

GLI ENZIMI: proteine con attività CATALITICA

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

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

§ Sono altamente specifici

§ Partecipano alla reazione ma non ne sono modificati.

§ NON alterano l'**energetica** delle reazioni.

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

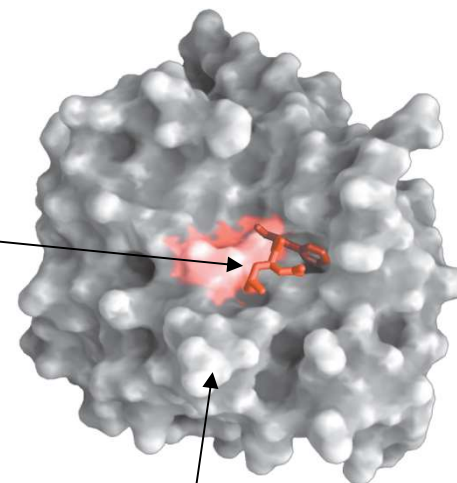
Gli ENZIMI sono altamente specifici

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

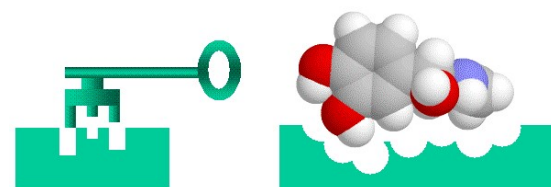
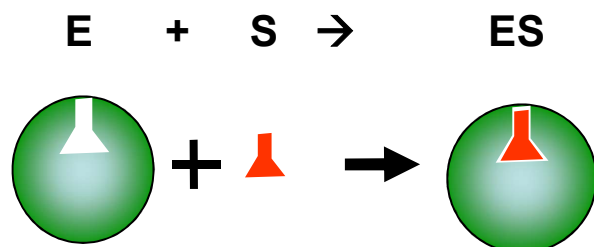
§ Riconoscono un reagente specifico (**IL/ SUBSTRATO/**, es. proteine, peptidi, oligonucleotidi, poli- ed oligosaccaridi, acidi grassi o altre molecole lipidiche, zuccheri ed altri carboidrati).

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

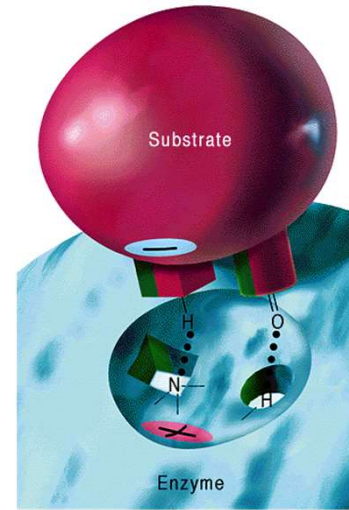
il SITO ATTIVO ha una forma **COMPLEMENTARE** a quella dei substrati *



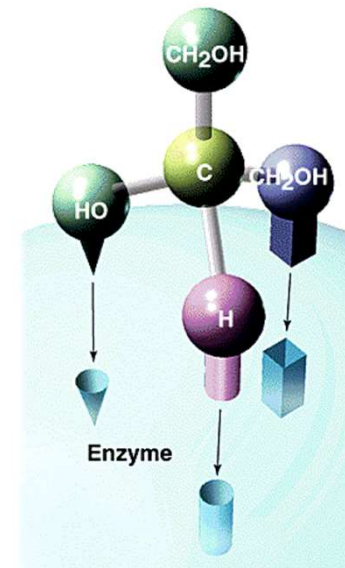
STRUTTURA TERZIARIA



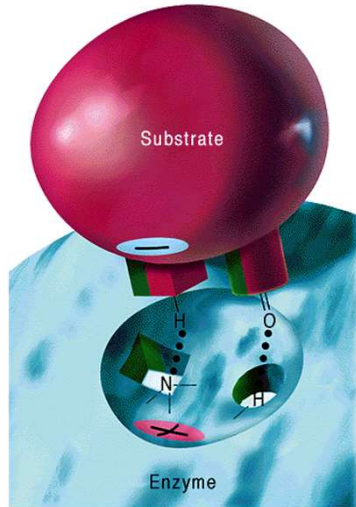
- Il sito attivo è costituito dal “negativo” del substrato
 - Si formano un insieme di legami deboli “esatti” fra enzima e substrato



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



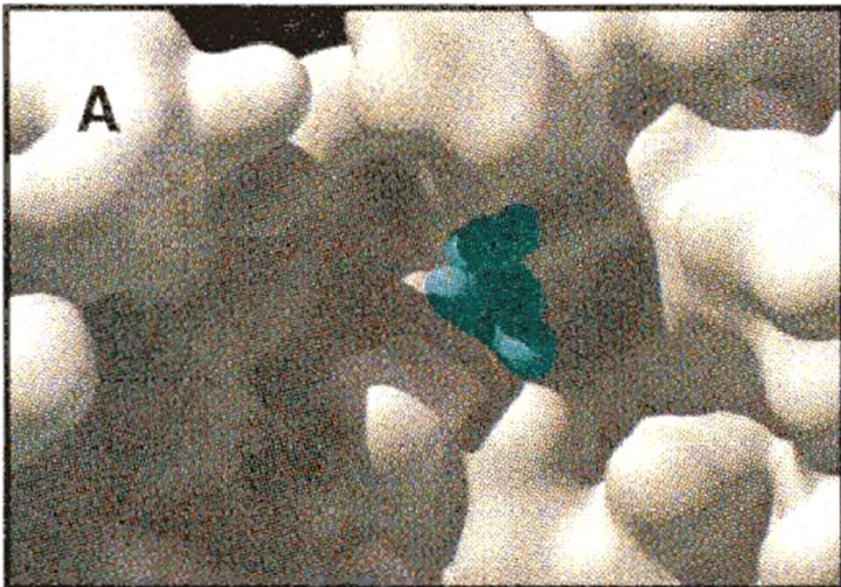
La complementarità di forma è data dalle caratteristiche chimiche degli aminoacidi che costituiscono la superficie del sito attivo.



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

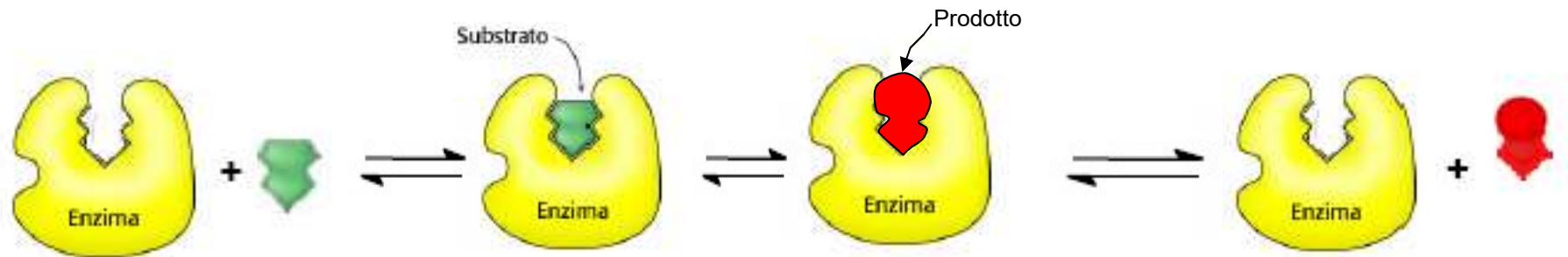
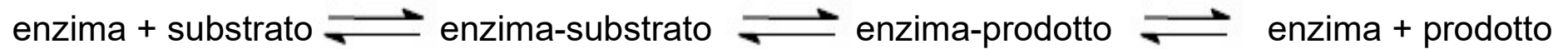
Garantisce che i gruppi chimici del/i substrato/i si avvicinino con l'orientazione giusta

- Prossimità (avvicinamento)
- Corretto orientamento



Il sito attivo occupa una regione molto piccola della proteina

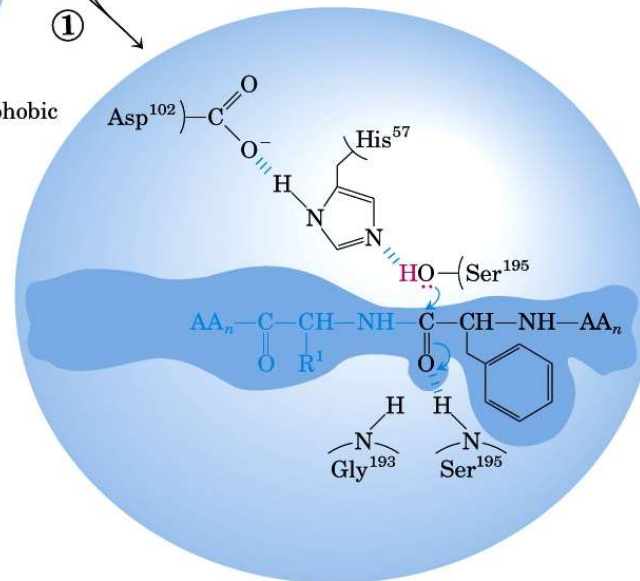
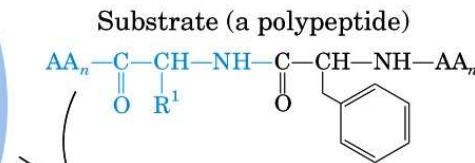
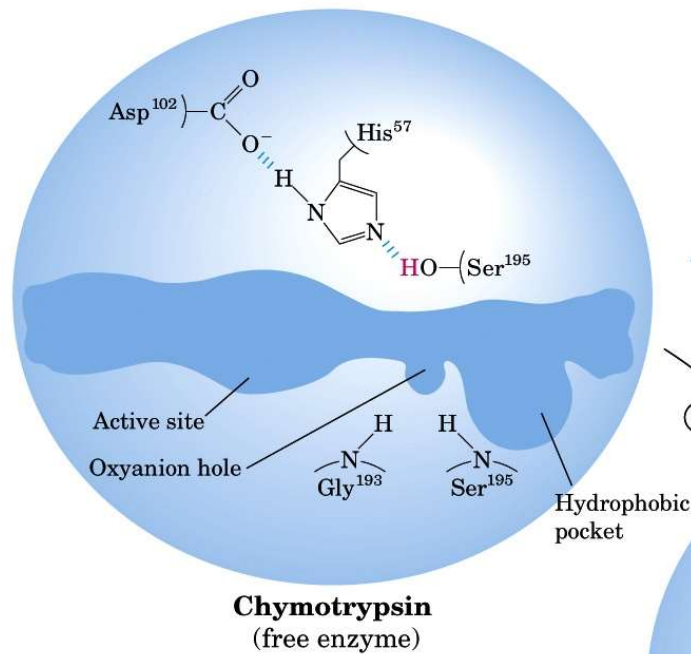
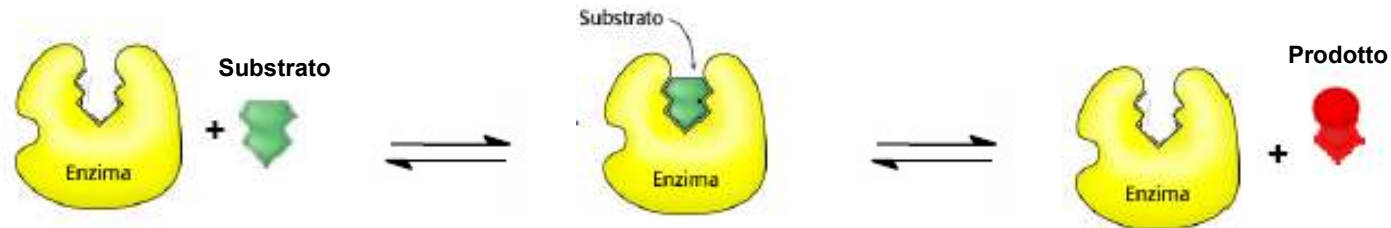
SEQUENZA DI INTERAZIONI IN UNA REAZIONE ENZIMATICA



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

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

Gli enzimi partecipano alla reazione ma NON ne sono modificati.



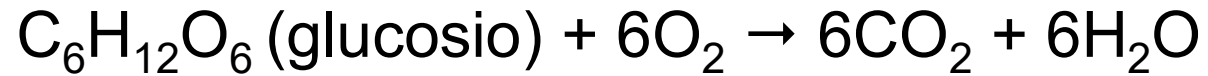
Ogni cop

Il numero
substrato

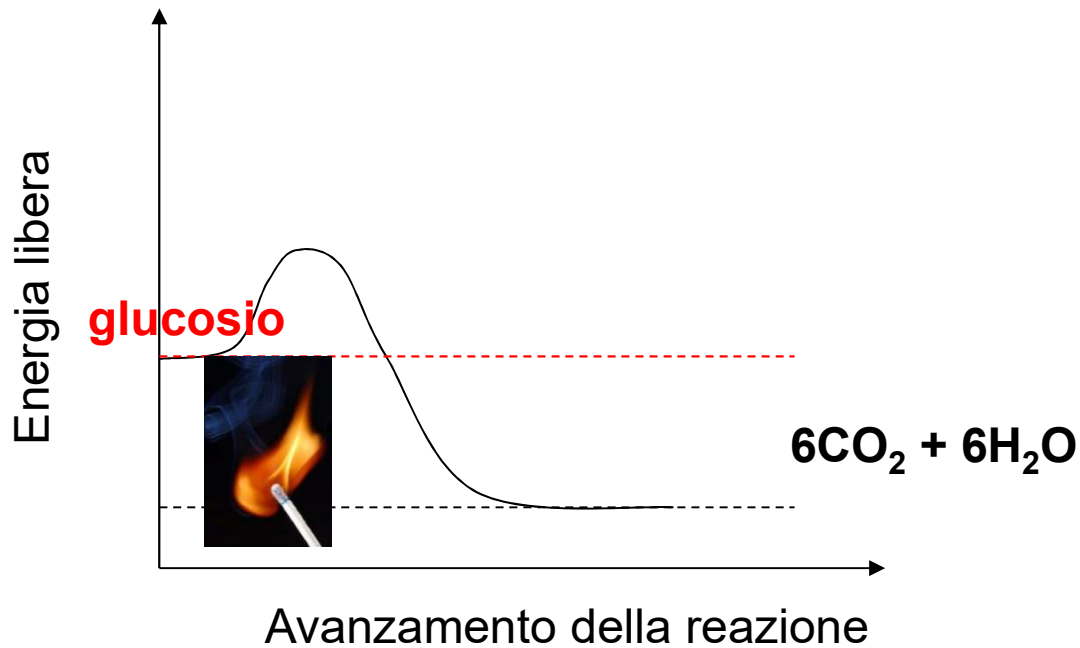
volte

di

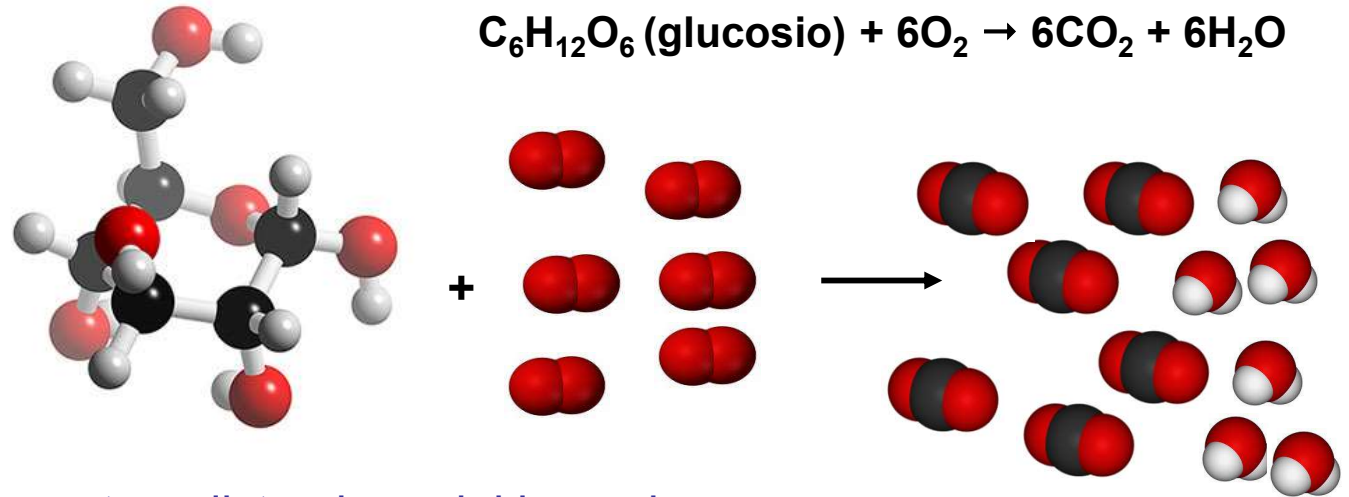
Gli enzimi NON alterano l'energetica delle reazioni.



OSSIDAZIONE DEL GLUCOSIO



molecola complessa
e ordinata

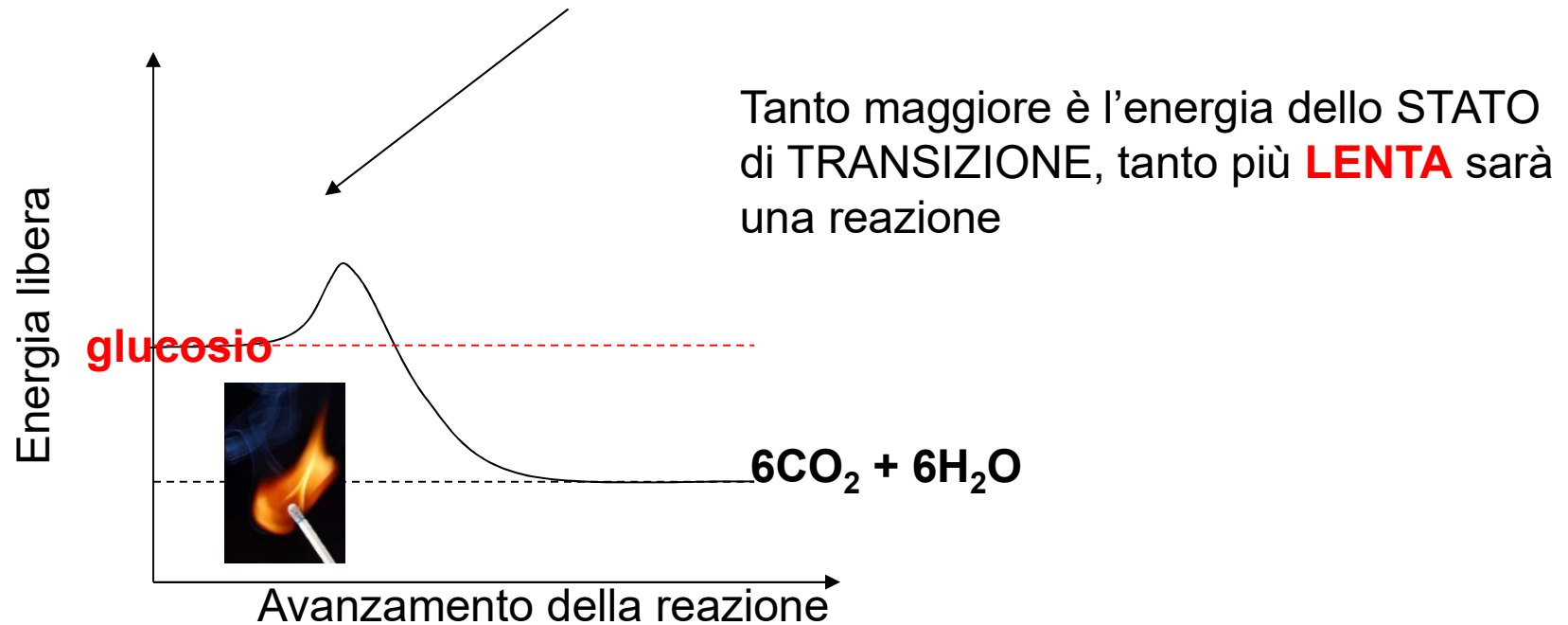


- stiramento e distorsione dei legami



STATO DI TRANSIZIONE

molecole semplici e
“disordinate”



Nomenclatura degli enzimi

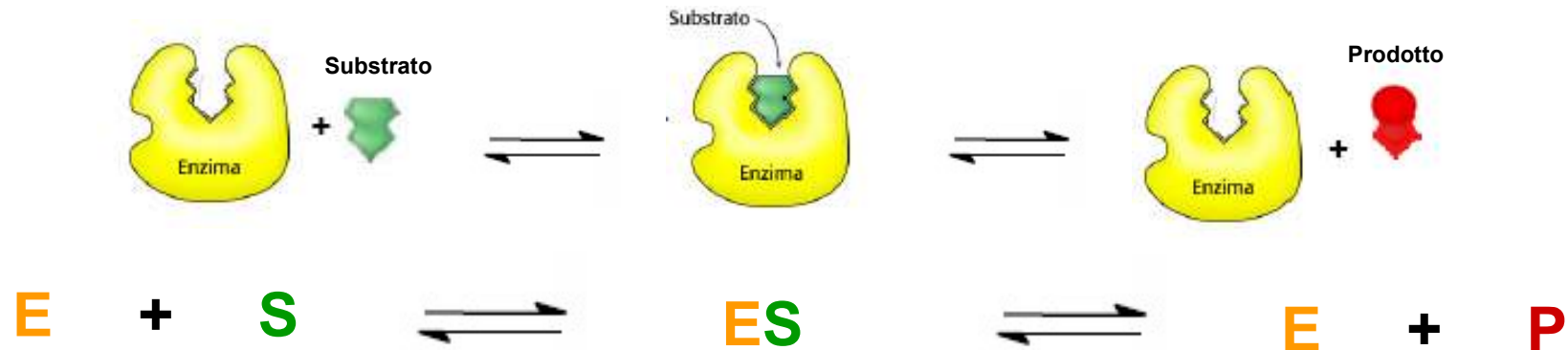
- Denominazione classica costituita da 3 parti:
 - Nome del substrato
 - Nome dell'eventuale coenzima
 - Nome della reazione catalizzata + “**asi**”

Esempio: Lattico-NAD-deidrogenasi

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

Progetto genoma umano :

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



- 1913: Michaelis e Menten

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



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

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

Equazione di Michaelis Menten

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

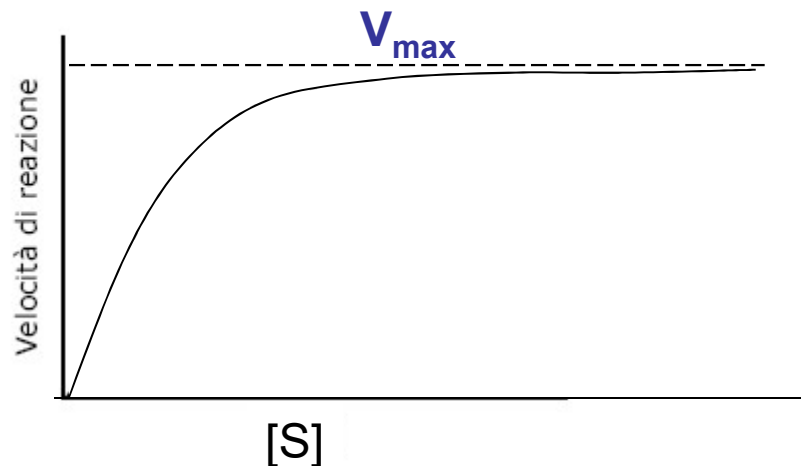
Equazione del tipo

$$y = ax / b+x$$

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

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

la reazione procede alla **MASSIMA VELOCITA'** possibile **V_{max}**



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

Significato della costante di Michaelis-Menten

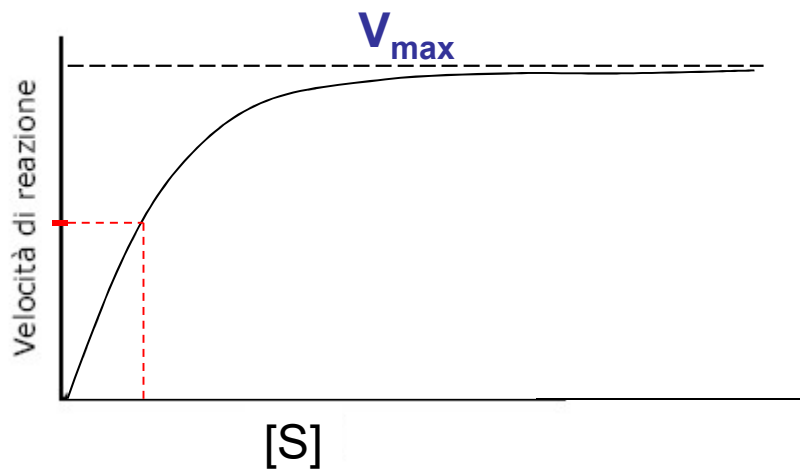
K_M è, dimensionalmente, una concentrazione: **mol/l**

diventa

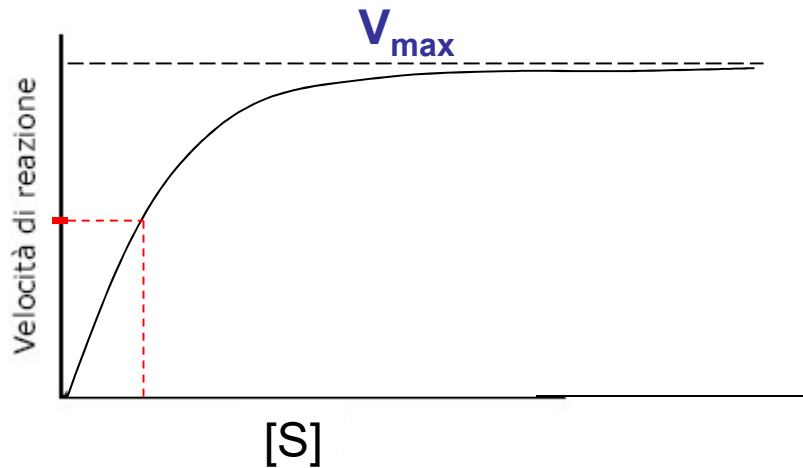
Se $K_M = [S]$

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

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



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

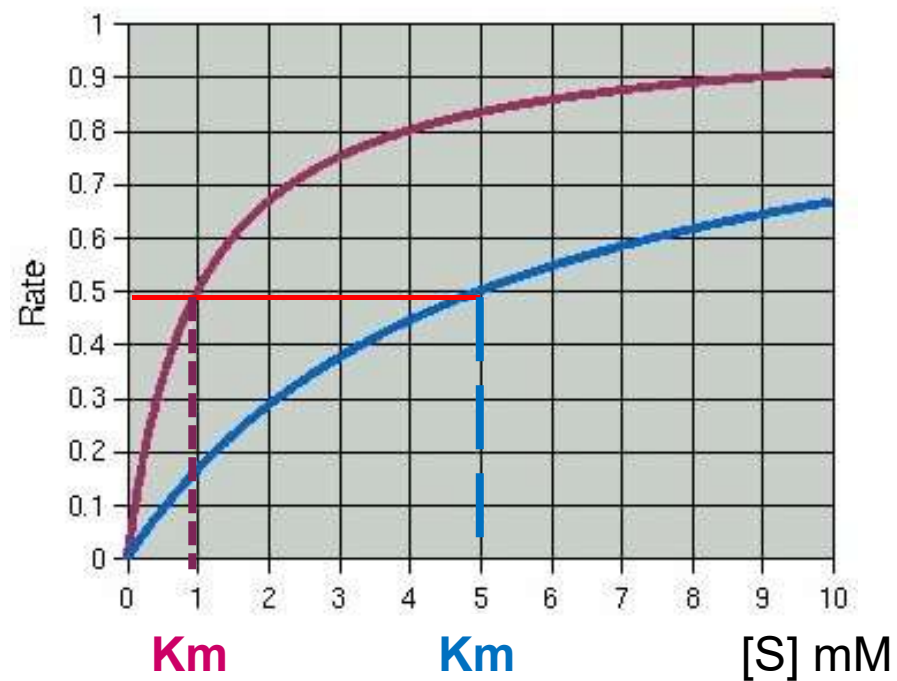


$K_M \Rightarrow$ E' la concentrazione di substrato alla quale il 50% dei siti attivi è occupato dal substrato stesso

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

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

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



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

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

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

Sarebbe più semplice lavorare con una retta.

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

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



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



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

Equazione di Lineweaver-Burk

Equazione del tipo

$$y = mx + b$$

$$y = 1/V$$

$$x = 1/[S]$$

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

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

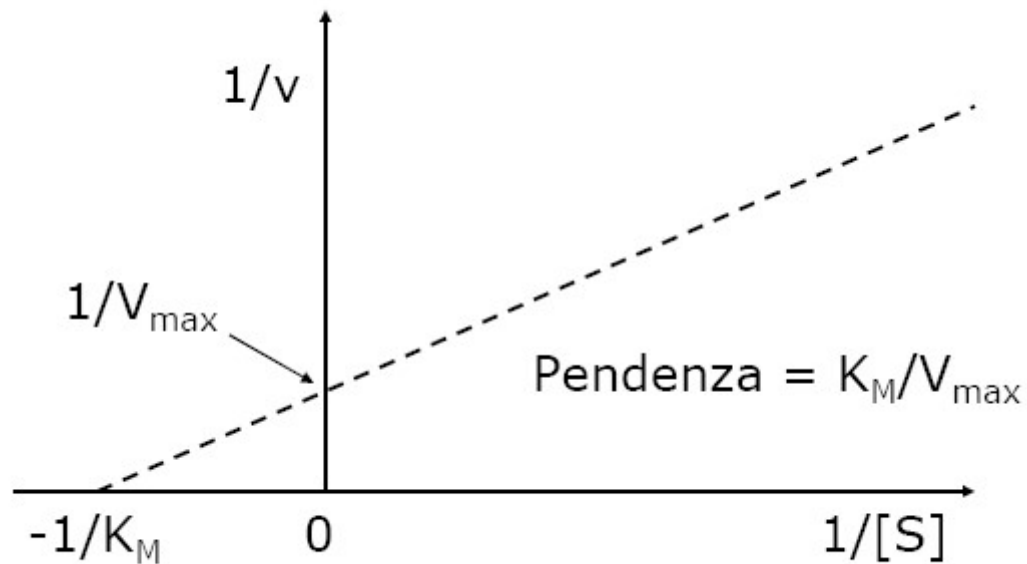
Equazione del tipo

$$y = mx + b$$

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

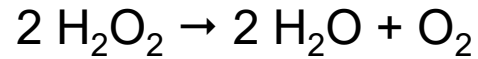
Intercetta asse y $\Rightarrow b = 1/V_{\text{max}}$

Intercetta asse x $\Rightarrow -1/K_M$



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

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



Sono stati ottenuti i seguenti dati sperimentali

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

DETERMINARE K_M e V_{max}

Calcolando i reciproci

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

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

1/H₂O₂ 1/Velocità

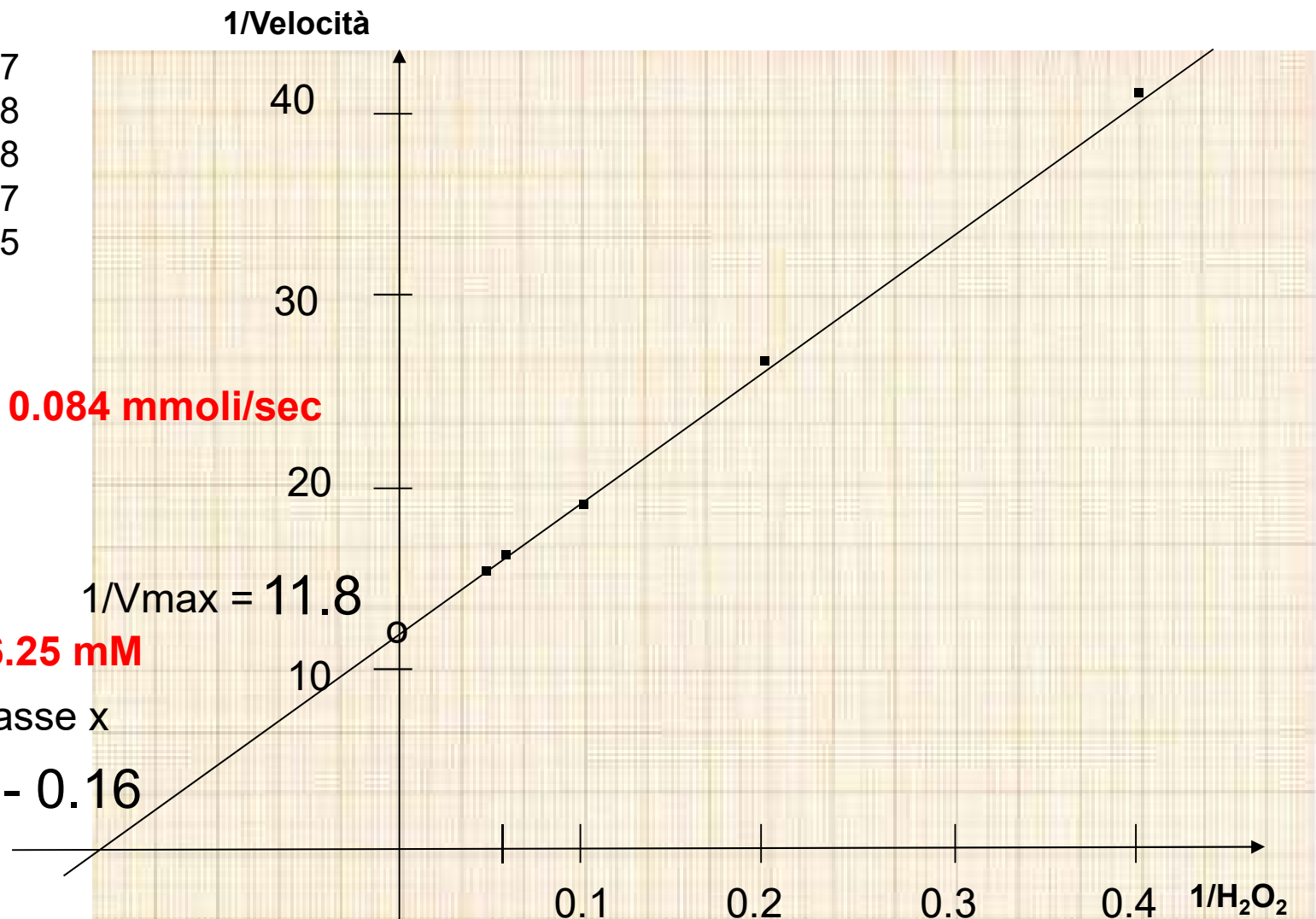
0,4	41,667
0,2	27,778
0,1	18,868
0,067	16,667
0,05	15,625

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

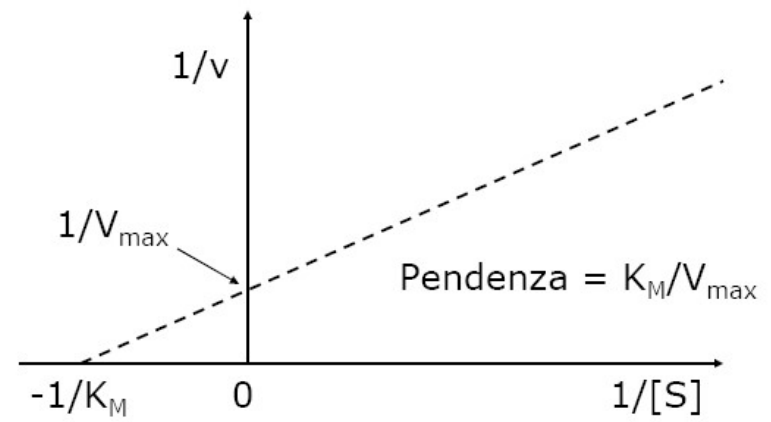
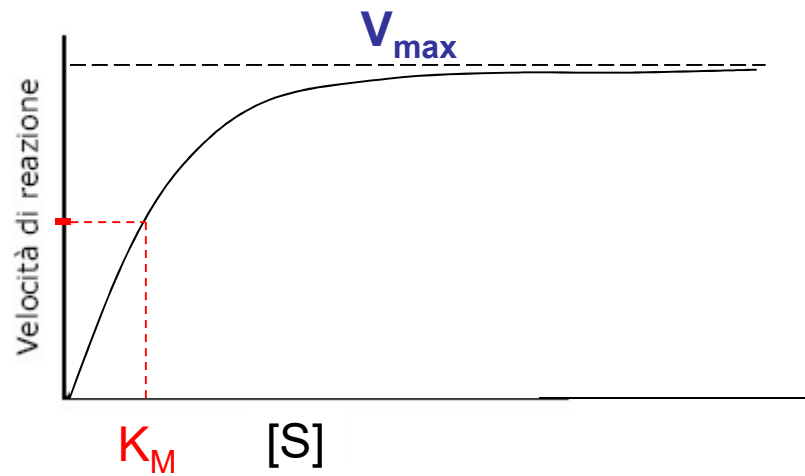
$K_M = -1 / 0.16 = \mathbf{6.25 \text{ mM}}$

Intercetta asse x

$- 1/K_M = - 0.16$



$$6,25 : 50 = x : 100$$



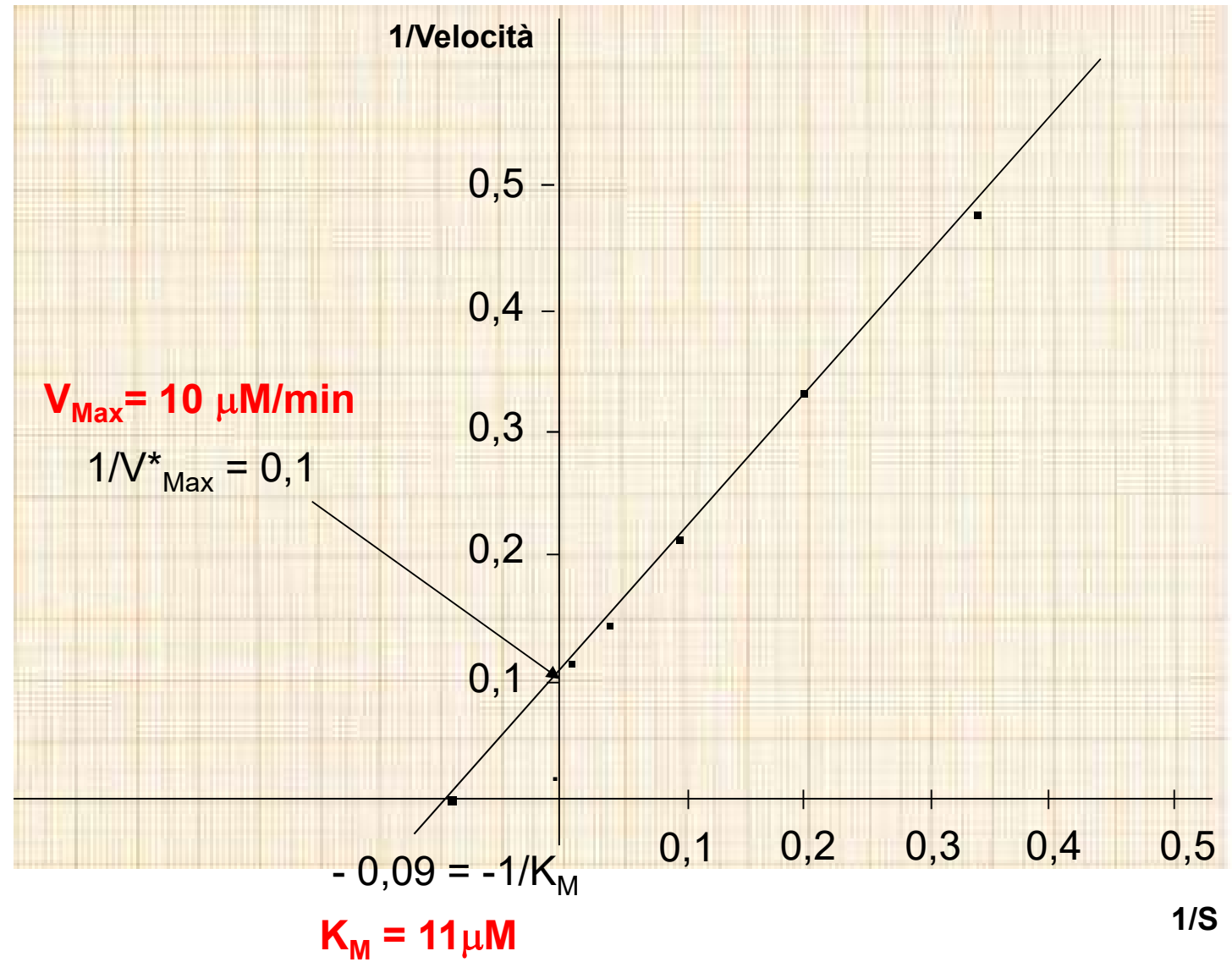
1. La cinetica di un enzima è studiata ed i valori ottenuti dall'esperimento sono i seguenti:

[S] $\mu\text{mol/L}$	Velocità ($\mu\text{mol/L})\text{min}^{-1}$
3	2,1
5	2,9
10	4,5
30	6,8
90	8,1

- a) Determinare K_M e $V_{\max}$
b)

$1/[S] =$ 0,334
0,200
0,100
0,030
0,011

$1/V =$ 0,476
0,344
0,222
0,147
0,123



1. La cinetica di un enzima è studiata ed i valori ottenuti dall'esperimento sono i seguenti:

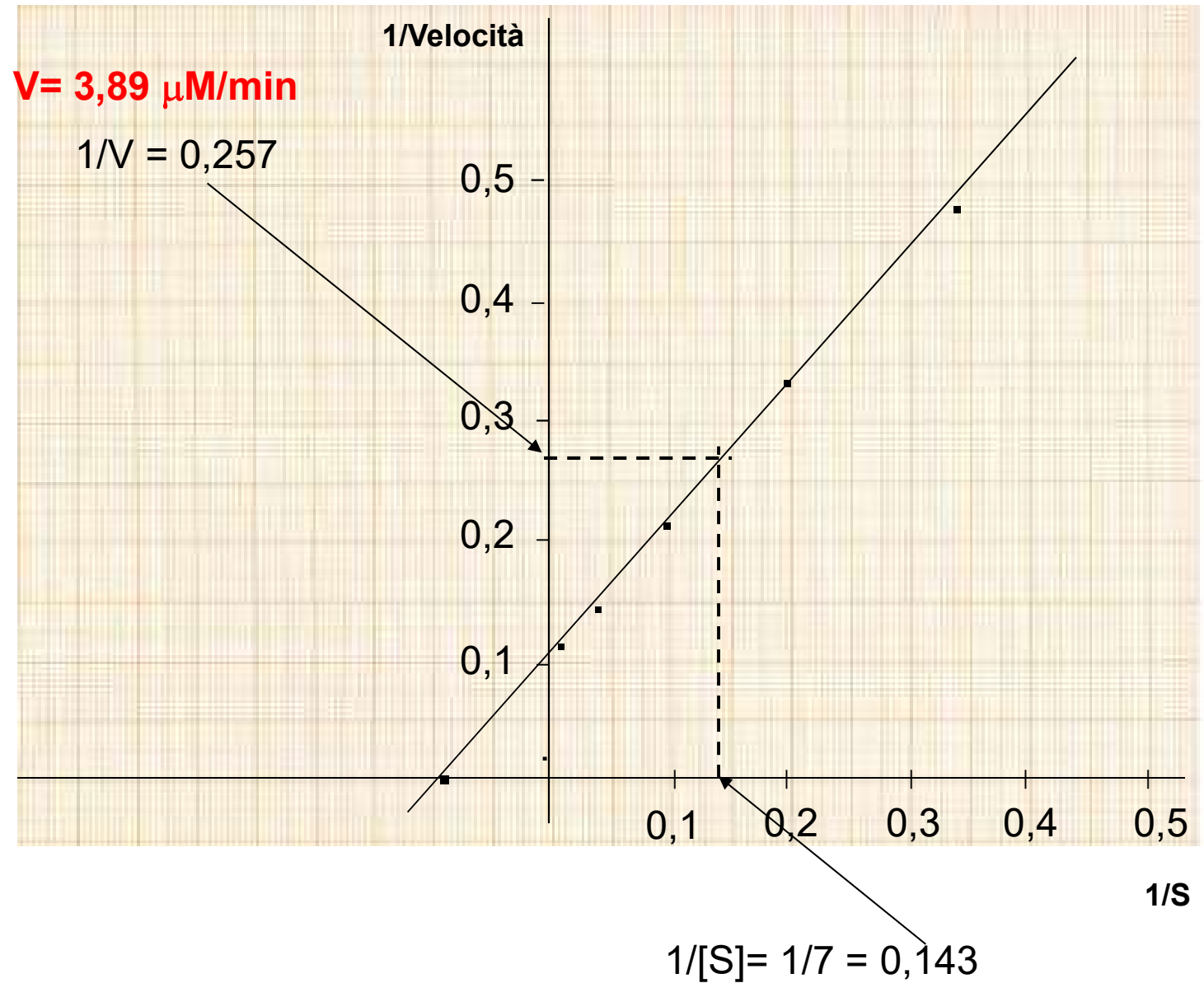
[S] $\mu\text{mol/L}$	Velocità ($\mu\text{mol/L})\text{min}^{-1}$
3	2,1
5	2,9
10	4,5
30	6,8
90	8,1

a) Determinare K_M e $V_{\max}$

b) Calcolare la velocità di reazione quando la concentrazione del substrato è pari a $7 \mu\text{mol/L}$

$1/[S] =$ 0,334
0,200
0,100
0,030
0,011

$1/V =$ 0,476
0,344
0,222
0,147
0,123



$$V_{\text{Max}} = 10 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_M = 11 \mu\text{M}$$

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

$$= \frac{10 \mu\text{M}/\text{min} (7 \mu\text{M})}{11 \mu\text{M} + 7 \mu\text{M}} = 70 \mu\text{M}/\text{min} / 18 \mu\text{M}$$

$$= 3,88 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$= 3,89 \mu\text{M}/\text{min}$$

1. I seguenti dati descrivono il legame dell'ossigeno alla mioglobina umana:

Considerando le analogie tra la mioglobina e gli enzimi

P_{O_2} (mmHg)	θ
0.5	0.161
1	0.277
2	0.434
3	0.535
4	0.605
6	0.697

a) Calcolare la P_{50}

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

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

$$\theta = \frac{1 [L]}{[L] + Kd}$$

$$\frac{1}{\Theta} = \frac{P50}{1} \frac{1}{pO_2} + \frac{1}{1}$$

P_{O₂} (mmHg)	1/P_{O₂}	θ	1/θ
0.5	2	0.161	6.2
1	1	0.277	3.6
2	0.5	0.434	2.3
3	0.33	0.535	1.8
4	0.25	0.605	1.65
6	0.17	0.697	1.4

$1/PO_2$

$1/\theta$

2

6.2

1

3.6

0.5

2.3

0.33

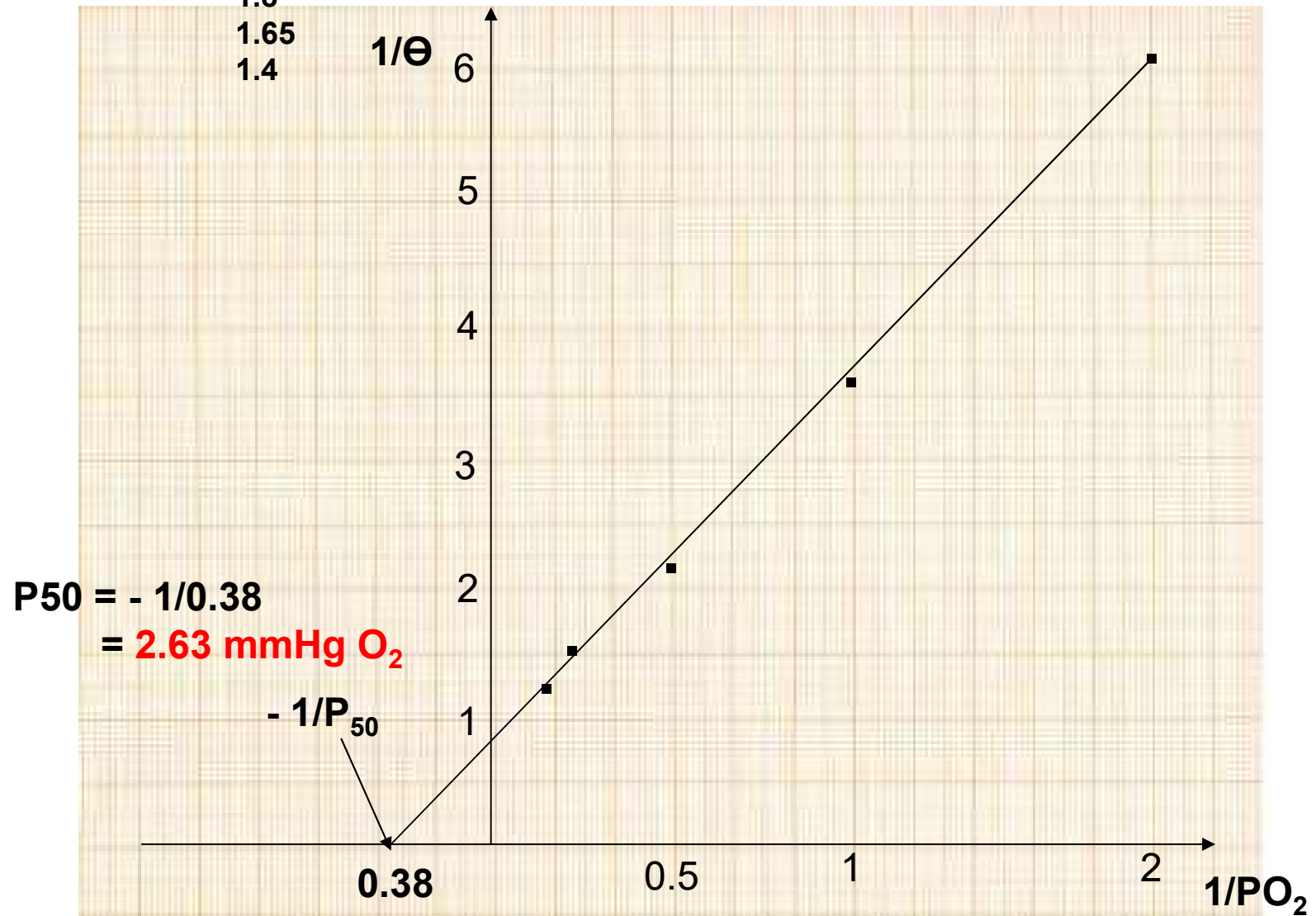
1.8

0.25

1.65

0.17

1.4



INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA

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

Inibizione reversibile

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

Inibizione irreversibile

- Modificano in modo irreversibile l'enzima

Inibitori reversibili

Inibitori Competitivi

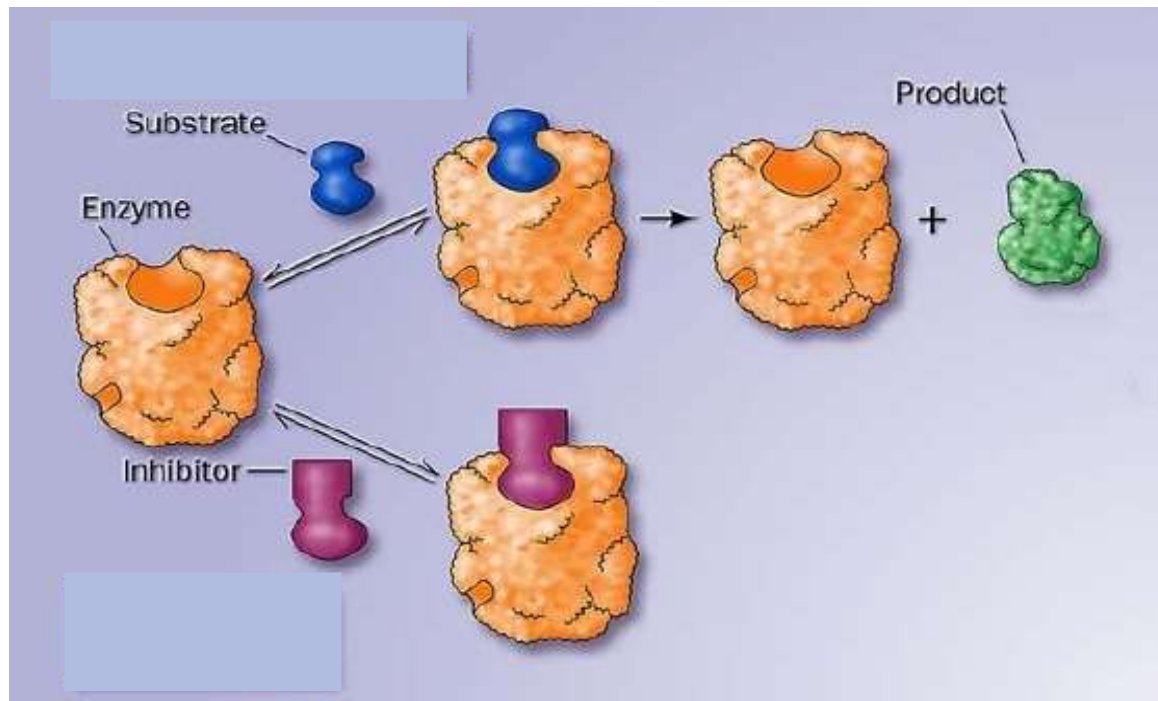
Inibitori NON Competitivi

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

Inibitori competitivi

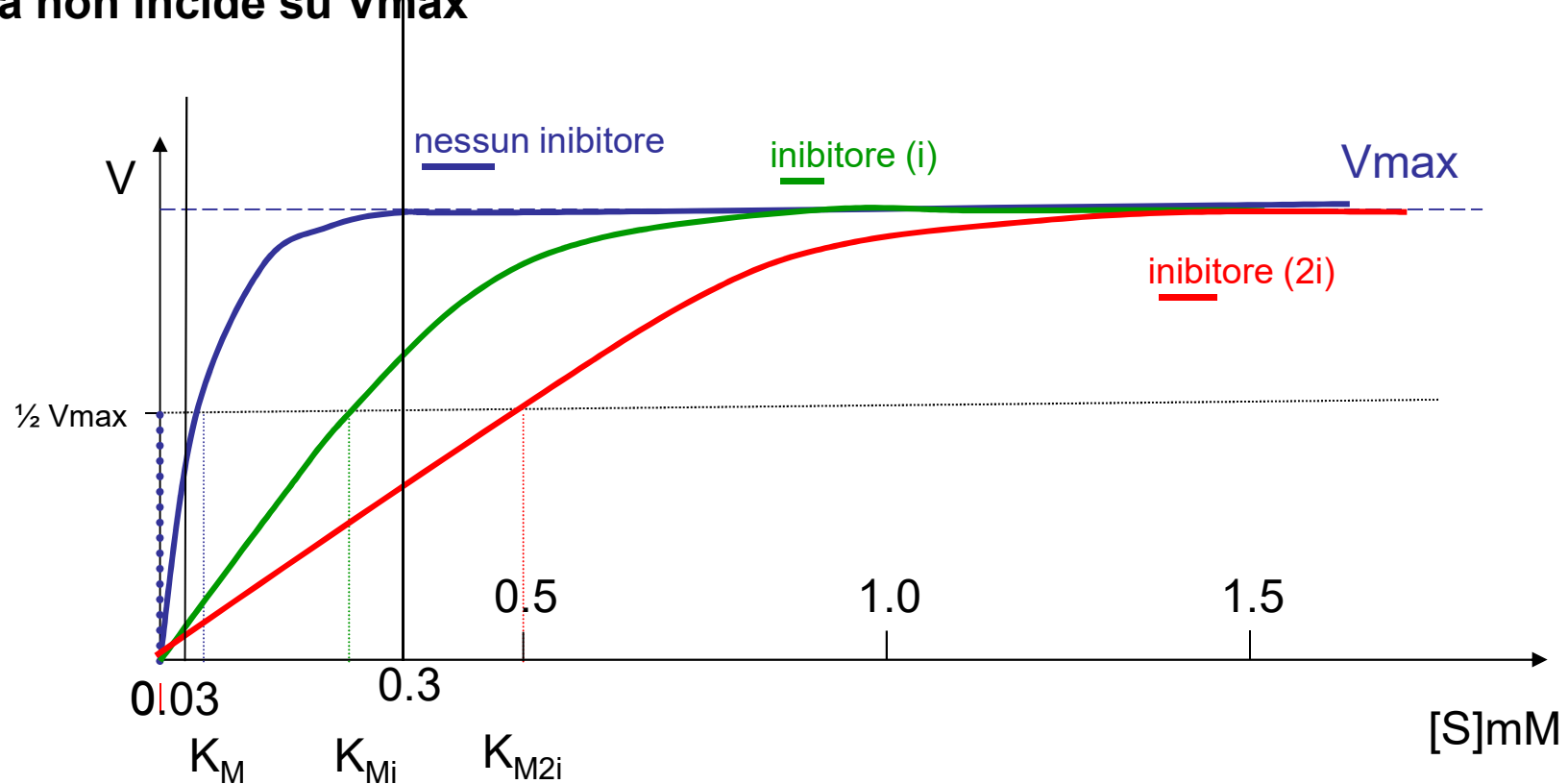
- Sono molecole simili al substrato
- Occupano lo stesso sito di legame
- Agiscono competendo con il substrato per lo stesso sito di legame, agiscono quindi sulla formazione del complesso ES.

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

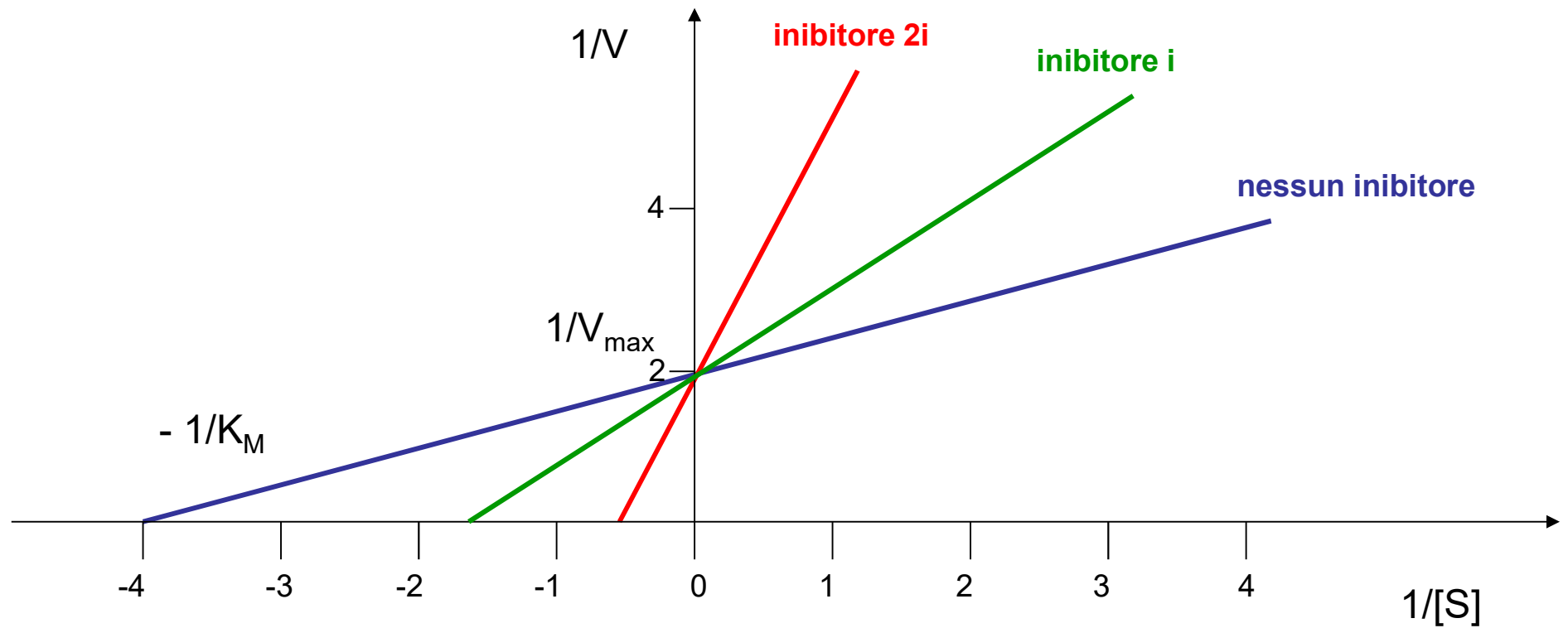


- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S

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

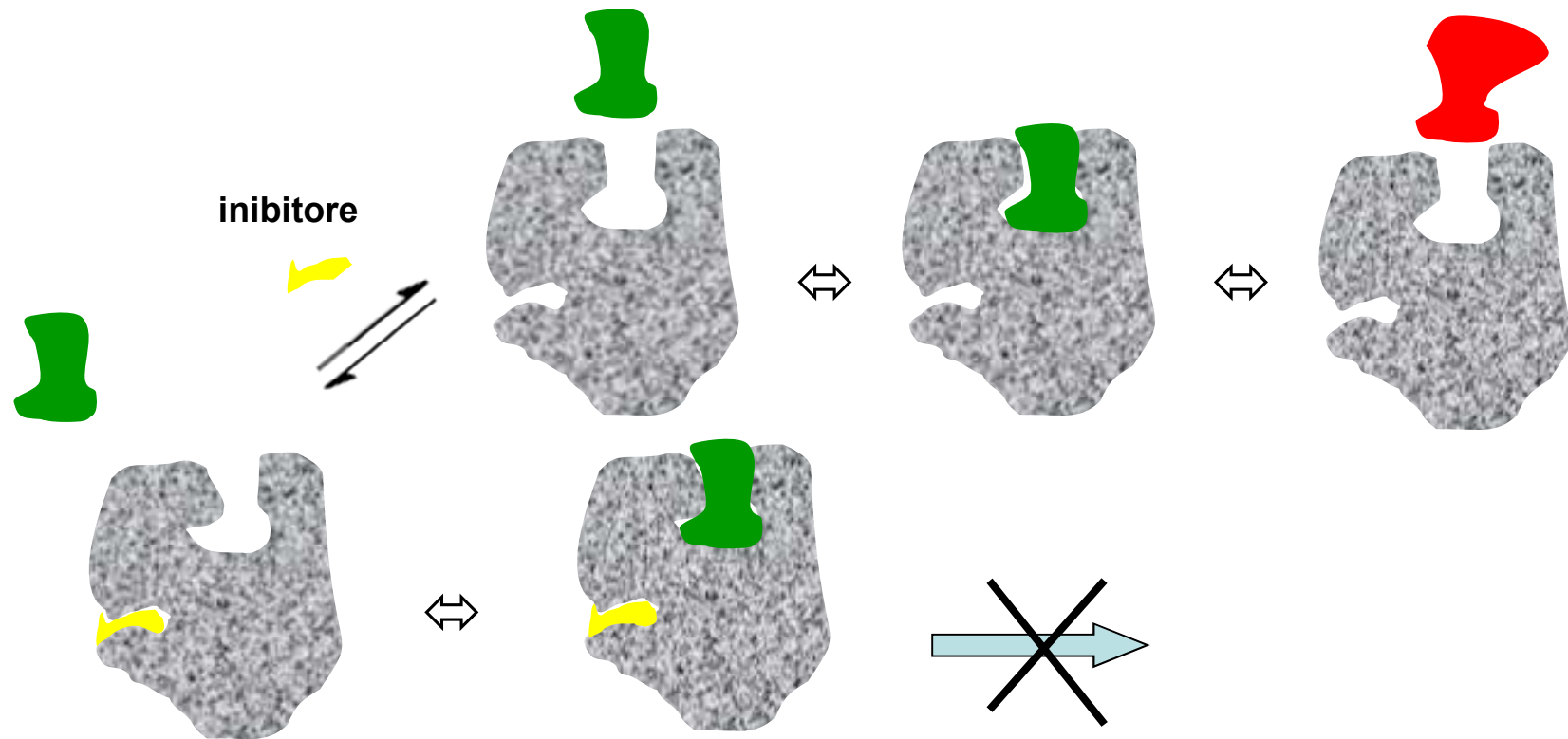


Risultato dell'INIBIZIONE COMPETITIVA secondo Lineweaver-Burk



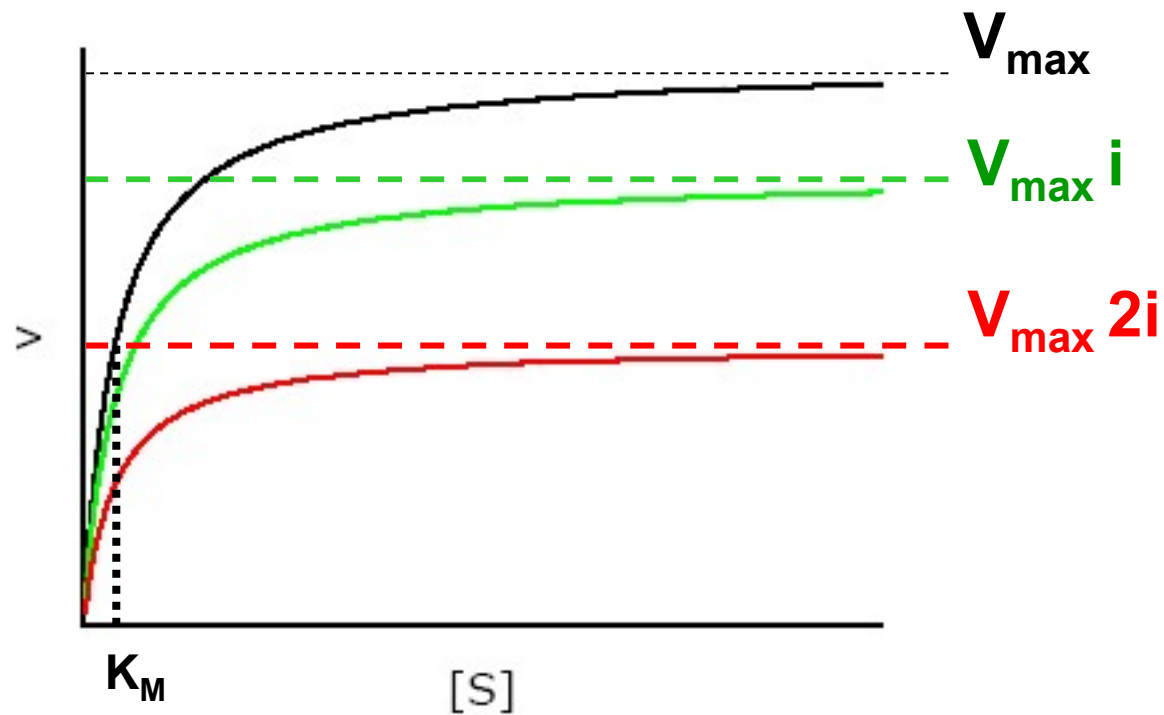
Inibitori non competitivi

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

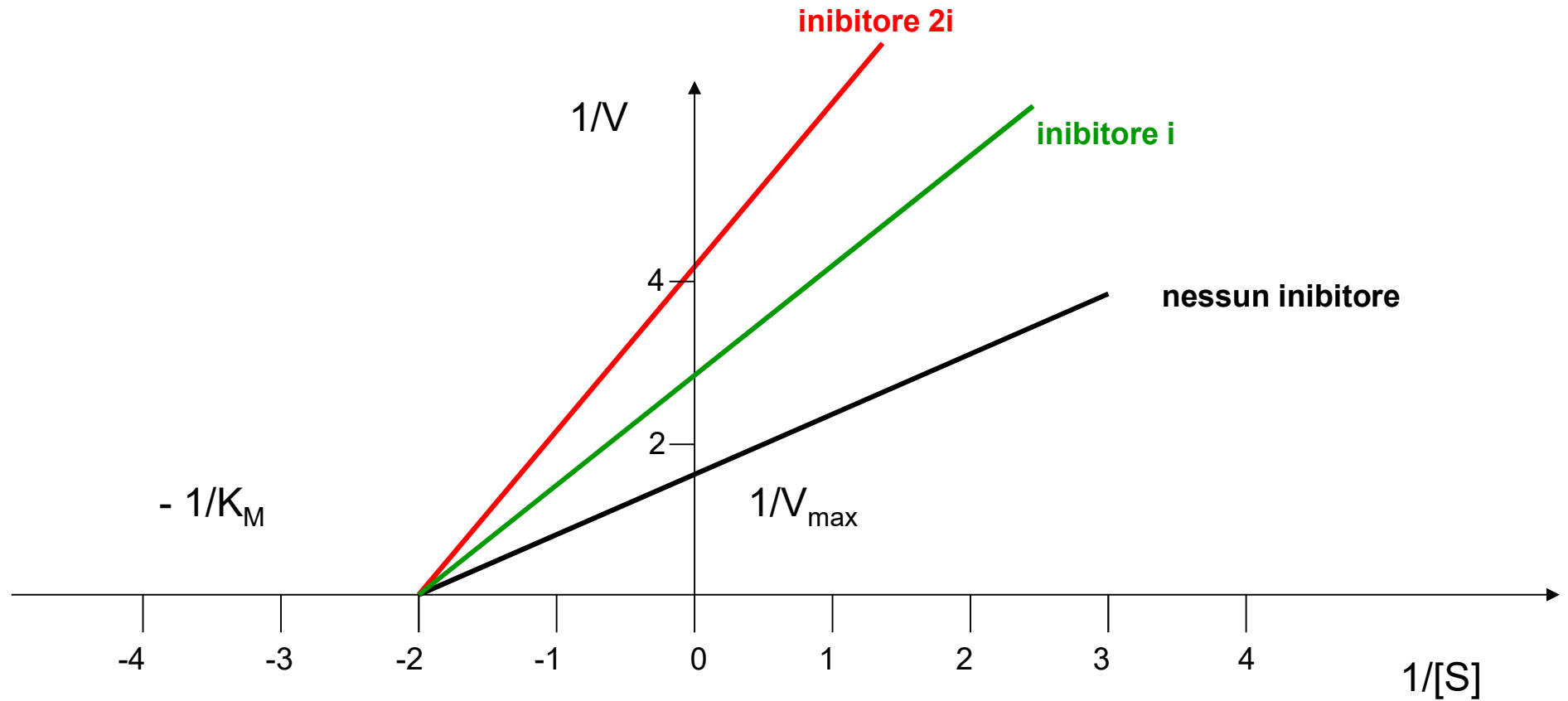


L'inibizione NON è rimossa aumentando la concentrazione di S

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



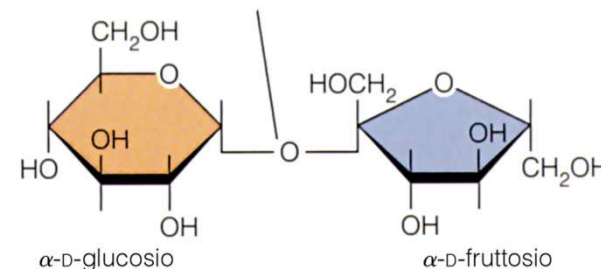
Risultato dell'INIBIZIONE NON COMPETITIVA secondo Lineweaver-Burk



Esercizio:

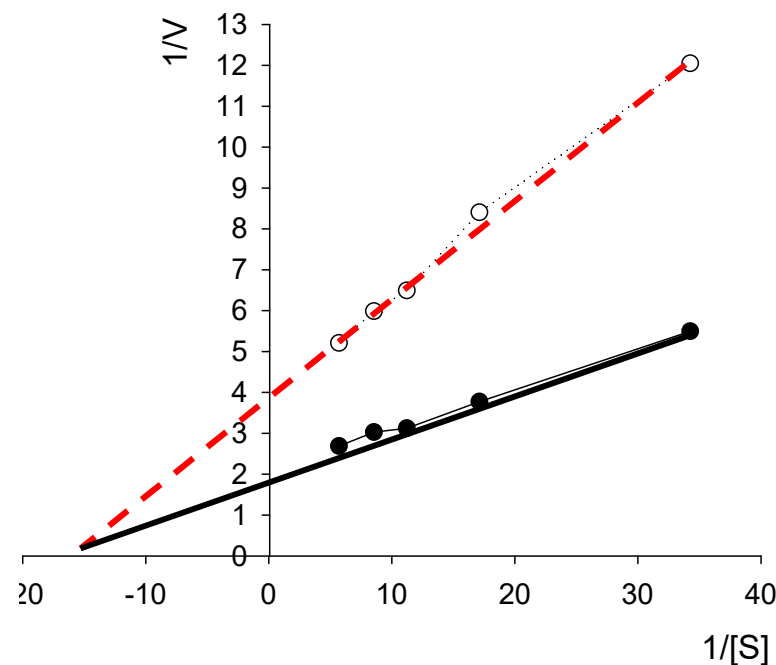
il saccarosio (zucchero da tavola) viene idrolizzato a glucosio e fruttosio in un esperimento di cinetica. L'enzima che catalizza questa reazione è chiamato INVERTASI.

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



(c) Saccarosio

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

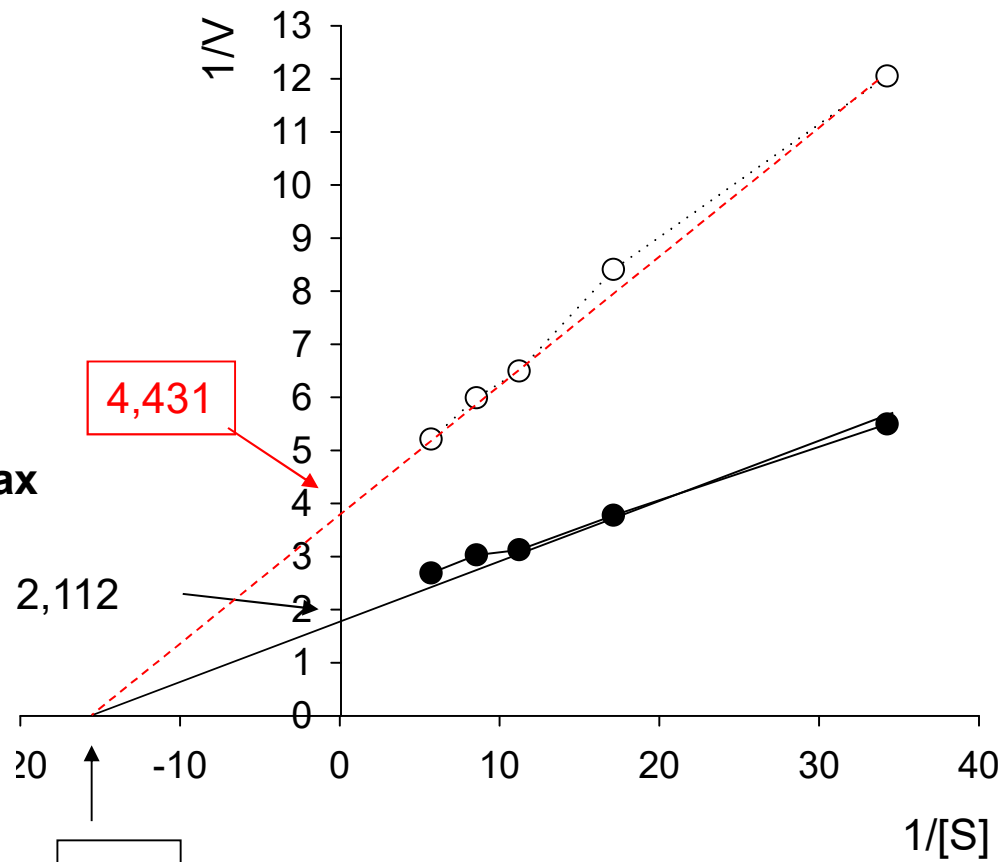


INIBIZIONE NON COMPETITIVA

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

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

intercetta y = $1/V_{\max}$



$K_M = 0,0625 \text{ mM}$