

Comprende versione

ebook



Umberto Mura

Enzimi in azione

Fondamenti di cinetica e regolazione delle reazioni enzimatiche

II Edizione

ENZIMI IN AZIONE

Fondamenti di cinetica e regolazione delle reazioni enzimatiche

II EDIZIONE

Umberto Mura
Docente di Biochimica
Dipartimento di Biologia
Università di Pisa



UMBERTO MURA

ENZIMI IN AZIONE: FONDAMENTI DI CINETICA E REGOLAZIONE DELLE REAZIONI ENZIMATICHE - II EDIZIONE

Copyright © 2020, EdiSES Università s.r.l. – Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

2025 2024 2023 2022 2021 2020

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata

A norma di legge è vietata la riproduzione, anche parziale, del presente volume o di parte di esso con qualsiasi mezzo.

L'Editore

L'Editore ha effettuato quanto in suo potere per richiedere il permesso di riproduzione del materiale di cui non è titolare del copyright e resta comunque a disposizione di tutti gli eventuali aventi diritto

Fotocomposizione: V colore di Francesco Omaggio – Pordenone

Stampato presso

PrintSprint Srl – Napoli

per conto della

EdiSES Università s.r.l. – Napoli

http://www.edisesuniversita.it e-mail: info@edisesuniversita.it

ISBN 978 88 3623 011 2

Prefazione

Non credo sia necessario spendere troppo tempo per sottolineare l'importanza degli enzimi. La loro azione è alla base di tutti i processi che concorrono a definire, anche se nel senso più meccanicistico del termine, la vita cellulare. Nel nostro vivere quotidiano, peraltro, la familiarità con queste importanti biomolecole, non fosse altro che per i loro nomi o per quello dei loro cofattori, è in continua crescita: dagli enzimi che compaiono come “markers” nei referti analitici di controllo della nostra salute, a quelli che nei “bugiardini” vengono indicati come specifici bersagli di farmaci, a quelli citati negli alimenti, nei prodotti per la cosmesi e perfino nei detersivi.

Ho speso la mia vita lavorativa occupandomi di enzimi, del loro isolamento, delle loro caratteristiche strutturali, delle loro proprietà cinetiche e regolatorie, esaltandomi per la loro pur rara generosità nel rivelare segreti e, allo stesso tempo, e più spesso, soffrendo per la loro dispettosa labilità, le loro restrittive esigenze di microambiente o per la loro delicatezza funzionale, insomma, per la loro complessità. Tutto ciò ha permesso di potermi dedicare all'insegnamento della Biochimica e dell'Enzimologia dalla posizione privilegiata che sempre ha chiunque parli di cose che vive in prima persona. Ci si rende in questo modo conto, trasmettendoli, dei limiti delle certezze della conoscenza, dei punti di criticità dell'insegnamento di discipline così vaste ed articolate, ma anche delle incongruità didattiche che sempre più di frequente accompagnano i nostri corsi d'insegnamento a livello universitario. Non è infrequente così incontrare “carri che precedono i buoi”, con passeggeri che avanzano fintanto che si viaggia in discesa, ma che non sono in grado di governare il viaggio alla prima difficoltà. Troppo spesso si saltano i preliminari, le tanto vituperate conoscenze di base o la noiosa terminologia, per rincorrere, più che per tuffarsi, argomenti avanzati più attraenti, dai quali sembra poi degradante tornare all'*ABC*. Un atteggiamento che riflette, sia pure con concreto distacco, il tanto comune pensare del prevalere dell'indagine applicata rispetto a quella di base.

L'idea di questo mio lavoro è nata dalla constatazione, verificata durante la pluriennale esperienza di docente a studenti dei Corsi di Laurea in Scienze Biologiche e in Chimica, della esigenza di un testo che presenti in modo non dispersivo quelli che sono gli ineludibili concetti di base per lo studio della funzione enzimatica. I diversi aspetti della cinetica enzimatica sono così affrontati con una impostazione focalizzata alla analisi delle proprietà catalitiche e regolatorie degli enzimi, evitando volutamente di indugiare su aspetti di metodologia biochimica, la cui necessaria sintesi (a meno della stesura di “manuali”) è spesso fonte di banalizzazione delle problematiche sperimentali che tali sistemi richiedono per essere studiati in modo adeguato.

L'obiettivo che mi prefiggevo nel momento in cui mi decisi a mettere in bella copia le mie lezioni, era quello di avviare lo studente che affronta una disciplina come la Biochimica ad uno “studio ragionato” della biocatalisi. Ciò vuol dire affrontare lo studio di una reazione catalizzata da un enzima utilizzando tutto il bagaglio di conoscenze che, almeno su carta, uno studente d'istruzione superiore dovrebbe possedere (concetti e strumenti di matematica, fisica e chimica). Il testo quindi si prefigge di accompagnare passo dopo passo lo studente nell'analisi di sistemi, a volte articolati, a volte semplificati al limite del banale, ponendo attenzione nel definire accuratamente, a costo di pedanteria, modelli e limiti di applicazione dei medesimi.

Gli argomenti trattati e la loro successione non sono che lo sviluppo di una parte del Corso di insegnamento di Enzimologia a cui per anni mi sono dedicato e particolare attenzione è posta, affrontando i diversi argomenti, nel garantire, oltre ad una omogeneità di linguaggio e di simbologia, anche il richiamo frequente di concetti di

base per lo studio delle reazioni enzimatiche. Ciò è favorito dall'inserimento nel testo di una brevissima parte iniziale (palesamente, ma anche dichiaratamente non esaustiva della materia) di richiamo di concetti di termodinamica nonché di cinetica chimica.

Nella trattazione si sottolinea costantemente l'importanza della definizione dei modelli adottati e dei loro limiti nella interpretazione dei risultati di studi cinetici di reazioni enzimatiche. Facendo uso di “note” e di “box esplicativi”, ma anche di un breve capitolo di “Appendice”, l'analisi è presentata accompagnando il lettore nella risoluzione, tappa dopo tappa, delle diverse equazioni che descrivono il comportamento dei sistemi presi in esame.

Sempre in Appendice è riportato un contributo del collega Prof. Paolo Parenti della Università di Milano Bicocca, che ringrazio di cuore per la sua generosa disponibilità, in cui il lettore trova una incisiva, chiara, ed istruttiva revisione storica dei meriti reali e presunti degli scienziati che, a cavallo dei due passati secoli, hanno aperto la strada alla moderna enzimologia.

Il testo “*Enzimi in azione: fondamenti di cinetica e regolazione delle reazioni enzimatiche*” intende rivolgersi prioritariamente a studenti universitari (Biologia, Chimica, Farmacia, Biotecnologie) che affrontano lo studio di materie biomolecolari, per le quali la conoscenza più o meno approfondita della funzione degli enzimi è elemento indispensabile. Esso può tuttavia essere, a mio avviso, un utile ausilio anche per coloro che, in diversi ambiti, si dedicano o intendono dedicarsi più specificamente a studi enzimologici.

Il messaggio che mi auguro possa arrivare è che l'analisi di un modello non deve essere un momento di disperazione, come accade a molti studenti che relegano discipline diverse in comparti diversi e a tenuta stagna, ma il momento di operare una sintesi delle proprie conoscenze e di dimostrare la capacità di una loro integrazione. L'auspicio è l'acquisizione della consapevolezza che arrivare in fondo all'analisi di uno schema di reazione più o meno complesso, come quelli che s'incontrano nello studio di una reazione enzimatica, significa aver compreso il sistema nei suoi dettagli, nei suoi punti di forza, ma anche nei suoi limiti. Questo è importante quando dallo studio “accademico” si passa allo studio che punta alla crescita delle conoscenze ed, in successione, alla innovazione nel proprio campo d'indagine professionale.

Umberto Mura
Giugno 2020

*A quanti che con la loro dedizione e passione
per il proprio lavoro, con la loro costruttiva
disponibilità, comprensione, pazienza e affetto,
hanno mantenuto viva la mia voglia di fare.*

Un ringraziamento particolare ad un drappello di ottimi studenti del corso di enzimologia II degli AA 2009-10 e 2010-11 (Alessandro, Chiara, Claudia, Cristina, Emanuele, Enrico, Fabio, Francesco, Giorgia, Leandro, Luigi, Marco e ancora Marco) il cui interesse alla materia ha fatto da volano alla stesura del testo. Un altro grazie a Piero (Piero Luigi Ipata, Professore Emerito di Biochimica dell'Università di Pisa) per le sue gocce di saggezza. Infine grazie ad Adele (Dr.ssa Adele Bonacci, Dipartimento di Biologia, Università di Pisa) per il suo attento e prezioso lavoro di "editing" del manoscritto.

*I proventi da diritti d'autore di quest'opera
sono devoluti al Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa,
quale contributo per l'attività didattica sperimentale in campo
biochimico/enzimologico.*

Indice generale

Capitolo 1 - Concetti di base per lo studio delle reazioni chimiche	1
1.1 Termodinamica in pillole: alcune definizioni, principi ed utili concetti	1
1.1.1 Il Primo principio della termodinamica	2
1.1.1.1 - L'energia interna	2
1.1.1.2 - Il lavoro	3
1.1.1.3 - Trasformazioni reversibili e irreversibili	4
1.1.1.4 - Il calore	5
1.1.1.5 - La funzione Entalpia	5
1.1.1.6 - Stati standard di riferimento	6
1.1.1.6.1 Legge di Hess o dell'additività dei calori di reazione	6
1.1.2 La spontaneità dei processi	7
1.1.2.1 - La funzione Entropia	8
1.1.2.1.1. Concetto statistico di entropia	8
1.1.2.1.1. Concetto termodinamico di entropia	11
1.1.2.2 - Funzioni ausiliarie per la definizione dei processi spontanei	12
1.1.2.3 - La condizione di equilibrio di una reazione chimica	13
1.2 Il decorso di una reazione chimica	15
1.2.1 L'energia di attivazione	15
1.2.2 Il concetto di coordinata di reazione	16
1.2.3 L'equazione di Arrhenius	19
1.2.4 La teoria dello stato di transizione	19
1.3 Fondamenti di cinetica formale	21
1.3.1 La velocità di reazione, ordine di reazione e moleolarità	21
1.3.2 Reazioni di ordine zero	24
1.3.3 Reazioni del primo ordine	25
1.3.4 Reazioni del secondo ordine	27
1.3.5 Reazioni consecutive	30
1.3.6 La cinetica e la termodinamica si incontrano	31
1.3.7 Effetto della temperatura sulla costante d'equilibrio	32
Riferimenti bibliografici ed utili letture	33
 Capitolo 2 - La catalisi enzimatica	 35
2.1 La catalisi	35
2.1.1 Il significato di catalisi in una reazione chimica	35
2.1.2 Catalisi in fase eterogenea ed in fase omogenea	36
2.1.2.1 - Catalisi acida e catalisi basica generalizzate	38
2.1.2.2 - Catalisi elettrostatica e catalisi da ione metallico	39
2.1.2.3 - Catalisi covalente	40
2.1.2.3.1 - Catalisi covalente nucleofila	41
2.1.2.3.2 - Catalisi covalente elettrofila	43
2.1.2.4 - Catalisi asimmetrica	43
2.1.2.5 - Catalisi concertata	44
2.1.2.6 - Reazioni intermolecolari e reazioni intramolecolari	45

2.2	Gli enzimi	49
2.2.1	Considerazioni generali	49
2.2.2	Il sito attivo ed il complesso enzima-substrato	51
2.2.3	Fattori che influiscono sull'efficienza catalitica degli enzimi	53
2.2.4	Cofattori, coenzimi e gruppi prostetici	55
2.2.5	La classificazione degli enzimi	58
2.2.5.1	Ossidoreduttasi (EC 1)	59
2.2.5.2	Transferasi (EC 2)	59
2.2.5.3	Idrolasi (EC 3)	60
2.2.5.4	Liasi (EC 4)	61
2.2.5.5	Isomerasi (EC 5)	62
2.2.5.6	Ligasi (EC 6)	63
2.2.6	Meccanismo d'azione degli enzimi	64
2.2.6.1	La chimotripsina	64
2.2.6.2	La saccarosio fosforilasi	66
2.2.6.3	Le transaminasi e la versatilità del piridossal-fosfato quale cofattore	66
2.2.6.4	Fenilalanina ed istidina ammoniacali, un esempio di enzimi autarchici	69
2.2.6.5	L'anidrasi carbonica, un catalizzatore al limite della perfezione	73
2.2.6.6	L'alcol deidrogenasi e la stereospecificità	75
	Riferimenti bibliografici ed utili letture	79
Capitolo 3	Cinetica enzimatica	81
3.1	Reazioni enzimatiche con un solo substrato	81
3.1.1	Introduzione all'analisi cinetica di una reazione enzimatica	81
3.1.2	L'equazione cinetica per un enzima semplice	84
3.1.2.1	Analisi del modello con ES all'equilibrio	85
3.1.2.2	Analisi del modello con ES allo stato stazionario	86
3.1.3	Determinazione dei parametri cinetici V_{max} e K_M	89
3.1.3.1	Metodi grafici per la determinazione di V_{max} e K_M	90
3.1.4	La costante di specificità k_{cat} / K_M	92
3.1.4.1	La perfezione catalitica	92
3.1.5	Le unità enzimatiche	94
3.1.6	Analisi di Henri-Michaelis-Menten (H-M&M) per reazioni reversibili	94
3.1.7	Reazioni reversibili e transizioni del complesso enzima-substrato	97
3.1.8	La relazione di Haldane	100
3.1.9	Equazione di H-M&M integrata	101
3.1.10	Reazioni enzimatiche con due substrati agonisti	105
3.1.10.1	Analisi del sistema in condizione di stato stazionario	105
3.1.10.2	Influenza reciproca dei due substrati agonisti	107
3.1.10.3	Il concetto di substrato "reporter"	110
3.2	Reazioni enzimatiche con due substrati	112
3.2.1	Meccanismi e loro rappresentazione	112
3.2.2	Meccanismo sequenziale Bi:Bi random	113
3.2.3	Meccanismo sequenziale Bi:Bi ordinato	119
3.2.4	Meccanismo sequenziale a doppio spostamento (ping-pong)	123
3.2.5	Nota conclusiva: diversi meccanismi a confronto	127
3.3	La cinetica di enzimi immobilizzati	128
3.3.1	Nota introduttiva	128
3.3.2	Il flusso di substrato	128
3.3.3	Equazione cinetica in presenza di fenomeni diffusivi	132
3.3.4	Effetto di interazioni elettrostatiche e di fenomeni di diffusione sulla cinetica di enzimi immobilizzati	135

3.3.4.1 - Definizione del flusso di substrato in presenza di fenomeni diffusivi e di carica elettrica	135
3.3.5 Equazione cinetica in presenza di fenomeni diffusivi e di carica	138
Riferimenti bibliografici ed utili letture	142
 Capitolo 4 - Modulazione dell'attività enzimatica	 143
 4.1 Effetto della temperatura sull'attività enzimatica	 143
4.1.1 Introduzione	143
4.1.2 Effetto della temperatura sulla reazione	144
4.1.3 Il processo di denaturazione termica dell'enzima	148
4.1.4 Preservazione dell'attività enzimatica	151
4.2 Effettori di una reazione enzimatica diversi dal substrato	152
4.2.1 Modello generale di interazione enzima-effettore	152
4.2.2 Inibizione reversibile degli enzimi	154
4.2.2.1 - Inibizione competitiva	154
4.2.2.2 - Inibizione non competitiva	159
4.2.2.2.1 - Inibizione puramente non competitiva	159
4.2.2.2.2 - Inibizione non competitiva di tipo misto	162
4.2.2.3 - Inibizione incompetitiva o incompetitiva	164
4.2.2.4 - Il parametro IC_{50} quale indicatore di suscettibilità di un enzima all'inibizione	166
4.2.2.5 - Determinazione della costante di inibizione	167
4.2.2.5.1 - Determinazione della K_i per l'inibizione di tipo competitivo	168
4.2.2.5.2 - Determinazione della K_i per l'inibizione di tipo non competitivo	169
4.2.2.5.3 - Determinazione della K_i per l'inibizione di tipo incompetitivo o incompetitivo	171
4.2.2.6 - Inibitori ad elevata affinità per l'enzima	172
4.2.2.6.1 - Come si riconosce un inibitore "tight binding"	172
4.2.2.6.2 - Determinazione delle costanti d'inibizione per inibitori "tight binding"	175
4.2.2.7 - Quando la perdita di attività dell'enzima è un processo lento	176
4.2.3 Inibizione irreversibile	178
4.2.3.1 - Inattivazione irreversibile lenta	181
4.2.3.1.1 - Inattivazione irreversibile lenta diretta	182
4.2.3.1.2 - Inattivazione irreversibile lenta a due stadi	182
4.2.3.1.3 - Quando il substrato protegge l'enzima dall'inattivazione	183
4.2.4 Titolazione del sito attivo di un enzima	185
4.2.4.1 - Titolazione del sito attivo della chimotripsina	186
4.3 Effetto del pH sull'attività enzimatica	191
4.3.1 Considerazioni generali	191
4.3.2 Le funzioni di pH	192
4.3.3 Effetto del pH in condizioni di concentrazioni di substrato saturante	198
4.3.4 Effetto del pH in condizioni di substrato sub-saturanti	200
4.3.5 Effetto del pH sulla K_M	201
4.3.6 Effetto sulla velocità di reazione dello stato di ionizzazione del substrato	203
4.3.7 Presenza di più forme ioniche attive	205
4.3.8 Inibizione degli enzimi e pH	210
4.3.9 Sulle restrizioni imposte al modello	211
4.4 Gli enzimi allosterici	214
4.4.1 Il concetto di cooperatività dall'analisi di equilibri multipli	214
4.4.1.1 - Risposte di tipo non iperbolico sono indizio di cooperatività	219
4.4.2 Modelli enzimatici in grado di spiegare fenomeni di cooperatività	221
4.4.2.1 - Modello sequenziale	221
4.4.2.2 - Il modello simmetrico o concertato ("MWC")	223
4.4.2.3 - Attivatori ed inibitori allosterici	226

X Indice generale

4.4.3	Modelli di regolazione retroattiva (regolazione a feed-back)	228
4.4.4	Falsa cooperatività: risposte di tipo sigmoideo non necessariamente riflettono fenomeni di cooperatività	231
4.4.4.1	Enzimi isteretici	232
4.5	Regolazione degli enzimi per modifica covalente: le cascate enzimatiche	236
4.5.1	La modifica covalente delle proteine	237
4.5.2	Cascate enzimatiche unidirezionali	240
4.5.3	Cascate enzimatiche reversibili	242
4.5.3.1	- Analisi di una cascata monociclica	242
4.5.3.1.1	- Ampiezza della modifica	245
4.5.3.1.2	- Segnale di amplificazione	246
4.5.3.1.3	- Flessibilità delle cascate monocicliche	246
4.5.3.1.4	- Sensibilità e ultrasensibilità delle cascate monocicliche	248
4.5.3.1.5	- La cascata monociclica che regola la piruvato deidrogenasi	254
4.5.3.2	- Sistemi enzimatici a cascata con più cicli di interconversione	257
4.5.3.2.1	- La cascata biciclica aperta	258
4.5.3.2.2	- La cascata biciclica chiusa	260
4.5.3.2.3	- La cascata biciclica che regola la glutammina sintetasi di <i>E. coli</i>	262
4.5.3.3	- Le cascate multicicliche	269
4.5.3.3.1	- La cascata multiciclica che regola la sintesi e degradazione del glicogeno	271
4.5.4	Consumo energetico nelle cascate enzimatiche	274
4.5.5	Le cascate enzimatiche quali “amplificatori” di velocità	276
	Riferimenti bibliografici ed utili letture	280

APPENDICI

Appendice A **283**

“Il contributo di Victor Henri alla nascita della cinetica enzimatica”
(Nota del Prof. Paolo Parenti Università Milano Bicocca)

Appendice B **299**

B§ 1.1.2.2	Sul significato di ΔA e ΔG	299
B§ 1.3.4	Sull'analisi di una reazione del 2° ordine con due reagenti	300
B§ 2.2.6	Elementi di nomenclatura di molecole chirali e di alcuni stereo descrittori	301
B§ 3.1.7	Reazioni reversibili e transizioni del complesso enzima-substrato	304
B§ 3.3.5	Equazione cinetica in presenza di fenomeni diffusivi e di carica	305
B§ 4.4.1	Sulla determinazione dei fattori statistici	309

Appendice C **310**

Soluzione di alcuni comuni integrali	310
--------------------------------------	-----

Appendice D **312**

Comuni unità di misura ed alcune importanti costanti	312
------------------------------------------------------	-----

Indice analitico **315**

Cinetica enzimatica



- 3.1 Reazioni enzimatiche con un solo substrato
- 3.2 Reazioni enzimatiche con due substrati
- 3.3 La cinetica di enzimi immobilizzati

3.1 Reazioni enzimatiche con un solo substrato

3.1.1 Introduzione all'analisi cinetica di una reazione enzimatica

Credo sia opportuno ricordare che lo studio delle reazioni catalizzate da enzimi ha avuto impulso solo dopo che Eduard ed Hans Bukner dimostrarono nel 1898 che era possibile riprodurre con un lisato cellulare la fermentazione alcolica anche in assenza di cellule di lievito e che fu soltanto nel 1902 che Adrian John Brown propose che la reazione catalizzata da un enzima doveva prevedere la formazione di un addotto con il reagente (che nella cinetica enzimatica viene indicato con il termine “substrato”) che si sarebbe quindi scisso per dare prodotti.

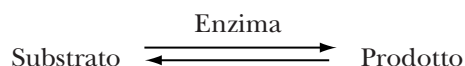
Il primo scienziato a dare una soluzione quantitativa per via analitica all'equazione cinetica di una reazione enzimatica fu Victor Henri (1903) che considerando valida l'assunzione di Brown di formazione del complesso ES ricavò, applicando alla reazione le leggi dell'equilibrio chimico, una equazione cinetica essenzialmente identica a quella oggi ampiamente celebrata di Michaelis e Menten. Nonostante Michaelis e Menten avessero riconosciuto a Henri il merito della scoperta, l'accuratezza di proporre misure di velocità al tempo zero e la più intuitiva presentazione dei loro dati li accreditò, con la complicità di una comunità scientifica disattenta, quali scopritori della equazione fondamentale della cinetica enzimatica, lasciando che il nome di Henri venisse ingiustamente dimenticato (al riguardo caldeggio la lettura dell'articolo di Paolo Parenti dell'Università di Milano-Bicocca, riportato in Appendice A).

Contrariamente a quanto avviene nello studio cinetico di una reazione chimica, nel quale l'obiettivo primario è quello di definire i parametri caratterizzanti il processo, nello studio di reazioni catalizzate da enzimi l'attenzione è principalmente rivolta alla caratterizzazione del catalizzatore della reazione. Dai dati cinetici si cerca quindi di definire per l'enzima, le caratteristiche di efficienza catalitica, di specificità nei confronti di un particolare substrato o per una specifica reazione, le

proprietà di stabilità in condizioni diverse (temperatura, pH, forza ionica); si indaga inoltre per mettere in evidenza molecole apparentemente estranee al chimismo della trasformazione, in grado di alterare (attivandola o inibendola) la capacità catalitica dell'enzima. Tutto ciò, per poter conoscere tutte le potenzialità di catalisi e di suscettibilità alla regolazione e predire il comportamento dell'enzima in studio sia nel naturale contesto metabolico da cui è stato estratto, sia quale possibile agente di catalisi in processi abiotici. Insieme a questo, c'è un altro obiettivo di rilievo dello studio: la definizione del meccanismo d'azione dell'enzima. L'indagine cinetica, ovvio strumento di eccellenza per raggiungere lo scopo, offre il vantaggio di richiedere una relativamente modesta quantità di materiale. Ciò non è di secondaria importanza, considerando che enzimi purificati da un sistema cellulare sono, nella generalità dei casi, materiale prezioso, di non sempre ampia disponibilità e spesso facilmente deperibile.

Affrontiamo ora l'analisi cinetica partendo dalle osservazioni sperimentali che normalmente emergono quando studiamo una reazione catalizzata da un enzima.

Consideriamo la reazione generica



Una volta fissate le condizioni di reazione: pH, forza ionica, temperatura, concentrazione dell'enzima, ecc., lo studio consiste nel misurare la velocità di reazione a diverse concentrazioni iniziali di substrato. Ciò significa che per ogni concentrazione di substrato si seguirà nel tempo o la di lui scomparsa o la formazione del prodotto.

In studi di cinetica enzimatica si eseguono (quando è possibile) misure di velocità al tempo zero. Ciò garantisce (entro certi limiti) che la concentrazione di enzima attivo, al momento della misura, sia quello nominalmente presente; non dimentichiamo che molti enzimi non sono particolarmente stabili e quindi le misure di velocità, qualora fossero eseguite a tempi relativamente alti, potrebbero venire falsate da una più o meno pronunciata inattivazione del catalizzatore. Analogamente il decorso della reazione potrebbe modificare alcune condizioni di saggio (es. pH) così come potrebbe aversi un qualche effetto sull'attività dell'enzima da parte del prodotto di reazione. Infine, come specificheremo tra breve, misure di velocità al tempo zero ci aiuteranno a semplificare lo schema di reazione permettendoci di trascurare con buona approssimazione il contributo che nasce dalla reazione di ritorno attraverso la quale il prodotto viene nuovamente trasformato nel substrato di partenza.

Dalle misure di velocità al tempo zero (si misura la pendenza della tangente alla curva di trasformazione di S al tempo $t = 0$) (Fig. 3.1.1), si può facilmente verificare che, a parità di concentrazione di substrato S_0 , la v_0 è proporzionale alla concentrazione di enzima $[E_T]$ presente nella miscela di reazione (*miscela di saggio*).

Se riportiamo in grafico le v_0 misurate a diverse concentrazioni di substrato e a diverse concentrazioni di enzima avremo *per molti* enzimi una risposta come quella descritta rispettivamente nei grafici di Fig. 3.1.2.

La velocità di reazione (v_0) è proporzionale sia alla $[E_T]$ che alla $[S_0]$. Per quanto riguarda la dipendenza dalla $[S_0]$, a diverse concentrazioni di enzima, l'andamento che si osserva è quello di una iperbole rettangolare il cui asintoto ad alte concentrazioni di substrato ha un valore proporzionale alla concentrazione di enzima presente.

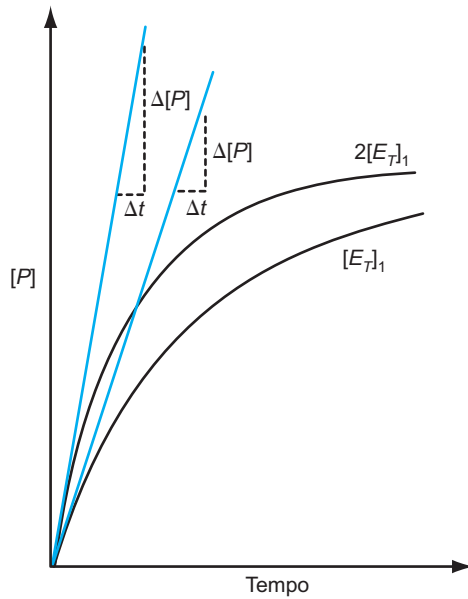


Figura 3.1.1

Formazione del prodotto di una reazione enzimatica nel tempo. La velocità di reazione misurata al tempo zero (la pendenza della tangente alla curva a $t=0$) è proporzionale alla concentrazione di enzima ($[E_T]$) presente.

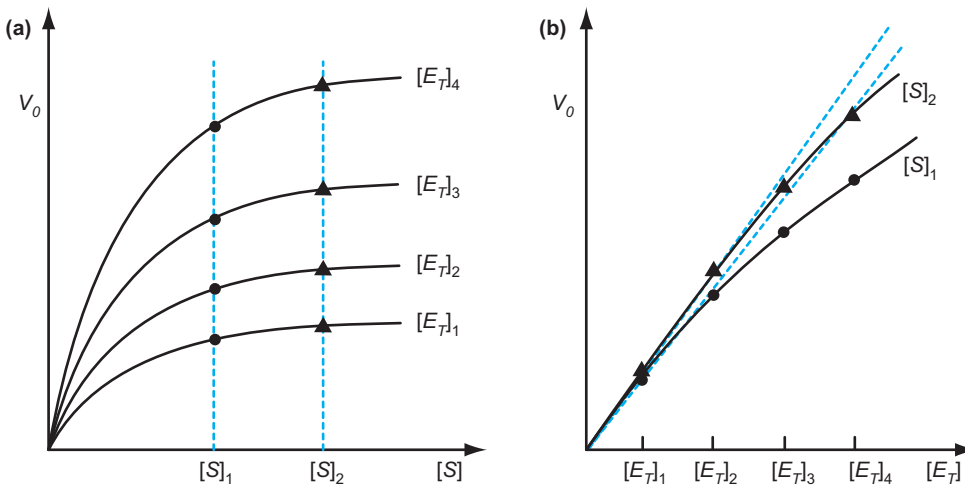


Figura 3.1.2

Dipendenza della velocità di una reazione enzimatica dalla concentrazione del substrato e da quella dell'enzima presente. *Riquadro A*: velocità di reazione al variare della concentrazione di substrato, misurata a diverse concentrazioni di enzima; *riquadro B*: velocità di reazione al variare della concentrazione di enzima, misurata a concentrazioni di substrato relativamente basse ($[S_0] = [S]_1$) e relativamente alte ($[S_0] = [S]_2$).

■ **Nota:** Gli enzimi che mostrano un siffatto comportamento vengono generalmente definiti come enzimi Michaelisiani o enzimi che obbediscono all'equazione di Michaelis e Menten (vedi in seguito). Memori del contributo di Henri, noi ci riferiremo a tali enzimi definendoli enzimi di Henri, Michaelis e Menten e li indicheremo, più brevemente, come enzimi-H-M&M.

Quando andiamo a misurare la velocità di reazione a diverse concentrazioni di enzima (Fig. 3.1.2b), possiamo osservare che la diretta proporzionalità tra v_0 e $[E_T]$ si realizza in un intervallo più o meno ampio di concentrazione enzimatica, a seconda della concentrazione di substrato a cui eseguiamo la nostra misura.

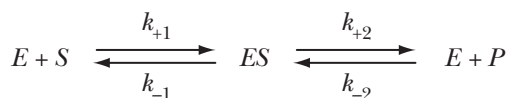
Tutte queste osservazioni dovranno essere soddisfatte dall'equazione cinetica.

3.1.2 L'equazione cinetica per un enzima semplice

Una volta accettata l'idea che la catalisi enzimatica evolva attraverso la formazione di un complesso tra enzima e substrato si consideri il modello interattivo più semplice (Fig. 3.1.3):

Figura 3.1.3

Schema generale di una reazione enzimatica ad un solo substrato.



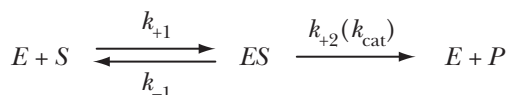
E ed S si incontrano per formare attraverso una reazione reversibile un addotto ES la cui velocità di formazione è caratterizzata dalla costante cinetica k_{+1} e la cui decomposizione ad E ed S liberi è caratterizzata da una costante cinetica k_{-1} . Una volta formatosi ES , la catalisi può realizzarsi attraverso una serie di riarrangiamenti strutturali e tappe intermedie fino a che il prodotto generato sulla matrice catalitica viene rilasciato in soluzione. Nel modello semplice che stiamo prendendo in esame tutte le tappe intermedie vengono considerate raccolte in un'unica tappa caratterizzata da una costante cinetica k_{+2} , che vede ES evolvere a prodotti rigenerando enzima libero (E) che può così ripartire con il successivo ciclo catalitico. La costante cinetica k_{+2} è quella che raccoglie in sé, tra le diverse fasi di riarrangiamento del complesso, quella che è la tappa lenta del processo, assumendo lei stessa il significato di costante di velocità di catalisi e spesso indicata come k_{cat} . Se è facile accettare l'idea di raccogliere in un unico evento la sommatoria dei riarrangiamenti strutturali che seguono la formazione di ES , meno intuitivo è il passaggio di ritorno attraverso il quale la specie molecolare che chiamiamo prodotto di reazione (P) determina, interagendo con E , la formazione di ES . Dovremmo infatti ammettere, per analogia con il processo di andata, che P formi con l'enzima un complesso EP (che non compare nello schema) e che questo riarrangi a formare ES attraverso una serie di tappe; il tutto caratterizzato da una costante cinetica complessiva k_{-2} . Questo aspetto dello schema di interazione, tuttavia, non pone almeno per un tale modello alcun problema se, come spesso accade, l'analisi cinetica viene condotta facendo misure di velocità al tempo zero. In tali condizioni, cioè facendo misure limitatamente all'inizio del decorso della reazione, la concentrazione di prodotto formato è infatti così bassa da permettere di trascurare la tappa di ritorno:

al tempo $t = 0$ si avrà $[P] \approx 0$ e di conseguenza $k_{-2}[E][P] = 0$

lo schema di reazione risulterà quindi ancor più semplificato:

Figura 3.1.4

Schema generale di una reazione enzimatica ad un solo substrato valido per misure di velocità al tempo zero.



Per trovare l'equazione cinetica che descrive il processo definiamo alcune utili condizioni.

L'equazione generale che esprime la velocità di formazione del prodotto di reazione sarà:

$$v_0 = k_{+2}[ES] \quad (\text{eq. 3.1.1})$$

In cui v_0 si riferisce alla velocità di reazione estrapolata al tempo zero.

Per l'enzima totale (E_T) e per il substrato inizialmente presente (S_0) varranno i seguenti bilanci di massa:

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

$$[S_0] = [S] + [ES]$$

nel caso del substrato tuttavia, essendo $[S_0] \gg [E_T] \gg [ES]$ potremo ragionevolmente considerare

$$[S_0] = [S]$$

È necessario ora esplicitare il termine $[ES]$. Per fare ciò si può procedere (come proposto da Henri e poi da Michaelis e Menten) ammettendo che la formazione del complesso ES sia caratterizzato da un equilibrio rapido, poco influenzato dalla evoluzione a prodotti (Analisi del modello con ES all'equilibrio), oppure, in modo meno restrittivo, considerando il complesso ES in condizioni di *stato stazionario*. Consideriamo i due casi.

3.1.2.1 Analisi del modello con ES all'equilibrio

Facendo riferimento allo schema di reazione di Fig. 3.1.4, se ammettiamo che l'equilibrio di formazione del complesso ES sia tanto rapido da non essere influenzato dalla evoluzione a prodotti, è come dire che $k_{+2} \ll k_{-1}$; una restrizione che dovrebbe porci qualche dubbio se è vero (come è vero) quanto abbiamo finora detto sulla straordinaria capacità catalitica degli enzimi. Per numerosi enzimi, infatti, questo tipo di analisi è inadeguato a descrivere il processo e si procede, come vedremo tra breve, attraverso una analisi più rigorosa.

Proseguendo con l'analisi del sistema all'equilibrio, ammettendo che $k_{+2} \ll k_{-1}$ potremo riscrivere lo schema di Fig. 3.1.4, sostituendo alle due costanti cinetiche, k_{+1} e k_{-1} la costante di equilibrio di dissociazione del complesso K_S



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

Tenendo conto del bilancio di massa dell'enzima $[E] = [E_T] - [ES]$, potremo esplicitare la $[ES]$

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

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_S + [S]}$$

Sostituendo $[ES]$ nella equazione generale della velocità (eq. 3.1.1) avremo:

$$v_0 = \frac{k_{+2} [E_T] [S]}{K_S + [S]} \quad (\text{eq. 3.1.2})$$

Abbiamo così ricavato l'equazione cinetica che, rappresentando lo schema di reazione considerato, ci permette di interpretare le osservazioni sperimentali. L'equazione ottenuta è quella di una iperbole rettangolare, nella quale compaiono due grandezze che possiamo variare a nostro piacimento nella sperimentazione (la concentrazione del substrato e quella dell'enzima totale), e due grandezze, la K_S e

la k_{+2} , che sono parametri intrinseci e peculiari della reazione e dell'enzima che stiamo studiando. In particolare la K_S è il parametro che dà la misura della stabilità del complesso ES e quindi dell'affinità tra E ed S mentre la k_{+2} , dà la misura della velocità con cui il complesso ES evolve a prodotti. Ricordiamo che questa è la tappa cineticamente limitante il ciclo di catalisi.

Il prodotto $k_{+2}[E_T]$ è indicato normalmente con V_{max} , così che l'eq. 3.1.2 si traduce nella classica equazione di H-M&M:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_S}{[S]}} \quad (\text{eq. 3.1.3})$$

La V_{max} è l'asintoto cui la v_0 tende all'aumentare della concentrazione del substrato e rappresenta la velocità massima teoricamente ottenibile ad una fissata concentrazione di enzima.

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{[S]}{[S] + K_S} \cong \frac{[S]}{[S]} = 1 \Rightarrow v_0 = V_{max}$$

In altre parole la V_{max} è la velocità di reazione che ci aspettiamo quando tutto l'enzima è saturato dal substrato, il che significa che esso è presente esclusivamente sotto forma di complesso ES :

$$[ES] = [E_T]$$

Una tale condizione si realizza ad una concentrazione di substrato infinitamente alta. È evidente che la V_{max} per quanto sperimentalmente irraggiungibile, potrà essere determinata utilizzando le misure di velocità ottenute a concentrazioni di substrato finite.

La costante di velocità k_{+2} (k_{cat}), che dimensionalmente è espressa di norma come sec^{-1} ,

□ **Nota:**

$$V_{max} = k_{cat} [E_T] \Rightarrow k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_T]} \Rightarrow \frac{\text{moli}}{L \text{ sec}} \frac{L}{\text{moli}} = \text{sec}^{-1}$$

viene spesso indicata come “Numero di turnover”; in tale caso la k_{cat} è definita come il numero di molecole di substrato trasformate ogni secondo da una molecola di enzima. La k_{cat} è un parametro che esprime quanto è efficace l'enzima quale catalizzatore della reazione, cioè quanto è abile ad abbassare l'energia di attivazione della reazione.

3.1.2.2 Analisi del modello con ES allo stato stazionario

Sempre facendo riferimento allo schema di **Fig. 3.1.4**, affrontiamo il problema della definizione dell'equazione cinetica con minori restrizioni. Abbandoniamo la limitazione imposta dall'esigenza di uno stato di equilibrio per la tappa di formazione del complesso ES ed applichiamo per la specie ES la condizione di stato stazionario. Una tale condizione si realizza quando, pur non trovandoci in condizioni di equilibrio chimico, la concentrazione del complesso ES rimane costante; dal momento che ci troviamo sempre davanti ad un processo dinamico, la condizione di stato stazionario si realizza quando la velocità di formazione di ES a partire da E ed S è uguale alla sua velocità di scomparsa, vuoi rigenerando il substrato da cui si è formato, vuoi evolvendo verso la formazione del prodotto di reazione. La **Fig. 3.1.5**, descrive gli eventi che possiamo aspettarci durante il processo di catalisi.

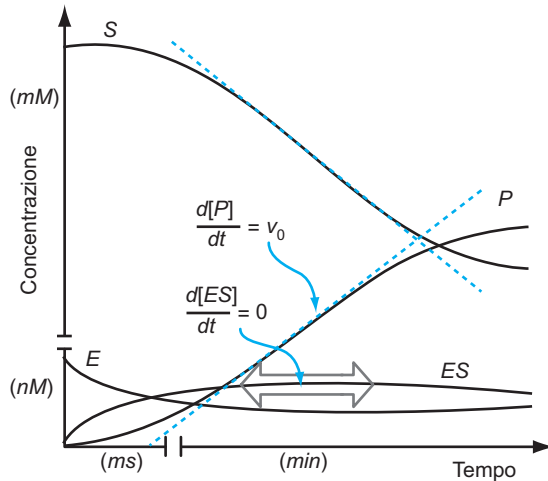


Figura 3.1.5

La concentrazione dei diversi componenti di una reazione enzimatica in funzione del tempo. Si noti: i) l'interruzione della scala temporale utile per rappresentare nel grafico sia il decorso della tappa veloce (formazione di ES), che quello della tappa lenta (formazione del prodotto); ii) l'interruzione sulla scale delle concentrazioni utile a rappresentare i diversi componenti il sistema, presenti a concentrazioni significativamente diverse. La condizione definita di "stato stazionario", si realizza nell'intervallo di tempo (delimitato dalla freccia bi-fronte) in cui la concentrazione del complesso rimane costante. Si noti che in tale condizione $[P]$ aumenta linearmente con il tempo ($v = v_0 = d[P]/dt = \text{costante}$).

Sul grafico sono riportate in ordinata le concentrazioni dei diversi componenti il sistema di reazione ed in ascissa i tempi di reazione a partire dal tempo zero, l'istante in cui avviene il mescolamento fisico dei reagenti. Si noterà come la scala dei tempi sia interrotta per consentire la rappresentazione di eventi rapidi ed eventi relativamente più lenti, che possiamo ipotizzare si realizzino dal momento del mescolamento dei reagenti. Nel momento in cui enzima e substrato vengono a contatto, dobbiamo aspettarci una rapida diminuzione della $[E]$, un equivalente rapido aumento della $[ES]$ ed un altrettanto rapido, anche se trascurabile, calo della $[S]$ (ricordiamo al riguardo che la concentrazione del substrato è comunque di almeno 2-3 ordini di grandezza superiore alla concentrazione dell'enzima). In questa prima fase, così detta di "pre stato stazionario", la concentrazione di prodotto aumenta molto lentamente tendendo ad un valore di incremento costante quando la concentrazione di ES tenderà a stabilizzarsi. La velocità misurata in queste condizioni è quella che definiamo v_0 ; essa rimarrà costante (per un tempo più o meno lungo a seconda della reazione e dell'enzima) fintanto che ES rimarrà in condizione di stazionarietà. Quando la $[S]$ si abbassa a seguito della reazione, la $[ES]$ comincerà a scendere: siamo nella condizione di *post-stato stazionario*, nella quale è verosimile che le assunzioni di ininfluenza del processo di ritorno non siano più accettabili.

Nella condizione di stato stazionario varrà quindi che la velocità netta di formazione di ES sarà zero e cioè:

$$\text{velocità formazione di } ES = \text{velocità di scomparsa di } ES$$

per cui

$$k_{+1}[E][S] = (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

Abbiamo quindi una relazione che ci permetterà di esplicitare la $[ES]$, alternativa a quella che definisce l'equilibrio termodinamico della reazione di formazione del complesso.

$$[ES] = \frac{[E][S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}}$$

Se consideriamo il bilancio di massa per l'enzima: $[E] = [E_T] - [ES]$ ed indichiamo:

$$\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_M \quad (\text{eq. 3.1.4})$$

potremo scrivere:

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Sostituendo $[ES]$ nell'equazione cinetica generale (eq. 3.1.1) e ponendo $k_{+2}[E_T] = V_{max}$, otterremo una equazione che, a meno del termine K_M che sostituisce K_S , è assolutamente identica alla eq. 3.1.3:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}} \quad (\text{eq. 3.1.5})$$

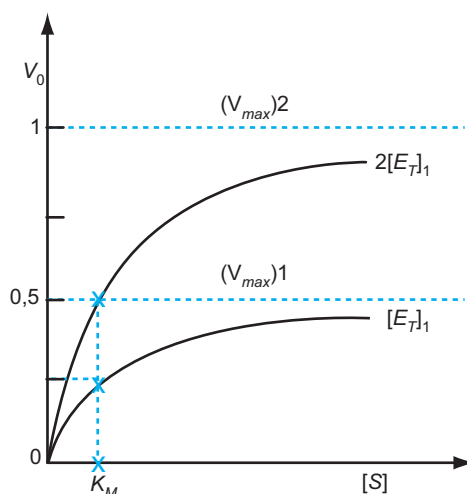
Alla costante K_M è stato dato il nome “Costante di Michaelis”. Dimensionalmente la K_M è una concentrazione di substrato; essa è definibile operativamente come quella concentrazione di substrato cui corrisponde un valore di velocità (v_0) pari alla metà del valore della V_{max} (Fig. 3.1.6).

Come si vede dall'equazione infatti, se poniamo

$$v_0 = \frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \Rightarrow K_M = [S]$$

Figura 3.1.6

Confronto della V_{max} e della K_M a due diverse concentrazioni di enzima ($[E_T]_1$ e $[E_T]_2 = 2[E_T]_1$). Definite le condizioni di saggio (temperatura, pH, forza ionica, .. ecc.), k_{+2} e K_M sono proprietà intensive caratteristiche dell'enzima nei confronti dello specifico substrato. Nelle stesse condizioni, la V_{max} appare come una proprietà estensiva della reazione enzimatica, dipendente dalla concentrazione enzimatica.



La K_M è quindi un indice di affinità tra E ed S ; più bassa è la K_M , minore sarà la concentrazione di substrato per raggiungere una velocità pari alla metà della V_{max} . Dal punto di vista analitico sappiamo anche che:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

solo quando: $k_{+2} \ll k_{-1}$

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_S \quad (\text{costante di dissociazione di } ES)$$

È utile ribadire che mentre la V_{max} varia al variare della concentrazione totale di enzima, la K_M è una caratteristica intrinseca dell'enzima nei confronti dello specifico substrato. Ciò è mostrato in Fig. 3.1.6, (v. anche Fig. 3.1.8) in cui le due iperboli descrivono la velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato alla concentrazione di enzima $[E_T]$ e $2[E_T]$.

Enzima	Substrato	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (M)
cAMP fosfodiesterasi	cAMP	2	2×10^{-7}
Esocinasasi	ATP	60	2×10^{-4}
	D-glucosio		2×10^{-5}
	D-fruttosio		2×10^{-3}
Chimotripsina	Gly-Tyr-Gly	1×10^2	1×10^{-1}
	N-benzoil-Tyr-ammide	1×10^2	2×10^{-3}
Lattico deidrogenasi	L-lattato	1×10^3	2×10^{-2}
	NAD ⁺		1×10^{-4}
β -Galattosidasi	D-lattosio	2×10^3	4×10^{-3}
β -Lattamasi	benzilpenicillina	2×10^3	2×10^{-5}
Fumarato idrolasi	fumarato	3×10^3	4×10^{-6}
Ureasi	urea	3×10^3	2×10^{-4}
Acetilcolina esterasi	acetilcolina	4×10^3	9×10^{-5}
Anidrasi carbonica	CO ₂	7×10^4	8×10^{-3}
	HCO ₃ ⁻	3×10^4	9×10^{-2}
Catalasi	H ₂ O ₂	8×10^5	2×10^{-2}

Figura 3.1.7

Una raccolta di valori di k_{cat} e K_M per alcuni enzimi. I valori riportati sono solo indicativi, dipendendo le misure da numerosi parametri condizionanti la reazione.

Nella tabella di **Fig. 3.1.7** sono riportati i valori di k_{cat} e di K_M per alcuni enzimi.

Da essa si prende atto della varietà dei possibili valori che tali parametri possono assumere. È necessario tuttavia essere particolarmente attenti nella lettura comparata dei dati che la letteratura scientifica offre; oltre alla specificazione del substrato su cui l'enzima agisce, il confronto dovrebbe tener conto di tutte quelle condizioni che possono influire sulla reazione. Tra queste (pH, forza ionica, temperatura di saggio ..ecc.) sono incluse, ovviamente, la fonte da cui l'enzima è stato estratto, il suo grado di purezza, nonché la cura nel definire la sua concentrazione nominale non solo in termini di proteina ma anche, e soprattutto, in termini di enzima attivo presente. Si pensi al riguardo quanto il valore numerico della k_{cat} possa venire direttamente influenzato dal valore della concentrazione effettiva di enzima attivo presente nella miscela di reazione.

3.1.3 Determinazione dei parametri cinetici V_{max} e K_M

I parametri cinetici V_{max} e K_M che compaiono nell'equazione cinetica, possono facilmente essere determinati dall'analisi dei punti sperimentali per via computazionale mediante una analisi di regressione non lineare dei dati; si andrà così a definire la migliore interpolazione dei dati direttamente sulla funzione iperbolica. Tuttavia proprio considerando le caratteristiche delle funzioni iperboliche è possibile analizzare i dati dopo aver trasformato l'equazione di una iperbole in quella di una retta, sicuramente di più immediata analisi anche per via grafica. Di seguito alcuni approcci metodologici di determinazione di V_{max} e K_M per via grafica.

3.1.3.1 Metodi grafici per la determinazione di V_{max} e K_M

Il grafico cosiddetto dei “doppi reciproci”, proposto da Lineweaver-Burk (1934), è il capostipite dell’approccio metodologico di determinazione per via grafica dei parametri cinetici V_{max} e K_M , basato sulla trasformazione della equazione di una iperbole in quella di una retta.

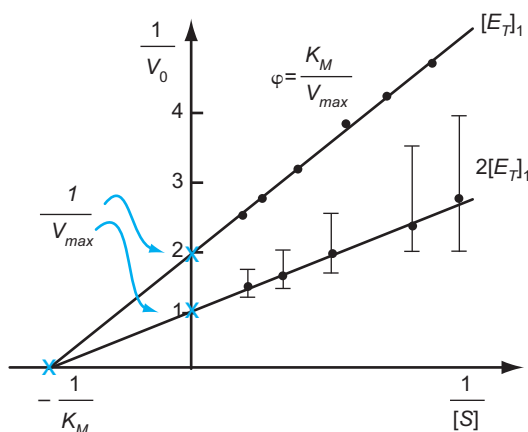
Se partiamo dalla equazione cinetica di H-M&M (eq. 3.1.4) e ne facciamo il reciproco avremo:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{eq. 3.1.6})$$

Riportando in grafico il reciproco delle misure di velocità iniziale $1/v_0$ (si faccia riferimento al grafico di Fig. 3.1.6) in funzione del reciproco della concentrazione del substrato $1/[S]$, i punti sperimentali giaceranno su una retta (Fig. 3.1.8) dalla cui analisi sarà facile determinare i due parametri cercati

Figura 3.1.8

Grafico di Lineweaver-Burk o dei “doppi reciproci”. Le due rette si riferiscono a misure ottenute con due diverse concentrazioni di enzima ($[E_T]_1$ e $[E_T]_2 = 2[E_T]_1$). La barra d’errore riportata su ciascun punto del grafico con $[E_T]_1$, è quello che risulta da un errore percentuale costante sulle misure di v_0 .



Infatti mentre l’intercetta con l’asse delle ordinate ($1/[S] = 0$ cioè $[S] = \infty$) fornirà il valore del reciproco della velocità massima, la pendenza della retta (K_M/V_{max}) o ancor meglio il valore dell’intercetta sull’asse delle ascisse ($-1/K_M$), permetteranno di determinare la K_M . Come si può osservare confrontando le due rette riportate in Fig. 3.1.8, è solo la V_{max} , ma non la K_M , come ci si aspettava, a risentire della diversa concentrazione di enzima presente nel saggio. Su una delle due rette di Fig. 3.1.8 è indicata la propagazione dell’errore sulle misure di v_0 , che si ha per tale tipo di grafico. Come si può osservare, la barra d’errore (che supponiamo costante su tutte le misure) appare nel grafico dei doppi reciproci, asimmetrico rispetto al punto e significativamente dilatato a basse concentrazioni di substrato. In realtà, confrontando questo metodo grafico con quelli che seguiranno, è proprio la diversa distribuzione dell’errore sulla funzione, l’elemento discriminante nella scelta di un metodo d’analisi rispetto ad un altro.

Sempre basato sulla trasformazione di una funzione iperbolica in quella di una retta è il metodo proposto da Hanes-Woolf (1932) per il quale, se moltiplichiamo l’equazione dei doppi reciproci (eq. 3.1.6) per $[S]$, avremo:

$$\frac{[S]}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \right) + \frac{1}{V_{max}} [S] \quad (\text{eq. 3.1.7})$$

Anche in questo caso, riportando $[S]/v_0$ in funzione di $[S]$ otterremo una retta (Fig. 3.1.9a) da cui potremo facilmente determinare i parametri cercati. La propagazione dell’errore per un tale tipo di funzione si manifesta in modo più uniforme per un ampio intervallo di punti della retta rispetto al grafico dei doppi reciproci.

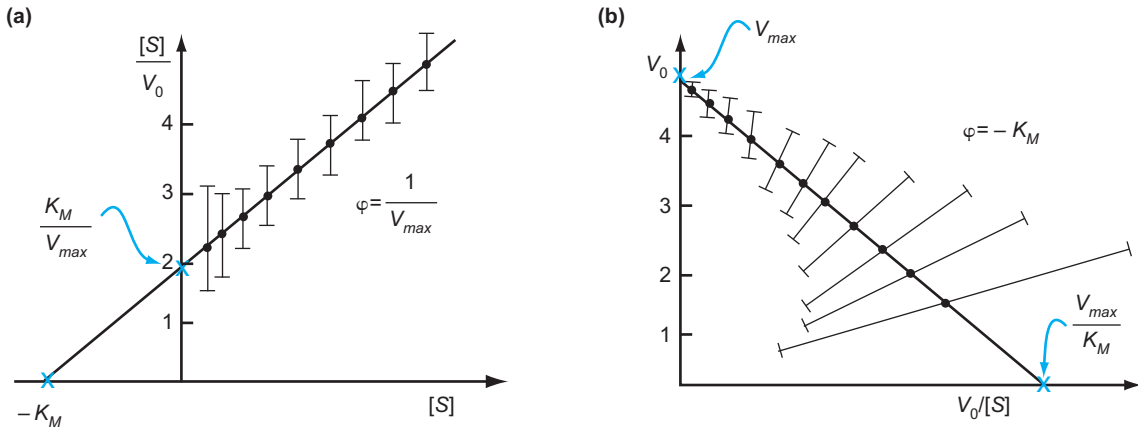


Figura 3.1.9

Due metodi grafici di determinazione della V_{max} e K_M per un enzima H-M&M. a) Metodo di Hanes-Woolf; b) metodo di Eadie-Hofstee. Sulle rette sono indicati i punti notevoli che forniscono i valori dei parametri cinetici cercati nonché le barre d'errore sui singoli punti conseguenti ad un errore percentuale costante sulle misure di v_0 .

In modo del tutto analogo, se moltiplichiamo l'equazione dei doppi reciproci (eq. 3.1.6) per v_0 , come proposto da Eadie-Hofstee (1942-1959), avremo ancora, riportando v_0 in funzione di $v_0/[S]$, l'equazione di una retta (eq. 3.1.7b, Fig. 3.1.9b) dalla cui analisi potremo facilmente ricavare i parametri cercati.

$$v_0 = V_{max} - K_M \frac{v_0}{[S]} \quad (\text{eq. 3.1.7b})$$

La propagazione dell'errore per tale tipo di grafico non è immediata. Il fatto che il termine v_0 compaia su ambedue gli assi fa sì che la barra d'errore relativa al punto si sviluppi sull'asse di connessione tra il punto medesimo e l'origine degli assi.

Infine, un metodo alternativo alla linearizzazione della funzione iperbolica, è il cosiddetto *grafico lineare diretto* proposto da Eisental-Cornish Bowden (1974). Questo tipo di analisi sfrutta la proprietà della funzione iperbolica per la quale, le rette passanti per i valori delle coordinate v_0 e $[S]$ convergono in un punto (fuoco dell'iperbole) le cui coordinate sono gli asintoti cui la funzione tende. Nel nostro caso gli asintoti sono appunto, V_{max} e $-K_M$. Per quanto concerne la propagazione dell'errore sulla misura dei parametri cercati, si dovrà procedere all'analisi dell'area di convergenza (piuttosto che al teorico punto di convergenza) che le diverse rette andranno a definire in una analisi di punti sperimentali reali.

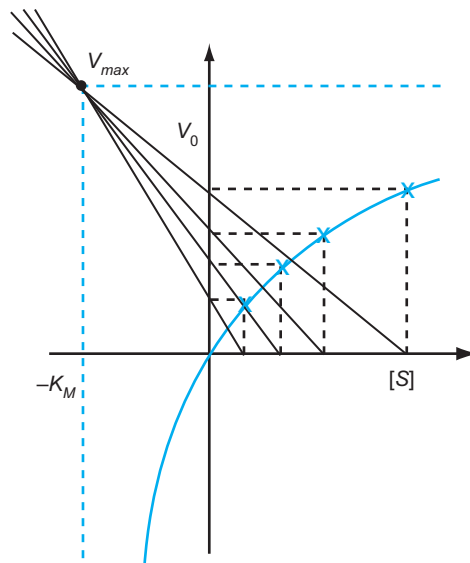


Figura 3.1.10

Grafico lineare diretto per la determinazione della V_{max} e K_M . I due parametri vengono determinati direttamente dal grafico di $v_0 = f([S])$, individuando il punto di convergenza delle rette passanti per le coordinate dei punti sperimentali (v. testo).

3.1.4 La costante di specificità k_{cat}/K_M

Come definire e come valutare l'efficienza catalitica di un enzima? Abbiamo già sottolineato al riguardo l'utilità del numero di turnover (k_{cat}) ma è evidente che tale parametro è un buon indicatore di capacità catalitica nella particolare condizione dettata da concentrazioni di substrato tecnicamente saturanti l'enzima (si ricordi che la V_{max} è un valore di asintoto che tenderà ad essere sottostimato sulla base di una misura diretta di velocità di reazione sia pure ad elevata concentrazione di substrato). D'altra parte sappiamo che è discriminante fra due enzimi a confronto, catalizzanti la medesima reazione o anche fra due substrati diversi trasformati da uno stesso enzima, il valore della K_M . Tanto più basso è il valore della K_M tanto più efficace è il processo interattivo tra enzima e substrato a dare ES . È intuitivo che per un enzima che catalizza una certa reazione, il rapporto tra le due grandezze k_{cat} e K_M (k_{cat}/K_M o in modo equivalente V_{max}/K_M) definito come "costante di specificità" (k_s), rappresenti un indice di efficienza catalitica. Più è elevato tale rapporto, vuoi per una migliore capacità interattiva con il substrato (bassa K_M) vuoi per un più elevato numero di turnover (k_{cat}), più l'enzima è cataliticamente efficiente.

La costante di specificità tuttavia non è solamente un utile indicatore di efficienza, bensì un ben definito parametro cinetico caratterizzante la reazione enzimatica. Per interpretare il rapporto k_{cat}/K_M , in termini cinetici, è sufficiente metterci in condizioni cosiddette subsaturanti, in cui

$$[S] \ll K_M$$

per rendersi conto che l'equazione di H-M&M

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

si riduce a

$$v_0 = \frac{V_{max}}{K_M}[S] = \frac{k_{cat}}{K_M}[E_T][S] = k_s[E_T][S]$$

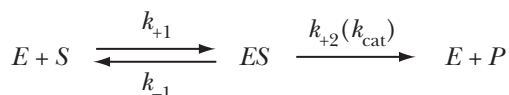
Vediamo quindi che in queste condizioni la costante di specificità k_s , non è altro che la costante cinetica di secondo ordine di una equazione che vede la velocità di reazione direttamente proporzionale sia alla concentrazione dell'enzima (primo ordine rispetto ad E) che a quella del substrato (1 ordine rispetto a S). Una condizione, quella di subsaturazione, in cui l'enzima "opera" nelle condizioni più sfavorevoli allo svolgimento della sua azione catalitica.

Nella tabella di [Fig. 3.1.11](#) sono riportati i valori della costante di specificità della chimotripsina per alcuni substrati (esteri di amminoacidi), il cui confronto mostra il progressivo avvicinamento a quello che è il substrato ottimale dell'enzima.

3.1.4.1 La perfezione catalitica

Per quanto abituati alla straordinarietà della efficienza catalitica che molti enzimi sono in grado di esprimere, è lecito chiedersi quale sia il limite di efficienza per un enzima nel catalizzare una reazione. La condizione di subsaturazione è la condizione ideale per individuare il limite alla efficienza di un catalizzatore e quindi alla definizione di perfezione catalitica.

Limitandoci agli enzimi descritti dall'equazione di H-M&M e nelle condizioni di validità dello schema di [Fig. 3.1.4](#):



Substrato	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
N-Ac-Triptofano metil estere	4×10^5
N-Ac-Fenilalanina metil estere	4×10^4
N-Ac-Leucina metil estere	2×10^3
N-Ac-Valina metil estere	2
N-Ac-Glicina metil estere	0,1
N-Ac-Etil estere	3×10^5
N-Ac-Alanina ammido	4×10^2
N-Ac-Glicinammido	30

Figura 3.1.11

La costante di specificità della chimotripsina per alcuni esteri e ammidi di amminoacidi N-acetilati. I valori riportati sono solo indicativi, dipendendo le misure da numerosi parametri condizionanti la reazione.

abbiamo appena detto che in condizioni subsaturanti, lo schema di reazione è adeguatamente descritto dalla relazione:

$$v_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E][S]$$

da cui, esprimendo la K_M in termini di costanti cinetiche $K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$ ed utilizzando la notazione $k_{+2} = k_{cat}$, potremo scrivere:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{+2}}{K_M} = \frac{k_{+2} k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2}} [E][S]$$

Il limite della costante di specificità per k_{+2} molto alti e cioè per $k_{+2} \gg k_{-1}$ sarà uguale a k_{+1} .

Il migliore catalizzatore immaginabile è quello in cui la costante di specificità (cioè la costante cinetica nelle condizioni meno favorevoli al decorso della reazione (bassa concentrazione di substrato), coincide con la costante di formazione del complesso ES (k_{+1}). Il valore limite cui può tendere la k_{+1} è quello imposto dalla diffusione delle molecole nel mezzo di reazione e non può ovviamente essere superiore alla frequenza di collisione. Il limite imposto dalla diffusione per reazioni in soluzione acquosa è circa $10^8 - 10^9 M^{-1}s^{-1}$. Basta guardare i dati della tabella di **Fig. 3.1.12**, per rendersi conto di quanto vicini sono alcuni enzimi a quella che possiamo considerare la perfezione catalitica.

Enzima	Substrato	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Anidrasi carbonica	CO_2 HCO_3^-	9×10^6 3×10^6
cAMP fosfodiesterasi	cAMP	1×10^7
Catalasi	H_2O_2	4×10^7
β -Lattamasi	Benzil-penicillina	1×10^8
Acetilcolina esterasi	Acetilcolina	2×10^8
Trioso fosfato isomerasi	Gliceraldeide 3P	2×10^8
Fumarato idrolasi	Fumarato	6×10^8
Superossido dismutasi	Ione superossido	7×10^9

Figura 3.1.12

Lista di alcuni enzimi ai limiti della perfezione catalitica. I valori riportati sono solo indicativi, dipendendo le misure da numerosi parametri condizionanti la reazione.

3.1.5 Le unità enzimatiche

Un problema connesso alla concentrazione nominale di un enzima presente in una miscela di reazione, attiene alla sua natura proteica sia in termini di purezza che in termini di stabilità. È infatti evidente che la contaminazione di altre proteine o la inattivazione di una parte dell'enzima rende difficile esprimere la concentrazione enzimatica in termini es. di mg/L o moli/L di molecola proteica. È necessario quindi fare riferimento esclusivamente alla attività catalitica che il preparato enzimatico è in grado di manifestare. Viene introdotto così il concetto di unità enzimatica come di seguito definito (International Union of Biochemistry 1964): si definisce *unità enzimatica* "U" la quantità di enzima in grado di catalizzare la trasformazione di una micro mole di substrato al minuto *in definite condizioni di saggio*.

Da una tale definizione discende che il volume della miscela di reazione nella quale viene valutata l'attività enzimatica è ininfluente sulla misura mentre, a parità di altre condizioni, è rilevante la concentrazione di substrato. Per quanto sia possibile usare una qualunque concentrazione di substrato, sempre se chiaramente definita nella metodologia di saggio adottata, è operativamente conveniente tentare il più possibile di svincolarsi dall'effetto della $[S]$ ed eseguire misure in condizioni di substrato saturanti (ordine zero rispetto ad S).

Connettiamo le unità enzimatiche alle misure di velocità della reazione catalizzata dall'enzima

$$v_0 = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{cat}[E_T][S]}{K_M + [S]}$$

Esprimendo $[P]$ in micromolarità (μM) ed il tempo in minuti, le dimensioni di v_0 saranno:

$$\frac{\mu M}{min} \Rightarrow \frac{\mu moli}{L min}$$

moltiplicando per il volume di saggio V_s (L)

$$\frac{\mu moli}{L min} V_s (L) = \frac{\mu moli}{min} \text{ nel saggio} = U \text{ nel saggio}$$

dividendo le U nel saggio per il volume di enzima usato nel saggio V_E :

$$\frac{U \text{ nel saggio}}{V_E} = \frac{U}{L \text{ di preparato enzimatico}}$$

Più recentemente è stata introdotta una nuova unità internazionale della attività catalitica (adottata ufficialmente nel 1999): il *Katal* (*kat*) (*moli/secondo*)

1 *kat* è quella quantità di enzima che converte 1 mole di substrato per secondo in definite condizioni di saggio:

$$1 U = 1/60 \text{ micro Katal.}$$

3.1.6 Analisi di Henri-Michaelis-Menten (H-M&M) per reazioni reversibili

Non sempre è possibile analizzare una reazione catalizzata da un enzima con la sicurezza di poter trascurare il processo di ritorno. Quando ad esempio il metodo di dosaggio del prodotto di reazione ha una bassa sensibilità, il che richiede che una certa quantità di prodotto debba formarsi per poter eseguire la misura, e la reazio-

Umberto Mura

Enzimi in azione

Fondamenti di cinetica e regolazione
delle reazioni enzimatiche

Accedi ai contenuti digitali > Espandi le tue risorse > con un libro che **non pesa** e si **adatta** alle dimensioni del tuo **lettore**



All'interno del volume il **codice personale** e le istruzioni per accedere ai **contenuti digitali**.
L'accesso alle risorse digitali è **gratuito** ma limitato a **18 mesi dalla attivazione del servizio**.

