

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).

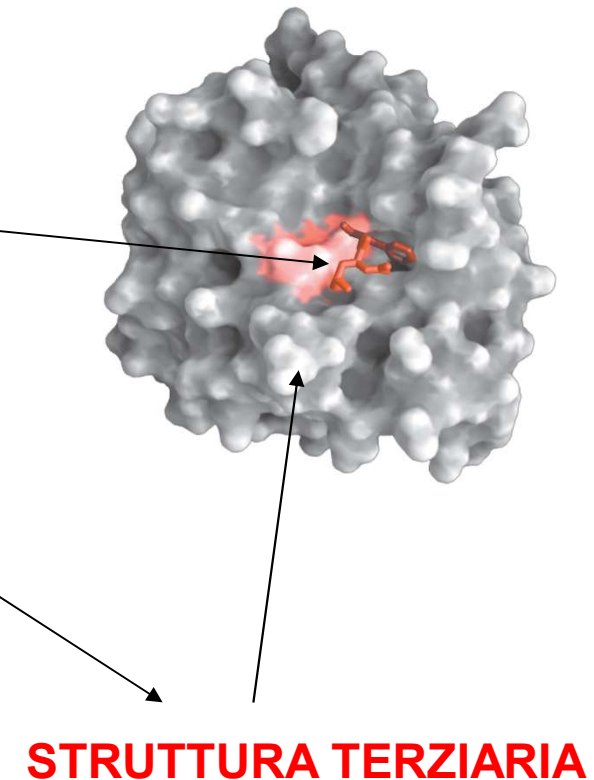
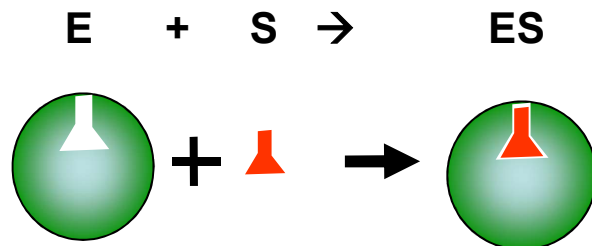
Gli ENZIMI sono altamente specifici

§ 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(il) substrati(o) prende il nome di **SITO ATTIVO**

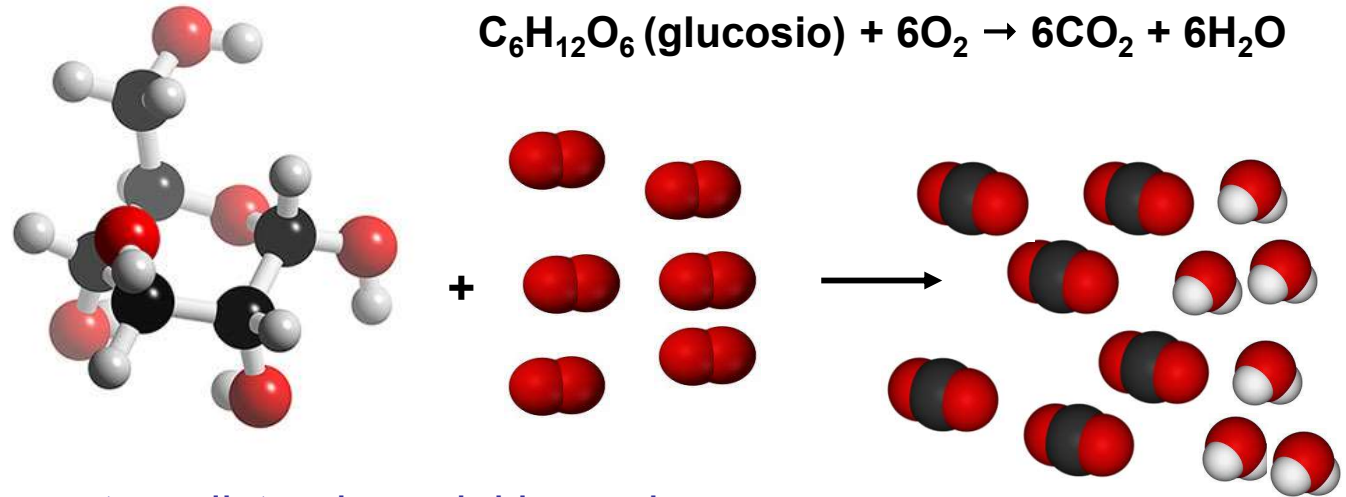
il SITO ATTIVO ha una forma **COMPLEMENTARE** a quella dei substrati *



§ Partecipano alla reazione ma non ne sono modificati.

§ NON alterano l'energetica delle reazioni.

molecola complessa
e ordinata

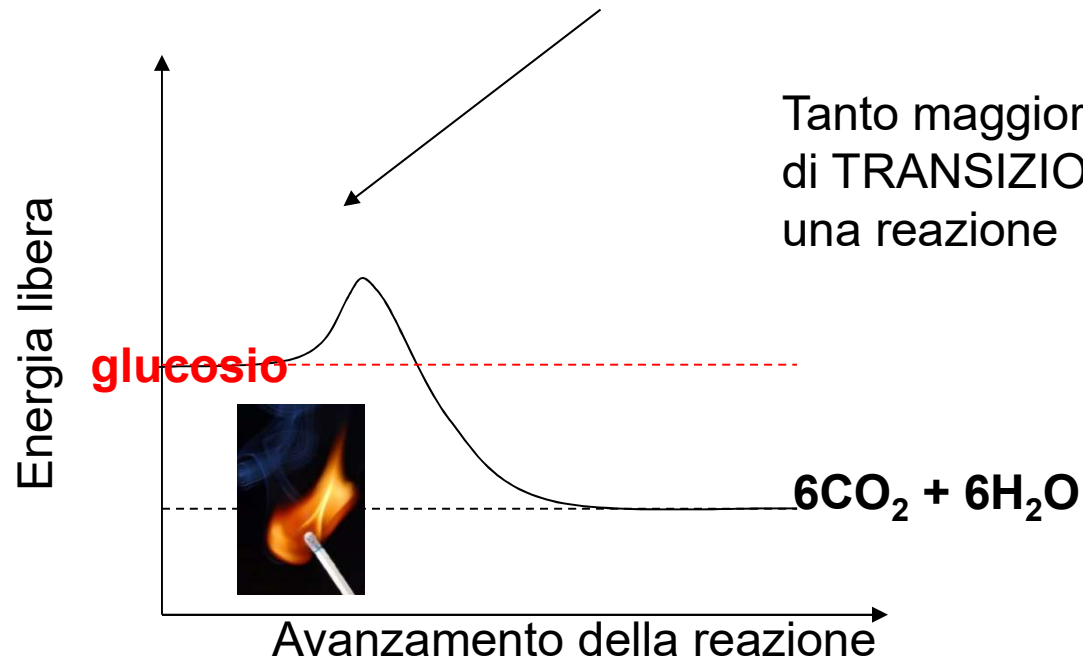


- stiramento e distorsione dei legami



STATO DI TRANSIZIONE

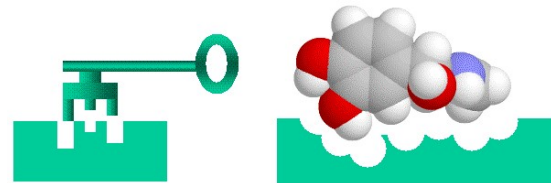
molecole semplici e
“disordinate”



INTERAZIONE TRA SUBSTRATO E SITO ATTIVO

Modello chiave-serratura

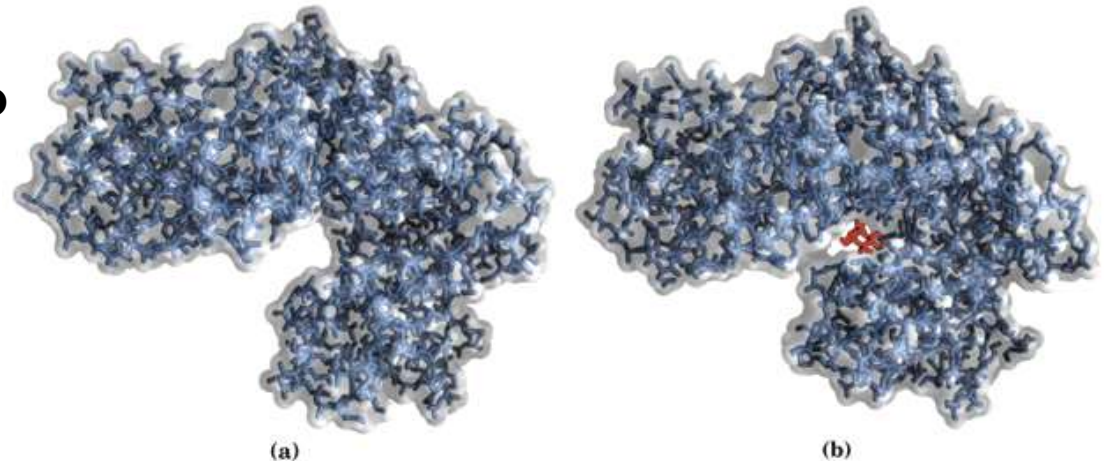
Prevede un alto grado di complementarità tra la forma del substrato e la geometria del sito attivo



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

Modello di adattamento indotto

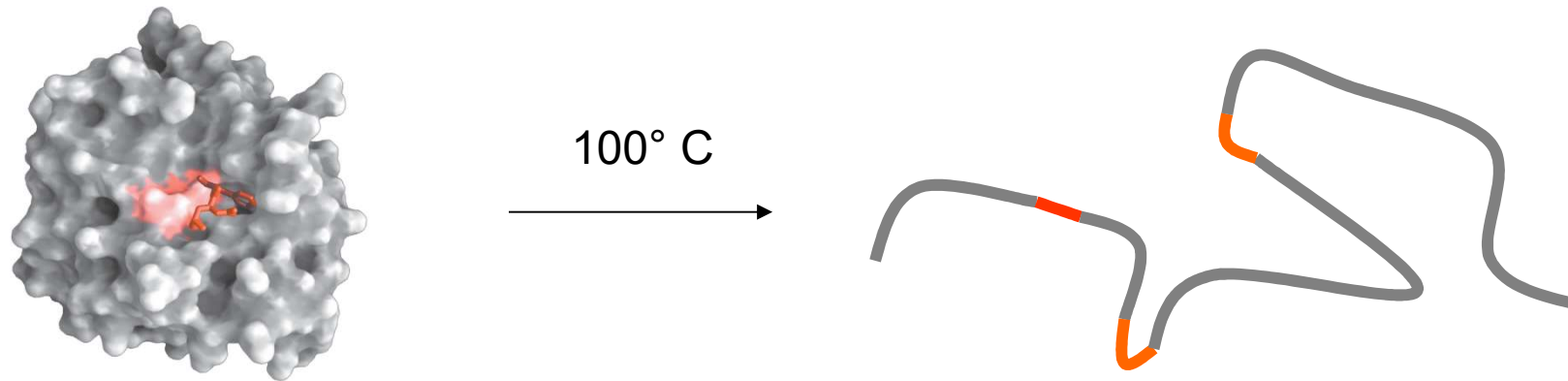
Tiene conto della flessibilità conformazionale delle proteine



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

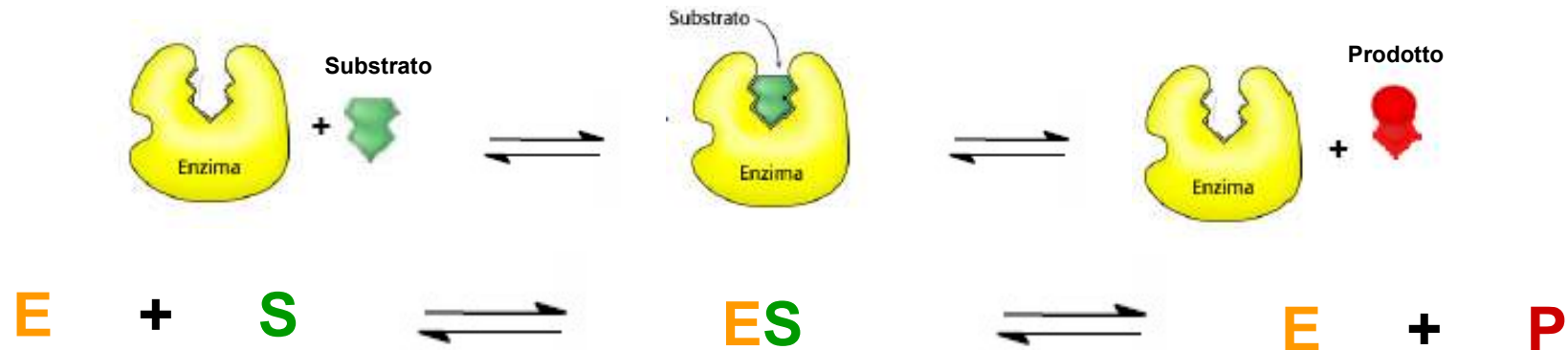
- Denominazione classica costituita da 3 parti:
 - Nome del substrato
 - Nome dell'eventuale coenzima
 - Nome della reazione catalizzata + “**asi**”

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 + forme di splicing = circa 18.000-20.000)



- 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

Equazione di Michaelis e Menten

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



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

Equazione di Michaelis e Menten

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

Equazione del tipo

$$y = ax / b+x$$

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

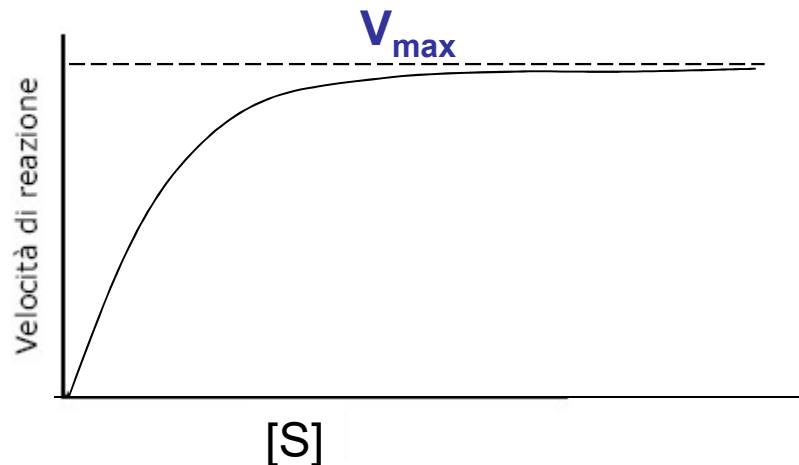
9.1.2 © Pearson 2003-2008

Cinetica enzimatica

- 91 -

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

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



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

Significato della costante di Michaelis-Menten

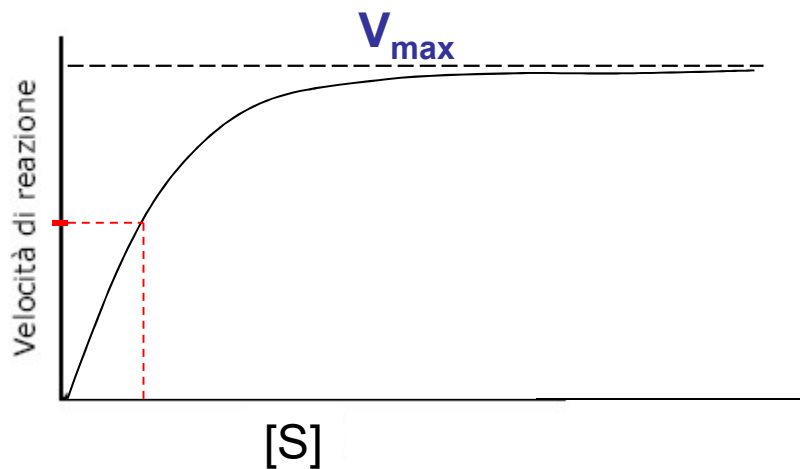
K_M è, dimensionalmente, una concentrazione: **mol/l**

diventa

Se $K_M = [S]$

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

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



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

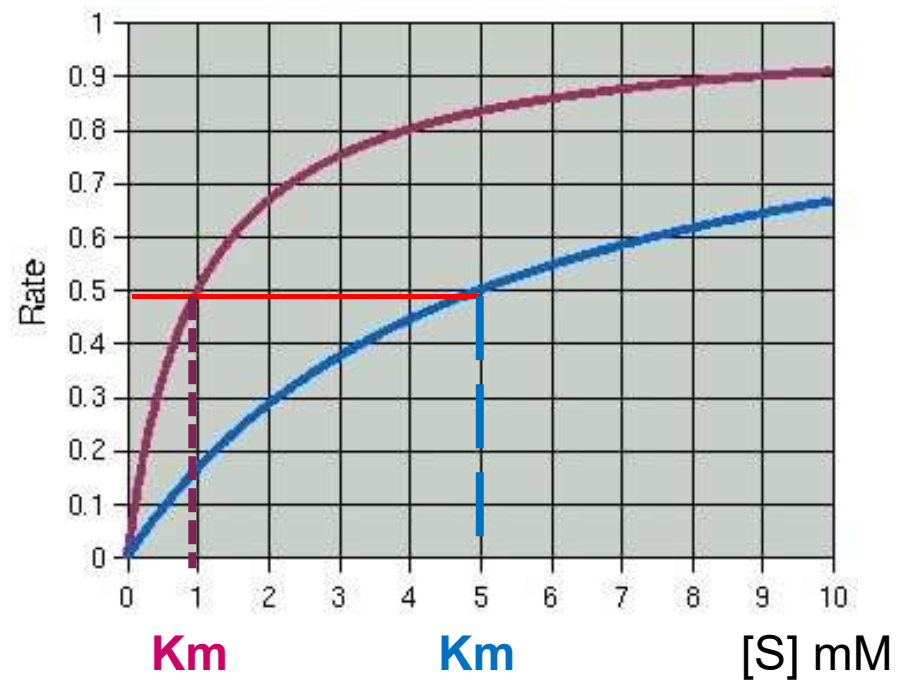
⇒ E' la concentrazione di substrato alla quale il 50% dei siti attivi è occupato dal substrato stesso

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



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

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

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

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



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



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

Equazione di Lineweaver-Burk

Equazione del tipo

$$y = mx + b$$

$$y = 1/v$$

$$x = 1/[S]$$

Equazione di Michaelis e Menten

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

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

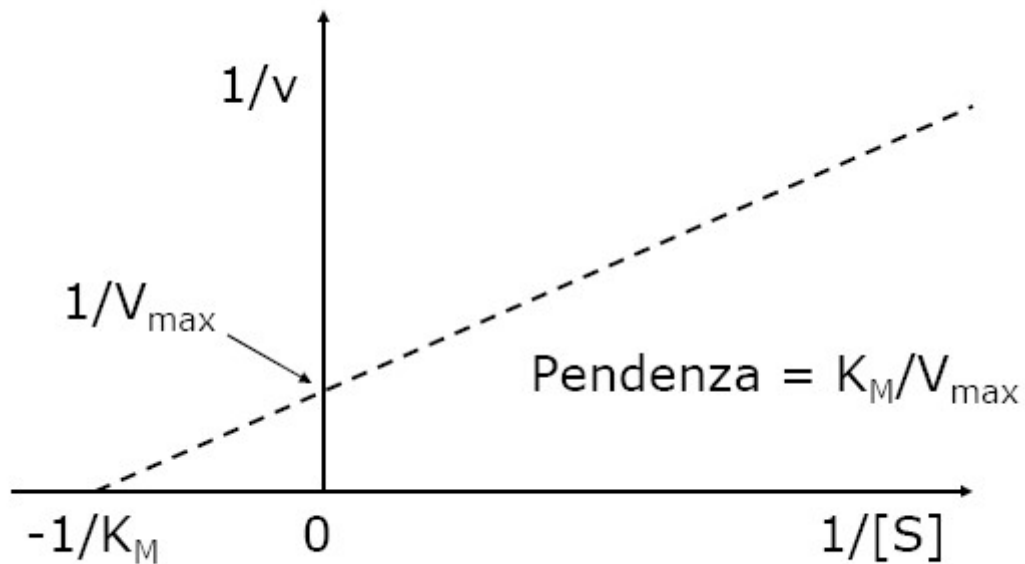
Equazione del tipo

$$y = mx + b$$

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

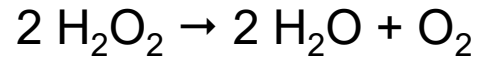
Intercetta asse y $\Rightarrow b = 1/V_{\max}$

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

Concentrazione
substrato
H₂O₂ (mM)

Velocità
mmoli/sec

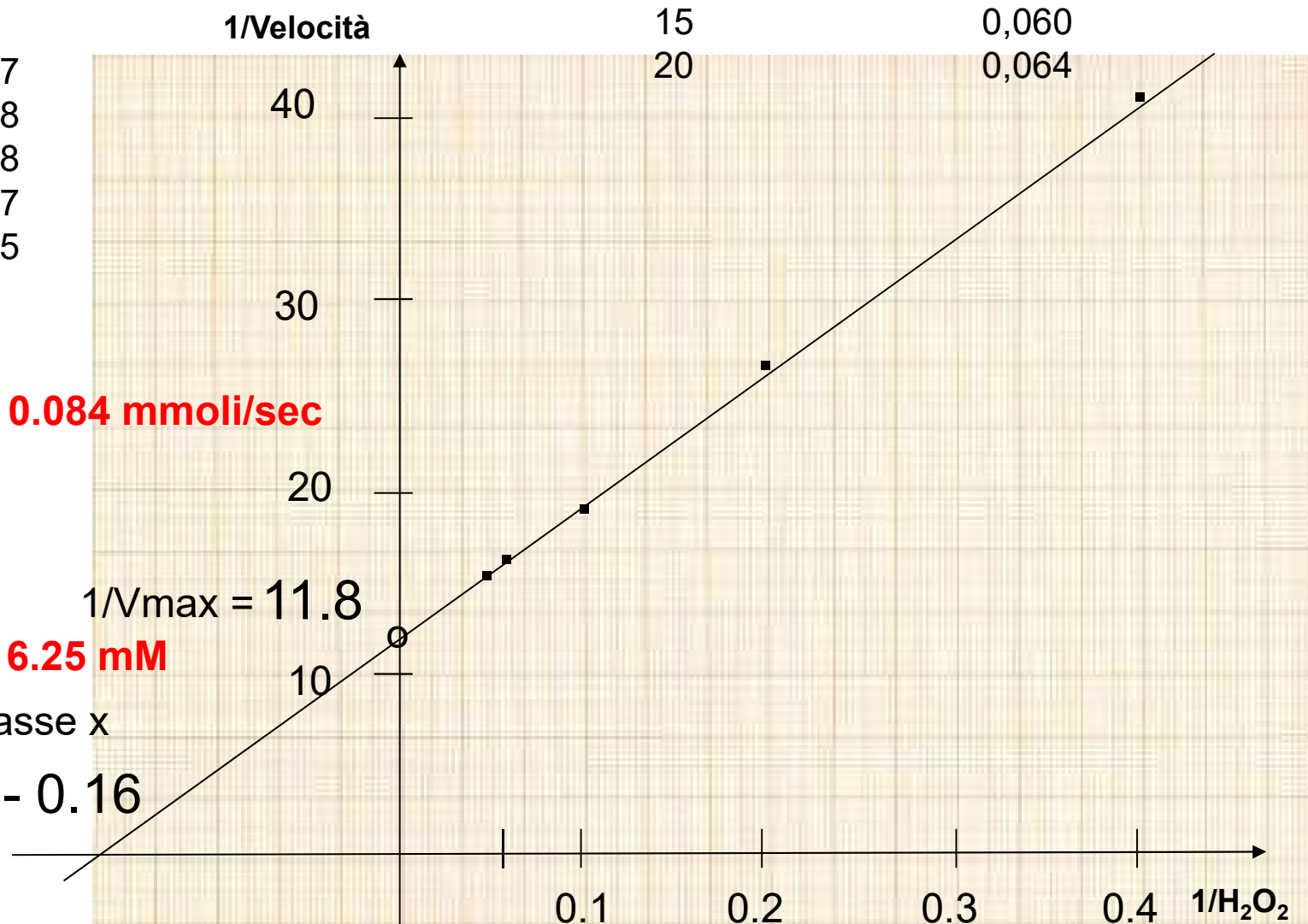
2,5	0,024
5,0	0,036
10	0,053
15	0,060
20	0,064

V_{max} = 1/11.8 = **0.084 mmoli/sec**

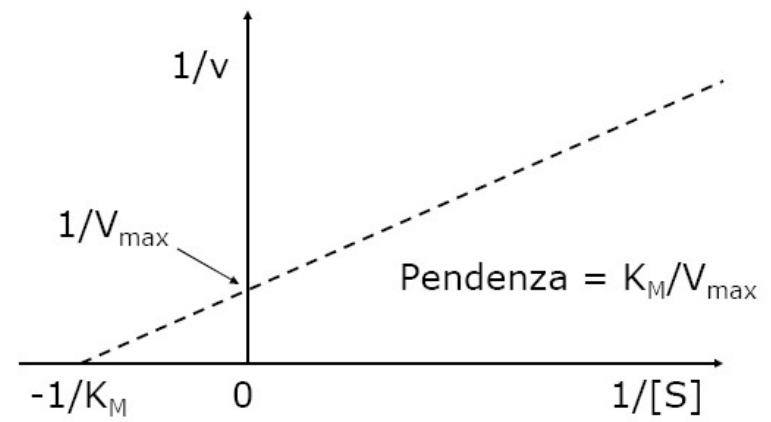
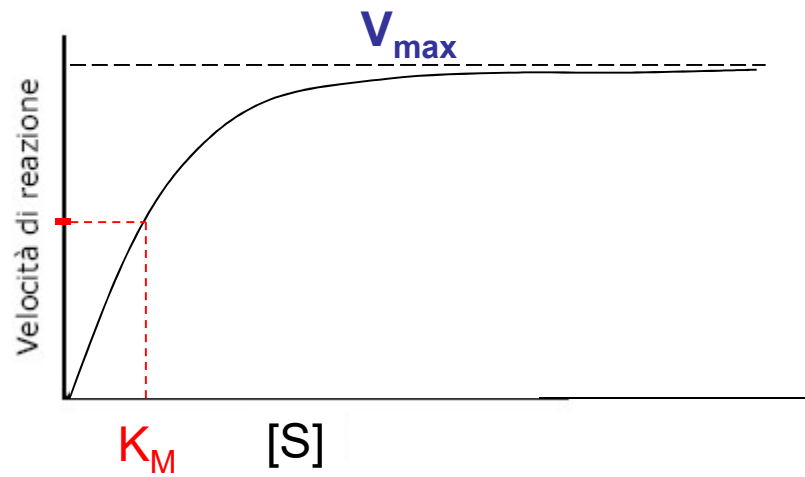
K_M = -1 / - 0.16 = **6.25 mM**

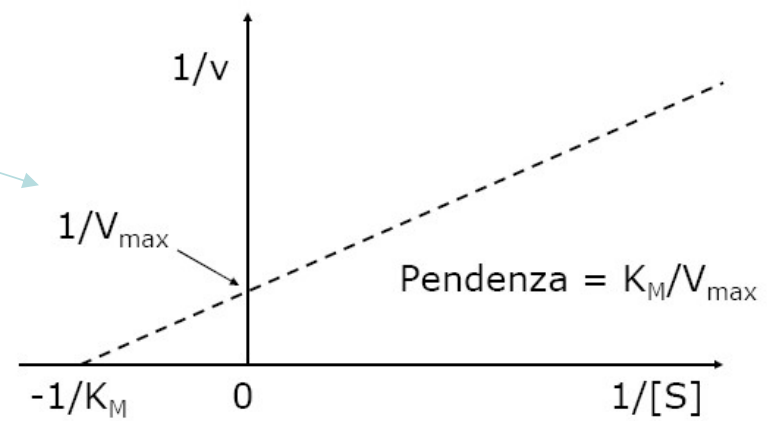
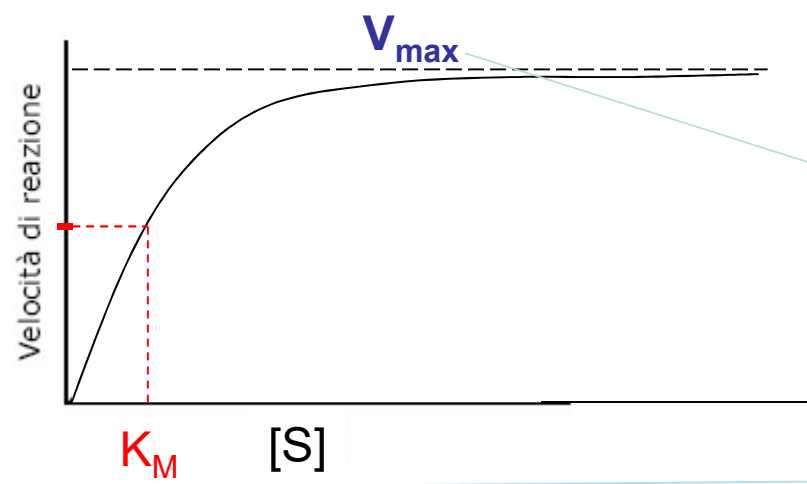
Intercetta asse x

- 1/K_M = - 0.16



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





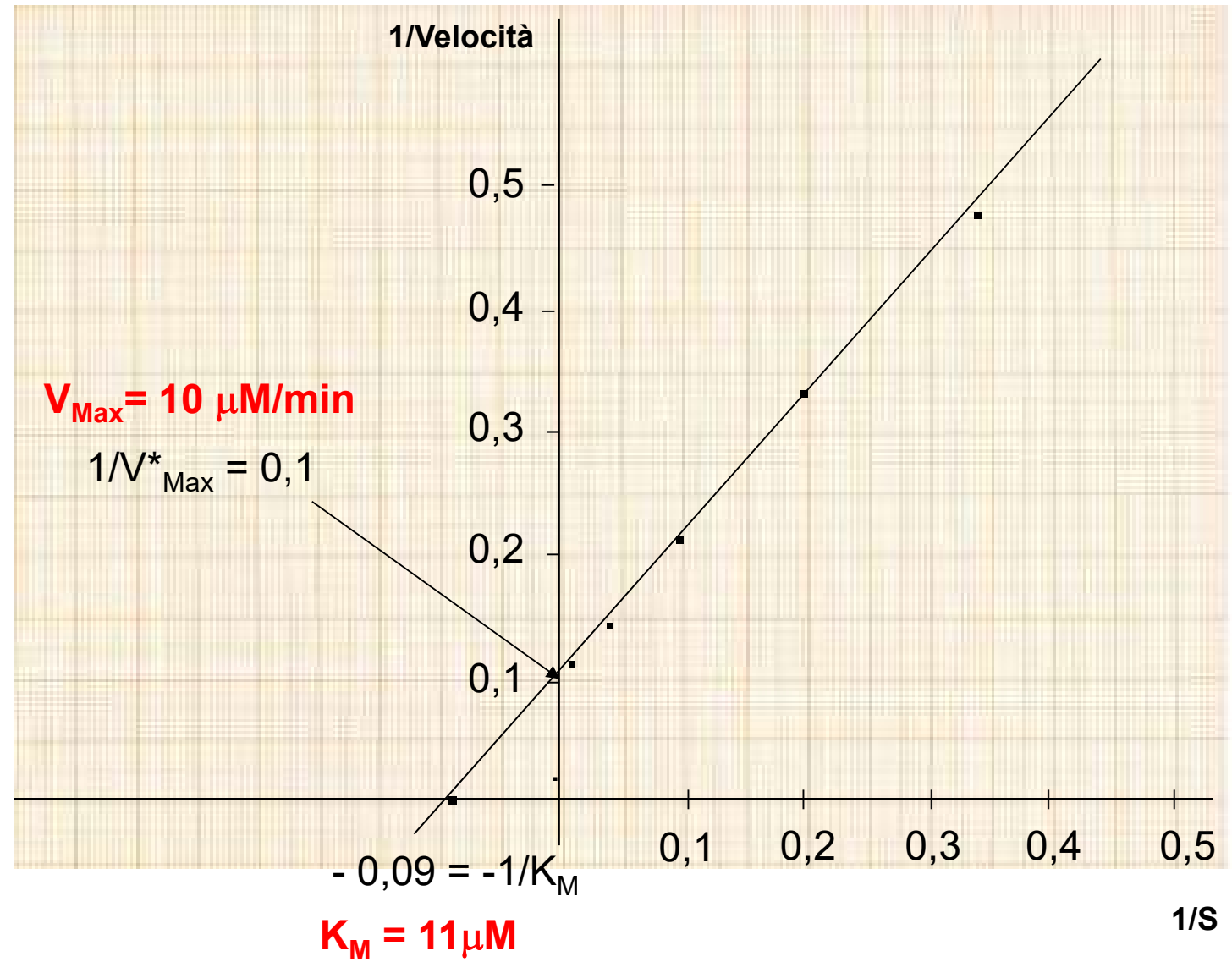
1. La cinetica di un enzima è studiata ed i valori ottenuti dall'esperimento sono i seguenti:

[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:

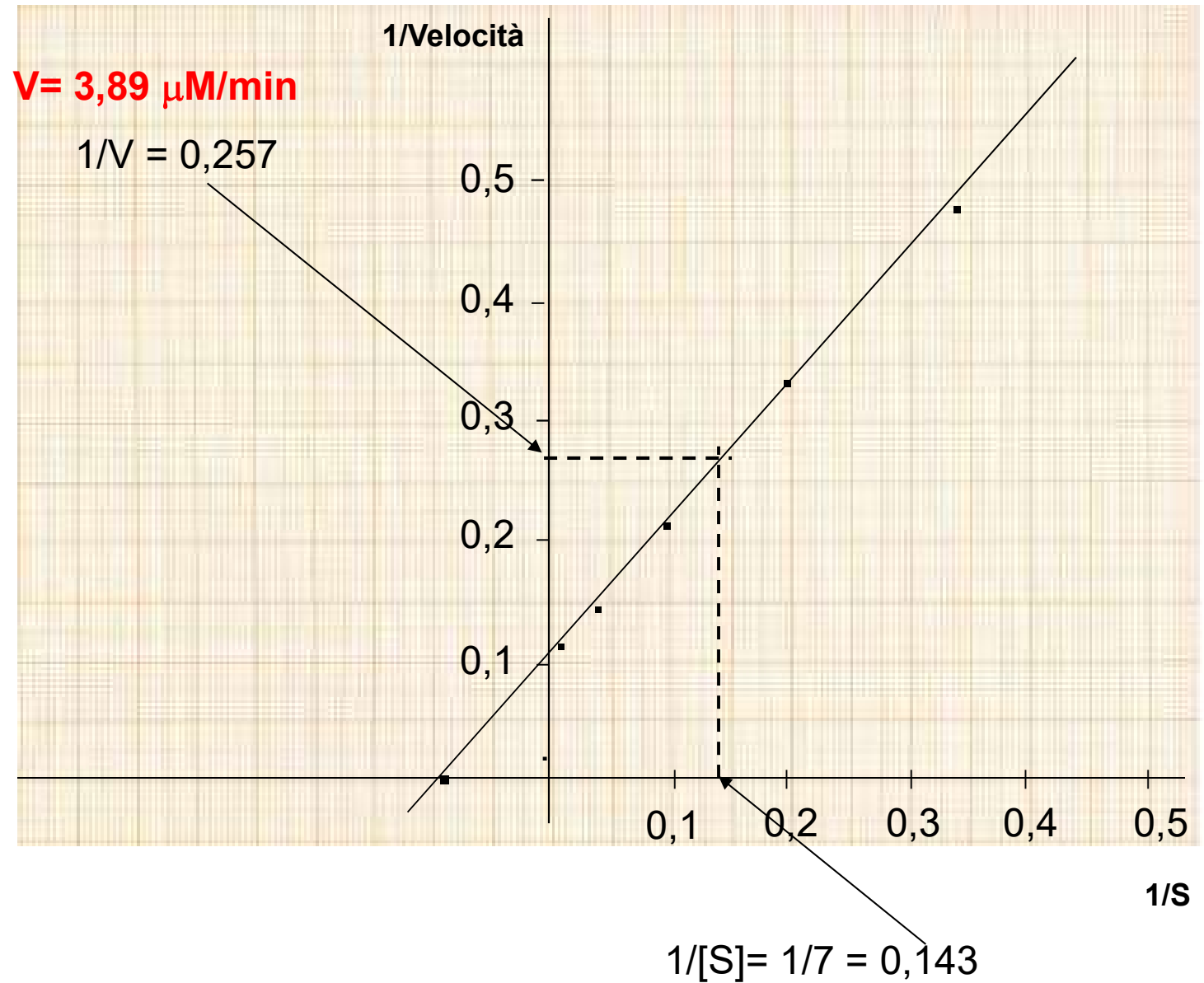
[S] $\mu\text{mol/L}$	Velocità ($\mu\text{mol/L})\text{min}^{-1}$
3	2,1
5	2,9
10	4,5
30	6,8
90	8,1

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



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

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

Equazione di Michaelis e Menten

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]} = \frac{10 \mu\text{M}/\text{min} (7 \mu\text{M})}{11 \mu\text{M} + 7 \mu\text{M}} = 70 \mu\text{M}/\text{min} / 18 \mu\text{M}$$

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

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

Retta dei doppi reciproci applicata ad altre funzioni proteiche

Equazione di Michaelis e Menten

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

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

11.1.1 © garlo 2003-2005

cinetica enzimatica

- 95 -

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

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

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)	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}

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

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

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

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

P_{O_2} (mmHg)	$1/PO_2$	θ	$1/\Theta$
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

$1/PO_2$

$1/\theta$

2

6.2

1

3.6

0.5

2.3

0.33

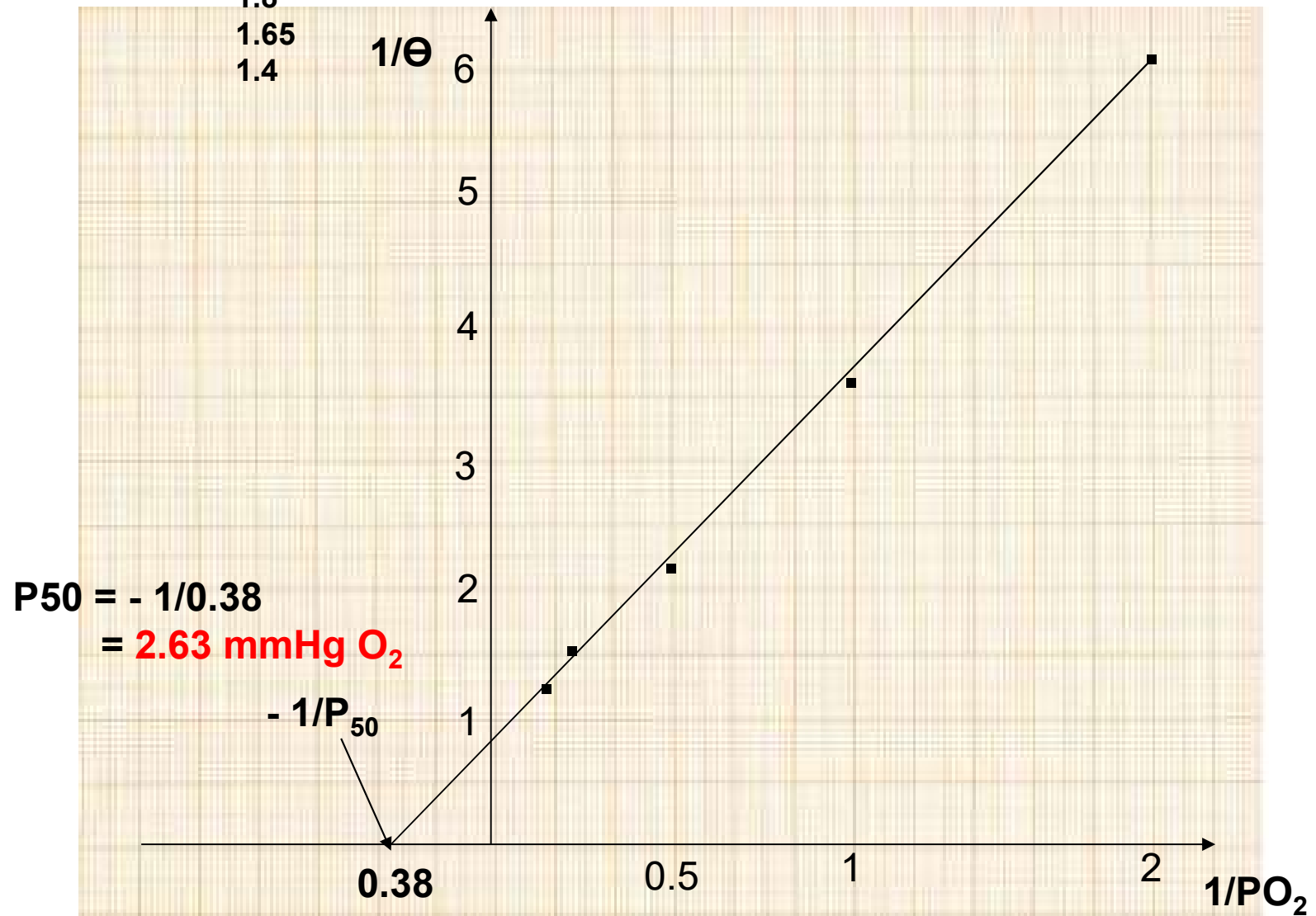
1.8

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

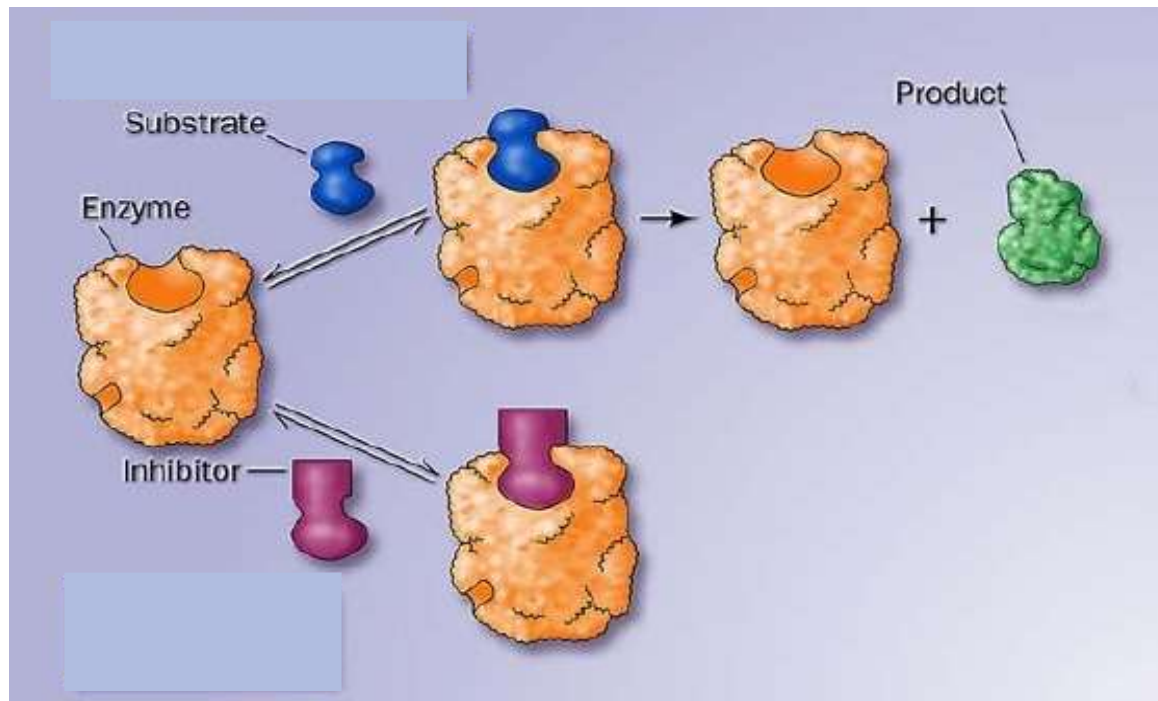
Inibitori Competitivi

Inibitori NON Competitivi

Inibitori competitivi

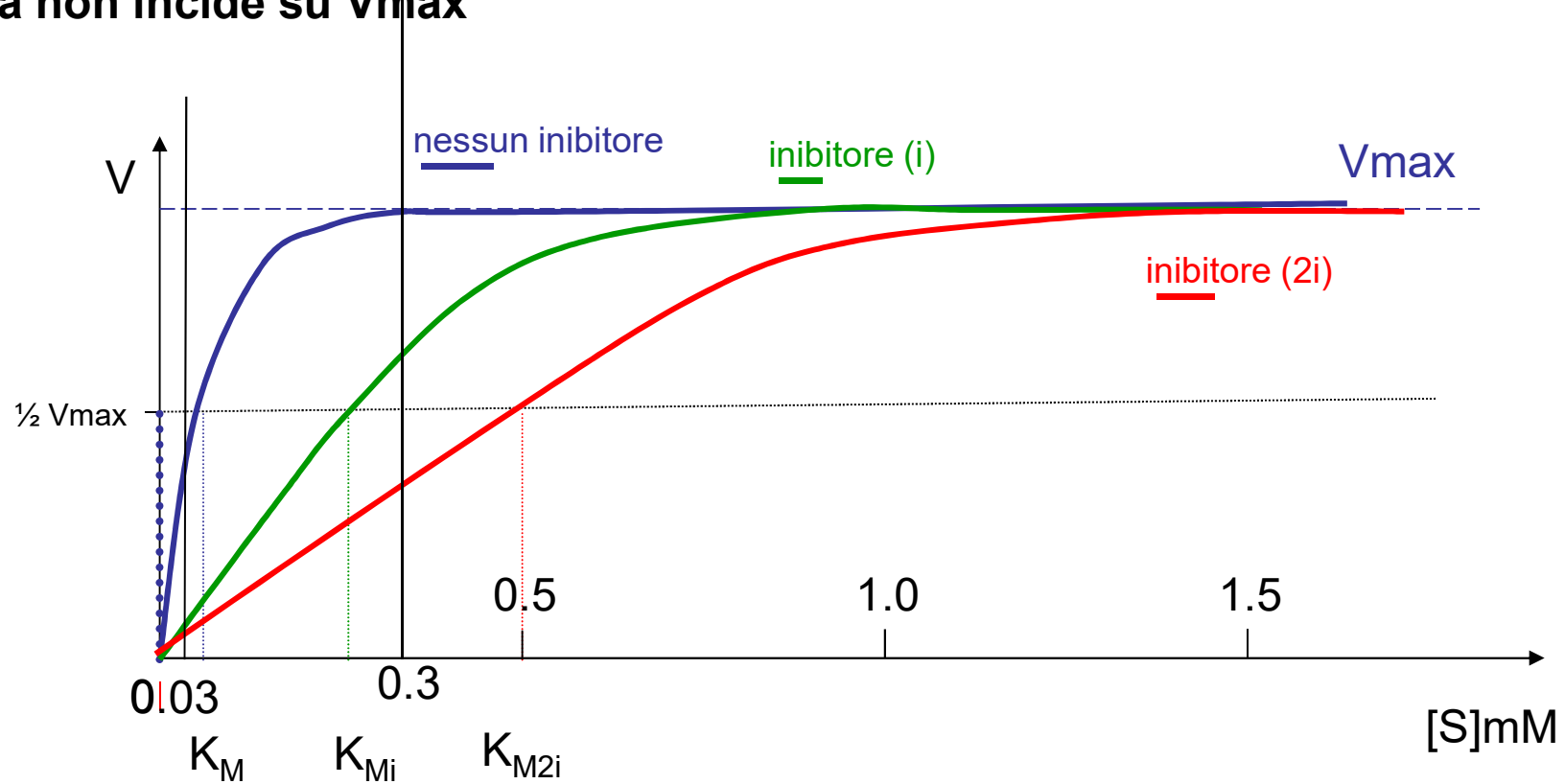
- Sono molecole simili al substrato
- Occupano lo stesso sito di legame
- Agiscono competendo con il substrato per lo stesso sito di legame, agiscono quindi sulla formazione del complesso ES.

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

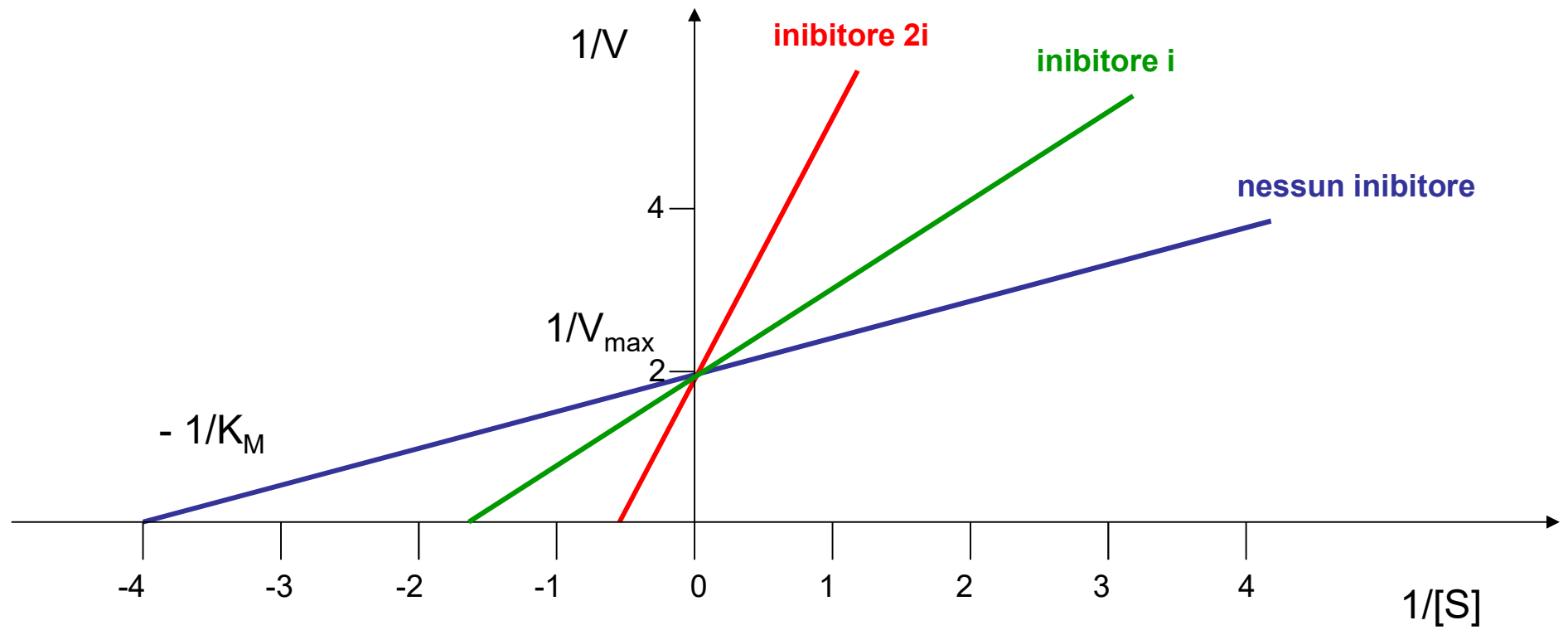


- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S

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

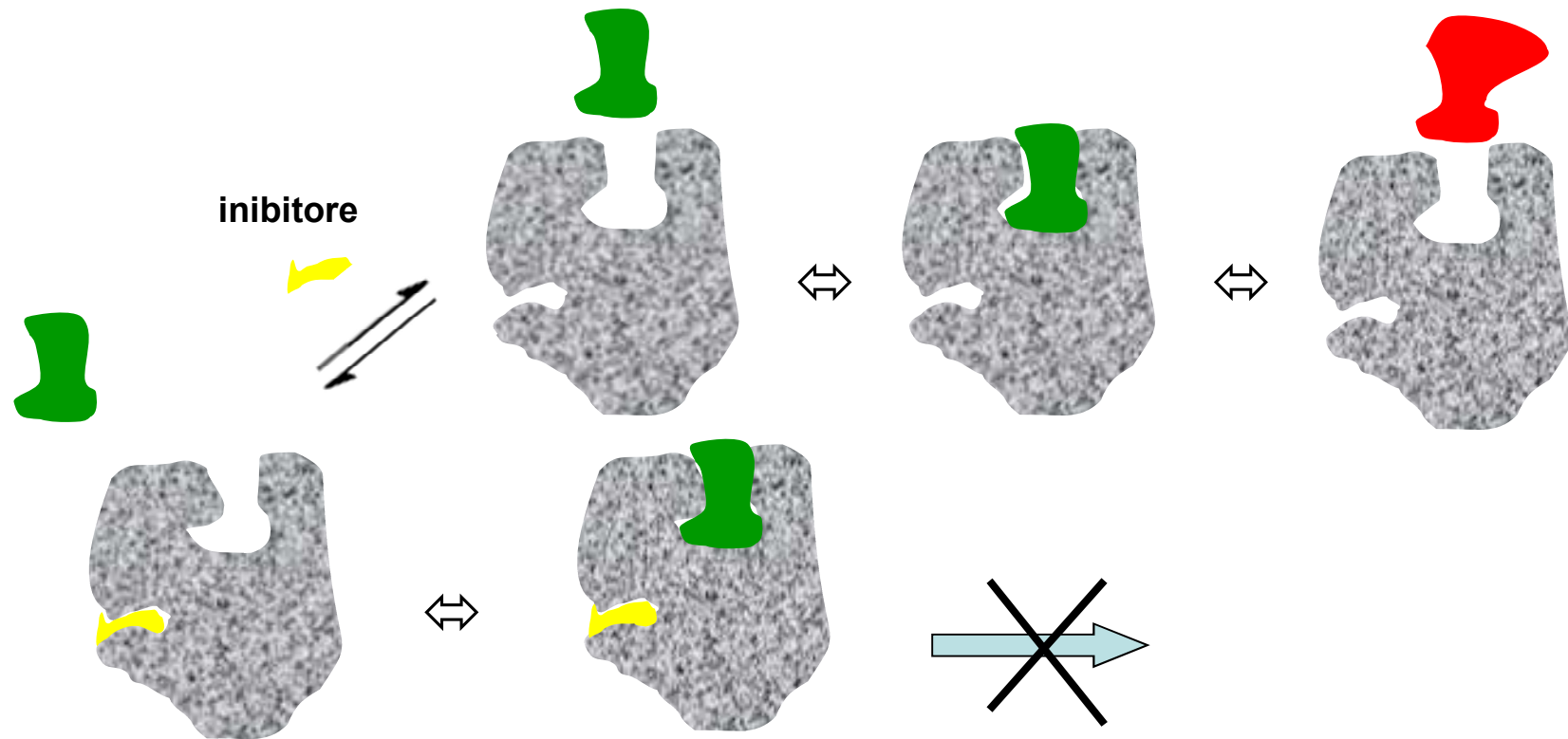


Risultato dell'INIBIZIONE COMPETITIVA secondo Lineweaver-Burk



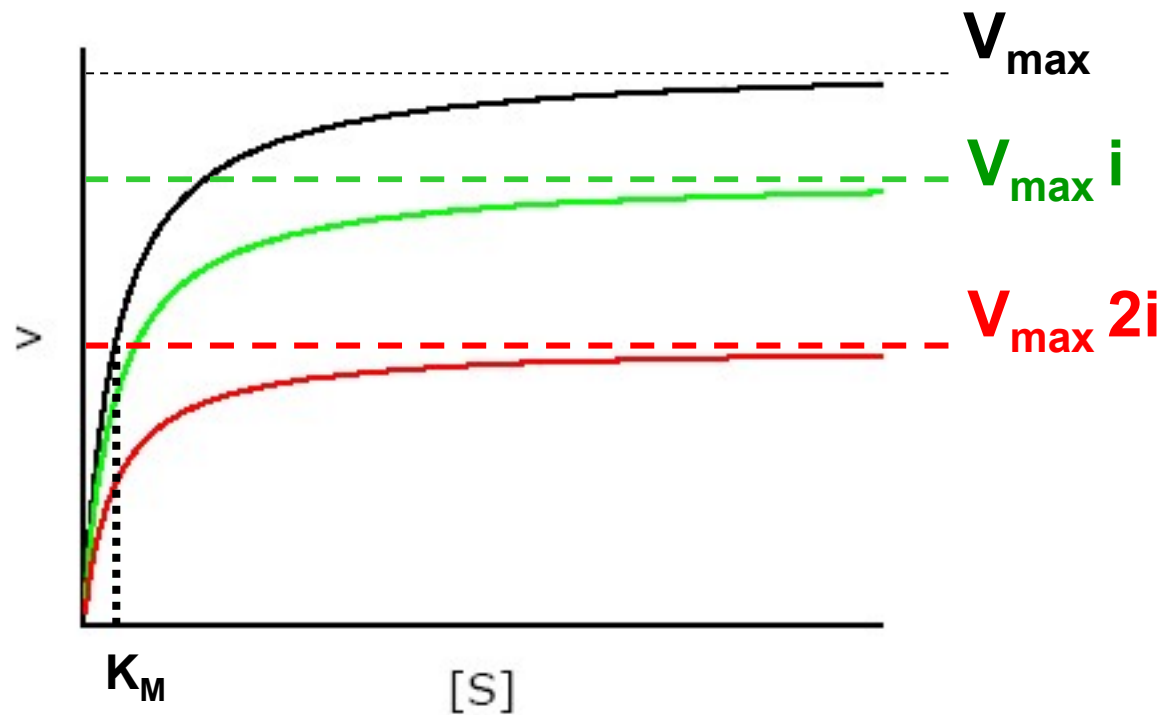
Inibitori non competitivi

- 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

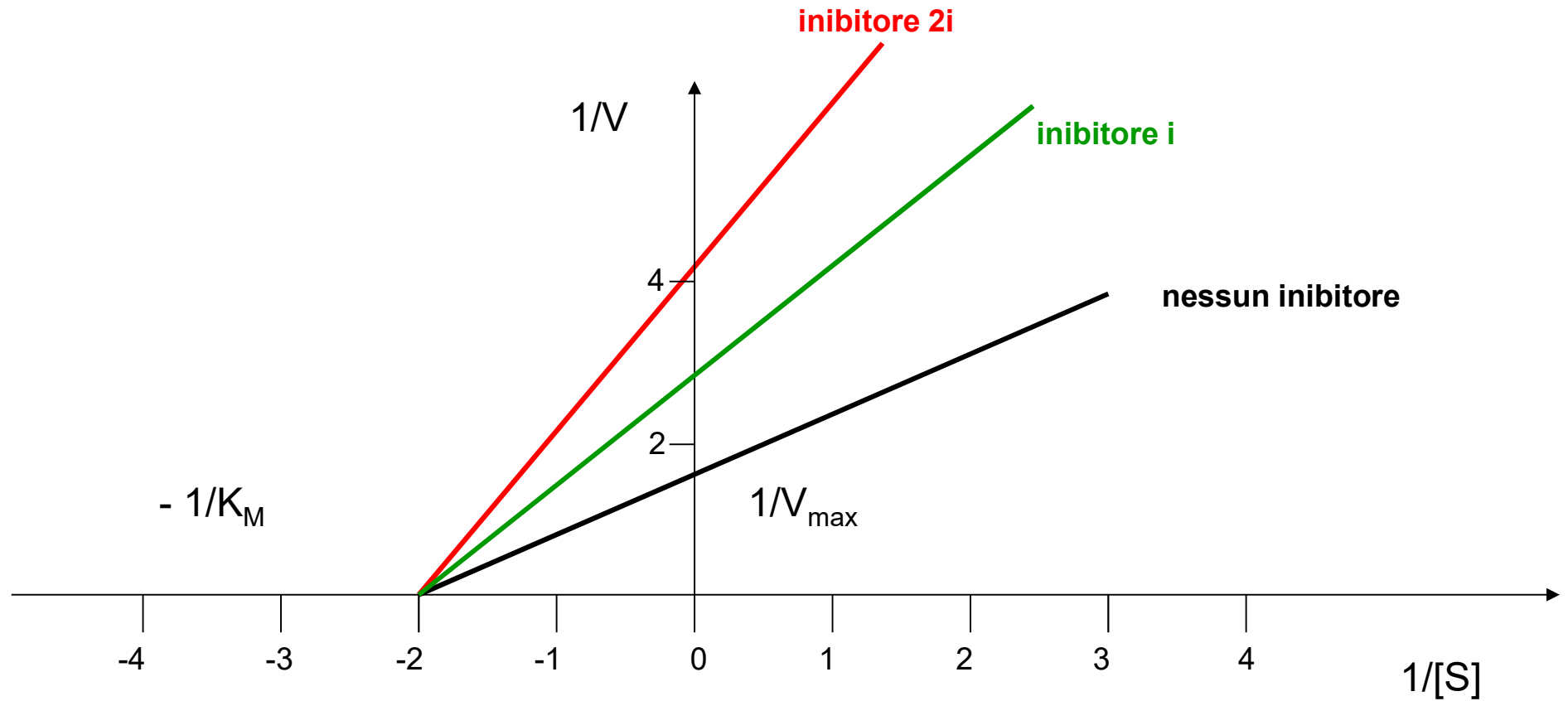


L'inibizione NON è rimossa aumentando la concentrazione di S

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



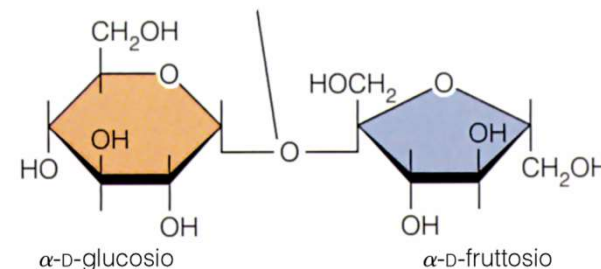
Risultato dell'INIBIZIONE NON COMPETITIVA secondo Lineweaver-Burk



Esercizio:

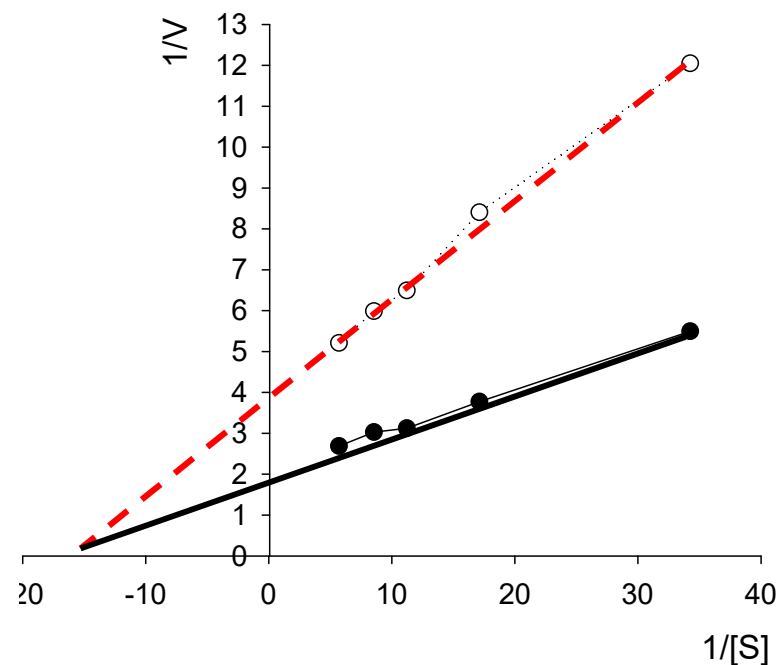
il saccarosio (zucchero da tavola) viene idrolizzato a glucosio e fruttosio in un esperimento di cinetica. L'enzima che catalizza questa reazione è chiamato INVERTASI.

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

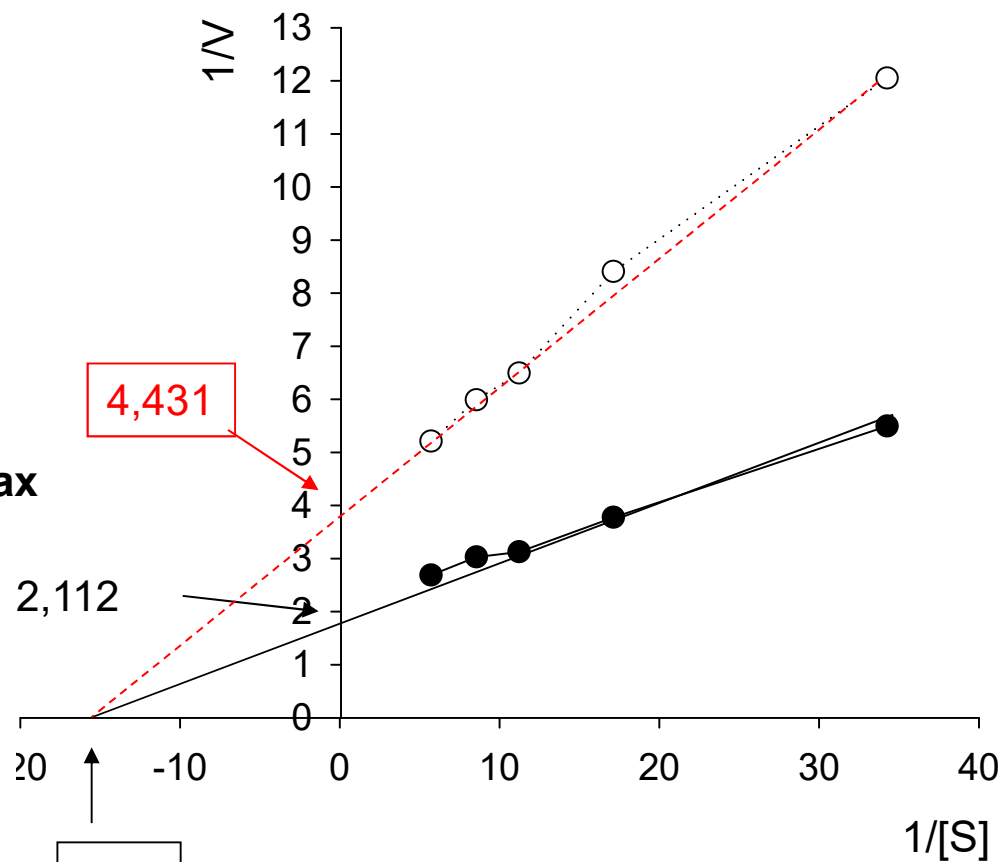


INIBIZIONE NON COMPETITIVA

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

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

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



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