

Biologie-Grundpraktikum für Bioinformatiker

Versuch Enzymkinetik

am Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, Prof. Giffhorn
Verantwortlich: Dr. Kaufmann

DIE KINETIK DER ENZYMREAKTIONEN

Enzymreaktionen folgen den Gesetzen der Reaktionskinetik, wenn man das Enzym als stöchiometrische Größe mit in den Reaktionsablauf aufnimmt. Um der Katalysatorfunktion gerecht zu werden, muß man einen Kreisprozeß formulieren:



Das Enzym bildet mit dem Substrat einen kurzlebigen Komplex, der bald wieder in freies Enzym und Produkt zerfällt. Spektroskopische Untersuchungen ließen *Emil Fischer* sein **Schlüssel-Schloß-Prinzip** formulieren, das heute durch das «**Induced-fit**»-Modell (*Koshland*) erweitert worden ist, da das aktive Zentrum nicht starr ist, sondern sich flexibel dem Substrat anpassen kann

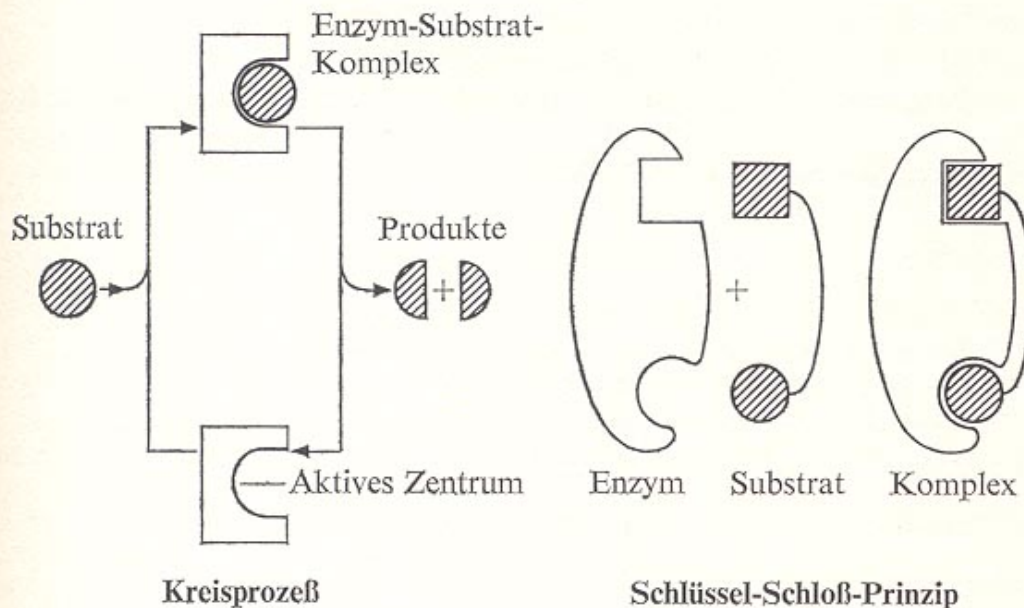


Abb. 30. Kreisprozeß der Enzymreaktion

Michaelis und *Menten* formulierten 1913 die Reaktionsgleichung:



Der Übergang zwischen dem Enzym-Substrat- und dem Enzym-Produkt-Komplex kann vernachlässigt werden. Aufbau und Abbaugeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes sind im Fließgleichgewicht gleich, wobei zunächst vorausgesetzt wird, daß folgende Beziehung gilt: $k_2 \ll k_1$.

$$k_{+1} \cdot [E] \cdot [S] + k_{-2} \cdot [E] \cdot [P] = k_{-1} \cdot [ES] + k_{+2} \cdot [ES] \quad (3)$$

[E] = Konzentration an freiem Enzym

[E₀] = Konzentration des gesamten Enzyms

[ES] = Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes

[E₀] - [ES] = E = freies Enzym

[S] = Konzentration des Substrats

[P] = Konzentration des Produkts

$k_{+1}, k_{-1}, k_{+2}, k_{-2}$ = Geschwindigkeitskonstanten

Durch Umformung erhält man den Ausdruck:

$$[E] \cdot (k_{+1} \cdot [S] + k_{-2} \cdot [P]) = [ES] \cdot (k_{-1} + k_{+2}). \quad (4)$$

Da zu Beginn der Reaktion die Konzentration des Produkts verschwindend klein ist, kann sie vernachlässigt werden:

$$[E] \cdot (k_{+1} \cdot [S]) = [ES] \cdot (k_{-1} + k_{+2}) \quad (5)$$

oder durch Umformung:

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}. \quad (6)$$

Durch Einsetzen erhält man

$$\frac{([E_0] - [ES]) \cdot [S]}{ES} = K_M, \quad (7)$$

wobei die **Michaelis-Konstante** K_M dem Quotienten aus $(k_{-1} + k_{+2})$ durch k_{+1} gleichzusetzen ist.

Zu Beginn der Reaktion (s. o.) entspricht K_M praktisch dem Quotienten aus k_{-1} durch k_{+1} , der Dissoziationskonstanten des Komplexes. Nach [ES] aufgelöst, ergibt sich die Gleichung:

$$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]}. \quad (8)$$

Die Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes ist

$$v = k_{+2} \cdot [ES] = k_{+2} \cdot \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]}. \quad (9)$$

Die Gesamtreaktion läuft mit maximaler Geschwindigkeit ab, wenn das Gesamtzym in den Enzym-Substrat-Komplex eingegangen ist, d.h. wenn $[E_0] = [ES]$ gilt:

$$V_{\max} = k_{+2} \cdot [E_0] = k_{+2} \cdot [ES] . \quad (10)$$

Setzt man in die Gleichung (9) anstelle von $k_{+2} \cdot [E_0]$ die Größe V_{\max} ein, so erhält man die **Michaelis-Menten-Gleichung**:

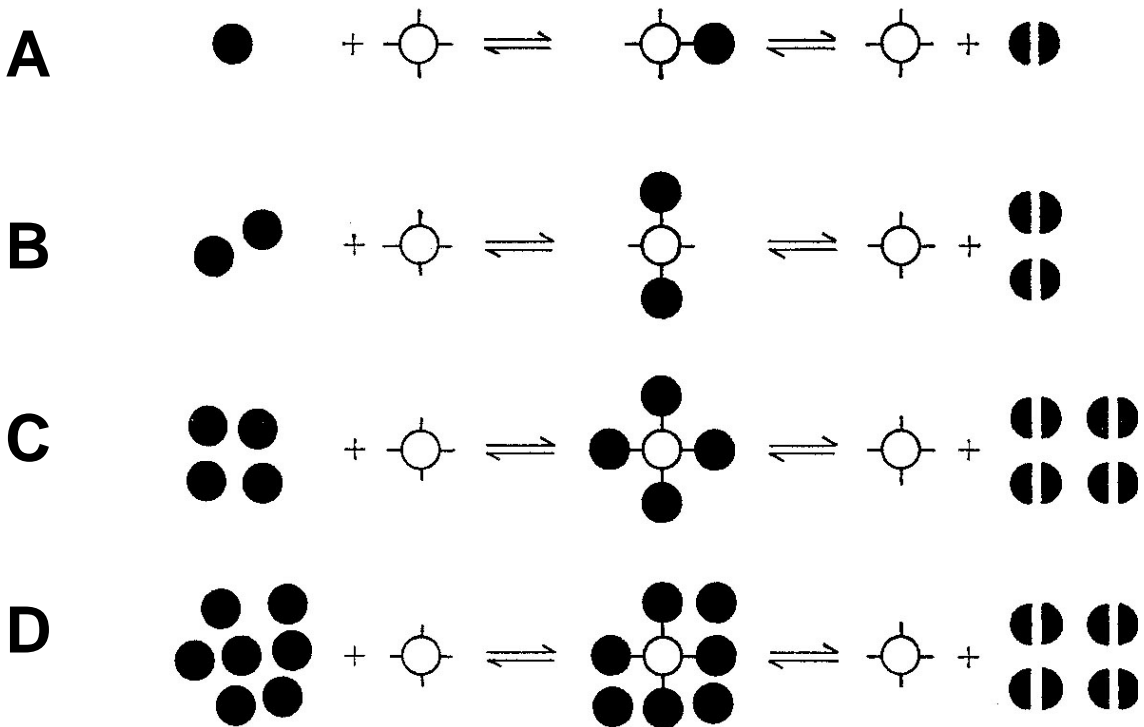
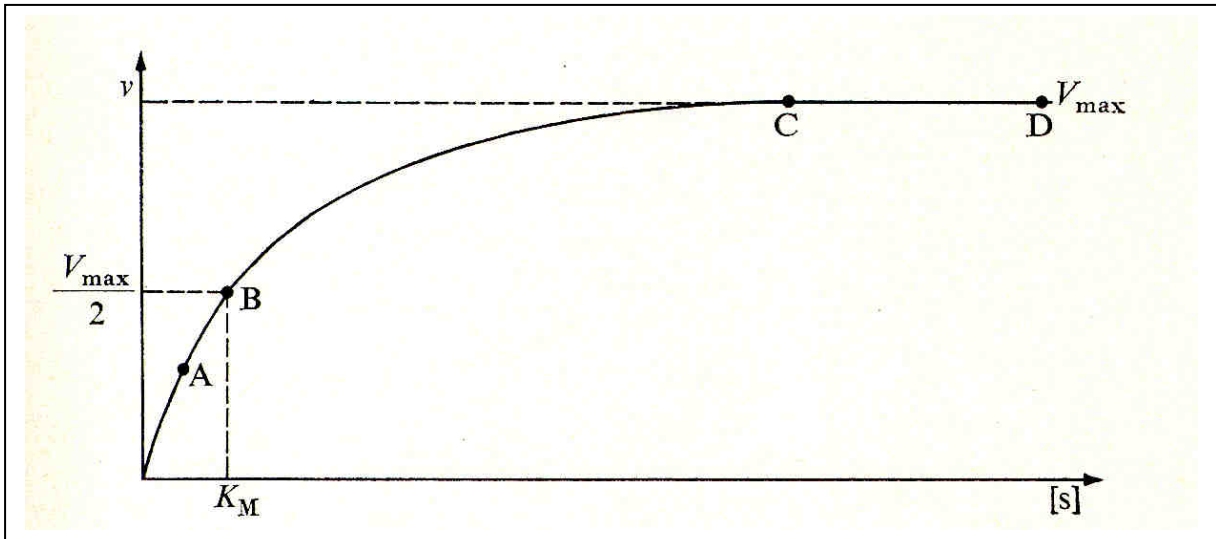
$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} . \quad (11)$$

Dies bedeutet in Worten, daß die Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion bei optimaler Enzymkonzentration von der Substratkonzentration abhängig ist (s. Steuerung durch die Substratkonzentration, Kapitel 8.1).

Die Michaelis-Menten-Gleichung entspricht in graphischer Darstellung einer *Hyperbel*.

Aus den Zusammenhängen der Gleichung (11) und aus der schematischen Darstellung der Funktion ergibt sich, daß die Michaelis-Konstante K_M gerade der Substratkonzentration entspricht, bei der die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Der K_M -Wert ($\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ist eine weitere charakteristische Größe für ein Enzym (s. Kapitel 7.1). Ein kleiner K_M -Wert bedeutet, daß ein Enzym bereits in Gegenwart geringer Substratkonzentrationen mit maximaler Geschwindigkeit arbeitet. In einem solchen Fall reagiert das Enzymsystem unter physiologischen Bedingungen stets so schnell wie möglich. Bei einem Enzym mit hohem K_M -Wert ist die Reaktionsgeschwindigkeit über weite Bereiche der Substratkonzentration variierbar.

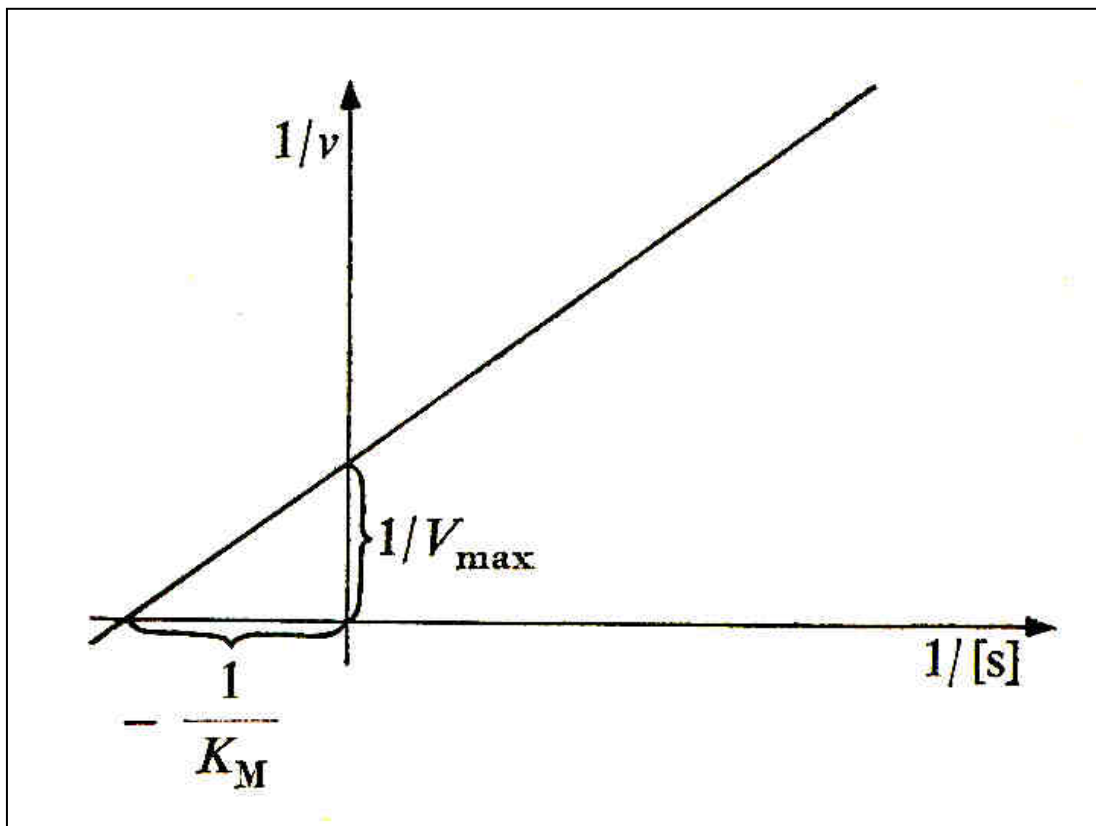
Michaelis-Menten Diagramm



Bei den Substratkonzentrationen A und B liegen noch freie aktive Zentren im Enzymkomplex (oder unbesetzte Enzyme) vor. Bei C ist die Sättigung - und damit v_{\max} - erreicht, so dass eine weitere Steigerung der Substratkonzentration (D) nicht mehr zu einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit führt.

Da V_{\max} und K_M an einer Hyperbel nur schwer ablesbar sind, haben *Lineweaver* und *Burk* eine andere Methode zur Bestimmung vorgeschlagen. Die *reziproken Werte von v und $[S]$* , gegeneinander aufgetragen, ergeben in graphischer Darstellung eine *Gerade*, deren Schnittpunkte mit den Achsen den gesuchten Werten entsprechen.

Lineweaver-Burk-Diagramm



Die Richtigkeit des **Lineweaver-Burk-Diagramms** lässt sich durch Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung beweisen:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (12)$$

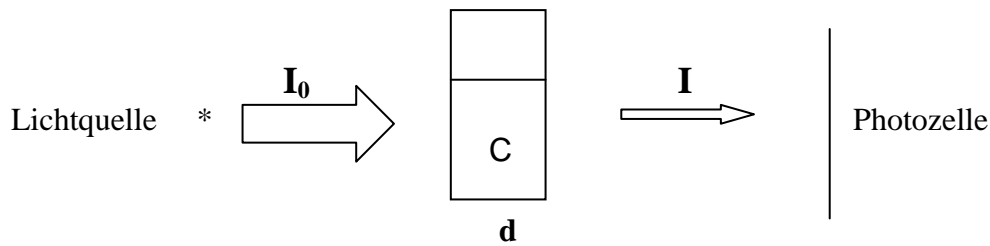
Wird nun eingesetzt:

a) $1/v = 0$ $-\frac{1}{K_M} = \frac{1}{[S]}$ oder $K_M = -[S]$,

b) $1/[S] = 0$ $1/v = 1/V_{\max}$ oder $v = V_{\max}$,

so kann man die Schnittpunkte mathematisch ableiten.

Grundlagen zur Messung von Enzymaktivitäten



Lambertsches Gesetz: Ein monochromatischer Lichtstrahl der Intensität I_0 wird beim Durchtritt durch ein absorbierendes Medium der Dicke d exponentiell in seiner Intensität geschwächt (Messung gegen eine Vergleichsküvette).

$$I = I_0 e^{-kd} ; \quad \ln \frac{I}{I_0} = -kd ; \quad -\ln \frac{I}{I_0} = kd ; \quad 2,303 \log \frac{I_0}{I} = kd$$

Beersches Gesetz: Die Intensität eines monochromatischen Lichtstrahls wird exponentiell mit der Konzentration c des absorbierenden Mediums geschwächt.

$$I = I_0 e^{-k' dc}$$

Gewöhnlich werden beide Gesetzmässigkeiten als **Lambert-Beersches Gesetz** zusammengefasst.

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon c d \quad \boxed{E = \epsilon c d} \quad \epsilon = \frac{k^*}{2,303}$$

Der Ausdruck $\log I_0 / I$ wird Optische Dichte (**OD**), Absorbance (**A**) oder Extinktion (**E**) genannt.

E steht mit der Durchlässigkeit "Transmittance" $T = (I / I_0)$ eines durchstrahlten Mediums in folgendem Zusammenhang:

$$E = \log 1/ T \text{ bzw. } E = - \log T.$$

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_M einer Substanz ist numerisch gleich der E einer 1 M-Lösung (1 mol/L; 1 mmol/mL) bei 1 cm Lichtweg. Da E keine Dimension trägt gilt für den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ :

$$\epsilon = \frac{E}{c d} \quad [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]; [L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$$

und für den milimolaren Extinktionskoeffizienten:

$$\epsilon = \frac{E}{10^3 \text{ mmol/L cm}}$$

Zunächst kann man auf der Grundlage des LB-Gesetzes Konzentrationen absorbierender Lösungen bestimmen (Colorimetrie). Man misst **E** und kann bei bekanntem ϵ und **d** die Konzentration **c** einfach berechnen. Man kann auch ϵ einer Substanz bestimmen indem man **E** bei unterschiedlichen Konzentrationen misst und ϵ berechnet.

$$c = \frac{E}{\epsilon d}$$

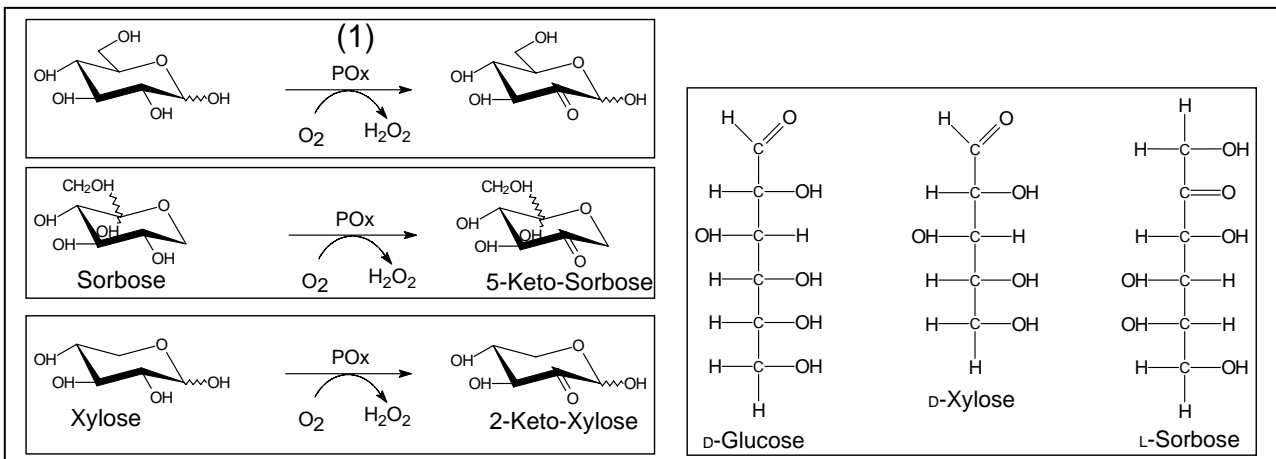
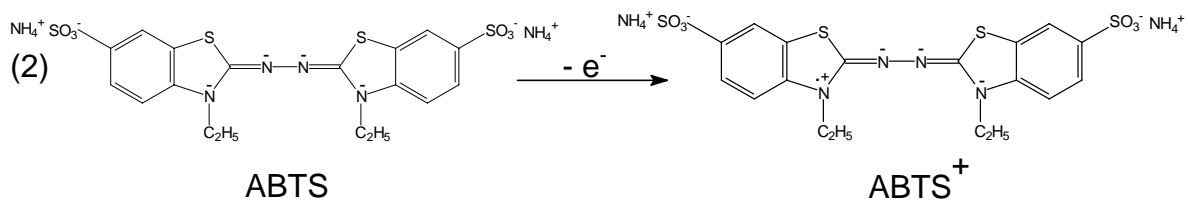
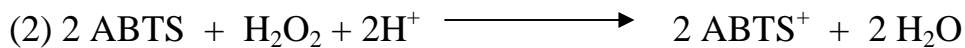
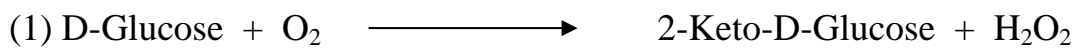
Bei der Messung von Enzymaktivitäten wird die Änderung von E in der Zeit ($\Delta E/\text{min}$) bestimmt und die entsprechende Konzentrations-änderung in der Zeit berechnet.

Durch Auswertung von $\Delta E/\text{min}$ auf dem Schreiberpapier kann bei bekanntem ϵ der an der Reaktion stöchiometrisch beteiligten Substanz die Enzymaktivität als **$\mu\text{mol Substratumsatz pro min}$** einfach bestimmen werden. Hierbei wird i. A. mit dem mM Extinktionskoeffizienten gerechnet, weil üblicher Weise im Konzentrationsbereich von $1\mu\text{mol/ml}$ (1 mmol/l) gemessen wird.

$$\Delta E/\text{min} = \epsilon c d$$

Beispiel Bestimmung der POx Aktivität mit ABTS.

Hierbei wird nicht die Absorptionsänderung des Substrates/Produktes direkt gemessen sondern mit einer Indikatorreaktion gekoppelt, die im sichtbaren Spektrum gemessen werden kann. Das Chromogen ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) wird mit Peroxidase und H₂O₂ in einen Farbstoff (ABTS⁺) umgesetzt, dessen Absorption bestimmt wird. Diese Umwandlung muss stöchiometrisch zur primären Reaktion erfolgen und die Hilfsenzymmenge darf nicht die Reaktion (der POx) begrenzen. In diesem Fall entsteht durch die Oxidation von einem mol D-Glucose 2 mol ABTS⁺, d.h. man muss diese 1:2 Stöchiometrie bei der Berechnung der Konzentrationsänderung berücksichtigen.



Michal et al. (1983) geben für ABTS den molaren Extinktionskoeffizienten wie folgt an:

$$\epsilon_{420} = 43,2 \times 10^2 \text{ [L mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}]$$

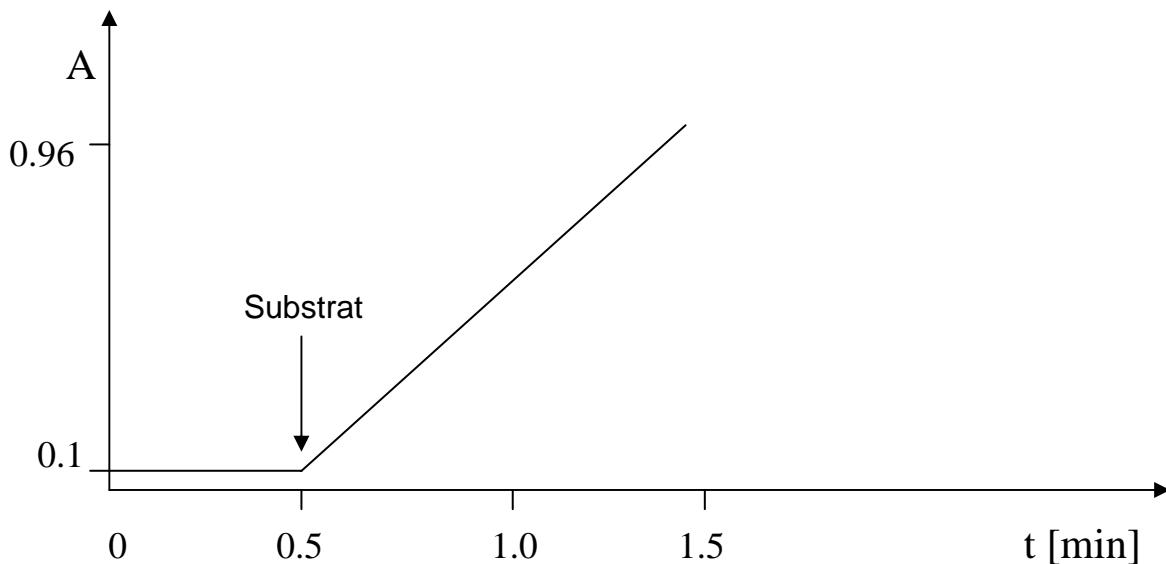
bezieht man auf den Lichtweg von 1 cm (statt 1 mm) ergibt sich :

$$\epsilon_{420} = 43,2 \times 10^3 \text{ [L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$$

D.h. das Vorliegen von 1 mol/L (1mmol/ml) ABTS⁺ ergibt eine Extinktion von $43,2 \times 10^3$.

Das Vorliegen einer Konzentration von 1 mmol/L (1 $\mu\text{mol/ml}$) ergibt daher ein ϵ von $43.2 [\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}]$ oder $[\text{ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}]!$

Gemessen wird die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta E/\text{min}$). Daraus wird die durch die Reaktion bewirkte Konzentrationsänderung und damit die Reaktionsgeschwindigkeit des gewählten Zuckersubstrates bei einem **Testansatzvolumen von 1 ml** berechnet.:



$$V = \frac{\Delta E/\text{min}}{\epsilon \times d} = \frac{0,86/\text{min}}{2 \times 43,2 \times 1} = 0,01 \mu\text{mol}/\text{min}$$

(der Faktor 2 kommt aus der Stöchiometrie 2 Moleküle ABTS pro oxidiertes Glukose. Siehe oben)

Diese Berechnung ist unabhängig vom eingesetzten Volumen ggf. Verdünnung der EnzymstammLösung (Myzelextrakt) und gibt die Enzymmenge in dem 1 ml Testansatz an.

Die Aktivität der Pyranose-Oxidase wird in einem Reaktionsgemisch aus Puffer mit ABTS, Peroxidase, Enzymlösung und Substrat bestimmt. Die Farbreaktion des Testansatzes wird bei 30°C und 420 nm im Photometer gemessen und die Extinktions-Zunahme mit einem Schreiber detektiert.

Die katalytische Aktivität des Enzyms wird durch die Einheit „Unit (U)“ angegeben. Eine Unit entspricht der Enzymmenge, die einen Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute katalysiert.

Die Spezifischen Aktivitäten der Pyranose-Oxidasen können nach Einbeziehen des Proteingehaltes aus der Volumenaktivität errechnet werden.

Die Volumenaktivität U/ml wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{U/ml} = \frac{\Delta E * V_{\text{Küvette}}}{\epsilon * V_{\text{Probe}} * d} = \frac{\Delta E * V_k}{\epsilon * t * V_p * d}$$

$\Delta E \text{ t}^{-1}$: Extinktionsänderung min^{-1}

ϵ : Extinktionskoeffizient

$V_{\text{Küvette}}$: Gesamtvolumen der Küvette: 1 ml

V_{Probe} : Probevolumen: 0,1 ml

d: Schichtdicke der Küvette: 1 cm

$$\epsilon_{\text{ABTS}} (420 \text{ nm}) = 43,2 \text{ ml} * \mu\text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

Pro Mol H_2O_2 werden 2 Mole ABTS oxidiert! $\Rightarrow \text{U/ml} = \Delta E / t * 1/8,64$

Die spezifische Aktivität berechnet sich aus der Volumenaktivität dividiert durch die Proteinkonzentration.

Literatur:

1. Lotspeich, F, Zorbas, H: Bioanalytic (1998), Kapitel 4, Spektrum Verlag Heidelberg
2. Stryer, L: Biochemie (1996), Kapitel 8, Spektrum Verlag Heidelberg
3. Voet, D, Voet, JG: Biochemistry (1994), Chapter 13, John Wiley & Sons, Somerset, USA
4. Gerhardt, P: Methods for General and Molecular Bacteriology (1994), Chapter 23, ASM, Washington, USA
5. Hassinger, H, Wiebusch, RD: Experimentelle Enzymologie (1977) Diesterweg Verlag Frankfurt/M

ABTS-Testansatz zur Bestimmung der Pyranose-Oxidase Aktivität:

- ABTS (2,56 mM) 780 μ l
- Peroxidase (1mg/ml) (Eis!) 20 μ l
- Enzymlösung (Eis!) 100 μ l
- in angegebener Reihenfolge in Küvette, mischen
Start mit:
- Substrat-Lösung (30°C) (Start der Reaktion) 100 μ l

Lösungen für Enzymbestimmung bei pH 7,0:

100 mM KH_2PO_4 (pH 7,0) zur Verdünnung

2,56 mM ABTS-Lösung in 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,0)

Peroxidase (1 mg/ml) in 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,0)

25 mM Glukose-Lösung (50 ml) in 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,0)

Lösungen für Enzymbestimmung bei pH 9,0:

100 mM TrisHCl-Puffer (pH 9,0) zur Verdünnung

2,56 mM ABTS-Lösung in 100 mM TrisHCl-Puffer (pH 9,0)

Peroxidase (1 mg/ml) in 100 mM TrisHCl-Puffer (pH 9,0)

25 mM Glukose-Lösung (50 ml) in 100 mM TrisHCl-Puffer (pH 9,0)

Substratkonzentrationen:

Glukose: 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039 mM/Küvettenansatz

Xylose oder Sorbose: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 mM/Küvettenansatz

Enzymkonzentrationen: ca. 25 und 50 mU/Küvettenansatz

Die Reaktion wird bei 7 Substratkonzentrationen und zwei Enzymkonzentrationen gemessen. Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt, so dass insgesamt 28 Messungen aufgenommen werden.

Die $\Delta E/\text{min}$ Werte werden auf Substratkonzentration/min umgerechnet und in einem Michaelis-Menten- und einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Für jede Enzymkonzentration werden eigene Diagramme angefertigt.

Die daraus bestimmten K_m und v_{max} -Werte werden verglichen.