

# ENZIMI

# ENZIMI

la maggior parte sono proteine (**ECCEZIONE: RIBOZIMI**)

catalizzatori biologici

elevata specificità per il substrato

NO sottoprodotti

blande temperature e pH

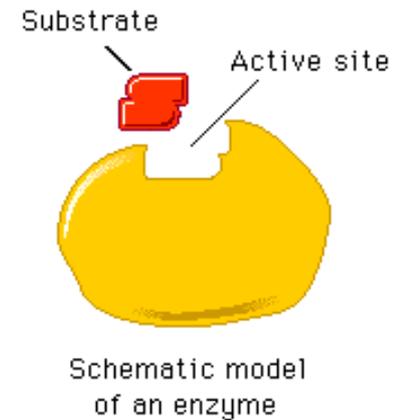
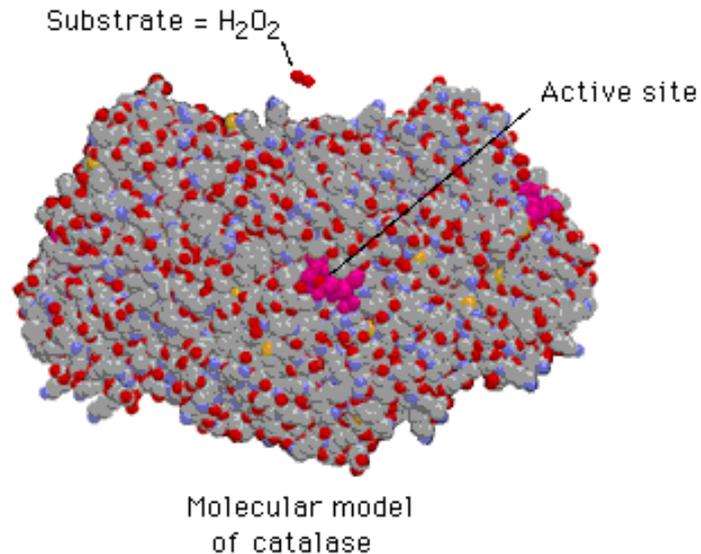
$12000 < MM < 1000000$

# STRUTTURA

\* solo catena peptidica

\* cofattori: 1) ioni inorganici

2) coenzimi (trasportatori reversibili di gruppi funzionali)



## Coenzimi più comuni

<b>Coenzimi</b>	<b>Reazione mediata</b>
Biotina	Carbossilazione
Coenzimi cobamidici (B12)	Alchilazione
Coenzima A	Trasferimento di acili
Coenzimi flavinici	Ossido-riduzioni
Acido lipoico	Trasferimento di acili
Coenzimi nicotinamidici	Ossido-riduzioni
Piridossal fosfato	Trasferimento di gruppi amminici
Tetraidrofolato	Trasferimento di gruppi a un atomo di carbonio
Tiamina pirofosfato	Trasferimento di aldeidi

## Alcuni Cofattori

$\text{Fe}^{2+}$ o $\text{Fe}^{3+}$	Citocromo ossidasi Catalasi Perossidasi
$\text{Cu}^{2+}$	Citocromo ossidasi
$\text{Zn}^{2+}$	DNA polimerasi Carbonico anidrase Alcool deidrogenasi
$\text{Mg}^{2+}$	Esochinasi Glucosio 6-fosfatasi
$\text{Mn}^{2+}$	Arginasi
$\text{K}^{+}$	Piruvato chinasi (richiede anche $\text{Mg}^{2+}$ )
$\text{Ni}^{2+}$	Ureasi
Mo	Nitrato reductasi
Se	Glutatione perossidasi

# CLASSIFICAZIONE INTERNAZIONALE DEGLI ENZIMI

<b>N.</b>	<b>Classe</b>	<b>Tipo di reazione catalizzata</b>
<b>1</b>	<b>Ossidoreduttasi</b>	<b>Trasferimento di elettroni (ioni H<sup>-</sup> o atomi di H)</b>
<b>2</b>	<b>Transferasi</b>	<b>Trasferimento di gruppi funzionali</b>
<b>3</b>	<b>Idrolasi</b>	<b>Idrolisi (trasferimento di gruppi funzionali all'acqua)</b>
<b>4</b>	<b>Liasi</b>	<b>Addizione di gruppi a doppi legami o viceversa</b>
<b>5</b>	<b>Isomerasi</b>	<b>Trasferimento di gruppi all'interno di una molecola per formare forme isomeriche</b>
<b>6</b>	<b>Ligasi</b>	<b>Formazione di legami C-C, C-S, C-O, e C-N, per mezzo di reazioni accoppiate all'idrolisi di ATP o simili</b>

# CLASSIFICAZIONE INTERNAZIONALE DEGLI ENZIMI

6 classi principali ciascuna divisa in sottoclassi

3.4.17.1. EC

3 classe principale

4 sottoclasse (legami peptidici)

17 sotto-sottoclasse (metallopeptidasi)

1 numero di serie

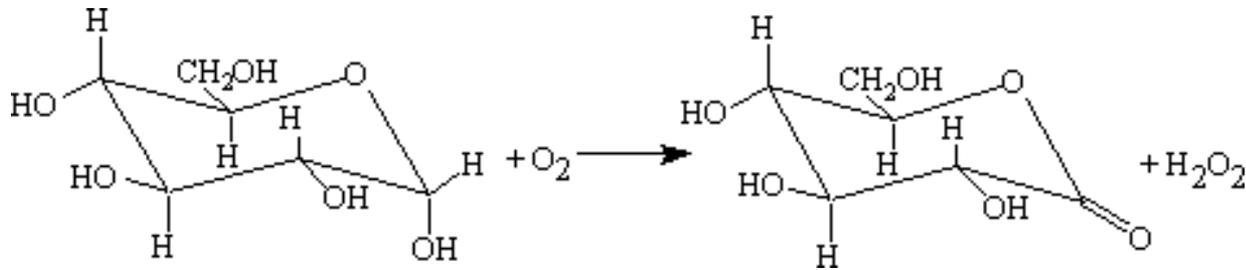
Utilizzo anche di:

nome raccomandato (corrente) es: carbossipeptidasi

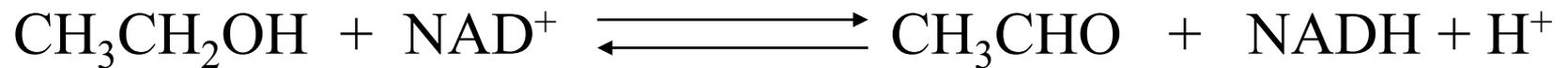
nome sistematico es: peptidil-L-ammino acido idrolasi

# 1. Ossidoreduttasi

Catalizzano reazioni di ossido-riduzione. Possono trasferire elettroni ad un coenzima ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$ ) oppure a una molecola di  $\text{O}_2$ .



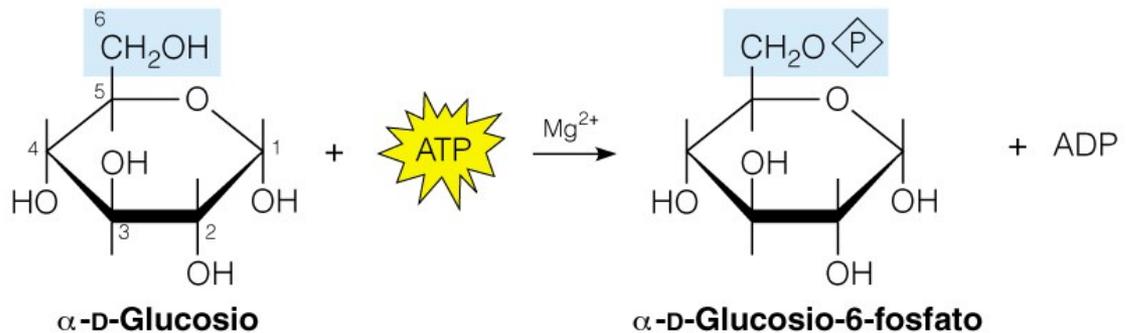
Glucosio ossigenasi



Alcol deidrogenasi

## 2. Transferasi

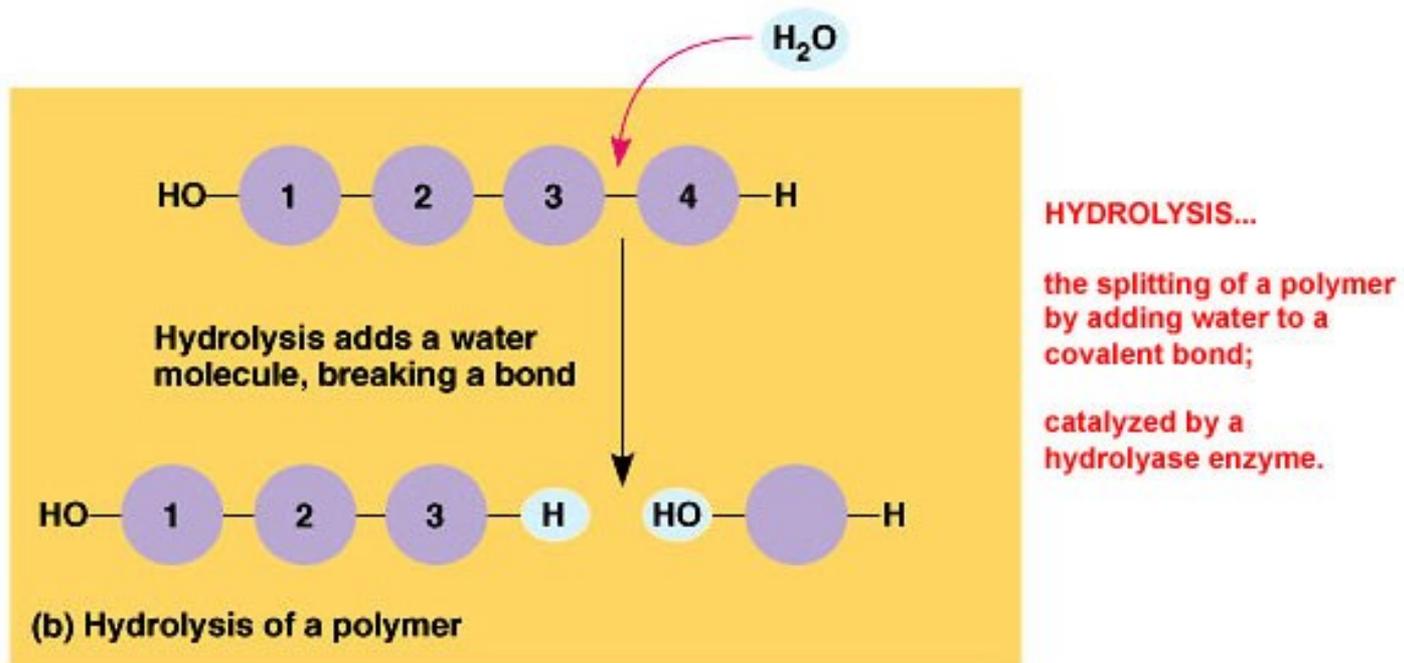
Questi enzimi trasferiscono gruppi funzionali tra donatori e accettori. I gruppi più comuni trasferiti sono: amminico (ammino transferasi), acile, fosfato, con un atomo di carbonio, e glicosidico (glicosil transferasi). Le chinasi sono enzimi che trasferiscono gruppi fosfato.



Esochinasi e glucochinasi

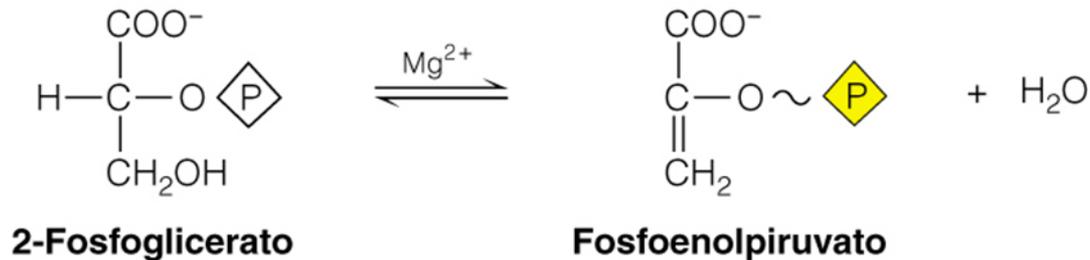
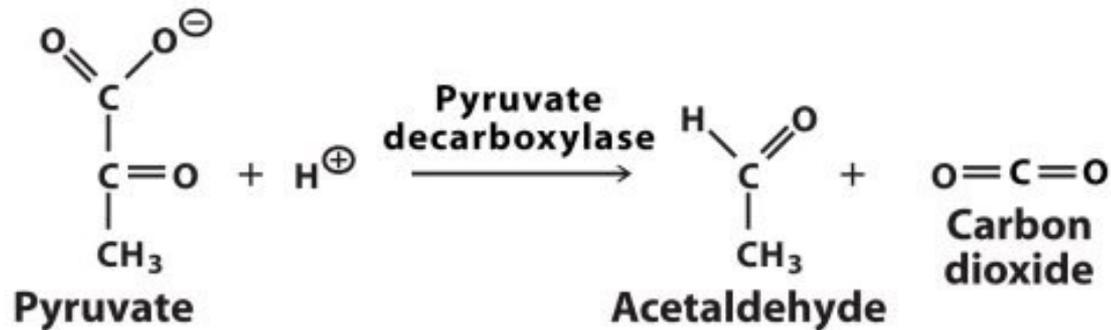
### 3. Idrolasi

Un enzima che catalizza la rottura di un legame chimico nel substrato e l'aggiunta di acqua alle molecole risultanti. Es: esterasi, glicosidasi, lipasi, nucleotidasi, peptidasi, fosfatasi.



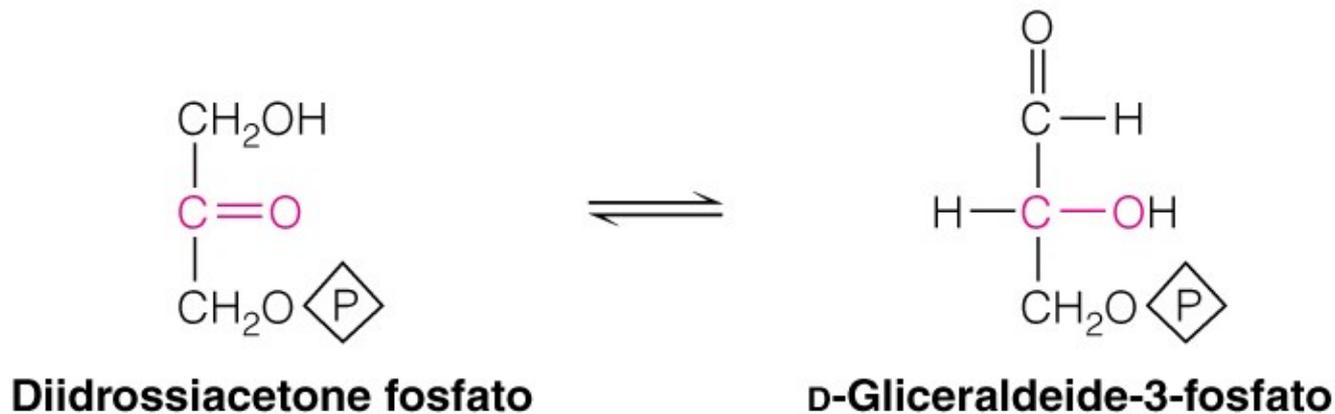
## 4. Liasi

Le liasi formano doppi legami rimuovendo gruppi [acqua (deidratasi), ammoniaca, o anidride carbonica (decarbossilasi)] da un substrato. Oppure aggiungono gruppi a un doppio legame. Quando la reazione in senso inverso è quella biochimicamente più importante, l'enzima è comunemente chiamato sintasi.



## 5. Isomerasi

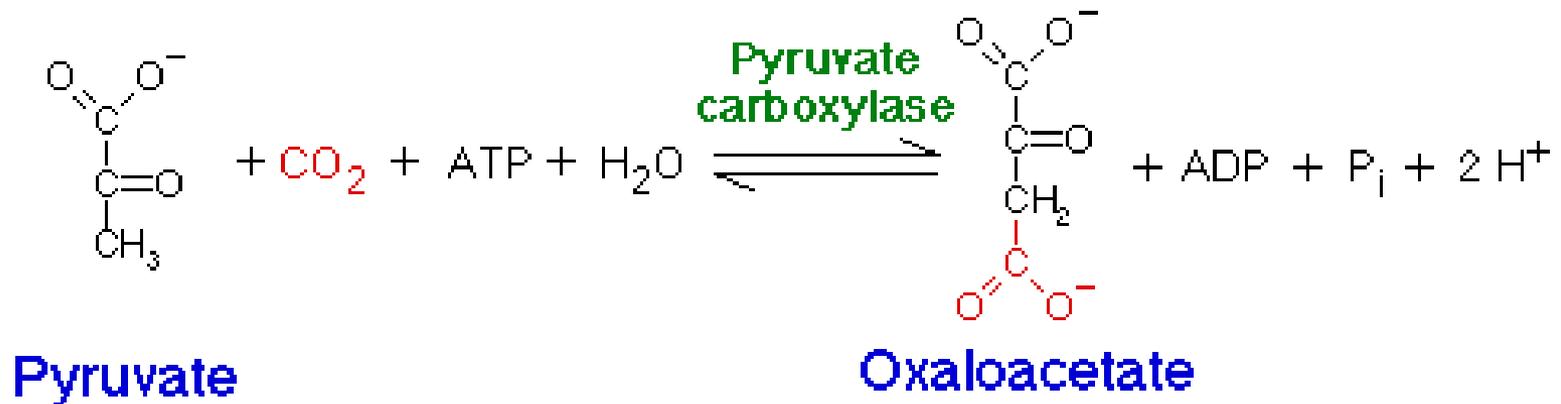
Gruppo eterogeneo di enzimi che catalizzano reazioni di diverso tipo. Es: interconversioni cis-trans e aldoso-chetoso.



Trioso fosfato isomerasi

## 6. Ligasi

Enzimi coinvolti in reazioni di sintesi, in cui due molecole sono unite a spese di legami ad alta energia dell'ATP (chiamati anche **sintetasi**).



## TERMINOLOGIA

**Attività enzimatica:** espressa come  $\mu\text{moli}$  di substrato convertito a prodotto per minuto in condizioni sperimentali specificate

**Unità enzimatica (UE):** è la quantità di enzima che provoca la trasformazione di 1  $\mu\text{mole}$  di substrato per minuto, a 25 °C e in condizioni ottimali.

**Attività specifica:** è il numero di UE per milligrammo di proteine.

**Attività molecolare o numero di turnover:** è il numero molecole di substrato che vengono trasformate per minuto da una singola molecola di enzima o da un singolo sito attivo (quando è l'enzima il fattore che limita la velocità di reazione).

**Katal (kat):** è l'unità di misura del Sistema Internazionale (SI) per l'attività catalitica. Quantità di enzima che trasforma una mole di substrato al secondo.

# CATALISI ENZIMATICA

## **Enzimi sono catalizzatori biologici**

Aumentano la velocità (fino a  $10^{17}$  volte) di una reazione chimica senza essere consumati o alterati. Non cambiano la costante di equilibrio (K) della reazione

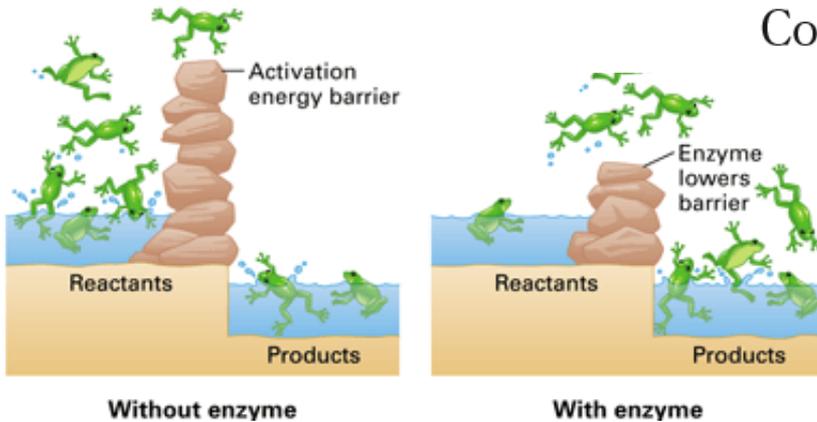
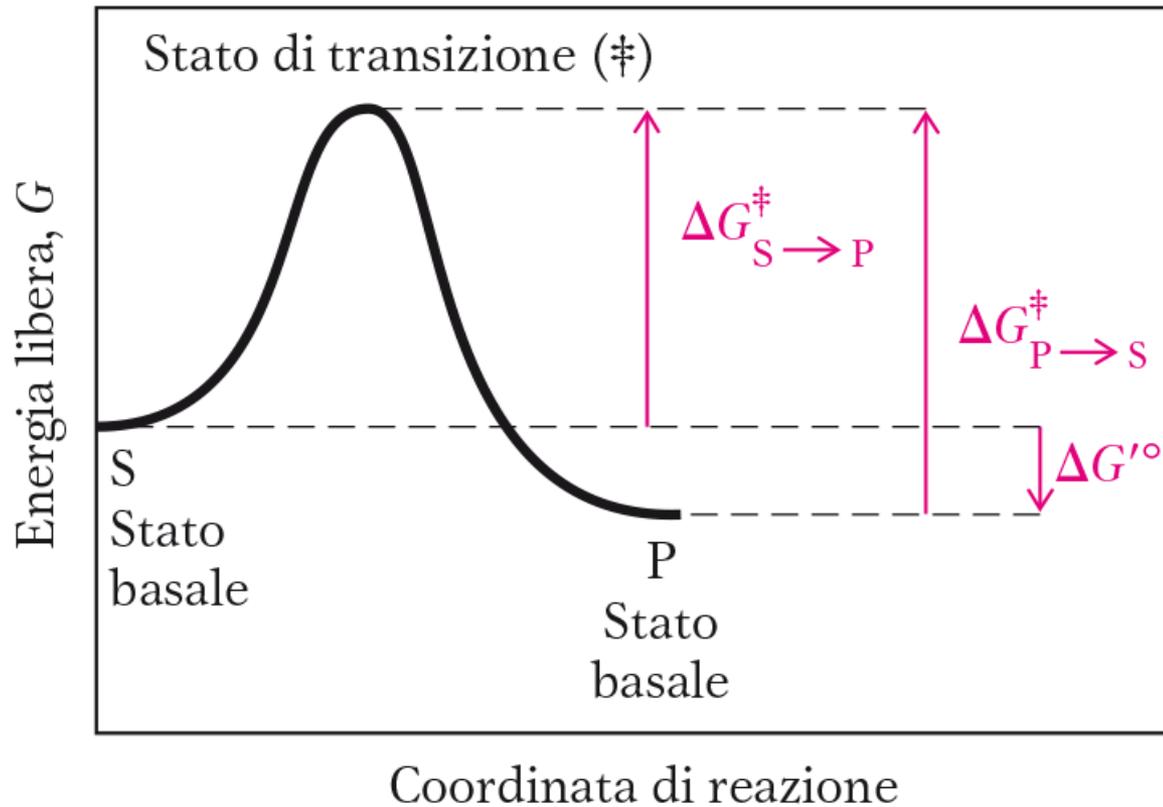
Sono prodotti da organismi viventi

Generano un ambiente specifico in cui una data reazione è energeticamente favorita

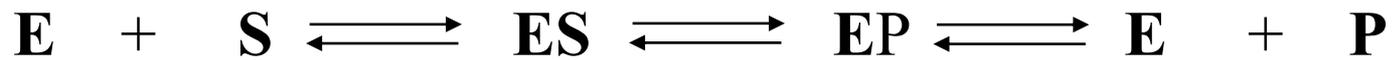
Differenze con i catalizzatori non biologici:

- 1) hanno maggior potere catalitico
- 2) sono altamente specifici (stereospecificità, legami specifici, specificità di reazione, specificità di gruppo)
- 3) attività strettamente regolata

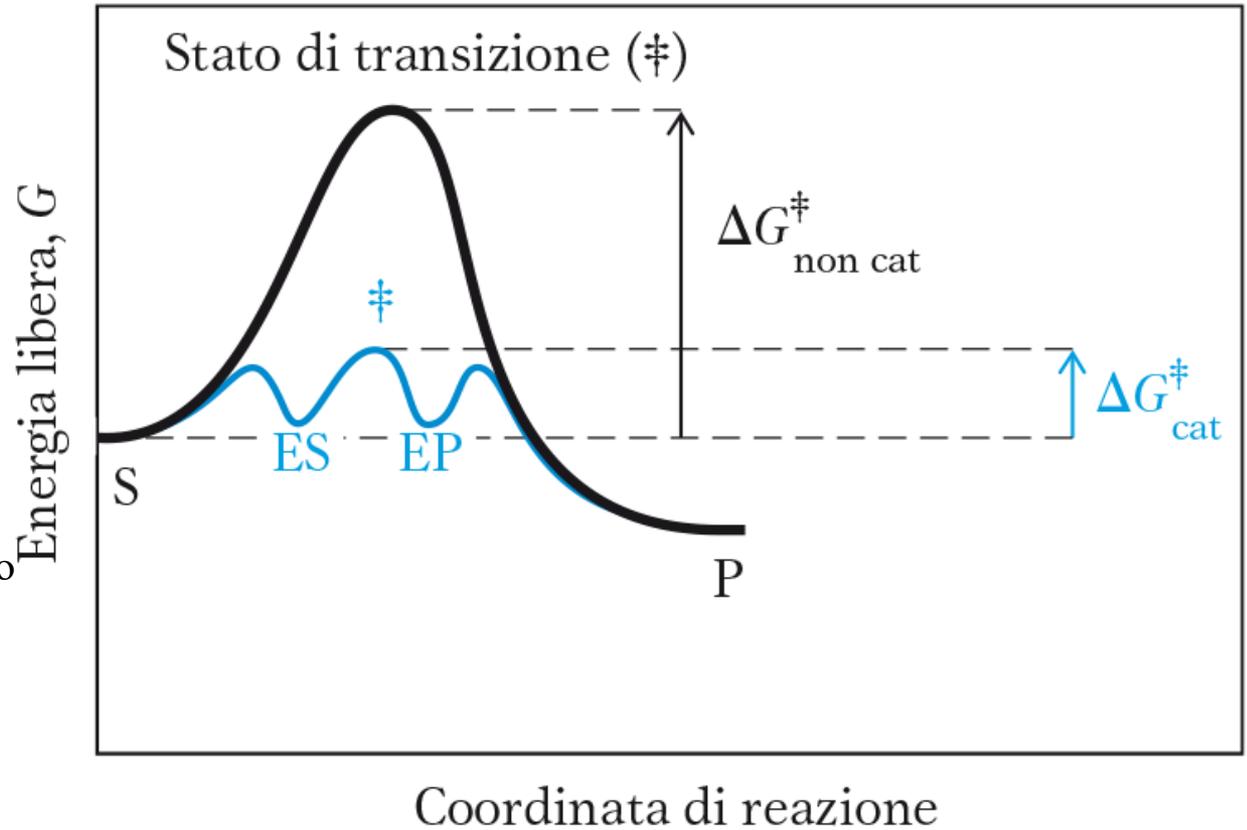
# GRAFICO DELLA COORDINATA DI REAZIONE



**Gli enzimi modificano la velocità della reazione catalizzata NON l'equilibrio della reazione**



**Stato di transizione** non corrisponde a una specie chimica con stabilità significativa. Non è un intermedio della reazione (come ES o EP). È un momento molecolare transitorio in cui alcuni eventi (la rottura di un legame, la formazione di un legame o la comparsa di una carica) si sono spinti fino al punto in cui vi è la stessa probabilità di un ritorno al substrato o di una formazione del prodotto



Confronto tra il grafico della coordinata di reazione di una reazione non catalizzata e di una catalizzata da un enzima. Nella reazione  $S \rightarrow P$  gli intermedi ES ed EP si trovano ai minimi energetici nella curva. I termini  $\Delta G_{\text{uncat}}$  and  $\Delta G_{\text{cat}}$  corrispondono alle energie di attivazione della reazione non catalizzata e catalizzata, rispettivamente. L'energia di attivazione è più bassa quando l'enzima catalizza la reazione.

# CATALISI ENZIMATICA

L'attività catalitica consiste nel legame di S a E per formare il complesso ES.

S si lega a una specifica regione di E chiamata sito attivo.

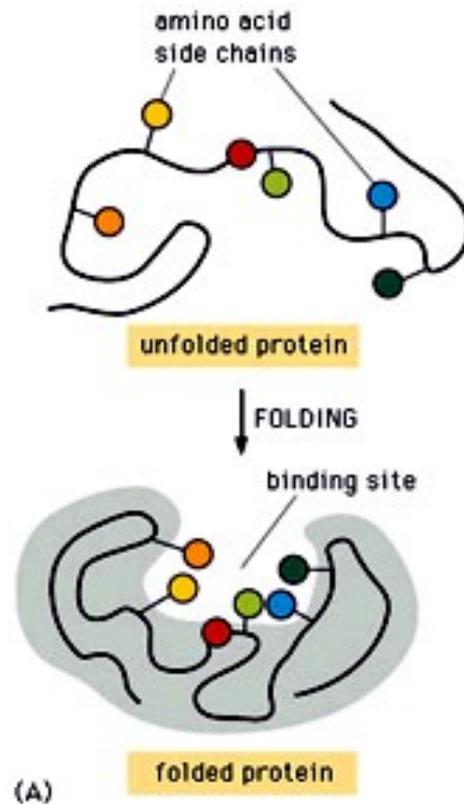
Il legame di S al sito attivo di E è un'interazione molto specifica.

Nel sito attivo S viene convertito in P che viene poi rilasciato da E.

Le catene laterali di amminoacidi legano il substrato e catalizzano la reazione

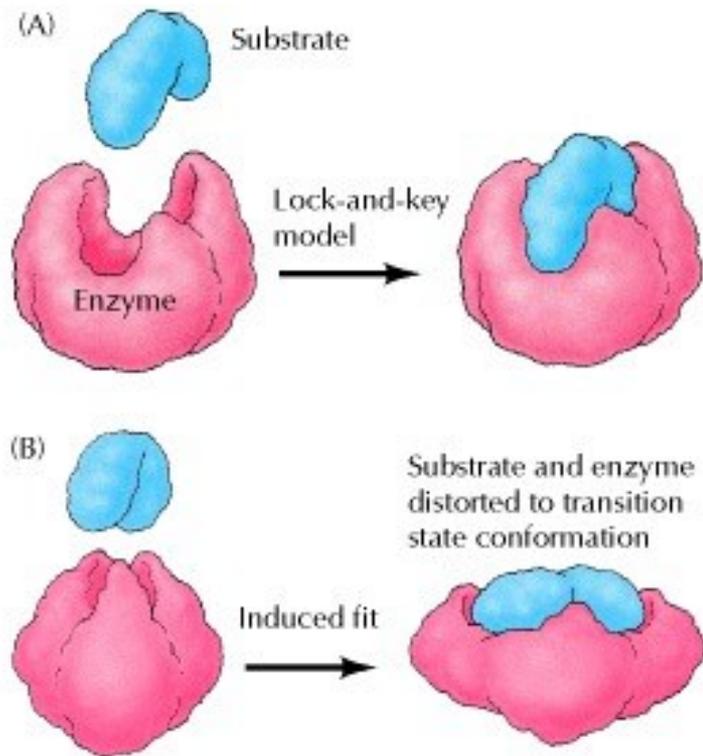
# CATALISI ENZIMATICA

Siti attivi: fessure o scanalature sulla superficie di E, composti da amminoacidi provenienti da diverse parti della catena polipeptidica che vengono riuniti nella struttura terziaria della proteina.





# CATALISI ENZIMATICA



Gli enzimi accelerano le reazioni anche alterando la conformazione dei loro substrati per avvicinarsi a quella dello stato di transizione. Il modello più semplice di interazione enzima-substrato è il modello chiamato **chiave e serratura**, in cui S si adatta esattamente al sito attivo.

Il modello più moderno è chiamato dell'**adattamento indotto**, dove le configurazioni sia di E che di S sono modificate dal legame di S ad E.

# Modello dell'adattamento indotto

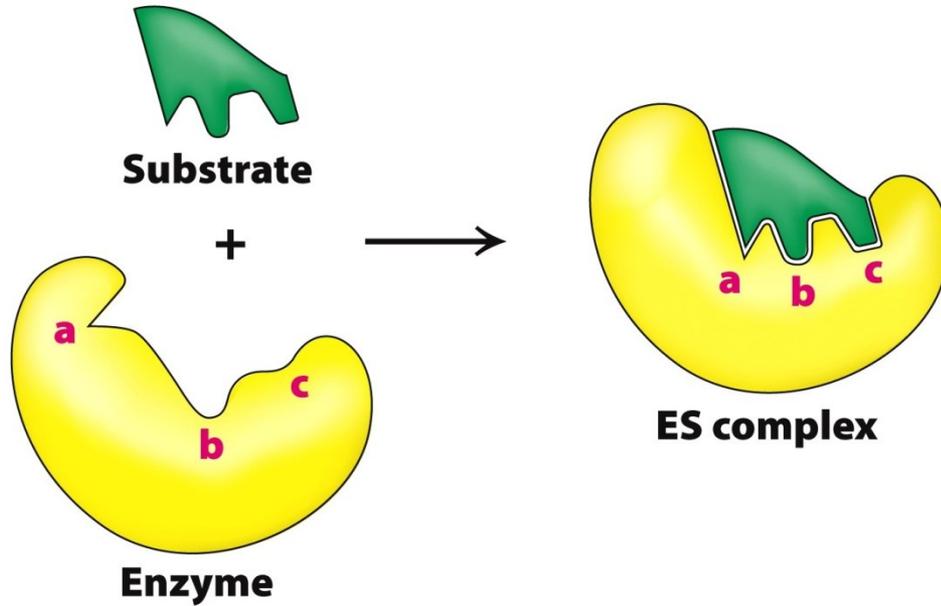
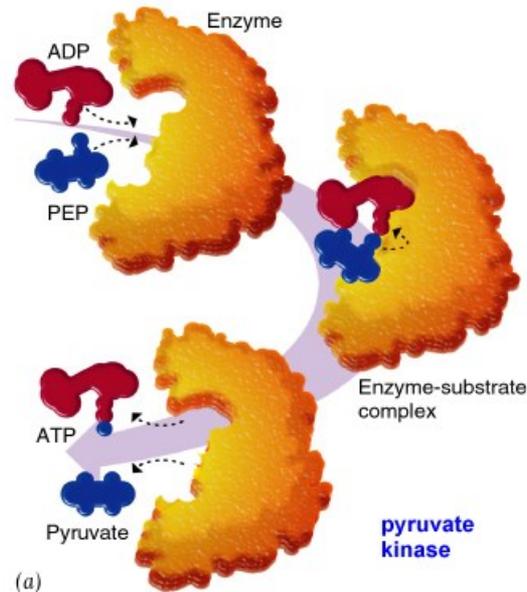
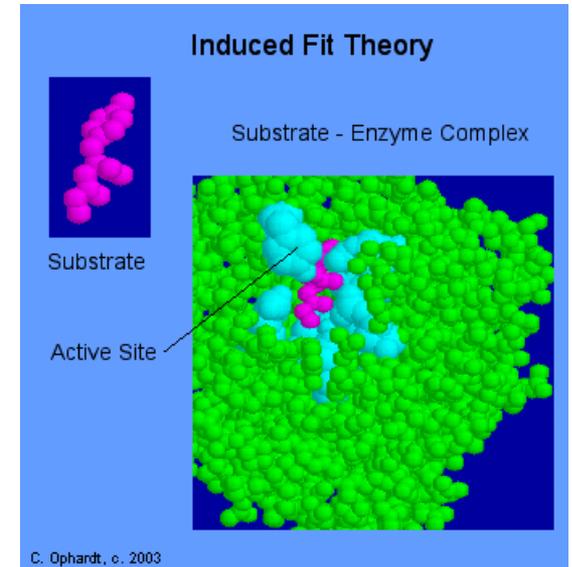


Figure 8.9  
Biochemistry, Seventh Edition  
© 2012 W. H. Freeman and Company

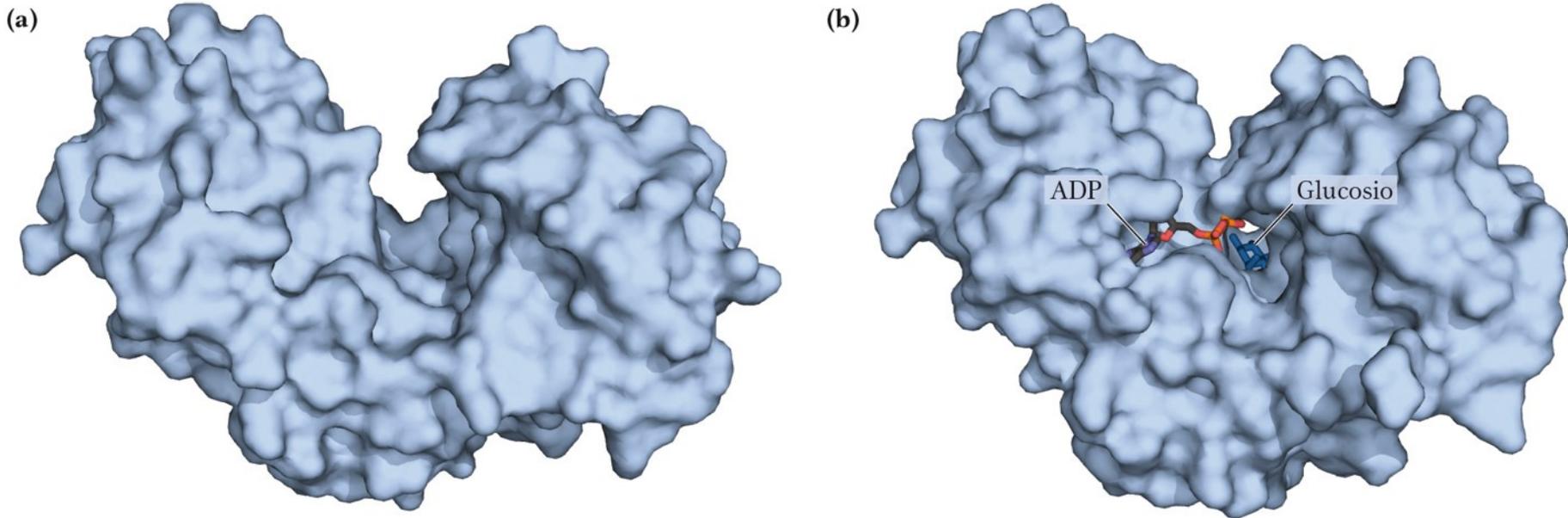


(a)

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



# ADATTAMENTO INDOTTO NELL'ESOCINASI



Lo stress prodotto da tale distorsione di S può facilitare ulteriormente la sua conversione allo stato di transizione indebolendo dei legami chimici critici.

# CATALISI ENZIMATICA

- Nel complesso ES si formano alcune interazioni deboli, ma tutte le possibili interazioni si generano soltanto quando il substrato raggiunge lo stato di transizione.
- Oltre a riunire più substrati e distorcere la conformazione dei substrati per avvicinarsi allo stato di transizione, molti enzimi partecipano direttamente al processo catalitico.
- Specifiche catene laterali di amminoacidi nel sito attivo possono reagire con S e formare legami con intermedi della reazione. Gli amminoacidi acidi e basici sono spesso coinvolti in questi meccanismi catalitici, come donatori o accettori di protoni.

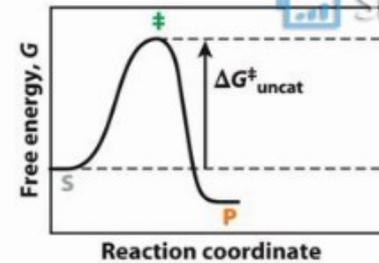
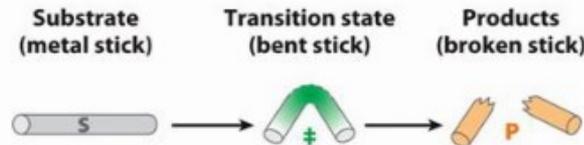
# Come è possibile spiegare l'enorme aumento della velocità di reazione indotto dagli enzimi?

## Da dove arriva l'energia necessaria ad abbassare così drasticamente l'energia di attivazione di una specifica reazione?

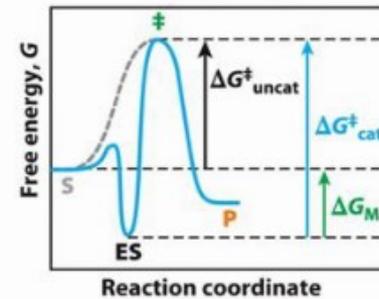
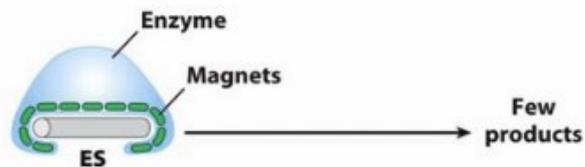
1. Interazioni non covalenti tra enzima e substrato. Si forma il complesso ES. L'interazione tra S ed E in questo complesso è mediata da legami idrogeno e interazioni idrofobiche e ioniche. La formazione di ogni interazione debole nel complesso ES è accompagnata da un piccolo rilascio di energia libera, che stabilizza l'interazione stessa. L'energia che si libera dalle interazioni ES viene detta energia di legame. L'energia di legame è la fonte principale di energia libera usata dall'enzima per abbassare l'energia di attivazione della reazione.
2. Interazioni covalenti tra E ed S. Tra i gruppi funzionali di S ed E (le catene laterali di alcuni amminoacidi, gli ioni metallici e i coenzimi) avvengono reazioni chimiche. I gruppi funzionali catalitici di un enzima possono formare un legame covalente transitorio con il substrato, attivandolo per la reazione, oppure un gruppo può essere trasferito momentaneamente dal substrato all'enzima. Queste reazioni avvengono solo nel sito attivo degli enzimi. Le interazioni covalenti tra E ed S abbassano l'energia di attivazione generando una via alternativa a bassa energia per la reazione.

# REAZIONE CATALIZZATA DA UN ENZIMA IMMAGINARIO

(a) No enzyme



(b) Enzyme complementary to substrate



(c) Enzyme complementary to transition state

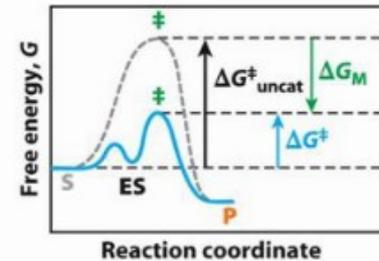
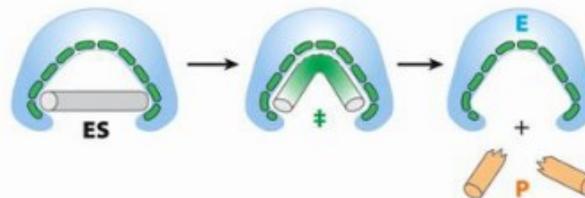


Figure 6-5  
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

# GLI ENZIMI SONO CATALIZZATORI MOLTO EFFICIENTI E SPECIFICI

**EFFICIENZA:** dipende da reazioni tra E ed S. Gruppi funzionali di E del sito attivo possono formare un legame transitorio con S rendendolo più reattivo

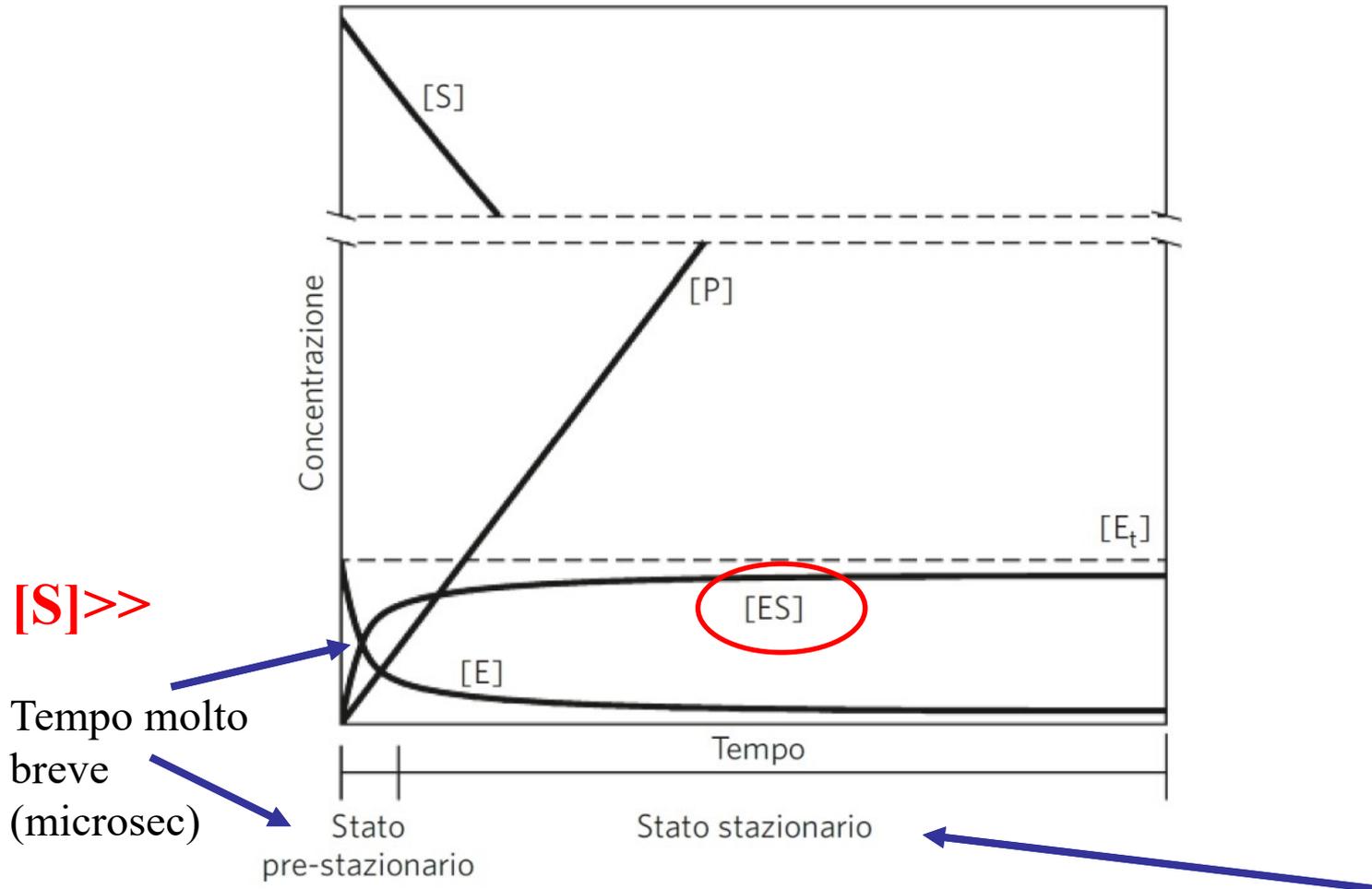
**SPECIFICITÀ:** risiede nei legami non covalenti fra E ed S. Molti legami deboli fra E ed S. Questa energia di legame abbassa l'energia di attivazione della reazione.

Le interazioni deboli sono ottimali nello stato di transizione della reazione

# CINETICA ENZIMATICA

la determinazione della velocità della reazione e di come questa cambi in risposta a variazioni dei parametri sperimentali

# ANDAMENTO DI UNA REAZIONE ENZIMATICA



analisi delle velocità di reazione = cinetica dello stato stazionario

# CINETICA ENZIMATICA

## CALCOLO DELLA VELOCITÀ INIZIALE ( $v_0$ )

VELOCITÀ = grandezza fisica che esprime la variazione di una proprietà nell'unità di tempo

$$v = \frac{\Delta X}{\Delta t}$$

Per le reazioni chimiche la proprietà più adeguata è la concentrazione.  $S \rightarrow P$

$$v = \frac{-\Delta S}{\Delta t} \qquad v = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

$$v = \frac{dP}{dt}$$

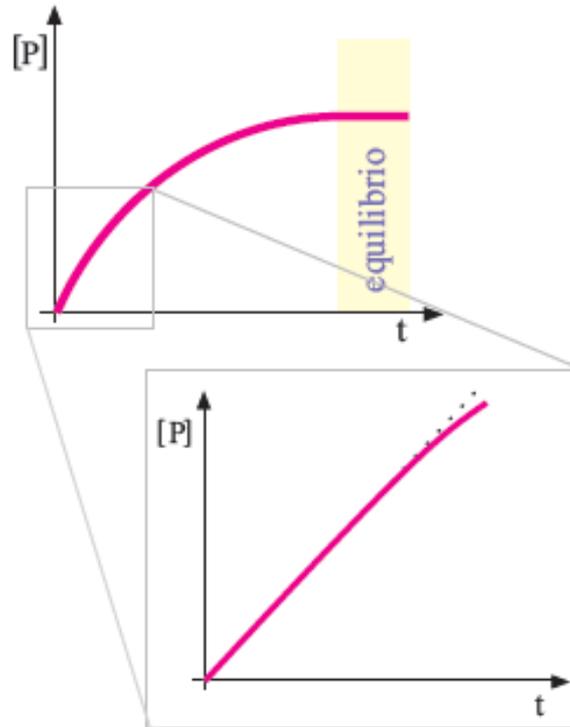
velocità istantanea di reazione = la variazione della concentrazione di S o P in un intervallo infinitesimo di tempo e corrisponde al coefficiente angolare della tangente alla curva della concentrazione rispetto al tempo; essa varia con il procedere della reazione)

# CINETICA ENZIMATICA



➔ *come si forma il prodotto P nel tempo ?*

La velocità di reazione istantanea corrisponde alla pendenza (coefficiente angolare;  $\Delta P / \Delta t$ ) della retta tangente alla curva in ogni suo punto e varia col procedere della reazione



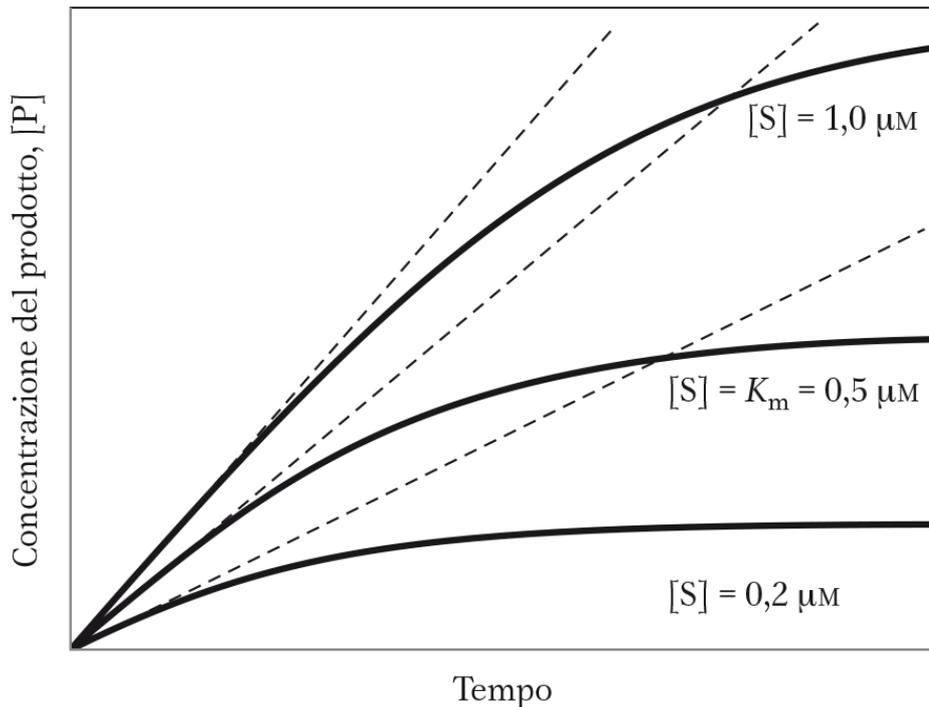
$$v = \frac{dP}{dt}$$

CURVA DI AVANZAMENTO della reazione enzimatica

# CINETICA ENZIMATICA

## CALCOLO DELLA VELOCITÀ INIZIALE ( $v_0$ )

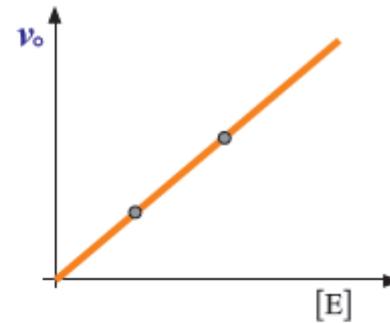
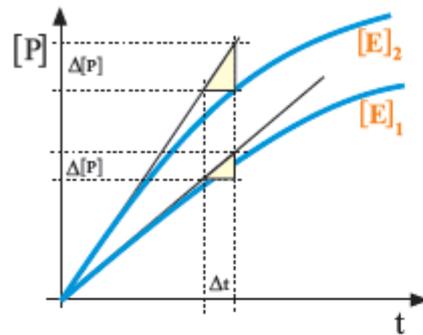
- La concentrazione di S è maggiore di quella di E  $[E] = \text{costante}$
- Tempo breve, circa 60 sec, la variazione di  $[S]$  è minima



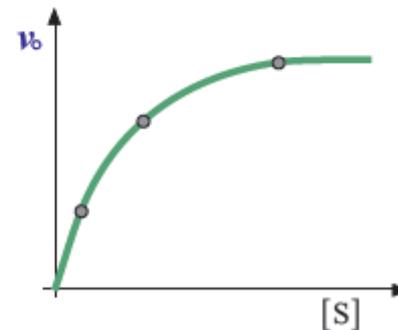
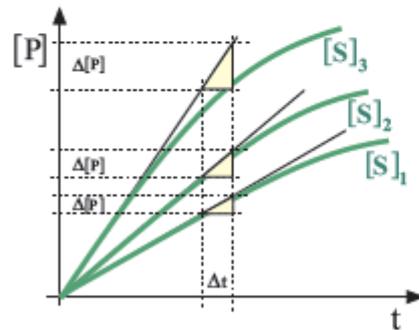
Curva di Progressione di una reazione catalizzata da un enzima in cui un substrato viene convertito in prodotto.  $[P]$ , la concentrazione del prodotto, aumenta al procedere della reazione. La velocità iniziale della reazione ( $v_0$ ) è la pendenza della parte lineare iniziale della curva.

La velocità iniziale di una reazione enzimatica non è sempre la stessa.  $v_0$  dipende da molti fattori, ma due sono decisivi:  
**[E] e [S]**

1) correlazione  $v_0 \leftrightarrow [E]$

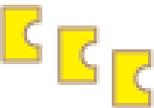
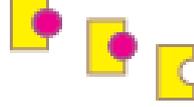
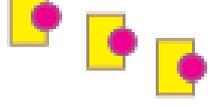
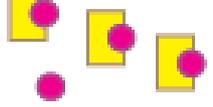
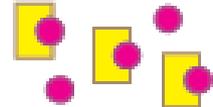


2) correlazione  $v_0 \leftrightarrow [S]$

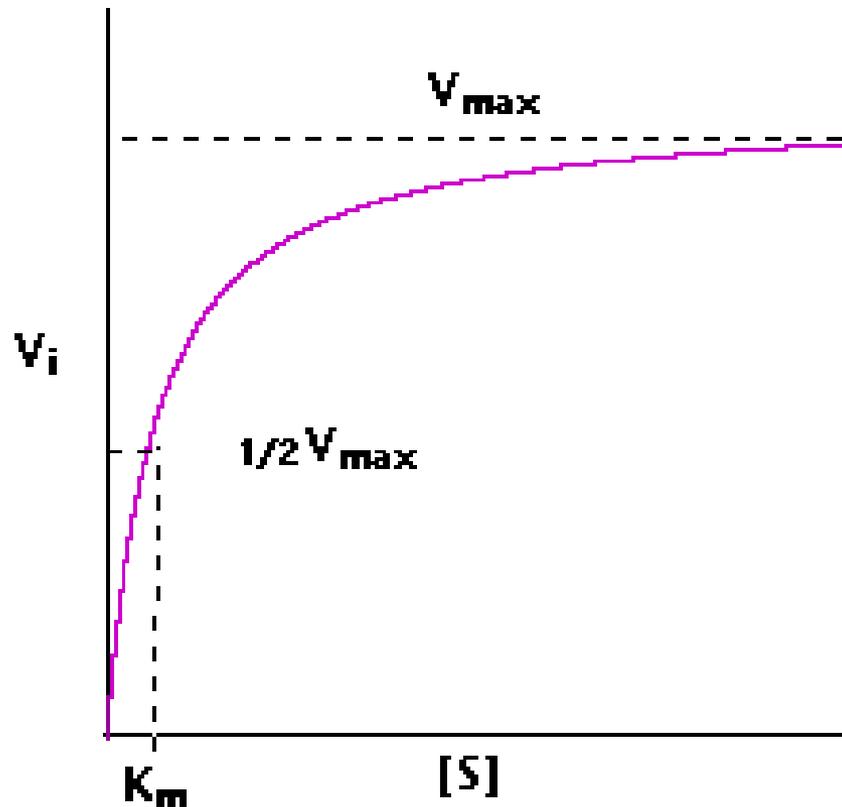


la tendenza asintotica di  $v_0$  evidenzia un fenomeno caratteristico delle reazioni enzimatiche

## la SATURAZIONE DA SUBSTRATO

S		+	E		→	ES		→	P	+	E		
													1 P/nsec
													2 P/nsec
													3 P/nsec
													3 P/nsec
													3 P/nsec

# CINETICA ENZIMATICA



Leonor Michaelis  
1875–1949



Maud Menten  
1879–1960

$V_i$  = initial velocity (moles/time)

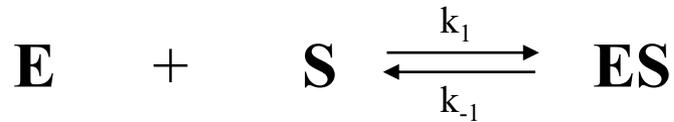
$[S]$  = substrate concentration (molar)

$V_{max}$  = maximum velocity

$K_m$  = substrate concentration when  
 $V_i$  is one-half  $V_{max}$

$K_m$  = costante di Michaelis-Menten

**E** lega substrato (**S**) per formare un complesso **ES** come prima tappa essenziale della catalisi enzimatica



La seconda reazione è più lenta, di conseguenza la velocità complessiva è proporzionale alla concentrazione del complesso **ES**.

In una reazione catalizzata da un enzima, esso è sempre presente in 2 forme:

libera **E**

combinata **ES**

Quando tutto l'enzima esiste in forma combinata, la velocità sarà massima. Ciò si ottiene a concentrazioni di substrato molto elevate.

E' molto difficile determinare la concentrazione di S alla quale la velocità corrisponde a Vmax

Michaelis e Menten definirono una costante  $K_M$

Corrisponde alla concentrazione di substrato alla quale un dato enzima esprime la metà della velocità massima. L'andamento della curva di saturazione di un enzima può essere espresso dalla equazione di Michaelis-Menten

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

$V_0$  = velocità iniziale a conc [S]

$V_{\max}$  = velocità massima

$K_M$  = costante di Michaelis-Menten

L'equazione è stata ottenuta assumendo che la tappa limitante di una reazione enzimatica sia la dissociazione del complesso ES per formare E e P.

L'equazione è fondamentale per tutti gli aspetti della cinetica enzimatica.

La maggior parte delle reazioni enzimatiche può essere analizzata quantitativamente con questa equazione.

# GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI

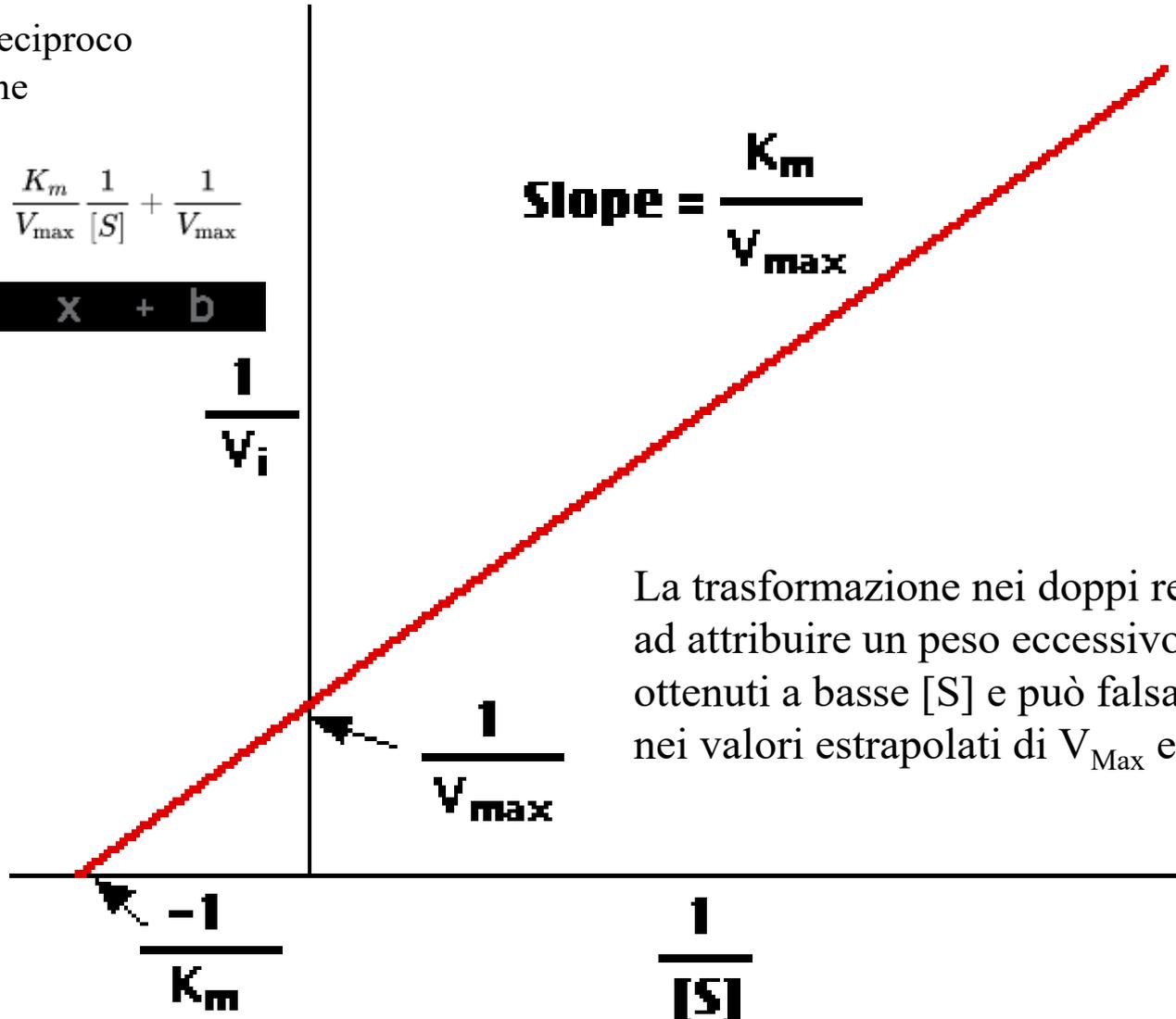
## LINEWEAVER-BURK

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

Facciamo il reciproco di ogni termine

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

$$y = m x + b$$



La trasformazione nei doppi reciproci tende ad attribuire un peso eccessivo ai dati ottenuti a basse  $[S]$  e può falsare gli errori nei valori estrapolati di  $V_{\max}$  e di  $K_m$

## Valori di $K_M$ per alcuni enzimi

Enzima	Substrato	$K_M$ , mM
Catalasi	$H_2O_2$	25
Esochinasi (cervello)	ATP	0.4
	D-glucosio	0.05
	D-fruttosio	1.5
Anidrasi carbonica	$HCO_3^-$	9
Chimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-benzoiltirosinammide	2.5
$\beta$ -galattosidasi	D-lattosio	4
Treonina deidratasi	L-treonina	5

# Significato di $K_M$

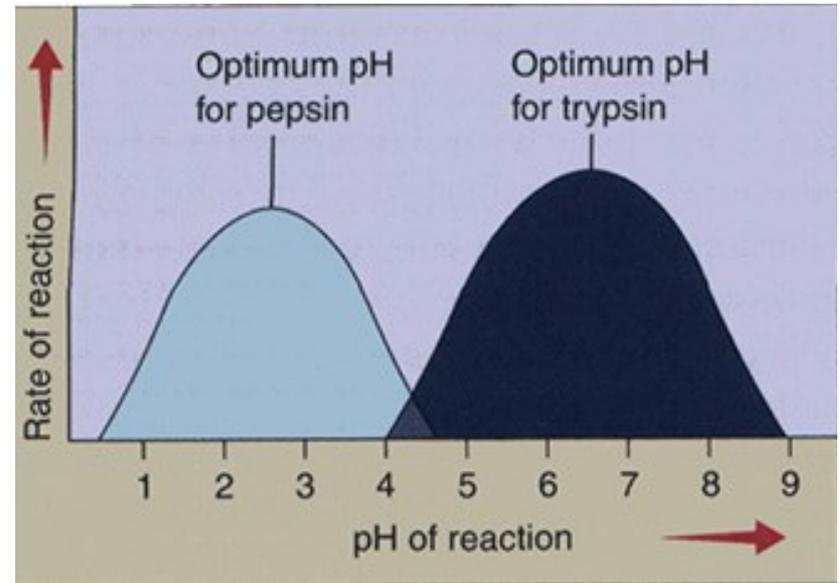
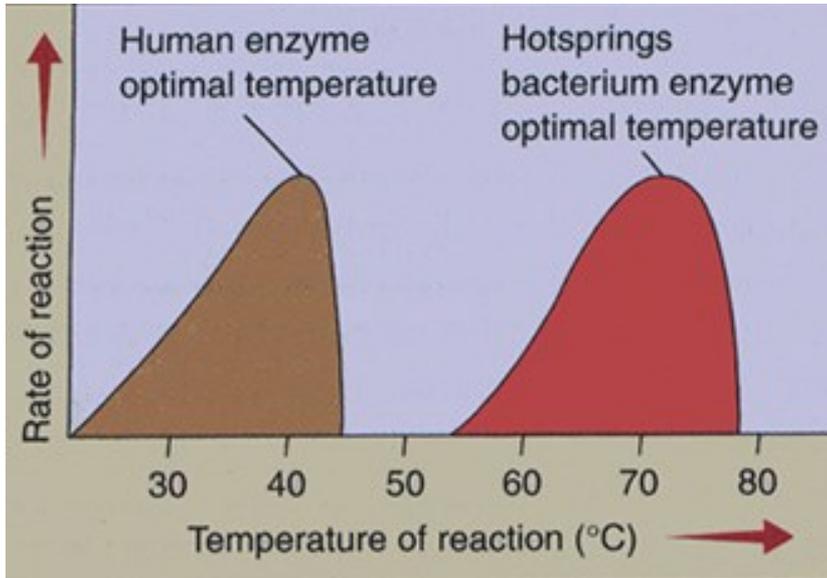
Il significato reale di  $K_M$  dipende da aspetti specifici del meccanismo della reazione, come il numero e le velocità relative delle tappe della reazione.

1. Per una reazione a due tappe 
$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Se  $k_2$  è la costante che limita la velocità,  $k_2 \ll k_{-1}$  e  $K_M = k_{-1}/k_1$ , che è la costante di dissociazione,  $K_d$ , del complesso ES. In queste condizioni,  $K_M$  rappresenta una misura dell'affinità dell'enzima per il suo substrato nel complesso ES. Questa situazione non si applica però alla maggior parte degli enzimi.

2. Nei casi in cui la reazione procede con molte tappe dopo la formazione di ES,  $K_M$  diventa una funzione molto complessa di numerose costanti di velocità e non può essere considerata come una indicazione dell'affinità per S.

# pH e temperatura ottimali



# INIBIZIONE DEGLI ENZIMI

Gli inibitori enzimatici interagiscono reversibilmente o irreversibilmente con un enzima alterandone i valori di  $K_m$  e  $V_{max}$

## INIBITORI IRREVERSIBILI:

Formano un legame covalente con il gruppo funzionale necessario all'attività catalitica:

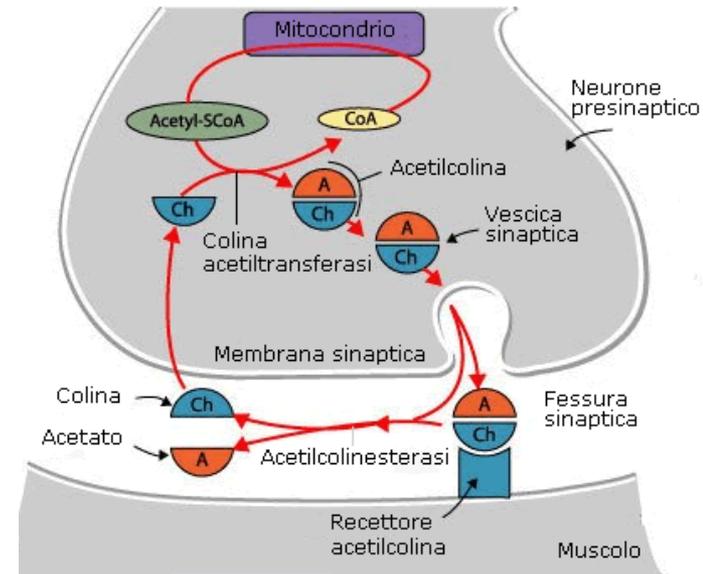
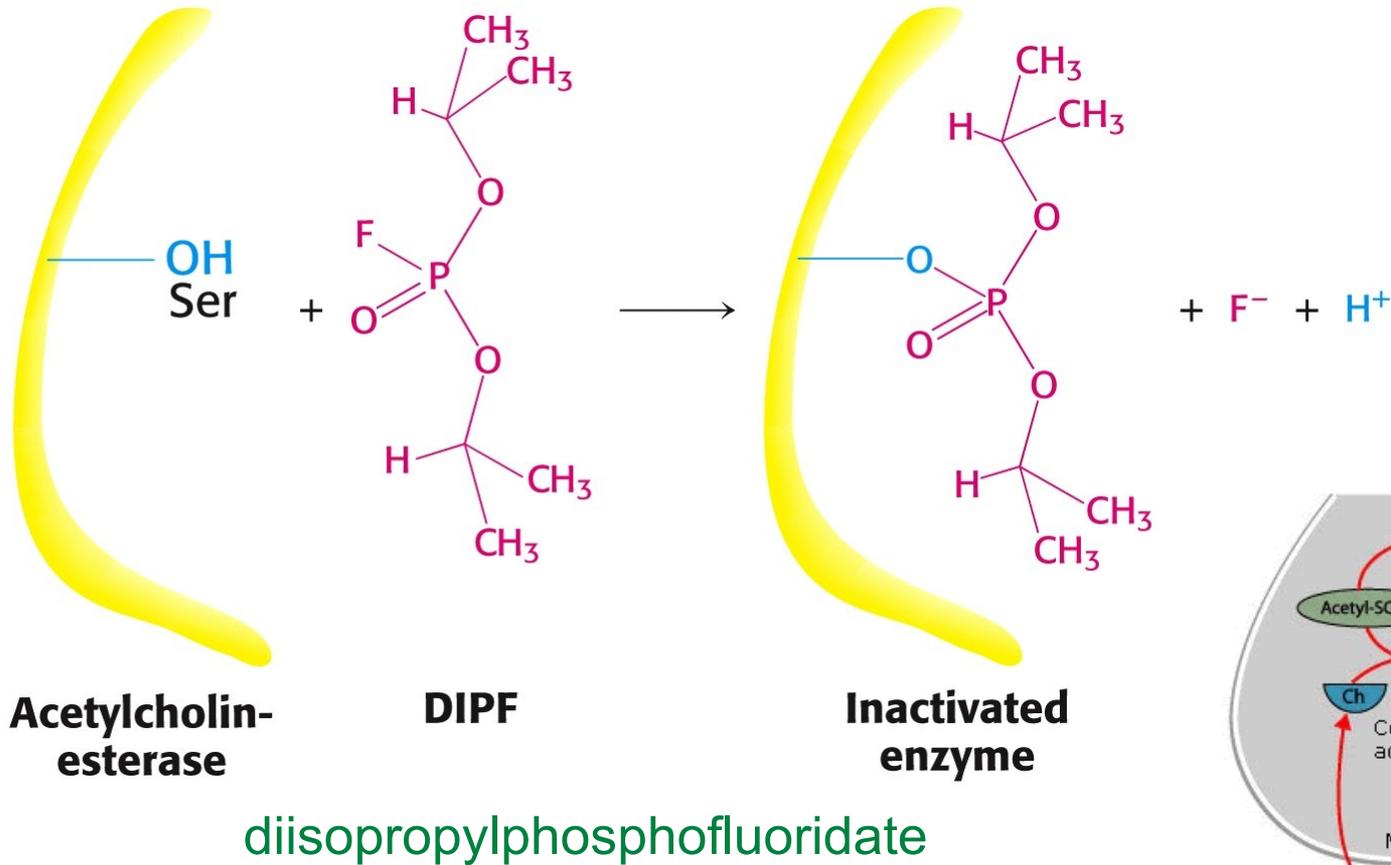
es: DIFP, penicillina, metotrexato

# INIBITORI IRREVERSIBILI

- Gli inibitori irreversibili sono anche molto utili per caratterizzare i meccanismi di reazione.
- Gli amminoacidi del sito attivo con funzioni catalitiche essenziali talvolta possono essere identificati determinando quale residuo del sito attivo risulta covalentemente legato in seguito all'inattivazione dell'enzima.
- Un inibitore irreversibile non ha bisogno di legarsi covalentemente all'enzima. Il legame non covalente è sufficiente se è così forte che l'inibitore si dissocia dall'enzima solo molto difficilmente.

# INIBIZIONE DA PARTE DI DIFP

Group - specific reagents react with R groups of amino acids

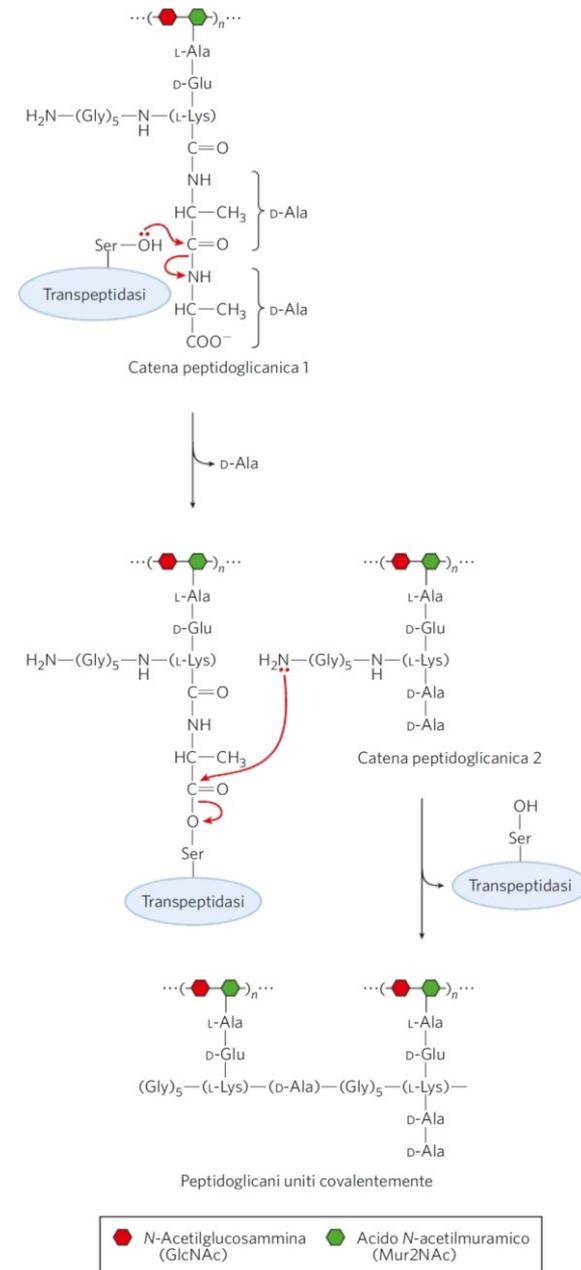


DIFP (**gas nervino**) reagisce con Ser in acetilcolinesterasi<sup>44</sup>

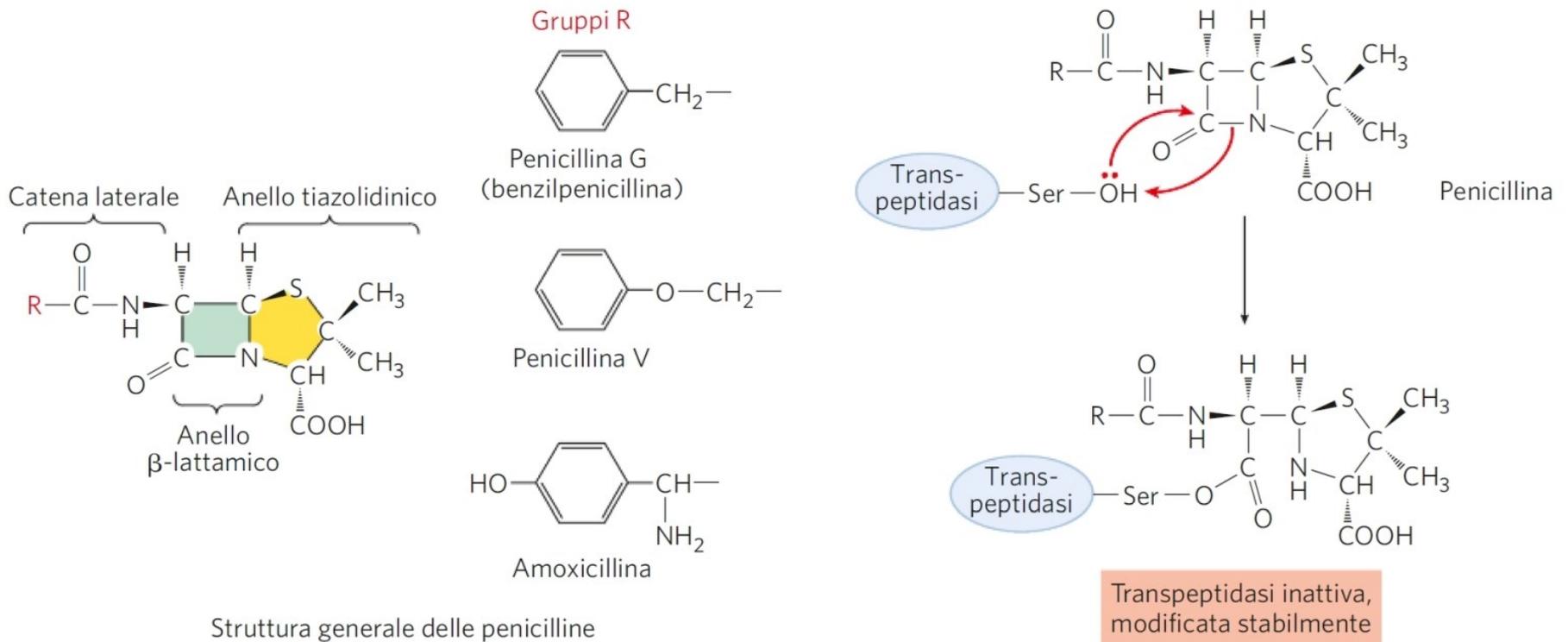
# SINTESI DELLA PARETE BATTERICA

## REAZIONE CATALIZZATA DALLA TRANSPEPTIDASI

**Figura 6.32** La reazione transpeptidasica. Questa reazione, che unisce due precursori peptidoglicanici formando un polimero più grande, viene favorita da una serina del sito attivo e da un meccanismo di catalisi covalente, simile a quello della chimotripsina. Si noti che il peptidoglicano è uno dei pochi composti naturali in cui sono presenti D-amminoacidi. La serina del sito attivo attacca il carbonile del legame peptidico tra i due residui di D-Ala, creando un legame estere covalente tra il substrato e l'enzima, con liberazione del residuo di D-Ala terminale. Un gruppo amminico del secondo precursore peptidoglicanico attacca il legame estere, liberando l'enzima e legando covalentemente tra loro i due precursori.

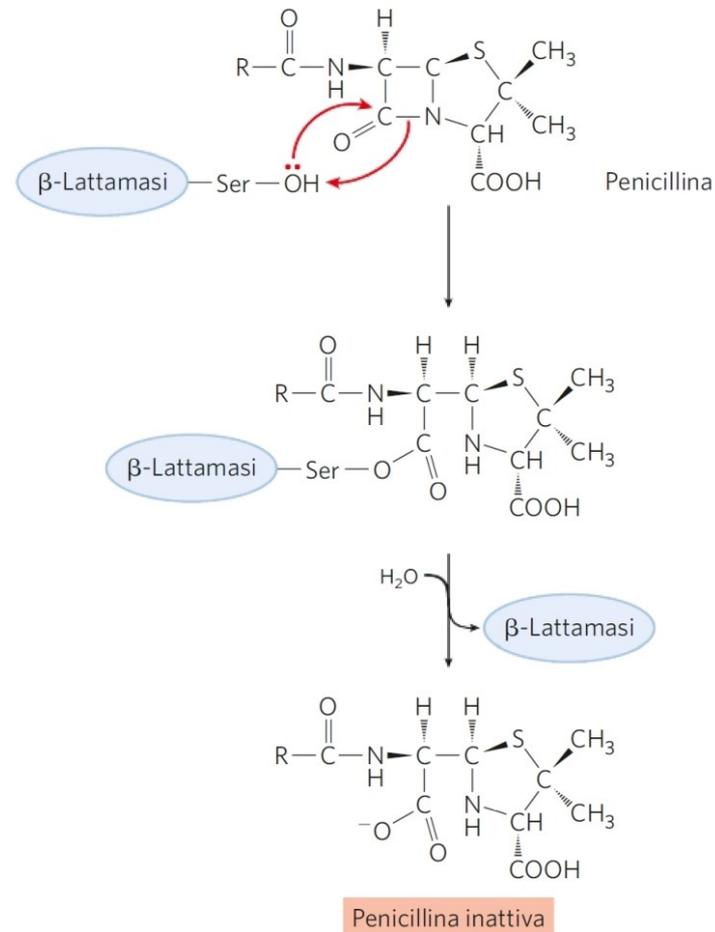


# AZIONE DELLA PENICILLINA



Il complesso covalente inattiva l'enzima in modo irreversibile. Bloccata la sintesi della parete cellulare batterica. La maggior parte dei batteri muore perché le membrane interne si rompono a causa di variazioni della pressione osmotica.

Il trattamento con la penicillina o con i suoi derivati ha portato alla comparsa di ceppi di batteri patogeni che esprimono le  $\beta$ -lattamasi, enzimi che inattivano le penicilline, rendendo i batteri resistenti a questi antibiotici. I geni per questi enzimi si sono rapidamente diffusi nelle popolazioni batteriche sotto la pressione selettiva imposta dall'uso e spesso dall'abuso degli antibiotici  $\beta$ -lattamici.

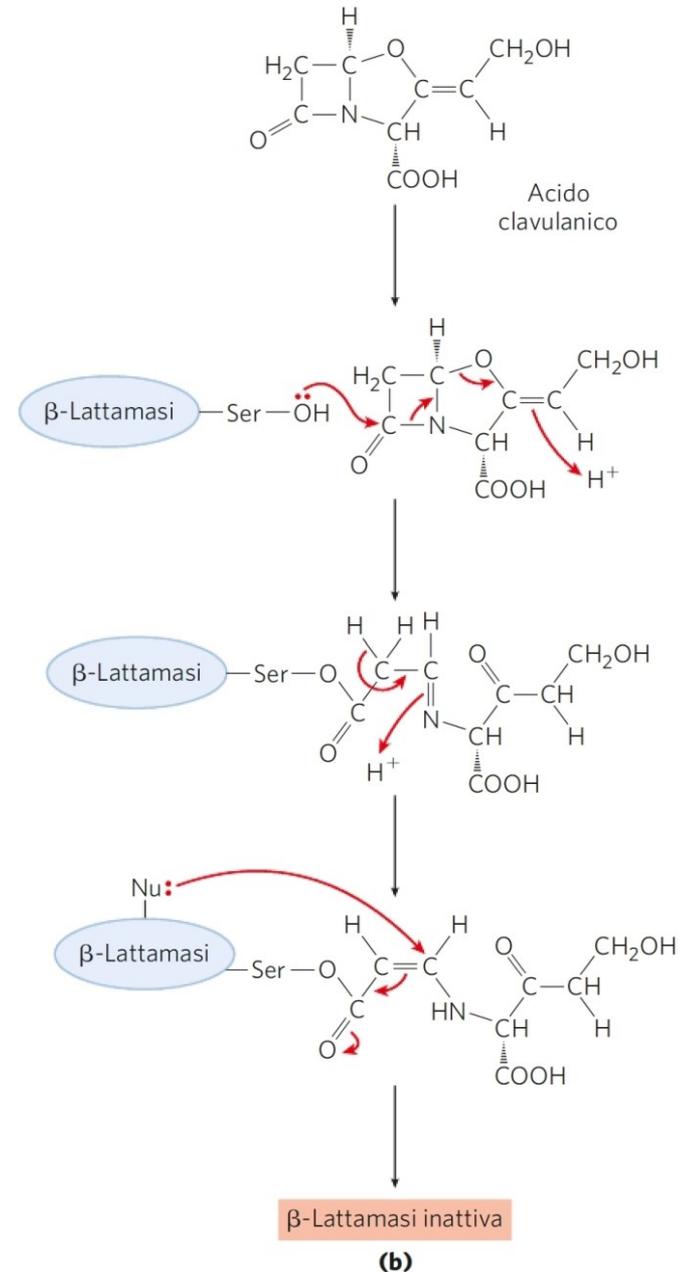


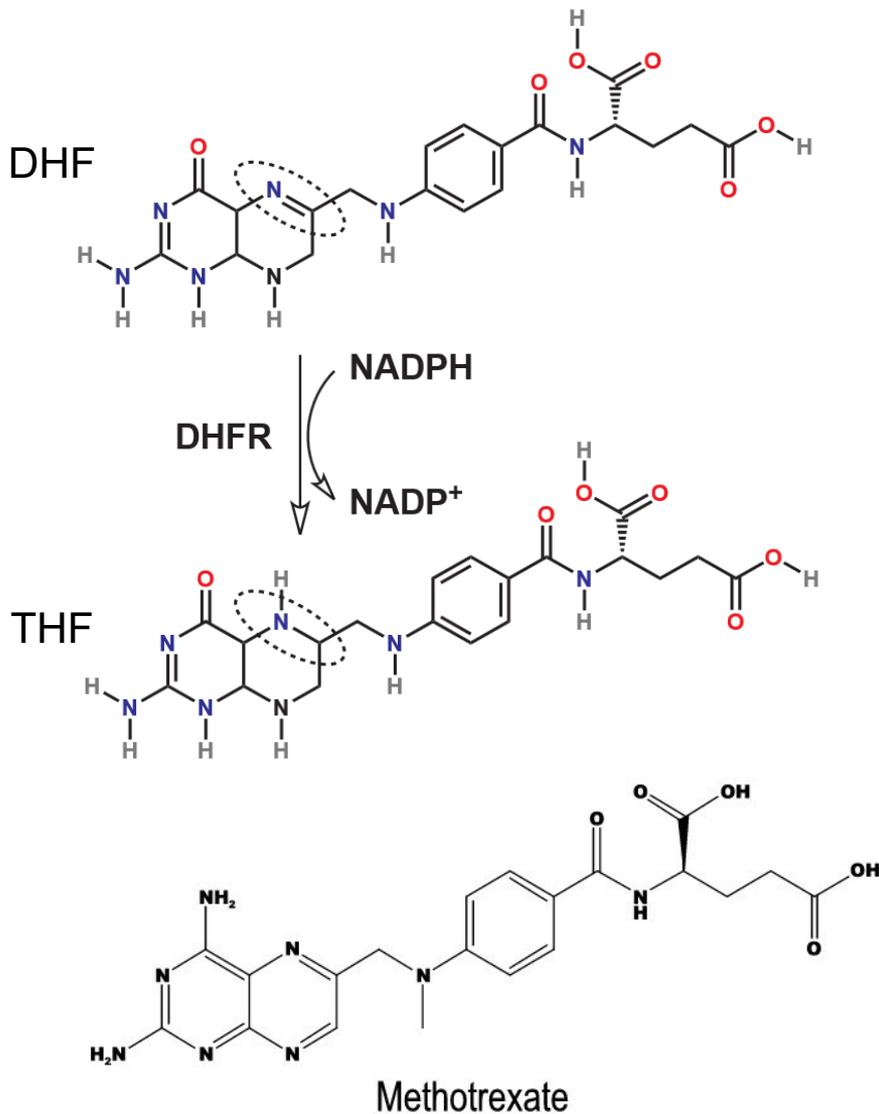
## Azione della $\beta$ -lattamasi

# Sintesi di un nuovo antibiotico: acido clavulanico

Ac. clavulanico inattiva le  $\beta$ -lattamasi

Sono stati isolati batteri che hanno  $\beta$ -lattamasi mutate, che sono insensibili all'Ac. clavulanico





Nella sintesi delle purine e delle pirimidine una reazione richiede tetraidrofolato.

Il metotrexato inibisce l'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR) che è responsabile della conversione del diidrofolato (DHF) a tetraidrofolato (THF). Il metotrexato ha una struttura simile ai folati. L'enzima lo lega 1000x più forte del suo substrato naturale e la sua attività è inibita. La sintesi del DNA non può procedere e non c'è replicazione cellulare.

# INATTIVATORI SUICIDI

- Classe speciale di inibitori irreversibili
- Sono relativamente stabili fino a che non si legano al sito attivo di uno specifico enzima.
- L'inattivatore suicida va incontro ad alcuni passaggi chimici che fanno parte del normale meccanismo di reazione dell'enzima, NON è trasformato nel normale prodotto MA viene convertito in un composto molto reattivo che si combina irreversibilmente con l'enzima.
- Hanno un ruolo importante nella progettazione razionale dei farmaci, un approccio moderno che serve a ottenere nuovi farmaci basandosi sulla conoscenza dei meccanismi di reazione degli enzimi.
- Un buon inattivatore suicida deve essere specifico per un singolo enzima e diventare reattivo solo quando ha raggiunto il sito attivo dell'enzima; questi farmaci hanno il vantaggio di non presentare effetti collaterali

ES: difluorometilornitina (DFMO) viene utilizzata nella cura della malattia del sonno provocata dal *Trypanosoma brucei gambiense*

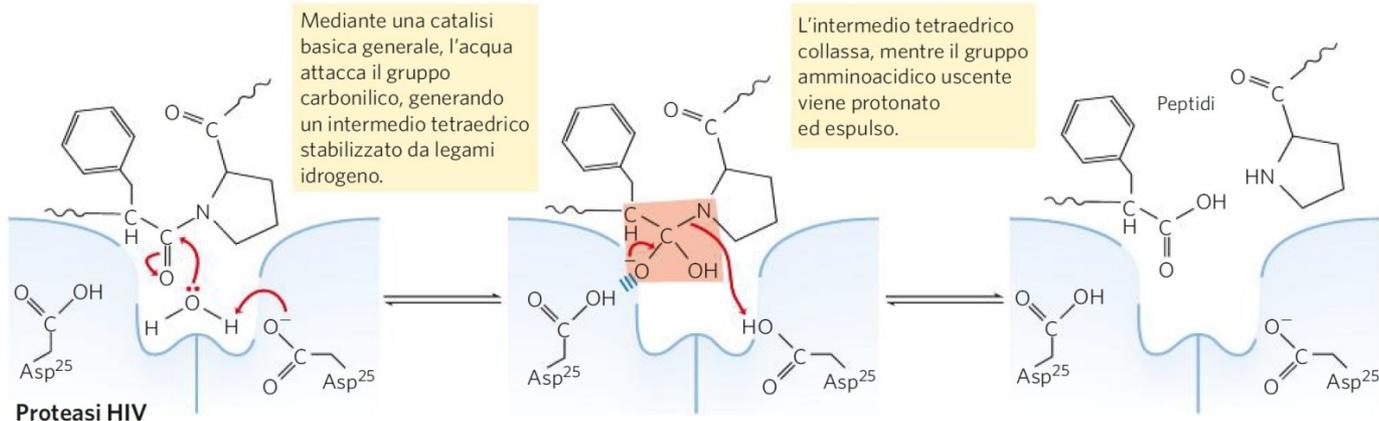
# ANALOGHI DELLO STATO DI TRANSIZIONE

- si legano a un enzima molto più saldamente di quanto faccia il substrato nel complesso ES.
- In linea di principio, una molecola con una struttura simile allo stato di transizione di una determinata reazione può legarsi all'enzima con un'affinità molto alta
- Gli stati di transizione non possono essere osservati direttamente, MA in base alle conoscenze a disposizione sul meccanismo di reazione si può prevedere la struttura più probabile di uno stato di transizione.
- Lo stato di transizione è per definizione instabile e quindi transitorio, in alcuni casi è possibile progettare delle molecole molto simili agli stati di transizione desiderati. Queste molecole si adattano meglio all'interno del sito attivo (si ha pertanto la formazione di un numero maggiore di interazioni deboli) del substrato stesso.
- Il concetto degli analoghi dello stato di transizione è importante per progettare nuovi agenti farmaceutici.
- ES: i farmaci molto efficaci contro l'HIV chiamati inibitori delle proteasi sono stati progettati, almeno in parte, come analoghi dello stato di transizione a forte legame

# ANALOGHI DELLO STATO DI TRANSIZIONE

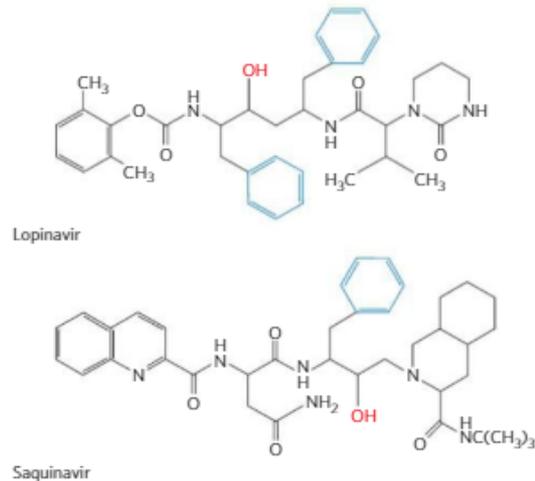
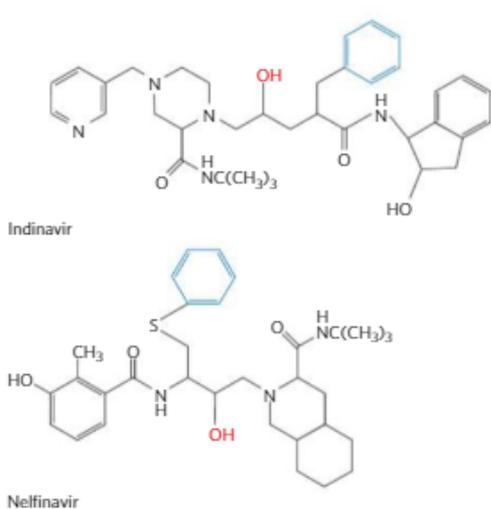
- Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è l'agente patogeno della sindrome da immunodeficienza acquisita (o AIDS).
- Nel 2018, 38 milioni di persone in tutto il mondo affette da HIV, con circa 1,7 milioni di nuove infezioni in quell'anno e circa 770 000 morti.
- L'HIV è un retrovirus.
- Nel ciclo di replicazione virale, la maggior parte dei geni virali viene tradotta sotto forma di grandi poliproteine, che vengono scisse dalla proteasi HIV in singole proteine necessarie per la formazione del virus. Queste proteasi sono il bersaglio di farmaci
- I farmaci fin qui sviluppati come inibitori della proteasi HIV formano complessi non covalenti con l'enzima, ma si legano così fortemente da poter essere considerati inibitori irreversibili. Un legame così forte deriva in parte dal fatto che essi sono analoghi strutturali dello stato di transizione. Sono farmaci molto efficienti.

# ANALOGHI DELLO STATO DI TRANSIZIONE



**Figura 6.28 MECCANISMO D'AZIONE** Meccanismo d'azione della proteasi HIV. Due residui di aspartato del sito attivo (appartenenti a due diverse subunità) agiscono con un meccani-

simo di catalisi acido-base, facilitando l'attacco dell'acqua sul gruppo carbonilico. L'intermedio tetraedrico instabile è colorato in rosa.

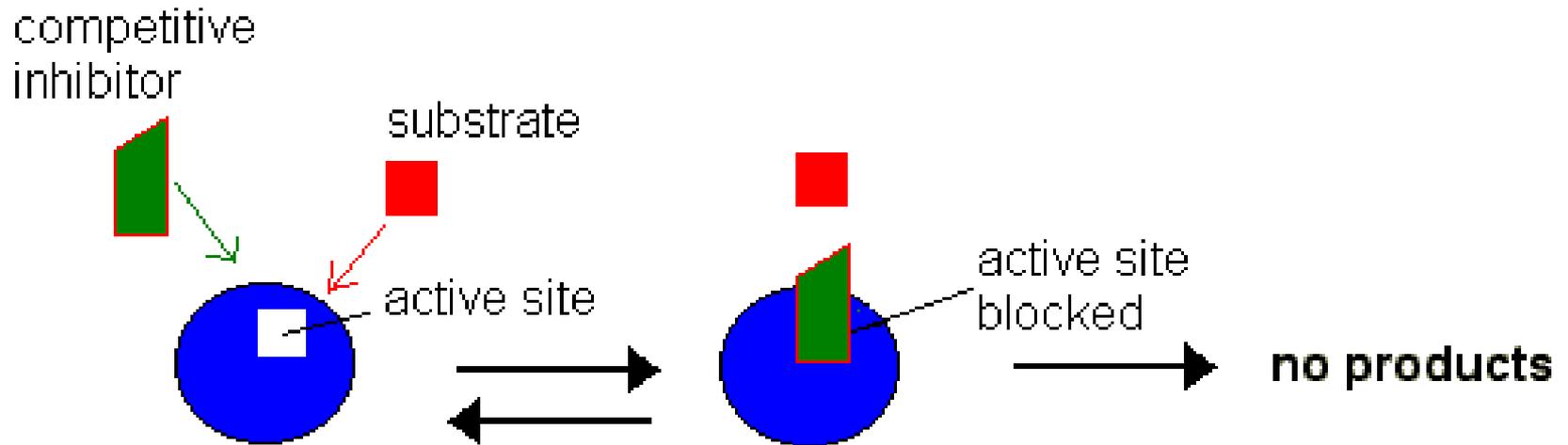


# INIBIZIONE DEGLI ENZIMI

## INIBITORI REVERSIBILI

- a) I competitivo: si lega al sito attivo dell'enzima.
- b) I incompetitivo: si può legare solo al complesso enzima-substrato.
- c) I misto si lega sia al complesso **ES** che a **E** libero. I non competitivo è un tipo particolare di inibitore misto

# INIBITORE COMPETITIVO



Compete con **S** a livello del sito attivo ma non può essere trasformato da **E**. Ha struttura simile a **S**. Rimosso aumentando  $[S]$ .

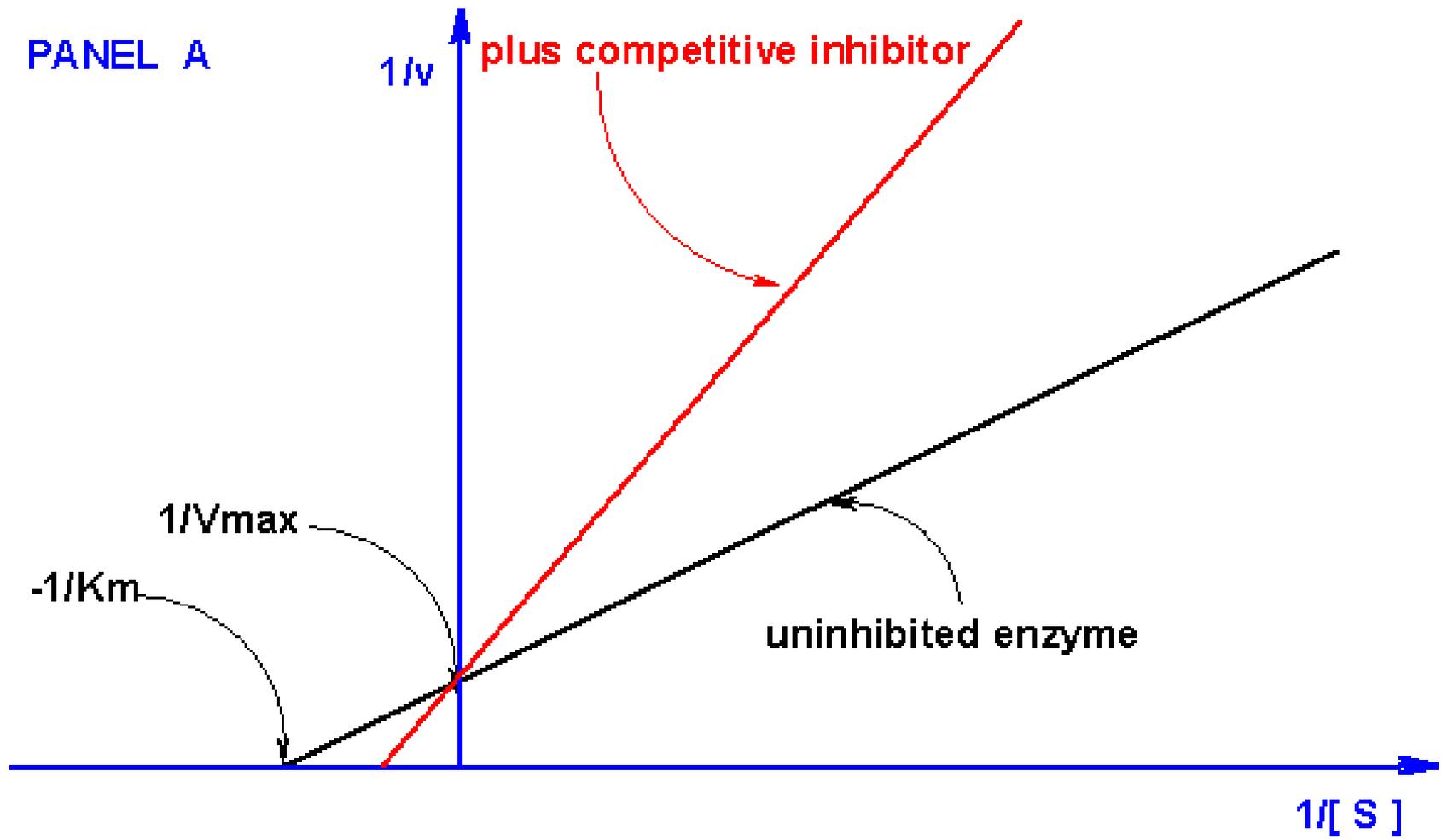
# INIBITORE COMPETITIVO

**EFFETTO SU  $V_{MAX}$**  : aumentando  $[S]$  si può annullare l'effetto di I. A una concentrazione di S sufficientemente elevata si raggiunge ugualmente  $V_{MAX}$  che si ha in assenza di inibitore.

**EFFETTO SU  $K_m$** : l'inibitore competitivo fa aumentare  $K_m$ , chiamata in questo caso apparente, che **aumenta** in presenza di I. È necessaria una quantità di S maggiore per raggiungere  $\frac{1}{2} V_{MAX}$ .

Principi analoghi regolano l'inibizione da prodotto.

PANEL A

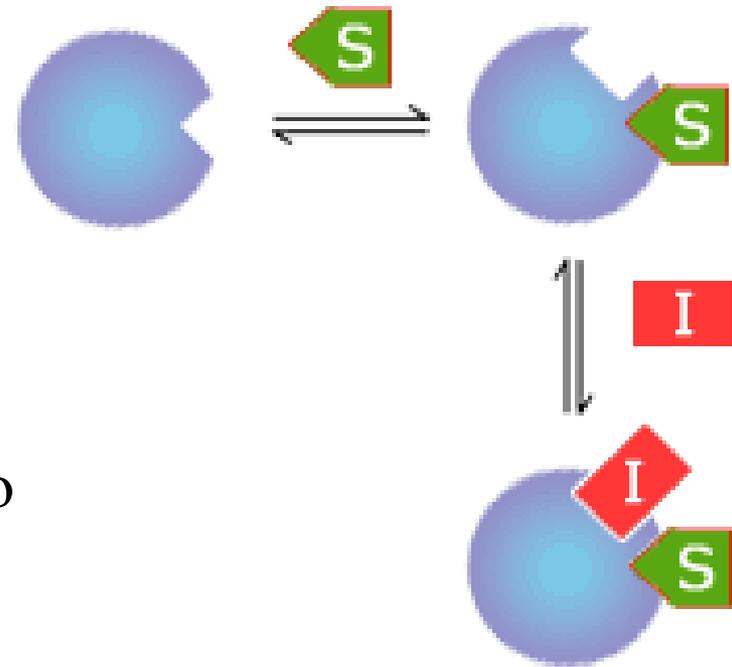


# INIBITORE INCOMPETITIVO

## Enzimi a due o più substrati.

Un inibitore incompetitivo può legarsi **unicamente al complesso enzima-substrato (ES)**.

Nel modello, il legame del substrato all'enzima libero induce una *modificazione conformazionale* che rende accessibile il sito per l'inibitore.

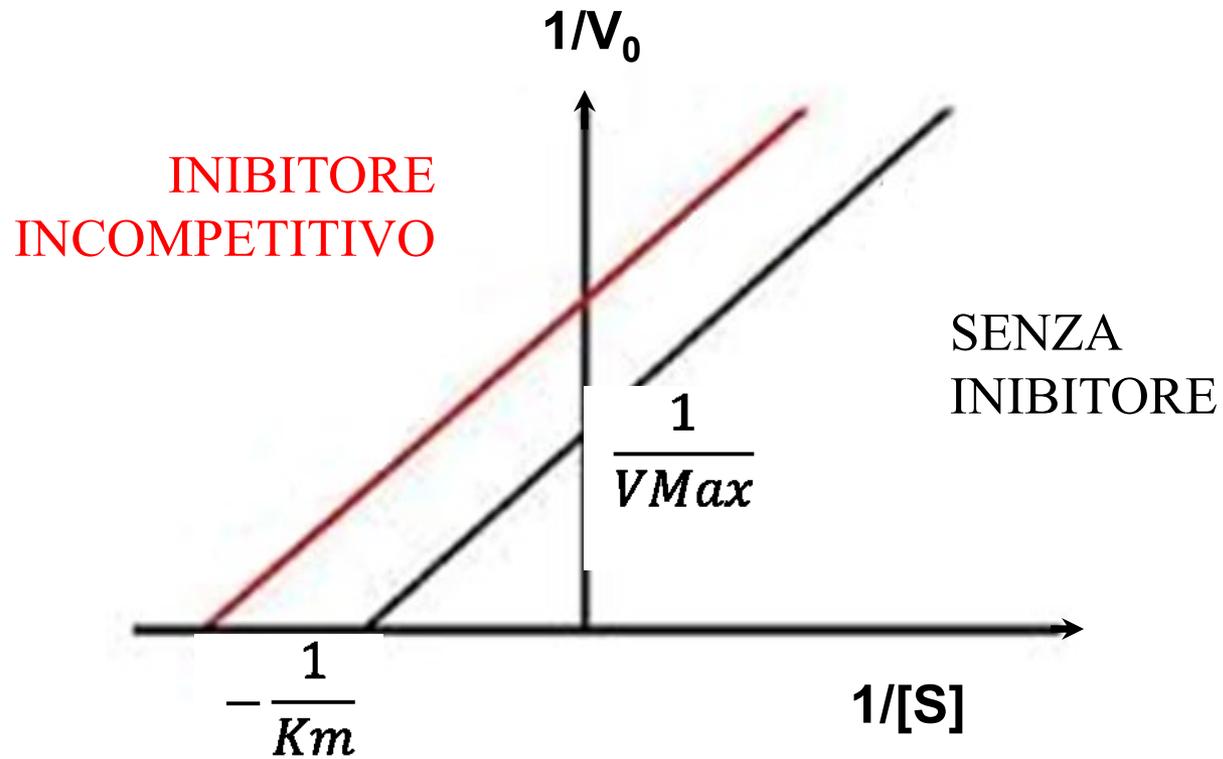


# INIBITORE INCOMPETITIVO

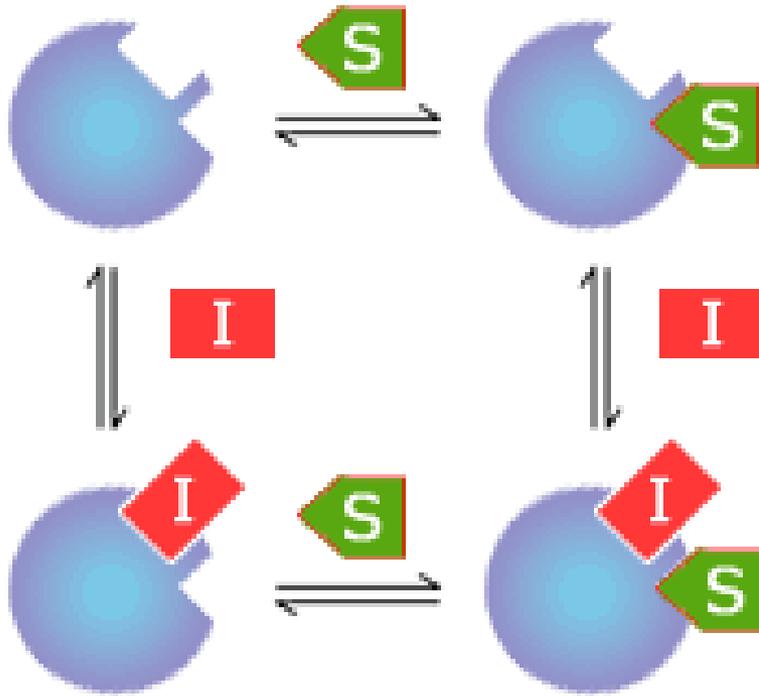
**EFFETTO SU  $V_{MAX}$** : la  $V_{MAX}$  raggiunta è inferiore a quella dell'enzima non inibito. L'inibizione aumenta con l'aumentare di [S].

**EFFETTO SU  $K_m$** : A differenza dell'inibizione competitiva, la  $K_m$  apparente **diminuisce** rispetto a  $K_m$  senza **I**. L'inibizione incompetitiva è *più marcata ad alte concentrazioni di substrato*: aumentando la [S], infatti, aumenta la [ES], la forma alla quale si lega l'inibitore.

# INIBITORE INCOMPETITIVO



# INIBITORE MISTO



## Enzimi a due o più substrati

Un inibitore misto può legarsi **sia all'enzima libero, sia al complesso enzima-substrato**, e influenza *entrambe* le costanti cinetiche.

L'effetto di un inibitore misto sulle costanti cinetiche è diverso, a seconda dell'affinità delle due specie enzimatiche, **E** ed **ES**, per **I**.  $V_{MAX}$  è influenzata perché l'inibitore inattiva una parte delle molecole di **E**, diminuendo la  $[E]$  disponibile, da cui dipende  $V_{MAX}$ .  $K_m$  può aumentare o diminuire, in base a quale forma dell'enzima, **E** o **ES**, viene legata meglio dall'inibitore

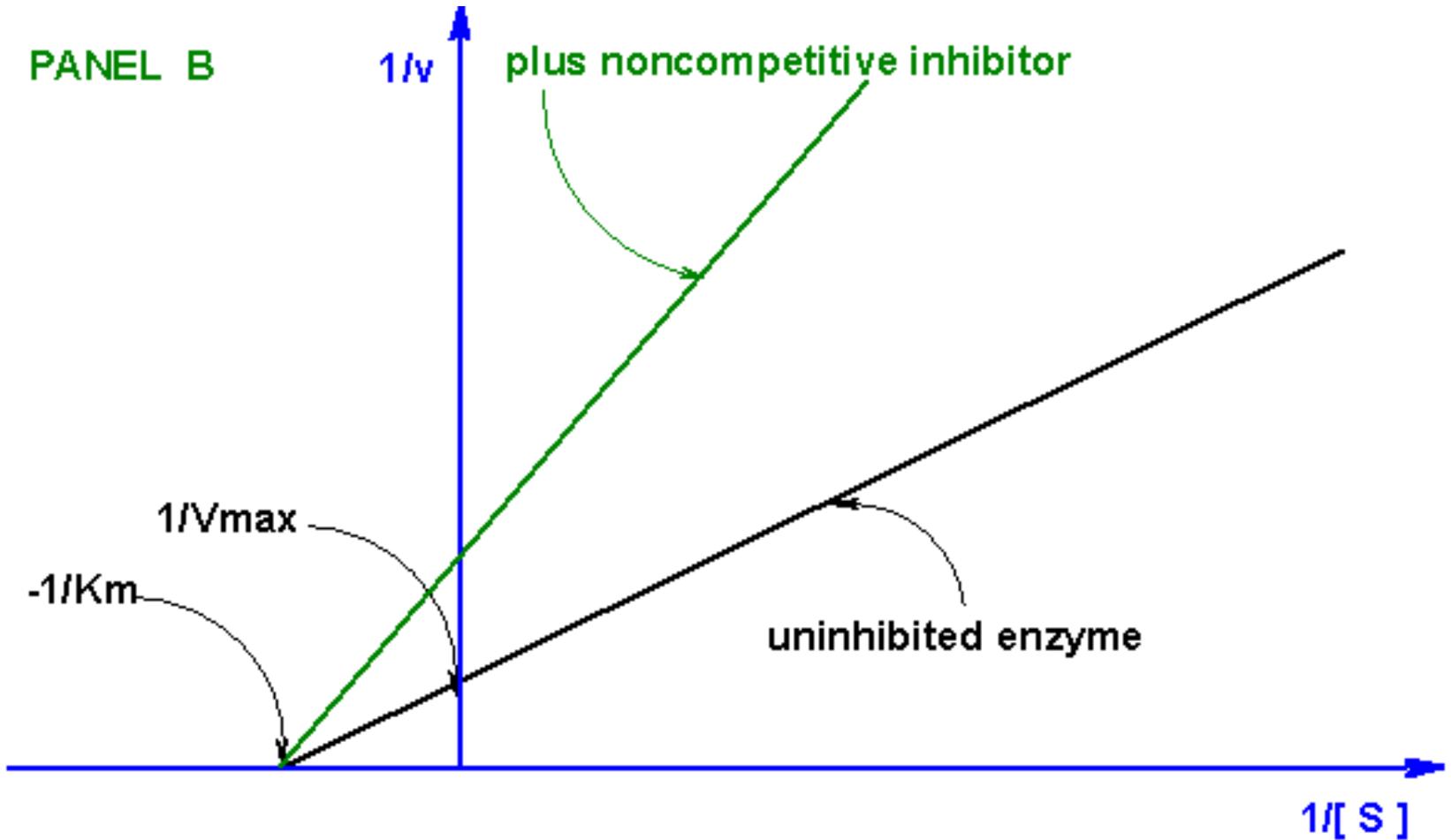
**Se l'affinità delle due specie enzimatiche (E ed ES) per l'inibitore è la stessa, si ha un caso particolare di inibizione mista, che viene definita NON COMPETITIVA**

## **INIBITORE MISTO NON COMPETITIVO**

**EFFETTO SU  $V_{MAX}$**  : l'inibizione non competitiva non può essere annullata aumentando [S]. La  $V_{MAX}$  raggiunta è inferiore a quella dell'enzima non inibito. L'inibizione aumenta con l'aumentare di [S].

**EFFETTO SU  $K_m$** : I non competitivo non interferisce con il legame di S ad E. Di conseguenza il valore di  $K_m$  rimane invariato.

# INIBITORE MISTO NON COMPETITIVO



# REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

Fondamentale affinché un organismo possa coordinare i suoi numerosi processi metabolici

1. [S]: molti E rispondono a [S] in quanto questa ha valori vicini a  $K_m$ . Per questo motivo, un aumento di [S] fa aumentare la velocità della reazione, che procedendo porta ad una diminuzione di [S].
2. Modulatori allosterici
3. Modificazioni covalenti
4. Velocità di sintesi degli enzimi (regolazione lenta, a carico di ormoni)
5. Proteine regolatrici che si legano a E
6. Scissione proteolitica (irreversibile)

# REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

Nel metabolismo cellulare, gruppi di enzimi lavorano in sistemi sequenziali per portare avanti un processo metabolico. In questi sistemi il prodotto della reazione catalizzata dal primo **E** diventa il substrato del secondo **E**, e così via. I sistemi multi-enzimatici sono costituiti da 15 o più enzimi.

La maggior parte degli enzimi di una via metabolica segue la cinetica di Michaelis-Menten. Ogni sistema multi-enzimatico ha uno o più **ENZIMI REGOLATORI**. Hanno un grosso effetto sulla velocità di tutta la via e rispondono a segnali molecolari. Questa modulazione della velocità permette alla cellula di adeguarsi alle richieste di energia e di metaboliti. Di solito l'**ENZIMA REGOLATORE** è il primo enzima della sequenza di reazioni.

1. **ENZIMI REGOLATORI: ENZIMI ALLOSTERICI**
2. **ENZIMI REGOLATI PER MODIFICAZIONE COVALENTE REVERSIBILE**

# ENZIMI ALLOSTERICI

- più grandi e più complessi (multimerici)
- regolati non covalentemente in modo reversibile
- hanno proprietà diverse dagli altri **E**
- oltre al sito attivo, uno o più siti regolatori (allosterici) a cui si lega il modulatore (o effettore, o ligando)
- i siti regolatori sono specifici per il modulatore

Il legame di un modulatore allosterico causa una modificazione conformazionale dell'enzima, e di conseguenza cambia anche l'affinità di **E** per il substrato. Ci sono modulatori + e modulatori –

- 1) effettori inibitori (negativi): prodotto, si parla di inibizione retroattiva.
- 2) effettori stimolatori (positivi): non il prodotto, ma un altro metabolita, spesso lo stesso **S**.

# ENZIMI ALLOSTERICI

***Effettori omotropici:*** il substrato è esso stesso un modulatore, di tipo positivo. Proteine multimeriche. Il sito attivo e il sito regolatore coincidono. I siti di legame funzionano in modo cooperativo. Curva cinetica sigmoide. (similitudini con legame di O<sub>2</sub> ad Hb).

***Effettori eterotropici:*** il modulatore è diverso dal substrato.

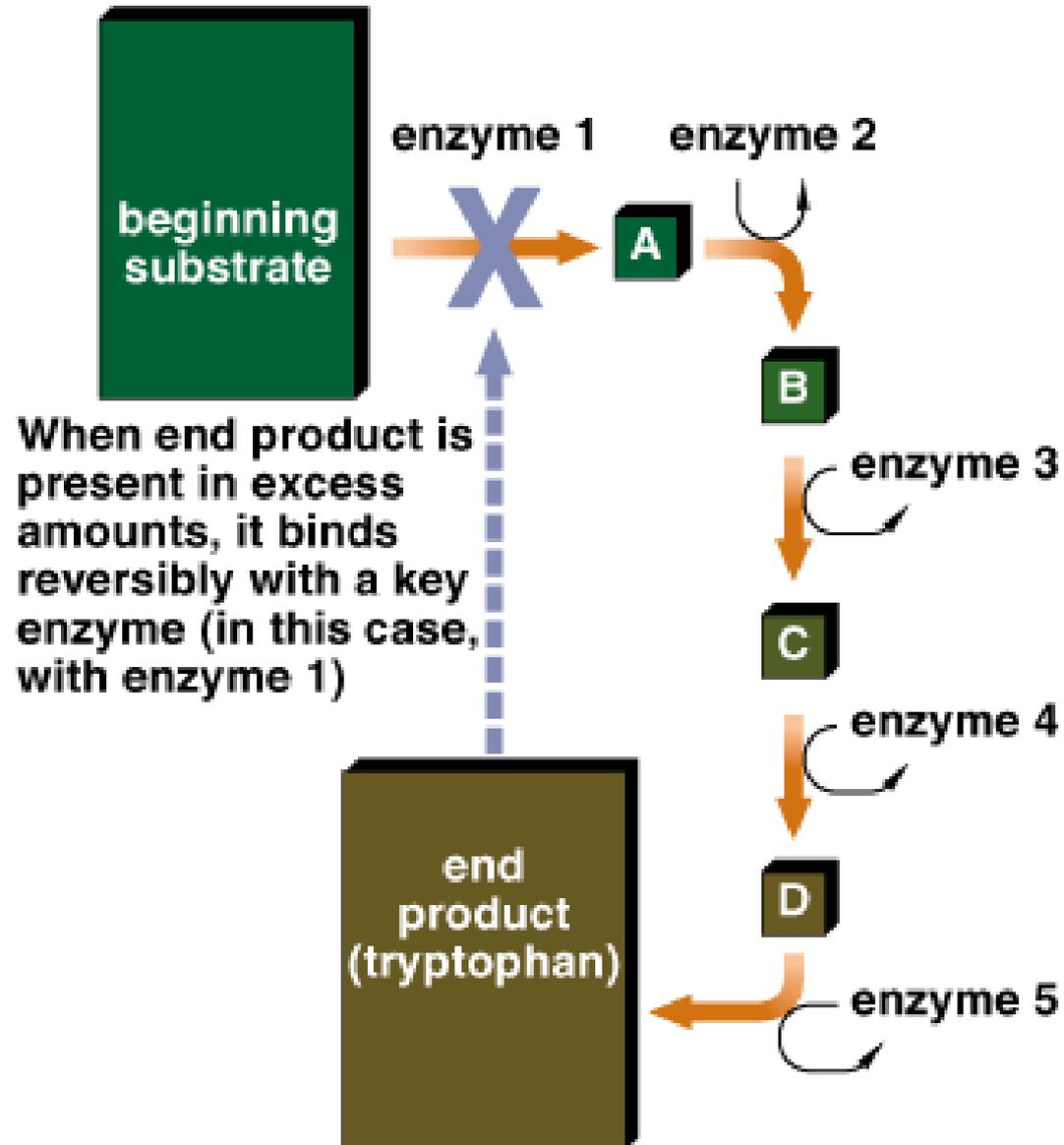
Un esempio è l'inibizione retroattiva.

Difficile generalizzare sull'andamento della curva di saturazione.

Queste interazioni sono mediate da effetti cooperativi fra le subunità che costituiscono l'enzima.

NON confondere i modulatori allosterici con gli inibitori incompetitivi e misti. I non mediano necessariamente l'interconversione tra forme attive e inattive di E, e gli effetti sulla cinetica enzimatica sono diversi.

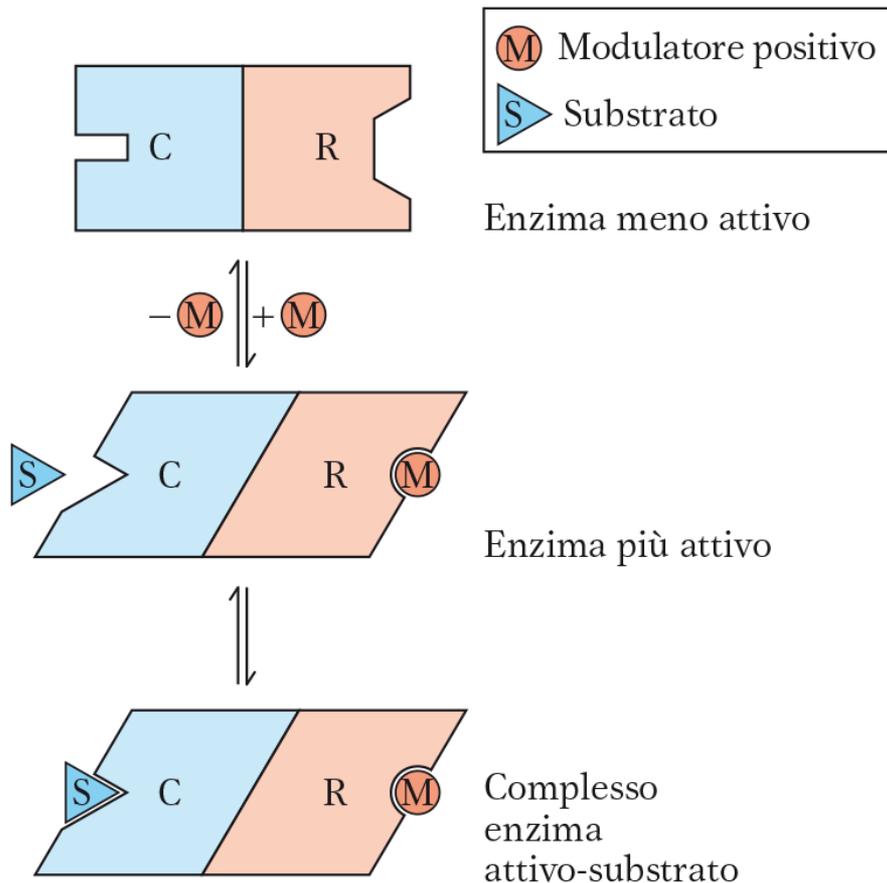
# INIBIZIONE RETROATTIVA



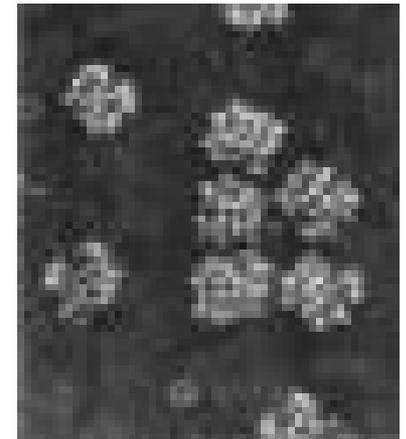
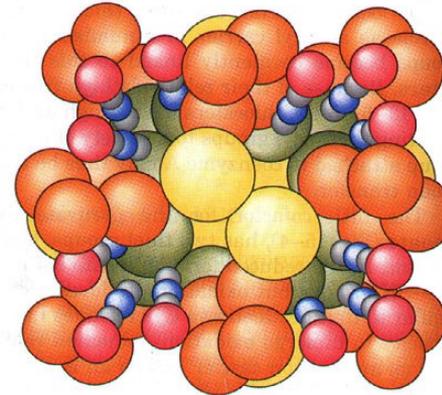
E allosterici hanno più subunità polipeptidiche.

Esiste una forma di comunicazione fra i siti regolatori e catalitici.

Subiscono modificazioni conformazionali in seguito al legame con il modulatore, passando da uno stato relativamente inattivo, ad uno più attivo.

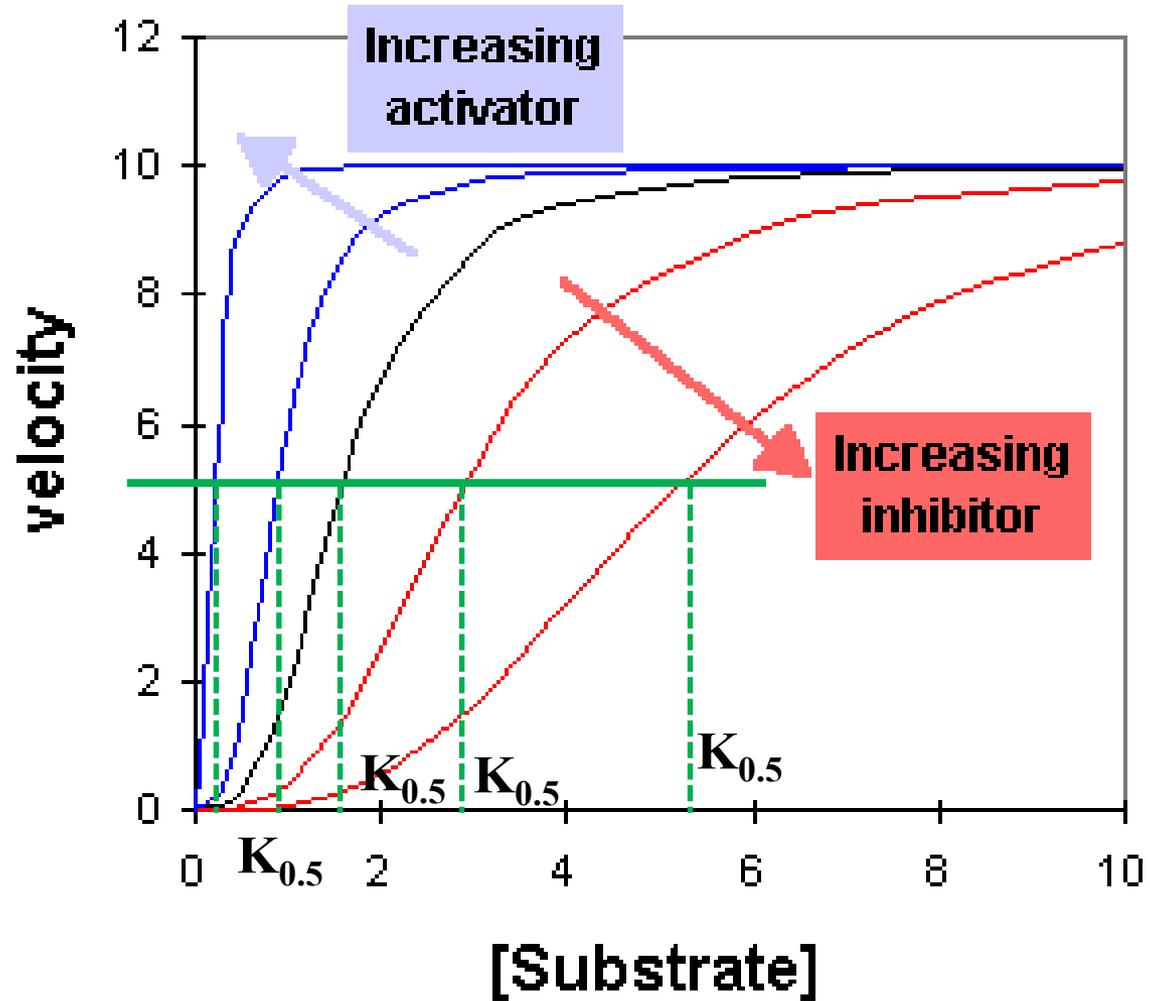


## Piruvato deidrogenasi



# ENZIMI ALLOSTERICI NON SEGUONO L'EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

$K_{0.5}$  o  $[S]_{0.5}$   
Cinetica sigmoide =  
interazioni cooperative



La linea centrale nera nel grafico ha un andamento sigmoide in assenza di effettori. Un attivatore aumenta la velocità della reazione, mentre un inibitore diminuisce la velocità della reazione per una data concentrazione di substrato. Guardando la forma delle curve, l'inibitore accentua la forma sigmoide, mentre l'attivatore ha l'effetto opposto. Alla più alta concentrazione di attivatore la curva passa da sigmoide a iperbolica.

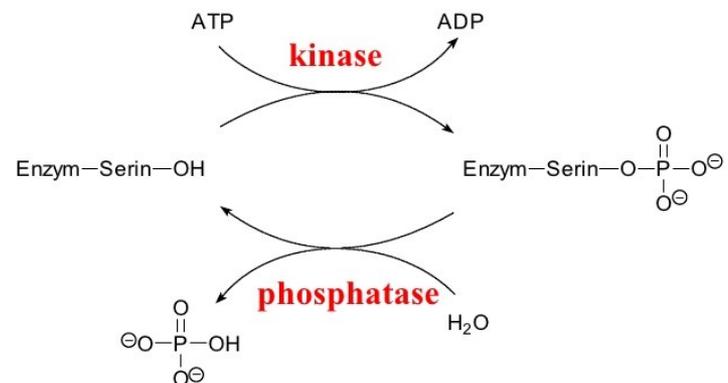
# ENZIMI REGOLATI DA MODIFICAZIONI COVALENTI REVERSIBILI

La modulazione avviene attraverso l'interconversione tra forme inattive e attive della molecola enzimatica per mezzo di modificazioni covalenti. La fosforilazione è il tipo più importante di modificazione regolatoria. La fosforilazione è mediata da segnali ormonali. Sono stati descritti più di 500 diverse modificazioni covalenti. I residui di Ser, Thr e Tyr sono i siti fosforilabili nelle proteine, sono localizzati in motivi strutturali comuni, chiamati sequenze consenso, che sono poi riconosciuti da specifiche proteina chinasi.

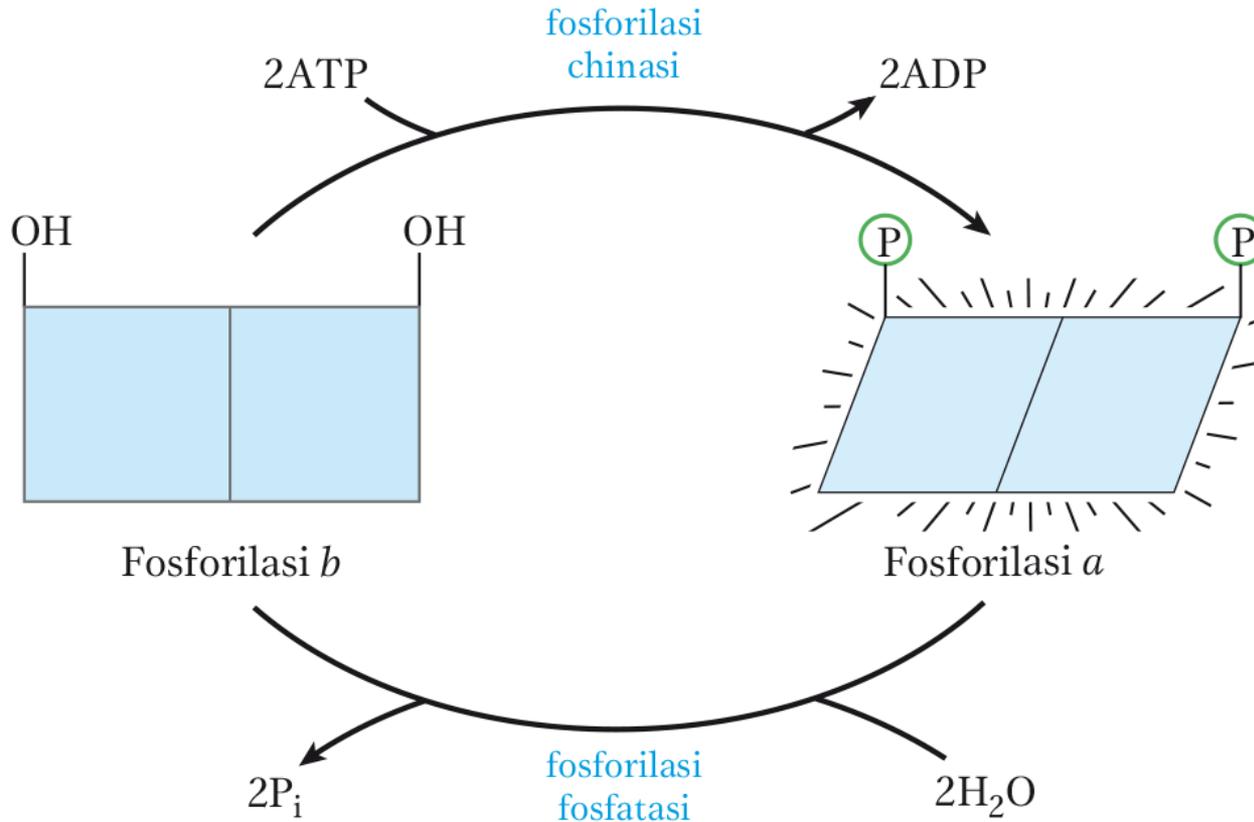
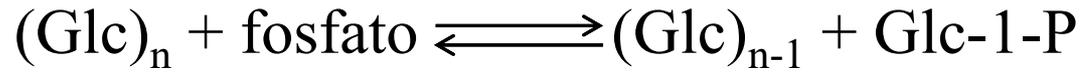
**proteina chinasi:** catalizza la fosforilazione (aggiunta di un gruppo fosfato legato con legame estereo)

**proteina fosfatasi:** catalizza la rimozione di un gruppo fosfato legato con legame estereo

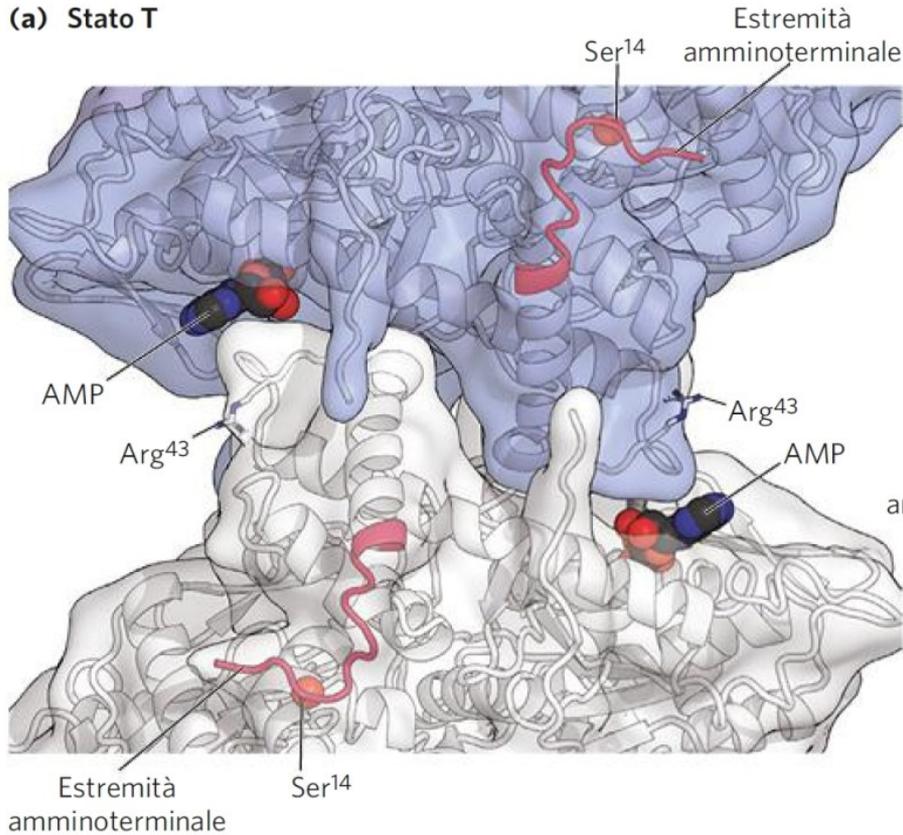
## Phosphorylation and dephosphorylation of enzyme alters its activity



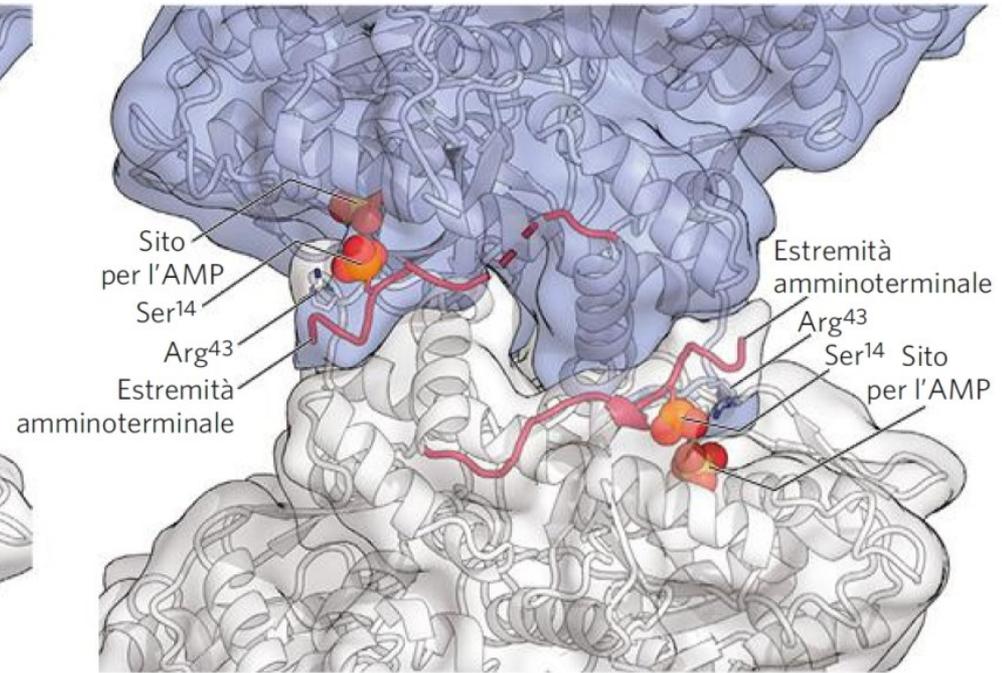
# GLICOGENO FOSFORILASI



(a) Stato T



(b) Stato R



**Figura 6.40** La modifica conformazionale determinata dalla fosforilazione della glicogeno fosforilasi di muscolo murino. I venti residui amminoacidici all'estremità amminotermine di ciascuna subunità sono evidenziati in rosso, compreso il residuo fosforilato nella fosforilasi a ( $\text{Ser}^{14}$ ). Questo segmento

peptidico interagisce con diverse parti della proteina, a seconda dello stato di fosforilazione di  $\text{Ser}^{14}$  che stabilizza le diverse conformazioni tipiche della fosforilasi a e della fosforilasi b. [Fonti: (a) PDB ID 8GPB; (b) PDB ID 1GPA; Barford, D. et al., *J. Mol. Biol.* **218**, 233 (1991).]

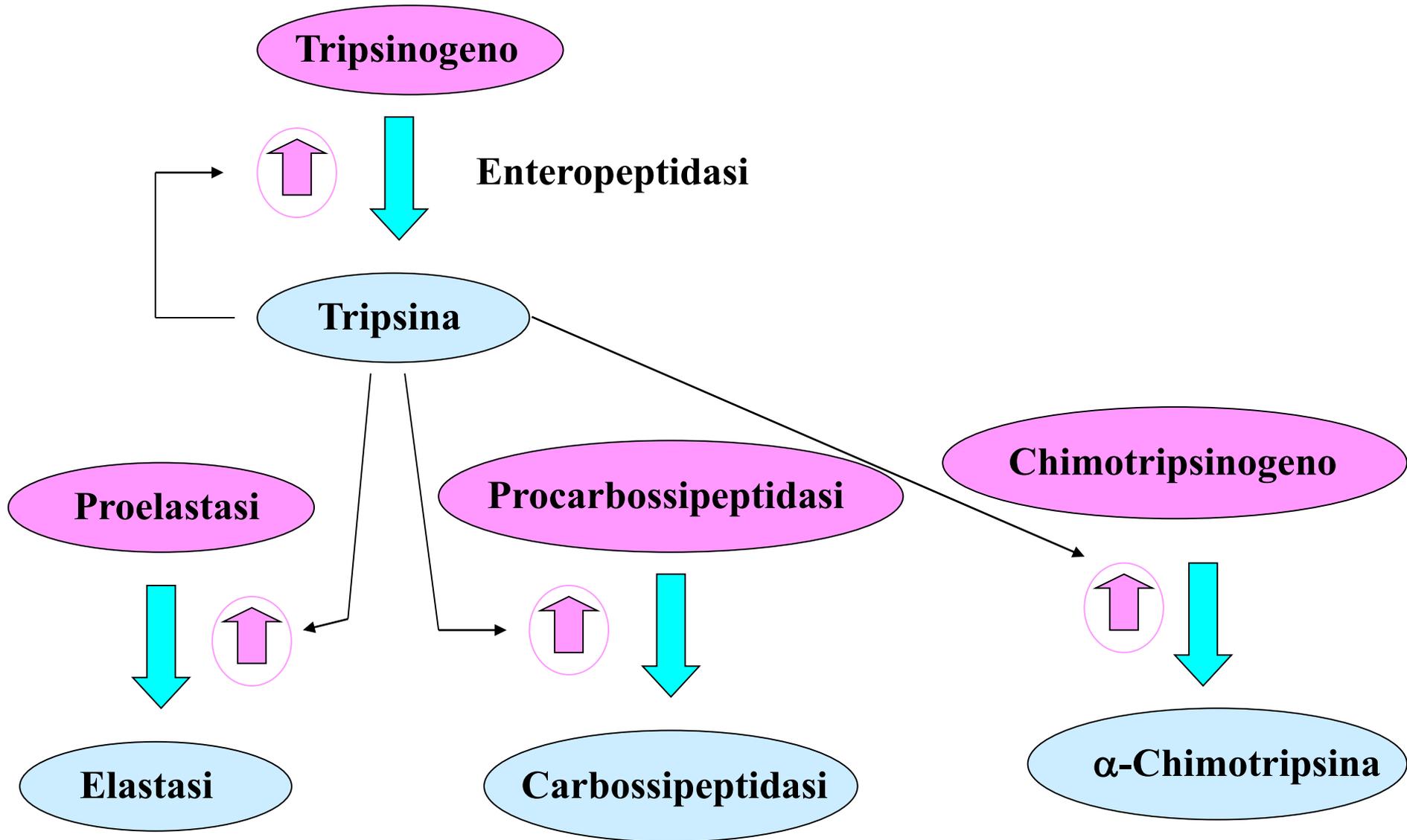
# ATTIVAZIONE MEDIANTE SCISSIONE PROTEOLITICA

Gli ZIMOGENI sono precursori inattivi degli enzimi

- Enzimi della digestione (prodotti dal pancreas)
- Enzimi della coagulazione

Zimogeno	Forma attiva dell'enzima
Pepsinogeno	Pepsina
Tripsinogeno	Tripsina
Protrombina	Trombina

# Attivazione degli zimogeni coinvolti nella digestione nell'intestino tenue



# ATTIVAZIONE MEDIANTE SCISSIONE PROTEOLITICA

Questo tipo di attivazione è irreversibile. Ci sono altri meccanismi per inattivare questi enzimi

Le proteasi sono inattivate da proteine:

es: inibitore pancreatico della tripsina si lega alla tripsina e ne inibisce l'attività.

## **LINK AL SITO PER VIDEO SUGLI ENZIMI**

<https://www.youtube.com/watch?v=yk14dOOvwMk>