

Hans Bisswanger

# Enzymkinetik

Theorie und Methoden

2., völlig neu bearbeitete Auflage

Bibliothek Fachbereich Chemie  
Technische Universität Darmstadt



Weinheim · New York  
Basel · Cambridge · Tokyo

Inventar Nr. OC / M901

# Inhalt

**Vorwort** VII

**Symbole und Abkürzungen** XIII

**Einleitung** 1

- 1 Multiple Gleichgewichte** 5
  - 1.1 Diffusion 6
  - 1.2 Wechselwirkung von Liganden mit Makromolekülen 11
    - 1.2.1 Bindungskonstanten 11
    - 1.2.2 Herleitung der Bindungsgleichung 12
  - 1.3 Makromoleküle mit identischen, unabhängigen Bindungsstellen 13
    - 1.3.1 Allgemeine Bindungsgleichung 13
    - 1.3.2 Graphische Darstellungen der allgemeinen Bindungsgleichung 19
      - 1.3.2.1 Direkte Auswertung 19
      - 1.3.2.2 Auswertung von Bindungskurven aus optischen Titrationsverfahren 22
    - 1.3.3 Bindung verschiedener Liganden, Konkurrenz 26
  - 1.4 Makromoleküle mit nicht-identischen, unabhängigen Bindungsstellen 31
  - 1.5 Makromoleküle mit identischen, sich beeinflussenden Bindungsstellen, Kooperativität 34
    - 1.5.1 Hill-Gleichung 34
    - 1.5.2 Adair-Gleichung 36
    - 1.5.3 Paulingsches Modell 38
    - 1.5.4 Allosterische Enzyme 38
    - 1.5.5 Symmetrie-Modell 39
    - 1.5.6 Sequenz-Modell und negative Kooperativität 44
    - 1.5.7 Physiologische Aspekte der Kooperativität 50
    - 1.5.8 Nachweis der Kooperativität 53
    - 1.5.9 Beispiele allosterischer Enzyme 55
      - 1.5.9.1 Hämoglobin 55
      - 1.5.9.2 Aspartat-Transcarbamylase 56
      - 1.5.9.3 Aspartokinase 57
      - 1.5.9.4 Andere Beispiele 58
  - 1.6 Nicht-identische, sich beeinflussende Bindungsstellen 59
  - 1.7 Literatur 60
- 2 Enzymkinetik** 63
  - 2.1 Reaktionsordnung 63
    - 2.1.1 Reaktionen erster Ordnung 64

- 2.1.2 Reaktionen zweiter Ordnung 65
- 2.1.3 Reaktionen nullter Ordnung 66
- 2.2 Steady-State-Kinetik und Michaelis-Menten-Gleichung 67
- 2.3 Auswertung enzymkinetischer Daten 71
- 2.3.1 Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung 71
- 2.3.1.1 Nicht-lineare Darstellungen 71
- 2.3.1.2 Direkt-lineare Diagramme 78
- 2.3.1.3 Linearisierungsverfahren 80
- 2.3.1.4 Graphische Auswertung von Zeit-Umsatz-Kurven 83
- 2.3.1.5 Integrierte Michaelis-Menten-Gleichung 84
- 2.3.2 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit 86
- 2.3.2.1 Experimentelle Bestimmung 86
- 2.3.2.2 Graphische Verfahren 89
- 2.4 Reversible Enzymreaktionen 92
- 2.4.1 Geschwindigkeitsgleichung für reversible Enzymreaktionen 92
- 2.4.2 Haldane-Beziehung 94
- 2.4.3 Produkthemmung 95
- 2.5 Enzymhemmung 98
- 2.5.1 Reversible Enzymhemmung 99
- 2.5.1.1 Allgemeine Geschwindigkeitsgleichung 99
- 2.5.1.2 Nicht-kompetitive Hemmung, Graphische Darstellung von Hemmdaten 102
- 2.5.1.3 Kompetitive Hemmung 109
- 2.5.1.4 Unkompetitive Hemmung 113
- 2.5.1.5 Partiiell nicht-kompetitive Hemmung 114
- 2.5.1.6 Partiiell unkompetitive Hemmung 116
- 2.5.1.7 Partiiell kompetitive Hemmung 119
- 2.5.1.8 Nicht- und unkompetitive Produkthemmung 121
- 2.5.1.9 Substrathemmung 123
- 2.5.2 Irreversible Enzymhemmung 125
- 2.5.2.1 Unterscheidung reversibler und irreversibler Hemmstoffe 125
- 2.5.2.2 Charakterisierung irreversibler Hemmungen 126
- 2.5.3 Enzymreaktionen mit zwei konkurrierenden Substraten 129
- 2.6 Mehrsubstrat-Reaktionen 131
- 2.6.1 Nomenklatur 131
- 2.6.2 Random-Mechanismus (Zufalls-Mechanismus) 133
- 2.6.3 Ordered Mechanismus (geordneter Mechanismus) 138
- 2.6.4 Ping-Pong-Mechanismus 140
- 2.6.5 Haldane-Beziehungen bei Mehrsubstrat-Reaktionen 142
- 2.6.6 Mechanismen mit mehr als zwei Substraten 143
- 2.6.7 Andere Schreibweisen für Mehrsubstratreaktionen 145
- 2.7 Herleitung von Geschwindigkeitsgleichungen komplexer Enzymmechanismen 146
- 2.7.1 King-Altman-Verfahren 146

2.7.2	Vereinfachtes Verfahren nach der Graphentheorie	153
2.7.3	Kombination von Gleichgewichts- und Steady-State-Annahmen	154
2.8	Kinetische Behandlung allosterischer Enzyme	156
2.8.1	Hysteretische Enzyme	157
2.8.2	Kinetische Kooperativität, Slow-Transition-Modell	158
2.9	Spezielle Enzym-Mechanismen	160
2.9.1	Kinetik immobilisierter Enzyme	160
2.9.1.1	Externe Diffusionslimitierung	161
2.9.1.2	Interne Diffusion	164
2.9.1.3	Hemmung immobilisierter Enzyme	166
2.9.1.4	pH- und Temperaturverhalten immobilisierter Enzyme	167
2.9.2	Polymere Substrate	168
2.10	pH- und Temperaturverhalten von Enzymen	169
2.10.1	pH-Optimumskurve und Bestimmung von pK-Werten	169
2.10.2	pH-Stabilität von Enzymen	172
2.10.3	Thermische Stabilität von Enzymen	172
2.10.4	Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen	174
2.11	Anwendung statistischer Methoden in der Enzymkinetik	177
2.12	Literatur	182

### **3 Methoden 187**

3.1	Methoden zur Bestimmung multipler Gleichgewichte	187
3.1.1	Gleichgewichtsdialyse und allgemeine Aspekte von Bindungs- messungen	189
3.1.1.1	Prinzip der Gleichgewichtsdialyse	189
3.1.1.2	Kontrollexperimente und Fehlerquellen	192
3.1.2	Kontinuierliche Gleichgewichtsdialyse	196
3.1.3	Ultrafiltration	198
3.1.4	Gelfiltration	201
3.1.4.1	Batchverfahren	201
3.1.4.2	Elution breiter Zonen	202
3.1.4.3	Verfahren nach Hummel und Dreyer	203
3.1.4.4	Verfahren nach Brumbaugh und Ackers	204
3.1.5	Ultrazentrifugationsmethoden	205
3.1.5.1	Einfache Ultrazentrifugation	205
3.1.5.2	Zentrifugationsmethode nach Chanutin et al. (1942)	205
3.1.5.3	Rohrzuckerzentrifugation nach Draper und Hippel	207
3.2	Elektrochemische Methoden	211
3.2.1	Sauerstoffelektrode	213
3.2.2	CO <sub>2</sub> -Elektrode	215
3.2.3	Potentiometrie, Oxidations-Reduktions-Potentiale	215
3.2.4	pH-Stat	216
3.2.5	Polarographie	217

3.3	Kalorimetrie	219
3.4	Spektroskopische Methoden	221
3.4.1	Absorptionsspektroskopie	223
3.4.1.1	Lambert-Beersches Gesetz	223
3.4.1.2	Spektrale Eigenschaften von Enzymen und Liganden	224
3.4.1.3	Aufbau von Spektralphotometern	228
3.4.1.4	Doppelstrahl-Spektralphotometer	231
3.4.1.5	Differenzspektroskopie	232
3.4.1.6	Doppelwellenlängen-Spektralphotometer	235
3.4.1.7	Photochemische Aktionsspektren	236
3.4.2	Biolumineszenz	237
3.4.3	Fluoreszenz	237
3.4.3.1	Quantenausbeute	237
3.4.3.2	Störungen von Fluoreszenzmessungen	238
3.4.3.3	Fluoreszierende Verbindungen (Fluorophore)	239
3.4.3.4	Aufbau von Spektralfluorimetern	245
3.4.3.5	Strahlungslose Energieübertragung	246
3.4.3.6	Fluoreszenzpolarisation	249
3.4.3.7	Pulsfluorimetrie	250
3.4.4	Circulardichroismus und optische Rotationsdispersion	252
3.4.5	Infrarot- und Raman-Spektroskopie	259
3.4.5.1	IR-Spektroskopie	259
3.4.5.2	Raman-Spektroskopie	260
3.4.5.3	Anwendungen	260
3.4.6	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	261
3.5	Messung schneller Reaktionen	264
3.5.1	Flußmethoden	266
3.5.1.1	Continuous-Flow-Methode	266
3.5.1.2	Stopped-Flow-Methode	269
3.5.1.3	Messung von Enzymreaktionen durch Flußmethoden	273
3.5.1.4	Bestimmung der Totzeit	275
3.5.2	Relaxationsmethoden	276
3.5.2.1	Temperatursprung-Methode	277
3.5.2.2	Drucksprung-Methode	280
3.5.2.3	Feldsprung-Methode	283
3.5.3	Flash-Photolyse, Pico- und Femtosekunden-Spektroskopie	283
3.5.4	Auswertung schneller kinetischer Reaktionen (Transient-Kinetik)	286
3.6	Literatur	290
<b>4</b>	<b>Anhang</b>	<b>297</b>
	Einführung in das EKI-Programm	