

ENZIMI:

CINETICA E REGOLAZIONE

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).

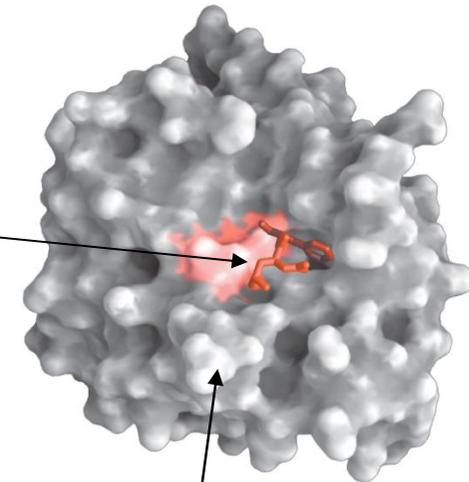
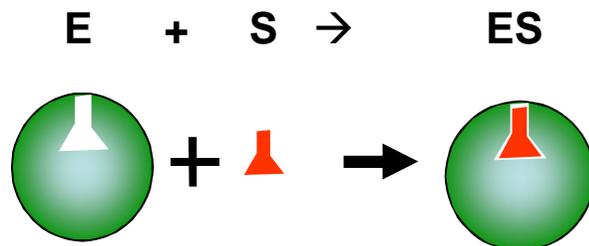
Gli ENZIMI sono altamente specifici

§ 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).

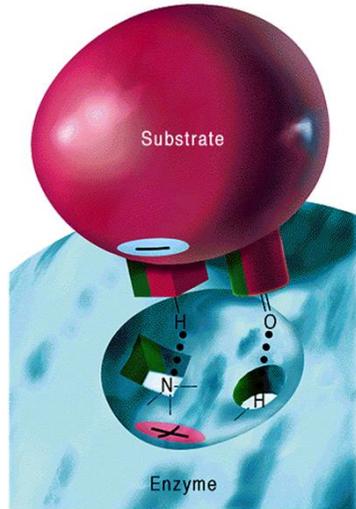
La regione della proteina che lega i(il) substrati(o) prende il nome di **SITO ATTIVO**

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



STRUTTURA TERZIARIA

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)

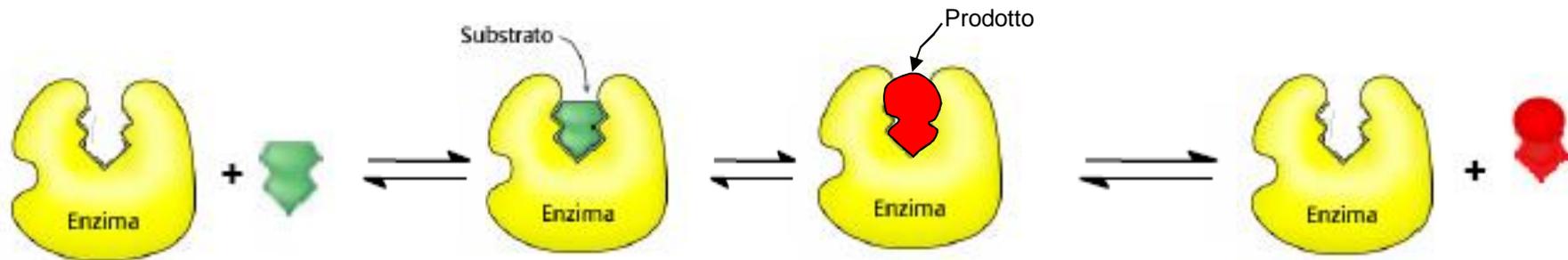
Garantisce che i gruppi chimici del/i substrato/i si avvicinino con l'orientazione giusta

- Prossimità (avvicinamento)
- Corretto orientamento



Il sito attivo occupa una regione molto piccola della proteina

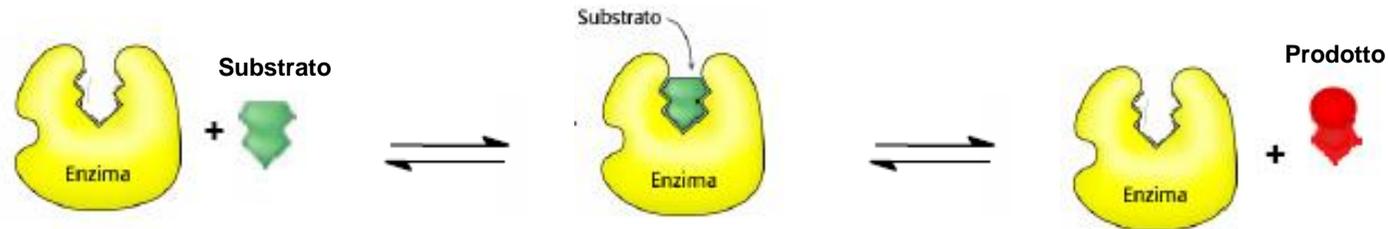
SEQUENZA DI INTERAZIONI IN UNA REAZIONE ENZIMATICA



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.

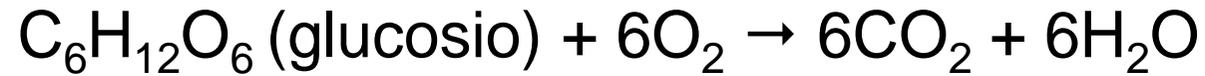


Ogni copia di enzima può catalizzare la stessa reazione moltissime volte

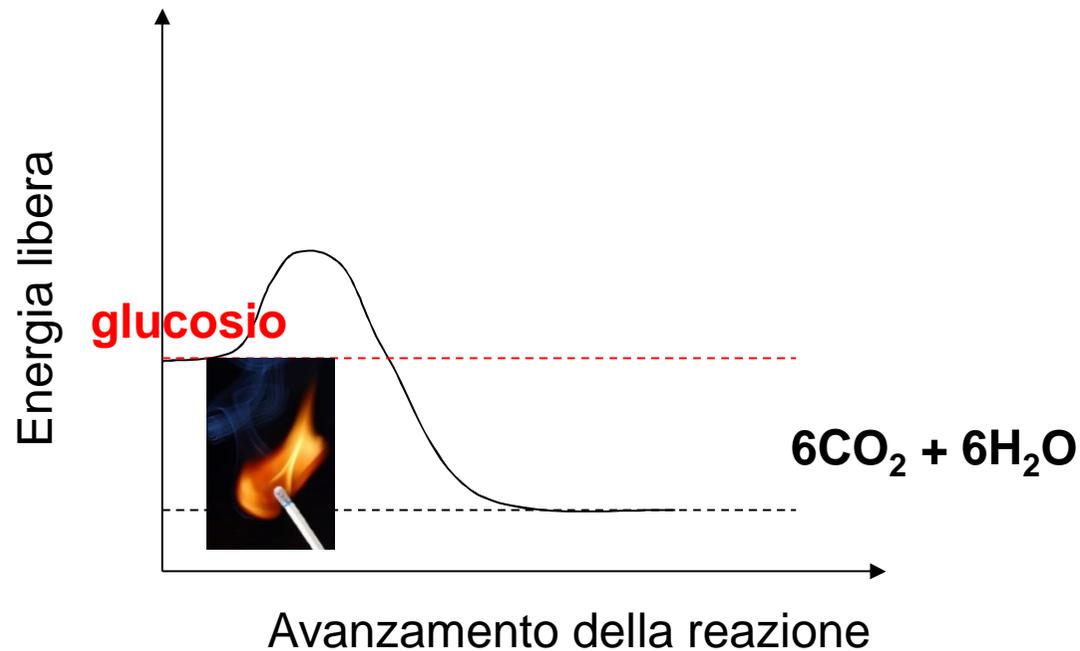
Il numero di reazioni catalizzate dipenderà dal numero di molecole di substrato disponibili

(cioè dalla sua CONCENTRAZIONE [S])

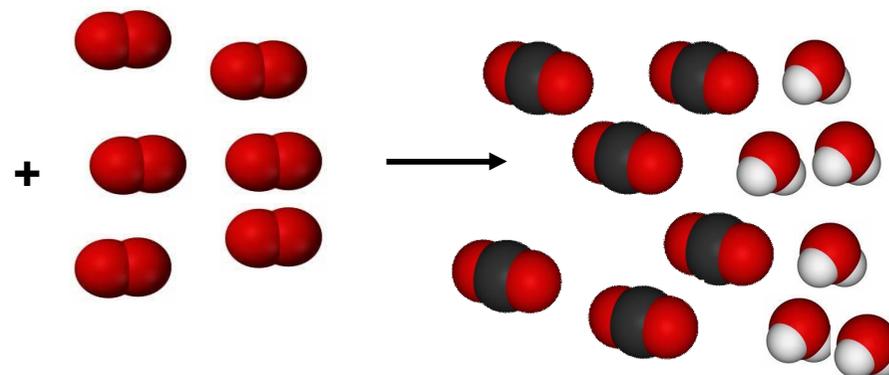
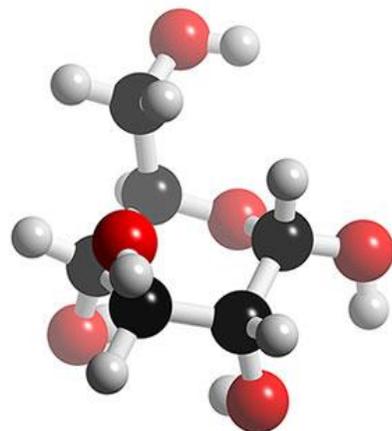
Gli enzimi NON alterano l'energia delle reazioni.



OSSIDAZIONE DEL GLUCOSIO



molecola complessa e ordinata

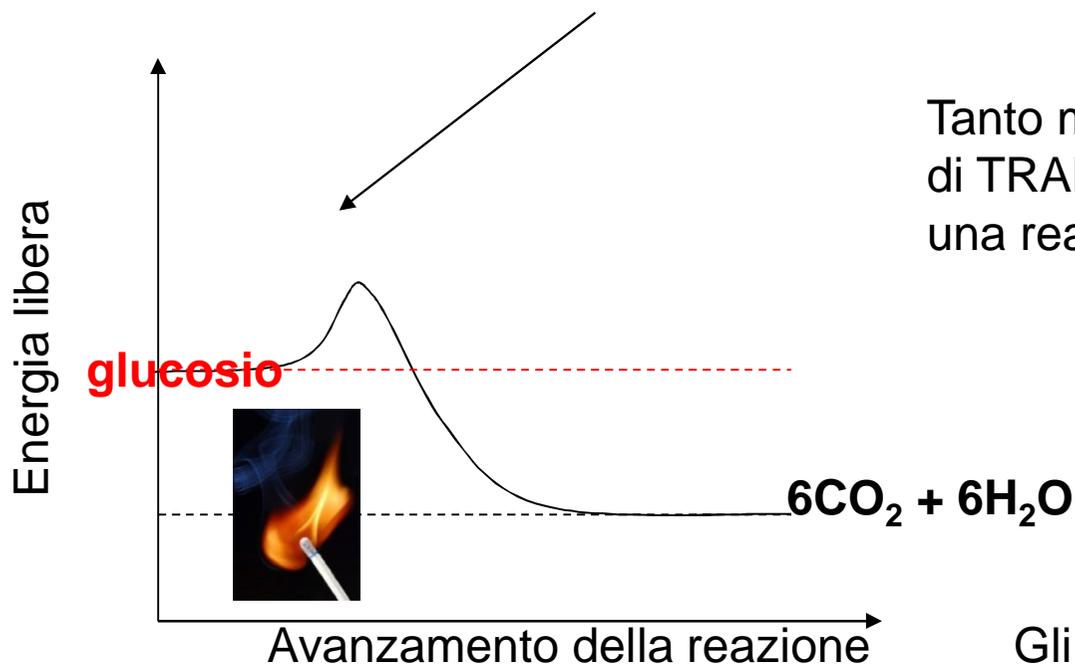


- stiramento e distorsione dei legami



STATO DI TRANSIZIONE

molecole semplici e disordinate+

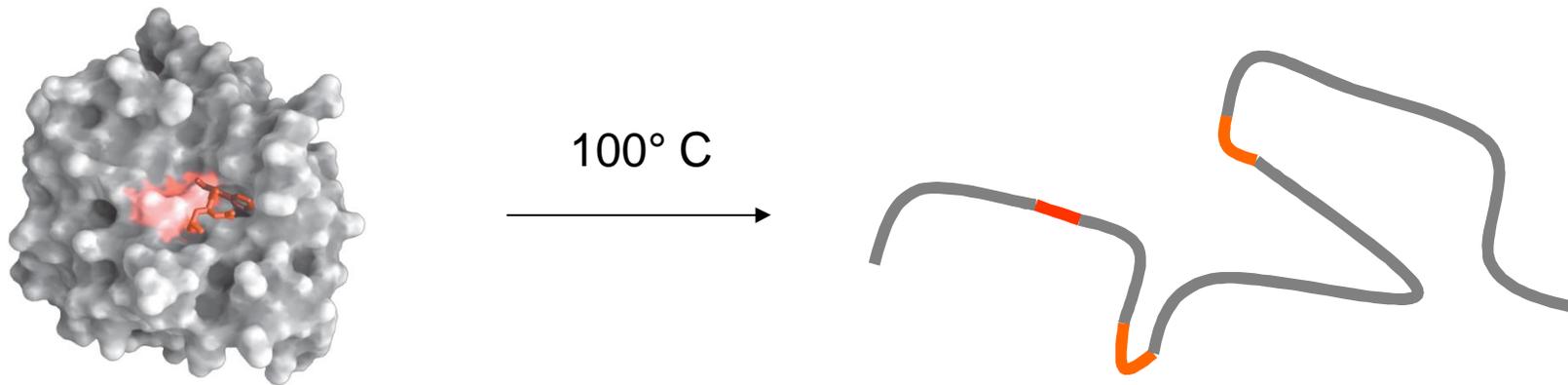


Tanto maggiore è l'energia dello STATO di TRANSIZIONE, tanto più **LENTA** sarà una reazione

Gli enzimi abbassano l'energia dello 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

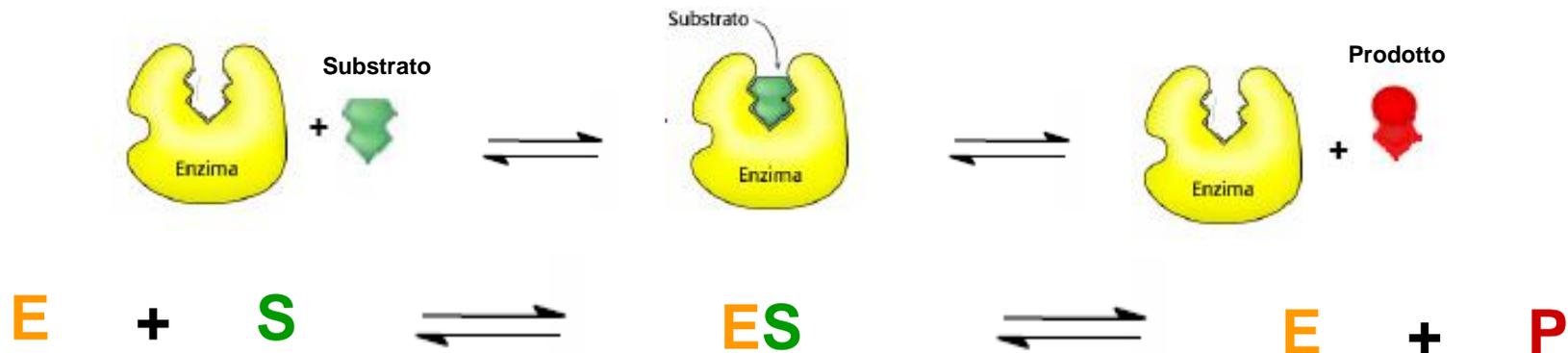
“ Denominazione classica costituita da 3 parti:

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

Esempio: Lattico-NAD-deidrogenasi

Progetto genoma umano :

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



“ 1913: Michaelis e Menten

Elaborarono una 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

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

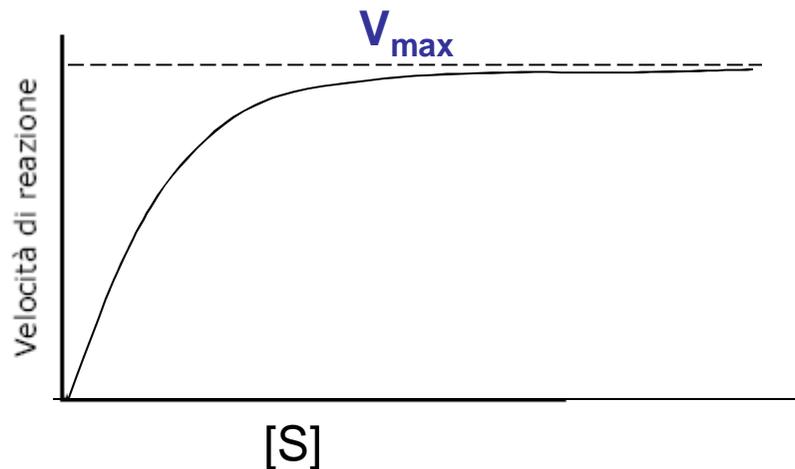
Equazione del tipo

$$y = ax / b+x$$

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d}$$

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}**



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

Significato della costante di Michaelis-Menten

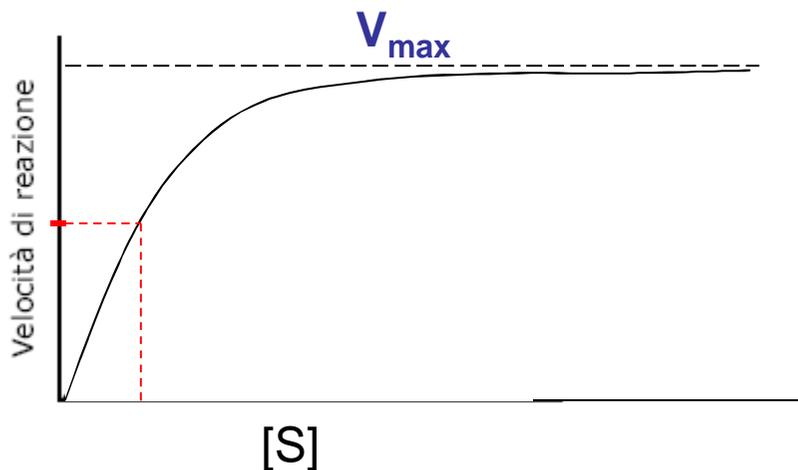
K_M è, dimensionalmente, una concentrazione: **mol/l**

Se $K_M = [S]$

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

diventa

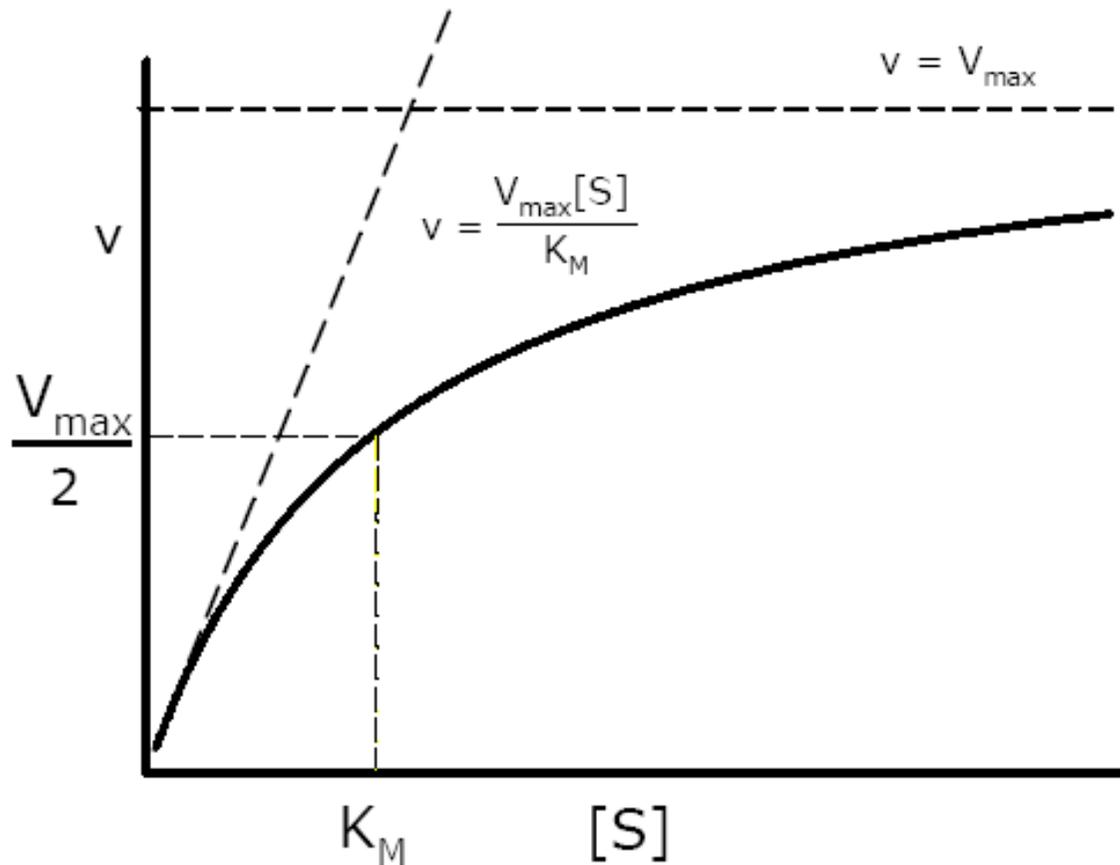
$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}}{2}$$



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

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

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

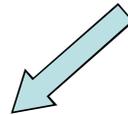
È più semplice lavorare con una retta.

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

$$y = mx + b$$

$$y = 1/V$$

$$x = 1/[S]$$

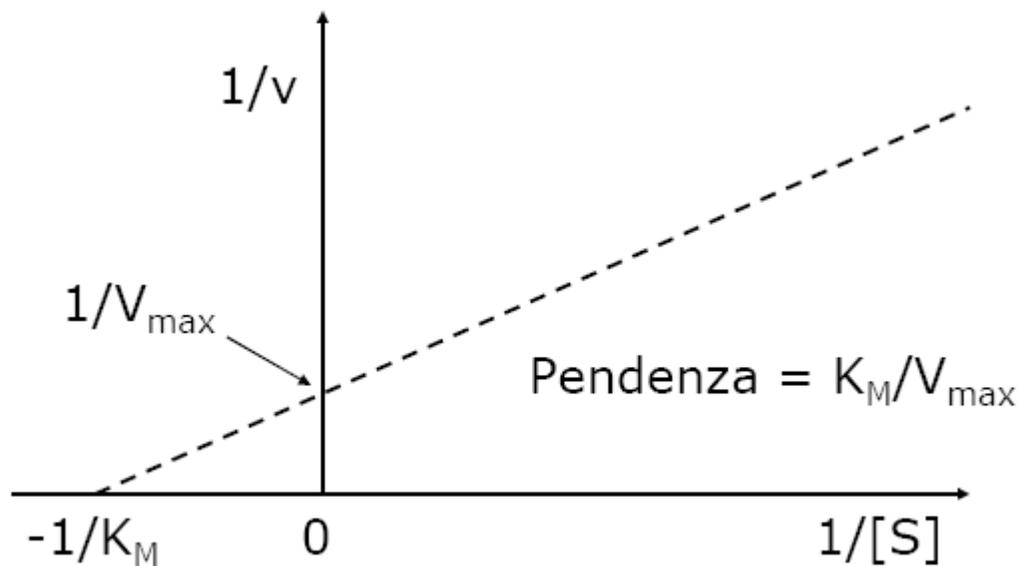
$$V_{\text{init}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

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

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 $\Rightarrow -1/K_M$

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

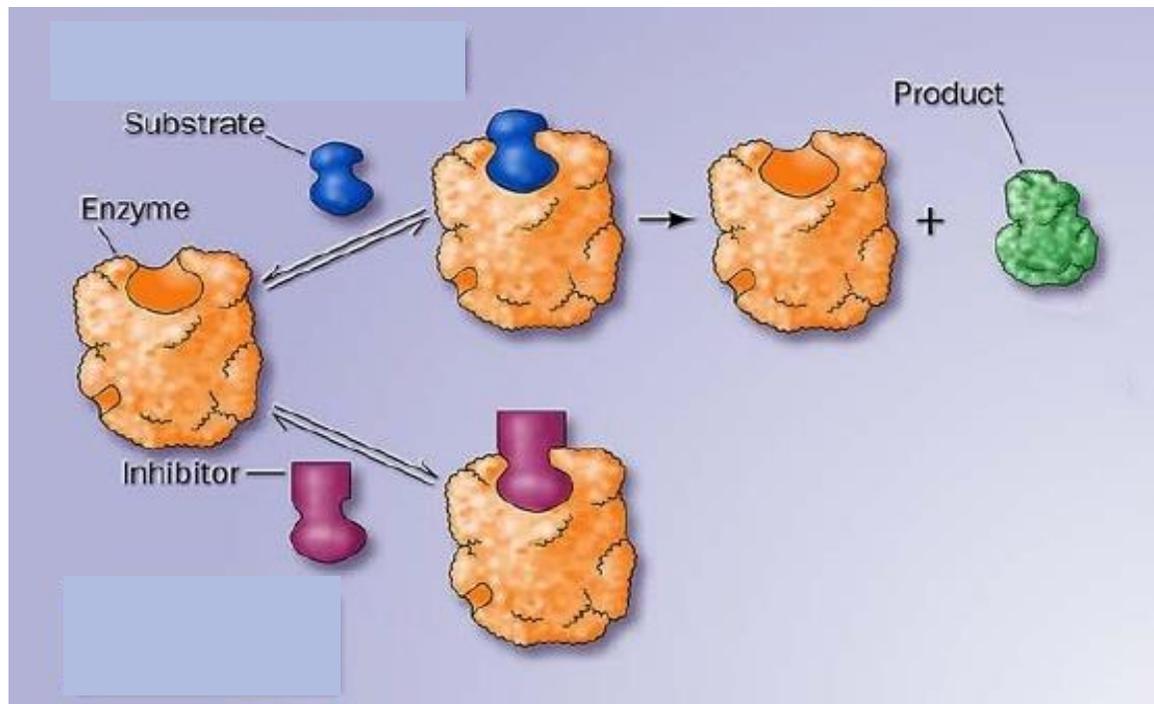
Inibitori NON Competitivi

I 6000/10000 enzimi espressi nell'organismo umano sono bersaglio di numerosi farmaci

Inibitori competitivi

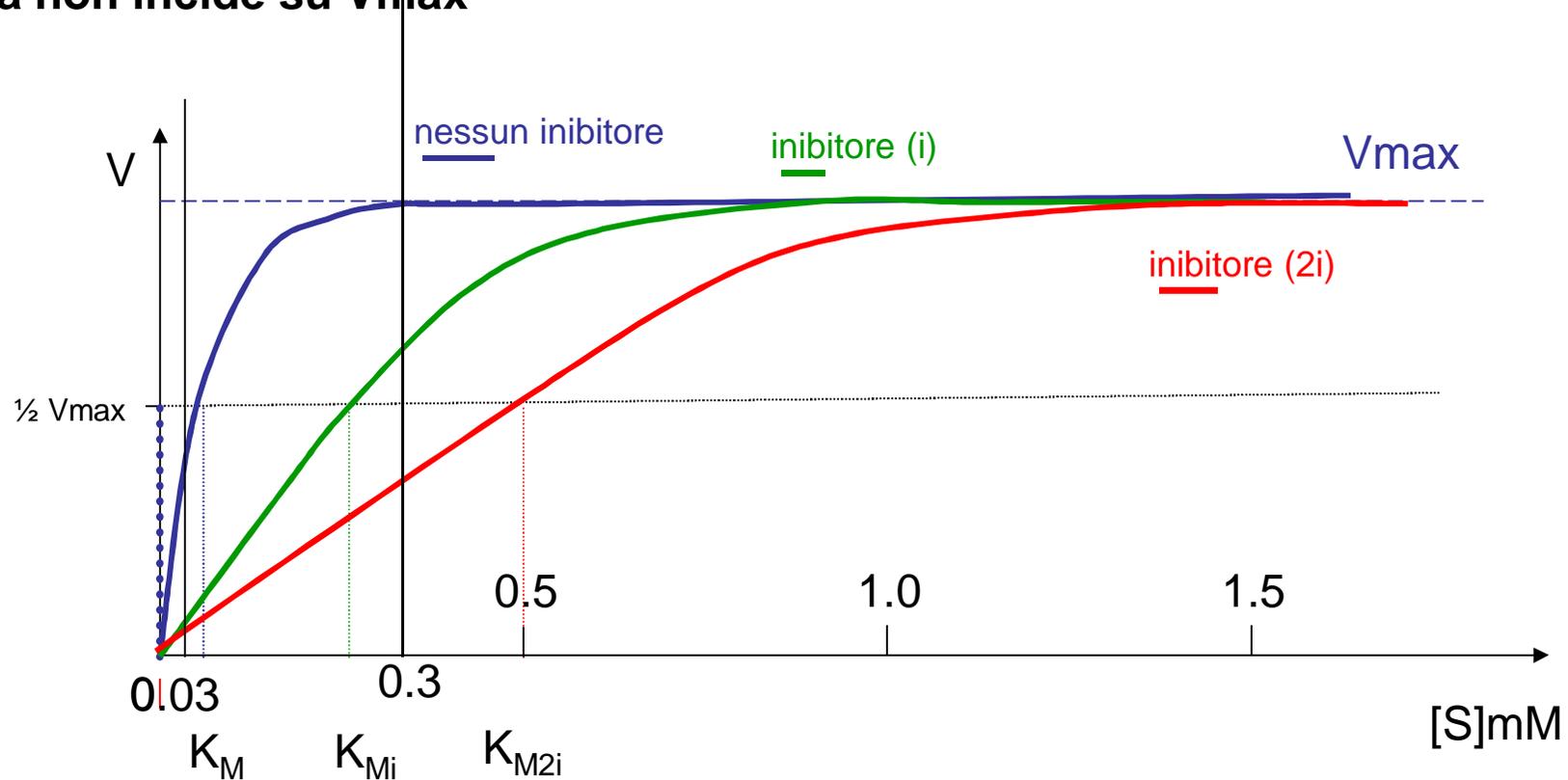
- Sono molecole simili al substrato
- Occupano lo stesso sito di legame
- Agiscono competendo con il substrato per lo stesso sito di legame, agiscono quindi sulla formazione del complesso ES.

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



- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S

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

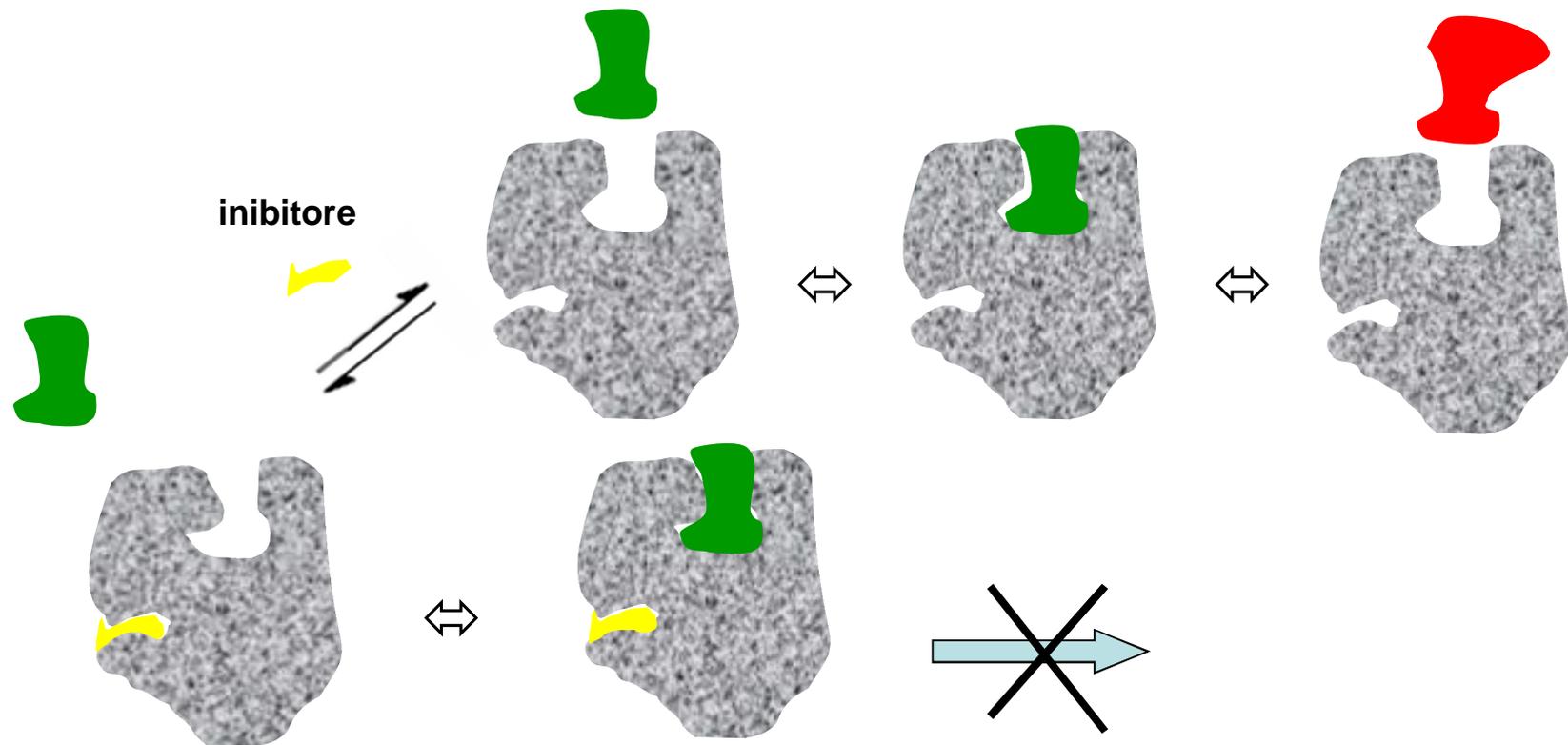


La presenza dell'inibitore fa perdere affinità al substrato per il sito attivo

- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S

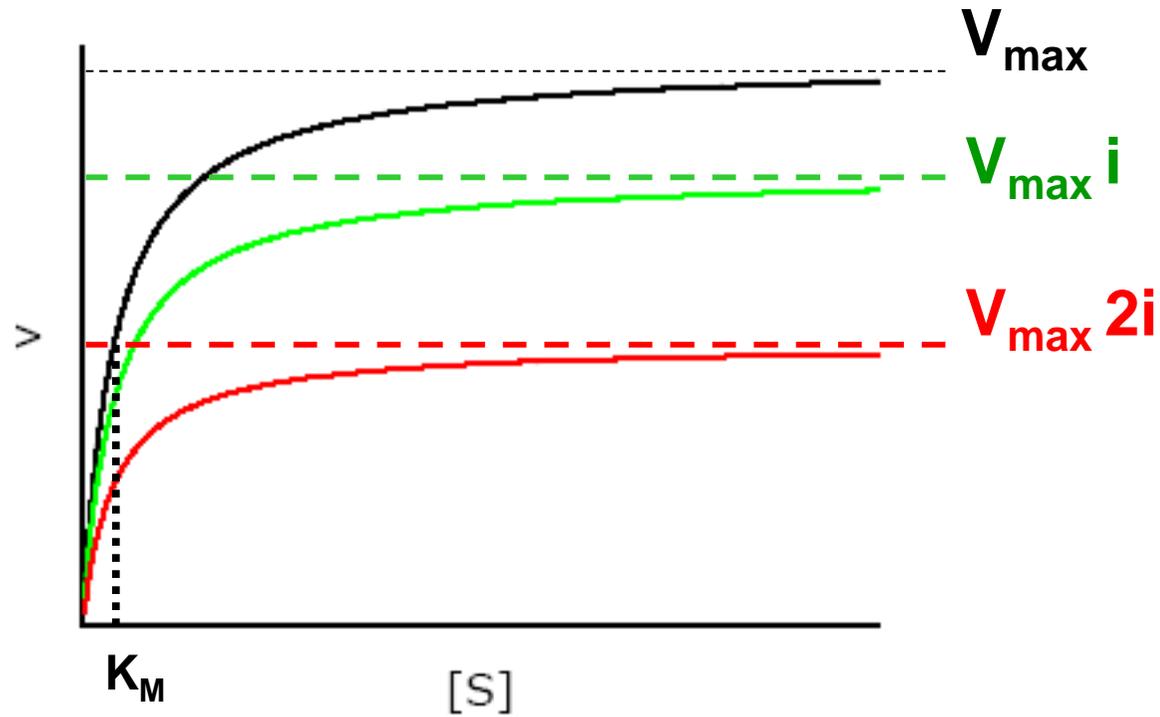
Inibitori non competitivi

- 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

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



“Enzimi semplici	- utilizzano esclusivamente le reattività chimiche di alcuni residui AA
“Enzimi coniugati	- richiedono la reattività chimica aggiuntiva di COFATTORI o COENZIMI È gruppi prostetici

COENZIMI

Molto spesso gli enzimi da soli non sono in grado di catalizzare la loro specifica reazione, ma necessitano di molecole non proteiche, dette **coenzimi**. Il coenzima interviene con alcuni suoi gruppi funzionali specifici, che l'enzima non possiede, e che sono necessari durante la catalisi.

I coenzimi vengono sintetizzati nelle nostre cellule a partire da molecole, le **vitamine idrosolubili**, che invece non siamo in grado di produrre: in altre parole, i coenzimi sono vitamine modificate chimicamente.

Le vitamine sono prodotte dalle **piante** e, in qualche caso, dai **batteri intestinali**.

REGOLAZIONE

L'attività di molti enzimi è regolata :

“CONTROLLO GENICO (+/-)

“MODIFICAZIONI COVALENTI REVERSIBILI (+/-)

Fosforilazione

“MODIFICAZIONI COVALENTI IRREVERSIBILI (+)/(-)

taglio proteolitico della catena enzimatica

“CONTROLLO ALLOSTERICO (+/-)

L'inibizione (irreversibile o reversibile, competitiva o non competitiva) non va considerata una forma di regolazione perché si basa sull'intervento di molecole **ESOGENE**

REGOLAZIONE ENZIMATICA

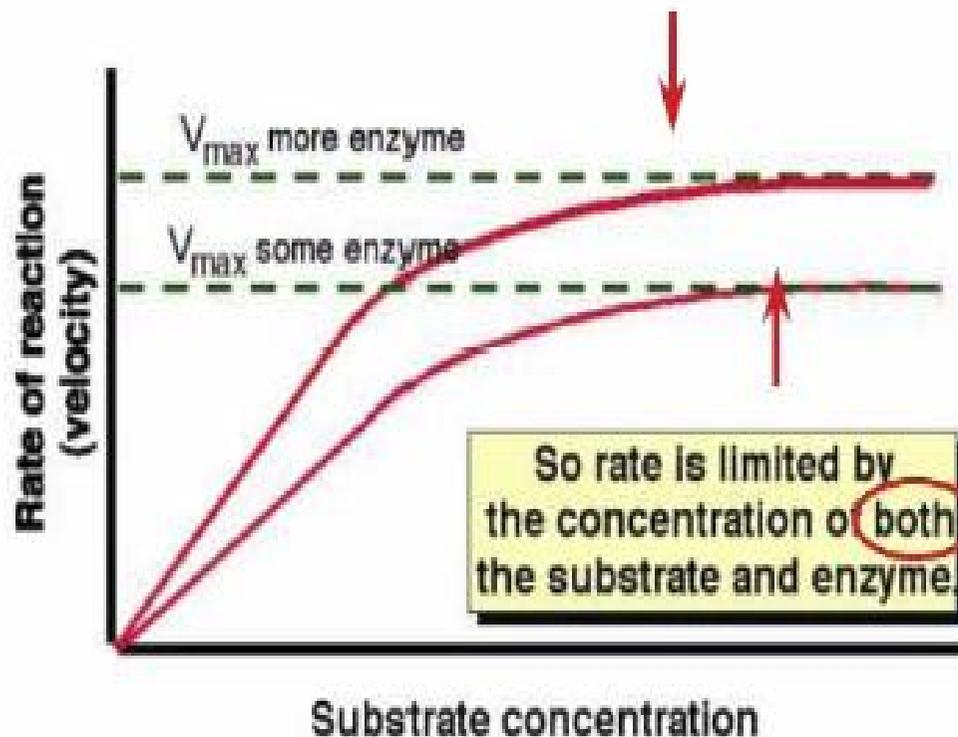
CONTROLLO GENICO (+/-)

Viene regolata l'ESPRESSIONE (quantità) dell'enzima a livello di trascrizione e traduzione del gene

EDREVERSIBILE

switch trascrizionale:
Attivazione (o inattivazione) di Fattori di Trascrizione
su specifici Promotori

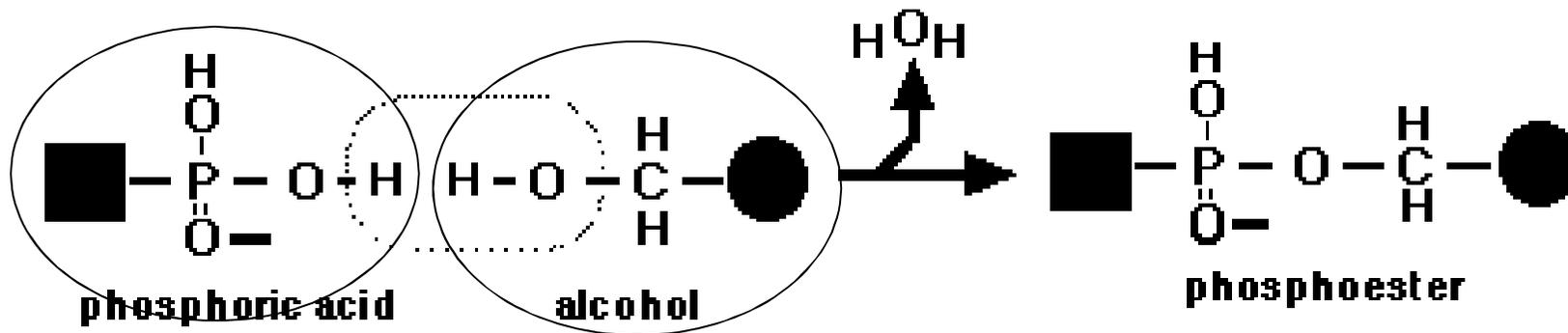
Tempo: decine di min -ore



REGOLAZIONE : MODIFICAZIONI COVALENTI REVERSIBILI

FOSFORILAZIONE E DEFOSFORILAZIONE: sintesi e idrolisi di un legame fosfo-estere

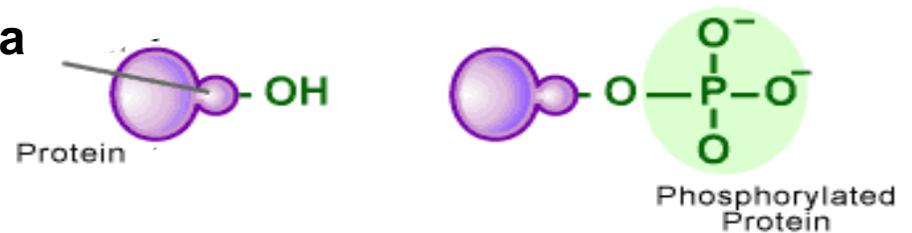
Sintesi di un FOSFO-ESTERE: condensazione tra un FOSFORILE e un ossidrile



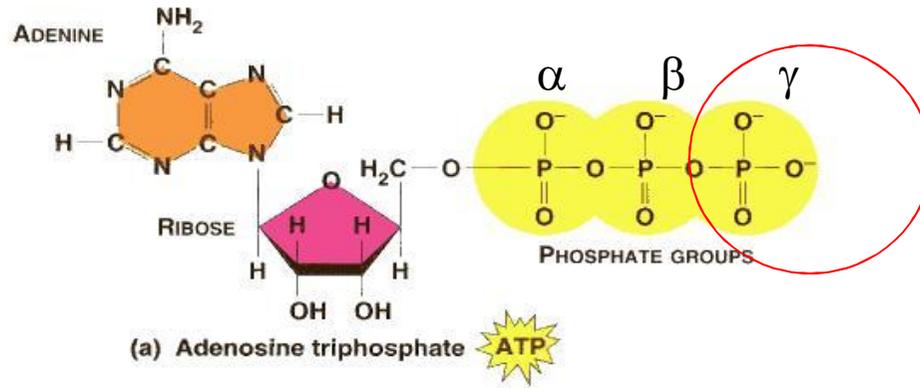
donatore di fosfato

accettore di fosfato

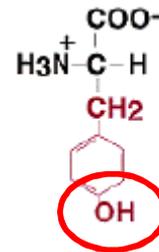
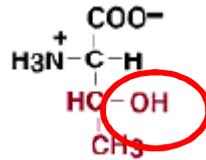
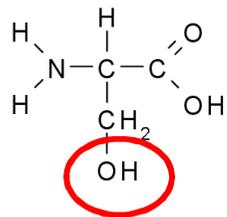
L'ossidrile è un gruppo OH di una proteina



FOSFORILAZIONE PROTEICA: il legame fosfo-estere



Il donatore di fosfato è **ATP** che **í** dona il fosfato γ

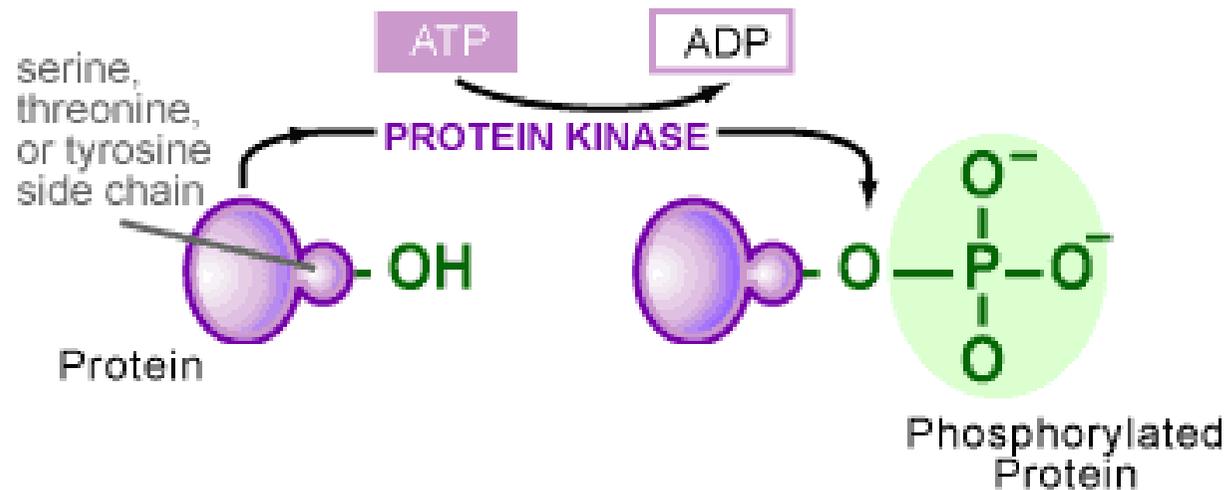


L'accettore è il gruppo **-OH** di un aa (Ser, Thr o Tyr) all'interno dell'enzima



Protein chinasi → I substrati sono proteine

Chinasi: fosforilazione



"~500 human kinases and ~100 human phosphatases"
(518 kinases (2,3% of the 22810 genes) according to Ensembl Dec 2006)

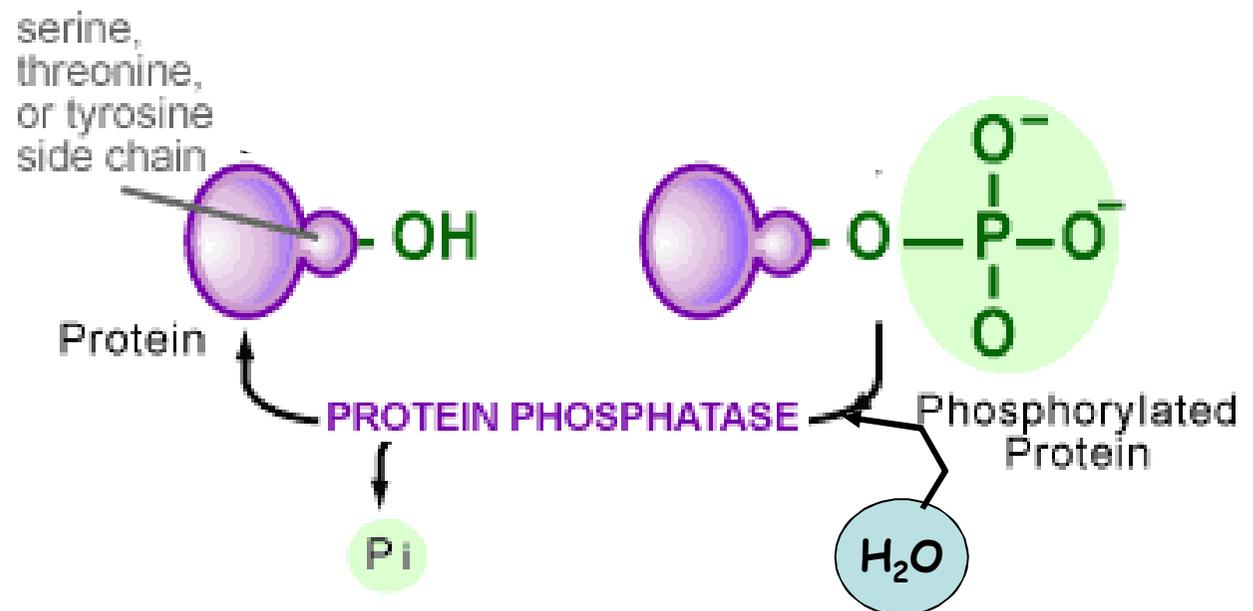
"One third of all proteins in a cell are phosphorylated at one time"
"100.000 potential phosphorylation sites in the human proteome"

REGOLAZIONE : MODIFICAZIONI COVALENTI REVERSIBILI

FOSFORILAZIONE E DEFOSFORILAZIONE: sintesi e idrolisi di un legame fosfo-estere



Protein Fosfatasi



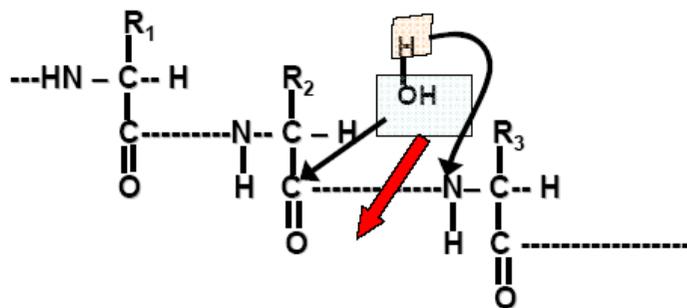
MODIFICAZIONI COVALENTI IRREVERSIBILI

- TAGLIO PROTEOLITICO della catena enzimatica (+)

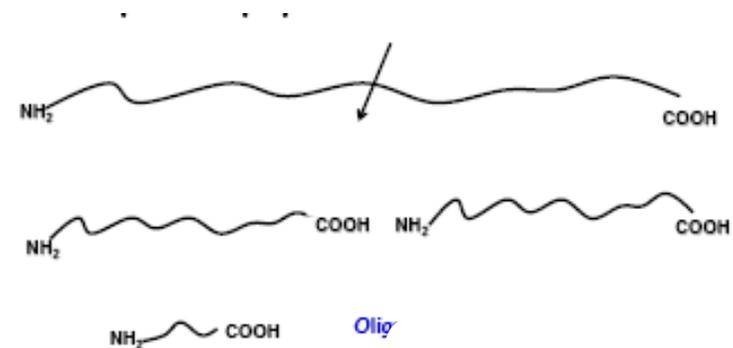
Alcuni enzimi (proteasi) sono prodotti e secreti in forma inattiva (proenzimi o zimogeni). La conversione di una preproteina nella proteina matura richiede un processo di proteolisi selettiva, mediante uno o più tagli proteolitici.

- Le proteine vengono degradate ad opera di enzimi idrolitici in grado di rompere i legami peptidici con cui gli aminoacidi sono uniti tra loro.
- Questi enzimi sono conosciuti come:

Peptidasi



ENDO peptidasi



ESO peptidasi



Attivazione degli zimogeni pancreatici mediante taglio proteolitico

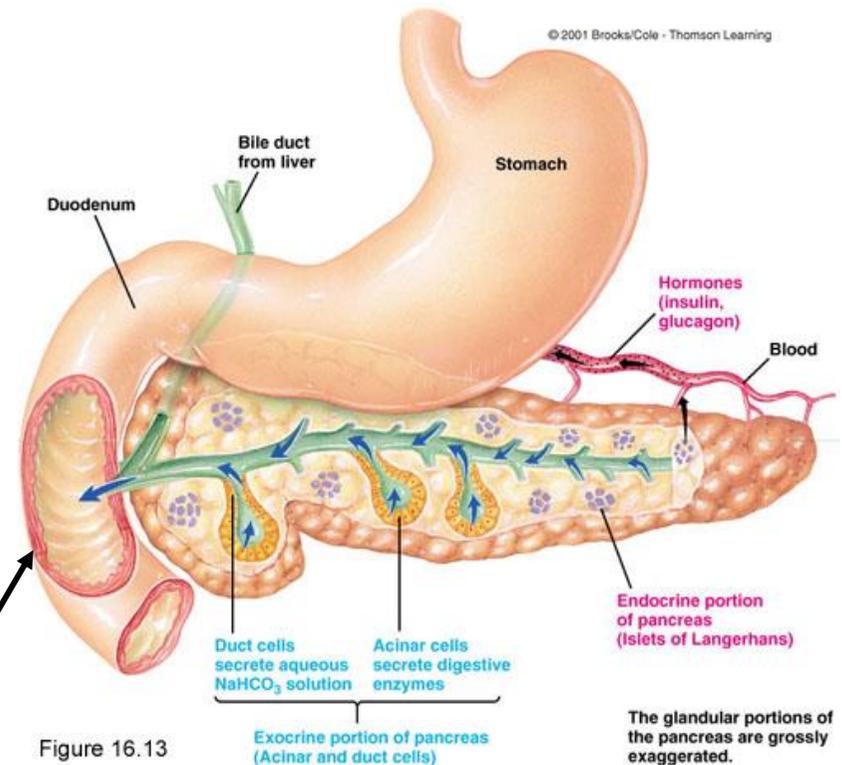
Proteasi pancreatiche

Il succo pancreatico contiene tre zimogeni (proteasi inattive):

- **Tripsinogeno**
- **Chimotripsinogeno**
- **Procarbossipeptidasi**

I primi due sono delle endopeptidasi, l'ultimo è una esopeptidasi. Tutti e tre vengono trasformati in forma attiva nel duodeno.

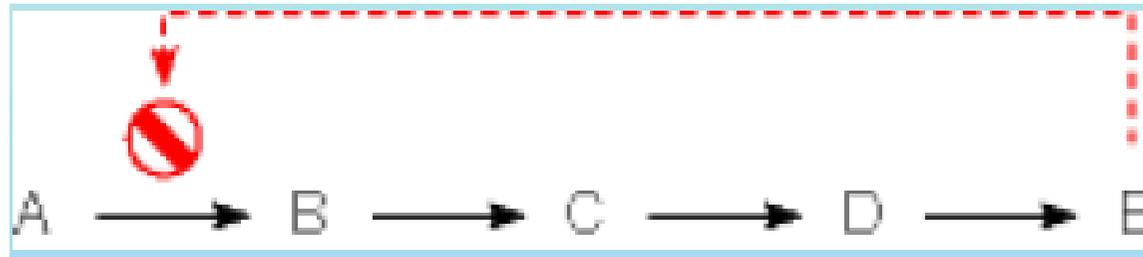
Il fattore chiave per l'attivazione di questi tre enzimi è l'enzima: **enteropeptidasi** prodotto dalle cellule duodenali all'arrivo del chimo.



Regolazione a FEEDBACK - (retroazione)

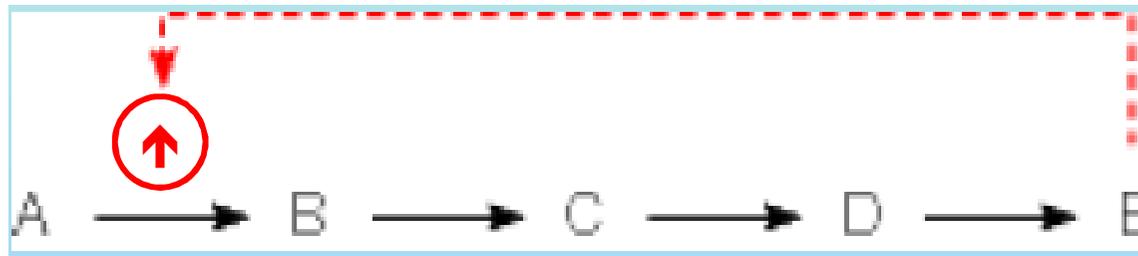
Feedback negativo (inibizione a feedback)

⇒ il prodotto finale di una via metabolica inibisce l'attività dell'enzima che catalizza la prima reazione



Feedback positivo (attivazione a feedback)

⇒ il prodotto finale di una via metabolica aumenta l'attività dell'enzima che catalizza la prima reazione



Regolazione attiva dell'attività enzimatica: MECCANISMI ALLOSTERICI

È un enzima regolatore è quello che controlla le quantità di sostanze che devono essere trasformate in una via metabolica (catalizza la reazione più lenta)

È tali enzimi non seguono la cinetica di Michaelis ó Menten e sono responsabili della modulazione della velocità con cui decorre l'intero processo metabolico

**ENZIMI
ALLOSTERICI**

È generalmente struttura quaternaria (due o più subunità proteiche)

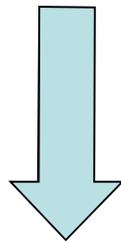
GLI ENZIMI ALLOSTERICI non seguono una cinetica di tipo Michaelis-Menten

andamento della velocità di trasformazione del substrato

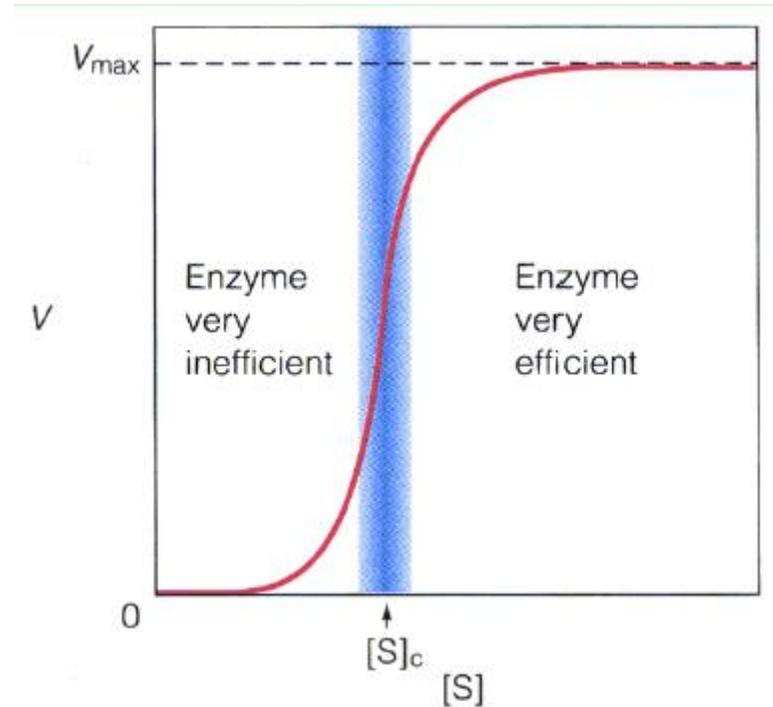


La cinetica enzimatica segue un andamento SIGMOIDALE

Piccole variazioni di $[S]$ inducono grosse variazioni nella V_0

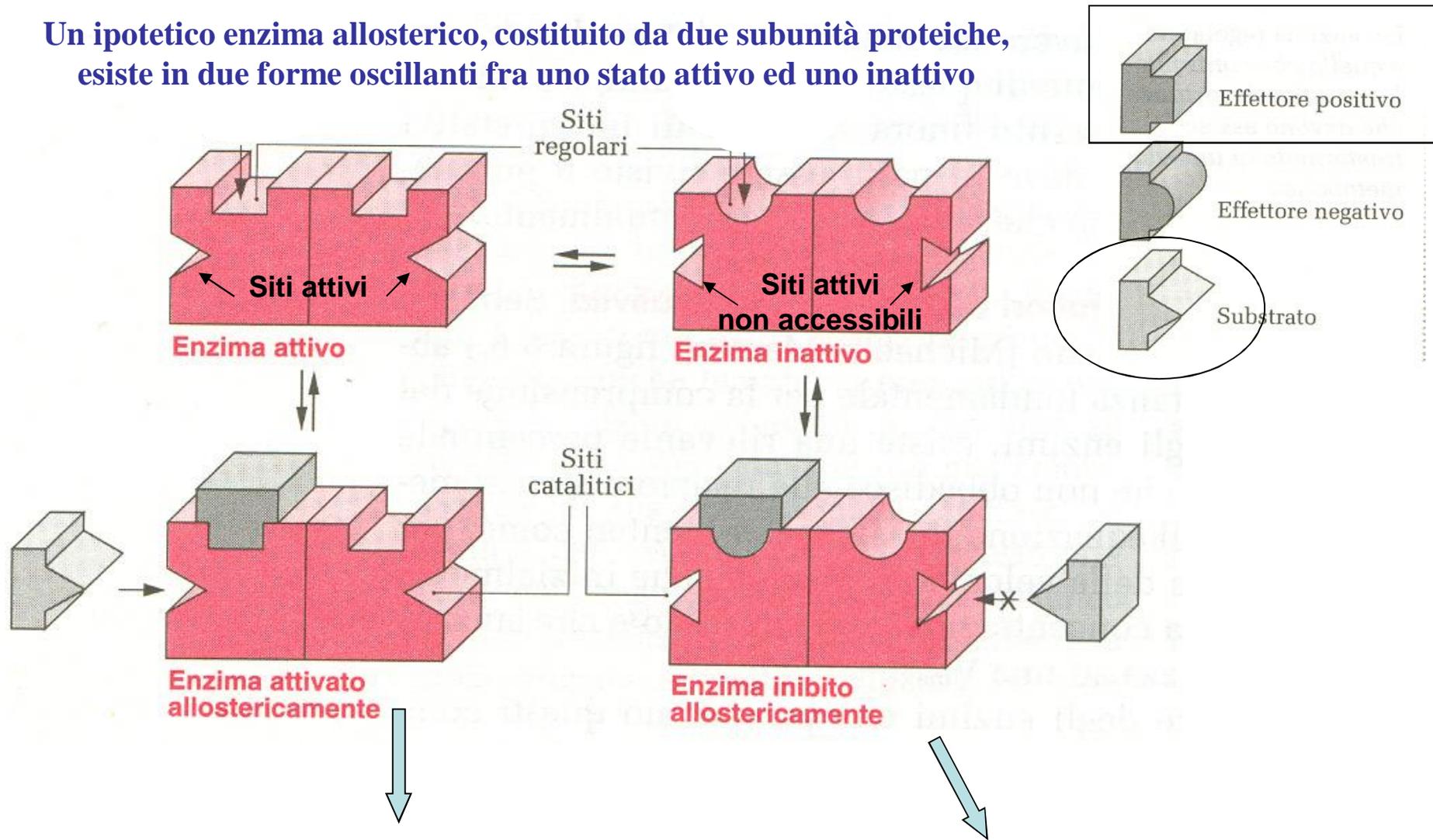


cooperatività



GLI ENZIMI ALLOSTERICI hanno più subunità che agiscono in maniera cooperativa.

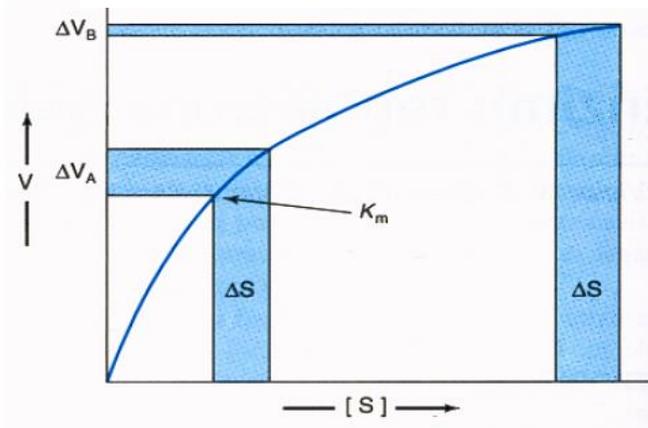
Un ipotetico enzima allosterico, costituito da due subunità proteiche, esiste in due forme oscillanti fra uno stato attivo ed uno inattivo



effettore positivo
induce modificazioni che stabilizzano l'enzima nella sua forma attiva: essa può legarsi al substrato

effettore negativo
induce una modificazione del sito attivo tale da impedire all'enzima di funzionare

Cinetica secondo MM



L'attivazione allosterica da parte di un **effettore positivo** porta ad una **diminuzione della K_M** per il substrato

L'inibizione allosterica da parte di un **effettore negativo** porta ad un **aumento della K_M** per il substrato

Cinetica di un enzima allosterico

