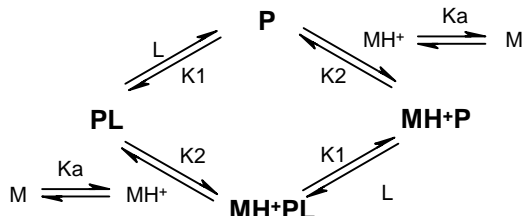


### Problema 24 Enzyme-substrate interaction

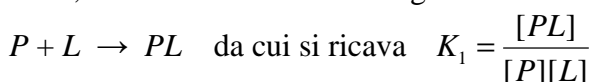
Il problema fa riferimento alle seguenti reazioni dove la proteina  $P$  si può legare a due diversi substrati  $L$  e  $MH^+$  in modo indipendente senza cioè che la presenza di un substrato già legato alteri l'affinità della proteina per l'altro. La reazione avviene a pH 9,5.

La  $K_a$  della specie  $MH^+$  è  $K_a = 10^{-10}$ . Le altre costanti sono  $K_1 = 2,22 \cdot 10^4$ ;  $K_2 = 5,26 \cdot 10^5$ .



a) Si mescolano uguali volumi di soluzioni 100  $\mu\text{M}$  di  $P$  ed  $L$ , calcolare la concentrazione all'equilibrio di  $P$ ,  $L$ ,  $PL$  e la percentuale di proteina  $P$  complessata.

Dopo il mescolamento della due soluzioni, la concentrazione iniziale di  $P$  ed  $L$  dimezza e diventa  $c = 5,00 \cdot 10^{-5}$  M. Avviene la seguente reazione:



Le concentrazioni all'equilibrio sono  $[P] = [L] = c - x$  e  $[PL] = x$  quindi si ha:

$$\frac{x}{(c-x)^2} = K_1 \quad x = K_1 (c^2 + x^2 - 2cx) \quad \text{sostituendo si ha}$$

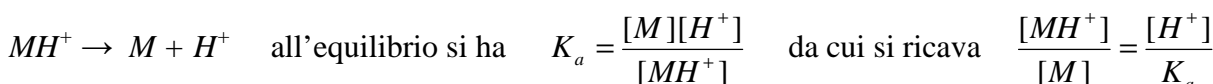
$$x = 2,22 \cdot 10^4 (25 \cdot 10^{-10} + x^2 - 10x^{-5}) \quad \text{cioè} \quad 2,22 \cdot 10^4 x^2 - 3,22x + 5,55 \cdot 10^{-5} = 0$$

Si ottiene  $x = 2,00 \cdot 10^{-5}$  cioè  $[PL] = 2,00 \cdot 10^{-5}$  M  $[P] = [L] = 3,00 \cdot 10^{-5}$  M

La percentuale di proteina  $P$  complessata si ottiene da  $\frac{[PL]}{[P_{tot}]} = \frac{2,00 \cdot 10^{-5}}{5,00 \cdot 10^{-5}} = 0,4$  quindi 40%

b) Calcolare la % di legando  $M$  protonato a pH 9,5

Avviene la seguente reazione:



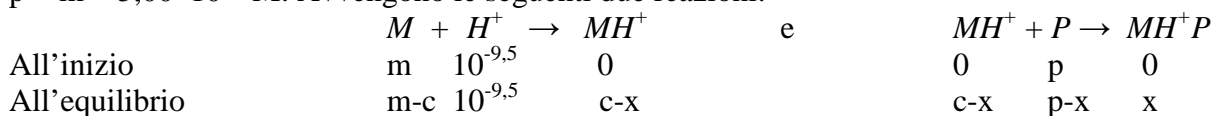
$$\frac{[MH^+]}{[M]} = \frac{10^{-9,5}}{10^{-10}} = 10^{0,5} = \sqrt{10} = 3,16 \quad \text{quindi} \quad \frac{[MH^+]}{[M]} = 3,16$$

da cui si ricava la % di legando  $M$  protonato

$$\frac{[MH^+]}{[M] + [MH^+]} = \frac{3,16}{1 + 3,16} = 0,76 \quad \text{quindi} \quad 76\%$$

c) Si mescolano uguali volumi di soluzioni 100  $\mu\text{M}$  di  $P$  ed  $M$  a pH = 9,5, calcolare la concentrazione all'equilibrio di  $P$ ,  $M$ ,  $MH^+$ ,  $MH^+P$  e la percentuale di proteina  $P$  complessata.

Dopo il mescolamento della due soluzioni, la concentrazione iniziale di  $P$  ed  $M$  si dimezza e diventa  $p = m = 5,00 \cdot 10^{-5}$  M. Avvengono le seguenti due reazioni:



Dai calcoli svolti al punto b si ha  $\frac{[MH^+]}{[M]} = 3,16$  quindi  $\frac{c-x}{m-c} = 3,16$

Sostituendo i valori e svolgendo i calcoli si ottiene:  $c = \frac{1,58 \cdot 10^{-4} + x}{4,16}$

Dalla seconda reazione si ricava:  $\frac{[MH^+P]}{[MH^+][P]} = K_2$

da cui si ottiene, sostituendo le concentrazioni all'equilibrio:  $\frac{x}{(c-x)(p-x)} = K_2$

Sostituendo il valore di c si ottiene:  $\frac{x}{\left(\frac{1,58 \cdot 10^{-4} + x}{4,16} - x\right)(p-x)} = K_2$

Sviluppando i calcoli si ottiene:  $3,16x^2 - 3,24 \cdot 10^{-4}x + 0,79 \cdot 10^{-8} = 0$

Da cui si ottiene  $x = 4,00 \cdot 10^{-5}$  cioè  $[MH^+P] = 4,00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$       40  $\mu\text{M}$

quindi  $[P] = 1,00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$       10  $\mu\text{M}$

Si ricava  $c = 4,76 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

$[M] = m-c$  quindi si ottiene  $[M] = 0,24 \cdot 10^{-5} \text{ M}$       2,4  $\mu\text{M}$

$[MH^+] = c-x$  quindi si ottiene  $[MH^+] = 0,76 \cdot 10^{-5} \text{ M}$       7,6  $\mu\text{M}$

La percentuale di proteina  $P$  complessata  $\frac{[MH^+P]}{[P_{tot}]} = \frac{4,0 \cdot 10^{-5}}{5,0 \cdot 10^{-5}} = 0,80$  quindi 80%

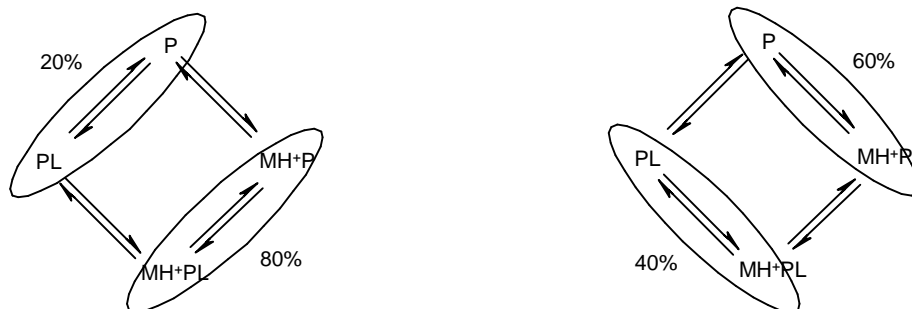
**d)** Si mescolano 100  $\mu\text{L}$  di proteina  $P$  100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{L}$  di legando  $L$  200  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{L}$  di legando  $M$  200  $\mu\text{M}$  a pH 9,5, calcolare la % di proteina  $P$  legata solo a  $L$ , solo a  $MH^+$  e ad entrambi. Calcolare la concentrazione molare di tutte le specie presenti all'equilibrio.

Si nota che nel volume finale di 200  $\mu\text{L}$ , le concentrazioni iniziali di proteina  $P$ , legando  $L$  e  $M$  sono identiche a quelle proposte nei punti precedenti:  $5,00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (50  $\mu\text{M}$ ).

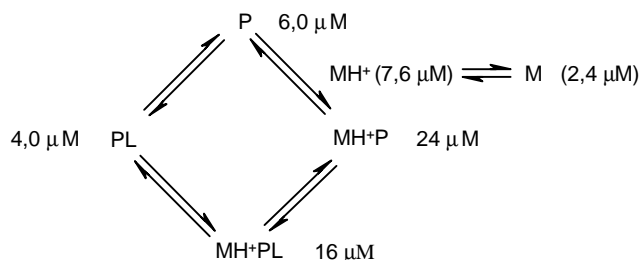
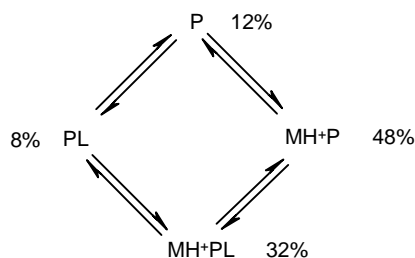
Inoltre le due reazioni della proteina  $P$  con il legando  $L$  ed  $M$  sono del tutto indipendenti, infatti il legando  $MH^+$  può legarsi sia alla proteina  $P$  libera sia a quella già legata con  $L$ .

Nello stesso modo il legando  $L$  può legarsi sia alla proteina  $P$  libera sia a quella già legata con  $MH^+$ .

In questo modo la percentuale di proteina  $P$  complessata con  $MH^+$  resta 80% come calcolato al punto c. La percentuale di proteina  $P$  complessata con  $L$  resta 40% come calcolato al punto a.



Usando questi semplici ragionamenti siamo in grado di calcolare la percentuale di proteina  $P$  presente all'equilibrio nelle quattro forme  $P$ ,  $MH^+P$ ,  $PMH^+PL$ ,  $PL$  e così pure per le concentrazioni all'equilibrio nella soluzione finale.



Soluzione proposta da  
Prof. Mauro Tonellato  
ITIS Natta – Padova