

Neue Methode zur viskosimetrischen Bestimmung der Hemmkonstante K_I für Enzymreaktionen, die in der Art einer reversiblen, kompetitiven Hemmung verlaufen

Von

M. Tschetkarov und D. Koleff

Fakultät für Physik der Universität Sofia
und Institut für Biochemie der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften,
Sofia, Bulgarien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 24. Juli 1968)

Es wird eine Theorie entwickelt, die es ermöglicht, viskosimetrisch die Kinetik von Enzymreaktionen zu verfolgen, an denen hochmolekulare Substrate teilnehmen und die in der Art einer reversiblen, kompetitiven Hemmung verlaufen. Die abgeleiteten Relationen geben die Möglichkeit, die Hemmkonstante (K_I) der verlaufenden Enzymreaktion bei dieser Art Hemmung zu bestimmen.

A New Method for the Viscosimetric Determination of the Inhibition Constant K_I for Enzymatic Reactions of the Reversible Competitive Inhibition Type

A theory has been developed making it possible to viscosimetrically trace enzyme reactions in which high molecular substrates are involved and which belong to the reversible competitive-inhibition type. The equations derived permit of a determination of the inhibition constant K_I .

Einführung

In Übereinstimmung mit den gegenwärtigen Auffassungen¹⁻³ zeigen die kompetitiven Hemmstoffe eine Strukturähnlichkeit mit dem

¹ M. Dixon und E. Webb, *Enzymes*, 2nd Ed., Longmans, 1964.

² V. A. Jakovlev, *Kinetik der Enzym-Katalyse*, Mir, Moskau 1965.

³ J. L. Webb, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic Press, 1963.

Substrat oder dem Produkt der Enzymreaktion, indem sie sich reversibel mit den aktiven Zentren des Enzyms verbinden, d. h. an derselben Stelle wie das Substrat. Folglich vermindern sie die Ähnlichkeit zwischen dem Substrat und dem Enzym, wodurch sich in Anwesenheit von Hemmstoff der Wert der „scheinbaren *Michaelis—Menten*-Konstante“ erhöht.

Bei der reversiblen, kompetitiven Hemmung verändert sich die Sättigungsgeschwindigkeit des Enzyms nicht; sie hängt sowohl von der relativen Affinität des Hemmstoffs und des Substrats zum aktiven Zentrum des Enzyms als auch vom Verhältnis zwischen den Konzentrationen des Hemmstoffs und des Substrats ab.

In der Literatur fehlt eine ausreichende Theorie zur viskosimetrischen Bestimmung der kinetischen Konstanten der Enzym—Substrat-Reaktionen. Dies war die Hauptursache für die geringe und nur teilweise Anwendung der viskosimetrischen Methode bei der qualitativen Bewertung gewisser hemmenden Wirkungen⁴.

In einigen aufeinanderfolgenden Arbeiten^{5–9} wurde eine Theorie entwickelt, die die viskosimetrische Verfolgung der Kinetik von Enzymreaktionen, an denen hochmolekulare Substrate beteiligt sind, ermöglicht. Die abgeleiteten Gleichungen wurden angewandt zur Verfolgung der Kinetik des Abbaus des Substrats Natriumcarboxymethylcellulose (Na-CMC) unter der katalysierenden Wirkung des Enzyms *C_x*-Cellulase (EC 3.2.1.4 β -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase), indem die *Michaelis—Menten*-Konstante dieser Reaktion sowie die Enzymaktivität in internationalen Einheiten bestimmt wurde.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Theorie zur viskosimetrischen Bestimmung der Hemmkonstante (K_I) bei Enzymreaktionen, an denen sich hochmolekulare Verbindungen beteiligen und die in der Art einer reversiblen, kompetitiven Hemmung verlaufen.

Theorie

Zur Erforschung der reversiblen, kompetitiven Hemmung der Enzymreaktionen wird nebst den in einer vorangehenden Arbeit⁵ verwendeten Symbolen hier mit

$$n_I = \frac{[I] N_0}{\mu_I} \quad (1)$$

⁴ M. Mandels und E. Reese, in Enzym. hydrol. cellul., Ed. E. Reese, Pergamon Press, p. 115, 1963.

⁵ M. Tschetkarov und D. Koleff, Mh. Chem. **100**, 976 (1969).

⁶ M. Tschetkarov und D. Koleff, Mh. Chem. **98**, 1908 (1967).

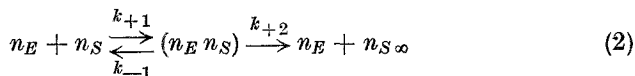
⁷ M. Tschetkarov, D. Koleff und S. Banikova, Mh. Chem. **98**, 1916 (1967).

⁸ M. Tschetkarov und D. Koleff, Mh. Chem. **100**, 986 (1969).

⁹ M. Tschetkarov und D. Koleff, Experientia [Basel] **25**, 439 (1969).

die Konzentration der Hemm-Moleküle in einer Volumseinheit bezeichnet. In (1) ist μ_I das Molekulargewicht des Hemmstoffs, $[I]$ seine Gewichtskonzentration und N_0 die Avogadrozahl.

Wenn eine Enzym—Substrat-Reaktion von der Art^{1, 2}



von der gleichzeitigen Wirkung eines kompetitiven Hemmstoffs begleitet wird, der reversibel die aktiven Zentren des Enzyms



mit der Hemmkonstante

$$K'_1 = \frac{k_{-i}}{k_{+i}} = \frac{n_E n_I}{(n_E n_I)} \quad (4)$$

blockiert, so wird ein Teil der aktiven Zentren der Enzymmoleküle in einem Enzym—Substrat-Komplex ($n_E n_S$) und in einem Enzym—Inhibitor-Komplex ($n_E n_I$) verbunden sein und ein anderer Teil, n_E , bleibt frei. Folglich wird die Gesamtzahl der aktiven Enzymzentren durch

$$n_E^0 = n_E + (n_E n_S) + (n_E n_I) = n_E + (n_E n_S) + \frac{n_E n_S}{K'_1} \quad (5)$$

definiert und die freien Zentren durch

$$n_E = \frac{n_E^0 - (n_E n_S)}{1 + \frac{n_I}{K'_1}} \quad (6)$$

Aus der algebraischen Summe der Geschwindigkeiten zur Bildung und zum Abbau des Enzym—Substrat-Komplexes erhalten wir in Übereinstimmung mit (2)

$$\sum \frac{d(n_E n_S)}{dt} = 0 = k_{+1} n_E n_S - (k_{-1} + k_{+2}) (n_E n_S) \quad (7)$$

und der Ausdruck (6) für die Konzentration des Enzym—Substrat-Komplexes wird

$$(n_E n_S) = \frac{n_E^0 n_S}{K'_m \left(1 + \frac{n_I}{K'_1} \right) + n_S} \quad (8)$$

worin wir

$$K'_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (9)$$

gesetzt haben. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Konzentration n_S der sich unter dem Einfluß des Enzyms abbauenden Substratmoleküle ist der Abbaugeschwindigkeit des Enzym—Substrat-Komplexes gleich, d. h.

$$\frac{dn_S}{dt} = - \frac{d(n_E n_S)}{dt} = k_{+2} (n_E n_S) \quad (10)$$

oder, wenn man (8) berücksichtigt,

$$\frac{dn_S}{dt} = \frac{k_{+2} n_E n_S}{K'_m \left(1 + \frac{n_I}{K'_1}\right) + n_S} \quad (11)$$

Setzen wir den Ausdruck (9)⁵ in die Gl. (11) ein, so erhalten wir

$$- \frac{d\mu_S}{dt} = \frac{k^* [E] \mu_S^2}{L \mu_S + [S]} \quad (12)$$

worin wir

$$k^* = \frac{p k_{+2}}{\mu_E}$$

$$K_m = \frac{K'_m}{N_0} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{N_0 k_{+1}} \quad \text{Michaelis—Menten-Konstante in Molarkonzentration}$$

$$K_I = \frac{K'_1}{N_0} = \frac{k_{-i}}{N_0 k_{+i}} \quad \text{Hemmkonstante in Molarkonzentration} \quad (13)$$

$$L = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I \mu_I}\right) \quad \text{„Scheinbare Michaelis—Menten-Konstante“ in Molarkonzentration}$$

eingesetzt haben.

Löst man die Gl. (12) in den Grenzen der Veränderung des Molgewichts des Substrats von μ_{S0} bis $\mu_{S\infty}$

$$\int_{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}}^{\mu_S - \mu_{S\infty}} \frac{d\mu_S}{\mu_S} + \frac{[S]}{L} \int_{\mu_S - \mu_{S\infty}}^{\mu_S - \mu_{S\infty}} \frac{d\mu_S}{\mu_S^2} = - \frac{k^* [E]}{L} \int_0^t dt, \quad (14)$$

so erhält man den Ausdruck

$$\ln \frac{\mu_S - \mu_{S\infty}}{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}} + \frac{[S]}{L} \left(\frac{1}{\mu_S - \mu_{S\infty}} - \frac{1}{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}} \right) = - \frac{k^* [E]}{L} t, \quad (15)$$

der in impliziter Art die Veränderung des Molgewichts μ_S des Substrats mit der Zeit t der Enzymreaktion zeigt.

Die Ausdrücke (12) und (15) weisen darauf hin, daß die Kinetik des Substratabbaus wesentlich vom Verhältnis der Enzym—Substrat- und Enzym—Hemmstoff-Konzentrationen $[E]$, $[S]$ und $[I]$ abhängig ist.

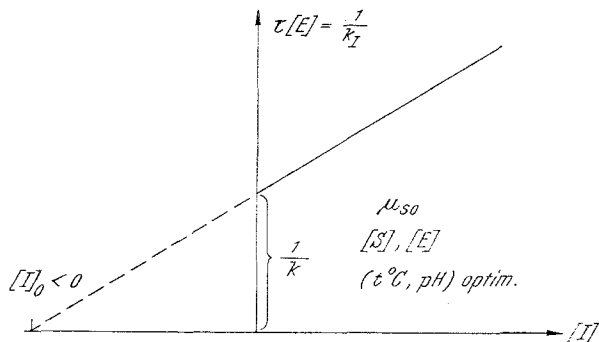


Abb. 1. Veränderung des Produktenwertes der Relaxationsdauer und der Enzymkonzentration $\tau [E]$ von der Hemmstoffkonzentration $[I]$ (schematische Darstellung)

Wenn man im Nenner von (12) solche Konzentrationen $[S]$ und $[I]$ des Substrats und Hemmstoffs wählt, daß die Ungleichung $L \mu_S \gg [S]$ gilt, dann verläuft der Reaktionsanfang ausschließlich nach dem Exponentialgesetz

$$\mu_S - \mu_{S\infty} = (\mu_{S0} - \mu_{S\infty}) e^{-k_I [E] t}, \tag{16}$$

worin wir

$$\frac{1}{k_I} = \frac{1}{k} \left(1 + \frac{[I]}{K_I \mu_I} \right) \tag{17}$$

und

$$k = \frac{k^*}{K_m} = \frac{p N_0 k_{+2} k_{+1}}{\mu_E (k_{-1} + k_{+2})} \tag{18}$$

[laut den Ausdrücken (13)] eingesetzt haben. Je kleiner die Enzymkonzentration $[E]$ ist, desto länger dauert die Reaktion nach Relation (16).

Verfolgt man, wie das vorher getan wurde⁵⁻⁹, viskosimetrisch die Veränderung des Molekulargewichts μ_S des Substrats nach Relation (16) und bestimmt man die Zeit $\tau = 1/k_I [E]$ der Relaxation bei unveränderter Enzymkonzentration $[E]$ und veränderlicher Hemmstoffkonzentration $[I]$, so kann man laut (17) die Hemmkonstante K_I (Abb. 1) bestimmen. Ist das Molekulargewicht μ_I des Hemmstoffs bekannt, so bestimmt man

durch die Neigung der Geraden auf Abb. 1 die Hemmkonstante durch den Ausdruck

$$K_I = -\frac{[I]_0}{\mu_I} > 0. \quad (19)$$

Drückt man $[I]_0$ in mg/ml und μ_I in mg/mMol aus, so hat K_I das Maßsystem mMol/ml.

Weil im Laufe der Enzymreaktion das Molekulargewicht des Substrats dauernd abnimmt, verändert sich das Verhältnis im Nenner von (12) inversiv $L \mu_S \ll [S]$ und der zweite Teil der Reaktion wird nach dem hyperbolischen Gesetz

$$\frac{1}{\mu_S - \mu_{S\infty}} = \frac{1}{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}} + \frac{k^* [E]}{[S]} t \quad (20)$$

verlaufen.

Die Relation (20) zeigt, daß sich die Reaktion in diesem Teil nicht von der Anwesenheit des Hemmstoffs beeinflussen läßt.