

# ENZIMI

Catalizzatori delle reazioni biologiche

Le tre proprietà distintive degli enzimi sono

**A capacità catalitica**

**B specificità**

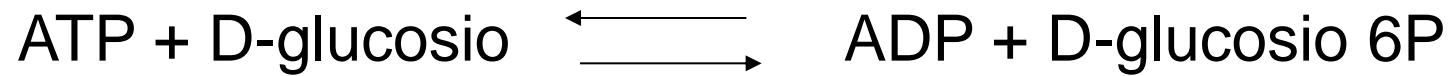
**C regolazione**

# NOMENCLATURA

Gli enzimi sono classificati in base alle reazioni  
che catalizzano e sono divisi in 6 classi

numero	classe	Reazione catalizzata
1	ossidoreduttasi	Reazioni di ossidoriduzione
2	Transferasi	Reazione di trasferimento di gruppi funzionali
3	Idrolasi	Reazione di idrolisi
4	Liasi	Addizione rimozione di gruppichimici: possono agire sui legami del C-C (decarbossilasi, aldolasi), C-O (idratasi, deidratasi) o, C-S (desulfidasi).
5	Isomerasi	Trasferimento di gruppi all'interno di molecole per formare isomeri
6	Ligasi	Formazione di legami C-C, C-S, C-O, C-N accoppiate all'idrolisi di ATP

Ogni enzima ha un numero di classificazione a quattro cifre e un nome sistematico



Nome sistematico glucosio fosfotransferasi

Numero di classificazione E.C. 2.7.1.1

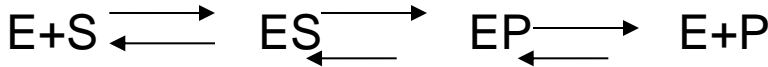
2 classe Transferasi

7 sottoclasse fosfotransferasi

1 Sotto sotto classe fosfotransferasi con un gruppo ossidrilico come accettore

1 numero dell'enzima nella sotto-sotto classe

# GLI ENZIMI VARIANO LA VELOCITA' DI UNA REAZIONE NON L'EQUILIBRIO

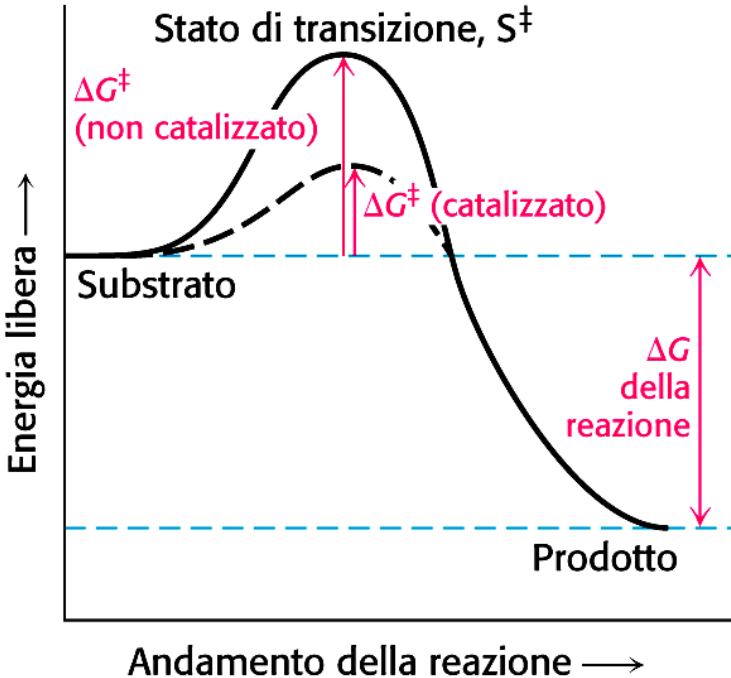


Qualsiasi reazione da S → P può essere descritta da un diagramma della coordinata della reazione in funzione dell'energia libera. L'equilibrio di una reazione è stabilito dalla differenza di energia libera tra reagenti e prodotti ΔG. Una reazione può procedere spontaneamente soltanto se il valore di ΔG < 0

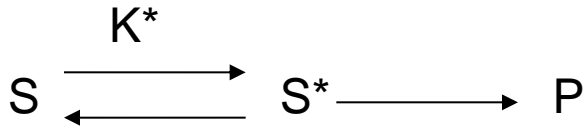
La reazione chimica passa attraverso uno **stato di transizione** che possiede più energia libera del substrato

L'energia di attivazione ΔG‡ è pari alla differenza tra l'energia dello stato di transizione e l'energia del substrato

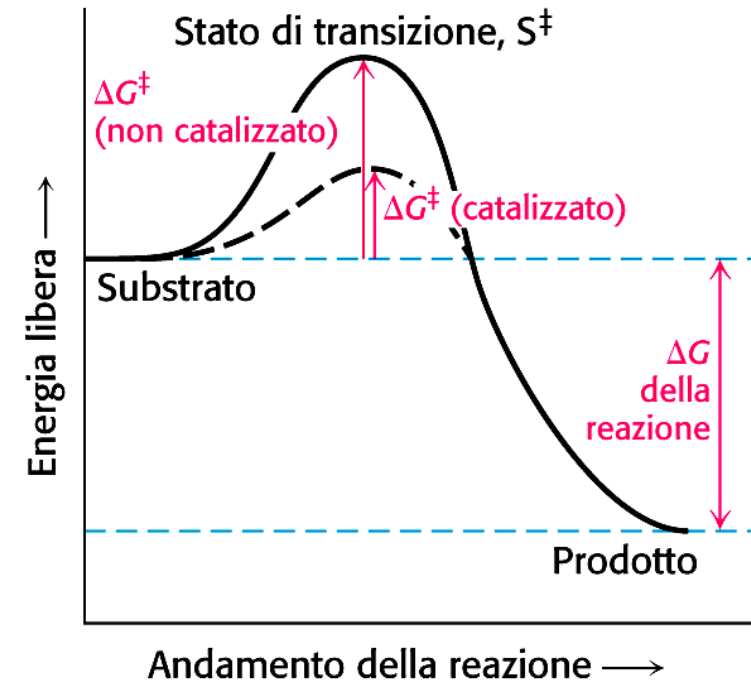
$$\Delta G^\ddagger = G^\ddagger - G$$



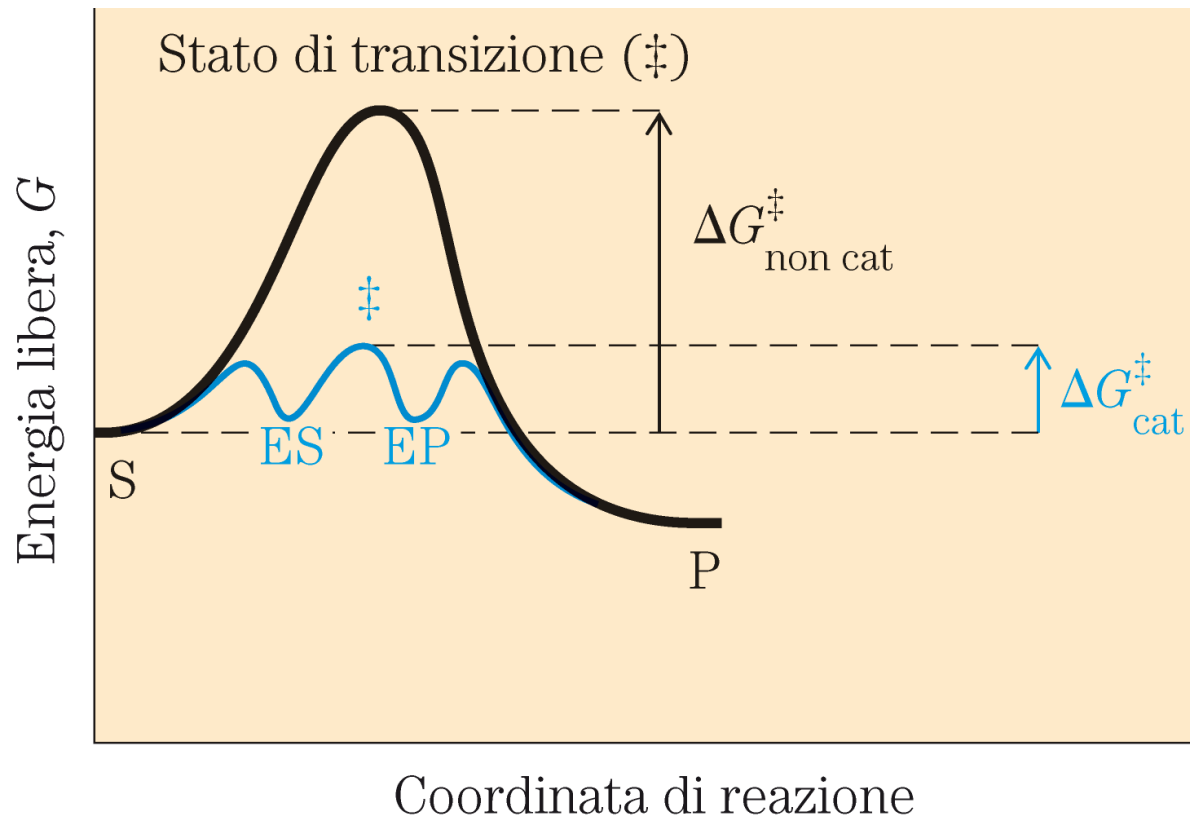
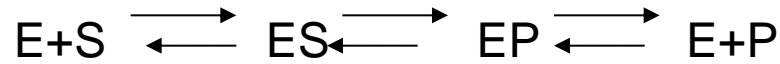
# I CATALIZZATORI ABBASSANO L'ENERGIA DI ATTIVAZIONE FACILITANDO LA FORMAZIONE DELLO STATO DI TRANSIZIONE



Il legame tra enzima e substrato genera un percorso di reazione caratterizzato da uno stato di transizione con una energia libera più bassa rispetto a quella priva di enzima

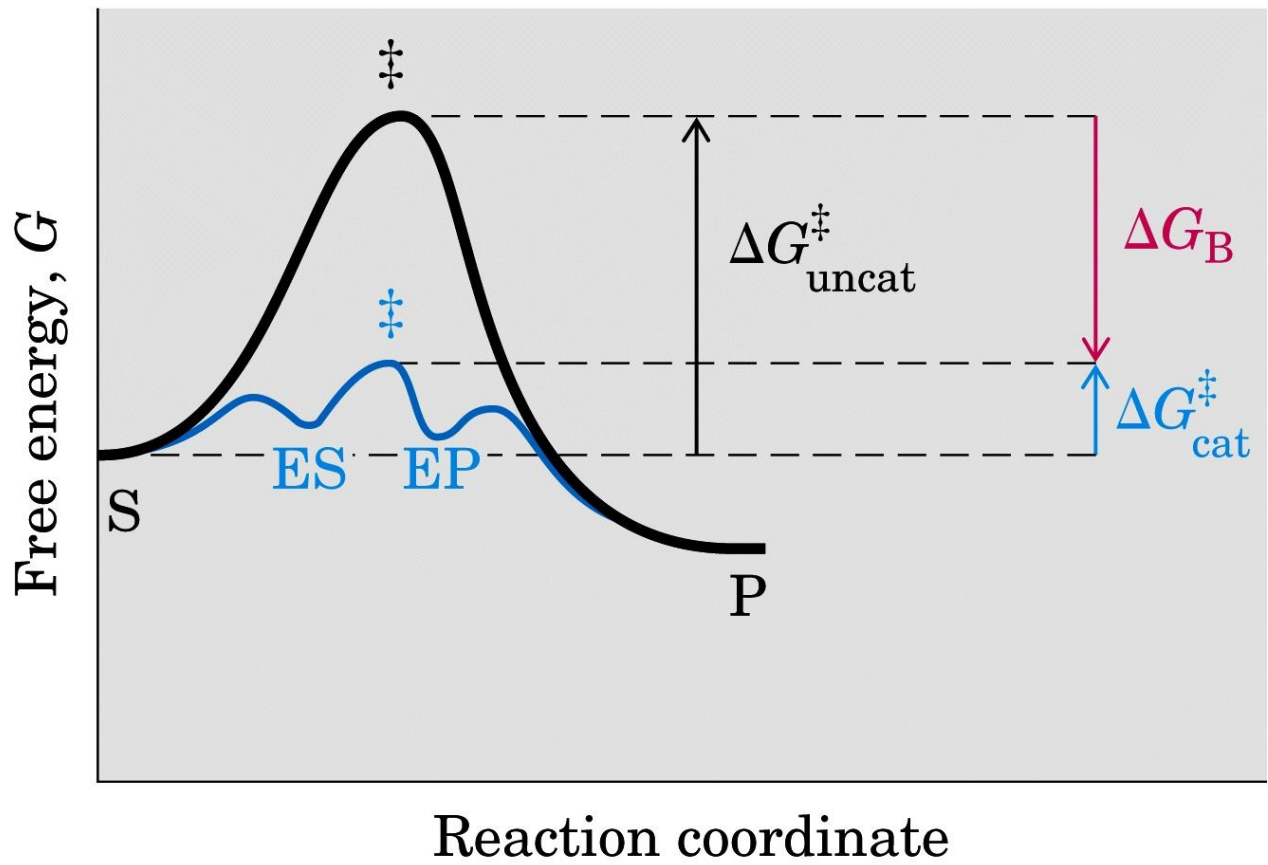


Ogni reazione è costituita da una serie di tappe in cui si ha la formazione e la scomparsa di varie specie chimiche transitorie specie che occupano livelli di minimi energetici





L'energia di legame  $\Delta G_B$  generata dalle interazioni deboli che l'enzima stabilisce con il substrato nello stato di transizione è la fonte principale di energia libera usata dall'enzima per abbassare l'energia di attivazione



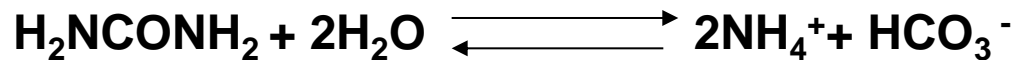
## Gli enzimi aumentano la velocità delle reazioni

- Le reazioni catalizzate da enzimi sono fino  $10^{16}$  volte più veloci di quelle non catalizzate
- La reazione avviene in condizioni molto blande di pH e Temperatura

## table 8-5

### Some Rate Enhancements Produced by Enzymes

Cyclophilin	$10^5$
Carbonic anhydrase	$10^7$
Triose phosphate isomerase	$10^9$
Carboxypeptidase A	$10^{11}$
Phosphoglucomutase	$10^{12}$
Succinyl-CoA transferase	$10^{13}$
→ Urease	$10^{14}$
Orotidine monophosphate decarboxylase	$10^{17}$

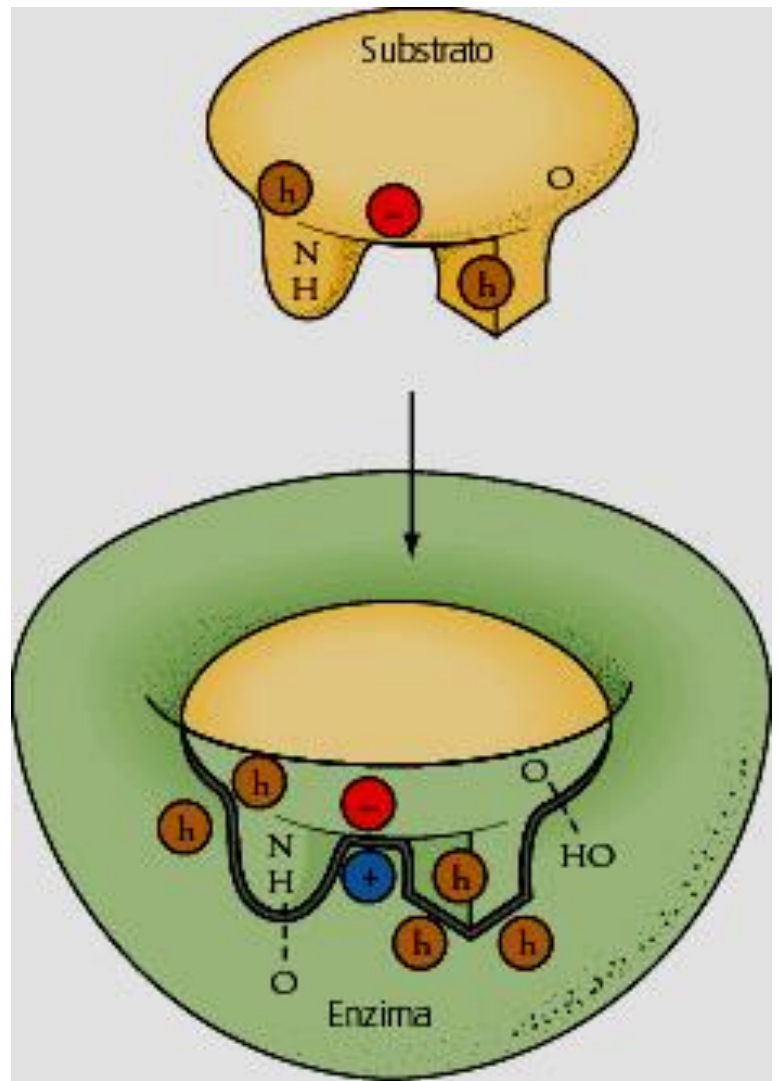


**B specificità Fisher 1890**

Gli enzimi hanno un elevata specificità che deriva dalle proprietà del complesso enzima substrato che è caratterizzato da

**Complementarità geometrica**

**Complementarità elettronica**

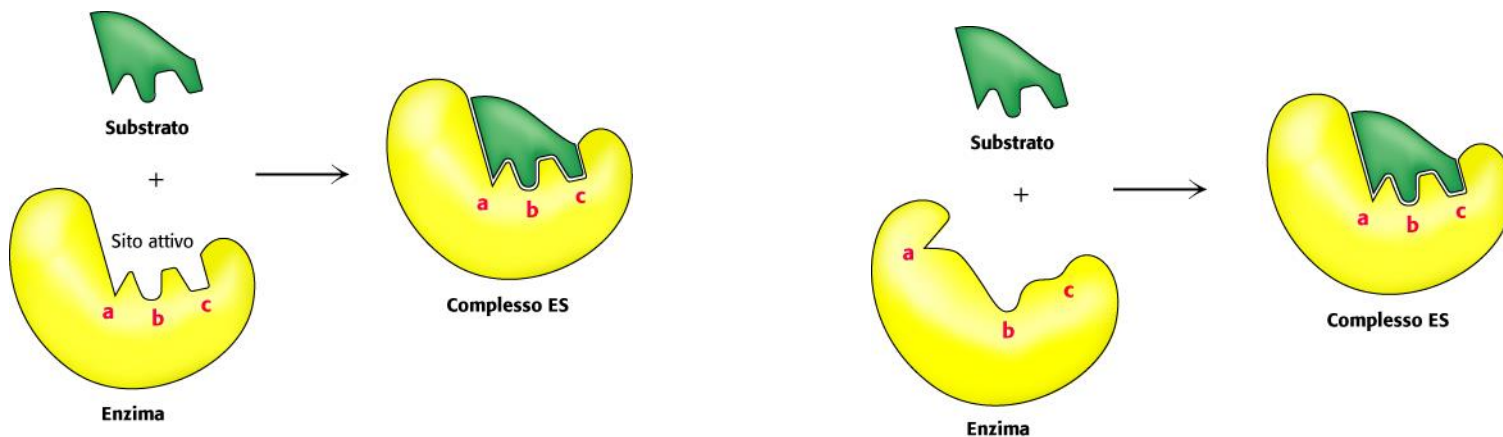


## Modello dell'adattamento indotto di Koshland 1958

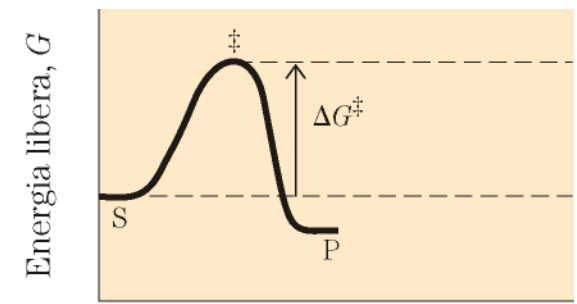
L'ipotesi dell'adattamento indotto implica distorsioni sia a livello del sito attivo che del substrato

L'entità della distorsione è variabile: può essere localizzata o determinare un grosso cambiamento conformazionale

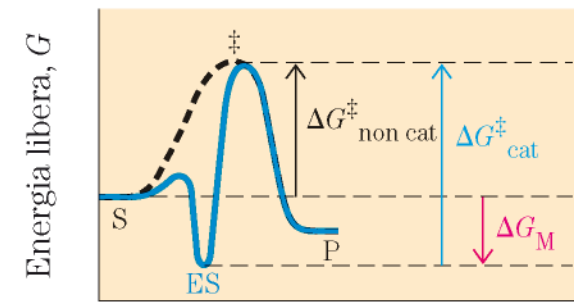
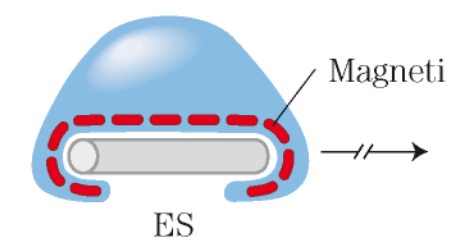
Il legame tra enzima e substrato prevede che quest'ultimo venga distorto in una forma simile a quella dello stato di transizione



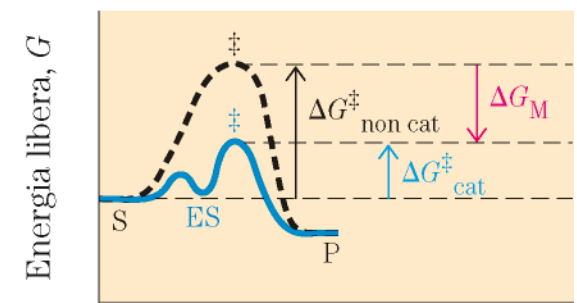
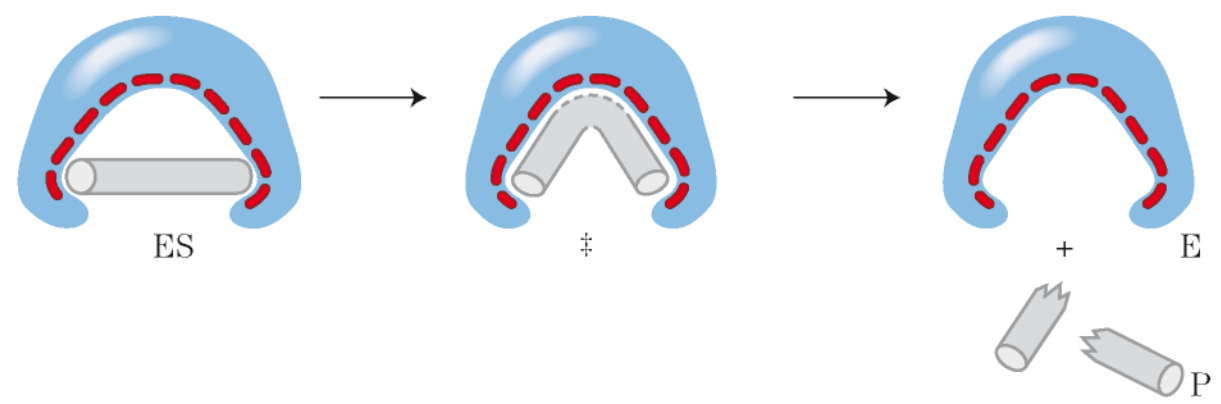
**(a) Senza enzima**



**(b) Complementarità tra enzima e substrato**



**(c) Complementarità tra enzima e stato di transizione**



Coordinata di reazione

## SPECIFICITA' E SELETTIVITA' DEGLI ENZIMI

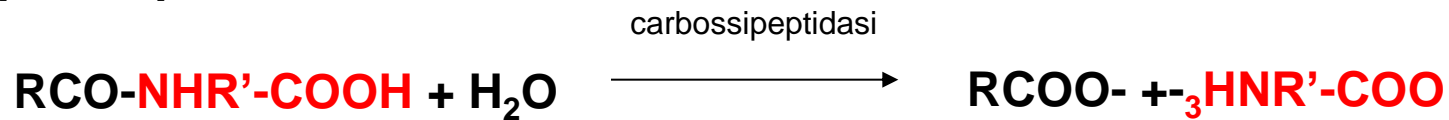
- **Chemioselettività:** specificità per il substrato, attività verso uno specifico tipo di composto (gruppo) chimico
- **Regioselettività:** capacità di discriminare tra gruppi funzionali identici che fanno parte della stessa molecola
- **Enantioselettività:** capacità di discriminare tra singoli enantiomeri o gruppi funzionali identici legati ad un centro prochirale.

La selettività dipende: dal tipo di enzima dalla struttura del substrato dalle condizioni di reazione

## GLI ENZIMI SONO DIVERSI PER SELETTIVITA' GEOMETRICA

Alcuni enzimi sono molto permissivi

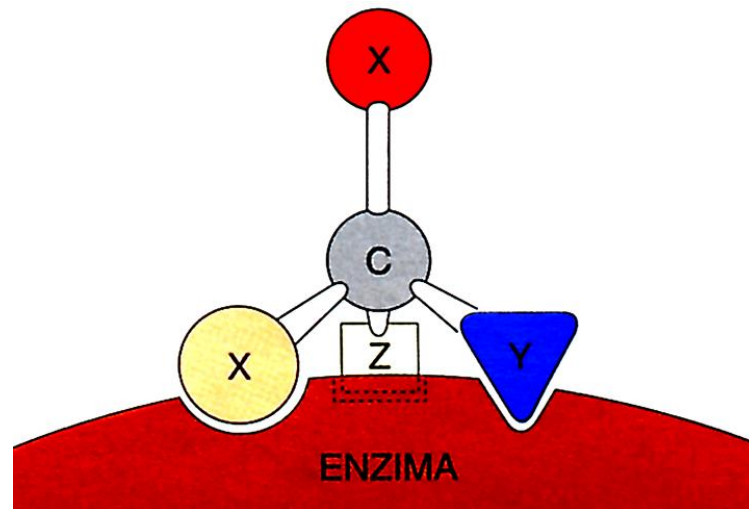
1 La **carbossi-peptidasi** idrolizza legami peptidici C-terminali formati da qualunque amminoacido



2 La **chimotripsina** catalizza anche la rottura di legami estere

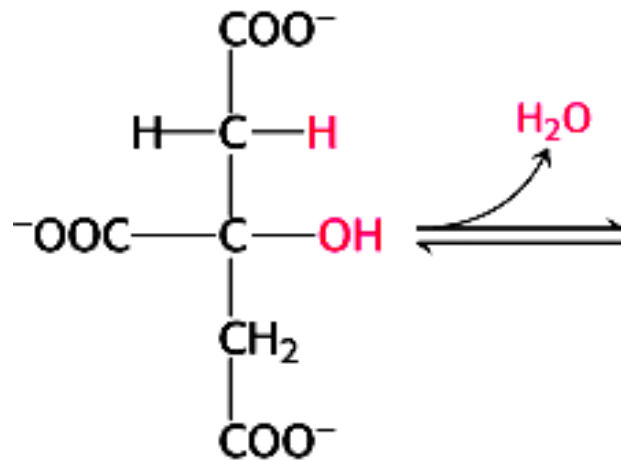


GLI ENZIMI SONO **STEREOESPECIFICI** IN QUANTO I SITI  
ATTIVI SONO ASIMMETRICI



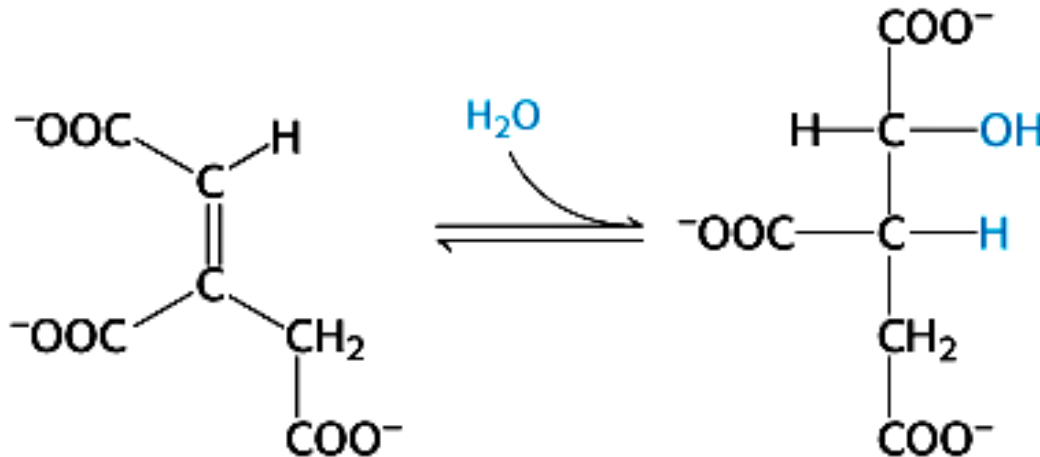


Il citrato viene isomerizzato ad isocitrato dall'**ACONITASI** che catalizza una reazione di *deidratazione* e di una successiva *idratazione*



**Citrato**

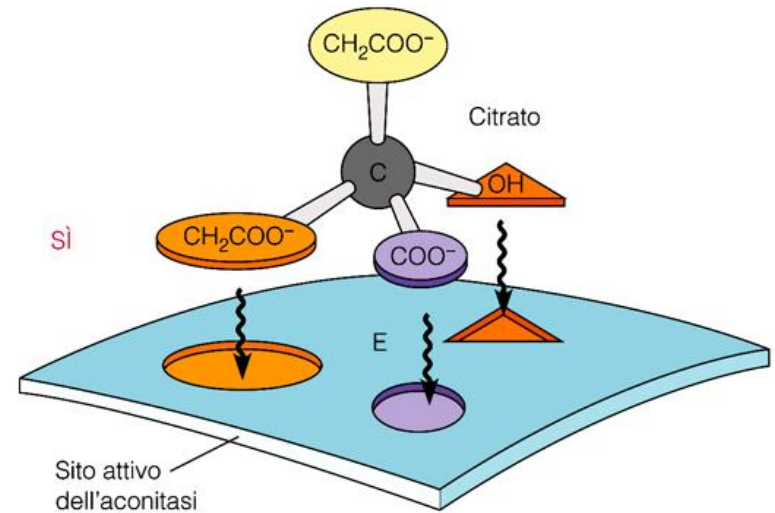
$$\Delta G^{\circ'} = 5 \text{ kJ mole}^{-1}$$



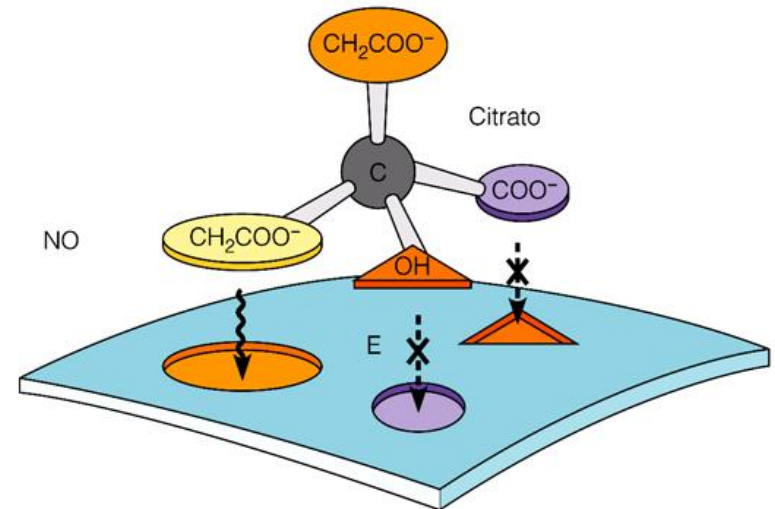
**cis-Aconitato**

**Isocitrato**

Citrato molecola **prochirale**:



l'**aconitasi** riesce a distinguere i due gruppi carbossimetilici



(b)

# STRATEGIE CATALITICHE

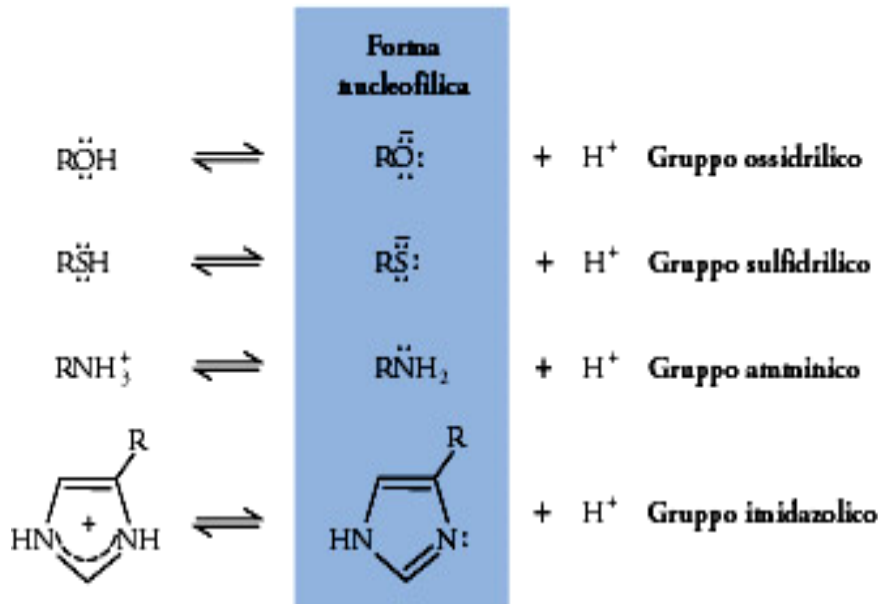
## DAGLI ENZIMI:

1. Catalisi acido-basica
2. Catalisi covalente
3. Catalisi da ioni metallici
4. Catalisi elettrostatica
5. Effetti di prossimità e orientamento
6. Legame preferenziale dello stato di transizione

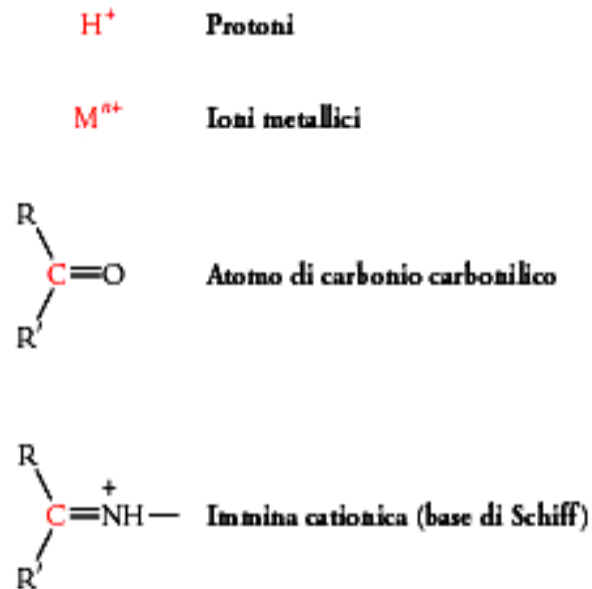
# CATALISI COVALENTE

La formazione di un legame covalente transitorio tra enzima e substrato abbassa l'energia di attivazione e aumenta la velocità di reazione. Generalmente il sito attivo contiene un forte nucleofilo che subisce una modifica covalente transitoria.

(a) Gruppi nucleofilici



(b) Gruppi elettrofilici



# **Catalisi favorita da ioni metallici**

**Gli ioni metallici partecipano ai processi catalitici in tre modi:**

- 1. Stabilizzano elettrostaticamente o proteggono le cariche negative**
- 2. Possono generare nucleofili aumentando l'acidità di una molecola vicina**
- 3. Possono legarsi al substrato per orientarlo correttamente**
- 4. Partecipano a reazioni di ossidoriduzioni**

I COFATTORI POSSONO ESSERE:

# Ioni inorganici

## table 8-1

### Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

---

$\text{Cu}^{2+}$	Cytochrome oxidase
$\text{Fe}^{2+}$ or $\text{Fe}^{3+}$	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
$\text{K}^{+}$	Pyruvate kinase
$\text{Mg}^{2+}$	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
$\text{Mn}^{2+}$	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
$\text{Ni}^{2+}$	Urease
Se	Glutathione peroxidase
$\text{Zn}^{2+}$	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

- I **coenzimi**

- vengono modificati chimicamente dalle reazioni enzimatiche a cui partecipano

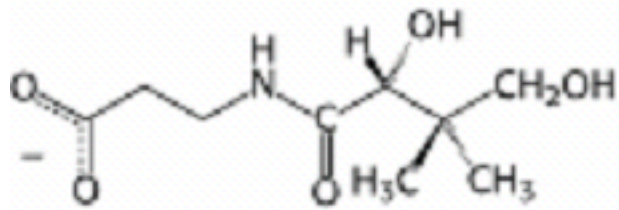
- devono tornare allo stato originale alla fine del ciclo catalitico

- La rigenerazione avviene in una fase separata della reazione enzimatica

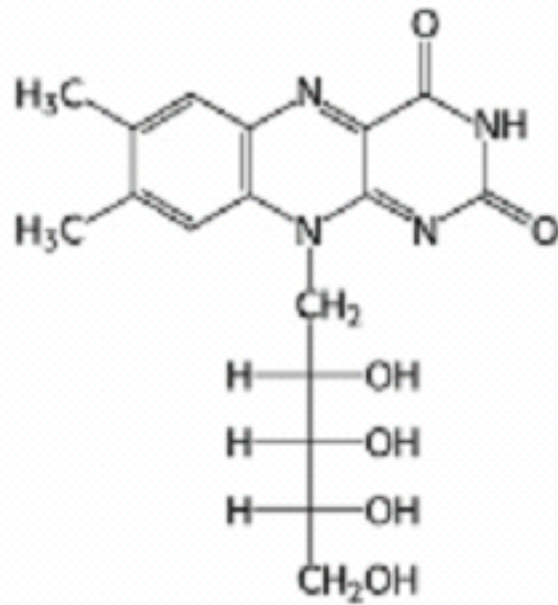


## MOLTI COENZIMI DERIVANO DALLE VITAMINE IDROSOLUBILI

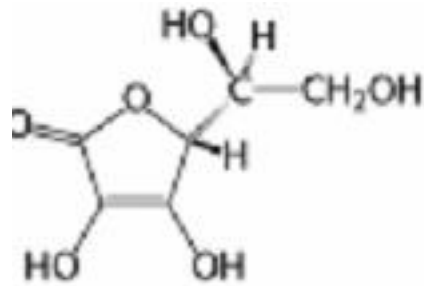
vitamina	coenzima	Reazione mediata
biotina	biotina	carbossilazione
Cobalamina (vitamina B12)	Coenzimi cobalaminici	Alchilazione
Acido folico	Tetraidrofolato	Trasferimento di gruppi contenenti un atomo di carbonio
Acido nicotinico vitamina B3	Coenzimi nicotinici(NADH NADPH)	Reazioni di ossido riduzione(trasferimento ioni idruro)
Acido pantotenico Vitamina B5	Coenzima A	Trasferimento di acili
Riboflavina, vitamina B2	Flavin adenin dinucleotide FADH <sub>2</sub> , FMN	Reazioni di ossido riduzione trasferimento di elettroni
Tiamina, vitamina B1	Tiamina pirofosfato	Trasferimento di aldeidi
piridossina, vitamina B6	Piridossalfosfato	Trasferimento di gruppi amminici



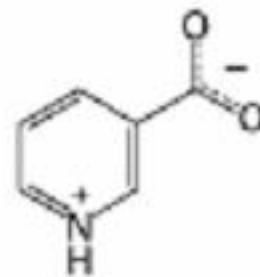
**Vitamina B5**  
(Pantotenato)



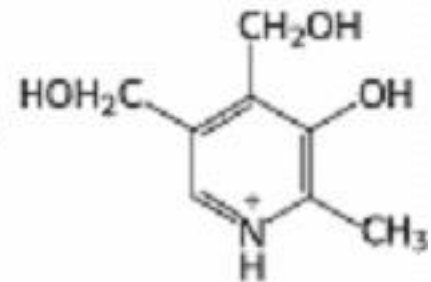
**Vitamina B2**  
(Riboflavina)



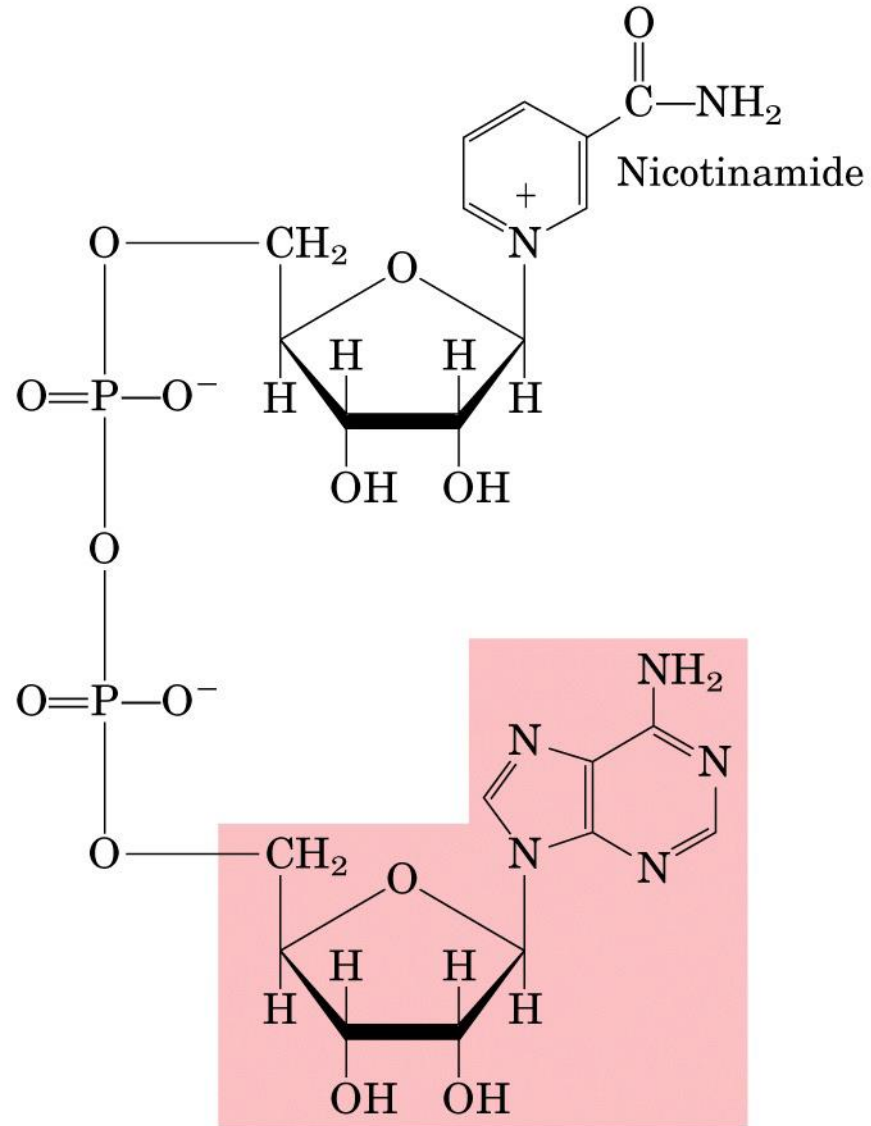
**Vitamina C**  
(Acido ascorbico)



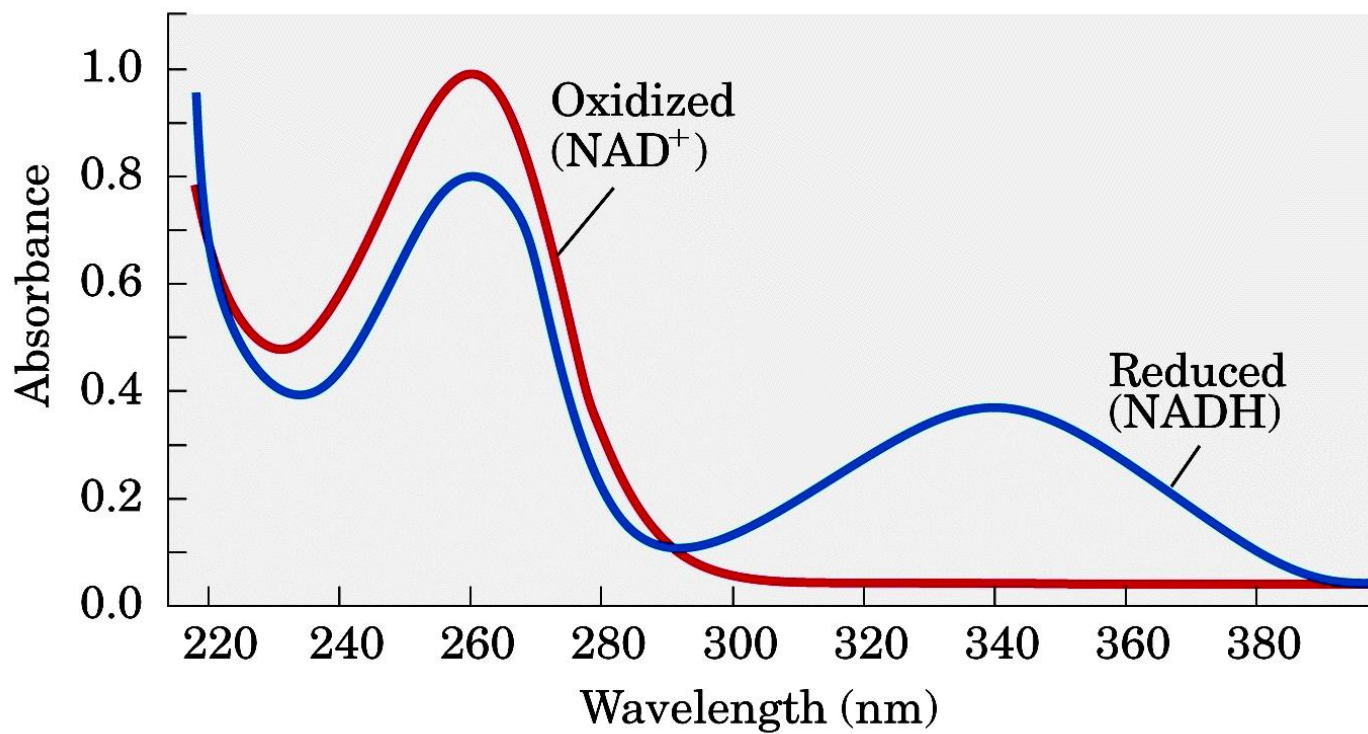
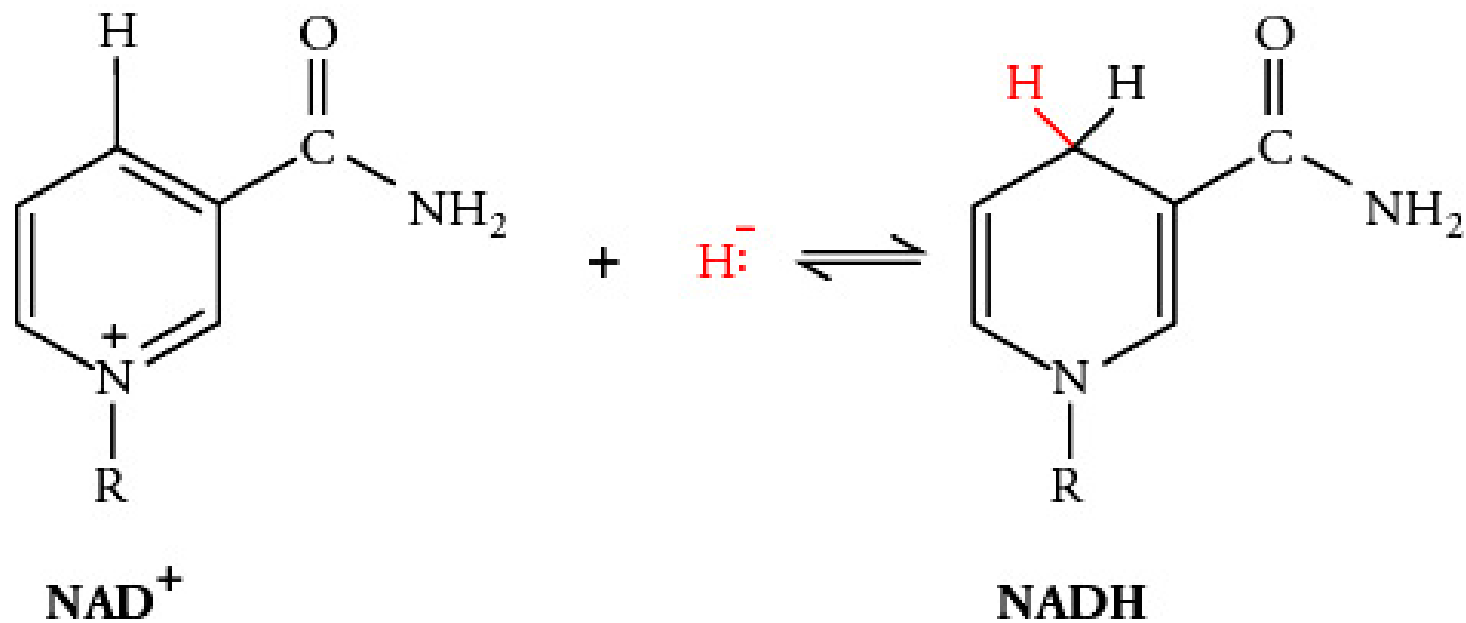
**Vitamina B3**  
(Niacina)



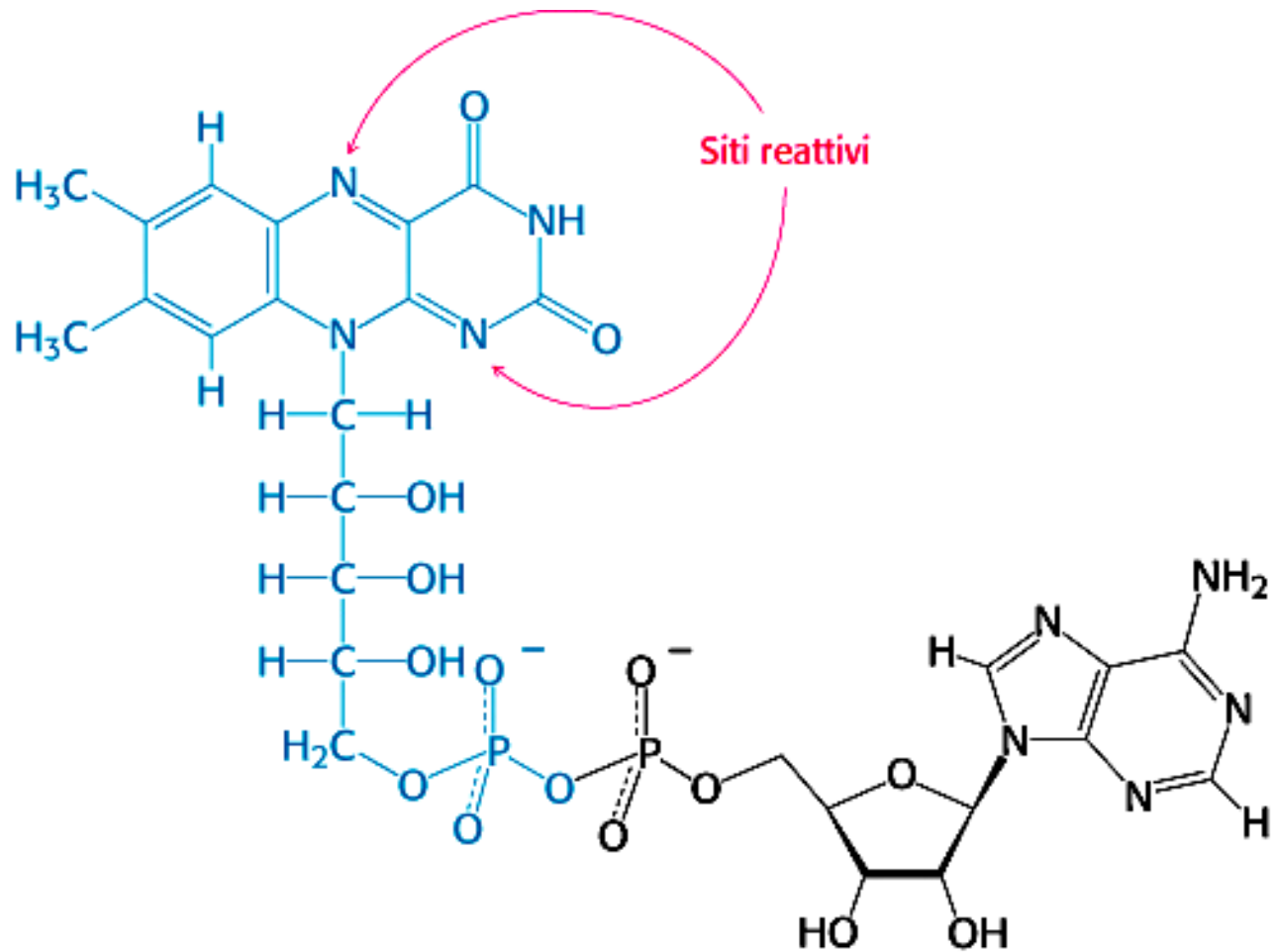
**Vitamina B6**  
(Piridossina)

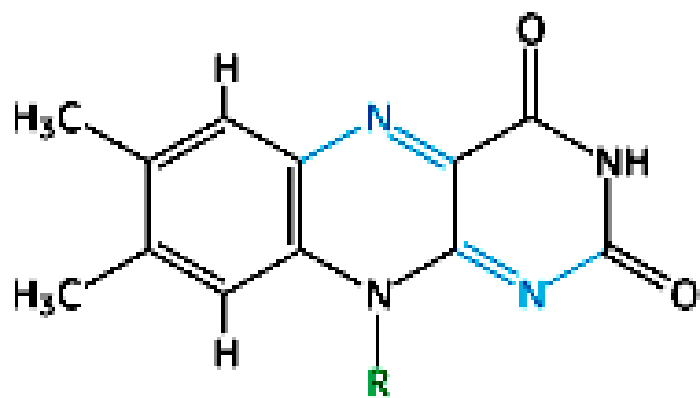


**Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)**



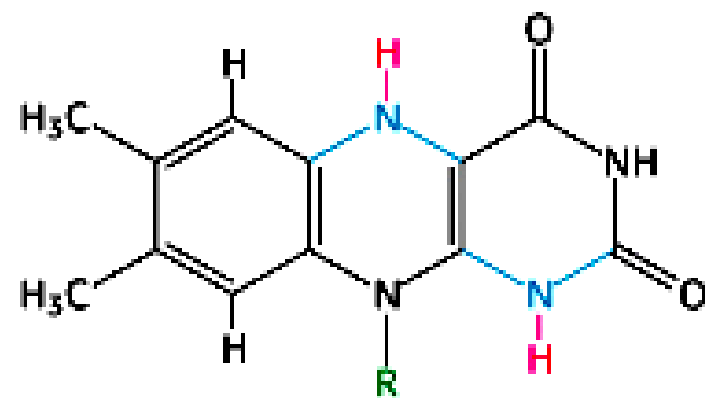
# FAD : Flavin Adenin Dinucleotide





**Forma ossidata  
(FAD)**

A 370nm e A440nm



**Forma ridotta  
(FADH<sub>2</sub>)**

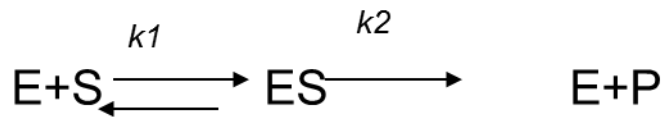
A 360 nm



# Cinetica enzimatica

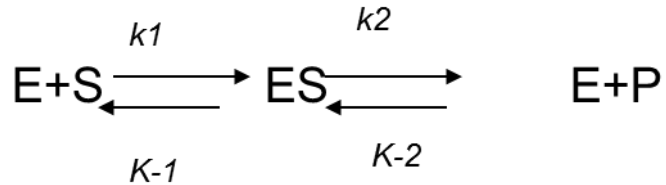


1902 – **Adrian Brown** dimostrò che quando la concentrazione del saccarosio è molto più alta di quella dell'enzima, la velocità della reazione diventa indipendente da quella del substrato: la velocità è di ORDINE ZERO rispetto al saccarosio



$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

# MICHAELIS-MENTEN (1913)

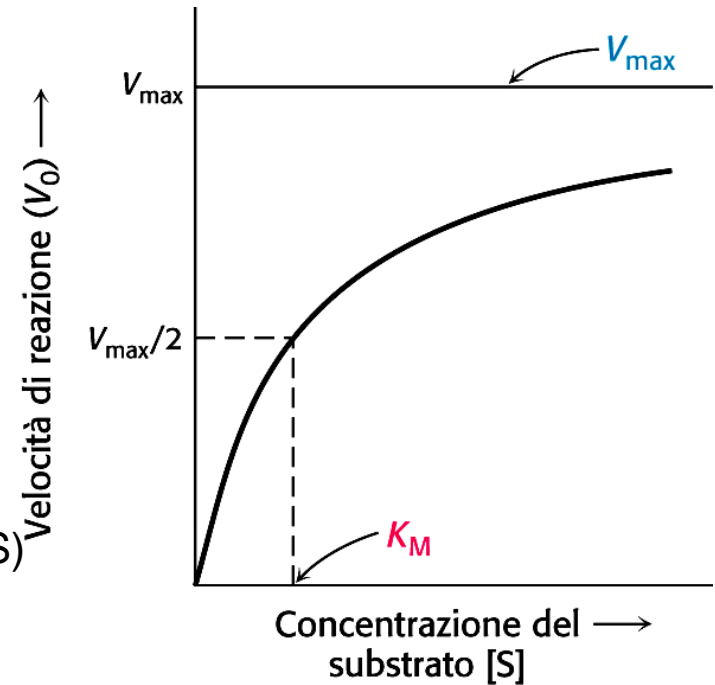


Leonor Michaelis  
1875–1949



Maud Menten  
1879–1960

$$V_0 = k_2 [ES]$$



Per semplicità matematica si assume  
 $k_{-2}$  trascurabile  
 $k_1$  e  $k_{-1} \gg k_2$

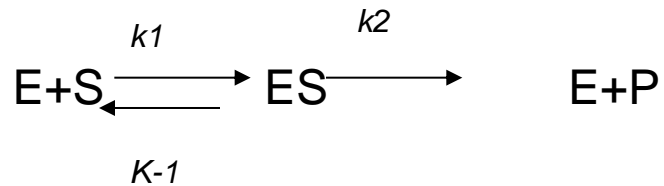
(ipotesi dell'equilibrio ES è in equilibrio rapido con E ed S)

# MICHAELIS E MENTEN (1913)

## Assunzione di equilibrio

Leonor Michaelis e Maude Menten, assunsero che  $k_{-1} \gg k_2$ , cioè che la prima tappa della reazione potesse raggiungere l'equilibrio

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$$



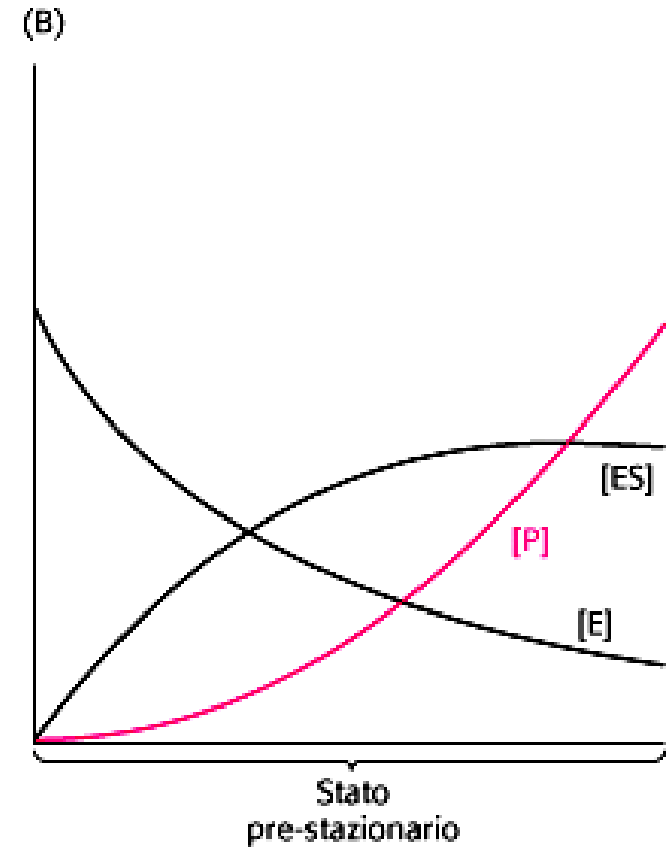
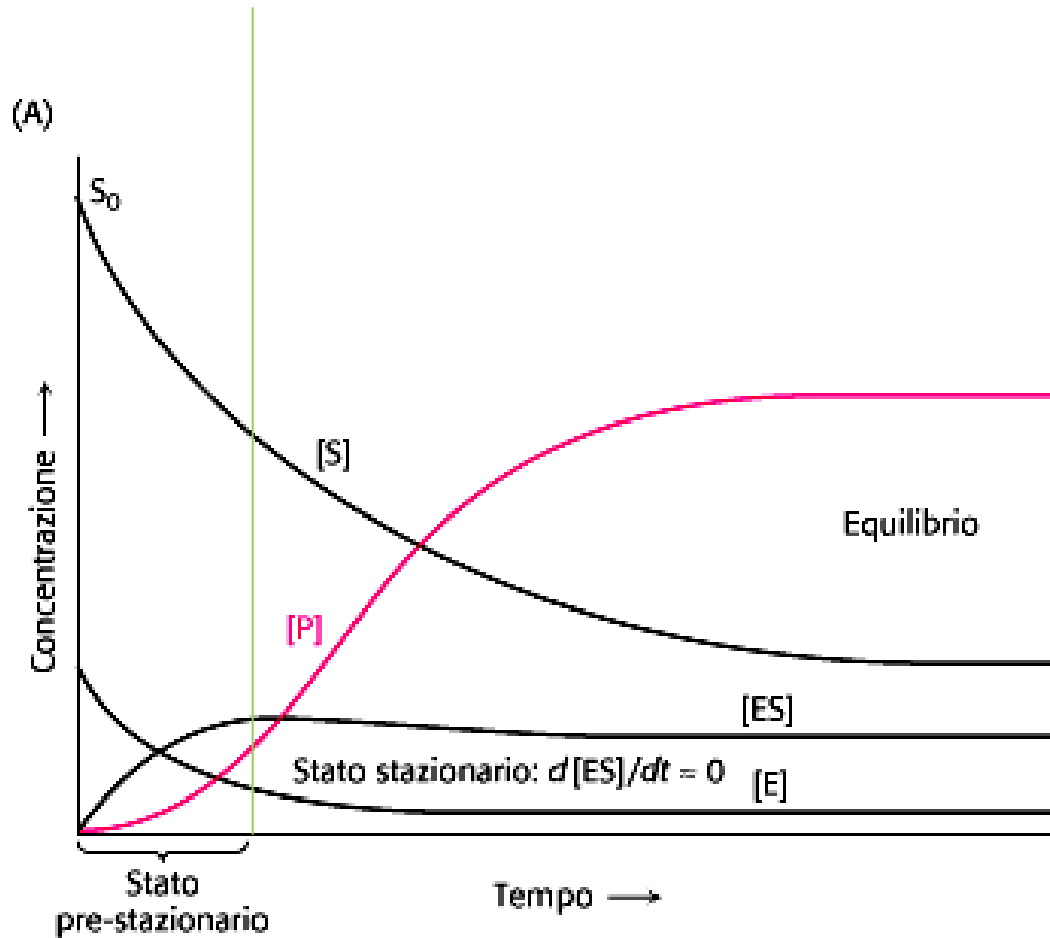
Leonor Michaelis  
1875–1949



Maud Menten  
1879–1960

Assunzione di stato stazionario  $d[ES]/dt = 0$

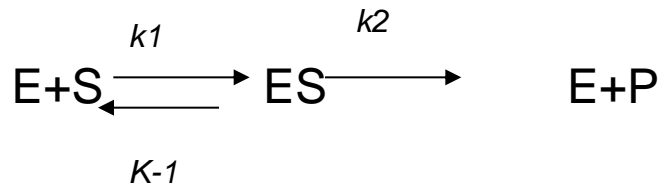
$[S] \gg [E]$



# EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

Ipotesi dell'equilibrio

Ipotesi dello stato stazionario



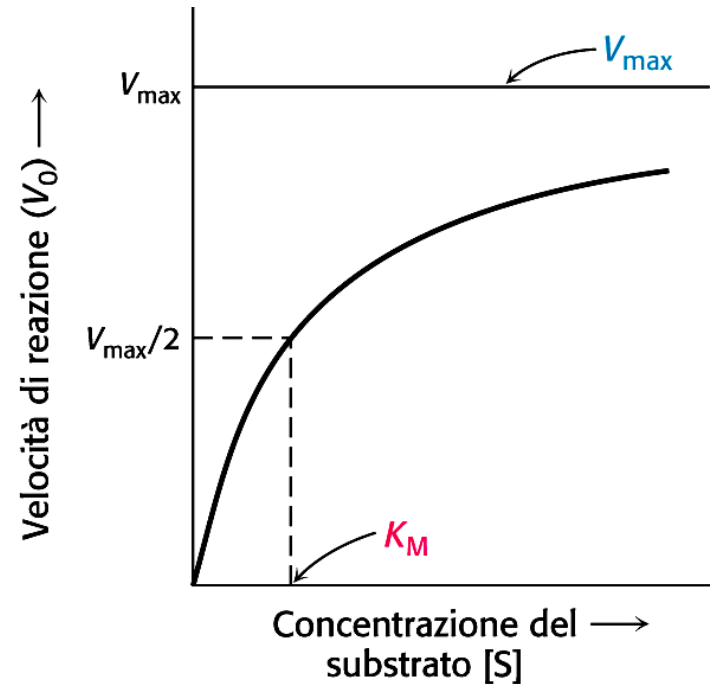
$$V_0 = k_2 [\text{ES}]$$

$$[\text{S}] \gg [\text{E}]$$

Velocità di formazione = Velocità di scissione

$$\text{Velocità di formazione di ES} = k_1 [\text{E}] [\text{S}]$$

$$\text{Velocità di scissione di ES} = k_2 [\text{E S}] + k_{-1} [\text{ES}]$$



Velocità di formazione di [ES] = velocità di scissione di [ES]

[S] >> [E]

$$k_1[E][S] = k_2[E S] + k_{-1}[ES]$$

$$k_1[E][S] = [E S](k_2 + k_{-1})$$

$$[E][S] = [E S](k_2 + k_{-1}) / k_1$$

$K_M = (k_2 + k_{-1}) / k_1$  costante di Michaelis Menten

$$[E S] = [E][S] / K_M$$

$$[E] = [Et] - [E S]$$

$$[E S] = ([Et] - [E S])[S] / K_M$$

$$[E S] = [Et][S] / K_M - [E S][S] / K_M$$

$$K_M[E S] = [Et][S] - [E S][S]$$

$$[E S](K_M + [S]) = [Et][S]$$

risolvendo per [E S]

$$[E S] = \frac{[Et][S]}{K_M + [S]}$$

$$[E S] = \frac{[Et] [S]}{K_M + [S]}$$

$$V_0 = k_2 [ES]$$

$$V_0 = k_2 \frac{[Et] [S]}{K_M + [S]}$$

$$V_{\max} = k_2 [Et]$$

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

**EQUAZIONE DI MICHAESIS MENTEN**

Questa equazione verifica i dati cinetici

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

$$S \gg K_M$$

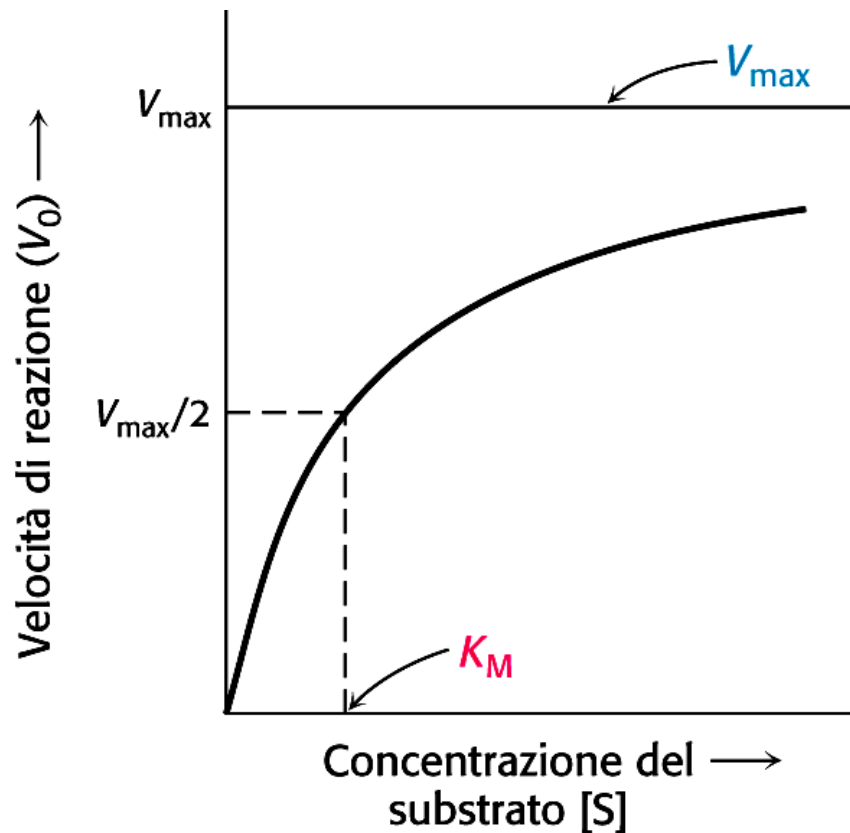
$$V_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Cioè  $V_0$  è indipendente dalla  $[S]$

$$S \ll K_M$$

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

$V$  è proporzionale alla  $[S]$





# A Significato $K_M$

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

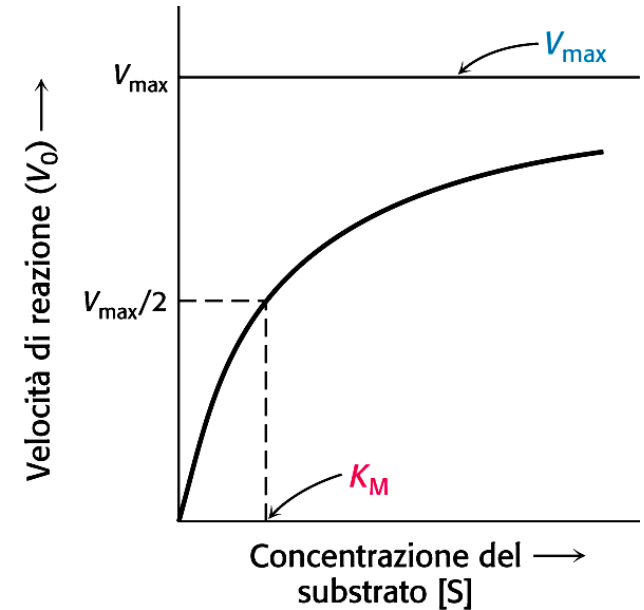
$$V_0 = 1/2 V_{\max}$$

$$K_M = S$$

table 8-6

$K_m$  for Some Enzymes and Substrates

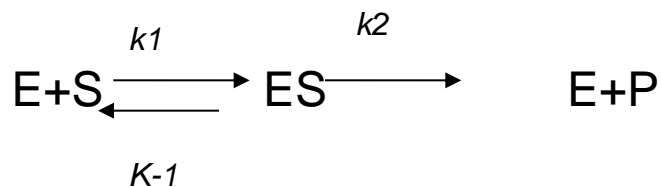
Enzyme	Substrate	$K_m$ (mM)
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
$\beta$ -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0



Il valore di  $K_M$  dipende dal substrato e dalle condizioni di reazione pH, T forza ionica. E' variabile da 10<sup>-1</sup> M a 10<sup>-7</sup> M

## Significato della $K_M$

**B**



$$K_M = (k_2 + k_{-1}) / k_1$$

$$k_2 \ll k_{-1}$$

$$k_{-1} / k_1 = K_S$$

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_{-1} / K_1$$

$K_M$  = alla costante di dissociazione del complesso  
quindi è la misura della forza del complesso

# Significato di $V_{max}$

$V_{max}$  = numero di molecole di substrato convertite in prodotto nell'unità di tempo quando l'enzima è completamente saturato

- Si esprime in concentrazione per unità di tempo ( $M s^{-1}$ )
- E' direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima usato

$$V_{max} = K_2 [Et]$$

$$K_{cat} = V_{max} / [Et]$$

$$\text{numero di turnover} = K_2 = K_{cat}$$

Numero di reazioni effettuati dall'enzima nell'unità di tempo

- Si esprime con il reciproco del tempo ( $s^{-1}$ )
- E' indipendente dalla concentrazione dell'enzima

**$K_{cat}$**  = numero di turnover numero di reazioni che un enzima catalizza nell'unità di tempo

table 8–7

**Turnover Numbers ( $k_{\text{cat}}$ ) of Some Enzymes**

Enzyme	Substrate	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2$	40,000,000
Carbonic anhydrase	$\text{HCO}_3^-$	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	140,000
$\beta$ -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

# Significato del rapporto $K_{cat}/K_M$

$$[S] \ll K_M$$

$$E_t = E$$

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

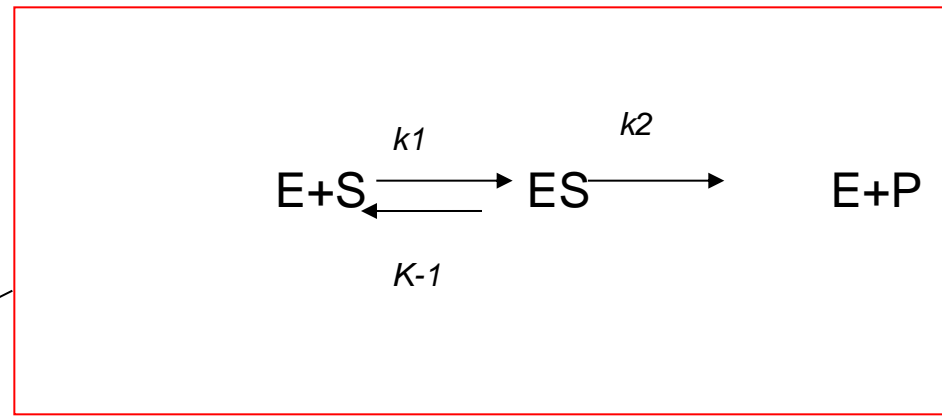
$$V_0 = \frac{k_2 \cdot E_t \cdot [S]}{K_M}$$

$$V_0 = \frac{k_{cat} \cdot E_t \cdot [S]}{K_M}$$

$$V_0 = k_{cat}/K_M \cdot [E] \cdot [S]$$

$$\frac{K_{cat}}{K_M}$$

= **costante di specificità**  
 misura dell'efficienza catalitica  
 dell'interazione di S ed E



In queste condizioni la costante di specificità è la costante di velocità usata per misurare l'efficienza catalitica dell'interazione S ed E

## Costante di specificità $K_{cat}/K_M$

È il rapporto tra la frequenza con cui l'enzima catalizza la reazione e l'affinità per il suo substrato  
Si esprime come il reciproco della concentrazione e il reciproco del tempo  $M^{-1} s^{-1}$

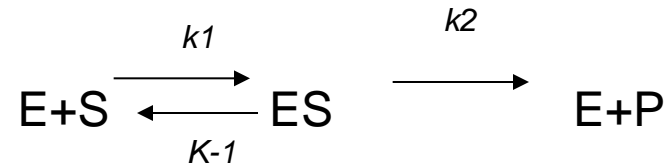
Non può essere superiore a  $k_1$

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

$$[S] \ll K_M \quad E_t = E$$

$$V_0 = \frac{k_2 \cdot E_t \cdot [S]}{K_M}$$

$$V_0 = \frac{k_{cat} \cdot E_t \cdot [S]}{K_M}$$



$$V_0 = k_{cat} / K_M \cdot [E] \cdot [S]$$

= **costante di specificità**  
misura dell'efficienza catalitica  
dell'interazione di S ed E

In queste condizioni la costante di specificità è la costante di velocità usata per misurare l'efficienza catalitica dell'interazione S ed E

$$\frac{k_{cat}}{K_M}$$

È una misura dell'efficienza catalitica dell'enzima

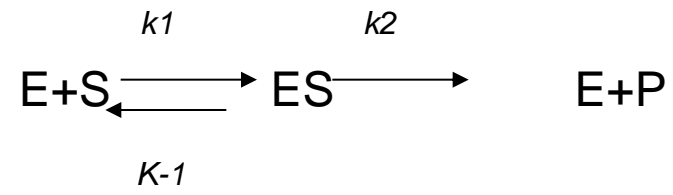
Qual è il limite superiore dell'efficienza catalitica degli enzimi ?

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} \quad k_2 \gg k_{-1}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = k_1$$

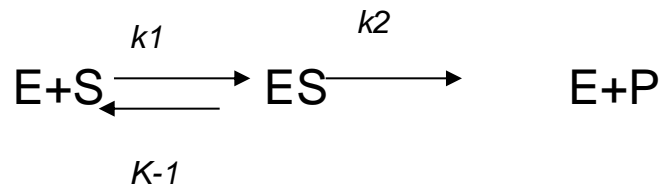
$k_1$  non può essere più grande della frequenza con cui le molecole di enzima e substrato arrivano a collisione in soluzione

Questo limite controllato dalla diffusione varia da  $10^8$  a  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



$$\frac{K_{\text{cat}}}{K_M} < K_1$$





$$V_o = k_{cat}/K_M \cdot [E] \cdot [S]$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} < k_1$$

Il limite superiore è  $k_1$

cioè la velocità di decomposizione di ES in E+P non può essere mai superiore alla probabilità di incontro di E+S che è controllata dalla diffusione

# ENZIMI IL CUI VALORE $k_{cat}/K_m$ È CONTROLLATO DALLA DIFFUSIONE $10^8$ - $10^9$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )

## Enzimi che hanno raggiunto la perfezione cinetica

table 8-8

Enzymes for Which  $k_{cat}/K_m$  Is Close to the Diffusion-Controlled Limit ( $10^8$  to  $10^9$   $M^{-1}s^{-1}$ )

Enzyme	Substrate	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (M)	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	$1.4 \times 10^4$	$9 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^8$
Carbonic anhydrase	$CO_2$	$1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^{-2}$	$8.3 \times 10^7$
	$HCO_3^-$	$4 \times 10^5$	$2.6 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	$H_2O_2$	$4 \times 10^7$	1.1	$4 \times 10^7$
Crotonase	Crotonyl-CoA	$5.7 \times 10^3$	$2 \times 10^{-5}$	$2.8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarate	$8 \times 10^2$	$5 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^8$
	Malate	$9 \times 10^2$	$2.5 \times 10^{-5}$	$3.6 \times 10^7$
$\beta$ -Lactamase	Benzylpenicillin	$2.0 \times 10^3$	$2 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^8$
Triose phosphate isomerase	Glyceraldehyde 3-phosphate	$4.3 \times 10^3$	$4.7 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^8$

Source: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W.H. Freeman and Company, New York.

## Effetto di piccole variazioni strutturali del substrato sui parametri cinetici

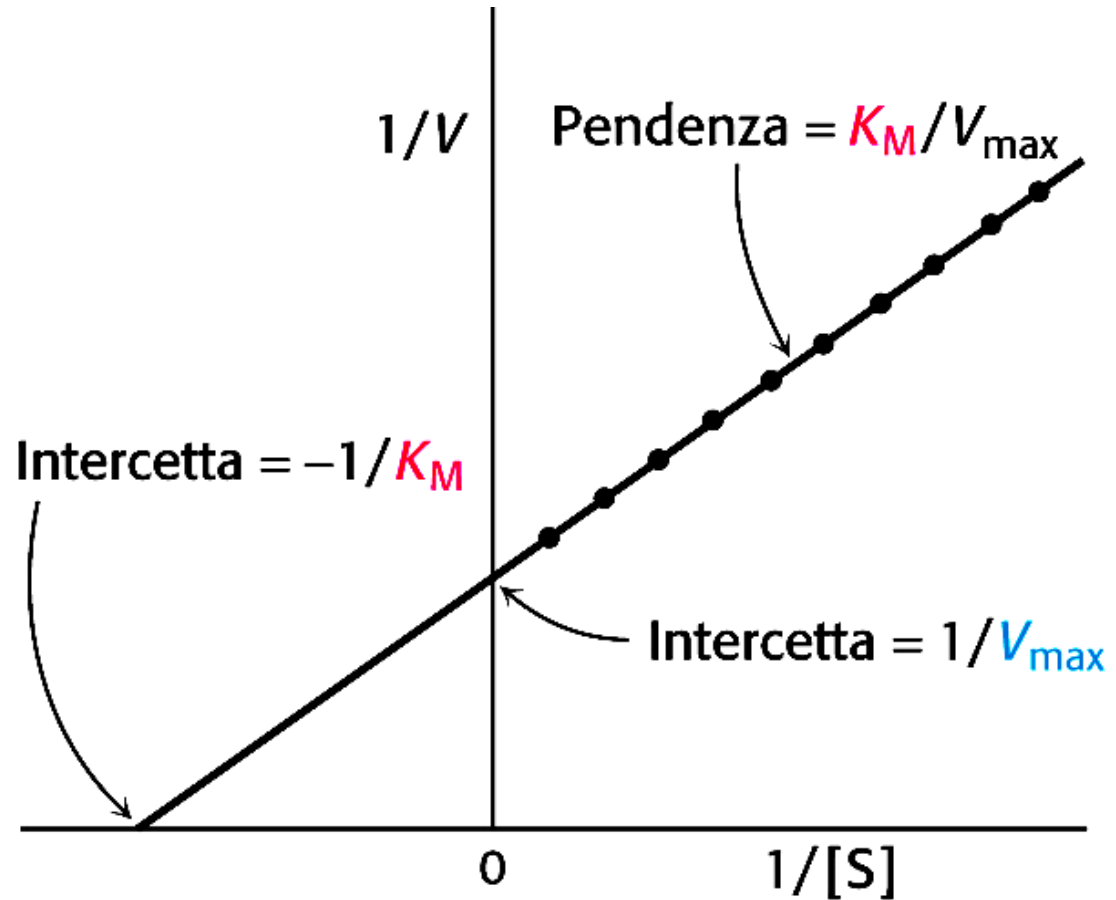
**SUBSTRATI CHIMOTRIPSINA**

		$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Substrate A	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_2}{\underset{\text{C}_6\text{H}_{11}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$	0.06	31	2
Substrate B	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_2}{\underset{\text{C}_6\text{H}_{11}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$	0.14	15	10
Substrate C	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_2}{\underset{\text{C}_6\text{H}_{11}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$	2.8	25	114

## Grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk

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

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_M}{v_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$



# Inibizione reversibile:

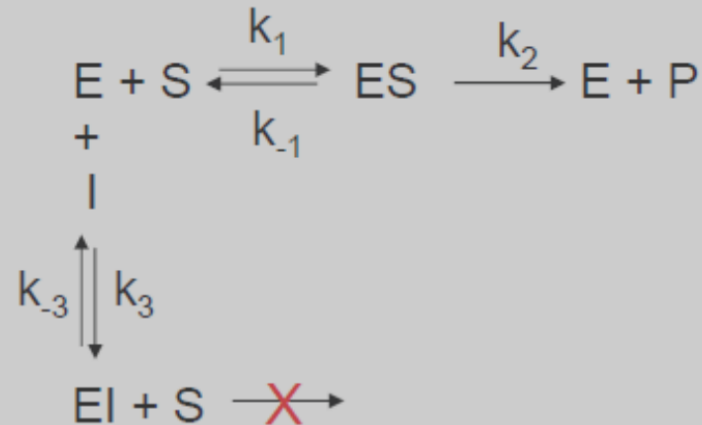
Competitiva

Incompetitiva

Mista o non competitiva

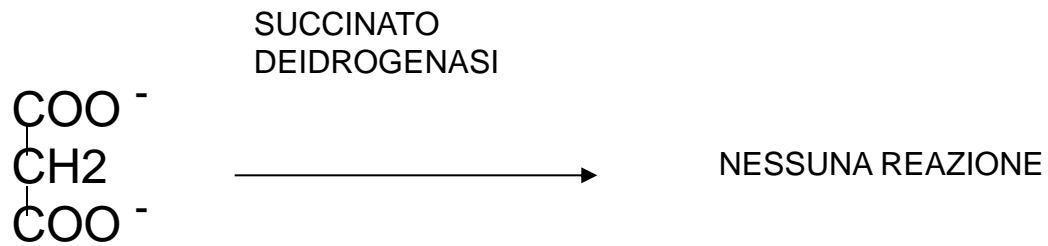
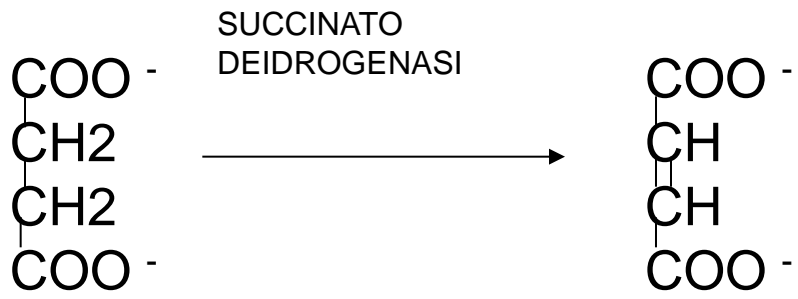
## Inibitori competitivi:

schema di reazione

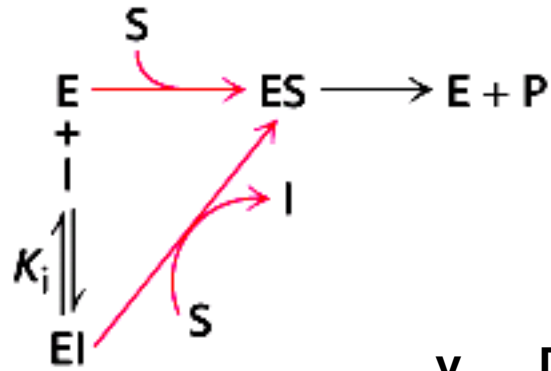


- EI = complesso enzima-inibitore cataliticamente inattivo
- il complesso ternario EIS è fisicamente impossibile
- EI non reagisce a dare E + P ( $\Rightarrow$  I non è alterato da E)
- l'inibitore si lega in modo reversibile all'enzima e si porta in rapido equilibrio con esso con **costante di dissociazione**

$$K_1 = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

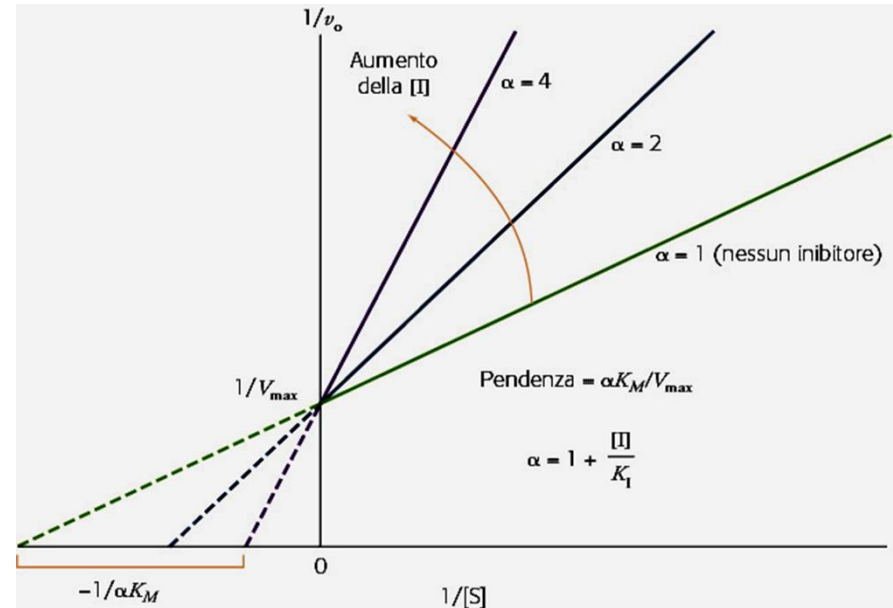
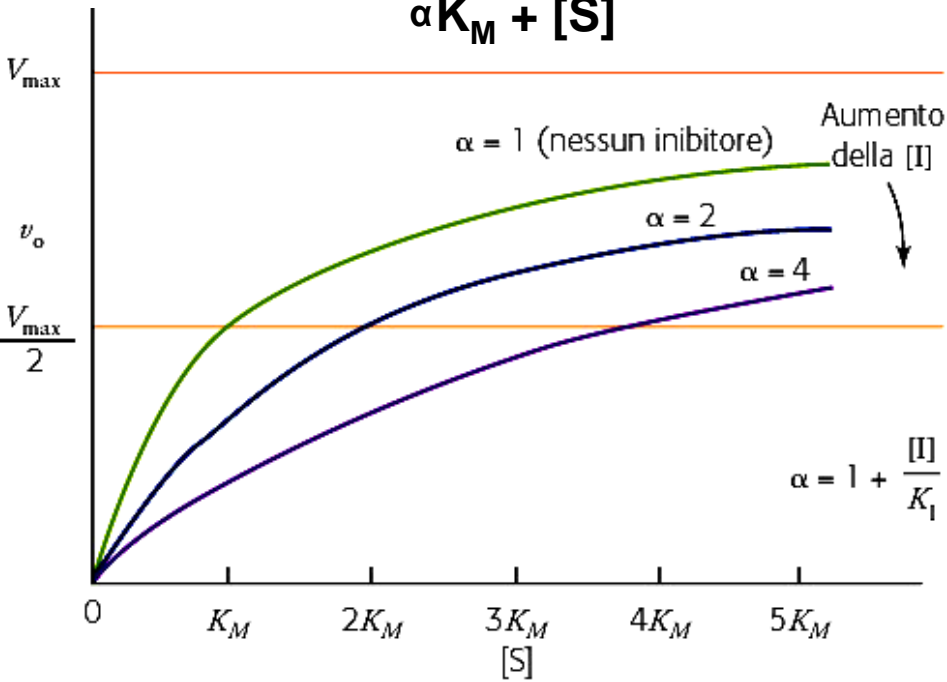


# INIBIZIONE COMPETITIVA



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

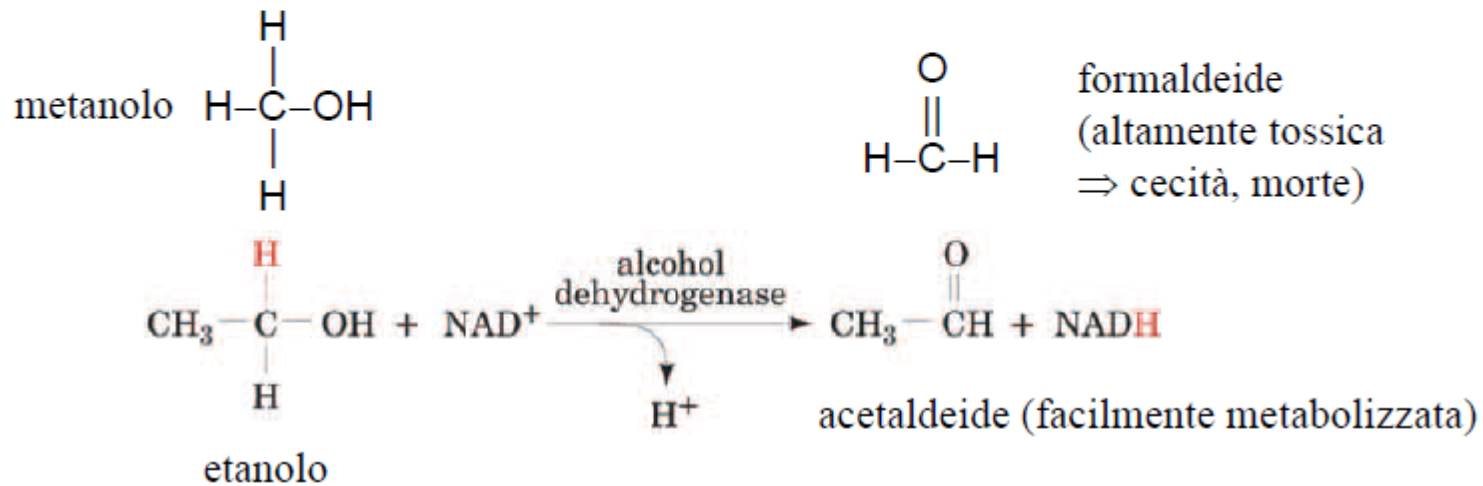
$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$





l'inibizione competitiva è il principio base dell'uso dell'**etanolo** nel trattamento dell'**avvelenamento da metanolo**

- metanolo solo parzialmente tossico
- etanolo inibitore competitivo per la alcol deidrogenasi di fegato
- metanolo escreto attraverso le urine



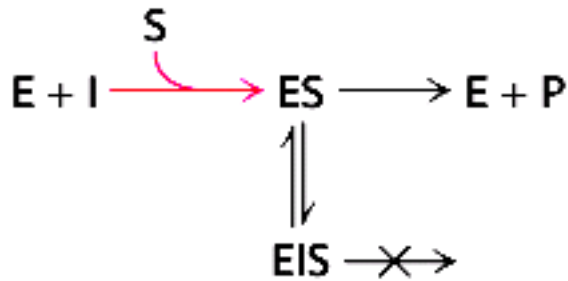




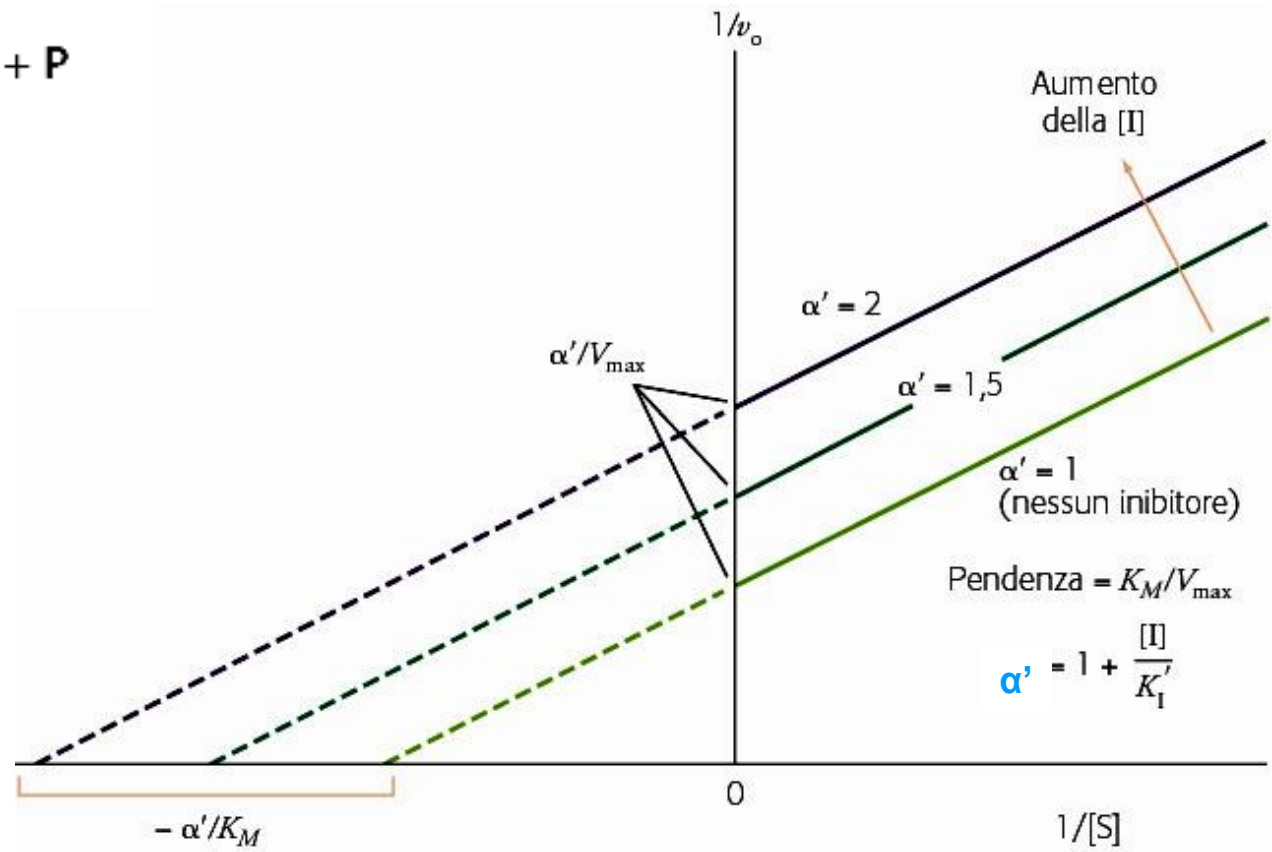
# Inibizione incompetitiva

$$V_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + \alpha' [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



$$K_I = \frac{[ES] [I]}{[ESI]}$$



# INIBIZIONE MISTA

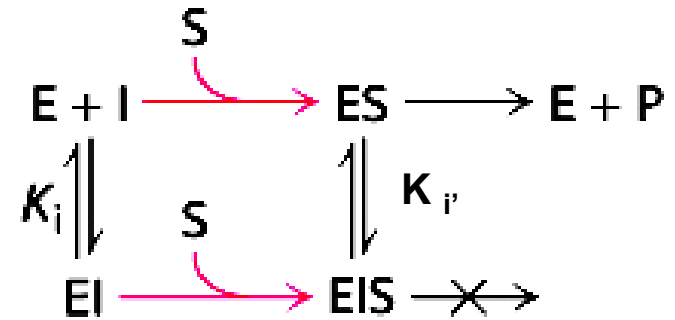
Gli inibitori interferiscono sia con il legame del substrato sia con l'attività catalitica

$$K_i = [E][I] / [EI]$$

$$K_p' = [ES][I] / [ESI]$$

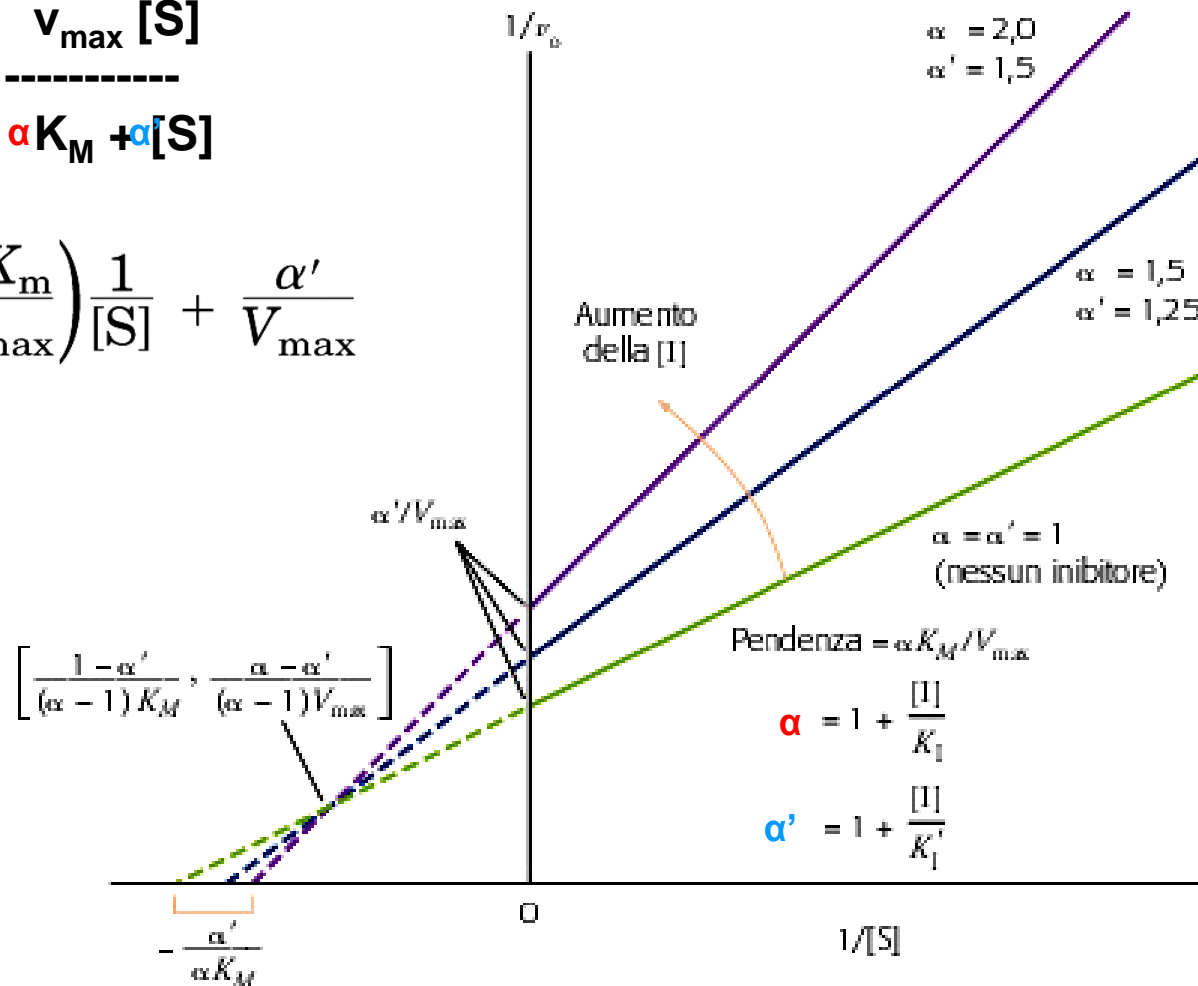
$$\alpha = 1 + [I] / K_i$$

$$\alpha' = 1 + [I] / K_i'$$



$$V_0 = \frac{v_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



-quando  $K_1 = K_1'$  si parla di **inibizione non-competitiva (mista) pura** ( $\alpha = \alpha'$ ),  
cioè l'enzima ed il complesso enzima-substrato legano I con la stessa affinità

⇒ intersezione linee sull'asse delle ascisse e a  $(-1/K_M)$

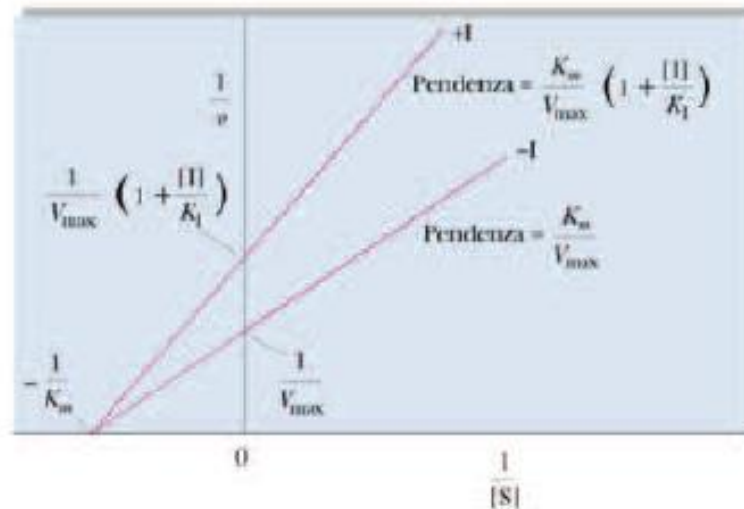
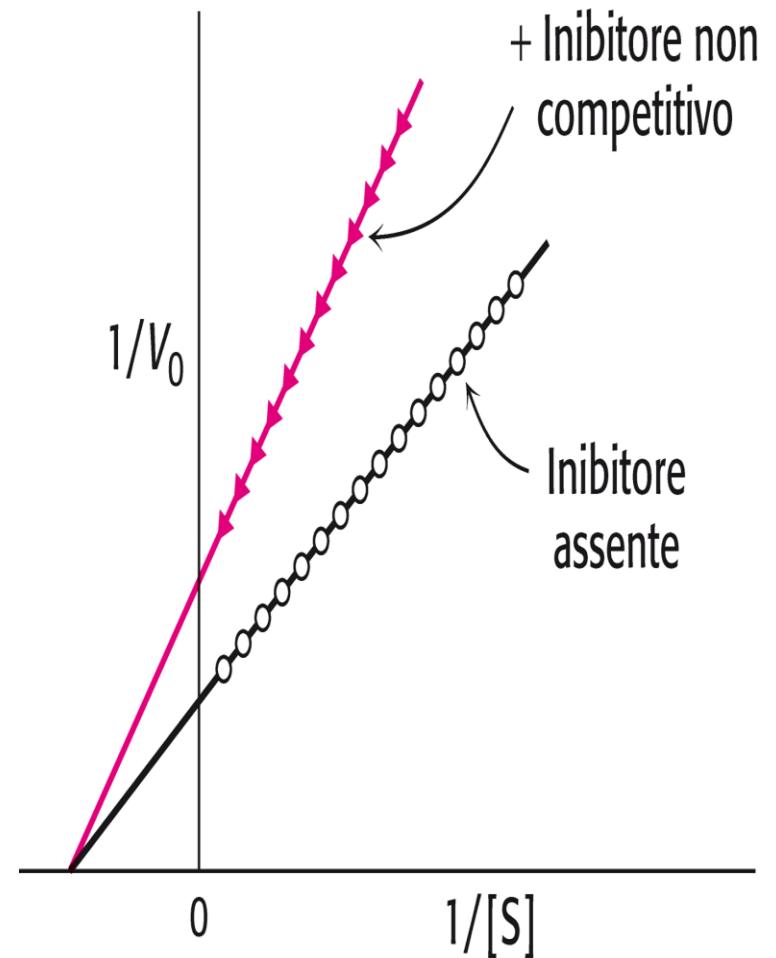
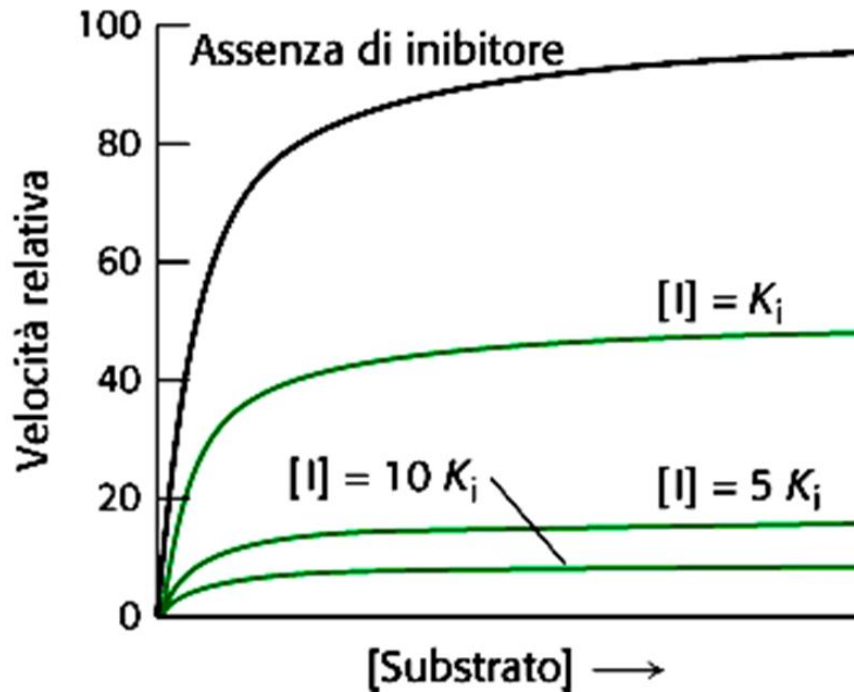
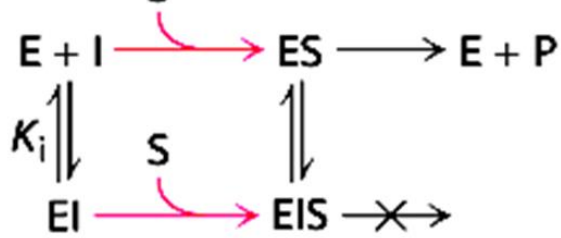


grafico dei doppi reciproci (Lineweaver-Burk)

# Inibizione non competitiva





## Tipo di inibizione

Competitiva

Incompetitiva

Mista

$V_{maxapp}$

$V_{max}$

$V_{max}/\alpha'$

$V_{max}/\alpha'$

$K_{Mapp}$

$\alpha K_M$

$K_M/\alpha'$

$\alpha K_M/\alpha'$

## Inibitori irreversibili:

- alterazioni stabili (covalenti) dell'enzima reale diminuzione della concentrazione dell'enzima attivo  $[E]_T$

⇒ diminuisce  $V_{MAX} = k_2 [E]_T$  per qualsiasi  $[S]$  senza variare  $K_M$

- stesso andamento di  $1/v_0$  come inibizione **non-competitiva (mista) pura** (intersezione linee asse ascisse)

- distinzione da inibizione non-competitiva

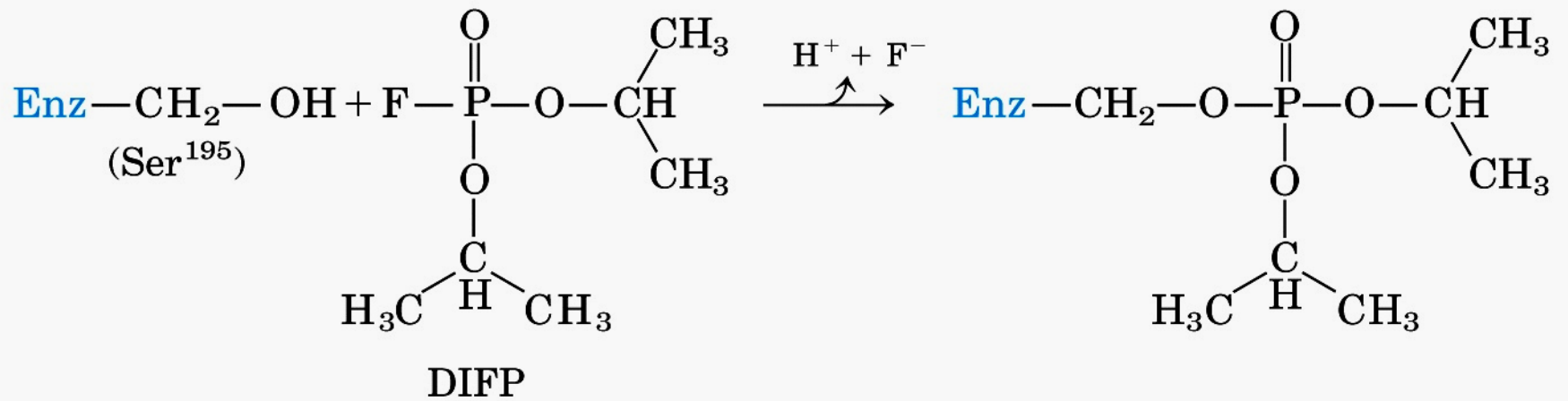
1) inibizione non istantanea, ma dipende da t (aumenta man mano che si forma EI)

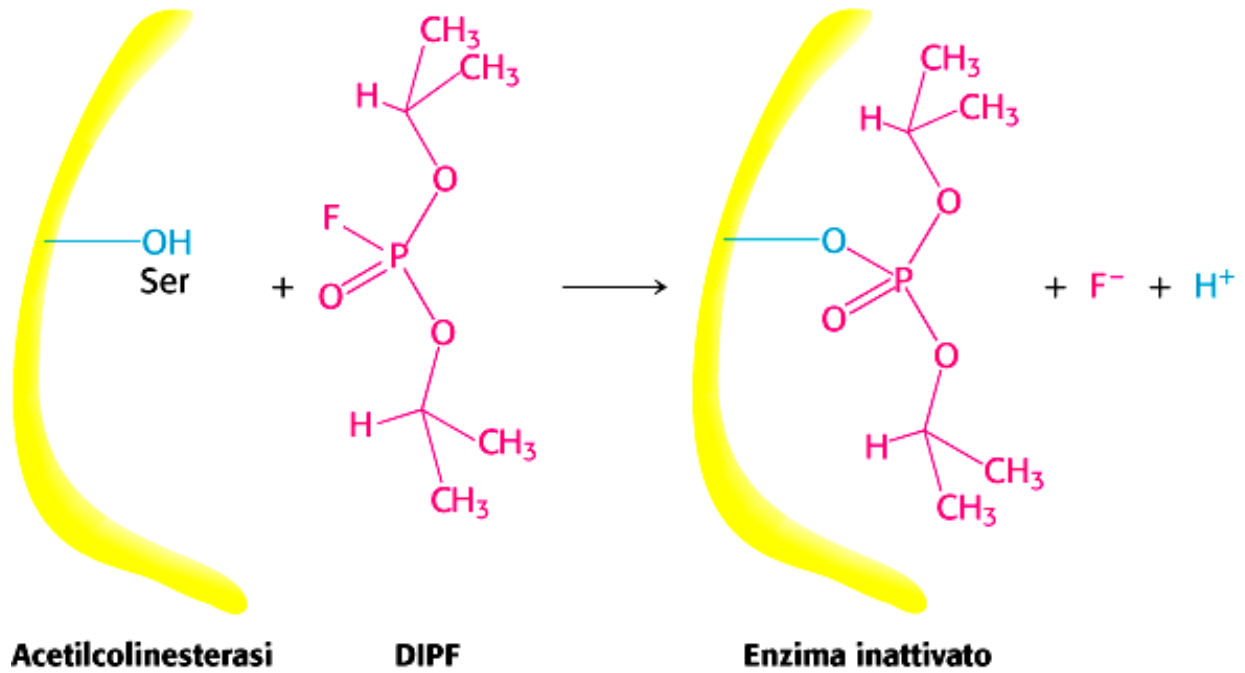
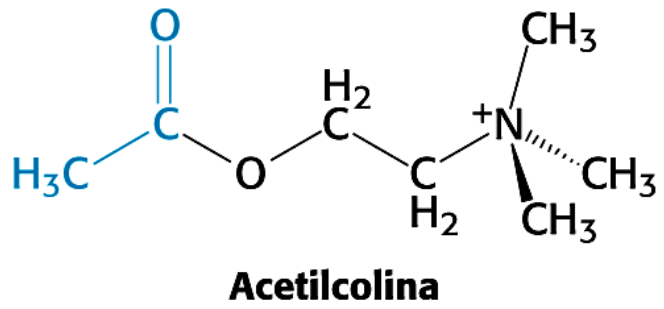
2) dialisi o diluizione non dissociano EI e non si restaura attività enzimatica

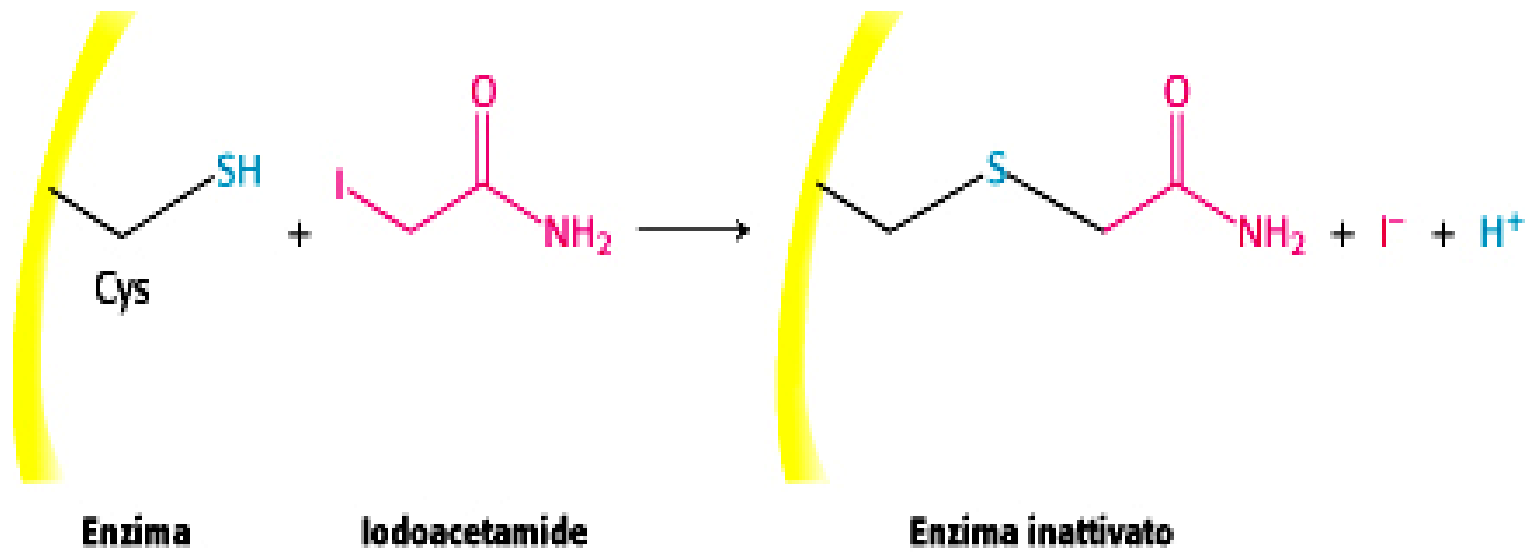
# **INIBIZIONE IRREVERSIBILE**

**Gli inibitori irreversibili si legano covalentemente ai gruppi funzionali degli enzimi**

- Reagenti gruppo specifici**
- Analoghi del substrato**
- Inibitori suicidi**

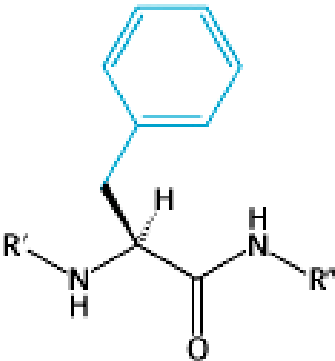




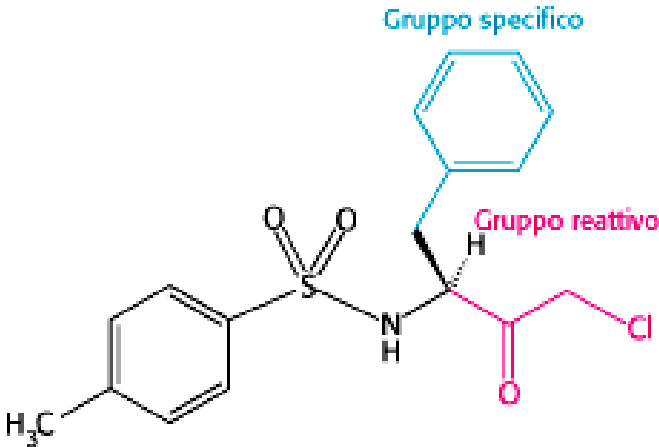


# Marcatori per affinità: molecole strutturalmente simili al substrato che modificano i residui del sito attivo

(A)

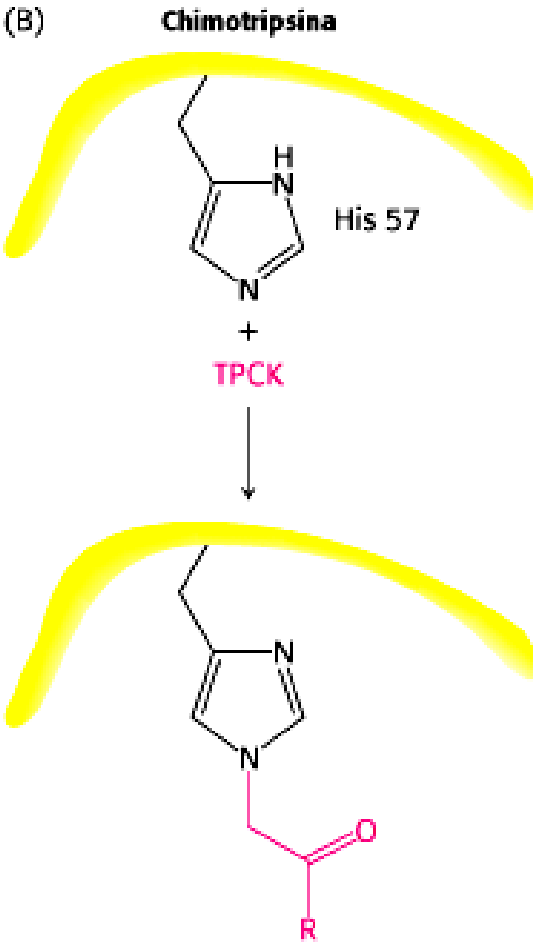


Substrato naturale della chimotripsina



Tosil-L-fenilalanina clorometil chetone (TPCK)

(B)



**Inibitori suicidi** :sfruttano il meccanismo d'azione dell'enzima

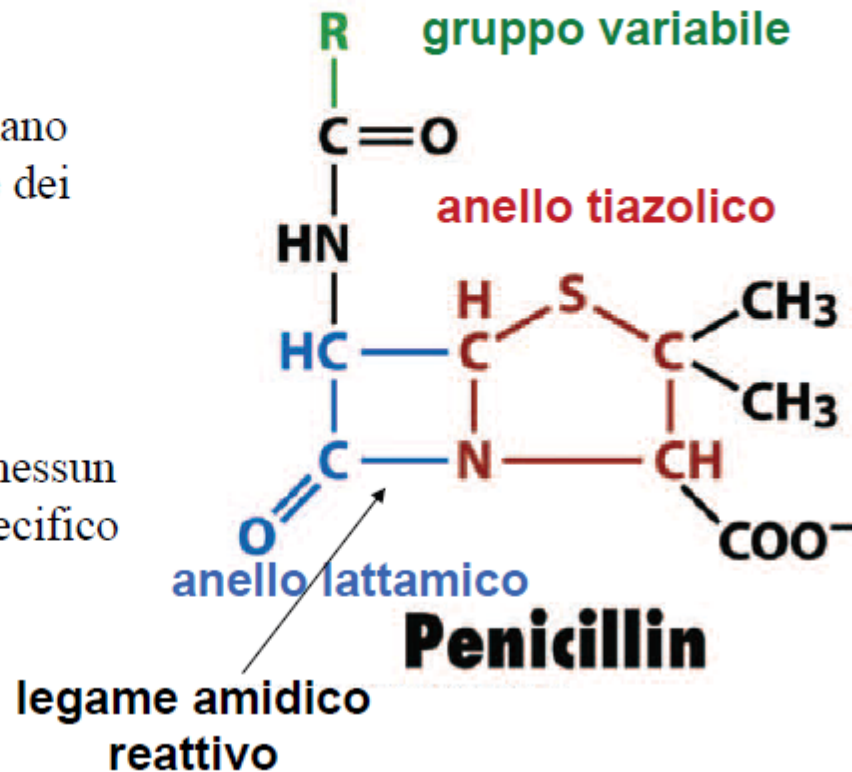
Sono analoghi del substrato che vengono inizialmente processati con il normale meccanismo catalitico

Questo crea un intermedio chimicamente attivo che modifica covalentemente e inattiva l'enzima

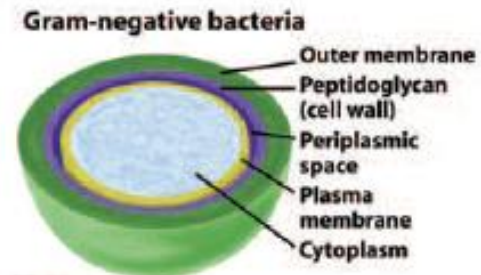
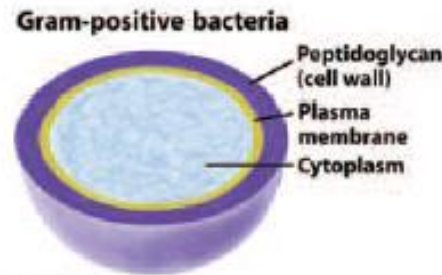


## Es: **penicillina**

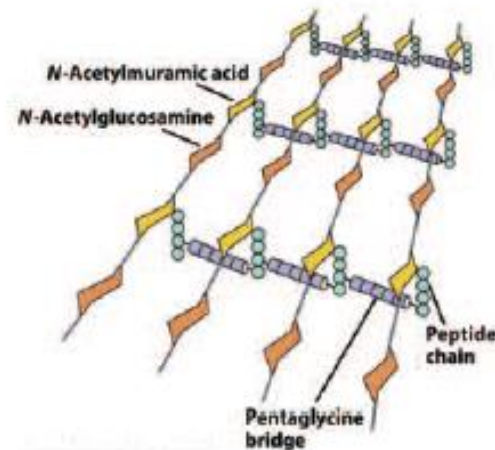
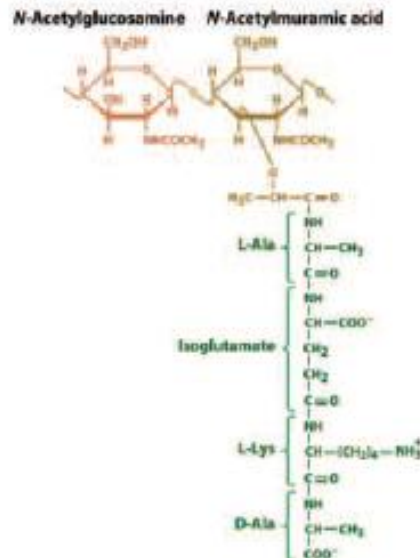
- antibiotico secreto dalla muffa *Penicilium notatum*
- induce lisi dei batteri
- lega ed inattiva gli enzimi formano i legami trasversali tra le catene dei **peptidoglicani**
- in fase di crescita l'esposizione alla penicillina è letale
- non tossica per l'uomo perché nessun enzima umano lega in modo specifico la penicillina

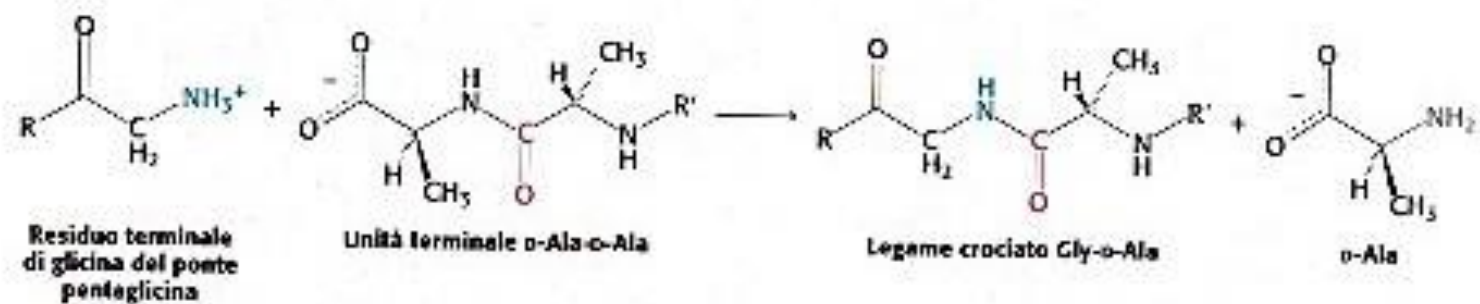


# Peptidoglicani

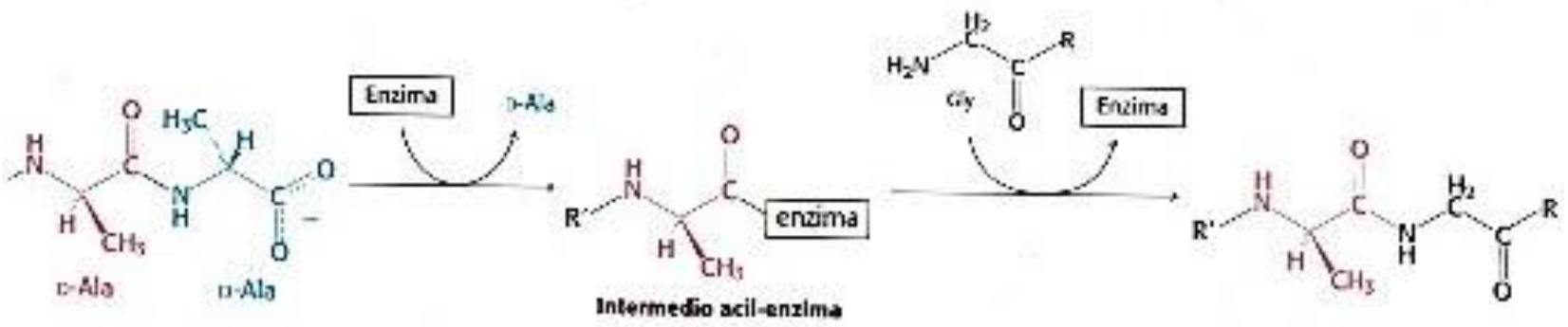


- reticolo di polisaccaridi legati in modo covalente e da catene polipeptidiche
- legami trasversali formati da 5 Gly che uniscono il gruppo C-terminale di un tetrapeptide con il gruppo amminico ε di una Lys



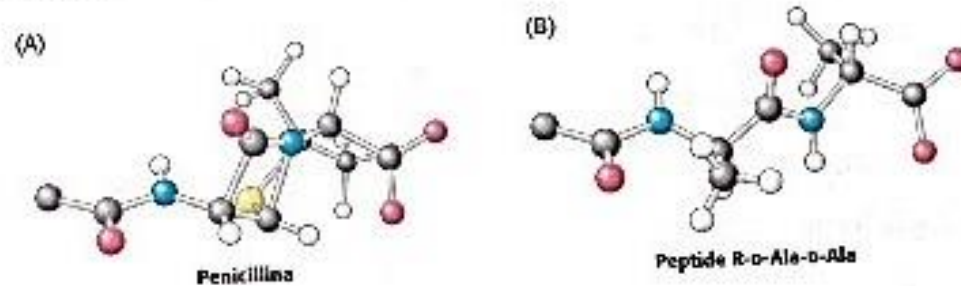


**Figura 8.28** Formazione dei legami trasversali nel peptidoglicano dello *S. aureus*  
 Nella parete della cellula il gruppo amminico terminale del ponte di pentaglicina attacca il legame peptidico tra le due D-alanine per formare un legame trasversale.



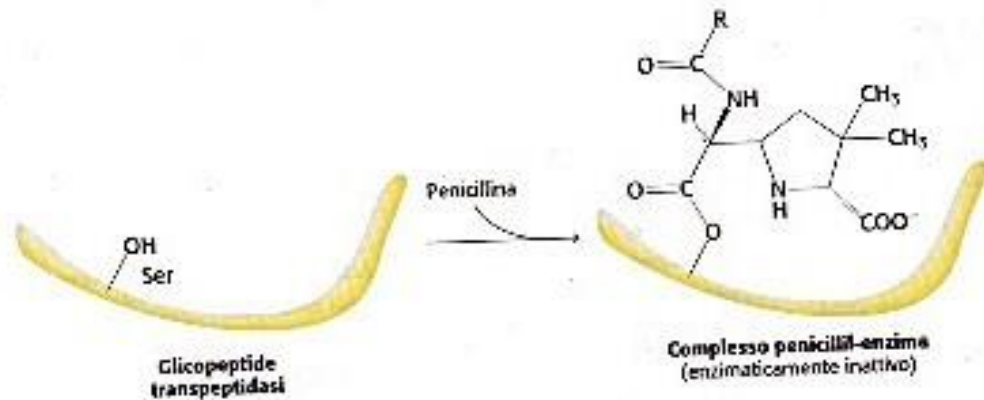
**Figura 8.29** Reazione transpeptidasi  
 Nella reazione transpeptidasi si forma un intermedio acil-enzima che porta alla formazione dei legami trasversali.

© 1983 07094 0



**Figura 8.30** Conformazione della penicillina e di un substrato naturale

La conformazione della penicillina in vicinanza del legame peptidico reattivo (A) è molto simile alla conformazione proposta per lo stato di transizione (B) nella reazione transpeptidasi. [Fonte: B. Lee, *J. Mol. Biol.* 61(1971):464.]



**Figura 8.31** Formazione del complesso penicillil-enzima

La penicillina reagisce con la transpeptidasi per formare un complesso inattivo, indefinitamente stabile.

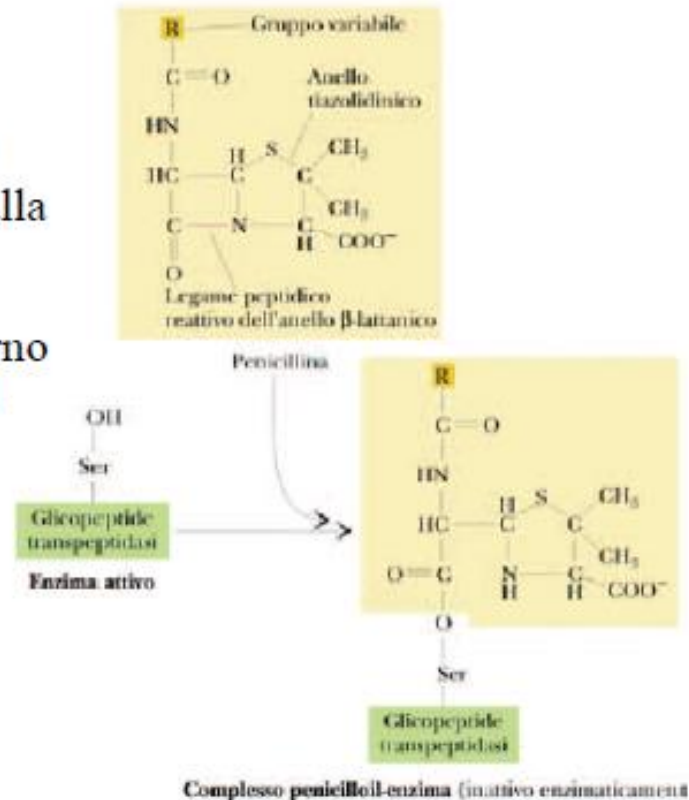
*Il complesso penicillil-enzima non può procedere oltre e la transpeptidasi è inibita irreversibilmente.*

gestire con la dieta che sintetizzano gli enzimi richiesti per costruirle a partire da semplici molecole. ... può essere una di esse.

## Inibitori irreversibili:

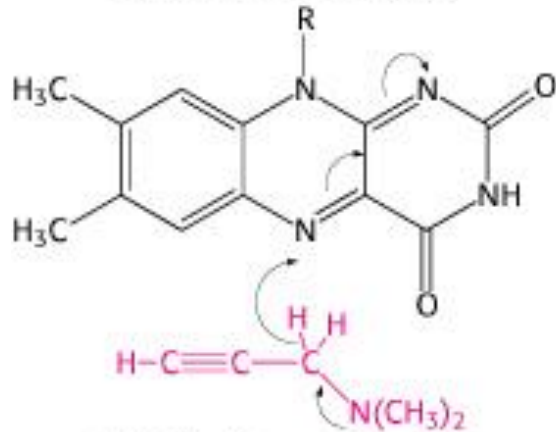
### Penicillina

- il legame peptidico reattivo dell'anello  $\beta$ -lattamico si attacca covalentemente alla Ser del sito attivo
- la conformazione della penicillina attorno al legame peptidico reattivo assomiglia allo stato di transizione
- legame irreversibile



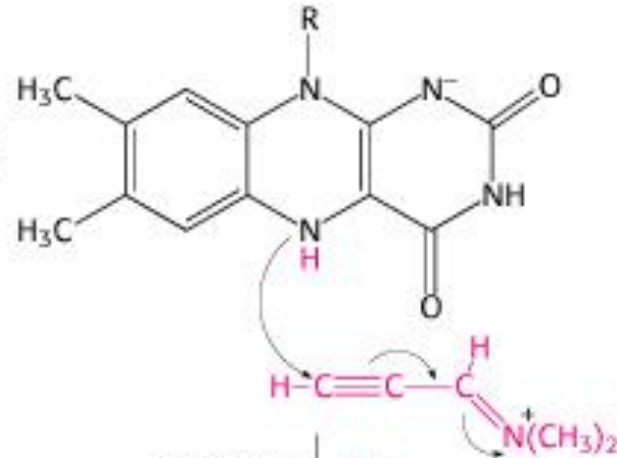
# Monoammina ossidasi

Gruppo prostetico flavinico



*N,N*-Dimetilpropargilammina

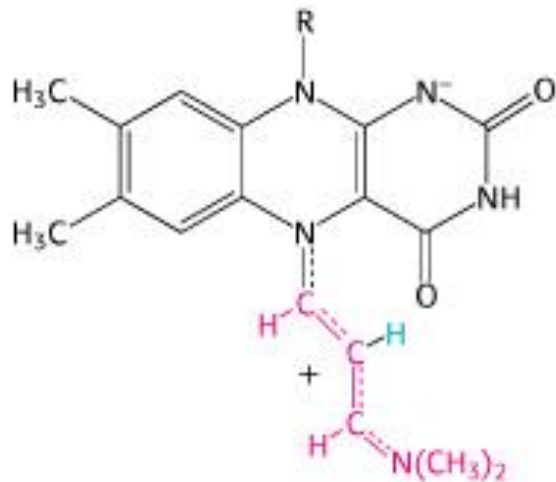
Ossidazione



Alchilazione -  $\text{H}^+$



+  $\text{H}^+$



Enzima inattivato con la flavina modificata stabilmente

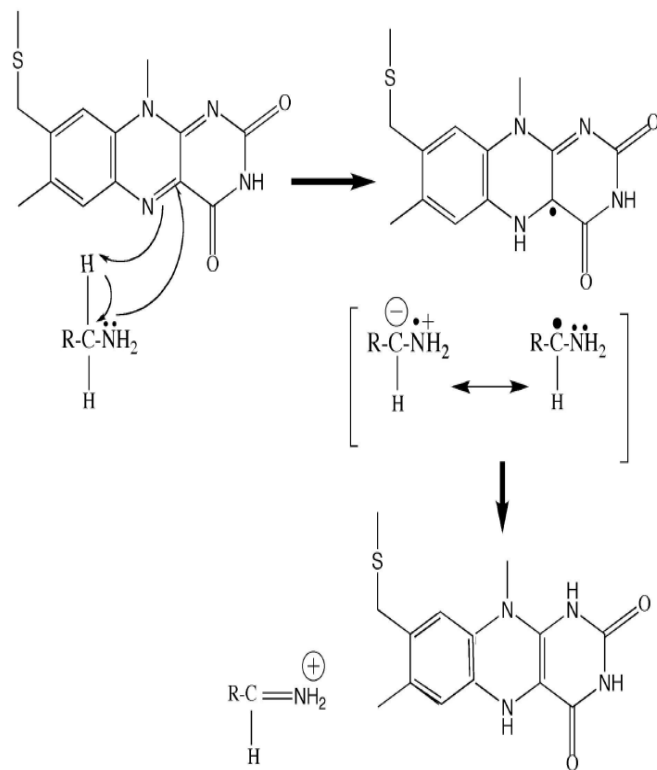
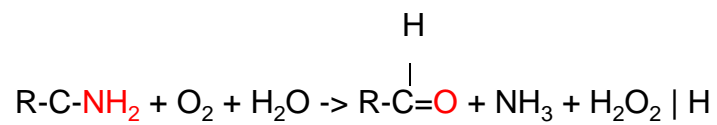


Fig9.  
Proposed Single Electron Transfer Mechanism for the reductive half reaction in MAO catalysis  
[30].

# Reazioni a due substrati

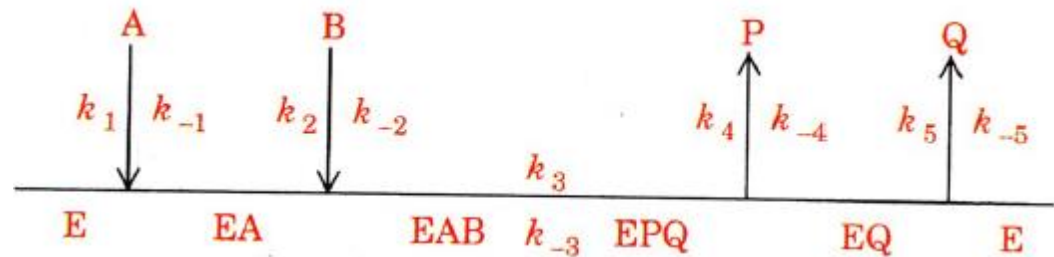


- Reazioni sequenziali o a spostamento singolo (si forma un complesso ternario)

Tutti i substrati si devono combinare con l'enzima prima che possa avvenire la reazione e possano essere rilasciati i prodotti

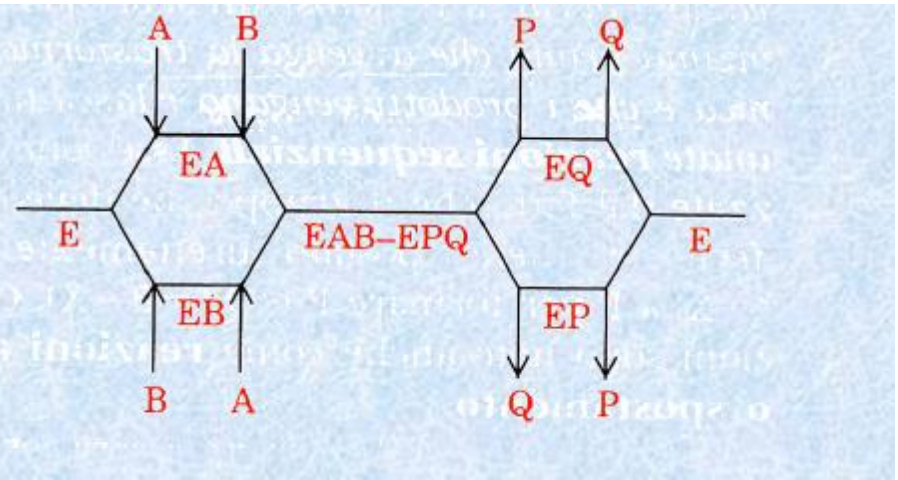
## meccanismo ordinato:

il legame del primo substrato è necessario affinché l'enzima possa formare il sito di legame per il secondo substrato



## meccanismo casuale:

entrambi i siti di legame sono presenti nell'enzima libero

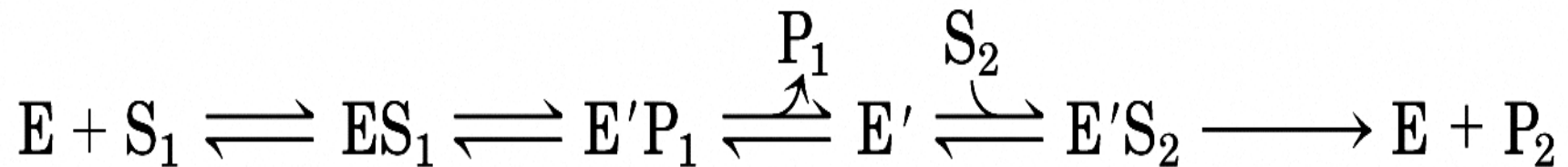




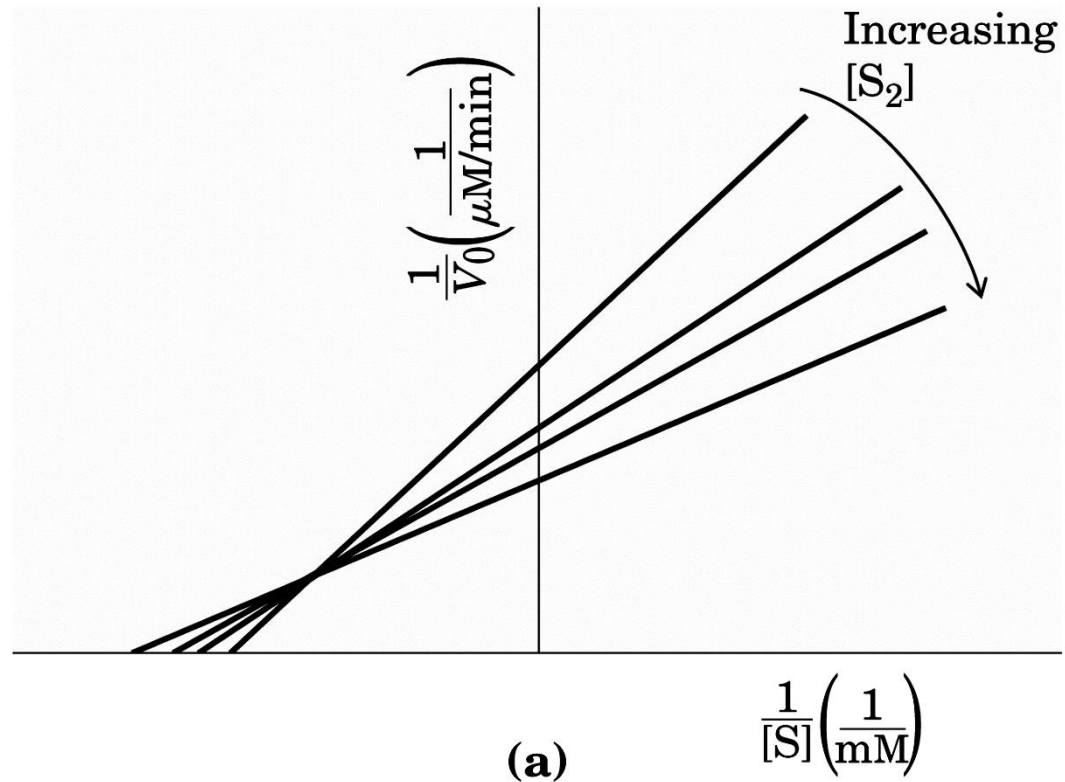
# Reazioni a ping-pong( non si forma un complesso ternario)

Si forma un complesso ES , l'enzima viene modificato E' a causa del trasferimento di un gruppo; viene allontanato dal complesso il primo prodotto P1, l'enzima modificato genera un secondo complesso E'S2 con il secondo substrato, viene rilasciato il secondo prodotto P2 e l'enzima ritorna libero E

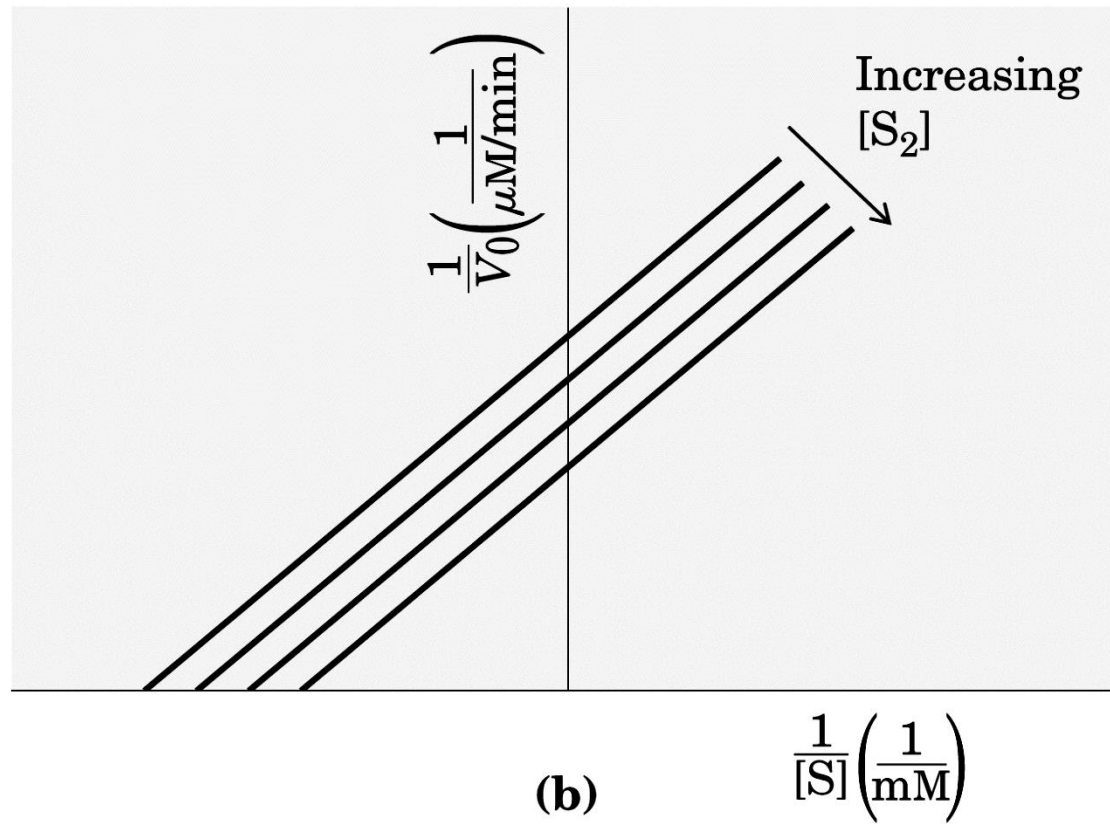
**(b) Enzyme reaction in which no ternary complex is formed**



# Complesso ternario SPOSTAMENTO SINGOLO



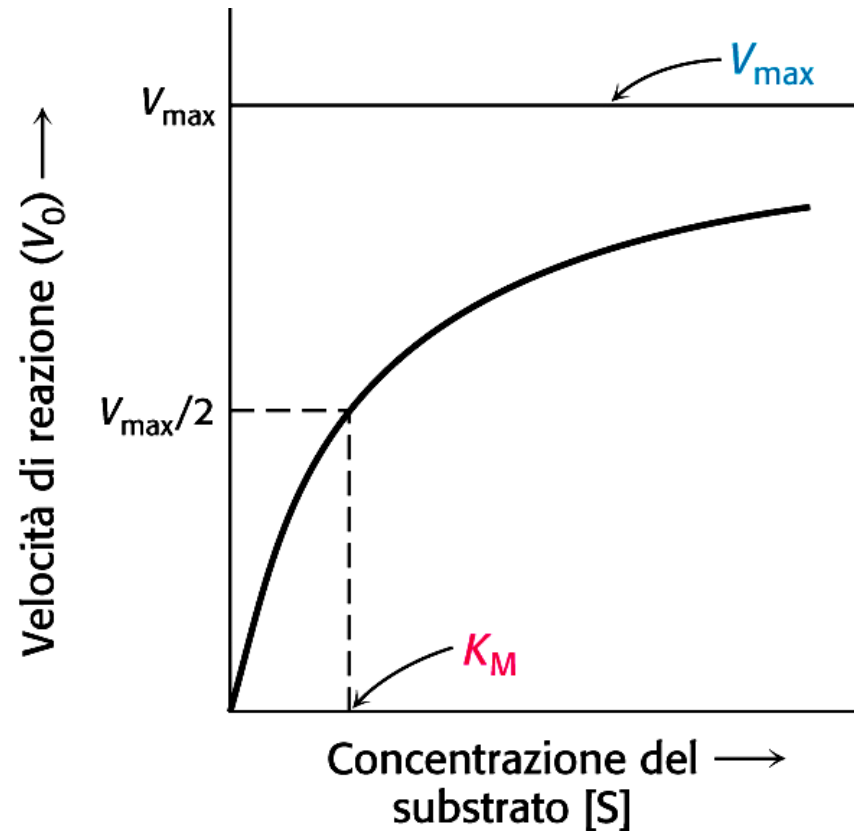
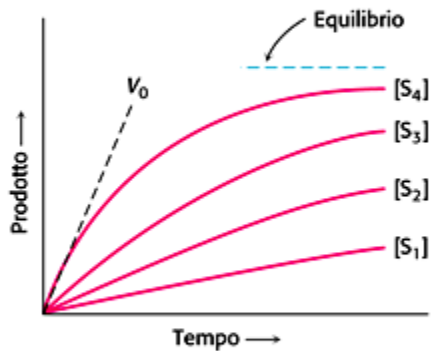
# Meccanismo a ping pong



- Gli enzimi possono essere usati come strumenti analitici per identificare o quantificare sostanze chimiche specifiche in soluzione.
- E' possibile determinare la presenza e la quantità di un determinato enzima in un fluido biologico misurandone l'attività con substrati specifici.
- Possiamo determinare i parametri cinetici ( $K_M$  ,  $K_{cat}$  o attività specifica) di un particolare enzima.

## Come si ricavano sperimentalmente i parametri cinetici?

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



## CONDIZIONI SPERIMENTALI DEL SAGGIO

- Controllo del pH con una soluzione tampone
- Controllo della temperatura
- Assenza di inibitori (agenti chelanti, metalli)

In un saggio di attività enzimatica in genere si misura il prodotto della reazione, piuttosto che il consumo di substrato

## Saggi Continui

- Sono più accurati e meno laboriosi di quelli discontinui
- Per lo più usano metodi spettrofotometrici

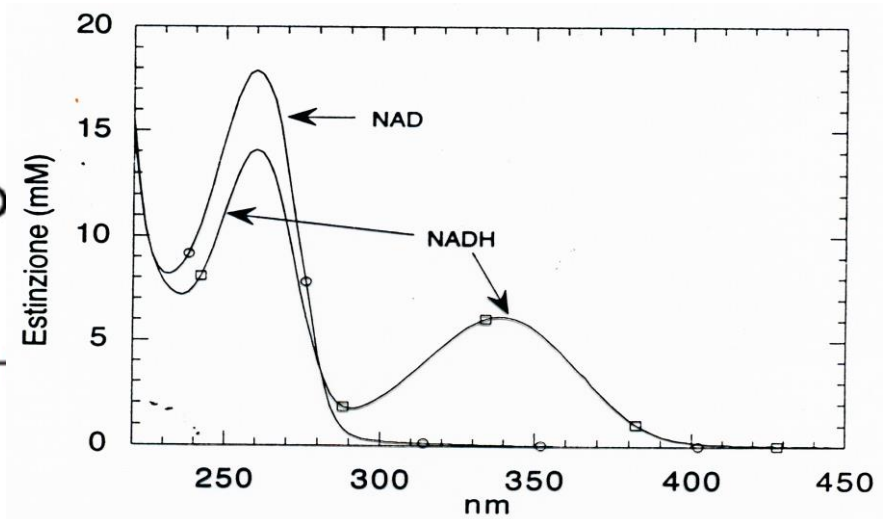
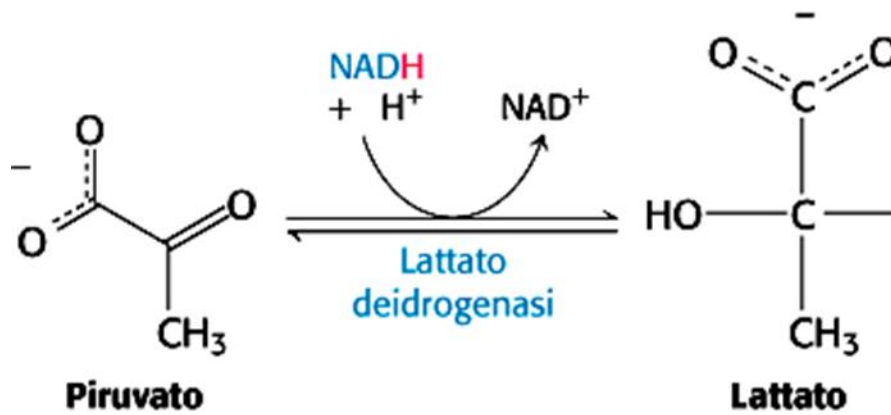
## Saggi Discontinui

a punti fissi

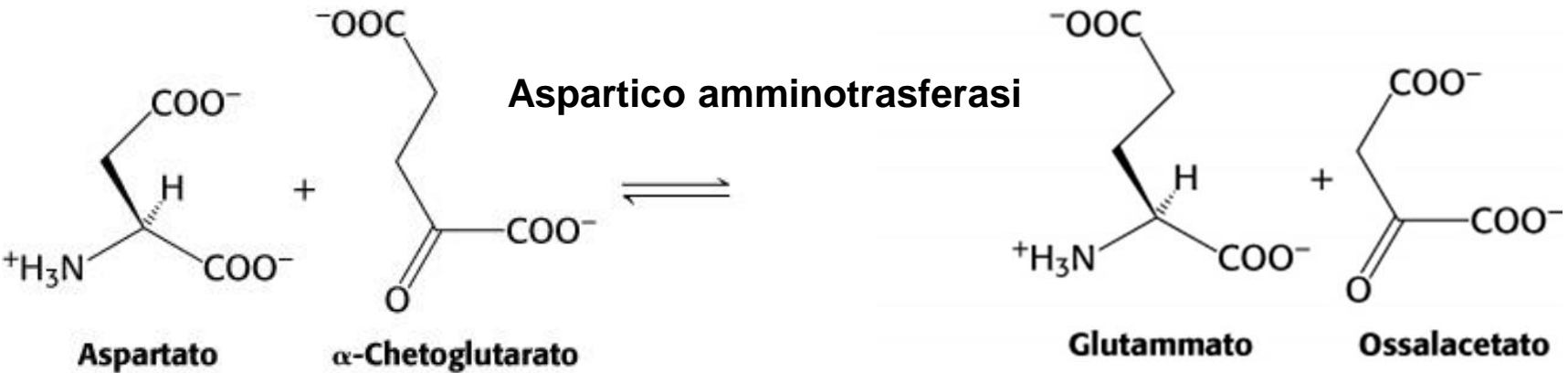
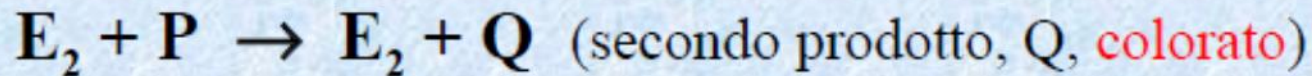
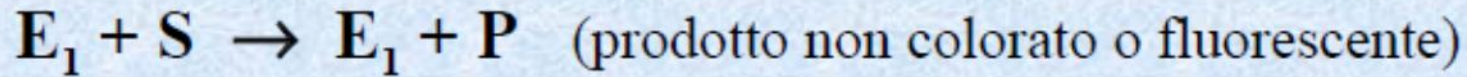
# SAGGI DIRETTI



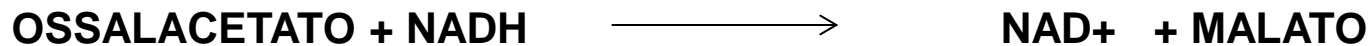
$E + S \longrightarrow E + P$  (prodotto colorato (fluorescente) – cromoforo )



# SAGGI ACCOPPIATI

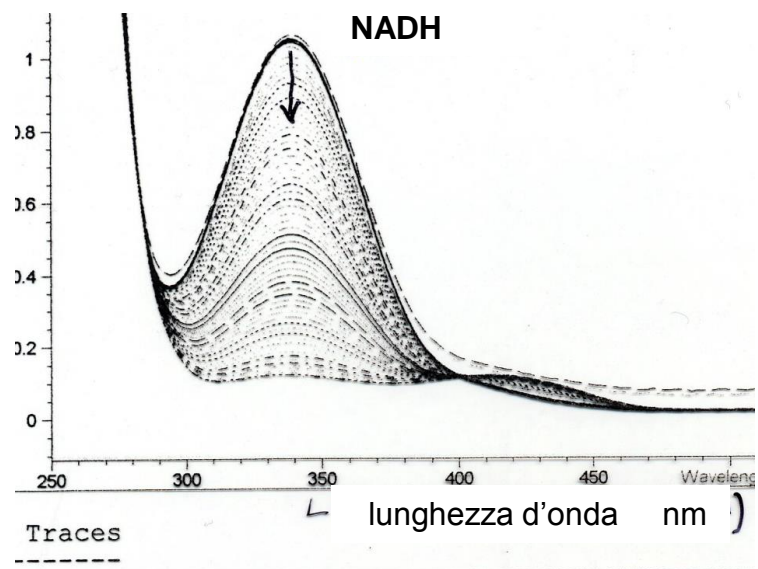


**Malico Deidrogenasi**

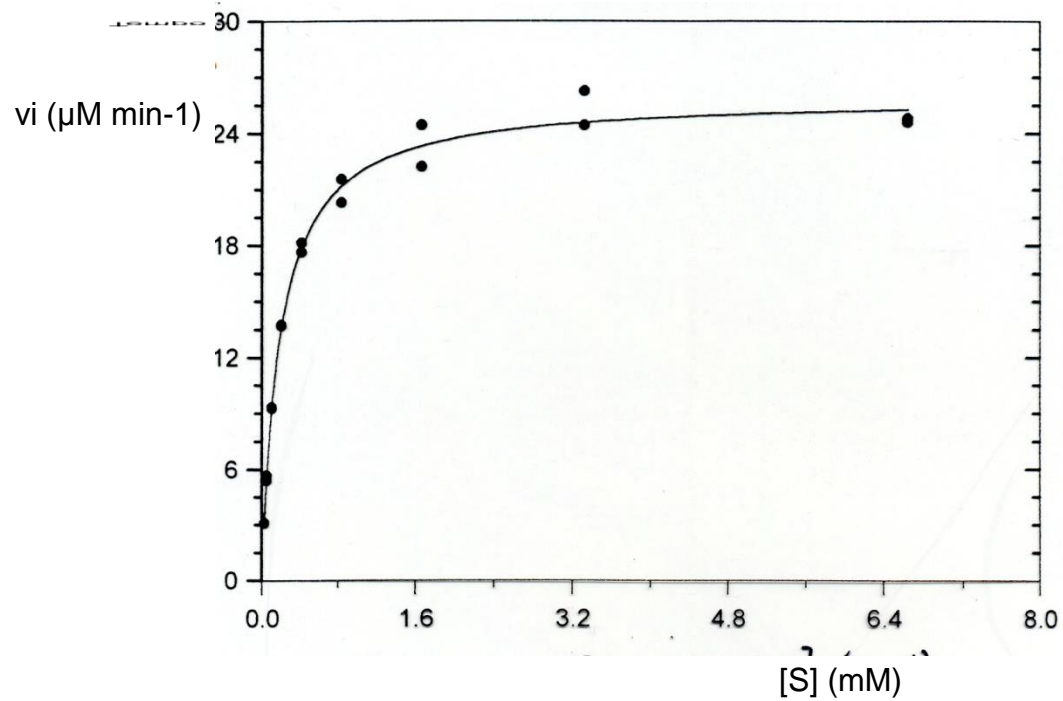
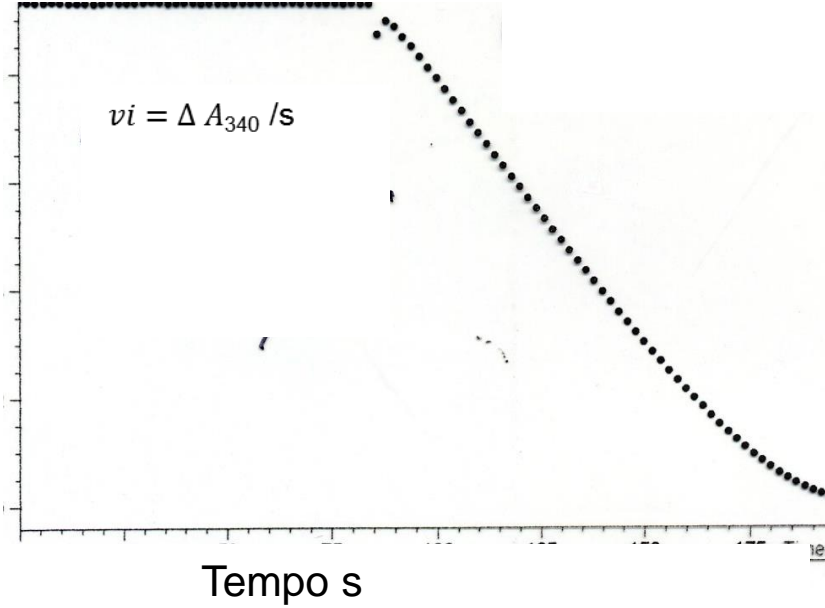




A



A340nm



# QUANDO SI USANO I SAGGI DISCONTINUI

1) Durante la reazione non si formano o consumano cromofori o fluorofori e le condizioni per far sviluppare colore o fluorescenza sono diverse da quelle del saggio.

2) Non è possibile far sviluppare colore o fluorescenza. La misura del prodotto o del substrato (consumato) devono essere fatte con altri sistemi, ad esempio HPLC, saggi biologici o immunologici.

3) Presenza di un fondo ( background ) elevato; ad esempio di assorbanza dovuta alle proteine in un estratto crudo o di altre molecole che assorbono alla lunghezze d'onda che a noi interessa. In questo caso dobbiamo condurre il saggio e poi eliminare la fonte di disturbo.



Contents lists available at ScienceDirect

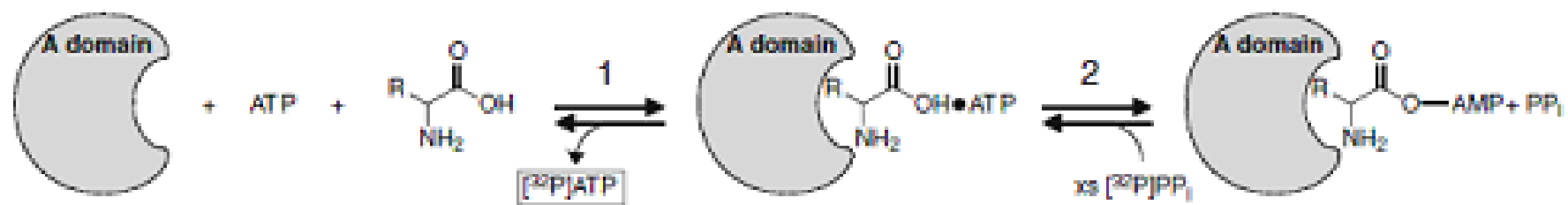
## Analytical Biochemistry

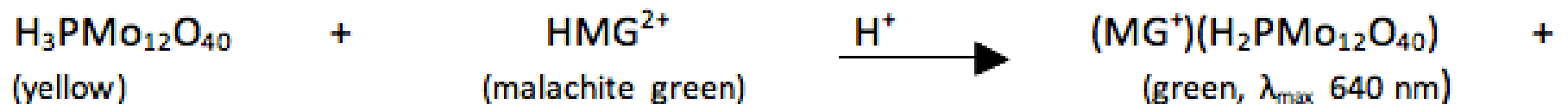
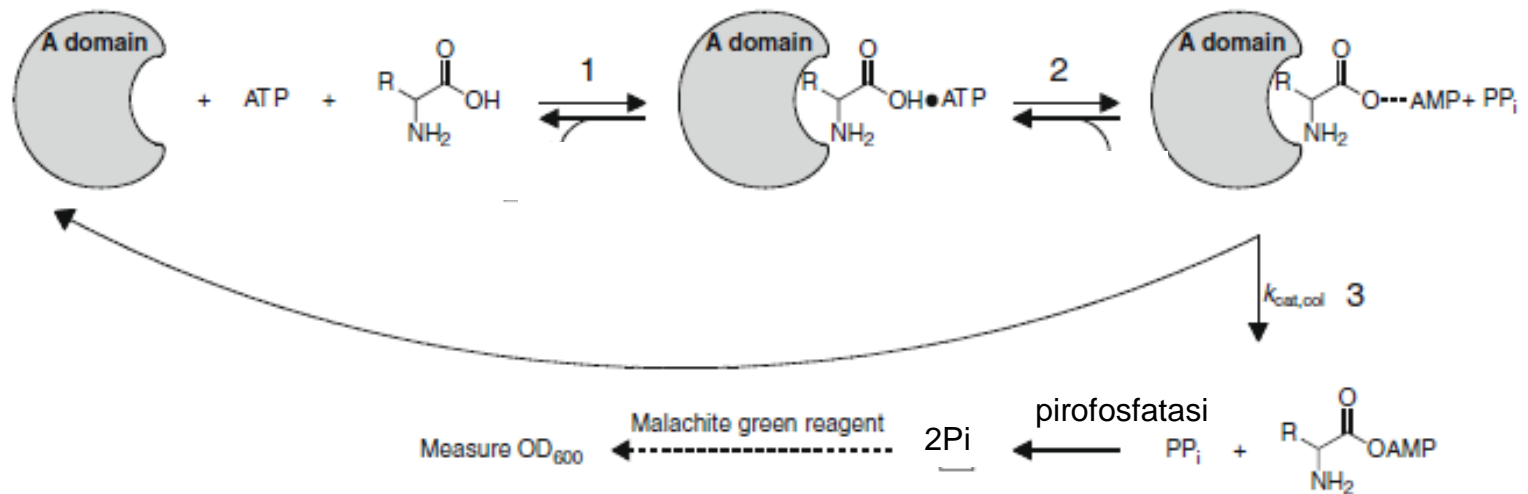
journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)

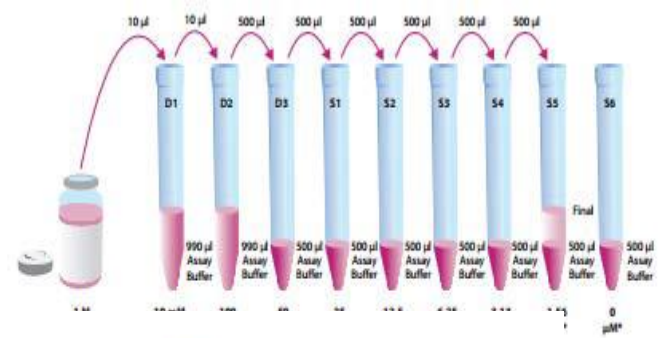


### A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis

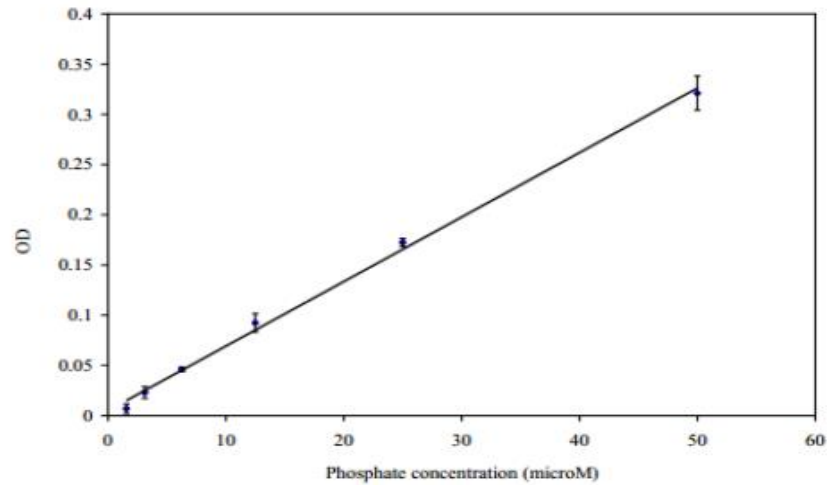
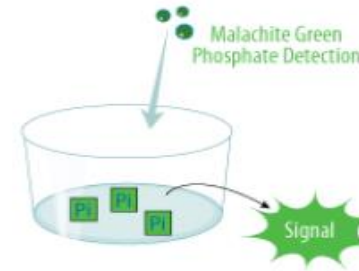
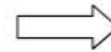
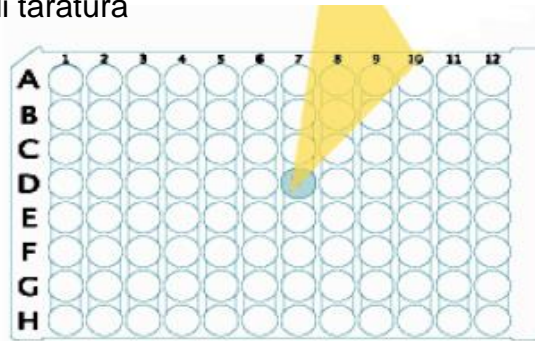
Thomas J. McQuade<sup>a</sup>, Abbie D. Shallop<sup>b</sup>, Anita Sheoran<sup>b</sup>, James E. DelProposto<sup>c</sup>, Oleg V. Tsodikov<sup>d</sup>, Sylvie Garneau-Tsodikova<sup>b,d,\*</sup>





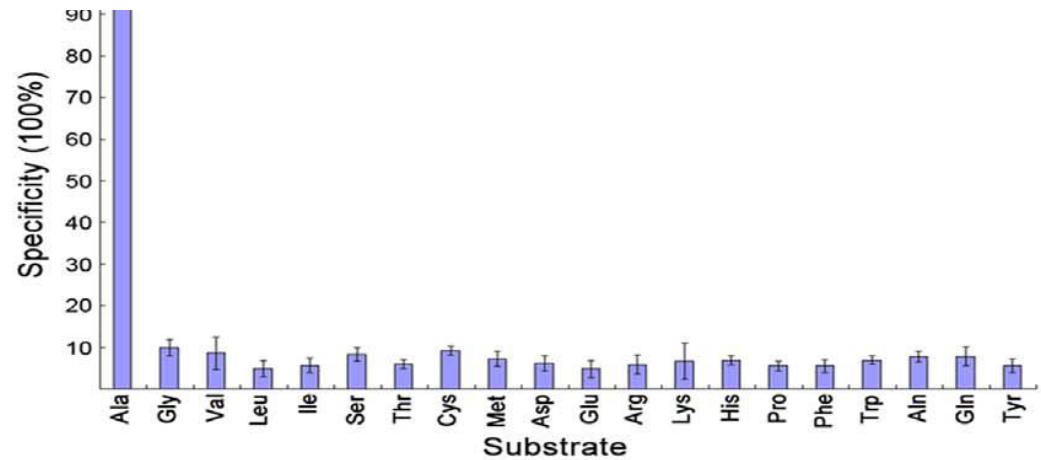
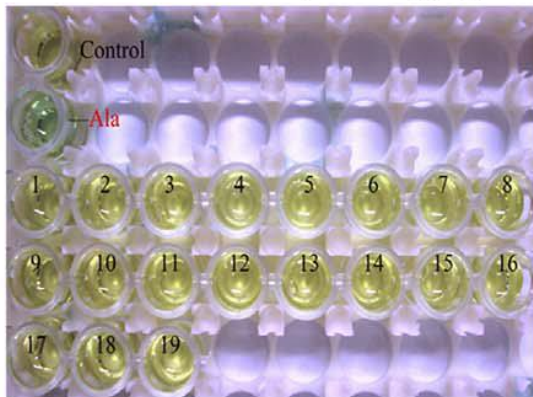
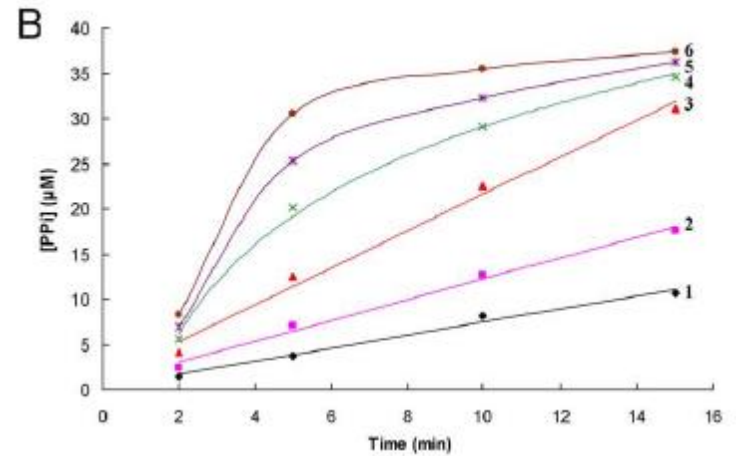
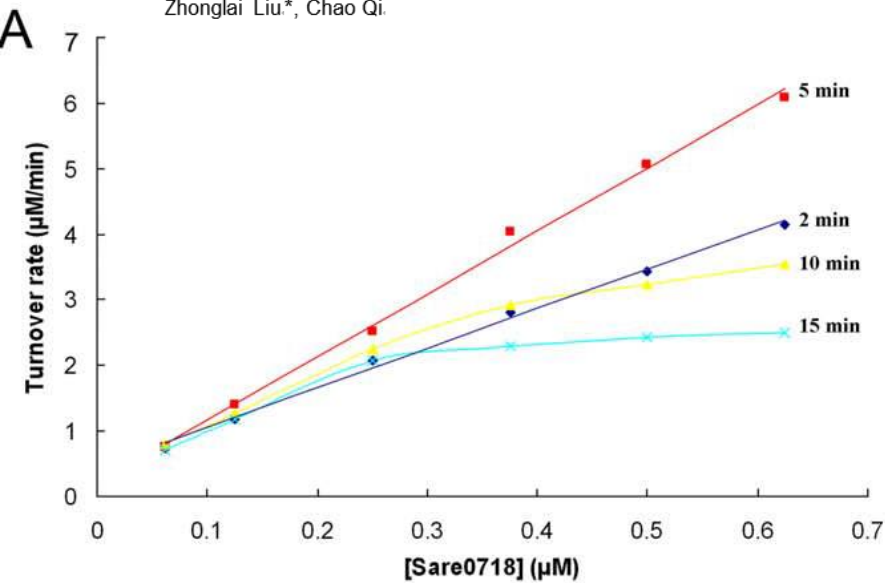


## Preparazione retta di taratura



# Identification of Sare0718 As an Alanine-Activating Adenylation Domain in Marine Actinomycete *Salinispora arenicola* CNS-205

Sisi Xia, Yanlin Ma, Wei Zhang, Yi Yang, Shaowen Wu, Minzhe Zhu, Lingfu Deng, Bing Li, Zhonglai Liu\*, Chao Qi.



## Selezione dell'ottimale tempo di incubazione e concentrazione dell'enzima per la determinazione dei parametri cinetici

Enzima 17  $\mu\text{M}$

tempo [min]	A1 (620 nm)	A2 (620 nm)	A3 (620 nm)	bianco	A (Val.ass.medio)	Pi [ $\mu\text{M}$ ]	v [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]
2,0000	0,29020	0,28700	0,29070	0,18420	0,10510	0,079413	0,039700
5,0000	0,28970	0,27890	0,28630	0,16550	0,11947	0,65562	0,13110
10,000	0,47000	0,46120	0,46820	0,18710	0,27937	7,0688	0,70688
15,000	0,57060	0,58080	0,57120	0,17070	0,40350	12,047	0,84310

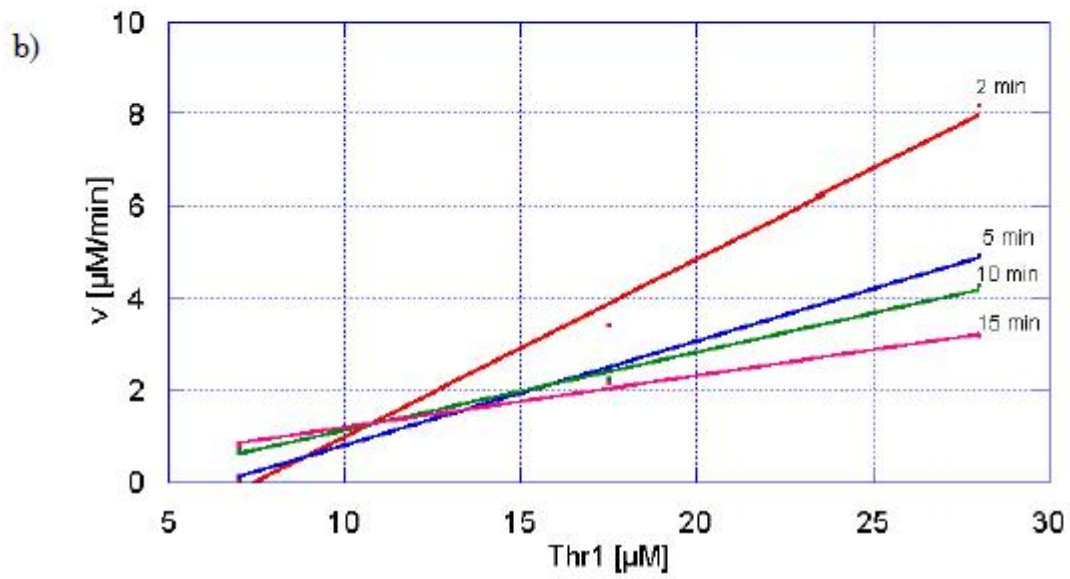
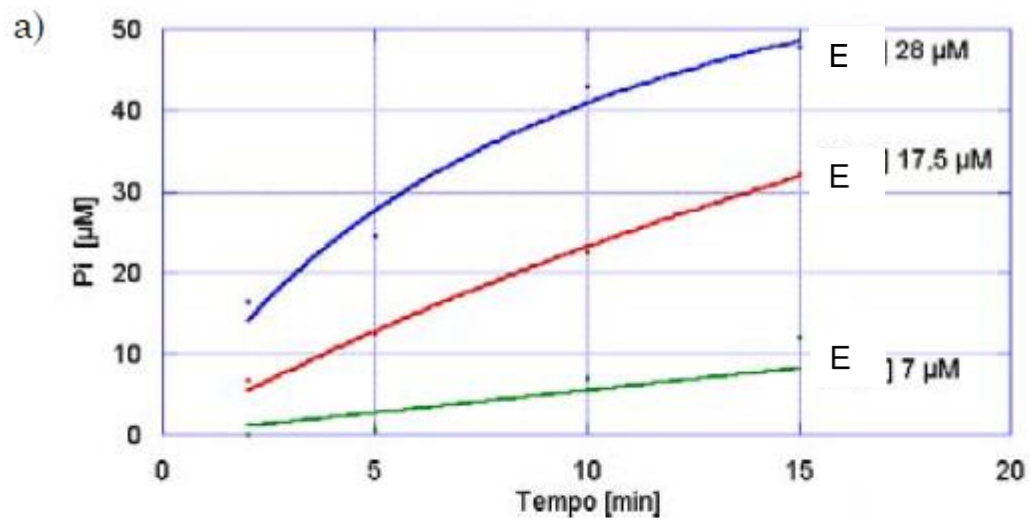
E 17,5  $\mu\text{M}$

tempo [min]	A1 (620 nm)	A2 (620 nm)	A3 (620 nm)	bianco	A (Val.ass.medio)	Pi [ $\mu\text{M}$ ]	v [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]
2,0000	0,48080	0,44950	0,47630	0,19390	0,27497	6,8923	3,4462
5,0000	0,58570	0,60060	0,59820	0,17910	0,41573	12,538	2,5076
10,000	0,84700	0,84340	0,83910	0,17680	0,66637	22,590	2,2590
15,000	1,0980	1,0152	1,0730	0,15520	0,90687	32,236	2,1491

E 128  $\mu\text{M}$

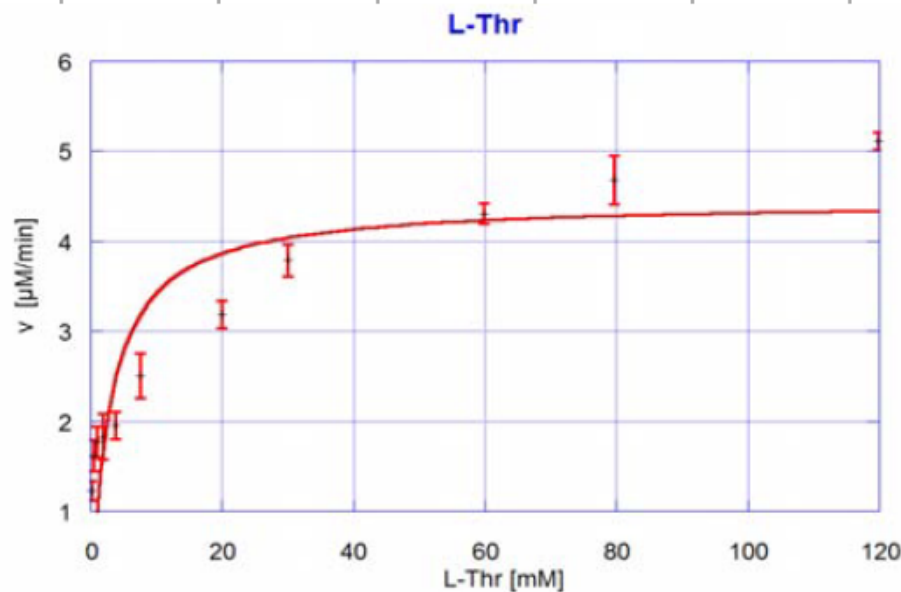
tempo [min]	A1 (620 nm)	A2 (620 nm)	A3 (620 nm)	bianco	A (Val.ass.medio)	Pi [ $\mu\text{M}$ ]	v [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]
2,0000	0,68900	0,69010	0,69120	0,17830	0,51167	16,386	8,1930
5,0000	0,90100	0,88530	0,89700	0,17650	0,71769	24,649	4,9298
10,000	1,3370	1,3650	1,3583	0,18110	1,1758	43,021	4,3021
15,000	1,4750	1,4563	1,4821	0,17590	1,2989	47,958	3,1972





## L-Thr

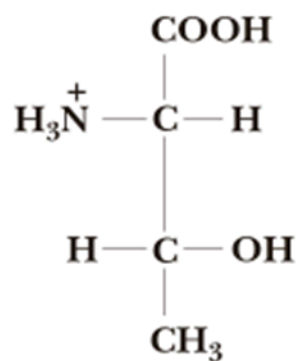
L-Thr [mM]	v1	v2	v3	v4	v [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]	D.S.
0,23000	1,3412	1,1467	1,2891	1,1226	1,2249	0,10681
0,46000	1,4114	1,8365	1,6240	1,5939	1,6164	0,17421
0,93000	1,6621	1,8405	1,6079	1,9849	1,7739	0,17227
1,8700	2,0792	1,7062	1,5337	1,9929	1,8280	0,25281
3,7400	2,0210	2,0511	1,7262	2,0090	1,9518	0,15144
7,4800	2,6286	2,7650	2,4081	2,1995	2,5003	0,24869
19,970	3,1139	3,4067	3,0498	3,1841	3,1886	0,15540
29,950	3,8299	3,9622	3,5451	3,8178	3,7888	0,17511
59,900	4,4676	4,2911	4,2109	4,2510	4,3051	0,11313
79,720	5,0652	4,6942	4,4836	4,4936	4,6842	0,27190
119,81	5,0832	5,2015	5,1674	4,9830	5,1088	0,097522



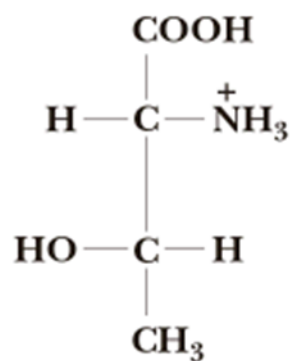
Parametri cinetici	Valore $\pm$ deviazione standard
$V_{\max}$ [ $\mu\text{M min}^{-1}$ ]	$4,443 \pm 0,150$
$K_M$ [mM]	$3,027 \pm 0,806$
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0,254 \pm 0,008$
$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ]	$0,087 \pm 0,020$

Figura 22: Dipendenza della velocità di amminoacil-adenilazione in funzione della concentrazione di

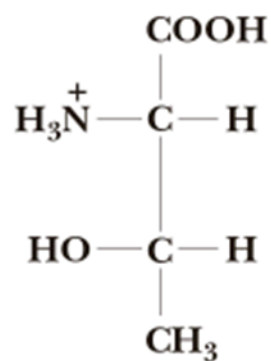
Amminoacido	$V_{\max}[\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}]$	$K_M[\text{mM}]$	$k_{\text{cat}}[\text{min}^{-1}]$	$k_{\text{cat}}/K_M[\text{min}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}]$
L-Thr	$4,443\pm 0,150$	$3,027 \pm 0,806$	$0,254\pm 0,008$	$0,087\pm 0,020$
D-Thr	$7,316\pm 0,066$	$13,877\pm 0,936$	$0,418\pm 0,004$	$0,030\pm 0,002$
L- <i>allo</i> -Thr	$8,143\pm 0,066$	$7,080 \pm 1,857$	$0,467\pm 0,020$	$0,066\pm 0,014$
D- <i>allo</i> -Thr	$11,169 \pm 0,417$	$3,911 \pm 0,536$	$0,637\pm 0,024$	$0,166\pm 0,017$
L-Ser	$7,550 \pm 0,870$	$15,913\pm 3,250$	$0,437\pm 0,049$	$0,030\pm 0,005$
D-Ser	$9,310 \pm 0,899$	$32,002\pm 6,834$	$0,534\pm 0,051$	$0,017\pm 0,002$
L-Cys	$16,946 \pm 1,185$	$52,323\pm 7,891$	$0,972\pm 0,067$	$0,018\pm 0,001$
D-Cys	$9,066 \pm 0,456$	$23,947\pm 3,026$	$0,519\pm 0,026$	$0,022\pm 0,001$
D-Ala	$8,320 \pm 0,305$	$40,711\pm 6,241$	$0,476\pm 0,017$	$0,012\pm 0,001$



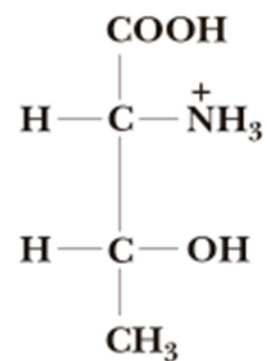
L-Threonine



D-Threonine



L-Allothreonine

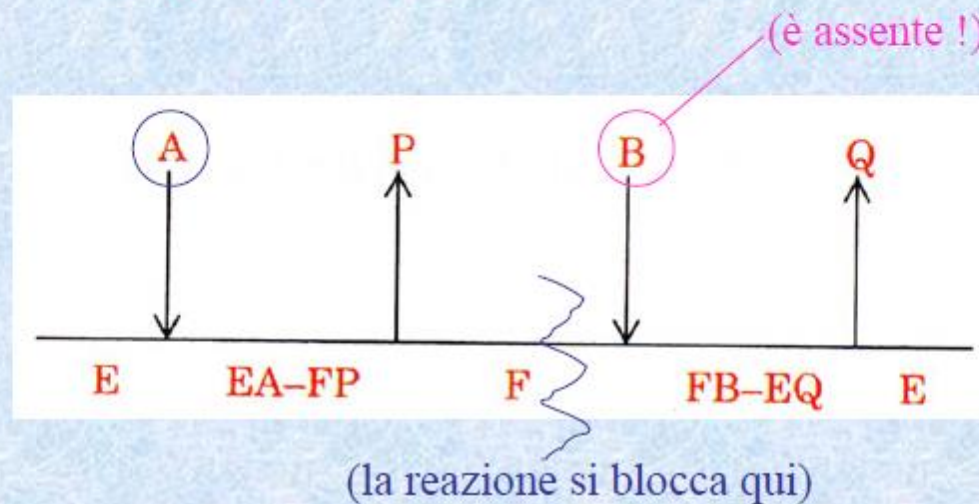


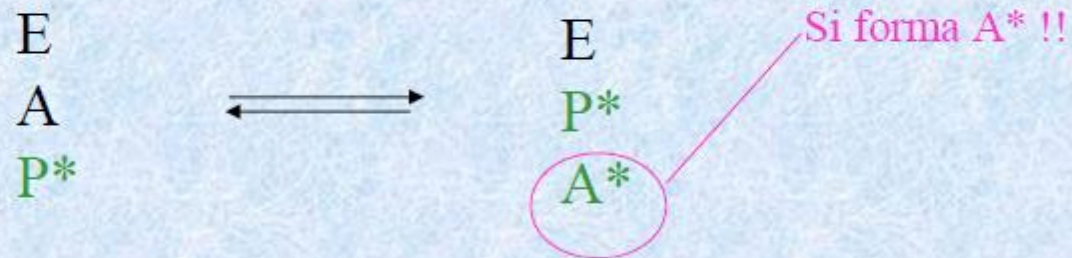
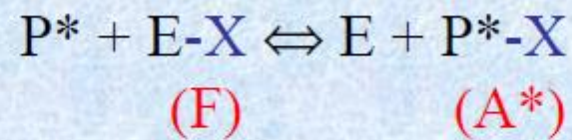
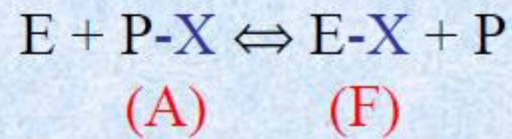
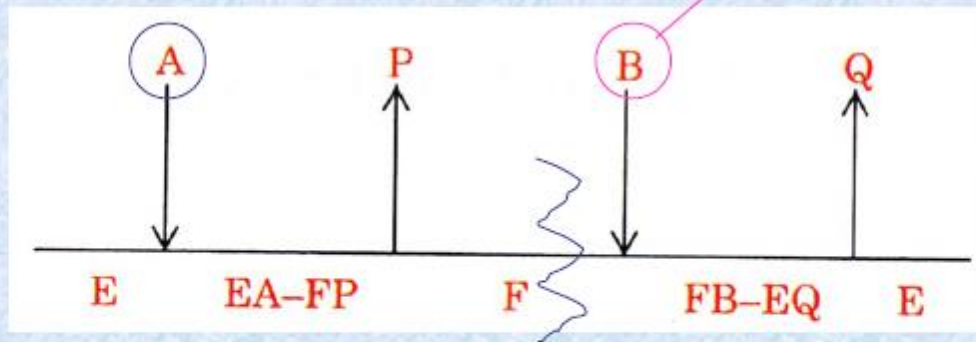
D-Allothreonine

I meccanismi **sequenziale** e **a ping pong** possono essere differenziati mediante **studi di scambi isotopici** (oltre che mediante studi cinetici)

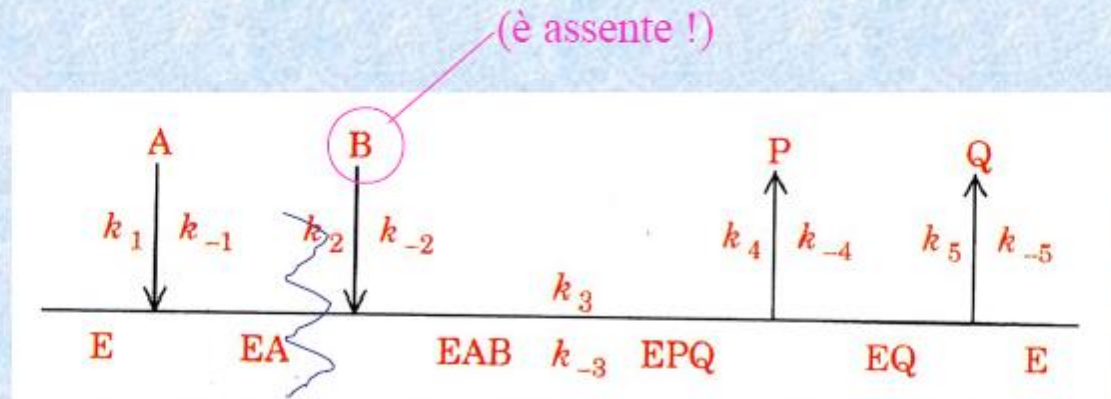
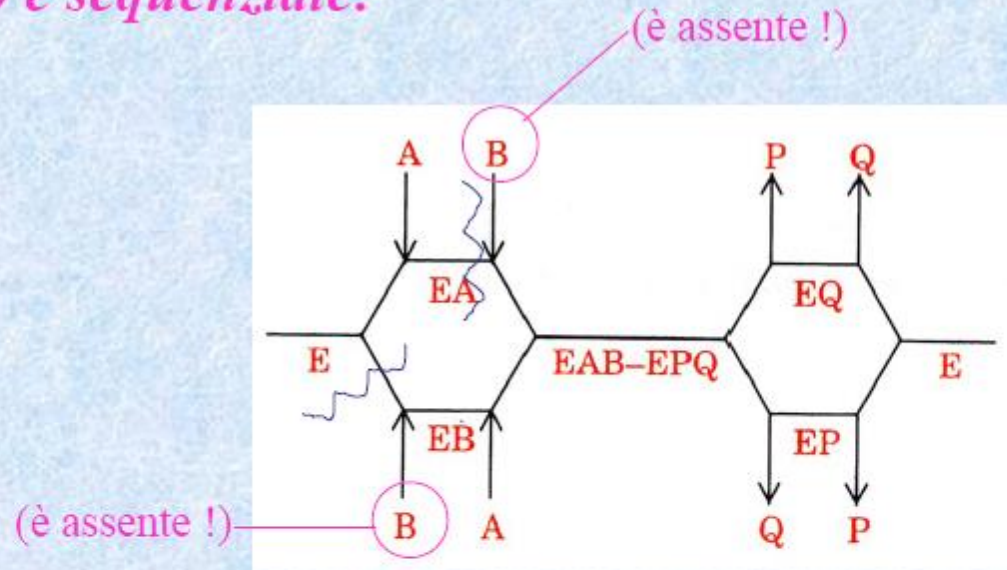
- Esperimento in cui oltre all'enzima è presente solo uno dei due substrati (**A**) insieme al primo prodotto rilasciato, marcato radioattivamente (**P\***)

*Se il meccanismo è a ping-pong:*





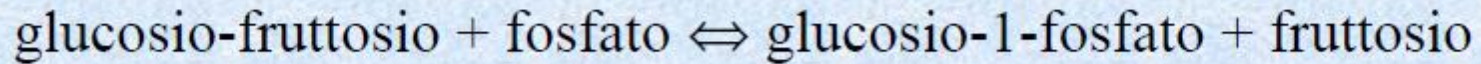
*Se il meccanismo è sequenziale:*



NON SI PUO' FORMARE  $A^*$  !!

## *Esempio*

### 1) Saccarosio fosforilasi

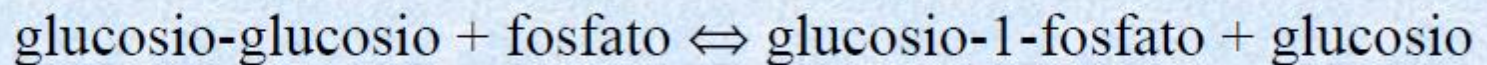


Esperimento di scambio isotopico:

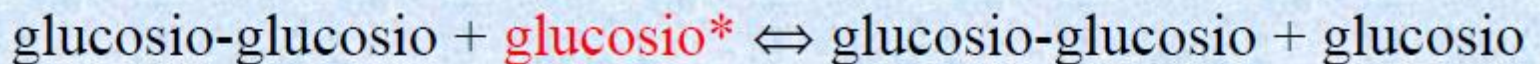


Il meccanismo è a ping pong

### 1) Maltosio fosforilasi



Esperimento di scambio isotopico:



Il meccanismo è sequenziale

# LO STUDIO DELLA CINETICA RAPIDA DELLE REAZIONI PUO' DARE IMPORTANTI INFORMAZIONI SUL MECCANISMO DI REAZIONE

