

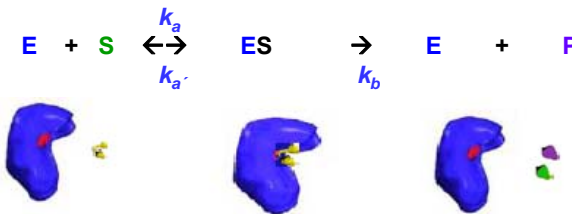
Aufnahme- und Enzymkinetik

- **Kinetik** = Verlauf einer Reaktion unter verschiedenen Bedingungen
- Alle enzym-katalysierten Reaktionen unterliegen Geschwindigkeitsgesetzen
- → **Carrier = Enzyme**
 - Enzyme sind *Biokatalysatoren*

Allgemeine Eigenschaften von Carriern

- **Transport ist sowohl passiv als auch aktiv möglich**
- Die Transportkinetik unterliegt der **Michaelis-Menten-Gleichung**.
- **Umsatzraten** limitiert durch:
 - Affinität zwischen Substrat und Carrier
 - und die Anzahl der Carriermoleküle.
- Der Carriertransport ist **hemmbar**
 - **kompetitiv** und
 - **nicht-kompetitiv**.
- Nach der Anzahl der transportierten Teilchen ist der Transport einteilbar in:
 - **Monoport** (ein Substratmolekül)
 - **Multiport** (zwei oder mehr Substratmoleküle).

Michaelis-Menten-Kinetik



- **E:** Enzym (Carrier)
- **S:** Substrat (Nährstoff)
- **ES:** Vorübergehende Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes
- **P:** Produkt (transportierter Nährstoff)

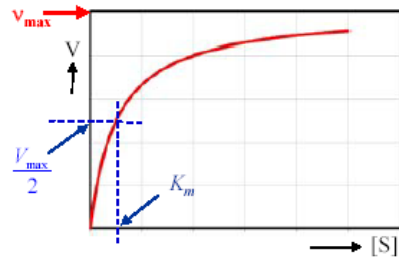
Michaelis-Menten-Konstante K_m
= ist jene Konz.:

bei der
die eine Hälfte des Enzyms als **ES**,
die andere Hälfte als freies **E** vorliegt:

$$K_m = (k_{-a} + k_b) / K_a$$

K_m : Die Michaelis-Menten Konstante

- Die **Geschwindigkeit der Reaktion**
 - Steigt anfangs schnell an und
 - nähert sich mit steigender Konz. [S] asymptotisch dem v_{\max} -Wert
- K_m und v_{\max} **ermitteln:**
 - durch Variation der Konz. [S]
- K_m = **Konstante**
 - an jenem Punkt, an dem die eine Hälfte des Enzyms als ES, die andere Hälfte als E vorliegt.
- $\rightarrow K_m = [S]$ bei halb-maximaler v

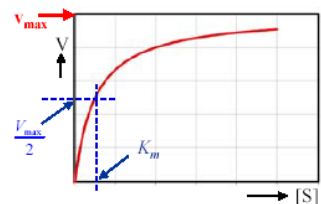


$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

[S] = Substrat-Konzentration
 [P] = Produkt-Konzentration
 = transportierter Nährstoff
 t = Zeit

Die Michaelis-Konstante K_m

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$



- K_m hat die Dimension einer Konzentration [mol/liter]
- K_m ist jene Substrat-Konz., bei der $v = v_{\max} / 2$ ist.
- Wenn ein Enzym mehrere Substrate umsetzt,
 - dann sind die K_m -Werte für die einzelnen Substrate i. d. R. unterschiedlich
- Typische K_m Werte liegen bei 10^{-1} bis 10^{-7} M

K_m [mol/l] = Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat

- K_m = *klein*: zur Halbsättigung des Enzyms ist geringe Substratkonzentration nötig;
 - \rightarrow das Enzym hat starke Affinität zum Substrat
- K_m = *groß*: zur Halbsättigung des Enzyms ist eine hohe Substratkonzentration nötig;
 - \rightarrow das Enzym hat geringe Affinität zum Substrat

Analogie der K_m -Kinetik bei der Stoff-Aufnahme

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

- Aufnahmegeschwindigkeit = Influx für das Teilchen $n = I_n$

$$v = I_n$$

$$v = \frac{I_{\max} \cdot [C_L - C_{L \min}]}{K_m + C_L - C_{L \min}}$$

wobei $[C_L - C_{L \min}] = \text{Substrat } [S]$

□ = Differenz zwischen:

aktuelle Konz. des Ions in der Lösung und

□ minimaler Konz. des Ions in der Lösung

- Wir bleiben zur Vereinfachung bei $[S]$

Michaelis-Konstanten K_m

Je kleiner K_m
desto affiner ES !

Z. Bsp.:

K^+ Ionenaufnahme

0,02 mmol / L

K Aufnahme
10x stärker als NO_3^-

NO_3^- Ionenaufnahme

0,21 mmol / L

$H_2PO_4^-$ Ionenaufnahme

0,0061 mmol / L

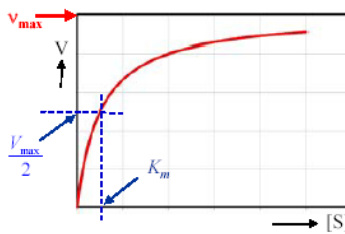
PEP Carboxylase v. C4 Pfl .

$[CO_2]$ -Aufnahme ca. 0,007 mmol / L

PEP Carboxylase
2x stärker als RuBisCo

RuBisCarboxylase v. C3 Pfl.

$[CO_2]$ -Aufnahme ca. 0,015 mmol / L

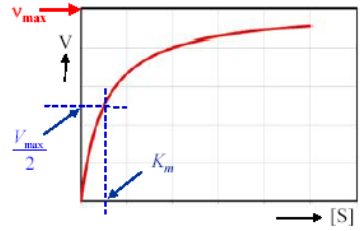


Warum die Lineweaver-Burk-Transformation?

- Problem bei der Michaelis-Menten-Gleichung:

- hyperbolische Kurve → V_{max} erst bei hohen [S]

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$



- Lösung:

- Umformung der Gleichung: Kehrwert-Bildung



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

$$y = k * x + d$$

Lineweaver-Burk-Transformation

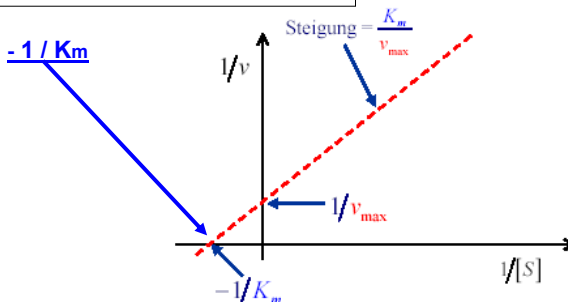
$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{max} [S]} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Eine Auftragung von $1/v$ gegen $1/[S]$ liefert also eine Gerade mit der Steigung: $\frac{K_m}{v_{max}}$

und dem Ordinatenabschnitt: $\frac{1}{v_{max}}$

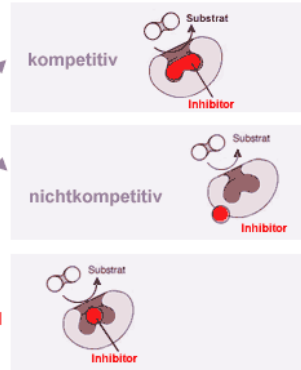
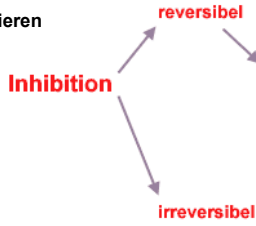
und dem Abszissenabschnitt: $-\frac{1}{K_m}$

$$y = k * x + d$$



Hemmung der Carrier- und Enzymaktivität

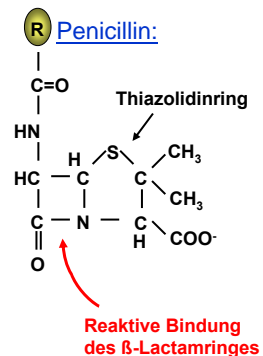
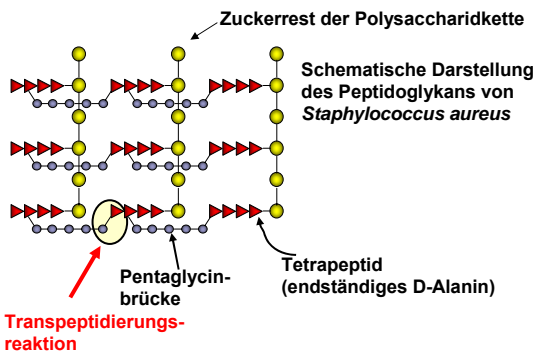
- Inhibition ist ein wichtiger Regulations-Mechanismus der Pflanze
- Inhibition durch Substanzen, die die Aktivität eines Enzyms / Carriers reduzieren
- Die Enzymaktivität eines Organismus kann beeinflusst werden
 - eigene oder
 - fremde Metaboliten
- Viele Pharmazeutika bestehen aus Enzym-Inhibitoren
- Beeinflussung der Enzym-Aktivität, indem der Inhibitor anstelle des Substrats an das Enzym bindet, jedoch nicht reagiert



- **A) irreversible Hemmung**
 - Inhibitor geht stabile Interaktion mit dem Enzym ein,
 - dissoziiert nur sehr langsam ab (z. T. kovalent gebunden)
 - **Beispiel:** Schwermetalle
 - → Extremfall: Denaturierung der Proteine

Irreversible Inhibition – Beispiel Antibiotika-Resistenz

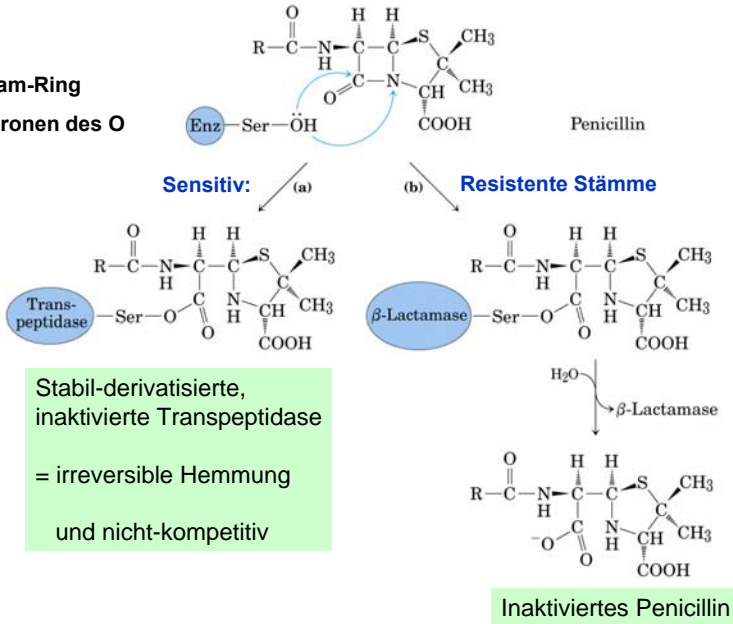
- Enzym wandelt Inhibitor in eine reaktive Form um:
 - → irreversible Bindung ans Enzym
 - Beispiele:
 - Nukleotid-Synthese: 5-Fluoruracil hemmt die Thymidylat-Synthase
 - Penicillin hemmt die Glykopeptid-Transpeptidase:
 - Blockade d. Quer-Vernetzung der Peptid-Glykan-Stränge der Bakterien-Zellwand



Mögliche Antwort der MO's auf Penicillin

□ β -Lactam-Ring

Ö = 2 Elektronen des O



B: Reversible Hemmung

■ Kompetitive Inhibitoren:

- kompetieren mit Substrat um Bindung am aktiven Zentrum
- Durch hohe [S] überwindbar

→ K_m erhöht,
aber v_{max} bleibt gleich

- v.a. Substrat-Analoga
 - Bsp.: Nikotin an AcetylCholin-Rezeptoren

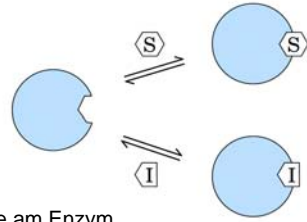
■ Nicht-kompetitive Hemmung:

- Inhibitor und Substrat können gleichzeitig gebunden werden
- Inhibitor vermindert die katalytische Aktivität des Enzyms

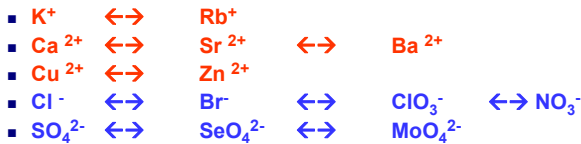
→ K_m bleibt gleich,
aber v_{max} reduziert

- Beispiel Düngung:
 - Urease Inhibitoren: Phosphorsäure-Diamide
 - Nitrifikationshemmer: z.B. „Didin“
- Metall-Ionen-Chelator (EDTA)

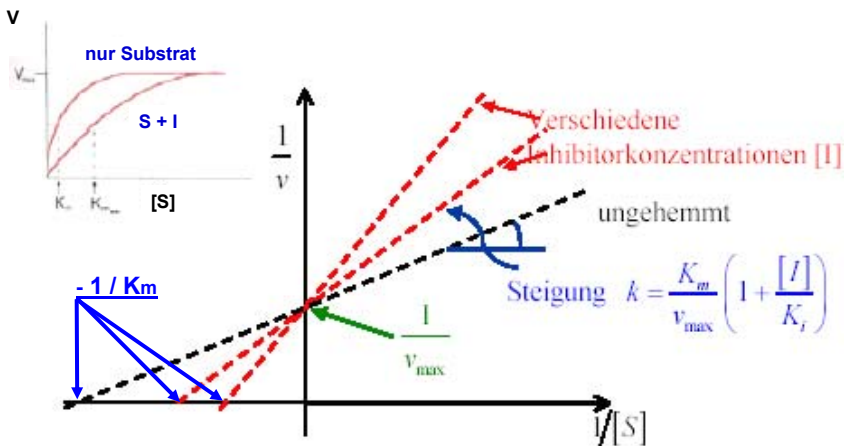
Kompetitive Inhibition an Carriern



- **Kompetitiver Inhibitor** = Strukturell ähnlich dem Substrat
 - konkurriert mit Substrat um katalytische Bindungsstelle am Enzym
- **Beispiele:**
 - **Nikotin** vs. Acetylcholin
 - **Succinat-DH** = Enzym des Citronensäure-Cyclus: **Succinat** → **Fumarat**
 - **Malonat** (strukturell ähnlich) kann die Dehydrogenase hemmen.
 - **Carrier-Transport:** Konkurrierende Nährstoff-Ionen:
Gegenseitige Hemmung bei der Ionen-Aufnahme an den Membranen:



Kinetik bei kompetitiver Inhibition

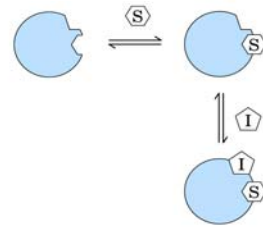


- Variable Inhibitor-Konzentrationen
- Kompetitiver Inhibitor erniedrigt die Konzentration des freien Enzyms, welches für die Substrat-Bindung verfügbar ist.
- **K_m erscheint größer!** (da nur die Reaktion mit dem Substrat [S] dargestellt ist, aber in Bezug auf die Gesamt-Reaktion mit [S+I] ist K_m gleichgroß)

Nicht-kompetitive Hemmung

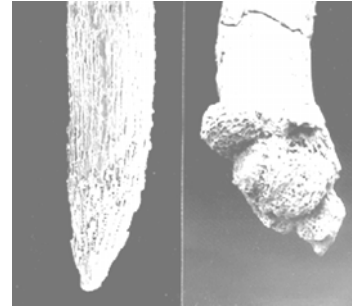
Inhibitor bindet an Enzym

- Inhibitor hat keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat
- bindet an 'falsche', unspezifische Stelle am Enzym
- Oft irreversible Hemmung:
- Inhibitor geht stabile Interaktion mit dem Enzym ein,
 - dissoziiert nur sehr langsam ab
 - z. T. kovalent gebunden

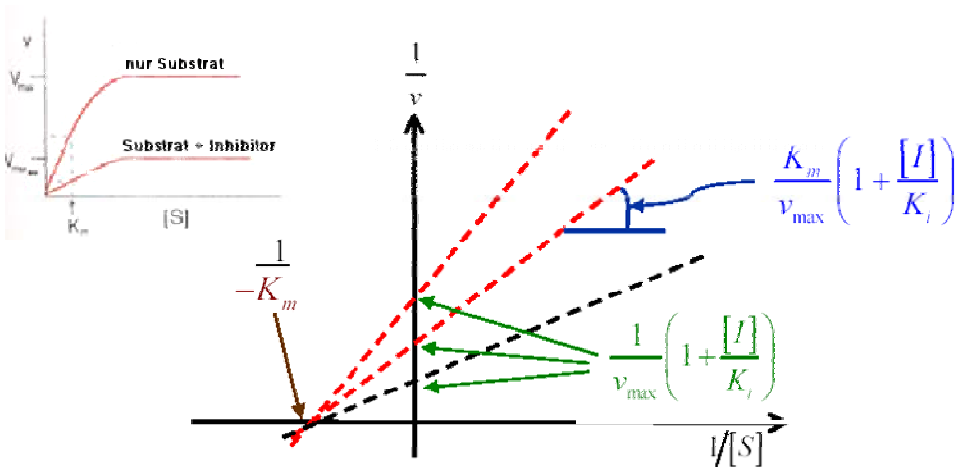


Beispiele:

- Z.B: Schwermetall-Ionen (Al, Pb, Hg, Cu, ..)
 - reagieren mit SH-(=Sulphydryl)-Gruppen
 - Blei-Vergiftung → Anämie
 - Hämsynthese wird in 2 Schritten inhibiert:
 - Porphobilinogen und Ferrochelatase enthalten -SH-Gruppen
 - reagieren auch mit Gruppen, die O und N enthalten:
 - -OH,
 - -COOH,
 - -C=O,
 - -NH₂, -NH
- Z.B: EDTA inhibiert Enzyme, die als Co-Faktoren Metall-Ionen benötigen
- Z.B: Cyanide bilden Komplexe mit katalytisch wirksamen Metall-Ionen
 - → unterbinden wichtige Enzymfunktionen (Enzymgifte).



Nichtkompetitive Hemmung

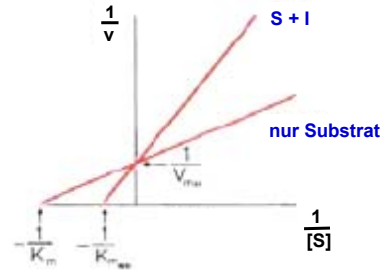
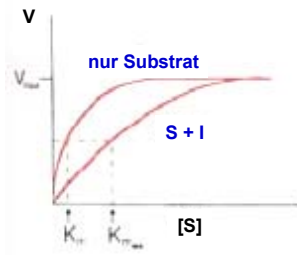


- K_m bleibt unverändert
- V_{max} wird kleiner (mit steigender Inhibitor-Konzentration $[I]$)
- → $1/V_{max}$ wird größer

Zusammenfassung der Michaelis-Menten-Kinetik mit Hemmstoffen

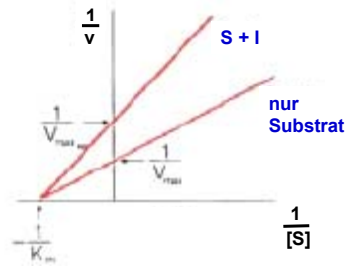
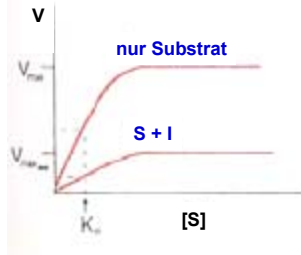
- Kompetitiv

- $V_{max} =$
- $K_m >$



- Nicht-kompetitiv

- $V_{max} <$
- $K_m =$

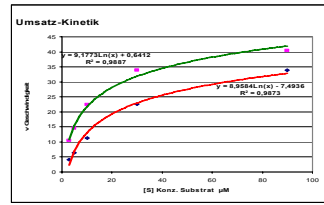


■

Beispiel-Rechnung zur Carrier-Kinetik **Rechnen in Gruppen**

- Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms in Abhängigkeit der Substratkonzentration und der An- bzw. Abwesenheit eines Hemmstoffs, ergibt folgende Werte:

S (µM)	V (µmol / min)	
	Ohne Hemmstoff	Mit Hemmstoff
3,0	10,4	4,1
5,0	14,5	6,4
10	22,5	11,3
30	33,8	22,6
90	40,5	33,8

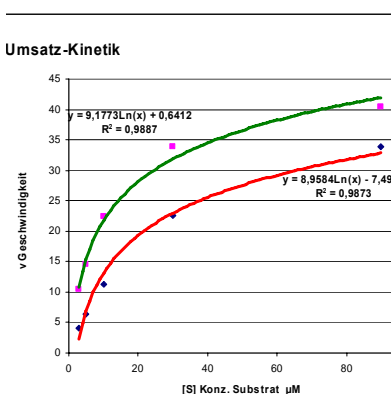


- Lineweaver-Burk-Transformation ergibt folgende Werte: $1/S$ (µM) $1/V$ (µmol / min):

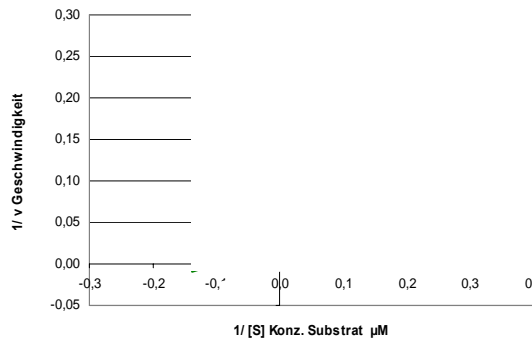
$1/S$ (µM)	$1/V$ (µmol / min)	
	Ohne Hemmstoff	Mit Hemmstoff
0,33	0,096	
0,2	0,069	
0,1	0,044	
0,033	0,03	
0,011	0,025	

- Erstellen Sie die entsprechenden Lineweaver-Burk-Diagramme und ermitteln Sie graphisch die K_m Konstante und die V_{max} Werte für beide Versuchsbedingungen.
- Was liegt vor? Kompetitive oder Nicht- Kompetitive oder gemischte Hemmung?

Diagramme zur K_m und v_{max}



Lineweaver Burk Transformation



- Nach Kehrwertbildung:
Graphische Ermittlung der Michaelis Konstanten:

- Ohne Hemmung: $K_m = -1 / -0,1 = 10 \mu M$
- Mit Hemmung: $K_m =$