

Corso di Biologia dei Sistemi  
A.A. 2015/16

# Cinetiche di reazione

***Prof. Carlo Cosentino***

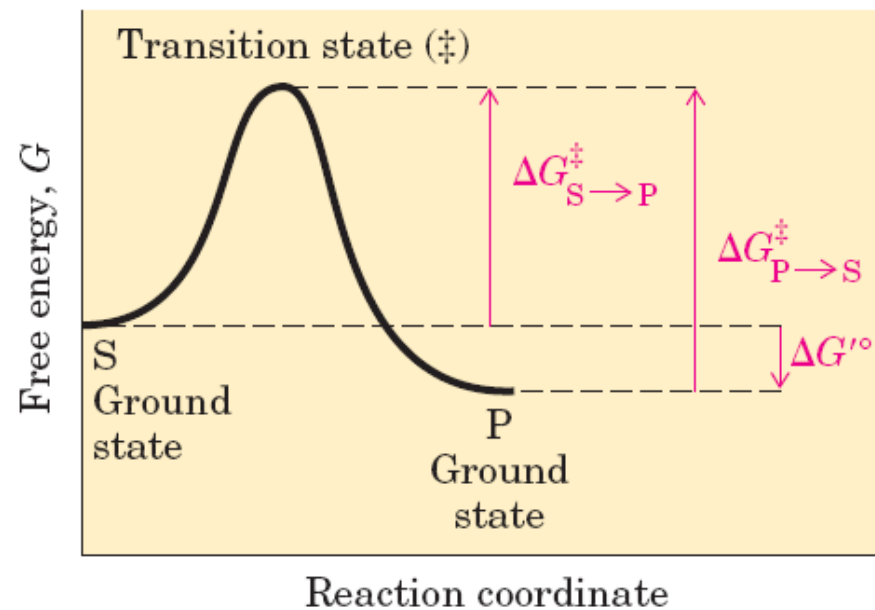
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica  
Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro  
tel: 0961-3694051

[carlo.cosentino@unicz.it](mailto:carlo.cosentino@unicz.it)

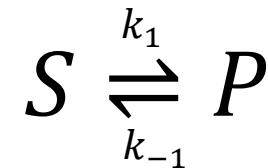
<http://bioingegneria.unicz.it/~cosentino>

<http://wpage.unina.it/carcosen>

- ✦ L'equilibrio è legato alla variazione di energia biochimica libera standard,  $\Delta G'^{\circ}$
- ✦ La velocità della reazione, invece, è determinata dall'energia di attivazione,  $\Delta G_{S \rightarrow P}^{\ddagger}$



- ⤴ Si consideri la semplice reazione reversibile
- ⤴ Essa può essere descritta dal sistema di eq.



$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[S] + k_{-1}[P] \\ \frac{d[P]}{dt} &= k_1[S] - k_{-1}[P] \end{aligned} \quad \longrightarrow \quad K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

- ⤴ La **costante di equilibrio**  $K'_{eq}$  soddisfa la relazione termodinamica

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$$

$$R \text{ (costante dei gas)} = 8.315 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$$

$$T \text{ (temperatura assoluta)} = 298 \text{ K (25 }^{\circ}\text{C)}$$



- ✦ La velocità della reazione è determinata da
  - ✦ concentrazione dei singoli reagenti
  - ✦ una costante cinetica, in genere indicata con  $k$

- ✦ Ad es. per la reazione  $S \xrightarrow{k} P$  la velocità di reazione è

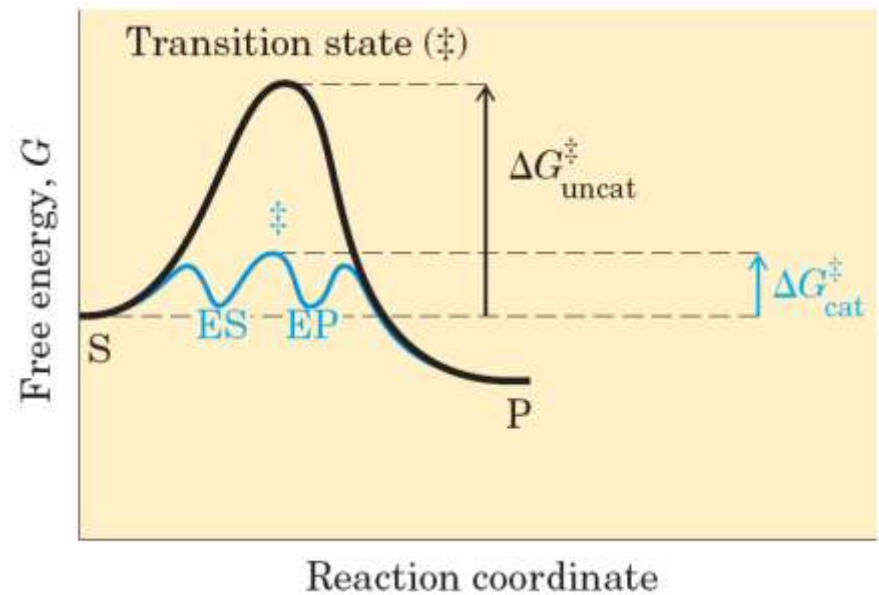
$$V = k[S]$$

- ✦ Dalla teoria dello stato di transizione si ha

$$k = \frac{\mathbf{k}T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

dove  $\mathbf{k}$  e  $h$  sono la costante di Boltzmann e Planck rispettivamente

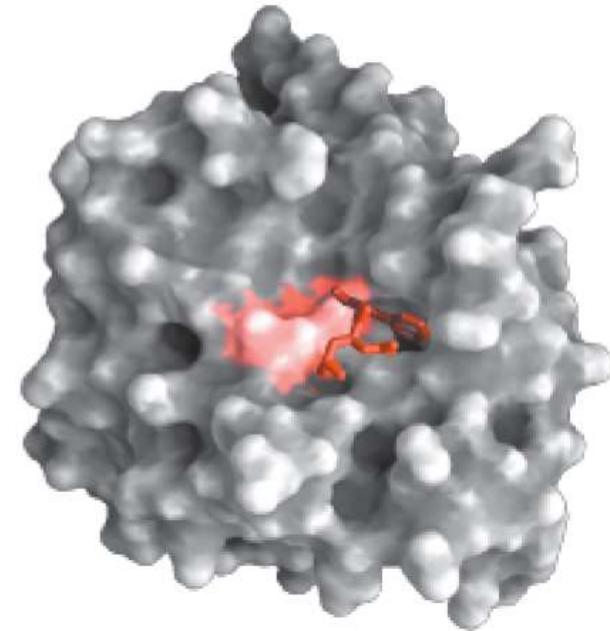
- ⤴ Gli **enzimi** sono una tipologia di proteine specializzate nella **catalisi** delle reazioni
- ⤴ I catalizzatori non reagiscono, ma favoriscono la reazione diminuendo la soglia di energia necessaria alla formazione del prodotto
- ⤴ Nel caso degli enzimi questo avviene tramite la formazione di un composto enzima-substrato, da cui poi il substrato viene trasformato nel prodotto finale della reazione



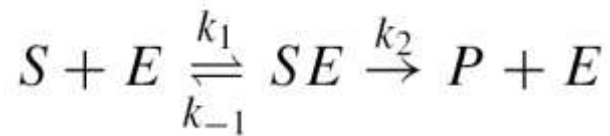


- ✦ Gli enzimi giocano un ruolo chiave in tutti i processi biologici
- ✦ Essi hanno un ruolo importante nella regolazione delle vie metaboliche
- ✦ Molte malattie sono causate dalla carenza o assoluta mancanza di enzimi
- ✦ Molti farmaci agiscono interagendo con gli enzimi

- Le reazioni catalizzate da enzimi avvengono in una *ansa* chiamata **sito attivo** in cui si formano condizioni favorevoli alla reazione
- La molecola che si lega al sito attivo viene chiamata **substrato**
- La superficie del sito attivo viene delineata da amminoacidi i cui residui legano il substrato e ne catalizzano la trasformazione

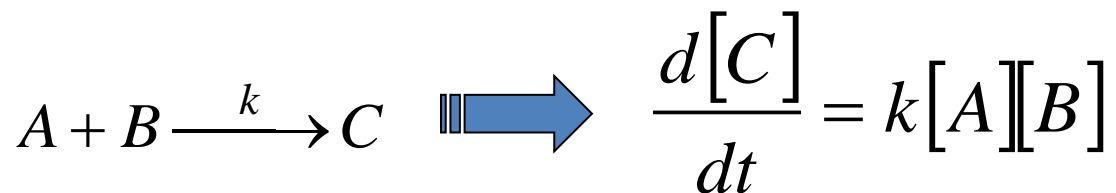


- Il modello base di reazione enzimatica è stato proposto da Michaelis e Menten nel 1913



dove  $k_1, k_{-1}, k_2$  sono costanti positive associate ai tassi di reazione

- La legge di azione di massa ci dice che il tasso di reazione è proporzionale al prodotto della concentrazione dei reagenti



L. Michaelis (1875-1949)



M. Menten (1879-1960)



- ⤴ Dalla reazione ricaviamo il seguente modello

$$\begin{aligned} \dot{s} &= -k_1 es + k_{-1}c, & \dot{e} &= -k_1 es + (k_{-1} + k_2)c \\ \dot{c} &= k_1 es - (k_{-1} + k_2)c, & \dot{p} &= k_2c \end{aligned}$$

dove abbiamo indicato le concentrazioni delle varie specie come

$$s := [S], e := [E], c := [ES], p := [P]$$

e le condizioni iniziali sono  $s(0)=s_0$ ,  $e(0)=e_0$ ,  $c(0)=0$ ,  $p(0)=0$

- ⤴ Si noti che l'eq. di  $p$  è disaccoppiata dalle altre e fornisce

$$p(t) = k_2 \int_0^t c(\tau) d\tau$$



- La quantità totale di enzima, libero più legato, rimane invariata nel tempo, come si può vedere anche sommando la seconda e terza eq.

$$\dot{e} + \dot{c} = 0 \quad \Rightarrow \quad e(t) + c(t) = e_0$$

per cui possiamo ricavare  $e(t)$  da questa relazione e sostituire, ottenendo il sistema semplificato in due equazioni

$$\begin{aligned} \dot{s} &= -k_1 e_0 s + (k_1 s + k_{-1})c, & s(0) &= s_0 \\ \dot{c} &= k_1 e_0 s - (k_1 s + k_{-1} + k_2)c, & c(0) &= 0 \end{aligned}$$

- ⤴ Tipicamente la formazione iniziale del complesso ES è molto veloce, dopodiché rimane all'equilibrio (*approssimazione di pseudo-regime*)
- ⤴ Ciò si traduce nell'assumere  $dc/dt \approx 0$ , da cui

$$c(t) = \frac{e_0 s(t)}{s(t) + K_m} \quad \Rightarrow \quad \dot{s} = -\frac{k_2 e_0 s}{s + K_m}$$

dove la costante positiva

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

è detta **costante di Michaelis-Menten**



- ✦ La quantità di enzima si assume tipicamente piccola rispetto a quella di substrato, per cui quest'ultima rimane pressoché invariata durante la formazione del complesso  $\Leftrightarrow s(0) = s_0$

- ✦ Dall'eq. di  $\dot{s}$  otteniamo la soluzione implicita

$$s(t) + K_m \ln s(t) = s_0 + K_m \ln s_0$$

- ✦ Si noti che l'eq. di  $c(t)$  non soddisfa la cond. iniz.  $c(0)=0$ , ma l'approssimazione vale in molti casi
- ✦ Esistono due scale temporali, una corrispondente alla formazione del complesso, l'altra relativa alla trasformazione del substrato

- ✦ Per stabilire il range di validità del modello approssimato dobbiamo rispondere a diverse domande
  - ✦ Quanto è veloce il transitorio iniziale?
  - ✦ Per quali valori di parametri sono sufficienti le approssimazioni di pseudo-regime?
  - ✦ Cosa accade se la concentrazione di enzima non è effettivamente piccola rispetto a quella di substrato?



- Per rispondere alle domande precedenti dobbiamo innanzitutto adimensionalizzare il sistema, mediante le trasformazioni

$$\tau = k_1 e_0 t, \quad u(\tau) = \frac{s(t)}{s_0}, \quad v(\tau) = \frac{c(t)}{e_0},$$

$$\lambda = \frac{k_2}{k_1 s_0}, \quad K = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 s_0} = \frac{K_m}{s_0}, \quad \varepsilon = \frac{e_0}{s_0}$$

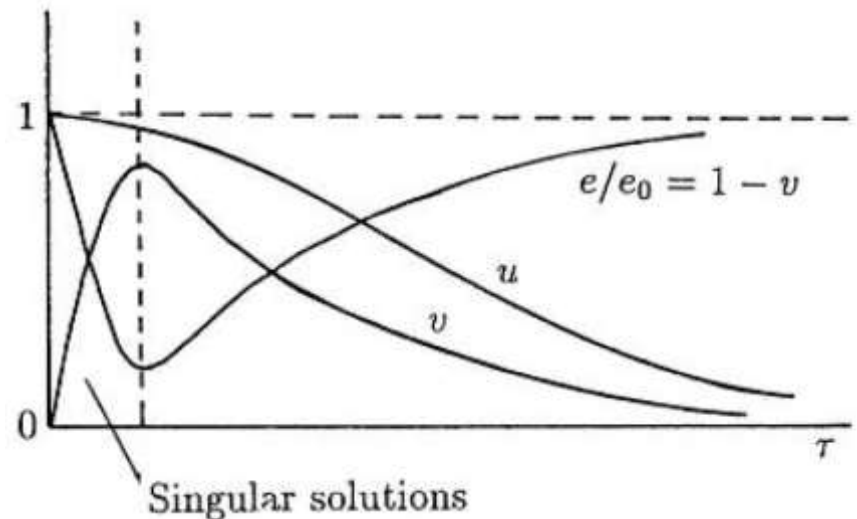
- Che è una scelta ragionevole se  $\varepsilon \ll 1$ , ossia quando l'enzima è presente in quantità molto minore del substrato

Utilizzando le trasformazioni precedenti otteniamo il sistema

$$\begin{aligned} \dot{u} &= -u + (u + K - \lambda)v, & u(0) &= 1 \\ \varepsilon \dot{v} &= u - (u + K)v, & v(0) &= 0 \end{aligned}$$

si noti che  $K - \lambda > 0$

Non è possibile ricavare una soluzione analitica, ma si può abbozzare l'andamento studiando il segno delle derivate al variare di  $u$





- Sfruttando il fatto che  $s$  non varia apprezzabilmente durante il transitorio iniziale si può valutare la durata di questo dall'eq. di  $c$  (ponendo  $s = s_0$ )

$$\dot{c} = k_1 e_0 s_0 - k_1 (s_0 + K_m) c$$

- La costante di tempo associata a questo sistema del primo ordine è

$$t_c = \frac{1}{k_1 (s_0 + K_m)}$$

- Una stima della durata della dinamica di  $s$  si ottiene considerando la derivata massima (ossia il valore per  $s = s_0$ )

$$t_s \approx \frac{s_0}{\left| \frac{ds}{dt} \right|_{\max}} \approx \frac{s_0 + K_m}{k_2 e_0}$$





- ⤴ Sulla base delle stime effettuate, la condizione che il transitorio iniziale sia molto veloce rispetto alla dinamica della trasformazione del substrato, ossia  $t_c \ll t_s$  si riscrive

$$\frac{k_2 e_0}{k_1 (s_0 + K_m)^2} \ll 1$$

- ⤴ Un'altra condizione per la validità dell'approssimazione è che la deplezione di S durante il transitorio iniziale sia una frazione trascurabile del totale, ossia  $|\Delta s/s_0| \ll 1$

$$\frac{e_0}{s_0 + K_m} \ll 1$$

- ⤴ La condizione precedente si ottiene considerando una stima per eccesso di  $ds/dt$ , derivabile dalla eq. nel modello del 2° ordine (v. lucido 10)

$$\Delta s \leq \left| \frac{ds}{dt} \right|_{\max} t_c = k_1 e_0 s_0 \cdot \frac{1}{k_1 (s_0 + K_m)}$$

- ✦ Si noti, tuttavia, che il primo vincolo si può riscrivere come

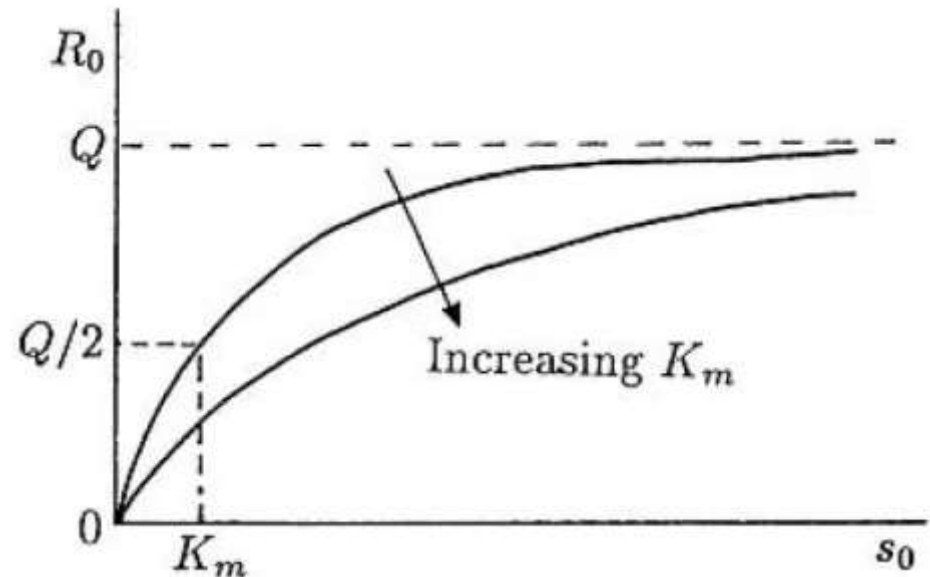
$$\frac{k_2 e_0}{k_1 (s_0 + K_m)^2} = \frac{e_0}{s_0 + K_m} \cdot \frac{1}{1 + (k_{-1}/k_2) + (s_0 k_1/k_2)} \ll 1$$

- ✦ Il secondo vincolo risulta, pertanto, più stringente e può essere considerato come condizione di validità dell'approssimazione di pseudo-regime
- ✦ Si noti inoltre che, anche se  $e_0/s_0 = O(1)$ , **l'approssimazione rimane valida se  $K_m$  è grande**

- ▲ Nella pratica sperimentale si misurano due parametri
  - ✦ La costante di Michaelis-Menten
  - ✦ La velocità massima di reazione

$$R_0 = \frac{k_2 e_0 s_0}{s_0 + K_m} = \frac{Q s_0}{s_0 + K_m}$$

$$Q = [R_0]_{\max} = k_2 e_0$$



# Quasi-Steady-State-Approximation (QSSA) e total QSSA



- ✦ L'approssimazione di pseudo-regime è conosciuta come Quasi-Steady-State-Approximation (QSSA)
- ✦ La presenza di sottosistemi con scale temporali molto diverse può complicare notevolmente sia la simulazione numerica che la comprensione del sistema
- ✦ Per questo è comune approssimare le dinamiche veloci come se fossero istantanee e ridurre le dinamiche del sistema a quelle del/i sottosistema/i più lento/i

$$d[A]/dt = \varepsilon^{-1} f([A],[B],[C],\dots)$$

fast

$$d[B]/dt = g([A],[B],[C],\dots)$$

intermediate

$$d[C]/dt = \varepsilon h([A],[B],[C],\dots)$$

slow

$$0 < \varepsilon \ll 1.$$

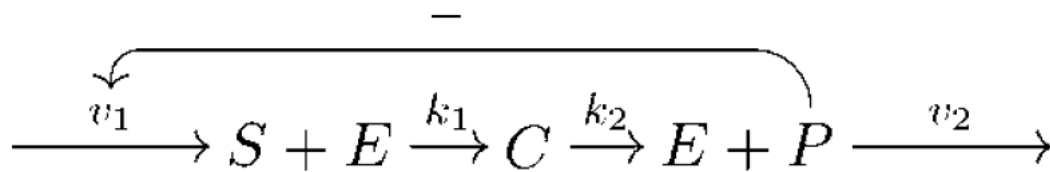


- ✧ Nelle reazioni enzimatiche, la validità della QSSA dipende dall'entità
  - ✧ della differenza delle scale temporali
  - ✧ della differenza di concentrazione tra enzima e substrato
  
- ✧ Quando si considerano reti di interazioni tra proteine, la QSSA in genere non produce risultati validi, perché
  - ✧ Gli enzimi hanno substrati multipli
  - ✧ I substrati sono catalizzati da più enzimi
  - ✧ Enzimi e substrati spesso hanno ruoli intercambiabili (ad es., due proteine chinasi possono fosforilarsi a vicenda)

- Un articolo interessante sulla validità della QSSA

E.H. Flach, S. Schnell, *Use and abuse of the quasi-steady-state approximation*, IEE Proc.–Syst. Biol. 153(4), 187–191, 2006

- Gli autori hanno confrontato i risultati di due modelli del meccanismo di Van Slyke–Cullen, un caso speciale di reazione di M-M, con e senza QSSA



$$\begin{aligned}
 s' &= v_1(p) - k_1se \\
 e' &= -k_1se + k_2c \\
 c' &= k_1se - k_2c \\
 p' &= k_2c - v_2(p)
 \end{aligned}$$

- ⤴ Dalla conservazione della quantità totale di enzima, otteniamo

$$\dot{s} = v_1(p) - k_1 s(e_0 - c)$$

$$\dot{c} = k_1 s(e_0 - c) - k_2 c$$

$$\dot{p} = k_2 c - v_2(p)$$

- ⤴ Adimensionalizzando possiamo eliminare i parametri  $k_1$  e  $k_2$ ,

$$s = \frac{k_2}{k_1} \bar{s}, \quad c = \frac{k_2}{k_1} \bar{c}, \quad p = \frac{k_2}{k_1} \bar{p}, \quad t = \frac{1}{k_2} \bar{t}$$

$$\dot{\bar{s}} = \bar{v}_1(\bar{p}) - \bar{s}(\bar{e}_0 - \bar{c})$$

$$\bar{e}_0 = k_1 e_0 / k_2$$

$$\dot{\bar{c}} = \bar{s}(\bar{e}_0 - \bar{c}) - \bar{c}$$

$$\bar{v}_i(\bar{p}) = k_1 v_i(p) / k_2$$

$$\dot{\bar{p}} = \bar{c} - \bar{v}_2(\bar{p})$$

*Nelle prossime slide, per brevità, indicheremo le nuove variabili senza la barretta sopra*



- ♣ Dall conservazione totale della massa si ricava la relazione

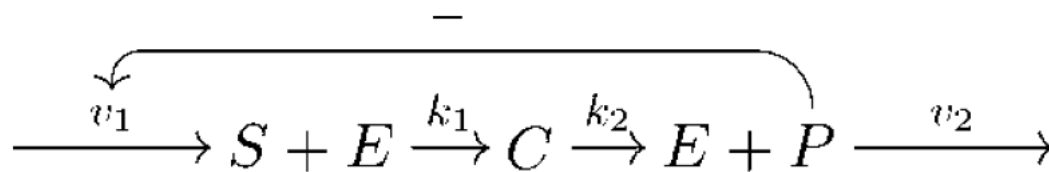
$$\dot{s} + \dot{c} + \dot{p} = v = v_1 - v_2$$

- ♣ Se i flussi in ingresso e uscita sono uguali ( $v = 0$ ), possiamo eliminare un'eq

$$\dot{s} = v_1(p) - s(e_0 - c)$$

$$\dot{c} = s(e_0 - c) - c$$

- ♣ Se  $v_i = 0$ , il sistema è isolato, poiché non entrano e non escono molecole
- ♣ Se  $v_1$  è costante, l'equazione di  $p(t)$  è disaccoppiata dalle altre (come nel modello di M-M)





- ✦ Consideriamo il sistema ridotto del secondo ordine ( $v = 0$ ), possiamo visualizzare le traiettorie sul piano delle fasi
- ✦ Annullando le derivate troviamo le isocline

$$s = \frac{v_1}{e_0 - c} \quad c = \frac{e_0 s}{1 + s}$$

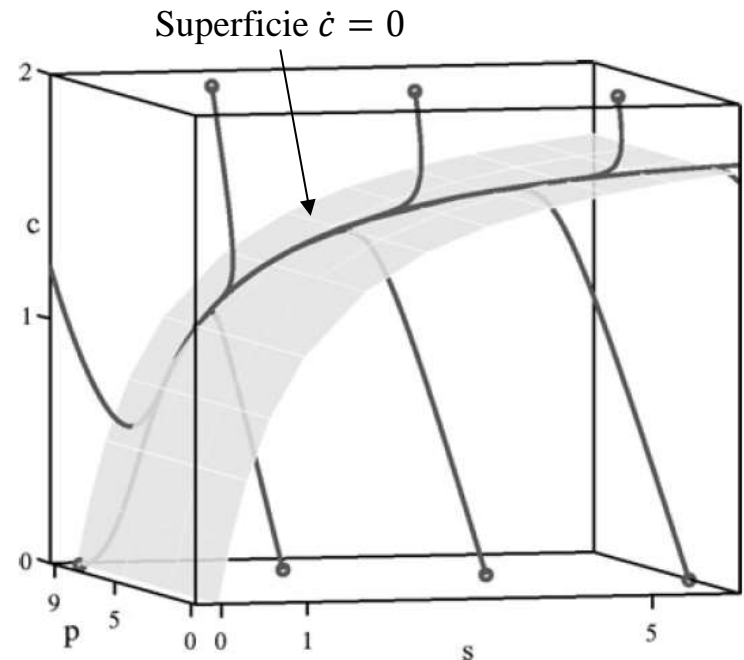
- ✦ L'intersezione ci fornisce il punto di equilibrio

$$\left( \left( \frac{v_1}{e_0} - v_1 \right), v_1 \right)$$

che dipende da  $k_1$  e  $k_2$ , come si può vedere tornando alle variabili originali

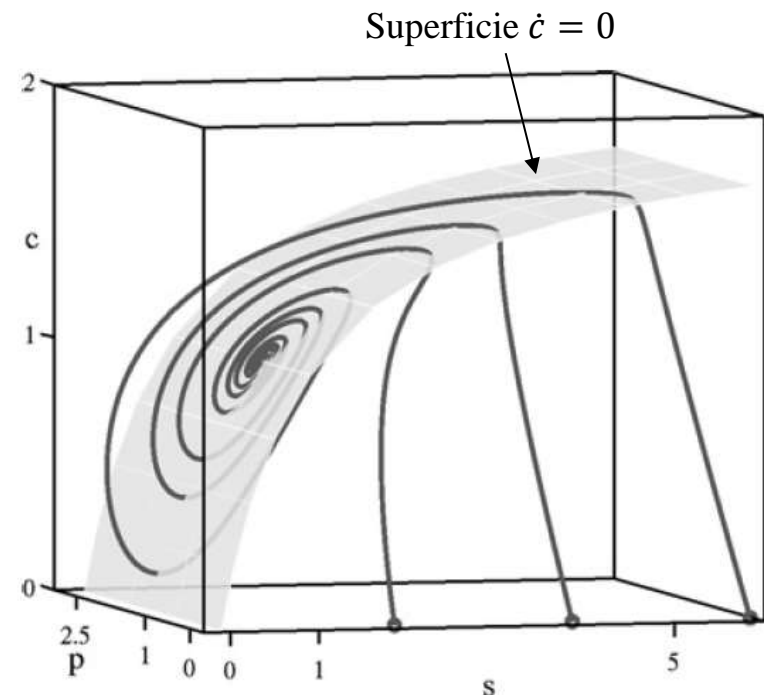
- ✦ Analizziamo il sistema linearizzato nell'intorno del punto di equilibrio calcolato
- ✦ Quando  $v$  è costante, gli autovalori del sistema linearizzato risultano reali e negativi; abbiamo quindi un nodo stabile nel piano delle fasi
- ✦ Le traiettorie sono attratte su una traiettoria definita dall'intersezione delle curve  $\dot{s} = 0$  e  $\dot{c} = 0$  e convergono nel punto di eq.

$$\left( \left( \frac{v_1}{e_0} - v_1 \right), v_1, s_0 \right)$$



- ✧ A questo punto, ripetiamo l'analisi, usando però il modello completo del terzo ordine (senza QSSA)
- ✧ In questo caso, l'analisi del modello linearizzato nell'intorno del punto di equilibrio porta a conclusioni diverse:

- ✧ Il p. di equilibrio è ancora asintoticamente stabile
- ✧ Per alcuni valori di  $v_1$  e  $v_2$ , gli autovalori diventano complessi, portando alla comparsa di fuoco stabile (spirale convergente)





- ✧ Adesso consideriamo il caso  $v_1(p) \gg v_2(p)$
- ✧ Assumiamo che, dopo un transitorio iniziale, la quantità di complesso varia molto lentamente, ossia  $dc/dt \approx 0$
- ✧ Possiamo esprimere  $c$  in funzione di  $s$

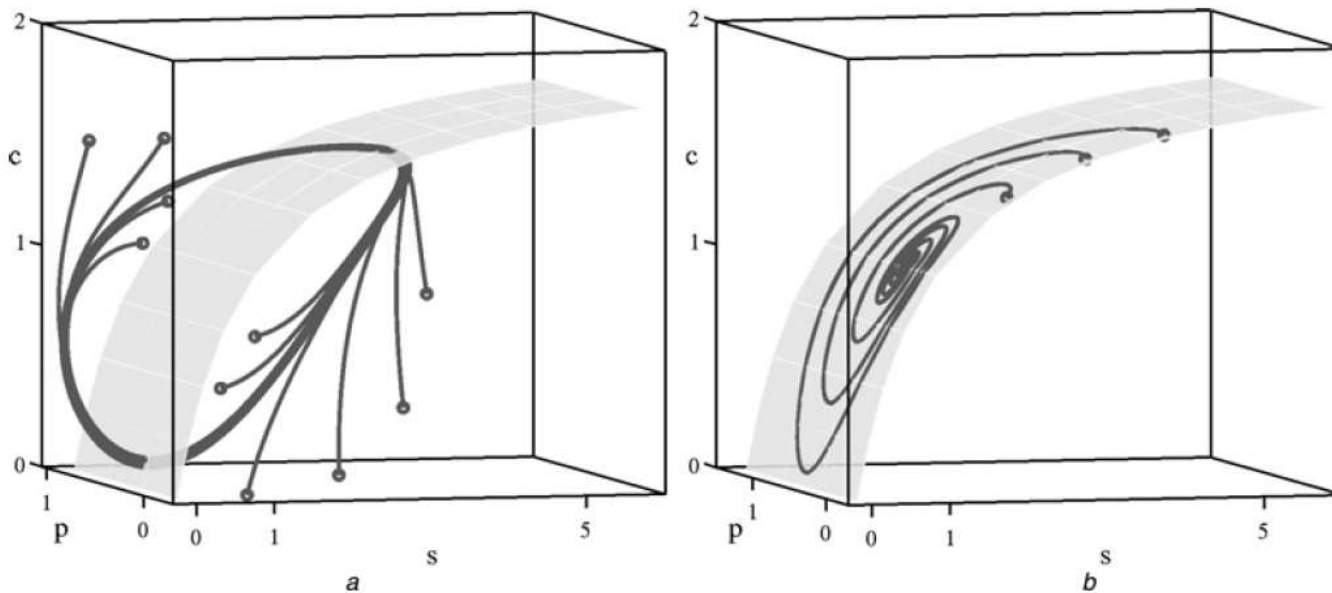
$$c \approx \frac{e_0 s}{1 + s}$$

- ✧ Sostituendo nelle altre equazioni, otteniamo

$$\dot{s} \approx v_1(p) - \frac{e_0 s}{1 + s}$$

$$\dot{p} \approx \frac{e_0 s}{1 + s} - v_2(p)$$

- ✧ Anche in questo caso il comportamento del sistema può variare notevolmente
- ✧ Le traiettorie mostrate sotto sono ottenute con gli stessi valori dei parametri e dei flussi, usando il modello completo (a) e quello ricavato con QSSA (b)
- ✧ Il modello esibisce un ciclo limite, mentre le traiettorie del sistema ridotto mostrano un modo a spirale convergente





- ✦ La QSSA è probabilmente il metodo più comunemente utilizzato per ridurre la complessità dei modelli di pathway biochimici
- ✦ Tuttavia, come dimostrato in questo e altri lavori, questa approssimazione può
  - ✦ camuffare alcune caratteristiche della dinamica nel transitorio
  - ✦ alterare le dinamiche di lungo periodo e, quindi, il comportamento qualitativo del sistema originale

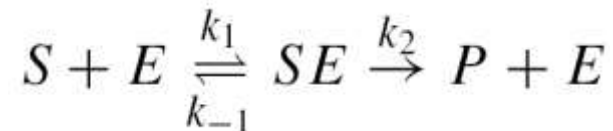


- ✦ Un modo per superare le limitazioni della QSSA nelle reazioni enzimatiche è stato proposto nel lavoro

JAM Borghans, RJ De Boer, LA Segel, *Extending the Quasi-Steady-State Approximation by Changing Variables*, Bull. Math. Biol. 58(1), 43–63, 1996

- ✦ L'idea di base è che, quando  $e_0$  e  $s_0$  hanno valori confrontabili, conviene utilizzare come variabile la conc. totale di substrato (libero + legato)

$$\hat{S}(t) = S(t) + C(t)$$





- ✦ Applicando la tQSSA alla reazione di M-M, otteniamo

$$\frac{d\hat{s}}{dt} = -k_2c \quad \hat{s}(0) = s_0$$

$$\frac{dc}{dt} = k_1[(e_0 - c)(\hat{s} - c) - K_Mc] \quad c(0) = 0$$

dove  $e + c = e_0$

- ✦ Assumendo  $\frac{dc}{dt} = 0$ , l'espressione di pseudo-regime di  $c(t)$  è data dalla soluzione della seguente equazione di secondo grado

$$c^2 - (e_0 + K_M + \hat{s})c + e_0\hat{s} = 0$$



- ✦ Tzafriri and Edelman (J. Theor. Biol., 2004) hanno derivato condizioni sufficienti per la validità della tQSSA, che possono essere sintetizzate come

$$k_{-1} \gg k_2$$

ossia, la velocità di dissociazione del complesso enzima-substrato deve essere molto più veloce della conversione del substrato in prodotto

- ✦ La tQSSA, dunque, rappresenta una buona approssimazione a prescindere dal rapporto tra quantità di enzima e substrato e tra le scale temporali
- ✦ Nel seguente articolo sono riportate interessanti applicazioni della tQSSA a diverse reti di interazione proteina-proteina

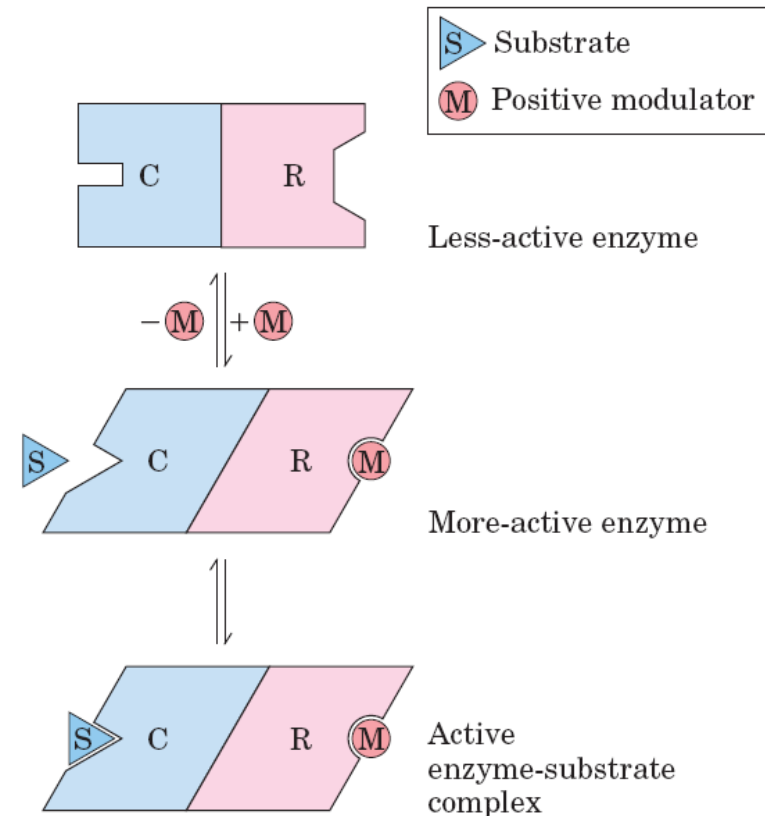
A Ciliberto, F Capuani, JJ Tyson, *Modeling Networks of Coupled Enzymatic Reactions Using the total Quasi-Steady State Approximation*, PLOS Computational Biology 3(3), 463–472, 2007

## Altri tipi di reazioni enzimatiche



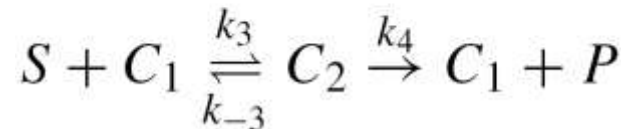
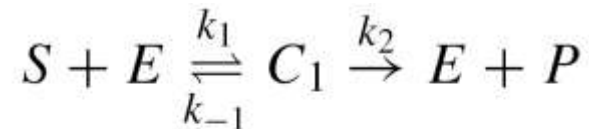
- ✦ Nel modello base abbiamo supposto che una molecola di enzima si combini con una sola di substrato
- ✦ Molte proteine hanno più di un sito di legame, ad es. l'emoglobina ha quattro siti per le molecole di ossigeno
- ✦ Una reazione tra un enzima e un substrato si dice **cooperativa** se una singola molecola di enzima, dopo aver legato una molecola di substrato ad un sito, può legarne un'altra ad un altro sito

- Una tipologia di reazione cooperativa molto importante si ha quando il legame di un substrato ad un sito può influenzare il legame di altri substrati ad altri siti (**enzima allosterico**)
- Un substrato viene detto attivatore o inibitore a seconda che aumenti o diminuisca l'attività di legame in altri siti
- Se la specie substrato funge anche da modulatore l'interazione si dice *omotropica*, altrimenti *eterotropica*





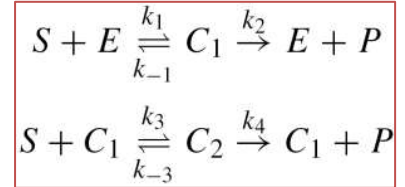
- Consideriamo ora un semplice esempio di reazione cooperativa in cui un enzima ha due siti di legame



- Calcoliamo l'approssimazione di pseudo-regime e la funzione di trasformazione del substrato



⤴ Applicando la legge dell'azione di massa otteniamo



$$\dot{s} = -k_1se + (k_{-1} - k_3s)c_1 + k_{-3}c_2$$

$$\dot{c}_1 = k_1se - (k_{-1} + k_2 + k_3s)c_1 + (k_{-3} + k_4)c_2$$

$$\dot{c}_2 = k_3sc_1 - (k_{-3} + k_4)c_2$$

$$\dot{e} = -k_1se + (k_{-1} + k_2)c_1$$

$$\dot{p} = k_2c_1 + k_4c_2$$

$$s(0) = s_0, \quad e(0) = e_0, \quad c_1(0) = c_2(0) = p(0) = 0$$

⤴ La conservazione dell'enzima fornisce

$$e + c_1 + c_2 = e_0$$

- ⤴ Analogamente ai casi precedenti troviamo il modello ridotto

$$\begin{aligned}\dot{s} &= -k_1 e_0 s + (k_{-1} + k_1 s - k_3 s) c_1 + (k_1 s + k_{-3}) c_2 \\ \dot{c}_1 &= k_1 e_0 s - (k_{-1} + k_2 + k_1 s + k_3 s) c_1 + (k_{-3} + k_4 - k_1 s) c_2 \\ \dot{c}_2 &= k_3 s c_1 - (k_{-3} + k_4) c_2\end{aligned}$$

e adimensionalizziamo usando le relazioni

$$\begin{aligned}\tau &= k_1 e_0 t, & u &= \frac{s}{s_0}, & v_1 &= \frac{c_1}{e_0}, & v_2 &= \frac{c_2}{e_0}, & a_1 &= \frac{k_{-1}}{k_1 s_0}, \\ a_2 &= \frac{k_2}{k_1 s_0}, & a_3 &= \frac{k_3}{k_1}, & a_4 &= \frac{k_{-3}}{k_1 s_0}, & a_5 &= \frac{k_4}{k_1 s_0}, & \varepsilon &= \frac{e_0}{s_0}\end{aligned}$$



✦ Sostituendo otteniamo

$$\dot{u} = -u + (u - a_3u + a_1)v_1 + (a_4 + u)v_2$$

$$\varepsilon \dot{v}_1 = u - (u + a_3u + a_1 + a_2)v_1 + (a_4 + a_5 - u)v_2$$

$$\varepsilon \dot{v}_2 = a_3uv_1 - (a_4 + a_5)v_2$$

$$u(0) = 1, \quad v_1(0) = v_2(0) = 0$$

✦ Come nei casi precedenti è possibile considerare a regime le eq. relative a  $v_1$  e  $v_2$ , ricavare queste quantità in funzione di  $u$  e sostituire nella prima eq., ottenendo

$$\dot{u} = -u \frac{a_2 + a_3a_5u(a_4 + a_5)^{-1}}{a_1 + a_2 + u + a_3u^2(a_4 + a_5)^{-1}} = -r(u) < 0$$

- ▲ Riportando in formato dimensionale troviamo la velocità di reazione di Michaelis-Menten per  $e_0/s_0 \ll 1$

$$R_0(s_0) = \left. \frac{ds}{dt} \right|_{t=0} = e_0 s_0 \frac{k_2 K'_m + k_4 s_0}{K_m K'_m + K'_m s_0 + s_0^2}$$

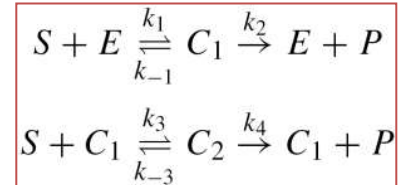
dove

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad K'_m = \frac{k_4 + k_{-3}}{k_3}$$

sono le costanti di Michaelis-Menten delle due reazioni

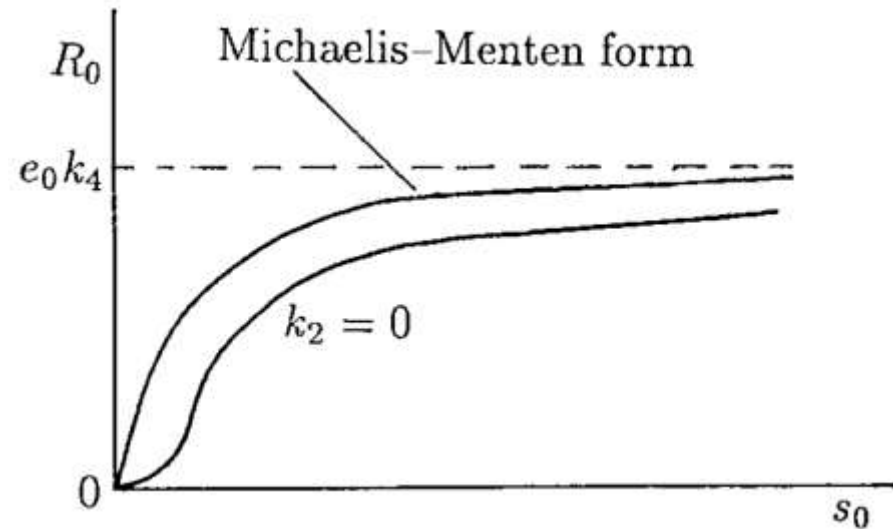
✦ La curva risultante può differire da quella di una reazione base, come mostrato in figura

✦ Ad es., per  $k_2 = 0$  si vede subito che  $s_0 \rightarrow 0 \Rightarrow R_0 \propto s_0^2$



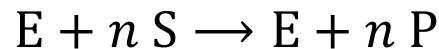
✦ In questo caso l'andamento viene approssimato con una curva di Hill

$$R_0(s_0) = \frac{Qs_0^n}{s_0^n + K_m^n}, \quad n > 0$$



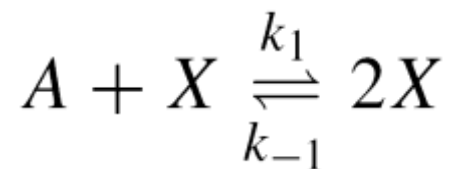


- ✦ Si noti che il numero  $n$  non è necessariamente intero, inoltre si definiscono i seguenti casi
  - ✦  $n > 1 \Leftrightarrow$  cooperazione positiva
  - ✦  $n < 1 \Leftrightarrow$  cooperazione negativa
  - ✦  $n = 1 \Leftrightarrow$  cooperazione nulla
- ✦ Alla stessa relazione (ma con  $n$  intero) si arriva considerando un modello di enzima che lega contemporaneamente  $n$  molecole substrato, ossia



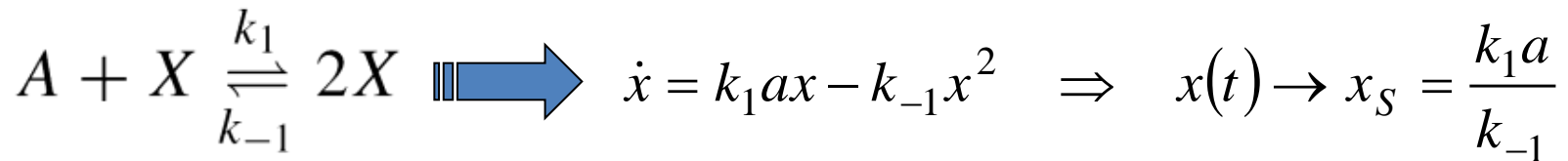


- ✦ Molti processi biologici hanno un meccanismo insito di regolazione mediante retroazione (feedback)
- ✦ In pratica la regolazione si basa sul fatto che il prodotto di una reazione può influenzare la storia futura del processo
- ✦ L'effetto di regolazione è generalmente nonlineare e può essere sia di attivazione che di inibizione nei confronti della reazione
- ✦ In particolare l'autocatalisi è il processo per cui una specie viene utilizzata nella reazione che la produce, ad es.



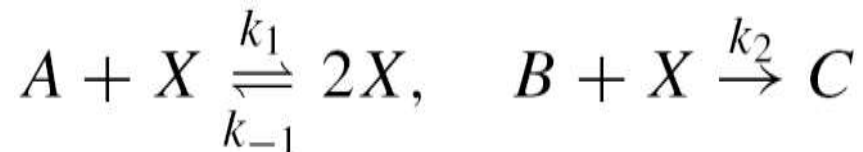


- Se la concentrazione della specie A viene mantenuta costantemente al livello  $a$ , possiamo scrivere



- Il sistema ha due punti di equilibrio,  $x = 0$  instabile e  $x = x_S$  stabile
- La retroazione è fornita dal prodotto stesso, che inibisce la formazione di ulteriore prodotto: l'intensità dell'azione inibente cresce con il quadrato della concentrazione
- Il meccanismo è analogo a quello studiato nelle popolazioni monospecie

- ⤴ Si consideri la reazione

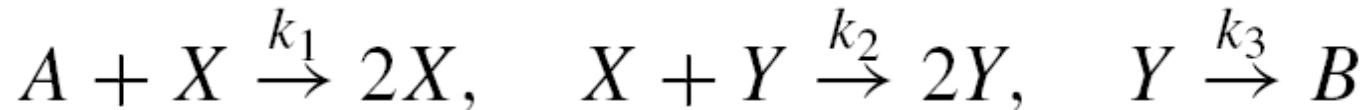


e si supponga che  $a$  e  $b$  vengano mantenuti costanti

$$\dot{x} = (k_1 a - k_2 b)x - k_{-1} x^2$$

- ⤴ Il sistema ha una biforcazione quando  $k_1 a - k_2 b = 0$ , infatti
- ✦  $k_1 a - k_2 b > 0 \Leftrightarrow$  L'origine è un p. di equilibrio instabile, infatti il tasso di produzione è maggiore di quello di trasformazione
  - ✦  $k_1 a - k_2 b < 0 \Leftrightarrow$  L'origine è un p. di equilibrio stabile, infatti il tasso di produzione è minore di quello di trasformazione

- Un ulteriore esempio di autocatalisi è il modello di oscillatore biologico ideale proposto da Lotka



dove la concentrazione di A è mantenuta costante

- Si noti che le prime due reazioni sono autocatalitiche
- Applicando la legge dell'azione di massa riotteniamo le equazioni di Lotka-Volterra

$$\dot{x} = k_1 ax - k_2 xy$$

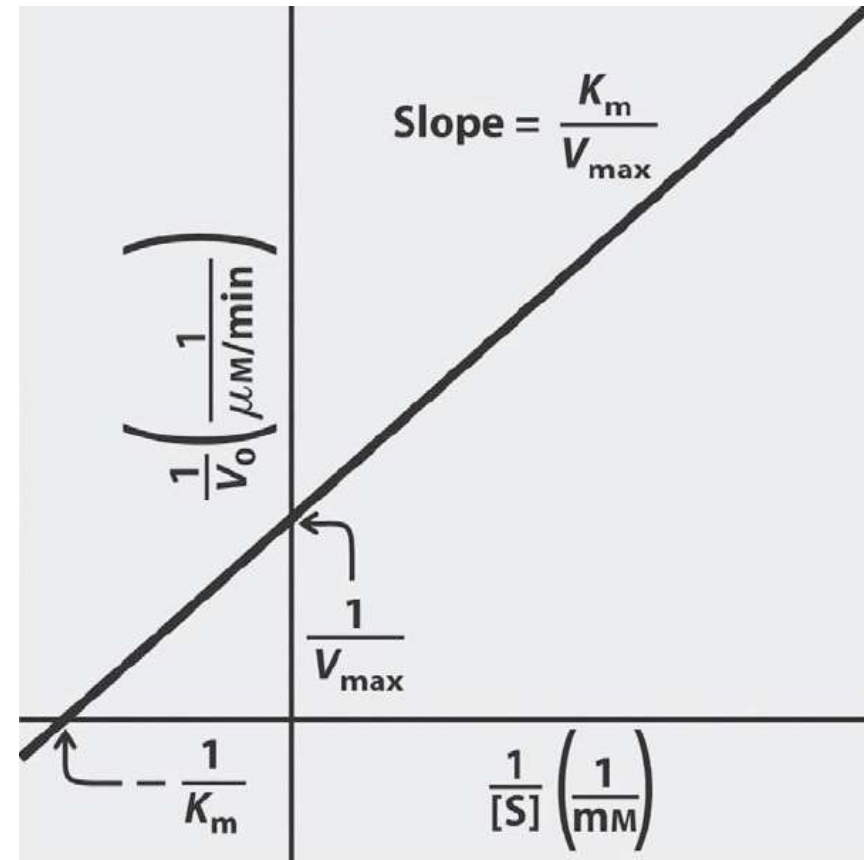
$$\dot{y} = k_2 xy - k_3 y$$



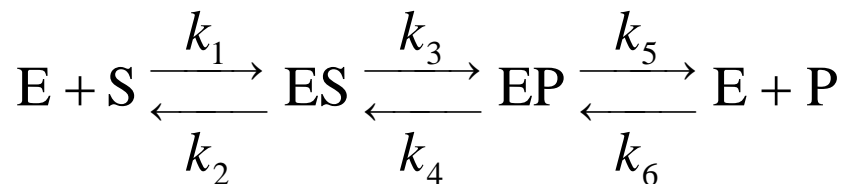
- Il grafico di L-B, detto anche dei doppi reciproci, si ricava invertendo ambo i membri dell'eq. della velocità di reazione

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



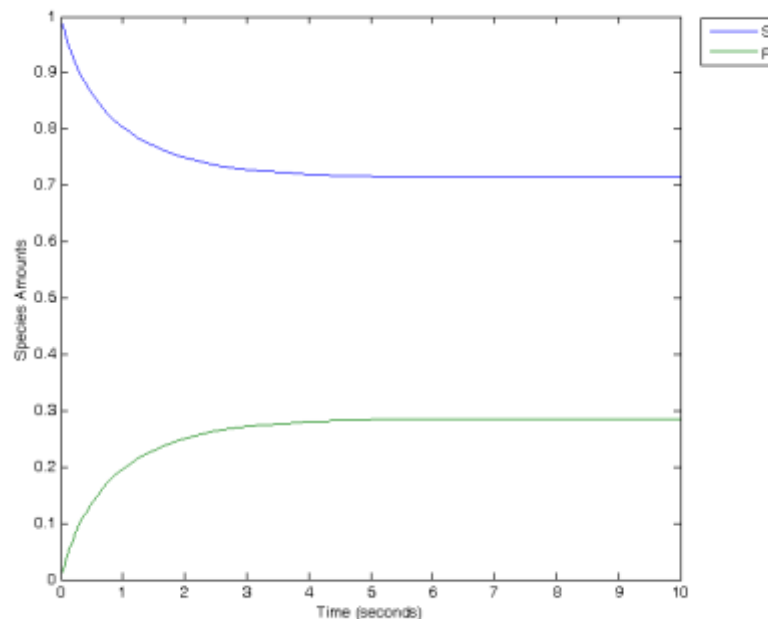
- Reazione enzimatica unireactant-unireactant (Michaelis-Menten reversibile)



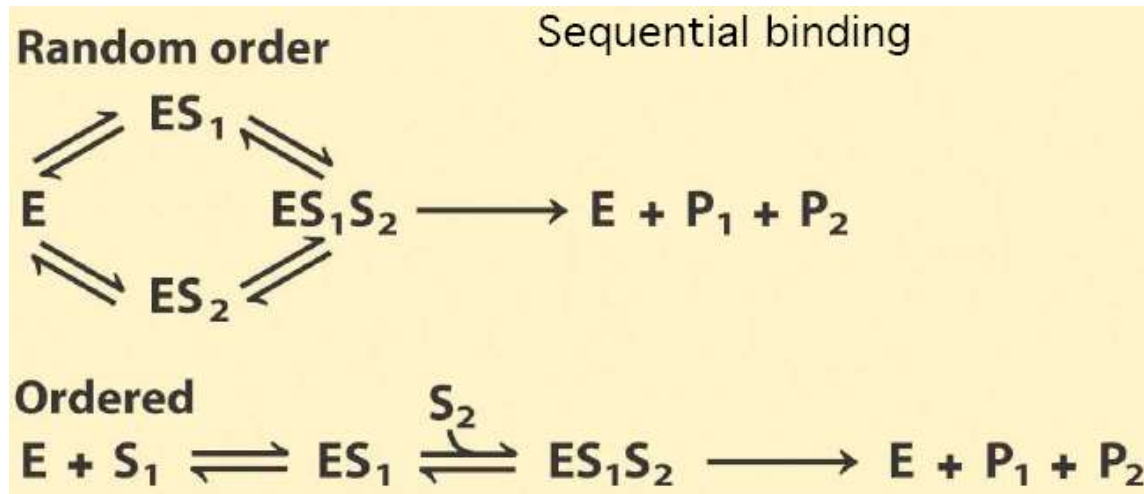
$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{\frac{V_M^f}{K_m^f} [S] - \frac{V_M^r}{K_m^r} [P]}{1 + \frac{[S]}{K_m^f} + \frac{[P]}{K_m^r}}$$

$$K_{eq} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = \frac{V_M^f K_M^r}{V_M^r K_M^f}$$

Relazione di Haldane

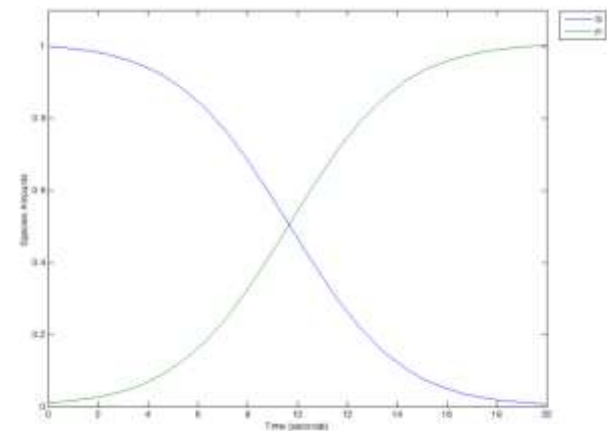


⤴ Reazioni enzimatiche bi-substrate

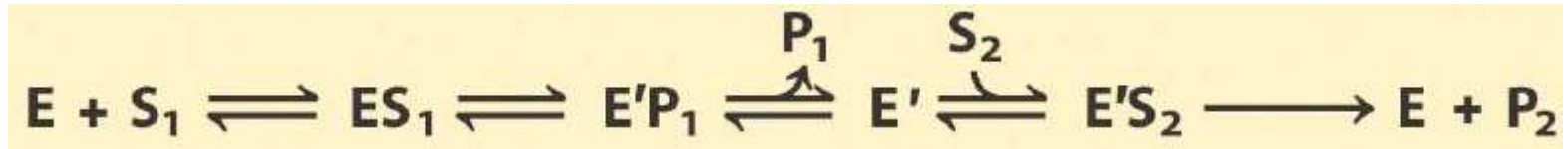


$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{V_{\max}}{\frac{K_s^{S_1} K_m^{S_2}}{[\text{S}_1][\text{S}_2]} + \frac{K_m^{S_1}}{[\text{S}_1]} + \frac{K_m^{S_2}}{[\text{S}_2]} + 1}$$

Ordered Bi-Bi

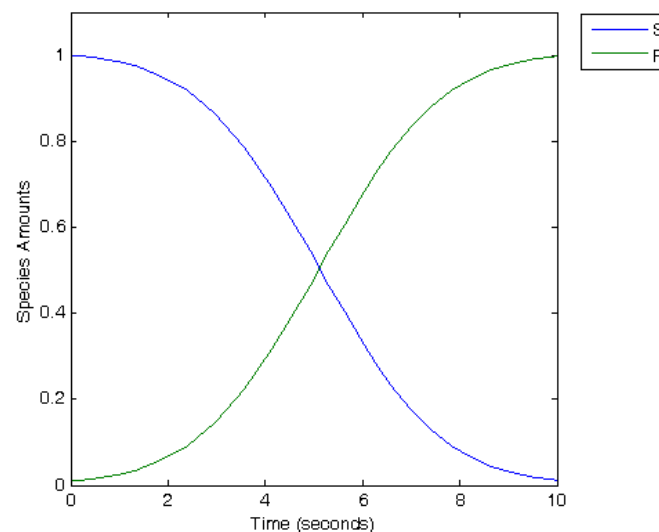


- ⤴ In questo caso non avviene la formazione di complesso ternario



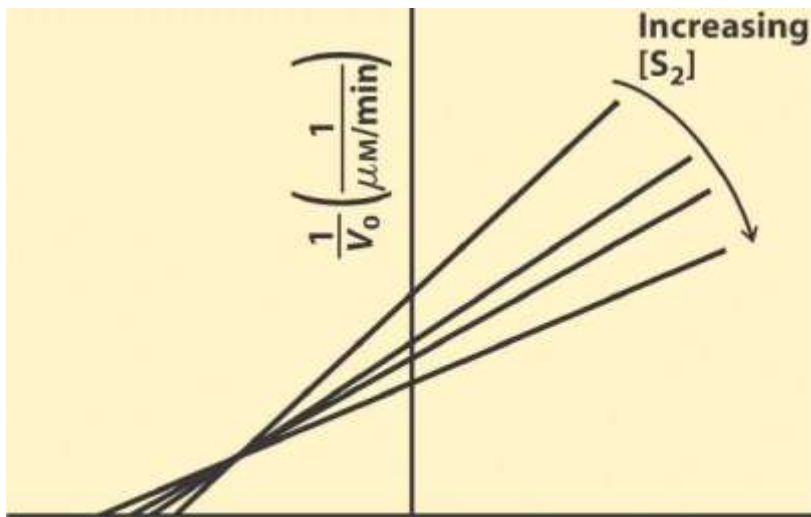
$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}}{\frac{K_m^{S_1}}{[S_1]} + \frac{K_m^{S_2}}{[S_2]} + 1}$$

N.B. Rispetto al caso precedente c'è un parametro in meno



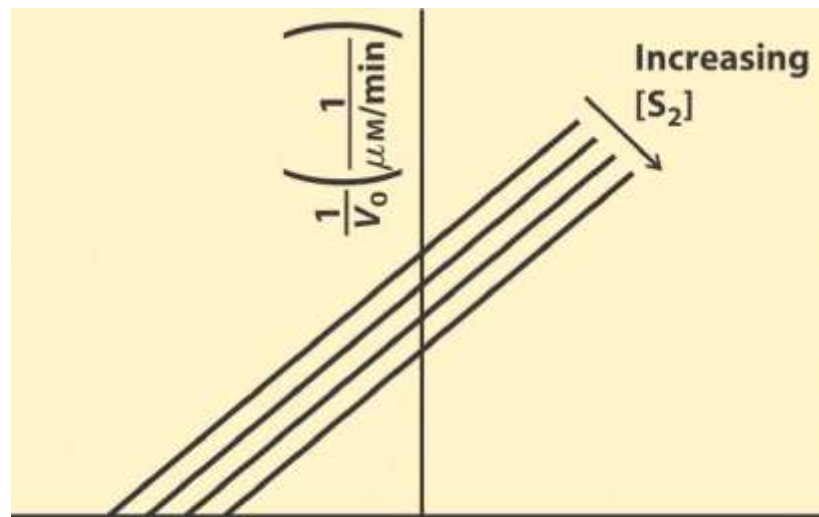
# Bi-Bi vs Ping-Pong

- ✧ L'andamento nel tempo è simile
- ✧ La differenza si evince dal comportamento al variare della concentrazione di  $S_2$



**Bi-Bi Ordinata**

$$\frac{1}{[S_1]} \left( \frac{1}{\text{mM}} \right)$$

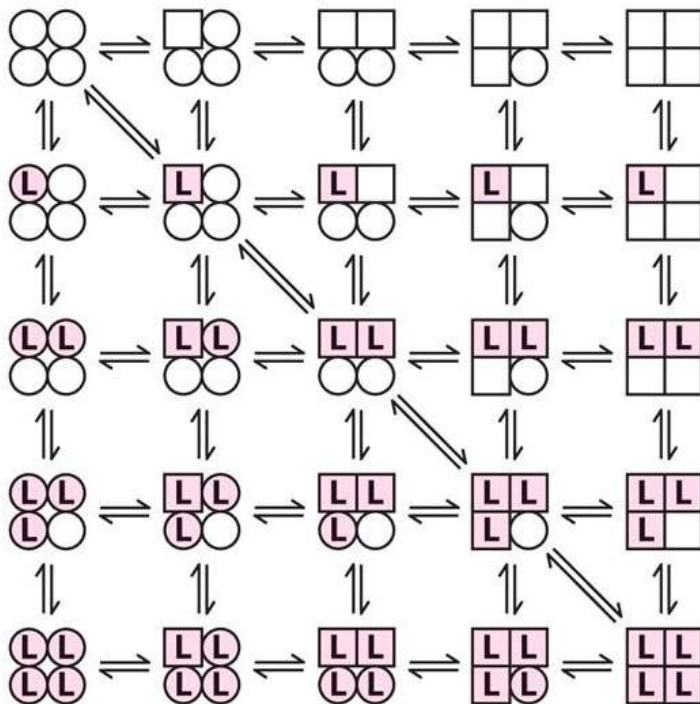


**Ping-Pong**

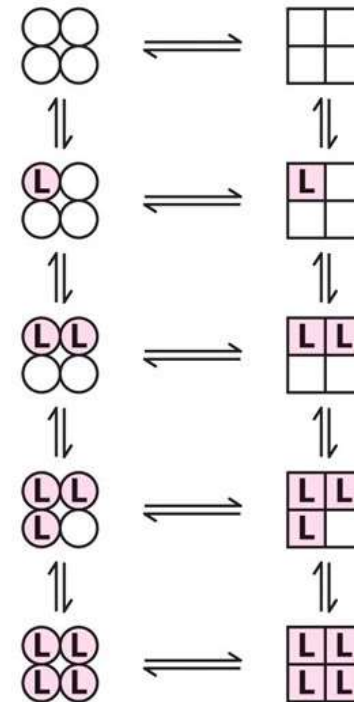
$$\frac{1}{[S_1]} \left( \frac{1}{\text{mM}} \right)$$

- ⤴ L'enzima è costituito da più unità, ciascuna delle quali può essere nello stato inattivo T (tense, ○) o attivo R (relaxed, □)

## Koshland-Némethy-Filmer (KNF) or sequential model

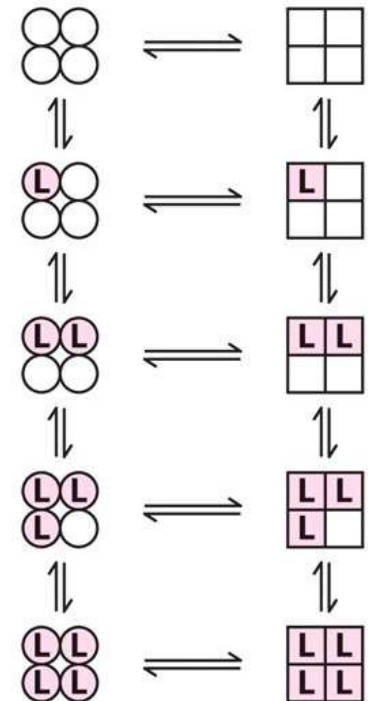


## Monod-Wyman-Changeux (MWC) or concerted model



✧ Il modello MWC si basa sulle seguenti ipotesi

- ✧ Le subunità sono equivalenti in termine di interazione con l'ambiente e con il ligando
- ✧ Ogni subunità ha un unico sito recettore
- ✧ La proteina si può trovare in due diversi stati conformazionali e le affinità di legame dei due stati sono diverse
- ✧ La commutazione tra questi due stati è concertata, ossia avviene contemporaneamente per tutte le subunità
- ✧ L'affinità di legame di un sito recettore dipende solo dallo stato conformazionale, è indipendente dallo stato di occupazione degli altri siti recettori

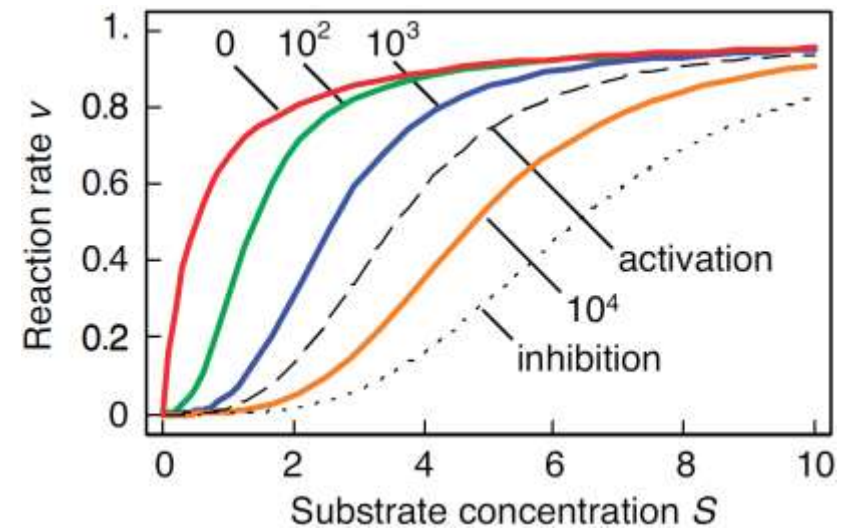
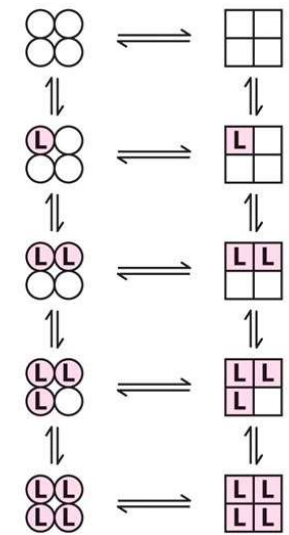


- ✦ L'equilibrio tra stato R e T, in assenza di ligando, è dato dalla costante allosterica

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

- ✦ Le costanti di legame per le due conformazioni sono  $K_R$  e  $K_T$
- ✦ Se le molecole di substrato possono legare solo la forma attiva (ossia  $K_T = 0$ ), la velocità di reazione è data da

$$V = \frac{V_{\max} K_R S}{(1 + K_R S)} \left[ 1 + \frac{L}{(1 + K_R S)^n} \right]$$

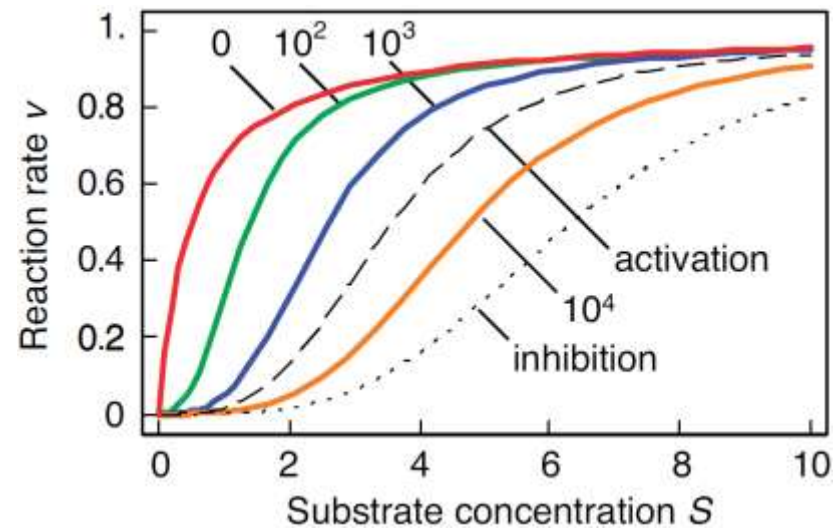
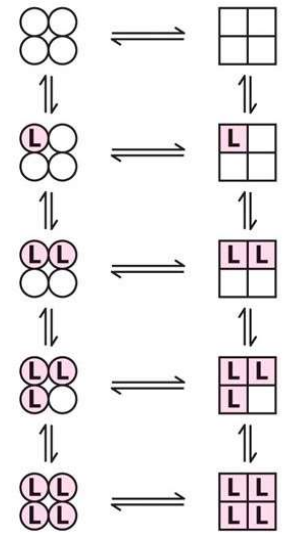




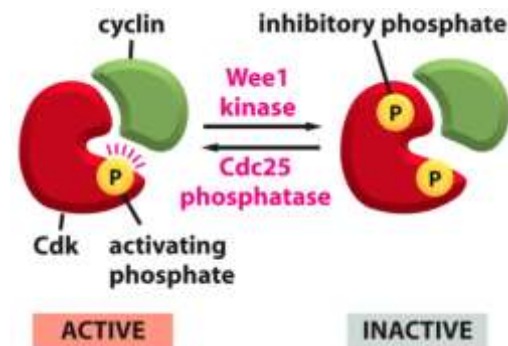
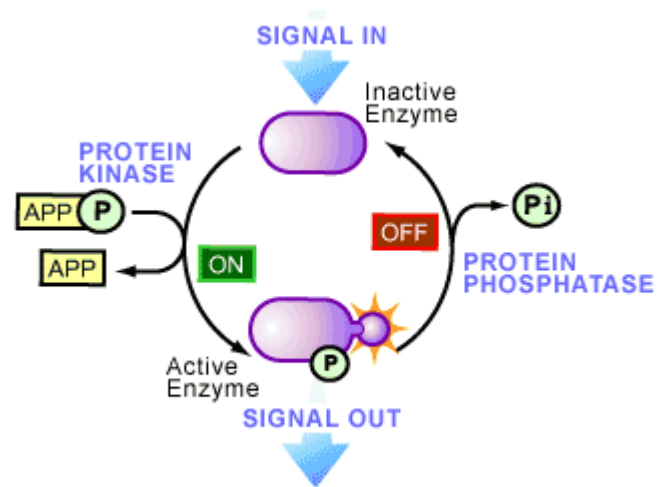
- Il modello MWC può essere esteso per portare in conto l'effetto di attivatori (A) ed inibitori (I), modificando la  $L$

$$L' = L \frac{(1 + K_I I)^n}{(1 + K_A A)^n}$$

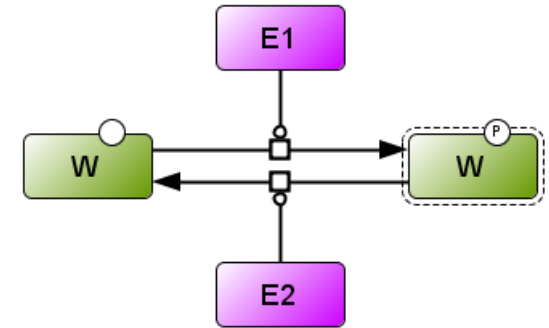
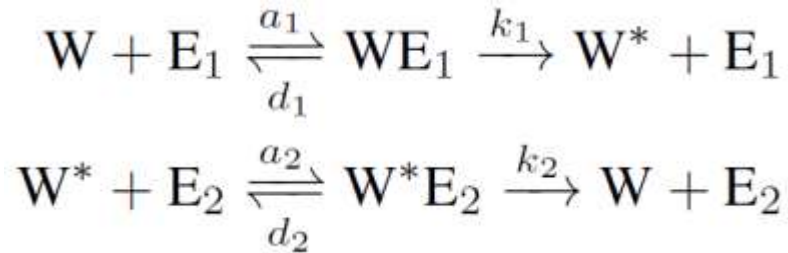
- A parità di  $L$ , l'attivatore riduce la sigmoidicità della curva, l'inibitore la aumenta



- ✦ Molti meccanismi di segnalazione si basano sull'attivazione di proteine mediante una modifica covalente
- ✦ Un esempio notevole sono i cicli di fosforilazione/defosforilazione per mezzo di chinasi e fosfatasi
- ✦ La cinetica di K-G descrive la condizione di equilibrio di un sistema di questo tipo
- ✦ Ad es., la regolazione del ciclo cellulare si basa sull'attivazione/inattivazione delle Cyclin-dependent kinases (Cdk)



- Lo switch di Goldbeter-Koshland è descritto dalle seguenti reazioni



- Assumendo costante la quantità totale di W, ossia  $W^T = W + W^* = \text{costante}$ , ed utilizzando la cinetica di Michaelis-Menten, si ha

$$\frac{dW^*}{dt} = \frac{V_1(W^T - W^*)}{K_{M1} + (W^T - W^*)} - \frac{V_2W^*}{K_{M2} + W^*}$$

✧ Imponendo la condizione di equilibrio  $dW^*/dt = 0$ , otteniamo la concentrazione all'eq. di  $W^*$  in funzione

✧ delle velocità max di reazione  $V_1 = k_1 E_1^T$  e  $V_2 = k_2 E_2^T$

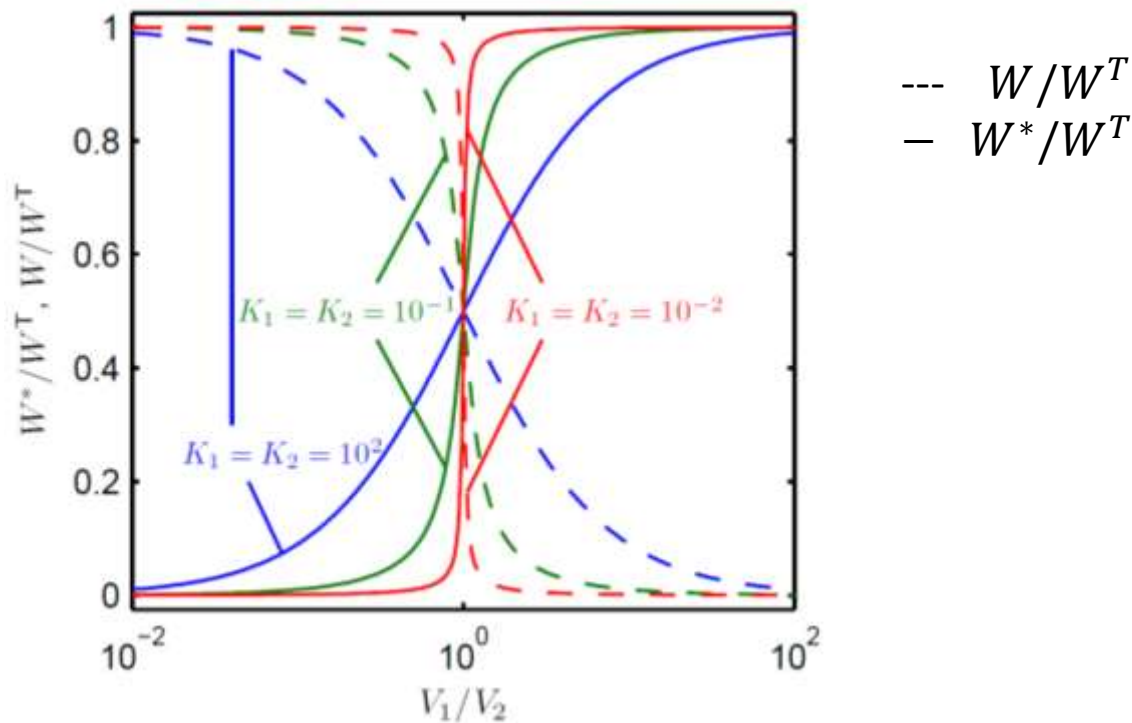
✧ e delle costanti di M-M normalizzate  $K_1 = \frac{K_{M1}}{W^T}$ ,  $K_2 = \frac{K_{M2}}{W^T}$

$$\frac{W^*}{W^T} = G(V_1, V_2, K_1, K_2) = \frac{B + \sqrt{B^2 + 4 \frac{V_1}{V_2} \left( \frac{V_1}{V_2} - 1 \right) K_2}}{2 \left( \frac{V_1}{V_2} - 1 \right)}$$

dove

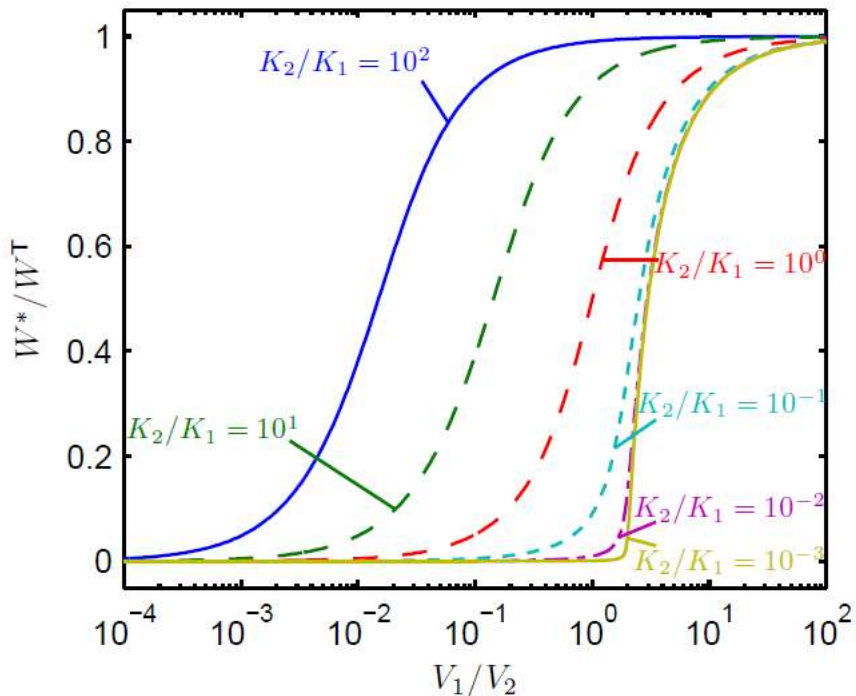
$$B = \left( \frac{V_1}{V_2} - 1 \right) - \left( \frac{V_1}{V_2} + \frac{K_1}{K_2} \right) K_2$$

- Il p. di eq. cambia al variare di  $V_1$  e  $V_2$ , ossia delle concentrazioni di chinasi  $E_1$  e fosfatasi  $E_2$
- Dall'andamento in figura, si vede che piccole variazioni possono produrre una attivazione/disattivazione pressoché completa (**ultrasensitività**)

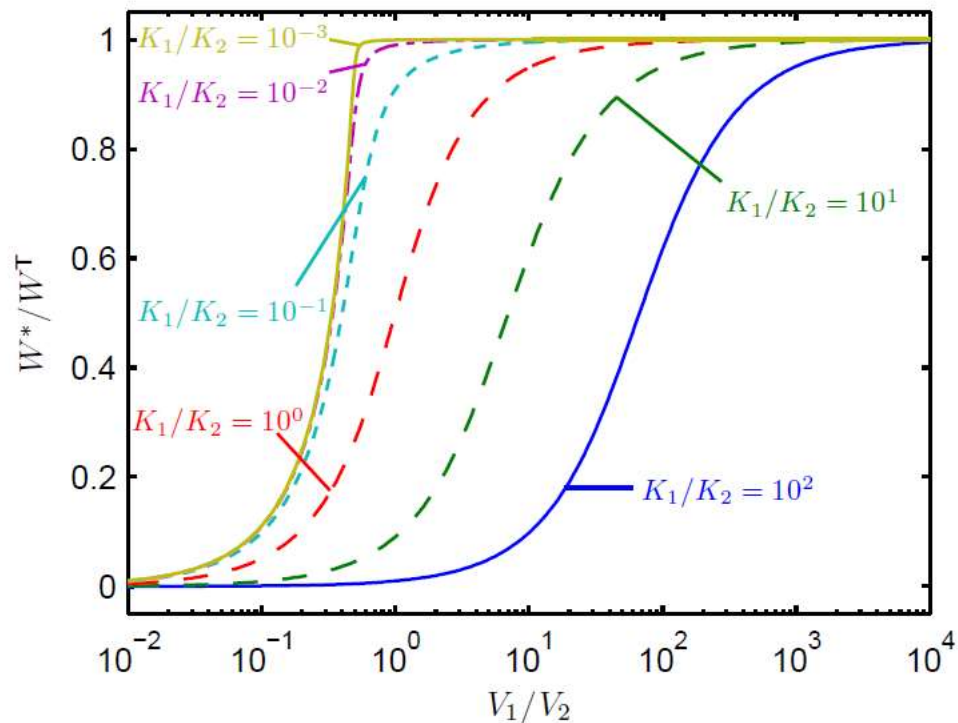


- Di seguito, riportiamo l'andamento al variare dei parametri  $K_1$  e  $K_2$
- Si noti che la funzione  $G$  varia sia in funzione di  $K_1/K_2$  che di  $K_2$

$K_1$  fisso,  $K_2$  varia



$K_2$  fisso,  $K_1$  varia



# Reazioni enzimatiche di inibizione



## ✦ Inibizione Irreversibile

- ✦ substrato suicida

## ✦ Inibizione Reversibile

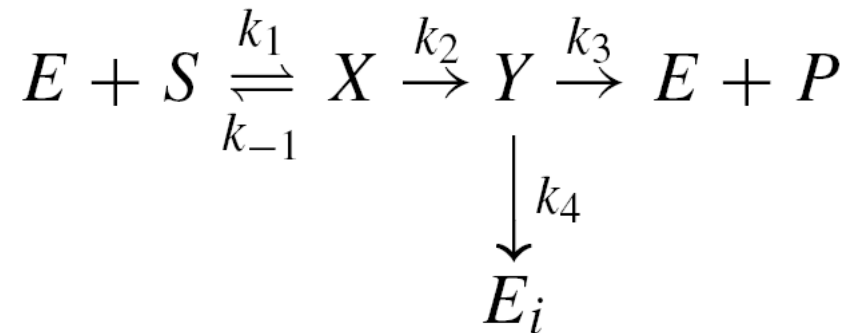
- ✦ Competitiva

- ✦ Mista (non competitiva)

- ✦ Incompetitiva



- Un processo enzimatico di particolare importanza è quello descritto dal modello di Walsh (1978)



dove E, S, P sono rispettivamente enzima, substrato e prodotto, X, Y sono prodotti intermedi,  $E_i$  è l'enzima inattivato e le k sono costanti positive

- Il rapporto  $r := k_3/k_4$  è chiamato **coefficiente di partizione**



- ✦ *S* viene detto **substrato suicida** ed è capace di legarsi al sito attivo dell'enzima come un comune substrato
- ✦ L'enzima lo converte in un inibitore che inattiva in maniera irreversibile l'enzima stesso
- ✦ I substrati suicidi sono importanti perché forniscono un metodo per inattivare uno specifico enzima
- ✦ L'uso principale è nella somministrazione di farmaci, perché non sono dannosi nella forma comune e solo l'enzima specifico li può convertire nella forma inibitoria (ad es. l'aspirina e la penicillina agiscono mediante questo meccanismo)



- ✦ La cinetica dei substrati suicidi è stata studiata a fondo da Waley (1980) e Tatsunami (1981)
- ✦ Questi studi si concentrano sul meccanismo che permette o meno al substrato di essere interamente trasformato prima che tutto l'enzima sia inattivato
- ✦ Waley ha concluso che questo dipende dal valore  $r \frac{e_0}{s_0}$
- ✦ Tatsunami ha proposto come indice il valore  $(1 + r) \frac{e_0}{s_0}$

$(1 + r)e_0/s_0 < 1$   Tutto l'enzima è inattivato

$(1 + r)e_0/s_0 > 1$   Il substrato viene trasformato interamente



✦ Applicando la legge di azione di massa

$$\dot{s} = -k_1 es + k_{-1} x$$

$$\dot{e} = -k_1 es + k_{-1} x + k_3 y$$

$$\dot{x} = k_1 es - k_{-1} x - k_2 x$$

$$\dot{y} = k_2 x - k_3 y - k_4 y$$

$$\dot{e}_i = k_4 y$$

$$\dot{p} = k_3 y$$

$$e(0) = e_0, \quad s(0) = s_0,$$

$$x(0) = y(0) = e_i(0) = p(0) = 0$$

- ✦ Anche in questo caso si può sfruttare la conservazione della quantità totale di enzima

$$e + x + y + e_i = e_0$$

e il fatto che l'eq. di  $p$  è disaccoppiata dalle altre

$$\dot{s} = -k_1(e_0 - x - y - e_i)s + k_{-1}x$$

$$\dot{x} = k_1(e_0 - x - y - e_i)s - (k_{-1} + k_2)x$$

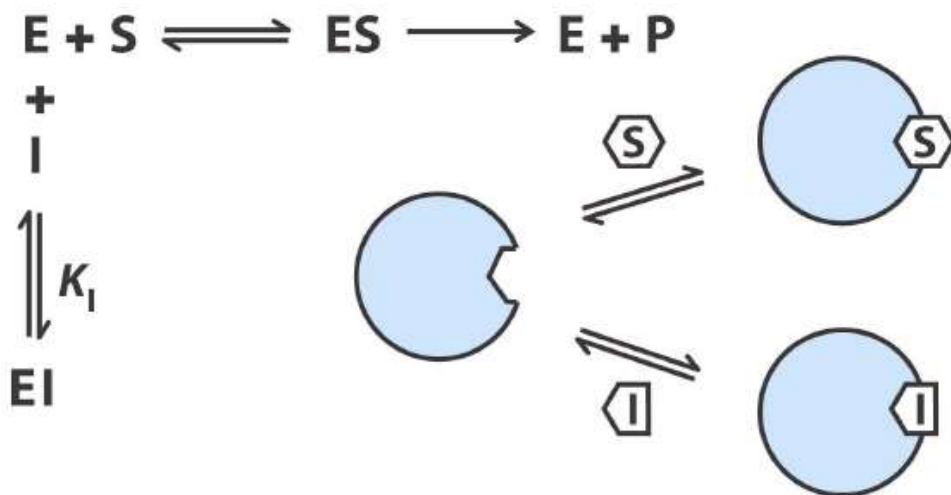
$$\dot{y} = k_2x - (k_3 + k_4)y$$

$$\dot{e}_i = k_4y$$

- ✦ Studieremo il sistema risolvendo numericamente le eq.

$$s_0 = 20, e_0 = 8, k_1 = 1, k_{-1} = 0.5, k_3 = 0.8, k_4 \in [0.01, 1],$$

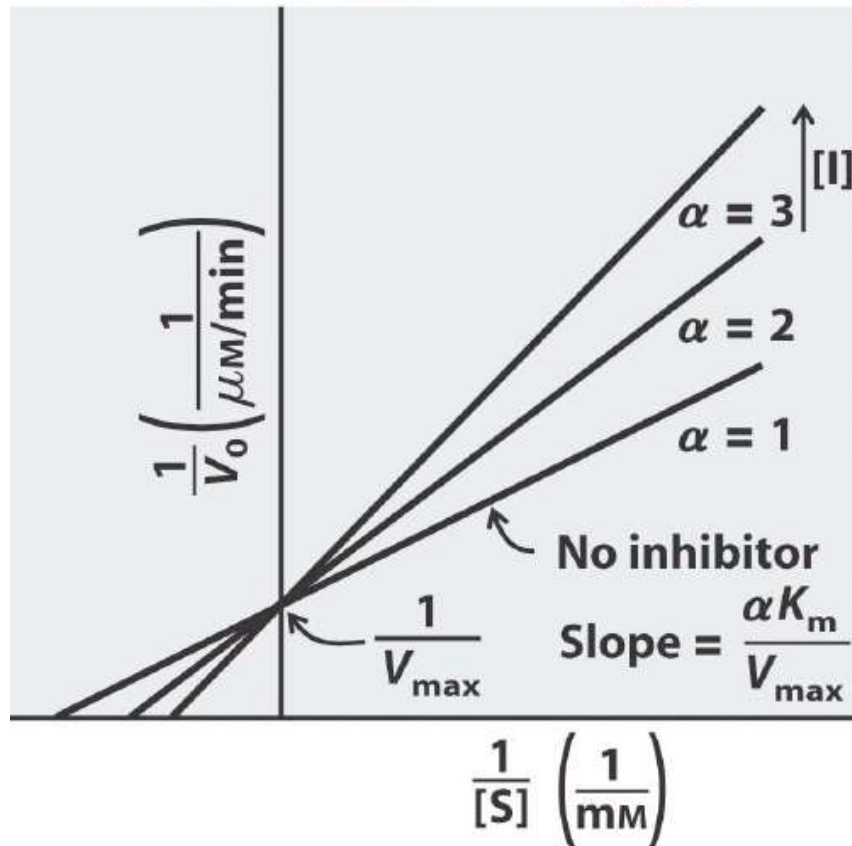
- ⤴ L'inibitore ed il substrato si legano allo stesso sito
- ⤴ L'aumento di  $[I]$  equivale ad un aumento di  $K_m$
- ⤴ La  $V_{max}$  raggiungibile dalla reazione non cambia (ma può cambiare la quantità di substrato necessaria per raggiungerla)



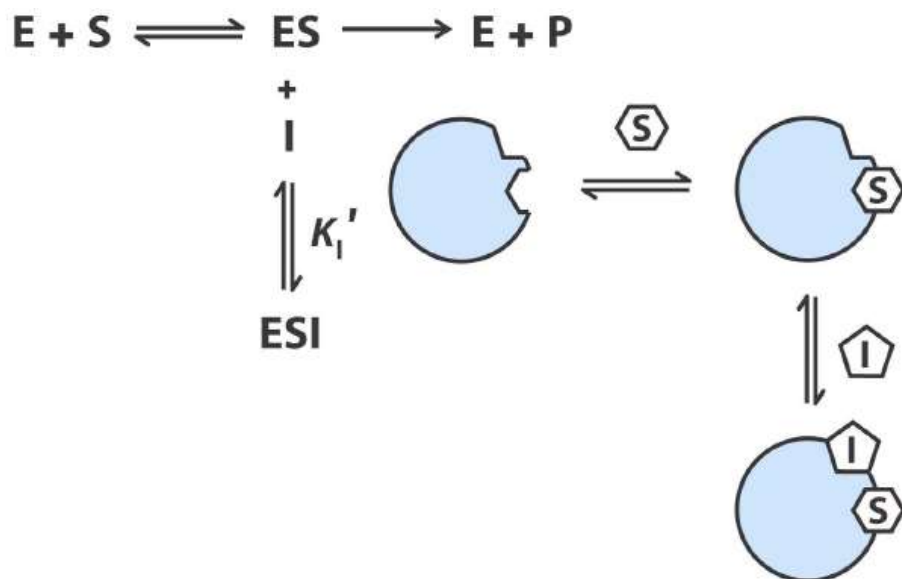
$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}, \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



- ⤴ Siti di legame differenti, l'inibitore si lega solo al complesso ES
- ⤴ L'aumentare di  $[I]$  equivale ad una diminuzione sia di  $V_{max}$  che di  $K_m$

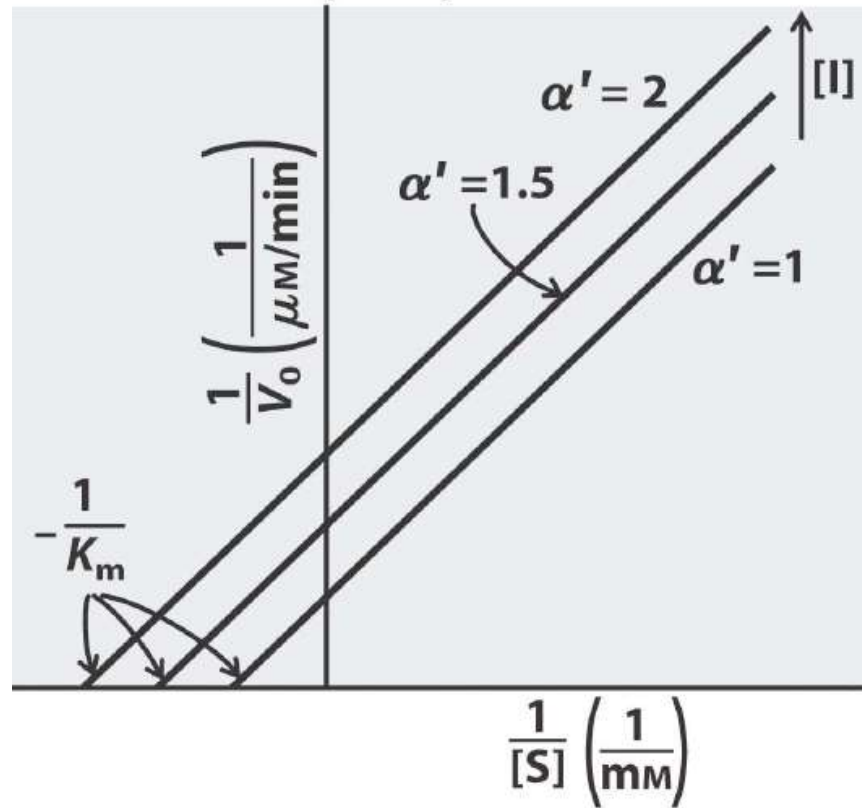


$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}, \quad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$



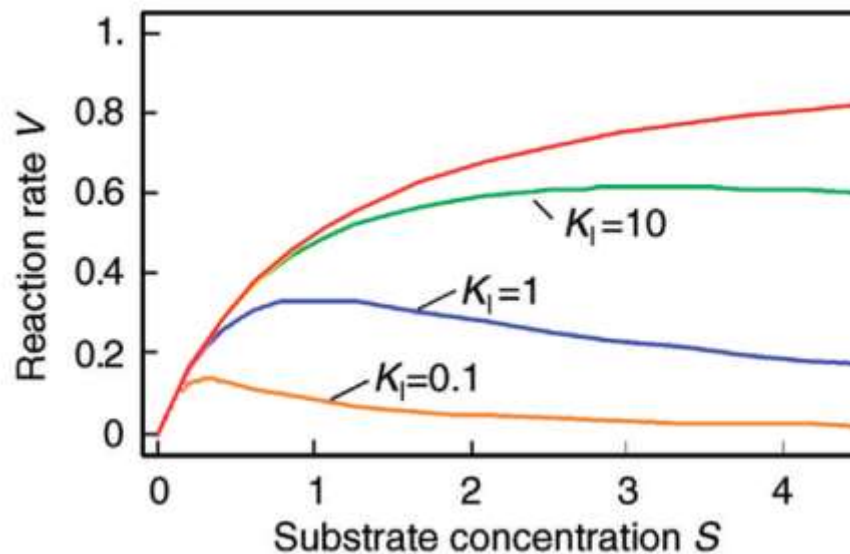
$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



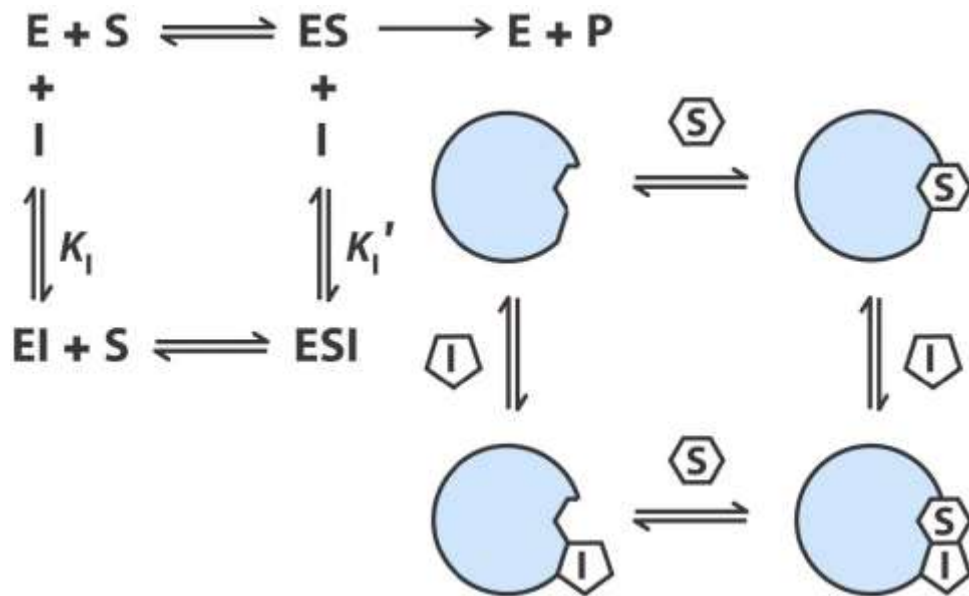


⤴ In questo caso il valore massimo di velocità si ottiene quando

$$\bar{S} = \sqrt{K_m K_I} \Rightarrow V_{\max} = \frac{V_f}{1 + 2\sqrt{\frac{K_m}{K_I}}}$$



- ▲ Siti di legame diversi, l'inibitore può legarsi sia a E che a ES



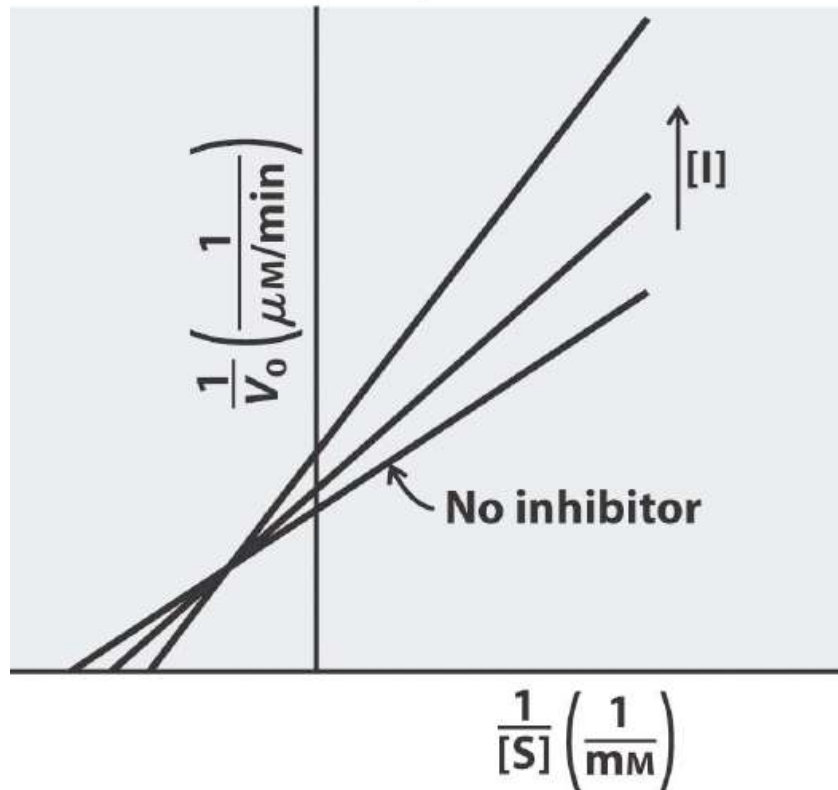
$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}, \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}, \quad K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Se  $\alpha = \alpha'$  l'inibizione viene detta non-competitiva pura

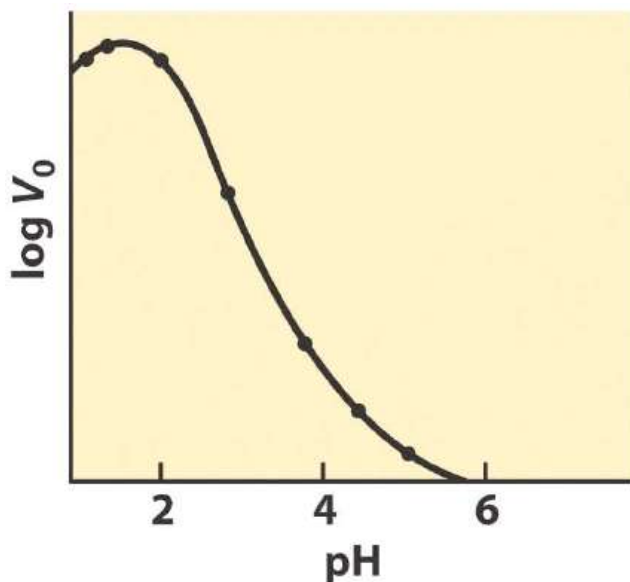
$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



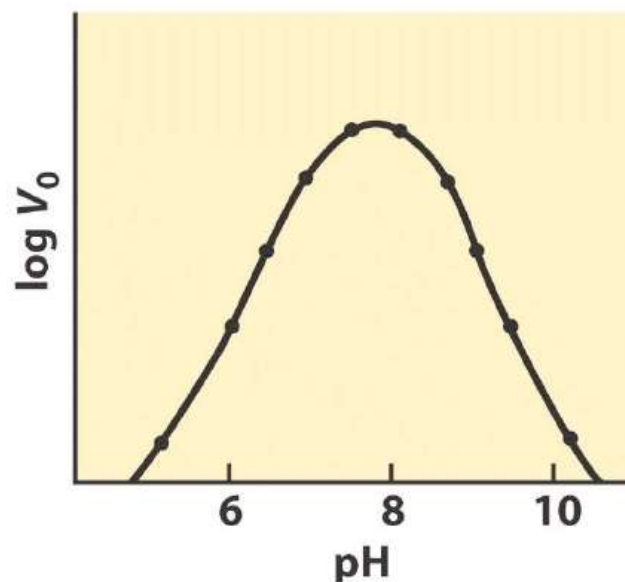


- ✧ **Systems Biology Ontology (SBO)** è un set di vocabolari relazionali controllati di termini utilizzati nella systems biology e, in particolare, nella modellistica di sistemi biologici
- ✧ Consultabile sul sito dello EBI (<http://www.ebi.ac.uk/sbo/main/>)
- ✧ E' composto da sette vocabolari ortogonali, che definiscono
  - ✧ ruoli delle specie che partecipano alla reazione (ad es., substrato)
  - ✧ parametri quantitativi (ad es., costante di Michaelis-Menten)
  - ✧ **espressioni matematiche cinetiche** (ad es., legge di azione di massa)
  - ✧ framework modellistico usato (ad es., logical framework)
  - ✧ tipo dell'entità funzionale o materiale (ad es., macromolecola)
  - ✧ tipo di interazione (ad es., processo)
  - ✧ tipi di metadati

- ⤴ Bisogna ricordare che le reazioni enzimatiche sono fortemente dipendenti da altri fattori, e.g. pH e temperatura



**(a) Pepsin**



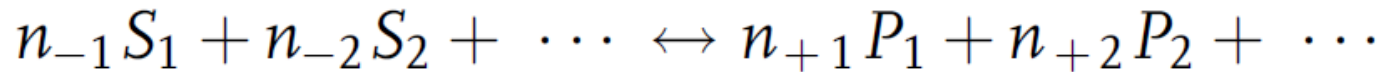
**(b) Glucose 6-phosphatase**



- ✦ In molti casi reali di interesse non si conosce in maniera dettagliata la lista di reazioni che genera un certo processo biologico
- ✦ Più realisticamente si può ricavare sperimentalmente l'effetto globale al variare di una specie o delle condizioni al contorno
- ✦ In questo caso non si può utilizzare l'approccio visto finora, trasformando direttamente le reazioni in eq. differenziali
- ✦ Il modello, quindi, è costituito da opportuni termini matematici che descrivono i vari fenomeni pur non rappresentandone i meccanismi biochimici di base



- ⤴ E' un'espressione generale che generalizza la cinetica di M-M reversibile al caso di più substrati e più prodotti



$$v = E_{\text{total}} \cdot f_{\text{reg}}$$

$$f_{\text{reg}} = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{for}} \prod_i (S_i / K_{m,S_i})^{n_i} - k_{\text{cat}}^{\text{back}} \prod_j (P_j / K_{m,P_j})^{n_j}}{\prod_i (1 + (S_i / K_{m,S_i}) + \dots + (S_i / K_{m,S_i})^{n_i}) + \prod_j (1 + (P_j / K_{m,P_j}) + \dots + (P_j / K_{m,P_j})^{n_j}) - 1}$$

- ⤴ I parametri sono indipendenti e non soggetti alla relazione di Haldane
- ⤴ Il fattore di regolazione  $f_{\text{reg}}$  può essere 1 (in assenza di modulatori) oppure una funzione di eventuali modulatori attivatori o inibitori (ad es.  $K_I / (K_I + I)$ )

- ✦ Si consideri il seguente modello

$$\dot{u} = \frac{a}{b + v} - cu$$

$$\dot{v} = du - ev$$

con  $a, b, c, d, e$  costanti positive

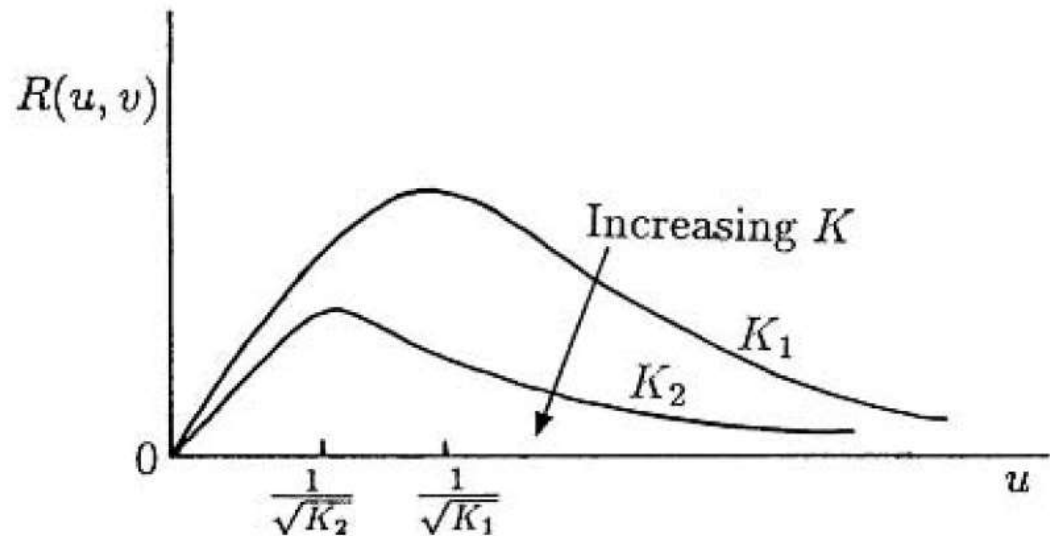
- ✦ L'interpretazione biologica di queste eq. è che  $u$  attiva  $v$ , attraverso un termine  $du$ , e entrambe  $u$  e  $v$  sono degradate in maniera linearmente proporzionale alla loro concentrazione (si parla in questo caso di cinetica del primo ordine)
- ✦ Il termine  $a/(b + v)$  porta in conto l'effetto di inibizione esercitato da  $v$  su  $u$ , infatti il tasso di produzione di  $u$  è tanto più piccolo quanto maggiore è la concentrazione di  $v$

- Il meccanismo di Thomas (1975) è stato sviluppato per descrivere la reazione dei substrati ossigeno e acido urico in presenza dell'enzima urease

$$\dot{u} = a - u - \rho R(u, v)$$

$$\dot{v} = \alpha(b - v) - \rho R(u, v)$$

$$R(u, v) = \frac{uv}{1 + u + Ku^2}$$



Effetto di inibizione del substrato



- Un ulteriore modello di sistema attivatore ( $u$ ) - inibitore ( $v$ )

$$\dot{u} = a - bu + \frac{u^2}{v(1 + Ku^2)}$$

$$\dot{v} = u^2 - v$$

- L'attivatore  $u$  è un prodotto autocatalitico, come descritto dal termine  $u^2/[v(1 + Ku^2)]$ , ma il tasso di produzione satura al valore  $1/Kv$  per  $u \rightarrow \infty$
- L'inibitore  $v$  è attivato da  $u$ , ma ne inibisce la produzione