

ENZIMI

ENZIMI

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

catalizzatori biologici

elevata specificità per il substrato

NO sottoprodotti

blande temperature e pH

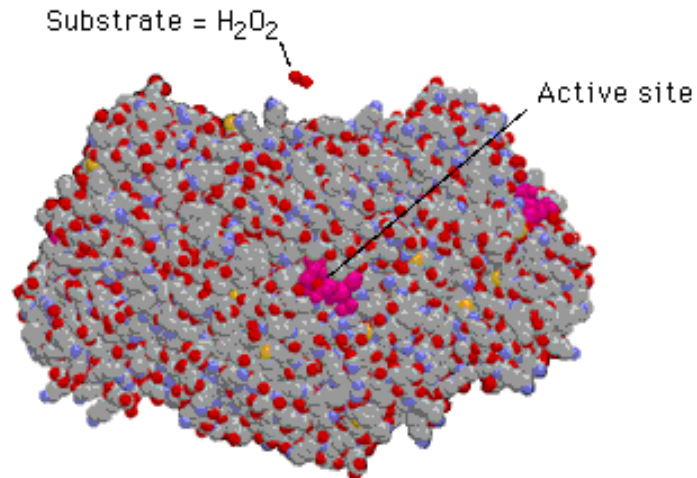
$12000 < MM < 1000000$

STRUTTURA

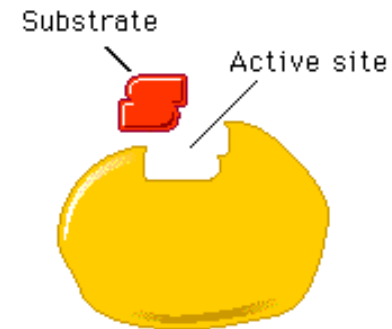
* solo catena peptidica

* 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 reduttasi
Se	Glutatione perossidasi

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

CLASSIFICAZIONE INTERNAZIONALE DEGLI ENZIMI

6 classi principali ciascuna divisa in sottoclassi

Enzyme Commission Number

"EC" + quattro numeri separati dal punto

numeri = classificazione progressivamente più dettagliata dell'enzima.

Esempio: aminopeptidasi tripeptidiche EC 3.4.11.4

3: idrolasi (enzimi che utilizzano l'acqua per rompere qualche altra molecola)

4: idrolasi che agiscono sui legami peptidici

11: scindono l'amminoacido amino-terminale da un polipeptide

4: scindono l'estremità amino-terminale da un tripeptide

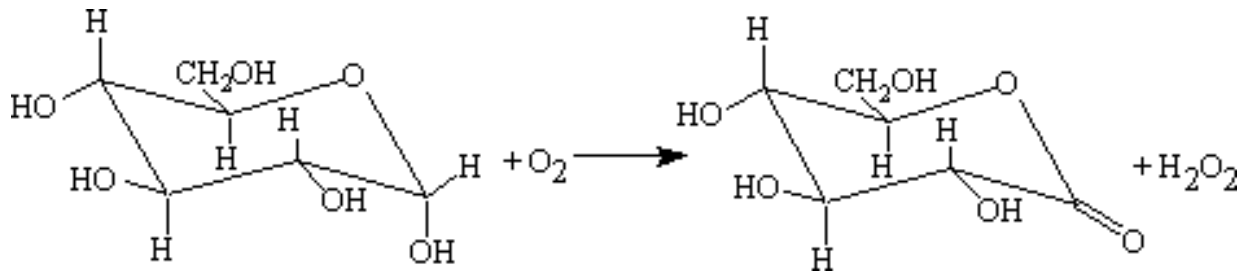
Utilizzo anche di:

nome raccomandato (corrente) es: carbossipeptidasi

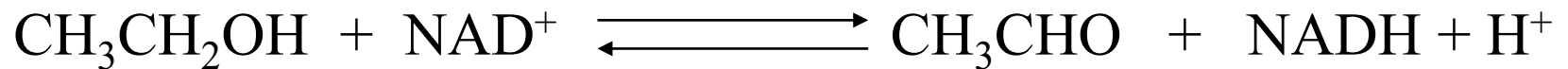
nome sistematico es: peptidil-L-ammino acido idrolasi

1. Ossidoreduttasi

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



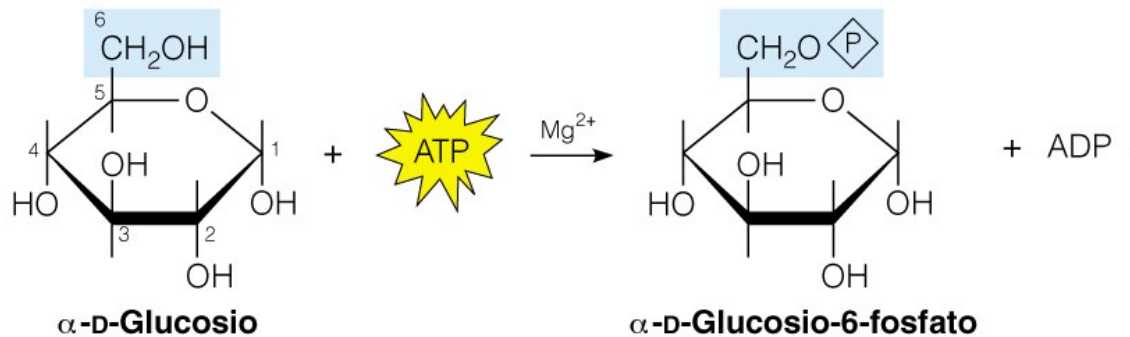
Glucosio ossigenasi



Alcol deidrogenasi

2. Transferasi

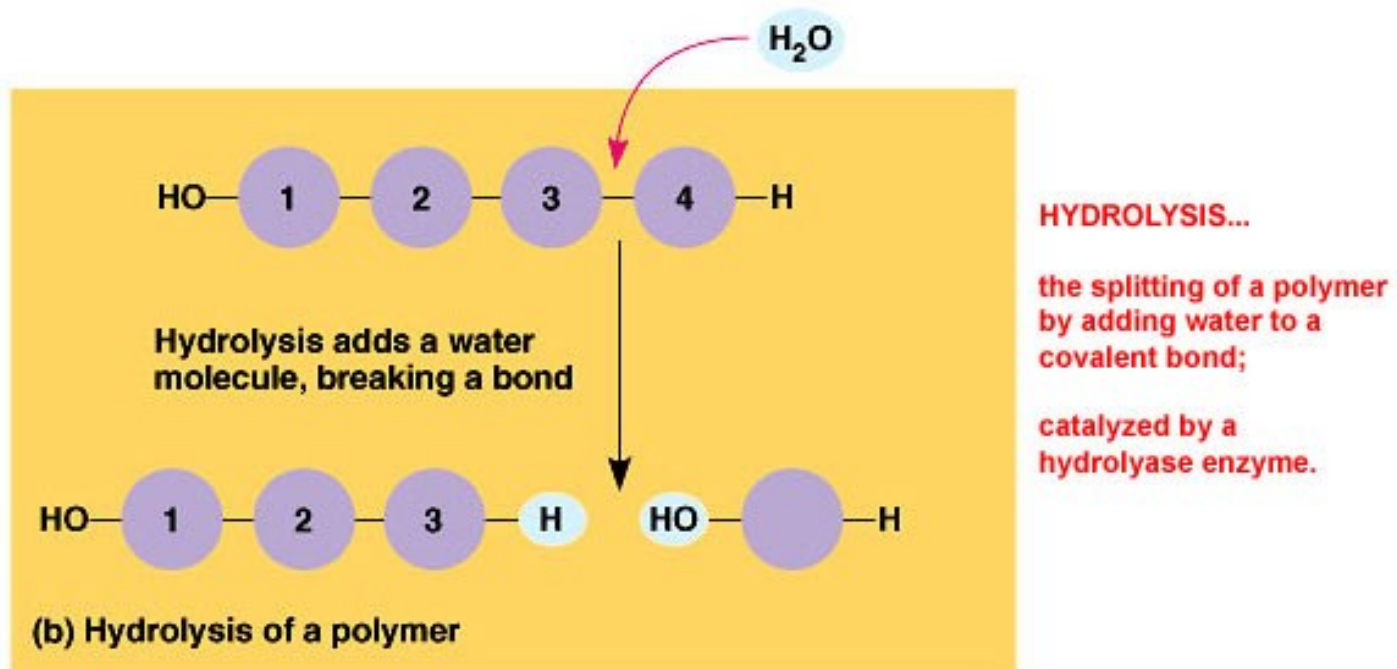
Questi enzimi trasferiscono gruppi funzionali tra donatori e accettori. I gruppi più comuni trasferiti sono: amminico (ammino transferasi), acile, fosfato, con un atomo di carbonio, e glicosidico (glicosil transferasi). Le chinasi sono enzimi che trasferiscono gruppi fosfato.



Esochinasi e glucochinasi

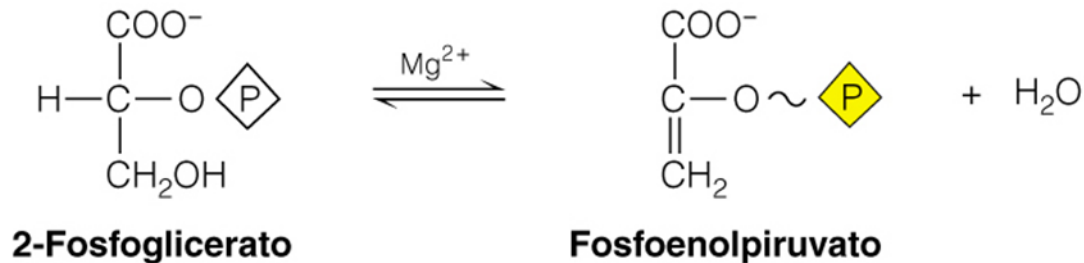
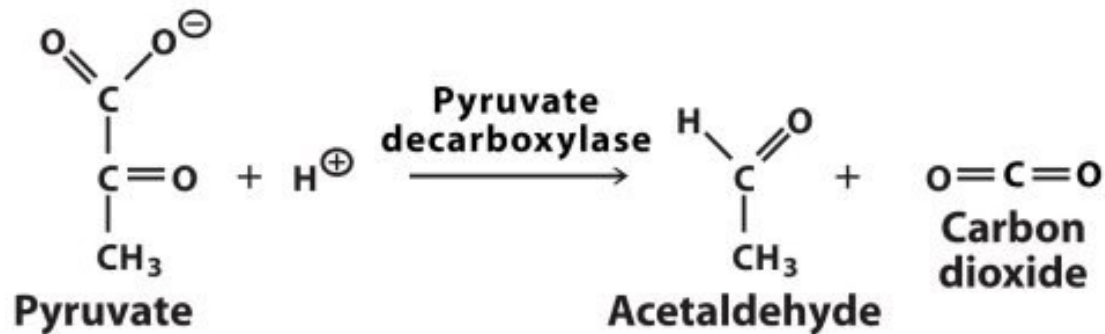
3. Idrolasi

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.



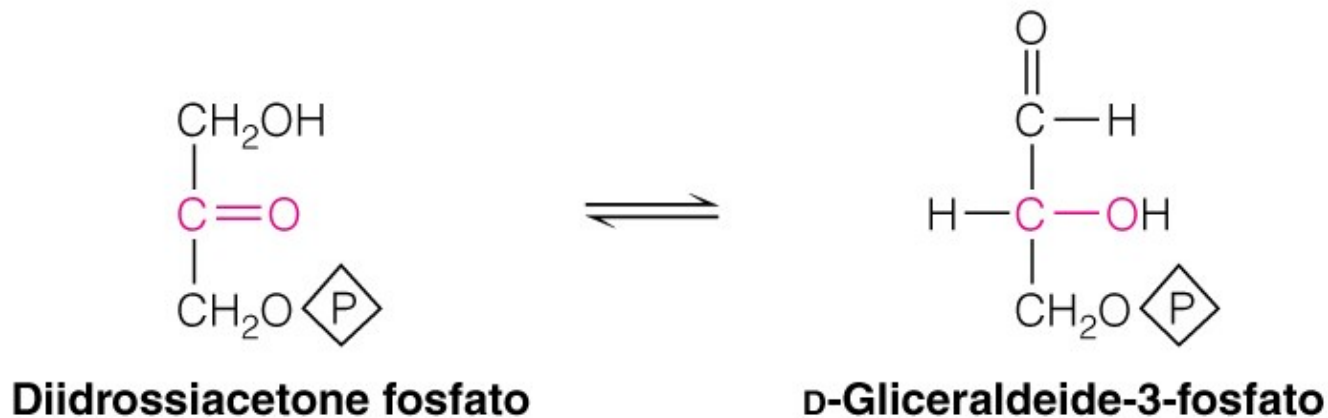
4. Liasi

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

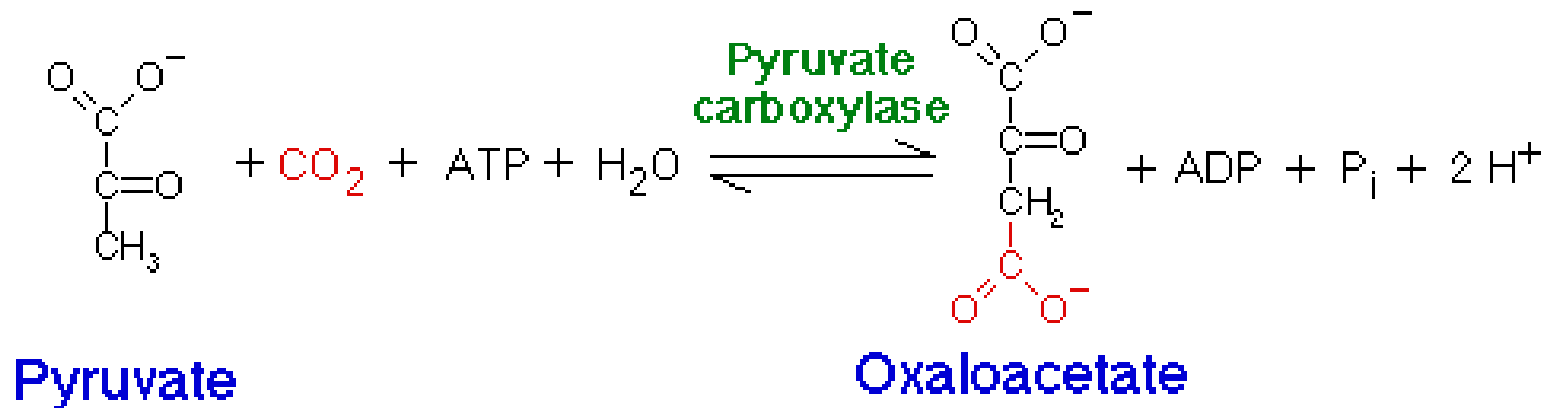
Gruppo eterogeneo di enzimi che catalizzano reazioni di diverso tipo. Es: interconversioni cis-trans e aldoso-chetoso.



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**).



TERMINOLOGIA

Attività enzimatica: espressa come μmoli di substrato convertito a prodotto per minuto in condizioni sperimentali specificate

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 molecolare o numero di turnover: è il numero molecole di substrato che vengono trasformate per minuto da una singola molecola di enzima o da un singolo sito attivo (quando è l'enzima il fattore che limita la velocità di reazione).

Katal (kat): è l'unità di misura del Sistema Internazionale (SI) per l'attività catalitica. Quantità di enzima che trasforma una mole di substrato al secondo.

CATALISI ENZIMATICA

Enzimi sono catalizzatori biologici

Aumentano la velocità (fino a 10^{17} volte) di una reazione chimica senza essere consumati o alterati. Non cambiano la costante di equilibrio (K) della reazione

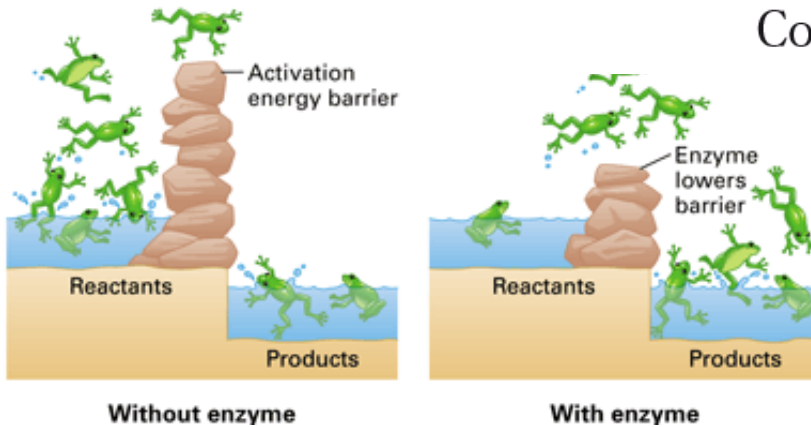
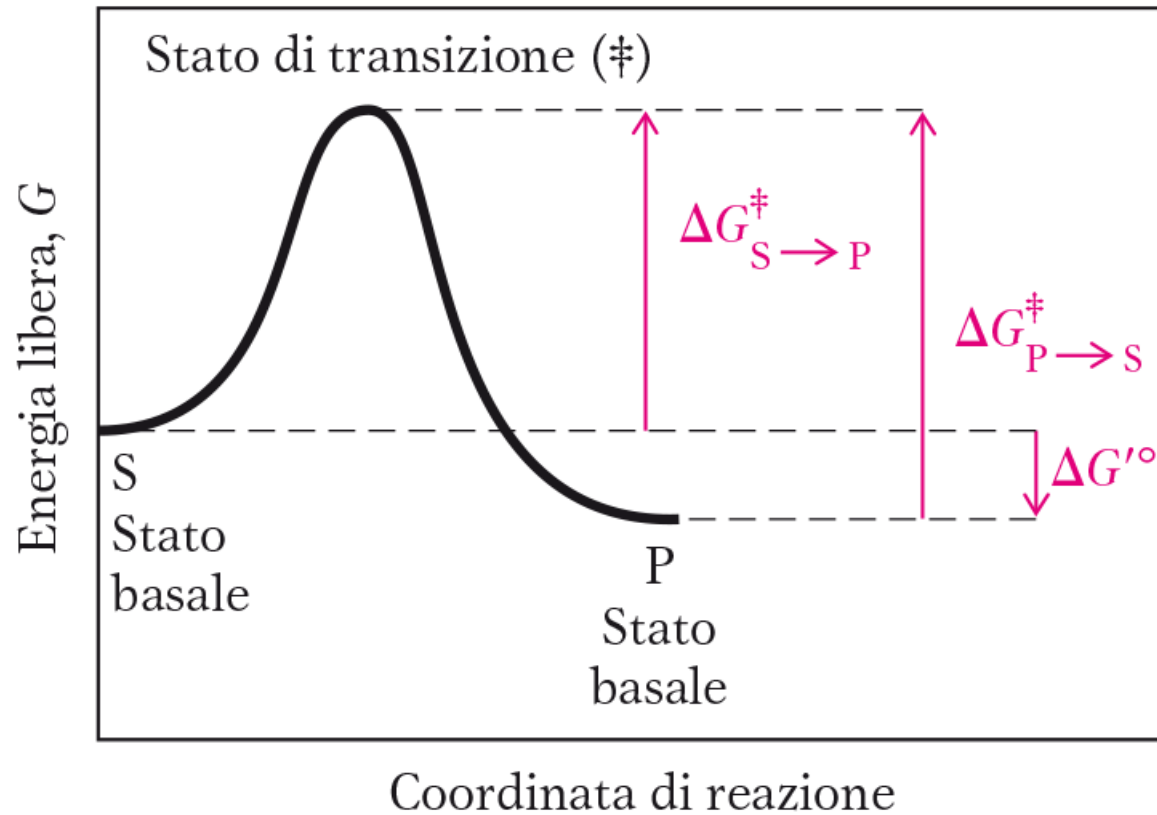
Sono prodotti da organismi viventi

Generano un ambiente specifico in cui una data reazione è energeticamente favorita

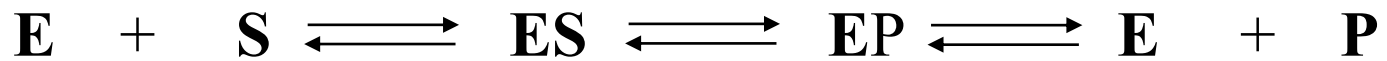
Differenze con i catalizzatori non biologici:

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

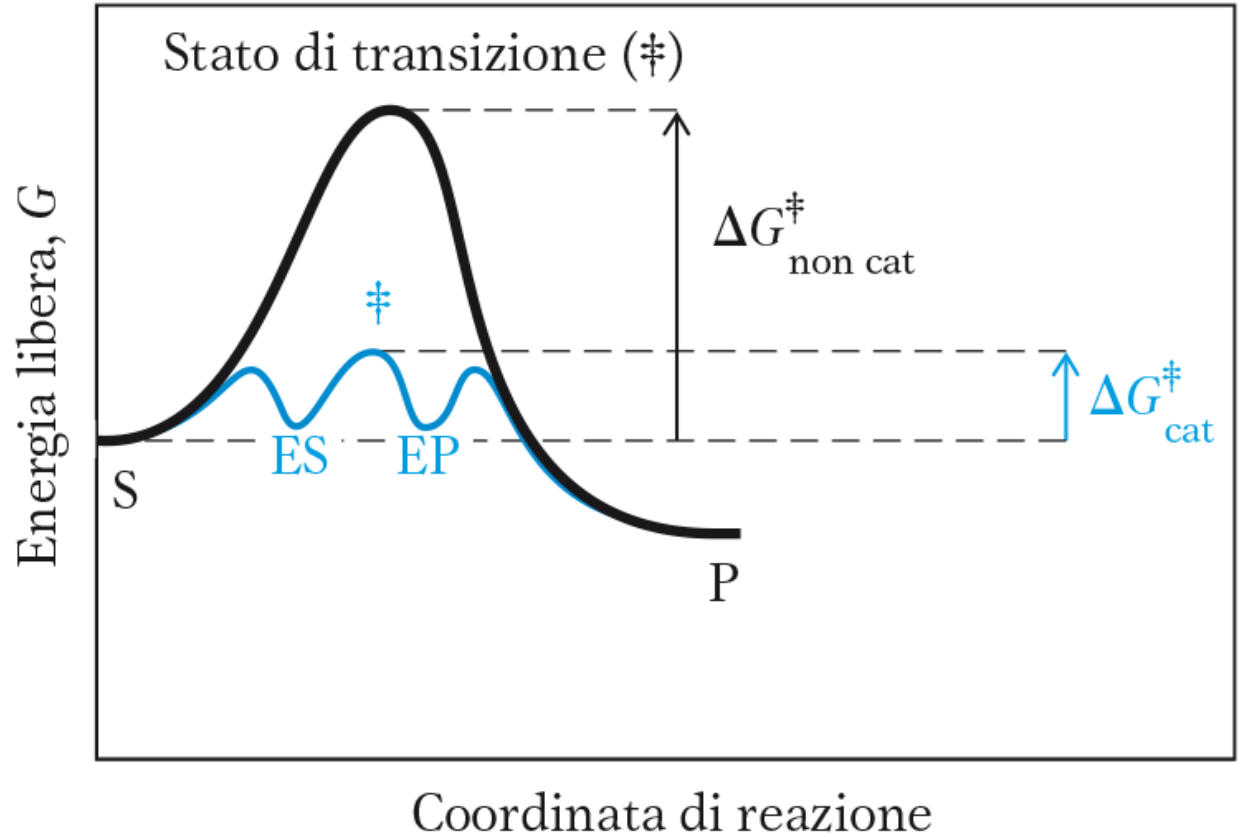
GRAFICO DELLA COORDINATA DI REAZIONE



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



Stato di transizione non corrisponde a una specie chimica con stabilità significativa. Non è un intermedio della reazione (come ES o EP). È un momento molecolare transitorio in cui alcuni eventi (la rottura di un legame, la formazione di un legame o la comparsa di una carica) si sono spinti fino al punto in cui vi è la stessa probabilità di un ritorno al substrato o di una formazione del prodotto



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.

CATALISI ENZIMATICA

L'attività catalitica consiste nel legame di S a E per formare il complesso ES.

S si lega a una specifica regione di E chiamata sito attivo.

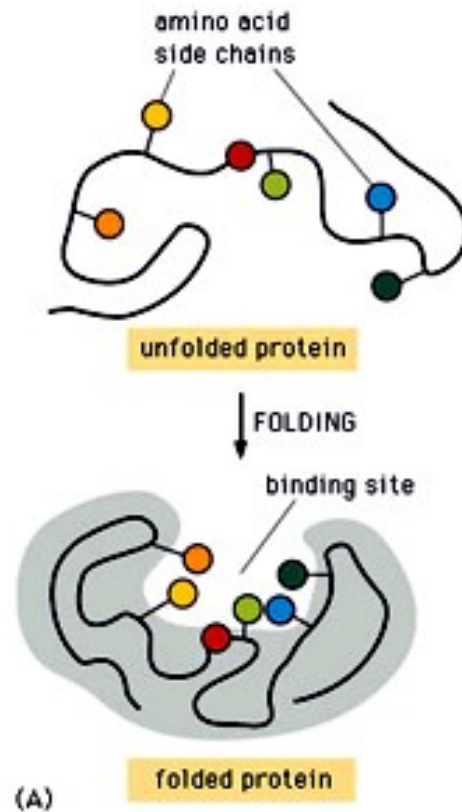
Il legame di S al sito attivo di E è un'interazione molto specifica.

Nel sito attivo S viene convertito in P che viene poi rilasciato da E.

Le catene laterali di amminoacidi legano il substrato e catalizzano la reazione

CATALISI ENZIMATICA

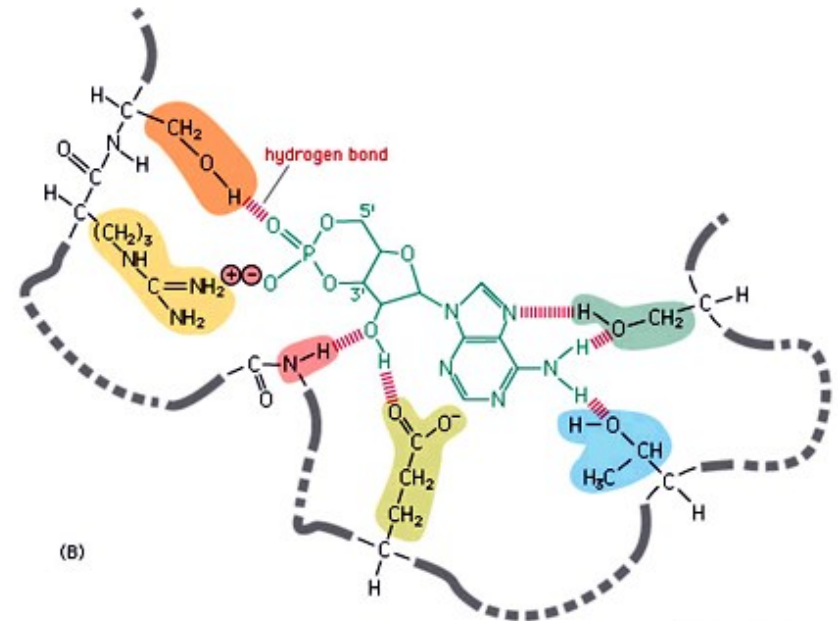
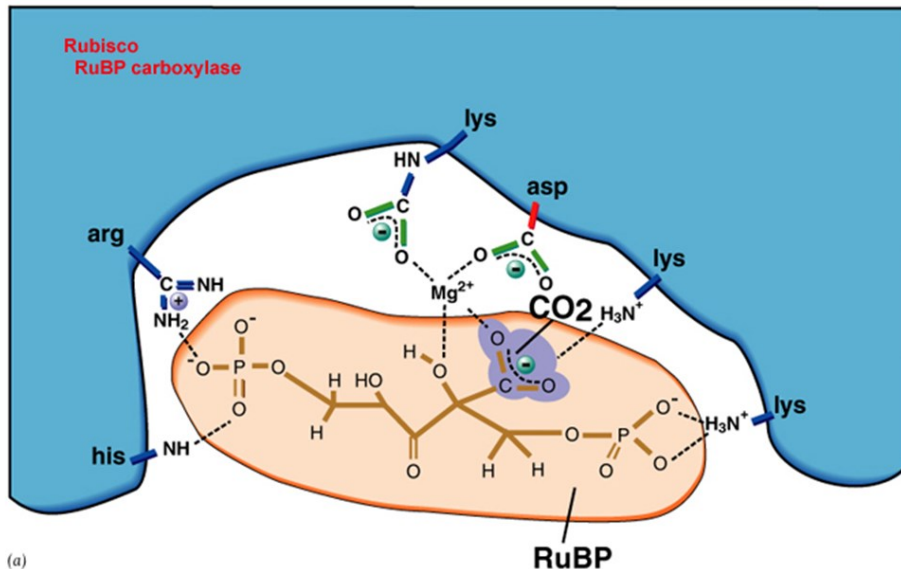
Siti attivi: fessure o scanalature sulla superficie di E, composti da amminoacidi provenienti da diverse parti della catena polipeptidica che vengono riuniti nella struttura terziaria della proteina.



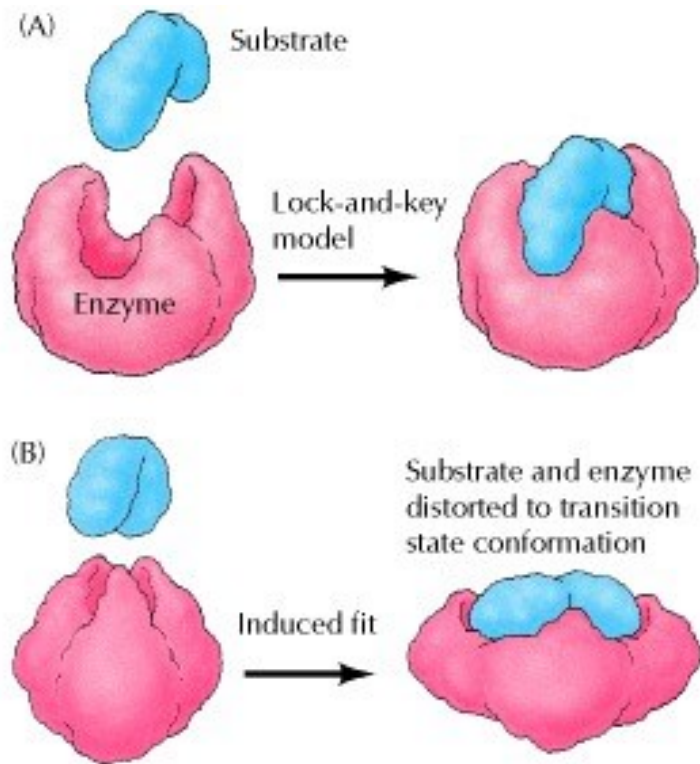
CATALISI ENZIMATICA

S si lega al sito attivo di E mediante interazioni non covalenti, inclusi legami a idrogeno, legami ionici e interazioni idrofobiche.

Nel complesso ES, più meccanismi possono accelerare la conversione di S in P. L'enzima fornisce un modello su cui i reagenti sono riuniti e correttamente orientati per favorire la formazione dello stato di transizione.



CATALISI ENZIMATICA



Gli enzimi accelerano le reazioni anche alterando la conformazione dei loro substrati per avvicinarsi a quella dello stato di transizione. Il modello più semplice di interazione enzima-substrato è il modello chiamato **chiave e serratura**, in cui S si adatta esattamente al sito attivo.

Il modello più moderno è chiamato dell'**adattamento indotto**, dove le configurazioni sia di E che di S sono modificate dal legame di S ad E.

Modello dell'adattamento indotto

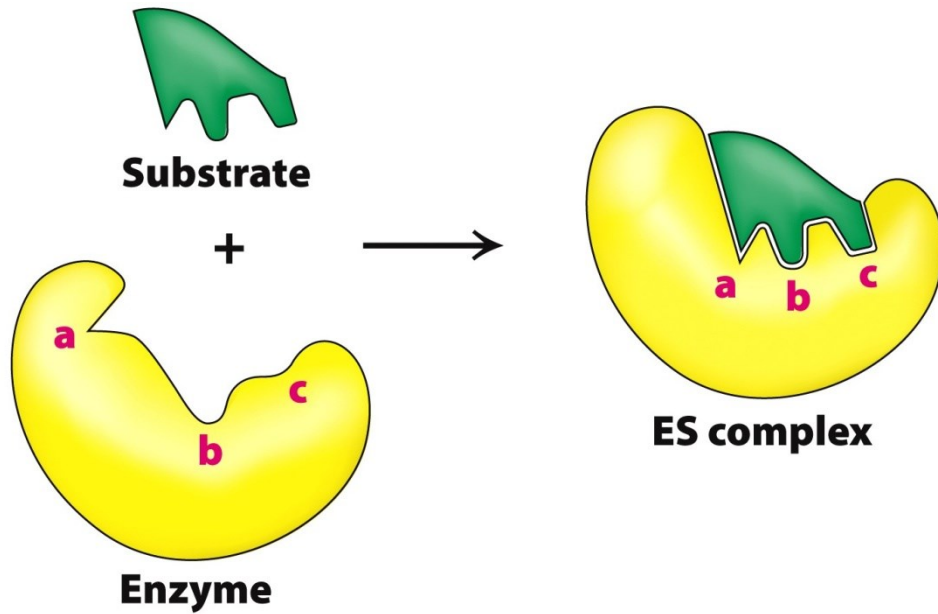
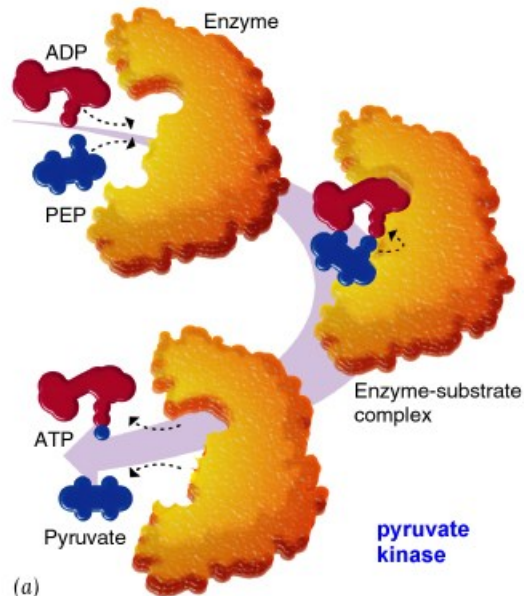
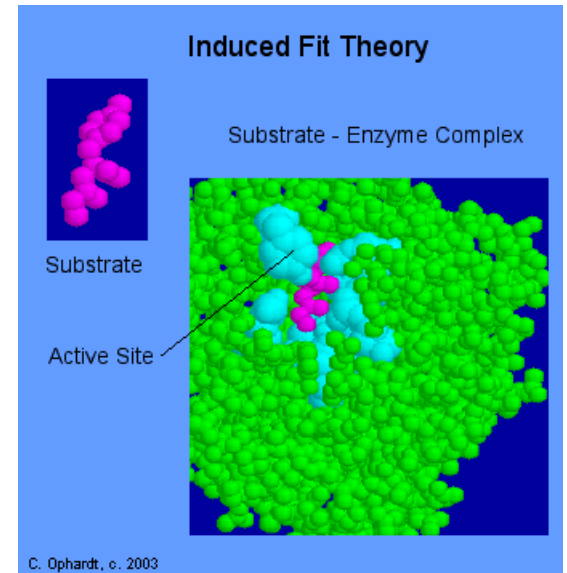


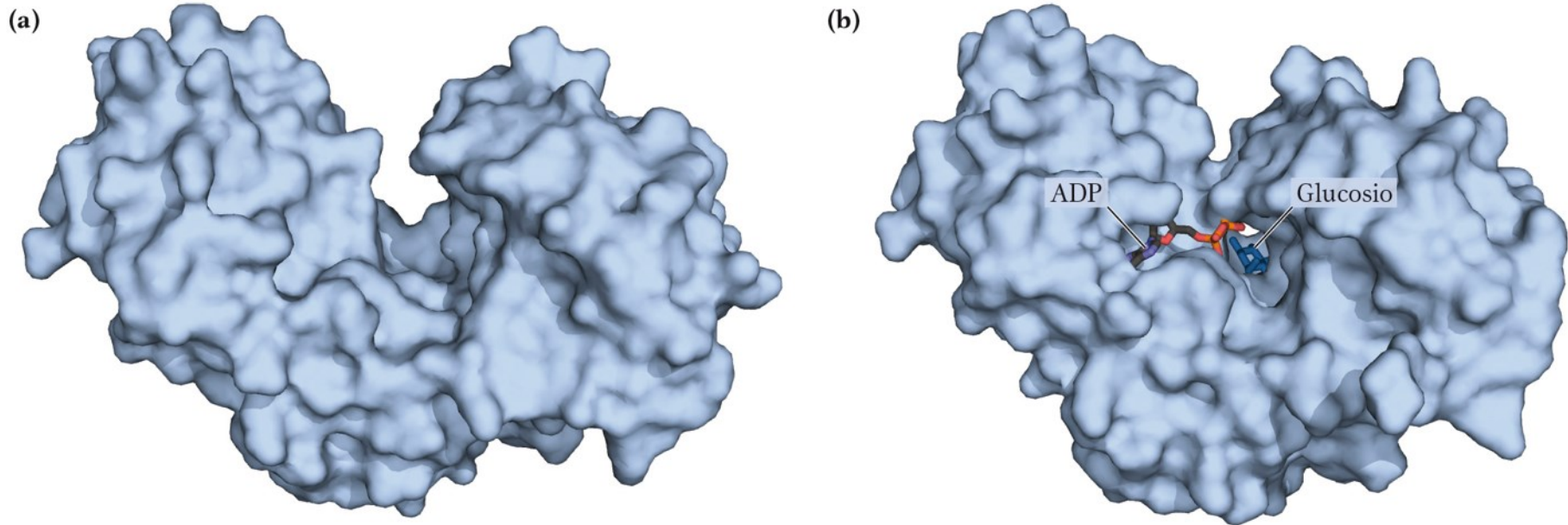
Figure 8.9
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company



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



ADATTAMENTO INDOTTO NELL'ESOCINASI



Lo stress prodotto da tale distorsione di S può facilitare ulteriormente la sua conversione allo stato di transizione indebolendo dei legami chimici critici.

CATALISI ENZIMATICA

- Nel complesso ES si formano alcune interazioni deboli, ma tutte le possibili interazioni si generano soltanto quando il substrato raggiunge lo stato di transizione.
- Oltre a riunire più substrati e distorcere la conformazione dei substrati per avvicinarsi allo stato di transizione, molti enzimi partecipano direttamente al processo catalitico.
- Specifiche catene laterali di amminoacidi nel sito attivo possono reagire con S e formare legami con intermedi della reazione. Gli amminoacidi acidi e basici sono spesso coinvolti in questi meccanismi catalitici, come donatori o accettori di protoni.

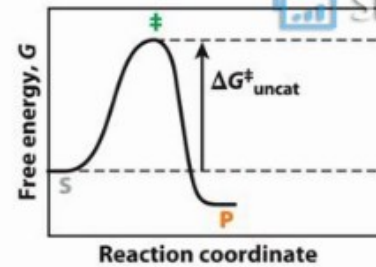
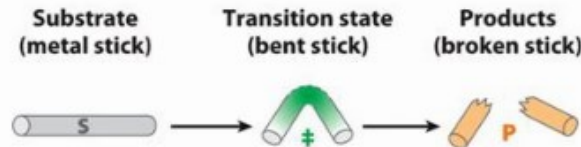
Come è possibile spiegare l'enorme aumento della velocità di reazione indotto dagli enzimi?

Da dove arriva l'energia necessaria ad abbassare così drasticamente l'energia di attivazione di una specifica reazione?

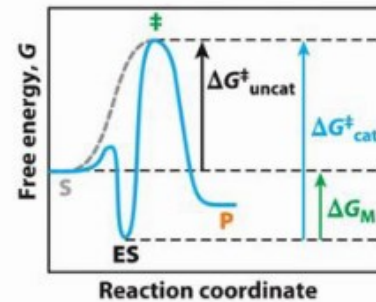
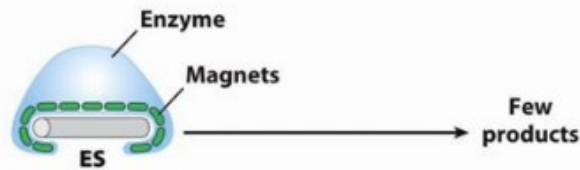
1. Interazioni non covalenti tra enzima e substrato. Si forma il complesso ES. L'interazione tra S ed E in questo complesso è mediata da legami idrogeno e interazioni idrofobiche e ioniche. La formazione di ogni interazione debole nel complesso ES è accompagnata da un piccolo rilascio di energia libera, che stabilizza l'interazione stessa. L'energia che si libera dalle interazioni ES viene detta energia di legame. L'energia di legame è la fonte principale di energia libera usata dall'enzima per abbassare l'energia di attivazione della reazione.
2. Interazioni covalenti tra E ed S. Tra i gruppi funzionali di S ed E (le catene laterali di alcuni amminoacidi, gli ioni metallici e i coenzimi) avvengono reazioni chimiche. I gruppi funzionali catalitici di un enzima possono formare un legame covalente transitorio con il substrato, attivandolo per la reazione, oppure un gruppo può essere trasferito momentaneamente dal substrato all'enzima. Queste reazioni avvengono solo nel sito attivo degli enzimi. Le interazioni covalenti tra E ed S abbassano l'energia di attivazione generando una via alternativa a bassa energia per la reazione.

REAZIONE CATALIZZATA DA UN ENZIMA IMMAGINARIO

(a) No enzyme



(b) Enzyme complementary to substrate



(c) Enzyme complementary to transition state

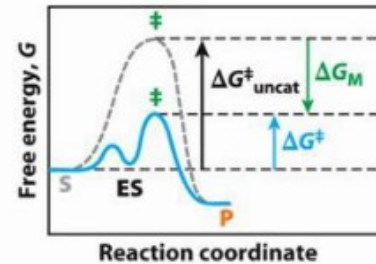
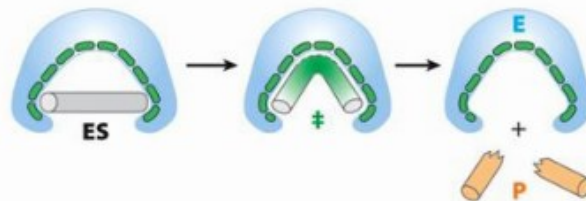


Figure 6-5
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

GLI ENZIMI SONO CATALIZZATORI MOLTO EFFICIENTI E SPECIFICI

EFFICIENZA: dipende da reazioni tra E ed S. Gruppi funzionali di E del sito attivo possono formare un legame transitorio con S rendendolo più reattivo

SPECIFICITÀ: risiede nei legami non covalenti fra E ed S. Molti legami deboli fra E ed S. Questa energia di legame abbassa l'energia di attivazione della reazione.

Le interazioni deboli sono ottimali nello stato di transizione della reazione

Strategie di catalisi

- 1. Catalisi covalente:** il sito attivo contiene un gruppo reattivo (es: un potente nucleofilo) che si lega temporaneamente a una regione del substrato nel corso della catalisi. Esempio di catalisi covalente: proteasi chimotripsina
- 2. Catalisi generale acido-base:** una molecola diversa dall'acqua svolge un ruolo di donatore o accettore di protoni. La chimotripsina utilizza un residuo di istidina come catalizzatore basico per aumentare il potere nucleofilo della serina
- 3. Catalisi per prossimità:** reazioni a due substrati. La velocità della reazione può essere accelerata notevolmente ponendo i substrati uno vicino all'altro su un'unica superficie di legame dell'enzima. Per esempio, l'anidrasi carbonica lega il diossido di carbonio e l'acqua in siti adiacenti per facilitarne la reazione

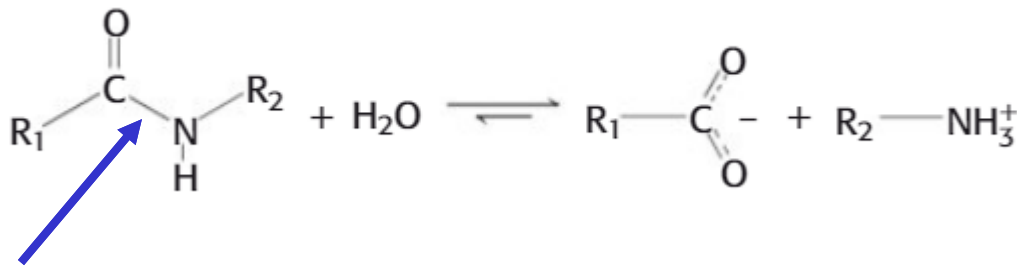
Strategie di catalisi

4. **Catalisi da ioni metallici.** Gli ioni metallici possono partecipare alla catalisi in diversi modi.
- Possono facilitare la formazione di un nucleofilo, come lo ione ossidrile, mediante coordinazione. Lo ione Zn(II) svolge questa funzione nel processo di catalisi dell'anidasi carbonica.
 - Possono servire da elettrofili, stabilizzando una carica negativa di un intermedio della reazione. Uno ione magnesio(II) svolge questo ruolo nell'EcoRV.
 - Possono fungere da ponte tra l'enzima e il substrato, aumentando l'energia di legame e mantenendo il substrato in una conformazione appropriata per la catalisi.

PROTEASI

TURNOVER DELLE PROTEINE: processo importante nei sistemi viventi

- Degradazione delle proteine: riciclo degli amminoacidi per la formazione di nuove proteine.
- Le proteine della dieta: scisse in piccoli peptidi e amminoacidi liberi per essere assorbiti dall'intestino.
- Reazioni proteolitiche importanti per la regolazione dell'attività di alcuni enzimi e di altre proteine.



sono idrolasi

Idrolisi del legame peptidico: termodinamicamente favorita, ma estremamente lenta. Senza catalizzatore: emivita dell'idrolisi di un tipico legame peptidico a pH neutro è compresa tra 10 e 1000 anni. I legami peptidici vengono idrolizzati in pochi millisecondi nei processi biochimici.

SERIN PROTEASI

Chimotripsina: scinde i legami peptidici selettivamente sul lato carbossilico degli amminoacidi con gruppo R di grandi dimensioni e idrofobico, come il triptofano, la tirosina, la fenilalanina e la metionina

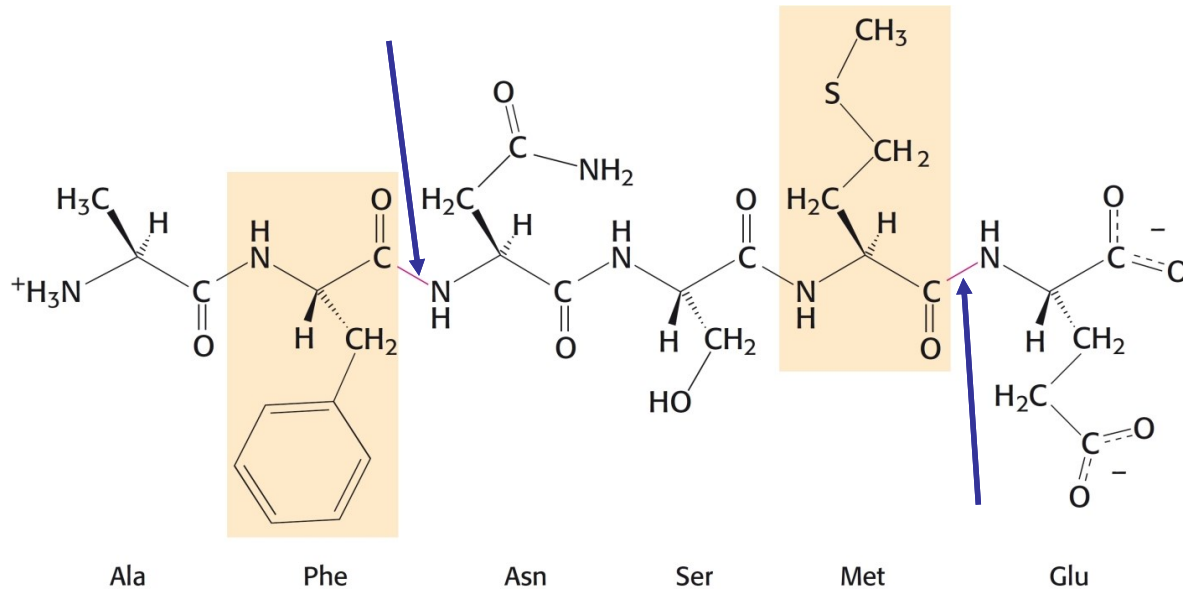


Figura 9.1 Specificità della chimotripsina
La chimotripsina taglia le proteine sul lato carbossilico di amminoacidi aromatici o con catene laterali alifatiche idrofobe (evidenziati in arancione). I legami che possono essere scissi dalla chimotripsina sono indicati in rosso.

CATALISI COVALENTE L'enzima impiega un potente nucleofilo per attaccare il carbonio carbonilico poco reattivo del substrato. Nel corso della catalisi il nucleofilo si lega covalentemente al substrato, anche se per un tempo molto breve.

SERIN PROTEASI

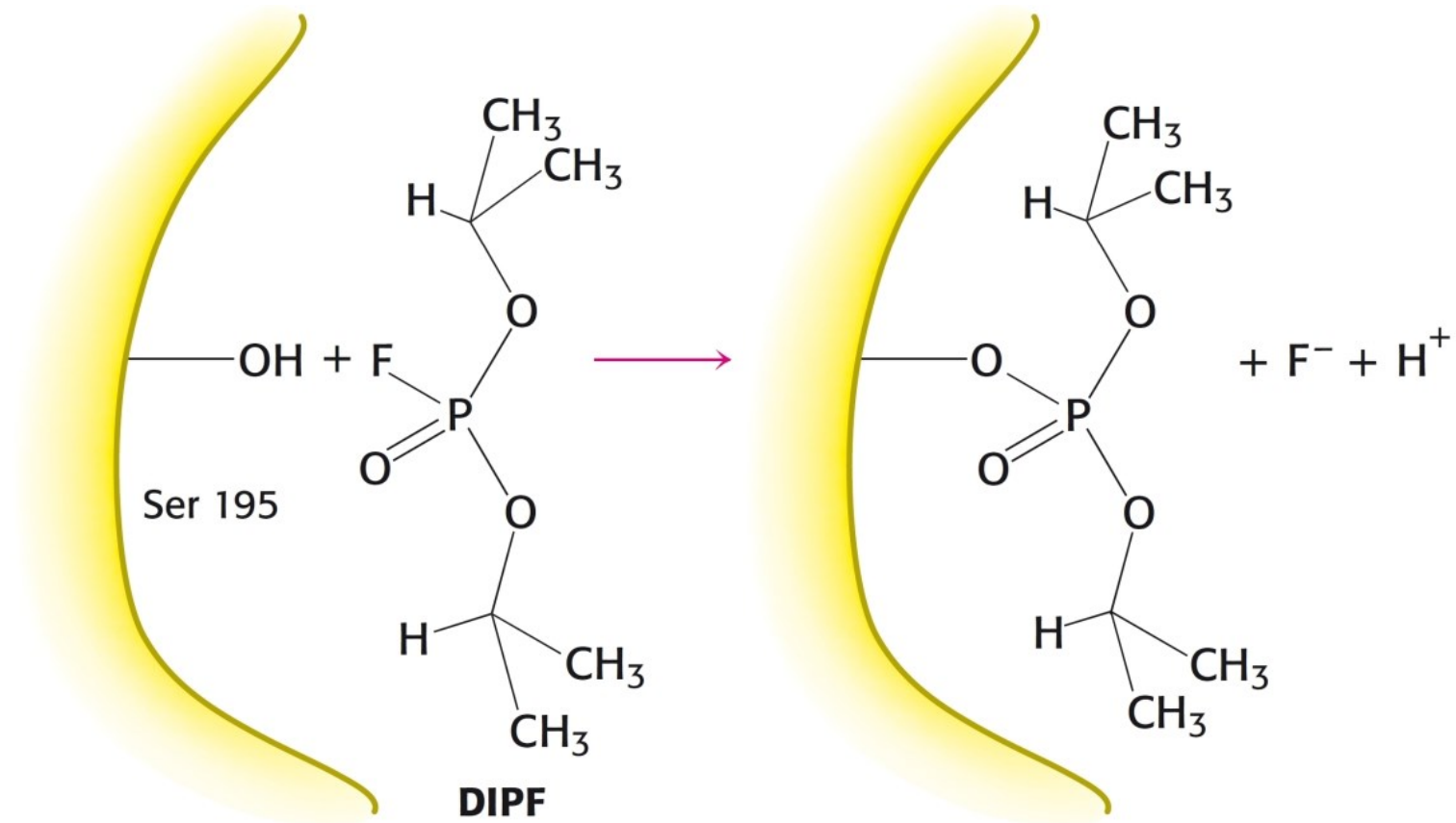
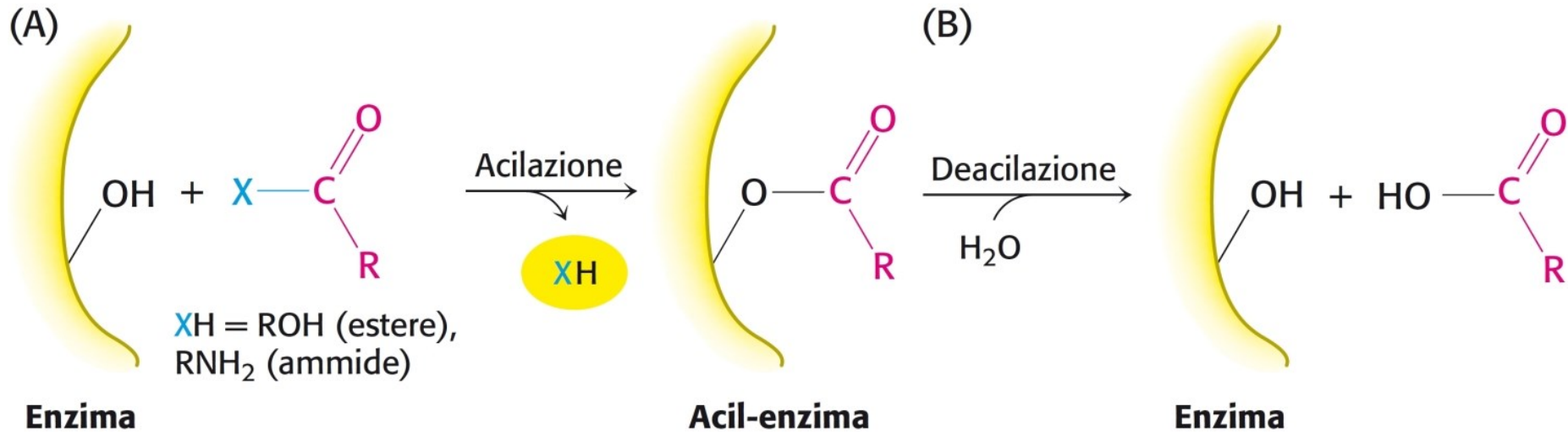


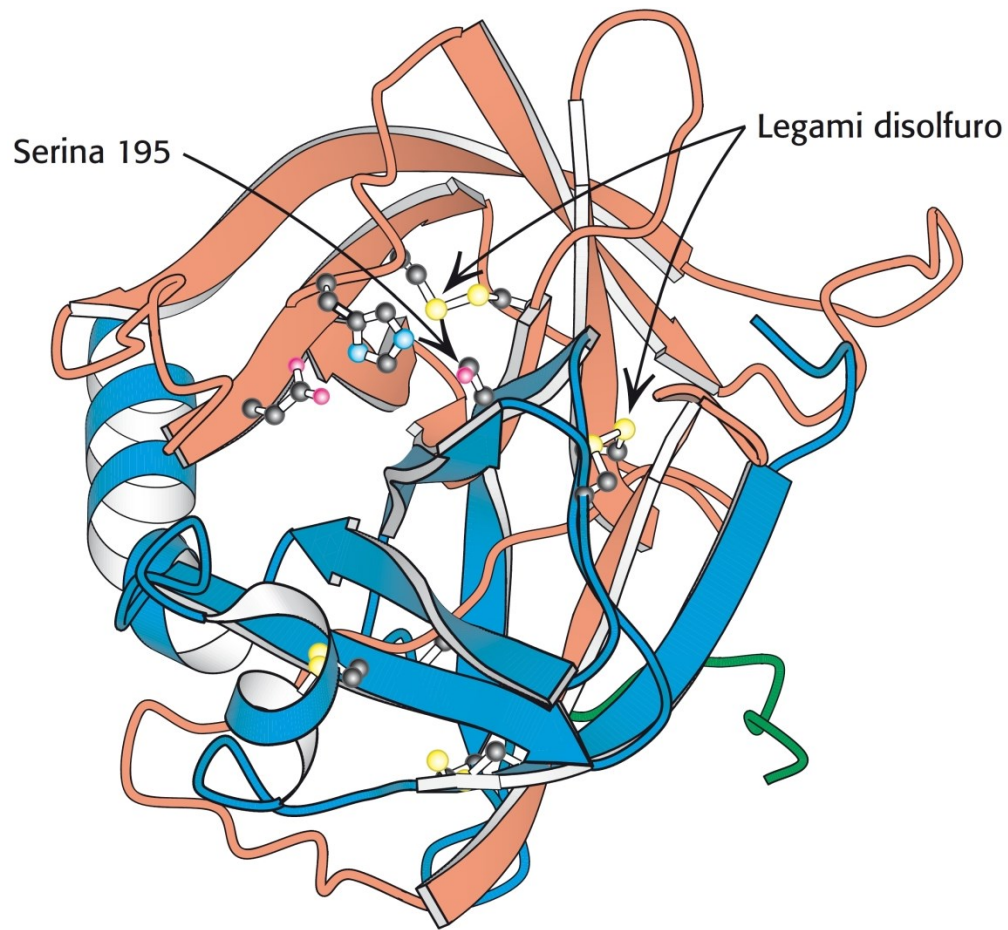
Figura 9.2 Una serina insolitamente reattiva nella chimotripsina
La chimotripsina è inattivata per trattamento con il diisopropilfluorofosfato (DIPF), che reagisce solo con la serina 195, tra le 28 presenti nell'enzima.

SERIN PROTEASI

Catalisi covalente

2 fasi: acilazione seguita da deacilazione





Chimotripsina: sintetizzata come singolo polipeptide, chiamato chimotripsinogeno, attivato per proteolisi con generazione delle tre catene

 **Figura 9.6** Localizzazione del sito attivo della chimotripsina

La chimotripsina è formata da tre catene, rappresentate con il modello a nastro, nei colori arancione, blu e verde. Le catene laterali dei residui della triade catalitica sono mostrate con il modello a sfere e bastoncini. Le tre catene laterali della triade, compresa la serina 195, sono localizzate nella metà superiore della tasca. Sono presenti anche due legami disolfuro intercatena e due intracatena, dislocati in varie zone della molecola.

[Fonte: 1GCT.pdb.]

In che modo la disposizione dei tre residui conferisce una reattività così elevata alla serina 195?

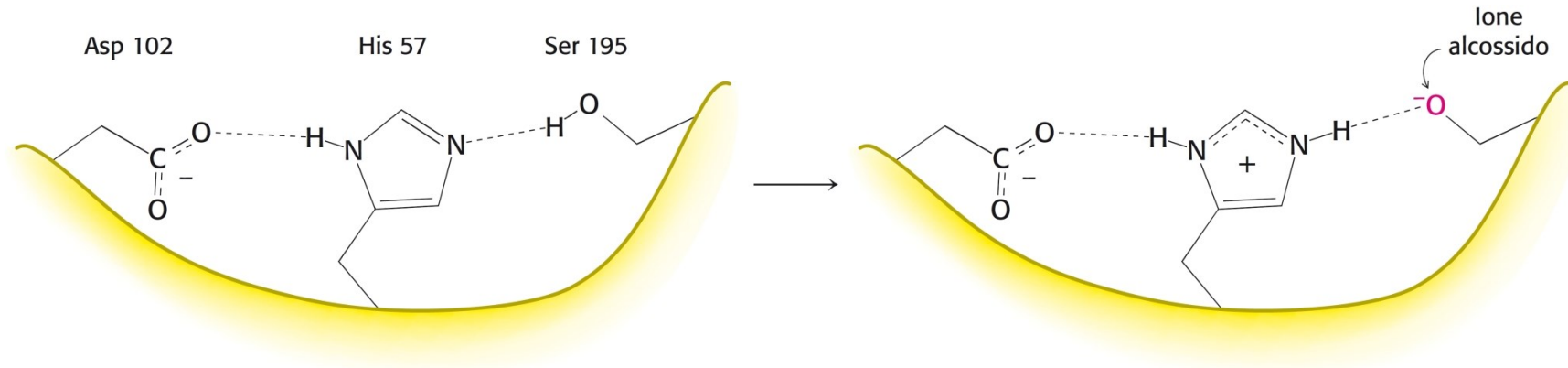


Figura 9.7 La triade catalitica

La triade catalitica, illustrata a sinistra, converte la serina 195 in un potente nucleofilo, come mostrato a destra.

His posiziona la catena laterale di Ser e ne polarizza il gruppo ossidrilico, che diventa disponibile alla deprotonazione. In presenza del substrato, il residuo His accetta il protone dall'ossidrile da Ser 195. His agisce con un meccanismo di catalisi basica generale. L'eliminazione di un protone dall'ossidrile di Ser genera uno ione alcossido, un nucleofilo più potente del gruppo alcolico. Il residuo di Asp contribuisce a mantenere il residuo di istidina nel giusto orientamento. Ci sono interazioni favorevoli tra Asp e His che rendono His una base più potente.

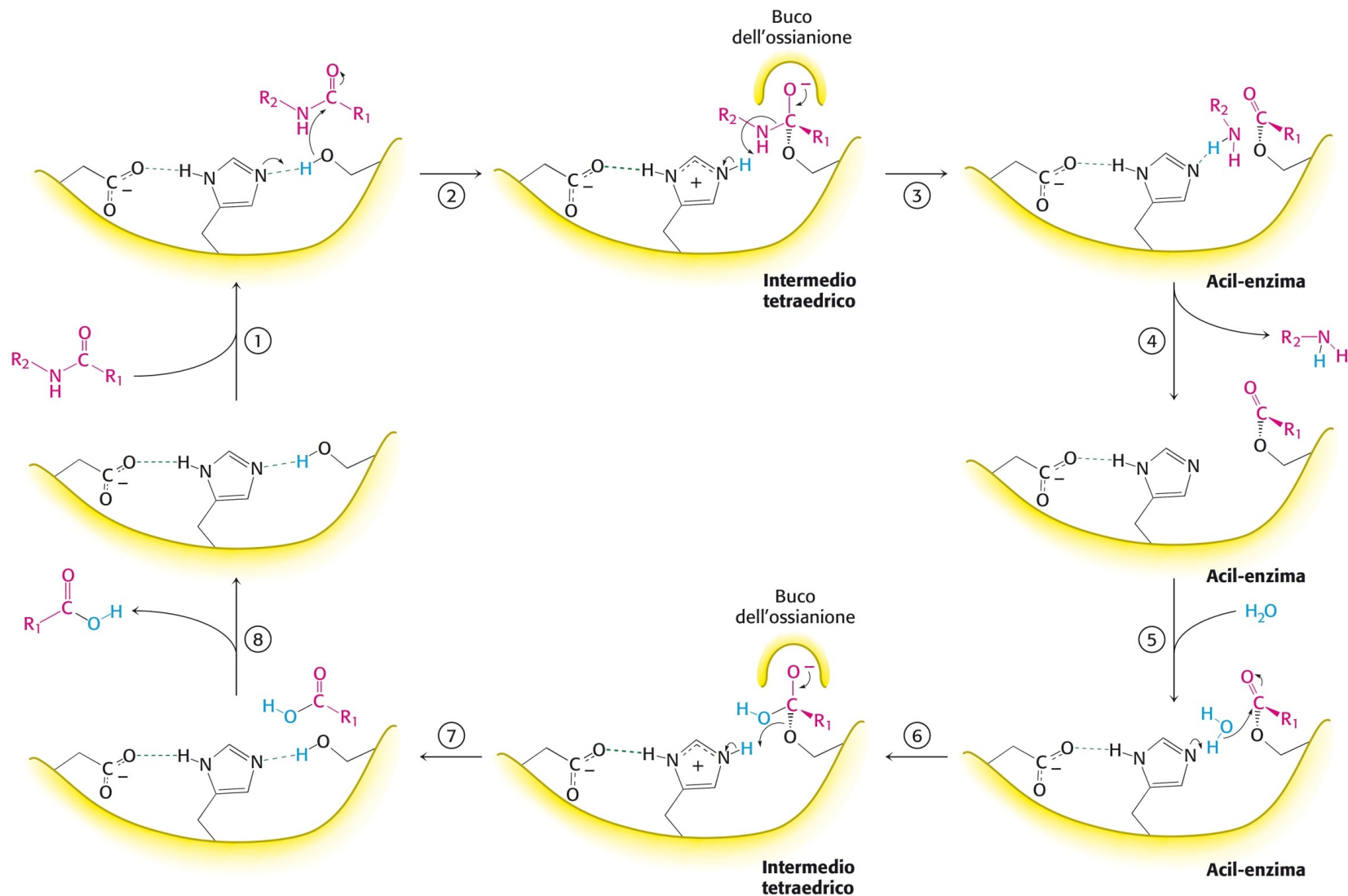


Figura 9.8 Idrolisi del legame peptidico catalizzata dalla chimotripsina

Il meccanismo di idrolisi del legame peptidico illustra i principi della catalisi covalente e della catalisi acido-base. La reazione procede attraverso otto stadi: (1) legame del substrato, (2) attacco nucleofilo della serina sul gruppo carbonilico del legame peptidico, (3) collasso dell'intermedio tetraedrico, (4) rilascio del componente amminico, (5) legame dell'acqua, (6) attacco nucleofilo dell'acqua sull'intermedio acil-enzima, (7) collasso dell'intermedio tetraedrico, (8) rilascio del componente acido carbossilico. Le linee verdi tratteggiate rappresentano i legami idrogeno.

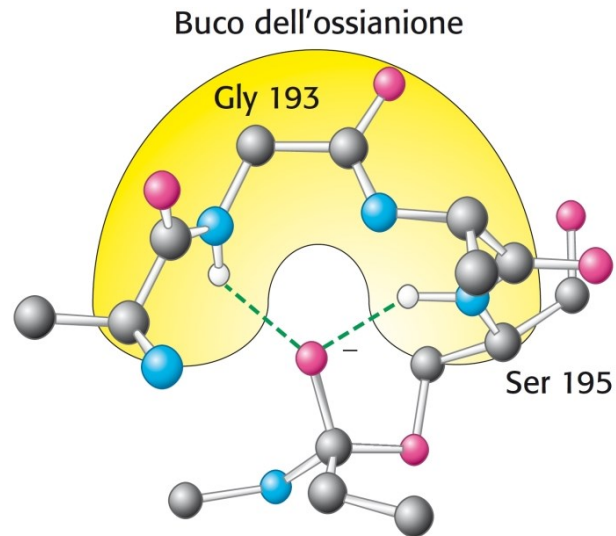


Figura 9.9 Il buco dell'ossianione

La struttura stabilizza l'intermedio tetraedrico della reazione catalizzata dalla chimotripsina. I legami idrogeno (in verde) uniscono i gruppi peptidici NH e l'ossigeno con carica negativa.

Intermedi dell'acil-enzima osservati con la cristallografia a raggi X, dopo averli intrappolati aggiustando le condizioni sperimentali: substrato, pH o temperatura

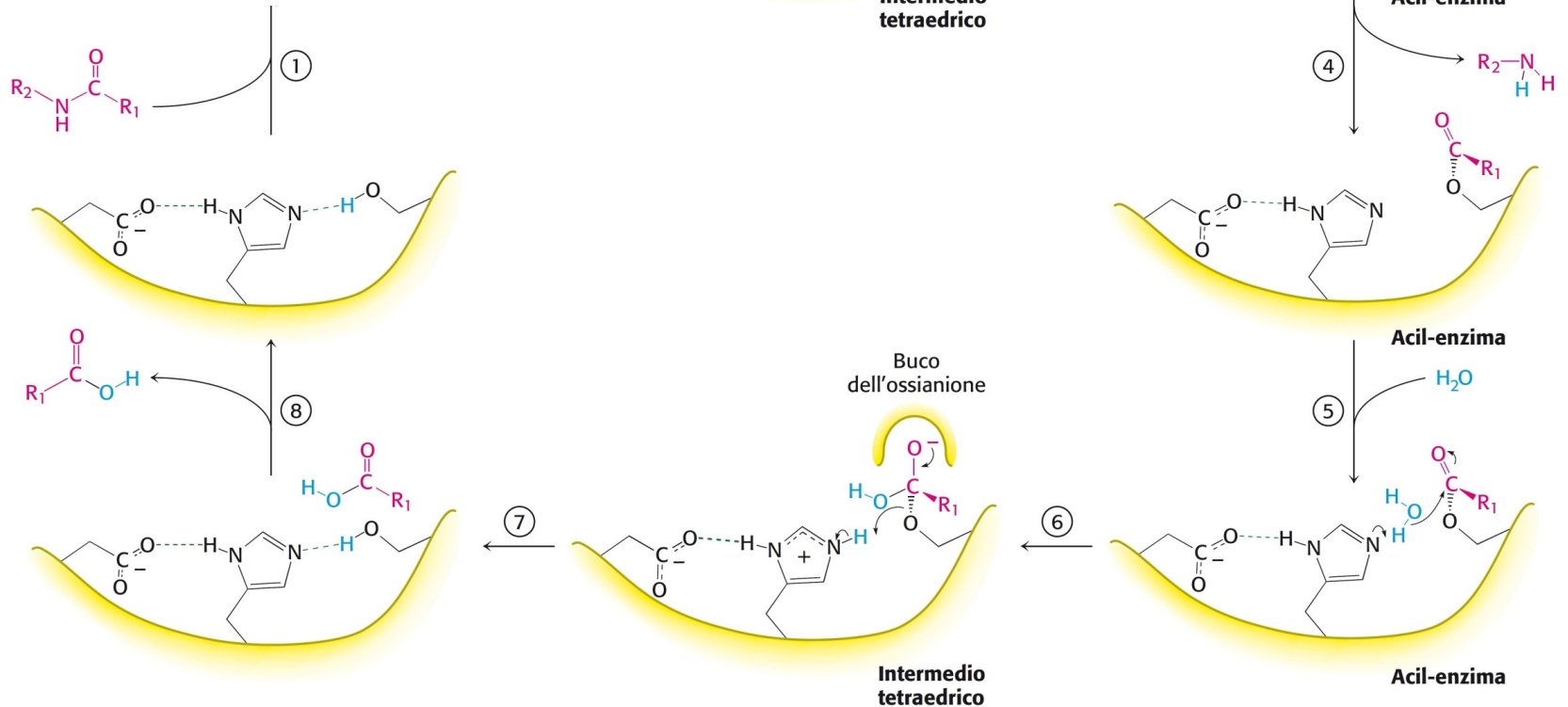
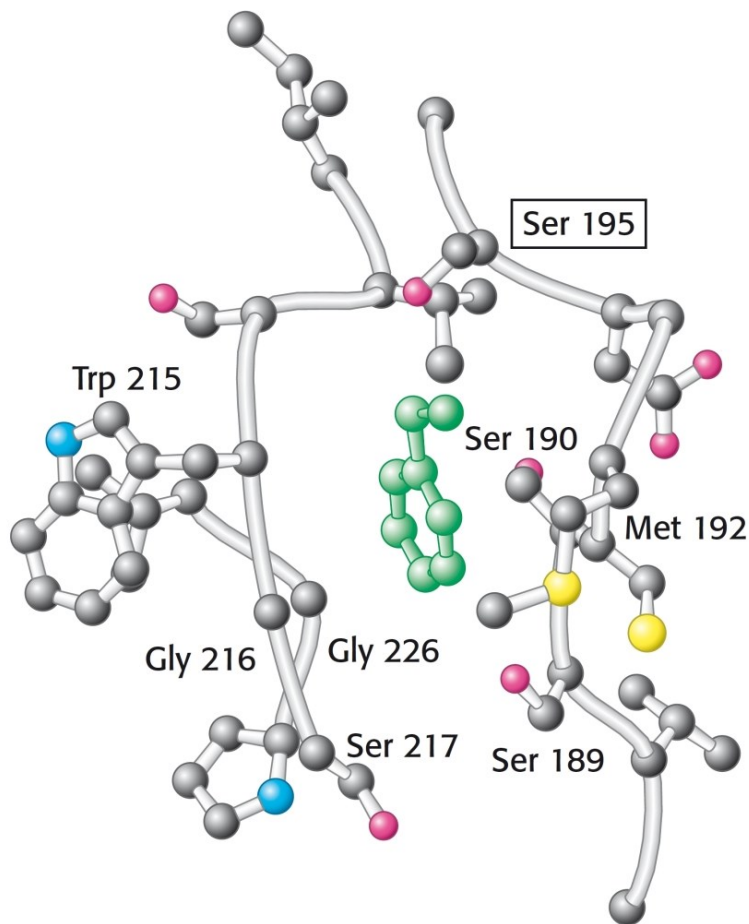


Figura 9.8 Idrolisi del legame peptidico catalizzata dalla chimotripsina

Il meccanismo di idrolisi del legame peptidico illustra i principi della catalisi covalente e della catalisi acido-base. La reazione procede attraverso otto stadi: (1) legame del substrato, (2) attacco nucleofilo della serina sul gruppo carbonilico del legame peptidico, (3) collasso dell'intermedio tetraedrico, (4) rilascio del componente amminico, (5) legame dell'acqua, (6) attacco nucleofilo dell'acqua sull'intermedio acil-enzima, (7) collasso dell'intermedio tetraedrico, (8) rilascio del componente acido carbossilico. Le linee verdi tratteggiate rappresentano i legami idrogeno.



Specificità della chimotripsina
 tasca S (idrofobica), dove si inseriscono bene i gruppi R privi di carica di AA come Phe e Trp

Specificità dipende da quale AA si trova sul lato amminico, rispetto al legame peptidico che deve essere idrolizzato

Figura 9.10 Tasca della specificità della chimotripsina

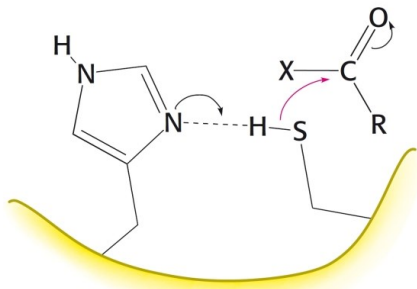
La tasca è rivestita da residui relativamente idrofobi. La sua profondità favorisce il legame di residui con catene laterali ingombranti e idrofobe, come la fenilalanina (mostrata in verde). La serina del sito attivo (serina 195) è posizionata in modo da poter scindere specificamente il legame peptidico che si trova tra il residuo legato nella tasca e il residuo successivo nella sequenza. Vengono anche mostrati gli amminoacidi principali che costituiscono il sito di legame.

ALTRE PROTEASI

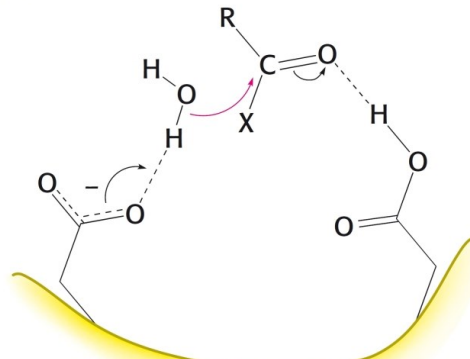
le cisteina proteasi
le aspartil proteasi
le metalloproteasi

strategia: generazione di un forte nucleofilo per attaccare il carbonio carbonilico del legame peptidico

(A) CISTEINA PROTEASI



(B) ASPARTIL PROTEASI



(C) METALLOPROTEASI

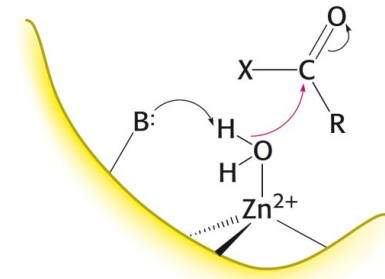


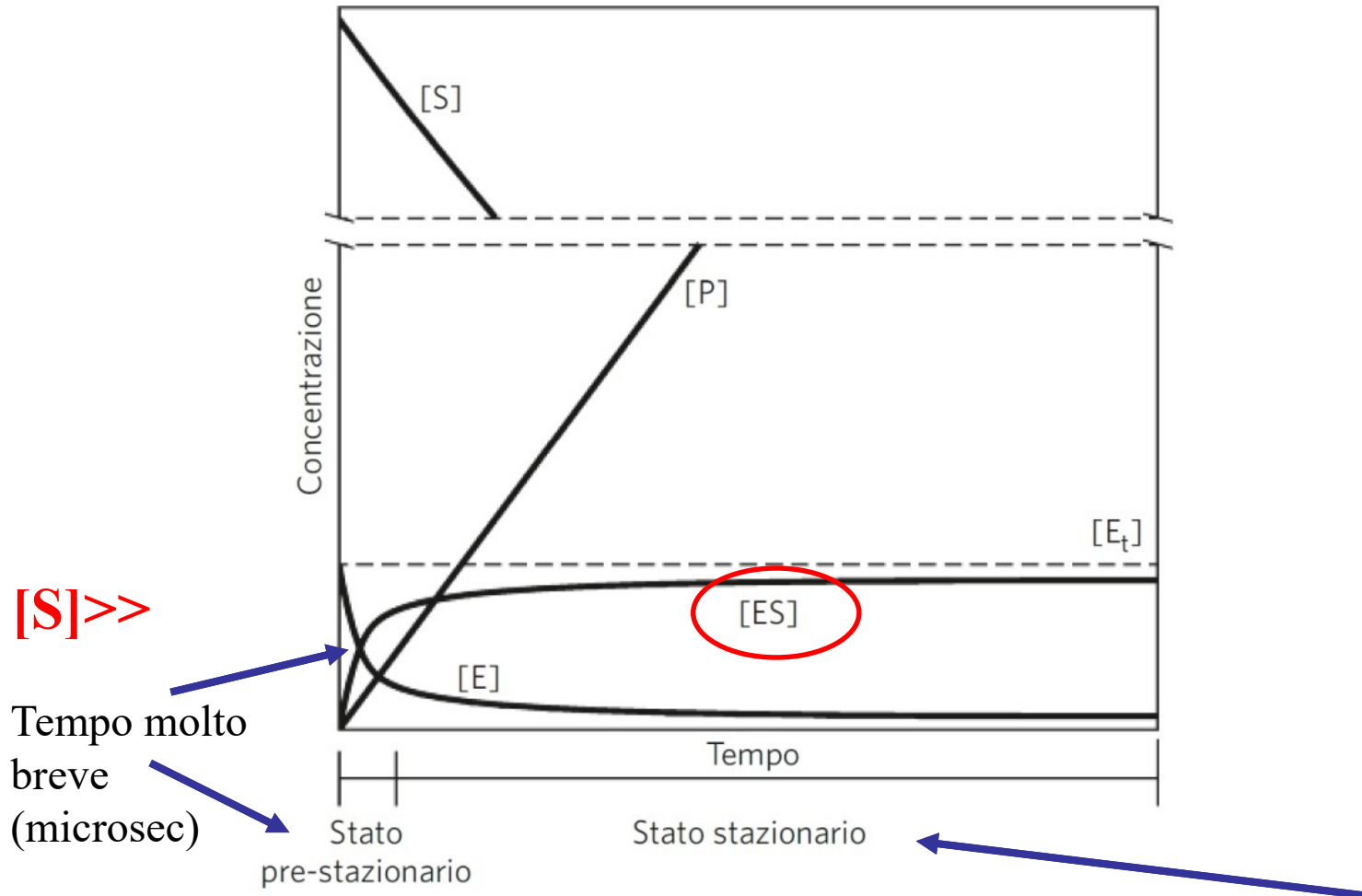
Figura 9.17 Strategie di attivazione per le tre classi di proteasi

Il gruppo carbonilico del peptide è attaccato da (A) una cisteina attivata dall'istidina, nelle cisteina proteasi; (B) una molecola di acqua attivata dall'aspartato, nelle aspartil proteasi; (C) una molecola di acqua attivata da un metallo, nelle metalloproteasi. Per le metalloproteasi la lettera B rappresenta una base (spesso un glutammato) che favorisce la deprotonazione dell'acqua legata al metallo.

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)

VELOCITÀ = grandezza fisica che esprime la variazione di una proprietà nell'unità di tempo

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

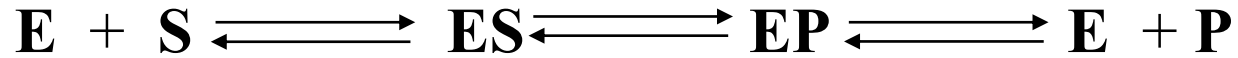
Per le reazioni chimiche la proprietà più adeguata è la concentrazione. $S \rightarrow P$

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

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

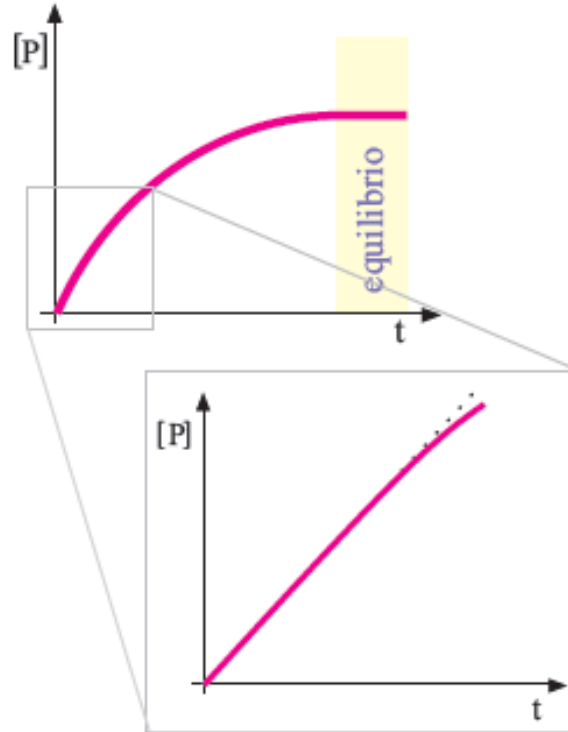
velocità istantanea di reazione = la variazione della concentrazione di S o P in un intervallo infinitesimo di tempo e corrisponde al coefficiente angolare della tangente alla curva della concentrazione rispetto al tempo; essa varia con il procedere della reazione)

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



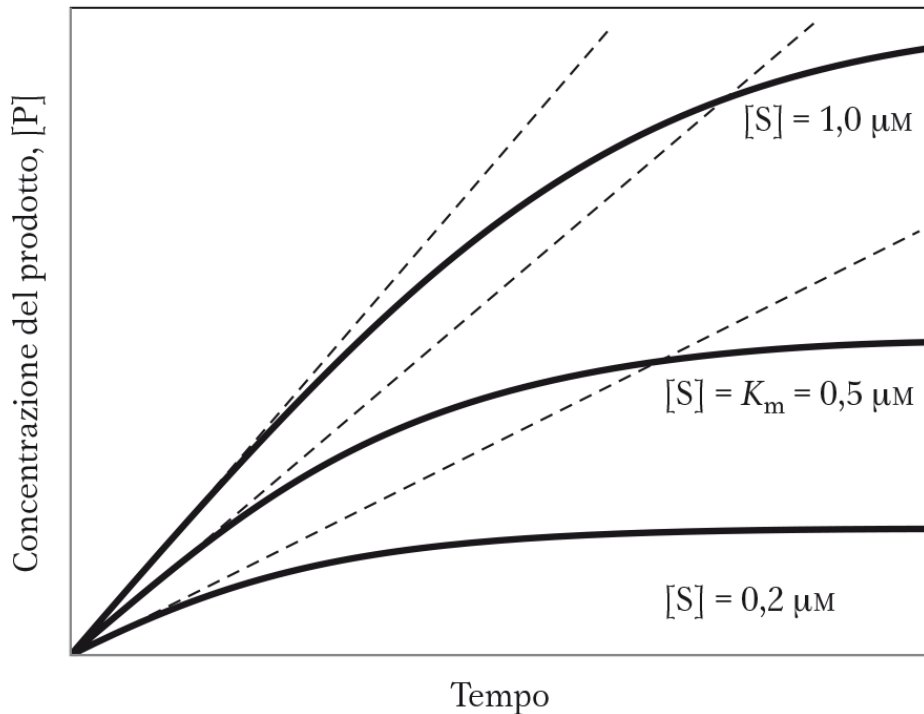
$$v = \frac{dP}{dt}$$

CURVA DI AVANZAMENTO della reazione enzimatica

CINETICA ENZIMATICA

CALCOLO DELLA VELOCITÀ INIZIALE (v_0)

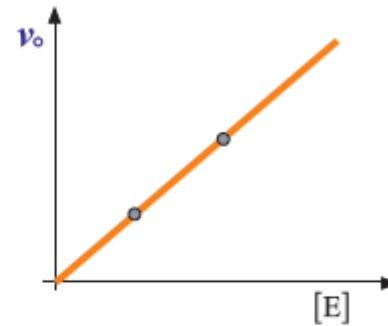
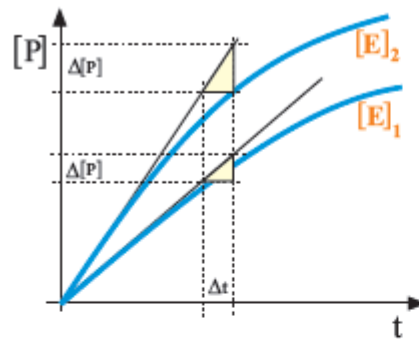
- La concentrazione di S è maggiore di quella di E $[E] = \text{costante}$
- Tempo breve, circa 60 sec, la variazione di $[S]$ è minima ($[S]$ considerata costante)



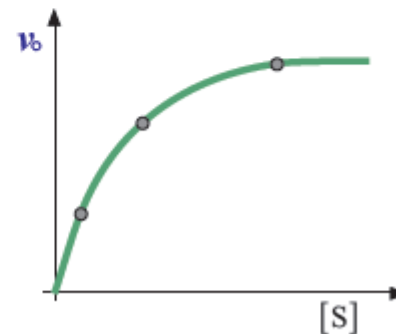
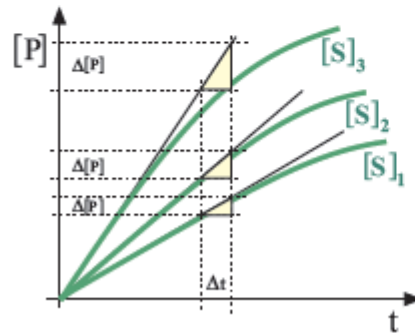
Curva di Progressione di una reazione catalizzata da un enzima in cui un substrato viene convertito in prodotto. $[P]$, la concentrazione del prodotto, aumenta al procedere della reazione. La velocità iniziale della reazione (v_0) è la pendenza della parte lineare iniziale della curva.

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 $v_0 \leftrightarrow [S]$

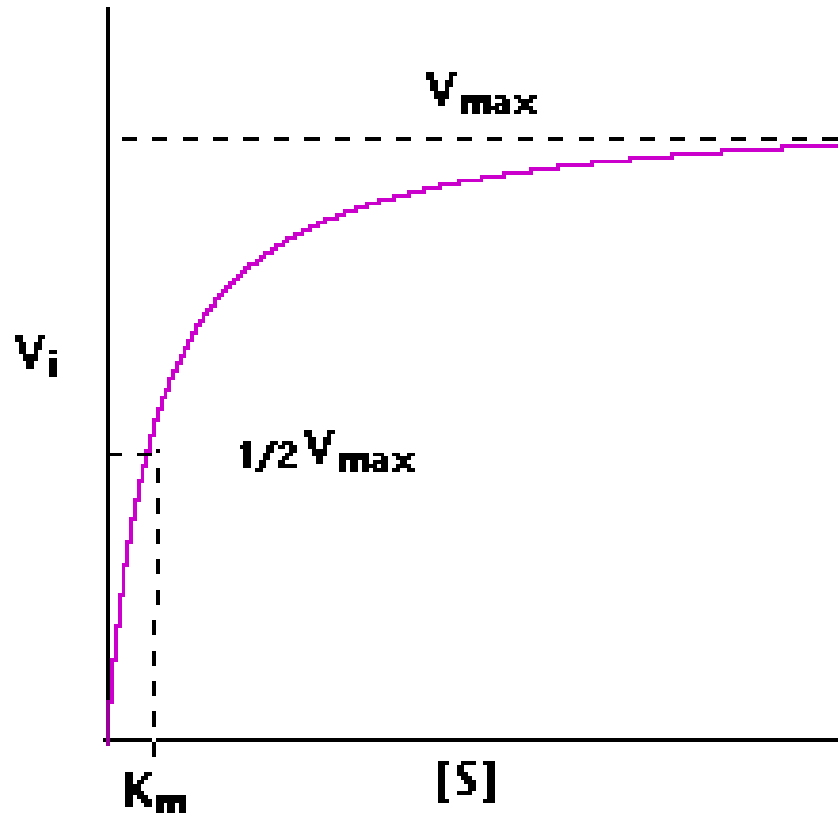


la tendenza asintotica di v_0 evidenzia un fenomeno caratteristico delle reazioni enzimatiche

la SATURAZIONE DA SUBSTRATO

S		+	E		→	ES		→	P		+	E		
1			3			1			1			3		1 P/nsec
2			2			2			2			3		2 P/nsec
3			3			3			3			3		3 P/nsec
4			4			3	1		3			3		3 P/nsec
5			5			3	2		3			3		3 P/nsec

CINETICA ENZIMATICA



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

V_i = initial velocity (moles/time)

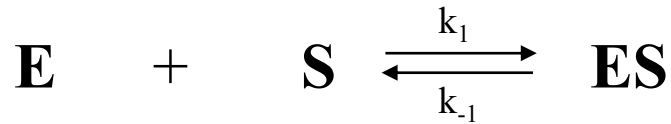
$[S]$ = substrate concentration (molar)

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.

E' molto difficile determinare la concentrazione di S alla quale la velocità corrisponde a Vmax

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

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

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.

Dipendenza della velocità iniziale da [S]

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

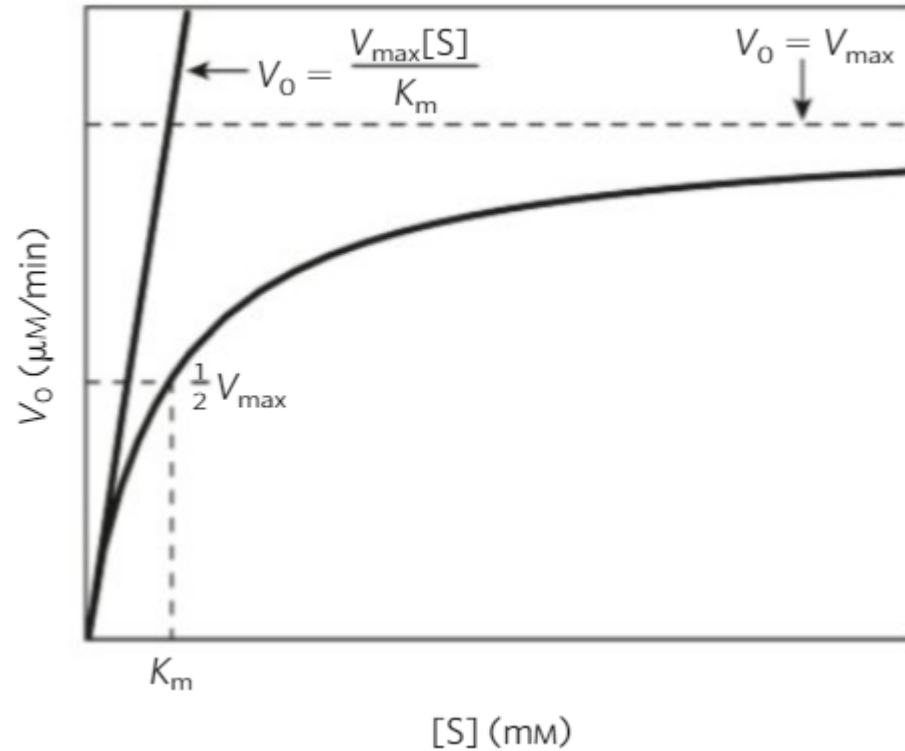


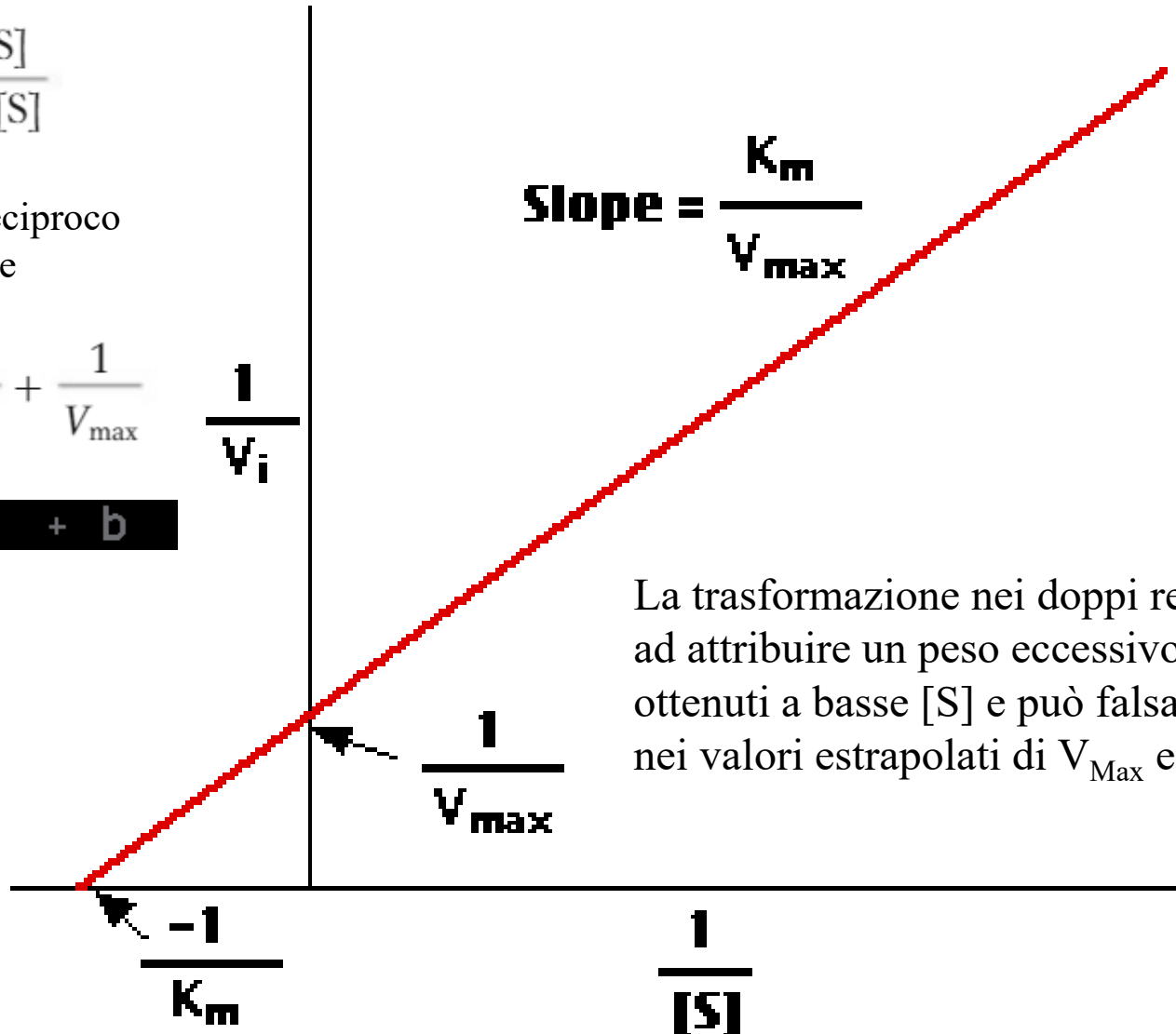
GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI LINEWEAVER-BURK

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Facciamo il reciproco di ogni termine

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = m x + b$$



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
Anidraasi carbonica	HCO_3^-	9
Chimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-benzoiltirosinammide	2.5
β -galattosidasi	D-lattosio	4
Treonina deidratasi	L-treonina	5

Significato di K_M

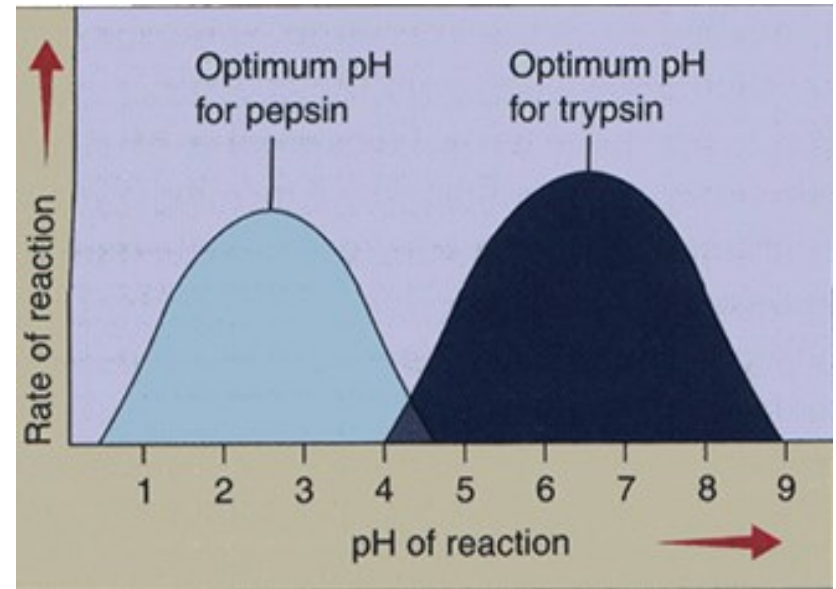
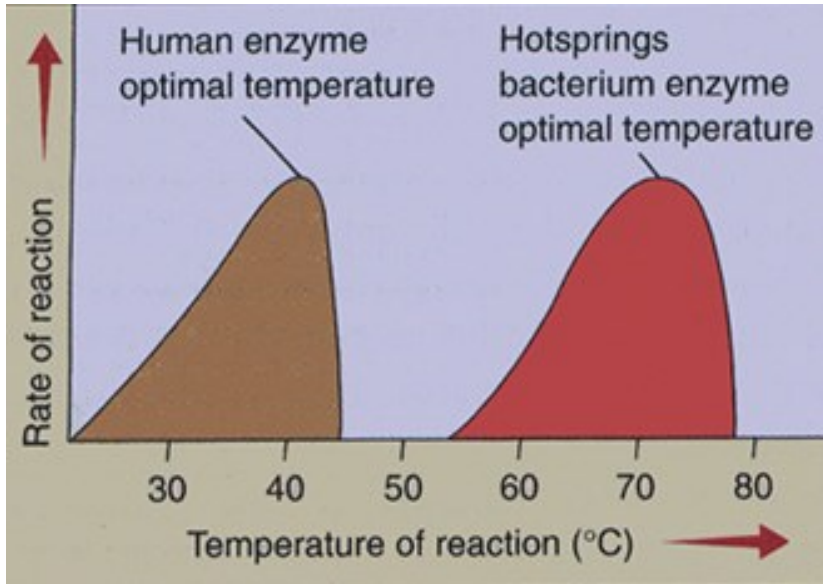
Il significato reale di K_M dipende da aspetti specifici del meccanismo della reazione, come il numero e le velocità relative delle tappe della reazione.

1. Per una reazione a due tappe
$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Se k_2 è la costante che limita la velocità, $k_2 \ll k_{-1}$ e $K_M = k_{-1}/k_1$, che è la costante di dissociazione, K_d , del complesso ES. In queste condizioni, K_M rappresenta una misura dell'affinità dell'enzima per il suo substrato nel complesso ES. Questa situazione non si applica però alla maggior parte degli enzimi.

2. Nei casi in cui la reazione procede con molte tappe dopo la formazione di ES, K_M diventa una funzione molto complessa di numerose costanti di velocità e non può essere considerata come una indicazione dell'affinità per S.

pH e temperatura ottimali



INIBIZIONE DEGLI ENZIMI

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:

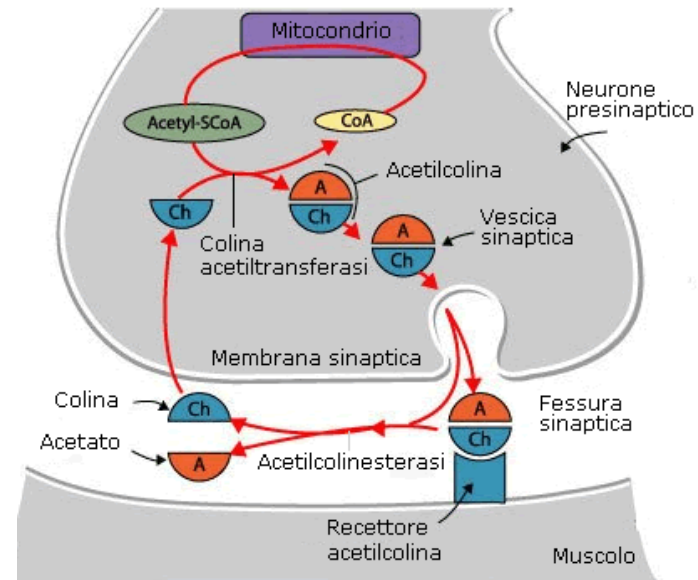
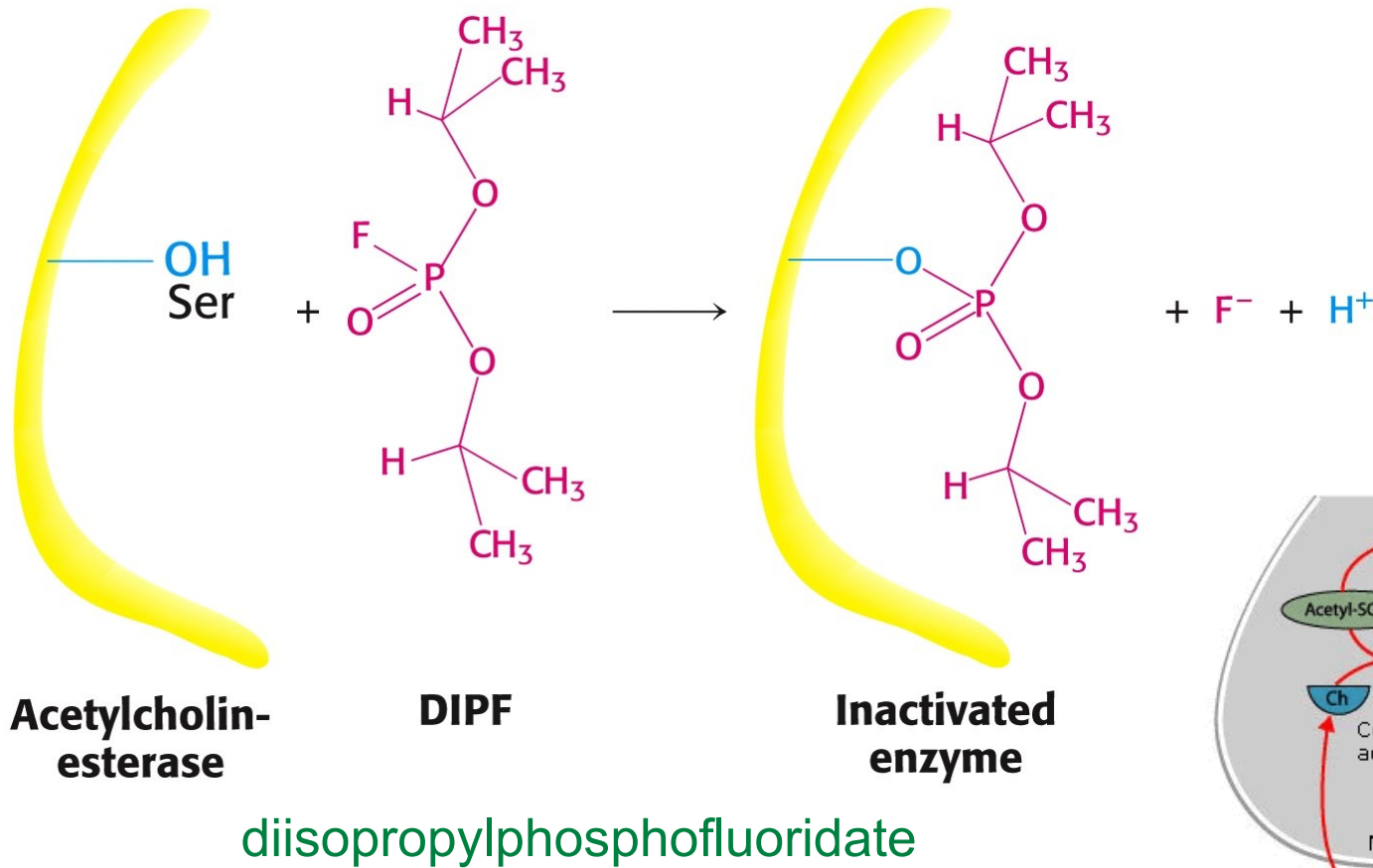
es: DIFP, penicillina, metotrexato

INIBITORI IRREVERSIBILI

- Gli inibitori irreversibili sono anche molto utili per caratterizzare i meccanismi di reazione.
- Gli amminoacidi del sito attivo con funzioni catalitiche essenziali talvolta possono essere identificati determinando quale residuo del sito attivo risulta covalentemente legato in seguito all'inattivazione dell'enzima.
- Un inibitore irreversibile non ha bisogno di legarsi covalentemente all'enzima. Il legame non covalente è sufficiente se è così forte che l'inibitore si dissocia dall'enzima solo molto difficilmente.

INIBIZIONE DA PARTE DI DIPF

Group - specific reagents react with R groups of amino acids

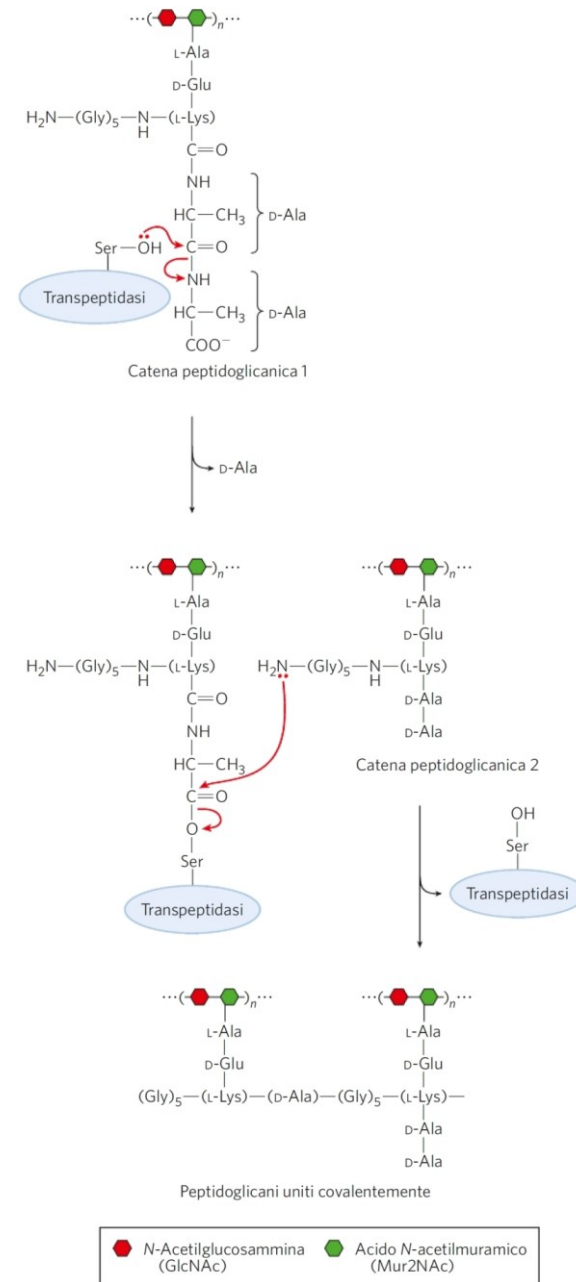


DIPF (**gas nervino**) reagisce con Ser in acetilcolinesterasi⁵⁸

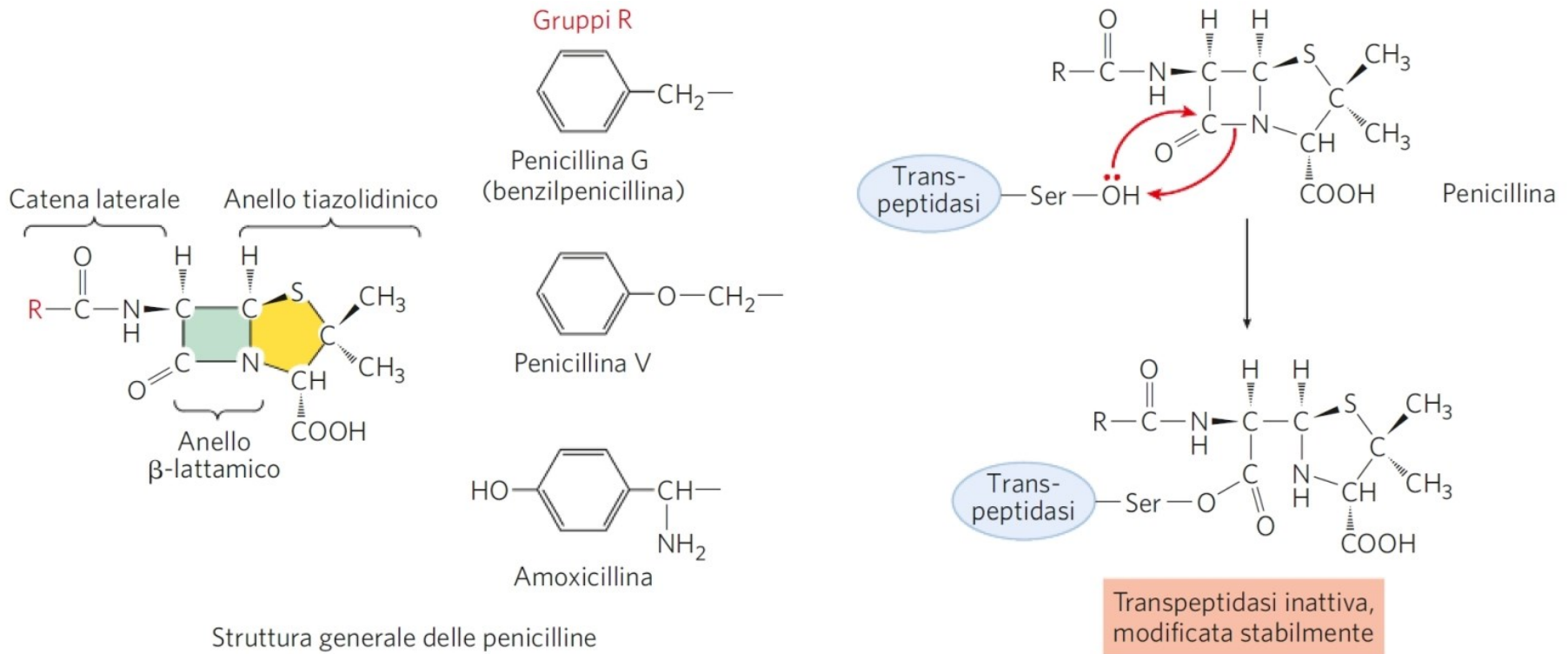
SINTESI DELLA PARETE BATTERICA

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.

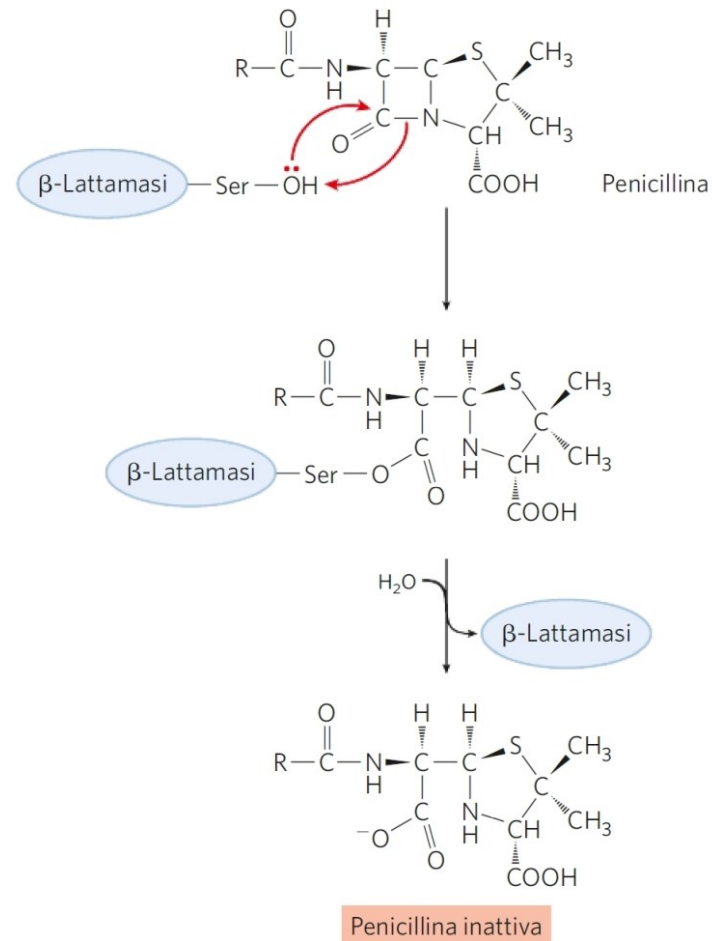


AZIONE DELLA PENICILLINA



Il complesso covalente inattiva l'enzima in modo irreversibile. La sintesi della parete cellulare batterica è bloccata. 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.

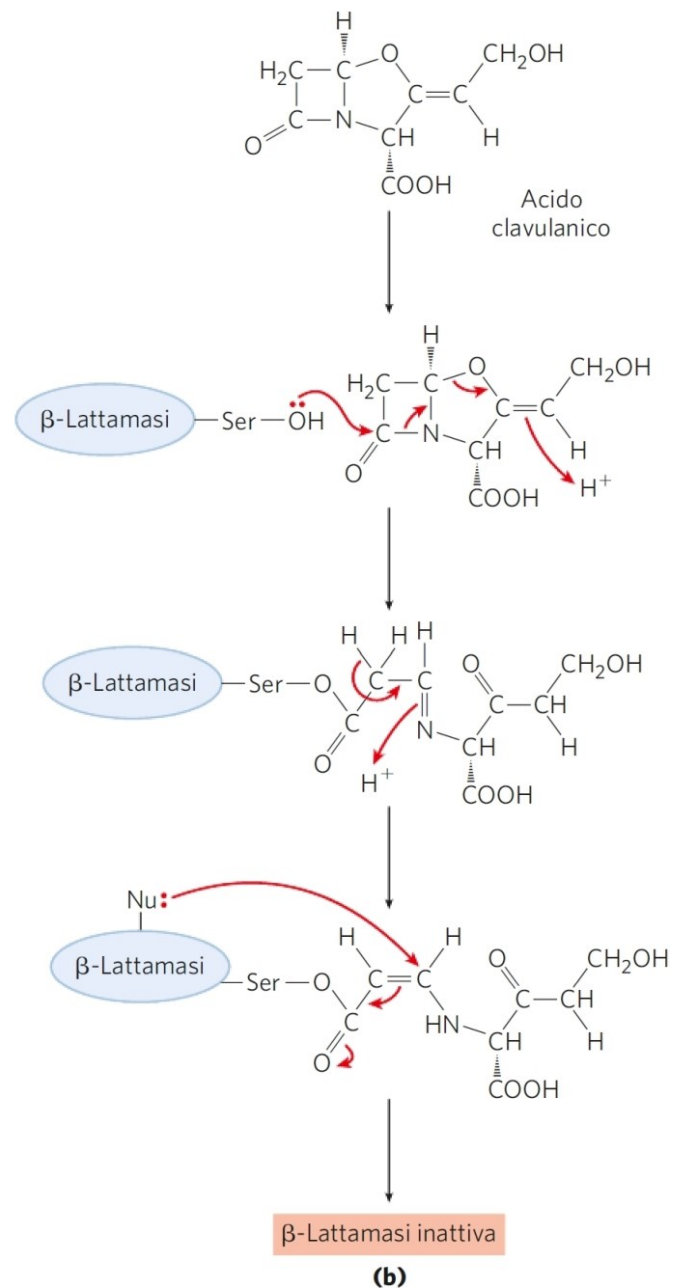


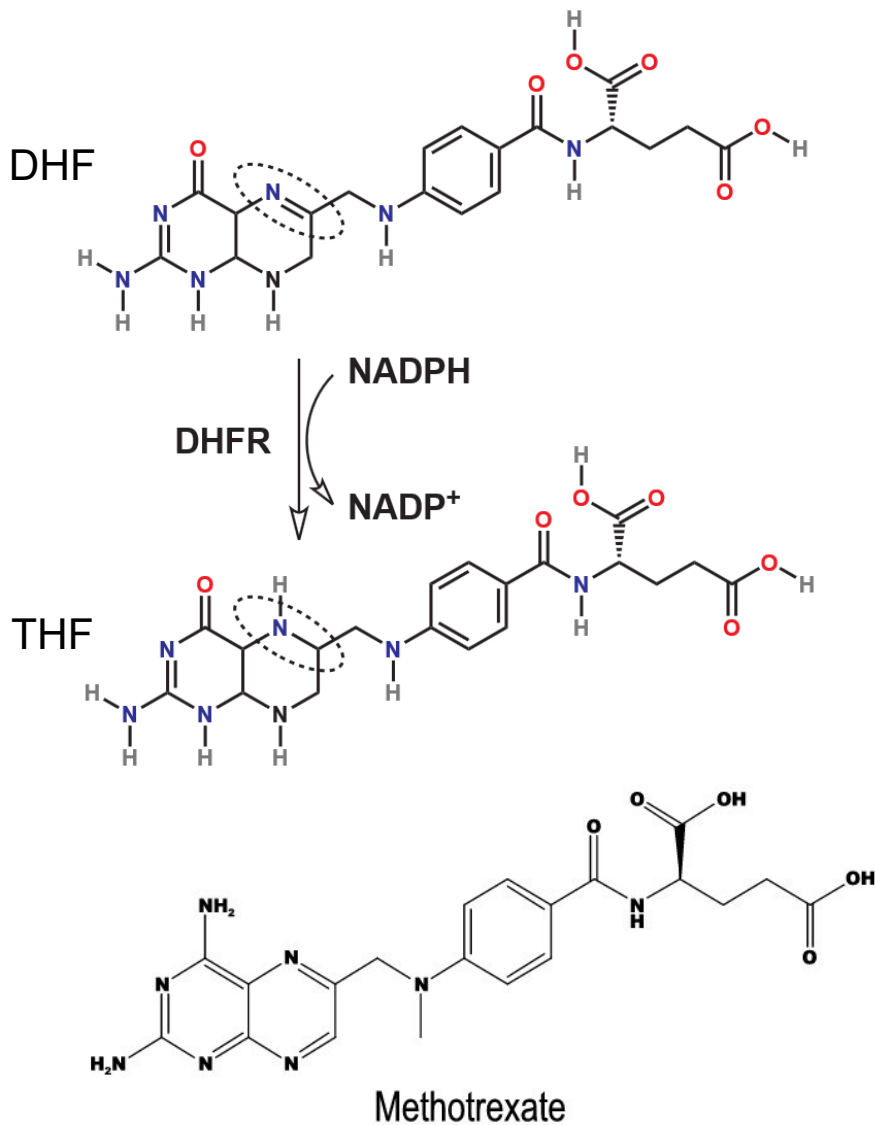
Azione della β -lattamasi

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





Nella sintesi delle purine e delle pirimidine una reazione richiede tetraidrofolato.

Il metotrexato inibisce l'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR) che è responsabile della conversione del diidrofolato (DHF) a tetraidrofolato (THF). Il metotrexato ha una struttura simile ai folati. L'enzima lo lega 1000x più forte del suo substrato naturale e la sua attività è inibita. La sintesi del DNA non può procedere e non c'è replicazione cellulare.

INATTIVATORI SUICIDI

- Classe speciale di inibitori irreversibili
- Sono relativamente stabili fino a che non si legano al sito attivo di uno specifico enzima.
- L'inattivatore suicida va incontro ad alcuni passaggi chimici che fanno parte del normale meccanismo di reazione dell'enzima, NON è trasformato nel normale prodotto MA viene convertito in un composto molto reattivo che si combina irreversibilmente con l'enzima.
- Ruolo importante nella progettazione razionale dei farmaci, un approccio moderno che serve a ottenere nuovi farmaci basandosi sulla conoscenza dei meccanismi di reazione degli enzimi.
- Un buon inattivatore suicida deve essere specifico per un singolo enzima e diventare reattivo solo quando ha raggiunto il sito attivo dell'enzima; questi farmaci hanno il vantaggio di non presentare effetti collaterali

ES: difluorometilornitina (DFMO) viene utilizzata nella cura della malattia del sonno provocata dal *Trypanosoma brucei gambiense*

MALATTIA DEL SONNO CAUSATA DA TRIPANOSOMA

punto vulnerabile nel metabolismo del tripanosoma: biosintesi delle poliammine (spermina e spermidina) coinvolte nel meccanismo di impacchettamento del DNA.

Prima reazione: catalizzata dall'ornitina decarbossilasi, che ha come coenzima il piridossal fosfato (PLP). PLP (derivato della vitamina B6) forma un legame covalente con l'ornitina

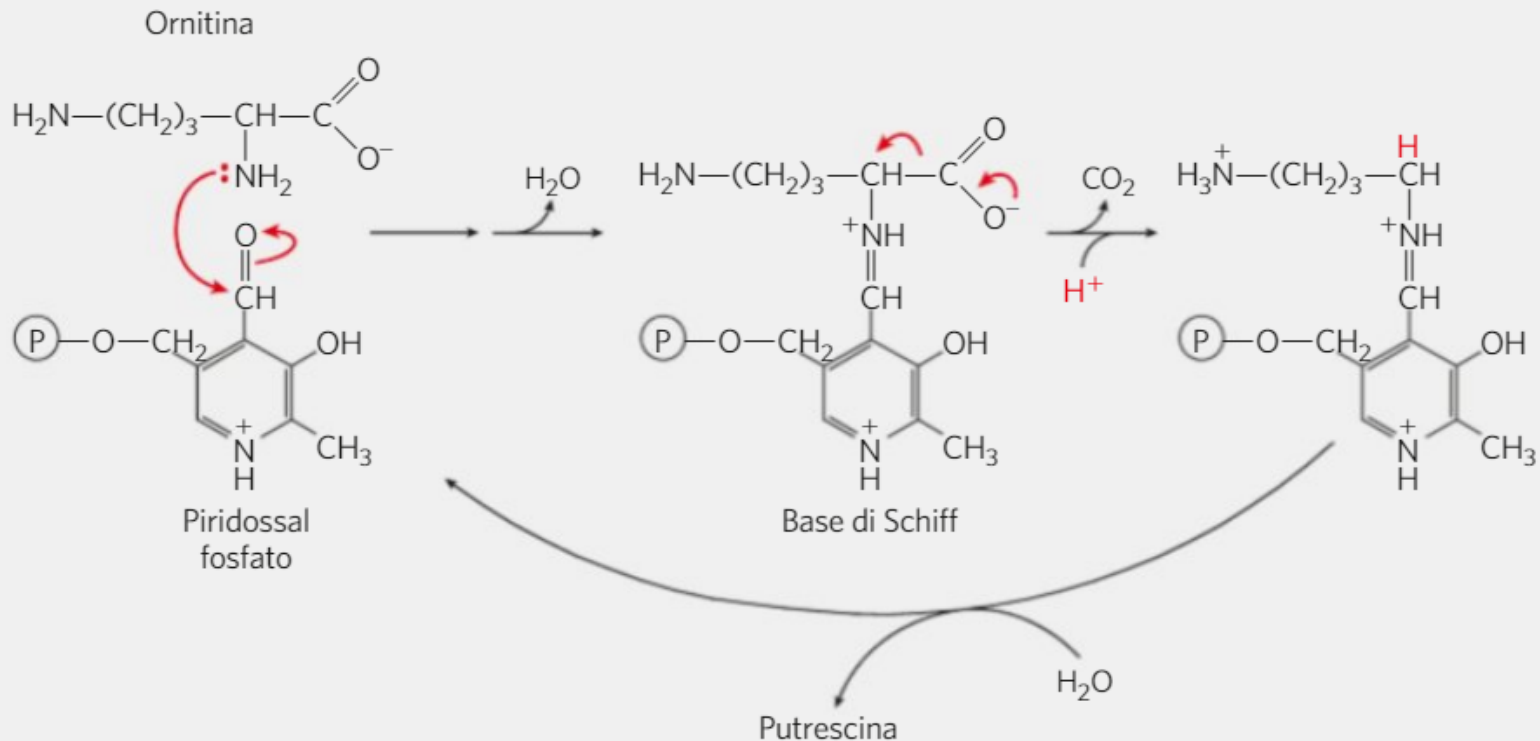


Figura 2 Meccanismo di reazione dell'ornitina decarbossilasi.

DFMO UN INATTIVATORE SUICIDA

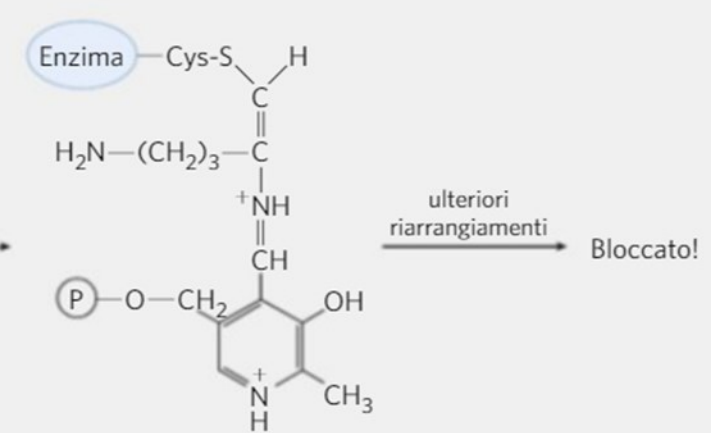
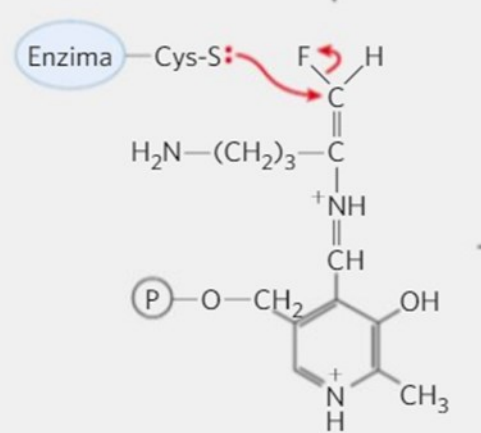
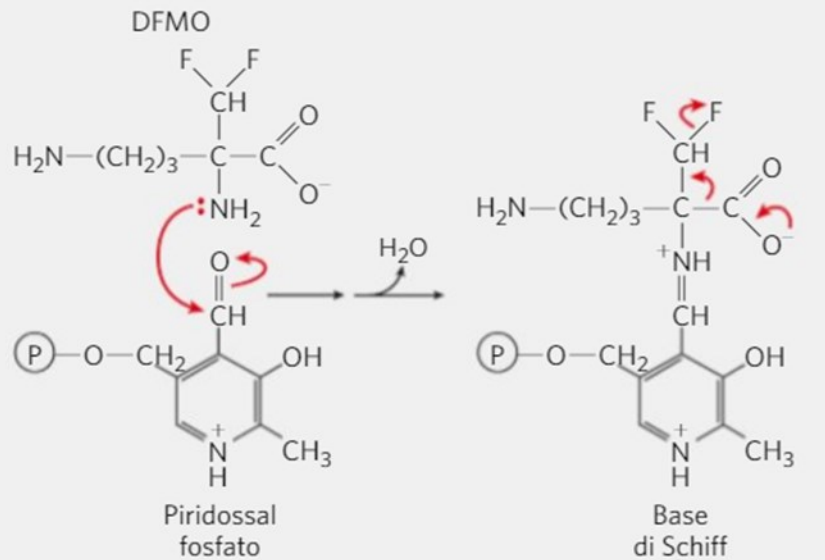


Figura 3 Inibizione dell'ornitina decarbossilasi da parte della DFMO.

difluorometilornitina

ANALOGHI DELLO STATO DI TRANSIZIONE

- si legano a un enzima molto più saldamente di quanto faccia il substrato nel complesso ES.
- In linea di principio, una molecola con una struttura simile allo stato di transizione di una determinata reazione può legarsi all'enzima con un'affinità molto alta
- Gli stati di transizione non possono essere osservati direttamente, MA in base alle conoscenze a disposizione sul meccanismo di reazione si può prevedere la struttura più probabile di uno stato di transizione.
- Lo stato di transizione è per definizione instabile e quindi transitorio, in alcuni casi è possibile progettare delle molecole molto simili agli stati di transizione desiderati. Queste molecole si adattano meglio all'interno del sito attivo (si ha pertanto la formazione di un numero maggiore di interazioni deboli) del substrato stesso.
- Il concetto degli analoghi dello stato di transizione è importante per progettare nuovi agenti farmaceutici.
- Es: i farmaci molto efficaci contro l'HIV chiamati inibitori delle proteasi sono stati progettati, almeno in parte, come analoghi dello stato di transizione a forte legame

ANALOGHI DELLO STATO DI TRANSIZIONE

- Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è l'agente patogeno della sindrome da immunodeficienza acquisita (o AIDS).
- Nel 2018, 38 milioni di persone in tutto il mondo affette da HIV, con circa 1,7 milioni di nuove infezioni in quell'anno e circa 770 000 morti.
- L'HIV è un retrovirus.
- Nel ciclo di replicazione virale, la maggior parte dei geni virali viene tradotta sotto forma di grandi poliproteine, che vengono scisse dalla proteasi HIV in singole proteine necessarie per la formazione del virus. Queste proteasi sono il bersaglio di farmaci
- I farmaci fin qui sviluppati come inibitori della proteasi HIV formano complessi non covalenti con l'enzima, ma si legano così fortemente da poter essere considerati inibitori irreversibili. Un legame così forte deriva in parte dal fatto che essi sono analoghi strutturali dello stato di transizione. Sono farmaci molto efficienti.

ANALOGHI DELLO STATO DI TRANSIZIONE

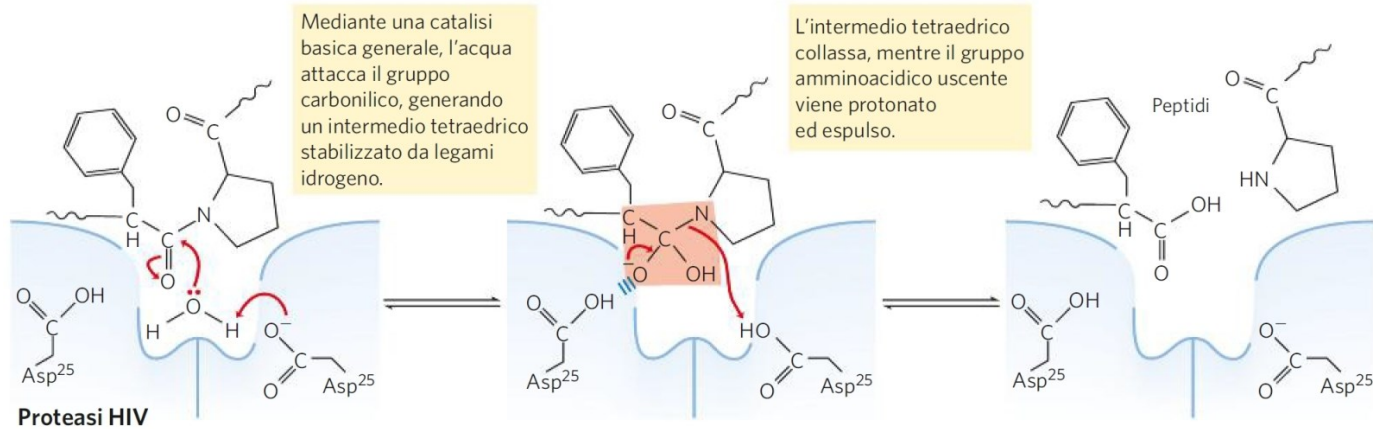
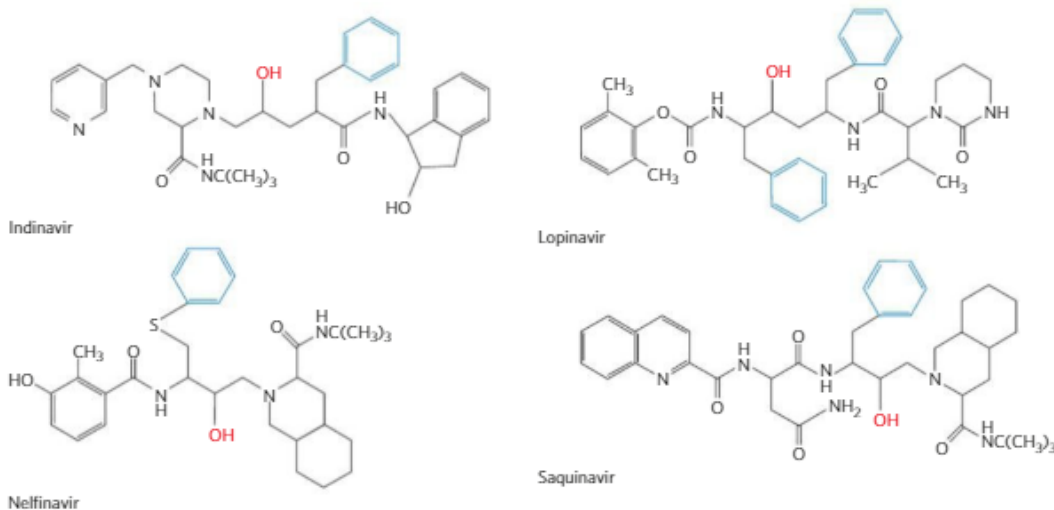


Figura 6.28 MECCANISMO D'AZIONE Meccanismo d'azione della proteasi HIV. Due residui di aspartato del sito attivo (appartenenti a due diverse subunità) agiscono con un mecca-

simo di catalisi acido-base, facilitando l'attacco dell'acqua sul gruppo carbonilico. L'intermedio tetraedrico instabile è colorato in rosa.



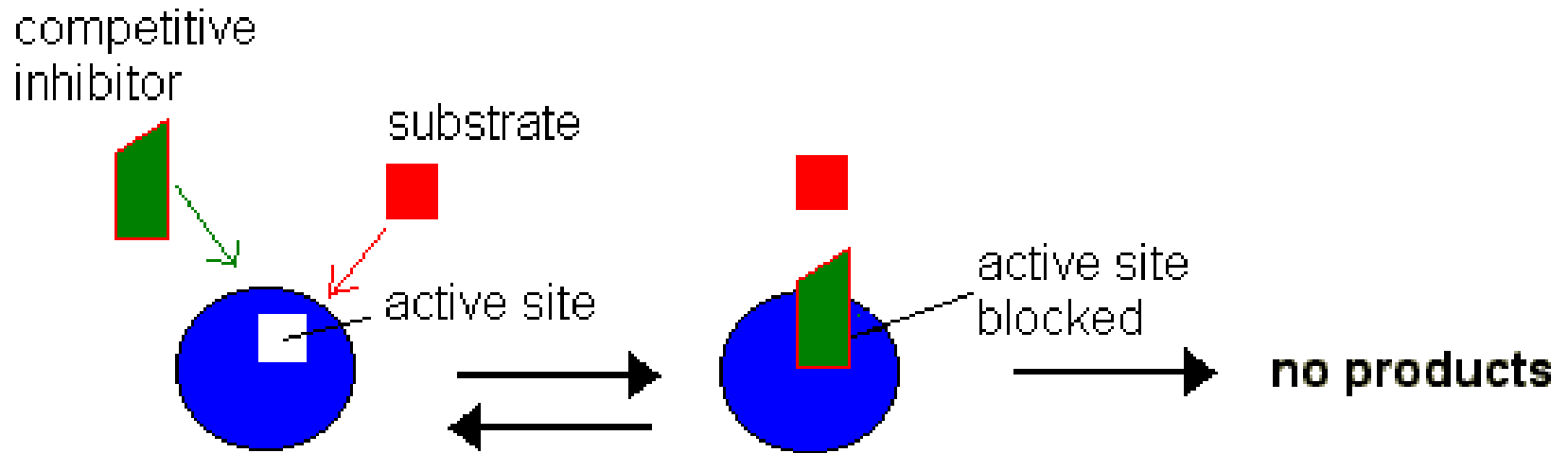
Inibitori della proteasi HIV. Il gruppo OH (in rosso) agisce da analogo dello stato di transizione, sostituisce l'ossigeno dell'intermedio tetraedrico. Il gruppo benzilico adiacente (in azzurro) aiuta a posizionare correttamente il farmaco nel sito attivo.

INIBIZIONE DEGLI ENZIMI

INIBITORI REVERSIBILI

- a) I competitivo: si lega al sito attivo dell'enzima.
- b) I incompetitivo: si può legare solo al complesso enzima-substrato.
- c) I misto si lega sia al complesso **ES** che a **E** libero. I non competitivo è un tipo particolare di inibitore misto

INIBITORE COMPETITIVO



Compete con **S** a livello del sito attivo ma non può essere trasformato da **E**. Ha struttura simile a **S**. Rimosso aumentando $[S]$.

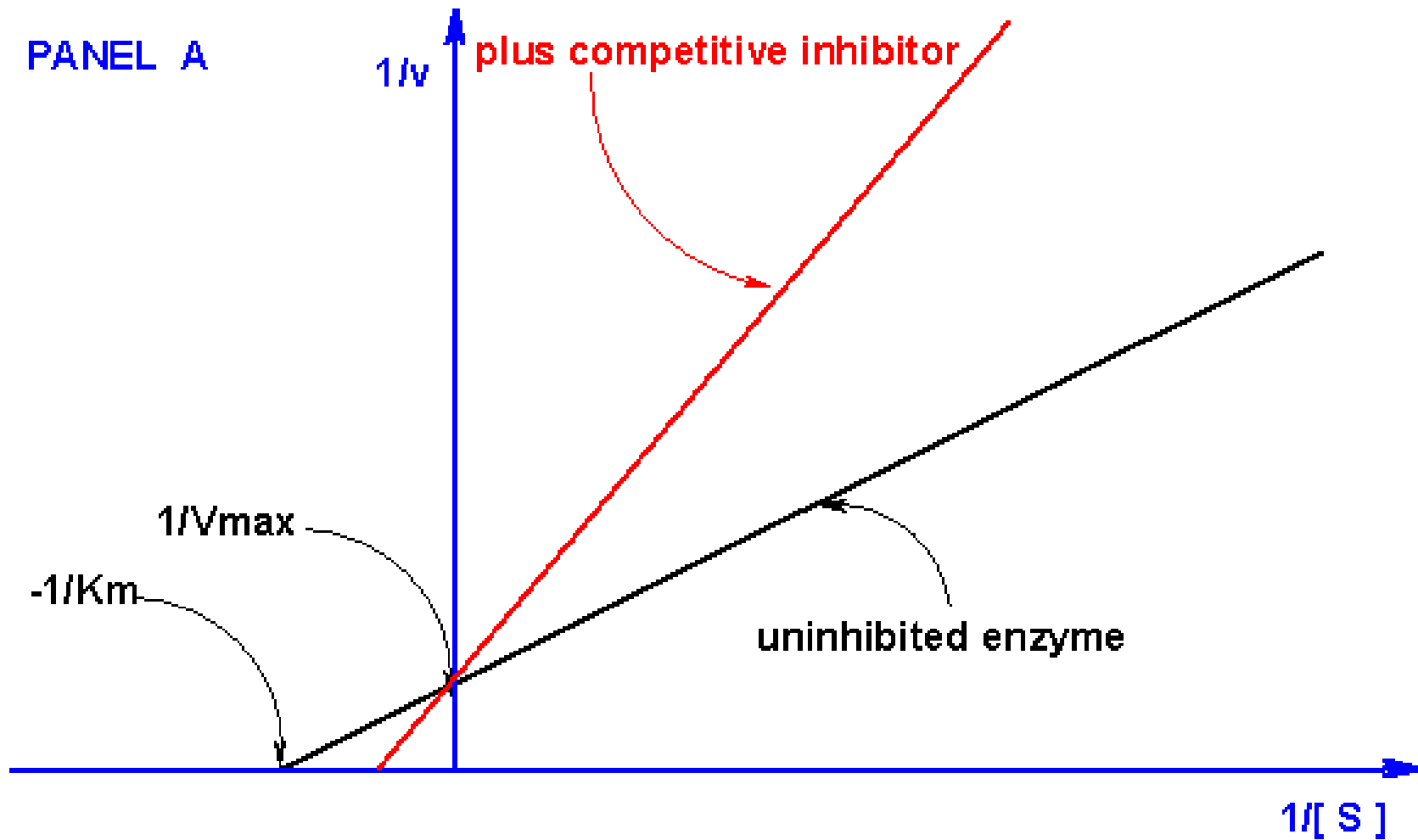
INIBITORE COMPETITIVO

EFFETTO SU V_{MAX} : aumentando $[S]$ si può annullare l'effetto di I. A una concentrazione di S sufficientemente elevata si raggiunge ugualmente V_{MAX} che si ha in assenza di inibitore.

EFFETTO SU K_m : **aumenta** in presenza di I. È necessaria una quantità di S maggiore per raggiungere $\frac{1}{2} V_{MAX}$.

Principi analoghi regolano l'inibizione da prodotto.

PANEL A

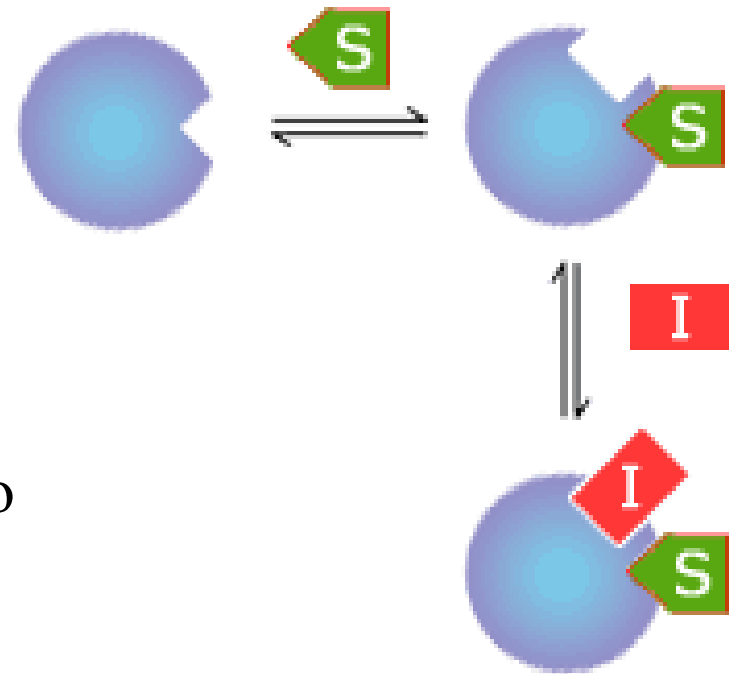


INIBITORE INCOMPETITIVO

Enzimi a due o più substrati.

Un inibitore incompetitivo può legarsi **unicamente al complesso enzima-substrato (ES)**.

Nel modello, il legame del substrato all'enzima libero induce una *modificazione conformazionale* che rende accessibile il sito per l'inibitore.

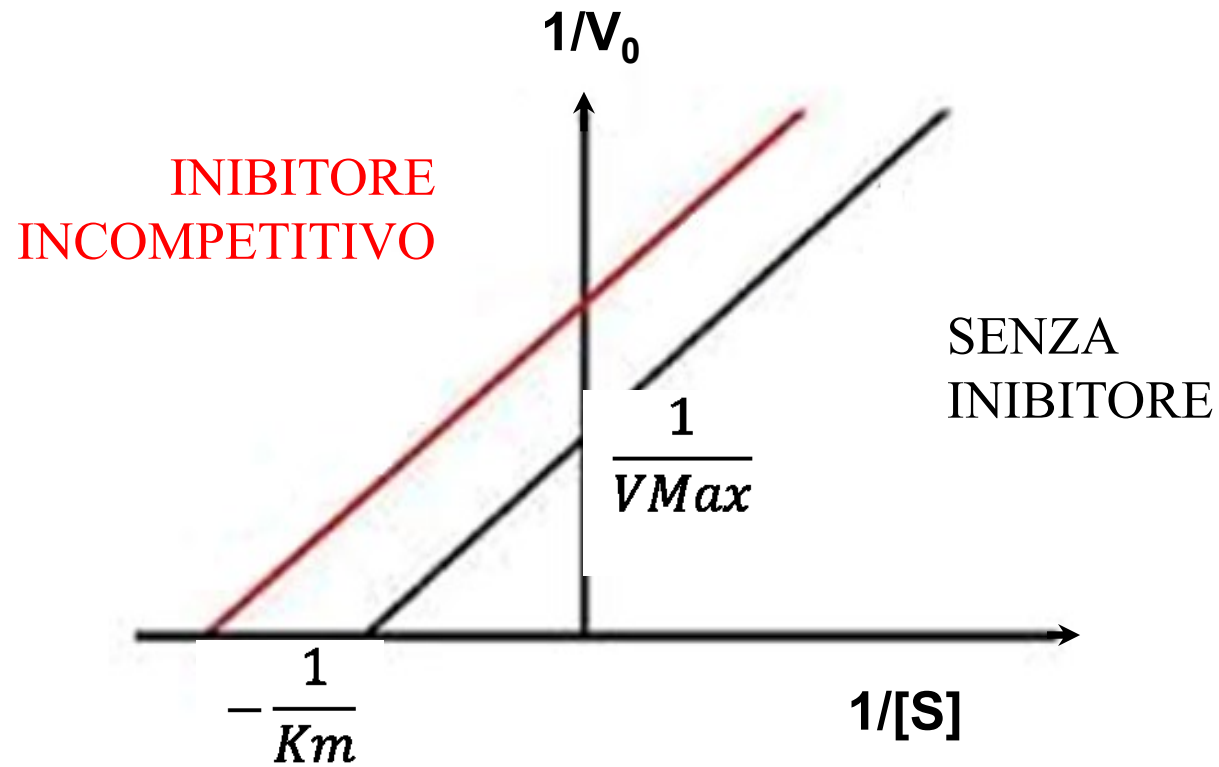


INIBITORE INCOMPETITIVO

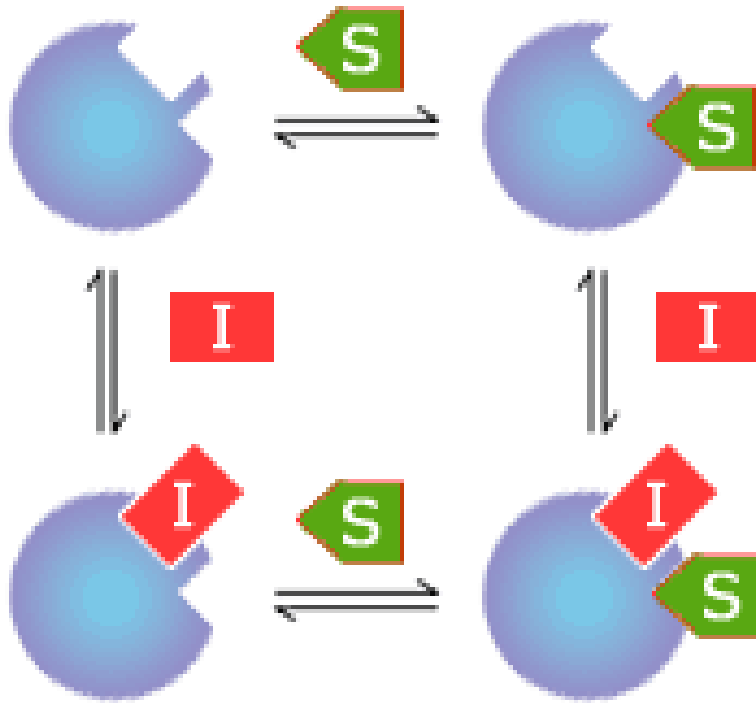
EFFETTO SU V_{MAX} : la V_{MAX} raggiunta è inferiore a quella dell'enzima non inibito. L'inibizione aumenta con l'aumentare di **[S]**.

EFFETTO SU K_m : A differenza dell'inibizione competitiva, la K_m apparente **diminuisce** rispetto a K_m senza **I**. L'inibizione incompetitiva è *più marcata ad alte concentrazioni di substrato*: aumentando la **[S]**, infatti, aumenta la **[ES]**, la forma alla quale si lega l'inibitore.

INIBITORE INCOMPETITIVO



INIBITORE MISTO



Enzimi a due o più substrati

Un inibitore misto può legarsi **sia all'enzima libero, sia al complesso enzima-substrato**, e influenza *entrambe* le costanti cinetiche.

L'effetto di un inibitore misto sulle costanti cinetiche è diverso, a seconda dell'affinità delle due specie enzimatiche, **E** ed **ES**, per **I**. V_{MAX} è influenzata perché l'inibitore inattiva una parte delle molecole di **E**, diminuendo la $[E]$ disponibile, da cui dipende V_{MAX} . K_m può aumentare o diminuire, in base a quale forma dell'enzima, **E** o **ES**, viene legata meglio dall'inibitore

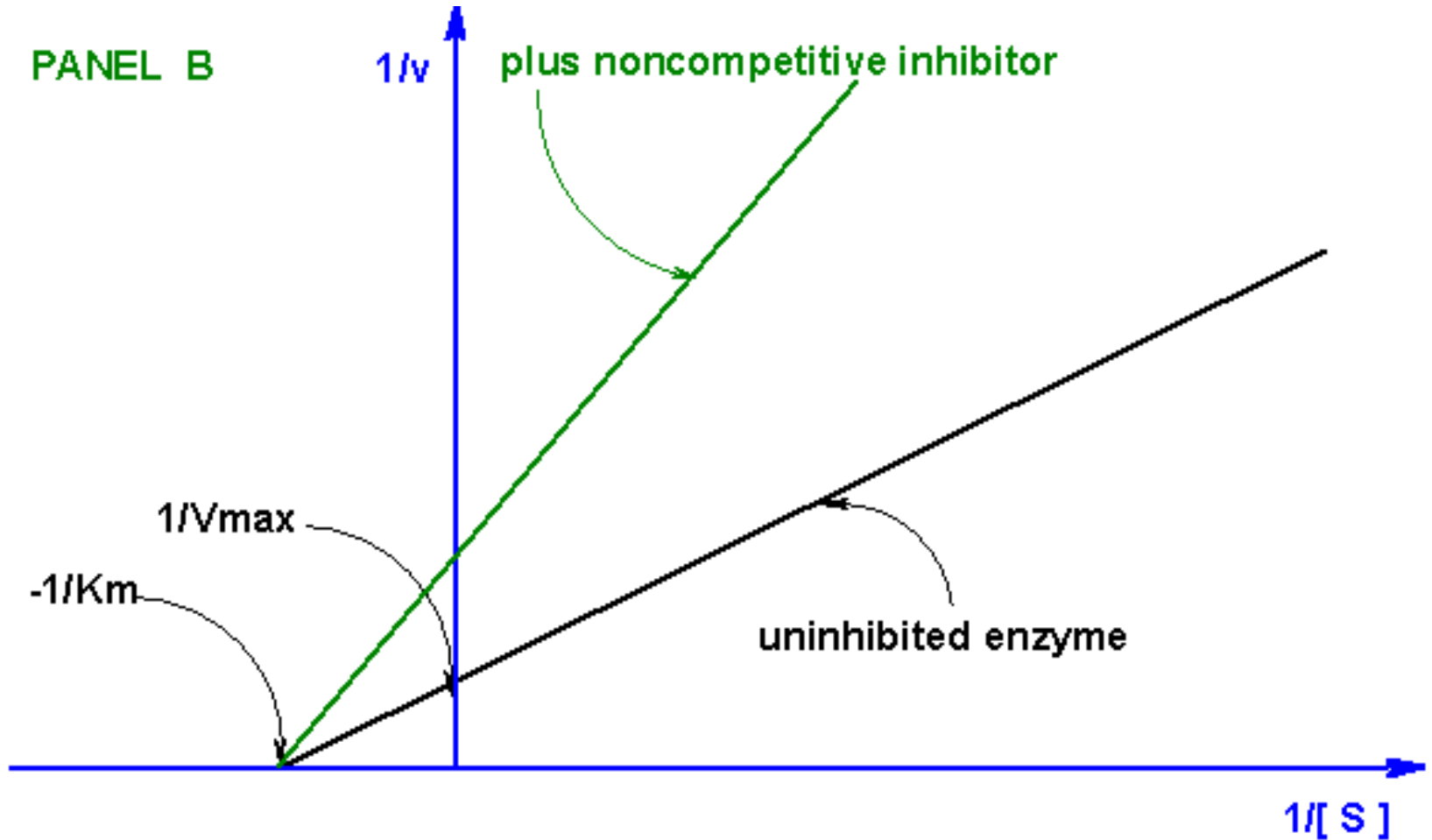
Se l'affinità delle due specie enzimatiche (E ed ES) per l'inibitore è la stessa, si ha un caso particolare di inibizione mista, che viene definita NON COMPETITIVA

INIBITORE MISTO NON COMPETITIVO

EFFETTO SU V_{MAX} : l'inibizione non competitiva non può essere annullata aumentando [S]. La V_{MAX} raggiunta è inferiore a quella dell'enzima non inibito. L'inibizione aumenta con l'aumentare di [S].

EFFETTO SU K_m : I non competitivo non interferisce con il legame di S ad E. Di conseguenza il valore di K_m rimane invariato.

INIBITORE MISTO NON COMPETITIVO



REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

Fondamentale affinché un organismo possa coordinare i suoi numerosi processi metabolici

1. [S]: molti E rispondono a [S] in quanto questa ha valori vicini a K_m . Per questo motivo, un aumento di [S] fa aumentare la velocità della reazione, che procedendo porta ad una diminuzione di [S].
2. Modulatori allosterici
3. Modificazioni covalenti
4. Velocità di sintesi degli enzimi (regolazione lenta, a carico di ormoni)
5. Proteine regolatrici che si legano a E
6. Scissione proteolitica (irreversibile)

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

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 multi-enzimatici 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**
2. **ENZIMI REGOLATI PER MODIFICAZIONE COVALENTE REVERSIBILE**

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 (negativi): prodotto, si parla di inibizione retroattiva.
- 2) effettori stimolatori (positivi): non il prodotto, ma un altro metabolita, spesso lo stesso **S**.

ENZIMI ALLOSTERICI

Effettori omotropici: il substrato è esso stesso un modulatore, di tipo positivo. Proteine multimeriche. Il sito attivo e il sito regolatore coincidono. I siti di legame funzionano in modo cooperativo. Curva cinetica sigmoide. (similitudini con legame di O₂ ad Hb).

Effettori eterotropici: il modulatore è diverso dal substrato.

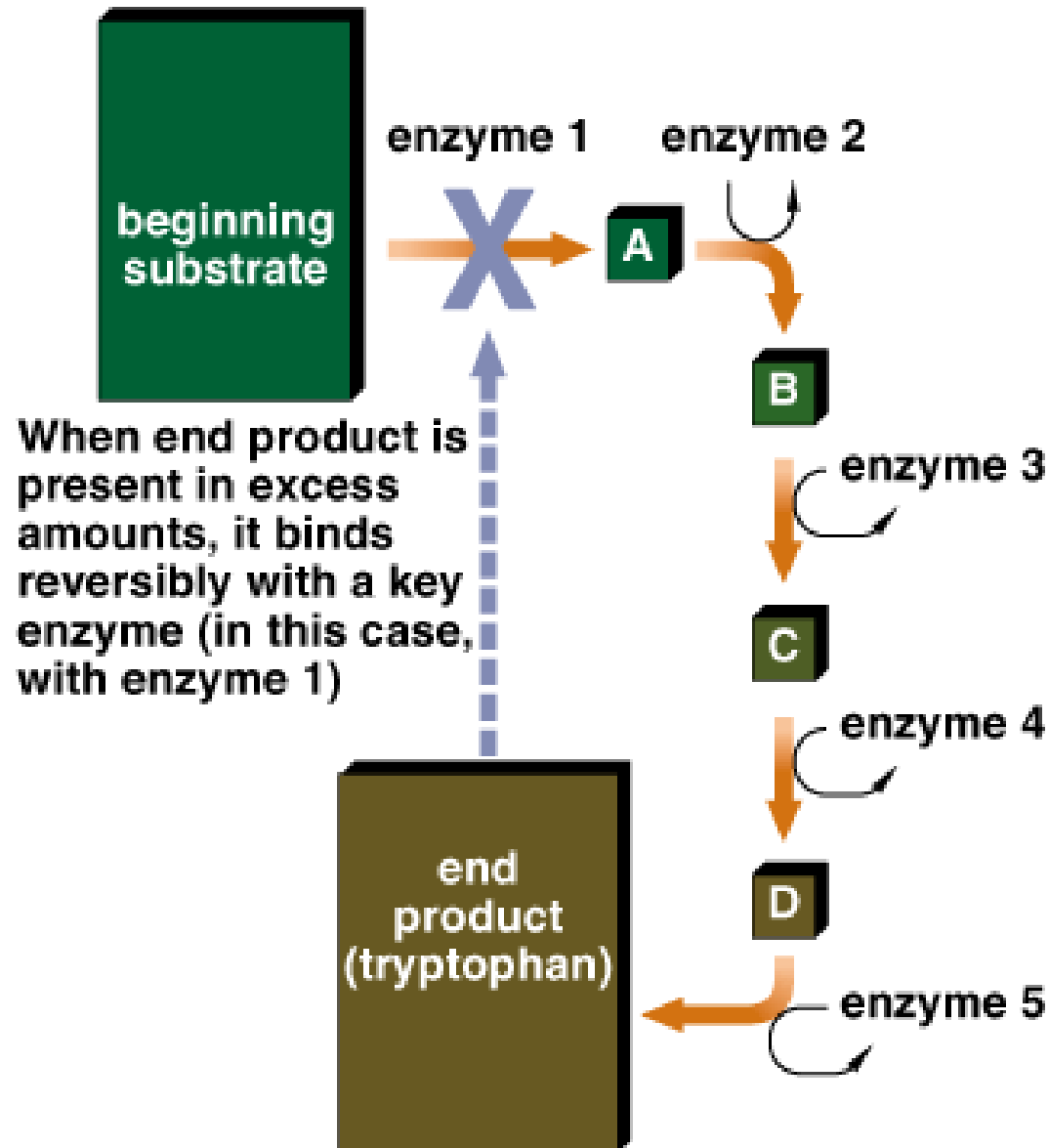
Un esempio è l'inibizione retroattiva.

Difficile generalizzare sull'andamento della curva di saturazione.

Queste interazioni sono mediate da effetti cooperativi fra le subunità che costituiscono l'enzima.

NON confondere i modulatori allosterici con gli inibitori incompetitivi e misti. I non mediano necessariamente l'interconversione tra forme attive e inattive di E, e gli effetti sulla cinetica enzimatica sono diversi.

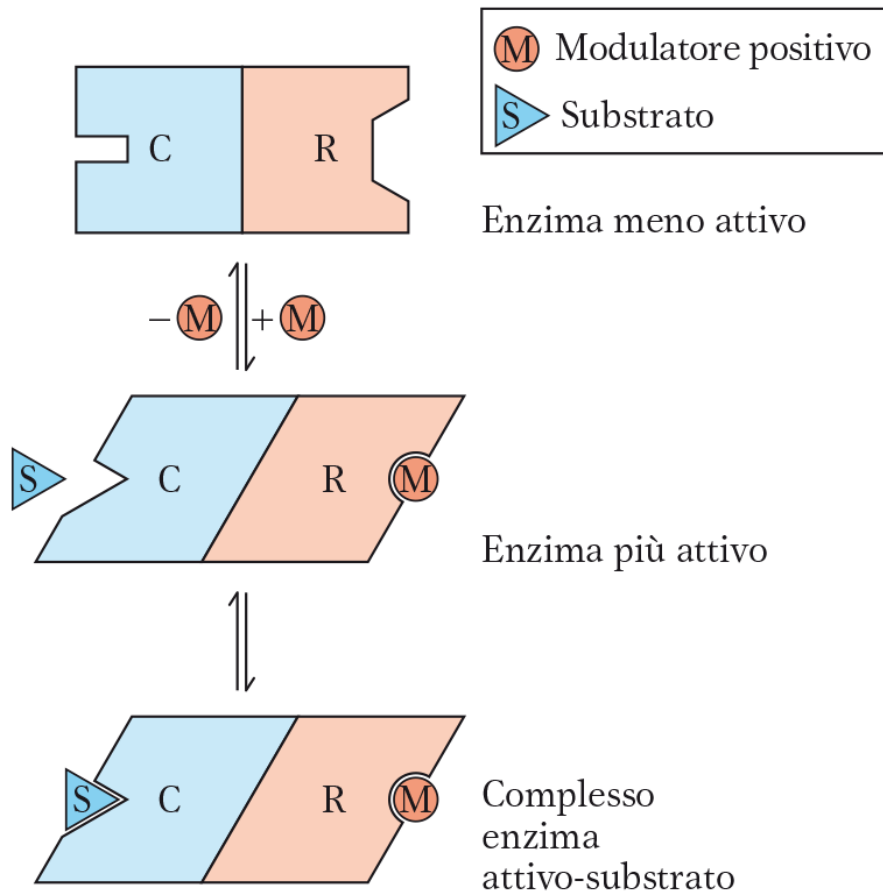
INIBIZIONE RETROATTIVA



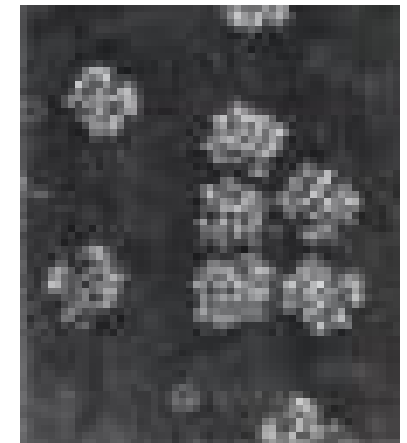
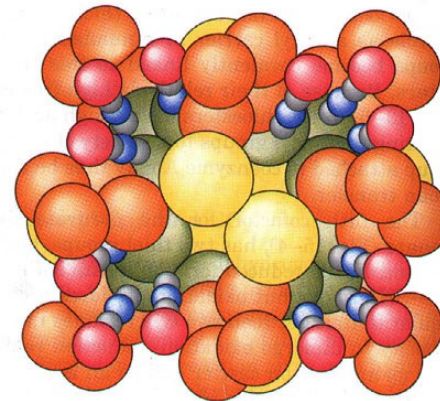
E allosterici hanno più subunità polipeptidiche.

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.

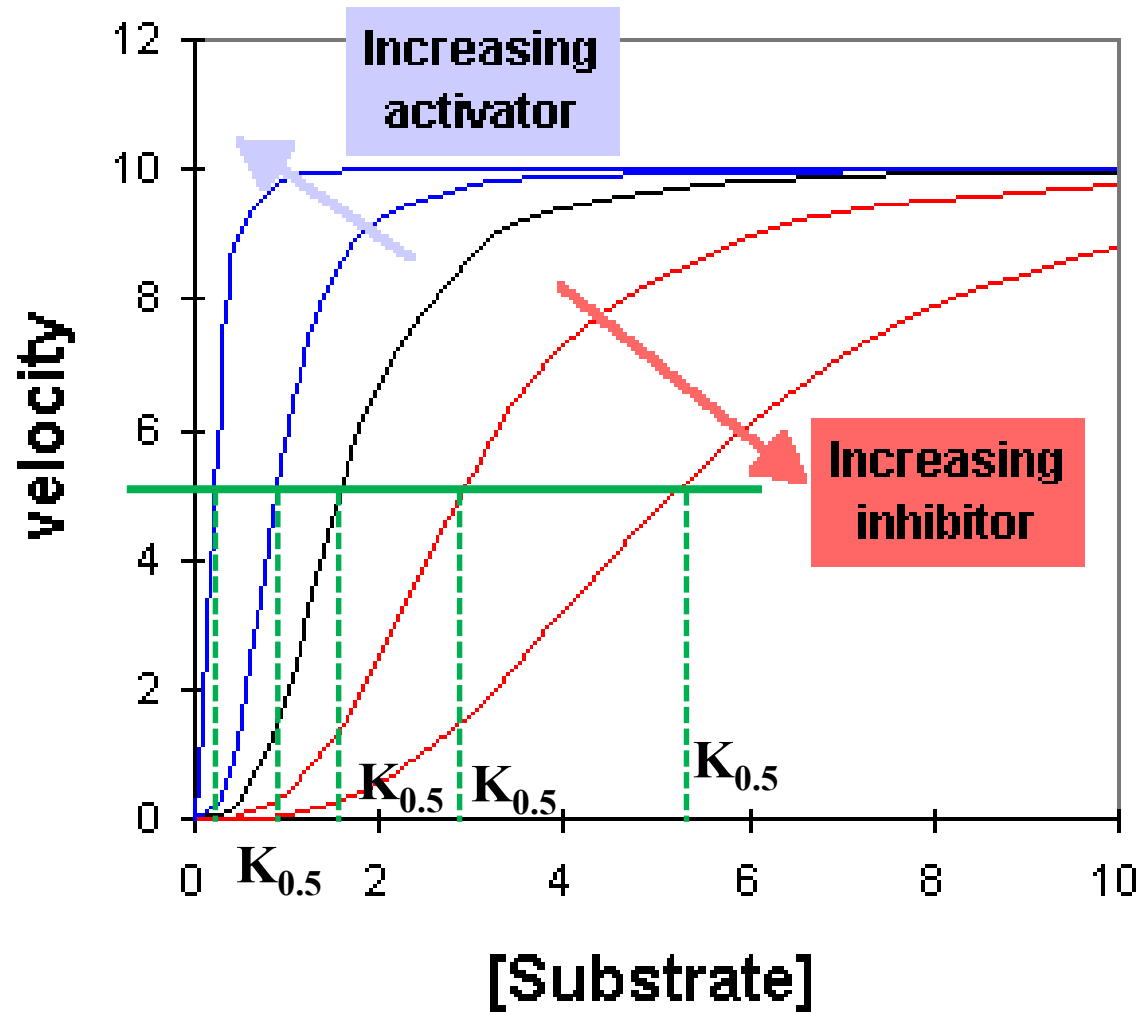


Piruvato deidrogenasi



ENZIMI ALLOSTERICI NON SEGUONO L'EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

$K_{0.5}$ o $[S]_{0.5}$
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.

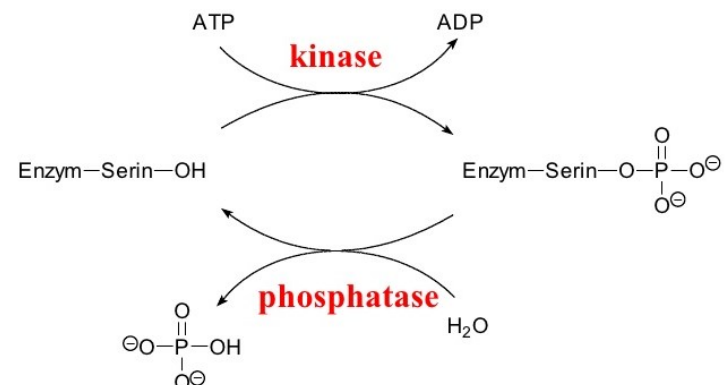
ENZIMI REGOLATI DA MODIFICAZIONI COVALENTI REVERSIBILI

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. La fosforilazione è mediata da segnali ormonali. Sono stati descritti più di 500 diverse modificazioni covalenti. I residui di Ser, Thr e Tyr sono i siti fosforilabili nelle proteine, sono localizzati in motivi strutturali comuni, chiamati sequenze consenso, che sono poi riconosciuti da specifiche proteina chinasi.

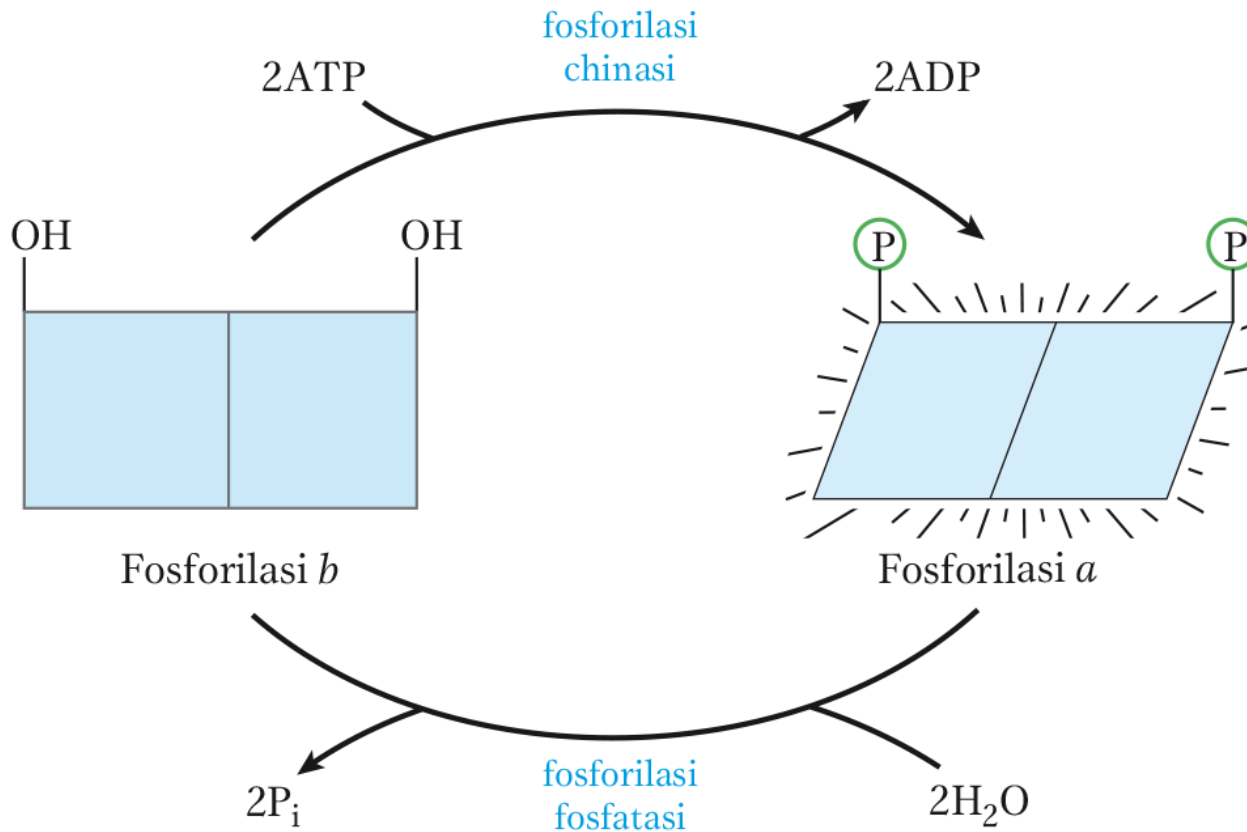
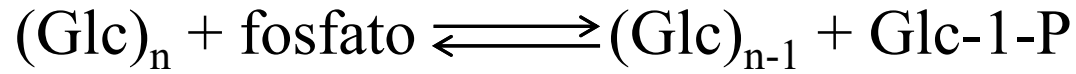
proteina chinasi: catalizza la fosforilazione (aggiunta di un gruppo fosfato legato con legame estereo)

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

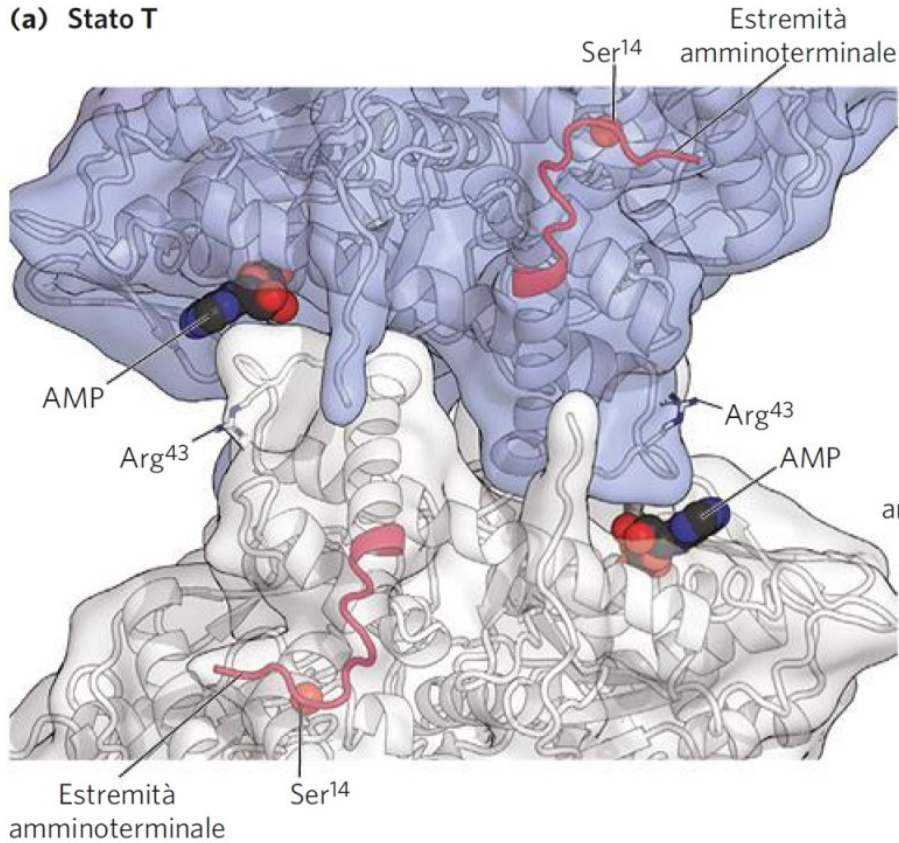
Phosphorylation and dephosphorylation of enzyme alters its activity



GLICOGENO FOSFORILASI



(a) Stato T



(b) Stato R

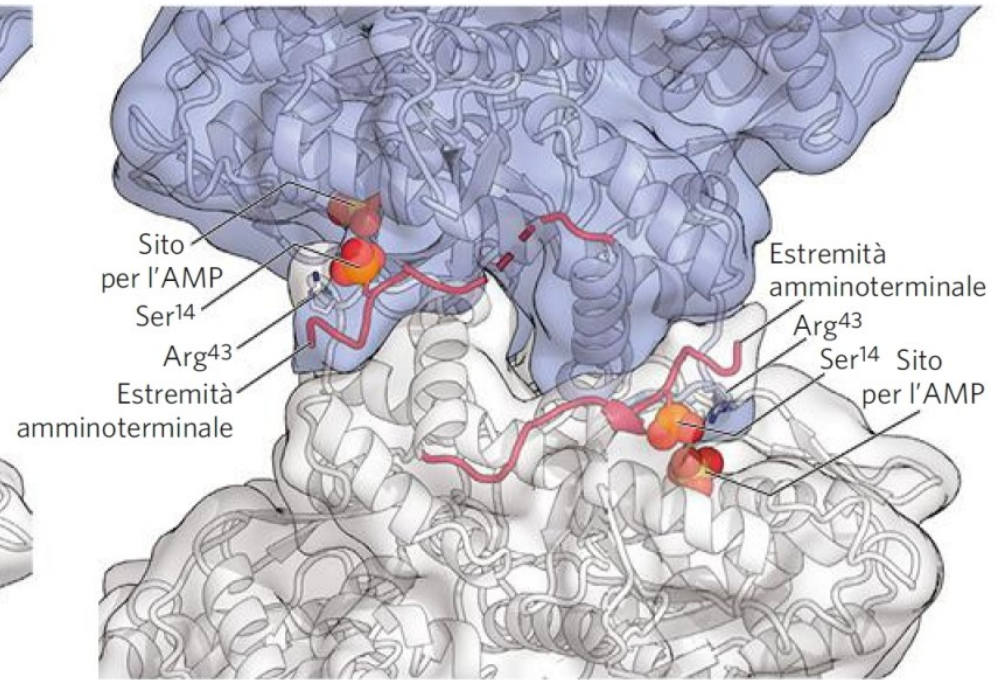


Figura 6.40 La modifica conformazionale determinata dalla fosforilazione della glicogeno fosforilasi di muscolo murino. I venti residui amminoacidici all'estremità amminoternale di ciascuna subunità sono evidenziati in rosso, compreso il residuo fosforilato nella fosforilasi a (Ser¹⁴). Questo segmento

peptidico interagisce con diverse parti della proteina, a seconda dello stato di fosforilazione di Ser¹⁴ che stabilizza le diverse conformazioni tipiche della fosforilasi a e della fosforilasi b. [Fonti: (a) PDB ID 8GPB; (b) PDB ID 1GPA; Barford, D. et al., *J. Mol. Biol.* **218**, 233 (1991).]

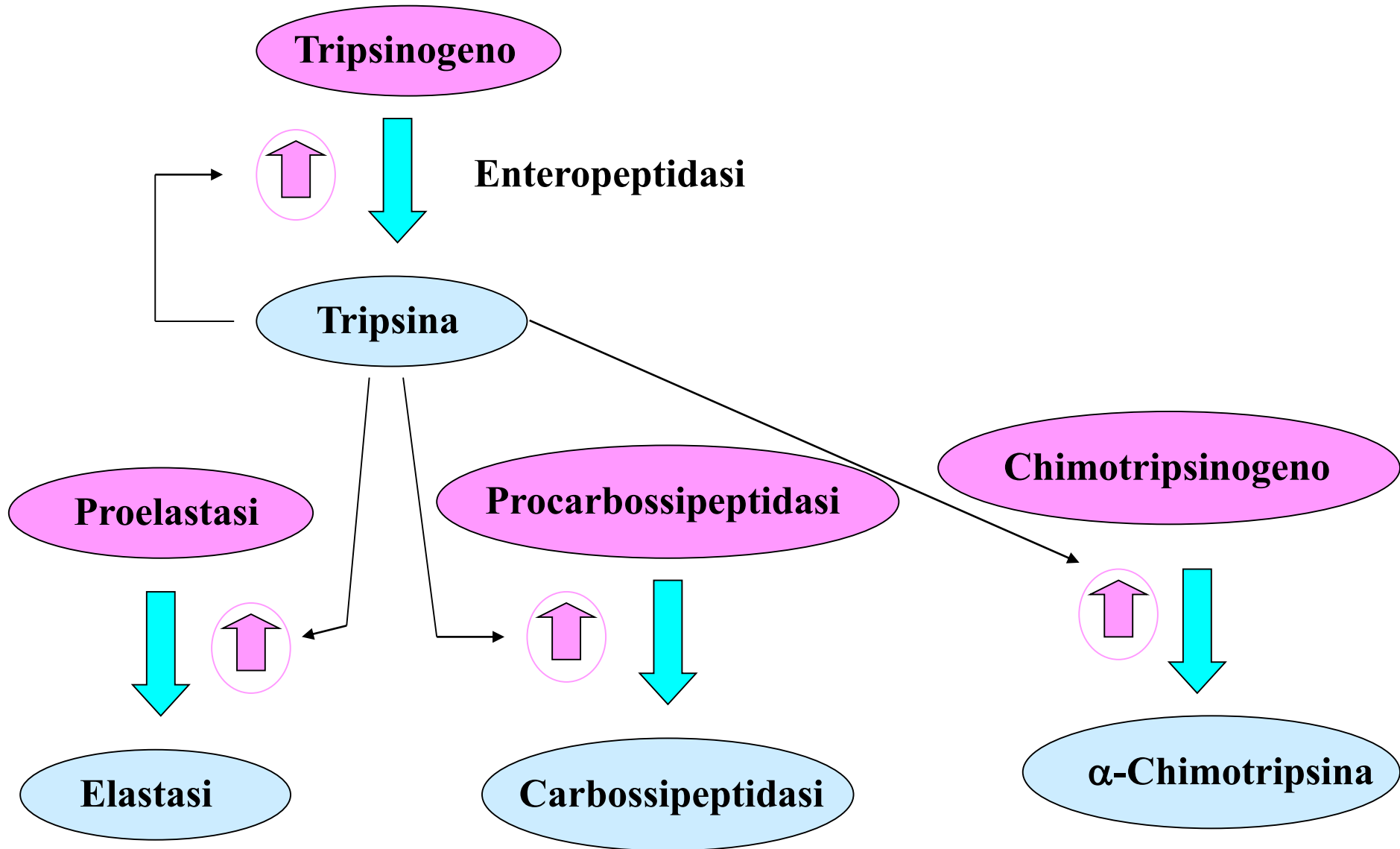
ATTIVAZIONE MEDIANTE SCISSIONE PROTEOLITICA

Gli ZIMOGENI sono precursori inattivi degli enzimi

- Enzimi della digestione (prodotti dal pancreas)
- Enzimi della coagulazione

Zimogeno	Forma attiva dell'enzima
Pepsinogeno	Pepsina
Tripsinogeno	Tripsina
Protrombina	Trombina

Attivazione degli zimogeni coinvolti nella digestione nell'intestino tenue



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.

LINK AL SITO PER VIDEO SUGLI ENZIMI

<https://www.youtube.com/watch?v=yk14dOOvwMk>