

## 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).

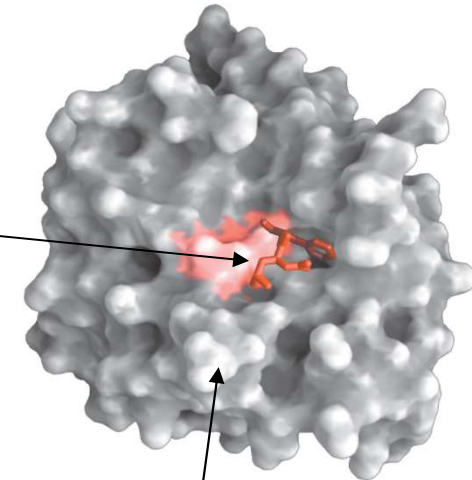
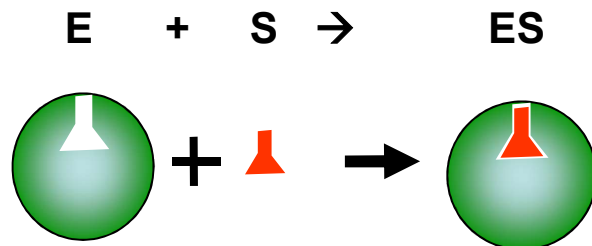
## Gli ENZIMI sono altamente specifici

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

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

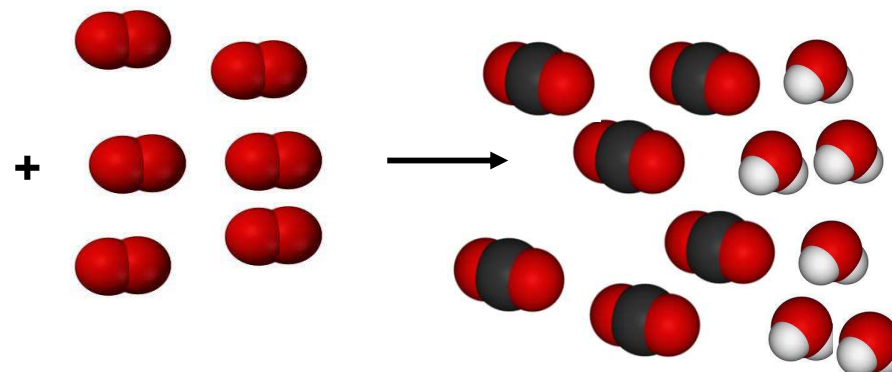
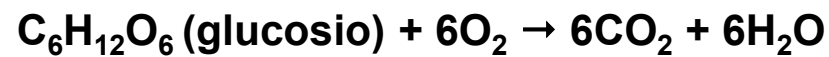
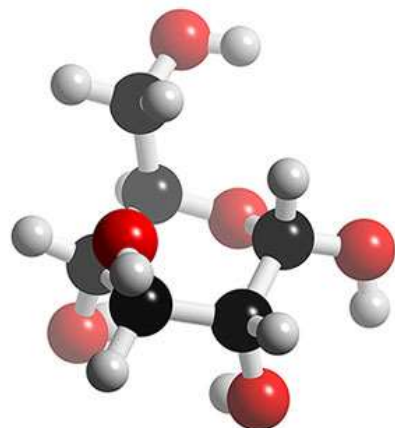
La regione della proteina che lega i(i) substrati(o) prende il nome di **SITO ATTIVO**

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



**STRUTTURA TERZIARIA**

molecola complessa  
e ordinata

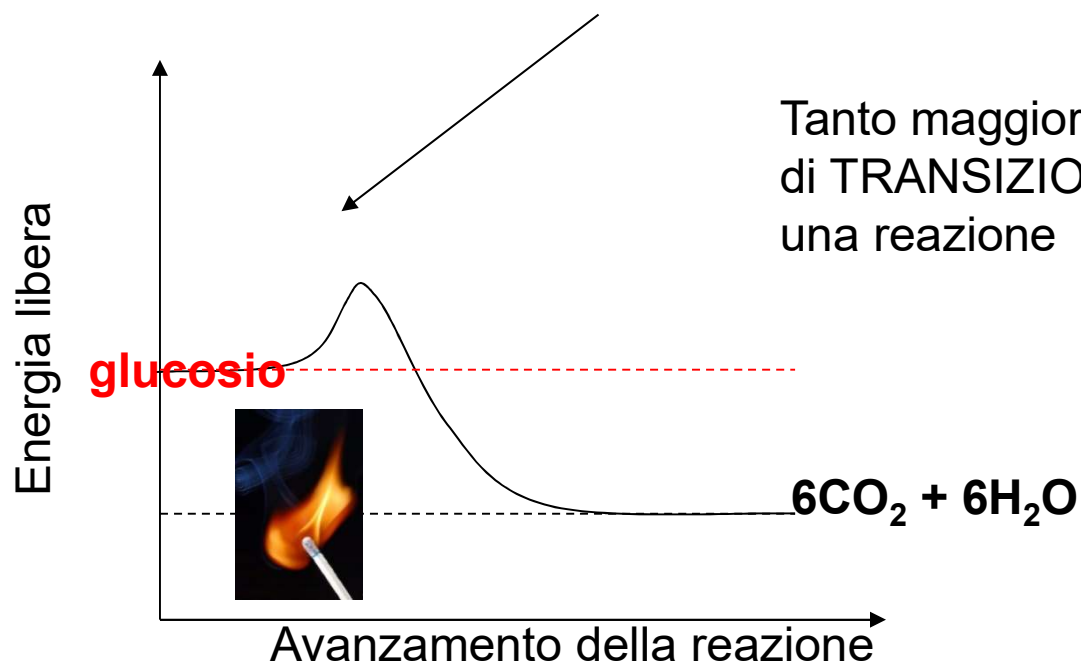


- stiramento e distorsione dei legami



**STATO DI TRANSIZIONE**

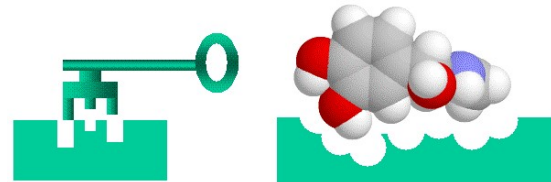
molecole semplici e  
“disordinate”



# INTERAZIONE TRA SUBSTRATO E SITO ATTIVO

## Modello chiave-serratura

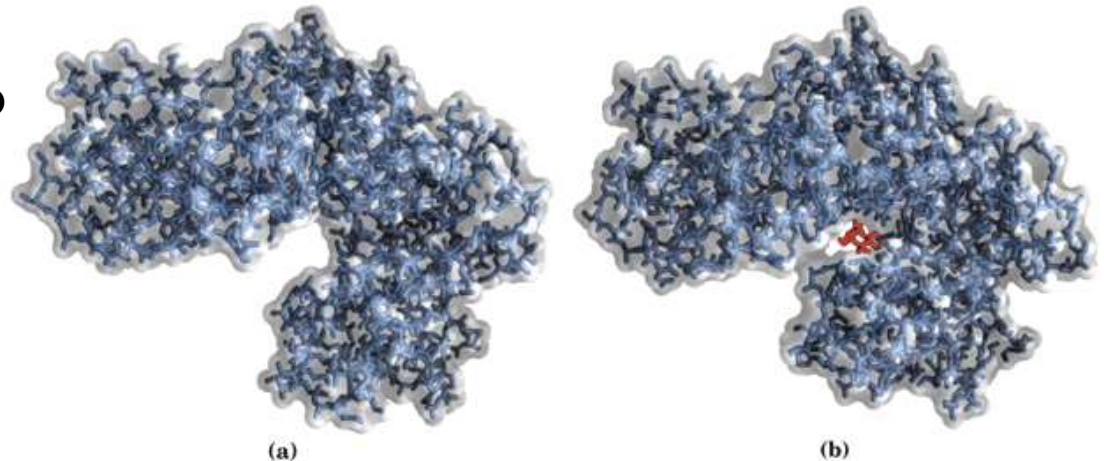
Prevede un alto grado di complementarità tra la forma del substrato e la geometria del sito attivo



Se fosse così l'interazione sarebbe MOLTO FORTE, al punto da diventare **irreversibile** (il complesso ES sarebbe estremamente stabile)

## Modello di adattamento indotto

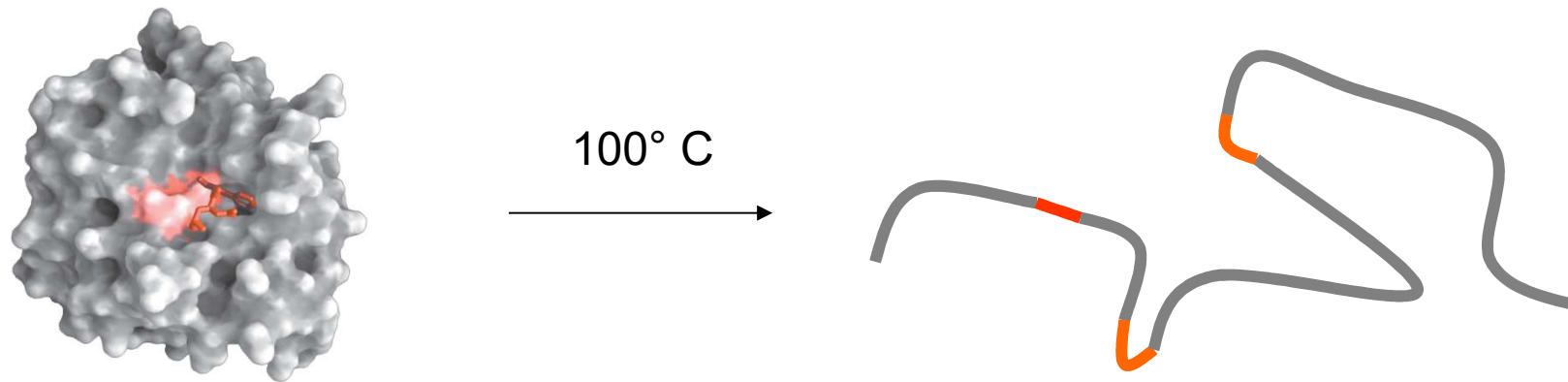
Tiene conto della flessibilità conformazionale delle proteine



Il sito attivo, legando il substrato, cambia leggermente conformazione, portando a tendere e distorcerne il legami

## Gli enzimi agiscono in un arco ristretto di condizioni (pH, temperatura, solvente)

Essendo proteine, la loro **STRUTTURA TERZIARIA** dipende dalle condizioni



La geometria (funzionalità) del **SITO ATTIVO** dipende dall'integrità della struttura terziaria

Solamente nella conformazione **NATIVA** gli aminoacidi che formano il **SITO ATTIVO** si trovano vicini e nelle corrette relazioni spaziali

## Nomenclatura degli enzimi

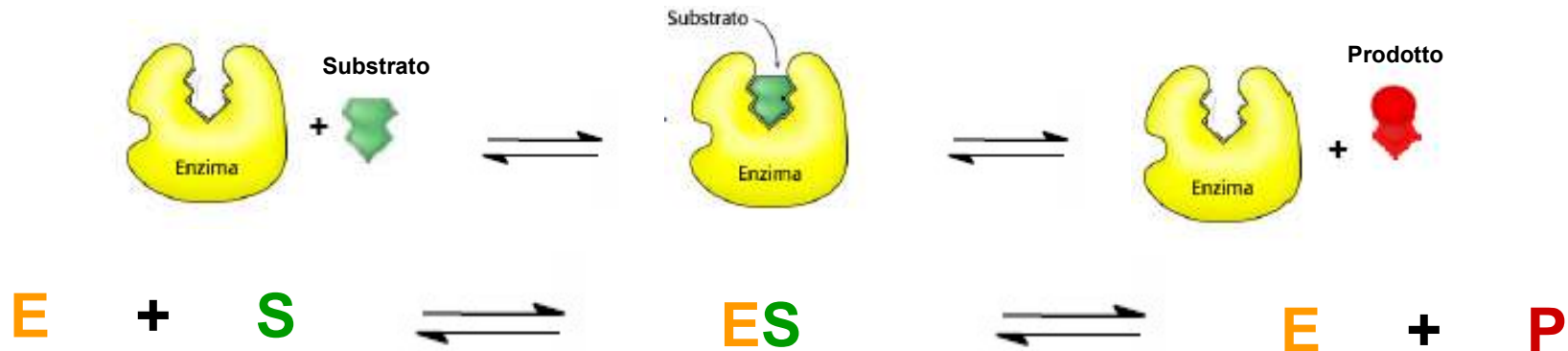
- Denominazione classica costituita da 3 parti:
  - Nome del substrato
  - Nome dell'eventuale coenzima
  - Nome della reazione catalizzata + “asi”

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

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

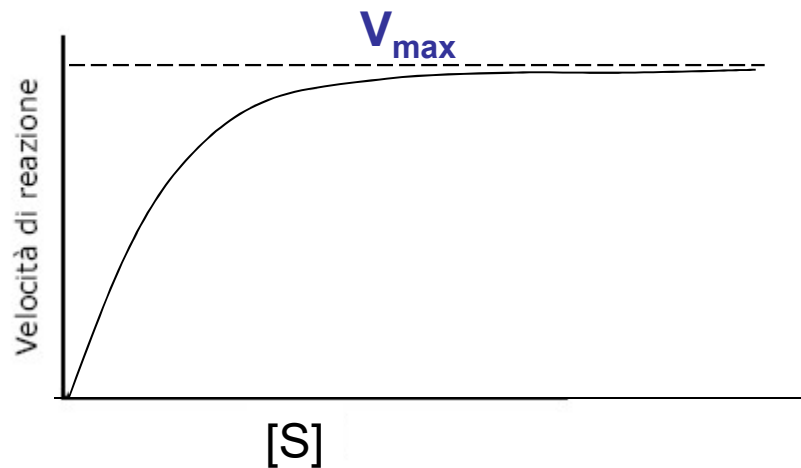
Equazione del tipo

$$y = ax / b+x$$

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

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

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





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

## Significato della costante di Michaelis-Menten

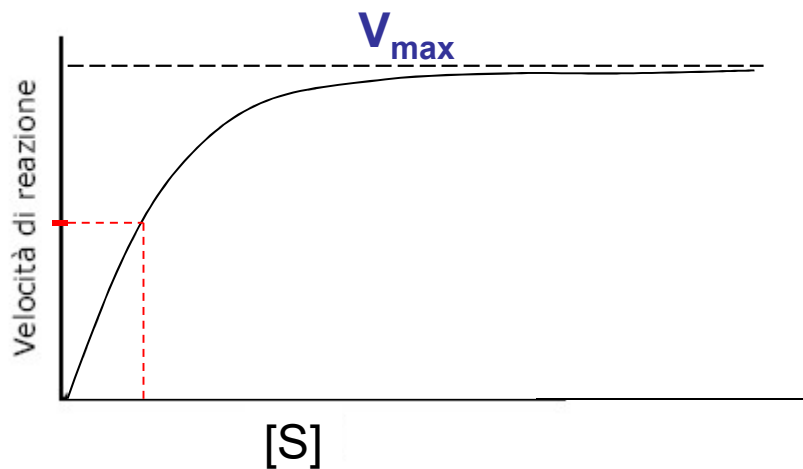
$K_M$  è, dimensionalmente, una concentrazione: **mol/l**

Se  $K_M = [S]$

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

diventa

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



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

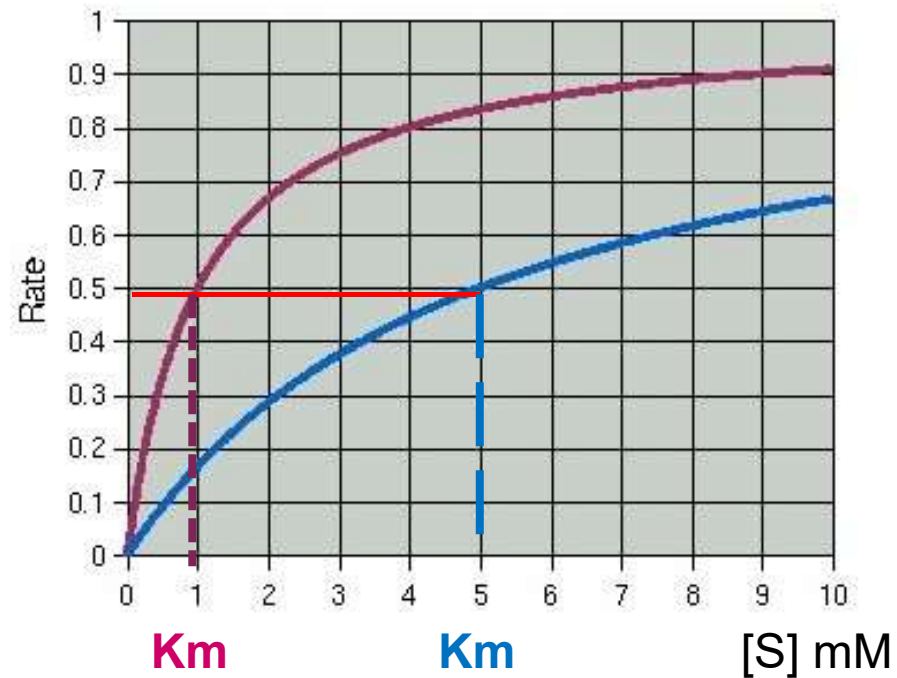
⇒ E' la concentrazione di substrato alla quale il 50% dei siti attivi è occupato dal substrato stesso

$K_M$  descrive l'interazione substrato-enzima a livello del sito di legame.

**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 <sub>m</sub> (mM) |
|--------------------|-------------------------------|---------------------|
| Esochinasi         | D-glucosio                    | 0,05                |
|                    | D-fruttosio                   | 1,5                 |
| Anidrase carbonica | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | 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  $V_{\text{max}}$  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

$$y = mx + b$$

$$y = 1/V$$

$$x = 1/[S]$$

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

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

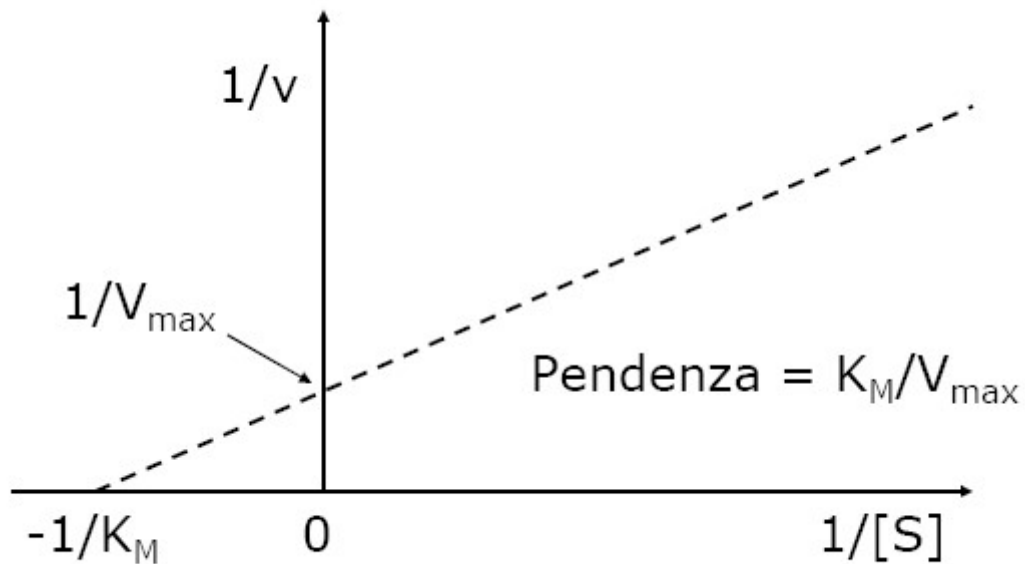
Equazione del tipo

$$y = mx + b$$

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

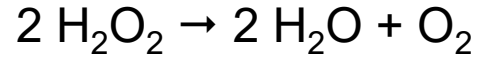
Intercetta asse y  $\Rightarrow b = 1/V_{\text{max}}$

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<br>substrato<br>$\text{H}_2\text{O}_2$ (mM) | Velocità<br>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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>      1/Velocità

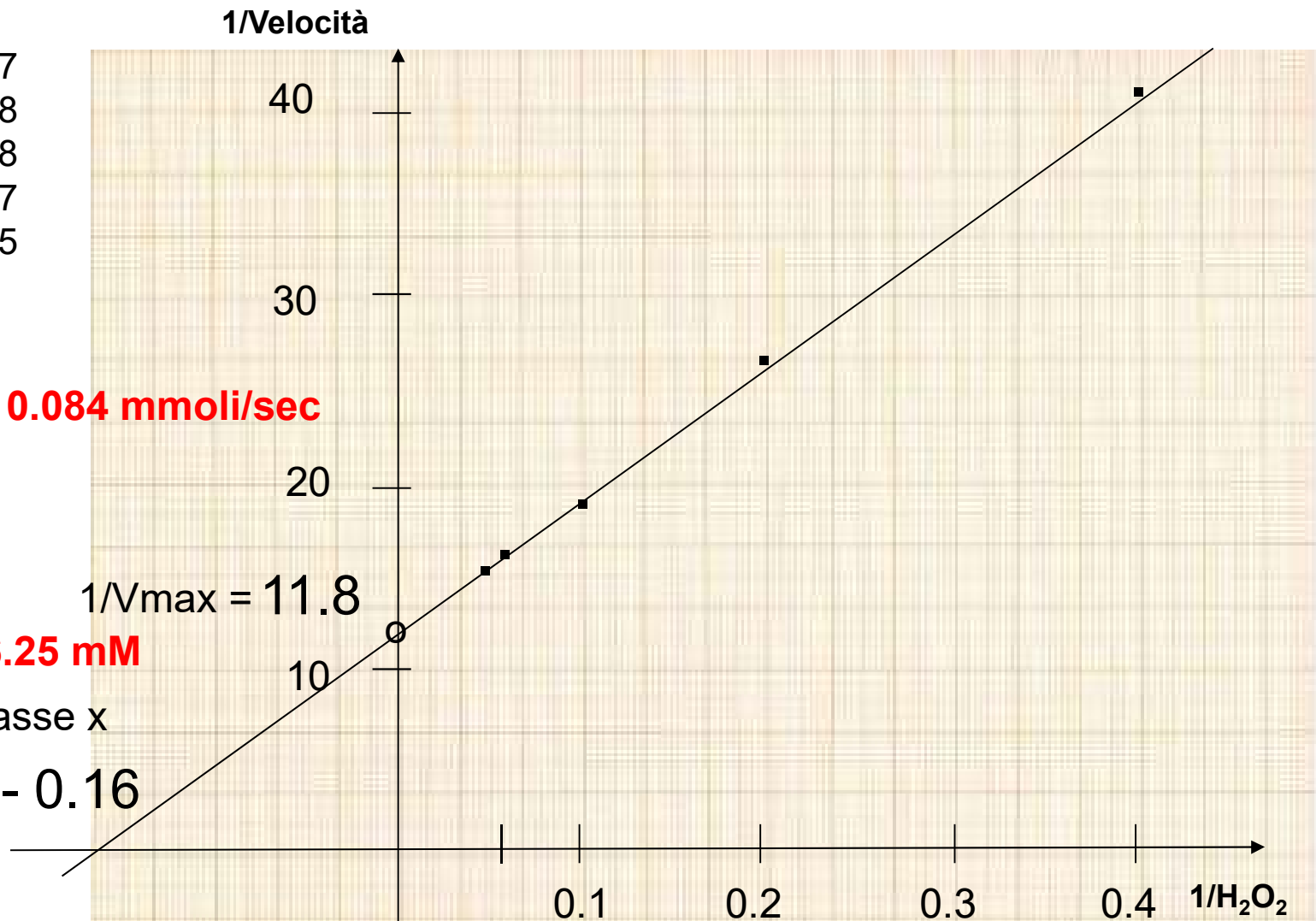
|       |        |
|-------|--------|
| 0,4   | 41,667 |
| 0,2   | 27,778 |
| 0,1   | 18,868 |
| 0,067 | 16,667 |
| 0,05  | 15,625 |

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

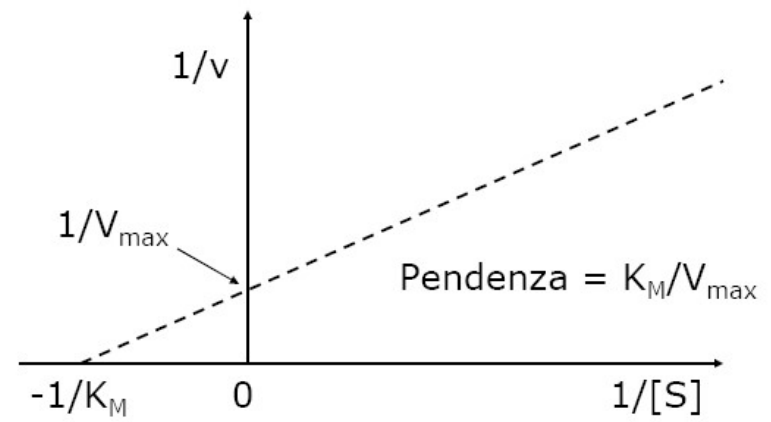
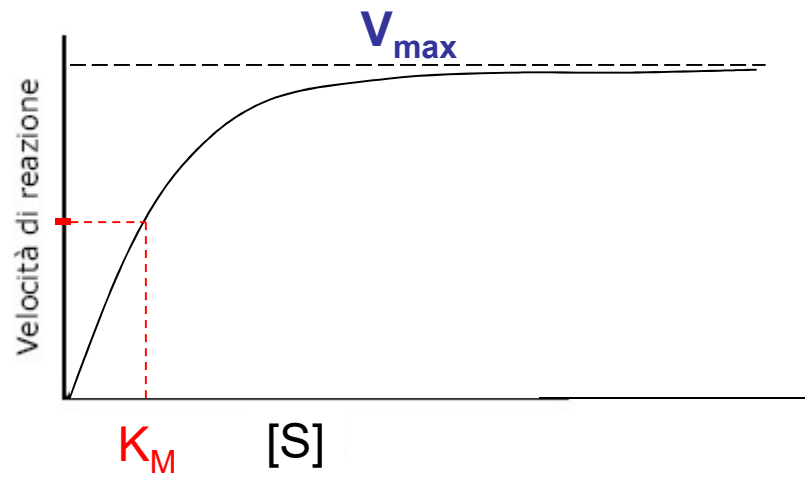
$K_M = -1 / 0.16 = \mathbf{6.25 \text{ mM}}$

Intercetta asse x

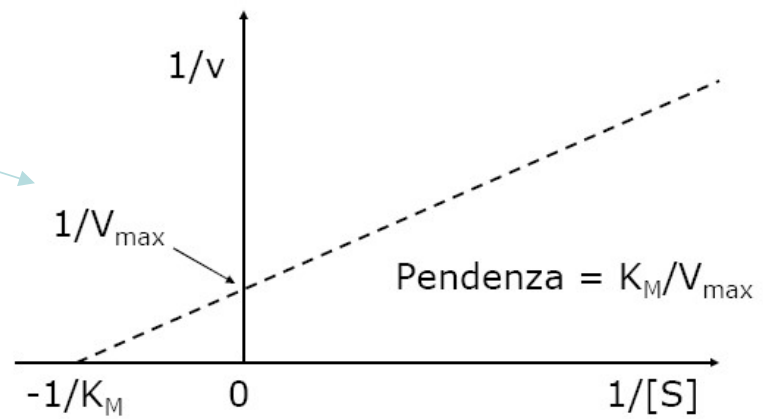
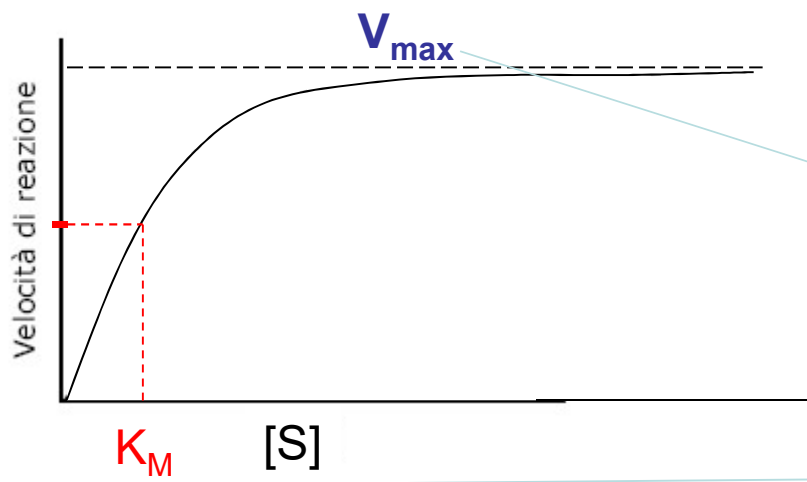
$- 1/K_M = - \mathbf{0.16}$



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







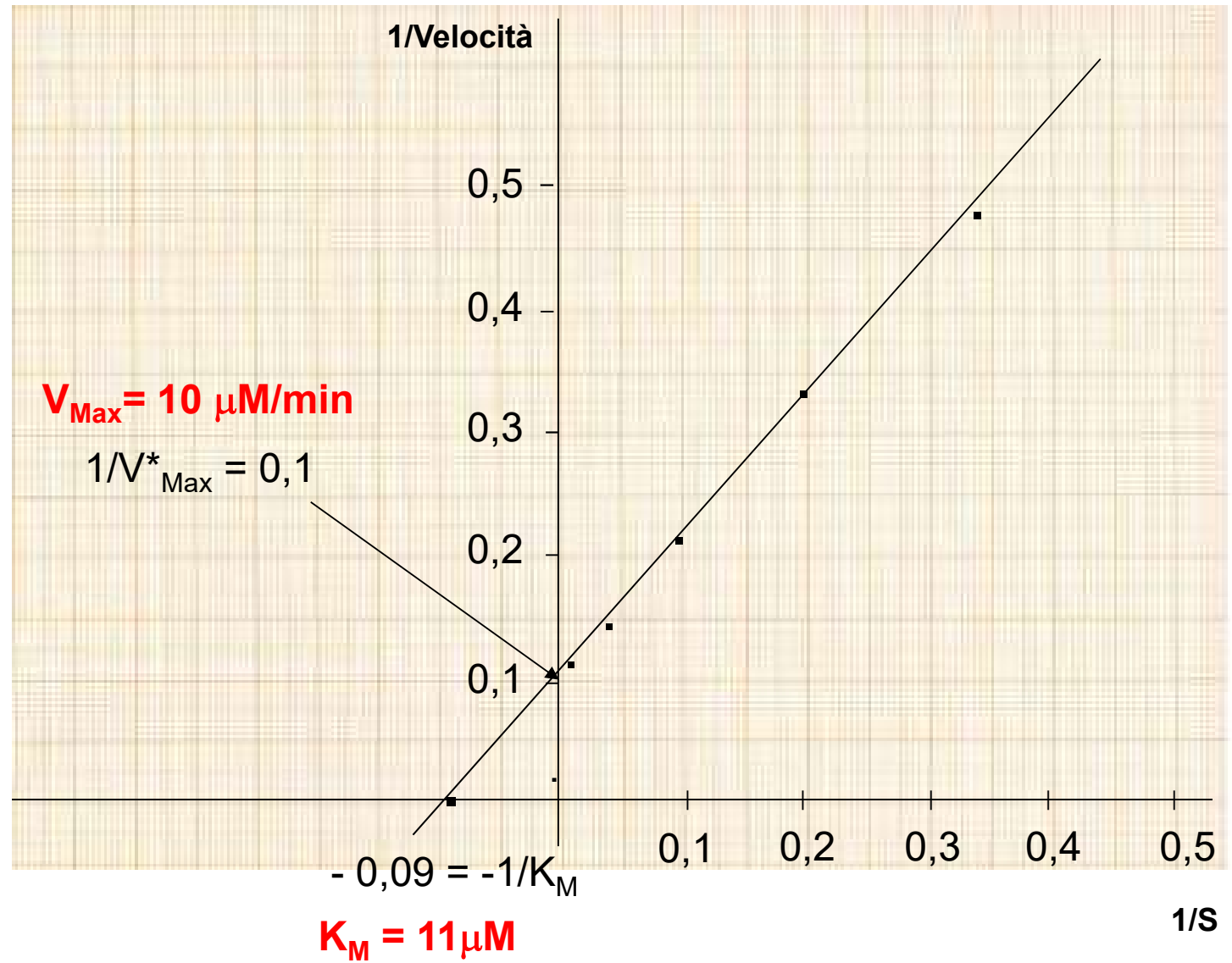
1. La cinetica di un enzima è studiata ed i valori ottenuti dall'esperimento sono i seguenti:

| <b>[S] <math>\mu\text{mol/L}</math></b> | <b>Velocità (<math>\mu\text{mol/L})\text{min}^{-1}</math></b> |
|---|---|
| 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:

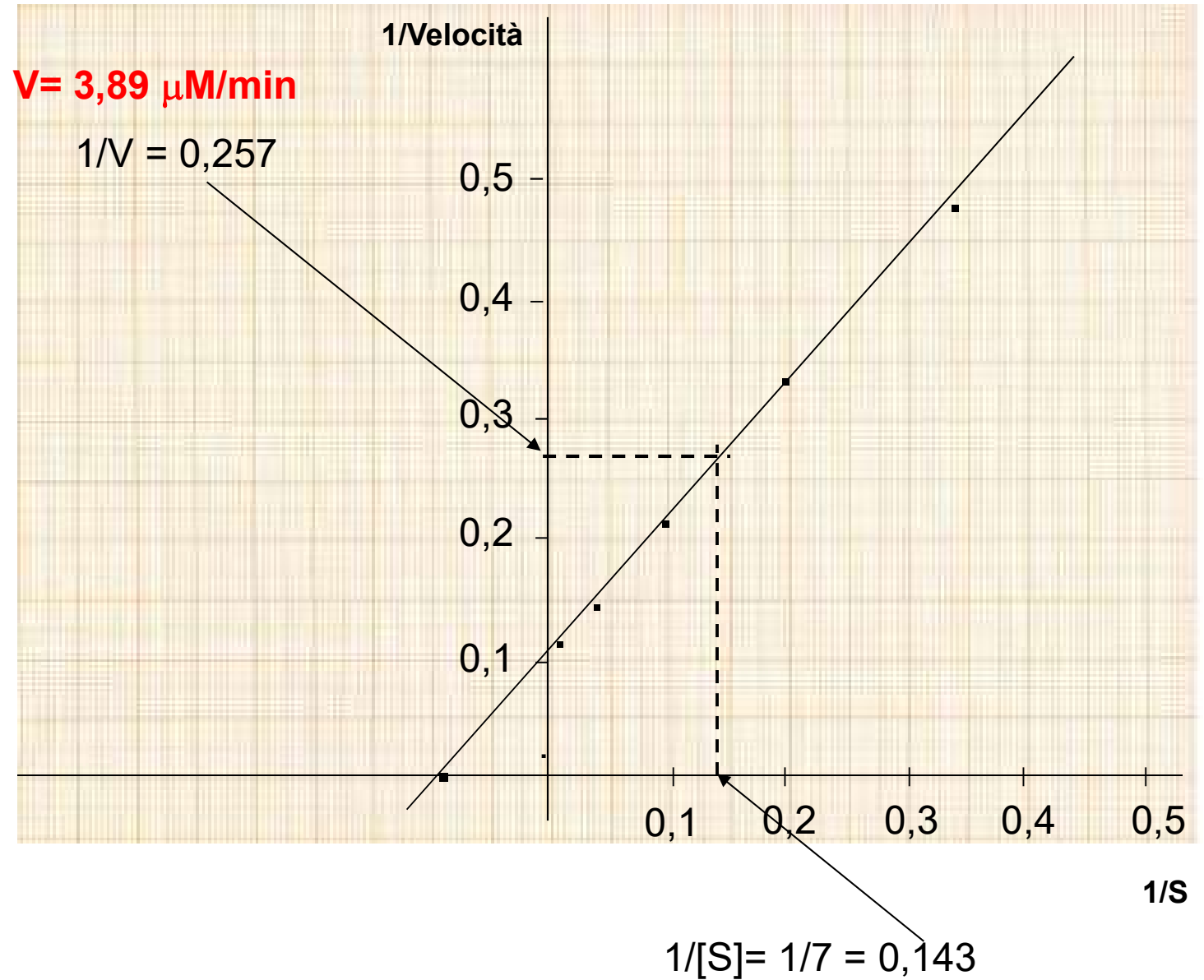
| [S] $\mu\text{mol/L}$ | Velocità ( $\mu\text{mol/L})\text{min}^{-1}$ |
|-----------------------|--|
| 3                     | 2,1  |
| 5                     | 2,9  |
| 10                    | 4,5  |
| 30                    | 6,8  |
| 90                    | 8,1  |

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



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

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

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

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

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

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

Retta dei doppi reciproci applicata ad altre funzioni proteiche

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

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

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

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

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) | $\theta$ |
|------------------|----------|
| 0.5              | 0.161    |
| 1                | 0.277    |
| 2                | 0.434    |
| 3                | 0.535    |
| 4                | 0.605    |
| 6                | 0.697    |

a) Calcolare la  $P_{50}$



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

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

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

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

| $P_{O_2}$ (mmHg) | $1/P_{O_2}$ | $\theta$ | $1/\theta$ |
|------------------|-------------|----------|------------|
| 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<sub>2</sub>

1/θ

2

6.2

1

3.6

0.5

2.3

0.33

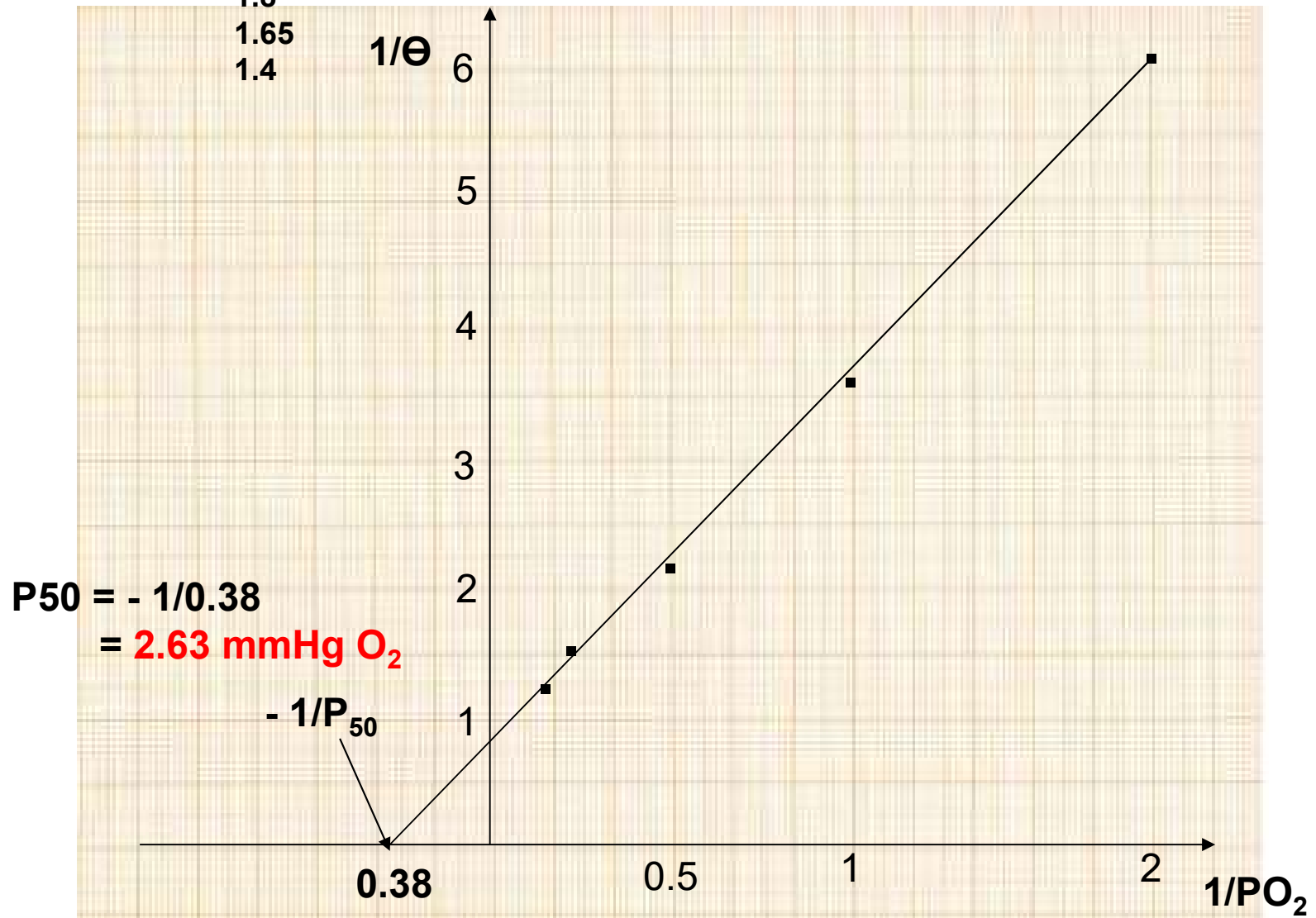
1.8

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

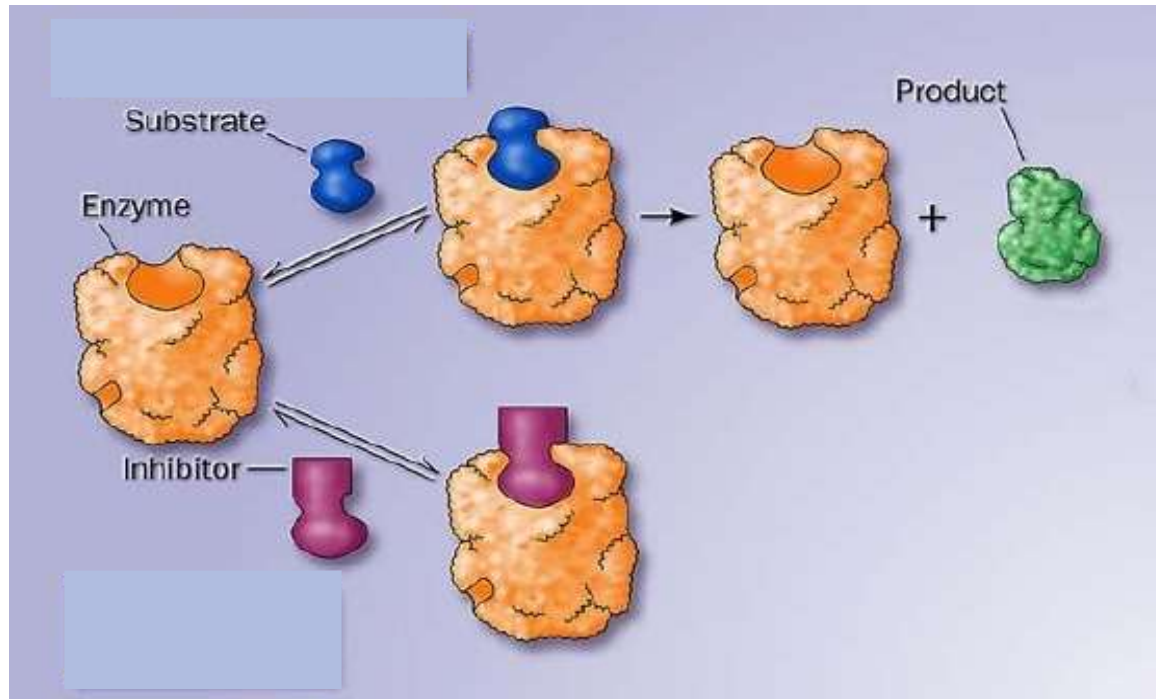
Inibitori NON Competitivi

**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.

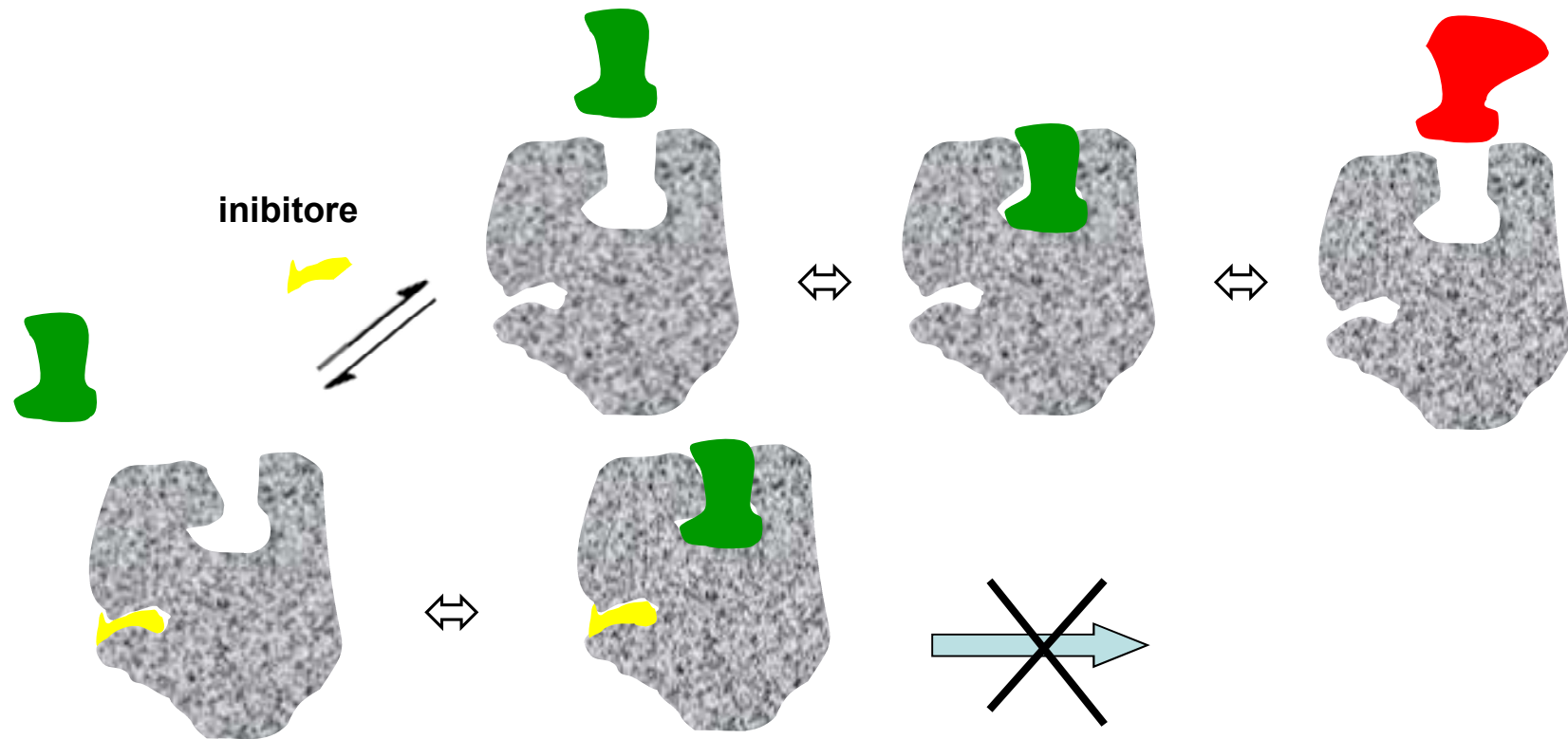
Impedendo la formazione di ES inibiscono la trasformazione di S in P



- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S

# 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