



Grundlagen der Enzymkinetik und Enzymologie

oder

die Michaelis Menten Kinetik

Leonar Michaelis & Maud Menten

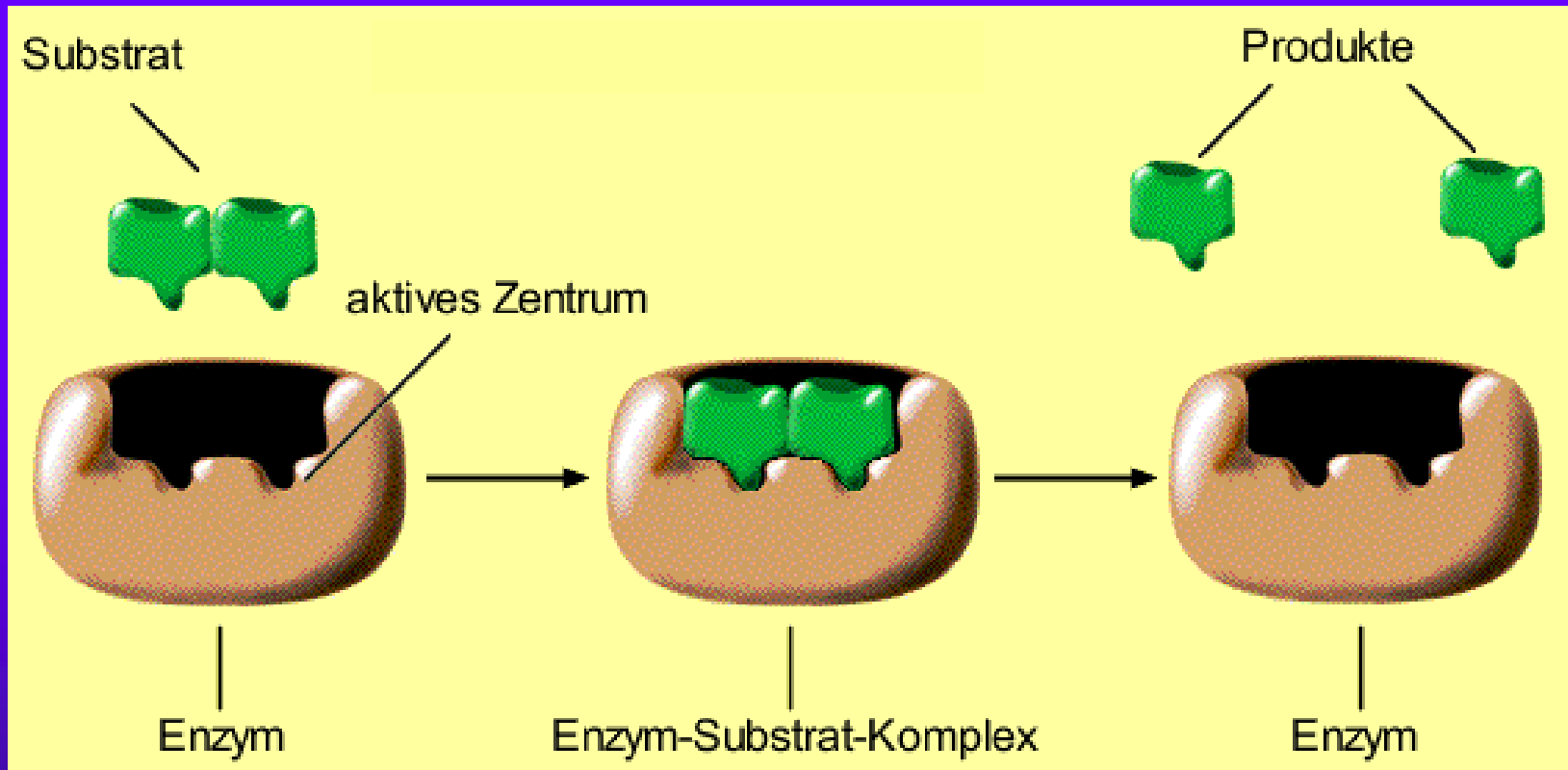


1875-1949



1879-1960

Enzymreaktion



1. Annahme:

es gibt keine Rückreaktion $E + P \rightarrow ES$

Herleitung der Michaelis Menten Kinetik

Ausgehend von dieser kinetischen Gleichung:



ist der allgemeine Ausdruck für die Geschwindigkeit der Produktbildung:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (1)$$



Herleitung der Michaelis Menten Kinetik



Produktbildung $v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (1)$

Bildung ES-Komplex $\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$

Zerfall ES-Komplex $-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 [ES]$

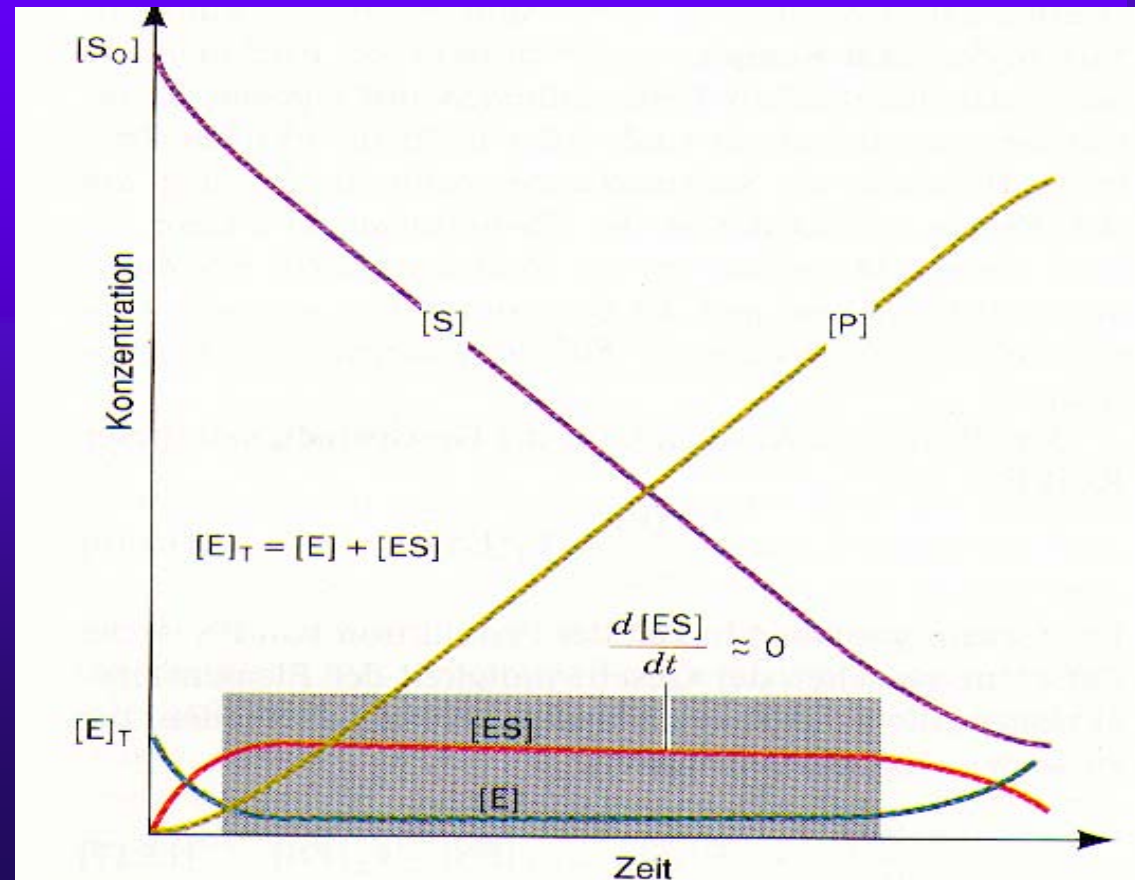
$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 [ES] \quad (2)$$

Herleitung der Michaelis Menten Kinetik

2. Annahme

Es besteht ein Fließgleichgewicht (steady state Annahme) zwischen Synthese und Verbrauch von Enzymsubstratkomplex.

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (3)$$



Herleitung der Michaelis Menten Kinetik

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 [ES] \quad (2)$$

2. Annahme: $\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (3)$

$$0 = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 [ES] \quad (2')$$

Unbekannt ist die Konzentration an freiem Enzym [E]

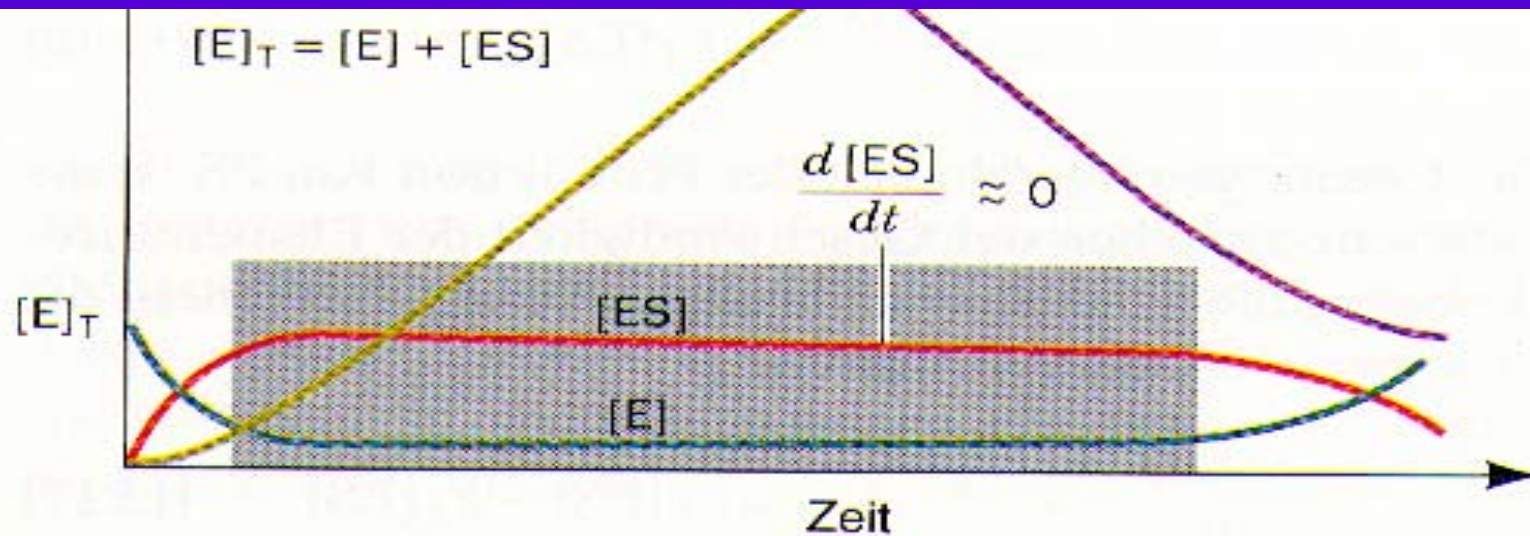


Herleitung der Michaelis Menten Kinetik

3. Annahme

Die eingesetzte Enzymkonzentration $[E]_T$ setzt sich zusammen aus freiem Enzym $[E]$ und Enzymsubstrat-Komplex $[ES]$.

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (4)$$





Herleitung der Michaelis Menten Kinetik

$$0 = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 [ES] \quad (2')$$

3. Annahme: $[E] = [E]_T - [ES]$

$$0 = k_1 \cdot ([E]_T - [ES]) \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 [ES] \quad (2'')$$

$$0 = k_1 \cdot [S] \cdot [E]_T - k_1 \cdot [S] \cdot [ES] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 [ES]$$

$$0 = k_1 \cdot [S] \cdot [E]_T - [ES] \cdot (k_1 \cdot [S] + k_{-1} + k_2)$$

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

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

Herleitung der Michaelis Menten Kinetik

$$[ES] = \frac{[S] \cdot [E_T]}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right) + [S]} = \frac{[S] \cdot [E_T]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

K_m ist eine spezifische Konstante für die Reaktion eines bestimmten Enzyms mit einem spezifischen Substrat.



Fast fertige Michaelis Menten Kinetik

Das Ziel war die Lösung der Gleichung 1

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (1)$$

$$[ES] = \frac{[S] \cdot [E_T]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot \frac{[S] \cdot [E_T]}{K_m + [S]} = \frac{[S] \cdot k_2 \cdot [E_T]}{K_m + [S]} \quad (1')$$





Fast fertige Michaelis Menten Kinetik

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[S] \cdot k_2 \cdot [E_T]}{K_m + [S]} \quad (1')$$

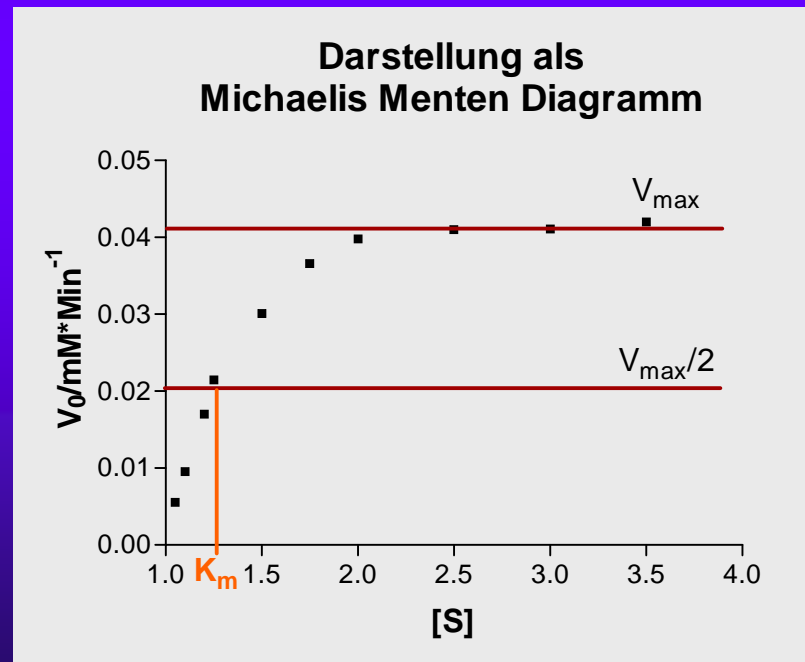
Geht man von einem gesättigtem Enzym aus, kann man $k_2 \cdot [E_T]$ durch die maximale Geschwindigkeit v_{max} ersetzen.

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[S] \cdot v_{max}}{K_m + [S]} \quad (1'')$$

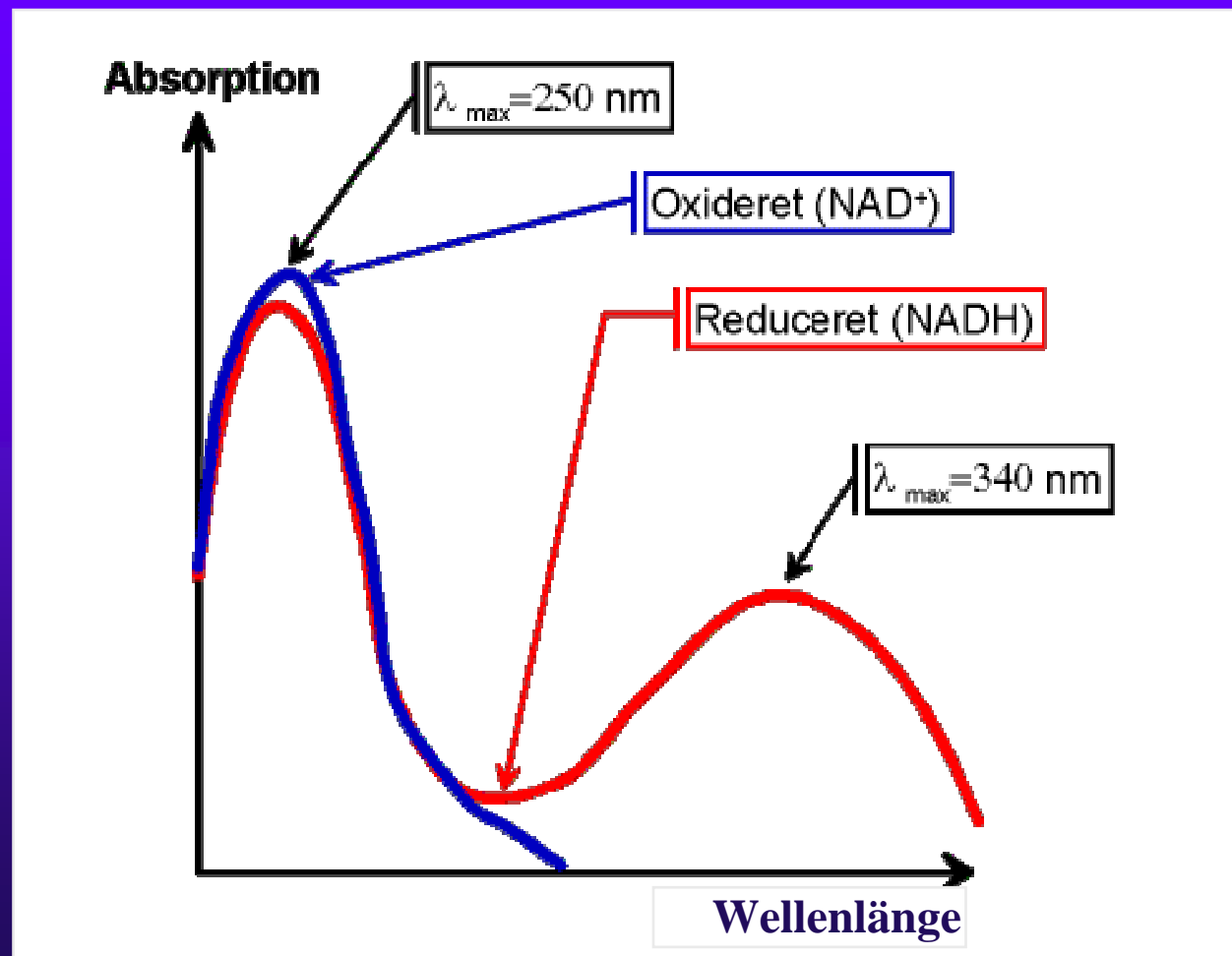
DIE Michaelis Menten Gleichung

1.Tag

Bestimmung der Michaelis Menten Konstante



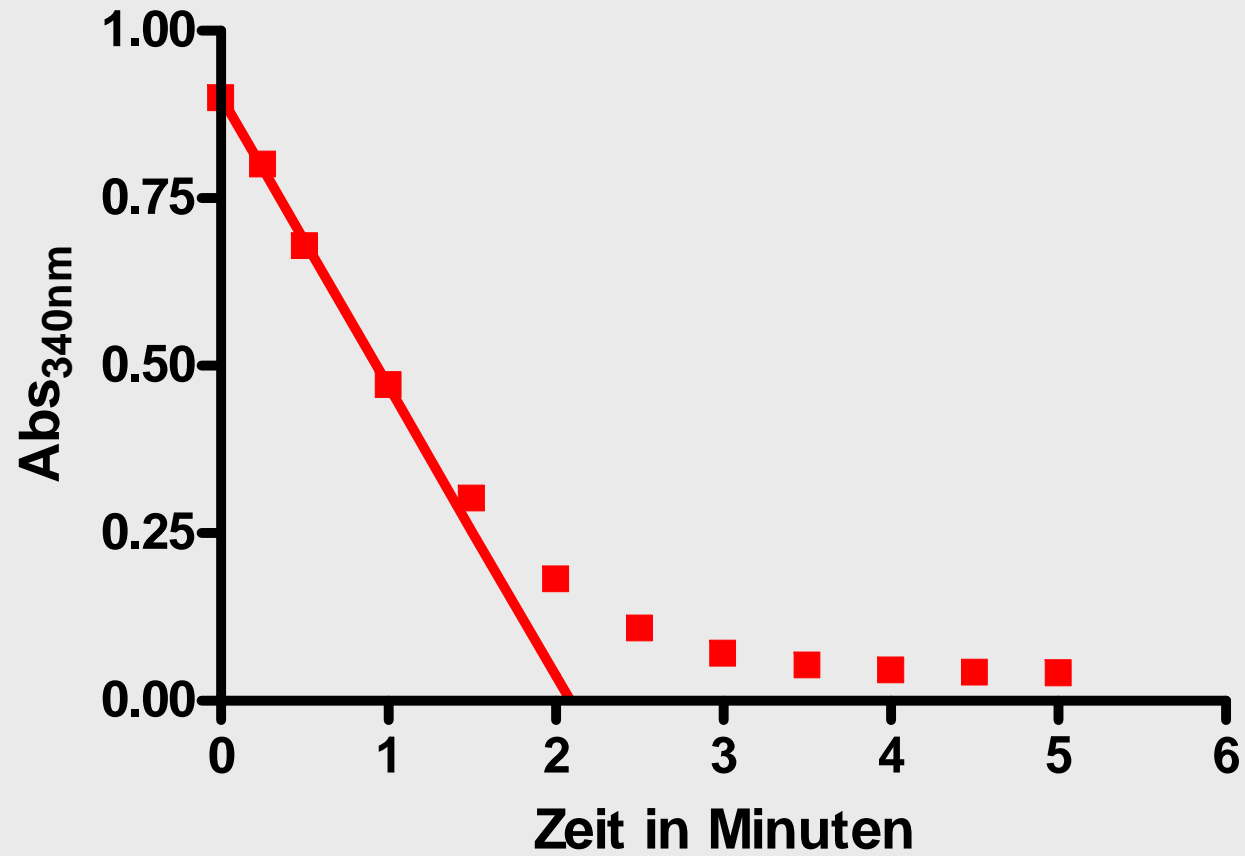
Bestimmung der LDH Aktivität



Der praktische Teil I



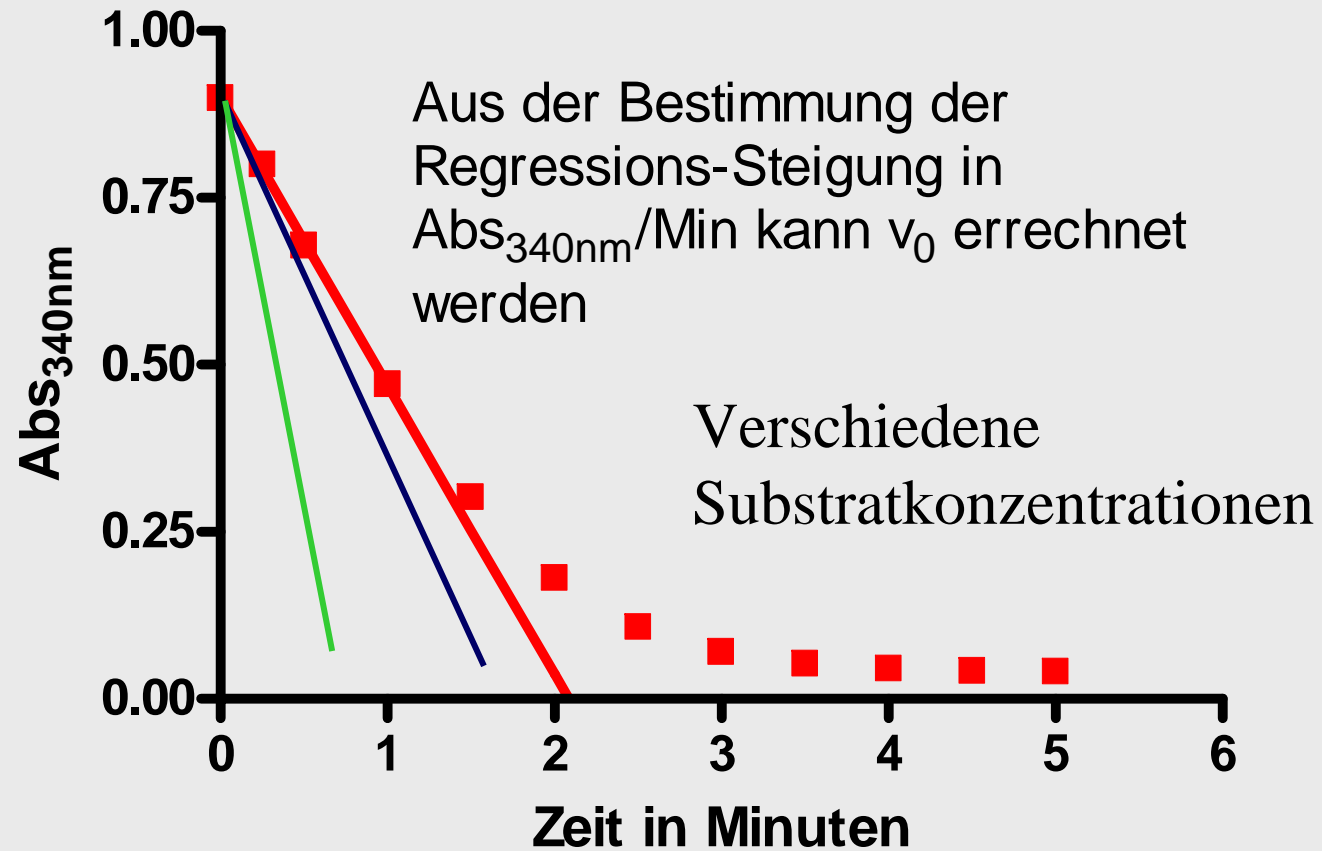
Reaktion der LDH mit Pyruvat



Der praktische Teil I



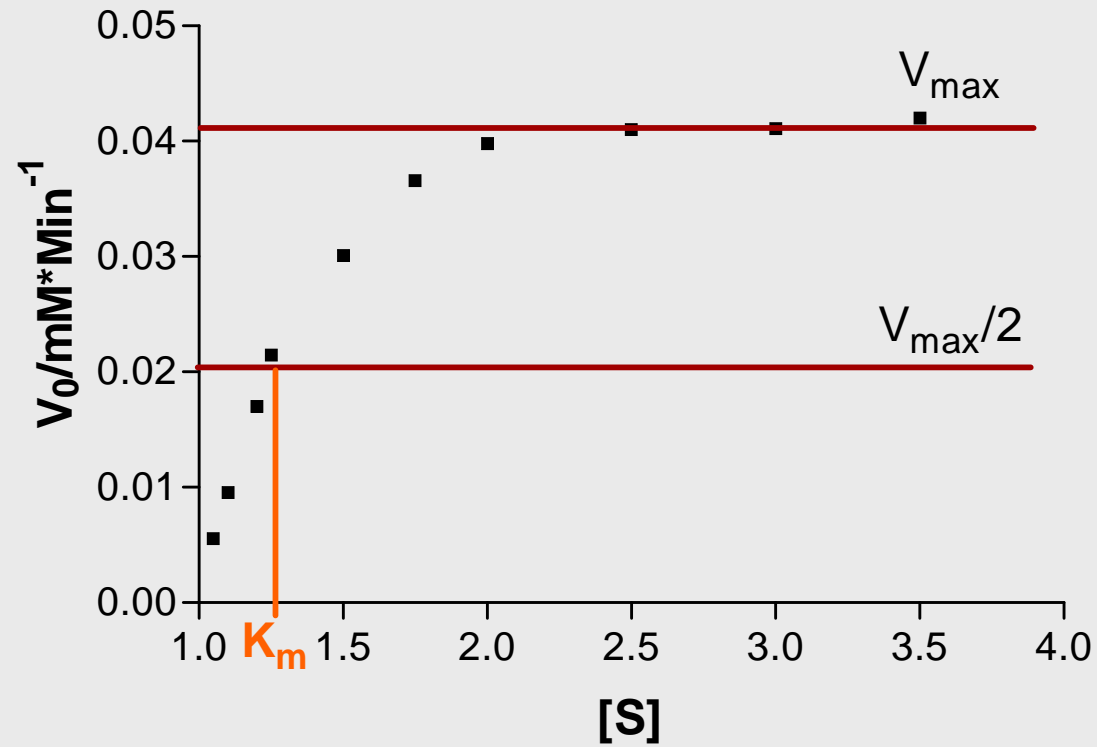
Reaktion der LDH mit Pyruvat



Der praktische Teil 1



Darstellung als
Michaelis Menten Diagramm



Der praktische Teil 1



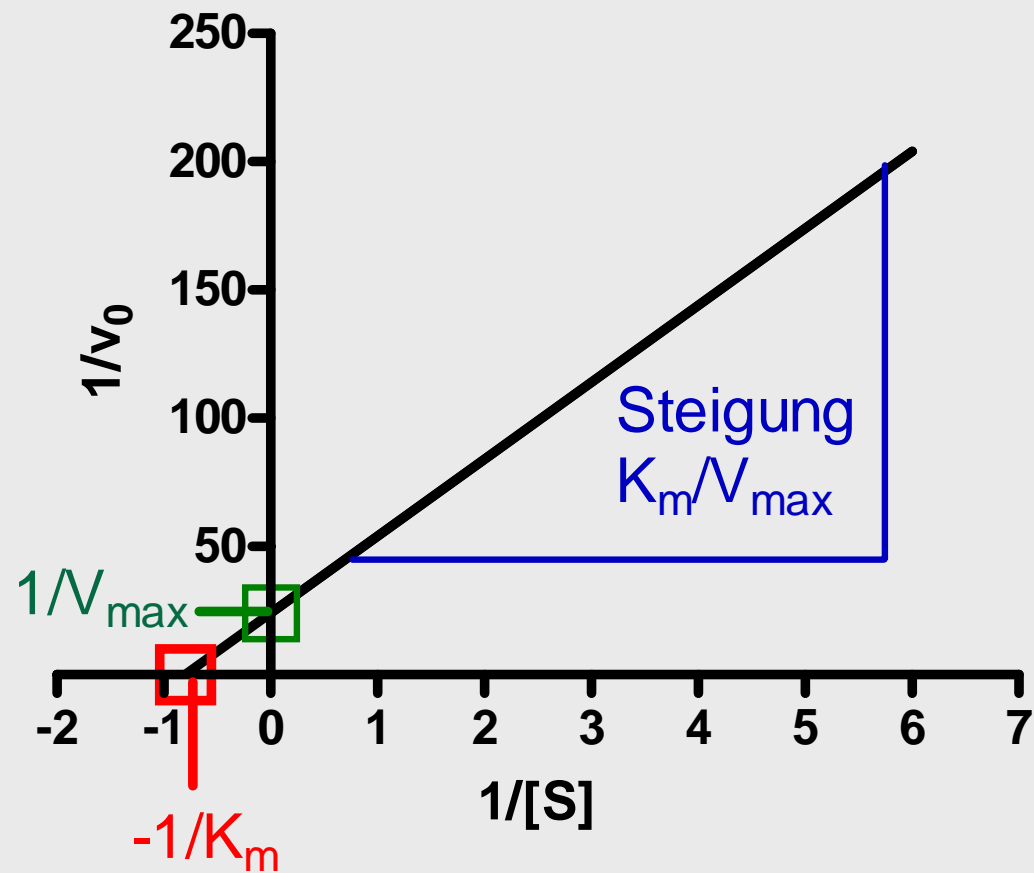
Der K_m bezeichnet
die Substratkonzentration,
bei der das Enzym mit
halbmaximaler Geschwindigkeit arbeitet.

Reaktionen mit kleinem K_m erreichen
ihre maximale katalytische Wirksamkeit
bei kleinen Substratkonzentrationen.

Der praktische Teil I



Darstellung als Lineweaver Burk Diagramm



Internet

Auf folgender Internet Seite findet man eine sehr schöne und verständliche Animation zum Verständnis der Michaelis Menten Kinetik und der Bedeutung von K_m und V_{max} Werten

<http://bcs.whfreeman.com/biochem5/>

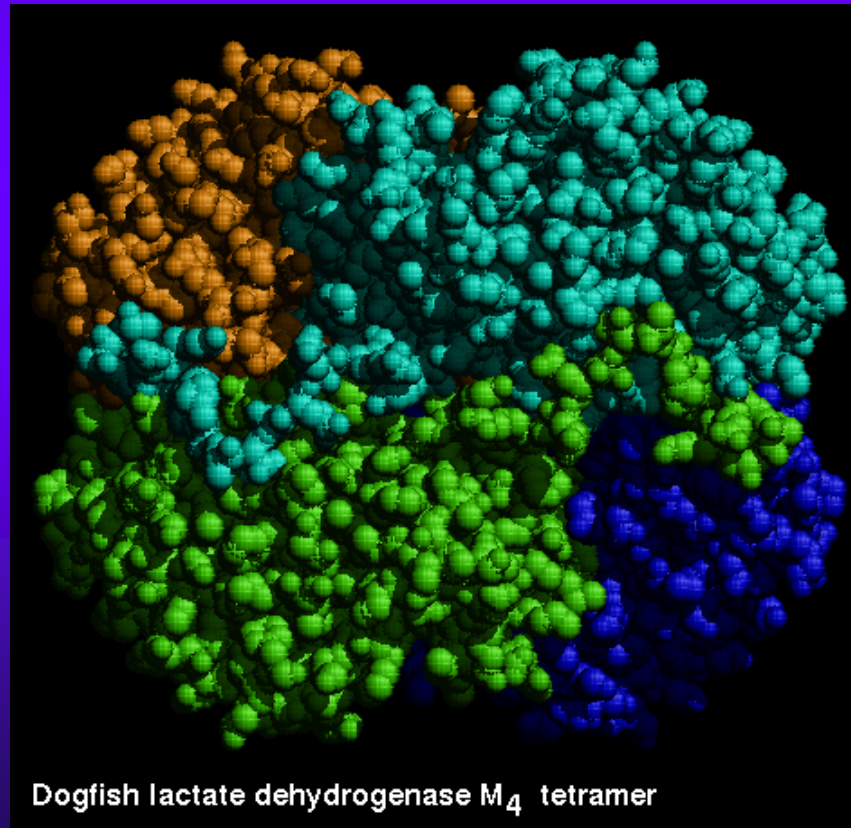
Unter „Chapter 8“

Conceptual Insights

Steady State Enzyme Kinetics

2.Tag

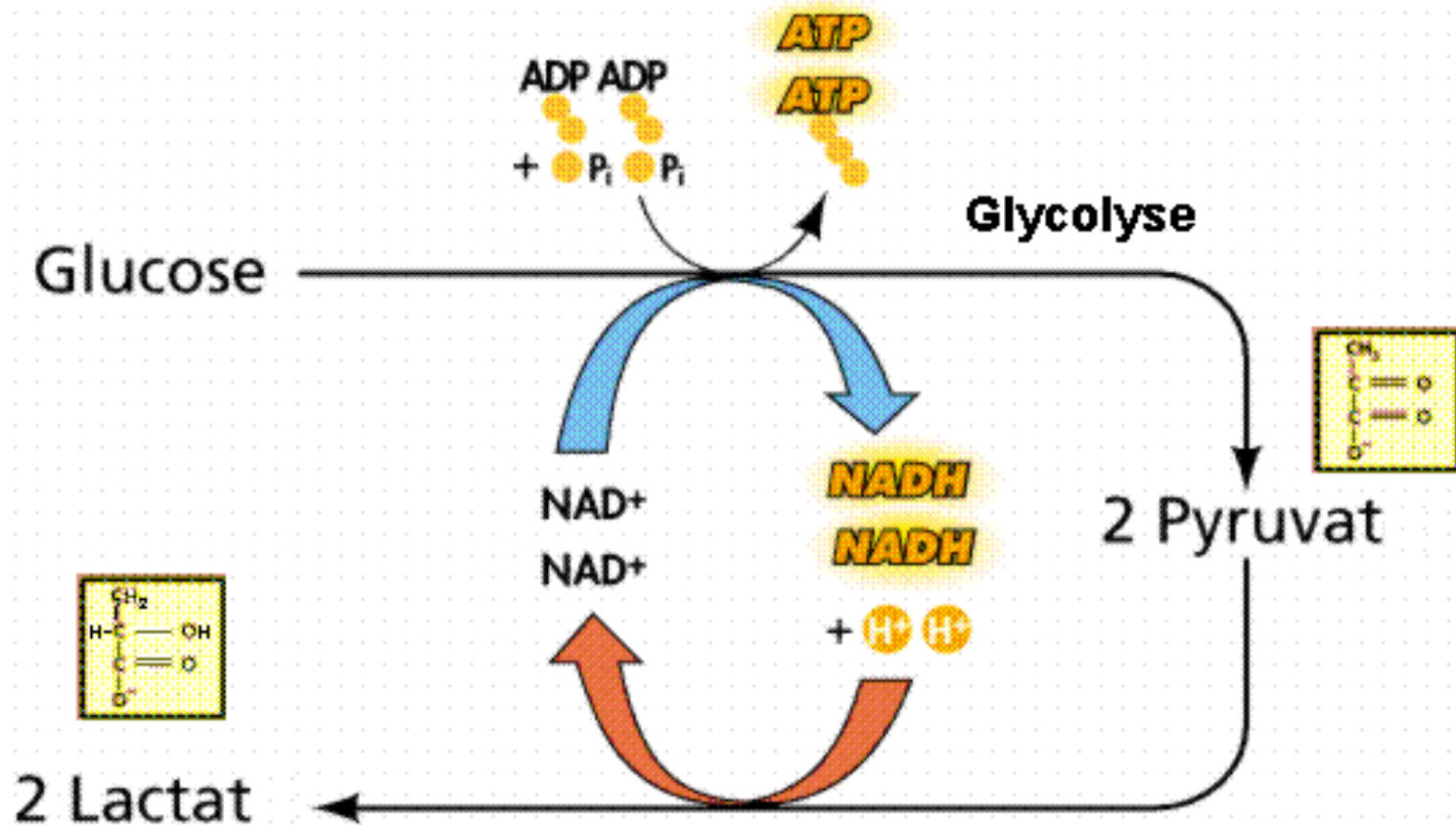
Laktatdehydrogenase (LDH) Isoformen



Dogfish lactate dehydrogenase M₄ tetramer

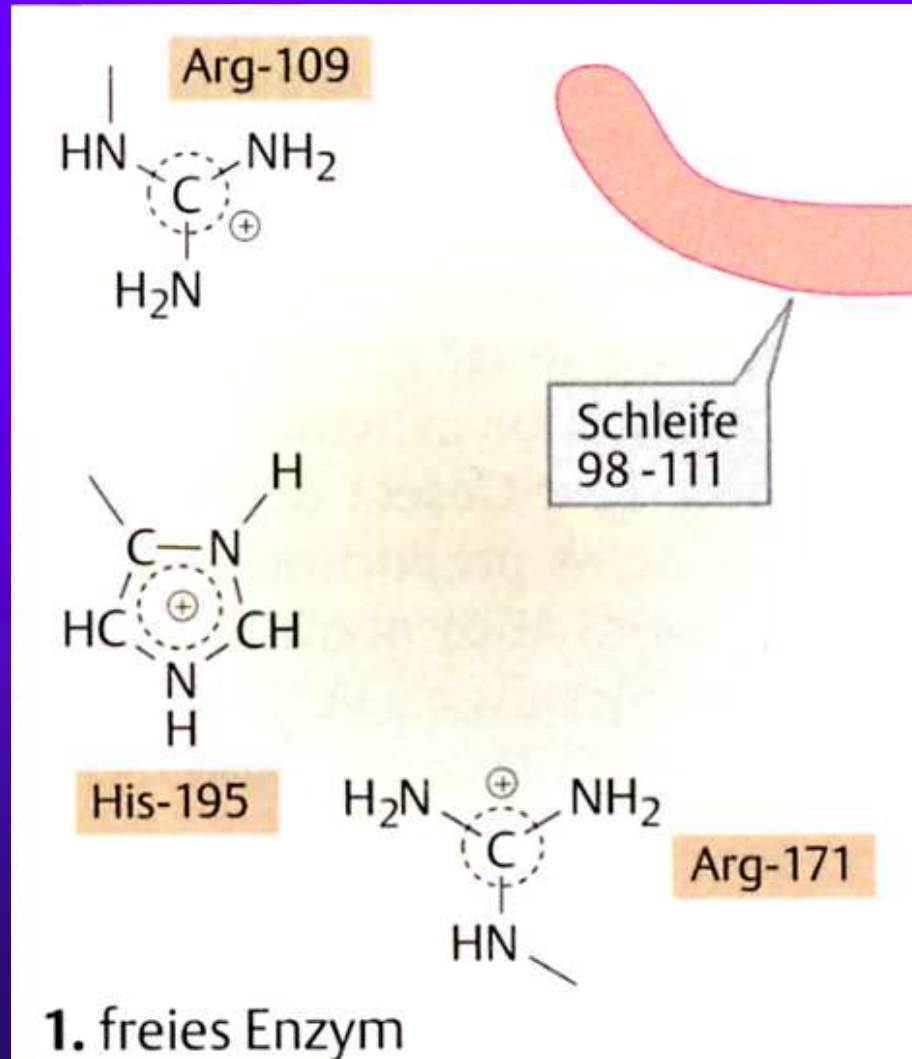
Grundlagen der LDH

Regenerierung von NAD⁺ in der Milchsäuregärung



Wichtig für die Glycolyse:
NADH muss zu NAD⁺ oxidiert werden!

Mechanismus der LDH



Aktives Zentrum einer
LDH-Untereinheit

Wichtig für die
Reaktion:

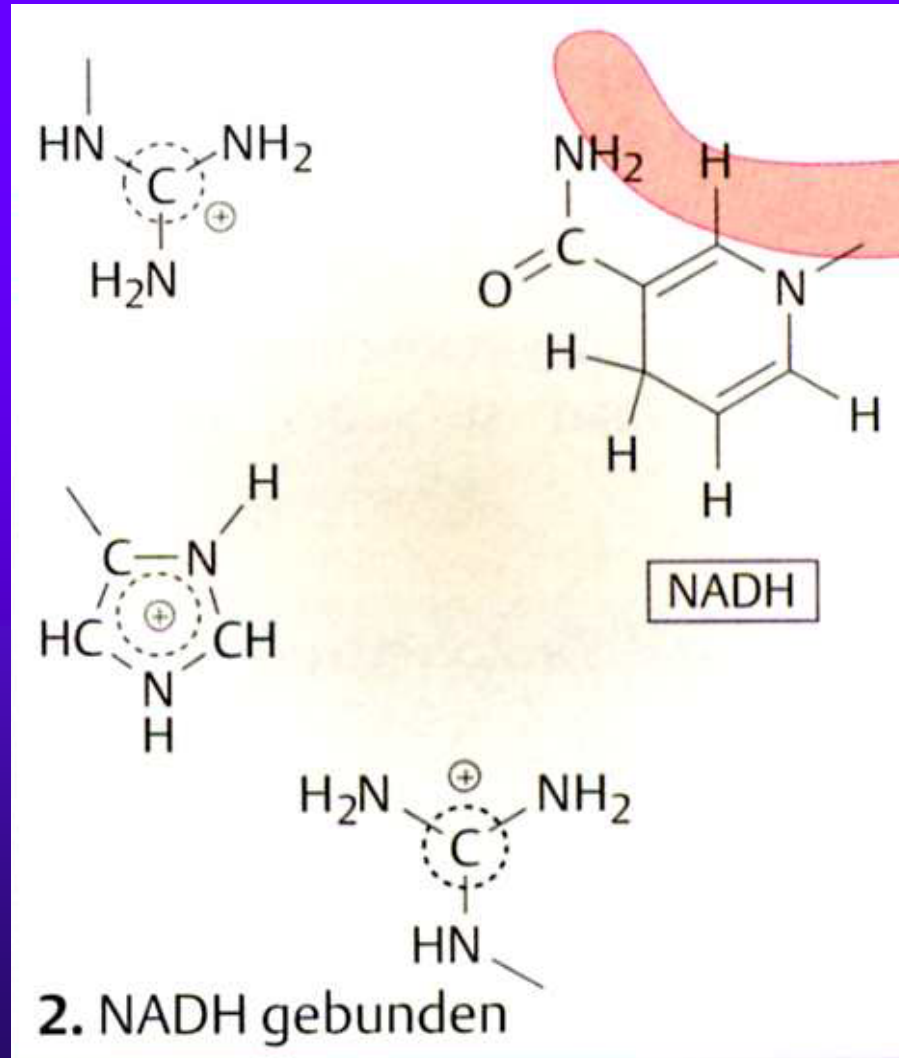
Peptidschleife 98-111

Arg-171

Arg-109

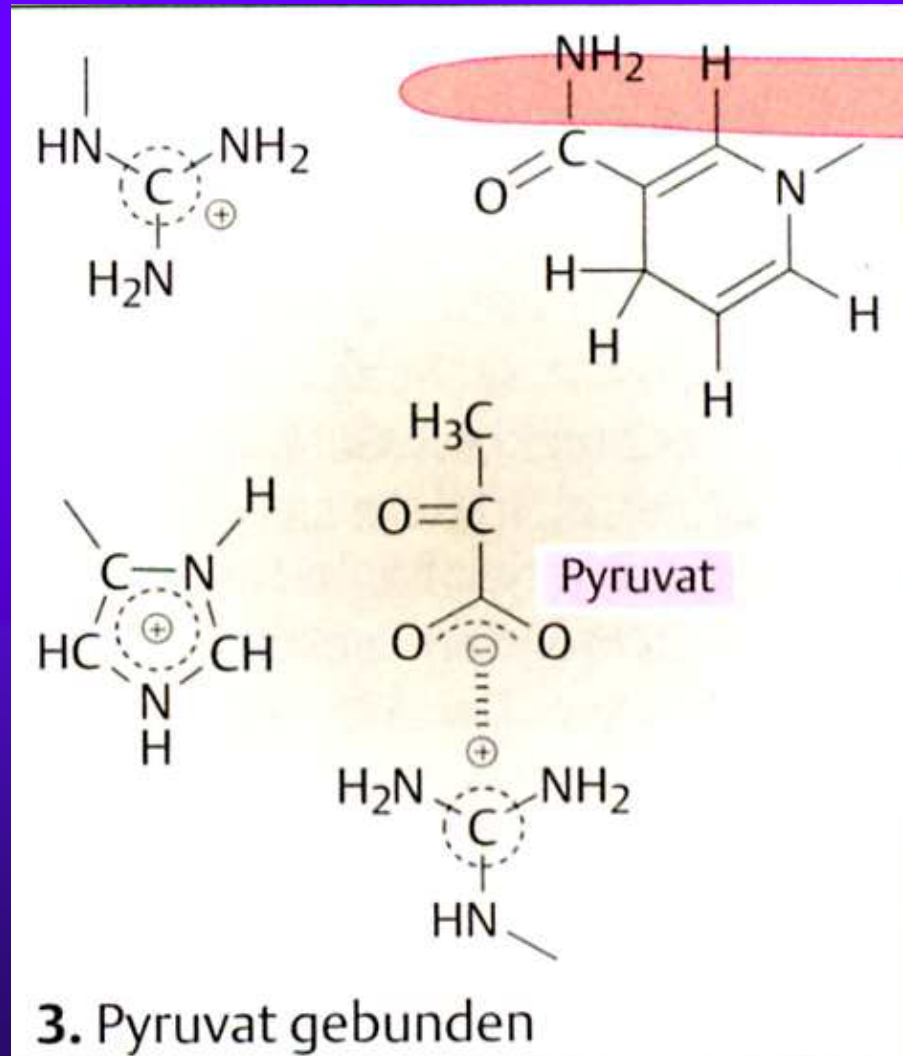
His-195

Mechanismus der LDH



Bindung des
Coenzym **NADH** an
die Peptidschleife,
Ausrichtung des
Nicotinamidrings

Mechanismus der LDH



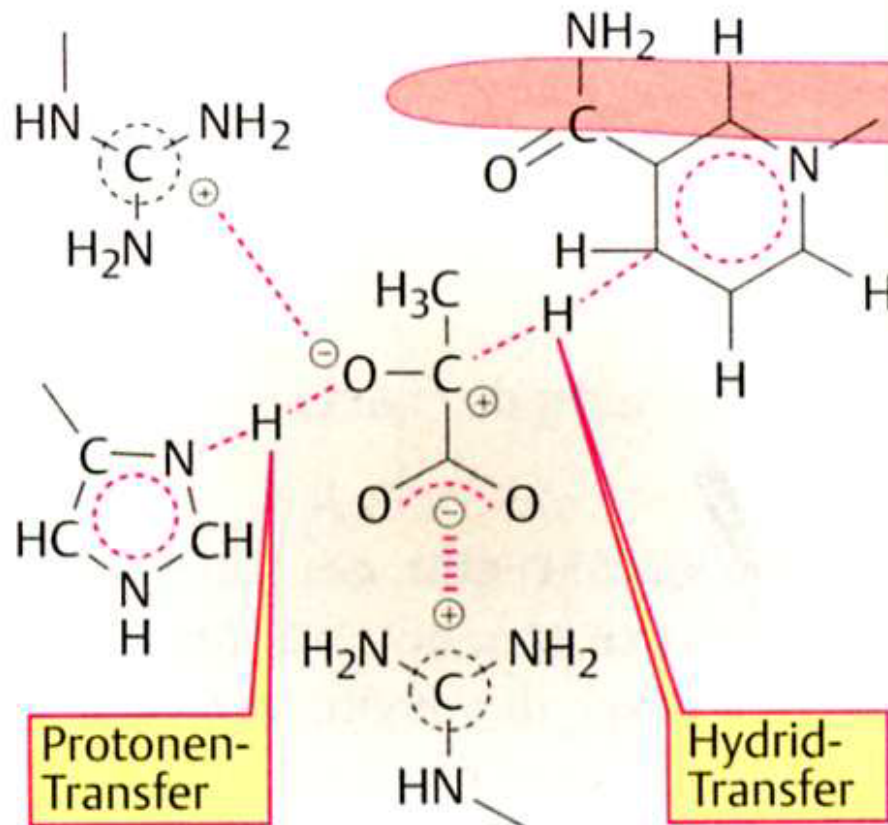
Pyruvat wird durch elektrostatische Wechselwirkung mit Arg- 171 gebunden und optimal zum NADH orientiert:

Annäherung und Orientierung des Substrates

Die Peptidschleife schließt sich über dem aktiven Zentrum:

Wasserausschluss

Mechanismus der LDH

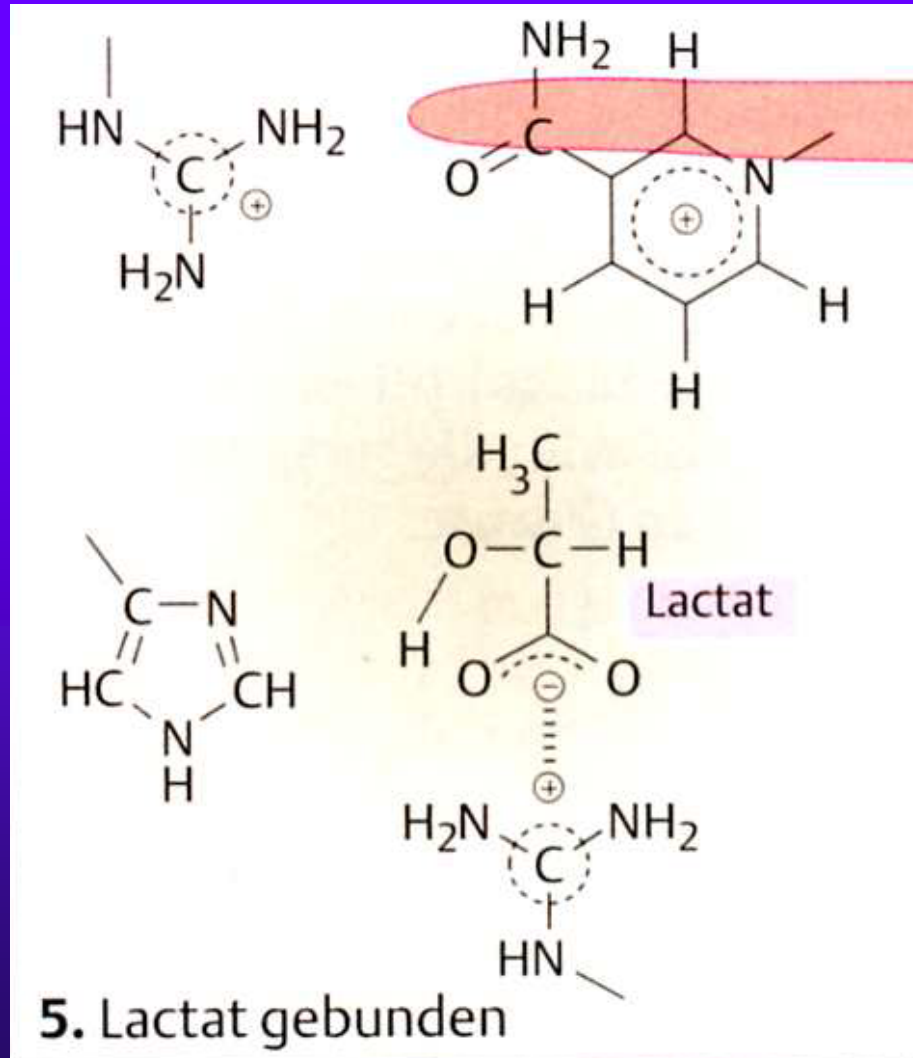


4. Redox-Reaktion

Übertragung eines Hydrid-Ions (Redoxreaktion) auf den Sauerstoff des Pyruvats – **Stabilisierung des Übergangszustandes** durch Arg-109. **Säure-Base Katalyse** durch Übertragung eines Protons vom His-195 auf den negativ geladenen Sauerstoff



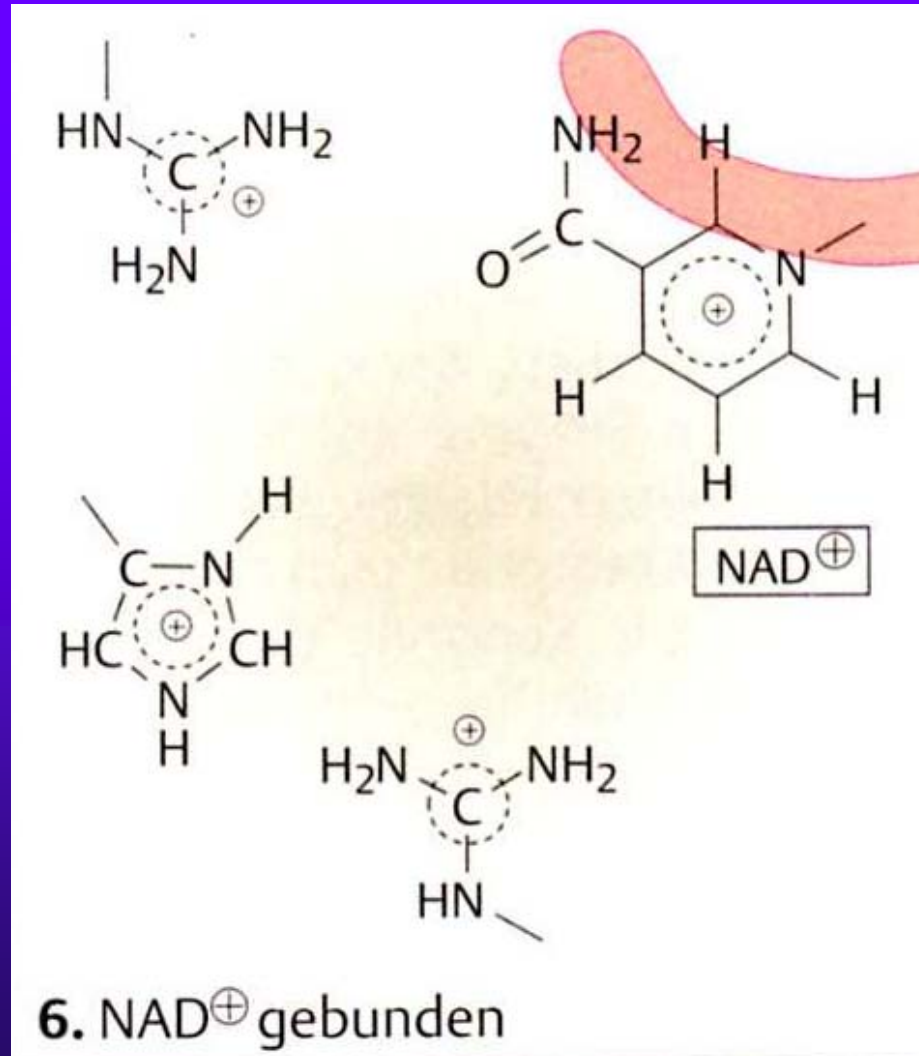
Mechanismus der LDH



Bildung Laktat
beendet, NAD⁺ wurde
regeneriert;

His-195 liegt
deprotoniert vor

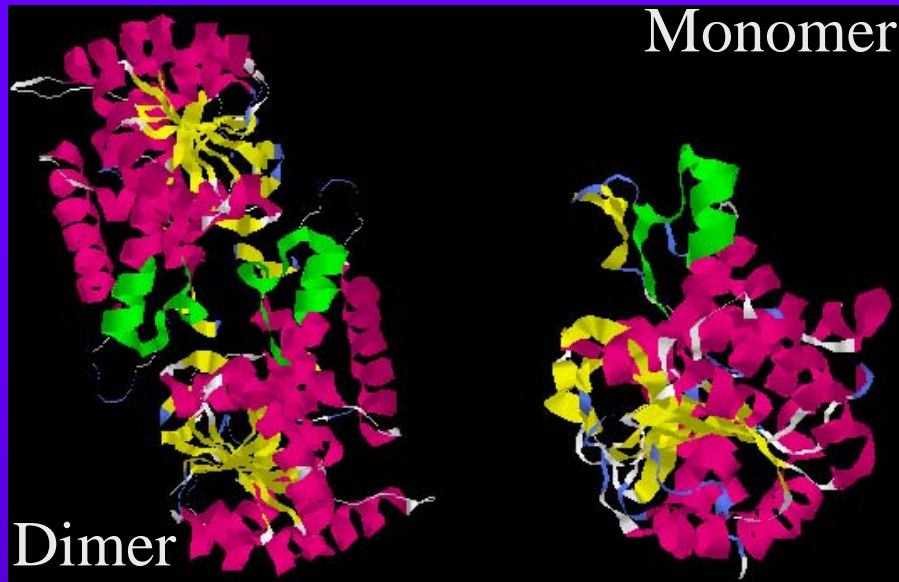
Mechanismus der LDH



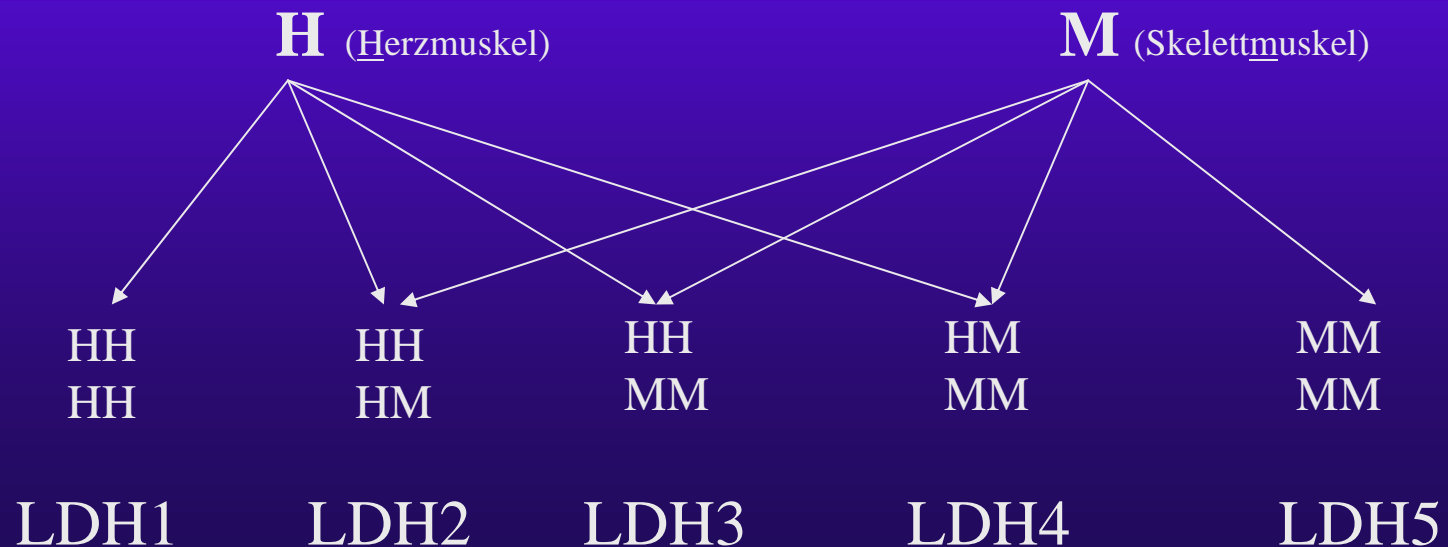
Die Peptidschleife öffnet das aktive Zentrum, Laktat wird freigegeben, NAD^{\oplus} wird gegen NADH ausgetauscht und die Reaktion findet erneut statt – bis das Substrat oder das Coenzym aufgebraucht wurde.

His-195 bindet ein Proton aus dem umgebenden Wasser.

LDH-Isoformen



- Es gibt 5 Isoenzyme der LDH, bestehend aus je 4 Untereinheiten
- Nichtkovalente Bindung der Untereinheiten
- Kodierung auf unterschiedlichen Genen
- 334 AS pro Untereinheit
- Unterschied zwischen M- und H- Untereinheiten = 12 AS





LDH-Isoformen

Die variierenden 12 AS zwischen H- und M- Untereinheiten führen zu Unterschieden der physikalischen und katalytischen Eigenschaften (katalysieren jedoch trotzdem die gleiche Reaktion):

Katalytisch*:
 K_m -Wert,
pH-Optimum
Wechselzahl

Physikalisch:
Molekulargewicht,
Isoelektrischer Punkt
Denaturierung

*

Isoenzym	Wechselzahl	K_m (Pyruvat)	Hemmung durch Pyruvat
H4 (LDH1)	45000 sec ⁻¹	1 * 10 ⁻⁴ M	Ja
M4 (LDH5)	100000 sec ⁻¹	3 * 10 ⁻⁵ M	nein

LDH-Isoformen

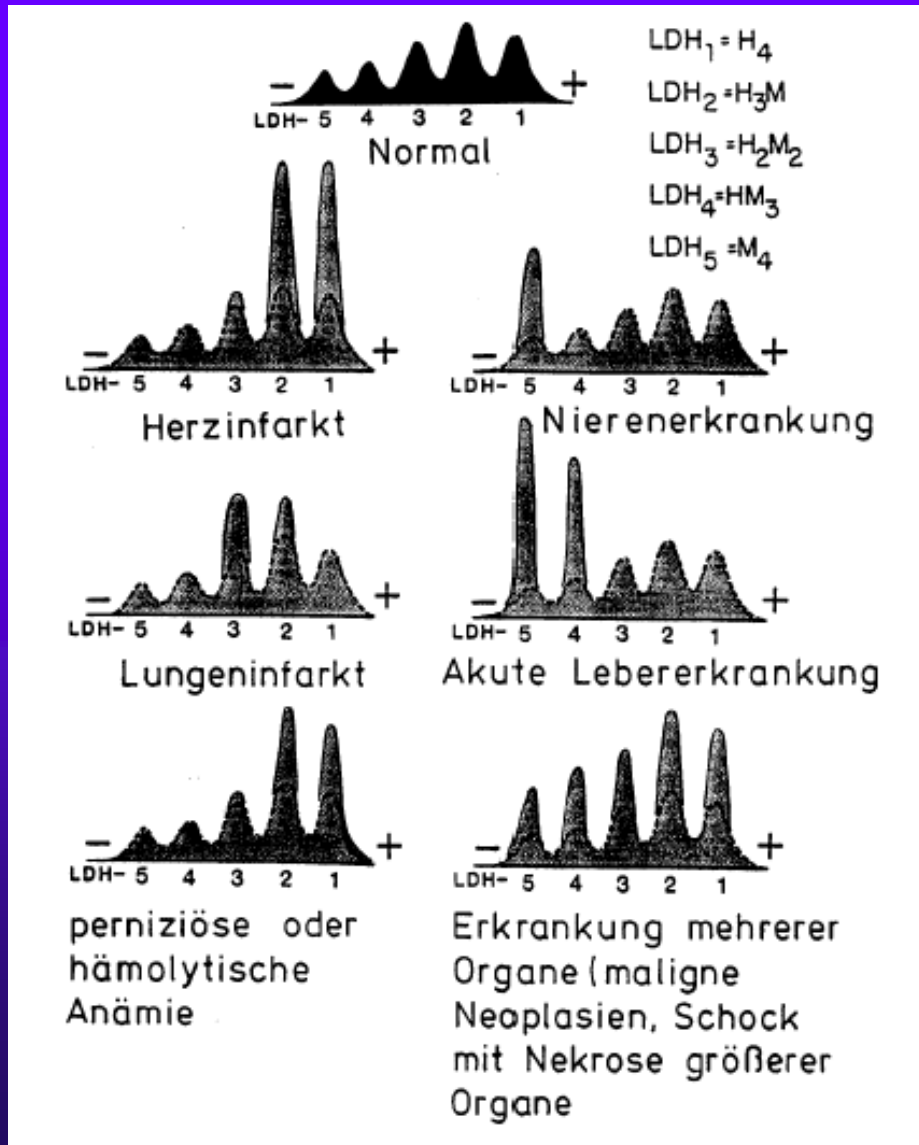
Die unterschiedlichen Isoformen der LDH kommen nur in spezifischen Organen vor:

(B)

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
H_4	█	█	█	█	█	—	—
H_3M_1	█	█	█	█	█	—	—
H_2M_2	—	█	—	█	█	█	—
H_1M_3	—	—	—	—	█	—	—
M_4	—	—	—	—	—	█	█

LDH-Isoformen

Prozentualer Vergleich
der unterschiedlichen
Isoformen bei einigen
Krankheitsformen





Na dann,

frohes Schaffen!!!