

Zur Wirkungsweise der Hydrolasen

KARL MYRBÄCK

Institution für organische Chemie und Biochemie der Universität Stockholm, Schweden

Um die Wirkung der hydrolysierenden Enzyme auf ihre Substrate und speziell die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration zu erklären, haben Michaelis und Menten¹ angenommen, dass Enzym und Substrat eine Verbindung bilden, die mit den freien Komponenten im Gleichgewicht steht. Bezeichnen wir die Substratkonzentration mit [S], die totale Enzymkonzentration mit [E] und mit [ES] die Konzentration der Enzymsubstratverbindung, so ist

$$\frac{([E] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = K_m \quad (1)$$

oder

$$\text{Relative Geschwindigkeit} = \frac{[ES]}{[E]} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (2)$$

Die Gleichgewichtskonstante K_m wurde später oft die Michaelis-Konstante genannt.

Diese Betrachtungsweise hat sich in vielen Fällen als sehr nützlich erwiesen. Besonders hat dabei das rohrzuckerspaltende Enzym, die Saccharase, als Objekt gedient. Es hat sich gezeigt, dass die einfache Gleichung (1) oft durch kompliziertere Ausdrücke ersetzt werden muss. Besonders gilt dies für den Fall, dass die Untersuchungen über grössere pH-Gebiete ausgedehnt werden. In der Gleichung (1) rechnet man offenbar damit, dass [E] für alle Versuche mit einer gewissen Enzymmenge konstant ist. Es ist aber durchaus nicht sicher, dass dies zutrifft. Bekanntlich haben Michaelis und Davidsohn² die Annahme eingeführt, dass die pH-Kurven der Enzyme durch die

amphotere Natur derselben bestimmt werden. Speziell wurde angenommen, dass der alkalische Ast der pH-Kurve der Saccharase die Dissoziationsrestkurve einer schwachen Säure mit $K_a = \text{etwa } 10^{-6.6}$ ist. Bezeichnen wir das als Säure aufgefasste Enzym mit [HE], so sollte der alkalische Ast der pH-Kurve durch die Formel

$$\frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{E}^-]}{[\text{HE}]} = 10^{-6.6} \quad (3)$$

dargestellt werden können. Nachdem dann die Annahme der Enzymsubstratverbindung durch Michaelis und Menten eingeführt wurde, haben Michaelis und Rothstein³ die Theorie der pH-Kurve dahin abgeändert, dass die Enzymsubstratverbindung eine Säure mit der erwähnten Dissoziationskonstante sein soll. Kuhn⁴ hat aber darauf hingewiesen, dass, wenn der nicht dissoziierte Teil des Enzyms (HE) das Substrat bindet und die Enzymsubstratverbindung eine Säure mit $K_a = 10^{-6.6}$ ist, eine Verschiebung des alkalischen Astes der pH-Kurve mit [S] erwartet werden muss. Von mehreren Seiten ist aber gezeigt worden, dass keine solche Verschiebung eintritt. Kuhn hat daraus den Schluss gezogen, dass die Theorie von Michaelis überhaupt falsch ist. Dies braucht indessen gar nicht der Fall zu sein. Wenn das Enzym ein Ampholyt mit gewissen K_a - bzw. K_b -Werten ist, das dank spezieller substratbindender Gruppen Rohrzucker binden kann, so ist nicht einzusehen, warum die Anlagerung des Rohrzuckers den K_a -Wert des Enzyms beeinflussen sollte. Vielmehr ist anzunehmen, dass sowohl Enzym wie Enzymsubstratverbindung Säuren mit derselben Dissoziationskonstante $K_a = 10^{-6.6}$ sind.⁵ Statt der obigen Formeln (1—3) erhalten wir dann:

$$\frac{[\text{HE}] \cdot [\text{S}]}{[\text{HES}]} = \frac{[\text{E}^-] \cdot [\text{S}]}{[\text{ES}^-]} = K_m$$

und

$$\frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{ES}^-]}{[\text{HES}]} = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{E}^-]}{[\text{HE}]} = K_a$$

Wenn Σ die totale Enzymkonzentration bedeutet, so ist

$$\Sigma = [\text{HES}] + [\text{ES}^-] + [\text{HE}] + [\text{E}^-]$$

und man findet, unter der Annahme, dass nur die Molekülart HES zerfällt, für die relative Reaktionsgeschwindigkeit den Ausdruck

$$\text{Relative Aktivität} = \frac{[\text{HES}]}{\Sigma} = \frac{1}{(1 + K_m/[\text{S}]) (1 + K_a/[\text{H}^+])} \quad (4)$$

Aus dieser Formel geht hervor, dass, wenn K_m in dem untersuchten Aziditätsgebiet konstant ist, keine Verschiebung des alkalischen Astes der pH-Kurve eintritt.

Anders liegen aber die Verhältnisse im sauren Teil des Aziditätsgebietes; das pH-Optimum der Saccharase wird mit steigendem $[\text{S}]$ breiter, indem sich der saure Ast der Kurve nach der sauren Seite verschiebt. Inaktivierungsversuche sprechen dafür, dass die Bindung des Rohrzuckers an das Enzym durch primäre Aminogruppen des Enzyms vermittelt wird, die auch für die basische Dissoziation des Enzyms verantwortlich sind.⁶ Die Verschiebung der pH-Kurve mit $[\text{S}]$ im sauren Gebiet ($\text{pH} < 4$) muss also gedeutet werden als die Folge einer Konkurrenz der H^+ -Ionen und des Rohrzuckers um die Aminogruppen des Enzyms. Anders ausgedrückt: Rohrzucker wird an die NH_2 -Gruppen, nicht aber an NH_3^+ -Gruppen gebunden. (Als Analogon kann die Bildung der Schiffschen Basen herangezogen werden.) Bezeichnen wir das nicht dissoziierte Enzymmolekül mit HENH_2 , so erhalten wir die Gleichungen

$$\frac{([\text{HENH}_2] + [\text{ENH}_2^-]) \cdot [\text{S}]}{[\text{HENH}_2\text{S}] + [\text{ENH}_2\text{S}^-]} = K_m$$

$$\frac{([\text{HENH}_3^+] + [\text{ENH}_3^-]) \cdot [\text{OH}^-]}{[\text{HENH}_2] + [\text{ENH}_2^-]} = K_b$$

$$\frac{([\text{ENH}_2\text{S}^-] + [\text{ENH}_2^-] + [\text{ENH}_3^+]) \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HENH}_2\text{S}] + [\text{HENH}_2] + [\text{HENH}_3^+]} = K_a$$

$$\Sigma = [\text{HENH}_2\text{S}] + [\text{ENH}_2\text{S}^-] + [\text{HENH}_2] + [\text{ENH}_2^-] + [\text{HENH}_3^+] + [\text{ENH}_3^-]$$

und daraus durch Elimination

$$\begin{aligned} \text{Relative Aktivität} &= \frac{[\text{HENH}_2\text{S}]}{\Sigma} = \\ &= \frac{1}{(1 + K_a/[\text{H}^+]) [(1 + K_m/[\text{S}]) (1 + K_b/[\text{OH}^-])] } \end{aligned} \quad (5)$$

Für die Saccharase gibt diese Formel die Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms von der Azidität und der Substratkonzentration im ganzen untersuchten Gebiet sehr gut wieder. Vergleicht man die Formel mit der einfachen Formel (2), so sieht man leicht ein, dass, wenn man von der Änderung des Enzyms

mit dem pH absieht und mit der Formel (2) rechnet, der K_m -Wert scheinbar mit der Azidität variiert.

In einer ganz anderen Weise betrachtet van Slyke⁷ das Problem der Hydrolasenwirkung: Die für den Umsatz eines Substratmoleküls nötige Zeit t ist zusammengesetzt aus a) der für den Zerfall eines Enzymsubstratmoleküls in die Reaktionsprodukte und freies Enzym nötigen Zeit t_1 und b) der Zeit t_2 die verstreicht, bis ein neues Substratmolekül die substratbindenden Gruppen des Enzyms trifft und dort gebunden wird. Die Zeit t_2 muss der Substratkonzentration $[S]$ umgekehrt proportional sein ($t_2 = 1/K_C \cdot [S]$), t_1 ist dagegen von der Substratkonzentration unabhängig ($t_1 = 1/K_D$). Für die Reaktionsgeschwindigkeit erhält man dann den Ausdruck

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{\frac{1}{K_C \cdot [S]} + \frac{1}{K_D}} \quad (6)$$

Die Geschwindigkeiten der beiden Reaktionen sollen nun nach van Slyke in verschiedener Weise vom pH beeinflusst werden: Die Geschwindigkeit der Bindung des Substrates an das Enzym soll in umgekehrter Proportion zur $[H^+]$ variieren, während die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzymsubstratverbindung in neutraler Lösung am grössten sein soll.

Da die Michaelis-Konstante K_m , wie aus der Formel (2) hervorgeht, gleich dem Wert derjenigen Substratkonzentration ist, bei welcher das Enzym die halbe maximale Aktivität zeigt, so muss für diesen Fall in der Formel (6) gelten, dass $K_C \cdot [S] = K_D$ ist. van Slyke hebt hervor, dass bei Variationen von K_C , die nach seiner Auffassung z. B. durch Veränderung der Azidität verursacht sein können, der K_m -Wert umgekehrt mit K_C variieren muss. Die Michaelis-Konstante ist nach van Slyke wertvoll, kann aber nur für definierte Bedingungen eine Konstante genannt werden. Van Slyke führt an, dass für Urease eine pH-Verschiebung um eine Einheit die Michaelis-Konstante 11-fach vergrössert.⁸

Es muss aber festgestellt werden, dass van Slyke bei diesen Überlegungen stillschweigend voraussetzt, dass sich die Zahl der substratbindenden Gruppen des Enzyms bei Variation der Azidität nicht ändert, eine Annahme, die kaum zulässig erscheint, da die Urease zweifelsohne ein amphoterer Eiweisstoff mit solchen Säure- und Basenkonstanten ist, dass sich ihr Dissoziationszustand in dem infragekommenden pH-Gebiet stark ändern muss. Nach Ansicht des Verfassers kann K_C (Formel (6)) an sich nicht mit der Azidität variieren; die Änderung des K_C -Wertes wird dadurch vorgetäuscht, dass sich die Anzahl der substratbindenden Gruppen ändert. Im Folgenden soll deshalb untersucht

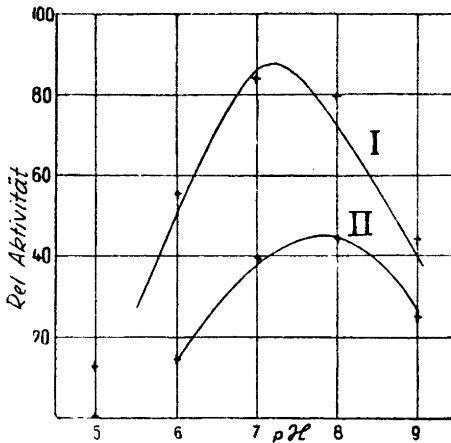


Fig. 1. Aktivitäts-pH-Kurven der Urease;
Kurve I: $[S] = 0,150 M$; Kurve II: $[S] = 0,020 M$ Harnstoff.

werden, ob die von van Slyke gefundenen Verhältnisse von diesem Gesichtspunkt aus gedeutet werden können.

Als Beispiel sollen die von van Slyke gegebenen zwei Aktivitäts-pH-Kurven der Urease für $[S] = 0,02$ bzw. $[S] = 0,150 M$ Harnstoff angeführt werden (ausgezogene Kurven in der Abbildung 1). Es fällt sofort auf, dass die durch die zwei Kurven veranschaulichten Verhältnisse denen bei der Saccharase ähnlich sind. Die alkalischen Äste der Kurven ($\text{pH} > 8$) geben den Eindruck, dass die Gruppe(n) des Enzyms, die seine Säurenatur bedingen, nicht für die Bindung des Substrats, wohl aber für die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzymsubstratverbindung eine Rolle spielen. In Lösungen saurer als $\text{pH} = 8$ tritt dagegen eine Verschiebung der Kurven (und dadurch eine Verschiebung des pH-Optimums) mit steigender Substratkonzentration deutlich hervor. Zu diesem Resultat ist auch Lövgren⁹ gelangt. Die Kurven erwecken also hier wie bei der Saccharase den Eindruck, dass die Gruppe(n), die die basischen Eigenschaften des Enzyms bestimmen, auch bei der Bindung des Substrats wirksam sind. Nimmt man an, dass die isoelektrische Urease aus Molekülen vom Typus HENH_2 besteht (wobei $-\text{NH}_2$ nur als Symbol einer basischen Gruppe aufzufassen ist), so deuten die Kurven darauf, dass einerseits die Salzbildung des Enzyms in saurer Lösung die Bindung des Substrats verhindert, dass aber andererseits die Dissoziation der sauren Gruppe(n) des Enzyms zwar mit der Anlagerung des Harnstoffs nichts zu tun hat, wohl aber den Zerfall der Enzymsubstratverbindung in Enzym und Reaktionsprodukte verhindert. Wir werden deshalb, am Beispiel der von van Slyke gegebenen Kurven, die Anwendung der für die Saccharase entwickelten Formel (5) auf die Urease versuchen.

Wenn wir also annehmen, dass der alkalische Ast der Kurven durch die saure Dissoziation des Enzyms bzw. der Enzymsubstratverbindung bedingt ist, so lässt sich der Abbildung entnehmen, dass K_a recht genau $= 10^{-9}$ sein muss. Da die Kurve für die hohe Substratkonzentration $0,150 M$, die nicht sehr weit von der theoretischen Kurve für unendlich hohe Substratkonzentration liegen kann, um die Koordinate durch $\text{pH} = 7,25$ symmetrisch ist, so muss, wenn der saure Ast der Kurven durch die basische Dissoziation des Enzyms bestimmt wird, $K_b = \text{etwa } 5 \cdot 10^{-8}$ sein. Merkwürdigerweise haben van Slyke und Zacharias¹⁰ hervorgehoben, dass die pH-Kurve der Urease der Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten mit fast gleichen Konstanten der sauren und basischen Dissoziation weitgehend ähnlich ist, ohne den naheliegenden Schluss zu ziehen, dass die Dissoziation die Anzahl der substratbindenden Stellen des Enzyms beeinflussen muss.

Aus älteren Untersuchungen, wie z. B. derjenigen von Lövgren ist ersichtlich, dass die Aktivität der Urease in $0,150 M$ Harnstoff nicht weit von der maximalen liegen kann. Schätzungsweise kann für die relative Aktivität beim pH-Optimum und $[S] = 0,150$ der Wert $0,88$ angegeben werden. Man findet dann, dass K_m etwa $0,02$ sein muss.

Wenn die Werte $K_a = 10^{-9}$, $K_b = 5 \cdot 10^{-8}$ und $K_m = 0,02$ in die Formel eingesetzt werden, findet man für die relative Aktivität die folgenden Werte (Tabelle 1):

Tabelle 1. Relative Aktivität der Urease.

pH	[S] = 0,02	[S] = 0,150
5	0,02	0,13
6	0,14	0,56
7	0,40	0,83
8	0,44	0,80
9	0,25	0,44

Die Werte der Tabelle sind in der Abbildung 1 durch Kreuze veranschaulicht. Die Übereinstimmung mit den experimentellen Kurven ist ganz gut und könnte zweifelsohne durch zweckmässige Wahl der Werte der Konstanten noch besser werden. Es ist also völlig klar, dass die Abhängigkeit der Ureasewirkung von Azidität und Substratkonzentration sehr gut unter der Annahme erklärt werden kann, dass Enzym und Substrat eine Verbindung mit einer wirklichen Gleichgewichtskonstante K_m bilden. K_m gilt für den ganzen pH-Bereich; die von van Slyke gefundene Variation von K_m mit der Azidität ist nur scheinbar und hängt damit zusammen, dass sich die Zahl der substratbindenden Gruppen mit der Azidität ändert.

Nachdem also gezeigt werden konnte, dass sich die Ureasewirkung unter gewissen Annahmen über die Affinität zum Substrat, über die sauren und ba-

sischen Eigenschaften des Enzyms und über die Art der substratbindenden Gruppen, formell beschrieben werden kann, so erhebt sich die Frage, ob die Bindung des Harnstoffes an das Enzym wirklich in der angenommenen Weise stattfinden kann. Angenommen wurde, dass die Bindung durch Aminogruppen oder andere basischen Gruppen des Enzyms vermittelt wird, und dass für den Zerfall der Enzymsubstratverbindung in Enzym und Reaktionsprodukte notwendig ist, dass die sauren Eigenschaften des Enzyms bzw. der Enzymsubstratverbindung bedingenden Gruppe(n) nicht dissoziiert ist (sind). Wenn die substratbindende Gruppe des Enzyms eine basische Gruppe ist, so wäre wohl anzunehmen, dass der Harnstoff in einer polaren Form angelagert wird. Polare Formen des Harnstoffes sind ja von mehreren Seiten diskutiert worden, so dass eine diesbezügliche Annahme nicht befremdend erscheint.

Wenn man die enzymatische Hydrolyse der zusammengesetzten Kohlehydrate, der Peptide, der Ester etc. mit der Hydrolyse dieser Verbindungen durch Säuren verknüpfen will, liegt die Annahme nahe, dass die Wirkung der Enzyme, die ja in Aziditätsgebiete fällt, in welchen die H^+ -Ionen an sich keine Rolle spielen können, damit zusammenhängt, dass die zu spaltende Bindung durch die Anlagerung des Substrats an das Enzym sehr nahe an Gruppen des Enzymmolekyls herankommt, die H^+ abgeben können und wo so zu sagen örtlich eine hohe H^+ -Konzentration herrscht. Es erscheint dann wahrscheinlich, dass es eben diese Gruppen sind, die die saure Dissoziation des Enzyms bzw. der Enzymsubstratverbindung bedingen. So erscheint es begreiflich, dass das Substrat nur dann in die Reaktionsprodukte zerfällt, wenn die betreffenden sauren Gruppen undissoziiert sind. Werden sie durch Aziditätsverschiebung nach der alkalischen Seite hin in die entsprechenden negativen Ionen übergeführt, so ist die notwendige » H^+ -Konzentration« nicht mehr vorhanden und die enzymatische Wirkung bleibt aus.

LITERATUR

1. Michaelis, L., und Menten, L., *Biochem. Z.* **49** (1913) 333.
2. Michaelis, L., und Davidsohn, H., ebenda **35** (1911) 386.
3. Michaelis, L., und Rothstein, M., ebenda **110** (1920) 217.
4. Kuhn, R., *Z. physiol. Chem.* **152** (1923) 28.
5. v. Euler, H., Josephson, K., und Myrbäck, K., ebenda **134** (1924) 39.
6. Myrbäck, K., ebenda **158** (1926) 160.
7. Van Slyke, D. D., *Advances in Enzymology* **2** (1942) 33.
8. Van Slyke, D. D., and Cullen, G. E., *J. Biol. Chem.* **19** (1914) 141, 211.
9. Lövgren, S., *Biochem. Z.* **119** (1921) 215; **137** (1923) 206.
10. Van Slyke, D. D., und Zacharias, C., *J. Biol. Chem.* **19** (1914) 181.

Eingegangen am 1. Februar 1947.