



Modulo 5a

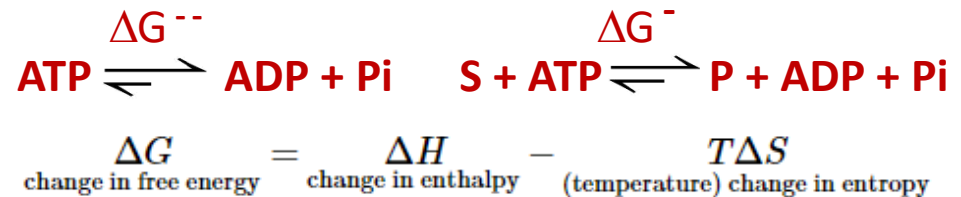
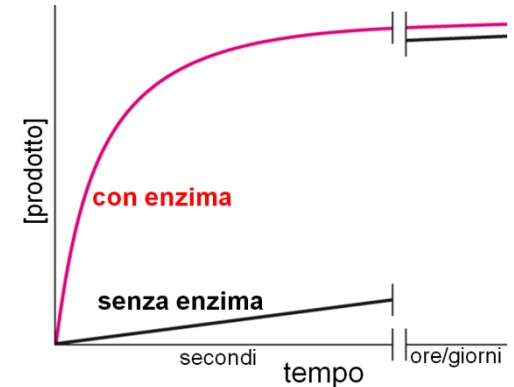
Gli enzimi – caratteristiche generali

2023-24

Introduzione agli enzimi

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

- quasi tutte queste reazioni sono **catalizzate** (rese più veloci) da **enzimi**, che sono **potenti biocatalizzatori**
- sono **proteine**, (in qualche caso riboproteine o RNA) specializzate nella **catalisi delle trasformazioni chimiche cellulari** e mediano la **conversione fra diversi tipi di energia**
- **aumentano la velocità** delle reazioni che catalizzano per un **fattore di almeno 10^6**
- essendo catalizzatori **non sono modificati** dalle reazioni che catalizzano e **non alterano l'equilibrio** di queste reazioni (***agiscono sulla cinetica, non la termodinamica***)
- però possono **accoppiare reazioni energeticamente sfavorevoli** (ΔG positivo) con reazioni favorevoli (es. idrolisi di ATP) rendendole **globalmente favorevoli** (ΔG negativo)

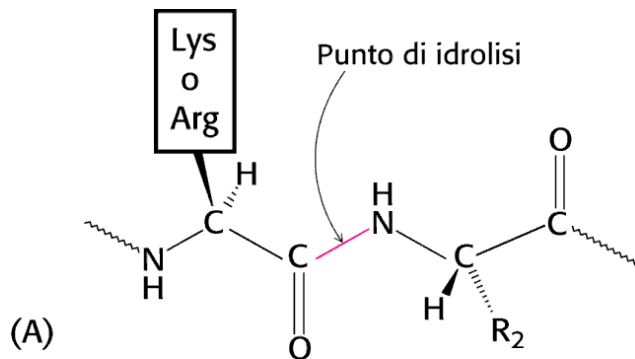


- generalmente agiscono in un arco ristretto di condizioni (pH, temperatura e pressione) che normalmente sono blande (pH ~ 7 , T ambiente e P atmosferica)

Introduzione agli enzimi (cont.)

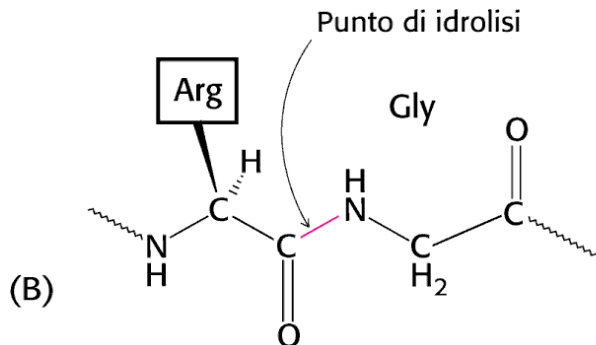
► Gli enzimi sono altamente specifici (... se serve)

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



Es. specificità:

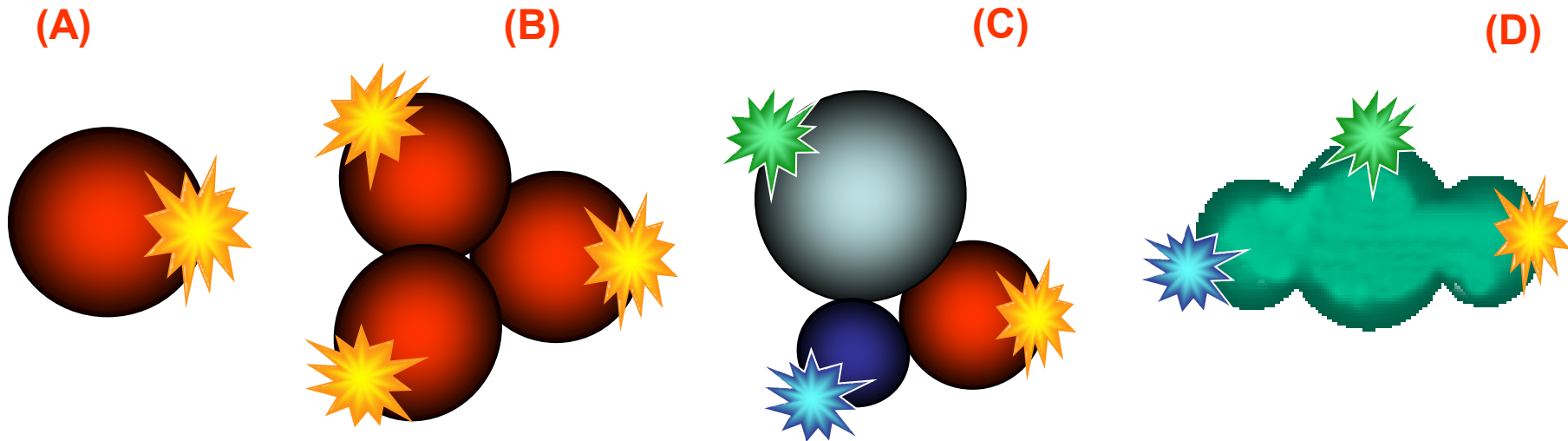
(A) La **tripsina** (enzima digestivo) taglia in corrispondenza del lato C di **Arg** o **Lys** - la **chimotripsina** taglia dopo catene grosse idrofobiche (es. **Phe**, Leu, Ile)



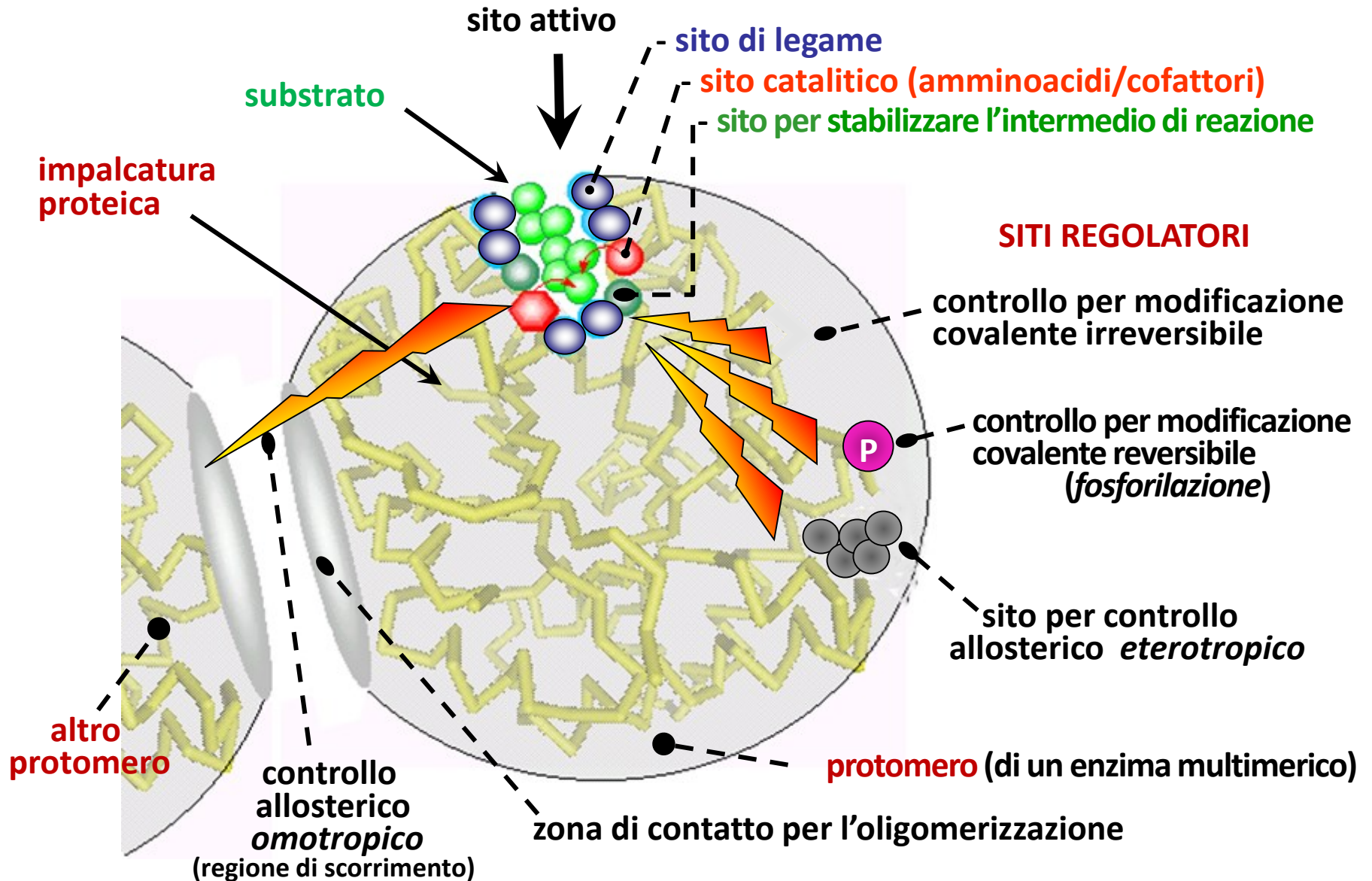
(B) La **trombina** (enzima della cascata di coagulazione) idrolizza solo legami **Arg-Gly**.

Introduzione agli enzimi (cont.)

- Gli enzimi possono avere solo uno o più siti attivi, ed essere composti da:
- una **sola subunità** con **un solo sito attivo** (enzima *monomero* e *monofunzionale*) (A)
 - **più subunità identiche**, con **gli stessi siti attivi** (enzima *multimerico* e *monofunzionale*) (B)
 - **più subunità diverse** con **diversi siti attivi** (enzima *multimerico* e *multifunzionale*) (C)
 - un'**unica catena** con **diversi domini strutturali** ciascuno con **diverso sito attivo** (enzima *monomero* e *multifunzionale*) (D)



Architettura generale degli enzimi



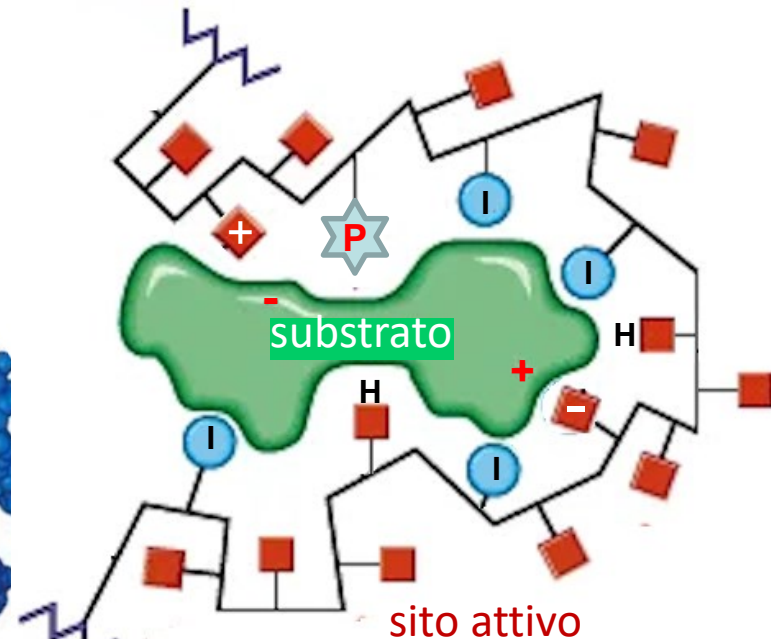
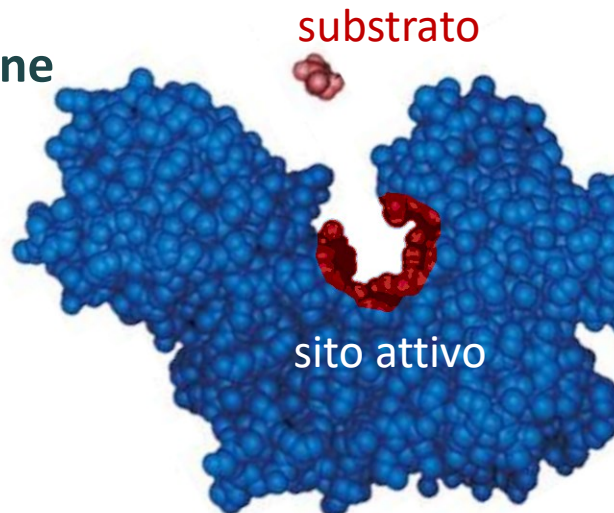
Caratteristiche del sito attivo di un enzima

► il sito attivo è una zona relativamente ristretta e ben definita dell'enzima

- ha una **precisa struttura tridimensionale** che coinvolge **pochi residui nella struttura 1^a**
- questi residui sono **vicini nella struttura 3^a** ma non necessariamente nella struttura 1^a

► Il sito attivo è composto da:

- **sito di legame**: generalmente un **solco o cavità** nella superficie dell'enzima, con elevata complementarità di forma al substrato, dove si instaurano interazioni multiple [legami-H (direzionali), interazioni elettrostatiche (utili per docking), forze di vdW (complementarità); interazioni idrofobiche (favoriscono l'associazione)].
- **sito catalitico**: può essere composto solo da AA ■, oppure anche da un **gruppo prostetico** ★
- **sito di stabilizzazione dell'intermedio della reazione catalizzata**



Regolazione dell'attività enzimatica

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

1) CONTROLLO ALLOSTERICO

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

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

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

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

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

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

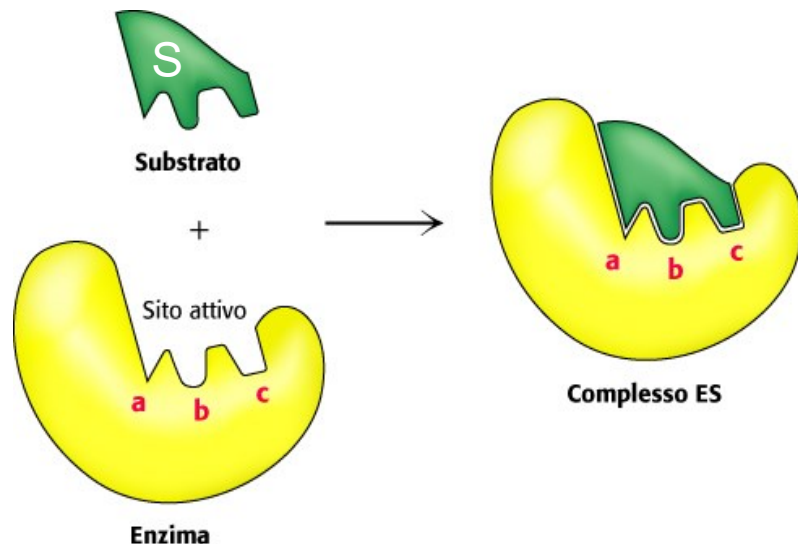
6) **COMPARTIMENTAZIONE:** isozimi sono separati in **diversi compartimenti/tessuti**

Modelli d'azione enzimatica

- Due modelli descrivono l'interazione enzima/substrato:

Modello a chiave e serratura

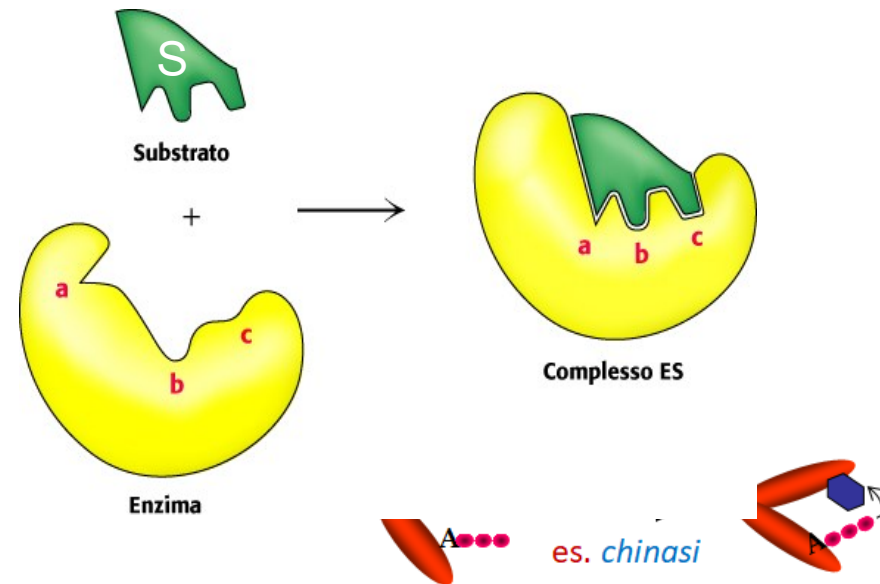
(Emil Fisher, 1890)



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

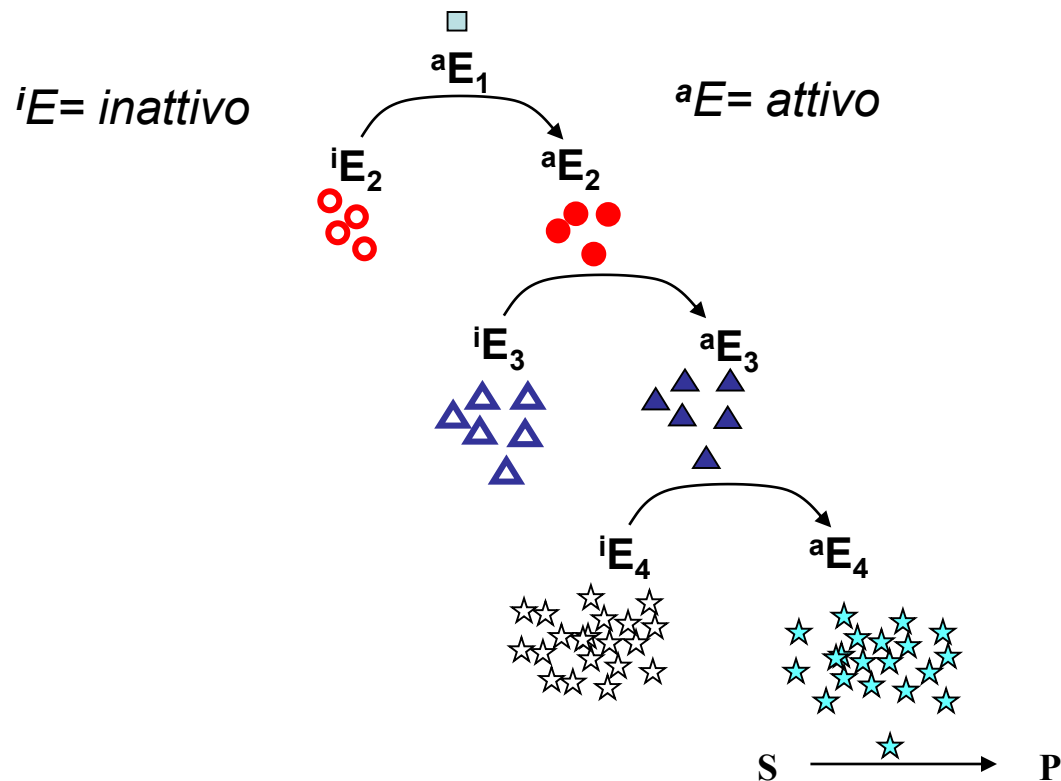
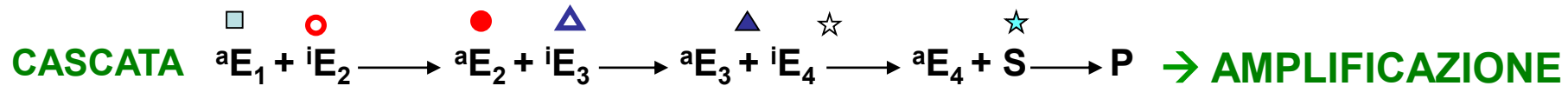
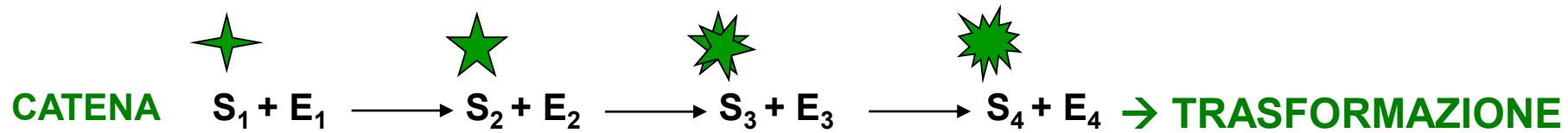
Modello ad adattamento indotto

(Daniel Koshland Jr., 1958)



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

Catene e cascate enzimatiche



Meccanismo d'azione degli enzimi

► Principi fondamentali dell'azione enzimatica

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

- sulla quale possono influire:

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

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

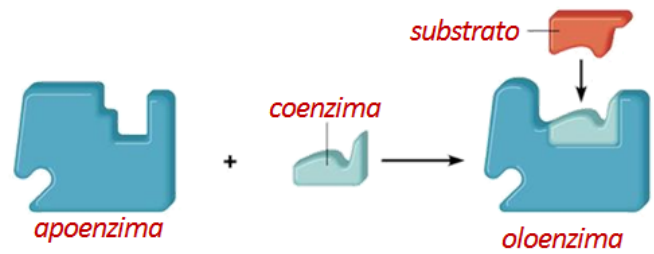
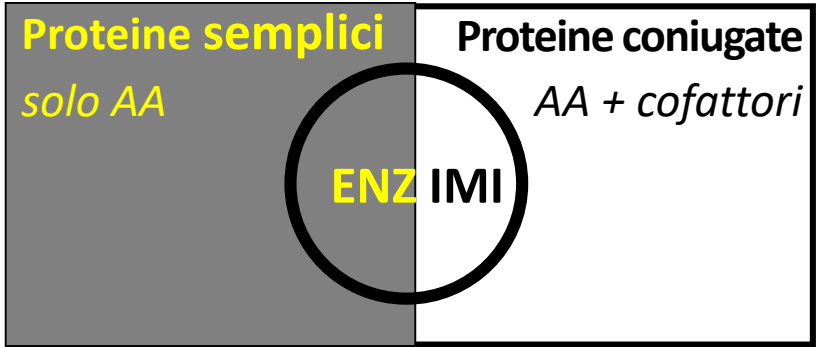
Catalisi covalente - **legame transiente** con catene laterali nucleofile

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

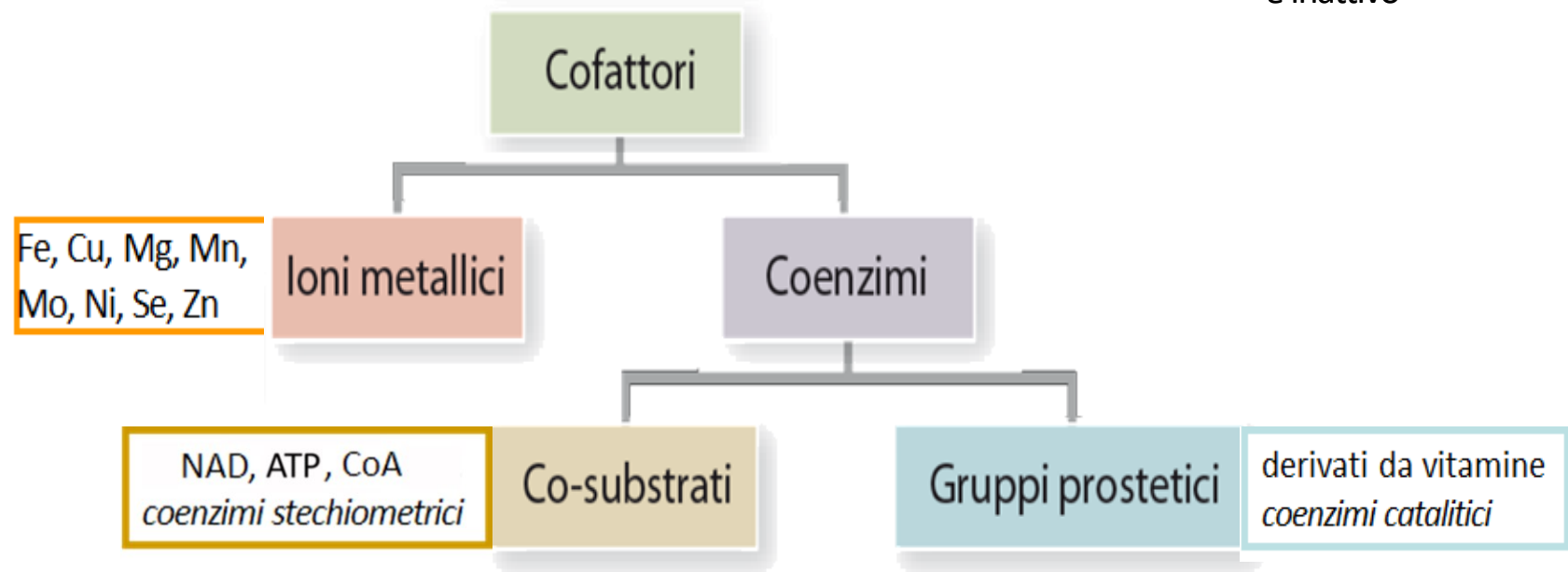
► All'azione enzimatica partecipano componenti del sito catalitico

- Il sito catalitico può utilizzare solo la **reattività chimica** delle catene laterali di **alcuni amminoacidi**; sono **enzimi semplici**
Asp & Glu (-COOH); Ser & Tyr (-OH)
Cys (-SH); Lys (-NH₂); His (-NH-)
- Il sito catalitico può necessitare di **reattività chimica aggiuntiva** che deriva da **cofattori** metallici o **gruppi prostetici (coenzimi)**; sono **enzimi coniugati**

Enzimi semplici e coniugati



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

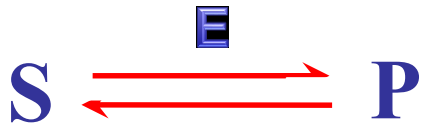


Ioni metallici - **formano legami di coordinazione multipli** - catalizzatori elettrofilici

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

Gli enzimi possono accoppiare reazioni

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



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

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

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

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

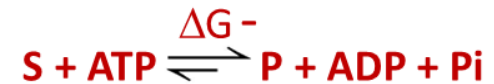
ad equilibrio, $\Delta G = 0$,

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

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

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

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



Gli enzimi diminuiscono l'energia dello stato di transizione



reaz. 1° ordine
(unimolecolare)

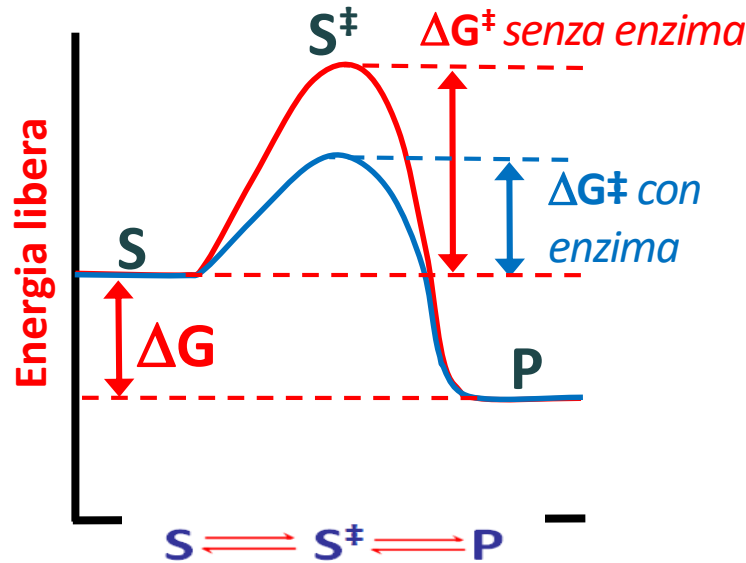
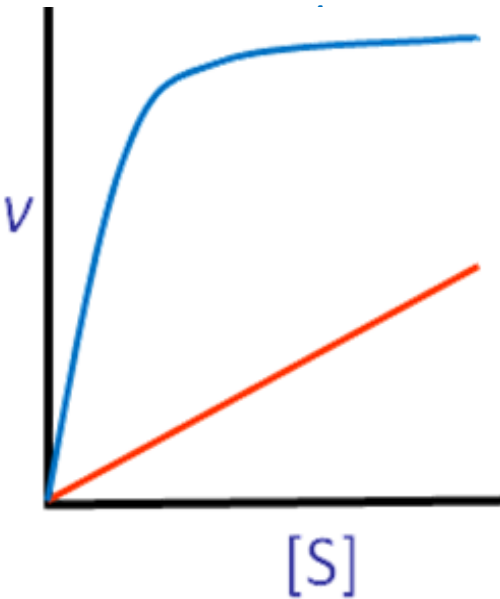
$$v = \frac{d[S]}{dt}$$

$$v = k [S]$$

$S^\ddagger$ = intermedio di reazione

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

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



$S^\ddagger$ = intermedio di reazione

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

(**barriera energetica**)

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

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

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

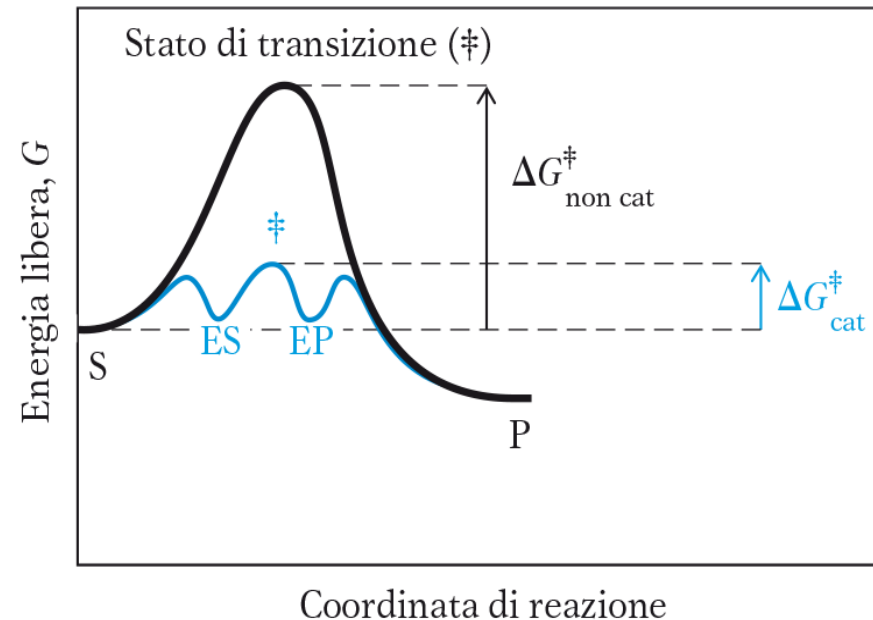
Gli enzimi diminuiscono l'energia di $S^\ddagger$ (cont.)

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

- una reazione enzimatica è descritta dall'equazione stechiometrica:



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

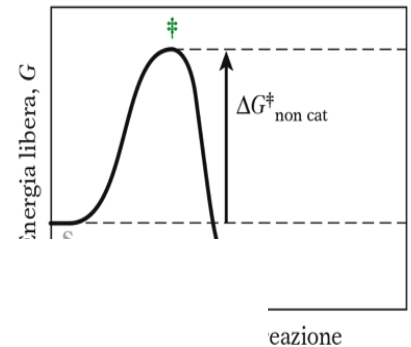
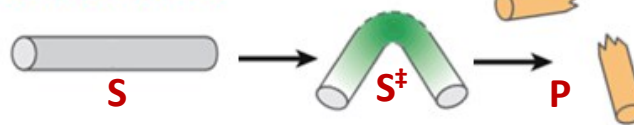


Gli enzimi diminuiscono l'energia di $S^\ddagger$ (cont.)

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

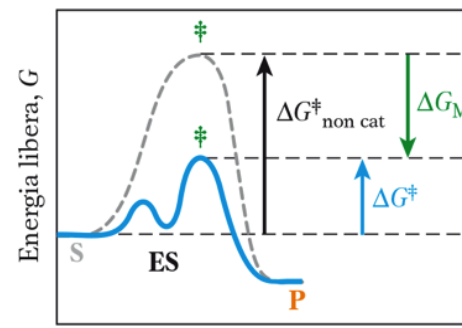
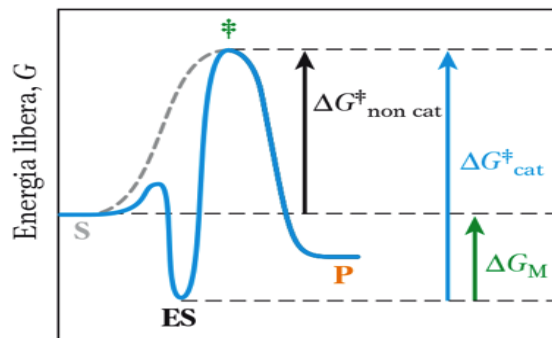
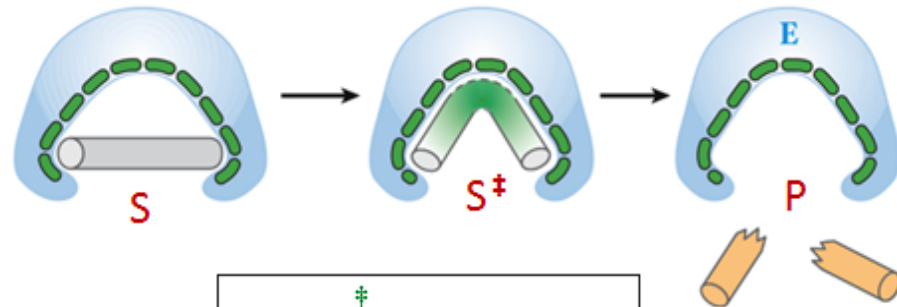
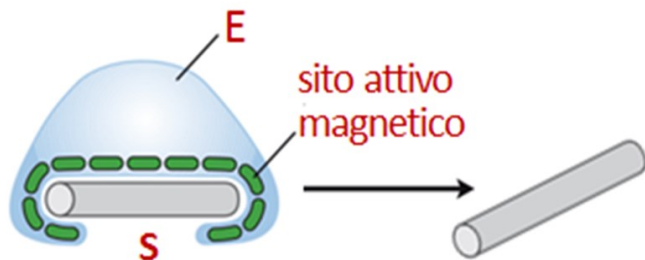
- La **formazione del complesso ES non è sufficiente** a spiegare il potere catalitico; è un complesso stabile, a bassa energia e scarsa reattività.
- Il sito attivo è **più complementare alla forma dello stato di transizione**, con il quale forma più interazioni
- Il concetto è illustrato dalla metafora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

senza enzima



E complementare ad S

E complementare ad $S^\ddagger$

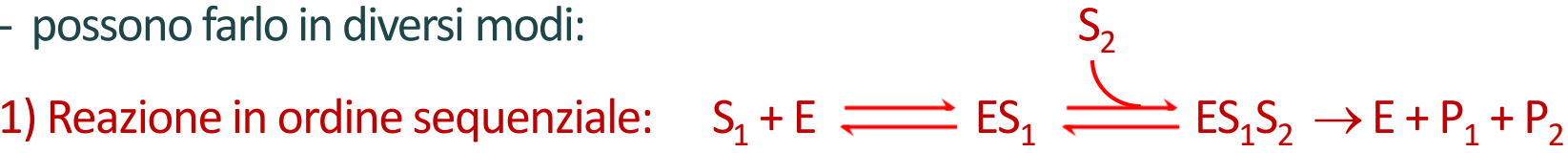


Reazioni enzimatiche a due substrati

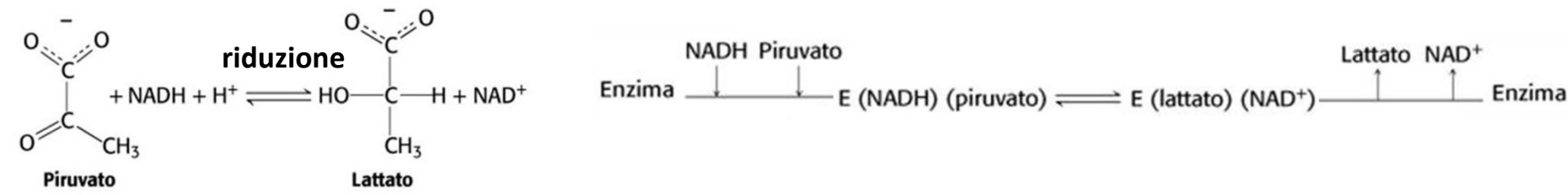
► Molti enzimi catalizzano reazioni con più substrati e producono più prodotti



- possono farlo in diversi modi:



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



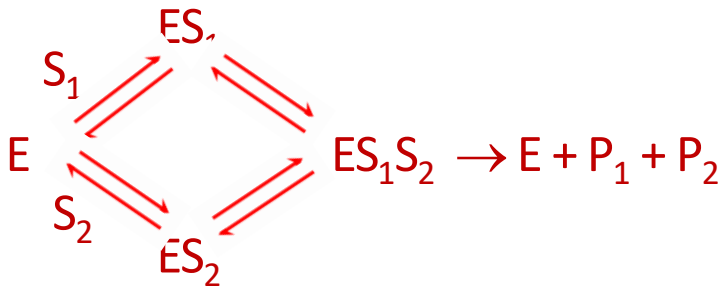
Enzima

$\xrightarrow[NADH]{Piruvato}$

$E (NADH) (piruvato) \rightleftharpoons E (lattato) (NAD^+) \xrightarrow[NAD^+]{Lattato}$

Enzima

2) Reazione in ordine casuale:



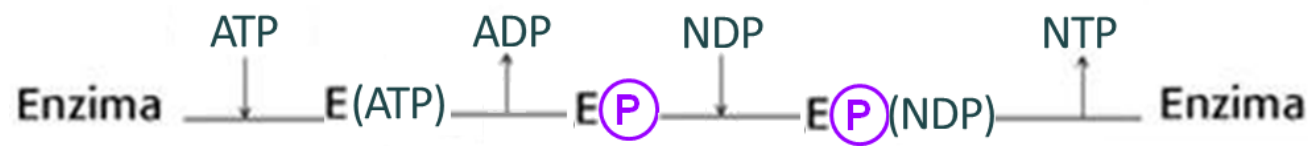
- In entrambe questi casi si forma un COMPLESSO TERNARIO (ES_1S_2)

Reazioni enzimatiche a due substrati (cont.)

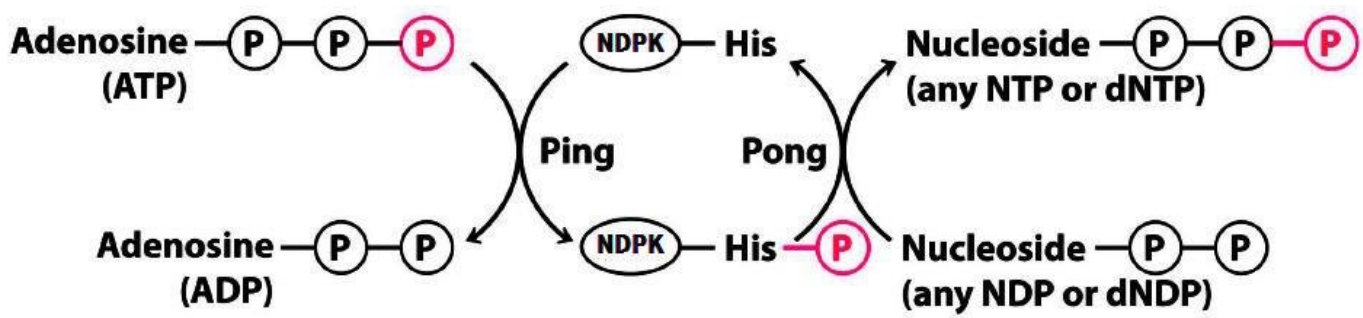
- ▶ Altri enzimi catalizzano reazioni multi-substrato/multi-prodotto senza formare un complesso ternario



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



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



Classificazione degli enzimi

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

- 1) **Ossidoriduttasi:** *reazioni redox (trasferimento O, H o e^-)*
- 2) **Transferasi:** *trasferimento intermolecolare gruppi funzionali
(es. $-CH_3$, $RCO-$, NH_3^+- , $PO_4^{2-}-$)*
- 3) **Idrolasi:** *reazioni di idrolisi (scissione idrolitica di legami)
(es. peptidici, glicosidici, estere e fosfoestere)*
- 4) **Liasi/sintasi:** *addizione o rimozione non idrolitica di gruppi chimici
(es. C-C, C-O, C-S, C-N con meccanismo non idrolitico di rottura dei legami)*
- 5) **Isomerasi:** *riarrangiamenti intramolecolari*
- 6) **Ligasi (sintetasi):** *formazione di legami ATP dipendente
(es. C-C, C-O, C-S, C-N accompagnata da idrolisi di ATP)*

- la classificazione indica il tipo di reazione catalizzata; **non specifica l'enzima ma la reazione**
- Il numero assegnato alla reazione è il primo presente nel codice numerico dell'enzima

Classificazione degli enzimi: (Enzyme Commission N°)

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

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

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

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

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

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

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

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