

Enzymkinetik in der Schule

Michaelis-Menten-Kinetik von Urease

Sara Müller^{1,2}, Marianne Kromke², Helmut Vogt², Daniela Moll³

¹ Science Bridge, Universität Kassel

² Abt. Didaktik der Biologie, Universität Kassel

³ Abt. Biochemie, Universität Kassel

Urease ist ein Enzym, das Harnstoff spaltet und dessen Reaktionsgeschwindigkeit leicht mittels Leitfähigkeitsmessungen bestimmt werden kann. Dieses Experiment kann, als Schüler- oder Demonstrationsversuch, im Biologie- und Chemieunterricht der Oberstufe von qualitativen Betrachtungen bis hin zur Ermittlung komplexer kinetischer Beschreibungen (Michaelis-Menten-Kinetik) ausgewertet werden.

Das Enzym Urease

Das nickelhaltige Enzym Urease (Harnstoff-Amidohydrolase, Abbildung 1) kommt in vielen Pflanzen und Bakterien vor. Urease katalysiert die Spaltung von Harnstoff in Kohlenstoffdioxid und Ammoniak, die in wässriger Lösung Ionen bilden (Abbildung 2). Harnstoff wird von allen Säugetieren produziert, wodurch überschüssiger Ammoniak (z.B. aus dem Aminosäureabbau) durch den Urin ausgeschieden wird. Ein Erwachsener produziert pro Jahr ca. 10 kg Harnstoff [7].

Der stechende Geruch von Mist ist hauptsächlich auf Ammoniak zurückzuführen, der durch den Abbau von Harnstoff durch Bodenbakterien mittels Urease erfolgt. Das Enzym spielt eine große Rolle beim Stickstoffkreislauf, da der Harnstoff der Jauche erst durch Urease hydrolysiert wird. Erst danach können Pflanzen den Stickstoff als Ammoniumionen aufnehmen.

Robin Warren und Barry Marshall erhielten 2005 den Nobelpreis für Medizin für ihre Arbeiten an dem Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), welches viele Menschen unfreiwilligerweise in ihrem Magen beherbergen. Die beiden Wissenschaftler hatten herausgefunden, dass die enzymatische Aktivität der von *H. pylori* in großen Mengen gebildeten Urease die Hauptursache für Magengeschwüre ist. Die produzierten Ammoniumionen sind ein Zellgift und wahrscheinlich verantwortlich für die Gewebeschädigungen [1]. Bei Schnelltests wird zum Nachweis des Bakteriums auch heute noch die enzymatische Aktivität der von *H. pylori* gebildeten Urease genutzt.

Die Urease war das erste Enzym, das in kristalliner Form erhalten wurde, und stellt damit den Beginn detaillierter Strukturaufklärung von Proteinen durch Röntgenkristallografie dar. James Batcheller Sumner erhielt für diese Arbeit 1946 den Nobelpreis für Chemie.



Abbildung 1: Kristallstruktur des Enzyms Urease aus *Helicobacter pylori* ([2], [3]). Gezeigt ist der Enzym-Substrat-Komplex mit einem Harnstoffanalogon (Acetohydroxamsäure). Dieses Molekül bindet wie Harnstoff im aktiven Zentrum, wird jedoch von der Urease nicht umgesetzt. Die beiden Nickelionen im aktiven Zentrum sind gelb dargestellt.

Der enzymatische Abbau von Harnstoff durch Urease kann mit relativ einfachen Mitteln durchgeführt werden. Nach den meisten Lehrplänen für die Oberstufe lässt sich das Experiment sowohl in den Biologie- als auch in den Chemieunterricht integrieren. Der Versuch lehrt eine quantitative Datenerfassung und -auswertung sowie die Ermittlung von ► Michaelis-Menten-Kinetiken. Die Auswertung des Experiments kann mit unterschiedlicher Tiefe erfolgen. Diese reicht von einer rein qualitativen Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen über die Ermittlung von ► K_M -Werten bis hin zu Experimenten zur Substratspezifität.

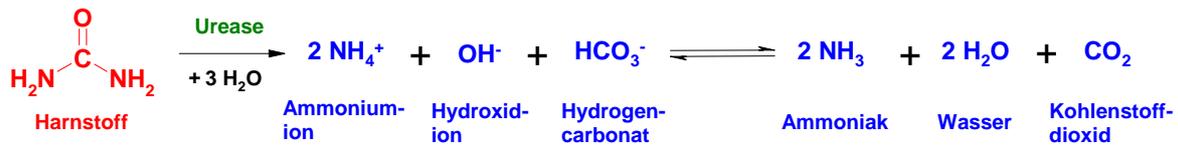


Abbildung 2: Harnstoff wird durch Urease zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid abgebaut, die in wässriger Lösung mit den dazugehörigen Ionen im Gleichgewicht liegen.

Die Messmethode

Enzyme sind nahezu immer Proteine, die als Katalysator fungieren. Das Funktionsprinzip von Enzymen besteht darin, den ►Enzym-Substrat-Komplex zu stabilisieren. Dies wird durch die Bindung des Substrats in optimaler Orientierung in einer geschützten Tasche (aktives Zentrum) des Enzyms (Abbildung 1) gewährleistet. Anschaulich wird dies häufig als Schlüssel-Schloss-Prinzip bezeichnet. Eine enzymatische Reaktion lässt sich nach einem Modell von Leonar Michaelis und Maud Menten (1913) vereinfacht mit folgender Gleichung darstellen:



E: (freies) Enzym
 S: Substrat
 ES: Enzym-Substrat-Komplex
 P: Produkt

Experimentell kann die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion durch die Messung der Substratabnahme oder der Produktbildung pro Zeiteinheit ermittelt werden.

$$v = \frac{-dc(S)}{dt} = \frac{dc(P)}{dt}$$

v: Geschwindigkeit
 dc(S): Änderung der Substratkonzentration
 dt: Zeitintervall
 dc(P): Änderung der Produktkonzentration

Die Produktbildung der Urease kann über die Leitfähigkeit gemessen werden. Die bei der enzymatischen Umsetzung frei gesetzten Ionen (Abbildung 2) erhöhen die Leitfähigkeit der Reaktionslösung, während Harnstofflösungen nicht leitend sind. Die Zunahme der Leitfähigkeit ist proportional zur Ionenkonzentration in der Lösung und damit ein Maß für die Produktbildung.

Material

Es wird benötigt:

Chemikalien

- 3 g Harnstoff (Harnstoff zur Analyse [Artikelnummer 108487], 500 g ca. 20 €, Fa. Merck)
- 0,12 g Urease (Urease aus Schwertbohnen (*Canavalia gladiata*), lyophilisiert 5 U mg⁻¹ [Artikelnummer 108489], 5 g ca. 46 €, Fa. Merck)
- Wasser (dest.)

Für den Versuch ist die Verwendung von Harnstofflösungen in destilliertem Wasser mit den Konzentrationen von 2 bis 50 mmol L⁻¹ (2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 24, 30, 50 mmol L⁻¹) empfehlenswert.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die einmalige Messung von zehn Harnstoffkonzentrationen und einer Negativkontrolle (dest. Wasser mit Urease).

Um Verdünnungsfehler möglichst gering zu halten, werden 50 mL einer 1 mol L⁻¹ HarnstoffstammLösung (= 3 g pro 50 mL) hergestellt. Aus dieser Lösung werden jeweils 100 mL der anderen Konzentrationen verdünnt. Harnstofflösungen sind auch im Kühlschrank nur wenige Tage haltbar und sollten daher möglichst zeitnah vor dem Versuch angesetzt werden. Die Ureaselösung (60 mL) wird mit der Konzentration 2 mg/mL (0,12 g pro 60 mL) jeweils frisch angesetzt.

Geräte (eines pro Schülergruppe)

Leitfähigkeitsmessgerät (z.B. Gerät LF91 der Firma WTW)

Magnetrührer

Rührfisch

5 mL-Voll- oder Messpipette

Pipettierhilfe für 5 mL-Pipetten

100 mL-Becherglas (muss nach jedem Versuch ausgewaschen und getrocknet werden)

Kleines Becherglas (50 mL, als Vorratsgefäß für die Urease)

Stoppuhr

100 mL-Messzylinder

Zusätzlich insgesamt zehn 150 mL-Bechergläser oder Glasflaschen (als Vorratsgefäße für die verschiedenen Harnstoffkonzentrationen).

Versuchsaufbau und Durchführung



Abbildung 3: Versuchsaufbau

Pro Versuchsansatz werden 80 mL der Harnstofflösung in ein 100 mL Becherglas gegeben und mit einem Rührfisch auf einen Magnetrührer gestellt. Der Messfühler eines Leitfähigkeitsmessgerätes wird so an einem Stativ befestigt, dass er in das Reaktionsgefäß abgesenkt werden kann (Abbildung 3). Je nach Qualität des destillierten Wassers wird eine Grundleitfähigkeit von ca. 3 bis 7 $\mu\text{S cm}^{-1}$ angezeigt. Mit der Pipette werden unter ständigem Rühren 5 mL der Ureaselösung hinzugefügt und gleichzeitig die Stoppuhr gestartet. Die Aufnahme der Messpunkte sollte nach ca. 15 s begonnen werden, da sich Ureaselösung und Harnstofflösung mischen müssen und die Messwerte zu Beginn ungenau sind. Dann werden über einen Zeitraum von zwei Minuten alle 5 s die Messwerte abgelesen und in einer Tabelle notiert. Nach jeder Experimentreihe wird die Leitfähigkeitselektrode mit destilliertem Wasser gespült. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Werden beispielsweise Gruppen à drei Schüler gebildet, ist je ein Schüler für die Zeit, ein zweiter für das Ablesen der Messwerte und ein dritter für die Protokollführung verantwortlich. Lässt man jede Schülergruppe andere Konzentrationen messen, können mit zwei bis drei Experimentreihen alle zehn Harnstoffkonzentrationen analysiert und die Messergebnisse untereinander ausgetauscht werden.

Ergebnisse

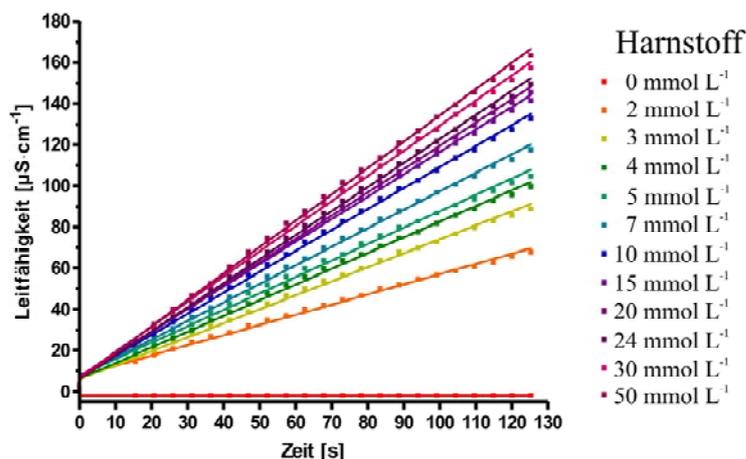


Abbildung 4: Umsetzung von Harnstoff durch Urease
Graphische Auswertung der Messergebnisse. Es werden die Messwerte (Leitfähigkeit) gegen die Zeit aufgetragen. Legt man eine Ausgleichsgerade durch jede Messreihe, kann man die Änderung der Leitfähigkeit pro Zeit (Reaktionsgeschwindigkeit) bestimmen, indem man die Steigung der Geraden ermittelt (Infokasten 1). Je größer die Harnstoffkonzentration, desto schneller die Umsetzung durch Urease.

Die Messwerte werden mit Hilfe eines Computerprogramms (z.B. Excel) oder auf Millimeterpapier graphisch dargestellt. Dazu wird die Leitfähigkeit (Messwerte) gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4). Nun legt man durch die aufgetragenen Messwerte einer Harnstoffkonzentration eine Ausgleichsgerade, deren Steigung ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion ist (Infokasten 1). In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass mit steigender Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt. Es lassen sich also schon an dieser Stelle

quantitative Aussagen treffen, so dass der Versuch auch durchgeführt werden kann, ohne im Detail auf die Michaelis-Menten-Kinetik einzugehen.

Die Michaelis-Menten-Kinetik verwendet ein mathematisches Modell, welches die enzymatische Umsetzung eines Substrats zu einem Produkt beschreibt. Basierend auf der Annahme, dass sich reversibel ein Enzym-Substrat-Komplex bildet, der dann in Enzym und Produkt zerfällt, lässt sich folgende Gleichung zur Beschreibung der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit herleiten:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot c(S)}{K_M + c(S)}$$

$c(S)$: Substratkonzentration bei Beginn der Reaktion

v_0 : Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei der entsprechenden Substratkonzentration $c(S)$

V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, die bei Substratsättigung erreicht wird

K_M : Michaelis-Menten-Konstante; bei dieser Substratkonzentration läuft die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit ab. Oft ist die Michaelis-Konstante ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.

Trägt man die im Experiment ermittelten Steigungen der Geraden gegen die verschiedenen Harnstoffkonzentrationen auf, erhält man eine Sättigungskurve, die die graphische Auswertung der Michaelis-Menten Gleichung darstellt (Abbildung 5a). Die Erstellung von Michaelis-Menten-Diagrammen kann demnach im Unterricht auch ohne die Besprechung der Michaelis-Menten-Gleichung durchgeführt werden.

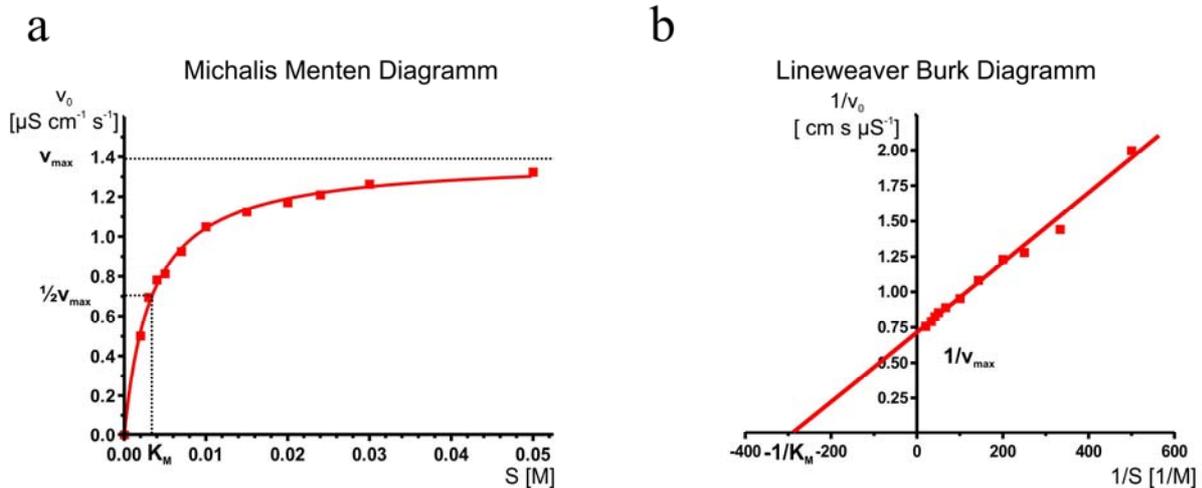


Abbildung 5:

a) Die Auftragung nach Michaelis und Menten stellt eine Sättigungskurve dar. Maximalgeschwindigkeit V_{max} und K_M -Wert wurden daraus abgeschätzt (gestrichelte Linien). **b)** Die doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk ermöglicht das direkte Ablesen der Messwerte an den Achsenabschnitten.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M ist eine spezifische Konstante für die Reaktion eines Enzyms mit einem bestimmten Substrat und gibt die Substratkonzentration an, bei der das Enzym mit der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit arbeitet. Der K_M -Wert kann im Michaelis-Menten-Diagramm ermittelt werden. Genauer lässt sich die Michaelis-Menten-Konstante bestimmen, wenn man die Daten doppelt reziprok als ► Lineweaver-Burk-Diagramm aufträgt (Abbildung 5b).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\text{max}} \cdot c(S)} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

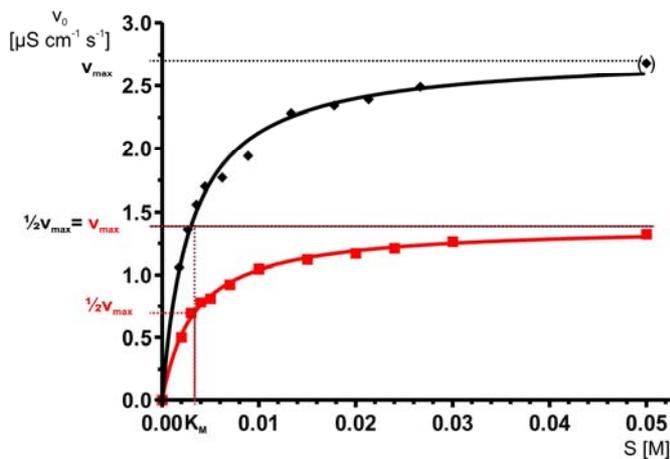


Abbildung 5c:
Michaelis Menten Diagramm für zwei verschiedene Enzymkonzentrationen

Verdopplung der Enzymkonzentration im Versuchsansatz (schwarze Hyperbel) führt auch zur Verdopplung der Maximalgeschwindigkeit V_{\max} . Der K_M -Wert bleibt jedoch konstant.

Hiermit können die Werte für V_{\max} und K_M leicht ermittelt werden. Der Schnittpunkt mit der Abszisse bildet den Wert $-1/K_M$, der Schnittpunkt mit der Ordinate gibt $1/V_{\max}$ an. In der dargestellten Messung liegt der K_M -Wert bei $3,3 \text{ mmol L}^{-1}$ und V_{\max} hat den Wert $1,4 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

In den von uns durchgeführten Messungen lag der K_M -Wert zwischen $2,8$ und $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$. Mit weiteren Messungen lässt sich zeigen, dass sich die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} verdoppelt, wenn die Enzymkonzentration mit doppelter Konzentration eingesetzt wird, der K_M -Wert jedoch konstant bleibt (Abbildung 5c).

In diesem Experiment wird die Produktbildung indirekt die Reaktionsgeschwindigkeit über die Leitfähigkeit in $\mu\text{S/cm}$ (Mikrosiemens pro Zentimeter) gemessen. Die ermittelte Geschwindigkeit V_{\max} ist dann zwar in einer unüblichen Einheit ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$) anstatt ($\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$), lässt sich aber relativ zu weiteren Versuchsreihen auswerten.

Diskussion

In der Literatur findet man für die Ureasereaktion K_M -Werte zwischen $1,3$ und $3,3 \text{ mmol l}^{-1}$ (Urease aus Schwertbohne), abhängig von der Temperatur [6]. Mit der hier dargestellten indirekten Methode zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit über die Leitfähigkeit der Reaktionsprodukte konnte der Literaturwert exakt bestimmt werden. Häufig findet man in Lehrbüchern für die Ureasereaktion allerdings einen K_M -Wert von ca. 25 mmol l^{-1} . Dieser wurde dann allerdings in gepufferten Lösungen bestimmt, die zu einer erheblichen Inhibition der Ureasereaktion führt [6]. Der K_M -Wert ist außerdem abhängig vom Organismus, aus dem die Urease gewonnen wurde. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit von Ureasen aus unterschiedlichen Organismen können die K_M -Werte für Harnstoff zwischen $0,12 \text{ mmol l}^{-1}$ (aus dem Cyanobakterium *Spirulina maxima*) bis 130 mmol l^{-1} (Bakterium *Bacillus pasteurii*) liegen [5].

Neben der Bestimmung des K_M -wertes könnte auch die Substratspezifität von Enzymen mit diesem Experiment verdeutlicht werden. Thioharnstoff und $\text{N,N}'$ -Dimethylharnstoff sind Harnstoffanaloga (Harnstoff ähnliche Substanzen) und binden ebenso wie das Substrat im aktiven Zentrum des Enzyms. Allerdings werden sie von der Urease nicht oder nur sehr langsam umgesetzt. (Abbildung 6). Allein der Austausch von einzelnen Atomen bzw. Atomgruppen reicht manchmal schon aus, dass ein Substrat zu einem Analogon wird. Thioharnstoff wird in vielen Versuchsleitungen für Versuche zur kompetitiven Hemmung von Urease eingesetzt. Dieser ist jedoch sehr giftig und sollte in Schulversuchen möglichst durch $\text{N,N}'$ -Dimethylharnstoff ersetzt werden. Allerdings ist die quantitative Auswertung der kompetitiven Hemmung mittels Leitfähigkeitsmessgerät in wässriger Lösung schwierig, da

aufgrund des sehr hohen K_M -Wertes der Substratanaloga ($>25 \text{ mmol l}^{-1}$) auch sehr hohe Konzentrationen dieser Stoffe eingesetzt werden müssten [4,5].

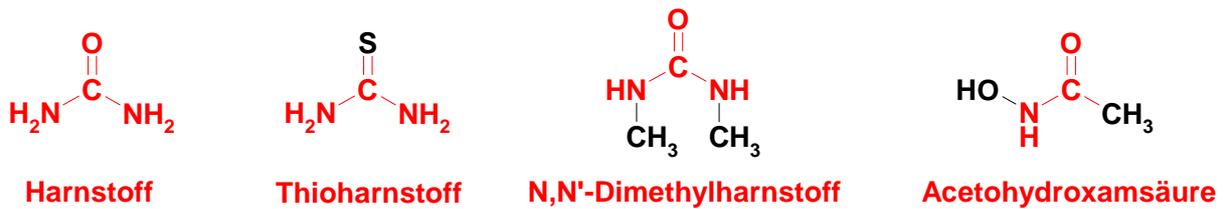


Abbildung 6: Chemische Struktur von Substrat und kompetitiven Inhibitoren der Urease. Die gezeigten Harnstoffanaloga ähneln dem Harnstoff in ihrem chemischen Aufbau und können wie Harnstoff im aktiven Zentrum der Urease binden, werden aber nicht umgesetzt.

Es gibt zu den dargestellten Experimenten eine schnell durchzuführende qualitative Variante, indem der Umsatz von Harnstoff mit Phenolphthalein sichtbar gemacht wird. Durch die entstehenden Hydroxidionen wird die Reaktionslösung basisch und der Indikator verfärbt sich von farblos nach rosa. Dieses Reaktionsprinzip wird auch beim Schnelltest auf *H. pylori* verwendet.

Zusammenfassung

In diesem Artikel wird ein Schulexperiment zur Michaelis-Menten-Kinetik vorgestellt. Die enzymatische Umsetzung von Harnstoff durch das Enzym Urease lässt sich mittels eines einfachen Versuchsaufbaus leicht verfolgen und in verschiedenen Komplexitätsebenen auswerten, wobei die ermittelte Michaelis-Menten-Konstante (K_M) dem Literaturwert entspricht. Um mögliche thematische Anknüpfungspunkte für den Unterricht zu geben, werden zusätzlich Funktion und Vorkommen der Urease in der Natur beschrieben.

Literatur

- [1] D. J. Evans, Jr., D. G. Evans, S. S. Kirkpatrick, D. Y. Graham, Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits, *Microb Pathog*, 1991, 10, 15-26.
- [2] N. C. Ha, S. T. Oh, J. Y. Sung, K. A. Cha, M. H. Lee, B. H. Oh, Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease, *Nat Struct Biol*, 2001, 8, 505-509.
- [3] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J Mol Graph*, 1996, 14, 27-28, 33-38.
- [4] C. Korb, Entwicklung enzymatischer Screeningverfahren, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, 2003.
- [5] H. L. Mobley, R. P. Hausinger, Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiol Rev*, 1989, 53, 85-108.
- [6] Y. Qin, J. M. Cabral, Kinetic studies of the urease-catalyzed hydrolysis of urea in a buffer-free system, *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, 49, 217-240.
- [7] W. J. Visek, Effects of urea hydrolysis on cell life-span and metabolism, *Fed Proc*, 1972, 31, 1178-1193.

► Glossar

ES: Abkürzung für Enzym-Substrat-Komplex. Komplex der entsteht, wenn bei einer enzymatischen Reaktion das Substrat am aktiven Zentrum des Enzyms bindet.

K_M -Wert: Michaelis-Menten-Konstante. Spezifische Konstante für die Reaktion eines Enzyms mit einem bestimmten Substrat. Gibt die Substratkonzentration an, bei der ein Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeitet.

Lineweaver-Burk-Diagramm: doppelt reziproke Darstellung des Michaelis-Menten-Diagramms. Werte für K_M und V_{max} können hier anhand der Achsenabschnitte ermittelt werden.

Michaelis-Menten-Kinetik: Von Michaelis und Menten aufgestelltes Modell zur einfachen Beschreibung von enzymatischen Reaktionen.

U/mg: Units pro Milligramm, Unit: alte Einheit für die Enzymmenge, die die Umwandlung von 1 μmol Substrat pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert, Abkürzung U.

V_{max} : Maximalgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion.

Danksagung

Wir bedanken uns bei Prof. Dr. F.W. Herberg für die Bereitstellung von Laborausstattung und die praktische Betreuung. Außerdem danken wir Prof. Dr. W. Nellen für Diskussionen und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Die Autoren



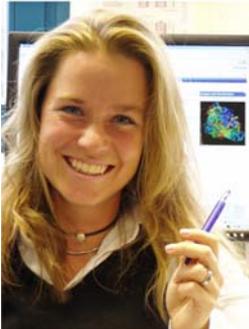
Sara Müller, geb. 1983, studiert seit 2003 Biologie/Chemie für das Gymnasiallehramt an der Universität Kassel. Seit 2005 ist sie Mitarbeiterin von Science Bridge.



Marianne Kromke, geb. 1985, studiert seit 2004 Biologie/Sozialkunde für das Gymnasiallehramt an der Universität Kassel.



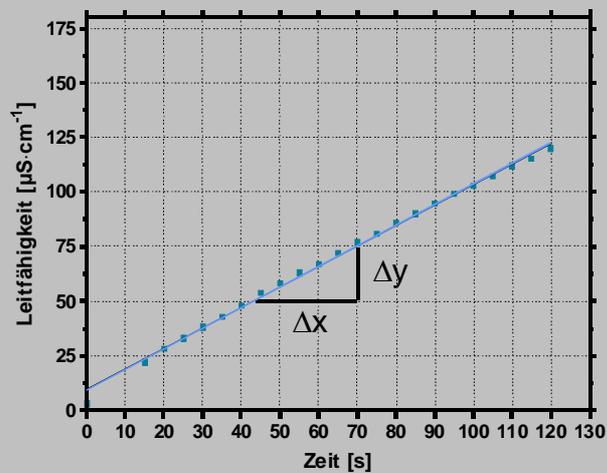
Prof. Dr. Helmut Vogt, geb. 1954, ist Leiter der Abteilung Didaktik der Biologie der Universität Kassel. Er studierte an der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster Diplombiologie und promovierte 1991. Ab 1988 war er am Institut für Didaktik der Biologie der WWU Münster tätig – zuletzt als Studienrat im Hochschuldienst. Nach der Habilitation 2001 nahm er einen Ruf an die Universität Kassel an.



Daniela Moll, geb. 1977 in Wuppertal. 1998 Abschluss der Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistenten (BTA) am Lessing Berufskolleg in Düsseldorf, dann Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum. Zurzeit Promotion an der Universität Kassel.

Infokasten 1

Ermittlung der Steigung einer Geraden



Geradengleichung

$$y = m \cdot x + b$$

Für die Bestimmung der Steigung einer Geraden benötigt man zwei Punkte (x_1/y_1) und (x_2/y_2) der Geraden. Daraus ergibt sich die Steigung

$$m = \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)} = \frac{\Delta y}{\Delta x}$$

Bei der Auswertung auf Millimeterpapier bietet sich das Einzeichnen eines Steigungsdreiecks an. Die Differenzen $x_2 - x_1$ und $y_2 - y_1$ können mit dem Lineal abgemessen werden und der Quotient ergibt den Wert der Steigung. Mit Computerprogrammen (wie z.B. Excel) kann man die Steigung vom Computer berechnen lassen.