

Cap. 6

GLI ENZIMI: proteine con attività CATALITICA

Catalizzatori biologici: permettono alle reazioni biochimiche di avvenire a temperature e pressioni fisiologiche e a velocità misurabile.

Aumentano la velocità delle reazioni che catalizzano almeno centomila volte (10^5 È 10^{17}). I catalizzatori non enzimatici aumentano la velocità di 100-10000 volte (10^2 - 10^4)

§ Sono altamente specifici

§ Partecipano alla reazione ma non ne sono modificati.

§ NON alterano l'energetica delle reazioni.

§ Agiscono in un arco ristretto di condizioni (pH, temperatura).

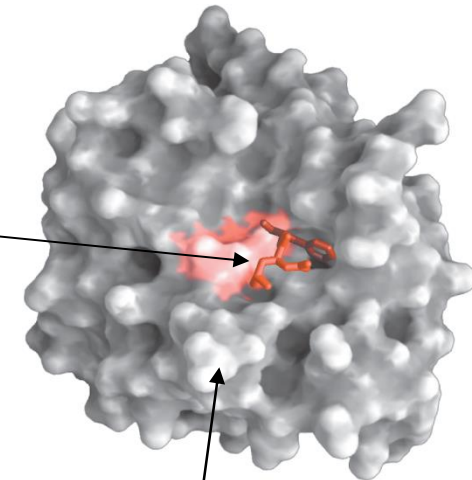
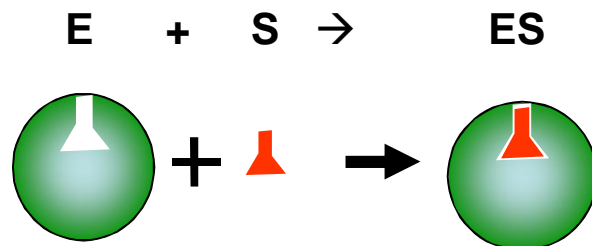
Gli ENZIMI sono altamente specifici

§ Catalizzano solo un tipo di reazione (es: $A+B \rightarrow C$).

§ Riconoscono un reagente specifico (**IL/ SUBSTRATO/I**, es. proteine, peptidi, oligonucleotidi, poli- ed oligosaccaridi, acidi grassi o altre molecole lipidiche, zuccheri ed altri carboidrati).

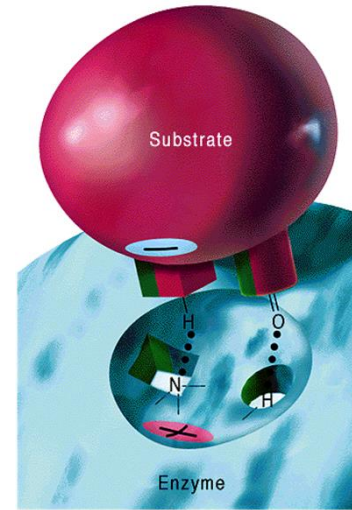
La regione della proteina che lega i(il) substrati(o) prende il nome di **SITO ATTIVO**

il SITO ATTIVO ha una forma **COMPLEMENTARE** a quella dei substrati *

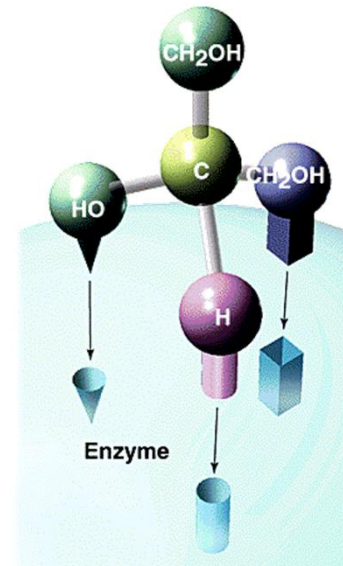


STRUTTURA TERZIARIA

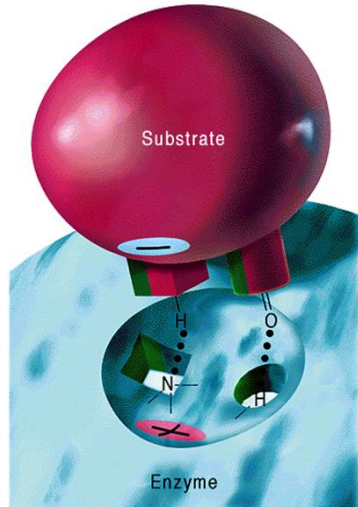
- “ Il sito attivo è costituito dal **í negativoî del substrato**
 - . Si formano un insieme di **legami deboli í esattiî fra enzima e substrato**



- “ Il riconoscimento è **tridimensionale** e può **distinguere tra stereoisomeri (D- e L- aminoacidi)**



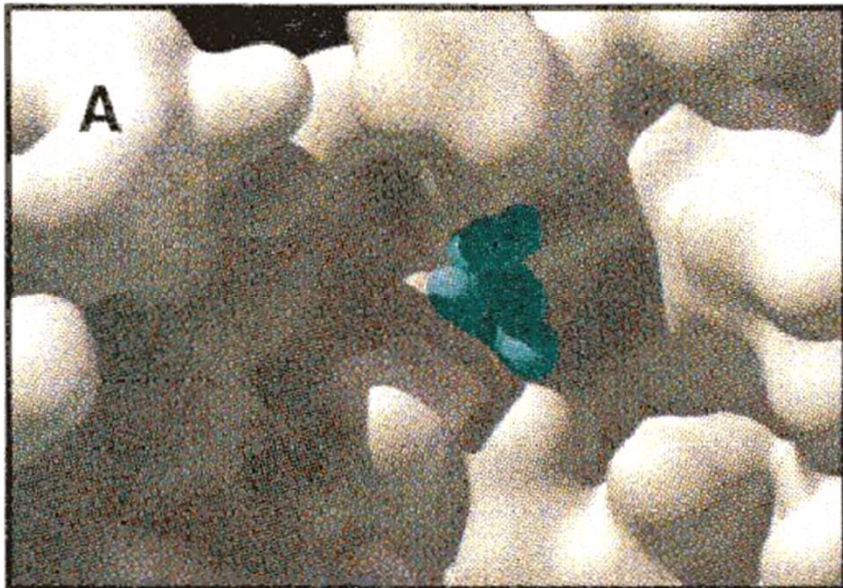
La complementarità di forma è data dalle caratteristiche chimiche degli aminoacidi che costituiscono la superficie del sito attivo.



Il legame con il Substrato è mediata da interazioni deboli (legami H, Idrofobici, VdW, ponti salini)

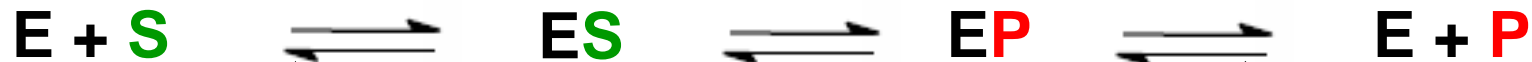
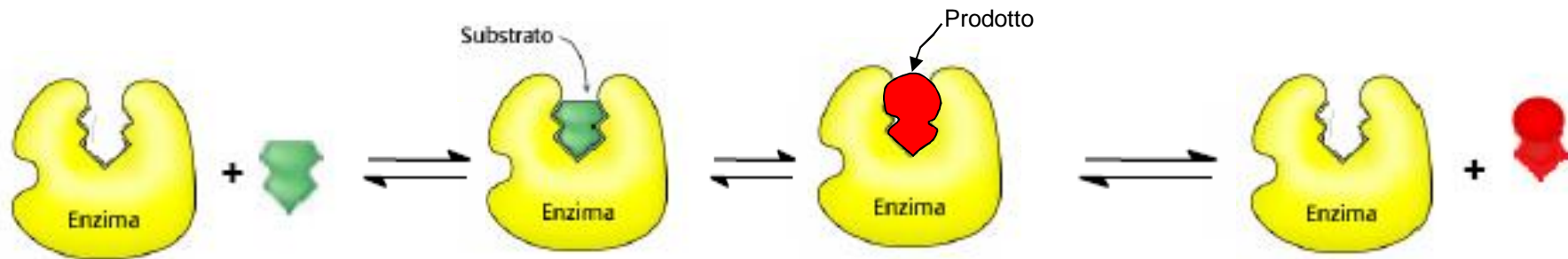
Garantisce che i gruppi chimici del/i substrato/i si avvicinino con l'orientazione giusta

- Prossimità (avvicinamento)
- Corretto orientamento



Il sito attivo occupa una regione molto piccola della proteina

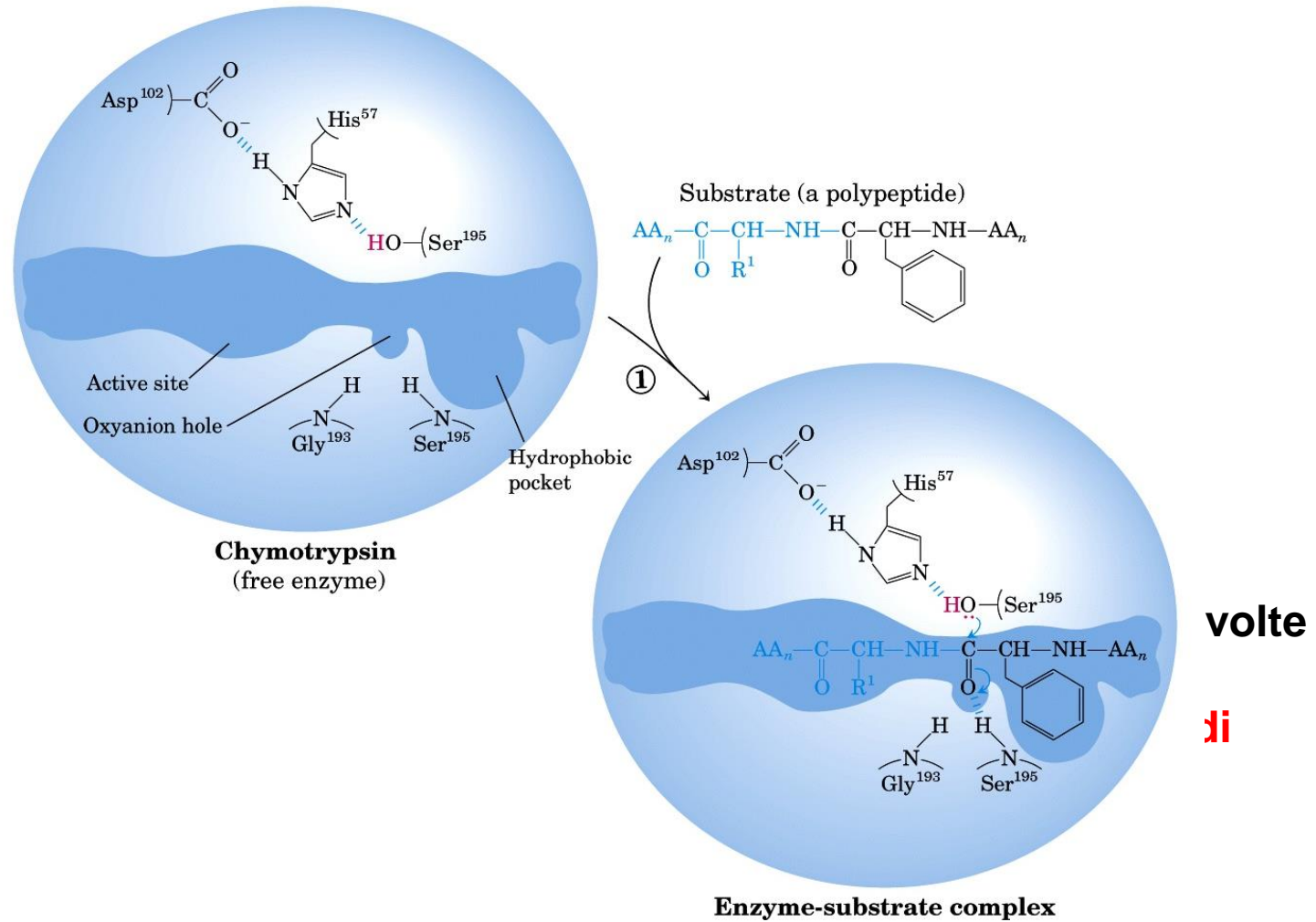
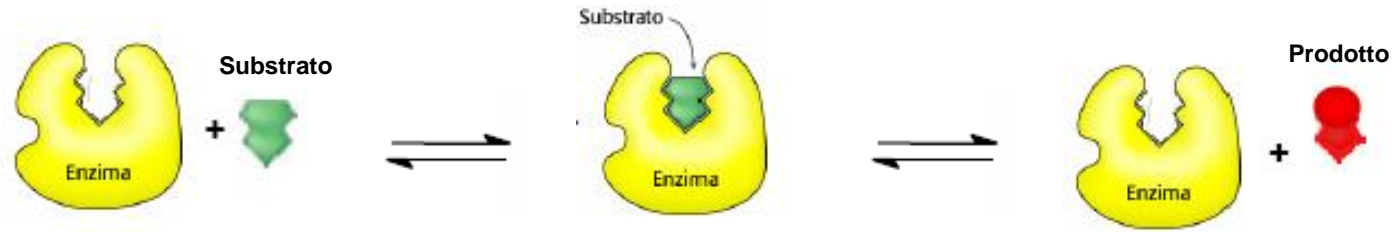
SEQUENZA DI INTERAZIONI IN UNA REAZIONE ENZIMATICA



Una volta che l'enzima ha legato il substrato, **la formazione del prodotto è molto veloce**

Le tappe che limitano la velocità di reazione sono la formazione di ES e la dissociazione di P da E

Gli enzimi partecipano alla reazione ma NON ne sono modificati.



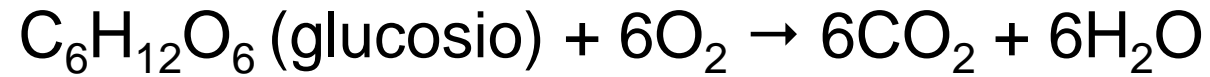
Ogni cop

Il numero
substrato

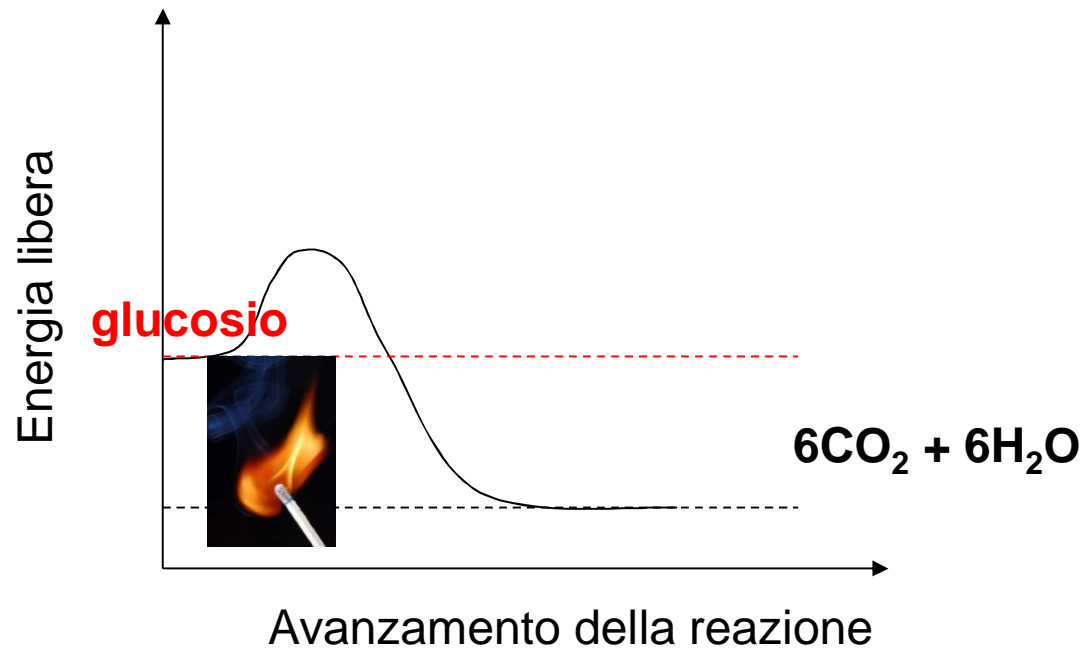
volte

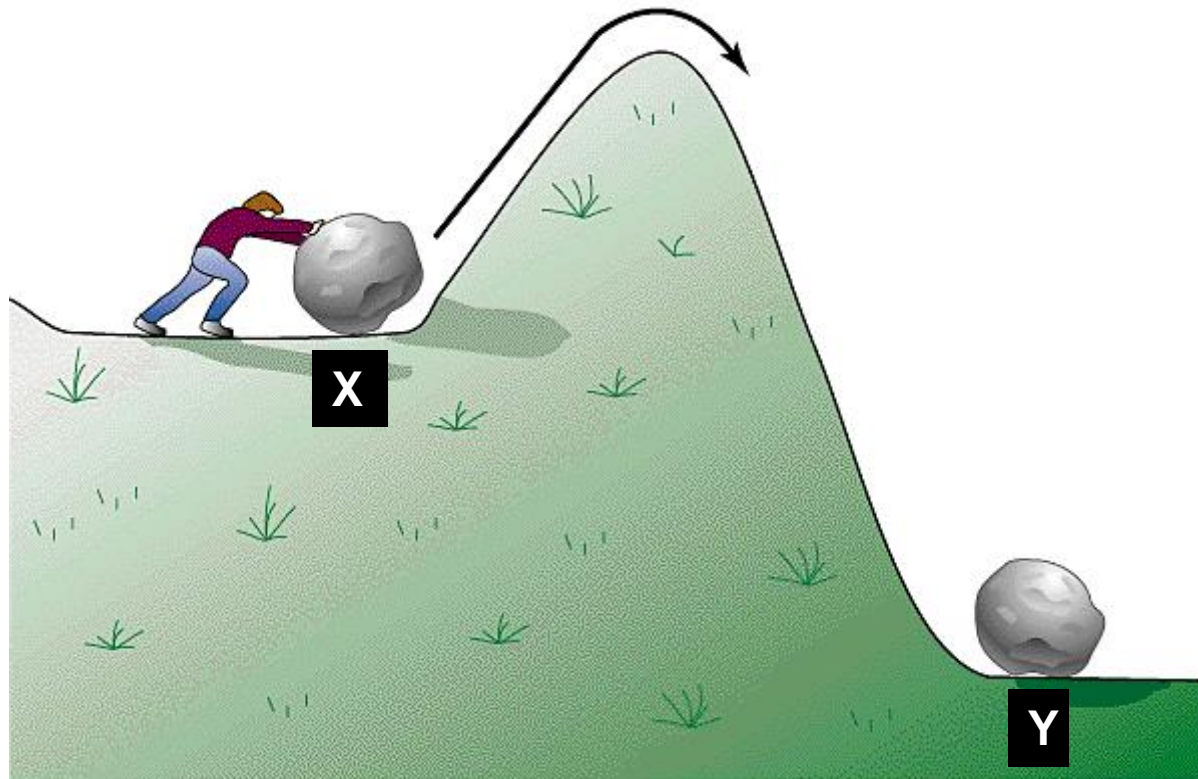
di

Gli enzimi NON alterano l'energia delle reazioni.



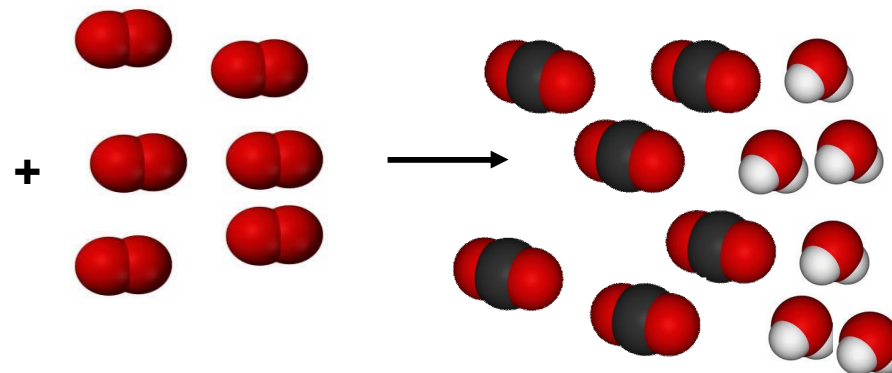
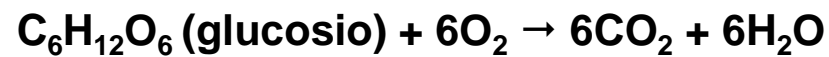
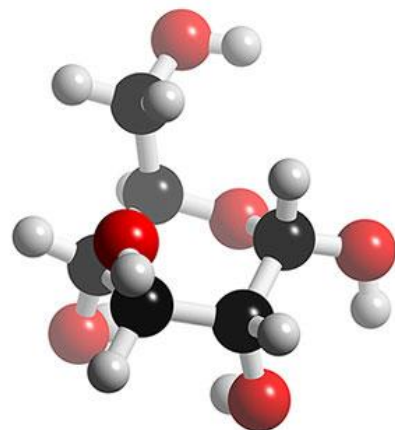
OSSIDAZIONE DEL GLUCOSIO





- “ Y si trova ad uno stato energetico inferiore rispetto a X
 . Conversione $X \rightarrow Y$ termodinamicamente favorevole
- “ Ma la reazione non può avvenire se X non acquisisce sufficiente energia per superare la barriera dell'energia di attivazione

molecola complessa e ordinata

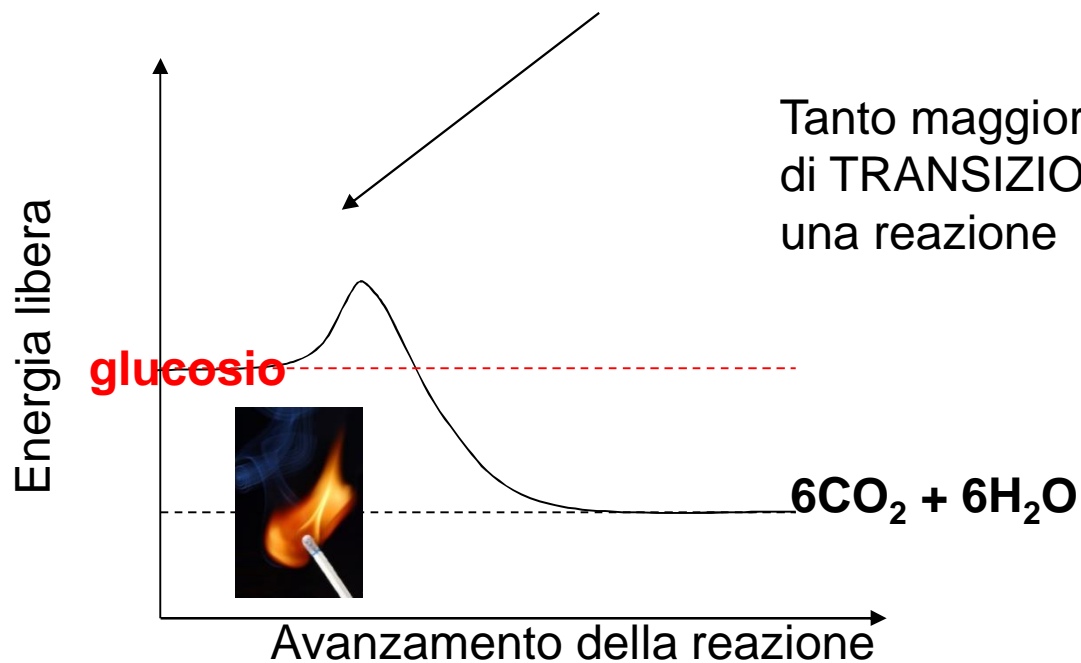


- stiramento e distorsione dei legami



STATO DI TRANSIZIONE

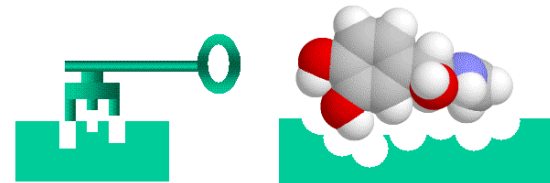
molecole semplici e disordinate+



INTERAZIONE TRA SUBSTRATO E SITO ATTIVO

Modello chiave-serratura

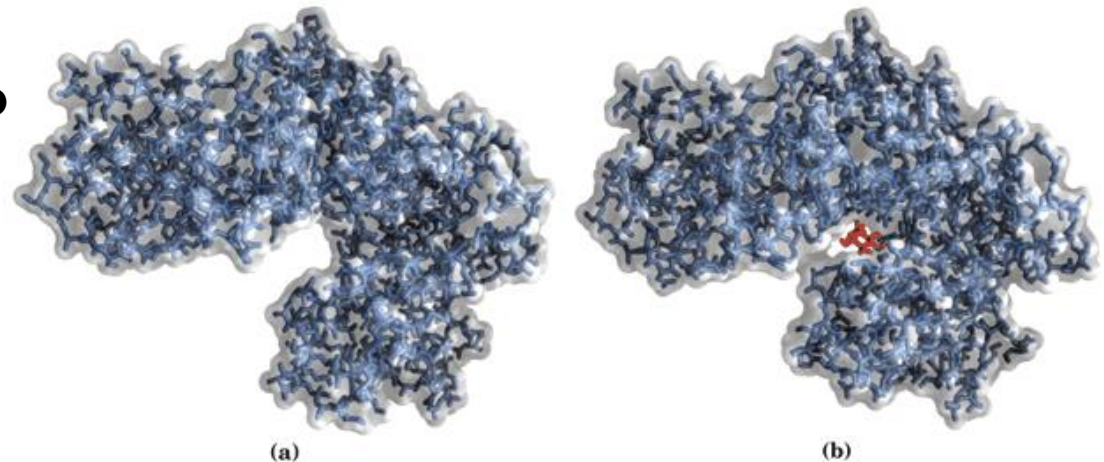
Prevede un alto grado di complementarità tra la forma del substrato e la geometria del sito attivo



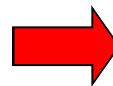
Se fosse così l'interazione sarebbe MOLTO FORTE, al punto da diventare **irreversibile** (il complesso ES sarebbe estremamente stabile)

Modello di adattamento indotto

Tiene conto della flessibilità conformazionale delle proteine



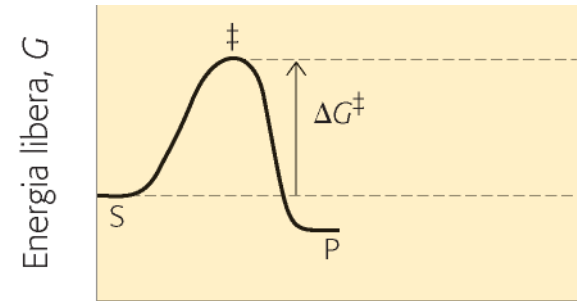
Il sito attivo, legando il substrato, cambia leggermente conformazione, portando a tendere e distorcerne i legami



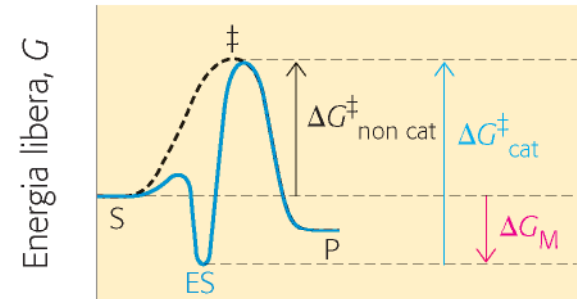
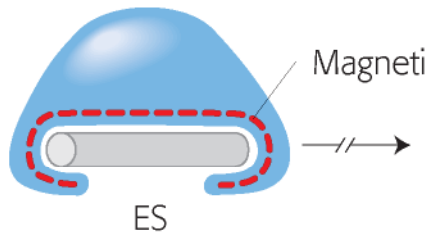
Il sito attivo è complementare allo **STATO DI TRANSIZIONE**

§ Gli enzimi NON alterano l'energetica delle reazioni.

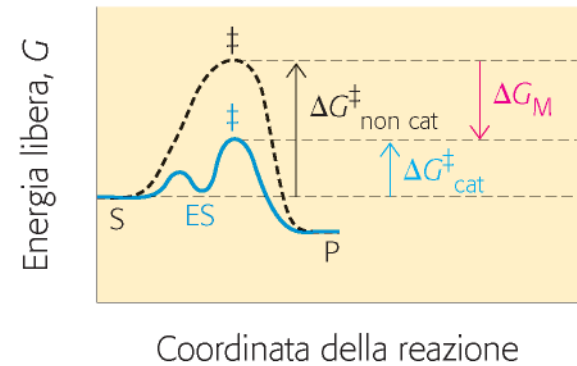
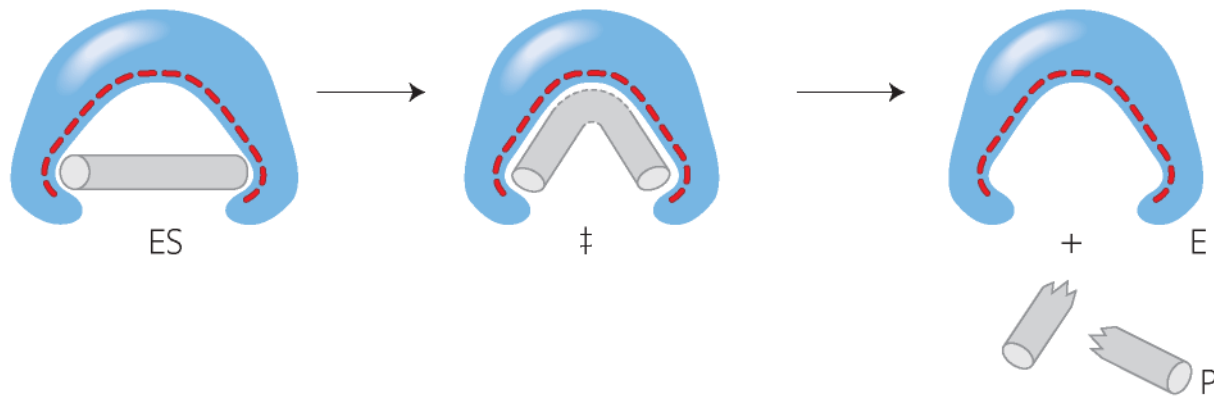
(a) Senza enzima



(b) Complementarità tra enzima e substrato

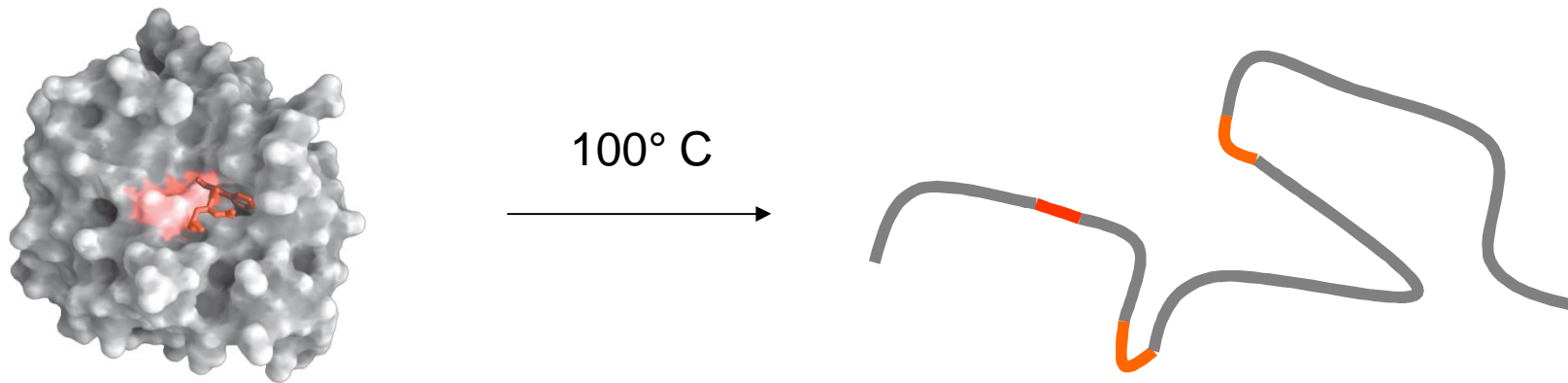


(c) Complementarità tra enzima e stato di transizione



Gli enzimi agiscono in un arco ristretto di condizioni (pH, temperatura, solvente)

Essendo proteine, la loro **STRUTTURA TERZIARIA** dipende dalle condizioni



La geometria (funzionalità) del SITO ATTIVO dipende dall'integrità della struttura terziaria

Solamente nella conformazione NATIVA gli aminoacidi che formano il SITO ATTIVO si trovano vicini e nelle corrette relazioni spaziali

Nomenclatura degli enzimi

“ Denominazione classica costituita da 3 parti:

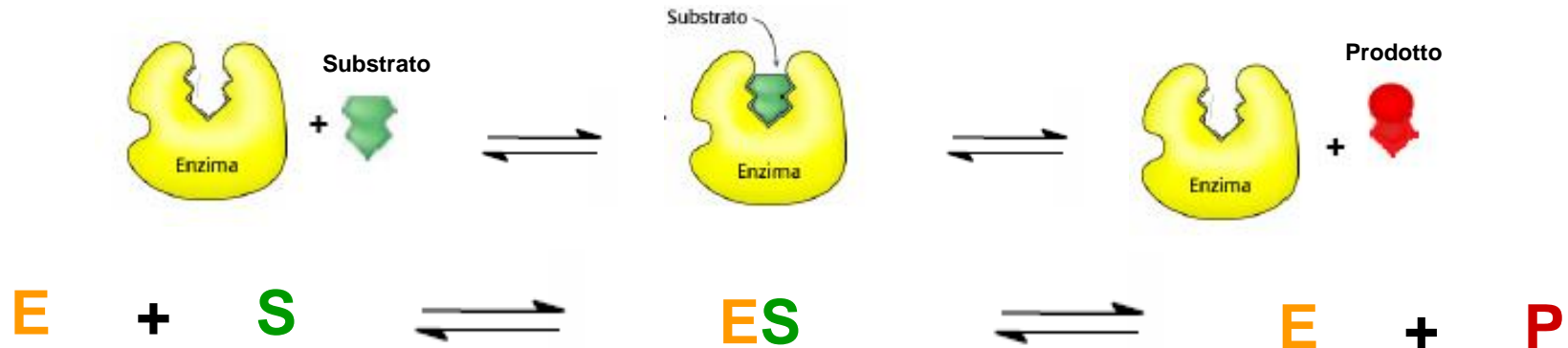
- . Nome del substrato
- . Nome dell'eventuale coenzima
- . Nome della reazione catalizzata + **Íasiî**

Esempio: Lattico-NAD-deidrogenasi

- “ 1 È **ossidoreduttasi - deidrogenasi**: reazioni di ossido-riduzione
- “ 2 - **transferasi**: trasferimento di gruppi chimici da una molecola ad un'altra
- “ 3 - **idrolasi**: reazioni di idrolisi
- “ 4 - **liasi**: reazioni di addizione a doppi legami
- “ 5 - **isomerasi**: reazioni di trasformazione di una molecola nel suo isomero
- “ 6 - **ligasi**: reazioni di formazione di nuovi legami con consumo di ATP

Progetto genoma umano :

Esistono circa 24,000 geni, di cui almeno 1/4 sono codificano per enzimi (6000)



“ 1913: Michaelis e Menten

Elaborarono di un legge che permette di **trattare quantitativamente** i dati di cinetica enzimatica e di **PREVEDERE** le caratteristiche di una reazione catalizzata



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

Equazione di Michaelis Menten

$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

Equazione del tipo

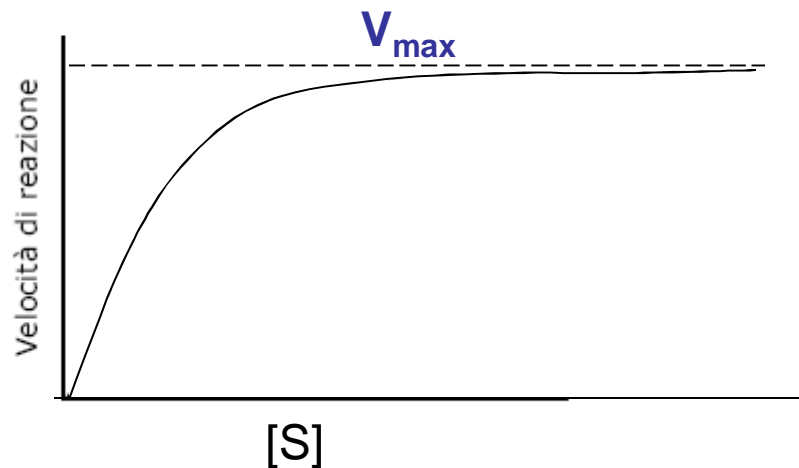
$$y = ax / b+x$$

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + Kd}$$

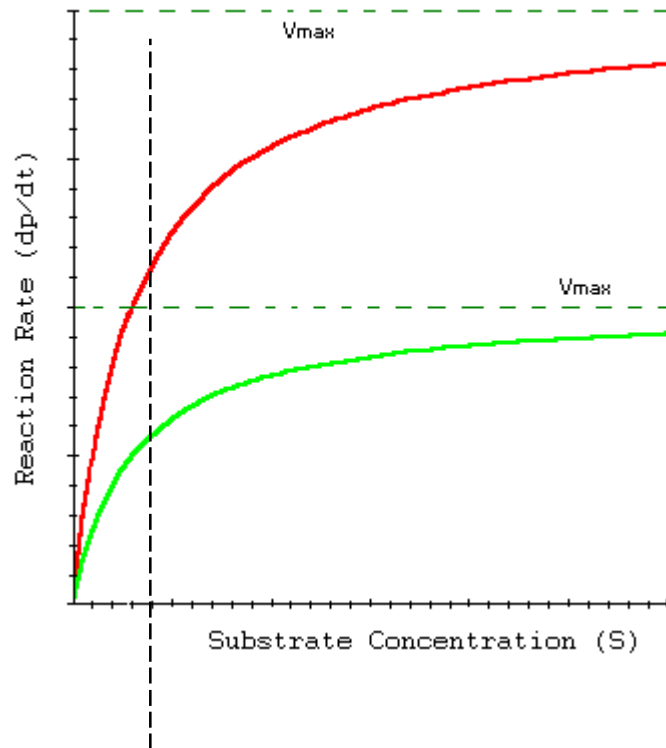
K_M = Costante di Michaelis-Menten

Se la concentrazione del substrato è così **alta** che l'enzima è completamente saturato dal substrato

la reazione procede alla MASSIMA VELOCITÀ possibile **V_{max}**



V_{max} è funzione della quantità di enzima presente



$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_{\text{tot}}]}$$

K_{cat} è pari al numero di molecole di substrato convertite in prodotto nell'unità di tempo (sec) per ciascuna molecola di enzima.

Dimensioni = sec⁻¹

Enzima	substrato	K _{cat} (sec ⁻¹)
Catalasi	H ₂ O ₂	4 x 10 ⁷
Anidrasi carbonica	HCO ₃ ⁻	4 x 10 ⁵
Fumarasi	fumarato	8 x 10 ²
RecA (ATPasi)	ATP	0,5

$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

Significato della costante di Michaelis-Menten

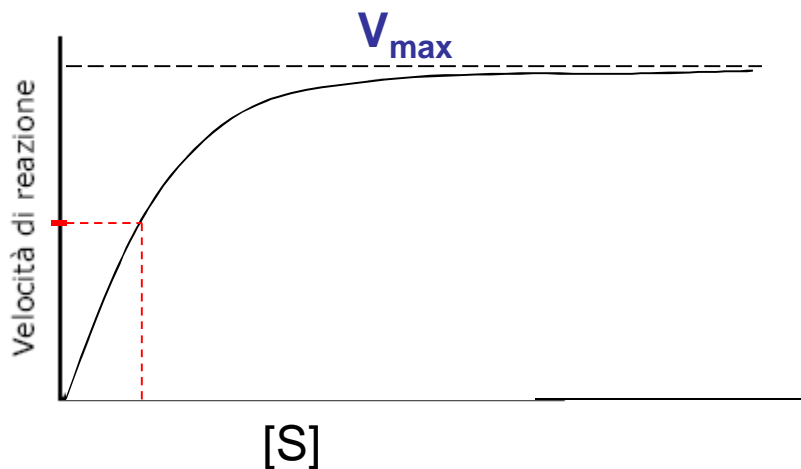
K_M è, dimensionalmente, una concentrazione: **mol/l**

Se $K_M = [S]$

$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

diventa

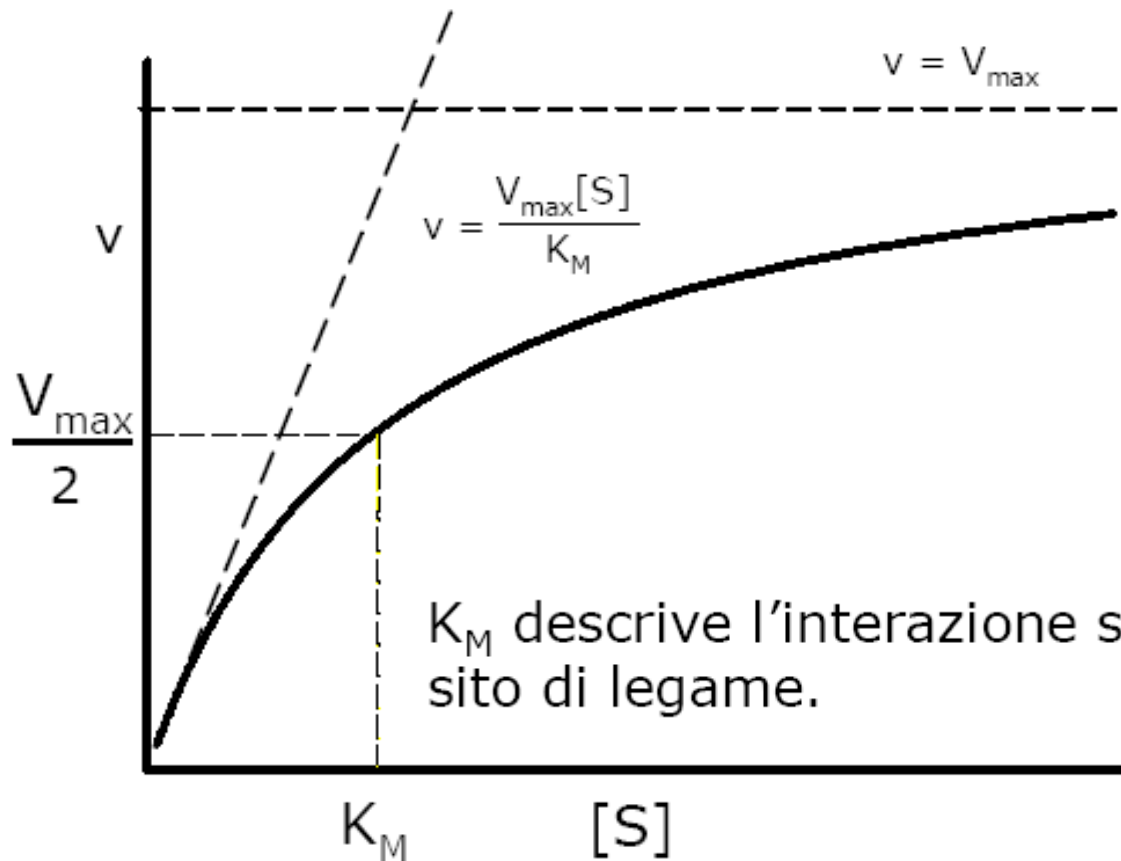
$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}}{2}$$



K_M è la concentrazione di substrato alla quale la velocità della reazione è **metà** della V_{max}

Significato di K_M

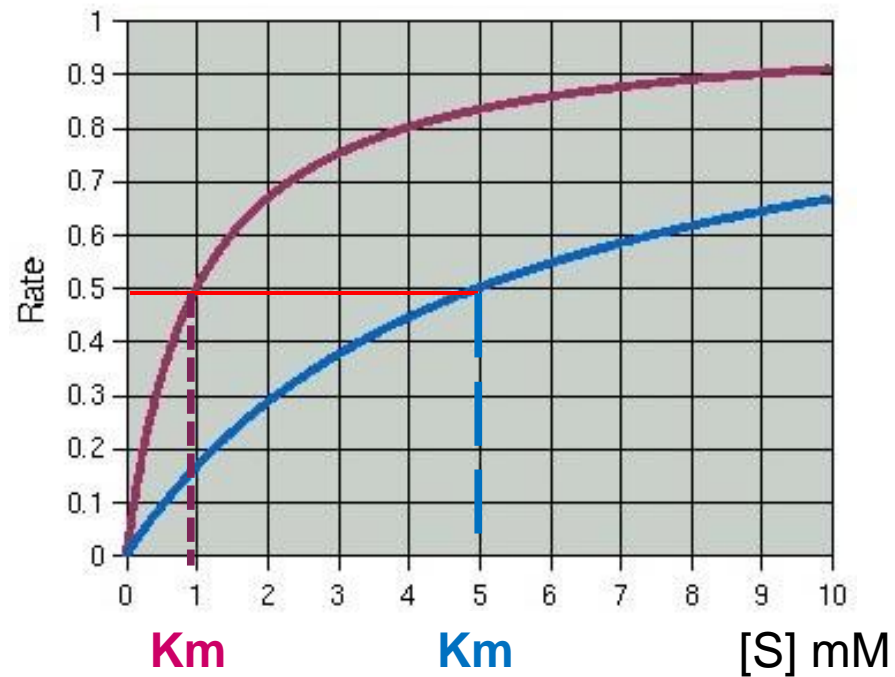
⇒ È la concentrazione di substrato alla quale il 50% dei siti attivi è occupato dal substrato stesso



Il valore di K_M è una misura di quanto strettamente il substrato sia legato all'enzima (affinità)

Tanto maggiore sarà il valore di K_M tanto più debole sarà l'interazione tra substrato ed enzima

Enzima	Substrato	Km (mM)
Esochinasi	D-glucosio	0,05
	D-fruttosio	1,5
Anidrase carbonica	HCO ₃ ⁻	26
Chimotripsina	peptide	108
β-galattosidasi	D-lattosio	4



$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

La curva descritta dall'equazione di Michaelis-Menten è un'iperbole

È molto difficile stimare V_{max} perché è un asintoto
Questo rende difficile determinare il valore di K_M per un enzima

È più semplice lavorare con una retta.

È possibile trasformare l'equazione di un'iperbole in quella di una retta considerando i reciproci di entrambi i termini dell'equazione

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{\text{max}}[S]}$$



$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}[S]} + \frac{[S]}{V_{\text{max}}[S]}$$



$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

Equazione del tipo

$$y = mx + b$$

$$y = 1/V$$

$$x = 1/[S]$$

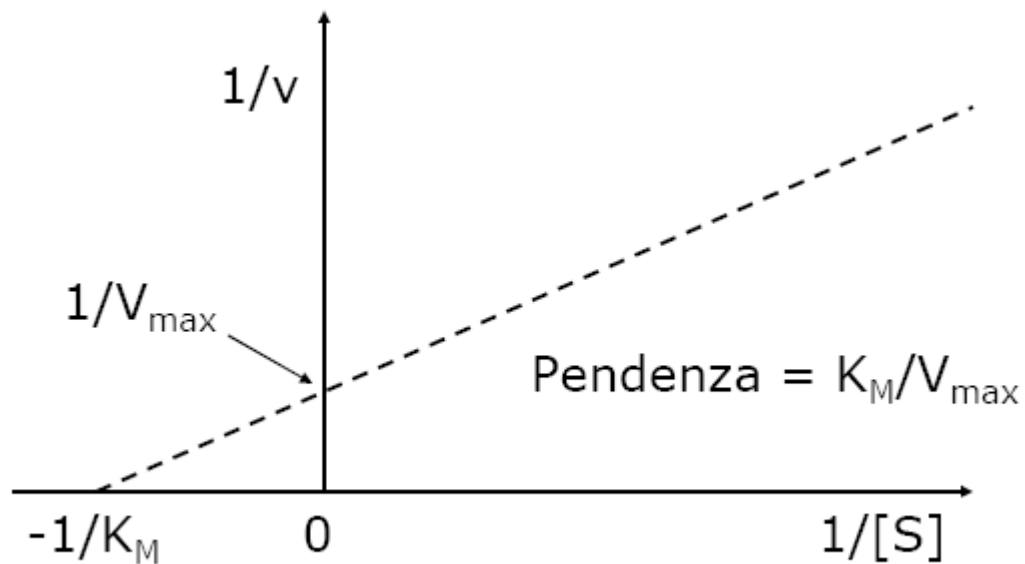
$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

Equazione del tipo

$$y = mx + b$$

Equazione di Lineweaver-Burk



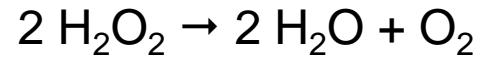
Pendenza $\Rightarrow m = K_M/V_{\text{max}}$

Intercetta asse y $\Rightarrow b = 1/V_{\text{max}}$

Intercetta asse x $\Rightarrow -1/K_M$

Applicazione della **Lineweaver-Burk** allo studio dell'attività di un enzima

L'enzima catalasi converte il perossido di idrogeno (acqua ossigenata) in acqua e ossigeno



Sono stati ottenuti i seguenti dati sperimentali

Concentrazione substrato H_2O_2 (mM)	Velocità mmoli/sec
2,5	0,024
5,0	0,036
10	0,053
15	0,060
20	0,064

DETERMINARE K_M e V_{max}

Calcolando i reciproci

$1/\text{H}_2\text{O}_2$	$1/\text{Velocità}$
0,4	41,667
0,2	27,778
0,1	18,868
0,067	16,667
0,05	15,625

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

1/H₂O₂ 1/Velocità

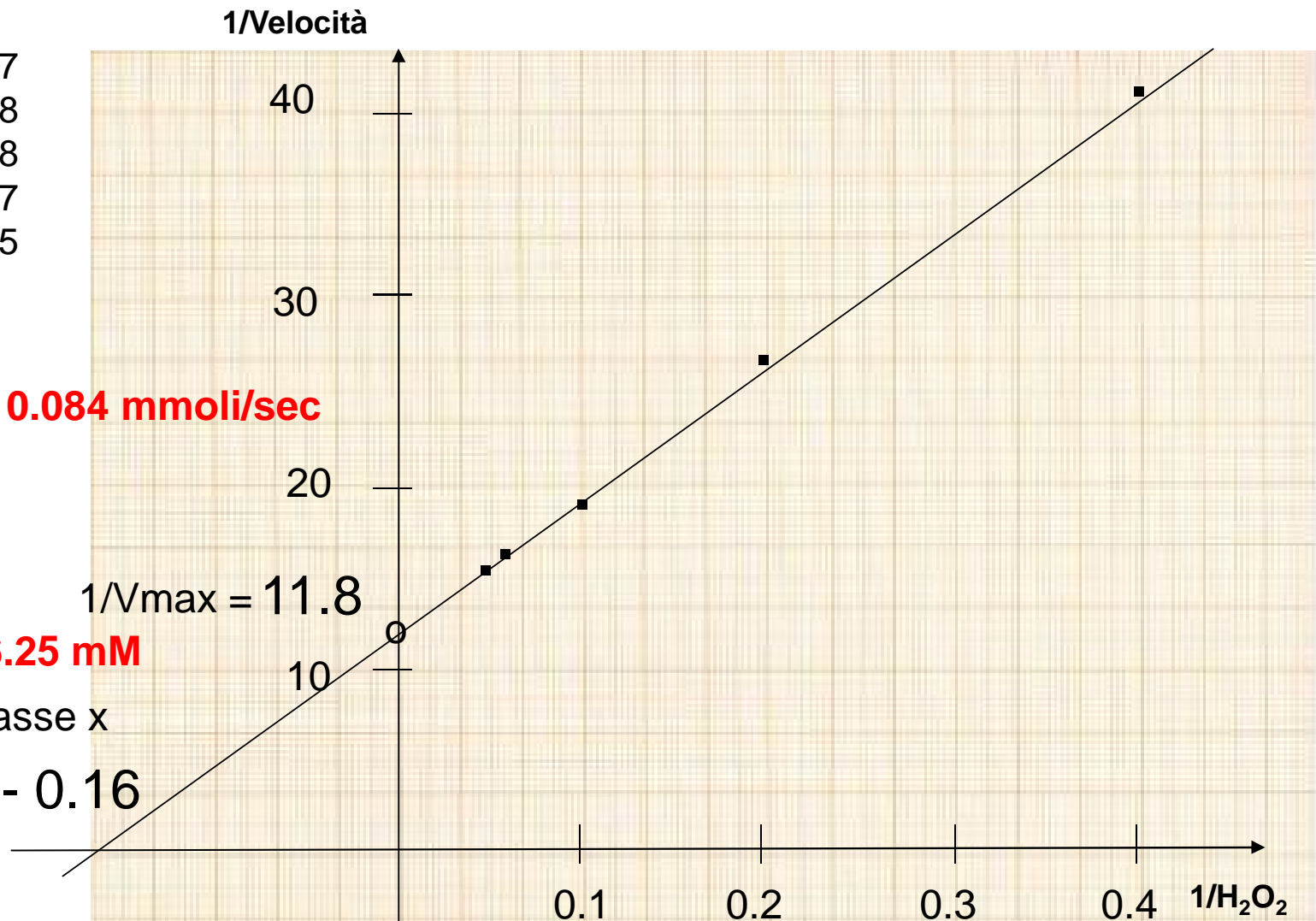
0,4	41,667
0,2	27,778
0,1	18,868
0,067	16,667
0,05	15,625

$V_{\max} = 1/11.8 = \mathbf{0.084 \text{ mmoli/sec}}$

$K_M = -1 / 0.16 = \mathbf{6.25 \text{ mM}}$

Intercetta asse x

$- 1/K_M = - \mathbf{0.16}$



INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

Si definiscono **INIBITORI** molecole che diminuiscono l'attività di un enzima.
Tali molecole possono indurre

Inibizione reversibile

- Modificano in modo reversibile (in genere attraverso un legame non covalente) l'enzima

Inibizione irreversibile

- Modificano in modo irreversibile l'enzima

Inibitori reversibili

Inibitori Competitivi

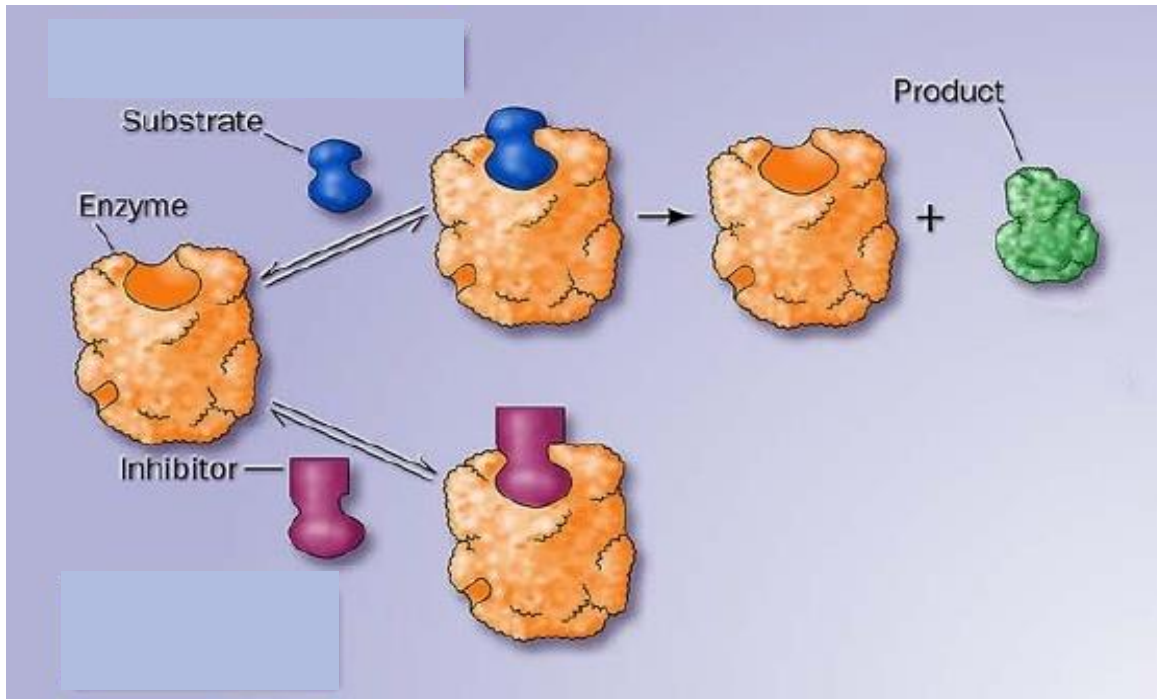
Inibitori NON Competitivi

I 6000 enzimi espressi nell'organismo umano sono bersaglio di numerosi farmaci

Inibitori competitivi

- Sono molecole simili al substrato
- Occupano lo stesso sito di legame
- Agiscono competendo con il substrato per lo stesso sito di legame, agiscono quindi sulla formazione del complesso ES.

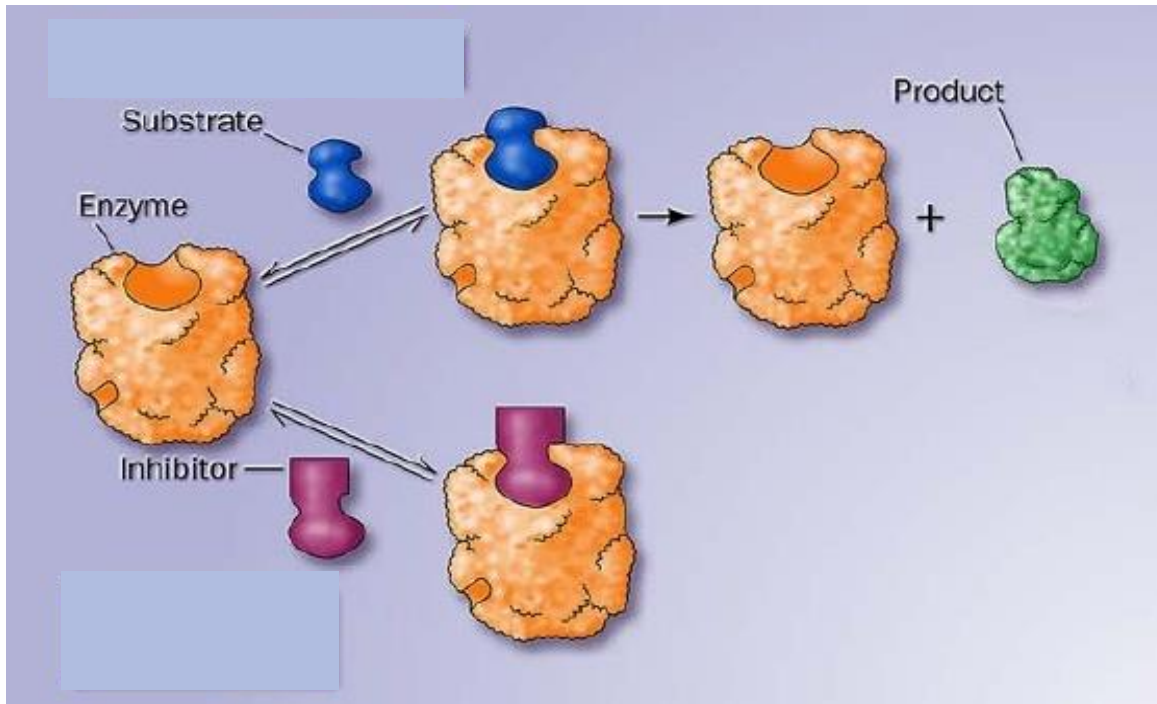
Impedendo la formazione di ES inibiscono la trasformazione di S in P



- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S

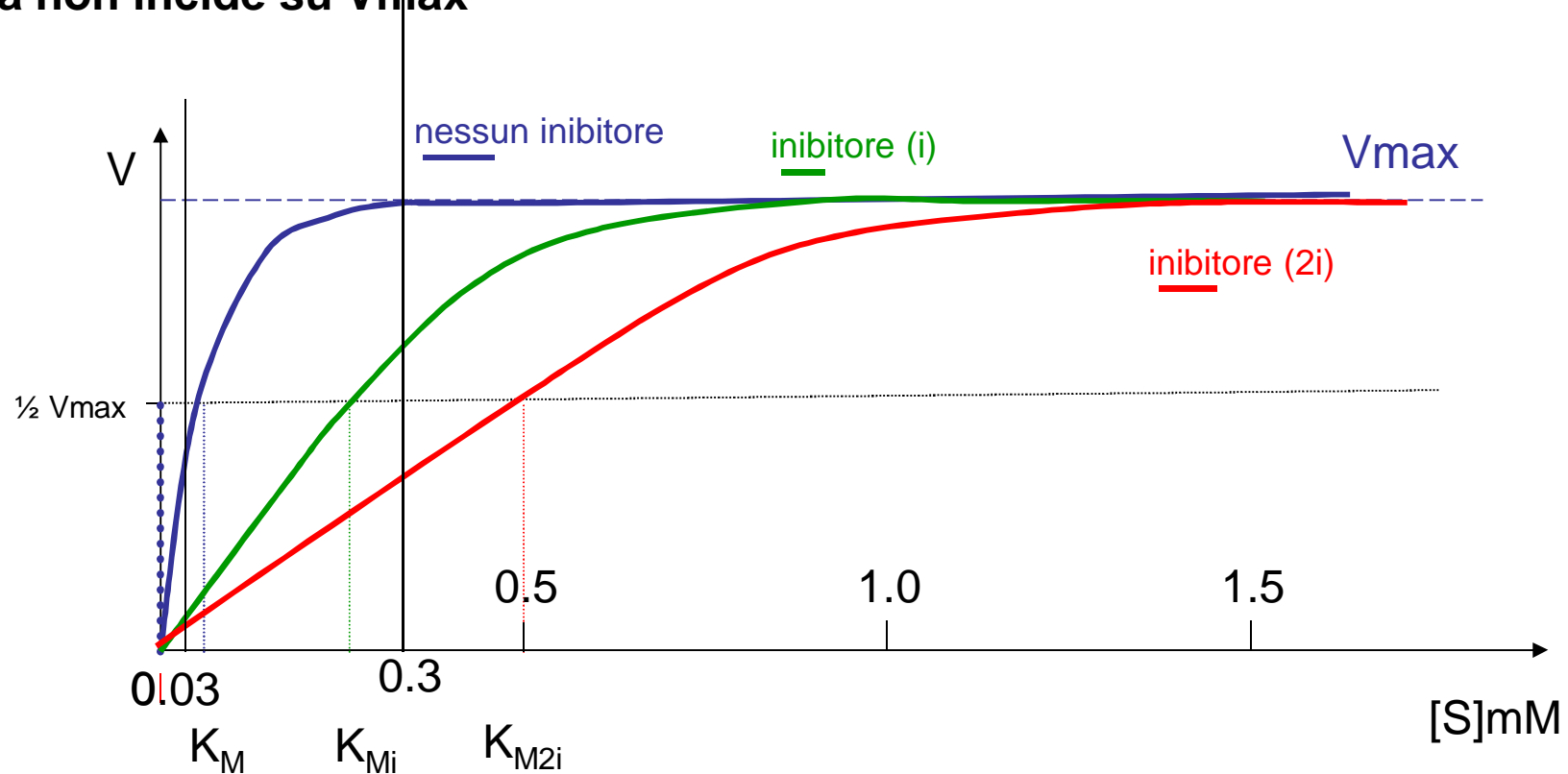


$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_{DS}$$



$$\frac{[E][I]}{[EI]} = K_{DI}$$

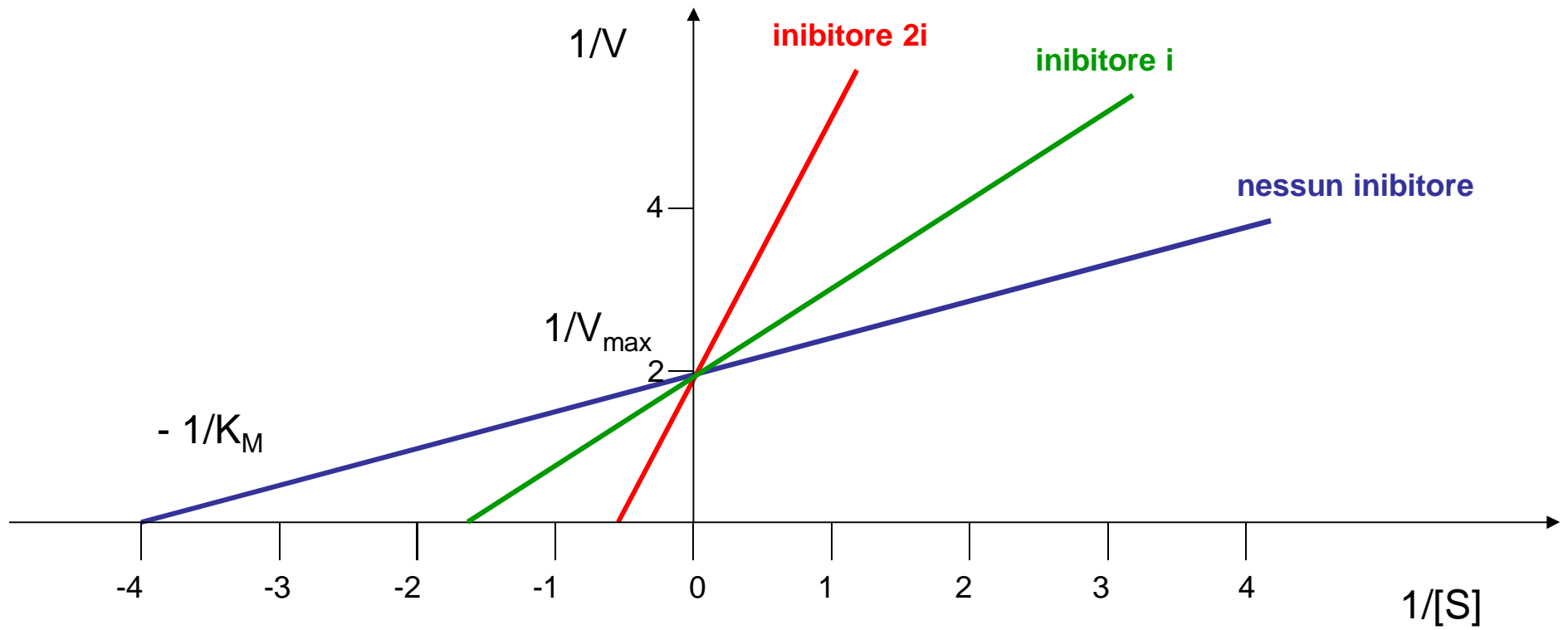
L'inibizione competitiva determina un **aumento della K_M** per il substrato, ma non incide su V_{max}



La presenza dell'inibitore fa perdere affinità al substrato per il sito attivo

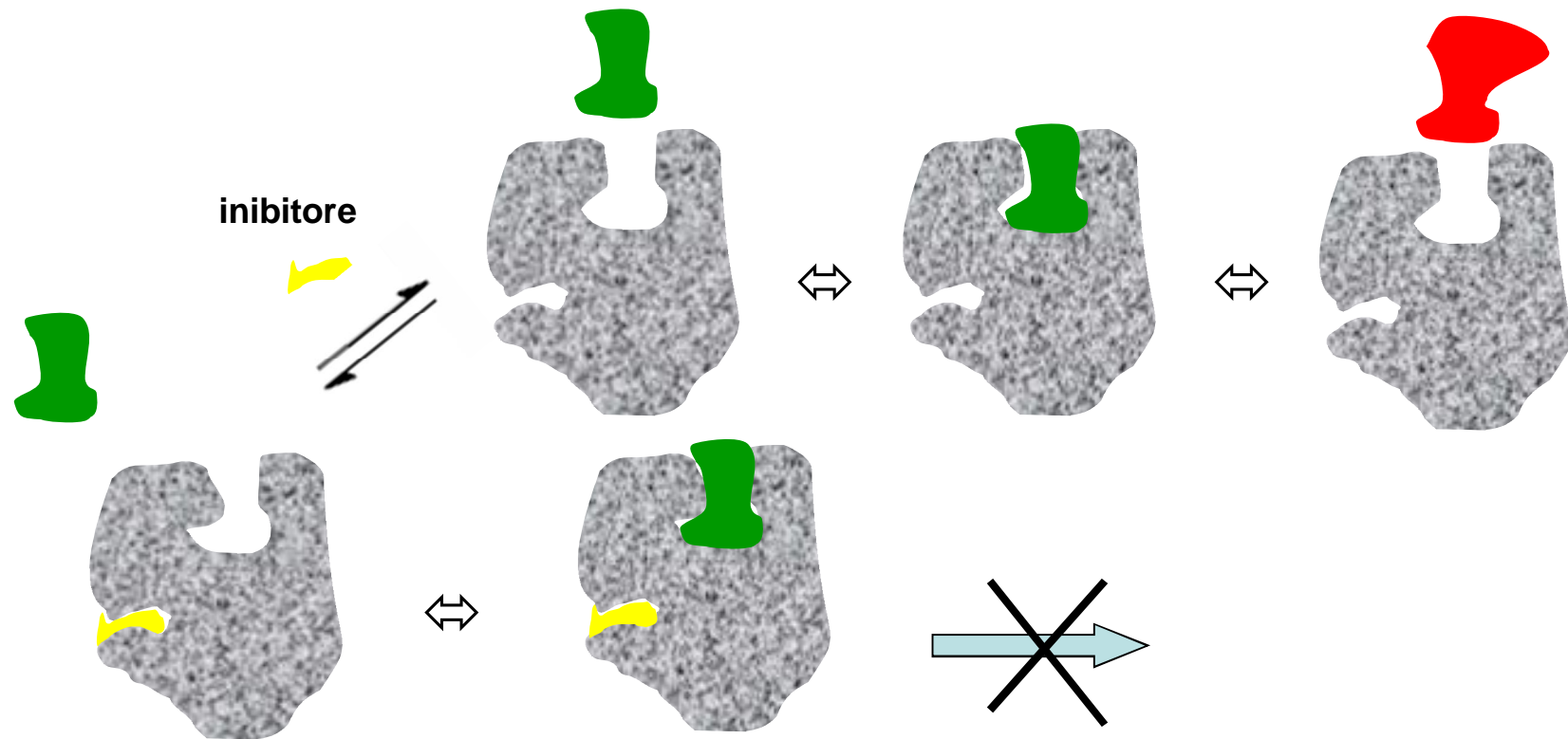
- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S

Risultato dell'INIBIZIONE COMPETITIVA secondo Lineweaver-Burk



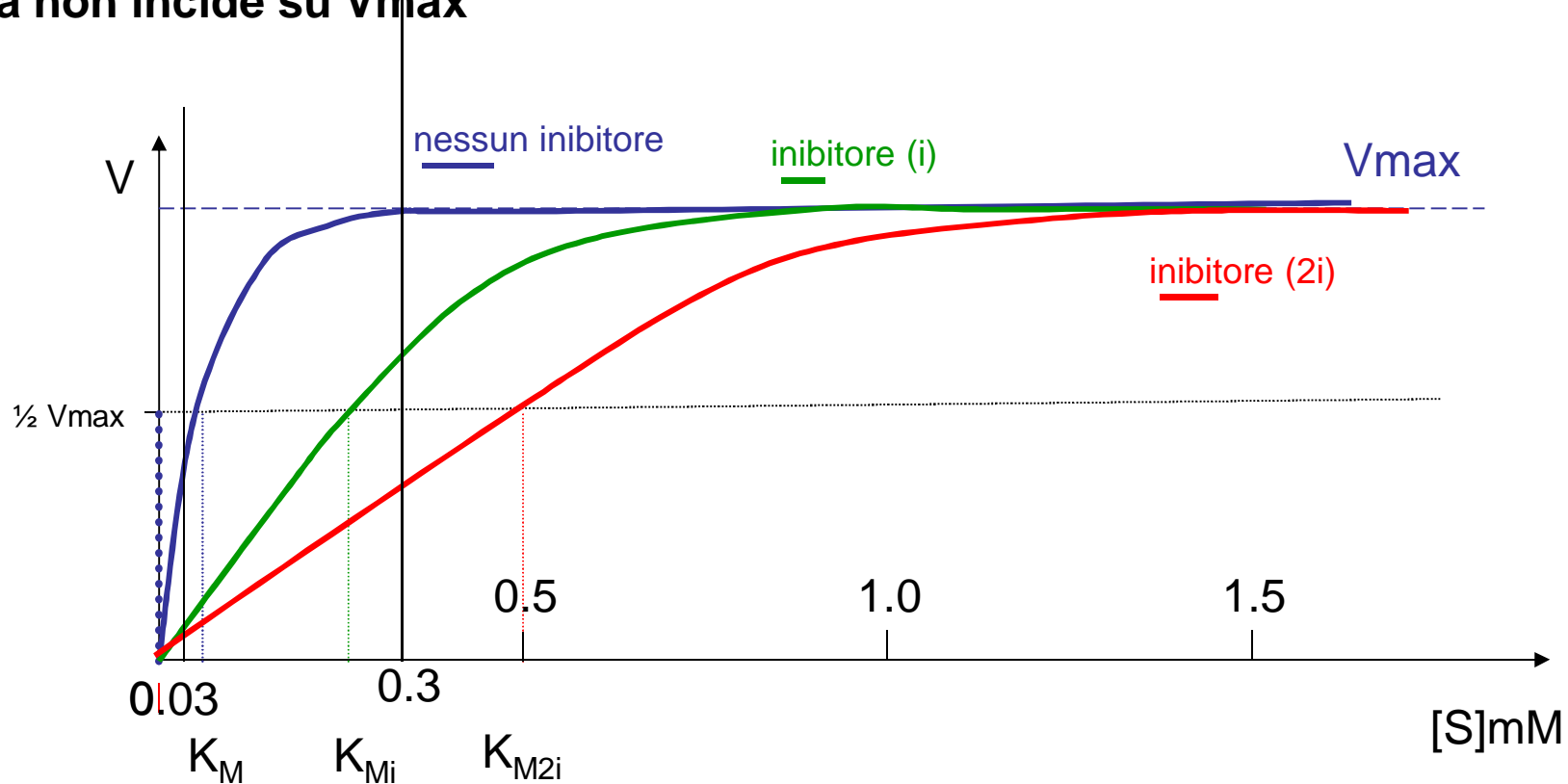
Inibitori non competitivi

- Sono molecole diverse dal substrato, che legano l'enzima in una regione diversa dal sito attivo
- Pur non interagendo col sito attivo, modificano la struttura terziaria della proteina in maniera tale che viene alterata anche la struttura (forma) del sito attivo
- Grazie alla modifica della struttura terziaria, l'enzima è in grado di legare il substrato, MA NON di trasformarlo in prodotto

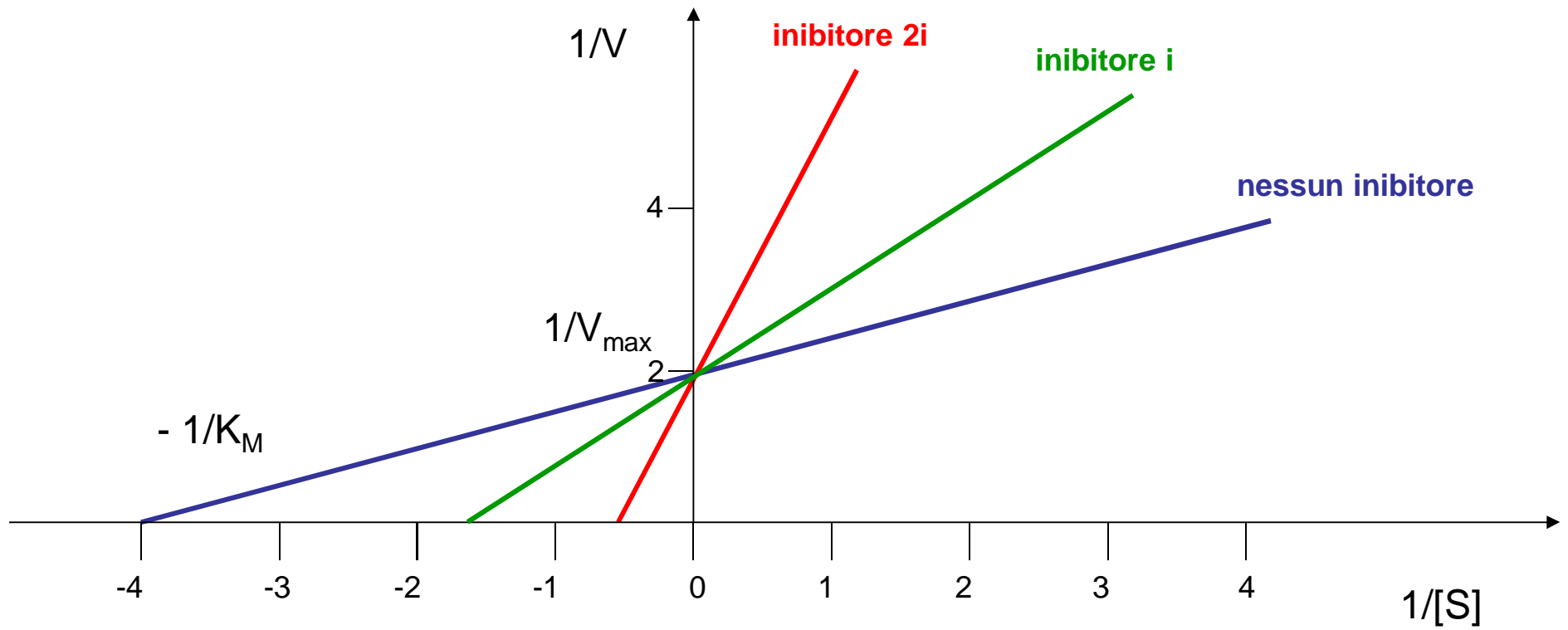


L'inibizione NON è rimossa aumentando la concentrazione di S

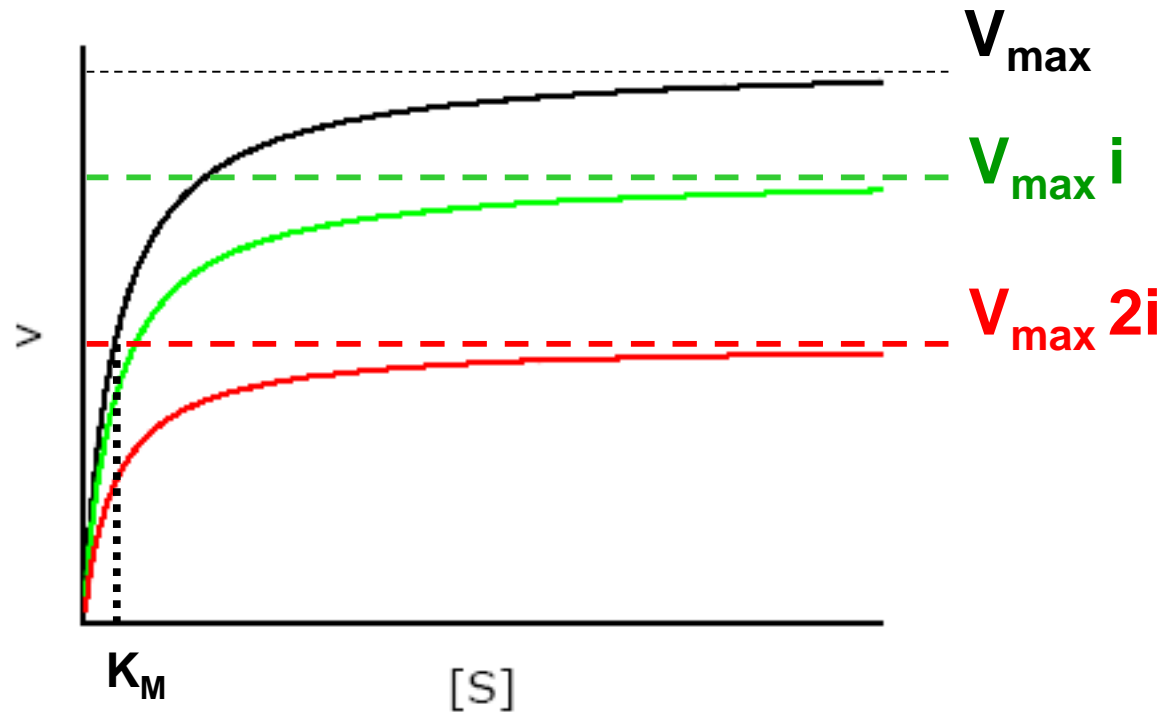
L'inibizione competitiva determina un **aumento della K_M** per il substrato, ma non incide su V_{max}



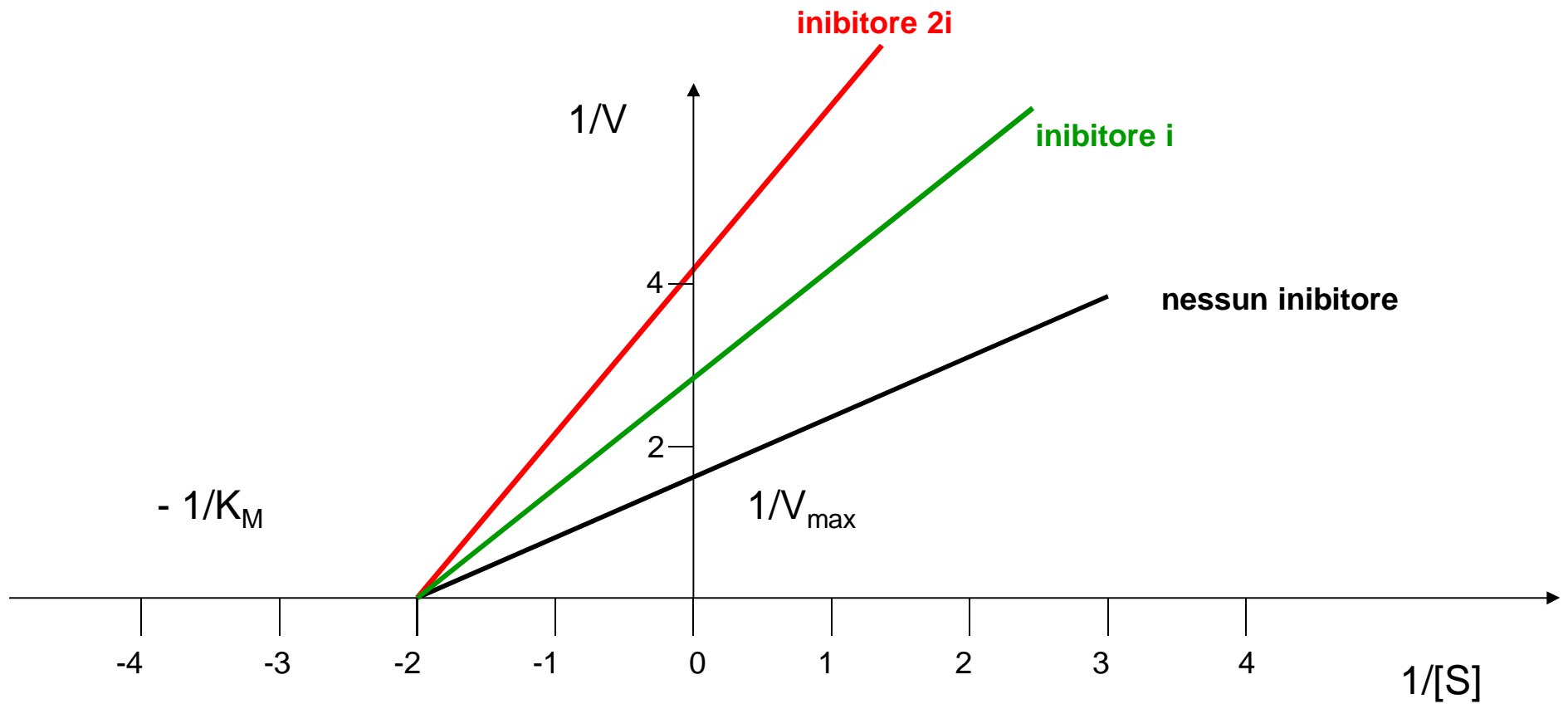
Risultato dell'INIBIZIONE COMPETITIVA secondo Lineweaver-Burk



La **inibizione non competitiva** determina una **diminuzione di V_{max}** per il substrato, ma non incide su K_M



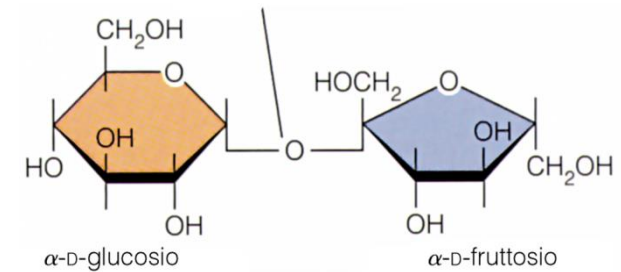
Risultato dell'INIBIZIONE NON COMPETITIVA secondo Lineweaver-Burk



Esercizio:

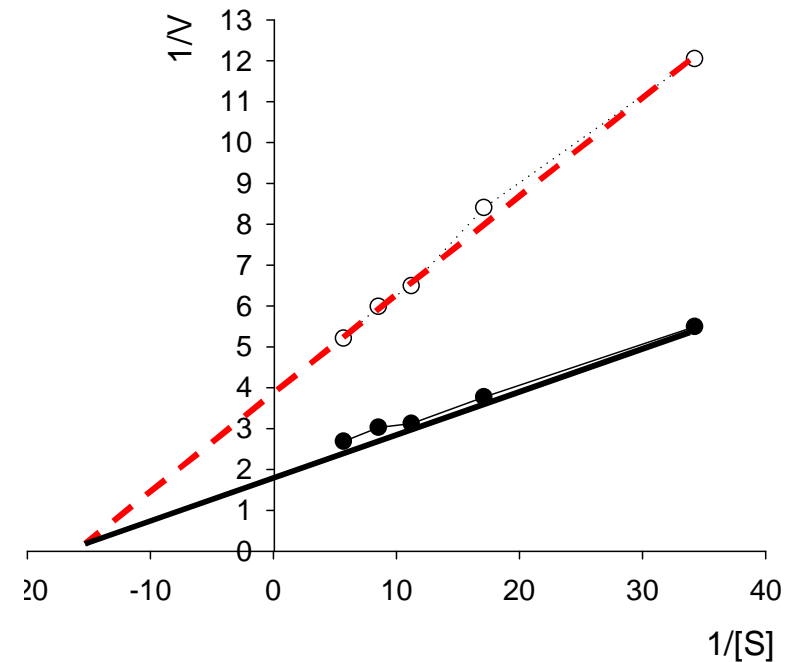
il saccarosio (zucchero da tavola) viene idrolizzato a glucosio e fruttosio in un esperimento di cinetica. L'enzima che catalizza questa reazione è chiamato INVERTASI.

La aggiunta di urea 2M alla soluzione contenente enzima e substrato inibisce l'attività enzimatica. Usando i dati sperimentali qui riportati determinare se l'inibizione è competitiva o non competitiva



(c) Saccarosio

[saccarosio] (mM)	Velocità unità arbitrarie	Velocità + urea u.a.
0,0292	0,182	0,083
0,0584	0,265	0,119
0,0876	0,311	0,154
0,117	0,330	0,167
0,175	0,372	0,192
1/[sacc] (mM ⁻¹)	1/V	1/V + urea
34,246	5,494	12,048
17,123	3,773	8,403
11,215	3,125	6,493
8,547	3,030	5,988
5,714	2,688	5,208

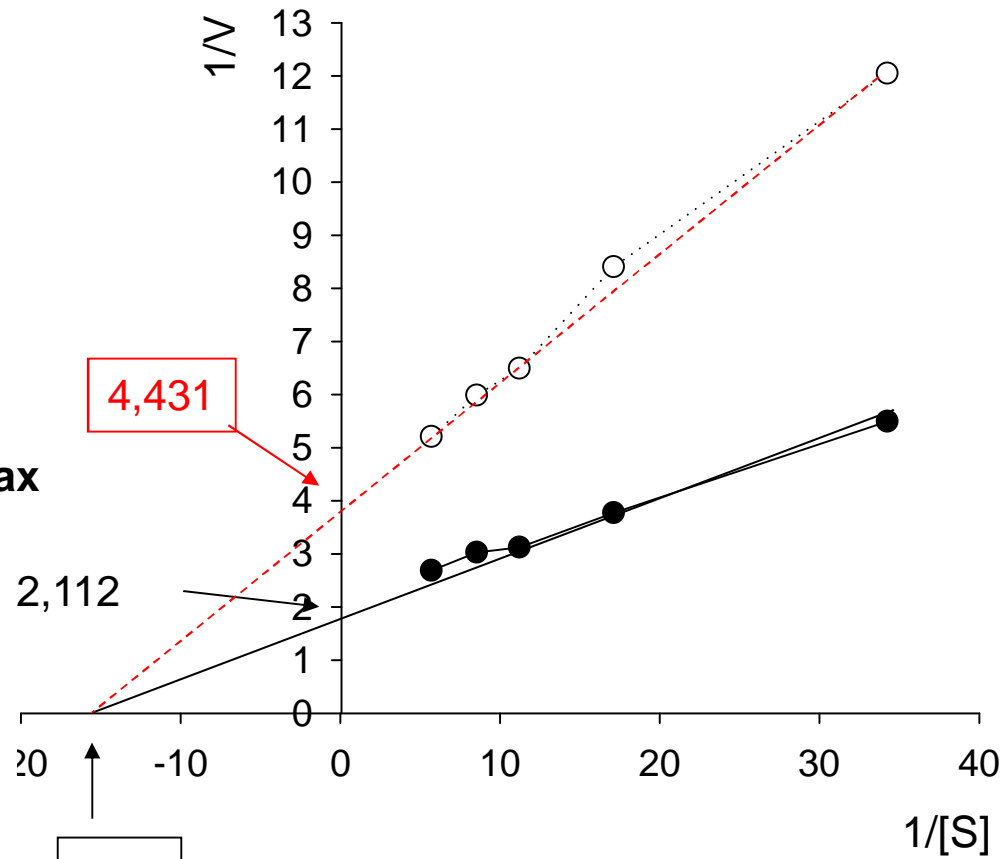


INIBIZIONE NON COMPETITIVA

$V_{max} = 0,47$ u.a.

$V_{max} = 0,24$ u.a.

intercetta y = $1/V_{max}$



intercetta x = $1/K_M$

- 16

$K_M = 0,0625$ mM