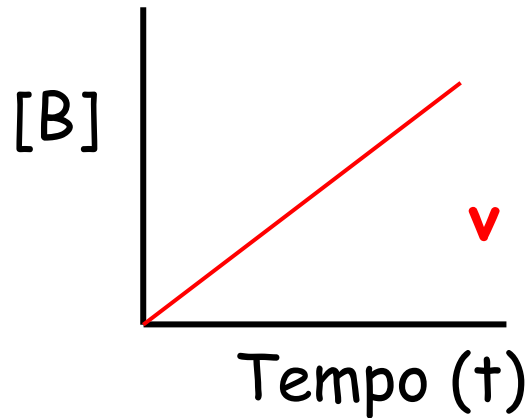
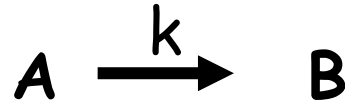


Cinetica Enzimatica

IN UNA REAZIONE CHIMICA

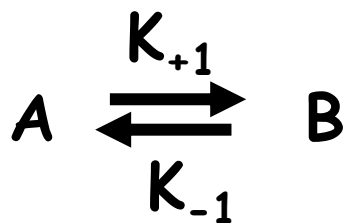


$$v = -d[A]/dt = d[B]/dt = k [A]$$

v è la **velocità di reazione**

k è la **costante cinetica** della reazione

A parità di [A], **maggiore** è il valore della **costante cinetica**, **maggiore** è la **velocità di reazione**



Velocità diretta $v_1 = -d[A]/dt = k_{+1}[A]$

Velocità inversa $v_{-1} = -d[B]/dt = k_{-1}[B]$

All'equilibrio $v_1 = v_{-1}$

$$k_{+1}[A] = k_{-1}[B]$$

$$K_{eq} = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}}$$

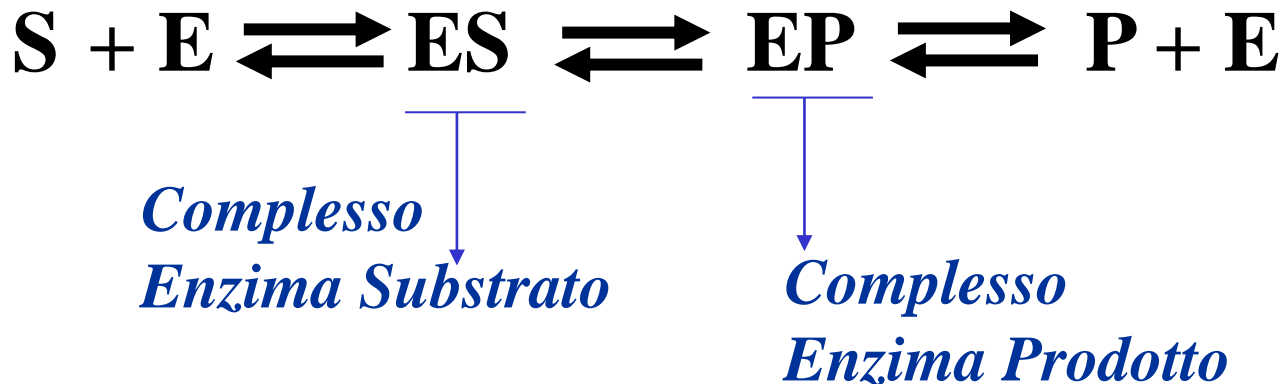
Catalisi Enzimatica

Un composto chimico (il **SUBSTRATO, S**, dell'enzima) reagisce non libero in soluzione ma legato all'enzima

Reazione non catalizzata



Reazione catalizzata dall'enzima (E)



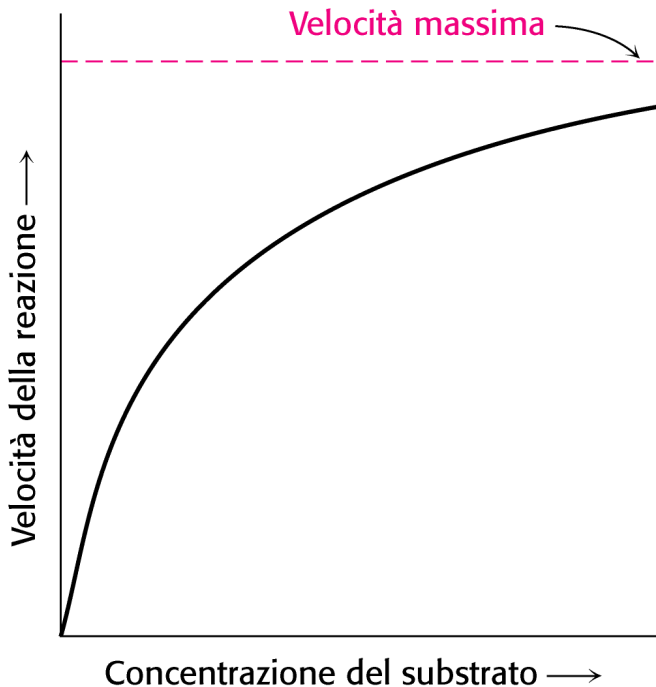
La formazione del complesso Enzima-Substrato è la prima tappa nella catalisi enzimatica

Le osservazioni sperimentali

Effetto di saturazione

È stato osservato che, a **concentrazioni costanti di enzima**, la **velocità** della reazione **aumenta** all'aumentare della **concentrazione del substrato**, fino a che non si raggiunge una **velocità massima** (V_{\max}).

Le reazioni non catalizzate non mostrano questo effetto di saturazione



Complesso Enzima- Substrato

Il fatto che le reazioni catalizzate da enzimi raggiungono una **velocità massima**, suggerisce la formazione di un complesso enzima-substrato.

Ipotesi

Lo Stato di Transizione

Il **substrato** si lega nel **sito attivo** dell'enzima

L'**interazione** tra enzima e substrato a livello del sito attivo **libera energia di legame** e **promuove** la **formazione** dello **stato di transizione**

Il numero delle **interazioni** tra il substrato e l'enzima è **massimo** solo quando il substrato si trova nello **stato di transizione**.

Le **interazioni** deboli diventano **ottimali** nello **stato di transizione**; *i siti attivi non sono complementari al substrato come tale, ma allo stato di transizione* che il substrato deve raggiungere per convertirsi nel prodotto.

Lo **stato di transizione** è **instabile**

Concentrazione del substrato e Velocità di reazione

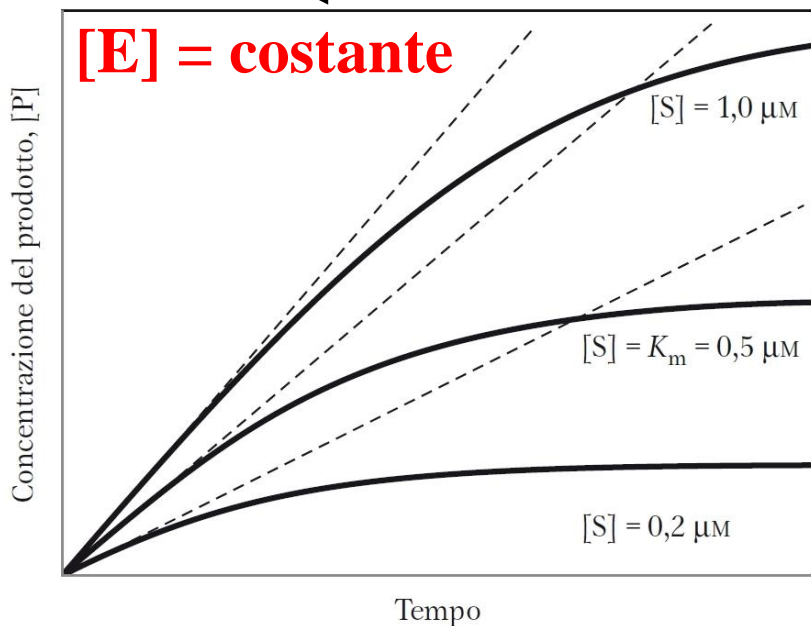
Velocità iniziale V_0

La velocità iniziale V_0 per ogni concentrazione di substrato viene determinata dalla **pendenza** della **curva all'inizio** della **reazione**, cioè quando la reazione in **direzione opposta** è trascurabile

Indichiamo con V_0 la **velocità iniziale** della reazione

Se la velocità V_0 è misurata in un **tempo breve** la $[S]$ si può considerare **costante**

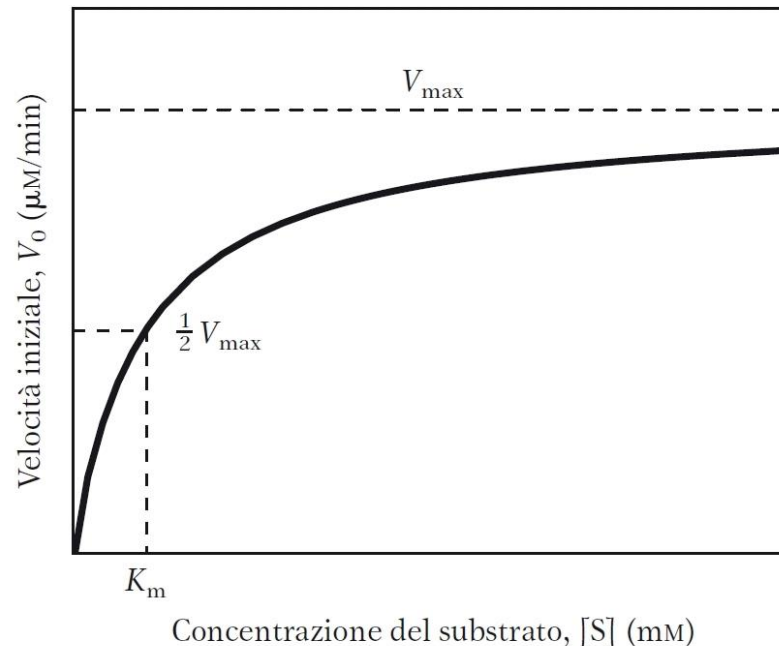
La **concentrazione del substrato** modifica la **velocità** delle reazioni catalizzate da enzimi



La **velocità iniziale (V_0)** per ogni concentrazione del substrato viene determinata dalla **pendenza** della **curva all'inizio della reazione**, e cioè quando la **velocità della reazione inversa è trascurabile**

Effetto della concentrazione del substrato sulla velocità iniziale V_0

- a **basse** concentrazione di **[S]**, V_0 aumenta in modo **lineare** con l'aumentare di **[S]**
- a concentrazioni di **[S]** più **elevate**, V_0 aumenta in misura sempre **minore** in funzione dell'aumentare di **[S]**
- a concentrazioni di **[S]** **molto elevate** l'aumento di V_0 è sempre minore e si avvicina alla massima velocità definita V_{\max}



la [E] è costante

Si osserva una Cinetica di saturazione



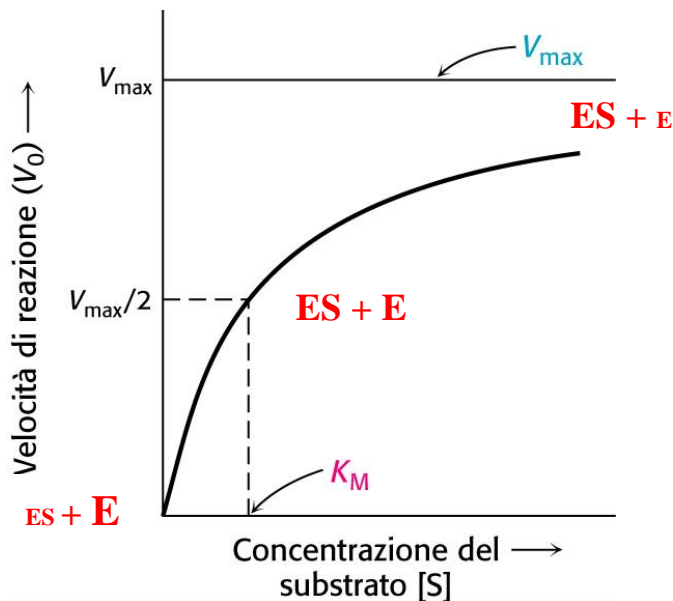
In qualsiasi istante, **E** è presente in **due forme**, **E** ed **ES**

[S] bassa: E >> ES

V_0 è proporzionale a [S] (man mano che [S] aumenta viene favorito ES)

[S] alta: tutto l'*enzima* è nella **forma ES** e **[E] è trascurabile**

in queste condizioni si osserva V_{\max} : l'**enzima** è **saturato** con il suo substrato e ulteriori aggiunte di S non variano V_0



Quando ES si dissocia per formare P, E torna libero e pronto ad iniziare un nuovo ciclo catalitico

Si osserva una **Cinetica di saturazione**

effetto saturante del substrato, proprietà caratteristica dei catalizzatori enzimatici

Teoria di Michaelis-Menten

Il modello di Michaelis-Menten

Ipotesi centrale

Formazione del complesso Enzima:Substrato



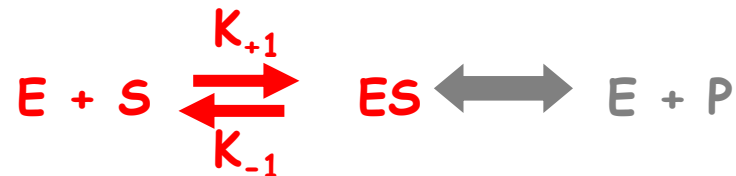
Le altre ipotesi:

a) Nella reazione si raggiunge lo **STATO STAZIONARIO**

[ES] è costante nel tempo

a1) la velocità di formazione di ES è eguale alla velocità del suo consumo

b) La reazione di **formazione del complesso ES è veloce e reversibile**



c) La reazione di **formazione del prodotto è praticamente irreversibile** ed è la più **lenta** del processo

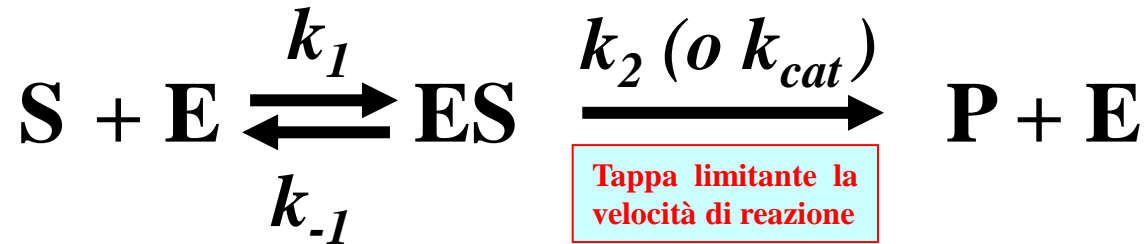


quindi la **velocità** della reazione **complessiva** è **proporzionale** alla **concentrazione di ES**

$$v_0 = k_{cat} * [ES]$$

Cinetica enzimatica

L'equazione di Michaelis e Menten



La reazione inversa $\text{P} \rightarrow \text{S}$ è trascurabile

velocità INIZIALE della reazione o V_0

$$v_0 = k_2 * [\text{ES}]$$

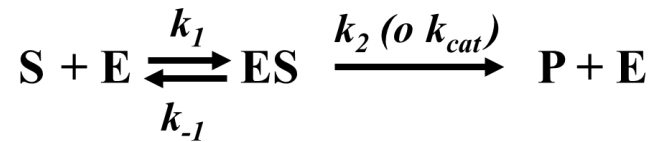
La **velocità** della reazione è **proporzionale** alla **concentrazione** di **ES**

Come si può esprimere la velocità V_0 in funzione di parametri noti?

Vogliamo ottenere una **espressione** che *metta in relazione* la **velocità della reazione** con la **concentrazione** del **substrato**, **dell'enzima** e con la **velocità** delle singole **tappe** (costanti cinetiche k_1 k_{-1} k_2)

Ipotesi dello Stato Stazionario

[ES] è costante



La velocità di formazione di [ES] è uguale alla velocità della sua demolizione

$$\text{velocità di formazione di ES} = k_1[E_L][S] = k_1([E_t] - [ES])[S]$$

$$\text{velocità di demolizione di ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Allo Stato Stazionario

velocità di formazione di ES = velocità di demolizione di ES

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Risolviamo l'equazione per [ES] troviamo
l'**espressione** della **[ES]** *in funzione di parametri noti*

$$[ES] = [E_t] * [S] / ([S] + K_M)$$

Dove **K_M** è un rapporto tra le costanti cinetiche:

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

Risoluzione dell'equazione

velocità di formazione di ES = $k_1[E_L][S] = k_1([E_t]-[ES])[S]$

velocità di demolizione di ES = $k_{-1}[ES]+k_2[ES] = (k_{-1}+k_2)[ES]$

$$k_1([E_t]-[ES])[S] = (k_{-1}+k_2)[ES]$$

$$\frac{([E_t]-[ES])[S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1}$$

$$K_M = (k_{-1}+k_2) / k_1$$

$$\frac{([E_t]-[ES])[S]}{[ES]} = K_M \quad \longrightarrow \quad \frac{([E_t]-[ES])[S]}{K_M} = [ES]$$

Risolviamo l'equazione per [ES]

$$\frac{[E_t][S] - [ES][S]}{K_M} = [ES] \quad \longrightarrow \quad \frac{[E_t][S]}{K_M} - \frac{[ES][S]}{K_M} = [ES]$$

$$\frac{[E_t][S]}{K_M} = [ES] + \frac{[ES][S]}{K_M} \quad \longrightarrow \quad \frac{[E_t][S]}{K_M} = [ES] \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$$

$$\frac{\frac{[E_t][S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} = [ES] \quad \longrightarrow \quad \frac{\frac{[E_t][S]}{K_M}}{K_M + [S]} = [ES]$$

$$\frac{[E_t][S]}{K_M} * \frac{\cancel{K_M}}{K_M + [S]} = [ES]$$

si semplifica per K_M

$$\frac{[E_t][S]}{K_M + [S]} = [ES]$$

$$[E_t] * [S] / ([S] + K_M) = [ES]$$

Questa è l'espressione di [ES].

Sostituiamo nella equazione $V_0 = k_2 * [ES]$

Equazione di Michaelis e Menten

Questa è l'espressione di [ES]

$$[ES] = [E_t] * [S] / ([S] + K_M)$$

sostituiamo questa espressione di [ES] nella equazione

$$V_0 = k_2 * [ES]$$

$$V_0 = k_2 * [E_t] * [S] / ([S] + K_M)$$

eq 1

**Equazione di
Michaelis e Menten**

$$V_0 = \frac{k_2 [E_t] [S]}{K_M + [S]}$$

La velocità massima (V_{\max}) si raggiunge quando tutti i siti catalitici sono saturati con il substrato. Allora $[ES] = [E_t]$ quindi:

$$V_{\max} = k_2 * [E_t]$$

eq 2

Sostituendo l'equazione 2 nella equazione 1 si ottiene:

**Equazione di
Michaelis e Menten**

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

IL MODELLO DI MICHAELIS E MENTEN (il significato di V_{max})

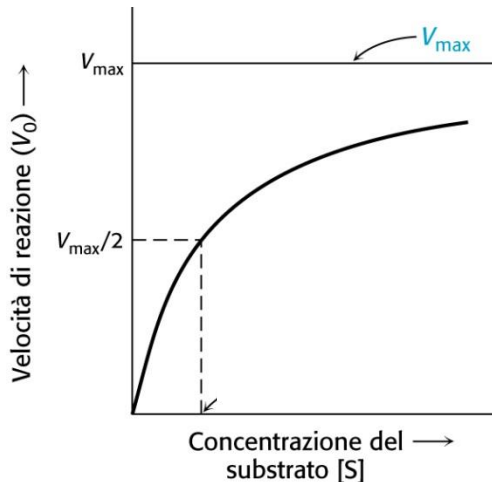
è possibile dare un significato fisico ai parametri dell'equazione di Michaelis e Menten.

Infatti nell'equazione:

$$v = \frac{k_{cat} E_{tot} [S]}{K_M + [S]}$$

Quando la concentrazione di substrato diventa molto alta (tende all'infinito) ...

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} v = \lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{k_{cat} E_{tot} [S]}{K_M + [S]} \approx \frac{k_{cat} E_{tot} [S]}{[S]} = k_{cat} E_{tot}$$

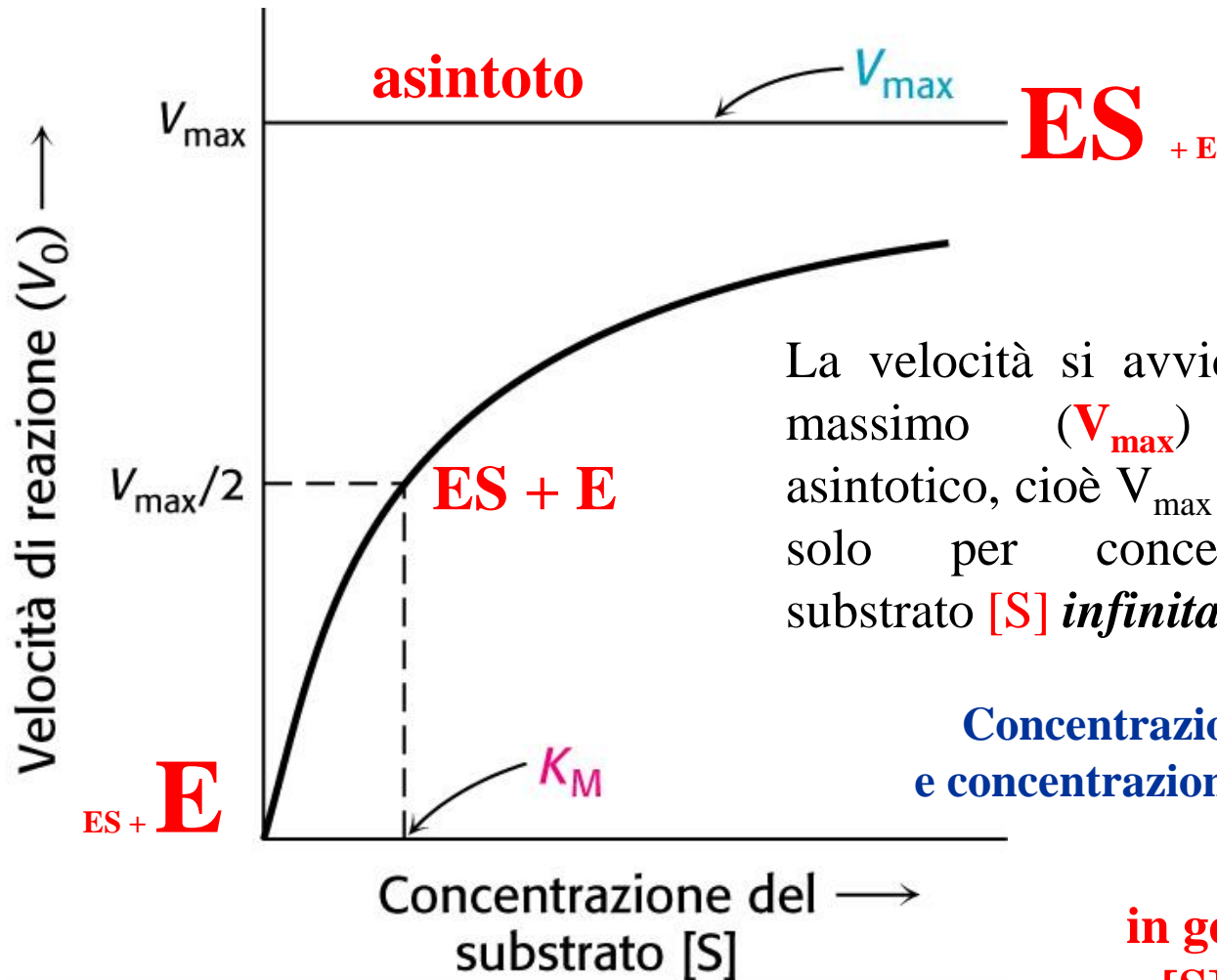


Poiché $\lim_{[S] \rightarrow \infty} v$ è l'asintoto a cui tende la curva, che è la massima velocità della reazione, allora:

$$V_{max} = k_{cat} E_{tot}$$

Grafico della velocità iniziale V_0 in funzione della concentrazione di $[S]$

Iperbole



La velocità si avvicina al valore massimo (V_{\max}) in modo asintotico, cioè V_{\max} sarà raggiunta solo per concentrazioni di substrato $[S]$ *infinitamente alte*.

Concentrazione fissa di E
e concentrazioni crescenti di S

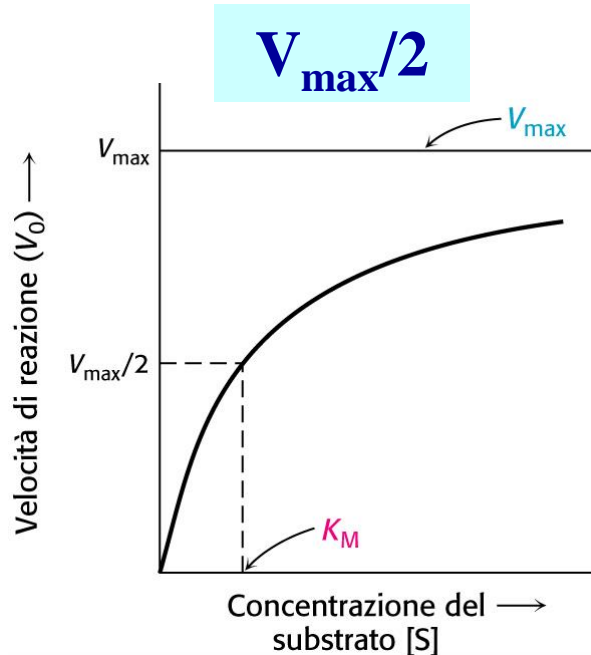
in generale:
 $[S] \gg [E]$

Significato K_M

È una misura dell'**affinità**
Enzima/Substrato

K_M corrisponde alla concentrazione
di substrato $[S]$ a cui si ha $V_{\max}/2$

K_M è espressa in molarità



se $[S] = K_M$ allora

$$v_0 = \frac{k_2 * [E] * K_M}{2K_M}$$

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{2} * \frac{K_M}{K_M}$$

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{2}$$

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

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

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

$$[E]_T = [E] + [ES]$$

$$V_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]}$$

l'equazione di **M-M** descrive il **comportamento cinetico** di tutti gli enzimi che presentano una relazione di **tipo iperbolico** tra velocità iniziale e concentrazione del substrato

Riflessioni su K_M

La regola $K_M = [S]$ quando $V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$ è **valida** per tutti gli enzimi che seguono la **cinetica di M-M**

I valori V_{max} e K_M sono **funzioni tipiche** di ogni **enzima** e possono servire per valutare e confrontare l'efficienza catalitica di enzimi diversi

K_M può **variare** per **substrati diversi** dello stesso enzima

K_M viene in genere usata come indicazione dell'**affinità** di un **enzima** per il suo **substrato**

L'equazione di Michaelis-Menten verifica i dati cinetici?

$$v_0 = \frac{k_2 * [E]_T * [S]}{K_M + [S]}$$

$$v_0 = \frac{V_{\max} * [S]}{K_M + [S]}$$

A concentrazioni **basse** di **S**

$$[S] \ll K_M$$

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{K_M} * [S]$$

V_0 è direttamente proporzionale **[S]**

A concentrazioni **alte** di **S**

$$[S] \gg K_M$$

$$v_0 = k_2 * [E]_T$$

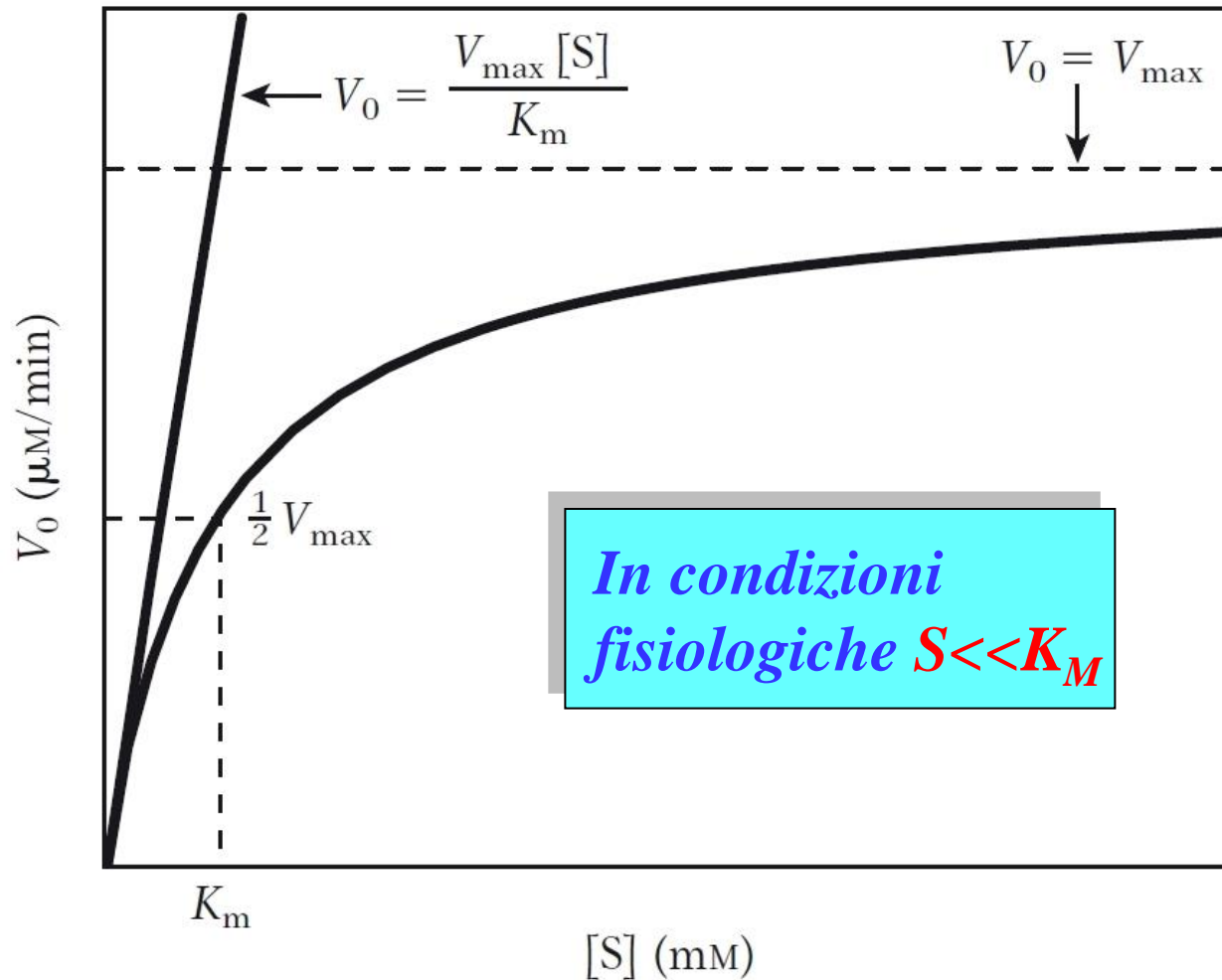
$$v_0 = V_{\max}$$

V_0 è indipendente dalla **[S]**

Dipendenza della velocità iniziale dalla concentrazione del substrato

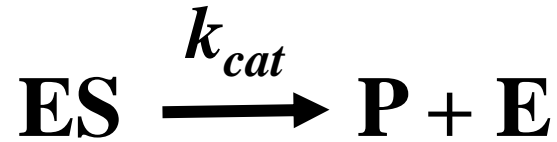
Basse [S]
[S] \ll K_M

Alte [S]
[S] \gg K_M



Enzima	Substrato	K_m (mM)
Anidraasi Carbonica	CO₂	12
Esochinasi	Glucosio fruttosio	0.15 1.5
β-Galattosidasi	Lattosio	4
Treonina deamminasi	Treonina	5
Piruvato carbossilasi	HCO³⁻ Piruvato ATP	1.0 0.4 0.06
Penicillinasi	Benzilpenicillina	0.05
Lisozima	Esa-N- acetilglucosammina	0.006

Numero di turnover



k_{cat} espressa in **sec⁻¹** rappresenta il numero di molecole di prodotto che l'enzima forma in 1 sec

Enzima	k_{cat} (sec ⁻¹)	
Catalasi	40,000,000	$2H_2O_2 \Rightarrow 2H_2O + O_2$
Anidrasi carbonica	1,000,000	$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$
Acetil colinesterasi	14,000	degrada l'acetilcolina
Penicillinasi	2,000	degrada la penicillina
Lattato deidrogenasi	1,000	degrada l'acido lattico
Chimotripsina	100	idrolizza le proteine
DNA Polimerasi I	15	aggiunge nucleotidi al DNA
Lisozima	0.5	taglia l'involucro dei batteri

I parametri k_{cat} e K_M consentono anche di valutare *l'efficienza catalitica* degli enzimi

In condizioni
fisiologiche $S \ll K_M$

Quando $[S] \ll K_M$

$$v_0 = \frac{k_{cat} * [E]_T * [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat}}{K_M} * [E]_T * [S] = K_S * [E]_T * [S]$$

$$(k_{cat} / K_M) = K_S = \text{costante di specificità} \quad (E + S \Rightarrow E + P)$$

(M⁻¹s⁻¹)

Vi è un **limite superiore** al valore della K_S imposto dalla **velocità di diffusione** dei due reagenti nelle soluzioni acquose

Il **limite** controllato dalla **diffusione** varia tra **10⁸ e 10⁹ M⁻¹s⁻¹**

Molti enzimi hanno valori di k_{cat}/K_M in questo intervallo

Questi enzimi hanno raggiunto la *perfezione catalitica*

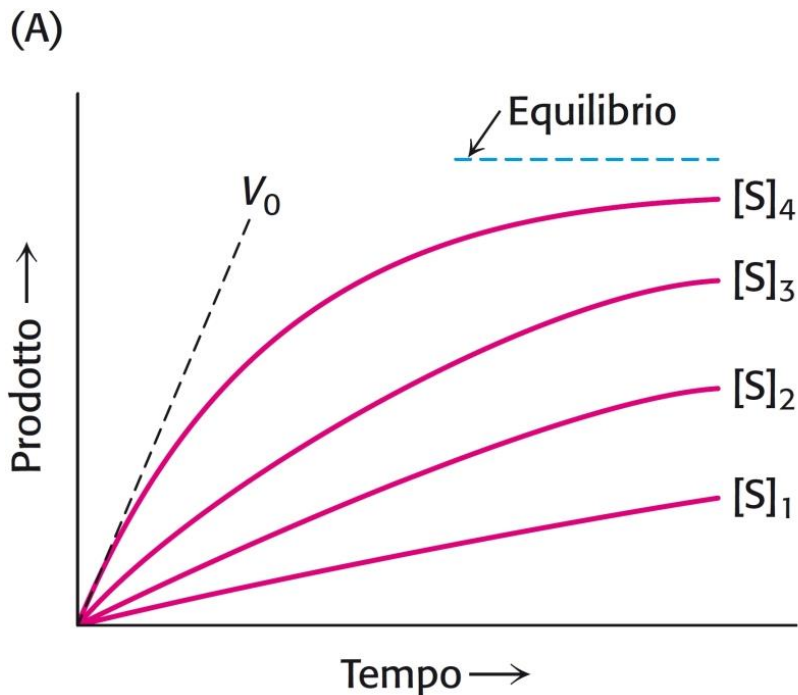
Gli enzimi che mostrano una K_s pari a 10^8 10^9 $s^{-1} M^{-1}$ hanno raggiunto la **perfezione cinetica**, e la **velocità di reazione** è **limitata** solo dalla **velocità** con cui l'enzima ed il substrato si **incontrano**

Enzima	Substrato	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($sec^{-1}M^{-1}$)
Acetilcolinesterasi	Acetilcolina	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Anidrasi carbonica	CO ₂ HCO ₃ ⁻	1×10^6 4×10^5	0.012 0.026	8.3×10^7 1.5×10^7
Catalasi	H ₂ O ₂	4×10^7	1.1	4×10^7
Crotonasi	Crotonil-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarasi	Fumarato Malato	800 900	5×10^{-6} 2.5×10^{-5}	1.6×10^8 3.6×10^7
Triosofosfato isomerasi	Gliceraldeide-3-fosfato	4.3×10^3	1.8×10^{-5}	2.4×10^8
β -lattamasi	Benzilpenicillina	2×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

Determinazione sperimentale dei parametri cinetici

Come si allestisce un esperimento?

[E]=costante. Si stabilisce la concentrazione di [E] che consente di apprezzare la variazione della velocità in funzione della concentrazione del substrato. Tale concentrazione resta costante in tutti i saggi effettuati per determinare la curva iperbolica

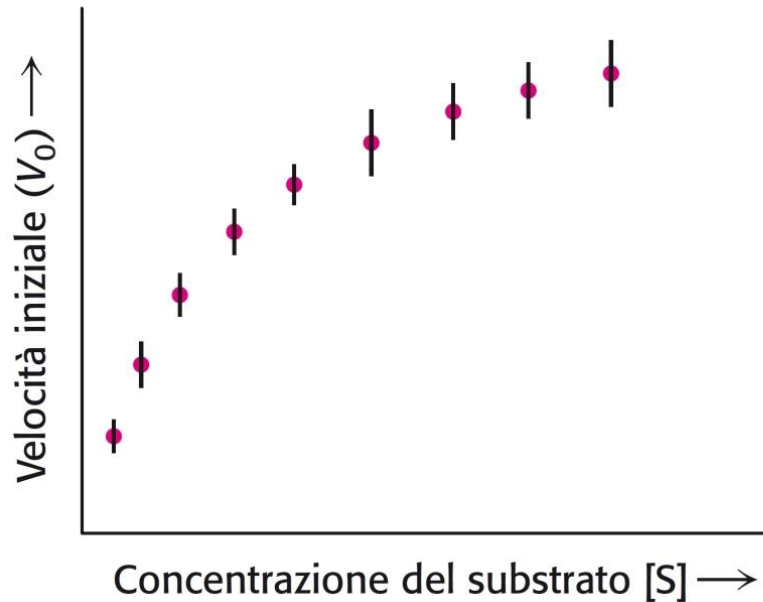


Si misura la velocità (V_0)
della reazione a **[S] crescenti**

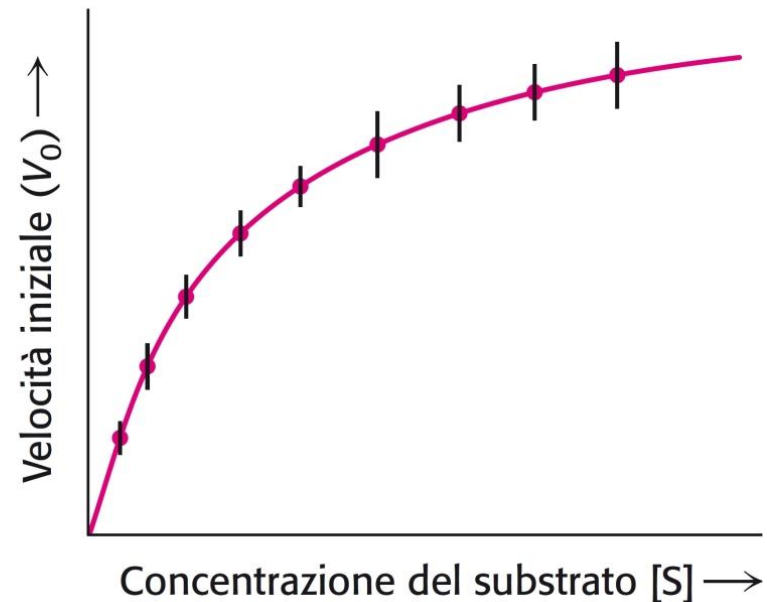
La **velocità iniziale (V_0)** per ogni concentrazione del substrato viene determinata dalla **pendenza** della **curva all'inizio della reazione**, e cioè quando la *velocità della reazione inversa è trascurabile*

I valori della **velocità iniziale (V_0)** sono riportati in grafico in funzione della concentrazione del substrato **[S]**

(B)



(C)



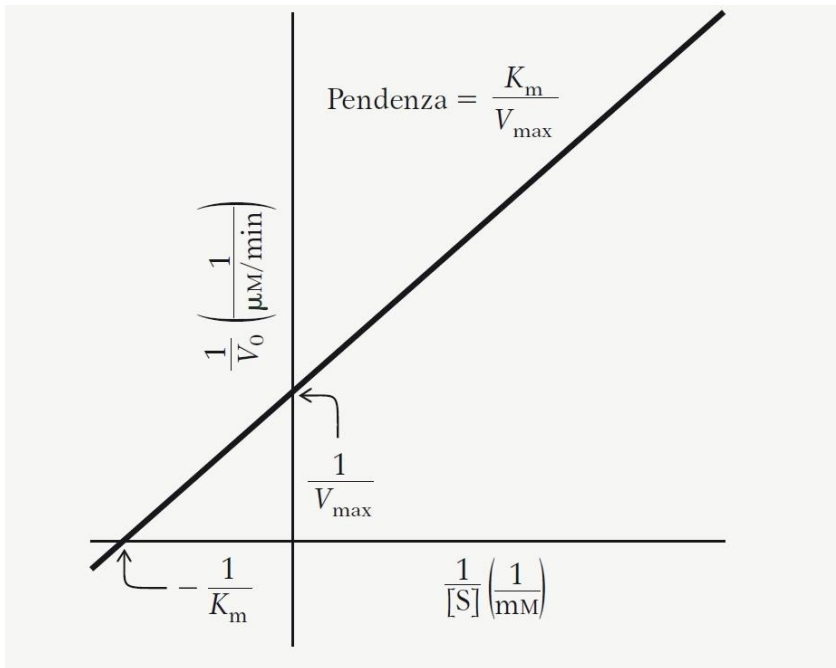
V_{\max} rappresenta un **valore asintotico** e non può essere determinato sperimentalmente con sufficiente precisione.

Di conseguenza non si possono determinare nemmeno **K_M** e **k_{cat}**

K_M e V_{max} possono essere determinati sperimentalmente

Il grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk

$$v_0 = \frac{V_{max} * [S]}{K_M + [S]}$$



Determinata V_{max} si può calcolare k_2

$$V_{max} = k_2 * [E_t]$$

$$y = a x + b$$

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

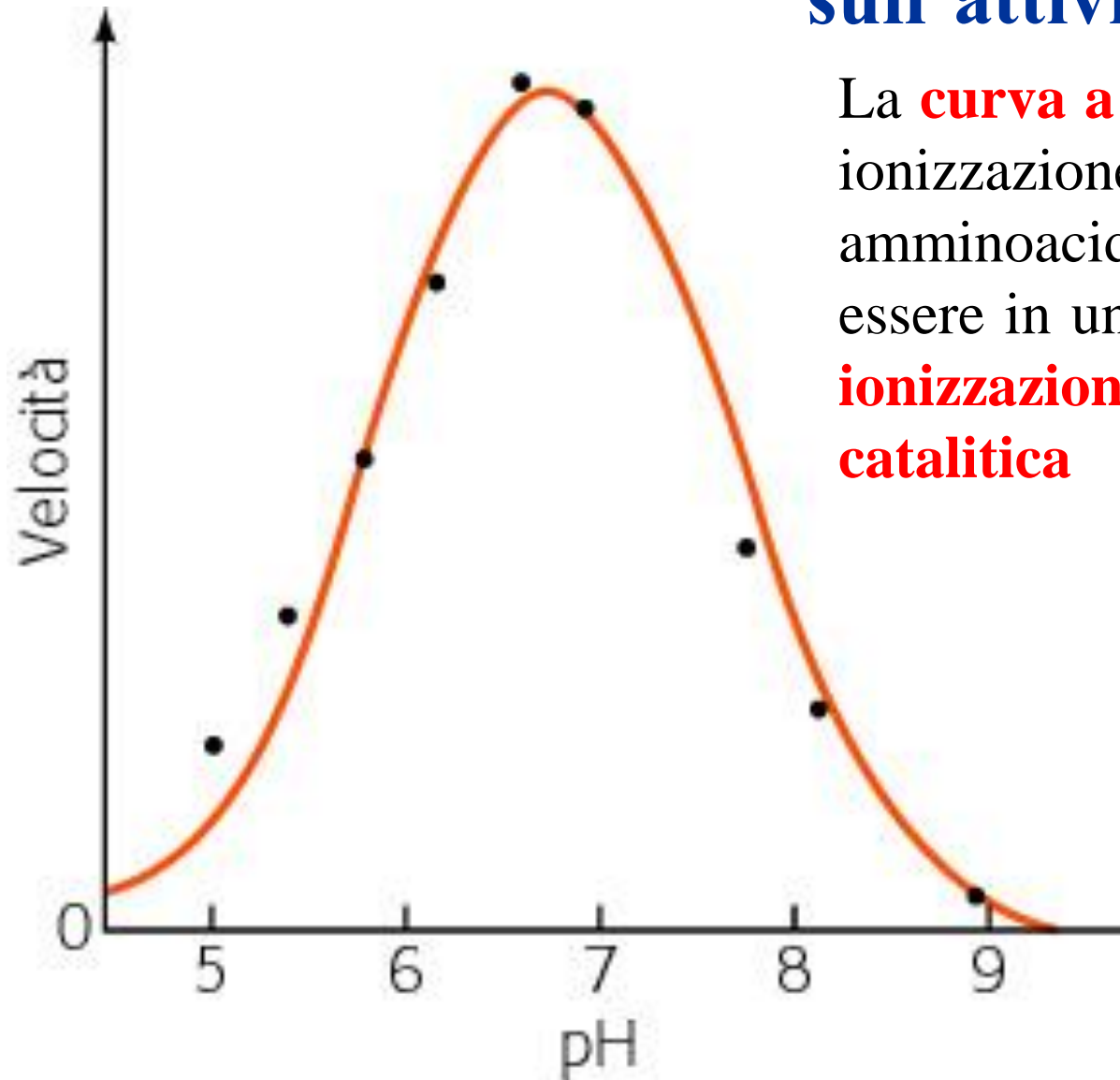
$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

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

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

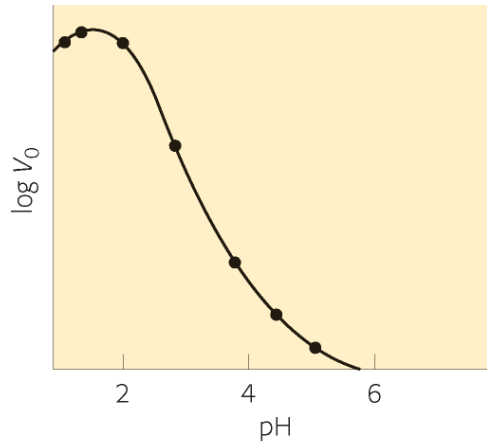
$$1/V_0 = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Effetto del pH sull'attività enzimatica



La **curva a campana** riflette la ionizzazione di alcuni residui amminoacidici che devono essere in un particolare stato di **ionizzazione** per **l'attività catalitica**

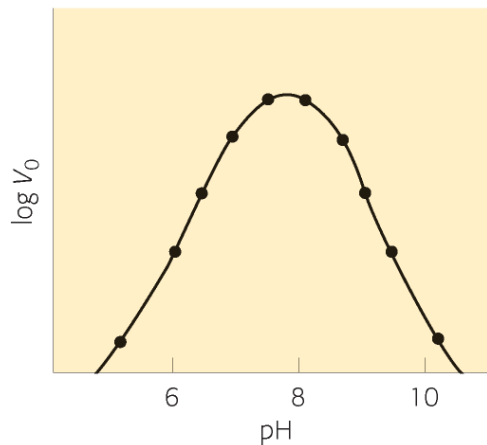
L'effetto del pH



(a) Pepsina

effetto sulla k_{cat}

Il pH può influenzare lo stato di ionizzazione di gruppi che intervengono nella fase di trasformazione del substrato in prodotto



(b) Glucosio 6-fosfatasi

effetto sul K_M

Influenza il legame del substrato