

Cinetica enzimatica

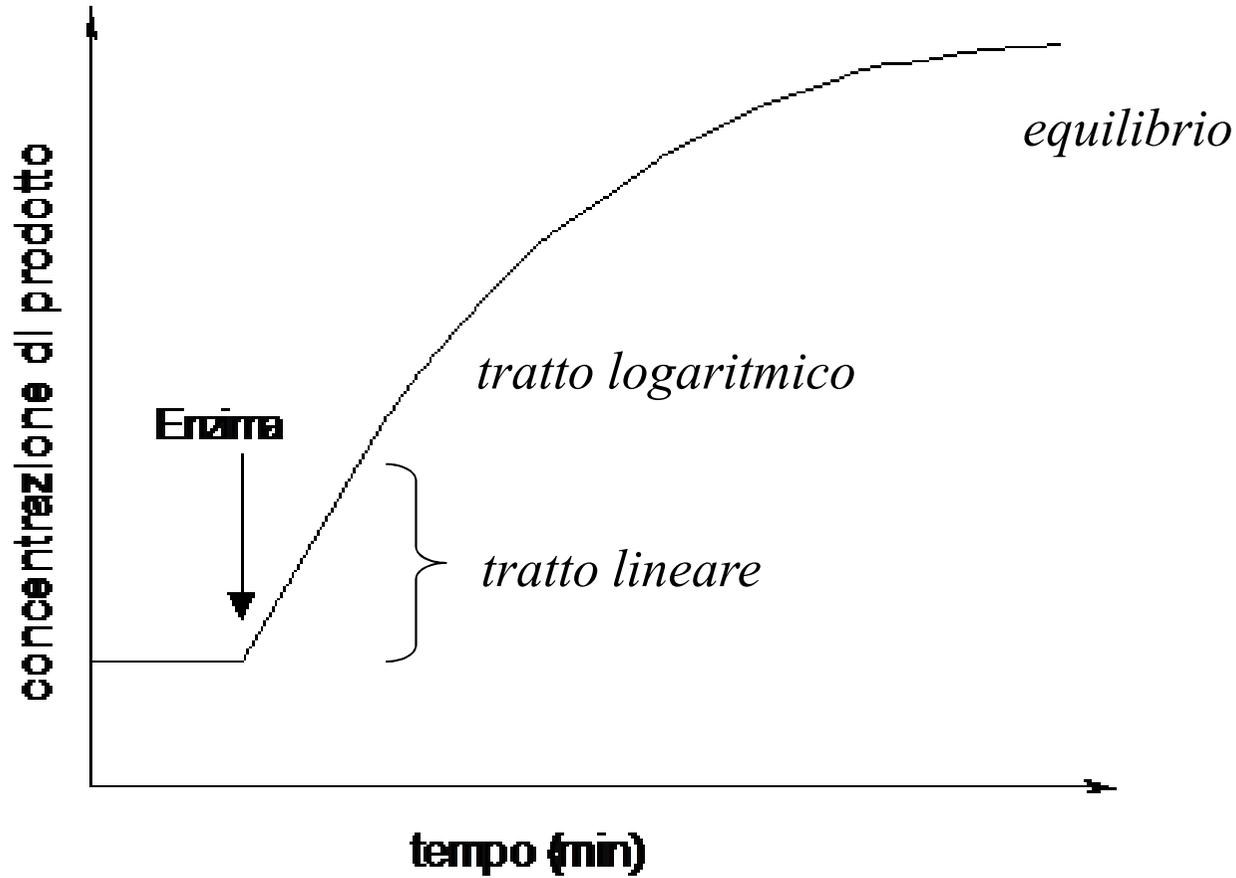
parole chiave:

equazione di velocità

stato stazionario

K_m

Decorso di una reazione catalizzata da enzimi.



La velocità v (in mM/min) $v = \frac{d[P]}{dt}$ è costante per un certo periodo poi varia ad ogni istante fino ad essere pari a zero (equilibrio).

Il decorso della reazione è influenzato da vari fattori chimico-fisici:

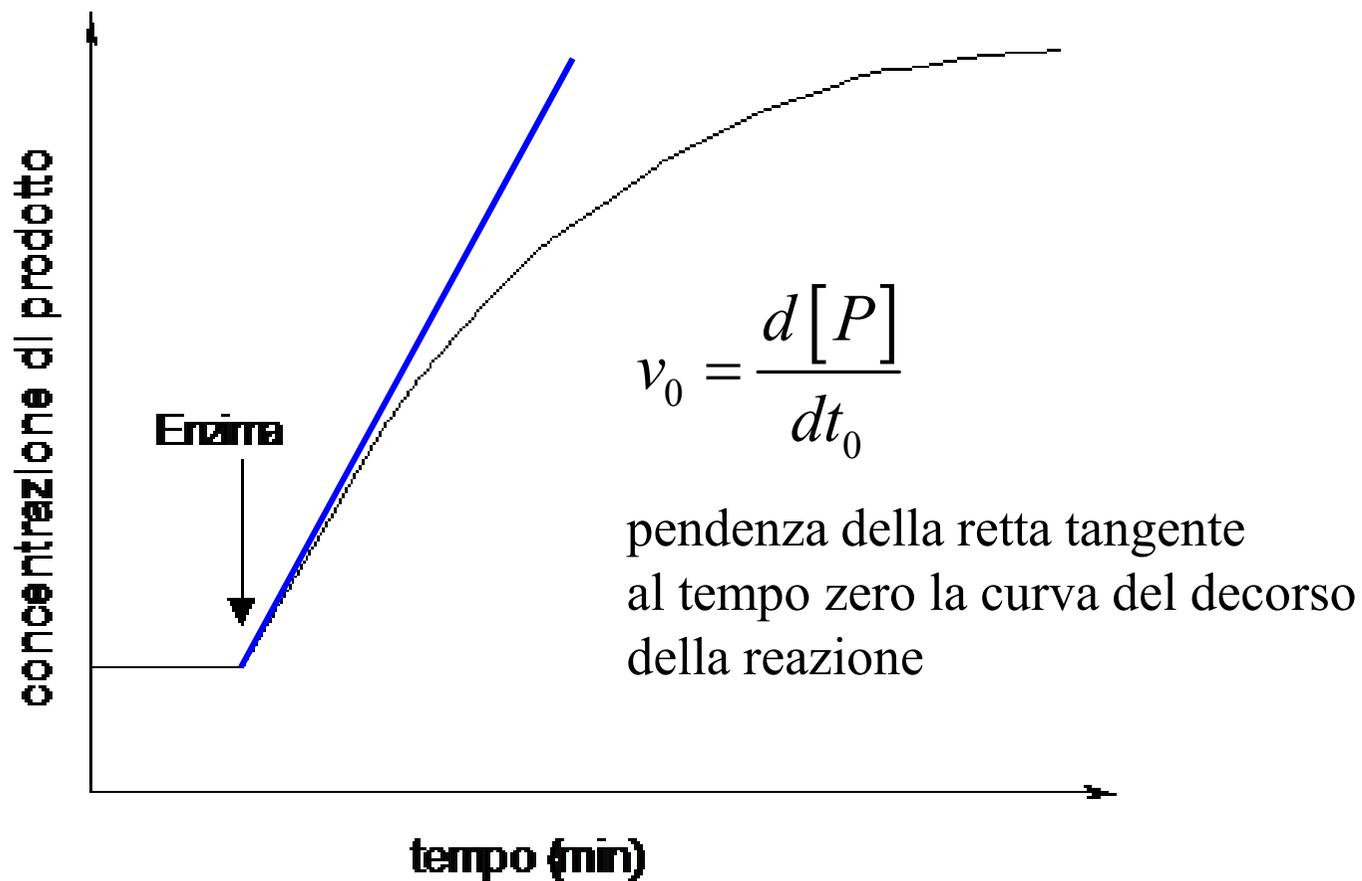
1. la concentrazione iniziale di substrato
2. la concentrazione di enzima
3. la concentrazione di prodotto
4. la temperatura
5. il pH del mezzo
6. la forza ionica

Occorre semplificare il sistema per discriminare l'effetto di ogni fattore sulla velocità della reazione

Utilizzare la velocità iniziale e condizioni controllate di temperatura (misure termostatate), di pH (presenza di un sistema tampone) e di eventuali cofattori inorganici consente di ridurre a due le variabili in grado di influenzare la velocità di catalisi:

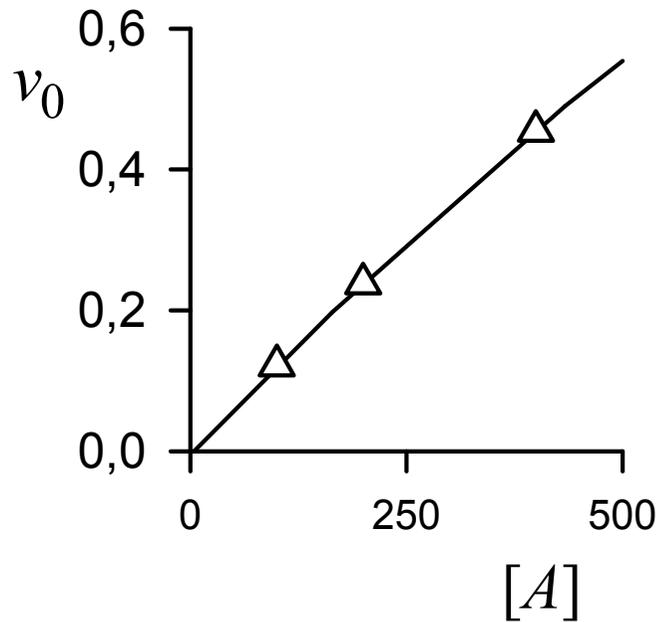
1. Concentrazione di substrato
2. Concentrazione di enzima

Concetto di velocità iniziale, v_0



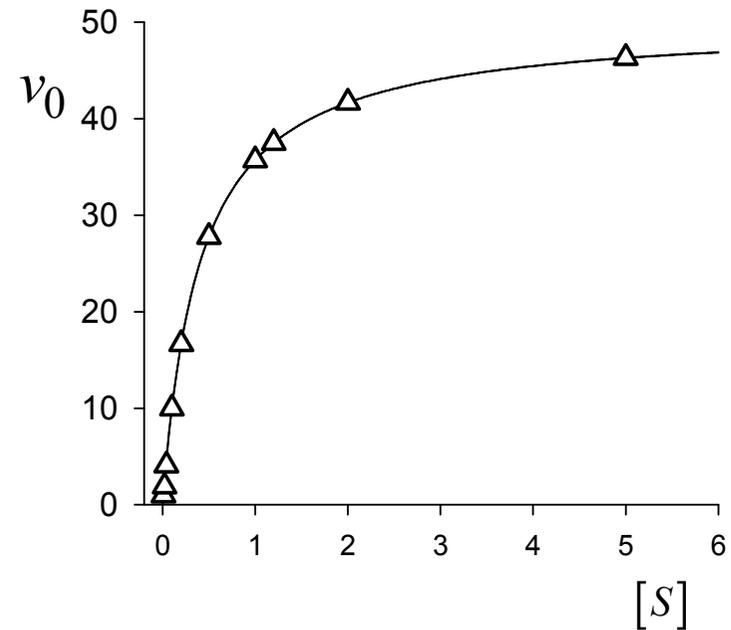
Dipendenza della velocità iniziale dalla concentrazione di reagente A di una generica reazione non catalizzata e di substrato S di una reazione catalizzata da enzima

Reazione non catalizzata



$$v_0 = k[A]$$

Reazione catalizzata da enzima



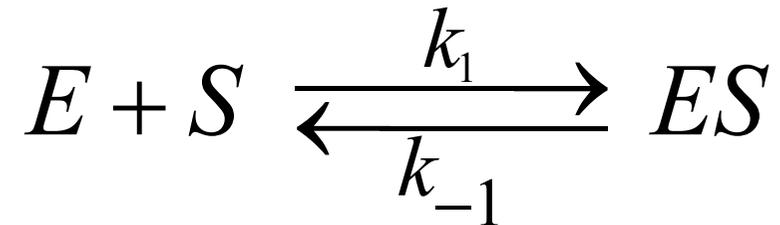
$$v_0 = f(S, E)$$

Cinetica enzimatica.

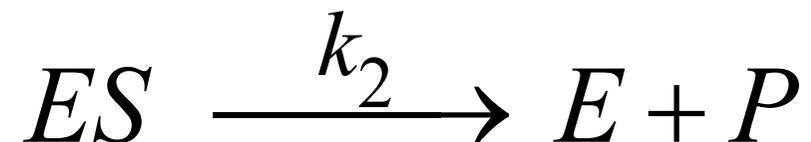
Si occupa di quantificare gli effetti dei fattori che influenzano la velocità della reazione sviluppando opportune equazioni di velocità

Victor Henri (1903) deriva la prima equazione cinetica per una reazione enzimatica assumendo che:

1. Le concentrazioni di enzima e substrato siano in equilibrio con la concentrazione del complesso



2. Il prodotto si forma dal complesso ES



3. Pertanto la velocità di formazione del prodotto è direttamente proporzionale alla concentrazione del complesso:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$$

4. *Inoltre: sia $[S] \gg [E]$*

5. *sia $[P] = 0$ per cui vale la velocità iniziale*

Derivazione dell'equazione di Henri.

Si considerino le seguenti espressioni:

$$K_a = \frac{[ES]}{[E][S]} \quad (1)$$

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (2)$$

dove K_a è la costante di associazione, $[E]_T$ l'enzima totale ed $[E]$ l'enzima libero

poiché $[S] \gg [E]$ la quota di substrato legata al complesso ES è trascurabile. Pertanto $[S]$ è la concentrazione totale di substrato presente all'inizio della reazione:

$$[S]_T = [S] + \cancel{[ES]}$$

$$v_0 = k[ES]$$

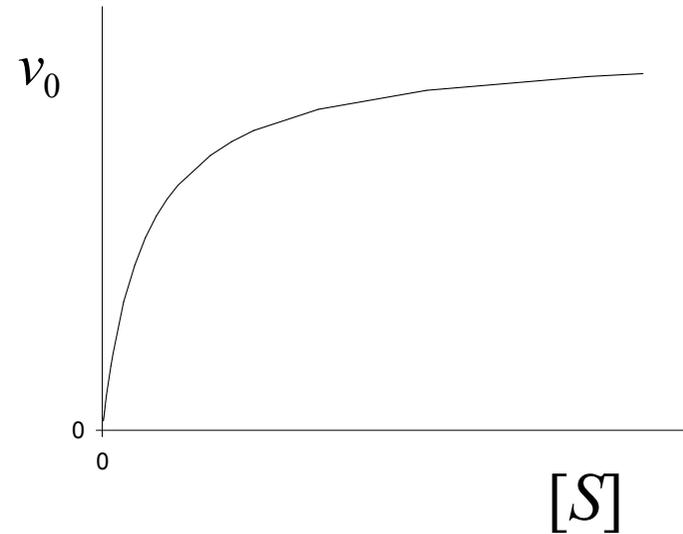
$$\frac{v_0}{[E]_T} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES]}$$

$$\frac{v_0}{[E]_T} = \frac{k_2 K_a [E][S]}{[E] + K_a [E][S]} = \frac{k_2 K_a [S]}{1 + K_a [S]}$$

$$v_0 = \frac{k_2 K_a [E]_T [S]}{1 + K_a [S]} \quad (3)$$

L'equazione di velocità di Henri (1903) spiega le osservazioni sperimentali

$$v_0 = \frac{K' [S]}{1 + K_a [S]}$$



v_0 = velocità iniziale

K' = costante che dipende dall'enzima e include K_a

K_a = costante di associazione

$[S]$ = concentrazione di substrato

Nel 1913 Michaelis e Menten
derivano una versione modificata
dell'equazione di Henri.



Leonor Michaelis,
1875–1949



Maud Menten,
1879–1960

Derivazione secondo Michaelis e Menten

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_2 [ES]}{[E] + [ES]}$$

Si considera la **costante di dissociazione**

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_2 \frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S}}$$

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

quando $[S]$ è molto grande rispetto al parametro K_S *questo diventa trascurabile rispetto ad $[S]$ e la velocità iniziale tende ad un valore limite*

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_S + [S]} = \frac{k_2 [E]_T [S]}{\cancel{K_S} + [S]} = k_2 [E]_T$$

chiamiamo $k_2[E]_T$ velocità massima, V_{max} . Pertanto:

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

La concentrazione di S alla velocità massima è detta **concentrazione saturante** (tutte le molecole di enzima sono impegnate con il substrato, non esiste enzima libero; si dice che l'enzima è saturato dal substrato).

Quando $[S]$ è uguale al valore di K_S *la velocità è pari a metà della velocità massima*. Quindi K_S è la concentrazione di substrato che dà la velocità semimassimale

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_S + [S]} = \frac{V_{\max} K_S}{K_S + K_S} = \frac{V_{\max} \cancel{K_S}}{2 \cancel{K_S}} = \frac{V_{\max}}{2}$$

L'equazione di Henri e l'equazione di Michaelis e Menten sono due versioni di una stessa relazione tra velocità iniziale e concentrazione di substrato. La prima può essere facilmente convertita nella seconda e viceversa.

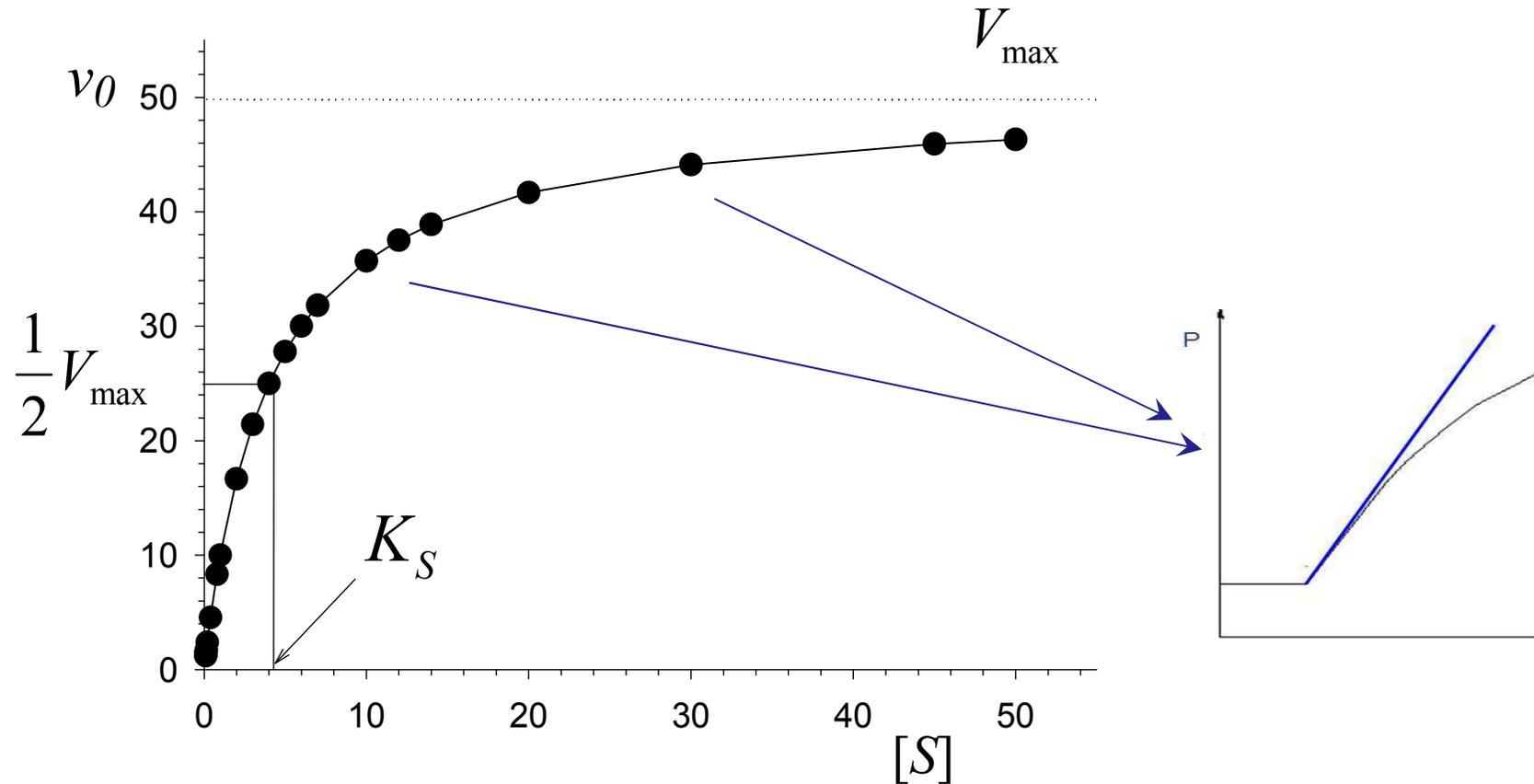
$$v_0 = \frac{k_2 K_a [E]_T [S]}{1 + K_a [S]} \quad \text{Equazione di Henri}$$

Dividendo per K_a si ottiene:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{\frac{1}{K_a} + [S]}$$

Ma $\frac{1}{K_a}$ non è nient'altro che K_S

Rappresentazione grafica dell'equazione di Henri-Michaelis-Menten



I cerchi rappresentano misurazioni di velocità alle corrispondenti concentrazioni iniziali di substrato ossia i valori delle pendenze ottenute dai corrispondenti tracciati

L'equazione di velocità di Briggs e Haldane (1925)

Se la reazione dà prodotto con velocità costante, ossia

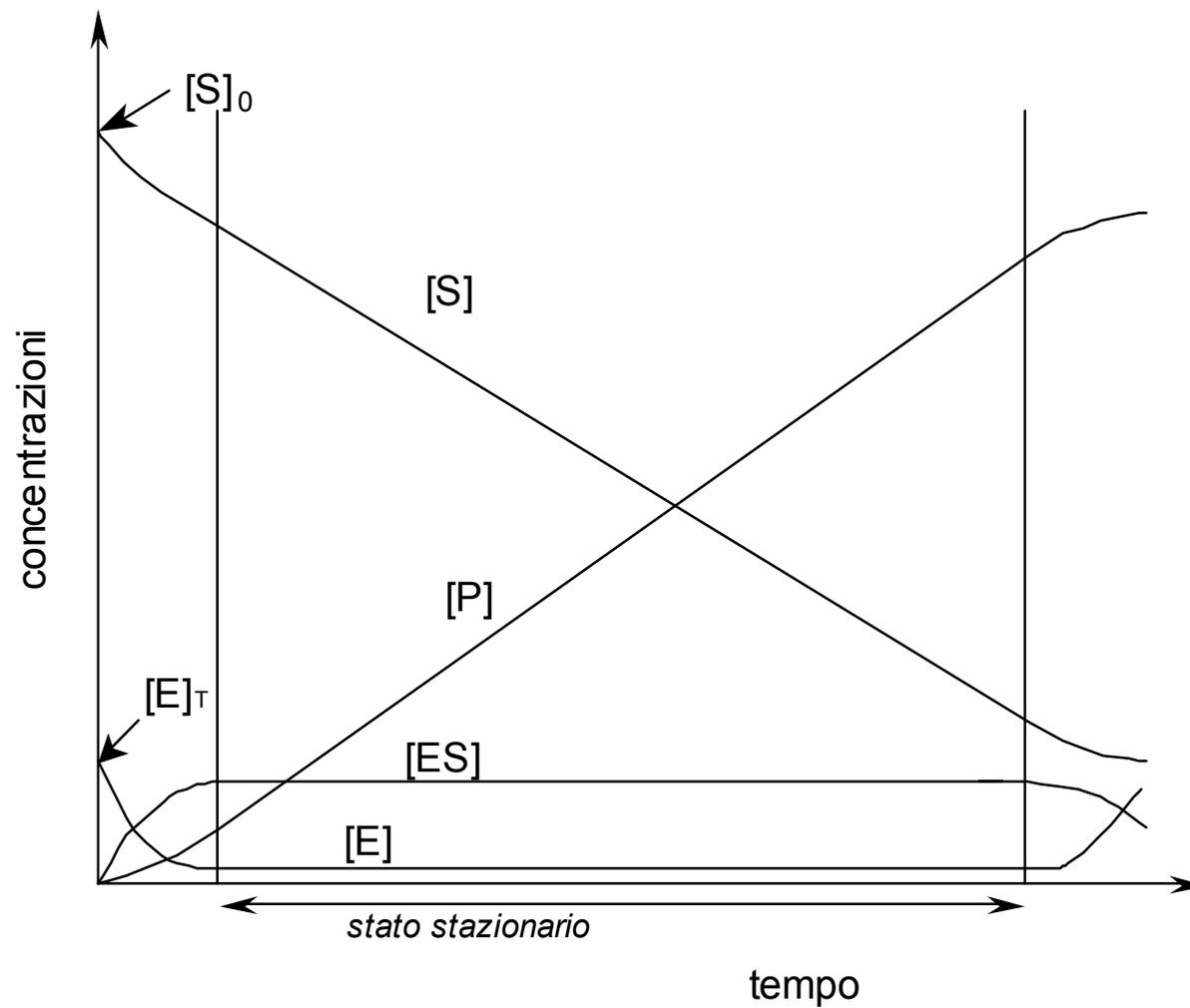
$$v_0 = k_2 [ES] = \text{costante}$$

come si può osservare dal decorso della reazione,

allora si può scrivere:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Rappresentazione dello stato stazionario



Derivazione secondo l'ipotesi dello stato stazionario

Condizioni iniziali: $[S] \gg [E]$; $[P] = 0$

1. Scrivere le equazioni di formazione e di scissione di ES :

$$\frac{d[ES]_f}{dt} = k_1[E][S]$$

$$-\frac{d[ES]_s}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

2. Eguagliare le equazioni

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

3. Sostituire e arrangiare:

$$k_1 \left([E]_T - [ES] \right) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

$$k_1 [ES] [S] + k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = k_1 [E]_T [S]$$

$$[ES] = \frac{k_1 [E]_T [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]}$$

4. Dividere numeratore e denominatore per k_1 :

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

e sostituire il valore di $[ES]$ nell'equazione di velocità:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Equazione di Briggs e Haldane,
una terza espressione della stessa
relazione trovata da Henri e da
Michaelis e Menten

L'equazione di velocità di Henri-Michaelis-Menten assume una nuova forma, più generale

chiamando $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ costante di Michaelis-Menten, per

definizione di Haldane (1930), e ricordando che $V_{\max} = k_2 [E]_T$

l'equazione $v_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$ diventa:

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

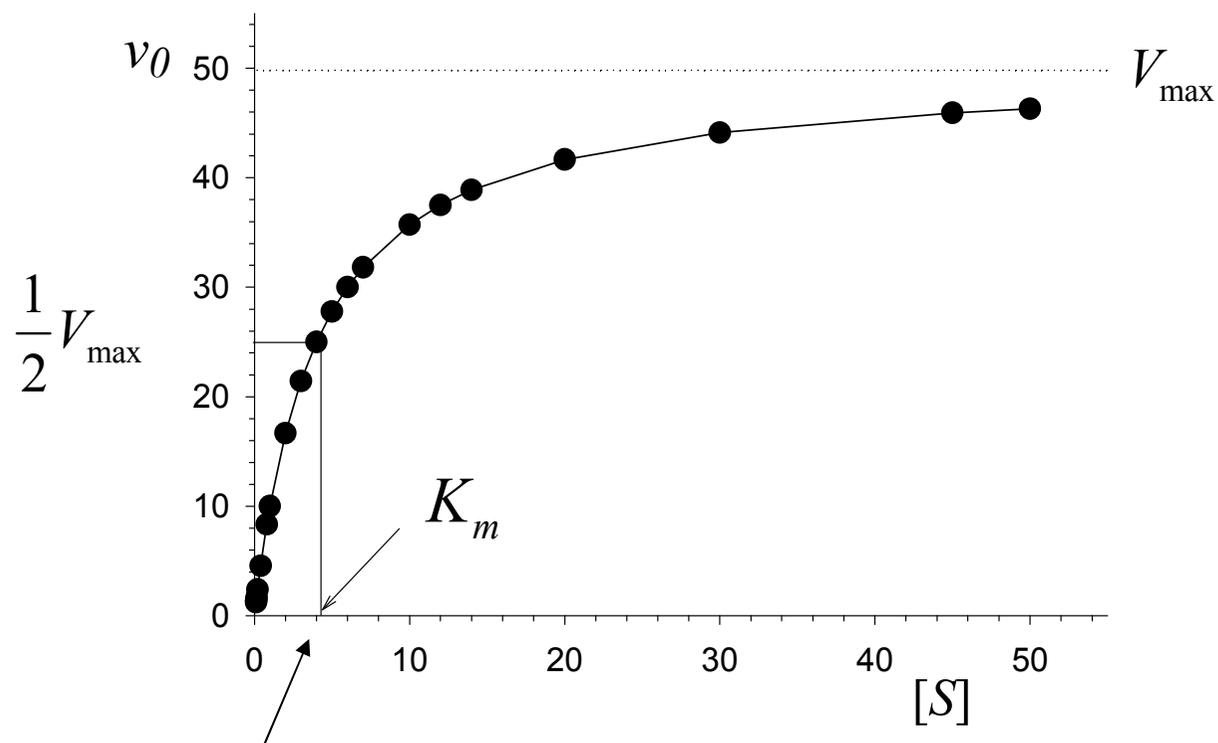
Equazione di Henri-Michaelis-Menten

Se effettivamente $k_2 \ll k_{-1}$ si ricade nell'ipotesi di Henri-Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{k_2 [E]_T [S]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [S]} = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_S + [S]}$$

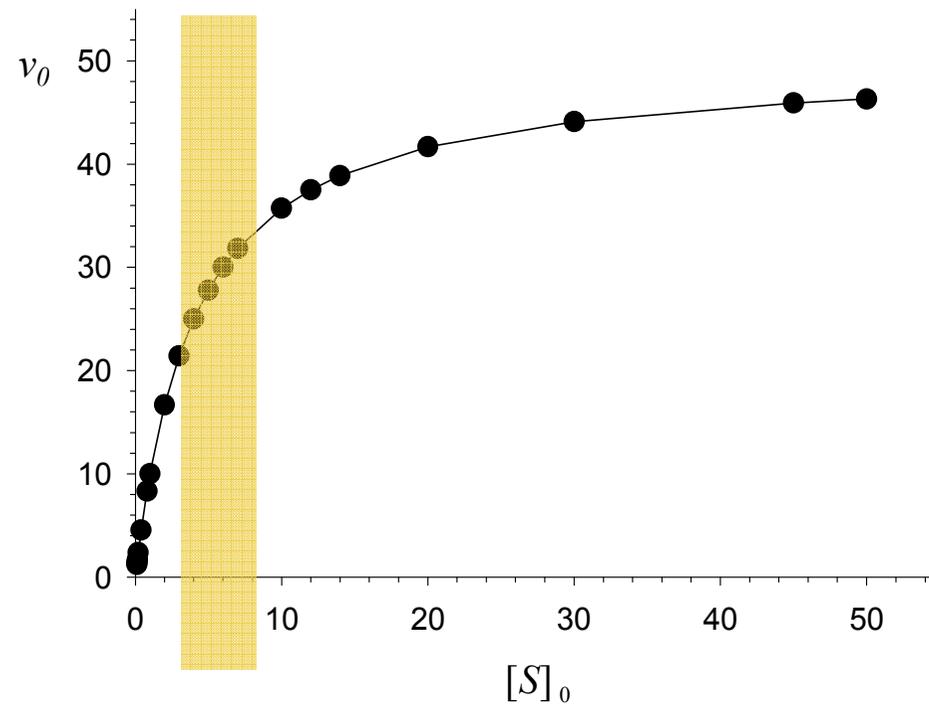
Rappresentazione dell'equazione di Henri-Michaelis-Menten

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



La K_m è numericamente equivalente alla K_S

Il valore K_m corrisponde alla concentrazione approssimativa del substrato in condizioni fisiologiche



Il valore della K_m suggerisce il grado di affinità dell'enzima per il substrato

interattivo

file: eq06_Michaelis[1]

Significato di k_2

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

- k_2 indica il numero di molecole trasformate in prodotto da un singolo enzima quando è saturato da substrato;*
- *ha le dimensioni di un tempo⁻¹ (sec⁻¹);*
 - *oscilla tra 10² e 10⁷*
 - *è detta anche costante catalitica (k_{cat}) o numero di turnover (talora indicato con k_p)*
 - *il reciproco equivale al tempo di un ciclo catalitico*

Costanti catalitiche di alcuni enzimi

enzima	substrato	k_2 (sec ⁻¹) (molecole di S/molecola di enzima in 1 s)
Catalasi	H ₂ O ₂	40.000.000
Anidrasi carbonica	HCO ₃ ⁻	400.0000
Acetilcolinesterasi	acetilcolina	14.000
Fumarasi	fumarato	800

Si racconta che nel 1934 il dr. Lineweaver, vedendo l'equazione di H.M.M.....

$$\frac{[S] + K_m}{[S]_{\max}} = v/v_0$$

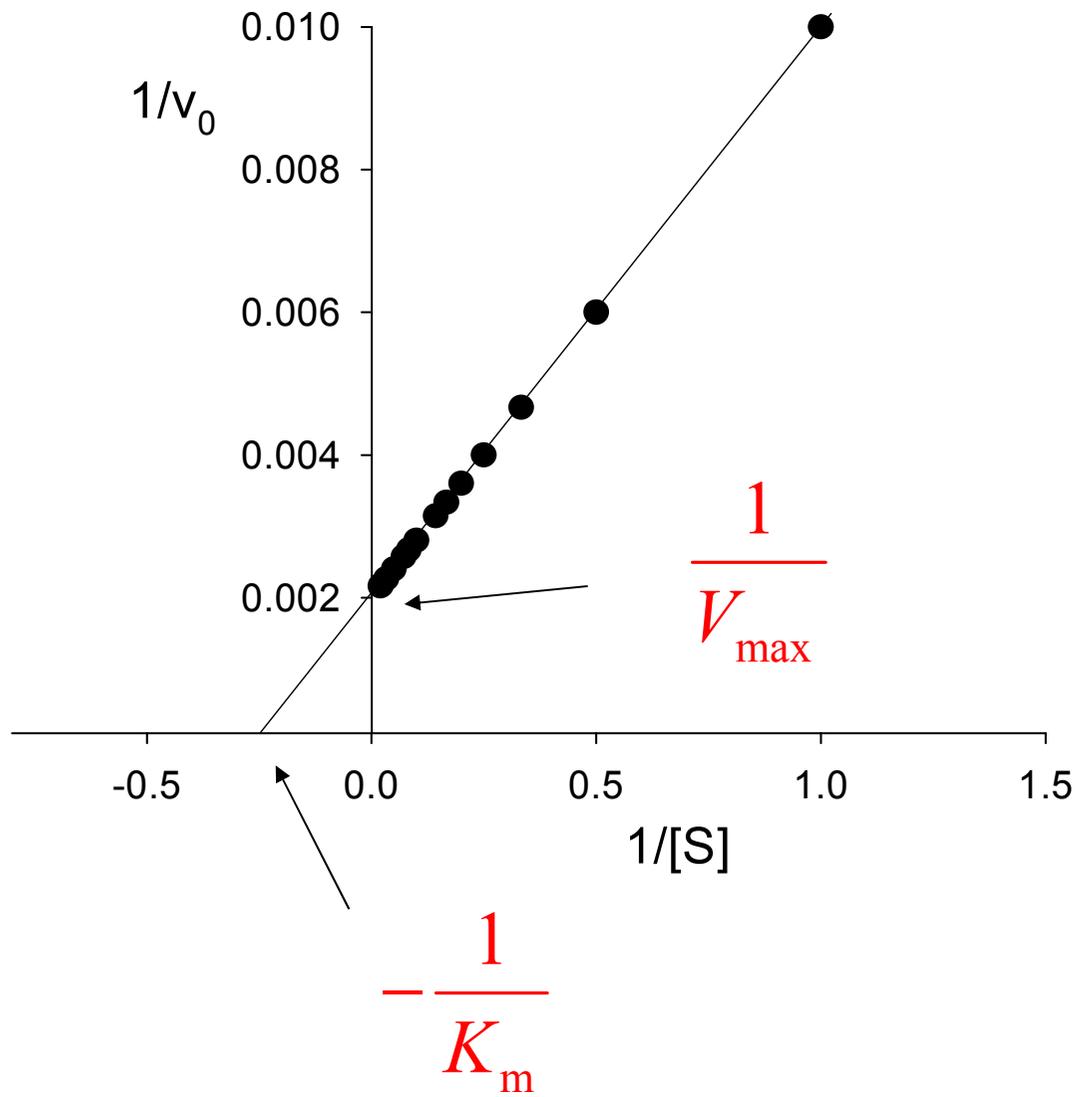
...avesse pensato che si poteva trasformare l'equazione in una forma più pratica.

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

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

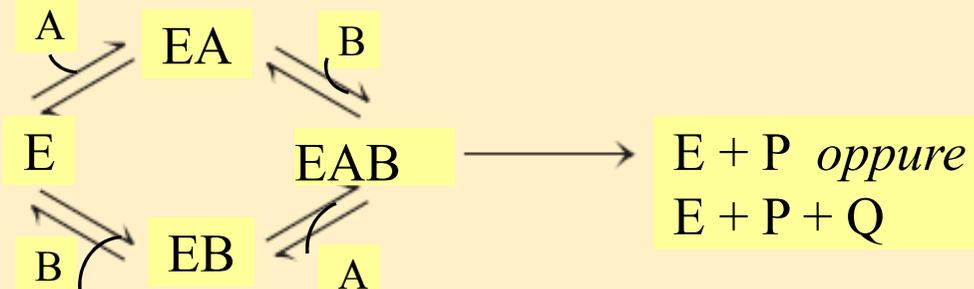
Equazione dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk



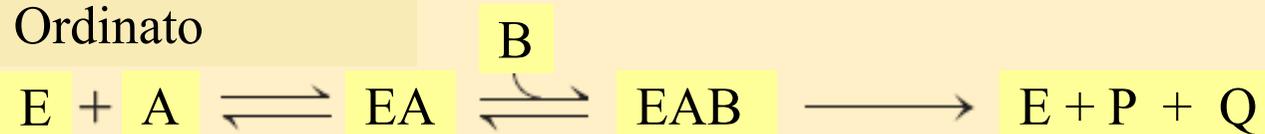
Reazioni enzimatiche con più di un substrato

Meccanismi sequenziali (si forma un complesso ternario)

Random

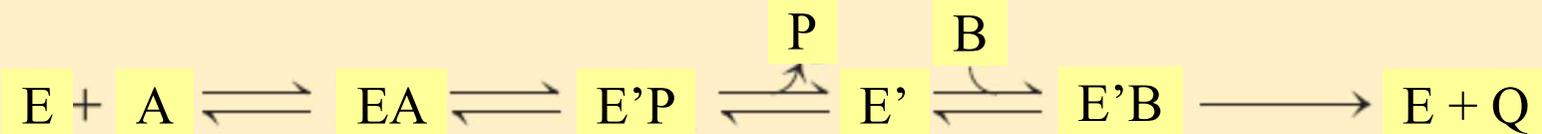


Ordinato



Meccanismi ping-pong

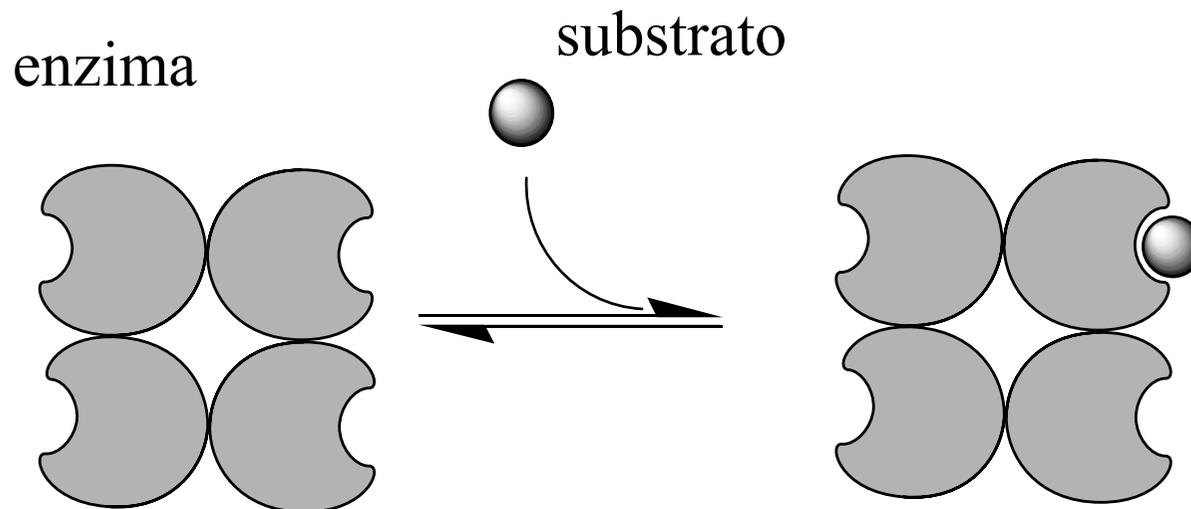
Meccanismi non sequenziali (non si forma un complesso ternario)



Enzimi con più siti catalitici: enzimi allosterici

Il legame di una molecola di substrato facilita il legame del substrato incrementando l'affinità per i siti vacanti.

Il fenomeno prende anche il nome di *cooperatività di legame* o *cooperatività positiva*



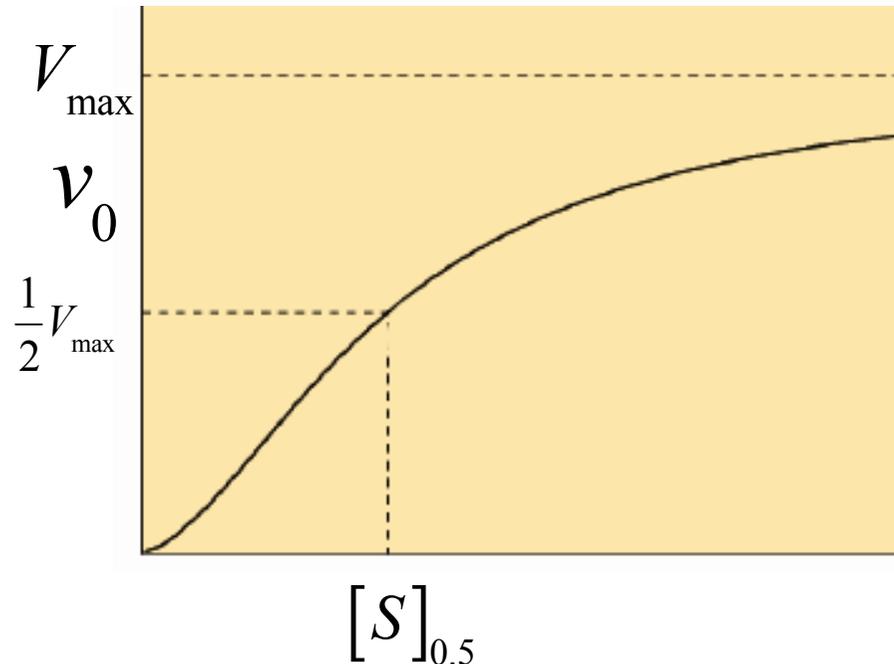
Esempio: Enzima con 4 catene polipeptidiche ognuna con un sito catalitico

Equazione di velocità per una cinetica sigmoidale:

$$v_0 = V_{\max} \frac{[S]^n}{K' + [S]^n}$$

dove n è detto coefficiente di Hill e:

$$K' = [S]_{50}^n$$



n **non** rappresenta il numero dei siti ma l'**indice di cooperatività** e assume valori (anche non interi) compresi tra 1 e il n° dei siti.

Ad esempio, se $n = 1.8$ può voler dire che l'enzima ha due siti con forte cooperatività oppure 3 o più con bassa cooperatività.

Se $n < 1$ si parla di *cooperatività negativa*; la curva non sigmoidale né iperbolica (raro)

Vantaggio di una cinetica sigmoidale

Qual è l'incremento di concentrazione di substrato se voglio portare un enzima da una velocità pari al 10% della V_{max} ad una pari al 90% della V_{max} ?

Riconsideriamo l'equazione di Henri-M-M.:

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} = \frac{[S]/K_m}{1 + [S]/K_m} = \frac{[S]'}{1 + [S]'} \quad \text{da cui:} \quad v' = \frac{[S]'}{1 + [S]'}$$

$$\text{riarrangiata:} \quad [S]' = \frac{v'}{1 - v'}$$

$$[S]_{10}' = \frac{v'}{1 - v'} = \frac{10}{100 - 10} = \frac{1}{9} = 0.11$$

$$[S]_{90}' = \frac{v'}{1 - v'} = \frac{90}{100 - 90} = \frac{9}{1} = 9 \quad \text{risposta} = \frac{[S]_{90}'}{[S]_{10}'} = \frac{9}{0.11} = 81$$

Risposta: occorre un incremento di ben 81 volte

Ripetiamo applicando l'equazione di velocità sigmodale

$$\frac{v_0}{V_{\max}} = v' = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n}$$

$$[S]_{10} = \sqrt[n]{\frac{K'}{9}}$$

$$[S]_{90} = \sqrt[n]{9K'}$$

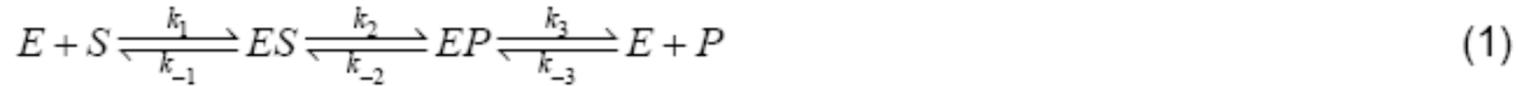
$$\frac{[S]_{90}}{[S]_{10}} = \frac{\sqrt[n]{9K'}}{\sqrt[n]{\frac{K'}{9}}} = \sqrt[n]{\frac{9}{1/9}} = \sqrt[n]{81}$$

$$\text{Se } n = 3 \quad \frac{[S]_{90}}{[S]_{10}} = \sqrt[3]{81} = 9$$

E' sufficiente incrementare [S] di sole 9 volte!

Appendice

Derivazione dell'equazione di velocità allo stato stazionario considerando tutti gli intermedi



L'equazione di velocità di formazione del prodotto è la seguente:

$$v = k_3 [EP] - k_{-3} [E][P] \quad (2)$$

Per lo stato stazionario valgono le seguenti equazioni:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] + k_{-2} [EP] - (k_{-1} + k_2) [ES] = 0 \quad (3)$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_2 [ES] + k_{-3} [E][P] + (k_{-2} + k_3) [EP] = 0 \quad (4)$$

considerando che:

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EP] \quad (5)$$

$$[P] = 0 \quad (6)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E]_T - [ES] + [EP])[S] + k_{-2}[EP] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (7)$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] + (k_{-2} + k_3)[EP] = 0 \quad (8)$$

Pertanto vale anche:

$$v_0 = k_3[EP] \quad (9)$$

dove v_0 è la *velocità iniziale*.

In base alla (9) risulta che:

$$[EP] = \frac{k_2[ES]}{(k_{-2} + k_3)} \quad (10)$$

$$v_0 = k_3 \frac{k_2[ES]}{(k_{-2} + k_3)} \quad (11)$$

Sostituendo la (10) nella (7) ed eseguendo le successive operazioni algebriche si ha che:

$$k_1 \left([E]_T - [ES] + \frac{k_2[ES]}{(k_{-2} + k_3)} \right) [S] + k_{-2} \frac{k_2[ES]}{(k_{-2} + k_3)} - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (12)$$

$$[E]_T [S] - [ES] [S] + \frac{k_2 [ES] [S]}{(k_{-2} + k_3)} + k^{-2} \frac{k_2 [ES]}{k_1 (k_{-2} + k_3)} - \frac{(k_{-1} + k_2) [ES]}{k_1} = 0 \quad (13)$$

$$[E]_T [S] - [ES] \left(\frac{k_1 (k_{-2} + k_3) [S] + k_1 k_2 [S] - k_2 k_{-2} + (k_{-1} + k_2) (k_{-2} + k_3)}{k_1 (k_{-2} + k_3)} \right) = 0 \quad (14)$$

$$[ES] \left(\frac{k_1 (k_{-2} + k_3) [S] + k_1 k_2 [S] - \cancel{k_2 k_{-2}} + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + \cancel{k_2 k_{-2}} + k_2 k_3}{k_1 (k_{-2} + k_3)} \right) = [E]_T [S] \quad (15)$$

$$[ES] = \frac{k_1 (k_{-2} + k_3) [E]_T [S]}{k_1 (k_{-2} + k_3) [S] + k_1 k_2 [S] + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3} \quad (16)$$

Ora, sostituendo la (16) nella (11) si ha che:

$$v_0 = k_3 \frac{k_2}{(\cancel{k_{-2} + k_3})} \frac{k_1 (\cancel{k_{-2} + k_3}) [E]_T [S]}{k_1 (k_{-2} + k_3) [S] + k_1 k_2 [S] + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3} \quad (17)$$

Isolando $[S]$ si ha che:

$$v_0 = k_3 \frac{k_1 k_2 [E]_T [S]}{k_1 (k_{-2} + k_3 + k_2) [S] + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3} \quad (18)$$

$$v_0 = k_3 \frac{\cancel{k_1} k_2 [E]_T [S] / \cancel{k_1} (k_{-2} + k_3 + k_2)}{[S] + (k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3) / \cancel{k_1} (k_{-2} + k_3 + k_2)} \quad (19)$$

$$v_0 = \frac{k_{cat} [E]_T [S]}{K_m + [S]} \quad (20)$$

dove:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3 + k_2} \quad \text{e} \quad K_m = \frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_{-2} + k_3 + k_2} \quad (21)$$

Equazione di velocità in presenza di prodotto

$$v_{0_S} = \frac{V_{\max_S} [S]}{K_{m_S} + [S]} \quad v_{0_P} = \frac{V_{\max_P} [P]}{K_{m_P} + [P]}$$

$$v_{netta} = k_2 [ES] - k_{-2} [E][P]$$

allo stato stazionario:

$$k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = k_1 [E][S] + k_{-2} [E][P]$$

seguendo la procedura già descritta si ottiene:

$$v_{netta} = \frac{\frac{V_{\max_S} [S]}{K_{m_S}} - \frac{V_{\max_P} [P]}{K_{m_P}}}{1 + \frac{[S]}{K_{m_S}} + \frac{[P]}{K_{m_P}}}$$

Caso in cui [S] non è molto maggiore di [E]

$$[S]_{\text{libero}} = [S]_{\text{totale}} - [ES]$$

$$K_S = \frac{([E]_T - [ES])([S]_T - [ES])}{[ES]}$$

$$\frac{v_0}{V_{\max}} = \frac{([E]_T + [S]_T + K_S) - \sqrt{([E]_T + [S]_T + K_S)^2 - 4[E]_T[S]_T}}{2[E]_T}$$

$$\frac{[S]_T}{v} = K_S \frac{1}{V_{\max} - v} + \frac{[E]_T}{V_{\max}}$$

equazione di Henderson (1973)