

# *CINETICA ENZIMATICA*

*Per gli Studenti dei CdS in  
Scienze Ambientali  
e  
Chimica e Chimica dei Materiali  
dell'Università di Bologna*



---

## Sommario

<b>Sommario .....</b>	<b>I</b>
<b>1. Cinetica chimica.....</b>	<b>1</b>
1.1 Velocità di reazione.....	1
<b>2. Cinetica di reazioni enzimatiche ad un substrato.....</b>	<b>3</b>
2.1 Le equazioni di Michaelis-Menten e di Briggs-Haldane.....	4
2.2 Derivazione dell'equazione cinetica in condizioni di equilibrio rapido.....	6
2.3 Considerazioni generali sull'equazione cinetica.....	7
2.4 Significato fisico di $K_m$ .....	9
2.5 Significato pratico di $K_m$ .....	9
2.6 La costante catalitica ( $k_{cat}$ ).....	10
2.7 La costante di specificità.....	10
2.8 Derivazione dell'equazione cinetica della reazione con accumulo di intermedio.....	11
2.9 Considerazioni su $k_{cat}$ e $\frac{k_{cat}}{K_m}$ .....	13
2.10 Analisi grafica (linearizzazione dell'equazione di Michaelis-Menten).....	15
<b>3. Inibizione enzimatica.....</b>	<b>18</b>
3.1 Inibizione competitiva.....	18
3.2 Inibizione non competitiva.....	21
3.3 Inibizione acompetitiva.....	24
3.4 Cenni su altri tipi di inibizione.....	26
<b>4. Enzimi con siti catalitici multipli .....</b>	<b>27</b>
4.1 Enzimi con siti catalitici multipli non-cooperativi.....	27
4.2 La cinetica degli enzimi con siti catalitici multipli.....	27
4.3 Enzimi con siti catalitici multipli cooperativi: enzimi allosterici.....	32
4.4 Enzimi allosterici: modello ad interazione sequenziale (KNF).....	33
4.5 La sigmoidicità della curva di velocità.....	36
4.6 Effetto cooperativo sulla $V_{max}$ .....	38
4.7 Effetto cooperativo su $V_{max}$ e $K_s$ .....	39
4.8 Enzimi allosterici: modello a simmetria concertata (MWC).....	39
4.9 Derivazione dell'equazione di velocità per il modello MWC.....	40
4.10 Effetto della costante allosterica $L$ sulla cooperatività.....	42
4.11 Effetto del coefficiente di legame non-esclusivo ( $c$ ) sulla cooperatività.....	46
4.12 L'inibizione allosterica con legame esclusivo del substrato e dell'inibitore.....	46
4.13 L'attivazione allosterica con legame esclusivo del substrato e dell'attivatore.....	47
4.14 Derivazione dell'equazione cinetica per un dimero con legame esclusivo del substrato e dell'inibitore.....	47
4.15 Derivazione dell'equazione cinetica per un dimero con legame esclusivo del substrato e dell'attivatore.....	48
4.16 Enzimi allosterici con legame non-esclusivo del substrato e dell'effettore.....	50

---

---

<b>5. Considerazioni finali .....</b>	<b>52</b>
<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>53</b>
<i>Bibliografia citata.....</i>	53
<i>Per approfondire.....</i>	53
<b>Indice delle figure .....</b>	<b>54</b>

---

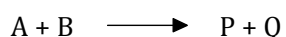
## 1. Cinetica chimica

Dalle caratteristiche termodinamiche dei reagenti e dei prodotti si può prevedere se una reazione chimica sia realizzabile e fino a qual punto, cioè se avvenga spontaneamente ( $\Delta G < 0$ ) e quale sia il punto di equilibrio ( $\Delta G = 0$ ). Da questi parametri però non si può ottenere alcuna informazione circa la velocità della reazione e del suo meccanismo.

Queste informazioni possono essere ottenute solo da misurazioni cinetiche il cui obiettivo è quello di determinare, appunto, con quale meccanismo (come) e con quale velocità (quando) le molecole reagiscono tra loro. La disciplina che studia la velocità e il meccanismo delle reazioni chimiche è la **cinetica chimica**.

### 1.1 Velocità di reazione.

Consideriamo una generica reazione



Questa equazione ci dice che A reagisce con B, dando origine a P e Q.

In che modo ci accorgiamo che la reazione “parte e procede”?

Bisogna dare per scontato che siamo in grado di determinare in qualche modo le quantità di tutti i partecipanti A, B, C e D, in qualsiasi momento: non è spesso molto facile ma qui, per semplicità, lo dobbiamo immaginare sempre possibile. Il fenomeno che all'esterno ci avvisa che le cose cambiano all'interno della soluzione è che le concentrazioni di A e B diminuiscono mentre quelle di P e Q aumentano.

Esprimiamo perciò la velocità di un processo chimico in un certo periodo di tempo come il rapporto tra la variazione di concentrazione di un reagente o di un prodotto ed il valore di quell'intervallo di tempo:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{d[Q]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} \quad 1.1$$

dove il segno - (meno) indica la variazione negativa della concentrazione dei reagenti. D'altra parte, la velocità di reazione risulta correlata alla concentrazione dei reagenti attraverso l'**equazione di velocità**:

$$v = -\frac{dA}{dt} = k[A]^m[B]^n \quad 1.2$$

dove **k** è la **costante di velocità** ed indica la misura della velocità di reazione quando i reagenti sono in concentrazione unitaria, mentre **m** ed **n** sono coefficienti che possono essere pari a zero, numeri interi o frazionari, il cui valore può essere determinato solo sperimentalmente. Ogni coefficiente determina l'ordine di reazione, rispetto al proprio componente, mentre la somma **m+n** determina l'**ordine globale della reazione**, da non confondersi con la **molecolarità** che rappresenta il numero delle molecole effettivamente coinvolte nella reazione e che urtandosi in modo efficace si trasformano nei prodotti finali.

Lo studio empirico delle reazioni permette di definirne i meccanismi e di stabilirne la legge cinetica; in pratica permette di determinare gli esponenti m ed n. Nella tabella seguente sono rappresentati alcuni dei casi più comuni.

$m$	$n$	Ordine globale della reazione	Legge cinetica
0	0	0	$v = k$
1	0	1	$v = k[A]$
0	1	1	$v = k[B]$
2	0	2	$v = k[A]^2$
1	1	2	$v = k[A][B]$

Per calcolare l'ordine globale della reazione si procede nel seguente modo: in una reazione in cui A e B siano gli unici partecipanti, si determina dapprima la velocità di reazione facendo variare A e tenendo fissa la concentrazione di B, e successivamente la velocità di reazione tenendo fisso A e variando la concentrazione di B. Se il risultato sperimentale è quello rappresentato in *figura 1* dove la velocità di reazione è direttamente proporzionale a  $[A]^2$  e a  $[B]$ , allora la reazione è di *secondo ordine* rispetto ad A e di *primo ordine* rispetto a B.

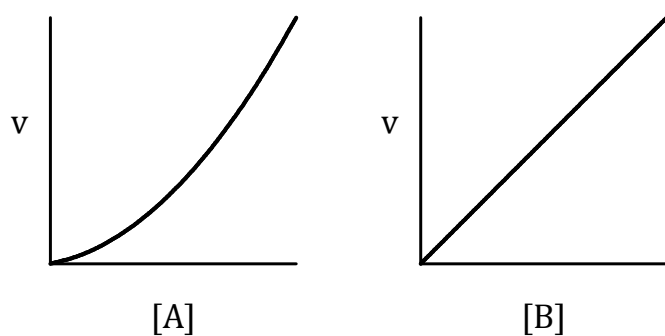


Figura 1: Dipendenza della velocità di reazione da  $[A]$  e  $[B]$

La reazione è globalmente di terzo ordine e l'equazione di velocità totale è:

$$v = k[A]^2[B]$$

Le applicazioni della cinetica chimica sono numerose, ma quelle che presentano un interesse per il biochimico sono quelle che riguardano le reazioni catalizzate da enzimi ed i meccanismi di reazione.

## 2. Cinetica di reazioni enzimatiche ad un substrato.

La prima equazione generale di velocità per una reazione enzimatica fu derivata da Victor Henri<sup>1</sup> nel 1903 dopo alcune osservazioni pubblicate in precedenza dallo stesso Henri<sup>2</sup>. L'equazione di Henri era in grado di spiegare l'osservazione che la velocità iniziale della reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima, ma cresce in modo non lineare al crescere della concentrazione del substrato fino ad un valore limite

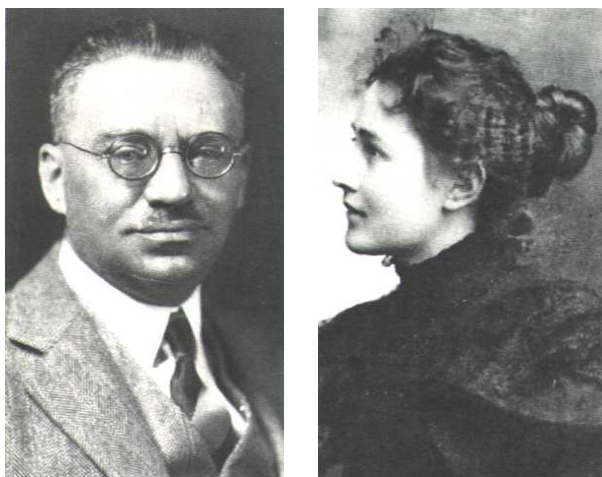
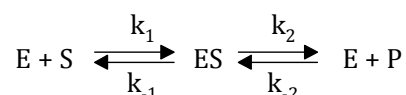


Figura 2: Leonor Michaelis (1875-1949) e Maud Menten (1879-1960).

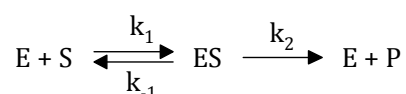
massimo.

Gli studi di Henri furono ripresi ed ampliati da Michaelis e Menten<sup>3</sup> nel 1913 che definirono l'equazione generale di velocità di reazioni enzimatiche ad un substrato che da loro prese il nome. Il loro approccio cinetico si basa su due assunzioni. La prima, nota come del "quasi equilibrio" (o dell'"equilibrio rapido"), definisce il complesso enzima-substrato in equilibrio con l'enzima libero ed il substrato e che questa situazione di equilibrio non sia disturbata dalla formazione del prodotto.



In altre parole la velocità di formazione del prodotto a partire da ES è molto piccola rispetto alla velocità con cui ES si scinde a dare E+S ( $k_2 \ll k_{-1}$ ).

La seconda assunzione è quella nota come assunzione della **velocità iniziale**: la velocità della reazione viene valutata per un periodo di tempo durante il quale la reazione inversa è fisicamente trascurabile in quanto poco è il prodotto formatosi: la velocità iniziale che può così essere determinata sarà la massima velocità ottenibile. In condizioni di velocità iniziale la reazione è, di fatto, irreversibile ( $k_{-2}=0$ ). Quindi la sequenza degli equilibri viene riscritta come:



Una assunzione meno restrittiva fu introdotta da Briggs e Haldane<sup>4</sup> nel 1925 (nota come assunzione dello "**stato stazionario**"), secondo la quale il complesso ES si mantiene in uno stato stazionario durante tutto il periodo di tempo in cui si possono misurare delle velocità iniziali: [ES] rimane costante (ovvero  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ ) perché la velocità con cui il complesso ES si forma a partire da E+S è uguale alla somma delle velocità con cui si scinde a dare E+P ed E+S.

<sup>1</sup> Henri, V. (1903) "Lois Générales de l'Action des Diastases". Paris Hermann.

<sup>2</sup> Henri, V. (1902) "Théorie générale de l'action de quelques diastases". Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences **135**, 916-919.

<sup>3</sup> Michaelis, L., Menten, M.L. (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung". Biochemistry Zeitung **49**, 333-369.

<sup>4</sup> Briggs, G.E., Haldane, J.B. (1925) "A Note on the Kinetics of Enzyme Action". Biochemical Journal **19**, 338-339.

Entrambe le assunzioni verranno utilizzate per derivare le corrispondenti equazioni.

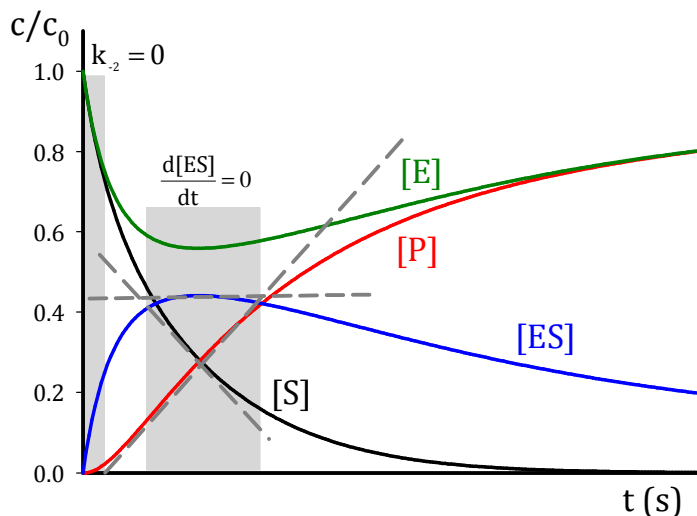


Figura 3: Dipendenza delle concentrazioni (normalizzate) di S, P, E ed ES dal tempo.

### 2.1 Le equazioni di Michaelis-Menten e di Briggs-Haldane.

Genericamente, per ricavare un'equazione di velocità, si segue la seguente procedura standard:

**A)** Scrivere le reazioni che dai substrati portano ai prodotti ed assegnare ad ogni passaggio una costante di velocità.

Per reazioni ad un solo substrato, si ha:



**B)** Scrivere l'equazione di conservazione di massa per l'enzima:

$$[E_{\text{tot}}] = [ES] + [E] \quad 2.3$$

ove [E] rappresenta la concentrazione dell'enzima libero.

**C)** Scrivere l'equazione della velocità di formazione di ES, tenendo conto che ES si forma da E+S ( $k_1[E][S]$ ) e si decompone in E+S ( $k_{-1}[ES]$ ) ed E+P ( $k_2[ES]$ ).

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad 2.4$$

**D)** Definire le assunzioni che semplificano la risoluzione dell'equazione 2.4.

Le seguenti assunzioni possono essere fatte:

- a)** che durante tutto il periodo in cui si misurano delle velocità iniziali, il complesso ES abbia una concentrazione costante:



$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Questa condizione si realizza quando la velocità di formazione di ES a partire da E+S è uguale alla somma delle velocità di decomposizione in E+S e E+P. Questa è l'assunzione dello stato stazionario proposta da Briggs-Haldane.

Se si assume che  $k_2 \ll k_{-1}$  cioè, che la velocità di trasformazione di ES in E+P sia trascurabile rispetto alla sua velocità di decomposizione (in E+S) la concentrazione di ES è costante quando la sua velocità di formazione (da E+S) eguaglia la sola velocità di decomposizione in E+S. Questa è l'assunzione dell'equilibrio rapido di Michaelis e Menten, che, come facilmente si può notare, non è che un caso particolare della assunzione dello stato stazionario.

- b)** che la concentrazione del substrato sia molto più grande della concentrazione dell'enzima ( $[S] \gg [E]$ ) in modo tale che la formazione del complesso ES non alteri significativamente la concentrazione di S. Questa assunzione ci permette di rappresentare S con la sua concentrazione iniziale, piuttosto che con la sua concentrazione attuale, uguale in ogni istante a  $[S] - [ES] = [S]_{eq}$ .

**E)** Scrivere l'equazione di velocità di formazione del prodotto come funzione della concentrazione di ES:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad 2.5$$

e dividere questa equazione per l'equazione 2.3 di conservazione di massa per l'enzima:

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_2[ES]}{[ES] + [E]} \quad 2.6$$

Questa equazione è già un'equazione di velocità; il suo valore pratico è però nullo in quanto vi appaiono termini di non facile determinazione ( $[ES]$  e  $E$ ).

Facendo però uso delle assunzioni definite precedentemente, è trasformarla in una equazione cinetica semplice e di facile applicazione.

Affrontiamo dapprima l'approccio dello stato stazionario. Nel caso dell'assunzione dello stato stazionario, essendo  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ , l'equazione 2.4 diviene:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

da cui :

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

e sostituendo questo valore di  $[ES]$  nella equazione 2.6 si ottiene:

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_2 \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S]}{\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] + [E]}$$

e dividendo numeratore e denominatore per [E]:

$$\frac{v}{[E_{\text{tot}}]} = \frac{k_2 \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S]}{\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S] + 1}$$

da cui portando [E<sub>tot</sub>] al secondo membro dell'equazione:

$$v = \frac{k_2 [E_{\text{tot}}] \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S]}{\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S] + 1} \quad 2.7$$

L'assunzione di cui al punto **b**) ([S] >> [E<sub>tot</sub>]) garantisce che tutto l'enzima sia presente in forma di complesso con il substrato, quindi:

$$k_2 [E_{\text{tot}}] = k_2 [ES]$$

ma  $k_2 [ES]$  non è altro che la massima velocità ottenibile per una data quantità di enzima in condizioni di saturazione del substrato. Potremo quindi scrivere:

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

L'equazione di velocità 2.7 può essere quindi riscritta come:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S]}{\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S] + 1}$$

e dividendo numeratore e denominatore per  $\frac{k_1}{k_{-1} + k_2}$ :

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}}$$

Il rapporto delle costanti cinetiche  $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  è anch'esso una costante che chiamiamo **costante di Michaelis (K<sub>m</sub>)**:

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

l'equazione può essere scritta nella forma semplificata:

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{[S] + K_m} \quad 2.8$$

Abbiamo così ottenuto un'equazione semplificata nella quale la **velocità iniziale** di una reazione enzimatica ad un substrato è messa in relazione, tramite due costanti ( $V_{\text{max}}$  e  $K_m$ ), con la sola concentrazione del substrato, che tra l'altro per la assunzione del punto **c**) è assimilabile sempre alla sua concentrazione iniziale.

## 2.2 Derivazione dell'equazione cinetica in condizioni di equilibrio rapido.

Vediamo ora come la medesima equazione può essere ricavata partendo dalla assunzione dell'equilibrio rapido.

In questo caso per  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$

l'equazione

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

diviene:

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

da cui:

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

e sostituendo il valore di  $[ES]$ , così ottenuto, nell'equazione 2.5:  $\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_2[ES]}{[ES]+[E]}$  si ottiene:

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_2 \frac{k_1}{k_{-1}} [E][S]}{\frac{k_1}{k_{-1}} [E][S] + [E]}$$

da cui, prima dividendo numeratore e denominatore per  $[E]$ , poi per  $k_1/k_{-1}$ , e portando  $[E_{tot}]$  al secondo membro dell'equazione, si ottiene:

$$v = \frac{k_2[E_{tot}][S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_1}} = \frac{V_{max}[S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_1}}$$

Essendo il rapporto delle costanti cinetiche anch'esso una costante che chiamiamo, ancora, **costante di Michaelis**:

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = K_s$$

si ottiene l'equazione:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s} \quad 2.9$$

Partendo da due assunzione diverse si ottiene un'unica equazione cinetica in due forme che differiscono nel differente significato fisico attribuibile alle costanti  $K_m$  e  $K_s$ .

Entrambe le costanti  $K_m$  e  $K_s$ , sono espresse come concentrazioni infatti:

$$(K_s) \text{ oppure } K_m = \frac{V_{max}[S]}{v} - [S]; \text{ moli} \cdot \ell^{-1} = \frac{\text{moli} \cdot \ell^{-1} \cdot \text{s}^{-1}}{\text{moli} \cdot \ell^{-1} \cdot \text{s}^{-1}} - \text{moli} \cdot \ell^{-1}$$

### 2.3 Considerazioni generali sull'equazione cinetica.

Questa equazione rappresenta un'iperbole rettangolare del tipo  $y = \frac{ax}{b+x}$  dove  $a$  e  $-b$  rappresentano gli asintoti della curva. Nel nostro caso gli asintoti sono quindi  $V_{max}$  e  $-K_s$  ( $-K_m$ ) (Figura 4).

Per concentrazioni di substrato  $[S] \ll K_m$  (concentrazione di substrato trascurabile rispetto a  $K_m$ , regione A della curva) l'equazione di Michaelis-Menten diviene l'equazione della retta:

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

L'equazione è quindi di primo ordine nei confronti del substrato.

Per concentrazioni di substrato  $[S] \gg K_m$  (regione B della curva) l'equazione di Michaelis-Menten si semplifica nella relazione:

$$v = V_{\max}$$

la velocità è costante ed indipendente da  $[S]$ . L'equazione è quindi di ordine zero nei confronti del substrato.

L'equazione di Michaelis-Menten dimostra inoltre che  $v$  è proporzionale alla concentrazione dell'enzima impiegato per ogni concentrazione di substrato fissata:

$$v = \frac{[S]}{K_m + [S]} k_2 [E_{\text{tot}}]$$

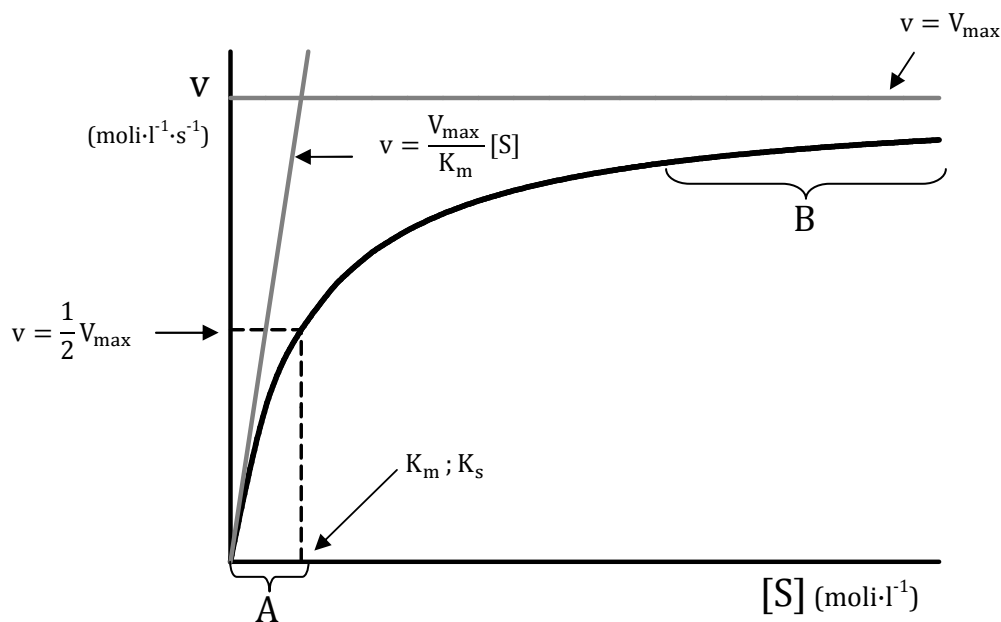


Figura 4: Dipendenza della velocità di reazione da  $[S]$  per una reazione enzimatica ad un solo substrato.

Quando poi  $[S] = K_m$  si ricava:

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

$K_m$  ( $K_s$ ) è quindi quella concentrazione di substrato alla quale la velocità della reazione è uguale a  $\frac{V_{\max}}{2}$ .

L'equazione di Michaelis-Menten dimostra, inoltre, che la velocità della reazione è proporzionale alla concentrazione dell'enzima impiegato per ogni concentrazione di substrato ( $[S]$ ,  $K_m$  e  $k_2$  costanti):

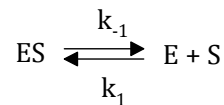
$$v = \left( \frac{[S]}{K_m + [S]} k_2 \right) [E_{\text{tot}}]$$

L'equazione cinetica è quindi di primo ordine nei confronti dell'enzima totale come osservato da Henry<sup>1</sup>.

#### 2.4 Significato fisico di $K_m$ .

Abbiamo visto che l'equazione cinetica di una reazione enzimatica ad un solo substrato è la stessa sia che venga derivata con l'assunzione dell'equilibrio rapido (Michaelis-Menten) o con l'assunzione dello stato stazionario (Briggs-Haldane). La costante, che abbiamo chiamato costante di Michaelis ( $K_m$ ) non ha però lo stesso significato fisico nei due casi.

Nel primo caso  $K_m$  è la costante di dissociazione del complesso ES in E+S, e viene chiamata  $K_s$ :



da cui all'equilibrio:

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

e

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

In questo caso  $K_s$  è dunque inversamente proporzionale all'affinità dell'enzima per il suo substrato: più piccola è la  $K_s$ , più alta è l'affinità.

Nel secondo caso  $K_m$  è derivata dalle tre costanti cinetiche:

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

non è più una costante di equilibrio e quindi non è correlabile all'affinità dell'enzima per il suo substrato.

Il significato fisico della  $K_m$  non può essere dunque affermato se non si conosce il valore delle singole costanti cinetiche. Solo sapendo che  $k_2 \ll k_{-1}$  si potrà dire che la  $K_m$  è una misura dell'affinità dell'enzima per il suo substrato. Un elevato valore di  $K_m$  non vuol dire che l'enzima abbia una bassa affinità per il suo substrato:

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

$K_s$  (ovvero  $k_{-1}/k_1$ ) può infatti avere un piccolo valore.

#### 2.5 Significato pratico di $K_m$ .

Il valore della  $K_m$  è importante per varie ragioni:

- La  $K_m$  rappresenta approssimativamente il valore della concentrazione intracellulare del substrato. Infatti per  $[S_{\text{intracell}}] \ll K_m$ , l'enzima sarebbe estremamente sensibile a variazioni della concentrazione del substrato, ma gran parte del suo potenziale catalitico sarebbe inutilizzato in quanto in queste condizioni  $v \ll V_{\text{max}}$ . Non a-

vrebbe senso dal punto di vista fisiologico neppure che  $[S_{\text{intracell}}]$  fosse molto maggiore di  $K_m$ , in quanto l'enzima, pur lavorando con una velocità vicino alla  $V_{\text{max}}$ , perderebbe la possibilità di essere regolato da variazioni della concentrazione del substrato.

- b) La  $K_m$  è una costante specifica per ogni coppia enzima-substrato. Quindi, il suo valore numerico, fornisce un mezzo per comparare enzimi provenienti da organismi diversi, da differenti tessuti dello stesso organismo o dallo stesso tessuto a differenti stadi di sviluppo: se due enzimi hanno lo stesso valore di  $K_m$  ci sono buone probabilità che siano lo stesso enzima; al contrario se due enzimi hanno valori differenti di  $K_m$  per il medesimo substrato, pur catalizzando la medesima reazione, è probabile che siano due *isoenzimi*.
- c) Spesso ligandi differenti dal substrato (modulatori) possono modificare il valore della  $K_m$ . Se la  $K_m$  determinata *in vitro* sembra essere troppo alta, allora è pensabile che *in vivo* sia presente un attivatore che ne abbassi il valore ad un livello "fisiologico". Lo studio dell'effetto di diversi composti sulla  $K_m$  permette di identificare eventuali inibitori/attivatori.
- d) Se si conosce il valore della  $K_m$  di un enzima, allora è possibile misurarne la velocità di reazione in condizioni di  $[S] \gg K_m$  e sarà possibile quindi determinare direttamente  $V_{\text{max}}$  che è una misura indiretta di  $[E_{\text{tot}}]$ .

## 2.6 La costante catalitica ( $k_{\text{cat}}$ ).

Per enzimi che seguano un semplice meccanismo di equilibrio rapido o di stato stazionario la costante  $k_2$  (costante cinetica di formazione del prodotto a partire da ES) coincide con la **costante catalitica**  $k_{\text{cat}}$ . Per reazioni più complicate la  $k_{\text{cat}}$  è una funzione di tutte le costanti di velocità di primo ordine nel corso della reazione diretta e non può essere assegnata ad alcun processo in particolare (vedere più avanti la *Derivazione dell'equazione cinetica della reazione con accumulo di intermedio*).

In assenza di conoscenze sul meccanismo cinetico l'equazione cinetica per enzimi ad un substrato viene così rappresentata:

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E_{\text{tot}}][S]}{K_m + [S]} \quad 2.10$$

La costante catalitica è detta anche **numero di turnover** dell'enzima perché rappresenta il numero massimo di molecole di substrato convertite in prodotto per sito attivo e per unità di tempo. In altri termini è il numero di volte che l'enzima re-inizia il ciclo per unità di tempo.

Quando l'enzima è saturato dal substrato si ha infatti:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_{\text{tot}}]}; \frac{\text{mol} \cdot \ell^{-1} \cdot \text{s}^{-1}}{\text{mol} \cdot \ell^{-1}} = \text{s}^{-1}$$

## 2.7 La costante di specificità.

Per  $[S] \ll K_m$  l'equazione 2.34 assume la forma:

$$v = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E_{\text{tot}}][S]$$

Il rapporto  $\frac{k_{cat}}{K_m}$  è una costante di velocità apparente di secondo ordine per la formazione di E+P da E+S quando il processo dipende dall'incontro di E con S ( $[S] \ll K_m$ ). Per reazioni che seguano un meccanismo di stato stazionario (cfr. Briggs-Haldane):

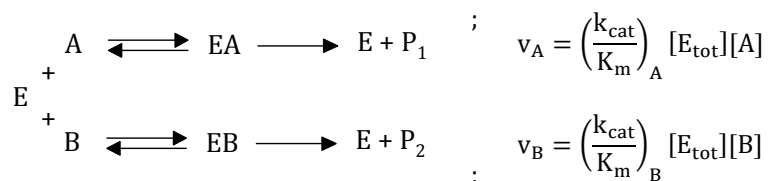
$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2}$$

in caso di  $k_2 \gg k_{-1}$  la relazione precedente diviene:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = k_1$$

$k_{cat}/K_m$  in queste condizioni è uguale alla costante cinetica per l'associazione dell'enzima con il suo substrato: in questo caso la velocità di reazione è vicina alla velocità dell'incontro controllato dalla diffusione del substrato sull'enzima. Si comportano in questo modo enzimi particolarmente efficienti ed evoluti quali l'acetilcolinesterasi (EC 3.1.1.7), l'anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1), la catalasi (EC 1.11.1.6), la fumarasi (EC 4.2.1.2) e la triosofosfato isomerasi (EC 5.3.1.1).

Vediamo ora perché il rapporto  $k_{cat}/K_m$  è detto anche **costante di specificità**. Supponiamo che due substrati differenti A e B siano in competizione per uno stesso enzima



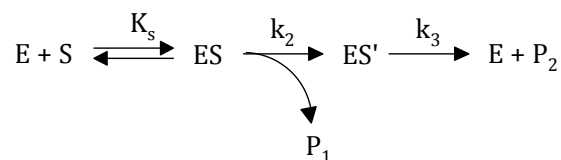
quando la concentrazione di A è uguale a quella di B, il rapporto tra le velocità di trasformazione nel prodotto P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub> è uguale al rapporto dei rispettivi valori di  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ :

$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{\left( \frac{k_{cat}}{K_m} \right)_A}{\left( \frac{k_{cat}}{K_m} \right)_B}$$

Per questo motivo  $\frac{k_{cat}}{K_m}$  è detto anche costante di specificità: l'enzima ha infatti maggior specificità per il substrato per il quale ha il valore più elevato di  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ .

## 2.8 Derivazione dell'equazione cinetica della reazione con accumulo di intermedio.

Alcuni enzimi, come la chimotripsina (EC 3.4.21.1), procedono con un meccanismo che può essere così rappresentato:



Il primo complesso si scinde liberando un primo prodotto e trasformandosi in un secondo complesso che tende ad accumularsi in quanto la costante cinetica di trasformazione del complesso ES' in E e P<sub>2</sub> risulta più piccola della costante cinetica di trasformazione del complesso ES in ES' ( $k_3 \ll k_2$ ).

Ricaviamo l'equazione cinetica assumendo una condizione di stato stazionario utilizzando la procedura già descritta, avendo presente che la reazione da considerare è quella che porta alla formazione di P<sub>2</sub>.

La velocità di formazione del prodotto diventa:

$$v = k_3[ES'] \quad 2.11$$

e l'equazione di conservazione di massa per l'enzima:

$$[E_{tot}] = [E] + [ES] + [ES'] \quad 2.12$$

Calcoliamo la [ES] in condizioni di stato stazionario:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES']$$

da cui

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] \quad 2.13$$

Calcoliamo la [ES'] in condizioni di stato stazionario:

$$k_2[ES] = k_3[ES']$$

da cui risolvendo per [ES'] e sostituendo a [ES] l'espressione corrispondente 2.12:

$$[ES'] = \frac{k_2}{k_3} [ES] = \frac{k_2}{k_3} \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] \quad 2.14$$

Dividiamo ora l'equazione 2.11 per l'equazione 2.10

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_3[ES']}{[E] + [ES] + [ES']} \quad 2.15$$

sostituiamo a [ES] e [ES'] le corrispondenti espressioni calcolate nelle equazioni 2.13 e 2.14

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_3 \frac{k_2}{k_3} \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S]}{[E] + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] + \frac{k_2}{k_3} \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S]}$$

semplifichiamo:



$$\frac{v}{[E_{\text{tot}}]} = \frac{\frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} [S]}{1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S] + \frac{k_2}{k_3} \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S]}$$

dividiamo per  $\frac{k_1}{k_{-1} + k_2}$

$$\frac{v}{[E_{\text{tot}}]} = \frac{k_2 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] + \frac{k_2}{k_3} [S]} = \frac{k_2 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] \frac{k_3 + k_2}{k_3}}$$

e dividiamo per  $\frac{k_3 + k_2}{k_3}$  per ottenere l'equazione finale:

$$\frac{v}{[E_{\text{tot}}]} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_3 + k_2} [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \frac{k_3}{k_3 + k_2} + [S]}$$

Ponendo

$$\frac{k_2 k_3}{k_3 + k_2} = k_{\text{cat}}$$

e

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \frac{k_3}{k_3 + k_2} = K_m$$

l'equazione può essere scritta nella forma che ormai conosciamo:  $v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{[S] + K_m}$

Si noti che se  $k_3 \gg k_2$  l'intermedio ES' non si accumulerebbe più (ES verrebbe istantaneamente convertito in ES') e l'equazione di velocità sarebbe quella di un enzima ad un substrato in condizioni di stato stazionario con  $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$  e  $k_3 = k_{\text{cat}}$ .

## 2.9 Considerazioni su $k_{\text{cat}}$ e $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ .

Una delle caratteristiche degli enzimi è quella di legarsi al substrato. Ma il substrato cambia durante lo svolgimento della reazione e prima di trasformarsi in prodotto passa attraverso lo stato di transizione. Poniamoci la seguente domanda: è cataliticamente vantaggioso per un enzima formare un complesso ES stabile (legame forte con il substrato) oppure un legame forte con il substrato allo stato di transizione (ES\* stabile)? Immaginiamo di modificare un enzima sostituendo un residuo aminoacidico del sito attivo e di valutarne le conseguenze in primo luogo in condizioni di saturazione di substrato quando  $v = k_{\text{cat}}[E_{\text{tot}}]$ ; in conseguenza di ciò si potrà avere:

- (A) situazione dell'enzima prima della modificazione introdotta nel sito attivo,
- (B) formazione di un legame più stabile sia con il substrato che con il substrato allo stato di transizione,
- (C) formazione di un legame più stabile solo con il substrato,
- (D) formazione di un legame più stabile solo con il substrato allo stato di transizione.

Nella *figura 5* sono rappresentate le energie di attivazione nei casi ipotizzati.

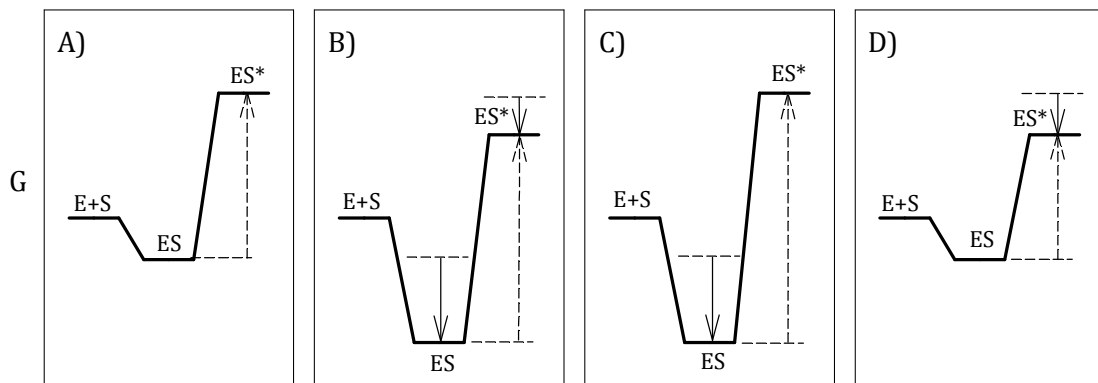


Figura 5: Variazione dell'energia libera in funzione dell'affinità tra enzima e substrato.

Solo nel caso D, quando l'ulteriore legame si realizza a livello dello stato di transizione si ha una diminuzione dell'energia di attivazione e quindi un aumento della velocità di reazione ( $k_{cat}$  aumenta). Consideriamo ora lo stesso esperimento a basse concentrazioni di substrato, quando l'energia G di ES è maggiore di quella di E+S e la velocità della reazione è espressa da:

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} [E_{tot}][S]$$

Come si può vedere in figura 6 sia la situazione in B che quella in D portano ad un abbassamento dell'energia di attivazione, ma è chiaro (C) che l'origine del vantaggio catalitico deriva dalla stabilizzazione dello stato di transizione. Aumenta la velocità di reazione perché aumenta  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ .

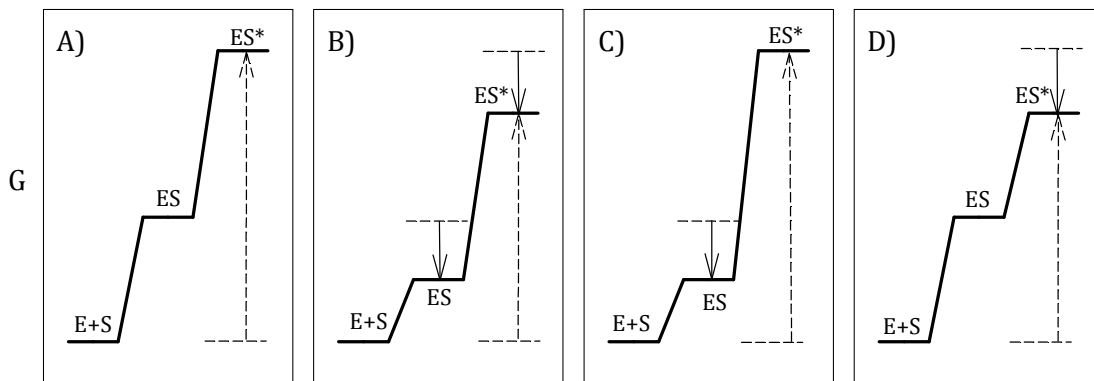


Figura 6: Variazione dell'energia libera in funzione dell'affinità tra enzima e substrato a bassa concentrazione di substrato.

Si deduce, quindi, che per un enzima evolutosi per catalizzare al meglio una reazione, sarà vantaggioso legare più fortemente lo stato di transizione del substrato del substrato stesso.

Questo avviene con conseguente aumento di  $k_{cat}$  e  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ ; ma se  $k_{cat}$  e  $\frac{k_{cat}}{K_m}$  aumentano contemporaneamente se ne deduce che anche  $K_m$  dovrà aumentare. Che sia vantaggioso per un enzima legare debolmente il suo substrato

( $K_m$  grande) è chiaro anche dalla *figura 5 C*, dove si vede che un aumento di affinità tra enzima e substrato (diminuzione della  $K_m$ ) porta ad un aumento dell'energia di attivazione.

Sebbene il legame forte dell'enzima con il substrato allo stato di transizione massimizzi  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ , questo non è l'unico criterio per la massimizzazione della velocità della reazione: mantenendo  $\frac{k_{cat}}{K_m}$  costante, la velocità di reazione di un enzima aumenta se aumenta  $K_m$ . Questo viene definito come **principio di massimizzazione di  $K_m$  a  $\frac{k_{cat}}{K_m}$  costante**.

Vediamo ora un esempio numerico: confrontiamo due enzimi alla stessa concentrazione di substrato  $[S]=10^{-3}M$ , aventi la stessa concentrazione  $[E_{tot}]=10^{-6}M$ , aventi entrambi  $\frac{k_{cat}}{K_m}=10^6M^{-1}s^{-1}$ .

Il primo enzima ha una  $K_m=10^{-3}M$  e una  $k_{cat}=10^3s^{-1}$ . Il secondo enzima ha una  $K_m=10^{-2}mol \cdot l^{-1}$  e una  $k_{cat}=10^4s^{-1}$ .

Risolviamo l'equazione di Michaelis-Menten per il primo enzima,

$$v = \frac{k_{cat}[E_{tot}][S]}{K_m + [S]} = \frac{10^3 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-3}}{10^{-3} + 10^{-3}} = \frac{10^{-6}}{2 \cdot 10^{-3}} = 5 \cdot 10^{-4} (mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1})$$

e per il secondo enzima.

$$v = \frac{k_{cat}[E_{tot}][S]}{K_m + [S]} = \frac{10^4 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-3}}{10^{-2} + 10^{-3}} = \frac{10^{-5}}{0.011} = 9.09 \cdot 10^{-4} (mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1})$$

L'enzima con  $K_m$  più elevata (minore affinità) è quello che catalizza la reazione in modo più efficiente: con una maggior velocità.

### 2.10 Analisi grafica (linearizzazione dell'equazione di Michaelis-Menten).

L'equazione di Michaelis-Menten descrive come abbiamo già detto un'iperbole equilatera, in cui  $V_{max}$  e  $-K_m$  sono gli asintoti. Il valore di  $K_m$  può essere determinato graficamente semplicemente ricordando che quando la velocità  $v$  della reazione è uguale a metà della  $V_{max}$  allora  $K_m=[S]$ .

Non essendo però possibile determinare sperimentalmente il valore di  $V_{max}$  in maniera accurata ( $V_{max}$  è il valore di  $v$  quando  $[S]=\infty$ ), allora anche  $K_m$  sarà determinato in maniera imprecisa. L'equazione di Michaelis-Menten può però essere manipolata per ottenere l'equazione di una retta in cui  $V_{max}$  e  $K_m$  siano delle intercette e non più degli asintoti.

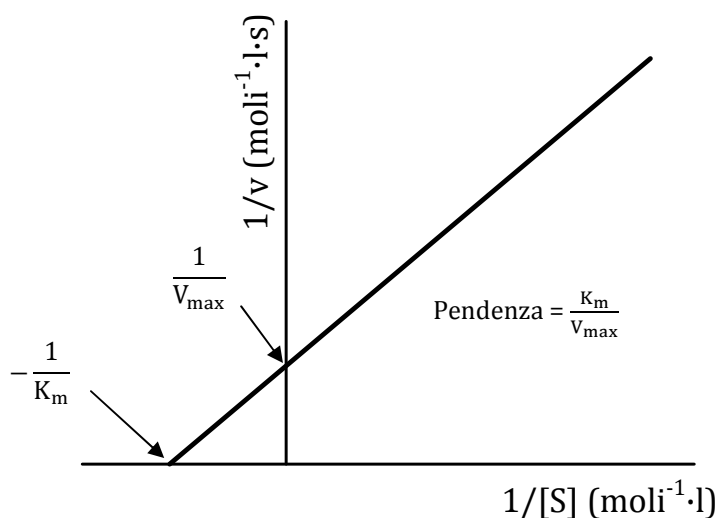
Uno dei metodi più usati è quello di **Lineweaver-Burk**<sup>5</sup> che usa il reciproco dell'equazione di Michaelis-Menten:

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

dove le variabili sono  $\frac{1}{v}$  e  $\frac{1}{[S]}$ ;  $\frac{1}{V_{max}}$  è l'intercetta sull'asse  $y$  e  $-\frac{1}{K_m}$  è l'intercetta sull'asse  $x$  (*Figura 7*).

<sup>5</sup> Lineweaver, H., Burk, D. (1934). "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". Journal of the American Chemical Society. **56** (3), 658-666.

Figura 7: Diagramma di Lineweaver-Burk.



Attenzione va posta nella valutazione degli errori associati alle determinazioni di basse velocità di reazione che rendono i valori di  $1/v$  proni a maggiore indeterminazione<sup>6</sup>.

Anche per questa ragione è utile un'altra trasformazione lineare dell'equazione di Michaelis-Menten, la trasformazione di **Eadie<sup>7</sup>-Hofstee<sup>8</sup>** nella quale il valore di  $v$  compare esclusivamente al numeratore:

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

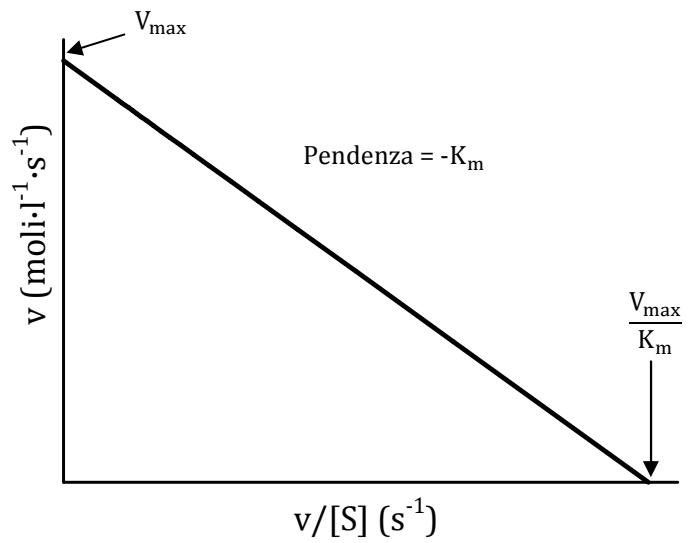
Mettendo in grafico i valori di  $v$  contro  $v/[S]$  il risultato è una retta con pendenza uguale  $-K_m$  e  $\frac{V_{\max}}{K_m}$  l'intercetta sull'asse  $y$  (Figura 8).

<sup>6</sup> Atkins, G.L., Nimmo, I.A. (1975). "A Comparison of Seven Methods for Fitting the Michaelis-Menten Equation". *Biochemical Journal* **149**, 775-777.

<sup>7</sup> Eadie, G.S. (1942). "The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine". *Journal of Biological Chemistry*. **146**, 85-93.

<sup>8</sup> Hofstee, B.H.J. (1959). "Non-Inverted Versus Inverted Plots in Enzyme Kinetics". *Nature*. **184** (4695), 1296-1298.

Figura 8: Diagramma di Eadie-Hofstee.



Le trasformazioni di Lineweaver-Burk e di Eadie-Hofstee rendono più semplice e più accurata la determinazione di  $V_{\max}$  e  $K_m$  e permettono di scoprire se l'enzima segue una cinetica classica (stato stazionario ed equilibrio rapido) oppure no.

L'uso di trasformazioni lineari dell'equazione di Michaelis-Menten sono inoltre particolarmente utile nello studio degli inibitori reversibili.

### 3. Inibizione enzimatica.

Ogni sostanza che riduca la velocità di una reazione enzimatica è da considerarsi un inibitore. La formazione *reversibile* di un legame non covalente con una molecola diversa dal substrato porta alla formazione di complessi anomali che non fanno parte, di norma, del processo catalitico.

Nella trattazione cinetica della inibizione enzimatica si applicano le assunzioni di Michaelis-Menten anche all'inibitore, cosicché anche i complessi enzima-inibitore vengono considerati in equilibrio con le forme che li generano. Ci sono almeno tre tipi principali di inibizione.

Inibizione competitiva;

Inibizione non competitiva;

Inibizione acompetitiva (o incompetitiva).

#### 3.1 Inibizione competitiva.

**Un inibitore competitivo è una sostanza che si lega all'enzima libero, impedendo così la formazione del complesso enzima-substrato.**

Esso può essere un analogo non metabolizzabile del substrato, un substrato alternativo per l'enzima o un prodotto di reazione.

L'inibizione della succinato deidrogenasi (EC 1.3.5.1), che catalizza la

conversione del succinato in fumarato, da parte del malonato è un classico esempio

di inibizione competitiva da analogo non metabolizzabile (Figura 9): il malonato è in grado di legarsi nel sito attivo dell'enzima, ma non può essere ossidato avendo un solo gruppo CH<sub>2</sub>.

Altro esempio di inibitore competitivo è la sulfonilamide che inibisce l'utilizzazione enzimatica dell'acido *p*-aminobenzoico, precursore dell'acido folico (Figura 10).

L'inibizione della reazione catalizzata dall'esochinasi (EC 2.7.1.1) da parte del fruttosio o del mannoso è un esempio di inibizione competitiva da substrati alternativi. Tutti e tre gli esosi sono substrati per l'enzima, di conseguenza

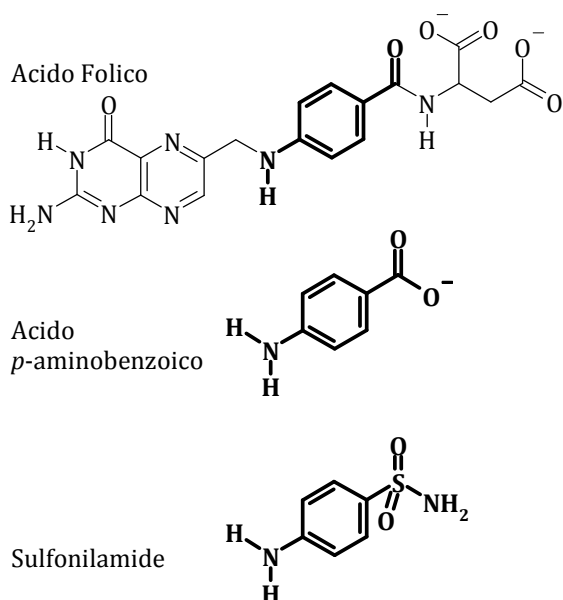


Figura 10: Sulfonilamide: inibitore dell'utilizzo dell'acido *p*-aminobenzoico come precursore nella biosintesi dell'acido folico.

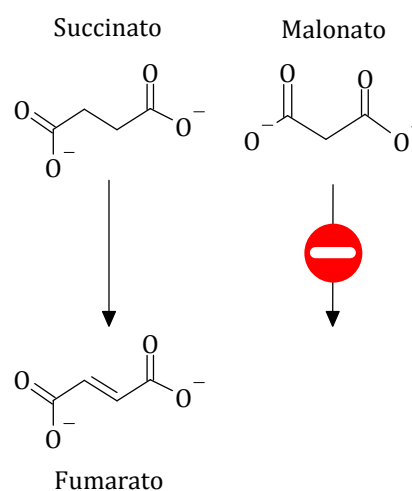
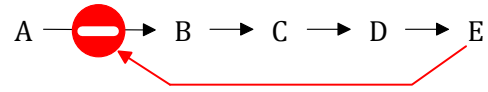


Figura 9: Substrato e inibitore della succinato deidrogenasi (EC 1.3.5.1)

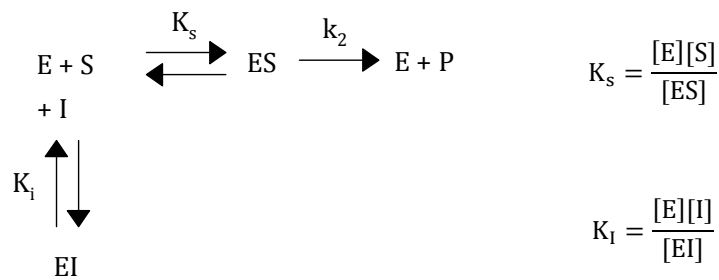
l'utilizzazione di uno di essi è inibita dalla presenza degli altri due.

Non è però necessario che l'inibitore competitivo debba legarsi esclusivamente al sito attivo. Ad esempio, nel caso di un prodotto terminale di una sequenza metabolica che inibisca competitivamente un enzima catalizzante una delle prime reazioni della sequenza (**inibizione a feedback**), lo potrà fare legandosi in un sito diverso da quello del substrato.



La combinazione dell'inibitore con l'enzima provoca però un cambiamento conformazionale che altera il sito del substrato, impedendo quindi al substrato di legarsi. Analogamente il substrato legandosi all'enzima libero, impedisce all'inibitore di legarsi alterandone il sito (competizione indiretta).

Gli equilibri che descrivono la competizione e la reciproca esclusione tra S ed I sono i seguenti:



dove  $k_2$  è la costante di velocità per la dissociazione del complesso in E+P.

L'equazione cinetica che correla  $v$ ,  $V_{max}$ ,  $[S]$ ,  $[I]$ ,  $K_s$  e  $K_i$  è facilmente ricavabile tenendo presente che

$$v = k_2[ES]$$

e

$$[E_{tot}] = [E] + [ES] + [EI]$$

da cui

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES] + [EI]}$$

Sostituendo ad  $[ES]$  e  $[EI]$  i loro rispettivi valori all'equilibrio  $[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$  e  $[EI] = \frac{[E][I]}{K_i}$  si ha:

$$v = \frac{k_2 E_{tot} \frac{[E][S]}{K_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][I]}{K_i}}$$

dividendo per  $[E]$  e moltiplicando per  $K_s$  sia il numeratore che il denominatore:

$$v = \frac{k_2 E_{tot} [S]}{K_s + [S] + \frac{K_s [I]}{K_i}}$$

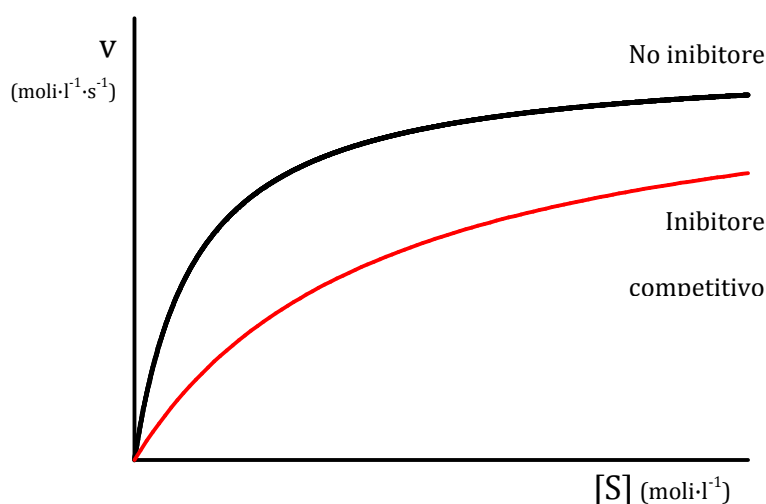
da cui si ottiene la relazione conclusiva:

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

Questa equazione di velocità differisce da quella classica di Michaelis-Menten in quanto la costante di Michaelis è moltiplicata per il fattore  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$ . La velocità massima della reazione non è influenzata dalla presenza dell'inibitore, in quanto ad elevate concentrazioni di substrato tutto l'enzima viene complessato in forma di ES. La  $K_m$  (o meglio la  $K_m$  apparente) in presenza dell'inibitore appare aumentata (*Figura 11*).

Questo non vuol dire che l'enzima in presenza dell'inibitore abbia una minore affinità per il suo substrato. Il complesso EI ha affinità zero per il substrato, mentre l'affinità dell'enzima libero E rimane inalterata; il valore aumentato di  $K_m$  (che ci dice che più substrato è necessario per raggiungere la stessa  $\frac{V_{\max}}{2}$  che si avrebbe in assenza dell'inibitore) risulta dal relativo contributo di due forme enzimatiche, una ad affinità zero (EI) e una ad affinità piena (E). È chiaro che la  $K_m$  apparente ( $K_m'$ ) aumenterà all'aumentare della concentrazione di [I].

*Figura 11: Inibizione competitiva.*



L'effetto di un inibitore competitivo sulla cinetica di una reazione enzimatica è facilmente descrivibile utilizzando la trasformazione lineare di Lineweaver-Burk (*Figura 12*).

In presenza dell'inibitore è richiesto più substrato per ottenere la stessa  $\frac{V_{\max}}{2}$  ( $K_m' > K_m$ ).

Un caso particolarmente interessante di inibizione competitiva è quello dovuto al prodotto di una reazione che sia interconvertibile con il substrato e per i quali  $[S] + [P] = \text{costante}$ .

Siccome  $[S] + [P]$  è un valore costante, un aumento in [S] significa automaticamente una diminuzione di [P] e quindi una diminuzione dell'inibizione. È il caso di un certo numero di enzimi che utilizzano ATP e che sono fortemente inibiti da ADP o AMP.



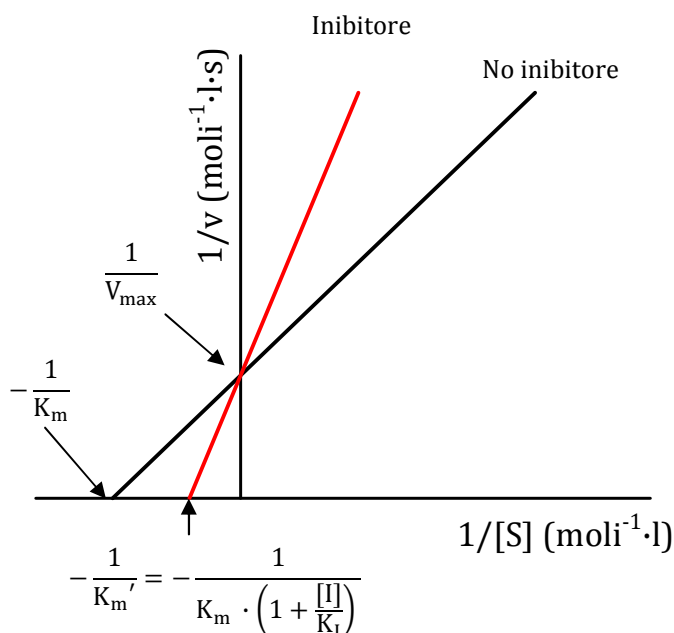


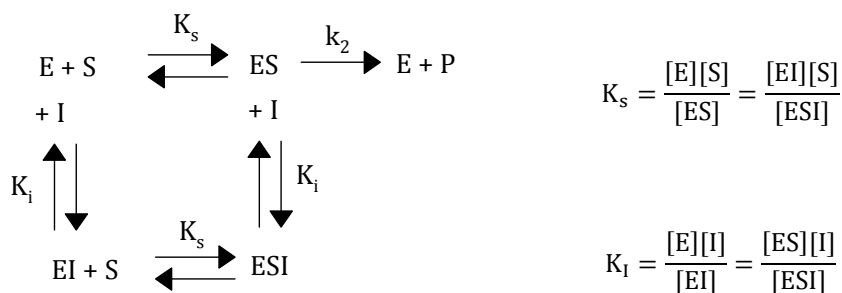
Figura 12: Diagramma di Lineweaver-Burk per inibizione competitiva.

### 3.2 Inibizione non competitiva.

**In un tipico sistema di inibizione non competitiva l'inibitore non ha alcun effetto sul legame del substrato con l'enzima, ed il substrato non ha alcun effetto sulla formazione del legame tra inibitore ed enzima, in quanto entrambi si legano reversibilmente all'enzima in siti differenti.**

Ciò significa che I si lega tanto ad E che a ES e che S si lega sia ad E che a EI. La presenza di uno di essi non ha alcun effetto sulla costante di dissociazione dell'altro, ma il complesso ESI è inattivo e non è in grado, cioè, di liberare il prodotto.

Queste caratteristiche sono riassunte nel seguente modello:

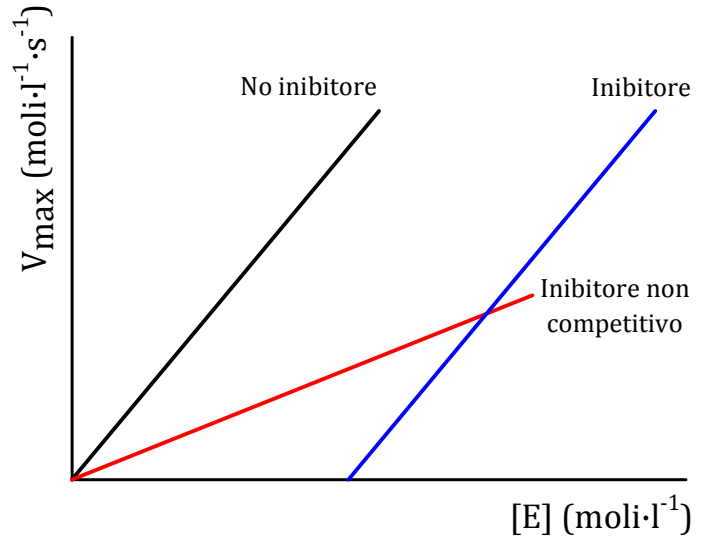


Assumiamo che i valori delle costanti di dissociazione dei complessi EI e ESI siano uguali ( $K_i$ ).

In presenza di I, anche ad infinite concentrazioni di S, l'enzima non potrà essere tutto sotto forma di ES, ma parte rimarrà come complesso non produttivo ESI. Di conseguenza  $V_{max}$  sarà più bassa in presenza dell'inibitore; mentre la  $K_m$  non sarà variata poiché i complessi ES ed ESI hanno le stesse costanti di dissociazione (E ed EI hanno quindi uguale affinità per S). La presenza di un inibitore non competitivo fa quindi sembrare che meno enzima sia presente.

Spesso vengono confusi con gli inibitori non competitivi (che si legano reversibilmente) le sostanze che legandosi irreversibilmente inattivano l'enzima, causando una diminuzione di  $V_{max}$ . La inibizione irreversibile è distinguibile da quella reversibile non competitiva analizzando le curve di  $V_{max}$  in funzione di  $[E]$ :

Figura 13: Lo studio della dipendenza di  $V_{max}$  da  $[E]$  permette di differenziare l'inibizione non competitiva dall'inibizione irreversibile.



Mentre per l'inibitore non competitivo la curva ha semplicemente una inclinazione più bassa rispetto al controllo (per ogni concentrazione di enzima si ha dunque una  $V_{max}$  minore), nel caso dell'inibitore irreversibile al di sotto di un certo valore di  $[E]$  (corrispondente alla quota di enzima inattivato dall'inibitore) la  $V_{max}$  è zero, al di sopra la curva ha un andamento parallelo al controllo.

Un'espressione per correlare  $v$ ,  $V_{max}$ ,  $[S]$ ,  $[I]$ ,  $K_s$  e  $K_i$  quando l'inibitore sia di tipo non competitivo può essere ricavata dalle assunzioni dell'equilibrio rapido ricordando che  $[E_{tot}] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$  e  $v = k_2[ES]$ :

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]}$$

Sostituendo a  $[ES]$ ,  $[EI]$  e  $[ESI]$  i loro rispettivi valori all'equilibrio

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}; [EI] = \frac{[E][I]}{K_i}; [ESI] = \frac{[E][S][I]}{K_s K_i}$$

si ha:

$$v = \frac{k_2[E_{tot}] \frac{[E][S]}{K_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][I]}{K_i} + \frac{[E][S][I]}{K_s K_i}}$$

dividendo per  $[E]$  e moltiplicando per  $K_s$  sia il numeratore che il denominatore:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S] + \frac{K_s[I]}{K_i} + \frac{[S][I]}{K_i}}$$

da cui raccogliendo opportunamente si ha:

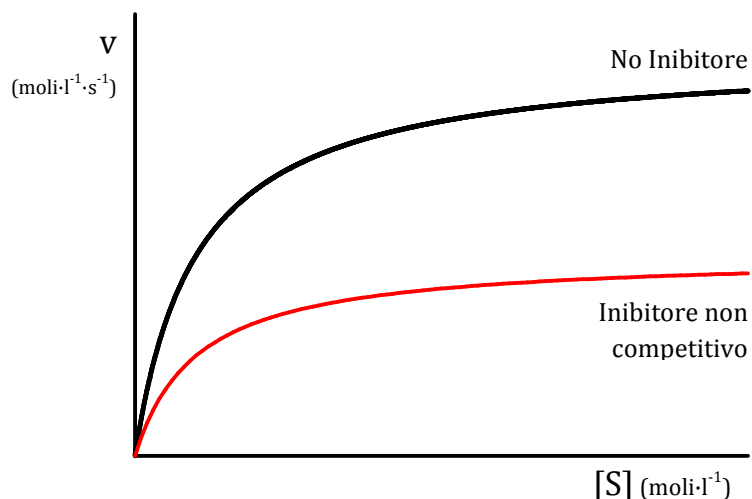
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

Sia  $K_s$  che  $S$  appaiono al denominatore moltiplicati per lo stesso fattore  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$ ; dividendo numeratore e denominatore per questo fattore, avremo:

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

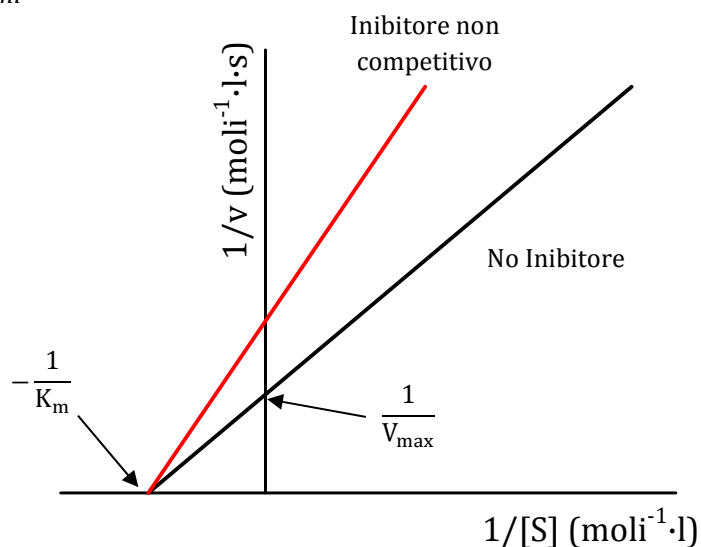
Da questa relazione si comprende che è la sola  $V_{\max}$  ad essere diminuita. La diminuzione di  $V_{\max}$  è dovuta al fatto che meno ES è presente a causa della formazione del complesso non produttivo ESI:

Figura 14: Inibizione non competitiva.



L'effetto di un inibitore non-competitivo sulla cinetica di una reazione enzimatica è facilmente descrivibile utilizzando la trasformazione lineare di Lineweaver-Burk (Figura 15):

Figura 15: Diagramma di Lineweaver-Burk per inibizione non competitiva.



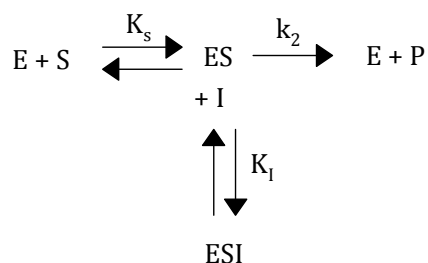
Gli esempi di inibitori non competitivi non sono molti e comprendono ioni di metalli pesanti ( $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$ ). Un buon esempio di inibitore non-competitivo è l'aspirina che inibisce le cicloossigenasi (EC 1.14.99.1), enzimi coinvolti nella sintesi delle prostaglandine.

### 3.3 Inibizione acompetitiva.

**Il tipico inibitore acompetitivo è una sostanza che si lega reversibilmente al complesso ES dando origine al complesso non produttivo ESI.**

L'enzima libero E non è in grado di legare l'inibitore. Il fenomeno della inibizione acompetitiva è anch'esso raro; sono considerati inibitori acompetitivi la sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ) per la citocromo-ossidasi (EC 1.9.3.1) e i cianuri per l'arilsolfatasi (EC 3.1.6.1). L'inibizione da eccesso di substrato può essere talvolta di tipo acompetitivo, in quanto questa si manifesta quando una seconda molecola di substrato si lega al complesso ES, dando origine al complesso ESS, che è non produttivo.

L'inibizione acompetitiva classica può essere descritta dalla seguente serie di equilibri:



Si può vedere che in presenza di una qualsiasi [I], per quanto elevata possa essere la concentrazione di S, l'enzima non può essere presente solo come ES; di conseguenza si può predire che  $V_{\max}$  in presenza di I sarà più bassa che in assenza dell'inibitore. Diversamente però che per l'inibizione non competitiva, il valore della  $K_m$  apparente sarà più basso in quanto il complesso ESI non può liberare il substrato, mostrando per esso una affinità infinita ( $K_s = 0$ ).

L'equazione cinetica in presenza di un inibitore acompetitivo si ricava come al solito avendo presente che

$$v = k_2[\text{ES}] \quad 3.1$$

e

$$[\text{E}_{\text{tot}}] = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{ESI}] \quad 3.2$$

Dividendo la 3.14 per la 3.15 e ponendo al posto di [ES] e [ESI] i rispettivi valori all'equilibrio:

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_s}; [\text{ESI}] = \frac{[\text{E}][\text{S}][\text{I}]}{K_s K_I}$$

si ottiene:

$$v = \frac{k_2[\text{E}_{\text{tot}}] \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_s}}{[\text{E}] + \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{E}][\text{S}][\text{I}]}{K_s K_I}}$$

e moltiplicando per  $K_s$  e si dividendo per [E] sia il numeratore che il denominatore:

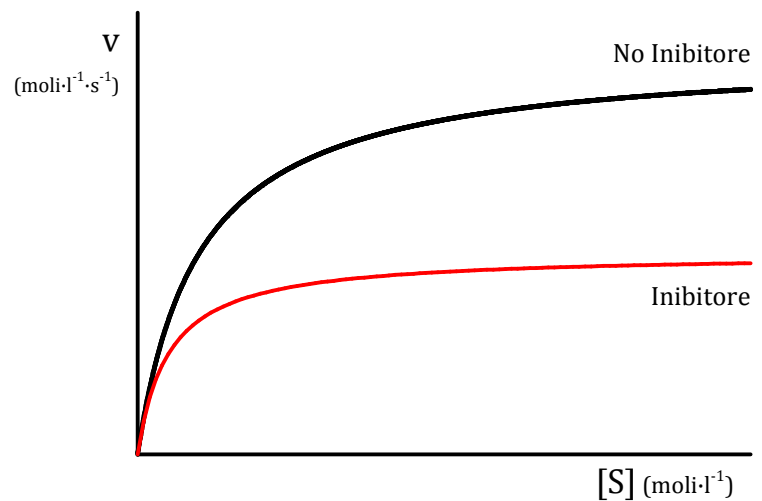
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S] + \frac{[S][I]}{K_I}}; v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

da cui dividendo sia numeratore che denominatore per  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$  si ottiene:

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

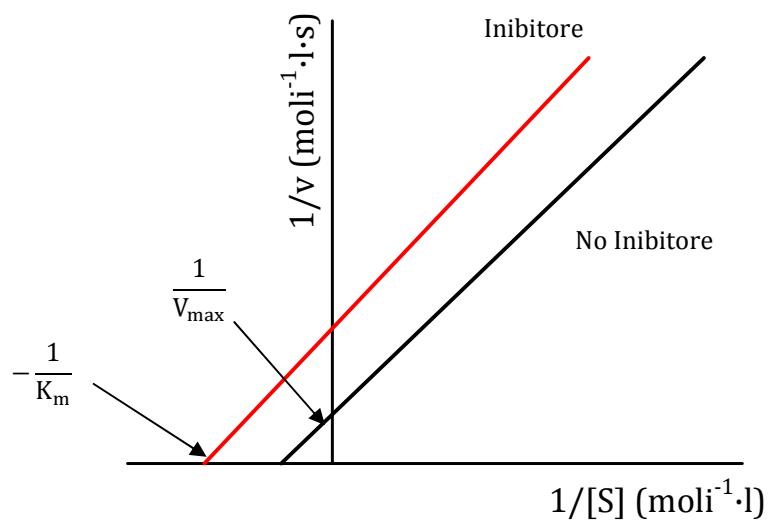
da cui si vede che tanto la  $V_{\max}$  che la  $K_s$  ( $K_m$ ) sono diminuite dello stesso fattore.

Figura 16: Inibizione incompetitiva.



Un inibitore incompetitivo è riconoscibile nella trasformazione lineare di Lineweaver-Burk: dalla presenza di rette parallele (Figura 17).

Figura 17: Diagramma di Lineweaver-Burk per inibizione incompetitiva.



È interessante notare che, per l'inibizione acompetitiva, il grado di inibizione aumenta all'aumentare della concentrazione del substrato. Ciò è comprensibile in quanto l'inibitore acompetitivo si lega al solo complesso ES, e la [ES] cresce al crescere di [S].

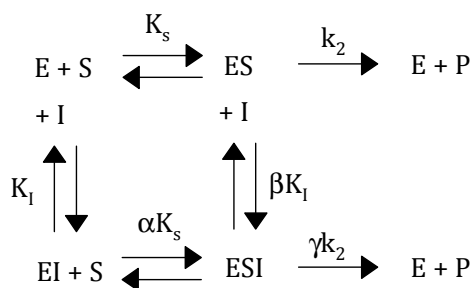
L'inibitore acompetitivo è inibitore per il suo effetto sulla  $V_{max}$ , ma è virtualmente un attivatore per quanto riguarda la  $K_m$ .

### 3.4 Cenni su altri tipi di inibizione.

Abbiamo fin qui considerato le proprietà dei tre più semplici tipi di inibizione. Il complesso ESI, quando presente era non produttivo, con costanti di dissociazione  $K_s$  e  $K_I$  identiche rispettivamente alle costanti di dissociazione dei complessi ES ed EI.

Consideriamo ora la possibilità che ESI sia un complesso produttivo e che le costanti di cui sopra non siano uguali, ovvero che il substrato si leghi ad E con affinità diversa che per EI e che l'inibitore si leghi con differente affinità ad E e a ES.

Potremo scrivere la seguente sequenza di equilibri:



Questo è un modello generale utilizzabile per ogni tipo di inibizione. Senza passare in rassegna tutti i casi possibili è evidente che i casi di inibizione pura sono situazioni del tutto particolari, ed inoltre l'inibitore, qualora ESI sia un complesso produttivo, può agire anche facendo variare la  $k_2$ . In questi casi si parla di **inibizione mista**.

## 4. Enzimi con siti catalitici multipli

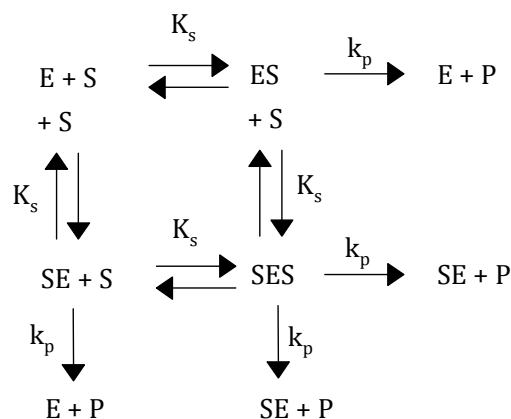
### 4.1 Enzimi con siti catalitici multipli non-cooperativi.

Molti enzimi sono degli oligomeri composti da subunità distinte, dette **monomeri**. Spesso i monomeri sono identici e ciascun portante un suo sito catalitico; qualora i siti siano completamente indipendenti, allora la presenza del substrato (o di qualsiasi altro legante) in un sito non avrà alcun effetto sulle proprietà di legame dei siti vacanti (o sulla attività catalitica dei siti occupati). Un enzima siffatto si comporterà quindi come una miscela di monomeri attivi e seguirà una normale cinetica iperbolica descritta dalla equazione di Michaelis-Menten. In questo tipo di enzimi, sebbene non esistano interazioni tra i siti, le subunità isolate sono normalmente inattive.

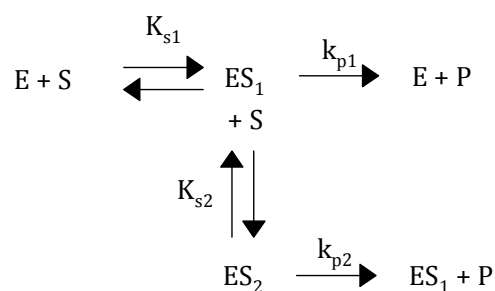
### 4.2 La cinetica degli enzimi con siti catalitici multipli.

Consideriamo un dimero con siti identici e non-cooperativi. La sequenza degli equilibri di legame secondo l'approccio dell'equilibrio rapido può essere visualizzata in due modi differenti:

- 1) mostrando tutti i diversi complessi che si possono formare, e cioè nel caso di un dimero ES, SE ed SES;



- 2) indicando solo i diversi tipi di complessi **ES<sub>1</sub>** per indicare i due complessi mono-occupati ed **ES<sub>2</sub>** per il complesso bi-occupato).



Nel primo caso le costanti **K<sub>s</sub>** e **k<sub>p</sub>** (rispettivamente costante dissociazione e costante cinetica) sono dette **INTRINSECHE** e riferiscono al sito isolato.

Nel secondo caso le costanti **K<sub>s1</sub>**, **K<sub>s2</sub>**, **k<sub>p1</sub>** e **k<sub>p2</sub>** sono invece dette **EFFETTIVE** e si riferiscono ai complessi considerati come se fossero uno solo.

Ricaviamo l'equazione cinetica secondo gli equilibri "intrinseci" del punto 1). La velocità di formazione del prodotto è data da:

$$v = k_p[ES] + k_p[SE] + 2k_p[SES]$$

l'equazione di conservazione di massa per l'enzima:

$$[E_{tot}] = [E] + [ES] + [SE] + [SES]$$

ed i valori delle concentrazioni dei complessi in condizioni di equilibrio rapido:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}; [SE] = \frac{[E][S]}{K_s}; [SES] = \frac{[S][ES]}{K_s} = \frac{[S][SE]}{K_s} = \frac{[E][S]^2}{K_s^2}$$

Dividendo l'equazione della velocità di formazione del prodotto per l'equazione di conservazione di massa per l'enzima e sostituendo alle concentrazioni dei complessi i loro valori calcolati in condizioni di equilibrio rapido, si ha:

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_p \frac{[E][S]}{K_s} + k_p \frac{[E][S]}{K_s} + 2k_p \frac{[E][S]^2}{K_s^2}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][S]^2}{K_s^2}}$$

Dividendo numeratore e denominatore per  $[E]$ , portando  $[E_{tot}]$  al secondo membro e raggruppando opportunamente, si ottiene:

$$v = \frac{2k_p[E_{tot}] \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}{1 + 2 \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}$$

Considerando che  $2k_p[E_{tot}] = V_{max}$  si ha:

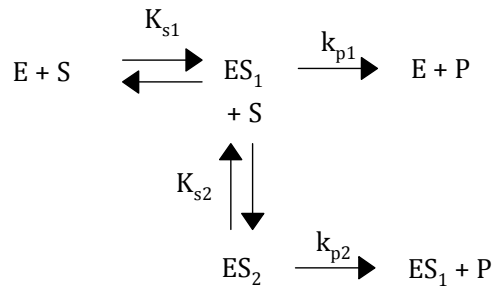
$$v = \frac{V_{max} \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}{1 + 2 \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}} = \frac{V_{max} \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^2} = \frac{V_{max} \frac{[S]}{K_s}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)} = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]}$$

Si dimostra così che l'equazione di velocità per un enzima a siti multipli non-cooperativi coincide con quella derivata da Michaelis-Menten per enzimi formati da un'unica catena polipeptidica ed interagenti con un unico substrato.

Quando si consideri un enzima formato da più di due subunità, diventa troppo complicato scrivere gli equilibri in termini di costanti intrinseche. Si preferisce allora descrivere gli equilibri in termini di costanti effettive e convertirle in un secondo tempo nelle corrispondenti costanti intrinseche.

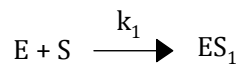
Vediamo come si procede. Riscriviamo gli equilibri effettivi nel caso più semplice di un dimero:





Per ricavare la relazione esistente tra costanti effettive e costanti intrinseche bisogna tener presente che la velocità di formazione di un complesso è direttamente proporzionale alla  $[S]$  ed al numero dei siti catalitici liberi; mentre la velocità di dissociazione dello stesso complesso è proporzionale alla sola concentrazione dei siti occupati.

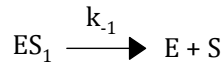
Per la formazione del complesso  $ES_1$  si ha:



La velocità di formazione  $v_1$  del complesso  $ES_1$  a partire da  $E$  ed  $S$  è direttamente proporzionale alla  $[S]$  e al doppio della  $[E]$ , per cui:

$$v_1 = k_1 2[E][S]$$

Per la velocità  $v_{-1}$  di dissociazione del complesso  $ES_1$  avremo invece:



La velocità di dissociazione del complesso  $ES_1$  è proporzionale all'unico sito occupato nel complesso, per cui:

$$v_{-1} = k_{-1}[ES_1]$$

All'equilibrio  $v_1 = v_{-1}$  e quindi  $k_1 2[E][S] = k_{-1}[ES_1]$ , da cui raccogliendo si ha:

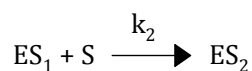
$$\frac{[E][S]}{[ES_1]} = \frac{k_{-1}}{2k_1}$$

Il rapporto  $\frac{[E][S]}{[ES_1]}$  è uguale alla  $K_{s1}$ ;

$k_{-1}/k_1$  è la costante di dissociazione del complesso  $ES$ , per cui la relazione esistente tra la costante effettiva  $K_{s1}$  e la costante di dissociazione intrinseca  $K_s$  è:

$$K_{s1} = \frac{K_s}{2}$$

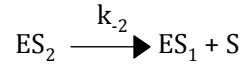
Ricaviamo ora la relazione esistente tra la costante effettiva  $K_{s2}$  e la costante intrinseca  $K_s$ . Per la formazione del complesso  $ES_2$  si ha:



La velocità di formazione del complesso  $ES_2$  è proporzionale alla  $[S]$  nonché all'unico sito libero (quindi proporzionale a  $[ES_1]$ ):

$$v_2 = k_2[S][ES_1]$$

La velocità di dissociazione del complesso  $ES_2$



è invece proporzionale solo al numero dei siti occupati, che in questo caso sono due, e quindi proporzionale a  $2[ES_2]$ .

All'equilibrio  $v_2 = v_{-2}$  e quindi  $k_2[S][ES_1] = 2k_{-2}[ES_2]$ , da cui raccogliendo si ha  $\frac{[ES_1][S]}{[ES_2]} = 2\frac{k_{-2}}{k_2}$ . Il rapporto  $\frac{[ES_1][S]}{[ES_2]}$  è uguale alla  $K_{S2}$ ; noi però sappiamo che  $k_2/k_{-2}$  è la costante di dissociazione del complesso  $ES$ , per cui la relazione esistente tra la costante effettiva  $K_{S1}$  e la costante di dissociazione intrinseca  $K_s$  è:

$$K_{S2} = 2K_s$$

La velocità di formazione del prodotto a partire dai complessi è sempre proporzionale al numero dei siti occupati per cui è facile comprendere che  $k_{p1} = k_p$  e  $k_{p2} = 2k_p$ .

Utilizzando gli equilibri descritti dal modello semplificato possiamo ricavare l'equazione cinetica in termini di costanti effettive e successivamente sostituire i valori corrispondenti delle costanti intrinseche.

$$v = k_{p1}[ES_1] + k_{p2}[ES_2]$$

$$[E_{tot}] = [E] + [ES_1] + [ES_2]$$

$$[ES_1] = \frac{[E][S]}{K_{S1}} \text{ e } [ES_2] = \frac{[ES_1][S]}{K_{S2}} = \frac{[ES_1][S]^2}{K_{S1}K_{S2}}$$

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_{p1} \frac{[E][S]}{K_{S1}} + k_{p2} \frac{[ES_1][S]^2}{K_{S1}K_{S2}}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_{S1}} + \frac{[ES_1][S]^2}{K_{S1}K_{S2}}} = \frac{k_{p1} \frac{[S]}{K_{S1}} + k_{p2} \frac{[S]^2}{K_{S1}K_{S2}}}{1 + \frac{[S]}{K_{S1}} + \frac{[S]^2}{K_{S1}K_{S2}}}$$

Sostituiamo ora alle costanti effettive le corrispondenti costanti intrinseche:

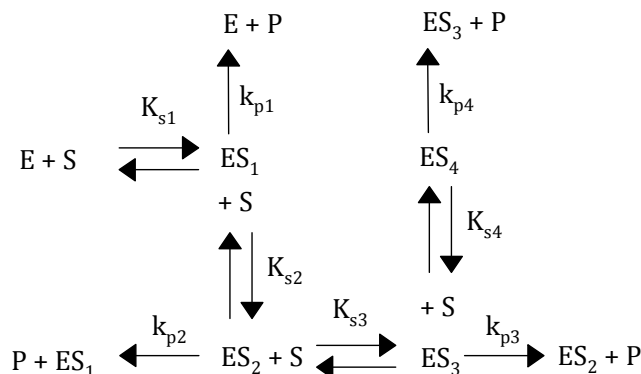
$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_s} + 2k_p \frac{[S]^2}{K_s 2K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s 2K_s}} = \frac{2k_p \frac{[S]}{K_s} + 2k_p \frac{[S]^2}{K_s^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}$$

da cui

$$v = \frac{2k_p[E_{tot}] \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^2} = \frac{v_{pmax} \frac{[S]}{K_s}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^2} = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]}$$

Come si vede si giunge alla medesima conclusione dell'approccio che utilizza gli equilibri in esteso. Il metodo semplificato è l'unico praticabile quando si abbia a che fare con enzimi con più di due subunità.

Affrontiamo ora il caso di un tetramero sempre in termini di costanti effettive. Gli equilibri in gioco sono i seguenti:



Tenendo presente che:

$$v = k_{p1}[\text{ES}_1] + k_{p2}[\text{ES}_2] + k_{p3}[\text{ES}_3] + k_{p4}[\text{ES}_4]$$

e

$$[\text{E}_{\text{tot}}] = [\text{E}] + [\text{ES}_1] + [\text{ES}_2] + [\text{ES}_3] + [\text{ES}_4]$$

e che le concentrazioni dei complessi all'equilibrio sono:

$$\begin{aligned}
 [\text{ES}_1] &= \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_{s1}} \\
 [\text{ES}_2] &= \frac{[\text{ES}_1][\text{S}]}{K_{s2}} = \frac{[\text{E}][\text{S}]^2}{K_{s1}K_{s2}} \\
 [\text{ES}_3] &= \frac{[\text{ES}_2][\text{S}]}{K_{s3}} = \frac{[\text{E}][\text{S}]^3}{K_{s1}K_{s2}K_{s3}} \\
 [\text{ES}_4] &= \frac{[\text{ES}_3][\text{S}]}{K_{s4}} = \frac{[\text{E}][\text{S}]^4}{K_{s1}K_{s2}K_{s3}K_{s4}}
 \end{aligned}$$

si può affrontare la derivazione dell'equazione cinetica.

Nel caso di un tetramero le relazioni esistenti tra le costanti effettive e quelle intrinseche (ricavabili col ragionamento esposto poco sopra per il dimerico), sono:

$$K_{s1} = \frac{1}{4}K_s; K_{s2} = \frac{2}{3}K_s; K_{s3} = \frac{3}{2}K_s; K_{s4} = 4K_s$$

Vale la pena di notare che il numero che moltiplica la costante di dissociazione intrinseca  $K_s$  è composto da un numeratore che corrisponde al numero dei siti occupati nel complesso ed un denominatore che corrisponde al numero dei siti liberi del complesso che lo precede. Ad esempio nella relazione  $K_{s2} = \frac{2}{3}K_s$ , 2 è il numero dei siti

occupati nel complesso  $ES_2$  e 3 è il numero dei siti liberi nel complesso  $ES_1$ . Per quanto riguarda le costanti cinetiche si ha:

$$k_{p1} = k_p; k_{p2} = 2k_p; k_{p3} = 3k_p; k_{p4} = 4k_p$$

Considerando che  $V_{\max} = k_{p4}[ES_4] = 4k_p[E_{\text{tot}}]$  ed avendo presente tutto ciò si può senza grandi difficoltà derivare la seguente equazione in termini di costanti intrinseche:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} + 3\frac{[S]^2}{K_s^2} + 3\frac{[S]^3}{K_s^3} + \frac{[S]^4}{K_s^4}}{1 + 4\frac{[S]}{K_s} + 6\frac{[S]^2}{K_s^2} + 4\frac{[S]^3}{K_s^3} + \frac{[S]^4}{K_s^4}}$$

da cui raccogliendo opportunamente e semplificando

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{3[S]^2}{K_s^2} + \frac{3[S]^3}{K_s^3} + \frac{[S]^4}{K_s^4}\right)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^4} = \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^3}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^4} = \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

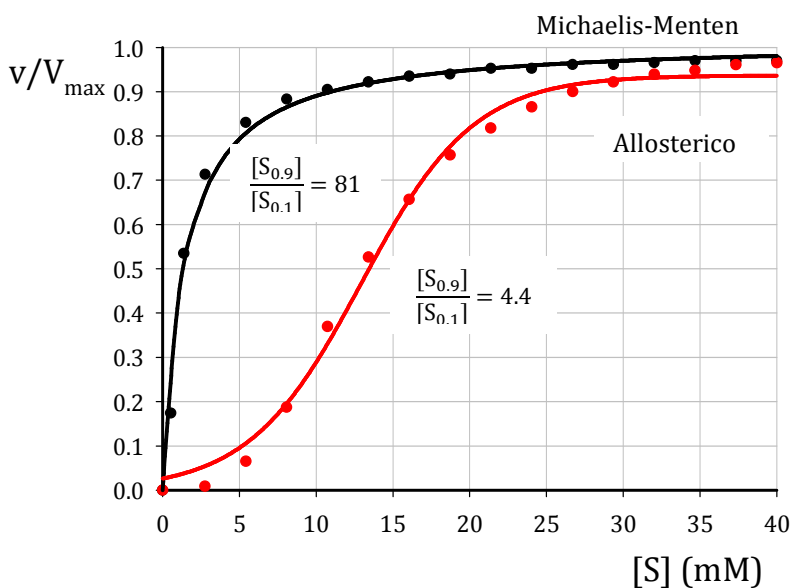
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S]}$$

si arriva a dimostrare ancora una volta che un enzima a siti multipli non-cooperativi si comporta cinematicamente come un enzima formato da un'unica catena polipeptidica.

### 4.3 Enzimi con siti catalitici multipli cooperativi: enzimi allosterici.

Se il legame di una molecola di substrato (o di altro legante) con l'enzima induce cambiamenti strutturali tali da alterare le affinità dei siti vacanti, la curva di  $v/[S]$  non seguirà più la cinetica di Michaelis-Menten e l'enzima sarà classificato come allosterico. Generalmente, ma non sempre, gli enzimi allosterici hanno delle curve  $v/[S]$  di tipo sigmoidale (Figura 18).

Figura 18: Dipendenza della velocità di reazione relativa da  $[S]$  in presenza di siti multipli cooperativi.



Se il legame di una molecola di substrato (o di altro legante) facilita il legarsi di ulteriori molecole di substrato come conseguenza di una aumentata affinità dei siti vacanti si parla di **EFFETTO COOPERATIVO POSITIVO**.

I vantaggi potenziali di una risposta sigmoidale si possono constatare comparando tra loro una curva iperbolica con una curva sigmoidale.

Si può ricavare che, nel caso della risposta iperbolica, il rapporto  $\frac{[S_{0.9}]}{[S_{0.1}]}=81$ ; ciò vuol dire che per passare da un decimo della  $V_{max}$  ai nove decimi della  $V_{max}$ , la concentrazione di substrato deve incrementare di 81 volte.

$$0.1 = \frac{[S_{0.1}]}{K_m + [S_{0.1}]} ; 0.1 \cdot (K_m + [S_{0.1}]) = [S_{0.1}]; K_m = \frac{0.9[S_{0.1}]}{0.1} = 9 \cdot [S_{0.1}]$$

$$0.9 = \frac{[S_{0.9}]}{K_m + [S_{0.9}]} ; 0.9 \cdot (K_m + [S_{0.9}]) = [S_{0.9}]; K_m = \frac{0.1[S_{0.9}]}{0.9} = \frac{1}{9} \cdot [S_{0.9}]$$

$$\frac{1}{9} \cdot [S_{0.9}] = 9 \cdot [S_{0.1}] = ; \frac{[S_{0.9}]}{[S_{0.1}]} = 9 \cdot 9 = 81$$

Invece, nel caso della curva sigmoidale riportata in *figura 18*, il rapporto  $\frac{[S_{0.9}]}{[S_{0.1}]}$  vale 4.4; ciò significa che è sufficiente un incremento molto minore della concentrazione del substrato per passare da  $\frac{v}{V_{max}}=0.1$  a  $\frac{v}{V_{max}}=0.9$ . In altri termini la risposta sigmoidale agisce come un interruttore e le variazioni della velocità, per valori intermedi di velocità, appaiono più sensibili a variazioni di [S].

Sono stati proposti due tipi di modelli per spiegare il comportamento allosterico degli enzimi, entrambi basati sull'assunzione dell'equilibrio rapido. Sono i modelli ad **INTERAZIONE SEQUENZIALE** ed il modello a **SIMMETRIA CONCERTATA**.

I **modelli sequenziali** ipotizzano un progressivo cambiamento nell'affinità dei siti vacanti man mano che questi vengono occupati.

Il **modello a simmetria concertata** ipotizza invece, che l'enzima esista in soluzione in due forme, una ad elevata affinità e l'altra a bassa affinità per il legando, in equilibrio tra loro; i ligandi agiscono "spostando l'equilibrio" in favore di una forma o dell'altra. Durante la transizione tutte le subunità cambiano contemporaneamente di conformazione cosicché l'enzima mantiene la sua simmetria.

#### 4.4 Enzimi allosterici: modello ad interazione sequenziale (KNF).

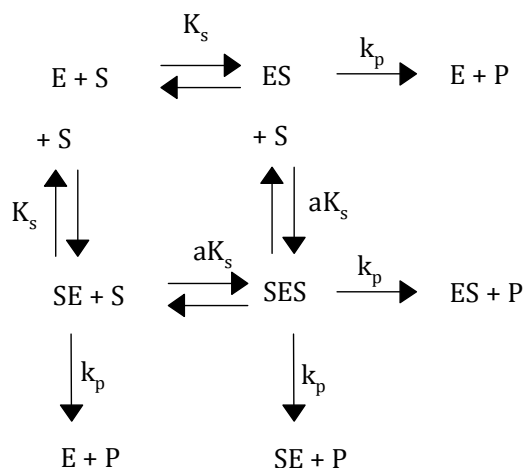
Il modello di **Koshland-Némethy-Filmer**<sup>9</sup> (KNF) si basa su due ipotesi principali:

1. in assenza di ligandi, la proteina allosterica esiste in una sola conformazione.
2. il legame del ligando ad una subunità produce un cambiamento conformazionale alla subunità stessa. Tale cambiamento altera a sua volta la conformazione delle subunità libere adiacenti.

<sup>9</sup> Koshland, D.E.Jr, Némethy, G., Filmer, D. (1966). "Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits". *Biochemistry*. **5** (1), 365-385.

Questo modello, detto dell’**“adattamento indotto”**, ipotizza che il legame dell’enzima con il suo substrato (od altro ligando) può risultare in modificazioni conformazionali funzionali ad una migliore interazione tra enzima e il substrato stesso.

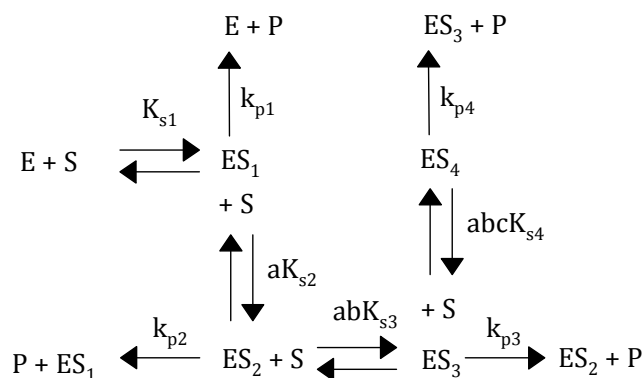
Consideriamo il semplice caso di un dimero in cui il legame di una molecola di substrato provochi una modificazione della costante di dissociazione intrinseca  $K_s$  di un fattore  $a$ . La sequenza delle reazioni in termini di costanti intrinseche è la seguente:



Ricordando che  $2k_p[E_{tot}] = V_{max}$  si ha, l’equazione di velocità facilmente ricavabile è:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}}{1 + 2\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}}$$

Consideriamo ora il caso di un enzima con quattro subunità identiche. In questo caso come abbiamo visto nella trattazione per un enzima con siti non-cooperativi, per il quale possiamo facilmente scrivere gli equilibri in termini di costanti effettive:



La costante di dissociazione effettiva del complesso  $ES_1$  ( $K_{s1}$ ) è correlata alla costante intrinseca di dissociazione dalla relazione:

$$K_{s1} = \frac{1}{4} K_s$$

Ora, se il legame della prima molecola di substrato altera le costanti di dissociazione dei siti vacanti di un fattore **a**, la costante di dissociazione effettiva  $K_{s2}$  del complesso  $ES_2$  sarà correlata alla costante intrinseca  $K_s$  dalla:

$$K_{s2} = a \frac{2}{3} K_s$$

Il legame della seconda molecola di substrato altera le costanti di dissociazione dei siti rimasti vacanti di un fattore **b**, per cui avremo:

$$K_{s3} = ab \frac{3}{2} K_s$$

Analogamente la terza molecola di substrato introduce un fattore di interazione **c**, per cui la costante di dissociazione effettiva  $K_{s4}$  del complesso  $ES_4$ , sarà:

$$K_{s4} = abc4K_s$$

Si noti che l'alterazione nell'affinità introdotta dalla prima e dalla seconda molecola di substrato non viene eliminata dalla variazione indotta rispettivamente dalla seconda e dalla terza; in altre parole le interazioni sono cumulative. Avendo presente che anche in questo caso, come per un enzima con siti non-cooperativi, le relazioni tra le costanti cinetiche effettive e quella intrinseca sono:

$$k_{p1} = k_p; k_{p2} = 2k_p; k_{p3} = 3k_p; k_{p4} = 4k_p$$

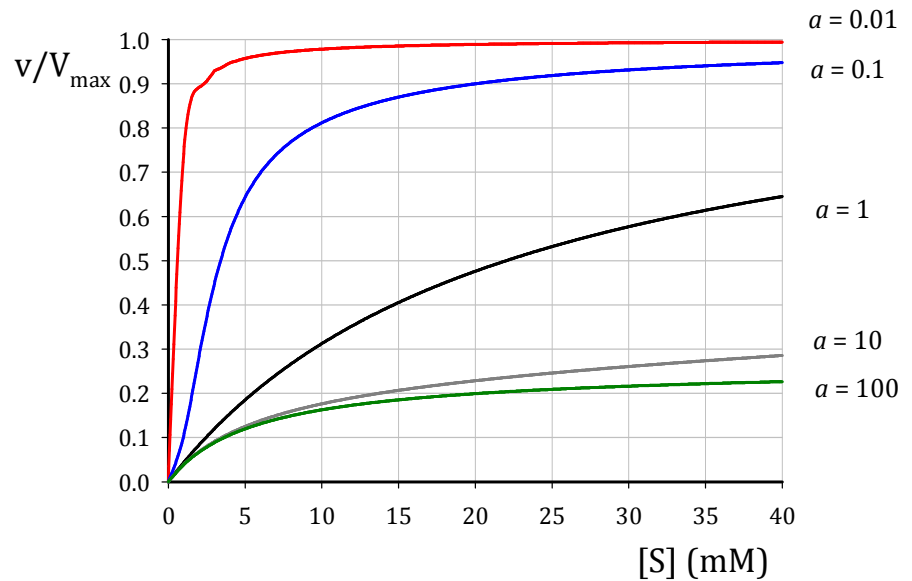
e che  $V_{\max} = k_{p4}[ES_4] = 4k_p[E_{\text{tot}}]$ , si può, con un po' di pazienza, ricavare l'equazione cinetica.

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} + 3 \frac{[S]^2}{aK_s^2} + 3 \frac{[S]^3}{a^2bK_s^3} + \frac{[S]^4}{a^3b^2bK_s^4}}{1 + 4 \frac{[S]}{K_s} + 6 \frac{[S]^2}{aK_s^2} + 4 \frac{[S]^3}{a^2bK_s^3} + \frac{[S]^4}{a^3b^2bK_s^4}}$$

I fattori di interazione **a**, **b** e **c** possono assumere qualunque valore. Per **a=b=c=1** (ma anche per **a=b=c=0**) l'equazione diviene l'equazione di un enzima con siti non-cooperativi (equazione di Michaelis-Menten). Per valori di **a=b=c<1** si ha sicuramente a che fare con un enzima in cui ogni molecola di substrato provoca legandosi ad un sito un aumento dell'affinità nei siti vacanti; si dice quindi che l'enzima presenta un **effetto cooperativo positivo** ed esibirà una curva di tipo sigmoideale. Per valori di **a=b=c>1** si ha a che fare con un enzima in cui ogni molecola di substrato provoca legandosi ad un sito una diminuzione dell'affinità dei siti vacanti; si dice quindi che l'enzima presenta un **effetto cooperativo negativo** ed avrà una curva **v vs [S]** non sigmoideale e non iperbolica (Figura 19).

L'effetto cooperativo negativo non è una caratteristica puramente teorica del modello ad interazione sequenziale. Molti enzimi allosterici, tra cui la lattico deidrogenasi del cuore (EC 1.1.1.27), la glutammato deidrogenasi (EC 1.4.1.2) e la isocitrato deidrogenasi (EC 1.1.1.42), lo presentano. Con una combinazione dei fattori di interazione del tipo **a=1, b>1 e c>1**, un enzima formato da quattro subunità può funzionare in maniera quasi normale a basse concentrazioni di substrato ed esibire una notevole inibizione ad elevate concentrazioni di substrato.

Figura 19: Influenza del fattore di interazione  $a$  sulla cooperatività in un dimero con  $b = c = 1$ .



#### 4.5 La sigmoidicità della curva di velocità.

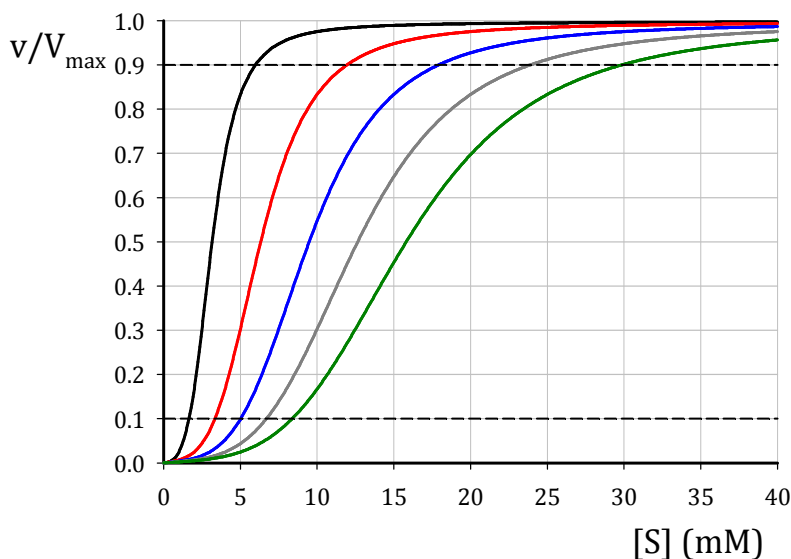
La sigmoidicità di una curva di velocità di un enzima allosterico è definita dal rapporto tra due concentrazioni di substrato richiesto per ottenere due valori di velocità: ad esempio il rapporto  $\frac{[S_{0.9}]}{[S_{0.1}]}$ , ovvero tra la concentrazione di substrato necessaria per ottenere rispettivamente  $0.9 V_{\max}$  e  $0.1 V_{\max}$ .

Solo dal calcolo di questo rapporto è possibile stabilire la relativa sigmoidicità di due curve. Il semplice confronto visivo di due curve sigmoidi non può infatti darci indicazioni valide.

Curve diversamente inclinate possono presentare la stessa sigmoidicità (stessi fattori di interazione); ciò che provoca la diversa inclinazione è una diversa  $K_s$ . In figura 20 sono riportate differenti curve di enzimi aventi gli stessi fattori di interazione ( $a=0.05$ ,  $b=0.1$  e  $c=0.1$ ) con identico rapporto  $\frac{[S_{0.9}]}{[S_{0.1}]}$  (3.57), ma valori di  $K_s$  crescenti da sinistra verso destra.



Figura 20: Enzimi con medesimi fattori di interazione ( $a=0.05$ ,  $b=0.1$  e  $c=0.1$ ) con  $K_s$  crescente da sinistra verso destra.

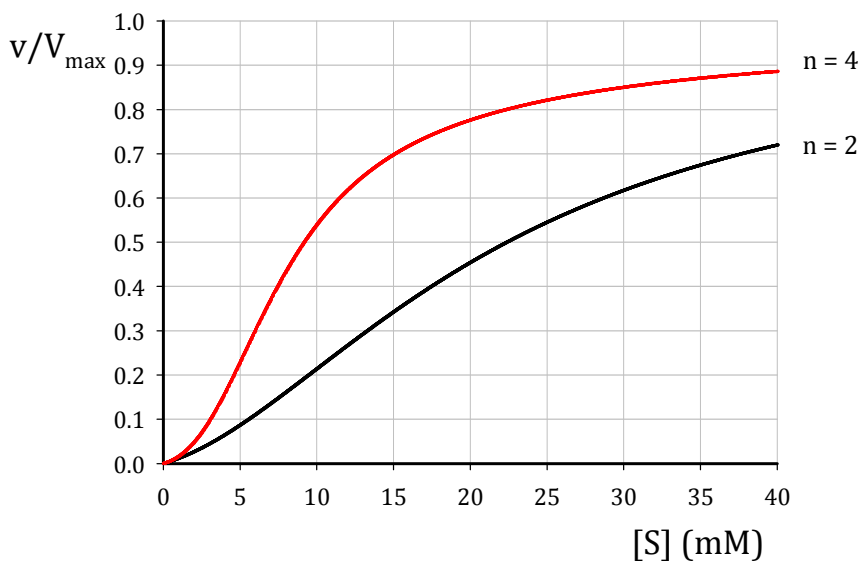


Il rapporto  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]$  per un enzima che segua una cinetica iperbolica (Michaelis-Menten) è sempre uguale a **81**.

Al diminuire di questo rapporto aumenta la sigmoidicità, vale a dire aumenta l'effetto cooperativo positivo e i fattori di interazione avranno valori sempre più piccoli.

La sigmoidicità non dipende però solo dal, o dai, fattori di interazione; essa è anche funzione del numero delle subunità presenti nell'enzima: un dimero con un fattore di interazione  $a=0.05$  ha una sigmoidicità inferiore a quella di un tetramero con fattori di interazione  $a=0.05$ ,  $b=c=1$  (Figura 21).

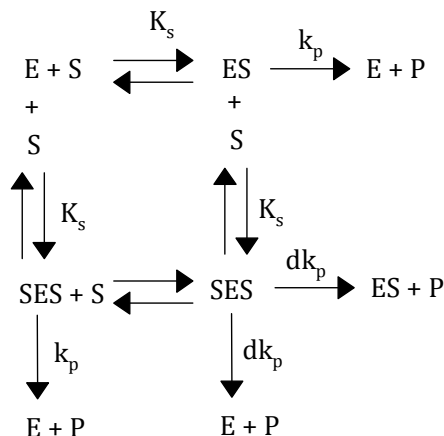
Figura 21: Un dimero con un fattore di interazione  $a=0.05$  ha una sigmoidicità inferiore a quella di un tetramero con il medesimo fattore di interazione.



La presenza di un maggior numero di subunità amplifica l'effetto cooperativo nonostante i fattori di interazione siano gli stessi.

#### 4.6 Effetto cooperativo sulla $V_{max}$ .

Prendiamo ora in considerazione il caso in cui il legame del substrato non provochi alcuna modificazione di affinità dei siti vacanti, ma provochi invece una modificazione delle costanti cinetiche di formazione del prodotto a partire dai siti plurioccupati.



Consideriamo un dimero in cui il complesso ES (o SE) abbia una costante di dissociazione intrinseca  $K_s$  uguale a quella del complesso SES, ma quest'ultimo abbia una costante cinetica intrinseca per la formazione del prodotto  $d$  volte quella del complesso ES o SE. Gli equilibri in gioco sono:

L'equazione di velocità sarà in questo caso:

$$v = \frac{2k_p \frac{[S]}{K_s} [E_{tot}] + 2dk_p \frac{[S]^2}{K_s^2} [E_{tot}]}{1 + 2 \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}$$

da cui, ponendo  $2dk_p[E_{tot}] = V_{max}$  e raccogliendo opportunamente, si ha l'equazione definitiva:

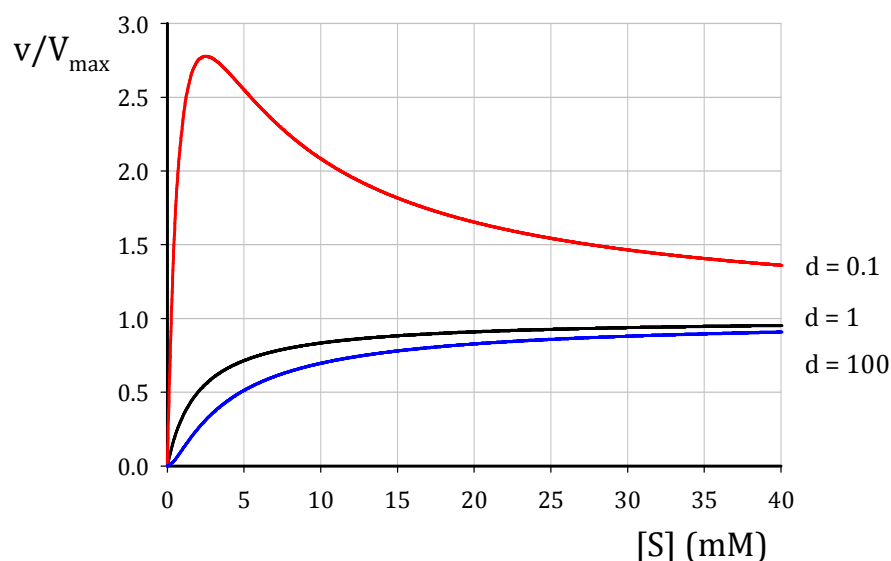
$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^2}$$

Per valori di  $d > 1$  la curva di velocità è sigmoideale. Ciò è comprensibile considerando che a basse concentrazioni di substrato la velocità osservata è quella dovuta all'attività dei soli complessi ES e SE aventi una costante di formazione del prodotto uguale a  $k_p$ , mentre a concentrazioni elevate di substrato sono presenti essenzialmente i complessi SES, molto più produttivi, in quanto  $dk_p > k_p$ .

Per valori di  $d < 1$ , quando cioè il complesso SES ha una costante cinetica di formazione del prodotto  $dk_p$  inferiore a quella dei complessi ES e SE ( $dk_p < k_p$ ) la curva non è una sigmoide. A basse concentrazioni di substrato l'enzima lavora a velocità più elevate della  $V_{max}$  e presenta una marcata inibizione da eccesso di substrato. Anche in questo caso anche se la cinetica non è di tipo sigmoideale il rapporto  $[S_{0.9}]$  e  $[S_{0.1}] < 81$ .

In figura 22 sono riportate le curve di tre enzimi allosterici, uno allosterico con  $d=0.1$  e l'altro con  $d=100$ , l'enzima non-allosterico ha  $d=1$ . I tre enzimi hanno lo stesso valore di  $K_s$ .

Figura 22: Enzimi allosterici con  $n=2$ ,  $d=0.1$  e  $d=100$  paragonati ad un enzima non allosterico ( $d=1$ ). ( $K_S=2$  mM).



#### 4.7 Effetto cooperativo su $V_{max}$ e $K_S$ .

Esistono enzimi nei quali il legarsi del substrato provoca alterazioni contemporaneamente a  $V_{max}$  e  $K_S$ . L'equazione generale che descrive il fenomeno per il più semplice caso di un dimero è la seguente:

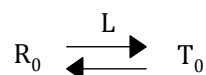
$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_S} + \frac{d[S]^2}{aK_S^2}}{1 + 2\frac{[S]}{K_S} + \frac{[S]^2}{aK_S^2}}$$

ove  $d$  ed  $a$  sono i fattori di interazione che moltiplicano rispettivamente  $k_p$  e  $K_S$ . La forma delle curve dipenderà dai valori assoluti di  $d$  ed  $a$ , nonché dal loro rapporto.

#### 4.8 Enzimi allosterici: modello a simmetria concertata (MWC).

Le caratteristiche del modello a simmetria concertata, proposto nel 1965 da Monod, Wyman e Changeux<sup>10</sup> per una qualsiasi proteina allosterica, sono le seguenti:

1. le proteine allosteriche sono degli oligomeri formati da subunità (monomeri) identiche, disposte in modo simmetrico.
2. ogni monomero possiede un unico sito di legame per ogni ligando (uno per il substrato, uno per ogni eventuale inibitore ed uno per ogni eventuale attivatore).
3. L'oligomero è presente, in assenza di qualsiasi ligando, in due conformazioni tra loro in equilibrio:



una forma  $R_0$  (*relax*) ad elevata affinità ed una forma  $T_0$  (*tight*) a bassa affinità per il ligando.

La costante di equilibrio della trasformazione  $R_0 \rightleftharpoons T_0$  è detta **costante allosterica** ed è uguale a:

<sup>10</sup> Monod, J., Wyman, J., Changeux J.P. (1965). "On the nature of allosteric transitions: a plausible model". Journal of Molecular Biology. **12**, 88-118.

$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

Il passaggio da una conformazione all'altra è un evento "tutto o nulla", ovvero tutti i monomeri di un oligomero cambiano contemporaneamente di conformazione: non sono quindi ammesse forme ibride all'interno di un singolo oligomero.

4.) L'affinità di un sito di legame per un dato ligando dipende dalla configurazione dell'oligomero. Alcuni ligandi preferiscono legarsi alla forma  $R_0$  altri alla forma  $T_0$ .

Il substrato si lega preferenzialmente alla forma  $R_0$  secondo l'equazione:



$K_R$  è la costante di dissociazione intrinseca del complesso RS ed è uguale a:

$$K_R = \frac{[R_0][S]}{[RS]}$$

Il substrato però può legarsi anche alla forma  $T_0$  secondo l'equazione:



La costante intrinseca di dissociazione del complesso TS è in questo caso indicata come  $K_T$  ed è sempre maggiore (o al massimo eguale) della  $K_R$ .

Il rapporto:

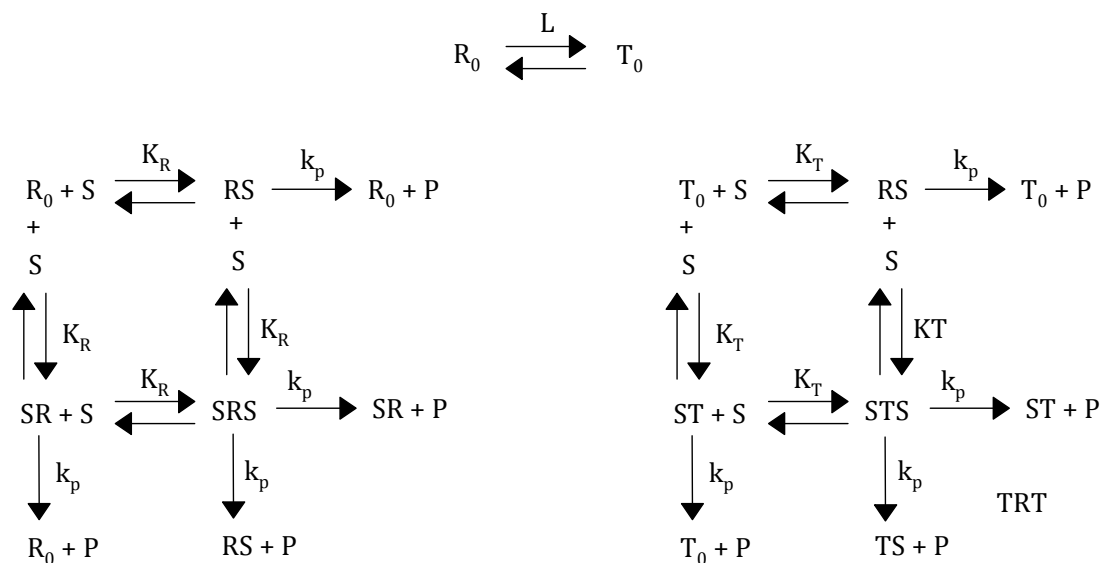
$$\frac{K_R}{K_T} = c \quad 4.1$$

Viene definito come: *coefficiente di legame non-esclusivo*.

Una molecola di substrato legandosi alla forma  $R_0$  sottrae all'equilibrio della trasformazione  $R_0 \rightleftharpoons T_0$  una intera molecola di enzima in forma R; di conseguenza l'equilibrio determinato dal valore di L viene ripristinato a spese della trasformazione  $T_0 \rightarrow R_0$ . In questo modo il numero dei siti ad elevata affinità resi disponibili è superiore all'unico utilizzato dalla prima molecola di substrato: come risultato la curva di velocità in funzione della concentrazione del substrato è una sigmoide, per cui il modello MWC rende conto solo della cooperatività positiva.

#### 4.9 Derivazione dell'equazione di velocità per il modello MWC.

La derivazione dell'equazione generale di velocità nel modello a simmetria concertata è solo più complessa a causa del fatto che abbiamo a che fare con un numero doppio di complessi. Ricaveremo l'equazione nel caso di un dimero, per il quale siamo in grado di scrivere tutti gli equilibri in termini di costanti intrinseche. Gli equilibri in gioco nel caso di un dimero sono i seguenti:



Nella situazione più complessa di un tetramero il modo di ricavare l'equazione di velocità può essere affrontato descrivendo gli equilibri in termini di costanti effettive e successiva loro conversione nelle costanti intrinseche, come già visto in altra occasione.

Quindi per un dimero la velocità di formazione del prodotto è data dalla equazione:

$$v = k_p[RS] + k_p[SR] + 2k_p[SRS] + k_p[TS] + k_p[ST] + k_p[ST] + 2k_p[STS] \quad 4.2$$

L'enzima totale presente in soluzione è uguale a:

$$[E_{\text{tot}}] = [R_0] + [RS] + [SR] + [SRS] + [T_0] + [TS] + [ST] + [STS] \quad 4.3$$

Le concentrazioni dei complessi all'equilibrio sono:

$$\begin{aligned}
 [RS] &= \frac{[R_0][S]}{K_R}; \quad [SR] = \frac{[R_0][S]}{K_R}; \quad [SRS] = \frac{[RS][S]}{K_R} = \frac{[R_0][S]^2}{K_R^2}; \\
 [ST] &= \frac{[T_0][S]}{K_T}; \quad [TS] = \frac{[T_0][S]}{K_T}; \quad [STS] = \frac{[TS][S]}{K_T} = \frac{[T_0][S]^2}{K_T^2};
 \end{aligned}$$

Ricordando che:  $[T_0] = L[R_0]$  e che  $K_T = \frac{K_R}{c}$ , possiamo definire le concentrazioni dei complessi della forma T in funzione della concentrazione dell'enzima in configurazione R:

$$[ST] = \frac{L[R_0][S]}{\frac{K_R}{c}}; \quad [TS] = \frac{L[R_0][S]}{\frac{K_R}{c}}; \quad [STS] = \frac{L[R_0][S]^2}{\left(\frac{K_R}{c}\right)^2}$$

Dividendo la 4.2 per la 4.3:

$$\frac{v}{[E]_{\text{tot}}} = \frac{k_p[RS] + k_p[SR] + 2k_p[SRS] + k_p[TS] + k_p[ST] + k_p[ST] + 2k_p[STS]}{[R_0] + [RS] + [SR] + [SRS] + [T_0] + [TS] + [ST] + [STS]}$$

Semplifichiamo ponendo ovunque  $\frac{[S]}{K_R} = \alpha$  per cui avremo:

$$[RS] = \alpha[R_0]$$

$$[SR] = \alpha[R_0]$$

$$[SRS] = \alpha^2[R_0]$$

$$[TS] = \alpha c L [R_0]$$

$$[ST] = \alpha c L [R_0]$$

$$[STS] = \alpha^2 c L [R_0]$$

Sostituendo, raccogliendo opportunamente e ricordando che in questo caso  $2k_p[E_{tot}] = V_{max}$  avremo:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\alpha + \alpha^2 + \alpha c L + \alpha^2 c^2 L}{1 + 2\alpha + \alpha^2 + L + 2\alpha c L + \alpha^2 c^2 L} = \frac{\alpha c L (1 + c\alpha) + \alpha(1 + \alpha)}{L(1 + c\alpha)^2 + (1 + \alpha)^2}$$

Si può dimostrare che per un enzima con  $n$  subunità, l'equazione generale di velocità secondo il modello MWC è la seguente:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\alpha c L (1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

#### 4.10 Effetto della costante allosterica $L$ sulla cooperatività.

##### a) Legame esclusivo del substrato.

Consideriamo dapprima il caso più semplice in cui solo  $R_0$  abbia affinità per il substrato; in questo caso il coefficiente di legame non esclusivo  $c$  è uguale a zero ( $c = \frac{K_R}{K_T} = 0$  essendo  $K_T \rightarrow \infty$ ) e l'enzima sarà un **enzima a legame "esclusivo" del substrato**. In altre parole l'enzima è presente in soluzione in due forme di cui la  $T_0$  non reagisce con il substrato. L'equazione di velocità per un dimero con  $c = 0$  diviene allora:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\alpha(1 + \alpha)}{L(1 + \alpha)^2} \quad 4.4$$

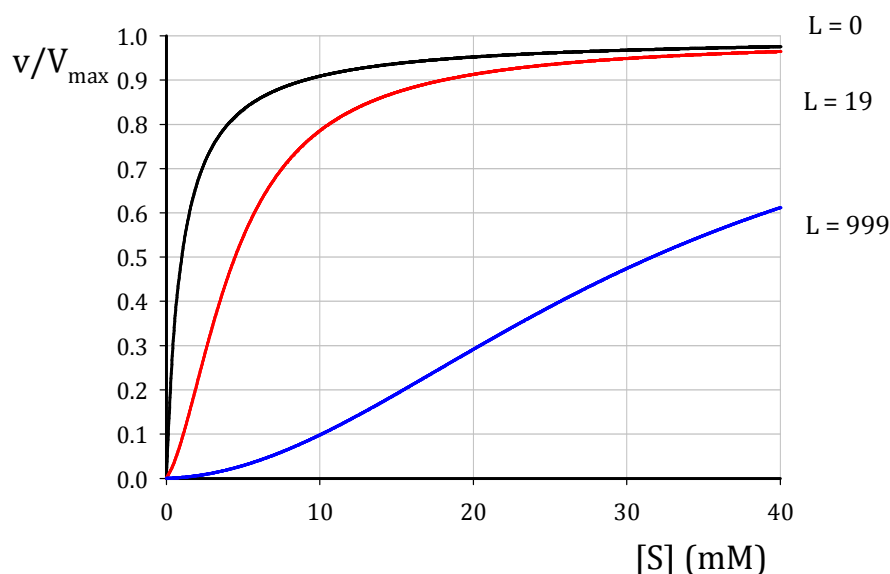
Quando  $L=0$ , l'enzima esiste solo nella forma  $R_0$  e quindi sarà un enzima con siti catalitici multipli non cooperativi ( $[S_{0.9}]/[S_{0.1}] = 81$ ).

Infatti la sua equazione di velocità sarà indistinguibile da quella di un enzima formato da una singola catena polipeptidica, che come sappiamo ha una equazione di velocità che descrive un'iperbole:

$$L = 0; \quad \frac{v}{V_{max}} = \frac{\alpha(1 + \alpha)}{(1 + \alpha)^2} = \frac{\alpha}{(1 + \alpha)}$$

Per valori di  $L$  maggiori di zero l'equazione è quella di enzimi cooperativi. All'aumentare di  $L$ , aumenta la cooperatività.

Figura 23: Andamento della velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato a diversi valori della costante allosterica  $L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$ . Per valori di  $L > 0$  il comportamento è allosterico mentre per  $L=0$  l'enzima si comporta seguendo Michaelis-Menten.



Nell'esempio di figura 23 per  $L=19$ ,  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]=16.1$  e per  $L=999$ ,  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]=9.8$ . Per  $L \rightarrow \infty$  l'enzima esisterà solo nella configurazione  $T_0$  che però, in una situazione di legame esclusivo del substrato, non ha alcuna affinità per il substrato: un tale enzima, con  $c=0$  ed  $L$  enormemente grande, è un enzima inattivo.

#### b) Legame non esclusivo del substrato.

Prendiamo ora in considerazione il caso più generale di un enzima che abbia un **legame con il substrato non-esclusivo** ( $0 < c < 1$ ). Anche in questo caso per  $L = 0$  abbiamo a che fare con un enzima che non presenta cooperatività: l'equazione cinetica è quella di una iperbole con costante di dissociazione intrinseca del complesso uguale a  $K_R$ , in quanto l'unica forma enzimatica presente è  $R_0$ . Per un valore infinito di  $L$ , si individua un enzima presente nella sola conformazione  $T_0$  che ha ancora una volta una cinetica iperbolica e che lavora con una costante intrinseca di dissociazione  $K_T$ .

Nell'equazione generale infatti, per  $L \rightarrow \infty$ , i termini  $\alpha(1+\alpha)$  al numeratore e  $(1+\alpha)^2$  al denominatore diventano quantitativamente trascurabili rispetto ai termini che appaiono moltiplicati per  $L$ ; l'equazione si riduce quindi a:

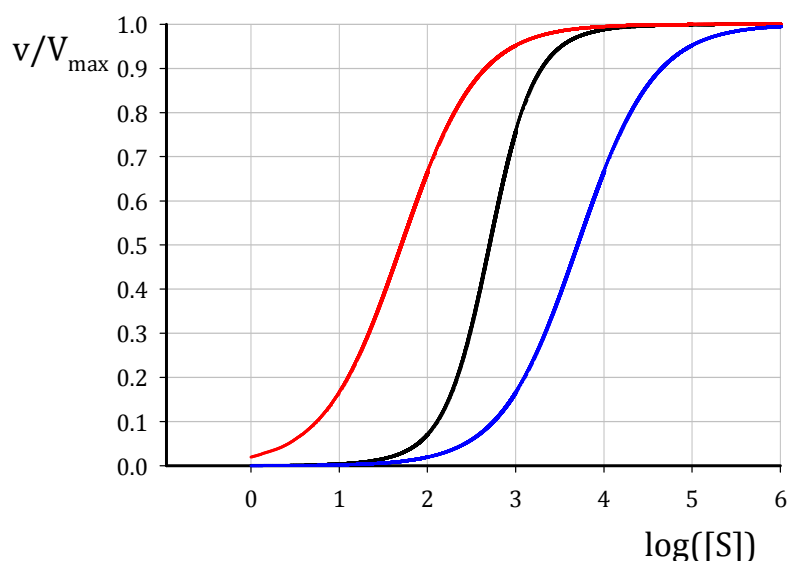
$$L \rightarrow \infty; \frac{v}{V_{\max}} = \frac{\alpha c L (1 + \alpha)}{L (1 + \alpha)^2} = \frac{\alpha c}{(1 + \alpha)} = \frac{c \frac{[S]}{K_R}}{1 + c \frac{[S]}{K_R}}$$

Quindi sia per  $L=0$  che per  $L \rightarrow \infty$  l'equazione è quella di un enzima non-cooperativo: i due enzimi differiscono tra loro per un diverso valore di costante di dissociazione intrinseca. Quando infatti  $0 < c < 1$ , l'iperbole che individua l'enzima con costante di dissociazione  $K_T$  appare più inclinata verso l'asse  $[S]$ . Il rapporto  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]$  è ovviamente per entrambe le curve uguale a **81**. Abbiamo così individuato i due casi estremi nei quali non vi è cooperatività. Come varia la cooperatività per valori intermedi di  $L$  ( $0 < L < \infty$ )?

All'aumentare del valore di  $L$  ci dobbiamo aspettare un aumento della cooperatività, in quanto aumenta la concentrazione dell'enzima in configurazione  $T_0$ ; ma nel caso di enzimi che legano il substrato in modo non-esclusivo, anche la forma  $T_0$  è attiva e la trasformazione del substrato in prodotto da parte della forma  $T_0$  si op-

pone all'effetto cooperativo "spostando l'equilibrio" in favore della forma  $T_0$ . Siamo quindi di fronte a due fenomeni che si oppongono: il legame del substrato con la forma più affine  $R_0$  porta ad un aumento della cooperatività; il legame del substrato con la forma meno affine  $T_0$  provoca invece una diminuzione della cooperatività. All'aumentare di  $L$  quindi, la cooperatività aumenta fino ad un massimo, a partire dal quale un ulteriore aumento di  $L$  rende preponderante la quantità di prodotto che si libera per reazione del substrato con l'enzima in forma  $T_0$ . La cooperatività diminuisce fino al nuovo limite determinato da  $L \rightarrow \infty$ , per il quale abbiamo già visto si individua un enzima non cooperativo e che lavora con una costante di dissociazione intrinseca uguale a  $K_T$ .

Figura 24: Andamento della velocità di reazione in funzione di valori limite della costante allosterica per  $c=0.01$ . Per  $L=0$  (curva a sinistra) e  $L=\infty$ : enzima Michaelis-Menten (curva al centro). Per  $L=100$ : enzima allosterico (curva a destra).



Un enzima allosterico formato da due subunità ( $n=2$ ) raggiunge la massima cooperatività quando  $Lc=1$ . In altre parole se  $c=0.01$ , il valore della costante allosterica che determina il massimo della cooperatività deve essere 100 (Figura 24).

La relazione esistente tra il rapporto  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]$ , che può essere considerato una misura dell'effetto cooperativo, e le costanti  $c$  ed  $L$ , può essere derivata risolvendo l'equazione generale per il modello MCW prima per  $v/V_{\max}=0.9$  e poi per  $v/V_{\max}=0.1$ . La relazione è una relazione complessa essendo, nel caso di un dimero, il rapporto tra le soluzioni di due polinomi di secondo grado:

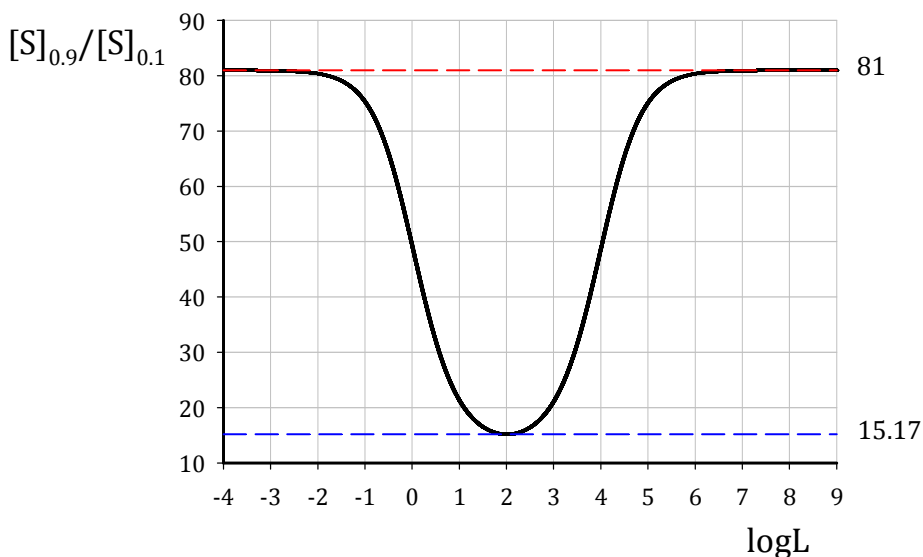
$$\frac{[S_{0.9}]}{[S_{0.1}]} = 9 \frac{(\sqrt{L^2 c^2 + 0.36 L c^2 + 1.28 L c + 0.36 L + 1}) + 0.8(Lc + 1)}{(\sqrt{L^2 c^2 + 0.36 L c^2 + 1.28 L c + 0.36 L + 1}) - 0.8(Lc + 1)}$$

Utilizzando questa relazione siamo ora in grado di descrivere come varia la cooperatività per enzimi che abbiano lo stesso valore del coefficiente di legame non-esclusivo  $c$  in funzione delle loro differenti costanti allosteriche  $L$ .

In figura 25 è riportato il grafico che descrive l'andamento della sigmoidicità in funzione di  $L$  per enzimi con  $c=0.01$ .



Figura 25: Dipendenza del rapporto  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]$  dalla costante allosterica  $L$  per un enzima allosterico con legame non esclusivo del substrato ( $c=0.01$ ).



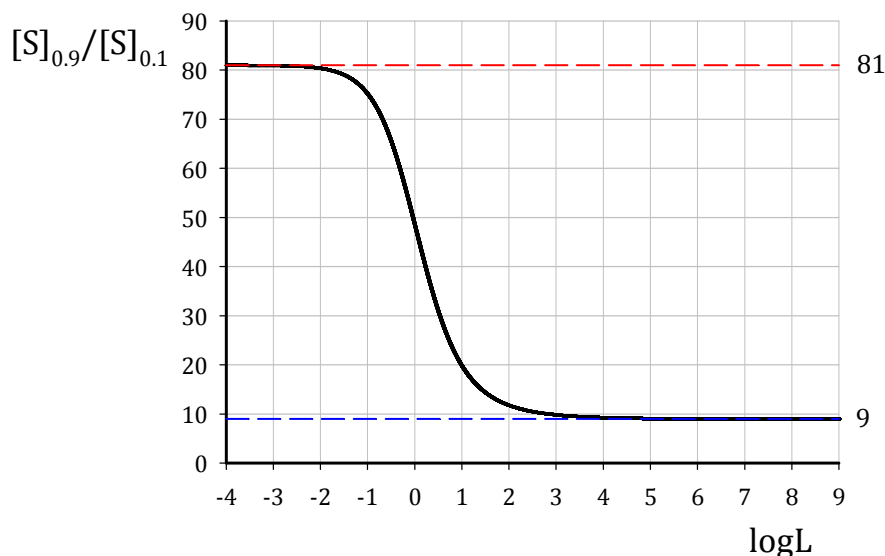
Come si vede per valori di  $L \rightarrow 0$  e  $L \rightarrow \infty$  si hanno enzimi non-cooperativi ( $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]=81$ ). Per  $L=100$  la cooperatività è massima ( $[S_{0.9}]/[S_{0.1}] = 15.17$ ). Per valori di  $L < 100$  e  $L > 100$ , la cooperatività diminuisce.

Per enzimi con legame del substrato esclusivo ( $c=0$ ) il rapporto  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]$  in funzione di  $L$  è dato dalla più semplice relazione:

$$\frac{[S_{0.9}]}{[S_{0.1}]} = 9 \frac{(\sqrt{0.36L + 1}) + 0.8}{(\sqrt{0.36L + 1}) - 0.8}$$

L'andamento della cooperatività è quello riportato in figura 26.

Figura 26: Dipendenza da  $L$  della cooperatività per un enzima allosterico con legame esclusivo del substrato ( $c=0$ ).

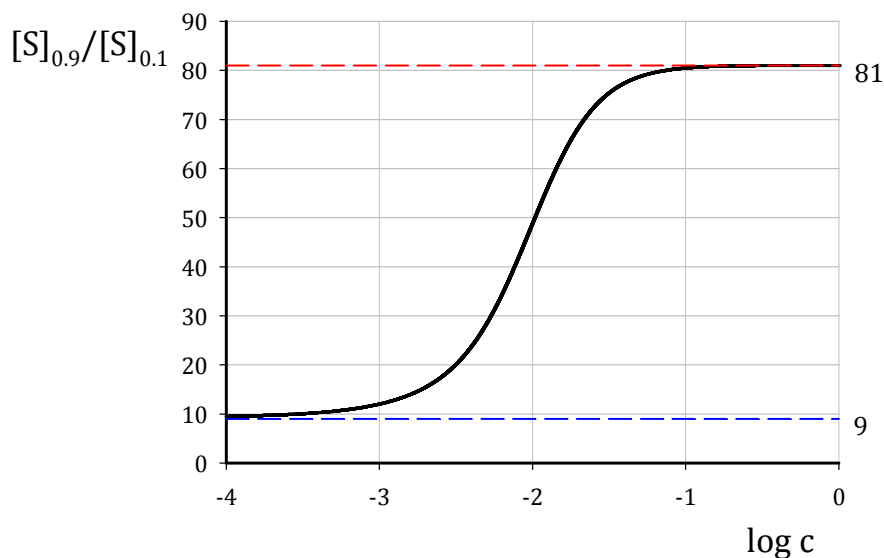


nel caso di un dimero la massima cooperatività si ha per un ipotetico enzima con  $L \rightarrow \infty$  ( $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]=9$ ): un tale enzima, essendo rappresentato dalla sola forma  $T_0$ , forma che non lega il substrato, non avrebbe però alcuna attività.

#### 4.11 Effetto del coefficiente di legame non-esclusivo ( $c$ ) sulla cooperatività.

Utilizzando l'equazione che correla il rapporto  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]$  con  $c$  ed  $L$  non è particolarmente difficile calcolare come la cooperatività vari in funzione di  $c$  per un valore determinato di  $L$ . Nella figura 27 è riportato il caso di un dimero con  $L=10^4$ . Per  $c=1$  l'enzima è un enzima non-cooperativo ( $K_R=K_T$ ;  $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]=81$ ). Al diminuire di  $c$  la cooperatività aumenta fino a raggiungere il massimo per  $c=0$  ( $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]=9$ ).

Figura 27: Dipendenza da  $c$  della cooperatività per un enzima allosterico con  $L=10000$ .



#### 4.12 L'inibizione allosterica con legame esclusivo del substrato e dell'inibitore.

Nel modello a simmetria concertata (MCW) un inibitore è una sostanza che si lega preferenzialmente alla forma  $T_0$ . La formazione dei complessi TI allontana dall'equilibrio  $R_0 \rightleftharpoons T_0$  dell'enzima in forma  $T_0$ : l'equilibrio viene ristabilito dalla trasformazione  $R_0 \rightarrow T_0$ .

Dunque in presenza di un inibitore allosterico meno enzima  $R_0$  è presente.

Consideriamo ora un enzima che abbia un legame esclusivo col substrato ( $c=0$ ) e che abbia un legame esclusivo anche con l'inibitore (I si lega solo alla forma  $T_0$ ). In presenza di substrato ed inibitore l'enzima è presente in soluzione oltre che nelle due forme libere  $R_0$  e  $T_0$ , in forma di complessi RS e TI.

Non è difficile dimostrare (vedi il caso di un dimero) che in presenza dell'inibitore la costante allosterica  $L$  sarà aumentata di un fattore  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)^n$  dove  $n$  è il numero delle subunità. L'equazione generale per un enzima allosterico con legame esclusivo del substrato e dell'inibitore è la seguente:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + c\alpha)^n + L\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)^n} \quad 4.6$$

Con  $L\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)^n = L'$  è la costante allosterica apparente.

All'aumentare della concentrazione dell'inibitore la costante allosterica apparente  $L'$  aumenta, per cui aumenta l'effetto cooperativo. A concentrazioni elevate di inibitore l'enzima esisterà però prevalentemente nella forma T che però è cataliticamente inattiva.

#### 4.13 L'attivazione allosterica con legame esclusivo del substrato e dell'attivatore.

Un attivatore è una sostanza che si lega preferenzialmente alla forma  $R_0$  in un sito però differente da quello del substrato. Analogamente al substrato l'attivatore sposta l'equilibrio delle forme in favore della forma  $R_0$ . Nel caso di un enzima che leghi esclusivamente alla forma  $R_0$  tanto il substrato che l'attivatore avremo in soluzione  $T_0$ ,  $R_0$  e tutti i possibili complessi  $RS$ ,  $RA$  ed  $RSA$ . L'equazione cinetica in presenza di un attivatore è la seguente:

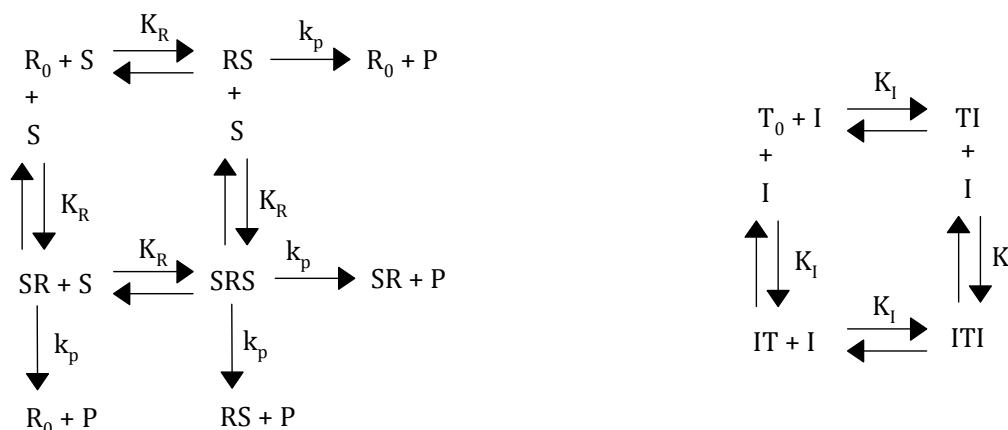
$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + \frac{L}{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^n}} \quad 4.5$$

Dove  $L\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^n$  è la costante allosterica apparente  $L'$ .

All'aumentare della concentrazione dell'attivatore, la costante allosterica apparente  $L'$  diminuisce e quindi diminuisce la cooperatività. Per una concentrazione infinita di attivatore  $L'$  va a zero, per cui la curva di velocità si riduce ad una iperbole e l'enzima non presenta più cooperatività.

#### 4.14 Derivazione dell'equazione cinetica per un dimero con legame esclusivo del substrato e dell'inibitore.

Nel caso di un dimero possiamo scrivere i seguenti equilibri:



Le concentrazioni dei complessi all'equilibrio sono ( $[T_0] = L[R_0]$ ):

$$\begin{aligned}
 [RS] &= [SR] = \frac{[R_0][S]}{K_R} = [R_0]\alpha & [TI] &= [IT] = \frac{[T_0][I]}{K_I} = [R_0]L\frac{[I]}{K_I} \\
 [SRS] &= \frac{[SR][S]}{K_R} = \frac{[R_0][S]^2}{K_R^2} = [R_0]\alpha^2 & [ITI] &= \frac{[T_0][I]}{K_I} = \frac{[T_0][I]^2}{K_I^2} = [R_0]L\frac{[I]^2}{K_I^2}
 \end{aligned}$$

La velocità di reazione è.

$$v = k_p[RS] + k_p[SR] + 2k_p[SRS] \quad 4.7$$

L'enzima totale è:

$$[E_{\text{tot}}] = [R_0] + [RS] + [SR] + [SRS] + [T_0] + [TI] + [IT] + [ITI] \quad 4.8$$

Dividendo 4.7 per la 4.8:

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{2k_p[RS] + 2k_p[SRS]}{[R_0] + 2[RS] + [SRS] + [T_0] + 2[TI] + [ITI]}$$

e sostituendo opportunamente si ottiene:

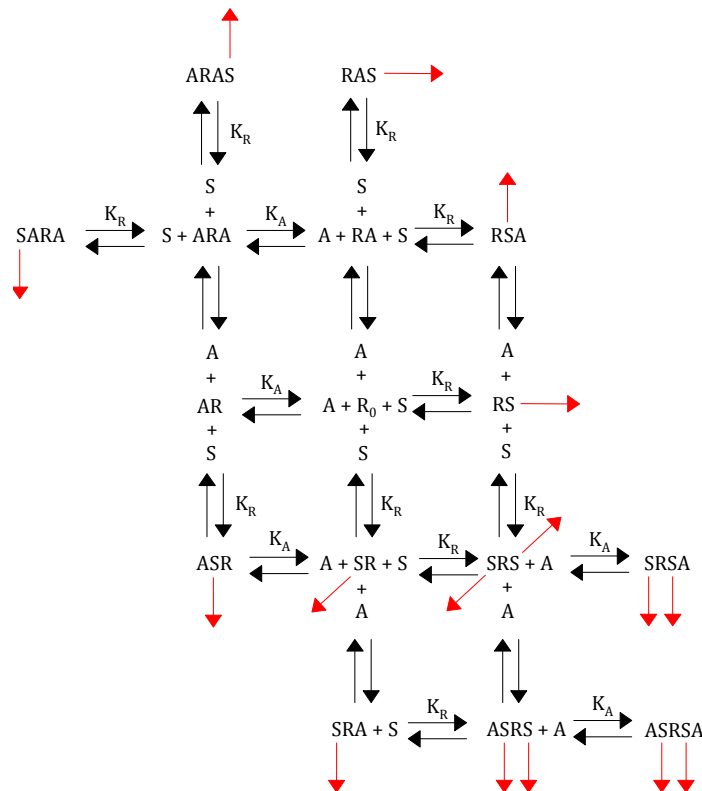
$$\begin{aligned} \frac{v}{[E_{tot}]} &= \frac{2k_p[R_0]\alpha + 2k_p[R_0]\alpha^2}{[R_0] + 2[R_0]\alpha + [R_0]\alpha^2 + [R_0]L + 2[R_0]L\frac{[I]}{K_I} + [R_0]L\frac{[I]^2}{K_I^2}} = \\ &= \frac{2k_p\alpha + 2k_p\alpha^2}{1 + 2\alpha + \alpha^2 + L + 2L\frac{[I]}{K_I} + L\frac{[I]^2}{K_I^2}} = \frac{2k_p\alpha(1 + \alpha)}{(1 + \alpha^2) + L\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)^2} \\ \frac{v}{2k_p[E_{tot}]} &= \frac{\alpha(1 + \alpha)}{(1 + \alpha^2) + L\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)^2} \end{aligned}$$

si arriva all'equazione finale:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\alpha(1 + \alpha)}{(1 + \alpha^2) + L\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)^2} \tag{4.9}$$

**4.15 Derivazione dell'equazione cinetica per un dimero con legame esclusivo del substrato e dell'attivatore.**

Nel caso di un dimero possiamo scrivere i seguenti equilibri:



Dove le frecce rosse rappresentano i punti di formazione di prodotto.

Le concentrazioni dei complessi all'equilibrio sono (ricorda che  $[T_0] = L[R_0]$ ):

$$\begin{aligned}
 [RS] &= [SR] = \frac{[R_0][S]}{K_R} = [R_0]\alpha & [AR] &= [RA] = [R_0] \\
 [SRS] &= \frac{[SR][S]}{K_R} = \frac{[R_0][S]^2}{K_R^2} = [R_0]\alpha^2 & [ARA] &= \frac{[AR][S]}{K_A} = [R_0] \frac{[A][A]}{K_A K_A} = [R_0] \frac{[A]^2}{K_A^2} \\
 [RAS] &= [ASR] = [SRA] = [RSA] = \frac{[SR][A]}{K_A} = & [SRSA] &= [ASRS] = \frac{[SRS][A]}{K_A} = [R_0]\alpha^2 \frac{[A]}{K_A} \\
 &= [R_0]\alpha \frac{[A]}{K_A} & & \\
 [ARAS] &= [SARA] = \frac{[ARA][S]}{K_S} = [R_0]\alpha \frac{[A]^2}{K_A^2} & [ARASA] &= \frac{[SRSA][A]}{K_{SA}} = [R_0]\alpha^2 \frac{[A]^2}{K_A^2}
 \end{aligned}$$

La velocità di reazione è:

$$v = 2k_p[SR] + 2k_p[SRS] + 4k_p[RAS] + 4k_p[SRSA] + 2k_p[ARAS] + 2k_p[ASRSA] \quad 4.10$$

L'enzima totale è:

$$[E_{tot}] = [R_0] + 2[RS] + [SRS] + 4[RAS] + 2[SRSA] + 2[ARAS] + [ASRSA] + 2[AR] + [ARA] + [T_0] \quad 4.11$$

Dividendo la 4.10 per la 4.11:

$$\frac{v}{[E_{tot}]} = \frac{2k_p[SR] + 2k_p[SRS] + 4k_p[RAS] + 4k_p[SRSA] + 2k_p[ARAS] + 2k_p[ASRSA]}{[R_0] + 2[RS] + [SRS] + 4[RAS] + 2[SRSA] + 2[ARAS] + [ASRSA] + 2[AR] + [ARA] + [T_0]}$$

e sostituendo opportunamente si ha:

$$\begin{aligned}
 \frac{v}{2k_p[E_{tot}]} &= \frac{[R_0]\alpha + [R_0]\alpha^2 + 2[R_0]\alpha \frac{[A]}{K_A} + 2[R_0]\alpha^2 \frac{[A]}{K_A} + 2[R_0]\alpha^2 \frac{[A]^2}{K_A^2} + [R_0]\alpha^2 \frac{[A]^2}{K_A^2}}{[R_0] + 2[R_0]\alpha + [R_0]\alpha^2 + 4[R_0]\alpha \frac{[A]}{K_A} + 2[R_0]\alpha^2 \frac{[A]}{K_A} + 2[R_0]\alpha \frac{[A]^2}{K_A^2} +} \\
 &\quad + [R_0]\alpha^2 \frac{[A]^2}{K_A^2} + 2[R_0] \frac{[A]}{K_A} + [R_0] \frac{[A]^2}{K_A^2} [R_0] + L[R_0]
 \end{aligned}$$

da cui dividendo per  $[R_0]$  si ottiene:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\alpha + \alpha^2 + 2\alpha \frac{[A]}{K_A} + 2\alpha^2 \frac{[A]}{K_A} + 2\alpha^2 \frac{[A]^2}{K_A^2} + \alpha^2 \frac{[A]^2}{K_A^2}}{1 + 2\alpha + \alpha^2 + 4\alpha \frac{[A]}{K_A} + 2\alpha^2 \frac{[A]}{K_A} + 2\alpha \frac{[A]^2}{K_A^2} + \alpha^2 \frac{[A]^2}{K_A^2} + 2 \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A]^2}{K_A^2} + L}$$

e raccogliendo opportunamente:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{(\alpha + \alpha^2) \left(1 + 2 \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A]^2}{K_A^2}\right)}{(1 + 2\alpha + \alpha^2) \left(1 + 2 \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A]^2}{K_A^2}\right) + L} = \frac{a(1 + \alpha) \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^2}{(1 + \alpha)^2 \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^2 + L}$$

e dividendo per  $\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^2$  si arriva all'equazione finale:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\alpha(1 + \alpha)}{(1 + \alpha)^2 + \frac{L}{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^2}} \quad 4.12$$

#### 4.16 Enzimi allosterici con legame non-esclusivo del substrato e dell'effettore.

Abbiamo appena visto che un inibitore allosterico legandosi alla forma  $T_0$  di un enzima che abbia esclusività di legame sia substrato che dell'inibitore provoca un aumento dell'effetto allosterico; mentre un attivatore legandosi alla sola forma  $R_0$  ne provoca una diminuzione.

Quando si abbia a che fare con enzimi che leghino sia il substrato che l'effettore allosterico ad entrambe le forme (enzimi quindi con legame non-esclusivo del substrato e dell'effettore) la situazione si complica ed anche i termini inibitore ed attivatore diventano poco chiari.

Continueremo a chiamare inibitore una qualunque sostanza che si leghi preferenzialmente alla forma  $T_0$  ed attivatore una sostanza che si leghi preferenzialmente alla forma  $R_0$ , nonostante vedremo che sia l'uno che l'altro possono far aumentare o diminuire la cooperatività a seconda che l'enzima, in assenza di essi, sia già o meno al massimo delle sue capacità allosteriche. L'equazione generale in presenza di effettore non-esclusivo, per un enzima che abbia pure legame non-esclusivo del substrato è la seguente:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{L'\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{L'(1 + \alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

dove la costante allosterica apparente  $L' = \frac{(1+e\gamma)^n}{(1+\gamma)^n} L$

nel caso di un inibitore:  $\gamma = \frac{[I]}{K_{IT}}$  ed  $e = \frac{K_{IR}}{K_{IT}}$  ( $e > 1$  in quanto l'inibitore ha maggior affinità per la forma  $T_0$ ).

Nel caso di un attivatore:  $\gamma = \frac{[A]}{K_{AR}}$  ed  $e = \frac{K_{AR}}{K_{AT}}$  ( $e < 1$  in quanto l'attivatore ha maggior affinità per la forma  $R_0$ ).

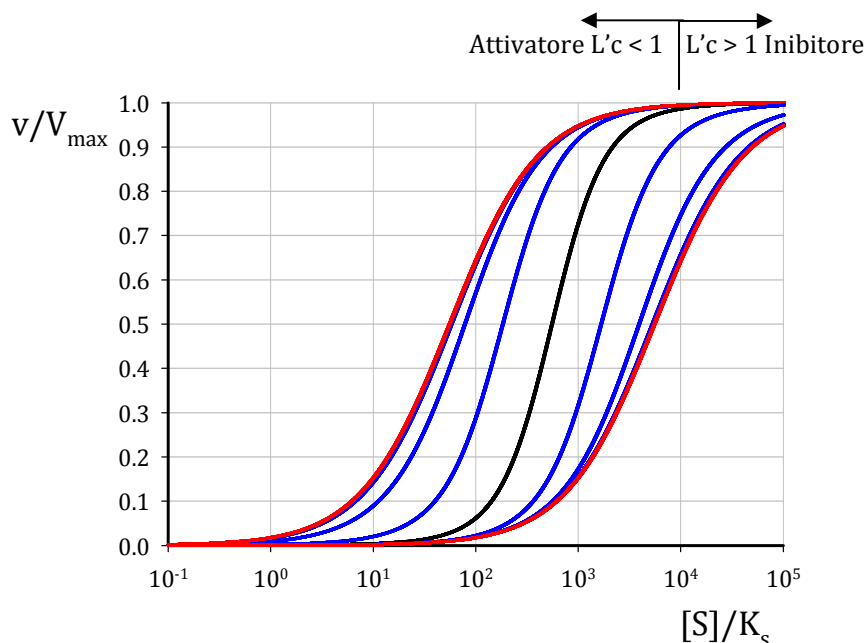
In presenza di un inibitore il rapporto per cui è moltiplicata la costante allosterica  $L$  ha un valore maggiore di 1 e quindi la costante allosterica apparente  $L'$  aumenta all'aumentare della concentrazione dell'inibitore.

Per quanto riguarda l'andamento della costante allosterica apparente all'aumentare della concentrazione dell'effettore, esso è lo stesso nel caso di enzimi a legame esclusivo e di enzimi a legame non-esclusivo.

Per comprendere se ad un aumento o ad una diminuzione del valore della costante  $L'$  corrisponda, anche nel caso di enzimi a legame non-esclusivo, un aumento o una diminuzione dell'effetto allosterico, conviene prendere in considerazione differenti situazioni possibili.

Immaginiamo in primo luogo di avere a che fare con un enzima allosterico (sempre a legame non-esclusivo) che in assenza di qualunque effettore sia già al massimo effetto cooperativo ( $Lc=1$  per un dimero,  $Lc^2=1$  per un tetramero, e per un enzima con  $n$  subunità  $Lc^{n/2}=1$ ) (Figura 28).

Figura 28: Dipendenza della velocità normalizzata da  $[S]/K_s$  per un enzima allosterico a legame non-esclusivo per differenti valori di  $L_c$ .



Avendo presente come varia la cooperatività in funzione di  $L$  diviene subito chiaro che sia l'inibitore che l'attivatore provocano una diminuzione dell'effetto allosterico: in questo caso mentre l'attivatore si comporta come in un sistema a legame esclusivo, l'inibitore ha un effetto opposto. I termini attivatore ed inibitore restano validi solo per quanto riguarda il loro effetto sulla velocità a concentrazioni non saturanti di substrato: un inibitore provoca sempre, a parità di concentrazione di substrato una diminuzione della velocità; l'attivatore ha un effetto inverso.

Immaginiamo ora di avere a che fare con un enzima che non sia al massimo effetto cooperativo, con un valore di  $L' < L$  (per cui  $L_c < 1$ ). Questa situazione è quella riportata nella figura 28 dove sono riportate nella curva centrale la dipendenza della velocità di reazione normalizzata per  $L_c = 1$ ; nella curva più a sinistra la risposta dell'enzima completamente attivato (forma R) e nella curva più a destra l'enzima nella forma T. Le curve comprese fra  $L_c = 1$  e la forma R rappresentano diversi livelli di attivazione ( $L_c < 1$ ) mentre quelle a sinistra diversi livelli di inibizione ( $L_c > 1$ ).

Mentre un attivatore provoca come nel caso precedente una diminuzione dell'effetto cooperativo, un inibitore ha un duplice effetto: fino alla concentrazione che fa aumentare la  $L'$  ad un valore per cui  $L'_c = 1$ , l'effetto dell'inibitore è di far aumentare l'effetto cooperativo; ulteriori aumenti della concentrazione dell'inibitore fanno diminuire l'effetto cooperativo fino ad annullarlo completamente (l'enzima lavora solo in forma T).

Nel caso di un enzima per il quale  $L_c > 1$  un inibitore, qualunque sia la sua concentrazione, provoca una diminuzione dell'effetto allosterico; un attivatore, invece lo fa aumentare fino a quando  $L'_c = 1$ . Da questo punto in poi l'effetto allosterico torna a diminuire, fino a scomparire del tutto.

In tutti e tre i casi considerati una concentrazione saturante di attivatore o di inibitore, trasformano l'enzima nella forma  $R_0$  e  $T_0$  rispettivamente ed esso seguirà una cinetica iperbolica con costante di dissociazione intrinseca  $K_R$  in un caso e  $K_T$  nell'altro.

Inoltre il modello a simmetria concertata non prevede l'effetto cooperativo negativo da parte del substrato. Il modello a simmetria concertata appare però estremamente duttile nel fornire adeguate spiegazioni di molte delle proprietà degli enzimi allosterici.

### **5. Considerazioni finali.**

Per ogni valore di  $K_R$ ,  $L$  e  $c$  del modello a simmetria concertata possono essere calcolati i corrispondenti valori di  $K_S$ ,  $a$ ,  $b$  e  $c$  del modello ad interazione sequenziale. In altri termini le equazioni di velocità derivate separatamente nei due modelli descrivono lo stesso fenomeno. Ciononostante il modello ad interazione sequenziale è più generale del modello a simmetria concertata in quanto la sua equazione è valida per molte combinazioni di  $a$ ,  $b$  e  $c$ , per le quali non esistono i corrispondenti valori di  $L$  e  $c$ . Persino valori uguali di  $a$ ,  $b$  e  $c$  (diversi da 1) non sono ammessi nel modello a simmetria concertata.

---



## 6. Bibliografia

### *Bibliografia citata.*

1. Henri, V. (1903) *"Lois Générales de l'Action des Diastases"*. Paris Hermann.
2. Henri, V. (1902) *"Théorie générale de l'action de quelques diastases"*. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences **135**, 916–919.
3. Michaelis, L., Menten, M.L. (1913). *"Die Kinetik der Invertinwirkung"*. Biochemistry Zeitung **49**, 333–369.
4. Briggs, G.E., Haldane, J.B. (1925) *"A Note on the Kinetics of Enzyme Action"*. Biochemical Journal **19**, 338-339.
5. Lineweaver, H., Burk, D. (1934) *"The Determination of Enzyme Dissociation Constants"*. Journal of the American Chemical Society. **56** (3), 658–666.
6. Atkins, G.L., Nimmo, I.A. (1975) *"A Comparison of Seven Methods for Fitting the Michaelis-Menten Equation"*. Biochemical Journal **149**, 775-777.
7. Eadie, G.S. (1942) *"The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine"*. Journal of Biological Chemistry. **146**, 85–93.
8. Hofstee, B.H.J. (1959) *"Non-Inverted Versus Inverted Plots in Enzyme Kinetics"*. Nature. **184** (4695), 1296–1298.
9. Koshland, D.E.Jr, Némethy, G., Filmer, D. (1966) *"Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits"*. Biochemistry. **5** (1), 365-385.
10. Monod, J., Wyman, J., Changeux J.P. (1965) *"On the nature of allosteric transitions: a plausible model"*. Journal of Molecular Biology. **12**, 88-118.

### *Per approfondire.*

- A. Bohr C., Hasselbalch K., Krogh A. (1904) *"Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. Skandinavisches"*. Arch Physiol **16**: 402–412.
- B. Hill, A. V. (1910) *"The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves"*. J. Physiol. **40** (Suppl), iv–vii.
- C. Van Slyke, D. D., and Cullen, G. E. (1914) *"The Mode of Action of Urease and of Enzymes in General"*, J Biol Chem **19**, 141-180.
- D. Rubin M.M., Changeux JP. (1966) *"On the Nature of Allosteric Transitions: Implications of Non-exclusive Ligand Binding"*. J. Mol. Biol. **21**, 265-274.
- E. Changeux JP., Thiéry J., Tung Y., Kittel C. (1967) *"On the cooperativity of biological membranes"*. Proc Natl Acad Sci USA **57**, 335–341.
- F. Morrison J.F. (1969) *"Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors"*. BBA - Enzymology **185**, (2), 269-286.
- G. J N Weiss J.N. (1997) *"The Hill equation revisited: uses and misuses"*. FASEB J **11**, 835-841.
- H. Murphy D.J. (2004) *"Determination of accurate KI values for tight-binding enzyme inhibitors: an in silico study of experimental error and assay design"*. Analytical Biochemistry **327**, 61–67
- I. Changeux JP., Stuart J., Edelstein S.J. (2005) *"Allosteric Mechanisms of Signal Transduction"*. Science **308**, (5727), 1424-1428.
- J. Najdi T.S., Yang C.R., Shapiro B.E., Hatfield G.W., Mjolsness E.D. (2006) *"Application of a generalized MWC model for the mathematical simulation of metabolic pathways regulated by allosteric enzymes"*. J. Bioinform. Comput. Biol. **4**, 335–355.
- K. Stefan M.I., Le Nove,N. (2013) *"Cooperative Binding"*. PLOS Computational Biology **9**, e1003106.

**Indice delle figure**

Figura 1: Dipendenza della velocità di reazione da $[A]$ e $[B]$ .....	2
Figura 2: Leonor Michaelis (1875-1949) e Maud Menten (1879-1960).....	3
Figura 3: Dipendenza delle concentrazioni (normalizzate) di S, P, E ed ES dal tempo.....	4
Figura 4: Dipendenza della velocità di reazione da $[S]$ per una reazione enzimatica ad un solo substrato.....	8
Figura 5: Variazione dell'energia libera in funzione dell'affinità tra enzima e substrato.....	14
Figura 6: Variazione dell'energia libera in funzione dell'affinità tra enzima e substrato a bassa concentrazione di substrato.....	14
Figura 7: Diagramma di Lineweaver-Burk.....	16
Figura 8: Diagramma di Eadie-Hofstee.....	17
Figura 9: Substrato e inibitore della succinato deidrogenasi (EC 1.3.5.1).....	18
Figura 10: Sulfonilamide: inibitore dell'utilizzo dell'acido p-aminobenzoico come precursore nella biosintesi dell'acido folico.....	18
Figura 11: Inibizione competitiva.....	20
Figura 12: Diagramma di Lineweaver-Burk per inibizione competitiva.....	21
Figura 13: Lo studio della dipendenza di $V_{max}$ da $[E]$ permette di differenziare l'inibizione non competitiva dall'inibizione irreversibile.....	22
Figura 14: Inibizione non competitiva.....	23
Figura 15: Diagramma di Lineweaver-Burk per inibizione non competitiva.....	23
Figura 16: Inibizione acompetitiva.....	25
Figura 17: Diagramma di Lineweaver-Burk per inibizione acompetitiva.....	25
Figura 18: Dipendenza della velocità di reazione relativa da $[S]$ in presenza di siti multipli cooperativi.....	32
Figura 19: Influenza del fattore di interazione $a$ sulla cooperatività in un dimero con $b = c = 1$ .....	36
Figura 20: Enzimi con medesimi fattori di interazione ( $a=0.05$ , $b=0.1$ e $c=0.1$ ) con $K_s$ crescente da sinistra verso destra.....	37
Figura 21: Un dimero con un fattore di interazione $a=0.05$ ha una sigmoidicità inferiore a quella di un tetramero con il medesimo fattore di interazione.....	37
Figura 22: Enzimi allosterici con $n=2$ , $d=0.1$ e $d = 100$ paragonati ad un enzima non allosterico ( $d=1$ ). ( $K_s=2$ mM). 39	39
Figura 23: Andamento della velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato a diversi valori della costante allosterica $L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$ . Per valori di $L>0$ il comportamento è allosterico mentre per $L=0$ l'enzima si comporta seguendo Michaelis-Menten.....	43
Figura 24: Andamento della velocità di reazione in funzione di valori limite della costante allosterica per $c=0.01$ . Per $L=0$ (curva a sinistra) e $L=\infty$ : enzima Michaelis-Menten (curva al centro). Per $L=100$ : enzima allosterico (curva a destra).....	44
Figura 25: Dipendenza del rapporto $[S_{0.9}]/[S_{0.1}]$ dalla costante allosterica $L$ per un enzima allosterico con legame non esclusivo del substrato ( $c=0.01$ ).....	45
Figura 26: Dipendenza da $L$ della cooperatività per un enzima allosterico con legame esclusivo del substrato ( $c=0$ ). .....	45
Figura 27: Dipendenza da $c$ della cooperatività per un enzima allosterico con $L=10000$ .....	46
Figura 28: Dipendenza della velocità normalizzata da $[S]/K_s$ per un enzima allosterico a legame non-esclusivo per differenti valori di $Lc$ .....	51

