

La cinetica enzimatica

ENZIMI

- ❑ Gli enzimi sono macromolecole biologiche di natura quasi esclusivamente proteica, con gruppi funzionali sui quali hanno luogo scambi o trasformazioni di sostanze
- ❑ Svolgono una funzione di catalizzatori (biologici), cioè accelerano le reazioni chimiche

Il ΔG è utile per comprendere il funzionamento degli enzimi

L'energia libera (G) è una funzione termodinamica che rappresenta una misura dell'energia utile, cioè dell'energia in grado di compiere un lavoro

Ad una reazione chimica è sempre associata una variazione di energia:

$$\Delta G = G (\text{prodotti}) - G (\text{reagenti})$$

$\Delta G < 0$ reazione esoergonica (la trasformazione dei reagenti nei prodotti avviene spontaneamente)

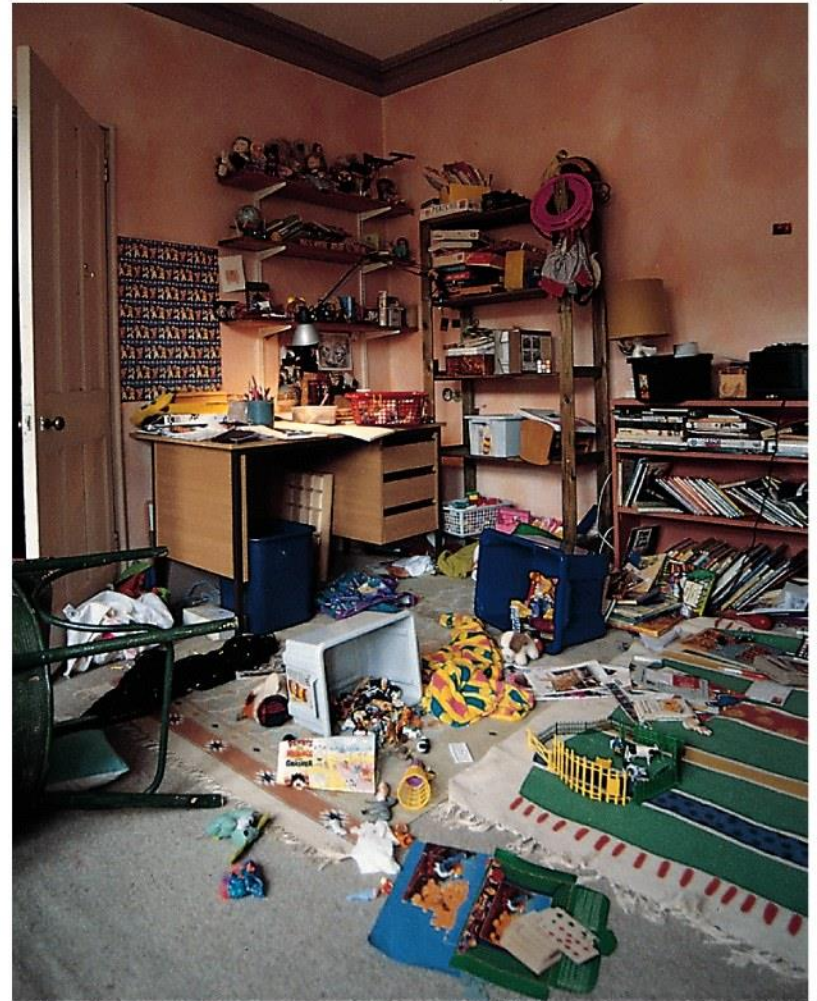
$\Delta G = 0$ la reazione è all'equilibrio

$\Delta G > 0$ reazione endoergonica (la trasformazione dei reagenti nei prodotti NON avviene spontaneamente)

L'energia libera misura la spontaneità di una reazione

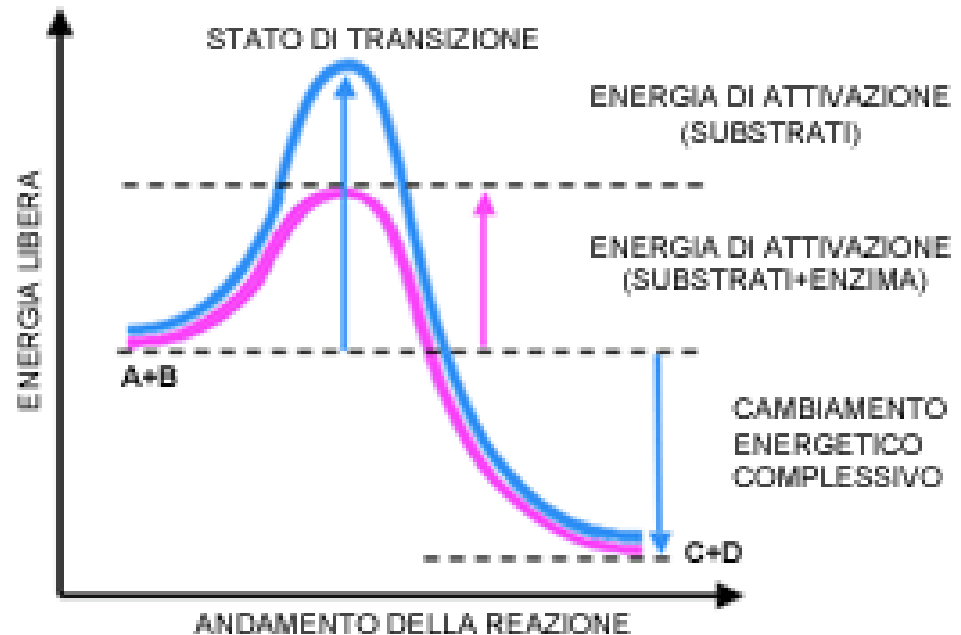
"SPONTANEOUS" REACTION

as time elapses



ORGANIZED EFFORT REQUIRING ENERGY INPUT

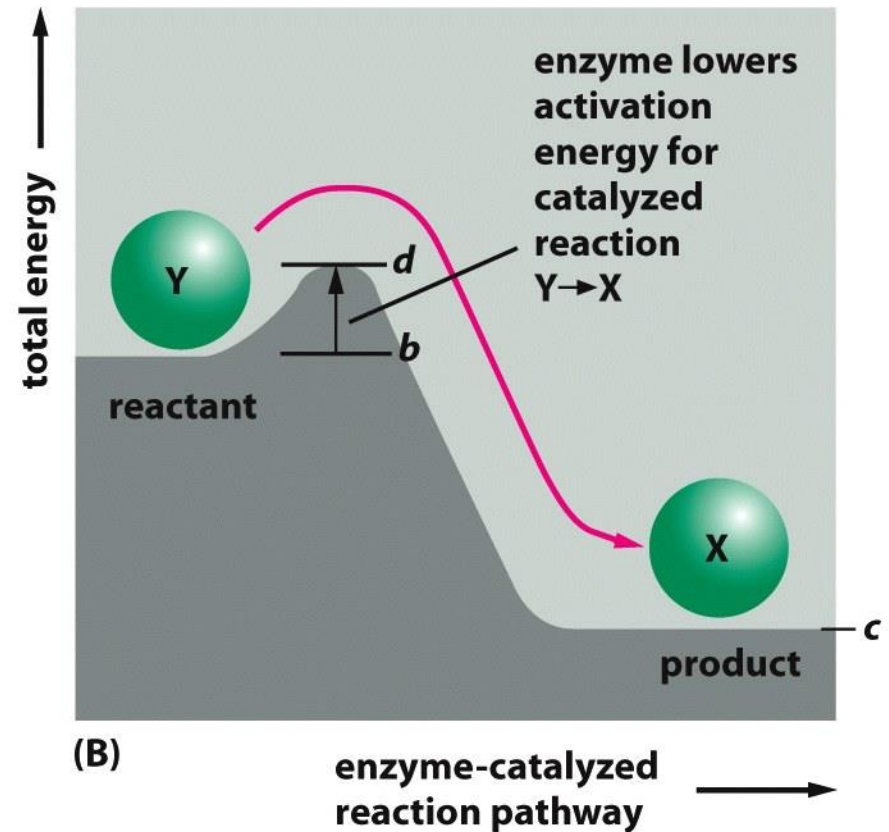
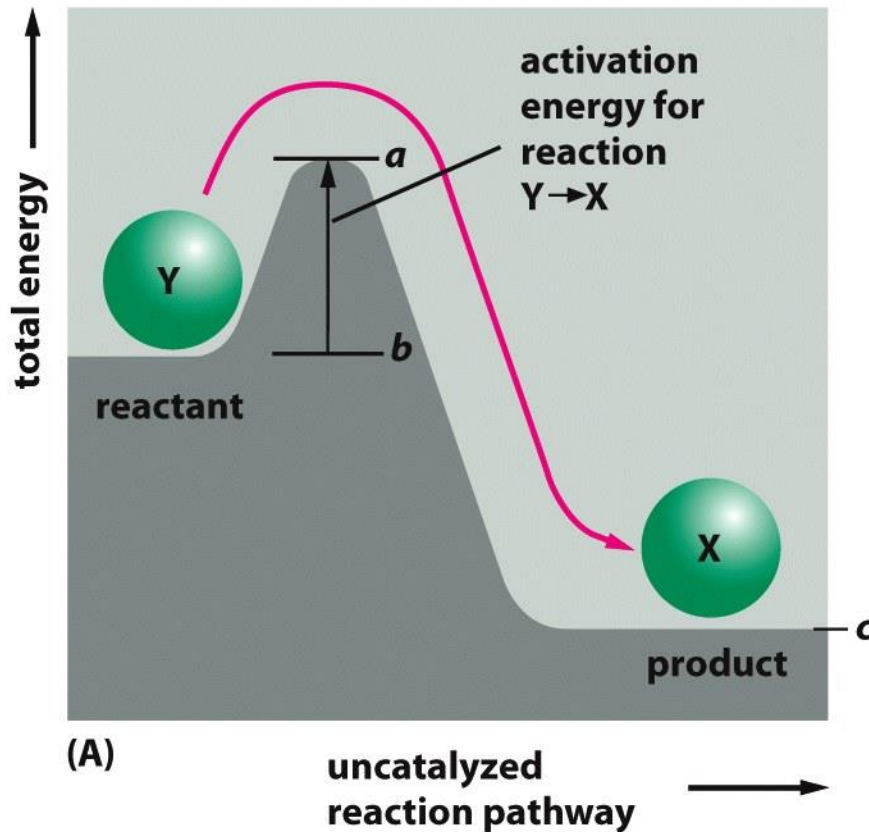
- ❑ Il ΔG non fornisce informazioni sulla velocità di reazione
- ❑ $\Delta G < 0$ non significa che la reazione (spontanea) avviene ad una velocità apprezzabile
- ❑ Gli enzimi aumentano la velocità, ma non influenzano la posizione dell'equilibrio



Enzimi. Gli enzimi svolgono la loro funzione come catalizzatori diminuendo l'energia di attivazione necessaria affinché una determinata reazione possa avvenire spontaneamente.

Energia di attivazione

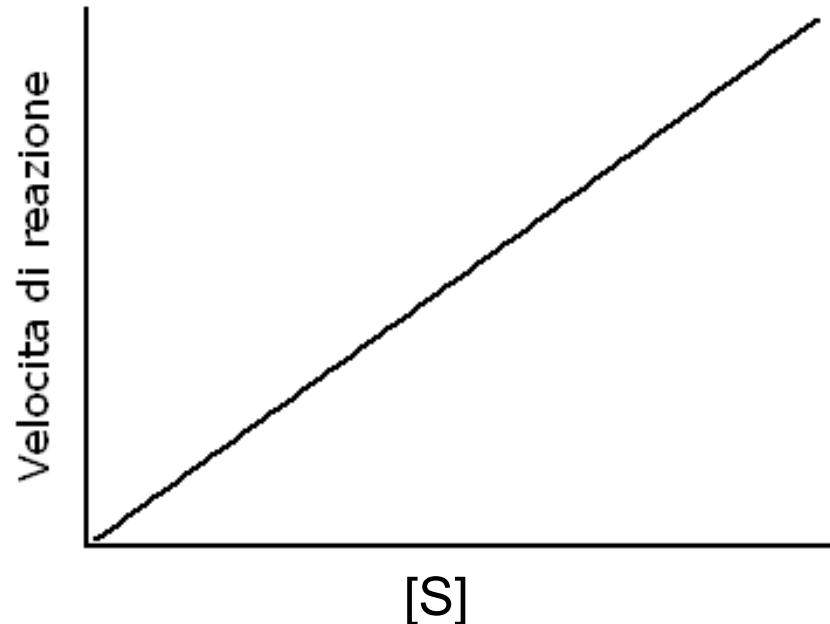
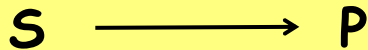
La conversione $Y \rightarrow X$ è termodinamicamente favorevole (X si trova ad uno stato energetico inferiore rispetto a Y), ma la reazione non può avvenire se Y non acquisisce sufficiente energia per superare la barriera dell'energia di attivazione



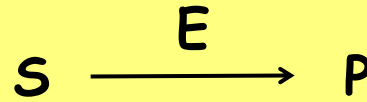
- Non spostano l'equilibrio della reazione, ma aumentano la velocità con cui l'equilibrio viene raggiunto
- Gli enzimi si combinano in modo transiente col substrato abbassandone l'energia di attivazione
- Non subiscono modifiche permanenti durante la reazione e sono subito disponibili per catalizzare un nuovo ciclo di reazione

- L'**attività di un enzima** viene misurata come velocità della reazione da esso catalizzata
- La **velocità di reazione** viene misurata in termini di quantità di substrato trasformato, o di prodotto che si forma, nell'unità di tempo
- La velocità delle reazioni chimiche è soggetta a leggi chimico-fisiche ben definite che consentono di ricavare delle equazioni della velocità diverse a seconda del tipo di reazione. Queste equazioni mettono in relazione la velocità di reazione con la concentrazione dei reagenti

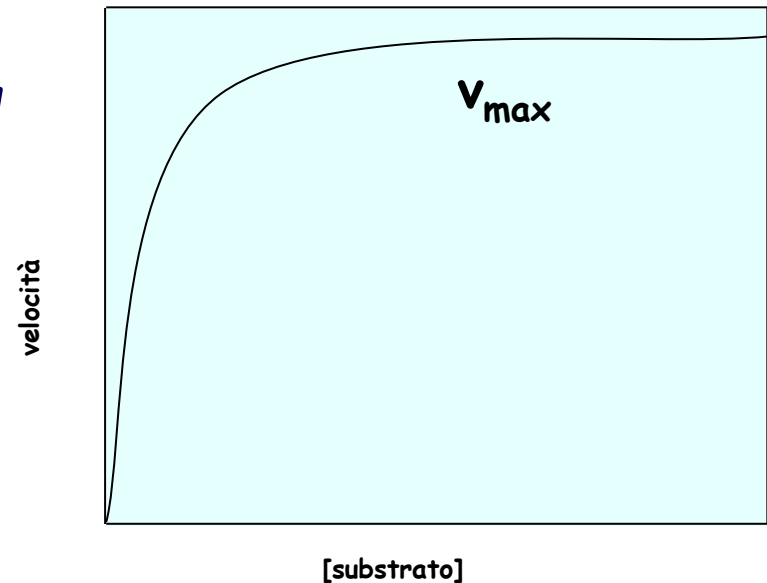
- In una reazione chimica non catalizzata, la velocità di reazione è direttamente proporzionale a $[S]$ e il grafico velocità-concentrazione è una linea retta

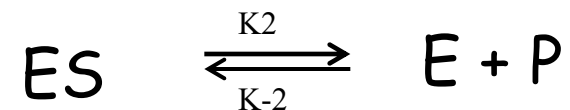
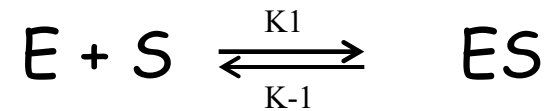
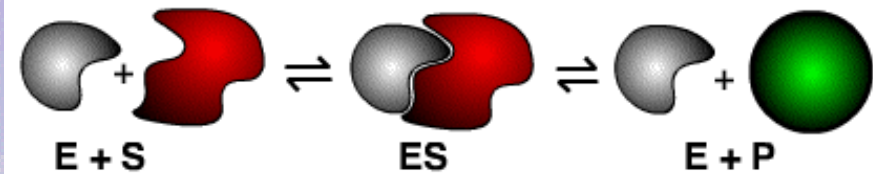
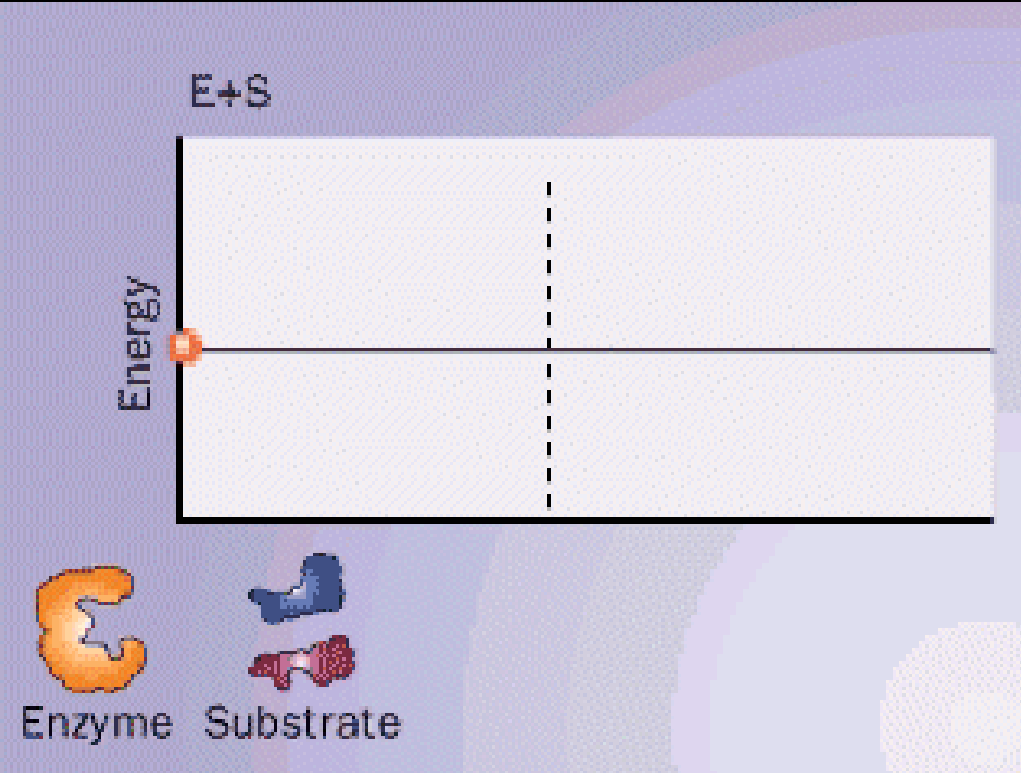


CINETICA ENZIMATICA



- ❑ In una reazione enzimatica, la dipendenza della velocità di reazione dalla $[S]$ non è costante, ma varia al variare della concentrazione del substrato stesso
- ❑ Il grafico velocità- $[S]$ è un'iperbole rettangolare, dove la velocità v e $[S]$ sono le due variabili



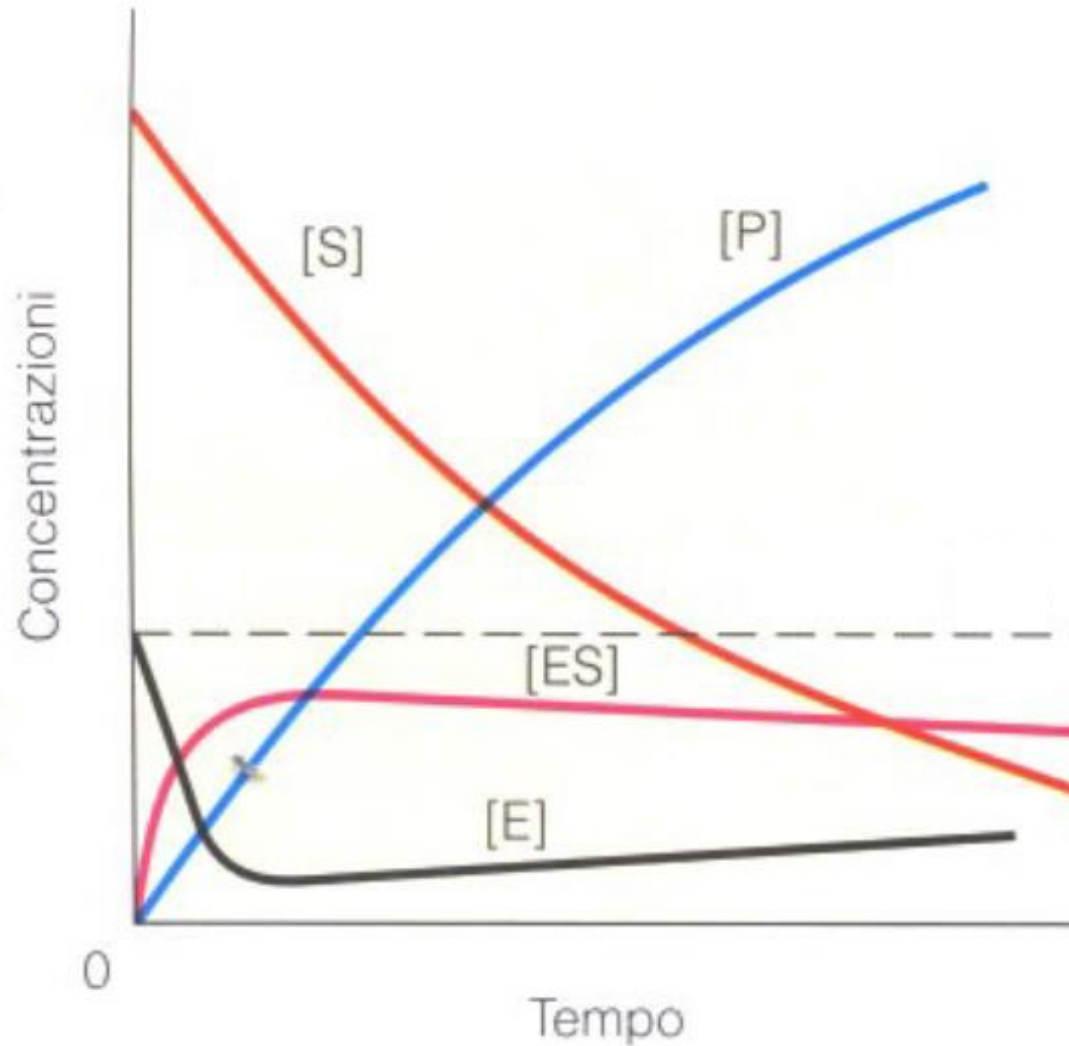


La formazione del complesso enzima-substrato (ES) è la prima tappa nella catalisi enzimatica (step veloce).

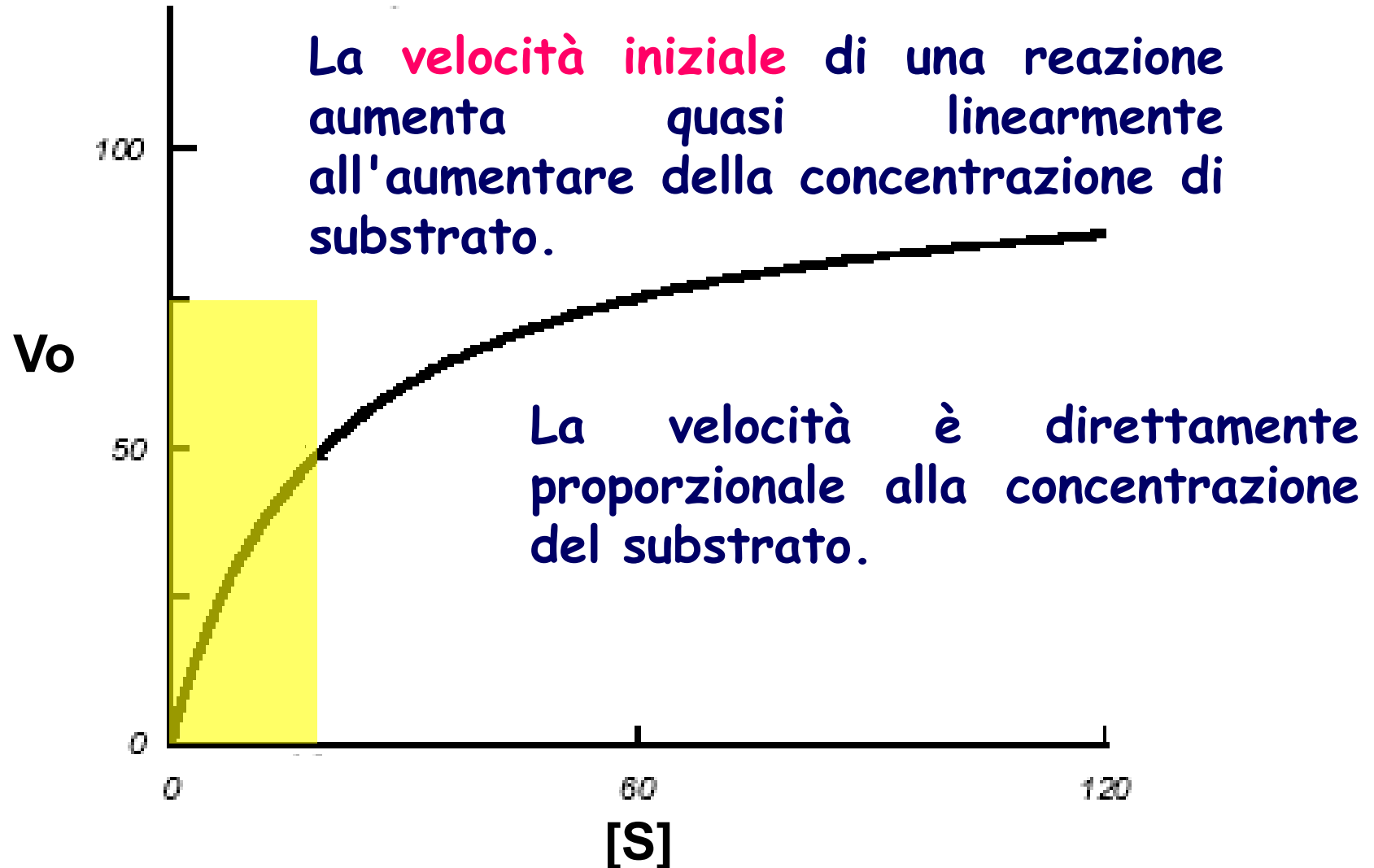
ES è un intermedio di reazione il cui basso valore di energia di attivazione permette di fare avvenire una specifica reazione catalizzata

La seconda reazione è più lenta e quindi limita la velocità globale.

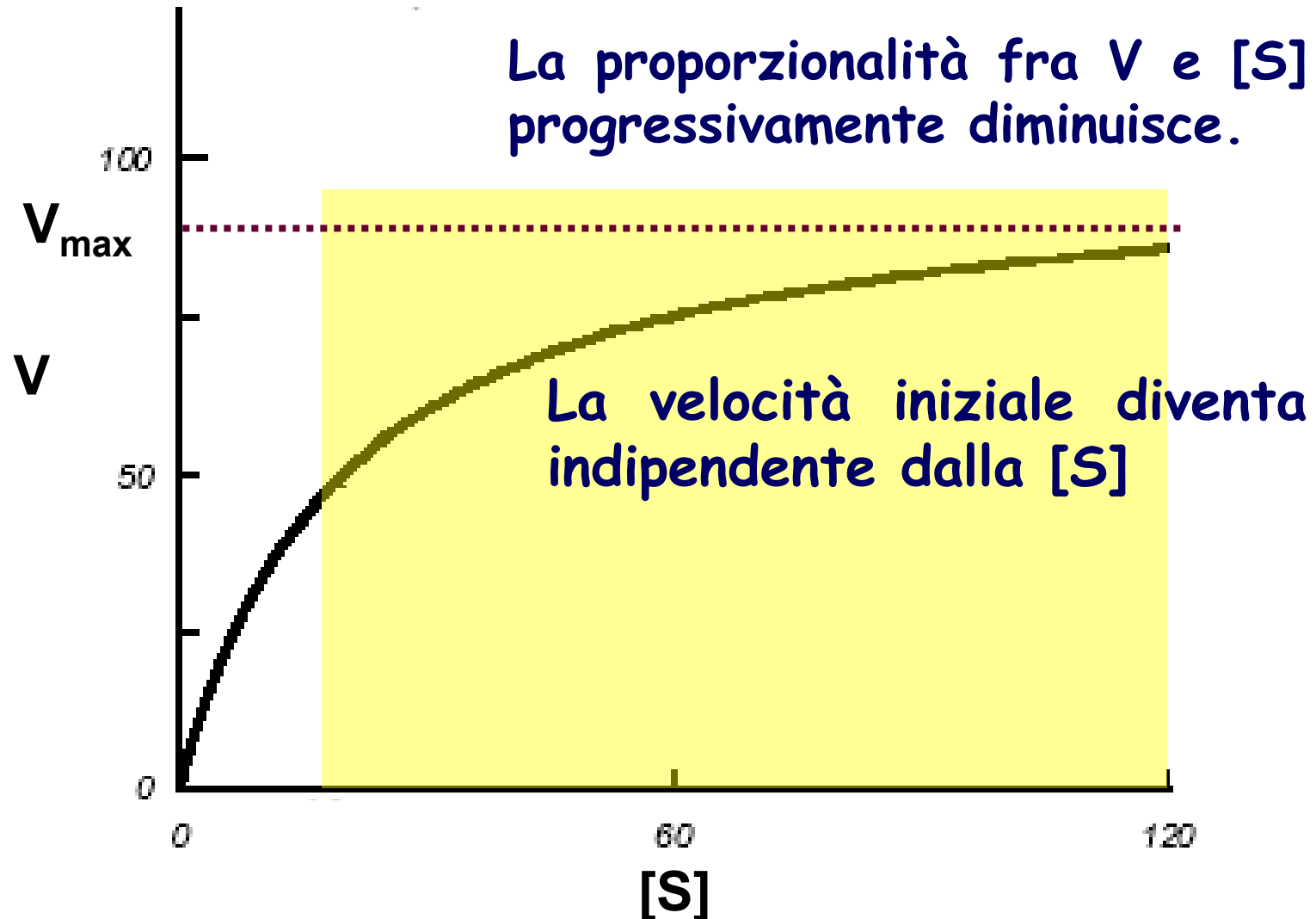
In qualsiasi istante, l'enzima è presente nella forma libera e in quella combinata. Se la $[S]$ è bassa, l'enzima sarà per lo più nella forma libera; via via che la $[S]$ tende ad aumentare viene favorita la formazione di ES .

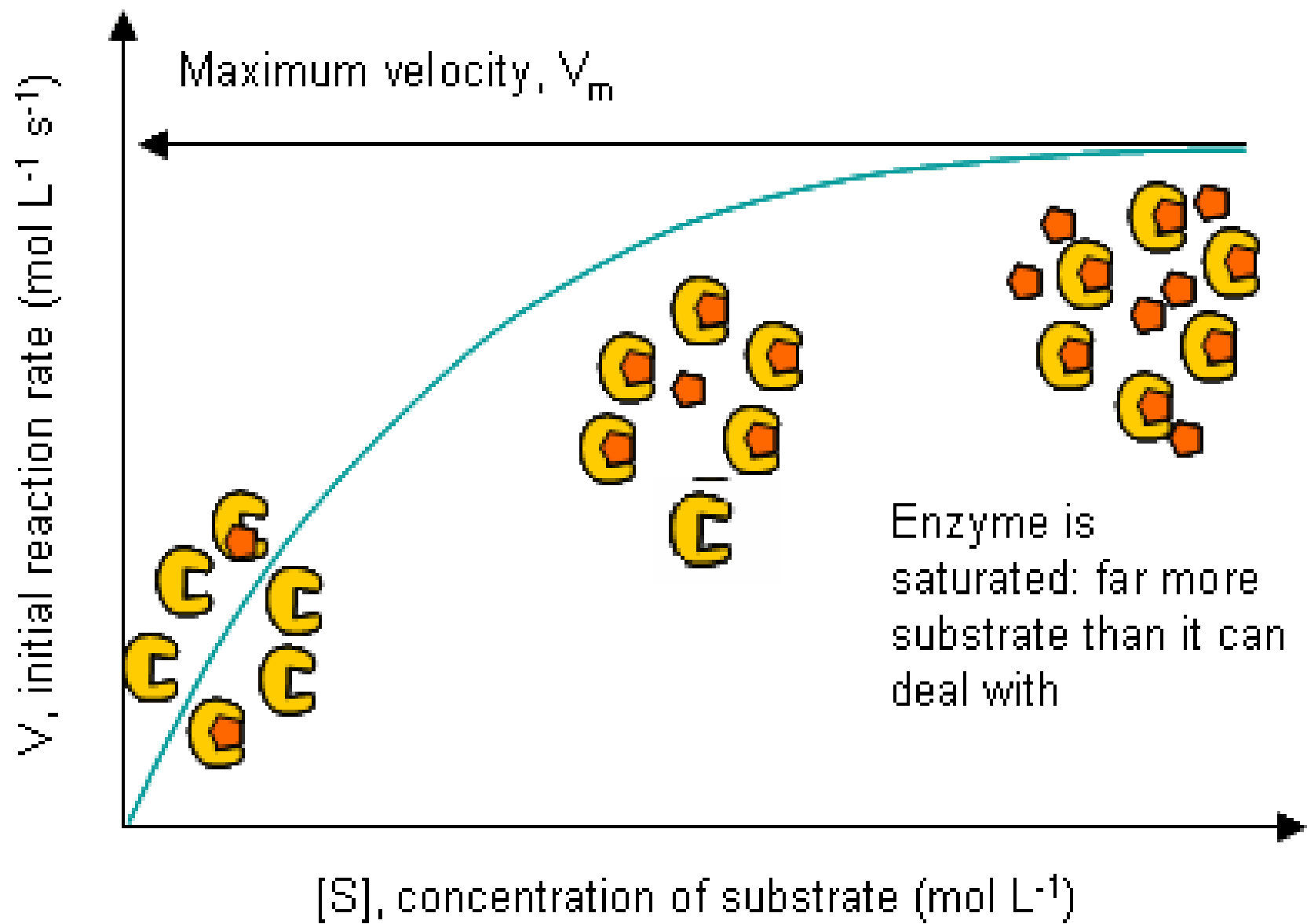


Cinetica Enzimatica

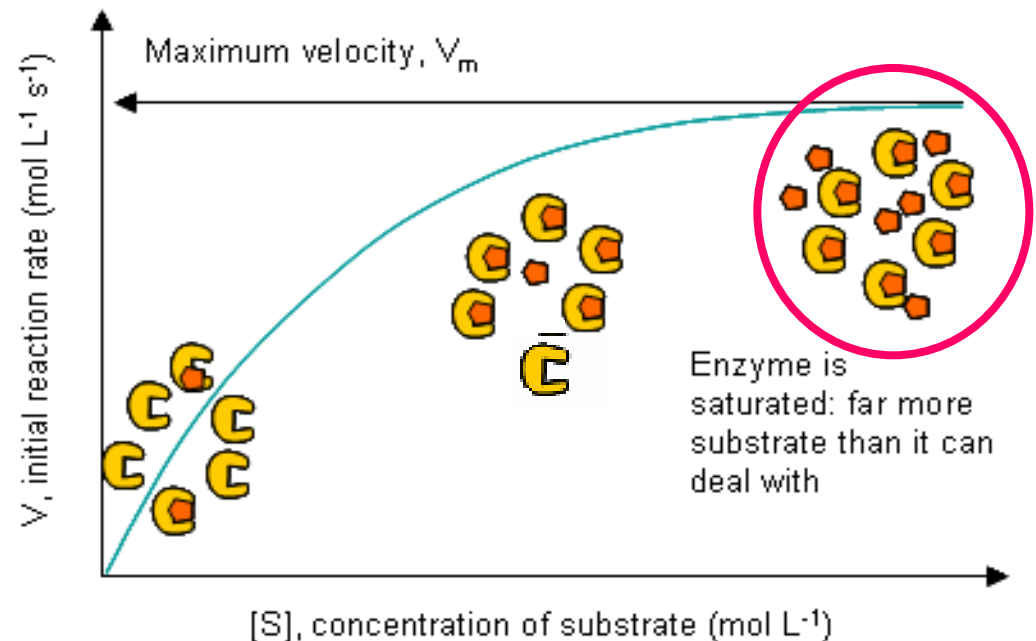


Cinetica Enzimatica

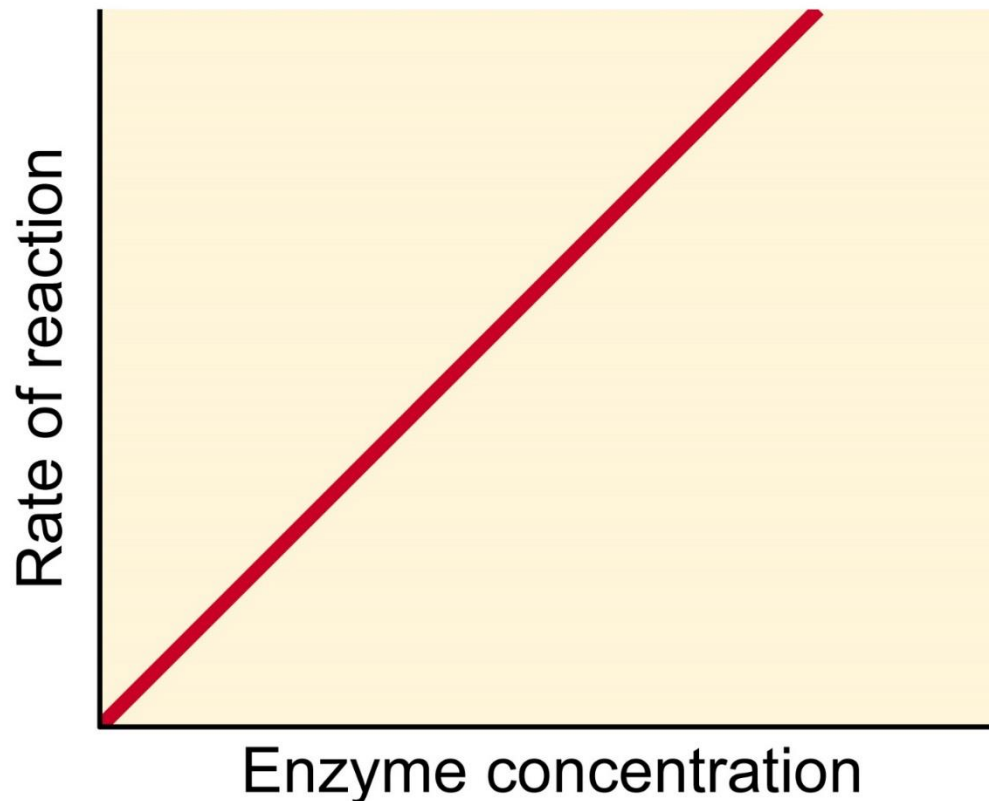




- ❑ La velocità iniziale massima della reazione (V_{max}) si osserva quando tutto l'enzima è presente sotto forma di complesso ES.
- ❑ Questa condizione esiste solo quando $[S]$ è elevata. L'effetto saturante del substrato è responsabile dell'appiattimento della curva.



□ Ad alte concentrazioni di substrato, l'enzima è saturato, perciò $[ES] = [E]$, da cui $V_{\max} = k_2[E]$



- L'equazione che descrive la relazione velocità-[S] in una reazione enzimatica è l'equazione di Michaelis-Menten

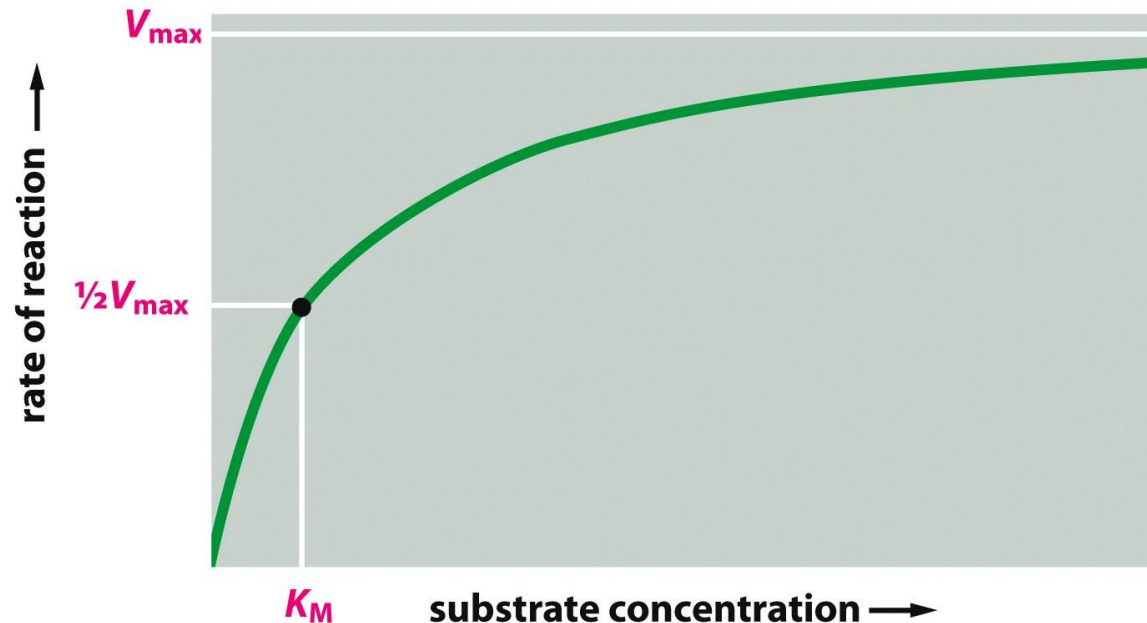


Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

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





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

costante di Michaelis-Menten

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

Se $K_m = [S] \rightarrow V = 1/2 V_{\max}$



K_m è la concentrazione di substrato in cui $V = \frac{1}{2} V_{\max}$

-ergo-

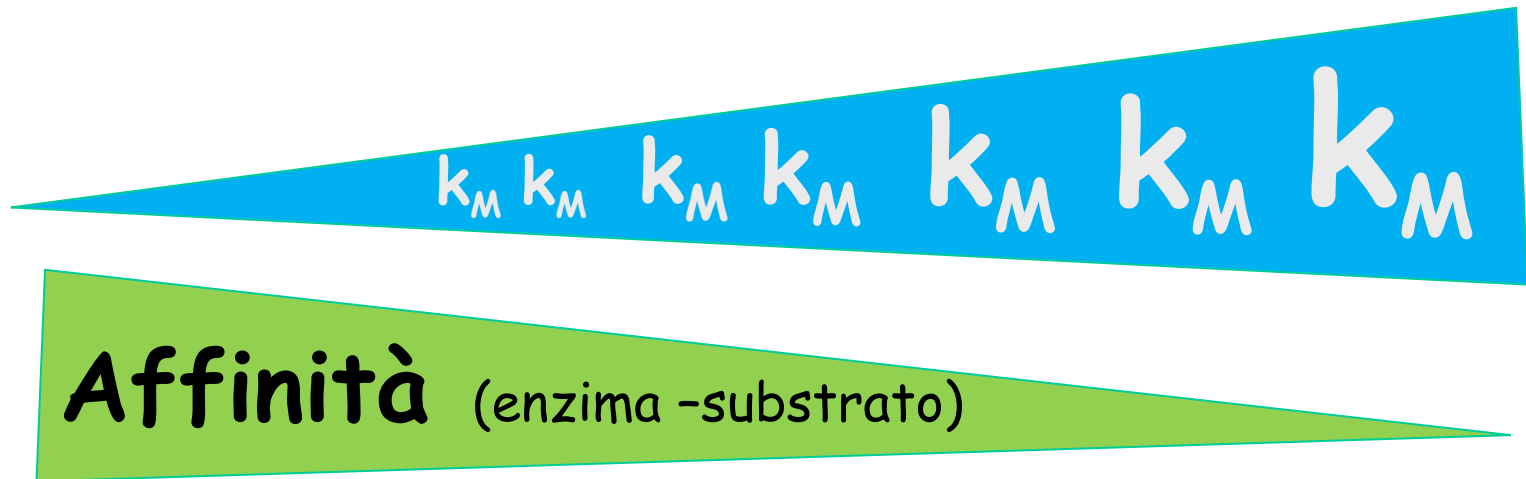
K_m è concentrazione di substrato che satura il 50% dell'enzima

La costante di Michaelis (K_M)



$$K_M = K_2 + K_{-1} / K_1$$

K_2 è la costante che limita la velocità (stadio lento) per cui è $\gg$ di K_{-1} che è la costante di dissociazione del complesso ES



K_M fornisce una misura della $[S]$ richiesta affinché la catalisi abbia luogo

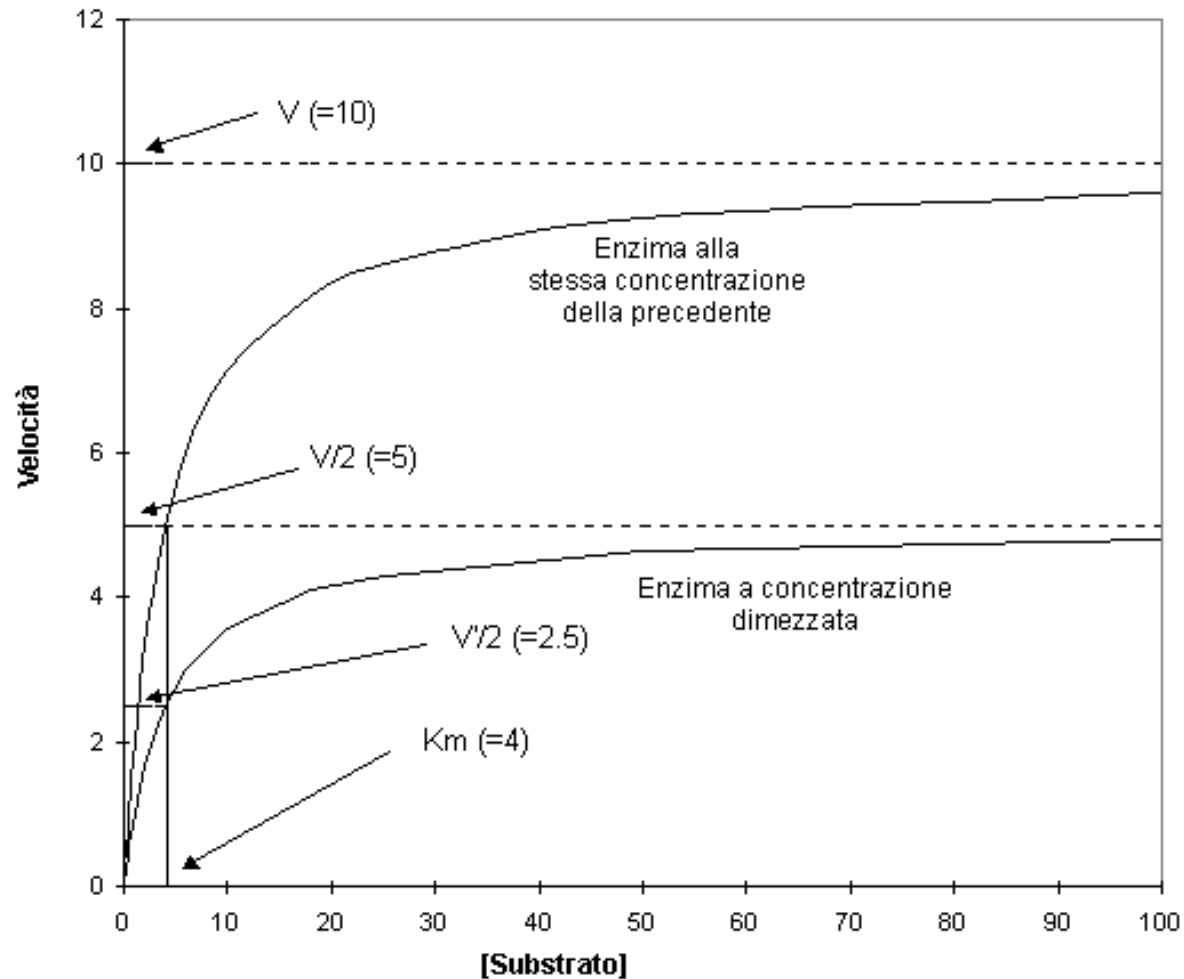
$$V_{\max} = k_2[E]$$

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

L'equazione può essere scritta in una forma diversa che evidenzia la dipendenza della velocità, oltre che dalla concentrazione di substrato, dalla concentrazione di enzima

$$v = k_2 \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Effetto di $[E]$ su V_{max} e K_m



V_{max} è direttamente proporzionale alla $[E]$

K_m è indipendente dalla $[E]$ e dalla $[S]$

K_M e $V_{\max}$ sono importanti caratteristiche degli enzimi

La $V_{\max}$ esprime il numero di turnover degli enzimi, cioè il numero di molecole di substrato convertite in prodotto da una molecola enzimatica nell'unità di tempo quando l'enzima è totalmente saturato dal substrato-

Il numero di turnover dipende da k_2 che può anche essere definita k_{cat}

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



$$k_{cat} = k_2 \quad V_{max} = k_{cat} [E_T]$$



efficienza catalitica

Il rapporto k_{cat}/K_M è una misura dell'efficienza catalitica

Quando $[S]$ è molto più elevata di K_M la velocità della reazione catalizzata è uguale a V_{max}

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

table 8-8

Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8
Triose phosphate isomerase	Glyceraldehyde 3-phosphate	4.3×10^3	4.7×10^{-4}	2.4×10^8

Source: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W.H. Freeman and Company, New York.

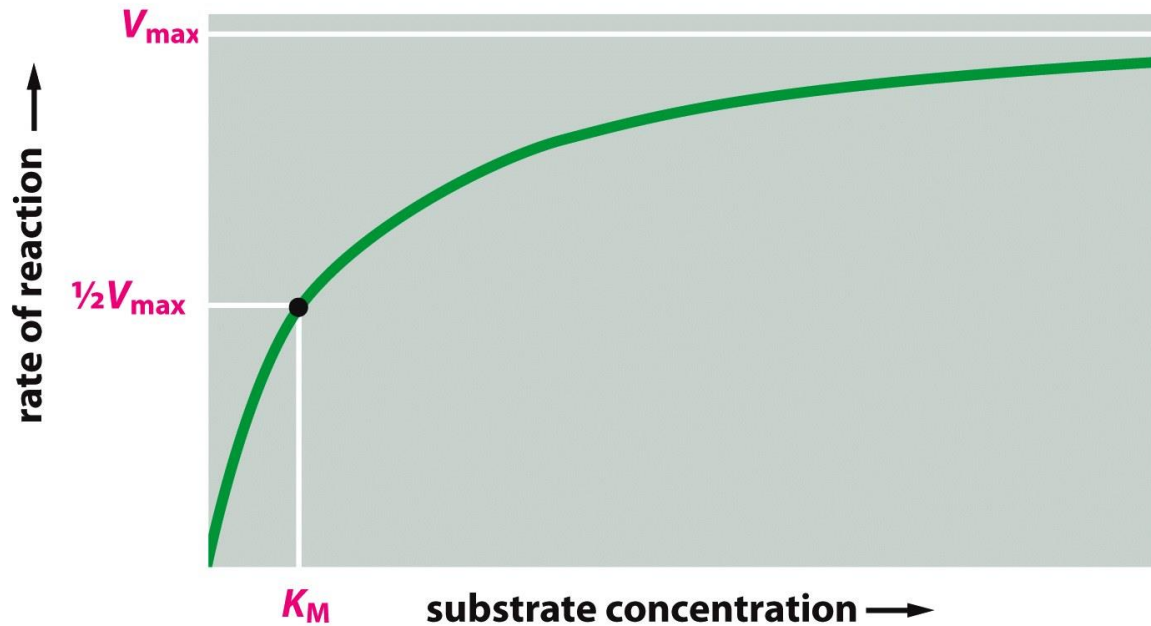
Riassumendo...



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960



A bassa $[S]$, la velocità V aumenta quasi linearmente con l'aumentare di $[S]$. All'aumentare di $[S]$, gli aumenti di V diventano via via più piccoli. L'asintoto rappresenta la velocità massima della reazione, $V_{\max}$ che non può essere superata indipendentemente dall'aumento di $[S]$, perché ad alta $[S]$ l'enzima è saturato.

La concentrazione di substrato che produce una V pari alla metà di $V_{\max}$ è detta costante di Michaelis-Menten, K_m .



- Ad elevata $[S]$, lo stadio limitante della reazione è la conversione del complesso ES a $P + E$
- Di conseguenza, $V_{\max}$ rappresenta una misura diretta dell'abilità dell'enzima di convertire il substrato in prodotto, cioè della **attività enzimatica**
- K_m è una espressione della **affinità** dell'enzima per il substrato:
 - **basso** valore di K_m $\longrightarrow$ **alta** affinità
 - **alto** valore di K_m $\longrightarrow$ **bassa** affinità

Calcolo dei parametri cinetici $V_{\max}$ e K_m

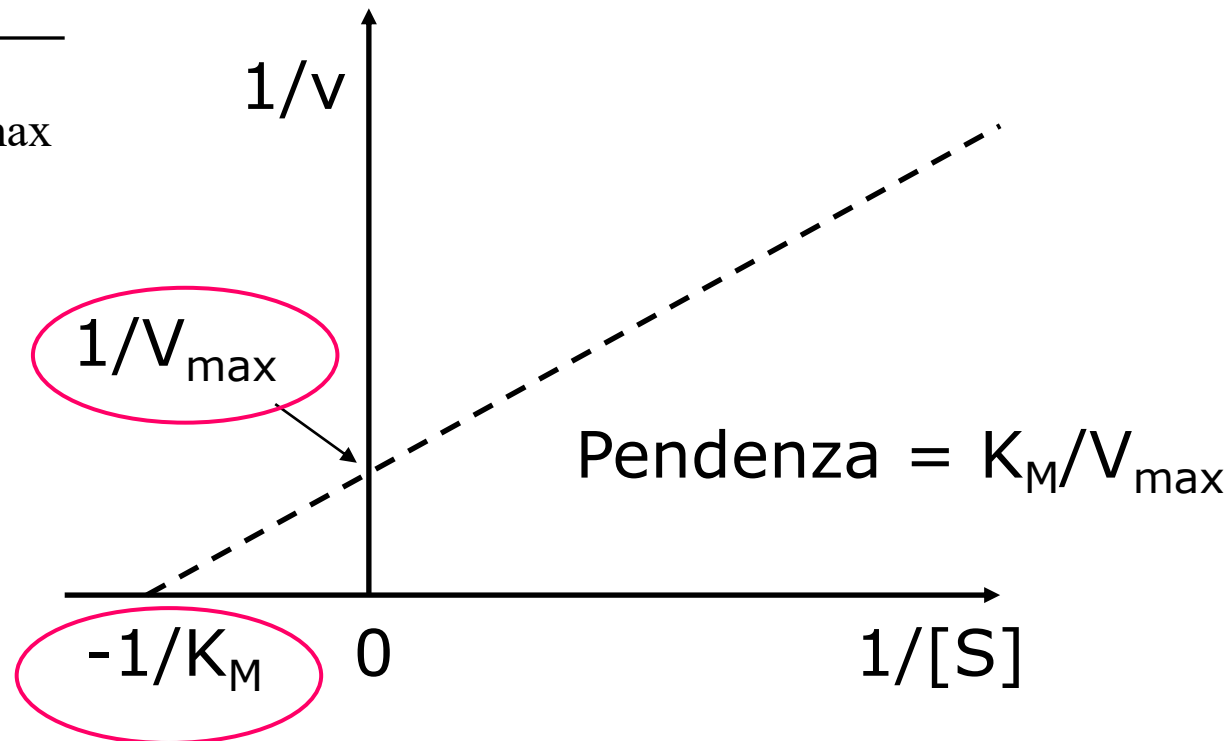
Dal grafico di M&M non è agevole calcolare la velocità massima della reazione, perché ad alte $[S]$ la curva ha un andamento asintotico. Per questo motivo si usa l'elaborazione di Lineweaver-Burk che permette di linearizzare l'equazione tramite il calcolo dei doppi reciproci.

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

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

Nel grafico dei doppi reciproci (o di **Lineweaver-Burk**), si riporta graficamente l'andamento di $1/V$ in funzione di $1/[S]$. In tal modo si ottiene una retta con intercetta sull'asse delle ascisse nel punto $-1/K_m$, sull'asse delle ordinate nel punto $1/V_{max}$ e con pendenza pari al rapporto K_m/V_{max} .

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



UNITÀ DI MISURA

- Un enzima può essere misurato in termini di concentrazione come qualunque altra proteina



- Da un punto di vista analitico interessa invece la misura dell'**attività catalitica** (o attività enzimatica)
- L'attività enzimatica si esprime in Unità Internazionali (**U.I.**)

1 U = la quantità di enzima che catalizza la formazione di una micromole di prodotto in un minuto

P6782**Peroxidase horseradish**

Type VI-A ~1000 units/mg solid (using ABTS) 250-330 units/mg solid (using pyrogallol) essentially salt-free, lyophilized powder

Synonyms	Horseradish peroxidase
	Donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase
CAS Number	9003-99-0
Enzyme Commission	1.11.1.7
EG/EC Number	2326686
MDL number	MFCD00071339

Description

Analysis Note	This product is assayed using ABTS for easy comparison to other suppliers' unit: approx. 1,000 units per mg solid
Linkage	Similar to P8375
Packaging	Packaged in mg solid
Unit Definition	One ABTS unit will oxidize 1µmole of ABTS per minute at 25°C at pH 5.0
Analysis Note	Using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) tablets (Prod. No. A 9941) as substrate, approx. four times the activity is observed.
Analysis Note	The RZ (Reinheitszahl) is the absorbance ratio A_{403}/A_{275} determined at 0.5-1.0 mg/ml in deionized water. It is a measure of hemin content, not enzymatic activity. Even preparations with high RZ may have low enzymatic activity.
Unit Definition	One unit will form 1.0 mg purpurogallin from pyrogallol in 20 sec at pH 6.0 at 20°C, unless otherwise indicated in the listing. This purpurogallin (20 sec) unit is equivalent to approx. 18µM units per min at 25°C.

49165

Glucose Dehydrogenase *Bacillus megaterium*

BioChemika ~33 units/mg

Identifiers

Synonyms	β -D-Glucose: NAD[P] ⁺ 1-oxidoreductase
CAS Number	9028-53-9
Enzyme Commission	1.1.1.47
EG/EC Number	2328369
MDL number	MFCD00131181

Description

Miscellaneous	NADH-regenerating enzyme. Valine manufacture from ketoisovalerate
Unit Definition	1 U corresponds to the amount of enzyme which will oxidize 1 μ mol β -D-glucose to D-glucono- δ -lactone per minute at pH 7.6 and 25°C

Properties

mol wt	$M_r \sim 120000$
storage temp.	-20°C

References

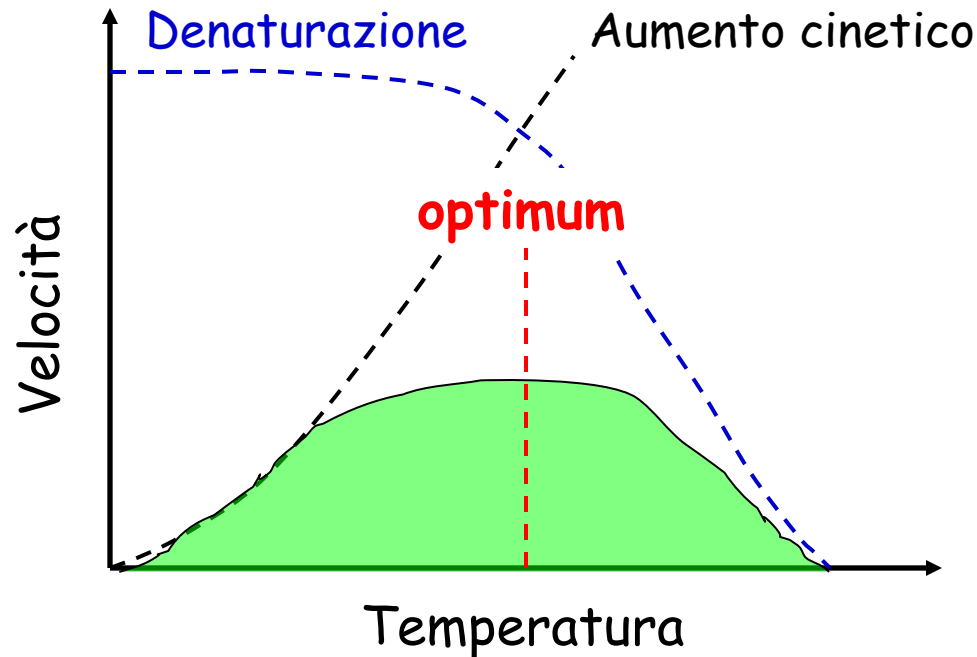
Literature	A. Honorat-Pascal et al., <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 34, 236 (1990)
------------	--

Fattori che influenzano la velocità di reazione

- Concentrazione dell'enzima
- Concentrazione del substrato
- Nel caso di enzimi allosterici (con più subunità), la presenza di modulatori positivi e negativi
- Temperatura
- pH

Temperatura

- La velocità delle reazioni chimiche dipende dalla temperatura
- La stabilità di una proteina dipende dalla temperatura

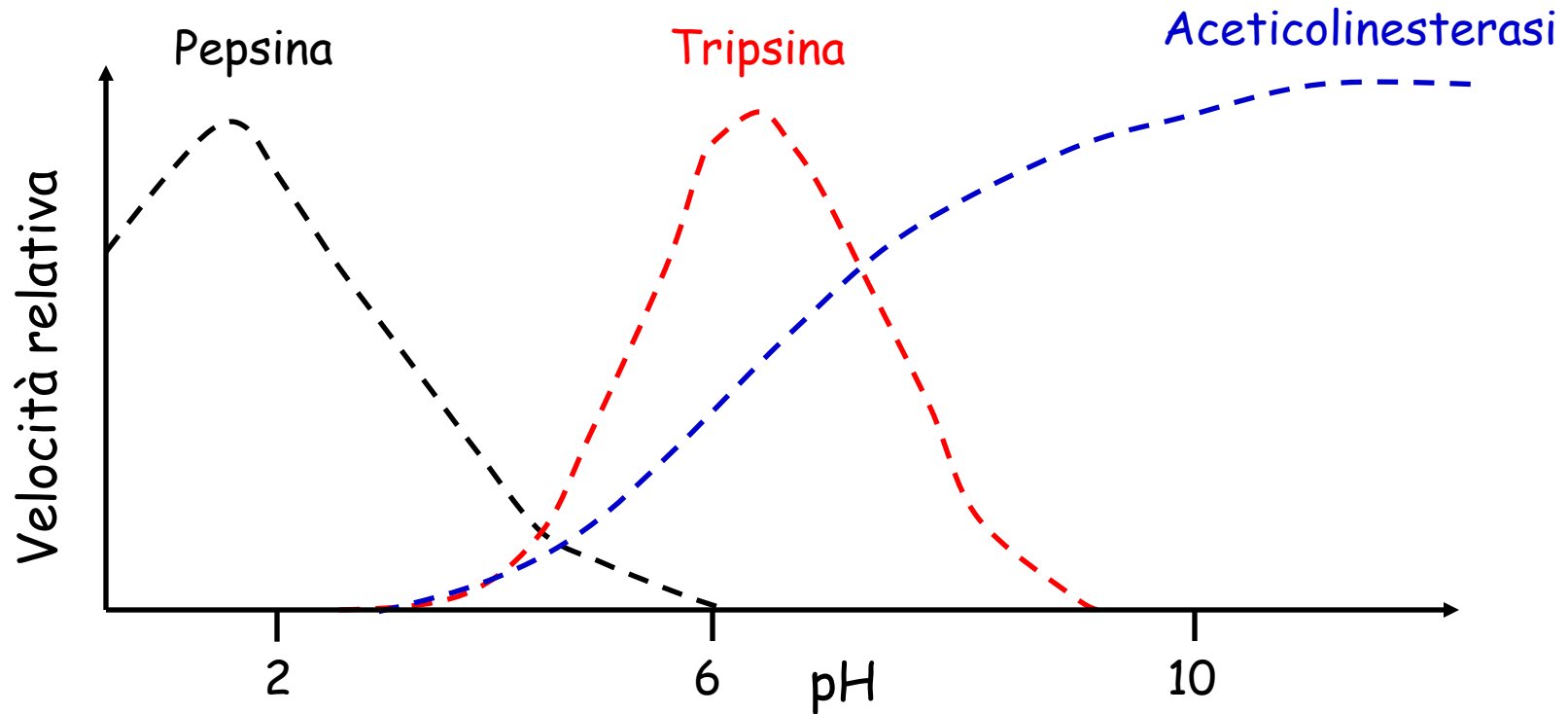


le molecole non possiedono, anche se catalizzate, l'energia sufficiente per superare la barriera dell'energia di attivazione

un eccessivo aumento della temperatura provoca la denaturazione degli enzimi con modificazione irreversibile del sito attivo e drastica riduzione dell'attività catalitica

pH

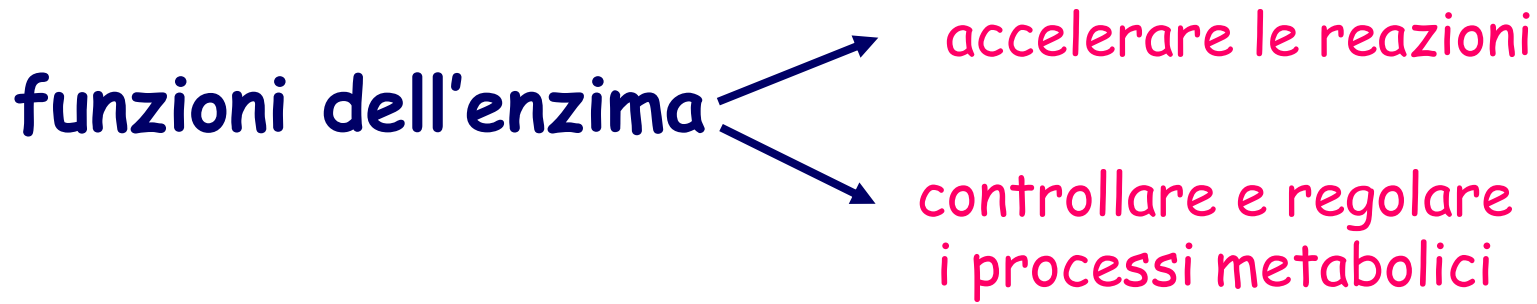
- ❑ La stabilità di una proteina dipende dal pH
- ❑ Alcuni processi coinvolgono valori estremi di pH



Il cambiamento del pH altera il grado di ionizzazione dei gruppi ionizzabili eventualmente presenti nella molecola substrato e/o nell'enzima



Sia la natura ionica del substrato che quella dell'enzima modificano il modo di combinarsi dell'uno con l'altro



un inibitore enzimatico è una molecola che impedisce all'enzima di funzionare correttamente

INIBIZIONE ENZIMATICA

REVERSIBILI

agiscono con modalità che consentono all'enzima di recuperare la propria funzionalità biologica

1. competitivi
2. non competitivi
3. incompetitivi

IRREVERSIBILI

si legano covalentemente ad un residuo amminoacidico presente nel sito attivo, modificandolo in modo irreversibile, annullando pertanto l'attività dell'enzima

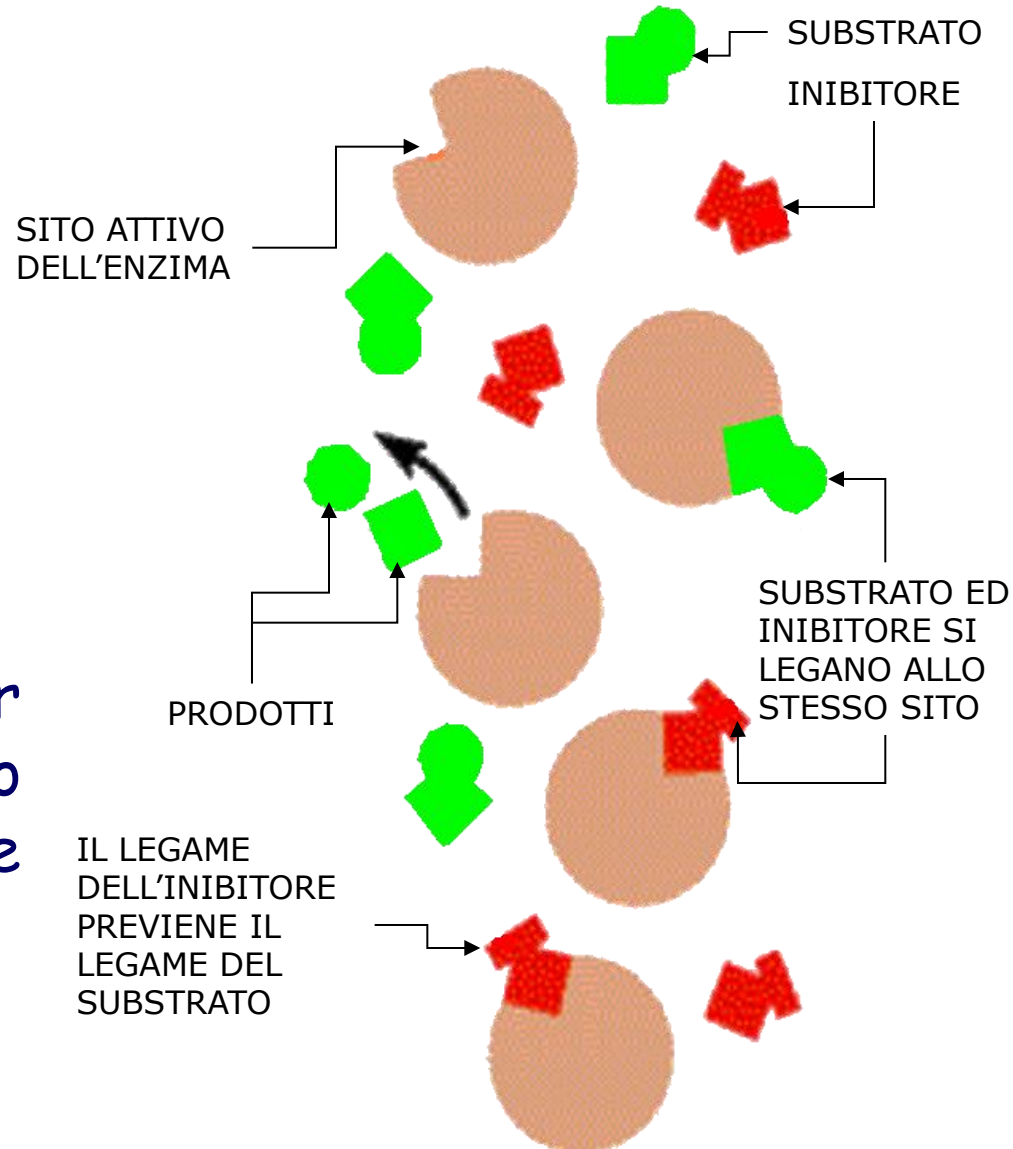
Inibitori competitivi

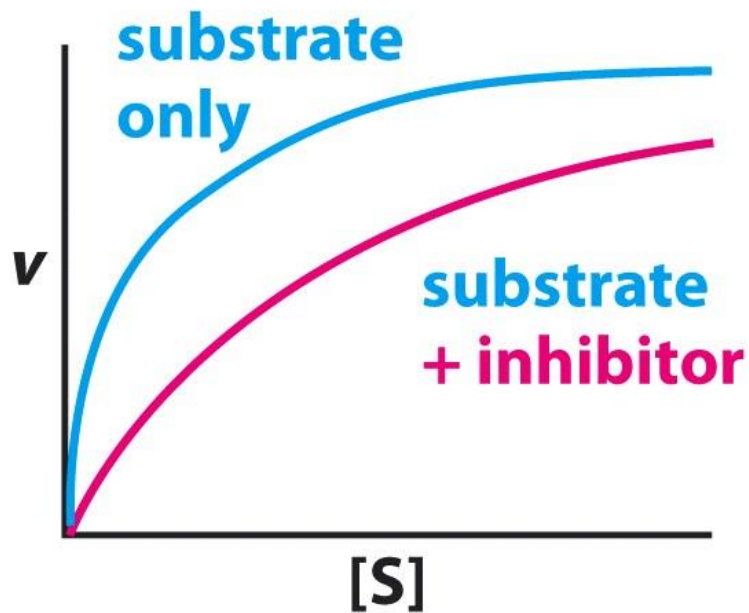
Sono molecole simili al substrato

Occupano reversibilmente lo stesso sito di legame

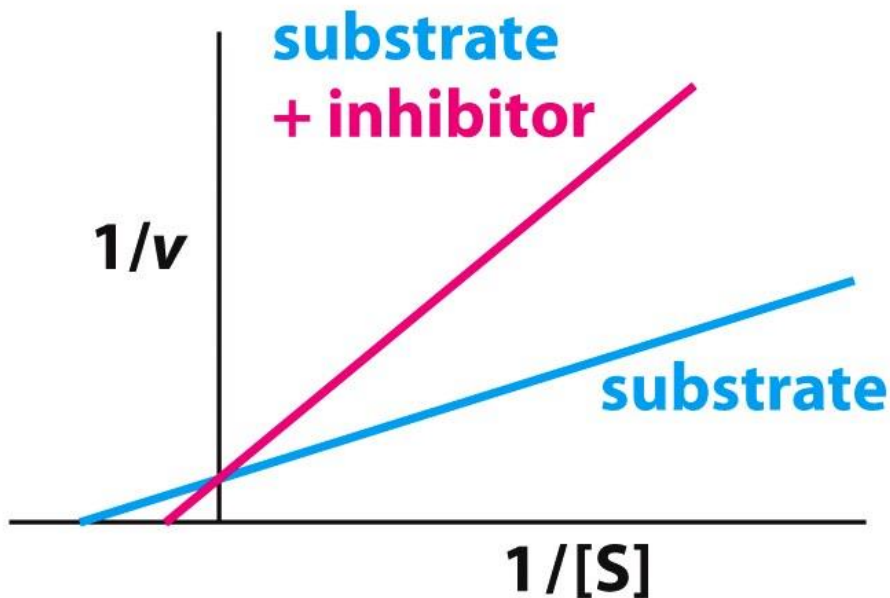


La competizione per conquistare il sito attivo dipende dalla concentrazione dei due contendenti





Un inibitore competitivo riduce l'affinità dell'enzima per il substrato, cioè aumenterà il valore di K_M .

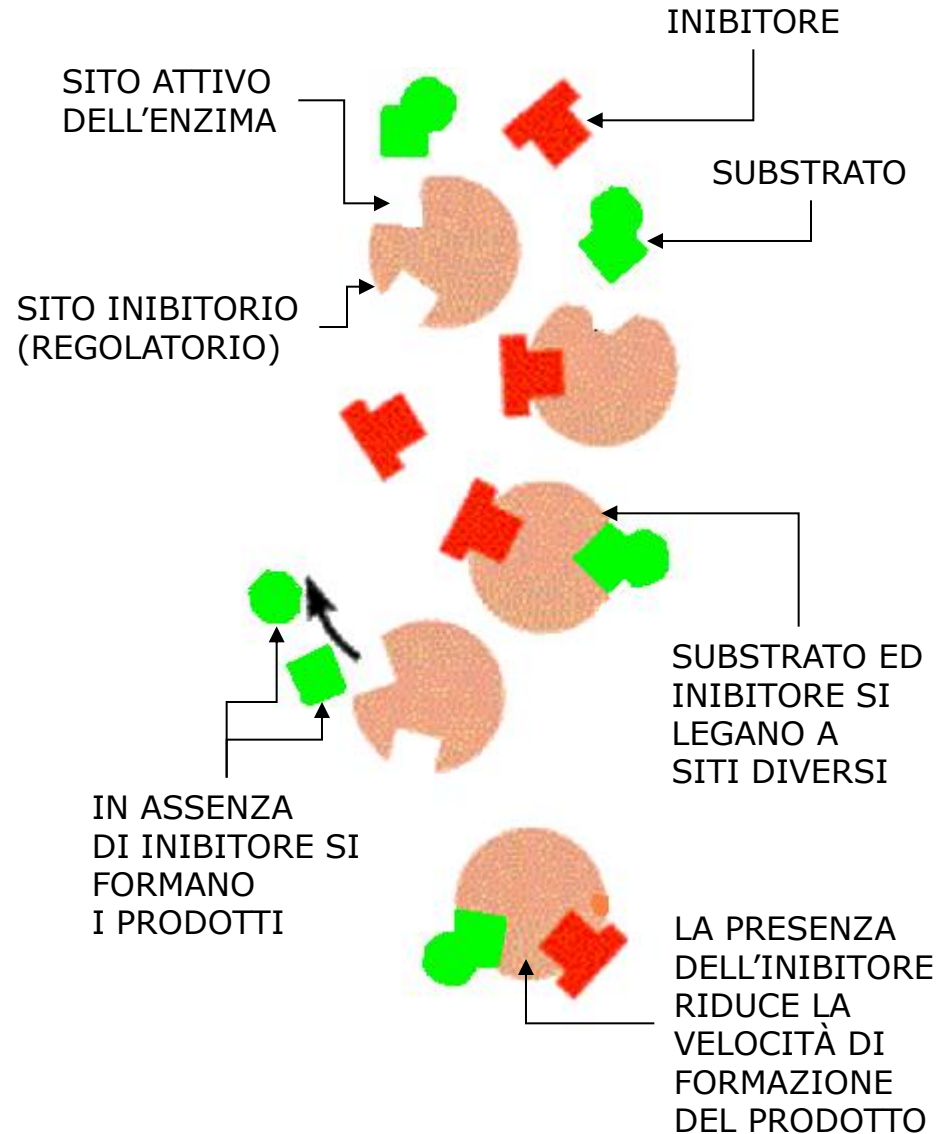


Si può rimuovere aumentando $[S]$. Ad alte concentrazioni di substrato, la reazione non viene rallentata e V_{max} è sempre la stessa.

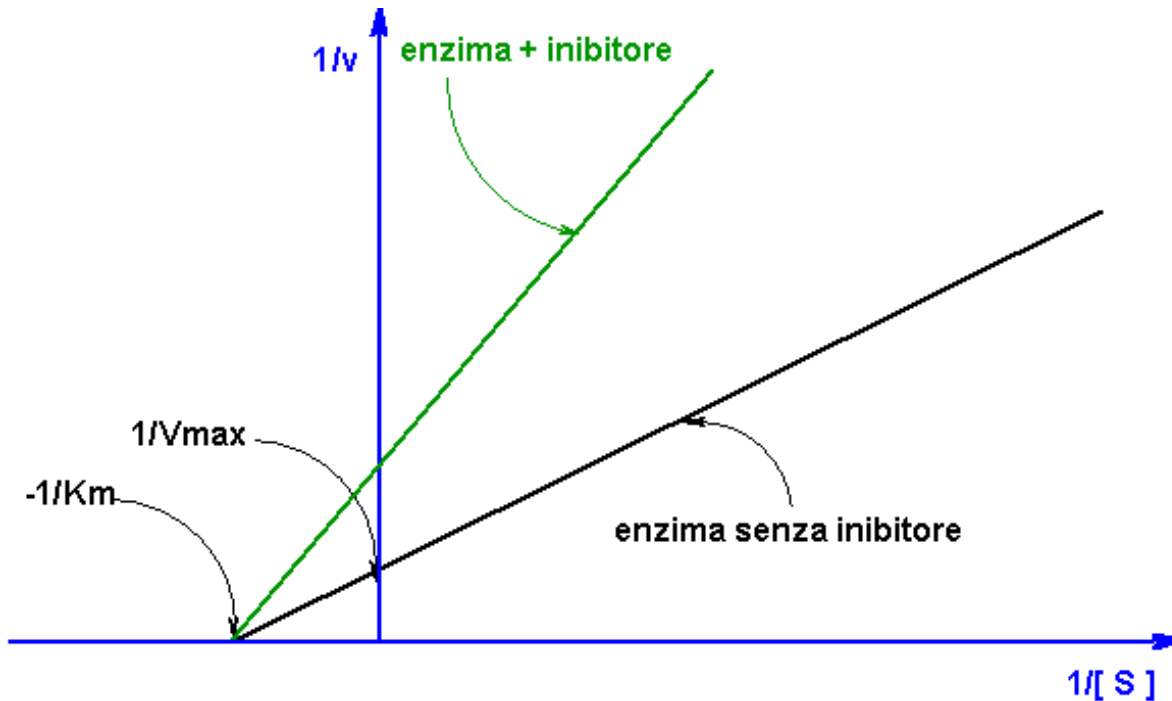
Inibitori non competitivi

Sono molecole diverse dal substrato, si legano ad un proprio sito

Gli inibitori non competitivi agiscono diminuendo il numero di turnover, ma non agiscono sulla proporzione di molecole che legano il substrato



Il substrato può ancora legarsi al complesso EI oltre che all'enzima da solo. In ogni caso il complesso ESI non procede verso la formazione dei prodotti



K_M rimane invariata

V_{max} diminuisce

L'inibitore abbassa
la $[E]$ funzionale

La possibilità di "vedere" una reazione enzimatica è legata al fatto che i substrati e i prodotti hanno proprietà chimico-fisiche diverse



Tali proprietà devono poter essere misurabili

I metodi di rivelazione più comuni in enzimologia sono:

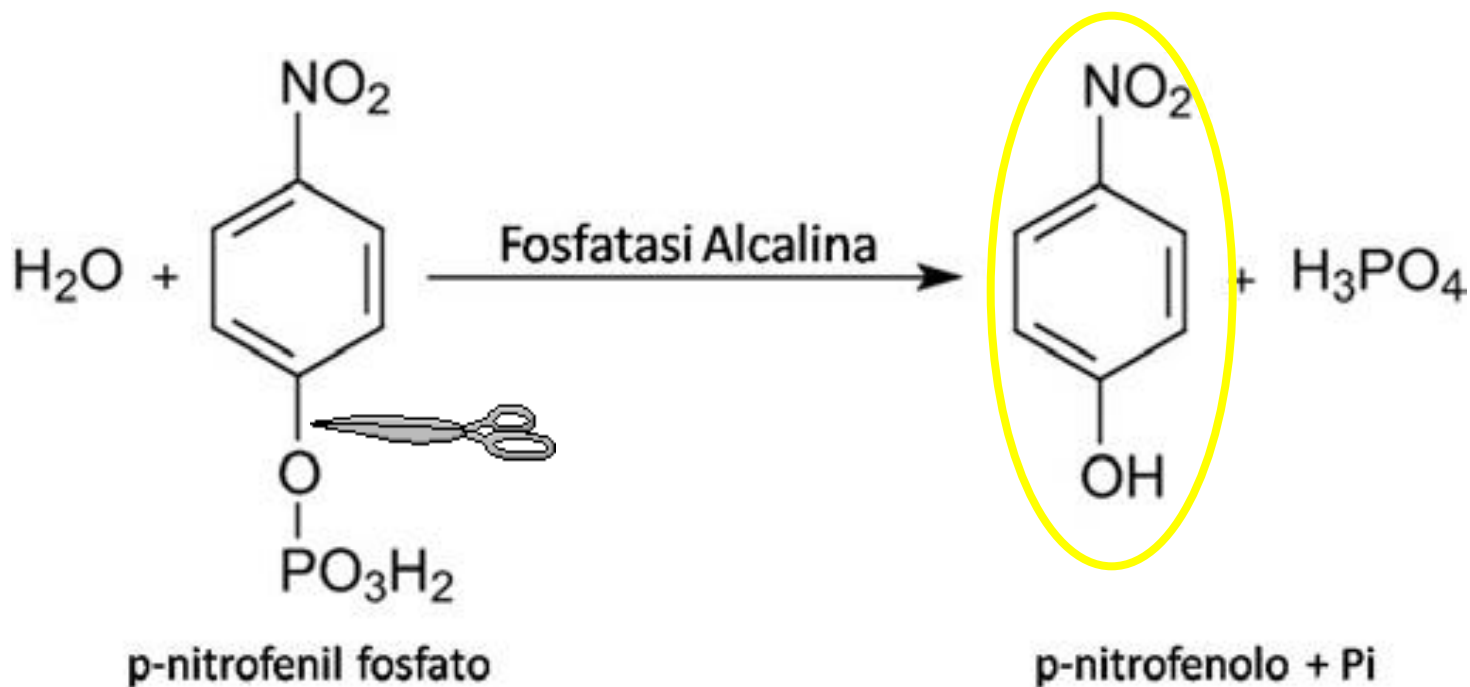
- spettrofotometrici
- luminometrici

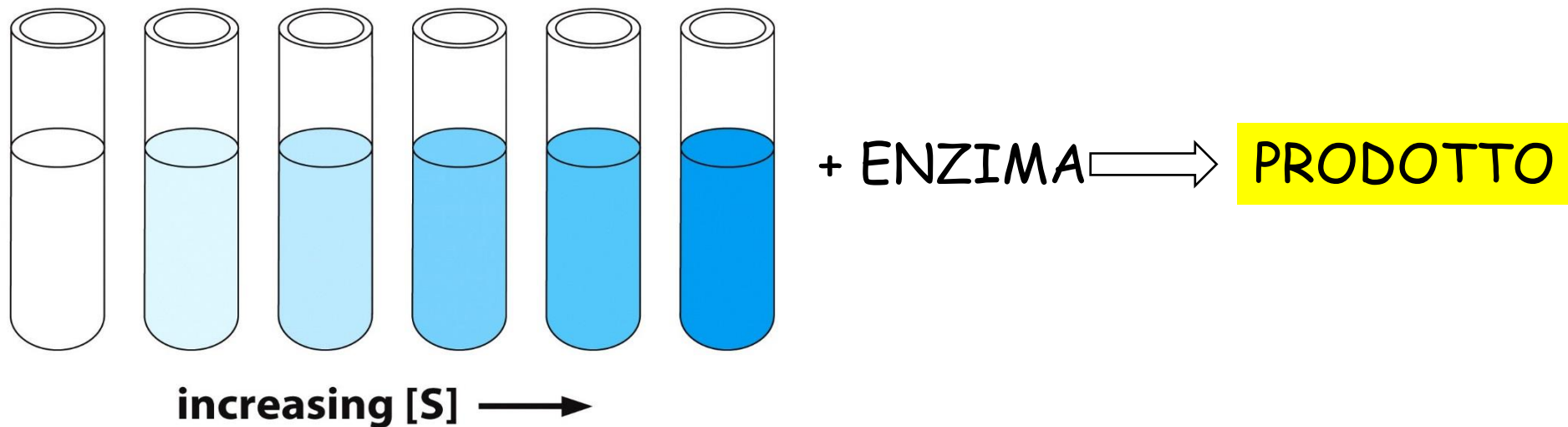
Cosa faremo in laboratorio

Cinetica enzimatica della fosfatasi alcalina

Nel corpo umano si trova nei reni, nel fegato, nell'intestino e nelle ossa; il suo titolo sierico è un elemento diagnostico in parecchie malattie.

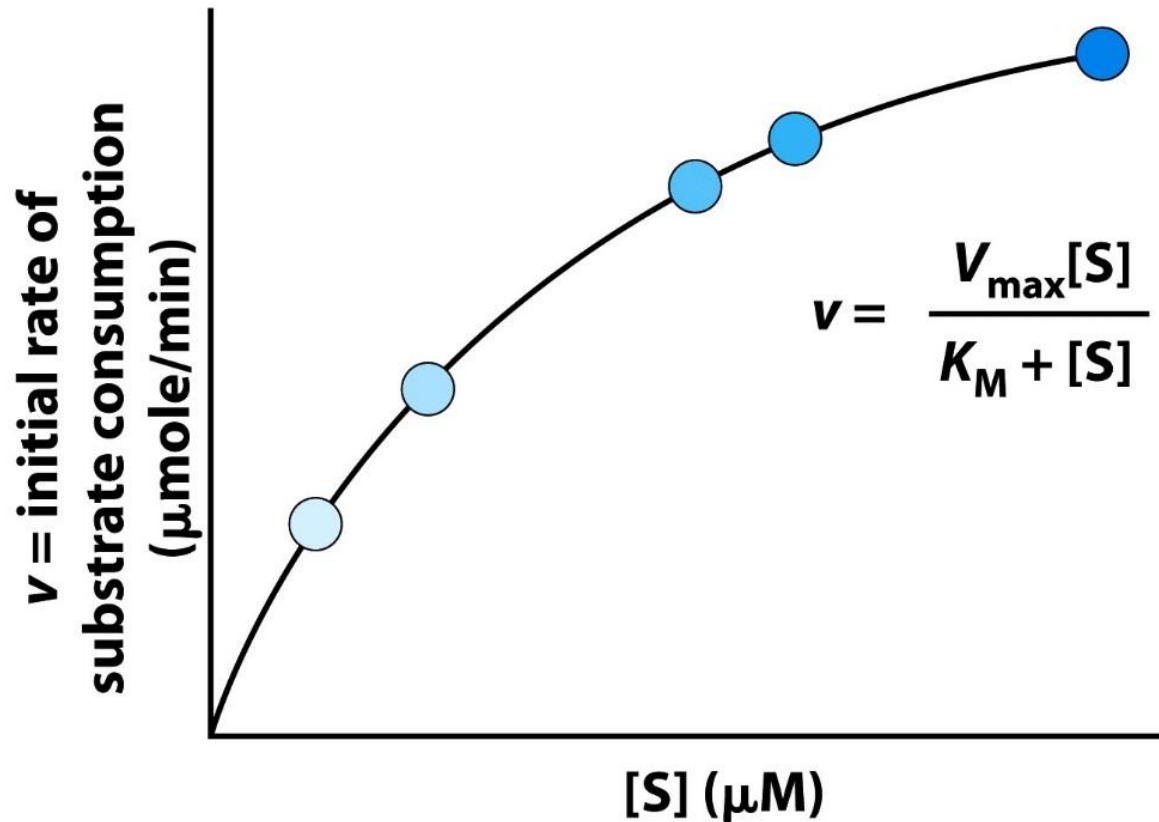
Il migliore substrato per il dosaggio sperimentale della fosfatasi alcalina è il p-nitrofenilfosfato (PNPP). Tale composto non è un substrato fisiologico dell'enzima, ma è rapidamente idrolizzato *in vitro* dalla fosfatasi, dando un prodotto di idrolisi, il p-nitrofenolo (PNP), che in ambiente alcalino sviluppa una colorazione gialla, che può esser così misurato mediante lettura spettrofotometrica a 405 nm.



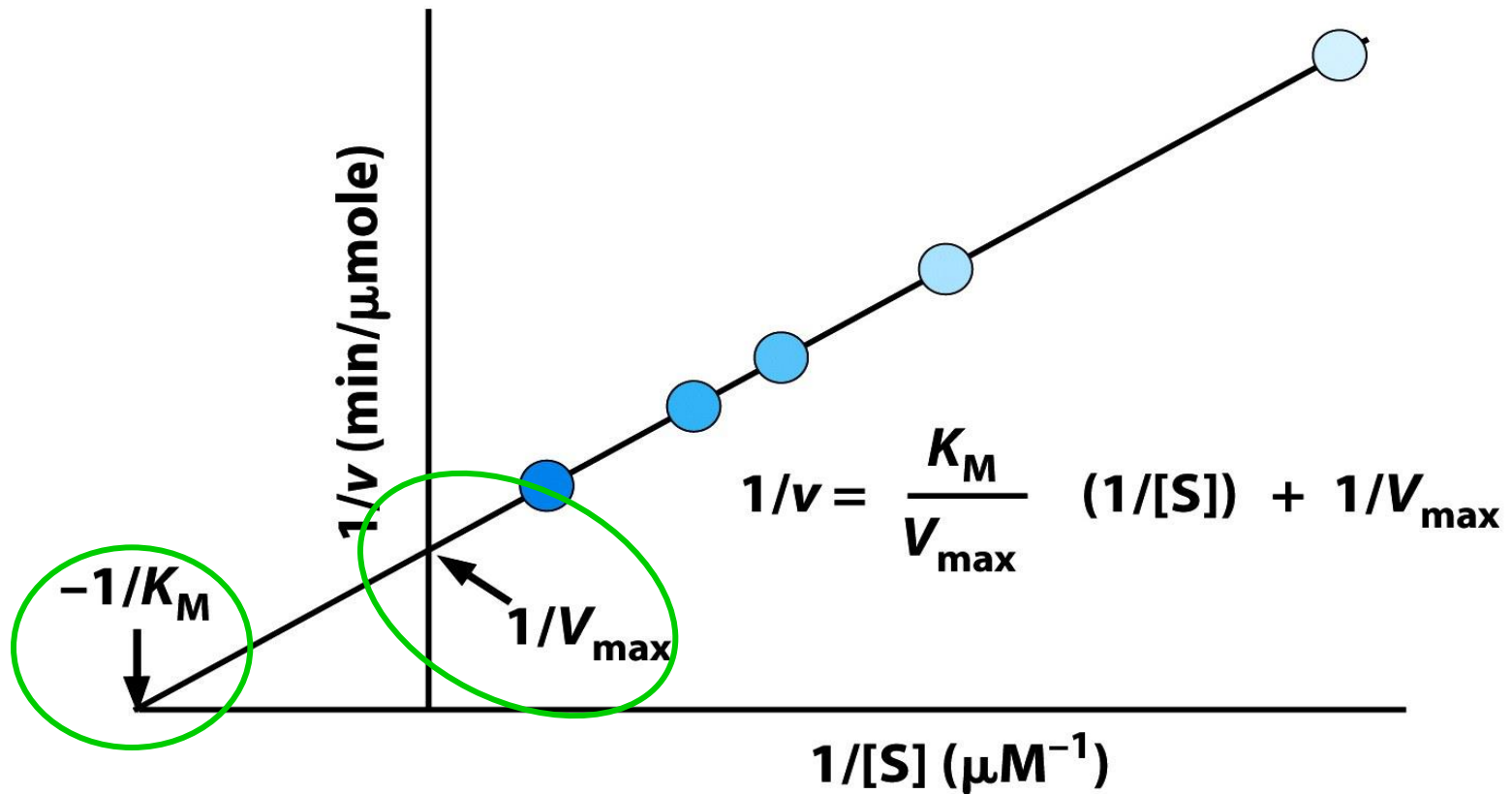


Utilizzando il **coefficiente di estinzione molare** del PNP a 405 nm (ϵ_{405}), calcolare la $[P]$ ottenuta a partire dalle diverse $[S]$ utilizzate.

Conoscendo il tempo di reazione, calcolare la velocità di formazione del prodotto per ogni [S] utilizzata, e riportare in un grafico la velocità in funzione di [S].



Calcolare i reciproci di v e di $[S]$ e riportarli su un grafico di Lineweaver-Burk ($1/V$ in funzione di $1/S$). Ricavare i valori di K_M e V_{max} .



Bonus: variazione sul tema

Ripetere il protocollo cambiando le condizioni, es stressando l'enzima.