



CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

**Corso di "Biochimica con Laboratorio"
9 CFU**

LEZIONE 8

Prof. Paola Di Donato
Stanza 520, V piano lato NORD
Tel. 081 547 6625
E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

Equazione di Michaelis-Menten – Cinetica dello stato stazionario

Equazione di Michaelis-Menten

$$V_o = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

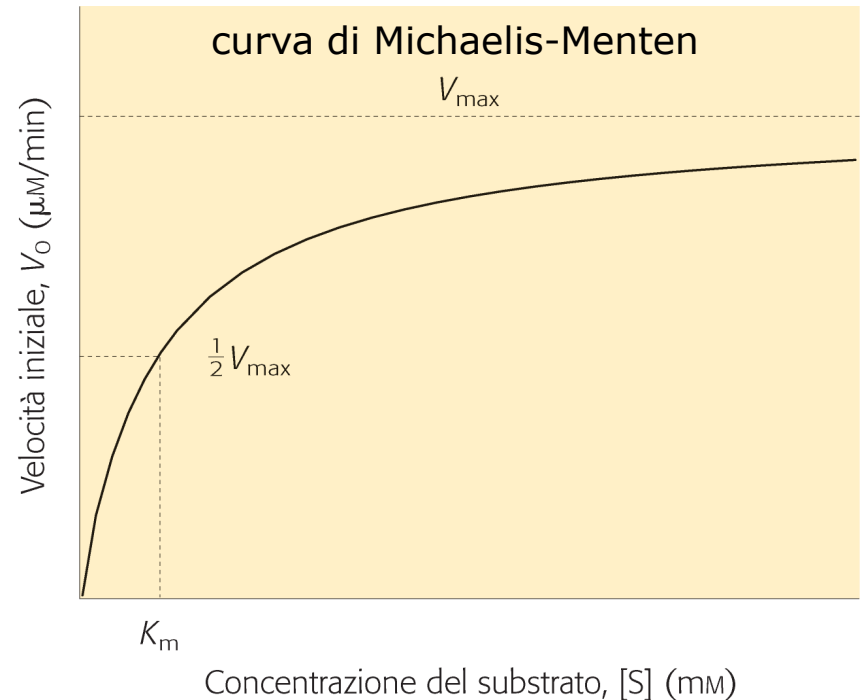
**equazione della velocità di una
reazione catalizzata da un enzima**

**V_o = velocità iniziale della reazione
misurata in un intervallo di tempo
breve**

V_{max} = velocità massima della reazione

K_m = costante di Michaelis

- **$[S]$ a cui la velocità è pari alla metà di V_{max}**
- **concentrazione minima affinché l'enzima riconosca il substrato (misura dell'affinità del substrato per l'enzima)**



Equazione di Michaelis-Menten – Parametri cinetici

K_m = costante di Michaelis

V_{max} = velocità massima

Equazione di Michaelis-Menten

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

Equazione di Lineweaver-Burk

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

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

($y = b x + c$)

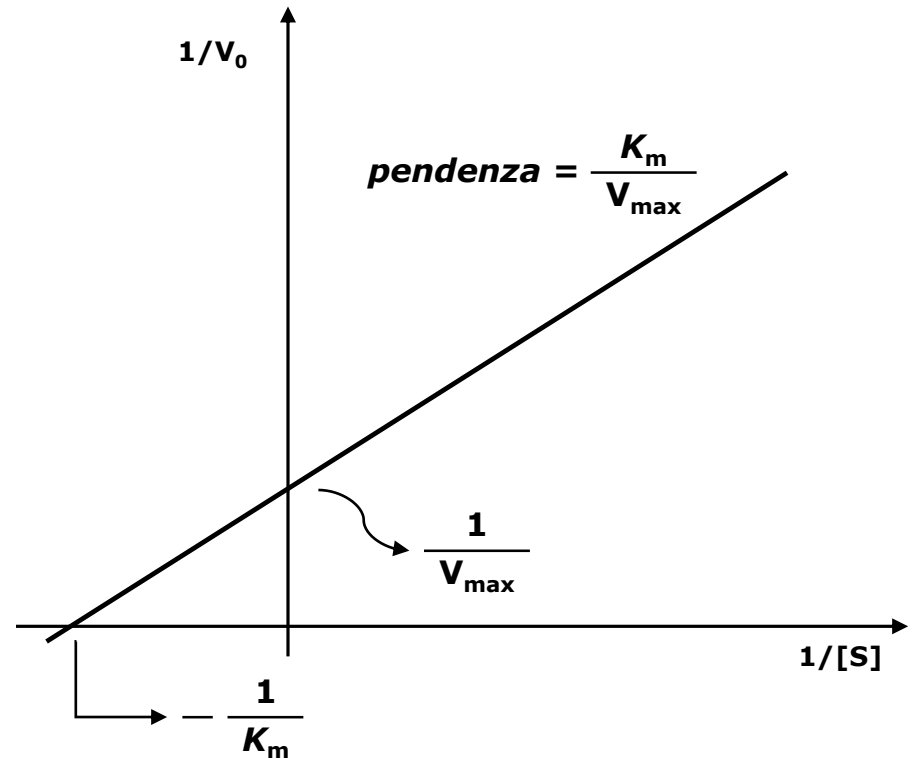


Grafico dei "doppi reciproci"

Significato dei parametri cinetici: K_m

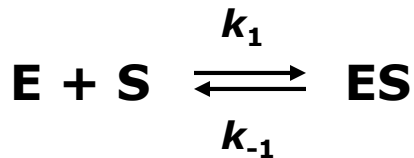
Reazione a 2 tappe



• Se $k_2 \ll k_{-1}$ $\Rightarrow K_M = \frac{k_{-1} + \cancel{k_2}}{k_1} \Rightarrow K_M = \frac{k_{-1}}{k_1}$



ovvero $K_m = K_d$ costante di equilibrio per la dissociazione per il complesso ES



K_m misura l'affinità del substrato per l'enzima

Significato dei parametri cinetici: K_m

Reazione a 2 tappe



$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$K_M = \frac{k_2}{k_1}$$

• Se $k_2 \gg k_{-1}$ o $k_2 \sim k_{-1}$



oppure

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

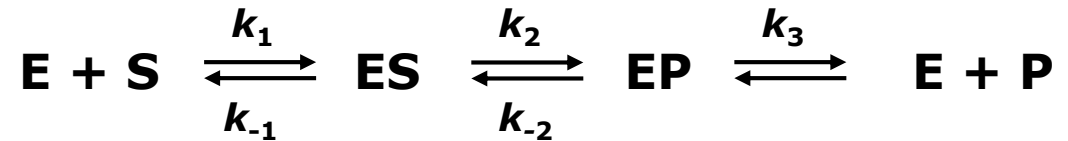


K_m funzione complessa delle costanti di velocità

in tal caso rappresenta la concentrazione minima affinché l'enzima riconosca il substrato

Significato dei parametri cinetici: K_m

Reazione a 3 tappe



K_m funzione complessa delle costanti di velocità

Significato di K_m dipende dal meccanismo con cui procede la reazione

IN GENERALE

K_m = costante di Michaelis

- [S] a cui la velocità è pari alla metà di $V_{\max}$
- concentrazione minima affinché l'enzima riconosca il substrato

Significato dei parametri cinetici: $V_{\max}$

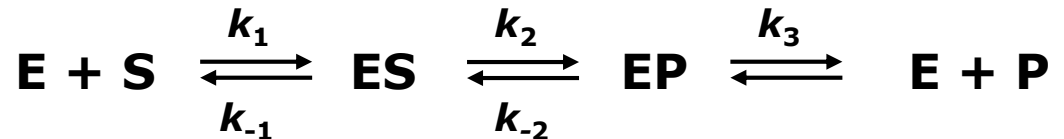
Reazione a 2 tappe



• k_2 : costante cinetica della tappa che limita la velocità $V_o = k_2 [ES]$

la velocità è max quando tutto l'enzima è complessato $\Rightarrow V_{\max} = k_2 [E_t]$

Reazione a 3 tappe



• k_3 : costante cinetica della tappa che limita la velocità $\Rightarrow V_{\max} = k_3 [E_t]$

NOTA: è possibile modificare il valore di $V_{\max}$?
 $\rightarrow$ SI, modificando la concentrazione totale dell'enzima

Parametri cinetici: K_{cat}

• k_{cat} : costante cinetica della tappa che limita la velocità in condizioni saturanti di substrato

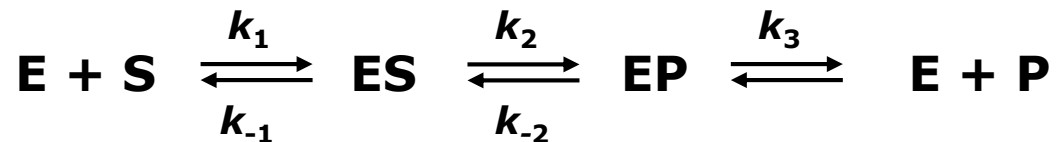
$$V_o = \frac{k_{\text{cat}} [E_t][S]}{K_M + [S]}$$

Reazione a 2 tappe



$$k_{\text{cat}} = k_2$$

Reazione a 3 tappe



$$k_{\text{cat}} = k_3$$

Parametri cinetici: k_{cat}

• k_{cat} : costante cinetica della tappa che limita la velocità in condizioni saturanti di substrato

$$V_o = \frac{k_{cat} [E_t][S]}{K_M + [S]}$$

Reazione a più tappe

k_{cat} funzione complessa delle costanti cinetiche delle tappe che costituiscono il processo in considerazione

k_{cat} : numero di *turn over* dell'enzima

ovvero

numero di molecole che nell'unità di tempo sono convertite in prodotto da una singola molecola di enzima in condizioni saturanti di substrato (ha le dimensioni di $s^{-1} M^{-1}$)

**Parametri cinetici: misura dell'efficienza di un enzima
che varia al variare delle condizioni del processo**

- In condizioni fisiologiche: $[S] \ll K_m$ e quindi $[E] \approx [E_t]$**

$$k_{\text{cat}} / K_m = \text{costante di specificità}$$

- In condizioni saturanti di substrato: $[S] \gg K_m$ e quindi $[ES] \approx [E_t]$**

k_{cat} : numero di *turn over* dell'enzima

- In condizioni fisiologiche: $[S] \ll K_m$ e quindi $[E] \approx [E_t]$

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



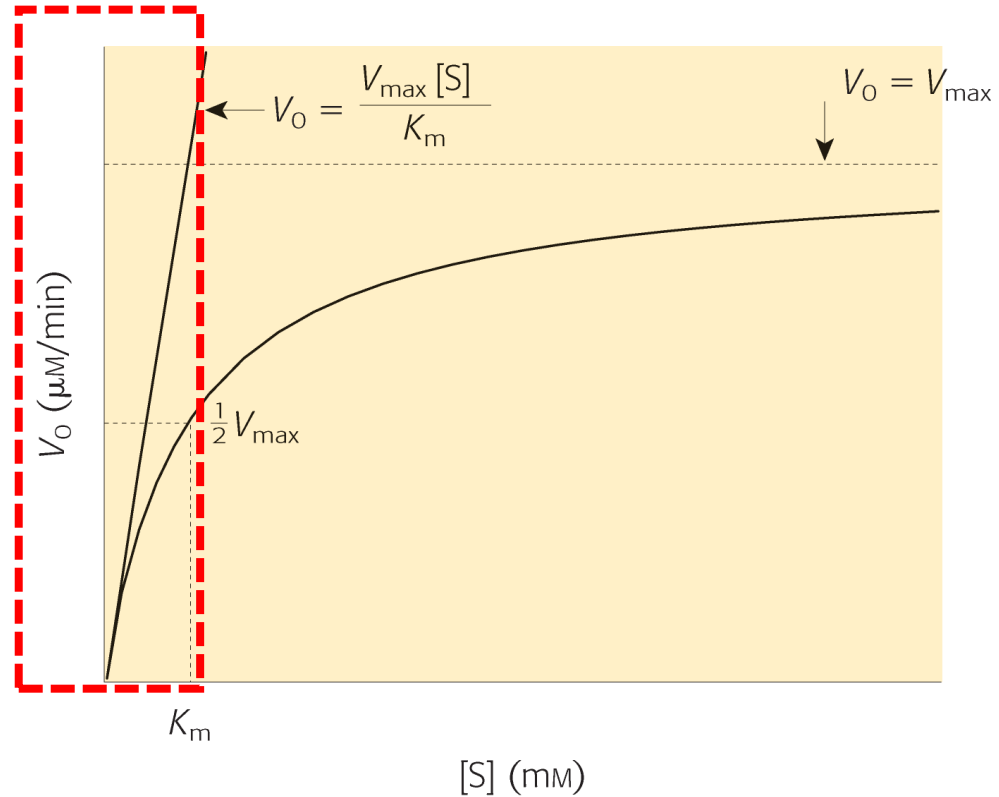
$$V_0 = \frac{V_{max}}{K_M} [S]$$



$$V_{max} = [E_t][S]$$

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E_t][S]$$

k_{cat}/K_m = costante di specificità



Parametri cinetici: costante di specificità

$$k_{\text{cat}} / K_{\text{m}} = \text{costante di specificità}$$

Parametro cinetico che esprime la
conversione di E + S in E + P

In condizioni fisiologiche $[S] \ll K_{\text{m}}$ e quindi $[E] \approx [E_{\text{t}}]$

$$V_o = \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{M}}} \right) [E_{\text{t}}][S]$$

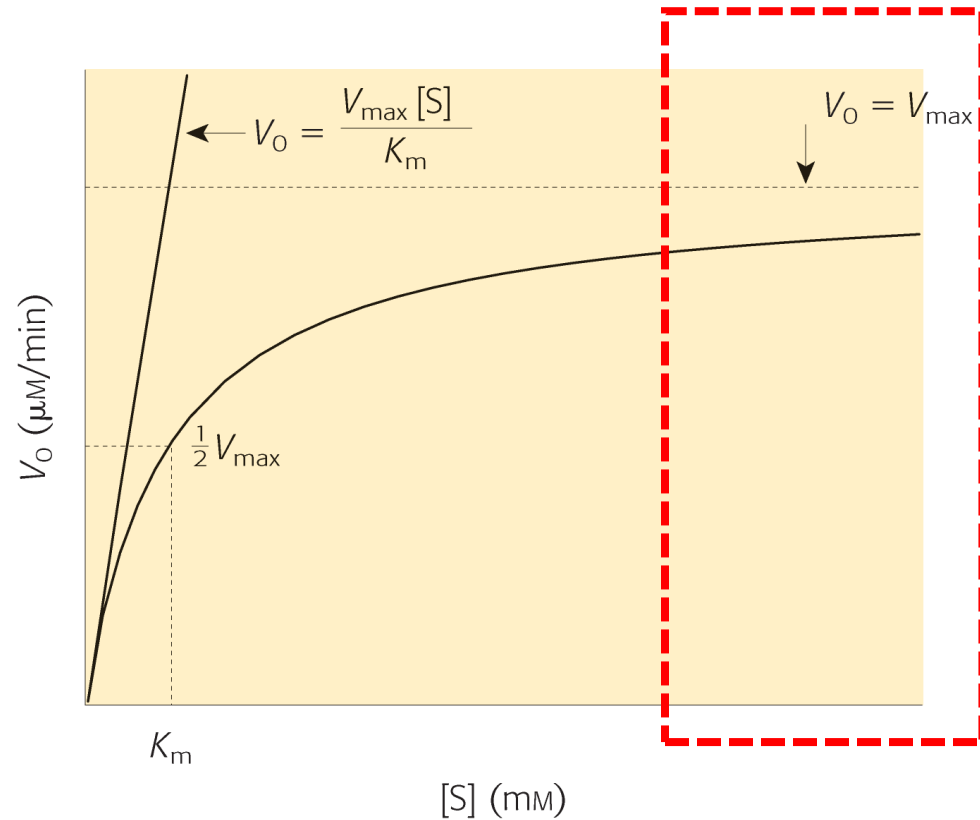
Perfezione catalitica
valore controllato dalla diffusione
varia tra $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

- In condizioni saturanti di substrato: $[S] \gg K_m$ e quindi $[ES] \approx [E_t]$

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



$$V_0 = V_{max} = k_{cat} [E_t]$$

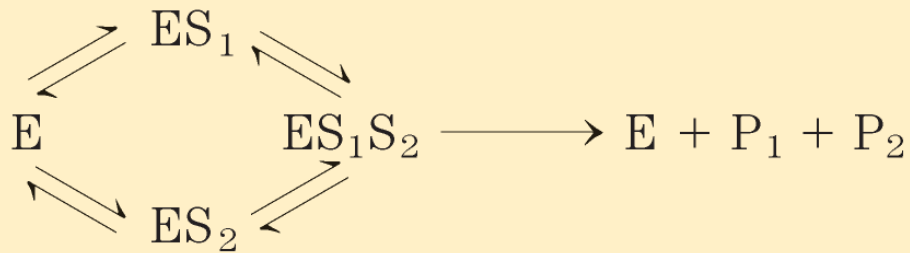


La velocità della reazione è indipendente dalla concentrazione del substrato ed è funzione solo del numero di turnover ovvero k_{cat}

REAZIONE A DUE SUBSTRATI

(a) Reazione enzimatica con formazione di un complesso ternario

Ordine casuale



Ordinata

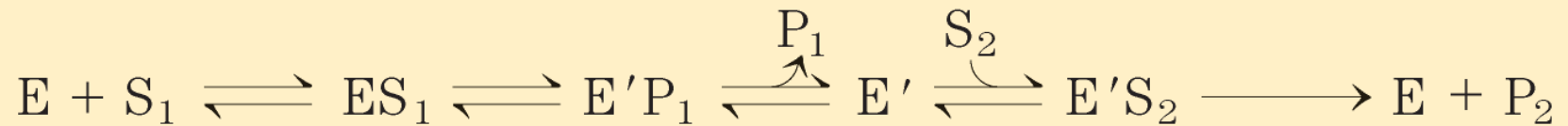


ES_1S_2 = complesso ternario

MODELLI CASUALE ED ORDINATO

REAZIONE A DUE SUBSTRATI

(b) Reazione enzimatica senza formazione di un complesso ternario



MECCANISMO A 'PING-PONG'

Controllo dell'attività enzimatica

- **Inibizione reversibile**
- **Enzimi regolatori (enzimi allosterici; enzimi regolati da modificazioni covalenti reversibili)**
- **Isozimi**
- **Scissione proteolitica (zimogeni)**
- **Controllo ormonale**
- **Controllo genetico**

Il controllo dell'attività enzimatica consente alla cellula di regolare in maniera razionale il proprio metabolismo in risposta alle esigenze energetiche della cellula stessa

INIBIZIONE REVERSIBILE

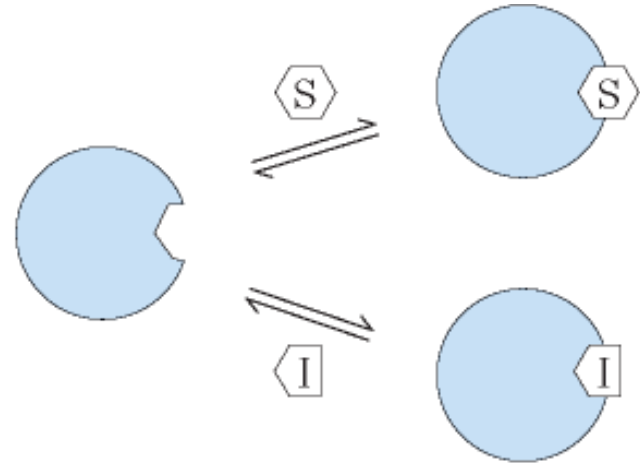
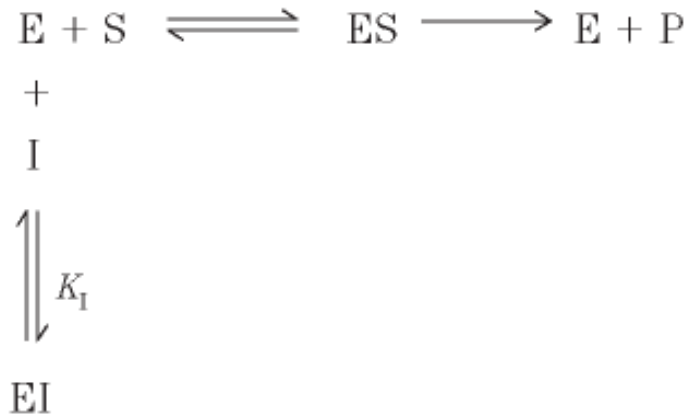
A seconda delle interazioni dell'inibitore con l'enzima libero e/o con il complesso enzima substrato si distinguono tre diversi tipi di inibizione reversibile dell'attività enzimatica:

- 1. competitiva**
- 2. incompetitiva**
- 3. mista**

I tre tipi di inibizione sono cineticamente distinguibili

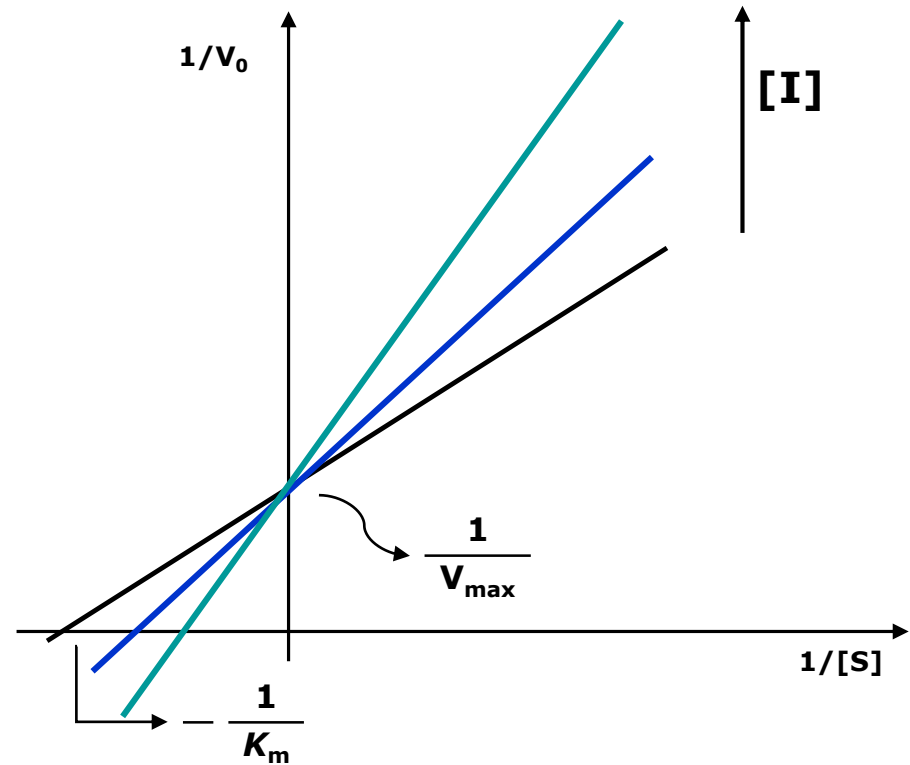
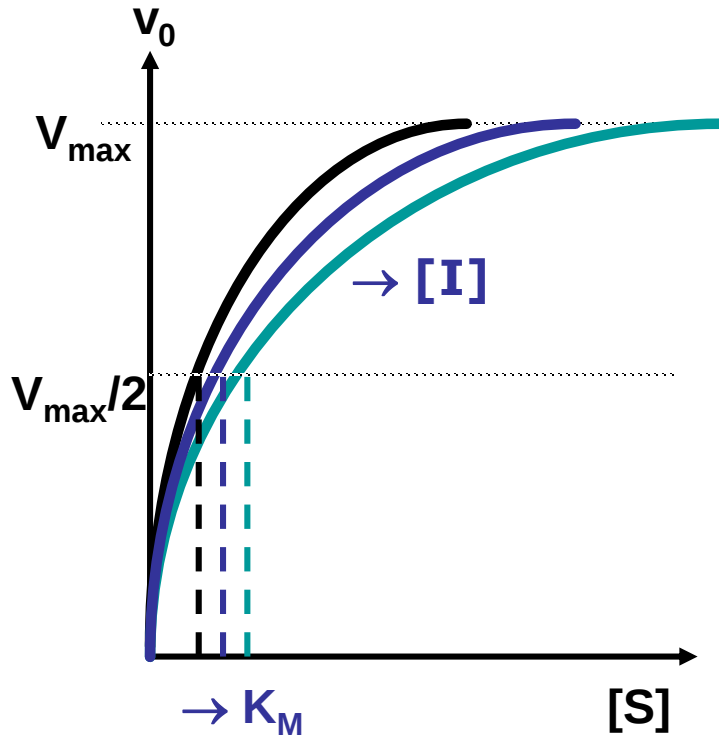
L'inibizione incompetitiva e quella mista si osservano solo per gli enzimi con due o più substrati.

1. Inibizione competitiva



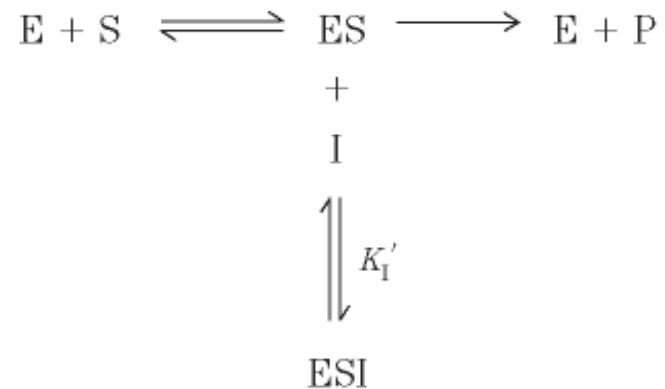
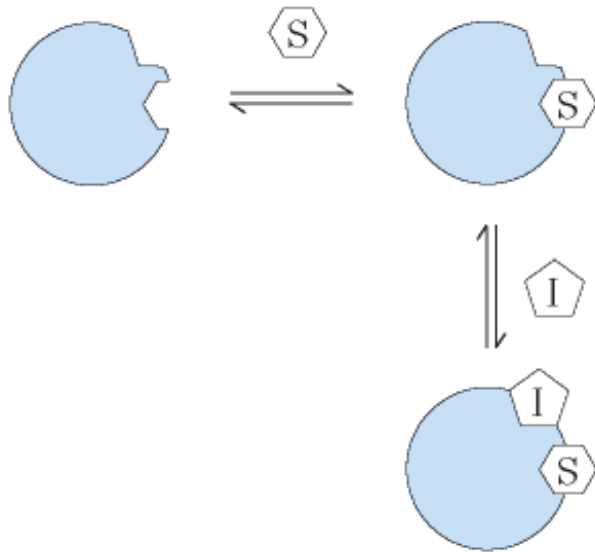
- Un inibitore competitivo si lega unicamente all'enzima libero e compete con il substrato per il legame sullo stesso sito dell'enzima.
- K_m aumenta all'aumentare di $[I]$, apparentemente l'affinità dell'enzima per il substrato diminuisce.
- La V_{max} resta invariata: infatti, per qualsiasi $[I]$ esiste una $[S]$ tale da "cancellare" l'effetto inibitorio. Ciò si spiega considerando che un aumento della $[S]$ sposta l'equilibrio del sistema verso la formazione di ES .

1. Inibizione competitiva



- K_m aumenta all'aumentare di $[I]$, apparentemente l'affinità dell'enzima per il substrato diminuisce.
- La $V_{\max}$ resta invariata: infatti, per qualsiasi $[I]$ esiste una $[S]$ tale da "cancellare" l'effetto inibitorio. Ciò si spiega considerando che un aumento della $[S]$ sposta l'equilibrio del sistema verso la formazione di ES .
- Questo tipo di inibizione può essere rimossa aumentando $[S]$.

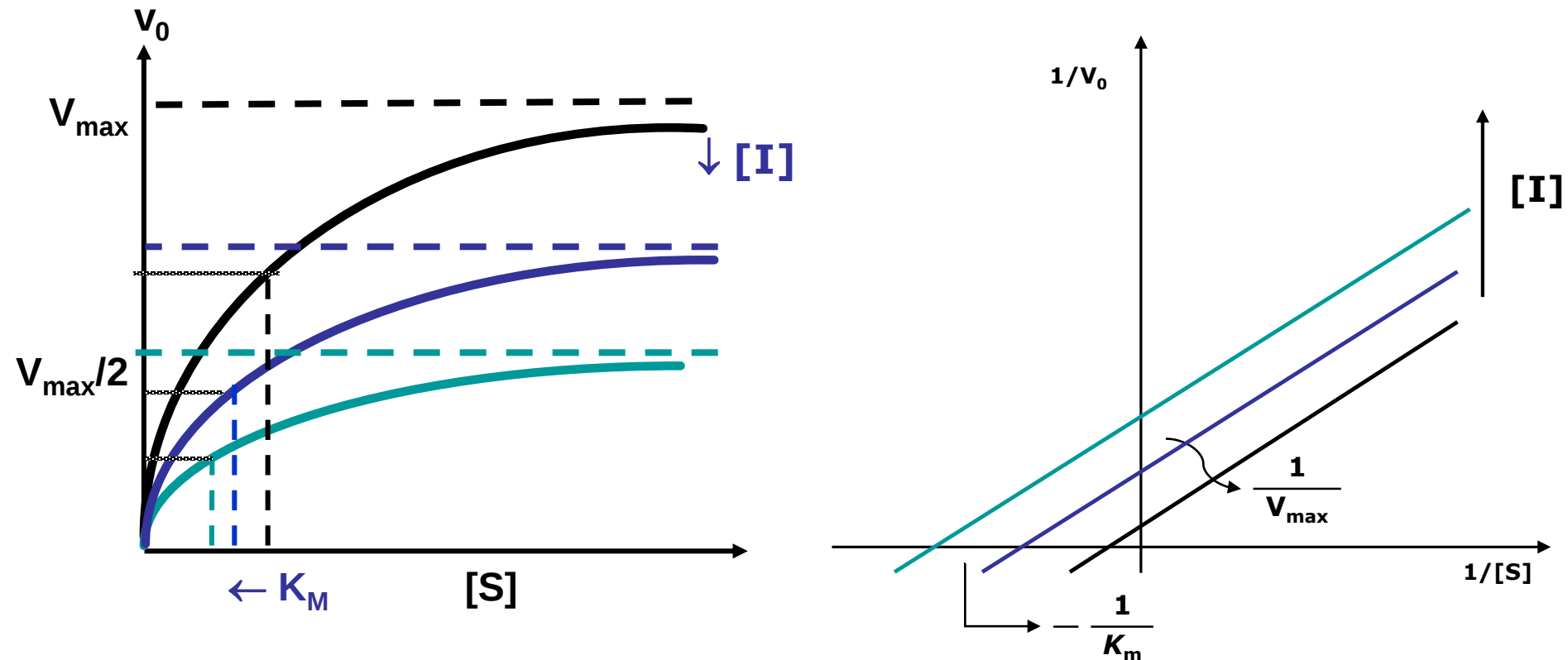
2. Inibizione incompetitiva



**complesso ternario (*ESI*):
cataliticamente inattivo**

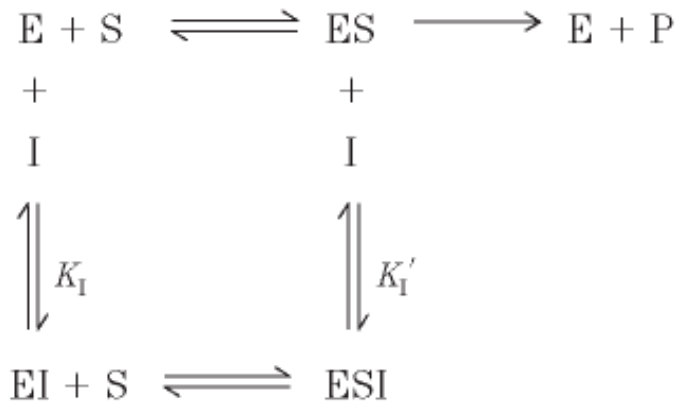
- **Un inibitore incompetitivo si lega unicamente al complesso enzima-substrato (*ES*)**
- **il legame del substrato all'enzima libero induce una modificazione conformazionale che rende accessibile il sito per l'inibitore**
- **K_m diminuisce all'aumentare di $[I]$, apparentemente l'affinità dell'enzima per il substrato aumenta**
- **V_{max} diminuisce. Tale tipo di inibizione è più marcata ad alte concentrazioni di substrato: aumentando la $[S]$, infatti, aumenta la $[ES]$, la forma alla quale si lega l'inibitore.**

2. Inibizione incompetitiva

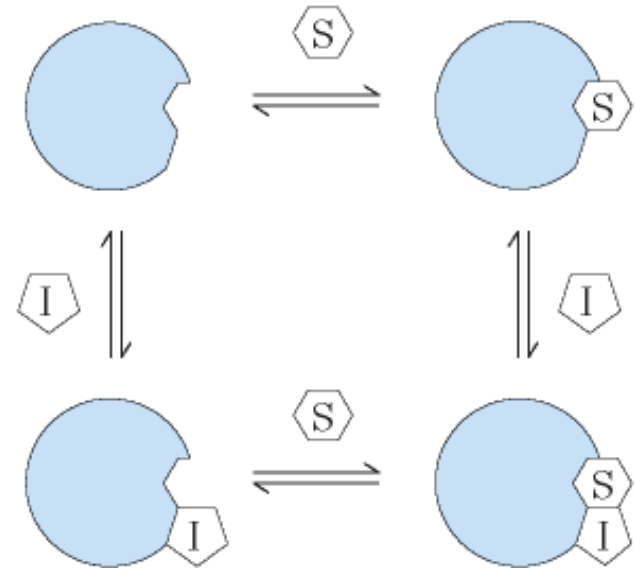


- K_m diminuisce all'aumentare di $[I]$, apparentemente l'affinità dell'enzima per il substrato aumenta
- V_{max} diminuisce. Tale tipo di inibizione è più marcata ad alte concentrazioni di substrato: aumentando la $[S]$, infatti, aumenta la $[ES]$, la forma alla quale si lega l'inibitore.
- Questo tipo di inibizione NON può essere rimossa aumentando $[S]$.

3. Inibizione mista

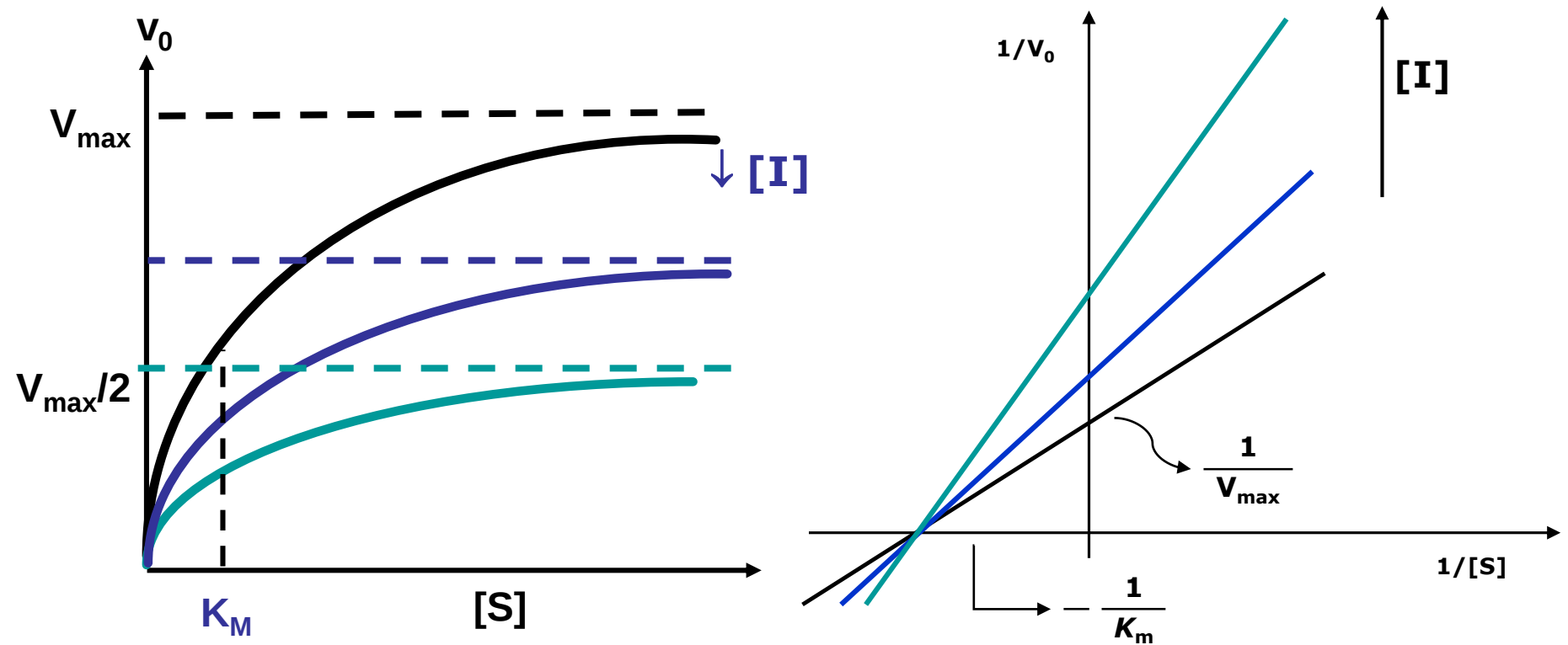


**complesso ternario (*ESI*):
cataliticamente inattivo**



- Un inibitore misto può legarsi sia all'enzima libero (*E*) che al complesso enzima-substrato (*ES*)
- l'effetto dell'inibitore misto dipende dall'affinità che esso ha per *E* e per *ES*
- K_m aumenta se l'affinità di *I* per *E* è maggiore di quella per *ES*
diminuisce se l'affinità di *I* per *E* è minore di quella per *ES*
- V_{max} subisce sempre una diminuzione
- Se l'affinità è la stessa allora si parla di inibizione **NON COMPETITIVA**: in tal caso K_m non varia, V_{max} invece diminuisce all'aumentare di $[I]$

3. Inibizione mista: inibizione non competitiva*



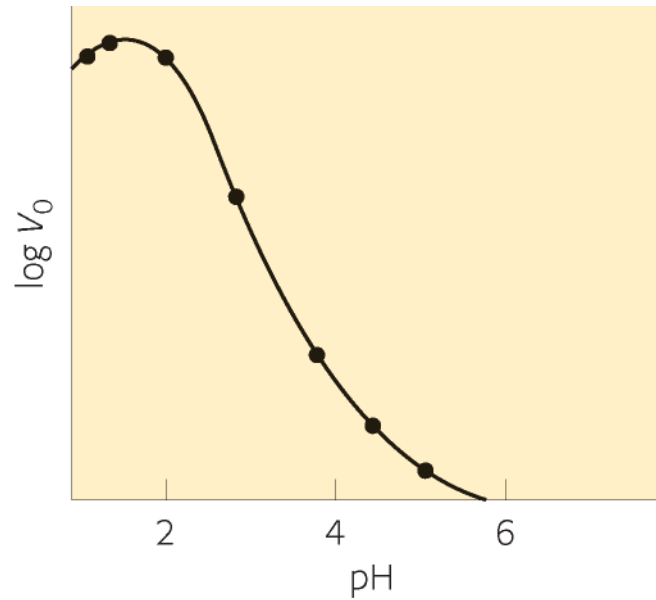
- K_m non varia al variare di $[I]$: l'inibitore ha uguale affinità per E ed ES in tal caso esso si definisce **NON COMPETITIVO**

- $V_{\max}$ diminuisce

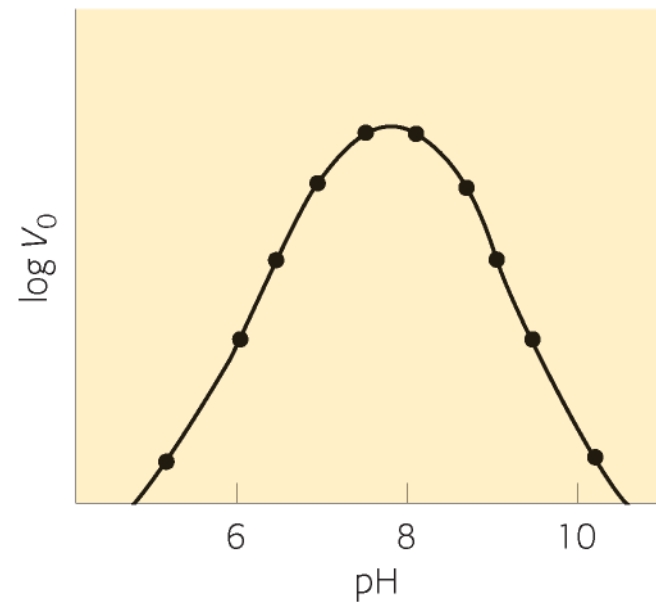
- Questo tipo di inibizione **NON** può essere rimossa aumentando $[S]$.

* Inibizione non competitiva: caso limite dell'inibizione mista

L'attività enzimatica dipende anche dal pH



(a) Pepsina



(b) Glucosio 6-fosfatasi

ENZIMI REGOLATORI



ENZIMI ALLOSTERICI
non seguono la cinetica di
Michaelis e Menten



ENZIMI REGOLATI
MEDIANTE
MODIFICAZIONI COVALENTI

Aggiunta di gruppi funzionali
all'enzima

ENZIMI ALLOSTERICI

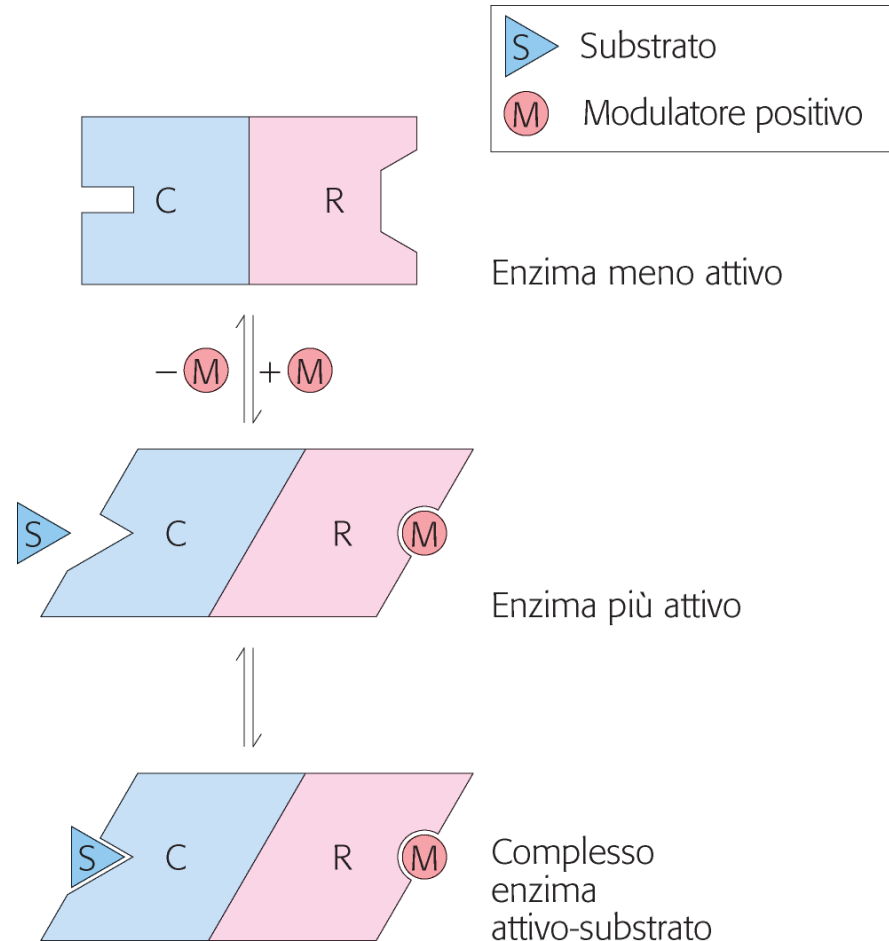
in genere proteine multisubunità
la cui attività è regolata dai

MODULATORI ALLOSTERICI

- Si legano non covalentemente e reversibilmente all'enzima
- Possono essere sia inibitori che attivatori

ENZIMI ALLOSTERICI

- **omotropici** se il substrato dell'enzima funge da modulatore
- **eterotropici** quando il modulatore è una molecola diversa dal substrato



enzima allosterico eterotropico

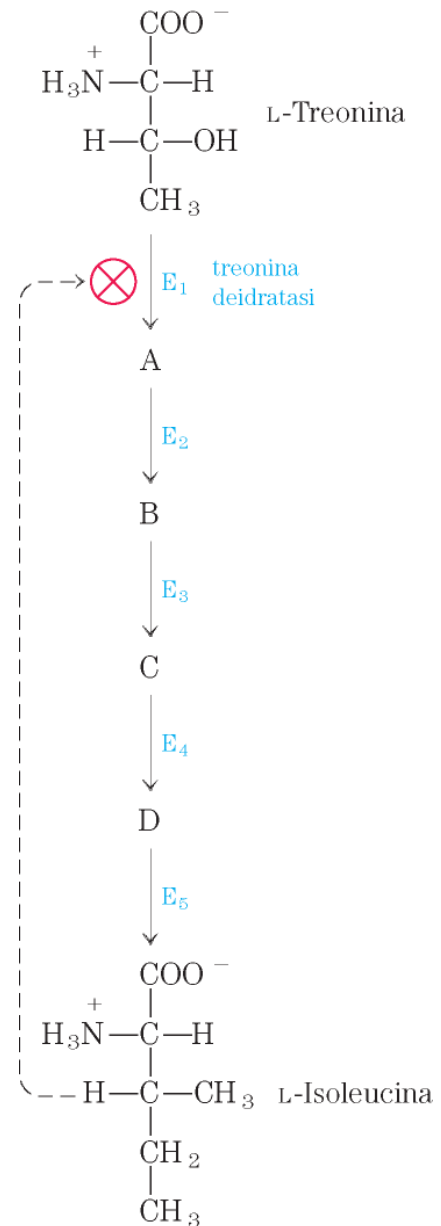
ENZIMI ALLOSTERICI

Spesso catalizzano la tappa di regolazione di una via metabolica (in genere la prima della sequenza)

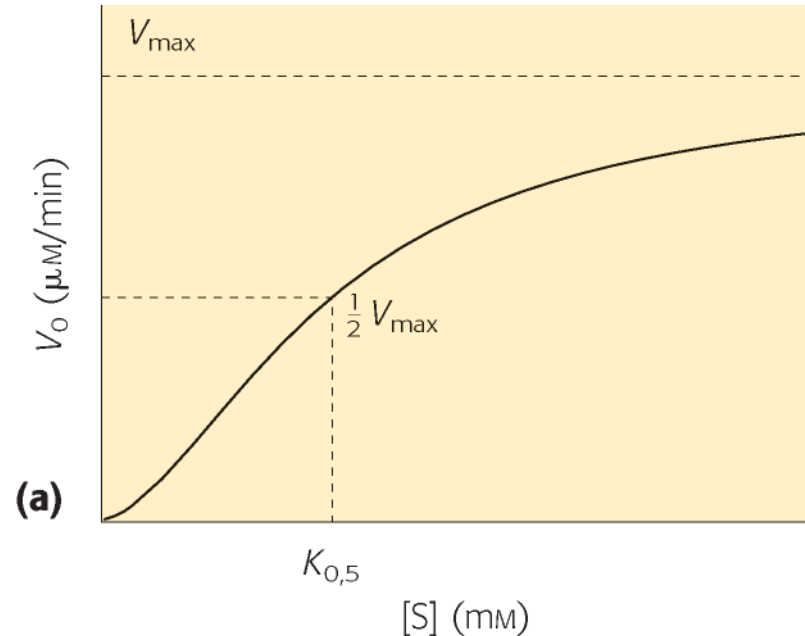
INIBIZIONE A FEEDBACK

La conversione della L-treonina in L-isoleucina è catalizzata da una sequenza di 5 enzimi.

Il primo enzima della via di conversione è inibito allostericamente dal prodotto finale della sequenza di reazioni.



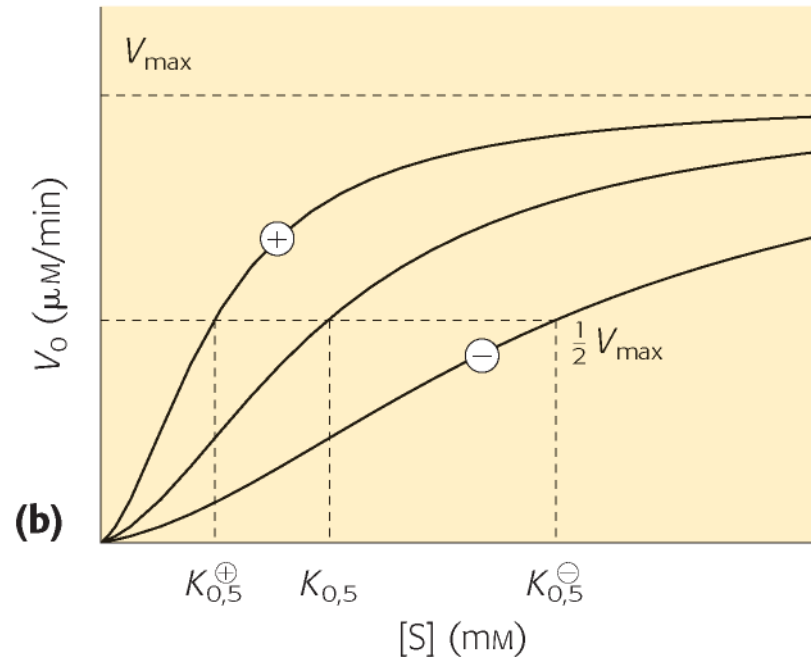
ENZIMI ALLOSTERICI non seguono la cinetica di Michaelis e Menten



ENZIMA OMOTROPICO

- Il substrato agisce da attivatore, la curva si sposta verso sinistra; la reazione si avvicina a V_{max} a concentrazioni di substrato minori
- La curva cinetica ha andamento sigmoidale che riflette la cooperatività di interazione tra le subunità

ENZIMI ALLOSTERICI non seguono la cinetica di Michaelis e Menten



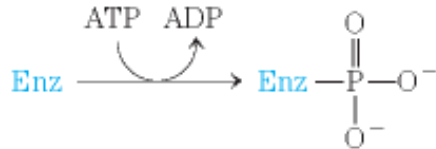
ENZIMA ETEROTROPICO

- La curva cinetica ha andamento sigmoidale che riflette la cooperatività di interazione tra le subunità
- Un inibitore sposta la curva verso destra, al contrario un attivatore verso sinistra

ENZIMI REGOLATI MEDIANTE MODIFICAZIONI COVALENTI

Fosforilazione

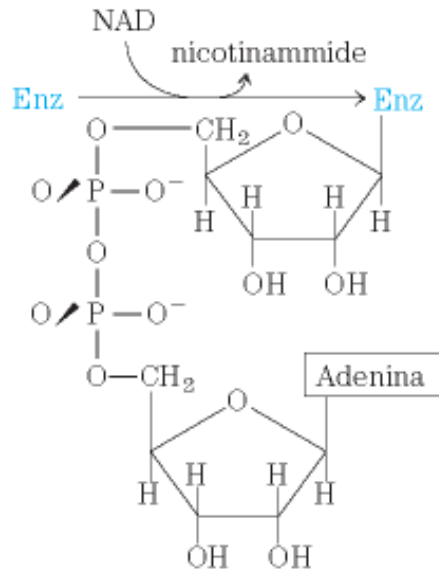
(Tyr, Ser, Thr, His)



Circa il 30% delle proteine cellulari sono fosforilate

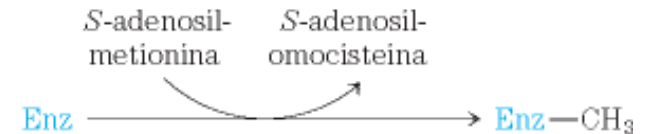
ADP-ribosilazione

(Arg, Gln, Cys, diptamide – una His modificata)



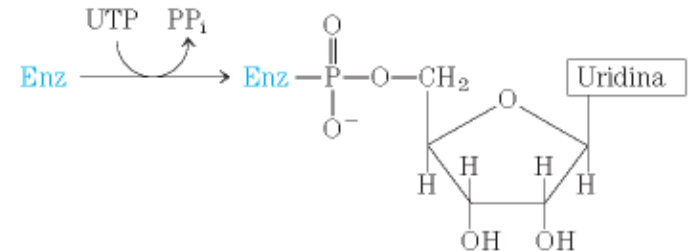
Metilazione

(Glu)



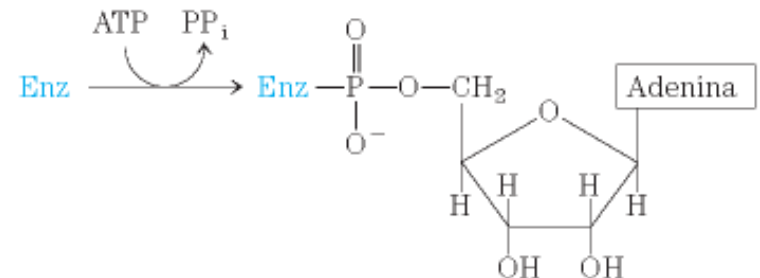
Uridilazione

(Tyr)



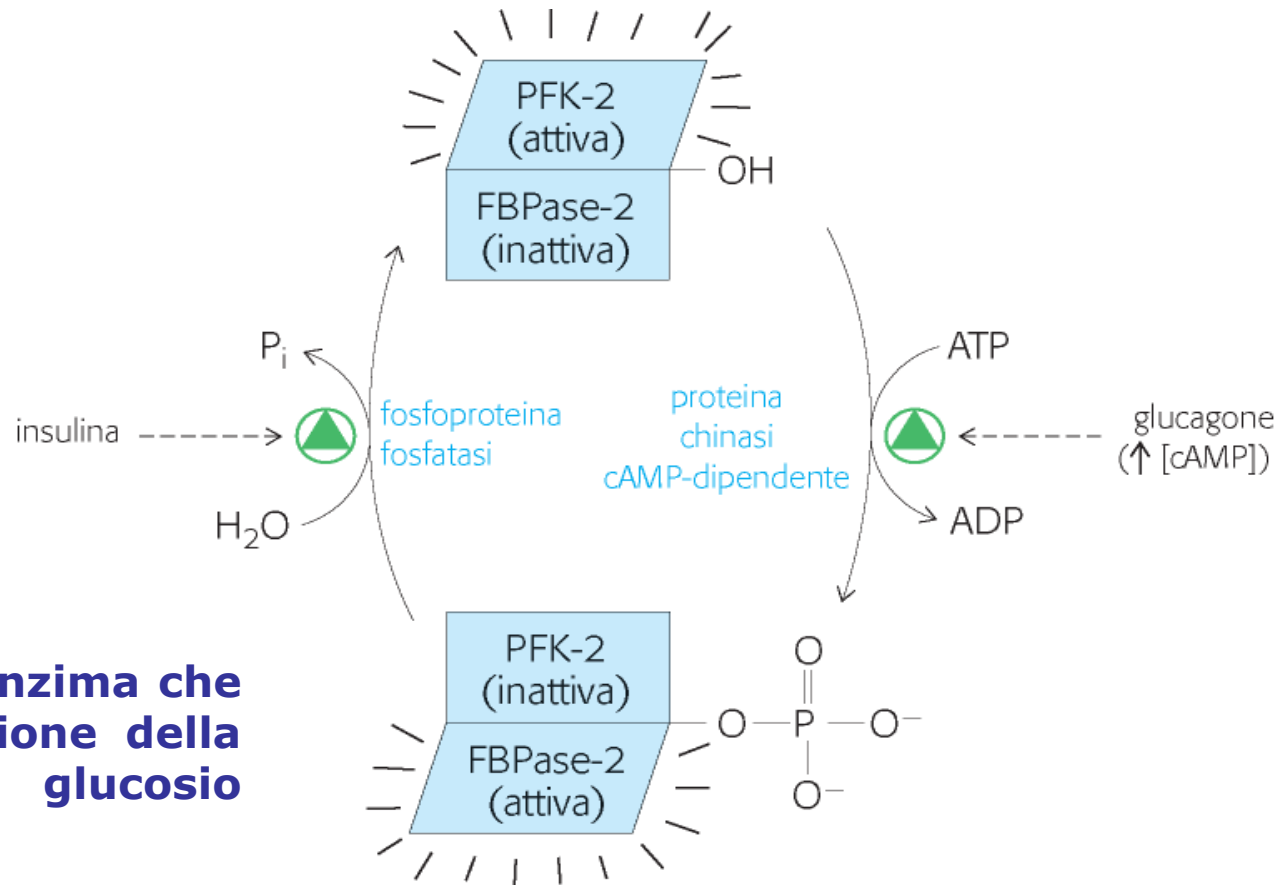
Adenilazione

(Tyr)



ENZIMI REGOLATI MEDIANTE MODIFICAZIONI COVALENTI

La fosforilazione: esempio dell'enzima fosfofruttochinasi 2



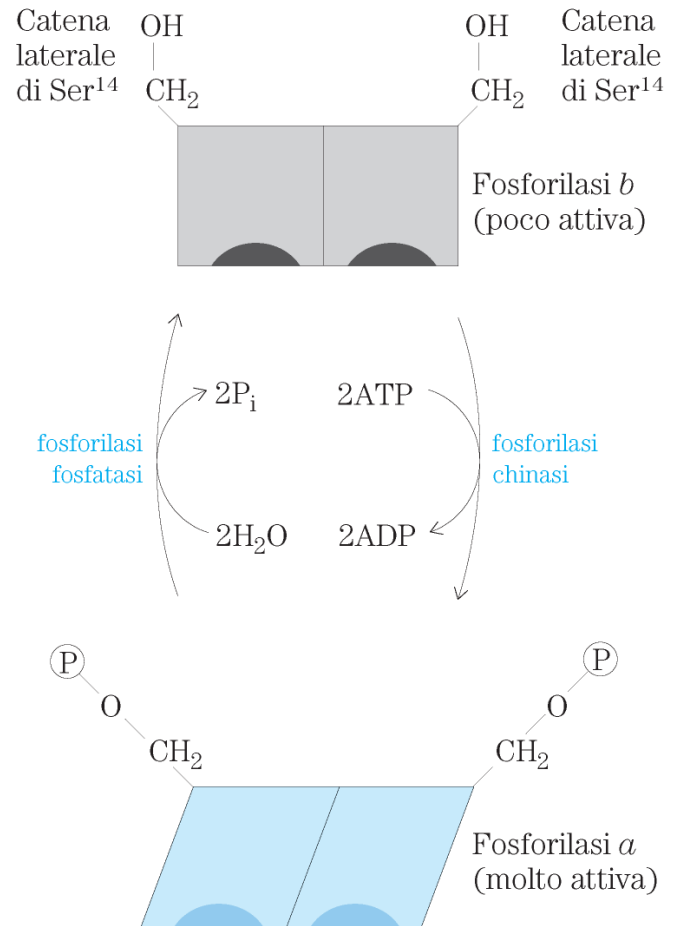
Fosfofruttochinasi 2: enzima che partecipa alla regolazione della degradazione del glucosio (glicolisi)

La fosforilazione è controllata dagli ormoni glucagone ed insulina

ENZIMI REGOLATI MEDIANTE MODIFICAZIONI COVALENTI

La fosforilazione: esempio dell'enzima glicogeno-fosforilasi

glicogeno fosforilasi: enzima che regola la degradazione del glicogeno



La fosforilazione è controllata dagli ormoni glucagone ed insulina

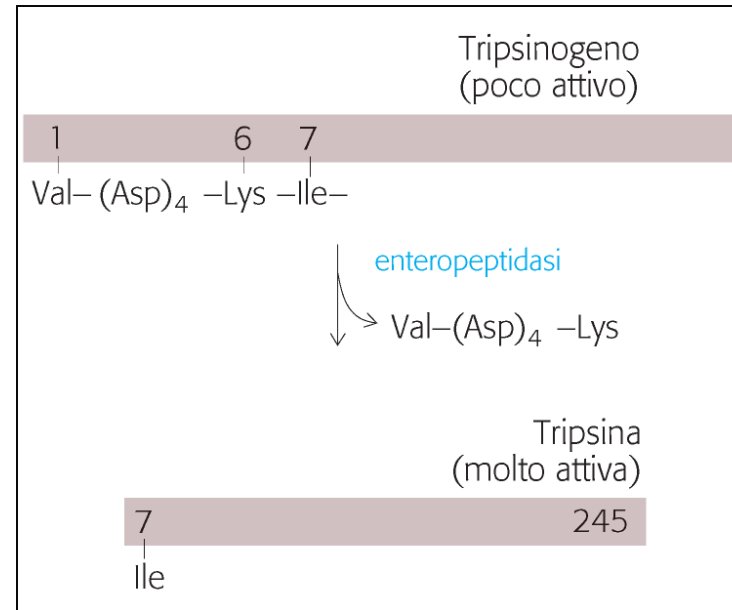
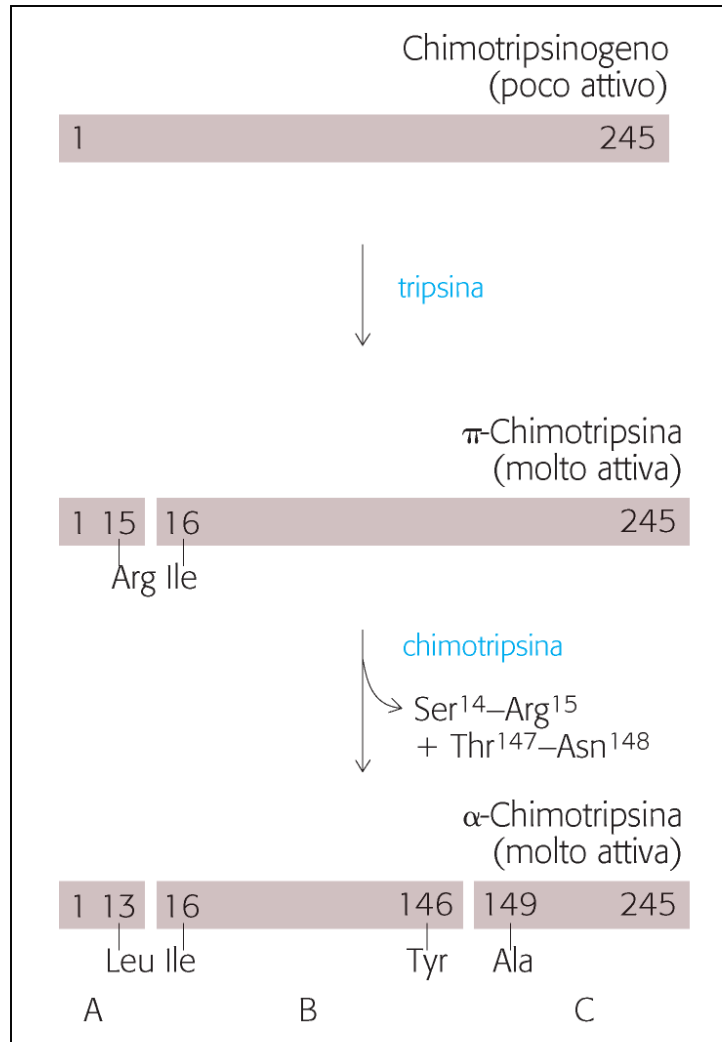
ISOZIMI



- Servono a variare la regolazione di una specifica reazione in distretti diversi di uno stesso organismo o in tempi diversi
- Regolazione specifica in diversi tessuti dello stesso organismo: l'esistenza degli isozimi consente di regolare il metabolismo in base al fabbisogno dei singoli tessuti o in base allo stadio dello sviluppo
- proteine omologhe presenti in localizzazioni differenti dello stesso organismo che catalizzano la stessa reazione ma con K_m e V_{max} diverse
- Hanno sequenza primaria diversa

REGOLAZIONE DIPENDENTE DA PROTEOLISI

ZIMOGENO: precursore inattivo



forma attiva dell'enzima, ottenuta per proteolisi dello zimogeno