Enzymkinetik

Peter Keusch Uni Regensburg

http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/index.html

Kinetische Experimente:

- **Enzymatische Spaltung von Harnstoff mit Urease**
- **Enzymatische Spaltung von Wasserstoffperoxid mit Katalase**

Die enzymatische Spaltung eines Substrats kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\mathbf{E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P} \qquad \textbf{(1)}$$

Das Enzym **E** reagiert mit dem Substrat **S** unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes **ES**, der nicht nur in freies Enzym und unverändertes Substrat dissoziieren kann, sondern auch in Enzym und Produkt **P**.

Im stationären Gleichgewicht (steady state) sind die Geschwindigkeiten von Bildung und Spaltung von **ES** gleich:

$$k_{+1} \cdot c_E \cdot c_S = (k_{-1} + k_{+2}) \cdot c_{ES} \qquad \textbf{(2)}$$

$$\frac{c_E \cdot c_S}{c_{ES}} = \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+1}} = K_m \qquad \textbf{(3)}$$

K_m wird als **Michaeliskonstante** bezeichnet. Um diese Konstante aus einfach messbaren Parametern bestimmen zu können, legt man folgende Überlegungen zugrunde:

Die Reakionsgeschwindigkeit **v** (Bildung des Produkts) ist unmittelbar der Konzentration von **ES** proportional:

$$v = k_{+2} \cdot c_{ES} \qquad \textbf{(4)}$$

Die Summe der Konzentrationen von **E** und **ES** ist von der Konzentration des Substrats unabhängig und konstant. Diese Summe wird als c_{ET} (totale Enzymkonzentration) bezeichnet. Wird in die Gleichung **(3)** für c_E jetzt c_{ET} - c_{ES} eingesetzt, so resultiert:

$$c_{ES} = \frac{c_{ET} \cdot c_S}{K_m + c_S} \qquad \textbf{(5)}$$

Eine Kombination der Gleichungen **(4)** und **(5)** ergibt:

$$v = k_{+2} \cdot c_{ET} \cdot \frac{c_S}{K_m + c_S} \qquad \textbf{(6)}$$

Aus Gleichung **(6)** folgt, dass bei sehr kleinen Substratkonzentrationen ($c_S << K_m$) die Reaktionsgeschwindigkeit linear mit c_S ansteigt. Bei sehr großen Substratkonzentrationen ($c_S > K_m$) ist die Reaktionsgeschwindigkeit konstant und von c_S unabhängig (Sättigung des Enzyms mit Substrat). Demzufolge gilt:

$$v_{max} = k_{+2} \cdot c_{ET} \qquad \textbf{(7)}$$

Setzt man Gleichung **(7)** in Gleichung **(6)** ein, so erhält man die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = v_{max} \cdot \frac{c_S}{K_m + c_S} \qquad \textbf{(8)}$$

In der Praxis hält man die Enzymkonzentration konstant, misst die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen und zeichnet das Diagramm **v** als Funktion von **[S]**.

Bei der halbmaximalen Reakionsgeschwindigkeit muß die Hälfte des Enzyms als reaktionsfähiger Enzym-Substrat-Komplex vorliegen ($c_E = c_{ES}$). Aus Gleichung **(3)** ergibt sich:

$$K_m = [S] \quad \text{bei} \quad v = 0.5\,V \qquad \textbf{(9)}$$

Die Bedeutung der Größe K_m geht aus Gleichung **(8)** hervor. Bei $K_m = c_S$ ist:

$$v = \frac{v_{max}}{2} \qquad \textbf{(10)}$$

K_M entspricht also der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht.

Die Aufnahme einer Sättigungskurve und die hinreichend genaue Ermittlung des Maximalwertes erfordern viele Messpunkte. Wenn außerdem bei größeren Substratkonzentrationen eine Enzymhemmung auftritt, entspricht die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nicht dem Zustand der Sättigung des Enzyms. Beide Nachteile werden vermieden, wenn man die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die reziproken Werte der Substratkonzentrationen aufträgt (Auftragung nach Lineweaver-Burk).

Durch entsprechende Umformung der Gleichung **(8)** erhält man:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{c_S} + \frac{1}{v_{max}} \qquad \mathbf{(11)}$$

Die Auftragung von **$1 / v$** gegen **$1 / c_S$** ergibt eine Gerade mit der steigung **K_m / v_{max}** und dem Ordinatenabschnit **$1 / v_{max}$**.

Man entnimmt der Gleichung **(11),** dass für $\frac{1}{v} = 0$ (Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse)

$\frac{1}{K_M} = -\frac{1}{c_S}$ gilt und für $\frac{1}{c_S} = 0$ (Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate) $\frac{1}{v_{max}} = \frac{1}{v}$ ist.

Für die Bestimmung einer Geraden genügen wenige Messpunkte.

Das Gleichungssystem gilt exakt nur für Ein-Substrat-Reaktionen. Hydrolysen in verdünnten, wässerigen Lösungen können wegen der praktisch konstanten Wasserkonzentration als solche behandelt werden.