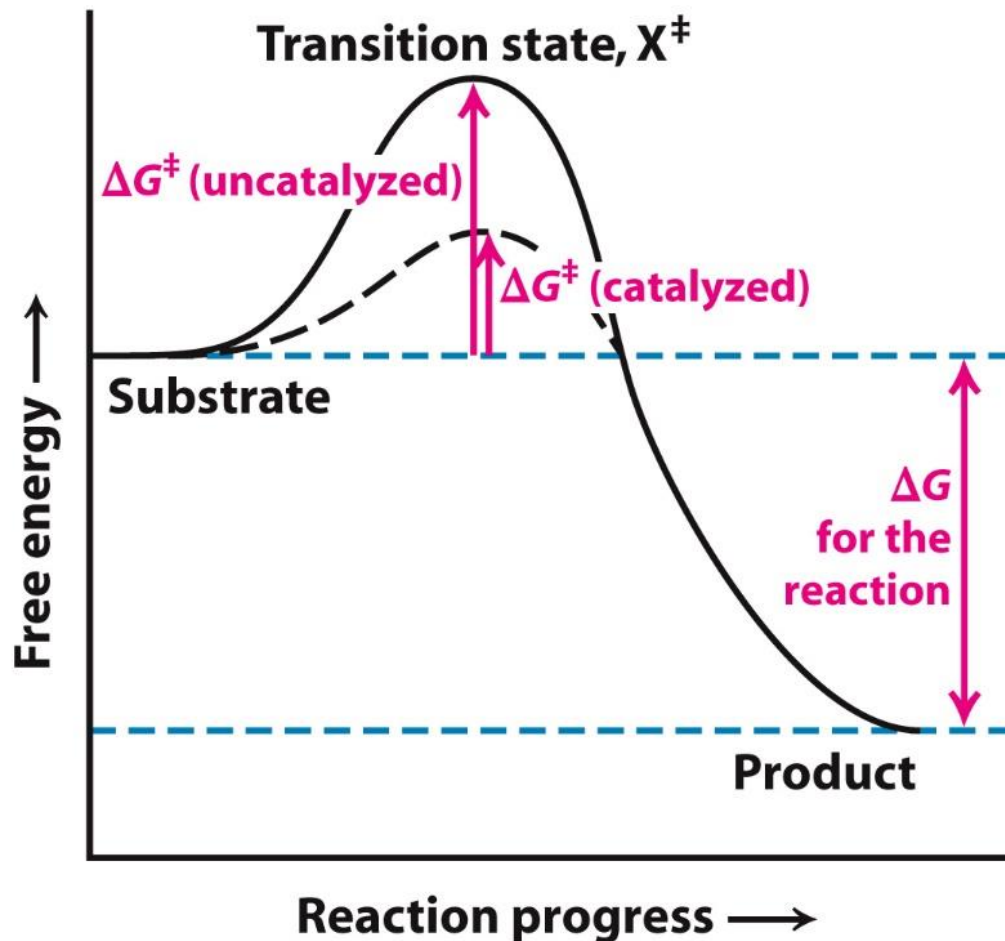


Biochimie 1

Les 9

Vorige les: enzymen

Versnellen reacties door de activeringsenergie te verlagen



Vandaag : (enzym)kinetiek

Studie van de snelheid van (door enzymen gekatalyseerde) reacties

Na afloop van deze les kun je ...

... het verschil tussen (pseudo) first en second order reacties uitleggen

...uitleggen waar V_0 , V_{max} , K_M en $[S]$ voor staan en wat deze waarden betekenen

...deze waarden berekenen m.b.v. de Michaelis Menten vergelijking

...de V_{max} en K_M bepalen m.b.v. de Lineweaver-Burk plot

...het turnover getal en de specificiteitsconstante van een enzym gekatalyseerde reactie berekenen

First order reactions



De snelheid van deze reactie (**V**) kun je als volgt berekenen:

$$V = d[A]/dt = d[P]/dt \quad (\text{waarbij } d = \text{toename of afname})$$

V is dus proportioneel aan de concentratie van A:

$$V = k[A]$$

k = snelheidsconstante/ rate constant

Eenheid van **k**: per seconde (s^{-1})

Second order reactions



$$V = k[A]^2$$



$$V = k[A][B]$$

eenheid k : per mol per seconde ($M^{-1}s^{-1}$)

Veel biologische reacties zijn second order reactions

Pseudo-first-order reaction:

- second order reaction die veel op een first order reaction lijkt.
- B.v. wanneer $[B] \gg [A]$ (reactie lijkt dan onafhankelijk van de concentratie van B)

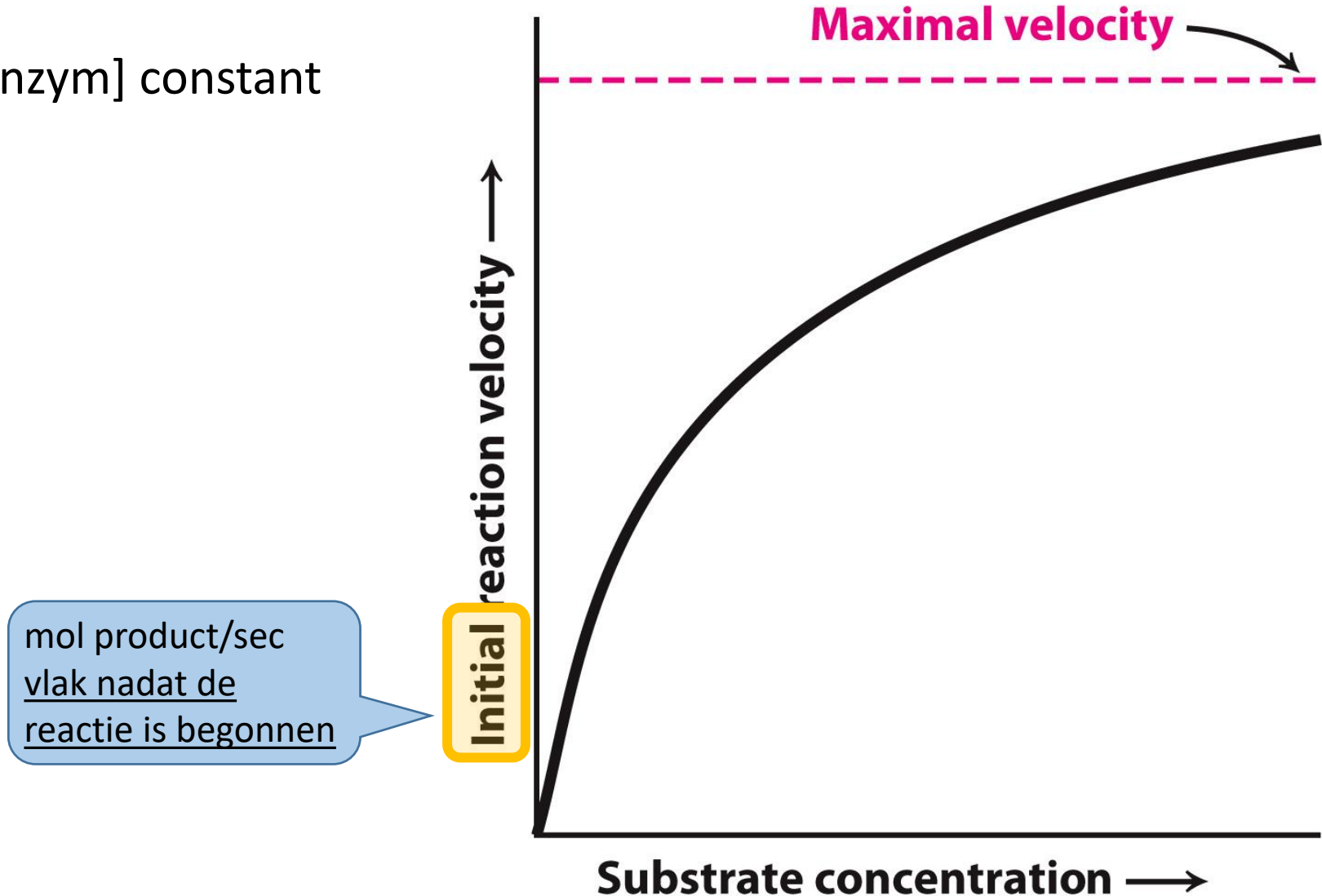
Dus...

Snelheid van de reactie (**V**) is afhankelijk van:

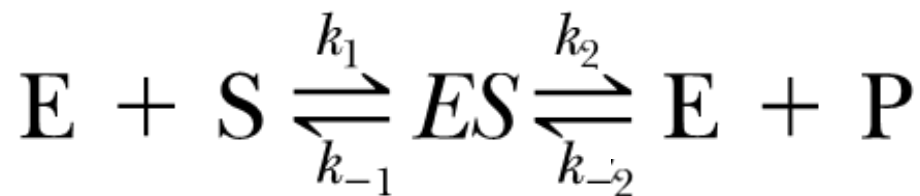
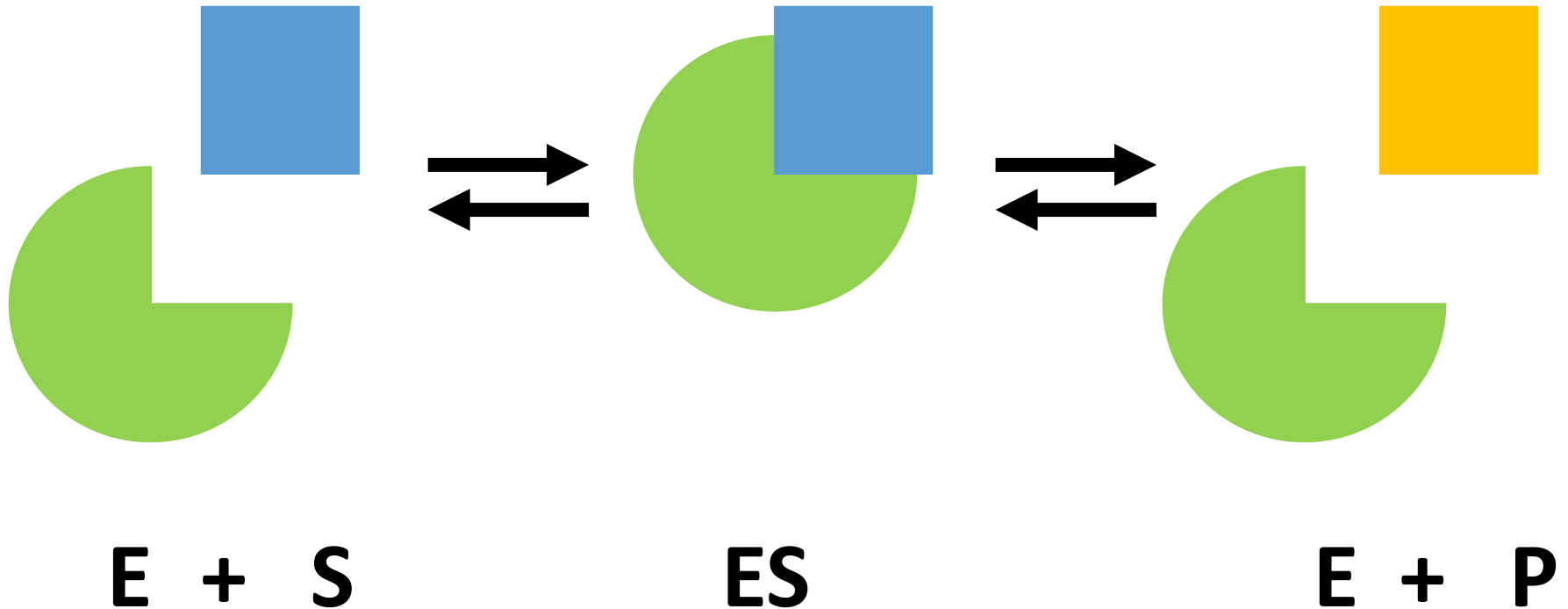
- de **concentratie** van de reactanten
- de **snelheidsconstante (*k*)** (rate constant)

Enzym gekatalyseerde reacties

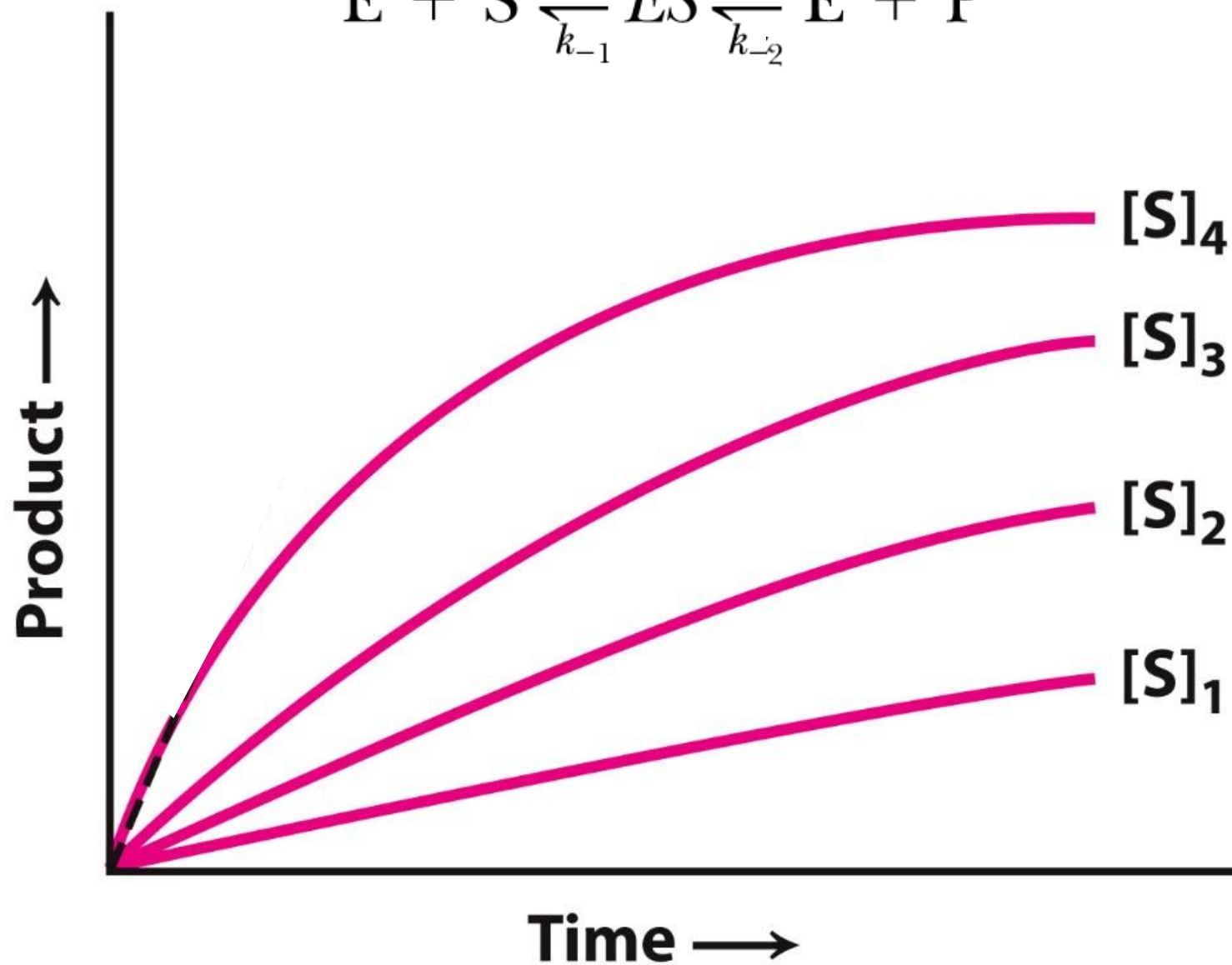
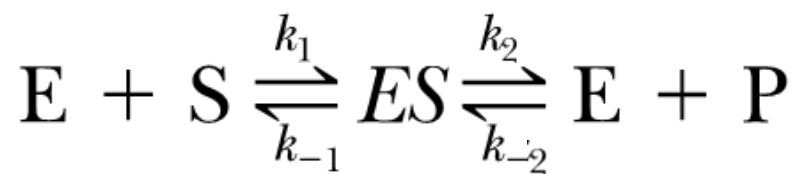
[enzym] constant

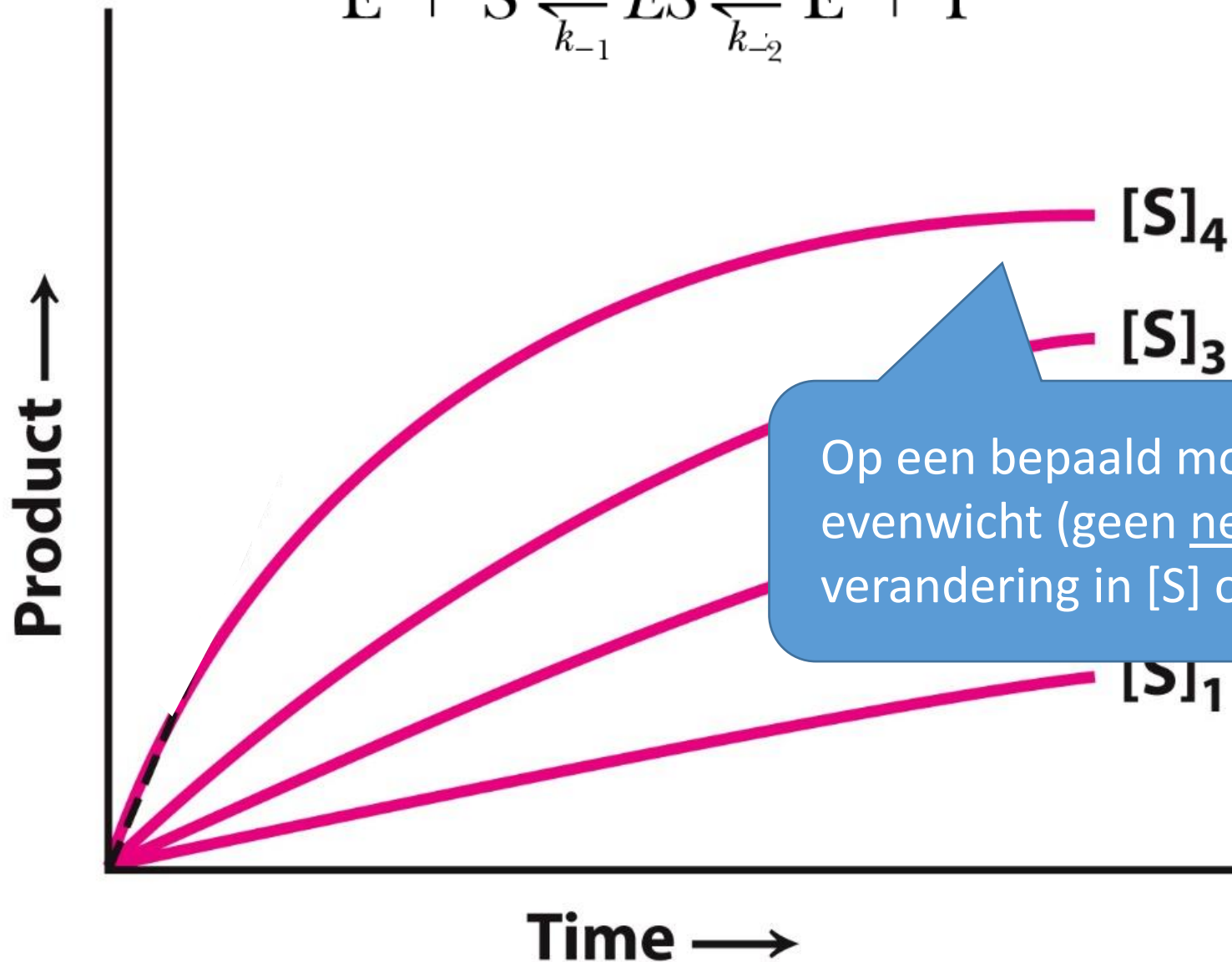
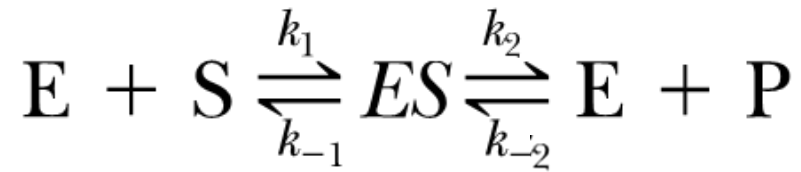


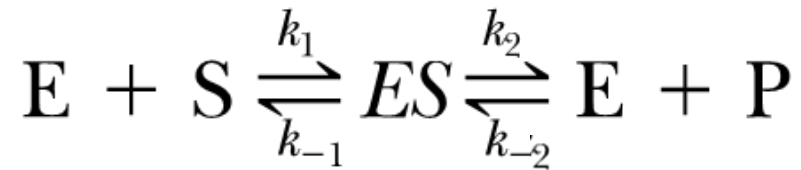
Enzym gekatalyseerde reacties



E= enzym
S= substraat
P= product



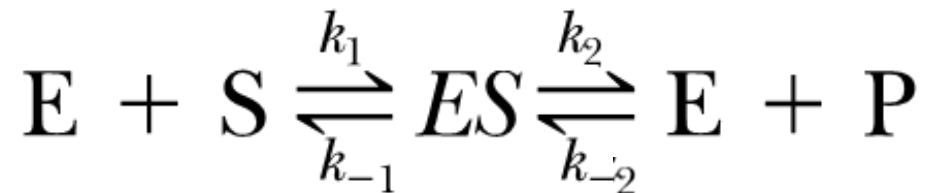




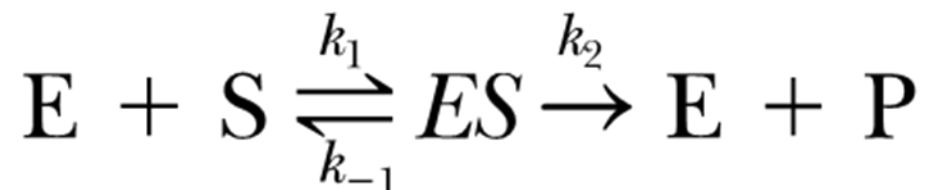
Helemaal aan het begin van de reactie

[P] is nog 0 \rightarrow nog geen terugreactie

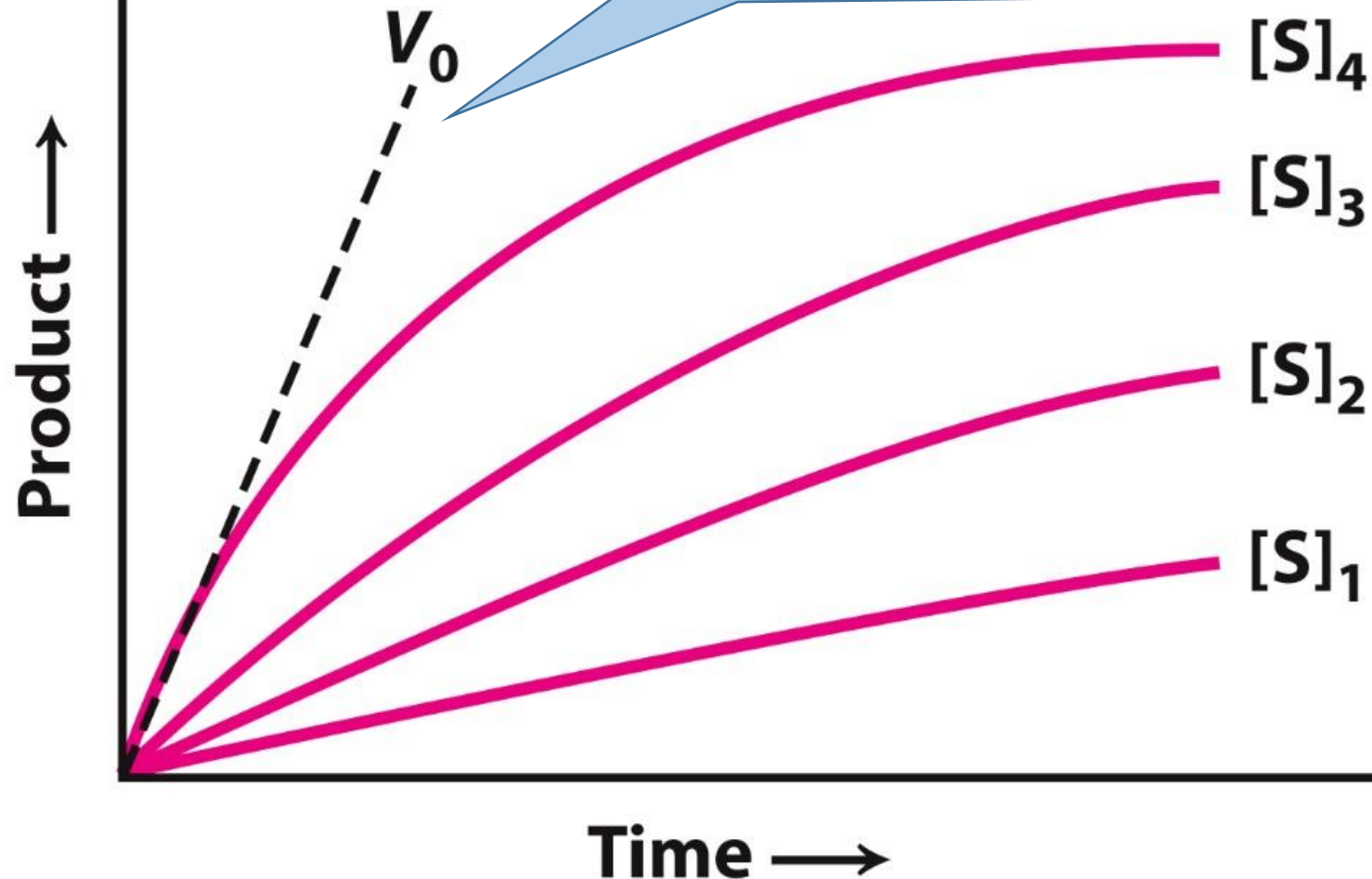
De reactievergelijking:



Kan dan vereenvoudigd worden tot:



V_0 = de "begin" snelheid van de reactie bij een bepaalde $[S]$. Hierbij wordt aangenomen dat de $[P]$ nog 0 is en er geen terugreactie optreedt.



Michaelis Menten vergelijking

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

V_0 = begin snelheid (initial rate)
 V_{max} = maximale snelheid
 K_M = Michaelis constante

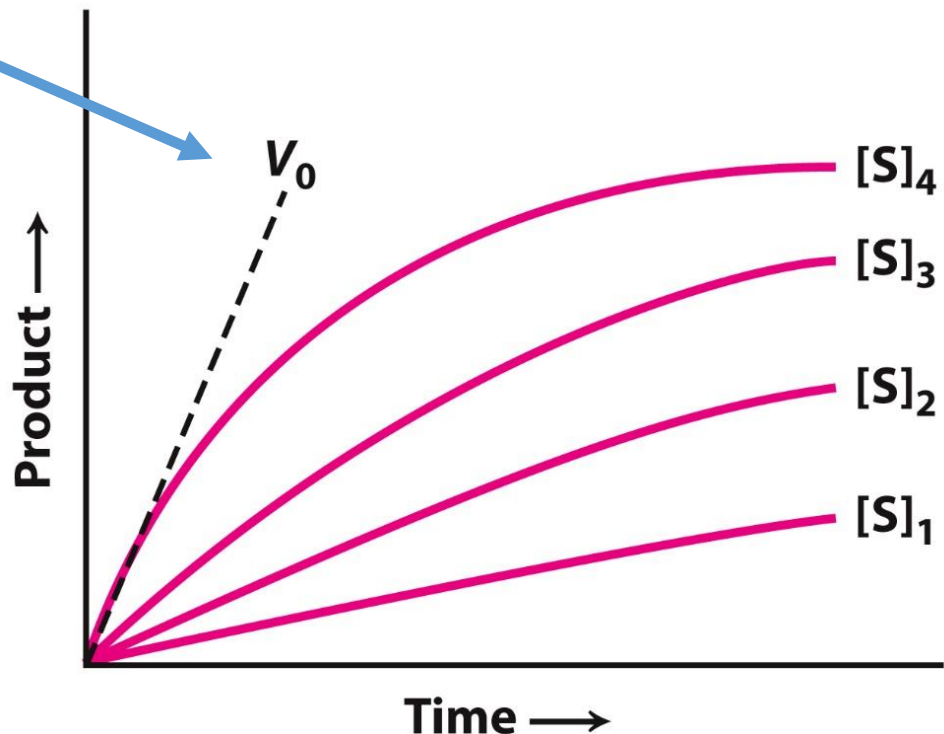
} Zie volgende slides

Geïnteresseerd in de afleiding van de Michaelis Menten vergelijking?
Zie appendix hoofdstuk 7 (geen tentamenstof)

Michaelis Menten vergelijking

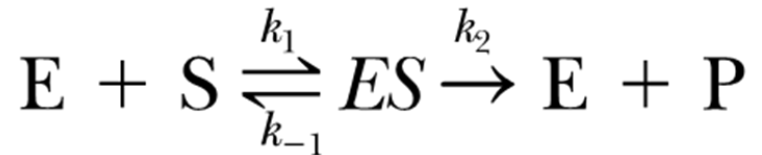
$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

V_0 = de "begin" snelheid van de reactie bij een bepaalde $[S]$.
Hierbij wordt aangenomen dat $[P]$ nog 0 is en er geen terugreactie optreedt.



Michaelis Menten vergelijking

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



V_{max} = maximale snelheid

E_T staat voor
'total enzyme'

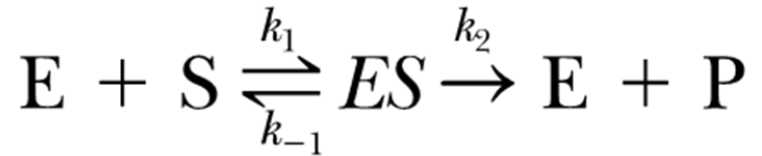
→ snelheid wanneer alle enzymen (E_T) substraat gebonden zijn

→ V_{max} is dus direct afhankelijk van de enzymconcentratie

$$V_{max} = k_2[E]_T$$

Michaelis Menten vergelijking

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

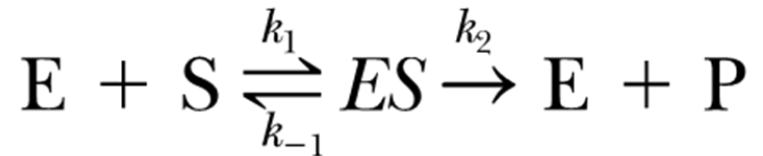


$$K_M = \text{Michaelis constante} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

K_M beschrijft de eigenschappen van de enzym/substraat interactie: uniek voor elk enzym, onafhankelijk van [E]

Michaelis Menten vergelijking

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

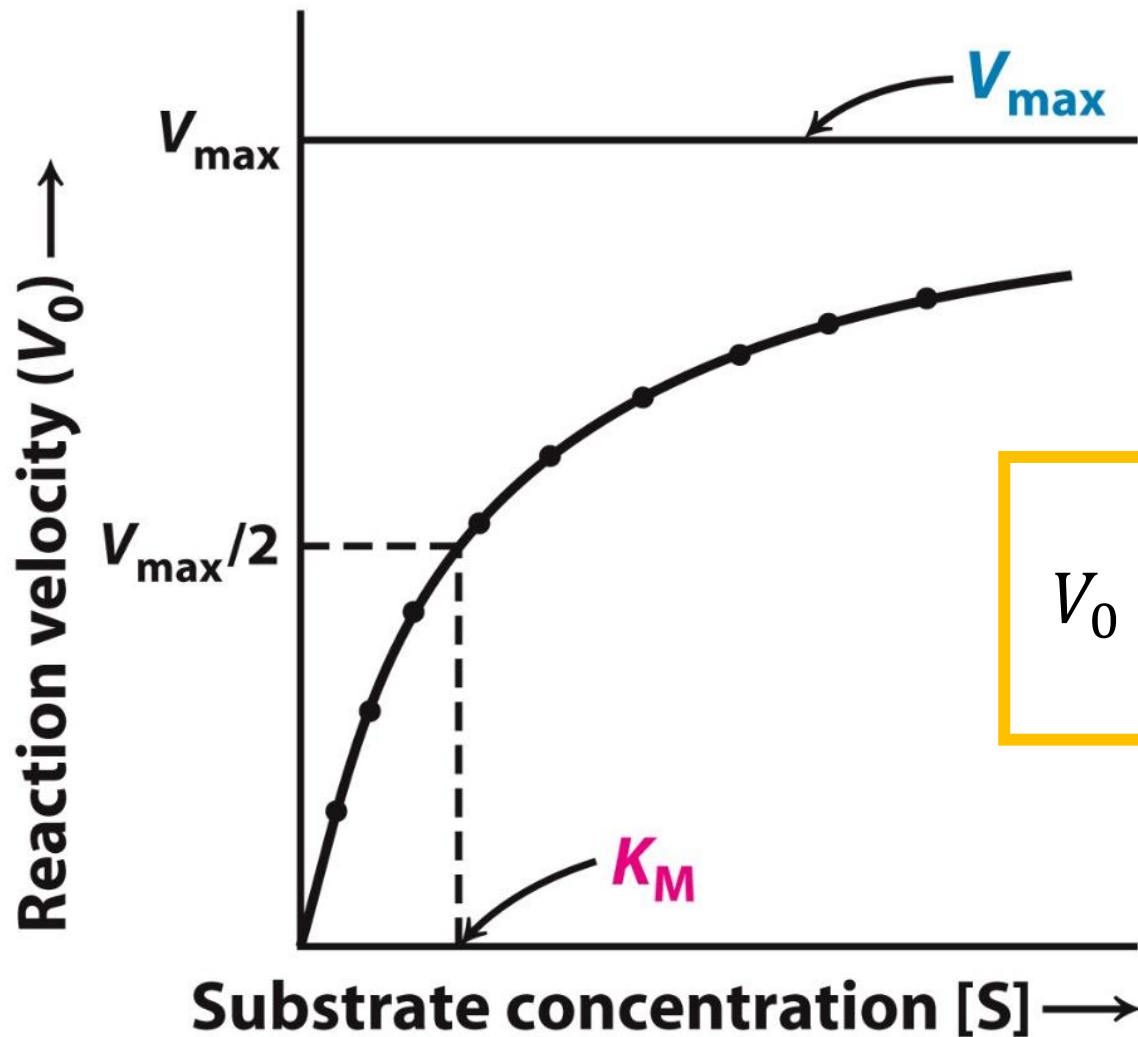


Stel: de initiële reactiesnelheid is de helft van de maximale snelheid ($V_0 = V_{max} / 2$)

Wat is dan de substraatconcentratie? $\rightarrow [S] = K_M$

K_M is gelijk aan de substraatconcentratie waarbij de reactiesnelheid de helft van de maximale snelheid is.

Michaelis Menten kinetiek



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

Video over K_M en V_{\max}

<https://www.youtube.com/watch?v=q94TCTSYv8>

Michaelis Menten plot

- Michaelis-Menten plot wordt bepaald door het fitten van experimentele V_0 waarden voor verschillende $[S]$ in de Michaelis-Menten vergelijking
- Toen er nog geen computers beschikbaar waren kon dit ook door de vergelijking om te schrijven tot een plot met rechte lijn: de **Lineweaver-burk plot**
Hieruit is V_{\max} en K_M makkelijk af te lezen

Lineweaver-Burk plot

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



$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

y = m • x + b

Lineweaver-Burk plot (afleiding)

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

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

omgekeerde nemen

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



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



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



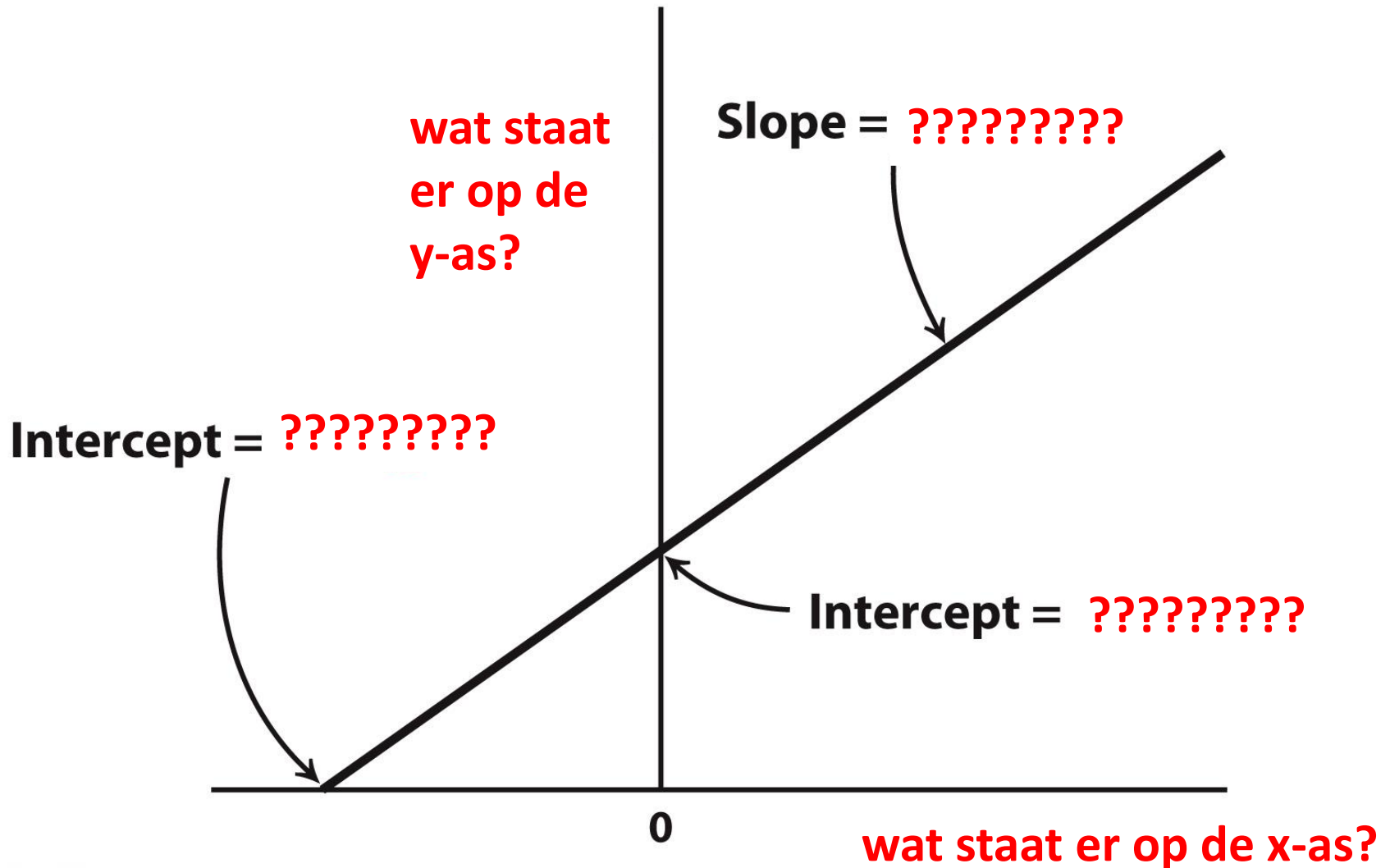
$$y = ax + b$$

Alleen ter informatie.

De afleiding is geen tentamenstof.

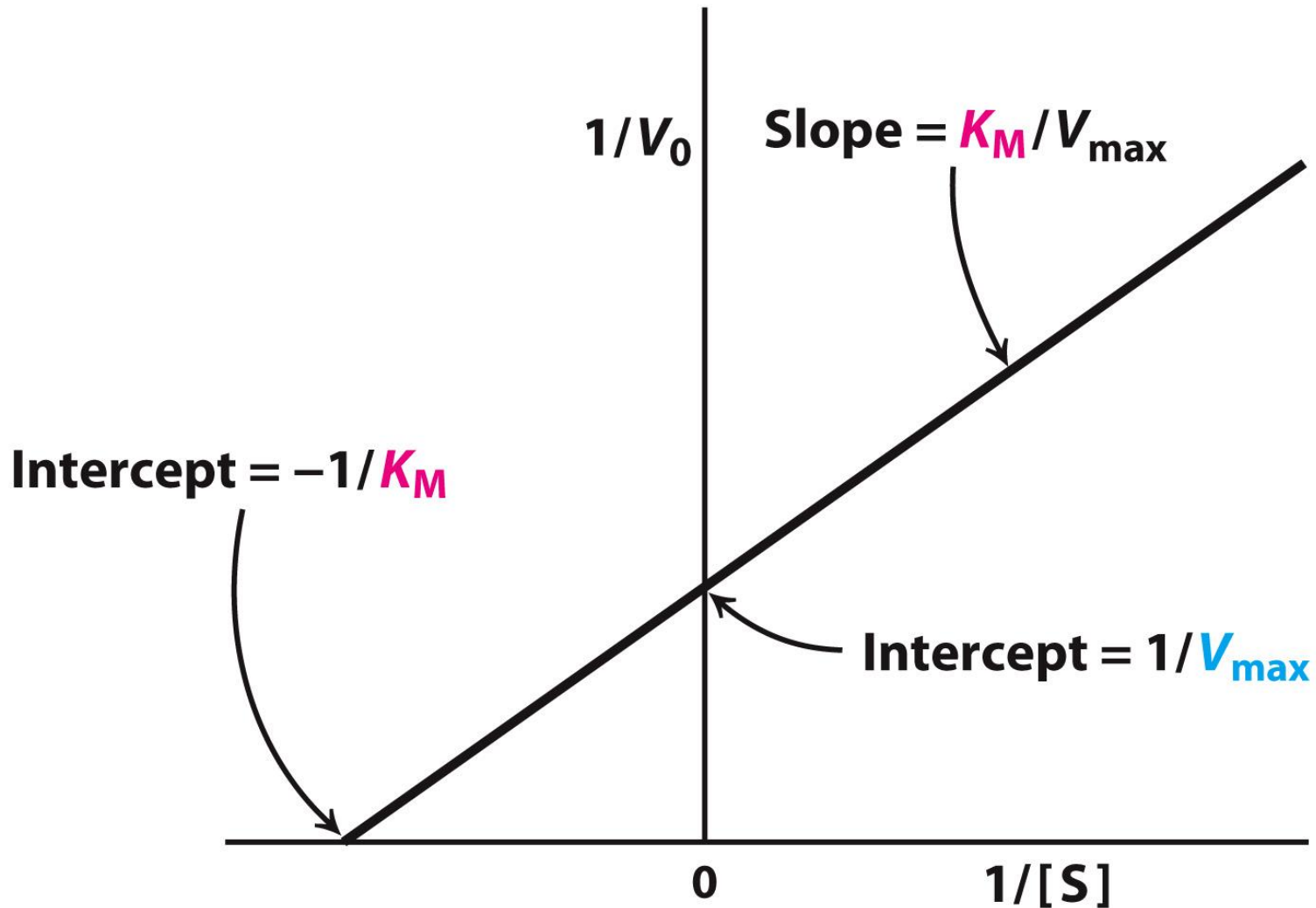
Lineweaver-Burk plot

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Lineweaver-Burk plot

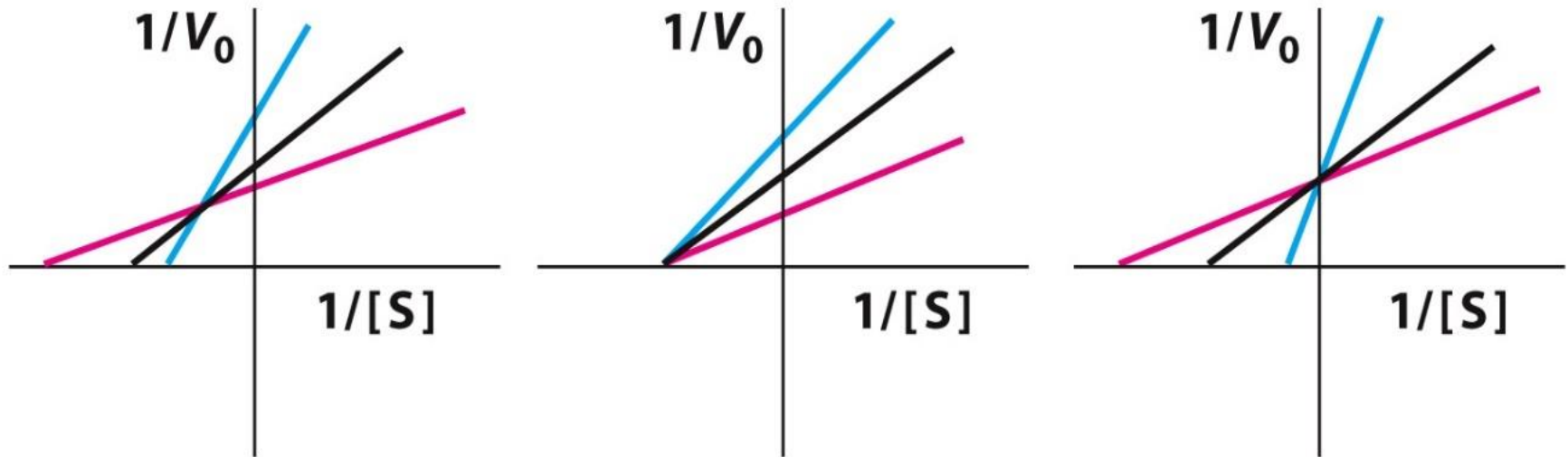
$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Oefening Lineweaver-Burk plot (1)

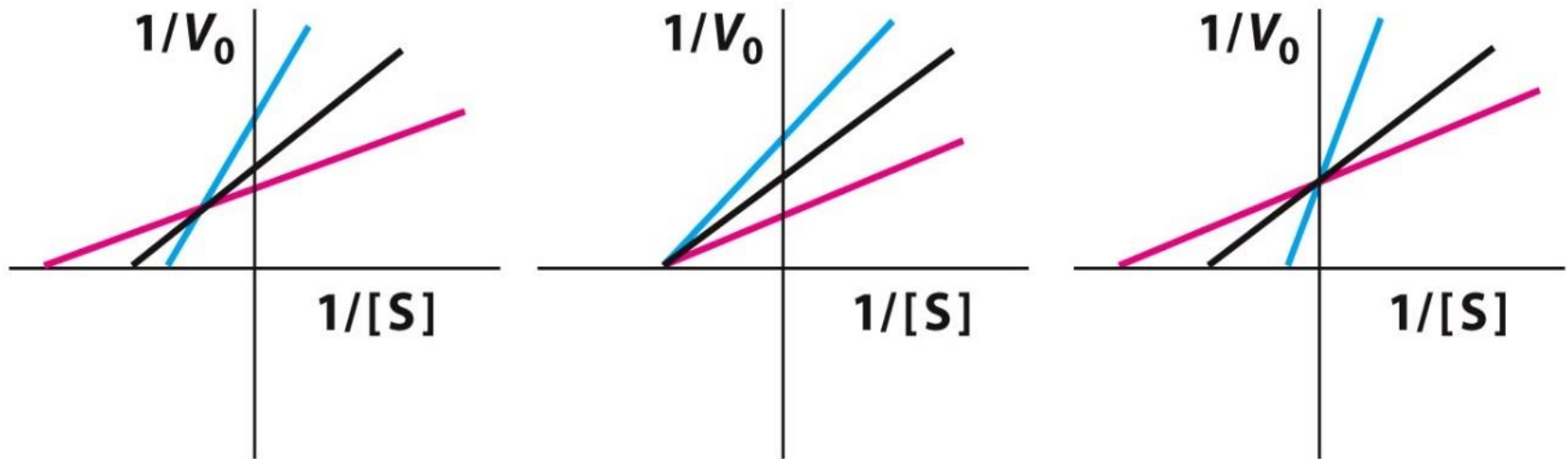
Voor een enzym gekatalyseerde reactie met één substraat worden Lineweaver-Burk plots getekend bij drie verschillende enzymconcentraties (roze, blauw, zwart).

Welke van de volgende drie plots verwacht je? Leg je antwoord uit.



Oefening Lineweaver-Burk plot (1)

Eén substraat, drie verschillende enzymconcentraties (blauw, roze, zwart).



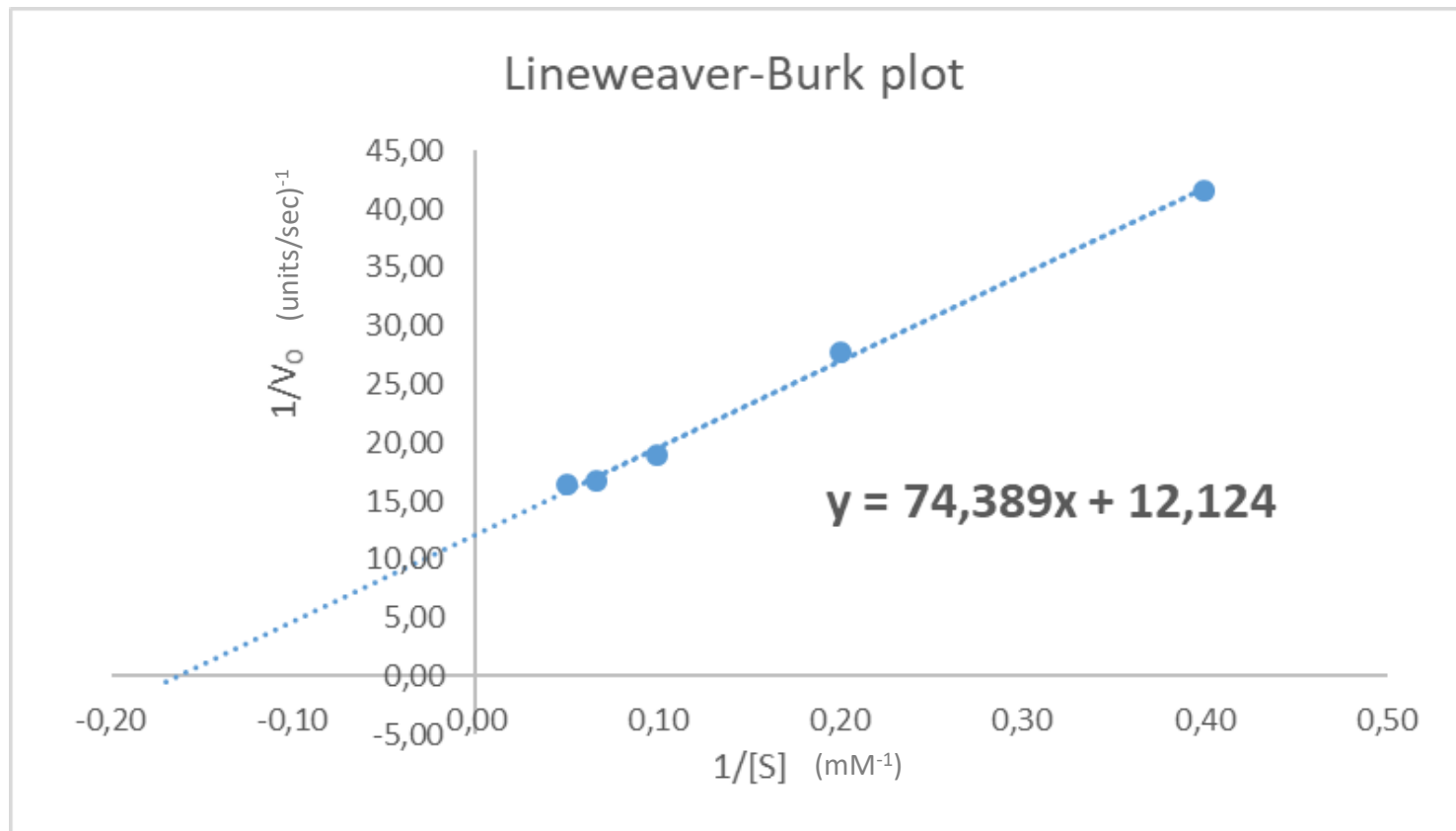
Als de enzymconcentratie verandert zal V_{\max} veranderen. Het snijpunt met de x-as zal daarom veranderen (want snijpunt y-as = $1/V_{\max}$).

Het snijpunt met de x-as mag niet veranderen, want snijpunt x-as = $-1/K_M$ en K_M hoort onafhankelijk van $[E]$ te zijn.

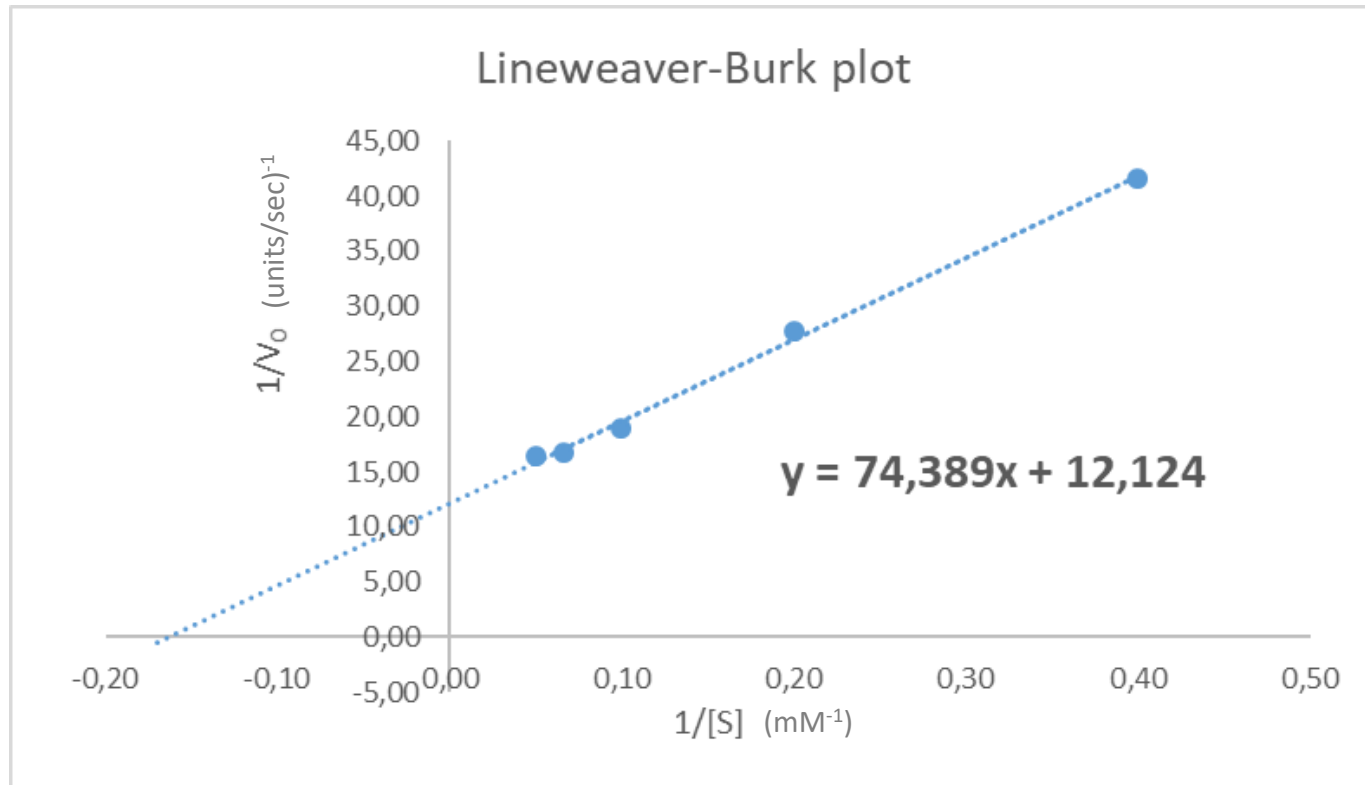
De middelste grafiek is dus de juiste grafiek.

Oefening Lineweaver-Burk plot (2)

De reactiesnelheid van een enzym (in Units/sec) wordt gemeten als functie van de substraatconcentratie. Hieronder staat de bijbehorende Lineweaver-Burk plot. Bereken de K_M en de V_{max} .

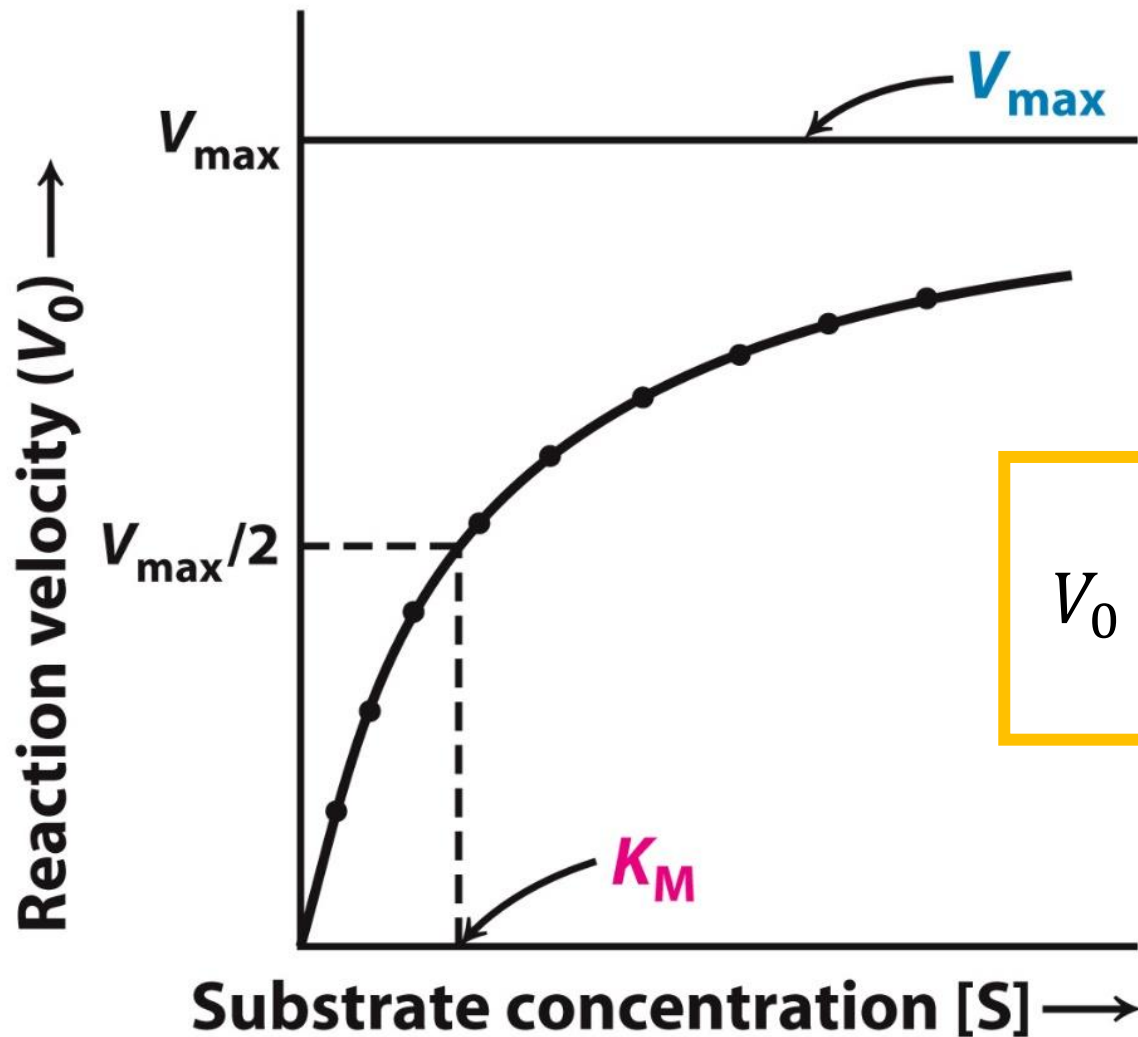


Oefening Lineweaver-Burk plot (2)



Km berekenen		Vmax berekenen		
snijpunt x-as is $-1/K_m$		snijpunt y-as = $1/V_{max}$		
$0 = 74,389x + 12,124$		als $x = 0$		
$74,389x = -12,124$		$y = 12,124$		
$x = -0,16$		$V_{max} = 0,082 \text{ units/ sec}$		
$K_m = -(-/0,16) = 6,25 \text{ mM}$				

Michaelis Menten kinetiek



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

K_M

- Geeft een indicatie hoeveel substraat nodig is voor een reactie
- normale $[S] \ll K_M \rightarrow$ erg gevoelig voor veranderingen in $[S]$
 \rightarrow weinig activiteit
- normale $[S] = K_M \rightarrow$ gevoelig voor veranderingen in $[S]$
 \rightarrow significante activiteit
- normale $[S] \gg K_M \rightarrow$ niet gevoelig voor veranderingen in $[S]$
 \rightarrow veel activiteit
- In biologische systemen zijn K_M waarden van enzymen vaak de normaal voorkomende concentraties van substraten

Table 7.1 K_M values of some enzymes

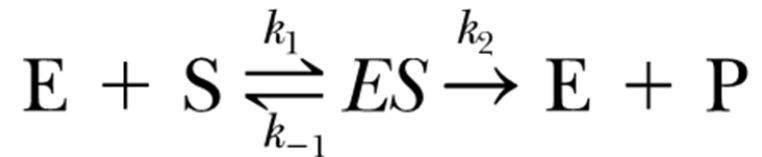
Enzyme	Substrate	K_M (μM)
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa-N-acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Carbonic anhydrase	CO_2	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50

Stel: substraat concentratie is heel hoog

→ Alle enzymen substraat gebonden (enzym is verzadigd).

→ $V_0 = V_{\max}$

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



Vorige slides:

- V_{\max} is afhankelijk van de enzymconcentratie
- $V_{\max} = k_2[E]_T$

k_2 wordt ook wel k_{cat} genoemd (**turnover number**)

Turnover number (k_{cat})

Het "turnover number" (conversiegetal) geeft aan hoeveel substraatmoleculen een enzym kan omzetten in productmoleculen per eenheid van tijd

Het turnover number (k_{cat}) is gelijk aan k_2 , dus:

$$V_{max} = k_{cat}[E]_T$$

en dus:

$$k_{cat} = V_{max}/[E]_T$$

Table 7.2 Turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

Table 7.2
Biochemistry: A Short Course, Third Edition
© 2015 Macmillan Education

Stel: substraat concentratie veel lager dan K_M

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

Als $S \ll K_M$ dan: $V_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_M}$

Vorige slide: $V_{max} = k_{cat}[E]_T$

Dus je kunt ook zeggen: $V_0 = k_{cat}[E]_T \frac{[S]}{K_M}$

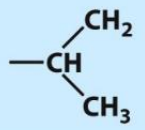
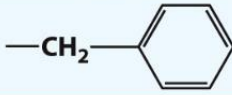
Dit kun je omschrijven naar: $V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E]_T [S]$

Specificiteitsconstante

Specificiteitsconstante (k_{cat}/K_M)

- De specificiteitsconstante combineert de eigenschappen van de enzym-substraat interactie (K_M) met de snelheid van omzetting (k_{cat})
- Voorbeeld: chymotrypsine heeft duidelijke voorkeur voor grote restgroepen

Table 7.3 Substrate preferences of chymotrypsin

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Glycine		$1.3 \cdot 10^1$
Valine		2.0
Norvaline	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	$3.6 \cdot 10^2$
Norleucine	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	$3.0 \cdot 10^3$
Phenylalanine		$1.0 \cdot 10^5$

Source: Data from A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W.H. Freeman and Company, 1999), Table 6.3.

Table 7.3
Biochemistry: A Short Course, Third Edition
© 2015 Macmillan Education