

Erweiterung der Theorie zur viskosimetrischen Verfolgung der Kinetik bestimmter Enzymreaktionen

Neue Methode zur viskosimetrischen Bestimmung der
Michaelis—Menten-Konstante

Von

Metodi Tschetkarov und Dimitar Koleff

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

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 24. Juli 1968)

Aus allgemeineren theoretischen Gründen sind die Schlußfolgerungen einer früheren Arbeit¹ definiert, welche sich auf die viskosimetrische Verfolgung der Kinetik bestimmter Enzymreaktionen beziehen. Es wird eine neue Methode zur viskosimetrischen Bestimmung der *Michaelis—Menten*-Konstante angegeben.

Enlargement of the Theory for the Viscosimetric Study of the Kinetics of Certain Enzymatic Reactions: A New Method for the Viscosimetric Determination of the Michaelis-Menten Constant

The inferences made in a preceding paper¹ dealing with the viscosimetric tracing of the kinetics of certain enzyme reactions were redefined for general reasons of a theoretical nature. A new method for the viscosimetric determination of the *Michaelis—Menten* constant is described.

Einführung

Die Methode der viskosimetrischen Verfolgung von Enzymreaktionen, bei welcher ein Abbau hochmolekularer Substrate vor sich geht, wurde von verschiedenen Autoren erfolgreich zur Bestimmung der katalytischen Aktivität verschiedener Enzyme: Amylasen, Nukleasen, Proteasen, Pektinasen, Hyaluronidasen, C_x -Cellulasen usw. angewandt.

¹ M. Tschetkarov und D. Koleff, Mh. Chem. **98**, 1908 (1967).

Da in der Literatur ausreichende theoretische Voraussetzungen und Schlußfolgerungen für Reaktionen fehlen, bei denen sich der Enzymabbau von hochmolekularen Verbindungen vollzieht, sahen sich die einzelnen Autoren gezwungen, die Versuchsbedingungen sowie die Einheiten zur Bewertung der Aktivität der mitwirkenden Enzyme willkürlich zu wählen. Auf diese Weise war es ausgeschlossen, viskosimetrisch die einzelnen die Enzymreaktion beschreibenden Konstanten zu bestimmen.

In einer früheren Arbeit¹ befaßten wir uns mit gewissen theoretischen Voraussetzungen einer viskosimetrischen Verfolgung von Enzymreaktionen der soeben beschriebenen Art. In einer anschließenden Arbeit², welche die kinetische Verfolgung der Enzymreaktion zwischen dem Enzym Cellulase (EC 3.2.1.4 β -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase) und dem Substrat Natriumcarboxymethylcellulose (Na-CMC) behandelte, wurden die aus der Theorie abgeleiteten Schlußfolgerungen experimentell überprüft und bestätigt.

Die vorliegende Abhandlung stellt eine Erweiterung der bereits festgestellten Voraussetzungen aus allgemeineren Gründen dar. Das ermöglicht einerseits, unsere früheren Voraussetzungen zu begründen, und andererseits zu neuen Schlußfolgerungen zur viskosimetrischen Verfolgung der Kinetik bestimmter Enzymreaktionen zu kommen.

Theorie

Zur Beschreibung der enzym-katalytischen Reaktionen verwenden wir folgende Symbole bzw. Bedeutungen:

| | Substrat | Enzym |
|--|----------|----------|
| Gewichtskonzentration in mg/ml | $[S]$ | $[E]$ |
| Aufgelöste Einwaage, mg | M_S | M_{EL} |
| Katalytisch aktive Masse des gelösten Enzyms, mg ... | — | M_E |
| Volumen der Lösung, ml | V | V |
| Masse eines Moleküls, mg | m_S | m_E |
| Molekulargewicht, mg/mMol | μ_S | μ_E |
| Anzahl der Moleküle in der gelösten Masse | N_S | N_E |
| Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit, 1 ml | n_S | n_E |
| Avogadro-Zahl pro 1 mMol | N_0 | N_0 |
| Anzahl der aktiven Zentren in einem Enzymmolekül . | — | z |

Demgemäß können die Konzentrationen des Substrats und Enzyms durch

$$[S] = \frac{M_S}{V} = \frac{m_S N_S}{V} \quad (1)$$

$$[E] = \frac{M_E}{V} = \frac{m_E N_E}{V} \quad (2)$$

² M. Tschetkarov, D. Koleff und S. Banikova, Mh. Chem. 98, 1916 (1967).

und die Zahl ihrer Moleküle in einer Volumeneinheit durch

$$n_S = \frac{N_S}{V} = \frac{[S]}{m_S} = \frac{[S] N_0}{\mu_S} \quad (3)$$

$$n'_E = \frac{N_E}{V} = \frac{[E]}{m_E} = \frac{[E] N_0}{\mu_E} \quad (4)$$

ausgedrückt werden.

Bei der Veränderung der Masse eines Substratmoleküls, bzw. des Molekulargewichts des Substrats, können wir die Gl. (1) folgendermaßen formulieren:

$$[S] = \frac{M_S}{V} = \frac{\sum m_i N_i}{V} = \frac{\sum \mu_i N_i}{V N_0} \quad (a)$$

Wenn wir für die Gesamtzahl der Substratmoleküle die Gleichung $N_S = \sum N_i$, mit Gewicht $r_i = N_i/N_S$, einführen, so ergibt sich für das durchschnittliche statistische Molekulargewicht des Substrats

$$\mu_S = \frac{\sum \mu_i r_i}{\sum r_i} = \frac{\sum \mu_i N_i/N_S}{\sum N_i/N_S} = \frac{\sum \mu_i N_i}{N_S} \quad (b)$$

oder

$$\mu_S N_S = \sum \mu_i N_i \quad (c)$$

Dann folgt aus Gl. (a):

$$[S] = \frac{\mu_S N_S}{V N_0} \quad (d)$$

oder

$$n_S = \frac{N_S}{V} = \frac{[S] N_0}{\mu_S},$$

was mit (3) übereinstimmt.

Zu Beginn der Enzymreaktion wird die Zahl der aktiven Zentren der Enzymmoleküle in einer Volumeneinheit durch

$$n_E^{\circ} = z n'_E = \frac{z [E] N_0}{\mu_E} \quad (5)$$

ausgedrückt.

Im Verlaufe der Enzymreaktion verbindet sich ein Teil der aktiven Zentren mit den Substratmolekülen, während ein anderer Teil unbeteiligt, d. h. frei bleibt. Wenn sich alle aktiven Zentren der Enzymmoleküle mit den Substratmolekülen verbunden haben, erreicht die Enzymreaktion

ihre maximale Geschwindigkeit. Die Enzymmoleküle können *ein* ($z = 1$) oder *mehrere* ($z > 1$) aktive Zentren haben. Wenn alle aktiven Zentren blockiert sind (z. B. durch Bindung an Hemmstoffe), wird $z = 0$.

In den meisten Fällen haben die angewandten Enzyme eine chemische Reinheit verschiedenen Grades, welche vom Verhältnis

$$r = \frac{M_E}{M_{EL}} \leq 1 \quad (6)$$

bestimmt wird.

Einsetzen von (6) in Gl. (2) ergibt

$$[E] = \frac{M_{EL}}{V} = \frac{M_E}{rV} = \frac{m_E N_E}{rV}, \quad (7)$$

oder

$$\frac{N_E}{V} = \frac{r[E]}{m_E}, \quad (8)$$

so daß Gl. (5) [aus (4) und (8)] übergeht in:

$$n_E^{\circ} = z n'_E = z \frac{N_E}{V} = \frac{z r [E]}{m_E} = \frac{z r [E] N_0}{\mu_E} = \frac{p [E] N_0}{\mu n}, \quad (9)$$

worin $p = z r$.

Der Ausdruck (3) zeigt an, daß im Verlaufe des enzymatischen Abbaues unter Abnahme des Molekulargewichts μ_S des Substrats die Anzahl der Moleküle in einer Volumeneinheit, n_S , wächst, bis sie nach Beenden der Reaktion den definierten Endwert $n_{S\infty}$ bekommt.

Bei der Wechselwirkung zwischen dem Enzym und dem hochmolekularen Substrat soll die Reaktion von der Art



realisiert werden, in welcher die Geschwindigkeitskonstanten folgende Dimensionen haben:

$$k_{+1} (L^{-3} T^{-1}), \quad k_{-1} (T^{-1}), \quad k_{+2} (T^{-1}).$$

Aus der algebraischen Summe der Entstehungs- und Abbaugeschwindigkeit des Enzym—Substrat-Komplexes

$$\sum \frac{d(n_E n_S)}{dt} = 0 = k_{+1} n_E n_S - (k_{-1} + k_{+2}) (n_E n_S) \quad (11)$$

erhält man, indem man die Anzahl der freien aktiven Zentren des Enzyms in Rechnung setzt,

$$n_E = z n'_E - (n_E n_S) = n_E^{\circ} - (n_E n_S) \quad (12)$$

für die Konzentration des Enzym—Substrat-Komplexes zu einem bestimmten Zeitpunkt den Ausdruck

$$(n_E n_S) = \frac{n_E^{\circ} n_S}{K'_m + n_S}, \quad (13)$$

worin

$$K'_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}, \quad (14)$$

die *Michaelis—Menten*-Konstante (Dimension der Konzentration; L^{-3}) ist.

Die Geschwindigkeit, mit der die Konzentration n_S der sich unter Einwirkung des Enzyms abbauenden Substratmoleküle wächst, ist der Abbaugeschwindigkeit des Enzym—Substrat-Komplexes gleich, d. h.

$$\frac{dn_S}{dt} = - \frac{d(n_E n_S)}{dt} = k_{+2} (n_E n_S) \quad (15)$$

oder, unter Berücksichtigung von (13):

$$\frac{dn_S}{dt} = \frac{k_{+2} n_E^{\circ} n_S}{K'_m + n_S}, \quad (16)$$

was mit der *Michaelis—Menten*-Gleichung identisch ist³.

Wenn man die Ausdrücke (3) und (9) in Gl. (16) einsetzt, erhält man

$$- \frac{d\mu_S}{dt} = \frac{k^* [E] \mu_S^2}{K_m \mu_S + [S]}, \quad (17)$$

worin

$$k^* = \frac{p k_{+2}}{\mu_E} \quad (18)$$

und

$$K_m = \frac{K'_m}{N_0} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{N_0 k_{+1}} \quad (19)$$

gesetzt wurde; die *Michaelis—Menten*-Konstante (K_m) hat nun die Dimension einer Molarkonzentration (M).

Die Differentialgleichung (17) drückt die Geschwindigkeit aus, mit der das Molekulargewicht des Substrats im Verlauf der Enzymreaktion abnimmt. Man kann die Gl. (20)

$$\int_{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}}^{\mu_S - \mu_{S\infty}} \frac{d\mu_S}{\mu_S} + \frac{[S]}{K_m} \int_{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}}^{\mu_S - \mu_{S\infty}} \frac{d\mu_S}{\mu_S^2} = - \frac{k^* [E]}{K_m} \int_0^t dt \quad (20)$$

unter definierten Grenzbedingungen lösen:

³ M. Dixon und E. Webb, *Enzymes*, 2nd Ed., Longmans, p. 63 (1964).

μ_{S0} — Molekulargewicht des Ausgangssubstrats.

$\mu_{S\infty}$ — Molekulargewicht des Produkts (ungefähr dem Gewicht des Monomeren gleich).

μ_S — Molekulargewicht des Substrats im Zeitpunkt t , vom Beginn der Enzymreaktion an gerechnet.

Lösung der Gl. (20) ergibt die Abhängigkeit:

$$\ln \frac{\mu_S - \mu_{S\infty}}{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}} + \frac{[S]}{K_m} \left(\frac{1}{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}} - \frac{1}{\mu_S - \mu_{S\infty}} \right) = - \frac{k^*[E]}{K_m} t \quad (21)$$

welche in impliziter Art die Veränderung des Molekulargewichts μ_S des Substrats mit der Zeit t zeigt.

Die Ausdrücke (17) und (21) weisen darauf hin, daß die Kinetik des Abbaus des Substrats wesentlich vom Verhältnis zwischen den Konzentrationen $[E]$ und $[S]$ des Enzyms und des Substrats sowie vom Molekulargewicht des letzteren abhängig sein wird.

Erster Fall

Bei geringer Konzentration $[S]$ des Substrats, wenn im Zeitpunkt $t = 0$ die Ungleichung $K_m \mu_S \gg [S]$ gilt, wird wegen des Nenners von (17) die Enzymreaktion vorwiegend nach einem Exponentialgesetz verlaufen. In diesem Falle wird in (21) das zweite Glied von links viel kleiner als das erste bleiben; daher wird der Beginn der Enzymreaktion durch den Ausdruck

$$\mu_S - \mu_{S\infty} = (\mu_{S0} - \mu_{S\infty}) e^{-k[E]t} \quad (22)$$

beschrieben werden, welcher die vorher von uns¹ abgeleitete Abhängigkeit von der Abnahme des Molekulargewichts des Substrats darstellt. Laut (14), (18) und (19) hängt die Konstante von allen Konstanten, die die Enzymreaktion [Typ (10)] charakterisieren, ab:

$$k = \frac{k^*}{K_m} = \frac{p k_{+2}}{K_m \mu_E} = \frac{p k_{+1} k_{+2} N_0}{(k_{-1} + k_{+1}) \mu_E} \quad (23)$$

Wir haben den Vorschlag gemacht¹, diese Konstante *Ferm* zu nennen, denn sie erleichtert die Bestimmung aller internationalen Einheiten für die Aktivität eines Enzyms.

Die Abnahme des Molekulargewichts μ_S des Substrats gemäß Gl. (22) hängt ausschließlich von der Enzymkonzentration $[E]$ ab. Je geringer die Enzymkonzentration $[E]$ ist, desto langsamer nimmt das Molekulargewicht μ_S des Substrats ab und desto länger ist das Zeitintervall, in dem die Relation (22) gültig ist.

Während der Enzymreaktion, nach Ablauf der von $[E]$ bestimmten Zeit t_1 , kehrt sich die oben betrachtete Ungleichung um. Zur Zeit $t \gg t_1$

lautet sie $K_m \mu_S \ll [S]$, und die Enzymreaktion wird wegen des Nenners von (17) ausschließlich nach einem hyperbolischen Gesetz weiter verlaufen. In diesem Falle wird das erste Glied von (21) viel kleiner als das zweite und folglich wird der zweite Teil der Reaktion vom Ausdruck

$$\frac{1}{\mu_S - \mu_{S\infty}} = \frac{1}{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}} + \frac{k^*[E]}{[S]} t \quad (24)$$

beschrieben.

Abb. 1 zeigt schematisch die Veränderung des Molekulargewichts des Substrats im Verlaufe seines Abbaus. Aus der Neigung der Geraden können wir, wenn wir die Abhängigkeiten (22) und (24) in Abb. 1 auftragen, die Konstanten k und k^* bestimmen und aus (23) die *Michaelis—Menten*-Konstante berechnen:

$$K_m = \frac{k^*}{k} \quad (25)$$

Zweiter Fall

Wenn eine genügend große Konzentration $[S]$ des Substrats gewählt wird, bei welcher $K_m \mu_S \ll [S]$, wird die Enzym—Substrat-Reaktion Typ (10) wegen des Nenners von (17) ausschließlich nach hyperbolischem Gesetz (24) verlaufen.

Viskosimetrisches Verfahren

Die Ausdrücke (22) und (24) können zur viskosimetrischen Verfolgung der Kinetik bestimmter Enzymreaktionen, Typ (10), für hochmolekulare Substrate angewandt werden.

1. Kleine Substratkonzentrationen $[S]$

Laut der von *Mark* und *Houwink*⁴ auf empirischem Wege festgestellten Abhängigkeit zwischen der Viskositätszahl $[\eta]$ und dem Molekulargewicht μ_S eines Substrats

$$[\eta] = K \mu_S^a, \quad (26)$$

worin $0 < a \leq 2$, und wegen des Zusammenhanges⁵ dieser Zahl mit der spezifischen Viskosität der Lösung mit einer Konzentration $[S]$ desselben Substrats

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = [\eta][S] + B[S]^2 + \dots \quad (27)$$

⁴ *H. Mark*, Der feste Körper, Hirzel Verlag, Leipzig, S. 103 (1948); *R. Houwink*, J. prakt. Chem. **157**, 15 (1940).

⁵ *P. Allen*, Techniques of polymer characterization, Butterworth, London, p. 226 (1952).

für nicht besonders große Konzentrationen des letzteren, und wenn man sich auf das erste Glied der Reihe (27) beschränkt, wie das erwogen wurde², folgt aus (26) und (27)

$$\mu_S = \sqrt[3]{\frac{\eta_{sp}}{K [S]}} = \frac{\eta'_{sp}}{D} \tag{28}$$

Setzt man (28) in (22) ein, so erhält man

$$\eta'_{sp}(t) - \eta'_{sp}(\infty) = [\eta'_{sp}(0) - \eta'_{sp}(\infty)] e^{-k [E] t}, \tag{29}$$

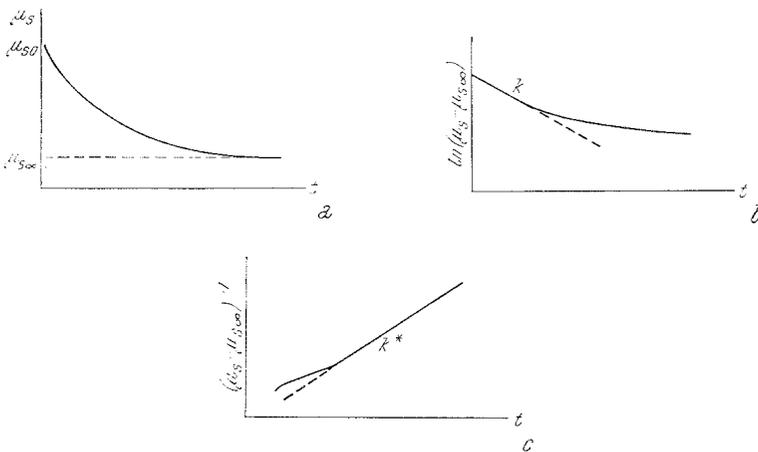


Abb. 1. a) Schematische Darstellung der Veränderung des Molgewichts μ_S des Substrats mit der Zeit t der Enzym—Substrat-Reaktion. b) Schematische Darstellung der Veränderung von $\ln (\mu_S - \mu_{S\infty})$ mit der Zeit t .

$$k = - \frac{1}{[E]} \frac{\Delta \ln (\mu_S - \mu_{S\infty})}{\Delta t}$$

c) Schematische Darstellung der Veränderung von $\frac{1}{\mu_S - \mu_{S\infty}}$ mit der Zeit t .

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

eine Abhängigkeit, die früher von uns¹ abgeleitet worden und zur Erforschung der Enzymreaktion zwischen Cellulase und Na-CMC angewandt worden ist². Aus der Abhängigkeit (9) bestimmt man leicht die Konstante k . Wird (28) in (24) eingesetzt, bekommt man den Ausdruck

$$\frac{1}{\eta'_{sp}(t) - \eta'_{sp}(\infty)} = \frac{1}{\eta'_{sp}(0) - \eta'_{sp}(\infty)} + \frac{k^* [E]}{D [S]} t. \tag{30}$$

Aus dieser Abhängigkeit kann man k^* und weiter aus (25) die *Michaelis—Menten*-Konstante (K_m) bestimmen.

2. Große Substratkonzentrationen $[S]$

Wenn wir uns bei der viskosimetrischen Verfolgung einer Enzym—Substrat-Reaktion, Typ (10), nicht auf das erste Glied der Reihe (27) beschränken, welches den linearen Zusammenhang zwischen der spezifischen Viskosität und dem Molekulargewicht des Substrats, wie in (28), definiert, ist ein anderer Zusammenhang zwischen der Viskosität und dem Molekulargewicht des Substrats erforderlich. *Baker*⁶ schlägt folgende Beziehung zwischen der Relativviskosität $\eta_{rel} = \eta/\eta_0$, der Viskositätszahl $[\eta]$ und der Substratkonzentration $[S]$ vor:

$$\eta_{rel} = \left(1 + \frac{[\eta][S]}{n} \right)^n. \quad (31)$$

Wir erhalten aus der Gl. (31) und (26) für das Molekulargewicht $\mu_S(t)$ des Substrats im Zeitpunkt t der Enzymreaktion:

$$\mu_S = \sqrt[n]{\frac{n(\sqrt[n]{\eta_{rel}} - 1)}{K[S]}}, \quad (32)$$

worin wir a , K und n als von vornherein bestimmte Konstanten annehmen. Für n wurde der Wert 8 vorgeschlagen⁷. So nehmen wir durch (32) an, daß in jedem Zeitpunkt μ_S des im Abbau befindlichen Substrats bekannt ist. Setzt man (32) in (22) und (24) ein, so entfällt bei der viskosimetrischen Verfolgung der Enzym—Substrat-Reaktion die Beschränkung auf das erste Glied der Reihe (27).

Aus der von uns theoretisch abgeleiteten Abhängigkeit (24) erhalten wir unter der Bedingung $\mu_{S0}, \mu_S \gg \mu_{S\infty}$, welche für den Anfangszeitpunkt der Reaktion gültig ist, und aus den Beziehungen (31) und (26)

$$[\eta] = \frac{n(\sqrt[n]{\eta_{rel}} - 1)}{[S]} = K \mu_S^a$$

$$\mu_S = \frac{[\eta]^{1/a}}{K^{1/a}}$$

den Ausdruck

$$[\eta]^{-1/a} = [\eta_0]^{-1/a} + \frac{B}{[S]} t,$$

⁶ *F. Baker*, J. Chem. Soc. **103**, 1653 (1913).

⁷ *K. Hess* und *W. Philippoff*, Ber. dtsh. chem. Ges. **70**, 639 (1937).

der empirisch abgeleitet^{8, 9} und unkorrekt bei der Bestimmung der Aktivität des Cellulasenenzym angewandt worden ist. Die Konstante

$$B = k^* [E] K^{-1/a}$$

wird durch unsere Schlußfolgerungen mit fest bestimmten Größen definiert und ist eine Linearfunktion von $[E]$, wie experimentell⁹ bereits festgestellt wurde.

⁸ *K. Almin* und *K. E. Eriksson*, *Biochim. biophys. Acta* **139**, 238 (1967).

⁹ *K. Almin*, *K. E. Eriksson* und *C. Jansson*, l. c. **139**, 248 (1967).