

Biologische Chemie

Proef 2. Enzymkinetiek

INLEIDING

Omdat biologische systemen grotendeels aangedreven worden door chemische reacties, is het in alle gebieden van de biologie en medische wetenschappen belangrijk om ook kwantitatief te kunnen rekenen aan dergelijke chemische reacties. Of het nou om bio-chemie, geneeskunde, ecologie, cel-biologie, toxicologie of bodemkunde gaat, overall kom je wiskundige *modellen* tegen van chemische processen. In deze proef maken we kennis met eenvoudige wiskundige modellen voor reacties, en gaan we aan de slag met het historisch belangrijke en nog steeds veel gebruikte *Michaelis-Menten model* voor de *kinetiek* (snelheid) van enzymreacties.

Het overgrote deel van de chemische reacties in levende cellen kan niet plaats vinden zonder hulp van *enzymen*. Deze (vaak complexe) eiwitten dienen als katalysatoren in de reactie-ketens die de cel aandrijven en in stand houden. De werking van katalysatoren berust op het feit dat ze de activeringsenergie van een reactie verlagen, zodat deze kan plaatsvinden bij bijvoorbeeld een lagere temperatuur dan gewoonlijk. Enzymen doen dit meestal door te binden aan het *substraat* of de *substraten* (de stoffen die reageren), en zo de vorming van *producten* “een handje te helpen”. In cellen worden dergelijke reacties vaak gereguleerd op gen-niveau (bijvoorbeeld door de aanmaak van enzymen te bevorderen of te remmen), maar soms ook door *remming* van enzymreacties. *Remmers* of *inhibitors* zijn stoffen die de snelheid van een enzymreactie verlagen, meestal door te binden aan het enzym. Hierover later meer.

REACTIEKINETIEK

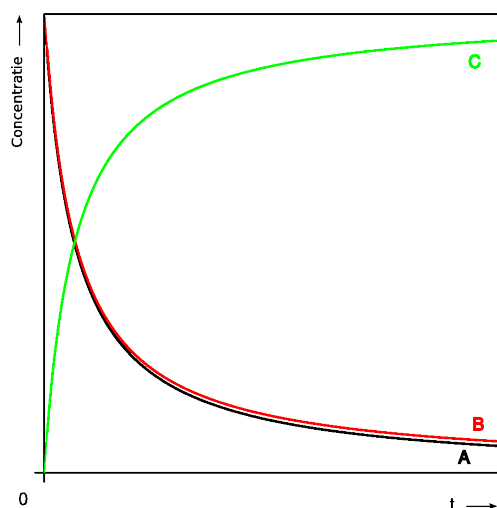
Reactiekinetiek is de tak van chemie die de snelheid van chemische reacties beschrijft. Zoals bekend is de snelheid van een reactie onder meer afhankelijk van temperatuur, druk, pH en concentraties van de reactanten. De invloed van temperatuur, druk en concentratie is te begrijpen aan de hand van wat men wel "*The Law of Mass-Action*" noemt. Voor stoffen in een oplossing of in gasvorm kun je je voorstellen dat de reactiesnelheid afhangt van het aantal "ontmoetingen" tussen rondzwevende moleculen in een bepaalde tijd. Het aantal ontmoetingen (de "*Action*") zal toenemen naarmate het aantal deeltjes (de "*Mass*") in een gegeven volume groter is. Dat wil dus zeggen, een hogere concentratie bij oplossingen, of een hogere druk bij gassen. Het aantal ontmoetingen neemt ook toe bij een hogere snelheid van de moleculen, oftewel een hogere temperatuur. We kunnen dus stellen dat de snelheid van een reactie evenredig is met de *kans* dat de moleculen van de reactanten elkaar ontmoeten. En deze kans neemt weer evenredig toe met concentratie, druk en temperatuur.

Voor de reactie $A + B \rightarrow C$ kunnen we de reactiesnelheid v schrijven als: $v = [A] \cdot [B] \cdot k$, waarbij de invloeden van temperatuur, druk, pH, etc. verrekend worden in k , de zogenaamde *snelheidsconstante*. Als je bovenstaande vergelijking leest als een kansberekening (van de ontmoeting tussen moleculen), dan staat er dus dat deze kans afhankelijk is

van het aantal moleculen van stof **A** in de oplossing, **EN** het aantal moleculen van stof **B** in de oplossing, **EN** de temperatuur, druk, pH, etc. Vandaar dat we de termen vermenigvuldigen in plaats van optellen.

Twee belangrijke dingen vallen op aan bovenstaande uitdrukking voor de reactiesnelheid. Ten eerste gaat deze manier van schrijven er vanuit dat temperatuur, druk, pH, etc. constant zijn, en dat de stoffen perfect gemengd zijn. Als de stoffen niet goed gemengd zijn (denk bijvoorbeeld aan vaste stoffen, maar ook aan de situatie in levende cellen!), dan gaat dit verhaal over ontmoetingskansen niet helemaal meer op. En als we de temperatuur etc. zouden veranderen, dan zou ook de snelheidsconstante k veranderen. Dat is ook een van de voornaamste redenen waarom we stoffen voor een experiment eerst oplossen en netjes mengen (nog afgezien van het feit dat het experiment anders wel erg lang zou gaan duren natuurlijk), en onze proeven uitvoeren bij gelijk blijvende omstandigheden. Dit betekent echter ook dat de resultaten van een experiment (*in vitro*) niet altijd overeen zullen komen met de processen "in het echt" (*in vivo*). Helaas is dit vaak het geval in de biologie en biomedische wetenschappen, let daar dus altijd goed op bij het ontwerpen van een experiment.

Ten tweede kun het aan bovenstaande uitdrukking al zien dat de snelheid niet constant zal zijn. Snelheid is namelijk afhankelijk van concentratie, en de concentraties zullen veranderen naarmate de reactie vordert. Naarmate stof **A** en **B** op raken zal de snelheid van de reactie afnemen. Dit kun je goed zien in figuur 1, dat de concentraties van de stoffen weergeeft in de tijd. Hoe steiler de lijnen, hoe sneller de concentraties veranderen, en hoe sneller de reactie dus verloopt. Met andere woorden, de reactiesnelheid is de helling, en dus de *afgeleide* van de concentratie.



Figuur 1. Concentraties van de stoffen A, B en C in de tijd, bij de reactie $A + B \rightarrow C$.

WISKUNDIGE MODELLEN

Wiskundig kunnen we de reactiesnelheid van bovenstaande reactie ook opschrijven als:

$$\frac{dC}{dt} = A \cdot B \cdot k, \text{ waarbij } A, B \text{ en } C \text{ de concentraties zijn van de stoffen } \mathbf{A}, \mathbf{B} \text{ en } \mathbf{C}.$$

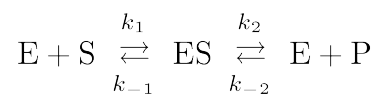
Chemisch gezien betekent $\frac{dC}{dt}$ de concentratieverandering van het *product*, stof **C**, in de tijd. Dit is dus een logische maat voor de snelheid van de reactie. Wiskundig gezien is $\frac{dC}{dt}$ een *differentiaal* (de verandering in *C* over een oneindig kleine tijd, ofwel de afgeleide van *C*). Dit type vergelijking is een *differentiaalvergelijking*. Differentiaalvergelijkingen zijn dus erg geschikt als *wiskundig model* van chemische reacties, je komt ze dan ook heel veel tegen in de levenswetenschappen en daarbuiten. Het type differentiaalvergelijking dat we nu zullen gebruiken heet een *ODE* (*Ordinary Differential Equation*). Als we de hele reactie willen beschrijven, kunnen we een *stelsel van differentiaalvergelijkingen* opstellen voor de reactiesnelheid van alle stoffen:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= -A \cdot B \cdot k \\ \frac{dB}{dt} &= -A \cdot B \cdot k \\ \frac{dC}{dt} &= A \cdot B \cdot k\end{aligned}$$

Dat ziet er in dit geval niet zo spannend uit, maar bij evenwichten en gekoppelde reacties wordt het natuurlijk al snel ingewikkelder. Het oplossen van ODE's is meestal geen eenvoudige kwestie, en vaak zelfs helemaal niet mogelijk. Maar bovenstaande vergelijkingen kunnen we, samen met *k* en beginwaarden voor *A*, *B* en *C* invoeren in een computer. Deze kan dan simpelweg de afgeleides berekenen voor kleine stapjes van *t*, nieuwe waarden voor *A*, *B* en *C* berekenen en invullen, enzovoort. Dit noemen we het *integreren* van een stelsel van ODE's, en zo is ook figuur 1 gemaakt. Je kunt het zien als een computersimulatie van een (goed gemengde) chemische reactie. Dergelijke vergelijkingen worden echter ook veel gebruikt om andere processen te modelleren, zoals populaties in de ecologie en ziektes in de epidemiologie.

EEN EENVOUDIGE ENZYMREACTIE

Een "prototype" enzymreactie zou er zo uit kunnen zien:



Het enzym **E** bindt aan het *substraat* **S** en vormt een *enzym-substraatcomplex* **ES**, dat vervolgens weer *dissocieert* tot vrij enzym en een *product* **P**. Het substraat en het product kunnen uiteraard ook meerdere stoffen zijn.

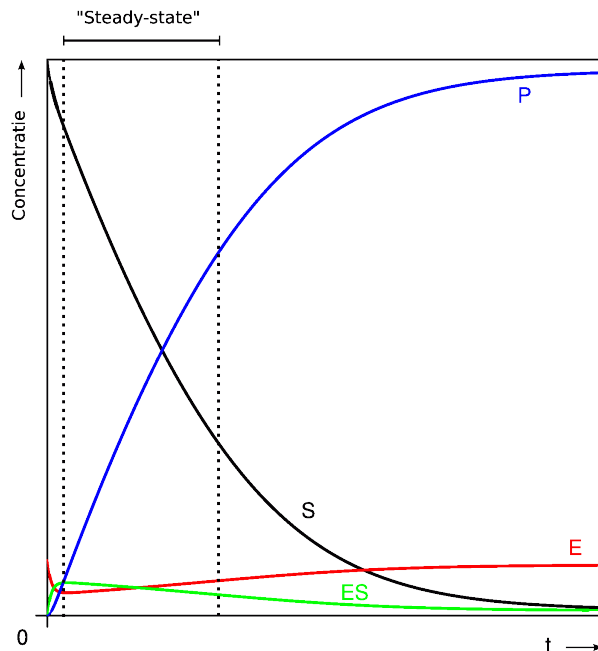
De "mass-action" snelheden van de vier deelreacties worden gegeven door de concentraties van de stoffen en de snelheidsconstanten voor iedere reactie:

$$\begin{aligned}v_1 &= E \cdot S \cdot k_1 \\ v_{-1} &= ES \cdot k_{-1} \\ v_2 &= ES \cdot k_2 \\ v_{-2} &= E \cdot P \cdot k_{-2}\end{aligned}$$

De vorming en afbraak van alle stoffen in deze reactie kunnen we vervolgens modelleren met het volgende stelsel van ODE's:

$$\begin{aligned}
 \frac{dS}{dt} &= -v_1 + v_{-1} = -E \cdot S \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} \\
 \frac{dE}{dt} &= -v_1 + v_{-1} + v_2 - v_{-2} = -E \cdot S \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} + ES \cdot k_2 - E \cdot P \cdot k_{-2} \\
 \frac{dES}{dt} &= v_1 - v_{-1} - v_2 + v_{-2} = E \cdot S \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 + E \cdot P \cdot k_{-2} \\
 \frac{dP}{dt} &= v_2 - v_{-2} = ES \cdot k_2 - E \cdot P \cdot k_{-2}
 \end{aligned} \tag{1}$$

Reacties waarbij een stof verdwijnt schrijven we als een negatieve term in de vergelijking (de concentratieverandering is immers negatief), reacties waarbij stoffen gevormd worden schrijven we als een positieve term. Het integreren van deze ODE's leidt tot de volgende grafiek voor het verloop van de concentraties in de tijd:



Figuur 2. Het verloop van de concentraties substraat (S), product (P), enzym (E) en enzym-substraat complex (ES) in de tijd, bij een eenvoudige enzymreactie.

MICHAELIS-MENTEN

In 1894 postuleerde de Duitse chemicus Emil Fischer in *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme* voor het eerst het mechanisme dat we nu kennen voor de werking van enzymen, waarbij hij enzym en substraat vergeleek met een slot en een sleutel die precies op elkaar passen. Op basis van dit mechanisme publiceerde de Fransman Victor Henri in 1903 een wiskundige beschrijving van de snelheid van een algemene enzymreactie in zijn boek *Lois Générales de l'Action des Diastases*. In 1913, tien jaar later, presenteerden de Canadese pathologe Leonor Michaelis en de Duitse biochemicus Maud Menten een beter uitgewerkte en enigszins vereenvoudigde versie van het model van Henri in hun artikel *Die Kinetik der Invertinwirkung*. Deze *Henri-Michaelis-Menten* vergelijking wordt tot op de dag van vandaag nog veel gebruikt in de

levenswetenschappen, al is de huidige afleiding afkomstig van de Britse biologen George Edward Briggs and John Burdon Sanderson ("JBS") Haldane (in: *A note on the kinetics of enzyme action*, 1925).

Het Henri-Michaelis-Menten model beschrijft de snelheid van een enzymreactie als functie van de concentratie substraat. Het model berust op de hierboven beschreven ODE's, met een aantal extra aannames en vereenvoudigingen.

Zoals al gezegd varieert de snelheid van een reactie met de concentratie van de reactanten, dus de snelheid is nooit constant. Echter, als je goed kijkt naar de helling van de lijnen in *figuur 2*, dan valt op dat de reactiesnelheid aan het begin van de reactie snel stijgt, en daarna enige tijd min of meer hetzelfde blijft. Pas als de reagerende stoffen op raken dan begint de snelheid merkbaar te dalen. We kunnen dus zeggen dat gedurende een groot deel van de reactie de snelheid *bij benadering* constant is, omdat de afname van de reagerende stoffen relatief klein is ten opzichte van de hoeveelheid stof die er nog is. Een dergelijke vereenvoudiging noemen we een *nulde-orde benadering*, en het is een erg nuttige maat als je het wilt hebben over "de" snelheid van een reactie. In het geval van onze enzymreactie, kunnen we zeggen dat de snelheid bij benadering constant is zo lang er voldoende substraat is (en het enzym niet degradeert of afgebroken wordt).

De snelheid is dan uiteraard nog wel afhankelijk van de (begin)concentraties enzym en substraat, en van temperatuur en pH. We verwaarlozen alleen de *afname* van de substraatconcentratie, zo lang deze relatief klein is ten opzichte van de nog overgebleven concentratie. Voor onze vergelijkingen betekent dit dat S , de concentratie substraat, in dit stadium van de reactie vrijwel gelijk zal zijn aan de beginconcentratie, S_0 .

Zo lang er relatief weinig substraat is omgezet, zal er ook relatief weinig product zijn gevormd. We kunnen dus ook stellen dat terugreactie van product naar enzym-substraat-complex verwaarloosbaar klein is ten opzichte van de heenreactie, in dit stadium van de reactie. Ofwel, de term voor de snelheid van deze reactie kunnen we verwaarlozen: $v_{-2} = E \cdot P \cdot k_{-2} \approx 0$.

Onze laatste belangrijke vereenvoudiging is een zogenaamde *steady-state aanname*. Deze vereenvoudiging wordt vaak toegepast als de mate van verandering in een bepaald proces veel kleiner is dan de variatie in andere processen die ermee samenhangen. Je kunt in dit geval bijvoorbeeld denken aan een reactieketen waarbij een van de tussenproducten alleen aanwezig is in zeer kleine hoeveelheden (bijvoorbeeld doordat deze snel gevormd en weer afgebroken wordt). Een verandering in concentratie van dit tussenproduct zal dan dus verwaarloosbaar klein zijn ten opzichte van een verandering in een van de andere stoffen, simpelweg omdat er weinig tussenproduct aanwezig is. Voor enzymreacties is dit inderdaad het geval: mits er veel minder enzym aanwezig is dan substraat, zal de concentratie enzym-substraatcomplex veel lager zijn dan de concentraties substraat en product. We kunnen dan ook stellen dat de *verandering* van de concentratie ES nog veel veel kleiner zal zijn dan de *verandering* in P en S . Dus als er veel meer substraat aanwezig is dan enzym, dan kunnen we bij benadering zeggen: $\frac{dES}{dt} \approx 0$.

Als we bovengenoemde vereenvoudigingen toepassen op de formules van het model in (1), dan krijgen we:

$$\begin{aligned}
\frac{dS}{dt} &= -v_1 + v_{-1} = -E \cdot S_0 \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} \\
\frac{dE}{dt} &= -v_1 + v_{-1} + v_2 = -E \cdot S_0 \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} + ES \cdot k_2 \\
\frac{dES}{dt} &= v_1 - v_{-1} - v_2 = E \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 = 0 \\
\frac{dP}{dt} &= v_2 = ES \cdot k_2
\end{aligned} \tag{2}$$

Zoals gezegd beschrijft het Henri-Michaelis-Menten model de snelheid van een enzymreactie als functie van de concentratie substraat. De effectieve snelheid van een enzymreactie is de snelheid waarmee product gevormd wordt: $\frac{dP}{dt} = ES \cdot k_2$. Onder de aannames die we zojuist hebben beschreven, en in een constante omgeving (die de waarde van k_2 bepaalt), is deze snelheid afhankelijk van de complexconcentratie ES . We hebben gesteld dat de verandering in deze concentratie relatief klein is, zodat $\frac{dES}{dt} = 0$ en de differentiaalvergelijking voor $\frac{dES}{dt}$ uit het model in (2) geschreven kan worden als een "gewone" vergelijking met twee variabelen (E en ES) en vier constanten (S_0 , k_1 , k_{-1} en k_2):

$$E \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 = 0 \tag{3}$$

We kunnen de variabele voor enzymconcentratie schrijven als een constante, door gebruik te maken van de *wet van behoud van massa*. Aangezien we aannemen dat er geen enzym verdwijnt, zal de totale concentratie enzym plus enzym-substraatcomplex gelijk zijn aan de beginconcentratie enzym, E_0 :

$$E_0 = E + ES, \text{ en dus ook: } E = E_0 - ES. \tag{4}$$

Dit laatste kunnen we invullen in vergelijking (3):

$$(E_0 - ES) \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 = 0 \tag{5}$$

Vervolgens kunnen we ES vrijmaken:

$$\begin{aligned}
E_0 \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 &= 0 \\
-ES \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 &= -E_0 \cdot S_0 \cdot k_1 \\
-ES \cdot (S_0 \cdot k_1 + k_{-1} + k_2) &= -E_0 \cdot S_0 \cdot k_1 \\
ES &= \frac{E_0 \cdot S_0 \cdot k_1}{S_0 \cdot k_1 + k_{-1} + k_2}
\end{aligned}$$

Als we nu teller en noemer delen door $S_0 \cdot k_1$, dan kunnen we alle snelheidsconstanten schrijven als één enkele breuk. En om de vergelijking wat overzichtelijker te maken kunnen we vervolgens deze breuk van constanten schrijven als een nieuwe constante, K_m :

$$ES = \frac{E_0}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{S_0 \cdot k_1}}$$

$$ES = \frac{E_0}{1 + \frac{k_{-1}+k_2}{k_1} \cdot \frac{1}{S_0}}$$

$$ES = \frac{E_0}{1 + K_m \cdot \frac{1}{S_0}}$$

De constante K_m wordt vaak de *Michaelis-Menten constante* genoemd. Let wel op dat deze constante een combinatie is van snelheidsconstanten, en dus afhankelijk is van de precieze reacties en de omgevingsfactoren. De constante moet daarom per geval experimenteel bepaald worden.

De uitdrukking voor ES die we nu verkregen hebben, kunnen we invullen in de vergelijking voor de vorming van het product:

$$\frac{dP}{dt} = ES \cdot k_2 = \frac{E_0}{1 + K_m \cdot \frac{1}{S_0}} \cdot k_2 = \frac{E_0 \cdot k_2}{1 + \frac{K_m}{S_0}}$$

Dit is de Henri-Michaelis-Menten vergelijking voor de snelheid van een enzymreactie als functie van de hoeveelheid substraat, S_0 . De term $E_0 \cdot k_2$ wordt meestal geschreven als V_{max} , omdat het een uitdrukking is voor de snelheid van de reactie als het enzym verzadigd is met substraat. In dat geval is al het enzym gebonden als enzym-substraatcomplex. Toevoeging van extra substraat zal de reactiesnelheid dan niet verder doen stijgen, want er is geen vrij enzym meer om aan te binden. In dat geval geldt $ES = E_0$, en dus $\frac{dP}{dt} = ES \cdot k_2 = E_0 \cdot k_2 = V_{max}$.

De Henri-Michaelis-Menten vergelijking geldt uiteraard alleen in gevallen waarin aan alle aannames redelijkerwijs wordt voldaan:

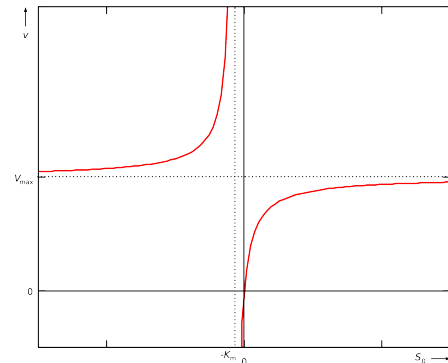
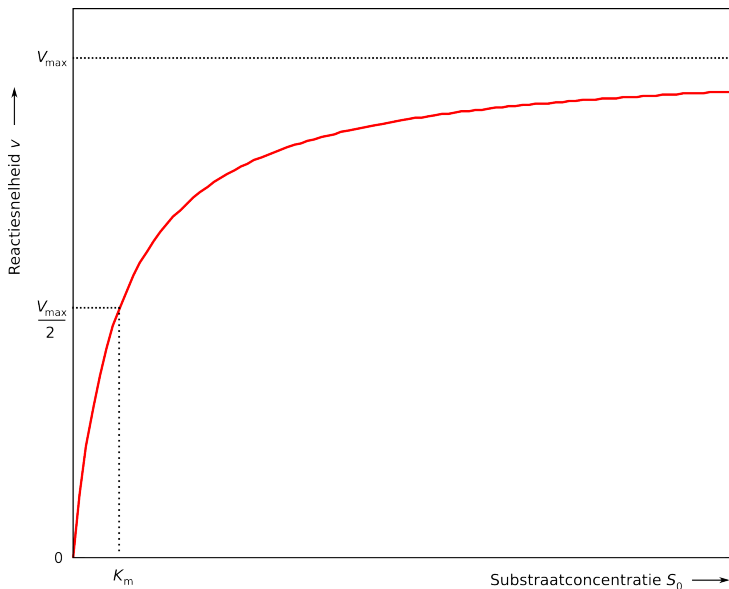
- De reactiesnelheid moet bij benadering constant zijn. Dit is het geval aan het begin van de reactie (zo lang de substraatconcentratie niet beperkend wordt), of in evenwichtssituaties (*steady-state*) waarbij verdwenen substraat direct weer wordt aangevuld.
- Er moet (veel) meer substraat aanwezig zijn dan product, zodat we de terugreactie van product naar complex kunnen verwaarlozen. Ook dit is het geval aan het begin van de reactie, of in situaties waarbij gevormd product direct wordt afgevoerd.
- Er moet (veel) meer substraat aanwezig zijn dan enzym, zodat de verandering in de concentratie ES verwaarloosd kan worden (*steady state aanname*).
- De overige omgevingsfactoren moeten constant zijn, anders veranderen de waarden van K_m en V_{max} .
- De reactie moet plaatsvinden in een homogeen medium.

Desalniettemin wordt de vergelijking erg veel gebruikt, meestal in de vorm:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S_0}} \quad \text{of} \quad v = \frac{V_{max} \cdot S_0}{K_m + S_0} \quad (6)$$

De tweede variant is gelijk aan de eerste, alleen zijn teller en noemer hier beiden vermenigvuldigd met S_0 .

Wiskundig gezien is dit een functie van de vorm $y = \frac{a \cdot x}{b + x}$, ofwel een breukfunctie. De bijbehorende grafiek is een hyperbool met een horizontale asymptoot bij V_{max} en een verticale asymptoot bij $-K_m$.



Figuur 3. De Michaelis-Menten curve (links) geeft het verband tussen reactiesnelheid en substraatconcentratie, en is de uitkomst van de Henri-Michaelis-Menten vergelijking. Wiskundig gezien is de vergelijking een breukfunctie en de grafiek dus een hyperbool (boven), waarvan we gewoonlijk uiteraard alleen het positieve deel tekenen.

Biologisch en chemisch gezien laat deze grafiek zien dat de snelheid van een enzymreactie toeneemt naarmate je meer substraat toevoegt. Echter, deze toename wordt steeds minder naarmate je substraat blijft toevoegen en het enzym verzadigd raakt. De Henri-Michaelis-Menten vergelijking geeft dus een *verzadigingsproces* weer. Daarom wordt deze vergelijking niet alleen gebruikt voor enzymreacties, maar ook om allerlei andere verzadigingsprocessen te modelleren. Bijvoorbeeld in de ecologie, voor het eten van prooien door roofdieren.

FITTEN VAN PARAMETERS

In biochemische experimenten kan de Henri-Michaelis-Menten vergelijking gebruikt worden voor het berekenen van reactiesnelheden bij verschillende substraatconcentraties, mits V_{max} en K_m bekend zijn (voor een gegeven enzymconcentratie en onder gegeven omstandigheden). Deze twee *parameters* worden daarom meestal eerst experimenteel bepaald door het meten van de reactiesnelheid bij een aantal substraatconcentraties. Als je deze meetwaarden tegen elkaar uitzet dan kun je met behulp van een computer de waarden van V_{max} en K_m vinden waarvoor de bijbehorende grafiek goed door de meetpunten loopt. Deze procedure noemen we het *fitten* van de parameters door middel van *niet-lineaire regressie*.

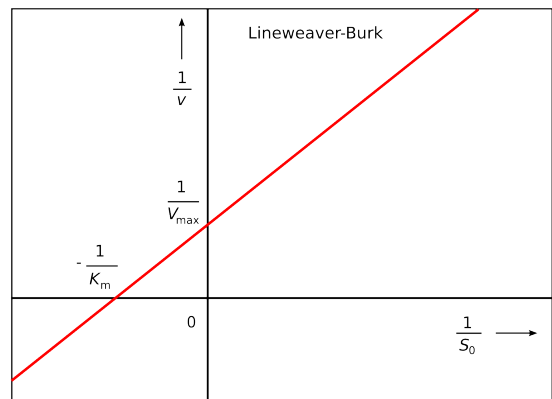
Het is echter pas sinds enkele decennia dat computers beschikbaar zijn voor biochemisch onderzoek. Voor die tijd was niet-lineaire regressie vrijwel onmogelijk uit te voeren, en waren dus andere methodes nodig om de waarden van V_{max} en K_m te bepalen. Meestal werden de meetwaarden via een eenvoudige wiskundige bewerking dusdanig *getransformeerd* dat ze op een rechte lijn zouden moeten vallen. Uit de snijpunten van

de best-passende lijn door de meetpunten met de "getransformeerde" assen kunnen dan de waarden van de parameters afgelezen worden (*lineaire regressie*). Dergelijke *lineaire transformatie* methodes wordt nog steeds veel gebruikt.

De meest gebruikte methode is de *Lineweaver-Burk* transformatie. Deze houdt in dat simpelweg de *dubbele reciproke* genomen wordt van de Henri-Michaelis-Menten vergelijking, in andere woorden men neemt 1 gedeeld door beide zijden van de vergelijking (en dus beide assen). Aangezien het een breukfunctie betreft, en delen door een breuk gelijk staat aan vermenigvuldigen met het omgekeerde, zal de uitkomst in dit geval een lineaire functie zijn van de vorm $y = b + a \cdot x$:

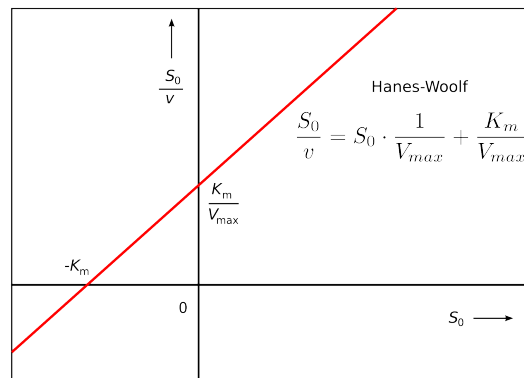
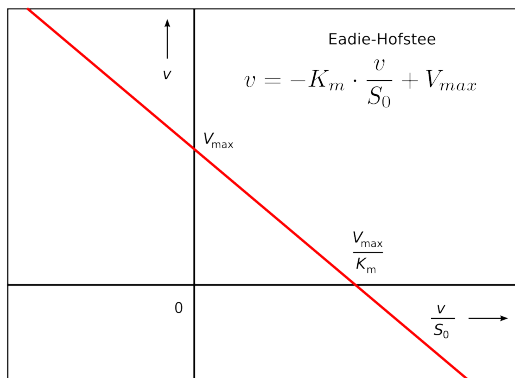
$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S_0}} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{K_m}{S_0}}{V_{max}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S_0}$$

In de praktijk betekent dit het volgende: als je niet de reactiesnelheid v tegen de substraatconcentratie S_0 uit zet, maar $\frac{1}{v}$ tegen $\frac{1}{S_0}$, dan zouden de meetpunten op een rechte lijn moeten vallen, met als functie $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S_0}$. Het snijpunt van deze lijn met de $\frac{1}{v}$ -as is $\frac{1}{V_{max}}$, en het snijpunt met de $\frac{1}{S_0}$ -as is $-\frac{1}{K_m}$. Hieruit



kun je eenvoudig de waarden van V_{max} en K_m berekenen. Het nadeel van deze methode is echter dat je met de meetwaarden tevens de meetfout transformeert. De laagste waarden, met relatief de grootste onzekerheid, worden "opgeblazen". Zij leveren daardoor de hoogste waarden op in de Lineweaver-Burk grafiek, en vice versa. Met andere woorden, de Lineweaver-Burk transformatie versterkt de invloed van meetfouten. Wees hier bedacht op bij het toepassen of interpreteren van deze methode.

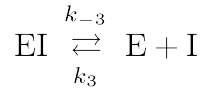
Naast Lineweaver-Burk zijn er nog twee veel gebruikte lineaire transformaties, *Eadie-Hofstee* en *Hanes-Woolf*. Deze hebben minder last van de statistische problemen van Lineweaver-Burk. De bijbehorende functies en grafieken zijn hieronder weergegeven. In de praktijk worden dergelijke lineaire transformaties echter alleen nog voor grafische representatie en vergelijking van gegevens gebruikt, en niet meer om parameters te schatten.



REMMERS

Remmers of *inhibitors* zijn stoffen die de activiteit van een enzym verlagen door te binden aan het enzym. Metabolische routes in cellen worden vaak voor een deel gereguleerd door remmers, en de werking van veel geneesmiddelen en pesticiden berust ook op remming van een bepaald enzym. Er zijn grofweg twee verschillende typen remming: reversibel en niet-reversibel. Niet-reversibele remmers binden meestal aan het enzym, waardoor de structuur verandert en het enzym inactief wordt of de activiteit vermindert. Reversibele remmers binden in een evenwicht aan het enzym zonder de structuur te veranderen. Het effect van reversibele remming op de reactiesnelheid hangt af van of een remmer bindt aan vrij enzym (*competitive inhibition*), aan enzym-substraatcomplex (*uncompetitive inhibition*) of aan beiden (*mixed inhibition* of *non-competitive inhibition*).

In het geval van *competitive inhibition* concurreert de remmer met het substraat om binding aan het vrije enzym. Hierdoor kan er minder substraat binden aan enzym, en gaat de reactiesnelheid omlaag. Echter, bij toevoeging van voldoende substraat zal de "concurrentiepositie" van het substraat wel beter worden. Dit kunnen we modelleren door twee extra snelheidsvergelijkingen op te stellen voor de binding van de remmer **I** aan het vrije enzym **E**. Maar we zullen het hier eenvoudiger doen, door de invloed van de remmer in het model te verwerken aan de hand van de *dissociatieconstante* K_d (de evenwichtsconstante voor de dissociatie van het enzym-remmer-complex) en de totale hoeveelheid enzym E_0 .



$$K_d^{EI} = \frac{I \cdot E}{EI} \Rightarrow EI = \frac{I \cdot E}{K_d^{EI}} \quad \text{en}$$

$$E_0 = E + ES + EI = E + ES + \frac{I \cdot E}{K_d^{EI}} = E \cdot \underbrace{\left(1 + \frac{I_0}{K_d^{EI}}\right)}_{Z_i^E} + ES$$

Net als voor de substraatconcentratie gaan we hier uit van een steady-state evenwicht ($\frac{dEI}{dt} \approx 0$), en nemen we aan dat er veel meer remmer aanwezig is dan product en enzym, zodat de afname van de hoeveelheid remmer daarom te verwaarlozen is (en dus $I \approx I_0$). Als we een nieuwe constante $Z_i^E = \frac{I_0}{K_d^{EI}}$ introduceren, vergelijking (4) vervangen door $E_0 = E \cdot Z_i^E + ES \Rightarrow E = \frac{E_0 - ES}{Z_i^E}$ en vervolgens opnieuw de Henri-Michaelis-Menten vergelijking afleiden, dan krijgen we een "geremde" variant van de originele vergelijking (6):

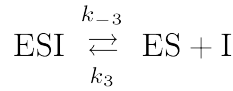
$$v_i^E = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m \cdot Z_i^E}{S_0}} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K'_m}{S_0}} \quad (7)$$

Het model in aanwezigheid van een remmer heeft dus in feite alleen een nieuwe K'_m , die gelijk is aan de K_m in afwezigheid van de remmer, vermenigvuldigd met de factor Z_i^E .

Deze factor kun je zien als een maat voor de hoeveelheid remming: Z_i^E neemt toe met de concentratie remmer I_0 , en neemt af bij een grotere dissociatieconstante K_d (aangezien het enzym-remmer complex dan makkelijker dissocieert).

Het Henri-Michaelis-Menten model kan dus gebruikt worden om enzymremming te herkennen, als de parameters K_m en V_{max} bepaald worden voor de situaties met en zonder remmer. *Competitive inhibition* is vervolgens te herkennen aan het feit dat het de waarde van K_m verhoogt, zonder de waarde van V_{max} te beïnvloeden.

Bij *uncompetitive inhibition* bindt de remmer enkel aan het enzym-substraatcomplex, waardoor het complex zijn catalytische functie niet meer kan uitoefenen. Aangezien het substraat in dit geval niet concurreert met de remmer, zal toevoeging van extra substraat de situatie niet verbeteren. Dit type remming is vrij zeldzaam. We kunnen het op dezelfde manier modelleren als bij *competitive inhibition*:



$$K_d^{ESI} = \frac{I \cdot ES}{ESI} \Rightarrow ESI = \frac{I \cdot ES}{K_d^{ESI}} \quad \text{en}$$

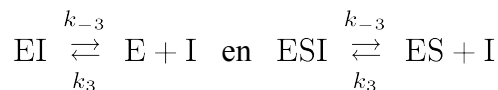
$$E_0 = E + ES + ESI = E + ES + \frac{I \cdot ES}{K_d^{ESI}} = ES \cdot \underbrace{\left(1 + \frac{I_0}{K_d^{ESI}}\right)}_{Z_i^{ES}} + E$$

Opnieuw afleiden van de Henri-Michaelis-Menten vergelijking geeft dan:

$$v_i^{ES} = \frac{V_{max}}{Z_i^{ES} + \frac{K_m}{S_0}} = \frac{V_{max}/Z_i^{ES}}{1 + \frac{K_m/Z_i^{ES}}{S_0}} = \frac{V'_{max}}{1 + \frac{K'_m}{S_0}} \quad (8)$$

Uncompetitive inhibition zal dus de waardes van zowel K_m als V_{max} verlagen met dezelfde factor.

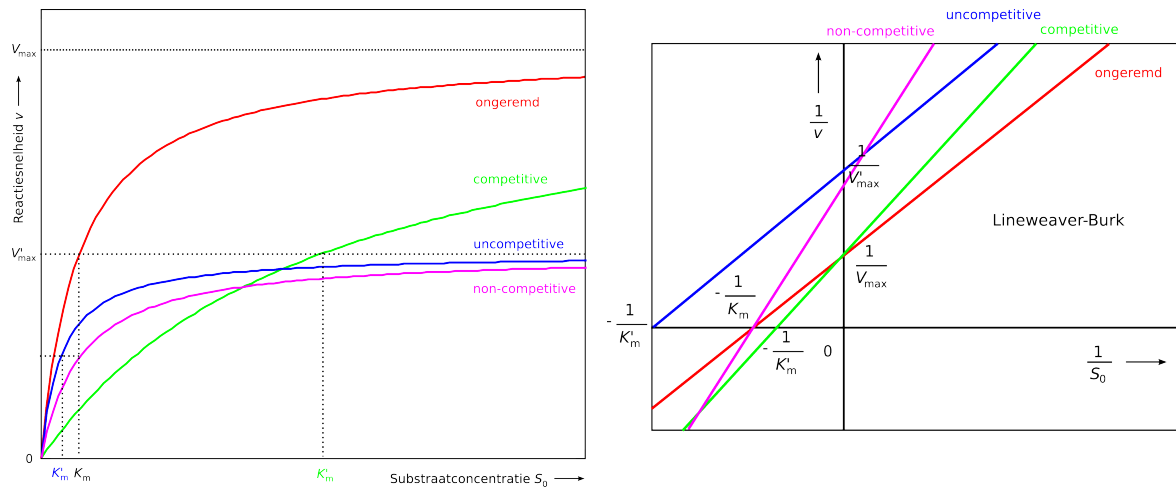
Bij *mixed inhibition* bindt de remmer aan zowel vrij als gebonden enzym. *Non-competitive inhibition* is een speciaal geval hiervan, waarbij de evenwichtsconstante (en snelheidsconstante) hetzelfde is, ongeacht of het enzym vrij of gebonden is. De uitkomst is dus een combinatie van vergelijking (7) en (8):



$$K_d^{ES} = K_d^{ESI} \quad \text{en} \quad Z_i^E = Z_i^{ES} = Z_i$$

$$v_i = \frac{V_{max}}{Z_i + \frac{K_m \cdot Z_i}{S_0}} = \frac{V_{max}/Z_i}{1 + \frac{K_m}{S_0}} = \frac{V'_{max}}{1 + \frac{K_m}{S_0}} \quad (9)$$

Uncompetitive inhibition is dus te herkennen aan het feit dat het enkel de waarde van V_{max} verlaagt. *Mixed inhibition* zal echter de waarden van zowel V_{max} als K_m beïnvloeden, omdat de evenwichts- en snelheidsconstanten van binding met vrij en gebonden enzym in dit geval verschillend zijn. *Mixed inhibition* is dus soms lastig te onderscheiden van de overige typen remming door alleen de waarden van K_m en V_{max} te meten, aangezien er altijd een meetfout is.



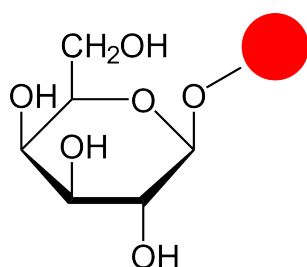
OVER DE PROEF

In deze proef gaan we de reactiesnelheid van een enzymreactie meten bij verschillende substraatconcentraties. Aan de hand daarvan zullen we een Michaelis-Menten curve maken en de waarden van de parameters K_m en V_{max} voor deze reactie bepalen. We doen dit voor zowel een normale reactie als een reactie in de aanwezigheid van een remmer. Door de waarden van de parameters te vergelijken kunnen we vaststellen met welk type remmer we te maken hebben.

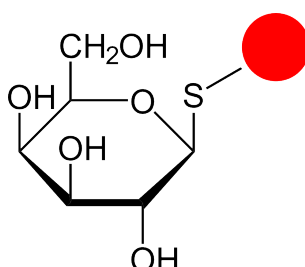
De reactie die we gebruiken is de splitsing (hydrolyse) van *ortho*-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) in *ortho*-nitrophenol (ONP) en galactose: $\text{ONPG} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ONP} + \text{G}$. Deze reactie wordt gecatalyseerd door het enzym β -galactosidase. Deze reactie heeft fysiologisch geen betekenis, maar wordt veel gebruikt om de activiteit van β -galactosidase enzymen te bepalen. De β -galactosidases zijn een familie van belangrijke hydrolase enzymen die in staat zijn om een β -galactoside brug te verbreken, en waartoe onder meer het bekende enzym *lactase* behoort. Lactase splitst *disaccharide-lactose* (aanwezig in melkproducten) in *galactose* en *glucose*. Een afname in de activiteit van lactase na het tweede levensjaar veroorzaakt lactose-intolerantie bij de meeste mensen. Een mutatie ongeveer 6 millenia geleden, heeft ervoor gezorgd dat Noord-Afrikanen, Europeanen (en hun afstammelingen in Amerika en Australië) langer lactase aan blijven maken. Daaraan hebben we te danken dat de meeste Nederlanders hun hele leven melkproducten kunnen blijven eten en drinken.

Thiogalactosides zijn verbindingen die een zwavelatoom in plaats van een zuurstofatoom hebben in de β -galactoside brug, en die daardoor ongevoelig zijn voor afbraak door β -galactosidase enzymen. Ze worden echter wel gebonden door het enzym, en kunnen dus fungeren als remmer. De remmer die we in de proef gebruiken, *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) is een thiogalactoside en speelt onder meer een belangrijke rol in de regulatie van het lactose-metabolisme van veel bacteriën.

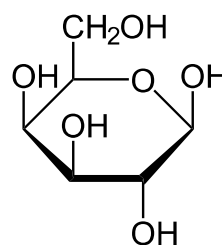
We meten de snelheid van de enzymreactie aan de hand van de concentratie-toename van één van de producten, ortho-nitrofenol (ONP). De ONPG-oplossing is kleurloos, maar ONP is geel, dus we kunnen de concentratieverandering van ONP bepalen met een spectrofotometer, door de absorptie van blauw/violet licht (400 nm) te meten over de tijd. We doen dit voor een aantal verschillende beginconcentraties substraat (ONPG), en tekenen een Michaelis-Menten curve door de gemeten vormingssnelheden van ONP uit te zetten tegen de beginconcentraties ONPG.



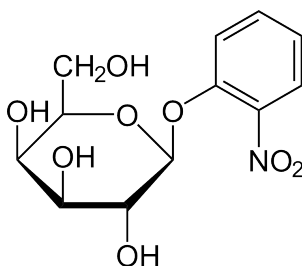
β -galactoside
(met willekeurige zijgroep)



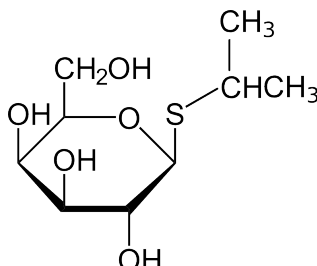
thiogalactoside
(met willekeurige zijgroep)



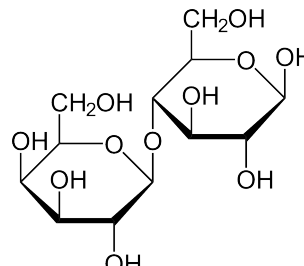
galactose



ortho-nitrophenyl- β -galactoside
(ONPG)



isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
(IPTG)



lactose

Uitvoering van de proef:

Benodigde oplossingen:

- 30 ml 0.3 M K/Na-fosfaatbuffer pH = 7.0 (KNaP buffer)
- 15 ml 1.5 mM ONPG (substraat) in KNaP-buffer
- 10 ml 5 mM IPTG (remmer) in KNaP-buffer
- 0.5 ml β -galactosidase suspensie (enzym, *E. coli* homogenaat) (koud bewaren!)

Twee reeksen (A en B) van 6 cuvetten worden als volgt gevuld:

Cuvet	KNaP (ml)	ONPG (ml)	IPTG (ml)
A ₁	1.00	2.00	-
A ₂	2.00	1.00	-
A ₃	2.50	0.50	-
A ₄	2.60	0.40	-
A ₅	2.75	0.25	-
A ₆	2.80	0.20	-
B ₁	-	2.00	1.00
B ₂	1.00	1.00	1.00
B ₃	1.50	0.50	1.00
B ₄	1.60	0.40	1.00
B ₅	1.75	0.25	1.00
B ₆	1.80	0.20	1.00

In één extra cuvet, de blanco, wordt 3.0 ml KNaP-buffer gepipetteerd. Met deze blanco wordt de spectrofotometer ingesteld op A = 0, bij een golflengte van 400 nm.

Start nu per cuvet de reactie door enzym toe te voegen. We meten met de computer direct de absorptietoename in de eerste fase van de reactie, en bepalen aan de hand daarvan de reactiesnelheid. Ga als volgt te werk:

- Plaats de meetcuvet in de spectrofotometer en start de meting op de computer.
- Pipetteer 10 µl β-galactosidase suspensie in de vloeistof, homogeniseer met parafilm en sluit het klepje van de spectrofotometer.
- Laat de reactie lopen (ongeveer een minuut), totdat een rechte lijn (constante reactiesnelheid) is verkregen waarvan de helling goed bepaald kan worden.
- Vervang de meetcuvet door een volgend meetcuvet, en herhaal de procedure.
- Het is niet noodzakelijk (maar uiteraard wel beter) na elke meting weer opnieuw de blanco in te stellen.
- Als je tussen de cuvetten de meting stopt en start, dan zijn de resultaten beter uit elkaar te houden. Het is ook mogelijk om commentaar toe te voegen bij de meting, dus maak daar gebruik van!

Na de metingen:

- Selecteer na de metingen in Chart van iedere lijn een zo groot mogelijk recht stuk, en bepaal hiervan de helling met behulp van de Data Pad. Voeg de helling voor iedere cuvet toe aan de Data Pad, en kopieer de resultaten naar een Excel-werkblad.
- Bereken de concentraties ONPG en IPTG in iedere cuvet, en zet deze concentraties ook in een kolom van het Excel-werkblad. Vergeet niet de betekenis en eenheid van iedere kolom te vermelden, bijvoorbeeld op de eerste regel. Sla het werkblad op in je home-directory.
- Schrijf kort op in je labjournaal wat je hebt gedaan, en waarom. Noteer ook mo-

gelijke problemen of eigenaardigheden die je bent tegengekomen tijdens de proef of de meting, zodat je weet welke resultaten betrouwbaar zijn. Laat je lab-journaal aan de assistent zien voordat je weggaat.

Uitwerking van de gegevens:

- Reken de gemeten vormingssnelheden van ONP om naar $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ met behulp van de wet van Lambert-Beer (zie proef 1). De millimolaire extinctiecoëfficiënt ϵ voor ONP bij $\text{pH} = 7.0$ is $2.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Noteer je berekening ook in je lab-journaal!
- Maak twee Michaelis-Menten plots van je gegevens (met en zonder remmer), door de reactiesnelheden (v , op de y-as) uit te zetten tegen de substraatconcentraties (S_0 , op de x-as). Maak ook Lineweaver-Burk plots, door de reciproke (1 gedeeld door de waarde) van beide variabelen tegen elkaar uit te zetten.
- Schat de waardes van de parameters K_m en V_{max} aan de hand van beide typen grafieken. Zijn de waardes geschat aan de hand van de Michaelis-Menten plots (ongeveer) hetzelfde als de waardes geschat aan de hand van Lineweaver-Burk? Zo nee, waarom niet?
- Kun je aan de hand van deze resultaten al zien met welk type remmer je te maken hebt?

Bepaal de waardes van K_m en V_{max} met behulp van een niet-lineaire regressie. Hiervoor gebruiken we de *Solver*-functie van Excel:

- Zet de eerder geschatte waardes van K_m en V_{max} in cellen van het werkblad en stel een formule op om de reactiesnelheid te berekenen aan de hand van deze twee parameters en de substraatconcentratie. Bereken deze snelheden met Excel in een kolom naast de gemeten snelheden.
- Maak ook een kolom met daarin het verschil tussen de gemeten en de berekende reactiesnelheid. Kwadrateer deze verschillen om absolute getallen te verkrijgen. Tel de gekwadrateerde verschillen op in een cel. Deze *kwadratensom* geeft aan hoe goed de berekende snelheden (aan de hand van de geschatte parameters) passen bij de metingen. Een kleinere waarde betekent een kleinere afwijking.
- Verander de geschatte waardes van K_m en V_{max} en kijk wat er gebeurt met de kwadratensom. Kun je de waarde van de som kleiner krijgen?
- Gebruik nu de Solver. Geef aan dat je de waarde van de kwadratensom wilt minimaliseren, door de waardes van K_m en V_{max} te veranderen. Verschilt de uitkomst veel van de eerder geschatte waardes? Zo ja, waar zou dat aan kunnen liggen?
- Bepaal het type remming door IPTG aan de hand van deze waardes van K_m en V_{max} . Komt dit overeen met wat je weet van de structuur van IPTG vergeleken met ONPG?
- Kun je de dissociatieconstante(s) van het enzym-remmer-complex berekenen aan de hand van de gegevens die je nu hebt? Probeer dit.
- Voeg je resultaten, berekeningen en grafieken toe aan je labjournaal, als je dit nog niet hebt gedaan. Vermeld in je labjournaal kort je conclusies aan de hand van *je eigen gegevens*. Indien je gegevens leiden tot eigenaardige uitkomsten, bediscussieer waar dit aan zou kunnen liggen en wat je daaraan zou kunnen doen indien je het experiment opnieuw zou doen. Laat je labjournaal aan de assistent zien voordat je weggaat.