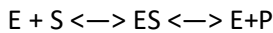


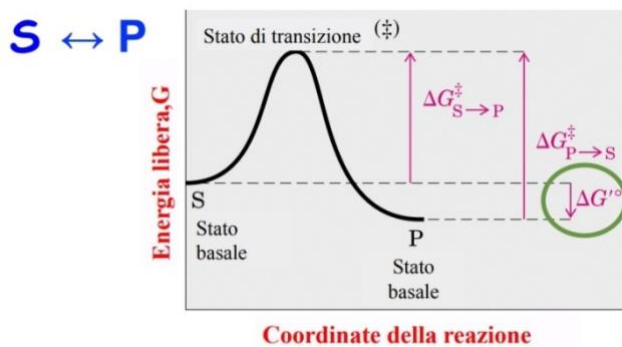
### Argomento: Gli enzimi (ultima parte)

Gli enzimi modificano le velocità delle reazioni, non gli equilibri.

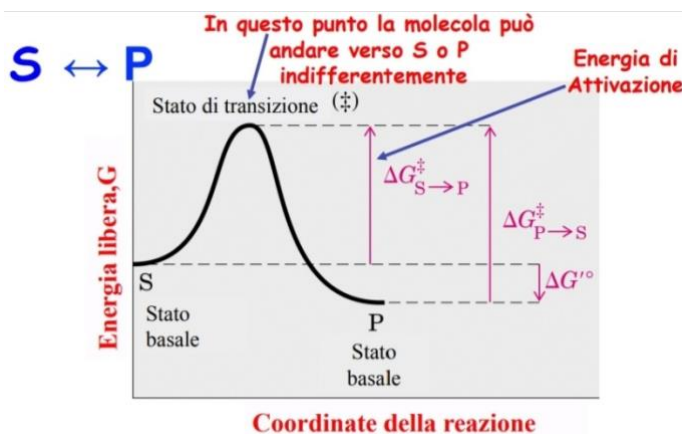


Per comprendere la catalisi dobbiamo distinguere fra **equilibrio chimico** e **velocità di reazione**.

La formazione del complesso ES è essenziale per la catalisi ed è anche il punto di partenza per definire **matematicamente** il comportamento cinetico di una reazione.



Il  $\Delta G'^\circ$  di questa reazione è negativo e l'equilibrio chimico favorisce P. Questo equilibrio non viene modificato da un catalizzatore. Se un equilibrio è favorevole non significa che la reazione procede velocemente in quanto tra S e P esiste una barriera energetica che deve essere superata. Per superare la barriera energetica le molecole devono raggiungere un livello energetico più elevato di quello basale (stato di transizione  $\Delta G^\ddagger$ ).



La velocità di una reazione dipende da un parametro diverso dall'equilibrio ovvero dall'Energia d'attivazione.

Un catalizzatore agisce sull' EA (A è pedice) e sul numero di molecole capaci di reagire (N).

L'EA (A=pedice) è la quantità minima di energia cinetica che le molecole di reagente devono possedere per consentire le collisioni, che portano alla formazione del prodotto.

Il numero di molecole N1 che ha sufficiente energia per superare EA e collidere può essere aumentato a N2:

• Aumentando la temperatura e/o pressione • Utilizzando un catalizzatore

**Il catalizzatore (enzima) aumenta la velocità della reazione abbassando l'energia di attivazione.**

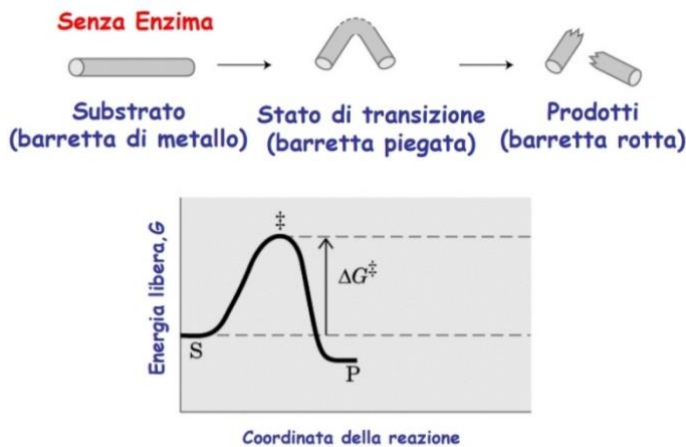
Quando in una reazione sono presenti più tappe



La velocità complessiva è data dalla tappa (o dalle tappe) con l'energia di attivazione più alta detta **"TAPPA CHE LIMITA LA REAZIONE"**



Fra Enzima e Substrato si instaurano una serie di **interazioni deboli**. La formazione di ogni interazione nel complesso ES e' accompagnata da **rilascio di energia libera**. Questa energia libera e' chiamata **Energia di Legame**. L'Energia di Legame e' la fonte principale di energia utilizzata per abbassare l'energia di attivazione.



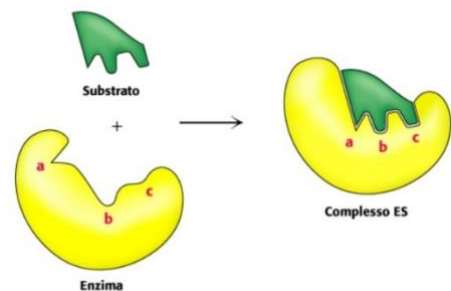
### Differenza tra adattamento indotto e serratura e chiave

La differenza fondamentale tra Induced Fit e Lock e Key è che nell'adattamento indotto, il legame del substrato con il sito attivo dell'enzima induce la modifica della forma del sito attivo nella forma complementare del substrato. Mentre, nella teoria della serratura e della chiave, il substrato e il sito attivo dell'enzima sono di forma complementare dall'inizio. Gli enzimi sono catalizzatori di reazioni metaboliche. Pertanto, sono specifici per i loro substrati. Il substrato si lega con il sito attivo dell'enzima e quindi converte nel prodotto.

#### Cos'è la misura indotta?

L'adattamento indotto è una teoria che spiega il legame di un substrato in un sito attivo di un enzima che non ha una corretta conformazione con quella del sito attivo. Secondo questa teoria, la conferma del sito attivo si modifica in una forma corretta quando il substrato si lega. Il legame del substrato induce la modifica della forma del sito attivo. Quindi, il nome "induced fit" è dato a questa ipotesi. Daniel E Koshland propose questa teoria nel 1959. Il sito attivo dell'enzima non è statico secondo questa teoria.

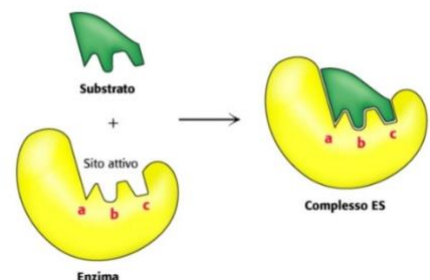
#### Adattamento indotto



#### Cos'è Lock and Key?

Lock and Key è una delle teorie che spiegano la modalità di azione di un enzima che catalizza una reazione. Emil Fischer propose questa teoria nel 1894. Secondo l'ipotesi della serratura e della chiave, il legame del substrato in un sito attivo di un enzima viene equalizzato nel meccanismo di blocco e chiave. Il blocco particolare può essere aperto utilizzando la chiave corretta. Allo stesso modo, se l'enzima è il blocco, sarà aperto solo dal substrato corretto che è la chiave. Entrambe si adattano l'una con l'altra correttamente e saldamente. Le loro forme sono complementari l'una con l'altra. Quindi, questo legame è molto specifico e non può essere facilmente rotto.

#### Modello Chiave-Serratura



#### Quali sono le somiglianze tra adattamento indotto e serratura e chiave?

Entrambe le teorie spiegano la modalità di azione di un enzima.

Sono davvero importanti per capire il legame del substrato in un sito attivo di un enzima.

La velocità delle reazioni e gli equilibri chimici hanno precise definizioni termodinamiche. Sappiamo che un equilibrio chimico come  $S \rightleftharpoons P$  è descritto dalla costante d'equilibrio  $K'_{eq} = [P]/[S]$

La velocità di una reazione dipende dalla [reagente/i] e da una **costante di velocità k**.

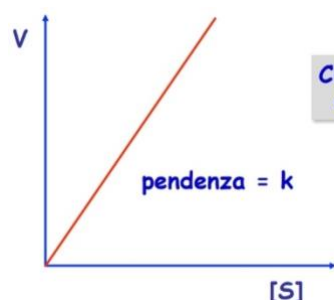
Per la reazione  $S \rightarrow P$  la velocità V È espressa dalla **legge della velocità**  $V = k [S]$

In Biochimica lo studio della velocità di una reazione catalizzata da un enzima, e di come essa varia in funzione delle modificazioni dei parametri sperimentali va sotto il nome di **Cinetica Enzimatica**.

Parametri sperimentali sono [S], [P], [E], pH, T° etc...

Data una qualunque reazione chimica  $S \xrightarrow{k} P$  La velocità della reazione (ovvero di formazione di P) è pari a:  $V = k[S]$ .

Questo equivale a dire che man mano che le molecole di S vengono consumate decresce la velocità.



Matematicamente possiamo dire che la velocità di formazione di P è proporzionale alla [S].

K è la costante cinetica di 1°ordine che esprime la velocità intrinseca della reazione a [ ] unitarie di substrato; la reazione che stiamo considerando è di 1°ordine. L'equazione mette in luce che la velocità con la quale si forma P è istante per istante proporzionale alla [S].

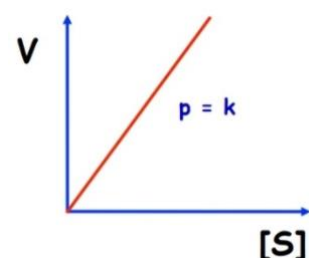
### Ordine n° di una Cinetica

Si definisce ordine di una reazione la somma degli esponenti con cui le concentrazioni dei reagenti compaiono nelle equazioni di velocità.

Riconsideriamo la reazione  $A + B \rightarrow C + D$ :  $V = k [A][B]$  se nella reazione la [B] si mantiene costante (eccesso di B rispetto ad A o continua aggiunta di B) la velocità di reazione risulta proporzionale solo ad A:  $V = k^{\circ} [A]$

Reazione	Ordine
$A \rightarrow B$	$V = k [A]$ 1°
$A + B \rightarrow C + D$	$V = k [A] [B]$ 2°
$2A \rightarrow B$	$V = k [A]^2$ 2°
$A + 2B \rightarrow C + D$	$V = k [A] [B]^2$ 3°

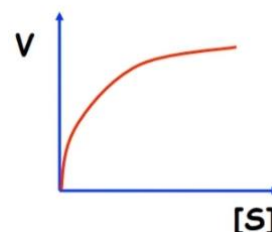
Si parla allora di reazione di pseudo 1° ordine in quanto la costante  $k^{\circ}$  è data dal prodotto della costante cinetica di 2° ordine per la [B] che è costante nel tempo  $k^{\circ} = k [B]$



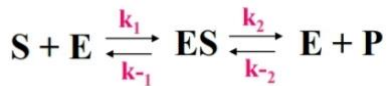
Data una reazione enzimatica  $S + E \rightarrow E + P$ , poiché E=costante trattandosi di una reazione di pseudo 1° ordine, ci si aspetterebbe una variazione della velocità proporzionale alla [S].

$$V = k^{\circ} [S]$$

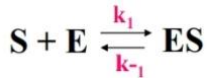
Tuttavia se la reazione è enzimatica, la curva di velocità in funzione della [S] presenta un caratteristico andamento iperbolico tipico della cinetica di saturazione.



La cinetica di saturazione può essere spiegata postulando l'esistenza di una tappa intermedia per la trasformazione di S in P che coinvolge la formazione di un intermedio ES.



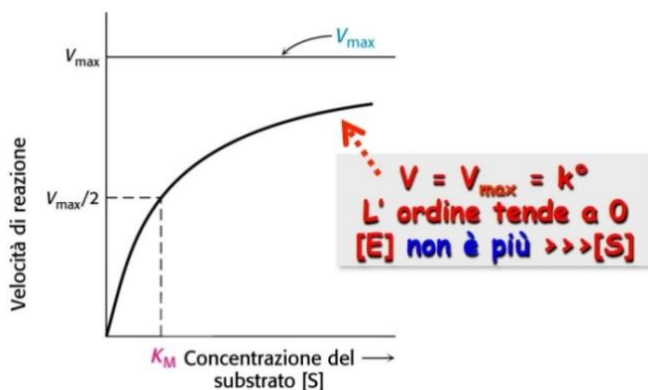
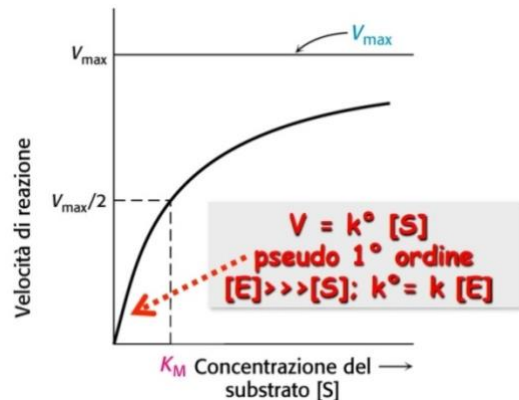
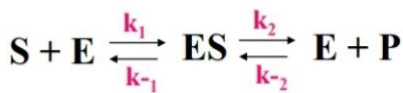
La reazione precedente può essere scomposta in una prima tappa relativamente veloce e reversibile



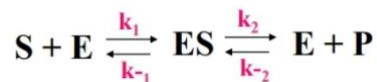
e in una seconda tappa più lenta e pertanto che limita la velocità complessiva della reazione.



Nel primo tratto della curva la  $[E] \gg [S]$  per cui la velocità di formazione di ES è direttamente proporzionale alla  $[S]$ ;

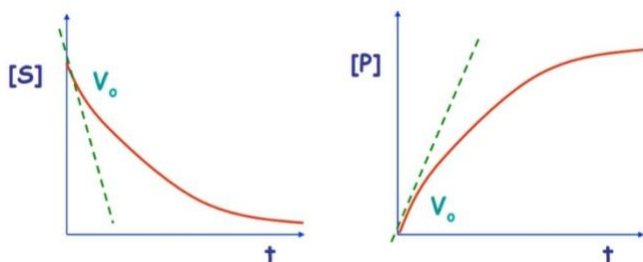
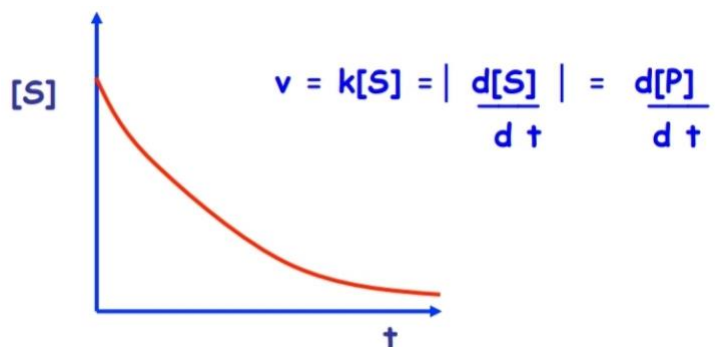


Man mano che aumentiamo il substrato S tutto l'enzima è presente sotto forma di complesso ES, in queste condizioni l'enzima è saturato con il suo substrato ( $S \gg E$ ), ulteriori aumenti di substrato non determinano aumenti di velocità. Pertanto l'ordine tende a zero e determina l'appiattimento del secondo tratto della curva.



### Cinetica nel tempo

Uno dei fattori che influenzano la velocità di una reazione è la  $[S]$ . Il problema è che la  $[S]$  varia durante la reazione. Per ovviare a questo problema le misure di velocità andrebbero fatte nell'istante iniziale della reazione ( $t \rightarrow 0$   $V=V_0$  Velocità iniziale) e in condizioni tali che  $[S] \gg [E]$  e  $[P]=0$

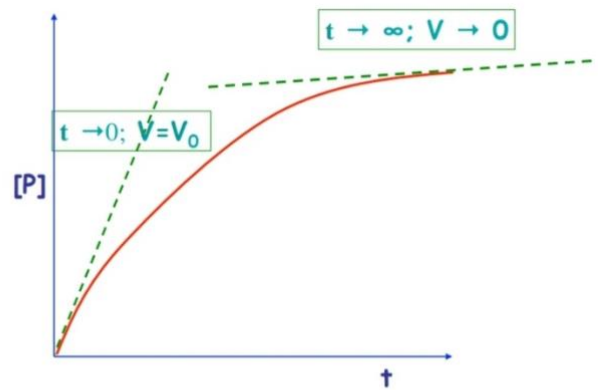
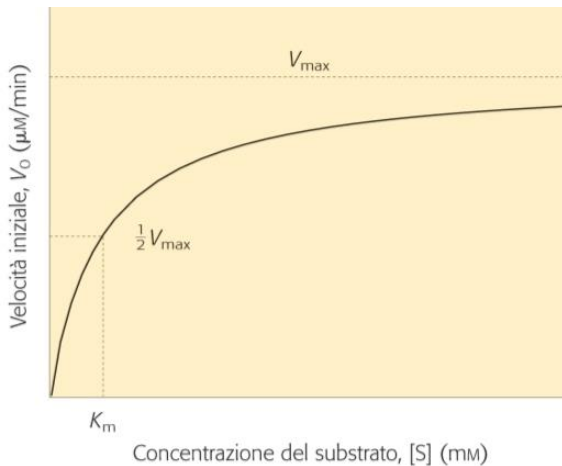


### Come facciamo a misurare la velocità esattamente al tempo $t=0$ ?

Sperimentalmente è possibile misurare la diminuzione di  $[S]$  (oppure l'aumento di  $[P]$ ) in funzione del tempo. In entrambi i casi si osserva la presenza di un tratto iniziale lineare, in cui la velocità di reazione è costante ed uguale a  $V_0$ .

Pertanto, è possibile effettuare la misura della velocità  $V$  al tempo  $x$ , che sarà uguale a  $V_0$ , una volta verificato di trovarsi ancora nelle condizioni di linearità.

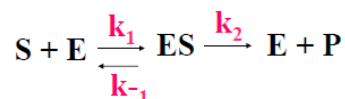
La velocità iniziale  $V_0$  può essere valutata variando  $[S]$ . L'effetto della variazione di  $[S]$  su  $V_0$  è rappresentato da un'iperbole.



**Cinetica nel tempo**  
Cinetica della comparsa del prodotto durante una reazione enzimatica  
(andamento della comparsa del prodotto in funzione del tempo)

$V_0$  può essere, dunque, valutata variando  $[S]$  e l'effetto della variazione di  $[S]$  su  $V_0$  è rappresentabile tramite un'iperbole ricavata inizialmente da Michaelis-Menten. Successivamente alla loro derivazione, vari matematici hanno lavorato sulla loro equazione. In particolare, la più rilevante è quella del tempo nello “**stato stazionario**” secondo il modello Briggs-Haldane. Questa prevede che

1.  $[S] \gg [E]$ , di conseguenza  $[S_{\text{tot}}] = [S] + [ES] \approx [S]$ . In una reazione enzimatica, infatti, si ha una parte di  $S$  libero e una parte legata al complesso  $ES$ . In eccesso di  $S$ , la minima quantità di esso legata a  $E$  risulta trascurabile;
2. Ci si trovi a  $V_0$ , di modo che la reazione venga semplificata, in quanto si ha formazione di  $ES$  e scissione di  $ES$  per rilasciare prodotto libero. Tale reazione, però, non regredisce, dunque la  $k_2$ , che riporta alla formazione di  $ES$  partendo da  $E + P_{\text{libero}}$ ;
3. Ci si trovi in uno stato stazionario: la velocità necessaria affinché il complesso  $ES$  si formi a partire da  $E + S$  è pari alla somma delle velocità con cui si scinde a dare  $E + P$  e  $E + S$ .



Prima che la reazione cominci si ha un punto detto “**punto prestazionario**” in cui  $E$  e  $S$  si legano di modo da formare il complesso  $ES$  (cost. per tutta la misurazione, di fatti è come non avere  $E$  libero). La velocità di formazione del prodotto è  $V_0 = k_2[ES]$

Vi è, però, un problema:  $[ES]$  non è misurabile!

Velocità di formazione di  $[ES]$ :  $k_1[E][S] = k_1([E_t] - [ES])[S]$

Velocità di demolizione di  $[ES]$ :  $k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

Per l'assunzione dello stato stazionario: V di formazione [ES] = V di demolizione [ES], dunque:

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

Risolvendo questa equazione  $k_1([E_t] - [ES]) [S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$  **otteniamo**

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

Portiamo il termine  $k_1[ES] [S]$  dall'altra parte dell'equazione

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

mettiamo in evidenza ES

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

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

**Risolvendo per [ES] otteniamo**

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

Combiniamo ora le costanti di velocità in un'unica espressione ovvero dividiamo tutto per  $k_1$

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

$(k_{-1} + k_2)/k_1$  è detta costante di Michaelis e Menten,  $K_m$

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

Possiamo ora esprimere  $V_o$  in termini di [ES] nell'equazione di partenza  $V_o = k_2 [ES]$

$$V_o = \frac{k_2 [E_t] [S]}{K_m + [S]}$$

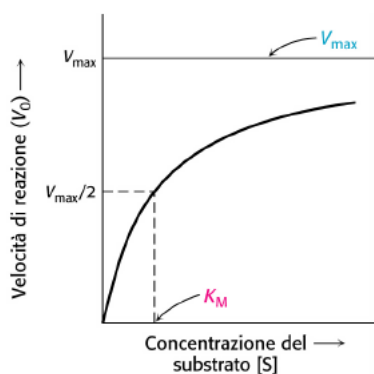
Questa equazione può essere semplificata poiché la  $V_{max}$  viene raggiunta quando  $[ES] = [E_t]$  e quindi  $V_{max} = k_2 [E_t]$

Con l'ultima sostituzione avremo che  $V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$

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

$K_m$  = costante di Michaelis-Menten

$V_{max}$  = velocità a concentrazioni saturanti di substrato



L'equazione di Michaelis-Menten descrive l'iperbole equilatera rappresentante la velocità di una reazione catalizzata da enzimi al variare della concentrazione di S ed E. In questa equazione due termini sono costanti, ovvero  $V_{max}$  e  $K_m$ .

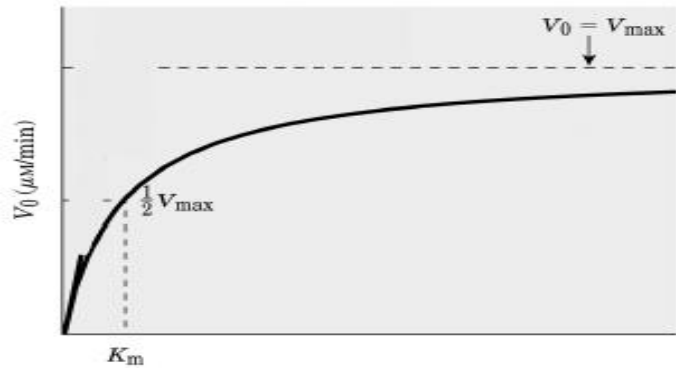
La  $V_{max}$  si raggiunge a [S] saturanti e si può dimostrare che  $V_{max}$  è uguale a quella

$V_o$  per cui la [S] è saturante rispetto all'enzima. Di fatti, se  $[S] \gg K_m$ , l'equazione diventa:  
immagine a sx nella prossima pagina.



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

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



Così come per l'equazione della mioglobina, anche nell'equazione di Michaelis-Menten, la  $K_m$  corrisponde a quella  $[S]$  per cui  $V_0 = 1/2 V_{\max}$ . Il valore di  $K_m$  è

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{se} \quad v_0 = \frac{1}{2} v_{\max}$$

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

Divido per  $v_{\max}$

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

Risolvo per  $k_m$

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

$$k_m + [S] = 2[S]$$

$$k_m = 2[S] - [S]$$

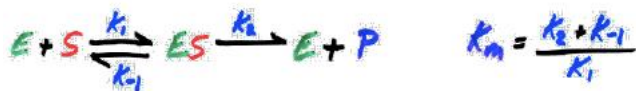
$$k_m = [S] \quad \text{mol/l}$$

Di fatto, la  $K_m$  è la concentrazione per cui metà dei siti della proteina sono occupati ed è spesso definita come **indice di affinità** del substrato.

La  $K_m$  è inversamente proporzionale all'affinità del substrato.

La  $K_m$  si valuta in base a due condizioni:

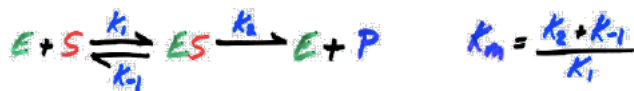
- Quando la  $k_2$  è trascurabile rispetto a  $k_1$ . In questo caso la  $K_m$  dipende solo dal substrato e dall'enzima e può essere considerata indice di affinità



$$\text{se } k_2 \ll k_{-1} \quad K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_{ES}$$

$k_2 \ll k_{-1}$   $K_m$  misura dell'affinità di  $E$  per  $S$ ;

- Quando la  $k_2$  non è trascurabile rispetto a  $k_1$ ,  $K_m$  non può essere considerata una misura di affinità per il substrato. La reazione è più complessa ed entrano in gioco  $E$ ,  $S$  e  $P$



$$\text{se } k_2 \gg k_{-1} \text{ o } k_2 \approx k_{-1}$$

$K_m$  Non può essere considerata una misura dell'affinità  $E$  per  $S$  nel complesso  $ES$  ma diventa una funzione complessa delle tre costanti di velocità

Non tutte le reazioni enzimatiche hanno semplicemente la formazione del complesso ES, a volte, dopo di esso, si forma il complesso EP, che si scinde per liberare E e P libero. In una reazione di questo tipo,  $k_{catalitica}$  è la  $k$  limitante la velocità della reazione. Dunque,

$$V_0 = k_{catalitica} \cdot E \cdot S / K_M + S$$

$$V_{MAX} = k_{catalitica} \cdot E_{totale} \rightarrow K_{catalitica} = V_{MAX} / E_{tot}$$

$K_M$ , dunque, può anche esser detta  $k_{catalitica}$  ed è il **numero di turnover dell'enzima**, ovvero le moli di S consumate dall'enzima nell'unità di tempo (misurato in mol/s).

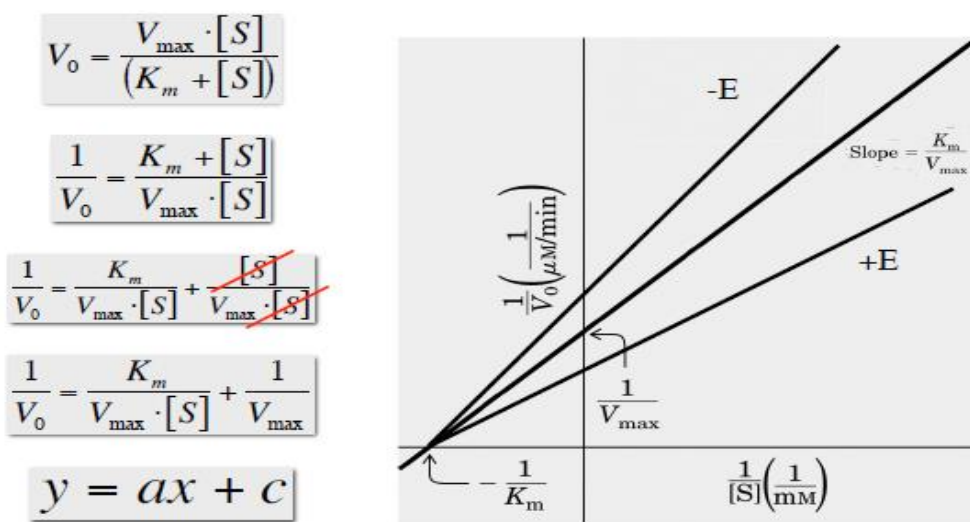
**Efficienza catalitica** =  $k_{catalitica} / K_M$

$K_M$  è una concentrazione di substrato, dunque si misura in moli. importante in quanto:

- Costante specifica per ogni enzima e, quindi, ogni substrato;
- Conferisce una misura indiretta della concentrazione intracellulare di substrato, perché l'enzima deve rispondere alle variazioni di substrato (es. nella glicolisi un aumento della concentrazione di glucosio implica un aumento della velocità degli enzimi idrolizzanti e un abbassamento della concentrazione implica un aumento degli enzimi anabolizzanti. Gli enzimi, dunque, modulano la loro velocità di reazione). La concentrazione "normale" di substrato dev'essere attorno alla  $K_M$ , di modo da consentire all'enzima di modulare la sua velocità;
- Il suo studio consente di identificare eventuali inibitori che ne fanno variare il valore;
- Misurare la  $K_M$  consente di misurare la  $V_{MAX}$ . Ci dà una misura indiretta della concentrazione di [E], poiché  $V$  è direttamente proporzionale a [E] presente in una cellula.

Nel grafico di Michaelis-Menten, man mano che il ramo d'iperbole si avvicina al suo asintoto, vi è una variazione di velocità in maniera infinitesimale che implica una variazione di  $K_M$ ; dunque non è possibile, attraverso l'equazione dell'iperbole, misurare precisamente i valori di  $K_M$  e  $V_{MAX}$ .

**Lineweaver** e **Burk** hanno risolto questo problema derivando l'equazione di Michaelis-Menten e ottenendo l'**equazione dei doppi reciproci**.



L'equazione derivata corrisponde a una retta non passante per l'origine in cui le variabili sono  $1/V_0$  e  $1/S$ .



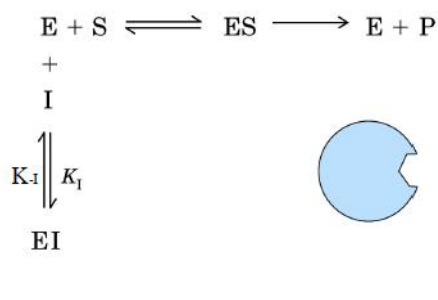
Risolve l'equazione

- l'intercetta sull'asse delle ordinate sarà pari a  $1/V_{MAX}$ ;
- l'intercetta sull'asse delle ascisse sarà uguale a  $-1/K_M$ ;
- la pendenza della retta è uguale a  $K_M/V_{MAX}$ .

$-1/K_M$  non può essere misurato sperimentalmente, in quanto inverso di una variazione di concentrazione molare.

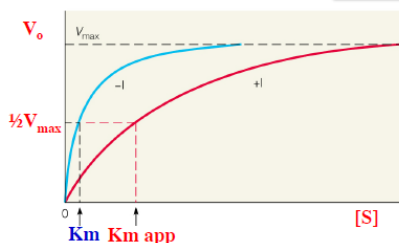
Gli enzimi che seguono la cinetica di Michaelis-Menten possono subire delle inibizioni di tipo reversibile assimilabili a tre categorie:

- **competitiva**, dove gli inibitori si vanno a legare allo stesso sito attivo del substrato. Oltre all'equilibrio in cui si ha la formazione del complesso ES, in questa reazione va considerato anche l'equilibrio in cui si ha la formazione del complesso E-inibitore. La  $K_M$  viene definita *apparente*, in quanto aumenta di un fattore definito  $\alpha$ . L'affinità per il substrato, di conseguenza, diminuisce. La  $V_{MAX}$ , invece, non diminuisce e la conseguenza catalitica rimane invariata.



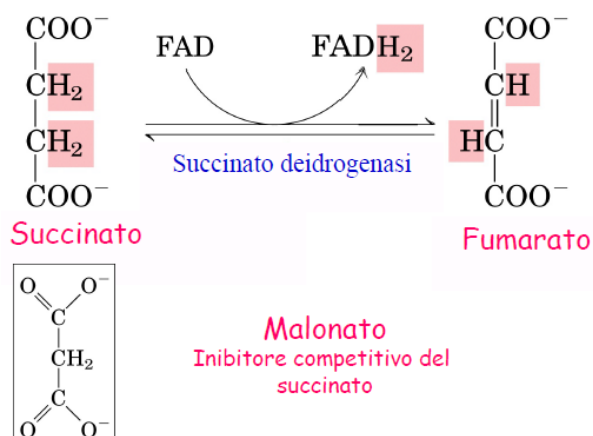
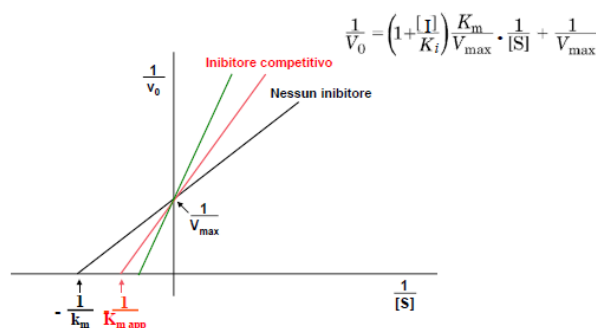
la  $K_M$  aumenta

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



$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$



Gli inibitori competitivi, logicamente, devono avere una struttura simile a quella del substrato. Chiaro esempio ne è il malonato per la succinato deidrogenasi. Se si aumenta la  $[S]$  in eccesso, questo tipo di inibizione può essere rimossa, infatti, a una  $[S]$  abbastanza elevata si raggiunge la stessa  $V_{MAX}$  che si ha in assenza dell'inibitore. Alcuni farmaci agiscono da inibitori competitivi, come le statine, i sulfamidici, il metotrexato e l'AZT.

L'inibizione competitiva può essere sfruttata anche per curare soggetti che abbiano ingerito metanolo o glicoletilenico, la cui tossicità è dovuta alla loro ossidazione di aldeidi e acidi organici.

L'etanolo compete efficacemente col metanolo o col glicoletilenico come substrato dell'enzima alcooldeidrogenasi, evitando la trasformazione di questi composti in metaboliti tossici;

- incompetitiva, l'inibitore non si lega al sito per il S, bensì in uno differente. Gl'inibitori non competitivi costituiscono un composto ternario E-S-I. in questo  $K_M$  e  $V_{MAX}$  diminuiscono, perché una parte del complesso ES si lega all'inibitore.

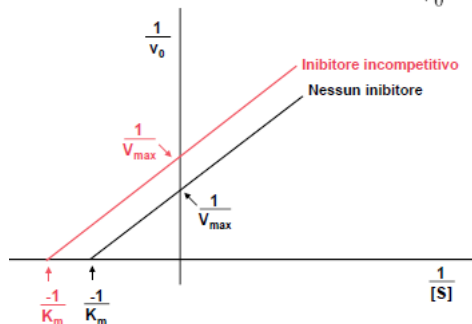
$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{(K_m + \alpha'[S])}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$$

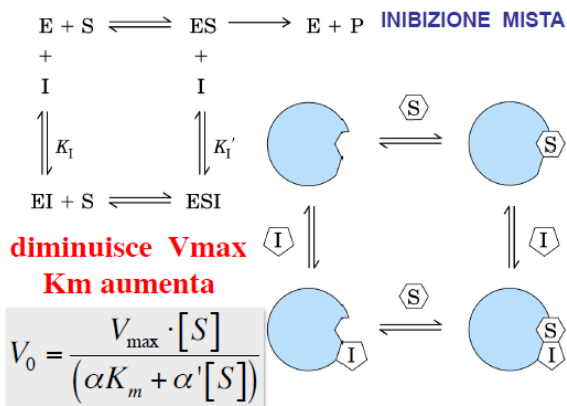
$$K'_I = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]}$$

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{(\alpha K_m + \alpha'[S])}$$

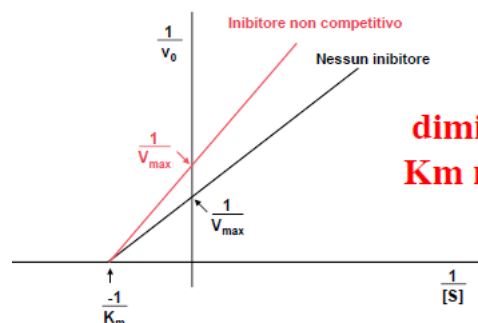
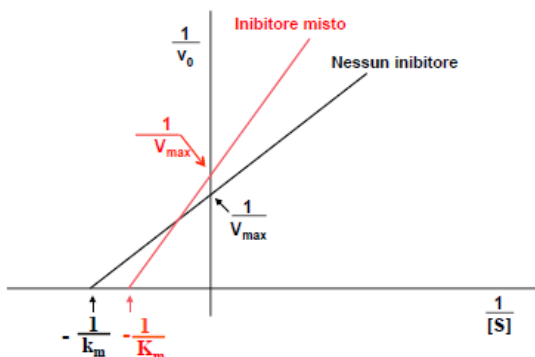
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \left(1 + \frac{[I]}{K'_I}\right) \frac{1}{V_{max}}$$



Ad alte quantità di S,  $V_0 \rightarrow V_{MAX}$ , ma essa dev'essere divisa per il fattore  $\alpha$  e diminuisce di conseguenza, causando anche diminuzione della  $K_M$ . Un inibitore di questo tipo sottrae enzima alla reazione e, se si aumenta di molto [S], l'inibizione non viene rimossa.



–Mista, in questo caso il complesso ternario si può ottenere sia legando direttamente l'inibitore all'enzima e poi il substrato oppure legandoli entrambi nello stesso momento. Si osserva una diminuzione della  $V_{MAX}$  e un aumento di  $K_M$ , in quanto si ha variazione sia del fattore  $\alpha$  che della [S]. Immagine sotto a sx. Anche in questo caso l'inibitore non è simile a S e si lega a un sito diverso e un aumento della [S] non lo rimuove.



**diminuisce  $V_{max}$**   
 **$K_m$  resta invariata**

- mista non competitiva, immagine su a dx: quando  $\alpha = \alpha'$ . Si osserva una diminuzione di  $V_{MAX}$ , mentre  $K_M$  rimane invariata.