

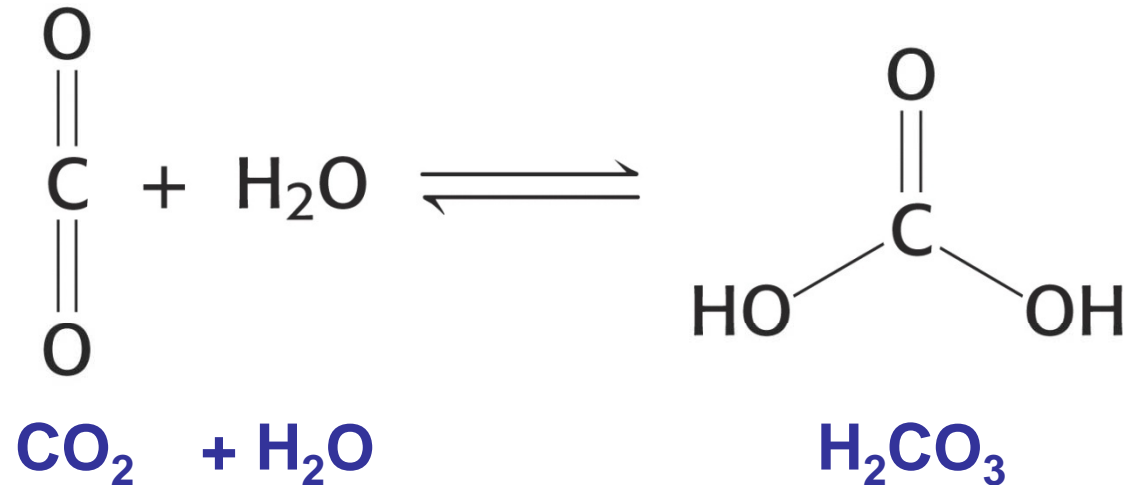
ENZIMI

Molecole proteiche **globulari** che consentono alle **reazioni** biochimiche di procedere ad una **velocità** adeguata alle condizioni fisiologiche

Aumentano la **velocità** delle reazioni senza alterarne l'equilibrio

Sono dotati di elevata **specificità**

Reazione di idratazione dell'anidride carbonica



Anche una reazione semplice come questa viene catalizzata da un enzima specifico: **l'anidrasi carbonica**

- In assenza di questo enzima il trasferimento di CO_2 dai tessuti al sangue non sarebbe efficiente
- Una molecola di **anidrasi carbonica** catalizza 100000 reazioni di idratazione al secondo.
- La reazione catalizzata è **10 milioni di volte** più veloce della reazione non catalizzata

Tutte le trasformazioni chimiche sono associate ad una variazione di **energia.**

TERMODINAMICA

studia i cambiamenti energetici relativi ad una reazione chimica (se e quanto una reazione avviene)

LE TRASFORMAZIONI BIOLOGICHE OBBEDISCONO ALLE LEGGI DELLA TERMODINAMICA

I Legge della termodinamica (conservazione dell'energia)

La quantità totale di energia **dell'Universo (sistema isolato)** rimane costante: l'energia può essere trasformata in altre forme di energia ma non può essere né creata né distrutta.

II Legge della termodinamica

Tutti i processi naturali tendono ad un aumento del disordine, ossia ad un aumento dell' **entropia**

Le **variazioni di energia** che accompagnano una reazione chimica sono definite dalle **3 grandezze termodinamiche**.

Entalpia (H)

contenuto di calore di un sistema, riflette il numero e il tipo di legami chimici dei reagenti e dei prodotti

Entropia (S)

esprime quantitativamente il grado di disordine e la casualità di un sistema

Energia libera di Gibbs (G)

esprime la quantità di energia in grado di produrre un lavoro

Le **variazioni di energia libera**, di entalpia e di entropia sono tra loro correlate

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

$$\Delta G < 0$$

reazione **esoergonica**, rilascia energia libera utilizzabile per compiere un lavoro. Il processo è **spontaneo**. Si verifica quando

$\Delta H < 0$: la reazione rilascia calore (**esotermica**)

$\Delta S > 0$: l'entropia aumenta

$$\Delta G > 0$$

reazione **endoergonica**, richiede energia. Il processo **non è spontaneo**. Si verifica quando

$\Delta H > 0$: la reazione richiede calore

$\Delta S < 0$: l'entropia diminuisce

Pertanto tutti i processi spontanei (che non richiedono energia) sono caratterizzati da un $\Delta G < 0$ e da un aumento dell'entropia ($\Delta S > 0$)



Tutte le trasformazioni chimiche sono associate ad una variazione di **energia**.

TERMODINAMICA

studia i cambiamenti energetici relativi ad una reazione chimica (se e quanto una reazione avviene)

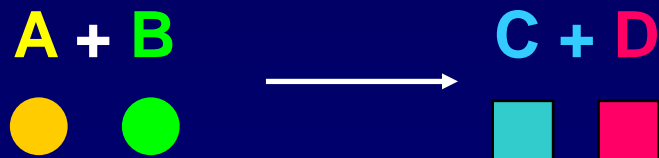
CINETICA

studia la **velocità** e il **meccanismo** di una reazione chimica


VELOCITÀ DI REAZIONE


quantità di reagenti che si trasformano nell'unità di tempo

Cosa determina la velocità di una reazione?

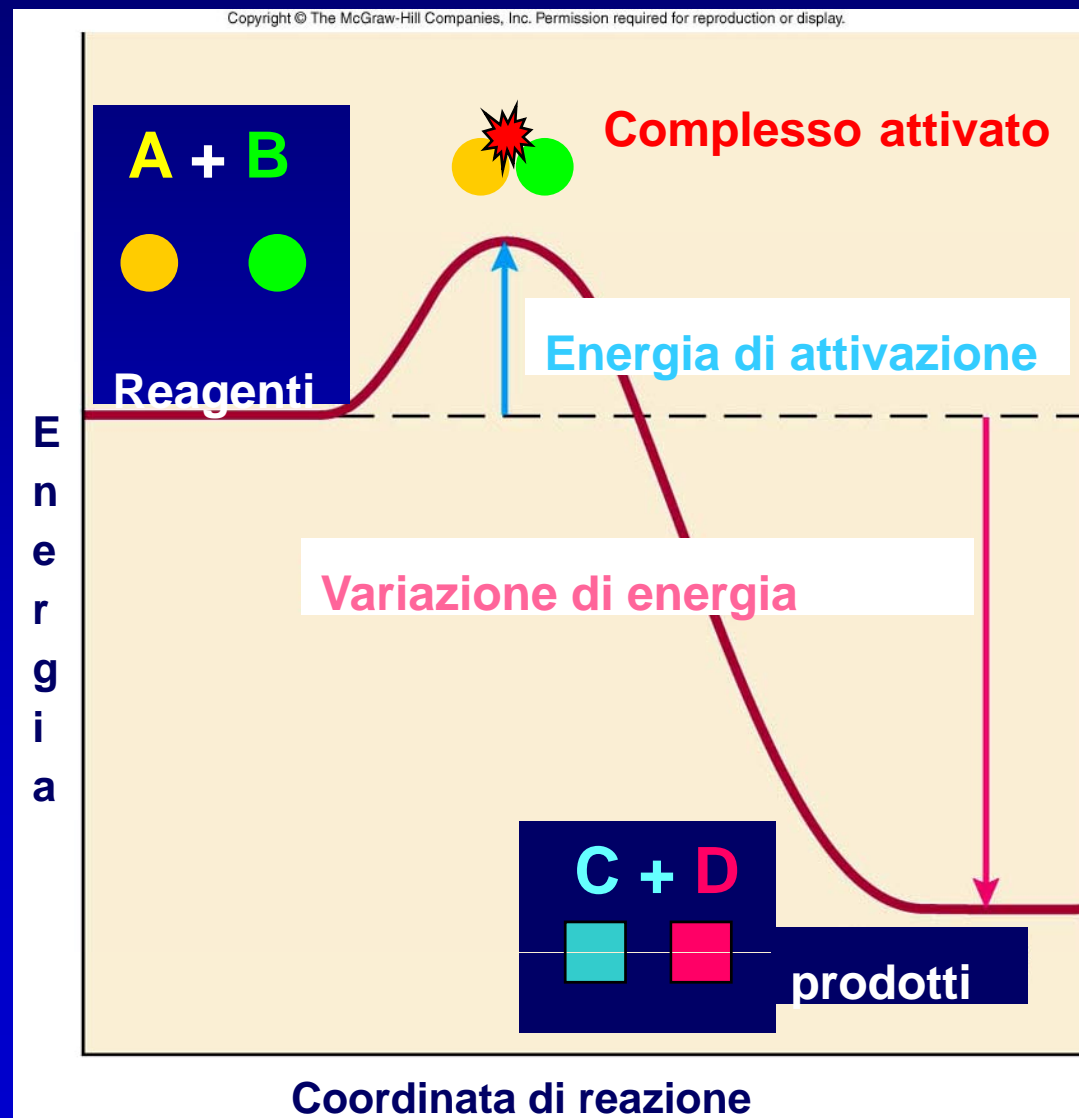


Affinchè A e B reagiscano è necessario

1) che A e B si avvicinino e si urtino 

2) che l'urto sia efficace, ossia che le molecole abbiano l'energia cinetica sufficiente per far avvenire la reazione 

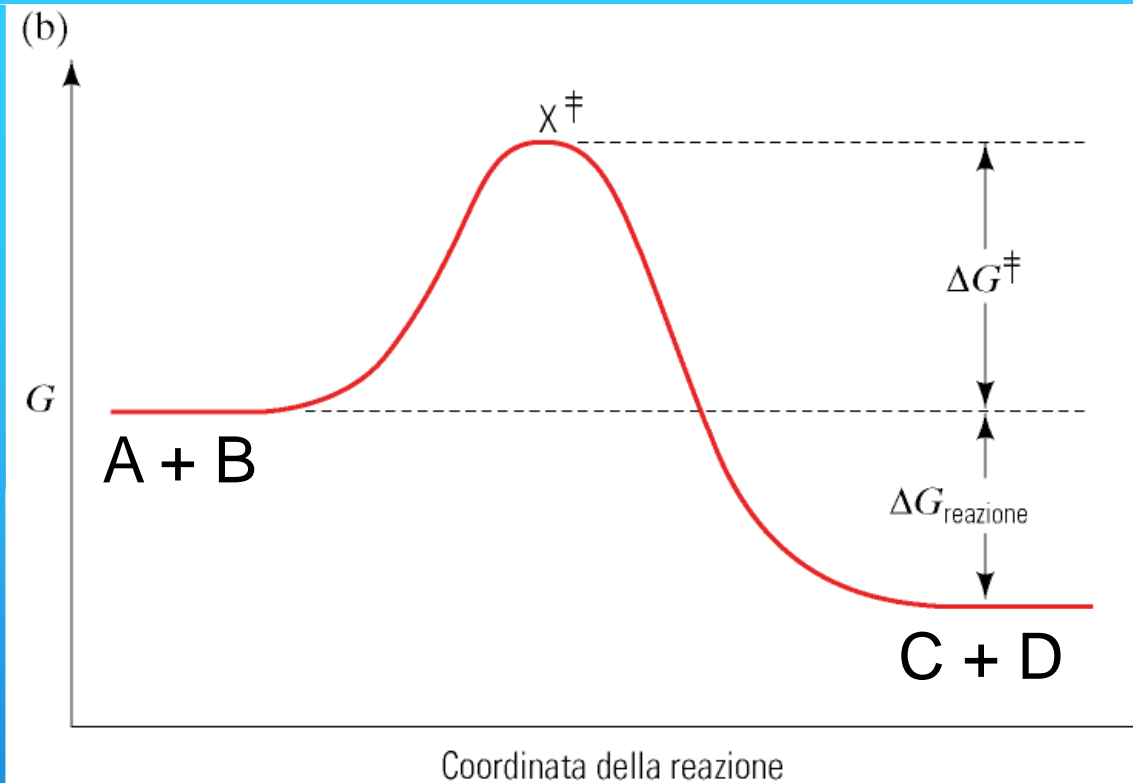
3) che l'orientamento sia vantaggioso (fattore sterico)



Data la reazione



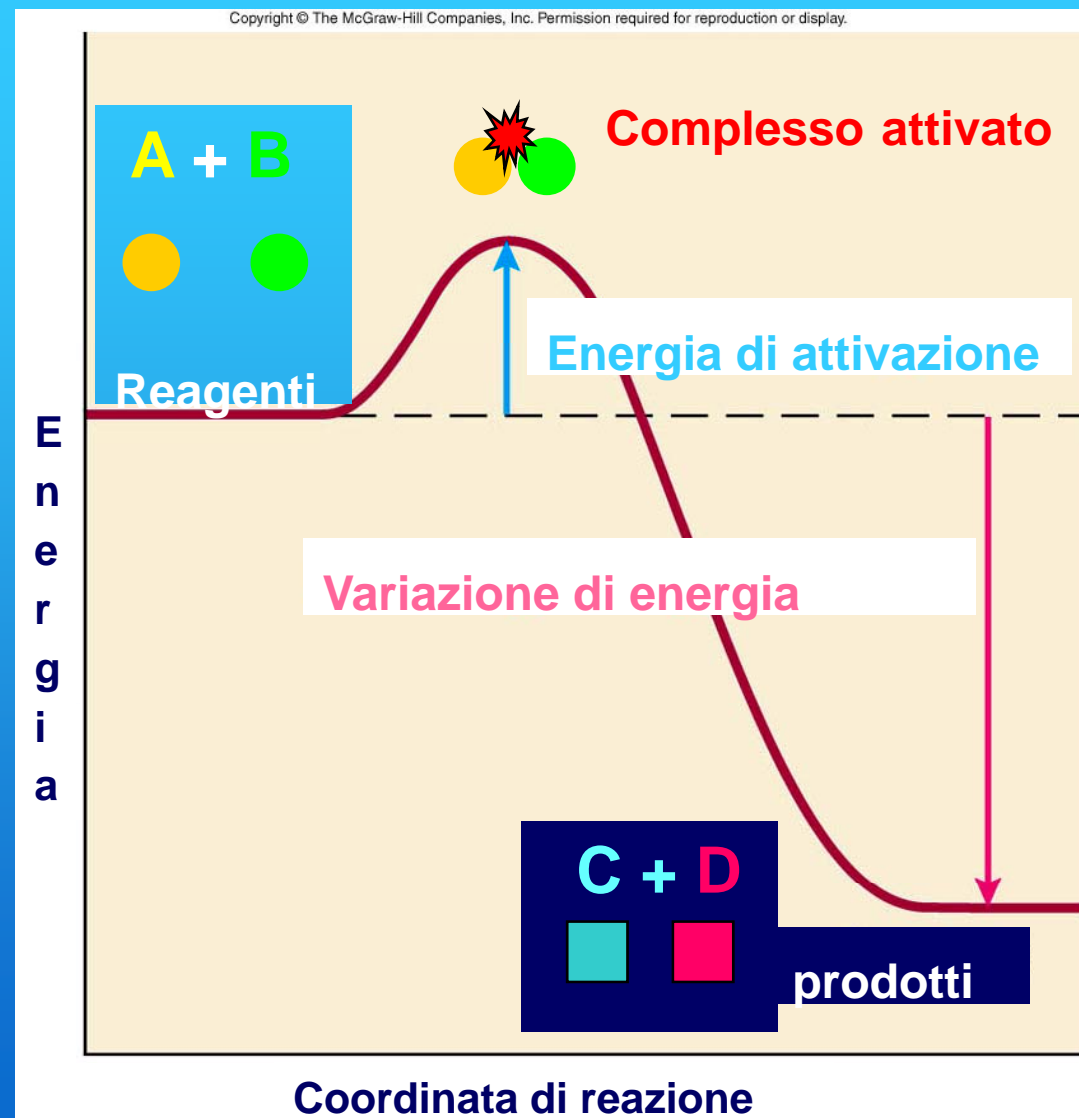
• la sua **velocità** dipenderà dal contenuto energetico delle molecole reagenti



- Reagiscono solo le molecole dotate di energia maggiore o uguale all'energia richiesta per la formazione del **complesso attivato (energia di attivazione E_a)**
- Lo **stato di transizione** è un momento transitorio relativo alla formazione del **complesso attivato**

ENERGIA DI ATTIVAZIONE (E_a)

- E' caratteristica di ogni reazione chimica
- E' la quantità di energia necessaria a portare tutte le molecole contenute in una mole di sostanza al massimo della barriera di attivazione
- È fornita principalmente dall'energia cinetica delle molecole



**Come può essere aumentata la
velocità di una reazione?**

VELOCITÀ DI REAZIONE

quantità di reagenti che si trasformano nell'unità di tempo

La **velocità di una reazione chimica aumenta**

- all'**aumentare** della **concentrazione** dei reagenti
- all'**aumentare** della **temperatura** (aumento della velocità media dei reagenti e del numero degli urti)
- al **diminuire** della **energia di attivazione**

<u>catalyst</u>	<u>rate enhancement</u>
non-enzymatic (Pd)	10^2 - 10^4 fold
enzymatic	up to 10^{20} fold

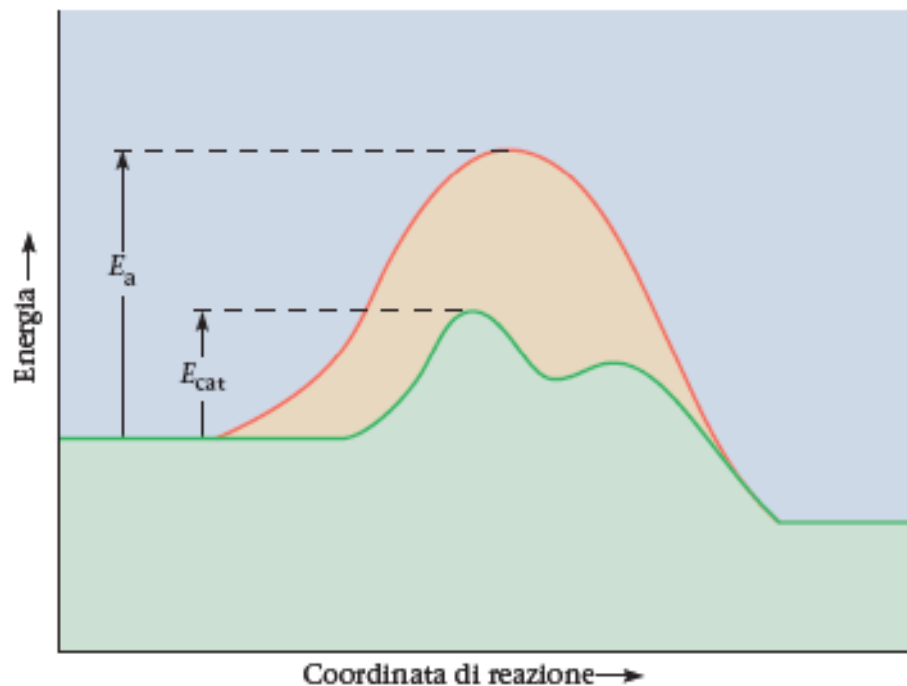
<u>catalyst</u>	<u>time for reaction</u>
yes	1 second
no	3×10^{12} years

3×10^{12} years is 500 times the age of the earth!

CATALISI

Un **catalizzatore** è una sostanza che

- **aumenta la velocità** di una reazione chimica cambiando il percorso della reazione in un nuovo percorso con una più bassa energia di attivazione E_a
- **non si consuma** nel corso della reazione



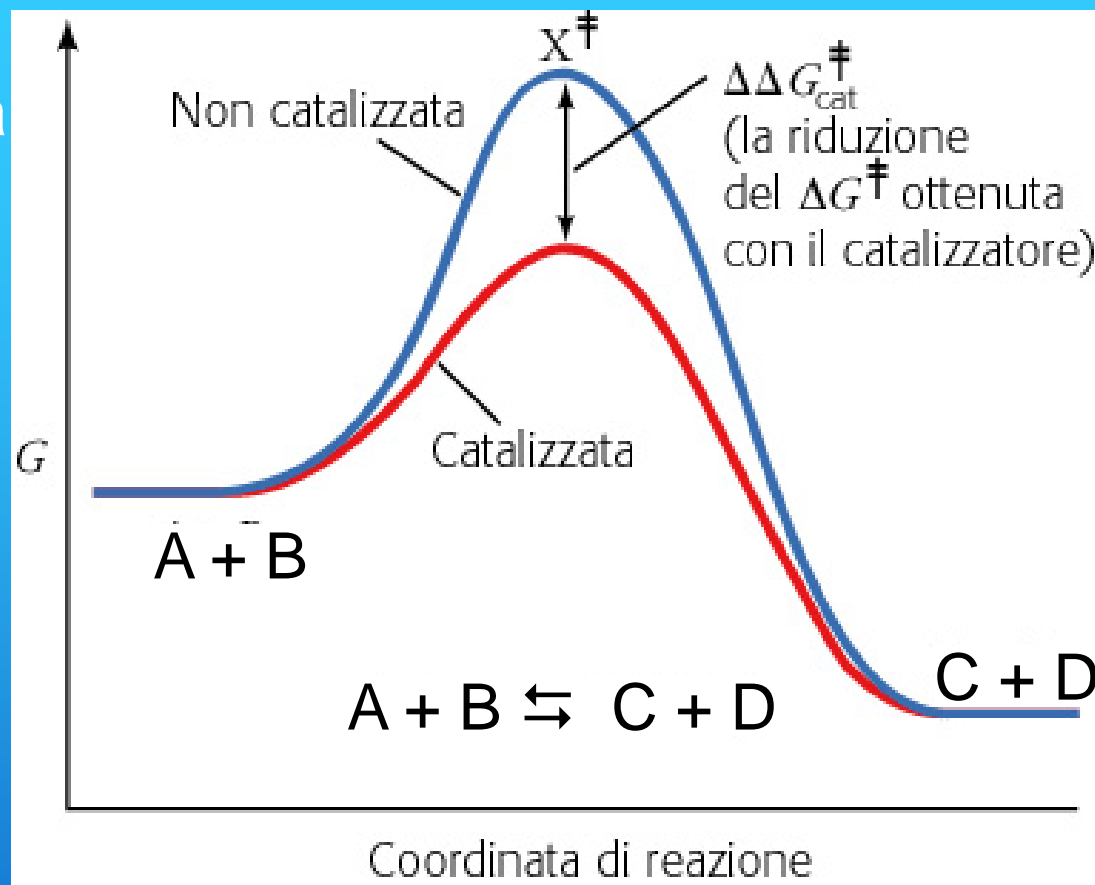
GLI ENZIMI SONO CATALIZZATORI ORGANICI

accelerano le reazioni
abbassandone l'energia
di attivazione

non sono consumati
nella reazione che
catalizzano e non
vengono modificati in
maniera permanente

accelerano solo le
reazioni che
avvengono
spontaneamente

possono essere
inattivati



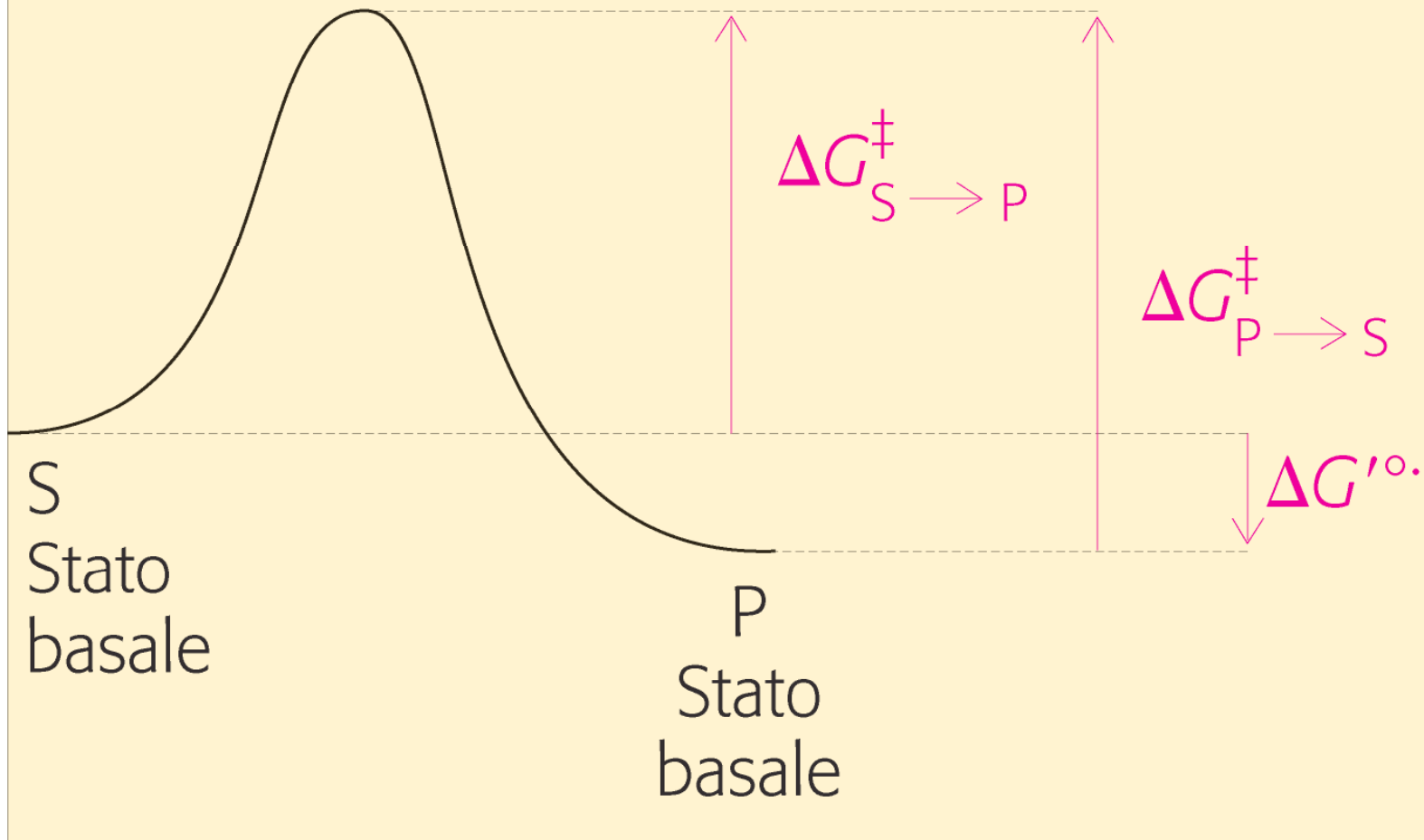
In una reazione reversibile
accelerano sia la reazione inversa
che quella diretta senza modificarne
l'equilibrio



Stato di transizione (\ddagger)

$$\Delta G^\ddagger = G_{X^\ddagger} - G_S$$

Energia libera, G



Coordinata della reazione

CARATTERISTICHE DEGLI ENZIMI

- Sono molto specifici in quanto catalizzano solo alcuni tipi di reazioni chimiche
- La loro attività può essere regolata, cioè esaltata o repressa, in molti casi dalle stesse molecole su cui agiscono
- Ogni enzima ha un sito attivo in cui i substrati reagenti possono entrare



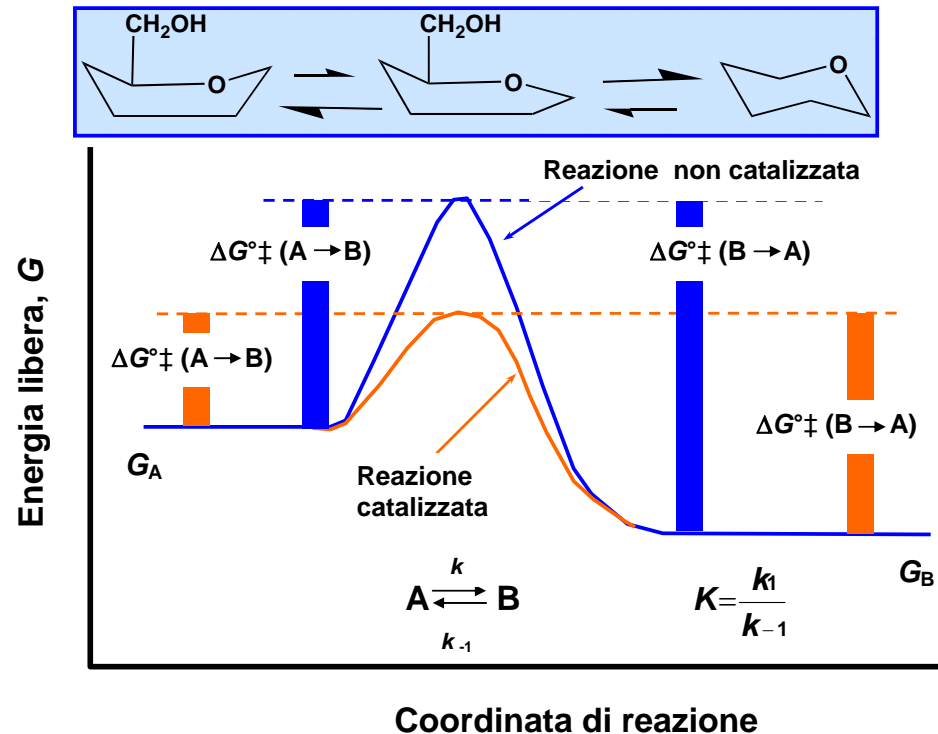
Le interazioni tra enzima (E) e substrato (S) si verificano in corrispondenza di una regione specifica:

il **sito catalitico** o **sito attivo**

Come fa un enzima ad abbassare l'energia di attivazione?

Lo stato di transizione si trova ad un livello energetico superiore a quello del reagente e del prodotto

L'enzima abbassa l'energia libera dello stato di transizione



Nel **sito catalitico** si verificano diversi tipi di **reazioni chimiche** tra substrato e i gruppi funzionali specifici dell'enzima (catene laterali di alcuni amminoacidi)

Alcuni enzimi per svolgere la loro attività funzionale hanno bisogno di componenti chimici addizionali:

i cofattori

Un **cofattore** può essere costituito da:

ioni inorganici come Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}

molecole organiche complesse, i **coenzimi**

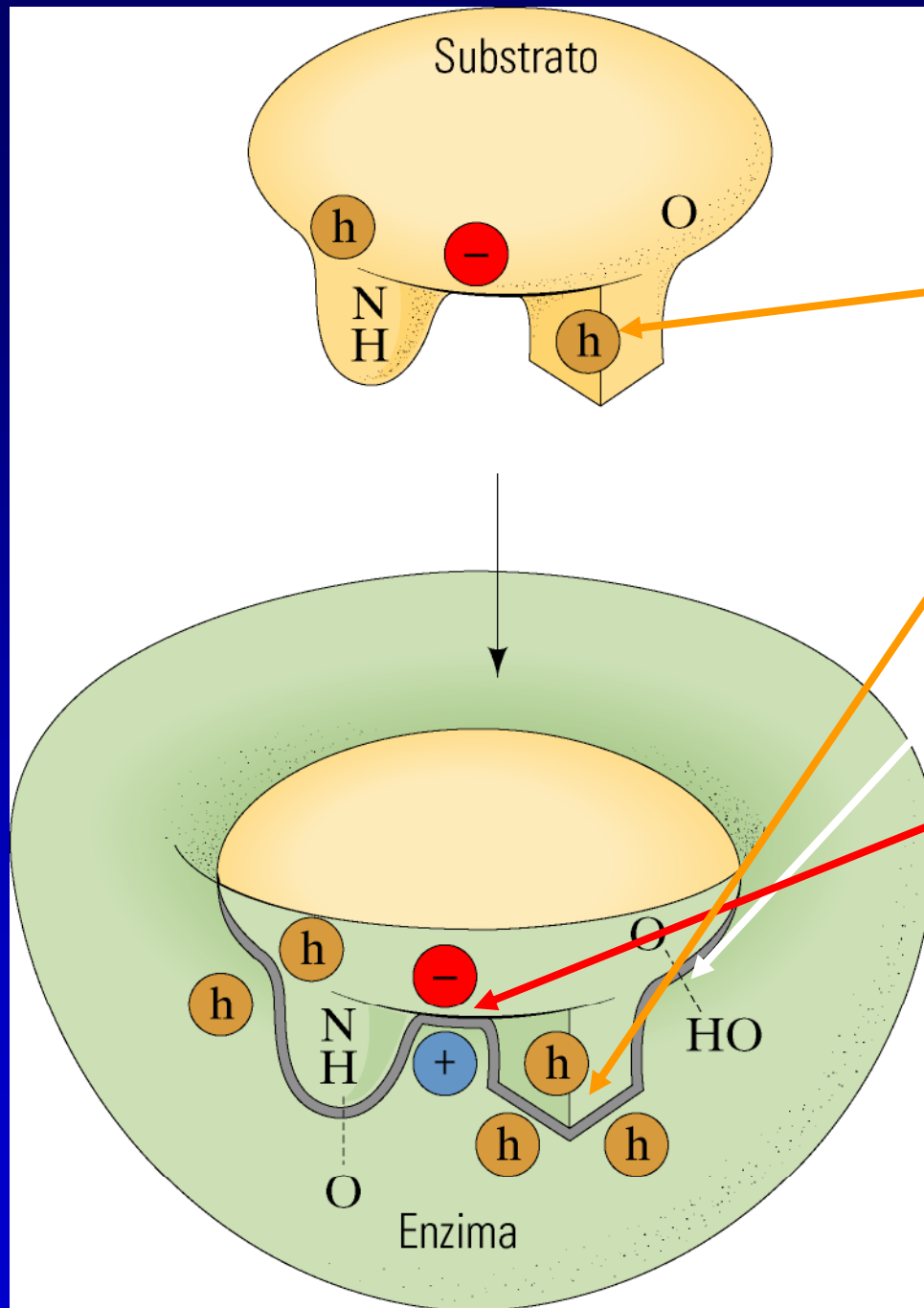
Affinità di legame tra enzima e substrato

h= residui idrofobici
(interazioni idrofobiche)

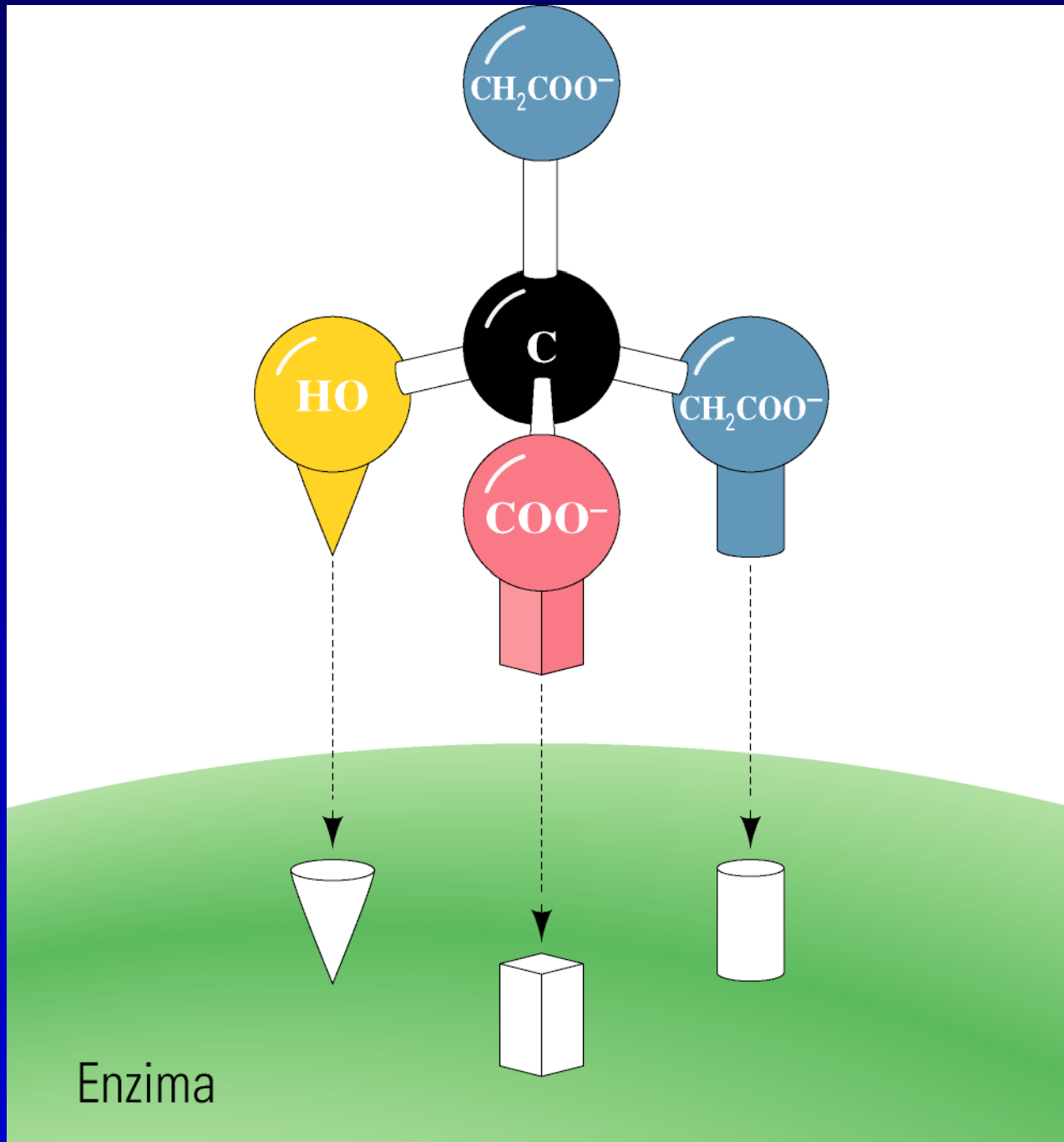
legami idrogeno

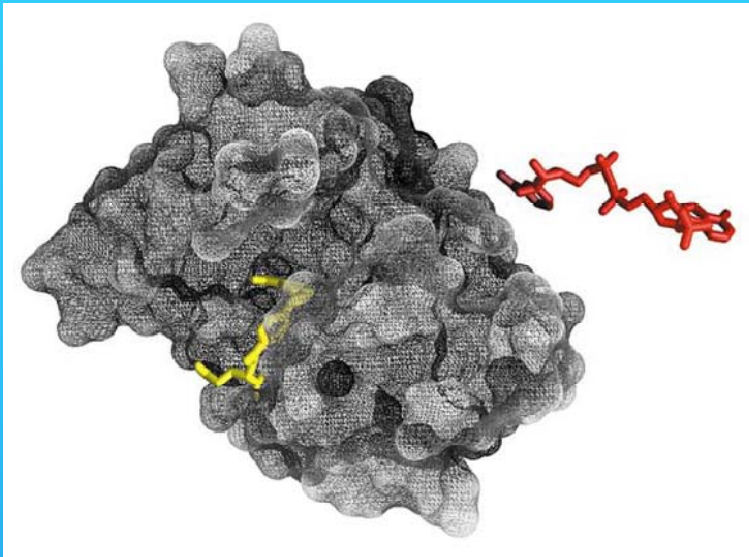
Interazioni
elettrostatiche
(ponti salini)

Forze non covalenti sono responsabili della complementarità geometrica e fisica tra enzima e substrato

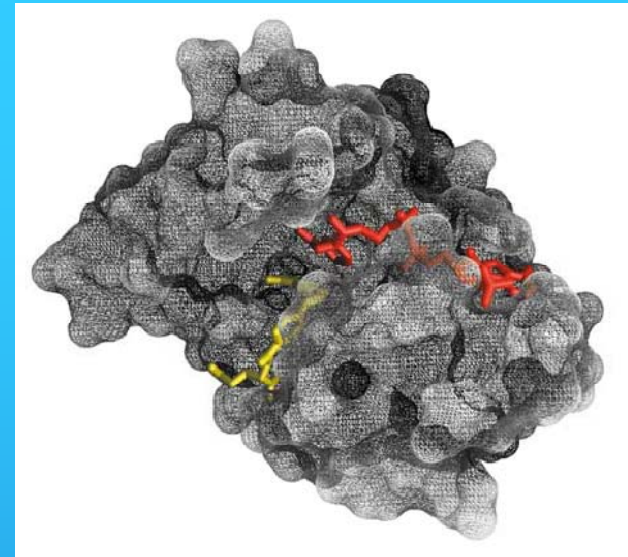


Stereospecificità

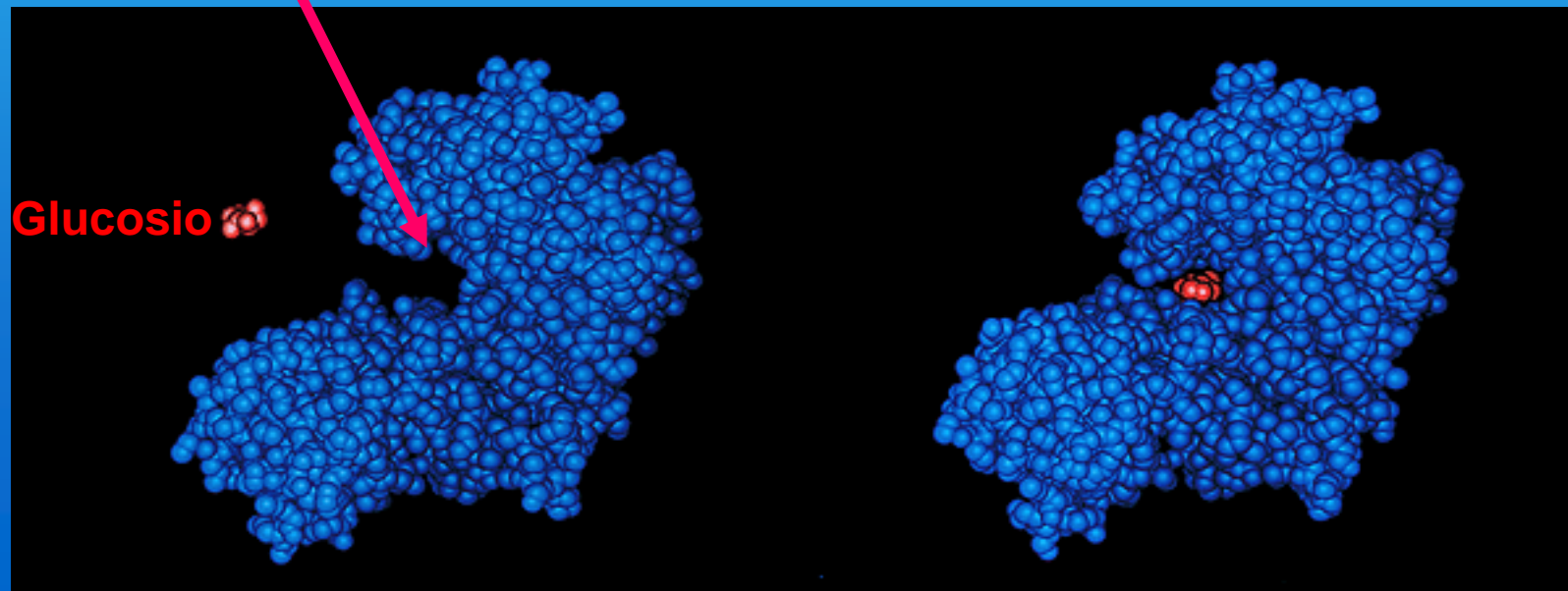




Orientamento
del substrato
e specificità

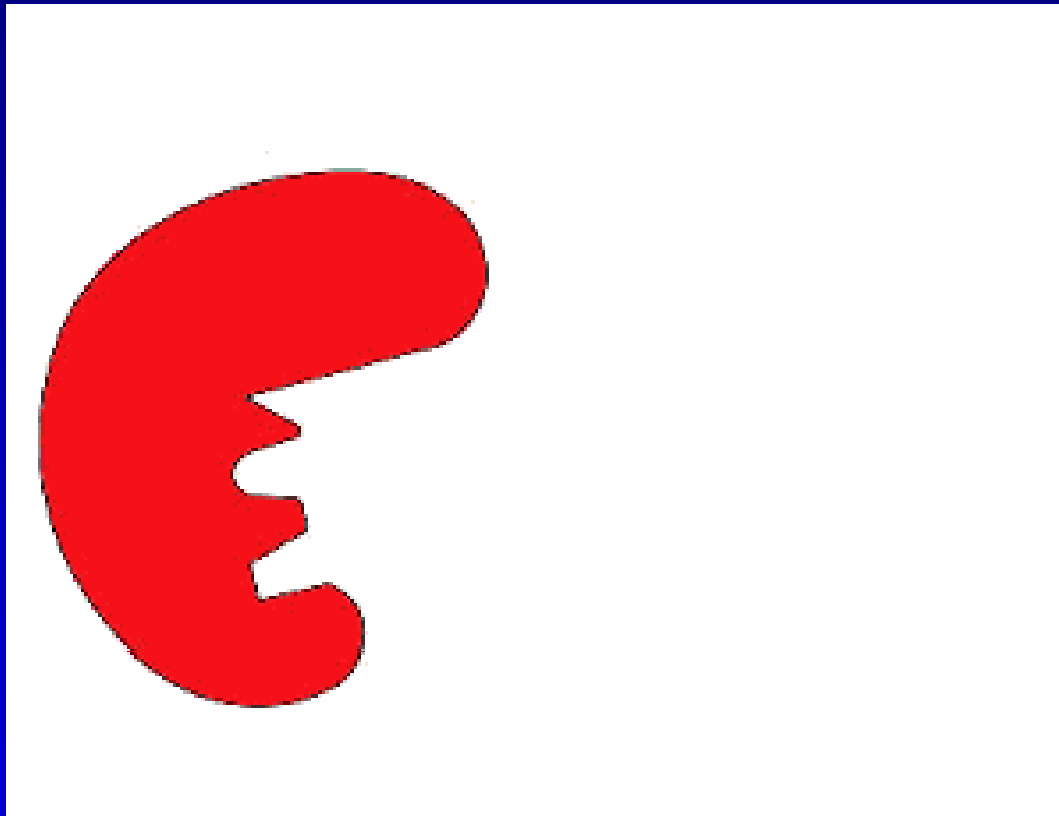


Il **sito attivo** rappresenta in genere meno del 5% della superficie di un enzima

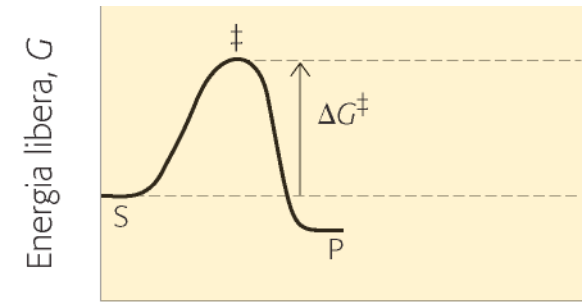


Glucosio

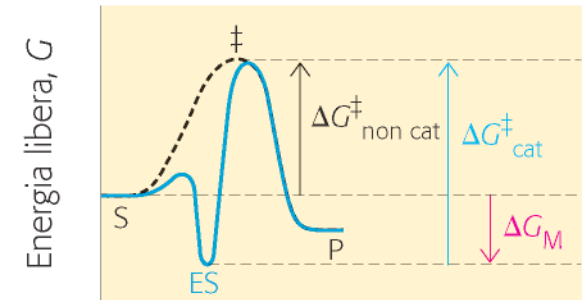
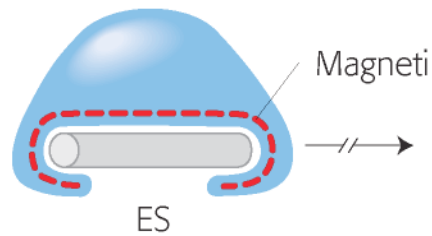
Interazione **substrato**-sito attivo



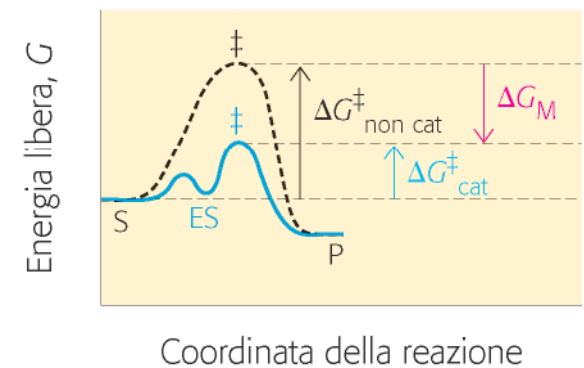
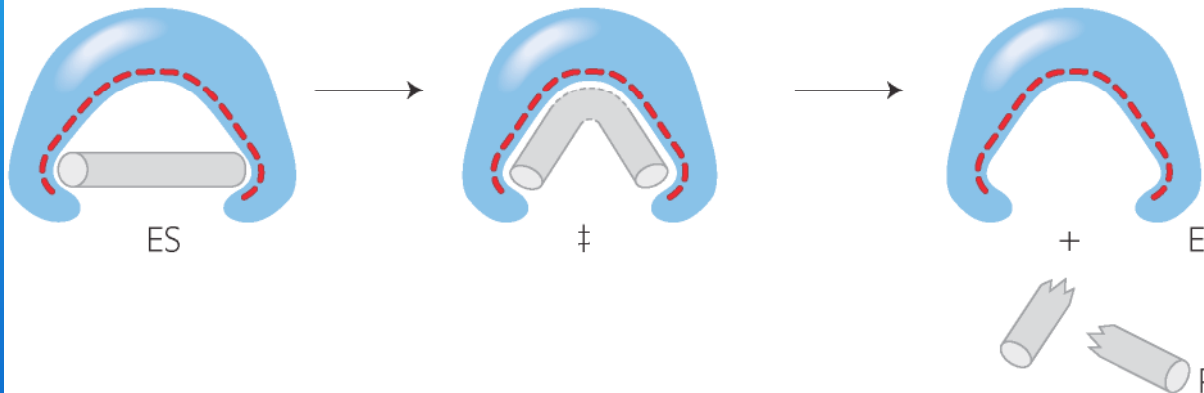
(a) Senza enzima



(b) Complementarità tra enzima e substrato



(c) Complementarità tra enzima e stato di transizione



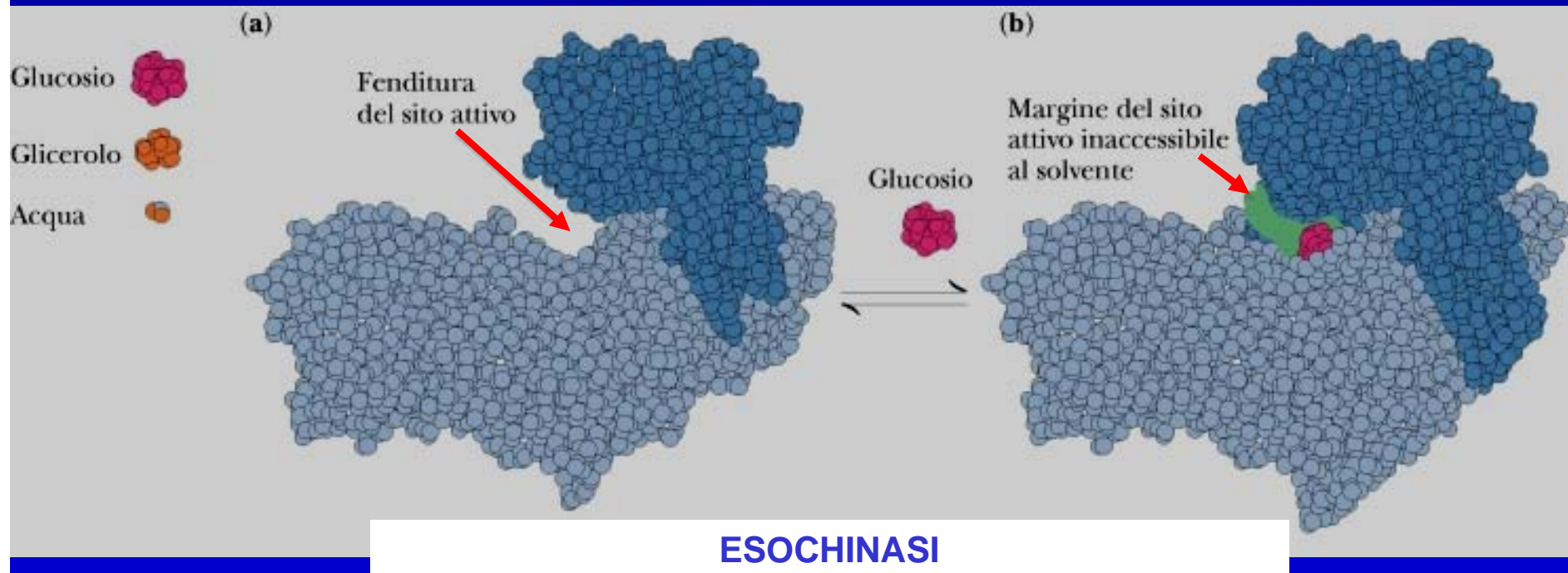
L'enzima è complementare allo stato di transizione

La **specificità** di un enzima e la sua **capacità catalitica** dipendono dall'energia rilasciata in seguito alla formazione di legami ed interazioni deboli con il substrato

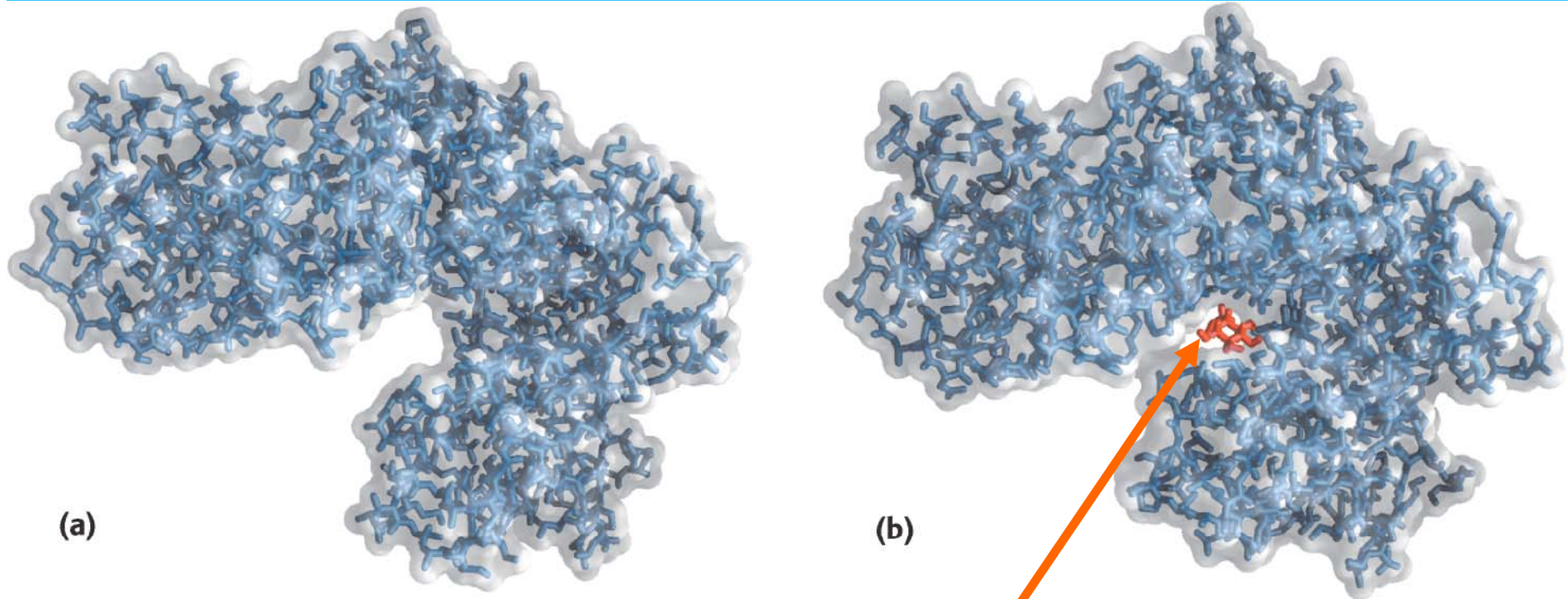
Le interazioni deboli tra enzima e substrato sono ottimali nello **stato di transizione**

L'enzima è **complementare** allo **stato di transizione**

L'enzima può subire un cambiamento conformazionale reversibile in seguito all'interazione con il substrato:

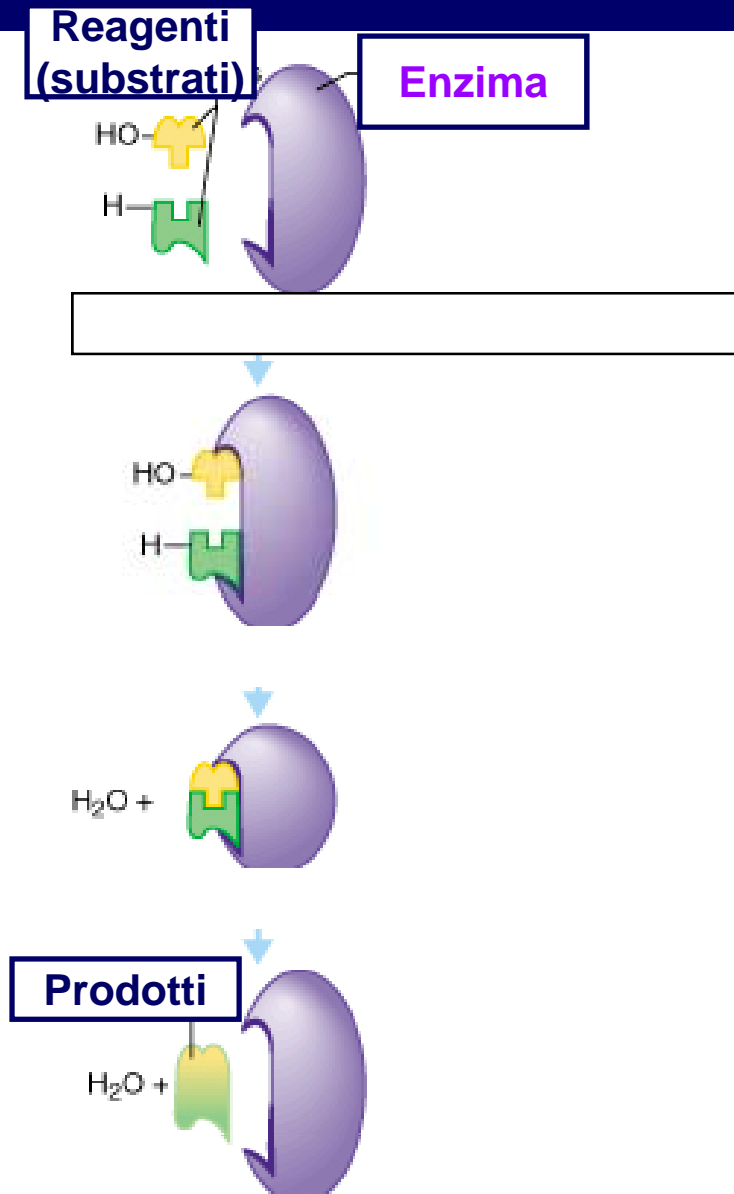


Esochinasi e adattamento indotto

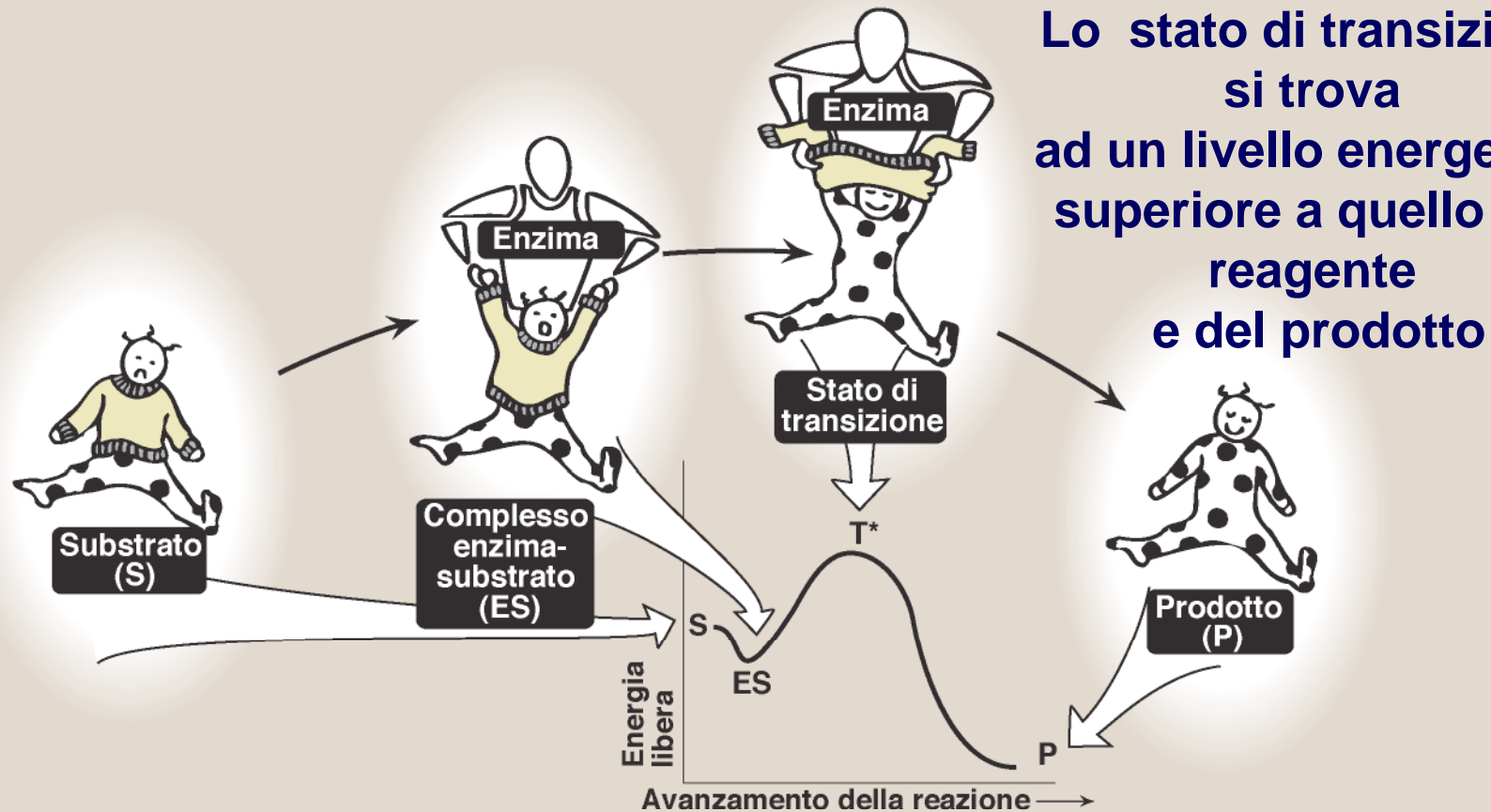


Il legame del substrato (**glucosio**) induce una modificazione conformazionale reversibile dell'enzima esochinasi

EVENTI AL SITO ATTIVO DI UN ENZIMA



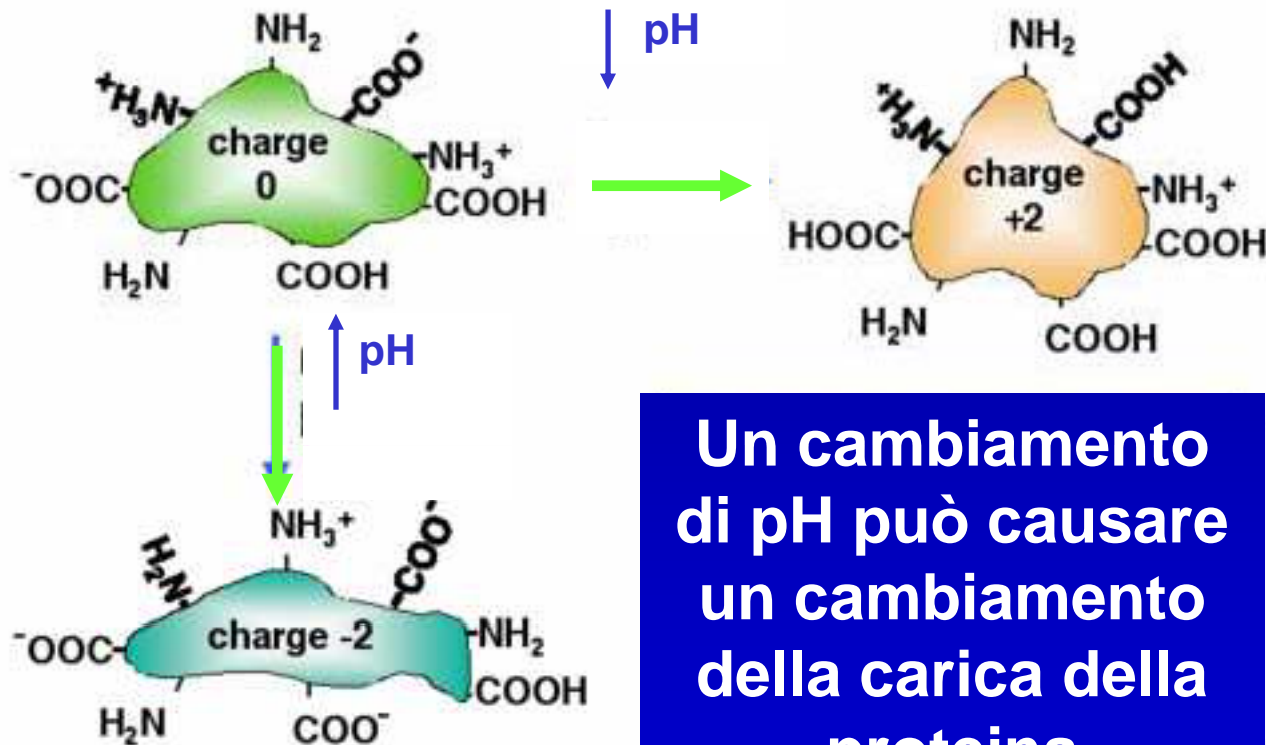
Come fa un enzima ad abbassare l'energia di attivazione?



L'enzima abbassa l'energia libera dello stato di transizione

L'ATTIVITÀ ENZIMATICA DIPENDE DAL MANTENIMENTO DELLA **CONFORMAZIONE NATIVA**

Effetto del pH



Un cambiamento di pH può causare un cambiamento della carica della proteina

**L'attività enzimatica può
essere modificata da**

pH

Temperatura

Concentrazione del substrato

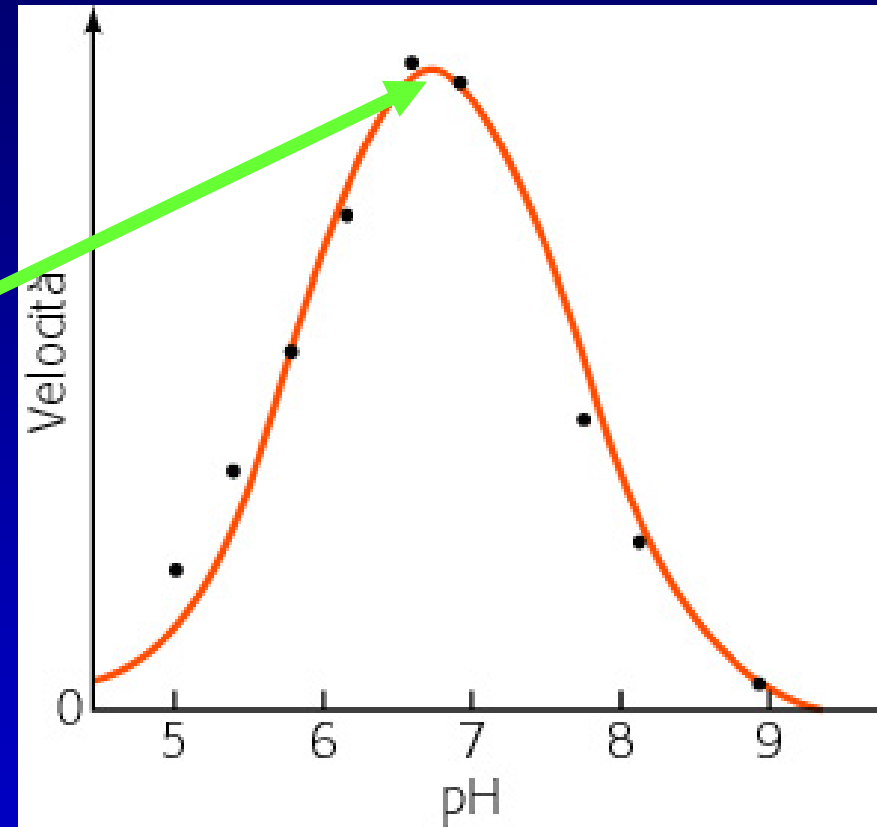
Modificazioni covalenti (es. fosforilazione)

L'ATTIVITÀ ENZIMATICA HA UN **pH OTTIMALE**

- Ogni enzima è attivo in un ristretto ambito di pH.

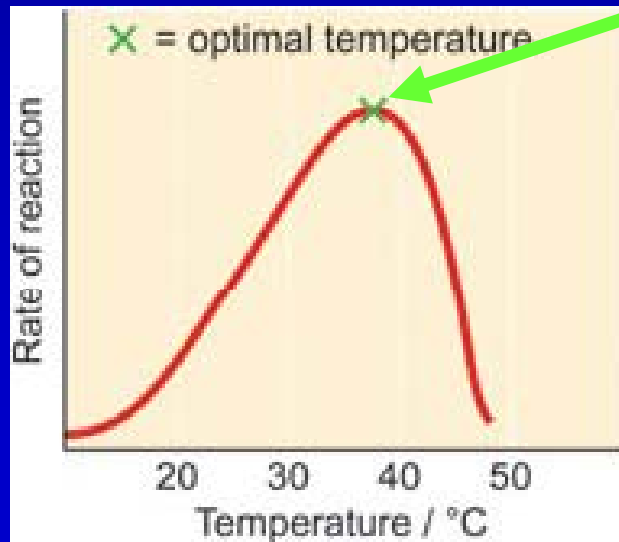
- Il **pH ottimale** è quello al quale corrisponde la massima attività enzimatica.

- Cambiamenti di pH possono alterare i legami intra- e intermolecolari di un enzima cambiandone la conformazione nativa e quindi inducendo una riduzione dell'efficienza catalitica



L'ATTIVITÀ ENZIMATICA HA UNA **TEMPERATURA OTTIMALE**

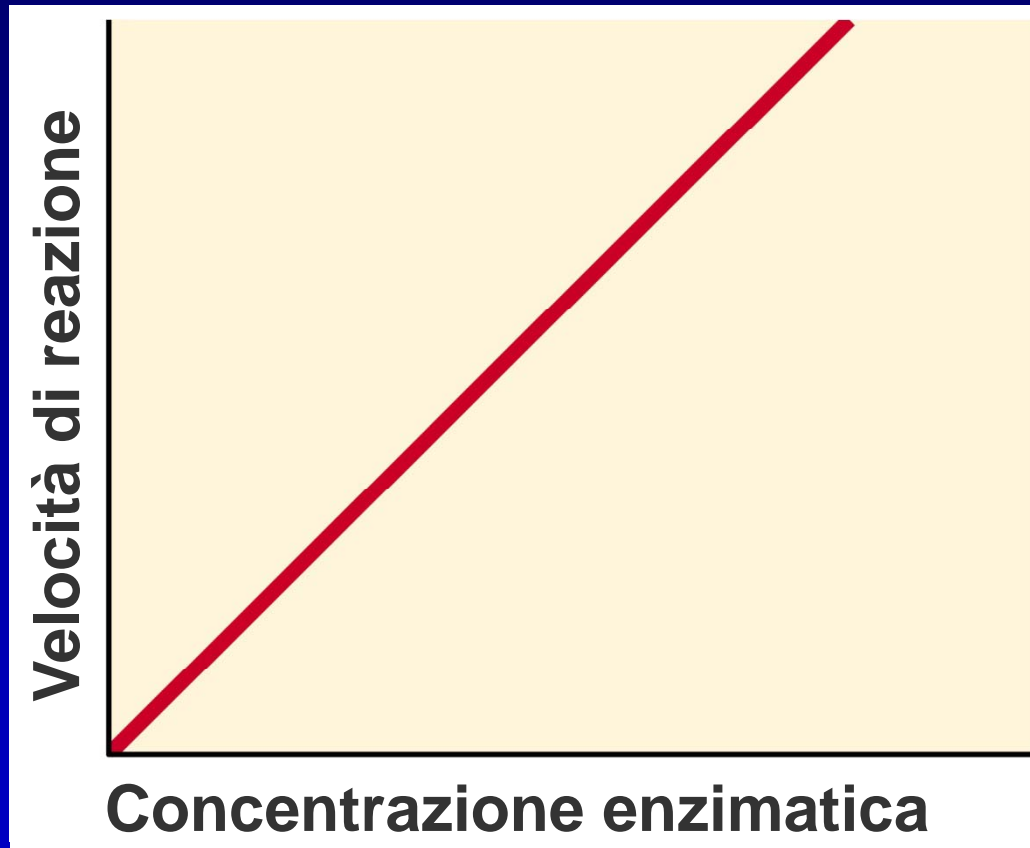
- All'aumentare della temperatura aumenta l'energia cinetica delle molecole e quindi aumenta la possibilità degli urti
- Un aumento di 10°C fa raddoppiare la velocità di una reazione



• La **temperatura ottimale** è quella alla quale corrisponde la massima attività catalitica (circa 37°C per gli enzimi presenti nelle cellule umane).

Al di sopra della temperatura ottimale l'enzima inizia a denaturare ovvero a perdere la sua conformazione nativa.

La velocità di una reazione catalizzata da un enzima dipende dalla **concentrazione dell'enzima**



A pH e temperatura costanti la velocità è proporzionale alla concentrazione dell'enzima

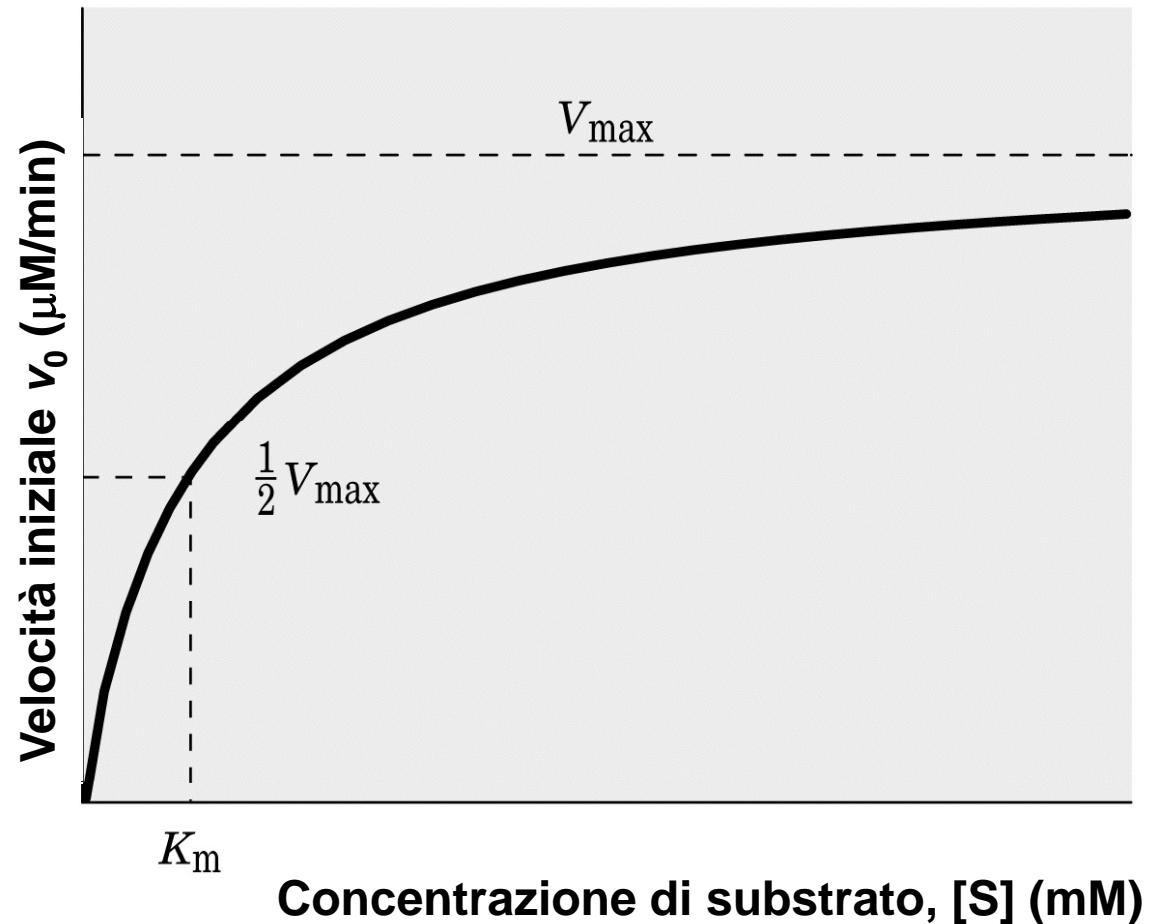
COME SI ESPRIME L'ATTIVITÀ ENZIMATICA?

1 unità enzimatica (U) : quantità di enzima che trasforma 1 micromole di substrato al minuto in condizioni definite di pH e temperatura.

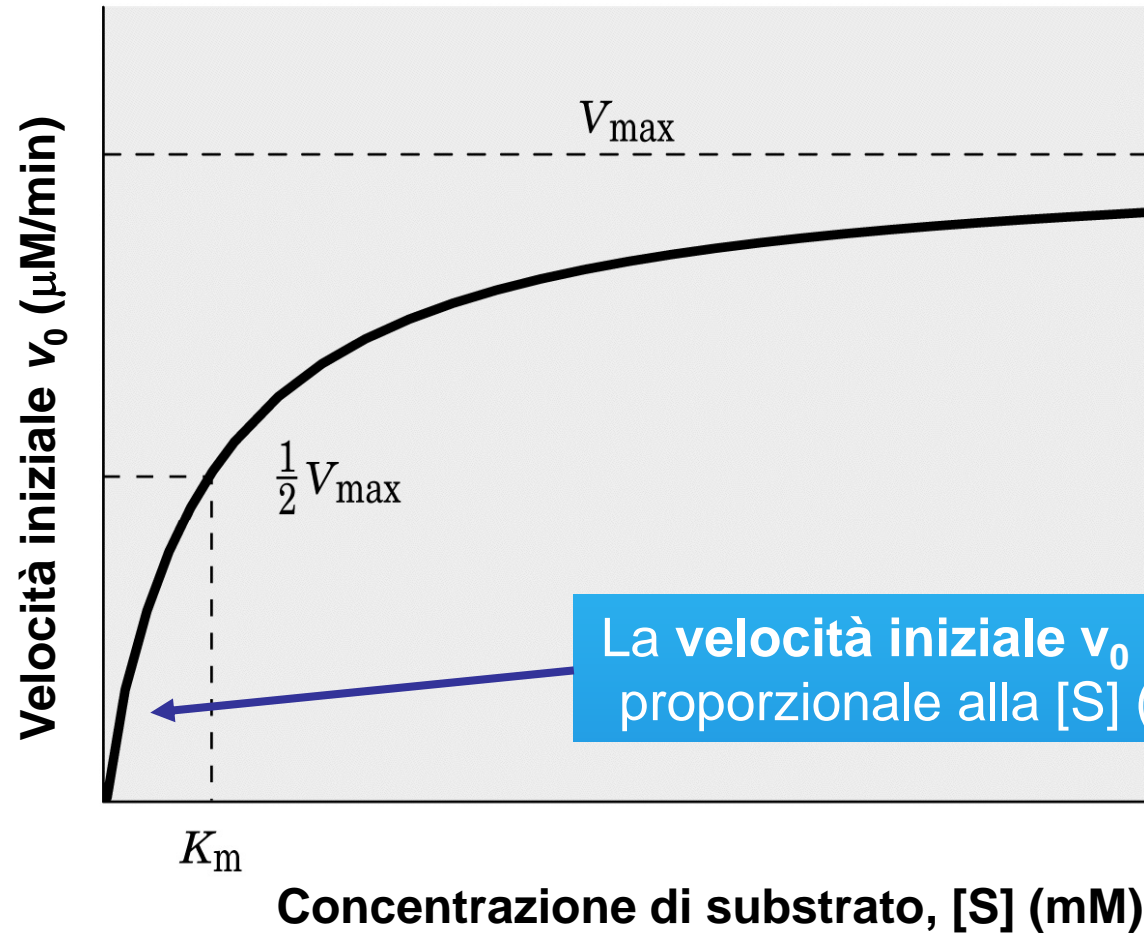
PROPRIETÀ CINETICHE DEGLI ENZIMI

- v_0 = velocità iniziale
numero di moli di prodotto che si formano, o di substrato che si consumano, nell'unità di tempo

- V_{\max} = velocità massima, tutti i siti catalitici sono occupati

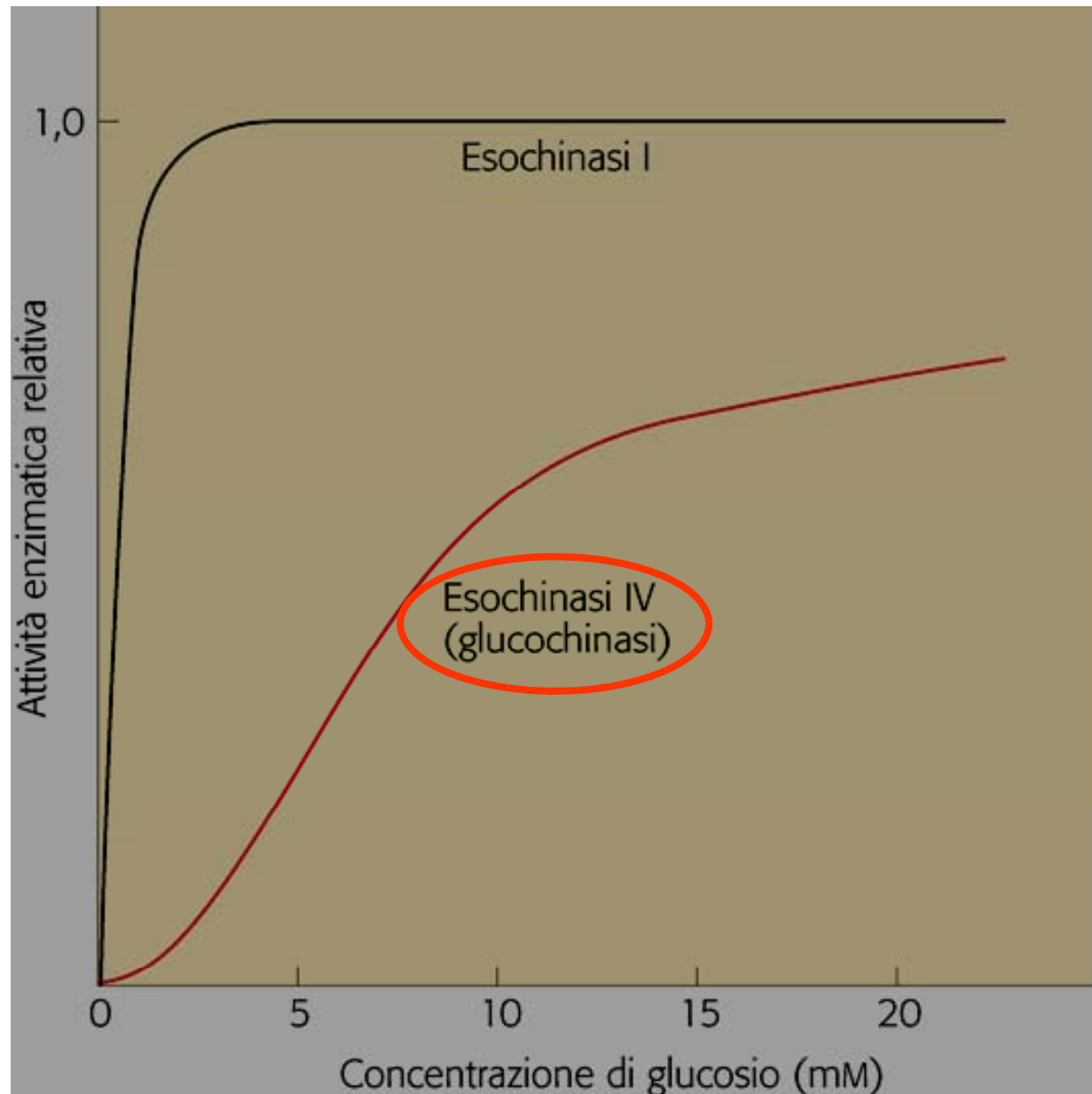


- K_m = costante di Michaelis-Menten, esprime la concentrazione di substrato alla quale corrisponde una velocità di reazione pari alla metà della velocità massima

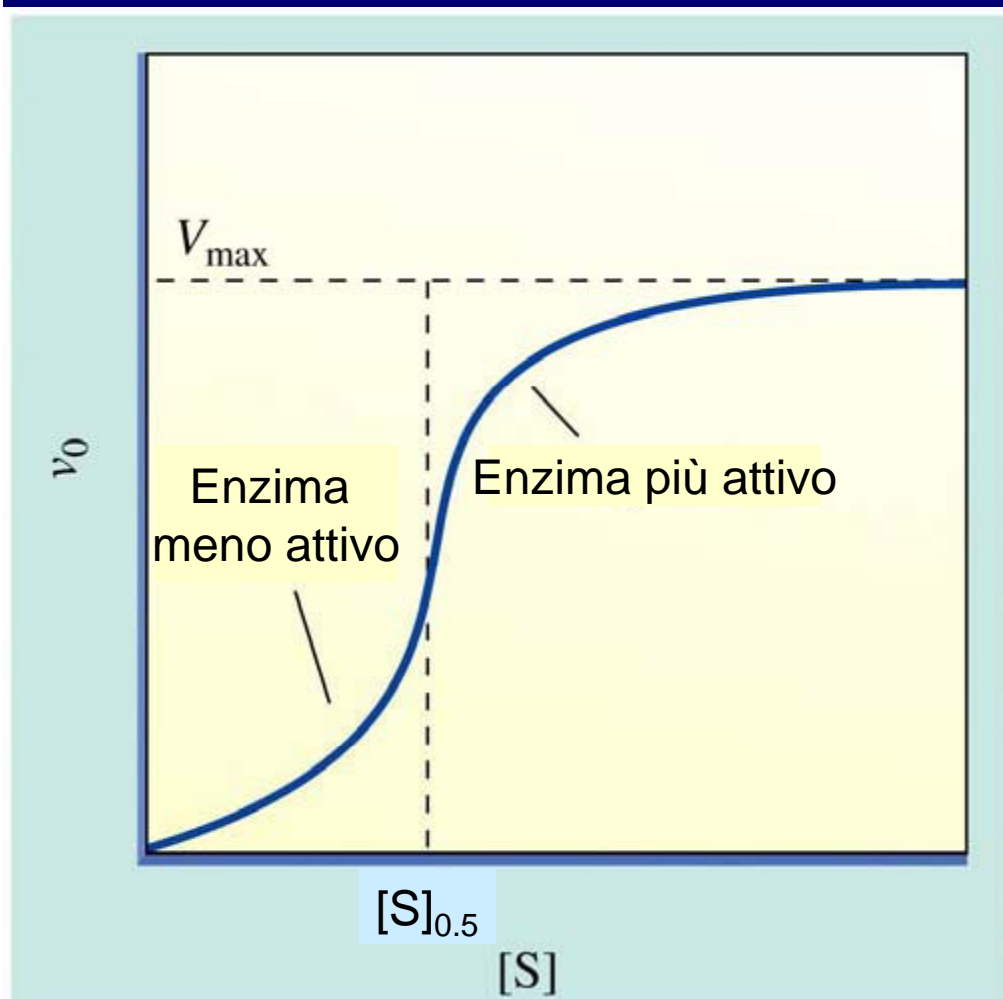


Ad una concentrazione fissa di enzima, la velocità è proporzionale a $[S]$, quando $[S]$ è bassa. Ad elevate $[S]$ invece la velocità è indipendente da $[S]$

La glucochinasi epatica è caratterizzata da un'elevata K_m per il glucosio e quindi può fosforilare il glucosio quando la sua concentrazione è elevata



Gli **ENZIMI ALLOSTERICI** non seguono la cinetica di Michaelis-Menten



Il grafico della velocità in funzione della $[S]$ ha un andamento sigmoidale

Presentano “altre” conformazioni

Hanno più siti di legame

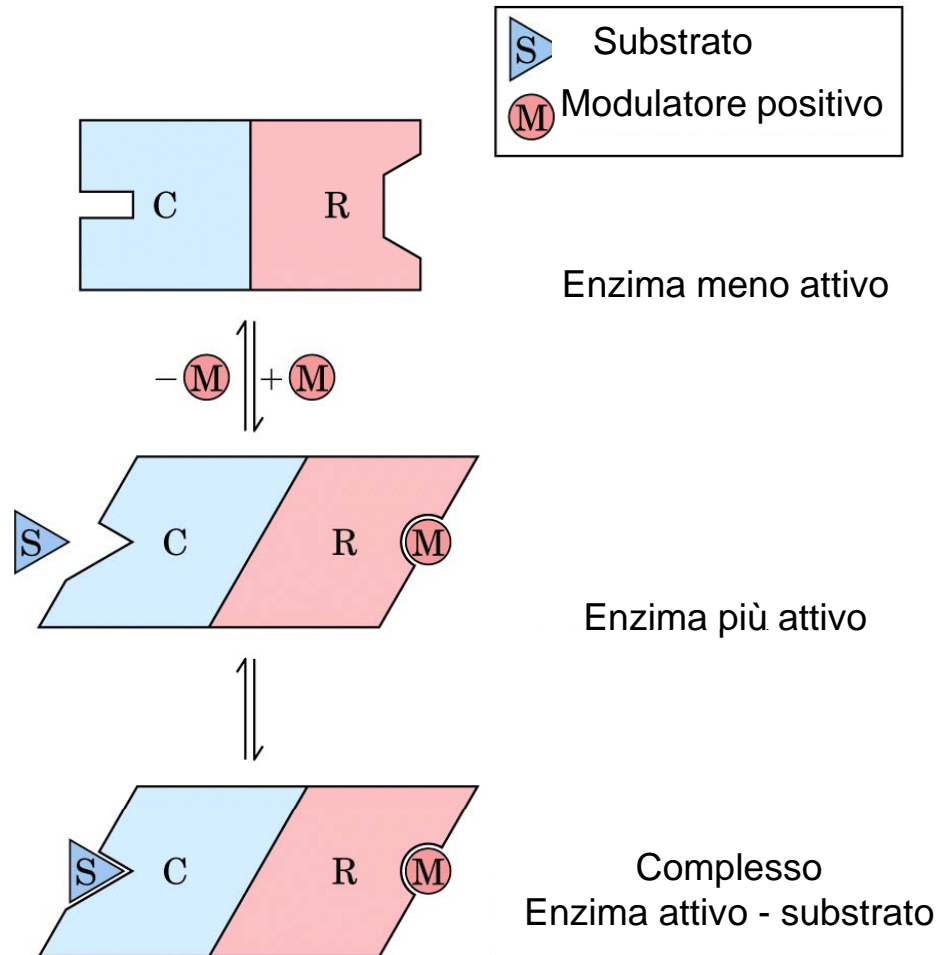
Spesso sono multimerici, formati da più subunità ciascuna contenente un sito attivo

Presentano altre conformazioni indotte dal legame con modulatori o effettori

L'attività enzimatica può risultare esaltata o inibita in seguito al legame con un modulatore

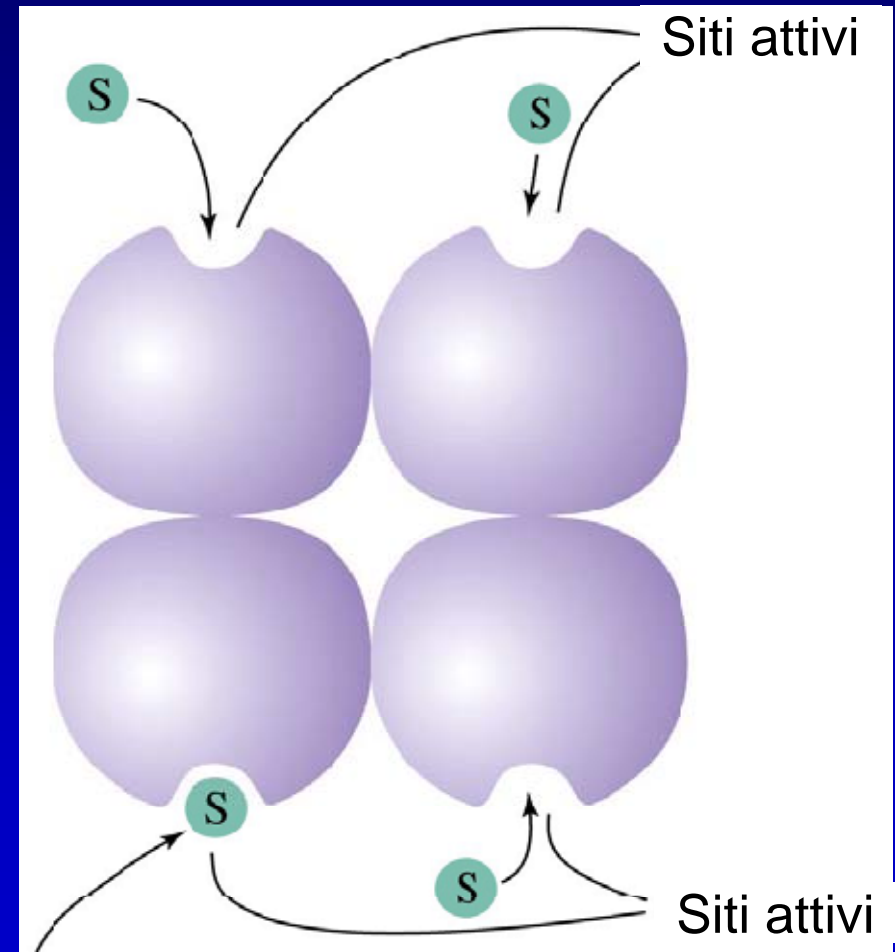
EFFETTORI ALLOSTERICI

EFFETTORI ETEROTROPICI

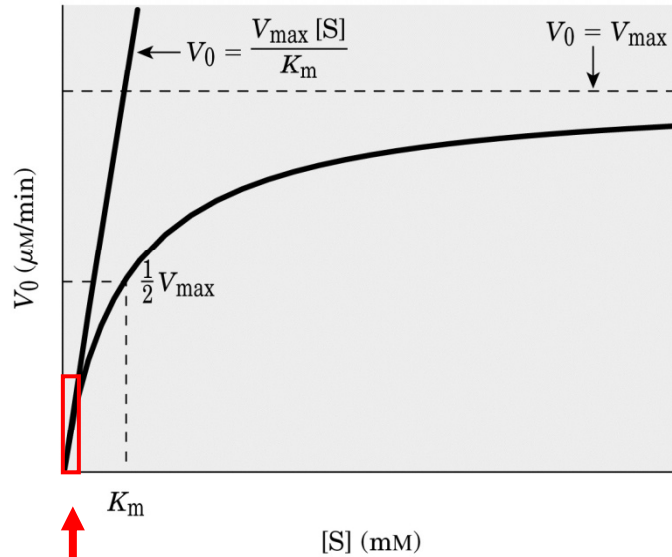
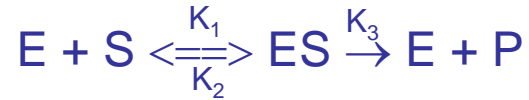


Il legame con il modulatore induce un cambiamento conformazionale

EFFETTORI OMOTROPICI

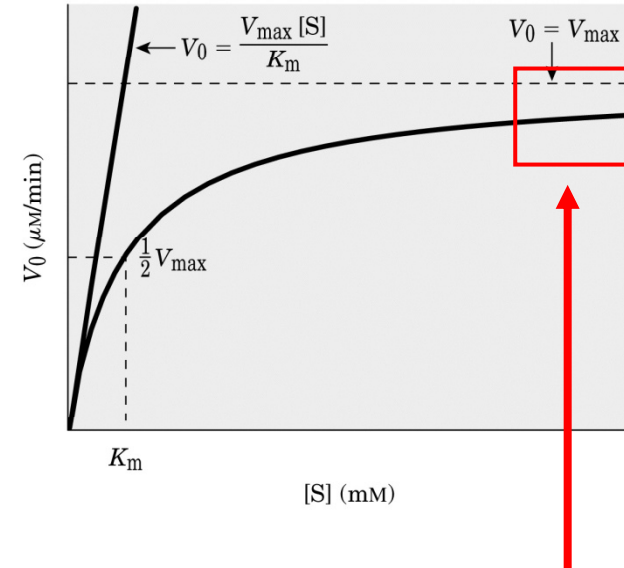


Il legame della prima molecola di substrato favorisce il legame della seconda, ecc....



Cinetica di primo ordine
 Se $[S]$ è più piccola della K_m
 $v = (V_{\text{max}}/K_m)[S]$

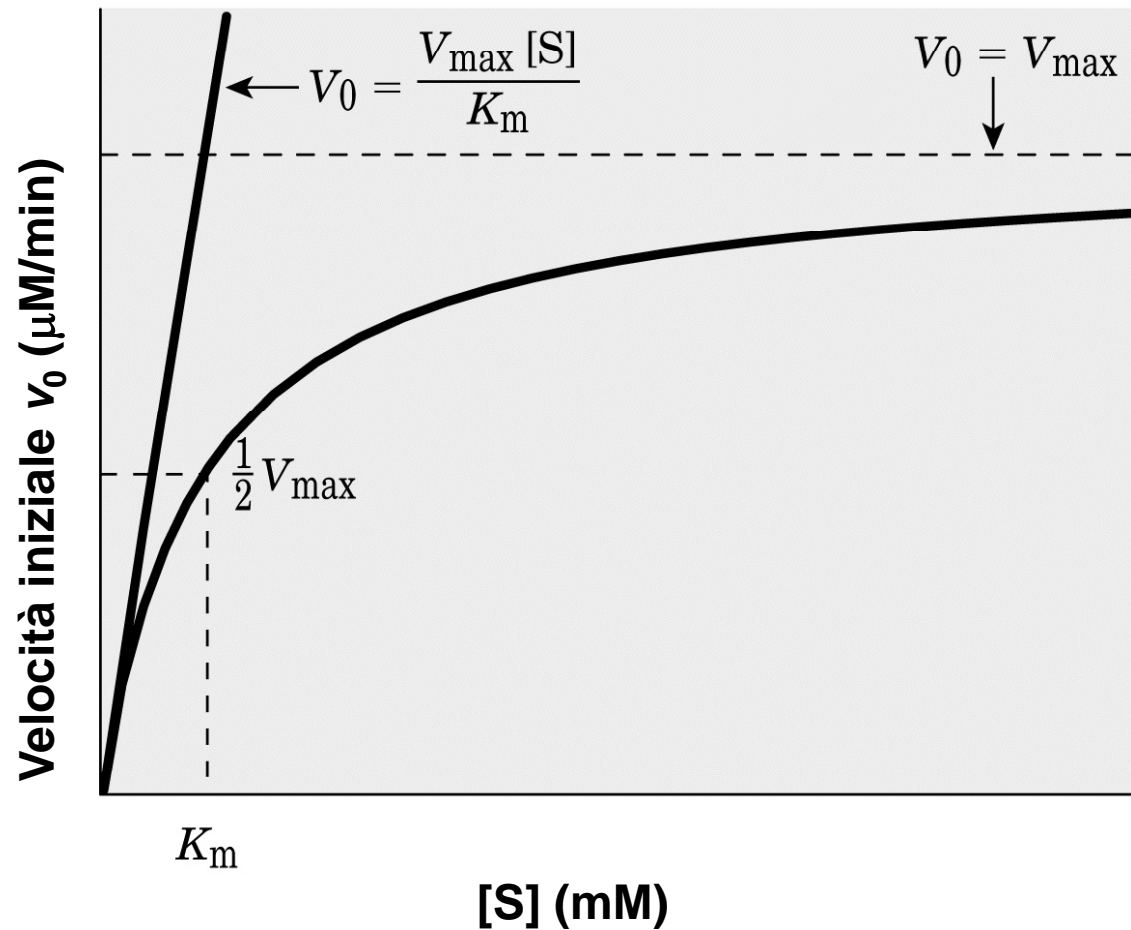
La **velocità iniziale** è direttamente proporzionale alla $[S]$ (tratto lineare)



Cinetica di ordine zero
 $[S] \gg K_m$
 $V_{\text{max}} = k_3 [E]$

la $[S] \gg K_m$ (circa 50 volte la K_m)
 E è saturo di S, la velocità corrisponde quindi alla V_{max} ed è proporzionale alla $[E]$.

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN



rappresentazione grafica: iperbole

$$v_0 = V_{\text{MAX}} \frac{[\text{S}]}{[\text{S}] + K_M}$$

**COME SI MISURANO K_m E V_{max} DI
UNA REAZIONE ENZIMATICA?**

Per determinare K_M e V_{max} si mantiene fissa la concentrazione di enzima e si misura la velocità di reazione v_0 in presenza di concentrazioni crescenti di substrato

La velocità di reazione v_0 può essere espressa come

numero di moli di substrato che si consumano nell'unità di tempo ($\mu\text{mol/L/min}$ o $\mu\text{M/min}$)

oppure

numero di moli di prodotto che si formano nell'unità di tempo ($\mu\text{mol/L/min}$ o $\mu\text{M/min}$)

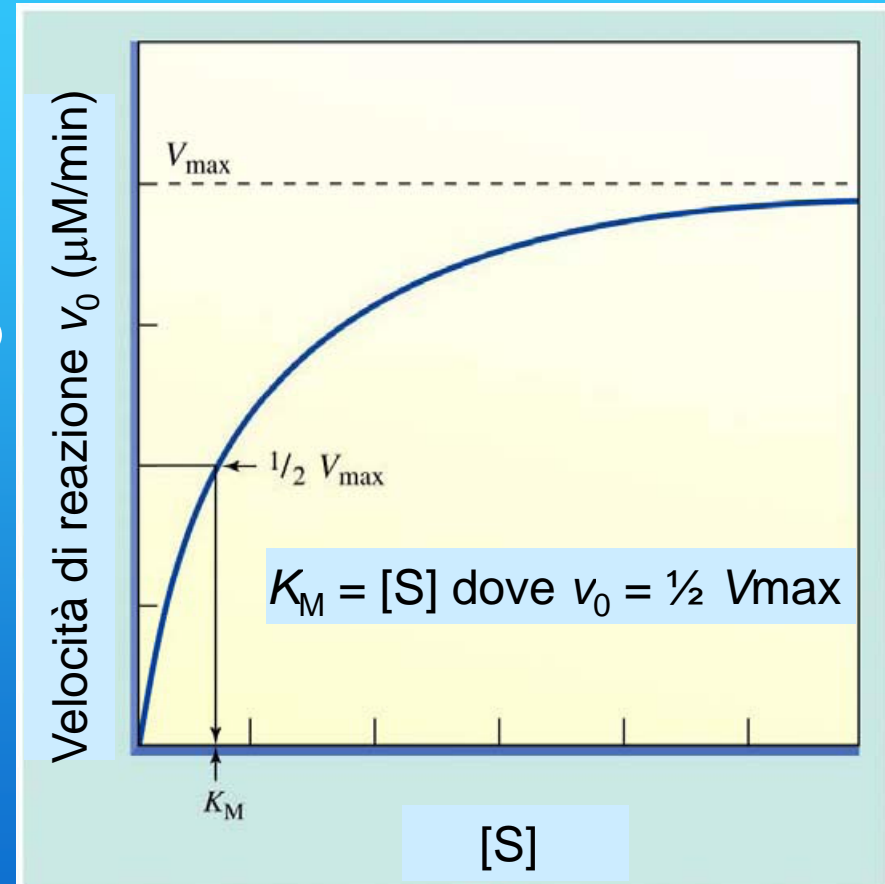


Figure 5-4 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

L'equazione di Michaelis-Menten può essere trasformata algebricamente per analizzare più semplicemente i dati sperimentali

EQUAZIONE DI LINEWEAVER E BURK

rappresentazione grafica:
retta che non passa per l'origine

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

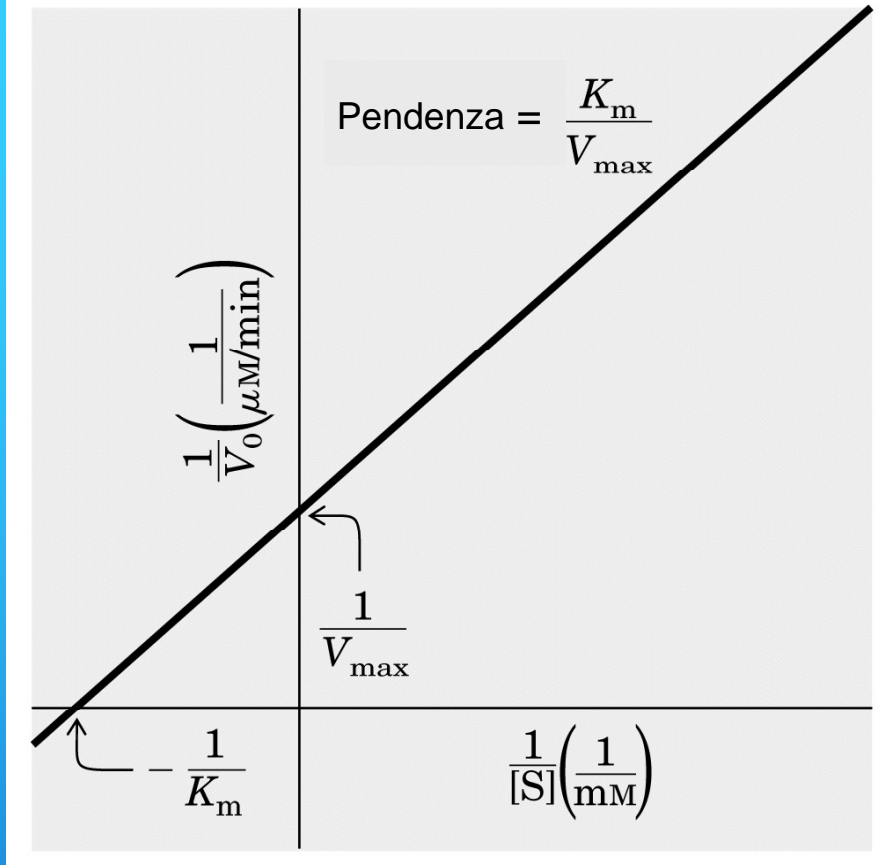
corrispondente
all'equazione di una retta

$$y = ax + b$$

dove

a rappresenta il coefficiente angolare (pendenza = K_m/V_{\max})

b rappresenta l'intercetta sull'asse delle ordinate ($1/V_{\max}$)



L'ATTIVITÀ ENZIMATICA PUÒ ESSERE INIBITA

Inibizione reversibile: legami deboli tra inibitore ed enzima

TIPI DI INIBIZIONE

1) Inibizione competitiva

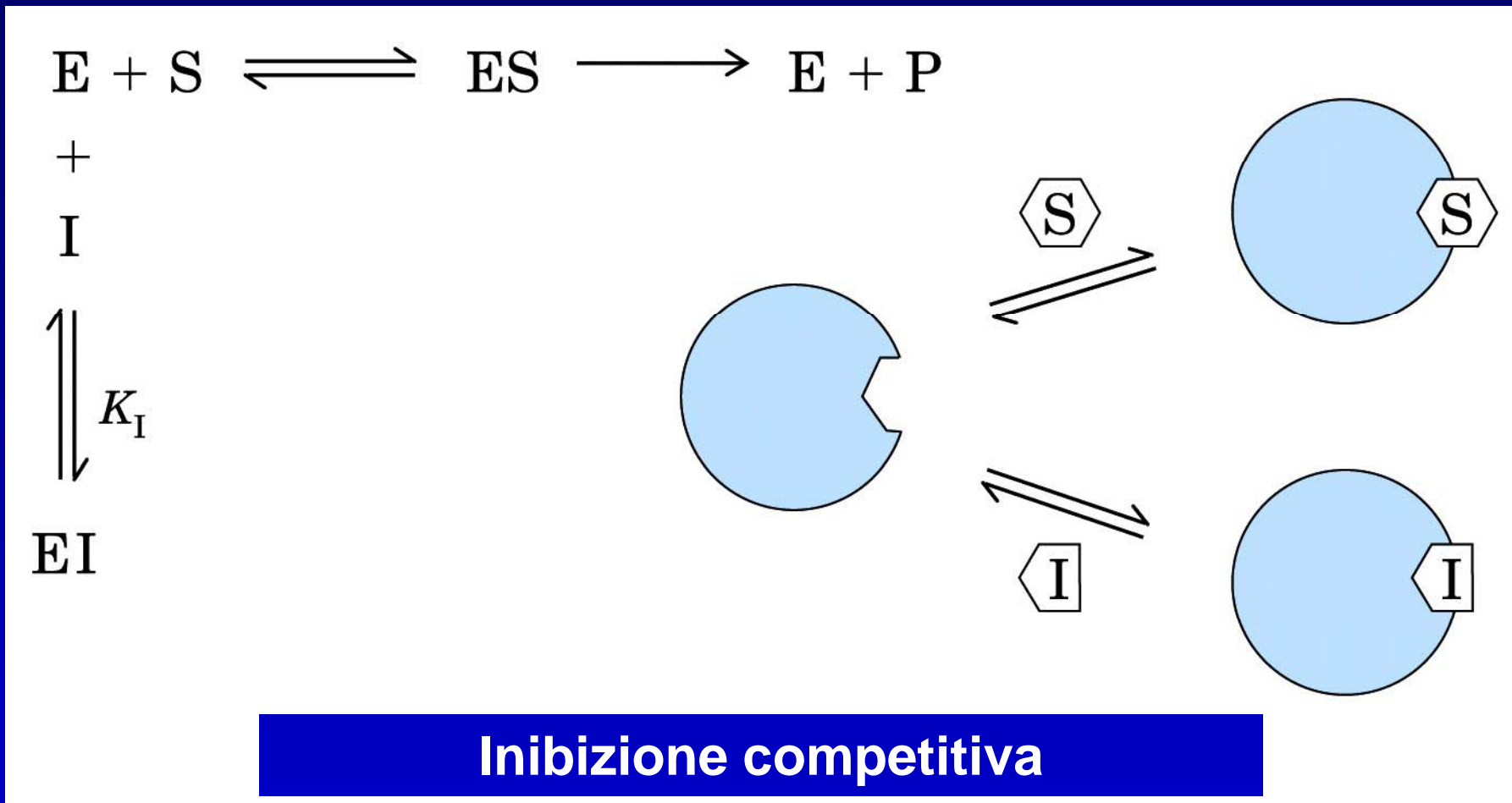
l'inibitore ha una struttura simile al substrato e compete con il substrato per il sito attivo

2) Inibizione non competitiva

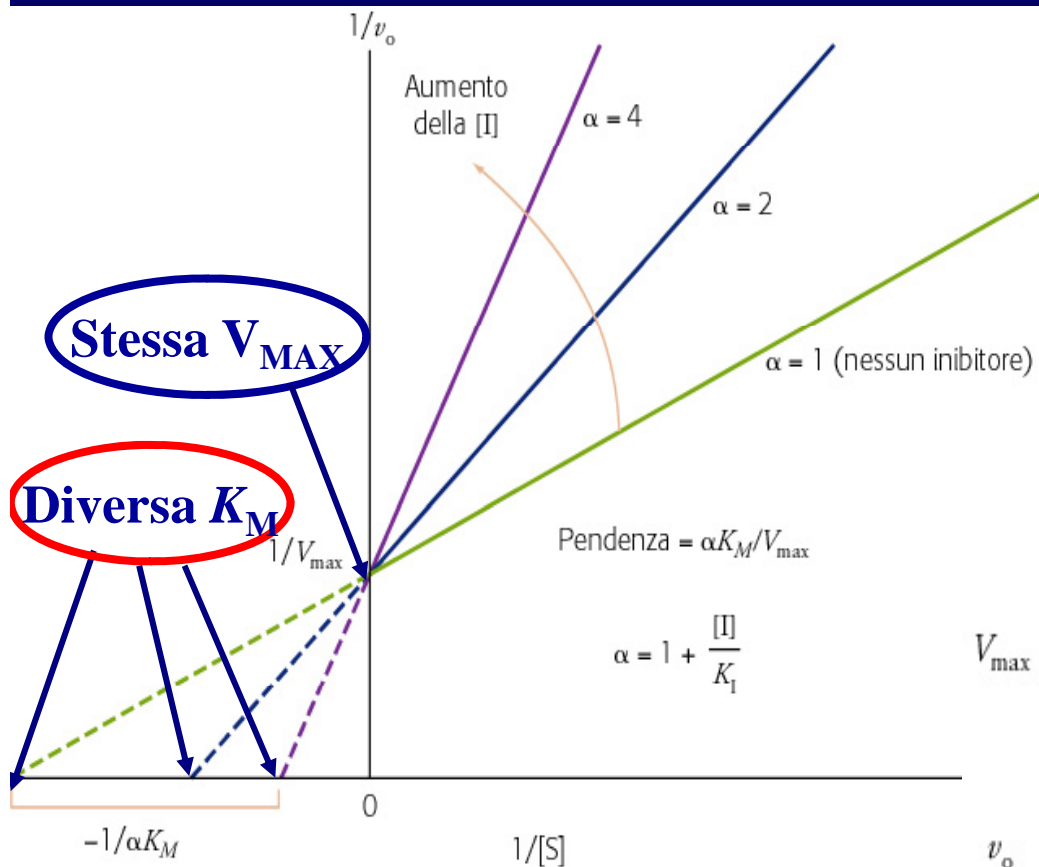
l'inibitore si lega a un sito diverso dal sito attivo

Molti farmaci agiscono come inibitori enzimatici

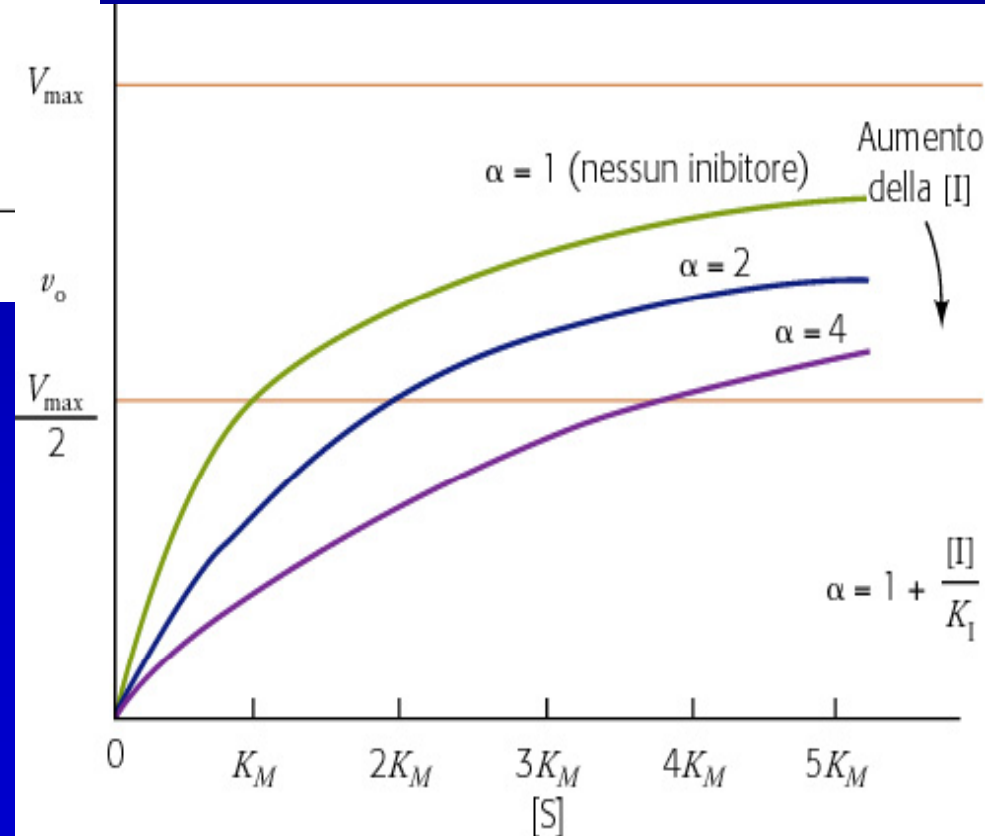
1) INIBIZIONE COMPETITIVA



Gli **inibitori competitivi** (I) si legano al sito attivo degli enzimi.
Un inibitore competitivo diminuisce la velocità di catalisi riducendo il numero di molecole enzimatiche disponibili per il substrato



Un **inibitore competitivo** diminuisce l'efficienza catalitica riducendo il numero di molecole enzimatiche disponibili per il substrato



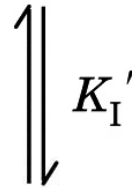
In presenza di un **inibitore competitivo** la K_M aumenta

2) INIBIZIONE NON COMPETITIVA

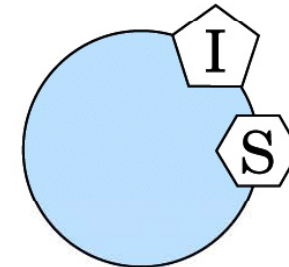
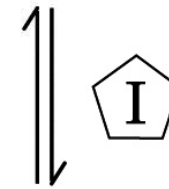
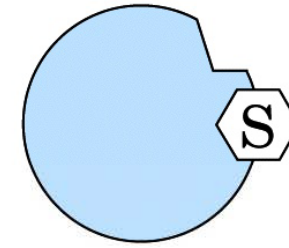
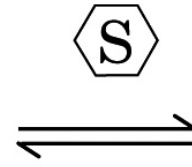
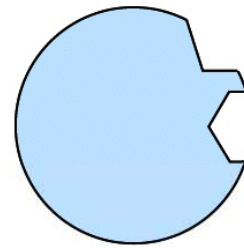


+

I



ESI

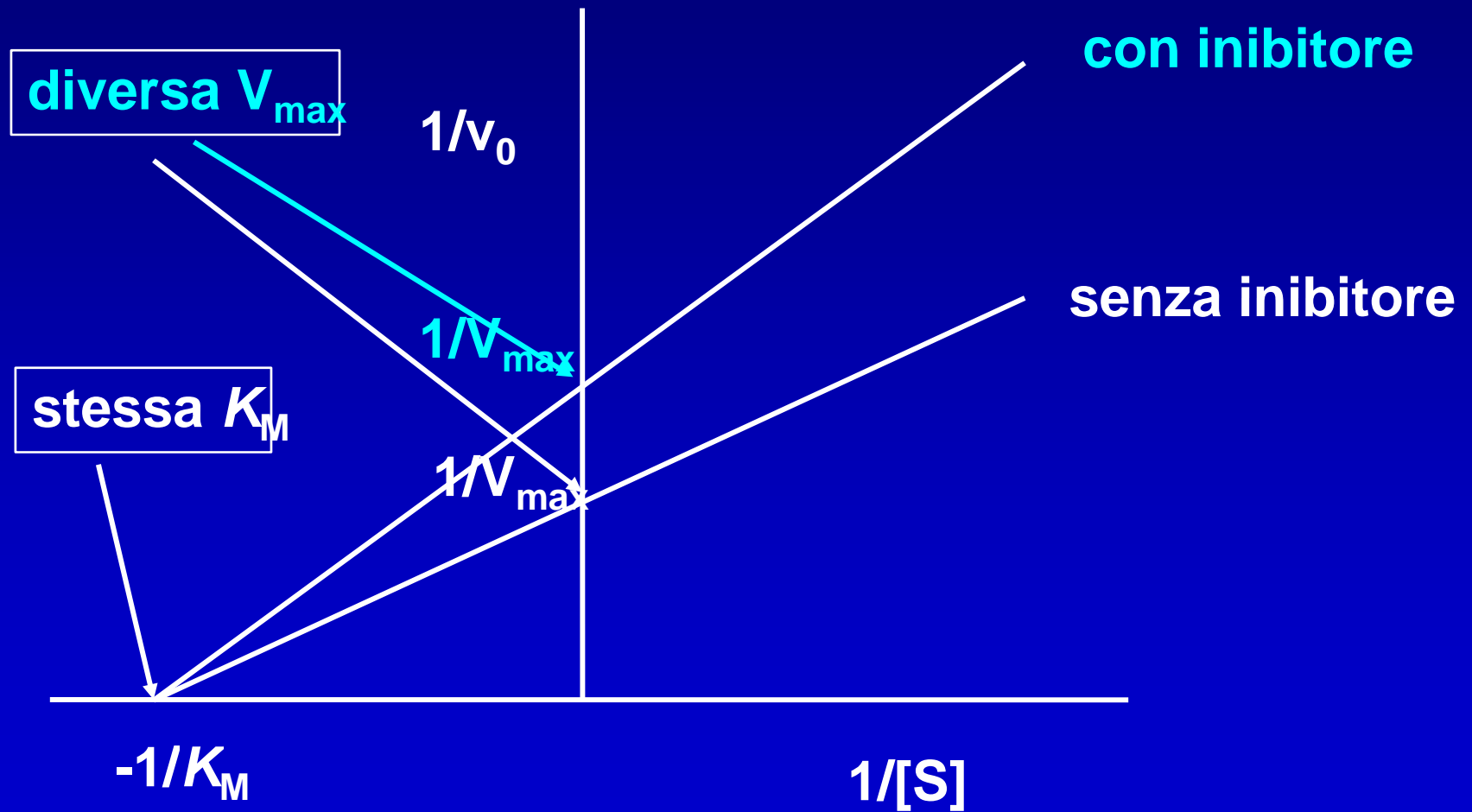


Inibizione incompetitiva

Gli inibitori non competitivi (I) si legano a siti diversi dal sito attivo degli enzimi

INIBIZIONE NON COMPETITIVA

In presenza di un **inibitore non competitivo** la V_{\max} diminuisce, la K_M rimane invariata



Classificazione degli enzimi

1. Ossidoreduttasi

deidrogenasi, ossidasi, ossigenasi, transelettronasi

2. Transferasi

amino-T, metil-T, fosfo-T, glicosil-T, ecc.

3. Idrolasi

peptidasi, glicosidasi, esterasi, lipasi, fosfatasi

4. Liasi

decarbossilasi, fumarasi, enolasi

5. Isomerasi

fosfoesoso-I, fosfotrioso-I, ecc.

6. Ligasi

sintetasi, sintasi, carbossilasi



Classificazione degli enzimi

Ad ogni enzima è assegnato un numero a 4 cifre che identifica la sottoclasse ed il tipo di reazione catalizzata



Reazione catalizzata dalla ATP glucosio fosfotransferasi

Enzyme Commission number 2.7.1.1.

(2): transferasi (classe)

(7): fosfotransferasi (sottoclasse)

(1): gruppo –OH come accettore

(1): il D-glucosio come accettore del gruppo fosforico

REAZIONI CATALIZZATE DAGLI ENZIMI

OSSIDOREDUOTTASI

Trasferimento di elettroni

TRANSFERASI

Trasferimento di gruppi funzionali

IDROLASI

Trasferimento di gruppi funzionali all'acqua

LIASI

Addizione di gruppi funzionali a doppi legami o formazione di doppi legami mediante rimozione di gruppi

ISOMERASI

Trasferimento di gruppi all'interno di molecole per formare isomeri

LIGASI

Formazione di legami C-C, C-S, C-O e C-N mediante reazioni di condensazione

ISOENZIMI

**Enzimi che presentano forme molecolari diverse
che catalizzano la stessa reazione**

**Esempio: gli isoenzimi della lattico deidrogenasi,
indicatori diagnostici di lesioni di organo**

