

PRINCIPI ELEMENTARI DI ENZIMOLOGIA

A. Bellelli, Dipartimento di Scienze Biochimiche "A. Rossi Fanelli", Università di Roma Sapienza

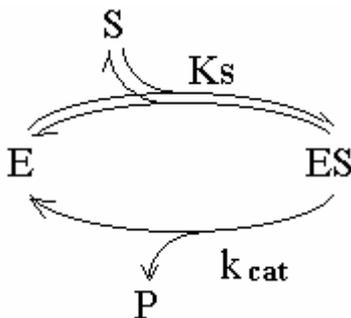
Come tutti sanno, gli enzimi sono proteine semplici o coniugate capaci di catalizzare una reazione biochimica. L'enzimologia, studio del meccanismo catalitico degli enzimi, è una branca importante della biochimica e a seconda del caso in esame può rivelarsi alquanto complessa; per questo per alcuni anni ho tenuto un breve corso monografico sull'argomento per la Scuola di Dottorato in Scienze Biochimiche, le cui lezioni sono raccolte in questo documento.

1. STUDIO DELLO STATO STAZIONARIO.

Lo stato stazionario è la condizione nella quale l'enzima catalizza la trasformazione del substrato a velocità costante, con ordine di reazione apparente uguale a zero. In questa condizione la miscela delle varie specie chimiche in cui può trovarsi l'enzima ha composizione costante (stato di pseudo-equilibrio). Lo stato stazionario può essere descritto da modelli più o meno complessi e in questa prima parte del corso monografico si assumerà lo schema di reazione più semplice, originariamente formulato da Michaelis e Menten nel 1927. Schemi più complessi saranno descritti nelle lezioni successive. Qualunque sia lo schema di reazione adottato, questo può essere trattato algebricamente in due modi distinti: l'approssimazione dello **pseudo-equilibrio** o il metodo analitico del **non equilibrio**. La prima è più semplice e pertanto sarà analizzata per prima. E' molto importante considerare che il trattamento semplificato non deve essere preferito perché "semplice" da descrivere; deve essere preferito, quando possibile perché comporta l'uso di un minor numero di parametri e pertanto è più resistente agli errori di misura.

1.1 Il modello di Michaelis e Menten nella sua forma originale.

Data la reazione chimica irreversibile $S \rightarrow P$, l'enzima forma rapidamente un complesso reversibile col substrato, e la trasformazione irreversibile avviene lentamente all'interno di esso. Questo modello è il primo e più semplice di una serie che definiamo di **pseudo-equilibrio** ed è rappresentato come: $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$; oppure in forma più gradevole all'occhio:



L'approssimazione dello pseudo-equilibrio riferisce ad una condizione sperimentale in cui l'enzima si combina con il suo substrato e si dissocia da questo molto più rapidamente di quanto non ne catalizzi la trasformazione. L'atto catalitico drena istante per istante una piccola frazione delle molecole di enzima presenti nella forma di complesso di Michaelis (ES) e queste vengono rapidamente rimpiazzate. La combinazione reversibile dell'enzima col suo substrato segue la legge di azione delle masse, e la costante di equilibrio può essere scritta sia per la formazione che per la dissociazione del complesso; poiché in genere la seconda è preferita, sarà utilizzata quest'ultima:



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

L'eq. [1.1] può essere riarrangiata così:



Il termine $[E] / [ES]$ è equivalente al rapporto tra le frazioni del complesso dissociato ed indissociato, $\alpha / (1-\alpha)$, e dall'equazione [1.2] è possibile calcolare la frazione di enzima che si trova nella forma del complesso con il substrato (si veda la nota¹):

$$[ES] / ([E] + [ES]) = [ES] / [E_{tot}] = [S] / (K_S + [S]) \quad [1.3]$$

La rappresentazione grafica dell'equazione [1.3] è un'iperbole equilatera (fig.1) con $[S]$ per ascissa, la frazione di $[ES]$ per ordinata, inizio nell'origine (per $[S]=0$ si ha anche $[ES]=0$) ed asintoto pari ad 1 (se $[S] \gg K_S$ si ha che $[ES] / [E]_{tot}$ tende ad 1). Si noti che l'ascissa del grafico dovrebbe riportare la concentrazione del substrato libero ad equilibrio (cioè non combinato con la proteina). Però poiché si è assunto che la concentrazione del substrato eccede largamente quella dell'enzima, si può riportare sull'ascissa del grafico $[S]_{tot}$ al posto di $[S]$.

La concentrazione di substrato necessaria per ottenere $[E] = [ES]$ (e quindi $[ES] / [E]_{tot} = 0,5$) è definita $[S]_{50}$; dall'equazione [1.3] si ricava: $[S]_{50} = K_S$

E' importante notare che K_S ha per dimensioni una concentrazione ed è pertanto *omogenea* con $[S]$.

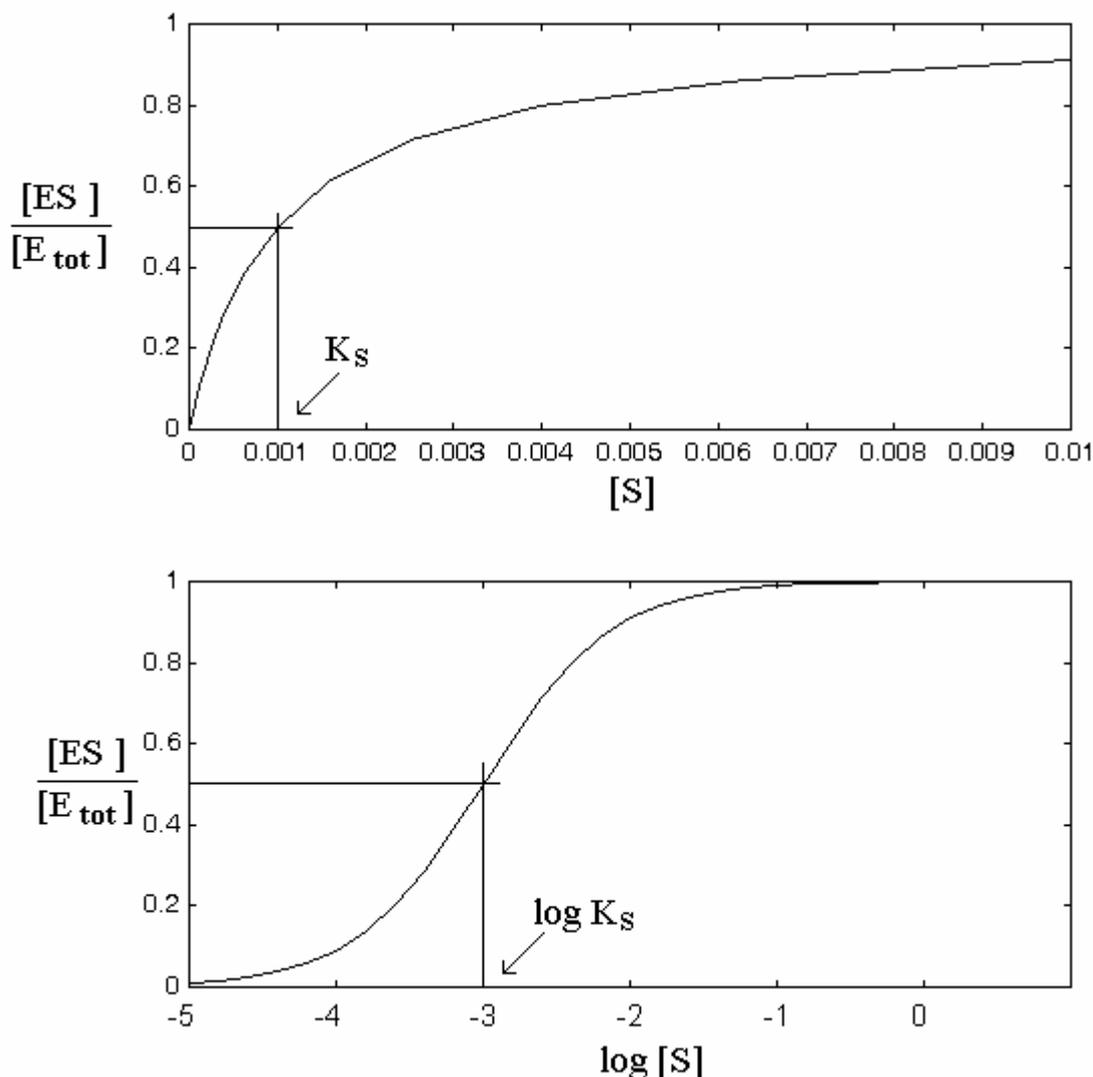


Figura 1: frazione di saturazione dell'enzima con il suo substrato.

¹: Per ricavare la relazione [1.3] conviene procedere come segue:

si definisce $[E]_{tot} = [E] + [ES]$ per ricavare che $[E] = [E]_{tot} - [ES]$; sostituendo $[E]$ con $[E]_{tot} - [ES]$ si ha:
 $[ES] / ([E]_{tot} - [ES]) = [S] / K_S$; $[ES] = [E]_{tot} [S] / K_S - [ES] [S] / K_S$;
 $[ES] (1 + [S] / K_S) = [E]_{tot} [S] / K_S$; quest'ultima equazione conduce facilmente alla [1.3]

L'atto catalitico è dato dal decadimento produttivo di ES secondo la reazione: $ES \rightarrow E + P$; questa è evidentemente una reazione di primo ordine con velocità pari a:

$$v = \delta [P] / \delta t = [ES] k_{cat} \quad [1.4]$$

sostituendo [ES] con l'eq. [1.3] e tenendo conto che $[E_{tot}] = [E] + [ES]$ si ottiene:

$$v = [E_{tot}] [S] k_{cat} / ([S] + K_S) \quad [1.5]$$

L'ordine di reazione che si ricava dalle eq. 1.4 e 1.5 è pari a zero (fig.2; si veda anche la nota²) perché a stato stazionario la concentrazione di ES è approssimativamente costante su piccoli intervalli di tempo, almeno nelle condizioni sperimentali più comuni ($[S] \gg [E_{tot}]$).

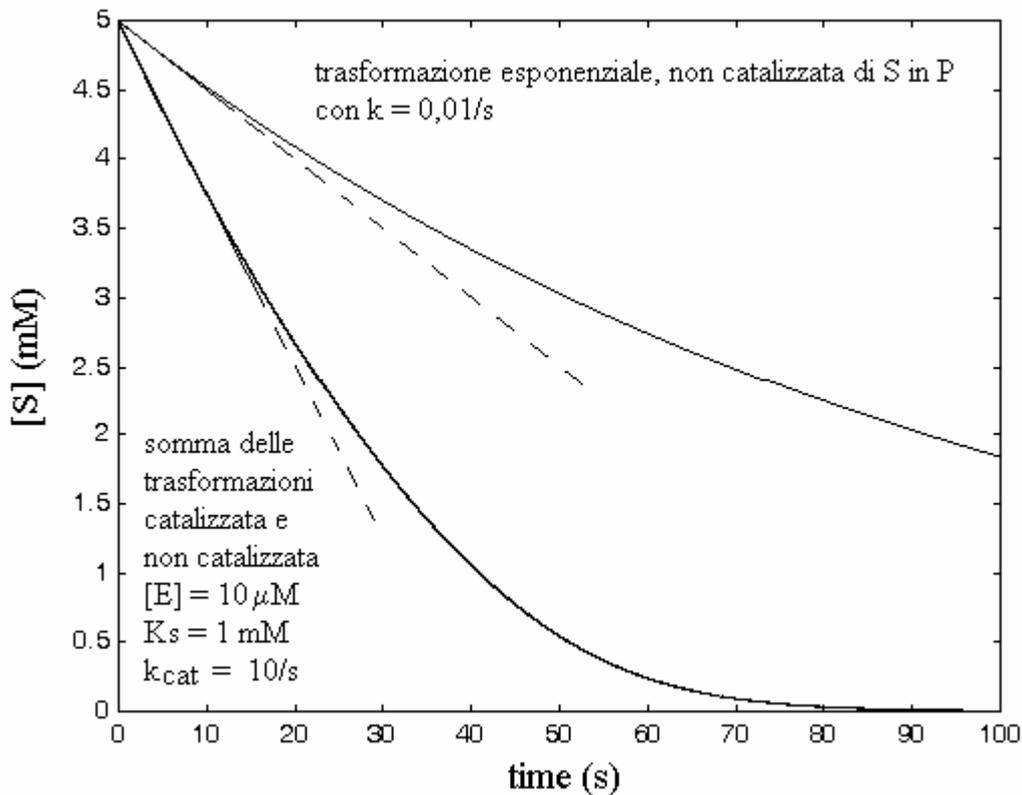


Figura 2: cinetica di ordine zero per la reazione catalizzata di primo ordine per la reazione non catalizzata.

Poiché la velocità della reazione catalizzata è proporzionale alla concentrazione del complesso ES, essa è una funzione iperbolica della concentrazione del reagente, che riflette la dipendenza di [ES] da [S] (si confrontino le fig. 1 e 3). Per ottenere il grafico di fig.3 occorre ripetere una serie di esperimenti come quello di fig.2 a concentrazione variabile di S (e fissa di E_{tot}). Per velocità della reazione catalizzata si deve prendere la linearizzazione della velocità iniziale (come evidenziata dalla linea tratteggiata in fig.2), sottratta della velocità della reazione spontanea. La linearizzazione del decadimento spontaneo del substrato nel tempo dà una stima soltanto approssimativa della

²: per ottenere i grafici di Fig.2 ho usato la funzione ode45 del programma Matlab con la seguente subroutine:

```
% enzil.m ; usage: >> [t,x]=ode45('enzil',t,x)
% modello: E + S <=> ES --> E + P
%      x1  x2   x3          x4 ; k1, k2, k3
%      S --> P  k0
function dx=enzi1(t,x);
k1=1e6; k2=1000; k3=10; k0=1e-2;
dx(1,1)=x(3)*(k2+k3) - x(1)*x(2)*k1 ;
dx(2,1)=x(3)*k2 - x(1)*x(2)*k1 - x(2)*k0;
dx(3,1)=x(1)*x(2)*k1 - x(3)*(k2+k3);
dx(4,1)=x(3)*k3 + x(2)*k0;
```

velocità di reazione perché il processo è esponenziale (mentre il decadimento catalizzato all'inizio è lineare, come previsto dall'ordine zero). Sia nel grafico di fig.2 che in quello di fig.3 è importante confrontare ciò che avviene in assenza dell'enzima con ciò che avviene in sua presenza.

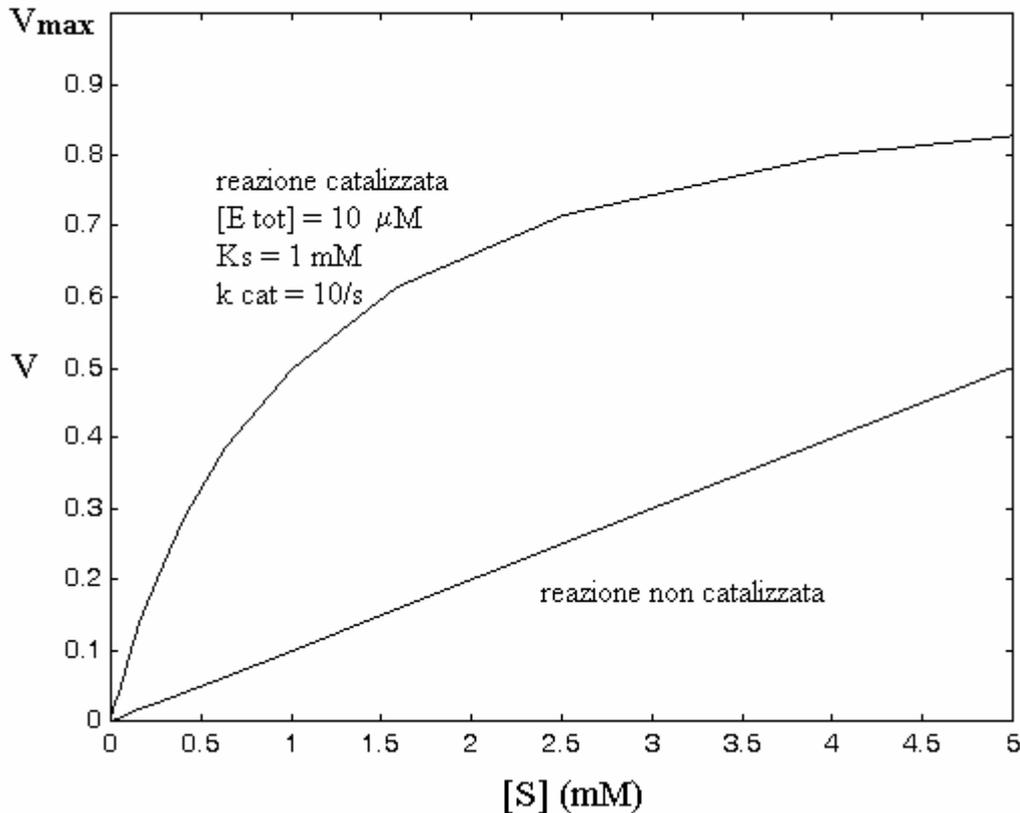
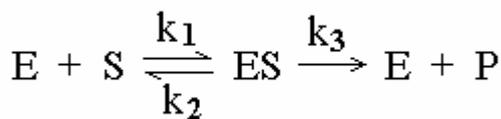


Figura 3: relazione tra la velocità di trasformazione del substrato e la sua concentrazione

1.2 Il modello di Michaelis e Menten per la condizione di non equilibrio.

Se la velocità con la quale l'enzima forma un complesso reversibile con il substrato, e quella con cui il complesso si dissocia con restituzione del substrato o con formazione del prodotto sono tra loro comparabili, non è possibile applicare l'approssimazione dello pseudo-equilibrio ed occorre determinare le tre costanti cinetiche dello schema:



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

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



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



Infine la trasformazione di S in P e la successiva dissociazione di quest'ultimo sono considerate avvenire in un unico processo cinetico di primo ordine con costante caratteristica k_3 ; questa reazione

corrisponde alla trasformazione di S in P e pertanto la sua velocità è quella della reazione in toto, in presenza del catalizzatore, ed è indicata semplicemente come v o come V_{cat} :



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

$$-\delta [\text{ES}] / \delta t = [\text{ES}] (k_2 + k_3) \quad [1.9]$$

Quando la concentrazione del substrato è elevata, il complesso ES che decade viene rapidamente riformato; la sua concentrazione rimane quindi approssimativamente costante (condizione dello stato stazionario). La velocità della reazione [1.8] rimane di conseguenza costante anche su tempi relativamente lunghi ed ha ordine uguale a zero. Il modello di Michaelis e Menten descrive lo stato stazionario, e la sua relazione con la concentrazione di substrato, nei termini seguenti:

$$-\delta [\text{ES}] / \delta t = 0 \quad (\text{a stato stazionario } [\text{ES}] \text{ è approssimativamente costante}) \quad [1.10]$$

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

$$-\delta [\text{E}] / \delta t = 0 \quad [1.11]$$

dall'equazione [1.10] si deduce che la velocità con la quale ES si forma [1.6] deve essere uguale a quella con cui questa specie scompare [1.7]; soltanto così infatti si potrà giustificare che [ES] rimane costante:

$$[\text{E}] [\text{S}] k_1 = [\text{ES}] (k_2 + k_3) \quad [1.12]$$

Riarrangiando l'equazione [1.12] si ottiene:

$$[\text{E}] [\text{S}] / [\text{ES}] = (k_2 + k_3) / k_1 = K_M \quad [1.13]$$

Si noterà che K_M , la costante di Michaelis, è formalmente equivalente alla K_S dell'equazione [1.2], ed è omogenea con [S]; valgono quindi tutte le considerazioni fatte in precedenza (equazioni da [1.2] a [1.5]) ed in particolare si può scrivere:

$$[\text{ES}] / ([\text{E}] + [\text{ES}]) = [\text{ES}] / [\text{E}]_{\text{tot}} = [\text{S}] / (K_M + [\text{S}]) \quad [1.14]$$

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

$$v = [\text{ES}] k_3 = [\text{E}]_{\text{tot}} [\text{S}] k_3 / (K_M + [\text{S}]) \quad [1.15]$$

L'equazione [1.15] descrive un'iperbole equilatera che ha [S] per ascissa e v per ordinata; valgono ovviamente tutte le altre considerazioni fatte nel par. 1.1, ed in particolare osserviamo che:

1) se la concentrazione del substrato è alta rispetto alla K_M ($[\text{S}] \gg K_M$) si ha $K_M + [\text{S}] \approx [\text{S}]$ e pertanto $v \approx [\text{E}]_{\text{tot}} k_3$. In questa condizione tutto l'enzima è presente nella forma del complesso di Michaelis (cioè $[\text{ES}] \approx [\text{E}]_{\text{tot}}$ ed $[\text{E}] \approx 0$) e un ulteriore aumento di [S] non può far aumentare né [ES] né, di conseguenza, la velocità della reazione catalizzata. Si dice che il substrato è saturante e che la velocità osservata è la massima possibile in quelle condizioni sperimentali ($v = [\text{E}]_{\text{tot}} k_3 = V_{\text{max}}$). Il termine $V_{\text{max}} / [\text{E}]_{\text{tot}}$, che nel modello originale corrisponde a k_3 , è definito numero di turnover o k_{cat} ed indica il massimo numero di molecole di substrato che ogni molecola di enzima può trasformare nell'unità di tempo.

2) La concentrazione di substrato necessaria per ottenere una velocità pari alla metà di V_{max} può essere definita algebricamente e corrisponde alla K_M : infatti per ottenere questa condizione si deve avere che $[\text{ES}] = [\text{E}] = [\text{E}]_{\text{tot}} / 2$ e pertanto ci si trova nella condizione già analizzata con l'equazione [1.5], e graficamente riportata nelle figure 1 e 3.

3) Il tratto iniziale dell'iperbole, in condizioni in cui $[\text{S}] \ll K_M$, può essere semplificato da:

$v = [\text{E}]_{\text{tot}} [\text{S}] k_3 / (K_M + [\text{S}])$ (eq. 1.15) a $v = [\text{E}]_{\text{tot}} [\text{S}] k_3 / K_M$. Pertanto la tangente del tratto iniziale del grafico di Michaelis e Menten è una retta con coefficiente angolare pari al rapporto k_3 / K_M (o k_{cat} / K_M). Questo termine viene chiamato **costante di specificità** dell'enzima e ne descrive l'attività

catalitica in presenza di basse concentrazioni di substrato, una situazione non rara nelle condizioni fisiologiche. E' essenziale però che anche a bassa [S] sia mantenuta la condizione [S] >> [E].

4) E' possibile trasformare la [1.15] in modo da ottenere l'equazione di una retta, uguagliando tra loro i reciproci del primo e del secondo membro:

$$1/v = K_M/V_{max} \times 1/[S] + 1/V_{max} \quad [1.16]$$

Questa formulazione, detta dei doppi reciproci, o di Lineweaver e Burk, dal nome degli autori che la elaborarono, corrisponde all'equazione di una retta che ha per ascissa il termine $1/[S]$, per ordinata $1/v$, per intercetta sull'asse delle ordinate $1/V_{max}$, e per coefficiente angolare K_M/V_{max} . L'intercetta coll'asse delle ascisse è sempre negativa e corrisponde a $-1/K_M$ (si veda la fig.4).

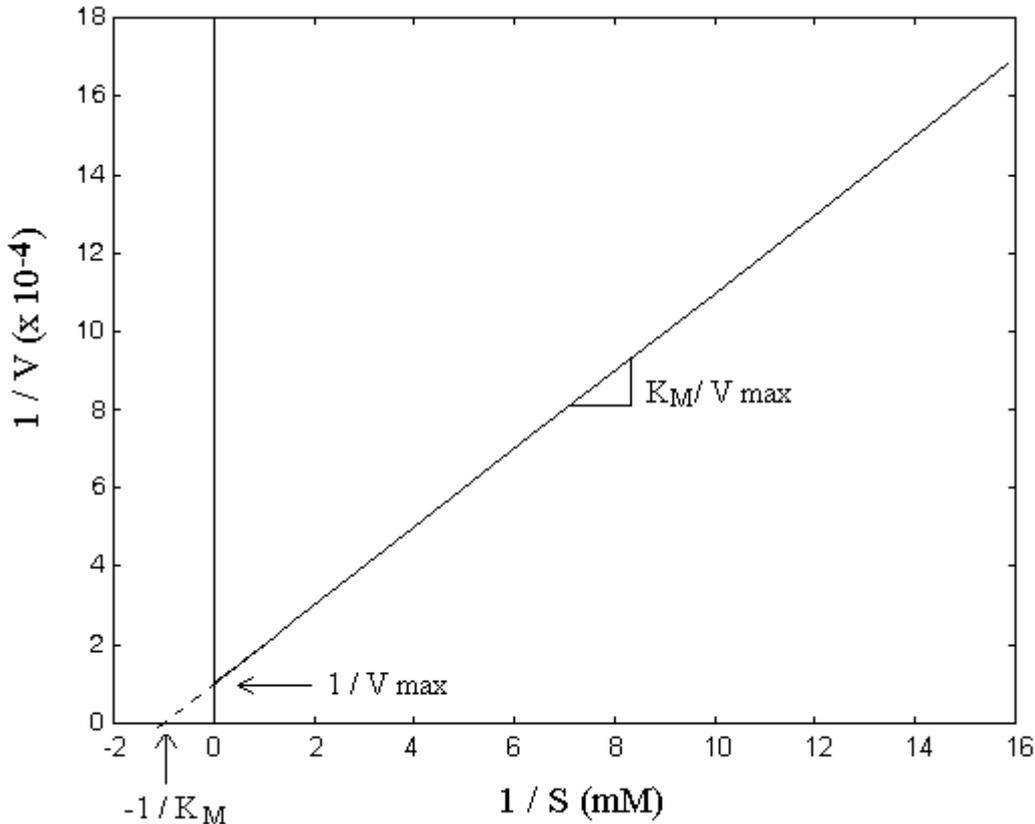
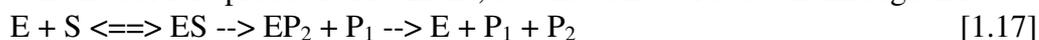


Fig. 4: grafico dei doppi reciproci secondo Linweaver e Burk

Il grafico dei doppi reciproci ha un grave difetto e non dovrebbe più essere usato: distorce l'errore sperimentale assegnando valori molto grandi di ascissa e ordinata alle misure effettuate a concentrazioni molto piccole di substrato (e quindi più soggette ad errore). La sua ragione d'essere era quella di linearizzare un'iperbole, consentendo una facile stima dei parametri di stato stazionario mediante il righello; oggi qualunque personal computer può analizzare molto in fretta curve complesse e ricavare gli stessi parametri direttamente dall'iperbole di Michaelis e Menten, senza distorcerne la statistica.

1.3 Meccanismi catalitici più complessi per la conversione irreversibile di un unico substrato

Il meccanismo di Michaelis e Menten è di grandissimo interesse concettuale ma in genere risulta sovrasemplificato: molte reazioni catalizzate da enzimi seguono schemi più complessi. Un caso frequente e perciò interessante è quello di molte idrolasi che formano un complesso più o meno stabile con uno dei loro prodotti di reazione, secondo uno dei due schemi seguenti:



Lo schema 1.17 non differisce in pratica da un Michaelis e Menten normale e la k_{cat} (definita come $V_{max} / [E_{tot}]$) è la più lenta tra la k_3 e la k_4 (nel caso in cui queste siano più o meno uguali, la k_{cat} sarà più piccola di entrambe). Per contro lo schema 1.18 presenta una interessante peculiarità, molto

evidente se il sistema può essere trattato con l'approssimazione dello pseudo-equilibrio (cioè se k_3 è la più lenta tra tutte le costanti cinetiche e quindi le altre costanti cinetiche possono essere sostituite dalle costanti di equilibrio delle reazioni rispettive). Per evidenziare il comportamento di questo sistema calcoliamo le concentrazioni di stato stazionario di ES ed EP₂ in equilibrio con una concentrazione unitaria (ad es. 1 nM) di E:

$$\text{da } K_S = [E][S] / [ES] \text{ ricaviamo } [ES] = [E][S] / K_S \quad [1.19]$$

$$\text{da } K_P = [E][P_2] / [EP_2] \text{ ricaviamo } [EP_2] = [E][P_2] / K_P \quad [1.20]$$

A stato stazionario, l'enzima totale si ripartisce tra le tre specie E, ES ed EP₂ secondo la somma:

$$[E_{\text{tot}}] = [E] + [ES] + [EP_2] = [E] (1 + [S] / K_S + [P_2] / K_P) \quad [1.21]$$

La frazione $[ES] / [E_{\text{tot}}]$ risulta:

$$[ES] / [E_{\text{tot}}] = ([S] / K_S) / (1 + [S] / K_S + [P_2] / K_P) = [S] K_P / (K_S K_P + [S] K_P + [P_2] K_S) \quad [1.22]$$

La velocità della reazione catalizzata risulta:

$$v = [ES] k_3 = [E_{\text{tot}}] k_3 [S] K_P / (K_S K_P + [S] K_P + [P_2] K_S) \quad [1.23]$$

Se lo sperimentatore ha correttamente analizzato la velocità iniziale della reazione ad ogni concentrazione di substrato (come riportato in fig. 2), può assumere $[P_2] = 0$ e ridurre il modello l'eq. 1.23 ad uno schema di Michaelis e Menten (eq. 1.15); se invece ha permesso che si accumulasse la specie P₂, egli osserva una velocità inferiore all'atteso, perché questa specie sequestra una quota di enzima nel complesso cataliticamente inattivo EP₂ (**inibizione da prodotto**). L'inibizione da prodotto è di norma di tipo competitivo (vedi oltre) perché il prodotto si lega allo stesso sito al quale era legato come substrato, prima della sua trasformazione.

1.4 Conversione reversibile di un solo substrato in un solo prodotto

E' il caso tipico delle isomerasi.

La reazione spontanea è $S \rightleftharpoons P$ di primo ordine in entrambe le direzioni; se essa non ha intermedi semi-stabili, si può scrivere la seguente legge cinetica:

$$v = -\delta [S] / \delta t = -[S] k_1 + [P] k_2 = -[S] k_1 + ([S_{\text{tot}}] - [S]) k_2 = [S_{\text{tot}}] k_2 - [S] (k_1 + k_2) \quad [1.24]$$

k_1 e k_2 rappresentano rispettivamente le costanti cinetiche delle trasformazioni diretta ed inversa, mentre S_{tot} è la somma (costante) del substrato e del prodotto.

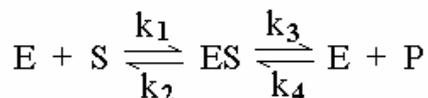
Integrando la 1.24 per δt , e aggiungendo la opportuna costante di integrazione si ottiene:

$$([S_t] - [S_{\text{eq}}]) = ([S_{\text{tot}}] - [S_{\text{eq}}]) e^{-(k_1+k_2)t} \quad [1.25]$$

In questa equazione $[S_t]$ è la concentrazione del substrato al tempo t , $[S_{\text{eq}}]$ quella di equilibrio e l'uso di $[S_{\text{tot}}]$ implica l'assunzione che a $t=0$ la miscela di reazione contenesse soltanto il substrato.

Ovviamente ad equilibrio raggiunto vale la relazione: $[P_{\text{eq}}] / [S_{\text{eq}}] = k_1 / k_2 = K_{\text{eq}}$.

La reazione catalizzata, schematizzata come:



Non può essere trattata secondo l'approssimazione dello pseudo-equilibrio, a meno che l'esperimento non sia stato iniziato in presenza di concentrazioni elevate sia di P che di S, tali però che il loro rapporto sia diverso dalla costante di equilibrio. Il trattamento per la condizione di non equilibrio ci da:

$$\delta [E] / \delta t = [ES] (k_2 + k_3) - [E] ([S] k_1 + [P] k_4) \quad [1.26]$$

$$\delta [S] / \delta t = [ES] k_2 - [E] [S] k_1 \quad [1.27]$$

$$\delta [P] / \delta t = [ES] k_3 - [E] [P] k_4 \quad [1.28]$$

A stato stazionario si ha:

$$[ES] (k_2 + k_3) = [E] ([S] k_1 + [P] k_4) \quad [1.29]$$

da cui:

$$[ES] = [E] ([S] k_1 + [P] k_4) / (k_2 + k_3) \quad [1.30]$$

$$[E_{\text{tot}}] = [E] + [ES] = [E] (1 + ([S] k_1 + [P] k_4) / (k_2 + k_3)) \quad [1.31]$$

$$v = \delta [P] / \delta t = [ES] k_3 - [E] [P] k_4 = [E_{\text{tot}}] (([S] k_1 + [P] k_4) k_3 - (k_2 + k_3) [P] k_4) / (k_2 + k_3 + [S] k_1 + [P] k_4) \quad [1.32]$$

La condizione di equilibrio è:

$$K_{eq} = [P_{eq}] / [S_{eq}] = k_1 k_3 / k_2 k_4 \quad [1.33]$$

Se il ricercatore conduce l'esperimento in assenza di P, misurando accuratamente le velocità iniziali, l'equazione cinetica si riduce alla 1.15 (provare per credere: basta azzerare [P] e omettere dalla 1.32 tutti i termini che la contengono, e ricordare che $K_M = (k_2 + k_3) / k_1$)

Se il ricercatore conduce l'esperimento in assenza di S ed in presenza di P, ottiene ancora una equazione equivalente alla 1.15, ma di segno opposto, che descrive la trasformazione di P in S:

$$v = - [E_{tot}] [P] k_2 / ([P] + (k_2 + k_3) / k_4) \quad [1.34]$$

In questa equazione il termine $(k_2 + k_3) / k_4$ rappresenta la K_M apparente del prodotto a $[S] = 0$, e k_2 la k_{cat} della conversione di P in S.

2 ENZIMI A DUE SUBSTRATI.

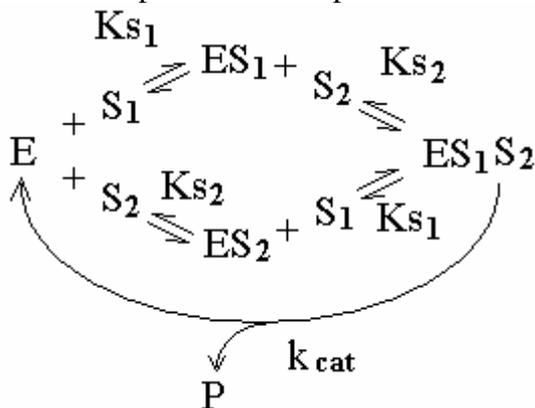
Molti enzimi di grande importanza biologica catalizzano reazioni di combinazione tra due substrati; ad esempio le sintetasi, le ossidasi, etc. Il loro ciclo catalitico può essere trattato anch'esso secondo lo schema di Michaelis e Menten, *ma i parametri di stato stazionario che si ottengono non hanno il significato originario.*

2.1 Schema simmetrico semplice per la reazione di combinazione irreversibile di due substrati diversi.

Questo caso, forse meno frequente di altri, è molto istruttivo. Nel caso ipotetico più semplice, la reazione non catalizzata procede con un meccanismo bimolecolare di secondo ordine:



La reazione catalizzata richiede la formazione del complesso ternario $ES'S''$, unica specie cataliticamente competente, e l'ordine di addizione dei due substrati è irrilevante (schema simmetrico; in molti casi reali l'ordine di aggiunta dei substrati potrebbe invece essere obbligato); inoltre, sempre per considerare il caso più semplice possibile, l'affinità dell'enzima per ciascun substrato è indipendente dalla presenza o dall'assenza dell'altro:



Trattando il sistema con l'approssimazione dello pseudo-equilibrio si ottengono i seguenti rapporti tra le diverse specie chimiche presenti a stato stazionario (riferiti alla concentrazione unitaria di E):

$$[ES'] = [E] [S'] / K_{S'} \quad [2.1]$$

$$[ES''] = [E] [S''] / K_{S''} \quad [2.2]$$

$$[ES'S''] = [ES_1] \times [S''] / K_{S''} = [E] ([S'] [S'']) / (K_{S'} K_{S''}) \quad [2.3]$$

$$\begin{aligned}
 [E_{tot}] &= [E] (1 + [S'] / K_{S'} + [S''] / K_{S''} + [S'] [S''] / K_{S'} K_{S''}) = \\
 &= [E] (K_{S'} K_{S''} + [S'] K_{S''} + [S''] K_{S'} + [S'] [S'']) / K_{S'} K_{S''} \quad [2.4]
 \end{aligned}$$

L'eq. 2.4 è chiamata la **funzione di partizione** dell'enzima tra le varie specie del ciclo catalitico ed è molto importante che il ricercatore sia sempre in grado di riconoscere ed assegnare ciascuno dei suoi termini alla specie chimica corrispondente, nonostante le possibili trasformazioni algebriche (ad es. nella 2.4 il termine $K_{S'} K_{S''}$ rappresenta [E], etc.). In tutti i modelli di cicli catalitici complessi sarà sempre necessario scrivere una funzione di partizione, anche quando, per risparmiare tempo, si ometteranno le equazioni relative a ciascuna specie (in questo esempio le eq. 2.1 - 2.5).

La frazione di enzima cataliticamente competente è:

$$[ES'S''] / [E_{tot}] = [S'] [S''] / (K_S' K_{S''} + [S'] K_{S''} + [S''] K_{S'} + [S'] [S'']) \quad [2.5]$$

La velocità della reazione catalizzata risulta:

$$v = [ES'S''] k_{cat} = [E_{tot}] k_{cat} [S'] [S''] / (K_S' K_{S''} + [S'] K_{S''} + [S''] K_{S'} + [S'] [S'']) \quad [2.6]$$

La massima velocità possibile, che si osserva assumendo infinite le concentrazioni di entrambi i substrati e quindi trascurando nelle somme i termini dell'equazione che non contengono il prodotto $[S'] [S'']$ è, come nel caso di Michaelis: $V_{max} = [E_{tot}] k_{cat}$

La K_M non può essere fisicamente assimilata né a K_S' , né a $K_{S''}$ né a una combinazione di queste, ed esistono infinite coppie di $[S']$ ed $[S'']$ che danno una velocità di reazione pari alla metà di V_{max} . In questo caso in genere lo sperimentatore procede come segue: fissa la concentrazione di un substrato e varia sistematicamente quella dell'altro in modo da ottenere una iperbole analoga a quella che si ottiene per gli enzimi ad un solo substrato e chiama K_M del substrato a concentrazione variabile quella concentrazione che da $v = \frac{1}{2} V_{max}$; poi inverte i ruoli del substrato a concentrazione fissa e di quello a concentrazione variabile e ripete la determinazione. In uno schema simmetrico come quello qui considerato le equazioni che si ottengono sono esattamente le stesse se viene fissata la concentrazione di S' o di S'' , quindi considereremo soltanto uno dei due casi; ma in schemi non simmetrici i due casi differiscono e devono essere analizzati separatamente.

La velocità massima osservabile nelle condizioni sperimentali descritte ($[S''] = \text{cost.}$) si calcola assumendo nell'equazione cinetica che il valore di $[S']$ sia infinitamente grande e cancellando dalle somme tutti i termini che non lo contengono:

$$V_{max S', S''=\text{cost.}} = [E_{tot}] k_{cat} [S''] / (K_{S''} + [S'']) \quad [2.7]$$

si osserva che questa V_{max} apparente non è quella assoluta (a concentrazione infinita di entrambi i substrati) ma dipende dalla concentrazione del substrato costante, e se ne potrebbero ottenere infinite variando semplicemente questo parametro.

Lo sperimentatore a questo punto tratta l'iperbole ottenuta come un modello di Michaelis e Menten e definisce K_M del substrato variabile la concentrazione di esso necessaria per avere $v = \frac{1}{2} V_{max}$:

$$2 [E_{tot}] k_{cat} K_{M'} [S''] / (K_S' K_{S''} + K_{M'} K_{S''} + [S''] K_{S'} + K_{M'} [S'']) = [E_{tot}] k_{cat} [S''] / (K_{S''} + [S''])$$

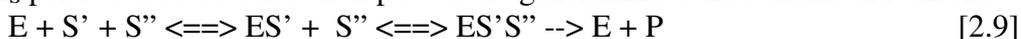
Semplificando i termini comuni si ottiene:

$$\begin{aligned} 2 K_{M'} (K_{S''} + [S'']) &= K_S' K_{S''} + K_{M'} K_{S''} + [S''] K_{S'} + K_{M'} [S''] \\ K_{M'} (K_{S''} + [S'']) &= K_S' (K_{S''} + [S'']) \\ K_{M'} &= K_S' \end{aligned} \quad [2.8]$$

In questo modello la K_M di ciascun substrato, misurata a concentrazione fissa dell'altro, risulta pari alla costante di dissociazione. Questo risultato è però eccezionale, e purtroppo non si ripete nei modelli non simmetrici, come si vedrà nel prossimo esempio.

2.2 Schema non simmetrico per due substrati con legame consecutivo obbligato.

Il confronto di questo caso, anch'esso molto semplice, col precedente, dimostra che la relazione tra K_M e K_S per lo stesso substrato non può essere generalizzata. Lo schema di reazione è:



Le concentrazioni relative delle diverse specie presenti a stato stazionario, calcolate sotto l'approssimazione dello pseudo-equilibrio, sono:

$$[ES'] = [E] [S'] / K_S' \quad [2.10]$$

$$[ES'S''] = [ES'] [S''] / K_{S''} = [E] [S'] [S''] / K_S' K_{S''} \quad [2.11]$$

$$\begin{aligned} [E_{tot}] &= [E] (1 + [S'] / K_S' + [S'] [S''] / K_S' K_{S''}) = \\ &= [E] (K_S' K_{S''} + [S'] K_{S''} + [S'] [S'']) / K_S' K_{S''} \end{aligned} \quad [2.12]$$

Rispetto al caso precedente si nota che questo schema esclude la specie chimica ES'' e tutte le equazioni relative.

La velocità della reazione catalizzata risulta:

$$v = [E_{tot}] k_{cat} [S'] [S''] / (K_S' K_{S''} + [S'] K_{S''} + [S'] [S'']) \quad [2.13]$$

La V_{max} assoluta, a concentrazione infinita di entrambi i substrati, è ancora $V_{max} = [E_{tot}] k_{cat}$;

la V_{max} misurata a concentrazione costante di ciascun substrato risultano invece:

$$V_{max S', [S''] = \text{cost.}} = [E_{tot}] k_{cat} [S''] / (K_{S''} + [S'']) \quad [2.14]$$

$$V_{\max} S'', [S'] = \text{cost.} = [E_{\text{tot}}] k_{\text{cat}} \quad [2.15]$$

Oltre ad osservare che le due V_{\max} apparenti sono diverse tra loro (come atteso per uno schema non simmetrico), merita un commento l'apparente paradosso per cui la seconda è uguale all'assoluta, sebbene sia misurata a concentrazione finita del primo substrato. La spiegazione è semplice: poiché nello schema di reazione in esame l'unica specie capace di combinarsi con S'' è ES' , una concentrazione molto elevata di S'' consuma ES' e trascina l'equilibrio verso destra inducendo quindi anche la combinazione di E con S' ; ovvero S'' causa un aumento apparente dell'affinità dell'enzima per S' .

Le K_M dei due substrati, definite come le concentrazioni necessarie per ottenere $v = 1/2 V_{\max}$ sono:

$$K_{M'} [S''] = \text{cost.} = K_{S'} K_{S''} / (K_{S''} + [S'']) \quad [2.16]$$

$$K_{M''} [S'] = \text{cost.} = K_{S''} (K_{S'} + [S']) / [S'] \quad [2.17]$$

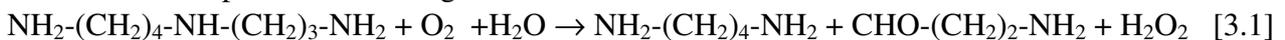
Si osserva che ciascuna delle due K_M è diversa dalla rispettiva K_S , ma è direttamente proporzionale ad essa; inoltre il fattore di proporzionalità è diverso per i due substrati.

2.3 Determinazione diretta delle K_S

La determinazione diretta della K_S , la costante di dissociazione del complesso enzima-substrato, è in genere difficile nel caso degli enzimi che catalizzano la trasformazione di un solo substrato: infatti deve essere condotta in condizioni sperimentali nelle quali la catalisi sia impossibile, e non c'è garanzia che il risultato ottenuto abbia valore nelle condizioni nelle quali la catalisi può avvenire. Nel caso degli enzimi a due substrati è invece spesso possibile determinare la K_S di ciascun substrato in assenza dell'altro, in condizioni idonee allo svolgimento della catalisi, e raccogliere quindi informazioni importanti sul meccanismo catalitico mediante il confronto della K_M con la K_S . La tecnica più frequentemente impiegata è la spettroscopia di fluorescenza perché spesso il sito di legame del substrato è idrofobico e contiene al suo interno residui aromatici fluorescenti (in particolare Trp), la cui emissione cambia in conseguenza del legame del substrato. Altri metodi includono la calorimetria e lo spiazzamento del substrato con un inibitore competitivo fluorescente (in questo caso si determina una costante di partizione ed è necessario un po' di calcolo e qualche esperimento addizionale per ricavare la K_S).

3 LA POLIAMMINO OSSIDASI (PAO): un esempio semplice di meccanismo cinetico per un enzima con due substrati.

La PAO ossida le amine secondarie per produrre una poliammina ed un'aminoaldeide; ad es. la reazione con la spermidina è la seguente:



L'enzima è una flavoproteina e presenta due spettri di assorbimento distinti per le due forme ossidata e ridotta. Il meccanismo più semplice che si può scrivere per questo enzima e che descrive in modo soddisfacente i dati sperimentali è il seguente:



La prima reazione è reversibile e richiede pertanto due costanti cinetiche, per le semireazioni diretta (k_1) ed inversa (k_2); la seconda reazione è di primo ordine e irreversibile (k_3); la terza è di secondo ordine e irreversibile (k_4). Il sistema può essere trattato sia con l'approssimazione dello pseudo-equilibrio sia per la condizione di non equilibrio; a titolo didattico sono proposte entrambe le soluzioni, ma l'esperimento dimostra che l'approssimazione dello pseudo-equilibrio è inadeguata. Un esperimento tipico è riportato nella fig. 4:

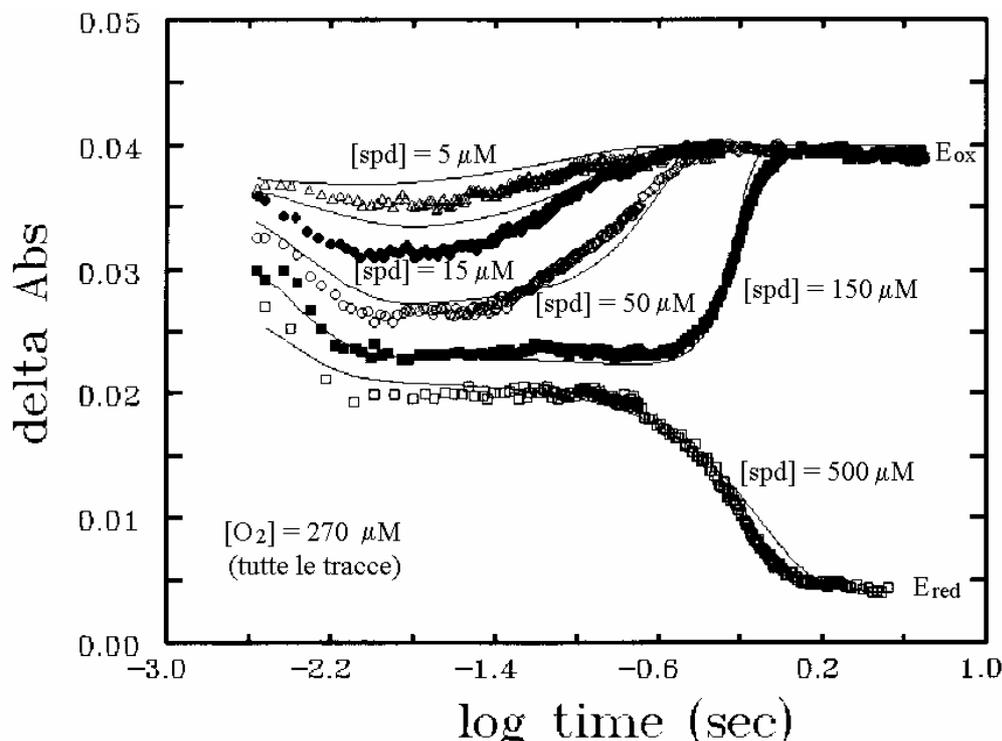


Figura 4. stati pre-stazionario e stazionario della poliammino ossidasi di mais. In questo esperimento l'enzima ossidato è stato mescolato con concentrazioni crescenti di spermidina ed è stata seguita l'assorbanza del cofattore FAD che differisce nei due stati ossidato e ridotto. Le tracce sono state analizzate per ricavare le costanti cinetiche dello schema 3.2 - 3.3 .

3.1 Trattamento approssimato per la condizione di pseudo-equilibrio

Lo schema cinetico proposto (eq. 3.2 e 3.3) presenta una sola reazione che può raggiungere la condizione di pseudo-equilibrio (la 1) e due reazioni irreversibili (la seconda e la terza). Di conseguenza l'approssimazione di pseudo-equilibrio è possibile per la seguente condizione:

$$k_3 \text{ e } k_4[\text{O}_2] \lll k_1[\text{S}] + k_2 \quad [3.4]$$

E' importante notare che il termine $k_1[\text{S}] + k_2$ rappresenta la costante apparente di velocità dell'approccio ad equilibrio per il sistema enzima-substrato e dipende dalla variabile $[\text{S}]$; pertanto esisteranno delle condizioni sperimentali nelle quali la condizione 3.4 è soddisfatta ed altre per le quali non lo è o potrebbe non esserlo.

La velocità istantanea della conversione di S in P è però una funzione complessa delle costanti k_3 e k_4 ; una semplificazione notevole si ottiene se si può porre anche:

$$k_3 \lll k_4[\text{O}_2] \lll k_1[\text{S}] + k_2 \quad [3.5]$$

Se questa condizione è soddisfatta (cosa probabile perché si può aumentare la concentrazione di ossigeno fino a renderla vera, purché k_4 non sia troppo piccola), allora il modello si riduce ad uno schema di Michaelis, con:

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [\text{E}]_{\text{tot}} = k_3 \quad [3.6]$$

$$K_M = (k_2 + k_3) / k_1 \approx k_2 / k_1 \quad [3.7]$$

Per ciò che concerne la 3.6 possiamo notare che coincide con la 3.26, ottenuta attraverso una procedura molto più complessa, mentre per la 3.7 notiamo che coincide con la 1.13.

2.3.2 Trattamento per la condizione di non-equilibrio

Per analizzare la condizione di non equilibrio occorre scrivere le equazioni differenziali cinetiche per ogni specie coinvolta nel meccanismo catalitico. Allo scopo di semplificare l'algebra necessaria conviene porre la condizione

$$[\text{E}]_{\text{tot}} \lll [\text{S}] \quad [3.8]$$

questo comporta che sia possibile scrivere l'approssimazione di pseudo primo ordine:

$$k_1[\text{S}] = k_1' \quad [3.9]$$

$$k_4[\text{O}_2] = k_4' \quad [3.10]$$

le equazioni differenziali cinetiche si scrivono prendendo con segno positivo quelle reazioni che producono la specie chimica di volta in volta considerata e con segno negativo quelle che la consumano:

$$\delta[E_{ox}] / \delta t = [E_{ox}S]k_2 + [E_{red}]k_4 - [E_{ox}]k_1' \quad [3.11]$$

$$\delta[E_{ox}S] / \delta t = [E_{ox}]k_1' - [E_{ox}S](k_2 + k_3) \quad [3.12]$$

$$\delta[E_{red}] / \delta t = [E_{ox}S]k_3 - [E_{red}]k_4' \quad [3.13]$$

$$\delta[S] / \delta t = [E_{ox}S]k_2 - [E_{ox}]k_1' \quad [3.14]$$

$$\delta[O_2] / \delta t = -[E_{red}]k_4' \quad [3.15]$$

Si noti che poiché la reazione 3.1 è irreversibile non è necessario scrivere le equazioni differenziali dei prodotti, che non hanno influenza sul meccanismo (3.2 e 3.3). Si noti inoltre che le equazioni differenziali da 3.11 a 3.13 devono sommare a zero (legge di conservazione della massa per quanto attiene all'enzima).

Le eq. 3.11-3.15 sono necessarie per l'analisi dei dati sperimentali e qualunque programma di minimizzazione non lineare può usarle per trovare i valori delle costanti cinetiche (spesso però con intervalli di confidenza piuttosto ampi). Una volta trovati i valori delle costanti occorre ricalcolare da questi i parametri di stato stazionario e verificarne la congruità con quelli determinati sperimentalmente. Si procede come segue: per prima cosa si applica alle eq. 3.11-3.13

l'approssimazione dello stato stazionario che impone nessuna variazione nella concentrazione delle specie intermedie:

$$\delta[E_{ox}] / \delta t = [E_{ox}S]k_2 + [E_{red}]k_4 - [E_{ox}]k_1' = 0 \quad [3.16]$$

$$\delta[E_{ox}S] / \delta t = [E_{ox}]k_1' - [E_{ox}S](k_2 + k_3) = 0 \quad [3.17]$$

$$\delta[E_{red}] / \delta t = [E_{ox}S]k_3 - [E_{red}]k_4' = 0 \quad [3.18]$$

conseguendo che, a stato stazionario, valgano le relazioni:

$$[E_{ox}S]k_2 + [E_{red}]k_4 = [E_{ox}]k_1' \quad [3.19]$$

$$[E_{ox}]k_1' = [E_{ox}S](k_2 + k_3) \quad [3.20]$$

$$[E_{ox}S]k_3 = [E_{red}]k_4' \quad [3.21]$$

Si sceglie ora una specie chimica di riferimento, avendo cura di preferire quella che darà luogo all'algebra più semplice; in questo caso andrebbero bene sia $E_{ox}S$ che E_{red} e noi prenderemo come riferimento quest'ultima, per ottenere:

$$[E_{ox}S] = [E_{red}] k_4' / k_3 \quad [3.22]$$

$$[E_{ox}] = [E_{ox}S] (k_2 + k_3) / k_1' = [E_{red}] k_4' (k_2 + k_3) / k_1' k_3 \quad [3.23]$$

Consegue che:

$$[E]_{tot} = [E_{red}] (1 + k_4' / k_3 + k_4' (k_2 + k_3) / k_1' k_3) = [E_{red}] (k_1' k_3 + k_1' k_4' + k_2 k_4' + k_3 k_4') / k_1' k_3 \quad [3.24]$$

La frazione di enzima presente nella forma del complesso catalitico $E_{ox}S$ risulta:

$$[E_{ox}S] / [E]_{tot} = k_1' k_4' / (k_1' k_3 + k_1' k_4' + k_2 k_4' + k_3 k_4') \quad [3.24]$$

La velocità della reazione che trasforma S in P è:

$$v = [E_{ox}S]k_3 = [E]_{tot} k_1' k_3 k_4' / (k_1' k_3 + k_1' k_4' + k_2 k_4' + k_3 k_4') \quad [3.25]$$

Si noti che al denominatore della 3.25 compare il prodotto di tutte le costanti per le reazioni dirette (e nessuna delle inverse); questa regola è generale.

Il massimo numero di turnover possibile per l'enzima viene determinato ponendo uguali ad infinito le concentrazioni di entrambi i substrati. Questo comporta che tutti i termini dell'eq. 3.25 che non contengono il prodotto $k_1' k_4'$ vengono eliminati:

$$k_{cat} = V_{max} / [E]_{tot} = k_1' k_3 k_4' / k_1' k_4' = k_3 \quad [3.26]$$

Di norma, però, gli esperimenti di stato stazionario non vengono condotti a concentrazione infinita di entrambi i substrati. Si mantiene invece costante la concentrazione di uno di essi e si determina il valore della velocità iniziale in funzione della concentrazione dell'altro substrato. E' pertanto necessario usare l'eq. 3.25 per determinare due valori di $V_{max} / [E]_{tot}$, uno per $[S]$ tendente ad infinito e $[O_2] = costante$, l'altro per $[S] = costante$ e $[O_2]$ tendente ad infinito. In ciascuno dei due casi nell'eq. 3.25 si trascurano i termini che non contengono il substrato a concentrazione infinita e si ottiene:

$$V_{max} / [E]_{tot, [S] \rightarrow \infty, [O_2] = const.} = k_3 k_4' / (k_3 + k_4') \quad [3.27]$$

$$V_{max} / [E]_{tot, [S] = const., [O_2] \rightarrow \infty} = k_1' k_3 / (k_1' + k_2 + k_3) \quad [3.28]$$

Come atteso, la velocità massima per ciascun substrato, misurata a concentrazione fissa dell'altro substrato, dipende da quest'ultimo parametro.

E' ora possibile calcolare i valori delle K_M nelle due condizioni, ponendo che la K_M è pari alla concentrazione di substrato alla quale la velocità (eq. 3.25) corrisponde alla metà della velocità massima (3.27 o 3.28). Ovviamente in questo passaggio occorre esplicitare alternativamente il termine k_1' o k_4' (eq. 3.9 e 3.10). Per il caso in cui si sia variata la concentrazione di S mantenendo costante quella dell'ossigeno si ha:

$$2 k_1 K_{M, S} k_3 k_4' / (k_1 K_{M, S} k_3 + k_1 K_{M, S} k_4' + k_2 k_4' + k_3 k_4') = k_3 k_4' / (k_3 + k_4') \quad [3.29]$$

Osservato che i numeratori delle due frazioni hanno necessariamente vari termini in comune ed operate le opportune semplificazioni si ottiene:

$$k_1 K_{M, S} k_3 + k_1 K_{M, S} k_4' = k_2 k_4' + k_3 k_4' \quad [3.30]$$

Ed infine:

$$K_{M, S} = (k_2 k_4' + k_3 k_4') / (k_1 k_3 + k_1 k_4') \quad [3.31]$$

Per il caso opposto, in cui si sia variata la concentrazione di ossigeno mantenendo costante quella di S si procede in maniera analoga:

$$2 k_1' k_3 k_4 K_{M, O_2} / (k_1' k_3 + k_1' k_4 K_{M, O_2} + k_2 k_4 K_{M, O_2} + k_3 k_4 K_{M, O_2}) = k_1' k_3 / (k_1' + k_2 + k_3) \quad [3.32]$$

$$k_1' k_4 K_{M, O_2} + k_2 k_4 K_{M, O_2} + k_3 k_4 K_{M, O_2} = k_1' k_3 \quad [3.33]$$

$$K_{M, O_2} = k_1' k_3 / (k_1' k_4 + k_2 k_4 + k_3 k_4) \quad [3.34]$$

Questa analisi è stata applicata all'esperimento raffigurato in Fig. 4 e sono stati ottenuti i risultati riportati nella tabella 3.1. Quando si fanno esperimenti per determinare le costanti cinetiche di un enzima è importante determinare le costanti di tutti le reazioni del ciclo catalitico, calcolare da queste i parametri di stato stazionario e confrontare questi ultimi con quelli determinati direttamente, che in genere sono noti con discreta precisione.

Tabella 3.1: parametri cinetici e di stato stazionario per PAO di mais; in parentesi i parametri di stato stazionario determinati direttamente (da Bellelli et al. (1997) Arch. Biochem. Biophys. 343, 146-148).

$k_1 = 3,3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$	$k_2 = 1 s^{-1}$	$k_3 = 183 s^{-1}$	$k_4 = 6.3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$
$k_{cat\ spd, O_2} = 270 \mu M = 88 s^{-1}$ (90)	$K_{M\ spd, O_2} = 270 \mu M = 27 \mu M$ (22)		
$k_{cat\ O_2, spd} = 100 \mu M = 125 s^{-1}$	$K_{M\ O_2, spd} = 100 \mu M = 198 \mu M$		

4. INIBIZIONE

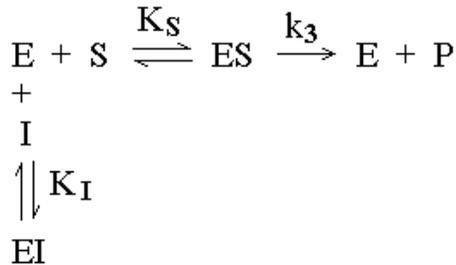
In genere l'inibizione enzimatica viene trattata con l'approssimazione dello pseudo-equilibrio perché determinare le costanti cinetiche di combinazione e dissociazione dell'inibitore è difficile; questa approssimazione potrebbe però in alcuni casi rivelarsi insoddisfacente perché gli inibitori ad

alta affinità potrebbero avere costanti di dissociazione molto basse; come al solito, le condizioni che giustificano l'approssimazione di pseudo equilibrio sono: $k_3 \ll k_1[S] + k_2$ e $k_3 \ll k_{al}[I] + k_{di}$ (costanti cinetiche di combinazione e dissociazione dell'inibitore).

Considereremo prima di tutto il caso dell'inibizione competitiva di Michaelis e Menten, più semplice, poi vedremo qualche esempio più complesso.

4.1 L'inibizione competitiva nell'approssimazione dello pseudo-equilibrio

Poiché l'inibitore (I) compete con il substrato per il sito attivo, il complesso ternario inibitore-enzima-substrato (EIS) non può mai formarsi e lo schema di reazione è il seguente:



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

$$EI \leftrightarrow E + I \quad K_I = [E][I] / [EI] \quad [4.1]$$

Con un ragionamento del tutto analogo a quello già condotto per lo schema di Michaelis si calcola la frazione delle tre specie E, ES ed EI (si veda la nota³), per ottenere la velocità della reazione:

$$v = [ES] k_3 = [E]_{tot} k_3 [S] / ([S] + K_M (1 + [I]/K_I)) \quad [4.2]$$

Bisogna osservare che in questo trattamento, che è quello classico, la K_M viene usata (impropriamente) come una costante di equilibrio, e la K_I non è risolta nelle sue componenti cinetiche. Sull'eq. 4.2 si possono fare le seguenti considerazioni:

1: è formalmente analoga alla [1.15], con la differenza che ma il termine K_M vi compare moltiplicato per $(1 + [I]/K_I)$; pertanto anche la [4.2] descrive un'iperbole equilatera, dalla quale è possibile calcolare graficamente V_{max} nonché una $[S]_{50}$, corrispondente al termine $K_M (1 + [I]/K_I)$. Quest'ultimo termine è spesso definito la "K_M apparente" per le condizioni sperimentali date.

2. E' caratteristico di questo tipo di inibizione enzimatica che la V_{max} rimanga invariata in presenza dell'inibitore: infatti a concentrazioni molto elevate il substrato spiazza l'inibitore e converte la totalità dell'enzima in ES (infatti se si pone $[S] \gg K_M (1 + [I]/K_I)$, si ottiene $v = [E]_{tot} k_3$). Per contro in presenza di un inibitore competitivo la $[S]_{50}$ è più grande che in assenza dell'inibitore stesso.

³: per ottenere l'equazione [4.2] conviene prendere come riferimento il termine [E] e calcolare rispetto a questo gli altri due, [ES] ed [EI]; la somma dei tre corrisponde ad $[E]_{tot}$:

$$[ES] = [E][S] k_1 / (k_2 + k_3) = [E][S] / K_M$$

$$[EI] = [E][I] / K_I$$

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

$$[E] / [E]_{tot} = [E] / ([E] + [ES] + [EI]) = [E] / [E] (1 + [S]/K_M + [I]/K_I) = 1 / (1 + [S]/K_M + [I]/K_I)$$

$$[EI] / [E]_{tot} = [I] / K_I (1 + [S]/K_M + [I]/K_I)$$

$$[ES] / [E]_{tot} = [S] / K_M (1 + [S]/K_M + [I]/K_I)$$

L'ultima equazione è quella usata per ottenere la [4.2].

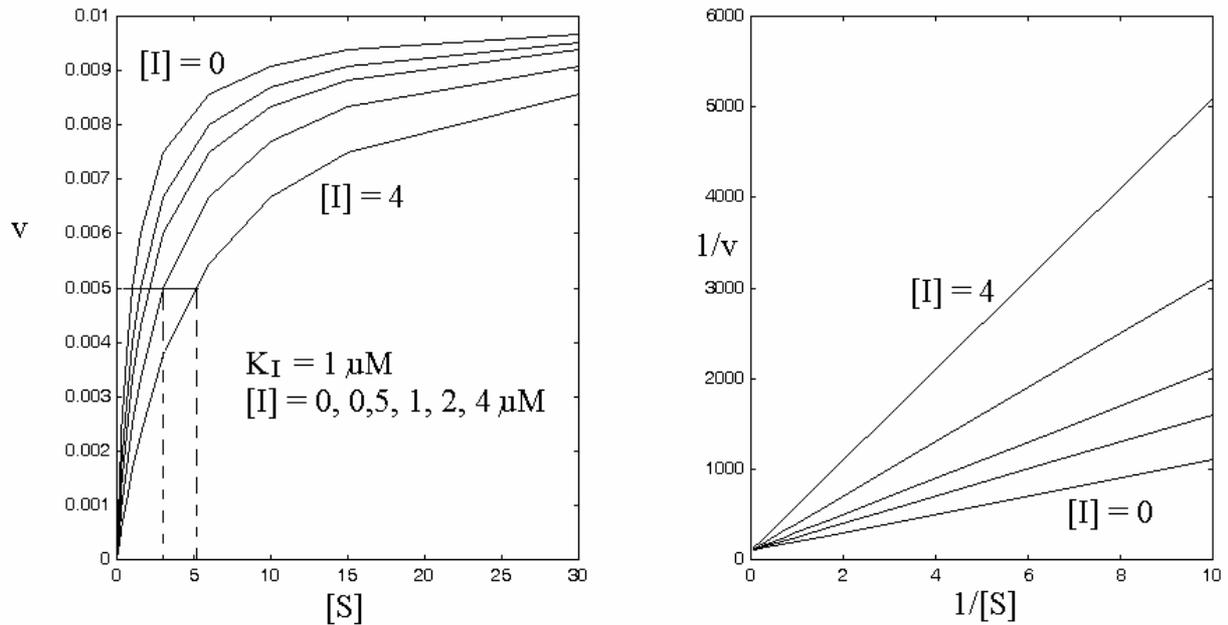


Figura 5: l'inibizione competitiva cambia la K_M apparente ma non la V_{max} .

4.2 L'inibizione competitiva trattata per lo stato di non equilibrio

Come facciamo ad accorgerci se l'approssimazione di pseudo-equilibrio dà una descrizione corretta del nostro sistema? L'esperimento più semplice è il seguente: prepariamo la miscela di substrato ed inibitore, aggiungiamo l'enzima e determiniamo la velocità della conversione del substrato in prodotto; poi prepariamo la miscela di enzima ed inibitore, aggiungiamo il substrato e determiniamo di nuovo la velocità della reazione. Bisogna ovviamente avere cura che le concentrazioni delle specie rilevanti siano le stesse, perché ciò che varia nell'esperimento è soltanto l'ordine in cui sono mescolati i componenti della miscela di reazione. Se la velocità della reazione nei due casi è la stessa, l'approssimazione di pseudo-equilibrio è sufficiente, in caso contrario occorre utilizzare il trattamento per la condizione di non equilibrio (si veda la fig.6).

Il trattamento per la condizione di non equilibrio richiede di definire due costanti cinetiche, per la combinazione e la dissociazione dell'inibitore, definite rispettivamente k_{ai} e k_{di} .

Le equazioni differenziali cinetiche delle tre specie chimiche dell'enzima possono essere scritte come segue, utilizzando (come nel paragrafo 3.2) la notazione k' per identificare una costante di pseudo primo ordine:

$$\delta[E] / \delta t = [ES] (k_2 + k_3) + [EI]k_{di} - [E] (k_1' + k_{ai}') \quad [4.3]$$

$$\delta[ES] / \delta t = [E]k_1' - [ES] (k_2 + k_3) \quad [4.4]$$

$$\delta[EI] / \delta t = [E]k_{ai}' - [EI]k_{di} \quad [4.5]$$

La velocità dell'atto catalitico è, come al solito: $v = [ES]k_3$ ma nel trattamento del non equilibrio la concentrazione di ES dipende dalle condizioni iniziali. Infatti si ha: $[ES]_i = [ES]_{i-1} + \delta[ES]$ e pertanto questa formulazione tiene conto dell'ordine in cui i componenti della miscela sono mescolati tra loro. Nel primo esperimento, a $t = 0$ si aveva: $[E] = [E]_{tot}$, $[ES] = 0$, $[EI] = 0$; nel secondo esperimento a $t = 0$ si aveva invece: $[E] = [E]_{tot} K_I / ([I] + K_I)$, $[EI] = [E]_{tot} [I] / ([I] + K_I)$, $[ES] = 0$.

E' possibile verificare che l'algebra del trattamento per il non equilibrio corrisponde a quella dello pseudo-equilibrio. Infatti, a stato stazionario le equazioni differenziali cinetiche si eguagliano a zero e si ottiene:

$$[ES] (k_2 + k_3) + [EI]k_{di} = [E] (k_1' + k_{ai}') \quad [4.6]$$

$$[E]k_1' = [ES] (k_2 + k_3) \quad [4.7]$$

$$[E]k_{ai}' = [EI]k_{di} \quad [4.8]$$

Prendendo come specie di riferimento l'enzima libero, E, si può scrivere:

$$[ES] / [E] = k_1' / (k_2 + k_3) \quad [4.9]$$

$$[EI] / [E] = k_{aI}' / k_{dI} \quad [4.10]$$

Pertanto:

$$\begin{aligned} [E]_{\text{tot}} &= [E] (1 + k_1' / (k_2 + k_3) + k_{aI}' / k_{dI}) = \\ &= [E] (k_{dI}k_2 + k_{dI}k_3 + k_{dI}k_1' + k_{aI}'k_2 + k_{aI}'k_3) / (k_{dI}k_2 + k_{dI}k_3) \end{aligned} \quad [4.11]$$

Nell'eq. 4.11 il termine $k_{dI}k_1'$ rappresenta la specie [ES] e pertanto si ha:

$$[ES] / [E]_{\text{tot}} = k_{dI}k_1' / (k_{dI}k_2 + k_{dI}k_3 + k_{dI}k_1' + k_{aI}'k_2 + k_{aI}'k_3) \quad [4.12]$$

$$v = [ES] k_3 = [E]_{\text{tot}} k_3 k_{dI}k_1' / (k_{dI}k_2 + k_{dI}k_3 + k_{dI}k_1' + k_{aI}'k_2 + k_{aI}'k_3) \quad [4.13]$$

Risolviendo k_1' in $k_1[S]$ e k_{aI}' in $k_{aI}[I]$ e dividendo numeratore e denominatore della 4.13 per il termine $k_{dI}k_1$ si ottiene l'eq. 4.2, a garanzia che il procedimento algebrico è corretto.

La simulazione di un caso di inibizione enzimatica competitiva da trattarsi con le equazioni del non equilibrio è riportato in Fig. 6 (simulazione ottenuta usando equazioni differenziali non integrate⁴).

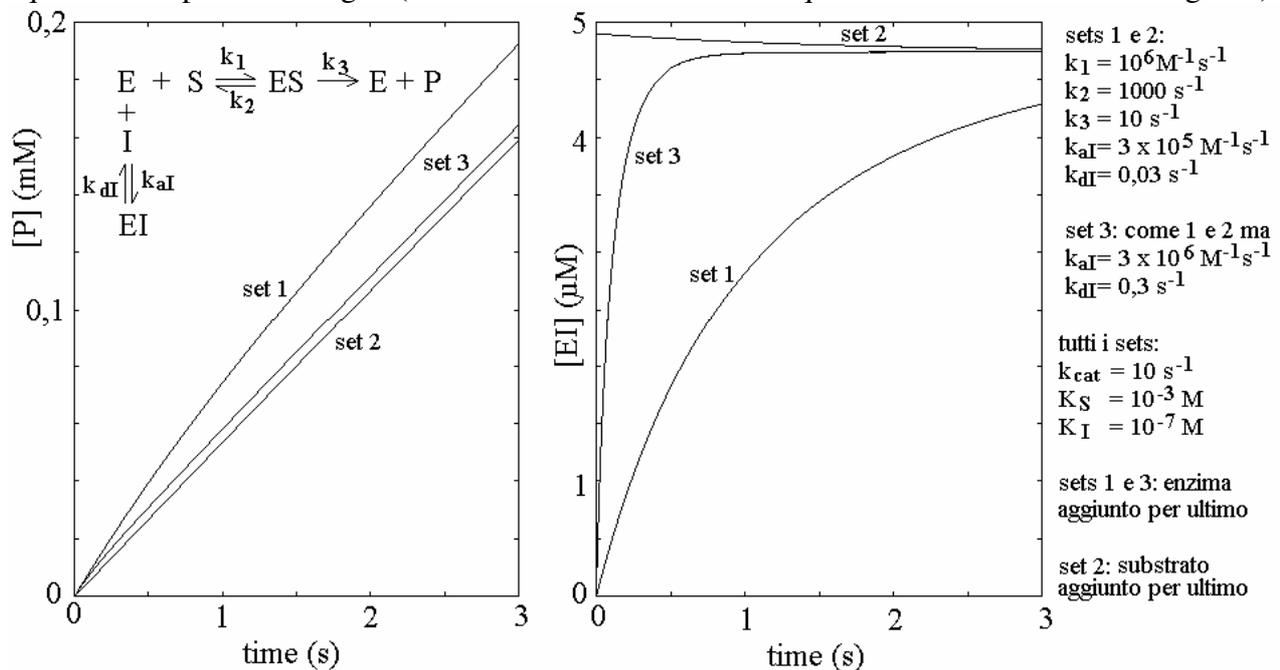


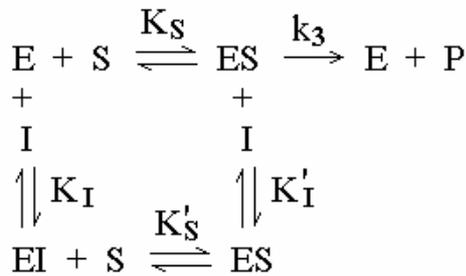
Figura 6: simulazione di due esperimenti nei quali è stata seguita la formazione del prodotto in presenza di un enzima e di un inibitore competitivo, nelle stesse condizioni sperimentali ma cambiando l'ordine di aggiunta dei componenti del sistema: la traccia più veloce è stata ottenuta quando l'enzima è stato aggiunto per ultimo (vedi testo). Per confronto è stato riportato anche un esperimento su un enzima nel quale l'equilibrizzazione dei componenti della miscela è più rapida. Si noti che la velocità iniziale è determinata (pannello di sinistra) su una miscela di reazione che non ha raggiunto lo stato stazionario (pannello di destra). Il valore della K_I (100 nM) non è irragionevolmente basso.

⁴ `function dx=enzi1(t,x);
k1=1e6; k2=1000; k3=10; k0=1e-2; k4=3e5; k5=0.03;
dx(1,1)=x(3)*(k2+k3) - x(1)*(x(2)*k1+x(5)*k4) + x(6)*k5;
dx(2,1)=x(3)*k2 - x(1)*x(2)*k1 - x(2)*k0;
dx(3,1)=x(1)*x(2)*k1 - x(3)*(k2+k3);
dx(4,1)=x(3)*k3 + x(2)*k0;
dx(5,1)=x(6)*k5 - x(1)*x(5)*k4;
dx(6,1)=x(1)*x(5)*k4 - x(6)*k5;`

Molti inibitori di interesse farmacologico hanno costanti di inibizione molto basse (inferiori a quella della fig.5) e queste dipendono spesso da costanti di dissociazione molto basse; pertanto il caso di inibitori competitivi che funzionano in regime di non equilibrio è frequente.

4.3 Le inibizioni non competitiva e parzialmente competitiva

Gli inibitori non competitivo e parzialmente competitivo non si legano sul sito attivo dell'enzima e, come conseguenza permettono la formazione del complesso ternario **EIS**. Il meccanismo di reazione è il seguente:



L'inibitore non competitivo classico è raro; rispetto allo schema qui sopra presenta la seguente peculiarità: $K_I = K'_I$, che evidentemente comporta: $k_2 / k_1 = k_2' / k_1'$. Nel caso dell'inibitore parzialmente competitivo questa condizione non si verifica. Il trattamento per la condizione di pseudo-equilibrio, valido per $k_3 \ll k_1[S] + k_2$, $k_3 \ll k_1'[S] + k_2'$ e $k_3 \ll k_{aI}[I] + k_{dI}$ è il seguente. Si definisce innanzitutto:

$$K_S = k_2 / k_1 = [E][S] / [ES]$$

$$K'_S = k_2' / k_1' = [EI][S] / [EIS]$$

$$K_I = [E][I] / [EI]$$

$$K'_I = [ES][I] / [EIS]$$

Una delle quattro costanti di equilibrio è ridondante perché vale la relazione, facilmente dimostrabile: $K_S K'_I = K'_S K_I$.

Preso come riferimento la specie E si deriva:

$$[ES] = [E][S] / K_S \quad [4.14]$$

$$[EI] = [E][I] / K_I \quad [4.15]$$

$$[EIS] = [ES][I] / K'_I = [E][S][I] / K_S K'_I \quad [4.16]$$

Consegue che:

$$\begin{aligned}
 [E_{tot}] &= [E] (1 + [S] / K_S + [I] / K_I + [S][I] / K_S K'_I) = \\
 &= [E] (K_S K_I K'_I + [S] K_I K'_I + [I] K_S K'_I + [S][I] K_I) / K_S K_I K'_I
 \end{aligned} \quad [4.17]$$

Il termine $[S] K_I K'_I$ rappresenta la specie [ES], unica capace di portare a termine l'atto catalitico; pertanto si ha:

$$\begin{aligned}
 v &= [ES] k_3 = [E_{tot}] [S] K_I K'_I k_3 / (K_S K_I K'_I + [S] K_I K'_I + [I] K_S K'_I + [S][I] K_I) = \\
 &= [E_{tot}] [S] k_3 / (K_S + [S] + K_S [I] / K_I + [S][I] / K'_I) = \\
 &= [E_{tot}] [S] k_3 / (K_S (1 + [I] / K_I) + [S] (1 + [I] / K'_I))
 \end{aligned} \quad [4.18]$$

Nel caso dell'inibizione non competitiva classica, con $K_I = K'_I$ l'eq. 4.18 si semplifica in:

$$v = [E_{tot}] [S] k_3 / ((K_S + [S]) (1 + [I] / K_I)) \quad [4.19]$$

L'eq. 4.2 comporta che: $V_{max} = [E_{tot}] k_3 K_I / ([I] + K_I)$; ovvero, l'inibizione non competitiva diminuisce la V_{max} moltiplicandola per il termine $K_I / ([I] + K_I)$ che è sempre minore di 1. Per contro, questo tipo di inibizione non cambia la $[S]_{50}$ (o, ciò che è lo stesso, la K_M). Una inibizione di questo tipo è riportata nella fig.7.

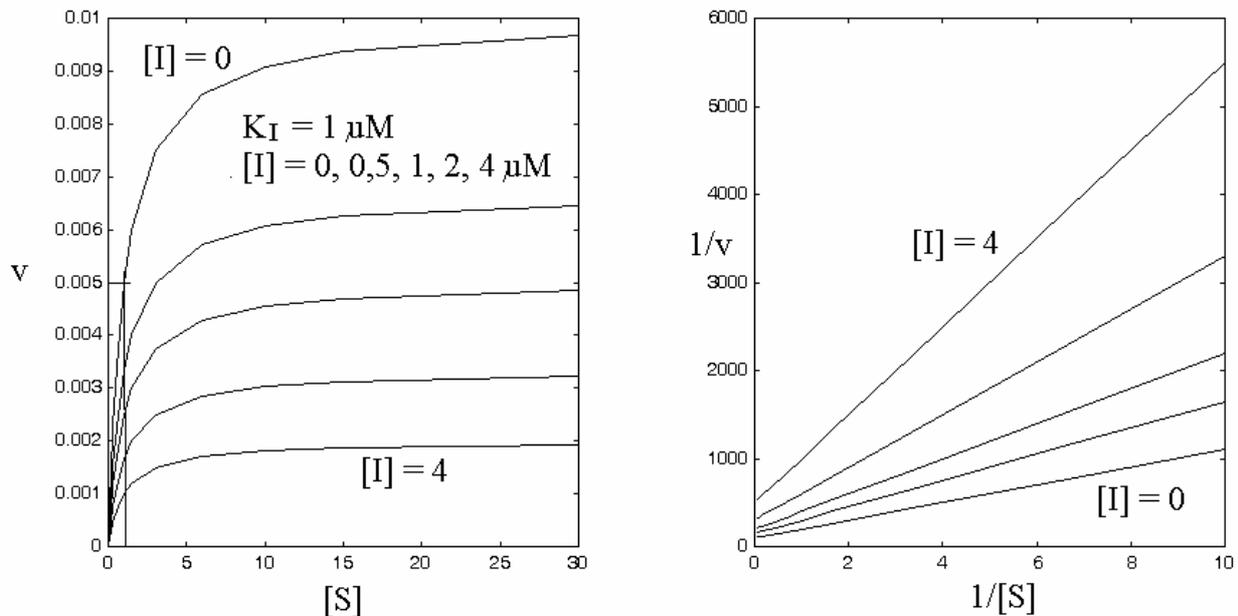


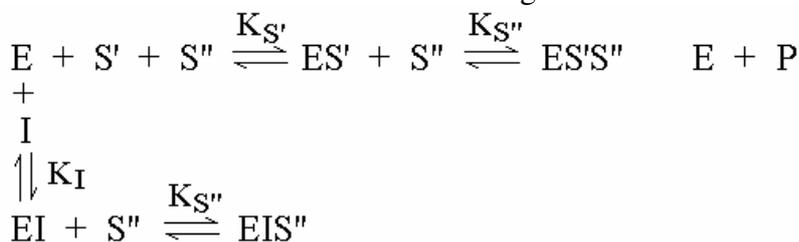
Figura 7: inibizione non competitiva pura (eq. 4.19).

La ragione per la quale una vera inibizione non competitiva classica è così rara è semplice: per impedire l'atto catalitico l'inibitore deve alterare, in modo anche sottile, la struttura di EIS rispetto ad ES. Questa alterazione strutturale in genere comporta $K_S \neq K_S'$ e, di conseguenza, $K_I \neq K_I'$. Dal punto di vista della fisiologia una inibizione competitiva si presta a realizzare un sistema di regolazione a feedback positivo (controllo a retroazione), in quanto l'enzima inibito permette l'accumulo del substrato e questo, prima o poi, sposta l'inibitore dal sito attivo. Per contro l'inibizione non competitiva non consente il controllo a retroazione e pertanto non ha una ovvia utilità per la fisiologia dell'organismo.

4.4 Inibizione in un enzima a due substrati

Quando un enzima utilizza due substrati è spesso possibile studiare inibitori che competono con uno solo di essi. Studiando il ciclo catalitico in presenza dell'inibitore e mantenendo costante uno dei due substrati a turno, si verifica il seguente fenomeno: l'inibitore si comporta sempre come inibitore competitivo quando si varia il substrato con cui compete, e si comporta in genere in modo complesso si varia la concentrazione dell'altro substrato.

Esaminiamo a titolo di esempio il ciclo catalitico seguente, analogo a quello del par. 2.2, nel quale l'ordine di addizione dei substrati è obbligato:



La funzione di partizione risulta:

$$\begin{aligned}
 [E_{\text{tot}}] &= [E] + [ES'] + [ES'S''] + [EI] + [EIS''] = \\
 &= [E] (1 + [S'] / K_{S'} + [S'][S''] / K_{S'} K_{S''} + [I] / K_I + [I][S''] / K_I K_{S''}) = \\
 &= [E] (K_I K_{S'} K_{S''} + [S'] K_I K_{S''} + [S'][S''] K_I + [I] K_{S'} K_{S''} + [I][S''] K_{S'}) / K_I K_{S'} K_{S''} \quad [4.20]
 \end{aligned}$$

Poiché l'unica specie cataliticamente competente è $ES'S''$ la velocità della reazione catalizzata è:

$$v = [E_{\text{tot}}] k_{\text{cat}} [S'][S''] K_I / (K_I K_{S'} K_{S''} + [S'] K_I K_{S''} + [S'][S''] K_I + [I] K_{S'} K_{S''} + [I][S''] K_{S'}) \quad [4.21]$$

Se si mantiene costante $[S'']$ e si variano $[S']$ ed $[I]$ si ottiene una famiglia di iperboli con i seguenti parametri:

$$V_{\text{max } S', [S'']=\text{cost.}} = [E_{\text{tot}}] k_{\text{cat}} [S''] / ([S''] + K_{S''}) \quad [4.22]$$

$$K_{M'}^{[S'']=\text{cost.}} = K_{S'} (K_{S''} / ([S''] + K_{S''}) + [I] / K_I) \quad [4.23]$$

La 4.22 è identica alla 2.14 (I compete con S' e quindi non cambia la V_{\max} per questo substrato); la 4.23 deve essere confrontata con la 2.16 e la 4.2 (inibizione competitiva).

Se invece si mantiene costante [S'] e si variano [S''] e [I] si ottiene una famiglia di iperboli descritta dai seguenti parametri:

$$V_{\max S''}^{[S']=\text{cost.}} = [E_{\text{tot}}] k_{\text{cat}} [S'] K_I / (K_I [S'] + [I] K_{S'}) \quad [4.24]$$

$$K_{M'}^{[S']=\text{cost.}} = K_{S''} (1 + K_I K_{S'} / (K_I [S'] + [I] K_{S'})) \quad [4.25]$$

Si confrontino la 4.24 con la 4.19 e con la 2.15 e la 4.25 con la 2.17; in particolare si noti che l'inibitore non competitivo in questo schema cambia la $K_{M'}$ apparente perché questo parametro dipendeva già in origine dalla concentrazione di S', ovvero dal grado di saturazione dell'enzima con il primo substrato, un parametro che evidentemente è sensibile alla presenza dell'inibitore.

4.5 Inibizione da prodotto

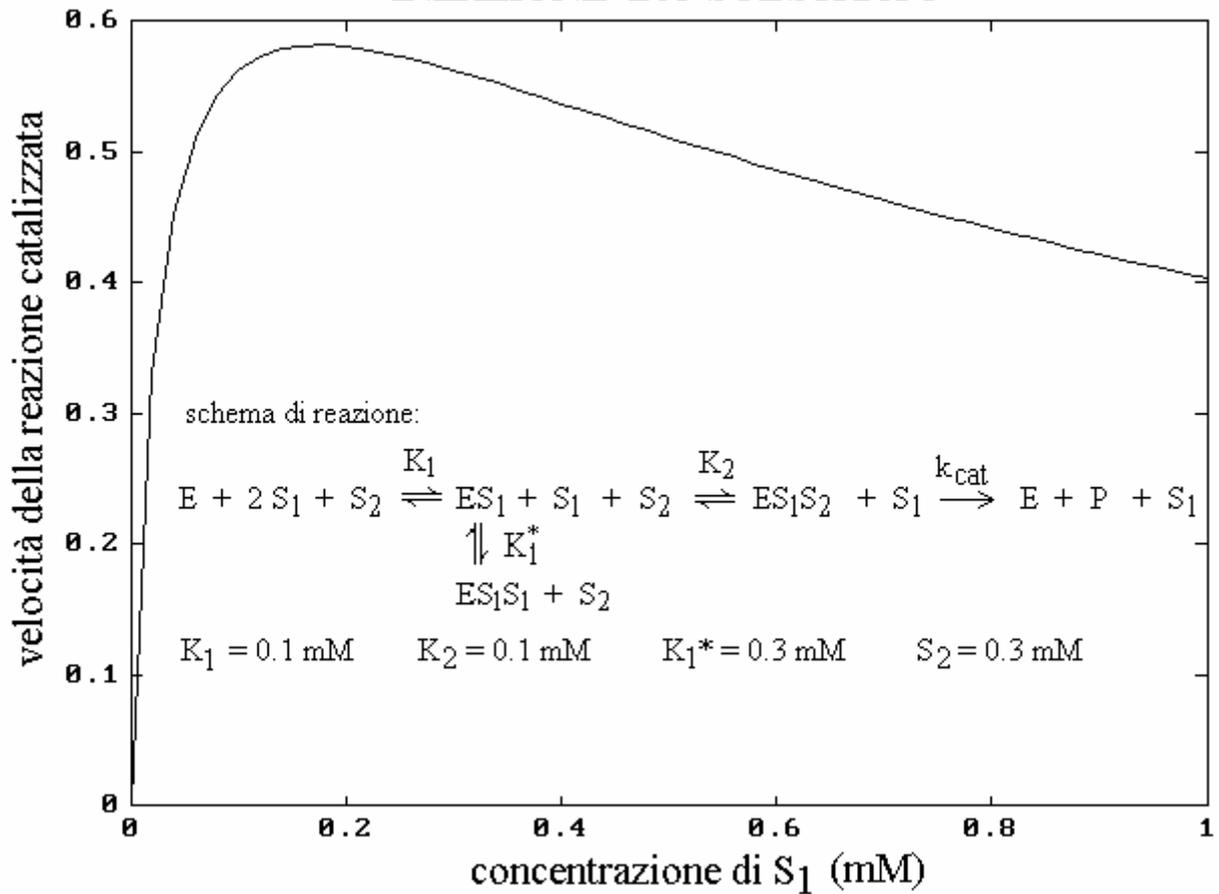
L'inibizione da prodotto **non** consiste nella presenza della reazione inversa a quella di trasformazione: $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$

Infatti questo tipo di reazione non rallenta ma accelera il conseguimento della condizione di equilibrio, sebbene diminuisca la resa in prodotto. Il caso più semplice di inibizione da prodotto è invece quello in cui il prodotto si comporta come un inibitore competitivo del substrato ed ha l'effetto di rallentare l'uscita dalla fase di stato stazionario, come discusso in 1.3 (eq. 1.18). L'inibizione da prodotto può essere meglio studiata in condizioni di stato stazionario se il prodotto, per ragioni termodinamiche, non si converte che in misura minima in substrato; in tal caso si deve soltanto misurare la velocità iniziale della reazione in funzione della concentrazione di substrato in presenza di varie concentrazioni di prodotto ed il trattamento è analogo a quello descritto nel paragrafo 4.1.

4.6 Inibizione da substrato

Anche il caso dell'inibizione da substrato è raro, e, dal punto di vista fisiologico, è ancora più pericoloso dell'inibizione non competitiva perché l'accumulo di substrato blocca vie più la funzione dell'enzima realizzando un circolo vizioso potenzialmente dannoso per l'organismo. Sono stati descritti vari casi di inibizione da substrato dei quali considereremo soltanto il più elementare: quello nel quale l'enzima ha due substrati, con i quali forma un complesso ternario, e uno di essi è un inibitore competitivo dell'altro. Un esempio classico di questo tipo di inibizione da substrato è quello della riduzione del blu di metilene ad opera dell'ipoxantina, catalizzata dalla xantina ossidasi (Dixon e Webb, Enzymes, 1964); in questo caso l'ipoxantina è un inibitore competitivo del colorante. Lo schema di reazione è il seguente:

INIBIZIONE DA SUBSTRATO



Per semplicità ho imposto che la reazione $S_1 + S_2 \rightarrow P$ sia irreversibile e ho trascurato la specie ES_2 ; questo implica che in questo esempio l'ordine di combinazione dei substrati è obbligato. Le costanti dello schema sono definite come segue:

$$K_1 = [E] [S_1] / [ES_1]$$

$$K_2 = [ES_1] [S_2] / [ES_1S_2]$$

$$K_1^* = [ES_1] [S_1] / [ES_1S_1] = [E] [S_1]^2 / K_1 [ES_1S_1]$$

Il trattamento per lo stato di pseudo-equilibrio è il seguente:

$$[ES_1] = [E] [S_1] / K_1$$

$$[ES_1S_2] = [E] [S_1] [S_2] / K_1 K_2$$

$$[ES_1S_1] = [E] [S_1]^2 / K_1 K_1^*$$

$$\begin{aligned} [E]_{tot} &= [E] (1 + [S_1] / K_1 + [S_1][S_2] / K_1 K_2 + [S_1]^2 / K_1 K_1^*) = \\ &= [E] (K_1 K_1^* K_2 + [S_1] K_1^* K_2 + [S_1][S_2] K_1^* + [S_1]^2 K_2) / K_1 K_1^* K_2 \end{aligned}$$

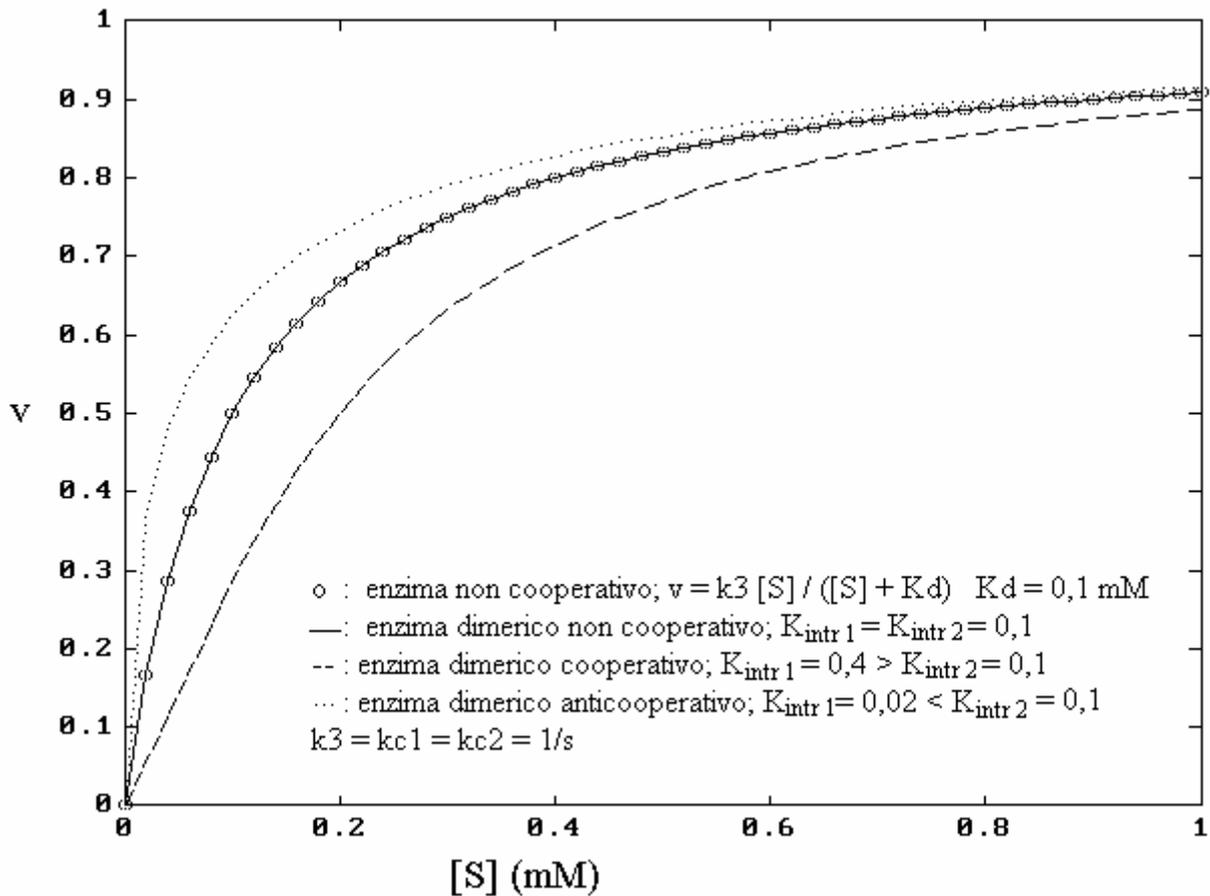
Si noti che la specie ES_1S_1 , inibita si popola in ragione del quadrato della concentrazione del primo substrato (S_1); pertanto a bassa concentrazione di S_1 è favorita la specie ES_1 , potenzialmente attiva, mentre ad alta concentrazione di S_1 è favorita la specie ES_1S_1 , inattiva. La velocità della reazione catalizzata è:

$$v = [ES_1S_2]k_{cat} = [E]_{tot} [S_1][S_2]K_1^* k_{cat} / (K_1 K_1^* K_2 + [S_1] K_1^* K_2 + [S_1][S_2] K_1^* + [S_1]^2 K_2)$$

Il valore della V_{max} si determina trascurando tutti i termini che non contengono il prodotto $[S_1][S_2]$; è facile vedere che, in teoria, $V_{max} = k_3$. Però determinare la V_{max} a concentrazione fissa di S_2 e variabile di S_1 è difficile perché l'esperimento produce una curva a campana asimmetrica anziché un'iperbole, come riportato nella figura.

5. ALLOSTERIA E COOPERATIVITA'

Se $K_{intr, 1} > K_{intr, 2}$ l'affinità apparente dell'enzima per il substrato sembra aumentare con la saturazione e la curva che descrive l'equilibrio di dissociazione è sigmoide anziché iperbolica, mentre se $K_{intr, 1} < K_{intr, 2}$ l'affinità apparente dell'enzima per il substrato sembra diminuire con la saturazione (si ricordi che le costanti sono definite per l'equilibrio di dissociazione).



Qualunque sia la relazione tra K_1 e K_2 , la concentrazione di substrato necessaria per saturare la metà dei siti attivi dell'enzima ($[S]_{50}$) risulta:

$$Y = 0,5 = ([S]_{50} K_2 + 2 [S]_{50}^2) / 2 (K_1 K_2 + [S]_{50} K_2 + [S]_{50}^2) \quad [5.8]$$

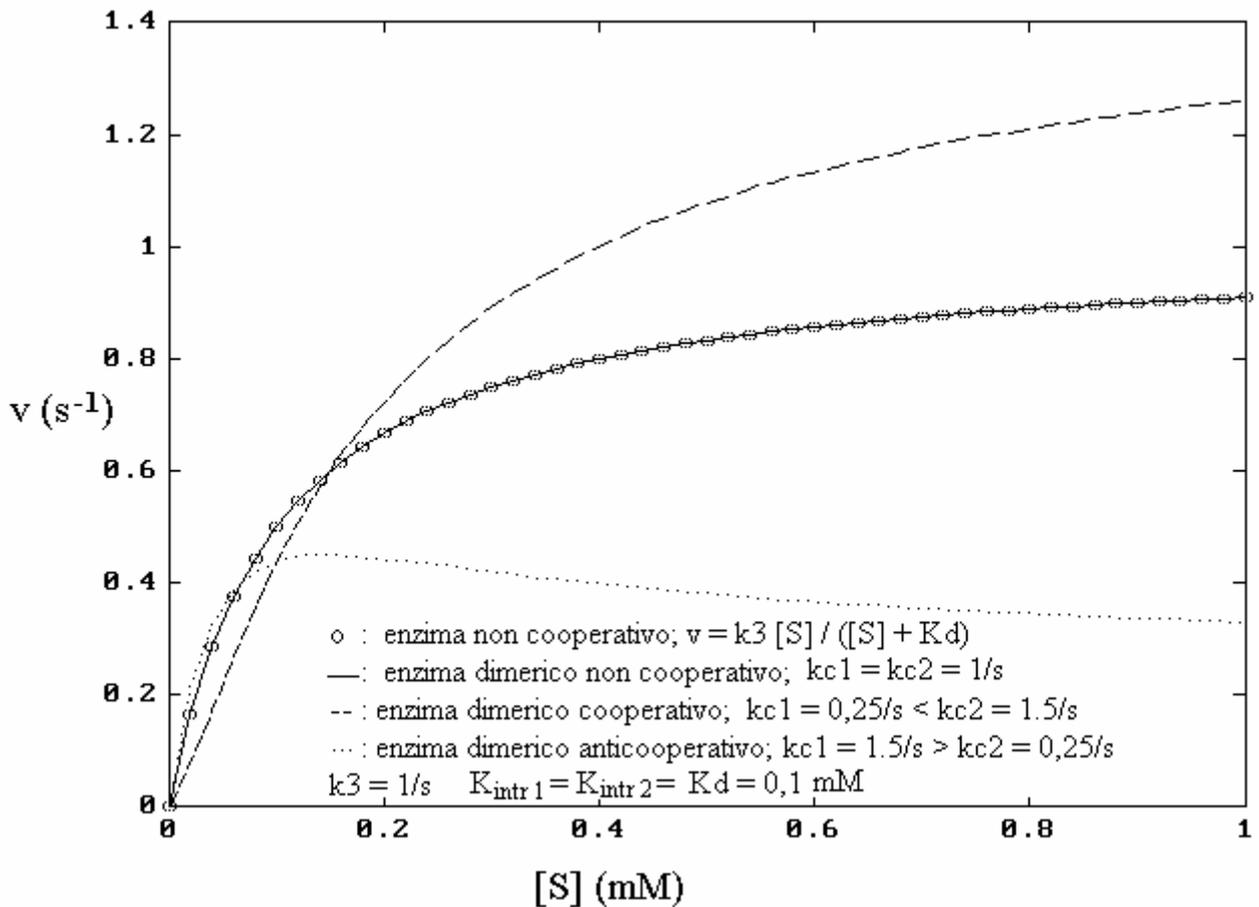
$$[S]_{50} K_2 + 2 [S]_{50}^2 = K_1 K_2 + [S]_{50} K_2 + [S]_{50}^2 \quad [5.9]$$

$$[S]_{50}^2 = K_1 K_2 = K_{intr, 1} K_{intr, 2} \quad [5.10]$$

La velocità della reazione catalizzata è:

$$v = [ES] k_{c1} + [ES_2] k_{c2} = [E]_{tot} ([S] K_2 k_{c1} + 2 [S]^2 k_{c2}) / 2 (K_1 K_2 + [S] K_2 + [S]^2) \quad [5.11]$$

Il meccanismo può prevedere varie ragioni per la cooperatività: ad esempio se $k_{c1} = k_{c2}$ si può osservare cooperatività dovuta alla differente affinità per il substrato delle specie mono- e bi- legata; di fatto con $k_{c1} = k_{c2} = 1$ la curva della velocità in funzione di $[S]$ è sovrapponibile a quella di Y in funzione di $[S]$. La differente affinità per il substrato non è però l'unica possibile causa di cooperatività; infatti anche se si avesse $K_{intr, 1} = K_{intr, 2}$ si potrebbe lo stesso osservare un fenomeno analogo se $k_{c1} \neq k_{c2}$:

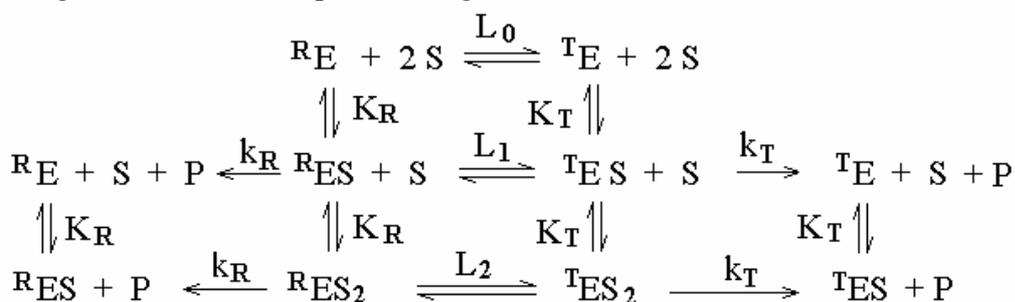


In questo modello la V_{\max} non è definita con certezza e dipende dal rapporto tra k_{c1} e k_{c2} ; infatti se $k_{c2} \geq k_{c1}$, allora la curva di v in funzione di $[S]$ tende asintoticamente a k_{c2} e $V_{\max} = [E]_{\text{tot}} k_{c2}$; invece, se $k_{c2} < k_{c1}$, la curva passa per un massimo che è una funzione complessa di tutte le costanti di equilibrio e cinetiche, e la cooperatività negativa si presenta come un vero e proprio caso di inibizione da substrato.

In molti casi di enzimi cooperativi valgono entrambe le condizioni e pertanto si ha: $K_{\text{intr}, 1} > K_{\text{intr}, 2}$ e $k_{c1} < k_{c2}$.

5.2 Meccanismo molecolare della cooperatività

L'ipotesi più plausibile sulla cooperatività, che in alcuni casi è stata confermata anche dalla cristallografia a raggi X, è la seguente: le due conformazioni allosteriche dell'enzima, qui definite T ed R per ragioni storiche, si trovano in equilibrio tra loro anche in assenza del substrato; la conformazione a bassa affinità (e, in genere, bassa attività catalitica), T, è preferita in assenza di substrato. Questa condizione è stata descritta nel dettaglio termodinamico da Monod, Wyman e Changeux (1965) e corrisponde al seguente schema di reazione:



In questo schema le costanti di equilibrio col substrato (K_R e K_T , espresse come costanti di dissociazione) e le costanti catalitiche (k_R e k_T) non dipendono dal numero di molecole di substrato legate all'enzima; per contro le costanti allosteriche (L_0 , L_1 e L_2) dipendono da questo parametro.

Più precisamente, e limitando il nostro ragionamento agli equilibri delle specie non legata e monolegata, si osserva che questi formano un quadrato termodinamico nel quale:

$$L_0 = [{}^T\text{E}] / [{}^R\text{E}] \quad [5.12]$$

$$K_R = [{}^R\text{E}] [S] / [{}^R\text{ES}] \quad [5.13]$$

$$L_1 = [{}^T\text{ES}] / [{}^R\text{ES}] \quad [5.14]$$

$$K_T = [{}^T\text{E}] [S] / [{}^T\text{ES}] \quad [5.15]$$

Consegue:

$$L_0 K_R = L_1 K_T = [{}^T\text{E}] [S] / [{}^R\text{ES}] \quad [5.16]$$

$$L_1 = L_0 K_R / K_T \quad [5.17]$$

e, generalizzando:

$$L_n = L_0 (K_R / K_T)^n \quad [5.18]$$

A causa della relazione di cui sopra, i parametri del modello sono 5: L_0 , K_R , K_T , k_R e k_T . Per un dimero il trattamento empirico già presentato è più economico in termini di costanti termodinamiche e perciò più facile da definire; per enzimi più grandi, però, il modello allosterico a due stati presenta un minor numero di parametri di quello empirico.

Le varie specie dell'enzima si trovano nei seguenti rapporti reciproci (rispetto ad ${}^R\text{E}$; bisogna ricordare di introdurre nelle equazioni i fattori statistici definiti al precedente punto 5.1 perché le costanti K_R e K_T sono intrinseche):

$$[{}^T\text{E}] = [{}^R\text{E}] L_0 \quad [5.19]$$

$$[{}^R\text{ES}] = [{}^R\text{E}][S] / 0,5 K_R \quad [5.20]$$

$$[{}^T\text{ES}] = [{}^T\text{E}][S] / 0,5 K_T = [{}^R\text{E}]L_0[S] / 0,5 K_T$$

$$[5.21]$$

$$[{}^R\text{ES}_2] = [{}^R\text{ES}][S] / 2 K_R = [{}^R\text{E}][S]^2 / K_R^2 \quad [5.22]$$

$$[{}^T\text{ES}_2] = [{}^T\text{ES}][S] / 2 K_T = [{}^T\text{E}][S]^2 / K_T^2 = [{}^R\text{E}]L_0[S]^2 / K_T^2$$

$$[5.23]$$

$$\begin{aligned} [E]_{\text{tot}} &= [{}^R\text{E}] (1 + 2[S]/K_R + [S]^2/K_R^2) + [{}^R\text{E}]L_0 (1 + 2[S]/K_T + [S]^2/K_T^2) = \\ &= [{}^R\text{E}] [(1 + [S]/K_R)^2 + L_0(1 + [S]/K_T)^2] \end{aligned} \quad [5.24]$$

La frazione di siti attivi dell'enzima combinato con il substrato è:

$$\begin{aligned} Y &= ([{}^R\text{ES}] + 2 [{}^R\text{ES}_2] + [{}^T\text{ES}] + 2 [{}^T\text{ES}_2]) / 2 [E]_{\text{tot}} = \\ &= [{}^R\text{E}] [(2[S]/K_R + 2[S]^2/K_R^2) + L_0 (2[S]/K_T + 2[S]^2/K_T^2)] / 2 [E]_{\text{tot}} = \\ &= [(S)/K_R + [S]^2/K_R^2) + L_0 ((S)/K_T + [S]^2/K_T^2)] / [(1 + [S]/K_R)^2 + L_0(1 + [S]/K_T)^2] \end{aligned} \quad [5.25]$$

generalizzando per un enzima allosterico con n subunità si ottiene:

$$Y = [(S)/K_R (1 + [S]/K_R)^{n-1} + L_0[S]/K_T (1 + [S]/K_T)^{n-1}] / [(1 + [S]/K_R)^n + L_0(1 + [S]/K_T)^n] \quad [5.26]$$

La velocità della reazione catalizzata risulta:

$$v = [E]_{\text{tot}} [k_R([S]/K_R + [S]^2/K_R^2) + L_0 k_T ([S]/K_T + [S]^2/K_T^2)] / [(1 + [S]/K_R)^2 + L_0(1 + [S]/K_T)^2] \quad [5.27]$$

Le condizioni necessarie perché l'enzima esprima comportamento cooperativo sono:

$$L_0 \gg 1 ; L_2 \ll 1 ; K_T \gg K_R ; \text{ inoltre spesso si ha anche: } k_T \ll k_R.$$

Per uno schema semplificato come questo si ha: $V_{\text{max}} = 2 [E]_{\text{tot}} k_R$ e $k_{\text{cat}} = 2 k_R$.

E' importante definire le relazioni tra il modello empirico presentato al par. 4.1 e quello allosterico. La $[S]_{50}$ (affinità apparente dell'enzima per il substrato) è la concentrazione di substrato necessaria per ottenere $Y = 0,5$ e corrisponde a:

$$2 ([S]_{50} / K_R + [S]_{50}^2 / K_R^2) + 2 L_0 ([S]_{50} / K_T + [S]_{50}^2 / K_T^2) = (1 + [S]_{50} / K_R)^2 + L_0 (1 + [S]_{50} / K_T)^2$$

$$[S]_{50}^2 / K_R^2 + L_0 [S]_{50}^2 / K_T^2 = 1 + L_0$$

$$[S]_{50}^2 = K_R^2 (1 + L_0) / (1 + L_0 K_R^2 / K_T^2) = K_R^2 (1 + L_0) / (1 + L_2) \quad [5.28]$$

$$[S]_{50} \sim K_R \sqrt{L_0} \quad [5.29]$$

Le costanti di equilibrio intrinseche $K_{intr,1}$ e $K_{intr,2}$ non hanno un vero equivalente nel modello allosterico e corrispondono all'affinità media delle popolazioni di $^R E$ e $^T E$. Possono essere ricavate definendo i valori teorici della $[S]_{50}$ per la prima e la seconda molecola di substrato, facendo l'astrazione teorica che l'equilibrio sia limitato alla sola reazione considerata; quindi $K_{intr,1}$ corrisponde alla concentrazione di substrato necessaria per ottenere $[^R E] + [^T E] = [^R ES] + [^T ES]$ con la condizione ipotetica e puramente teorica che non intervenga legame al secondo sito mentre $K_{intr,2}$ corrisponde alla concentrazione di substrato che sarebbe necessaria per ottenere $[^R ES] + [^T ES] = [^R ES_2] + [^T ES_2]$ in assenza di $[^R E]$ e $[^T E]$; poiché ci si riferisce in ciascuno dei due casi alla costante intrinseca di affinità di un solo sito attivo, si può trascurare il fattore statistico:

$$[^R E] + [^T E] L_0 = [^R E] K_{intr,1} / K_R + L_0 [^R E] K_{intr,1} / K_T$$

$$K_{intr,1} = (1 + L_0) K_R / (1 + L_0 K_R / K_T) = K_R (1 + L_0) / (1 + L_1) \quad [5.30]$$

$$K_{intr,2} = K_R (1 + L_1) / (1 + L_2) \quad [5.31]$$

Se $k_R = k_T$, $K_M = [S]_{50} = \sqrt{(K_{intr,1} K_{intr,2})}$; altrimenti la K_M dipende anche dai valori di k_R e k_T .

L'interpretazione energetica del modello allosterico a due stati corrisponde al grafico seguente:

