

Enzymkinetiek

Het Michaelis-Menten model en het Lineweaver-Burk plot

In deze opdracht leer je dat een enzymreactie volgens een bepaalde wetmatigheid verloopt en dat er verschillende factoren zijn die de snelheid van een enzymreactie beïnvloeden.

De leerdoelen van deze opdracht zijn:

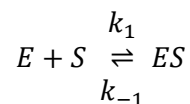
- Begrijpen hoe een 2-staps enzymreactie met één substraat werkt.
- Begrijpen hoe de Michaelis-Menten vergelijking tot stand komt en deze kunnen toepassen voor een gegeven enzymreactie.
- Het maken van een Lineweaver-Burk plot om de K_m en de V_{max} van een enzymreactie te berekenen.

1. Steady state en het Michaelis-Menten model voor enzymkinetiek

De omzetting van biologische moleculen is essentieel voor leven. Een dergelijke biochemische reactie kan spontaan plaatsvinden. Echter, veel biologische moleculen zijn stabiel onder fysiologische condities of de omzetting verloopt te traag. Om de omzetting van biologische moleculen te sturen, sneller en efficiënter te laten verlopen, worden deze reacties gekatalyseerd door middel van enzymen. Enzymen verlagen de benodigde energie die nodig is om een biochemische reactie te laten verlopen en versnellen daarmee dit proces. Enzymen (E) zijn eiwitten die een specifiek substraat (S) kunnen omvormen tot een product (P). Een eenvoudige 2-staps enzymreactie met één substraat wordt in het Michaelis-Menten model omschreven als:

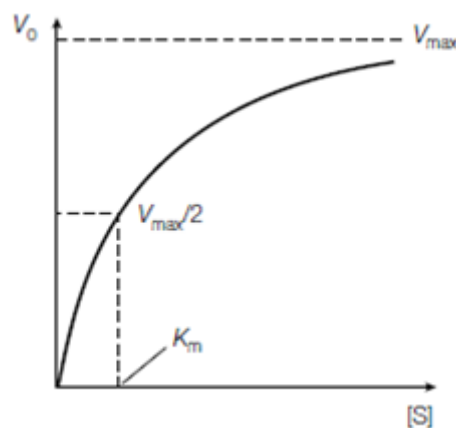


ES is het enzym-substraat complex. Dit is een overgangstoestand van het enzym tijdens de omzettingsreactie van substraat naar product. De vorming van het ES, de binding, verloopt snel. De snelheid van de omzetting wordt de V_0 (initiële snelheid) van de reactie genoemd. Tijdens deze fase wordt het ES gevormd. De omzetting van het enzym en substraat in het enzym-substraat complex, de bindingsstap, kun je omschrijven als:



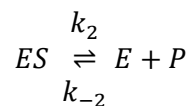
Hier is k_1 de reactieconstante van de vorming van het ES en k_{-1} de reactieconstante van de afbraak van ES in E + S.

Bij een constante concentratie van het enzym [E] en lage concentratie substraat [S], wordt de snelheid bepaald door de hoeveelheid substraat. De hoeveelheid substraat is hier namelijk de beperkende factor: [S] daalt tijdens de omzetting: deze wordt namelijk omgezet tot product. In figuur 1 zie je dat bij lage [S] en constante [E], de snelheid van de reactie (V_0) lineair stijgt met [S]. Bij zeer hoge [S] ontsaat er op een gegeven moment een overschot aan substraat is (met nog steeds een constante [E]). In deze situatie is de verandering in [S] door de reactie verwaarloosbaar klein is. De snelheid van de reactie neemt dan nauwelijks toe, deze benadert een asymptoot: de maximale snelheid van de reactie, de V_{max} (fig. 1). De V_{max} wordt benaderd als nagenoeg alle enzym een complex heeft gevormd met substraat. Omdat de vorming van ES sneller verloopt dan de vorming van het product ontslaat er een evenwicht in de reactie, ongeacht de [E] en [S]: de **steady state**.

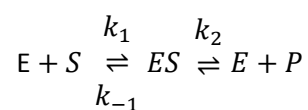


Figuur 1: De snelheid van een 2-staps enzymreactie die het Michaelis-Menten model volgt. In de initiële fase, waarin [ES] wordt gevormd, stijgt de snelheid van de reactie nagenoeg lineair met het stijgen van [S]. De snelheid van de reactie stijgt daarna minder snel en nadert een asymptoot: de V_{max} . De Michaelis-Menten constante is de concentratie substraat [S] bij $\frac{1}{2}V_{max}$.

Hierna vindt de werkelijke katalyse. Dit verloopt langzamer dan de bindingsstap en is dus snelheidsbepalend voor de reactiesnelheid. Deze stap wordt omschreven als:



Samengevat kun je een enzymreactie schrijven als:



Omdat k_{-2} verwaarloosbaar klein is, wordt deze niet meegenomen in deze vergelijking.

2. Michaelis-Menten vergelijking

De eigenschappen van een enzymreactie met één substraat worden omschreven door de **Michaelis-Menten vergelijking**:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Hier is K_m de Michaelis-Menten constante. Deze wordt bepaald door k_1 , k_{-1} en k_2 :

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Ook de K_m kun je uit figuur 1 afleiden: als V_0 de helft van V_{\max} is, geldt:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Dit kun je herleiden tot:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

En:

$$K_m = [S] \quad \text{als} \quad V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$$

Bij $K_m = [S]$ geldt dat de concentratie van het substraat gelijk is aan de concentratie van het enzym-substraat complex.

3. Lineweaver-Burk vergelijking en het Lineweaver-Burk plot

De Michaelis-Menten vergelijking kun je visueel maken in het Lineweaver-Burk plot. Hiertoe moet eerst de Michaelis-Menten vergelijking worden herleid:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Als je hier de reciproke van neemt (1 gedeeld door ...):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

Dit kan je splitsen:

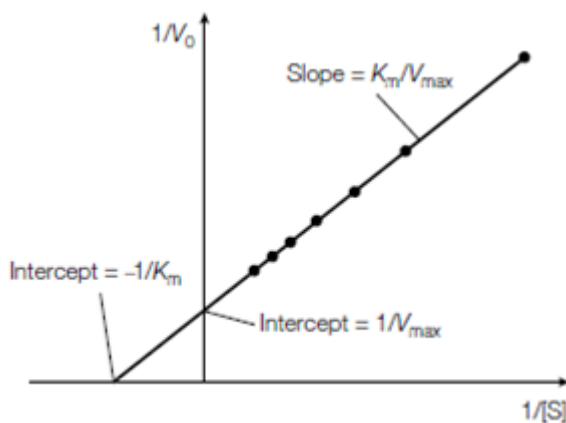
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]}$$

En vereenvoudigen tot de Lineweaver-Burk vergelijking:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Als je dan een grafiek maakt waarin je $\frac{1}{V_0}$ tegen $\frac{1}{[S]}$ uitzet, krijg je een rechte lijn (fig. 2). Het snijpunt van deze rechte lijn met de x-as is $-\frac{1}{K_m}$ en het snijpunt met de y-as is $\frac{1}{V_{\max}}$. De helling van deze rechte wordt beschreven door $\frac{K_m}{V_{\max}}$.

Dit is het **Lineweaver-Burk plot** (fig. 2). Hiermee kun je nauwkeurig de V_{\max} van een reactie bepalen.



Figuur 2: Het Lineweaver-Burk plot.

4. Opdracht

1 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD 1) is een enzym dat in de lever de omzetting van cortisol naar cortison katalyseert. Deze katalysestap volgt de Michaelis-Menten kinetiek (Maser *et al.*, 2002).

In de Excel file voor deze opdracht vind je de concentraties van cortison (mM) en de snelheid waarmee cortisol wordt gevormd (mM/min). Gebruik deze data om een Lineweaver-Burk plot te maken en de K_m en de V_{max} van deze reactie te bepalen.

Als je het Lineweaver-Burk plot maakt: kies voor xy-scatter, gebruik 'add trendline' (kies 'linear' en 'display equation on chart').

Referenties

Maser, E., Völker, B., and Friebertshäuser, J. (2002). 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 from Human Liver: Dimerization and Enzyme Cooperativity Support Its Postulated Role as Glucocorticoid Reductase. *Biochemistry*, 2002, 41, 2459–2465