

CINETICA ENZIMATICA

Determinare come varia la velocità delle reazioni enzimatiche in funzione della variazione dei parametri sperimentali.

1) [S]

2) [E]

3) pH

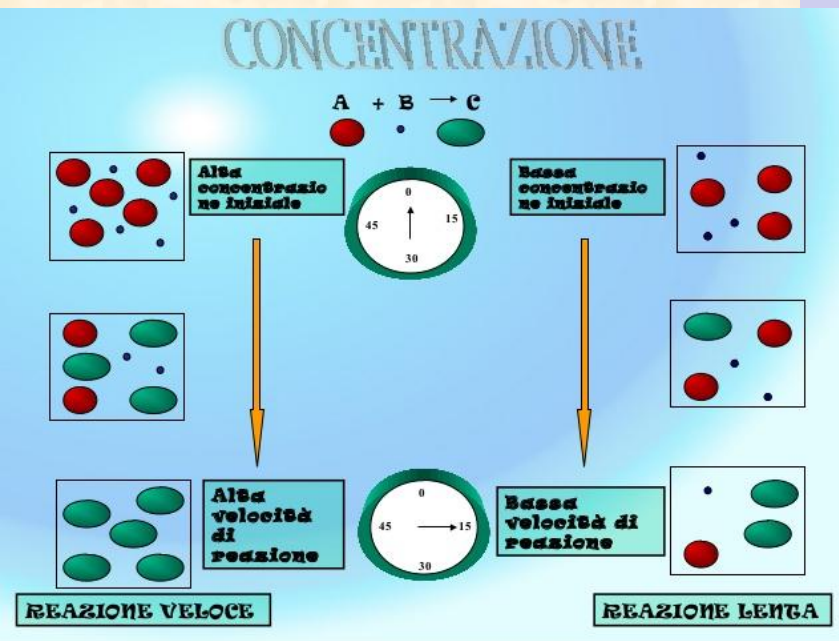
4) temperatura

- **velocità di una reazione (v):** è la variazione di concentrazione di substrato o di prodotto nell'unità di tempo. In ogni momento la velocità di reazione è proporzionale alla concentrazione del substrato



$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = - \frac{\Delta[S]}{\Delta t} = k [S]$$

Costante di velocità



- (v) si esprime come $\mu\text{mol/L}$ di prodotto formatosi in un minuto ($\mu\text{M}/\text{min}$).

CINETICA ENZIMATICA

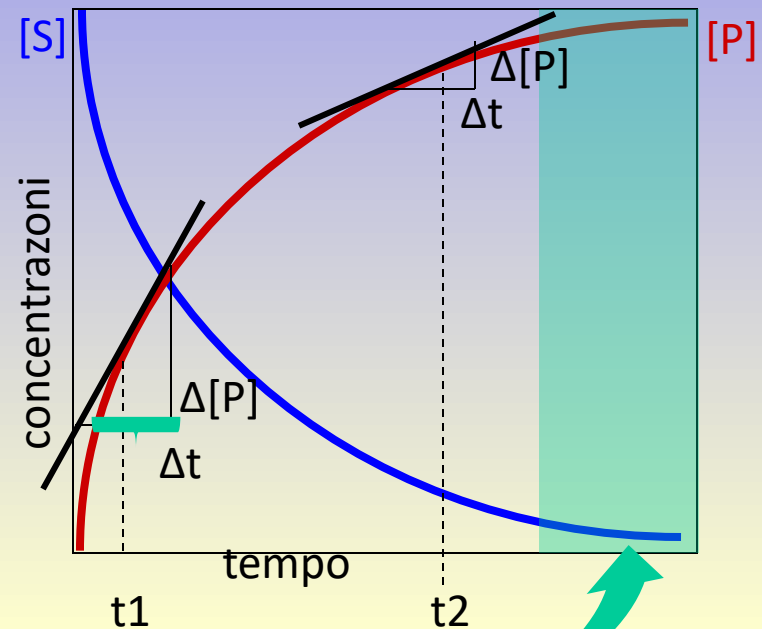
Gli esperimenti di cinetica enzimatica si basano sulla determinazione della velocità di reazione, misurata come variazioni della concentrazione del prodotto o del reagente in un dato intervallo di tempo.



$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = - \frac{\Delta[S]}{\Delta t}$$

[P] = aumenta nel tempo

[S] = diminuisce nel tempo



Col procedere della reazione le curve cinetiche si appiattiscono: la velocità non subisce variazioni. S è consumato perché trasformato in P e la reazione tenderà a raggiungere l'equilibrio.

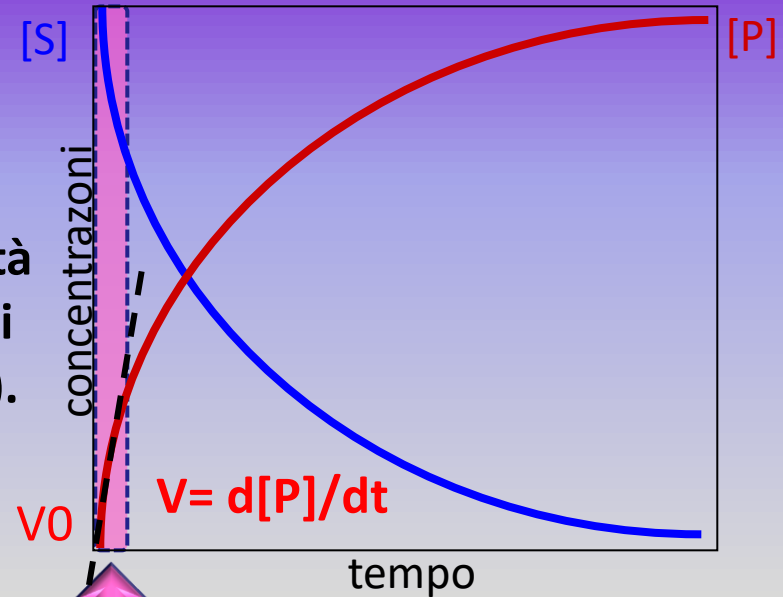
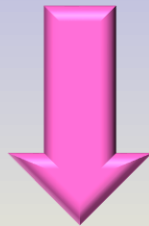


$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = - \frac{\Delta[S]}{\Delta t}$$

[P] = aumenta nel tempo
[S] = diminuisce nel tempo

Problema:

Voglio misurare in che modo varia la velocità della reazione se uso diverse concentrazioni iniziali di substrato (1, 5, o 10 mM, per es...).



Devo misurare la velocità della reazione al **MOMENTO INIZIALE** (entro i primi 50-60 sec), **quando la quantità di prodotto formato è molto bassa e la concentrazione del substrato ha un valore preciso che conosco** (quello iniziale stabilito dallo sperimentatore).



In questo modo posso associare al valore di [S] utilizzato un dato valore di **v_0** (**velocità iniziale**)

1) Cosa devo misurare per studiare la cinetica enzimatica?

**LA VELOCITA' della REAZIONE AL TEMPO ZERO
IN FUNZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI SUBSTRATO**

(misurata come variazione della concentrazione di prodotto ottenuto nel tempo, o di substrato consumato nel tempo)

2) Come interpreto i dati ottenuti?

Applico delle equazioni matematiche.

Il modello matematico BASE per elaborare i dati di una cinetica enzimatica
(per enzimi non allosterici)

è quello proposto da L. Michaelis e M. Menten (1913)/Haldane e Briggs
(1925)

3) Quali informazioni ottengo dalla cinetica di una reazione enzimatica?

Determino i parametri specifici e caratterizzanti per un dato enzima che ci dicono:

- Quanto un enzima è affine ad un dato substrato
- Quanto l'enzima è efficiente
- Come posso controllare la velocità della reazione
- Come posso regolare l'attività catalitica dell'enzima (inibendolo o attivandolo)

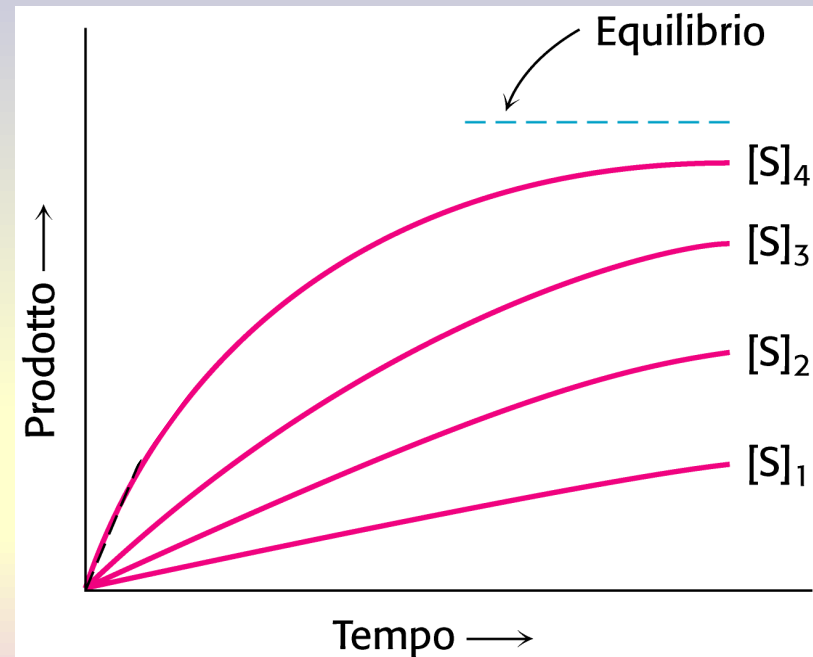
COME DETERMINO LA VELOCITA' INIZIALE?

Studio di una reazione enzimatica semplice (1 solo substrato e 1 solo stadio intermedio):

- 1) miscelo l'enzima con il suo substrato, lavoro a temperatura e pH costanti,
- 2) Preparo un certo numero di miscele di reazione in cui la $[E]$ è inalterata, ma la $[S]$ è diversa: per ogni esperimento misuro come varia la **velocità INIZIALE** della reazione nel tempo.
- 3) Velocità di reazione: misuro la concentrazione di **prodotto** che si formerà in tempi diversi nelle diverse miscele di reazione.

La **velocità di reazione** aumenta all'aumentare della **concentrazione del substrato** utilizzata.

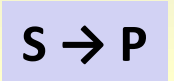
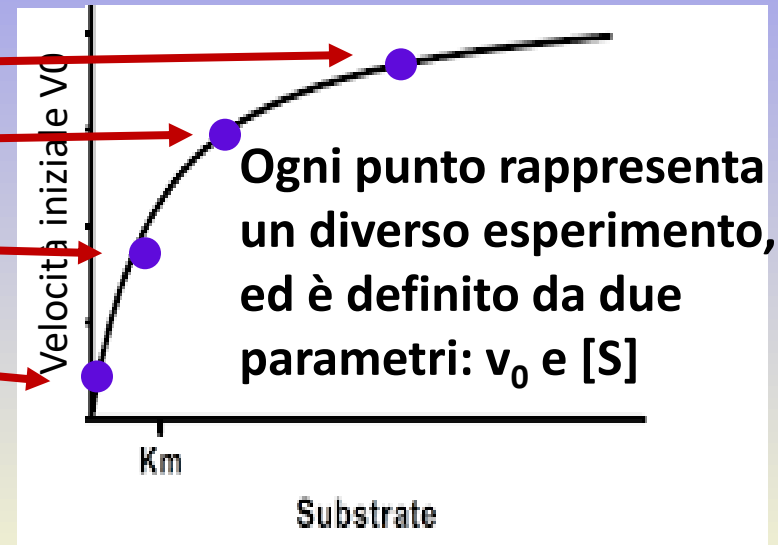
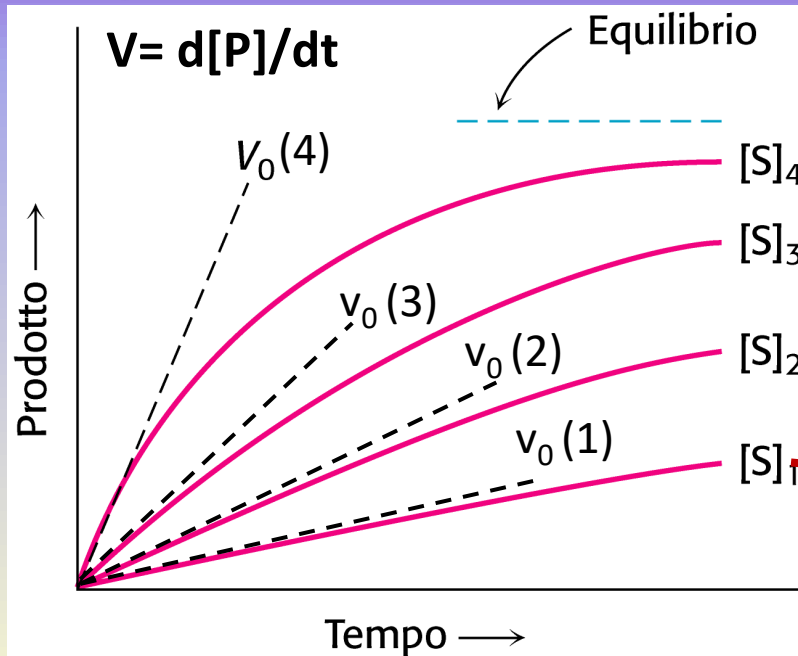
$$V = d[P]/dt$$



4) Calcolo il valore della velocità di reazione nello stadio iniziale (v_0) alle diverse $[S]$.

VELOCITA' INIZIALE (v_0) è calcolata come **pendenza della tangente al T0** alla curva cinetica.

Per ognuna delle curve cinetiche ottenute a diverse $[S]$ viene calcolata la v_0



- La v_0 è direttamente proporzionale alla concentrazione di reagente $[S]$ usata per la reazione.
- Per gli enzimi che seguono la cinetica di Micaelis-Menten la dipendenza della v_0 dalla $[S]$ è descritta da una curva iperbolica

K = cost cinetica velocità di formazione di P

ENZIMI CHE SEGUONO LA CINETICA DI MICHAELIS-MENTEN

Inserendo in un grafico i valori di v_0 ottenuti per le diverse $[S]$ utilizzate ottengo una curva iperbolica

Alte $[S]$ = la v_0 non varia molto al variare di $[S]$, l'enzima è quasi completamente saturato, viene raggiunta asintoticamente una velocità di reazione massima. La v_0 non dipende più da $[S]$.

Basse $[S]$ = la velocità di reazione v_0 dipende strettamente dalla $[S]$, aumenta all'aumentare della $[S]$

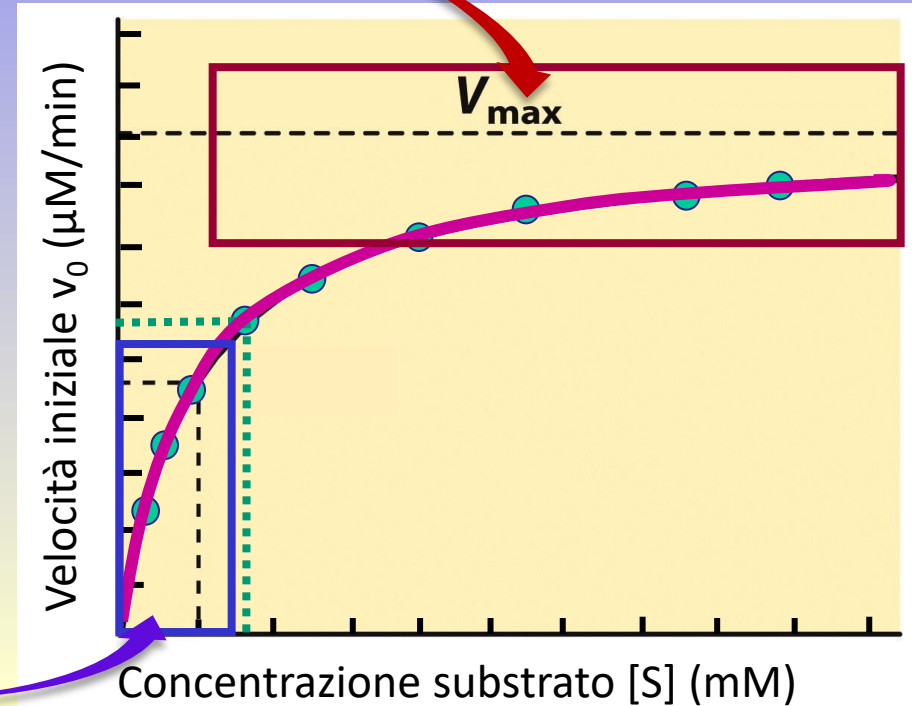
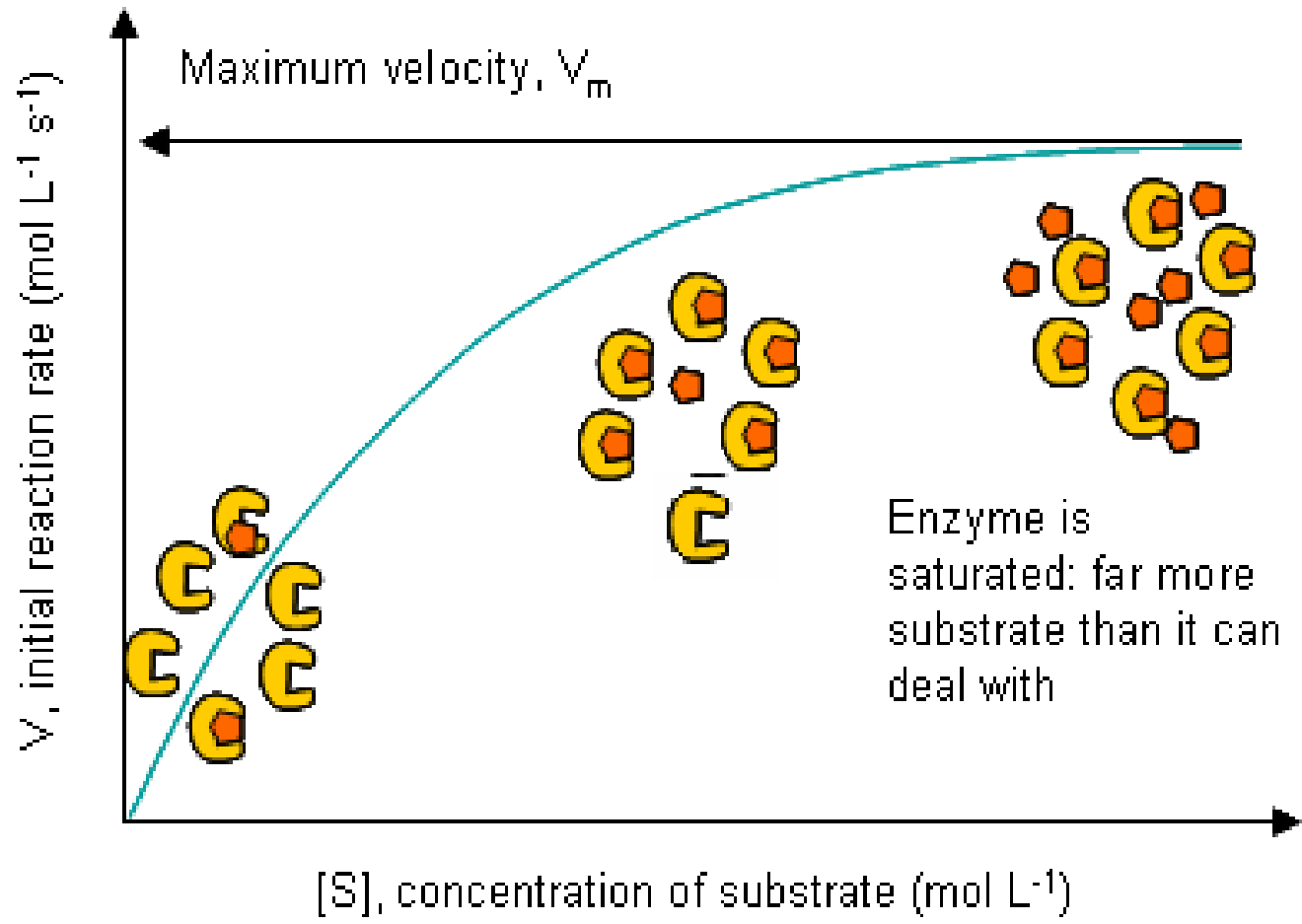


Figure 6-11
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

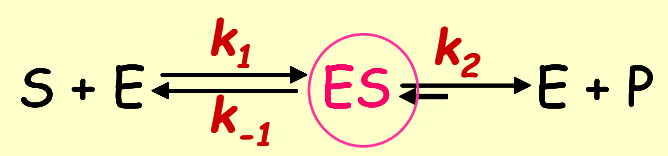


Se mettiamo in grafico V_0 in funzione di $[S]$, troviamo che:

- A bassi valori di $[S]$, la velocità V_0 , aumenta quasi linearmente con l'aumentare di $[S]$.
- Come $[S]$ aumenta, gli aumenti di V_0 diventano via via più piccoli (iperbole rettangolare).
- L'asintoto rappresenta la velocità massima della reazione, V_{\max}
- *velocità massima* (V_{\max}) riflette la saturazione con il substrato dei siti attivi delle molecole di enzima presenti.

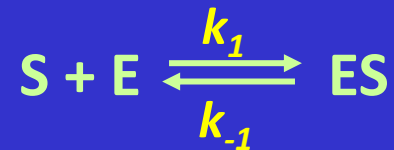
Posso spiegare questo comportamento con un'equazione che correla la v_0 alla $[S]$, alla V_{\max} e ad una costante di affinità (K_m)

ENZIMI CHE SEGUONO LA CINETICA DI MICHAELIS-MENTEN

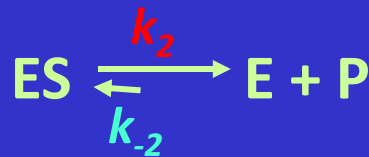


Mostrano una dipendenza della velocità iniziale (v_0) dalla concentrazione di substrato di tipo IPERBOLICO.

Catalizzano una reazione enzimatica che nel caso più semplice prevede:
1 prima tappa veloce e reversibile (ΔG^\ddagger minore e k maggiore)



1 seconda tappa lenta e irreversibile (ΔG^\ddagger maggiore e k minore) che determina la velocità globale di reazione



$$v_0 = k [S]$$

k_1 = cost cinetica velocità di formazione del complesso ES

k_{-1} = cost cinetica velocità di decomposizione del complesso ES in E + S

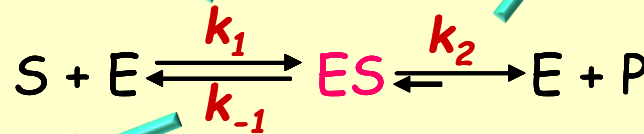
k_2 = cost cinetica velocità di decomposizione del complesso ES in E + P

k_{-2} = talmente piccola da essere trascurabile (al $t_0 \gg [P]=0 \gg k_{-2}[E]$ $[P]=0$)

$$v = k_1 [E] [S]$$

$$v = k_2 [ES]$$

1a tappa:
Passaggio rapido



2a tappa: Passaggio lento

$$v = k_{-1} [ES]$$

La v_0 GLOBALE della reazione enzimatica dipende da $[ES]$

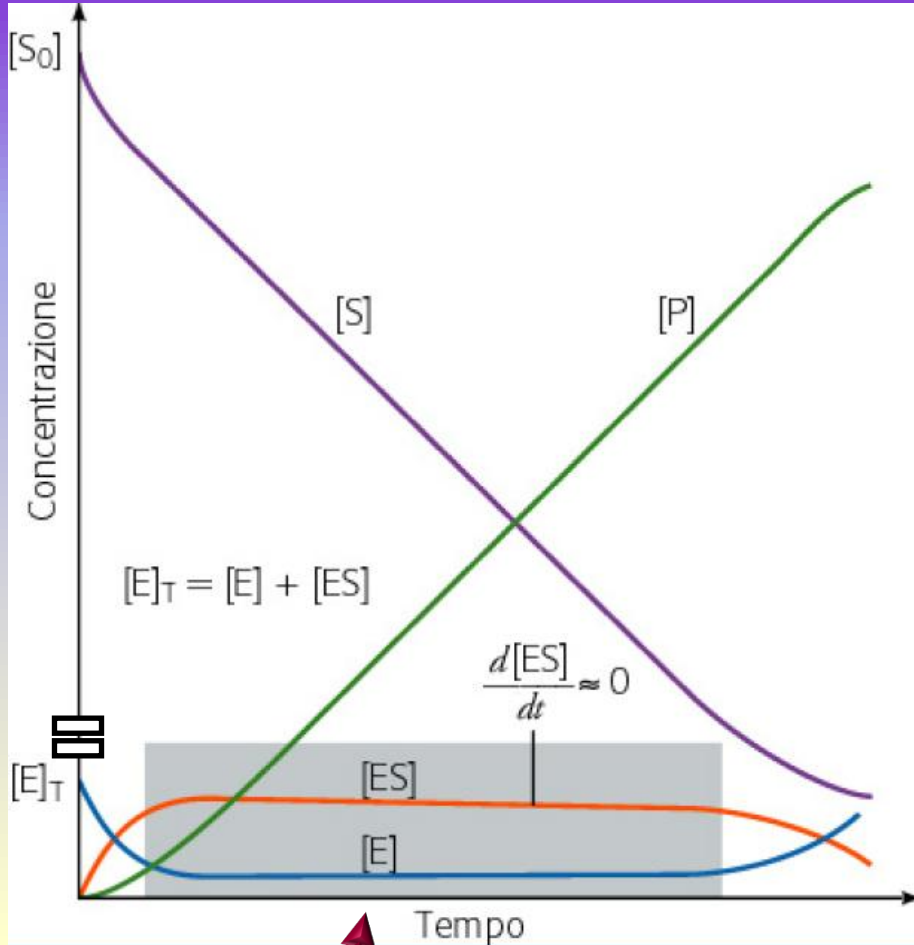
Questa equazione non è sufficiente a spiegare la relazione iperbolica esistente tra v_0 e $[S]$.

$$v_0 = k_2 [ES] = d[P]/dt$$

$[ES]$ = non è facilmente misurabile, e k_2 non è nota

Bisogna ricavare un'equazione alternativa partendo dalla considerazione che la $[ES]$ rimane costante nel tempo della reazione, STATO STAZIONARIO

STATO STAZIONARIO = COMPLESSIVAMENTE [ES] RIMANE COSTANTE NEL TEMPO



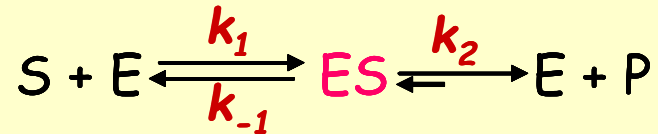
La concentrazione **dell'enzima libero** $[E]$ in soluzione diminuisce man mano che aumenta la concentrazione del complesso $[ES]$.

Ma poiché il complesso ES è demolito continuamente (in $E + S$ o in $E + P$), l'ENZIMA è di nuovo reso libero.

STATO STAZIONARIO

la concentrazione TOTALE di Enzima è $[E]_{TOT} = [E] + [ES]$

[ES] rimane costante: la velocità della sua formazione è uguale alla velocità della sua demolizione



Velocità di Formazione di ES

(E + S → ES):

$$V = k_1 [E] [S]$$

Velocità di Demolizione di ES

(ES → S + E ES → P + E):

$$V = (k_{-1} [ES])+ (k_2 [ES]) = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

[E] = [E]_{TOT} - [ES] poiché la concentrazione TOTALE di Enzima è [E]_{TOT} = [E] + [ES]

Se è raggiunto lo stato stazionario posso dire che:

$$V \text{ formazione ES} = V \text{ demolizione ES}$$
$$k_1 ([E]_{TOT} - [ES]) [S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Riarrangiando l'equazione per esplicitare le costanti si ottiene che:

$$\frac{([E]_{TOT} - [ES]) [S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Costante di Michaelis-Menten


$$\frac{([E]_{TOT} - [ES]) [S]}{[ES]} = K_m$$

Semplificando i termini dell'equazione precedente ed esplicitando la ES si ottiene che:

$$[ES] = \frac{([E]_{TOT} - [ES]) [S]}{K_m}$$

$$v_0 = k_2 [ES] \text{ e quindi:}$$

Poiché la v_0 globale di reazione è :


$$v_0 = \frac{k_2 [E]_{TOT} [S]}{[S] + K_m}$$

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_{TOT} [S]}{[S] + K_m}$$

$$k_2 [E]_{TOT} = V_{max}$$

Introduciamo un altro parametro importante: la Velocità massima di reazione. Quando sono presenti nella miscela di reazione concentrazioni saturanti di substrato, allora, tutto l'enzima è complessato col substrato:

$$[E]_{TOT} = [ES] \text{ e la } v_0 = v_{Max}$$

La velocità globale di reazione non dipende più dalla concentrazione di substrato, ma solo dalla concentrazione totale dell'enzima:

$$v_0 = k_2 [ES] \text{ diventa } V_{max} = k_2 [E]_{TOT}$$

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m}$$

→ EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

Equazione di Michaelis-Menten

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

La velocità iniziale della reazione enzimatica dipende dalla $[S]$ in modo iperbolico ed è correlata alla

V_{\max} ($= k_2[E]_{\text{tot}}$) e alla K_m

Il valore della K_m si può determinare sperimentalmente = Corrisponde alla $[S]$ alla quale raggiungo la metà della V_{\max} . Ha le unità di **misura di una concentrazione**

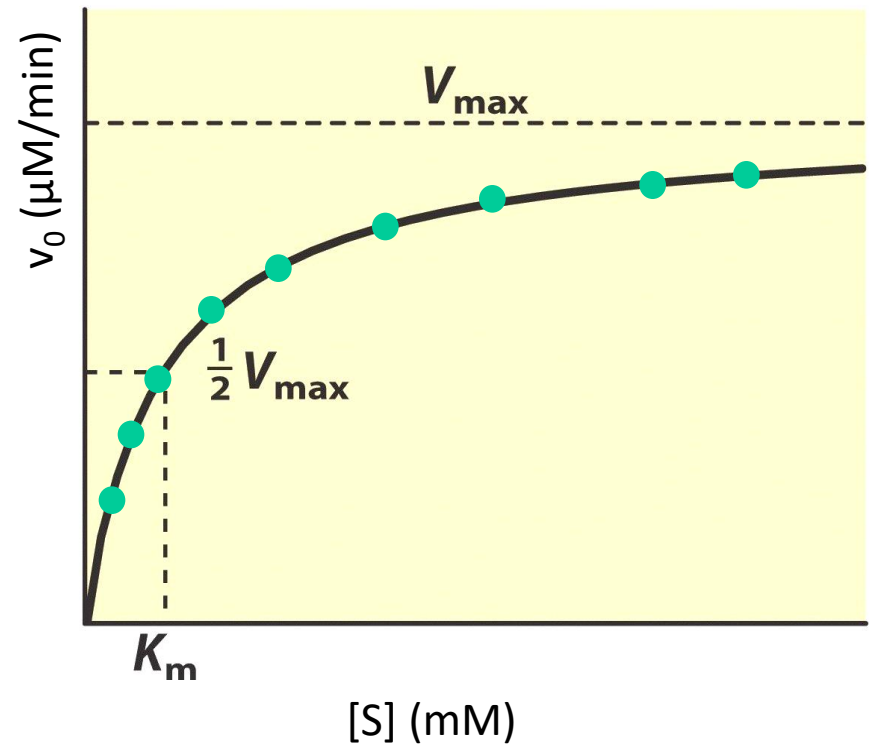
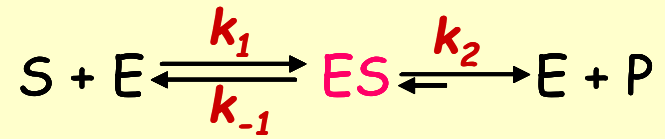
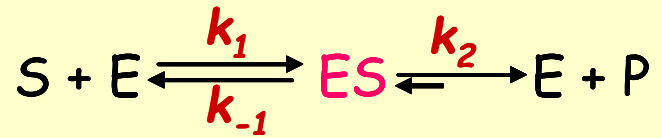


Figure 6-11
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Caratteristiche della K_m

- La K_m è pari alla *concentrazione di substrato* alla quale la *velocità della reazione (v_0)* è *1/2 della V_{max}* .
- *Ogni enzima* ha una K_m *caratteristica* per un *particolare substrato*.
- La K_m *non varia* al variare della [E].
- La K_m riflette *l'affinità dell'enzima per il substrato*:
 K_m piccola, alta affinità dell'enzima per il substrato
 K_m grande, bassa affinità dell'enzima per il substrato.

La costante di Michaelis (K_M)



$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

($k_2 \ll k_{-1}$ = trascurabile)



$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s$$

K_s = costante di dissociazione ES \Rightarrow

$$K_m = K_s = \frac{[S][E]}{[ES]}$$

Misura dell'affinità di E per il suo S nel complesso ES

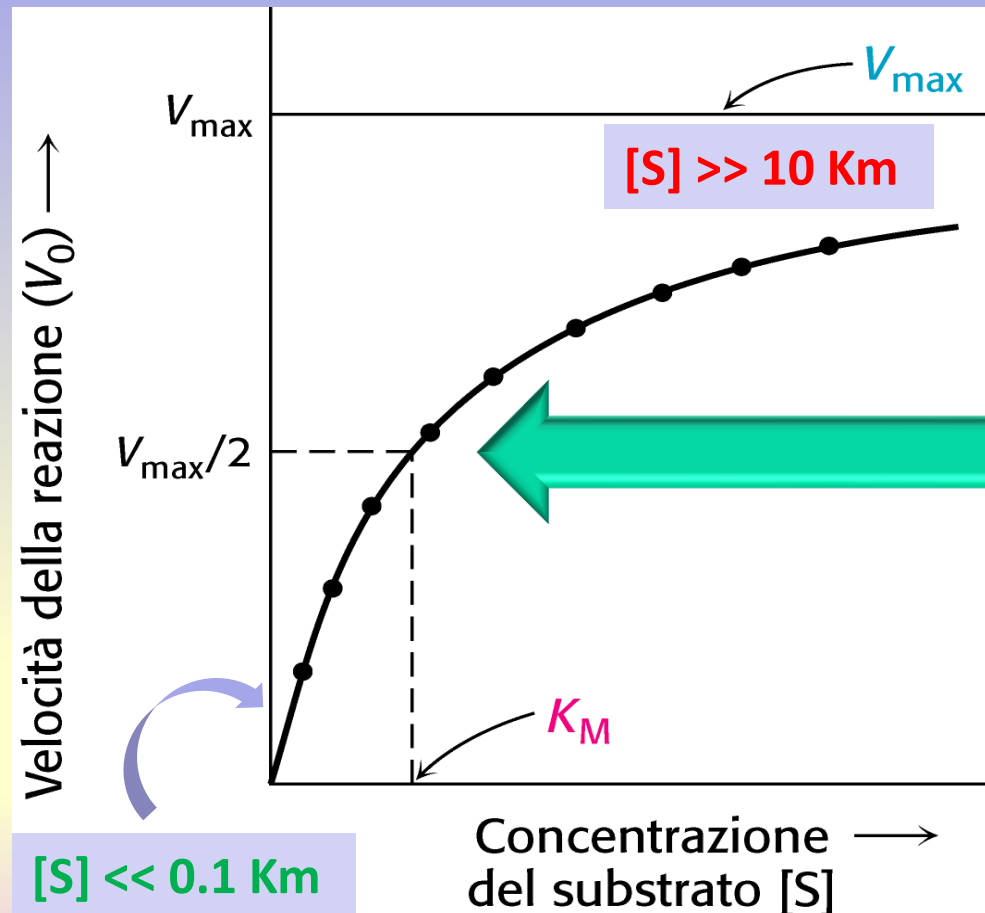
k_M k_M k_M k_M k_M k_M k_M

affinità

La K_M è la concentrazione del substrato alla quale la metà dei siti per il substrato sono saturati.

Quindi K_M fornisce una misura della conc di substrato richiesta affinché la catalisi abbia luogo

La K_m fornisce informazioni sulla efficienza della catalisi e sul controllo della velocità se $[S] \gg 10 K_m \rightarrow$ concentrazioni saturanti di substrato, la reazione è molto efficiente perché quasi a V_{max} , ma non controllabile variando la $[S]$
se $[S] \ll 0.1 K_m \rightarrow$ concentrazioni bassissime di substrato, la reazione non è efficiente ma la si può controllare variando $[S]$, poiché la v_0 aumenta all'aumentare della $[S]$.



Nelle cellule $[S] \approx K_m$
 \rightarrow la reazione ha velocità intermedia ed è regolabile variando $[S]$

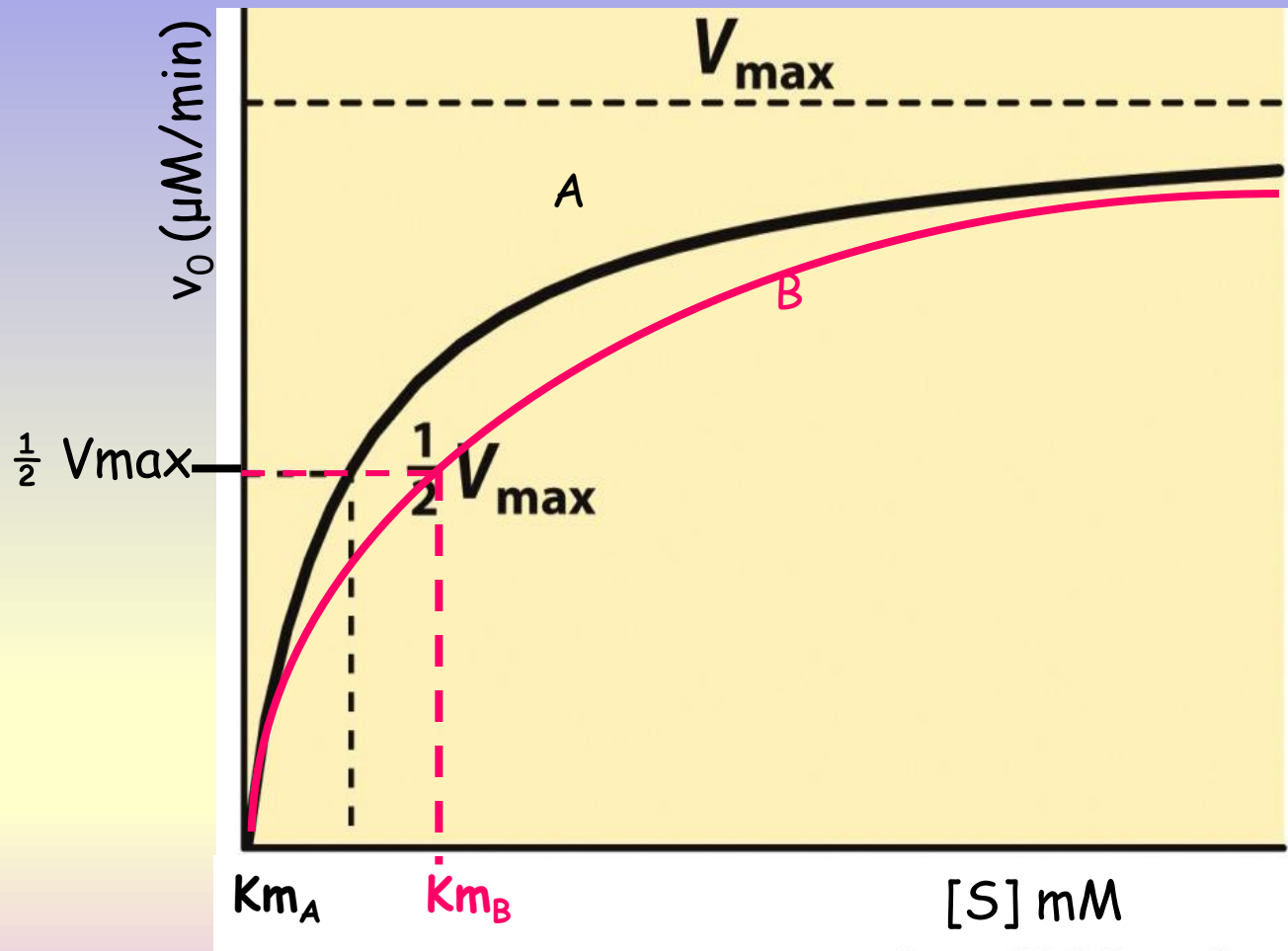
1 enzima

2 substrati simili A e B

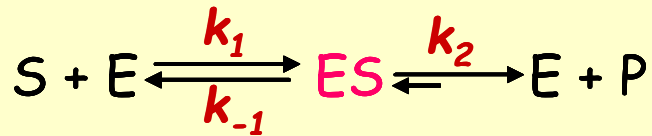
medesime condizioni di reazione

Verso quale dei due l'enzima è più affine?

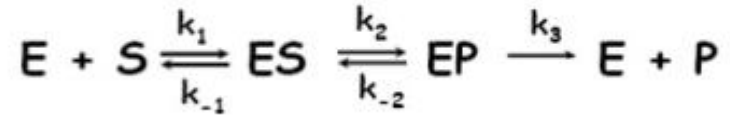
A



Costante catalitica K_{cat} è la tappa che limita la velocità di una reazione enzimatica **in condizioni di saturazione dell'E**



$$v_0 = k_2 [ES]: \quad V_{max} = k_2 [E]_{TOT}$$



$$V_{max} = k_{cat} [E]_{TOT}$$

$$K_{cat} = V_{max} / [E]_T$$

k_2 per una reazione semplice ad uno stadio corrisponde alla k_{cat} (*costante catalitica*)

Il numero di turnover misura la **velocità massima** di un enzima saturo di substrato, indicando quante molecole di substrato una singola molecola enzimatica converte in prodotto per unità di tempo (le sue unità di misura sono s^{-1} o min^{-1})

k_{cat} descrive la velocità massima che si raggiunge alla saturazione

k_{cat}/K_m indica l'efficienza catalitica, e valuta l'efficienza complessiva dell'enzima, tenendo conto sia della velocità (k_{cat}) che dell'affinità per il substrato (K_m).



k_{cat} k_{cat} k_{cat} k_{cat} k_{cat} k_{cat}



efficienza catalitica

le sue unità di misura sono s^{-1} o min^{-1}

Enzima	k_{cat}
catalasi	40 000 000
anidrase carbonica	1 000 000
acetilcolinesterasi	14 000
lattato deidrogenasi	1 000
chimotripsina	100
DNA polimerasi	15
lisozima	0,5



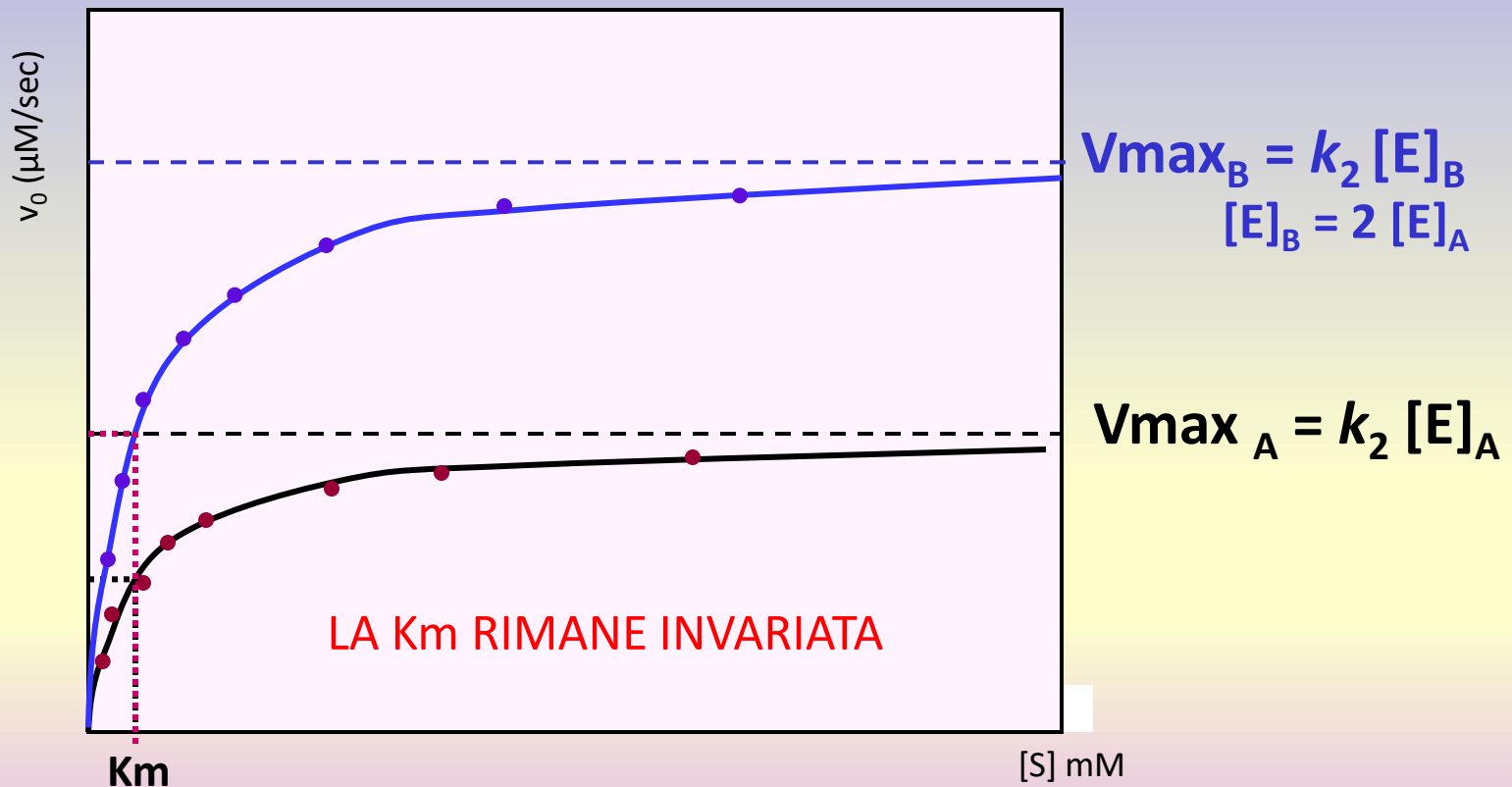
Se lavoro con una miscela di reazione enzimatica in cui utilizzo una [S] saturante e voglio raddoppiare la velocità di reazione cosa devo modificare nella miscela di reazione? In che modo?

$$v_0 = k_2 [ES]: \quad V_{\max} = k_2 [E]_{\text{TOT}}$$

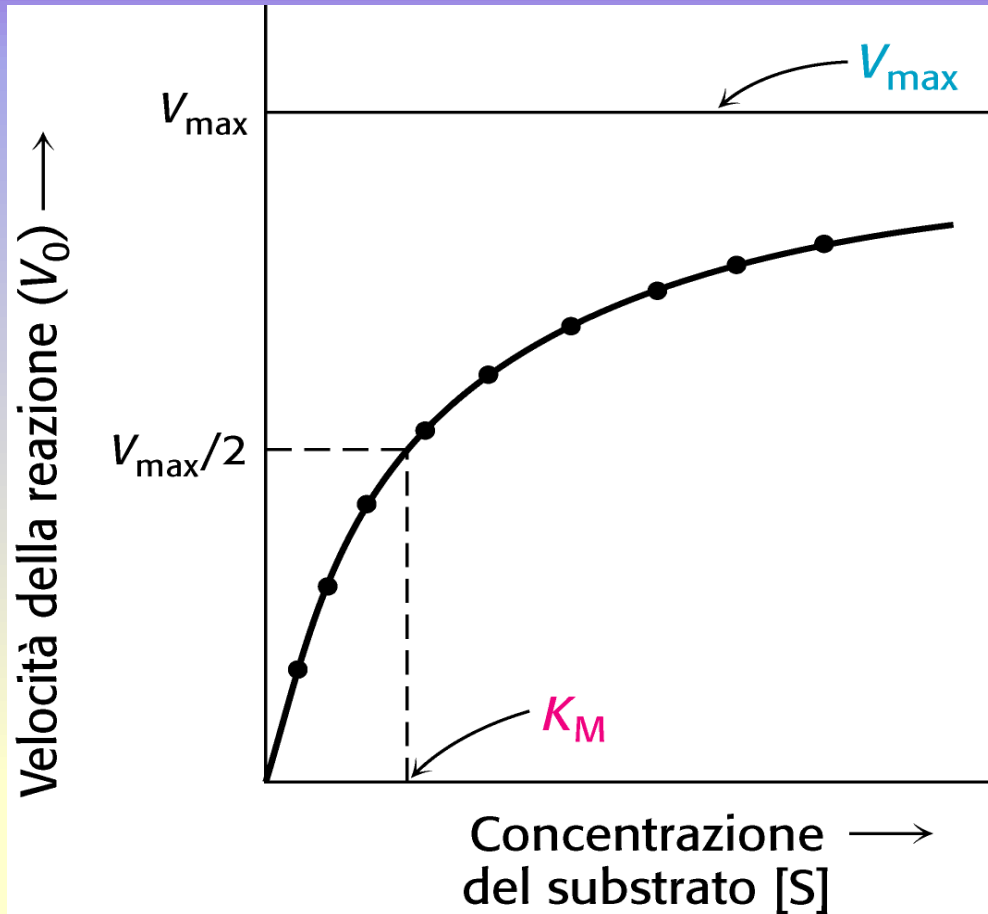
A [S] saturante la v_0 raggiunge il suo valore massimo (V_{max}), non può più variare in funzione della concentrazione di substrato, perché tutto l'enzima presente è saturato. Se voglio aumentare la Velocità di reazione devo aggiungere altro enzima alla miscela di reazione.

$$V_{max} = k_2 [E]_{tot}$$

per raddoppiare la velocità di reazione (V_{max})
devo raddoppiare la concentrazione dell'enzima



Determinazione sperimentale dei parametri cinetici K_M e V_{max}



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

La curva iperbolica tende ASINTOTICAMENTE verso la V_{max} ...
Ma non la raggiunge mai

Se il valore di V_{max} non è noto non può essere determinato neanche $\frac{1}{2} V_{max}$ quindi K_M

Determinazione sperimentale di Km e Vmax per una reazione enzimatica: GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI (Eq. di Lineweaver-Burk)

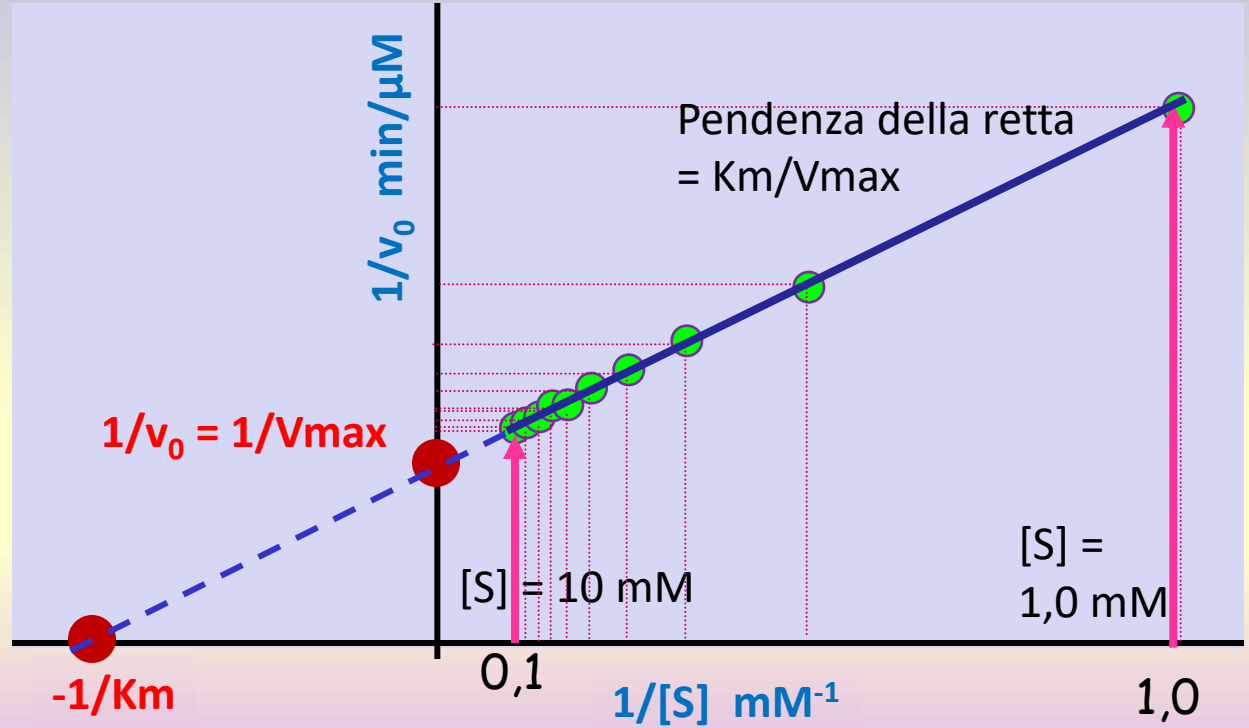
$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

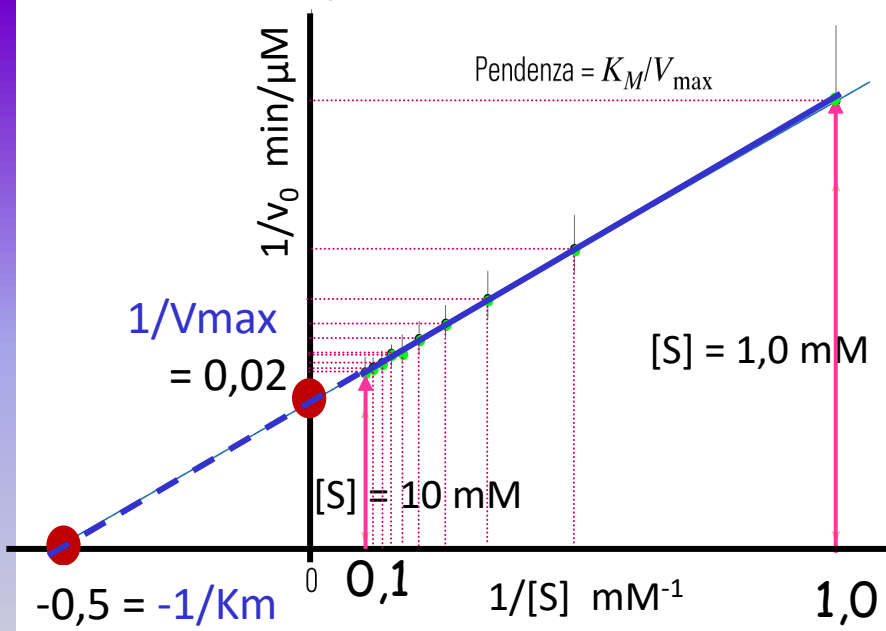
(linearizzazione della curva iperbolica) >>>>
$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

I valori sperimentali di v_0 sono trasformati nei loro reciproci: $1/v_0$
e i valori sperimentali di $[S]$ nei corrispettivi reciproci $1/[S]$



La curva iperbolica del grafico di Micaelis-Menten diventa una retta che interseca gli assi in punti precisi consentendo di determinare con esattezza Km e Vmax, e quindi anche k_{cat}





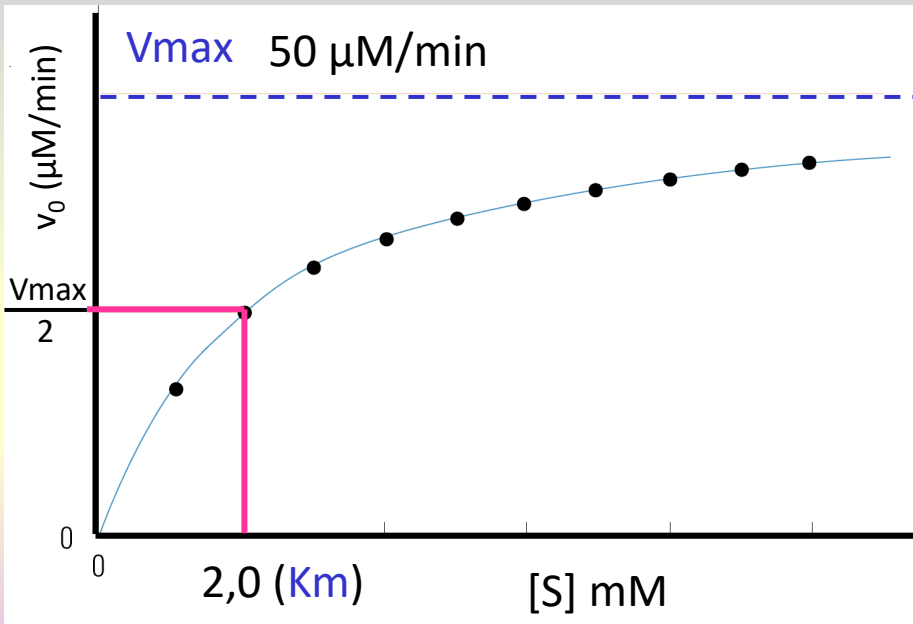
Per calcolare la V_{max} devo fare il reciproco del reciproco =

$$\frac{1}{V_{max}} = 0,02 \text{ min}/\mu\text{M} \rightarrow V_{max} = \frac{1}{0,02 \text{ min}/\mu\text{M}}$$

$$V_{max} = 50 \mu\text{M}/\text{min}$$

Per calcolare il valore della K_m devo fare il reciproco negativo del reciproco =

$$-1/K_m = -0,5 \text{ mM}^{-1} \rightarrow K_m = \frac{-1}{-0,5 \text{ mM}^{-1}} = 2 \text{ mM}$$



$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

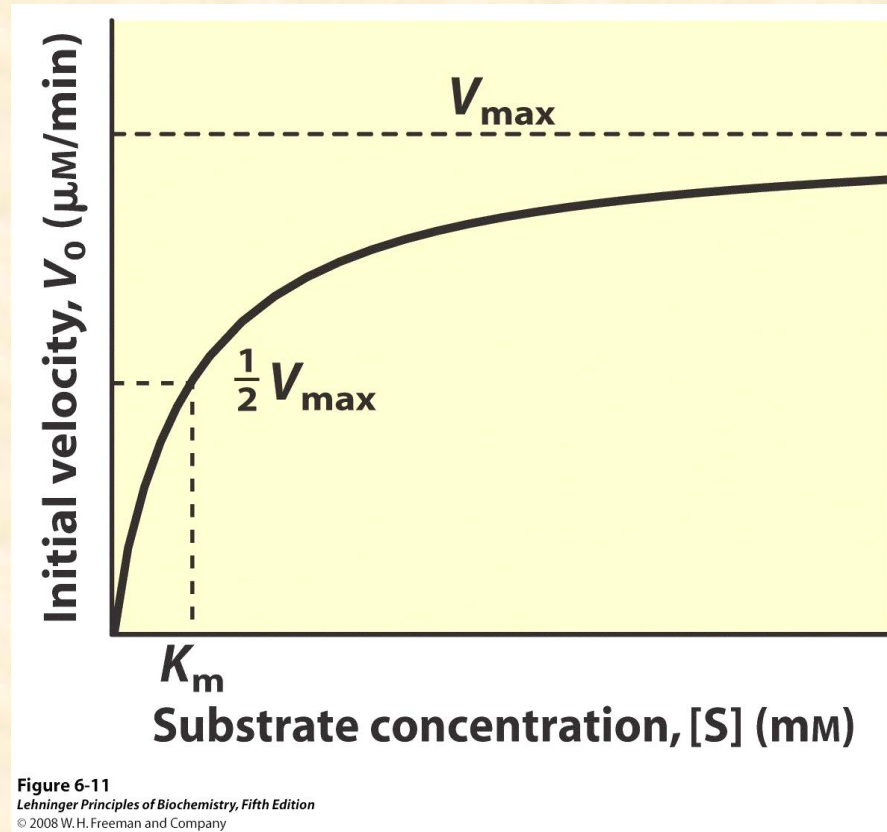
$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$



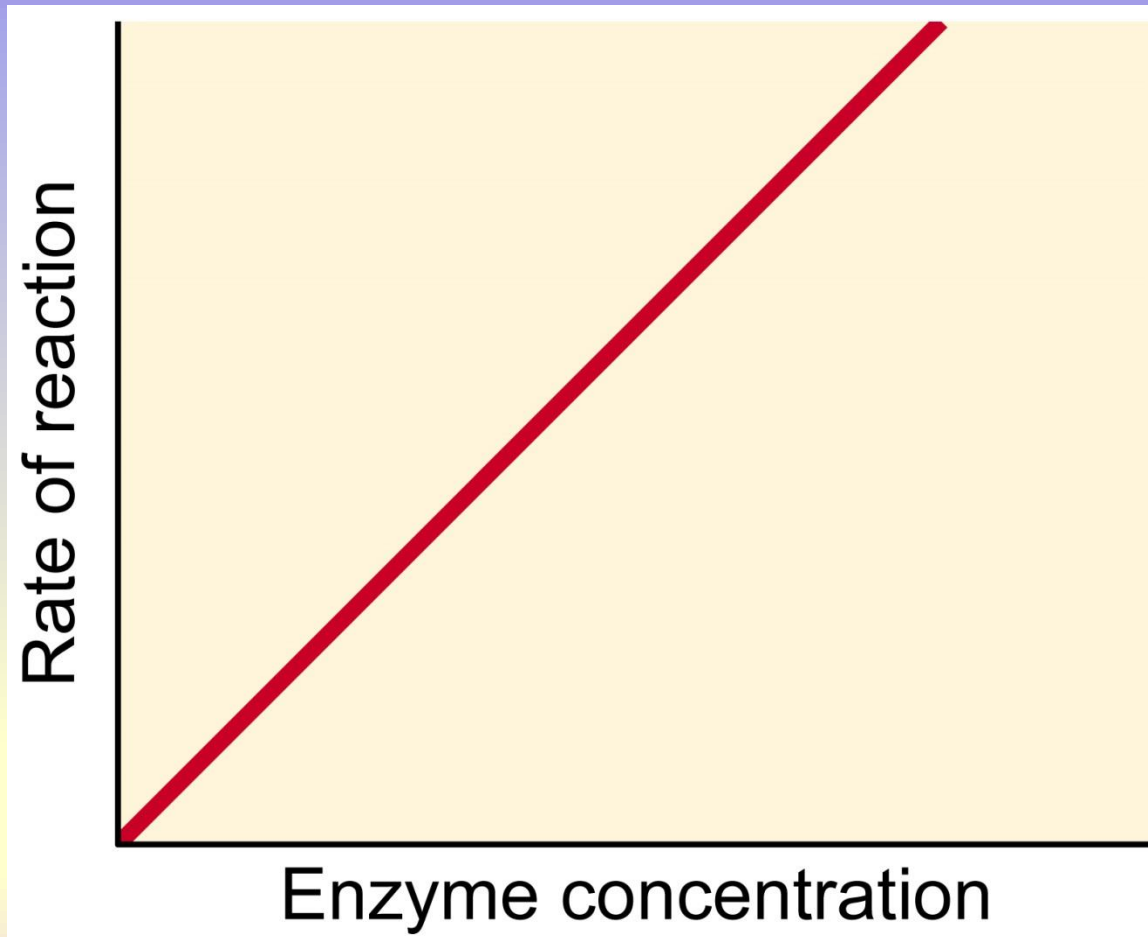
FATTORI CHE MODIFICANO LA VELOCITA' DELLE REAZIONI ENZIMATICHE:

- 1) [S] (iperbole rettangolare a causa della saturazione)**
- 2) [E] (relazione lineare)**
- 3) pH (curva a campana)**
- 4) temperatura (curva bifasica a causa della denaturazione)**

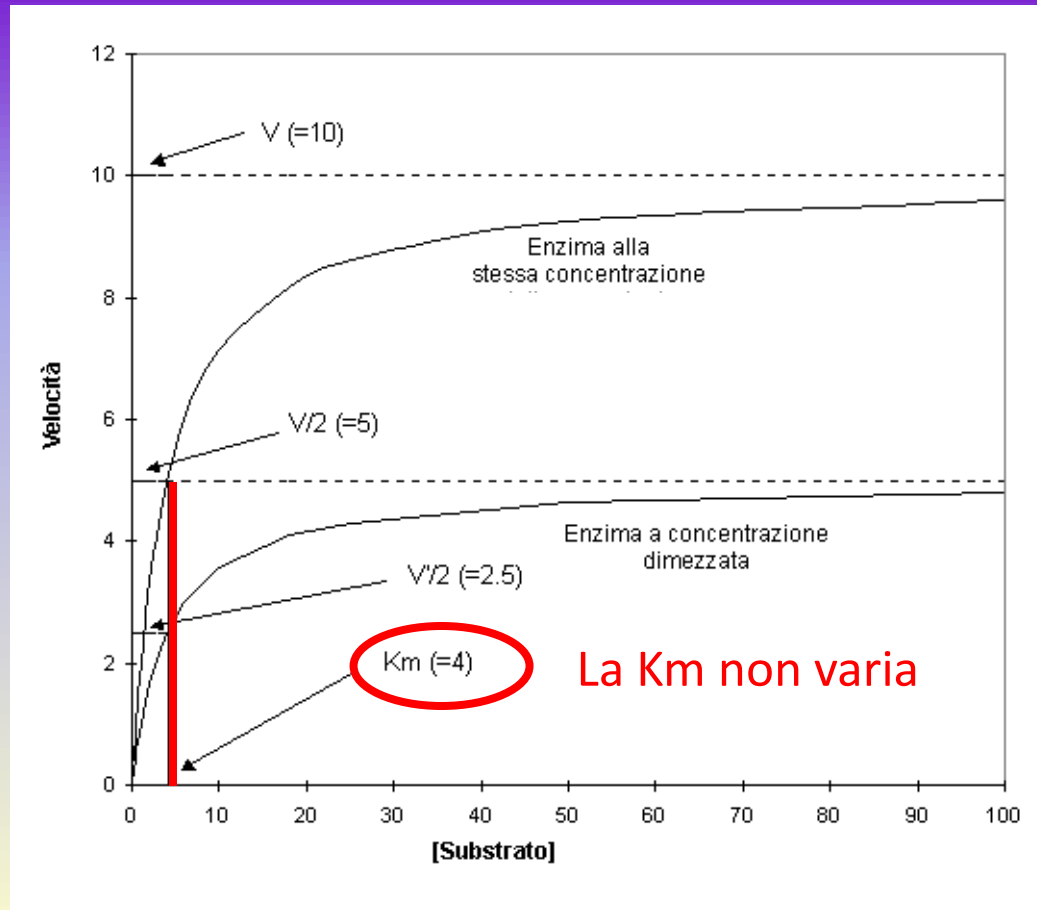
[S] (iperbole rettangolare a causa della saturazione)



[E]



Effetti della concentrazione dell'enzima



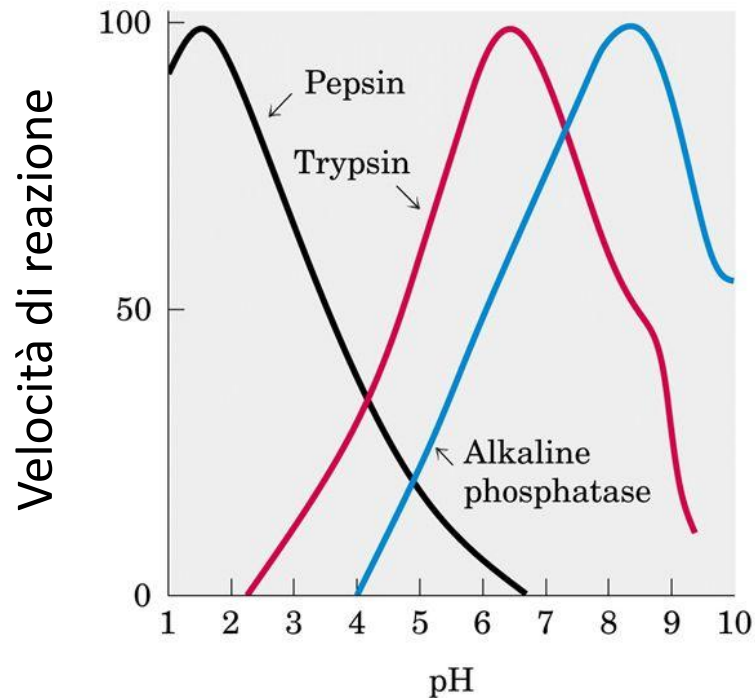
V_{max} è direttamente proporzionale alla $[E]$

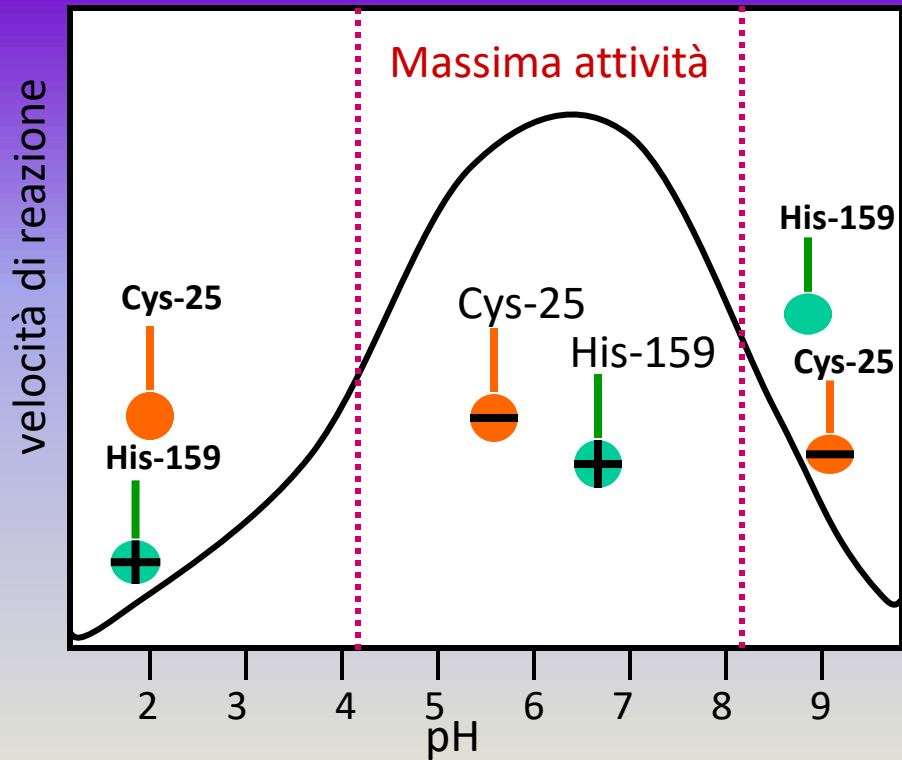
$$V_{max} = k_2 [ES] = k_2 [E]_{TOT}$$

Effetto del pH sulla velocità di una reazione enzimatica

Da ricollegare al diverso stato di protonazione delle catene laterali di residui amminoacidici che costituiscono il sito catalitico e il sito di legame per il substrato.

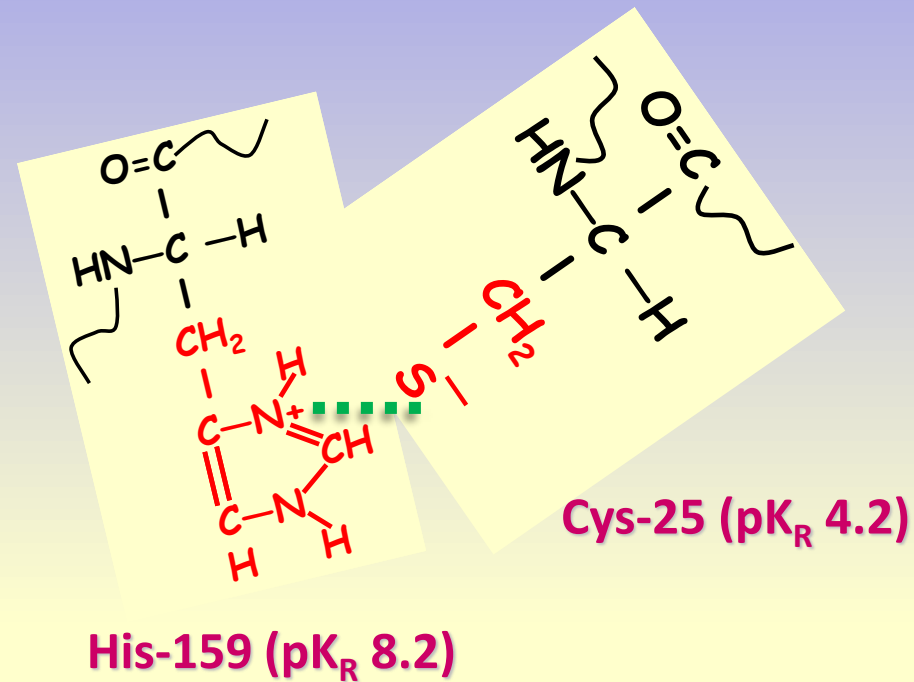
L'attività enzimatica dipende dal pH





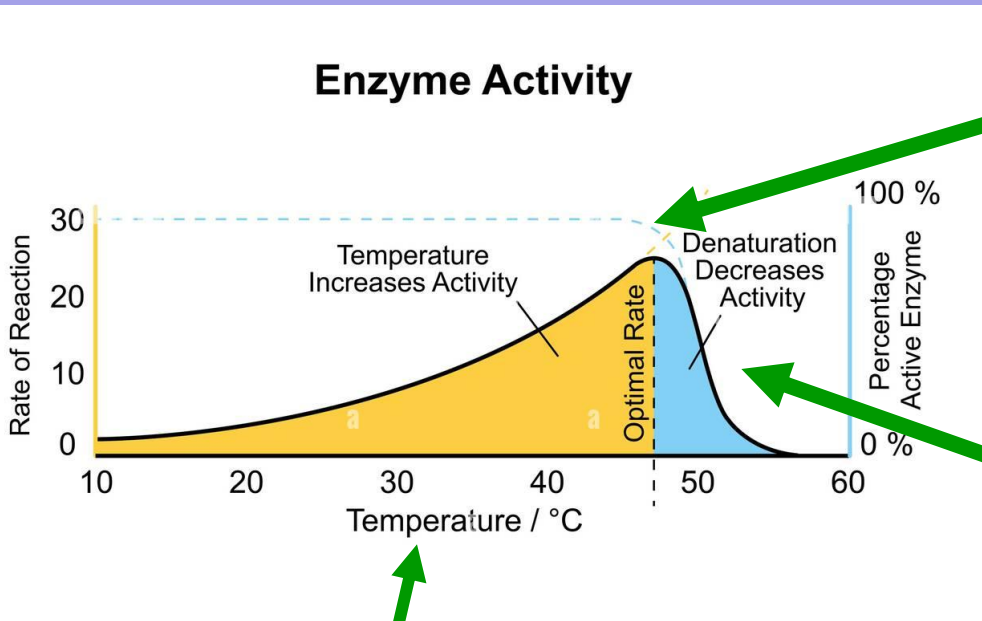
PAPAINA = enzima proteolitico, scinde i legami peptidici delle proteine. Nel sito attivo sono presenti una cisteina molto acida e un'istidina molto basica.

FORMANO UNA COPPIA IONICA



Massima attività: intervallo di pH compreso fra i pKa di due residui amminoacidici del sito attivo (fra pH 4.2 e 8.2). In questo intervallo le catene laterali di entrambi i residui amminoacidici sono ionizzati.

Effetto della temperatura sulla velocità di una reazione enzimatica >> CURVA BIFASICA



Optimum di temperatura: è diverso per i diversi enzimi

A T° superiori a quella ottimale:

- sono alterate le interazioni che consentono la formazione di ES;
- l'enzima va incontro a modificazioni strutturali del sito attivo (rottura dei legami deboli, denaturazione)

La velocità di reazione aumenta all'aumentare della temperatura sino a raggiungere un valore massimo (Mantenendo costanti pH, [E] e [S])

Inattivazione termica dell'enzima

Velocità della reazione (v_0)



20

40

60

80

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

Inibitori Enzimatici

Un **inibitore enzimatico** è una molecola che interferisce con l'attività catalitica di un enzima, rallentandola o bloccandola completamente.

Altera i valori di K_M e/o di V_{max} e/o K_{Cat} .

- Gli inibitori possono essere:
 - **REVERSIBILI** (Inibizione Reversibile)
 - **IRREVERSIBILI** (Inibizione Irreversibile)

INIBITORI ENZIMATICI

irreversibili $E + I \rightarrow EI$

reversibili $E + I \rightleftharpoons EI$

- a) competitivi

si legano a E nello stesso sito di S

- b) incompetitivi

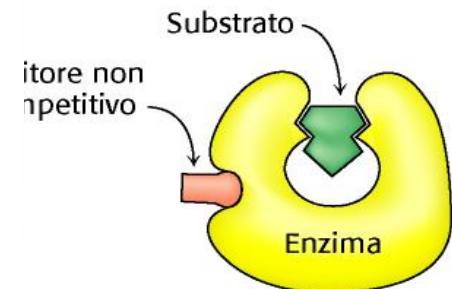
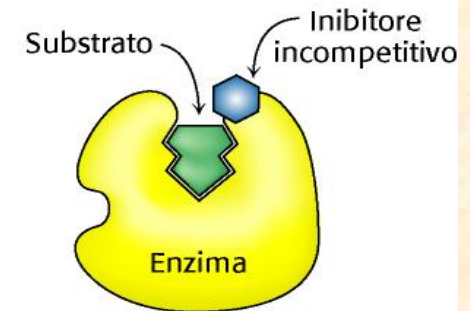
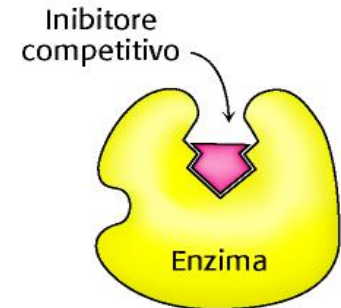
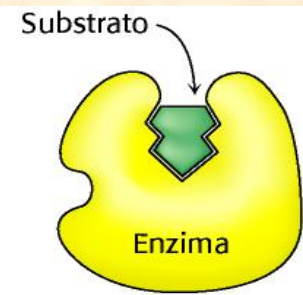
si legano a ES

- c) di tipo misto

si legano a E o a ES in un sito diverso da S

c') non competitivo

(caso particolare)



INIBIZIONE IRREVERSIBILE (**INATTIVATORI**)

Gli inibitori irreversibili si legano **FORTEMENTE** (in modo **COVALENTE** o **NON-COVALENTE**) all'enzima inattivandolo. Reagiscono con i gruppi funzionali del sito attivo impedendo al substrato di accedervi o impedendo la sua trasformazione.

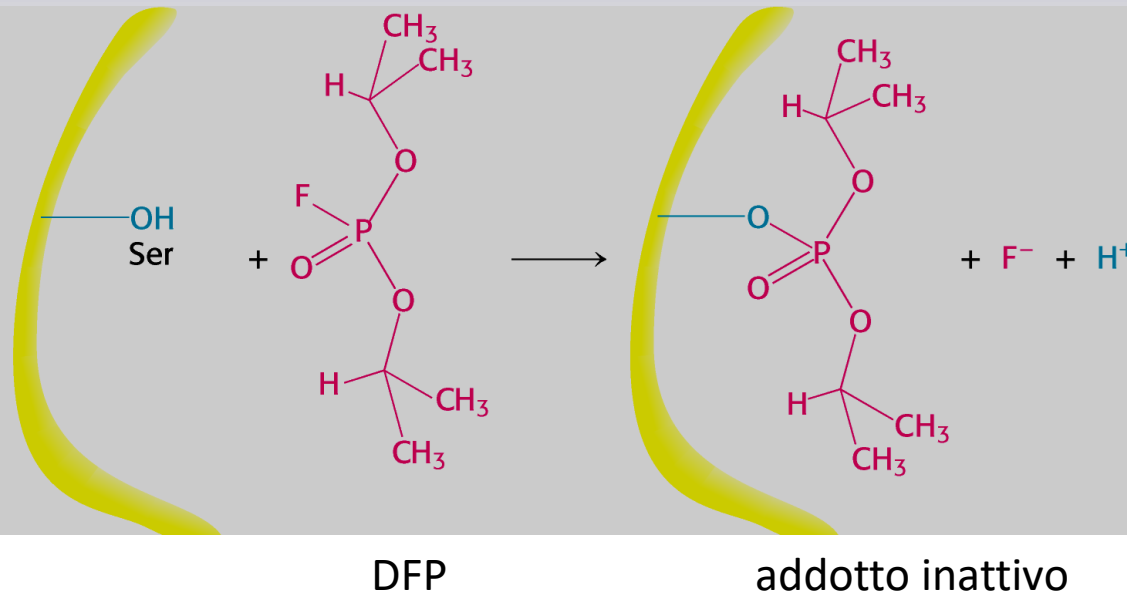
Analoghi dello stato di transizione

Bloccano enzimi con residui di Ser nel sito attivo: Proteasi seriniche (chimotripsina...); Esterasi a serina (Acetilcolinesterasi)

Es: composti organofosforici (**DFP (diisopropilfluorofosfato)**, gas nervini,

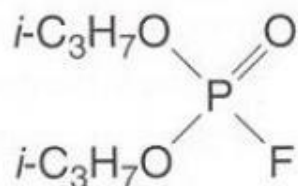


Sono composti con una **struttura tetraedrica intorno all'atomo di fosforo che assomiglia allo stato di transizione** della reazione catalizzata da tali enzimi. Stabiliscono interazioni col sito attivo che sono molto più forti di quelle che si otterrebbero nel complesso ES.

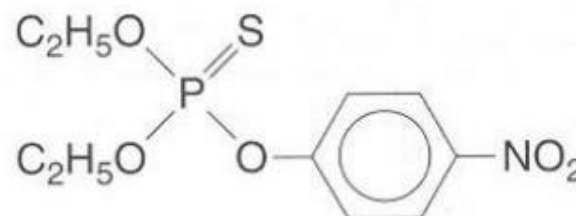


INIBITORI DELL'ACETILCOLINESTERASI (AChE)

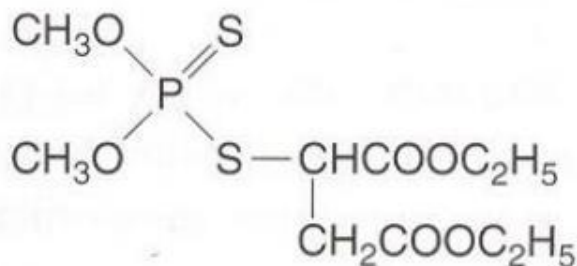
3a) irreversibili: insetticidi organofosforici



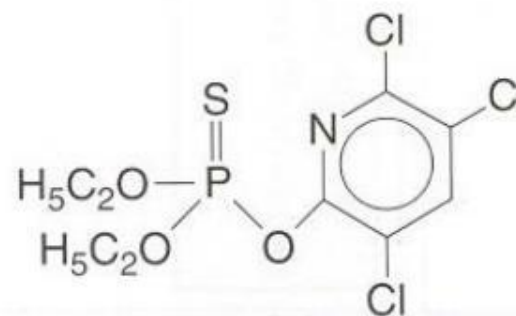
DFP
(DIIDROPROPILFLUOROFOSFATO)



PARATHION



MALATHION



CLORPIRIFOS

INIBIZIONE ENZIMATICA REVERSIBILE

La reazione enzimatica in vitro o in vivo può essere INIBITA REVERSIBILMENTE. Un inibitore (I) legandosi all'enzima interferisce con la sua attività modificando la V_{max} , la K_m o entrambe.

Quando l'inibitore si lega all'enzima si stabilisce un equilibrio che porta alla formazione del complesso inattivo EI.



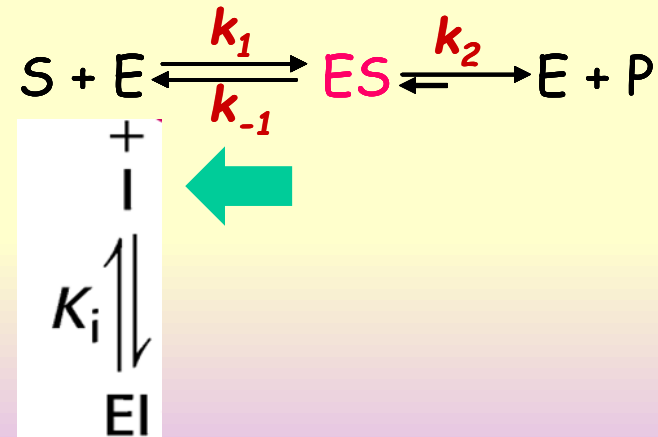
Tanto più piccola è la K_i (grande $[EI]$) tanto più potente è l'inibizione > Maggiore affinità

Principio di Le Chatelier

Si consideri una reazione chimica all'equilibrio. Se le condizioni di reazione vengono modificate la reazione si sposta dall'equilibrio e procede in una direzione o nell'altra fino a raggiungere una nuova condizione di equilibrio.

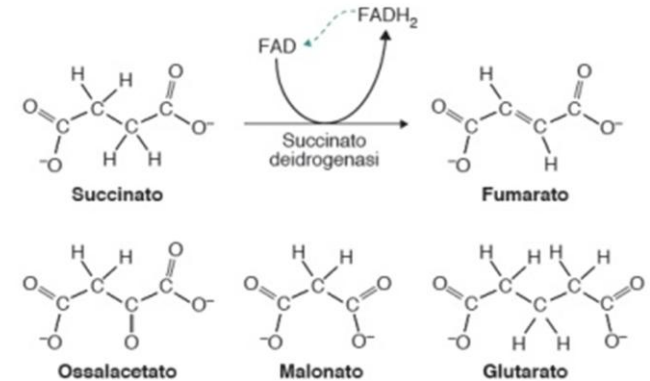
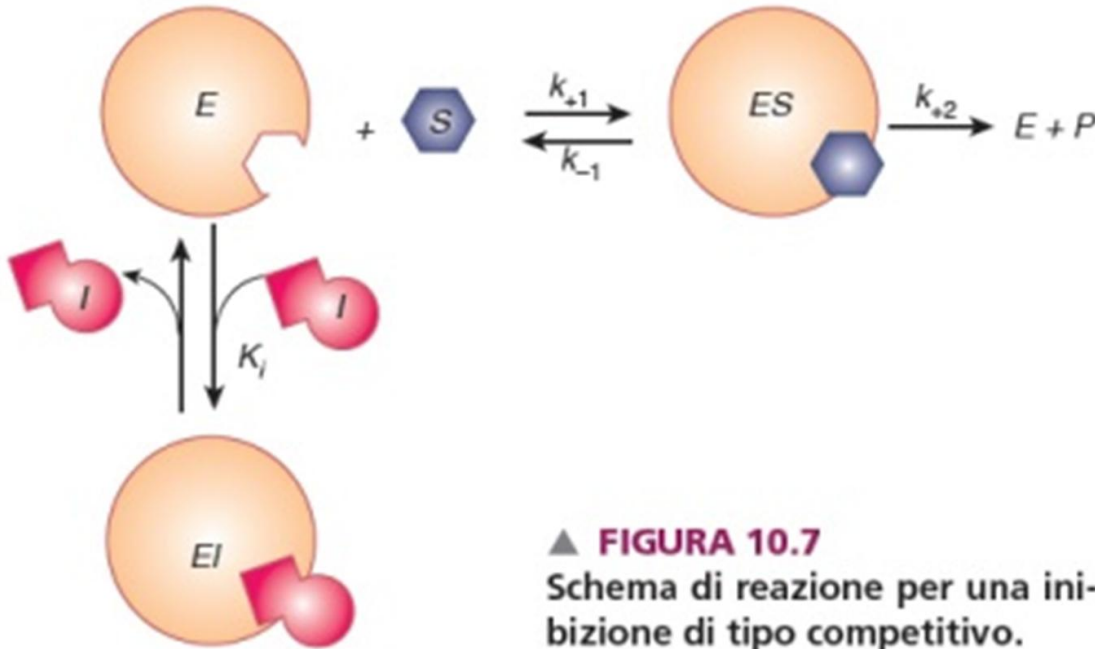
La direzione in cui la reazione si sposta può essere prevista usando il **principio di Le Chatelier**:

Quando un sistema all'equilibrio chimico viene perturbato mediante una variazione delle condizioni di reazione esso modifica la propria composizione all'equilibrio in modo da opporsi a tale variazione.



INIBITORI COMPETITIVI

Competono con il substrato per il sito attivo. Sono in genere analoghi strutturali del substrato. Rimuovono l'enzima dal ciclo catalitico naturale.



▲ **FIGURA 10.6**
La reazione catalizzata dalla succinato deidrogenasi e alcuni metaboliti strutturalmente analoghi al substrato che agiscono da inibitori competitivi dell'enzima.

SCHEMA DI REAZIONE DEL MODELLO DI INIBIZIONE COMPETITIVA

K_m aumenta/ V_{max} rimane invariata

In presenza di Inibitore **COMPETITIVO**:
Aumenta la dissociazione del complesso ES e quindi aumenta la k_{-1}



$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \rightarrow K_m \text{ aumenta (} K_{M_{app}} \text{)}$$

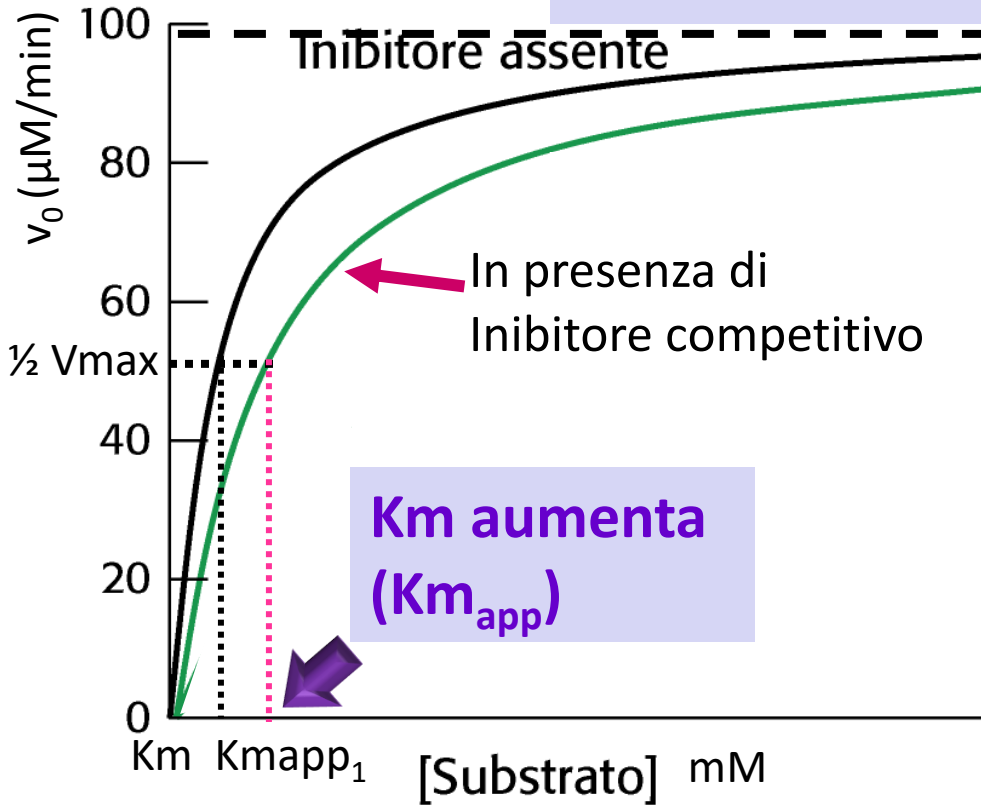
CONCENTRAZIONI
SATURANTI DI
SUBSTRATO

Sarà necessaria una maggiore $[S]$ per raggiungere $\frac{1}{2} V_{max}$

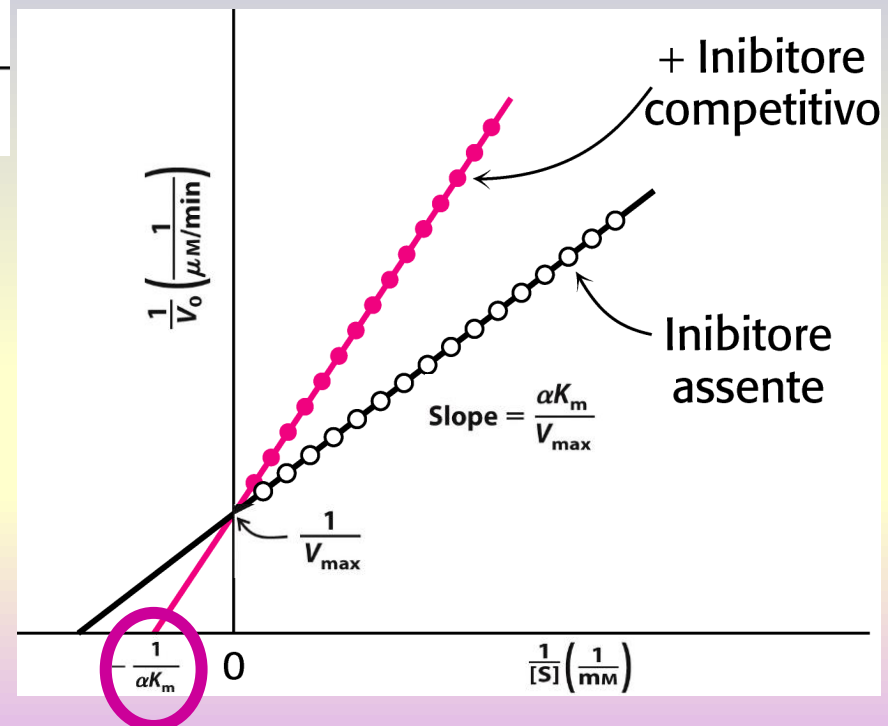
$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_{m_{app}} + [S]} \quad \alpha KM$$

V_{max} rimane inalterata,
In presenza di $[S]$ saturanti
l'inibitore è scalzato dal sito
attivo. ($V_{max} = k_2 [ES] = k_2 [E]_{tot}$)

Vmax inalterata



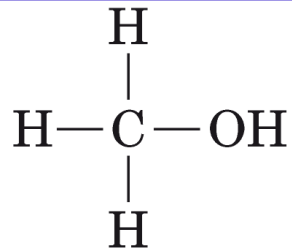
$1/V_{\text{max}}$ = invariato



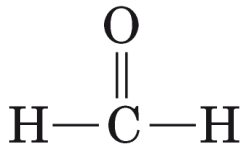
- $1/K_m$ = diventa meno negativo

Inibizione competitiva: il trattamento con etanolo dell'avvelenamento da metanolo

L'Etanolo è il più comune substrato dell'enzima: Alcool deidrogenasi (ADH), presente nel fegato. Altri alcoli possono essere substrati di quest'enzima: per es. il METANOLO



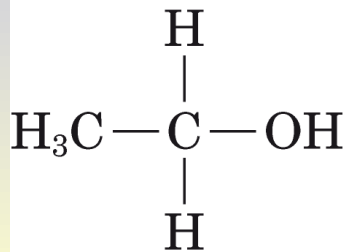
Metanolo



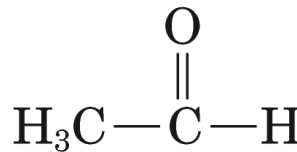
Formaldeide



Intossicazione da metanolo: è trasformato in un prodotto tossico che NON può essere metabolizzato.



Etanolo



Acetaldeide

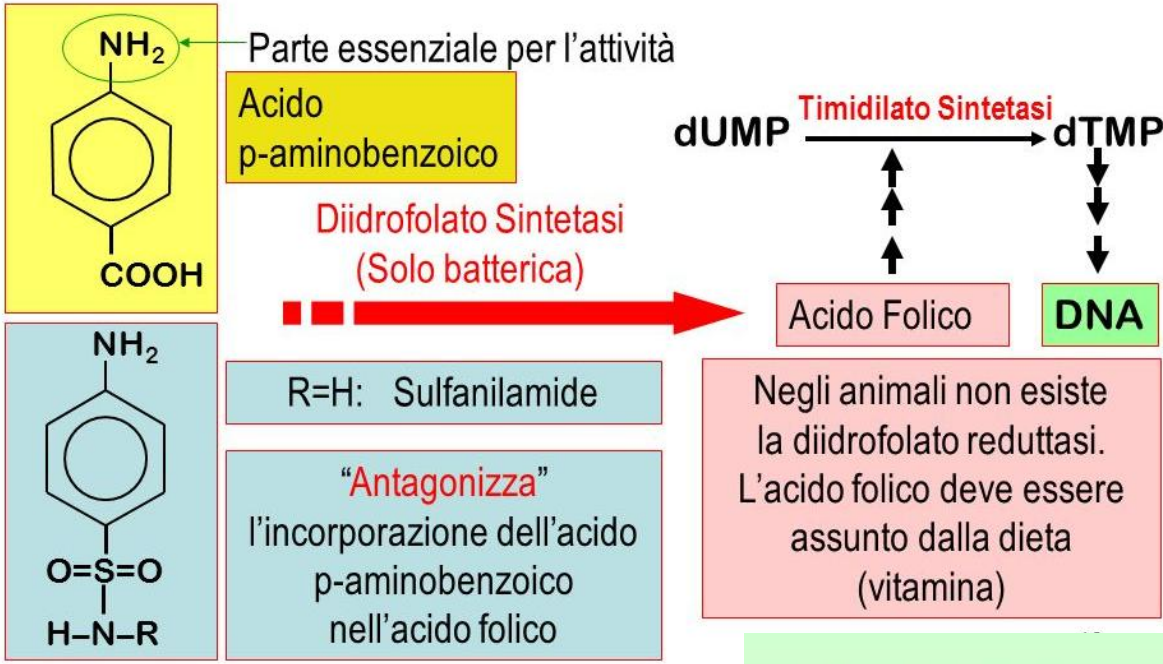


Può essere metabolizzata: non è tossica per l'organismo e viene convertita in acetato che può essere utilizzato dal fegato



Nei casi di intossicazione da metanolo si può usare un eccesso di etanolo, che va a competere per l'ADH e rimuove il metanolo dal sito attivo dell'enzima, consente quindi la rimozione di METOH attraverso i reni.

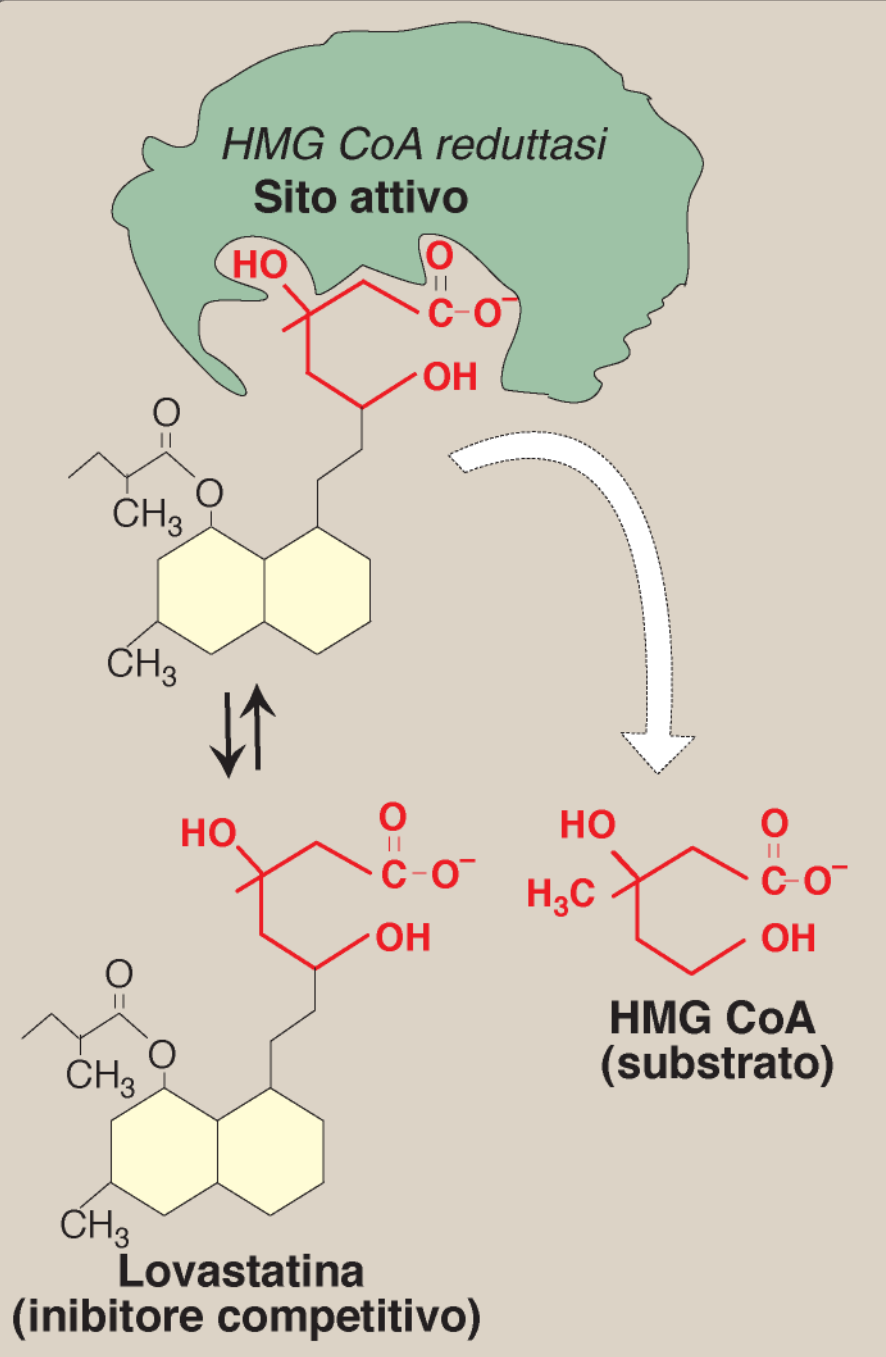
Es1: Antimetaboliti (sulfamidici, pro-farmaci analoghi di basi e nucleosidi purinici e pirimidinici)



Alcuni inibitori competitivi sono farmaci molto utili.

La sulfanilammide è un antibiotico contenente S strutturalmente identico all'acido p-amminobenzoico (PABA) un metabolita richiesto dai batteri per la sintesi dell'acido folico. La sulfanilammide si lega all'enzima che sintetizza la PABA e lo inibisce in modo competitivo inibendo la sintesi di acido folico.

**enzima chiave della
sintesi del colesterolo**

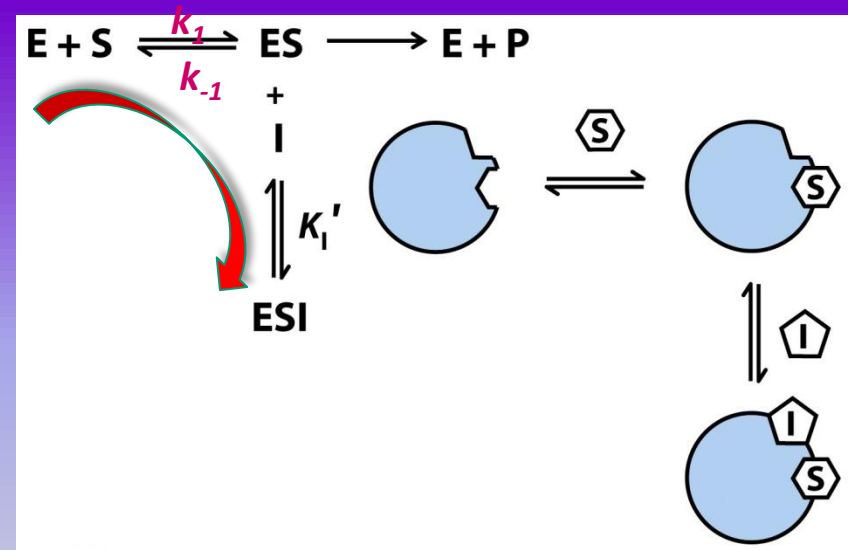


IN. INCOMPETITIVI (ACOMPETITIVI)

Si legano all'enzima solo dopo che si è già formato il complesso ES.

ES viene rimosso dal mezzo e quindi la **Vmax diminuisce**

$$(V_{max} = k_2 [ES] = k_2 [E]_{tot})$$



Se diminuisce [ES] tutto l'equilibrio si sposta verso la formazione di ES

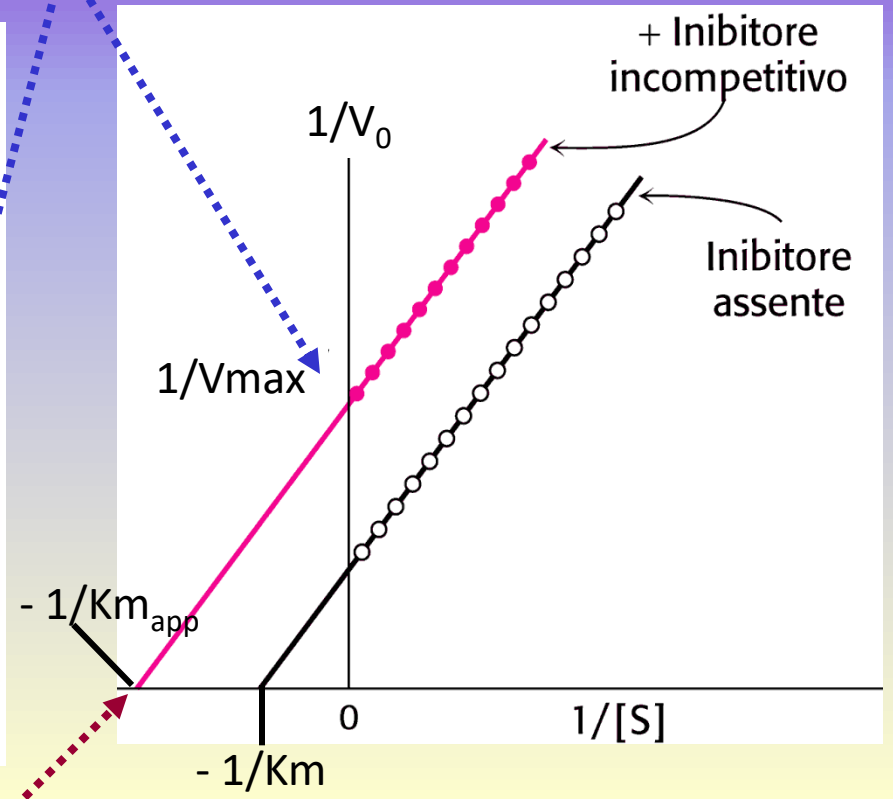
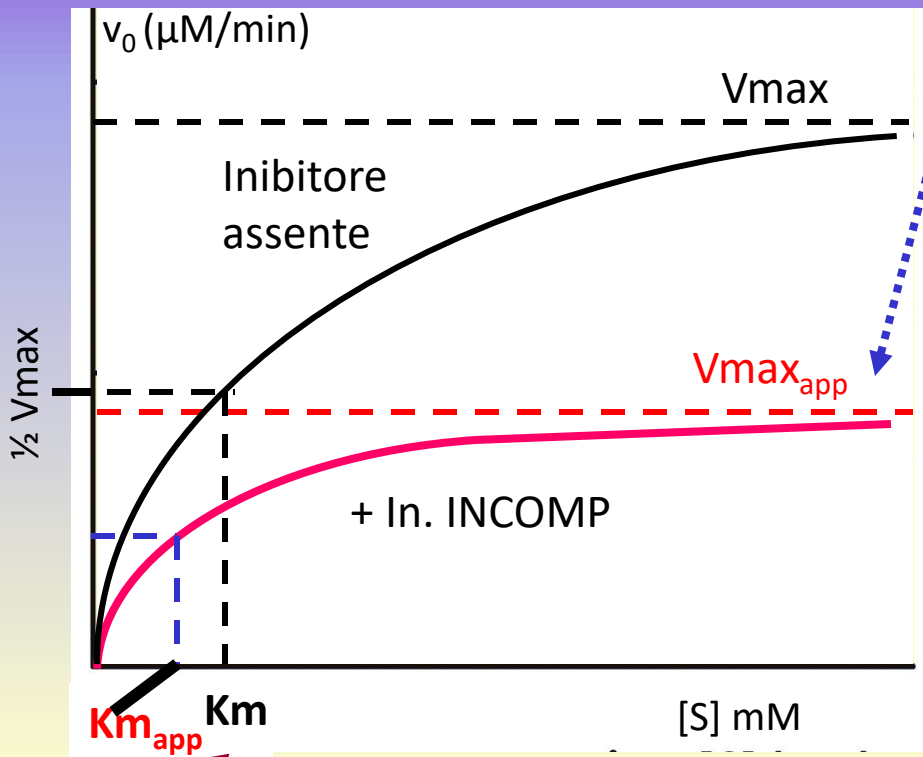
In presenza di In. INCOMP
aumenta la k_1 e quindi:

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \rightarrow K_m \text{ diminuisce } (K_{m_{app}})$$

Apparentemente aumenta l'affinità dell'enzima per il substrato

La V_{max} è più bassa in presenza di un inibitore incompetitivo

$1/V_{max}$ = aumenta perché diminuisce V_{max}



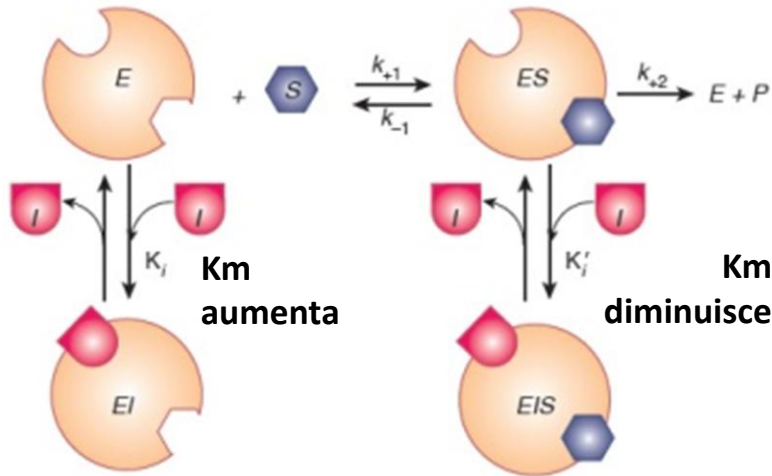
La K_m è più bassa in presenza di un inibitore incompetitivo

$$\frac{\alpha K_m}{\alpha V_{max}} = K_m / V_{max}$$

La pendenza della retta è la stessa

INIBITORE NON COMPETITIVO MISTO

Si legano all'enzima libero e al complesso ES.



▲ FIGURA 10.5
Schema di riferimento nello studio dell'inibizione reversibile di un enzima ad opera di un effettore diverso dal substrato.

L. Pollegioni
Fondamenti di Biochimica
EdiSES Edizioni

SE K_i e K_i' hanno diverso valore (il legame con il S influenza l'affinità di legame dell'I):

Diminuisce la V_{max} (perchè il Complesso ES è sottratto dal mezzo).

La K_m si modifica,

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Se $K_i < K_i'$ (I maggiore affinità per E)
allora **aumenta la k_{-1}**

OVVERO

AUMENTA K_M

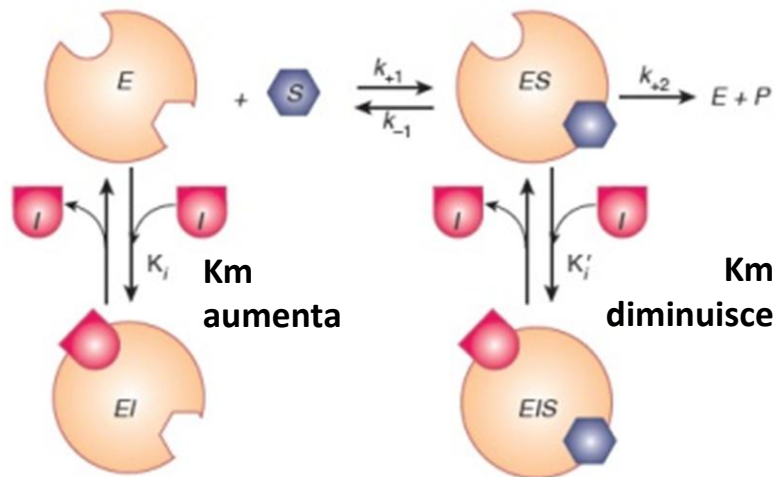
Se $K_i > K_i'$ (I maggiore affinità per ES)
allora **aumenta la k_1**

OVVERO

DIMINUISCE K_M

$$K_{diss} = K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

INIBITORE NON COMPETITIVO PURO



▲ FIGURA 10.5
Schema di riferimento nello studio dell'inibizione reversibile di un enzima ad opera di un effettore diverso dal substrato.

Si legano all'enzima libero e al complesso ES.

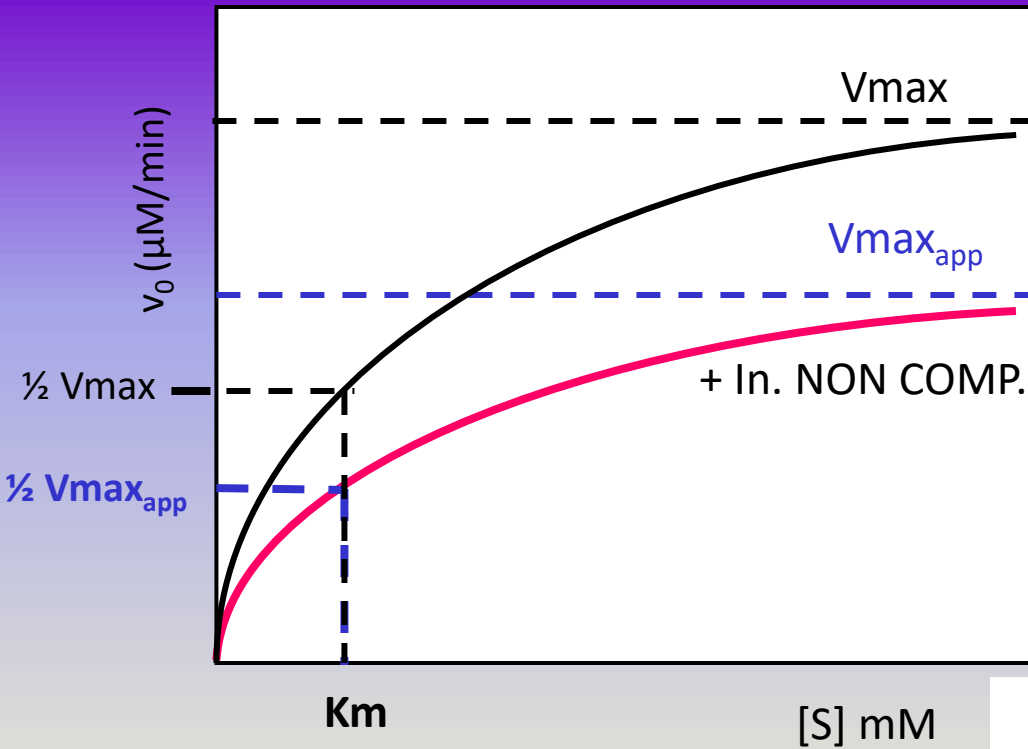
SE K_i e K'_i hanno lo stesso valore (il legame con il S non influenza l'affinità di legame dell'I):

Diminuisce la V_{max} (perché il Complesso ES è sottratto dal mezzo).

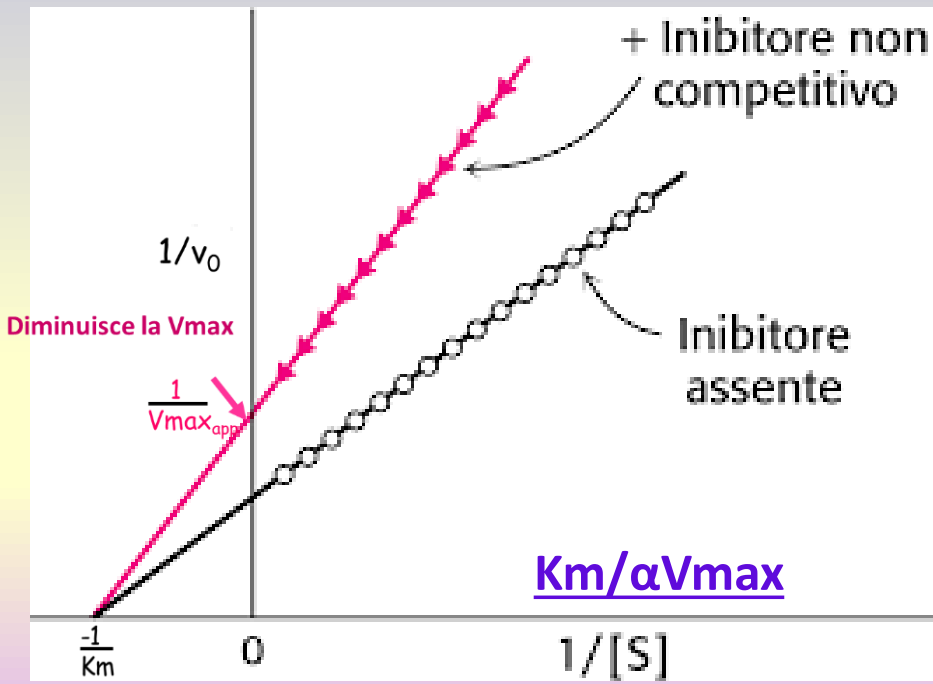
La K_m rimane invariata, perché l'inattivazione dell'enzima libero ($E \rightarrow EI$) e quella del complesso ($ES \rightarrow ESI$) avvengono con la stessa velocità.

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Diverse sostanze tossiche sono inibitori non competitivi di enzimi: METALLI PESANTI (MERCURIO, PIOMBO) inibiscono numerosi enzimi agendo sui gruppi -SH di residui di cisteina dell'enzima o di cofattori enzimatici.

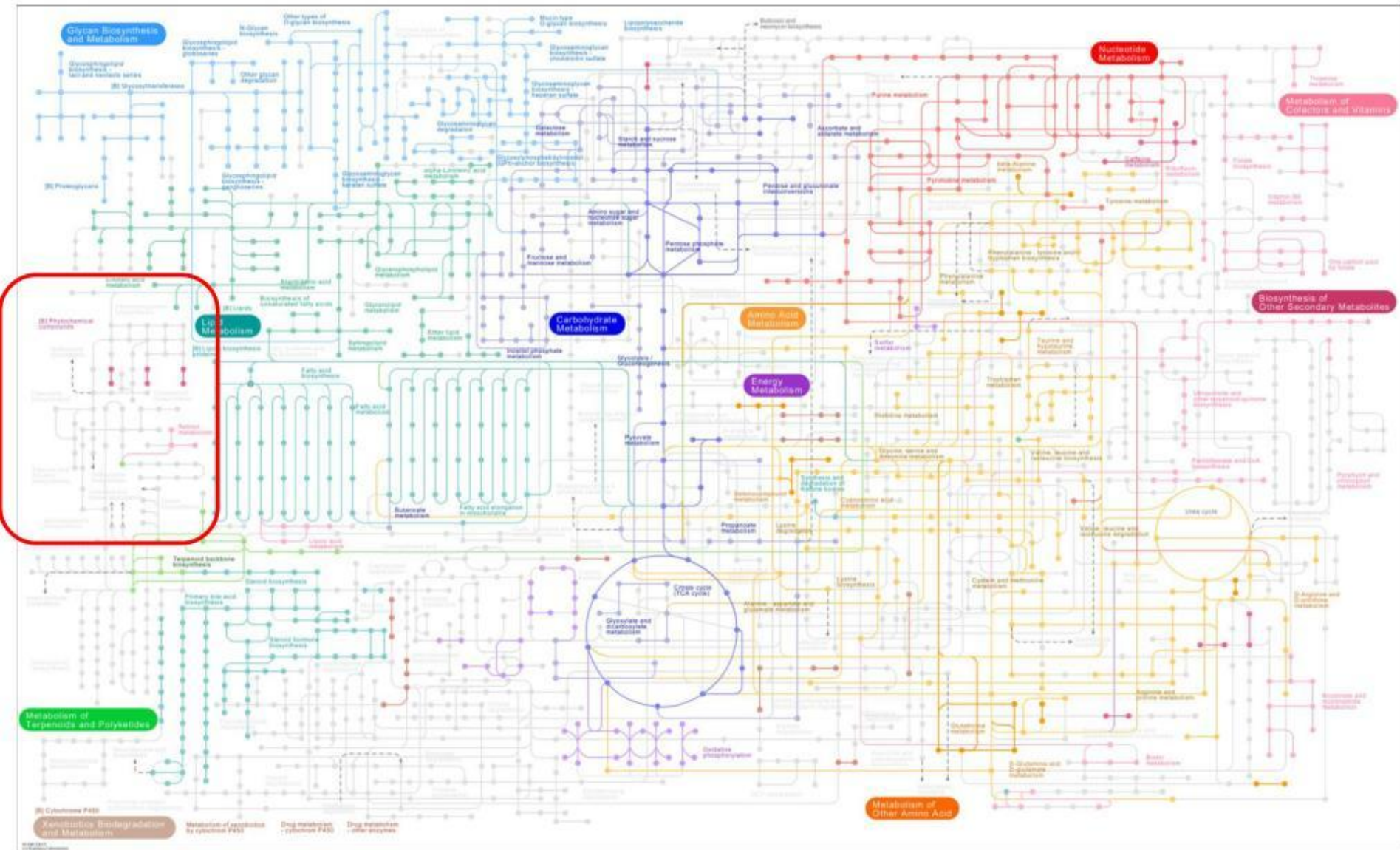


INIBITORE NON COMPETITIVO PURO



La K_m rimane invariata

Pathway globale – Homo sapiens



Controllo dell'attività enzimatica

1. accumulo del prodotto (dimin. velocità di sintesi di P)
2. disponibilità del substrato
3. controllo genetico
4. modifica covalente
 - reversibile
 - irreversibile

ENZIMI REGOLATORI

- Gli enzimi regolatori sono capaci di modulare la attività catalitica in risposta di certi segnali. Nei metabolismi possono lavorare insieme in modo sequenziale, ma almeno uno determina la velocità complessiva catalizzando la reazione più lenta (enzima regolatore).
- In molti sistemi multienzimatici il I enzima di ogni sequenza è un enzima regolatore.

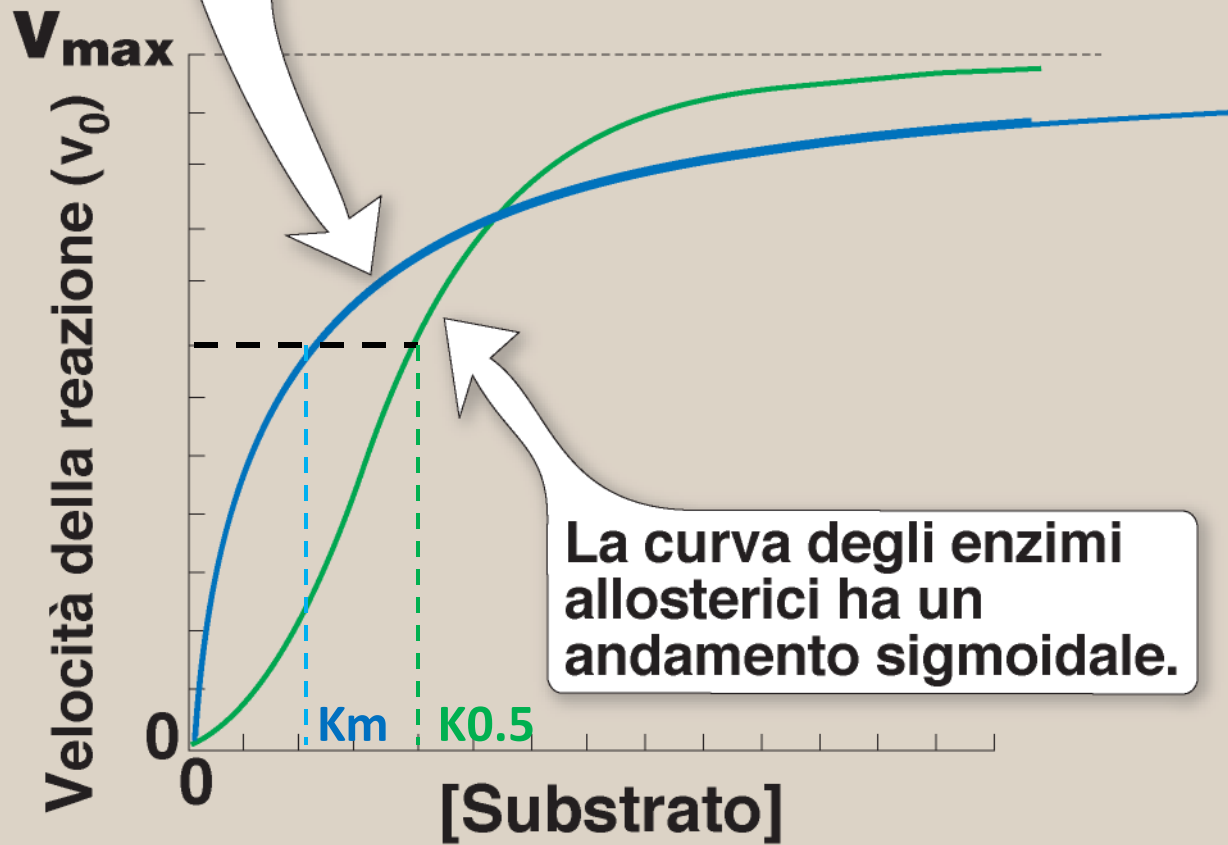
regolazione dell'attività enzimatica

- un enzima regolatore è quello che controlla le quantità di sostanze che devono essere trasformate in una via metabolica (catalizza la reazione più lenta in genere la prima di una serie)
- tali enzimi non seguono la cinetica di Michaelis – Menten e sono responsabili della modulazione della velocità con cui decorre l'intero processo metabolico

APPARTENGONO A QUESTA CATEGORIA GLI ENZIMI ALLOSTERICI

- struttura quaternaria (due o più subunità proteiche)
- in essi esistono più siti chimicamente attivi
- **effettore o MODULATORE:** molecola che interagendo in siti lontani dal sito attivo di un enzima, esercita un qualche effetto sulla sua attività (positivo o negativo)

La curva degli enzimi che seguono la cinetica di Michaelis-Menten ha un andamento iperbolico.



La curva degli enzimi allosterici ha un andamento sigmoidale.

Meccanismi di regolazione degli enzimi REGOLATORI

Modificazione non covalente o allosterica

MODULAZIONE COVALENTE REVERSIBILE

MODULAZIONE COVALENTE IRREVERSIBILE

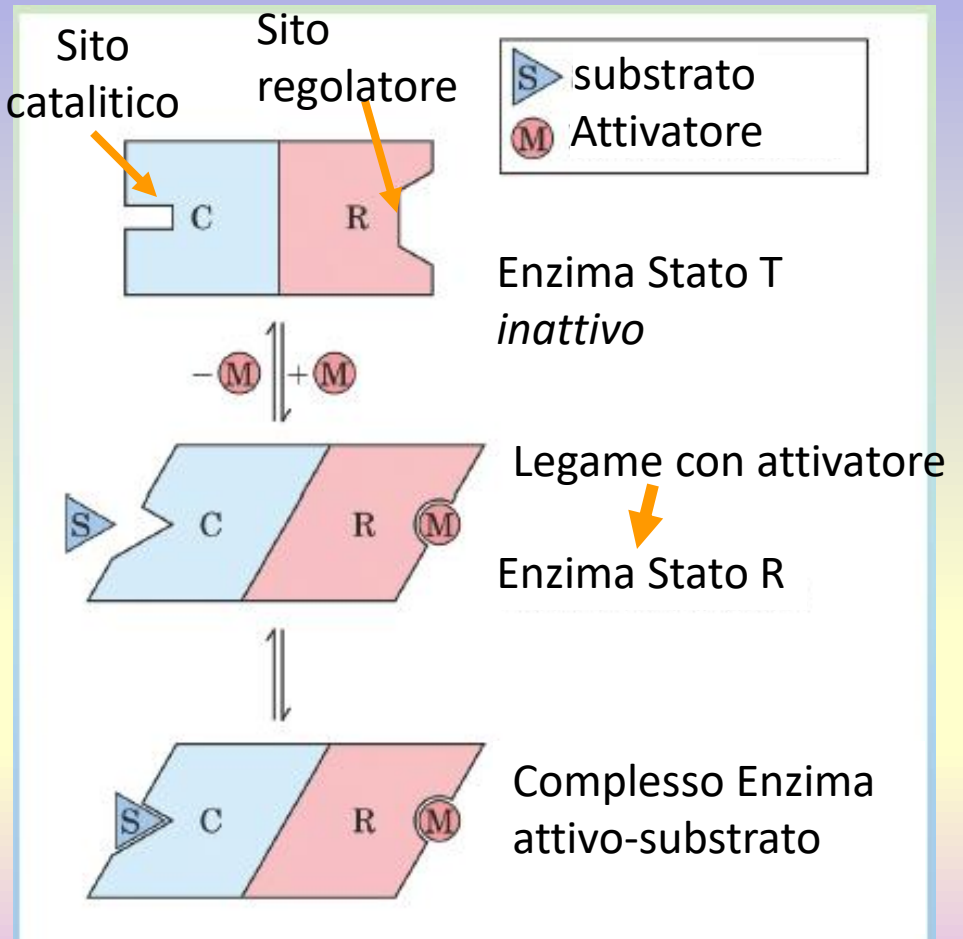
Modulatori eteroallosterici

1) Modificazione non covalente o allosterica

- 1) Si legano in siti diversi dal sito attivo = **SITI REGOLATORI**.
- 2) Il legame con il modulatore **altera la struttura** dell'enzima che nella nuova conformazione ha proprietà cinetiche differenti.
- 3) Il legame modulatore/enzima è sempre **NON-covalente e reversibile**.

4) Un **inibitore allosterico** favorisce la forma dell'enzima con minore affinità per il substrato stabilizzandola.

5) Un **attivatore allosterico** favorisce la forma R dell'enzima rendendola molto più affine al substrato



Regolazione eteroallosterica

MODULATORI ALLOSTERICI POSITIVI (ATTIVATORI)
MODULATORI ALLOSTERICI NEGATIVI (INIBITORI)

Possono modificare la $K_{0,5}$ o la V_{max} o entrambe

Cambia la $K_{0,5}$ ma non la V_{max}

Cambia la V_{max} ma non la $K_{0,5}$

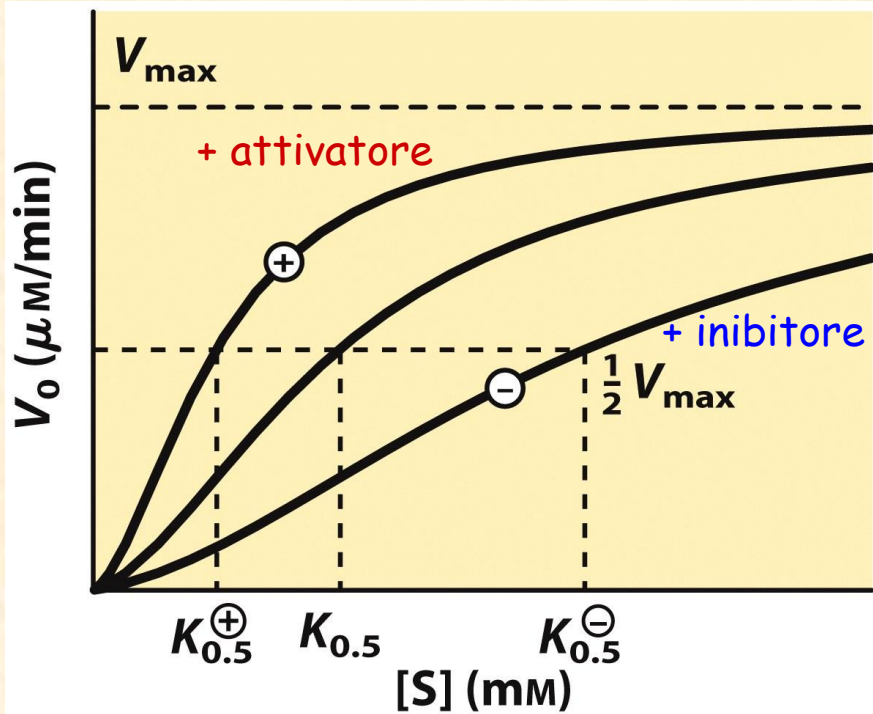


Figure 6-34b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

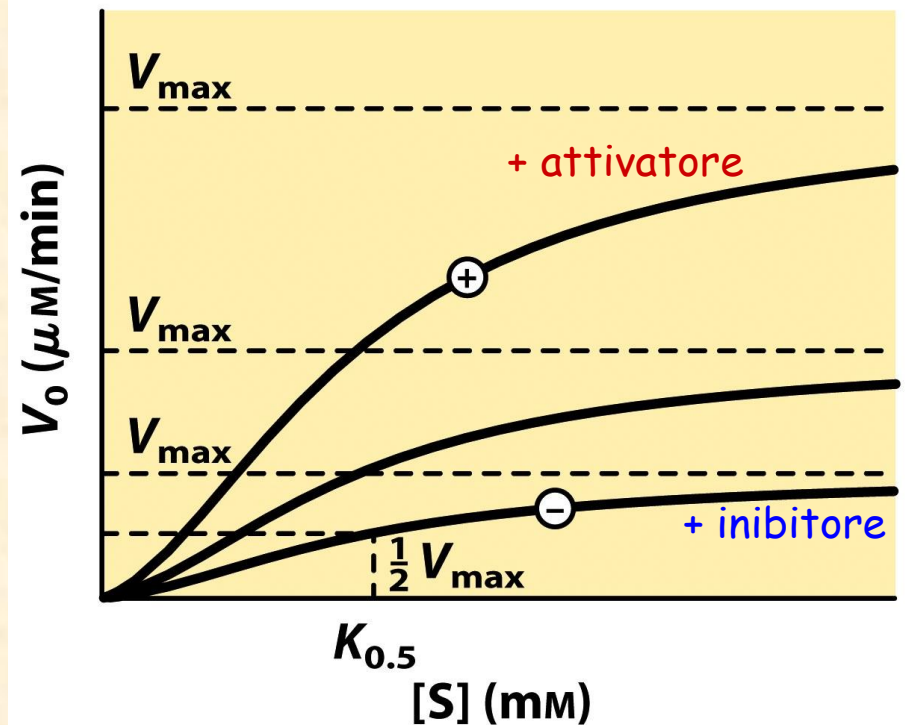


Figure 6-34c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

La modulazione di un enzima allosterico è utilizzata nel meccanismo della **RETROINIBIZIONE (inibizione a feed back)**



In un processo metabolico multistep il primo enzima della via è un enzima allosterico che viene inibito allostericamente dal prodotto che si ottiene nell'ultima reazione della via.

Sintesi di Isoleucina a partire da Treonina: processo in 5 reazioni.

La prima è catalizzata dalla treonina deidratasi che è inibita allostericamente dalla Isoleucina (prodotto finale)

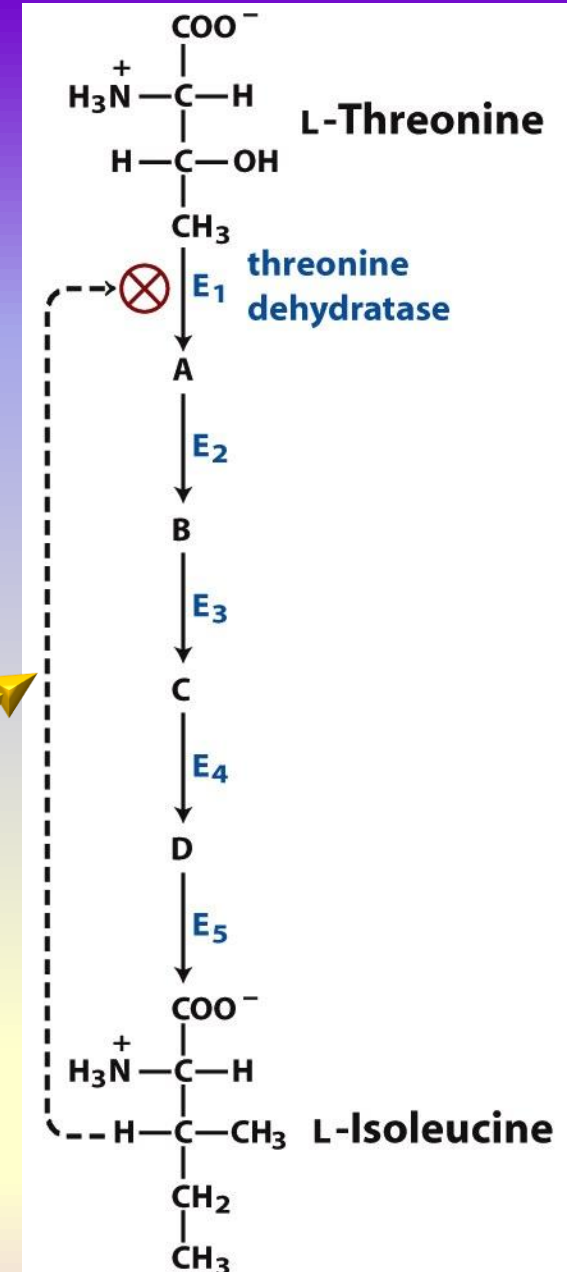
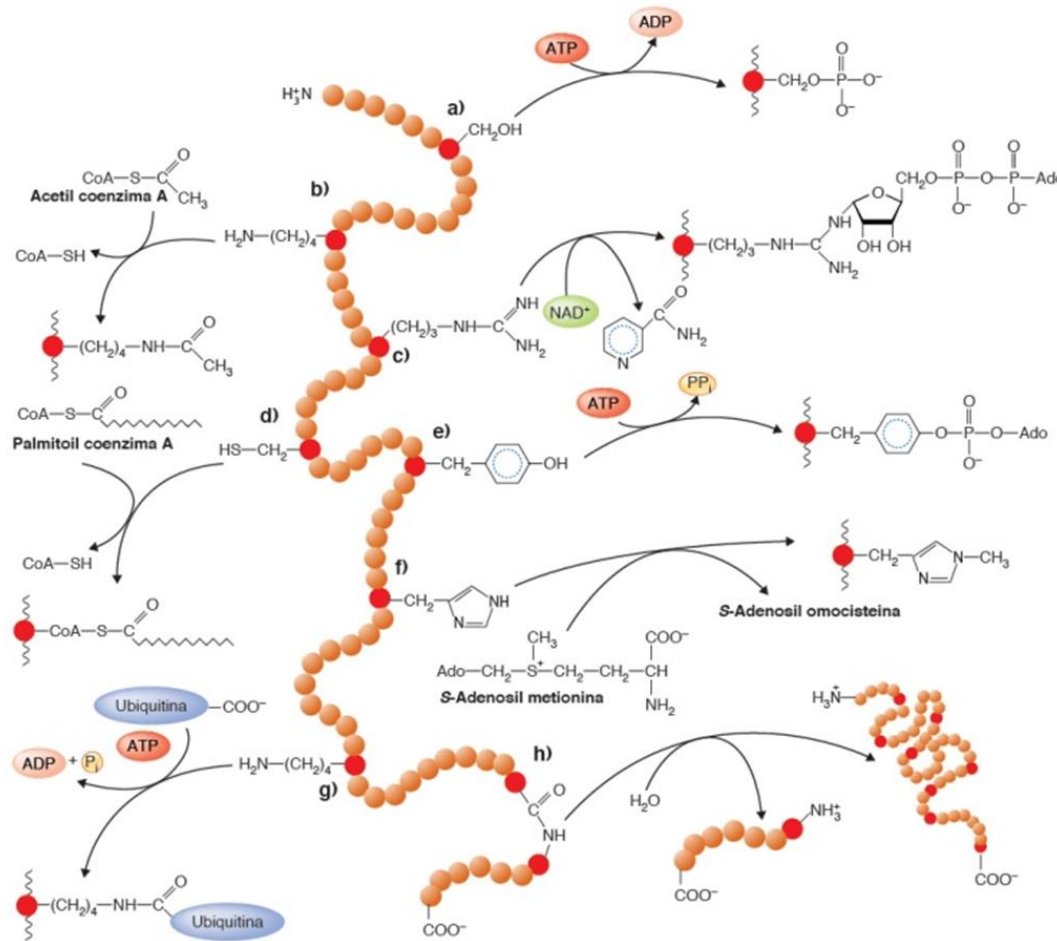


Figure 6-33

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

MODULAZIONE COVALENTE REVERSIBILE: l'enzima che deve essere regolato (in positivo o in negativo) subisce una modificazione post-traduzionale ad opera di altri enzimi, che a loro volta possono essere regolati.



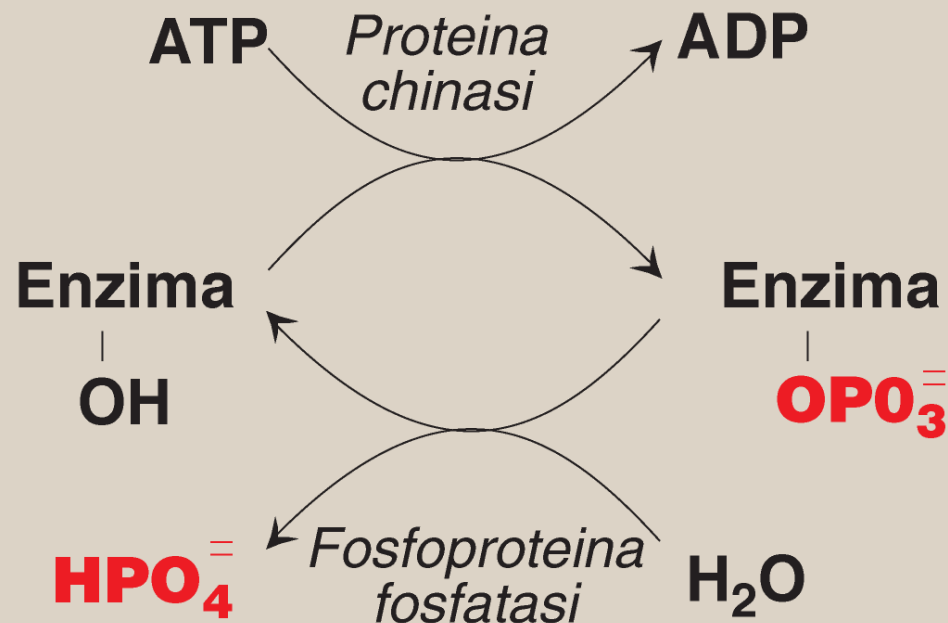
▲ FIGURA 10.13
 Alcune reazioni di modifica covalente delle proteine. (a) Fosforilazione; (b) acetilazione; (c) ADP-ribosilazione; (d) palmitoilazione; (e) adenilazione; (f) metilazione; (g) ubiquitinazione; (h) idrolisi. Ado: residuo adenosinico.

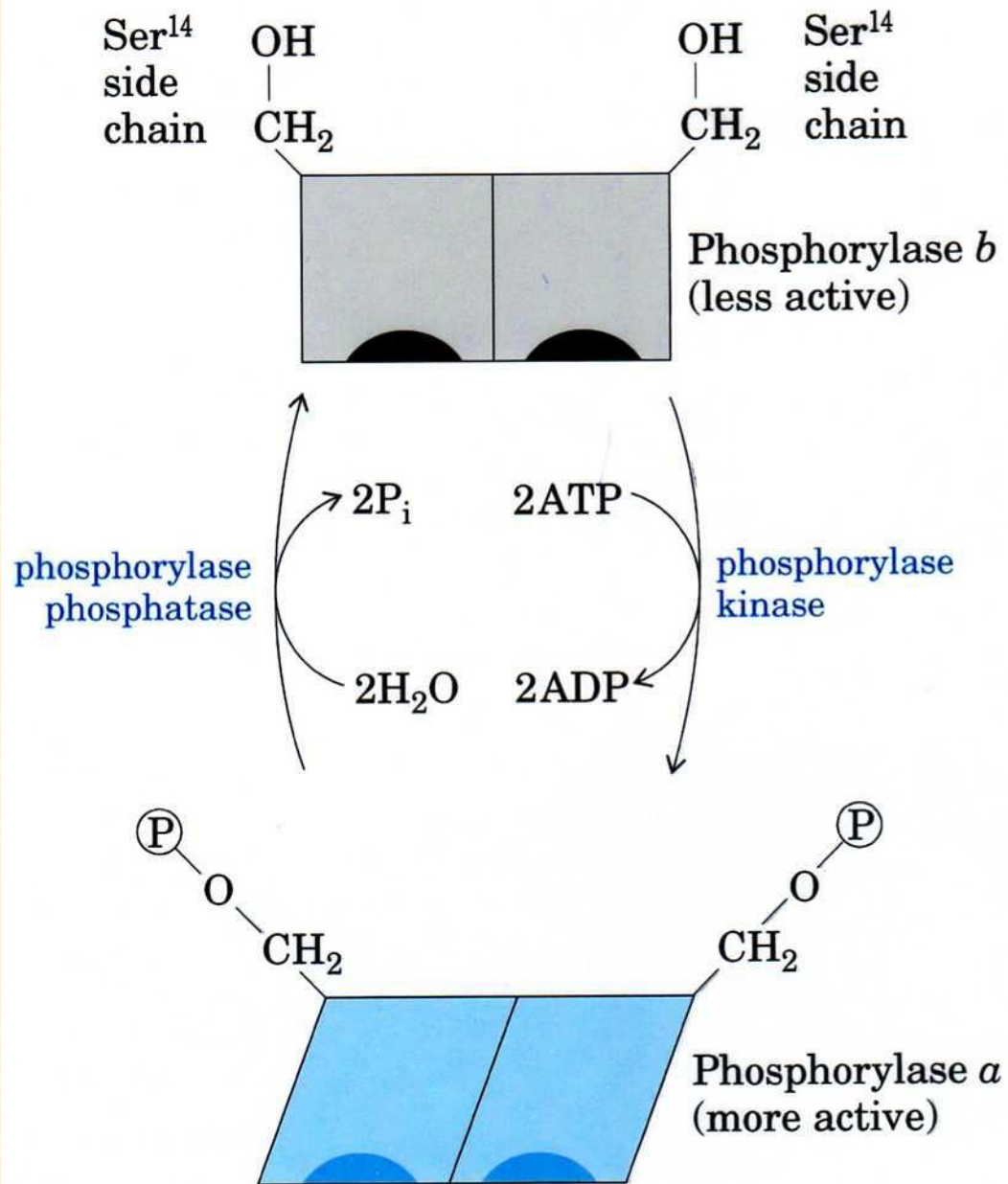
Modificazioni più comuni:
fosforilazioni (su residui di Ser, Thr, Tyr, His)
acetilazione (Lys, Ammino-terminale)
ubiquitinilazione (Lys)
metilazione (Lys, Arg)
 Altre.....

Ad opera di

- ▶ Chinasi
- ▶ Acetilasi
- ▶ Metilasi

La fosforilazione di residui di Ser, Thr, Tyr o His è la forma più comune di modulazione covalente, è controllata da 2 tipi di enzimi modificatori: CHINASI e FOSFATASI



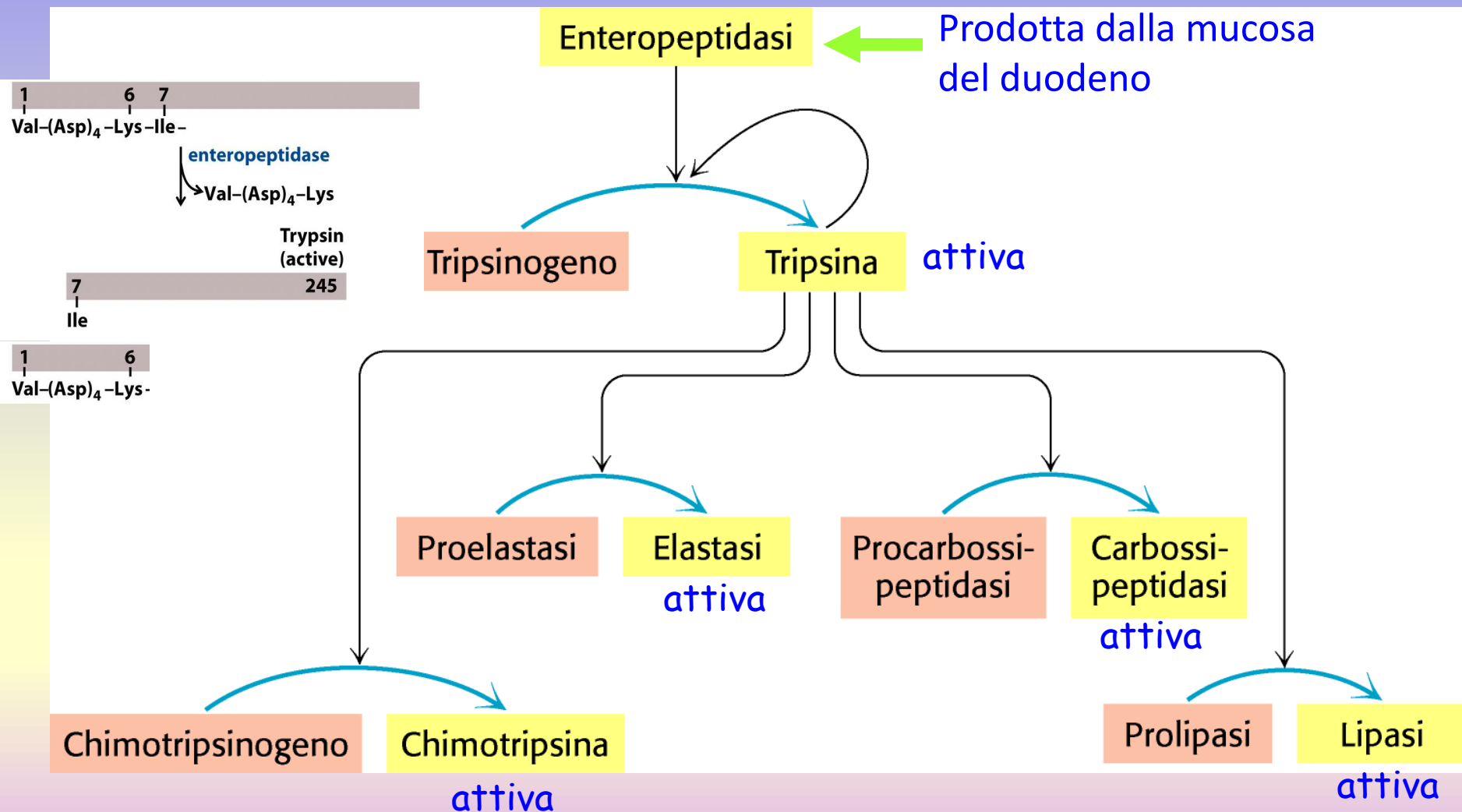


MODULAZIONE COVALENTE IRREVERSIBILE MEDIANTE TAGLIO PROTEOLITICO

-ZIMOGENI (proteasi)/PROPROTEINE (es Procollagene)

Enzimi prodotti in forma inattiva che vengono attivati solo dopo aver subito un taglio proteolitico che avviene solo nel momento e nella sede opportuni

Cascata enzimatica unidirezionale degli ZIMOGENI



Cascata enzimatica unidirezionale della coagulazione del sangue

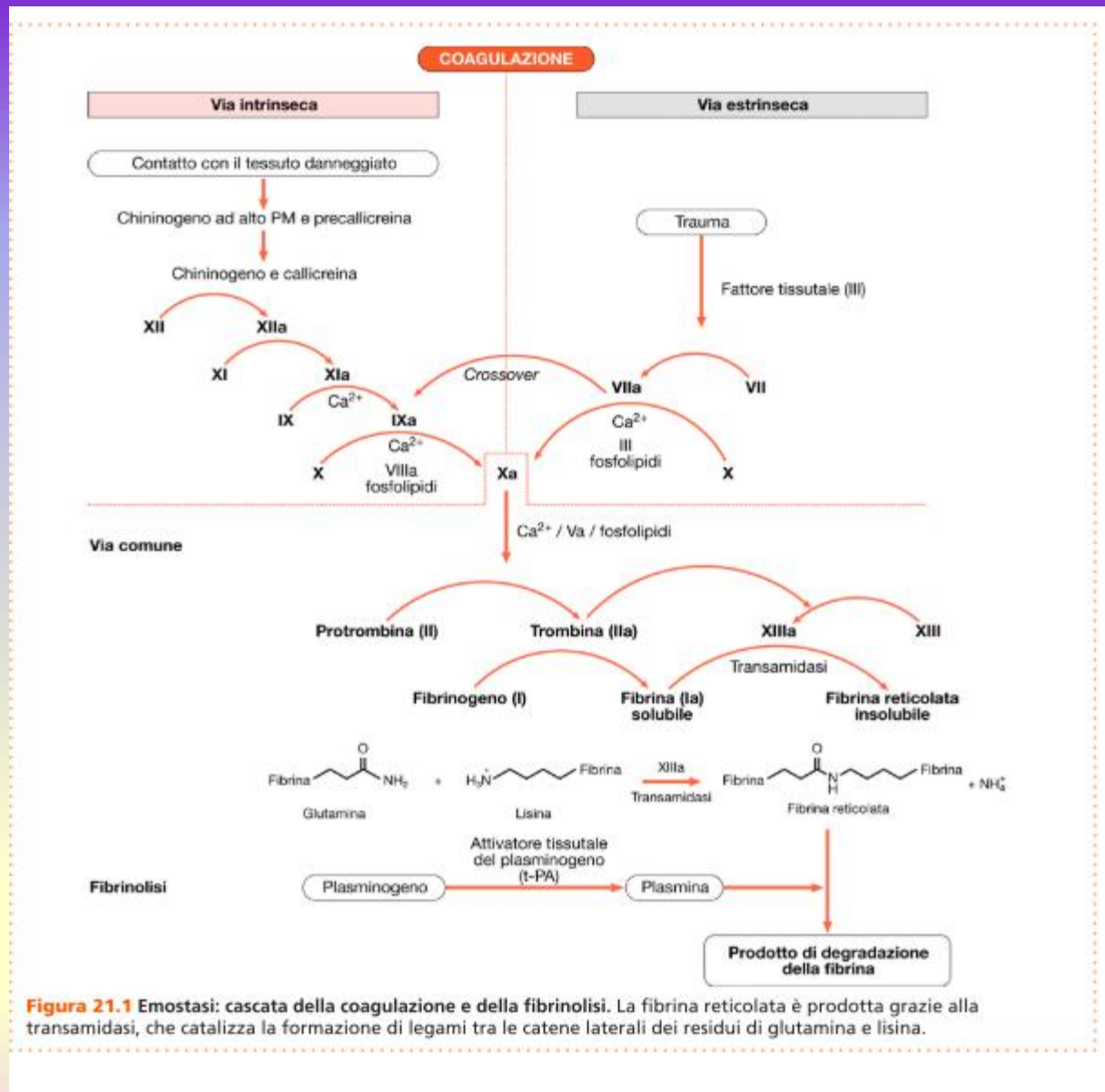


Figura 21.1 Emostasi: cascata della coagulazione e della fibrinolisi. La fibrina reticolata è prodotta grazie alla transamidasi, che catalizza la formazione di legami tra le catene laterali dei residui di glutamina e lisina.