



## Modulo 5a

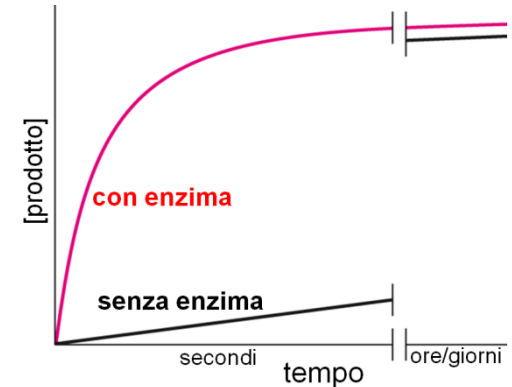
# Gli enzimi – caratteristiche generali

2022-23

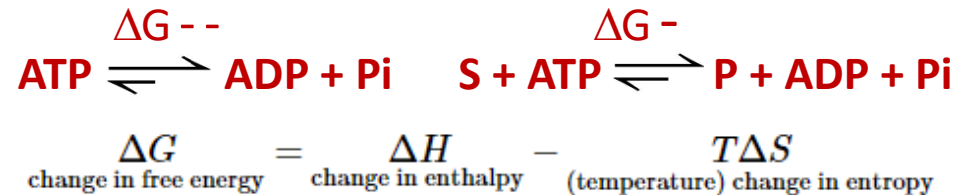
# Introduzione agli enzimi

## ► In ogni istante negli organismi viventi si verificano migliaia di reazioni chimiche

- quasi tutte queste reazioni sono **catalizzate** (rese più veloci) da **enzimi**, che sono **potenti biocatalizzatori**
- sono **proteine**, (in qualche caso riboproteine o RNA) specializzate nella **catalisi delle trasformazioni chimiche cellulari** e mediano la **conversione fra diversi tipi di energia**



- **aumentano la velocità** delle reazioni che catalizzano per un **fattore di almeno  $10^6$**
- essendo catalizzatori **non sono modificati** dalle reazioni che catalizzano e **non alterano l'equilibrio** di queste reazioni (*agiscono sulla cinetica, non la termodinamica*)
- possono **accoppiare reazioni** energeticamente sfavorevoli ( $\Delta G$  positivo) con reazioni favorevoli (es. idrolisi di ATP) rendendole **globalmente favorevoli** ( $\Delta G$  negativo)

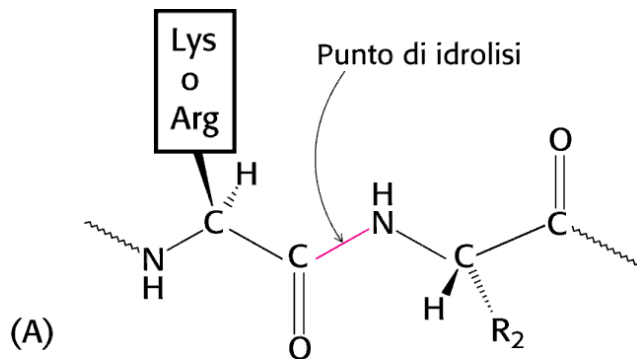


- generalmente agiscono in un arco ristretto di condizioni (pH, temperatura e pressione) che normalmente sono blande (pH  $\sim 7$ , T ambiente e P atmosferica)

# Introduzione agli enzimi (cont.)

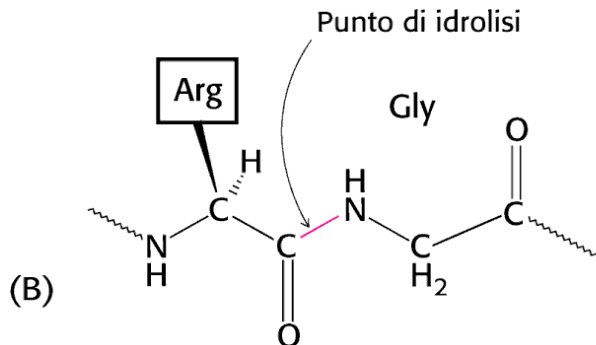
## ► Gli enzimi sono altamente specifici (... se serve)

- catalizzano **solo un tipo di reazione** (es. idrolisi, redox, isomerizzazioni, ecc.)
- riconoscono un **reagente specifico** (il **substrato**) [es. proteine/peptidi, acidi nucleici, polisaccaridi (o specifiche parti di essi), acidi grassi/lipidi, metaboliti vari ]
- possono riconoscere il substrato con una **specificità elevatissima**, oppure secondo le necessità biologiche in **maniera relativamente aspecifica**;



Es. specificità:

(A) La tripsina taglia in corrispondenza del lato C di arginina o lisina (la chimotripsina taglia dopo catene grosse idrofobiche)

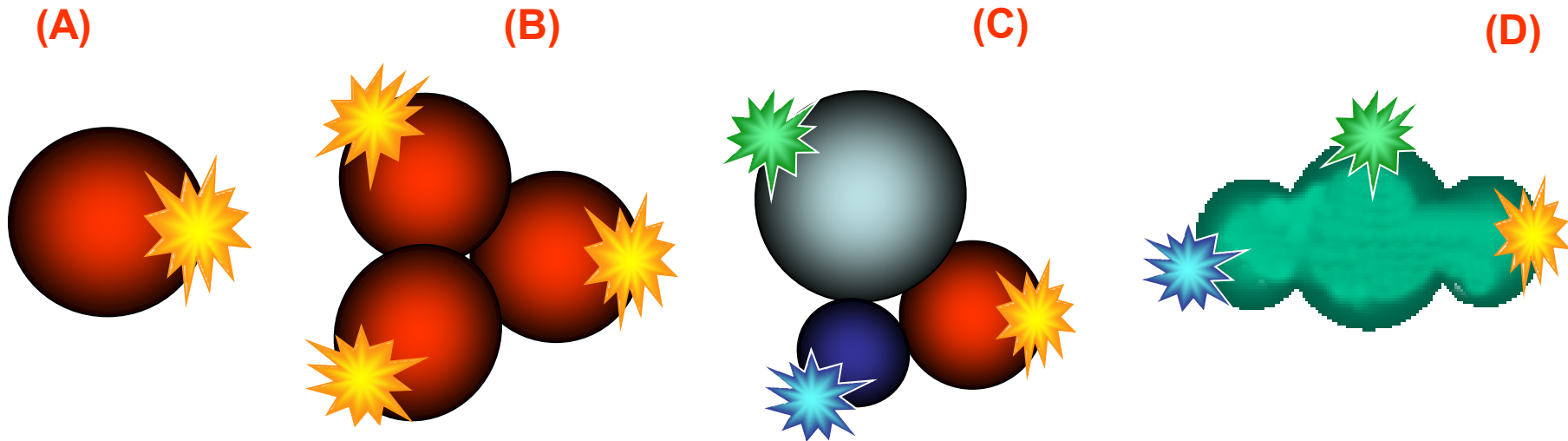


(B) La trombina idrolizza solo legami Arginina-glicina.

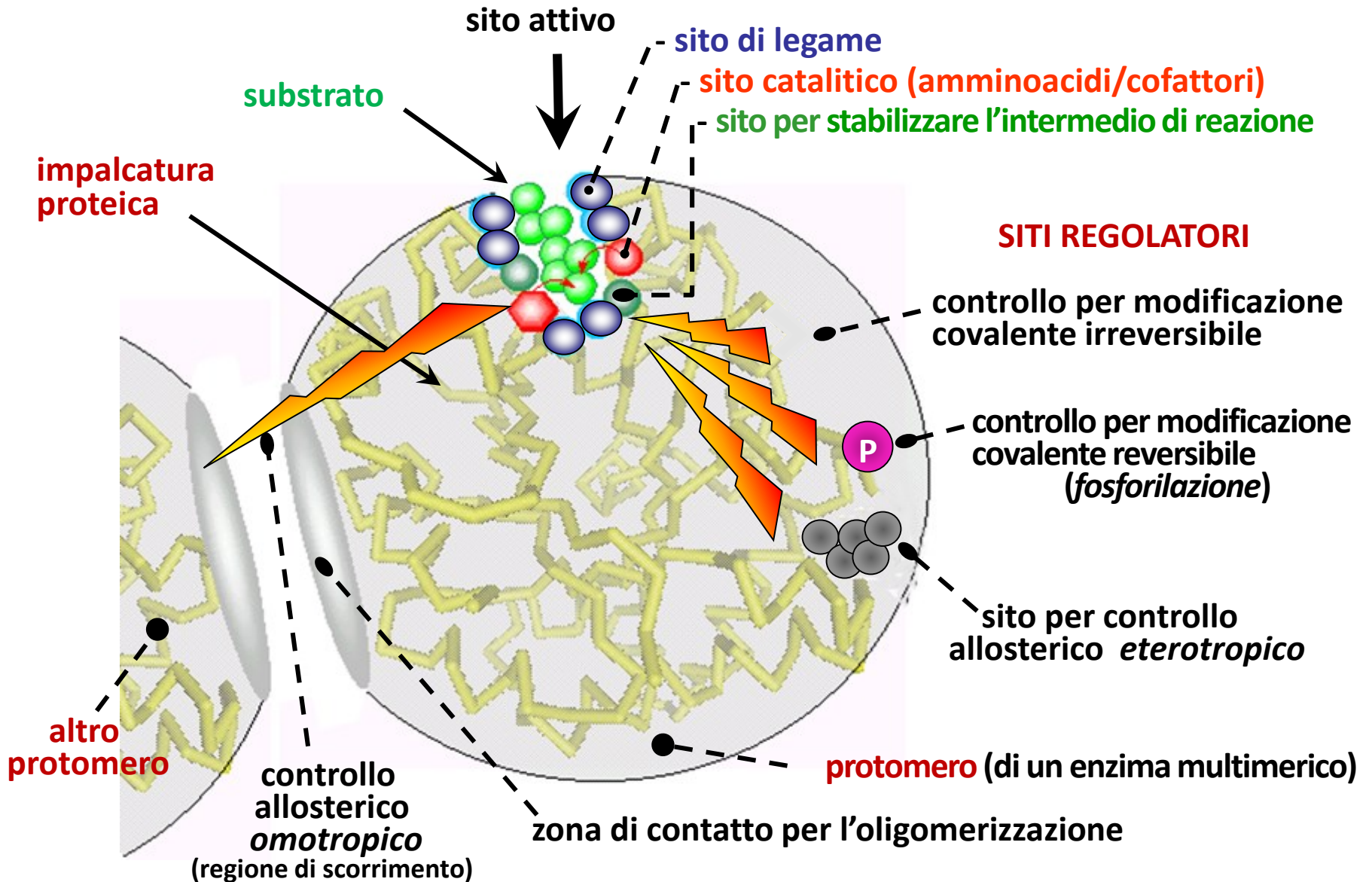
# Introduzione agli enzimi (cont.)

► Possono avere uno o più siti attivi, ed essere composti da:

- una **sola subunità con un solo sito attivo** (enzima *monomero* e *monofunzionale*) (A)
- **più subunità identiche, con gli stessi siti attivi** (enzima *multimerico* e *monofunzionale*) (B)
- **più subunità diverse con diversi siti attivi** (enzima *multimerico* e *multifunzionale*) (C)
- un'**unica catena con diversi domini strutturali ciascuno con diverso sito attivo** (enzima *monomero* e *multifunzionale*) (D)

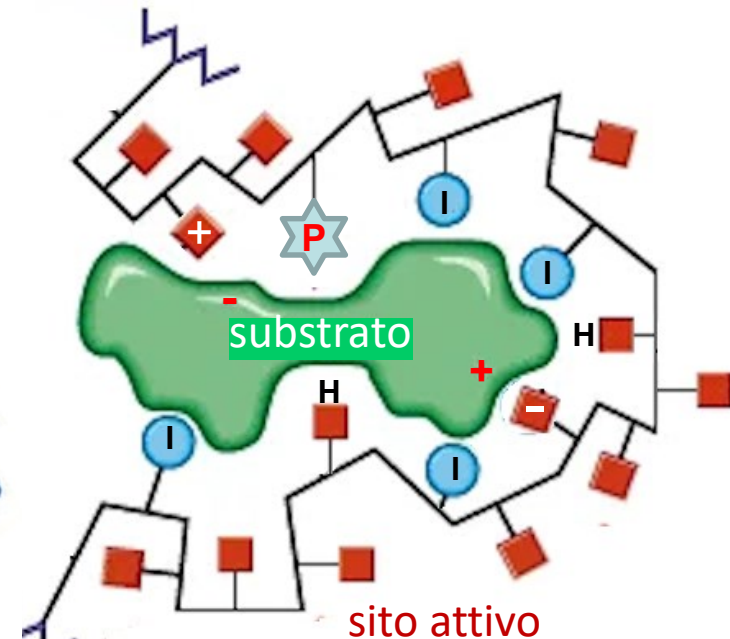
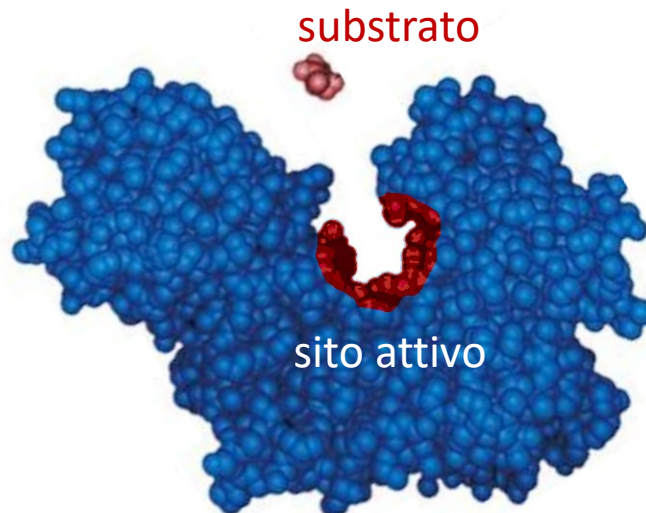


# Architettura generale degli enzimi



# Caratteristiche del sito attivo di un enzima

- ▶ il sito attivo è una zona relativamente ristretta e ben definita dell'enzima
  - ha una **precisa struttura tridimensionale** che coinvolge **pochi residui nella struttura 1<sup>a</sup>**
  - questi residui sono **vicini nella struttura 3<sup>a</sup>** ma **non necessariamente nella struttura 1<sup>a</sup>**
- ▶ Il sito attivo è composto da:
  - **sito di legame**: generalmente un **solco o cavità** nella superficie dell'enzima, con elevata complementarità di forma al substrato, dove si instaurano interazioni multiple [legami-H (direzionali), interazioni elettrostatiche (utili per docking), forze di vdW (complementarità); interazioni idrofobiche (favoriscono l'associazione)].
  - **sito catalitico**: può essere composto solo da AA ■, oppure anche da un **gruppo prostetico** ★
  - **sito di stabilizzazione dell'intermedio della reazione catalizzata**



# Regolazione dell'attività enzimatica

► L'attività di molti enzimi è regolata da fattori esterni

## 1) CONTROLLO ALLOSTERICO

**omotropico:** il legame di substrato al sito attivo di una subunità **stimola il legame** di un'altra molecola di substrato al sito attivo in un'altra subunità (+)

**eterotropico:** il legame di una molecola diversa dal substrato, ad un sito diverso dal sito attivo modula l'attività catalitica ( $\pm$ )

2) **MODIFICAZIONI COVALENTI REVERSIBILI:** attivazione/disattivazione mediante fosforilazione/defosforilazione ( $\pm$ )

3) **MODIFICAZIONI COVALENTI IRREVERSIBILI:** attivazione mediante taglio proteolitico della catena enzimatica (+)

4) **INIBIZIONE COMPETITIVA:** una sostanza simile al substrato **blocca il sito di legame** (–)

5) **CONTROLLO GENICO:** l'enzima è **espresso solo quando serve**, nelle quantità che servono

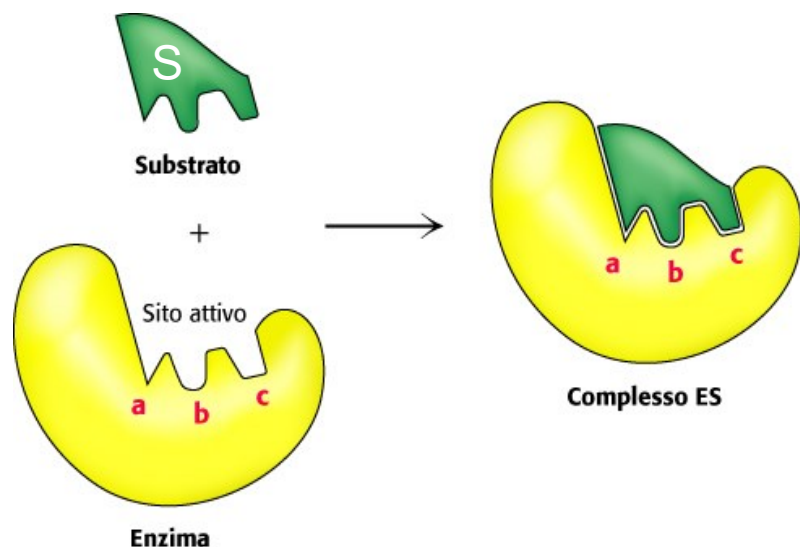
6) **COMPARTIMENTAZIONE:** isozimi sono separati in **diversi compartimenti/tessuti**

# Modelli d'azione enzimatica

- ▶ Due modelli descrivono l'interazione enzima/substrato:

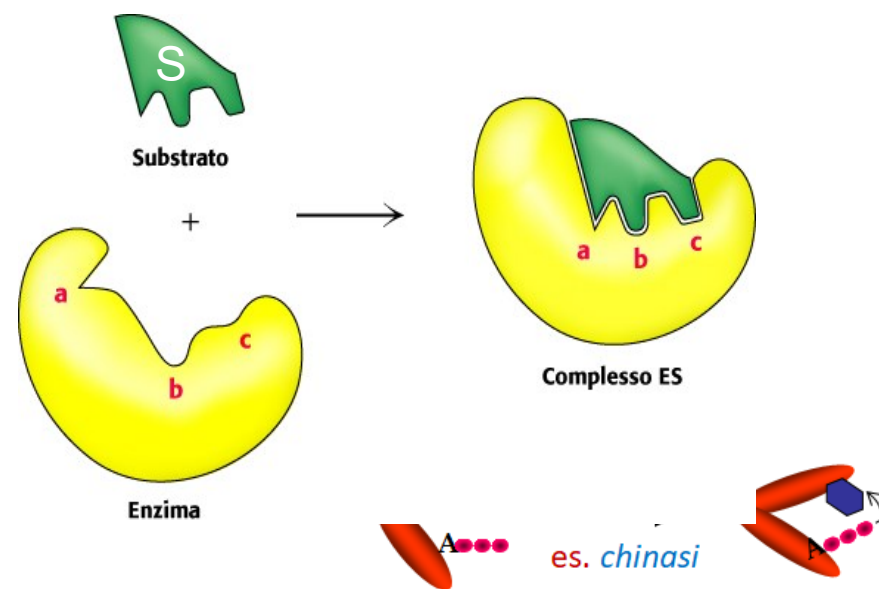
## Modello a chiave e serratura

(Emil Fisher, 1890)



## Modello ad adattamento indotto

(Daniel Koshland Jr., 1958)

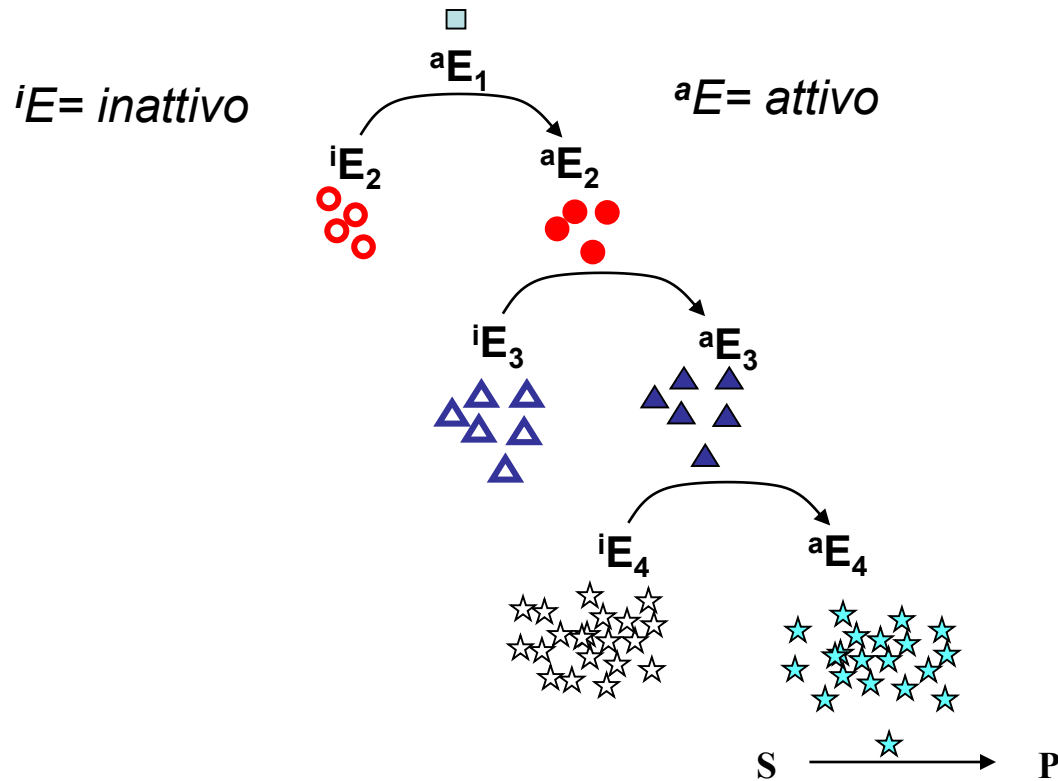
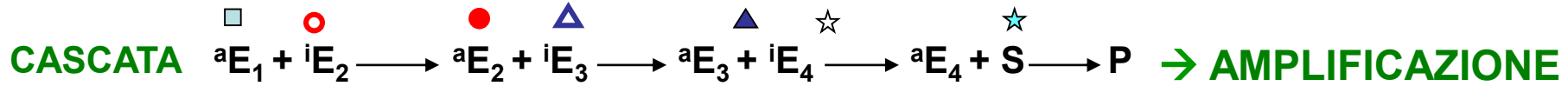
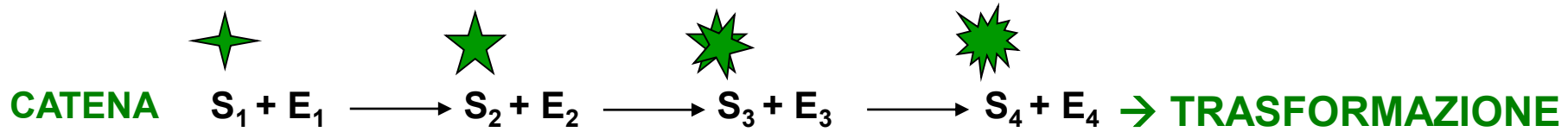


- il sito attivo ha una **forma complementare a quella del substrato**
- la selettività è data da questa complementarietà di forma

- In questo modello, il sito attivo **altera la forma** in seguito al legame del substrato,
- la forma diventa più complementare a quella del substrato (**si adatta**) e l'enzima si attiva
- spesso ancora più simile a  $S^\ddagger$  che a S



# Catene e cascate enzimatiche



# Meccanismo d'azione degli enzimi

## ► Principi fondamentali dell'azione enzimatica

- L'attività catalitica di un enzima dipende dalla **stabilizzazione dello stato di transizione** nella reazione  
$$S + E \rightarrow SE \rightarrow S^\ddagger E \rightarrow E + P$$

- sulla quale possono influire:

**Effetti sterici e di prossimità** - **posizionamento / deformazione**

**Catalisi generale acido-basica** - **addizione/rimozione di protoni**

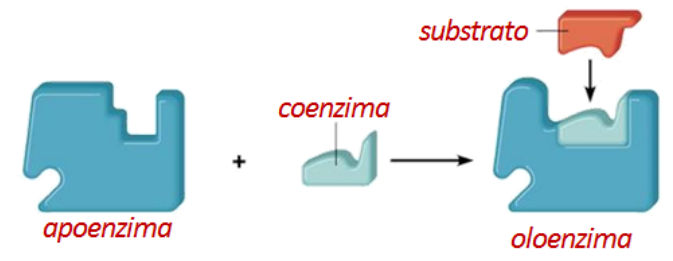
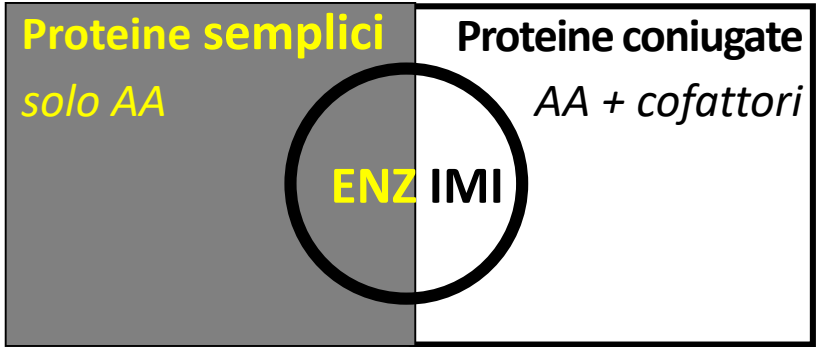
**Catalisi covalente** - **legame transiente** con catene laterali nucleofile

**Effetti elettrostatici** - **distribuzione favorevole alla reazione della carica (densità elettronica)** nel sito attivo

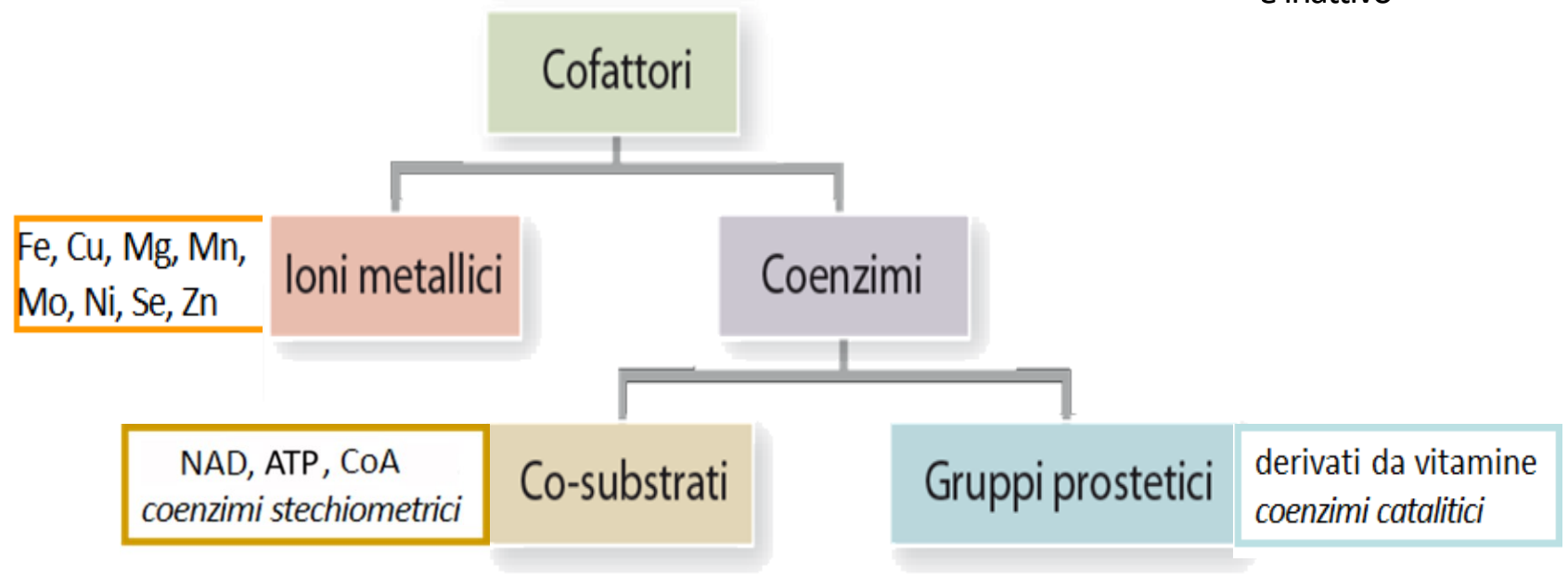
## ► All'azione enzimatica partecipano componenti del sito catalitico

- Il sito catalitico può utilizzare solo la **reattività chimica** delle catene laterali di alcuni **amminoacidi**; sono **enzimi semplici**  
Asp & Glu (-COOH); Ser & Tyr (-OH)  
Cys (-SH); Lys (-NH<sub>2</sub>); His (-NH-)
- Il sito catalitico può necessitare di **reattività chimica aggiuntiva** che deriva da **cofattori** o **gruppi prostetici (coenzimi)**; sono **enzimi coniugati**

# Enzimi semplici e coniugati



L'enzima coniugato con il suo gruppo prostetico e noto come **oloenzima** ed è attivo, in assenza è noto come **apoenzima** ed è inattivo

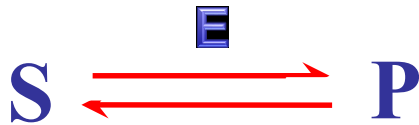


**Ioni metallici** - formano legami di coordinazione multipli - catalizzatori elettrofilici

**Coenzimi** - molecole organiche derivate da **vitamine idrofile o lipofile** che catalizzano reazioni tipo **redox** o di **trasferimento** o **riarrangiamento** di gruppi chimici

# Gli enzimi possono accoppiare reazioni

- ▶ Gli enzimi possono accoppiare una reazione sfavorevole ad una reazione favorevole per spostare l'equilibrio verso il prodotto



$$\Delta G = \Delta E - T \Delta S \quad (1)$$

$$K_{eq} = [P]/[S] \quad (2)$$

$$[R = 8,315 \times 10^{-3}, T = 298K (25^\circ C)]$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ'} + RT \ln [P]/[S] \quad (3)$$

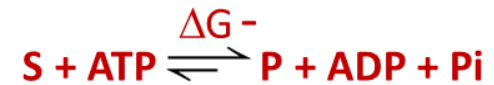
ad equilibrio,  $\Delta G = 0$ ,

$$\Delta G^{\circ'} = - RT \ln [P]/[S] \quad (3)$$

$$\Delta G^{\circ'} = - RT \ln K_{eq} = -2,303RT \log_{10} K_{eq} \quad (2,3)$$

$$K_{eq} = 10^{[-\Delta G^{\circ'}/(2,303RT)]}$$
$$= 10^{-\Delta G^{\circ'}/5,6}$$

- Più negativo diventa  $\Delta G^{\circ'}$  più aumenta  $K_{eq}$
- Questo avviene se l'enzima **accoppia la reazione** ad es. con l'idrolisi di ATP
- Ogni **variazione di 5,6 kJ/mol in  $\Delta G$**  comporta un **aumento di 10 volte in  $K_{eq}$**
- l'idrolisi di ATP mette a disposizione  $\Delta G^{\circ'} \sim 30 \text{ kJ/mol}$



# Gli enzimi diminuiscono l'energia dello stato di transizione



reaz. 1° ordine  
(unimolecolare)

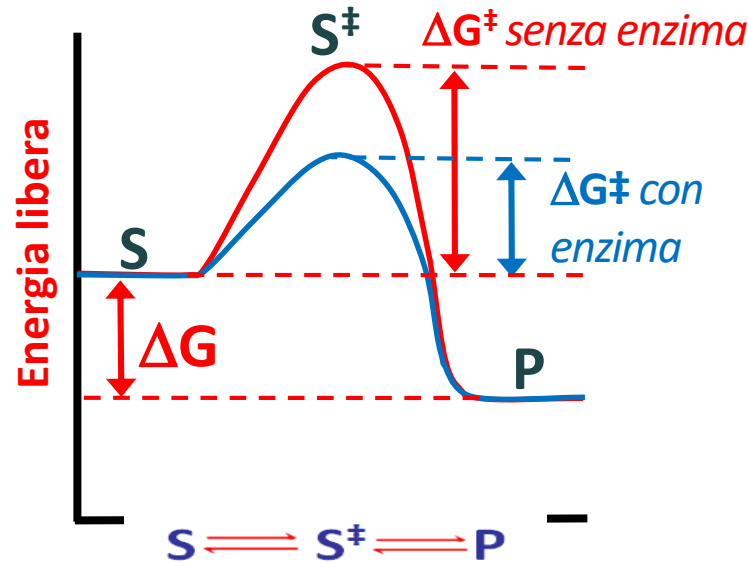
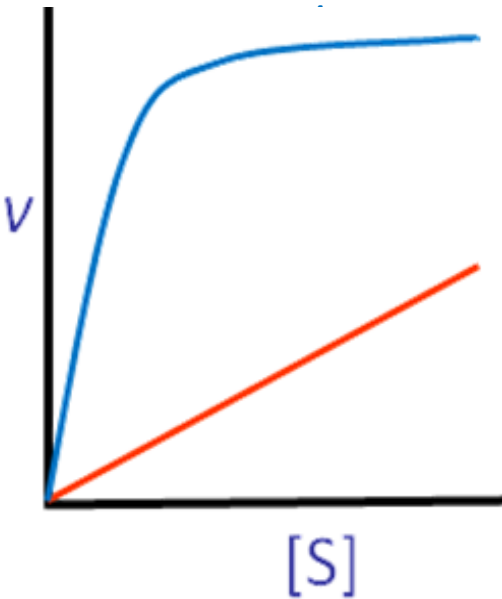
$$v = \frac{d[S]}{dt}$$

$$v = k [S]$$

$S^\ddagger =$  intermedio di reazione

dove  $v =$  velocità di reazione ( $M s^{-1}$  o  $M/s$ )

$k =$  costante di velocità ( $s^{-1}$  o  $1/s$ )



$S^\ddagger =$  intermedio di reazione

$S \rightarrow S^\ddagger \quad \Delta G^\ddagger$  positivo

(barriera energetica)

$$k = c \cdot \exp^{-(\Delta G^\ddagger/RT)}$$

$$\Delta G^\ddagger \downarrow \quad k \text{ e } v \uparrow$$

- per una reazione unimolecolare, senza catalisi,  $v \propto [S]$  e dipende da  $k$  (reaz. 1° ordine)
- per una reazione bimolecolare (2° ordine,  $S_1 + S_2 \rightleftharpoons P$ )  $v = k[S_1][S_2]$ ;  $v \propto [S]^2$  ( $k \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
- se la reazione è catalizzata da un enzima, si raggiunge una velocità massima e la reazione tende verso ordine 0 ( $< 1$ )

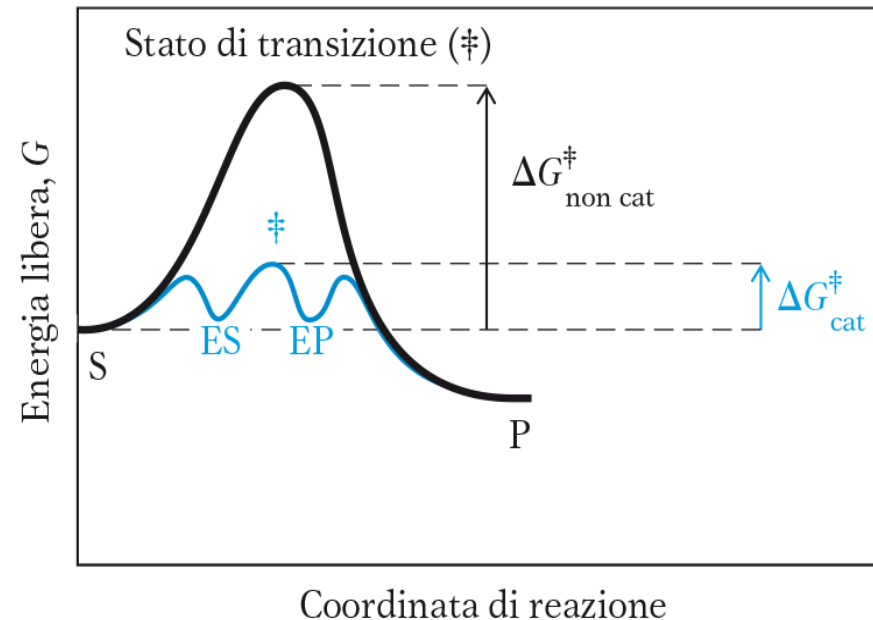
# Gli enzimi diminuiscono l'energia di $S^\ddagger$ (cont.)

## ► Gli enzimi accelerano le reazioni facilitando la formazione dello stato di transizione

- una reazione enzimatica è descritta dall'equazione stechiometrica:



- Si forma un complesso enzima-substrato (ES) che facilita la formazione dello stato di transizione ( $ES^\ddagger$ ), che si trasforma in prodotto ancora complessato (EP), e poi si stacca (P)
- l'enzima favorisce  $S^\ddagger$  in vari possibili modi: 1) distorcendo S; 2) protonando o deprotonando 2) stabilizzando la carica di  $S^\ddagger$ , 3) formando un legame covalente transiente con  $S^\ddagger$
- crea un nuovo percorso di reazione dove  $\Delta G^\ddagger$  è diminuita, riducendo la barriera energetica alla reazione e aumentandone la velocità.
- la reazione è ad equilibrio e la riduzione di  $\Delta G^\ddagger$  avviene in entrambe le direzioni
- L'enzima NON ALTERA l'equilibrio ma consente di raggiungerlo in tempi molto minori



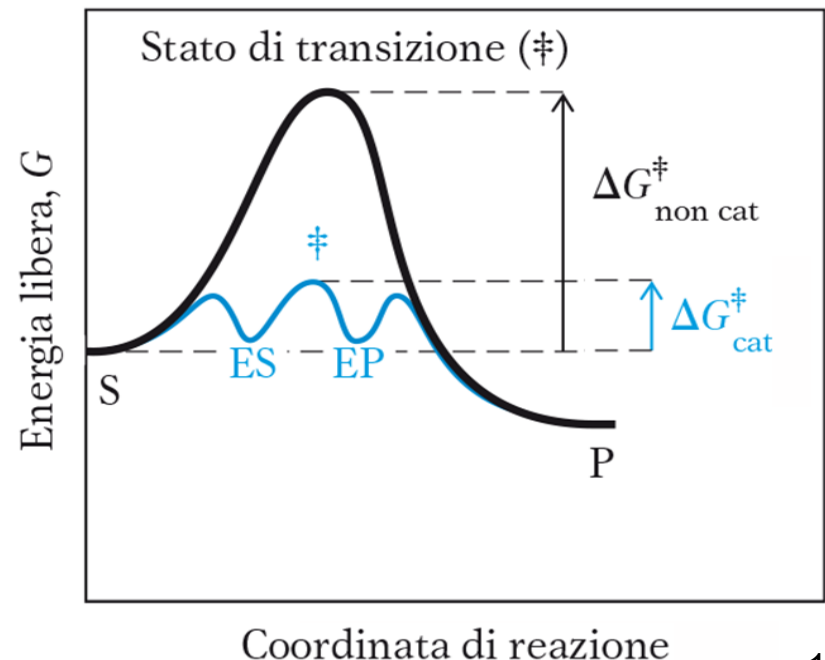
# Gli enzimi diminuiscono l'energia di $S^\ddagger$ (cont.)

► In presenza di un enzima si raggiunge una velocità massima:

- una reazione enzimatica è descritta dall'equazione stechiometrica:



- Si forma un complesso enzima-substrato (ES) che facilita la formazione dello stato di transizione ( $ES^\ddagger$ ), che si trasforma in prodotto ancora complessato (EP), e poi si stacca (P)
- l'enzima favorisce  $S^\ddagger$  in vari possibili modi: 1) distorcendo S; 2) protonando o deprotonando 2) stabilizzando la carica di  $S^\ddagger$ , 3) formando un legame covalente transiente con  $S^\ddagger$
- crea un nuovo percorso di reazione dove  $\Delta G^\ddagger$  è diminuita, riducendo la barriera energetica alla reazione e aumentandone la velocità.
- la reazione è ad equilibrio e la riduzione di  $\Delta G^\ddagger$  avviene in entrambe le direzioni
- L'enzima NON ALTERA l'equilibrio ma consente di raggiungerlo in tempi molto minori

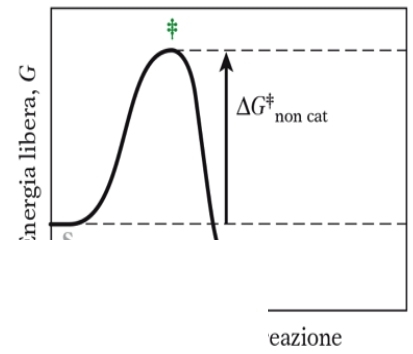
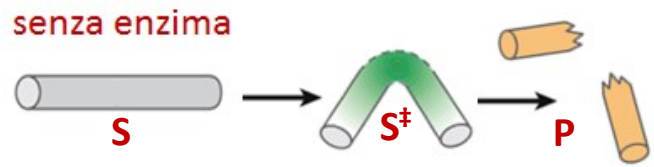


# Gli enzimi diminuiscono l'energia di $S^\ddagger$ (cont.)

► L'interazione tra E ed  $S^\ddagger$  è spesso migliore che tra E ed S

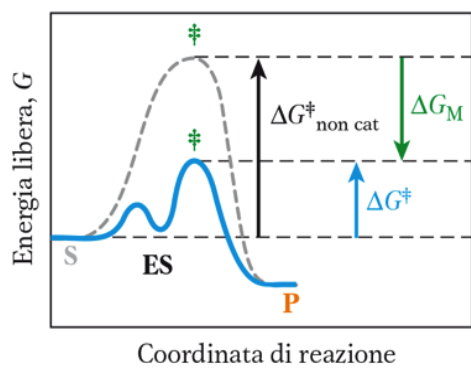
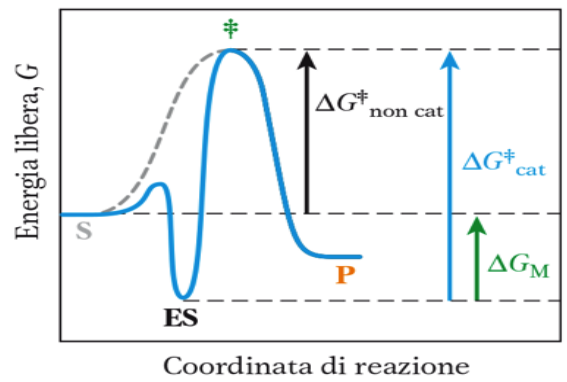
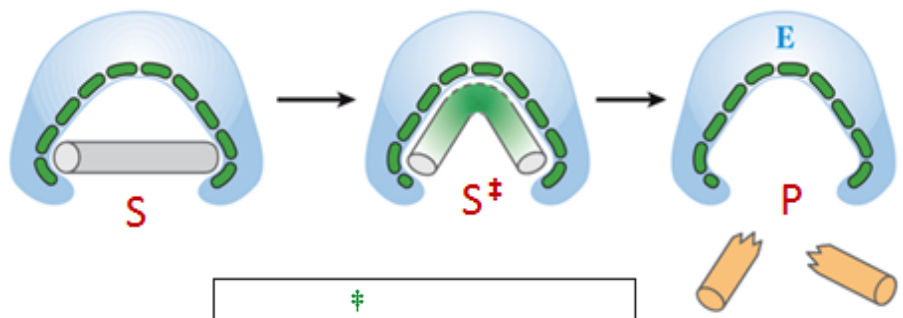
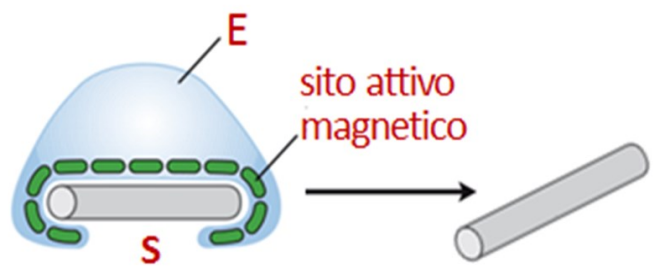
- La **formazione del complesso ES non è sufficiente** a spiegare il potere catalitico; è un complesso stabile, a bassa energia e scarsa reattività.
- Il sito attivo è **più complementare alla forma dello stato di transizione**, con il quale forma più interazioni

- Il concetto è illustrato dalla metafora della barretta di ferro



E complementare ad S

E complementare ad  $S^\ddagger$



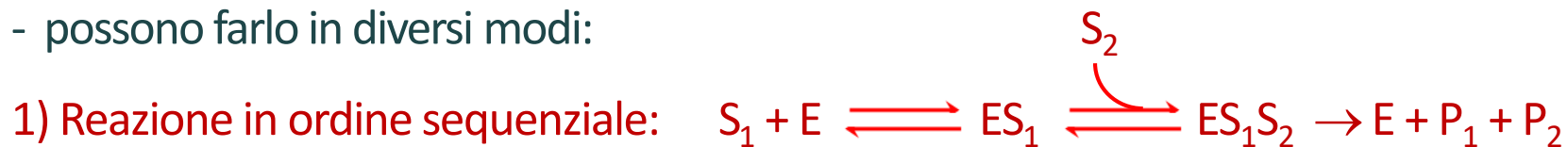


# Reazioni enzimatiche a due substrati

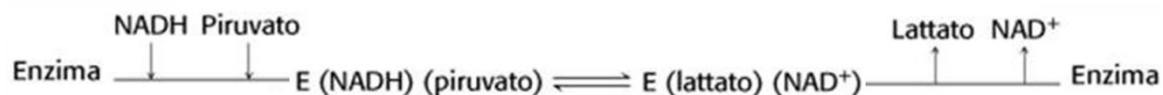
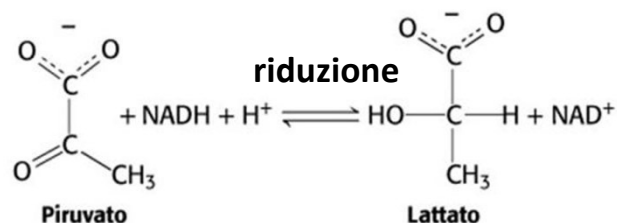
► Molti enzimi catalizzano reazioni con più substrati e producono più prodotti



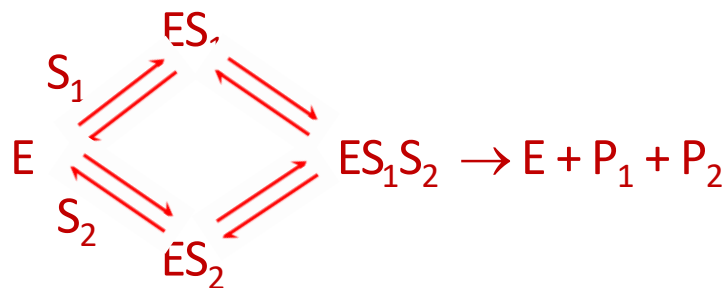
- possono farlo in diversi modi:



NADH partecipa in reazioni di ossidoriduzione catalizzate dalle *deidrogenasi* in questo modo



2) Reazione in ordine casuale:



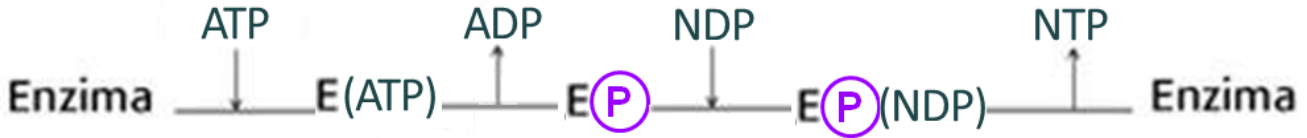
- In entrambe questi casi si forma un COMPLESSO TERNARIO (ES<sub>1</sub>S<sub>2</sub>)

# Reazioni enzimatiche a due substrati (cont.)

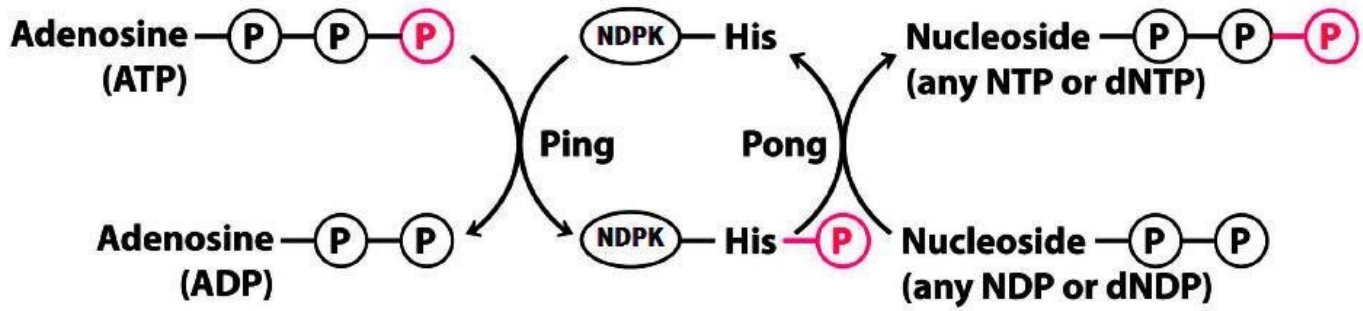
▶ Altri enzimi catalizzano reazioni multi-substrato/multi-prodotto senza formare un complesso ternario



- le *chinas* talvolta funzionano in questo modo, quando ATP ( $S_1$ ) trasferisce un fosfato su un residuo del sito catalitico con rilascio di ADP ( $P_1$ ) e poi questo lo trasferisce su  $S_2$ .



- per esempio nella *nucleoside difosfato chinasi (NDPK)*, ATP trasferisce un fosfato su un istidina nel sito catalitico, e questa poi lo trasferisce su un nucleoside difosfato (ATP)



# Classificazione degli enzimi

► La classificazione degli enzimi è basata sulle reazioni chimiche che catalizzano

- 1) **Ossidoriduttasi:** *reazioni redox (trasferimento O, H o e<sup>-</sup>)*
- 2) **Transferasi:** *trasferimento intermolecolare gruppi funzionali (es. -CH<sub>3</sub>, RCO-, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-)*
- 3) **Idrolasi:** *reazioni di idrolisi (scissione idrolitico di legami) (es. peptidici, glicosidici, estere e profoestere)*
- 4) **Liasi/sintasi:** *addizione o rimozione non idrolitica di gruppi chimici (es. C-C, C-O, C-S, C-N con meccanismo non idrolitico di rottura dei legami)*
- 5) **Isomerasi:** *riarrangiamenti intramolecolari*
- 6) **Ligasi (sintetasi):** *formazione di legami ATP dipendente (es. C-C, C-O, C-S, C-N accompagnata da idrolisi di ATP)*

- la classificazione indica il tipo di reazione catalizzata; **non specifica l'enzima ma la reazione**

- Il numero assegnato alla reazione è il primo presente nel codice numerico dell'enzima

# Classificazione degli enzimi: (Enzyme Commission N°)

## ► Sistema IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)

- definisce il **nome** dell'enzima (sistematico e comune) + il **codice numerico**
- **nome sistematico:** **nome substrato(i) + tipo di reazione + suffisso 'asi'**
- **nome comune:** nome **assegnato da chi lo ha scoperto**
- **numero E.C.:** **codice numerico** assegnato dalla **Enzyme Commission**

**Esocinasi** (nome comune) catalizza la reaz.: **Glucosio + ATP → glucosio-6-P + ADP**

classe	2	- transferasi
sottoclasse	2.7	- trasferimento di gruppi fosfato (chinasi)
sotto-sottoclasse	2.7.1	- trasferimento di gruppi fosfato su OH accettore
numero seriale	2.7.1.1	- <b>ATP:D-esoso-6-fosfotransferasi</b> (nome sistematico)

**Tripsina** (nome comune) - taglia legame peptidico dopo Arg o Lys

classe	3	- idrolasi
sottoclasse	3.4	- idrolisi di legami peptidici
sotto-sottoclasse	3.4.21	- <b>serina endopeptidasi</b>
numero seriale	3.4.21.4	

**idrolasi**   **peptidasi**  
↑   ↑  
EC **3.4.21.4**  
**serina endopeptidasi** ↙

- NB: enzimi diversi che catalizzano la stessa reazione, possono avere numeri EC identici o simili
- es. evoluzione convergente (isozimi) o divergente di enzimi (es. subtilisina EC 3.4.21.62)