Cinetica enzimatica

La cinetica delle reazioni

Concetti chiave

• L'equazione di Michaelis-Menten è quella di una curva iperbolica che mette in relazione la velocità iniziale di una reazione (V_0) con la velocità massima (V_{max}) e con la costante di Michaelis-Menten (K_M) per un particolare enzima e un dato substrato.

• La costante di Michaelis-Menten, K_M, rappresenta la concentrazione di substrato necessaria, affinché la reazione abbia velocità pari a metà della velocità massima (velocità semi-massimale).

• La velocità massima, V_{max}, può essere raggiunta solo quando tutto l'enzima presente in soluzione è legato al substrato (condizione di saturazione). La V_{max} dipende dalla concentrazione dell'enzima in soluzione $[E]_T$ secondo la relazione:

$$V_{max} = k_{cat} [E]_T$$

dove k_{cat} è la costante catalitica, o numero di turnover, una proprietà cinetica intrinseca dell'enzima che esprime il numero di molecole di substrato convertite in prodotto da una molecola di enzima nell'unità di tempo, quando l'enzima è saturo.

• Il grafico di Lineweaver-Burk può essere utilizzato per presentare i dati cinetici e per calcolare i valori di K_M e V_{max}.

CINETICA ENZIMATICA

La cinetica enzimatica è lo studio delle velocità di reazione catalizzate da enzimi.

Il suo studio consente di individuare il meccanismo di catalisi.

Meccanismo cinetico

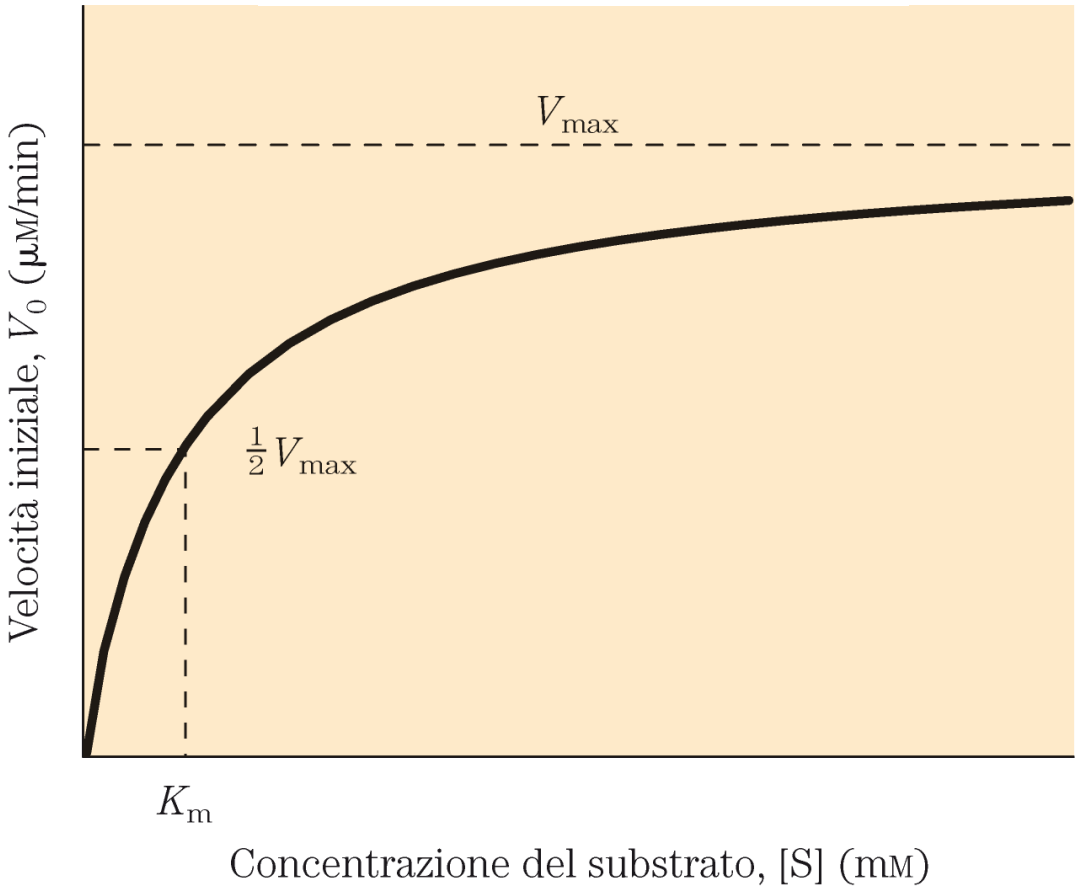
$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \mathrm{E} + \mathrm{P}$$

In condizioni di **velocità iniziale,** [P] ~ 0, quindi possiamo trascurare la reazione che dai prodotti porta ad ES:

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_2} \mathrm{E} + \mathrm{P}$$

La curva di Michaelis-Menten

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



L'equazione di Michaelis-Menten mette in relazione la velocità di formazione (iniziale) del prodotto V_0 con la concentrazione del substrato [S].

K_M

La costante di Michaelis-Menten, K_M, rappresenta la concentrazione di substrato necessaria, affinché la reazione abbia velocità pari a metà della velocità massima

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

La costante di Michaelis-Menten è una grandezza caratteristica di ciascun enzima.

Essa indica quantitativamente l'affinità tra un enzima e il suo substrato: più basso è il valore di K_M e più bassa sarà la concentrazione di substrato che permette di raggiungere un valore di velocità di reazione pari alla metà della velocità massima, il che indica un'alta affinità dell'enzima per il substrato.

Viceversa, un alto valore di K_M indica che sarà necessario più substrato per raggiungere una velocità di reazione pari alla metà della velocità massima, il che significa una minore affinità dell'enzima per il substrato.

V_{max}, Costante Catalitica/Numero di Turnover

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

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

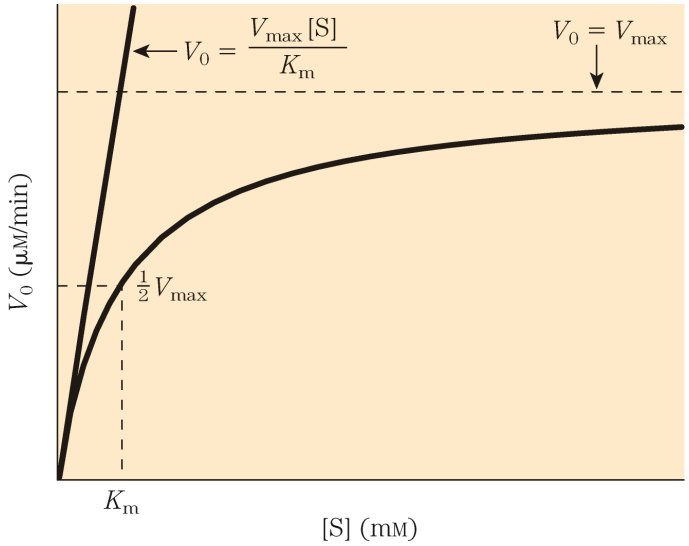
TABLE 8.6 Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

Per esempio una soluzione 10^{-6} M di anidrasi carbonica catalizza la formazione di 0,6 M H_2CO_3 al secondo, se l'enzima è completamente saturato col substrato (CO_2). Per cui k_{cat} è **6×10^5/s**. Questo numero di turnover è uno dei più elevati che si conosca. Ogni reazione catalizzata avviene in un tempo approssimativamente uguale a $1/k_{cat}$, che per l'anidrasi carbonica corrisponde a **1.7 microsecon**di (µs). Il numero di turnover della maggioranza degli enzimi nei confronti dei loro substrati fisiologici è compreso tra 1 e 10^4 (vedasi tabella).

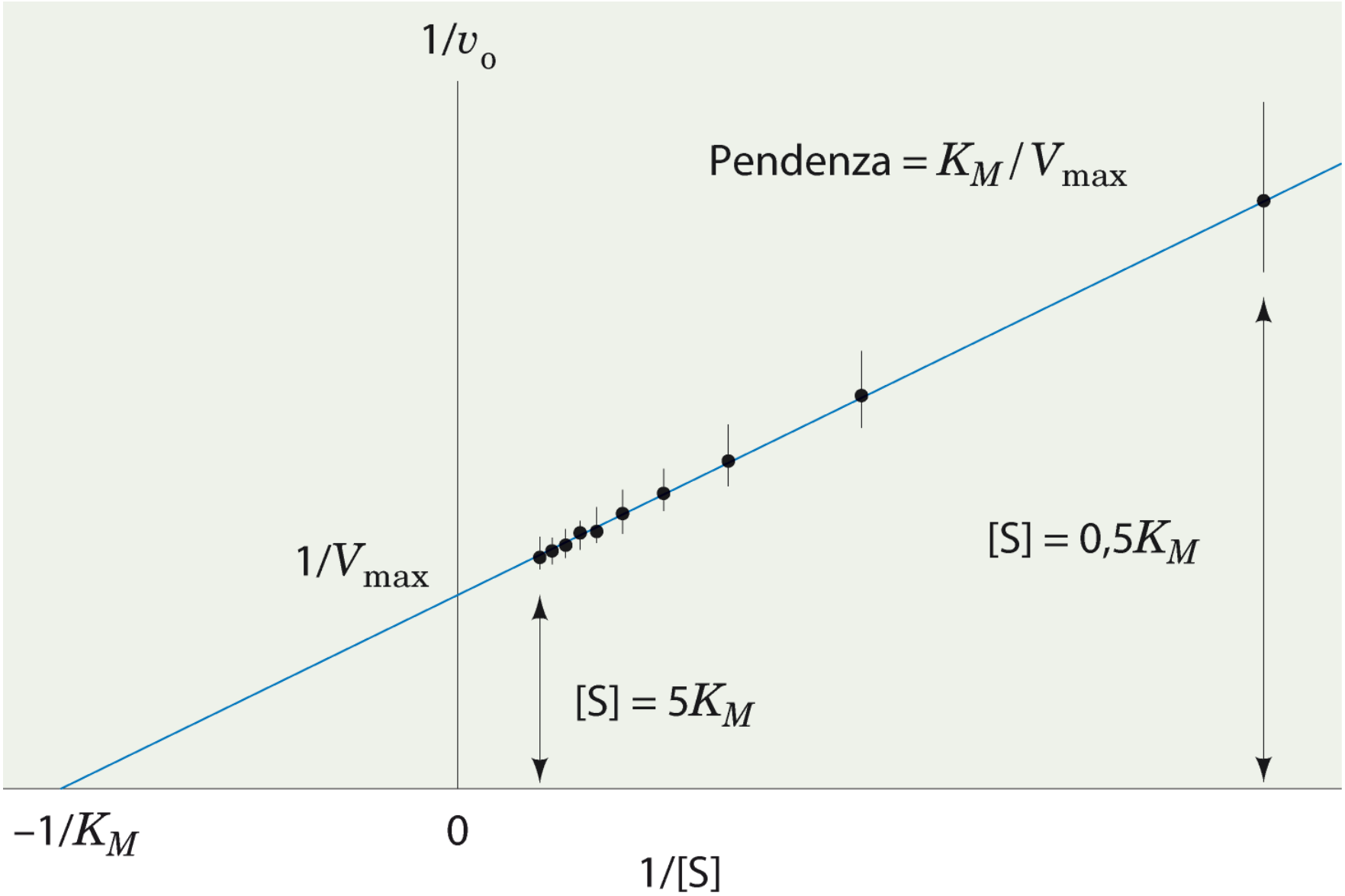
La curva di Michaelis-Menten, **un'iperbole rettango**lare, descrive l'andamento della velocità di una reazione catalizzata da enzimi, al variare della concentrazione del substrato.
Questa equazione è generalmente **valida per gli enzimi non allosterici**.

Il modello cinetico di Michaelis Menten spiega come all'aumentare della concentrazione del substrato disponibile per una data quantità di enzima, la velocità della reazione aumenti in modo lineare con la [S] quando questa sia trascurabile rispetto al valore K_m. In corrispondenza di tale valore la reazione raggiunge il suo valore semimassimale (i.e., 1/2 Vmax). A [S] più elevate, la velocità della reazione tende a aumentare in modo non-lineare e via via sempre più lentamente fino al raggiungimento di un valore massimo, chiamato velocità massima (V_{max}).



In questo punto è presente tanto substrato da saturare tutto l'enzima presente in soluzione, perciò un'ulteriore aggiunta di substrato non servirebbe, in quanto non verrebbe più attaccato da enzimi, che sono tutti già legati al substrato.

Grafico dei doppi reciproci (di Lineweaver-Burk)



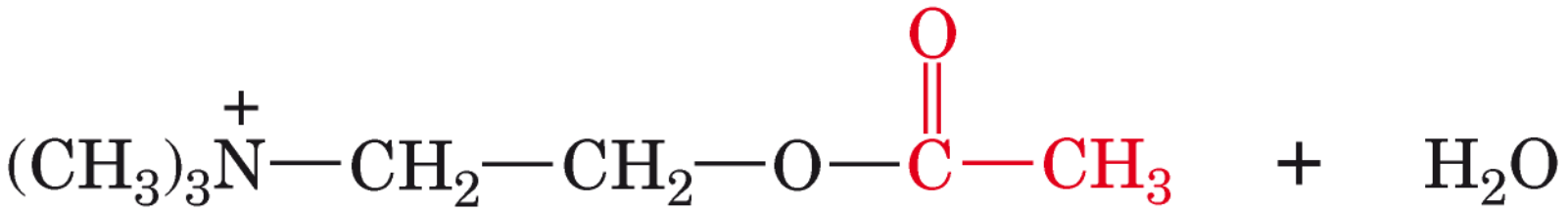
Inibizione e regolazione enzimatica

L'inibizione enzimatica

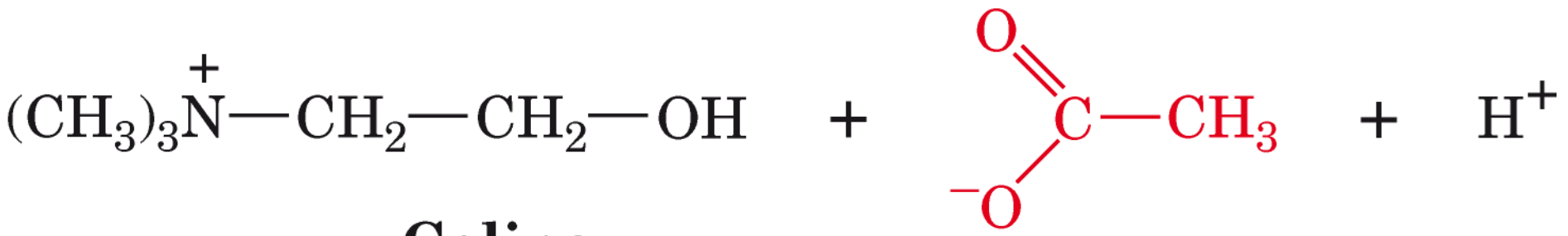
Concetti chiave

- Gli inibitori enzimatici interagiscono reversibilmente o irreversibilmente con un enzima alterandone i valori di K_M e/o di V_{max}
- Un **inibitore competitivo** si lega al sito attivo dell'enzima e fa aumentare il valore apparente di K_M della reazione, lasciando inalterato il valore di V_{max}

Inibizione irreversibile: I veleni per il sistema nervoso

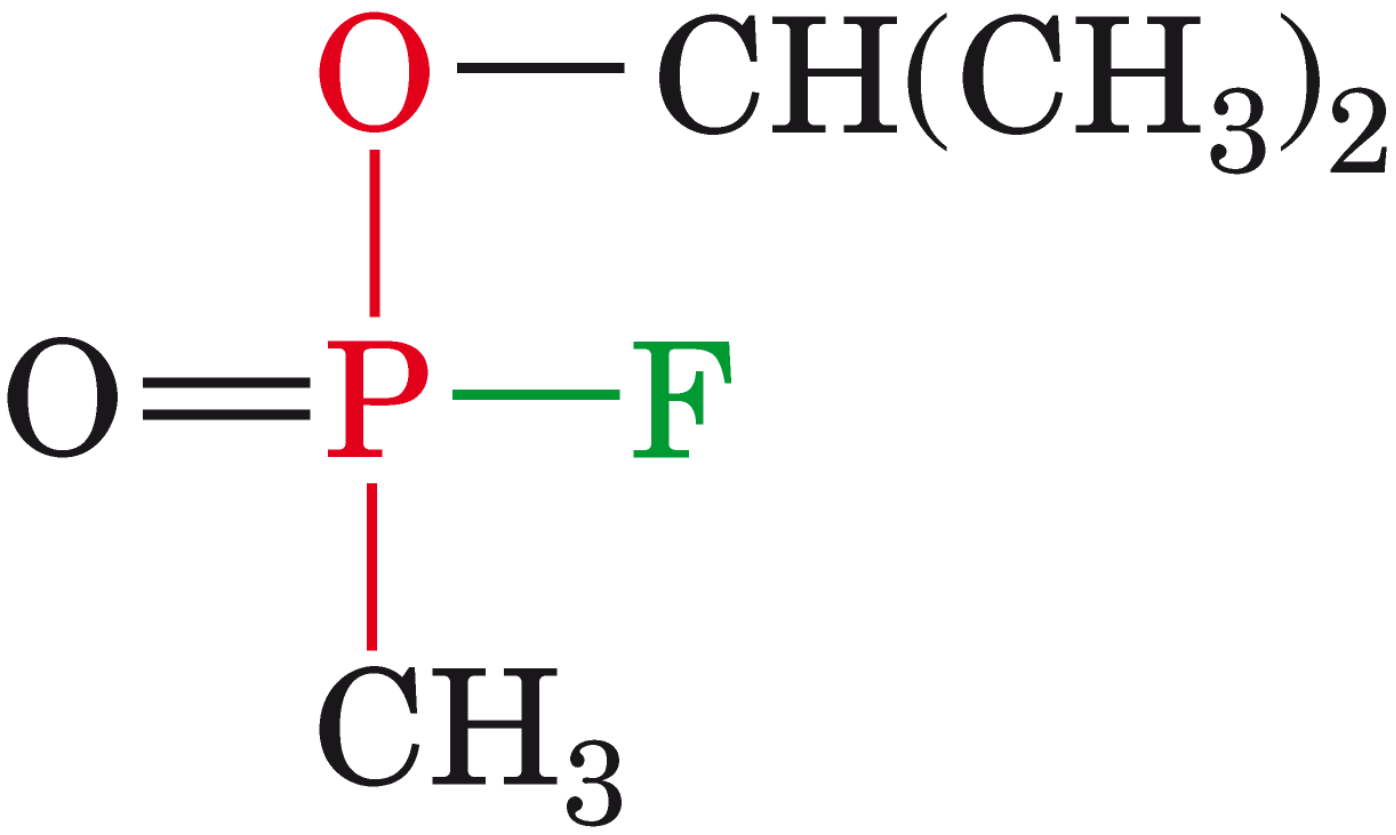


Acetilcolina



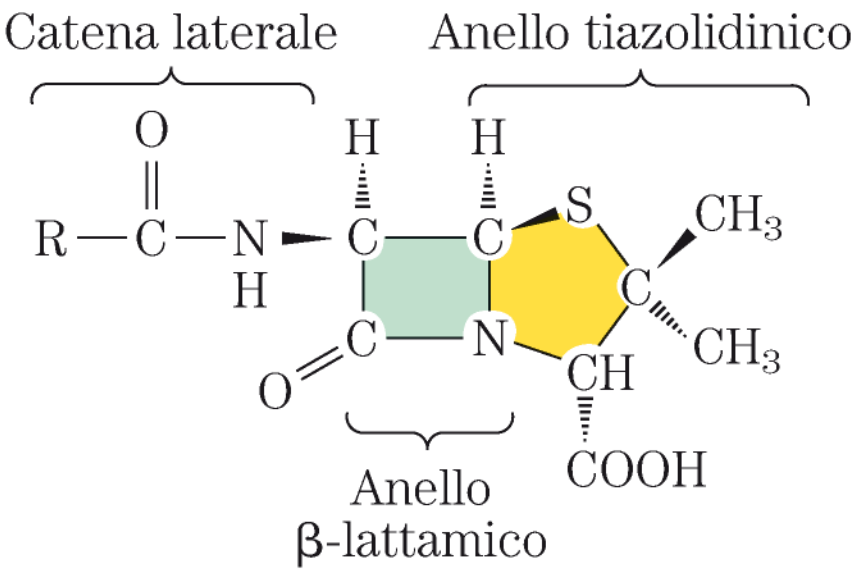
Colina

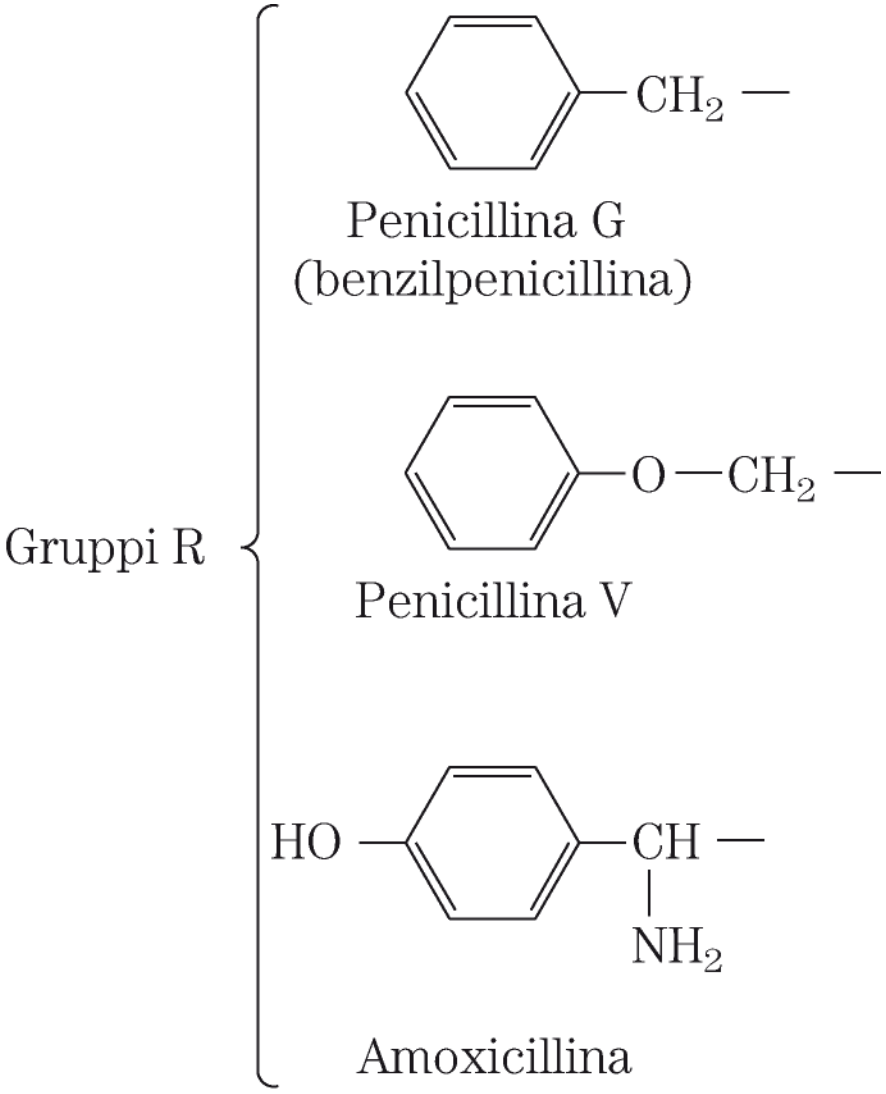
I veleni
per il sistema nervoso



Sarin

Inibizione irreversibile: gli antibiotici

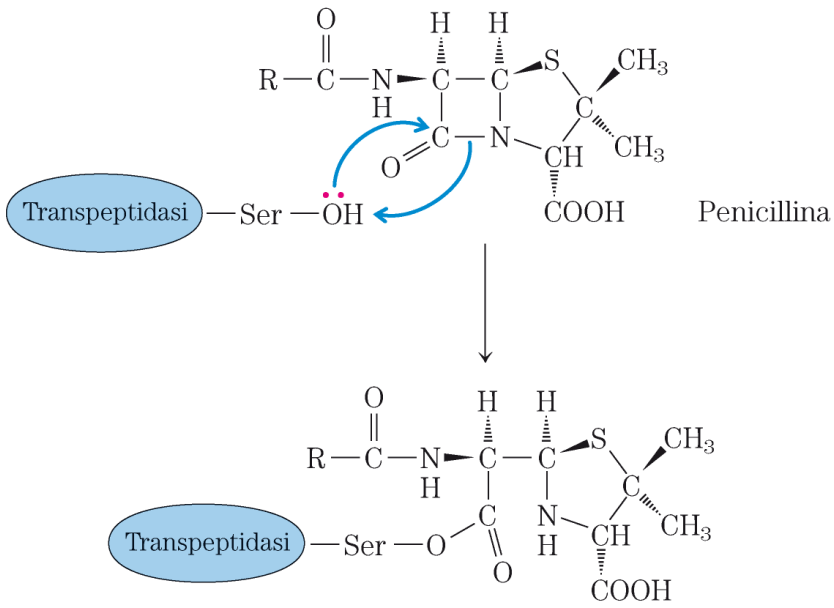




Struttura generale delle penicilline

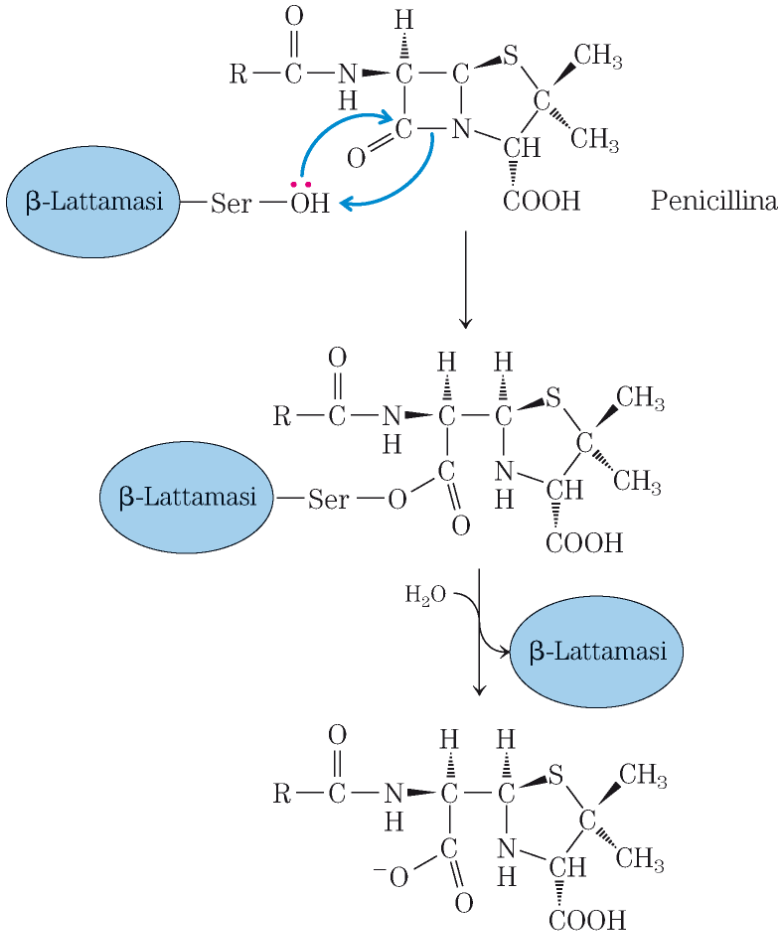
(a)

Meccanismo di azione della penicillina



(b)

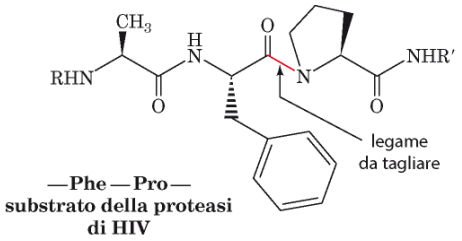
Meccanismo per la resistenza alla penicillina



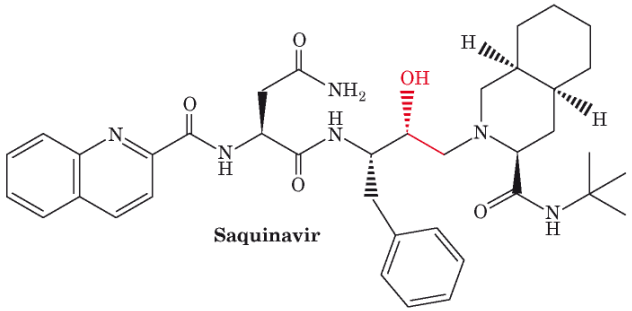
(a)

Gli inibitori enzimatici dell'HIV

inibitori della trascrittasi inversa;
inibitori della proteasi (inibizione reversibile);
inibitori della fusione;
inibitori dell'integrasi;
inibitori del co-recettore.

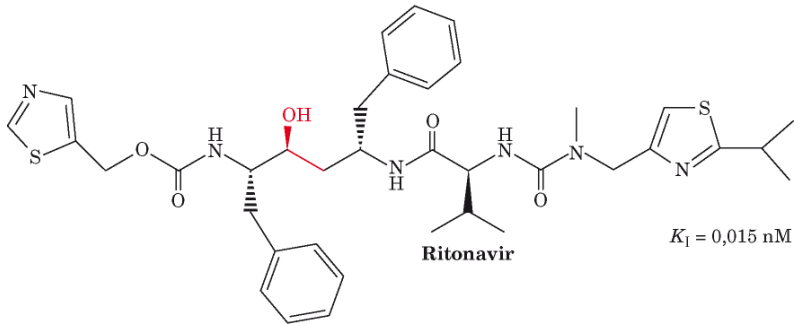


—Phe—Pro—
substrato della proteasi
di HIV



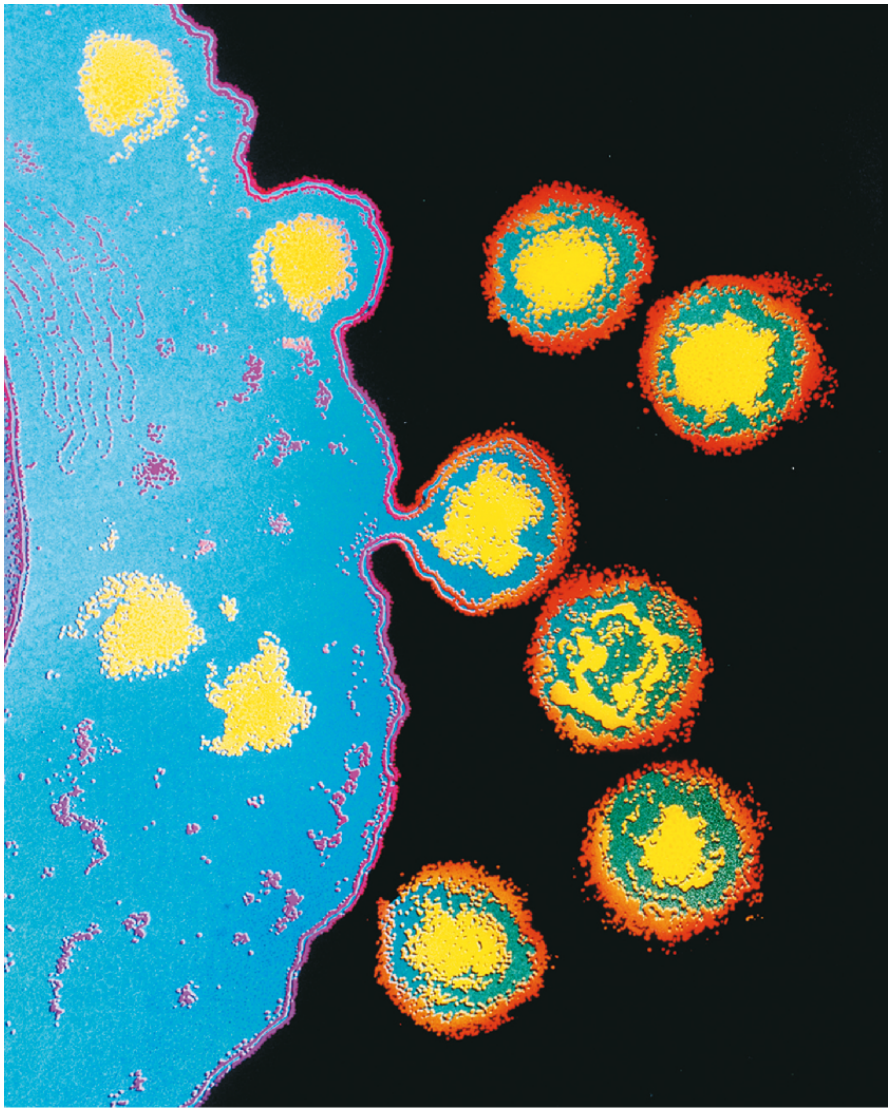
Saquinavir

K_I = 0,40 nM



Ritonavir

K_I = 0,015 nM



Inibizione enzimatica competitiva

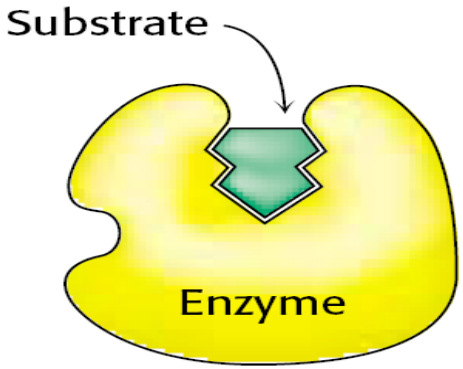
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E$$

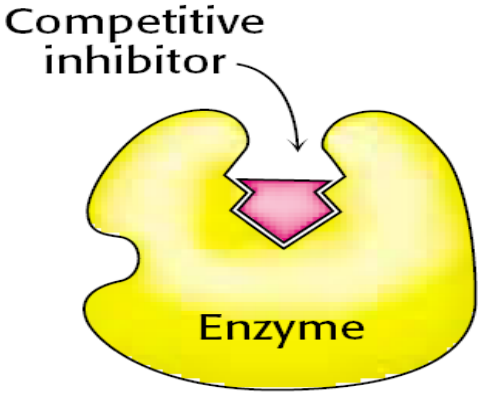
$$+$$

$$I$$

$$K_I \rightleftharpoons$$

$$EI$$





Il controllo dell'attività enzimatica

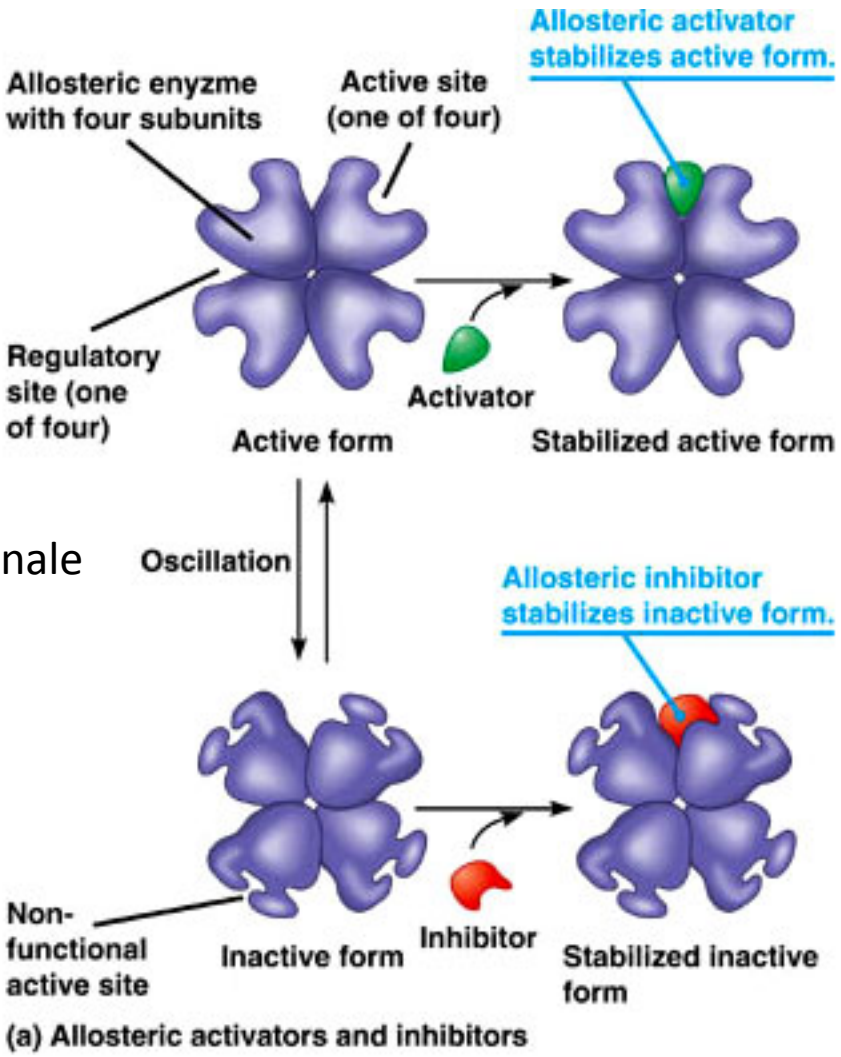
Concetti chiave

• Gli effettori allosterici si legano agli enzimi costituiti da diverse subunità quali la aspartato transcarbamilasi, inducendo cambiamenti conformazionali cooperativi che alterano l'attività catalitica dell'enzima.

• La fosforilazione e la defosforilazione di un enzima come la glicogeno fosforilasi possono modificarne l'attività spostando l'equilibrio tra la conformazione più attiva (forma R) e quella meno attiva dell'enzima (forma T).

• Il taglio proteolitico controllato è un altro meccanismo covalente (irreversibile) per regolare l'attività di certi enzimi (zimogeni).

Il controllo allosterico



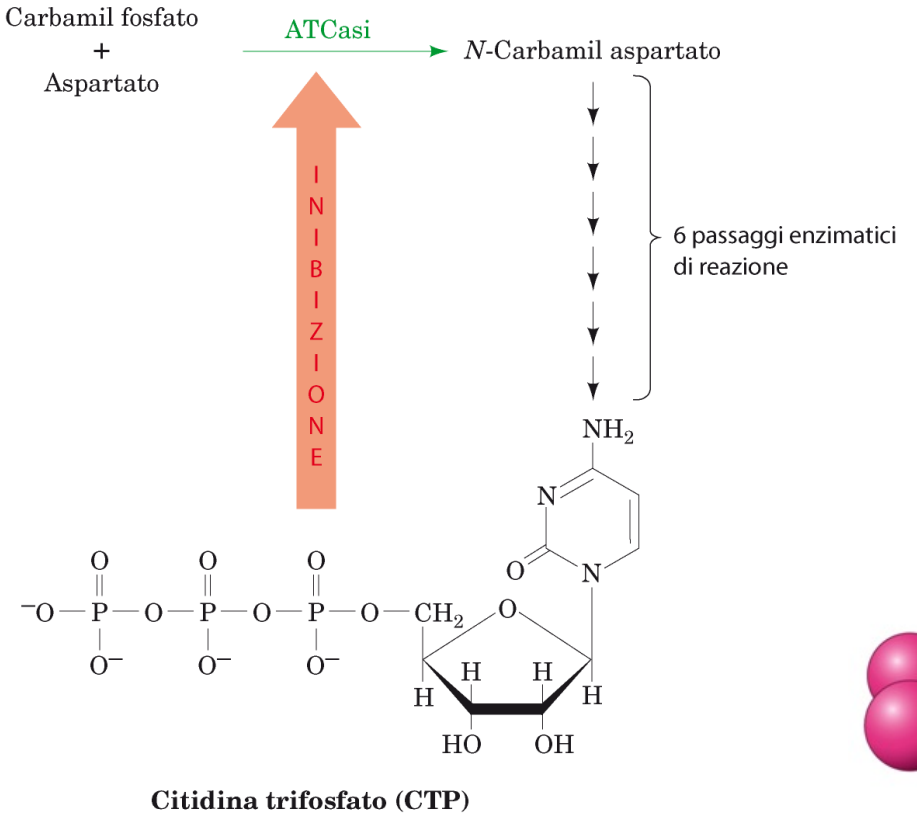
Forma R o attiva

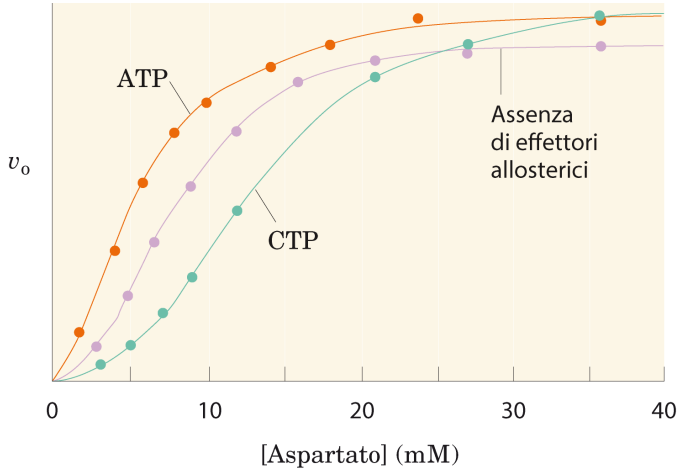
Equilibrio conformazionale

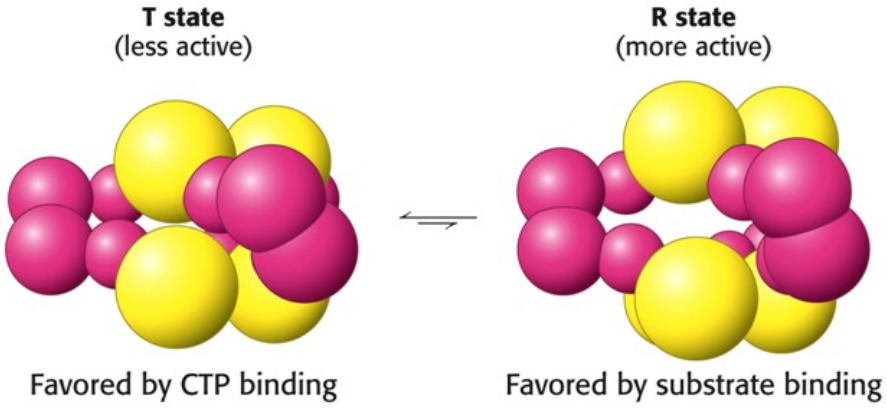
Forma T o inattiva

L'enzima allosterico possiede una struttura quaternaria che oscilla tra due stati conformazionali definiti: T ed R (Teso e Rilassato), in equilibrio tra di loro. Il legame di un ligando (effettore allosterico) modifica l'equilibrio spostandolo verso la forma R o T, chiamandosi così, rispettivamente, attivatore o inibitore allosterico.

La via di biosintesi delle pirimidine: l'inibizione retroattiva dell'aspartato transcarbamilasi (ATCasi)



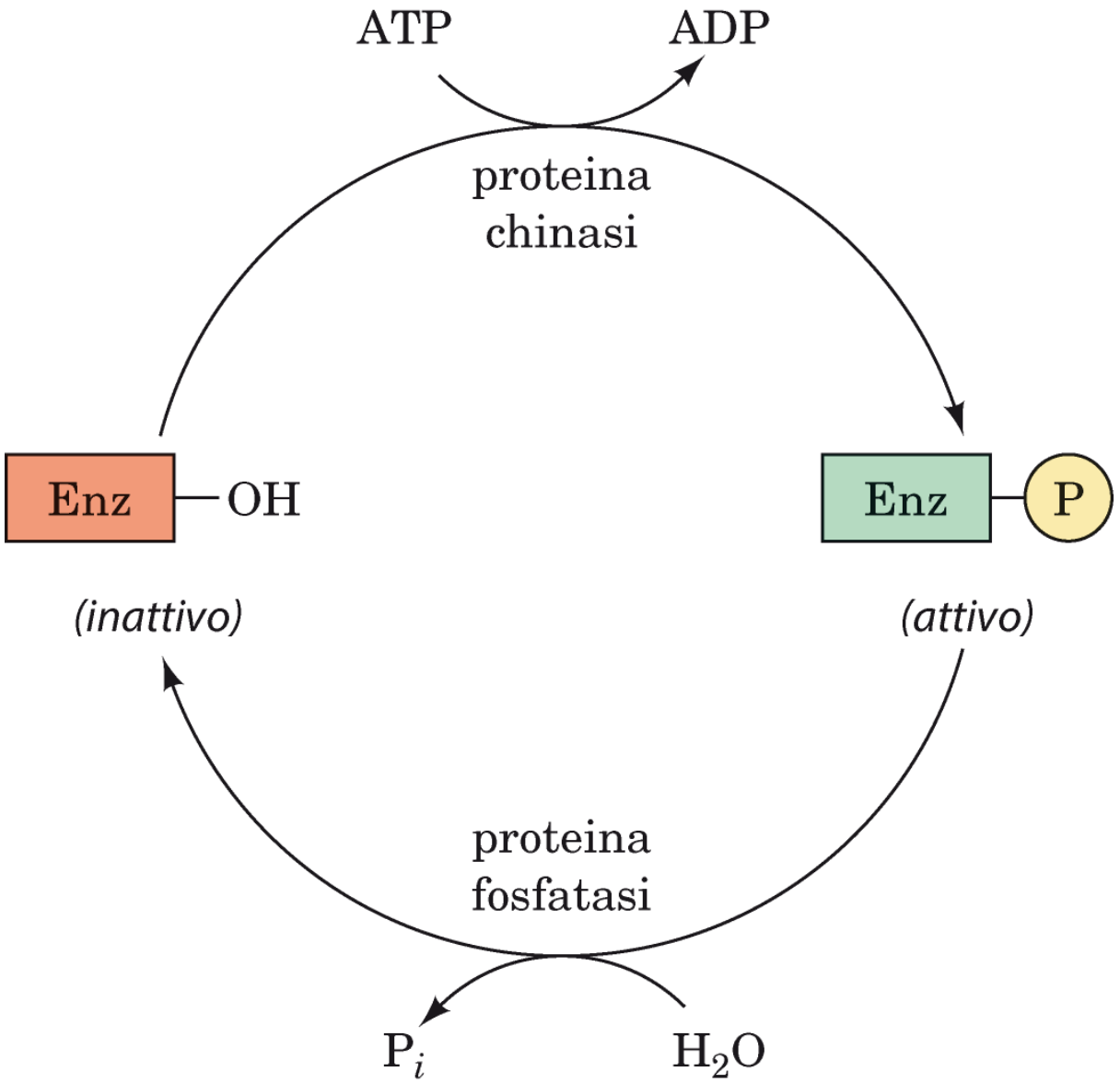




CTP: inibitore allosterico ATP: attivatore allosterico

La curva della velocità iniziale di reazione in funzione della concentrazione del substrato degli enzimi allosterici ha un andamento sigmoide

Il controllo per modificazione covalente: la fosforilazione



Le diverse proteina chinasi riconoscono specifiche sequenze consenso per la fosforilazione di specifiche proteine bersaglio

TABLE 6–10 Consensus Sequences for Protein Kinases

Protein kinase	Consensus sequence and phosphorylated residue*
Protein kinase A	-x-R-[RK]-x-[ST]-B-
Protein kinase G	-x-R-[RK]-x-[ST]-x-
Protein kinase C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Protein kinase B	-x-R-x-[ST]-x-K-
Ca^{2+}/calmodulin kinase I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca^{2+}/calmodulin kinase II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)-
Myosin light chain kinase (smooth muscle)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Phosphorylase *b* kinase	*-K-R-K-Q-I-S-V-R-*
Extracellular signal–regulated kinase (ERK)	-P-x-[ST]-P(2)-
Cyclin-dependent protein kinase (cdc2)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Casein kinase I	-[SpTp]-x(2)-[ST]-B†
Casein kinase II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
β-Adrenergic receptor kinase	-[DE](*n*)-[ST]-x(3)
Rhodopsin kinase	-x(2)-[ST]-E(*n*)-
Insulin receptor kinase	-x-E(3)-Y-M(4)-*K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-*
Epidermal growth factor (EGF) receptor kinase	*-E(4)-Y-F-E-L-V-*

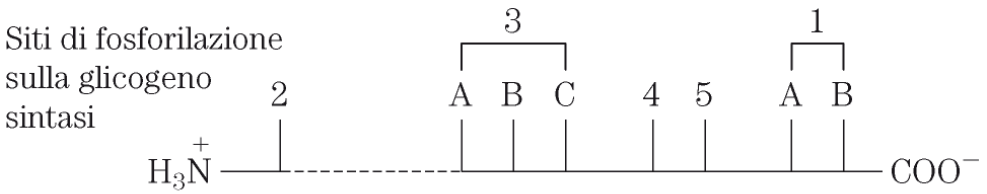
Symbol	Meaning
A	Alanine
C	Cysteine
D	Aspartic Acid
E	Glutamic Acid
F	Phenylalanine
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
K	Lysine
L	Leucine
M	Methionine
N	Asparagine
P	Proline
Q	Glutamine
R	Arginine
S	Serine
T	Threonine
V	Valine
W	Tryptophan
Y	Tyrosine

Sources: Pinna, L.A. & Ruzzene, M.H. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191–225; Kemp, B.E. & Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342–346; Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15,555–15,558.

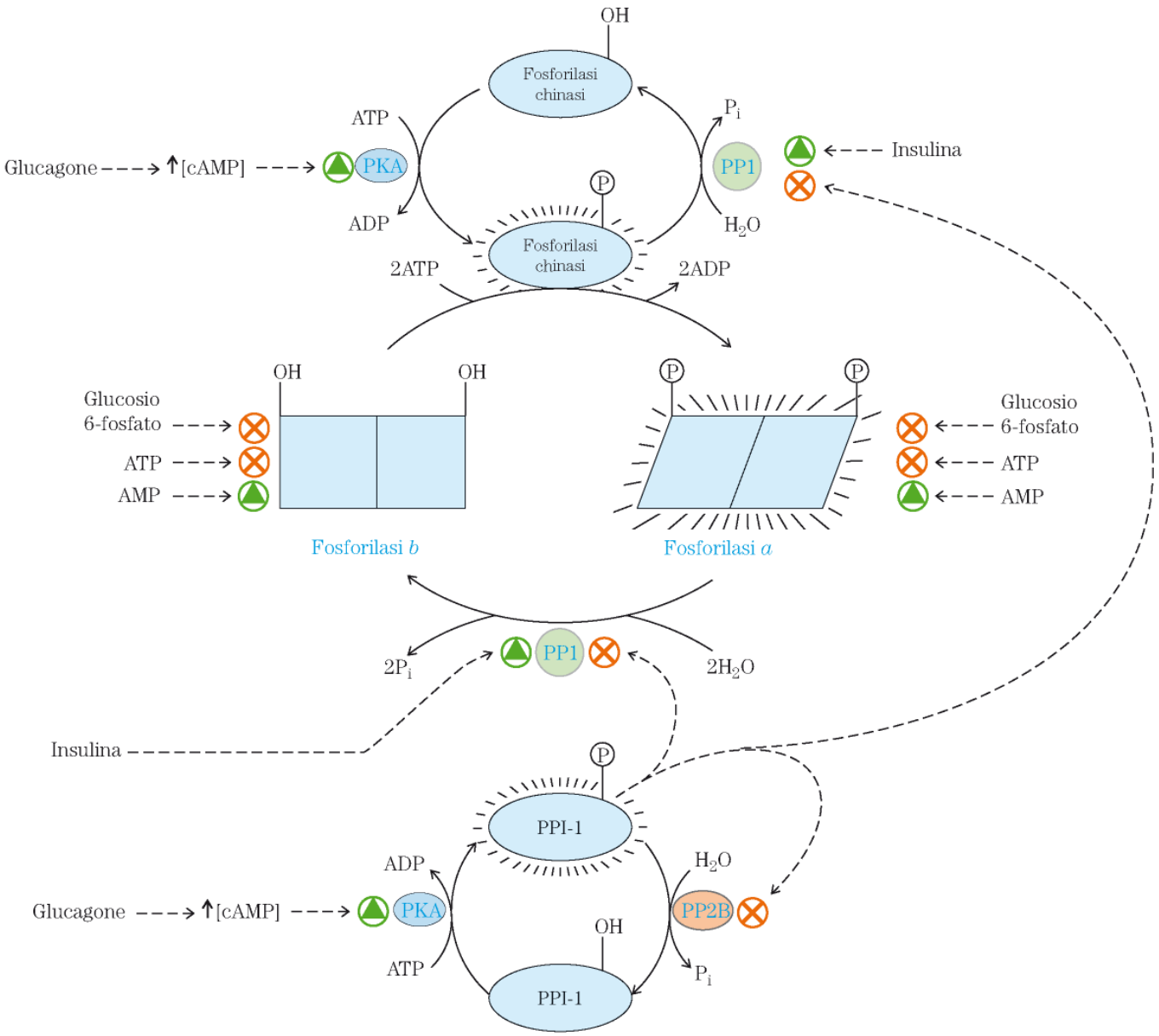
*Shown here are deduced consensus sequences (in roman type) and actual sequences from known substrates (italic). The Ser (S), Thr (T), or Tyr (Y) residue that undergoes phosphorylation is in red; all amino acid residues are shown as their one-letter abbreviations (see Table 3–1). x represents any amino acid. B, any hydrophobic amino acid. Sp, Tp, and Yp are Ser, Thr, and Tyr residues that must already be phosphorylated for the kinase to recognize the site.

†The best target site has two amino acid residues separating the phosphorylated and target Ser/Thr residues; target sites with one or three intervening residues function at a reduced level.

La regolazione mediante fosforilazioni multiple ad opera di diverse proteina chinasi permette un controllo molto accurato dell'attività enzimatica

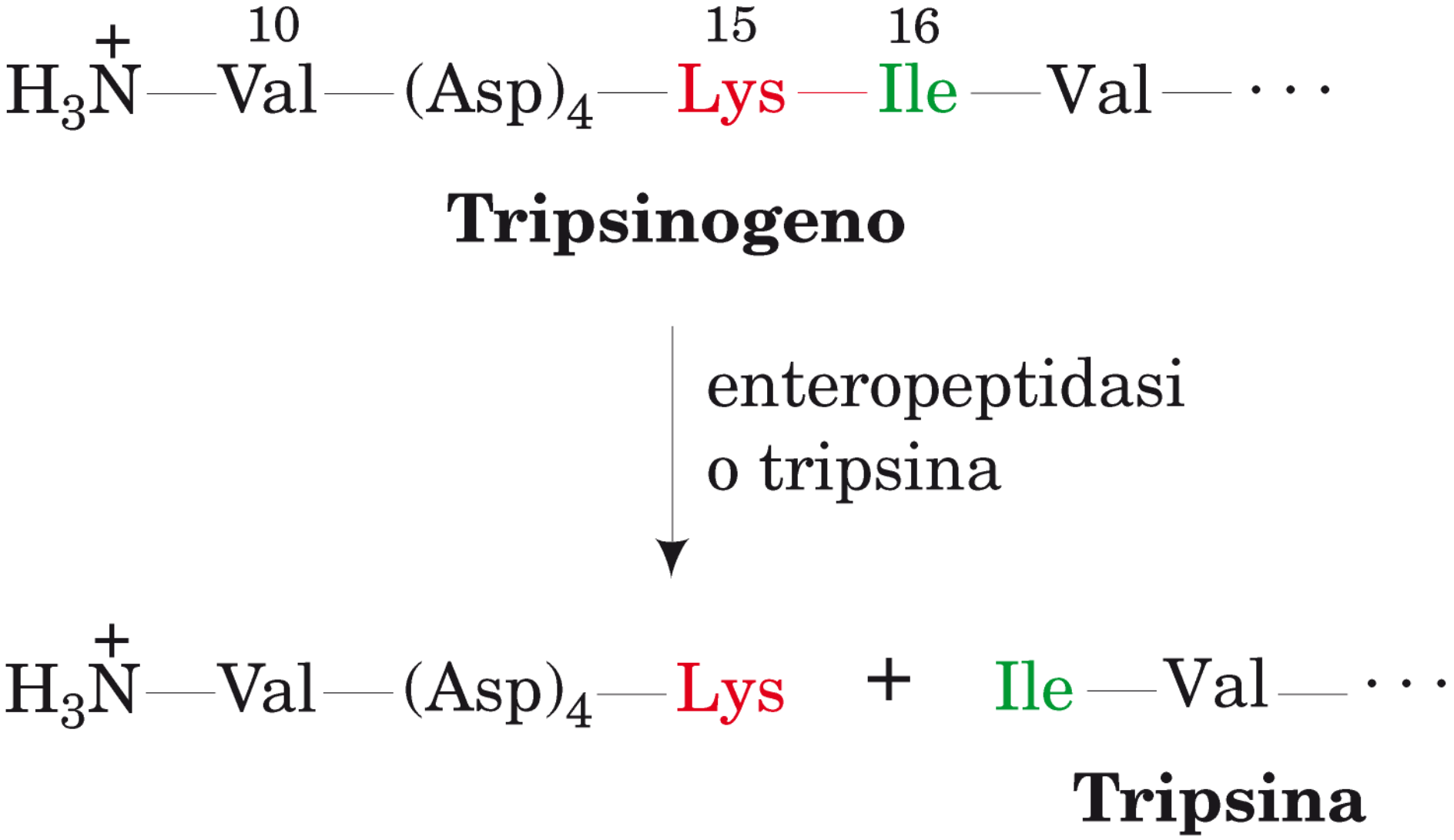


Proteina chinasi	Siti di fosforilazione	Grado di inattivazione della sintasi
Proteina chinasi A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteina chinasi G	1A, 1B, 2	+
Proteina chinasi C	1A	+
Proteina chinasi calcio/calmodulina-dipendente	1B, 2	+
Fosforilasi chinasi *b*	2	+
Caseina chinasi I	Almeno 9 siti	+ + + +
Caseina chinasi II	5	0
Glicogeno sintasi chinasi 3	3A, 3B, 3C	+ + +
Glicogeno sintasi chinasi 4	2	+

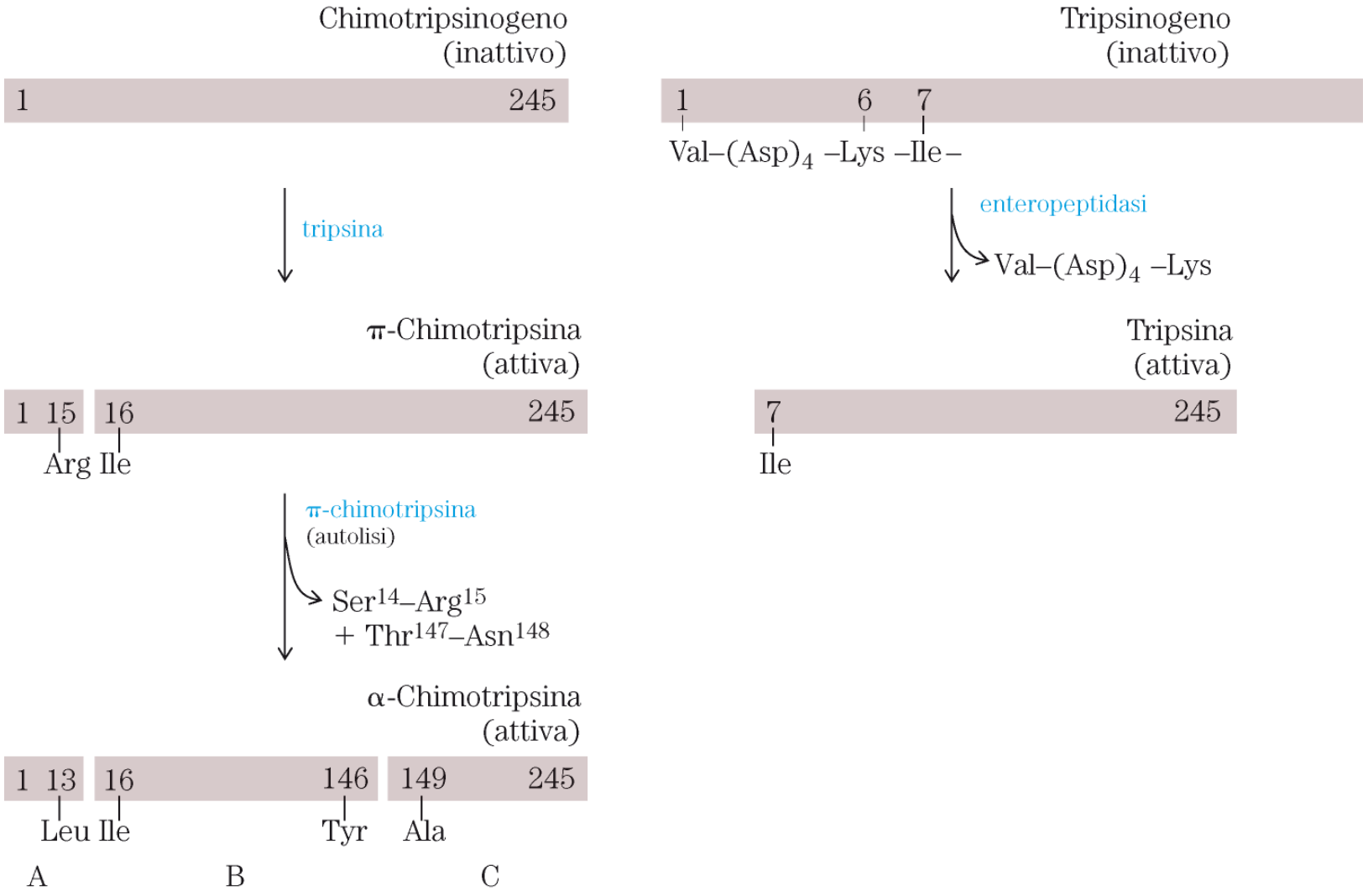


L'attività di enzimi particolarmente importanti, come la glicogeno fosforilasi muscolare (che regola il metabolismo glucidico), è finemente regolata mediante meccanismi multipli: fosforilazioni, regolazioni allosteriche ed una cascata enzimatica innescata da ormoni

Attivazione del tripsinogeno a tripsina



Alcuni enzimi ed altre proteine sono regolati per scissione proteolitica di un precursore enzimatico (detto zimogeno o proenzima nel caso degli enzimi)

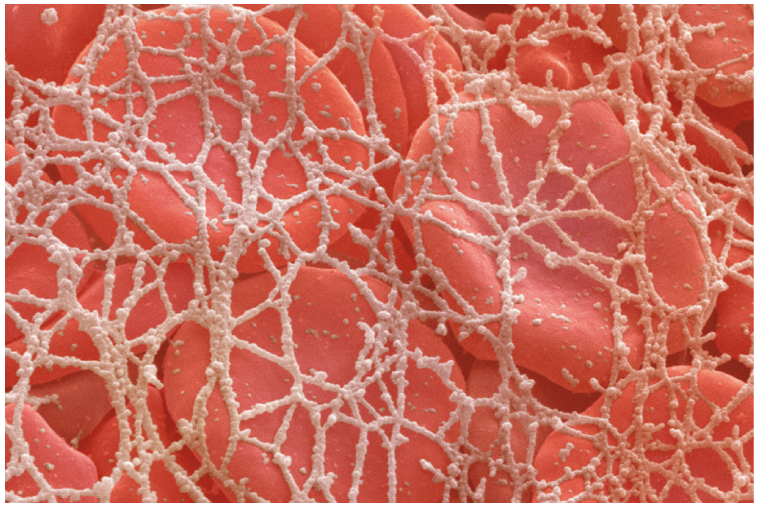
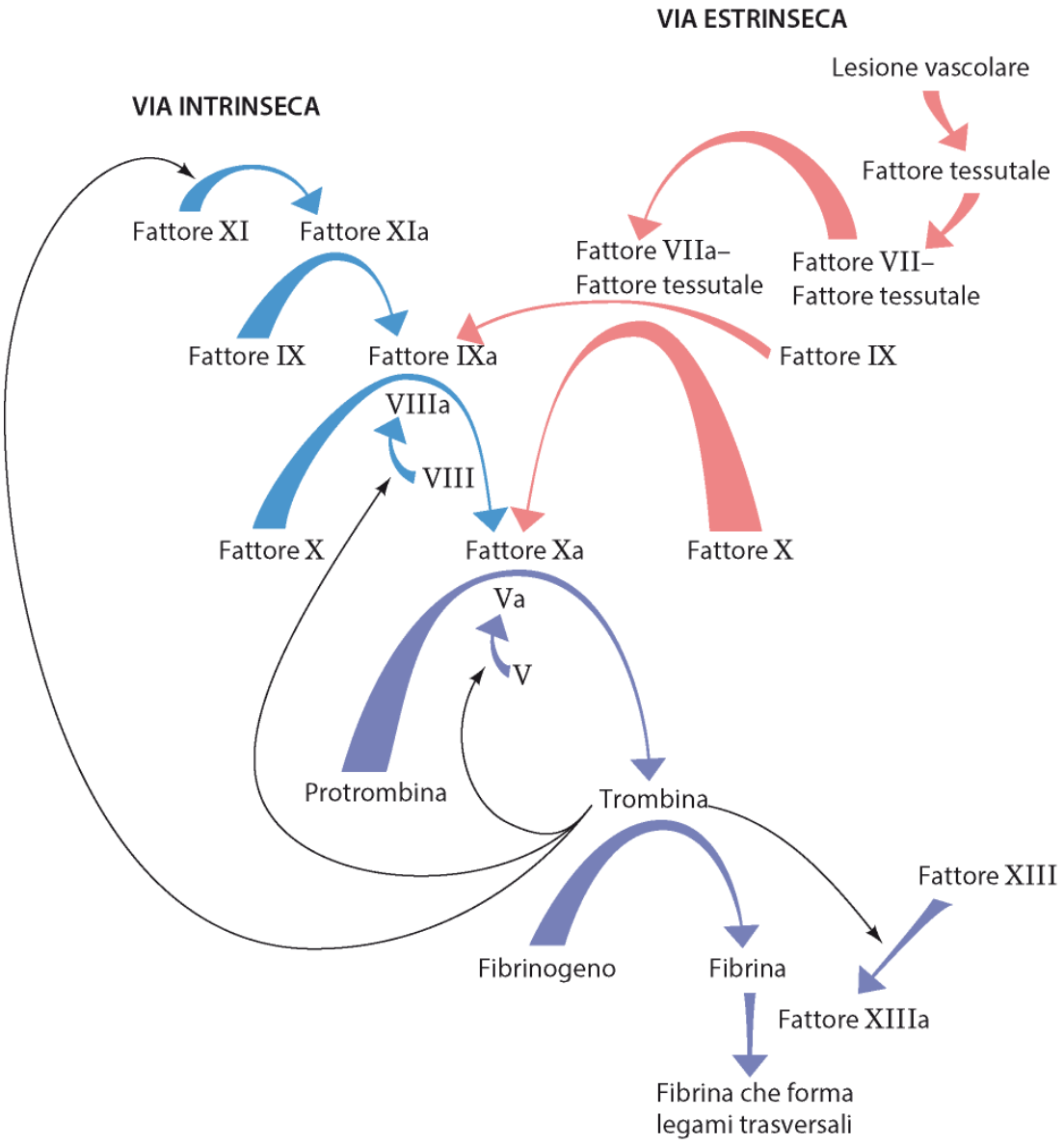


Esempi di zimogeni

Zimogeni pancreatici
Chimitripsinogeno
Tripsinogeno
Proelastasi

Prolipasi (co-lipasi)

Zimogeno stomaco
Pepsinogeno

Zimogeni del sistema di coagulazione
Protrombina
Fattore XI
…
Protransglutaminasi (Fattore XIII)

La cascata della coagulazione del sangue