

Urease

Peter Bützer

Inhalt

1	Das Enzym Urease	1
2	Das Substrat Harnstoff	2
3	Die chemische Reaktion.....	2
4	Folgerung	4
5	Messung	4
6	Aufgabenstellung	5
6.1	Simulation	5
6.1.1	Annahmen	5
6.1.2	Simulationsdiagramm (Typ 1 und Typ 3)	5
6.1.3	Dokumentation (Gleichungen, Parameter).....	6
6.1.4	Zeitdiagramm	7
6.1.5	Interpretation	7
6.1.6	Vergleich von Messung und Simulation	7
6.1.7	Interpretation	8
6.1.8	Temperaturabhängigkeit, Aktivierungsenergie	8
6.1.9	Folgerung	9

1 Das Enzym Urease

Das Enzym Urease katalysiert die Harnstoff-Hydrolyse 10^{14} mal rascher als die unkatalysierte Reaktion (Ribbon-Modell der Proteinketten von Urease-Monomer im Bild rechts). So spaltet 1 g Urease bei Raumtemperatur innerhalb 1 Minute ca. 60 g Harnstoff. Die pflanzliche Urease aus der Schwertbohne hat ein Molekulargewicht von ca. 544000 g/mol. Sie ist ein Metallenzym mit Nickel-Zentren und besteht aus 6 aktiven Monomeren (Quartärstruktur, abgebildet ist nur ein Monomer). Die Urease aus Schwertbohnen war eines der ersten Enzyme überhaupt, die um das Jahr 1926 durch James Batcheller Sumner (Chemie-Nobelpreis 1946) gereinigt und kristallisiert werden konnten. Die *Urease der Bodenbakterien* spielt eine wichtige Rolle im *Stickstoffkreislauf*, denn ohne sie würde der hydrolysebeständige **Harnstoff** der Jauche zu wenig rasch abgebaut - eine Stickstoffdüngung wäre nur schwer möglich. Urease ist weit verbreitet, sie kommt besonders oft in Pflanzensamen, Bakterien, Krebsen und Meeres-Muscheln vor.



Abbildung 2: Urease Monomer (Ribbon-Modell)

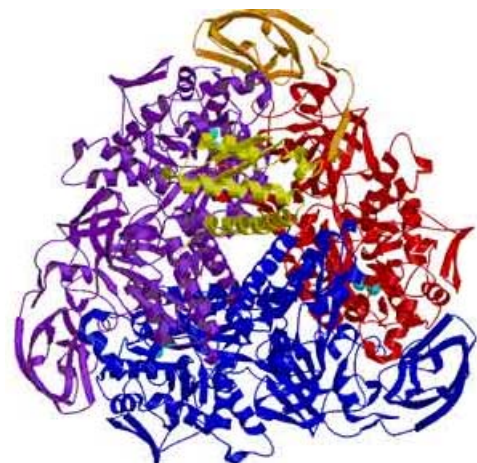


Abbildung 2: Urease Hexamer

2 Das Substrat Harnstoff

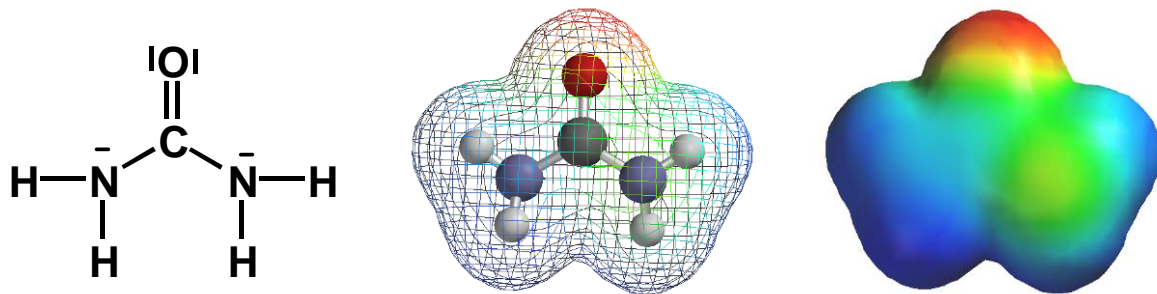


Abbildung 3: Formeln von Harnstoff: Konstitutionsformel, Stick and Ball-Modell mit der Elektronenhülle, Elektronenhülle (grosse Elektronendichte: rot, kleine Elektronendichte: blau)

Die Australier Robin Warren und Barry Marshall haben 1982 erstmals die Existenz des Magenbakteriums *Helicobacter pylori* nachgewiesen und auf dessen Gefahren aufmerksam gemacht. 2005 erhielten sie für diese Erkenntnis den Nobelpreis für Medizin. *Helicobacter pylori* schützt sich selbst vor der aggressiven Magensäure mit einem basischen „Schutzmantel“ aus Ammoniak, den das Bakterium mit Hilfe der Urease herstellt. Dieses Enzym kommt normalerweise nicht im Magen vor. Gelingt es, das Enzym beim Menschen nachzuweisen, ist das ein sicheres Zeichen für die Anwesenheit von *Helicobacter pylori*. Heute werden z.B. Gastritis, Magengeschwüre oder Magenkrebs teilweise auf dieses Bakterium zurückgeführt. Bei frühzeitiger Erkennung wird nicht mehr operiert, sondern das Bakterium mit Antibiotika beseitigt. Der *Helicobacter*-Urease-Test (kurz HUT oder HUT-Test) dient dabei zum Nachweis einer *Helicobacter*-Besiedlung im Magen.

Bei einer Magenspiegelung wird oft eine Gewebeprobe für einen HUT-Test entnommen. Die Gewebeprobe wird in ein Testmedium gegeben, welches aus einer Nährlösung für die Bakterien sowie aus Harnstoff und einem Indikator besteht. Ist das Bakterium in der Probe enthalten, verarbeitet es den Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid. Das Ammoniak färbt dann den Indikator rot. Das Testergebnis ist nach wenigen Minuten zu erkennen.

3 Die chemische Reaktion

Die Spaltung von Harnstoff in Kohlenstoffdioxid und Ammoniak ist summarisch:

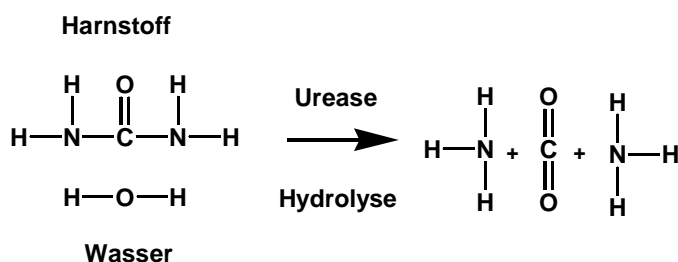
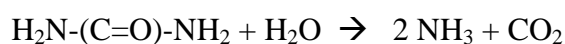


Abbildung 4: Vereinfachtes Reaktionsschema

Detaillierter betrachtet bildet sich aus Harnstoff jedoch zuerst die Carbamidsäure, welche dann spontan zu Ammoniak und Kohlendioxid zerfällt:

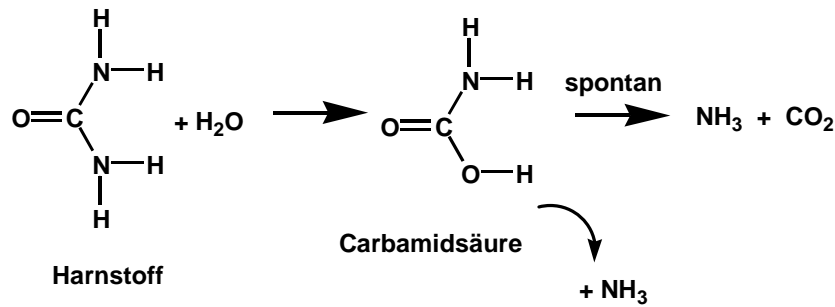


Abbildung 5: Reaktion mit dem wichtigen Zwischenschritt der Carbamidsäure

Dabei bilden sich geladene Teilchen: $\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^-$

Die bei der Spaltung gebildeten Ionen erhöhen die Leitfähigkeit der Lösung. Auf Grund dieser sich verändernden Eigenschaft lässt sich die Reaktion mit einer Leitfähigkeitssonde verfolgen.

Im aktiven Zentrum der Urease (Nickel-Atom) laufen folgende, heute mechanistisch recht genau bekannte Reaktionsschritte ab:

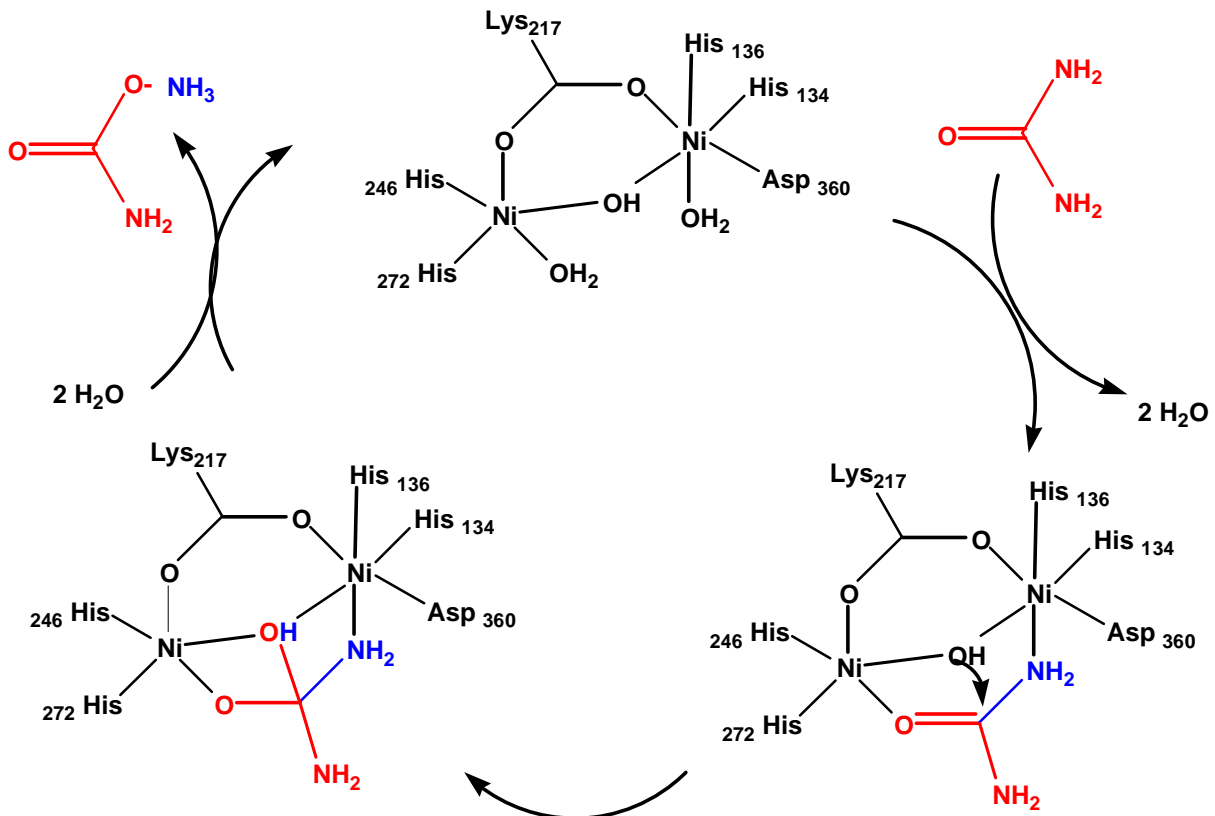


Abbildung 6: Mechanismus der Reaktion

Dieser genaue Ablauf zeigt, dass nicht Wasser direkt, sondern eine an Nickel gebundene OH-Gruppe beim C-Atom des Harnstoffs angreift.

4 Folgerung

Diese Reaktion ist so komplex, dass sie sich mit den einzelnen Schritten nicht simulieren lässt, da die Reaktions-Geschwindigkeitskonstanten der Teilschritte nicht bekannt sind. Als Gesamtreaktion lässt sich aber trotzdem viel über die Dynamik aussagen, wenn man das Michaelis-Menten-Modell der Enzymkinetik verwendet.

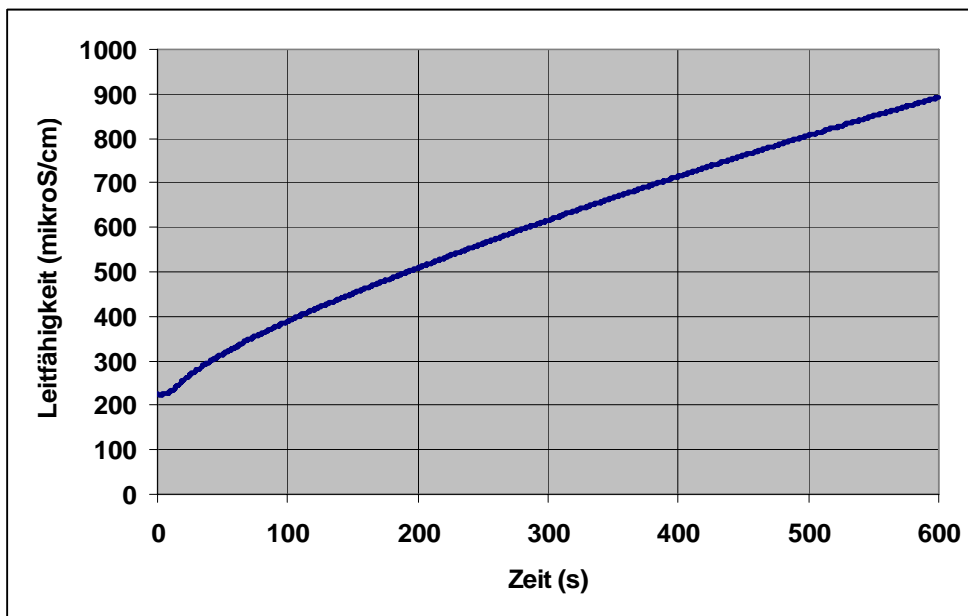
5 Messung

Durchführung:

100 mg Urease, 100 ml 0.1 mol/l Harnstofflösung mit einem Rührer.

Die Messung erfolgt mit einer Leitfähigkeitssonde (z.B. Vernier), Bereich 0 – 2000 mikroS/cm

Temperatur 22 °C



6 Aufgabenstellung

Man suche ein geeignetes Modell für diese Enzymreaktion (Urease) und simuliere den gemessenen Verlauf mit dem Michelis-Menten-Modell.

6.1 Simulation

6.1.1 Annahmen

- Der zeitliche Verlauf dieser Enzymreaktion soll mit der Michaelis-Menten-Gleichung simuliert werden¹.

Michaelis-Menten Gleichung²

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

v : Geschwindigkeit [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]:

$[S]$: Substratkonzentration [mol/l]

K_M : Dissoziationskonstante (mol/l) entspricht der Konzentration für die halbmaximale Geschwindigkeit. Übliche Werte von K_M : $10^{-2} - 10^{-5}$ [mol/l].

$K_M = (k_1 + k_3)/k_2$;³ meist ist $k_1 \gg k_3$, dann gilt $K_M \approx k_1/k_2$

- $K_m = 25$, k_1 und k_3 müssen der Messung angepasst werden, da die Reinheit der verwendeten Urease nicht bestimmt werden kann.
- Bei der Konzentration der Produkte muss ein Umrechnungsfaktor eingesetzt werden, um die Anzahl Millimole Produkt in eine Leitfähigkeit umzurechnen. Mit diesem Vorgehen ist ein Vergleich mit den Messresultaten möglich.

6.1.2 Simulationsdiagramm⁴ (Typ 1 und Typ 3)⁵

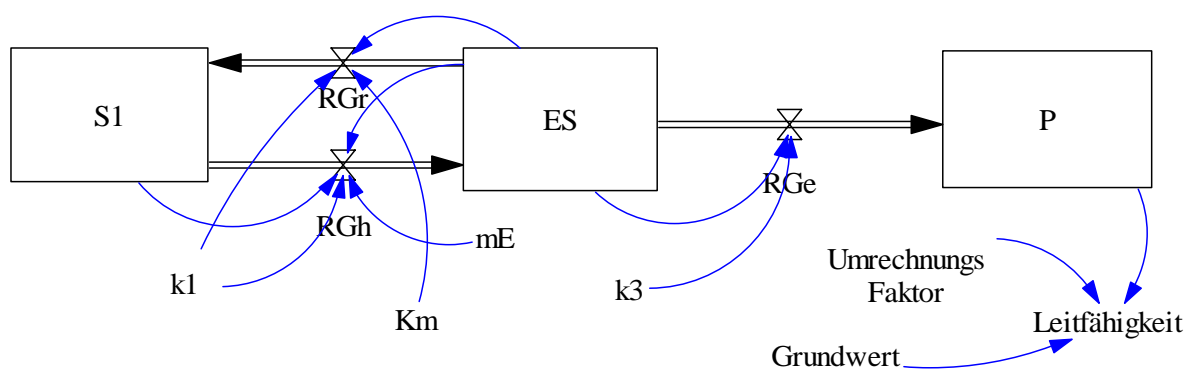


Abbildung 7: Simulationsdiagramm der Michaelis-Menten-Gleichung

¹ Bützer P., Roth M., Chemische Reaktionen als dynamische Systeme, T³-Schweiz, August, 2002, S.24ff

² Christensen H.N., Lehrprogramm Enzymkinetik, Verlag Chemie, Weinheim 1974, 12ff

³ Schumacher E., Chemische Reaktionskinetik (Skript zur Vorlesung), Universität Bern, Chemie Departement, 1997, CR 2-32

⁴ Simulations-Software: Vensim[®] PLE, Ventana Systems, Inc., <http://www.vensim.com/>

⁵ Bützer Peter, Roth Markus, Die Zeit im Griff, Systemdynamik in Chemie und Biochemie, verlag pestalozzianum, Zürich 2006, S. 37ff und 50ff

6.1.3 Dokumentation (Gleichungen, Parameter)

- (01) $ES = \text{INTEG} (R_{Gh} - R_{Gr} - R_{Ge}, \quad 0)$
Units: mmol [0,?]
- (02) $\text{FINAL TIME} = 600$
Units: Second
The final time for the simulation.
- (03) $\text{Grundwert} = 225$ (Grundwert der Messung)
Units: mikroS/cm [0,?]
- (04) $\text{INITIAL TIME} = 0$
Units: Second
The initial time for the simulation.
- (05) $k_1 = 4$ (Annahme)
Units: 1/(Second*mmol) [0,?]
- (06) $k_3 = 100$
Units: 1/Second [0,?]
- (07) $K_m = 25$ (aus der Literatur)
Units: mmol [0,?]
- (08) $\text{Leitfähigkeit} = \text{Grundwert} + \text{Umrechnungsfaktor} * P$
Units: mikroS/cm [0,?]
- (09) $mE = 0.001$ (verwendete Menge)
Units: mmol [0,1]
- (10) $P = \text{INTEG} (R_{Ge}, \quad 0)$
Units: mmol [0,?]
- (11) $R_{Ge} = k_3 * ES$
Units: mmol/Second [0,?]
- (12) $R_{Gh} = k_1 * (mE - ES) * S_1$
Units: mmol/Second [0,?]
- (13) $R_{Gr} = K_m * k_1 * ES$
Units: mmol/Second [0,?]
- (14) $S_1 = \text{INTEG} (R_{Gr} - R_{Gh}, \quad 10)$ (10 mmol/l, bei der Messung)
Units: mmol [0,?]
- (15) $\text{SAVEPER} = 1$ (für den direkten Vergleich mit der Messung)
Units: Second [0,?]
The frequency with which output is stored.
- (16) $\text{TIME STEP} = 0.01$
Units: Second [0,?]
The time step for the simulation.
- (17) $\text{Umrechnungsfaktor} = 100$
Units: mikroS/(cm*mmol) [0,?]

6.1.4 Zeitdiagramm

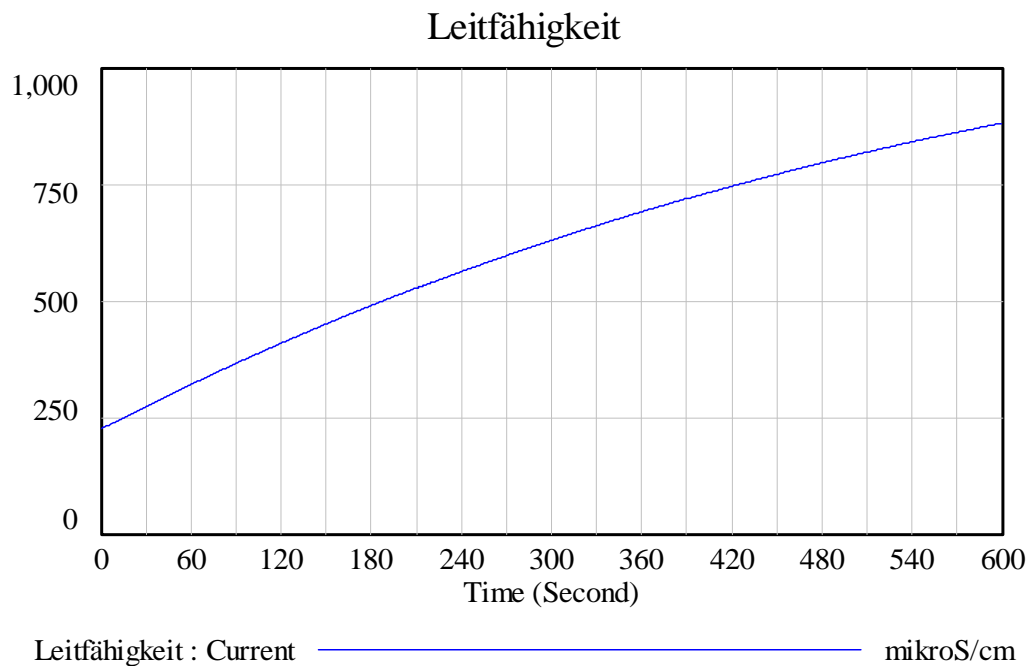


Abbildung 8: Zeitdiagramm der Messung der Leitfähigkeit

6.1.5 Interpretation

Die flache Kurve weist darauf hin, dass die Enzyme in einer zum Harnstoff kleinen Konzentration vorliegen.

6.1.6 Vergleich von Messung und Simulation

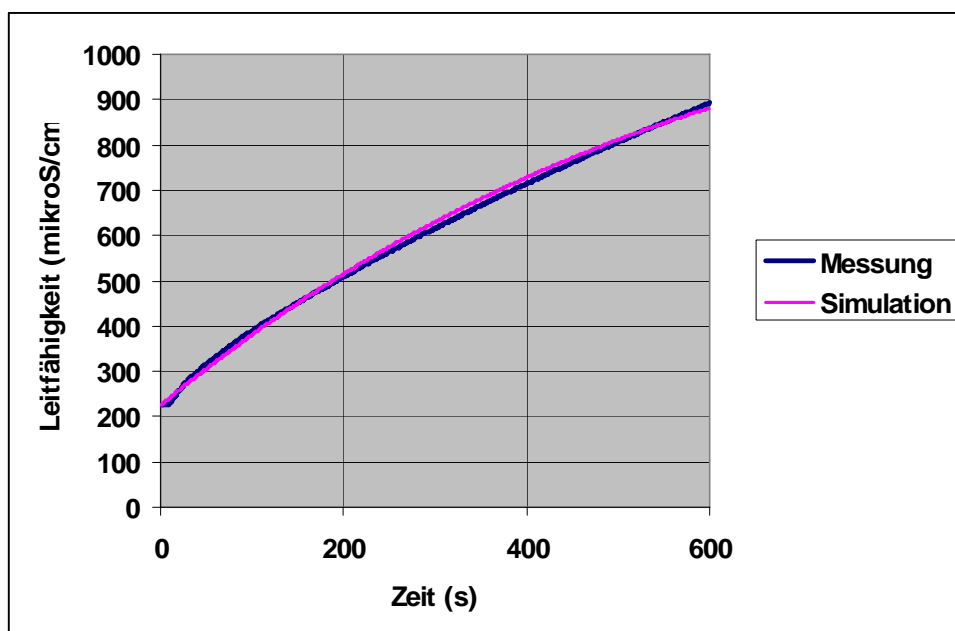


Abbildung 9: Vergleich von Messung und Simulation

6.1.7 Interpretation

Die Geschwindigkeit der Harnstoffhydrolyse durch Urease lässt sich leicht messen. Die Simulation mit der Michaelis-Menten-Gleichung für Enzyme gibt den zeitlichen Verlauf der Reaktion sehr gut wieder.

Die Beobachtung, dass die Reaktion einem Gleichgewichtswert zustrebt, auch wenn noch nicht aller Harnstoff aufgebraucht ist weist darauf hin, dass die Zunahme des pH-Werts und der Ionenkonzentration die Enzymreaktion bremst. Man beobachtet hier also eine sogenannte *Endproduktthemmung*. Die *Urease ist für diesen Prozess ein Regler* mit einer negativen Rückkopplung.

6.1.8 Temperaturabhängigkeit, Aktivierungsenergie

Die Temperaturabhängigkeit der Urease zeigt sich wie folgt:

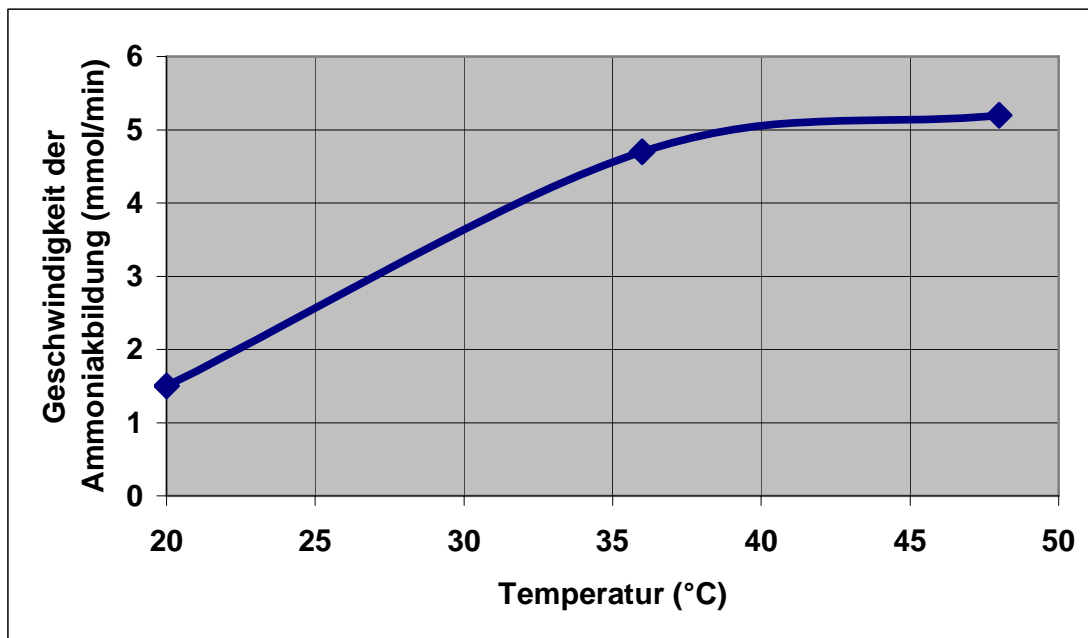


Abbildung 10: Messresultate der Geschwindigkeit in Funktion der Reaktionstemperatur

Die maximale Geschwindigkeit ist bei Körpertemperatur schon beinahe erreicht. Mit einem modifizierten Arrhenius-Plot lässt sich mit diesen Messdaten die Aktivierungsenergie der Harnstoffspaltung durch Urease bestimmen:

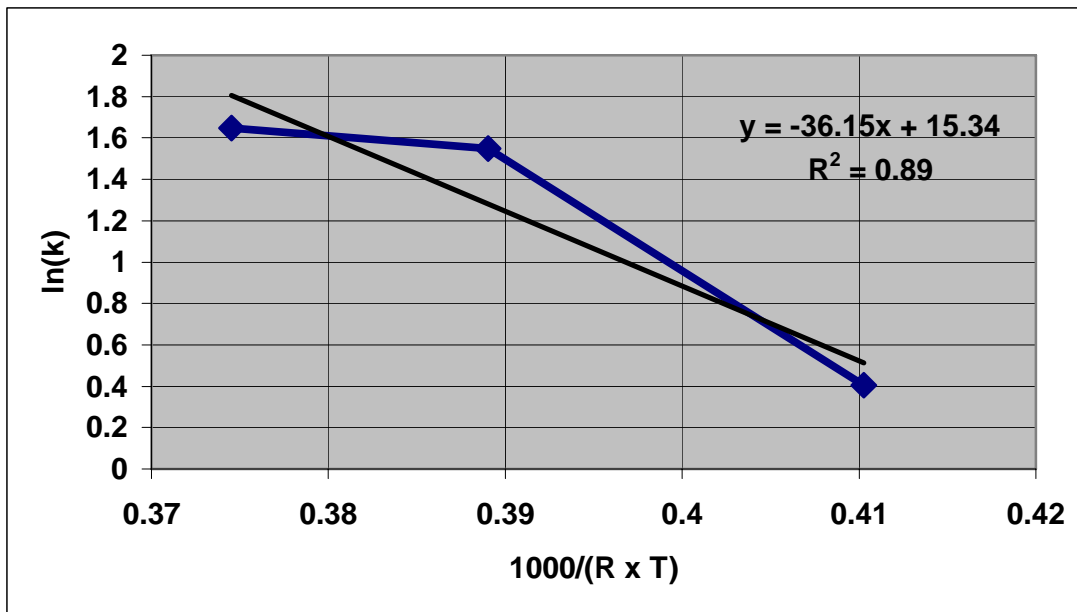


Abbildung 11: Modifizierter Arrhenius-Plot (Die Steigung entspricht dem negativen Wert der Aktivierungsenergie in kJ/mol)

Die Aktivierungsenergie dieser enzymatischen Reaktion beträgt 36.15 kJ/mol. Die durchschnittliche mittlere Bindungenthalpien bei 25°C einer C-N-Bindung beträgt rund achtmal mehr, nämlich 305 kJ/mol!

6.1.9 Folgerung

Die kleine Aktivierungsenergie macht deutlich, dass Enzymreaktionen sehr schnell sind.