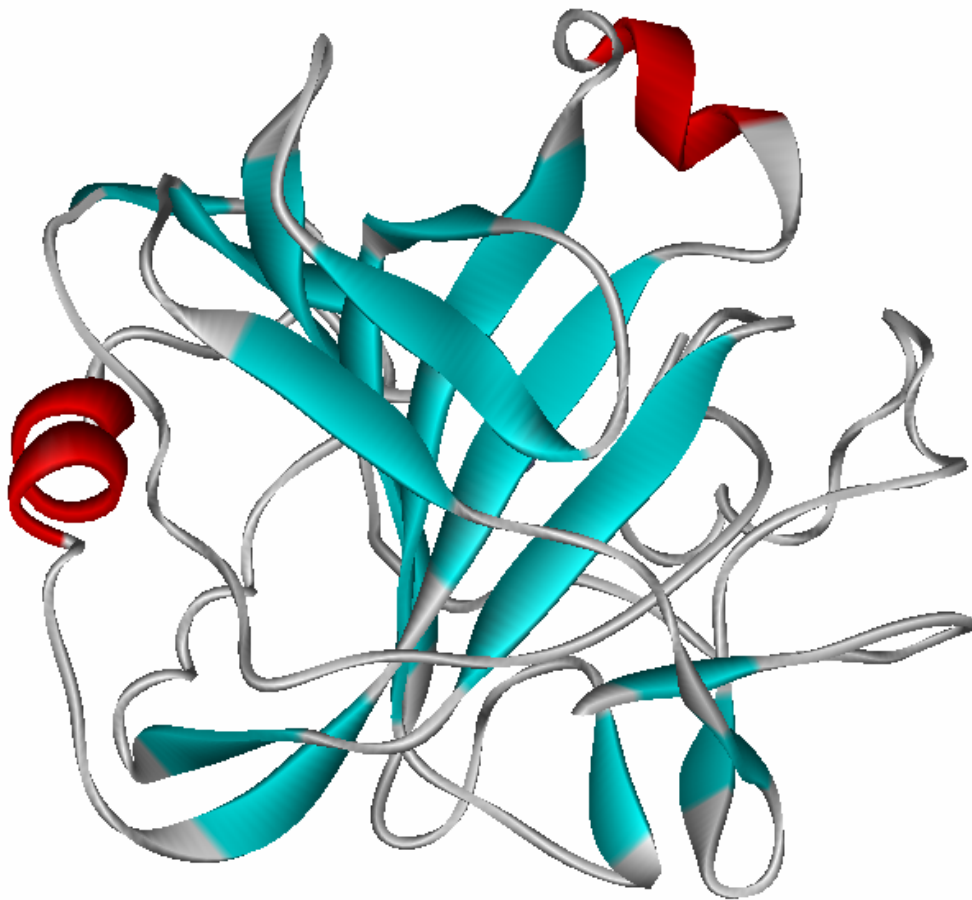


Enzymkinetik



Forsøgsundervisning i bioteknologi ved gymnasiale uddannelser

Enzymkinetik

Nordsjællands biotek fond 2004

Forfattere

Hans Chr. Jensen, Lektor, Frederikssund Gymnasium

Ulla Christensen, Kemisk Institut, Københavns Universitet

Jakob Schiødt, Adjunkt, Helsingør Gymnasium

Korrektur

Ib Geert Petersen, Lektor, Frederikssund Gymnasium

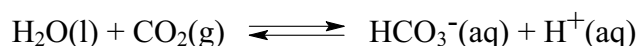
Undervisningsmaterialet er udarbejdet til forsøgsundervisning i bioteknologi på højt niveau i gymnasiet og finansieret af Nordsjællands Biotek Fond. Dele af undervisningsmaterialet kan dog også anvendes i fagene biologi og kemi på højt niveau.

Bioteknologi er et 2-årigt højniveaufag, der fra skoleåret 2003/2004 udbydes på 9 gymnasier fordelt med 6 i Fyns Amt, 2 i Frederiksborg Amt og 1 i Vejle Amt. Udviklingen af undervisningen i bioteknologi, der i dag som videnskabsfag er placeret mellem biologi, biokemi, kemi og medicin, skal ses både som et forsøg på faglig nytænkning af samspillet mellem undervisningsfagene biologi og kemi med henblik på en kommende gymnasireform og som et forsøg på at skabe et nyt naturvidenskabeligt fag- og arbejdsområde, som kan tiltrække yderligere elever til området.

Forsøgsundervisningen i bioteknologi ved gymnasiale uddannelser støttes af Undervisningsministeriet, Frederiksborg og Fyns Amter. Mere om forsøgsundervisningen i bioteknologi kan ses på web-adressen:

www.emu.dk/gym/tvaers/biotek

Forsidebilledet viser enzymet *human carboanhydrase II*, som er katalysator for reaktionen



Carboanhydrase er et af de hurtigste enzymer man kender. Et molekyle kan omsætte 1000.000 CO₂ molekyler pr. sek. Billede på grundlag af filen 1a42.pdb i Protein Data Bank.

Indhold

Enzymkinetik	3
Enzymer er katalysatorer.....	3
Flere trin i enzymreaktion	5
Reaktionshastighed.....	5
Initialhastighed	6
Stationær tilstand (steady state).....	7
Michaelis-Menten modellen.....	8
Bestemmelse af K_M og V_{max}	9
Enzymhæmning.....	10
Kompetitiv hæmning forøger K_M , men påvirker ikke V_{max}	10
Non-kompetitiv hæmning nedsætter V_{max} men påvirker ikke K_M	11
Trypsin og pH.....	12
Virkeligheden er ofte mere kompliceret.....	14
Irreversibel hæmning.....	15
Substratkoncentration som funktion af tiden	17
Første ordens reaktion når $[S] \ll K_M$	17
Eksempel: Hydrolyse af aspirin	18
Nulte ordens reaktion når $[S] \gg K_M$	19
Eksempel: Alkohol sætter leveren på arbejde	19
Appendix 1. Udledning af Michaelis-Menten formel	20
Modellen.....	20
Udledning af MM ligning	20
Appendix 2. IT-værktøjer til Michaelis-Menten model.....	21



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

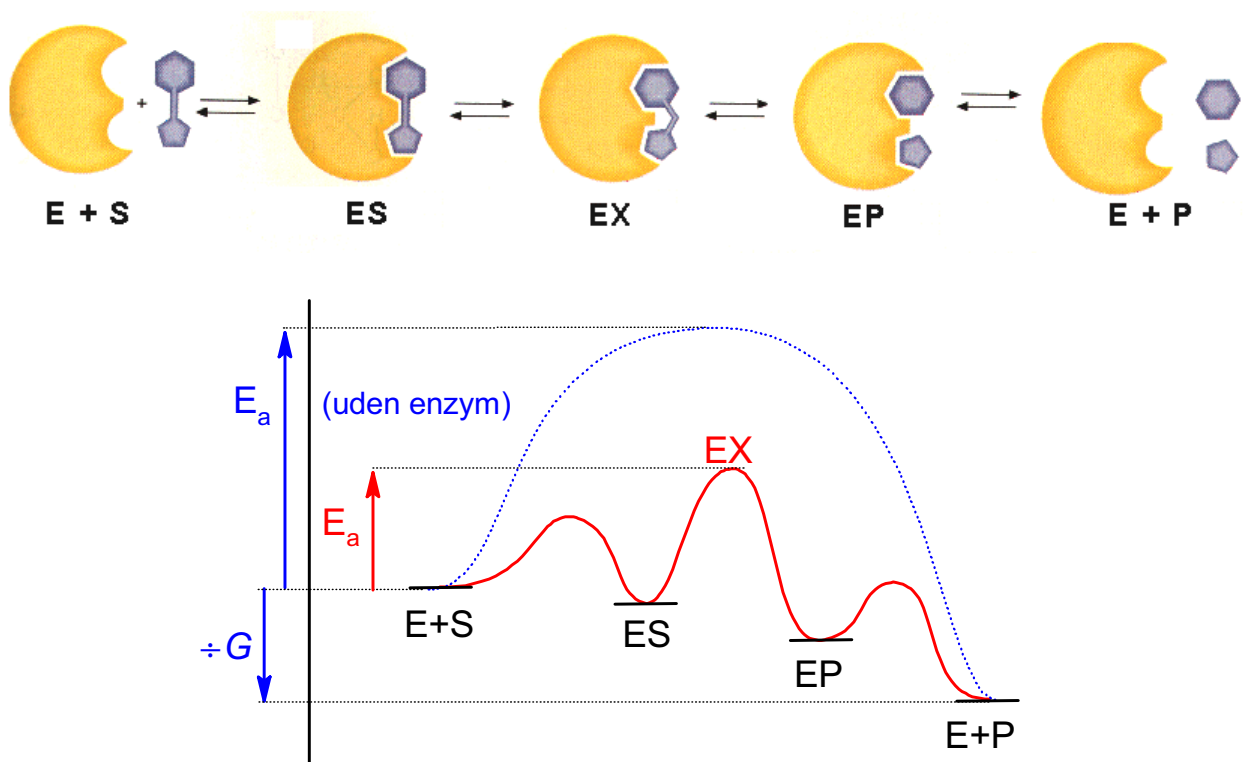


Enzymkinetik

Enzymer er katalysatorer

Enzymer er meget specifikke katalysatorer, dvs. hvert enzym virker ofte kun katalytisk på en enkelt biokemisk reaktion. Derfor finder man i en typisk celle flere tusinde forskellige enzymer. Hemmeligheden bag denne specificitet ligger i den måde, det aktive center er opbygget på. Det aktive center er en slags lomme eller grotte, der er formet ved, at enzymets proteindiel er foldet på en karakteristisk måde. Den tredimensionale struktur og de aminosyrer, der befinder sig i grottens dyb, sikrer, at kun et bestemt substrat passer ind i bindingsstedet. I nogle enzymer indgår der også en eller flere cofaktorer.

Der findes to funktionelle enheder i enzymet, en *bindingsdel* og en *katalyseringsdel*. En simpel model for en enzymreaktion, hvor et substrat omdannes til et produkt, opdeles i tre trin. I det første trin sørger bindingsdelen for, at substratet bindes til enzymet, så der dannes et enzym-substrat kompleks, der betegnes ES. I det andet trin katalyseres den kemiske reaktion i det aktive center, så der via et mellemtrin (aktiveret kompleks EX¹) dannes et enzym-produkt kompleks EP. Derefter splittes komplekset EP op i enzym E og produkt P. Enzymet er ikke blevet omdannet på nogen måde, og kan reagere igen med et substratmolekyle.



Figur 1. Aktiveringsenergien E_a for dannelse af aktiveret kompleks er mindre med enzym til stede end uden enzym. Den kemiske reaktion vil derfor kunne forløbe hurtigere med enzym til stede. Enzymet forøger reaktionshastigheden ved at nedsætte aktiveringsenergien, men det ændrer ikke på reaktionens energifrigivelse. Tilvæksten i Gibbs energi, ΔG , er den samme med eller uden enzym til stede.

¹ Vi kan tænke på aktiveret kompleks som en tilstand hvor "gamle" kemiske bindinger er ved at blive brudt og "nye" kemiske bindinger er ved at blive dannet.

For en god ordens skyld skal det nævnes, at enzymer naturligvis katalyserer både den reaktion, der forløber mod højre og den, der forløber mod venstre. Hvilken af reaktionerne, der er dominerende, afgøres af G for reaktionen. Enzymkatalyserede reaktioner kan altså ligesom alle andre ligevægtssystemer forskydes mod højre eller venstre ved at ændre på ligevægtsbetingelserne (koncentration af substrat og produkt, tryk og temperatur).

Enzymer er klassificeret efter de reaktioner de katalyserer. De inddeles i 6 hovedklasser og 3 underklasser og tildeles på denne måde et EC nummer (Enzyme Classification).

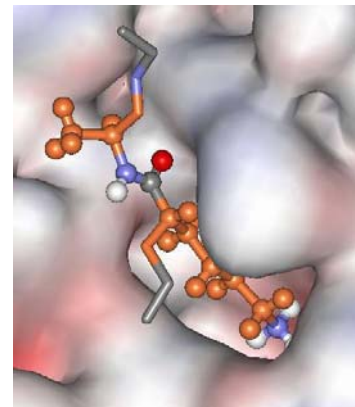
EC nummeret for fordøjelsesenzymet *trypsin* fremkommer på denne måde:

EC.3.-.-.-.- Hydrolaser.

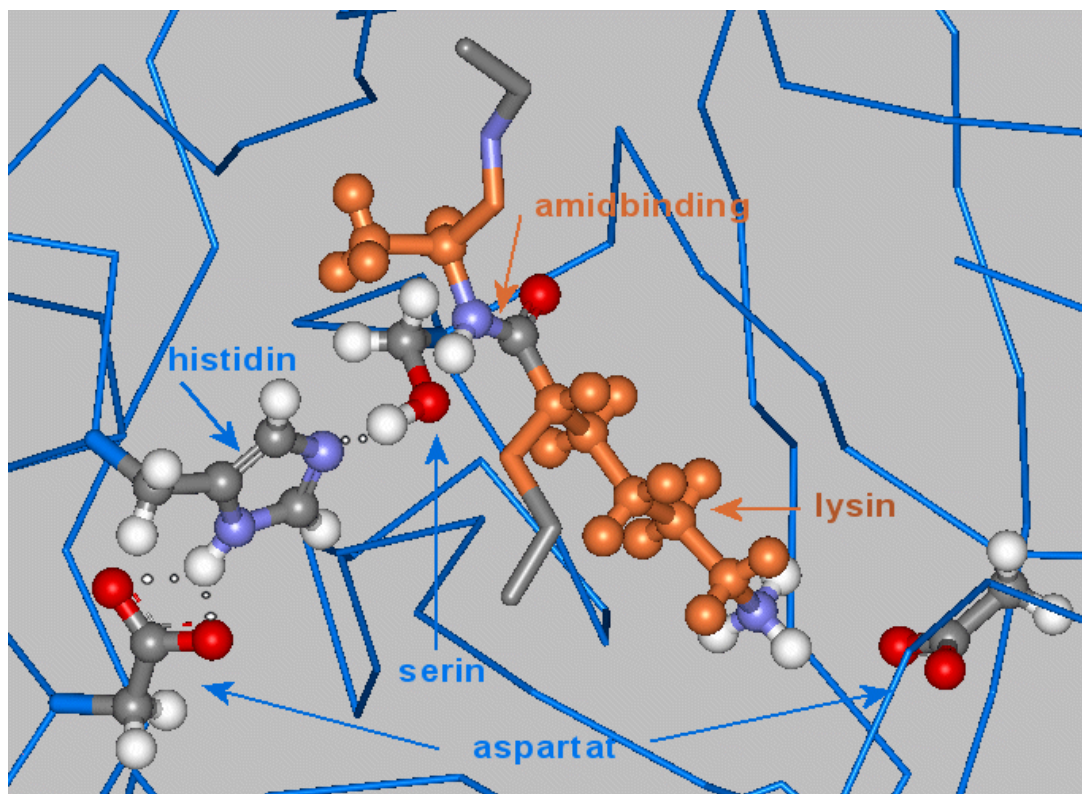
EC.3.4.-.-.- Virker på amidbinding (peptidhydrolaser).

EC.3.4.21.- Serin endopeptidaser.

EC.3.4.21.4 *Trypsin*.



Figur 2 à
Substrat i *trypsins* bindingslomme.

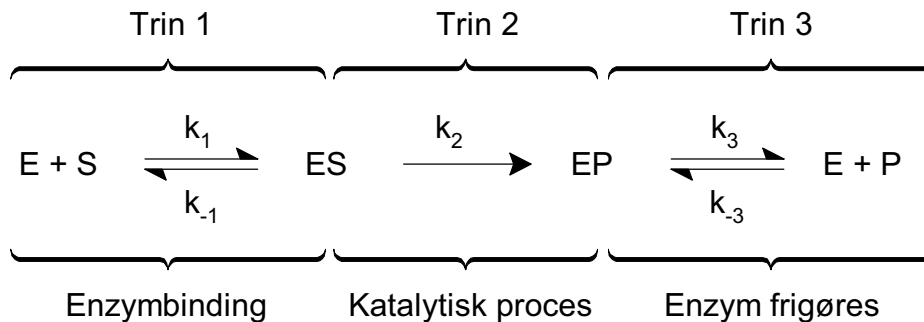


Figur 3. Substrat (vist med rødbrun farve) i det aktive center i enzymet *trypsin*. En amidbinding i substratet er markeret. En del af *trypsin*-kædens rygrad er vist med blå streg. Til venstre ses de tre aminosyrer, der er vigtigst for selve katalysen. Det er serin, histidin og aspartat. Vekselvirkning mellem aminosyrerne (vist som hvide prikker) aktiverer serin ved at trække i serins hydrogenatom. Det gør serin mere aktiv, så den bedre kan angribe amidbindingen i substratet.

Bemærk den lange lysin sidekæde i substratet. En anden aspartatgruppe i enzymet (ses i højre side) vekselvirker med lysin (ionbinding), og bringer derved amidbindingen i nærheden af serin. Denne mekanisme gør, at *trypsin* er tilbøjelig til at hydrolysere amidbindinger ved lysin eller arginin. Se endvidere figur 13a og 13b, under enzymhæmning.

Flere trin i enzymreaktion

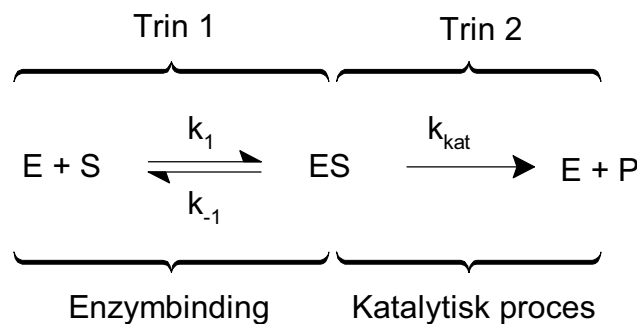
En simpel enzymreaktion kan beskrives som en tretrins proces:



Figur 4. Enzymatisk reaktion som tretrins reaktion

Trin 1 er reversibelt, da enzymet kan afgive substratet inden det er blevet omdannet til produktet. I trin 2 sker en katalytisk omdannelse af ES til EP. Dette trin er i praksis irreversibelt, i det mindste i starten af en enzymreaktion, hvor der ikke er dannet ret meget P.

Det tredje trin er spaltningen af EP komplekset til E + P. Hvis dette trin er hurtigt, bliver EP spaltet så snart det er dannet, det gælder fx for enzymet *lysozym*. Vi vil begrænse os til sådanne tilfælde og kan så forenkke reaktionsforløbet til en totrins model, hvor hastighedskonstanten for det hastighedsbestemmende trin kaldes k_{kat} :



Figur 5. Enzymatisk reaktion som totrins reaktion

Reaktionshastighed

Reaktionshastigheden v er defineret som tilvæksten i den aktuelle koncentration af produkt [P] pr tidsenhed:

$$v \mid \frac{\div[\text{P}]}{\div t} \qquad \text{ofte anvendt enhed} \quad \frac{\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}}{\text{min}} \mid \frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$$

I praksis angiver man ofte hvor mange mikromol P der dannes pr. liter opløsning pr minut, reaktionshastigheden får da enheden $\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$.

Trin 2 er flaskehalsen, som bestemmer, hvor hurtigt produktet P bliver dannet. Dannelsen af P i trin 2 må stige og falde i takt med koncentrationen af enzym-substrat kompleks ES. Reaktionshastigheden er med andre ord proportional med [ES] og givet ved udtrykket

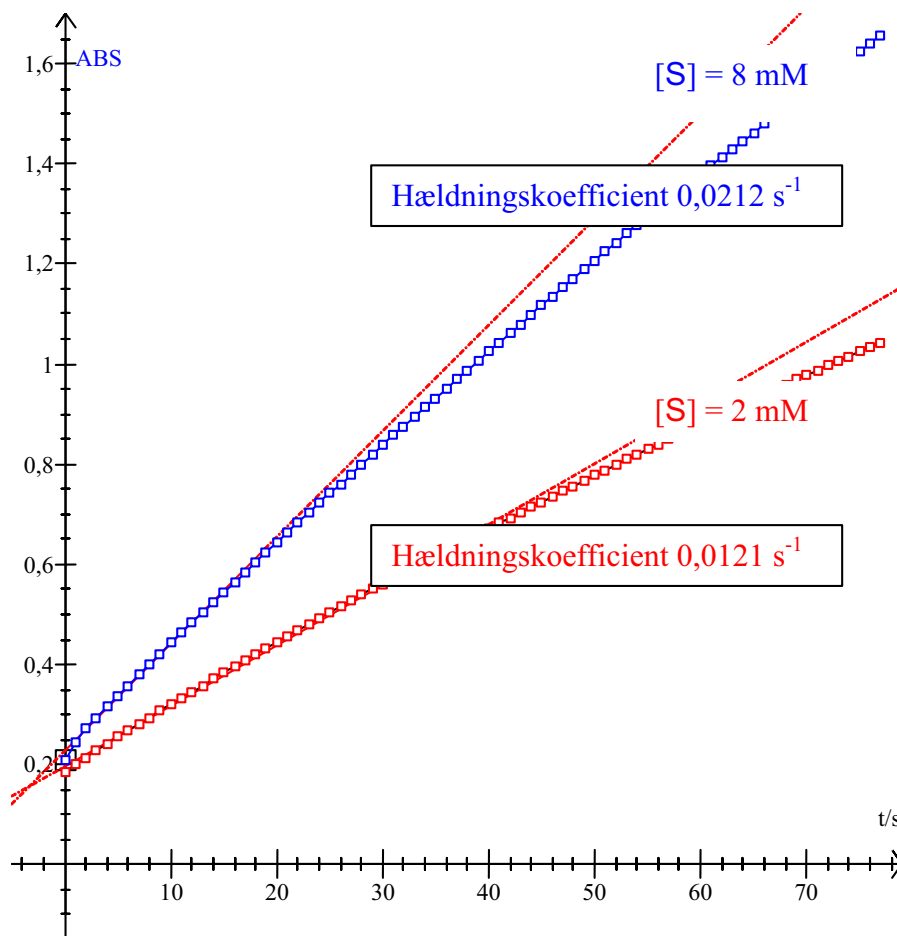
$$v = k_{\text{kat}} \cdot [\text{ES}]$$

Proportionalitetskonstanten k_{kat} har enhed min^{-1} (eller sek^{-1}). Talværdien af k_{kat} angiver det maksimale antal molekyler, et enzymmolekyle kan omdanne pr. tidsenhed, tallet kaldes enzymets "turnover number".

Hvis vi var i stand til at måle sammenhørende værdier af reaktionshastighed v og koncentration $[\text{ES}]$ for et specifikt enzym og substrat, kunne vi beregne hastighedskonstanten k_{kat} . Men $[\text{ES}]$ optræder normalt ikke i en koncentration, der kan måles direkte. Da enzymet under reaktionen er enten frit eller bundet til substrat, må der gælde at $[\text{E}] + [\text{ES}] = [\text{E}]_0$, hvor $[\text{E}]_0$ er startkoncentrationen. Startkoncentrationen af enzym, $[\text{E}]_0$, kan man bestemme.

Initialhastighed

Substratet ortho-nitrophenylgalactosid (ONPG) kan spaltes under indvirkning af enzymet η -galactosidase. Der dannes galactose og ortho-nitrophenol (ONP), se figur 9. Dannelsen af ONP kan følges ved at måle reaktionsblandingsens absorbans ved 420 nm, hvor ONP absorberer mere end andre stoffer i reaktionsblandingen. Figur 6 viser absorbans som funktion af tiden i to forsøg med forskellige substratkoncentrationer. Enzymkoncentrationen var den samme i begge forsøg. I begyndelsen er kurverne næsten rette linjer. Tangenternes hældningskoefficient blev bestemt vha. programmet DATALYSE.



Figur 6. Absorbans som funktion af tid.

Reaktionshastigheden beregnes vha. Lambert Beers lov

$$A = \kappa \cdot [\text{ONP}] \cdot l$$

Den molare absorptivitet for ONP ved 420 nm er $\kappa_{420} = 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ og $l = 1 \text{ cm}$ er lysvejen

Tilvækst i absorptivitet ΔA er proportional med tilvækst i koncentration $\Delta [\text{ONP}]$

$$\Delta A = \kappa \cdot \Delta [\text{ONP}] \cdot l$$

Tilvækst pr. tidsenhed finder vi ved at dividere med Δt

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \kappa \cdot \frac{\Delta [\text{ONP}]}{\Delta t} \quad \text{og} \quad \frac{\Delta A}{\Delta t} = \kappa \cdot v$$

$$\frac{\Delta [\text{ONP}]}{\Delta t} = v \quad \text{og} \quad \frac{\Delta A}{\Delta t} = \kappa \cdot v \quad \text{tangents hældningskoefficient, dvs.:}$$

$$\text{hældningskoefficient} = v = \frac{\text{hældningskoefficient}}{\kappa}$$

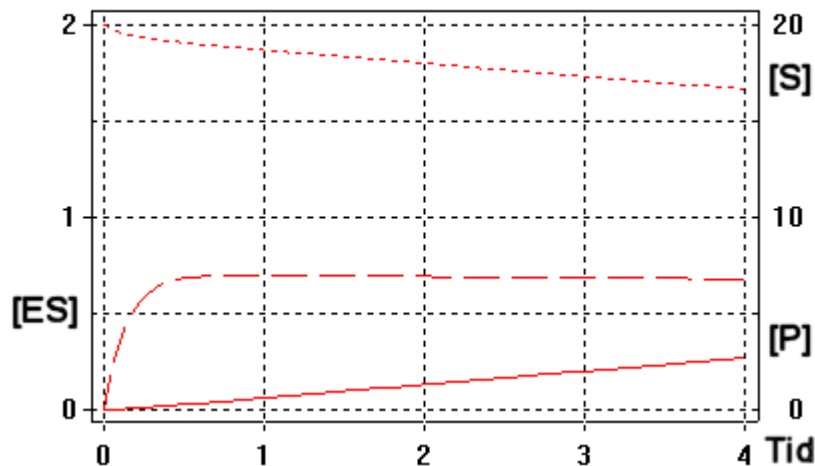
$$\text{Initialhastighed } v = \frac{0,0212 \text{ s}^{-1}}{4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} = 4,7 \cdot 10^{-6} \frac{\text{M}}{\text{s}} = 4,7 \frac{\mu\text{M}}{\text{s}} = 4,7 \cdot 60 \frac{\mu\text{M}}{\text{min}} = 282 \frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$$

Man taler om *initialhastighed*, fordi det er hastigheden i begyndelsen af reaktionen.

Stationær tilstand (steady state)

Når substrat og enzym er blandet sammen, stiger koncentrationen [ES] hurtigt. Der opstår hurtigt en tilstand, hvor dannelsen af ES (figur 5 trin 1 mod højre) foregår med samme hastighed som spaltningen af ES (figur 5 trin 1 mod venstre samt trin 2 mod højre).

I denne såkaldte *stationære tilstand* (engelsk: Steady state) vil [ES] være konstant.



Figur 7. Koncentrationer som funktion af tiden under en enzymreaktion. Michaelis-Menten modellen gælder kun, hvis $[\text{S}] > 10 \cdot [\text{ES}]$. Y-skalaen i grafens venstre side gælder for [ES], og y-skalaen i højre side gælder for [S] og [P]. [ES] vil som regel være konstant efter ca. 1ms.

Reaktionshastigheden bestemmes af [P]-grafens hældningskoefficient. Efterhånden som tiden går, vil [ES] og reaktionshastigheden langsomt aftage, i takt med at [S] aftager.

Michaelis-Menten modellen

Man kan opstille en matematisk model for reaktionshastigheden i begyndelsen af den stationære tilstand². Modellen kaldes Michaelis-Menten modellen. Den kan sammenfattes i følgende tre ligninger:

- (1) $v = k_{\text{kat}} \cdot [\text{ES}]$ Vi ser bort fra den mulighed, at $\text{E} + \text{P}$ kan omdannes tilbage til ES . Denne antagelse er rimelig i starten af reaktionen, hvor $[\text{P}]$ er lille. Man taler så om *initial-hastigheden* (eng.: initial = begyndelse).
- (2) $[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}]$
 $[\text{S}] \gg [\text{E}]_0$ Enzymet findes enten frit eller bundet til substrat. Det antages, at der er et stort overskud af substrat i forhold til enzym.
- (3) $\frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \approx K_M$ I den initiale stationære tilstand er der (næsten) konstante koncentrationer af E , S og ES . Den viste brøk, som man kalder *Michaelis-konstanten* K_M , har derfor en konstant værdi.

K_M fortæller noget om, hvor effektiv substratbindingen er³. En stor værdi af K_M svarer til en relativt stor koncentration af E i forhold til en relativt lille koncentration af ES - substratbindingen er med andre ord ikke effektiv. Omvendt svarer en lille værdi af K_M til relativt stor $[\text{ES}]$ - substratbindingen er effektiv. Bemærk, at K_M har enheden $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$.

Ved lidt formelgymnastik kommer man frem til Michaelis-Menten ligningen, der angiver initialhastigheden i den stationære tilstand som funktion af substratkoncentrationen $[\text{S}]$. Se appendix 1.



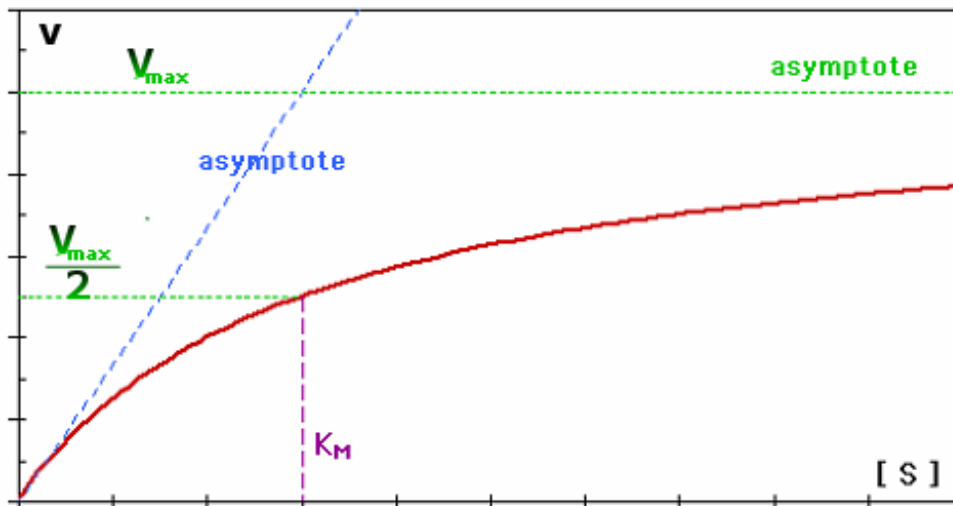
$$v \approx \frac{V_{\text{max}} [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$$



Leonor Michaelis og Maud Menten publicerede en model for enzymkinetik i 1913.

² Kaldes også "initial steady state hastighed".

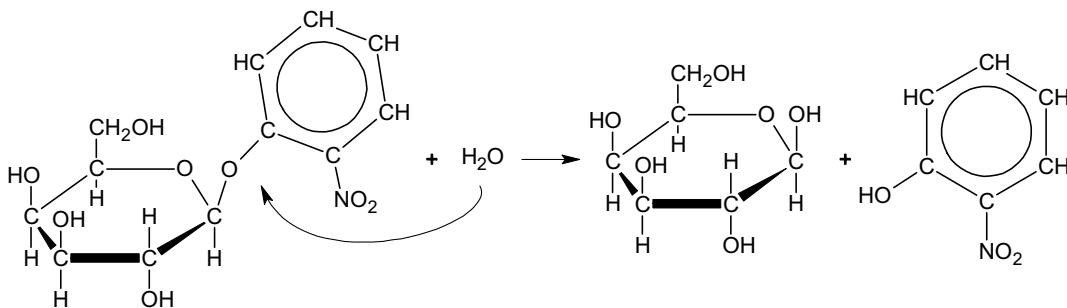
³ K_M kan udtrykkes ved hastighedskonstanterne idet $\frac{k_{-1} + k_{\text{kat}}}{k_1} \approx K_M$



Figur 8. Michaelis-Menten graf. Initialhastighed v som funktion af $[S]$. Kurven har to asymptoter. Når $[S] \ll K_M$, er hastigheden proportional med $[S]$ dvs. reaktionen foreløber som 1. ordens reaktion. Når $[S] \gg K_M$, nærmer hastigheden sig asymptotisk til en maksimalværdi V_{max} . Maksimalværdien svarer til den tænkte situation, at enzymet er fuldstændig mættet med substrat; hastigheden er da uafhængig af $[S]$ (en nulte ordens reaktion). Som det fremgår af figuren, opnår man ikke i praksis målinger ved maksimalhastighed. Når $[S] = K_M$ er hastigheden det halve af V_{max} .

Bestemmelse af K_M og V_{max}

Substratet ortho-nitrophenylgalactosid (ONPG) kan spaltes under indvirkning af enzymet η -galactosidase. Der dannes η -galactose og ortho-nitrophenol (ONP), som er gult.



Figur 9. ONPG spaltes ved hydrolyse.

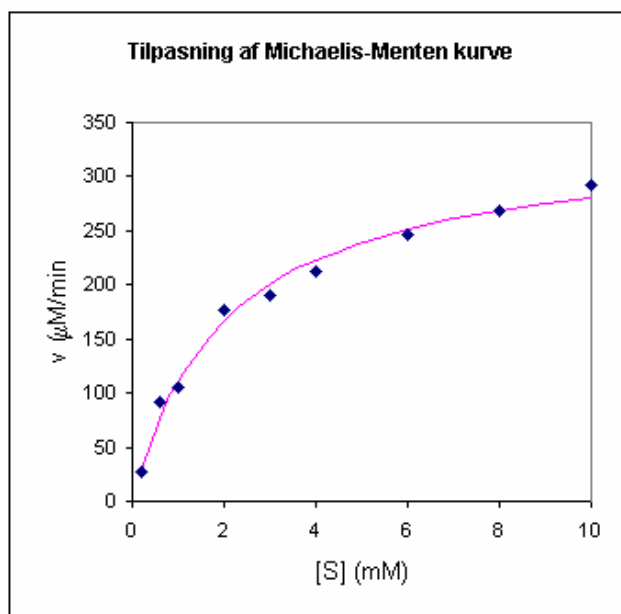
En gymnasieklasse gennemførte en række forsøg med forskellige koncentrationer af ONPG, og dannelsen af ONP blev fulgt ved at måle reaktionsblandingsens absorbans ved 420 nm (se også figur 6). Konstanterne K_M og V_{max} blev bestemt ved at tilpasse en Michaelis-Menten kurve til eksperimentelle data vha. et regneark (se figur 10 og appendix 2).

Konstanterne K_M og V_{max} bruges til at karakterisere enzymreaktioner. Ikke alle enzymreaktioner kan beskrives ved den simple Michaelis-Menten model.

Substratkonc. [S] (mM)	initial steady state hastighed v ($\mu\text{M}/\text{min}$)	V_{bereg}	afv. kvadrat $(v - V_{\text{bereg}})^2$
0,2	27	30	7
0,6	91	76	232
1	106	110	15
2	176	166	100
3	190	200	100
4	212	223	118
6	247	252	21
8	269	269	0
10	292	280	133

sum af afvigelseskvadrater:

K_M	2,1
V_{max}	339



Figur 10. Tilpasning af Michaelis-Menten kurve til eksperimentelle data vha. regnearket **mm-tilpasning.xls**.

Enzymhæmning

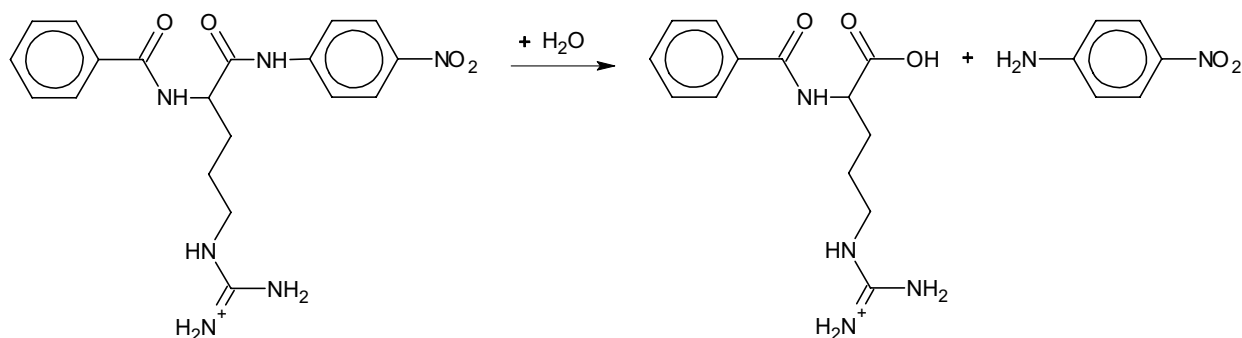
Der findes overordnet to forskellige typer af enzymhæmning - reversibel og irreversibel. Ved en reversibel hæmning bindes det hæmmende molekyle eller ion, ikke-covalent til enzymet. Den reversible hæmning kan opdeles i to typer - kompetitiv og non-kompetitiv. Det hæmmende stof kaldes en inhibitor (engelsk inhibit: at hæmme, blokere).

- ∅ Reversibel hæmning
 - kompetitiv
 - non-kompetitiv
- ∅ Irreversibel hæmning

Kompetitiv hæmning forøger K_M , men påvirker ikke V_{max}

Ved kompetitiv hæmning sætter inhibitor sig i enzymets bindingslomme og blokerer dermed for substratets binding. Reaktionshastigheden bliver mindre, men den kan øges ved at hæve substratkoncentrationen. Da substrat og hæmmende molekyle konkurrerer om samme bindingssted i enzymet, vokser sandsynligheden for, at et substratmolekyle binder sig i enzymets aktive center, når substratkoncentrationen vokser. En kompetitiv inhibitor gør K_M større, men ændrer ikke på V_{max} .

BANA (2-N-benzoyl L-arginin 4'-nitroanilid) er et modelsubstrat, som kan bruges til at undersøge enzymer, der katalyserer spaltning af amidbinding (peptidbinding). Reaktionsforløbet kan måles ved at følge absorbansen ved 410 nm, idet det dannede 4-nitroanilin ved denne bølglængde absorberer meget mere lys end substratet. Se figur 11a.



Figur 11a. **BANA** (2-N-benzoyl L-arginin 4'-nitroanilid) er et modelsubstrat, som kan bruges til at undersøge enzymer, der katalyserer spaltning af amidbinding (peptidbinding). Amidbindingen er markeret med en kraftigere streg. Reaktionsforløbet kan måles ved at følge absorbansen ved 410 nm, idet det dannede 4-nitroanilin ved denne bølgelængde absorberer meget mere lys end substratet.

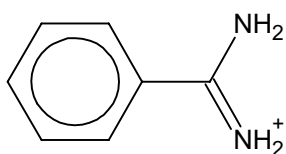
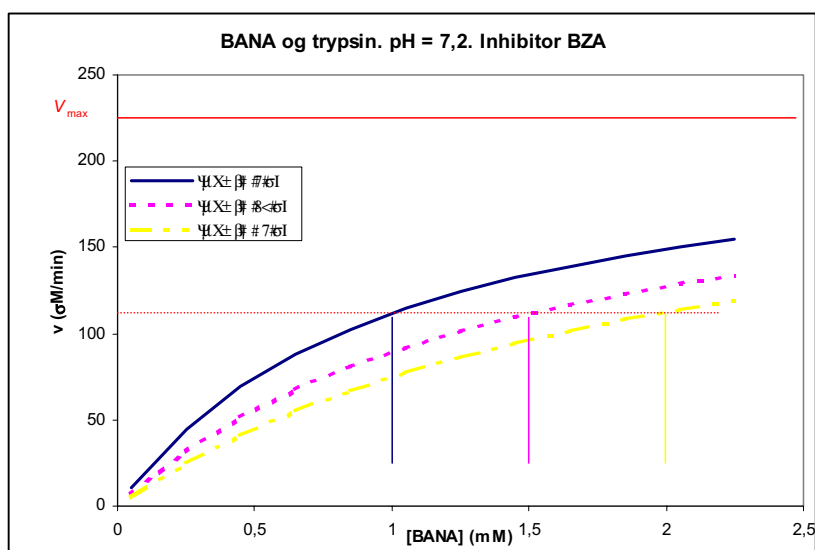


Fig. 11b. **BZA** (**Benzamidin**) kan bindes til trypsins bindingslomme, og herved forhindres et substrat i at binde. BZA virker altså som en kompetitiv inhibitor.

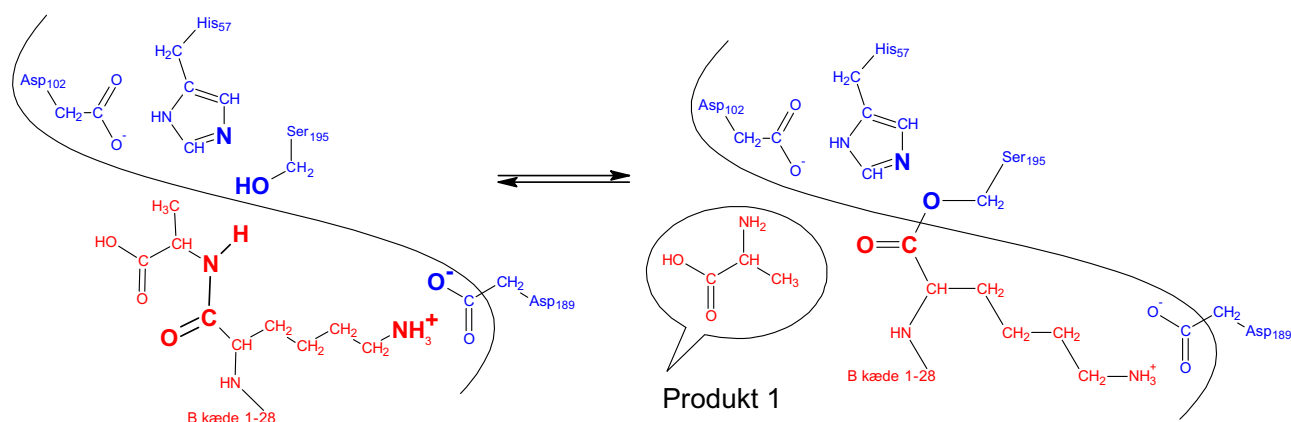


Figur 12. Hydrolyse af **BANA** katalyseret af *trypsin*. K_M stiger i takt med stigende koncentration af inhibitoren **BZA**.

Non-kompetitiv hæmning nedsætter V_{max} , men påvirker ikke K_M

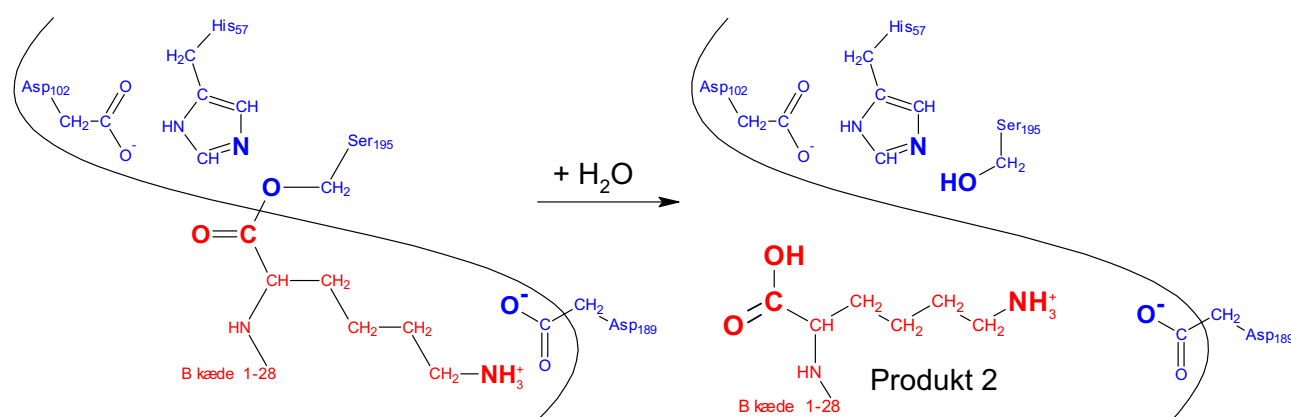
Ved non-kompetitiv hæmning sker der en ændring i enzymet, så den katalytiske proces bliver mindre effektiv. Eftersom inhibitoren og substratet ikke konkurrerer om pladsen i bindingslommen, så kan en højere substratkoncentration ikke udkonkurrere inhibitoren. K_M vil derfor være uændret ved ikke-kompetitiv hæmning. Den maximale reaktionshastighed, V_{max} , vil derimod blive mindre.

H^+ ioner kan virke som en non-kompetitiv hæmmer af enzymet trypsin. I det følgende vises først enzymet ved et pH, hvor trypsin ikke er hæmmet (figur 13a og b), derefter ved et pH, hvor enzymet er hæmmet af H^+ (figur 14a og b).



Figur 13a. Hydrolysen af en amidbinding (peptidbinding) katalyseret af enzymet *trypsin*. **Substratet, insulins B-kæde, er vist med rødt.** En del af trypsins bindingslomme og de tre aminosyrer, der er vigtigst for selve katalysen, er vist med blå.

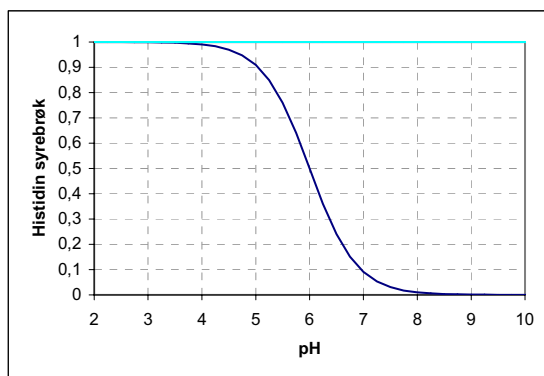
Substratet bindes til enzymet ved, at den primære aminogruppe fra lysin vekselvirker med syregruppen i enzymets asparaginsyre189 (ionbinding). Derved bliver amidbindingen bragt på plads i forhold til Serin195. Denne aminosyre er aktiveret ved vekselvirkning med Histidin57 og asparaginsyre102 og angriber amidbindingen. Alanin (det ene af to produkter) bliver fraspaltet og resten af det oprindelige substrat bliver midlertidigt bundet kovalent til enzymet med en esterbinding.



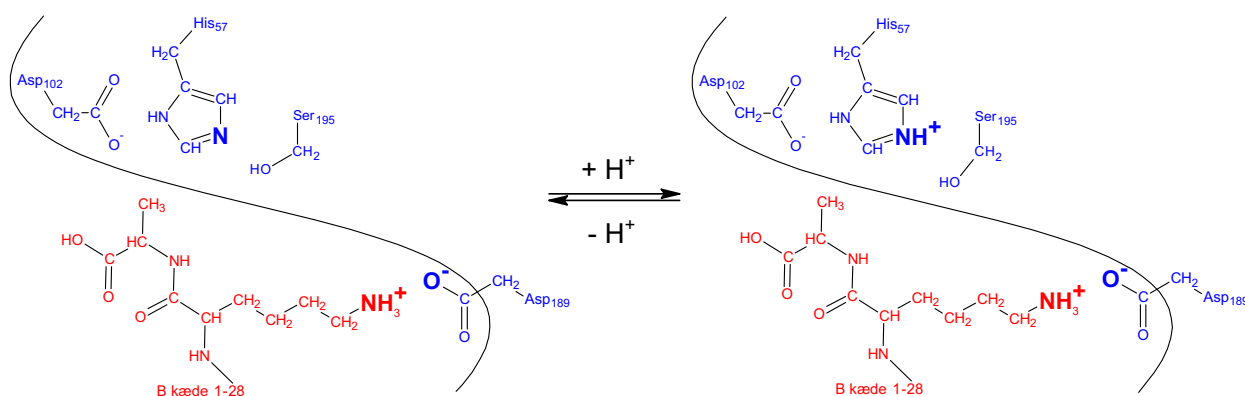
Figur 13b. Et vandmolekyle angriber den dannede esterbinding mellem serin195 og substratet. Herved hydrolyseres esterbindingen. Enzymet gendannes og frigiver det andet produkt, en insulin B-kæde, der nu er en aminosyre kortere.

Trypsin og pH

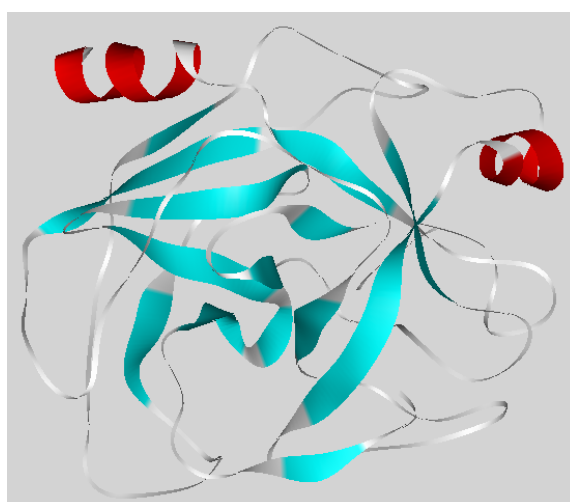
Trypsins aktivitet er afhængig af pH. Det hænger sammen med protonisering af histidin57. Protoniseringens afhængighed af pH kan illustreres i et Bjerrumdiagram. Når histidin er bundet i et protein, afviger syrestyrken pK_s fra syrestyrken af den frie aminosyre.



Figur 14a. Bjerrumdiagram for histidin i *trypsin*. Værdien af pK_s er vanskelig at bestemme præcist. Her er den sat til 6.

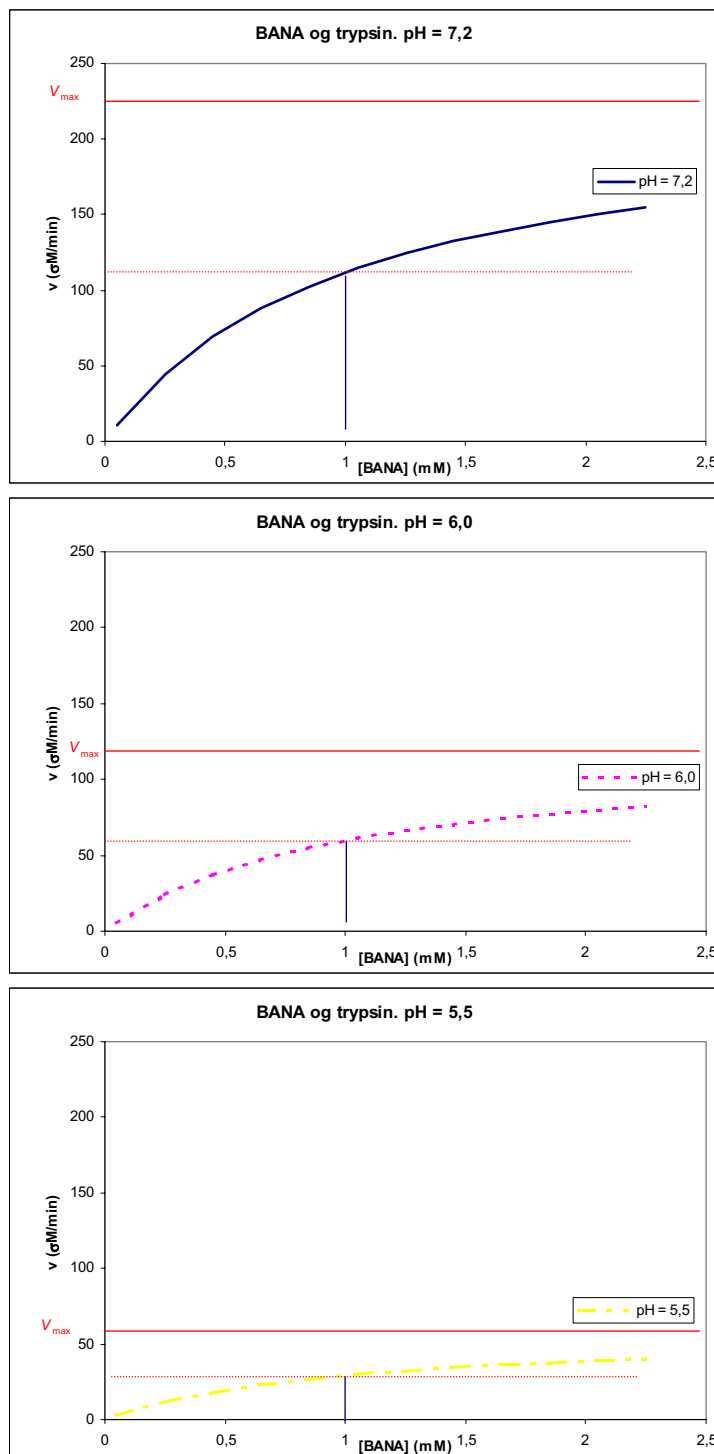


Figur 14b. Samme enzym og substrat som i figur 13. Ved lav pH er ligevægten forskudt mod højre og histidin57 bliver protoniseret så den ikke kan trække i serin195's hydrogenatom (se fig.3). Substratets ionbinding til aspartat189 er imidlertid uændret. Da substratet altså bindes ligeså godt som ved højere pH, er K_M uændret. Når histidin57 er fuldt protoniseret, kan enzymet ikke katalysere spaltningen af amidbindingen, hvilket svarer til en $k_{kat} \approx 0 \text{ min}^{-1}$. Når en del af histidin er protoniseret, er katalysen nedsat.



Figur 14c. Trypsins sekundære struktur.

I figur 15 ses 3 grafer med data for hydrolyse af BANA med *trypsin*. Den katalytiske aktivitet aftager efterhånden som histidin57 i det aktive center bliver mere og mere protoniseret.

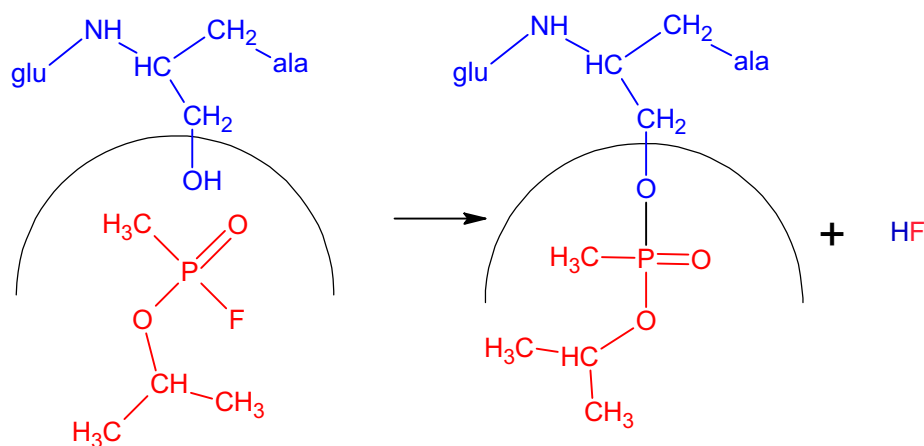


Figur 15. BANA og trypsin ved forskellige pH.

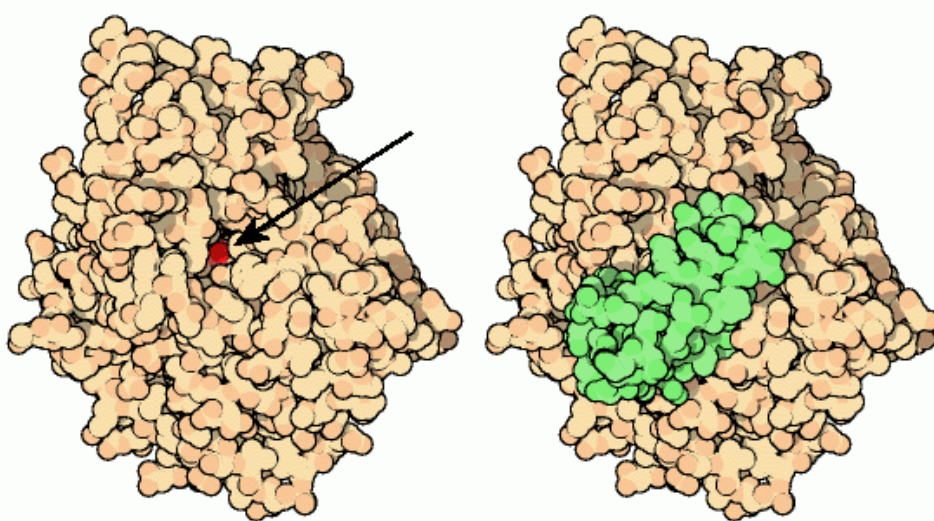
Virkeligheden er ofte mere kompliceret

Non-kompetitiv er ikke en særlig almindelig form for hæmning. Det er sjældent, at substratet bindes fuldstændigt uændret, når den katalytiske proces er mindre effektiv (fordi der er sket ændringer af konformation af aminosyrer i det aktive center). Det mest almindelige er, at der er tale om en blanding af kompetitiv og ikke-kompetitiv hæmning, hvor både K_M og V_{max} påvirkes i forskellig grad.

Når sarin bindes til det aktive center i enzymet dannes en meget stabil esterbinding. Det aktive center er blevet blokeret, og acetylcholin kan ikke bindes. Enzymet er blevet irreversibelt hæmmet.



Figur 17a. Irreversibel hæmning af *acetylcholinesterase* med **sarin**. Aminosyrer fra enzymet er vist med **blåt**. Sarin er vist med **rødt**.



Figur 17b. Nogle slangers toksiner angriber *acetylcholinesterase*. Billedet til venstre viser et lodret kig gennem tunnelen, der fører ned til det aktive center i *acetylcholinesterase*. Det aktive serin i det katalytiske center er vist med rødt. Billedet til højre viser, hvordan en dødelig toxin fra den østlige grønne mamba blokerer for adgang til det aktive center, og dermed forgifter enzymet.

Læs mere på: http://www.rcsb.org/pdb/molecules/pdb54_1.html (aktiv 1.09.2004).

Substratkoncentration som funktion af tiden

Michalis-Menten modellen beskriver, hvordan reaktionshastigheden for en enzymatisk reaktion afhænger af substratkoncentrationen. MM modellen er nyttig, fordi de to parametre V_{\max} og K_M kan bruges til at karakterisere, hvor effektive forskellige enzymer er.

Nu skal vi se på enzymreaktionen fra en anden vinkel, idet vi stiller spørgsmålet: Hvordan aftager substratkoncentrationen som funktion af tiden? Svaret på dette spørgsmål afhænger af hvor stor $[S]$ er i forhold til K_M . Der er tre situationer: $[S]$ er lille i forhold til K_M , $[S]$ er inden for samme størrelsesorden som K_M eller $[S]$ er stor i forhold til K_M . Den første og sidste situation er relativt simple at regne på, hvorimod det er mere komplekst når $[S]$ er inden for samme størrelsesorden som K_M . Vi vil kun redegøre for de to simple situationer under overskrifterne ”første ordens reaktion” og ”nulte ordens reaktion”.

Vi kan tage udgangspunkt i MM modellens udtryk for stationær tilstand og den situation, hvor $[S]$ er lille i forhold til K_M :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} \approx K_M \text{ og omskriver det til } \frac{[E][S]}{K_M} \approx [ES]$$

Dette indsættes i udtrykket for reaktionshastigheden

$$v = k_{cat} [ES] \approx k_{cat} \frac{[E][S]}{K_M} = \frac{k_{cat}}{K_M} [E][S] = \text{konst} [E][S] \quad ; \text{ altså er}$$

$$v \propto [E][S]$$

Reaktionshastigheden er proportional med koncentration af frit enzym og proportional med koncentration af frit substrat. Det er ikke overraskende, når vi tænker på, at enzymreaktionen indledes med, at S binder sig til E. Man bruger talemåden, at reaktionshastigheden er af *første orden* mht. $[E]$ og af *første orden* mht. $[S]$. Alt i alt er reaktionshastigheden så af *anden orden* (idet to aktuelle koncentrationer hver optræder i første potens i ligningen ovenfor).

Første ordens reaktion når $[S] \ll K_M$

I stationær tilstand er $[ES]$ (næsten) konstant, og så må $[E]$ jo også være (næsten) konstant⁴. Udtrykket for reaktionshastigheden kan derfor, i det tilfælde, hvor $[S]$ er lille i forhold til K_M , yderligere reduceres til

$$v \propto [S]$$

Under de givne omstændigheder falder reaktionshastigheden, i takt med at $[S]$ falder. Vi har at gøre med en første ordens reaktion. Hastighedskonstanten k har enheden s^{-1} eller min^{-1} .

Vi kan omskrive endnu en gang, idet vi bruger definitionen $v = \frac{d[S]}{dt}$

$$\frac{d[S]}{dt} = k [S] \quad ; \text{ en første ordens differentialligning siger man i matematikken}$$

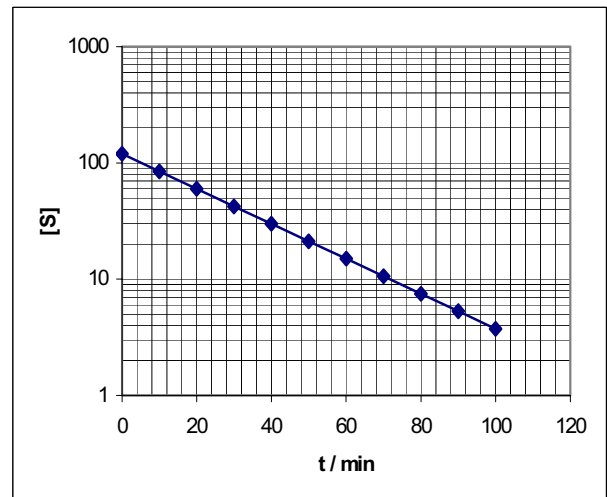
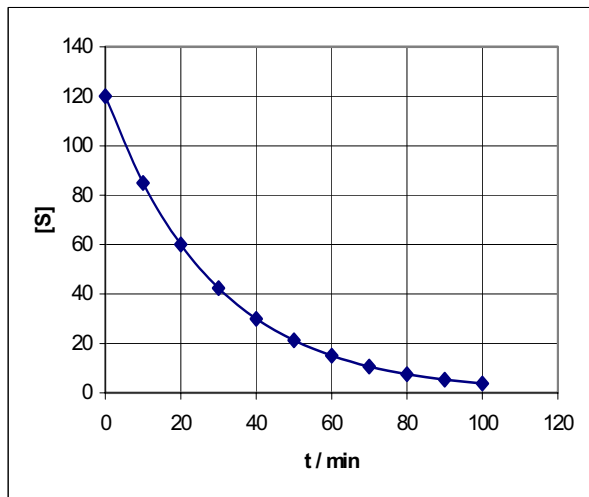
I matematik viser man, at ovenstående differentialligning har en løsning for $[S]$ som funktion af tid⁵:

⁴ På grund af stofbevarelse!

$$4 \frac{d[S]}{dt} = -k [S] \quad [S] = [S]_0 e^{-kt} \quad ; [S]_0 \text{ er startkoncentrationen, mindre end } K_M$$

Substratkoncentrationen aftager **eksponentielt** som funktion af tiden. Et kendetegn for eksponentiel udvikling er en **konstant halveringstid** $T_{1/2}$. Det er ikke overraskende, at en lille hastighedskonstant giver en stor halveringstid og omvendt. Matematisk er der følgende sammenhæng (sml. med radioaktivt henfald!)

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad k = \frac{\ln(2)}{T_{1/2}}$$



Figur 18a. $[S]$ aftager eksponentielt i første ordens reaktion. Hvad er halveringstiden? Hvad er hastighedskonstanten? Hvor meget er der tilbage efter 200 min?

Figur 18b. I enkeltlogaritmisk afbildning fås en ret linje. Halveringstiden aflæses til 20 min.

Eksempel: Hydrolyse af aspirin

Når lægemidlet Aspirin er optaget i blodet, bliver det (blandt andet) udsat for hydrolyse. Reaktionen kan betragtes som en første ordens reaktion mht. koncentration af Aspirin. Halveringstiden $T_{1/2} = 30$ min. Hvornår er 94% af aspirinen hydrolyseret?

Svar:

$$\text{Hastighedskonstanten } k = \frac{\ln(2)}{T_{1/2}} = \frac{\ln(2)}{30 \text{ min}} = 0,0231 \text{ min}^{-1}$$

Der er 6% tilbage, når 94% er hydrolyseret. Vi har da ligningen

$$0,06 [A]_0 = [A]_0 e^{-kt} \quad \ln(0,06) = -kt \quad t = \frac{\ln(0,06)}{-k}$$

$$t = \frac{4,281}{0,0231 \text{ min}^{-1}} = 185 \text{ min} \approx 3 \text{ timer}$$

94% af Aspirin er altså efter denne model hydrolyseret efter 3 timer.

⁵ Radioaktivt henfald beskrives i fysik ved samme matematiske model $4 \frac{dN}{dt} = -k [N] \quad [N] = [N]_0 e^{-kt}$

Nulte ordens reaktion når $[S] \gg K_M$

Vi husker fra Michaelis-Menten modellen, at reaktionshastigheden nærmer sig asymptotisk til en maksimal værdi ved høje substratkoncentrationer. Hvis $[S]$ er stor i forhold til K_M kan man tilnærmest regne med, at reaktionshastigheden er konstant.

$$v \mid \text{konst} \propto \frac{[S]}{t} \mid \text{konst} \quad ; \text{ for } [S] \gg K_M$$

Hvis $[S]$ er stor i forhold til K_M omsættes en konstant mængde substrat pr. min. Man siger at reaktionen da forløber som en *nulte ordens* reaktion (fordi der ikke optræder en koncentrationsafhængighed i hastighedsudtrykket). En analogi fra hverdagen er et brændende lys, det brænder ned med en konstant fart. Ved nulte ordens reaktion kan man også tale om en halveringstid, men den er ikke konstant, og bruges sjældent!

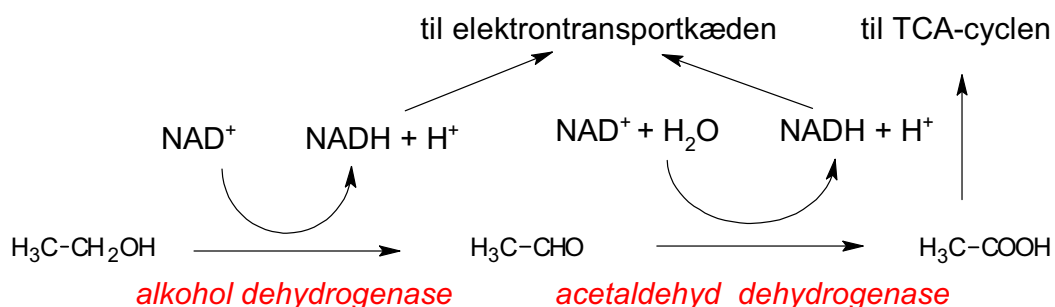
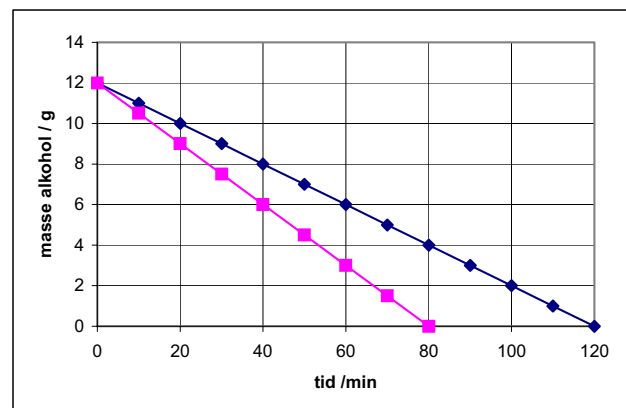
Eksempel: Alkohol sætter leveren på arbejde

Alkohol forbrændes først og fremmest i leveren, ved hjælp af enzymer. Medfødte forskelle, sygdom og medicin kan betyde, at alkoholen forbrændes hurtigere eller langsommere. Forbrændingen øges ikke væsentligt ved at drikke kaffe, danse, tage brusebad eller gå en tur i den friske luft. I praksis afhænger den hastighed, som alkohol forbrændes med, normalt kun af én ting: Personens levers vægt.

Som tommelfingerregel regner man med, at voksne raske personer forbrænder 1 – 1,5 gram alkohol pr. 10 kg legemsvægt i timen.

En person på 60 kg forbrænder altså 6-9 gram alkohol i timen, eller 1 genstand (12 gram ren alkohol) på mellem 1 time og 20 minutter og 2 timer.

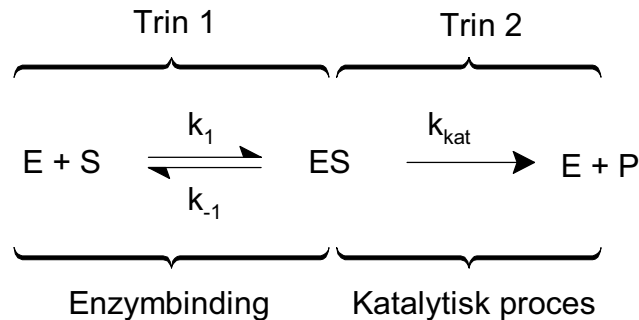
Figur 19 à
Omsætning af ethanol i person på 60 kg.



Figur 20. Ethanol nedbrydes via acetaldehyd (ethanal) til acetat. Acetat omdannes videre til acetyl coenzymA, som indgår i citronsyre cyklus (TCA-cyklus). Acetaldehyd er generende i små mængder (tømmermænd) og giftigt i større koncentrationer. Antabus virker som en hæmmer (blandet kompetitiv og non-kompetitiv) af enzymet acetaldehyd dehydrogenase.

Billedkilde: http://www.biosite.dk/staabi/ethanols_katabolisme.htm

Appendix 1. Udedning af Michaelis-Menten formel



Modellen

Vi ser bort fra den mulighed at $\text{E} + \text{P}$ kan omdannes tilbage til ES . Denne antagelse er rimelig i starten af reaktionen, hvor $[\text{P}]$ er lille. Man taler så om *initial-hastigheden* (eng.: initial = begyndelse).

$$v = k_{\text{kat}} \cdot [\text{ES}] \quad (1)$$

Enzymet findes enten frit eller bundet til substrat. Det antages at der er et stort overskud af substrat i forhold til enzym.

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}] \quad (2)$$

$$[\text{S}] \gg [\text{E}]_0$$

I den initiale stationære tilstand er der (næsten) konstante koncentrationer af E , S og ES . Den viste brøk, som man kalder *Michaelis-konstanten* K_M , har derfor en konstant værdi.

$$\frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = K_M \quad (3)$$

Udedning af MM ligning

Løs ligning 3 for $[\text{E}]$ og indsæt i ligning 2.

$$[\text{E}]_0 \left(1 - \frac{K_M [\text{ES}]}{[\text{S}]} \right) = [\text{ES}] \quad \left(\frac{K_M}{[\text{S}]} - 1 \right) [\text{ES}]$$

Omskriv ligning 2.

$$\frac{[\text{ES}]}{[\text{E}]_0} = \frac{1}{\frac{K_M}{[\text{S}]} + 1}$$

Multipliser venstre side med $\frac{k_{\text{kat}}}{k_{\text{kat}}}$ for at indføre hastigheder. $V_{\text{max}} = k_{\text{kat}} \cdot [\text{E}]_0$

$$\frac{k_{\text{kat}} [\text{ES}]}{k_{\text{kat}} [\text{E}]_0} = \frac{1}{\frac{K_M}{[\text{S}]} + 1}$$

Michaelis-Menten ligningen

$$\frac{v}{V_{\text{max}}} = \frac{1}{\frac{K_M}{[\text{S}]} + 1} \quad \text{eller} \quad v = V_{\text{max}} \frac{1}{1 + \frac{K_M}{[\text{S}]}}$$

Michaelis-Menten konstanten K_M

$$\text{For } [\text{S}] = K_M \text{ fås } v = \frac{1}{2} V_{\text{max}}$$

Appendix 2. IT-værktøjer til Michaelis-Menten model

Tilpasning af Michaelis-Menten kurve til målte enzymkinetiske data kan foretages vha. Excel regneark. Regnearket indeholder anvisninger i form af tekst og kommentater

Filnavn: mm_tilpasning.xls

Regnearket kan findes på adressen <http://www.emu.dk/gym/tvaers/biotek/uv/uv.html>

