

Biochemie I Enzymkinetik

Einleitung

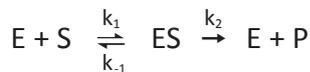
Enzymkinetik beschäftigt sich mit dem zeitlichen Ablauf Enzymkatalysierter Reaktionen.

Eckige Klammern um Substanznamen bezeichnen die Substanzkonzentration, z. B. [Glukose]: Glukosekonzentration, $[A]_0$: Konzentration von A zum Zeitpunkt 0

S: Substrat, P: Produkt, E: Enzym, ES: Enzymsubstratkomplex, I: Inhibitor, v : Substratumsatzrate, definiert als [P]-Zunahme über die Zeit.

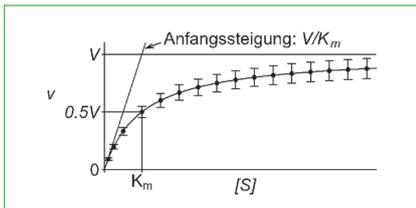
Die Michaelis-Menten-Gleichung

- meistgenutztes Modell in Enzymkinetik, anwendbar für komplexere Enzymmechanismen, teilweise nur unter bestimmten Bedingungen
- Modell zweistufiger Reaktion
 Schritt 1: Interaktion von E mit S zu ES
 Schritt 2: Zerfall des ES zu E und P, v -Bestimmung zu Reaktionsbeginn, da dann $[P] \approx 0 \rightarrow$ Rückreaktion und etwaige Produktinhibition vernachlässigbar



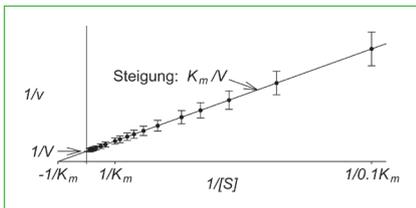
Die Gleichung lautet:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot k_A \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{k_{cat} + k_A \cdot [S]_0} = \frac{k_{cat} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} = \frac{V \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0}$$



Direkt-lineare Auftragung:

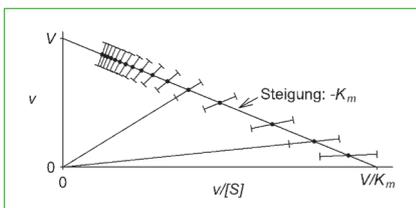
Anfangssteigung $V/K_m = k_A \cdot [E]_0 - v$ von Substratspezifität bestimmt (k_A)
 Hohe Substratkonzentration: $v \rightarrow V = k_{cat} \cdot [E]_0 - v$ von Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt (k_{cat})
 Nachteil: V und K_m können nur sehr ungenau abgelesen werden \rightarrow Linearisierte Auftragungen wurden entwickelt, z. B. Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee



Lineweaver-Burk-Auftragung:

Michaelis-Menten-Gleichung umgeformt zu: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]}$

Nachteil: Fehler für kleine v fallen stark ins Gewicht (alle Fehlerbalken entsprechen 15 % Messfehler), Möglichkeit Daten zu schönen \rightarrow von der Auftragung wird abgesehen.



Eadie-Hofstee-Auftragung:

Michaelis-Menten-Gleichung umgeformt zu: $v = V - K_m \cdot \frac{v}{[S]}$

Nachteil: Beide Koordinaten von v abhängig (\rightarrow Fehlerbalken Richtung Ursprung), Vorteile: Abweichungen sichtbar, gleichmäßige Messpunktverteilung leicht nachvollziehbar.

Was beeinflusst Substratumsatzraten?

- Temperatur (siehe RGT-Regel)
 - pH
 - Druck (in wässriger Lösung sehr geringer Effekt)
 - Konzentration der Reaktanden, des Enzyms, eventueller Inhibitoren
 - evtl. Inaktivierung des Enzyms (z.B. durch Alterung)
 - vieles mehr
- \rightarrow Diese Faktoren müssen bei Experimenten berücksichtigt werden!

Mit den Parametern:

k_{cat} katalytische Konstante, auch Wechselzahl genannt, Umsatz eines Enzyms an Substratmolekülen pro Zeiteinheit

k_A Spezifitätskonstante für Substrat A, Spezifität eines Enzyms zu Substrat A, es gilt: $\frac{v_B}{v_A} = \frac{k_B \cdot [B]}{k_A \cdot [A]}$

K_m Michaelis-Konstante, Substratkonzentration bei $\frac{1}{2} V$, Aussage über Enzymaffinität zu bestimmtem Substrat

V limitierende Rate, $V = k_{cat} \cdot [E]_0$, wenn $[E]_0$ nicht bekannt, häufig V_{max} oder V_m geschrieben (von „Maximalgeschwindigkeit“)

Biochemie I Enzymkinetik

Enzyminhibition

Enzyme können inhibiert werden. Dabei unterscheidet man zwischen irreversibler (also dauerhafter) und reversibler Inhibition. Ein Beispiel für die irreversible Inhibition eines Enzyms ist die Wirkung des Penicillins bei der Inhibition der Bakterienzellwandsynthese. Reversible Inhibitoren dissoziieren von den jeweiligen Enzymen und können diese auf verschiedene Arten und Weisen beeinflussen.

Kompetitive Inhibition → „spezifische“ Inhibition

k_A wird herabgesetzt zu scheinbarem (apparentem) k_{A-app} , Inhibitorstärke gegeben durch Inhibitorkonstante K_{iC}

$$k_{A-app} = \frac{k_A}{1 + \frac{i}{K_{iC}}}$$

$V/K_{m-app} = k_{A-app}[E]_0$ herabgesetzt
 $K_{m-app} = k_{cat} / k_{A-app}$ heraufgesetzt
 $V = k_{cat}[E]_0$ konstant, wird allerdings erst bei höheren Substratkonzentrationen erreicht

Im einfachsten Fall Inhibitor, der ausschließlich an E, aber nicht an ES binden kann – also beispielsweise mit S um Substratbindetasche konkurriert.

Unkompetitive Inhibition → „katalytische“ Inhibition

k_{cat} wird herabgesetzt zu $k_{cat-app}$, Inhibitorstärke gegeben durch Inhibitorkonstante K_{iU}

$$k_{cat-app} = \frac{k_{cat}}{1 + \frac{i}{K_{iU}}}$$

$V_{app} = k_{cat-app}[E]_0$ und $K_{m-app} = k_{cat-app}/k_A$ herabgesetzt
 $V_{app}/K_{m-app} = k_A[E]_0$ nicht beeinflusst

Im einfachsten Fall Inhibitor, der ausschließlich an ES, aber nicht an E allein binden kann.

Gemischte Inhibition

k_{cat} und k_A werden herabgesetzt

$V_{app} = k_{cat-app}[E]_0$ und $V_{app}/K_{m-app} = k_A[E]_0$ herabgesetzt
 $K_{m-app} = k_{cat-app}/k_{A-app}$ wird, je nach dem Verhältnis von K_{iC} zu K_{iU} , herauf- oder herabgesetzt

Möglicher Mechanismus: I kann E und ES binden

Sonderfall: nicht-kompetitive Inhibition mit $K_{iC} = K_{iU}$, k_{cat} und k_A um gleichen Faktor beeinflusst → $V_{app} = k_{cat-app}[E]_0$ und $V_{app}/K_{m-app} = k_{A-app}[E]_0$ herabgesetzt
 $K_{m-app} = k_{cat-app}/k_{A-app}$ bleibt konstant.

Gleicher Effekt durch niedrigeres $[E]_0$, beispielsweise durch Zerstörung eines Teils der Enzyme. Echte nicht-kompetitive Inhibition ist selten.

