

Enzymatische Katalyse

Kapitel 6

Prinzipien und Mechanismen der enzymatischen Katalyse

weitere:

Kapitel 7 (Enzymkinetik, Inhibitoren, Messung der Aktivität eines Enzyms)



Enzymatische Katalyse

Eine chemische Reaktion verläuft “freiwillig“, wenn sie zu einem Zustand niedrigerer freier Energie führt = wenn ΔG negativ

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (\text{Gibbs'sche Gleichung})$$

Reaktion zu Produkt, wenn ΔH negativ oder $T \cdot \Delta S$ positiv genug

ΔG^0 ... “freie Standardenthalpie“ einer Reaktion.

$\Delta G^{0'}$... “freie Standardenthalpie“ einer biochemischen Reaktion (pH 7 !)



Enzymatische Katalyse

Reaktion verläuft solange bis Gleichgewicht erreicht,
d.h. bis Hin- und Rückreaktion $S \rightleftharpoons P$ gleich schnell.

Lage des Gleichgewichts abhängig von $\Delta G^{0'}$ zwischen S und P.

$$\Delta G^{0'} = -R T \ln K_{eq}$$

$$\Delta G' = \Delta G^{0'} + R T \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad \text{genauer } [A]^a \text{ etc.}$$

Beispiel Fumarat: $\Delta G^{0'} = -3100 \text{ J/mol} = -8.315 * 298 * \ln K_{eq}$

$$\ln K_{eq} = -3100 / -8,315 * 298 = 1.25$$

$$K_{eq} = 3.49$$

$$K_{eq} = \frac{[\text{Malat}]_{eq}}{[\text{Fumarat}]_{eq}} = \frac{3.49}{1}$$

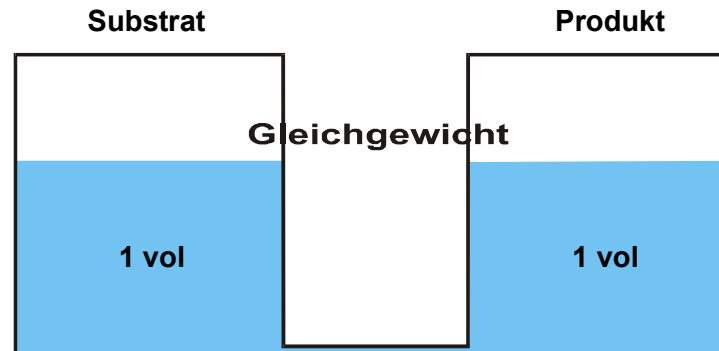
$$R = 8.315 \text{ J mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$$

$$T = 298 \text{ deg}$$



Enzymatische Katalyse

Bsp: $K_{eq} = 1$

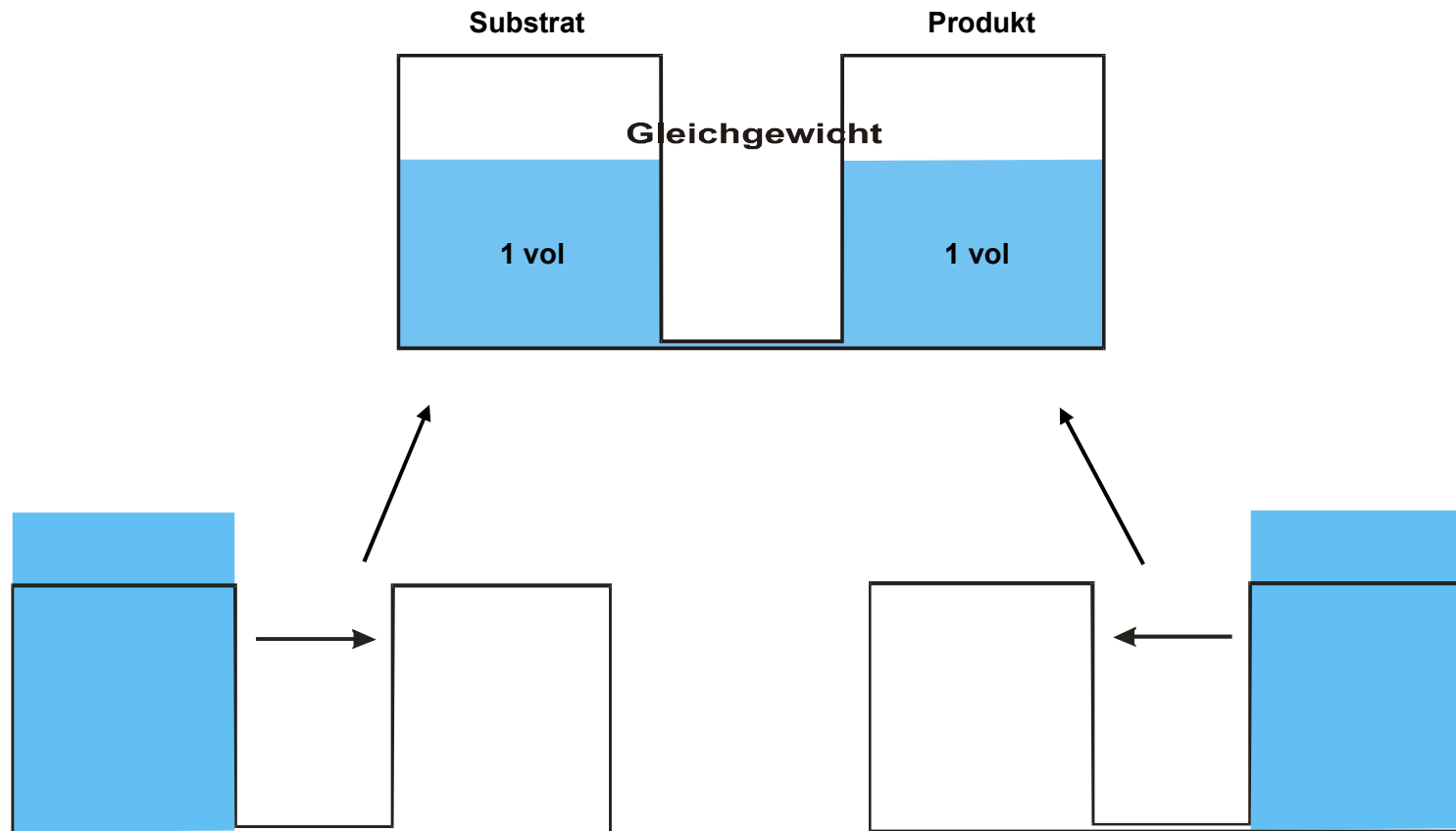


System im
Gleichgewicht
—
keine Nettoreaktion



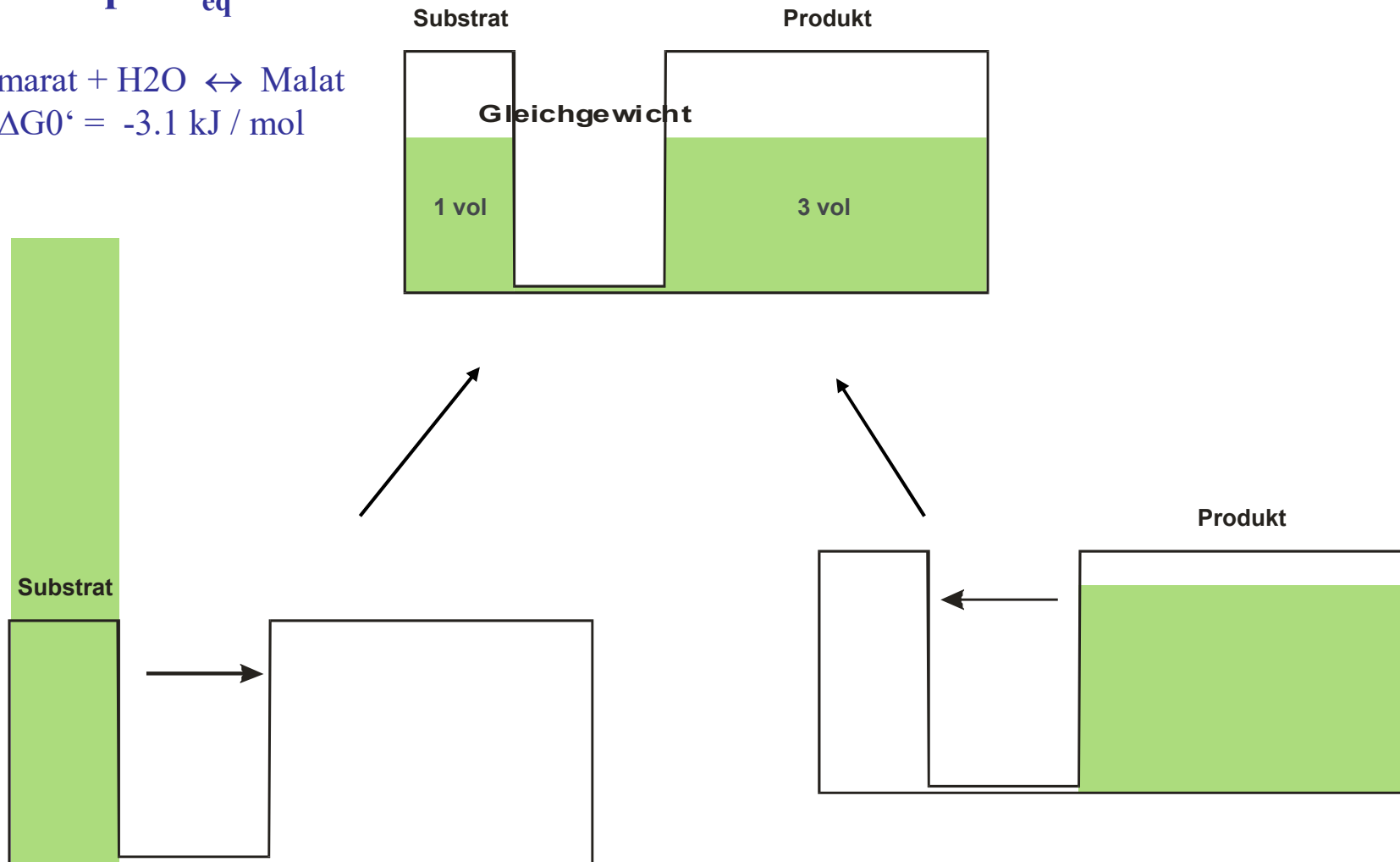
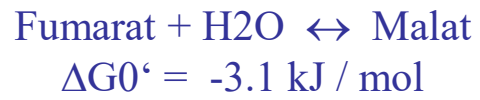
Enzymatische Katalyse

Bsp: $K_{eq} = 1$

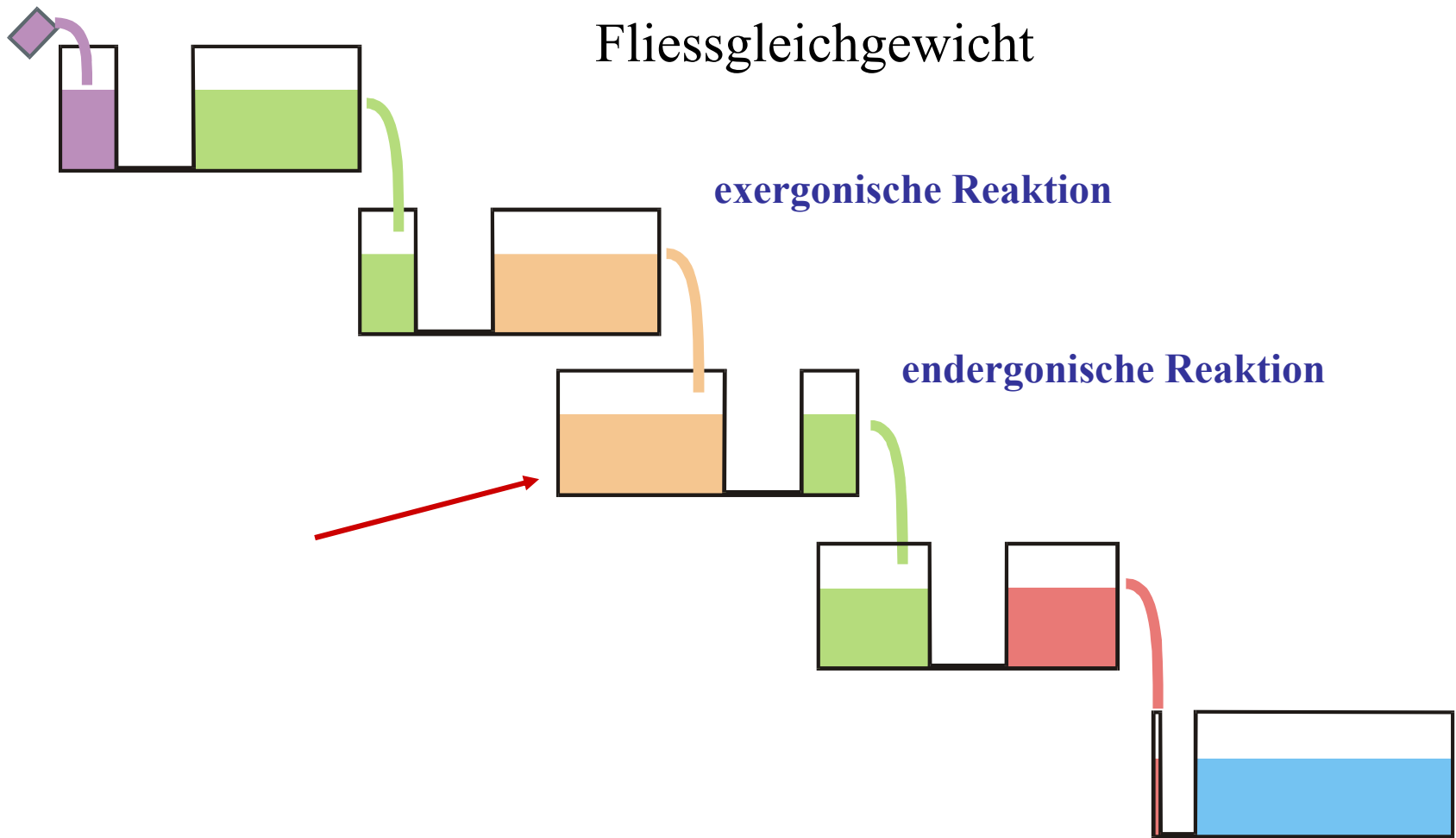


Enzymatische Katalyse

Bsp: $K_{eq} = 3$



Enzymatische Katalyse



Enzymatische Katalyse

Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen

	k_u	k_e (sec ⁻¹)
Hydrolyse von Phosphat-Estern / Phosphatase / alk. Phosphatase	10^{-15}	14
Glucose + ATP → Glc-1-P / Hexokinase	10^{-13}	$1.3 \cdot 10^{-3}$
Ethanol + NAD ⁺ → Acetaldehyd + NADH / Alkoholdehydr.	$6 \cdot 10^{-12}$	$3 \cdot 10^{-5}$
CO ₂ + H ₂ O → HCO ₃ ⁻ + H ⁺ / Carboanhydrase	10^{-2}	10^5

Enzyme erlauben den Ablauf chemischer Reaktionen unter physiologischen Bedingungen (T, pH, Milieu)



Enzymatische Katalyse

Enzyme haben keinen Einfluß auf Gleichgewicht einer Reaktion

**können aber endergonische mit exergonischen Reaktionen koppeln,
sodaß energetisch ungünstige Reaktionen ablaufen können.**

Besonders wichtig z.B. Beim Aufbau von Biomolekülen.

Kopplung mit Hydrolyse von ATP o. GTP

Enzyme wirken spezifisch

**Im Hinblick auf das Substrat,
auf die Art der katalysierten Reaktion,
auf die Stereochemie der katalysierten Reaktion.**

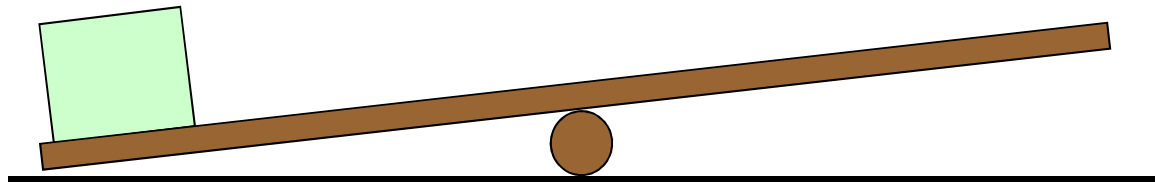
Geometrische Substratspezifität oft nicht absolut.

(ADH, Hexosaminidase)

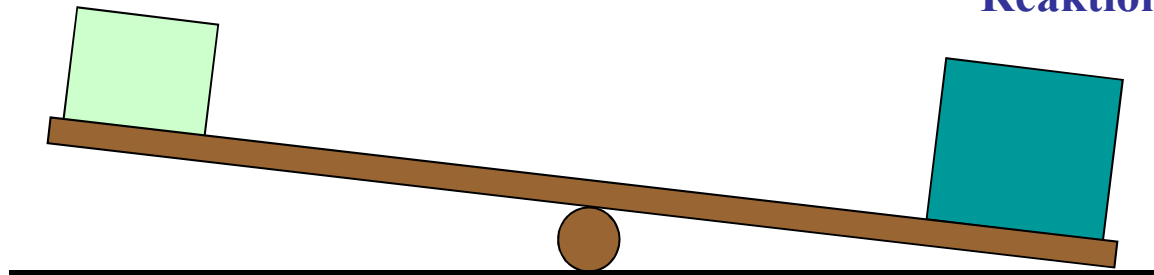


Enzymatische Katalyse

**Endergonische
Reaktion**



**Exergonische
Reaktion**

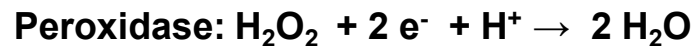
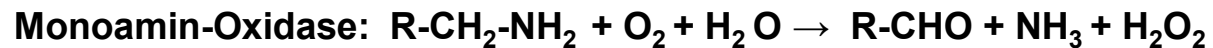


Enzymatische Katalyse

Enzymklassen

- 1 Oxidoreduktasen** katalysieren biologische Oxidationen und Reduktionen
 $A^- + B \rightarrow A + B^-$ = Übertragung von Elektronen
(Oxidasen, Reduktasen, Peroxidasen, Dehydrogenasen)

Bsp:



(Elektronen von e-Donator, vielfältig z.B. Cytochrom c; Glutathion)

- 2 Transferasen** Gruppenübertragungen
 $A + B-X \rightarrow A-X + B$ (Glykosyltransferasen, Aminotransferasen, Kinasen)

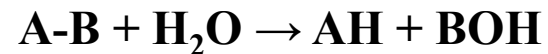
Kinasen übertragen Phosphat von ATP auf diverse Substrate (Glucose, Proteine ...)



Enzymatische Katalyse

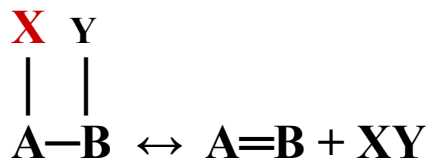
Enzymklassen

3 Hydrolasen

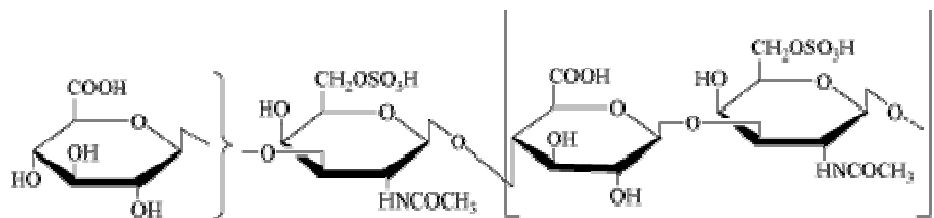


Spaltung von Bindungen unter Anlagerung von Wasser
(Esterasen, Lipasen, Glycosidasen, Peptidasen)

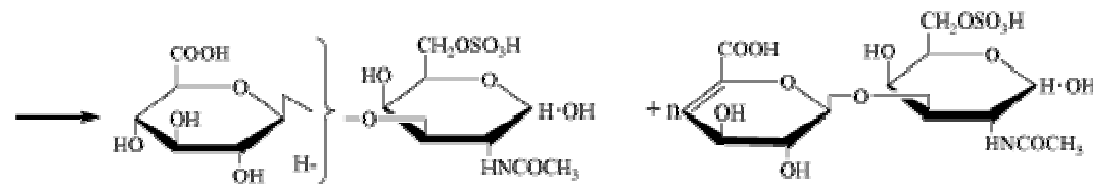
4 Lyasen



Hinzufügen von Gruppen zu Doppelbindungen *bzw.*
Eliminierung von Gruppen unter Bildung
einer Doppelbindung (H_2O , NH_3 , CO_2)



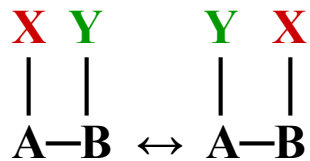
Chondroitin sulfate C



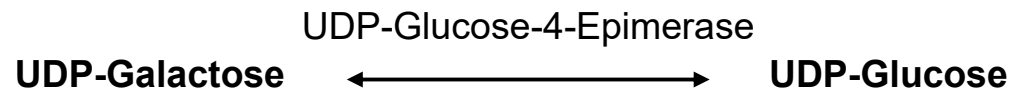
Enzymatische Katalyse

Fortsetzung Enzymklassen

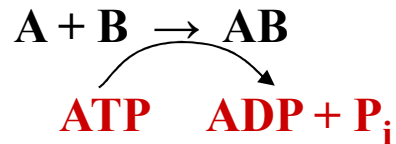
5 Isomerasen



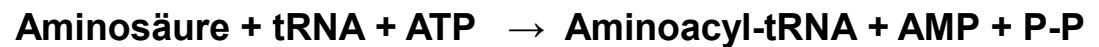
Intramolekulare Umlagerungen
(Isomerasen, Epimerasen, Mutasen)



6 Ligasen



Verbindung zwischen 2 Substraten unter gleichzeitiger Spaltung energiereicher Verbindungen (ATP)
(Bildung von C-C, C-S, C-O, und C-N Bindungen)



DNA-Ligasen



Enzymatische Katalyse

Enzymnamen: Trivialnamen (Pepsin, Emulsin, Lab-ferment, Invertase)

Systematischer Name (eigene Kunst)

E.C.-Nummer

Der Name eines Enzyms z.B. Hexosaminidase, Kathepsin etc. steht oft für mehrere Proteine eines Organismus, welche gleiche Reaktion katalysieren (“Isoenzyme“).

Verschiedene Arten haben gleichartige Enzyme mit leicht unterschiedlichen Peptidketten (homologe Enzyme)

Enzyme Commission Number 3.4.21.1 ... Chymotrypsin

= **E.C. Nummer**

3 ... Enzym-Hauptklasse

4 Unterklasse (Peptidase)

21 .. Unterunterklasse (Serinproteasen)

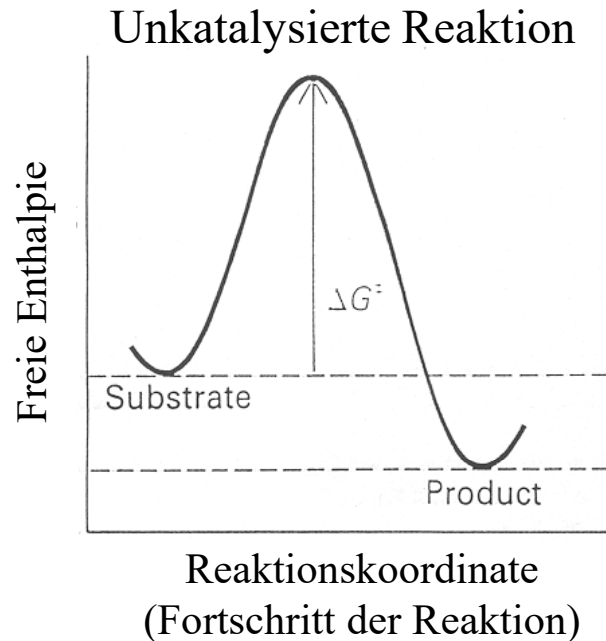
1 ... Willkürlich Seriennummer

Gibt aber nicht Organismus an !



Enzymatische Katalyse

Enzyme senken die Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger

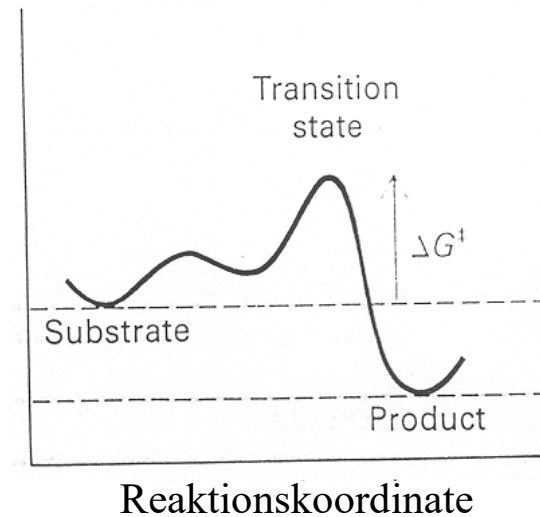


$$v = k \cdot [S] \quad \text{Einheiten ?}$$

Bei 2 Substraten: $V = k \cdot [S_1] \cdot [S_2]$

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{R \cdot T}}$$

Enzymatisch katalysierte Reaktion



Bei Senkung der Akt.en. um $5.71 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ wird
Reaktion um 10er-Potenz beschleunigt

Urease: ca. $80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

k ... Geschwindigkeitskonstante

k_B ... Boltzmannkonstante

h ... Plank'sches Wirkungsquantum



Enzymatische Katalyse

Modell der Enzymreaktion

Allgemeine Form:

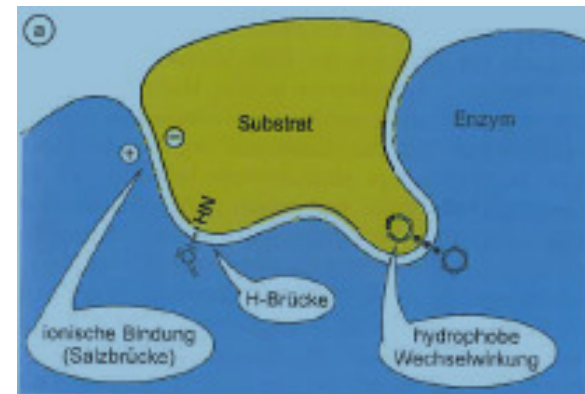


Zu Beginn der enzymatischen Reaktion (wenn kaum P vorhanden)



1. Schritt: Bildung eines Enzym-Substratkomplexes
2. Schritt: Umwandlung von Substrat in Produkt
3. Schritt: Dissoziation des Enzym-Produktkomplex

$E + S \leftrightarrow ES$ Exergonischer Vorgang
“Bindungsenergie“

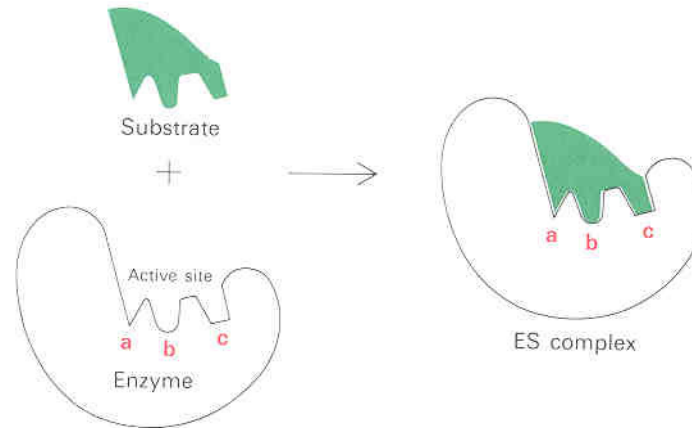


Enzymatische Katalyse

1. Schritt: Bildung eines Enzym-Substratkomplexes

Emil Fischer:

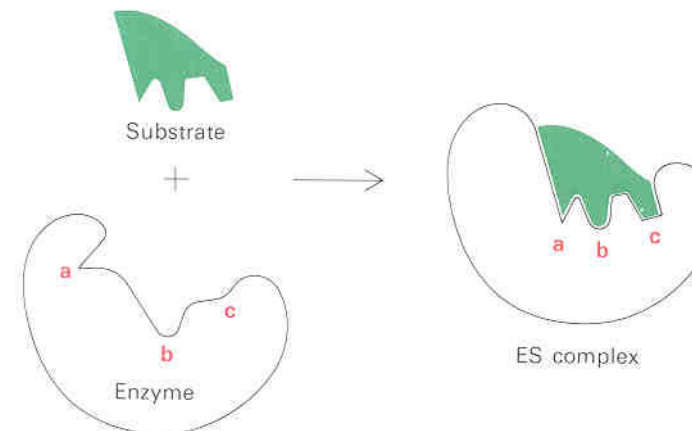
Schlüssel-Schloß Modell



Daniel Koshland:

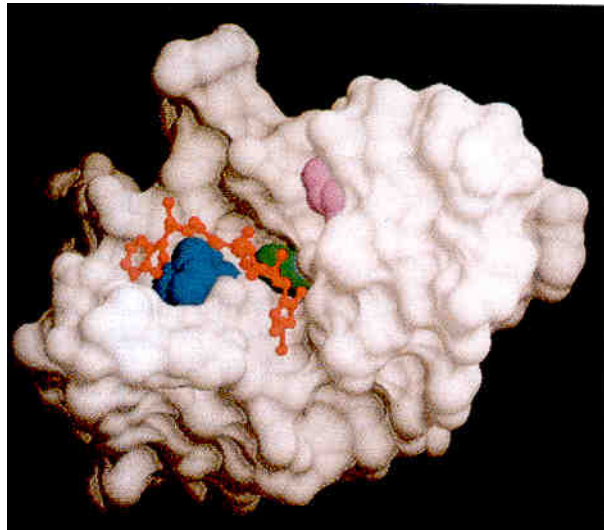
Induced Fit Modell

Konformationsänderung
des Enzyms gemeint;
es kommt aber auch zur
Konformationsänderung
des Substrates.



Enzymatische Katalyse

Substratbindungsstelle – *Active site*

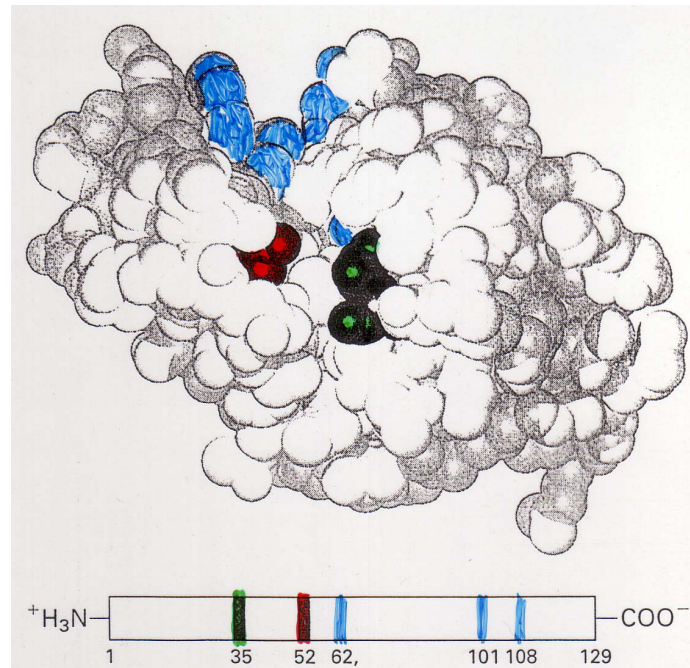
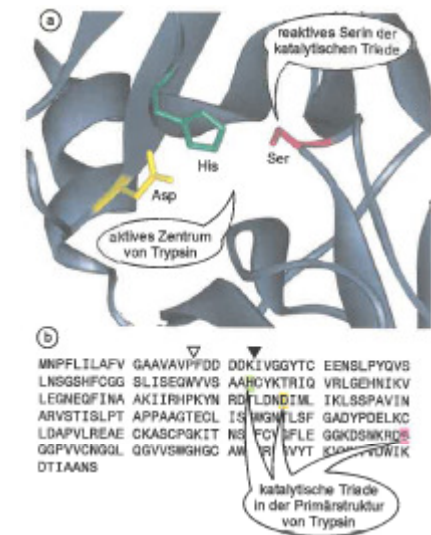


Ribonuclease
mit Substrat

Enzymatische Katalyse

Substratbindungsstelle – Active site

Active site meist hydrophobe Tasche auf Oberfläche
Nach Bindung von Substrat (fast) wasserfrei
Wichtige Aminosäuren oft von ganz verschiedenen
Teilen der Primärstruktur.



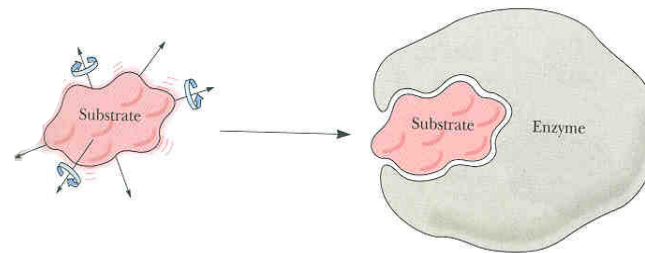
Lysozym

(spaltet die glykosidische Bindung von GlcNAc in Peptidoglykanen)

Enzymatische Katalyse

Mechanismen der enzymatischen Katalyse

- **Entropieverkleinerung (Translations- und Rotationsentropie)**
geht einher mit **Orientierungs- und Nachbarschaftseffe**



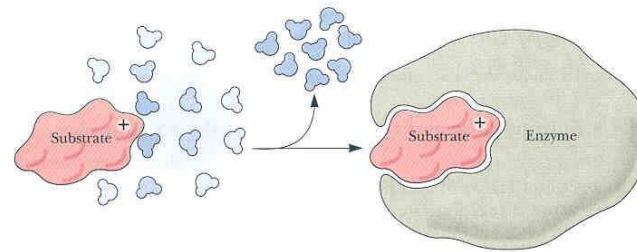
Senkung der Entropie durch
Verkleinerung der Möglichkeiten zur
Bewegung und Drehung

Für alle Zweisubstrat-Reaktionen von Bedeutung

Enzymatische Katalyse

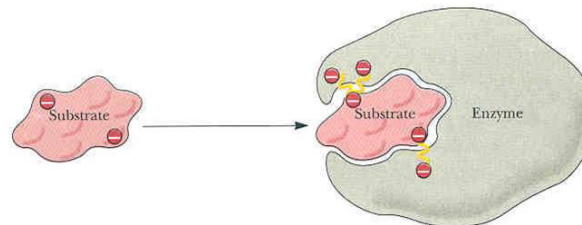
Mechanismen der enzymatischen Katalyse

- Desolvatisierung



Verlust des Hydratwassers bei Bildung des ES Komplexes erhöht Reaktionsfähigkeit

- Destabilisierung durch elektrostatische Abstossung



In hydrophober Bindungstasche kommen elektrostatische Kräfte zum Tragen. Entgegengesetzte Ladungen erhöhen Bindungsenergie. Gleiche Ladungen führen zur Verformung des Substrates

Enzymatische Katalyse

Mechanismen der enzymatischen Katalyse

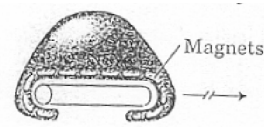
- Bevorzugte Bindung des Übergangszustandes

Ein Teil der Bindungsenergie wird verwendet um Substrat in den Übergangszustand zu bringen.

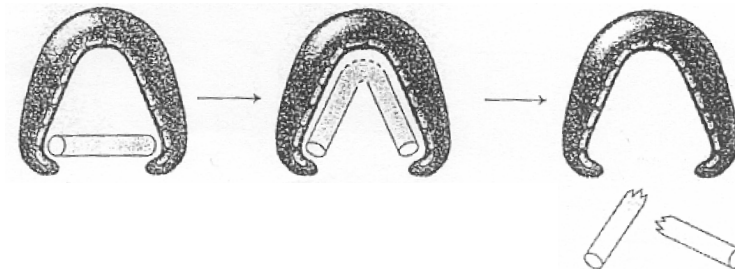
Reaktionsweg ohne
Enzym



“Enzym“ komplementär
zu Substrat



Reaktionsweg mit
Enzym, das
komplementär zu
Übergangszustand



Enzymatische Katalyse

Spezielle Mechanismen der enzymatischen Katalyse

Allgemeine Säure-Base Katalyse

allgemeine Säure = Substanz, die Proton abgeben kann

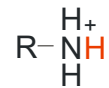
allgemeine Base = Substanz, die Proton aufnehmen kann

führt oft zu Verstärkung der Azidität oder Basizität von H_2O .

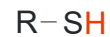
Glu , Asp



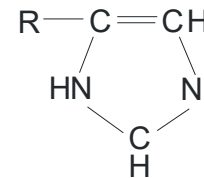
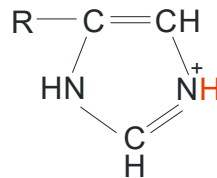
Lys, Arg



Cys



His



Tyr



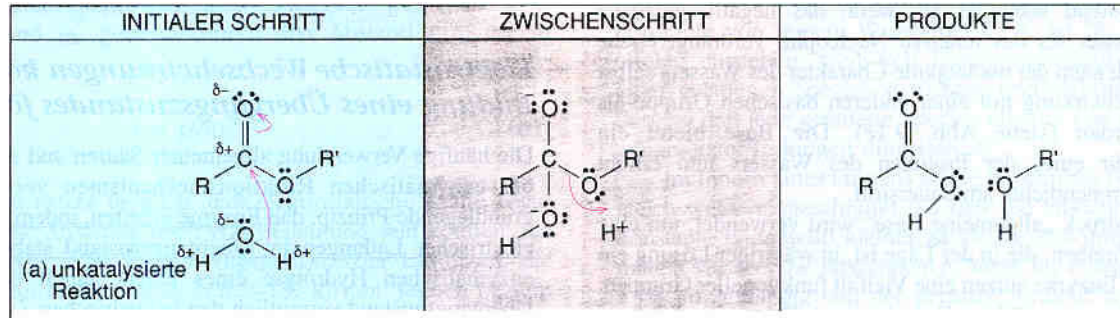
Protonendonor
(Allgemeine Säure)

Protonenakzeptor
(Allgemeine Base)

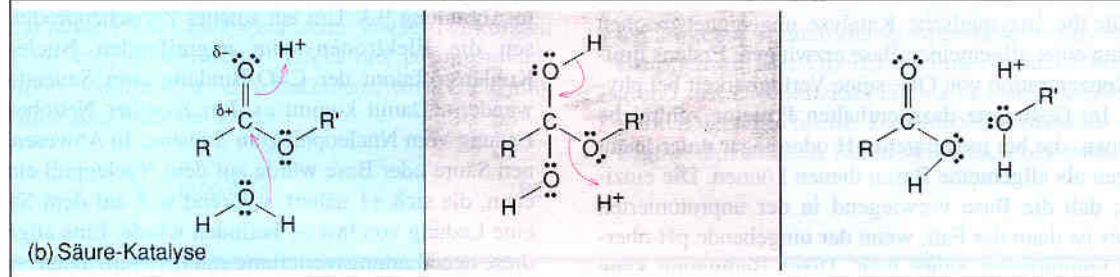


Ester-Hydrolyse

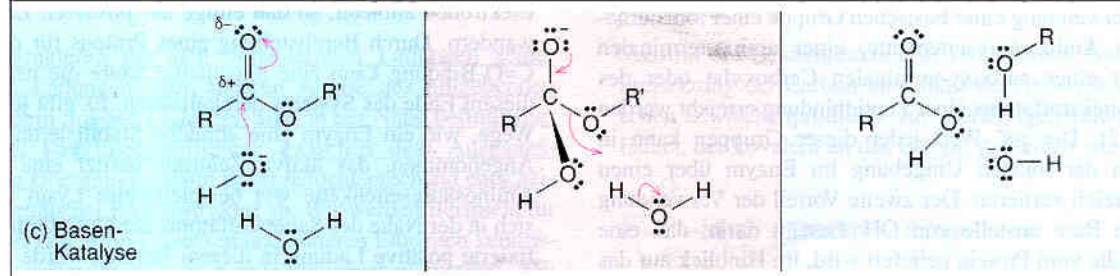
un-
katalysiert



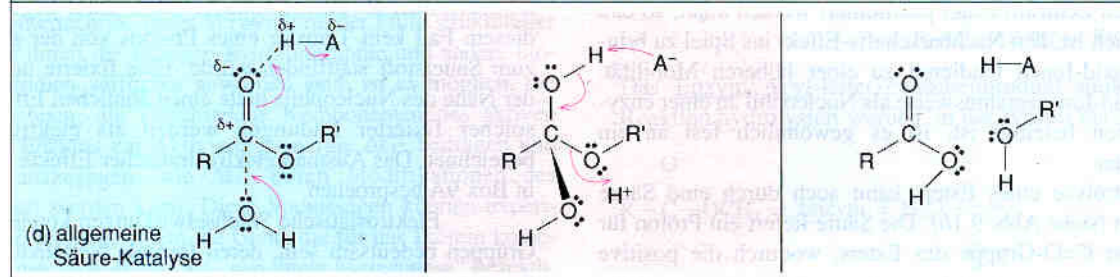
Säure-
Katalyse



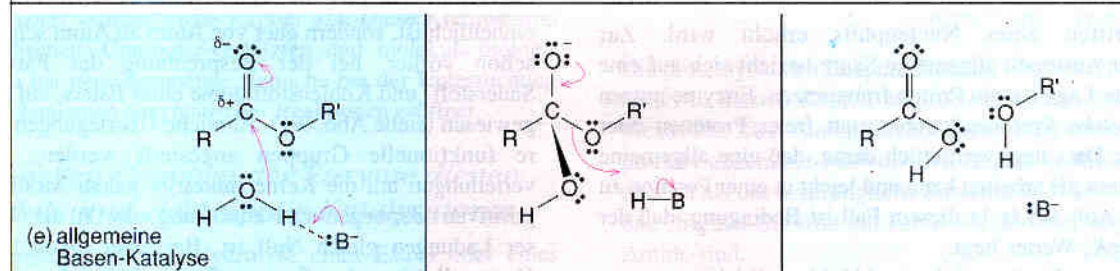
Basen-
Katalyse



allgemeine
Säure-
Katalyse



allgemeine
Basen-
Katalyse



Enzymatische Katalyse

Speziellere Mechanismen der enzymatischen Katalyse

Kovalente Katalyse

Ester (z.B. an Serin), Schiff-Basen
oft mithilfe von prosthetischen Gruppen

Metallionenkatalyse

Enzyme mit lose gebundenen Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}),
Beitrag zur Substratbindung, Ladungsabschirmung
elektrophile Gruppe

Metalloenzyme mit festgebundenen Übergangsmetallen
(Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} ...) für Redoxreaktionen



Enzymatische Katalyse

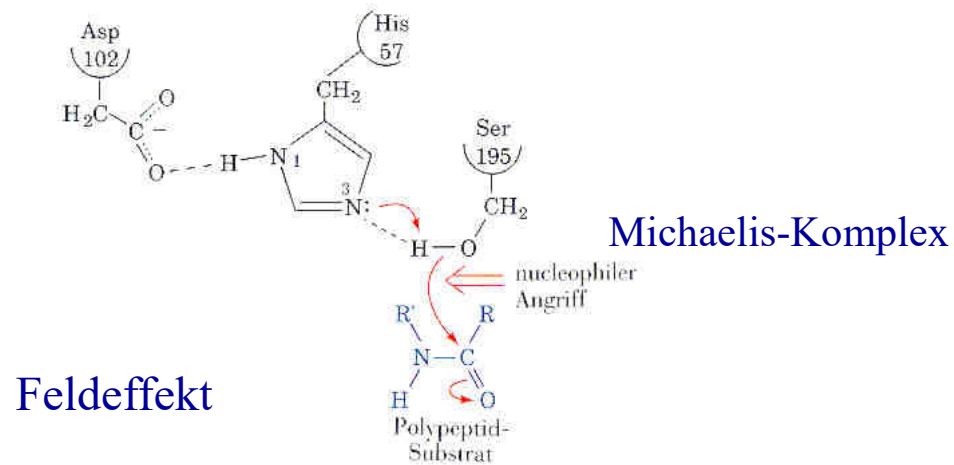
Mechanismen der enzymatischen Katalyse - Zusammenfassung

- **Entropieverkleinerung (Translations- und Rotationsentropie)**
geht einher mit Orientierungs- und Nachbarschaftseffekten
- **Destabilisierung durch elektrostatische Abstoßung**
- **Desolvatisierung**
- **Bevorzugte Bindung des Übergangszustandes**
- **Allgemeine Säure-Base Katalyse**
- **Kovalente Katalyse**
- **Metallionen-Katalyse**



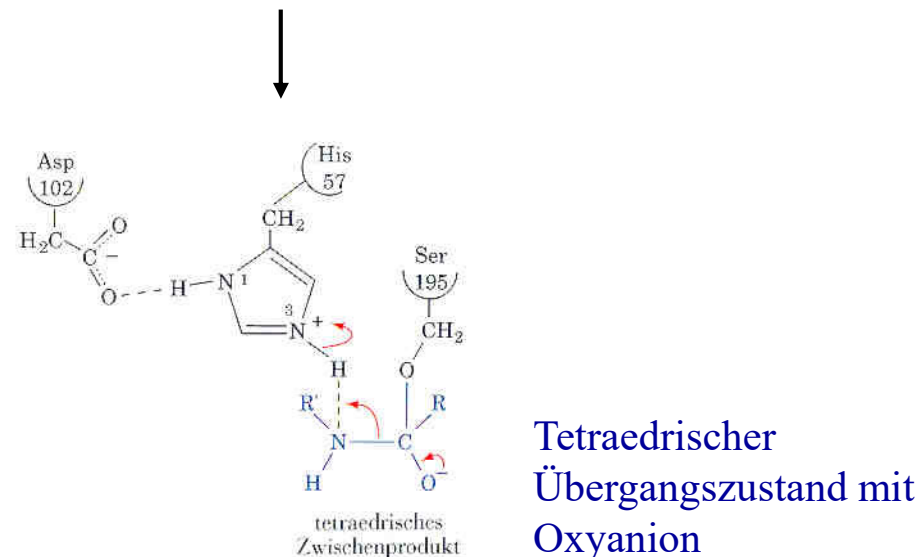
Enzymatische Katalyse

Mechanismus der Spaltung einer Peptidbindung durch Chymotrypsin



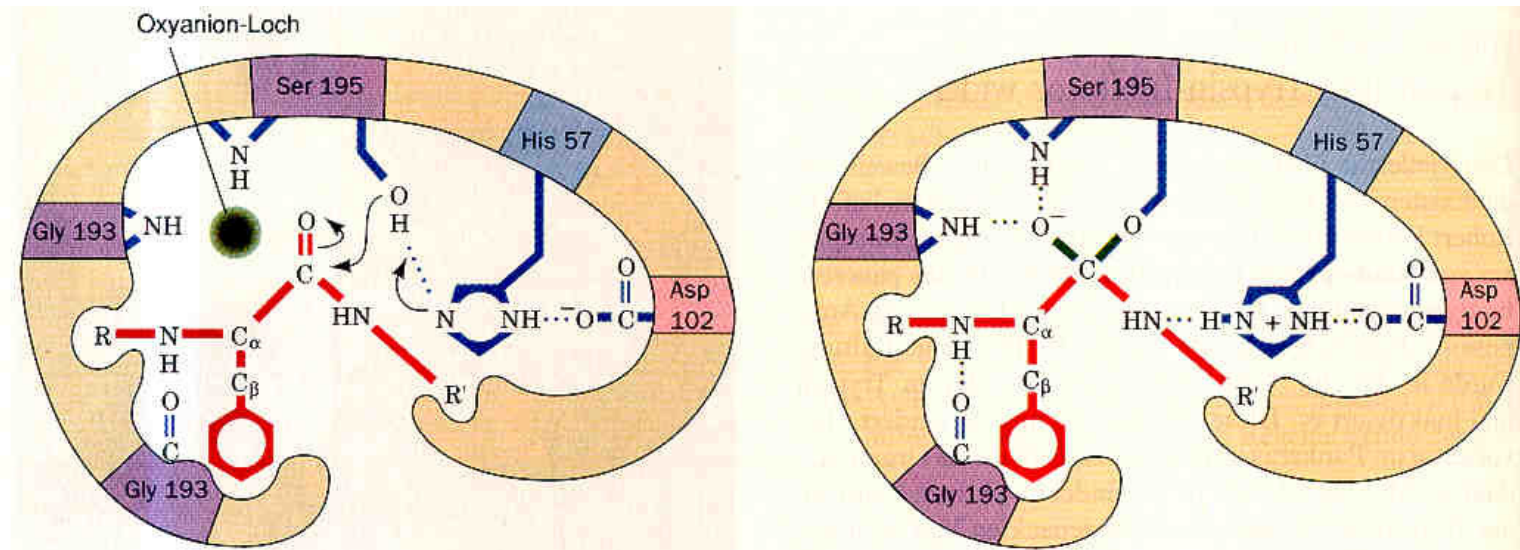
Bildung des tetraedrischen Übergangszustandes

Wenn Chymotrypsin ein Substrat gebunden und so den Michaelis-Komplex gebildet hat, greift Ser 195 die Carbonylgruppe des zu zerlegenden Peptides nucleophil an, wobei ein tetraedrisches Zwischenprodukt entsteht (**kovalente Katalyse**)



Enzymatische Katalyse

Stabilisierung des Übergangszustandes bei Serinproteasen:



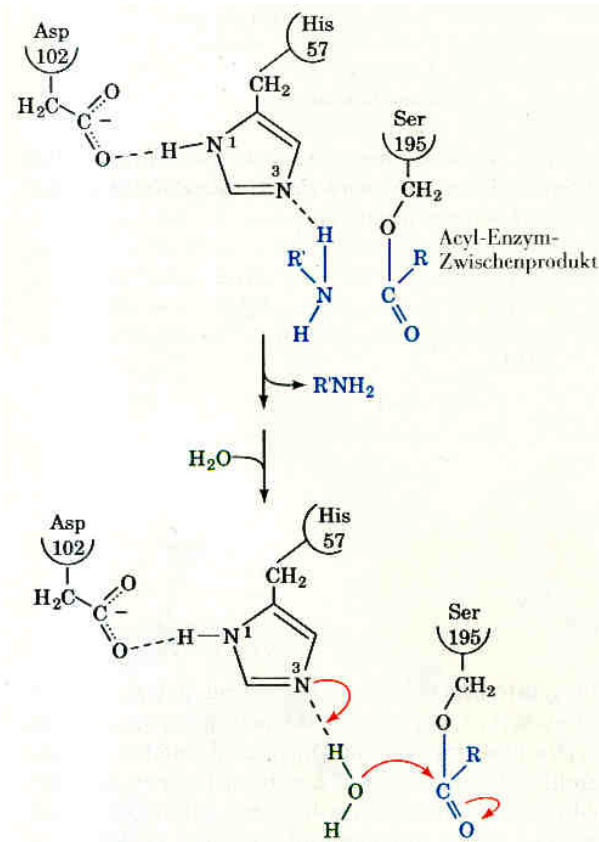
Im Michaelis-Komplex liegt der trigonale Carbonyl-Kohlenstoff des zu spaltenden Peptides nicht in der für die Bindung im Oxyanion-Loch notwendigen Konformation vor (*links*). Im tetraedrischen Zwischenprodukt ist der Carbonylsauerstoff des zu spaltenden Peptides (das Oxyanion) in das Oxyanion-Loch eingedrungen und bindet an die Gerüst-NH-Gruppen von Gly193 und Ser195. Die daraus resultierende Verzerrung der Konformation erlaubt es der NH-Gruppe jener Peptidbindung, die der zu spaltenden vorgelagert ist, eine Wasserstoffbrücke mit Gly193 zu bilden. In Summe binden Serinproteasen daher **bevorzugt das tetraedrische Zwischenprodukt = den Übergangszustand.**

Enzymatische Katalyse

Bildung des Acyl-Enzym-Zwischenprodukts

Das tetraedrische Zwischenprodukt zerfällt unter Deprotonierung von N(3) des His 57 in das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt (**allgemeine Säure-Katalyse**)

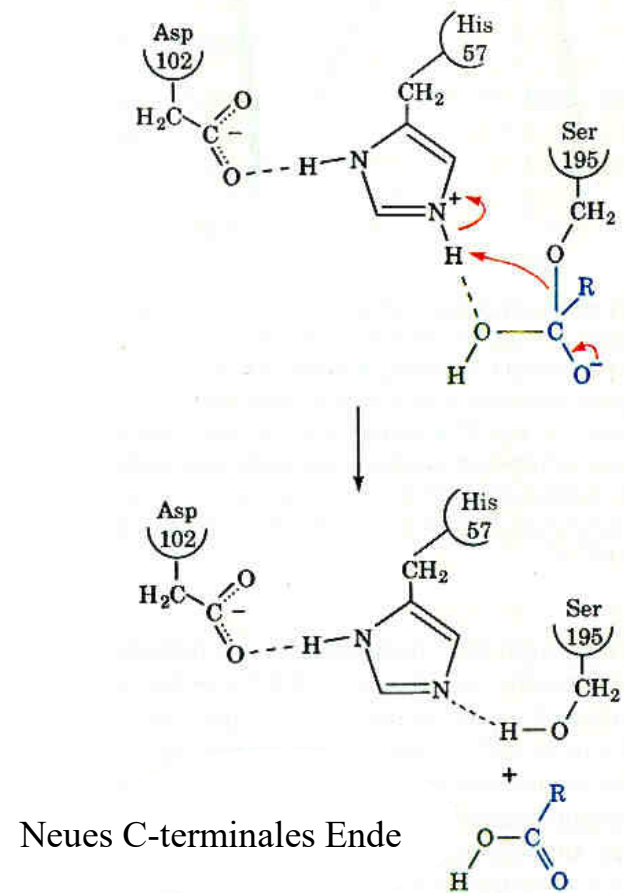
Die austretende Aminogruppe ($R'-NH_2$, der neue N-terminale Teil der geschnittenen Polypeptidkette) löst sich vom Enzym ab und wird durch Wasser aus dem Lösungsmittel ersetzt.



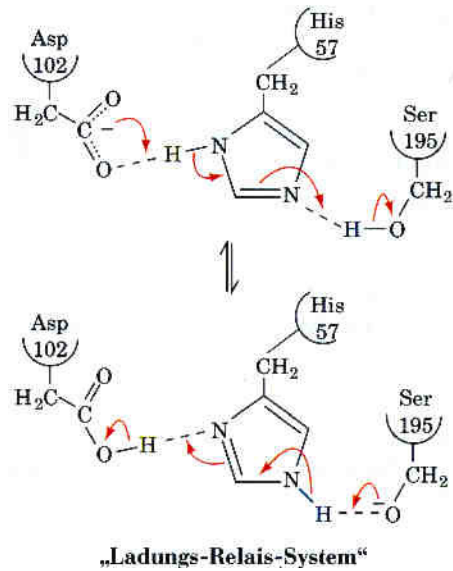
Enzymatische Katalyse

Decarboxylierungsschritt

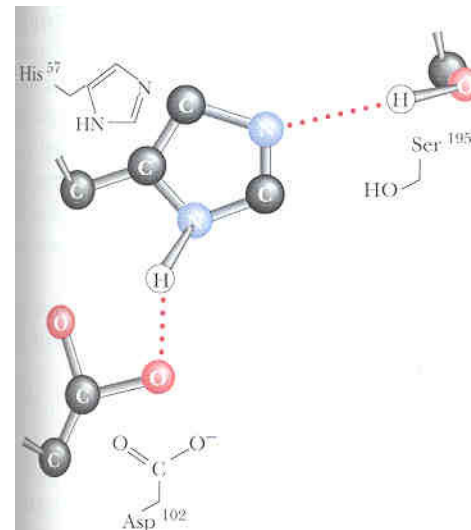
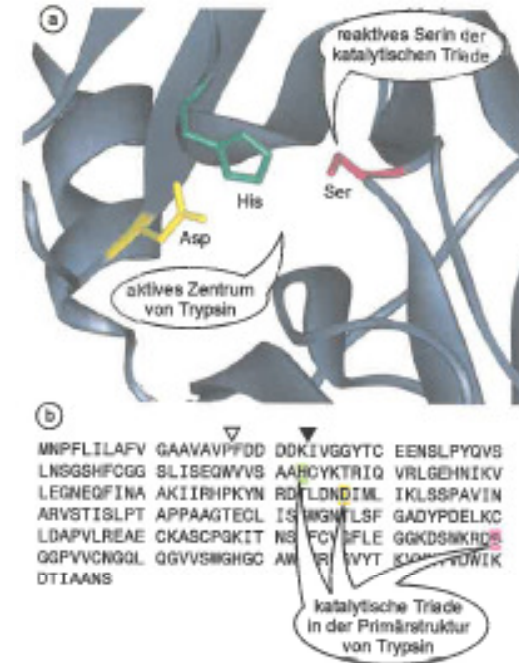
Die Decarboxylierung läuft im Wesentlichen als Umkehrung der vorigen Schritte ab, also unter Freisetzung des Carboxylat-Produktes (dem neuen C-terminalen Teil der geschnittenen Polypeptidkette) und Regenerierung des Enzyms.



Enzymatische Katalyse

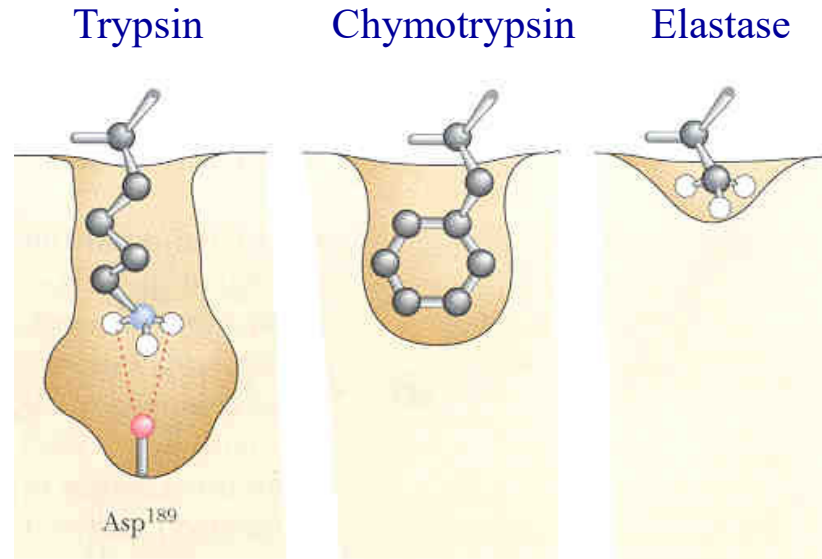


allgemeine Säure-Katalyse



Enzymatische Katalyse

Spezifität verschiedener Serinproteasen wird durch Substratbindungsstelle bestimmt.



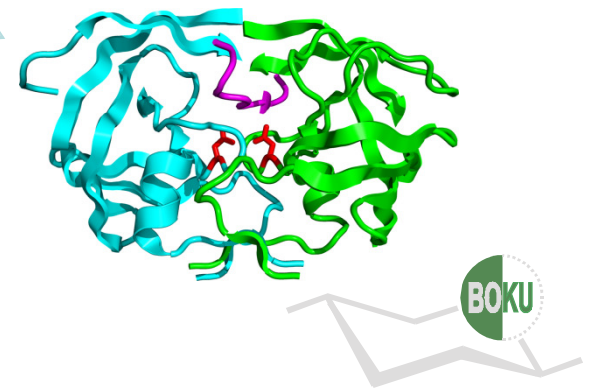
Subtilisin

Weiters:

Aspartatproteasen (saure Proteasen): Pepsin, HIV-Protease

Metalloproteinasen

Cysteinproteasen: Bromelain, Papain, Kathepsin



Enzymatische Katalyse

Aufklärung des Reaktionsweges

bzw.

Identifikation der Aminosäuren im aktiven Zentrum.

Kovalente Bindung von irreversiblen Inhibitoren

X-Ray von Enzym-Substrat-Komplex

NMR von Enzym und Substrat in Lösung

“Site-directed“ Mutagenese



Enzymatische Katalyse

Co-Faktoren

Co-Faktoren können auftreten als:

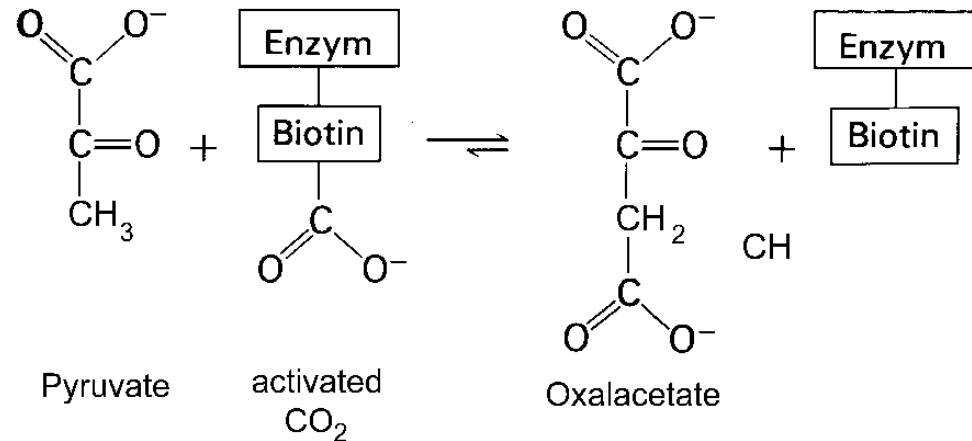
Coenzym : lösliche Co-Substrate, z.B. NAD^+ , Coenzym A ...

Prostethische Gruppe: kovalent an Enzym gebunden , z.B. Biotin, Häm ...
(Metallionen)

Beispiel für kovalente Katalyse
mithilfe eines Co-Faktors:

CO_2 – Übertragung
mittels Biotin

(Gluconeogenese
Fettsäure-Synthese)



Enzymatische Katalyse

Co-Faktoren, ihre Funktion und Herkunft

Thiamin-Pyrophosphat	Aldehyde	Thiamin (Vitamin B ₁)
Flavinadenin-Dinukleotid	e ⁻	Riboflavin (Vitamin B ₂)
Nikotinamid-Adenin-Dinukl.	Hydrid-Ion (e ⁻)	Nikotinsäure (Niacin)
Coenzym A	Acyl-Gruppen	Pantothensäure
Pyridoxylphosphat	Amino-Gruppen	Pyridoxin (Vitamin B ₆)
Coenzym B ₁₂	Methyl-Gruppen	Vitamin B ₁₂
Biotin	CO ₂	Biotin
Tetrahydrofolate	C ₁ Gruppen	Folsäure
Porphyrinring + Me ²⁺ (Häm, Chlorophyll),	O ₂ , e ⁻	---



Enzymatische Katalyse

Anhang: Vorwörter für Zahlen

Anzahl	griechische Vorsilben	lateinische Vorsilben
Ein., erst., allein	mono..., protos	prim..., unus, simplex
Zwei., zweit..., doppelt	di...	sekund..., bi..., duo..., duplex
Drei...	tri...	tert..., tri..., tres...
Vier...	tetra...	quart...
Fünf...	penta...	quint...
Sechs...	hexa...	sext...
Sieben...	hepta...	sept...
Acht...	okta...	okt...
Neun...	nona..., ennea...	non...
Zehn...	deka...	dezi...



Enzymkinetik

Kapitel 7

Enzymkinetik

Inhibitoren

Messung der Aktivität eines Enzyms



Enzymkinetik

Kinetik ist die Betrachtung des zeitlichen Verlaufes (*vulgo* der Geschwindigkeit) einer Reaktion und des Einflusses verschiedener Parameter darauf.

Unimolekulare Reaktion (Isomerisierung, Hydrolysen, radio.Zerfall)



$$v = k \cdot [A] \quad \text{Reaktion 1. Ordnung} \quad k \dots \text{Geschwindigkeitskonstante}$$

Bimolekulare Reaktion



$$v = k \cdot [A] \cdot [B] \quad \text{Reaktion 2. Ordnung}$$

oder



$$v = k \cdot [A]^2$$



Unimolekulare Reaktion



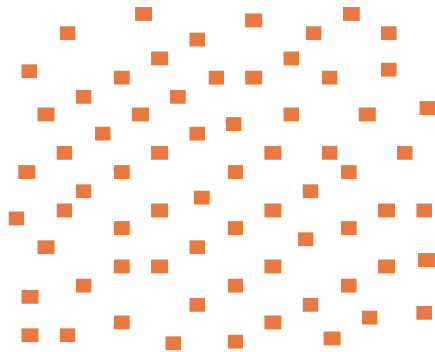
$$v = \Delta[P] / t$$

$$v = k \cdot [A]$$

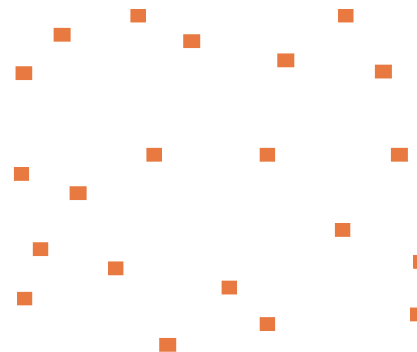
Reaktion 1. Ordnung

Annahme: $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$

$c = 100 \text{ mM}$



$c = 20 \text{ mM}$



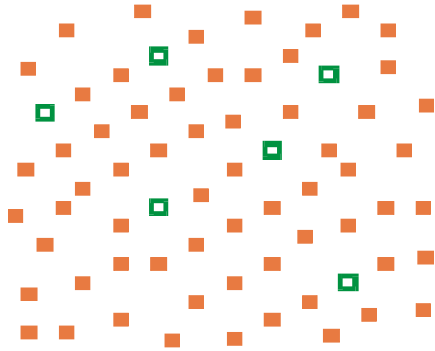
Unimolekulare Reaktion



$$v = k \cdot [A] \quad \text{Reaktion 1. Ordnung}$$

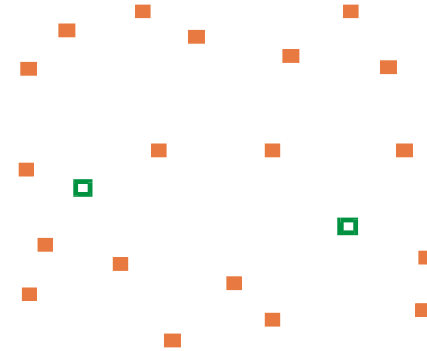
Annahme: $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$

$c = 100 \text{ mM}$



$$v_0 = 0.01 * 100 = 1 \text{ mM/s}$$

$c = 20 \text{ mM}$

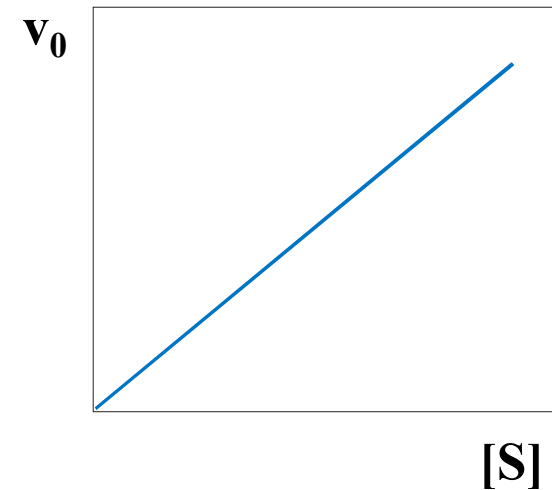
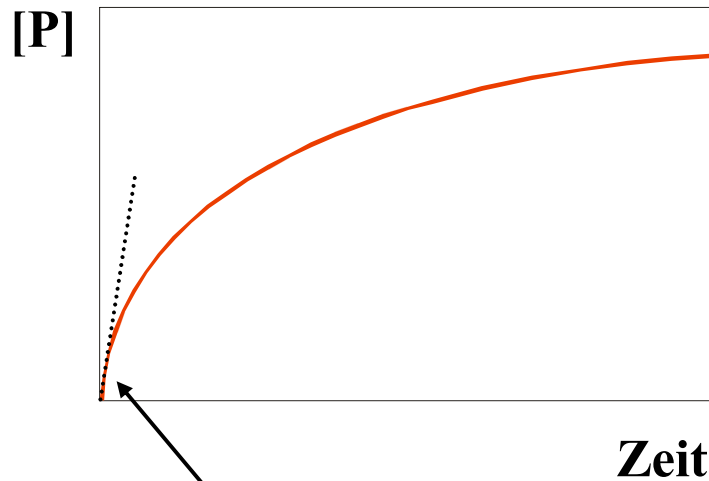


$$v_0 = 0.01 * 20 = 0.2 \text{ mM/s}$$

Enzymkinetik

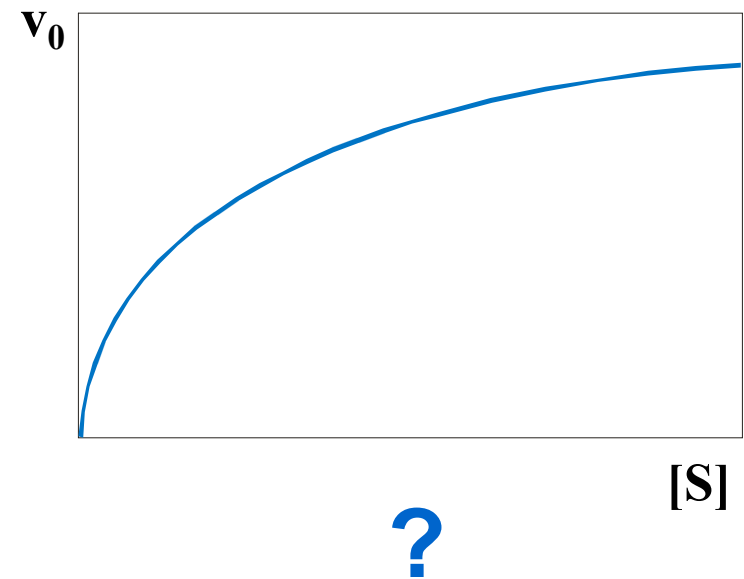
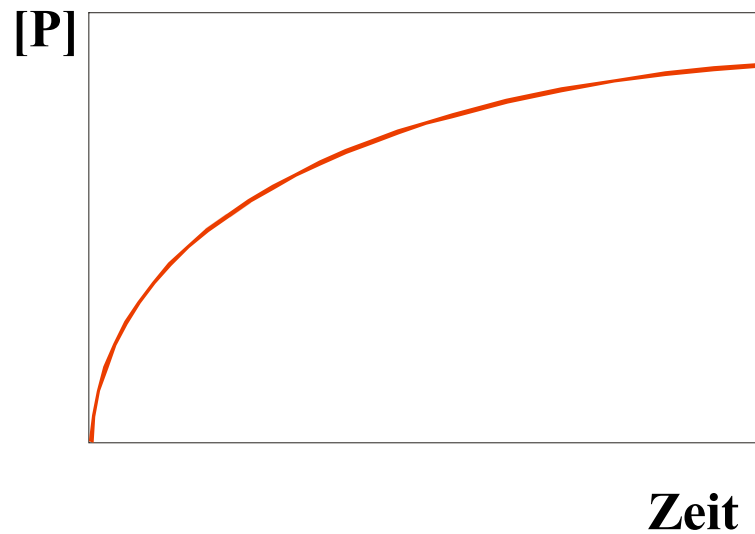
Zeitverlauf und Geschwindigkeit einer Reaktion 1. Ordnung

$$v = \frac{d [P]}{d t} = k \cdot [A]$$



Enzymkinetik

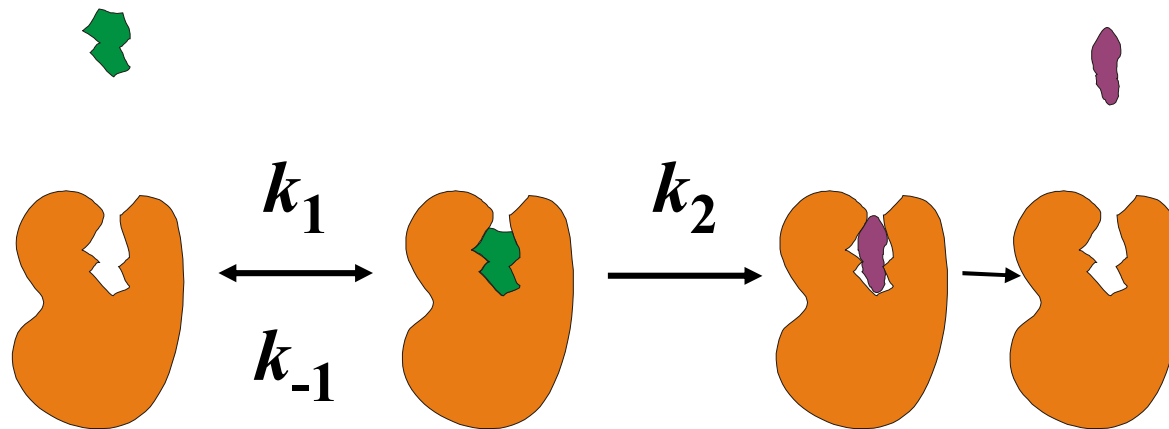
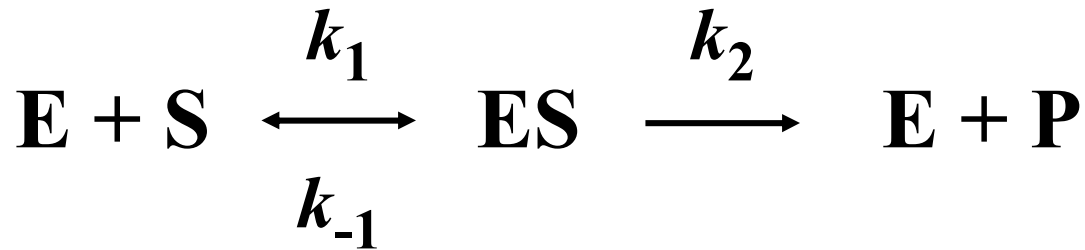
Zeitverlauf und Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion



Enzymkinetik

Enzymkinetik nach Michaelis und Menten

stimmt ganz am Anfang, wenn noch kaum P vorhanden
und daher keine Rückreaktion



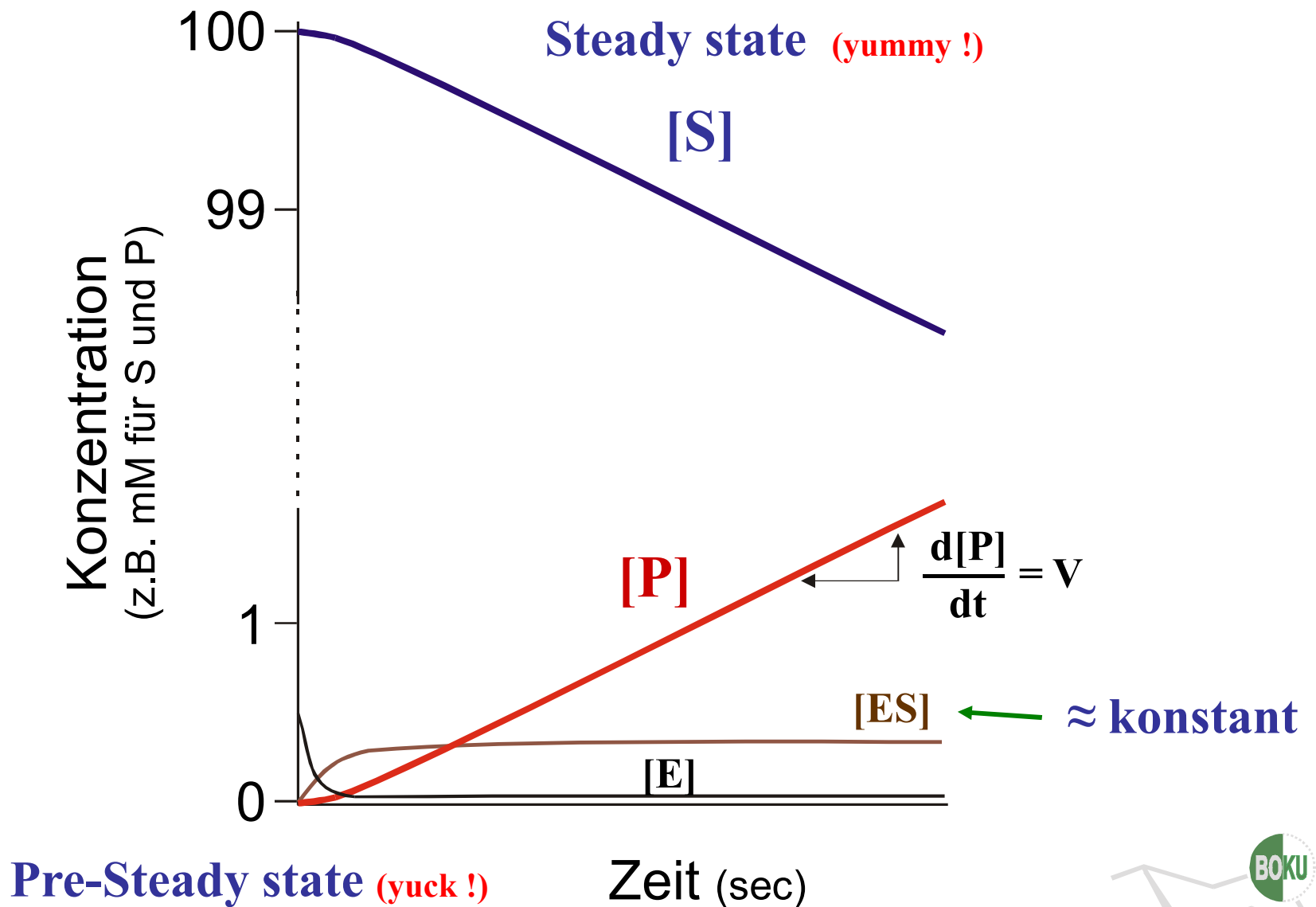
Maud Menten



Leonor Michaelis

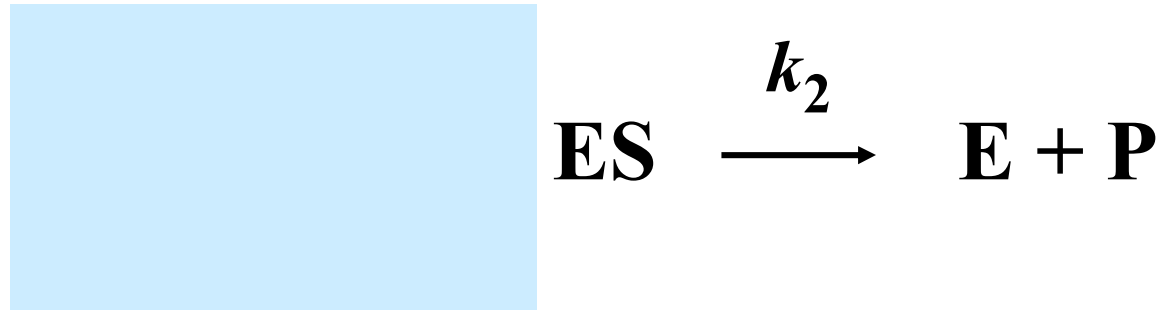


Enzymkinetik



Enzymkinetik nach Michaelis und Menten

Annahme des Reaktionsverlaufes:



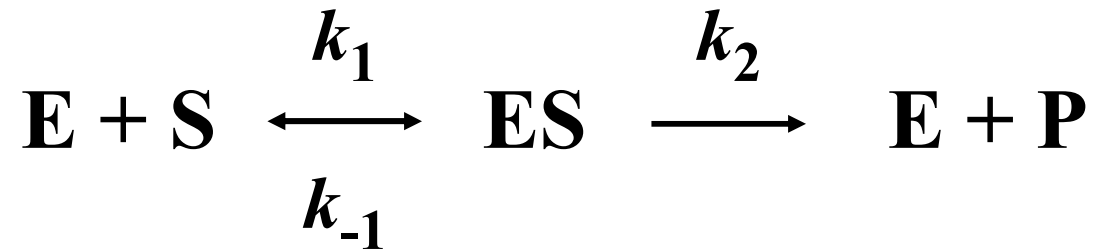
Folgerung:

I $v_0 = k_2 \cdot [\text{ES}]$

II Problem: $[\text{ES}]$ ist nicht meßbar, aber es gilt: $[\text{E}_t] = [\text{E}] + [\text{ES}]$



Enzymkinetik



Im Steady state ist Bildung gleich dem Zerfall von ES, d.h. [ES] konstant

$$\text{III} \quad k_1 \cdot [\mathbf{E}] \cdot [\mathbf{S}] = k_2 \cdot [\mathbf{ES}] + k_{-1} \cdot [\mathbf{ES}]$$

$$k_1 \cdot [\mathbf{E}] \cdot [\mathbf{S}] = (k_2 + k_{-1}) \cdot [\mathbf{ES}]$$

$$[\mathbf{E}] \cdot [\mathbf{S}] = \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1} \cdot [\mathbf{ES}]$$

$$[\mathbf{E}] \cdot [\mathbf{S}] = K_M \cdot [\mathbf{ES}]$$

$$\frac{[\mathbf{E}] \cdot [\mathbf{S}]}{[\mathbf{ES}]} = K_M$$

Michaelis-Konstante:

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$



Enzymkinetik

Übertrag:

$$[E] \cdot [S] = K_M \cdot [ES]$$

$$([E_t] - [ES]) \cdot [S] = K_M \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] / [ES] - [S] = K_M$$

$$[E_t] \cdot [S] / [ES] = [S] + K_M$$

Michaelis-Konstante:

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

$$\frac{[ES]}{[E_t] \cdot [S]} = \frac{1}{[S] + K_M}$$

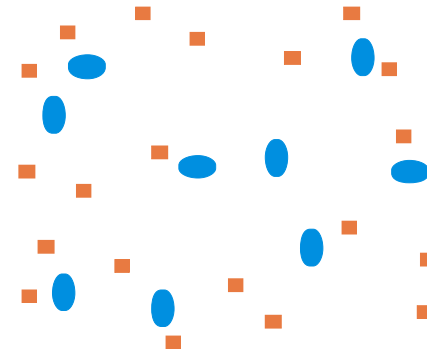
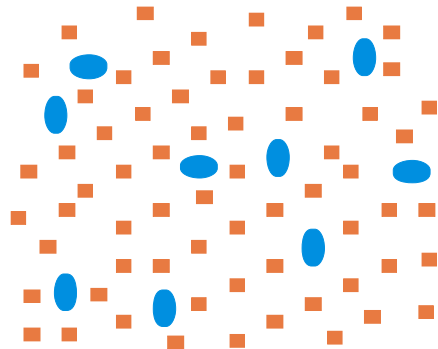
IV

$$[ES] = \frac{[E_t] \cdot [S]}{[S] + K_M} = [E_t] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

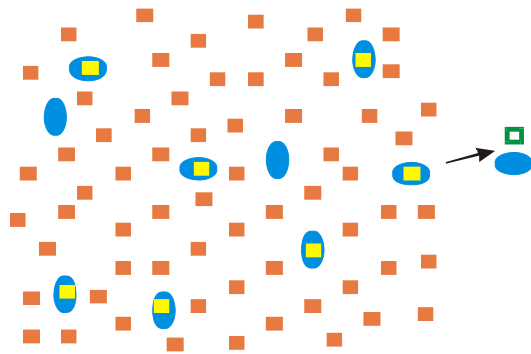


Enzymkinetik

Situation: Gleiche $[E_t]$, aber verschiedene $[S]$

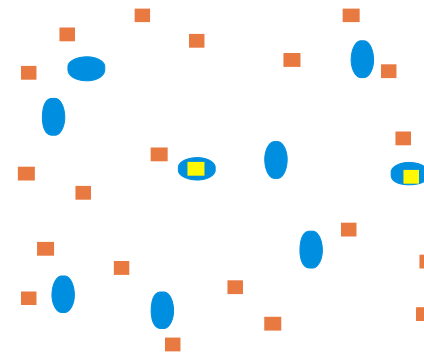


Produkt entsteht aus ES - $[ES]$ immer $< [E_t]$, aber abhängig von $[S]$ und K_M



$$v_0 = k_2 \cdot [ES]$$

hier fast schon: $v_0 = k_2 \cdot [E_t] = v_{\max}$



hier: $v_0 \ll v_{\max}$

Enzymkinetik

Aus I und IV wird:

$$\text{V} \quad v_0 = k_2 \cdot [\text{ES}] = k_2 \cdot [\text{E}_t] \cdot \frac{[\text{S}]}{[\text{S}] + K_M}$$

Nähert sich 1
wenn [S] groß

$$\text{VI} \quad v_{\max} = k_2 \cdot [\text{E}_t] \quad \text{gilt, wenn } [\text{S}] = \infty$$

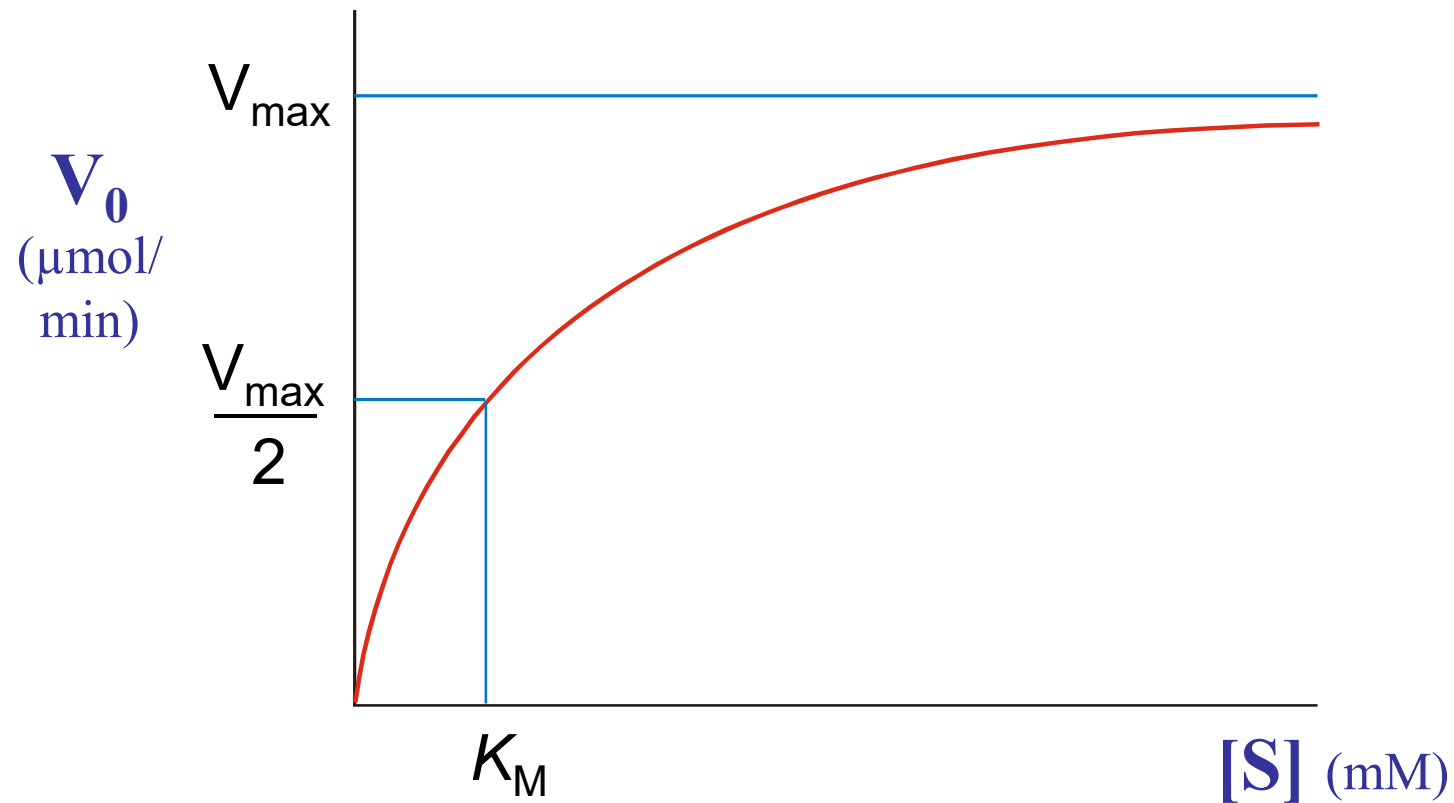
Aus V und VI wird:

$$\text{VII} \quad v_0 = v_{\max} \cdot \frac{[\text{S}]}{[\text{S}] + K_M}$$



Enzymkinetik

Graphische Darstellung des Michaelis und Menten-Modells



Enzymkinetik

Praktische Aspekte der K_M - Wert Bestimmung

Aktivitätsbestimmung in 6 - 10 Ansätzen mit unterschiedlichem [S]

Auswahl der Enzymdosis, v.a. kleinem [S] kritisch,
Ziel: bei allen Messungen V_0

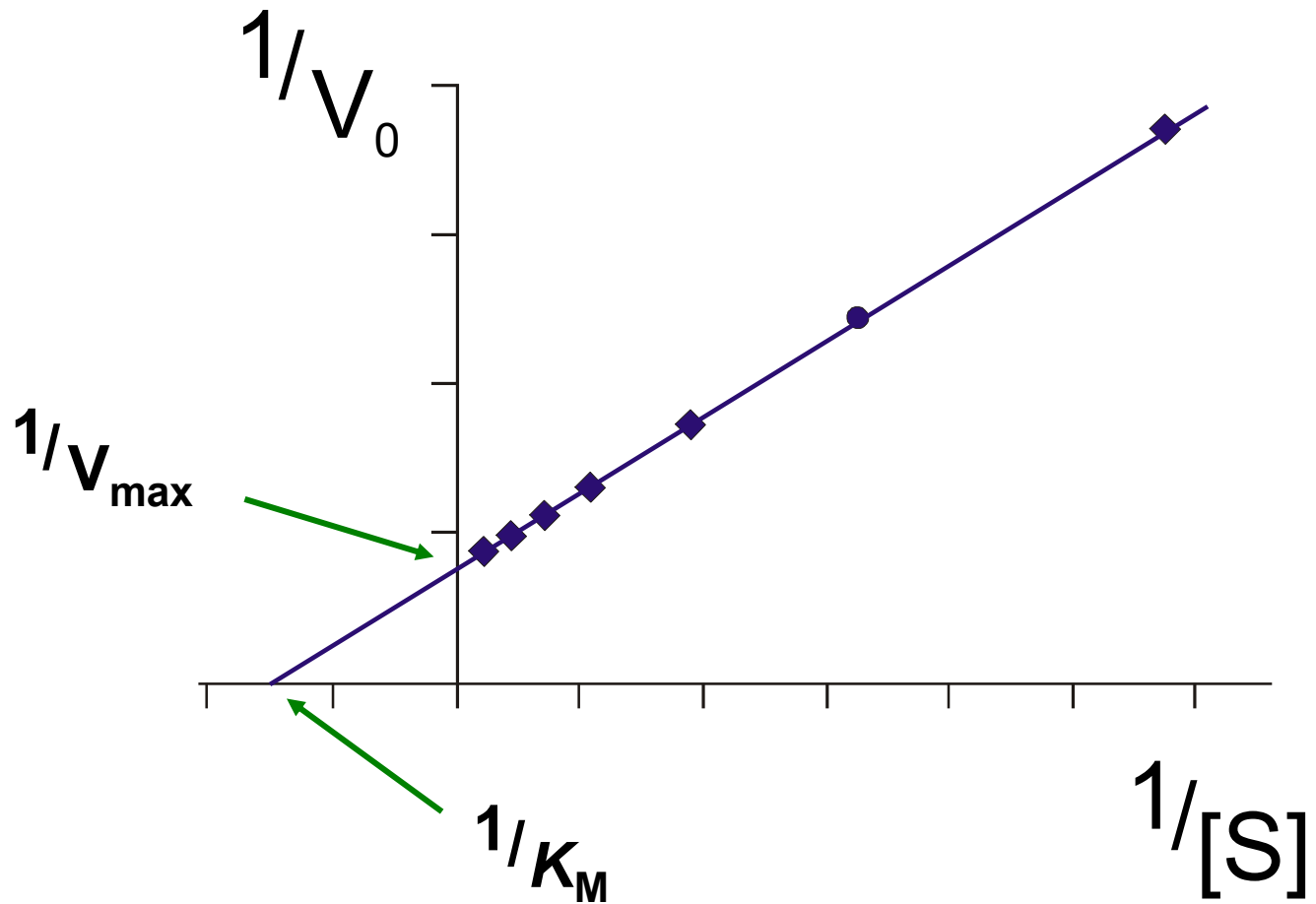
Aufzeichnen des Ergebnisses: möglichst so wie auf Vorseite
Aber: Fehler nicht ganz vermeidbar !

Auswertung des Ergebnisses mit linearem Plot



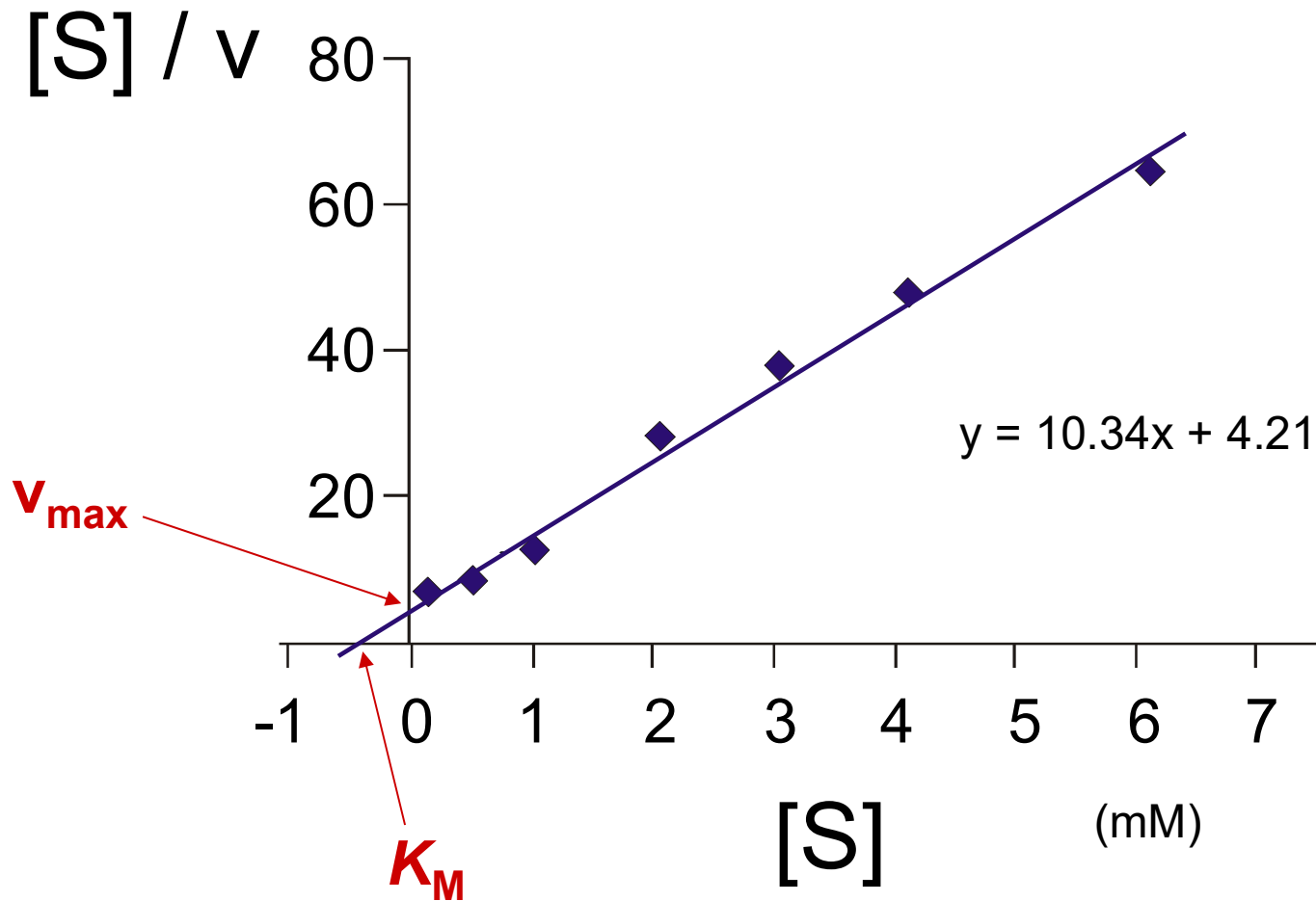
Enzymkinetik

Ermittlung des K_M Wertes mit doppelt-reziprokem Plot nach Lineweaver und Burk



K_M -Wert Bestimmung mit Hanes Plot

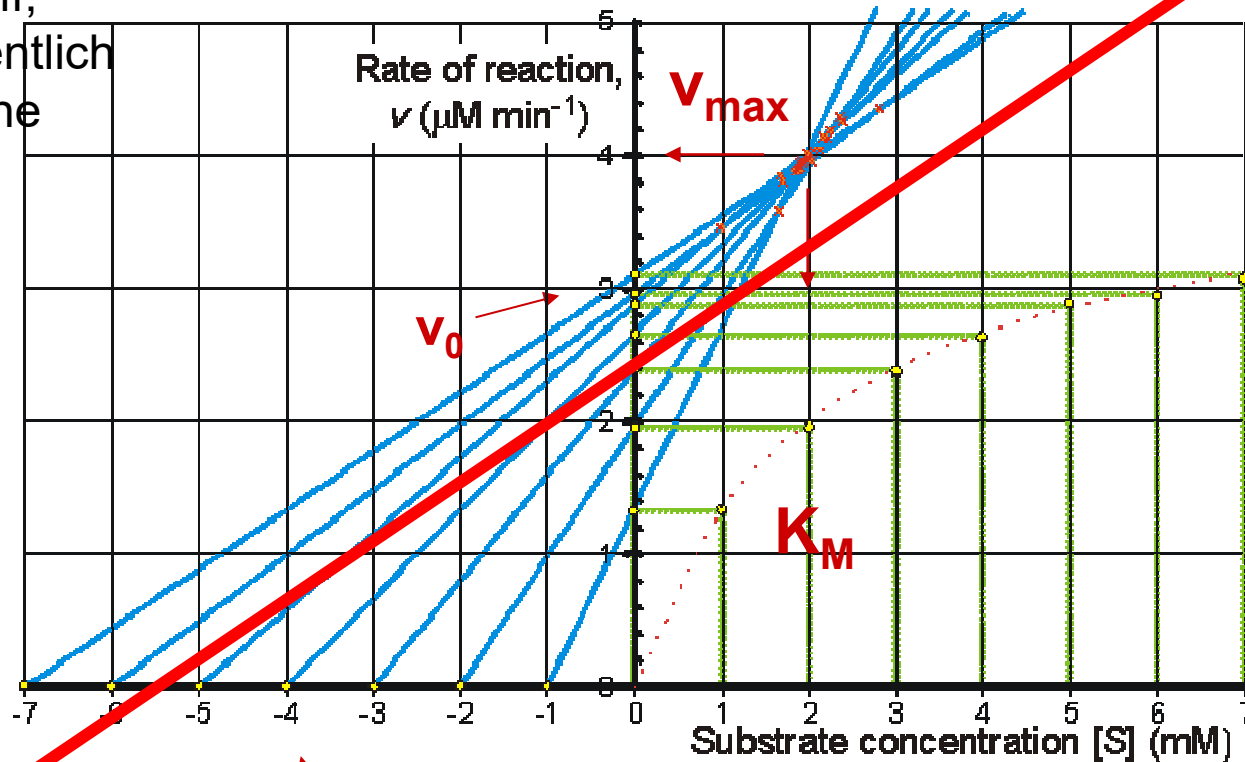
(Hanes-Woolf plot)



Enzymkinetik

K_M -Wert Bestimmung mit direktem linearen Plot

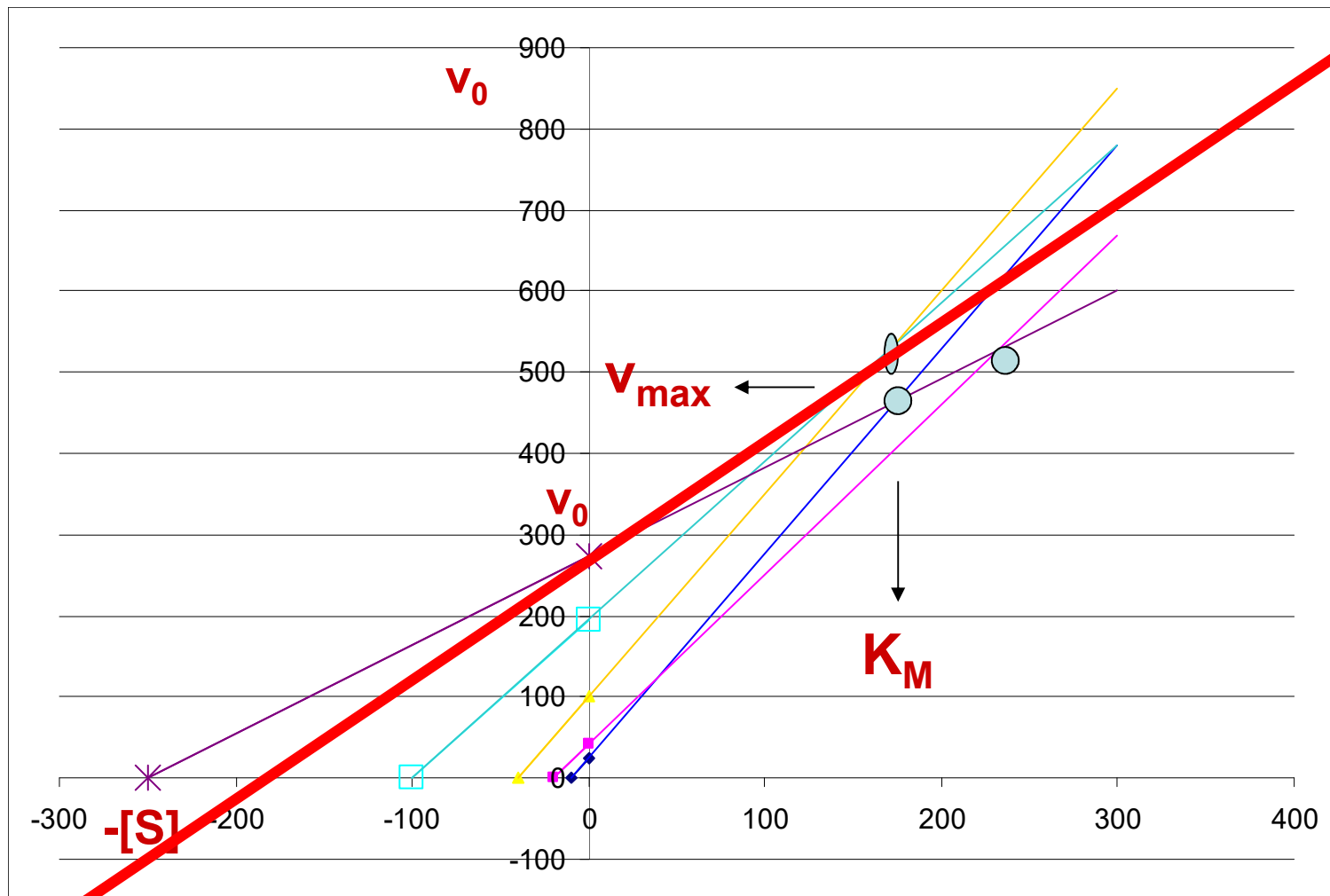
Nicht Stoff,
aber eigentlich
tolle Sache



Quasi-statistische Auswertung,
Ausreisser gut erkennbar



Enzymkinetik



Quasi-statistische Auswertung,
Ausreisser gut erkennbar



Bedeutung und Anwendung kinetischer Kennzahlen

K_M -Wert:

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

- Vergleich verschiedener Substrate eines Enzyms
Aussagen über Stoffwechselwege
- Wenn $k_2 = k_{-1}$ oder $k_2 > k_{-1}$ dann ist Situation komplex
- Wenn $k_2 < k_{-1}$ dann ist $K_M \approx K_D$
(wenn k_2 geschwindigkeitsbestimmend)

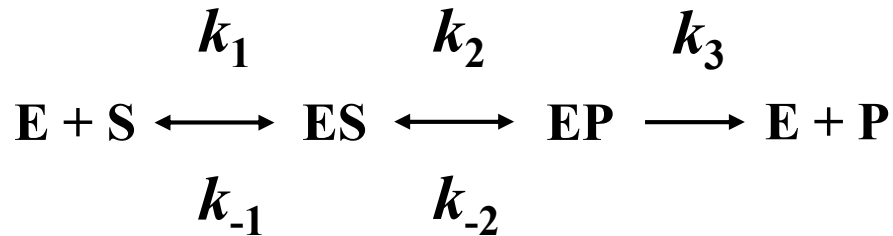
d.h. K_M ist ein Maß für die
Affinität von Enzym und Substrat

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1}$$



Enzymkinetik

Die katalytische Konstante k_{cat}



$$v_0 = k_2 \cdot [\text{ES}] \quad ?$$

$$v_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \cdot [\text{E}_t]$$

bzw.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\text{max}}}{[\text{E}_t]}$$

$$\frac{(\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1})}{(\text{mol L}^{-1})}$$

Produkt

Enzym

$$k_{\text{cat}} = \text{Wechselzahl} / \text{Turnover number (s}^{-1}\text{)}$$

$$= \text{mol Produkt} / \text{mol Enzym und Sekunde}$$

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$$

Katalytische Effizienz, wichtig wenn $[\text{S}] \ll K_M$



Enzymkinetik

Die katalytische Konstante k_{cat} als Maß für die Perfektion eines Enzyms

		k_{cat} (sec ⁻¹)
Katalase	H ₂ O ₂	40.000.000
Carboanhydrase	HCO ₃ ⁻	400.000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14.000
β-Lactamase	Benzylpenicillin	2.000
Fumarase	Fumarate	800
DNA-Polymerase I		15
Lysozym	Murein, Chitooligosacch.	0,5



Enzymkinetik

Einfluß anderer Parameter

Temperatur

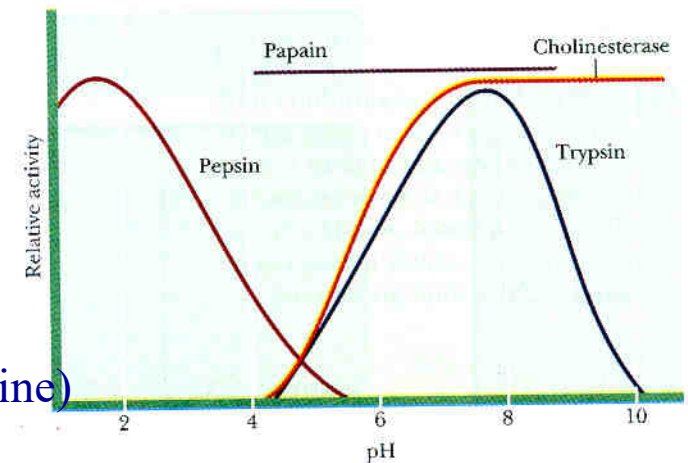
Erhöhung von v mit T , aber auch Beschleunigung der Denaturierung
(Verdoppelung pro ca. 10°C)

pH-Wert

Maximale Aktivität in bestimmtem pH-Bereich
Individuell verschieden, von Mechanismus
abhängig

Daher immer Puffer verwenden

Pufferionen haben unterschiedlichen Einfluß
ev. Mischpuffer (Citrat-Phosphat von 3 – 8; McIlvaine)



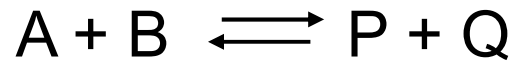
Andere

Metallionen (zweiwertige), Inhibitoren

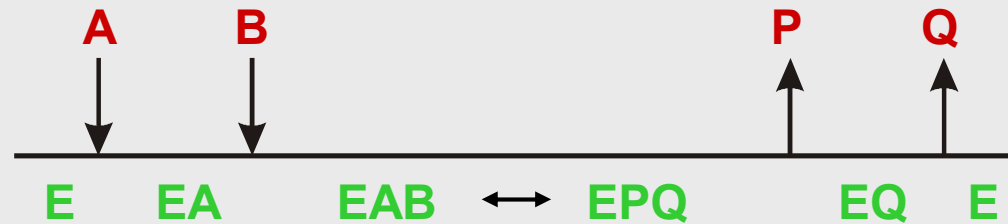


Enzymkinetik

Bisubstrat-Reaktionen



Sequentielle Reaktion -- geordneter Mechanismus



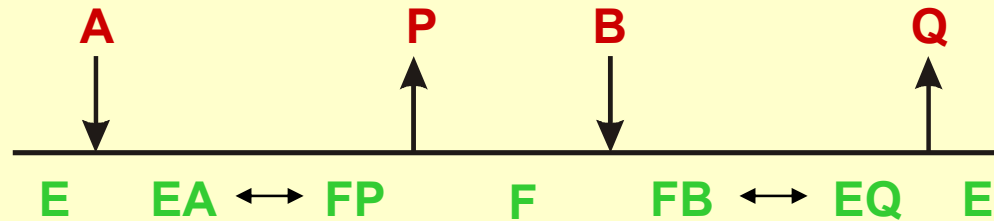
mit
ternärem Komplex

Sequentielle Reaktion -- "Random" - Mechanismus

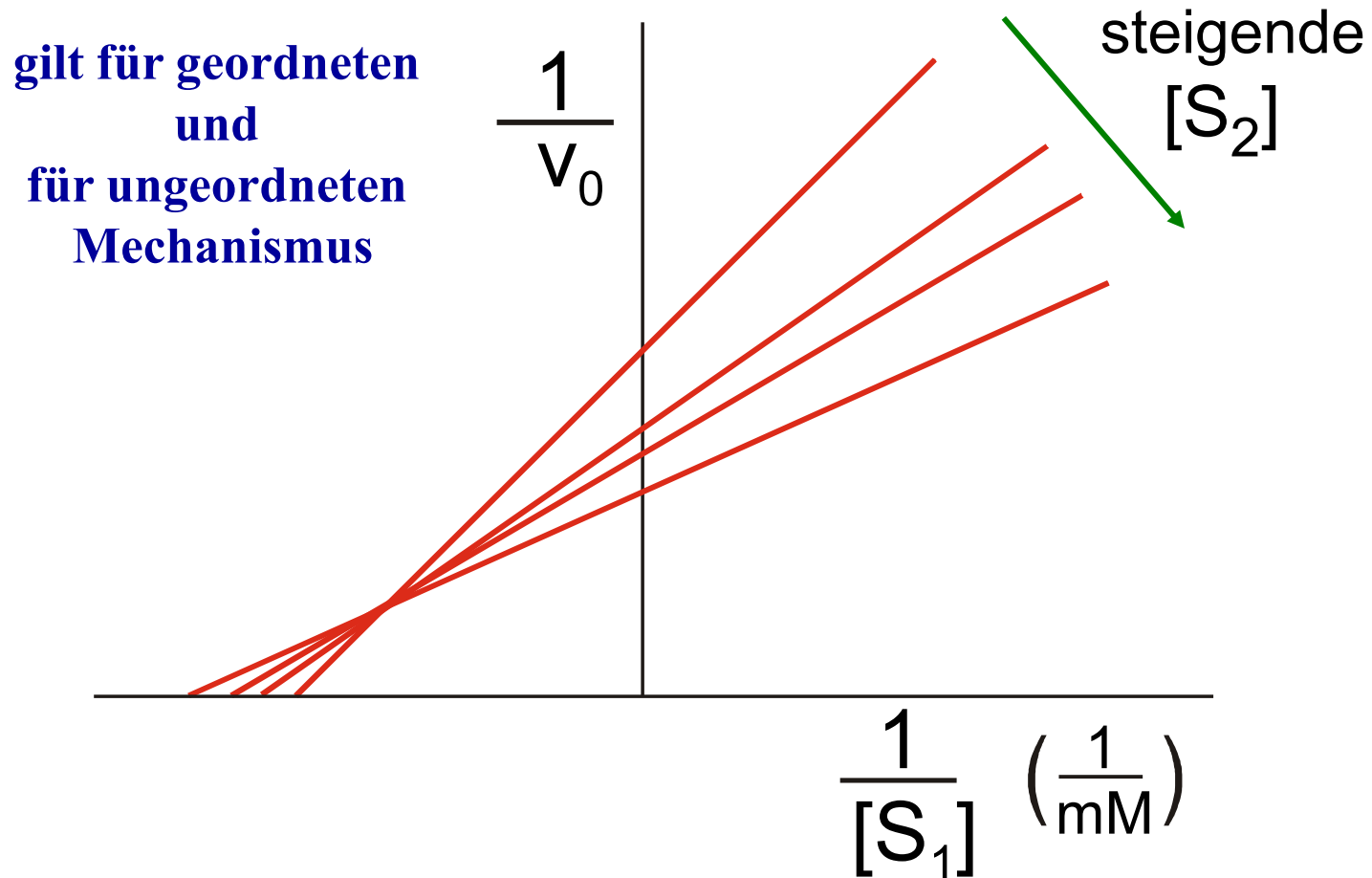
Zuerst EA oder EB

ohne
ternärem Komplex

"Ping Pong" - Reaktionen

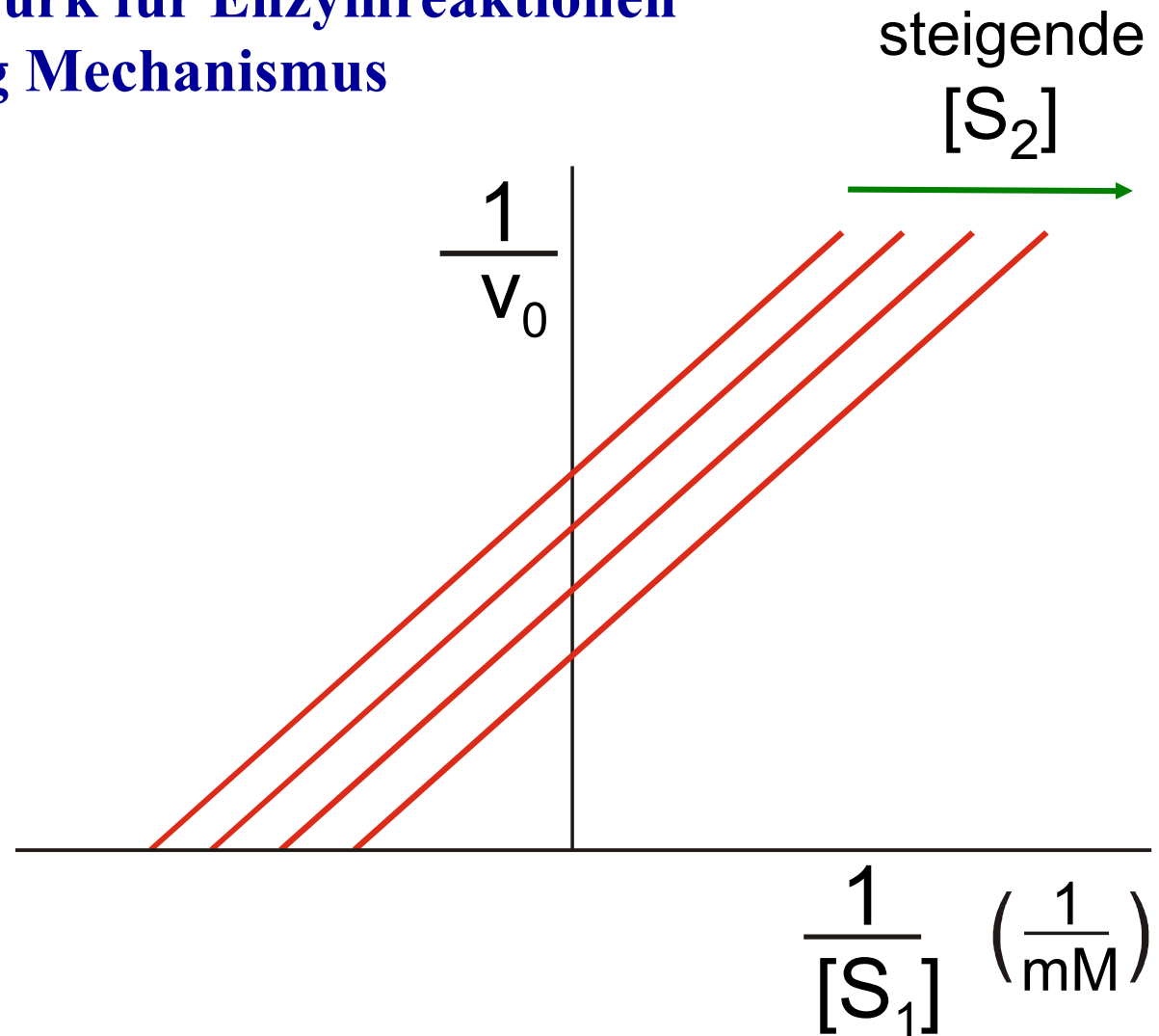


Lineweaver-Burk für Enzymreaktionen mit ternärem Komplex



Enzymkinetik

Lineweaver-Burk für Enzymreaktionen mit Ping-pong Mechanismus



Bedeutung der kinetischen Parameter von Bisubstrat-Enzymreaktionen

K_M - und v_{\max} -Werte haben für jeweils eines der beiden Substrate dieselbe Bedeutung wie bei Einsubstratreaktionen, wenn das jeweils andere Substrat in Sättigung vorliegt.

Wenn dies unmöglich ist:

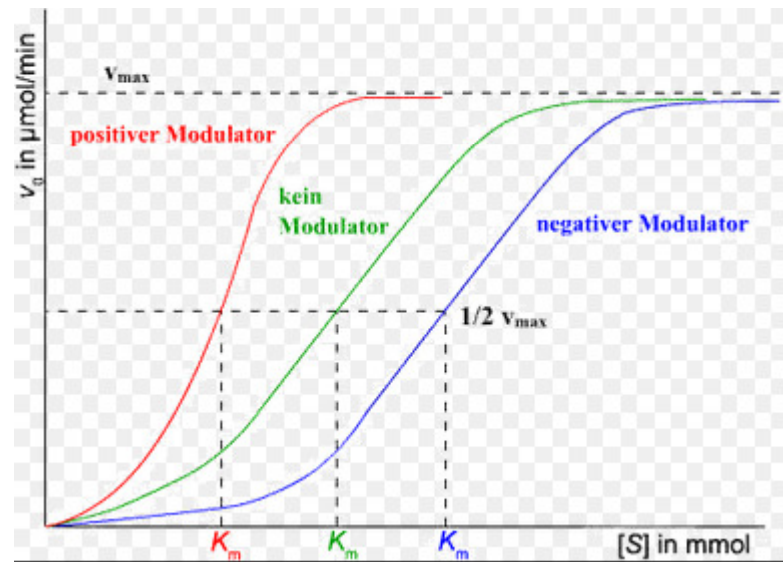
$[S_B]$ definieren und für A K_{Mapp} (scheinbaren K_M bestimmen)



Enzymkinetik

Allosterie

Viele Enzyme weisen kompliziertere Kinetik auf, da „Modulatoren“ ihre Aktivität regulieren



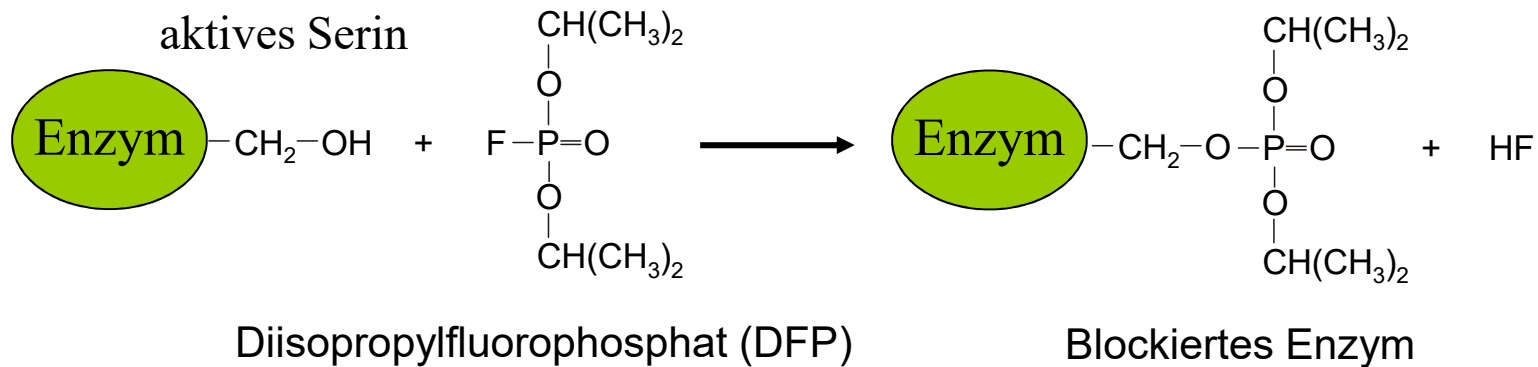
Genauer im Sommersemester



Enzymkinetik

Irreversible Inhibition von Enzymen

Beispiel: „Vergiftung“ einer Esterase (z.B. Acetylcholinesterase)



Organophosphor-Inhibitoren wirken auf Proteasen u. Esterasen:

- als
- Insektizide (E605)
 - Giftgase (DFP, Sarin, **Tabun**, **VX*** und Co.)
 - Natürliche Inh. (alfa1-Trypsininhibitor auf Elastase in Lunge)
[COPD]

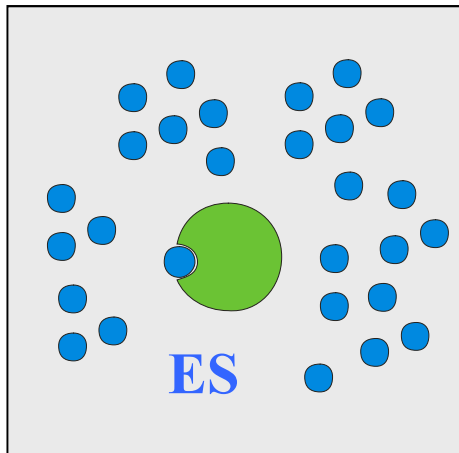
* noch nicht Stoff



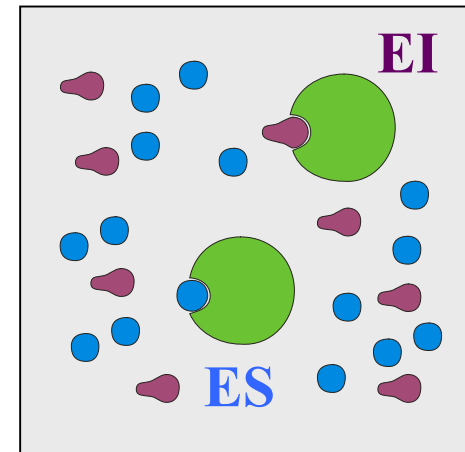
Enzymkinetik

Reversible Inhibition von Enzymen

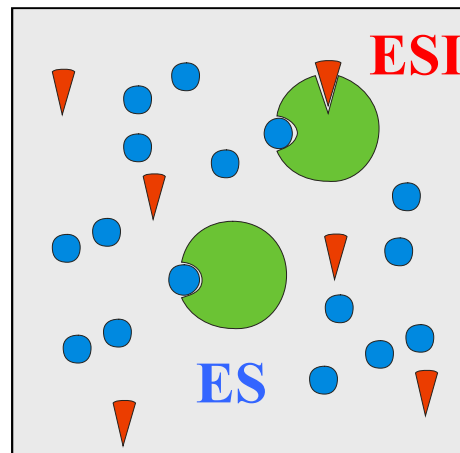
Ohne Inhibitor



Mit kompetitivem Inhibitor

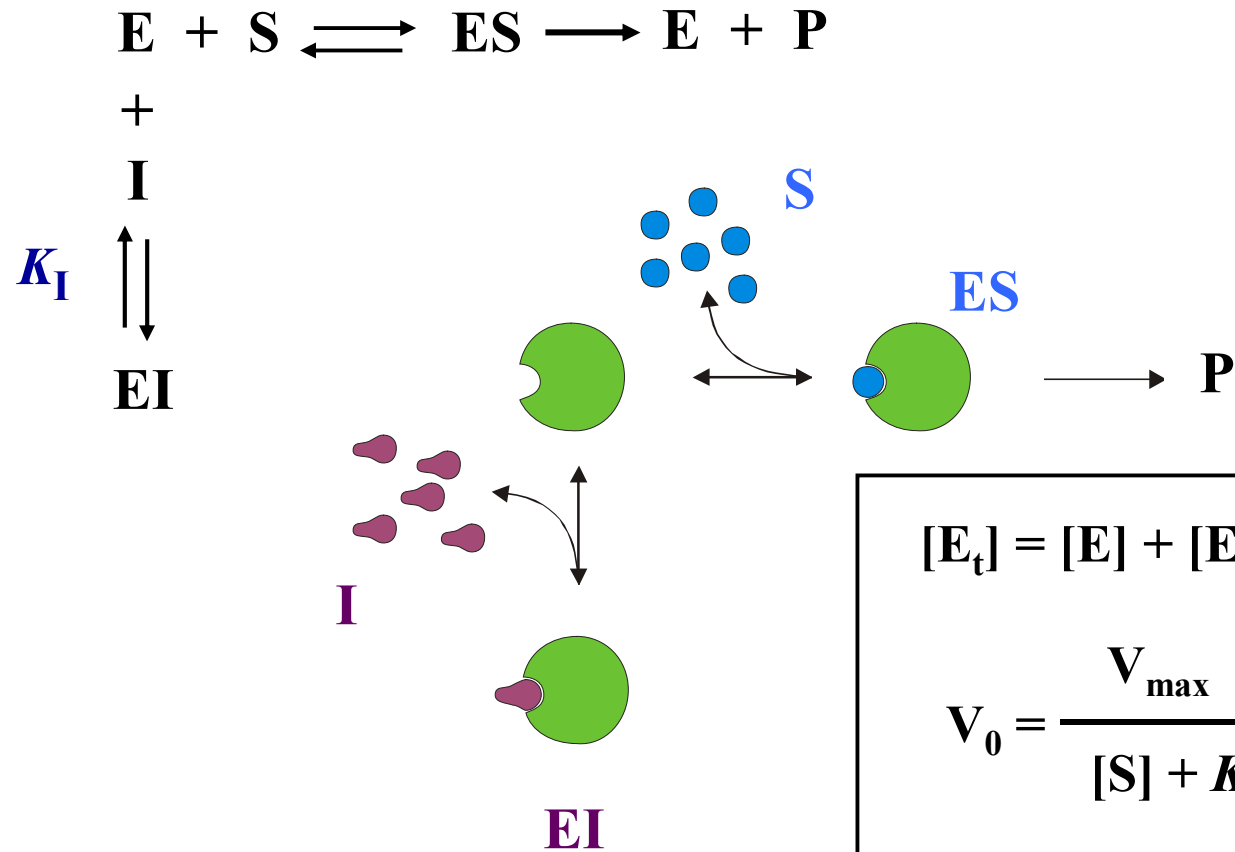


Mit nicht-
kompetitivem
Inhibitor



Enzymkinetik

Kompetitive Inhibition eines Enzyms



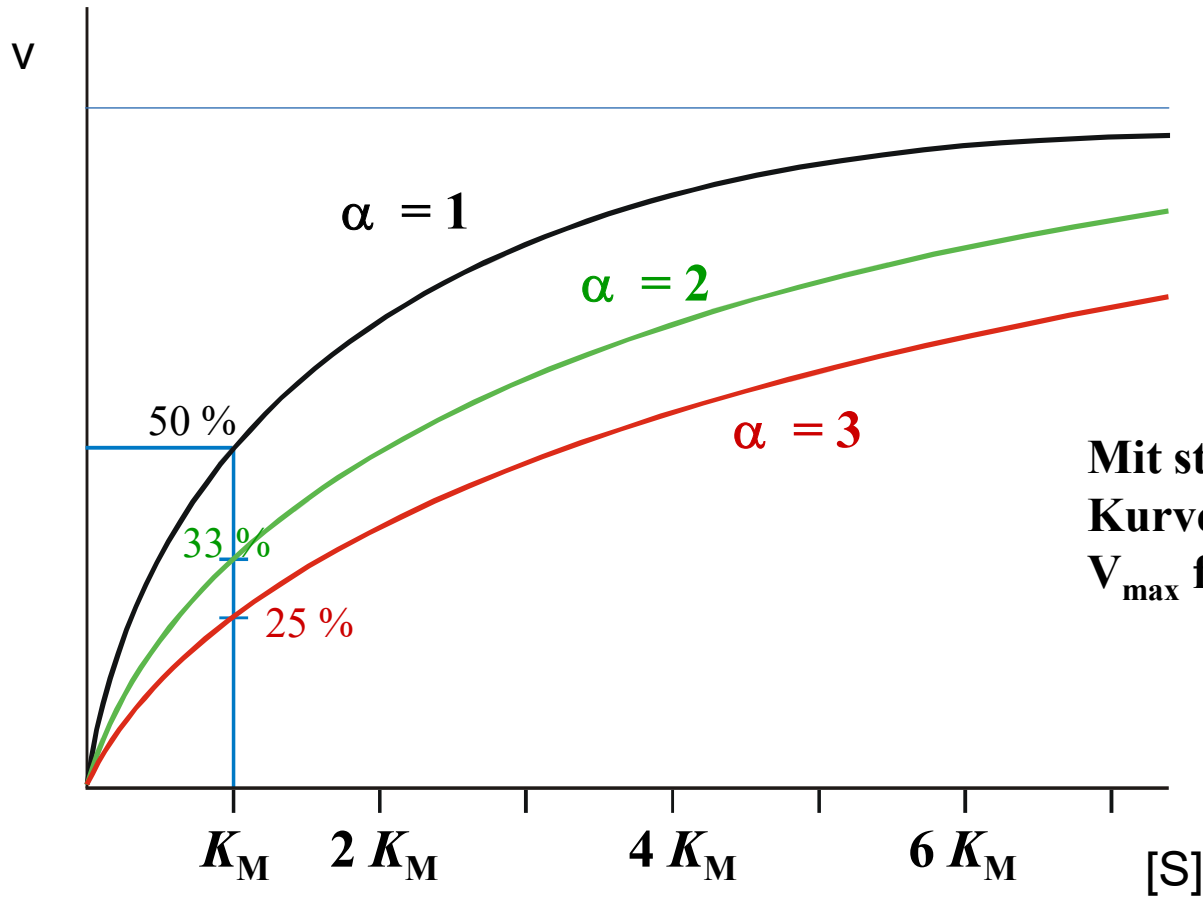
$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M \alpha}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

Enzymkinetik

Kompetitive Inhibition eines Enzyms



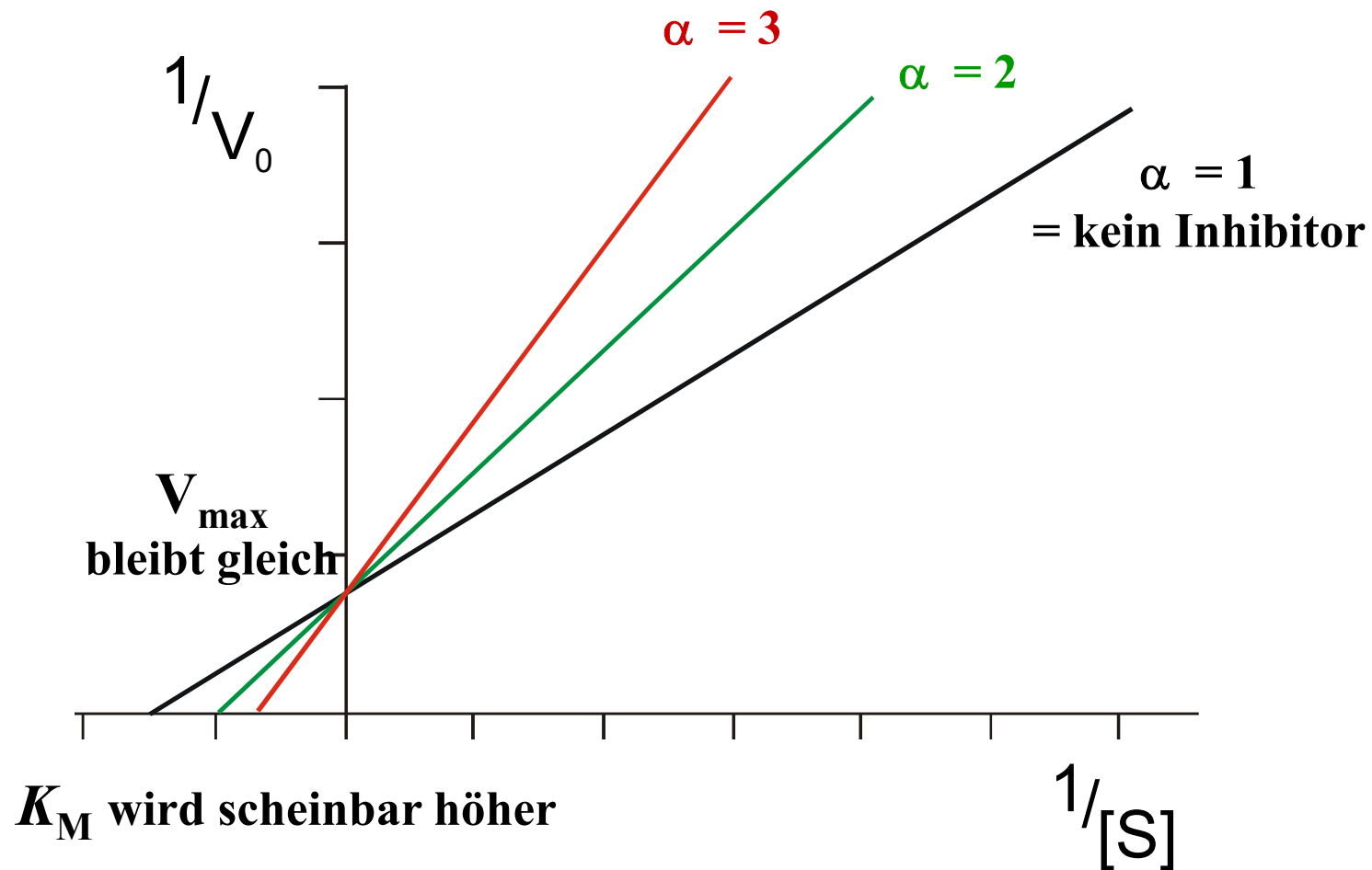
Mit steigender $[S]$ nähern sich Kurven einander an.
 V_{max} für alle gleich.

2 Substrate können sich gegenseitig kompetitiv inhibieren.
(Methanol / Äthanol)



Enzymkinetik

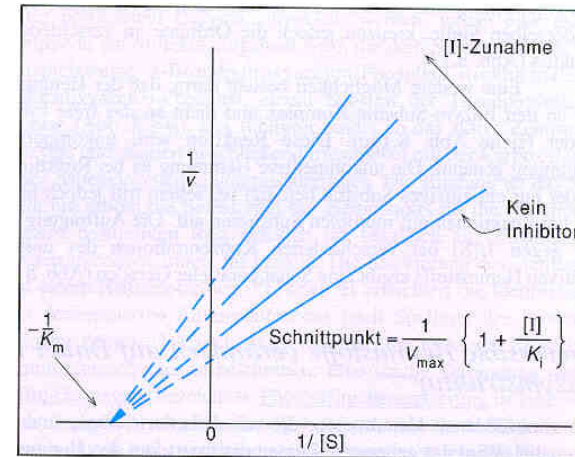
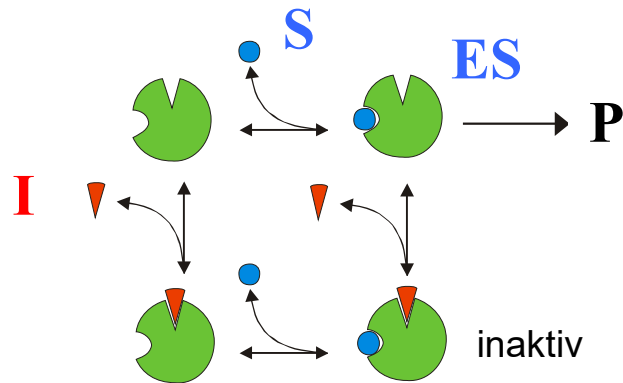
Kompetitive Inhibition eines Enzyms



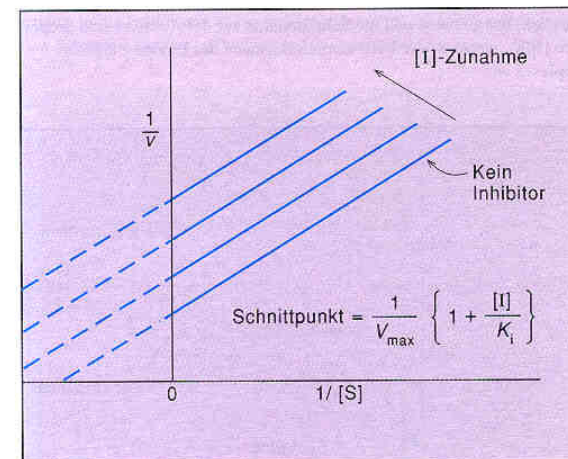
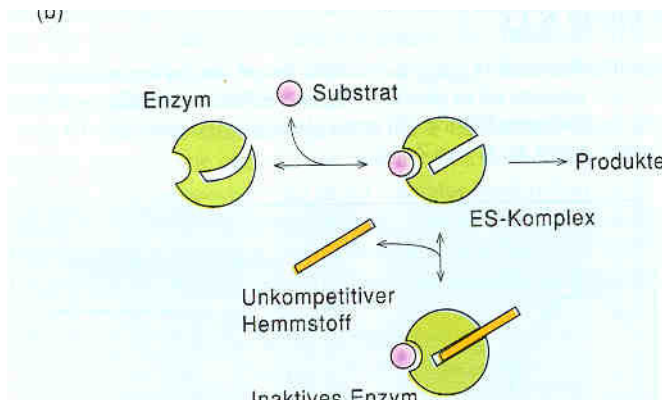
Enzymkinetik

Andere Arten der Inhibition eines Enzyms

Nicht-kompetitive Hemmung

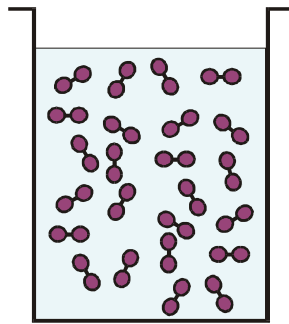
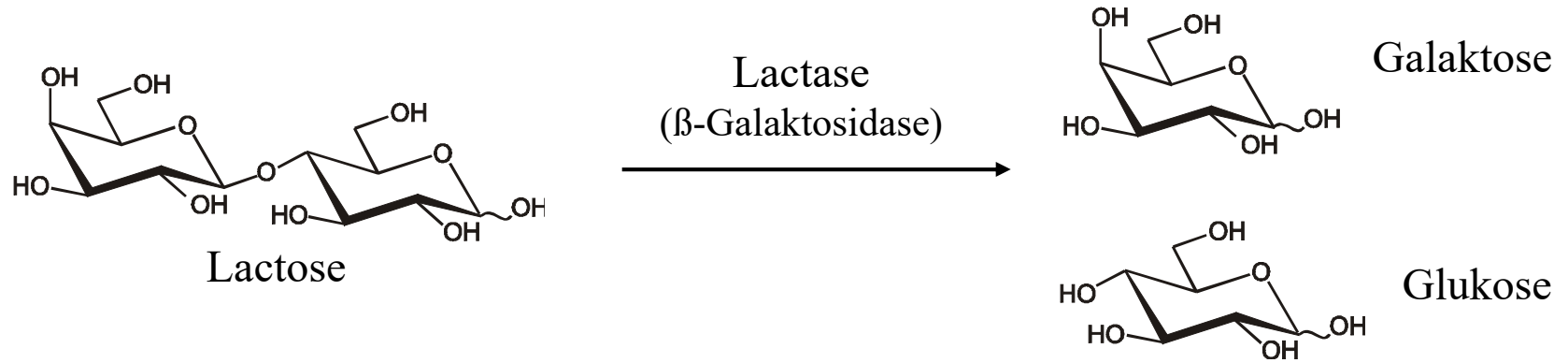


Unkompetitive Hemmung (ars pro arte)

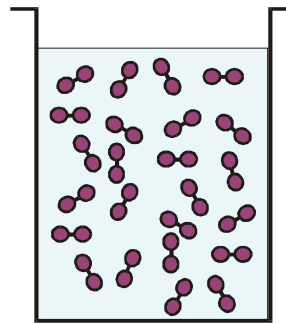


Enzymkinetik

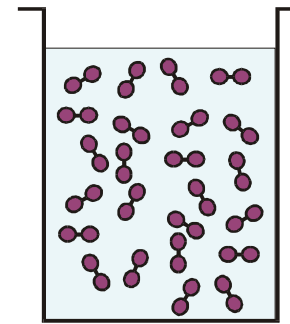
Messung der Enzymaktivität



Zeit: 0 h



Zeit: 1 h

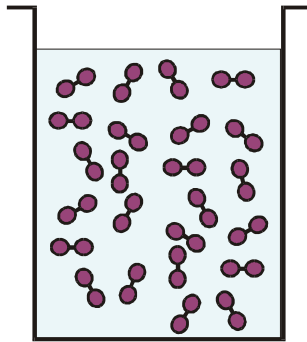


Zeit: 2 h

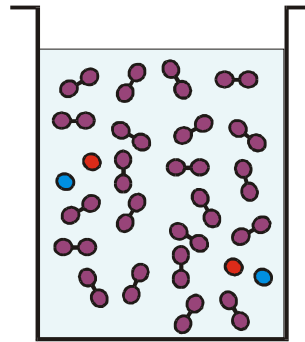
Ohne Enzym

Enzymkinetik

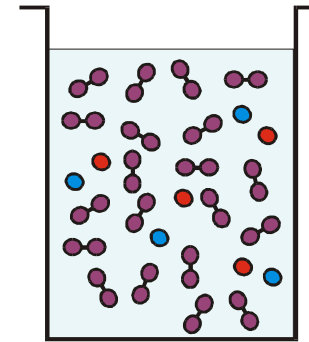
Messung der Enzymaktivität



Zeit: 0 h

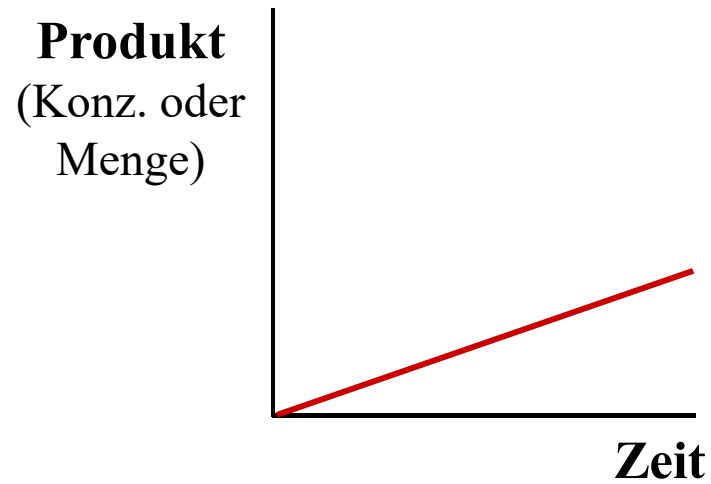


Zeit: 1 h



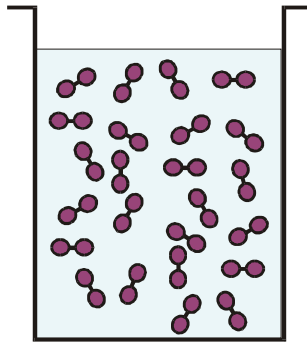
Zeit: 2 h

Mit Lactase

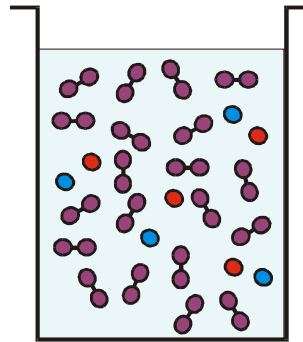


Enzymkinetik

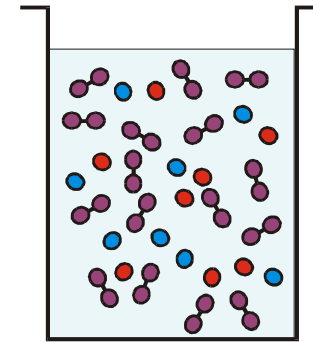
Messung der Enzymaktivität



Zeit: 0 h



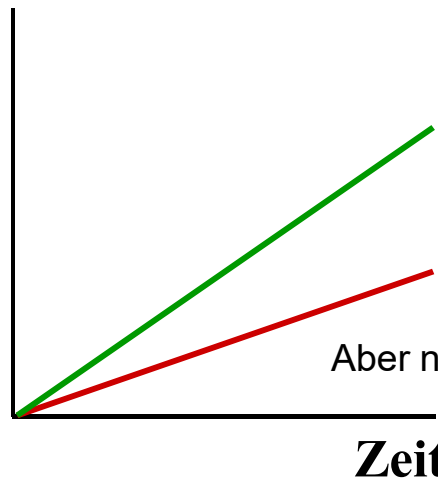
Zeit: 1 h



Zeit: 2 h

Mit mehr Lactase

Produkt
(Konz. oder
Menge)



Aber nur gewisse Zeit linear !

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{d(\text{Produkt})}{d(\text{Zeit})}$$

Enzymkinetik

Messung der Enzymaktivität

Die “Menge“ eines Enzyms gibt man als Enzymaktivität an.
Die Enzymaktivität ist eine Reaktionsgeschwindigkeit.

Anders als in der Kinetik, betrachten wir
hier die Menge an umgesetztem P oder S !

$$v = \frac{\Delta n(\text{P})}{\Delta t}$$

Einheiten für Enzymaktivität:

- Willkürliche “Konventionseinheiten“ (z.B. 0.01 Abs / min)
- Internationale Einheit (international unit, IU, U) $\mu\text{mol}/\text{min}$
- Katal (SI Einheit, kat) ... mol/sec



Enzymkinetik

Messung der Enzymaktivität

Temperatur, pH, Ionenmilieu möglichst gut kontrolliert

Substratkonzentration möglichst hoch (Preis, Störungen)

Inkubationszeit > 10 min (Handling, Temperaturäquilibrierung)
< 30-120 min (Inaktivierung, Fadesse)

Enzymmenge (bzw. Enzymverdünnung)

Ziel: gut meßbares Ergebnis, aber im v_0 -Fenster bleiben (*Linearität*)

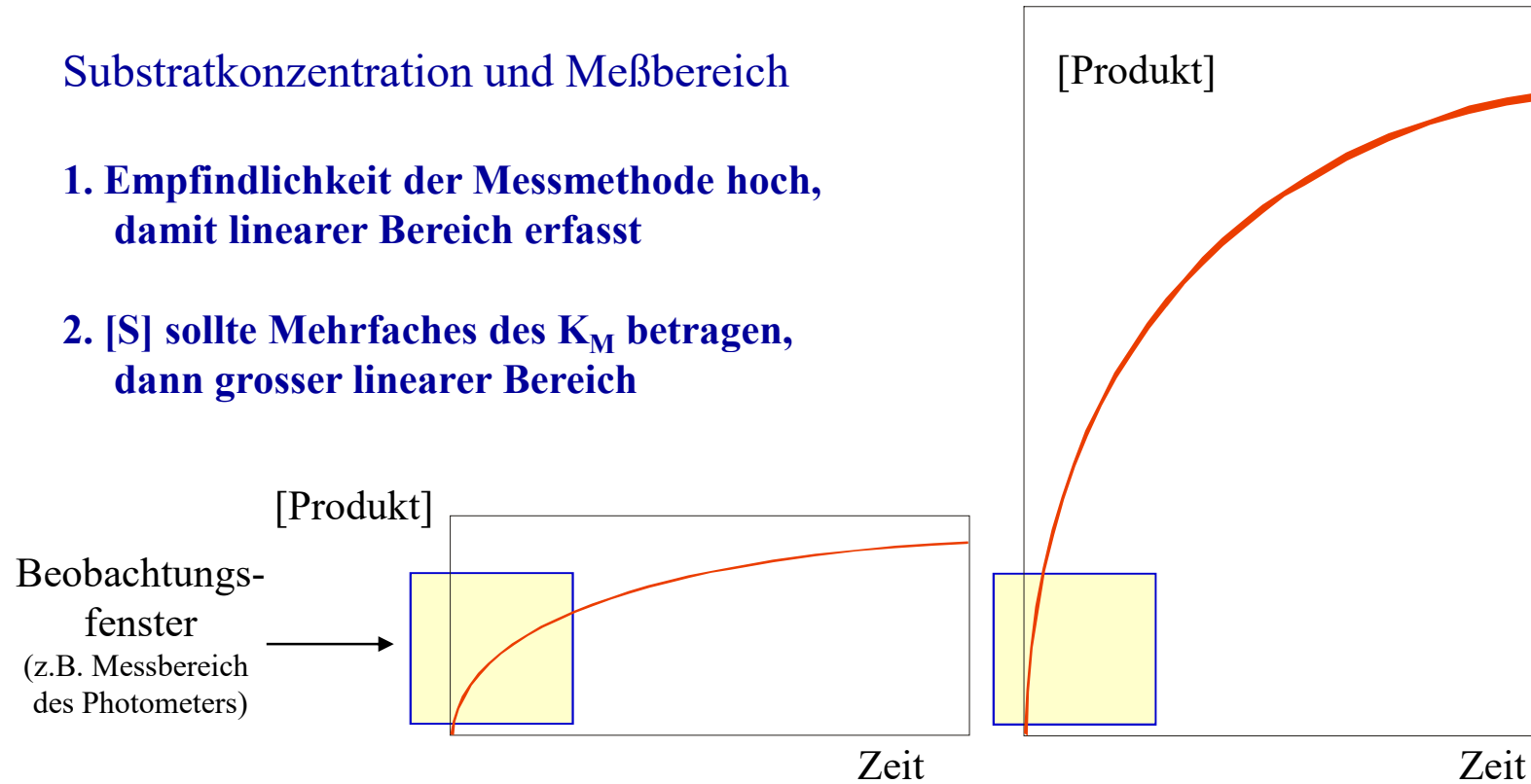
Enzymdosis = Enzymmenge x Inkubationszeit

Enzymkinetik

Messung der Enzymaktivität

Substratkonzentration und Meßbereich

1. **Empfindlichkeit der Messmethode hoch, damit linearer Bereich erfasst**
2. **[S] sollte Mehrfaches des K_M betragen, dann grosser linearer Bereich**



Enzymkinetik

Messung der Enzymaktivität

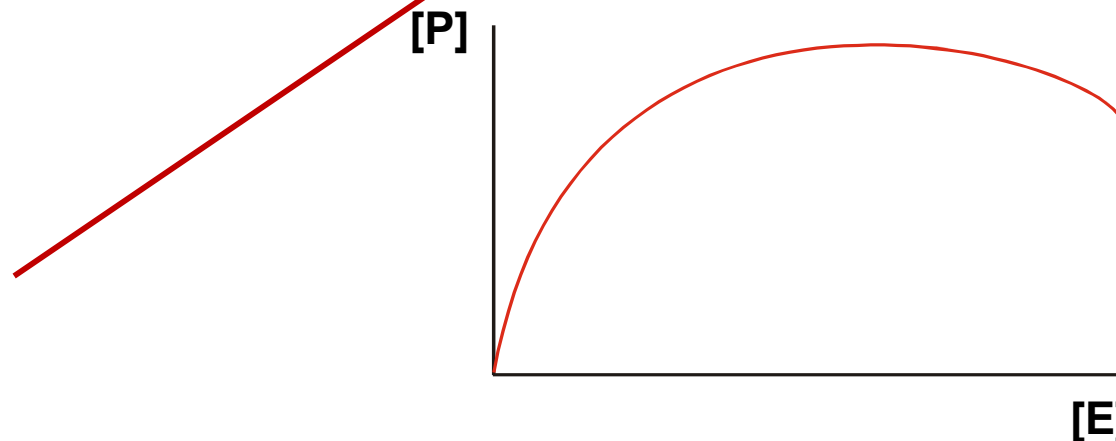
Praxis

Linearität der Messung für Enzymmenge (und Zeit) überprüfen

Messung nur auswerten, wenn in linearem Bereich

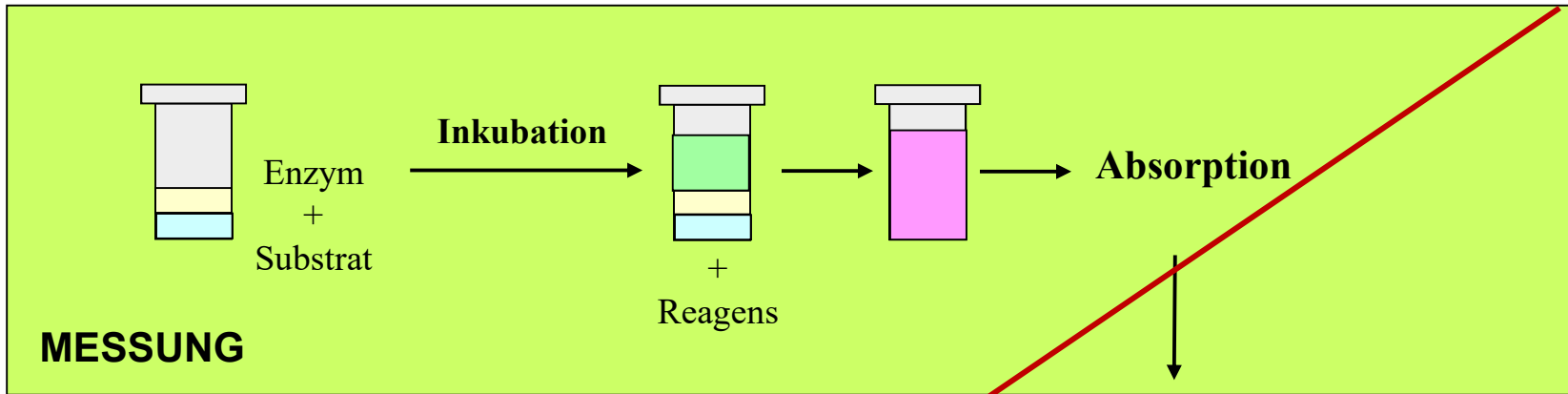
Enzym-Probe verdünnen, um in diesen Bereich zu kommen

Am Besten Ansätze gleich mit Verdünnungsreihe

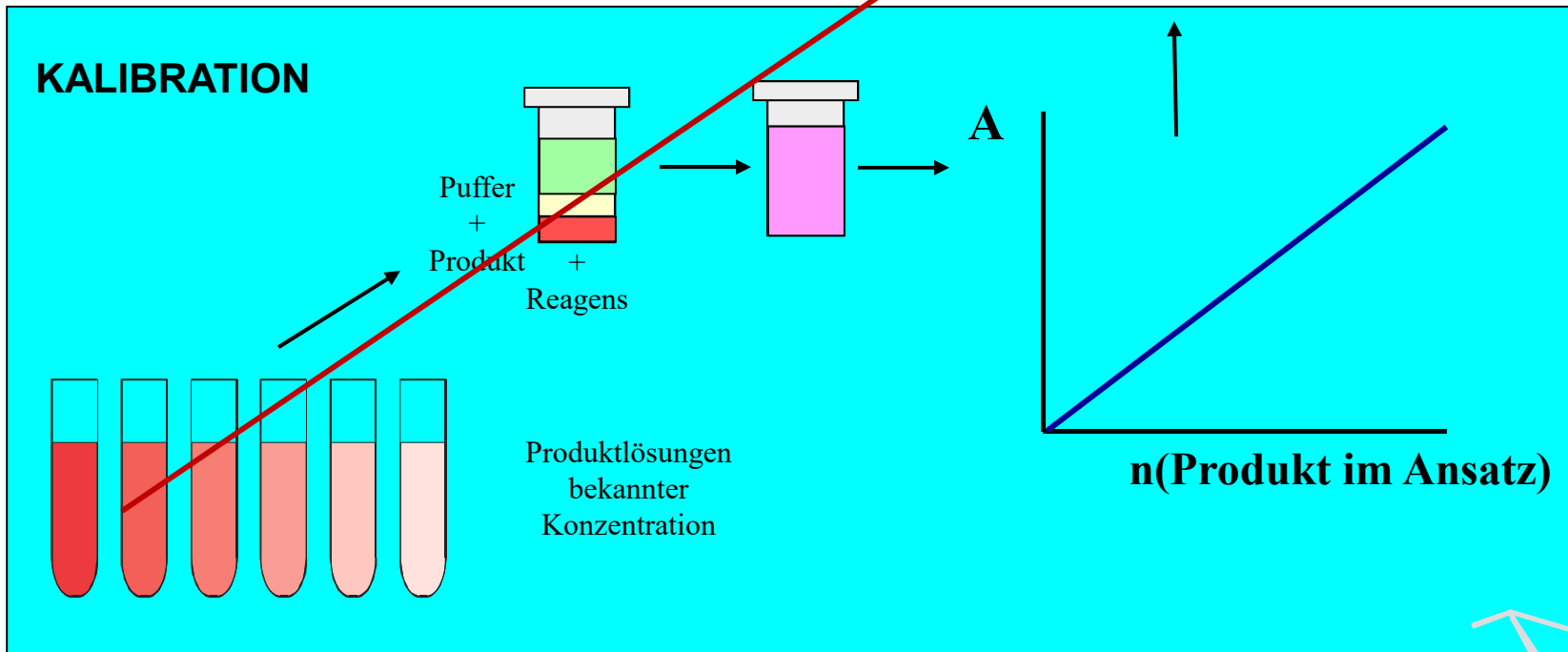


manchmal niedriger Meßwert
bei hoher Enzymdosis

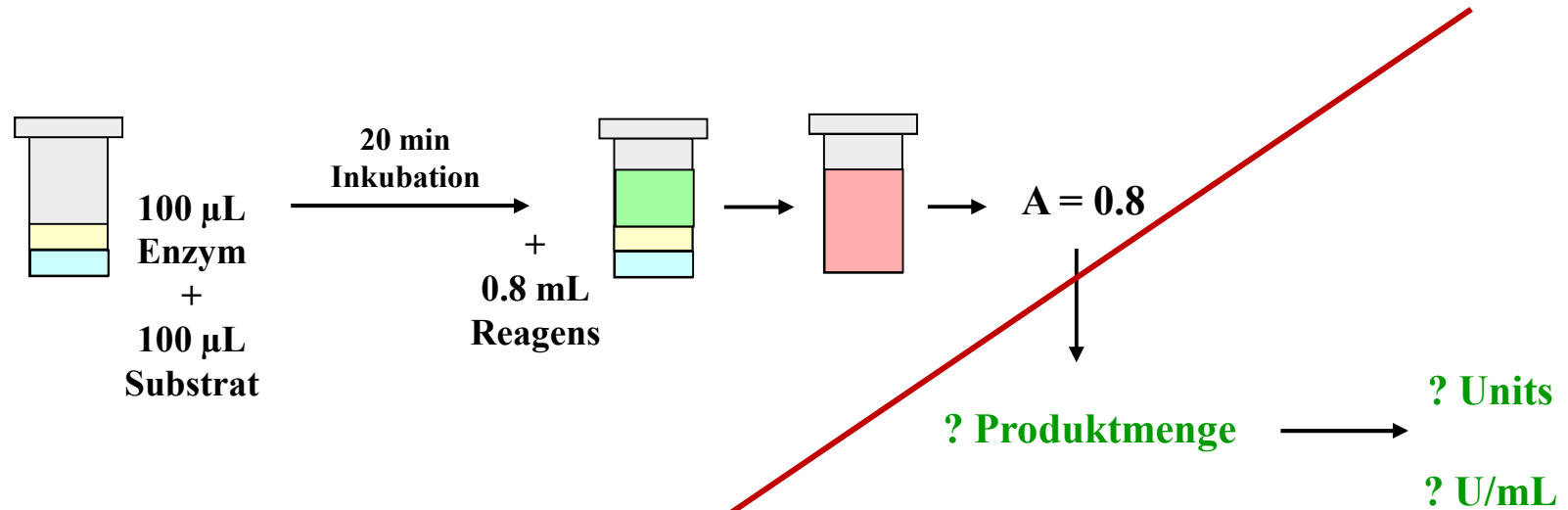
Auswertung der Messergebnisse für Enzymaktivität I



Produktmenge \longrightarrow Units



Berechnung der Enzymaktivität Ia



Was uns hier fehlt ist ein Bezug zwischen der Absorption und der Konzentration unseres Produktes, aus der wir dann die gebildete Produktmenge errechnen könnten.

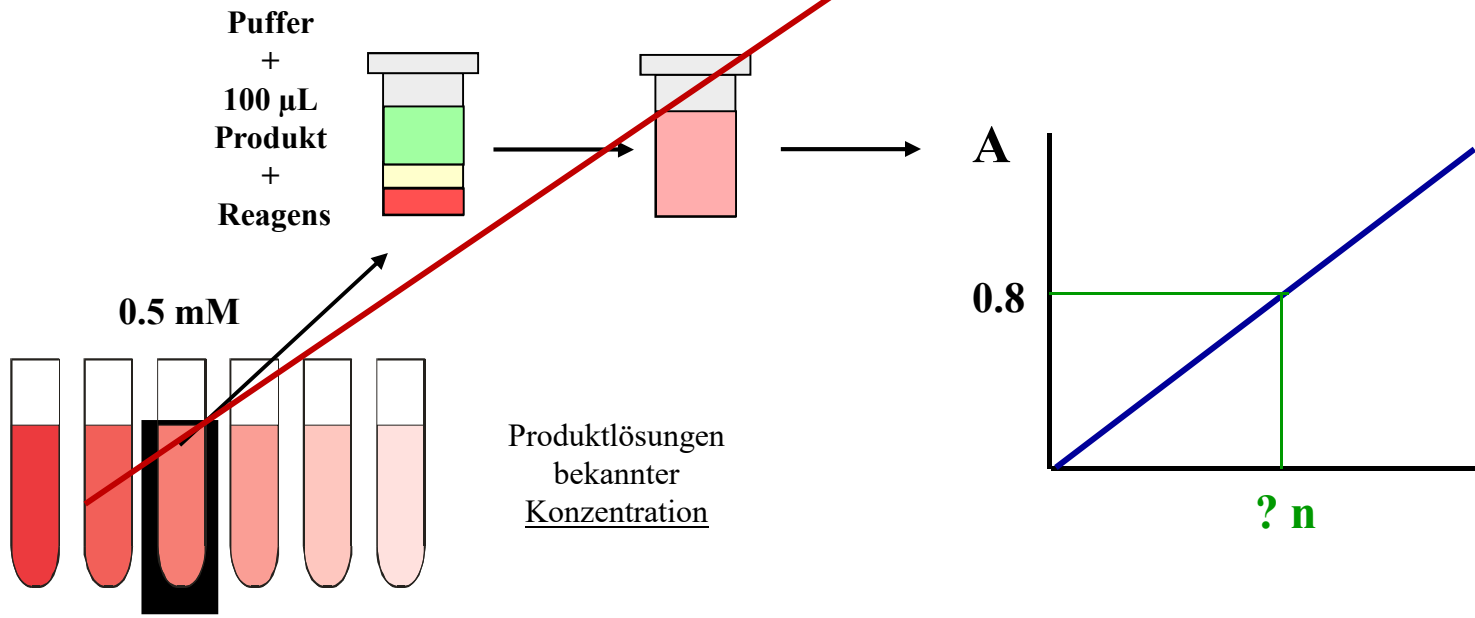
Diesen Bezug können wir durch Kalibration mit Produkt erhalten.

Berechnung der Enzymaktivität Ib

Zur Kalibration machen wir einen Pseudo-Enzymansatz, der

- 1) nicht inkubiert wird
- 2) kein Enzym, sondern nur leeren Puffer
- 3) dafür aber eine bekannte Menge des Produkts enthält.

Das Produkt können wir anstelle des Substrates zufügen.

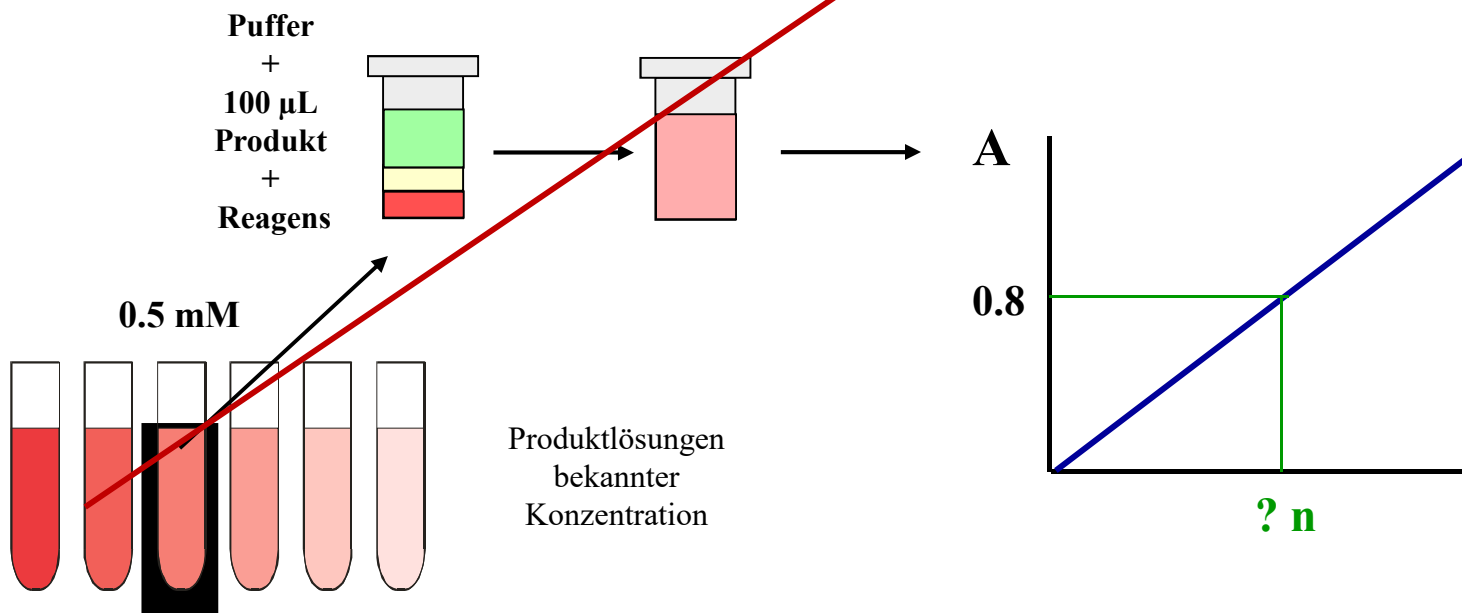


Berechnung der Enzymaktivität Ic

Zufällig stimmt ein Meßwert unserer Kalibrationsserie mit unserem Enzymansatz überein und wir können uns hier das Interpolieren bzw. die Verwendung einer Gleichung ersparen.

D.h. wenn wir für unsere Kalibration eine 0.5 mM Produktlösung einsetzen, erhalten wir ebenfalls eine $A = 0.8$.

Aber wieviel davon haben wir eingesetzt ?



Berechnung der Enzymaktivität Id

Richtig, 100 μL

Ausgehend von 0.5 mM, heisst: 1 L ... 0.5 mmol

können wir rechnen 1 mL ... 0.5 μmol = 500 nmol

und 0.1 mL .. 50 nmol

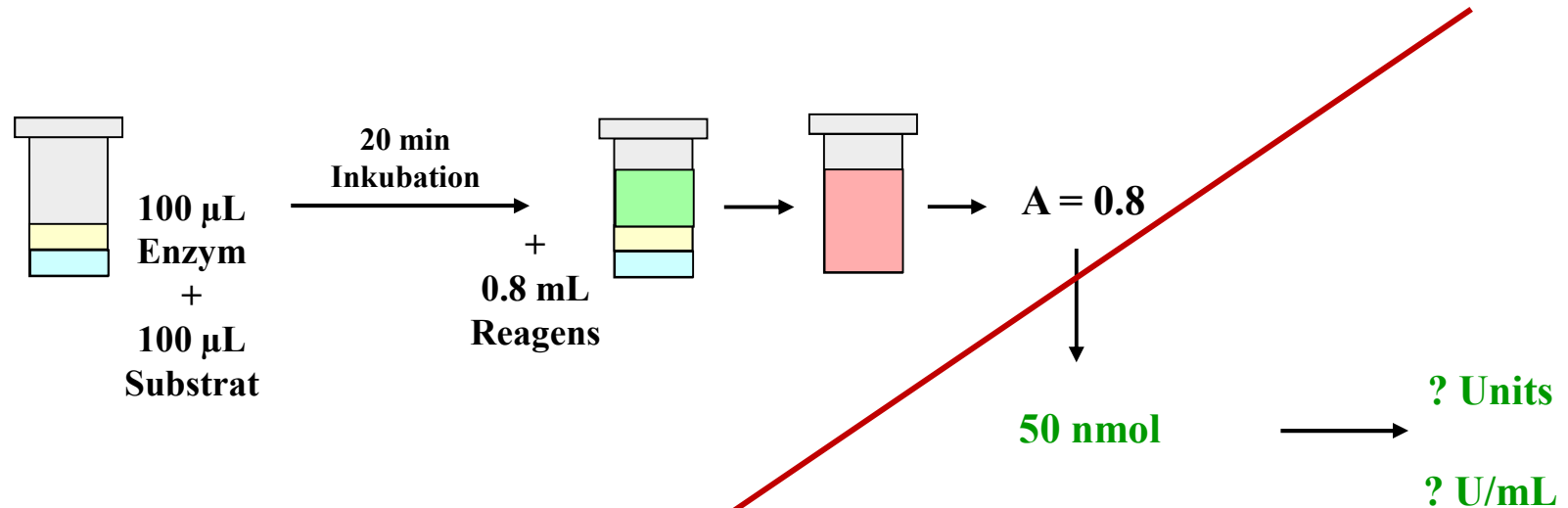
D.h. in unseren Kalibrationsansatz haben wir 50 nmol Produkt getan und eine Extinktion von 0.8 erhalten.

Im Enzymansatz haben wir ebenfalls eine Extinktion von 0.8 erhalten, d.h. unser Enzym hat 50 nmol gebildet.

Das hat es in 20 min getan, d.h. in 1 min sind jeweils 2.5 nmol Produkt entstanden.



Berechnung der Enzymaktivität Id



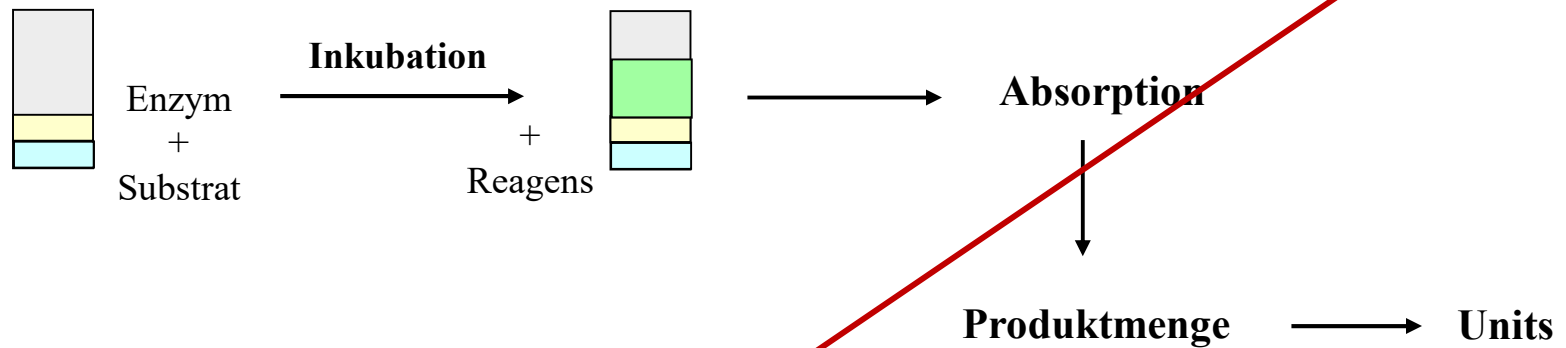
2.5 nmol Produkt pro min ausgedrückt in U sind 2.5 mU

Unser Ansatz enthielt 2.5 mU an Enzym.

Da wir 100 µL Enzymlösung eingesetzt haben, enthält 1 mL dieser Lösung das 10-fache, d.h. die Lösung hatte 25 mU/mL.

Jetzt ist Zeit, daran zu denken, ob die eingesetzte Lösung vielleicht schon eine Verdünnung war.

Auswertung der Meßergebnisse für Enzymaktivität II

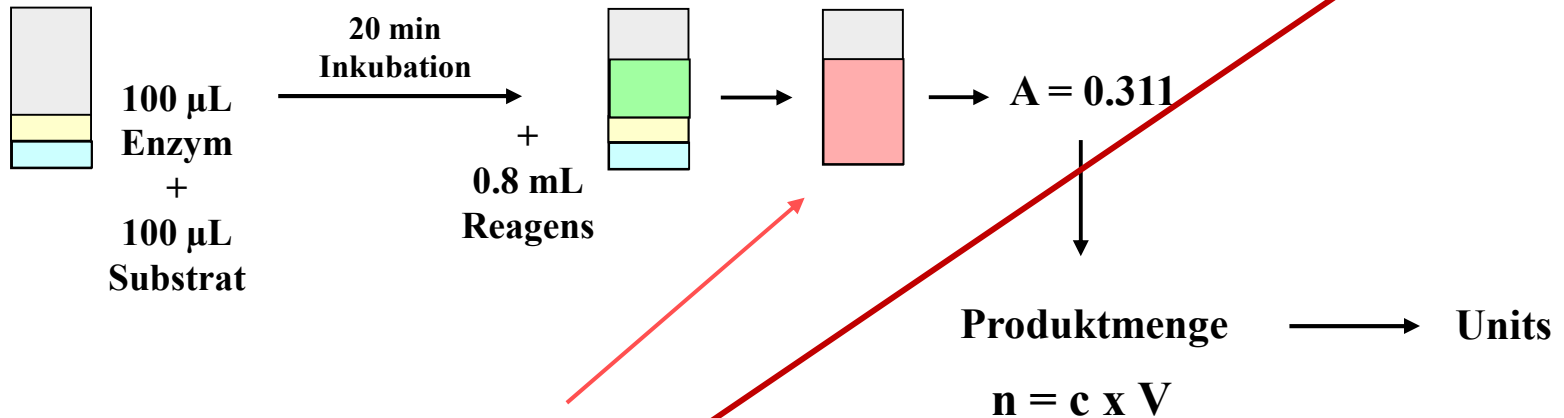


Molarer Extinktionskoeffizient ϵ

Lambert-Beer'sches Gesetz: $A = \epsilon \times c \times d$
(d fast immer 1 cm)

$$\epsilon = \frac{A}{c \times d} \quad (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$$

Berechnung der Enzymaktivität II



Beispiel NADH: $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$$\epsilon = \frac{A}{c \times d} \quad (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$$

bzw.:

1 M	6220
1 mM	6.22
0.1 mM	0.622

Frage:

- Wieviele U im Ansatz
- Wieviele U/mL, wenn Enzym 1 : 100 verdünnt war ?