

LE SCIENZE *live*



LE SCIENZE *live*

Cinetica Enzimatica
un approccio di didattica attiva
Renato Lombardo

L'ambito didattico

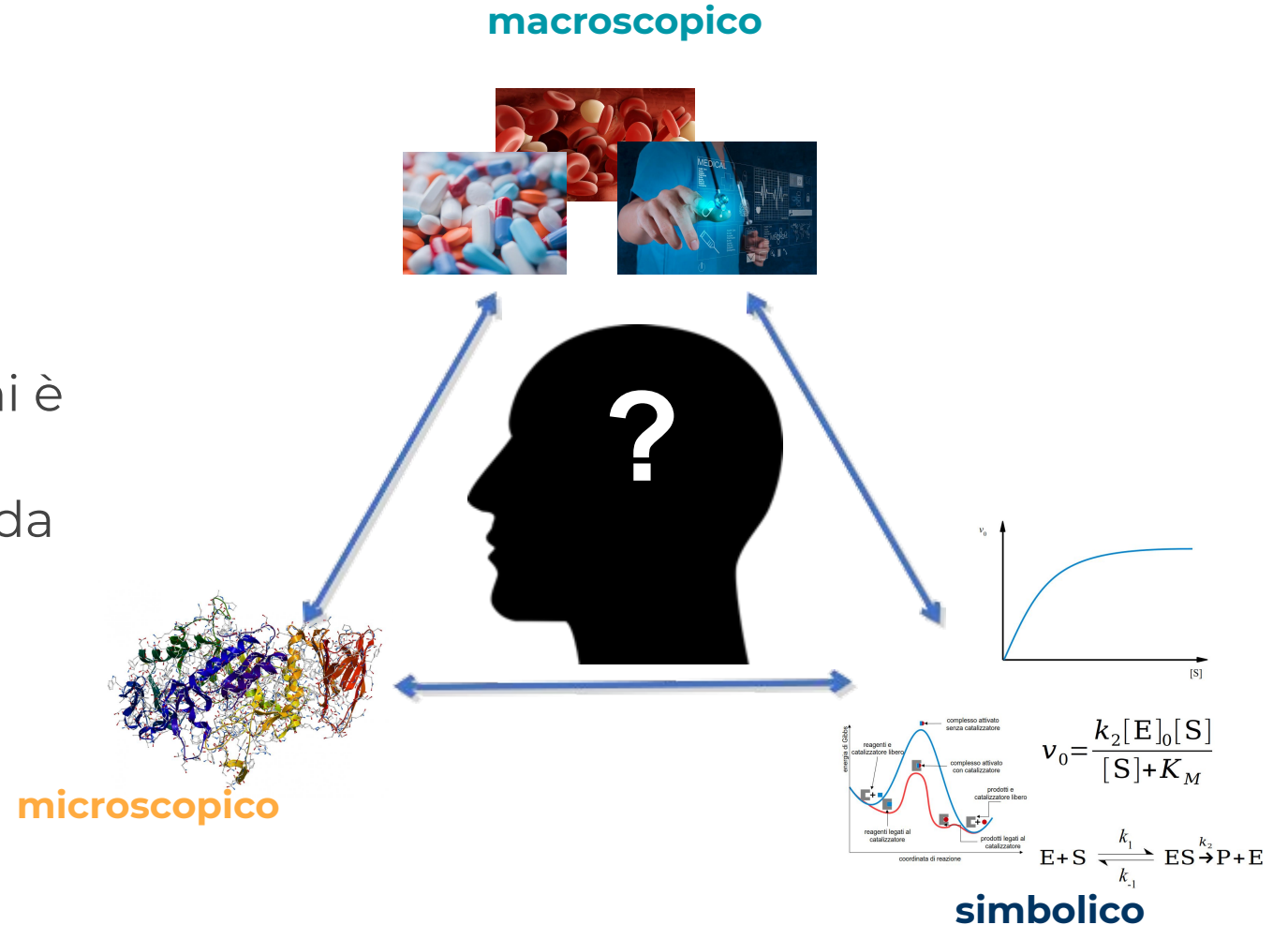
- La cinetica enzimatica è importante per comprendere numerosi fenomeni
 - Relazione struttura/funzione, regolazione enzimatica, *network* metabolici, ecc.
- Il modello di Michaelis e Menten è un aspetto fondamentale nella trattazione degli enzimi
 - Essenziale nella descrizione, eppure sufficiente a cogliere numerosi aspetti del funzionamento (effetto del substrato, inibizione, ecc.)

La sfida didattica

- Le interazioni fra enzima e substrato presentano spesso difficoltà di concettualizzazione da parte degli studenti
 - Modellizzazione delle interazioni, effetto della concentrazione del substrato, diversi tipi di inibizione, ecc.
- Come ogni “problema” in didattica, questo è anche una “occasione”
 - Per integrare e mettere a frutto conoscenze e abilità acquisite e sviluppare nuove competenze
 - Anche in ambito interdisciplinare

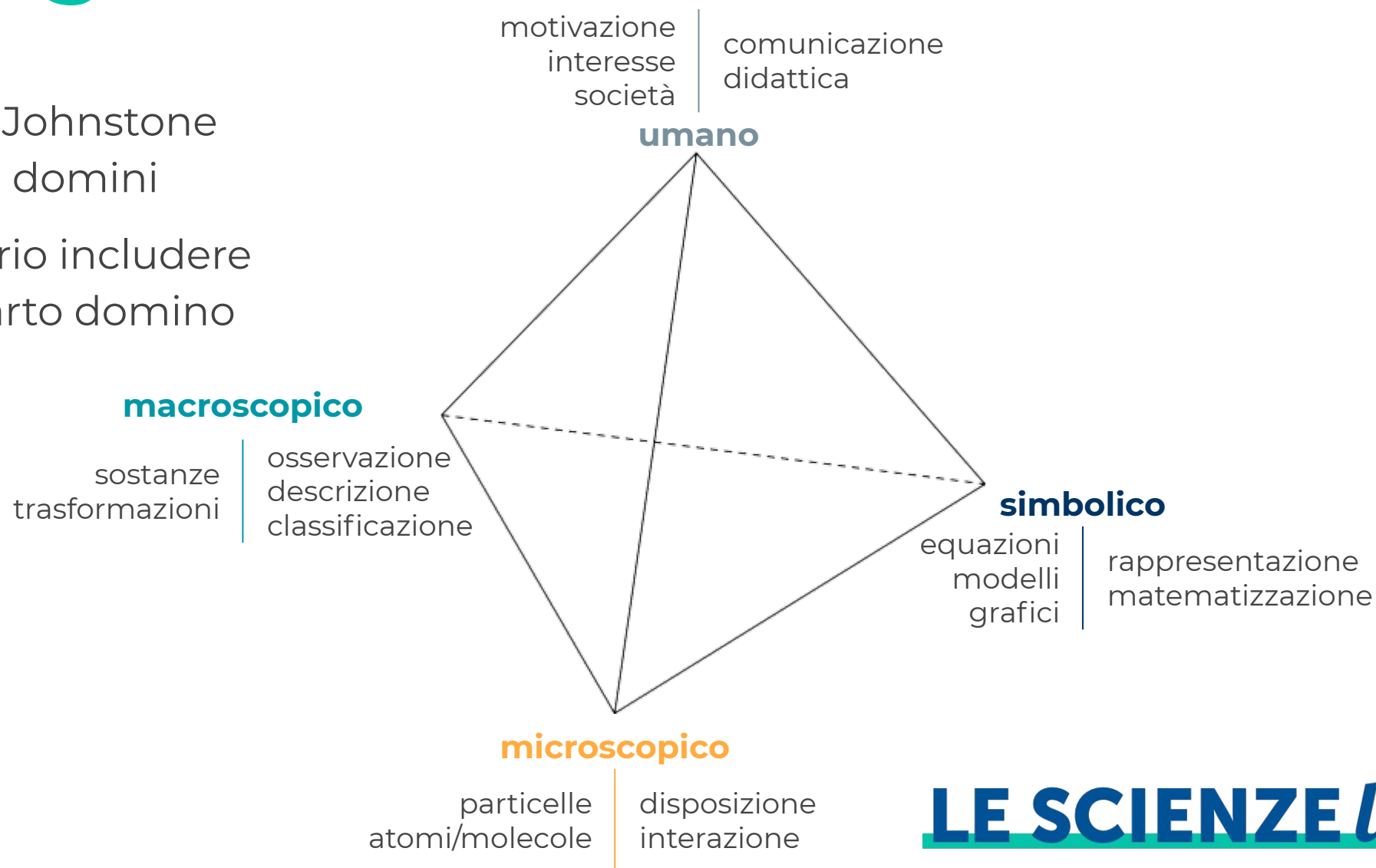
Multi domini

- La concettualizzazione deve avvenire su più domini
- La connessione fra questi domini è essenziale
 - ognuno è collegato agli altri da molte relazioni
- L'azione didattica deve promuovere questo processo
 - Impiegando più approcci e strumenti



Dal triangolo al tetraedro

- Il triangolo di Johnstone individua i tre domini
- Ma è necessario includere anche un quarto dominio



La strategia didattica

- L'approccio che proponiamo è quello del laboratorio analogico
 - Una esperienza sperimentale che funzioni in maniera analoga a quella reale ma impiegando altre entità su scale e/o tempi diversi
- Un laboratorio analogico ha dei vantaggi pratici
 - Accessibilità
 - Personale
 - Sicurezza
- Ma anche e soprattutto dei vantaggi didattici
 - Dà accesso diretto ad un analogo della scala microscopica
 - Coglie gli aspetti essenziali del fenomeno, senza ulteriori distrazioni o complicazioni
 - Permette di ripartire il lavoro con grande flessibilità, in classe o a casa, in gruppo o da soli

Obiettivi

- Acquisire una migliore comprensione concettuale del meccanismo di Michealis e Menten
 - Giustificare la curva di saturazione
 - Comprendere i contributi dei singoli processi
- Correlare modello chimico e rappresentazione matematica
 - Sia in forma di equazione che di grafico
 - Spiegare i parametri dell'equazione di Michealis e Menten alla luce del modello
- Stimolare competenze trasversali
 - Favorire la collaborazione, la riflessione e il confronto fra gli studenti
 - Promuovere l'approccio sperimentale

Un percorso, più strategie

- Contesto nel quale viene proposta l'attività
- Brainstorming iniziale
- Effettuazione delle misure
- Analisi dei dati
- Verifica finale
- Derivazione dell'equazione e giustificazione dell'andamento
- Estensione del modello

Trasmissiva

Inquiry

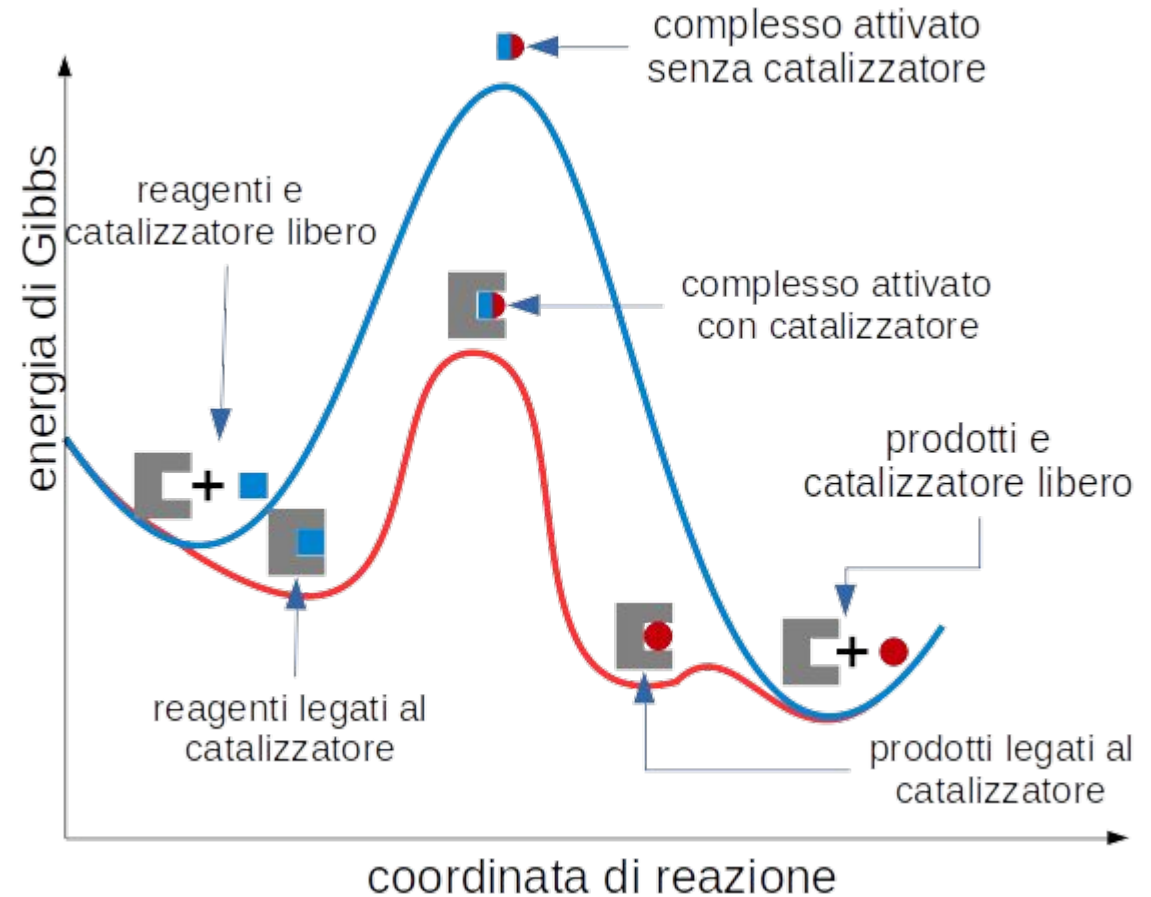
Attiva

La catalisi

- Un catalizzatore è una sostanza in grado di accelerare il decorso di una reazione chimica
- Il catalizzatore prende parte alla reazione
 - Forma legami con le specie reagenti promuovendone la trasformazione in prodotti
 - Alla fine della reazione, i prodotti si staccano dal catalizzatore rigenerando la forma libera pronta per un nuovo ciclo reattivo

Il percorso catalizzato

- L'effetto del catalizzatore è quello di fornire un meccanismo di reazione alternativo
- Tale meccanismo presenta una energia di attivazione minore rispetto alla reazione non catalizzata
 - In una reazione catalizzata la reazione avviene fra le specie legate al catalizzatore e non fra le specie libere
 - Gli stati energetici possono essere molto differenti



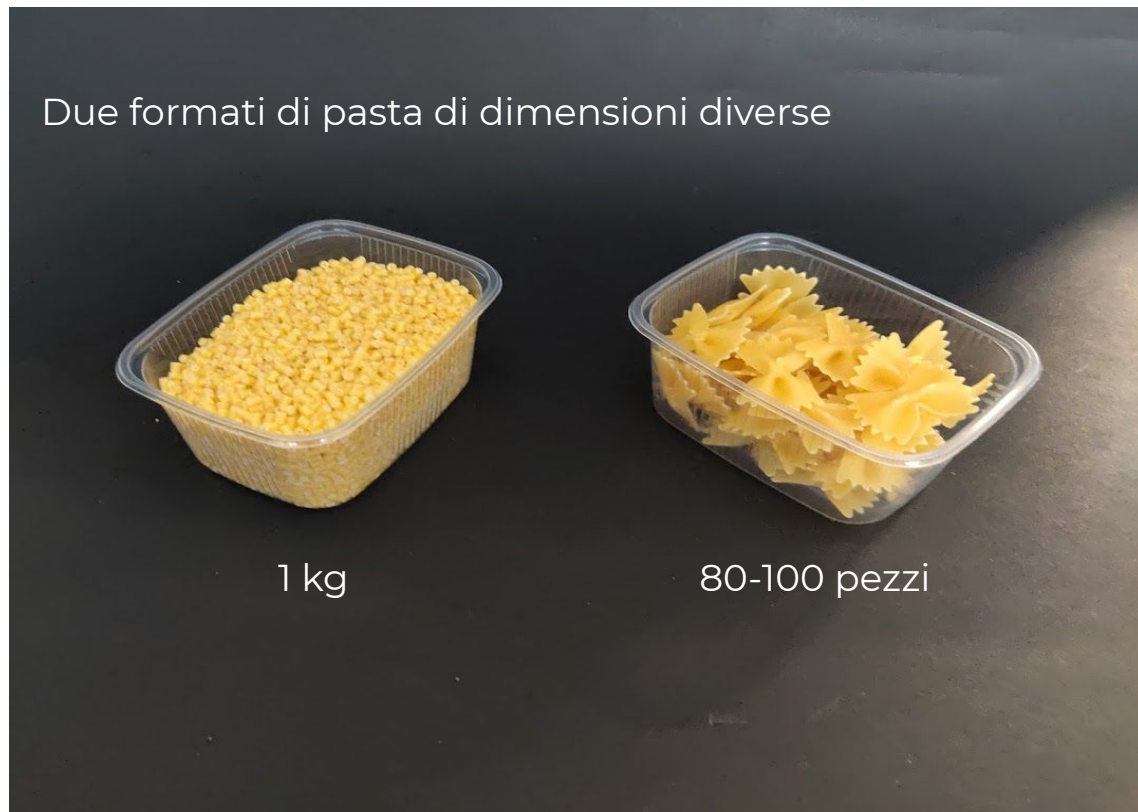
Gli enzimi

- La maggior parte delle reazioni biochimiche sono catalizzate da particolari catalizzatori detti enzimi
 - Sono quasi sempre molecole di natura proteica
 - Hanno una enorme capacità catalitica
 - Nella maggior parte dei casi hanno una notevole specificità verso un determinato tipo di substrato
- In un enzima, solitamente, sono presenti uno o più siti attivi dove si svolgono le reazioni con i substrati
 - Dove tipicamente sono presenti porzioni non proteiche
 - La grande capacità catalitica e l'alta specificità sono dovute alla natura del sito attivo

Brainstorming iniziale

- Stimola l'interesse e prepara la costruzione della base concettuale sulla quale operare
 - Può essere condotto in vari modi: discussione in classe, test non valutativo, attività online (kahoot, answergarden, ecc.)
- Deve essere specificamente pensato per gli studenti ai quali si rivolge
 - In base al programma svolto, le difficoltà incontrate in precedenza, le competenze interdisciplinari, ecc.
- Si può partire da molti punti di discussione
 - Come avviene il riconoscimento fra enzima e substrato?
 - Come cambierà la velocità al variare della concentrazione di substrato?
 - Cosa potrebbe succedere in presenza di altre sostanze?

Il materiale





La metodologia



Un altro esempio

Metodologia

microscopico

- Senza guardare nel sacchetto, con una mano cercare un pezzo di pasta, romperla e trasferirla nel contenitore (formazione del prodotto)
- Ripetere l'operazione più volte, con movimenti uniformi per 60 secondi
- Una volta ogni due, dopo aver trovato il substrato, non completare il gesto e rimettere la molecola nel sacchetto con il solvente

macroscopico

- Preparare il solvente nell'ambiente di reazione
 - Versare 1 kg di pasta di piccolo formato nel sacchetto
- Solubilizzare una certa quantità di substrato nel solvente
 - Disporre un certo numero di pezzi di pasta di formato più grande nel sacchetto, chiudere e mescolare bene

- Ripetere più volte la misura
- Fare altre misure con quantità crescenti di substrato

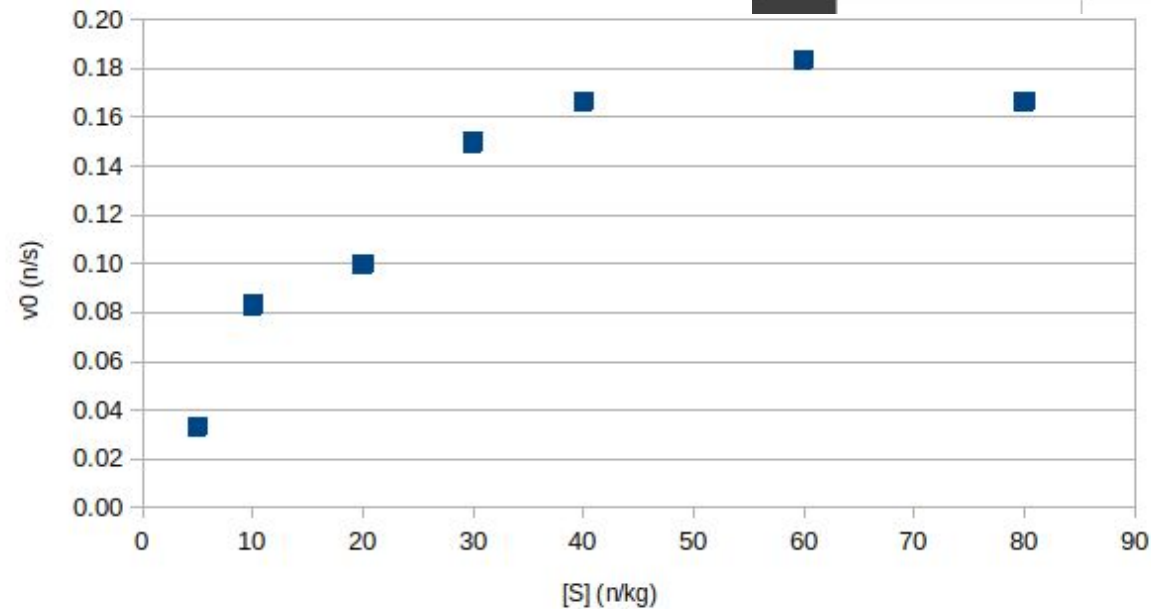
simbolico

- Riportare i risultati di ogni misura in una tabella
- Fare le medie dei risultati ottenuti per ogni concentrazione di substrato
- Riportare in grafico la velocità in funzione della concentrazione di substrato

I risultati attesi

	A	B	C	D	E	F
1	[S] (n/kg)	Misura 1	Misura 2	Misura 3	Media	v_0 (n/s)
2	80	10	13	11	11.3	0.17
3	60	11	10	11	10.7	0.18
4	40	10	10	9	9.7	0.17
5	30	9	9	10	9.3	0.15
6	20	6	8	8	7.3	0.10
7	10	5	6	7	6.0	0.08
8	5	2	3	4	3.0	0.03

Risultati esperimento
valori medi su tre misure



Attività a distanza?

- I materiali sono di facile reperimento e possono essere sostituiti con altri altrettanto semplici
- Non è richiesta una supervisione diretta dell'insegnante, rendendo possibile anche una fruizione asincrona
- Si può svolgere facilmente da soli, ma si presta anche alla collaborazione (a distanza o in presenza)
- Il tempo impiegato non è eccessivo e può essere frazionato con facilità

Riconoscere l'analogia

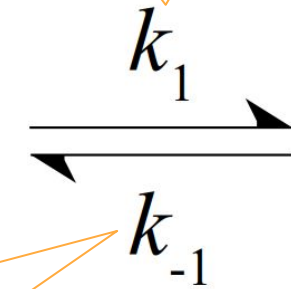
Il primo passaggio della concettualizzazione è comprendere la corrispondenza fra **entità** e **azioni** nell'attività svolta e quelle presenti nel modello illustrato dal docente

la pasta più piccola è il solvente

la pasta più grande è il substrato

Lo sperimentatore è l'enzima e la sua mano è il sito attivo

$E + S$



$ES \rightarrow P + E$

prelevare la pasta è la formazione del complesso enzima/substrato

rompere e spostare la pasta nel contenitore è la trasformazione del substrato in prodotto

la pasta rotta nel contenitore è il prodotto

rimettere la pasta nel sacchetto è la distruzione del complesso enzima/substrato

la pasta nella mano è il complesso enzima/substrato

Verifica finale

- Una volta riconosciuta l'analogia, sarà possibile procedere alla comprensione concettuale del modello di Michealis e Menten
 - Perché è importante che i movimenti siano il più possibile uniformi?
 - Quale è il vantaggio della ripetizione della stessa misura più volte?
 - Quale è la relazione fra la concentrazione di substrato iniziale e la velocità di reazione?
 - Perché si raggiunge una velocità limite a concentrazioni molto elevate?
 - Perché la velocità cresce rapidamente all'aumentare della concentrazione di substrato, per concentrazioni basse?
 - Cosa succederebbe se si aumentasse la quantità di enzima?

Derivazione dell'equazione

- A partire dal modello cinetico sarà possibile derivare agevolmente l'equazione di Michaelis e Menten
 - I passaggi emergono dalla natura del modello microscopico
- Il legame fra il modello microscopico e il modello matematico viene favorito dalla concettualizzazione analogica precedente
 - Si ritrovano le stesse entità e azioni dell'attività laboratoriale e del modello

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$
 dall'approssimazione dello stato stazionario e dal bilancio di massa

$$v_0 = k_2[ES]$$

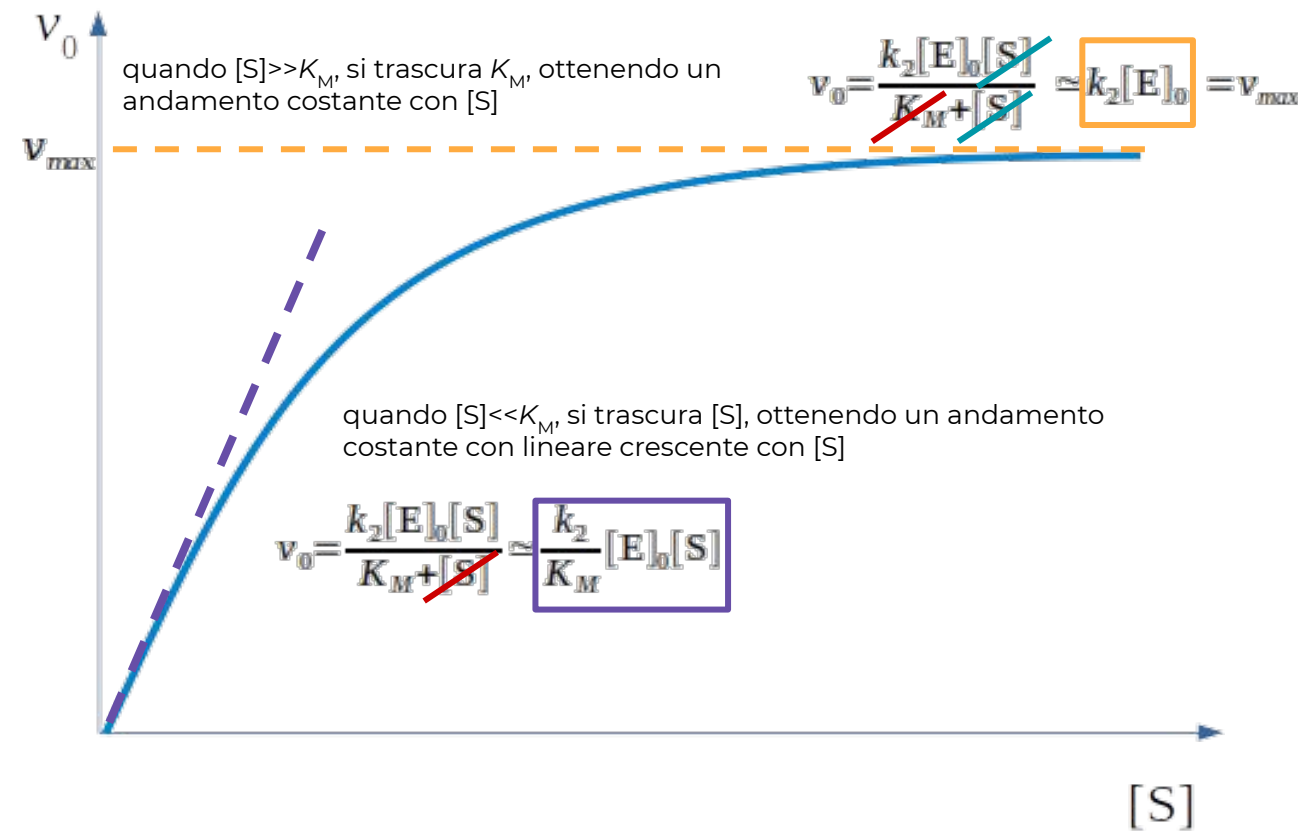
$$v_0 = \frac{k_2 k_1 [E]_0 [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2}$$
 dividiamo il numeratore e il denominatore per k_1

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}}$$
 definiamo la costante di Michealis $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{[S] + K_M}$$

Giustificazione dell'andamento

- A basse valori di $[S]$ la velocità è limitata dalla difficoltà di formazione del complesso
 - Trovare la pasta nel sacchetto è difficile
- Aumentando $[S]$ la velocità aumenta di conseguenza
 - Trovare la pasta diventa sempre più facile
- Ad alti valori di $[S]$ la velocità dipende solo da k_2 e $[E]_0$
 - La velocità con la quale riponiamo la pasta nel contenitore (k_2)
 - Il numero di persone che prelevano la pasta ($[E]_0$)



Velocità massima e saturazione

- La pendenza iniziale della curva corrisponde all'efficienza catalitica: k_2/K_M
 - Grandi valori dell'efficienza catalitica sono dovuti a una grande capacità di legare il substrato (K_M piccola) e/o una grande velocità nel trasformarlo in prodotti (k_2 grande)
- La velocità massima si raggiunge quando tutte le molecole di enzima hanno tutti i siti attivi occupati dal substrato
 - Tutto l'enzima esiste sotto forma di complesso enzima/substrato
- In condizioni di saturazione, l'unico modo di aumentare ulteriormente la velocità è quello di aumentare la quantità di enzima
 - A basse concentrazioni v_0 dipende da $[E]_0$ e da $[S]$, mentre ad alte concentrazioni dipende solamente da $[E]_0$

La saturazione al supermercato



Prima della saturazione



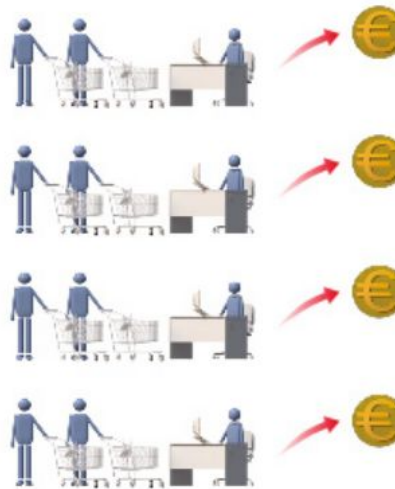
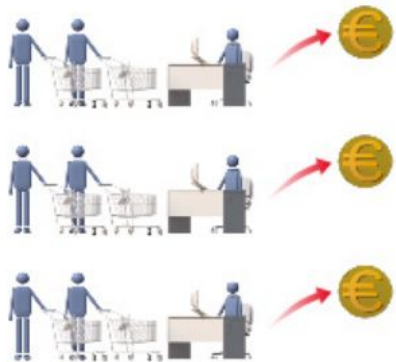
per aumentare il guadagno, basta aumentare la quantità di substrato



Dopo la saturazione



per aumentare il guadagno, bisogna aumentare la quantità di enzima



$$[S] \ll K_M$$

la parte iniziale della curva di Michaelis e Menten

$$[S] \gg K_M$$

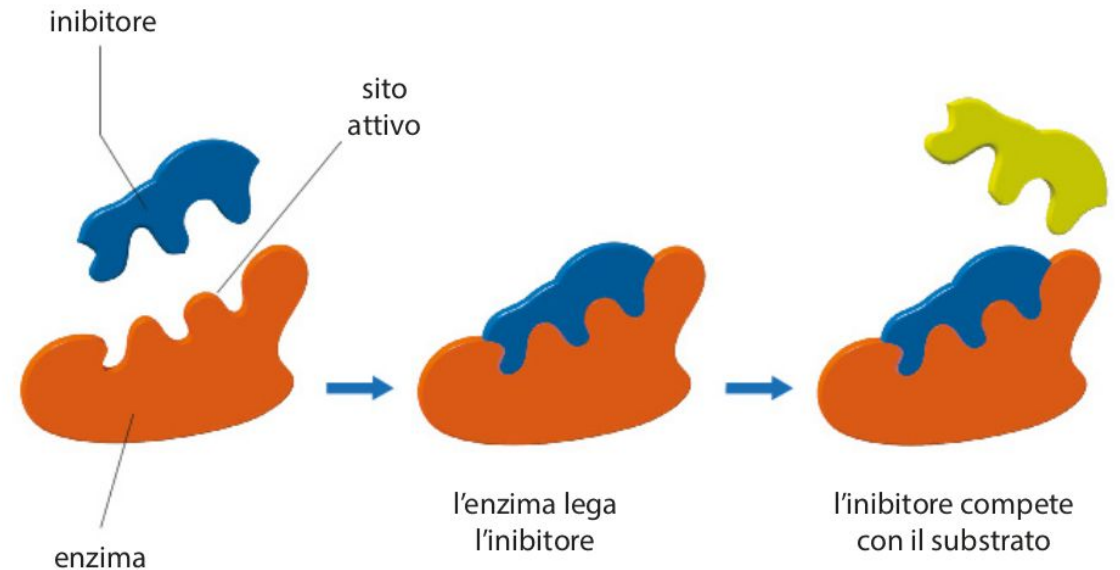
la parte finale della curva di Michaelis e Menten

Estendere l'analogia

- Pur nella sua semplicità, il modello analogico proposto si presta ad essere esteso e/o modificato abbastanza facilmente
 - Gli aspetti essenziali del meccanismo di funzionamento degli enzimi è colto con sufficiente coerenza e completezza
- Anche questa attività può essere svolta con un approccio inquiry favorendo il ciclo dell'apprendimento
 - esplorazione del modello e dei dati
 - concettualizzazione del funzionamento
 - applicazione in nuovi contesti

L'inibizione competitiva

- Contesto
 - Un inibitore competitivo compete con il substrato per legarsi al sito attivo dell'enzima
- Inquiry
 - Come si potrebbe modificare il modello per tener conto di una inibizione competitiva?
 - Quali risultati si possono attendere?



Bibliografia

- Orgill, M., Bodner, G. The role of analogies in chemistry teaching. In *Chemists' Guide to Effective Teaching*; Pienta, N., Cooper, M., Greenbowe, T., Eds.; Prentice-Hall: Upper Saddle River, NY, 2005; pp 90–105.
- Taber, K. S. Revisiting the Chemistry Triplet: Drawing upon the Nature of Chemical Knowledge and the Psychology of Learning to Inform Chemistry Education. *Chem. Educ. Res. Pract.* **2013**, *14* (2), 156–168.
 - <https://doi.org/10.1039/C3RP00012E>
- Linenberger, K. J.; Bretz, S. L. Biochemistry students' ideas about how an enzyme interacts with a substrate. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2015**, *43* (4), 213–222.
 - <https://doi.org/10.1002/bmb.20868>
- House, C.; Meades, G.; Linenberger, K. J. Approaching a Conceptual Understanding of Enzyme Kinetics and Inhibition: Development of an Active Learning Inquiry Activity for Prehealth and Nonscience Majors. *J. Chem. Educ.* **2016**, *93* (8), 1397–1400.
 - <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00562>.
- Gehret, A. U. Pop-It Beads to Introduce Catalysis of Reaction Rate and Substrate Depletion Effects. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2017**, *45* (2), 179–183.
 - <https://doi.org/10.1002/bmb.21000>.
- Rodriguez, J.-M. G.; Towns, M. H. Research on Students' Understanding of Michaelis-Menten Kinetics and Enzyme Inhibition: Implications for Instruction and Learning. *The Biophysicist* **2020**, *1* (2).
 - <https://doi.org/10.35459/tbp.2019.000108>.

Contatti

Renato Lombardo

renato.lombardo@unipa.it

<https://www.unipa.it/persona/docenti/l/renato.lombardo>

Antonella Maggio

antonella.maggio@unipa.it

www.unipa.it/persona/docenti/m/antonella.maggio



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)

LE SCIENZE *live*

Rizzoli
EDUCATION