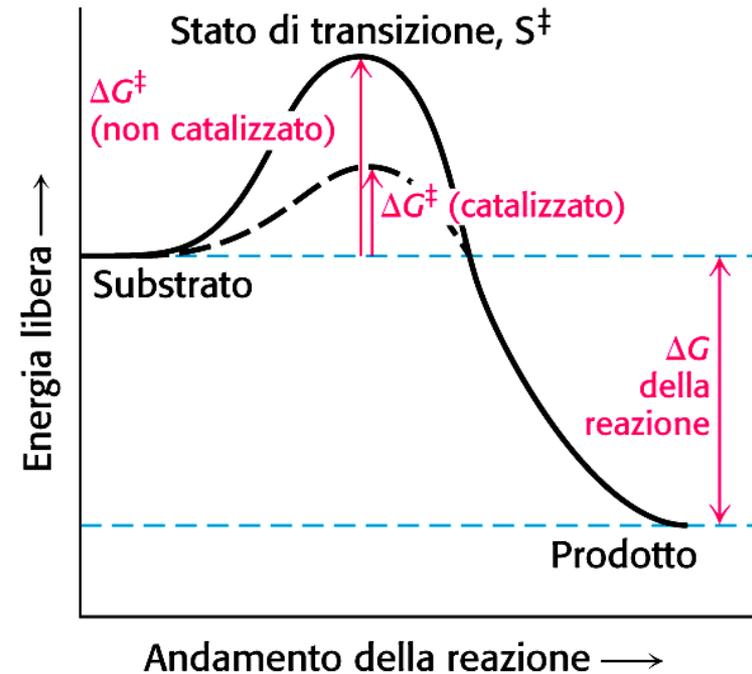


ENZIMI

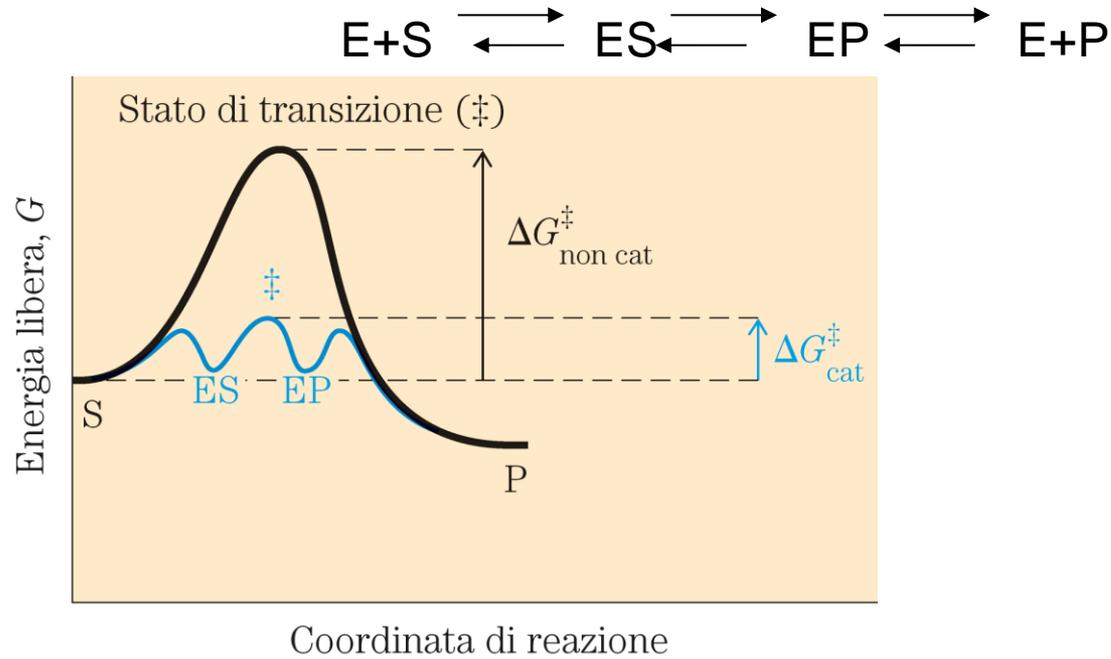
Catalizzatori delle reazioni biologiche

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

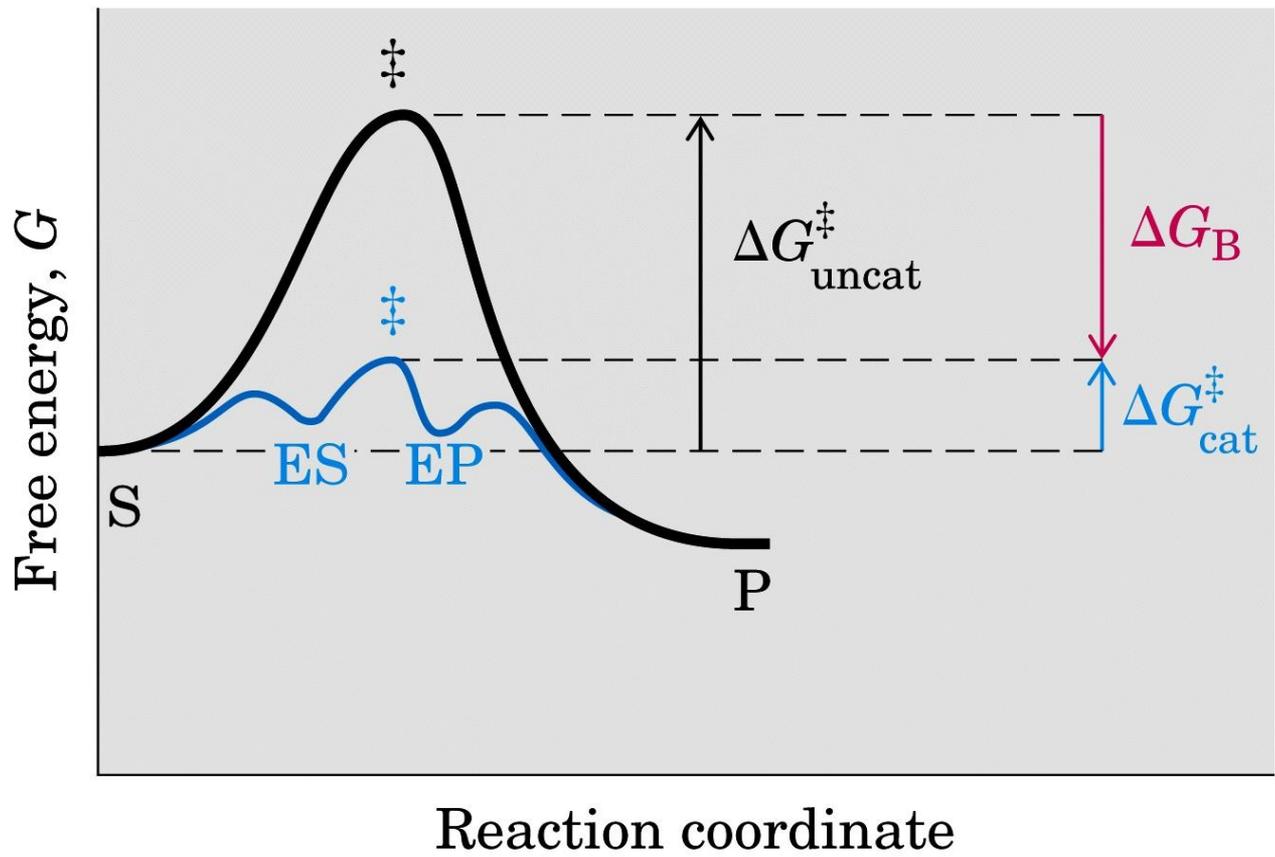
Il legame tra enzima e substrato genera un percorso di reazione caratterizzato da uno stato di transizione con una energia libera più bassa rispetto a quella priva di enzima



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 ΔG_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



Le tre proprietà distintive degli enzimi sono

A capacità catalitica

B specificità

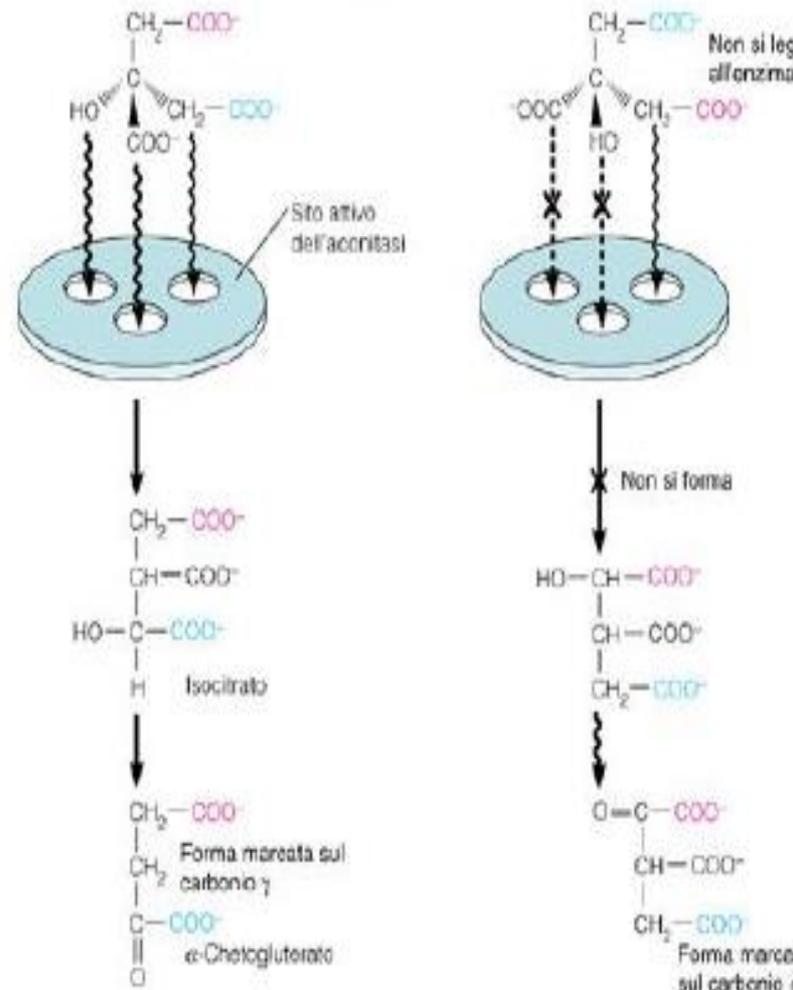
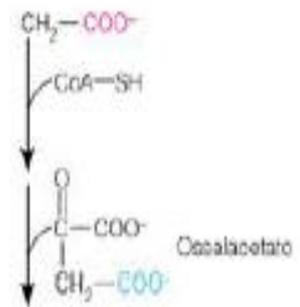
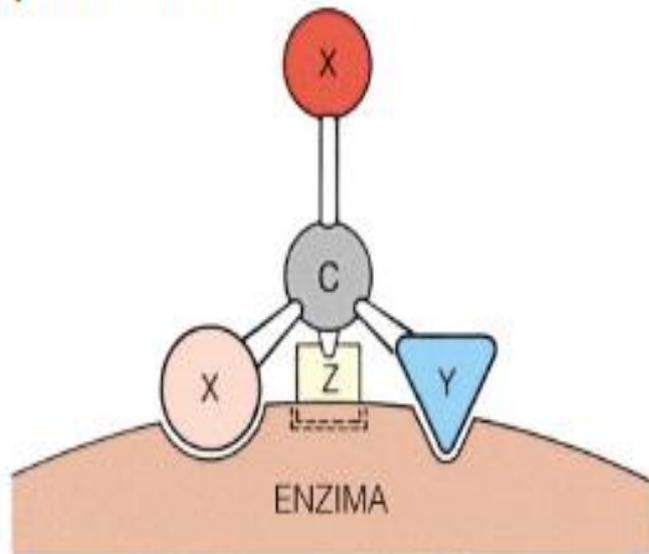
C regolazione

SPECIFICITA' E SELETTIVITA' DEGLI ENZIMI

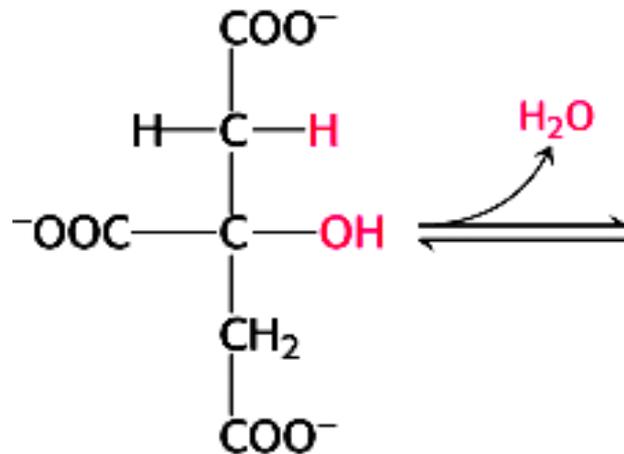
- **Chemioselettività:** specificità per il substrato, attività verso uno specifico tipo di composto (gruppo) chimico
- **Regioselettività:** capacità di discriminare tra gruppi funzionali identici che fanno parte della stessa molecola
- **Enantioselettività:** capacità di discriminare tra singoli enantiomeri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

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

Se la molecola di substrato interagisce in tre punti con gruppi complementari particolari sulla superficie asimmetrica dell'enzima, allora i due atomi/gruppi X non possono più essere equivalenti.

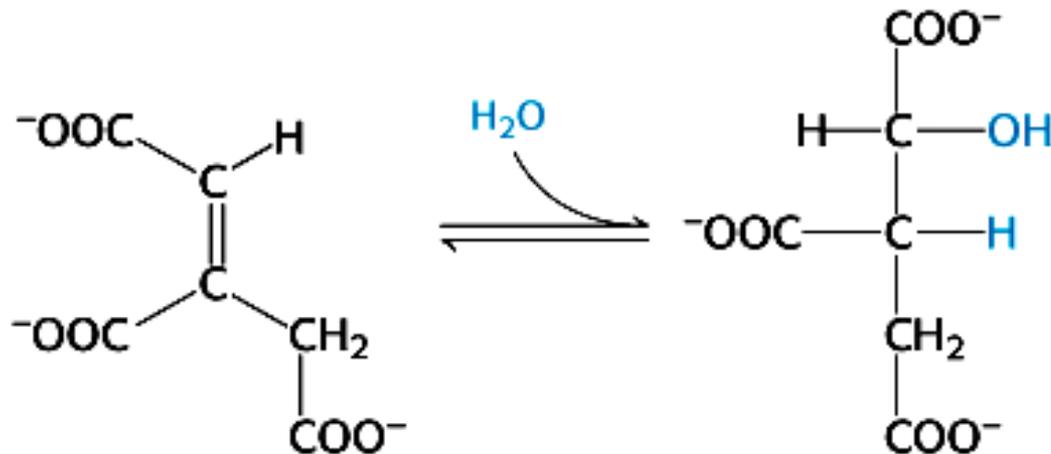


Il citrato viene isomerizzato ad isocitrato dall'**ACONITASI** che catalizza una reazione di *deidratazione* e di una successiva *idratazione*



Citrato

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



cis-Aconitato

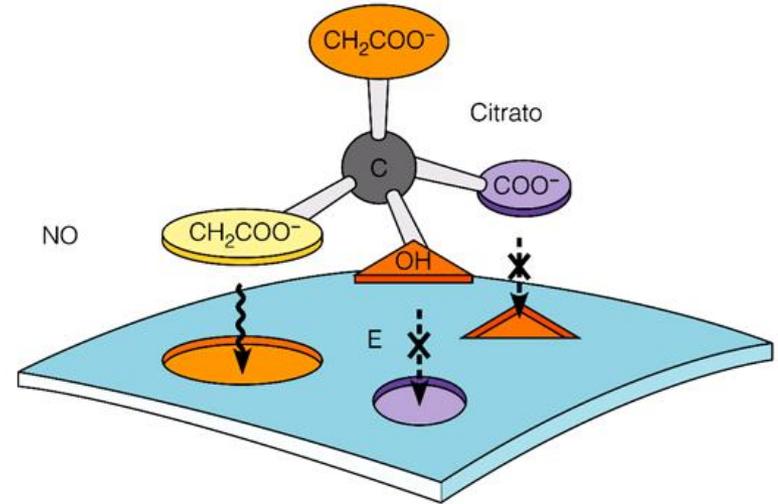
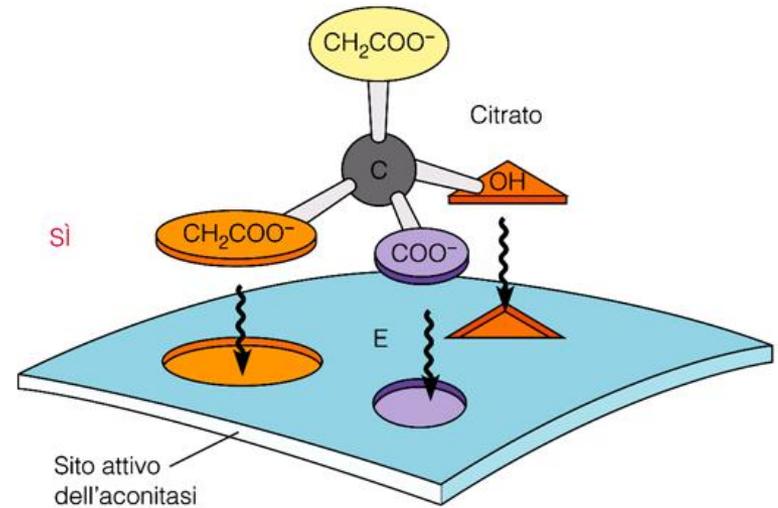
Isocitrato

i

Citrato molecola **prochirale**: contiene due gruppi carbossimetilici che non risultano equivalenti se la molecola viene posta in uno stampo asimmetrico

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

poiché il substrato può legarsi con l'enzima solo in un modo solo uno dei due gruppi CH_2COO^- può reagire e formare isocitrato.



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

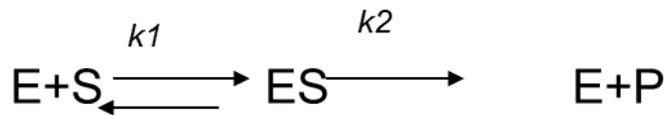
7 sottoclasse fosfotransferasi

1 Sotto sotto classe fosfotransferasi con un gruppo ossidrilico come accettore

1 numero dell'enzima nella sotto-sotto classe

Cinetica enzimatica

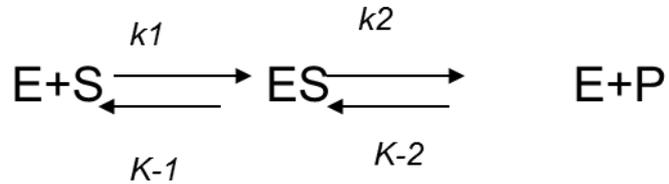
1902 – **Adrian Brown** dimostrò che quando la concentrazione del saccarosio è molto più alta di quella dell'enzima, la velocità della reazione diventa indipendente da quella del substrato: la velocità è di ORDINE ZERO rispetto al saccarosio



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

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

MICHAELIS-MENTEN (1913)



Leonor Michaelis
1875–1949

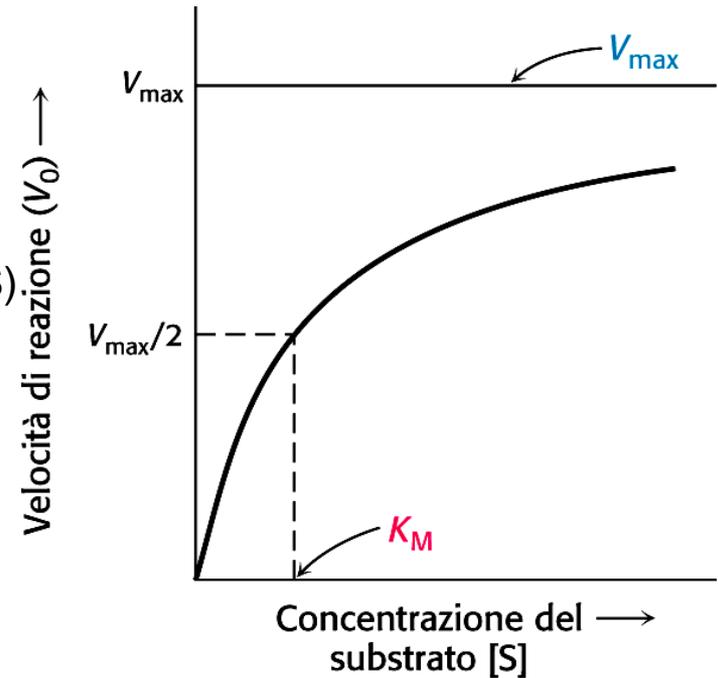


Maud Menten
1879–1960

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

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

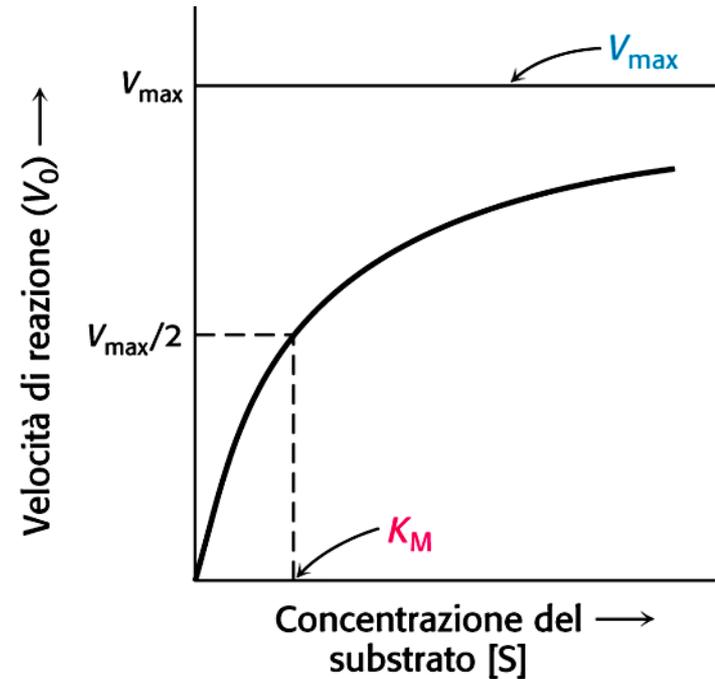
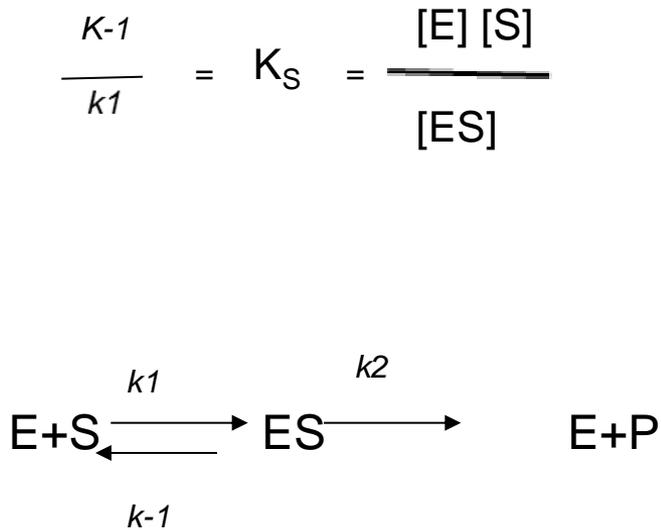
(ipotesi dell'equilibrio ES è in equilibrio rapido con E ed S)



MICHAELIS E MENTEN (1913)

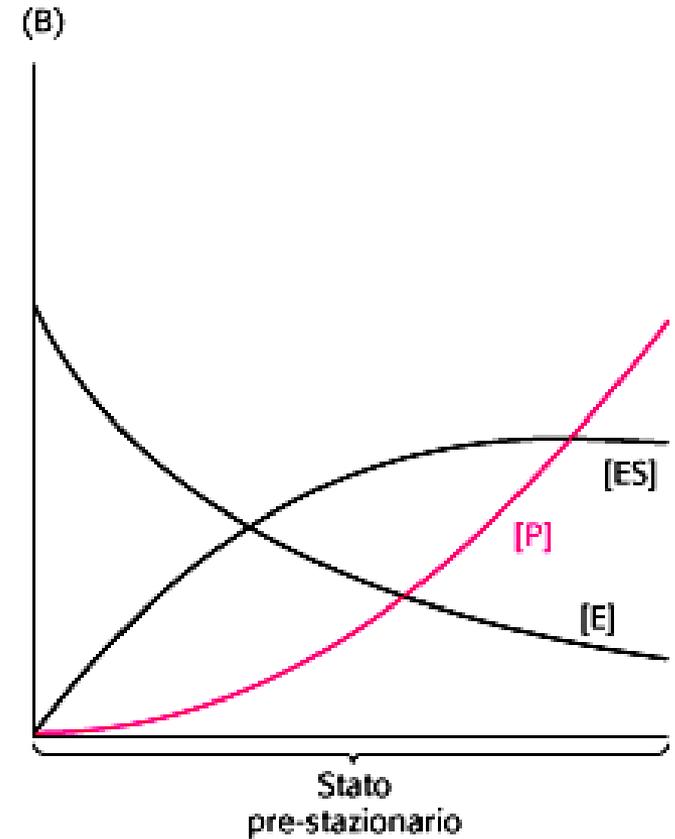
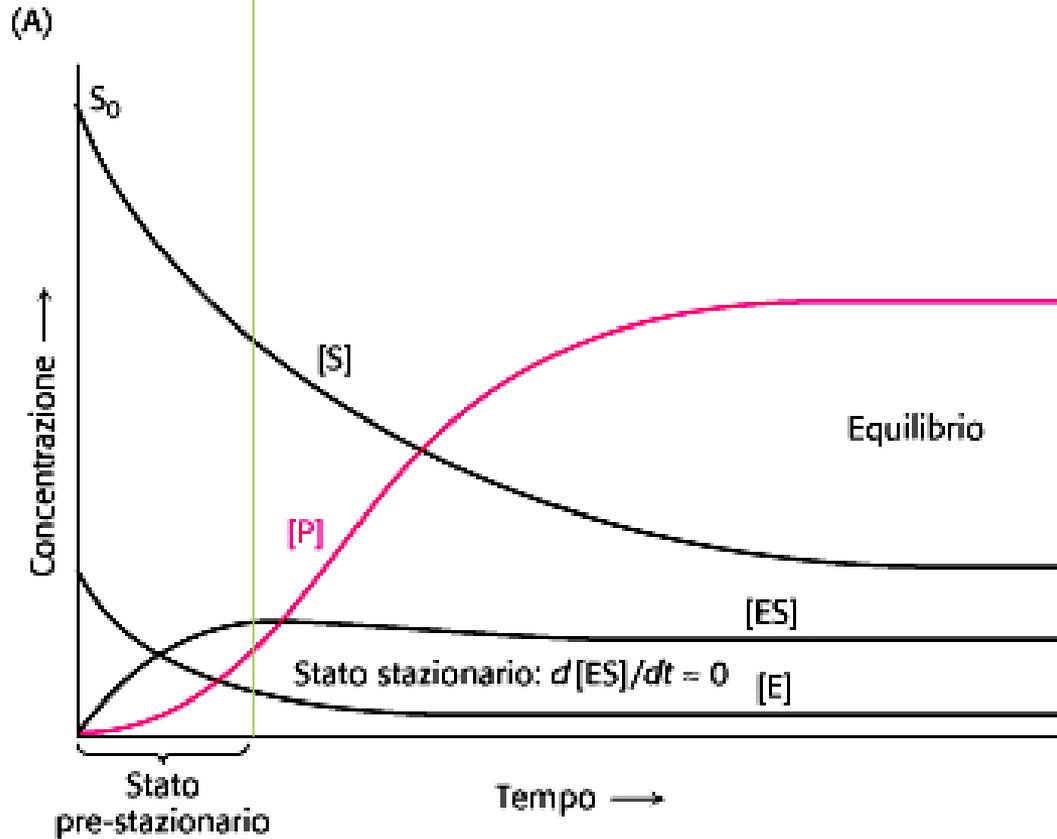
Assunzione di equilibrio

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



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

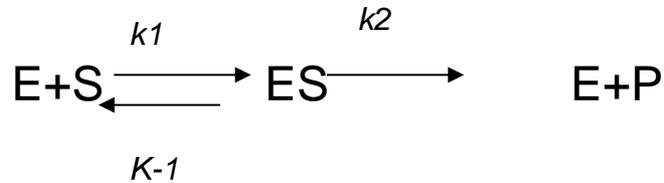
$[S] \gg [E]$



EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

Ipotesi dell'equilibrio

Ipotesi dello stato stazionario



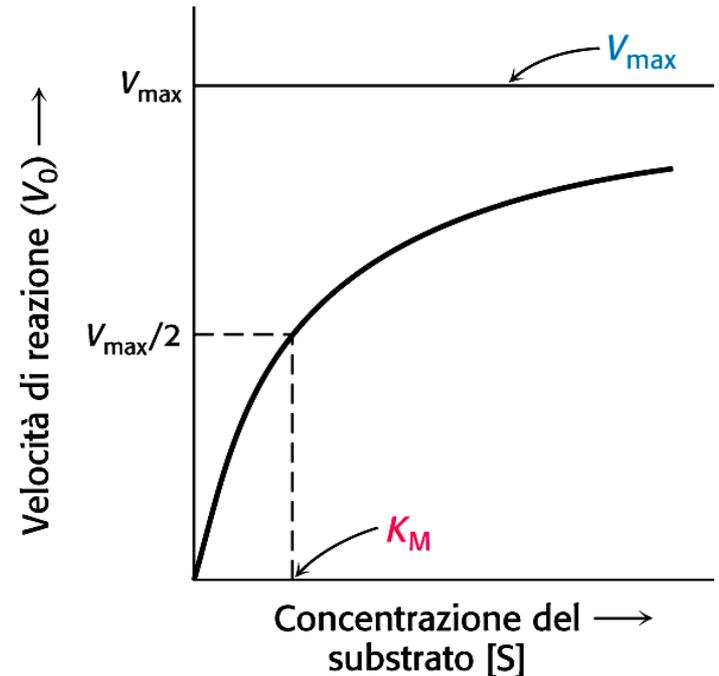
$$V_0 = k_2 [ES]$$

$$[S] \gg [E]$$

Velocità di formazione = Velocità di scissione

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

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



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

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

$$[E] = [E_t] - [E S]$$

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

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

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

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

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

$$V_0 = k_2 [ES]$$

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

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

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

EQUAZIONE DI MICHAESIS MENTEN

Questa equazione verifica i dati cinetici

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

$$S \gg K_M$$

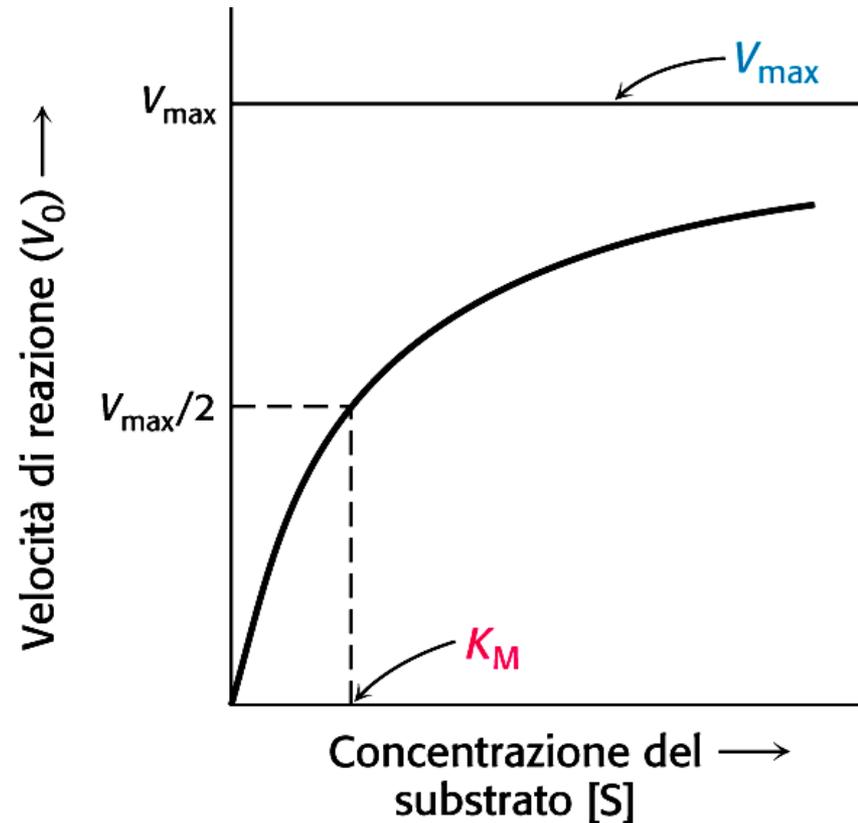
$$V_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

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

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

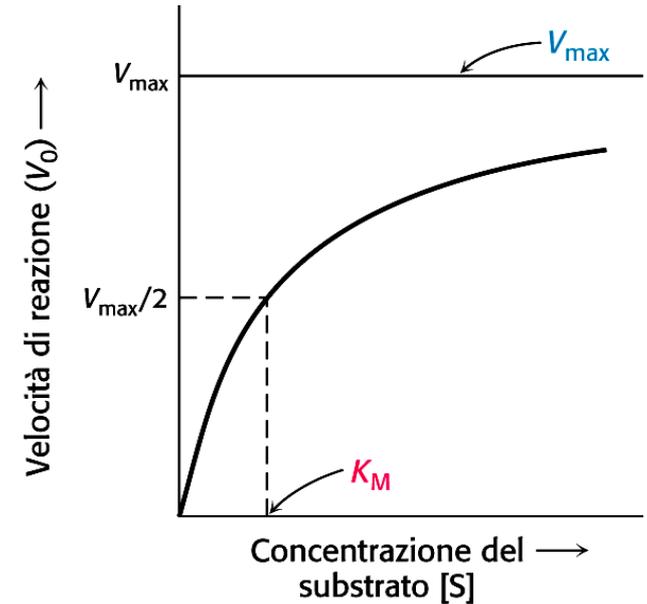
$$V_0 = 1/2 V_{\max}$$

$$K_M = S$$

table 8-6

K_m for Some Enzymes and Substrates

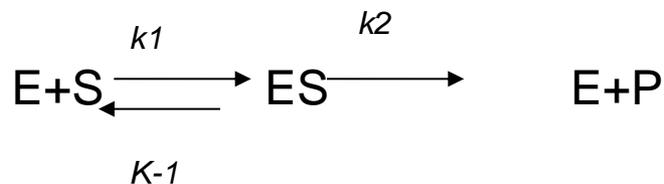
Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Catalase	H ₂ O ₂	25
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0



Il valore di K_M dipende dal substrato e dalle condizioni di reazione pH, T forza ionica. E' variabile da 10^{-1} M a 10^{-7} 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

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

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

numero di turnover o

costante catalitica 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

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

table 8–7

Turnover Numbers (k_{cat}) of Some Enzymes

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	140,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

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 $M^{-1} s^{-1}$

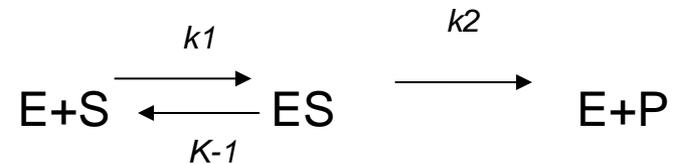
Non può essere superiore a k_1

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

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

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

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



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

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

= **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

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

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 $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

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	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8
Triose phosphate isomerase	Glyceraldehyde 3-phosphate	4.3×10^3	4.7×10^{-4}	2.4×10^8

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

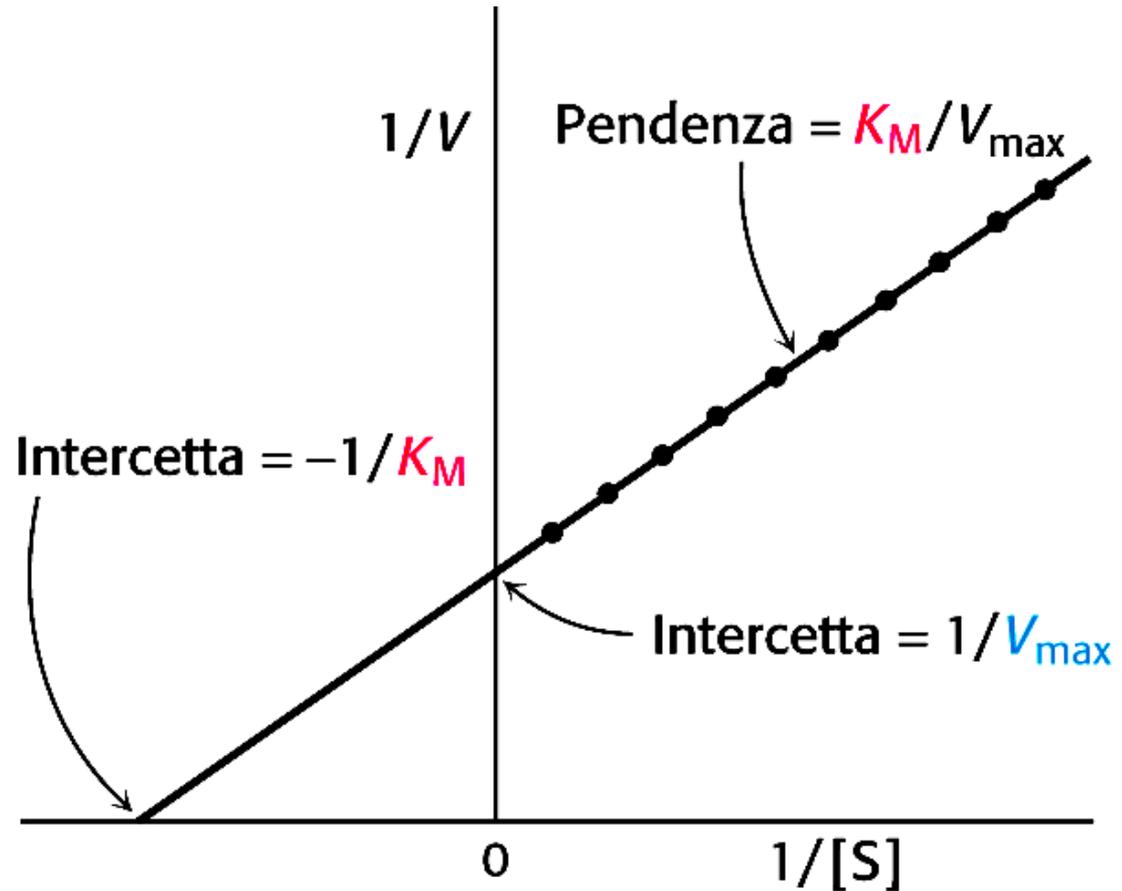
SUBSTRATI CHIMOTRIPSINA

		k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Substrate A	$ \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_{11} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 \end{array} $	0.06	31	2
Substrate B	$ \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_{11} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 \end{array} $	0.14	15	10
Substrate C	$ \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_{11} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 \end{array} $	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:

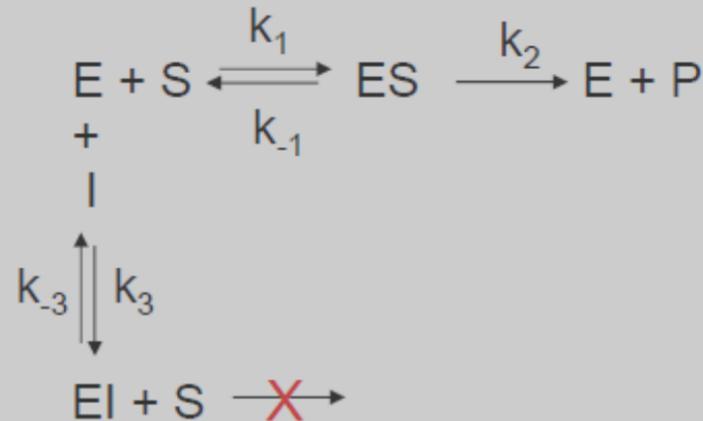
Competitiva

Incompetitiva

Mista o non competitiva

Inibitori competitivi:

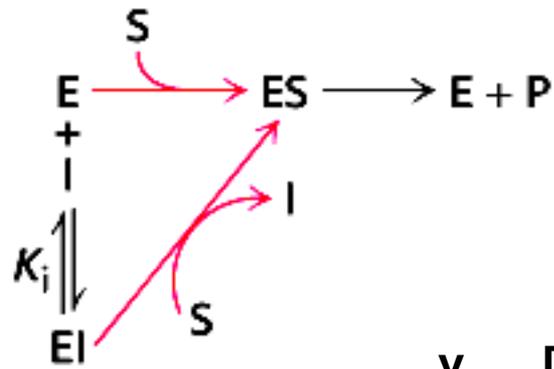
schema di reazione



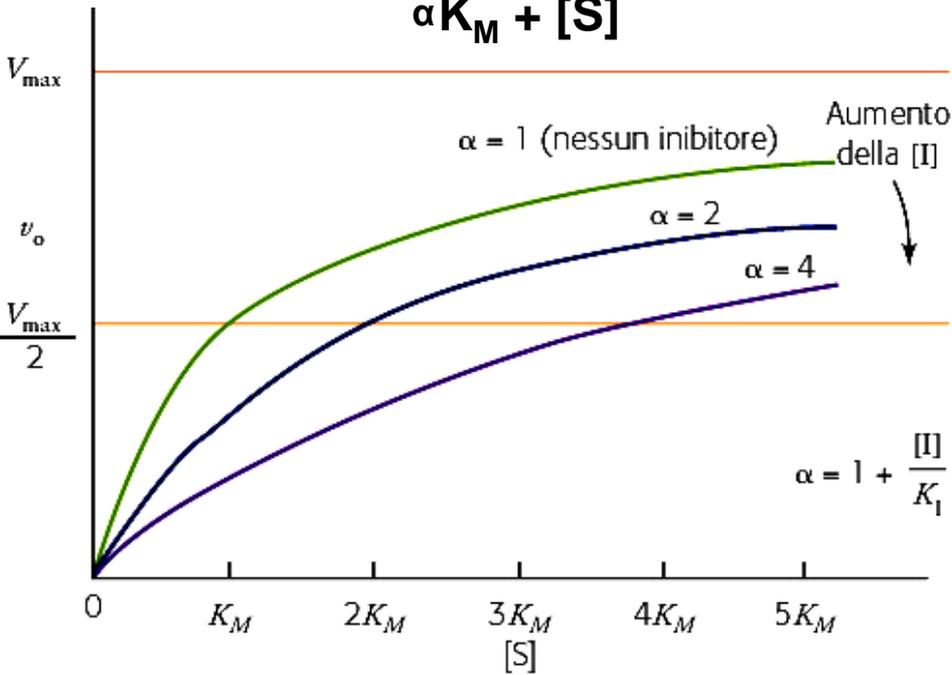
- EI = complesso enzima-inibitore cataliticamente inattivo
- il complesso ternario EIS è fisicamente impossibile
- EI non reagisce a dare E + P (\Rightarrow I non è alterato da E)
- l'inibitore si lega in modo reversibile all'enzima e si porta in rapido equilibrio con esso con **costante di dissociazione**

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

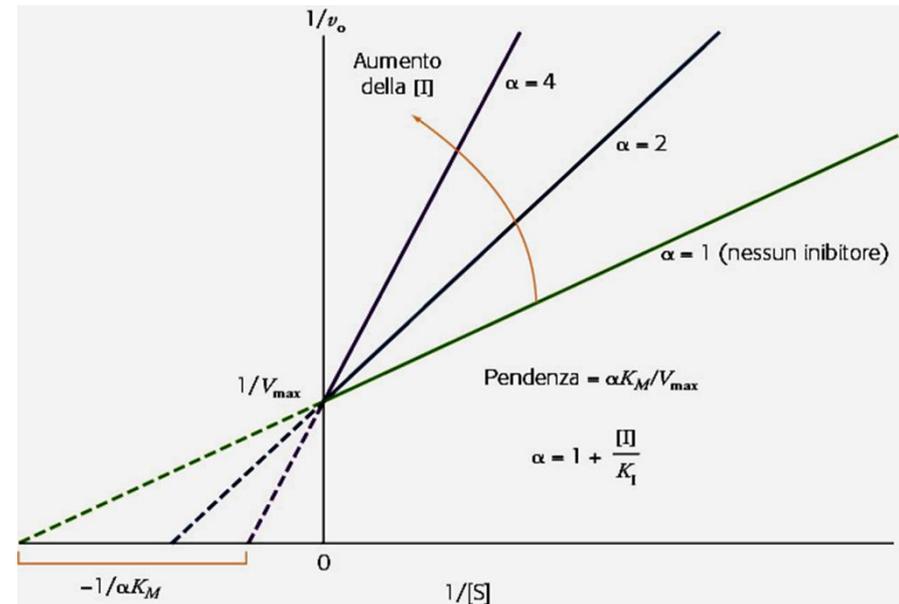
INIBIZIONE COMPETITIVA



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

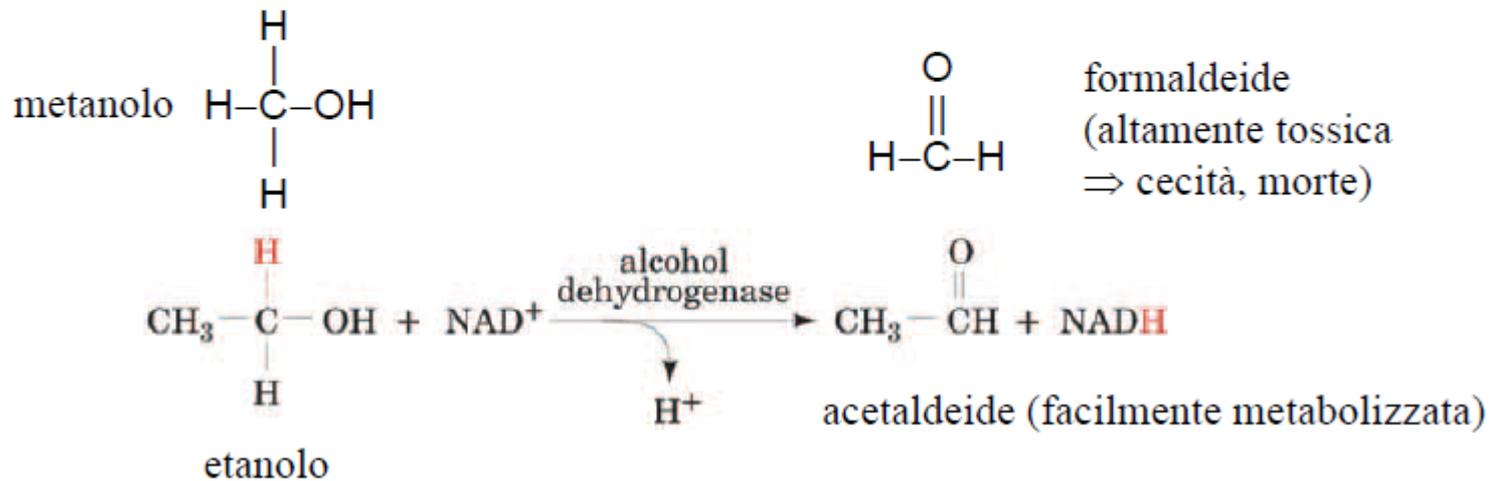


$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

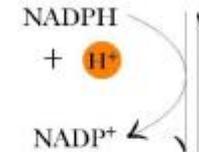
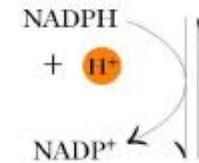
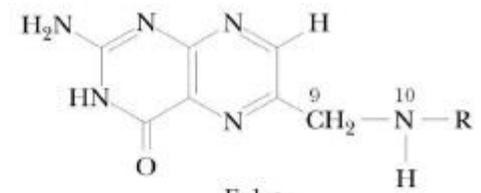
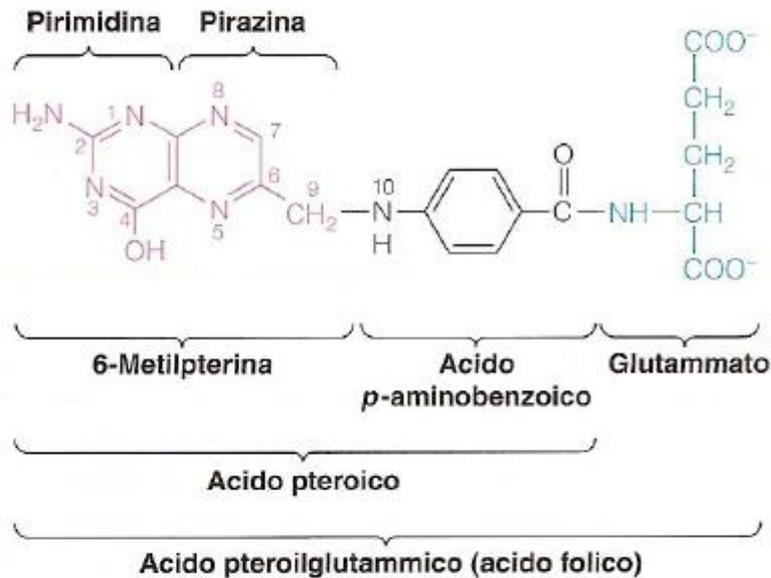


l'inibizione competitiva è il principio base dell'uso dell'**etanolo** nel trattamento dell'**avvelenamento da metanolo**

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

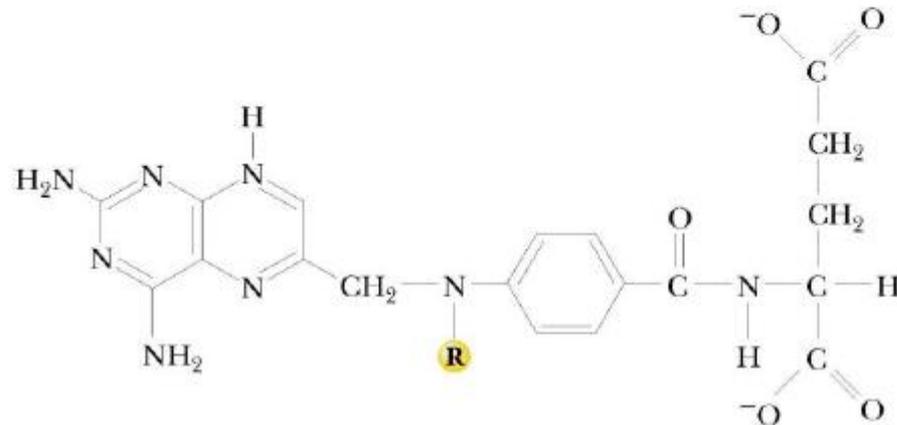


Un bersaglio per inibitori competitivi: gli enzimi della sintesi e del metabolismo del tetraidrofolato



Tetraidrofolato

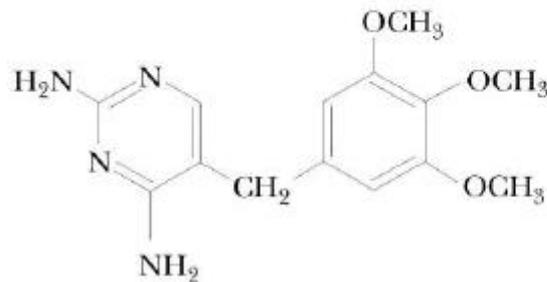
Inibitori competitivi della diidrofolato reduttasi sono utilizzati come chemioterapici



2-Ammino, 4-ammino analoghi dell'acido folico

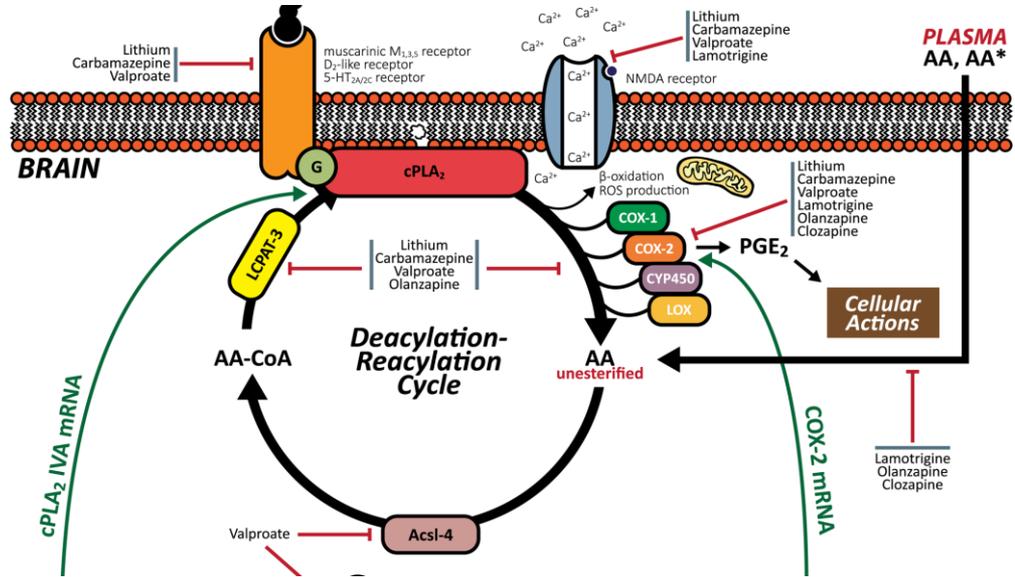
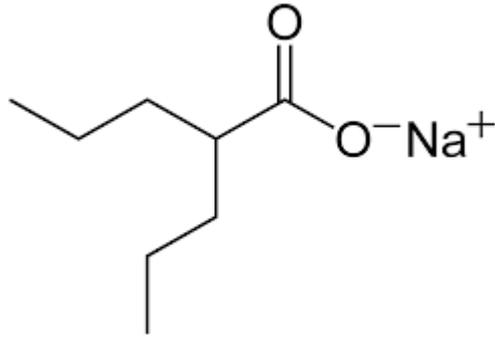
R = H **Amminopterina**

R = CH₃ **Ametopterina (metotressato)**

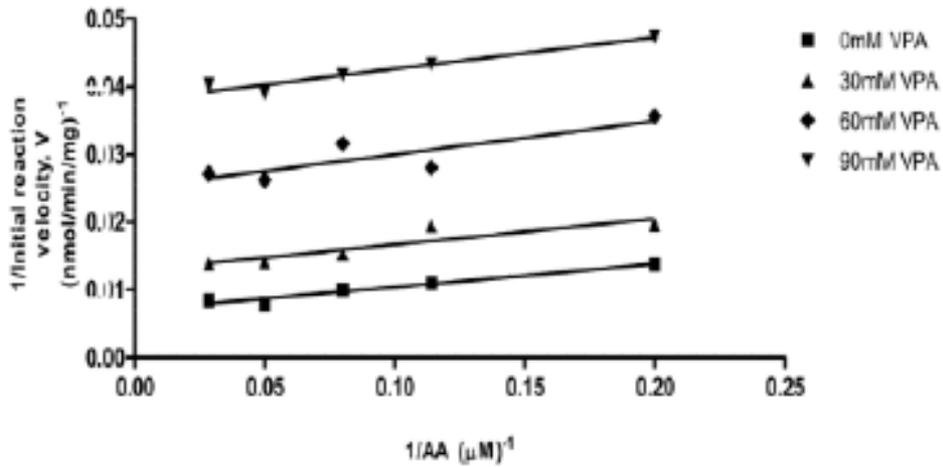


Trimetoprim

Un esempio di inibizione incompetitiva è quella operata dal valproato sull'acil CoA sintetasi



b



INIBIZIONE MISTA

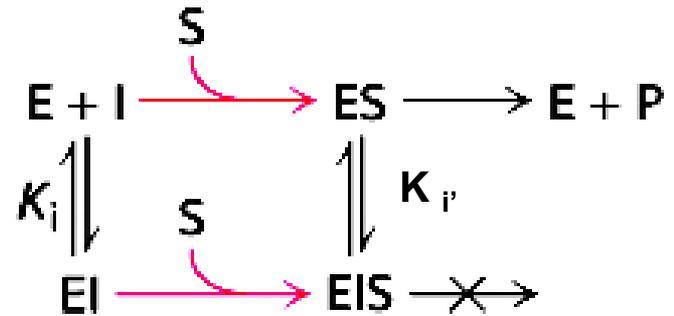
Gli inibitori interferiscono sia con il legame del substrato sia con l'attività catalitica

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

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

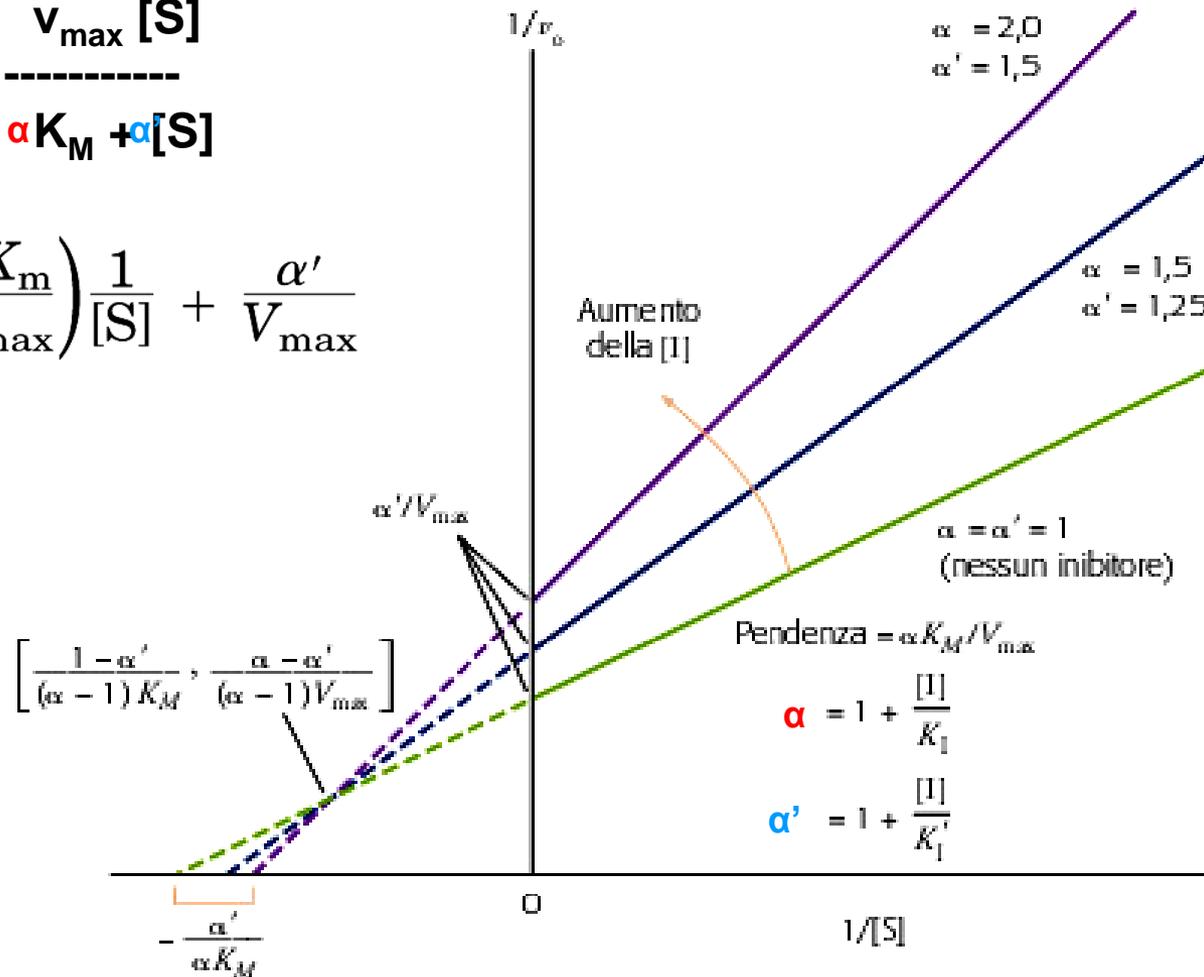
$$\alpha = 1 + [I] / K_i$$

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



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

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



-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 $(-1/K_M)$

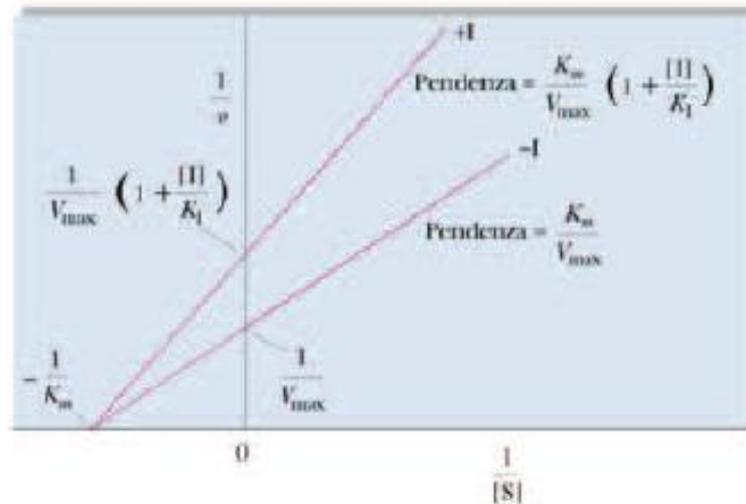
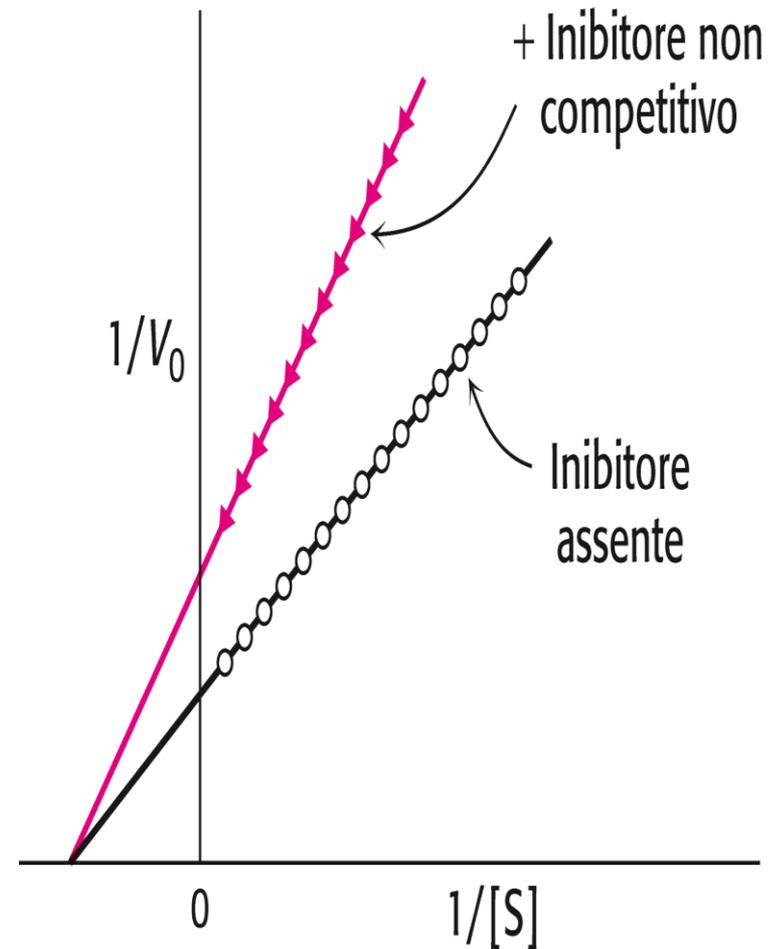
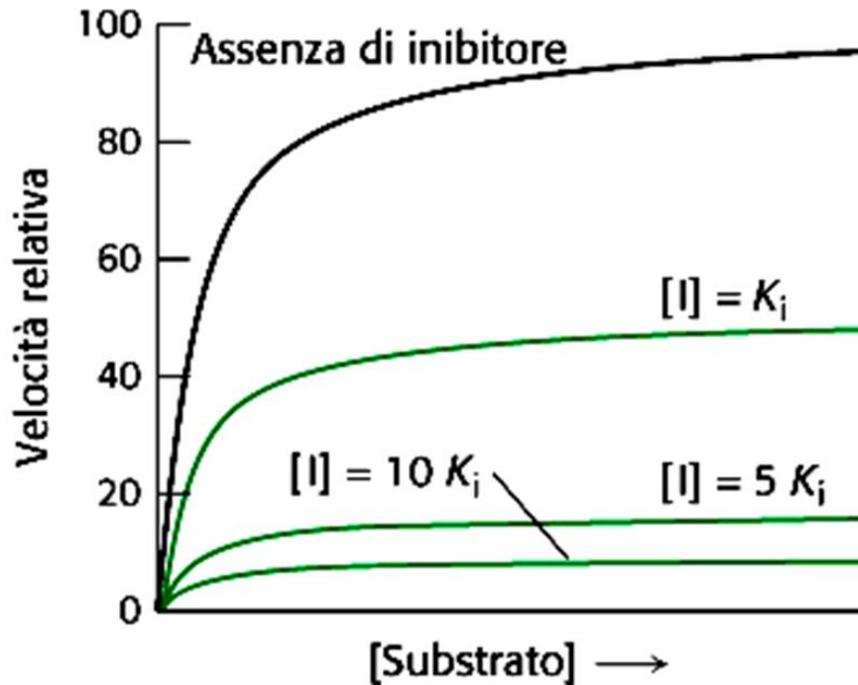
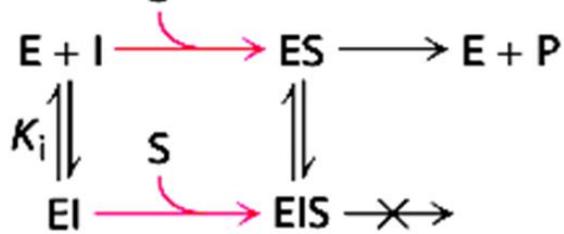


grafico dei doppi reciproci (Lineweaver-Burk)

Inibizione non competitiva



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 noi

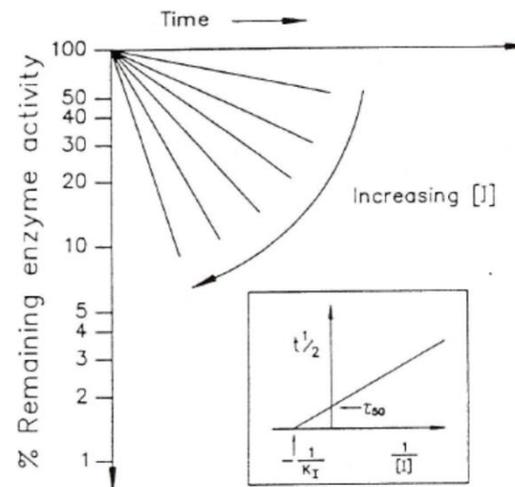
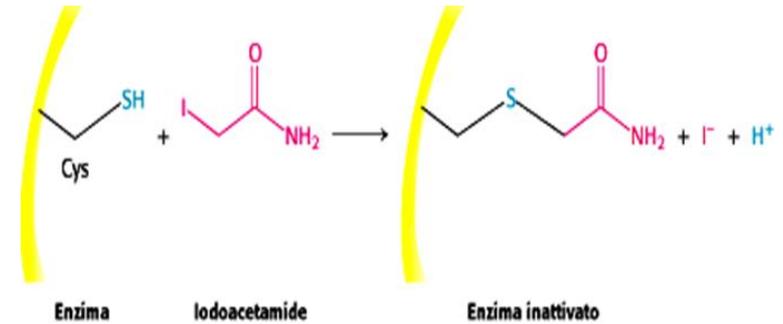


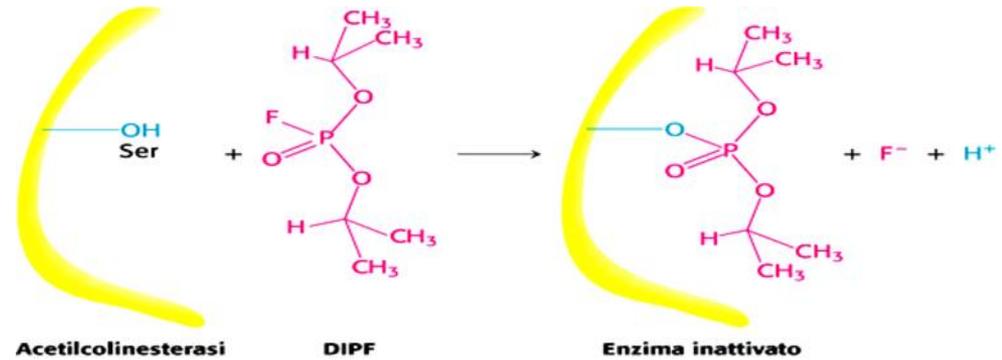
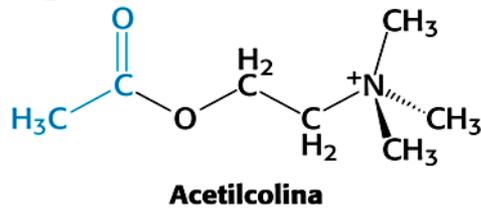
Fig. 1. Semilog plot of remaining enzyme activity against time as a function of various inhibitor concentrations.

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

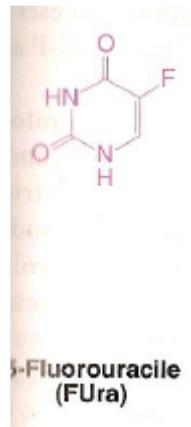
- Reagenti gruppo specifici



- Analoghi del substrato



- Inibitori suicidi

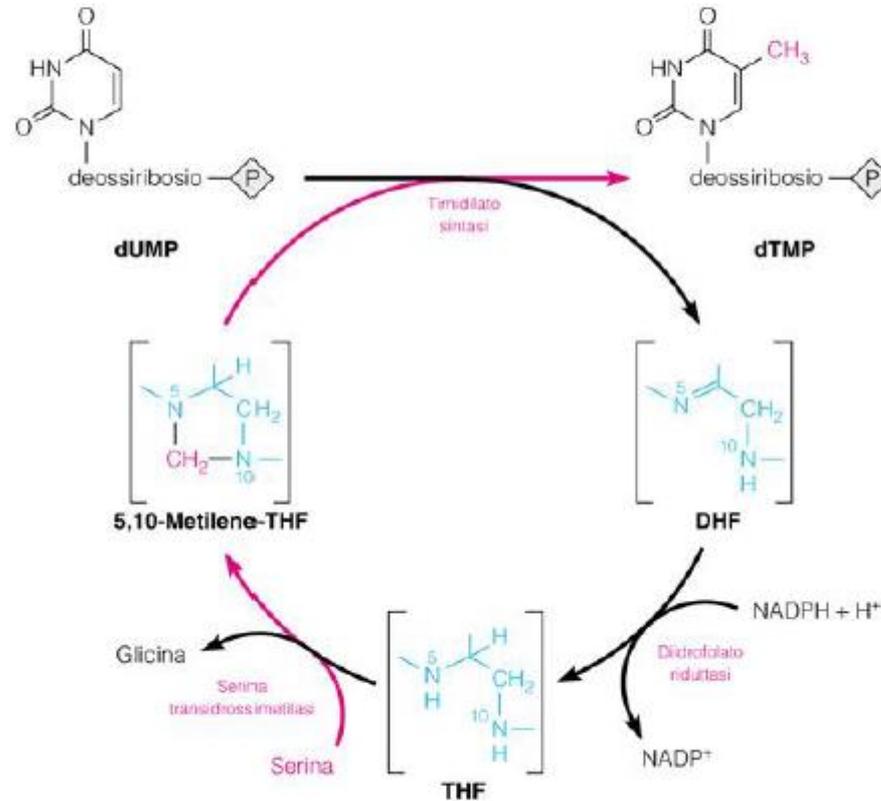


Inibitori suicidi :sfruttano il meccanismo d'azione dell'enzima

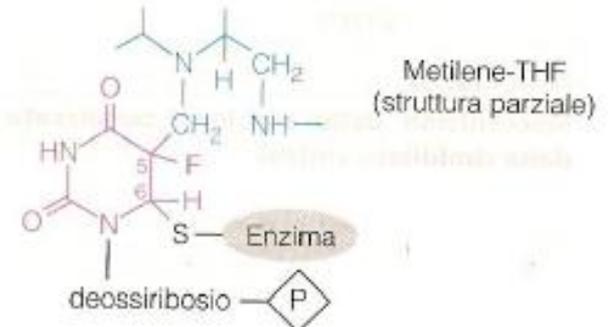
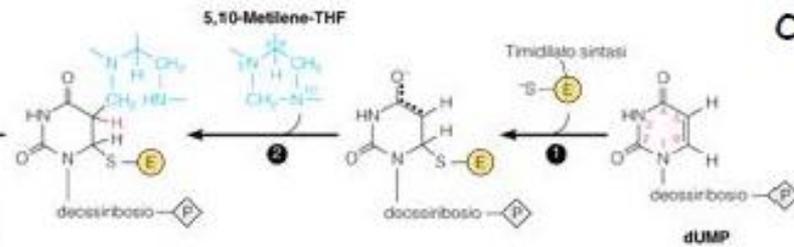
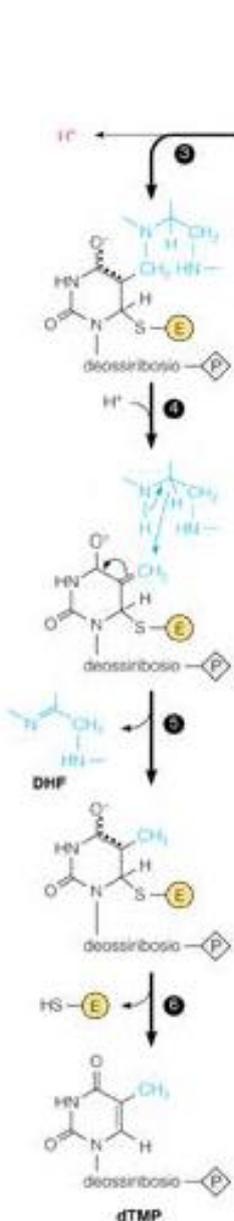
Sono analoghi del substrato che vengono inizialmente processati con il normale meccanismo catalitico

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

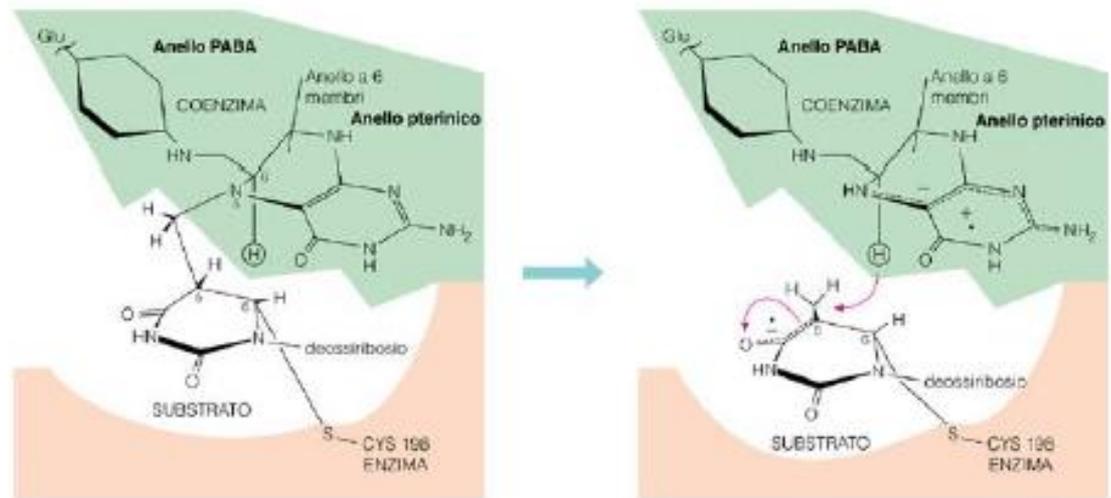
Il 5-fluorouracile: un inibitore suicida della timidilato sintasi



Meccanismo della reazione catalizzata dalla timidilato sintasi



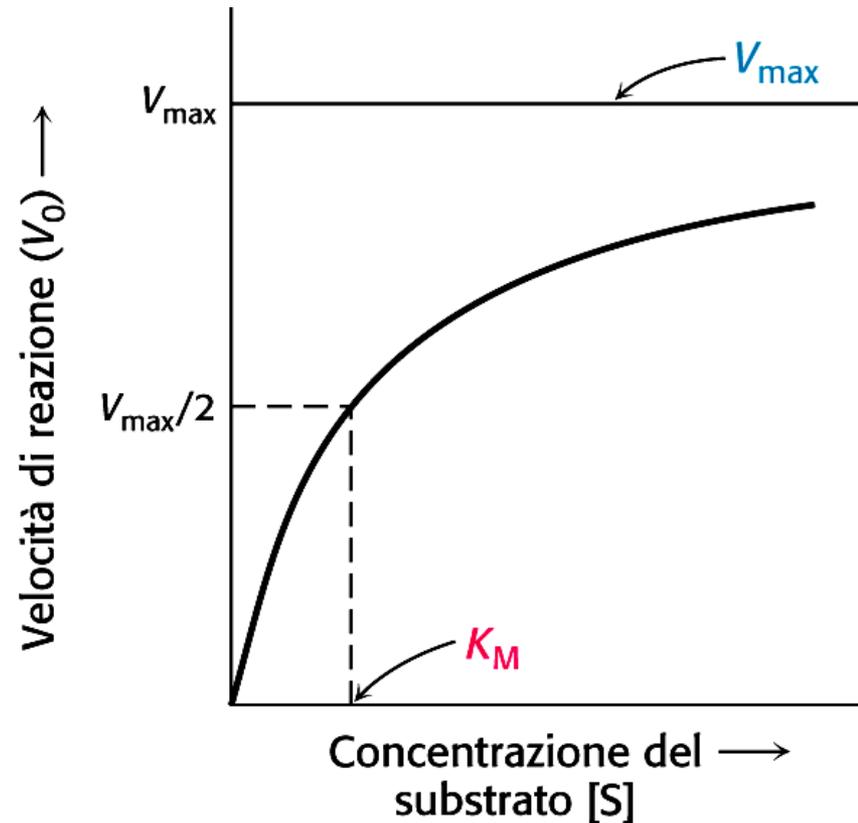
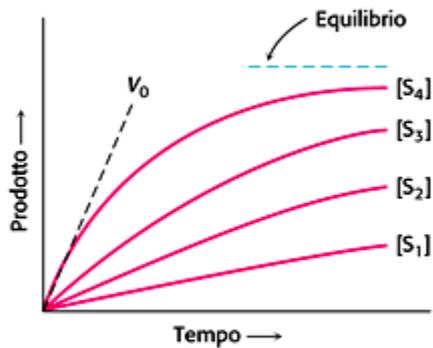
Complesso tra FdUMP legato all'enzima e il 5,10-metilene-THF



Orientamento del substrato e del coenzima nel sito attivo della timidilato sintasi

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

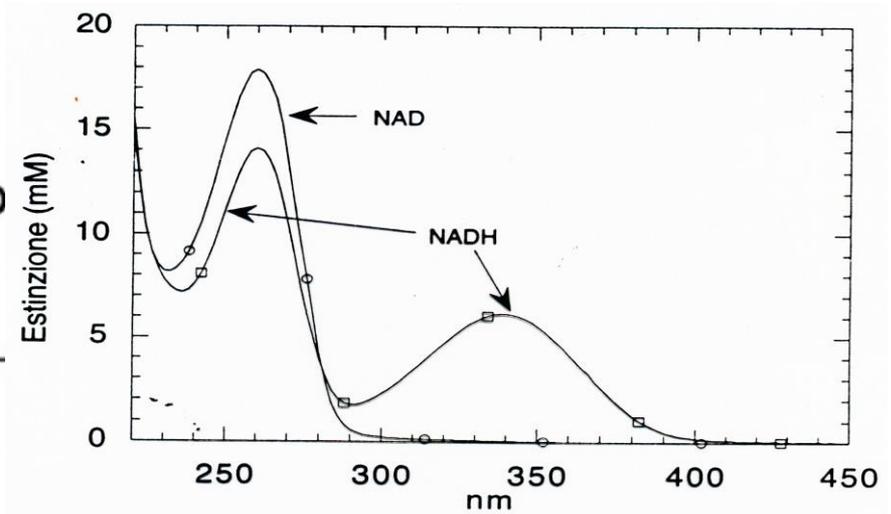
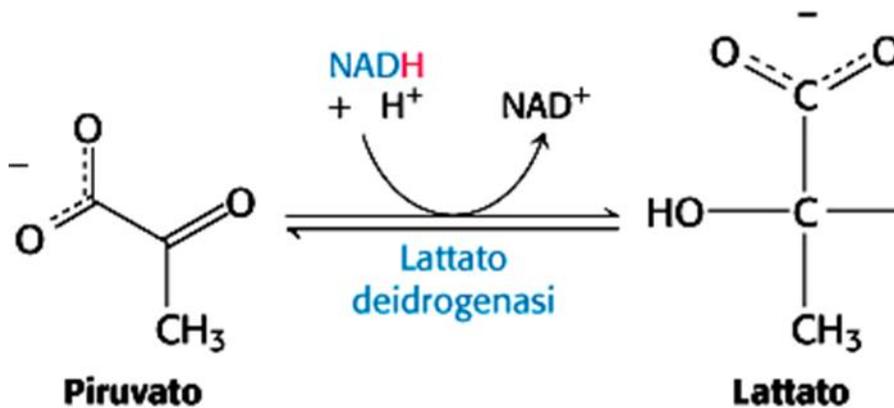
Saggi continui e discontinui

Saggi continui Sono più accurati e meno laboriosi di quelli discontinui usano lo spettrofotometro

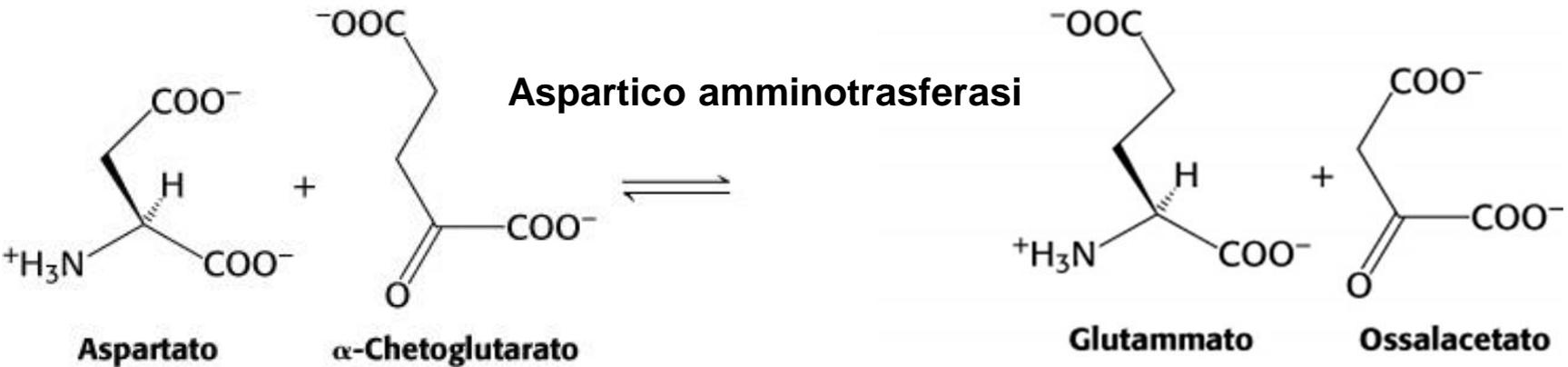
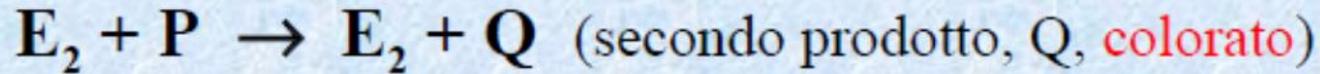
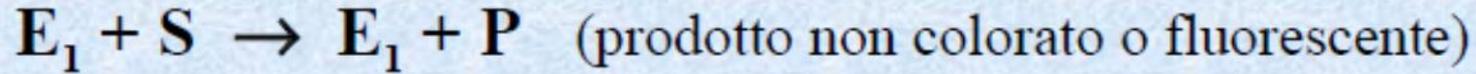
Saggi diretti



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



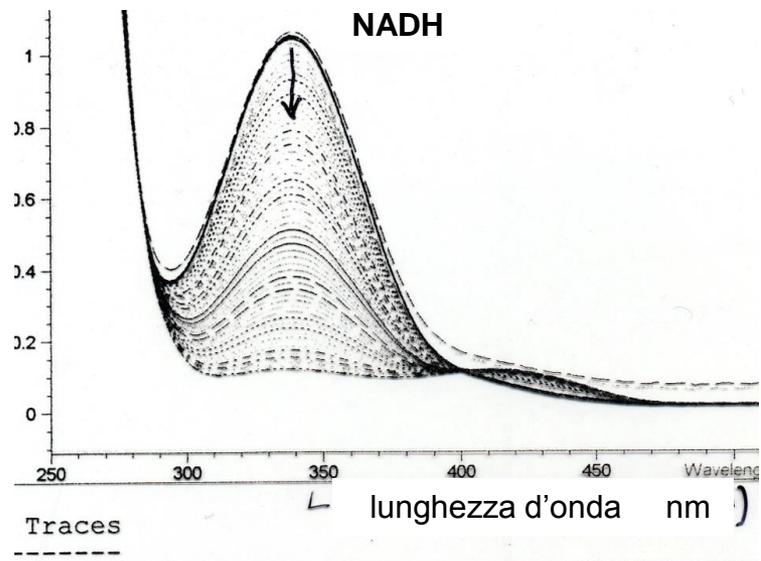
Saggi accoppiati



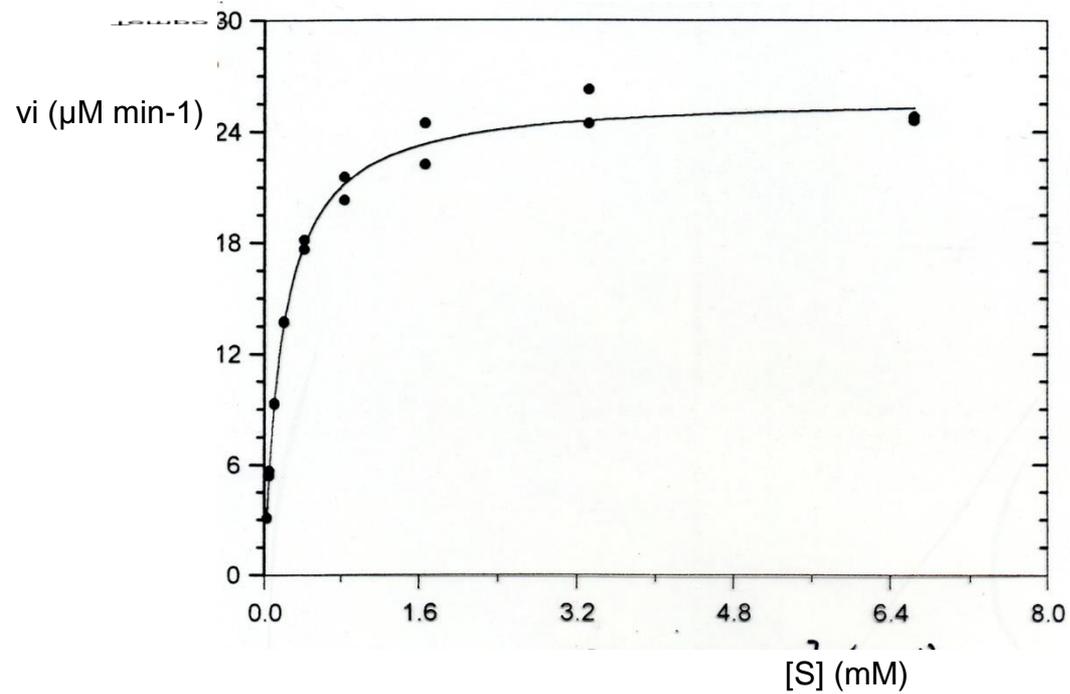
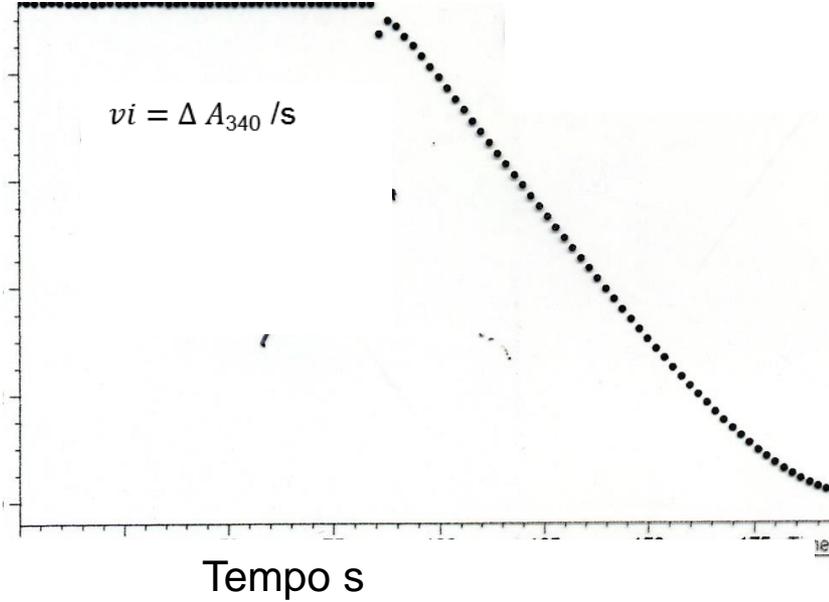
Malico Deidrogenasi



A



A340nm

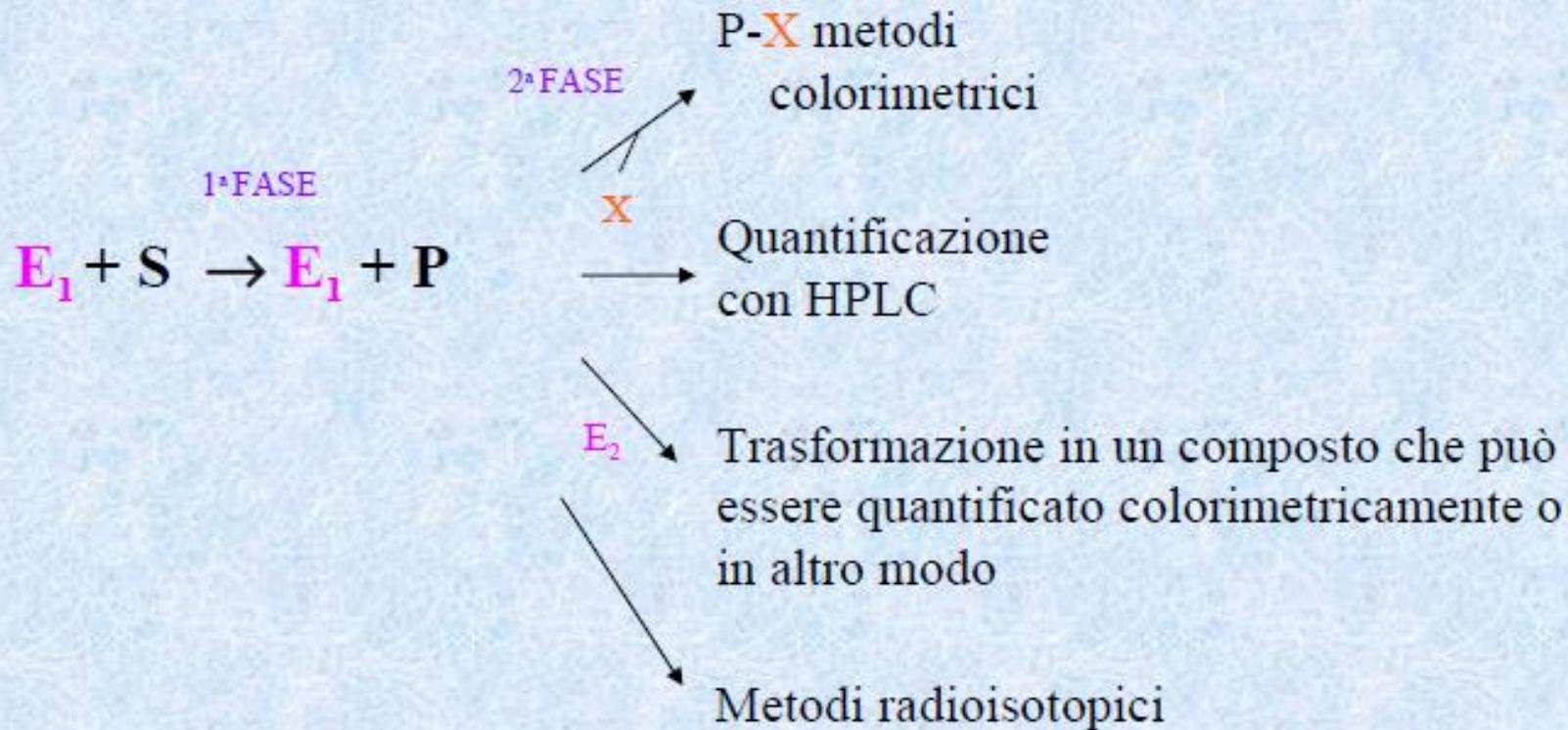


Saggi discontinui:

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 lunghezza d'onda che a noi interessa. In questo caso dobbiamo condurre il saggio e poi eliminare la fonte di disturbo.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

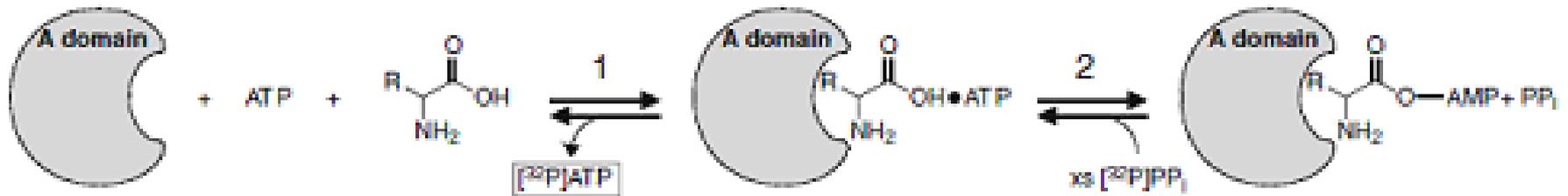
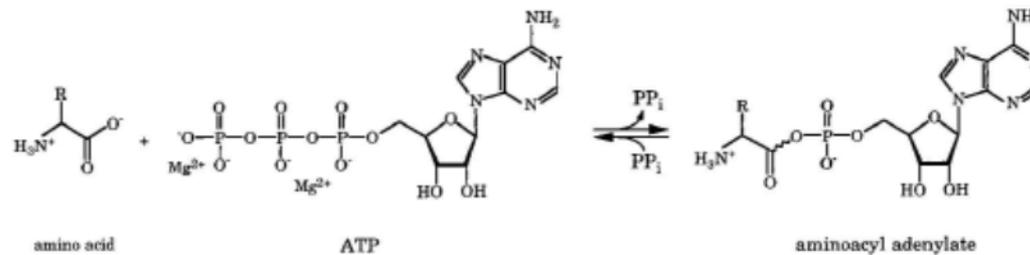


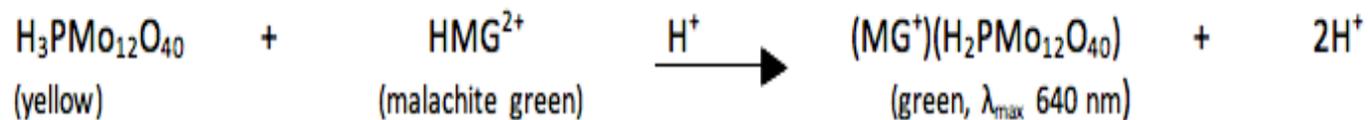
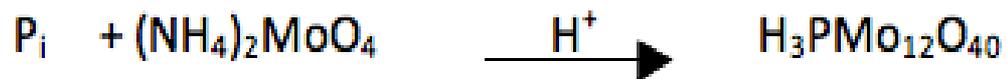
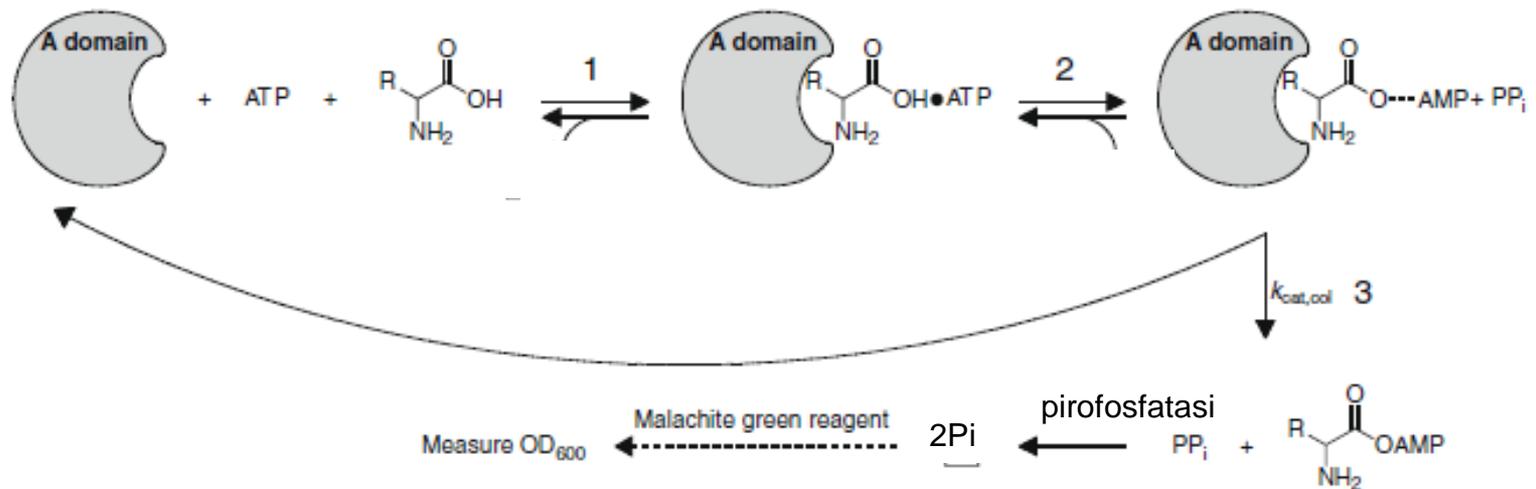
A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis

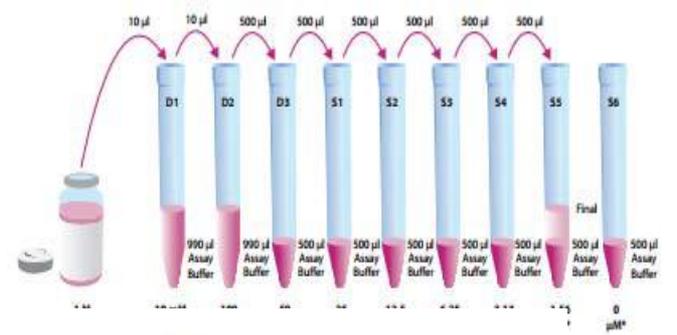
Thomas J. McQuade^a, Abbie D. Shallop^b, Anita Sheoran^b, James E. DelProposto^c, Oleg V. Tsodikov^d,
Sylvie Garneau-Tsodikova^{b,d,*}

Dominio di adenilazione (A)

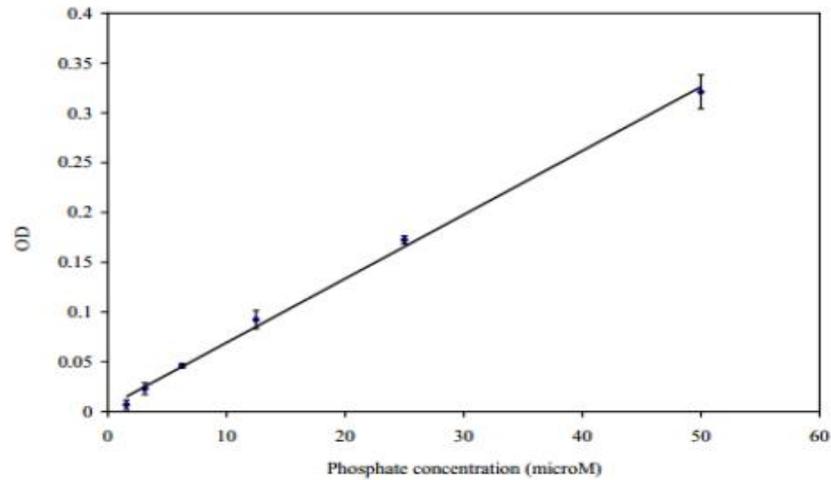
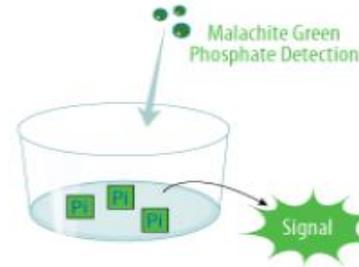
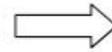
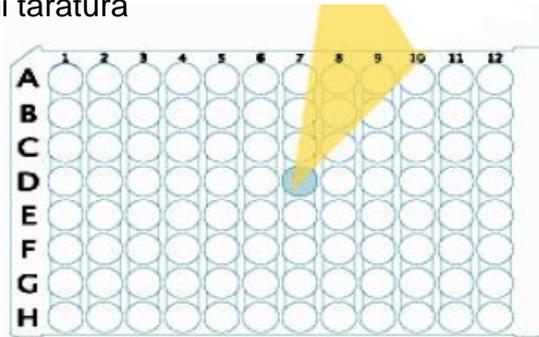
Il dominio di adenilazione è formato da circa 550 aminoacidi ed è deputato al riconoscimento ed all'attivazione dell'amminoacido in una reazione di amminoacil-adenilazione con idrolisi dell'ATP e formazione di un amminoacil-AMP.





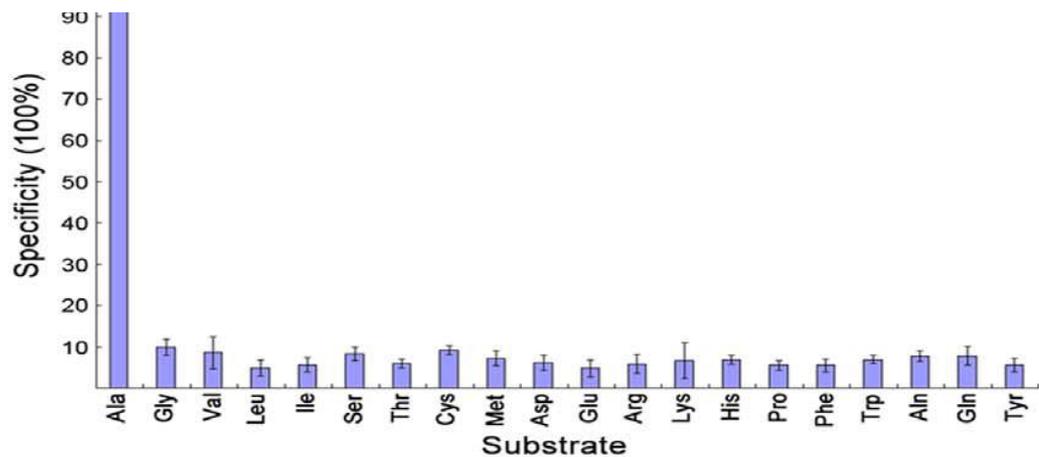
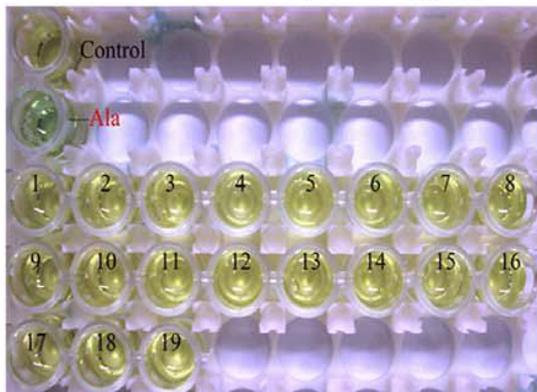
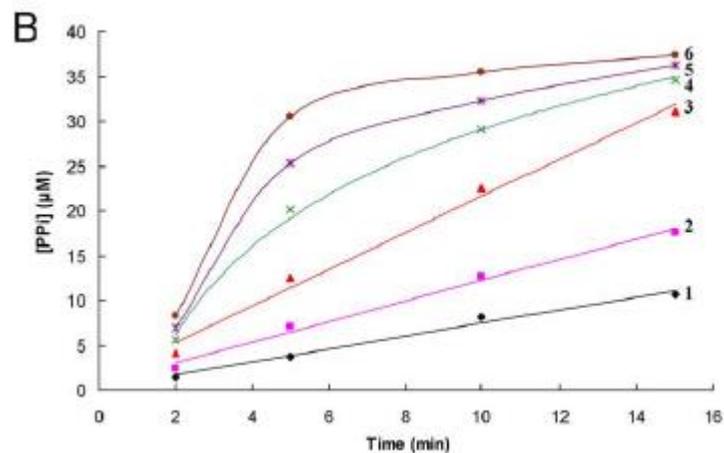
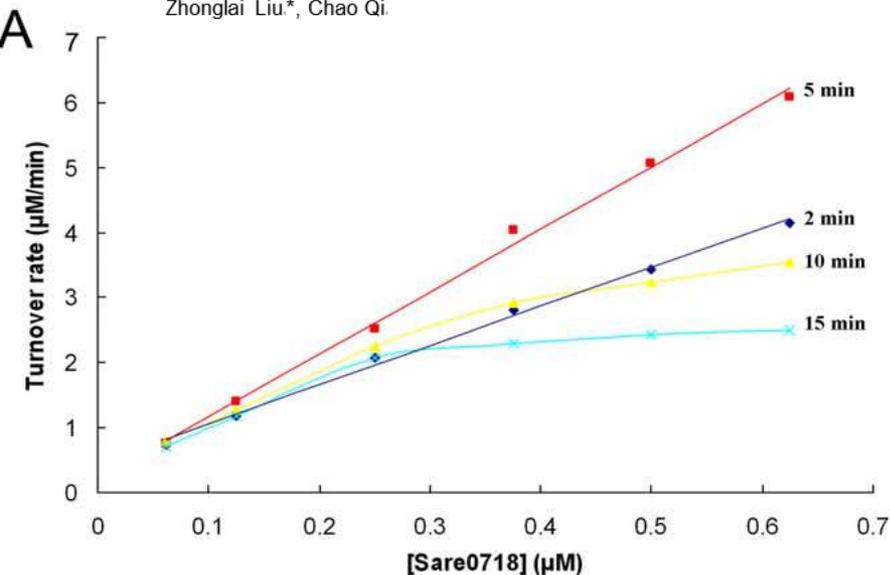


Preparazione retta di taratura

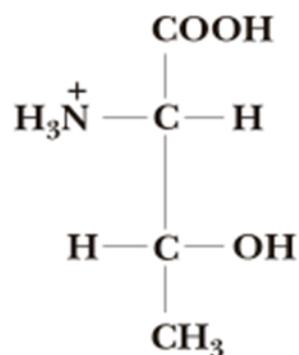


Identification of Sare0718 As an Alanine-Activating Adenylation Domain in Marine Actinomycete *Salinispora arenicola* CNS-205

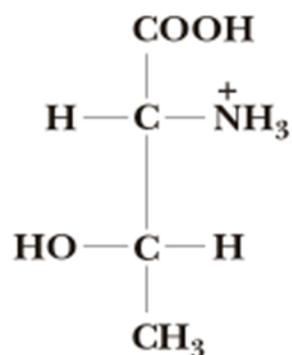
Sisi Xia, Yanlin Ma, Wei Zhang, Yi Yang, Shaowen Wu, Minzhe Zhu, Lingfu Deng, Bing Li, Zhonglai Liu*, Chao Qi.



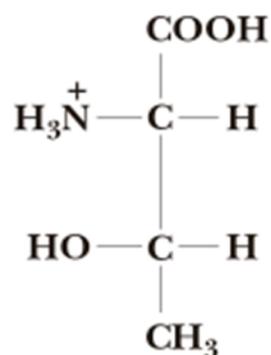
Amminoacido	$V_{\max}[\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}]$	$K_M[\text{mM}]$	$k_{\text{cat}}[\text{min}^{-1}]$	$k_{\text{cat}}/K_M[\text{min}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}]$
L-Thr	$4,443\pm 0,150$	$3,027 \pm 0,806$	$0,254\pm 0,008$	$0,087\pm 0,020$
D-Thr	$7,316\pm 0,066$	$13,877\pm 0,936$	$0,418\pm 0,004$	$0,030\pm 0,002$
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	$8,320 \pm 0,305$	$40,711\pm 6,241$	$0,476\pm 0,017$	$0,012\pm 0,001$



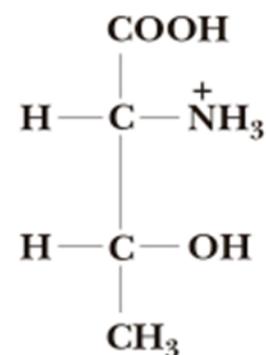
L-Threonine



D-Threonine



L-Allothreonine



D-Allothreonine

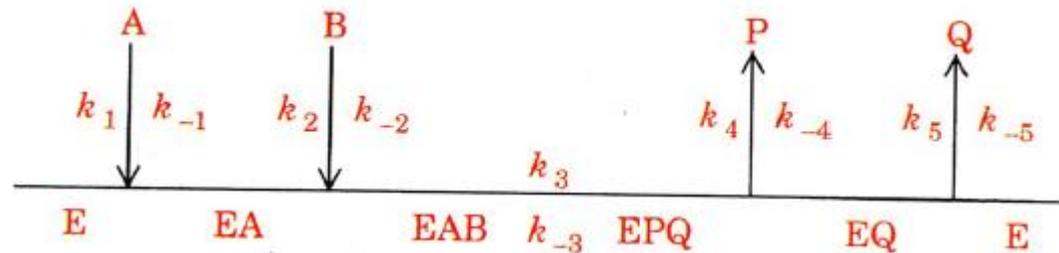
Reazioni a due substrati



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

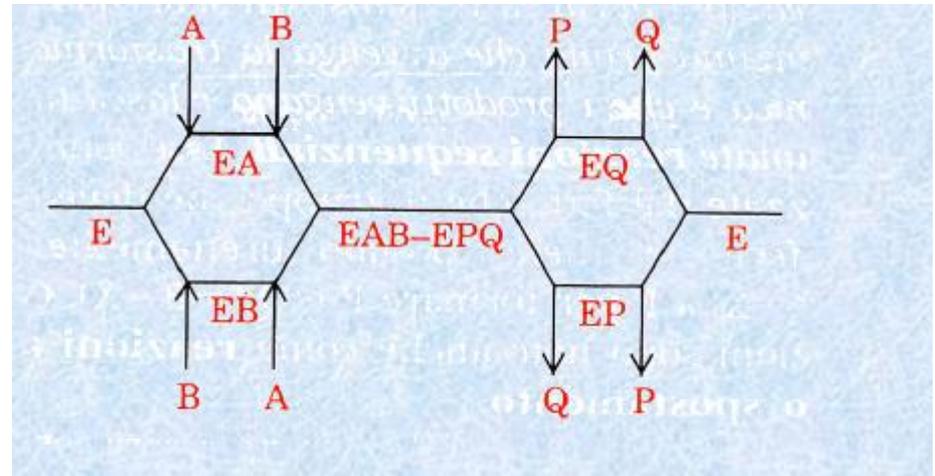
meccanismo ordinato:

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

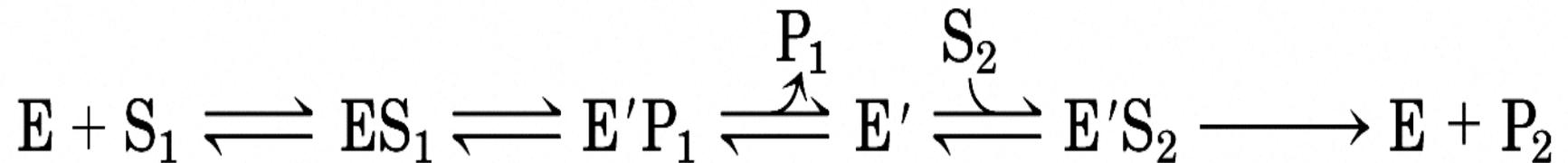


Reazioni a ping-pong (non si forma un complesso ternario)

Reazioni di trasferimento

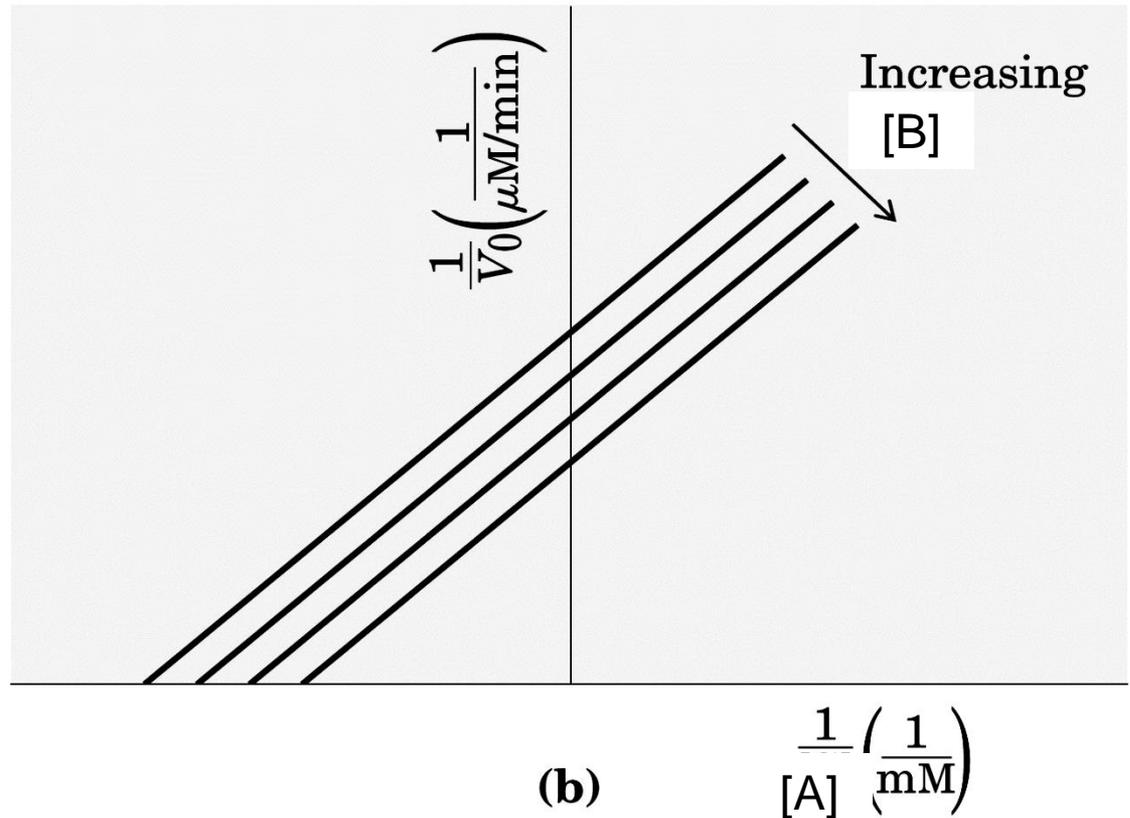
Si forma un complesso ES_1 , l'enzima viene modificato E' a causa del trasferimento di un gruppo; viene allontanato dal complesso il primo prodotto P_1 , l'enzima modificato genera un secondo complesso $E'S_2$ con il secondo substrato, viene rilasciato il secondo prodotto P_2 e l'enzima ritorna libero E

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

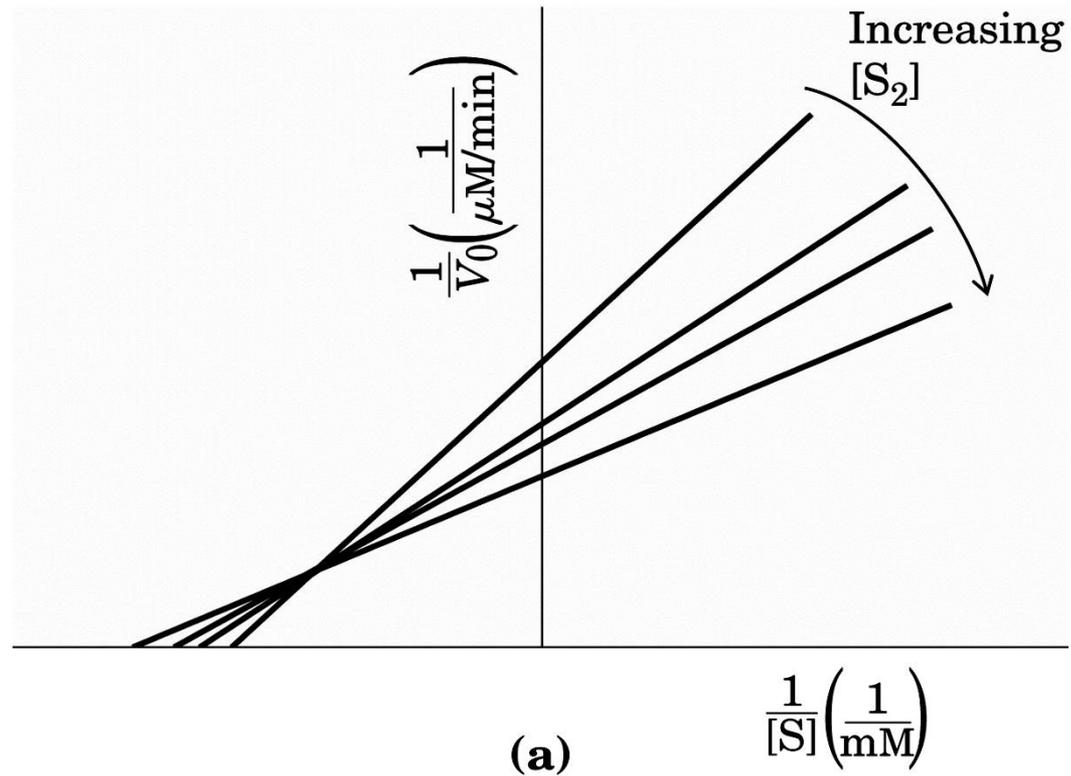


Meccanismo a ping pong

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M(A)}{V_{\max [A]}} + \frac{K_M(B)}{V_{\max [B]}} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Reazioni sequenziali



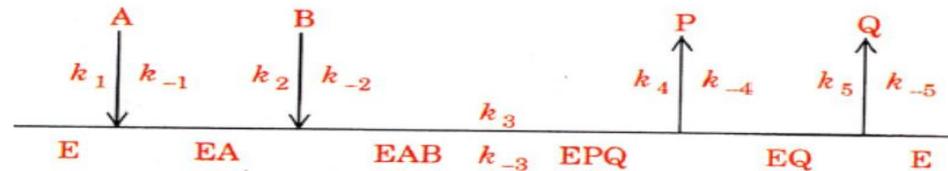
Discriminazione tra meccanismi sequenziali casuali o ordinati

Inibizione da prodotto

Se alla miscela di reazione viene aggiunto solo uno dei prodotti la reazione non può tornare indietro ma legandosi all'enzima questo inibirà la reazione

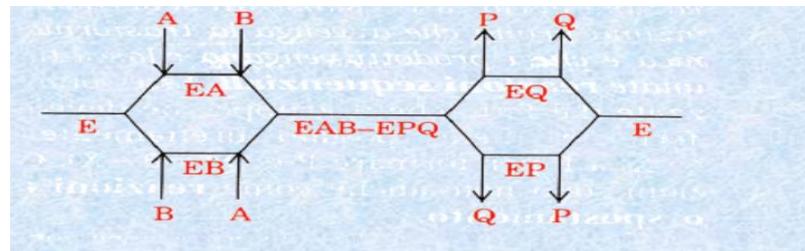
Meccanismo molecolare ordinato

L'aggiunta del secondo prodotto Q compete con il primo substrato per il legame all'enzima fungendo da inibitore competitivo mentre l'aggiunta del prodotto P che si combina solo con EQ funziona da inibitore misto di A quando B è mantenuto costante e inibitore misto di B quando A è mantenuto costante



Meccanismo casuale

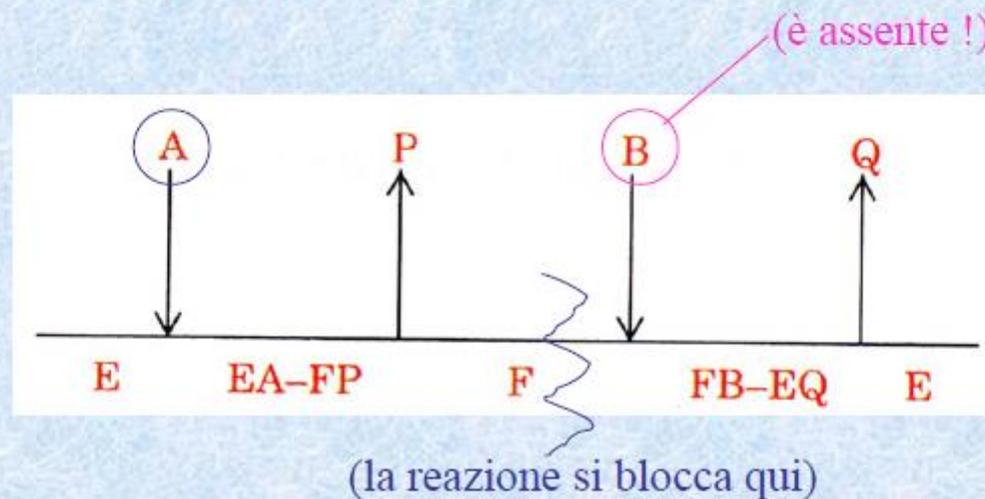
Poiché entrambi i substrati e i prodotti possono legarsi direttamente ad E sia P che Q sono inibitori competitivi

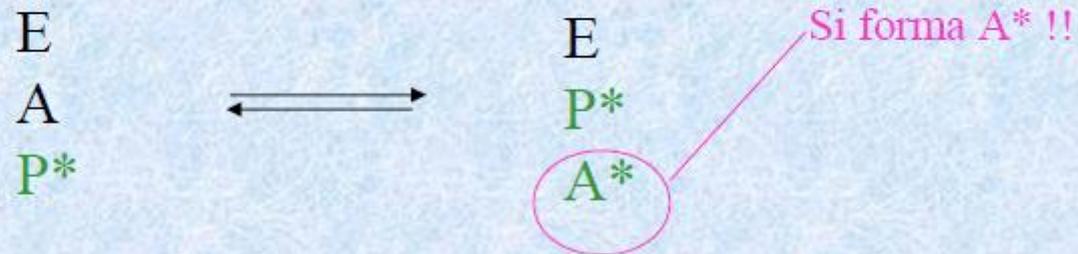
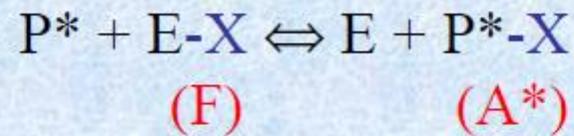
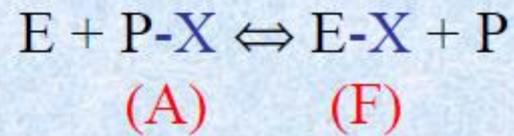
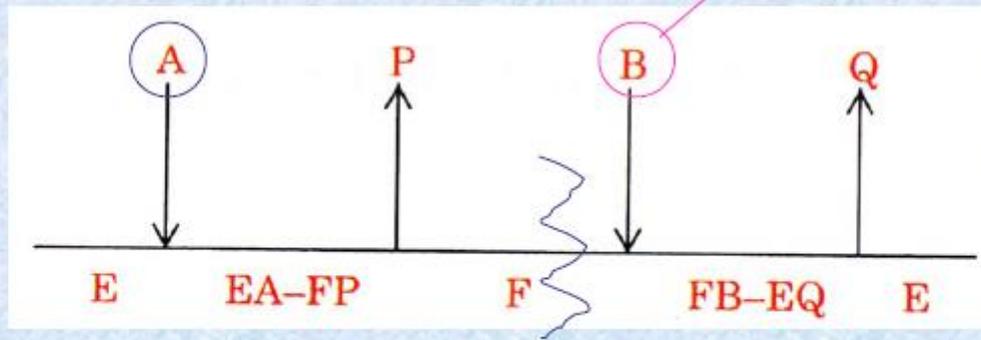


I meccanismi **sequenziale** e **a ping pong** possono essere differenziati mediante **studi di scambi isotopici** (oltre che mediante studi cinetici)

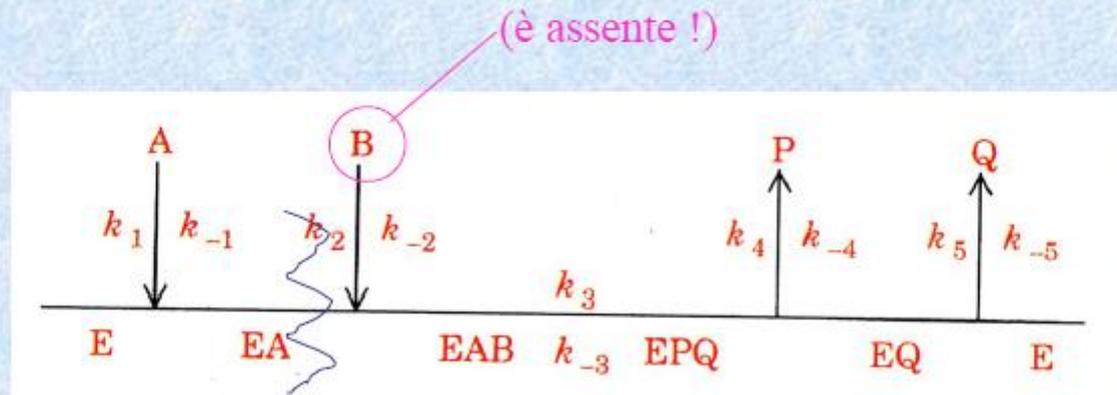
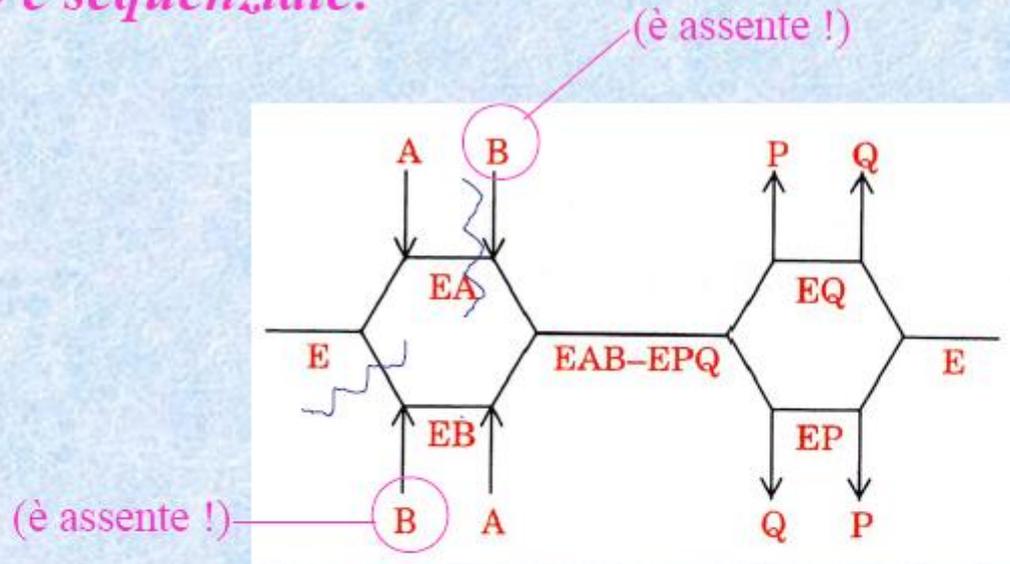
- Esperimento in cui oltre all'enzima è presente solo uno dei due substrati (**A**) insieme al primo prodotto rilasciato, marcato radioattivamente (**P***)

Se il meccanismo è a ping-pong:





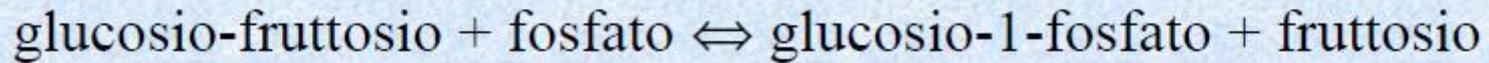
Se il meccanismo è sequenziale:



NON SI PUO' FORMARE A^* !!

Esempio

1) Saccarosio fosforilasi

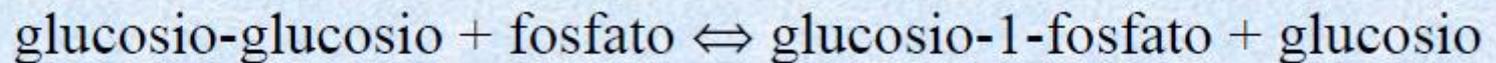


Esperimento di scambio isotopico:



Il meccanismo è a ping pong

1) Maltosio fosforilasi

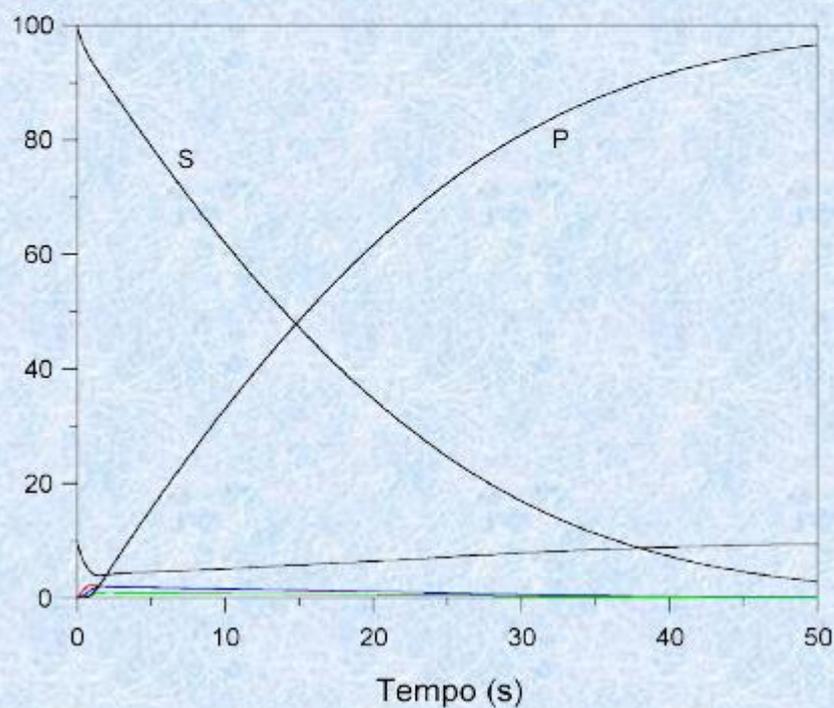
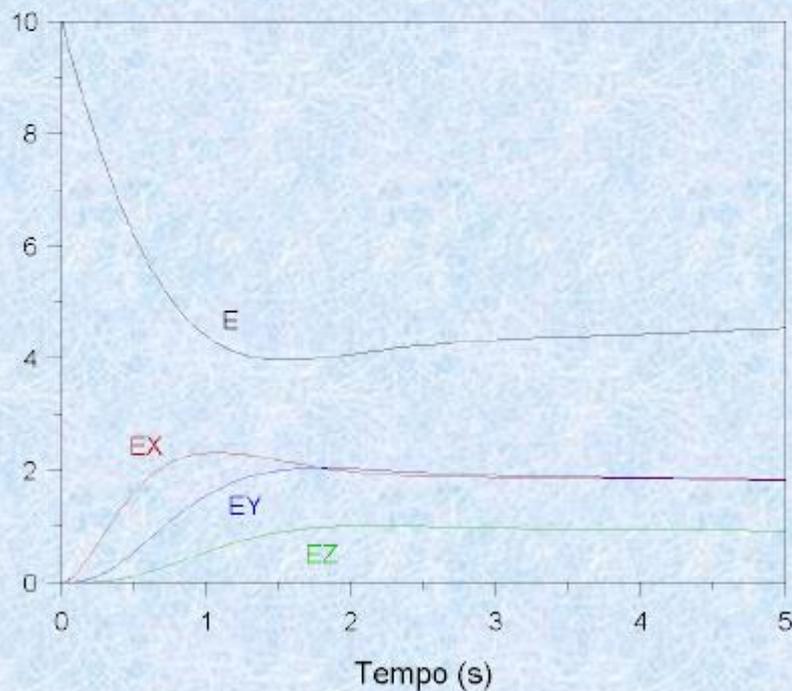


Esperimento di scambio isotopico:



Il meccanismo è sequenziale

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

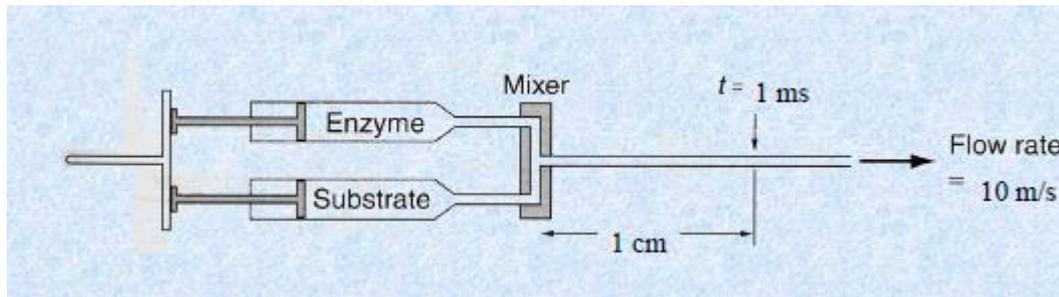


Metodi a mescolamento rapido

Flusso continuo: le soluzioni dell'enzima e del substrato sono introdotte mediante siringhe in una camera di mescolamento

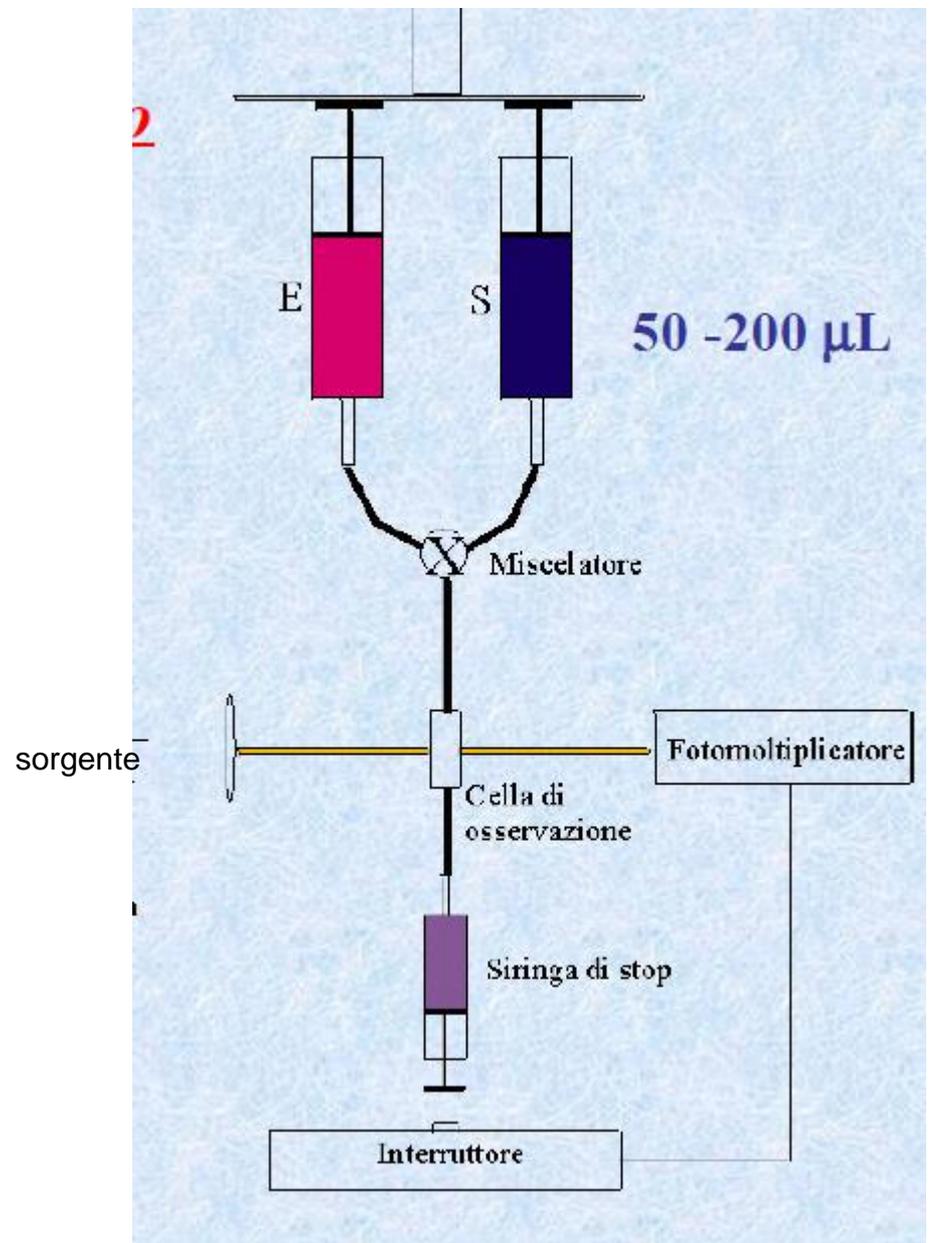
La miscela viene pompata ad una velocità prestabilita

Il tempo di reazione viene calcolato dal punto di mescolamento al punto di osservazione variando il flusso si possono variare i tempi di reazione e calcolare direttamente le costanti cinetiche



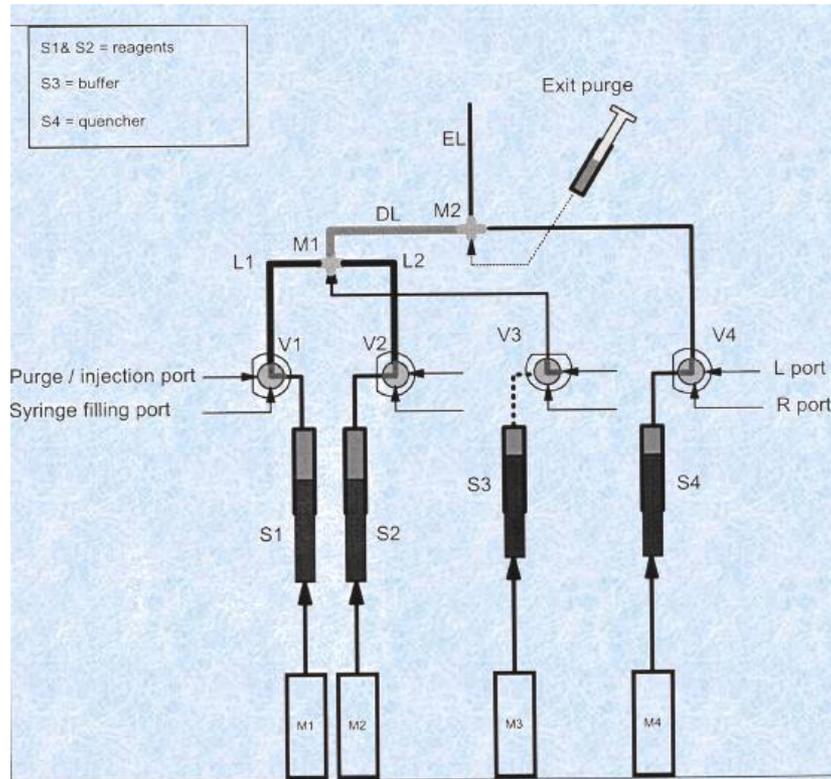
Metodo a flusso interrotto

Enzima e substrato inizialmente in siringhe separate vengono rilasciati attraverso una camera di miscelazione in una terza siringa detta di bloccaggio. Ciò permette ad un rivelatore di iniziare l'analisi nel tubo che connette la camera di miscelazione con la siringa di bloccaggio. Si possono facilmente raggiungere velocità di 1000 cm/sec cioè il sistema rivela una miscela vecchia di **1ms**



Metodo a smorzamento

In questa tecnica i reagenti provenienti dalla camera di mescolamento sono trattati con un agente di smorzamento che blocca la reazione che verrà poi analizzata per valutare la formazione degli intermedi
Svantaggio è il tempo morto che è determinato dal tempo di mescolamento



Metodi di rilassamento

Si allestisce prima una miscela all'equilibrio, poi si altera la posizione dell'equilibrio variando le condizioni della reazione (temperatura pressione)

Il tempo di rilassamento (velocità con la quale il sistema raggiunge il nuovo equilibrio) è inversamente proporzionale alla costante di velocità della reazione

