

# ENZIMI: cosa sono ?

- sono PROTEINE (fanno eccezione i ribozimi a RNA)
- funzionano da **catalizzatori biologici** nelle reazioni cellulari aumentando la velocità=favoriscono una reazione.
- lavorano in condizioni blande di temperatura e pH

Durante la reazione l'enzima può essere temporaneamente modificato ma alla fine del processo ritorna nel suo stato originario, un enzima viene **«riciclato»** in modo da poter prendere parte alla stessa reazione numerose volte.

- **Specificità molto elevata**: quando un enzima funziona correttamente **non si formano mai prodotti secondari di reazione** (che potrebbero essere potenzialmente tossici per la cellula)

# proprietà degli Enzimi

- Velocità di reazione più elevate. ( $10^6$ - $10^{12}$  superiore rispetto alla velocità delle reazioni non catalizzata)
- Condizioni di reazione più blande rispetto alla catalisi chimica ( $T < 100^\circ\text{C}$ ; pH neutro, pressione atmosferica).
- Maggiore specificità di reazione: creano un ambiente specifico in cui una data reazione è "*energeticamente favorita*" (non è vero lo stesso per i catalizzatori artificiali)
- Possibilità di regolazione. Le attività catalitiche variano in risposta alla concentrazione di sostanze  $\neq$  dal substrato

# Importanza della catalisi:

- **Esempio del saccarosio**



In presenza di ossigeno si converte in  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  in una reazione estremamente ESOERGONICA

- **Aumentano la velocità di una reazione**

## Decomposizione del perossido d'idrogeno



# Nomenclatura enzimi

Suffisso **-asi** al nome del substrato.

Nel 1961 la Commissione per gli Enzimi (**EC**) dell'Unione Internazionale di Biochimica propone un sistema di nomenclatura e classificazione basato sul tipo di reazione catalizzata e sul nome del substrato di ciascun enzima

gli enzimi sono suddivisi in 6 classi

-NOME SISTEMATICO (classificazione EC a quattro cifre)

-NOME COMUNE

6° Gruppo: LIGASI (SINTETASI)			
Sottogruppo	Sotto-sottogruppo	Sottogruppo	Sotto-sottogruppo
6.1 Ligasi che formano legami C—O	6.1.1 Ligasi che formano gli aminoacil-tRNA e composti affini	6.3 Ligasi che formano legami C—N	6.3.1 Ligasi che legano fra loro ammoniacca e un acido (amidesintetasi)
	6.2 Ligasi che formano legami C—S		6.2.1 Ligasi che formano i tioesteri (fra un acido e un tiolo)
			6.3.3 Ciclo-ligasi
			6.3.4 Altre ligasi per legami C—N
			6.3.5 Ligasi per legami C—N con glutammina come donatore dell'azoto amidico
		6.4 Ligasi che formano legami C—C	
		6.5 Ligasi che formano esteri fosforici	

**1. Ossidoreduttasi** Catalizzano delle reazioni di ossidoriduzione, per esempio:

$$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{C}}-\text{H} + \text{COOF}^- + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{COO}^- + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Lattato Lattato deidrogenasi Piruvato

**2. Transferasi** Catalizzano il trasferimento di gruppi contenenti C, N o P, per esempio:

$$\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{C}}-\text{H} + \text{COOF}^- + \text{THF} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{CH}_2-\underset{\text{NH}_3^+}{\text{C}}-\text{COO}^- + \text{THF} + \text{H}^+$$

Serina Serina idrossimetil transferasi Glicina

**3. Idrolasi** Catalizzano la scissione dei legami mediante l'aggiunta di acqua, per esempio:

$$\text{NH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Ureasi}} \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$$

Urea

**4. Liasi** Catalizzano la scissione dei legami C—C, C—S e di certi legami C—N, per esempio:

$$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{COO}^- \xrightarrow{\text{Piruvato decarbossilasi}} \text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{H} + \text{CO}_2$$

Piruvato Acetaldeide

**5. Isomerasi** Catalizzano la racemizzazione di isomeri ottici o geometrici, per esempio:

$$\text{OOC}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CoA} \rightleftharpoons \text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CoA}$$

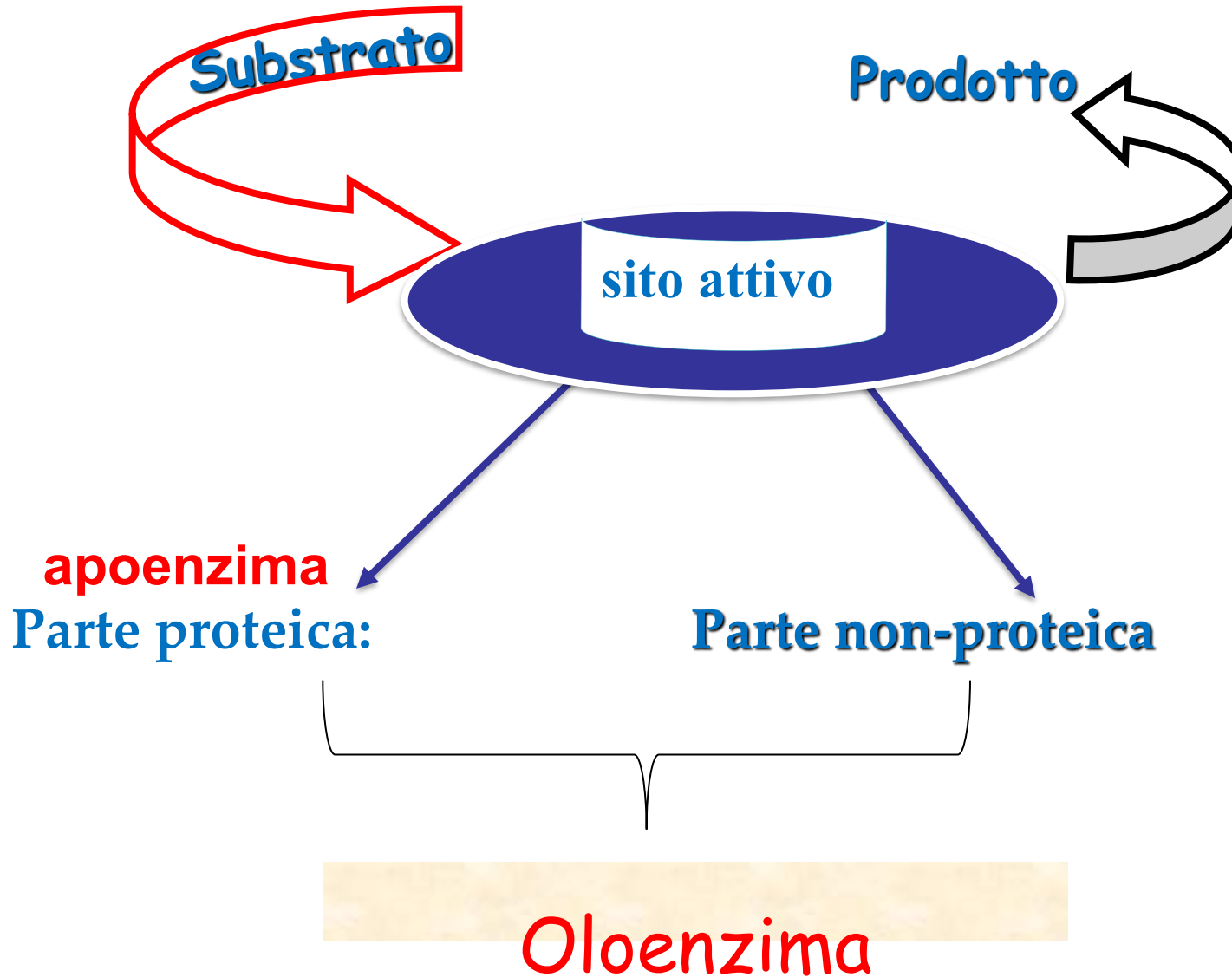
Metilmalonil CoA Metilmalonil CoA mutasi Succinil CoA

**6. Ligasi** Catalizzano la formazione di legami tra carbonio e O, S o N, accoppiata all'idrolisi di fosfati ad alta energia, per esempio:

$$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{COO}^- + \text{CO}_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Piruvato carbossilasi}} \text{OOC}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{COO}^- + \text{ADP} + \text{P}_i$$

Piruvato Ossalacetato

# Struttura generale degli enzimi



# Parte non-proteica



Cofattori

Denti chimici dell'enzima

# Come lavorano i Catalizzatori

- Aumentano la velocità di una reazione
- Non modificano l'equilibrio della reazione e la variazione di E tra reagenti e prodotti ( $\Delta G$ )
- Si ritrovano inalterati al termine del processo



# LA VARIAZIONE DI ENERGIA LIBERA STANDARD E' CORRELATA ALLA $K_{eq}$

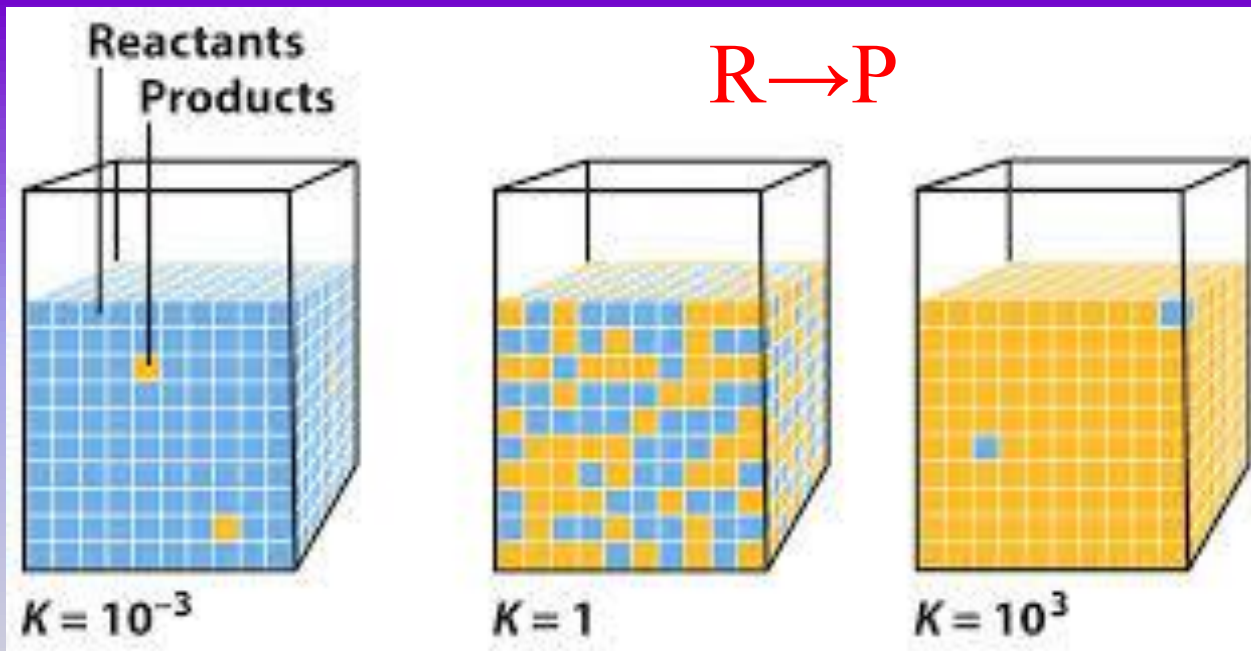
Consideriamo la generica equazione:



Definiamo costante di equilibrio  $K_{eq}$

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}^c [D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a [B]_{eq}^b} \quad \text{a temperatura costante!}$$

Le concentrazioni nell'espressione sopra sono riferite all'equilibrio.



$K_{eq} < 0.1$  = la  $[R] \gg [P]$  l'equilibrio favorisce nettamente i reagenti: Reazione spostata a SX

$0.1 < K_{eq} < 10$  = l'equilibrio non favorisce fortemente né i prodotti, né i reagenti

$K_{eq} > 10$  = la  $[P] \gg [R]$  equilibrio favorisce nettamente i prodotti. Reazione spostata a DX

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}^c [D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a [B]_{eq}^b}$$

La K equilibrio è correlata alla variazione di energia libera standard

$$\Delta G^{\circ} = - R T \ln K_{eq}$$

$\Delta G^{\circ}$  = in condizioni standard: 25°C (298 K), 1M, 1 atm

R = 8,315 J/mol costante universale dei gas

$\Delta G^{\circ'}$  = in condizioni standard biochimiche :  
25°C, pH 7 ( $H^+$   $10^{-7}$  M), 1 atm

## AD UNA REAZIONE CHIMICA E' SEMPRE ASSOCIATA UNA VARIAZIONE DI ENERGIA

$$\Delta G = G(\text{prodotti}) - G(\text{reagenti})$$

$\Delta G < 0$  La trasformazione dei reagenti nei prodotti avviene spontaneamente

### REAZIONE ESOERGONICA

$\Delta G = 0$  La reazione è all'equilibrio

$\Delta G > 0$  La trasformazione dei reagenti nei prodotti NON avviene spontaneamente

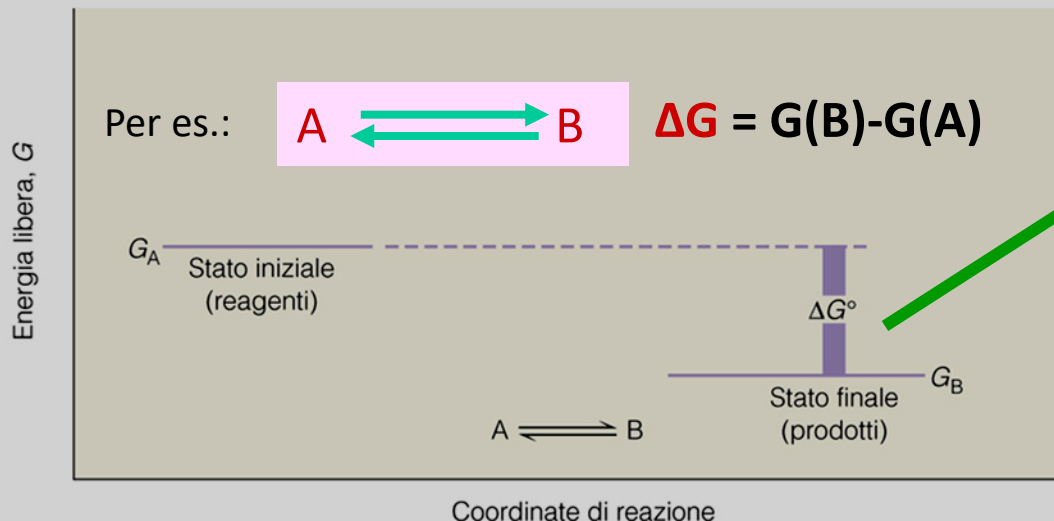
### REAZIONE ENDOERGONICA

LA ENERGIA LIBERA MISURA LA SPONTANEITA' DI UNA REAZIONE ma non fornisce informazioni sulla velocità della reazione

## L'enzima partecipa alla reazione che catalizza:

- senza modificare lo stato di equilibrio della reazione.
- senza modificare la variazione di energia libera tra reagenti e prodotti che si verifica durante la reazione.
- **accelerando i tempi con cui reagenti e prodotti raggiungono l'equilibrio.**

La **coordinata di reazione** analizza le variazioni di energia libera che avvengono nel corso della reazione chimica.



$G_A$  = Energia libera reagenti

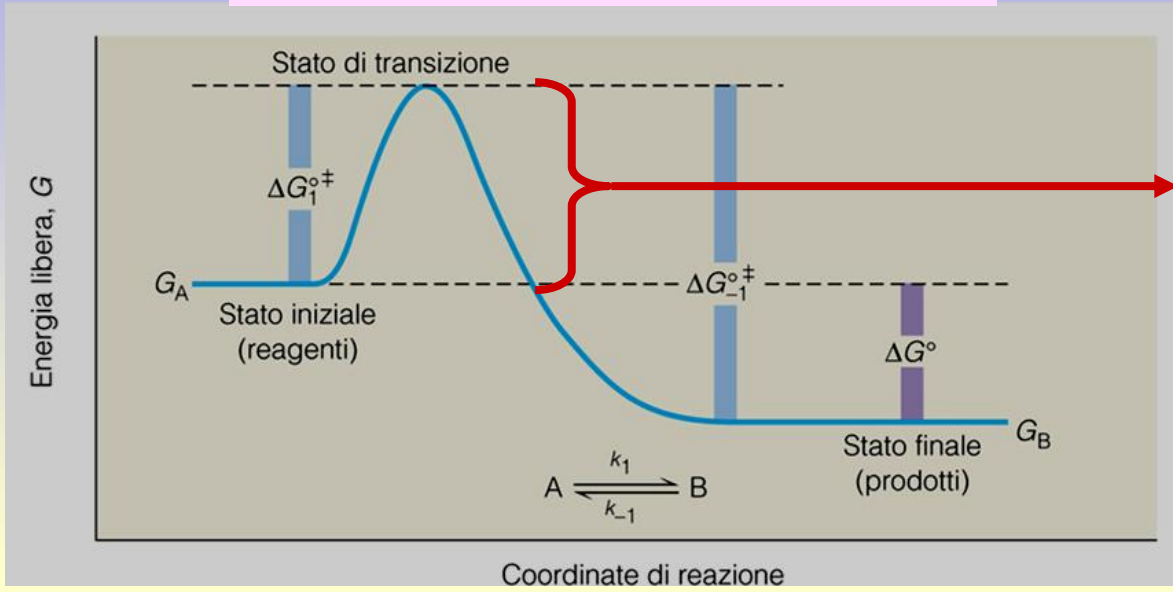
$G_B$  = Energia libera prodotti

$\Delta G^\circ$  = variazione di energia libera della reazione (**rende conto della spontaneità della reazione, non della sua velocità**)

$\Delta G^\circ < 0$  = reazione esoergonica (spontanea) ( $A \rightarrow B$ )

$\Delta G^\circ > 0$  = reazione endoergonica (non spontanea) (è spontanea la reazione inversa  $B \rightarrow A$ )

# Diagramma dello stato di transizione o diagramma della coordinata di reazione

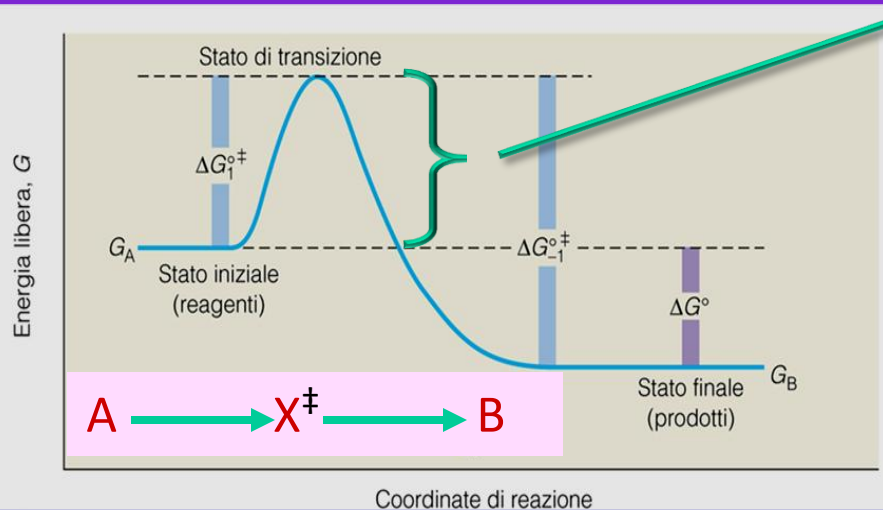


Affinché avvenga la trasformazione dei reagenti in prodotti è necessario superare un dislivello energetico: **ENERGIA DI ATTIVAZIONE ( $\Delta G^{0\ddagger}$ )** (correlata alla velocità della reazione)

$\Delta G_1^{0\ddagger} = E_{att}$  della reazione diretta  
 $\Delta G_{-1}^{0\ddagger} = E_{att}$  della reazione inversa

# ENERGIA DI ATTIVAZIONE ( $\Delta G^{0\ddagger}$ ) =

È l'energia necessaria a raggiungere e superare lo stato di transizione della reazione.



**$X^{\ddagger}$  = STATO DI TRANSIZIONE:** corrisponde con il punto di energia più elevato della reazione, in cui le molecole sono orientate correttamente per trasformarsi, sono avvicinate e subiscono distorsioni perché contemporaneamente si rompono alcuni legami e se ne formano degli altri.

Vanno avanti nella reazione solo le molecole che hanno l'energia sufficiente per superare gli ostacoli alla loro trasformazione. E che possiedono, quindi, un'energia  $\geq$  all'En. ATTIVAZIONE ( $\Delta G^{0\ddagger}$ ).

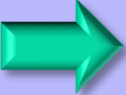
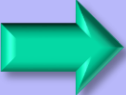
## Ostacoli da superare

- 1) URTI MOLECOLARI
- 2) ORIENTAMENTO
- 3) FORZE REPULSIVE
- 4) DESOLVATAZIONE

L'energia di cui necessitano le molecole di reagente per essere trasformate in prodotto è fornita dalla **En. cinetica che le molecole stesse possiedono**.



L'En. cinetica è convertita in energia libera G: le molecole di reagente che hanno un'En. cinetica  $>$  all' $E_{att}$  superano lo STATO DI TRANSIZIONE e si trasformano in prodotto.

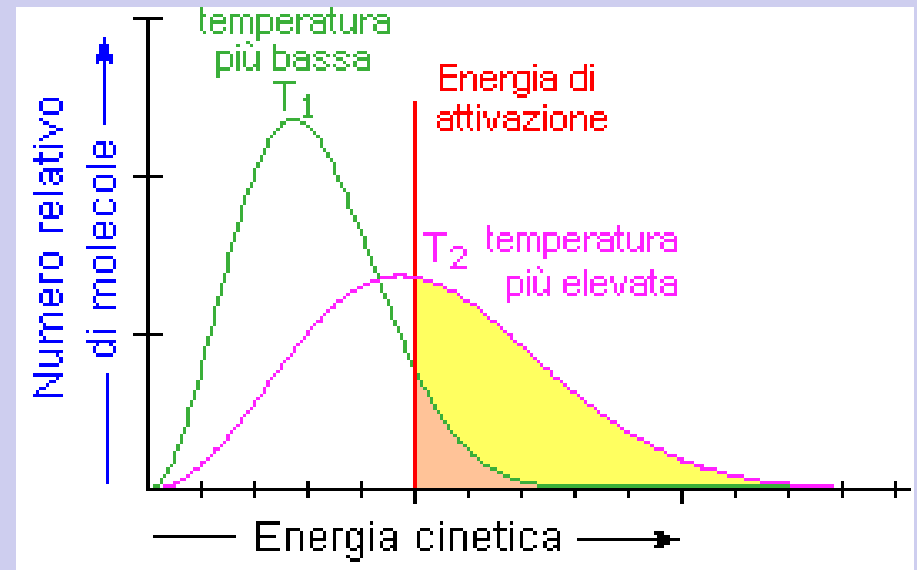
- ❖ Se l' $E_{att}$  è BASSA: un gran numero di molecole avrà l'en. cinetica media  $\geq$  all' $E_{att}$   **La reazione sarà VELOCE**
- ❖ Se l' $E_{att}$  è ALTA: un piccolo numero di molecole avrà l'en. cinetica media  $\geq$  all' $E_{att}$   **La reazione sarà LENTA**

**LA VELOCITÀ DELLA REAZIONE DIPENDE DALL'ENERGIA DI ATTIVAZIONE**



# STRATEGIE PER AUMENTARE LA VELOCITA' DELLE REAZIONI

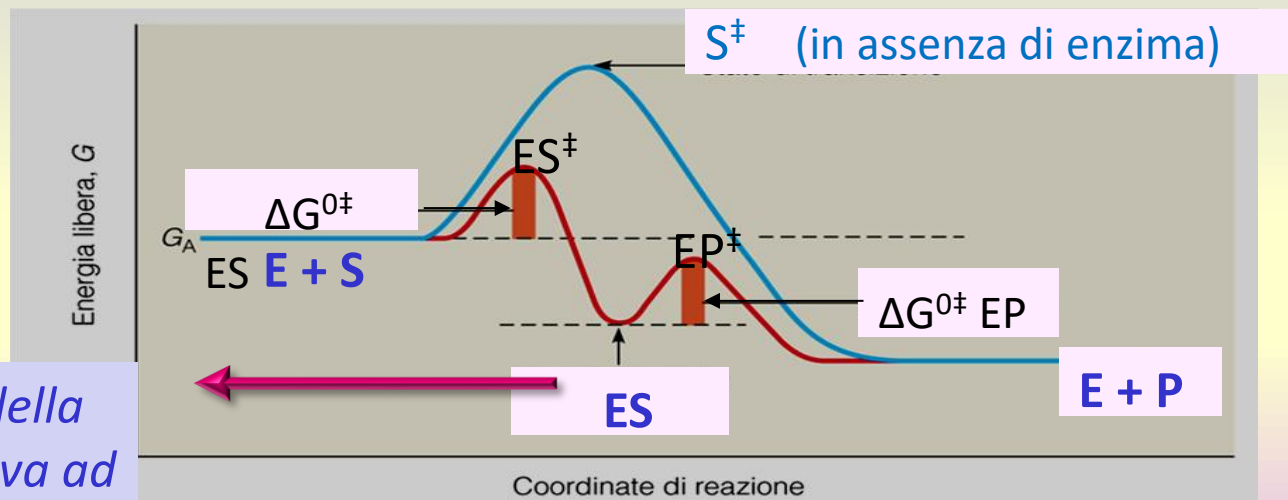
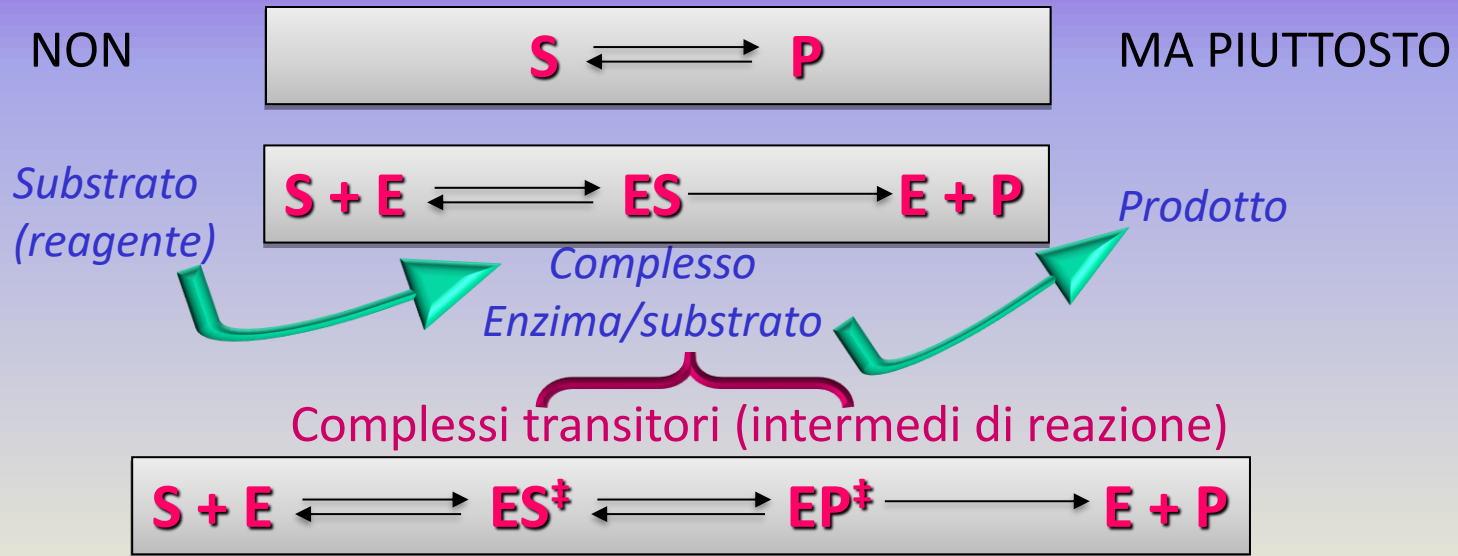
-AUMENTARE LA TEMPERATURA DELLA REAZIONE: AUMENTA L'ENERGIA CINETICA DELLE MOLECOLE



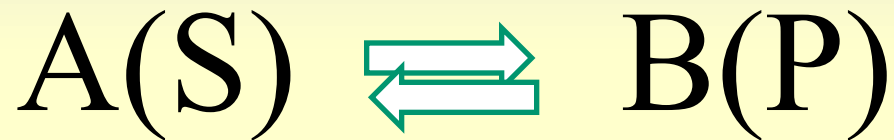
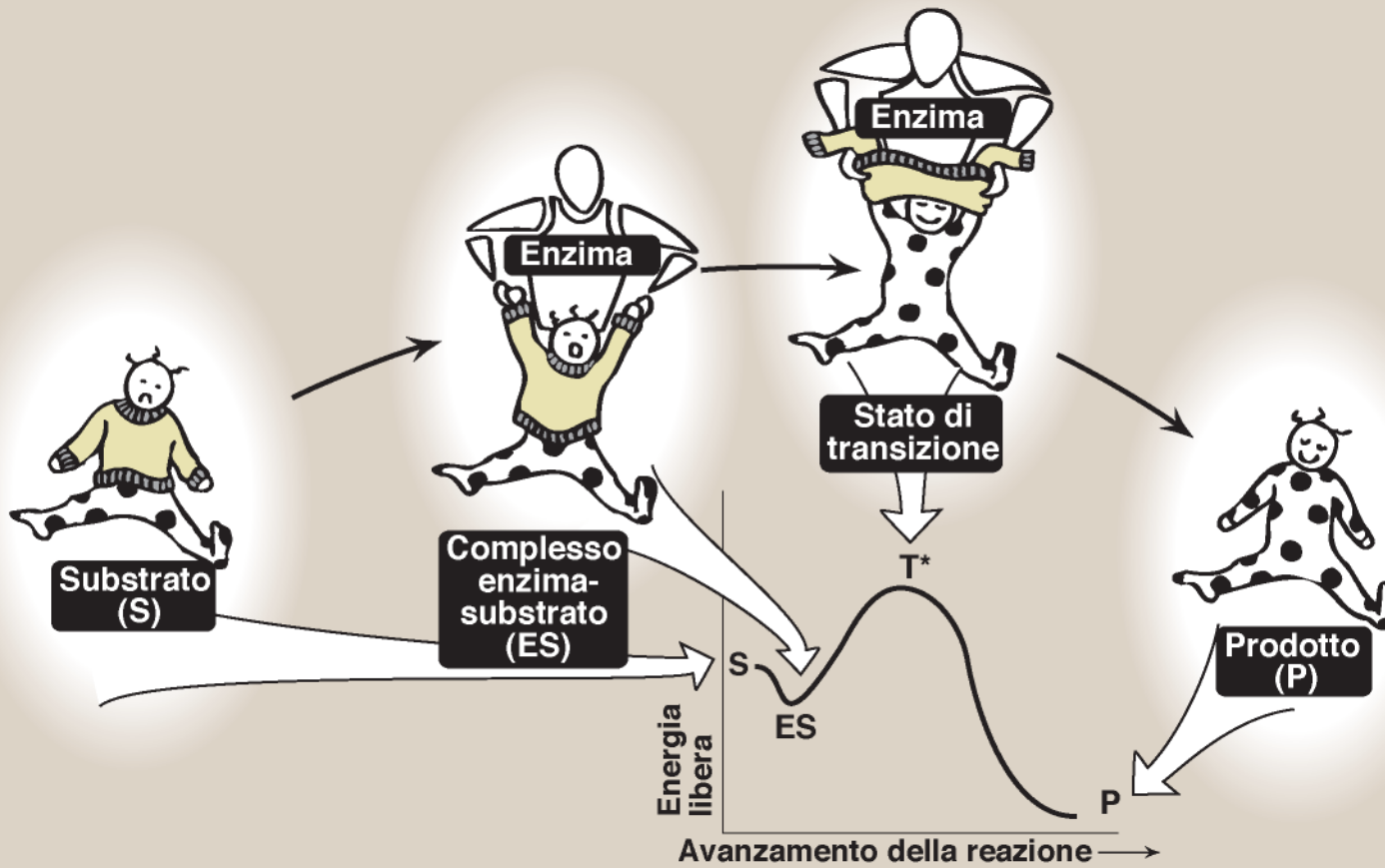
-RIDURRE L'ENERGIA DI ATTIVAZIONE

# L'ENZIMA AGISCE ABBASSANDO L'ENERGIA DI ATTIVAZIONE

Modifica il meccanismo della reazione e crea un ambiente in cui i reagenti non incontrano ostacoli alla reazione>>>RIDUCE L'ENERGIA DI ATTIVAZIONE



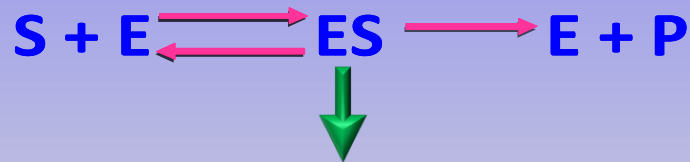
*Stato intermedio della reazione che si trova ad un minimo energetico*



L'enzima lega il reagente (o i reagenti) >> SUBSTRATO/I.

Abbassa l' $E_{att}$  nella formazione di un complesso enzima/substrato (ES)

Promuove direttamente l'evento catalitico rilasciando il prodotto e ritornando inalterato nel suo stato originario



- L'interazione fra enzima e substrato (o più substrati) è **reversibile**.
  - La formazione del complesso ES comporta il legame fra il **SITO ATTIVO** dell'enzima e il substrato/i.
- 

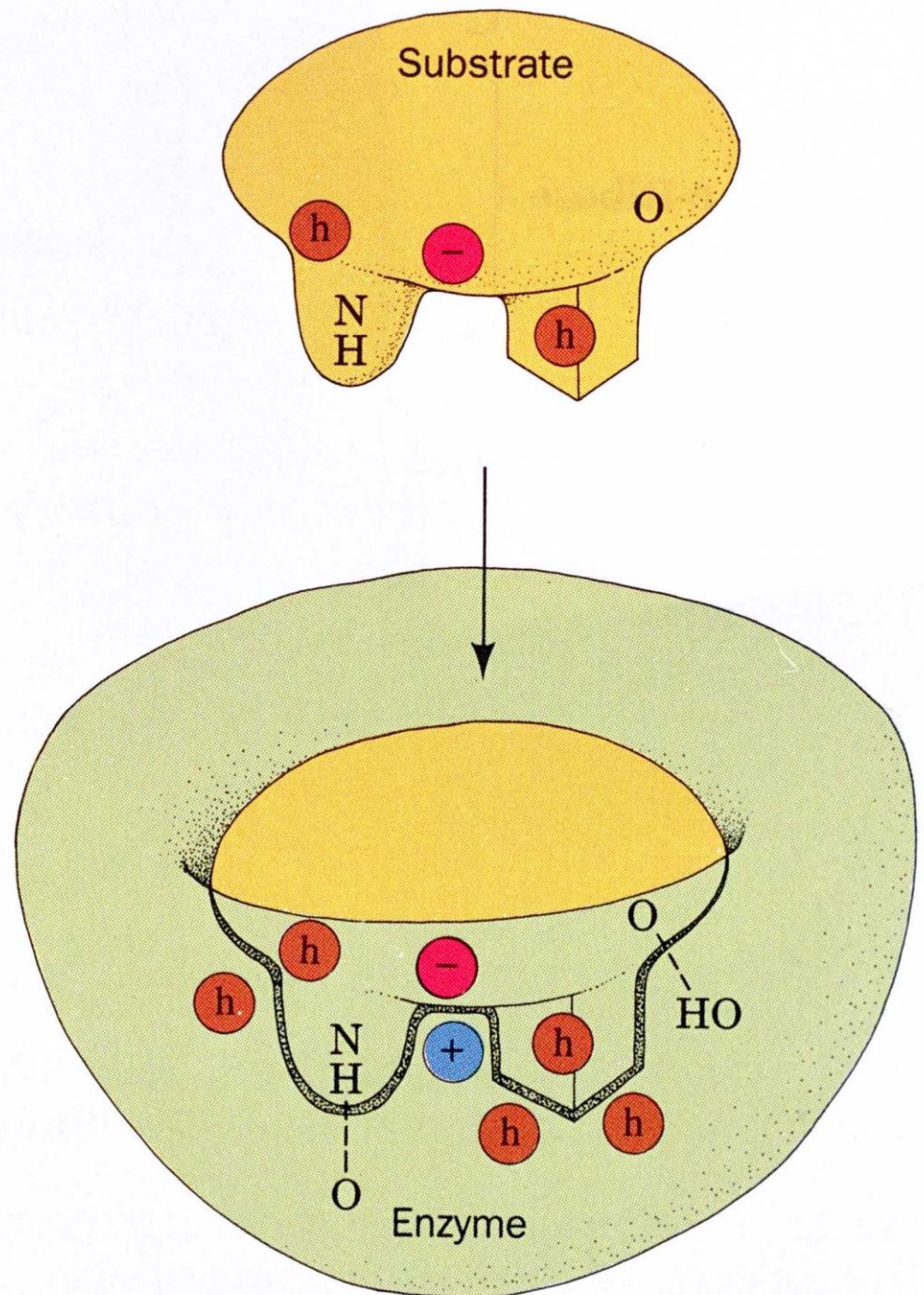
Tasca della proteina in cui sporgono le catene laterali di alcuni residui amminoacidici che costituiscono il **sito di legame** per il substrato (responsabile della specificità) e di altri residui amminoacidici, o cofattori che costituiscono il **sito catalitico** (responsabile dell'evento catalitico)

La **formazione di legami fra il sito attivo dell'enzima e il substrato** è un processo **esoergonico**: libera ENERGIA DI LEGAME che va ad abbassare la barriera costituita dall' $E_{att}$ .

# Complesso Enzima-Substrato

L'energia usata per aumentare la velocità enzimatica deriva dalle **interazioni deboli** (legami idrogeno, interazioni ioniche e idrofobiche) che si formano tra enzima e substrato

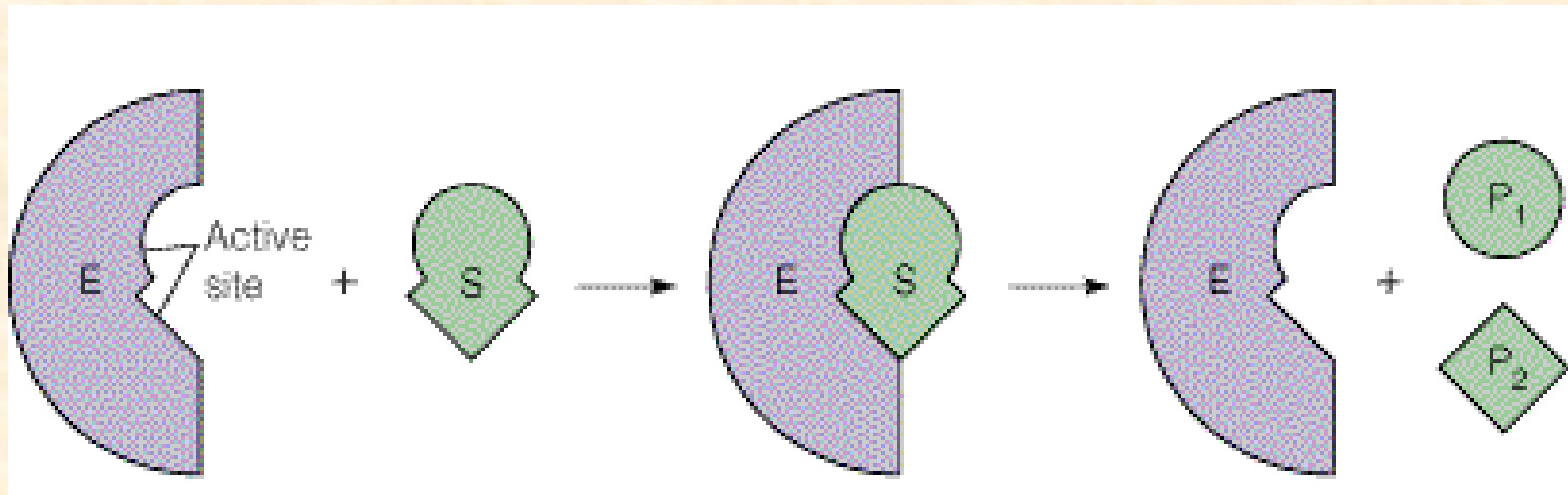
**ENERGIA di LEGAME**



In quale modo l'enzima utilizza l'energia di legame per ridurre l'energia di attivazione??

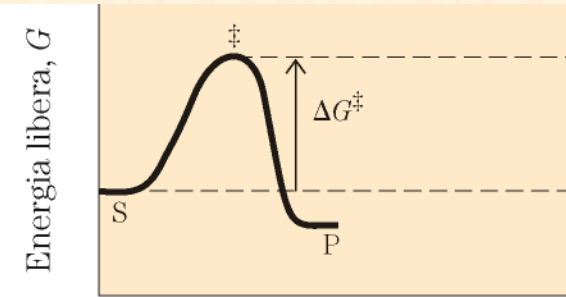
## Modello chiave-serratura, (Fisher 1894):

- L'enzima contiene nel sito attivo il "complementare" al substrato
- Si formano legami deboli "esatti" fra enzima e substrato

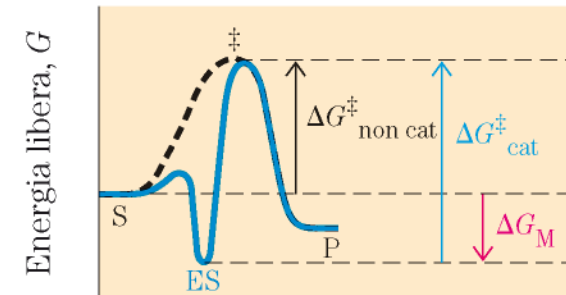
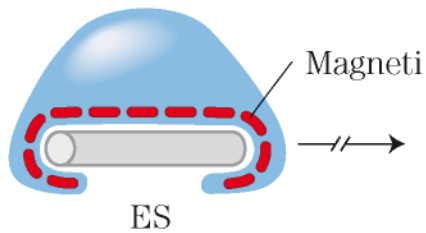


# Un enzima con sito attivo complementare al substrato potrebbe non essere un buon enzima

## (a) Senza enzima



## (b) Complementarità tra enzima e substrato



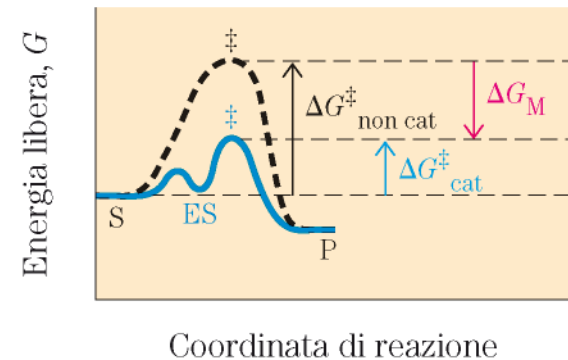
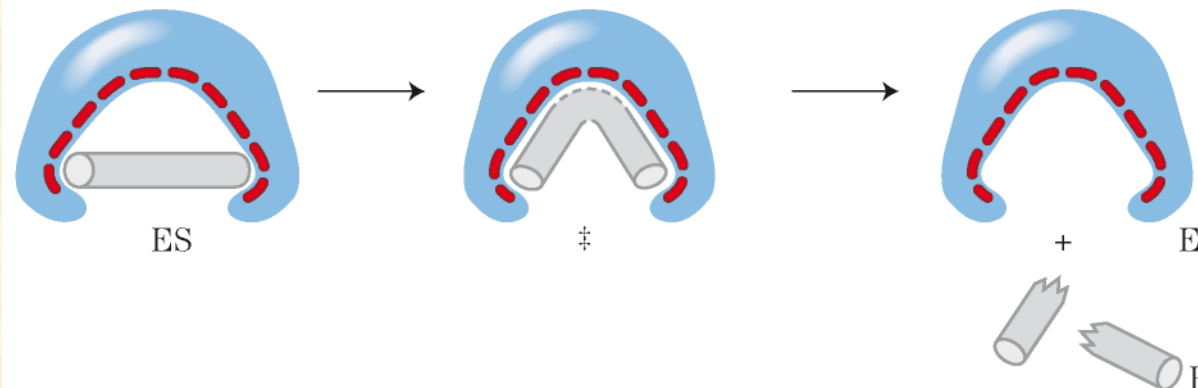
# attuale modello per le interazioni substrato-enzima

## Enzima complementare allo stato di transizione: Teoria dell'adattamento indotto (Koshland 1958)

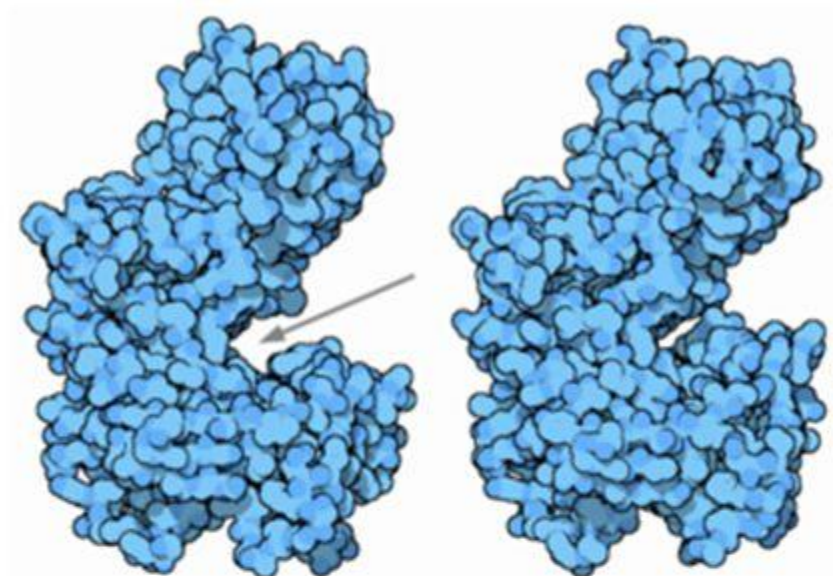


Il substrato induce  
modificazioni  
conformazionali sull'enzima  
per stabilizzare lo stato di  
transizione

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







L'enzima **esochinasi** è un esempio del modello dell'adattamento indotto: quando il glucosio si avvicina al sito attivo (immagine a sinistra - freccia), l'enzima cambia conformazione, avvolgendosi attorno al substrato (destra).

➔ I gruppi catalitici di **E** interagendo con **S** lo preparano (attivano) alla reazione abbassando  **$E_a$** . Tra substrato-enzima si forma il complesso **ES** la cui **energia di legame** serve per:

- ridurre l'entropia (avvicinamento e orientamento substrato)
- desolvatare il substrato
- indurre binding produttivo o adattamento indotto

Dall'energia del legame E-S dipendono la catalisi e la **specificità**.

# MECCANISMI DI CATALISI

Ogni enzima ha un suo specifico meccanismo catalitico ma spesso più meccanismi si integrano:

Una volta che il S si è legato con l'E, i gruppi funzionali catalitici, opportunamente disposti, contribuiscono alla rottura o alla formazione di un legame attraverso diversi MECCANISMI:

- 1) CATALISI PER EFFETTO DI PROSSIMITA' E ORIENTAMENTO
- 2) CATALISI DA LEGAME PREFERENZIALE PER LO STATO DI TRANSIZIONE
- 3) CATALISI ACIDO-BASE
- 4) CATALISI COVALENTE
- 5) CATALISI MEDIANTE IONI METALLICI

I primi due meccanismi sono comuni a tutti gli enzimi

### **CATALISI favorita dalla PROSSIMITA' e dall'ORIENTAMENTO:**

- 1) Gli enzimi **bloccando il substrato** nel sito di legame aumentano la prossimità dei gruppi funzionali che devono reagire (è come se aumentassimo la concentrazione dei reagenti nel sito attivo)
- 2) **diminuisce la libertà di movimento** e quindi l'entropia dei reagenti, l'energia necessaria a compensare questo aumento di ordine del sistema è fornita dalla formazione di legami fra il sito attivo dell'enzima e il substrato.

### **CATALISI favorita dal LEGAME PREFERENZIALE PER LO STATO DI TRANSIZIONE**

il sito attivo dell'enzima si adatta perfettamente al substrato quando viene raggiunto lo stato di transizione:

la complementarità abbassa la  $\Delta G^\ddagger$  e accelera la trasformazione

(legami deboli con lo stato di transizione: **CATALISI ELETTROSTATICA**)

## CATALISI ACIDO-BASE

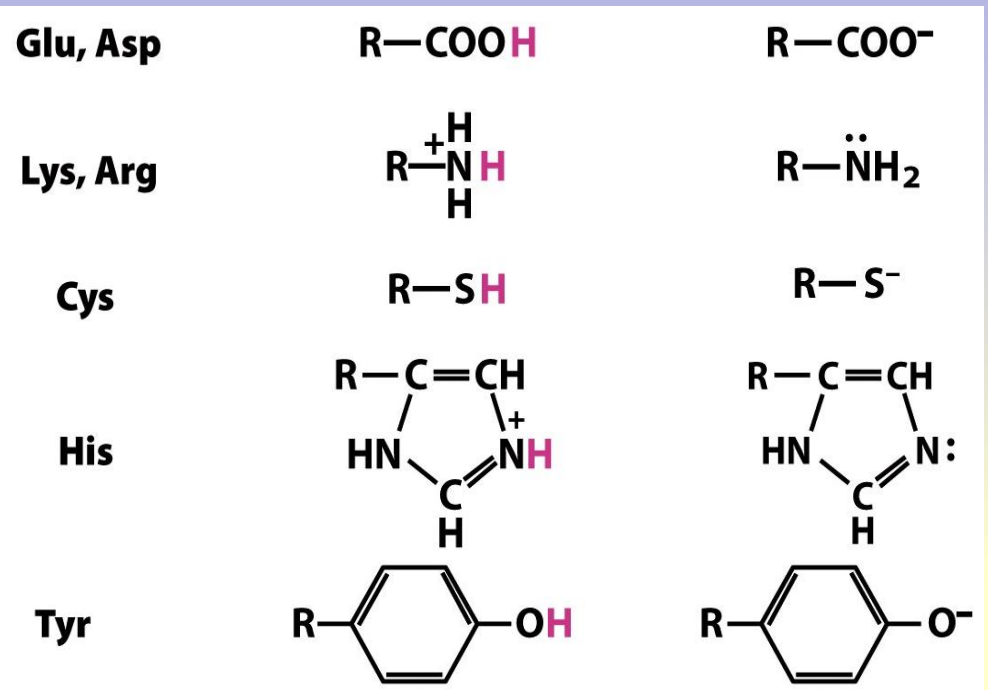
Trasferimento di ioni  $H^+$  o  $OH^-$  dal o al substrato

Favorisce quelle reazioni in cui si forma un intermedio carico instabile che tende a degradarsi e a bloccare la reazione

**Specifica:** quando l'acceptore o il donatore di ioni  $H^+$  o  $OH^-$  è l' $H_2O$

**Generale (GABC):**

quando sono coinvolte le catene laterali ionizzabili di residui amminoacidici del sito Catalitico. I pKa di tali residui possono variare molto rispetto a quelli dei singoli amminoacidi in soluzione.



donatore di ioni  $H^+$     acceptore di ioni  $H^+$

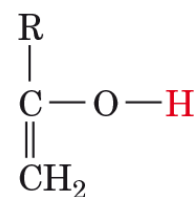
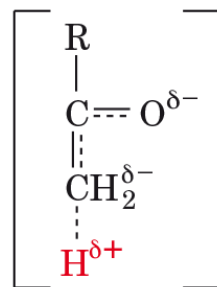
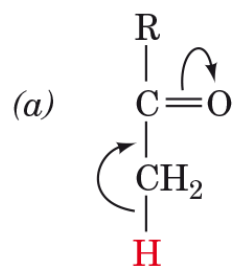
L'attività catalitica di questi enzimi è sensibile al pH

# TAUTOMERIZZAZIONE CHETO-ENOLICA

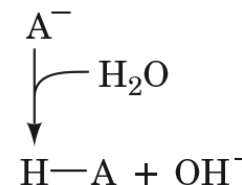
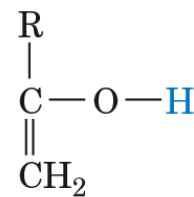
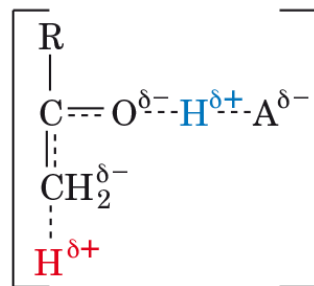
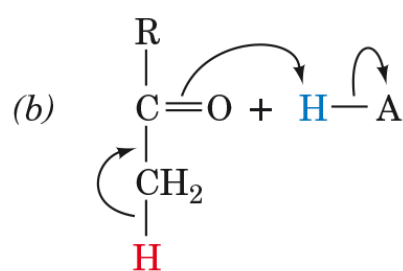
**Forma chetonica**

**Stato di transizione**

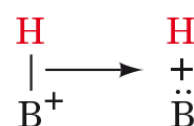
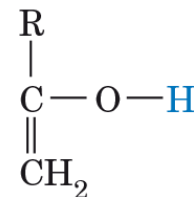
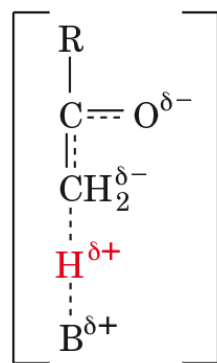
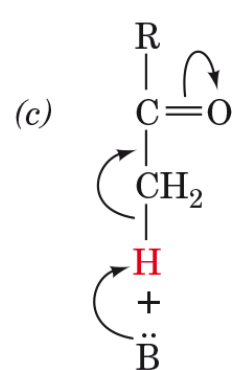
**Forma enolica**



non  
catalizzata



Catalisi  
ACIDA  
generale



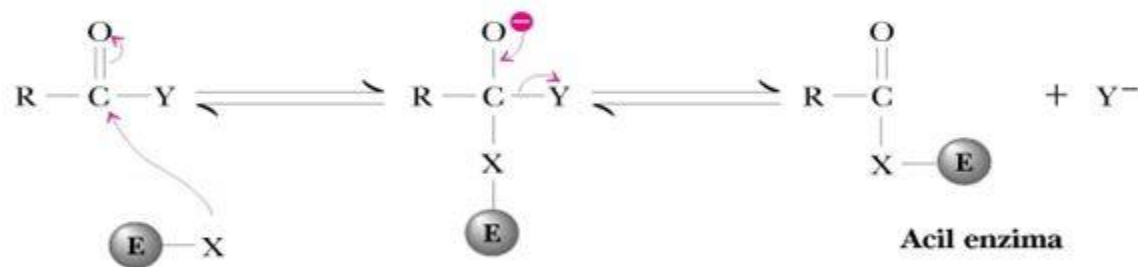
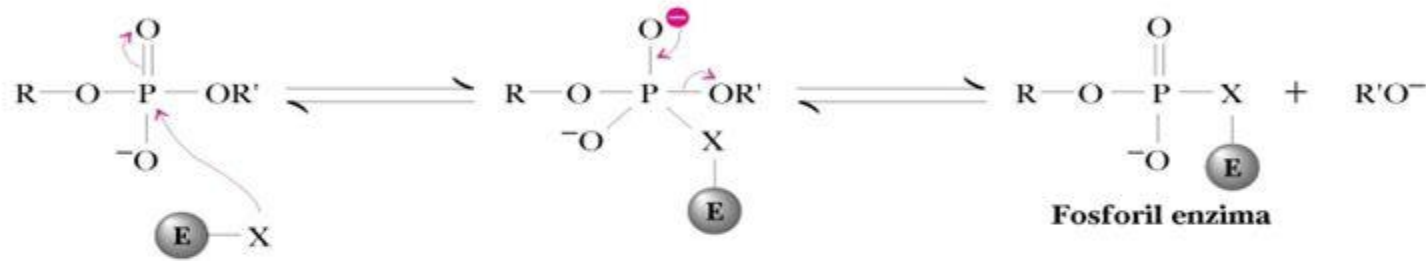
Catalisi  
BASICA  
generale

## CATALISI COVALENTE

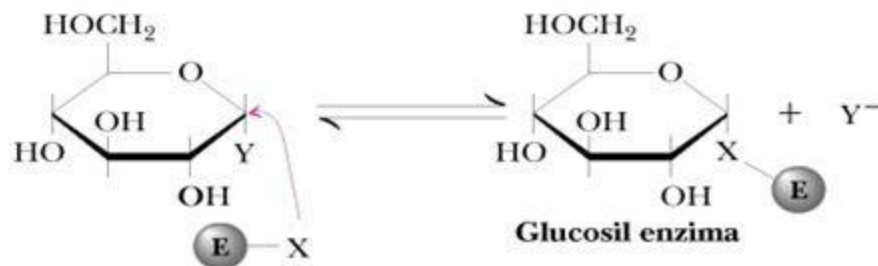
Comporta la formazione di intermedi **TRANSITORI** in cui il substrato è **legato covalentemente** con un residuo amminoacidico del sito attivo dell'enzima.

La catena laterale reattiva dell'enzima può comportarsi sia da **nucleofilo**(donando un doppietto elettronico) che da **elettrofilo**(accettando un doppietto elettronico). La più comune è la **catalisi nucleofila** (un gruppo funzionale dell'enzima si comporta da nucleofilo):

**Catalisi covalente:** alcune reazioni enzimatiche devono gran parte dell'aumento della loro velocità alla formazione di legami covalenti fra E ed S

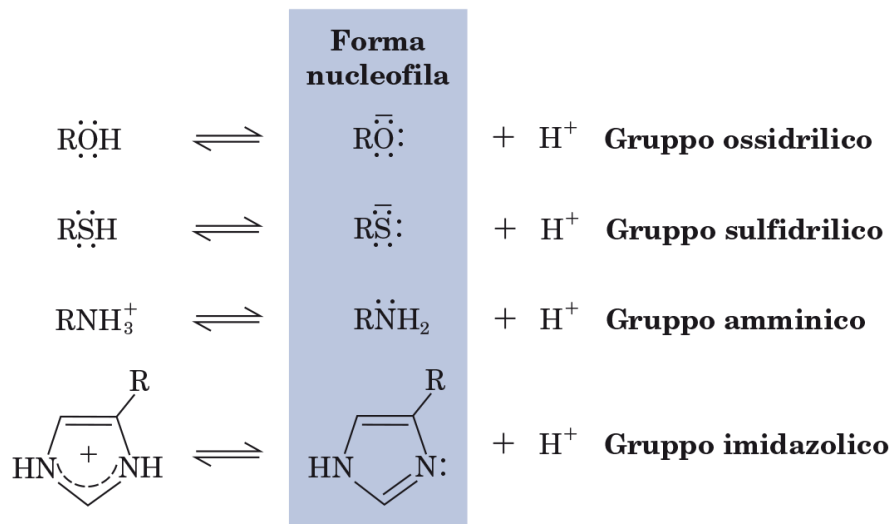


$X$  = centro nucleofilo che attacca un centro elettrofilo

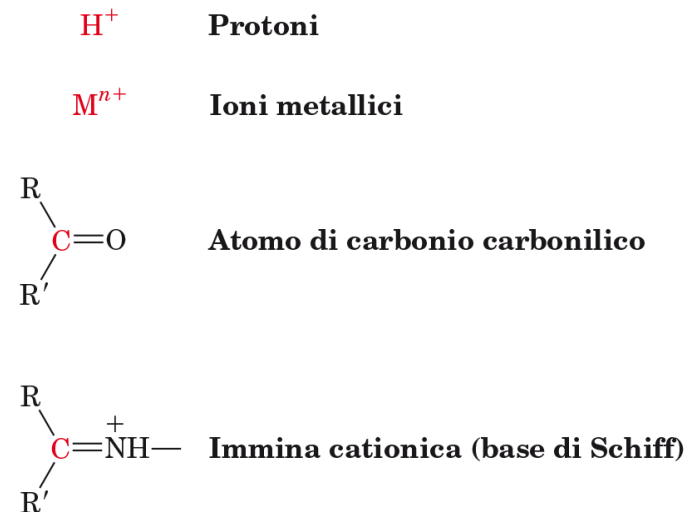




(a) Nucleofili



(b) Elettrofili



Nella CATALISI COVALENTE quanto maggiore è la stabilità del legame covalente formatosi, tanto minore è la facilità con cui esso tende a rompersi dopo la catalisi.

**Nelle PROTEINE agiscono da ottimi nucleofili:**

- $\epsilon$ -ammino gruppo della Lys
- gruppo TIOLICO della Cys
- gruppo IMIDAZOLICO dell'His
- gruppo CARBOSSILICO dell'Asp
- gruppo OSSIDRILICO della Ser

## CATALISI TRAMITE IONI METALLICI

quando nel sito attivo sono presenti ioni metallici che servono a:

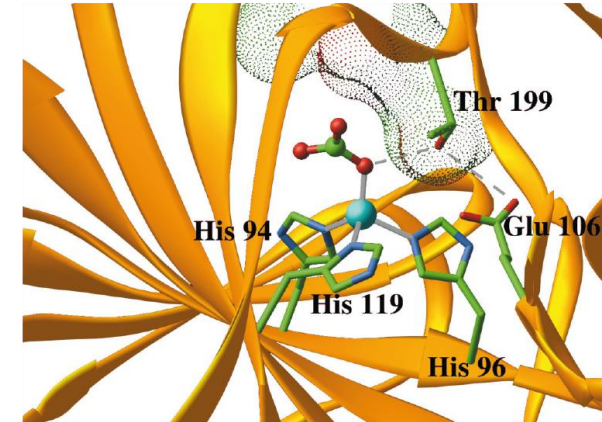
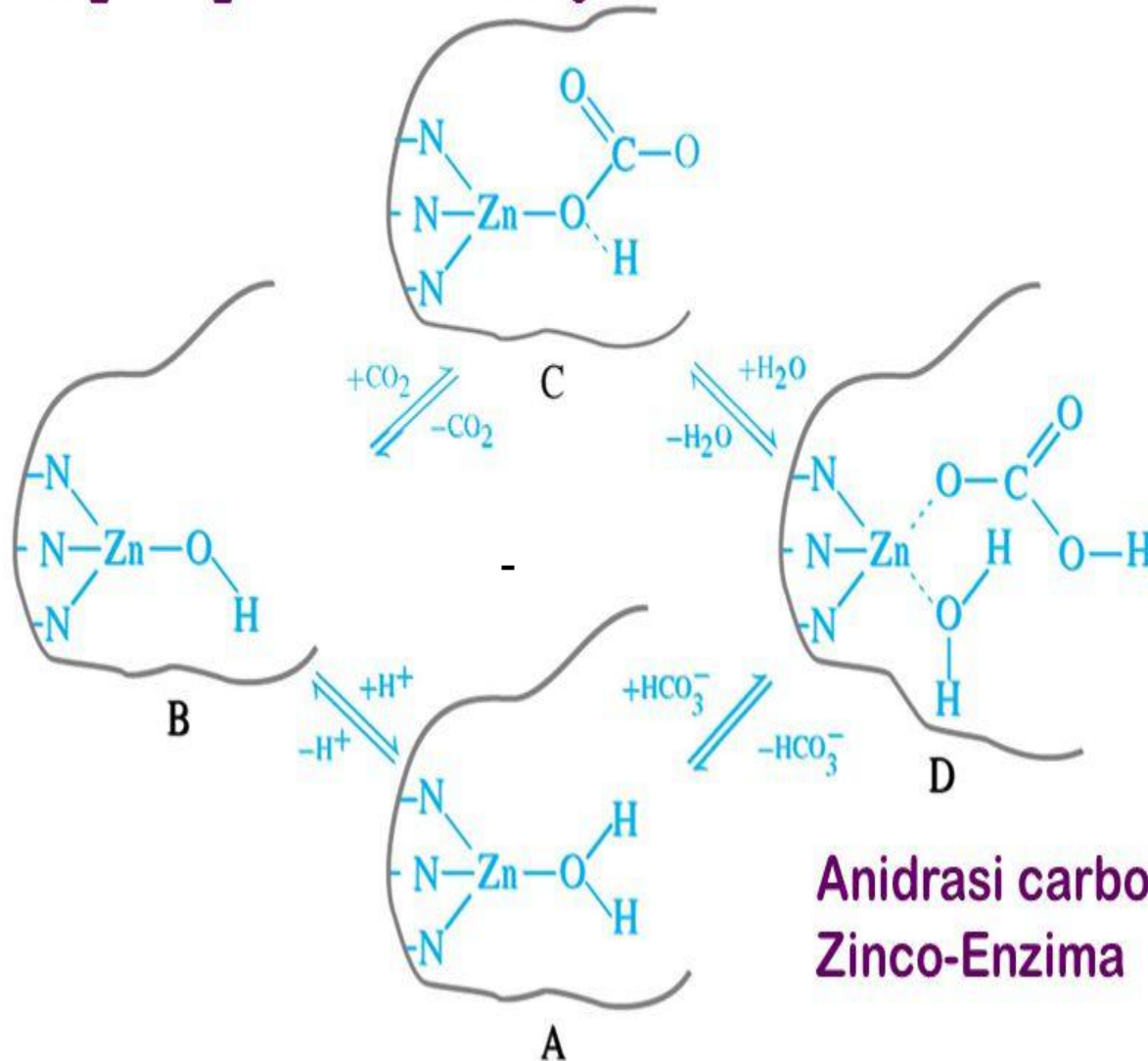
- stabilizzare lo stato di transizione
- proteggere cariche negative ( $Mg^{2+}$  nelle chinasi scherma le cariche negative dell'ATP e facilita l'attacco nucleofilo del substrato al fosfato)
- orientare il substrato ai fini della reazione
- partecipare a reazioni di ossido-riduzione

**METALLO-ENZIMI:** metallo di transizione legato fortemente all'enzima (Fe, Cu, Mn, Zn, Co)

**ENZIMI ATTIVATI DA METALLI:** legano debolmente un metallo alcalino o alcalino-terroso

# Anidrase carbonica (zinco-enzima)

Lo ione  $Zn^{2+}$  polarizza una molecola d'acqua che si ionizza a formare uno ione  $OH^-$  che, a sua volta, effettua un attacco nucleofilo su una molecola di  $CO_2$  convertendola in  $HCO_3^-$

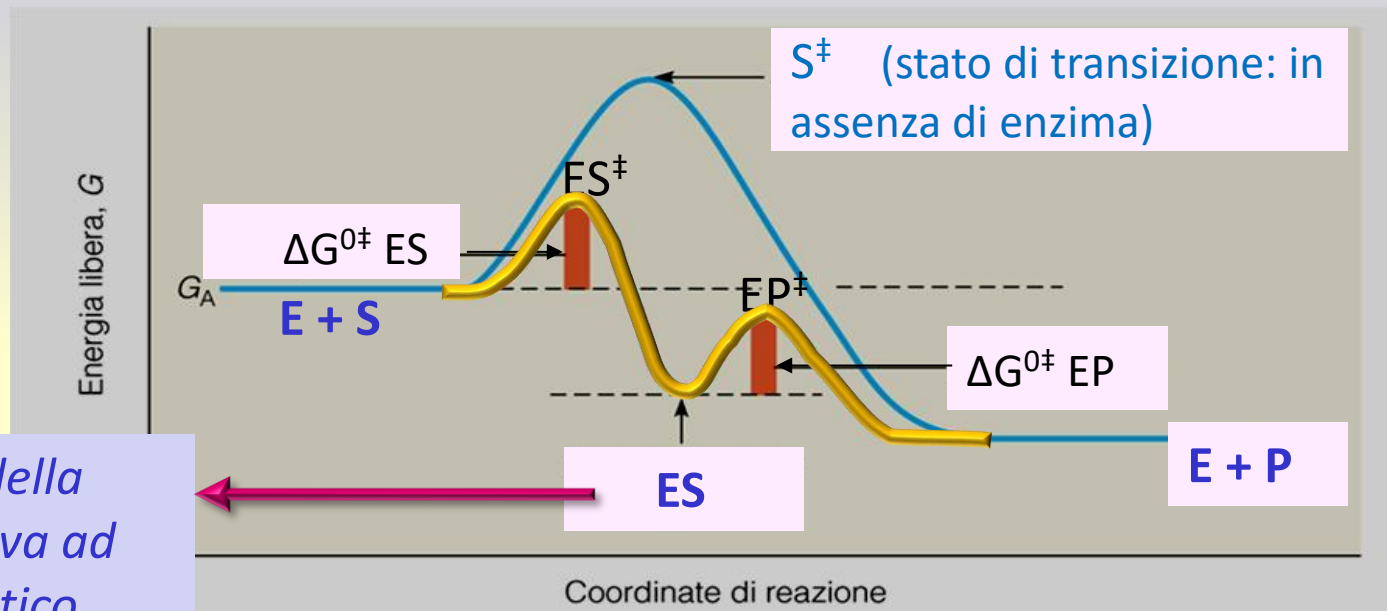
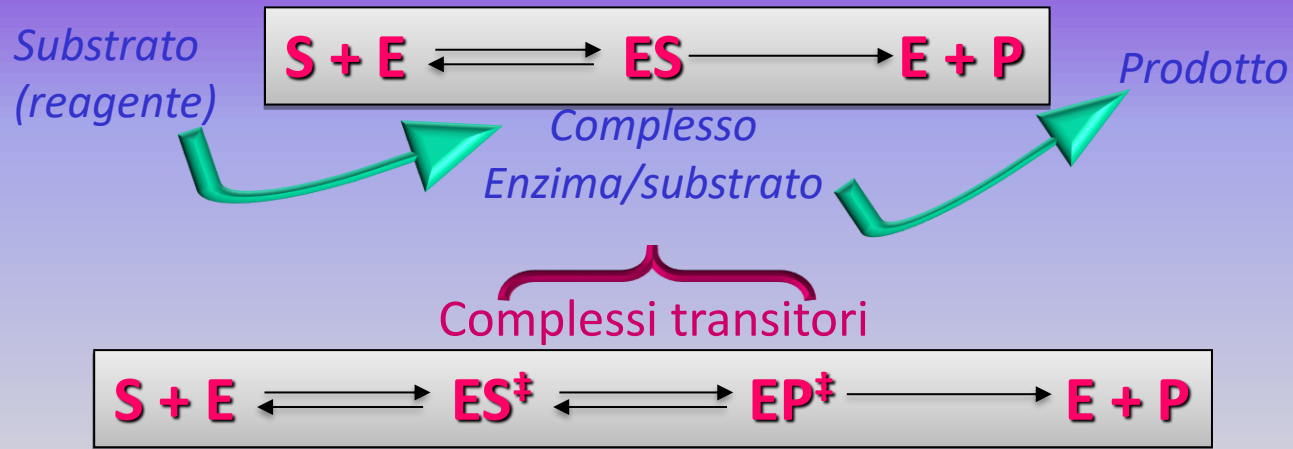


Sito attivo dell'anidrase carbonica

Anidrase carbonica  
Zinco-Enzima

# L'ENZIMA AGISCE ABBASSANDO L'ENERGIA DI ATTIVAZIONE

Modifica il meccanismo della reazione e crea un ambiente in cui i reagenti non incontrano ostacoli alla reazione



Stato intermedio della reazione che si trova ad un minimo energetico