

- [205] *M. Sugita, M. Williams, J. T. Dulaney, H. W. Moser, Biochim. Biophys. Acta* 398, 125 (1975).
- [206] *C. L. Schengrund, A. Rosenberg, J. Biol. Chem.* 245, 6196 (1970).
- [207] *G. Tettamanti, I. G. Morgan, G. Gombos, G. Vincendon, P. Mandel, Brain Res.* 47, 515 (1972).
- [207a] *M. Cantz, J. Gehler, J. Spranger, Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 732 (1977).
- [207b] *G. H. Thomas, G. E. Tiller, L. W. Reynolds, C. S. Miller, J. W. Bace, Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 188 (1976).
- [207c] *G. Strecker, J. C. Michalski, J. Montreuil, J. P. Farriaux, Biomedicine* 25, 238 (1976).
- [208] *H. Pilz, K. Sandhoff, H. Jatzkewitz, J. Neurochem.* 13, 1273 (1966).
- [209] *S. R. Max, N. K. Maclarens, R. O. Brady, R. M. Bradley, M. B. Rennels, J. Tanaka, J. H. Garcia, M. Cornblath, N. Engl. J. Med.* 291, 929 (1974).
- [210] *P. H. Fishman, S. R. Max, J. F. Tallman, R. O. Brady, N. K. Maclarens, M. Cornblath, Science* 187, 68 (1975).
- [211] *D. L. Johnson, M. A. del Monte, E. Cotlier, R. J. Desnick, Clin. Chim. Acta* 63, 81 (1975).
- [212] *A. Saifer, G. Perle, C. Valenti, L. Schneck in B. W. Volk, S. M. Aronson: Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders. Plenum Press, New York 1972, S. 599f.*
- [213] *J. S. O'Brien, M. W. Ho, S. Okada, K. Zielke, M. L. Veath, L. Tennant in B. W. Volk, S. M. Aronson: Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders. Plenum Press, New York 1972, S. 581f.*
- [214] *K. Zielke, M. L. Veath, J. S. O'Brien, J. Exp. Med.* 136, 197 (1972).
- [215] *C. W. Hall, E. F. Neufeld, Arch. Biochem. Biophys.* 158, 817 (1973).
- [216] *K. Harzer, Humangenetik* 20, 9 (1973).
- [217] *K. Harzer, H. U. Benz, J. Neurochem.* 21, 999 (1973).
- [218] *K. Harzer, K. Sandhoff, H. Schall, F. Kollmann, Klin. Wochenschr.* 49, 1189 (1971).
- [219] *M. M. Kaback, J. S. O'Brien, Hosp. Pract.* 8, 107 (1973).
- [220] *S. Chatterjee, L. F. Velicer, C. C. Sweeley, J. Biol. Chem.* 250, 4972 (1975).
- [221] *A. Milunsky, J. W. Littlefield, J. N. Kanfer, E. H. Kolodny, V. E. Shih, L. Atkins, N. Engl. J. Med.* 283, 1370 (1970).
- [222] *A. Milunsky, J. W. Littlefield, J. N. Kanfer, E. H. Kolodny, V. E. Shih, L. Atkins, N. Engl. J. Med.* 283, 1441 (1970).
- [223] *A. Milunsky, J. W. Littlefield, J. N. Kanfer, E. H. Kolodny, V. E. Shih, L. Atkins, N. Engl. J. Med.* 283, 1498 (1970).
- [224] *B. K. Burton, A. B. Gerbie, H. L. Nadler, Am. J. Obstet. Gynecol.* 118, 718 (1974).
- [225] *P. S. Harper, K. M. Laurence, A. Parkes, F. S. Wusterman, H. Kresse, K. v. Figura, M. A. Ferguson-Smith, D. M. Duncan, R. W. Logan, F. Hall, P. Whiteman, J. Med. Genet.* 11, 123 (1974).
- [226] *R. J. Desnick, W. Krivit, H. L. Sharp, Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 20 (1973).
- [227] *R. C. A. Sengers, K. J. B. Lamers, J. A. J. M. Bakkeren, E. D. A. M. Schretlen, J. M. F. Trijbels, Neuropädiatrie* 6, 377 (1975).
- [228] *H. Galjaard, A. Hoogeveen, W. Keijzer, E. de Wit-Verbeek, C. Vlek-Noot, Histochem.* 6, 491 (1974).
- [229] *M. F. Niermeijer, W. J. Kleijer, M. Jahodova, E. S. Sachs, H. Galjaard, J. Genet. Hum.* 23, 123 (1975).
- [230] *A. E. Gal, R. O. Brady, S. R. Hibbert, P. G. Pentchev, N. Engl. J. Med.* 293, 632 (1975).
- [231] *A. Scharfman, N. Houdret, P. Roussel, G. Biserte, C. Aerts, A. B. Tonnel, C. Voisin, Clin. Chim. Acta* 63, 369 (1975).
- [232] *P. G. Pentchev, R. O. Brady, A. E. Gal, S. R. Hibbert, J. Mol. Med.* 1, 73 (1975).
- [233] *J. F. Tallman, P. G. Pentchev, R. O. Brady, Enzyme* 18, 136 (1974).
- [234] *M. Phillipart, S. S. Franklin, A. Gordon, Ann. Intern. Med.* 77, 195 (1972).
- [235] *M. Phillipart, Birth Defects, Orig. Artic. Ser.* 9, 81 (1973).
- [236] *R. J. Desnick, K. Y. Allen, R. L. Simmons, J. E. Woods, C. F. Anderson, J. S. Najarian, W. Krivit, Birth Defects, Orig. Artic. Ser.* 9, 88 (1973).
- [237] *P. D. Snyder Jr., F. Wold, R. W. Bernlohr, C. Dullum, R. J. Desnick, W. Krivit, R. C. Condie, Biochim. Biophys. Acta* 350, 432 (1974).
- [238] *B. Geiger, B. U. v. Specht, R. Arnon, Eur. J. Biochem.* 73, 144 (1977).
- [239] *G. M. Ihler, R. H. Glew, F. W. Schnurre, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2663 (1973).
- [240] *M. B. Fiddler, S. R. Thorpe, R. J. Desnick, Am. J. Hum. Genet.* 26, 30a (1974).
- [241] *C. M. Cohen, G. Weissmann, S. Hoffstein, Y. C. Awasthi, S. K. Srivastava, Biochemistry* 15, 452 (1976).
- [242] *J. Horst, F. Kluge, K. Beyreuther, W. Gerok, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3531 (1975).

Effizienz und Evolution der Enzymkatalyse

Von W. John Albery und Jeremy R. Knowles^[*]

Als Maß für die Wirksamkeit von Katalysatoren wurde aus kinetischen Daten eine neue Funktion abgeleitet, die Wirksamkeitsfunktion. Für frei diffundierende Spezies ist die maximale Wirksamkeit 1. Das Enzym Triosephosphat-Isomerase hat eine Wirksamkeit von 0.6 und ist demnach ein nahezu perfekter Katalysator. Die Wirksamkeit des Acetat-Ions als Katalysator der gleichen Reaktion beträgt $2.5 \cdot 10^{-11}$. Diese Zahlen lassen ahnen, was die Evolution geleistet hat.

1. Einleitung

Chemische Kinetik ohne Katalyse ist wie Skifahren ohne Ski. Enzyme sind die Katalysatoren der Natur; jedes lebende System ist davon abhängig, wie wirkungsvoll sie den Energie- und Materiefluss durch den Organismus lenken. Während der letzten Milliarde Jahre (10^9 Jahre = 1 Gigajahr) haben

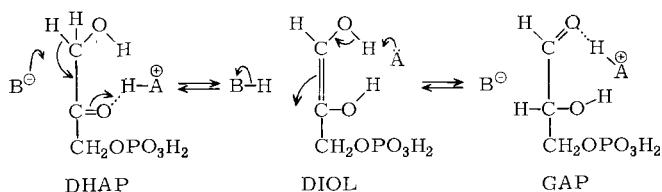
sich die Arten entsprechend den Bedingungen in ihrer Umgebung entwickelt. Wir können erwarten, daß die Evolution auch die Eigenschaften der Enzyme verbessert hat, weil die Organismen mit einem wirkungsvolleren Energie- und Materiefluss einen Selektionsvorteil besitzen.

Zum Beispiel beschleunigt das glykolytische Enzym Triosephosphat-Isomerase die in Schema 1 gezeigte Reaktion etwa 10^{10} -mal stärker als ein einfacher Katalysator wie das Acetat-Ion^[1].

Wir sollten nicht zu überrascht sein, daß das Enzym ein weit leistungsfähigerer Katalysator ist als die einfachen funktionellen Gruppen, die es enthält. Damit das Enzym den Energie- und Materiefluss durch das lebende System steuern kann,

[*] Dr. W. J. Albery
Physical Chemistry Laboratory
South Parks Road, Oxford, OX1 3QZ (England)
Prof. Dr. J. R. Knowles
Department of Chemistry, Harvard University
12, Oxford Street, Cambridge, Mass. 02138 (USA)

müssen die gewünschten Prozesse unbedingt sehr viel schneller ablaufen als die zufälligen thermischen Reaktionen der Metabolite. Daraus folgt, daß es zwischen den einfachen Katalysatoren und dem Enzym einen großen Unterschied in der

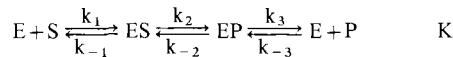


Schema 1. Isomerisierung von Dihydroxyacetonephosphat (DHAP) über das Endiol (DIOL) zu D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP). Diese Reaktion wird durch Triosephosphat-Isomerase katalysiert.

katalytischen Wirksamkeit geben muß. Können wir nun diesen Unterschied quantifizieren, und gibt es irgendeine Grenze, wie leistungsfähig ein Katalysator sein kann? Gibt es so etwas wie einen „perfekten“ Katalysator? Auf beide Fragen ist die Antwort ja. Der erste Teil dieses Aufsatzes ist der Beschreibung einer Wirksamkeitsfunktion („efficiency function“) für katalytische Reaktionen in Lösung gewidmet; im zweiten Teil wird die Funktion auf Triosephosphat-Isomerase angewendet.

2. Die Wirksamkeitsfunktion („efficiency function“)

Obgleich die im folgenden behandelten Konzepte genereller Art sind, wollen wir sie hier nur auf die Reaktion in Schema 2 anwenden, um ein Übermaß an Algebra zu vermeiden.



Schema 2. E = Katalysator, S = Substrat, P = Produkt.

An dieser Reaktion sind ein einziges Substrat und ein einziges Produkt beteiligt, die in einem Einzelschritt ineinander umgewandelt werden. Die Gleichgewichtskonstante für alle Schritte beträgt

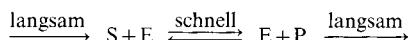
$$K = [P]_{eq}/[S]_{eq}$$

Der Buchstabe E läßt zwar ein Enzym vermuten, doch beschreibt Schema 2 nur die gegenseitige Umwandlung von S und P in Lösung unter dem Einfluß irgendeines Katalysators E. In diesem Aufsatz wollen wir jedoch E auf das Enzym beziehen – in der Erkenntnis, daß wir sonst einfache organische Katalysatoren mit einem Titel schmücken, den sie nicht verdienen.

Die Reaktion in Schema 2 kann unter irreversiblen oder reversiblen Bedingungen stattfinden. Unter irreversiblen Bedingungen kommt es nicht zu einer nennenswerten Rückumwandlung von P in S. Dies kann darauf beruhen, daß P thermodynamisch so stabil ist, daß die Möglichkeit seiner Rückreaktion vernachlässigt werden kann, oder darauf, daß P durch irgendwelche Folgereaktionen abgefangen wird, die genügend schnell sind, um seine Umwandlung in S zu verhindern.

Unter reversiblen Bedingungen ist der Netto-Materialfluß von S nach P klein genug, um die Konzentration von S und P fast bei ihren Gleichgewichtswerten zu halten. Dieser

Fall tritt ein, wenn die von E katalysierte Reaktion von zwei relativ langsam Prozessen flankiert wird:



In einer geordneten Abfolge von enzymkatalysierten Reaktionen kontrolliert oft ein Schritt den Fluß durch die ganze Sequenz. Dieser Schritt muß ein irreversibler Schritt sein. Die Kontrolle kann nicht durch einen reversiblen Schritt ausgeübt werden, weil der Übergangszustand zwischen S und P dann eine so niedrige freie Energie hätte, daß er den Fluß weder durch frühere noch durch spätere Schritte steuern könnte. Andererseits ist es viel wirkungsvoller, wenn Reaktionsschritte, die keine Kontrollschritte sind, reversibel statt irreversibel verlaufen. Bei gegebenem Fluß wird nämlich unter reversiblen Bedingungen weniger Entropie erzeugt.

Wir wollen nun eine Funktion y vorschlagen, die die Wirksamkeit eines Katalysators mißt^[2]:

$$y = \frac{[E]_0(1 - [P]/K[S])}{\vec{v}} \quad (1)$$

[E]₀ ist die Gesamtkonzentration des Enzyms und \vec{v} die Geschwindigkeit der Hinreaktion. Unter irreversiblen Bedingungen ist [P] ≪ K[S]; y wird dann [E]₀/ \vec{v} , d. h. der Reziproker Wert der Wechselzahl des Enzyms. Der Term in runden Klammern beschreibt, wie weit das System aus dem Gleichgewicht gebracht ist; er modifiziert die Wechselzahl, um die reversiblen Fälle abzudecken.

Wie ändert sich nun y mit jeder Variablen auf der rechten Seite von Gleichung (1)? Erstens: Wenn alle Konzentrationen konstant gehalten werden und die Reaktionsgeschwindigkeit \vec{v} erhöht wird, so nimmt y ab. Zweitens: Wenn die Reaktionsgeschwindigkeit sowie [P] und [S] konstant gehalten werden, aber die Enzymkonzentration verringert wird, so nimmt y ab. Drittens: Wenn bei gleicher Enzymkonzentration und gleicher Reaktionsgeschwindigkeit die Abweichung von [S] und [P] von den Gleichgewichtswerten kleiner wird, so wird y ebenfalls kleiner. Alle diese drei Änderungen führen somit zu einer Abnahme von y, aber es liegen hier in allen Fällen Änderungen vor, durch die das Enzym ein wirkungsvoller Katalysator wurde. Im ersten Fall wird die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert, im zweiten Fall wird die Reaktionsgeschwindigkeit von weniger Enzym aufrechterhalten, im dritten Fall wird die Reaktionsgeschwindigkeit unter stärker reversiblen Bedingungen und in Gegenwart von mehr Produkt und/oder weniger Substrat aufrechterhalten. Bei Abbauwegen des Stoffwechsels ist das ein Vorteil, weil dort S zugleich ein Produkt und P zugleich ein Substrat für andere enzymkatalysierte Reaktionen dieser Sequenz ist. Eine geringere Konzentration von S mindert die Geschwindigkeit der Rückreaktion durch den vorigen Schritt (oder die vorigen Schritte), eine höhere Konzentration von P steigert die Geschwindigkeit der Hinreaktion durch den folgenden Schritt (oder die folgenden Schritte). Darüber hinaus ist das System um so wirkungsvoller, je reversibler es ist.

Diese Argumente sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Wir können daraus folgern: *Je kleiner der Wert von y ist, desto wirkungsvoller ist das Enzym oder der Katalysator.* Diese Feststellung trifft zu, ob wir nun versuchen, die Reaktionsgeschwindigkeit so weit wie möglich zu erhöhen, eine gegebene Ge-

Tabelle 1. Variation von y in Gleichung (1).

	weniger Enzym $[E]_0$	stärkerer Fluß \vec{v}	stärker reversibel $(1 - [P]/K[S])$
gesteigerte Wirksamkeit	↓	↑	↓
Änderung von y	↓	↓	↓

schwindigkeit mit einer möglichst kleinen Katalysatorkonzentration zu erreichen oder das System so wenig wie möglich aus dem Gleichgewicht zu bringen. Eine solche allgemeine Funktion zu haben ist wertvoll, da das Enzym in seiner biochemischen Umgebung unter Bedingungen des konstanten Fluxes oder der konstanten Konzentration der Metabolite oder unter keiner dieser beiden Bedingungen wirken kann.

Als nächstes untersuchen wir, wie die Reaktionsgeschwindigkeit \vec{v} von den Geschwindigkeitskonstanten in Schema 2 abhängt, und erhalten

$$y = a/[S] + b + \theta c \quad (2)$$

Darin ist

$$a = \frac{\vec{K}_m}{\vec{k}_{\text{kat}}} = \frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} + \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2 k_3} \quad (3)$$

$$b = \frac{1}{\vec{k}_{\text{kat}}} = \frac{1}{k_2} + \frac{k_{-2}}{k_2 k_3} + \frac{1}{k_3} \quad (4)$$

$$c = \frac{1}{\vec{k}_{\text{kat}}} = \frac{1}{k_{-2}} + \frac{k_2}{k_{-1} k_{-2}} + \frac{1}{k_{-1}} \quad (5)$$

θ ist Null im irreversiblen und Eins im reversiblen Fall. \vec{K}_m ist die Michaelis-Konstante für die irreversible Hinreaktion.

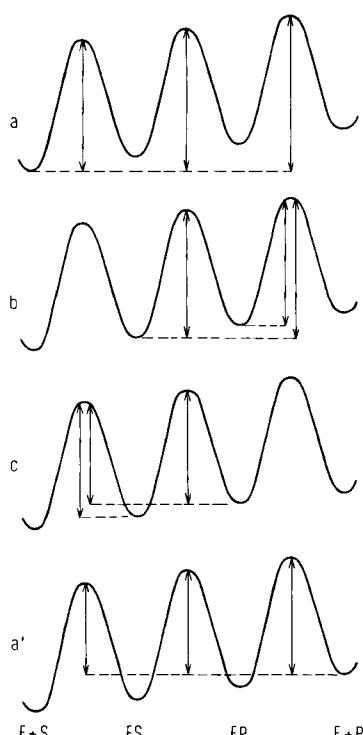


Abb. 1. Energiedifferenzen, die den Termen in den Ausdrücken a, b, c und a' [Gleichung (3) bis (6)] entsprechen. Man beachte, daß die k_{kat} -Ausdrücke b und c auf die gebundenen Zustände ES und EP bezogen sind, während die drei Übergangszustände in a und a' auf E+S bzw. E+P bezogen sind.

Diese Gleichungen beschreiben die Beziehung der Funktion y zum Energieprofil der Reaktion. Jeder individuelle Term in den Ausdrücken a, b und c entspricht einer einzigen Energiedifferenz (siehe Abb. 1).

Unter irreversiblen Bedingungen ($\theta=0$) sind die Terme im Ausdruck c, der \vec{k}_{kat} für die Rückreaktion beschreibt, überhaupt nicht in y [Gl. (2)] enthalten. Die Terme in den Ausdrücken a und b beschreiben jede nur mögliche geschwindigkeitsbestimmende Barriere, die das System auf dem Weg von links nach rechts überwinden muß. Unter reversiblen Bedingungen ($\theta=1$) haben wir zusätzlich die Terme im Ausdruck c zu berücksichtigen. Sie gelten für die Rückreaktion und sind „spiegelbildlich“ zu den Termen im Ausdruck b. Die Terme in a werden nicht in dieser Weise „gespiegelt“. Es gilt nämlich die Haldane-Gleichung. Sie besagt, daß die Gleichgewichtskonstante durch den folgenden Ausdruck wiedergegeben wird:

$$K = \frac{[P]_{\text{eq}}}{[S]_{\text{eq}}} = \frac{a'}{a}$$

Darin ist

$$a' = \frac{\vec{K}_m}{\vec{k}_{\text{kat}}} = \frac{1}{k_{-3}} + \frac{k_3}{k_{-2} k_{-3}} + \frac{k_2 k_3}{k_{-1} k_{-2} k_{-3}} \quad (6)$$

\vec{K}_m ist die Michaelis-Konstante für die irreversible Rückreaktion. Die Terme in a' sind ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt.

Man kann sehen, daß unter reversiblen Bedingungen

$$\frac{a}{[S]_{\text{eq}}} = \frac{a'}{[P]_{\text{eq}}}$$

gilt und daß man den gleichen Wert für y erhält, ob man nun die Reaktion von links nach rechts ($a/[S]_{\text{eq}}$) oder von rechts nach links ($a'/[P]_{\text{eq}}$) betrachtet. Abbildung 1 zeigt, daß der Energieunterschied der Terme in a und a' nur von der Basislinie herführt, von der aus sie gemessen werden.

Aus Gleichung (2) und Abbildung 1 können wir demnach entnehmen, wie die Wirksamkeit eines Katalysators mit dem Energieprofil der katalysierten Reaktion zusammenhängt.

Die rechte Seite von Gleichung (2) enthält viele Geschwindigkeitskonstanten, aber auch eine Variable: die Konzentration von S. Dies ist unvermeidlich, da die Schritte E+S und E+P Reaktionen 2. Ordnung sind, während alle übrigen Schritte Reaktionen 1. Ordnung sind; daher muß das Energieprofil für die Reaktion von der Konzentration von S abhängen.

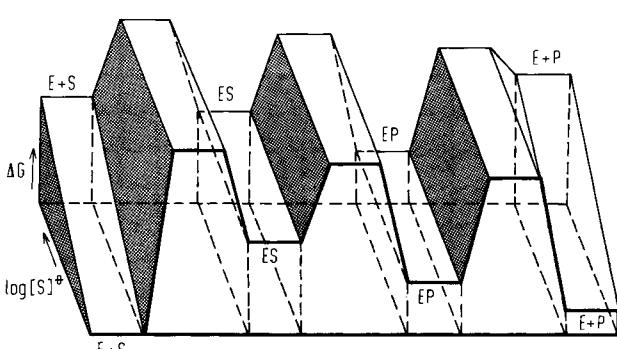


Abb. 2. Einfluß der Standardkonzentration $[S]^0$ des Substrats auf das Energieprofil. Je größer $[S]^0$ ist, um so größer ist auch die freie Energie von E+S und E+P gegenüber den anderen Zuständen.

Abbildung 2 veranschaulicht den Einfluß der Konzentrationsänderung von S und P auf das Energieprofil. Im Hintergrund der Abbildung sind die Konzentrationen von S und P hoch, und ES und EP sind stabiler als E+S und E+P. Unter diesen Bedingungen ist das Enzym gesättigt, und die Funktion y hängt hauptsächlich von den k_{kat} -Ausdrücken b und c ab. Im Vordergrund der Abbildung sind die Konzentrationen von S und P niedrig, ES und EP sind also weniger stabil als die ungebundenen Zustände, und die Funktion y wird weitgehend vom \bar{K}_m/k_{kat} -Ausdruck a bestimmt.

Wollten wir uns den üblichen Konventionen in der Chemie anschließen, müßten wir für den Schnitt in Abbildung 2 die Konzentration $[S]=1$ mol/Liter wählen. Aber diese Wahl hängt von allem möglichen ab, von Napoleon, dem CGS-System und anderen historischen Zufällen. Das Energieprofil bei 1 mol/Liter sagt überhaupt nichts über die Vorgänge in der lebenden Zelle aus, und wenn wir einen für die in-vivo-Situation relevanten Schnitt legen wollen, so müssen wir die Substratkonzentration $[S]^a$ wählen, mit der es das Enzym in der Zelle zu tun hat. Dieser gewählte Wert wird für jede Abfolge reversibler enzymkatalysierter Reaktionen gelten, und man kann für die gesamte Sequenz ein einziges Energieprofil konstruieren. Nach jeder irreversiblen Reaktion steht die Produktkonzentration allerdings in keiner thermodynamischen Beziehung zur Substratkonzentration, und es muß ein neuer Standardzustand für die folgende Sequenz reversibler Reaktionen gewählt werden.

Nun können physikalisch-organische Chemiker sagen: „Aber wir können doch die Wirksamkeit des Katalysators in Schema 2 mit Hilfe der Gesamt-Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung (k_{obs}) messen. Zum Beispiel tragen wir diese Geschwindigkeitskonstante als Maß der katalytischen Wirkung in einem Brønsted-Katalyse-Diagramm auf. Warum brauchen wir die Funktion y ?“ Die Antwort ist, daß bei der Katalyse durch einfache organische Moleküle die Zustände ES und EP aus den Reaktanden bzw. Produkten im Lösungsmittelkäfig bestehen. Diese Zustände haben bei den üblichen Konzentrationen von S eine höhere freie Energie als E+S (oder E+P). So wirkt sich bei einfachen Systemen in Gleichung (2) vor allem der $[S]^{-1}$ -Term aus:

$$y \approx \frac{a}{[S]} \approx \frac{1}{k_{\text{obs}}[S]}$$

Daher kann man die katalytische Wirksamkeit durch k_{obs} ausdrücken, solange die freie Energie des Katalysator-Substrat- und Katalysator-Produkt-Komplexes hoch ist. Sobald jedoch die freie Energie von ES und EP berücksichtigt werden muß, brauchen wir die allgemeine Funktion y .

Wir haben gesehen, daß y mit zunehmender Wirksamkeit des Katalysators abnimmt. Demnach zielt der Evolutionsdruck auf ein Enzym immer auf eine Verminderung von y ab. Gerade so wie die Gibbssche freie Energie ein Maß für die Annäherung an das chemische Gleichgewicht ist, können wir y als ein Maß für die evolutionäre Steigerung der katalytischen Wirksamkeit betrachten. Beim chemischen Gleichgewicht hat die Gibbssche freie Energie ein Minimum. Wir könnten nun fragen, ob es einen Minimalwert für y gibt, der den perfekten Katalysator beschreibt.

Kehren wir zu Abbildung 1 und Gleichung (2) zurück! Wir können sehen, daß y kleiner wird, wenn die Energiebarrie-

ren sich soweit verringern, daß sie kinetisch insignifikant werden. (Der Begriff der kinetischen Signifikanz wurde von *Richard Noyes* eingeführt. Ein kinetisch insignifikanter Übergangszustand hat eine so niedrige freie Energie, daß er in keiner Weise für den Gesamtprozeß geschwindigkeitsbestimmend wirkt. Ähnlich hat eine kinetisch insignifikante Zwischenstufe eine so hohe freie Energie, daß sich, verglichen mit den Reaktanden oder stabileren Zwischenstufen, nur sehr wenig Materie in der insignifikanten Zwischenstufe sammelt.)

Welche Energiebarrieren kann das Enzym bei der Evolution verändern? Die äußeren Niveaus (E+S und E+P) kann es nicht ändern, da diese durch die Thermodynamik des S-P-Systems festgelegt sind. Es kann auch nicht die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-3} beeinflussen, mit denen sich S+E und P+E in der Lösung finden. Die Werte für k_1 und k_{-3} sind nach oben durch die Diffusion begrenzt, und Diffusionskoeffizienten ändern sich nicht sehr stark mit der Molekülstruktur. Die freien Energien dieser „externen“ Zustände (E+S, E+P und Übergangszustände 1 und 3) können also durch das Enzym nicht verändert werden. Demgegenüber hängt die Energie der „internen“ Zustände (ES, EP und Übergangszustand 2) davon ab, wie eng sich das Enzym an S und P bindet und wie gut es die Reaktion katalysiert. Wenn alle diese internen Zustände kinetisch insignifikant werden, dann erreicht die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion ein Maximum; das Energieprofil, das dem perfekten Katalysator entspricht, hat deshalb die in Abbildung 3 gezeigte Form. Der Ausdruck für y enthält dann gerade zwei Terme des Ausdrucks a:

$$y_{\text{min}} = \frac{1}{k_D[S]} + \frac{1}{Kk_D[S]}$$

wobei k_D die Geschwindigkeitskonstante für die diffusionskontrollierte Reaktion von E+S und E+P ist. Die durch den perfekten Katalysator katalysierte Reaktion wird daher nur durch die Diffusion begrenzt, und zwar durch die Diffusion des Substrats *hin* zum Enzym bei einer energieliefernden („Bergab“-)Reaktion und durch die Diffusion des Produktes *weg* vom Enzym bei einer energieverbrauchenden („Bergauf“-)Reaktion.

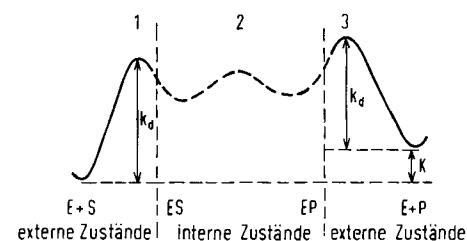


Abb. 3. Energieprofil für den perfekten Katalysator. Das Enzym kann die relativen freien Energien der externen Zustände nicht verbessern, da sie durch die Thermodynamik (K) oder durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle in Lösung (k_D) festgelegt sind. Für den perfekten Katalysator sind alle anderen Zustände, die internen Zustände, kinetisch insignifikant.

Wir haben nun eine Definition für y_{min} und können somit eine Wirksamkeitsfunktion E_f definieren, die die Wirksamkeit eines beliebigen Katalysators mit der des perfekten Katalysators vergleicht:

$$E_f = \frac{y_{\text{min}}}{y} = \frac{k_D^{-1}(1+K^{-1})}{a+[S](b+c)} \quad (7)$$

Für einfache organische Reaktionen ist

$$E_f = \frac{k_{obs}(1 + K^{-1})}{k_D} \quad (8)$$

Für eine enzymkatalysierte Reaktion kann E_f mit den üblichen Michaelis-Menten-Parametern ausgedrückt werden:

$$E_f = \frac{k_D^{-1}(1 + K^{-1})}{K_m/k_{kat} + [S](k_{kat}^{-1} + k_{kat}^{-1})} \quad (9)$$

Im reversiblen System ($\theta \approx 1$) erhält man den gleichen Wert für E_f , wenn man vom Produkt ausgeht:

$$E_f = \frac{k_D^{-1}(1 + K^{-1})}{K_m/k_{kat} + [P](k_{kat}^{-1} + k_{kat}^{-1})}$$

3. Anwendung auf Triosephosphat-Isomerase

Das Energieprofil für die Katalyse nach Schema 1 durch das Enzym Triosephosphat-Isomerase ist inzwischen weitgehend bekannt^[3], und die nichtenzymatische Katalyse der Reaktion wurde ebenfalls untersucht. So können wir also die Werte der Wirksamkeitsfunktion E_f vergleichen, und zwar für die Katalyse durch das Enzym und für die Katalyse vor der Zeit des Gartens Eden durch eine Base wie das Acetat-Ion. Aus den oben diskutierten Gründen wählen wir für die Berechnung von y eine Konzentration von S , die der in-vivo-Konzentration von Triosephosphaten im Muskel entspricht (etwa 40 $\mu\text{mol}/\text{Liter}$)^[4]. Die Ergebnisse sind^[2]:

Triosephosphat-Isomerase: $E_f = 0.6$

Acetat-Ion: $E_f = 2.5 \cdot 10^{-11}$

Da für den perfekten Katalysator $E_f = 1$ ist, zeigt sich deutlich, daß Triosephosphat-Isomerase fast perfekt ist. Die Energieprofile für die enzym- und für die acetatkatalysierte Reaktion sind in Abbildung 4 dargestellt. Der höchste Übergangszu-

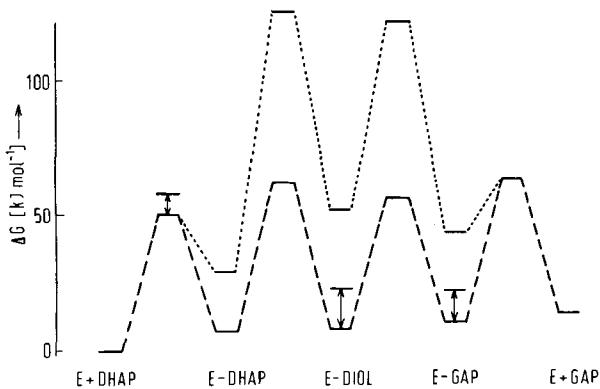


Abb. 4. Energieprofil für die Reaktion in Schema 1. (....): Durch das Acetat-Ion katalysiert; (—): durch das Enzym Triosephosphat-Isomerase katalysiert. Die vertikalen Pfeile weisen auf die Stellen, an denen das Energieprofil für die enzymkatalysierte Reaktion etwas unsicher ist.

stand der enzymkatalysierten, von links nach rechts ablaufenden Reaktion ist durch die Wegdiffusion des Produktes bestimmt, und dies ist auch der Grund, warum das Enzym ein fast perfekter Katalysator ist. Wie hat das Enzym diese bemerkenswerte Verbesserung erreicht?

3.1. Einheitliche Bindung

Die einfachste Antwort auf diese Frage könnte etwa folgende sein: Während bei einfachen organischen Katalysatoren ES und EP nur aus Reaktanden und Produkten im Lösungsmittelkäfig bestehen, kann das Enzym die Substrate, Zwischenstufen und Übergangszustände fester binden; die niedrigere freie Energie der Übergangszustände führt dann zu einer schnelleren Reaktion.

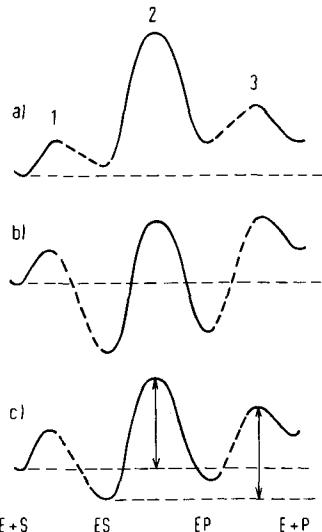


Abb. 5. Einfluß der „einheitlichen Bindung“ von Substrat und Produkt an das Enzym auf das Energieprofil. a) Zu schwache einheitliche Bindung und zu „hoher“ Übergangszustand 2; b) zu feste einheitliche Bindung und zu „niedrige“ Zwischenstufe ES; c) optimales Energieprofil.

Abbildung 5 zeigt den Einfluß der Bindung der internen Zustände auf das Energieprofil. In Abbildung 5a ist das Energieprofil für einen einfachen Katalysator dargestellt. In Abbildung 5b bindet der Katalysator das Substrat und das Produkt so fest, daß der Übergangszustand 2 „niedriger“ als der Übergangszustand 3 liegt. Haben wir somit schon den perfekten Katalysator entwickelt? Leider ist die Antwort nein, weil nun die Zwischenstufen ES und EP so stabil sind, daß ein Großteil des Enzyms im ES-Tal festgehalten wird. Die Terme von y , die das Energieprofil festlegen, gehen aus den Abbildungen 5a und 5b hervor. Durch Differenzieren kann man nachweisen, daß die Optimalbedingung (d. h. Minimalwert von y) dann erfüllt ist, wenn diese beiden Terme gleich sind. Dies ist in Abbildung 5c dargestellt.

Bei den Änderungen in Abbildung 5 haben wir alle internen Zustände (ES, EP und den Übergangszustand 2) als Block gegenüber den externen Zuständen verschoben. Wenn wir uns überlegen, welche Änderungen zufällige Punkt-Mutationen im Energieprofil einer enzymkatalysierten Reaktion verursachen könnten, so dürfen wir wohl annehmen, daß Änderungen, bei denen die internen Zustände nicht voneinander unterschieden werden und das Enzym vielerlei Wechselwirkungen nutzen kann, viel öfter vorkommen werden als Änderungen, bei denen die Zustände sehr wohl unterschieden werden und spezielle Modifikationen der Enzymstruktur erforderlich sind. So könnte der in Abbildung 5 gezeigte Typ der Änderung des Energieprofils durch Wechselwirkungen des Enzyms mit Teilen des Substratmoleküls zustandekommen, die außerhalb des Reaktionszentrums liegen, und z. B. durch hydrophobe

Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindung und elektrostatische Wechselwirkung. Bei Änderungen der Bindungsverhältnisse in einem Abstand vom Reaktionszentrum werden die gebundenen Zustände praktisch nicht voneinander unterscheiden, und wir können deshalb erwarten, daß sich die Bindung aller dieser Zustände in gleicher Weise ändert. Da bei den meisten Enzymsubstraten das Reaktionszentrum nur einen relativ kleinen Teil des Moleküls ausmacht, ist es wahrscheinlicher, daß zufällige Mutationen die Bindungen *einheitlich* modifizieren als daß sie z. B. zwischen ES und EP unterscheiden. Da Änderungen an einheitlichen Bindungen am einfachsten von allen Änderungen sind, können wir wohl erwarten, daß viele Enzyme in dieser Hinsicht optimale Profile erreicht haben. Wie Abbildung 6 zeigt, kommt Triosephosphat-Isomerase der in Abbildung 5c illustrierten Optimalbedingung sehr nahe.

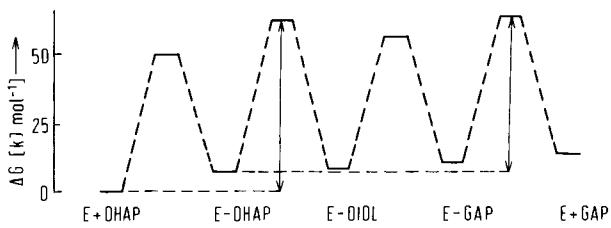


Abb. 6. Energieprofil für die durch Triosephosphat-Isomerase katalysierte Reaktion in Schema 1. Es erfüllt fast die Optimalbedingung für einheitliche Bindung.

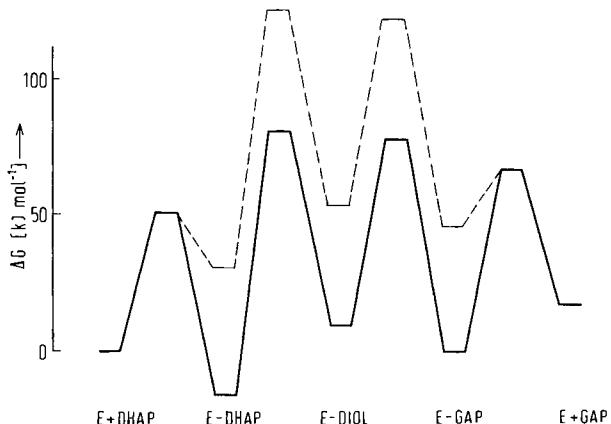


Abb. 7. Energieprofil für die durch das Acetat-Ion katalysierte Reaktion in Schema 1 vor (---) und nach (—) Optimierung der einheitlichen Bindung. Die relativen freien Energien aller internen Zustände (E-DHAP bis E-GAP) sind in beiden Energieprofilen gleich.

Nun können wir fragen: „Hat Triosephosphat-Isomerase ihre im Vergleich zum Acetat-Ion hohe Wirksamkeit nur durch Optimierung der einheitlichen Bindung erreicht?“ Abbildung 7 zeigt das Energieprofil für die acetatkatalysierte Reaktion vor und nach Optimierung der einheitlichen Bindung. Die Wirksamkeitsfunktion erreicht dabei einen Wert von $E_f = 3 \cdot 10^{-6}$. Dies ist fünf Größenordnungen besser als der Wert für den einfachen Acetatkatalysator, aber immer noch sehr weit vom Wert für das Enzym (0.6) entfernt.

3.2. Unterschiedliche Bindung

Wir nehmen an, daß die zweitleichteste Änderung, die das Enzym vornehmen kann, eine Änderung der internen Thermodynamik der gebundenen Zwischenstufen ist. Zum Beispiel

kann das optimierte Energieprofil aus Abbildung 7 weiter verbessert werden, wenn das Endiol fester als DHAP an den Katalysator gebunden wird. Eine solche Verminderung der freien Energie des Enzym-Endiol-Komplexes erleichtert die

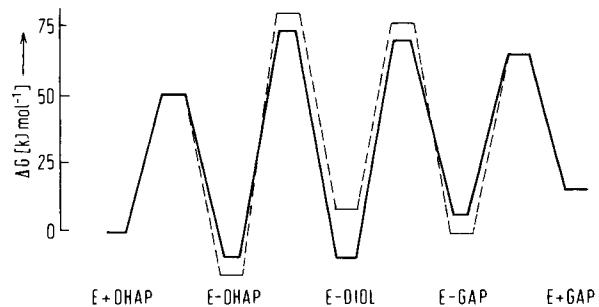


Abb. 8. Das Energieprofil aus Abb. 7 (---) wird durch Gleichsetzen der freien Energien des E-DHAP- und E-DIOL-Komplexes und anschließende Optimierung der einheitlichen Bindung weiter verbessert (—).

Abspaltung des Protons von DHAP und verbessert dadurch die Wirksamkeit. Um diese Änderung zu bewirken, muß das Enzym die Bindung an DHAP und an das Endiol voneinander unterscheiden. Es gibt noch andere Möglichkeiten, z. B. Wasserstoffbrückenbindungen, durch die der Zweck erreicht werden könnte, aber diese Änderung ist stärker lokalisiert und spezifischer; das Enzym muß offensichtlich in der Nähe des Reaktionszentrums mit dem Substrat in Wechselwirkung treten und dabei unterschiedliche Bindungen knüpfen.

Abbildung 8 zeigt das Energieprofil für die Reaktion nach Schema 1; die interne Thermodynamik ist optimiert worden, und außerdem ist die einheitliche Bindung modifiziert worden, um sie den neuen Niveaus anzupassen. Man beachte, daß die interne Thermodynamik optimal ist, wenn DHAP und das Endiol die gleiche freie Energie haben. Der Grund ist folgender: Versucht man die Abspaltung des Protons durch Senken der freien Energie des Enzym-Endiol-Komplexes weiter zu erleichtern, dann nimmt die Wirksamkeit ab, weil der Enzym-Endiol-Komplex zu stabil wird. Der Wert der Wirksamkeitsfunktion für einen Katalysator mit diesem Profil (Abb. 8) ist $E_f = 1.5 \cdot 10^{-4}$. Die Optimierung der internen Thermodynamik hat eine zwar kleinere, aber durchaus signifikante Verbesserung gebracht.

3.3. Katalyse von Einzelschritten

Nachdem wir nun sowohl die einheitliche Bindung als auch die interne Thermodynamik optimiert haben, bleibt uns nur noch übrig, die freien Energien der kinetisch signifikanten Übergangszustände gegenüber denjenigen der kinetisch signifikanten Zwischenstufen zu vermindern. Das bedeutet, daß die Energiedifferenz zwischen dem höchsten Berg und dem tiefsten Tal verkleinert werden muß. Es ist schon viel darüber geredet worden, ob dabei die Bindung des Übergangszustandes verstärkt oder die Bindung der Zwischenstufen gelockert wird. Wir halten diese Unterscheidung für belanglos, weil es nach einer Verbesserung der Katalyse eines Einzelschrittes zu Änderungen der einheitlichen Bindung kommt, die die Niveaus der internen Zustände gegenüber den Niveaus der äußeren Zustände optimieren. Wie die Abbildungen 6 und 8 zeigen, sind solche Vorgänge bei Triosephosphat-Isomerase eingetreten. Die Eingriffe zur Verbesserung der Katalyse von Einzel-

schritten müssen die subtilsten von allen sein, denn es gibt nur sehr wenige Fälle, in denen der Austausch von Aminosäuren die erforderlichen Reaktionen der kovalenten Bindungen beschleunigt hätte. Bei einer solchen Verbesserung könnte das Enzym z. B. eine zusätzliche Funktion entwickeln. Tatsächlich scheint Triosephosphat-Isomerase eine elektrophile Gruppe im aktiven Zentrum zu benutzen, um die Carbonylgruppe des Substrates zu polarisieren, wodurch die Abspaltung des Enolat-Wasserstoffs durch die Base im aktiven Zentrum erleichtert wird (Abb. 9).

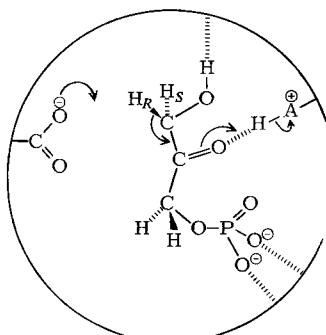


Abb. 9. Hypothetischer Komplex von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Triosephosphat-Isomerase. Die Carboxylgruppe der Glutaminsäure 165 abstrahiert unter Mithilfe einer elektrophilen Gruppe HA das pro-R-Wasserstoffatom [5].

Wir können nicht verallgemeinern, auf welche Weise die Katalyse der Einzelschritte einer Enzymreaktion verbessert wird. Jedoch können wir mit der Wirksamkeitsfunktion berechnen, *wieviel* von der gesteigerten Leistungsfähigkeit des Enzyms auf die relativ unkomplizierte Bindung der Substrate und *wieviel* auf die Katalyse der Einzelschritte zurückzuführen ist.

3.4. Änderung der Wirksamkeitsfunktion mit der Substratkonzentration

In unserer Diskussion der Triosephosphat-Isomerase verwendeten wir für die Berechnung der Wirksamkeitsfunktion als Wert für S die *in-vivo*-Konzentration des Substrats. Es ist nun interessant, den Wert E_f für Triosephosphat-Isomerase

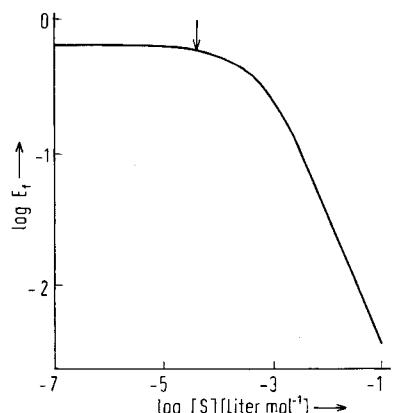


Abb. 10. Abhängigkeit der Wirksamkeitsfunktion E_f für Triosephosphat-Isomerase von $[S]$ gemäß Gleichung (7). Der Pfeil bezeichnet die *in-vivo*-Konzentration des Substrats.

als Funktion der Substratkonzentration gemäß Gleichung (7) aufzutragen. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis. Wir finden

das Enzym am Ende des Plateaus, das für das perfekte Enzym gilt. Das sollte man auch erwarten, denn wir haben ja gesehen, daß das Energieprofil bei diesem Enzym gut auf die Substratkonzentration in der Umgebung abgestimmt ist. Das Enzym ist aus den Niederungen der einfachen Katalysatoren aufgestiegen und hat das Plateau erreicht, von dem aus keine weiteren signifikanten Steigerungen seiner katalytischen Wirksamkeit mehr möglich sind.

4. Die Wirksamkeitsfläche („efficiency surface“)

Bisher haben wir die Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Substratkonzentration und von der einheitlichen Bindung getrennt behandelt. Aber einheitliche Bindung und Substratkonzentration stehen in Beziehung zueinander, denn die einheitliche Bindung wird für eine bestimmte Substratkonzentration in der Umgebung optimiert sein. Um dieses Verhalten zu veranschaulichen, können wir eine Fläche der Wirksamkeitsfunktion berechnen. Zur Konstruktion des dreidimensionalen Diagramms nehmen wir als erstes an, daß die Schritte $E + S$ und $E + P$ diffusionskontrolliert sind:

$$k_1 = k_{-3} = k_D$$

Zweitens beschreiben wir die Variation der einheitlichen Bindung durch den Parameter β , wobei

$$\beta = \frac{k_2}{k_{-1}} + \frac{k_{-2}}{k_3} \quad (10)$$

Eine Änderung der einheitlichen Bindung verursacht in k_{-1} und k_3 die gleiche proportionale Änderung, während k_2 und k_{-2} konstant bleiben. Wenn die Bindung der internen Zustände zunimmt, werden k_{-1} und k_3 kleiner und β wird größer.

Die meisten anderen Geschwindigkeitskonstanten der Wirksamkeitsfunktion können dann zu einem Parameter vereinigt werden, wobei

$$\gamma = \frac{y_{\min}}{k_2^{-1} + \theta k_{-2}^{-1}} = \frac{1 + K^{-1}}{k_2(k_2^{-1} + \theta k_{-2}^{-1})} \quad (11)$$

Demnach bleibt γ von Änderungen der einheitlichen Bindung unberührt, aber jede Verbesserung, die von Änderungen in der internen Thermodynamik oder in der Katalyse der Einzelschritte herrührt und zu größeren Werten von k_2 oder k_{-2} führt, vergrößert auch den Wert von γ .

Wir erhalten also für die Wirksamkeitsfunktion:

$$E_f \approx \frac{1}{1 + \beta^{-1} + (1 + \beta)[S]/\gamma} \quad (12)$$

Diese Gleichung^[*] gilt für alle reversiblen Systeme ($\theta = 1$), für alle einfachen Systeme ($k_2/k_{-2} \approx K$) und für alle energieverbrauchenden („Bergauf“-)Systeme ($k_2/k_{-2} \approx K \ll 1$). Einen etwas anderen Ausdruck bekommen wir für irreversible Systeme

$$E_f = \frac{1}{1 + \beta^{-1} + [1 + (1 + \rho)\beta][S]/\gamma}$$

$$\rho = \frac{(k_2/k_{-2} - K)(1 - \theta)}{(1 + K)(1 + \theta k_2/k_{-2})}$$

Für die unter Gleichung (12) diskutierten Systeme ist $\rho \approx 0$, für das unter Gleichung (13) diskutierte System ist $\rho \approx -1$.

[*] Der vollständige Ausdruck für E_f lautet

($\theta=0$), die „bergab“ gerichtet sind ($K \gg 1$) und bei denen die interne Thermodynamik ausgewogener als die externe Thermodynamik ist ($k_2/k_1 \ll K$):

$$E_f \approx \frac{1}{1 + \beta^{-1} + [S]/\gamma} \quad (13)$$

Der Unterschied besteht nur im zusätzlichen β/γ -Term in Gleichung (12). Da sie jedoch für eine größere Zahl von Fällen einschließlich der wirkungsvolleren reversiblen Systeme gilt, konzentrieren wir uns auf Gleichung (12).

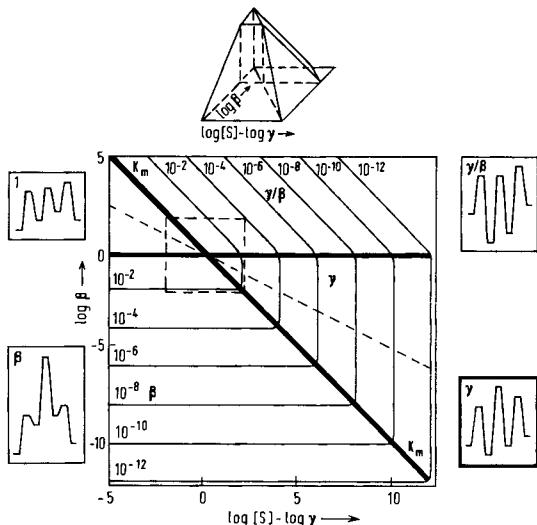


Abb. 11. Das Schichtdiagramm zeigt die Änderung der Wirksamkeitsfunktion [Gl. (12)] mit dem Parameter β der einheitlichen Bindung [Gl. (10)] und mit der durch γ geteilten Substratkonzentration [Gl. (11)]. Oben ist die Form der Fläche in einer perspektivischen Zeichnung wiedergegeben. Die vier eingeraumten kleinen Abbildungen zeigen typische Energieprofile für die vier Ebenen des Schichtdiagramms. Die mit K_m bezeichnete Linie [Gl. (15)] gibt die Konzentration $[S]$ an, bei der das Enzym halbgesättigt ist. Die gestrichelte Linie gilt für den Optimalwert von β (siehe Abb. 5c). Die Fläche im gestrichelten Rechteck ist in Abb. 12 vergrößert dargestellt.

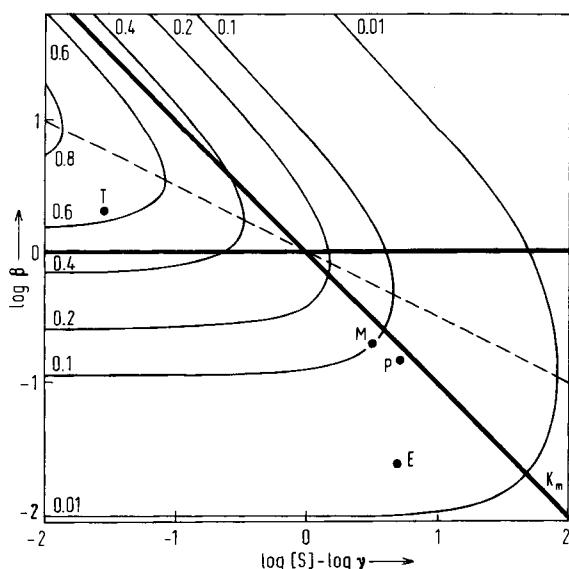


Abb. 12. Das Gebiet in der Nähe des Ursprungs von Abb. 11. Die Punkte T, M, P und E bezeichnen die Lage von vier glykolytischen Enzymen in diesem Diagramm: T = Triosephosphat-Isomerase, M = Phosphoglycerat-Mutase, P = Phosphoglucose-Isomerase, E = Enolase.

Da nun E_f von β und $[S]/\gamma$ abhängt, können wir Gleichung (12) für E_f als Schichtdiagramm zeichnen (siehe Abb. 11 und

12). Je nachdem, welcher Term im Nenner von Gleichung (12) dominiert, finden wir in Abbildung 11 vier Ebenen. In der oberen linken Ecke liegt das „Plateau der Perfektion“; dort tendiert E_f nach 1. Unten haben wir die β -Ebene mit $E_f \approx \beta$. In dieser Ebene ist die einheitliche Bindung zu schwach, und der Übergangszustand 2 ist immer geschwindigkeitsbestimmend. In diesen beiden Ebenen ist die Wirksamkeitsfunktion unabhängig von der Substratkonzentration. Der Katalysator ist ungesättigt, und das kinetische Geschwindigkeitsgesetz hat die Form

$$v = k[S][E]$$

Wenn dagegen die beiden anderen Terme in Gleichung (12) überwiegen, ist die Wirksamkeitsfunktion umgekehrt proportional zu $[S]$. Die Wirksamkeit fällt mit zunehmendem $[S]$, und das Geschwindigkeitsgesetz hat die Form

$$v = k[E]$$

Diese Systeme sind gesättigt.

Wir führen nun zusätzlich zu \vec{K}_m und \vec{K}_m eine dritte Michaelis-Konstante $K_{m, eq}$ ein. Sie gilt für reversible Systeme in der Nähe des Gleichgewichts:

$$K_{m, eq} = \frac{\vec{K}_m}{1 + \vec{k}_{kat}/\vec{k}_{kat}} = \frac{\vec{K}_m K^{-1}}{1 + \vec{k}_{kat}/\vec{k}_{kat}} \quad (14)$$

Diese Systeme werden halbgesättigt, wenn

$$[S] \approx [P] K^{-1} \approx K_{m, eq}$$

Um nun sowohl reversible als auch irreversible Fälle zu erfassen, schreiben wir

$$K_m = \gamma/\beta = \vec{K}_m / (1 + \theta \vec{k}_{kat}/\vec{k}_{kat}) \quad (15)$$

wobei K_m zu \vec{K}_m wird, wenn $\theta=0$, und zu $K_{m, eq}$, wenn $\theta=1$ [*].

Diese Konstante K_m definiert die Trennungslinie zwischen den vier Ebenen in Abbildung 11. Systeme, die diese Linie schneiden, wenn die Substratkonzentration variiert wird, gehorchen der Michaelis-Menten-Kinetik.

Rechts von der β -Ebene liegt die γ/β -Ebene. Hier hängt die Wirksamkeit nicht sehr stark vom Parameter β für einheitliche Bindung ab, weil der wichtigste geschwindigkeitsbestimmende Prozeß der Zerfall einer relativ stabilen Zwischenstufe EP oder ES über den Übergangszustand 2 ist. In der rechten oberen Ecke haben wir schließlich die γ/β -Ebene. Hier ist die Bindung fest, und für den Zerfall von ES und EP ist der Übergangszustand 1 oder 3 geschwindigkeitsbestimmend. Bei der irreversiblen „Bergab“-Reaktion, bei der Gleichung (15) gilt, fehlt diese Ebene. Man kann daran sehen, daß die Wirksamkeitsfunktion ohne Rücksicht darauf angewendet werden kann, ob die biologische Rolle der betrachteten Systeme es erfordert, daß sie unter gesättigten oder ungesättigten Bedingungen reagieren.

[*] Der vollständige Ausdruck für K_m lautet

$$K_m = \frac{\gamma/\beta}{1 + \rho(1 + \beta)^{-1}}$$

ρ ist in der Fußnote auf S. 301 definiert. Gleichung (15) gilt, wenn $\rho=0$, und Gleichung (12) gilt, oder wenn $\beta \gg 1$.

Nachdem wir nun die Flächen beschrieben haben, können wir die Gebiete suchen, in denen einfache organische Systeme vorkommen. Für die typischen Werte $k_{\text{obs}} = 1 \text{ Liter mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_D/k_{-D} = 0.1$ erhalten wir aus Gleichung (10)

$$\beta \approx \frac{k_2}{k_{-1}} = \frac{k_{\text{obs}}}{k_D} = E_f \approx 10^{-10}$$

und aus Gleichung (11)

$$\gamma \approx \frac{k_2}{k_D} = \frac{k_{\text{obs}} k_{-D}}{k_D^2} = \frac{\beta k_{-D}}{k_D} = 10\beta \approx 10^{-9} \text{ mol/Liter}$$

(k_D/k_{-D} beschreibt eine typische Gleichgewichtskonstante für die Assoziation zwischen Katalysator und Reaktand oder Katalysator und Produkt im Lösungsmittelkäfig. Bei Abwesenheit spezifischer Wechselwirkungen kann man eine solche Konstante für ES und EP aus der Wahrscheinlichkeit ableiten, daß die Moleküle E und S oder E und P nächste Nachbarn sind.) In Abbildung 13 haben wir deshalb das Gebiet markiert, in dem die einfachen organischen Systeme gefunden werden. Sie zeigen keine Michaelis-Menten-Kinetik, und die Substratkonzentration ist nicht groß genug, um sie die Trennungslinie zwischen der β - und γ -Ebene überschreiten zu lassen.

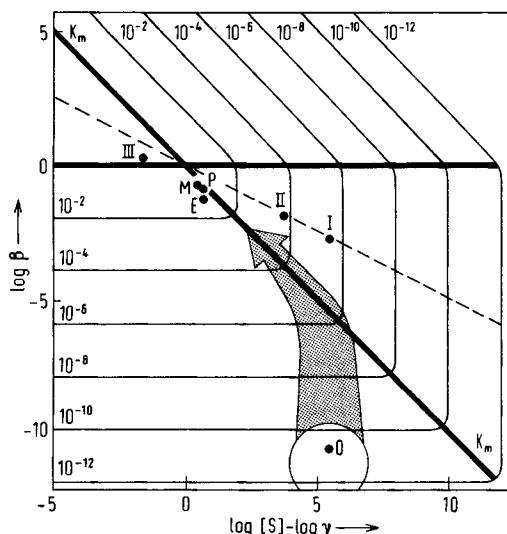


Abb. 13. Die Lage mehrerer Systeme auf der Wirksamkeitsfläche. Der Kreis bezeichnet das Gebiet der einfachen organischen Systeme. Punkt 0 entspricht der acetatkatalysierten Reaktion in Schema 1. Die Punkte I und II gelten für die gleiche Reaktion nach Optimierung der einheitlichen Bindung (Abb. 7) bzw. nach Verbesserung durch unterschiedliche Bindung (Abb. 8). Punkt III entspricht der Triosephosphat-Isomerase; M, P, E siehe Abb. 12.

Der Druck der natürlichen Selektion wird das Enzym bei der Evolution zuerst auf die γ -Ebene treiben, da es viele Wege gibt, die einheitliche Bindung zu etablieren (d. h. β zu erhöhen). Wenn das Enzym erst einmal das Gebiet um die K_m -Linie erreicht hat, ist die weitere Optimierung der einheitlichen Bindung nicht allzu kritisch. Die katalytische Wirksamkeit muß nun durch Erhöhung von k_2 oder k_{-2} (d. h. Erhöhung von γ) gesteigert werden. Schließlich kann das Enzym den Ursprung überqueren und das Plateau der Perfektion erreichen. In Abbildung 13 sind diese Schritte für Triosephosphat-Isomerase eingezzeichnet.

Das Enzym wird nicht weit auf das Plateau der Perfektion vorstoßen. Der Grund ist, daß das Enzym einen konstanten

Evolutionsdruck benötigt, um sich auf dem Plateau behaupten zu können. Die meisten Mutationen sind für das Enzym ungünstig und tendieren dazu, es wieder nach unten zu stoßen. Auf dem flachen Teil des Plateaus kann es keinen Evolutionsdruck geben. Stellen wir uns ein Enzym vor, das durch irgendeinen Glücksschlag „super-perfekt“ wurde und einen sehr niedrigen Übergangszustand 2 besitzt (siehe Abb. 3). Der hohe Anteil an nachteiligen Mutationen würde diese Vergünstigung abbauen, bis der Übergangszustand 2 wieder teilweise geschwindigkeitsbestimmend wird. An diesem Punkt würde die natürliche Selektion eine weitere Verschlechterung verhindern. Aus diesem Grund erwarten wir, daß Enzyme am Rand des Plateaus hängen. Der zugänglichste Teil des Plateaus ist nahe dem Ursprung, und dies ist auch der Bereich, wo wir die Enzyme finden sollten. Die Bedingungen für den Ursprung sind $\beta = 1$ und $\gamma = [S]^0$, wobei $[S]^0$ die in-vivo-Konzentration des Substrates ist. Mehrere Autoren haben vorgeschlagen^[6-8], daß bei einem wirkungsvollen Enzym die Michaelis-Konstante mit der Konzentration des umgebenden Substrats vergleichbar sein sollte. Wir stimmen dem zu, da am Ursprung gilt

$$K_m = \gamma/\beta = [S]^0$$

Hier muß aber auf die Reversibilität des Systems geachtet werden, und K_m muß durch Gleichung (15) definiert sein. Zusätzlich können wir auch das Energieprofil am Ursprung beschreiben. Es gibt Gründe für die Annahme, daß ein Katalysator besser wird, wenn $k_2 \approx k_{-2}$. Wenn wir $k_2 = k_{-2}$ und $[S] = [S]^0$ setzen, erhalten wir das in Abbildung 14 gezeigte Energieprofil. Man kann sehen, daß die Übergangszustände 2 und 3 die gleiche freie Energie haben. Der Grund dafür ist, daß das Enzym unwirksam wäre, wenn der Übergangszustand 2 über dem Übergangszustand 3 läge. Wenn aber der Zustand 2 weit unter dem Zustand 3 läge, dann gäbe es keinen Evolutionsdruck, der eine unnötig schnelle gegenseitige Umwandlung von ES und EP bewirke. Wir erwarten daher, daß bei Enzymen am Rand des Plateaus mehrere Übergangszustände teilweise geschwindigkeitsbestimmend sind. Wie bei der geologischen Erosion werden die hohen Berge abgetragen, bis sie ein gutes Plateau geworden sind.

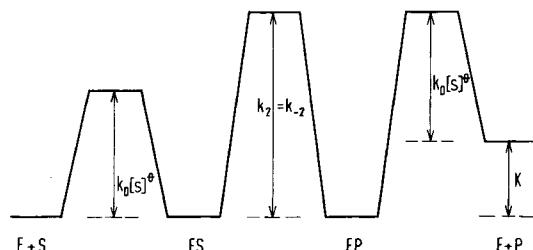


Abb. 14. Energieprofil eines fast perfekten Enzyms, das in den Abbildungen 11 bis 13 in der Nähe des Ursprungs liegt.

Kehren wir zu Abbildung 14 zurück, so finden wir, daß die Zwischenstufen ES und EP fast die gleiche freie Energie haben wie E+S. Läge die freie Energie der Zwischenstufen weit unter der von E+S, so wäre das Enzym unwirksam, der Katalysator wäre tief im ES-Tal verborgen. Aber es gibt keinen Evolutionsdruck, der die freie Energie von ES erheblich über der von E+S hielte. Wir erwarten daher, daß im Energieprofil für ein Enzym mehrere Zwischenstufen etwa die gleiche freie Energie wie E+S haben werden, wenn die Konzentration

des umgebenden Substrats $[S]^6$ ist. Für reversible „Bergab“-Systeme wird das maßgebende Niveau E + P sein, da seine freie Energie unter denjenigen von E + S liegt.

In diesem Aufsatz haben wir Triosephosphat-Isomerase als Beispiel verwendet, weil wir von ihrem Energieprofil detaillierte Kenntnisse besitzen. Wir können jedoch auch andere Enzyme in unser Diagramm eintragen, indem wir Werte aus der Literatur für k_{kat} und K_m benutzen. Die Beziehungen zwischen unseren Variablen und k_{kat} und K_m sind:

$$\beta^{-1} \approx \frac{\bar{K}_m k_D}{\bar{k}_{\text{kat}}(1 + K^{-1})} - 1 \quad (16)$$

und

$$\gamma^{-1} \approx \frac{k_D(\bar{k}_{\text{kat}} + \theta \bar{k}_{\text{kat}}^{-1})}{1 + K^{-1}} - (1 + \rho) K_m^{-1} \quad (17)$$

In Abbildung 13 haben wir drei andere glykolytische Enzyme eingezeichnet, für die die Werte für k_{kat} , K_m , K und $[S]^6$ zur Verfügung standen. Diese Daten sind erforderlich, um E_f , β und γ für ein reversibles System ($\rho = 0$) zu berechnen. Diese drei Enzyme (Enolase, Phosphoglucose-Isomerase und Phosphoglycerat-Mutase) haben keine Kontrollfunktion in der Glykolyse; es ist erfreulich, sie in den Abbildungen 12 und 13 nahe am Ursprung und nahe an der K_m -Linie zu finden^[*].

[*] Die Werte für k_{kat} , K_m und K_{eq} wurden aus folgenden Veröffentlichungen entnommen: Phosphoglycerat-Mutase [aus Kaninchennmuskel: *H. G. Britton, J. B. Clarke*, Biochem. J. 130, 397 (1972). Es wurde angenommen, daß die Konzentration des Cofaktors 2,3-Diphosphoglycerat ($K_m = 0,28 \mu\text{mol/Liter}$) optimal war]; Enolase [aus Kaninchennmuskel: *R. P. Cory, F. Wold*, Biochemistry 5, 3131 (1966); *F. Wold* in *P. Boyer*: The Enzymes. Academic Press, New York 1971, Bd. 5, S. 499. Es wurde angenommen, daß die optimale Mg-Konzentration bei 1 mmol/Liter lag]; Phosphoglucose-Isomerase [aus Kaninchennmuskel: *E. Noltmann* in *P. Boyer*: The Enzymes. Academic Press, New York 1972, Bd. 6, S. 271. Es wurde angenommen, daß die α -Formen die bevorzugten Substrate sind; *K. J. Schray, S. J. Benkovic, P. A. Benkovic, I. A. Rose*, J. Biol. Chem. 248, 2219 (1973)]. Die in-vivo-Konzentrationen der Substrate wurden entnommen aus *J. R. Williamson*, J. Biol. Chem. 240, 2308 (1965); *H. J. Horrocks, M. Reim, H. Bartels*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 137 (1962).

5. Schlußbetrachtung

Zum Schluß fassen wir unsere Folgerungen zusammen.

1. Unsere vorgeschlagene Wirksamkeitsfunktion quantifiziert die Wirksamkeit eines beliebigen Katalysators für eine Reaktion in Lösung sowohl unter reversiblen als auch unter irreversiblen Bedingungen.

2. Für frei diffundierende Spezies ist die maximale Wirksamkeit 1.

3. Wir erwarten und finden Enzyme mit einer Wirksamkeit, die etwas unter 1 liegt ($\approx 0,1$).

4. Einfache organische Systeme haben eine Wirksamkeit in der Größenordnung von 10^{-11} .

5. Bei Triosephosphat-Isomerase beruht die Steigerung der Enzymwirkung etwa zur Hälfte auf der Bindung der Substrate, Zwischenstufen und Übergangszustände durch eine Wechselwirkung, die nicht zwischen den einzelnen Spezies unterscheidet, und zur Hälfte auf einer verbesserten Katalyse der Reaktionen an den kovalenten Bindungen des Substrats.

6. Bei einem fast perfekten Enzym entspricht die Michaelis-Konstante der Substratkonzentration in vivo.

7. Im Energieprofil eines fast perfekten Enzyms wird es mehrere Übergangszustände geben, die teilweise geschwindigkeitsbestimmend sind, und mehrere Zwischenstufen, deren freie Energie mit derjenigen des Enzyms plus Substrat oder des Enzyms plus Produkt vergleichbar ist.

Eingegangen am 30. September 1976 [A 163]
Übersetzt von Dr. Dietmar Kukla, Martinsried

- [1] *A. Hall, J. R. Knowles*, Biochemistry 14, 4348 (1975).
- [2] *W. J. Albery, J. R. Knowles*, Biochemistry, im Druck.
- [3] *W. J. Albery, J. R. Knowles*, Biochemistry, im Druck.
- [4] *J. R. Williamson*, J. Biol. Chem. 240, 2308 (1964).
- [5] *M. R. Webb, J. R. Knowles*, Biochemistry 14, 4692 (1975).
- [6] *A. R. Fersht*, Proc. Roy. Soc. B 187, 397 (1974).
- [7] *P. H. Crowley*, J. Biol. Chem. 250, 461 (1975).
- [8] *A. Cornish-Bowden*, J. Mol. Biol. 101, 1 (1976).