

Cinetica enzimatica

Cenni alla cinetica delle reazioni

- *Velocita' di reazione*
- *Reazioni di I° e II° ordine*
- *Molecolarita' di una reazione*
- $t_{1/2}$
- *Velocita' e costanti di equilibrio*

CINETICA ENZIMATICA

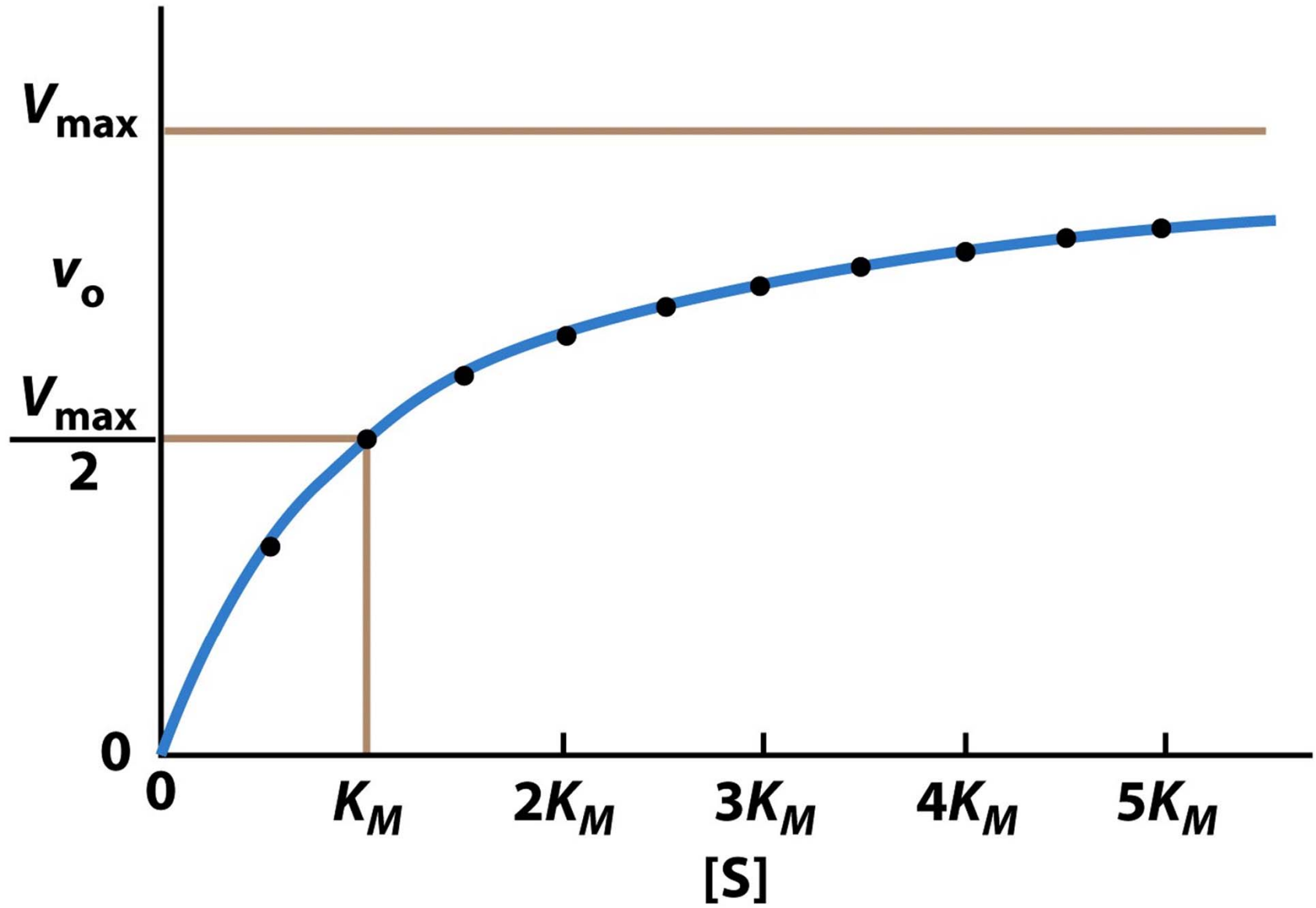
OVVERO:

LO STUDIO DELLA VELOCITA' DI REAZIONE

FATTORI CHE INFLUENZANO LA VELOCITA' DI REAZIONE:

- Concentrazione del substrato**
- Concentrazione dell'enzima**
- pH**
- Temperatura**
- Inibitori, Attivatori**
- Concentrazione dei Sali (forza ionica)**

La velocità di una reazione enzimatica in funzione della concentrazione del substrato



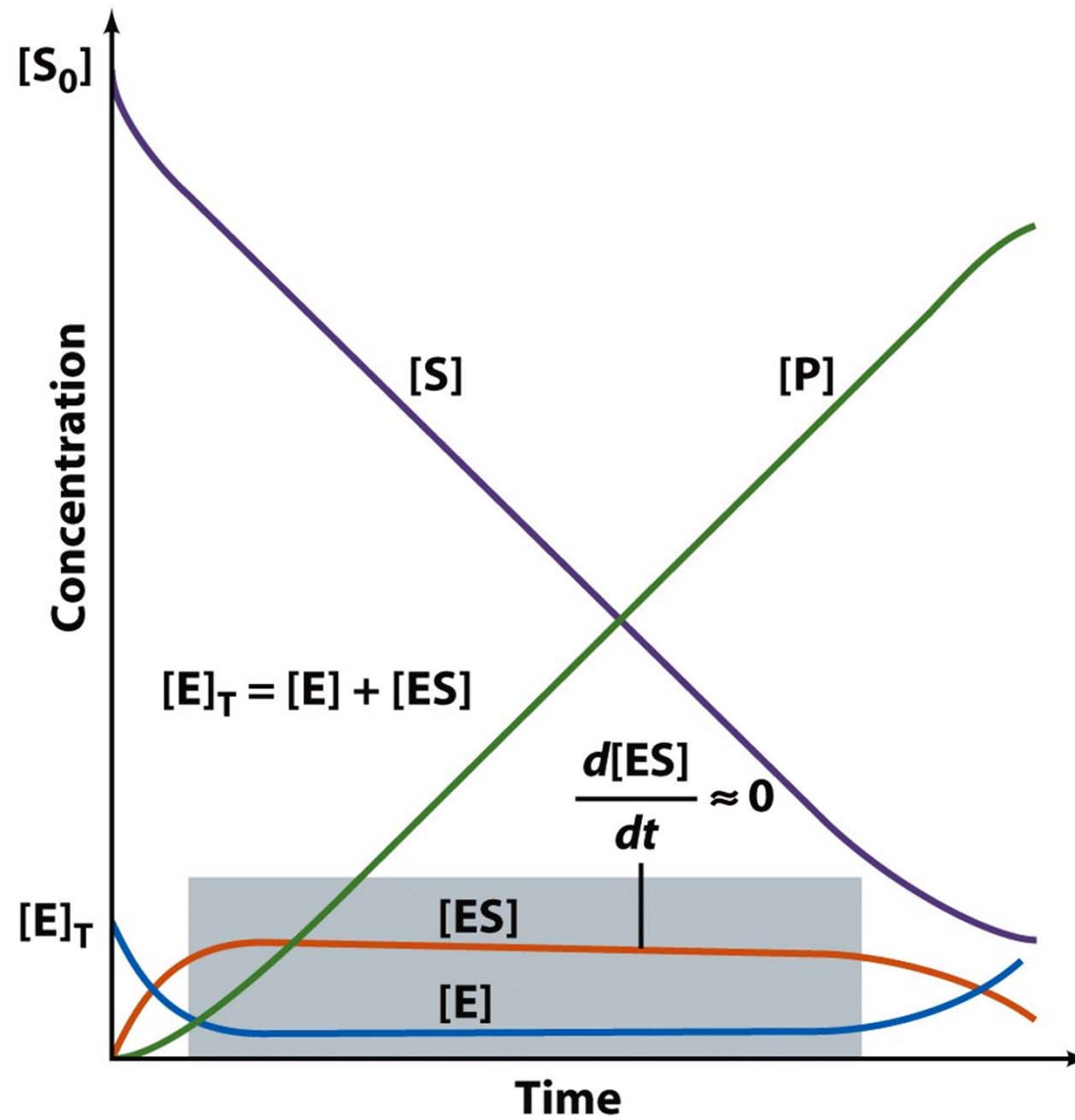
© 2008 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

(D. Voet, J.G. Voet, Biochemistry, 3^o ed., John Wiley & Sons, 2004)

Teoria di Michaelis e Menten

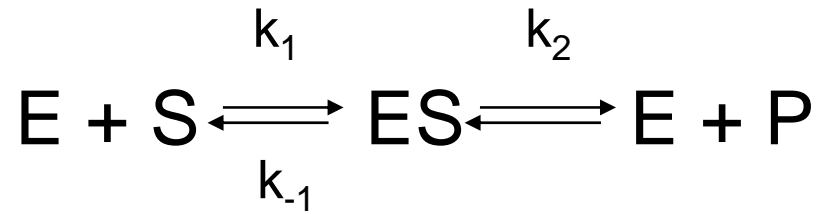
Teoria di Briggs e Haldane

(Teoria dello “stato stazionario”)



© 2008 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

(D. Voet, J.G. Voet, Biochemistry, 3^o ed., John Wiley & Sons, 2004)



Dove: $k_2 = k_{cat}$

e se: $k_2 \geq k_{-1}$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_{-1}[ES]$$

sostituendo con: $[E] = [E_0] - [ES]$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} + [S]} \quad \text{ma poiché: } v = k_{cat}[ES]$$

$$v = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} + [S]}$$

Questa è l'equazione di Michaelis-Menten, dove:

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

Equazione di Michaelis e Menten

$$v = \frac{k_{cat} [E_0][S]}{K_M + [S]}$$

dove: $k_{cat} [E_0] = V_{\max}$

La concentrazione del substrato alla quale $v = \frac{1}{2} V_{\max}$ è denominata K_M , **la costante di Michaelis.**

Notare che a basse $[S]$, dove $[S] \ll K_M$:

$$v = \frac{k_{cat}}{K_M} [E_0][S]$$

Poiché K_S per la dissociazione di [ES] è uguale a $\frac{k_{-1}}{k_1}$ si ha:

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

E' chiaro che quando $k_{-1} \gg k_2$, l'equazione si semplifica a:

$$K_M = K_S$$

Se: $k_{cat} [E_0] = V_{max}$ si ha che :

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \text{ da cui :}$$

$$[S] \gg K_M, \quad v = V_{max}$$

$$[S] \ll K_M, \quad v = \frac{V_{max}}{K_M} \times [S]$$

$$[S] = K_M, \quad v = \frac{V_{max}}{2}$$

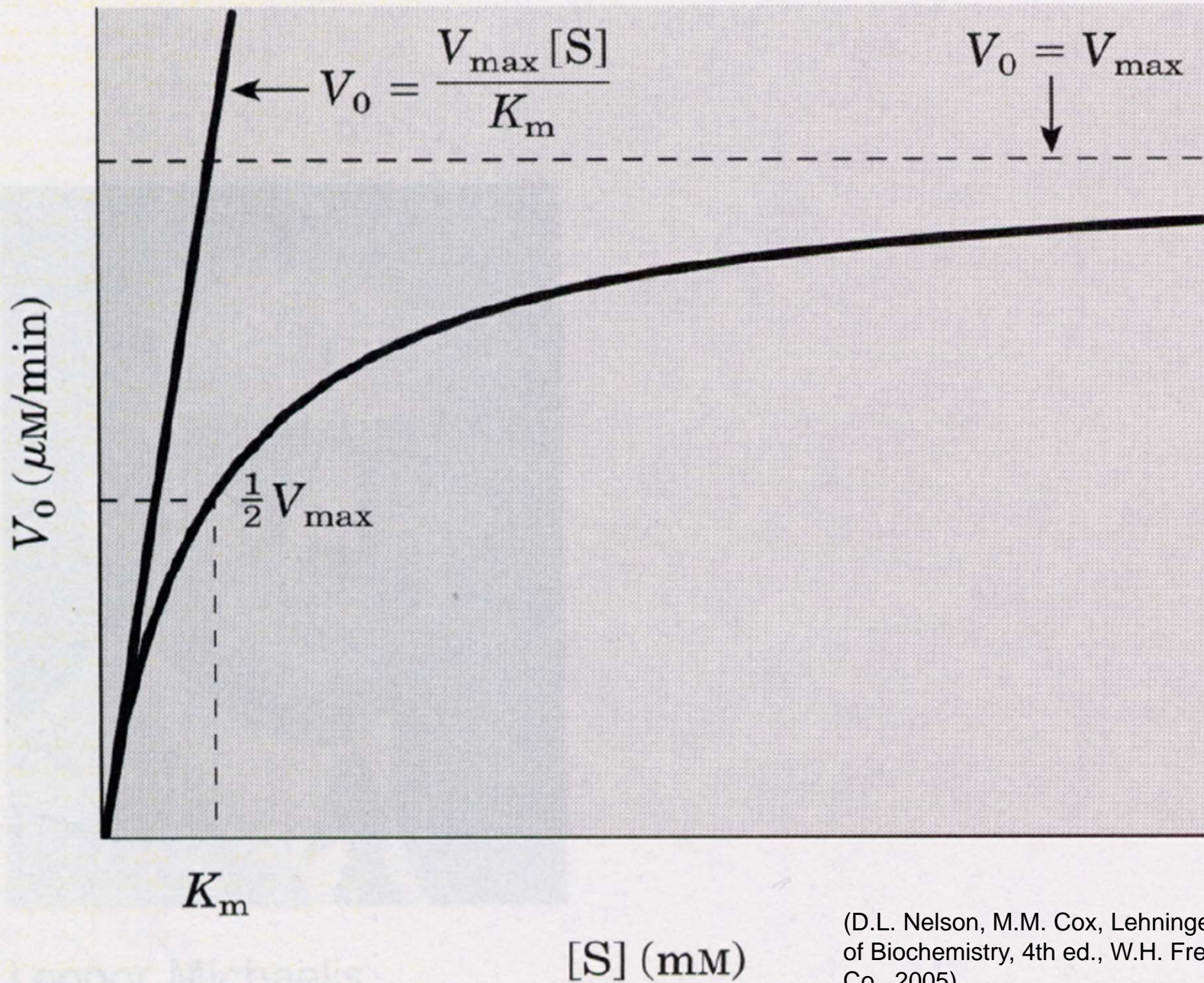


$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_S \quad v = k_{cat} [ES]$$

$[E] = [E_0] - [ES]$ da cui:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_S + [S]} \quad \text{e} \quad v = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{K_S + [S]}$$

Quest'ultima equazione è uguale a quella iniziale, dove K_M è uguale alla costante di dissociazione del complesso enzima-substrato, K_S .



(D.L. Nelson, M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed., W.H. Freeman & Co., 2005)

Dato:

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

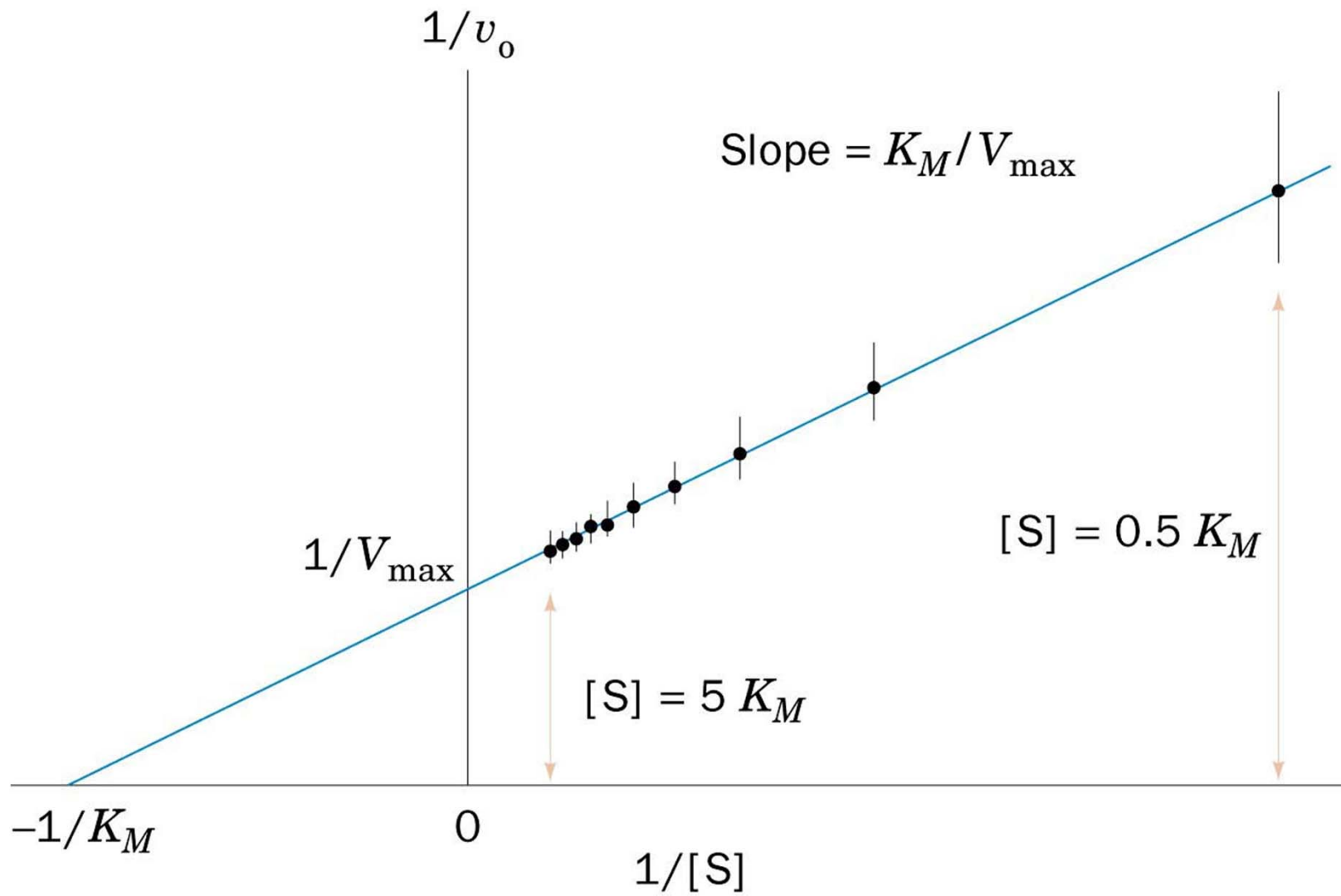
prendendo i reciproci :

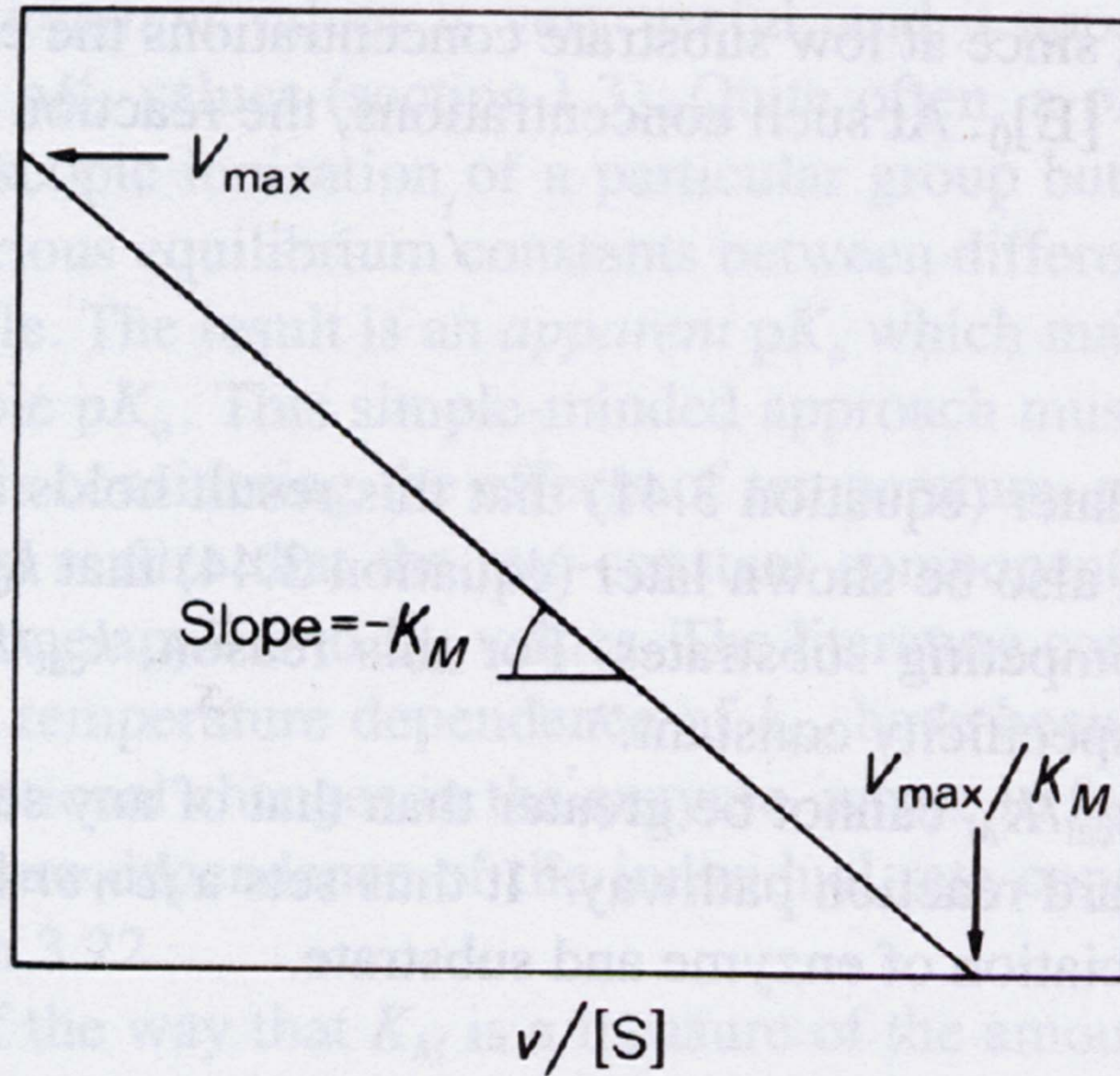
$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Grafico di Lineweaver e Burk (o dei reciproci)

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

Grafico di Eadie e Hofstee





The Eadie-Hofstee plot.

(A. Fersht, Structure and mechanism in protein science, W.H. Freeman & Co., 1999)

Il significato dei parametri di Michaelis e Menten:

k_{cat} :

- nel semplice meccanismo di Michaelis e Menten in cui vi è un solo complesso enzima-substrato e tutte gli steps di “binding” sono veloci, k_{cat} è semplicemente la costante di I° ordine per la conversione chimica del complesso ES nel complesso EP;
- (per reazioni più complesse, k_{cat} è una funzione di tutte le costanti di I° ordine e non può essere assegnata a un particolare processo eccetto quando intervengano delle semplificazioni;)

- $k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]}$, questa quantità è detta anche *numero di turnover* perché rappresenta il numero massimo di molecole di substrato convertite in prodotto per sito attivo nell’unità di tempo (o il numero di volte che l’enzima ‘turns over’ per unità di tempo.

K_M :

-sebbene valida per il semplice meccanismo di Michaelis e Menten o in casi in cui comunque $K_M = K_S$, la vera costante di dissociazione del complesso enzima-substrato, K_M può essere considerata in qualche caso come **una costante di dissociazione apparente**.

- K_M è unica per ogni coppia enzima-substrato. Substrati differenti che reagiscono con uno stesso enzima hanno K_M differenti; così come enzimi differenti che agiscono su uno stesso substrato hanno K_M differenti.

-In reazioni enzimatiche dove esistono più complessi ES, K_M rappresenta comunque la quantità di enzima legato sotto qualsiasi forma al substrato.

-In tutti i casi K_M è la concentrazione del substrato alla quale:

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

K_M è una costante di dissociazione apparente che può essere considerata come la costante di dissociazione complessiva di tutte le specie di enzima legato.

k_{cat}/K_M :

quando $[S] \ll K_M$, ES si forma in quantità minima. Di conseguenza,

$$[E] \approx [E_0]$$
$$v = \frac{k_{cat} [E_0] [S]}{K_M} \approx \frac{k_{cat}}{K_M} \times [E][S]$$

In questo caso, k_{cat}/K_M è la costante apparente di secondo ordine della reazione enzimatica; la velocità della reazione varia direttamente in proporzione *a quante volte enzima e substrato si incontrano* in soluzione. Questa quantità è quindi *una misura dell'efficienza catalitica dell'enzima*.

Vi è un limite superiore al valore di k_{cat}/K_M : esso non può essere più grande di k_1 , cioè la decomposizione di ES a dare E + P non può avvenire con maggior frequenza di quanto E ed S si uniscono a formare ES.

Gli enzimi più efficienti hanno valori di k_{cat}/K_M prossimi al limite di diffusione di $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$.

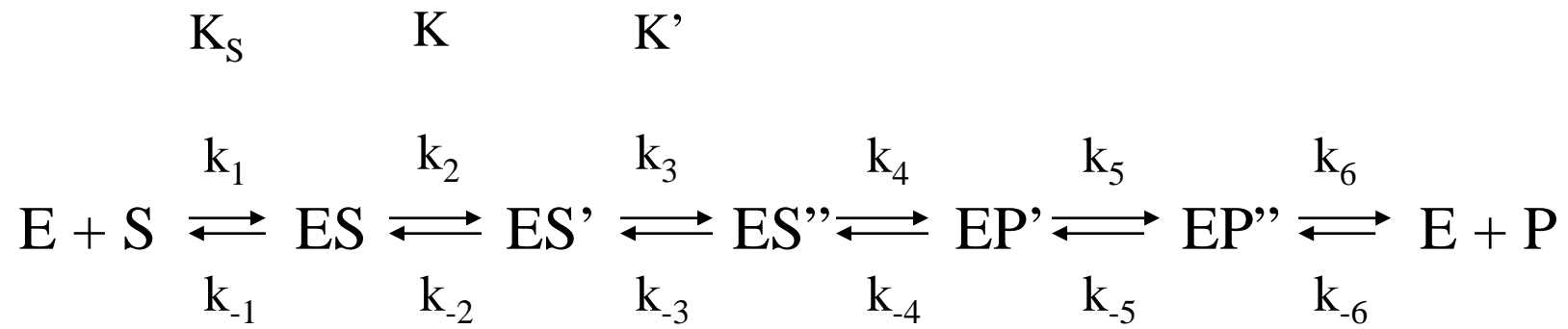
Praticamente l'enzima catalizza una reazione ogni volta che esso incontra una molecola di substrato.

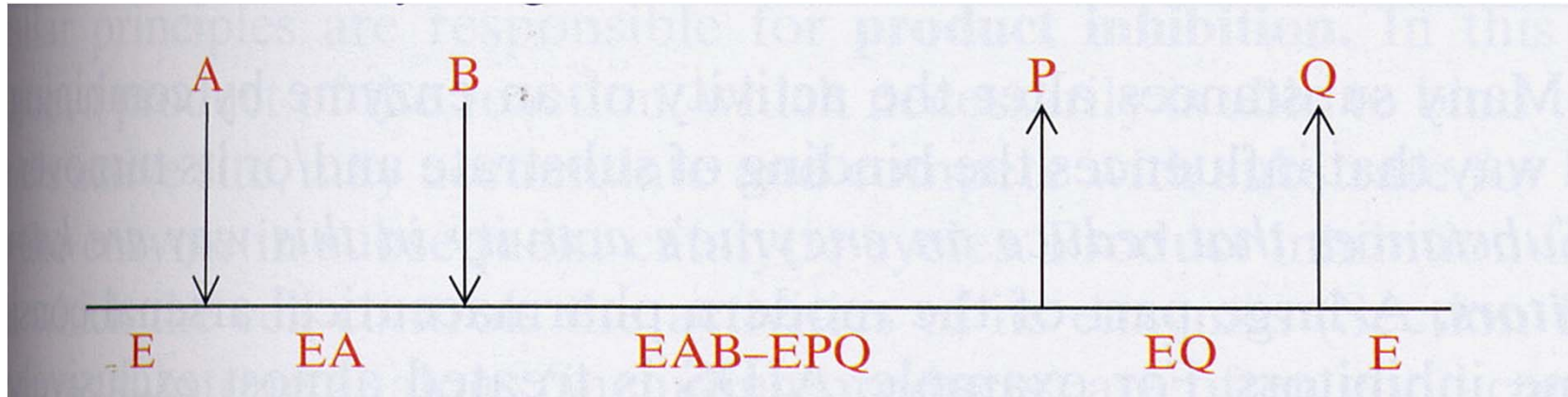
Table 12-1 The Values of K_M , k_{cat} , and k_{cat}/K_M for Some Enzymes and Substrates

Enzyme	Substrate	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	9.5×10^{-5}	1.4×10^4	1.5×10^8
Carbonic anhydrase	CO ₂	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO ₃ ⁻	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
Catalase	H ₂ O ₂	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	<i>N</i> -Acetyl glycine ethyl ester	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	<i>N</i> -Acetylvaline ethyl ester	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	<i>N</i> -Acetyltyrosine ethyl ester	6.6×10^{-4}	1.9×10^2	2.9×10^5
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-6}	8.0×10^2	1.6×10^8
	Malate	2.5×10^{-5}	9.0×10^2	3.6×10^7
Urease	Urea	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

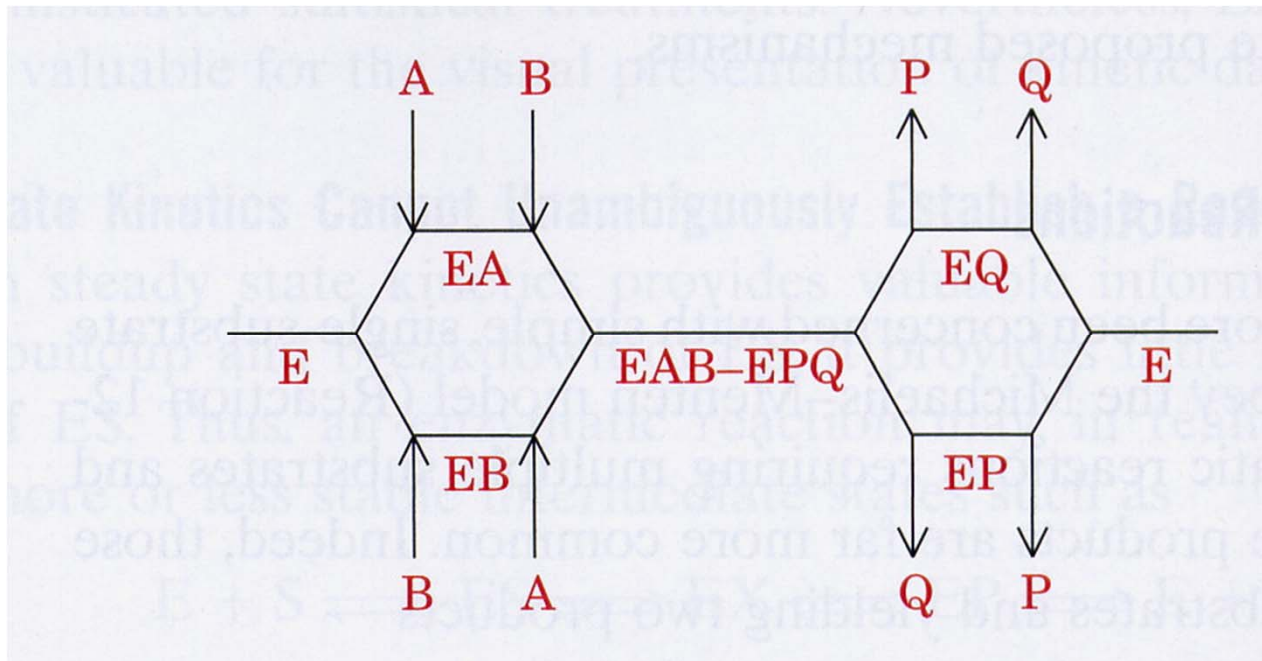
Table 12-1 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

k_{cat} : numero di micromoli di S convertite in P per secondo da una micromole di enzima operante in condizioni saturanti di S.

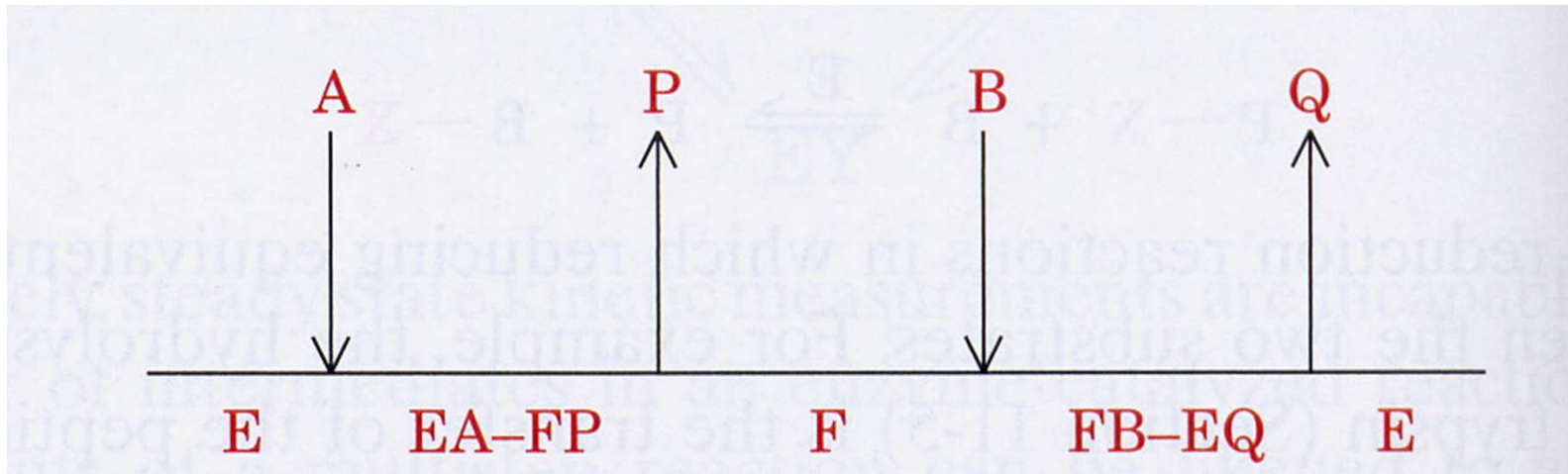




(D. Voet, J.G. Voet, Biochemistry, 3^o ed., John Wiley & Sons, 2004)



(D. Voet, J.G. Voet, Biochemistry, 3^o ed., John Wiley & Sons, 2004)



(D. Voet, J.G. Voet, Biochemistry, 3^o ed., John Wiley & Sons, 2004)

