

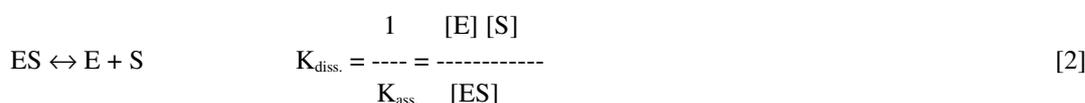
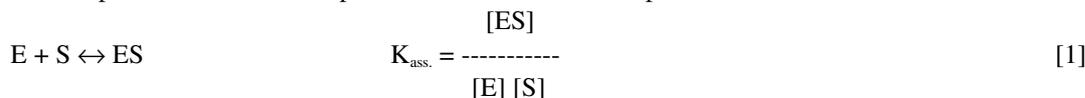
IL MODELLO DI MICHAELIS E MENTEN PER LA CINETICA ENZIMATICA.

Un enzima è una proteina capace di catalizzare una specifica reazione chimica, accelerandone l'andamento. L'ordine di reazione in presenza di un enzima differisce notevolmente da quello osservato in sua assenza (nel primo caso è in genere zero, nel secondo è pari o superiore ad uno) e riflette un meccanismo complesso che verrà analizzato nei paragrafi che seguono, scomponendolo in vari processi semplici.

1. Equilibrio di legame tra un enzima ed un substrato presente in largo eccesso.

L'analisi presentata in questo paragrafo è preliminare allo studio della catalisi enzimatica e riferisce ad una condizione sperimentale in cui l'enzima si combina con il suo **substrato** (la sostanza di cui catalizza la trasformazione; in genere una piccola molecola organica) ma non ne catalizza la trasformazione. La più comune condizione sperimentale in cui alla formazione del complesso tra enzima e substrato segue la trasformazione di quest'ultimo sarà considerata nei paragrafi successivi.

La combinazione reversibile dell'enzima col suo substrato segue la legge di azione delle masse, e la costante di equilibrio può essere scritta sia per la formazione che per la dissociazione del complesso:



Il termine [S] indica la concentrazione del substrato libero, non combinato con l'enzima; se, come in genere avviene, il substrato è presente in concentrazione molto superiore a quella dell'enzima, si ha: $[S]_{\text{tot}} = [S] + [ES] \approx [S]$. Poiché questa condizione semplifica notevolmente la descrizione quantitativa del sistema, da qui in avanti assumeremo che sia sempre rispettata.

Per ragioni storiche e convenzionali la cinetica enzimatica è trattata secondo la reazione di dissociazione del complesso enzima-substrato (eq. [2]); lo studente può esercitarsi a dimostrare che relazioni del tutto equivalenti si possono ottenere impiegando la costante di associazione anziché quella di dissociazione. La costante di dissociazione dell'equilibrio $ES \leftrightarrow E + S$ può essere riarrangiata così:

$$[E] / [ES] = K_{\text{diss.}} / [S] \quad [3]$$

Il termine $[E] / [ES]$ è equivalente al rapporto tra le frazioni del complesso dissociato ed indissociato, $\alpha / (1-\alpha)$, e dall'equazione [3] è possibile calcolare la frazione di enzima che si trova nella forma del complesso con il substrato (si veda la nota 1):

$$\frac{[ES]}{[E] + [ES]} = \frac{[S] / K_{\text{diss.}}}{1 + [S] / K_{\text{diss.}}} = \frac{[S]}{K_{\text{diss.}} + [S]} \quad [4]$$

La rappresentazione grafica dell'equazione [4] è un'iperbole equilatera con [S] per ascissa, la frazione di [ES] per ordinata, inizio nell'origine (per [S]=0 si ha anche [ES]=0) ed asintoto pari ad 1 (se $[S] \gg K_{\text{diss.}}$ si ha che $[ES] / [E]_{\text{tot}}$ tende ad 1), come riportato nella fig.1. Si noti che l'ascissa del grafico dovrebbe riportare la concentrazione del substrato libero ad equilibrio (cioè non combinato con la proteina). Però poiché si è assunto che la concentrazione del substrato eccede largamente quella dell'enzima, si può riportare sull'ascissa del grafico $[S]_{\text{tot}}$ al posto di [S].

La concentrazione di substrato necessaria per ottenere $[E] = [ES]$ (e quindi $[ES] / [E]_{\text{tot}} = 0,5$) è definita $[S]_{50}$; dall'equazione [3] si ricava:

$$[S]_{50} = K_{\text{diss.}} \quad [5]$$

E' importante notare che $K_{\text{diss.}}$ ha per dimensioni una concentrazione ed è pertanto *omogenea* con [S].

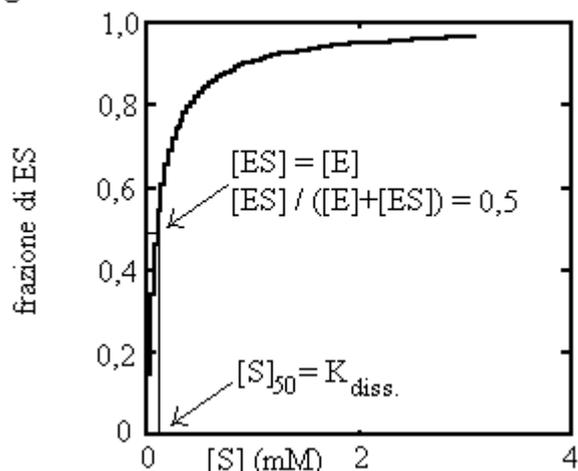
Nota 1: Per ricavare la relazione [4] conviene procedere come segue:

si definisce $[E]_{\text{tot}} = [E] + [ES]$ per ricavare che $[E] = [E]_{\text{tot}} - [ES]$; sostituendo [E] nella [3] si ottiene:

$$[ES] / ([E]_{\text{tot}} - [ES]) = [S] / K_{\text{diss.}}; \quad [ES] = [E]_{\text{tot}} [S] / K_{\text{diss.}} - [ES] [S] / K_{\text{diss.}};$$

$[ES] (1 + [S] / K_{diss.}) = [E]_{tot} [S] / K_{diss.}$; quest'ultima equazione conduce facilmente alla [4]

Figura 1: frazione di saturazione di E in funzione di [S]



2. Cinetica di una reazione catalizzata da un enzima.

Quando una reazione biochimica è catalizzata da un enzima l'ordine di reazione è in genere pari a zero e la velocità è una funzione iperbolica (anziché lineare o parabolica) della concentrazione del reagente. Quanto detto può essere compendiato in due grafici che non devono essere confusi tra loro: il primo riporta la variazione della concentrazione di S in funzione del tempo (fig.2), il secondo la velocità istantanea in funzione della concentrazione di S (fig.3). In entrambi i grafici è importante confrontare ciò che avviene in assenza dell'enzima con ciò che avviene in sua presenza.

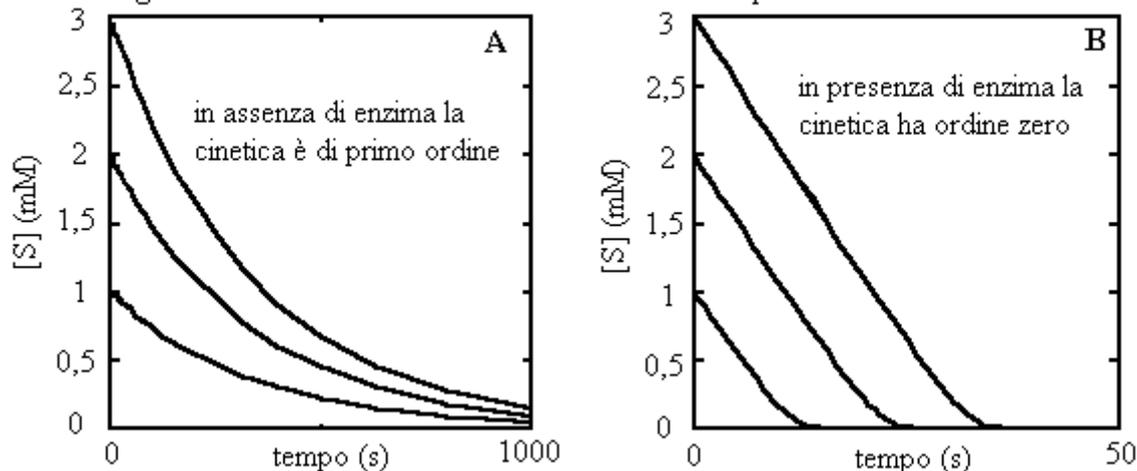
Si consideri, a titolo di esempio la reazione monomolecolare irreversibile nella quale il reagente (S) si trasforma in prodotto (P):



E' evidente che in assenza di catalizzatore la velocità (v) istante per istante è direttamente proporzionale alla concentrazione del reagente ([S]). Poiché S si consuma, se la reazione viene seguita per tempi lunghi, si osserva che la sua velocità diminuisce esponenzialmente nel tempo, come è caratteristico delle reazioni di primo ordine.

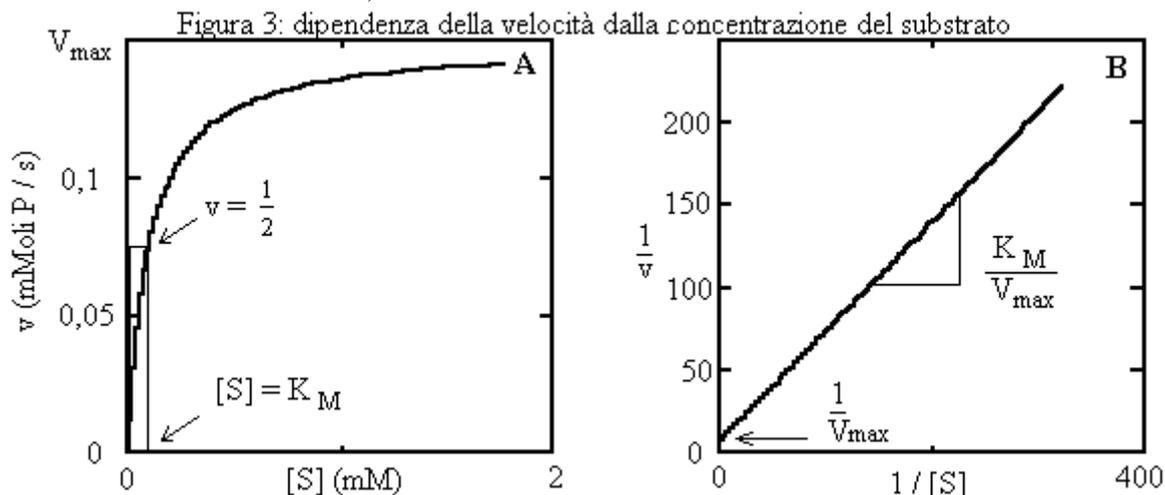
In presenza di un enzima specifico si osserva che: 1) la velocità di reazione è molto maggiore di quella osservata in sua assenza, e 2) per brevi intervalli di tempo il consumo di S è lineare anziché esponenziale (cioè *la cinetica è di ordine zero anziché primo*).

Figura 2: variazione della concentrazione di S nel tempo



Nella figura 2 si può confrontare la velocità con la quale S viene consumato in assenza di enzima (pannello di sinistra) ed in sua presenza (pannello di destra); sono riportati tre esperimenti immaginari a tre diverse concentrazioni iniziali di S (1, 0,5 e 0,25 mM), tutte molto superiore alla concentrazione dell'enzima, quando questo è presente. Si notino la differente scala di tempo dei due pannelli e la forma delle curve, che corrispondono a funzioni esponenziali nel pannello di sinistra (cinetica di *primo ordine*) e approssimano invece la linearità nel pannello di destra (cinetica di *ordine zero*, indipendente dalla concentrazione del reagente, caratteristica delle reazioni catalizzate).

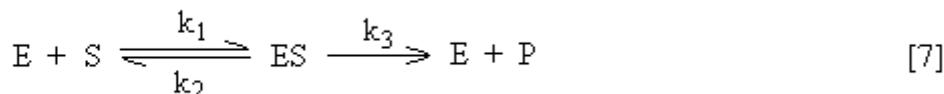
La figura 3 riporta la relazione tra la velocità istantanea e la concentrazione del substrato; si osserva che in assenza dell'enzima la velocità è molto bassa ed è direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato (cioè il grafico di v in funzione di $[S]$ corrisponde ad una linea retta), mentre in presenza dell'enzima la velocità è elevata e dipende iperbolicamente dalla concentrazione del substrato. È importante sottolineare che l'iperbole presenta un asintoto, limite massimo al quale la velocità può avvicinarsi ma che non può superare, indicato come velocità massima (V_{max}) in quelle condizioni sperimentali. È evidente la somiglianza tra i grafici delle figure 1 e 3, che pure riferiscono a fenomeni diversi (la frazione del complesso ES nella prima e la velocità di reazione nella seconda).



3. Il modello di Michaelis e Menten per la cinetica enzimatica.

Nel 1913 Michaelis e Menten proposero uno schema di reazione inteso a spiegare la cinetica enzimatica, che viene qui riassunto nelle sue linee essenziali tenendo presenti anche le evoluzioni successive.

L'enzima forma inizialmente un complesso reversibile con il substrato; questo può andare incontro sia alla dissociazione, che restituisce enzima e substrato, sia alla trasformazione, che converte il substrato in prodotto ed è seguita dalla dissociazione di quest'ultimo dall'enzima:



Per ragioni termodinamiche, l'enzima catalizza sempre anche la reazione inversa ($P \rightarrow S$), ma nel nostro esempio la conversione di S in P è stata assunta come praticamente irreversibile e pertanto la reazione inversa sarà considerata trascurabile e non sarà trattata.

La formazione del complesso ES (complesso di Michaelis) è una reazione bimolecolare semplice e pertanto di secondo ordine, governata dalla costante cinetica k_1 :



La reazione inversa, e cioè la dissociazione del complesso ES, è di primo ordine e la sua costante cinetica caratteristica è convenzionalmente indicata con k_2 :



Infine la trasformazione di S in P e la successiva dissociazione di quest'ultimo sono considerate avvenire in un unico processo cinetico di primo ordine con costante caratteristica k_3 ; questa reazione corrisponde alla trasformazione di S in P e pertanto la sua velocità è quella della reazione in toto, in presenza del catalizzatore, ed è indicata semplicemente come v o come V_{cat} :



Si noti che quando la stessa specie chimica (in questo caso ES) è consumata in due reazioni distinte, la velocità alla quale essa scompare è pari alla somma delle velocità delle due reazioni:

$$-\delta[ES] / \delta t = [ES] (k_2 + k_3) \quad [11]$$

Quando la concentrazione del substrato è elevata, il complesso ES che decade viene rapidamente riformato; la sua concentrazione rimane quindi approssimativamente costante. La velocità della reazione [10] rimane di conseguenza costante anche su tempi relativamente lunghi (ed è perciò spiegato l'ordine uguale a zero delle reazioni catalizzate), prima che il consumo di substrato sia tale da diminuirla in modo significativo; questa condizione è definita di **stato stazionario**.

Il modello di Michaelis e Menten descrive lo stato stazionario, e la sua relazione con la concentrazione di substrato, nei termini seguenti:

$$-\delta[ES] / \delta t = 0 \quad (\text{a stato stazionario } [ES] \text{ è approssimativamente costante)} \quad [12]$$

Poiché $[E]_{\text{tot}} = [E] + [ES]$ è costante, se è costante $[ES]$ deve esserlo anche $[E]$:

$$-\delta[E] / \delta t = 0 \quad [13]$$

dall'equazione [12] si deduce che la velocità con la quale ES si forma [8] deve essere uguale a quella con cui questa specie scompare [11]; soltanto così infatti si potrà giustificare che $[ES]$ rimane costante:

$$[E] [S] k_1 = [ES] (k_2 + k_3) \quad [14]$$

Riarrangiando l'equazione [14] si ottiene:

$$\frac{[E] [S] (k_2 + k_3)}{[ES] k_1} = K_M \quad [15]$$

Si noterà che K_M , la costante di Michaelis, è formalmente equivalente alla K_{diss} dell'equazione [2], ed è omogenea con $[S]$; valgono quindi tutte le considerazioni fatte in precedenza (equazioni da [1] a [5]) ed in particolare si può scrivere:

$$\frac{[ES]}{[E] + [ES]} = \frac{[ES]}{[E]_{\text{tot}}} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad [16]$$

La velocità alla quale procede la reazione $S \rightarrow P$ in presenza dell'enzima risulta pertanto:

$$v = [ES] k_3 = \frac{[E]_{\text{tot}} [S] k_3}{K_M + [S]} \quad [17]$$

Valgono le seguenti considerazioni:

1. L'equazione [17] descrive un'iperbole equilatera che ha $[S]$ per ascissa e v per ordinata; pertanto rappresenta bene il processo empiricamente osservabile (si confrontino i punti con la linea continua nella figura 3).
2. A concentrazione nulla di substrato la velocità della reazione è nulla.
3. A concentrazione elevata di substrato ($[S] \gg K_M$) si ha $K_M + [S] \approx [S]$ e pertanto $v \approx [E]_{\text{tot}} k_3$. In questa condizione tutto l'enzima è presente nella forma del complesso di Michaelis (cioè $[ES] \approx [E]_{\text{tot}}$ ed $[E] \approx 0$) e un ulteriore aumento di $[S]$ non può far aumentare né $[ES]$ né, di conseguenza, la velocità della reazione catalizzata. Si dice che il substrato è saturante e che la velocità osservata è la massima possibile in quelle condizioni sperimentali ($v = [E]_{\text{tot}} k_3 = V_{\text{max}}$). Il termine $V_{\text{max}} / [E]_{\text{tot}}$, che nel modello originale corrisponde a k_3 , è definito numero di turnover ed indica il massimo numero di molecole di substrato che ogni molecola di enzima può trasformare nell'unità di tempo.
4. La concentrazione di substrato necessaria per ottenere una velocità pari alla metà di V_{max} può essere definita algebricamente e corrisponde alla K_M : infatti per ottenere questa condizione si deve avere che $[ES] = [E] = [E]_{\text{tot}} / 2$ e pertanto ci si trova nella condizione già analizzata con l'equazione [5], e graficamente riportata nelle figure 1 e 3.
5. E' possibile trasformare la [17] in modo da ottenere l'equazione di una retta, uguagliando tra loro i reciproci del primo e del secondo membro:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{[E]_{\text{tot}} k_3} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{[E]_{\text{tot}} k_3} \quad [18]$$

Questa formulazione, detta dei doppi reciproci, o di Lineweaver e Burk, dal nome degli autori che la elaborarono, corrisponde all'equazione di una retta che ha per ascissa il termine $1 / [S]$, per ordinata $1 / v$, per intercetta sull'asse delle ordinate $1 / V_{\text{max}}$, e per coefficiente angolare K_M / V_{max} . La retta dei doppi reciproci è riportata nella fig.3B.

4. Meccanismi molecolari della catalisi enzimatica.

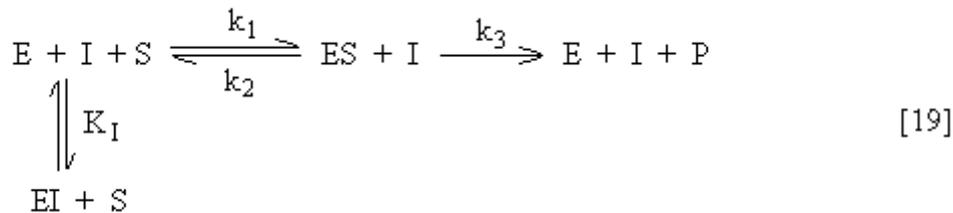
Il complesso di Michaelis di molti enzimi è un intermedio instabile e non risulta popolato in modo significativo ad equilibrio; è del resto proprietà dei catalizzatori quella di accelerare sia la reazione diretta che quella inversa, senza influenzare la costante di equilibrio. Ciononostante è stato possibile studiare la struttura di ES con varie tecniche, e dimostrare non solo l'effettiva

esistenza di questa specie, ma anche la natura delle interazioni chimiche che intervengono tra enzima e substrato. Queste sono in genere interazioni deboli multiple: legami idrogeno, legami dipolo-dipolo, legami di tipo ionico, etc.; più raramente veri e propri legami covalenti. Si osserva in genere che una regione specifica dell'enzima, detta il *sito attivo*, ha struttura complementare a quella della molecola del substrato: ad esempio presenta una carica positiva dove il substrato ne ha una negativa o un donatore di legame idrogeno dove il substrato ha un accettore. La complementarità stereochimica tra il sito attivo dell'enzima ed il substrato è però imperfetta e la formazione del complesso di Michaelis impone in genere una deformazione del substrato che ne indebolisce i legami interatomici; questo fenomeno è alla base del meccanismo catalitico.

5. Inibizione della funzione enzimatica.

Le reazioni a carico delle molecole di interesse biologico sono in genere molto lente e nel corso della vita della cellula non avverrebbero affatto se non fossero catalizzate da enzimi; la presenza o l'assenza di un enzima determina quindi se un determinato percorso metabolico sarà attivo o meno e consente di scegliere tra alternative metaboliche distinte. Come conseguenza, per la cellula è molto importante poter inibire l'azione di specifici enzimi quando se ne presenti la necessità.

Verrà qui considerato il solo caso dell'inibizione enzimatica competitiva, la più semplice da descrivere. Questo caso si verifica quando esiste una sostanza simile al substrato e capace di combinarsi reversibilmente con il sito attivo dell'enzima, ma incapace di essere trasformata in prodotto. Poiché l'inibitore (I) compete con il substrato per il sito attivo, il complesso ternario inibitore-enzima-substrato (EIS) non può mai formarsi e lo schema di reazione è il seguente:



Le costanti cinetiche k_1 , k_2 e k_3 hanno lo stesso significato già visto per lo schema di Michaelis e Menten; K_I è invece la costante dell'equilibrio di dissociazione dell'inibitore, definita come:

$$EI \leftrightarrow E + I \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad [20]$$

Con un ragionamento del tutto analogo a quello già condotto per lo schema di Michaelis si calcola la frazione delle tre specie E, ES ed EI (si veda la nota 2), per ottenere la velocità della reazione:

$$v = [ES] k_3 = \frac{[E]_{tot} k_3 [S] / K_M}{1 + [S]/K_M + [I]/K_I} = \frac{[E]_{tot} k_3 [S]}{[S] + K_M (1 + [I]/K_I)} \quad [21]$$

Si confronti l'equazione [21] con la [17] e si facciano le seguenti considerazioni:

1. La [21] è formalmente analoga alla [17], con la differenza che ma il termine K_M vi compare moltiplicato per $(1 + [I]/K_I)$; pertanto anche la [21] descrive un'iperbole equilatera, dalla quale è possibile calcolare graficamente V_{max} nonché una $[S]_{50}$, corrispondente al termine $K_M (1 + [I]/K_I)$. Quest'ultimo termine è spesso definito la " K_M apparente" per le condizioni sperimentali date.

2. È caratteristico di questo tipo di inibizione enzimatica che la V_{max} rimanga invariata in presenza dell'inibitore: infatti a concentrazioni molto elevate il substrato spiazza l'inibitore e converte la totalità dell'enzima in ES. Per contro in presenza di un inibitore competitivo la $[S]_{50}$ è più grande che in assenza dell'inibitore stesso.

Nota 2: per ottenere l'equazione [21] conviene prendere come riferimento il termine [E] e calcolare rispetto a questo gli altri due, [ES] ed [EI]; la somma dei tre corrisponde ad $[E]_{tot}$:

$$[ES] = [E] [S] k_1 / (k_2 + k_3) = [E] [S] / K_M \quad (\text{dalla [15]});$$

$$[EI] = [E] [I] / K_I \quad (\text{dalla [20]}).$$

Le tre specie dell'enzima si trovano quindi nei seguenti rapporti:

$$\begin{array}{l}
 \frac{[E]}{[E]_{tot}} = \frac{[E]}{[E] + [ES] + [EI]} = \frac{[E]}{[E] (1 + [S]/K_M + [I]/K_I)} = \frac{1}{1 + [S]/K_M + [I]/K_I} \\
 \frac{[EI]}{[E]_{tot}} = \frac{[I]/K_I}{1 + [S]/K_M + [I]/K_I}
 \end{array}$$

$$\frac{[ES]}{[E]_{\text{tot}}} = \frac{[S] / K_M}{1 + [S]/K_M + [I]/K_I}$$

L'ultima equazione è quella usata per ottenere la [21].