

Hans Bisswanger

Enzymkinetik

Theorie und Methoden

3., völlig neu bearbeitete Auflage

WILEY-VCH

Weinheim • New York • Chichester • Brisbane • Singapore • Toronto

Inhalt

Symbole und Abkürzungen XIII

Einleitung 1

1 Multiple Gleichgewichte 5

- 1.1 Diffusion 5
- 1.2 Wechselwirkung von Liganden mit Makromolekülen 10
 - 1.2.1 Bindungskonstanten 10
 - 1.2.2 Herleitung der Bindungsgleichung 11
- 1.3 Makromoleküle mit identischen, unabhängigen Bindungsstellen 12
 - 1.3.1 Allgemeine Bindungsgleichung 12
 - 1.3.2 Graphische Darstellungen der allgemeinen Bindungsgleichung 18
 - 1.3.2.1 Direkte Auswertung 18
 - 1.3.2.2 Auswertung von Bindungskurven aus optischen Titrationsverfahren 20
 - 1.3.3 Bindung verschiedener Liganden, Konkurrenz 23
- 1.4 Makromoleküle mit nicht-identischen, unabhängigen Bindungsstellen 27
- 1.5 Makromoleküle mit identischen, sich beeinflussenden Bindungsstellen, Kooperativität 30
 - 1.5.1 Hill-Gleichung 30
 - 1.5.2 Adair-Gleichung 32
 - 1.5.3 Paulingsches Modell 33
 - 1.5.4 Allosterische Enzyme 34
 - 1.5.5 Symmetrie-Modell 34
 - 1.5.6 Sequenz-Modell und negative Kooperativität 39
 - 1.5.7 Physiologische Aspekte der Kooperativität 43
 - 1.5.8 Nachweis der Kooperativität 46
 - 1.5.9 Beispiele allosterischer Enzyme 48
 - 1.5.9.1 Hämoglobin 48
 - 1.5.9.2 Aspartat-Transcarbamylase 49
 - 1.5.9.3 Aspartokinase 49
 - 1.5.9.4 Andere Beispiele 50
- 1.6 Nicht-identische, sich beeinflussende Bindungsstellen 51
- 1.7 Literatur 51

2 Enzymkinetik 53

- 2.1 Reaktionsordnung 53
 - 2.1.1 Reaktionen erster Ordnung 53

2.1.2	Reaktionen zweiter Ordnung	55
2.1.3	Reaktionen nullter Ordnung	56
2.2	Steady-State-Kinetik und Michaelis-Menten-Gleichung	57
2.2.1	Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung	57
2.3	Auswertung enzymkinetischer Daten	60
2.3.	Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung	60
2.3. .1	Nicht-lineare Darstellungen	60
2.3. .2	Direkt-lineare Diagramme	66
2.3. .3	Linearisierungsverfahren	68
2.3. .4	Graphische Auswertung von Zeit-Umsatz-Kurven	71
2.3. .5	Integrierte Michaelis-Menten-Gleichung	71
2.3.2	Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit	74
2.3.2.1	Experimentelle Bestimmung	74
2.3.2.2	Graphische Verfahren	75
2.4	Reversible Enzymreaktionen	78
2.4.1	Geschwindigkeitsgleichung für reversible Enzymreaktionen	78
2.4.2	Haldane-Beziehung	80
2.4.3	Produkthemmung	81
2.5	Enzymhemmung	84
2.5.1	Reversible Enzymhemmung	84
2.5.1.1	Allgemeine Geschwindigkeitsgleichung	84
2.5.1.2	Nicht-kompetitive Hemmung, graphische Darstellung von Hemmdaten	87
2.5.1.3	Kompetitive Hemmung	94
2.5.1.4	Unkompetitive Hemmung	97
2.5.1.5	Partielle Hemm-Mechanismen, partiell nicht-kompetitive Hemmung	99
2.5.1.6	Partiell unkompetitive Hemmung	101
2.5.1.7	Partiell kompetitive Hemmung	102
2.5.1.8	Nicht-und unkompetitive Produkthemmung	105
2.5.1.9	Substrathemmung	106
2.5.2	Irreversible Enzymhemmung	108
2.5.2.1	Unterscheidung reversibler und irreversibler Hemmstoffe	108
2.5.2.2	Charakterisierung irreversibler Hemmungen	109
2.5.3	Enzymreaktionen mit zwei konkurrierenden Substraten	111
2.6	Mehrsubstrat-Reaktionen	113
2.6.1	Nomenklatur	113
2.6.2	/?and«m-Mechanismus (Zufalls-Mechanismus)	114
2.6.3	CWered-Mechanismus (geordneter Mechanismus)	118
2.6.4	<i>Ping-Pong-Mech-dmsmus</i>	121
2.6.5	Haldane-Beziehungen bei Mehrsubstrat-Reaktionen	123
2.6.6	Mechanismen mit mehr als zwei Substraten	124
2.6.7	Andere Schreibweisen für Mehrsubstratreaktionen	126
2.7	Herleitung von Geschwindigkeitsgleichungen komplexer Enzymmechanismen	126
2.7.1	King-Altman-Verfahren	126
2.7.2	Vereinfachtes Verfahren nach der Graphentheorie	132

2.7.3	Kombination von Gleichgewichts- und Steady-State-Annahmen	133
2.8	Kinetische Behandlung allosterischer Enzyme	135
2.8.1	Hysteretische Enzyme	135
2.8.2	Kinetische Kooperativität, Slow-Transition-Modell	137
2.9	Spezielle Enzym-Mechanismen	138
2.9.1	Kinetik immobilisierter Enzyme	138
2.9.1.1	Externe Diffusionslimitierung	140
2.9.1.2	Interne Diffusionslimitierung	142
2.9.1.3	Hemmung immobilisierter Enzyme	144
2.9.1.4	pH- und Temperaturverhalten immobilisierter Enzyme	144
2.9.2	Polymere Substrate	145
2.10	pH- und Temperaturverhalten von Enzymen	146
2.10.1	pH-Optimumskurve und Bestimmung von pK-Werten	146
2.10.2	pH-Stabilität von Enzymen	148
2.10.3	Thermische Stabilität von Enzymen	149
2.10.4	Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen	150
2.11	Isotopenaustausch	153
2.11.1	Isotopenaustauschkinetik	153
2.11.2	Isotopeneffekte	157
2.11.2.1	Primäre kinetische Isotopeneffekte	157
2.11.2.2	Einfluß des kinetischen Isotopeneffekts auf K_m und V	158
2.11.2.3	Andere Isotopeneffekte	160
2.12	Anwendung statistischer Methoden in der Enzymkinetik	160
2.12.1	Allgemeine Bemerkungen	160
2.12.2	In der Enzymkinetik gebräuchliche statistische Begriffe	164
2.13	Literatur	166

3 Methoden 169

3.1	Methoden zur Bestimmung multipler Gleichgewichte	169
3.1.1	Gleichgewichtsdialyse und allgemeine Aspekte von Bindungsmessungen	171
3.1.1.1	Prinzip der Gleichgewichtsdialyse	171
3.1.1.2	Kontrollexperimente und Fehlerquellen	173
3.1.2	Kontinuierliche Gleichgewichtsdialyse	177
3.1.3	Ultrafiltration	179
3.1.4	Gelfiltration	181
3.1.4.1	Batchverfahren	181
3.1.4.2	Elution breiter Zonen	182
3.1.4.3	Verfahren nach Hummel und Dreyer	182
3.1.4.4	Verfahren nach Brumbaugh und Ackers	183
3.1.5	Ultrazentrifugationsmethoden	184
3.1.5.1	Einfache Ultrazentrifugation	184
3.1.5.2	Zentrifugationsmethode von Chanutin <i>et cd.</i> (1942)	184
3.1.5.3	Rohrzuckergradientenzentrifugation nach Draper und Hippel	186
3.2	Elektrochemische Methoden	189

XII *Inhalt*

3.2.1	Sauerstoffelektrode	190
3.2.2	CO ₂ -Elektrode	192
3.2.3	Potentiometrie, Oxidations-Reduktions-Potentiale	193
3.2.4	pH-Stat	193
3.2.5	Polarographie	195
3.3	Kalorimetrie	196
3.4	Spektroskopische Methoden	197
3.4.1	Absorptionsspektroskopie	200
3.4.1.1	Lambert-Beersches Gesetz	200
3.4.1.2	Spektrale Eigenschaften von Enzymen und Liganden	200
3.4.1.3	Aufbau von Spektralphotometern	204
3.4.1.4	Doppelstrahl-Spektralphotometer	207
3.4.1.5	Differenzspektroskopie	208
3.4.1.6	Doppelwellenlängen-Spektralphotometer	210
3.4.1.7	Photochemische Aktionsspektren	211
3.4.2	Biolumineszenz	212
3.4.3	Fluoreszenz	212
3.4.3.1	Quantenausbeute	212
3.4.3.2	Störungen von Fluoreszenzmessungen	213
3.4.3.3	Fluoreszierende Verbindungen (Fluorophore)	214
3.4.3.4	Aufbau von Spektralfluorimetern	218
3.4.3.5	Strahlungslose Energieübertragung	219
3.4.3.6	Fluoreszenzpolarisation	221
3.4.3.7	Pulsfluorimetrie	223
3.4.4	Circulardichroismus und optische Rotationsdispersion	224
3.4.5	Infrarot- und Raman-Spektroskopie	230
3.4.5.1	IR-Spektroskopie	230
3.4.5.2	Raman-Spektroskopie	230
3.4.5.3	Anwendungen	231
3.4.6	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	232
3.5	Messung schneller Reaktionen	234
3.5.	Flußmethoden	236
3.5. .1	Continuous-Flow-Methode	236
3.5. .2	Stopped-Flow-Methode	238
3.5. .3	Messung von Enzymreaktionen durch Flußmethoden	242
3.5. .4	Bestimmung der Totzeit	243
3.5.2	Relaxationsmethoden	244
3.5.2.1	Temperatursprung-Methode	245
3.5.2.2	Drucksprung-Methode	248
3.5.2.3	Feldsprung-Methode	250
3.5.3	Flash-Photolyse, Pico- und Femtosekunden-Spektroskopie	250
3.5.4	Auswertung schneller kinetischer Reaktionen (Transient-Kinetik)	252
3.6	Literatur	256