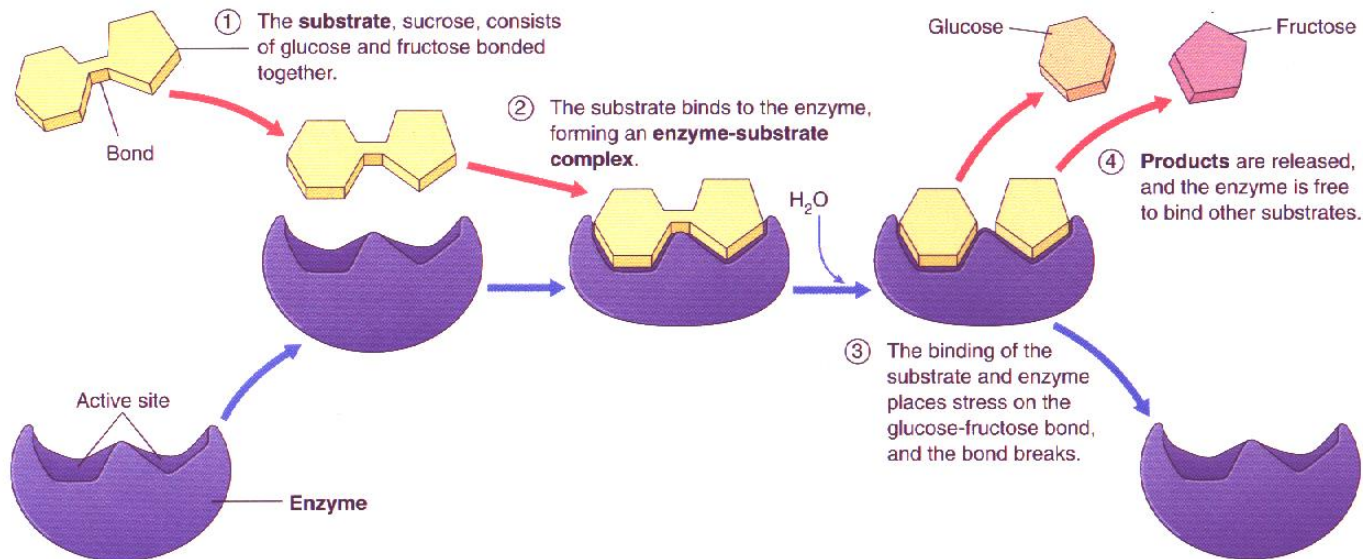


Gli enzimi

Sono proteine con peso molecolare che varia da 12.000 fino a oltre un 1.000.000 u.m.a. che sono in grado di fungere da efficienti catalizzatori nei sistemi biologici

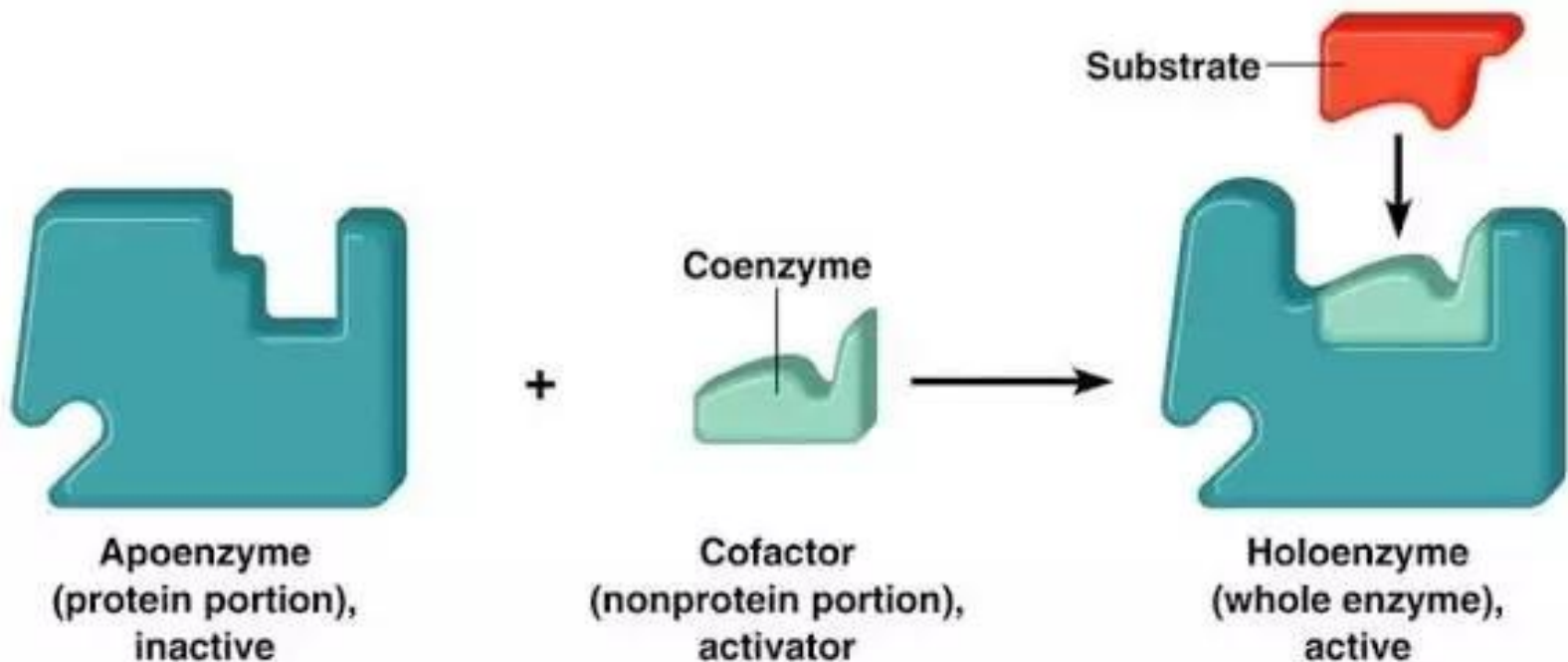


Gli enzimi

ALCUNI HANNO BISOGNO DI COFATTORI, DETTI **GRUPPO PROSTETICI**:

-IONI INORGANICI: Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ,

-MOLECOLE ORGANICHE: COENZIMI

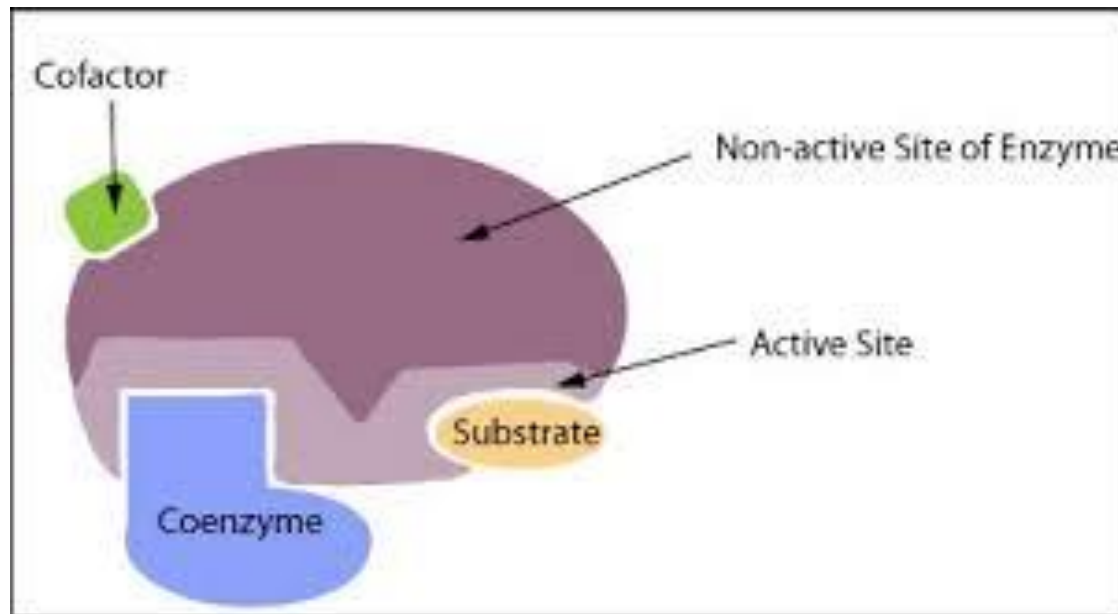


I cofattori

il termine **cofattore** si intende una piccola molecola di natura non proteica o uno ione metallico che si associa all'enzima e ne rende possibile l'attività catalitica.

La maggior parte degli enzimi che richiedono il legame a cofattori perdono ogni funzionalità in caso di sua assenza.

Un enzima privo del cofattore che ne rende possibile l'attività enzimatica è detto **apoenzima**. Il legame tra cofattore ed apoenzima permette la formazione del cosiddetto **oloenzima**.



Alcuni enzimi che contengono come cofattori elementi inorganici

Fe^{2+} o Fe^{3+}	Citocromo ossidasi, Catalasi, Perossidasi
Cu^{2+}	Citocromo ossidasi
Zn^{2+}	Anidrasi carbonica Alcool deidrogenasi
Mg^{2+}	Esochinasi Glucosio-6-fosfatasi Piruvato chinasi
Mn^{2+}	Arginasi Ribonucleotide reductasi
K^{+}	Piruvato kinasi
Ni^{2+}	Ureasi
Mo	Solfito ossidasi
Se	Glutatione perossidasi

**Alcuni enzimi contengono
come cofattori molecole organiche che servono come trasportatori
temporanei di specifici atomi o gruppi funzionali**

<i>Coenzima</i>	<i>Esempi di gruppi chimici trasferiti</i>	<i>Precursore nella dieta dei mammiferi</i>
Tiamina pirofosfato	Aldeidi	Tiamina (vitamina B ₁)
Flavin adenin dinucleotide	Elettroni	Riboflavina (vitamina B ₂)
Nicotinamide adenina dinucleotide	Ione idruro (:H ⁻)	Acido nicotinico (niacina)
Coenzima A	Gruppi acilici	Acido pantotenico
Piridossal fosfato	Gruppi amminici	Piridossina (vitamina B ₆)
5'-deossiadenosil-cobalamina (coenzima B ₁₂)	Atomi di H e gruppi alchilici	Vitamina B ₁₂
Biocitina	CO ₂	Biotina
Tetraidrofolato	Gruppi a un atomo di carbonio	Folato
Acido lipoico	Elettroni e gruppi alchilici	Non necessario nella dieta

Classificazione internazionale degli enzimi

Classe	<i>Tipo di reazione catalizzata</i>
1 - Ossidoreduttasi	Trasferimento di elettroni
2 - Trasferasi	Reazioni di trasferimento di gruppi
3 - Idrolasi	Reazioni di idrolisi (trasferimento di gruppi funzionali all'acqua)
4 - Liasi	Addizione di gruppi a legami doppi o formazione di doppi legami mediante la rimozione di gruppi
5 - Isomerasi	Trasferimento di gruppi all'interno di molecole formando isomeri
6 - Ligasi	Formazione di legami C-C, C-S, C-O, C-N mediante reazioni di condensazione accoppiata alla scissione di ATP

EC numbers

- La **classificazione EC** è un sistema di categorizzazione degli enzimi attraverso un cosiddetto numero **EC** (dall'inglese Enzyme Commission) sulla base della reazione chimica catalizzata dall'enzima

EC 1 **Oxidoreductases**

EC 1.3 **Acting on the CH-CH Group of Donors**

EC 1.3.1 **With NAD⁺ or NADP⁺ as acceptor**

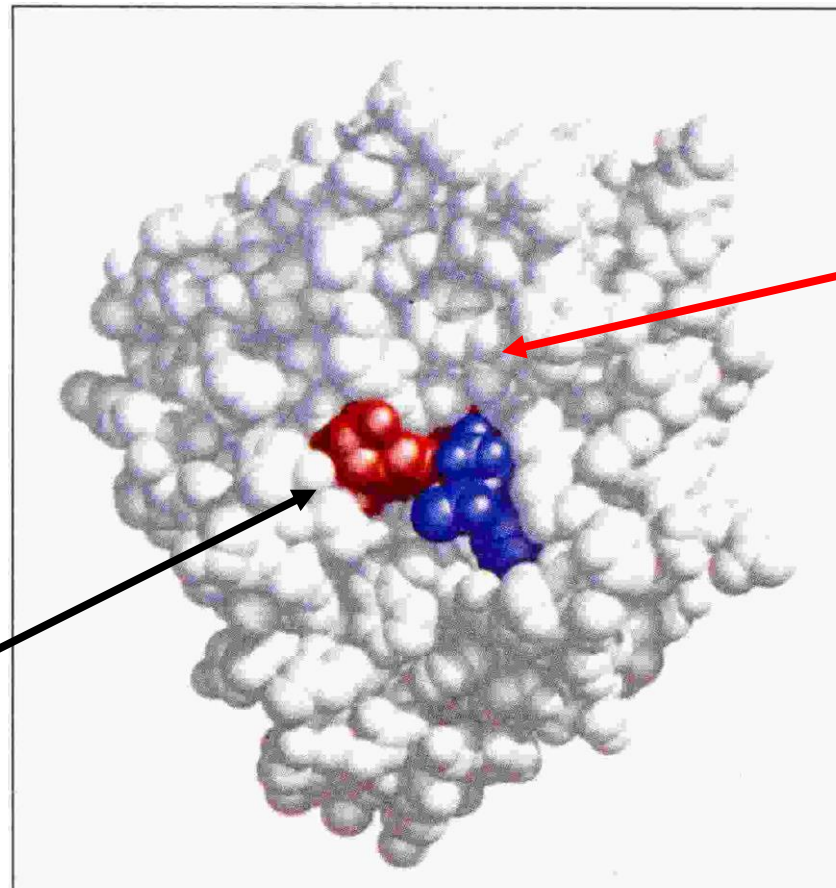
EC 1.3.1.21 **7-dehydrocholesterol reductase**

IUBMB Enzyme Nomenclature

EC 1.3.1.21

La cinetica enzimatica è lo studio della velocità delle reazioni catalizzate da enzimi

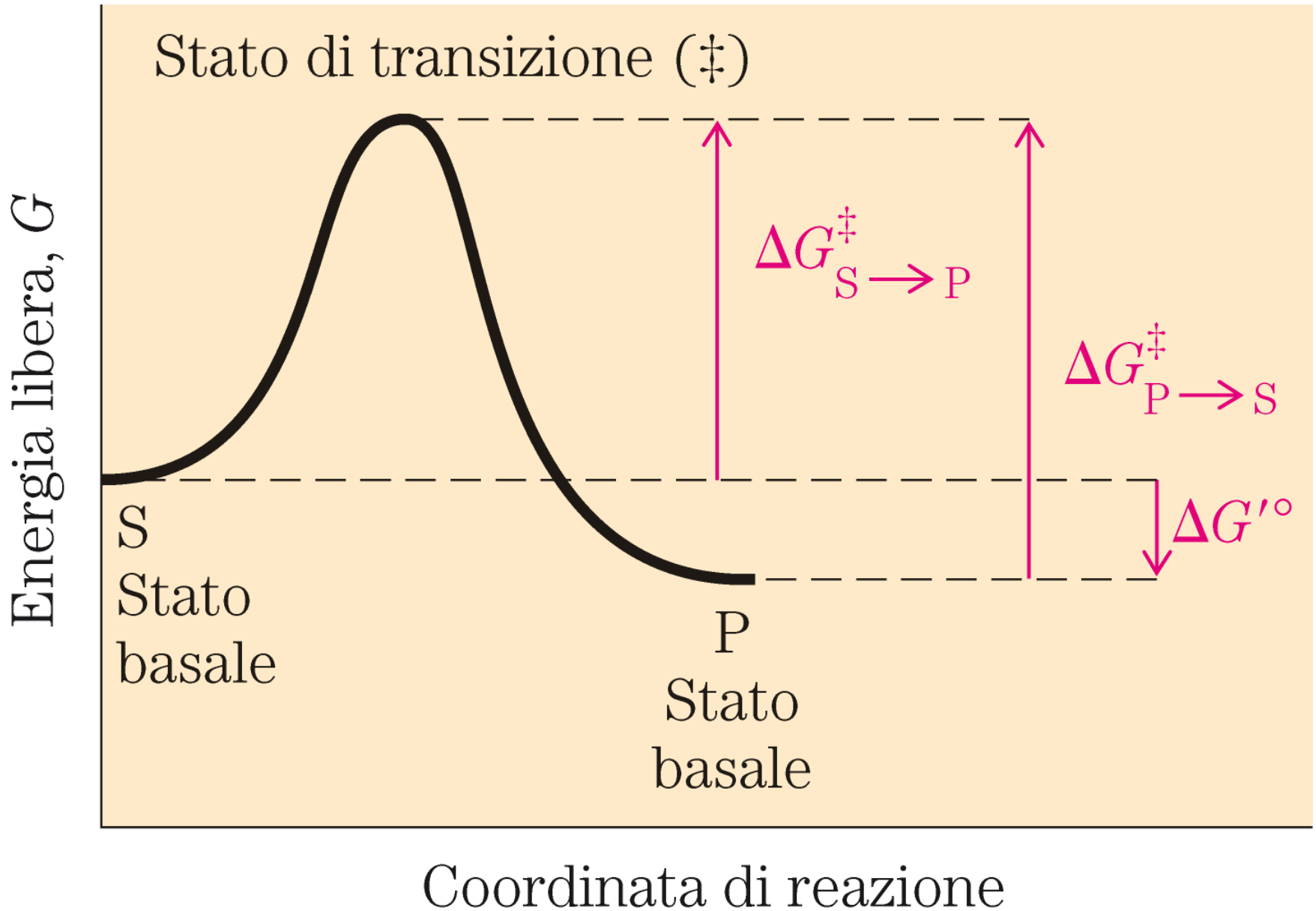
Legame di un substrato al sito attivo di un enzima



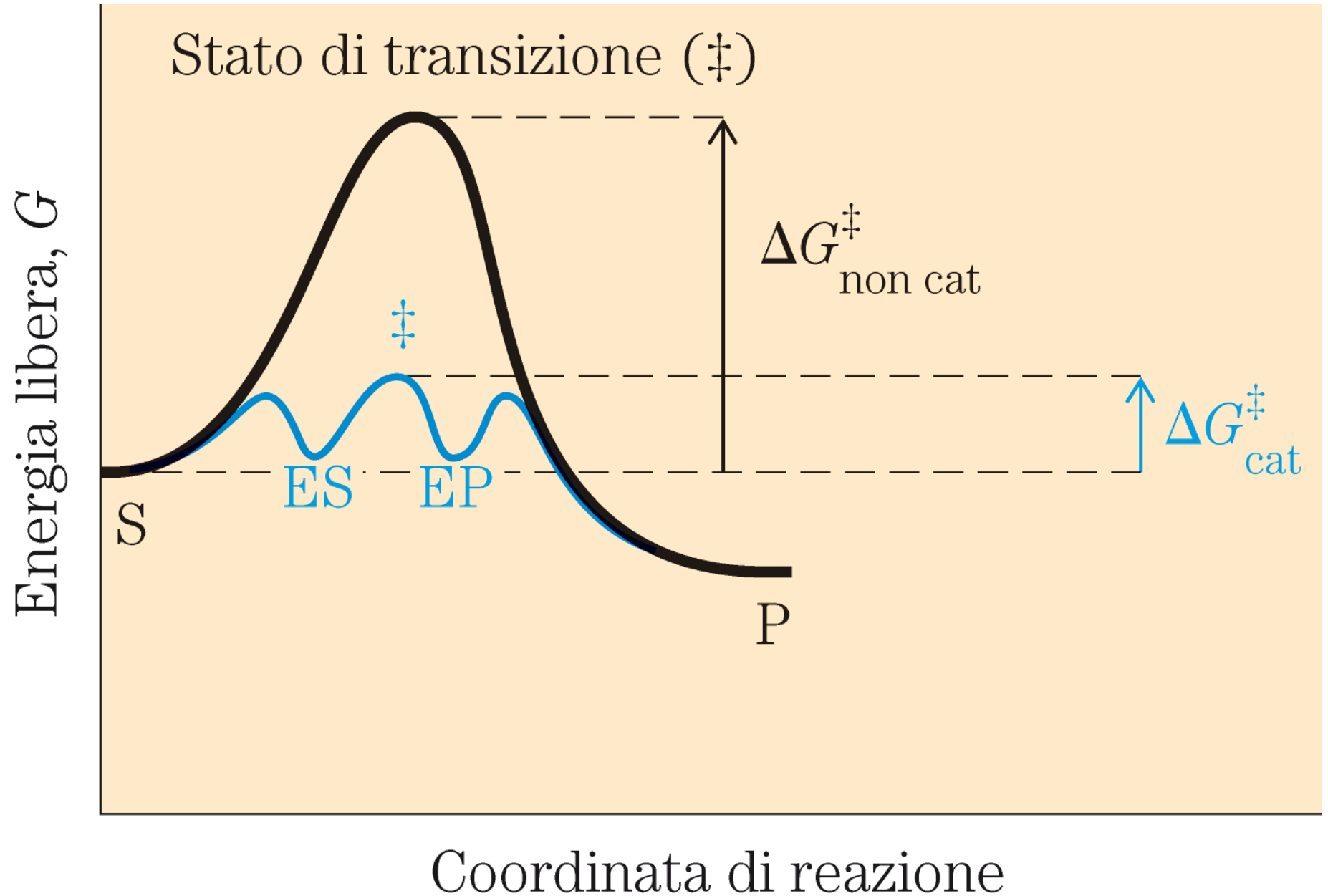
Residui importanti
Del sito catalitico

Substrato

Lo stato di transizione

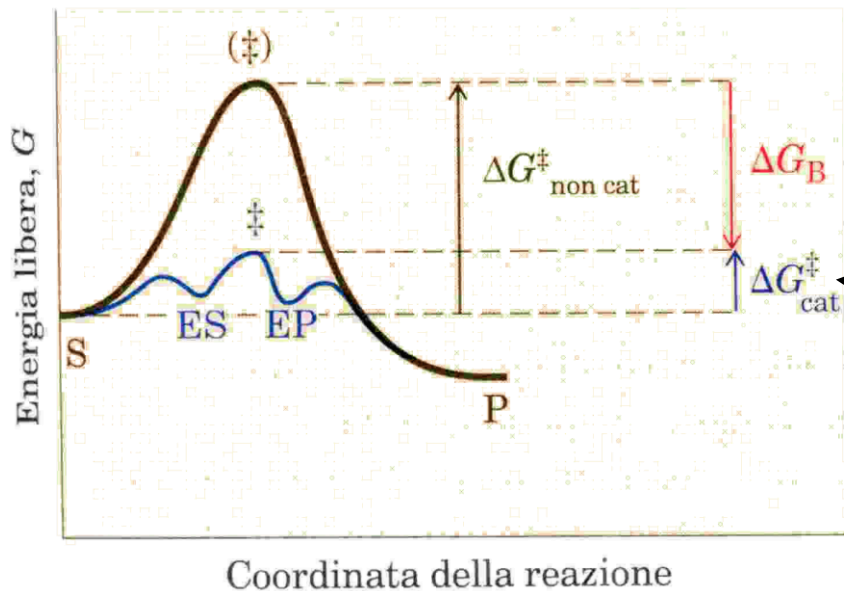


Azione di un catalizzatore



L'aumento della velocità prodotto da alcuni enzimi rispetto alla reazione non catalizzata

Anidraasi carbonica	$\times 10^7$
Fosfoglucomutasi	$\times 10^{12}$
Succinil-CoA-trasferasi	$\times 10^{13}$
Ureasi	$\times 10^{14}$

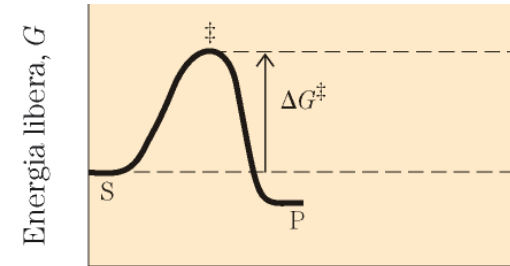


Energia di legame, che si libera dalle interazioni enzima-substrato

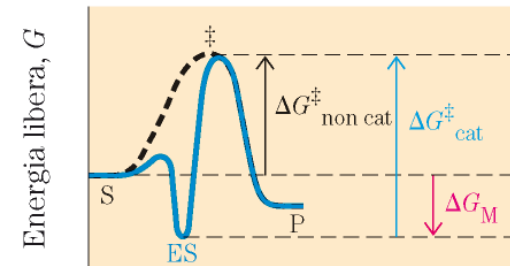
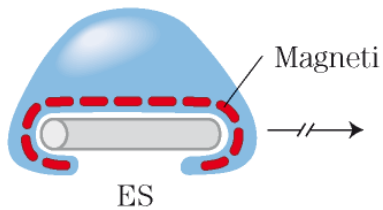
La catalisi:

il fenomeno del riconoscimento del substrato

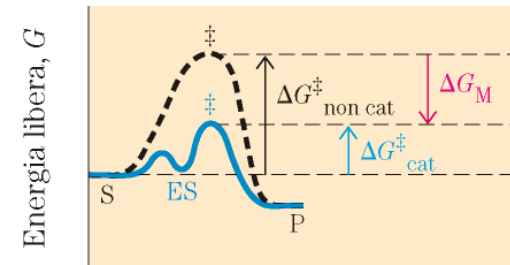
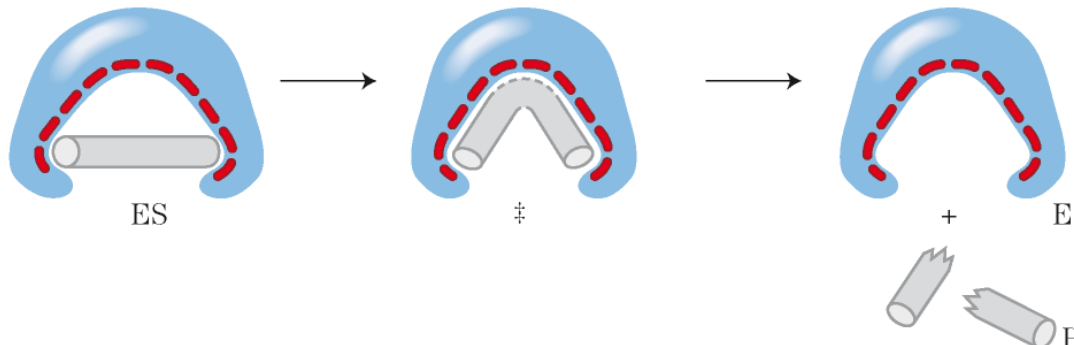
(a) Senza enzima



(b) Complementarità tra enzima e substrato



(c) Complementarità tra enzima e stato di transizione



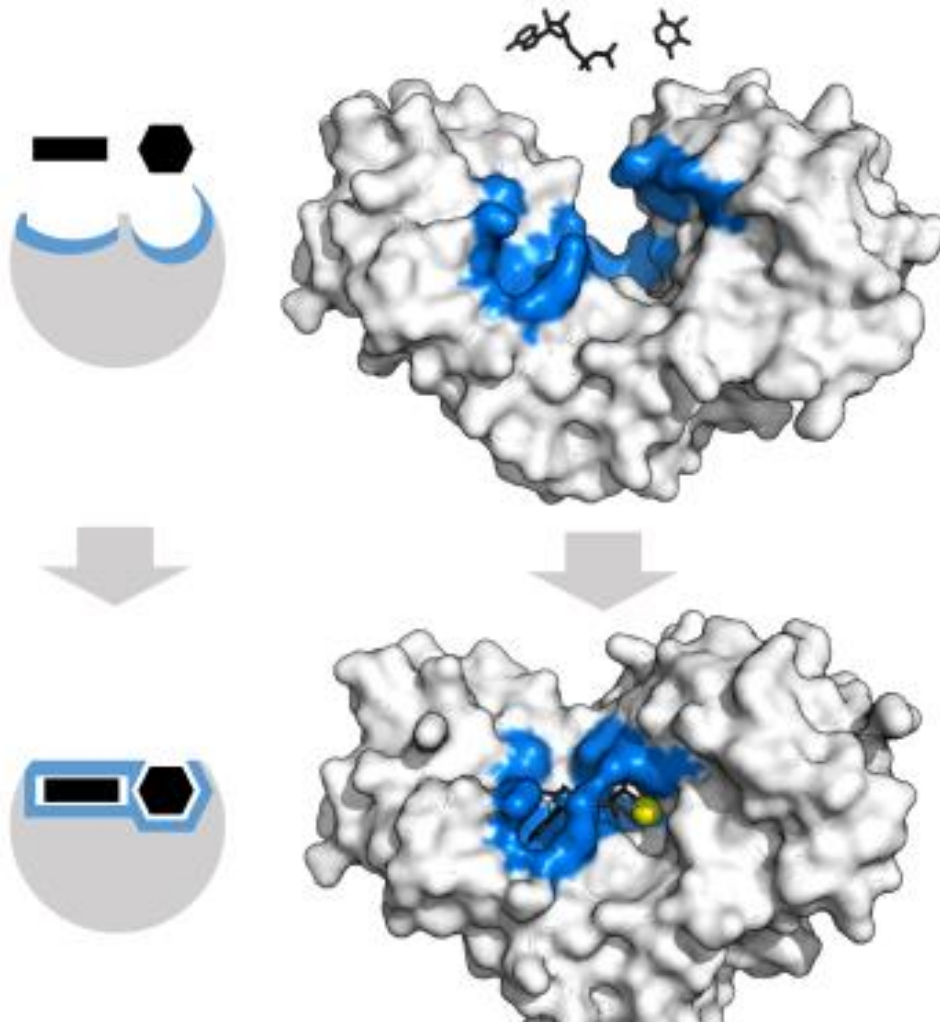
Coordinata di reazione

Il riconoscimento del substrato

Modello *chiave-serratura*: Il primo modello a essere stato messo a punto per spiegare la specificità degli enzimi è quello suggerito da Hermann Fischer nel 1894, secondo il quale l'enzima e il substrato possiedono una forma esattamente complementare che ne permette un *incastro* perfetto. Tale modello è spesso definito come *chiave-serratura*. Spiega bene la specificità degli enzimi, ma è decisamente meno affidabile nello spiegare la stabilizzazione dello stato di transizione.

Modello dell'*adattamento indotto*: Nel 1958 Daniel Koshland propose una modifica: dal momento che gli enzimi sono strutture relativamente flessibili, il sito attivo può continuamente modellarsi in base alla presenza o meno del substrato. Come risultato, il substrato non si lega semplicemente a un sito attivo *rigido*, ma genera un rimodellamento del sito stesso, che lo porta a un legame più stabile in modo da portare correttamente a termine la sua attività catalitica.

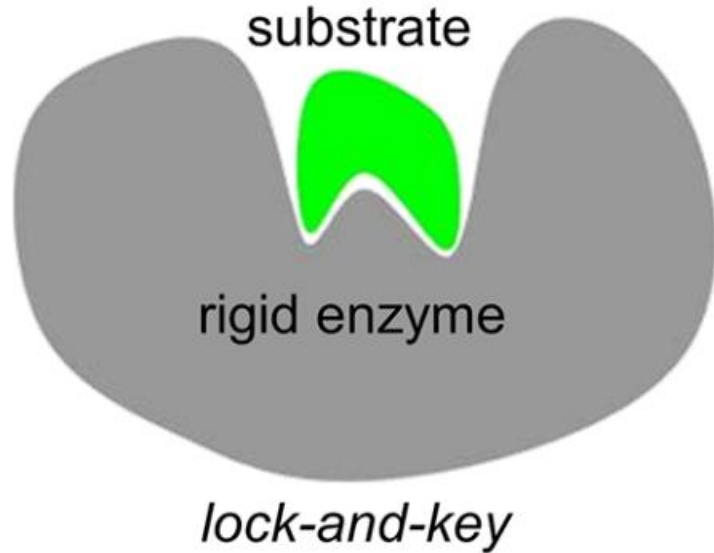
Riconoscimento del substrato: induced fit



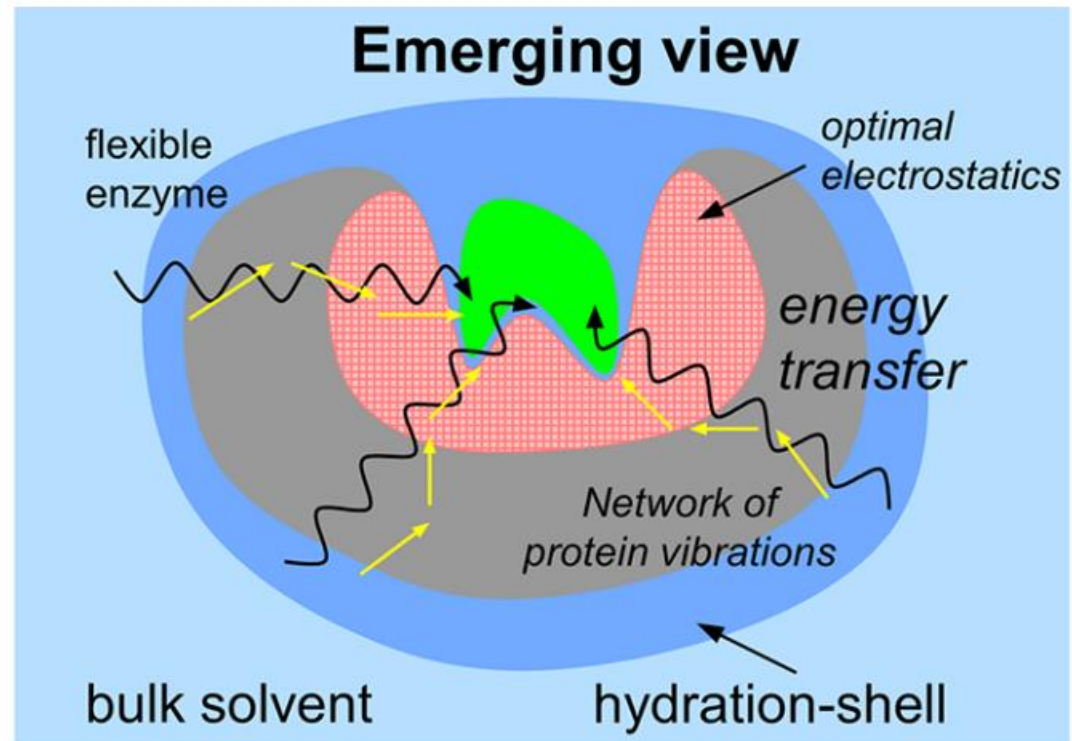
- L'enzima cambia forma in seguito all'interazione con i substrati per formare un complesso Enzima-substrato.
- L'esochinasi presenta una grande modificazione conformazionale in seguito al legame con i substrati (ATP e zucchero).

Il riconoscimento del substrato: la catalisi

Conventional view

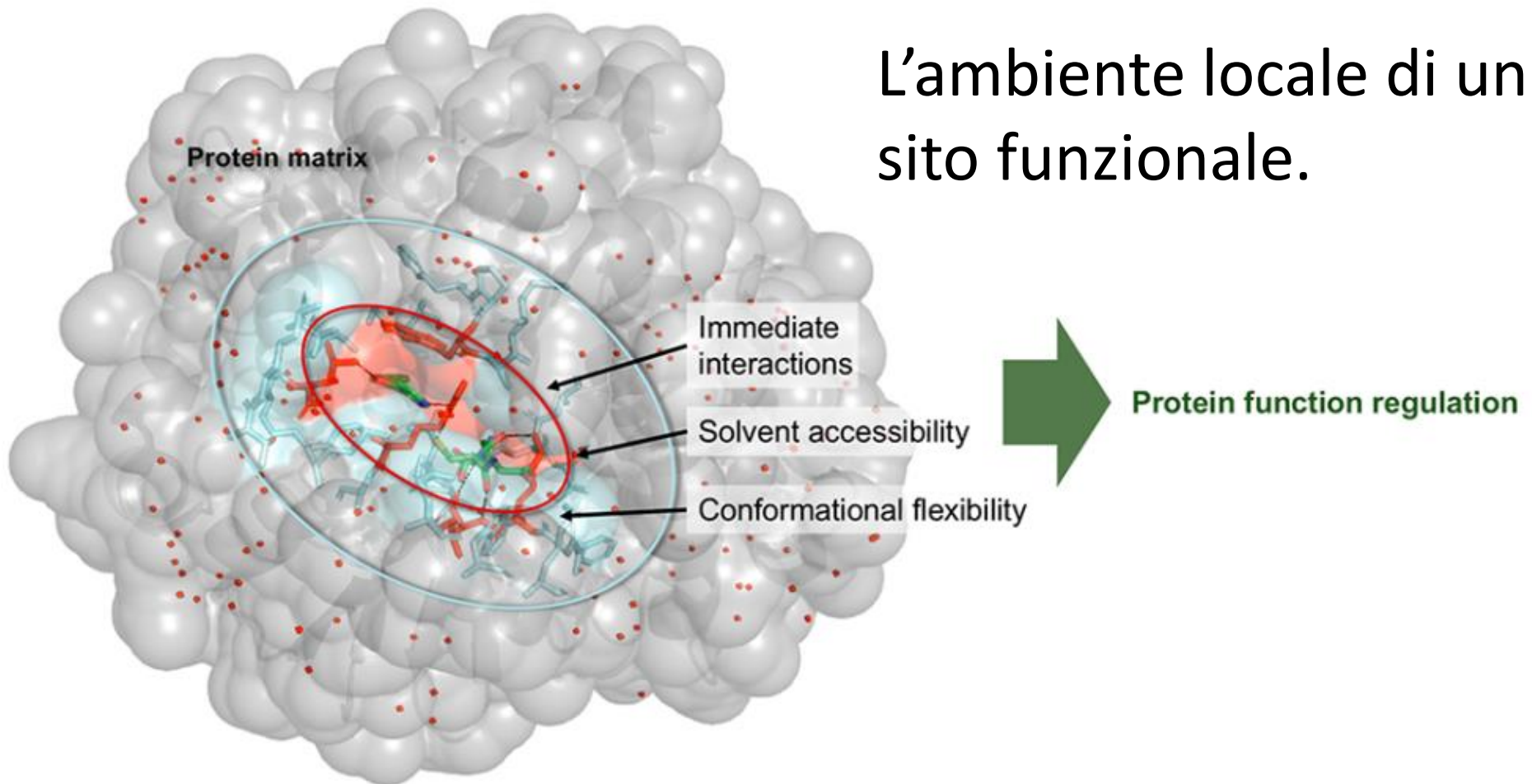


Emerging view



L'interconnessione tra struttura, dinamica e funzione della proteina partecipano all'efficienza catalitica degli enzimi

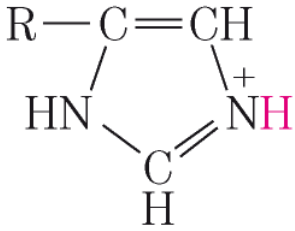
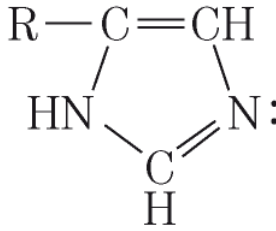
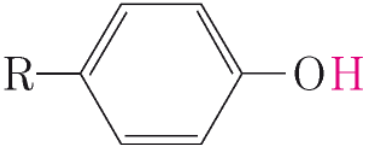
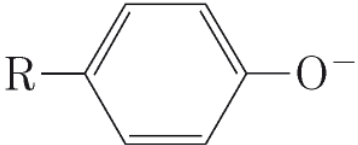
Il riconoscimento del substrato: la catalisi



L'ambiente locale di un sito funzionale.

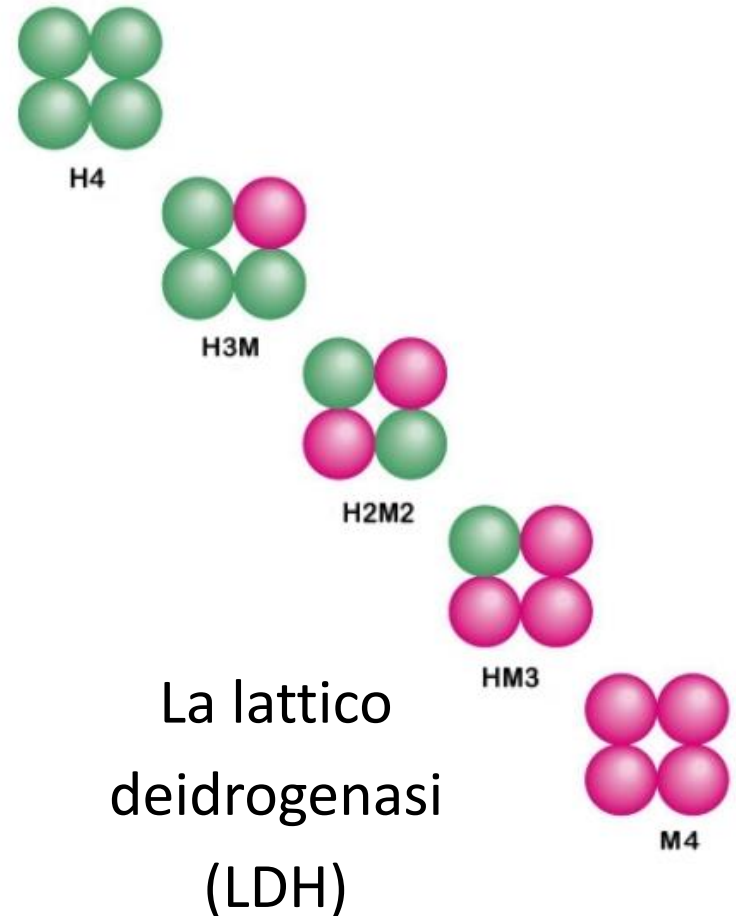
Riconoscimento enzima - substrato

Il riconoscimento del substrato da parte del enzima è dovuto alla presenza di opportuni residui amminoacidici nel sito attivo ed alle interazioni deboli che si instaurano con la molecola del substrato

Residui amminoacidici	Forma acida generale (donatore di protoni)	Forma basica generale (accettore di protoni)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His		
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr		

Gli isoenzimi

- Gli **isoenzimi** sono enzimi che catalizzano la stessa reazione, ma hanno una struttura e proprietà chimico-fisiche differenti, quali il pH ottimale, il punto isoelettrico.
- Possono essere presenti in una stessa specie animale o vegetale, in individui diversi, o anche in uno stesso organismo a livello di distretti cellulari differenti.
- Gli isoenzimi possono derivare da geni differenti o da modificazioni post-traduzionali diverse, oppure dall'assemblaggio alternativo delle differenti subunità.



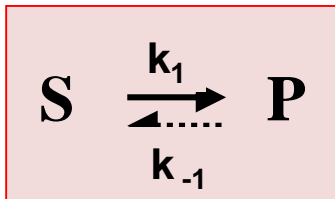
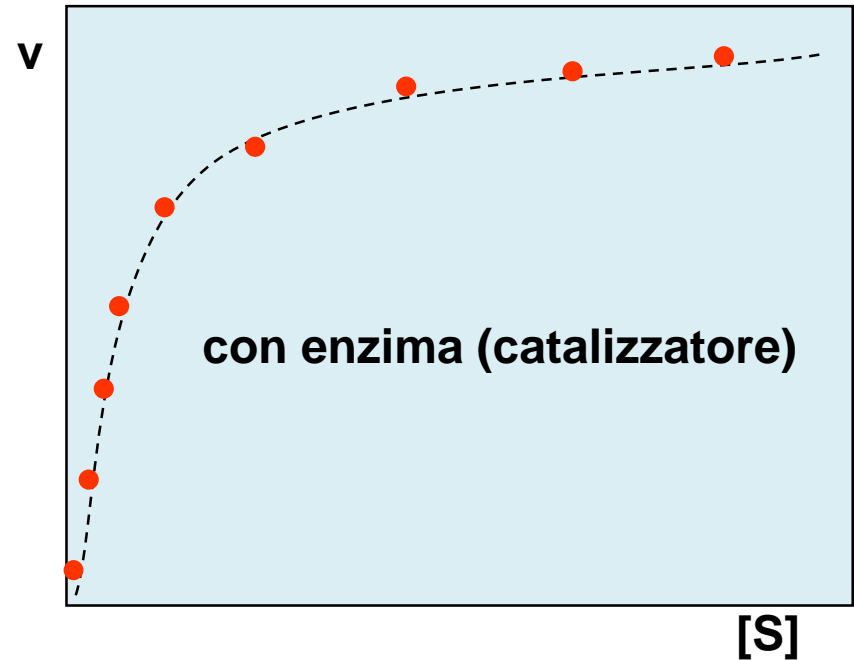
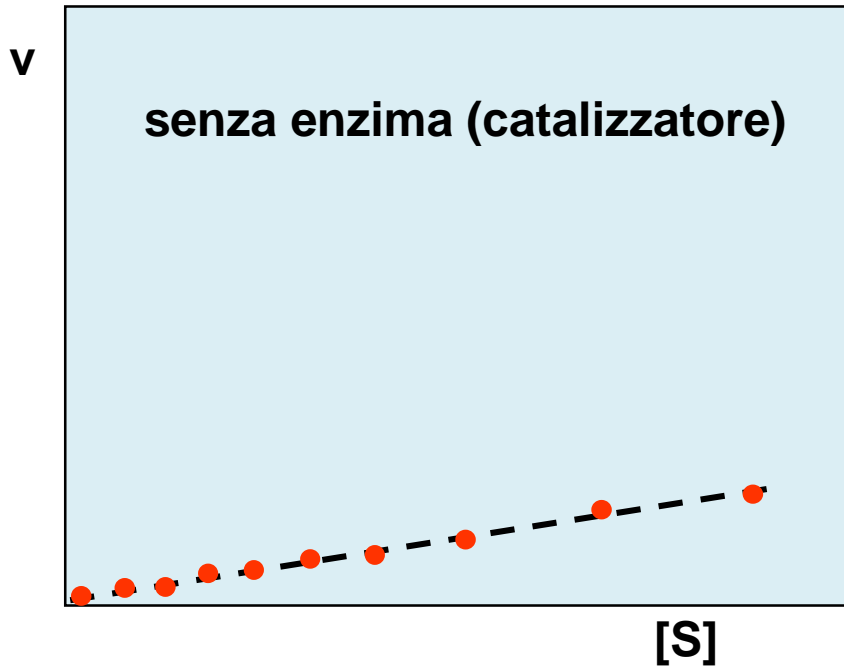
La lattico deidrogenasi (LDH)

- La LDH ha cinque differenti isoenzimi, tutti tetramericici (quattro catene polipeptidiche) di due tipi differenti, M ed H. Dalle diverse combinazioni delle due catene si hanno gli isoenzimi: M₄, M₃H, M₂H₂, MH₃, H₄.
- Poiché gli isoenzimi sono distribuiti in maniera differente nei vari organi, la loro analisi quantitativa consente di risalire all'organo bersaglio della patologia. Livelli alterati degli isoenzimi dell'LDH sono indici specifici di alcune malattie, come quelle cardiache, muscolari, ossee etc. e di grande utilità diagnostica.

Type	Composition	Location	Stabilità a 60° C	Frazione nel siero
LDH ₁	HHHH	Heart and Erythrocyte	Si	25%
LDH ₂	HHHM	Heart and Erythrocyte	Si	35%
LDH ₃	HHMM	Brain and Kidney	Parziale	27%
LDH ₄	HMMM	Skeletal Muscle and Liver	No	8%
LDH ₅	MMMM	Skeletal Muscle and Liver	no	5%

Reazioni catalizzate da enzimi

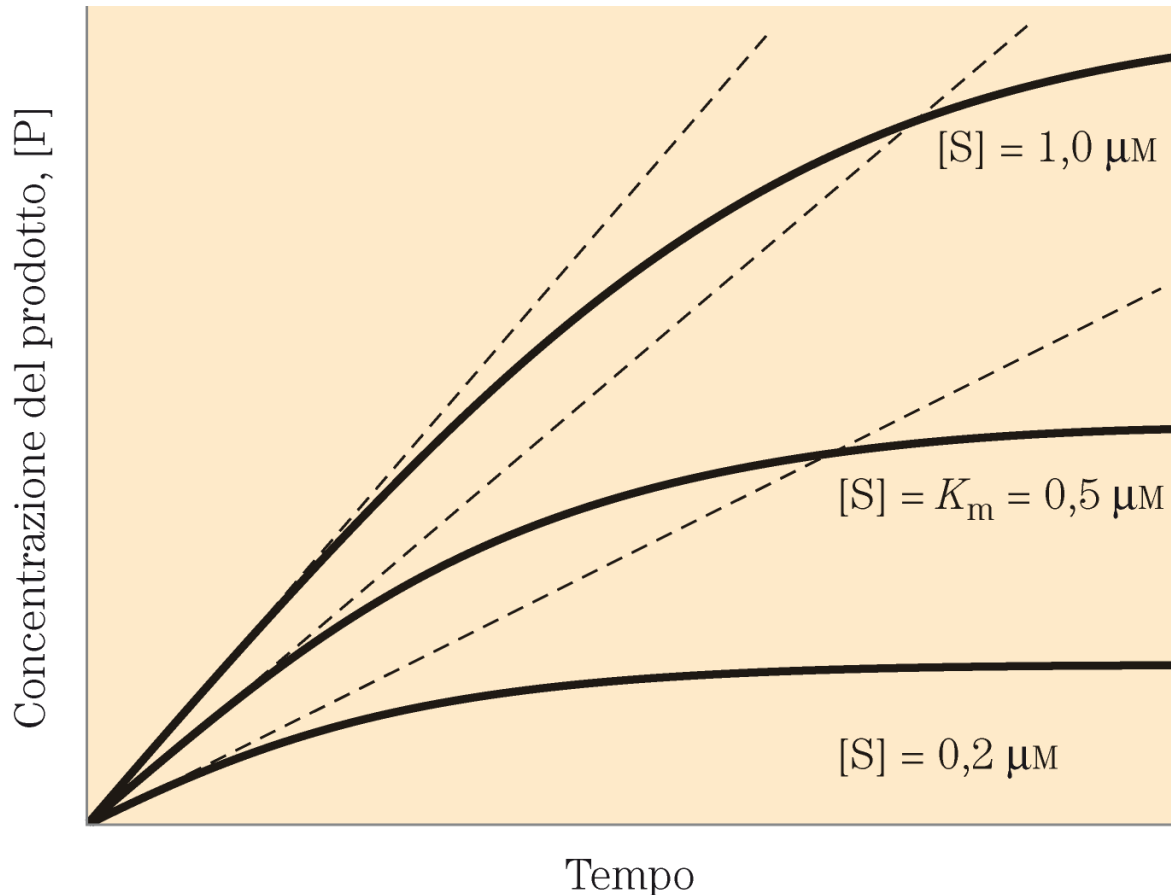
v = velocità iniziali di reazione



$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_1[S]$$

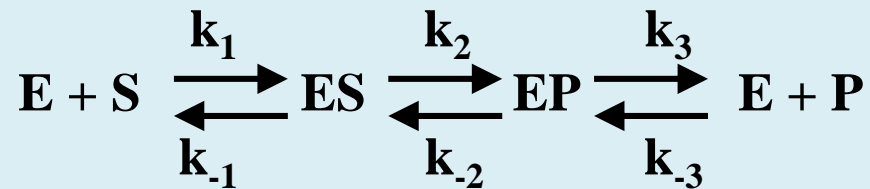
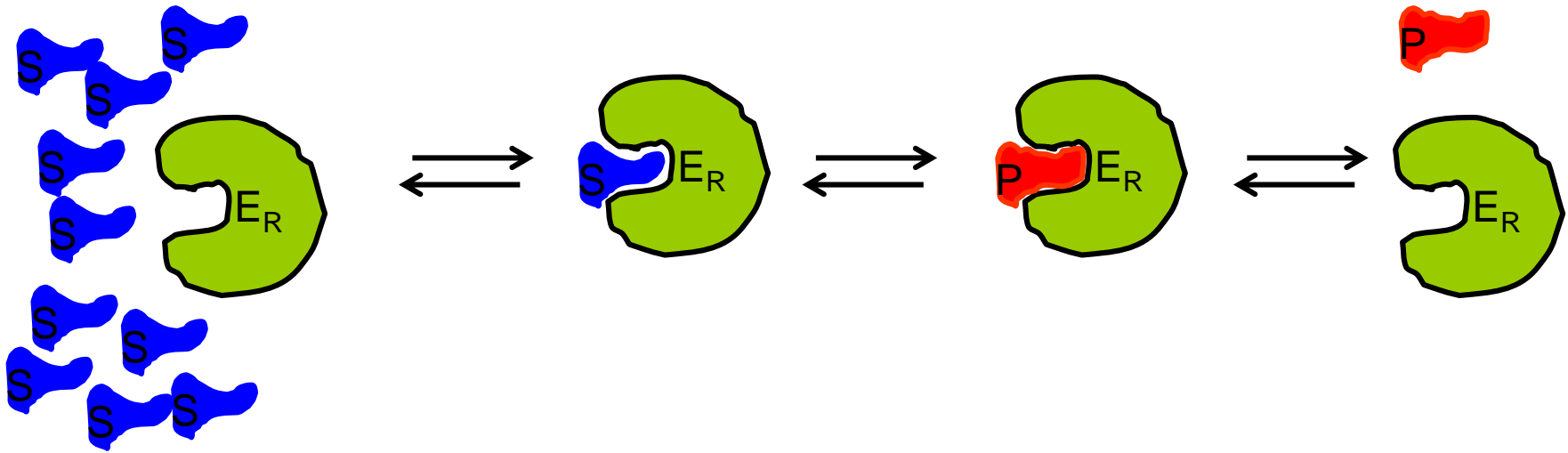
$$v = f([S])?$$

Velocità di una reazione



Velocità reazione è espressa come la variazione della concentrazione del substrato o del prodotto nell'unità di tempo

L'interazione enzima-substrato

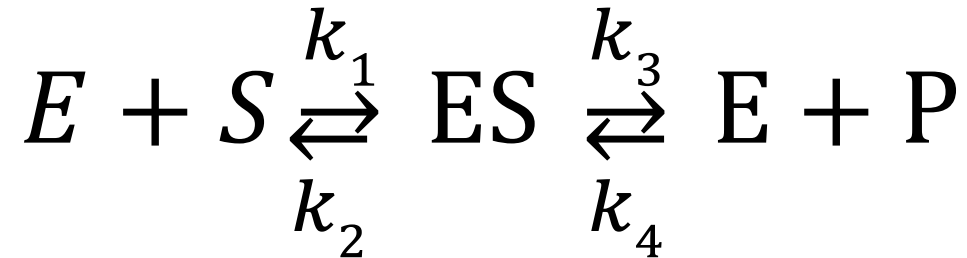


Sistema semplificato secondo Michaelis e Menten

- Sebbene la maggior parte degli enzimi catalizzino reazioni tra due substrati, dando luogo alla produzione di uno o due prodotti, la trattazione cinetica è semplificata considerando un solo substrato ed un prodotto.



Assunzioni iniziali: 1

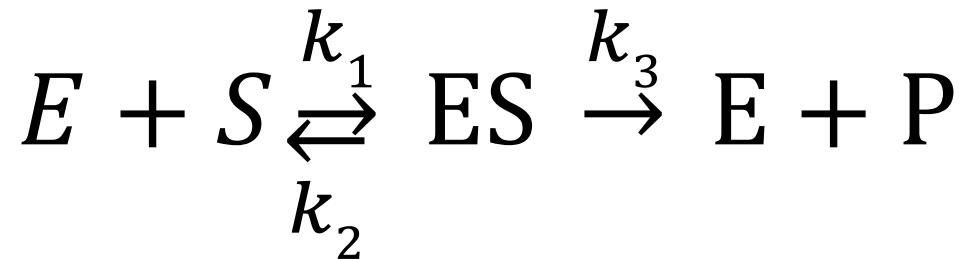


- l'**equilibrio rapido**: il complesso enzima-substrato è in equilibrio con l'enzima libero ed il substrato. Questa situazione di equilibrio non è disturbata dalla formazione del prodotto ($k_3 \ll k_2$). Ciò significa che l'associazione e la dissociazione tra l'enzima ed il substrato sono fenomeni molto rapidi.

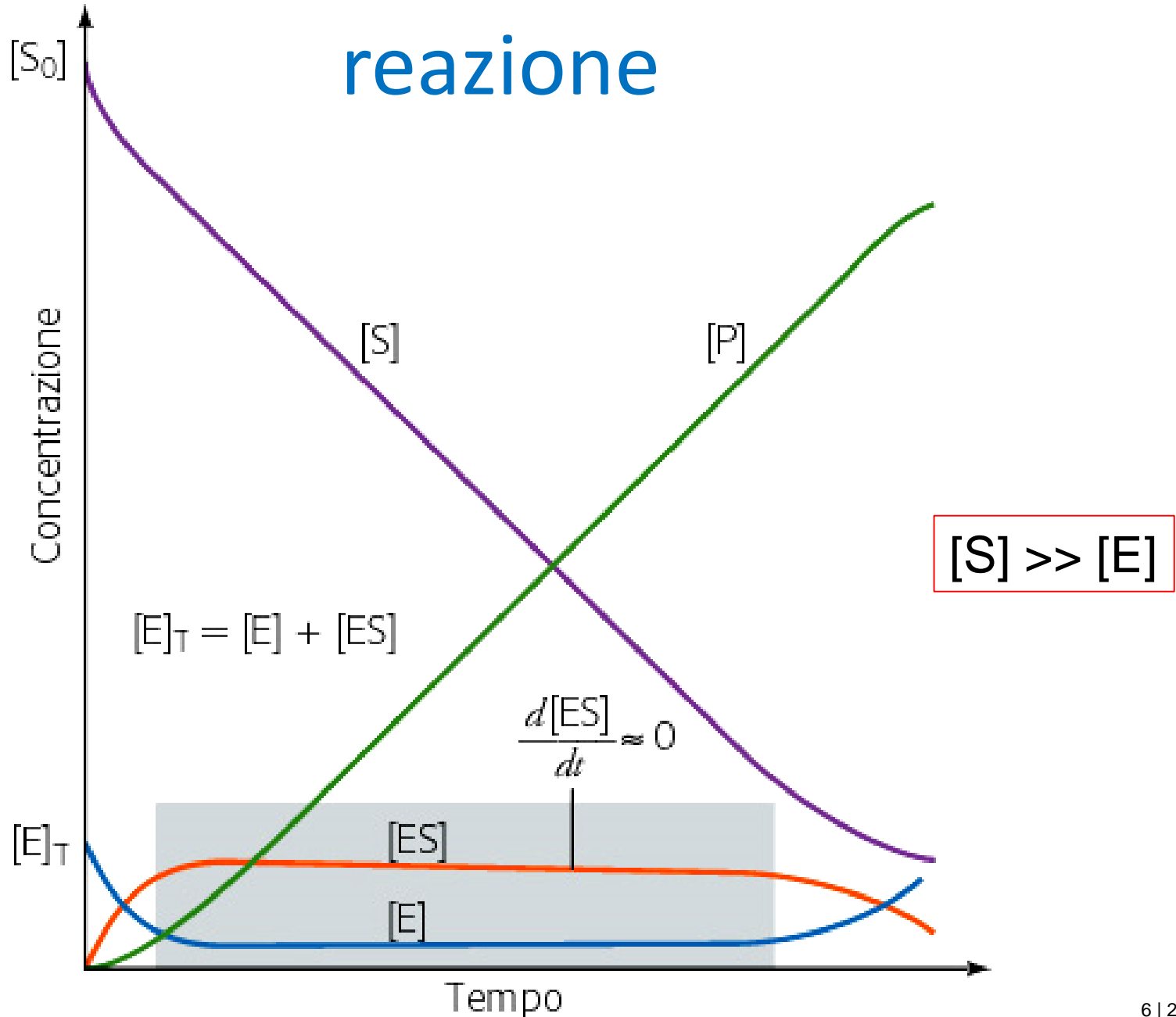
$$K_a = \frac{[ES]}{[E][S]}$$

Assunzioni iniziali: 2

- Lo **stato stazionario**: Nel corso della reazione il complesso enzima-substrato (ES) ha una concentrazione costante. ES si forma molto velocemente, appena viene rilasciato il prodotto. Ciò avviene quando la concentrazione del substrato è molto più elevata della concentrazione dell'enzima e quindi in condizioni di velocità iniziale. La velocità della reazione viene valutata per un periodo di tempo durante il quale la reazione inversa è fisicamente trascurabile ($k_4 = 0$).



Le concentrazioni nel corso della reazione



Cinetica enzimatica

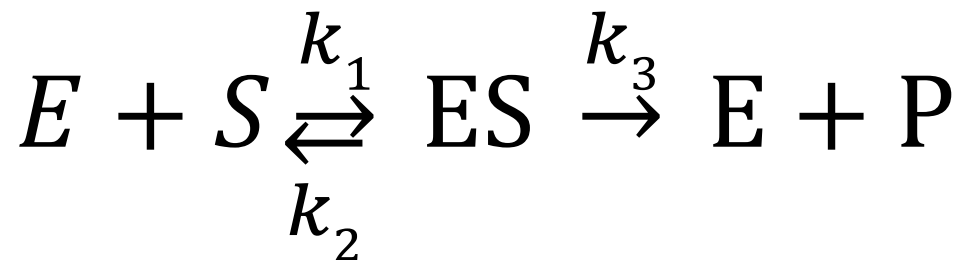


Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

La velocità di scomparsa del substrato (reagente) o la velocità di comparsa del prodotto è descritta dal modello di Michaelis e Menten.

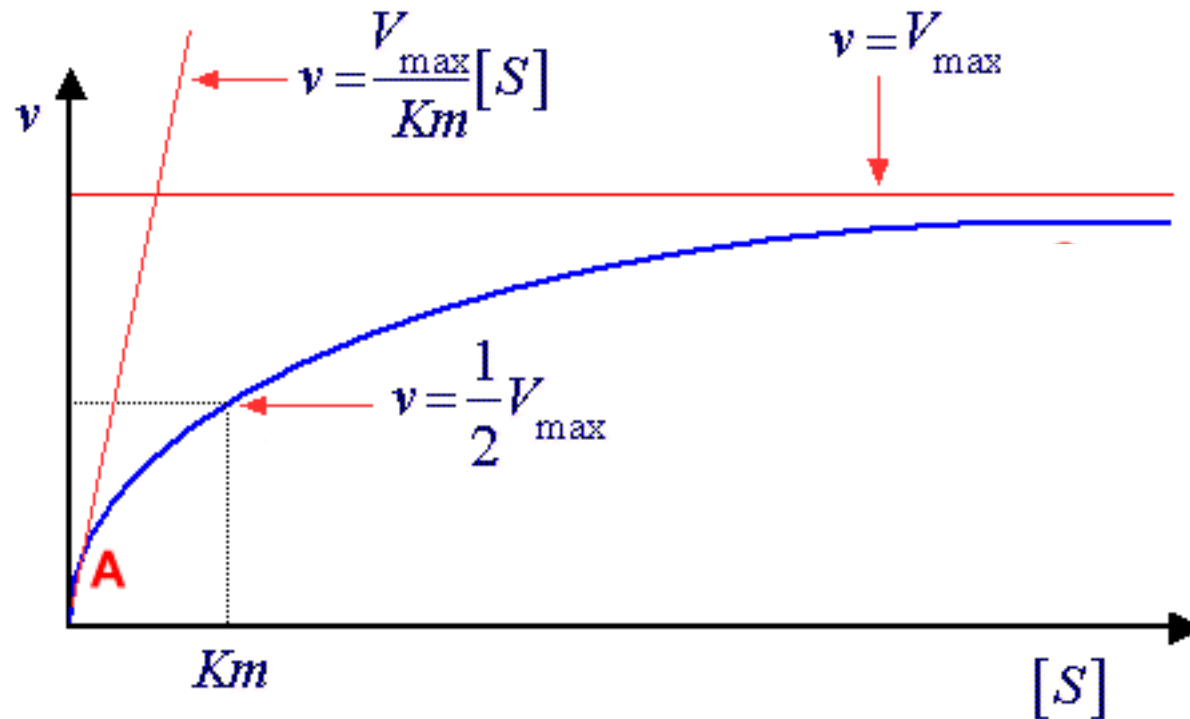


$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Cinetica enzimatica

- L'equazione di Michaelis-Menten descrive un'iperbole rettangolare avente come asintoto V_{\max} .

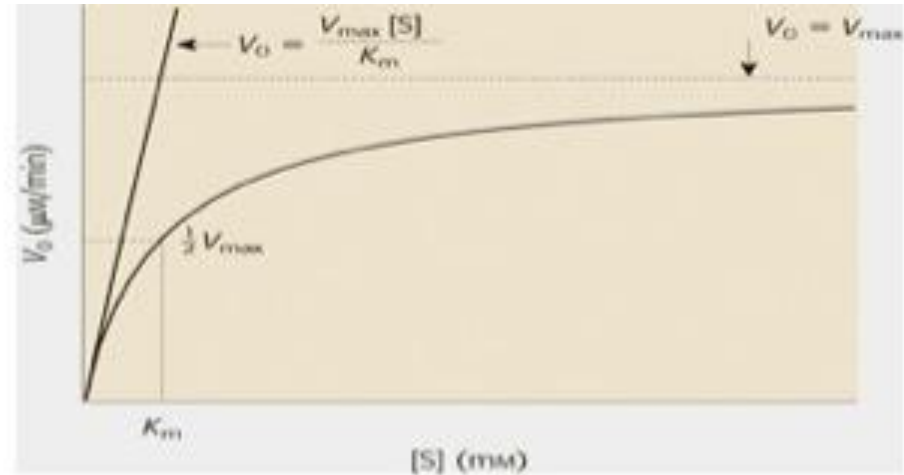
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



Cinetica enzimatica: casi limite

[E] = fissata

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$



[S] >>>> K_m

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S]}$$

$$v_0 = V_{\max}$$

cinetica di ordine 0
costante cinetica:
 $V_{\max} = k_{+2} \cdot [E]_t$

[S] <<<< K_m

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m}$$

cinetica di 1° ordine
costante cinetica: V_{\max}/K_m

[S] = K_m

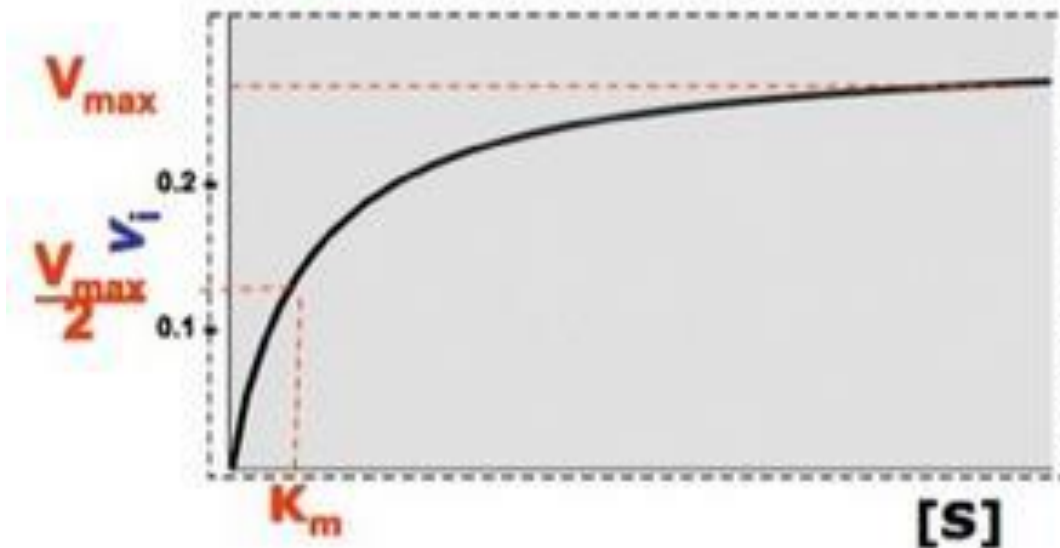
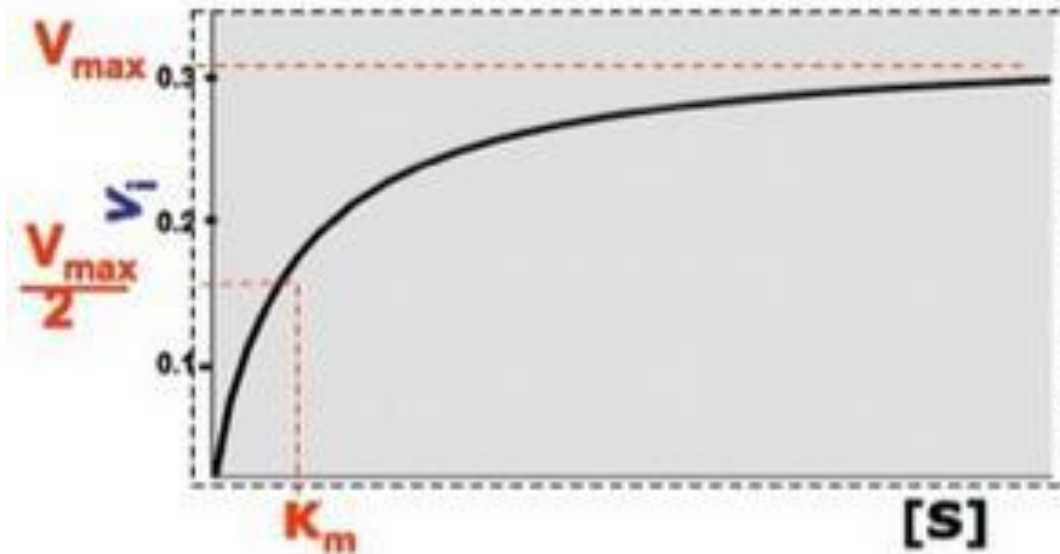
$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{2[S]}$$

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{2}$$

$K_m = [S]$ per cui v_0 è uguale a metà della velocità massima ed è espressa in molarità (M)

Cinetica enzimatica

La K_m è indipendente dalla concentrazione di enzima



Quantità diverse dello stesso E:

- V_{max} diverse
- K_m uguali

- Il valore di K_m : varia notevolmente da un enzima all'altro.
- Varia per substrati diversi dello stesso enzima
- Varia in funzione della temperatura e del pH

La velocità massima, V_{\max}

La velocità massima di un enzima, V_{\max} , rappresenta velocità raggiunta dall'enzima in condizioni di saturazione, quando un'ulteriore aggiunta di substrato non troverebbe più enzima libero disponibile. In soluzione l'enzima è tutto impegnato a catalizzare la reazione e risulta legato al substrato.

Dal punto di vista cinetico

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]$$

Dove k_{cat} è il numero di turnover.

il numero di turnover k_{cat} è il numero di molecole di substrato trasformate da 1 molecola di enzima ogni secondo.

Modello di Michaelis e Menten

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

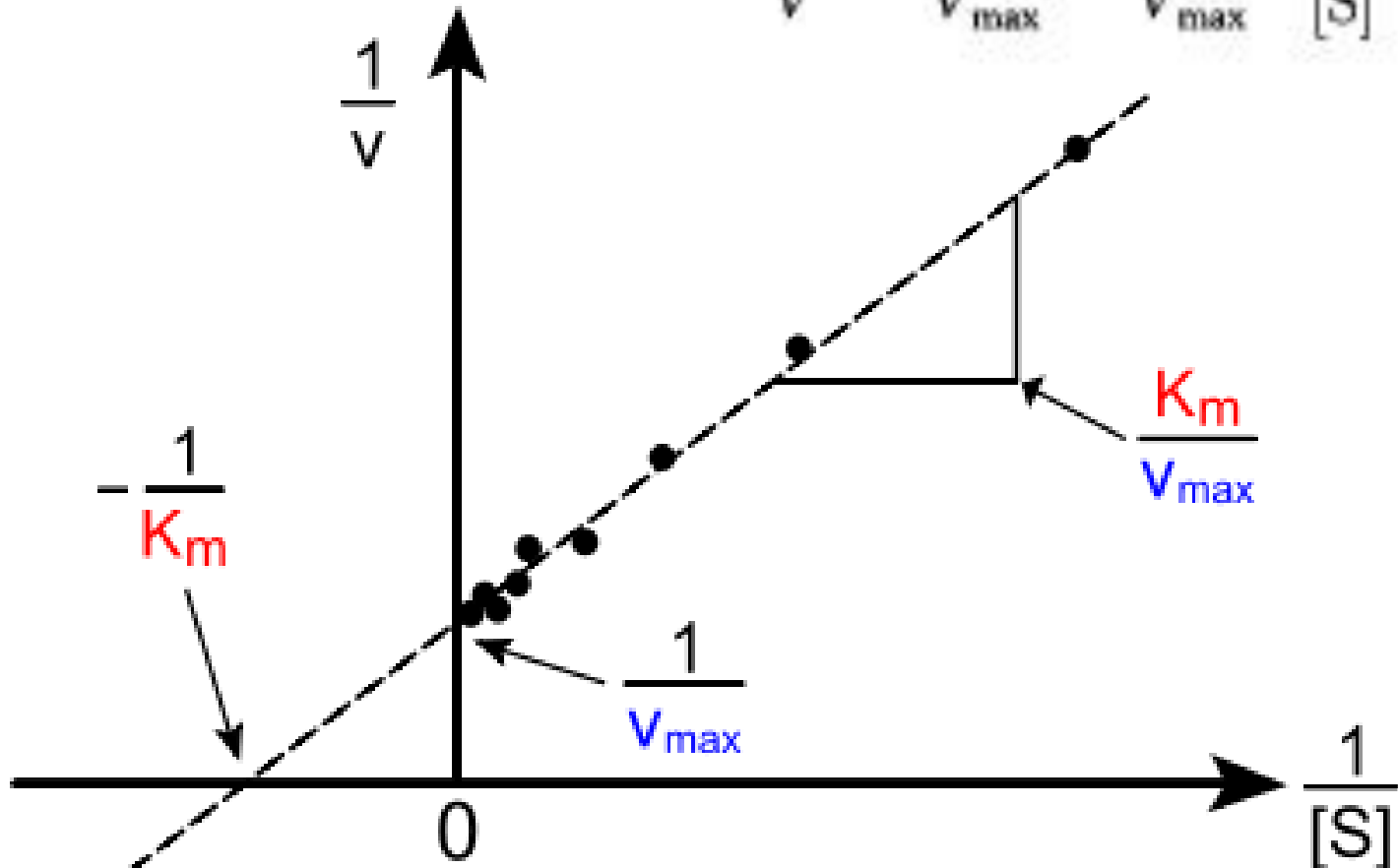
Modello complessivo

$$V = \frac{k_{cat} \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Diagramma di Lineweaver-Burk

Con una semplice conversione algebrica dell'equazione di Michaelis-Menten si ottiene la seguente espressione

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



Esempi

La velocità reazione enzimatica è influenzata da numerosi fattori:

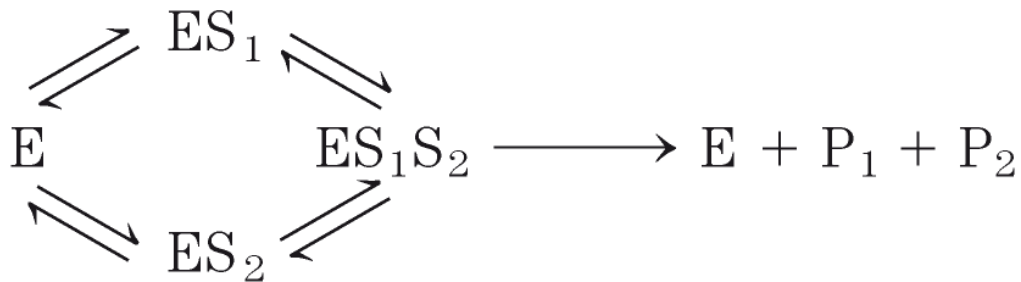
- Temperatura
- pH
- concentrazione dell'enzima
- concentrazione del substrato
- inibitori o attivatori

Enzyme	Substrate	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{sec}^{-1} M^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO ₂	1×10^6	0.012	8.3×10^7
	HCO ₃ ⁻	4×10^5	0.026	1.5×10^7
Catalase	H ₂ O ₂	4×10^7	1.1	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	800	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	900	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
Triosephosphate isomerase	Glyceraldehyde- 3-phosphate*	4.3×10^3	1.8×10^{-5}	2.4×10^8

Meccanismo d'azione degli enzimi

(a) Reazione enzimatica con formazione di un complesso ternario

Ordine casuale



Ordinata



(b) Reazione enzimatica senza formazione di un complesso ternario



Attivatori ed inibitori

Sostanze che diminuiscono l'attività enzimatica o rendono l'enzima inattivo sono detti **inibitori**.

Gli **inibitori** sono sostanze (in genere piccole molecole), che legandosi all'Enzima, ne riducono l'attività, modificando l'affinità per il substrato e/o la velocità di catalisi.

Gli **inibitori** si distinguono in:

reversibili: modificano le proprietà dell'enzima attraverso una interazione non covalente con esso

irreversibili: modificano le proprietà dell'enzima legandosi covalentemente ad esso (inattivatori o inibitori suicidi)

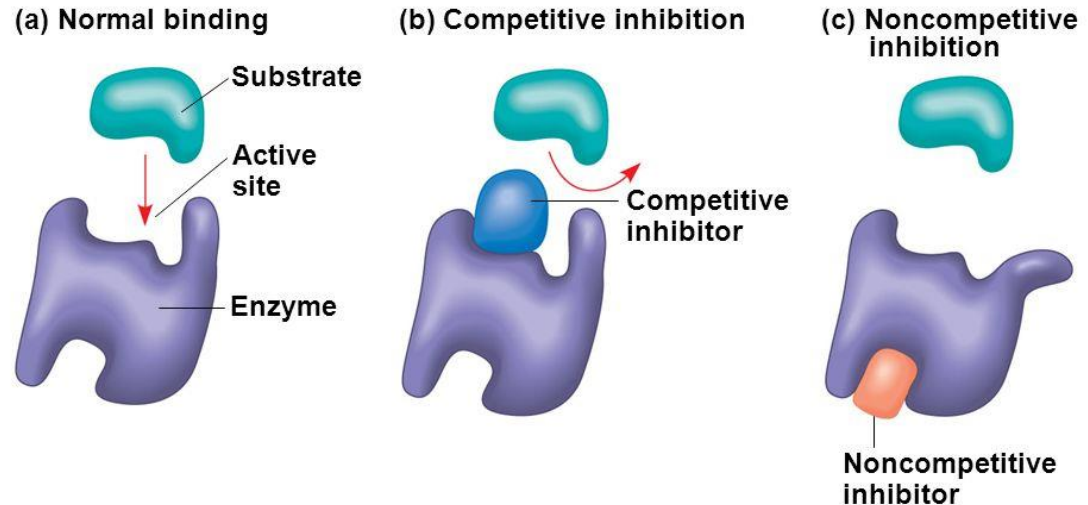
Inibizione enzimatica (reversibile)

Inibizione competitiva

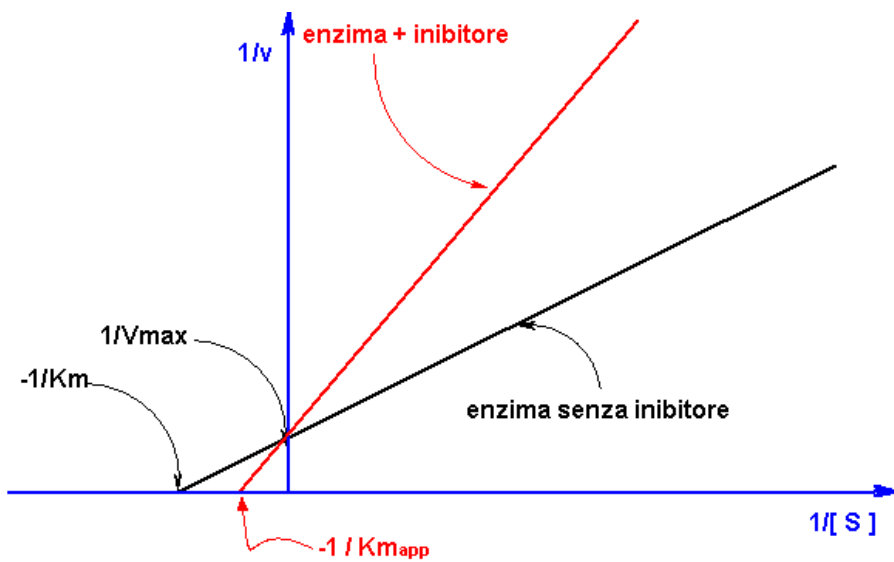
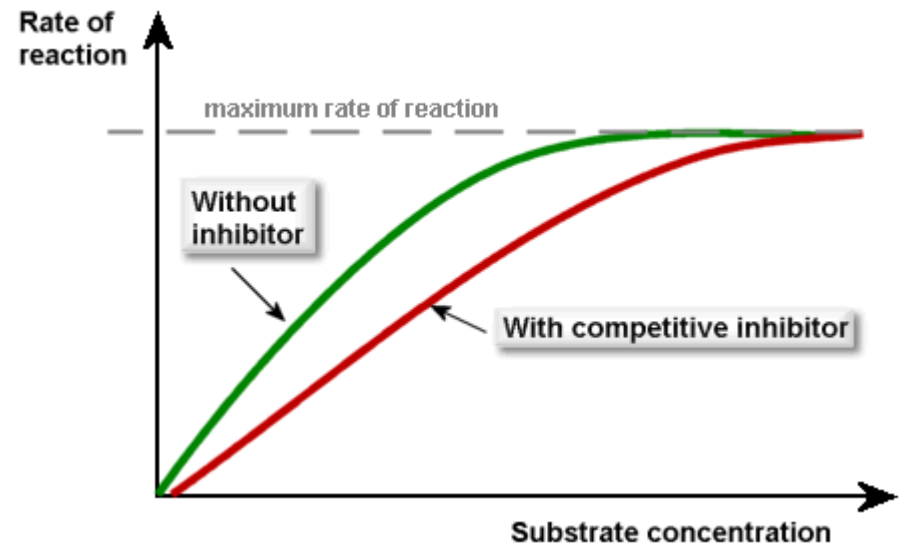
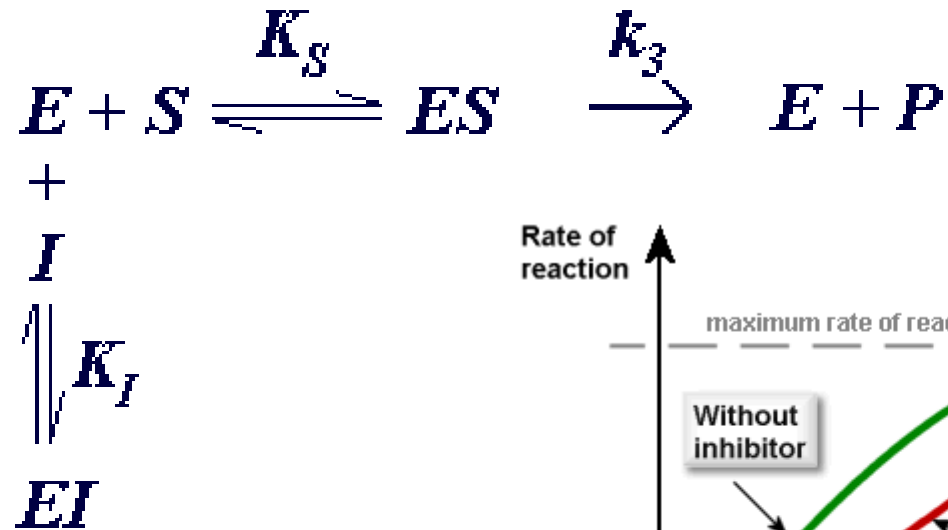
Inibitore compete con il substrato per il legame al sito attivo dell'enzima. Se si lega l'inibitore all'enzima la reazione non può avvenire. Aumenta la K_M perchè deve aumentare $[S]$ per raggiungere V_{max} , che non si modifica-

Inibizione non competitiva

Inibitore si lega ad un sito diverso dal substrato. Enzima è meno attivo anche se il substrato è presente. Non cambia la K_M , ma diminuisce la V_{max}

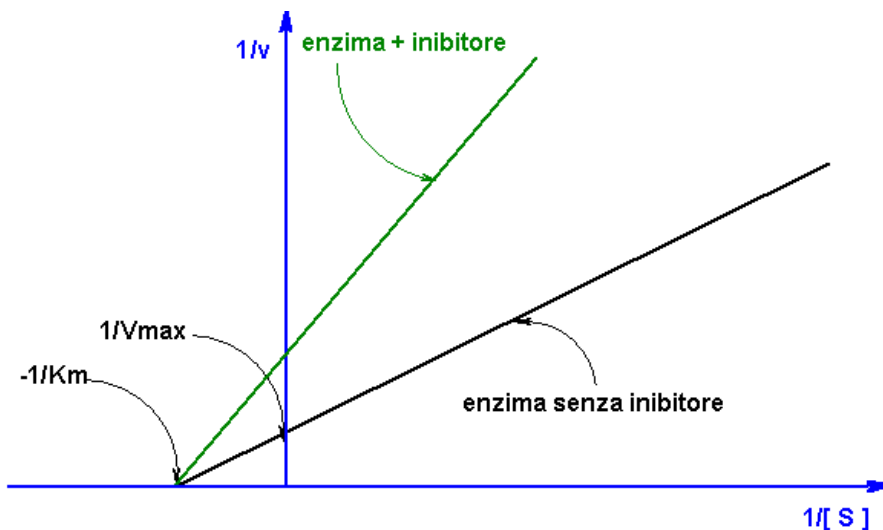
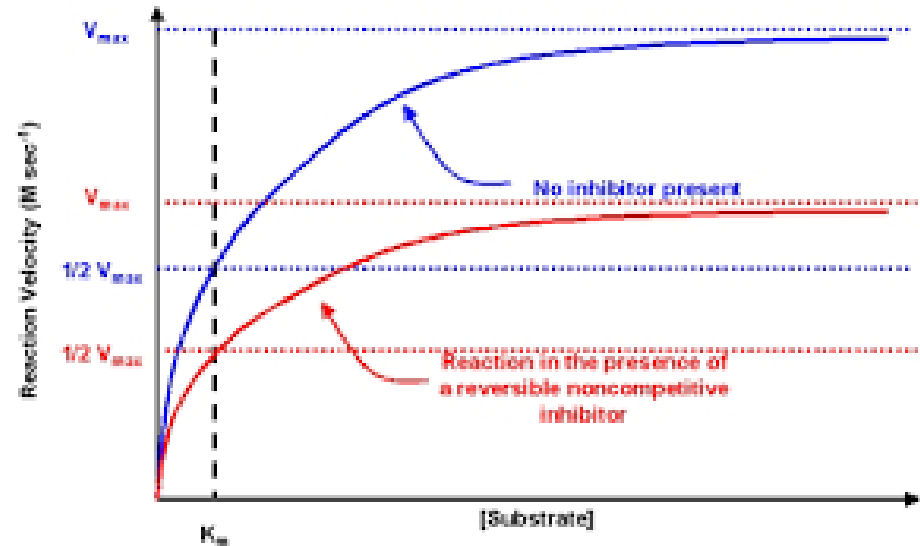
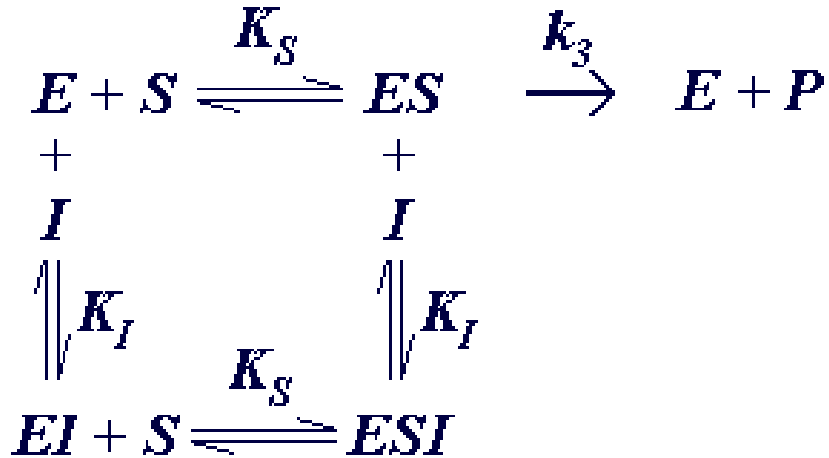


Inibizione competitiva



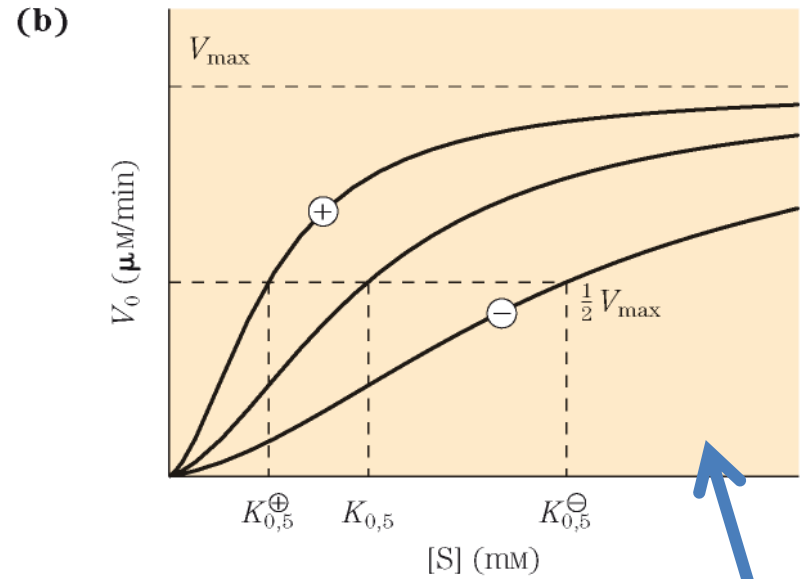
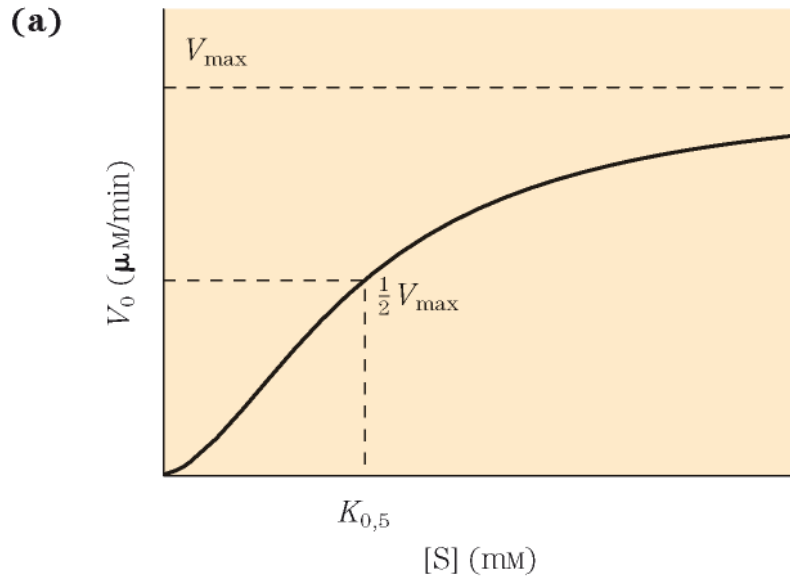
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

Inibizione non competitiva

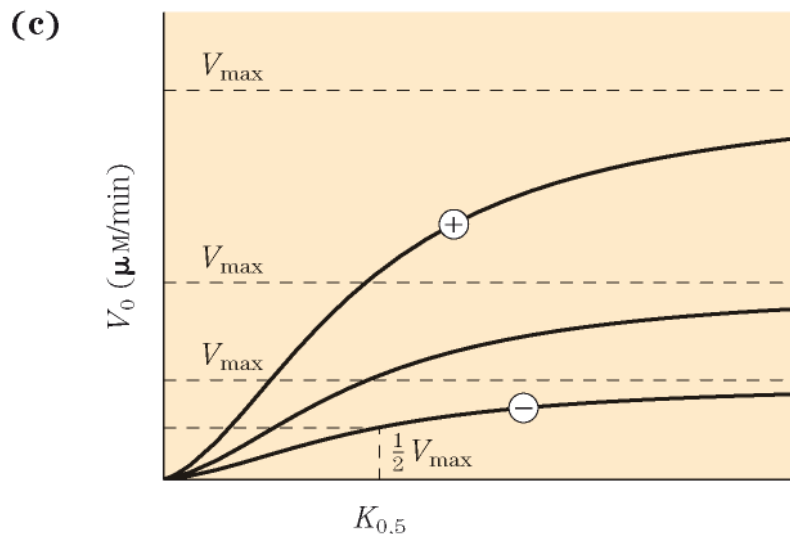


$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_S + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

Inibizione enzimatica

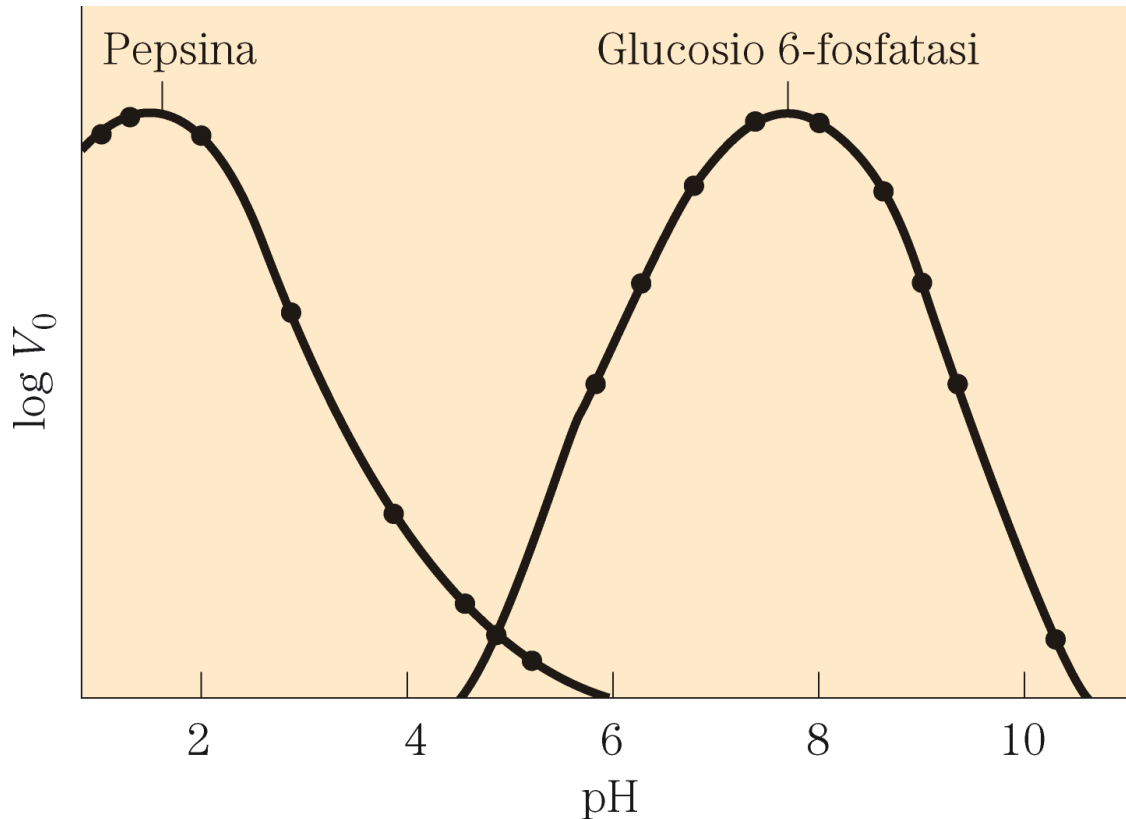


Inibizione competitiva



Inibizione non competitiva

Effetto del pH

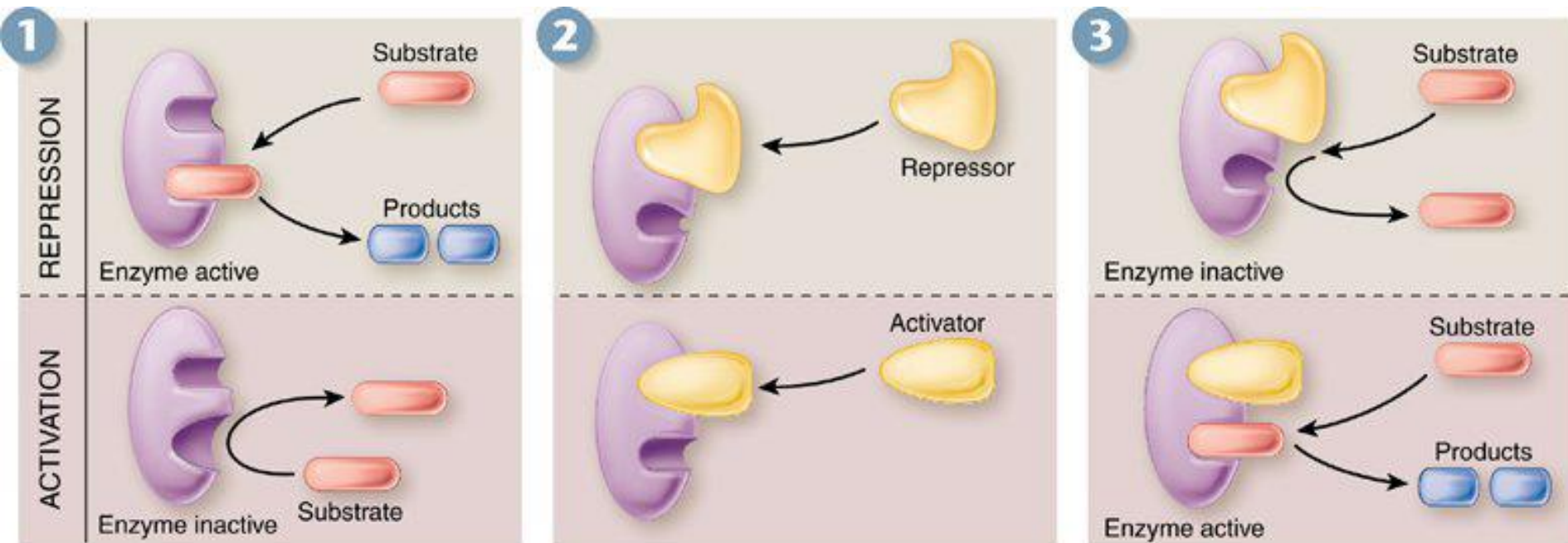


Effetto del pH

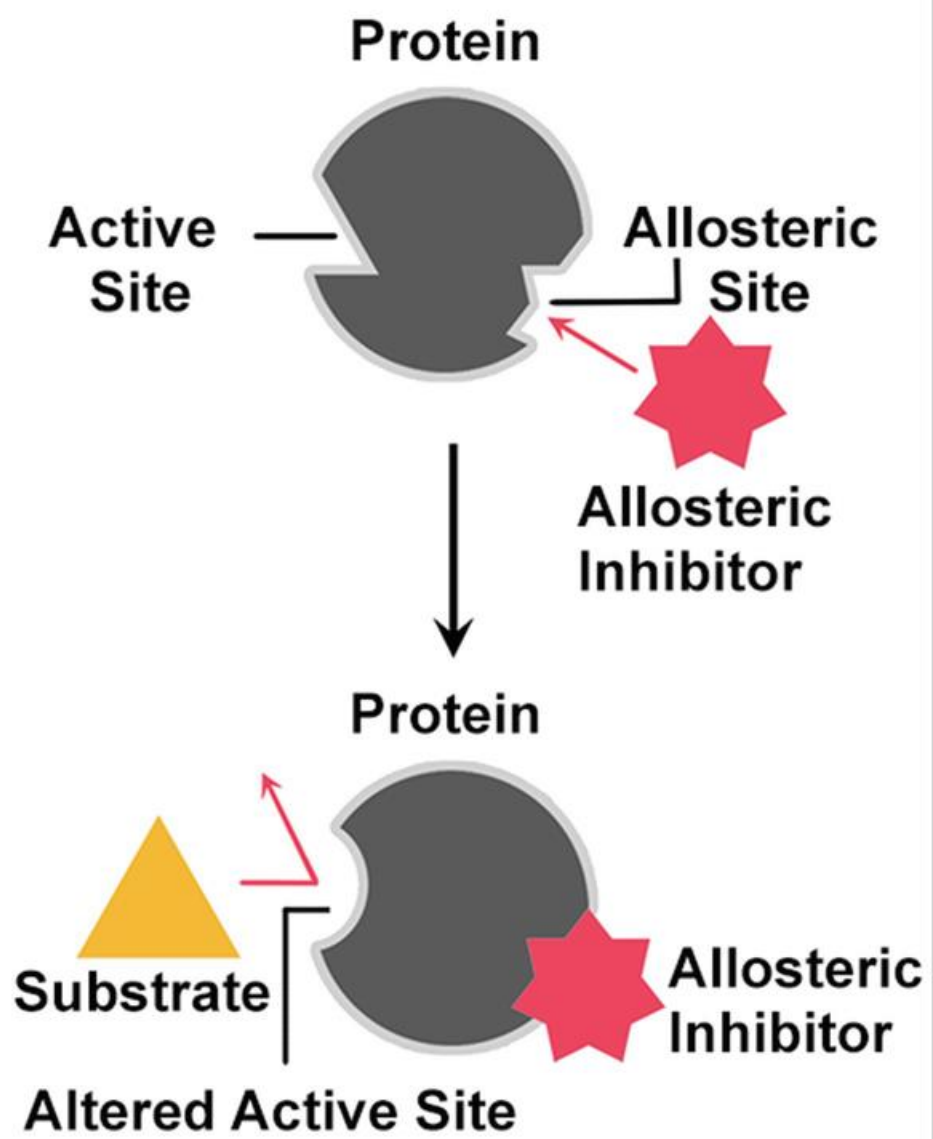
Il pH può far variare sia la K_m che la k_{cat} di un enzima attraverso la protonazione/deprotonazione di determinati residui amminoacidici (acidi o basici) che partecipano al meccanismo di catalisi. Ogni enzima comunque ha il suo caratteristico valore di pH a cui manifesta la sua massima attività

La regolazione allosterica

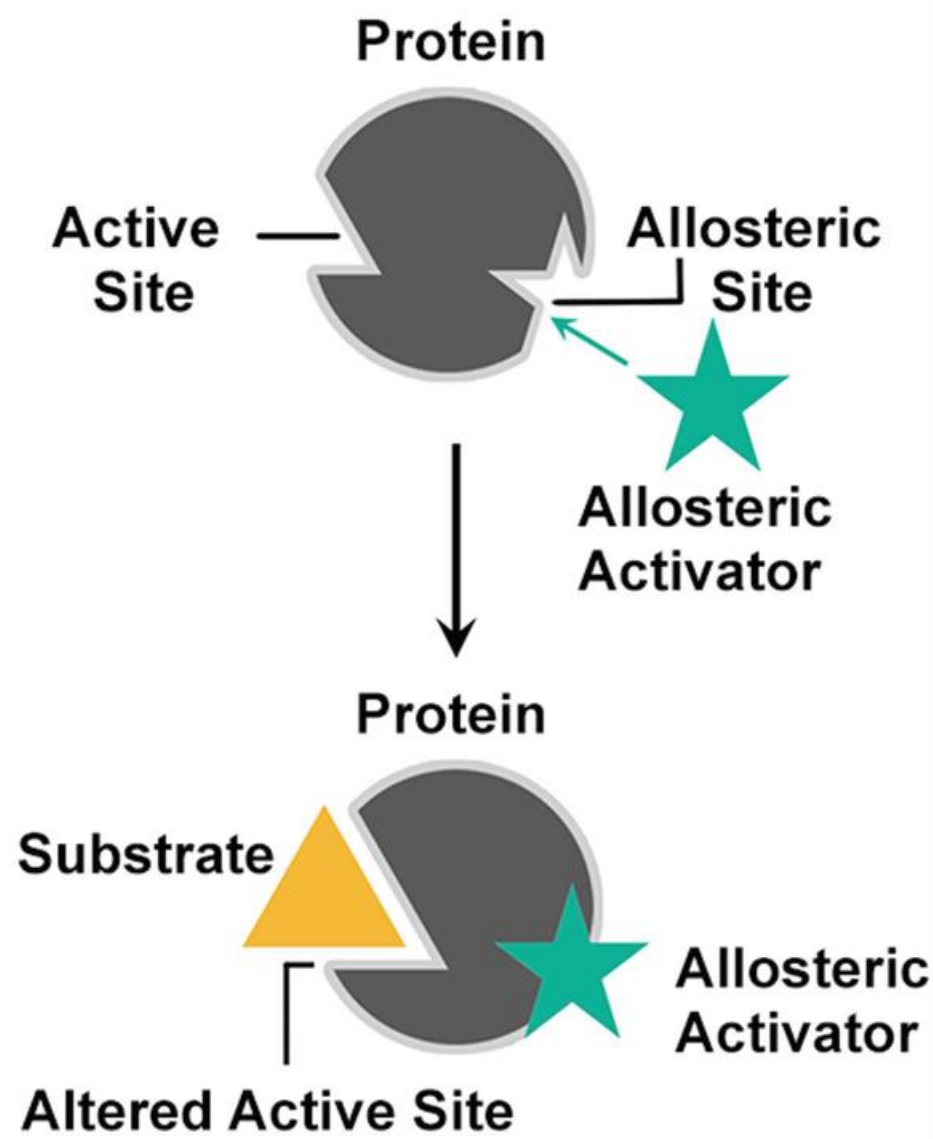
la **regolazione allosterica** è mediata da un *effettore*, che svolge tale funzione legandosi presso il *sito allosterico*. Il legame che unisce l'effettore è reversibile, non covalente e consente all'enzima di passare dalla forma inattiva a quella attiva.



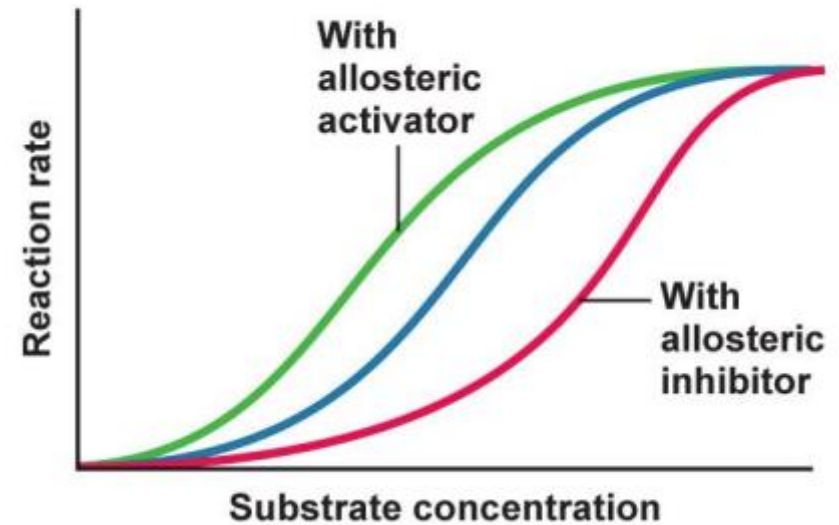
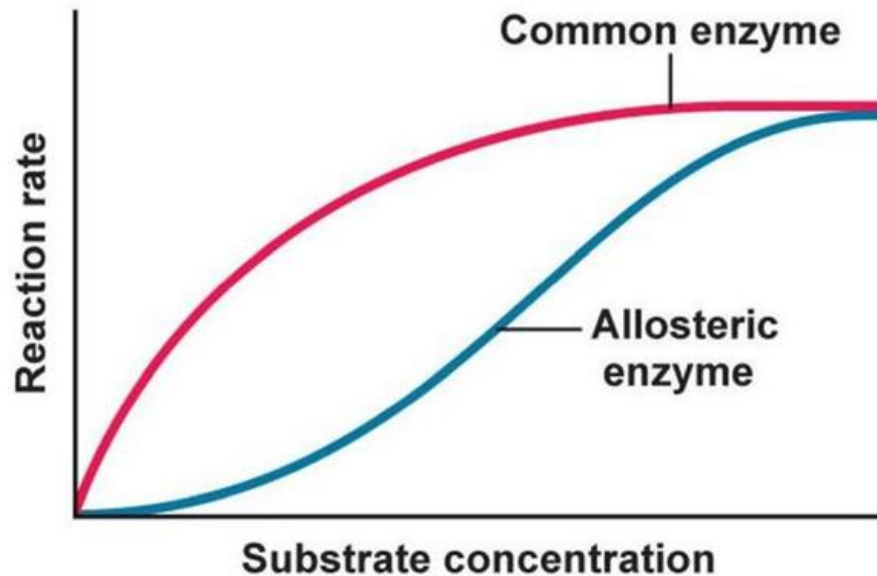
Negative Allosteric Modulation



Positive Allosteric Modulation



Confronto rispetto ad enzima non regolato mediante allosteria



Gli enzimi allosterici non seguono la cinetica di Michaelis-Menten: essi infatti hanno curve di velocità con andamento sigmoide, che riflettono la presenza di interazioni cooperative tra le diverse subunità dell'enzima stesso. Gli effettori allosterici non modificano la velocità massima, mentre modificano la K_M , riducendola in caso di effettore positivo o aumentandola, se l'effettore è negativo.