

ENZIMI

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

catalizzatori biologici

elevata specificità per il substrato

NO sottoprodotti

blande temperature e pH

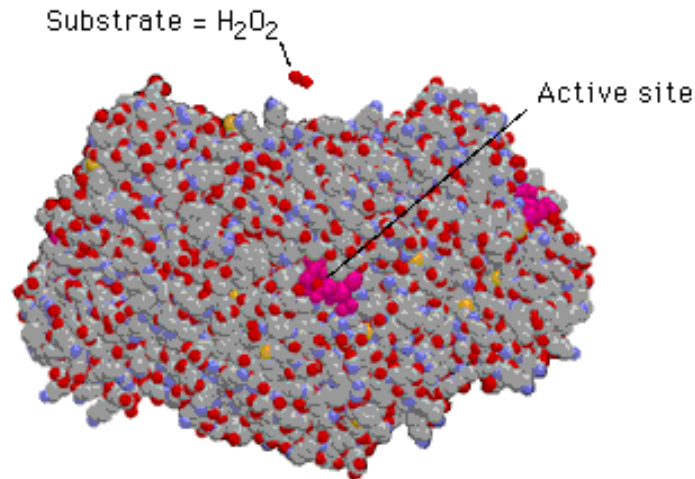
$12000 < MW < 1000000$

STRUTTURA

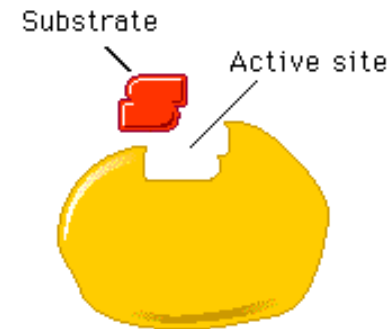
* solo catena peptidica

* cofattori: 1) ioni inorganici

2) coenzimi (trasportatori reversibili di gruppi funzionali)



Molecular model
of catalase



Schematic model
of an enzyme

Coenzimi più comuni

Coenzimi	Reazione mediata
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

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

CLASSIFICAZIONE INTERNAZIONALE DEGLI ENZIMI

ENZYME NOMENCLATURE COMMISSION

6 classi ciascuna divisa in sottoclassi

Denominazione costituita da tre parti: nome del substrato, nome del coenzima, nome della reazione catalizzata, spesso con suffisso “asi”.

ES: lattico-NAD⁺-deidrogenasi

EC 1.1.1.27

1 classe principale

1 sottoclasse

1 sotto-sottoclasse

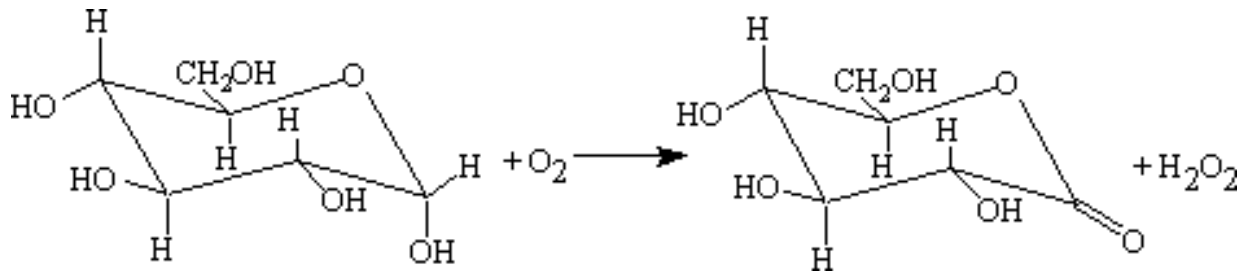
27 numero di serie

CLASSIFICAZIONE INTERNAZIONALE DEGLI ENZIMI

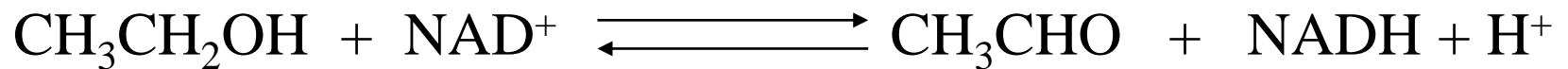
N.	Classe	Tipo di reazione catalizzata
1	Ossidoreduttasi	Trasferimento di elettroni (ioni H⁺ o atomi di H)
2	Transferasi	Trasferimento di gruppi funzionali
3	Idrolasi	Idrolisi (trasferimento di gruppi funzionali all'acqua)
4	Liasi	Addizione di gruppi a doppi legami o viceversa
5	Isomerasi	Trasferimento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

1. Ossidoreduttasi

Catalizzano reazioni di ossido-riduzione. Possono trasferire elettroni ad un coenzima (NAD^+ , NADP^+ , FAD) oppure a una molecola di O_2 .



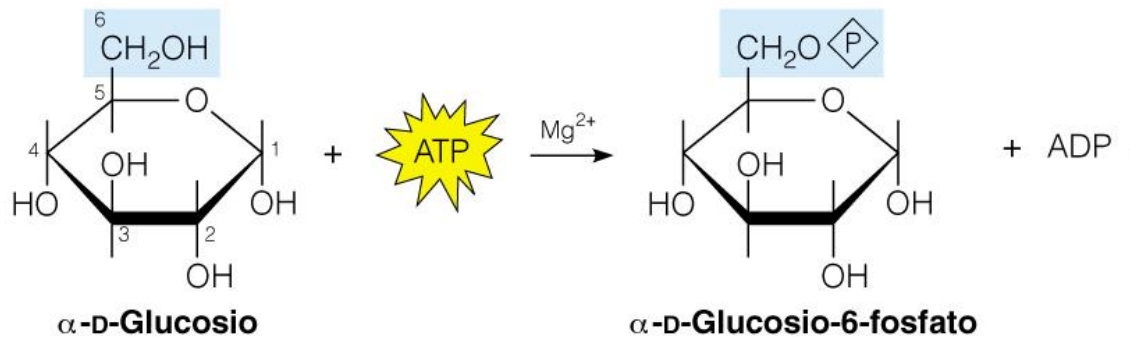
Glucosio ossigenasi



Alcol deidrogenasi

2. Transferasi

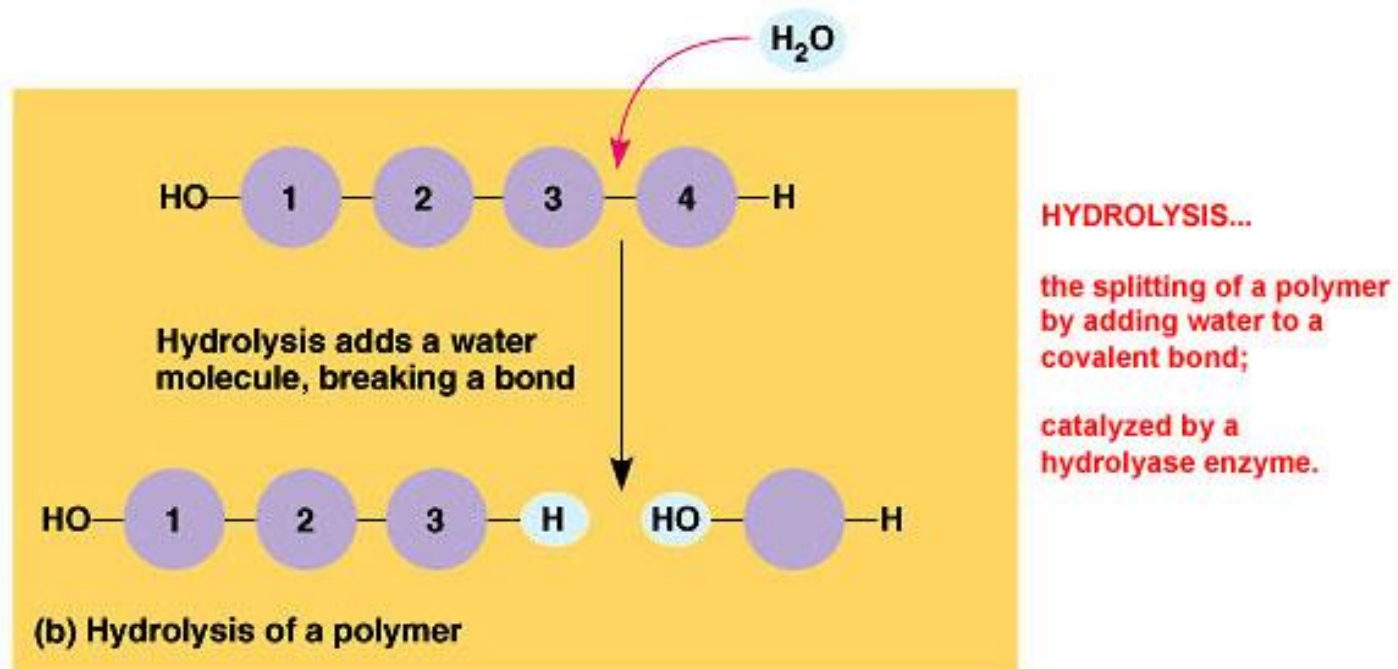
Questi enzimi trasferiscono gruppi funzionali tra donatori e accettori. I gruppi più comuni trasferiti sono: amminico (ammino transferasi), acile, fosfato, con un atomo di carbonio, e glicosidico (glicosil transferasi). Le chinasi sono enzimi che trasferiscono gruppi fosfato.



Esochinasi e glucochinasi

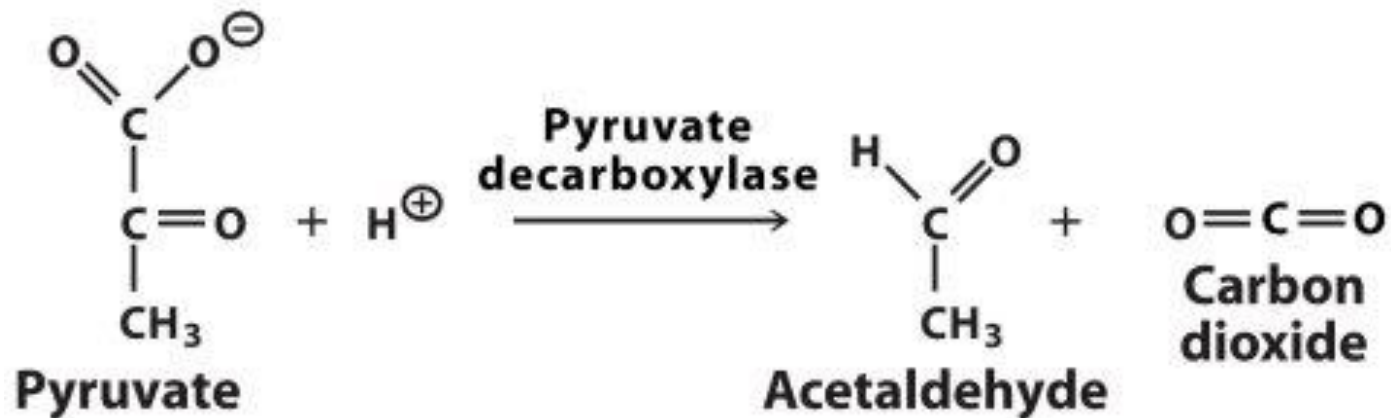
3. Idrolasi

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.



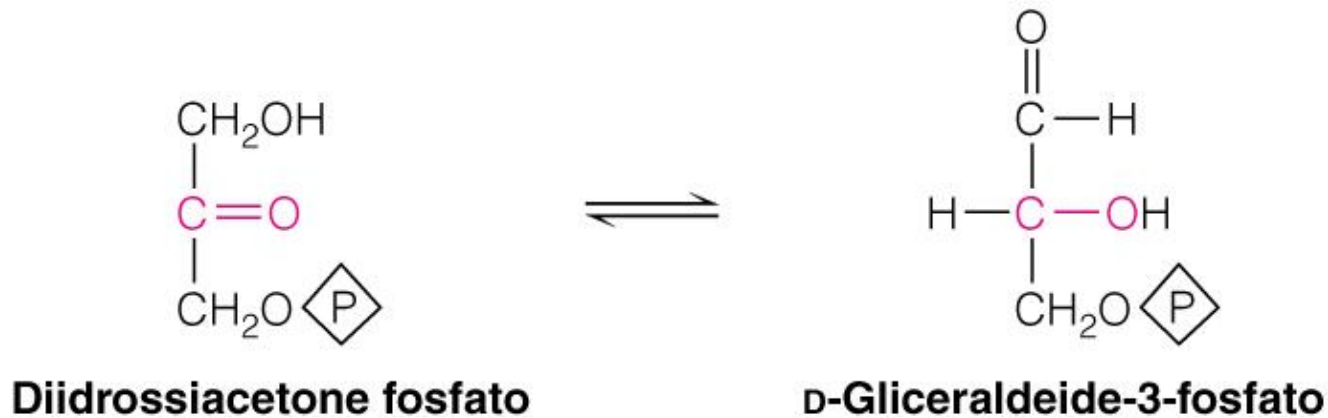
4. Liasi

Le liasi formano doppi legami rimuovendo gruppi [acqua (deidratasi), ammoniacca, 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

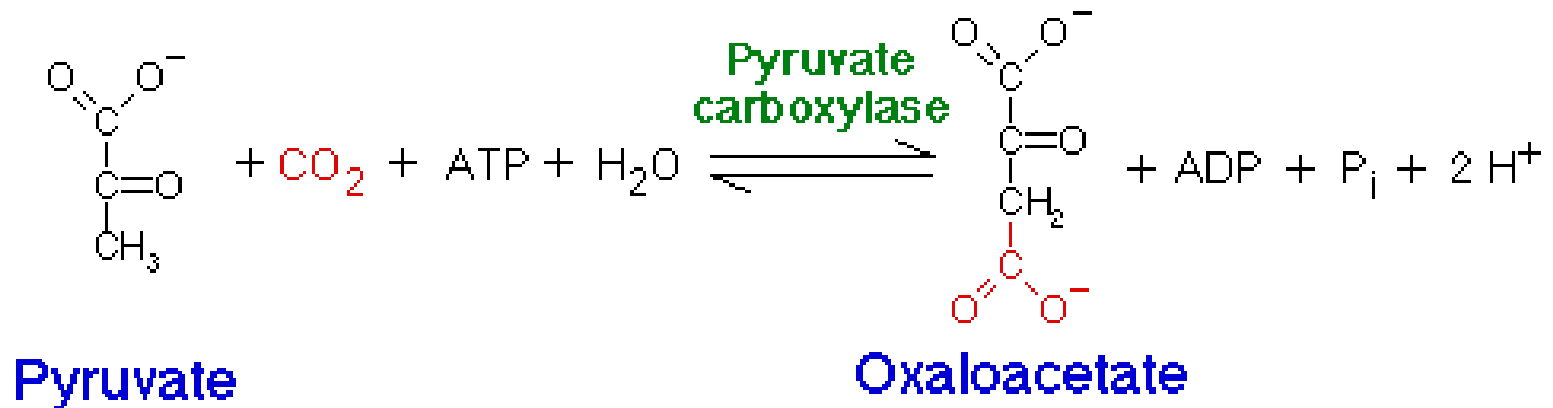
Gruppo eterogeneo di enzimi che catalizzano reazioni di diverso tipo. Es: interconversioni cis-trans e aldoso-chetoso.



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).



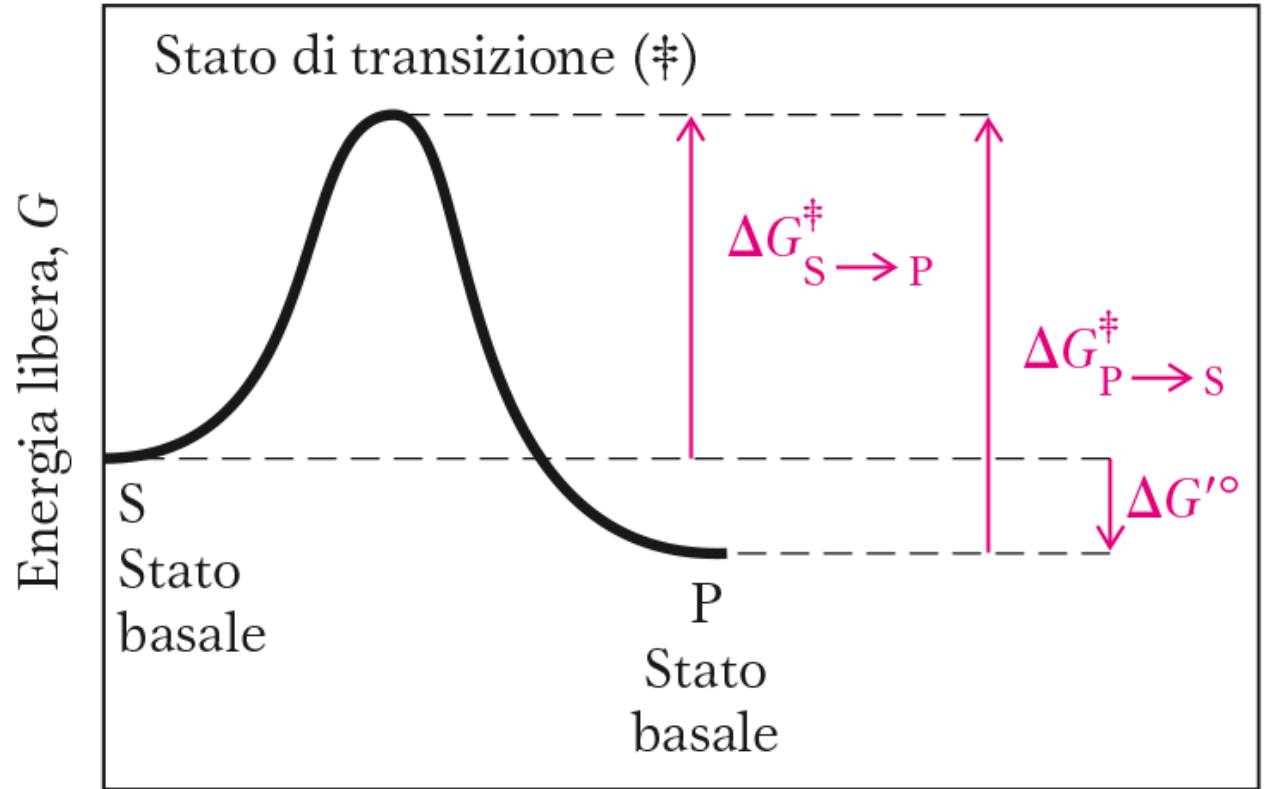
Gli ENZIMI sono CATALIZZATORI BIOLOGICI

Aumentano la velocità di una reazione chimica

Sono prodotti da organismi viventi

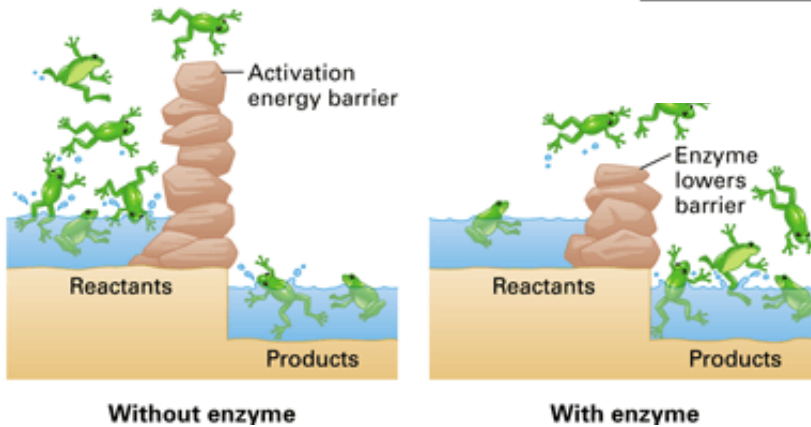
Differenze con i catalizzatori non biologici

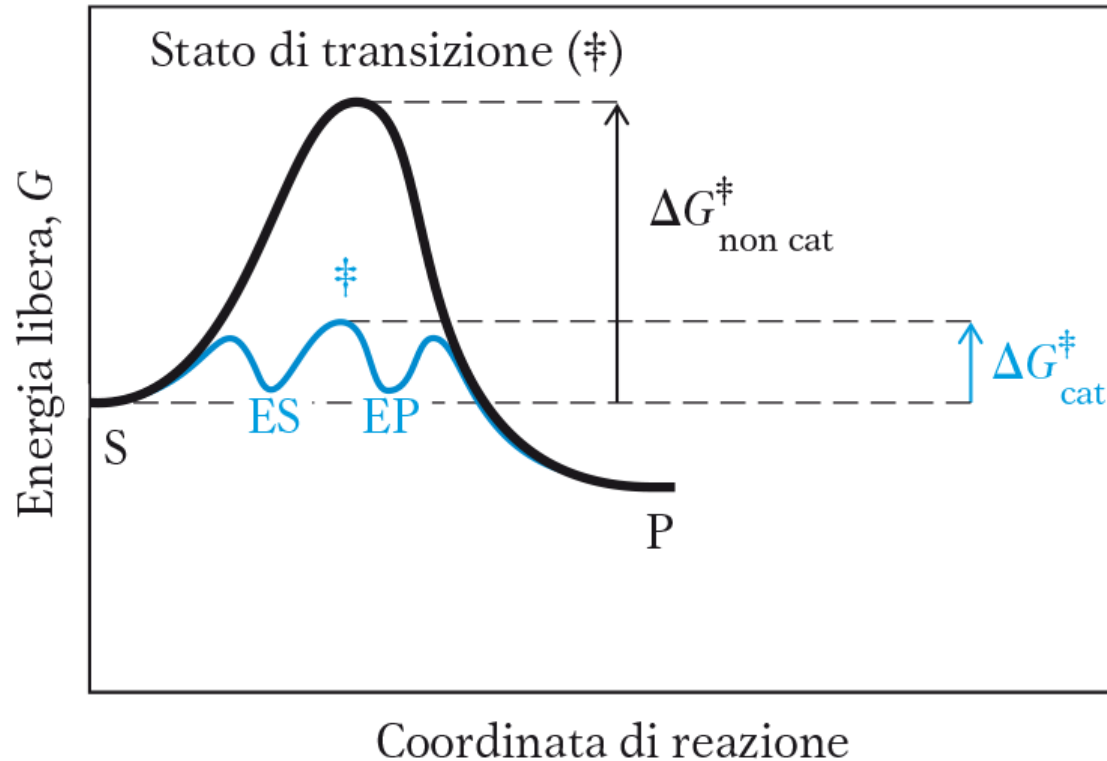
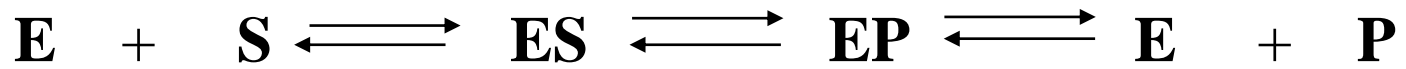
- 1) hanno maggior potere catalitico
- 2) sono altamente specifici (stereospecificità, legami specifici, specificità di reazione, specificità di gruppo)
- 3) attività strettamente regolata



Coordinata di reazione

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





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 ΔG_{uncat} and ΔG_{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.

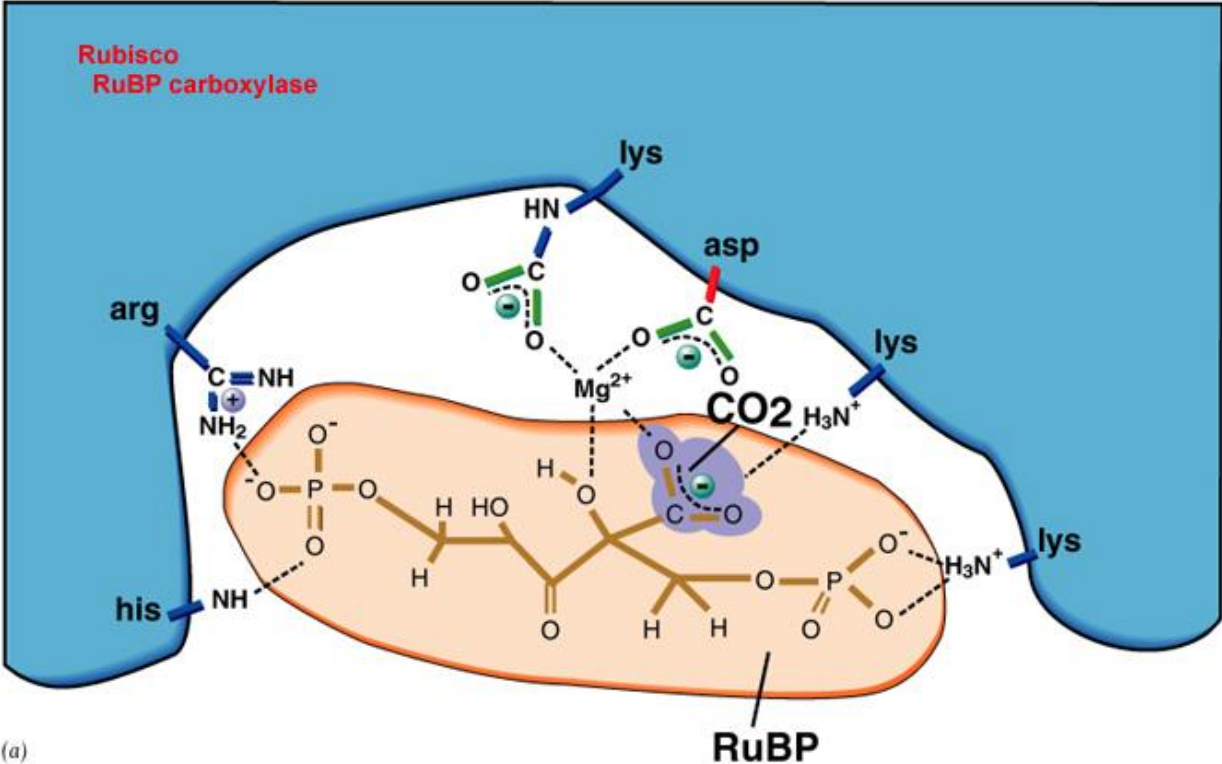
IL POTERE CATALITICO DEGLI ENZIMI

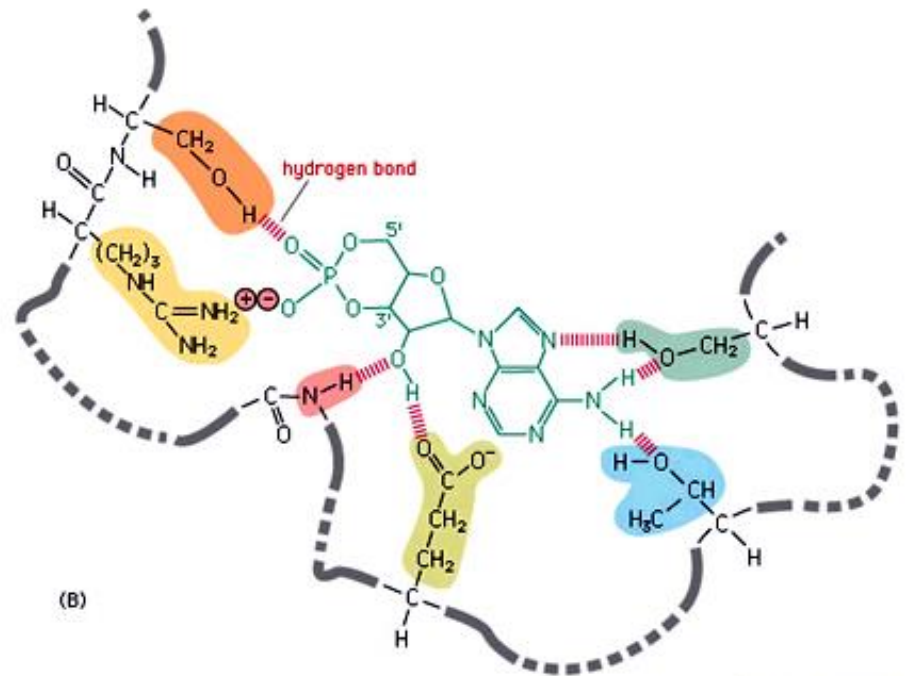
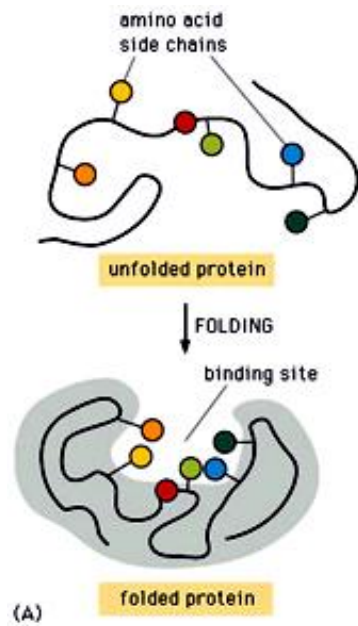
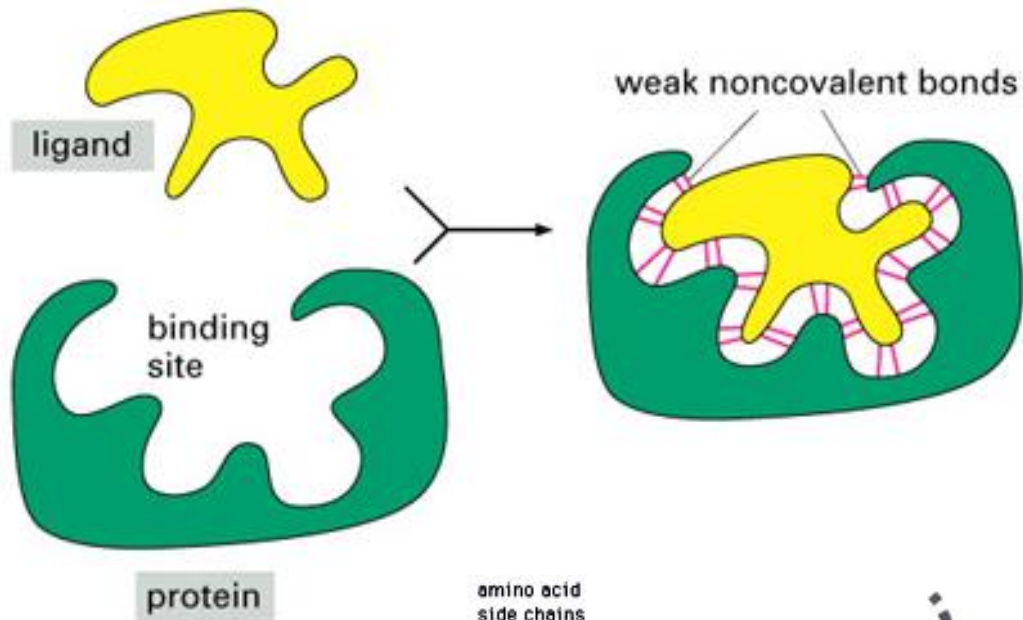
Aumentano la VELOCITA' di una reazione anche di 10^{17} volte

Come si può spiegare questo aumento di V?

- a) **E** favoriscono l'incontro dei substrati mediante legame al sito attivo
- b) **E** orienta i substrati in posizioni favorevoli alla reazione
- c) **E** possono agire da acidi o da basi durante la catalisi. Alcune catene laterali di aa sono acidi o basi, possono rilasciare o accettare protoni, cedendoli o prendendoli da S, che così diventa più suscettibile alla reazione.

COMPLESSO ES





Modello dell'adattamento indotto

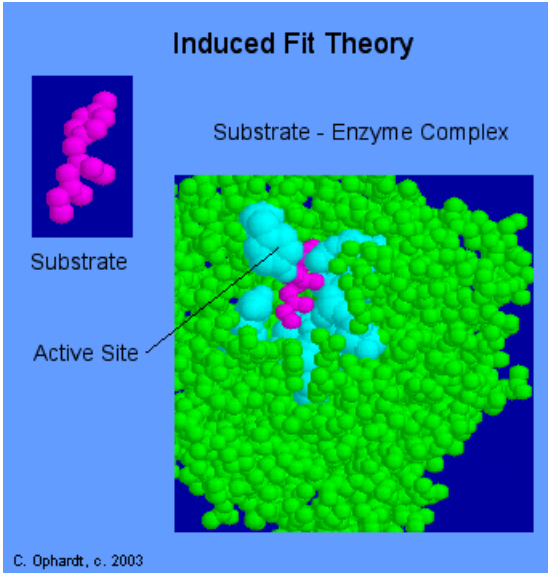
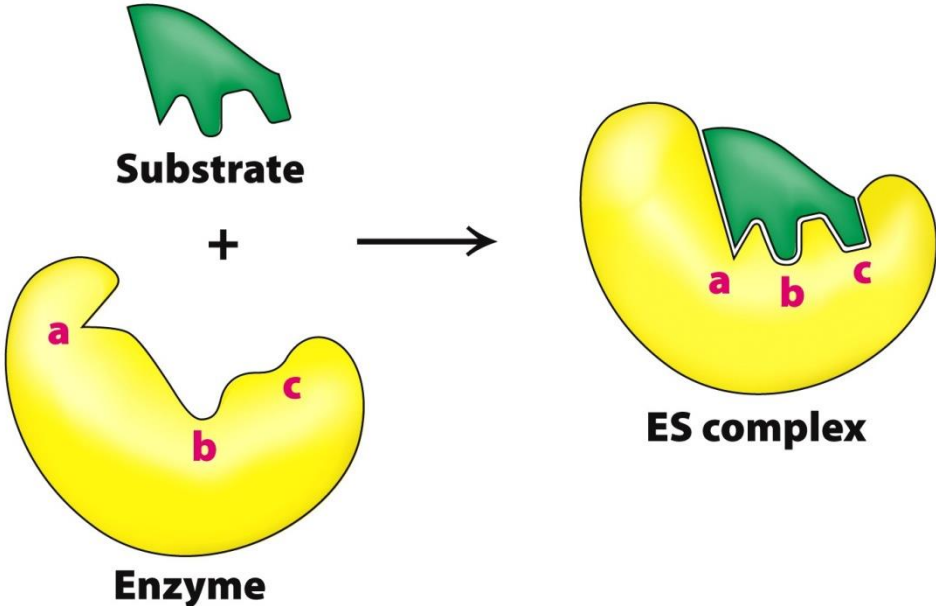
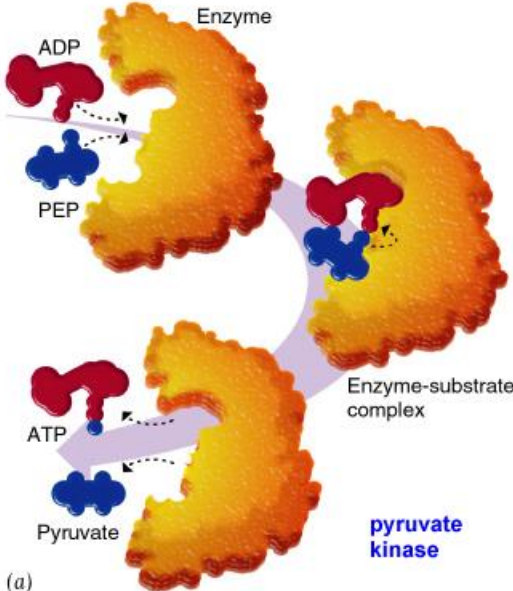
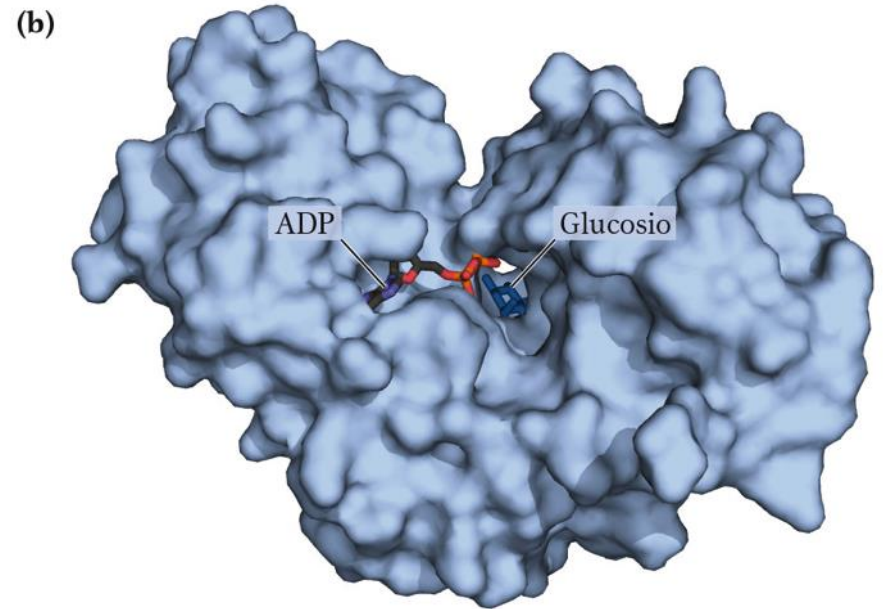
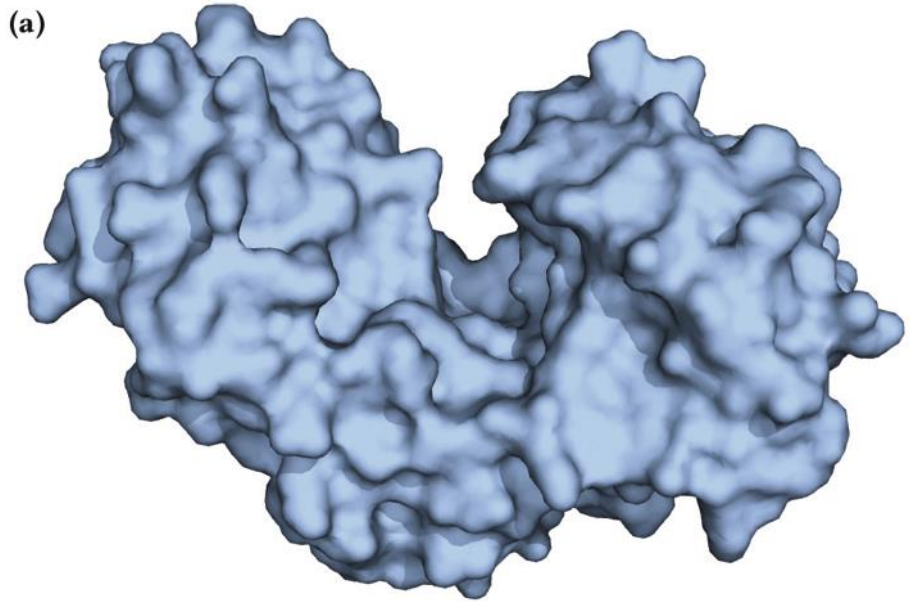


Figure 8.9
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company



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

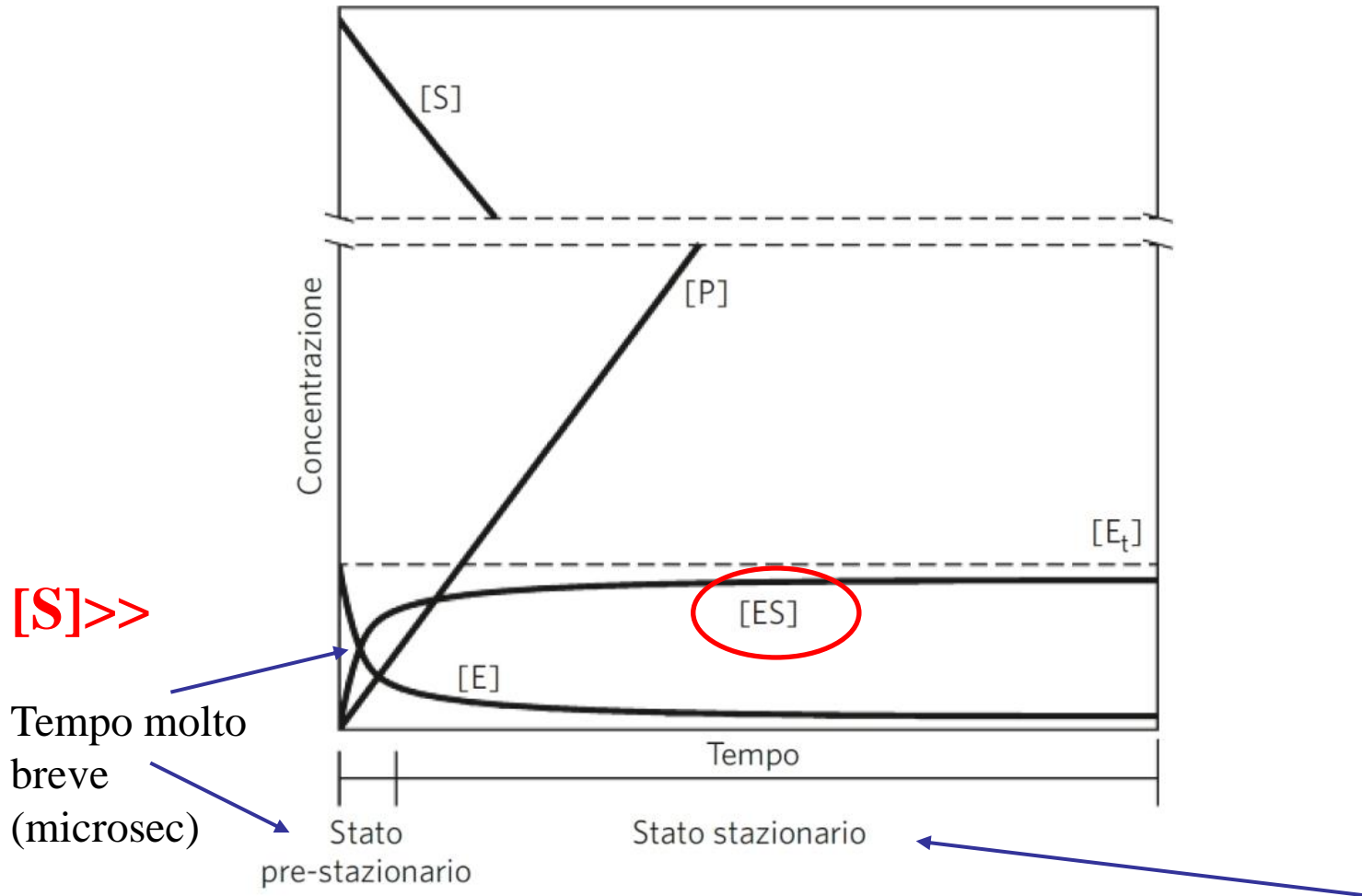
ADATTAMENTO INDOTTO NELL'ESOCINASI



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)

VELOCITA' = 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. $S \rightarrow P$

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

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

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

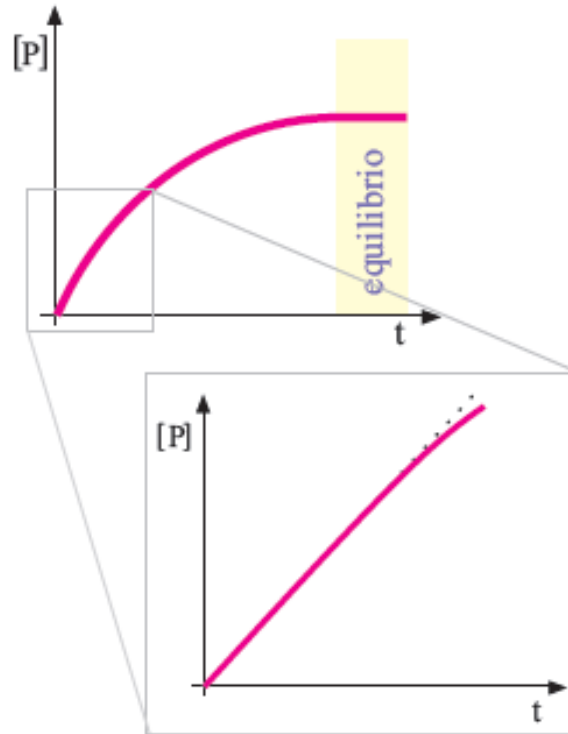
(velocità istantanea di reazione = la variazione della concentrazione di S o P in un intervallo infinitesimo di tempo e corrisponde al coefficiente angolare della tangente alla curva della concentrazione rispetto al tempo; essa varia con il procedere della reazione)

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



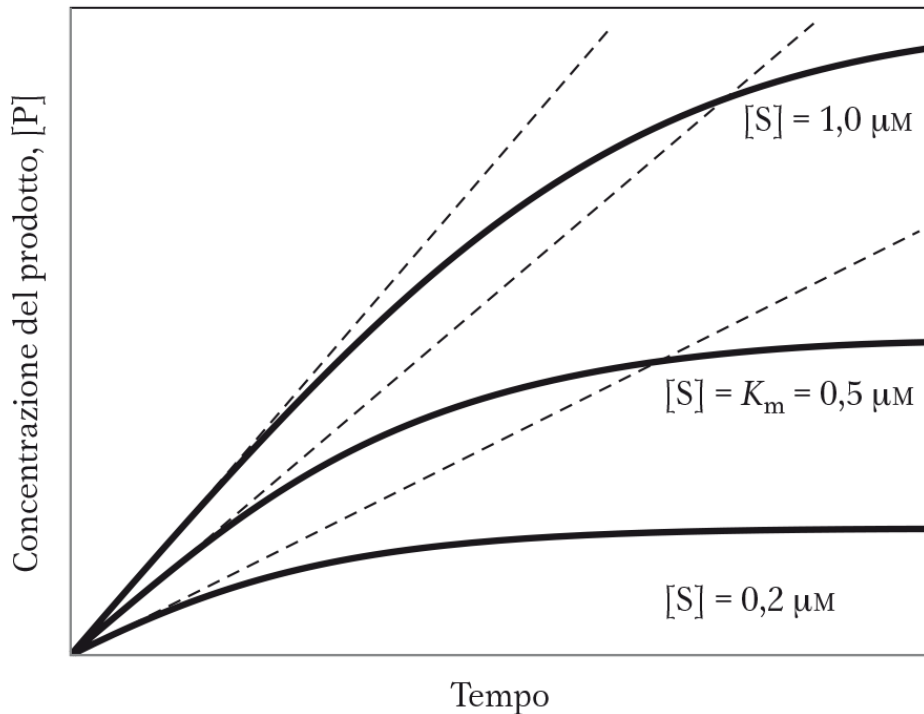
$$v = \frac{dP}{dt}$$

CURVA DI AVANZAMENTO della reazione enzimatica

CINETICA ENZIMATICA

CALCOLO DELLA VELOCITÀ INIZIALE (v_0)

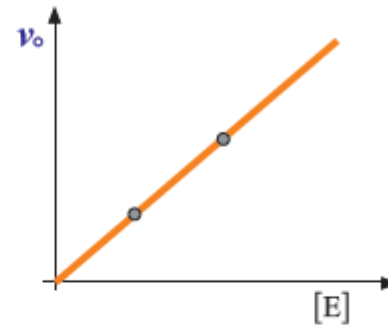
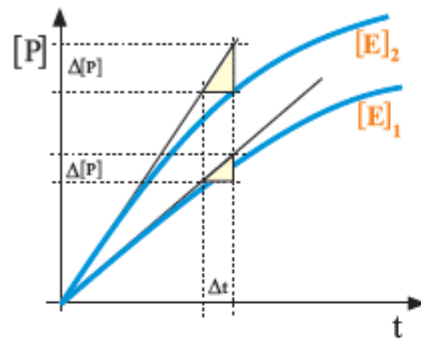
- La concentrazione di S è maggiore di quella di E
- Tempo breve, circa 60 sec, la variazione di [S] è minima



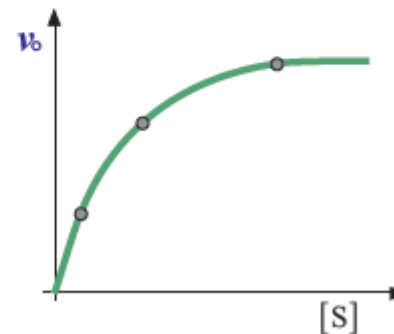
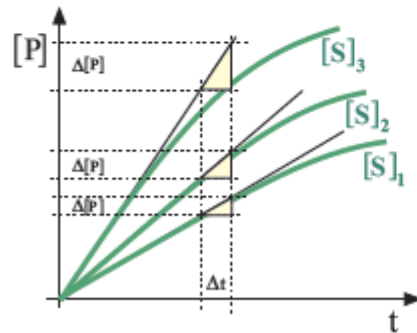
Curva di Progressione di una reazione catalizzata da un enzima in cui un substrato viene convertito in prodotto. [P], la concentrazione del prodotto, aumenta al procedere della reazione. La velocità iniziale della reazione (v_0) è la pendenza della parte lineare iniziale della curva.

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 $v_0 \leftrightarrow [E]$



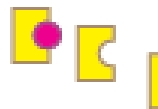




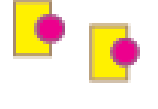




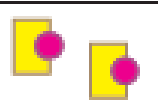




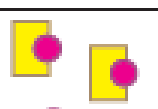




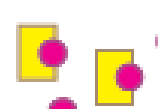




2) correlazione $v_0 \leftrightarrow [S]$

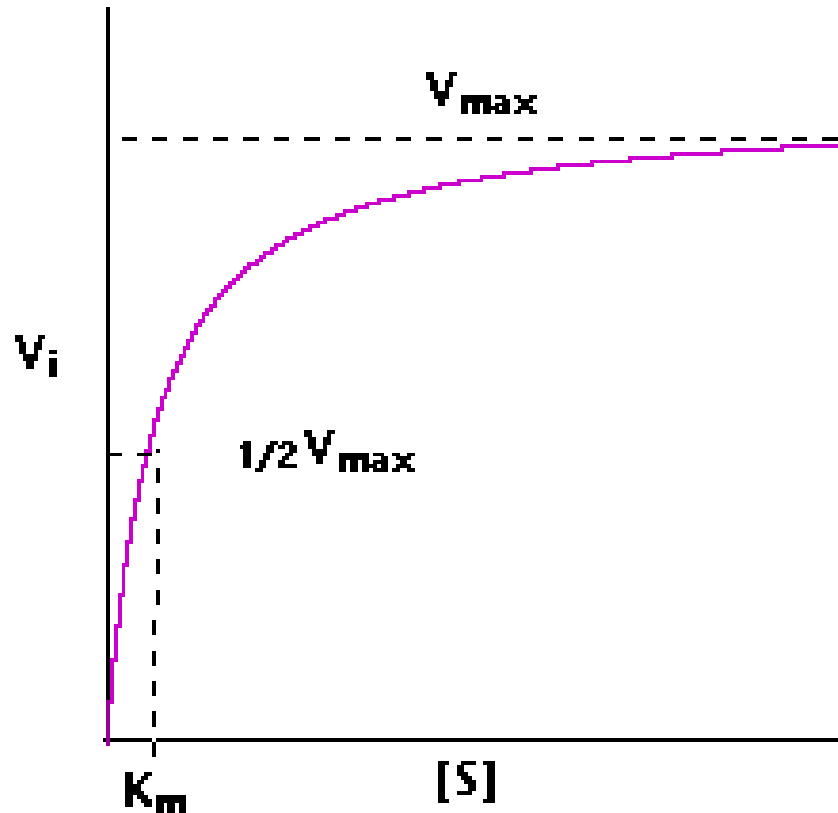


la tendenza asintotica di v_0 evidenzia un fenomeno caratteristico delle reazioni enzimatiche

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)

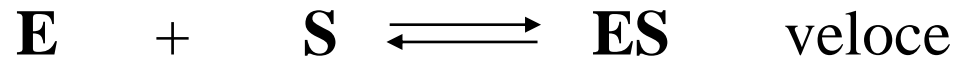
$[S]$ = substrate concentration (molar)

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.

È molto difficile determinare la concentrazione di S alla quale la velocità corrisponde a V_{max}

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

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

$$y = \frac{ax}{b+x} \quad \text{Equazione iperbole}$$

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.

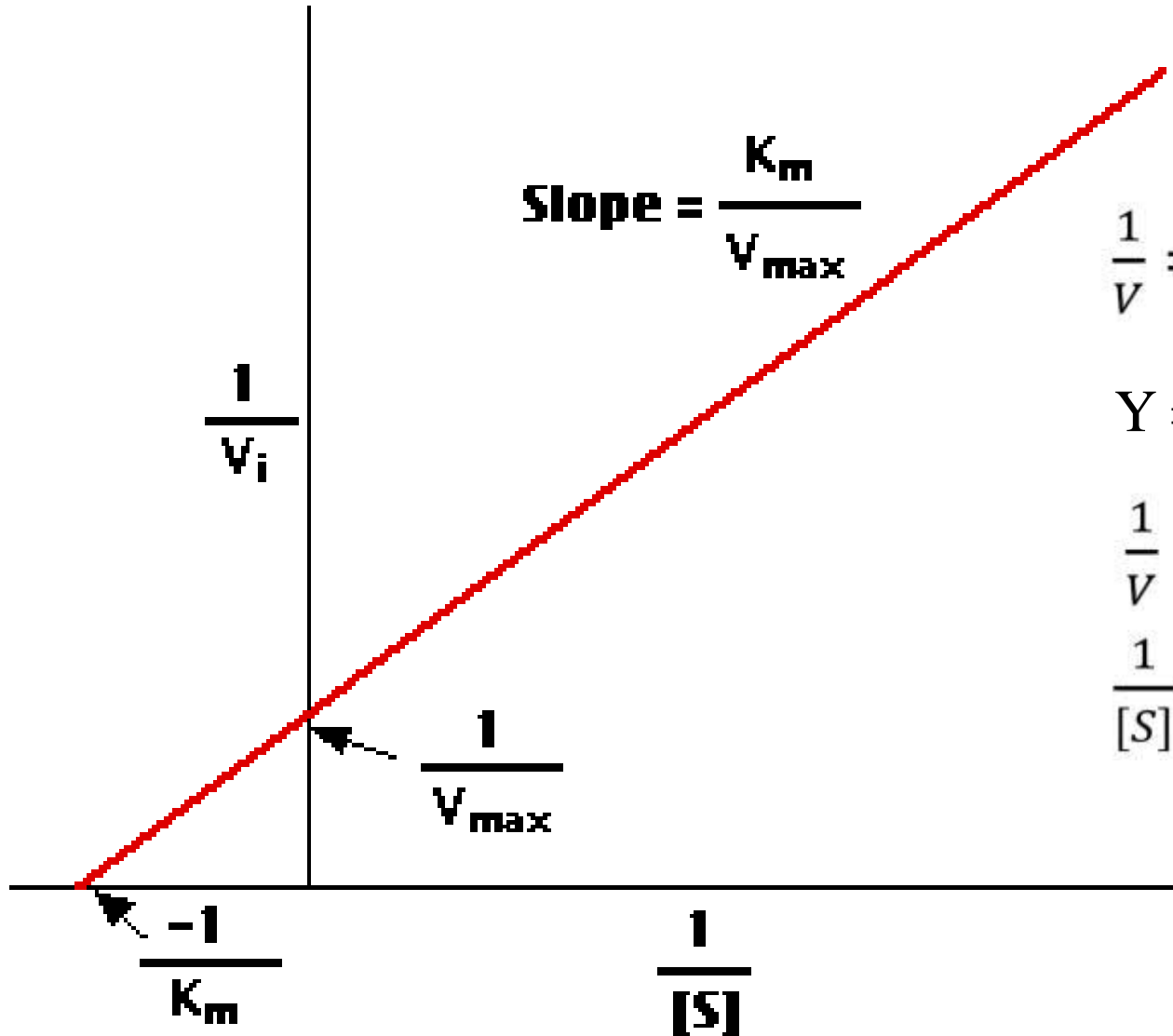
L'equazione è fondamentale per tutti gli aspetti della cinetica enzimatica.

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

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
β -galattosidasi	lattosio	4
Treonina deidratasi	L-treonina	5

GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI LINEWEAVER-BURK



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

$$Y = aX + b$$

$$\frac{1}{v} = Y$$

$$\frac{1}{[S]} = X$$

TERMINOLOGIA

Attività enzimatica: la quantità di S convertito per min in condizioni sperimentali (temperatura e pH) specificate. Espressa come μmoli substrato convertito a prodotto per minuto.

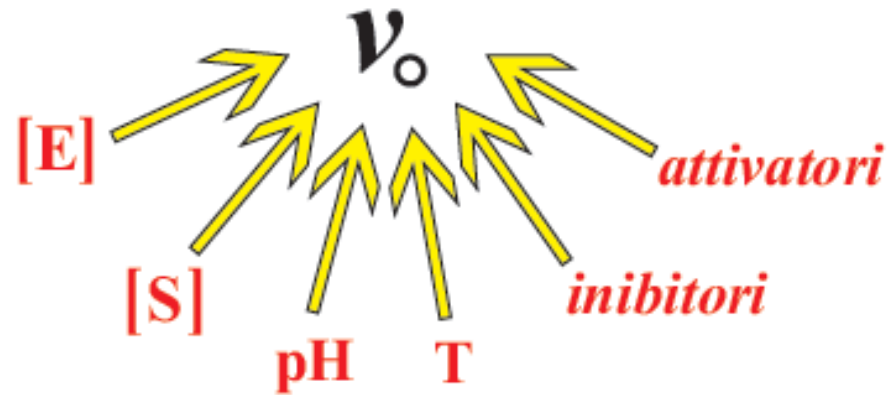
1 Unità enzimatica (UE): è la quantità di enzima che provoca la trasformazione di 1 μmole di substrato per minuto, a 25 °C e in condizioni ottimali.

Attività specifica: è il numero di UE per milligrammo di proteine. Attività enzimatica per mg di proteina ($\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$ proteina).

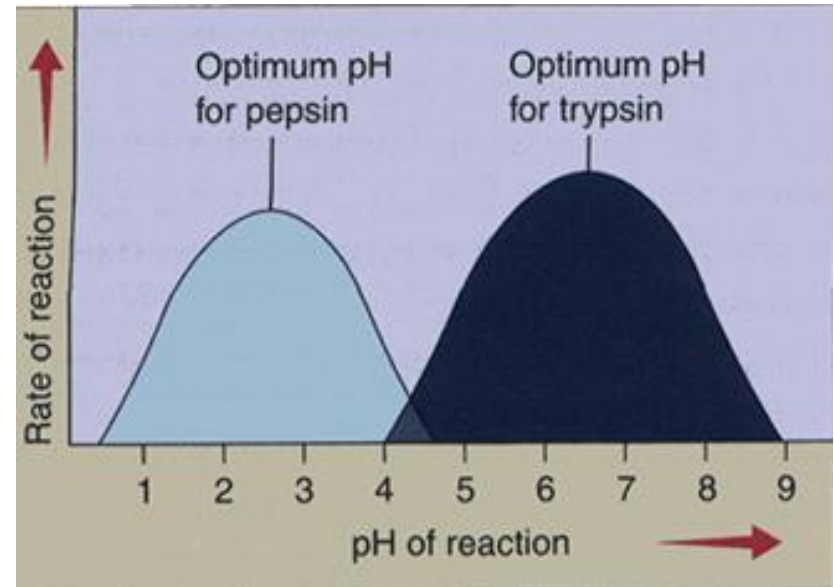
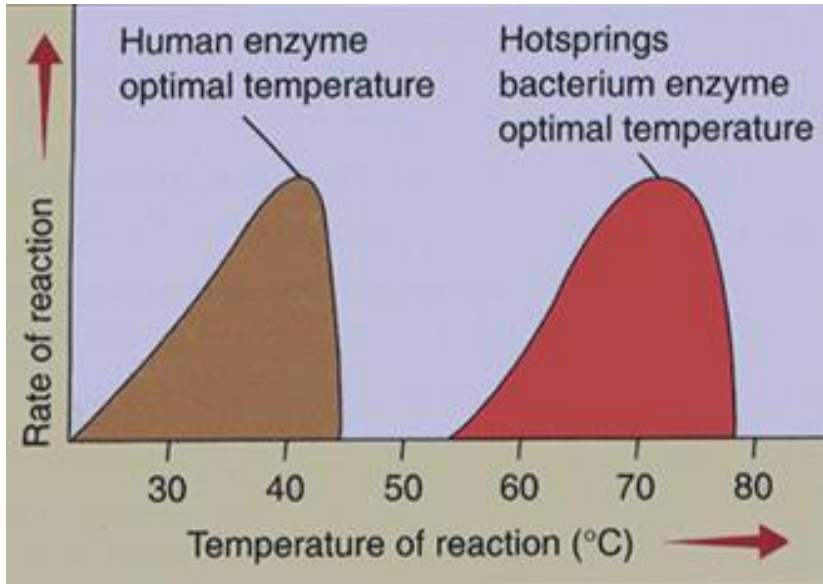
Costante catalitica o numero di turnover: è il numero massimo di molecole di substrato convertite in prodotto in un secondo da una molecola di enzima.

Katal (kat): è la quantità di enzima che trasforma una mole di substrato al secondo.

FATTORI CHE INFLUENZANO V_0



pH e temperatura ottimali



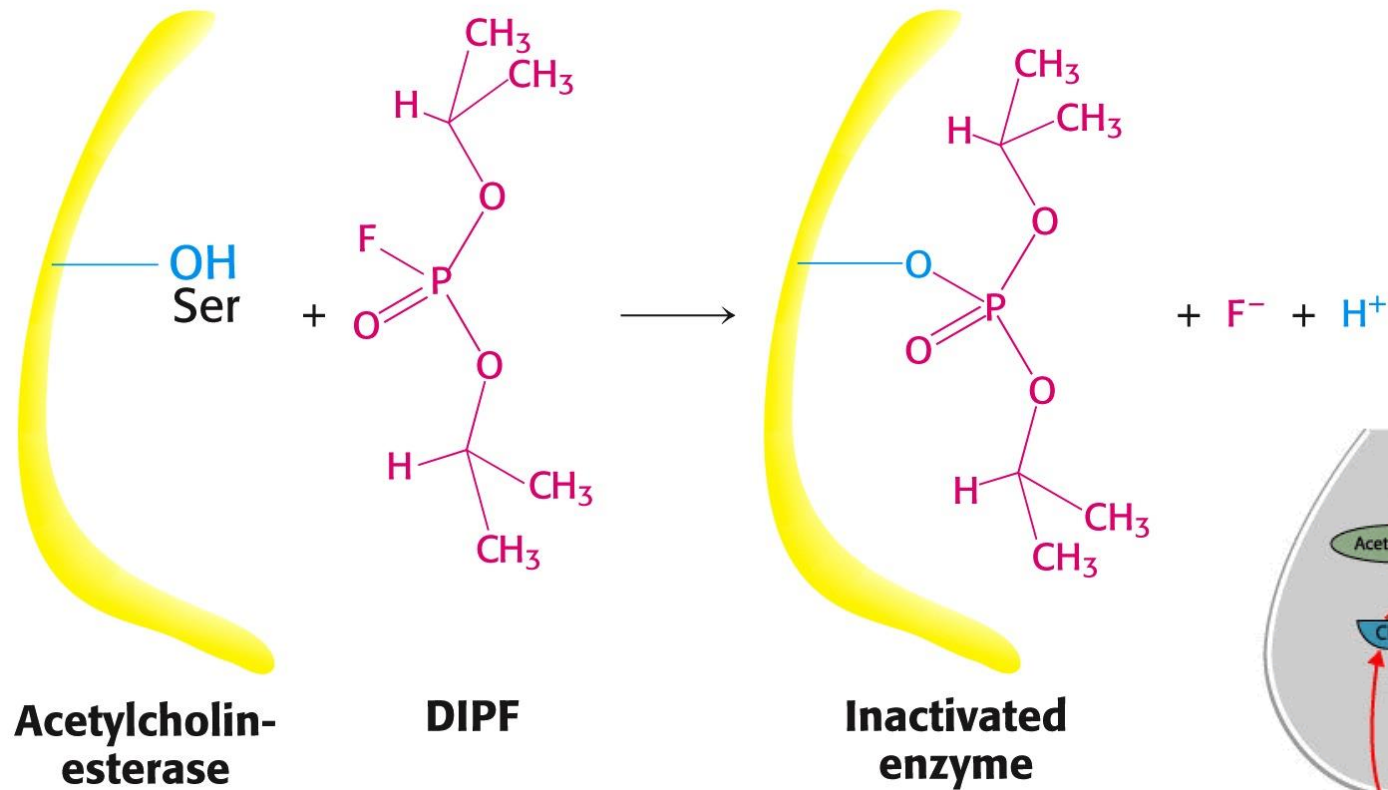
INIBITORI ENZIMATICI

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

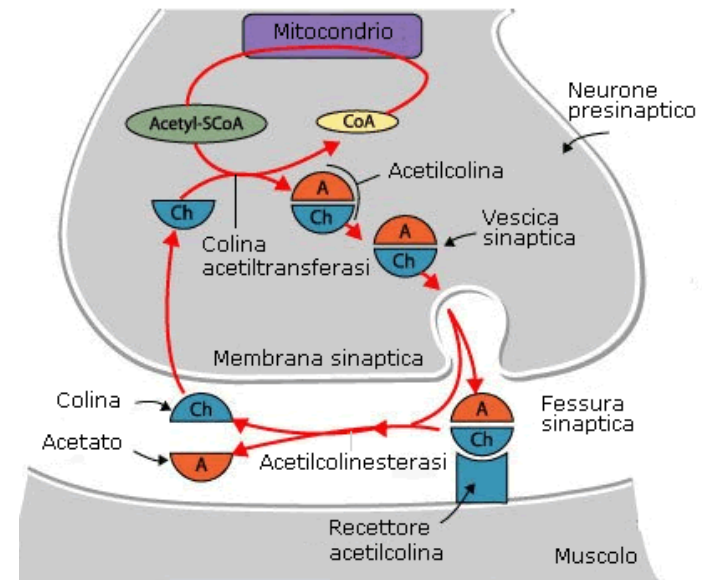
INIBITORI IRREVERSIBILI: Formano un legame covalente con il gruppo funzionale necessario all'attività catalitica:
es: diisopropil fluoro fosfato (DIFP), penicillina, metotrexato

INIBITORI REVERSIBILI: si legano all'enzima mediante forze deboli.

INIBITORI IRREVERSIBILI



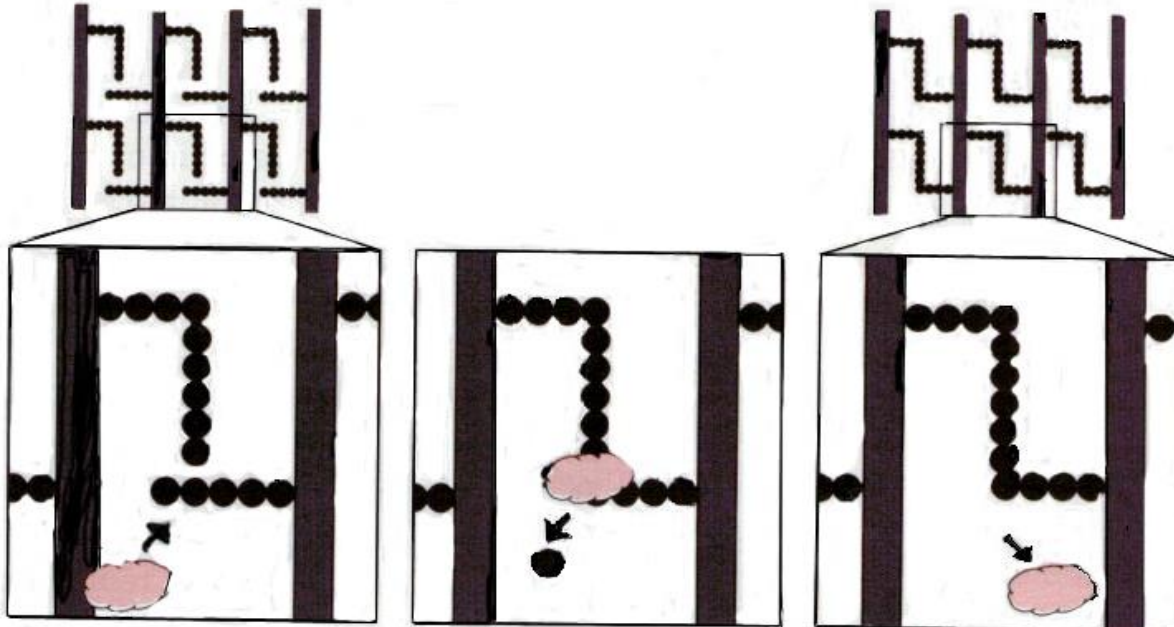
Diisopropil fluorofosfato



DIPF (**gas nervino**) reagisce con Ser in acetilcolinesterasi³⁷

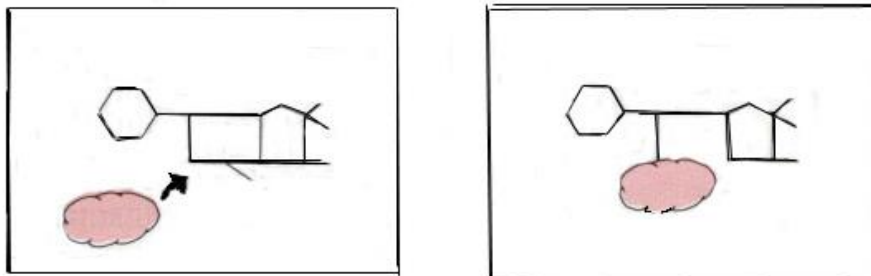
INIBITORI IRREVERSIBILI

Part of the bacterial cell wall

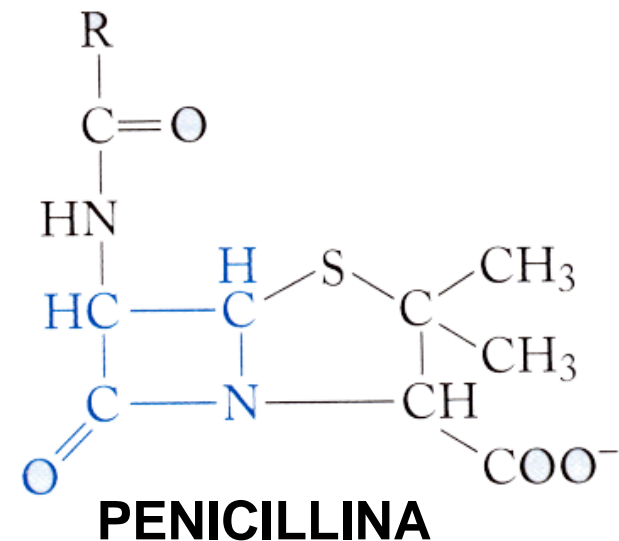


The enzyme "stitches together" proteins of the cell wall

Penicillin bonds to the enzyme instead.



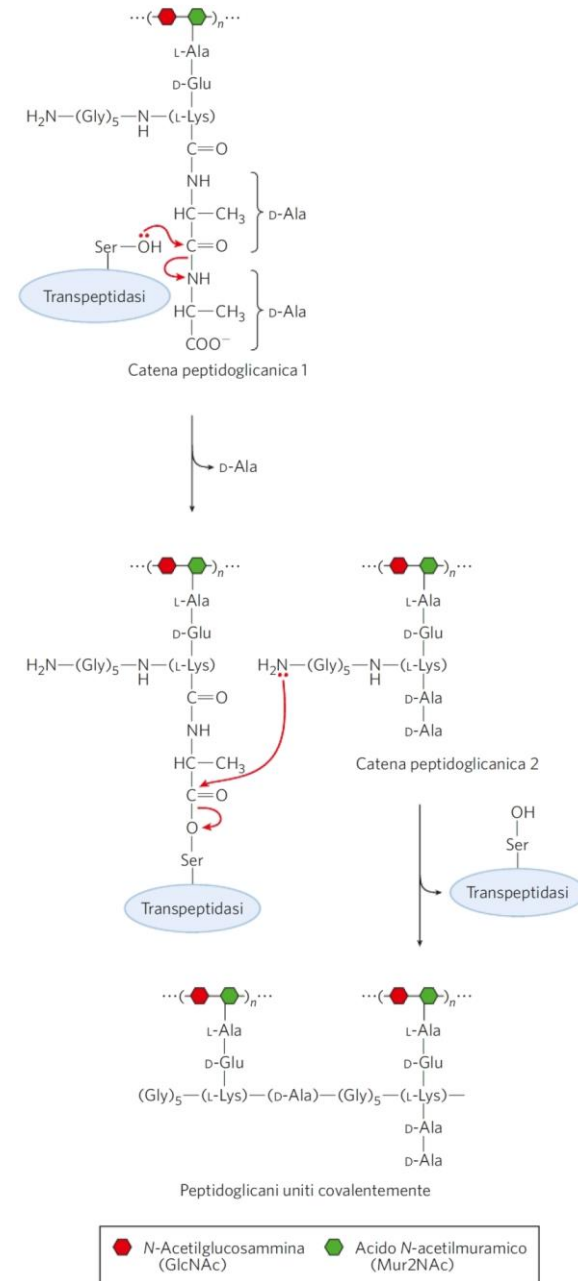
The enzyme is no longer available to build the cell walls, so the bacteria cannot reproduce.



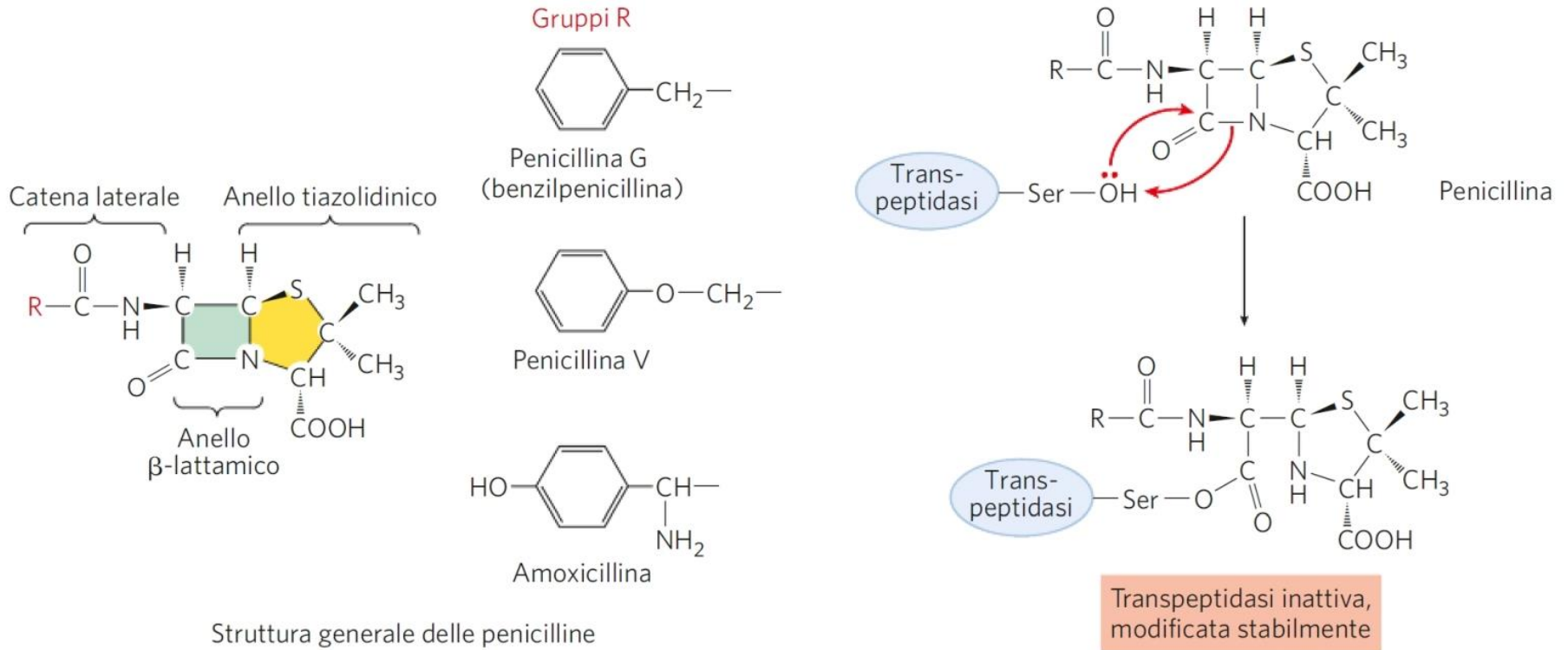
SINTESI DELLA PARETE BATTERICA

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.

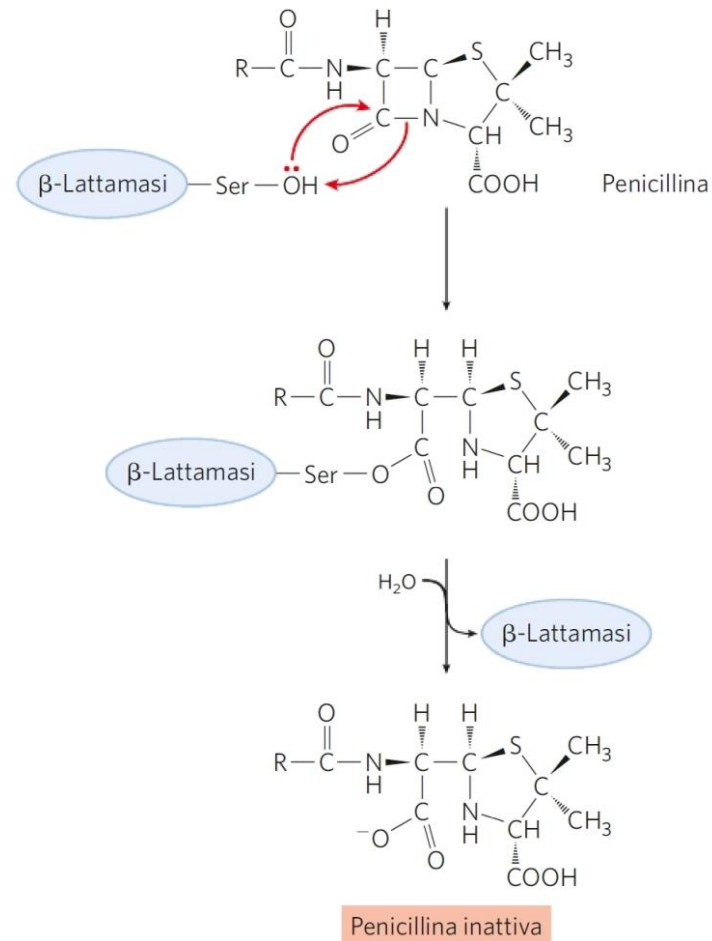


AZIONE DELLA PENICILLINA



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 β -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 β -lattamici.

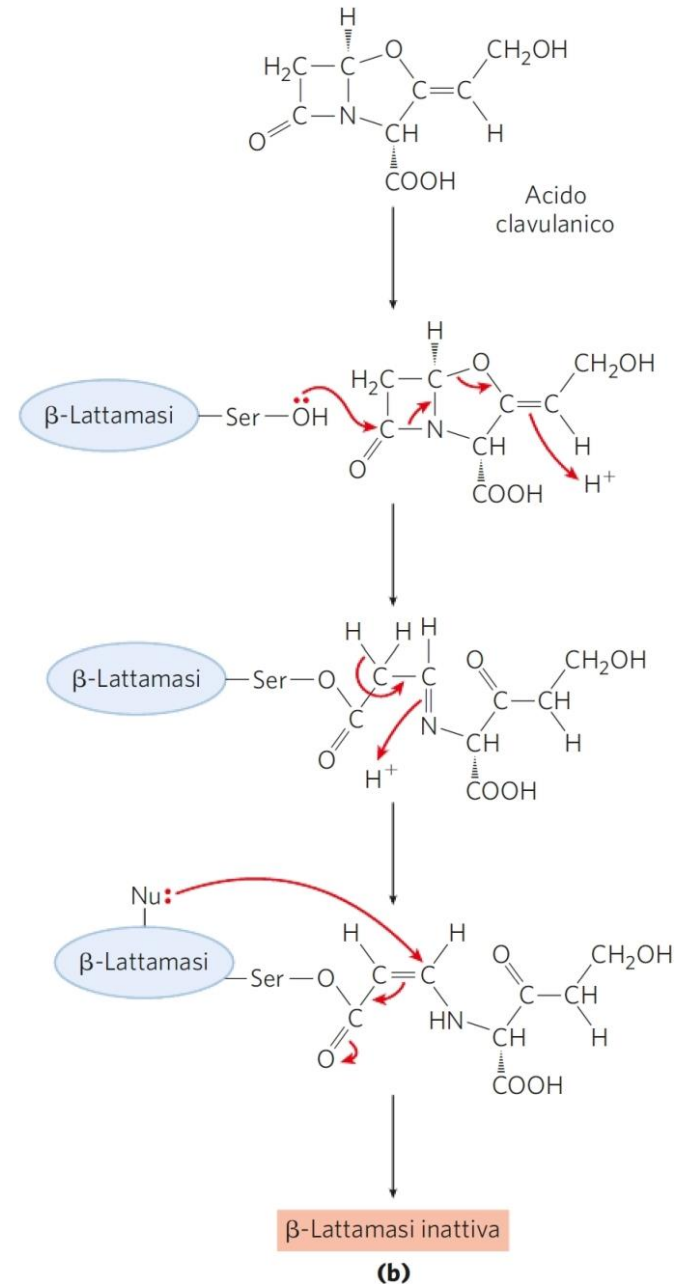


Azione della β -lattamasi

Sintesi di un nuovo antibiotico: acido clavulanico

Ac. clavulanico inattiva le β -lattamasi

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

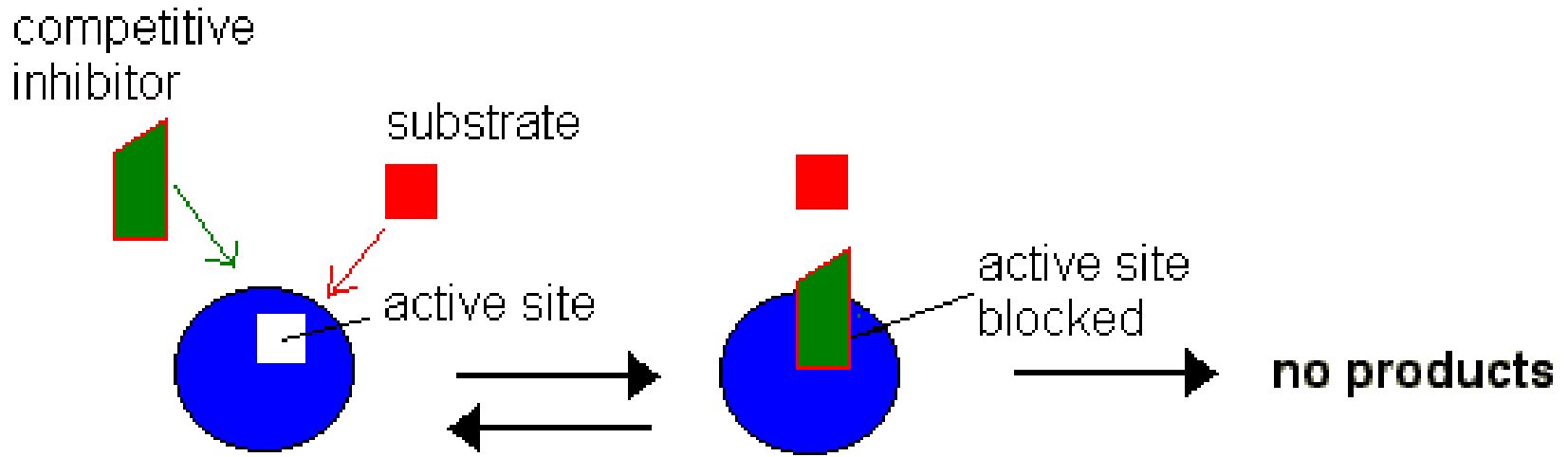


INIBITORI REVERSIBILI

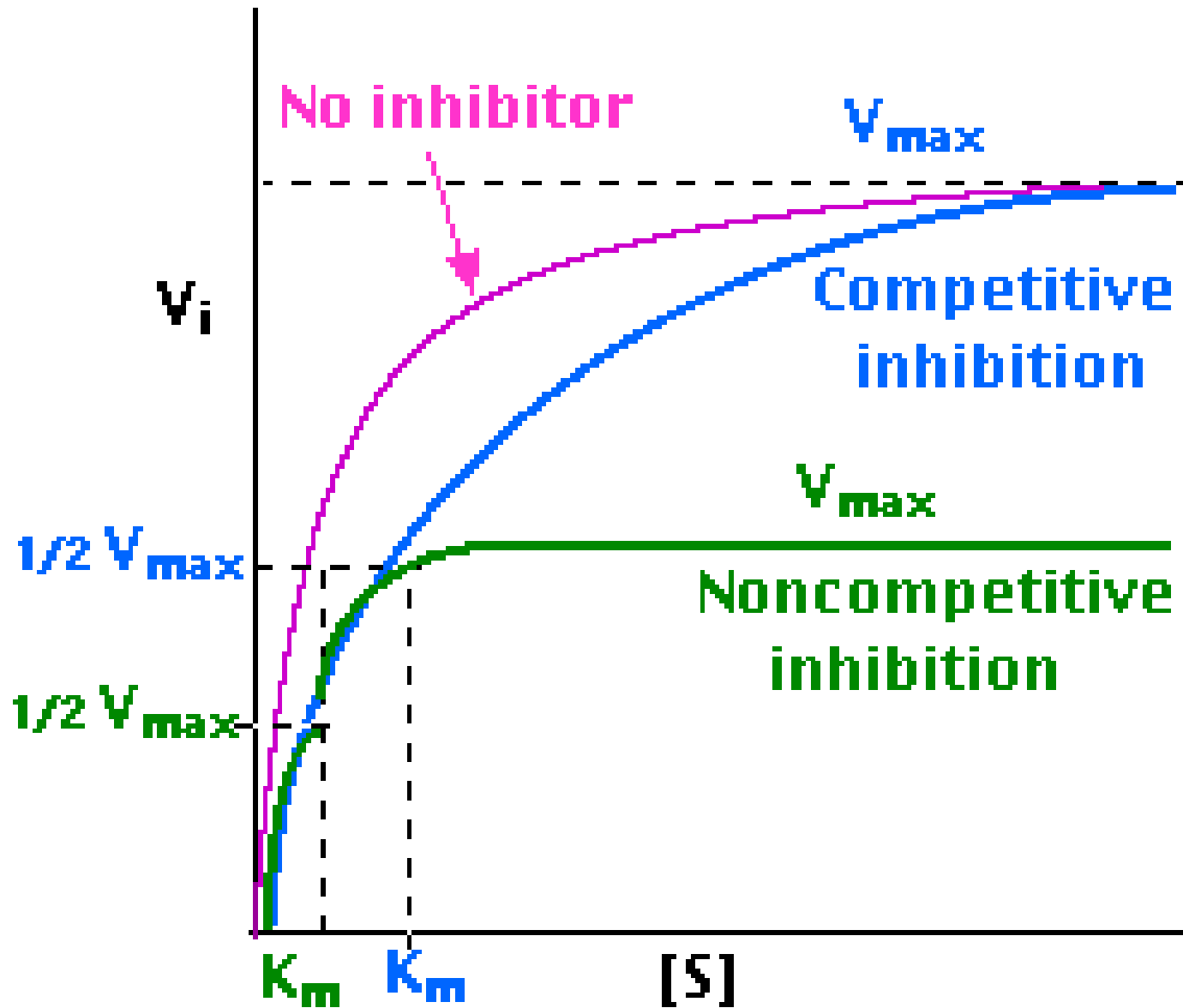
Riducono il potere catalitico dell'enzima in modi diversi che si distinguono tra loro per l'aspetto cinetico

- a) I competitivo (IC)
- b) I non-competitivo (INC)

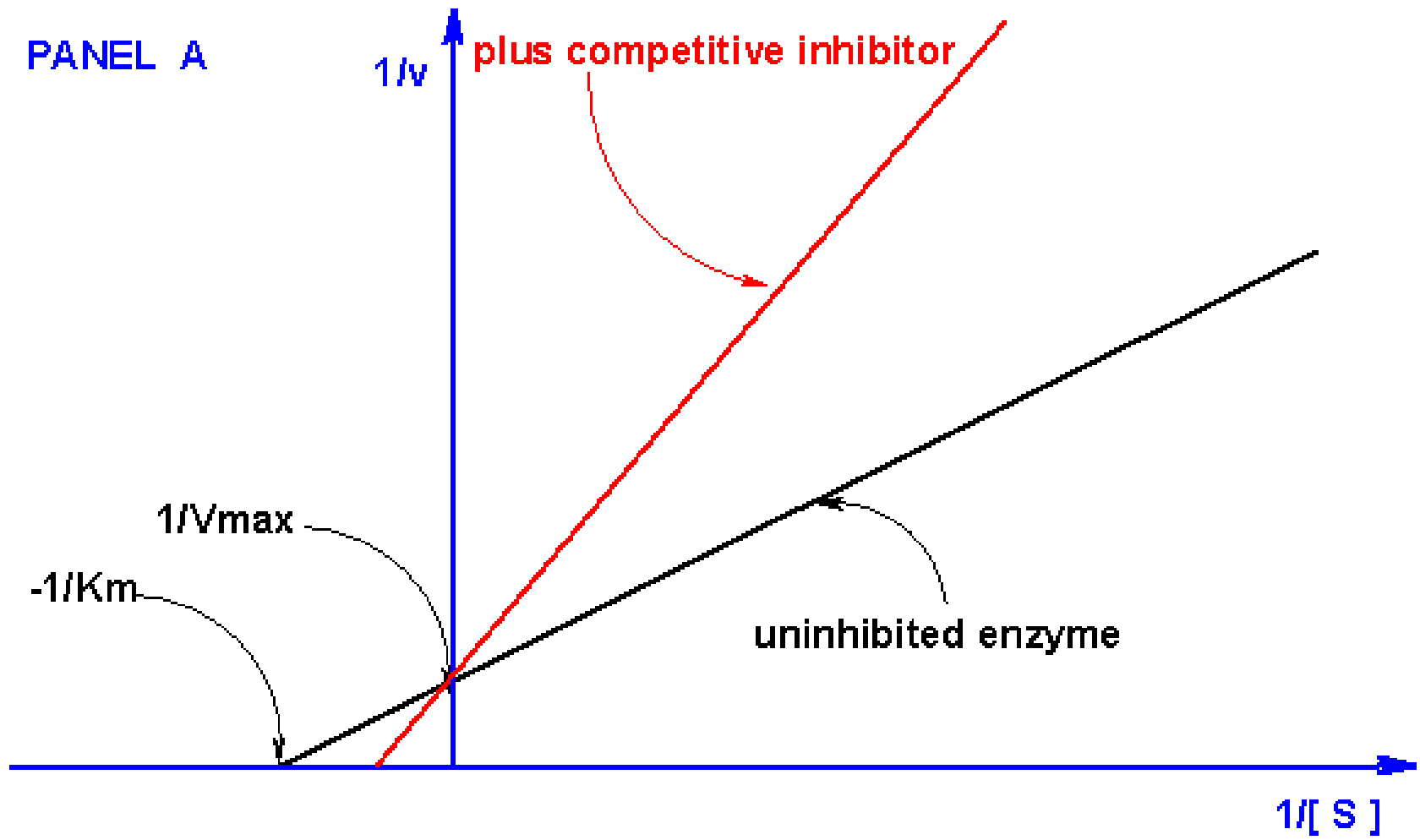
INIBITORE COMPETITIVO



IC ha struttura simile a **S** e compete con **S** per il sito attivo di **E**. Non può essere trasformato da **E**. **IC** è rimosso aumentando $[S]$. La presenza dell'inibitore ha un **effetto solo sulla K_m** (chiamata apparente), che **aumenta** in presenza di **IC**. La V_{max} resta invece invariata: infatti, per qualsiasi $[IC]$ esiste una $[S]$ tale da "cancellare" l'effetto inibitorio. Principi analoghi regolano l'inibizione da prodotto.



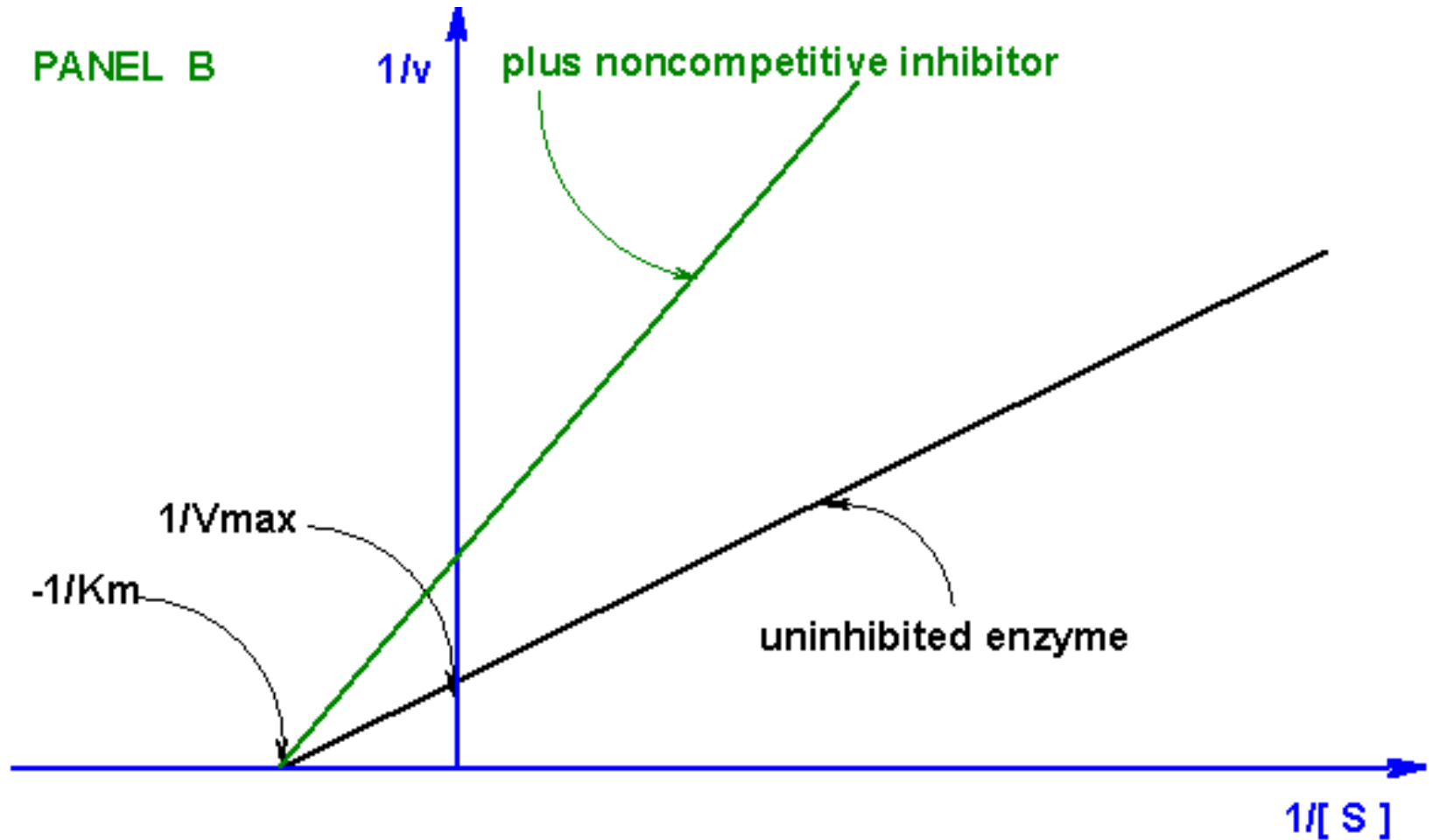
PANEL A



INIBITORE NON COMPETITIVO

INC interagiscono con **E** attraverso un sito diverso dal sito attivo. Quando **INC** si lega causa un cambiamento conformazionale di **E**, portando anche ad un cambiamento di forma del sito attivo. **E** non può più catalizzare la reazione. L'inibizione non viene rimossa da **S**, perché **INC** e **S** si legano a due siti diversi. V_{MAX} diminuisce, ma K_M non cambia.

INIBITORE NON COMPETITIVO



ENZIMA REGOLATORE

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 multienzimatici 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

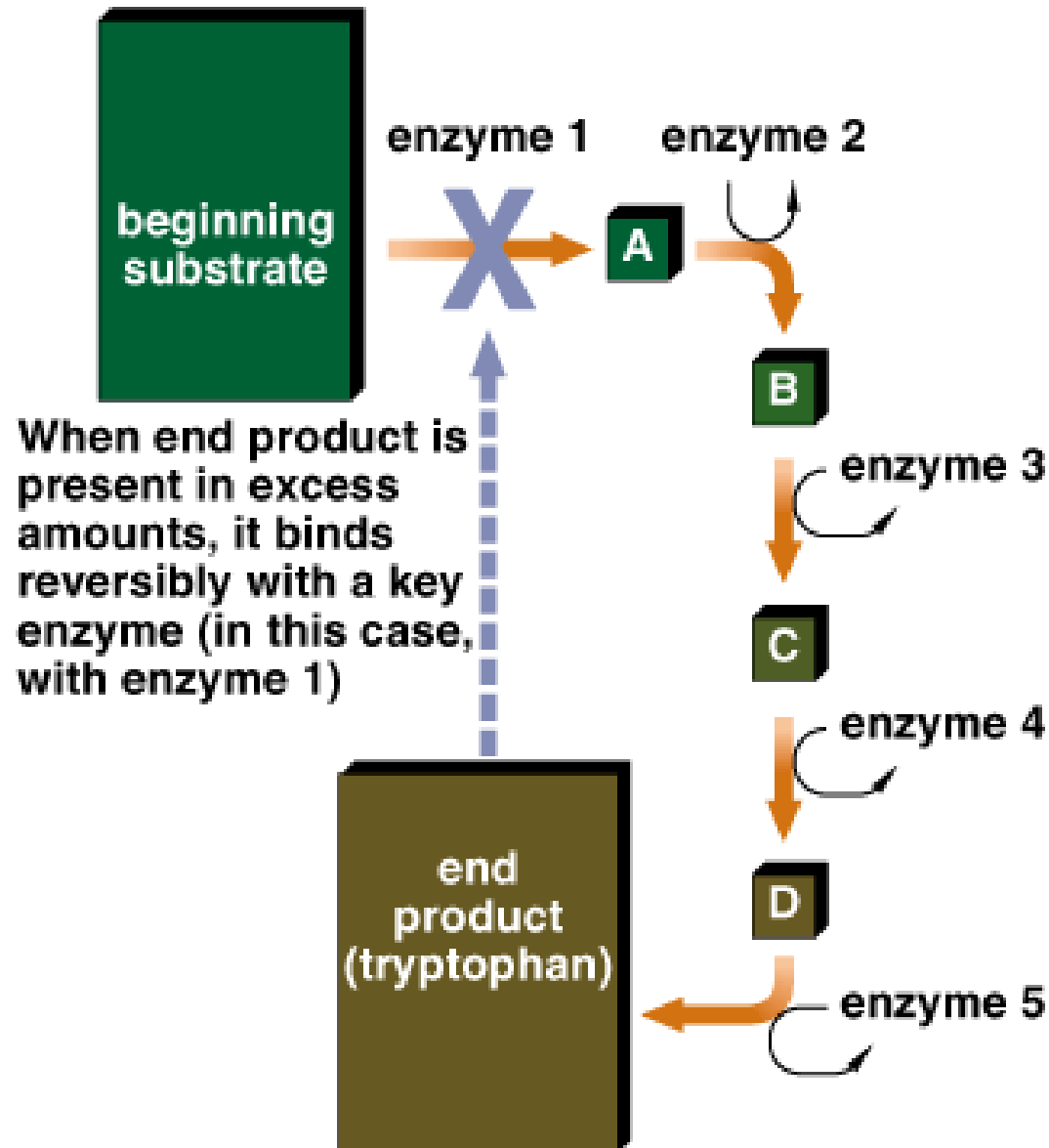
- più grandi e più complessi (multimerici)
- regolati non covalentemente in modo reversibile
- hanno proprietà diverse dagli altri **E**
- oltre al sito attivo, uno o più siti regolatori (allosterici) a cui si lega il modulatore (o effettore, o ligando)
- i siti regolatori sono specifici per il modulatore

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: (prodotto, si parla di inibizione retroattiva).

2) effettori stimolatori: (non il prodotto, ma un altro metabolita, spesso lo stesso **S**).

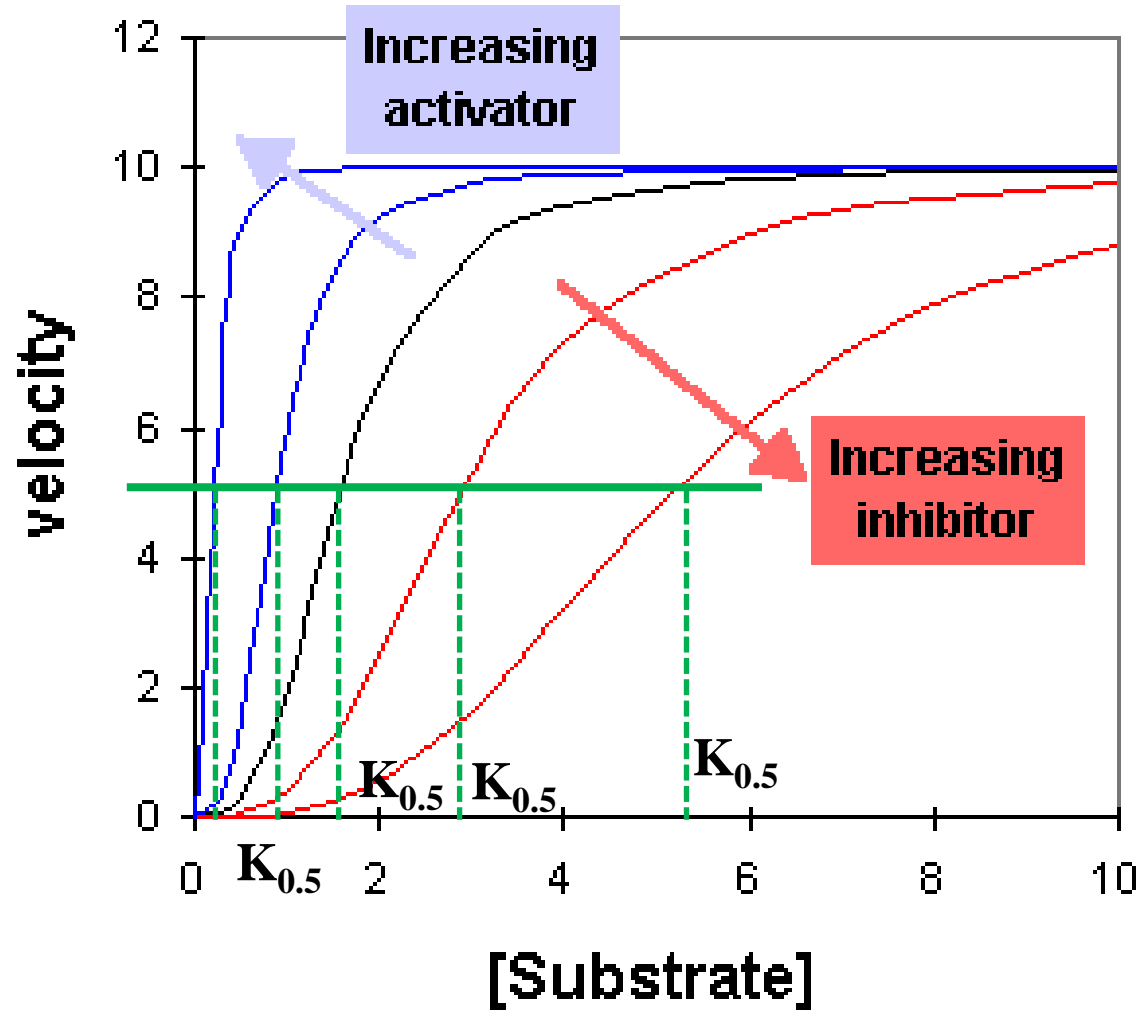
INIBIZIONE RETROATTIVA



ENZIMI ALLOSTERICI NON SEGUONO L'EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

$$K_{0.5} \approx [S]_{0.5}$$

Cinetica sigmoide =
interazioni
cooperative



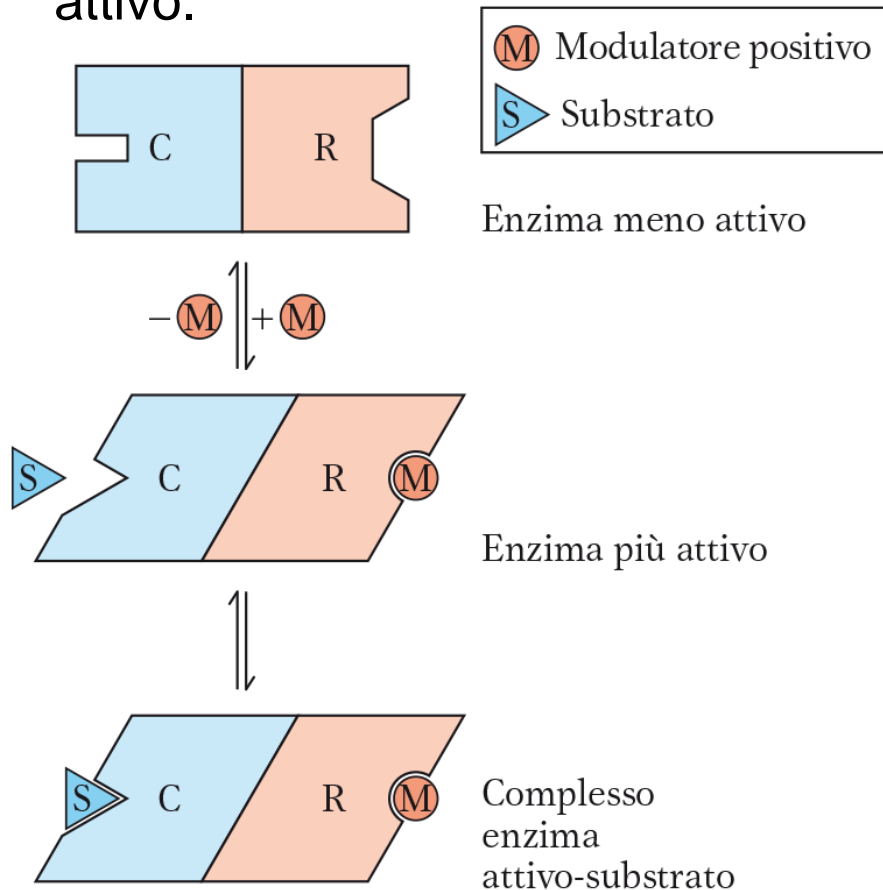
La linea centrale nera nel grafico ha un andamento sigmoide in assenza di effettori. Un attivatore aumenta la velocità della reazione, mentre un inibitore diminuisce la velocità della reazione per una data concentrazione di substrato. Guardando la forma delle curve, l'inibitore accentua la forma sigmoide,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

Questo significa che un inibitore allosterico aumenta il livello di cooperatività del substrato, mentre un attivatore lo diminuisce.

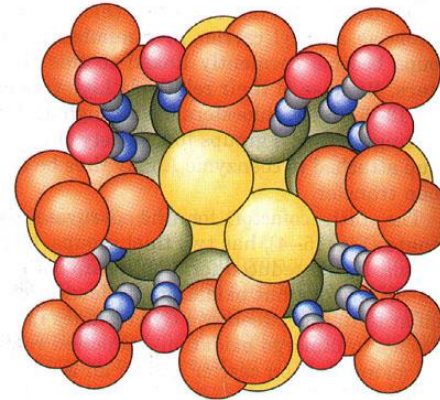
E allosterici hanno più subunità polipeptidiche.

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



2. ENZIMI REGOLATI PER MODIFICAZIONE COVALENTE REVERSIBILE

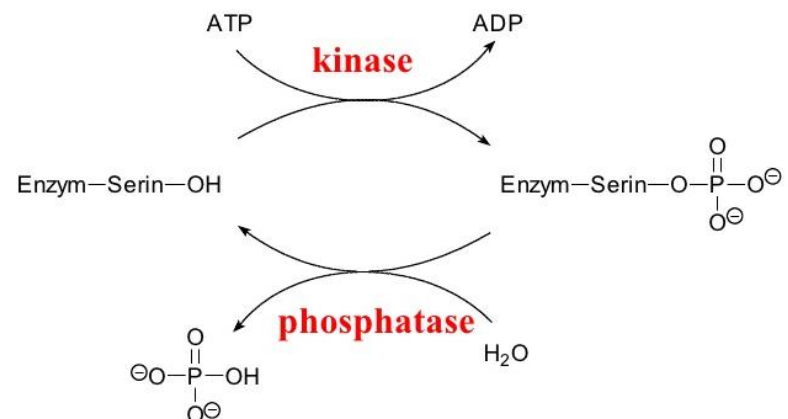
La modulazione avviene attraverso l'interconversione tra forme inattive e attive della molecola enzimatica per mezzo di modificazioni covalenti. La fosforilazione è il tipo più importante di modificazione regolatoria.

Sono stati descritti più di 500 diverse modificazioni covalenti

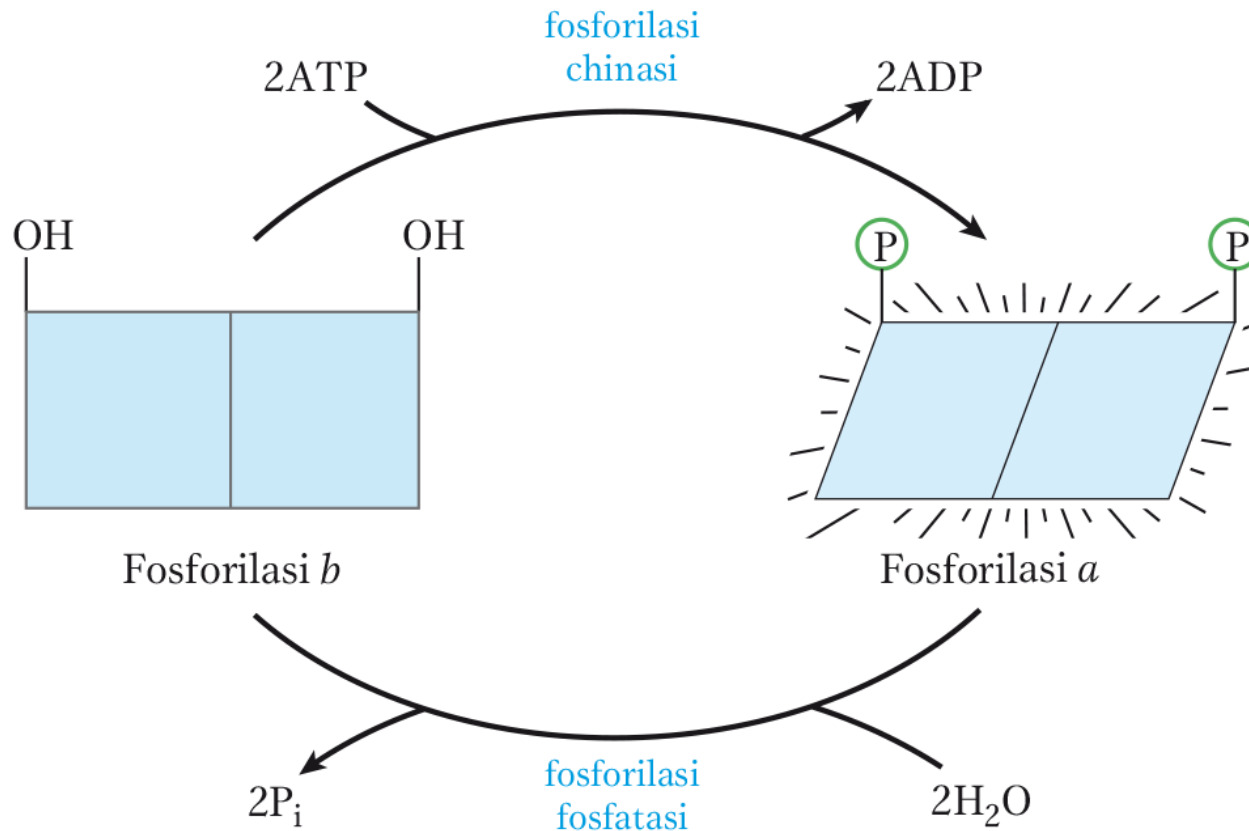
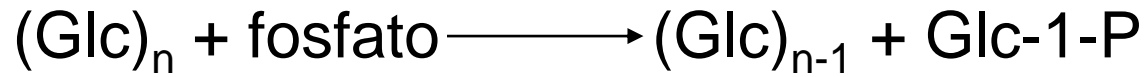
proteina chinasi: catalizza la fosforilazione (aggiunta di un gruppo fosfato legato con legame estereo)

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

Phosphorylation and dephosphorylation of enzyme alters its activity



GLICOGENO FOSFORILASI



3. ATTIVAZIONE MEDIANTE SCISSIONE PROTEOLITICA

Gli ZIMOGENI sono precursori inattivi degli enzimi

- Enzimi della digestione
- Enzimi della coagulazione

Zimogeno
dell'enzima

Forma attiva

Pepsinogeno

Pepsina

Tripsinogeno

Tripsina

Protrombina

Trombina

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.

Altri casi di attivazione per proteolisi:

in generale i precursori si chiamano proproteine o proenzimi

es. procollagene, proinsulina