

Prof. Giorgio Sartor

# Cinetica enzimatica

Copyright © 2001-2014 by Giorgio Sartor.  
All rights reserved.

Versione 1.9.2 - 25/03/2014

## Spontaneità

- Una qualunque reazione chimica avviene spontaneamente **se e solo se la variazione di energia libera ( $\Delta G$ ) è negativa:**

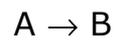
$$\Delta G_{T,p} < 0$$

$$\Delta G_T = \Delta H - T\Delta S$$

- A T e p costanti

# Spontaneità

- Quindi, data una qualunque reazione chimica



- Essa avviene spontaneamente se le energie libere molari

$$G_B < G_A$$

- Più in generale qualunque trasformazione avviene **se e solo se**:

$$G_{\text{finale}} < G_{\text{iniziale}}$$

# Spontaneità ed equilibrio

- Quando

$$G_B = G_A$$

- Quindi

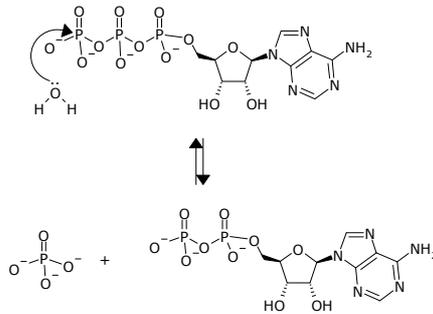
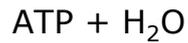
$$\Delta G = 0$$

- La reazione è all'equilibrio



# Spontaneità e realtà

- Questo non significa che una reazione chimica (un processo) esoergonica ( $\Delta G < 0$ ) avvenga con velocità apprezzabile.



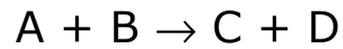
$$\Delta G^{\circ'} = -7.3 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1} (-30.6 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}) \text{ a pH } 7$$

# Energia di attivazione

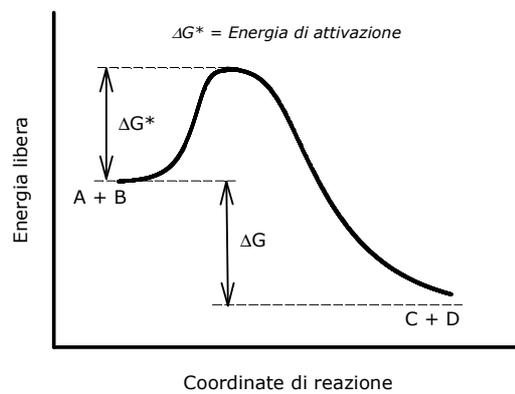
- In soluzione l'ATP è stabile perché esiste l'energia di attivazione.

# Catalisi

- In assenza di catalizzatore:

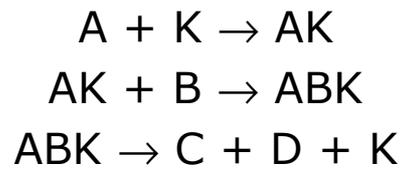


# Catalisi

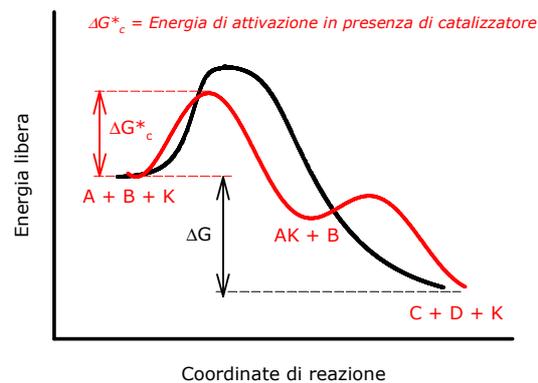


# Catalisi

- In presenza di catalizzatore:

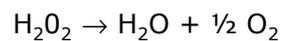


# Catalisi



## Controllo termodinamica e controllo cinetico di una reazione

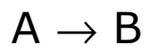
- Ogni reazione può avvenire **se e solo se** è termodinamicamente favorita ( $\Delta G < 0$ ),
- Avviene **se e solo** se vi è abbastanza energia per superare l'energia di attivazione:



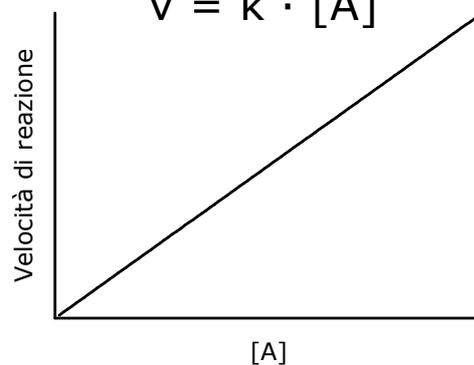
- Catalizzatore :
  - Nessuno  $\Delta H^* = 18 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$
  - Platino  $\Delta H^* = 11.7 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$
  - Catalasi  $\Delta H^* = 5.5 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$

( $\Delta H^*$  = energia di attivazione)

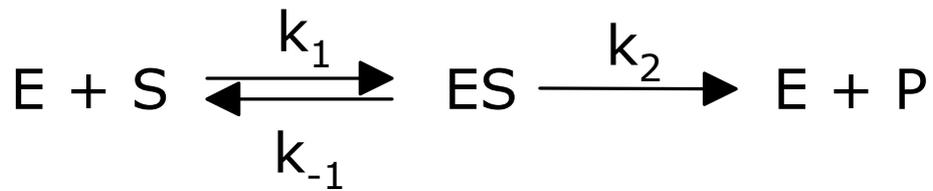
## In una reazione chimica



$$v = k \cdot [\text{A}]$$



## Una reazione enzimatica

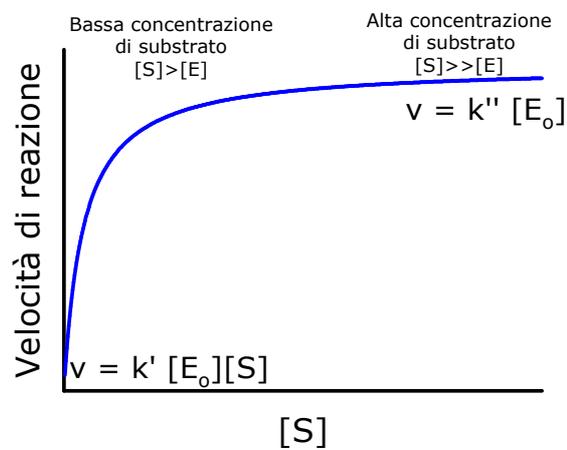


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 13 -

## In una reazione enzimatica



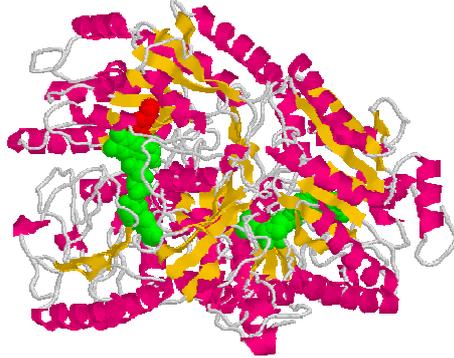
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 14 -

# Enzimi

- Gli enzimi sono sistemi catalitici, in genere...  
... **proteine**



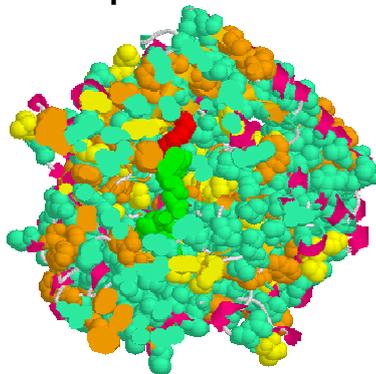
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 15 -

# Enzimi

- Gli enzimi sono sistemi catalitici, in genere...  
... **proteine**



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 16 -

# Specificità degli enzimi

- Specificità
  - Stereochimica
  - Assoluta
  - Di gruppo
  - Di legame

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

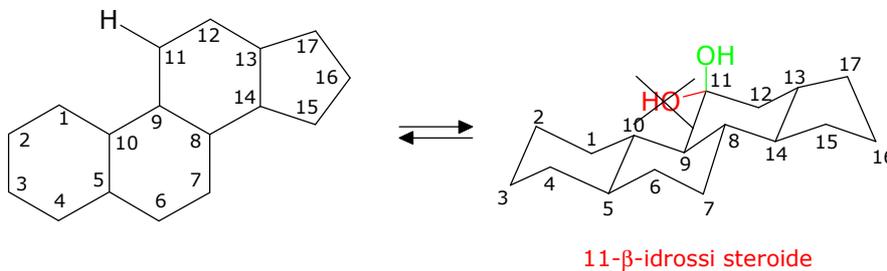
Cinetica enzimatica

- 17 -

# Specificità degli enzimi

- Specificità stereochimica

steroidi 11- $\beta$ -monossigenasi



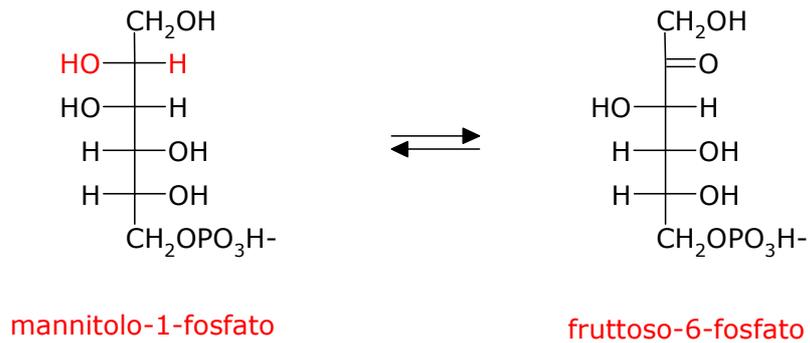
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 18 -

# Specificità degli enzimi

- Specificità assoluta  
mannitolo-1-fosfato deidrogenasi

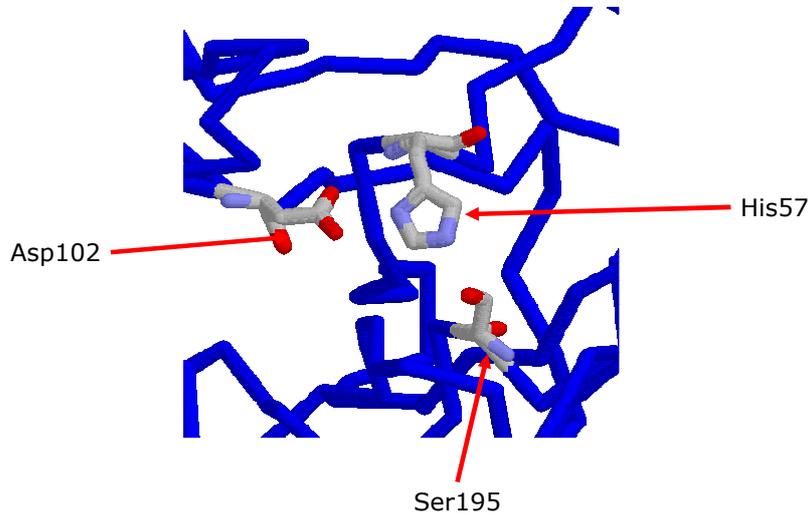


# Specificità degli enzimi

- Specificità di gruppo  
- Proteasi



## Centro catalitico

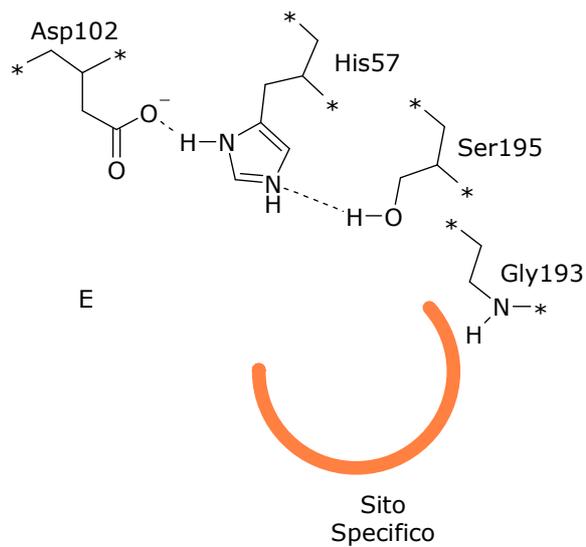


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 21 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

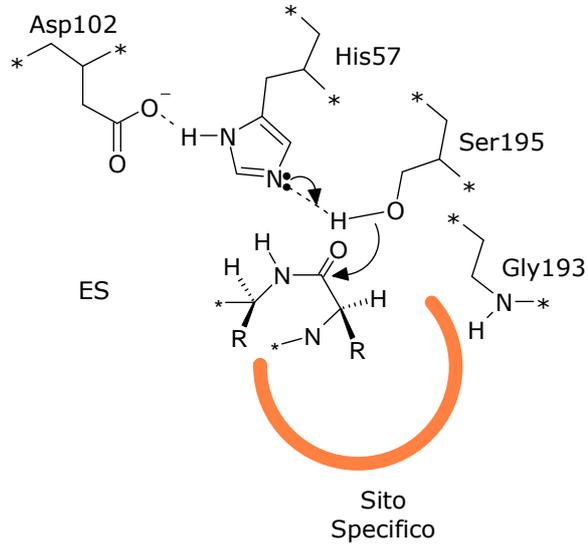


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 22 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

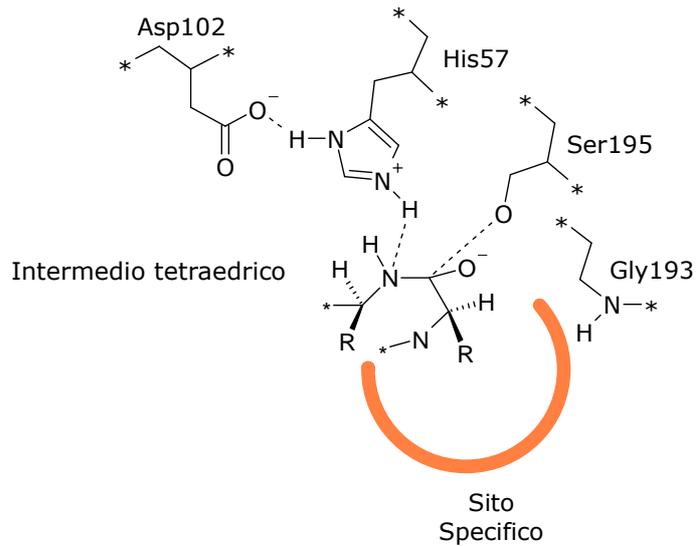


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 23 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

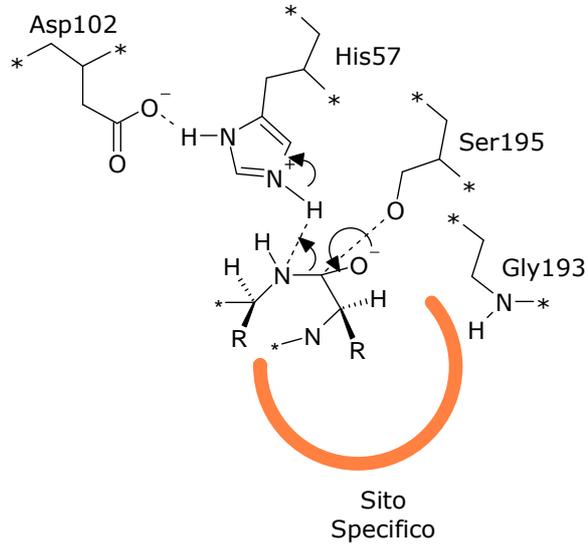


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 24 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

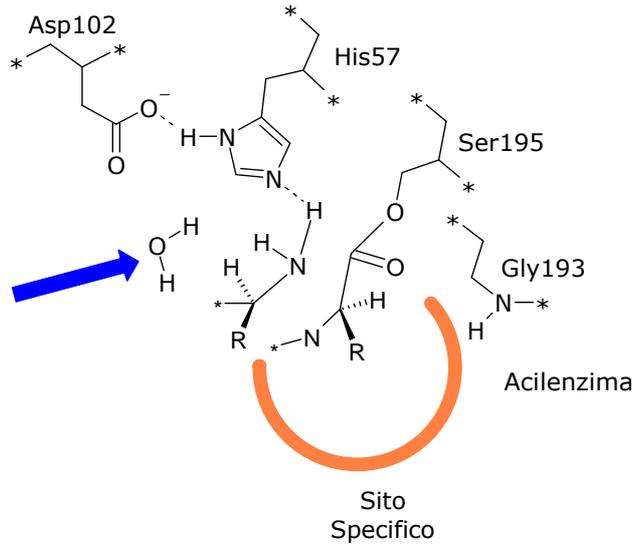


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 25 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

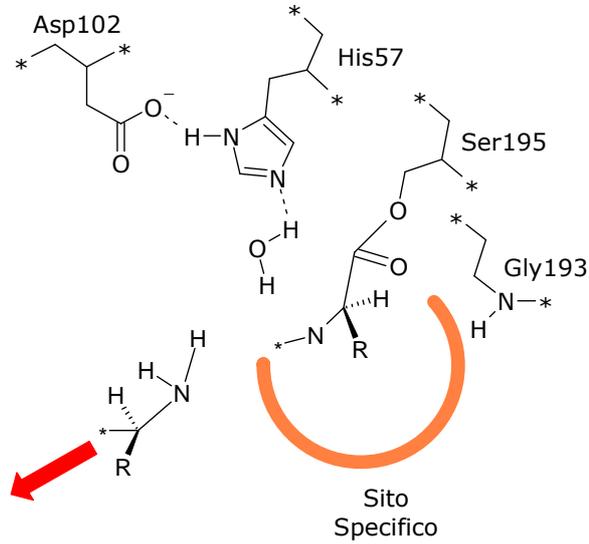


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 26 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

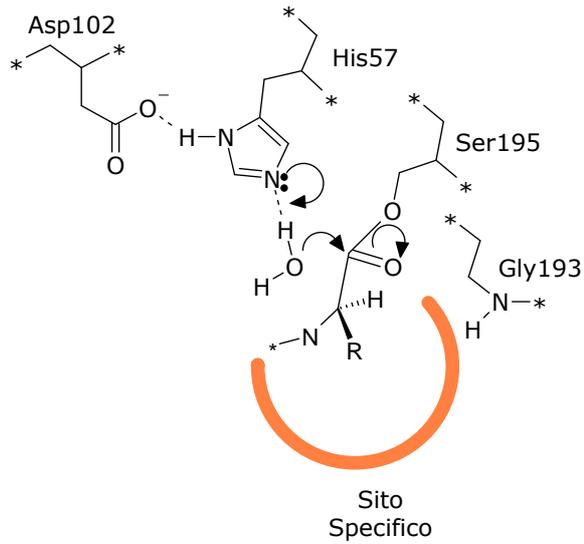


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 27 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

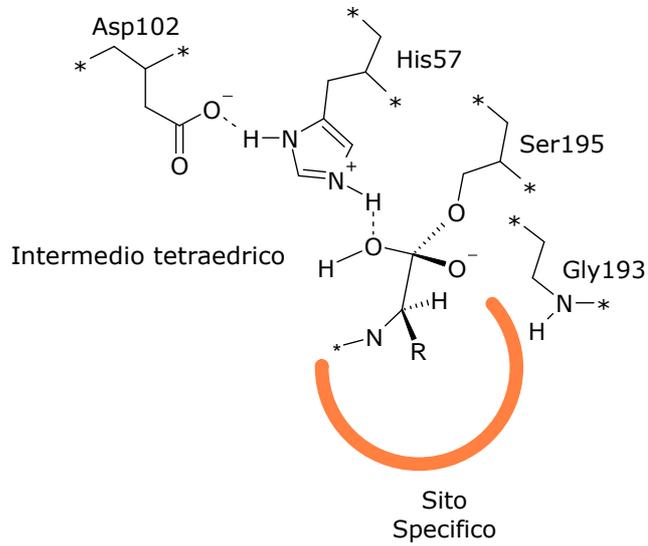


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 28 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

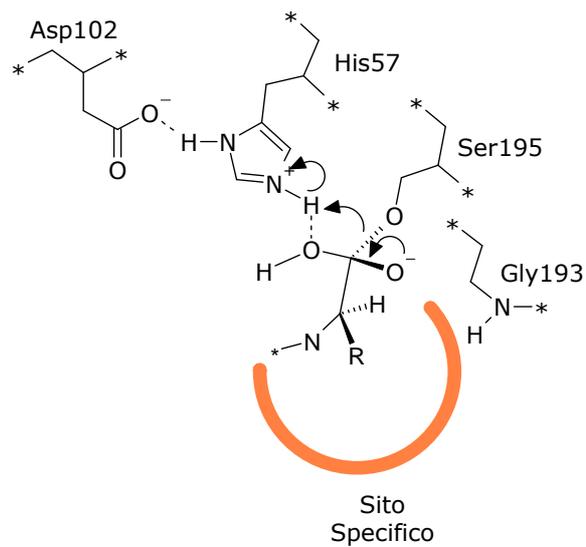


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 29 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

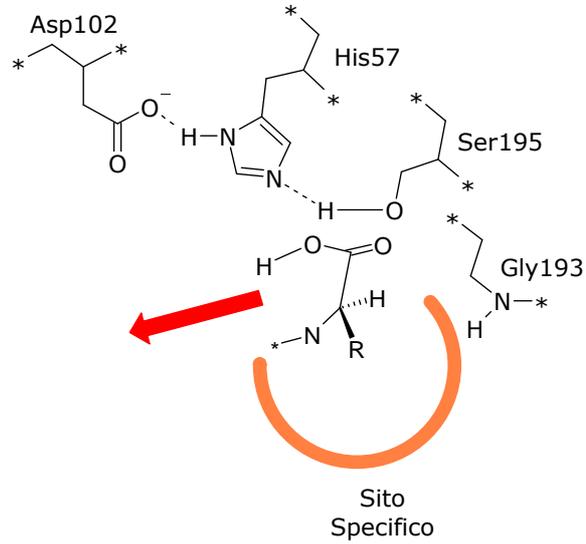


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 30 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

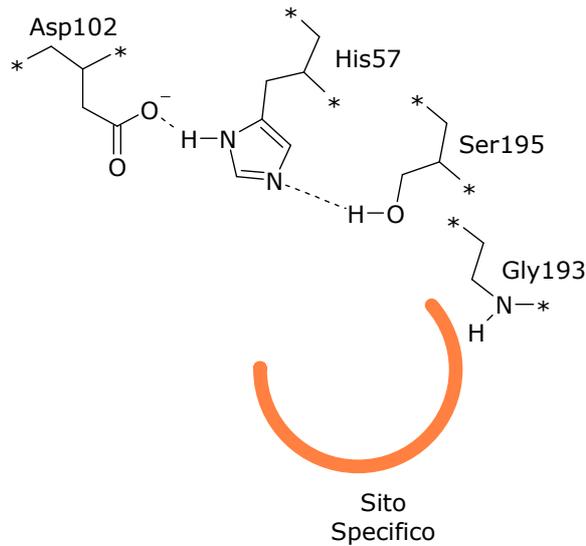


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 31 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

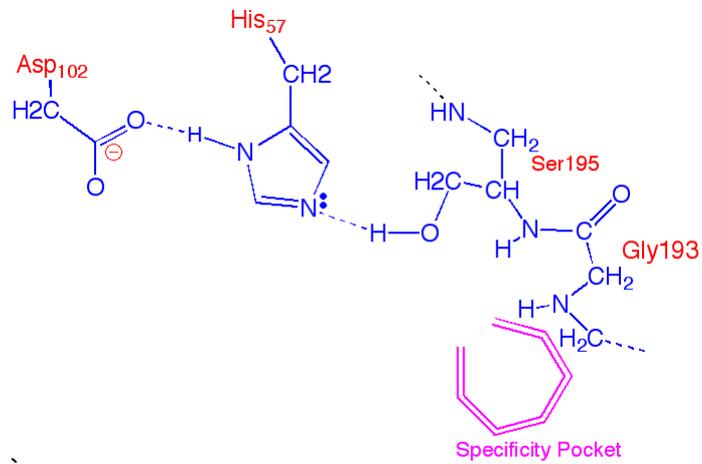


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 32 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

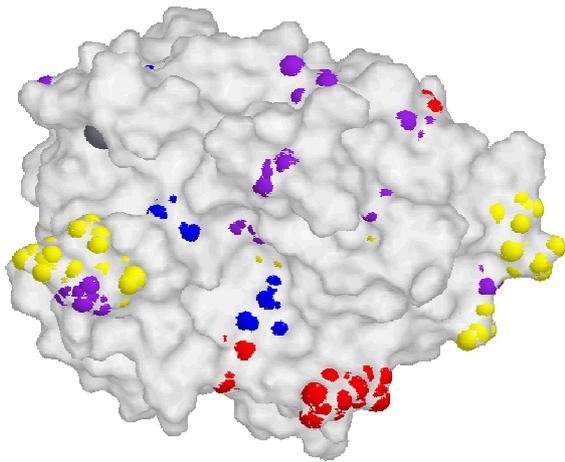


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 33 -

## Proteasi a serina (1HAX)

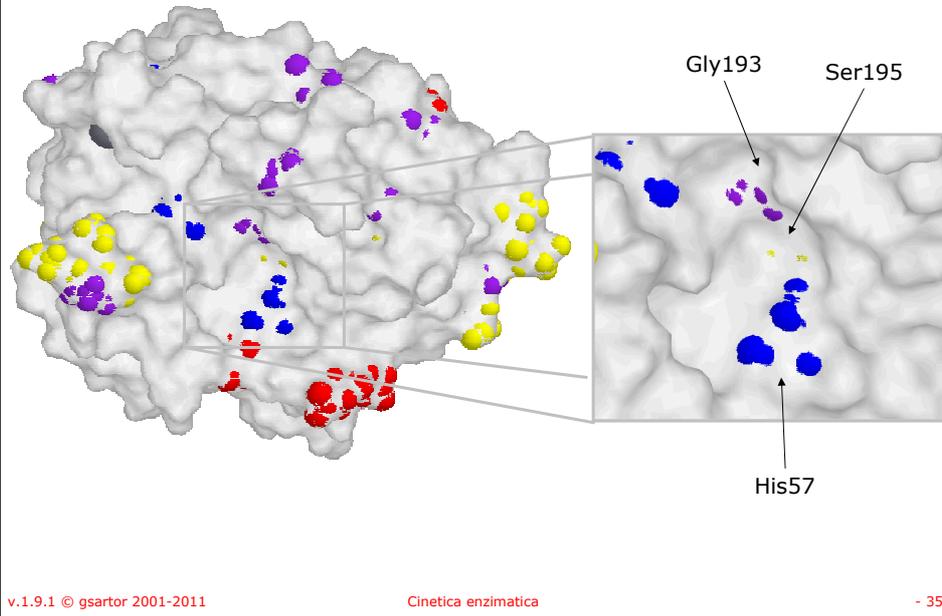


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 34 -

## Proteasi a serina (1HAX)



## Specificità degli enzimi

- Specificità di legame
  - Esterasi



# Classificazione degli enzimi

- Singolo enzima
  - Ureasi
- Complesso enzimatico
  - Complesso piruvato deidrogenasi

# Classificazione gerarchica degli enzimi

- Ogni enzima viene classificato a secondo della **reazione** che catalizza.
- Viene classificato con un numero:
  - EC X.Y.Z.T
  - X = classe
  - Y = sottoclasse
  - Z = sotto-sottoclasse
  - T = numero dell'enzima nella sotto-sottoclasse
    - <http://www.enzyme-database.org/class.php>
    - <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>
    - <http://www.brenda-enzymes.org/>
    - [http://www.genome.jp/kegg-bin/get\\_htext?ko01000.keg](http://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?ko01000.keg)

## Classificazione gerarchica degli enzimi

- Classi:
  - 1. Ossidoreduttasi
    - Catalizzano una reazione redox.
  - 2. Transferasi
    - Catalizzano il trasferimento di un gruppo da una molecola ad un'altra:  
 $X-Y + Z \rightarrow X-Z + Y$   
le chinasi trasferiscono un gruppo fosfato.
  - 3. Idrolasi
    - Catalizzano la scissione idrolitica di legami C=O, C-N, C-C, P-O-P,...

## Classificazione gerarchica degli enzimi

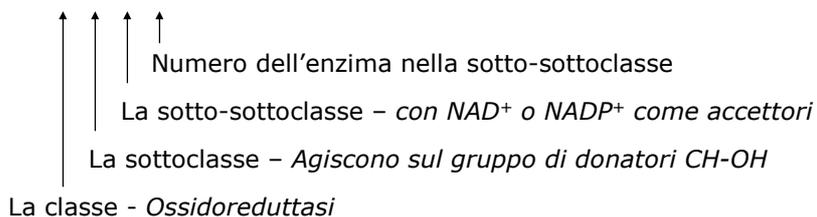
- Classi:
  - 4. Liasi
    - Catalizzano scissioni di legami con meccanismi diversi dalle Ossidoreduttasi e dalle Idrolasi.
  - 5. Isomerasi
    - Catalizzano modificazioni geometriche.
  - 6. Ligasi (Sintetasi)
    - Catalizzano l'unione di due molecole accoppiata al consumo di ATP o di un altro nucleotide trifosfato.

## Classificazione gerarchica degli enzimi

- Per esempio:



- Nome comune: **alcool deidrogenasi**
- Nome sistematico: **alcool:NAD<sup>+</sup> ossidoreduttasi**
- EC **1.1.1.1**



## Enzyme EC numbers

EC (Enzyme Commission) numbers assigned by IUPAC-IUBMB

[ [1st Level](#) | [2nd Level](#) | [3rd Level](#) | [4th Level](#) | [Text Search](#) ]

- ▶ 1. Oxidoreductases;
- ▶ 2. Transferases;
- ▶ 3. Hydrolases;
- ▶ 4. Lyases;
- ▶ 5. Isomerases;
- ▶ 6. Ligases;

[ [KEGG Home Page](#) | [GenomeNet Home Page](#) | [DBGET Links Diagram](#) ]

Last updated: March 3, 2009

## Enzyme EC numbers

EC (Enzyme Commission) numbers assigned by IUPAC-IUBMB

[ [1st Level](#) | [2nd Level](#) | [3rd Level](#) | [4th Level](#) | [Text Search](#) ]

### ▼ 1. Oxidoreductases;

- ▶ 1.1 Acting on the CH-OH group of donors;
- ▶ 1.2 Acting on the aldehyde or oxo group of donors;
- ▶ 1.3 Acting on the CH-CH group of donors;
- ▶ 1.4 Acting on the CH-NH<sub>2</sub> group of donors;
- ▶ 1.5 Acting on the CH-NH group of donors;
- ▶ 1.6 Acting on NADH or NADPH;
- ▶ 1.7 Acting on other nitrogenous compounds as donors;
- ▶ 1.8 Acting on a sulfur group of donors;
- ▶ 1.9 Acting on a heme group of donors;
- ▶ 1.10 Acting on diphenols and related substances as donors;
- ▶ 1.11 Acting on a peroxide as acceptor;
- ▶ 1.12 Acting on hydrogen as donor;
- ▶ 1.13 Acting on single donors with O<sub>2</sub> as oxidant and incorporation of oxygen into
- ▶ 1.14 Acting on paired donors, with O<sub>2</sub> as oxidant and incorporation or reduction
- ▶ 1.15 Acting on superoxide as acceptor;
- ▶ 1.16 Oxidizing metal ions;
- ▶ 1.17 Acting on CH or CH<sub>2</sub> groups;
- ▶ 1.18 Acting on iron-sulfur proteins as donors;
- ▶ 1.19 Acting on reduced flavodoxin as donor;
- ▶ 1.20 Acting on phosphorus or arsenic in donors;
- ▶ 1.21 Acting on X-H and Y-H to form an X-Y bond;
- ▶ 1.97 Other oxidoreductases;
- ▶ 1.98 Other oxidoreductases
- ▶ 1.99 Other oxidoreductases
- ▶ 1.- Other oxidoreductases

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 43 -

## Enzyme EC numbers

EC (Enzyme Commission) numbers assigned by IUPAC-IUBMB

[ [1st Level](#) | [2nd Level](#) | [3rd Level](#) | [4th Level](#) | [Text Search](#) ]

### ▼ 1. Oxidoreductases;

- ▼ 1.1 Acting on the CH-OH group of donors:
  - ▶ 1.1.1 With NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup> as acceptor
  - ▶ 1.1.2 With a cytochrome as acceptor
  - ▶ 1.1.3 With oxygen as acceptor
  - ▶ 1.1.4 With a disulfide as acceptor
  - ▶ 1.1.5 With a quinone or similar compound as acceptor
  - ▶ 1.1.99 With other acceptors
  - ▶ 1.1.- Acting on the CH-OH group of donors
- ▶ 1.2 Acting on the aldehyde or oxo group of donors;
- ▶ 1.3 Acting on the CH-CH group of donors;
- ▶ 1.4 Acting on the CH-NH<sub>2</sub> group of donors;
- ▶ 1.5 Acting on the CH-NH group of donors;
- ▶ 1.6 Acting on NADH or NADPH;
- ▶ 1.7 Acting on other nitrogenous compounds as donors;
- ▶ 1.8 Acting on a sulfur group of donors;

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 44 -

## Enzyme EC numbers

EC (Enzyme Commission) numbers assigned by IUPAC-IUBMB

[ [1st Level](#) | [2nd Level](#) | [3rd Level](#) | [4th Level](#) | [Text Search](#) ]

### ▼ 1. Oxidoreductases;

#### ▼ 1.1 Acting on the CH-OH group of donors;

##### ▼ 1.1.1 With NAD+ or NADP+ as acceptor

1.1.1.1 alcohol dehydrogenase; aldehyde reductase; ADH; alcohol dehydrogenase (NAD); aliphatic alcohol dehydrogenase; ethanol dehydrogenase; NAD-dependent alcohol dehydrogenase; NAD-specific aromatic alcohol dehydrogenase; NADH-alcohol dehydrogenase; NADH-aldehyde dehydrogenase; primary alcohol dehydrogenase; yeast alcohol dehydrogenase

1.1.1.2 alcohol dehydrogenase (NADP+); aldehyde reductase (NADPH2); NADP-alcohol dehydrogenase; NADP+-aldehyde reductase; NADP+-dependent aldehyde reductase; NADPH-aldehyde reductase; NADPH-dependent aldehyde reductase; nonspecific succinic semialdehyde reductase; ALR 1; low-Km aldehyde reductase; high-Km aldehyde reductase; alcohol dehydrogenase (NADP+)

1.1.1.3 homoserine dehydrogenase; HSDH; HSD

1.1.1.4 (R,R)-butanediol dehydrogenase; butyleneglycol dehydrogenase; D-butanediol dehydrogenase; D-(-)-butanediol dehydrogenase; butylene glycol dehydrogenase; diacetyl (acetoin) reductase; D-aminopropanol dehydrogenase; D-aminopropanol dehydrogenase; 1-amino-2-propanol dehydrogenase; 2,3-butanediol dehydrogenase; D-1-amino-2-propanol dehydrogenase; (R)-diacetyl reductase; (R)-2,3-butanediol dehydrogenase; D-1-amino-2-propanol:NAD+ oxidoreductase; 1-amino-2-propanol oxidoreductase; aminopropanol oxidoreductase

1.1.1.5 acetoin dehydrogenase; diacetyl reductase

1.1.1.6 glycerol dehydrogenase; glycerin dehydrogenase; NAD+-linked glycerol dehydrogenase

1.1.1.7 propanediol-phosphate dehydrogenase; PDP dehydrogenase; 1,2-propanediol-1-phosphate:NAD+ oxidoreductase; propanediol phosphate dehydrogenase

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 45 -

## Isoenzimi

- Questa classificazione NON riguarda gli enzimi in quanto proteine ma in quanto CATALIZZATORI
- La classificazione riguarda quindi gli enzimi che catalizzano una reazione.
- Proteine diverse (con diversa struttura primaria) che catalizzano la stessa reazione, sono

## ISOENZIMI

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

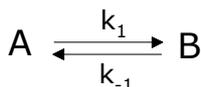
Cinetica enzimatica

- 46 -

## Isoenzimi

- Sono le forme multiple dovute a differenze, determinate geneticamente, di struttura primaria
- Sono anche isoenzimi quelle proteine che svolgono la stessa funzione ma sono geneticamente indipendenti, per esempio:
- EC 1.1.1.37 malato deidrogenasi
  - Citosolica (codificata dal DNA nucleare)
  - Mitocondriale (codificata dal DNA mitocondriale)

## Cenni di cinetica chimica



$$\text{Velocità diretta } v_1 = - \frac{d[A]}{dt} = k_1[A]$$

$$\text{Velocità inversa } v_{-1} = - \frac{d[B]}{dt} = k_{-1}[B]$$

- All'equilibrio

$$v_1 = v_{-1}$$

$$k_1[A]_{\text{eq}} = k_{-1}[B]_{\text{eq}}$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[B]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}}} = K_{\text{eq}}$$

## Cenni di cinetica chimica

- Ordine di reazione

- **I ordine**

$$v_1 = k_1[A]$$

- **II ordine**

$$v_1 = k_1[A]^2$$

oppure

$$v_1 = k_1[A][B]$$

- I ordine rispetto ad A
    - I ordine rispetto a B
    - II ordine globale

- **Ordine 0**

$$v_1 = k_1$$

- indipendente dalla concentrazione dei reagenti

## Dipendenza dalla temperatura

- La velocità di una reazione dipende dalla temperatura attraverso la costante di velocità  $k$

$$v = k[A]$$

$$k = A e^{-\frac{E_{att1}}{RT}}$$

- All'equilibrio

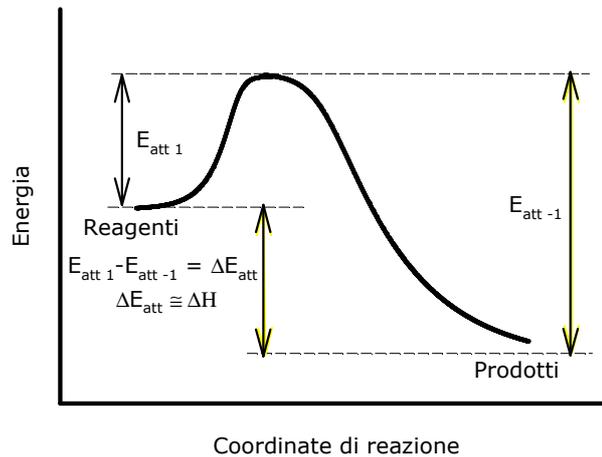
$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{A_1 e^{-\frac{E_{att1}}{RT}}}{A_{-1} e^{-\frac{E_{att-1}}{RT}}} = Z e^{-\frac{\Delta E_{att}}{RT}}$$

## Dipendenza dalla temperatura

$$K_{eq} = Z e^{-\frac{\Delta E_{att}}{RT}} = Z e^{-\frac{\Delta G}{RT}} = Z e^{-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}} = Z e^{-\frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R}}$$

$$K_{eq} = e^{-\frac{\Delta H}{RT}}$$

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H}{RT}$$

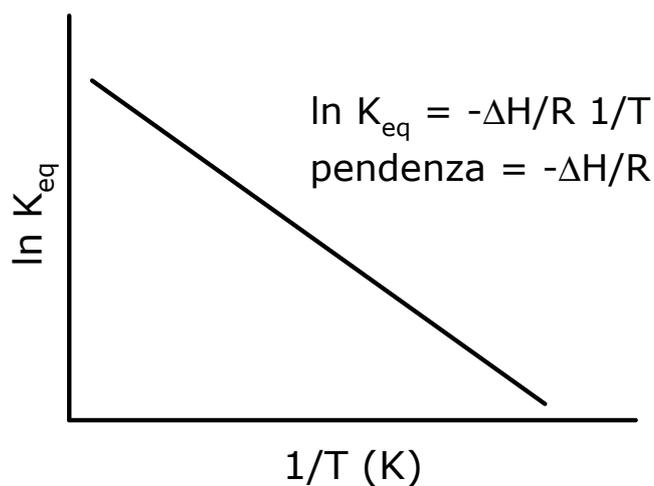


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 51 -

## Dipendenza dalla temperatura



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 52 -

## Dipendenza dalla temperatura

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Prodotti}]}{[\text{Reagenti}]}$$

- All'equilibrio

$$\frac{[\text{Prodotti}]}{[\text{Reagenti}]} = K_{\text{eq}}; \quad \Delta G = 0$$

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln K_{\text{eq}}$$

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K_{\text{eq}}$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

## Enzima e substrato

- In una reazione tra enzima (E) e substrato (S), possiamo distinguere tre fasi:

1. Legame tra E e S per formare il complesso ES

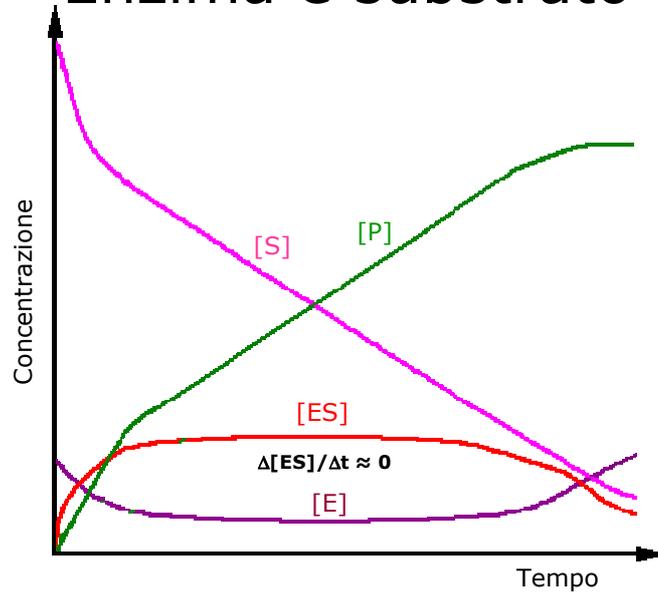


Stato prestazionario

2.  $\frac{d[ES]}{dt} = 0;$  Stato stazionario

3. Scompare il substrato, [ES] diminuisce, v diminuisce

# Enzima e substrato

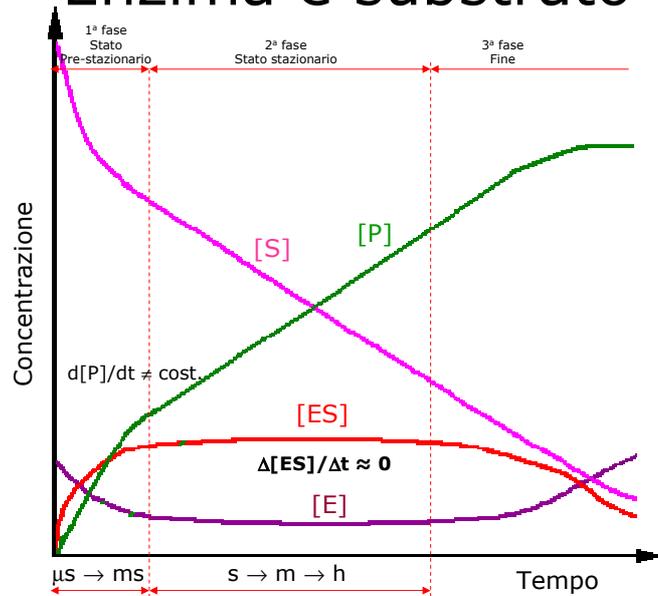


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 55 -

# Enzima e substrato

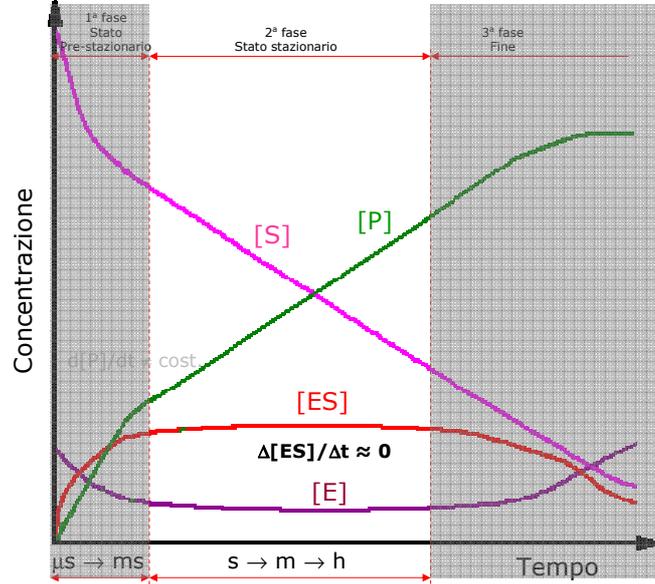


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 56 -

# Enzima e substrato

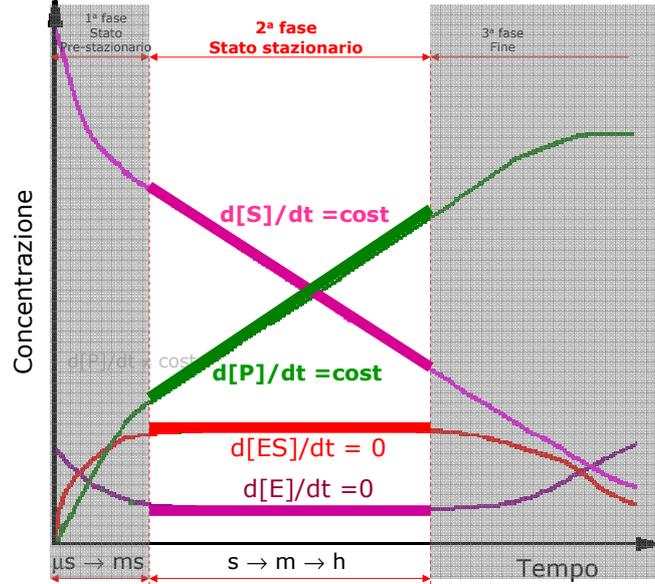


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 57 -

# Enzima e substrato



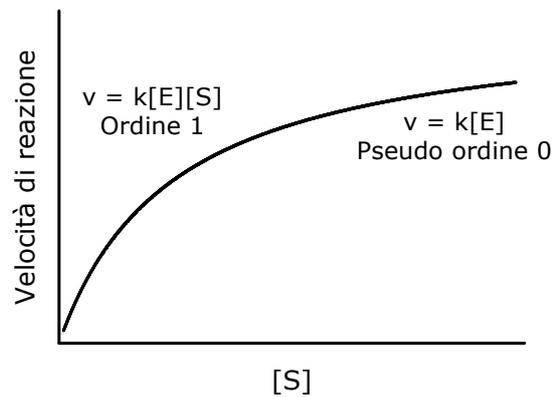
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 58 -

## Enzima e substrato

- In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile



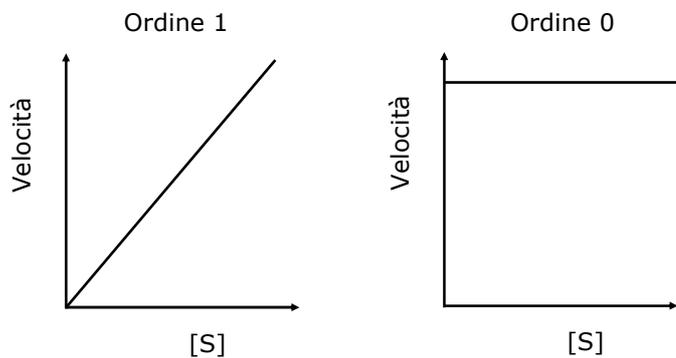
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 59 -

## Enzima e substrato

- In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 60 -

## Trattamento secondo Michaelis e Menten

- In una reazione enzimatica  $[S] \gg [E]$ :



$$v_{\text{diretta}} = k_2[ES]$$

- Per l'equilibrio veloce (1)

INDETERMINABILE

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[ES]}{[E][S]}$$

INDETERMINABILE

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1}} [E][S]$$

## Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Per l'equilibrio veloce (1)

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[ES]}{[E][S]}$$

INDETERMINABILE

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1}} [E][S]$$

$[E_{\text{tot}}]$  misurabile

$$[E_{\text{tot}}] = [E] + [ES]$$

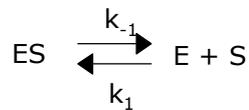
$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1}} ([E_{\text{tot}}] - [ES]) [S]$$

## Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Da cui

$$[ES] = \frac{[E_{\text{tot}}][S]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [S]}$$

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = K_d \longleftarrow \text{Costante di dissociazione del complesso ES}$$



$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_d = K_M \longleftarrow \text{Costante di Michaelis e Menten}$$

## Trattamento secondo Michaelis e Menten

- La concentrazione del complesso ES

$$[ES] = \frac{[E_{\text{tot}}][S]}{K_M + [S]}$$

- Poiché:

$$v_{\text{diretta}} = k_2[ES]$$

$$v_{\text{diretta}} = \frac{k_2[E_{\text{tot}}][S]}{K_M + [S]}$$

## Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Quando tutto  $E_{\text{tot}}$  diventa ES allora la velocità sarà massima.

$$V_{\text{max}} = k_2[E_{\text{tot}}]$$

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

- Quando il substrato satura l'enzima allora la velocità sarà massima

## Equazione di Michaelis e Menten

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

## Michaelis e Menten



Leonor Michaelis (1875-1949)



Maud Menten (1879-1960)

## Efficienza catalitica o numero di turnover

- $k_2$  è detta anche  $k_{cat}$  e si ottiene:

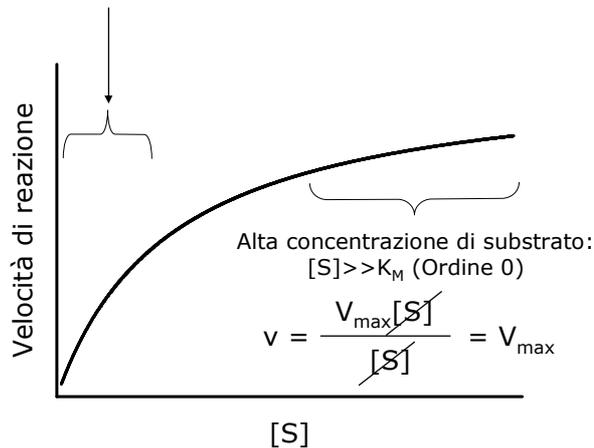
$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_{tot}]}$$

- $k_2$  è detto anche numero di turnover (Moli di substrato consumate per secondo per moli di enzima) si esprime in  $s^{-1}$ .

$$\sim 1 s^{-1} < k_2 < 10^6 s^{-1}$$

## Trattamento secondo Michaelis e Menten

Bassa concentrazione (relativamente) di substrato:  $[S] \ll K_M$  (Ordine 1)  $v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M}$



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 69 -

## Trattamento secondo Briggs-Haldane

- Da un punto di vista formale il trattamento è lo stesso di M.M., cambia il significato cinetico di  $K_M$



- Allo stato stazionario:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = \underset{\text{formazione di ES}}{k_1[E][S]} - \underset{\text{scomparsa di ES}}{(k_{-1}[ES] + k_2[ES])}$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{(k_{-1} + k_2)} \longrightarrow v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 70 -

## Significato di $K_M$

- $K_M$  descrive l'interazione substrato-enzima a livello del sito di legame.
- $K_M$  è, dimensionalmente, una concentrazione:

$$K_M = K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} ; \text{ moli l}^{-1}$$

- È la concentrazione di substrato al quale la velocità della reazione è metà della  $V_{\max}$

$$v = \frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} ; \quad \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]} ;$$

$$K_M = [S]$$

## Significato di $V_{\max}$



- $V_{\max}$  è legata a  $k_2$

$$V_{\max} = k_2[E_{\text{tot}}]$$

- Dipende dalla concentrazione dell'enzima (induzione).

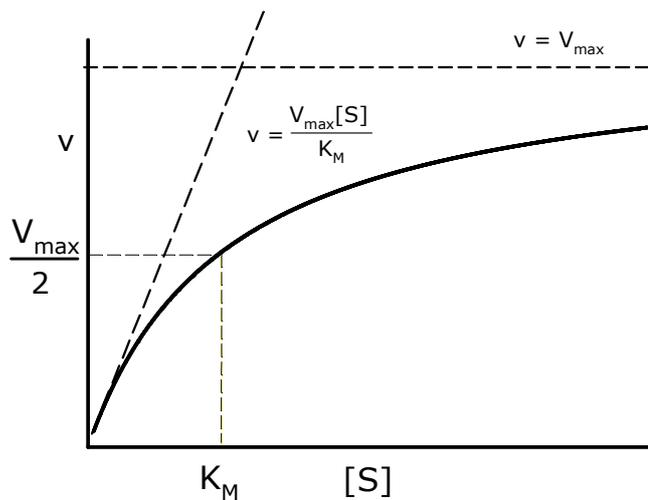
## Significato di $k_2$

- $k_2$  è una frequenza

$$V_{\max}/[E_{\text{tot}}] = k_2 \text{ (moli}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})/(\text{moli}\cdot\text{l}^{-1})$$
$$k_2 = \text{s}^{-1}$$

- Numero di eventi per unità di tempo (numero di turnover).
- Proprietà cinetica dell'enzima.

## Significato di $K_M$ e $V_{\max}$



Enzima	Sorgente	Substrato	Km (mM)	n° di turnover (1/s)
Acetil-CoA sintasi	Cuore di bue	Acetato	1.4	
ATP-asi	Muscolo di coniglio	ATP	0.014	
Alcool deidrogenasi	Fegato di cavallo	Etanolo	0.5	
Anidrasi carbonica	Eritrociti	Anidride carbonica	7.5	1000000
Aspartato aminotransferasi	Cuore di maiale	Acido aspartico	0.9	
		Acido $\alpha$ -chetoglutarico	0.1	
		Acido ossalacetico	0.04	
		acido glutammico	4	
Butiril-CoA deidrogenasi	Fegato di bue	Butiril-CoA	0.014	
<b>Chimotripsina</b>	<b>Pancreas bovino</b>	<b>N-benziltirosinamide</b>	<b>2.5</b>	
		<b>N-formiltirosinamide</b>	<b>12</b>	
		<b>N-acetiltirosinamide</b>	<b>32</b>	
		<b>gliciltirosinamide</b>	<b>122</b>	
Creatina fosfochinasi	Muscolo di coniglio	Creatina	19	
<b>Esocinasi</b>	<b>Lievito</b>	<b>Glucosio</b>	<b>0.15</b>	
<b>Esocinasi</b>	<b>Cervello</b>	<b>Glucosio</b>	<b>0.008</b>	
Fosfatasi acida	Prostata	$\alpha$ -glicerofosfato	3	
Fosfogliceraldeide deidrogenasi	Muscolo di coniglio	Gliceraldeide-3-fosfato	0.05	
Glutamato deidrogenasi	Fegato bovino	Acido glutammico	0.12	
		Acido $\alpha$ -chetoglutarico	2	
		Ione ammonio	57	
		NAD+	0.025	
		NADH	0.018	
Xantina ossidasi	Latte	Xantina	0.03	
		Acetaldeide	1000	

Enzima	Sorgente	Substrato	Km (mM)	n° di turnover (1/s)
Acetil-CoA sintasi	Cuore di bue	Acetato	1.4	
ATP-asi	Muscolo di coniglio	ATP	0.014	
Alcool deidrogenasi	Fegato di cavallo	Etanolo	0.5	
Anidrasi carbonica	Eritrociti	Anidride carbonica	7.5	1000000
Aspartato aminotransferasi	Cuore di maiale	Acido aspartico	0.9	
		Acido $\alpha$ -chetoglutarico	0.1	
		Acido ossalacetico	0.04	
		acido glutammico	4	
Butiril-CoA deidrogenasi	Fegato di bue	Butiril-CoA	0.014	
<b>Chimotripsina</b>	<b>Pancreas bovino</b>	<b>N-benziltirosinamide</b>	<b>2.5</b>	
		<b>N-formiltirosinamide</b>	<b>12</b>	
		<b>N-acetiltirosinamide</b>	<b>32</b>	
		<b>gliciltirosinamide</b>	<b>122</b>	
Creatina fosfochinasi	Muscolo di coniglio	Creatina	19	
<b>Esocinasi</b>	<b>Lievito</b>	<b>Glucosio</b>	<b>0.15</b>	
<b>Esocinasi</b>	<b>Cervello</b>	<b>Glucosio</b>	<b>0.008</b>	
Fosfatasi acida	Prostata	$\alpha$ -glicerofosfato	3	
Fosfogliceraldeide deidrogenasi	Muscolo di coniglio	Gliceraldeide-3-fosfato	0.05	
Glutamato deidrogenasi	Fegato bovino	Acido glutammico	0.12	
		Acido $\alpha$ -chetoglutarico	2	
		Ione ammonio	57	
		NAD+	0.025	
		NADH	0.018	
Xantina ossidasi	Latte	Xantina	0.03	
		Acetaldeide	1000	

Enzima	Sorgente	Substrato	Km (mM)	n° di turnover (1/s)
Acetil-CoA sintasi	Cuore di bue	Acetato	1.4	
ATP-asi	Muscolo di coniglio	ATP	0.014	
Alcool deidrogenasi	Fegato di cavallo	Etanolo	0.5	
Anidrasi carbonica	Eritrociti	Anidride carbonica	7.5	1000000
Aspartato aminotransferasi	Cuore di maiale	Acido aspartico	0.9	
		Acido $\alpha$ -chetoglutarico	0.1	
		Acido ossalacetico	0.04	
		acido glutammico	4	
Butiril-CoA deidrogenasi	Fegato di bue	Butiril-CoA	0.014	
Chimotripsina	Pancreas bovino	<b>N-benziltirosinamide</b>	<b>2.5</b>	
		<b>N-formiltirosinamide</b>	<b>12</b>	
		<b>N-acetiltirosinamide</b>	<b>32</b>	
		<b>gliciltirosinamide</b>	<b>122</b>	
Creatina fosfochinasi	Muscolo di coniglio	Creatina	19	
<b>Esochinasi</b>	<b>Lievito</b>	<b>Glucosio</b>	<b>0.15</b>	
<b>Esochinasi</b>	<b>Cervello</b>	<b>Glucosio</b>	<b>0.008</b>	
Fosfatasi acida	Prostata	$\alpha$ -glicerofosfato	3	
Fosfogliceraldeide deidrogenasi	Muscolo di coniglio	Gliceraldeide-3-fosfato	0.05	
Glutamato deidrogenasi	Fegato bovino	Acido glutammico	0.12	
		Acido $\alpha$ -chetoglutarico	2	
		Ione ammonio	57	
		NAD+	0.025	
		NADH	0.018	
Xantina ossidasi	Latte	Xantina	0.03	
		Acetaldeide	1000	

## Linearizzazione dell'equazione di Michaelis e Menten

## Lineweaver-Burk

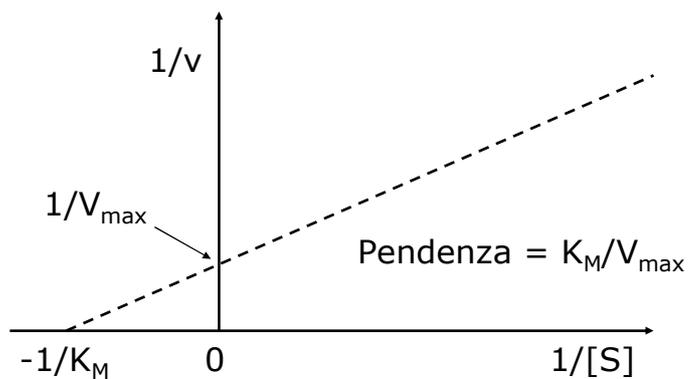
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

- Inversione

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

## Lineweaver-Burk

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



# Eadie-Hofstee

- Trasformazione

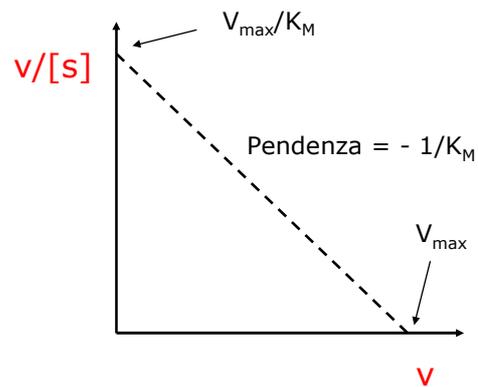
$$v (K_M + [S]) = V_{\max}[S]$$

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

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

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

$$\frac{v}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_M} - v \frac{1}{K_M}$$



# Eadie-Hofstee (oppure)

- Trasformazione

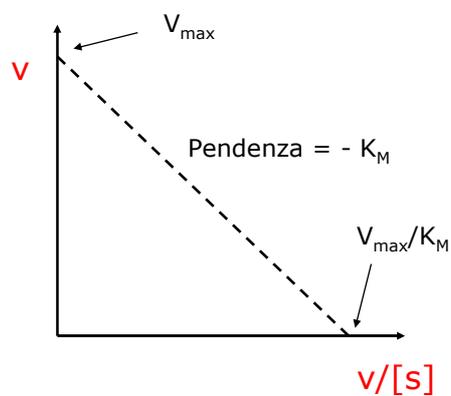
$$v (K_M + [S]) = V_{\max}[S]$$

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

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

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

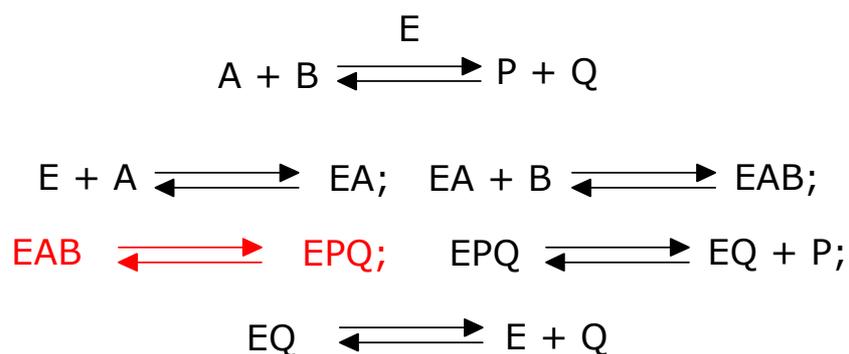
$$v = -K_M \frac{v}{[S]} + V_{\max}$$



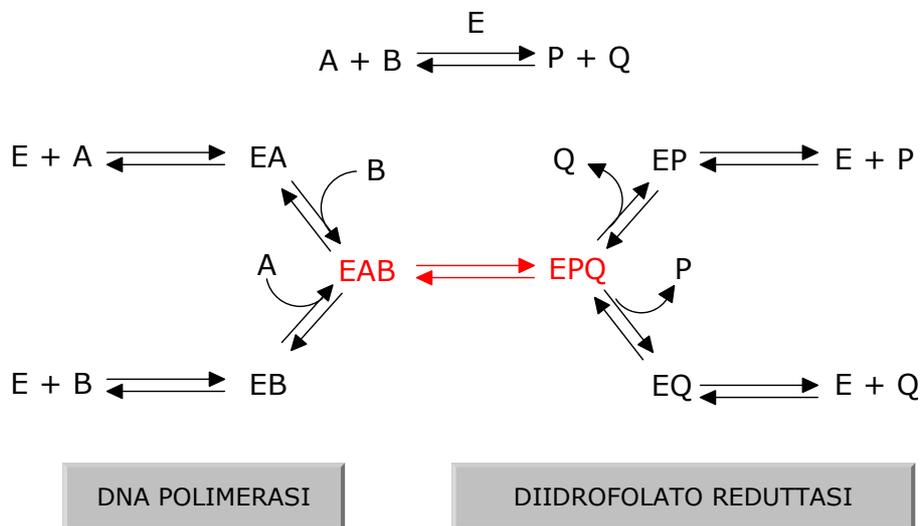
## Reazioni enzimatiche con più substrati

- Meccanismo sequenziale: i substrati si legano in modo sequenziale:
  - Prima uno poi l'altro in ordine preciso:
    - Meccanismo sequenziale ordinato
  - Senza un ordine preciso:
    - Meccanismo sequenziale casuale
- Meccanismo a ping-pong

## Meccanismo sequenziale ordinato



## Meccanismo sequenziale casuale

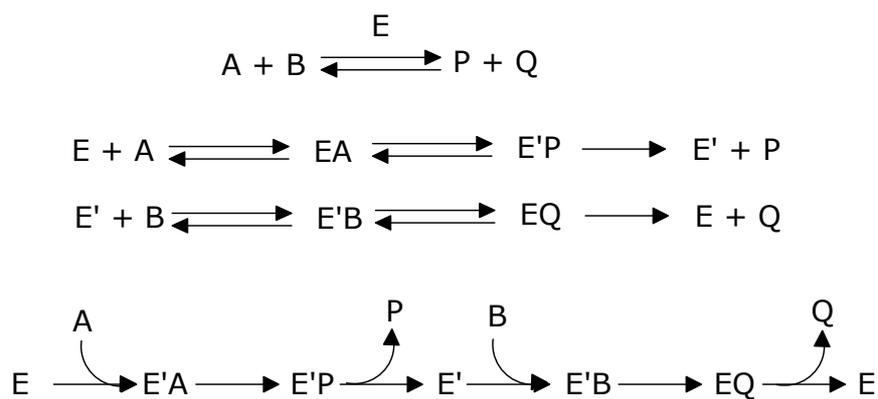


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 85 -

## Meccanismo a ping-pong

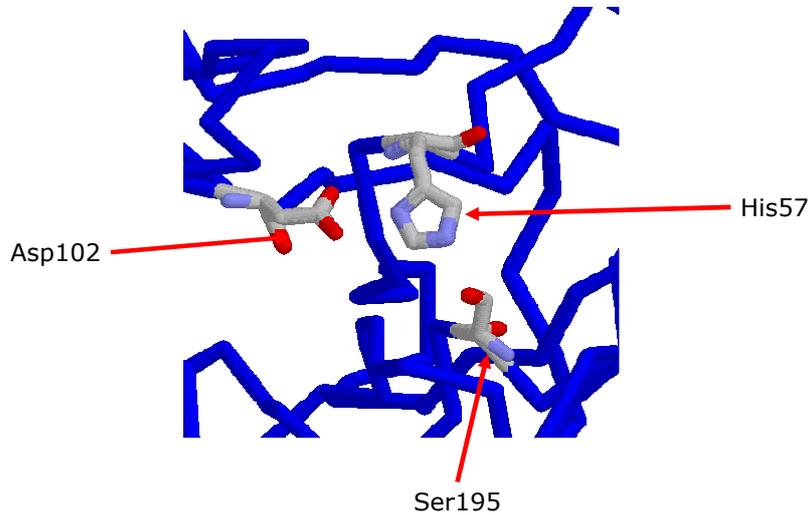


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 86 -

## Centro catalitico

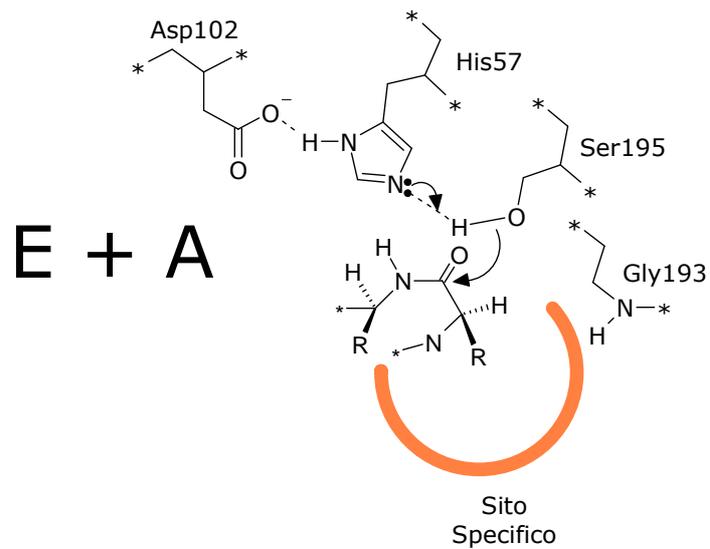


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 87 -

## Meccanismo delle proteasi a serina



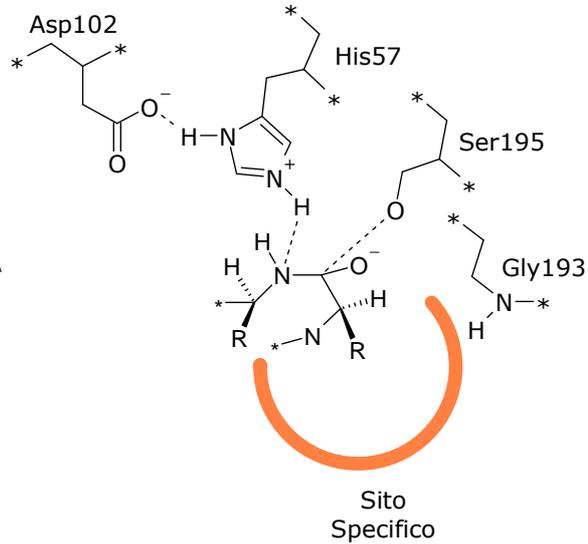
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 88 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

**E'A**



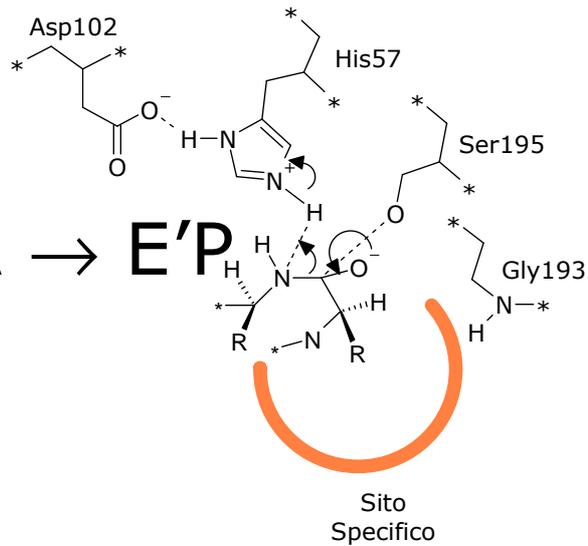
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 89 -

## Meccanismo delle proteasi a serina

**E'A → E'P**

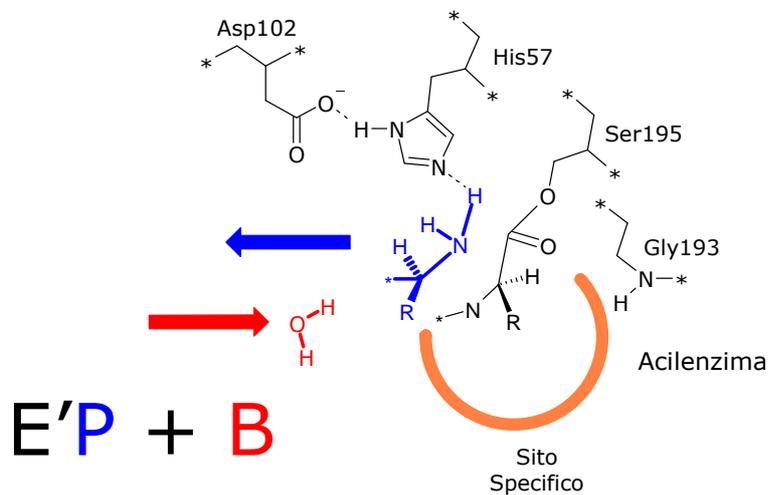


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 90 -

## Meccanismo delle proteasi a serina



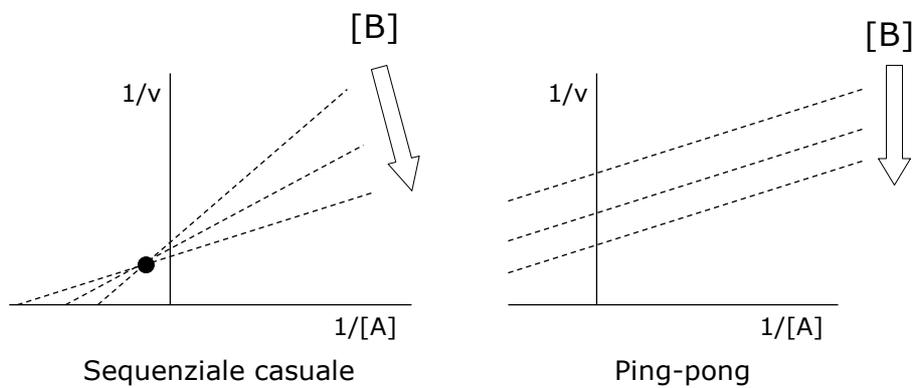
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 91 -

## Reazioni enzimatiche con più substrati

- Il trattamento è complesso, occorre fare lo studio cinetico tenendo fissa la concentrazione di uno dei substrati (B) variando l'altro (A), così, di grafici di Lineweaver-Burk si può avere una descrizione del meccanismo:



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 92 -

## Regolazione dell'attività enzimatica

- I fattori che regolano l'attività enzimatica sono:
  - Temperatura
    - Enzimi solubili o di membrana
  - pH
  - Effettori
    - Inibitori (inattivatori)
    - Attivatori
    - Effetti allosterici
  - Concentrazione di substrati e prodotti
    - Vie metaboliche
  - Repressione o induzione genica

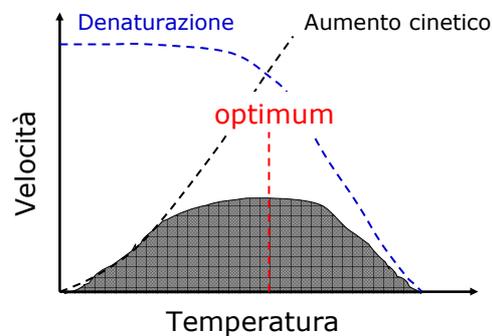
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 93 -

## Temperatura

- La velocità delle reazioni chimiche dipende dalla temperatura.
- La stabilità di una proteina dipende dalla temperatura.



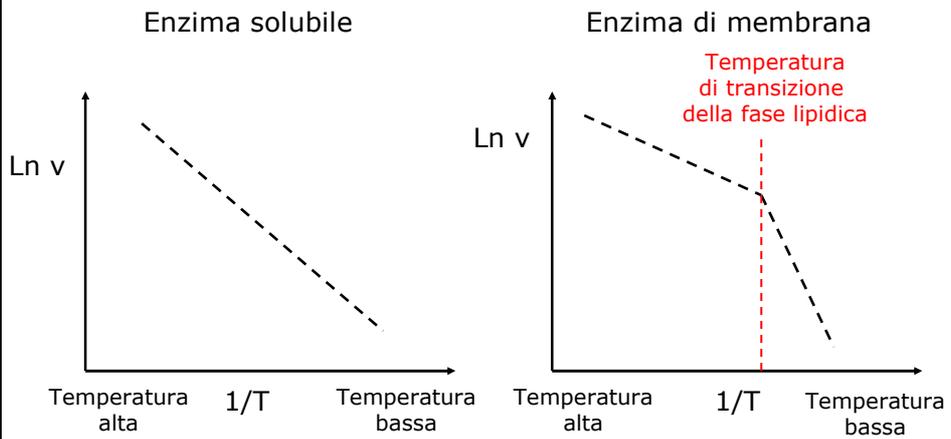
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 94 -

# Temperatura

- La temperatura influenza la fluidità di membrana



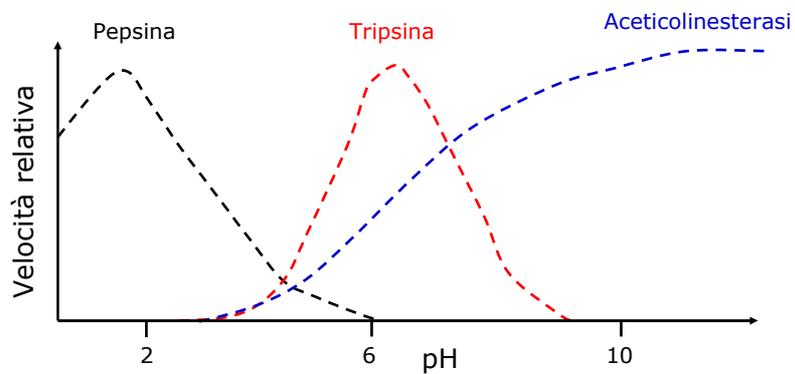
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 95 -

# pH

- La stabilità di una proteina dipende dal pH.
- Alcuni processi coinvolgono valori estremi di pH



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 96 -

## Effettori

- Attivatori
- Inibitori
  
- La differenza non è netta, la stessa molecola può funzionare in entrambi i modi a seconda delle condizioni
  - Carica
  - Concentrazione
  - Enzima legato ad altre molecole
  - ...

## Inibitori

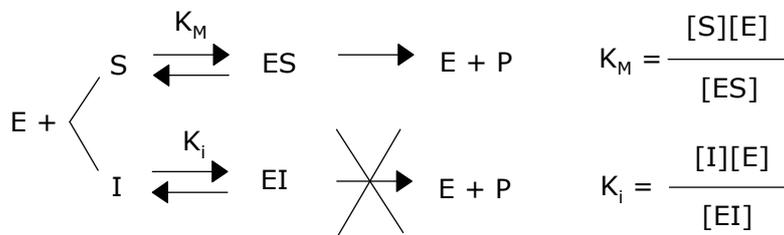
- Si definiscono inibitori quelle molecole che diminuiscono l'attività di un enzima, possono dare
- Inibizione reversibile
  - Modificano in modo reversibile (in genere attraverso un legame non covalente) l'enzima
- Inibizione irreversibile
  - Modificano in modo irreversibile l'enzima

## Inibitori reversibili

- A secondo delle loro caratteristiche si definiscono:
  - Inibitori competitivi
  - Inibitori non competitivi
  - Inibitori acompetitivi

## Inibitori competitivi

- Agiscono competendo con il substrato per lo stesso sito di legame, agiscono quindi sulla formazione del complesso ES.
- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S



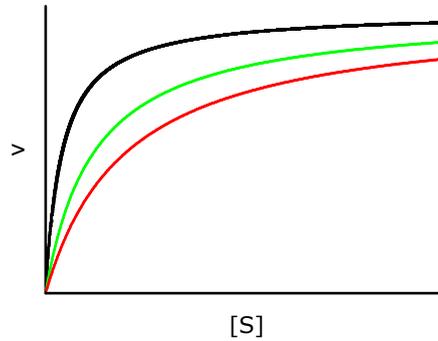
## Inibitori competitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

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



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

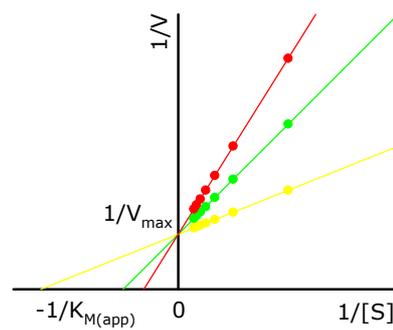
Cinetica enzimatica

- 101 -

## Inibitori competitivi

- Senza inibitore

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



- Con inibitore

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

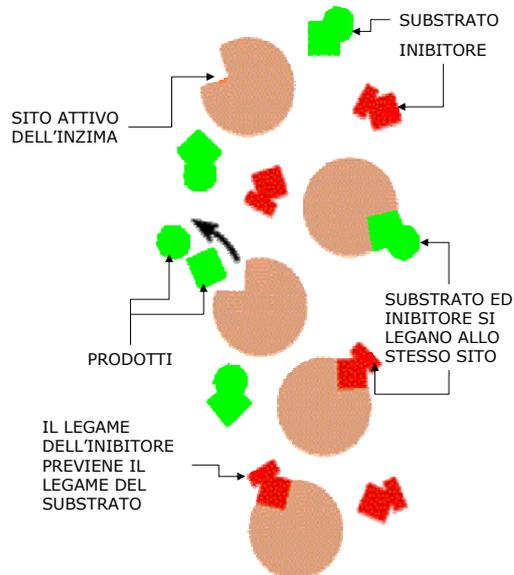
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 102 -

## Inibitori competitivi

- Sono molecole simili al substrato
- Occupano lo stesso sito di legame



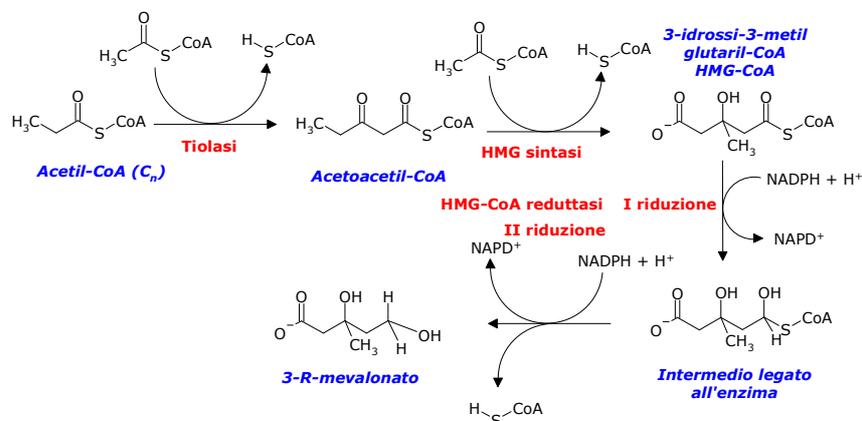
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 103 -

## Biosintesi del colesterolo

- Viene sintetizzato nelle cellule epatiche a partire da acetil-CoA per formare 3-R-mevalonato.



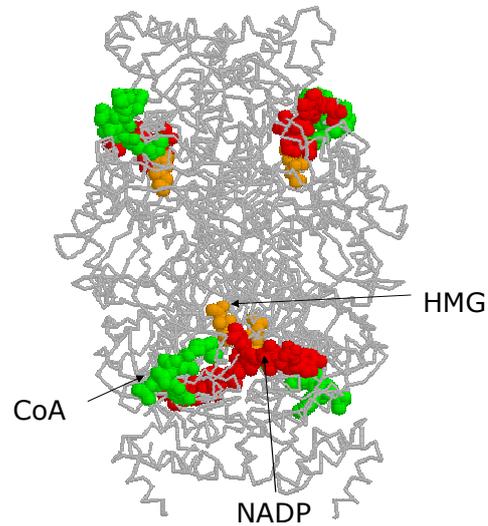
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 104 -

## HMG reduttasi EC 1.1.1.34

- È una glicoproteina di membrana del reticolo endoplasmatico,
- Il suo peso molecolare è di 97 kD,
- Il sito attivo è rivolto verso il citoplasma.
- È anch'essa regolata dal sistema protein chinasi.



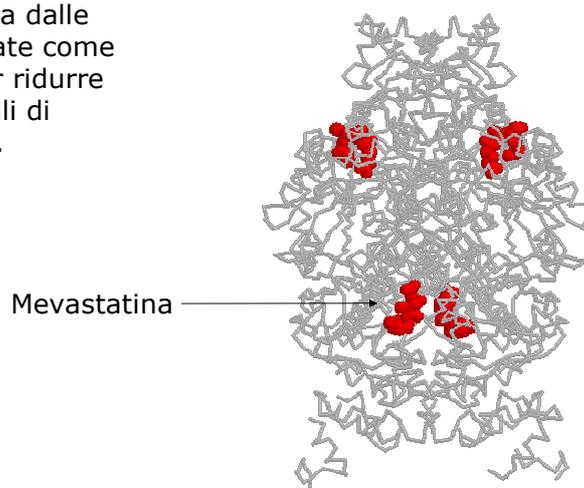
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 105 -

## HMG reduttasi EC 1.1.1.34

- Viene inibita dalle statine, usate come farmaci per ridurre elevati livelli di colesterolo.

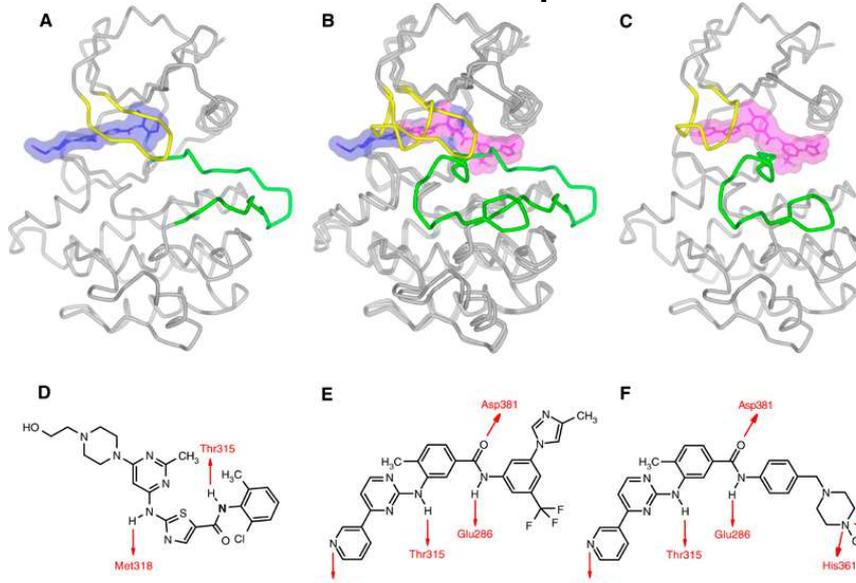


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 106 -

## Inibitori competitivi



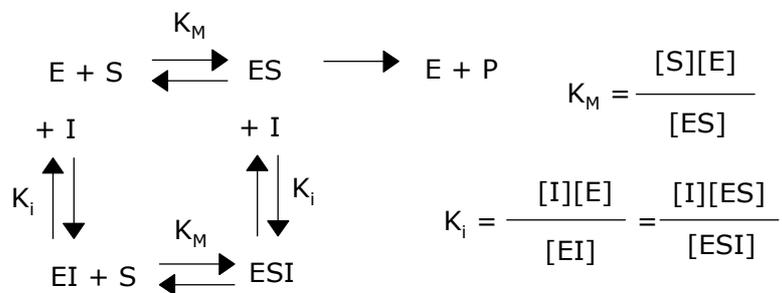
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 107 -

## Inibitori non competitivi

- Agiscono legandosi in un sito diverso dal sito di legame del substrato il quale può comunque legarsi.
- L'inibizione NON è rimossa aumentando la concentrazione di S



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 108 -

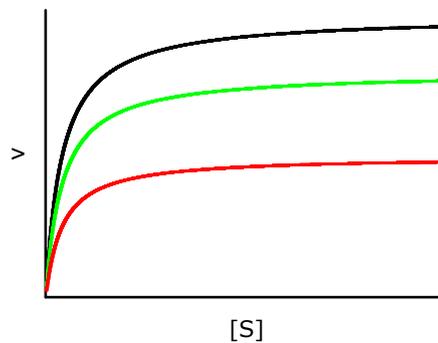
## Inibitori non competitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

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



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 109 -

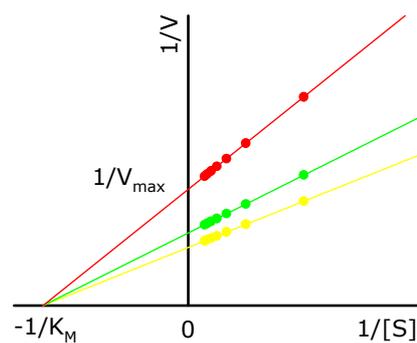
## Inibitori non competitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

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



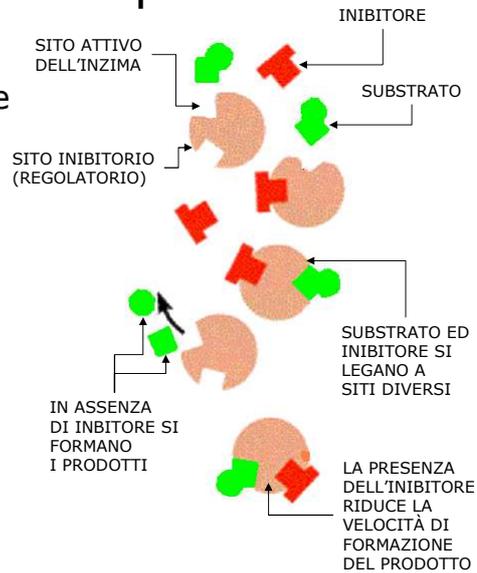
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 110 -

## Inibitori non competitivi

- Sono molecole diverse dal substrato, si legano ad un proprio sito
- Ioni metallici ( $\text{Cu}^{++}$ )
- Complessanti (EDTA)
- Modulatori



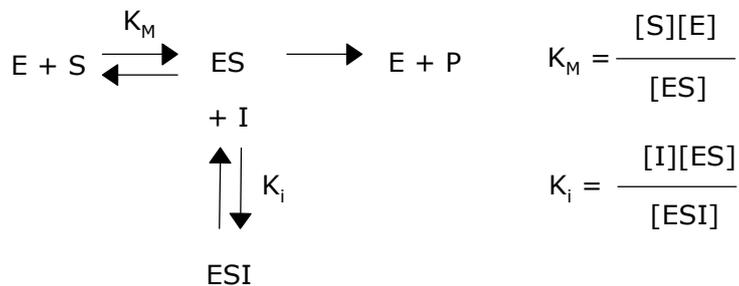
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 111 -

## Inibitori incompetitivi

- Agiscono legandosi e bloccando il complesso enzima-substrato.



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 112 -

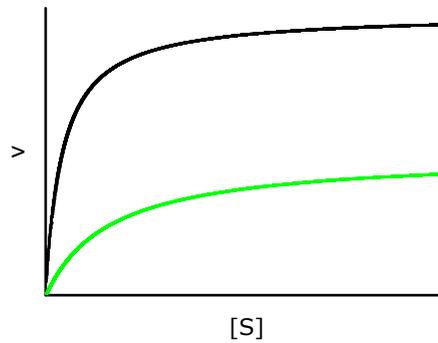
## Inibitori incompetitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

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



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

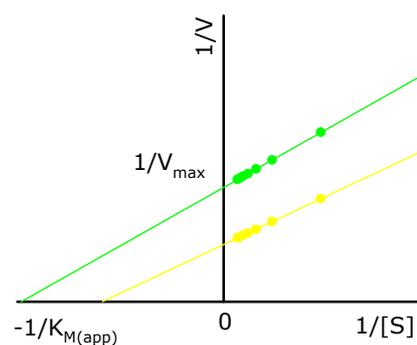
- 113 -

## Inibitori incompetitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore



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

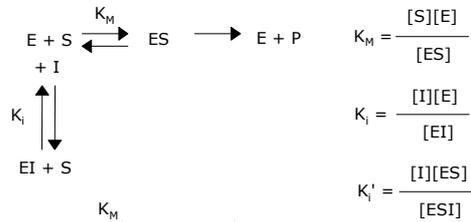
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

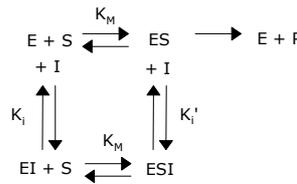
- 114 -

## Riassumendo...

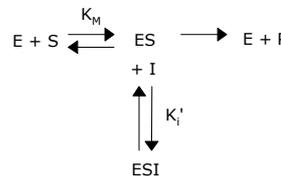
- Inibizione competitiva



- Inibizione non competitiva



- Inibizione acompetitiva



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 115 -

## ...riassumendo

$$a = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

$$a' = \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)$$

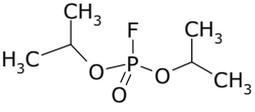
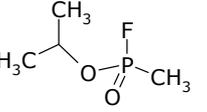
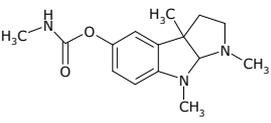
Tipo di inibizione	$V_{MAX}^{app}$	$K_M^{app}$
Nessuna	$V_{MAX}$	$K_M$
Competitiva	$V_{MAX}$	$aK_M$
Non competitiva	$V_{MAX}/a'$	$aK_M/a'$
Acompetitiva	$V_{MAX}/a'$	$K_M/a'$

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 116 -

## Inibitori irreversibili

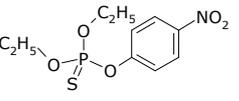
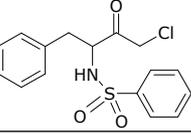
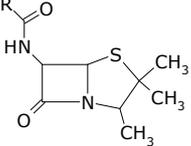
Inibitore	Formula	Origine	Meccanismo
Ione cianuro	CN <sup>-</sup>	Mandorle amare	Complessa gli ioni metallici nelle proteine
Diisopropil fluorofosfato (DFP)		Sintetico	Inibisce gli enzimi con serina nel sito attivo
Sarin		Sintetico	Come il DFP
Fisostigmina		Frutto del calabar	Come il DFP

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 117 -

## Inibitori irreversibili

Inibitore	Formula	Origine	Meccanismo
Parathion		Sintetico	Come il DFP (particolarmente attivo su acetilcolinesterasi di insetti)
N-tosil-L-fenilalanina clorometil chetone (TPCK)		Sintetico	Reagisce con l'His-57 della chimotripsina
Penicillina		<i>Penicillium Notatum</i>	Inibisce gli enzimi della sintesi della parete batterica

v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 118 -

## Attivatori

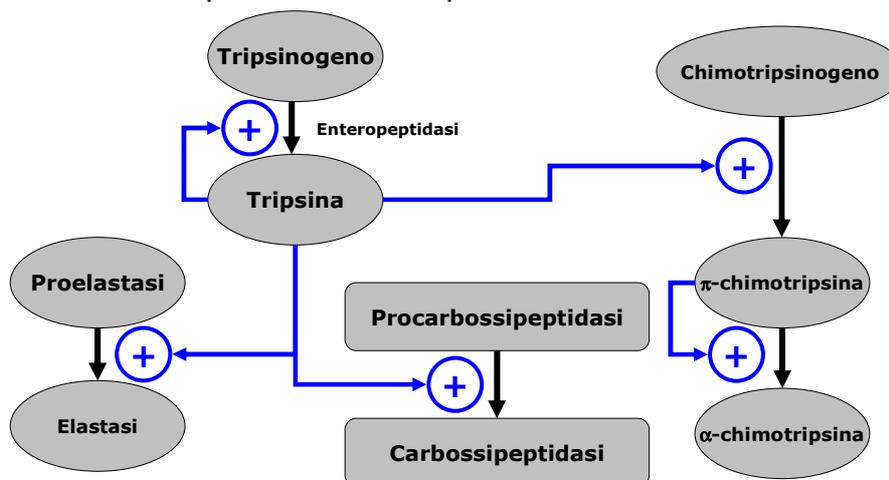
- Sono molecole che aumentano (o permettono) l'attività enzimatica
  - Protezione dell'enzima
    - Glutazione
    - Ioni metallici
  - Attivazione per azione sulle subunità



- Enzima inattivo + cAMP → Subunità catalitica + Subunità regolatrice
- Azione proteolitica su proenzimi

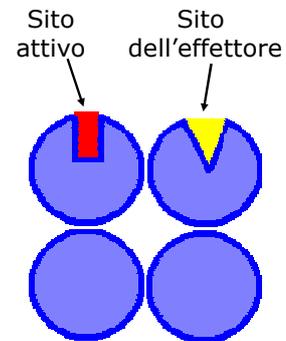
## Attivatori

- Azione proteolitica su proenzimi



## Effetti allosterici

- Un enzima allosterico è, in genere, un oligomero con subunità correlate.
- Gli effetti allosterici consistono nel legame di un effettore ad un sito diverso da quello del substrato con conseguente variazione delle proprietà cinetiche dell'enzima.
- L'effettore può essere lo stesso substrato (effettori omotropici) o diverso (effettori eterotropici).

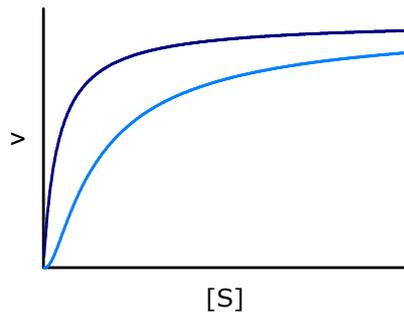


## Effetto allosterico

- Un enzima allosterico è un oligomero con subunità correlate la cui attività ( $K_m$ ) viene influenzata dal legame del substrato

## Effetti allosterici

- Il legame con l'effettore modifica (modula) le proprietà di legame del substrato.
- La velocità dipende da [S] come una sigmoide.

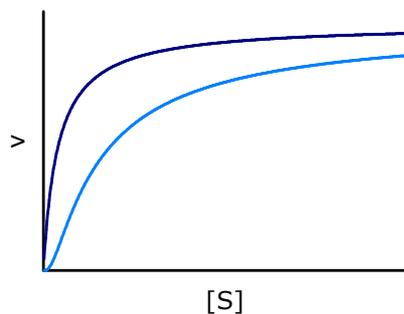


$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K + [S]^n}$$

n = indice di cooperatività (costante di Hill)  
n = 1 nessuna cooperatività  
n > 1 cooperatività positiva  
n < 1 cooperatività negativa

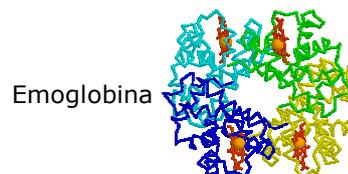
## Effetti allosterici

- Il legame con l'effettore modifica (modula) le proprietà di legame del substrato.
- La velocità dipende da [S] come una sigmoide.



$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K + [S]^n}$$

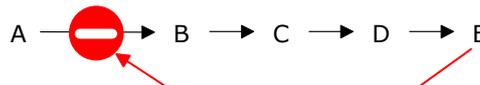
n = indice di cooperatività



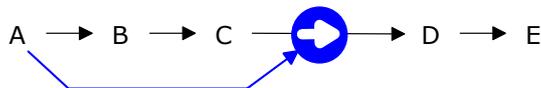
## Vie metaboliche

- Una via metabolica è data da un insieme di reazioni catalizzate da enzimi che si susseguono l'una all'altra.
- Le vie metaboliche sono regolate:

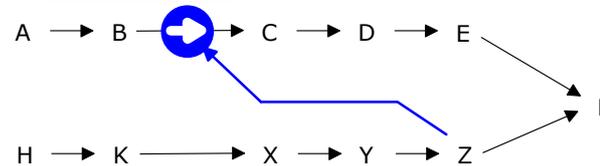
Inibizione da prodotto



Attivazione da substrato



Attivazione compensatoria



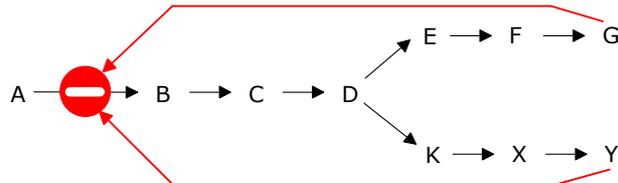
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

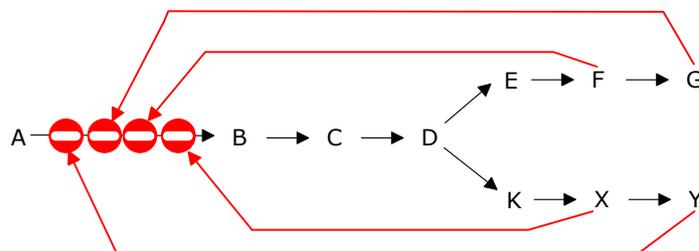
- 125 -

## Vie metaboliche ramificate

Inibizione multivalente



Inibizione cooperativa

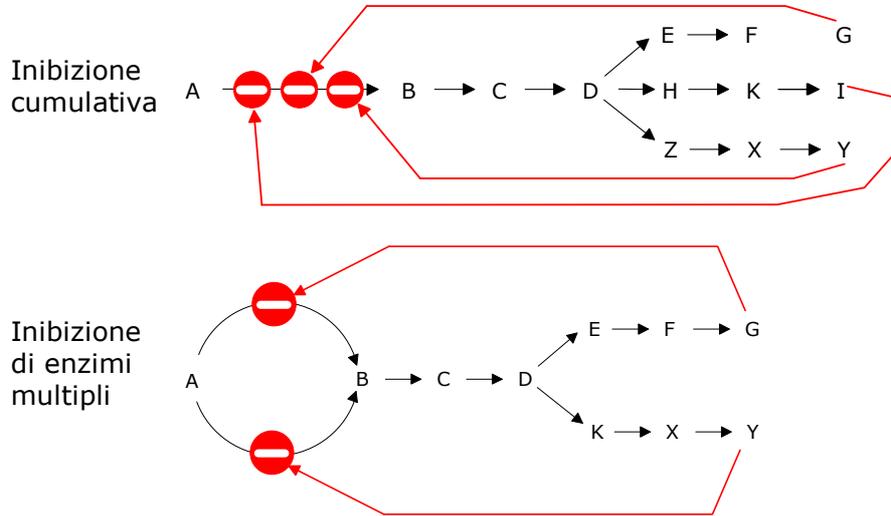


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 126 -

## Vie metaboliche ramificate

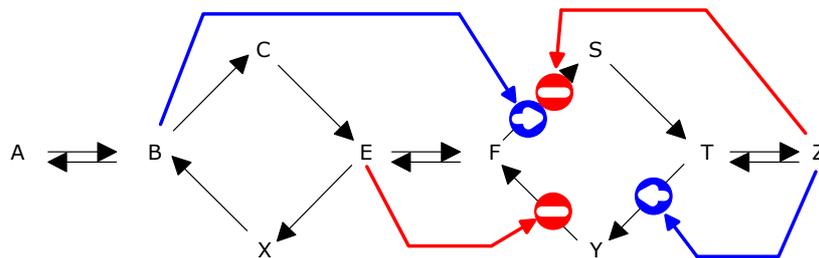


v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 127 -

## Catabolismo e anabolismo



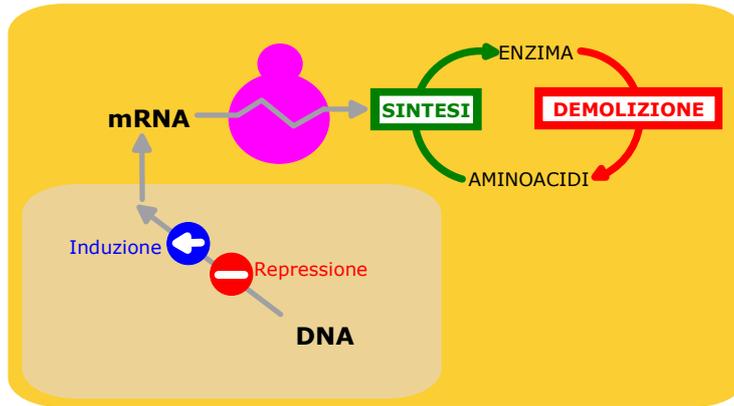
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 128 -

## Regolazione genica

- Un'altra via con la quale viene regolata l'attività di uno o più enzimi è attraverso l'induzione o la repressione genica della sintesi proteica di quella proteina con attività enzimatica.
- Anche per gli enzimi esiste una sorta di omeostasi.



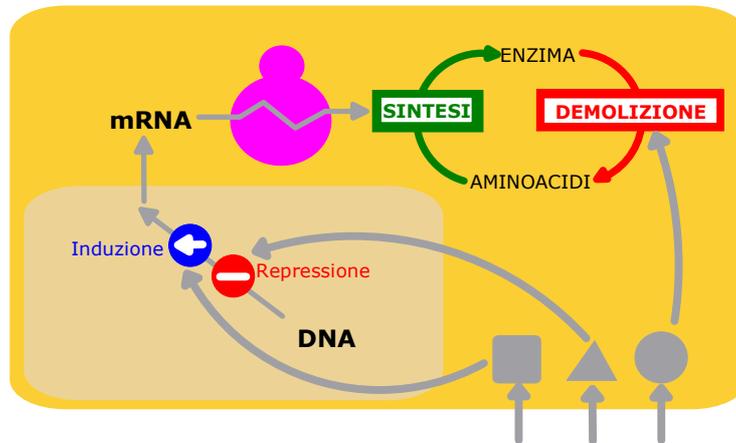
v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 129 -

## Regolazione genica

- Un'altra via con la quale viene regolata l'attività di uno o più enzimi è attraverso l'induzione o la repressione genica della sintesi proteica di quella proteina con attività enzimatica.
- Anche per gli enzimi esiste una sorta di omeostasi.



v.1.9.1 © gsartor 2001-2011

Cinetica enzimatica

- 130 -

## Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
  - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] – Zanichelli
  - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
  - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
  - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
  - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
  - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
  - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
  - Rensselaer Polytechnic Institute:  
<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:

<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>, oppure da <http://www.qsartor.org/>

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

**Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**  
Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - [giorgio.sartor@unibo.it](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)