

ENZIMI

Gli **enzimi** sono catalizzatori delle reazioni biologiche. Essi aumentano la velocità delle reazioni senza influenzarne l'equilibrio.

Essere enzimi è la funzione più importante delle proteine, poiché mediano tutto ciò che la cellula fa. La prima cosa da capire in una reazione è dove la freccia è orientata; la seconda cosa che bisogna capire è quanto tempo impiegano i reagenti a trasformarsi nei prodotti.

Tutte le reazioni che avvengono nella cellula sono trasformazioni che avvengono lentamente, quindi nessuna reazione potrebbe avvenire da sola senza l'aiuto degli enzimi. Questo implica che tutte le reazioni all'interno della cellula hanno bisogno di un catalizzatore per far sì che diventino veloci.

Caratteristiche degli enzimi:

- Potere catalitico
- Specificità
- Regolazione

Potere catalitico

Si prenda un legame peptidico che si voglia rompere. Un legame peptidico è possibile che si rompa perché esso libera energia. Effettivamente il legame peptidico si rompe anche da solo, ma con una velocità di 10^{-16} secondi. Se invece c'è un enzima proteasi, la velocità della reazione diventa 10^2 , quindi, per secondo, questo enzima aiuta a rompere 100 legami peptidici. Una reazione che avveniva una volta ogni 1000 anni, in presenza dell'enzima, avviene 100 volte in un secondo.

Specificità

Un enzima aumenta la velocità di una particolare reazione e soltanto di quella particolare reazione. Per ogni tipo di reazione ci sarà un enzima diverso. Una proteasi che rompe un legame peptidico non rompe un altro tipo di legame, ma rompe solo il legame peptidico. Per ogni tipologia di reazione ci sono anche enzimi diversi in funzione delle molecole che vanno incontro alla reazione. Le proteasi rompono i legami peptidici e fanno solo quello, ma non qualsiasi legame peptidico, perché ogni proteasi rompe un determinato legame peptidico. Per esempio la tripsina rompe il legame peptidico quando c'è una lisina o un'arginina legata; la trombina rompe il legame peptidico soltanto tra residui di arginina e glicina.

Ogni reazione avrà un suo enzima specifico, che sarà unico per il substrato. La specificità si basa sul meccanismo di azione degli enzimi di interagire solo con quel substrato, e quindi la capacità dell'enzima di riconoscere alcuni gruppi funzionali sul substrato, farà sì che solo quel substrato verrà legato e non altri. Tanti enzimi distinguono molto bene gli stereoisomeri della stessa molecola.

Nomenclatura

Per le ragioni di specificità, il numero di enzimi è enorme e si pone il problema di dargli un nome. Esiste una nomenclatura ufficiale degli enzimi che si basa sul fatto che tutti gli enzimi sono suddivisi in classi, sottoclassi, famiglie... Le classi sono sei in funzione della tipologia di funzione che svolgono (es. proteasi, ossidoriduttasi). In genere un enzima viene identificato attraverso 4 diversi numeri: l'enzima nucleoside-monofosfato-chinasi catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato da un nucleotide trifosfato (es. ATP) a un nucleotide monofosfato (es. AMP). Questa banale reazione ha bisogno di un enzima e l'enzima che catalizza questa reazione si chiama 2.7.4.4 (nucleoside-monofosfato chinasi):

2: classe (transferasi)

7: sottoclasse (trasferisce gruppi fosfato)

4: sotto-sottoclasse (l'accettore è un altro gruppo fosfato)

4: membro specifico

Cofattori

Molto spesso l'enzima come proteina è sufficiente per catalizzare la reazione, in molti casi però tanti enzimi hanno bisogno di **cofattori** per svolgere l'attività. I cofattori sono gruppi chimici diversi dai residui amminoacidici che si legano agli enzimi e che servono per la reazione enzimatica. Questi gruppi chimici diversi dai residui amminoacidici sono i cofattori e possono essere degli ioni inorganici (caso più semplice) oppure molecole organiche derivate da vitamine come i **coenzimi** (caso più complesso). Le vitamine sono composti che dobbiamo introdurre con la dieta ed esistono due tipi di vitamine: vitamine liposolubili e vitamine idrosolubili, ma solo queste ultime servono a questo scopo, quindi vengono utilizzate come precursori per produrre coenzimi. Questi coenzimi sono legati alla parte proteica dell'enzima con interazioni deboli, ma in alcuni casi questi cofattori possono essere legati covalentemente agli enzimi; se sono legati covalentemente agli enzimi, prendono il nome di **gruppi prostetici** (es. il gruppo eme è un gruppo prostetico dell'emoglobina, anche se l'emoglobina non è un enzima).

Isoenzimi

Gli isoenzimi sono enzimi diversi che catalizzano la stessa reazione, ma presentano parametri cinetici diversi e spesso diversa distribuzione tissutale.

Molto spesso hanno una distribuzione tissutale diversa, cioè che una certa reazione che nel fegato è catalizzata da un enzima, nel muscolo, la stessa reazione, è catalizzata da un enzima diverso.

Del **lattico deidrogenasi** esistono cinque isoenzimi diversi. Nel cuore è presente l'isoenzima-1, il 2 e il 3 sono poco espressi, mentre il 4 e il 5 non sono espressi; nel muscolo e nel fegato si trova l'isoenzima-5, che nel cuore non c'è.

Se l'attività del lattico deidrogenasi è ovunque, l'isoenzima-1 è un marcatore del cuore, mentre il 5 è un marcatore del fegato e del muscolo. Quindi se c'è lattico deidrogenasi nel sangue, si può capire da quale tessuto esso è uscito, dopo aver identificato quale dei 5 isoenzimi è.

Questi isoenzimi sono diversi anche per parametri cinetici, catalizzano la stessa reazione, ma con una cinetica diversa. Questo conferisce ai diversi tessuti che hanno questi isoenzimi meccanismi regolatori diversi.

FUNZIONAMENTO DEGLI ENZIMI

L'equilibrio di una reazione è indipendente dall'enzima.

Una reazione avviene spontaneamente quando il contenuto di energia del prodotto è inferiore a quello dei reagenti (substrato). Ogni molecola è associata a una certa quantità di energia (**energia di Gibbs: G**) ed è definita come la capacità di compiere un lavoro, ma nella cellula va aggiunto che il lavoro deve avvenire a pressione e temperatura costante.

Il substrato P avrà il suo contenuto di energia, S avrà il suo contenuto di energia, allora quando S si trasforma in P, avremo una variazione di energia libera che è data dalla differenza tra l'energia del prodotto e l'energia del substrato: $G_p - G_s = \Delta G$.

- ΔG è minore di 0 quando l'energia libera del prodotto è inferiore all'energia libera del substrato: in questo caso la reazione procede da S verso P, liberando energia (reazione esoergonica). La reazione avviene spontaneamente quando è esoergonica.

- ΔG è maggiore di 0 se l'energia libera del prodotto è superiore all'energia libera del substrato: in questo caso la reazione procede da P verso S, necessitando energia (reazione endoergonica). La reazione non avviene spontaneamente quando è endoergonica.

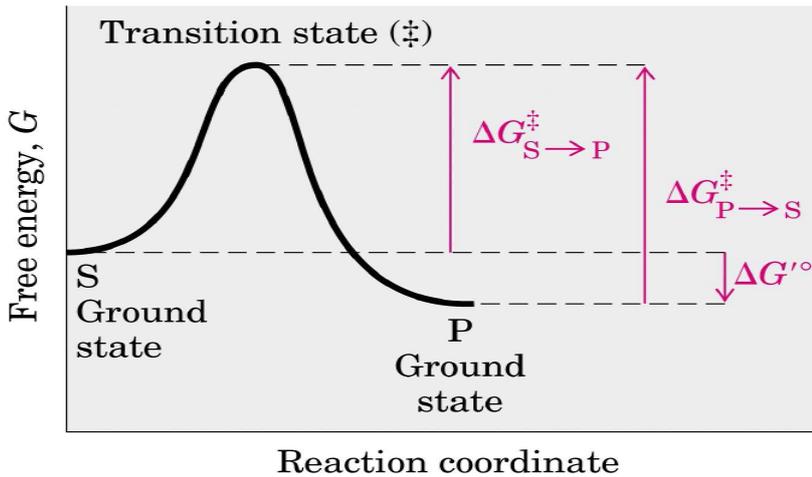
- ΔG è uguale a 0 quando la reazione è all'equilibrio e non ha tendenza a spostarsi verso i prodotti o verso i reagenti.

ΔG è una grandezza che non è una costante, quindi si modifica all'interno della reazione.

ΔG è uguale alla differenza tra la variazione dell'entalpia e la variazione dell'entropia di un sistema:

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S$$

I chimici hanno introdotto ΔG in condizioni standard ed è indicato con ΔG^0 (ΔG a 25°C, 1 atm, 1M).

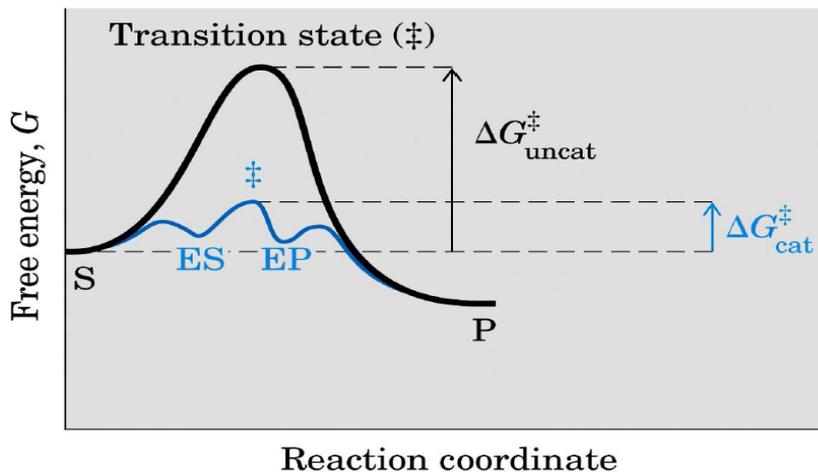


I biochimici hanno pensato che fosse impossibile una concentrazione di 1M per ogni molecola nella cellula, perché le concentrazioni di reagenti e prodotti cambiano continuamente, quindi $\Delta G^{o'}$ è ΔG in condizioni standard biologiche (ΔG a pH=7 e in ambiente acquoso). Non si può misurare la costante di equilibrio reale, perché non si può essere certi della concentrazione reale dei

reagenti nella reazione stessa.

ΔG negativo ci dice che la reazione è spontanea, ma non fa riferimento alla velocità della reazione. Il diagramma della coordinata della reazione mette in relazione l'energia libera con le coordinate della reazione. L'energia di S deve prima aumentare fino a un valore superiore a quello posseduto, per poi rilasciare tutta l'energia e scendere al livello energetico di P. Il picco più alto della curva prende il nome di **energia di attivazione** e rappresenta lo stato energetico più elevato. La parte di curva tra il livello energetico di S e quello di P, con all'interno il picco dell'energia di attivazione, prende il nome di **stato di transizione**. Quello che determina la velocità di una reazione non è $\Delta G^{o'}$, ma è ΔG di transizione.

Se l'energia di attivazione è alta, significa che la reazione avverrà molto lentamente. Una reazione si rende più veloce riducendo l'energia di attivazione e uno dei sistemi più utilizzati in chimica è scaldare, perché il calore fornisce energia a S e si raggiunge l'energia necessaria a raggiungere lo stato di transizione, riducendo l'energia di attivazione. Gli enzimi aumentano la velocità di una reazione riducendo l'energia di attivazione, facendo trasformare S in P, in un microambiente controllato, cambiando il modo in cui avviene la reazione. In presenza di un enzima, succede che il



substrato S si lega prima all'enzima, formando un complesso E-S (enzima + substrato) e in questo ambiente ristretto, esso si può più velocemente trasformare in P perché ora l'energia di attivazione è minore.

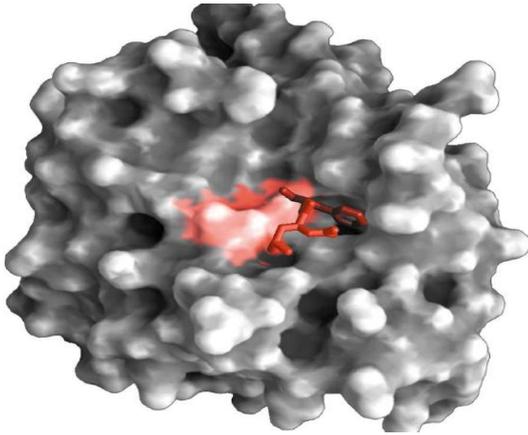
$E + S \rightarrow ES \rightarrow EP \rightarrow E + P$
L'enzima non si modifica al termine della reazione, ma può modificarsi durante la reazione, però alla fine di essa, avrà la

stessa composizione iniziale.

La cosa importante è che l'enzima si lega al substrato, si lega sempre attraverso interazioni deboli (es. ponti H), magari numerose interazioni deboli. Ogni reazione debole ha il suo contenuto di energia e, al momento in cui si creano queste relazioni deboli, esse fanno abbassare l'energia di attivazione. L'energia è fornita dalle interazioni tra l'enzima e il substrato.

Substrato

L'enzima si lega in un punto preciso del substrato. Il sito dell'enzima dove si va a legare il substrato si chiama **sito attivo** (entità tridimensionale dell'enzima). Il substrato è costituito da aminoacidi che non necessariamente sono legati l'uno all'altro. Questi aminoacidi vengono a rivolgere tutte le



catene laterali verso l'esterno. L'enzima ha una particolare struttura primaria e, se si sostituisce un solo amminoacido del sito attivo con un altro, il sito attivo smette di funzionare e l'enzima non funziona più.

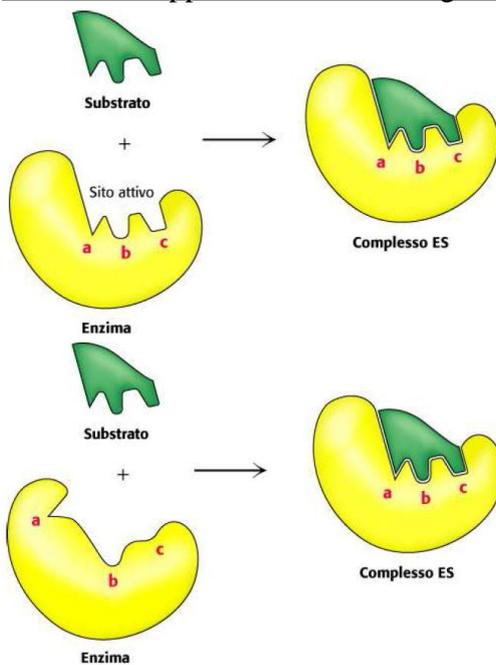
Un'altra caratteristica del sito attivo è che raramente si trova esposto sulla superficie di una proteina globulare. Molto spesso è all'interno di una nicchia, o un'ansa, ed è importante, perché così facendo il substrato si libera dal guscio di solvatazione per legarsi. Viene quindi esclusa l'acqua che impedirebbe il legame.

Il substrato lega l'enzima al sito attivo attraverso legami deboli, mai legami covalenti, anche perché dev'essere

un'interazione reversibile. Sono queste interazioni che forniscono l'energia necessaria per abbassare l'energia di attivazione. E' proprio questo tipo di interazione che sta alla specificità di un enzima; riesce solo con quel substrato lì ad instaurare un'interazione.

L'attività catalitica di un enzima è molto dipendente dal pH. La capacità di un enzima di catalizzare una reazione si basa sulla sua capacità di fare interazioni deboli con il substrato. Lo stato di attivazione varia al variare del pH. Se si abbassa il pH, si va a protonare dei gruppi carichi e quindi il sito attivo non funziona più. Il pH a cui funziona un enzima è detto **pH ottimale**.

Modelli di rappresentazione del legame tra enzima e substrato



La specificità degli enzimi è così elevata che per un dato tempo si è pensato che ci fosse una perfetta complementarità tra il substrato e il sito attivo dell'enzima. Questo ha portato a lavorare al modello della chiave-serratura, per cui c'è una complementarità perfetta tra la chiave e la serratura.

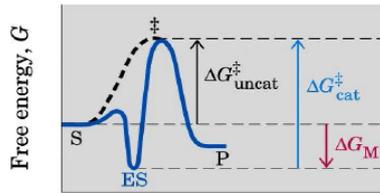
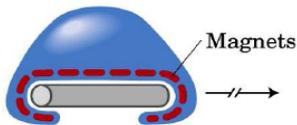
L'enzima ha la massima affinità col substrato, quindi nel momento in cui lo lega, esso non si stacca e si lega perfettamente.

Il modello *chiave-serratura* di Fisher (prima immagine) è stato modificato da Koshland nel modello dell'*adattamento indotto* (seconda immagine). La complementarità non è perfetta per questo modello e, soltanto dopo che il substrato si è legato, l'enzima si modifica di conformazione e assume una conformazione perfettamente complementare al substrato. Questa è una differenza concettuale molto importante, perché non è il substrato che ha una massima affinità con l'enzima, ma il

contrario. Sarà proprio la forma nello stato di transizione quella che avrà la massima complementarità.

Esempio della bacchetta di ferro

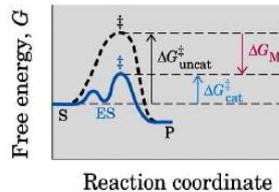
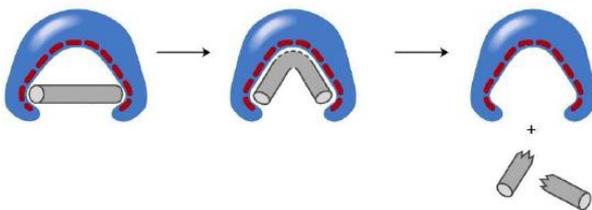
(b) Enzyme complementary to substrate



La rottura di una bacchetta di ferro non libera energia perché è una reazione endoergonica. Per rompersi c'è bisogno di piegarla perché viene spesa energia.

Questo equivale allo stato di transizione, quindi il momento in cui il substrato libera energia per poi rilasciarla. L'enzima *metallasi* (non esiste, è solo un esempio) lega la bacchetta di metallo (come se l'enzima fosse un magnete), se valesse il modello della *chiave-serratura*, si dovrebbe immaginare che quest'enzima, senza cambiare conformazione, rompa la bacchetta.

(c) Enzyme complementary to transition state



Se si ha un enzima in cui il magnete è disposto ad arco con alcuni magneti che permettono l'entrata del substrato e che cominciano a legarlo. Questi magneti per interagire con il substrato, prendono una conformazione diversa in

modo tale che il magnete si rompe. Questo avviene nel modello di Koshland.

STRATEGIE CATALITICHE ENZIMATICHE

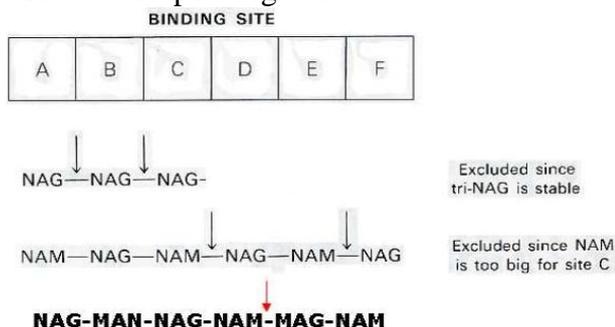
L'energia di legame, cioè l'energia libera rilasciata durante la formazione di interazioni deboli e l'enzima, consente di ridurre l'energia di attivazione.

Esistono diversi tipi di catalisi:

- **Catalisi acido-base:** il sito attivo si comporta da acido o da base, cedendo o strappando un protone.
- **Catalisi covalente:** durante la reazione enzimatica si forma un intermedio che è transitoriamente legato all'enzima in modo covalente.
- **Catalisi con ioni metallici**
- **Catalisi per prossimità:** il substrato si posiziona direttamente vicino al sito attivo con il gruppo chimico interessato alla reazione.
- **Catalisi per distorsione:** molto spesso il substrato dev'essere un po' distorto per entrare nel sito attivo, tirando diversi legami. Quindi il substrato si modifica nella conformazione.

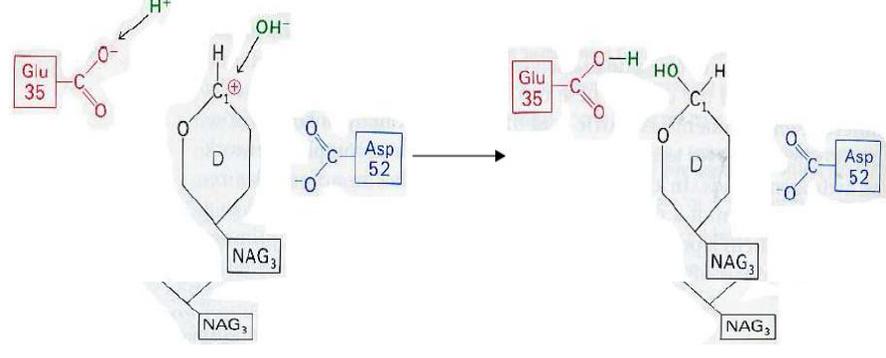
Catalisi acido-base

Il **lisozima** è un enzima che rientra nella catalisi acido-base. Ha 129 amminoacidi e PM=14.2kDa. Il lisozima ha un'attività battericida (è presente anche nella nostra saliva) ed è in grado di idrolizzare l'oligosaccaride che costituisce la parete dei batteri. I batteri hanno bisogno di un rivestimento esterno che dia rigidità alla cellula, perché altrimenti la cellula farebbe lisi. L'oligosaccaride della parete batterica (proteoglicano) è costituito da due zuccheri che si ripetono: il **NAG** (N-acetilglucosammina) e il **NAM** (N-acetilmuramico). Questi zuccheri sono simili tra loro e il lisozima rompe il legame tra un NAM e un NAG.



Sei residui, costituiti da un'alternanza di NAM-NAG, si legano al sito attivo in siti di legame indicate con le lettere da A a F. Dai modelli strutturali si è stabilito che la catena laterale del NAM non può mai legarsi ai siti C e E, riducendo i siti di legame del NAM esclusivamente a B, D, e F. Solo uno dei legami glicosidici viene scisso, quello tra il residuo MUR del sito D e del residuo

NAG del dito E. I residui catalitici essenziali del sito attivo sono gli amminoacidi Glu³⁵ e Asp⁵².



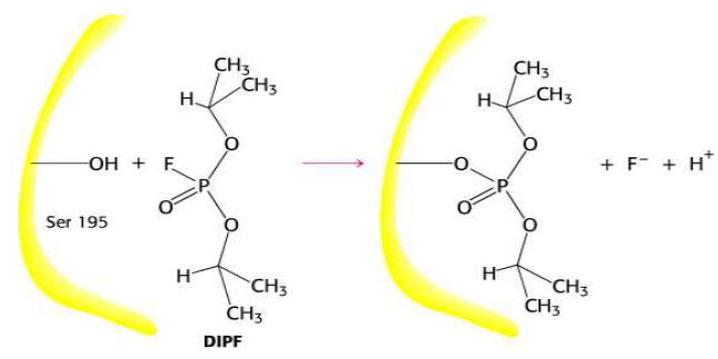
Affinché il NAM possa alloggiare nel sito D, deve cambiare conformazione (da sedia a semi-sedia). Le catene laterali di due residui (Glu e Asp) nel sito attivo sono disposti ai lati opposti del legame glicosidico da idrolizzare e sono inserite in ambienti profondamente

diversi. L'aspartico, che è in ambiente polare, gli consente di ionizzarsi; il glutammico è in ambiente non polare, quindi è favorito il suo essere in forma protonata. In quel microambiente, nonostante il gruppo carbossilico abbia un pK_a basso, è favorita la sua interazione.

L'ossigeno, col doppietto libero, stacca l'idrogeno al glutammico protonato. Di conseguenza l'ossigeno deve rinunciare un legame e rinuncia al legame col sito D. In questo modo, il sito D rimane carico positivamente (carbocatione), che è una specie instabile, però in questo contesto si può formare perché, la formazione di questo carbocatione, associata alla conformazione a semi-sedia, fa sì che l'aspartico carico negativamente stabilizzi il carbocatione. La presenza del meccanismo per stabilizzare il carbocatione rende più stabile il processo. Il glutammico, rimasto deprotonato, prende un protone dall'acqua, liberando un ossidrilico che andrà a legarsi al carbocatione. In questo modo il sito D lascia il sito attivo.

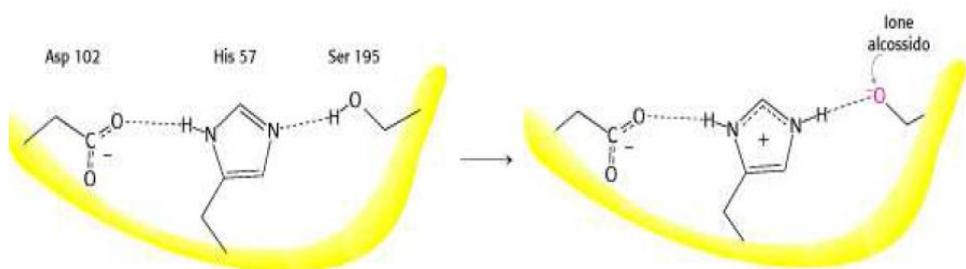
Catalisi covalente

La **chimotripsina** rompe legami peptidici tra amminoacidi idrofobici. La chimotripsina è definita come **serin-preotasi**, quindi vuole dire che contiene un residuo di serina importante per la catalisi. Questo residuo è stato identificato attraverso lo studio di un inibitore irreversibile di questo enzima, il **DIPF** (diisopropilfosfofluoridato). Questa molecola è una tossina che si lega covalentemente al



sito attivo dell'enzima (si lega alla serina), quindi forma un legame difficile da rompere. Il **DIPF** è un importante veleno neurotossico e ha quest'azione sia sulla chimotripsina che su altri enzimi. Quindi blocca l'azione degli enzimi, anche di enzimi esterasi e non solo proteasi, e una delle esterasi che blocca è l'**acetilcolina esterasi** (neurotrasmettitore che serve per la contrazione muscolare). Tanti veleni

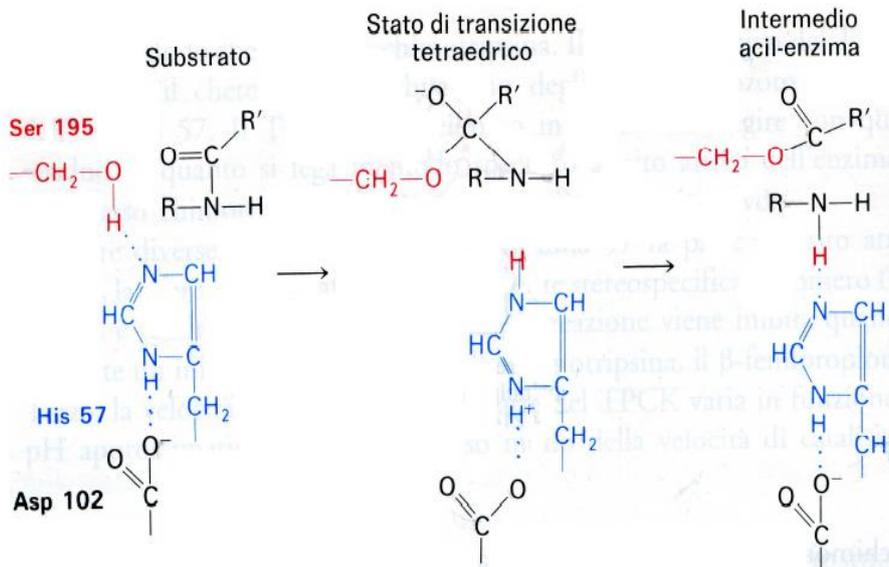
chimici funzionano in questo modo (es. sarin → gas nervino tossico). L'avvelenamento è causato dalla stimolazione continua.



Dopo aver preso nota della posizione della serina (posizione 195) nel sito attivo, è stato scoperto che sono presenti anche l'istidina-57 e l'aspartico-102. Quindi

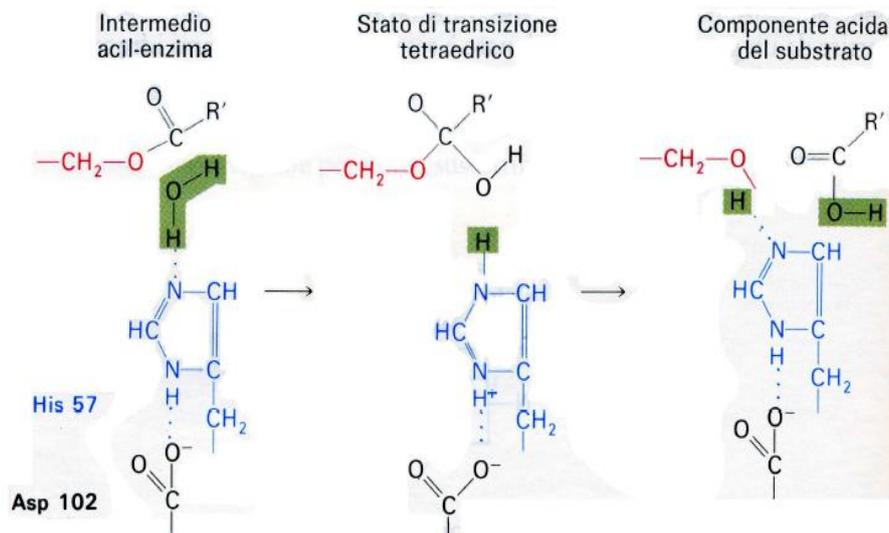
nel sito attivo sono presenti anche amminoacidi lontani l'uno dall'altro. Questi tre amminoacidi nel sito attivo sono disposti in un modo ben preciso, perché le catene laterali sono ben allineate e interagiscono tra di loro tramite ponti H. Gli amminoacidi così disposti prendono il nome di **triade**

catalitica (Asp-His-Ser). Questa disposizione è importante perché bisogna immaginare che sia una sorta di risonanza sempre presente, quindi la si può estremizzare in due modi, in base a una delocalizzazione di cariche.



Grazie alla **risonanza delle cariche**, la serina si può trovare anche con l'ossigeno carico negativamente e con l'idrogeno che va all'azoto dell'istidina. In questo modo, se ne sito attivo c'è un polipeptide, la serina può promuovere un attacco nucleofilo sul carbonio carbossilico (gli elettroni del carbonio cercano di andare all'ossigeno che è più elettronegativo). Gli elettroni dell'ossigeno della

serina formano un legame con il carbonio del gruppo carbossilico del polipeptide, il carbonio non può formare 5 legami e sposta il doppietto di un legame all'ossigeno del gruppo carbossilico, che diventa negativo. Ora questo carbonio è legato a 4 sostituenti e assume una **conformazione tetraedrica**, mentre prima con il doppio legame con l'ossigeno era sullo stesso piano dell'azoto. Questo cambio di conformazione porta a che, mentre prima l'ossigeno era in una certa direzione (**il carbonio era planare**), ora



che il carbonio è tetraedrico, l'ossigeno cambia di posizione. L'assunzione della conformazione tetraedrica del carbonio sposta l'ossigeno in una tasca che è detta **tasca dell'ossanione**. E' una tasca, un sito, in cui ci sono residui di lisina e arginina carichi positivamente che alloggianno l'ossigeno carico negativamente e lo stabilizzando interagendo

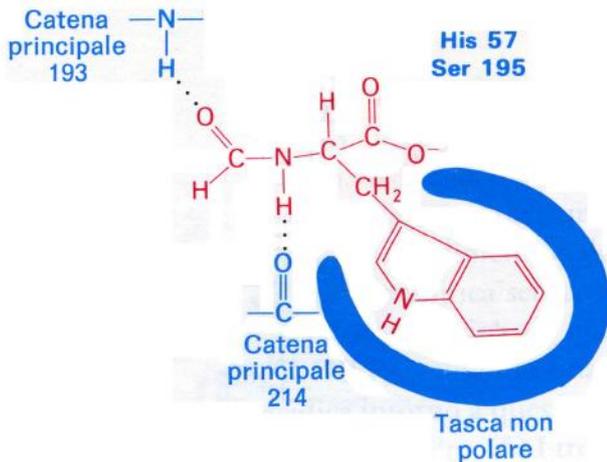
con questo.

La triade catalitica continua a funzionare, quindi vengono continuamente scambiati protoni per risonanza. Ora la serina non è soggetta a prendere il protone dall'istidina (ora la serina è stabile e legata al carbonio del gruppo carbossilico). L'istidina deve per forza donare il protone e lo dona all'azoto del gruppo amminico legato a quello carbossilico (gruppo amminico che forma il legame peptidico con il gruppo carbossilico). L'azoto rompe il legame con il carbonio per rimanere stabile, a questo punto il carbonio manca di elettroni (forma 3 legami) e per riequilibrare si riprende i due elettroni sull'ossigeno, l'ossigeno da cui aveva rotto il doppio legame precedentemente. In questo modo si è rotto il legame peptidico. La parte del polipeptide con l'azoto è libera e se ne va, ma la parte con il carbonio rimane attaccata all'ossigeno della serina.

A questo punto interviene una molecola d'acqua che fa rompere il legame tra l'ossigeno della serina e carbonio carbossilico, in modo tale che si riformi il residuo di serina vero e proprio (quindi che si riformi OH) e che venga liberato anche il gruppo carbossilico.

L'azoto prende un protone dell'acqua, quindi rimane libero un OH⁻ e questo OH⁻ può attaccare nucleofilamente il carbonio, quindi si forma un intermedio tetraedrico (5 legami), il doppietto di uno dei legami che formano il doppio legame con l'ossigeno va all'ossigeno e in questo modo OH⁻ si può attaccare.

La risonanza di cariche continua nella triade amminoacidica. Ora non si ha più l'azoto del polipeptide che può prendersi un protone, ma lo riprende la serina, riformando il gruppo OH. Ora si rompe il legame con il carbonio e si libera il gruppo carbossilico.



Tantissime proteasi sono serin-proteasi, ma proteasi diverse e serin-proteasi diverse hanno specificità diverse. La specificità è dovuta alla presenza nel sito attivo di una particolare tasca con residui amminoacidici particolari. Affinché il legame peptidico, da rotto, venga posizionato correttamente alla serina che dovrà promuovere l'attacco nucleofilo, il residuo amminoacidico deve avere una conformazione tale da entrare nella tasca. A seconda delle caratteristiche amminoacidiche della tasca, alcuni amminoacidi possono entrare e altri no.

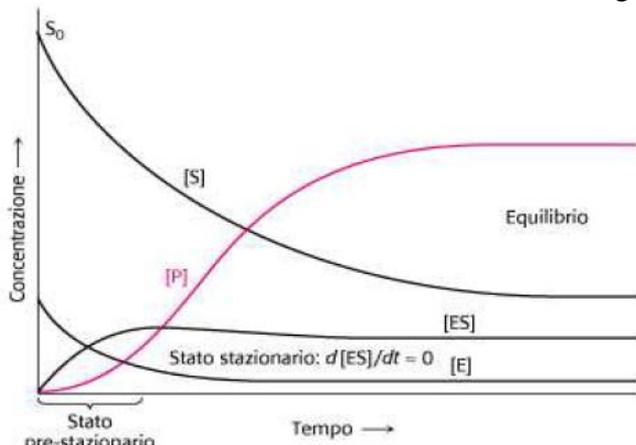
Nella chimotripsina la tasca è composta da

amminoacidi idrofobici, quindi solo residui idrofobici possono alloggiare nella tasca, quindi il legame peptidico si porrebbe nel modo giusto per poter essere rotto dalla chimotripsina.

Tutte le serin-proteasi hanno il sito attivo con la triade catalitica Asp-His-Ser, anche se questi residui possono avere posizioni differenti.

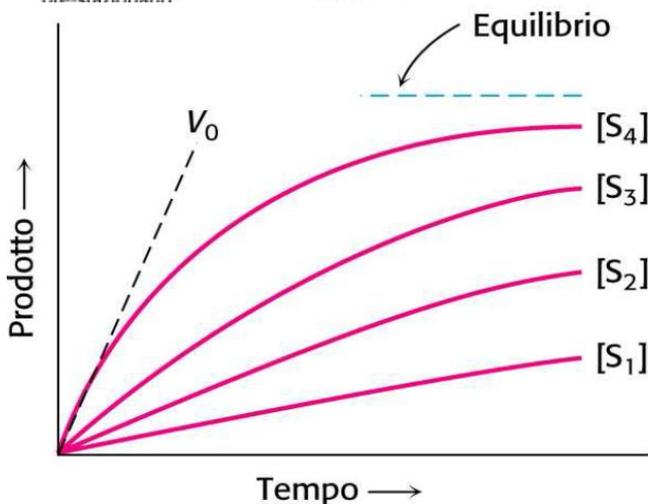
CINETICA ENZIMATICA

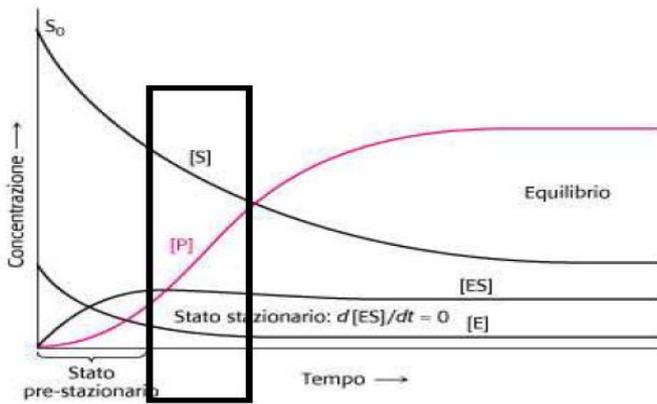
La cinetica enzimatica è la **velocità di lavoro** degli enzimi.



Gli studi di cinetica enzimatica sono stati fatti per la fase della reazione che prende il nome di **stato stazionario**. Esso è un piccolo intervallo temporale della reazione in cui il sistema, quello che succede, è informata abbastanza semplificata.

Man mano che la reazione procede, la concentrazione di substrato diminuisce, quella del prodotto aumenta con ritardo, la concentrazione di enzima libero tende a diminuire, la concentrazione di enzima con il substrato tende ad aumentare e poi a rimanere costante. Lo stato stazionario è la zona in cui la concentrazione di S e di E sono uguali, ma il substrato si sta trasformando in prodotto e l'accumulo di prodotto porta la reazione in un solo senso (per la legge dell'azione di massa). Prendiamo l'enzima e il substrato, li mescoliamo e si vede quanto prodotto si forma. Quando tutto il substrato è diventato prodotto, la curva rimane costante. Se si aumenta la

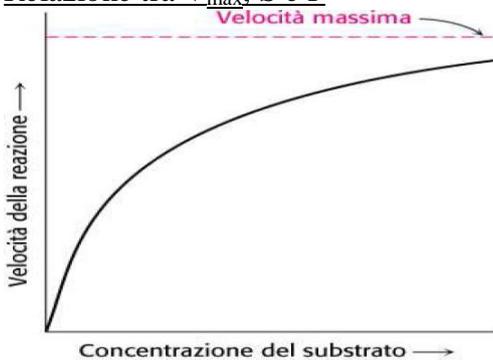




concentrazione di substrato, la quantità di prodotto finale che avrò sarà superiore al caso precedente. L'aumento di prodotto è ovvio, ma è meno ovvia la ripidità delle curve. Proviamo a vedere qual è la quantità di prodotto che si forma per unità di tempo. Quindi si va a misurare la velocità con cui sono stati generati i prodotti per unità di tempo. Si nota che se si ha più substrato viene generato più prodotto per unità di tempo, quindi aumenta la velocità della reazione quando si

aumenta il substrato. La velocità con cui un enzima trasforma il substrato in prodotto dipende dalla quantità di substrato, quindi più substrato ha a disposizione, più veloce sarà la reazione.

Relazione tra V_{max} , S e P



La differenza di prodotto generato per unità di tempo a quantità di substrato differente, è la velocità di una reazione, ma più precisamente di velocità iniziale di una reazione (tangente della curva). La velocità iniziale arriva a un punto in cui non aumenta più (velocità massima).

Arrivati alla velocità massima, si produce ancora prodotto, ma la velocità con cui questo avviene rimane sempre costante. La velocità iniziale della reazione aumenta fino a un certo punto, perché è indicazione di un processo di saturazione. Tutto l'enzima presente è saturo, quindi tutto

è legato al substrato.

- Se ho 10 molecole di enzima e 1 molecola di substrato, 9 molecole di enzima rimangono libere e 1 molecola di enzima trasforma il substrato in prodotto. Quindi la velocità è 1.
- Se ho 10 molecole di enzima e 2 molecole di substrato, 8 molecole di enzima rimangono libere e 2 molecole di enzima trasformano il substrato in prodotto. Quindi la velocità è 2.
- Se ho 10 molecole di enzima e 3 molecole di substrato, 7 molecole di enzima rimangono libere e 3 molecole di enzima trasformano il substrato in prodotto. Quindi la velocità è 3.
- Se ho 10 molecole di enzima e 5 molecole di substrato, 5 molecole di enzima rimangono libere e 5 molecole di enzima trasformano il substrato in prodotto. Quindi la velocità è 5.
- Se ho 10 molecole di enzima e 10 molecole di substrato, 0 molecole di enzima rimangono libere e 10 molecole di enzima trasformano il substrato in prodotto. Quindi la velocità è 10.
- Se ho 10 molecole di enzima e 20 molecole di substrato, 0 molecole di enzima rimangono libere e 10 molecole di enzima trasformano il substrato in prodotto. Quindi la velocità è 10.
- Se ho 10 molecole di enzima e 30 molecole di substrato, 0 molecole di enzima rimangono libere e 10 molecole di enzima trasformano il substrato in prodotto. Quindi la velocità è 10.

Equazione di Michaelis-Menten

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

La costante di Michaelis-Menten deriva dall'elaborazione delle diverse costanti di equilibrio delle fasi della reazione.

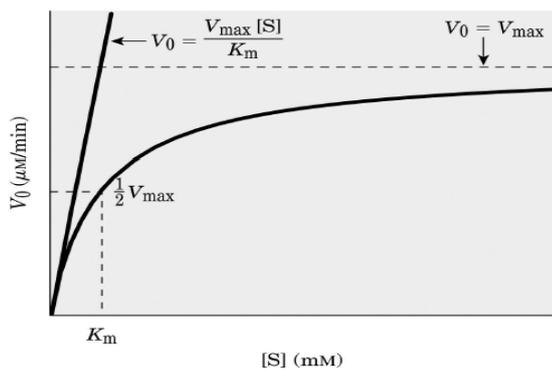
- Se k_m è minore della concentrazione del substrato, essa incide poco nel determinare la somma a denominatore tra k_m e la concentrazione del substrato. Inoltre si può semplificare l'equazione, eliminando k_m e eliminando la concentrazione di substrato a numeratore e a denominatore.

L'equazione diventa uguale a: $V_o = V_{max}$

- Se k_m è maggiore della concentrazione del substrato, quest'ultima incide poco nel determinare la somma a denominatore tra k_m e la concentrazione del substrato. Inoltre si può semplificare l'equazione, eliminando la concentrazione di substrato a denominatore. L'equazione diventa uguale a: $V_o = V_{max} \frac{[S]}{K_m}$

- Se k_m è uguale concentrazione del substrato, esse incidono entrambe nel determinare la somma a denominatore tra k_m e la concentrazione del substrato. Inoltre si può semplificare l'equazione, sostituendo k_m con la concentrazione del substrato e sommando le due concentrazioni. L'equazione diventa uguale a: $V_o = \frac{V_{max}}{2}$

Costante di Michaelis Menten



Questo porta a capire cosa rappresenta k_m , di fatto rappresenta la concentrazione di substrato per la quale la velocità iniziale è la metà della velocità massima. Se la velocità massima si ottiene quando l'enzima è saturo, metà della velocità massima si ha quando l'enzima è metà saturo, quindi la k_m dà un'idea del grado di saturazione dell'enzima, inoltre dà anche un'idea dell'affinità tra l'enzima e il substrato: se la k_m è bassa vuol dire che l'enzima avrà alta affinità con il substrato.

La k_m è una costante specifica per ogni enzima e per ogni reazione, quindi enzimi diversi o reazioni diverse hanno k_m diverse.

Supponiamo di avere una sostanza A nella molecola e si sa che A può andare incontro a tante diverse reazioni (es. può essere trasformata in B o in C), due reazioni diverse che, come tutte le reazioni della cellula, sono catalizzate da enzimi diversi: $A \rightarrow B$ (enzima E-1); $A \rightarrow C$ (enzima E-2). Si ipotizzi che l'enzima E-1 abbia una k_m di 1mM e che E-2 abbia una k_m di 5mM. Se siamo in una cellula e abbiamo il composto A, per capire se verrà trasformato in B o in C, bisogna vedere quanta è la concentrazione di A. Se A ha una concentrazione di 10mM, A verrà trasformato in B, non in C. Si capisce anche una minima strategia di regolazione enzimatica, cioè la regolazione mediata da disponibilità di substrato. Quello che si può fare è fare in modo di aumentare la concentrazione di A per far sì che un po' di A si trasformi in C.

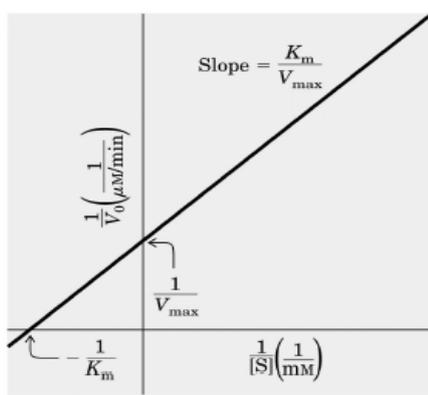
Numero di turnover

La k_m ci dice che aumentando la concentrazione di substrato sopra la k_m , l'enzima lavora più velocemente, ma non ci dice quante molecole di prodotto sono generate. Quello che ci dice l'efficienza dell'enzima, quindi quanto più prodotto si produce, è un'altra grandezza detta **numero di turnover (k_{cat})**. E' una costante che indica il numero assoluto di molecole o di moli che sono trasformate dall'enzima per unità di tempo.

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

equazione di Lineweaver-Burk:

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



Equazione di lineweaver-burk

Il grafico dei doppi reciproci è una rielaborazione dell'equazione di Michaelis Menten. Se l'equazione di Michaelis Menten mette in relazione V_o con la concentrazione di substrato, si può anche fare un grafico che metta in relazione i due reciproci. Di fatto, elaborandola così, si forma l'equazione di Lineweaver-Burk. Quest'equazione è importante perché il grafico è una retta che non passa per l'origine e intercetta l'asse delle ordinate per il valore di $1/V_{max}$ e l'asse delle ascisse per il valore di $1/k_m$. Nella retta i parametri cinetici dell'enzima sono molto più facilmente calcolabili.

INIBIZIONE ENZIMATICA

In molti casi, tanti farmaci funzionano perché inibiscono l'attività di un particolare enzima e prevengono una certa reazione. Lo studio dell'inibizione enzimatica ha un'importanza sia nel capire l'inibizione degli enzimi stessi, sia per capire gli aspetti farmacologici.

Esistono due tipi di inibizione enzimatica:

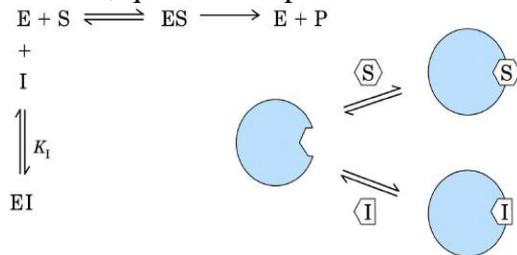
- Inibizione irreversibile
- Inibizione reversibile

Inibizione irreversibile

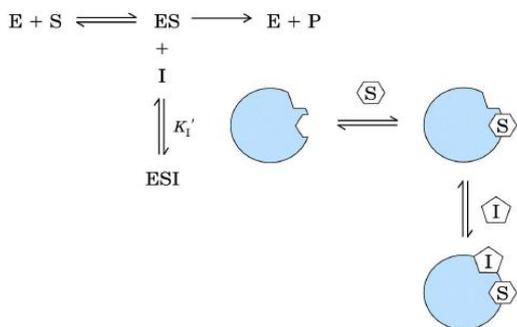
L'inibitore blocca l'attività dell'enzima in modo permanente e definitivo, quindi l'enzima inibito non potrà mai più funzionare. Gli inibitori irreversibili vanno a legarsi covalentemente all'enzima nel sito attivo (es. DIPF va a legarsi alla serina del sito attivo della serin-proteasi e blocca permanentemente l'enzima). L'azione farmacologica dell'aspirina funziona perché è un inibitore irreversibile di un particolare enzima, la ciclossigenasi-1, che serve a produrre alcuni messaggeri che mediano l'infiammazione, il dolore e l'aggregazione delle piastrine. L'aspirina ha tantissimi effetti diversi in base ai tessuti su cui agisce.

Inibizione reversibile

L'inibizione che si ha quando l'effetto dell'inibitore non perdura in modo definitivo, ma può essere rimosso, quindi è temporanea. Esistono due tipi di inibizione reversibile:

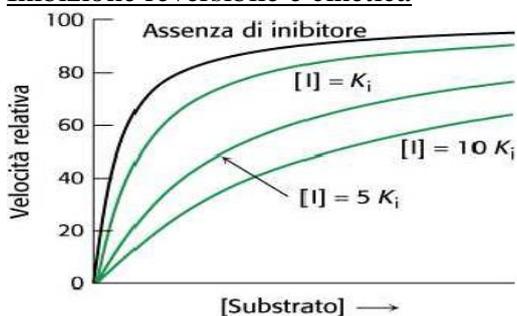


- **Competitiva:** si ha quando tipicamente è operata da molecole che sono strutturalmente simili al substrato dell'enzima e questi inibitori vanno a legarsi al sito attivo al posto del substrato, quindi bloccano il sito attivo impedendo al substrato di legarsi. Quindi vengono legati dall'enzima come verrebbe legato il substrato. L'interazione è debole e quindi può staccarsi e l'inibitore può lasciare il sito attivo.



- **Non competitiva:** l'inibitore si lega all'enzima in un sito diverso rispetto al sito attivo, però il legame dell'inibitore determina un cambio di conformazione dell'enzima stesso, per cui il substrato non riesce più a nel sito attivo. Quindi l'inibitore non competitivo gli ha impedito di entrare nell'enzima perché gli ha cambiato la conformazione. Nel momento in cui l'inibitore si stacca il sito attivo, l'enzima torna alla conformazione standard per far entrare il substrato.

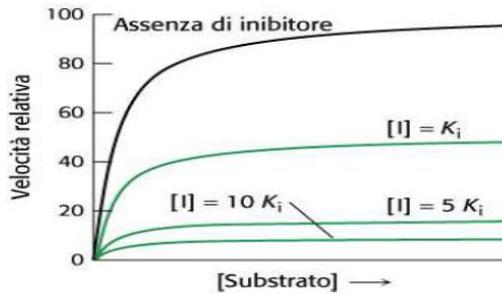
Inibizione reversibile e cinetica



E' importante poter distinguere se un inibitore è di tipo competitivo o non competitivo. E' possibile distinguere questi tipi di competizione in base alla cinetica enzimatica.

Nel caso di inibitore competitivo esso può essere eliminato nel momento in cui aumenta il substrato, quindi

l'enzima torna a funzionare. Questo significa che, in presenza di un inibitore competitivo, questa curva si sposta in modo tale che la velocità massima venga raggiunta molto più lentamente e con concentrazione del substrato più alta, per cui cambia anche la k_m . Quindi in presenza di inibitore competitivo, la k_m risulterà aumentata. Un inibitore competitivo non altera la velocità massima di un enzima, ma fa aumentare la sua k_m .



Con l'inibizione non competitiva, avviene la cosa opposta. Il substrato si lega ma male, perché il sito attivo ha cambiato conformazione. Finché l'inibitore non lascerà l'enzima, esso non riuscirà mai a legare il substrato, anche se la concentrazione di substrato aumenta. La singola molecola di enzima è fuori uso finché ha legato l'inibitore, quindi, in una popolazione di molecole di enzima, se metto una certa quantità di inibitore non competitivo, inibisco

alcuni enzimi e costringo gli altri a saturare. Quindi riduco la velocità massima, che è più bassa rispetto a quella dell'enzima senza inibitori, ma K_m rimane immutata.

REGOLAZIONE ENZIMATICA

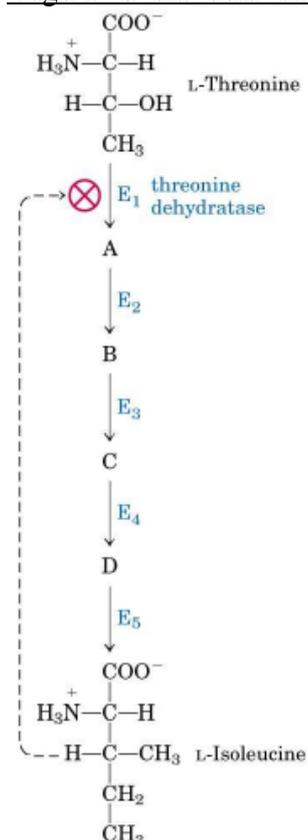
La regolazione enzimatica può avvenire in quattro diversi modi:

- Regolazione a livello del substrato
- Regolazione allosterica
- Regolazione mediante modificazione covalente
- Regolazione mediante attivazione proteolitica

Regolazione a livello del substrato

L'attività di un enzima può essere fatta variare facendo variare la quantità di substrato. Un aumento di substrato può far aumentare la velocità di una reazione. E' un meccanismo di regolazione che le cellule sfruttano tantissimo. La cellula di solito spinge la regolazione in una certa direzione, in modo tale che il substrato venga aumentato. Spesso succede che la cellula impedisce che una reazione avvenga in una certa direzione, sottraendo substrato a quella reazione.

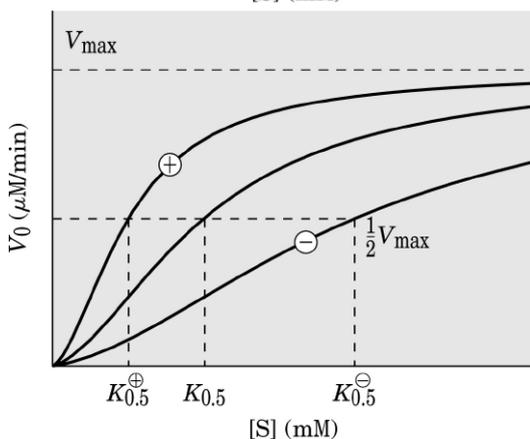
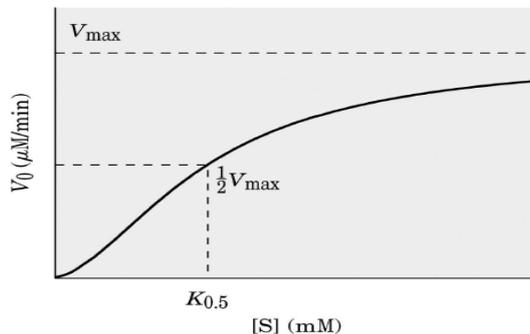
Regolazione allosterica



Il legame non covalente di molecole regolatrici a siti distinti dal sito attivo modula l'attività catalitica al sito attivo stesso. Riguarda una classe di enzimi definiti **enzimi allosterici**. Gli enzimi allosterici sono sempre dotati di struttura quaternaria. Il sito della molecola regolatrice (sito effettore) può anche trovarsi su sub-unità diverse da quelle contenenti il sito catalitico (sub-unità catalitiche e sub-unità regolatrici). Le molecole regolatrici sono dette **effettori allosterici** e possono essere: uguali (**omotropi**) o distinti (**eterotropi**) dal substrato e possono determinare un aumento (positivi) o un'inibizione (negativi) dell'attività enzimatica. L'effettore allosterico in alcuni casi è la stessa molecola di substrato (si lega in un punto dell'enzima distinto dal sito attivo, che promuove un piccolo cambio conformazionale dei siti che erano attivi: aumento dell'attività enzimatica o diminuzione di essa), ma in molti altri è una molecola diversa dal substrato. Le catene polipeptidiche che compongono gli enzimi allosterici possono essere anche diverse tra di loro: alcune possono ospitare il sito attivo (sub-unità catalitica), mentre altre possono avere il sito effettore (sub-unità regolatrice). Questi siti possono essere sia sulla stessa sub-unità che su sub-unità diverse.

L'inibizione retroattiva (inibizione a feedback) è un frequente ed importante esempio di regolazione allosterica. Succede molto spesso che il

prodotto finale della via metabolica sia un inibitore allosterico di uno dei primi enzimi della via metabolica, il quale è un enzima allosterico. E' un'autoregolazione della via metabolica. Per gli enzimi allosterici la curva tra la velocità e la concentrazione è di tipo sigmoideale. Quindi, tecnicamente, non seguendo la cinetica di Michaelis-Menten, non ha senso parlare di K_m , dato che l'andamento è sigmoideale. Non si chiama K_m , quindi, ma $K_{0.5}$.



E' come per l'emoglobina, quindi la velocità della reazione è favorita dalla concentrazione di substrato. Quando si arriva ad una particolare concentrazione di substrato, l'enzima comincia a funzionare e a questo punto basta poco aumento della concentrazione di substrato per far aumentare la velocità. La saturazione si ha quando tutto l'enzima avrà legato il substrato. Per gli enzimi allosterici, il legame di una molecola di substrato, favorisce il legame di altre molecole di substrato, quindi è ovvio che l'enzima allosterico non può essere composto solo da una sola catena polipeptidica. Ogni sub-unità dell'enzima favorisce il legame col substrato anche alle altre sub-unità.

L'effettore allosterico, legandosi all'enzima, cambia la conformazione e aumenta o diminuisce l'affinità del sito attivo per il substrato. Quindi sposta la curva verso destra o sinistra in base al fatto che sia un inibitore o un attivatore allosterico. L'inibitore si lega, cambia la conformazione, riduce l'affinità col sito attivo e di fatto la curva si sposta verso destra. Un attivatore si lega e sposta la curva verso sinistra. Un inibitore fa aumentare

$K_{0.5}$, mentre un attivatore la fa diminuire.

Il comportamento degli enzimi allosterici dipende da cambi conformazionali tra una forma a bassa affinità (**T**) ad una forma ad alta affinità (**R**) per il substrato. Si può immaginare che tra due sub-unità dell'enzima esistano in due forme conformazionali differenti (**R** e **T**). Normalmente l'equilibrio è fortemente spostato verso la forma **T** e l'enzima non funziona, quindi arriva la molecola di substrato, la concentrazione di substrato diventa sufficientemente alta da legarsi alla molecola **R**, la specie molecolare **R** è diversa da quella che era prima, per cui la conformazione **R** libera è scomparsa. Per ripristinare l'equilibrio una molecola **T** si trasforma in **R**. Prima c'erano due sub-unità dell'enzima ad alta affinità. Il legame di una molecola di substrato all'enzima, porta ad avere quattro molecole ad alta affinità. Il legame del substrato all'enzima ad alta affinità sposta l'equilibrio stimolando la trasformazione di molecole **T** in molecole **R**. Quindi il legame di una prima molecola favorisce il legame delle molecole di substrato con le altre sub-unità.

Un attivatore allosterico bisogna immaginarlo come una molecola che si lega all'enzima nella forma ad alta affinità con il substrato. Il legame di un attivatore allosterico aumenta il numero di sub-unità dell'enzima.

Un inibitore allosterico si presume si legi preferenzialmente alla forma a bassa affinità e sposta l'equilibrio spostando una molecola ad alta affinità.

Regolazione mediante modificazione covalente

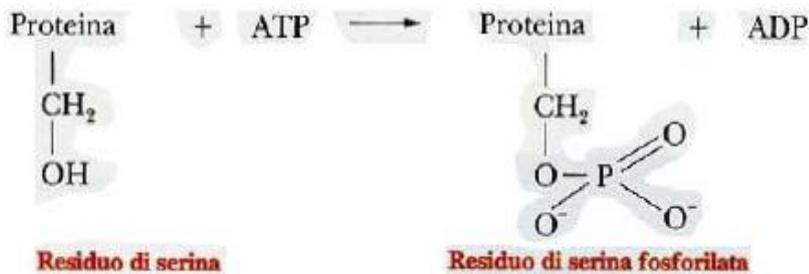
Il fatto che in questo caso all'enzima legata covalentemente un'unità chimica, un gruppo funzionale, e, in seguito a questo legame covalente, l'enzima cambia di conformazione, quindi cambia di attività catalitica.

Non è più un effettore allosterico, quindi una molecola che interagisce con le interazioni deboli, ma è un qualcosa che viene legato covalentemente all'enzima.

I gruppi chimici che possono venire legati agli enzimi, tali da alterarne la conformazione e quindi l'attività:

- Unità di AMP
- Unità di ADP-ribosio
- Gruppi metili
- Gruppi fosfato

Il 98% dei casi di regolazione covalente avviene attraverso un legame covalente di un gruppo fosfato, quindi, la fosforilazione, cioè l'attacco di un gruppo fosfato. L'attacco di un gruppo fosfato si presta così bene, perché è un gruppo carico negativamente e quindi, attaccare un gruppo fosfato, significa aggiungere delle cariche negative e consentire di instaurare particolari interazioni



elettrostatiche aggiuntive, che modificano la conformazione tridimensionale dell'enzima stesso. Questo gruppo fosfato che viene attaccato agli enzimi non è ortofosfato inorganico della cellula, ma è donato da una molecola che è l'ATP. L'ATP è il

donatore del gruppo fosfato che viene legato agli enzimi sempre. L'ATP è un nucleotide che dona un terzo dei suoi gruppi fosfato a una proteina e, trasferendo questo gruppo, determina la **fosforilazione** di quella proteina. L'ATP trasferisce il gruppo fosfato su un gruppo funzionale, che è il gruppo ossidrilico delle catene laterali degli amminoacidi: serina, treonina e tirosina, di fatto sono siti potenziali di fosforilazione. La fosforilazione sulla serina e sulla tirosina è molto più comune di quella sulla treonina.

Il punto è rompere un legame tra un gruppo fosfato terminale dell'ATP e creare un nuovo legame estere con l'ossidrilico di un amminoacido. Questa è una reazione che deve essere catalizzata da un enzima, quindi ci vuole un enzima che trasferisca un gruppo fosfato dall'ATP alla serina, per esempio. Gli enzimi che fosforilano sono le **chinasi**. Questo fenomeno deve essere reversibile, perché se l'enzima viene fosforilato e non cambia più, non può più tornare allo stato iniziale. Questo è quindi un fenomeno reversibile e si attua attraverso la **defosforilazione** dell'enzima, a seguito dell'idrolisi del gruppo fosfato. La defosforilazione è una reazione che di per sé non avviene e si parla di un enzima che la catalizza, chiamato **fosfatasi**, che taglia il gruppo fosfato legato alla serina.

La fosforilazione rende attivo l'enzima, mentre la defosforilazione lo inattiva. La regolazione dell'attività enzimatica è promossa da altri enzimi. La quantità di enzima in forma attiva (fosforilata) dipende dall'equilibrio dell'attività di altri enzimi: la chinasi e la fosfatasi. Quindi siamo in un sistema in cui l'attività di un enzima è controllata da altri enzimi.

Il legame di un gruppo fosfato comporta l'aggiunta di due cariche negative che possono alterare l'assetto delle interazioni deboli e determinare cambi conformazionali che si ripercuotono anche a livello del sito attivo.

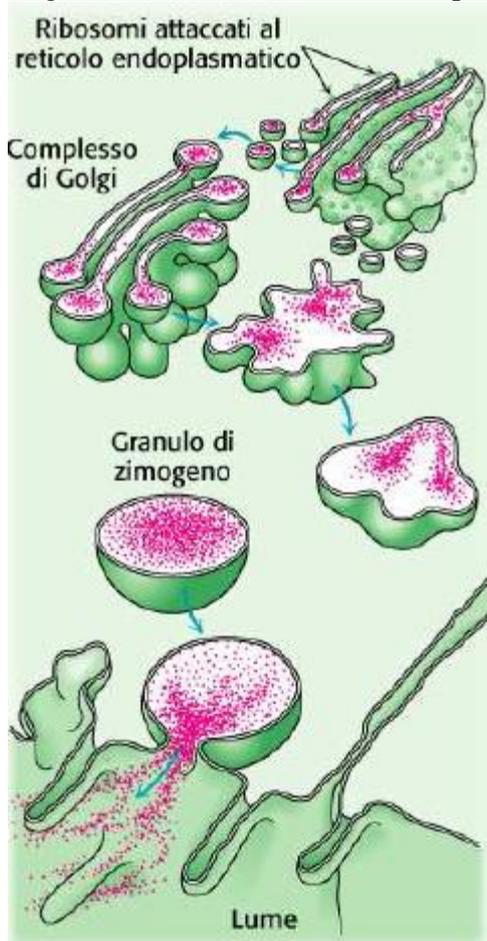
La fosforilazione e la defosforilazione possono essere rapide (secondi) o lente (ore) e quindi rispondono ad esigenze molto diverse.

La fosforilazione può provocare **effetti amplificati**. Una stessa molecola di protein-chinasi può rendere in forma attiva numerose molecole di enzima. E' diverso dalla regolazione allosterica, in cui ci sono un enzima e un effettore allosterico, che attiva solo una molecola di enzima. Si tratta quindi di capire quando vengono coinvolte la protein-chinasi e la fosfatasi.

Le protein-chinasi sono spesso sottoposte a regolazione ormonale e quindi la fosforilazione degli enzimi è tipicamente iniziata da ormoni. Tipicamente queste protein-chinasi e queste protein-fosfatasi, che regolano l'enzima, sono a loro volta regolate nella cellula, in risposta a segnali ormonali che arrivano dall'esterno della cellula. E' chiaro che una cellula debba regolare l'attività dei propri enzimi, ma, in un organismo multicellulare, dove gli organi sono specializzati a fare delle

funzioni che servono allo stesso organo e ad altri organi, l'attività di una cellula di un organo deve essere modificata in funzione di quello che risentono gli altri tessuti (es. l'epatocita deve produrre glucosio quando c'è una mancanza nel cervello, quindi solo un segnale del cervello può far sì che venga prodotto glucosio). Gli ormoni sono molecole di segnalazione che vengono prodotte per modificare le attività metaboliche di un organo bersaglio e significa modificare gli enzimi. Le modificazioni degli enzimi, con gli ormoni, avvengono per modificazione covalente.

Regolazione mediante attivazione proteolitica



Ci sono una serie di enzimi che vengono sintetizzati dalla cellula sotto forma inattiva e diventano enzimaticamente attivi quando una proteasi rompe, a volte, anche solo un legame peptidico all'interno di questa catena polipeptidica, trasformandola in due catene più piccole. Quindi questo tipo di regolazione consiste nel fatto che un enzima inattivo può essere reso attivo mediante un suo **taglio proteolitico** mediato da un altro enzima, la **proteasi**.

Un solo legame peptidico rotto è sufficiente per cambiare la conformazione dell'enzima e far sì che si attivi. Nella forma inattiva, l'enzima prende il nome di **zimogeno**, che poi viene attivato mediante taglio proteolitico. La maggior parte degli zimogeni che vengono attivati mediante taglio proteolitico sono proteasi. Quindi sono di fatto le proteasi che vengono prodotte come zimogeni inattivi e vengono attivate da un'altra proteasi, quindi una proteasi attiva una un'altra proteasi.

Questo taglio non è una vera regolazione enzimatica, ma si tratta di un'attivazione enzimatica, poiché è qualcosa di irreversibile e unidirezionale. Deve essere unidirezionale, perché è un'azione che riguarda solo una classe di enzimi particolare, che sono le **serin-proteasi** e che in genere non sono prodotte per stare dentro la cellula, ma sono prodotte dalla cellula per essere secrete fuori dalla cellula. Un caso particolare è quello degli enzimi digestivi, che devono idrolizzare le proteine che introduciamo dalla dieta, quindi

non funzionano nella cellula, ma nel lume dello stomaco. Per questa ragione, paradossalmente, questi enzimi possono essere molto dannosi per la cellula: si immagini una serin-proteasi attiva nella cellula, essa comincerebbe a degradare le proteine della cellula facendola morire.

La proteasi che attiva la proteasi dev'essere attivata da una proteasi, che deve essere attivata da un'altra proteasi... Quindi è un processo sensibile all'amplificazione. Basta una piccolissima traccia di enzima attivo (una miccia) che comincia a rompere un legame dello zimogeno. Così via, vengono attivati tutti gli altri zimogeni sintetizzati con un effetto cascata.

L'attivazione delle serin-proteasi della digestione è il classico esempio in contesto fisiologico in cui il taglio proteolitico è importante; un altro contesto è la coagulazione del sangue. Tutte le serin-proteasi sono immesse nel circolo sanguigno come zimogeno inattivo e solo quando c'è una miccia viene attivato.