

CDL CHIMICA



Corso di Biochimica (6
CFU) 48 ore

Prof.ssa **Alessandra Olianas**



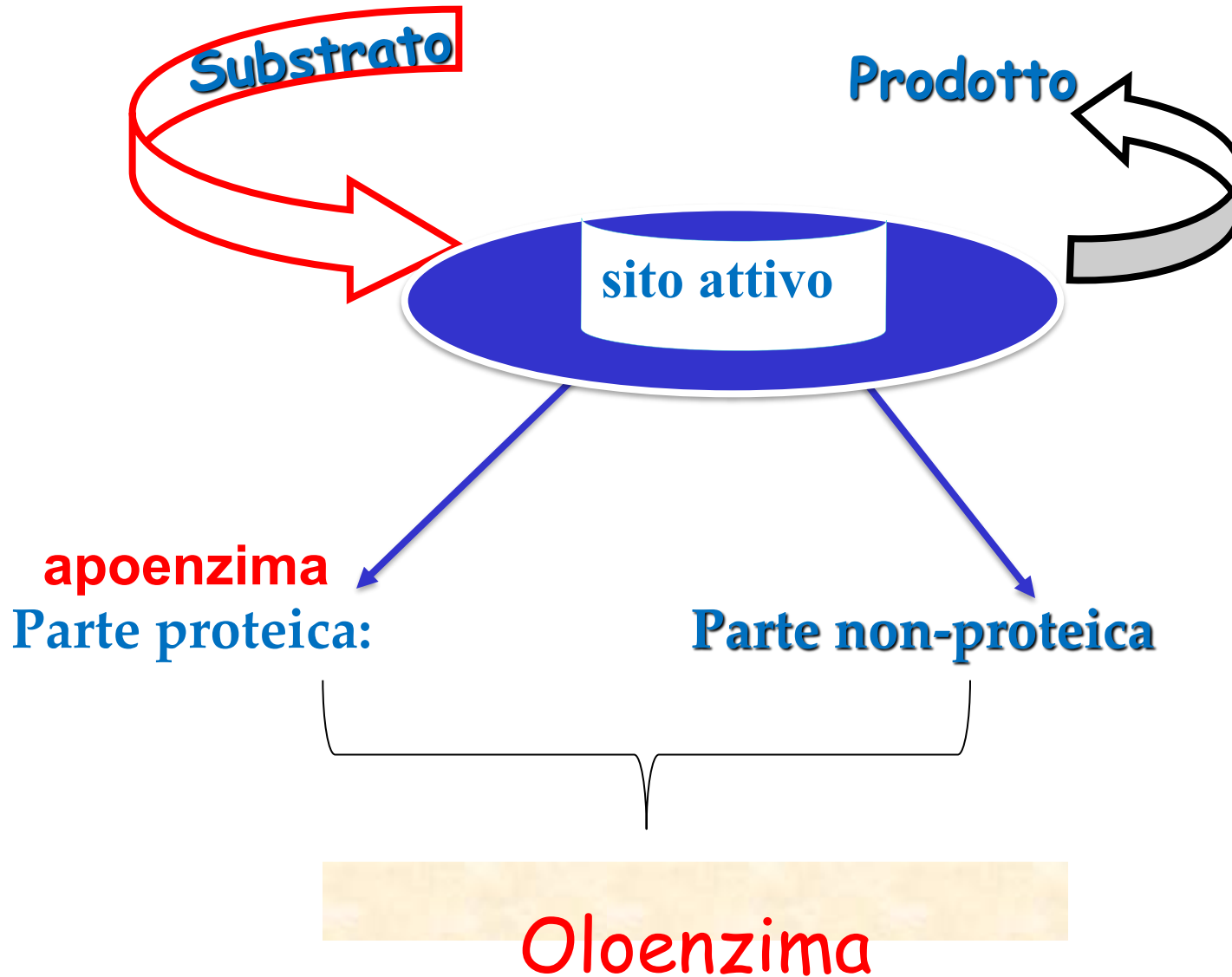
Prof.ssa Alessandra Olianas

Dip. Scienze della Vita e dell' Ambiente
Sezione Biomedica (laboratorio di Biochimica)
Tel. 0706754507 (studio)

Ricevimento studenti: **si riceve per appuntamento**


olianas@unica.it

Struttura generale degli enzimi



velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi: aspetti generali

La velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi è influenzata da diversi fattori:

1. temperatura
2. pH.
3. concentrazione del substrato 
4. concentrazione dell'enzima
5. concentrazione dei cofattori

Per comprendere i meccanismi enzimatici l'approccio più importante è la determinazione della **velocità** di una reazione.

La disciplina che si occupa di tale studio è la

**CINETICA
ENZIMATICA**

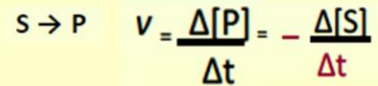
La concentrazione del substrato modifica la velocità di una reazione enzimatica

- *velocità di una reazione (v)*: è la variazione di concentrazione di substrato o di prodotto nell'unità di tempo. (mol/min)

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

-

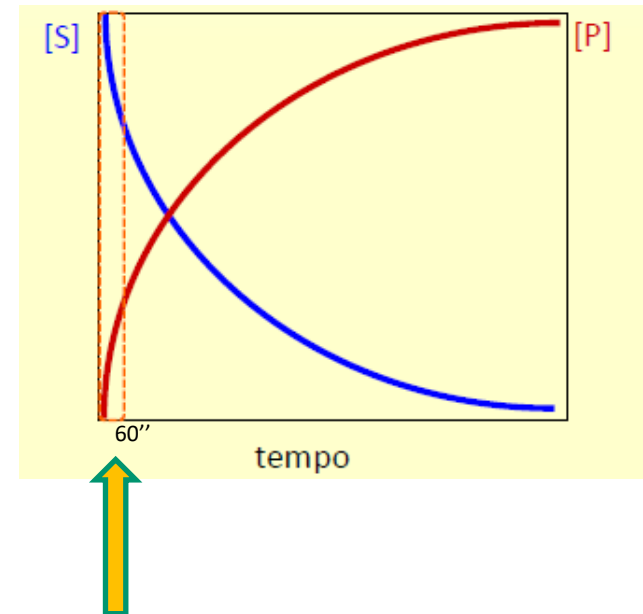
Prendiamo in considerazione una reazione enzimatica ad una determinata [S]



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

Col procedere della reazione, le 2 curve cinetiche si stabilizzano:

S è consumato e si forma **P**



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

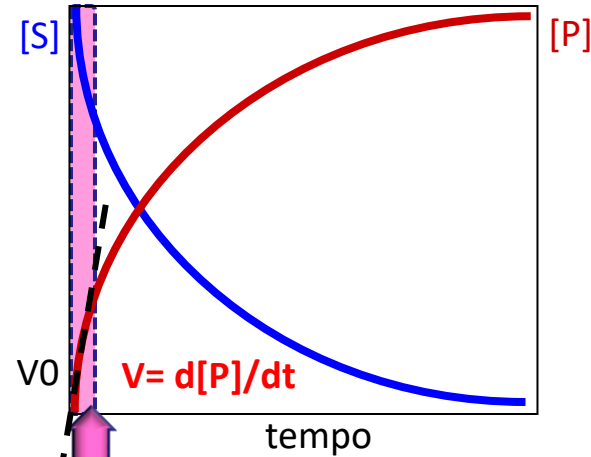
Lo studio è complicato dal fatto che il substrato viene subito convertito in prodotto



Devo **misurare** la **velocità** della reazione **al momento iniziale** (entro i primi 50-60 sec), ovvero quando la concentrazione del substrato consumata è bassa



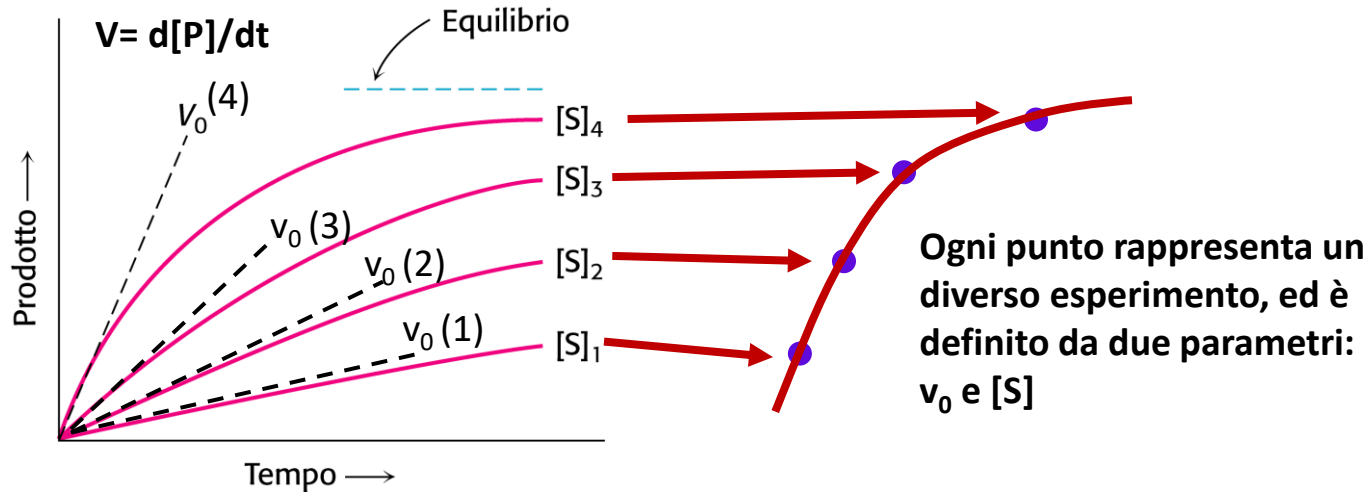
In questo modo posso associare al valore di [S] utilizzato un dato valore di **V₀** (**velocità iniziale**)



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 T_0 alla curva cinetica.

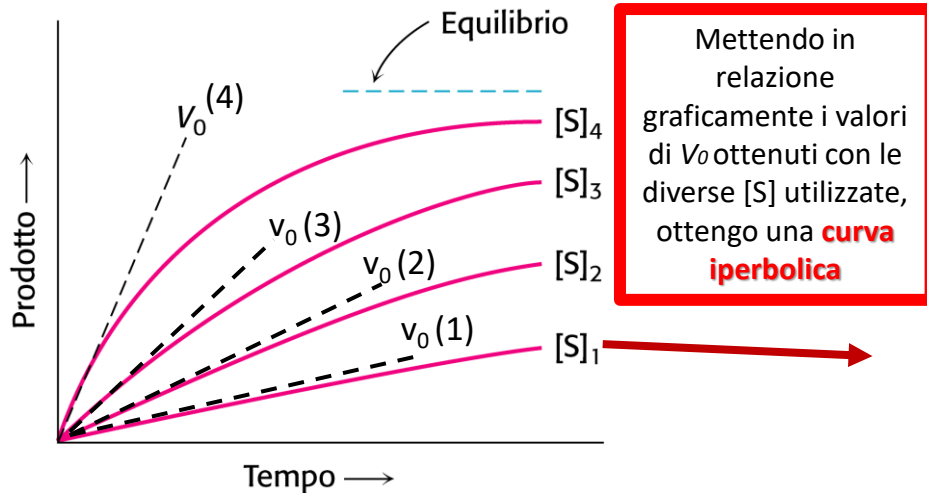
Per ognuna delle curve cinetiche ottenute a diverse $[S]$ viene calcolata la v_0



$$v_0 = k [S]$$

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

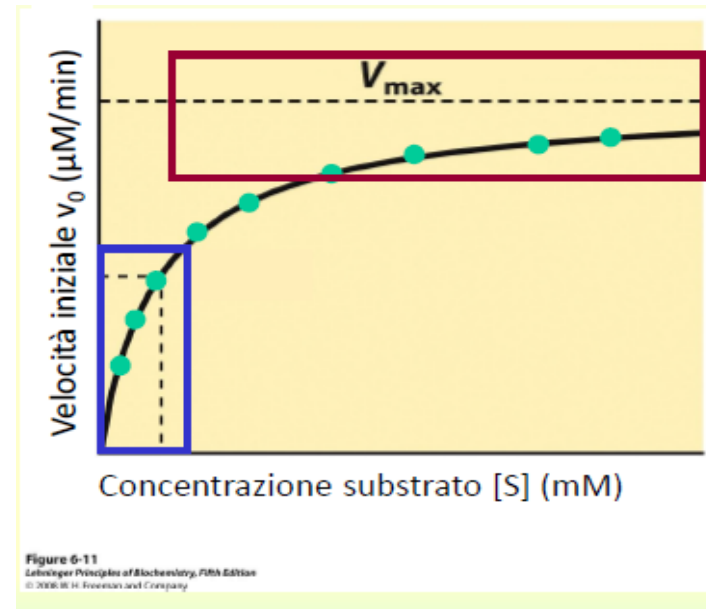
Curva iperbolica mettendo in relazione i valori di V_0 ottenuti con le diverse $[S]$?



V_0 = numero di moli substrato consumate in un minuto

1. Quando $[S]$ è bassa, la V_0 aumenta in modo quasi lineare con l'aumento di $[S]$;
2. Quando $[S]$ è più elevata, V_0 aumenta in misura sempre minore rispetto all'aumento di $[S]$, avvicinandosi alla **velocità massima (V_{max})**, valore al quale il substrato è talmente concentrato da saturare i siti attivi di ogni molecola di enzima presente.

Cinetica enzimatica (S→P)

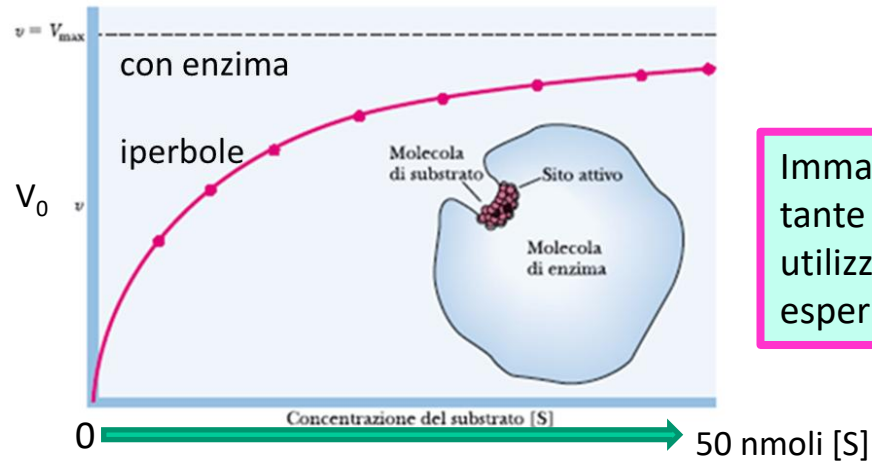


Velocità iniziale (V_0) = Velocità registrata nei primi secondi dall'inizio della reazione

LA VELOCITÀ INIZIALE DI
CATALISI V_0

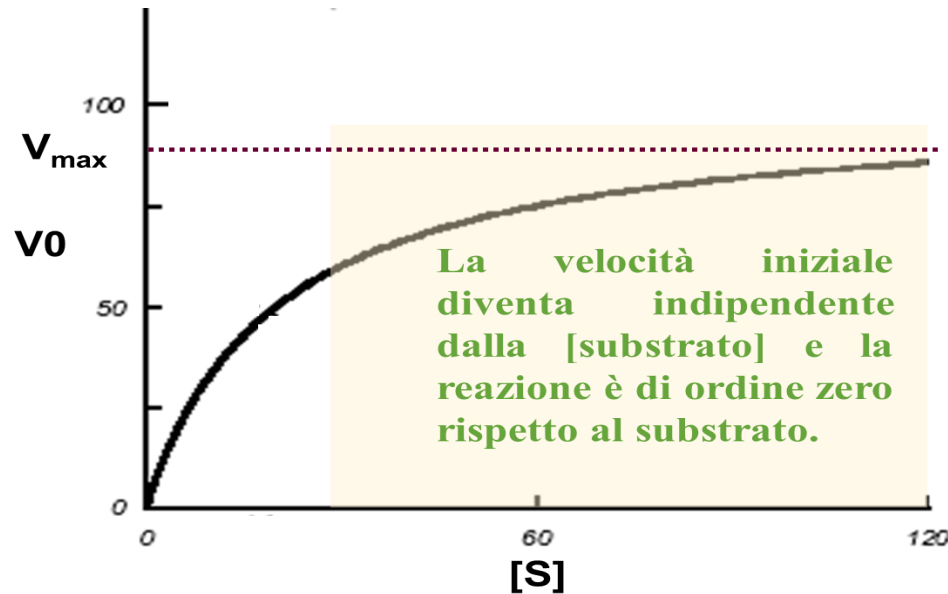


**definita come numero di
moli substrato consumate
in un minuto**

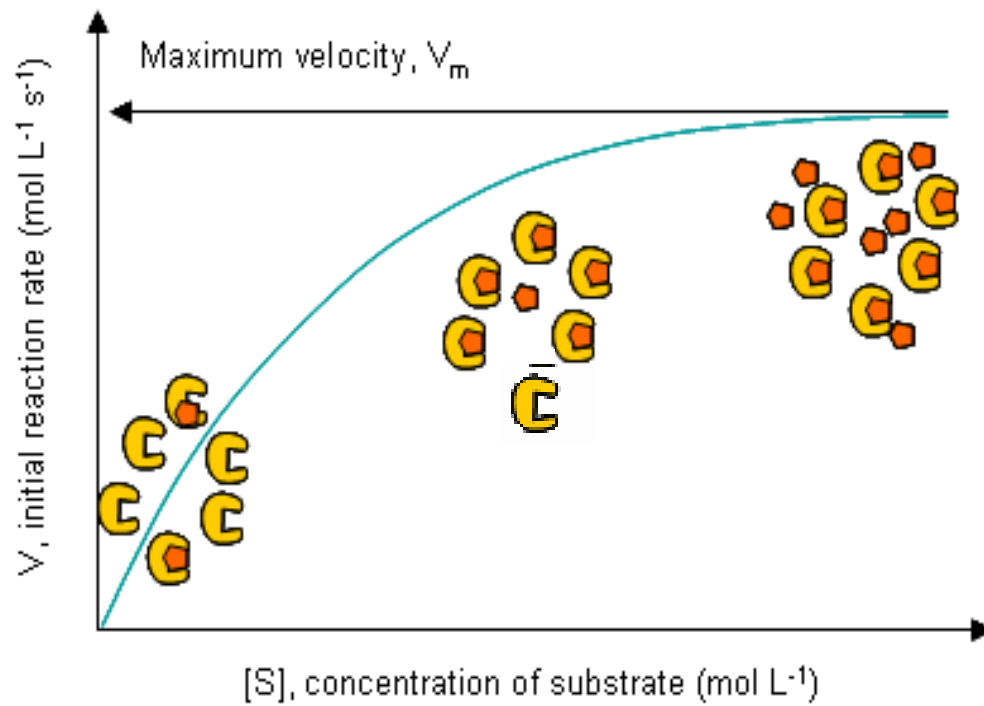


Immaginiamo di registrare
tante V_0 quante sono le $[S]$
utilizzate in un determinato
esperimento

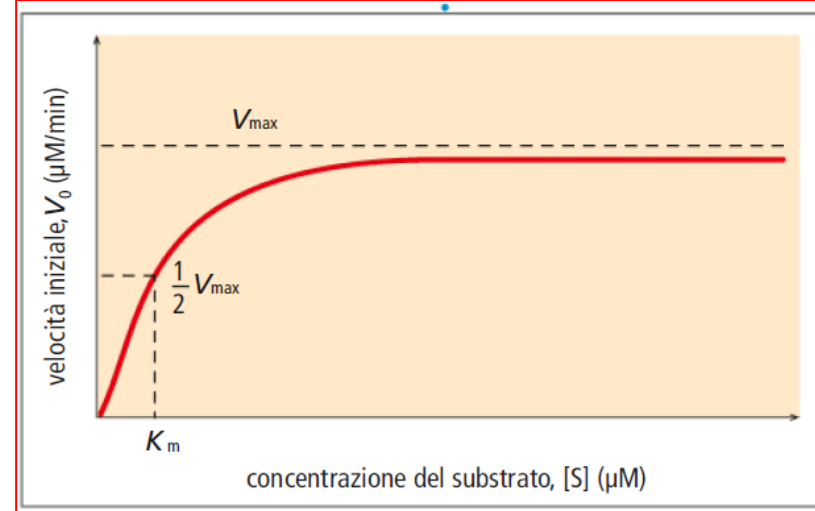
- La velocità iniziale massima della reazione (V_{max}) si osserva quando tutto l'enzima è presente sotto forma di complesso ES .



- Questa condizione esiste solo quando $[S]$ è elevata.
- L'effetto saturante del substrato è una proprietà caratteristica degli enzimi responsabile dell'appiattimento della curva.



La relazione tra velocità iniziale di reazione e concentrazione del substrato fu descritta all'inizio del secolo scorso dal biochimico tedesco **Leonor Michaelis (1875-1949)** e la fisiologa canadese **Maud Menten (1897-1960)**, attraverso una funzione iperbolica nota come **equazione di Michaelis-Menten**:



Leonor Michaelis
1875–1949

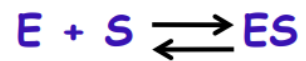


Maud Menten
1879–1960

1903: Victor Henri propone per la prima volta la formazione di un complesso ES come tappa necessaria per iniziare la catalisi

1913: l'idea di Henri diventa una teoria generale sugli enzimi ad opera di Leonor Michaelis e Maud Menten

Una reazione enzimatica nel caso più semplice prevede:



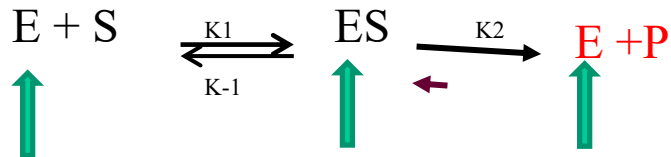
prima tappa veloce e reversibile



seconda tappa lenta e irreversibile
(tappa limitante)

La velocità della reazione complessiva è proporzionale alla concentrazione di ES

Il complesso ES è la chiave per comprendere la cinetica enzimatica



k_1 = cost cinetica velocità di formazione del complesso ES

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

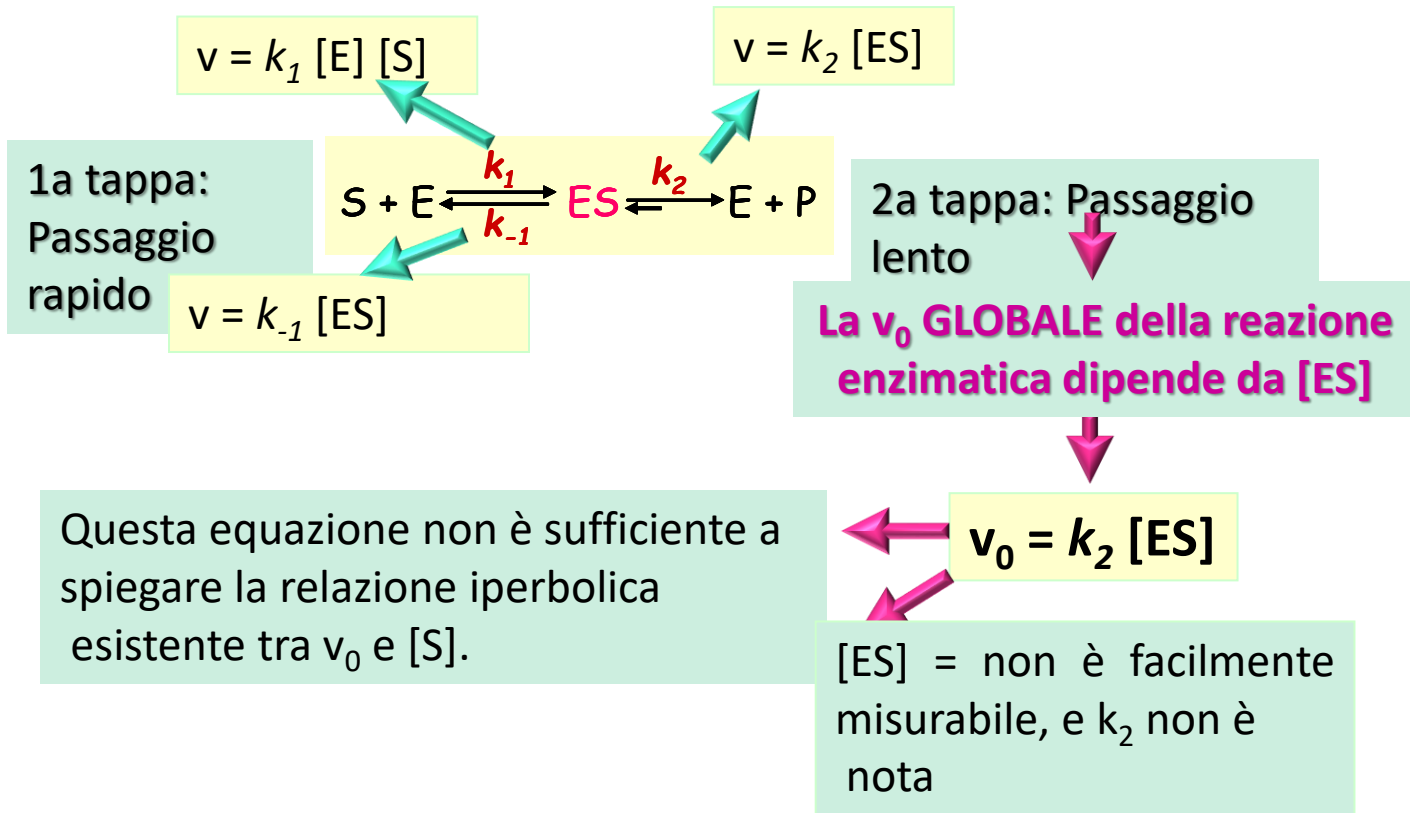
k_2 = cost cinetica velocità di decomposizione del complesso ES in E + P

k_{-2} = talmente piccola da essere trascurabile

In qualsiasi istante l'enzima è presente nella forma libera E e in quella combinata ES.

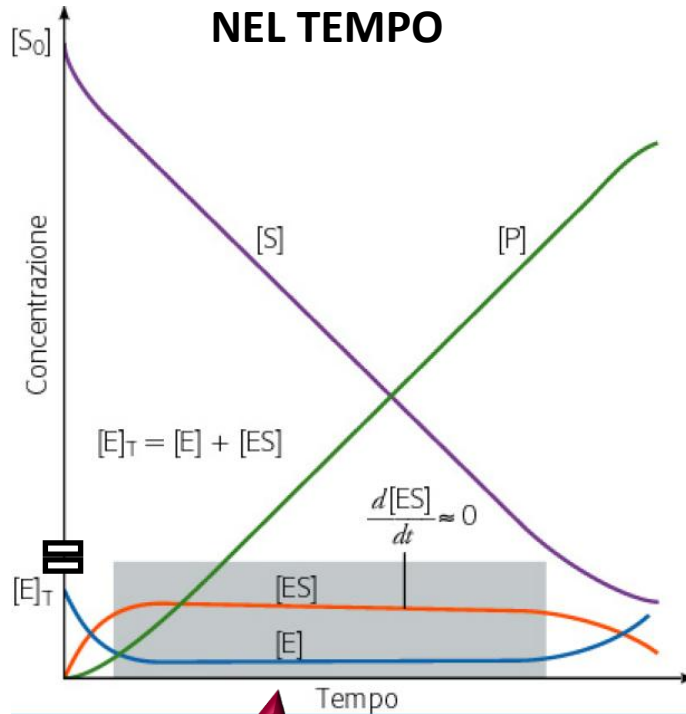
Quando la [S] è bassa, l'enzima sarà per lo più nella forma libera E.

Via via che [S] tende ad aumentare viene favorita la formazione di ES.



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

COMPLESSIVAMENTE [ES] RIMANE COSTANTE NEL TEMPO



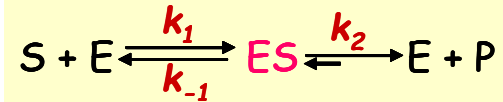
La concentrazione **dell'enzima libero** $[E]$ in soluzione diminuisce man mano che aumenta la concentrazione del complesso $[ES]$.

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):

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

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

$$[E] = [E]_{TOT} - [ES]$$

$$V = k_1 [E] [S] = k_1 ([E]_{TOT} - [ES]) [S]$$

Velocità di Demolizione di ES

(ES → S + E ES → P + E):

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

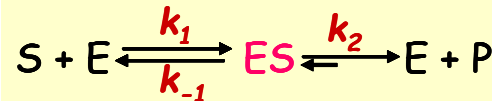
V formazione ES = V demolizione ES
 $k_1 ([E]_{TOT} - [ES]) [S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$

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



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

*Costante di
Michaelis-Menten*



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

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

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

Poiché la v_0 globale di reazione è :

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

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

$$\frac{([E]_T - [ES]) [S]}{[ES]} = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} = K_m \quad \text{e)}$$

Costante di Michaelis e Menten

e) può essere riscritta così

$$\frac{([E]_T - [ES]) [S]}{[ES]} = K_m \quad \text{f)}$$

riarrangiamo f) eliminando il denominatore

$$[E]_T [S] - [ES][S] = K_m [ES] \quad \text{h)}$$

$$[E]_T [S] = [ES] (K_m + [S]) \quad \text{i)}$$

risolvendo per [ES] otteniamo

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_m + [S]} \quad \text{l)}$$

$$v_0 = \frac{K_2 ([E]_T [S])}{K_m + [S]} \quad \text{m)}$$

....infatti, dobbiamo fare una considerazione riguardo all'equazione m).....

.....inizialmente abbiamo postulato che la **velocità** di reazione valutata **nei primi istanti** è definita **v₀** ed è uguale a **k₂ [ES]**

$$v_0 = K_2 [ES]$$

Sostituendo a [ES] di questa equazione il suo valore ricavato dalla l), otteniamo

Con la m) abbiamo eliminato la «scomoda» [ES] che compariva nella l).....

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

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

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:

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

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

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

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

→ diventa $V_{max} = k_2 [E]_{TOT}$

Equazione di Michaelis-Menten



equazione fondamentale della cinetica enzimatica



Dividendo per V_{max} :

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

consideriamo la condizione
quando
 $V_o = \frac{1}{2} V_{max}$

sostituiamo nella equazione di Michaelis-Menten.

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + S}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m + [S] = 2 [S]$$

$$K_m = [S] \quad \text{quando } V_o = \frac{1}{2} V_{max}$$

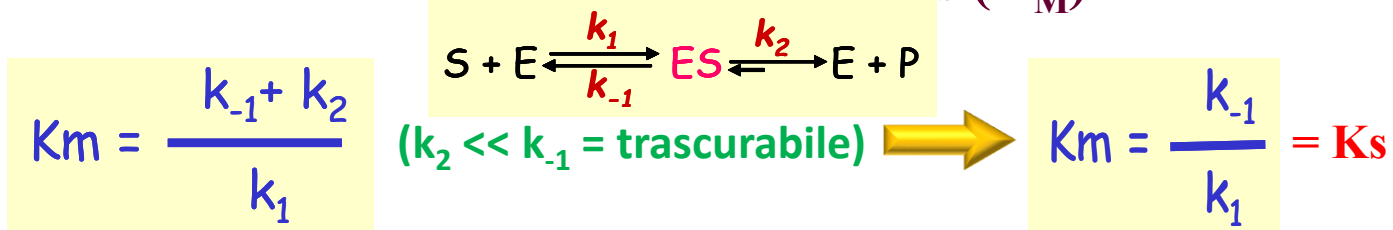
costante di **Michaelis-Menten**

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

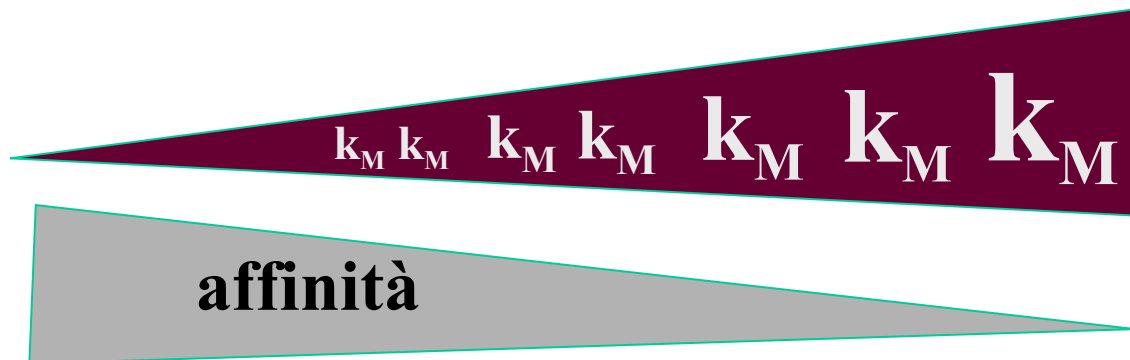
**K_m è pari al rapporto tra
velocità di demolizione di ES
e la velocità della sua
formazione**

**Quindi K_m è equivalente alla concentrazione
del substrato quando V_o è metà della V_{max}**

La costante di Michaelis (K_M)

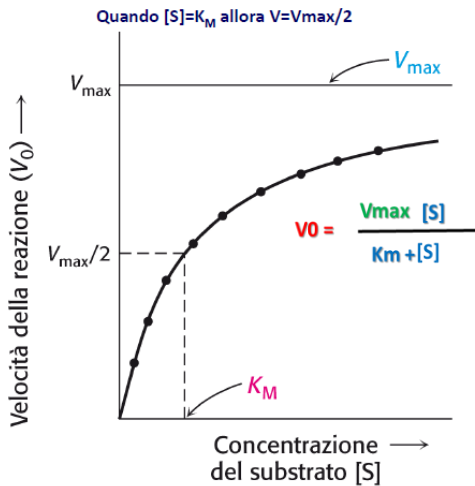


$K_s = \text{costante di dissociazione ES} = \frac{[S][E]}{[ES]}$



Quindi 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

Come posso calcolare Km e Vmax da una curva iperbolica?



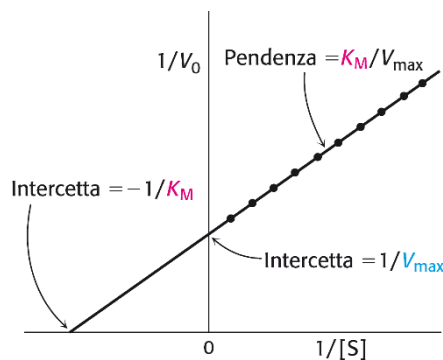
È molto difficile calcolare la V_{max} e di conseguenza K_M (1/2 di V_{max})

Poichè si raggiunge
asintoticamente

È molto più utile trasformare l'iperbole in una retta

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

GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI (Eq. di Lineweaver-Burk, 1934)
(linearizzazione della curva iperbolica)



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

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

Equazione di una retta
nel piano Cartesiano \rightarrow

$$Y = mx + q$$

Coeficiente
angolare

Intercetta asse x

Intercetta asse y

Determinazione sperimentale di K_m e V_{max} per una reazione enzimatica:
 GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI (Eq. di Lineweaver-Burk)

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

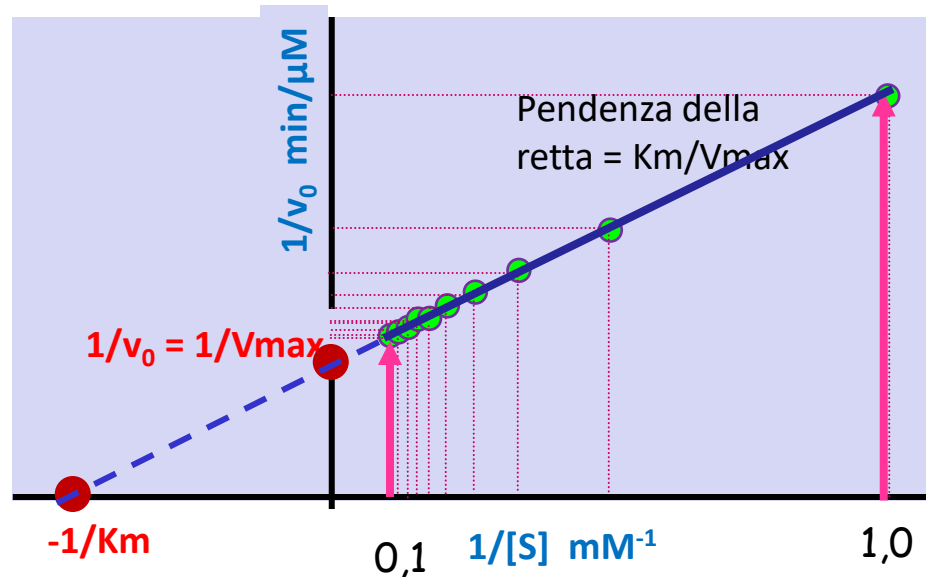
(linearizzazione della curva iperbolica) >>>>

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

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

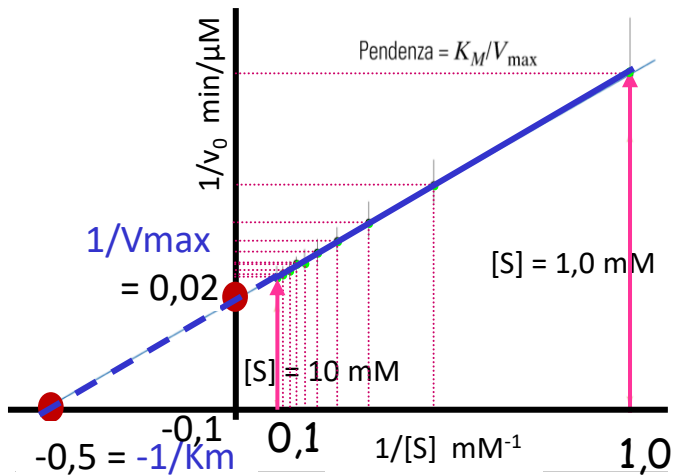


La curva iperbolica del grafico di Michaelis-Menten diventa una retta che interseca gli assi in punti precisi consentendo di determinare con esattezza K_m e V_{max} , e quindi anche k_{cat}



$[S] = 10$ mM

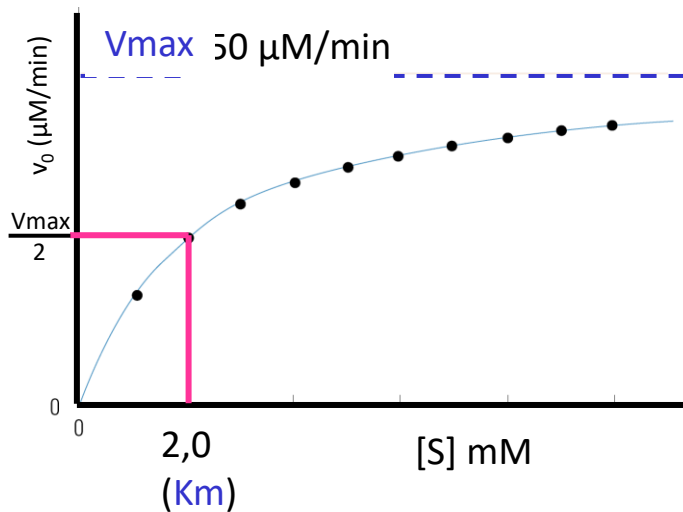
$[S] = 1,0$ mM



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

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

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

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


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

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

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

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

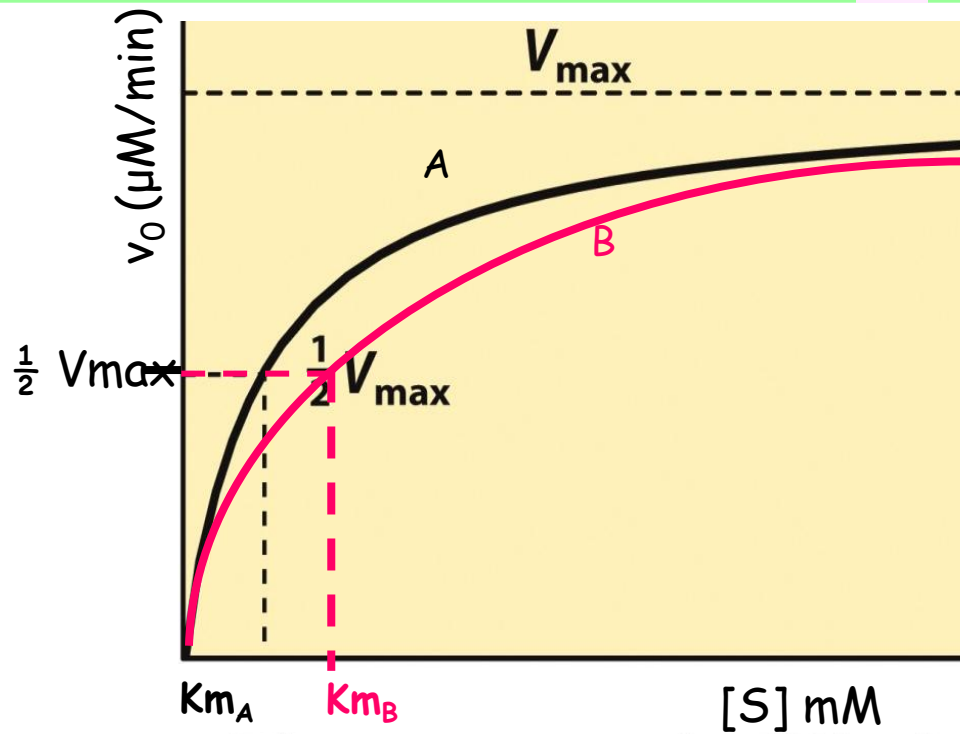
1 enzima

2 substrati simili A e B

medesime condizioni di reazione

Verso quale dei due l'enzima è più affine?

A



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?

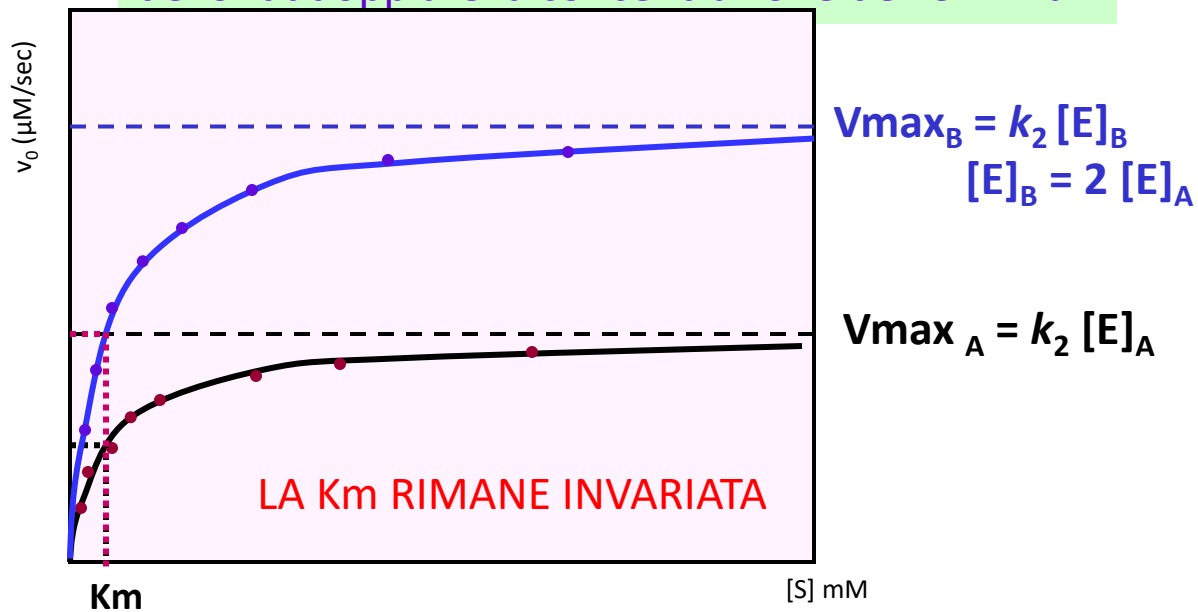
$$v_0 = k_2 [ES]: \quad V_{\max} = k_2 [E]_{\text{TOT}}$$

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



1) Cosa devo misurare per studiare la cinetica enzimatica?

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

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?

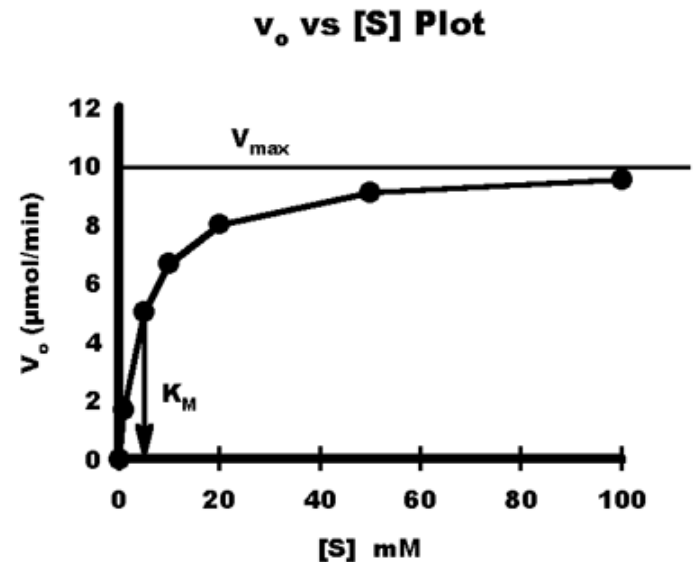
**Determino i parametri specifici e caratterizzanti per un dato enzima
che ci dicono:**

- 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)**

Lo studio della cinetica enzimatica è importante per vari motivi:

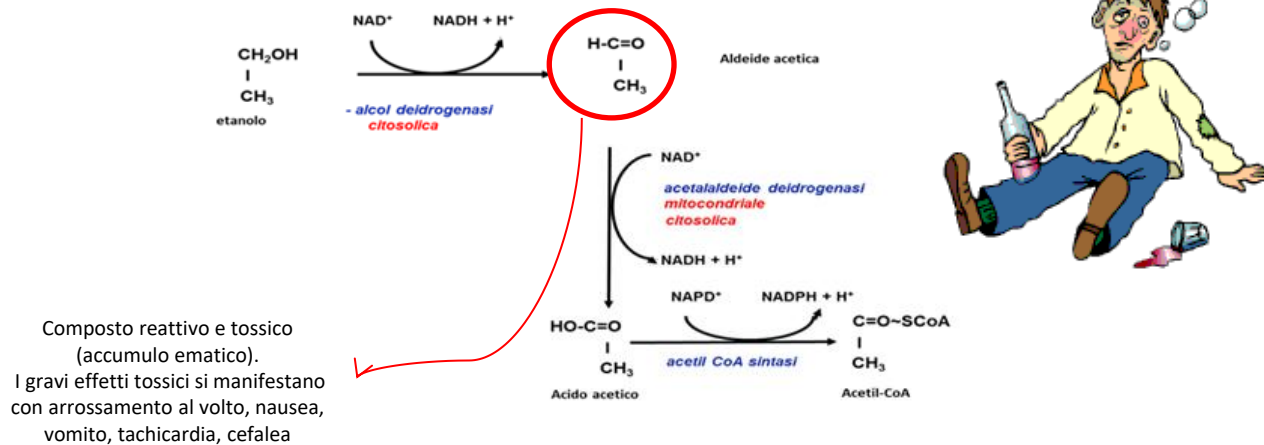
- 1) Comprendere come lavorano gli enzimi
- 2) Comprendere come lavorano in vivo:
- 3) le costanti cinetiche K_M e V_{max} , sono di estrema importanza per capire come gli enzimi si coordinano tra loro a livello metabolico
- 4) Può essere usata a scopo clinico-diagnostico

Grafico di Michaelis-Menten



Le variazioni della Km possono avere implicazioni fisiologiche

Es. metabolismo dell'etanolo

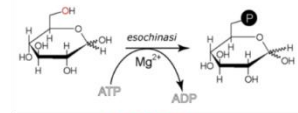


L'Acetaldeide deidrogenasi mitocondriale ha la Km per l'acetaldeide bassa
L'Acetaldeide deidrogenasi citosolica ha la Km per l'acetaldeide alta

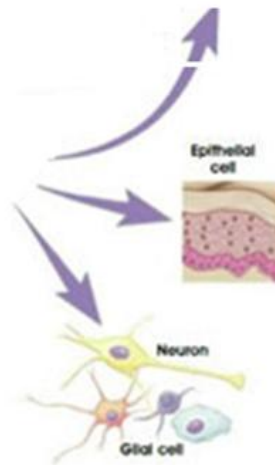
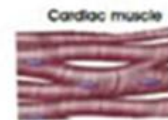
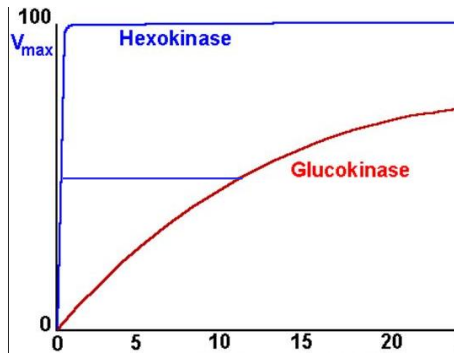
Negli individui sensibili all'etanolo, l'enzima mitocondriale a causa di una mutazione nel DNA è inattivo, per cui l'acetaldeide viene utilizzata come substrato dall'enzima citosolico che richiede alte quantità di acetaldeide.

In parte l'acetaldeide viene rilasciata a livello ematico, provocando gli effetti tossici

Affinità dell'enzima per il substrato e Km.....

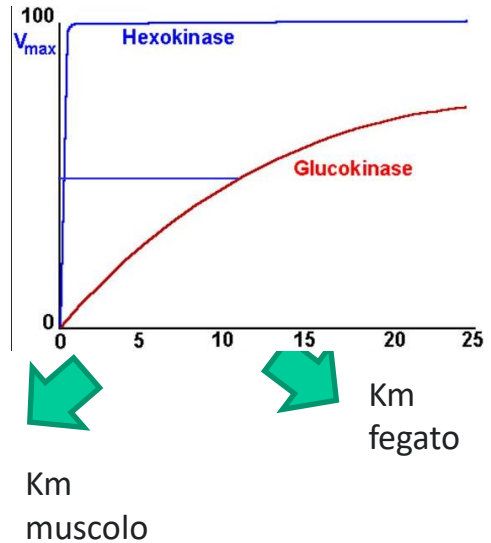


L'esoquinasasi presente nel cervello e nel muscolo ha valori di Km molto bassi



Alta affinità per il glucosio: Il glucosio che giunge ai miociti satura rapidamente tutto l'enzima
L'enzima lavora sempre al massimo della velocità

Quindi anche a basse concentrazioni di glucosio il glucosio viene convertito in glicoso 6 fosfato.



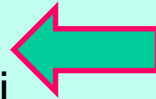
Bassa affinità per il glucosio
La concentrazione alla quale l'enzima è semisaturato è elevata rispetto alla normale concentrazione di glucosio nel sangue. (5 mM)

Quando la concentrazione di glucosio è maggiore di quella del sangue (5mM), il glucosio viene inviato verso la glicolisi.

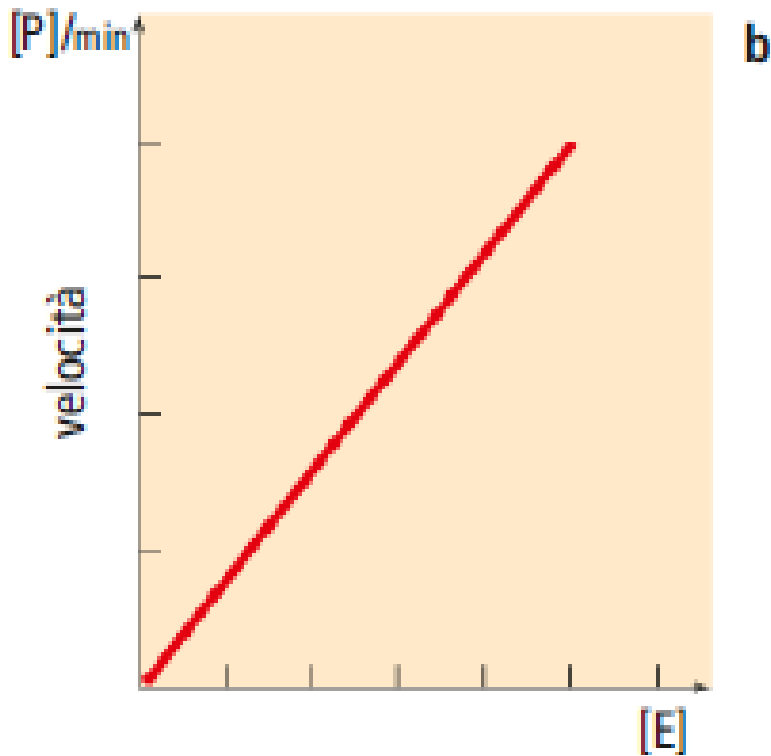
velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi: aspetti generali

La velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi è influenzata da diversi fattori:

1. temperatura
2. pH.
3. concentrazione del substrato
4. concentrazione dell'enzima
5. concentrazione dei cofattori



Effetto delle variazioni della concentrazione dell'enzima rispetto ad una costante di [S]

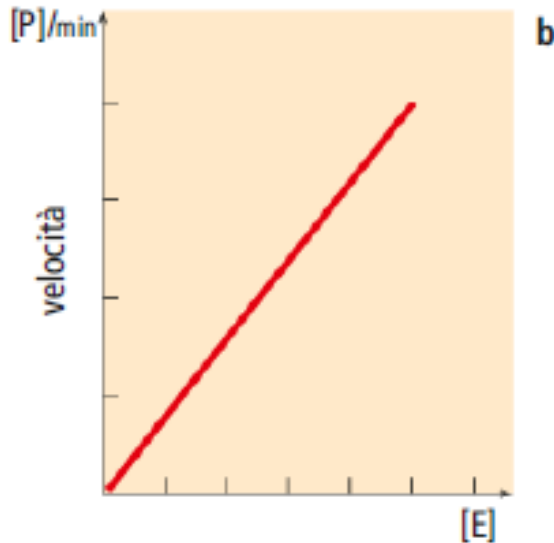


Se raddoppia la concentrazione dell'enzima, mantenendo costante la [S], raddoppia anche la velocità della reazione.



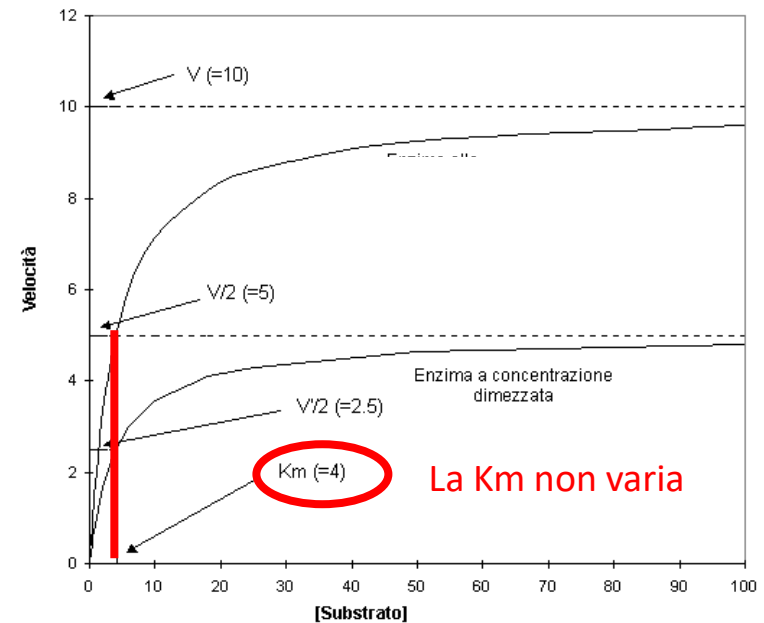
relazione lineare

Effetto delle variazioni della concentrazione dell'enzima rispetto ad una costante di [S]



Relazione lineare

Se raddoppia la concentrazione dell'enzima, mantenendo costante la [S], raddoppia anche la velocità della reazione.



Vmax è direttamente proporzionale alla [E]

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

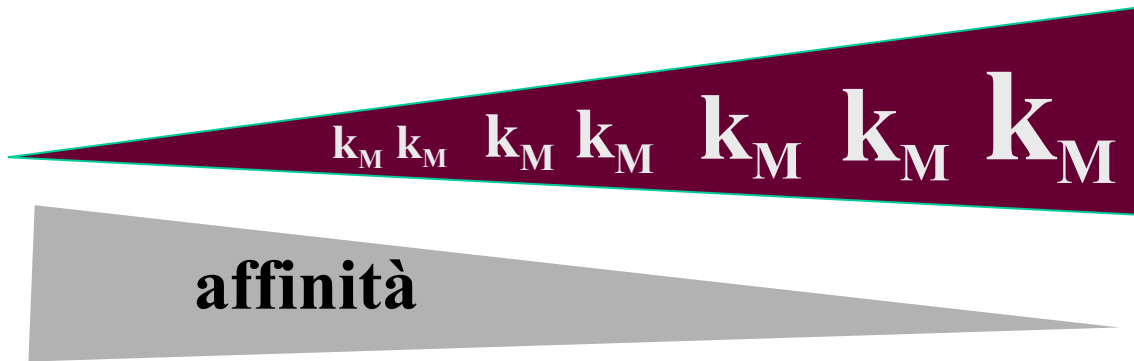
$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m}$$

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

Velocità massima di reazione.

Quando sono presenti nella miscela di reazione concentrazioni saturanti di substrato, tutto l'enzima è complessato col substrato:

K_m è la concentrazione del substrato quando V₀ è metà della V_{max}



Determinazione sperimentale di K_m e V_{max} per una reazione enzimatica:
 GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI (Eq. di Lineweaver-Burk)

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

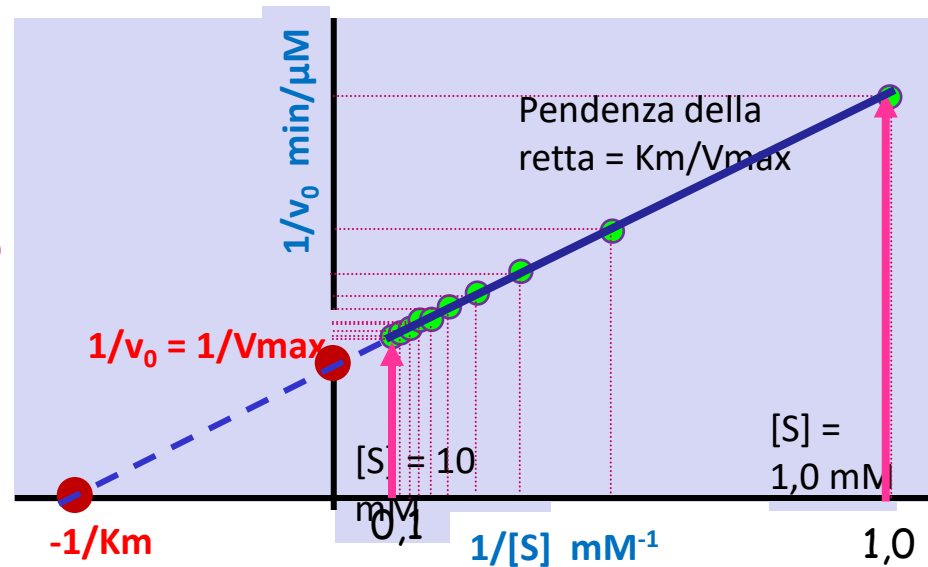
(linearizzazione della curva iperbolica) >>>>

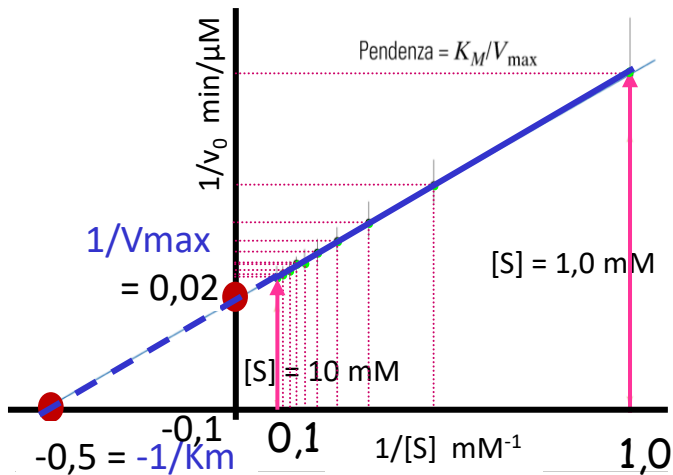
$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

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 Michaelis-Menten diventa una retta che interseca gli assi in punti precisi consentendo di determinare con esattezza K_m e V_{max} , e quindi anche k_{cat}

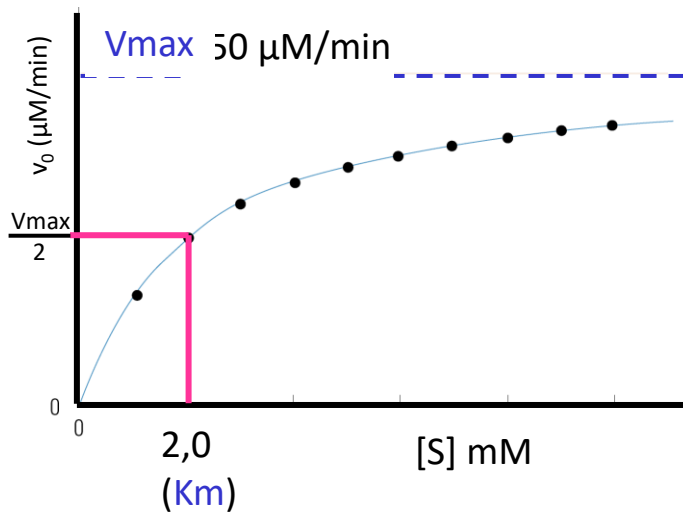




Per calcolare la V_{max} devo fare il reciproco del reciproco =

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

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

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


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

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

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

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

MECCANISMI DI CATALISI

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

- 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 ΔG^\ddagger e accelera la trasformazione

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

Trasferimento di 1 o più protoni H^+

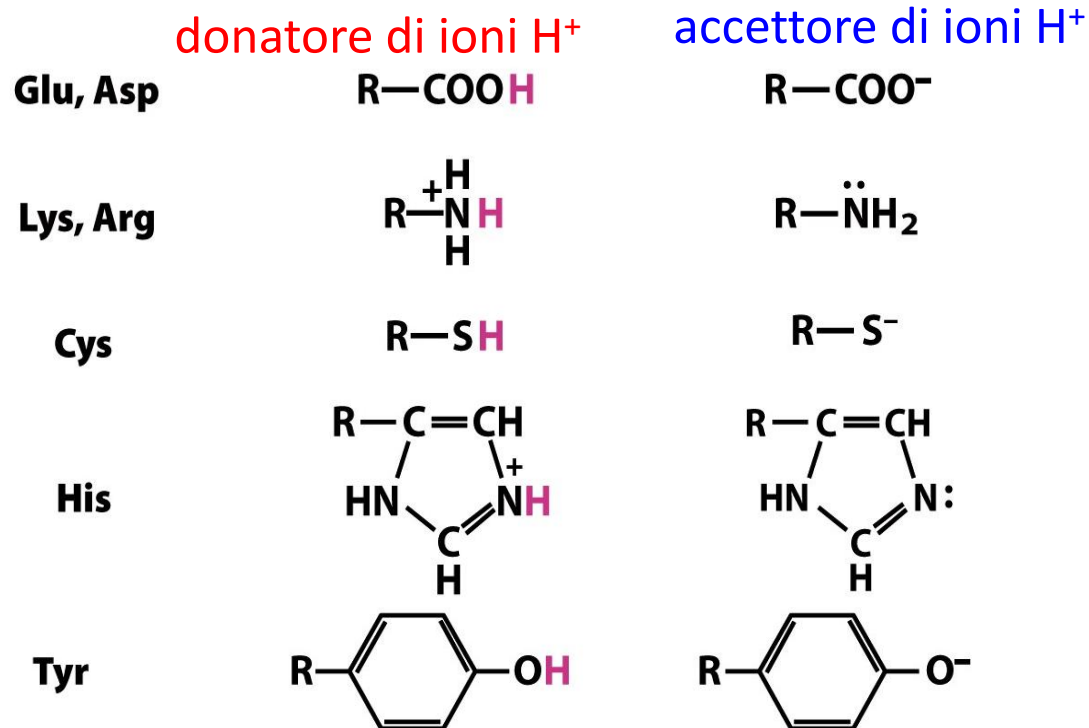
- La catalisi a cui partecipano H^+ o OH^- presenti nell' H_2O è chiamata **catalisi acido base specifica**
- **La catalisi acido-base generale**: trasferimento di protoni da acidi o basi deboli.
Sono coinvolte le catene laterali ionizzabili di residui amminoacidici del sito catalitico.
La velocità di reazione aumenta di 10^2 e 10^3 volte

CATALISI ACIDO-BASE generale

Residui importanti polari:

Catene laterali di AA acidi: Asp, Glu

Catene laterali di AA basici: Lys, Arg



Altri residui importanti: Ser, Tyr e Cys

L'attività catalitica di questi enzimi è sensibile al pH

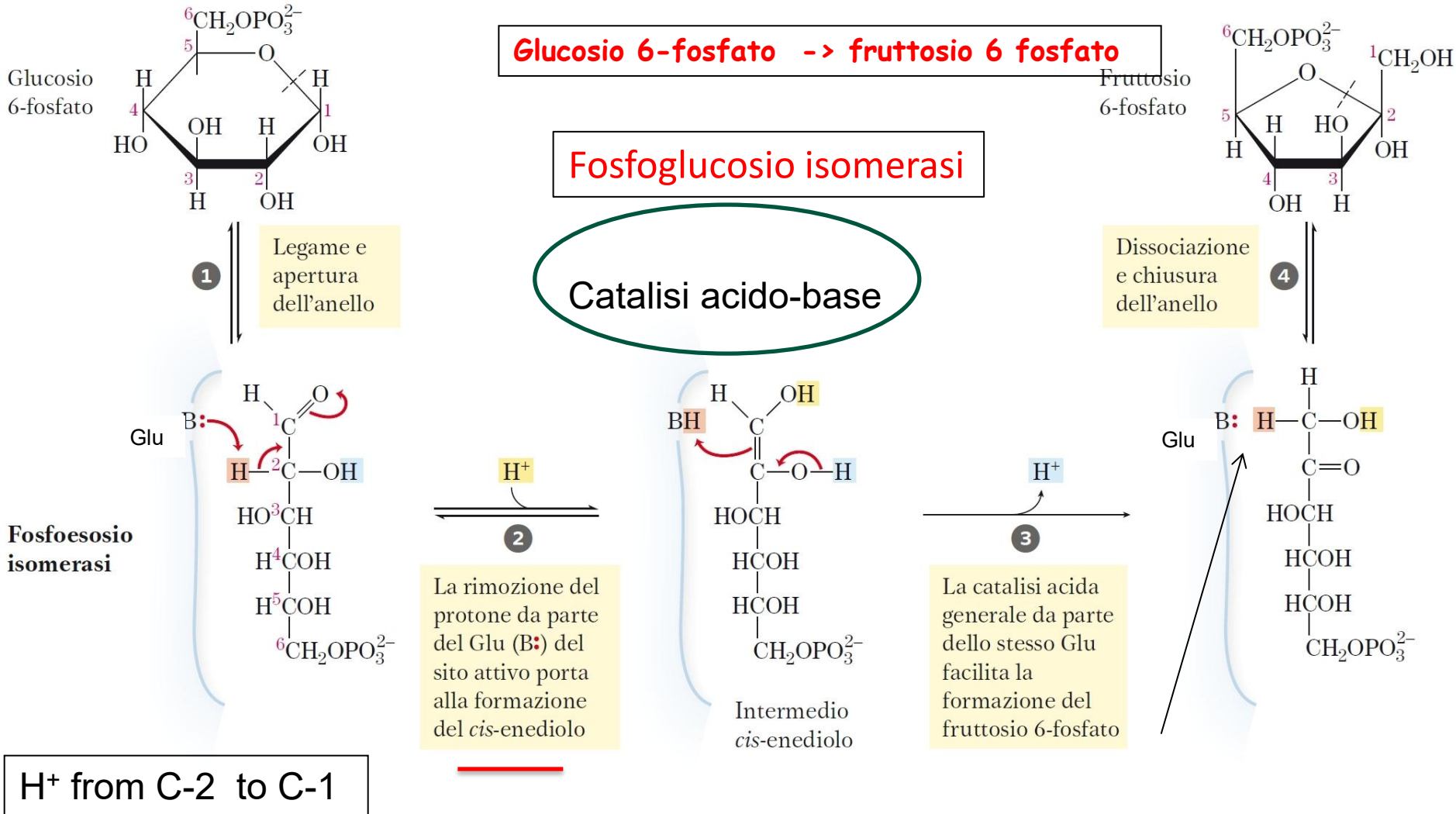


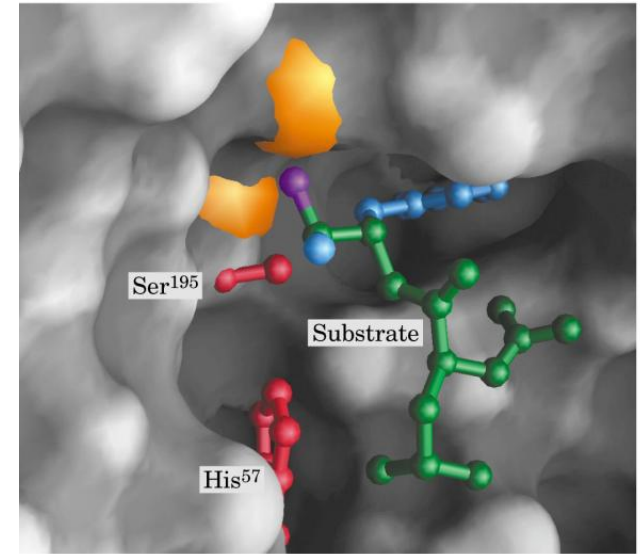
Figura 14.5 **MECCANISMO D'AZIONE** La reazione catalizzata dalla fosfoesiosio isomerasi. Le reazioni di apertura e chiusura dell'anello (passaggi da 1 a 4) sono catalizzate da un residuo di His posto sul sito attivo, tramite meccanismi che sono stati omessi per semplicità. Il protone (in rosa) inizialmente in C-2 è reso più facilmente rimuovibile per la vicinanza del gruppo

carbonilico adiacente e del gruppo ossidrilico. Dopo essere stato trasferito dal C-2 al Glu del sito attivo (un acido debole), il protone si scambia liberamente con la soluzione circostante; pertanto, il protone rimosso dal C-2 nella tappa 2 non è necessariamente lo stesso che viene aggiunto in C-1 nella tappa 3.

CATALISI COVALENTE

Prevede la formazione di un intermedio di reazione legato covalentemente all'enzima.

Si forma un legame
covalentemente TRANSITORIO
tra una catena laterale
dell'enzima nel sito attivo (o tra
un cofattore enzimatico) e il
substrato



- Tale legame ha un effetto di attivazione dell'intermedio e lo rende più reattivo.
- Riduce l'entropia (il substrato legato covalentemente è vincolato nei suoi movimenti)

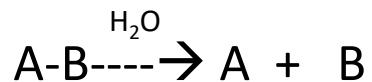
CATALISI COVALENTE

La catena laterale reattiva dell'enzima può comportarsi

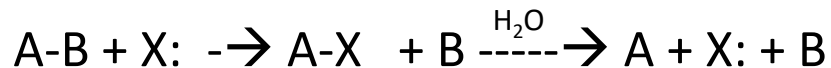
- nucleofilo (donando un doppietto elettronico)
- elettrofilo (accettando un doppietto elettronico).

La più comune è la **catalisi nucleofila**

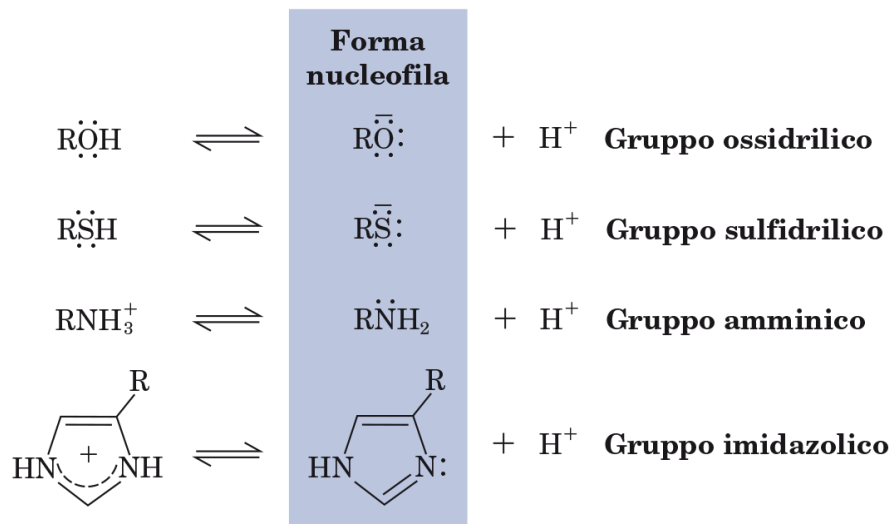
(un gruppo funzionale nel sito dell'enzima si comporta da nucleofilo):



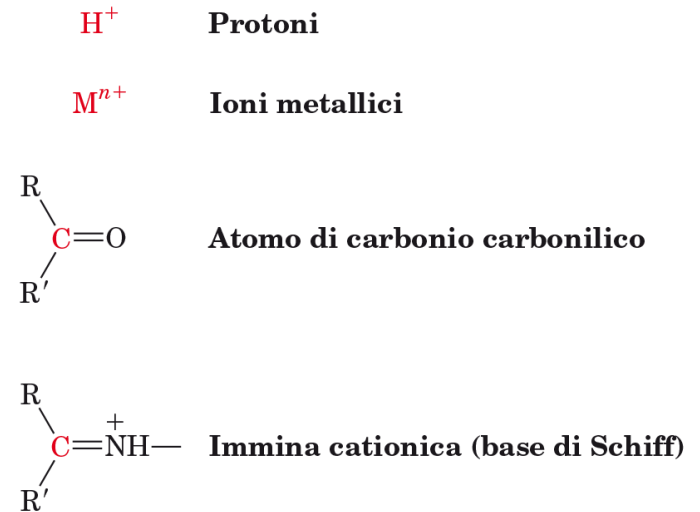
In presenza di un catalizzatore covalente (enzima con un gruppo nucleofilo)



(a) Nucleofili



(b) Elettrofili

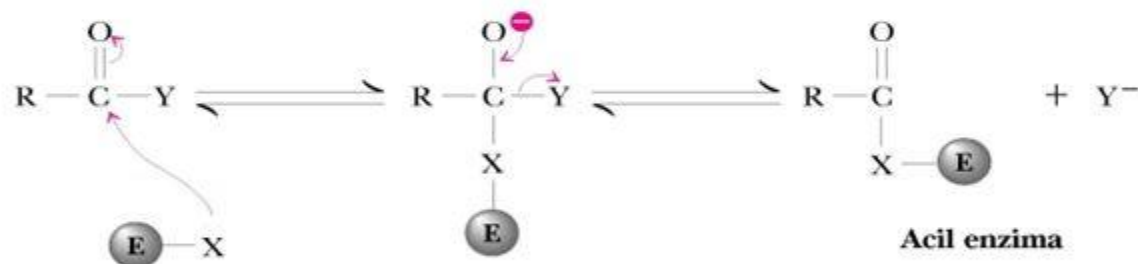
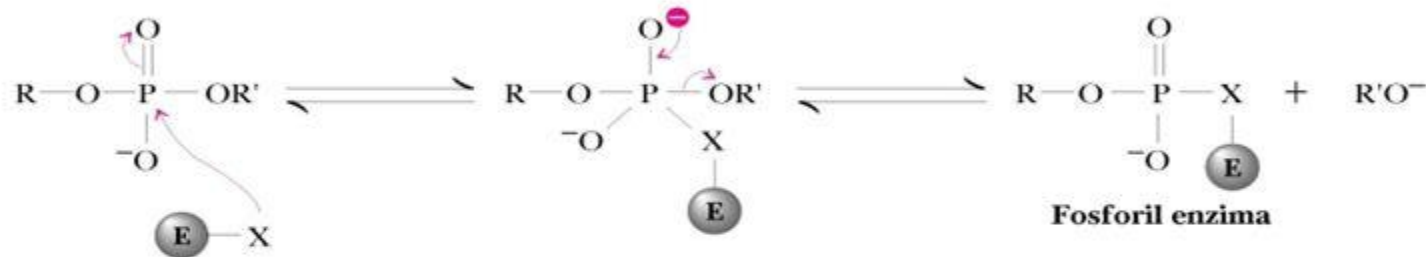


Nella CATALISI COVALENTE quanto maggiore è la stabilità del legame covalente formatosi, tanto minore è la facilità con cui esso tende a rompersi dopo la catalisi.

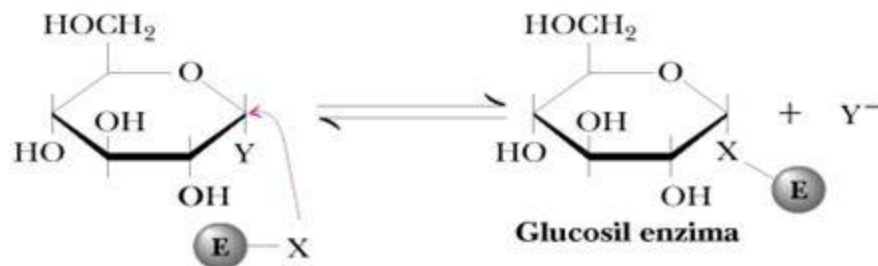
Nelle PROTEINE agiscono da ottimi nucleofili:

- ϵ -ammino gruppo della Lys
- gruppo TIOLICO della Cys
- gruppo IMIDAZOLICO dell'His
- gruppo CARBOSSILICO dell'Asp
- gruppo OSSIDRILICO della Ser

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

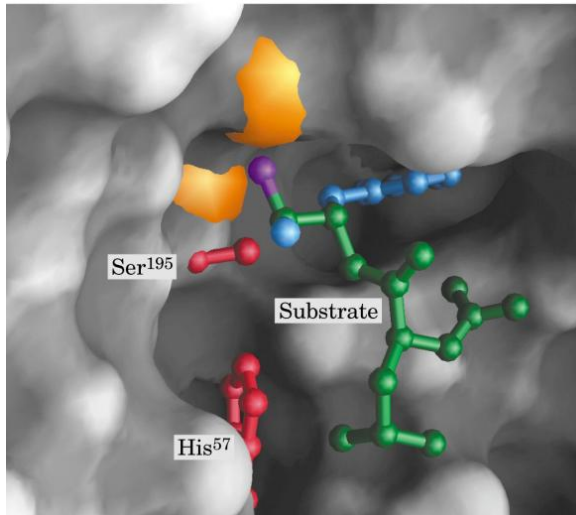


CATALISI COVALENTE

Chimotripsina (25 kDa)

Viene sintetizzata in forma inattiva dal pancreas (chimotripsinogeno)
è presente in forma attiva nell'intestino tenue.

Taglia il legame peptidico
Tyr, Trp, Phe (aromatici)
Ile, Leu. (catene laterali voluminose)



Chimotripsinogeno (Precursore)

**Viene tagliato (rimozione di due peptidi) e
convertito in chimotripsina**

Chimotripsinogeno (precursore)

Tagliati 2 peptidi:

Leucina 13 e isoleucina 16

Tirosina 146 e alanina 149



Chimotripsina

3 catene polipeptidiche tenute insieme da due ponti disolfuro

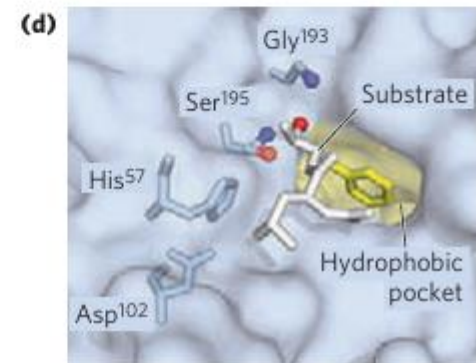
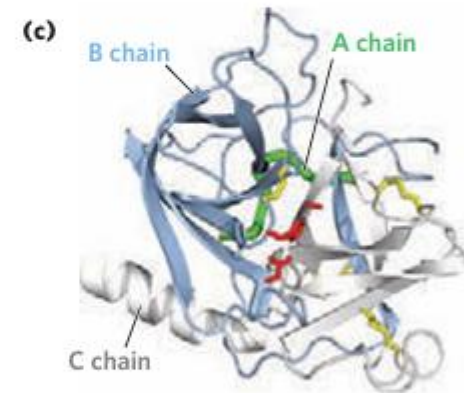
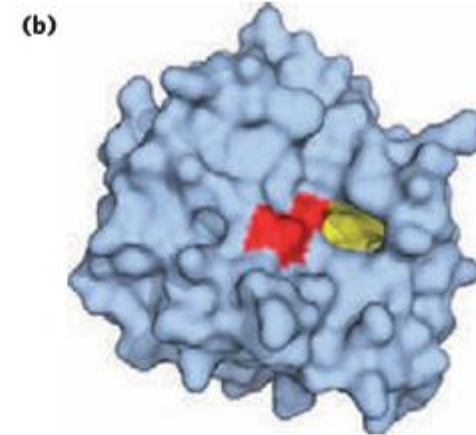
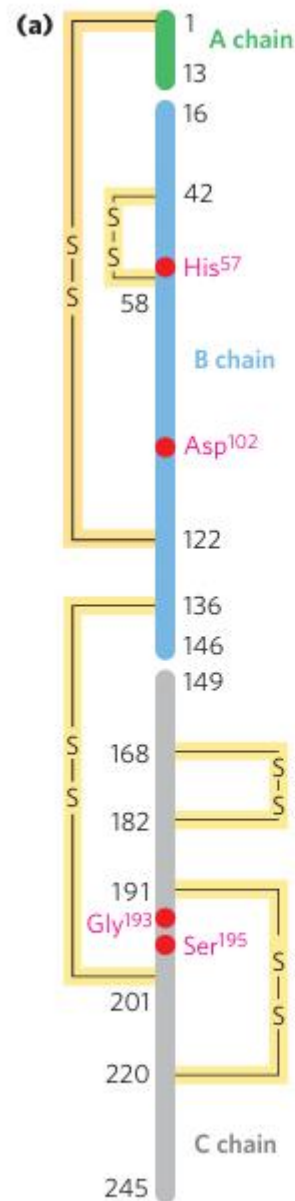
- 3 ponti disolfuro intracatena

Sito attivo:

Ser 195,

His 57

Asp 102

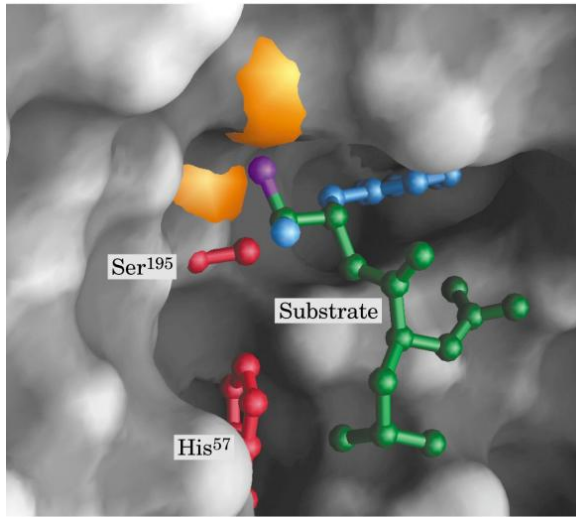


CATALISI COVALENTE

Chimotripsina (25 kDa)

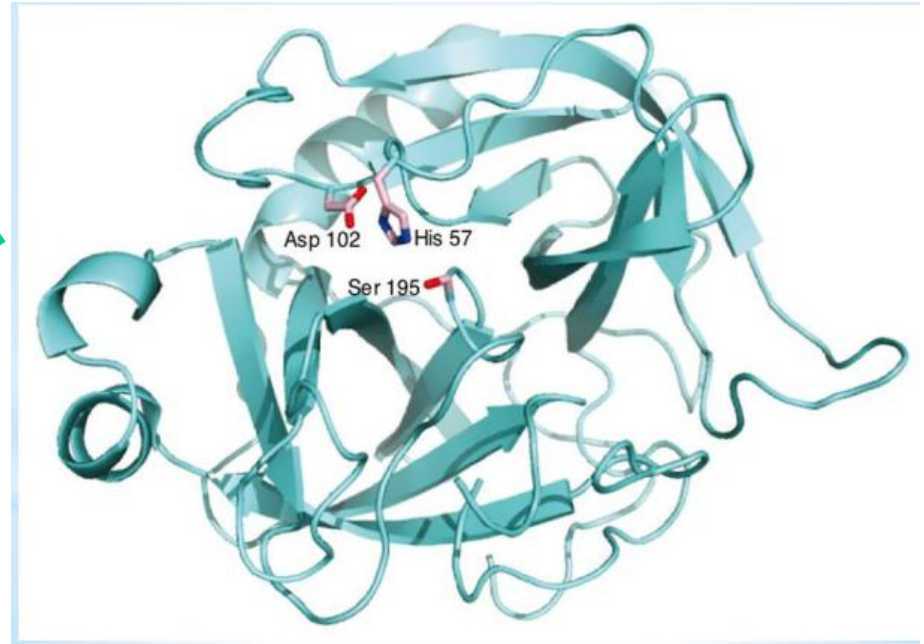
Proteasi a Serina (come la tripsina)
Famiglia delle serina proteasi,

Aumenta la velocità della reazione di 10^9 volte

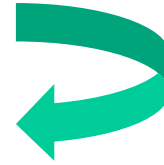


Sito attivo

Ser 195,
His 57
Asp 102



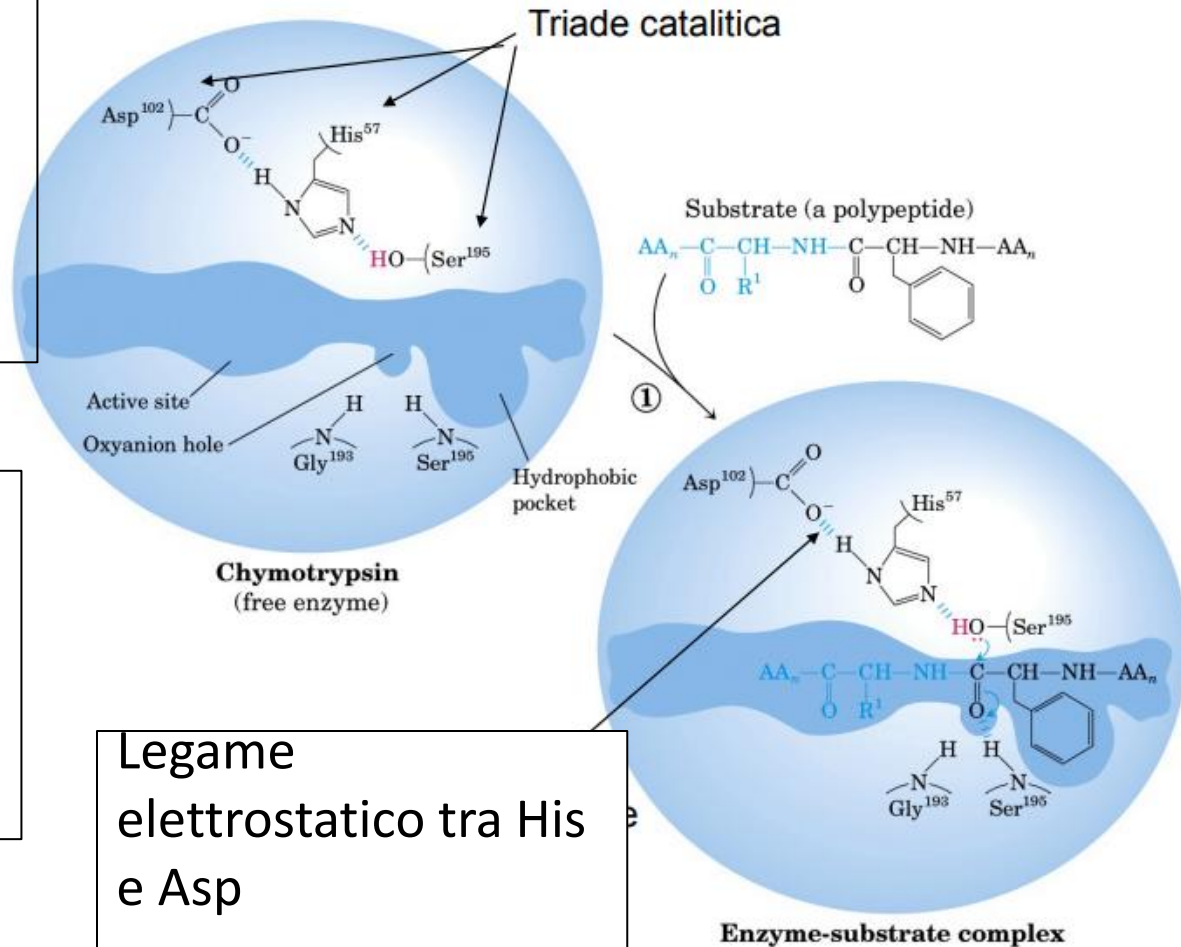
In assenza di substrato gli AA sono allineati



L'atomo di azoto dell'His polarizza -OH della Ser



Rende possibile la **cessione dell'H⁺**



L'ossigeno della Ser195 compie un **attacco nucleofilo** sul carbonio carbonilico del substrato

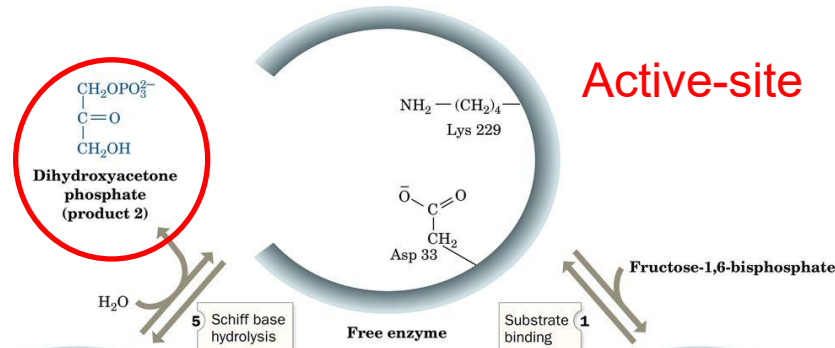
Legame elettrostatico tra His e Asp

Aldolase catalyzed a **aldol splitting** (the opposite of aldol condensation)

Fructose 1,6-bisphosphate -> dihydroxyacetone phosphate + glyceraldehyde-3-phosphate

STEP 5:

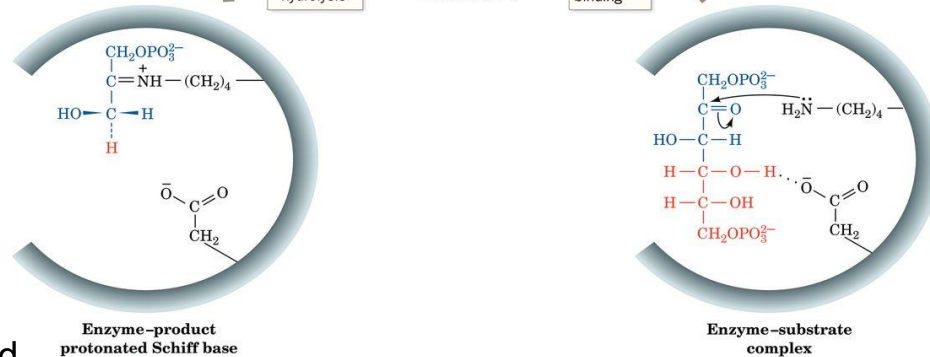
Schiff base hydrolyzed and released DHAP



Step 1:

Binding and opening the ring

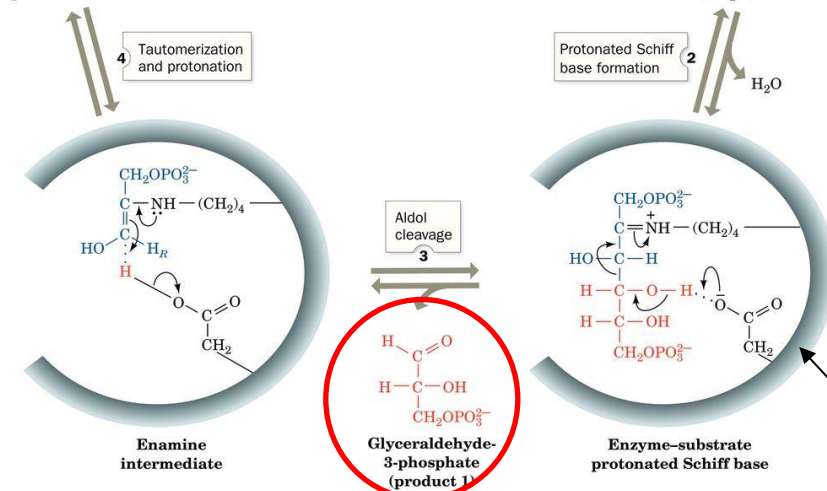
Fructose 1,6 bisphosphates binds the site-active



Step 2:

Carbonyl group reacts to Lys and lead to protonated Schiff base

Formation of the Schiff base between the C2 of the ketose and the epsilon-amino group of the lysine of the enzyme



STEP 3:

A Asp residue intervenes which leads to the breaking of the bond between C3 and 4 and the glyceraldehyde 3 phosphate is released.

STEP 4:

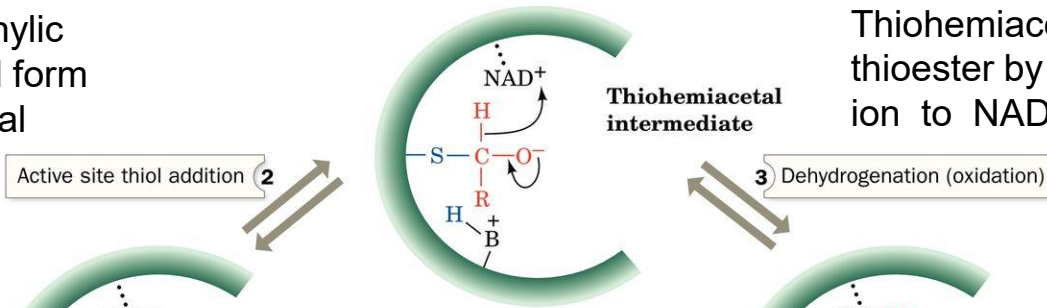
Protonated Schiff base and e tautomerizzazione

Gliceraldeide 3-P deigrogenasi



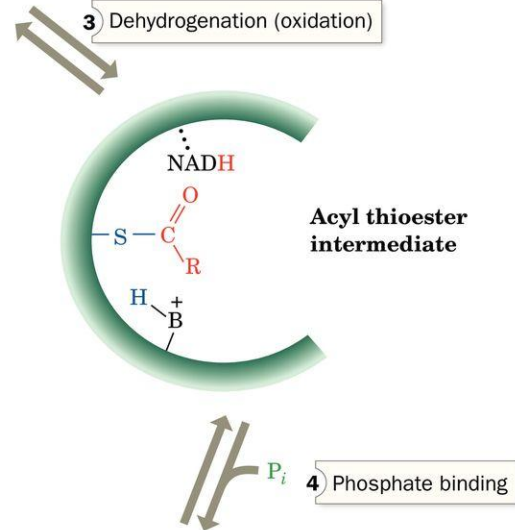
Step 2:

-SH group by nucleophilic attack to aldehyde and form Covalent thiohemiacetal



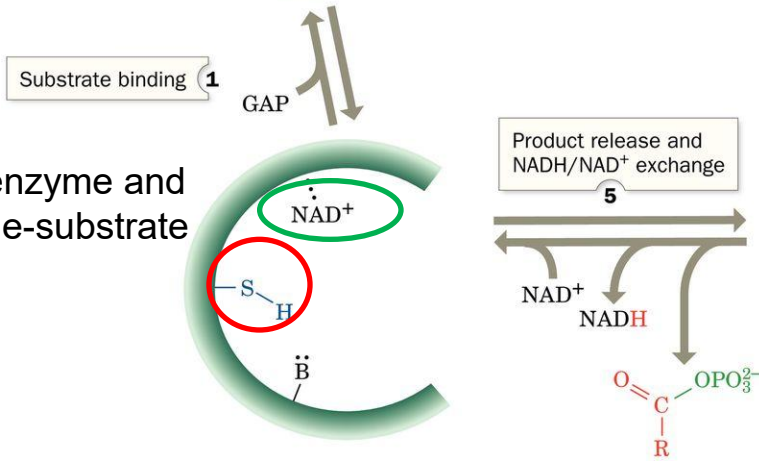
Step 3:

Thiohemiacetal is oxydized to acylthioester by transferring to hydride ion to NAD⁺ (storage energy)



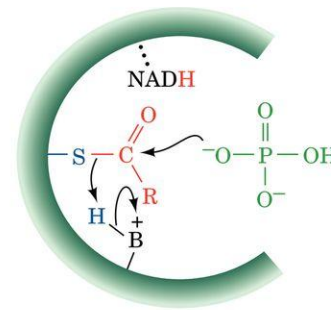
Step 1:

G3P binds to enzyme and forms a enzyme-substrate complex



Step 4:

Binding with phosphate



STEP 5:

Phosphate by nucleophilic attack to thioester and forms 1-3BPG

STEP 5:

NADH viene sostituito dal NAD⁺



CATALISI TRAMITE IONI METALLICI

Molti enzimi richiedono l'intervento di ioni metallici

METALLO-ENZIMI: metallo di transizione legato fortemente all'enzima (Fe²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e altri)

- Partecipano direttamente alla catalisi polarizzando il legame da rompere

Es: Zn²⁺ nelle carbossipeptidasi

- Consentono il legame di un substrato all'enzima

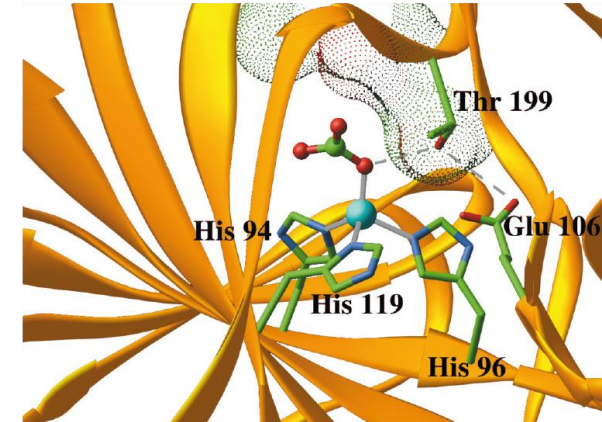
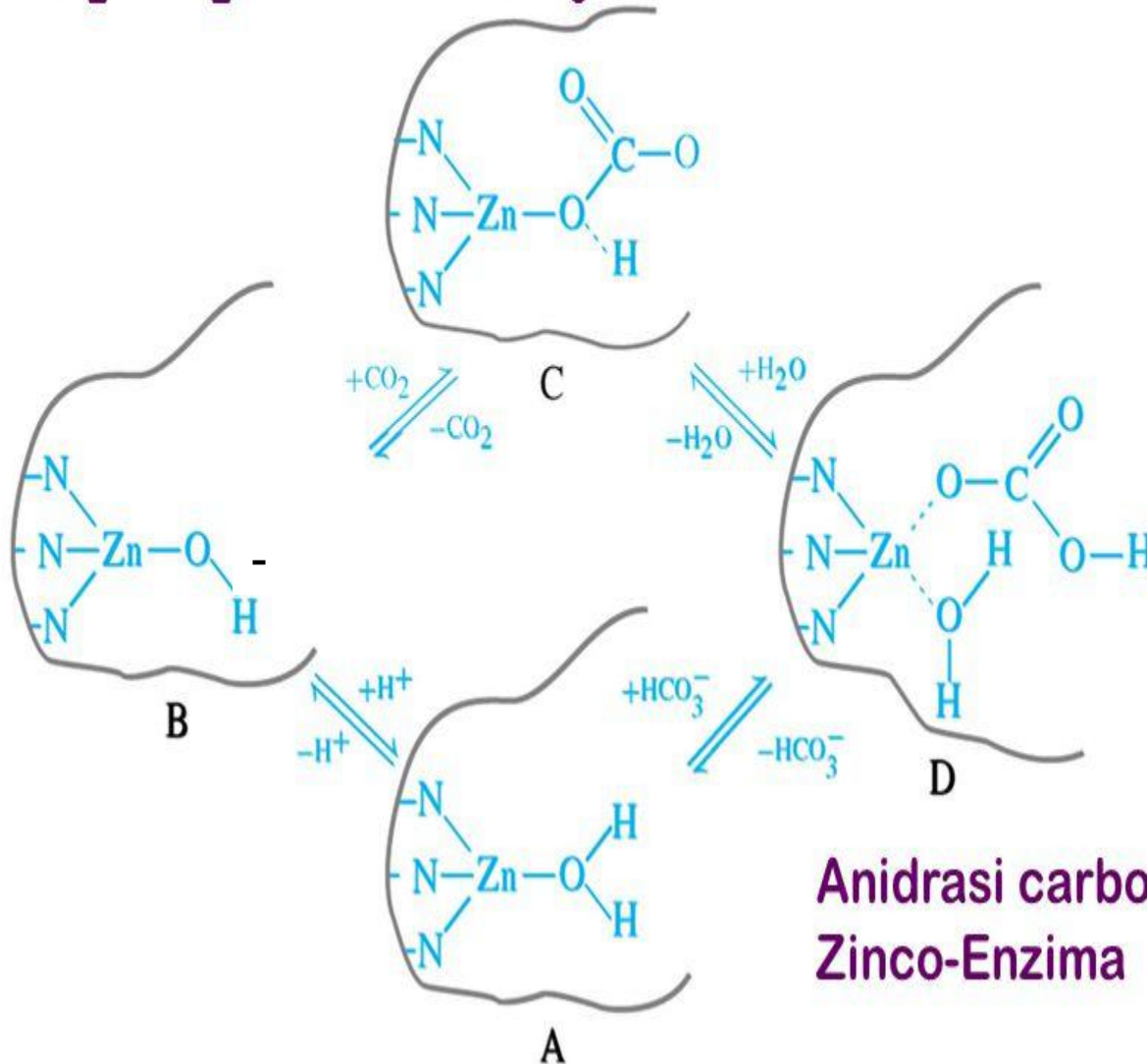
Es: Mg²⁺ nelle chinasi (il vero substrato non è ATP ma il complesso Mg²⁺-ATP)

- Possono comportarsi da gruppi prostetici (legati permanentemente all'enzima).

Es: Fe²⁺ → Fe³⁺ (citocromi)

Anidrasi 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'anidrasi carbonica

Anidrasi carbonica
Zinco-Enzima

Gli inibitori : Sostanze in grado di bloccare l'attività enzimatica

IRREVERSIBILI

Non possono essere allontanati dall'enzima (si legano stabilmente in modo covalente)

REVERSIBILI

Possono essere allontanati dall'enzima (normalmente non si legano in modo covalente)

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

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.

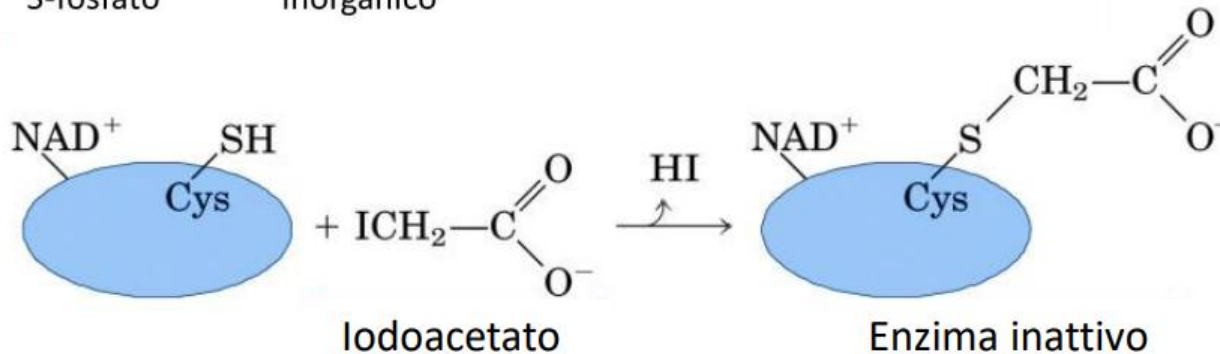
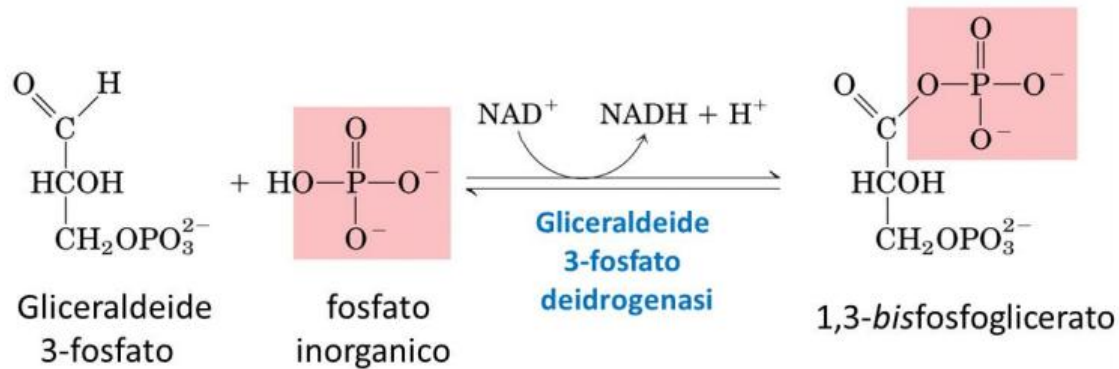
Utilizzati per lo studio dei meccanismi enzimatici o per studiare i gruppi coinvolti nelle catalisi:

Possono essere suddivisi:

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

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

- Reagenti gruppo-specifici

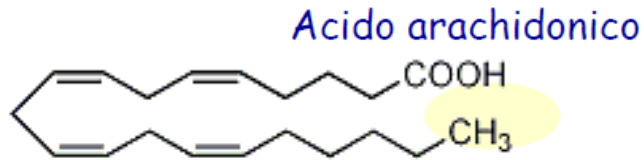


Esempi di inibitori enzimatici di uso comune

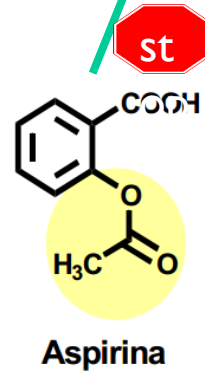
Acido acetilsalicilico



Inibitore **competitivo irreversibile**
dell'enzima cicloossigenasi



Cicloossigenasi



Prostaglandine



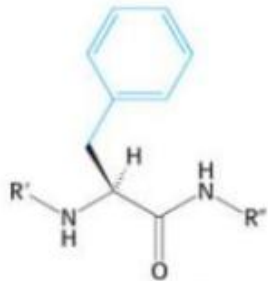
Inflammation

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

Analoghi del SUBSTRATO

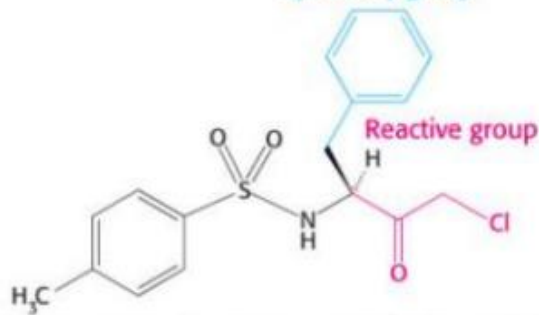
Bloccano enzimi con residui di Ser nel sito attivo:
Proteasi seriniche
(chimotripsina...);

(A)



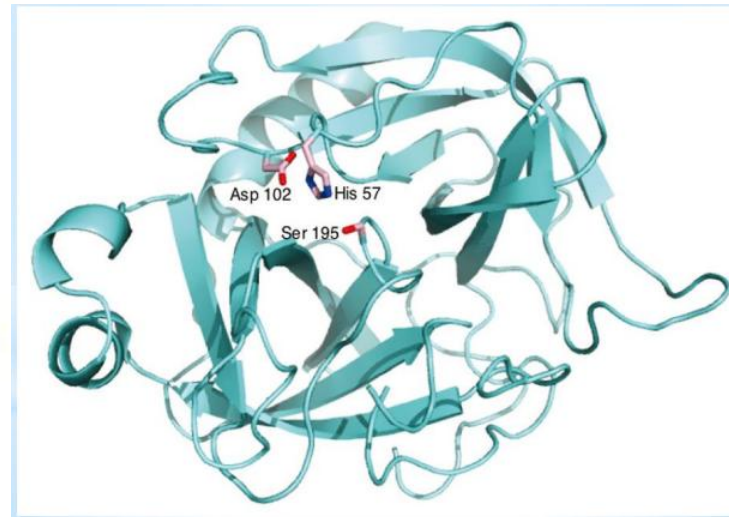
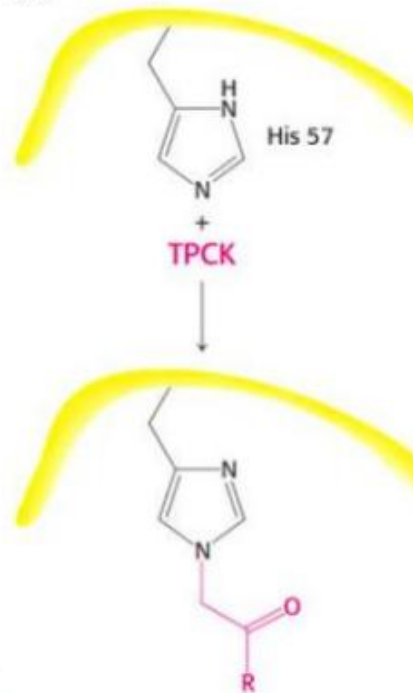
Substrato naturale della chimotripsina

Specificity group



TPCK (N-tosil-L-fenilalaninaclorometilchetone)

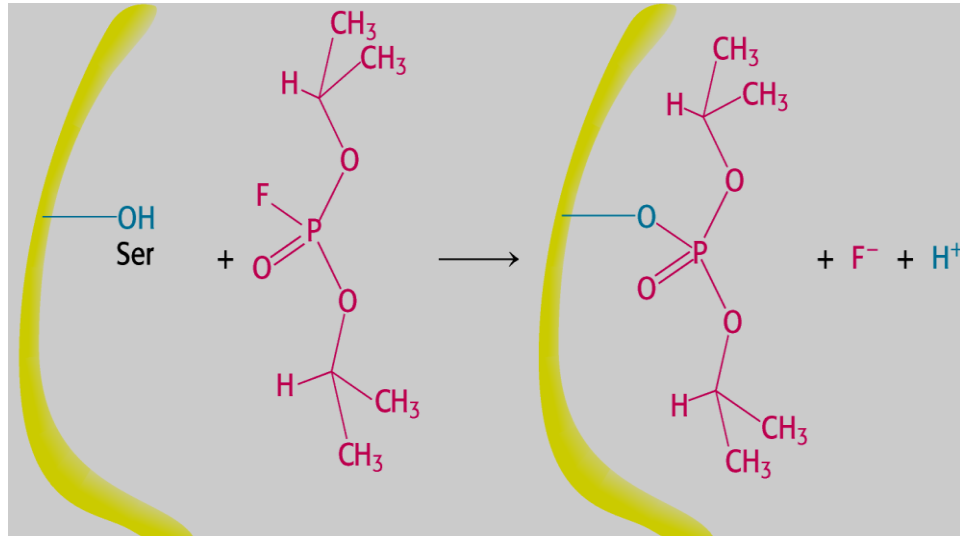
(B) Chimotripsina



TPCK (N-tosil-L-fenilalaninaclorometilchetone) blocca specificatamente la chimotripsina (proteasi a serina)

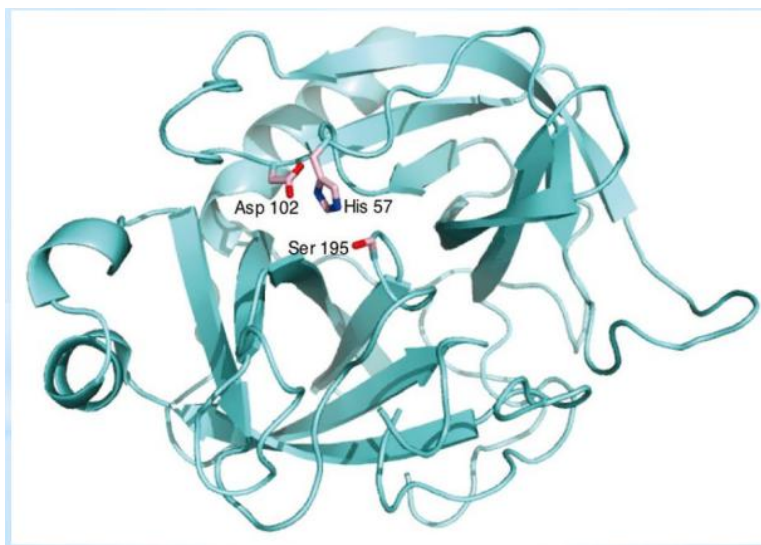
INIBIZIONE IRREVERSIBILE

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



DFP

addotto inattivo



Es: composti
organofosforici
(DFP
(diisopropilfluoro
fosfato),
gas nervini,



Sono composti con una
struttura tetraedrica
intorno all'atomo di
fosforo

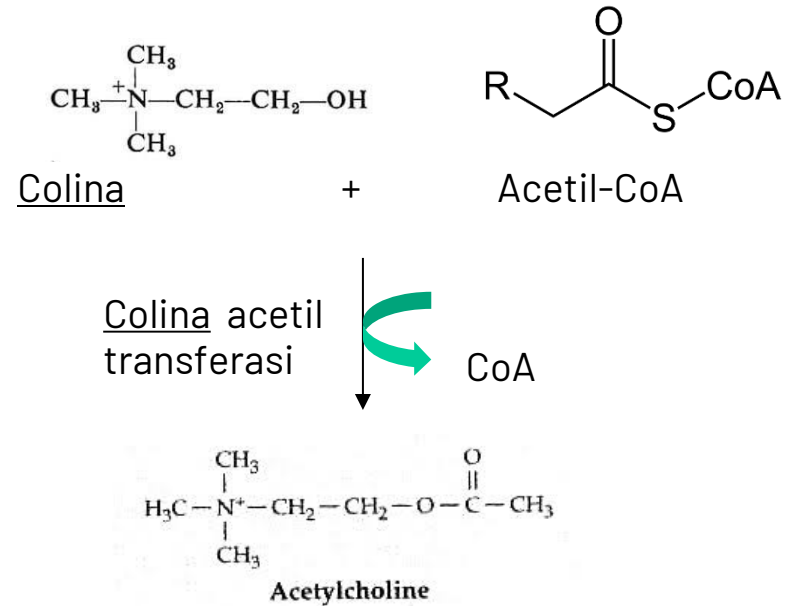
Stabiliscono interazioni
con il sito attivo che
sono molto più forti di
quelle che si
otterrebbero nel
complesso ES.

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

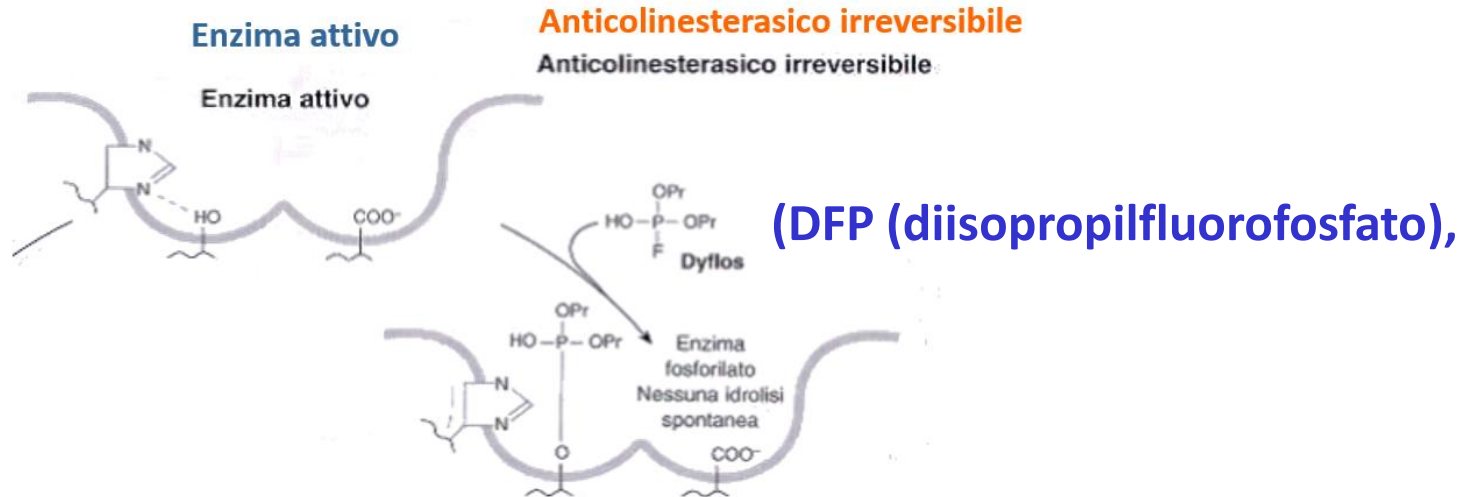
Esterasi a serina (Acetilcolinesterasi)

L'acetilcolina è un neurotrasmettitore, una sostanza prodotta dal nostro organismo per trasferire gli impulsi nervosi in molteplici punti del sistema nervoso centrale e periferico.

L'acetilcolina è formata dall'unione di una molecola di colina con una di acetil-coenzima A (acetil-CoA);



acetilcolina



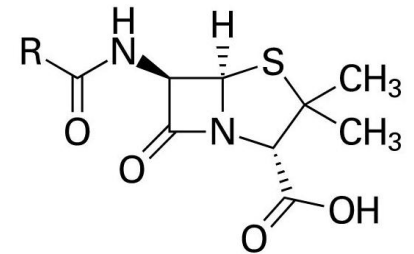
INIBIZIONE IRREVERSIBILE

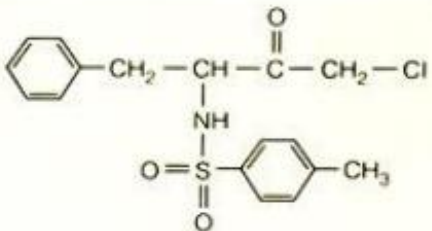
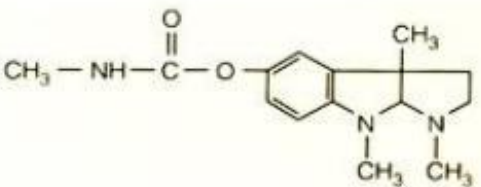
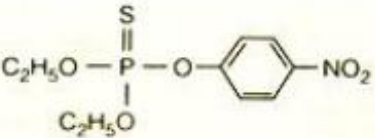
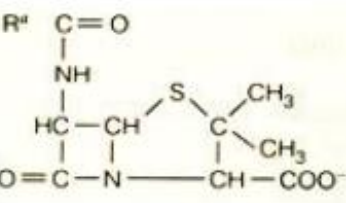
Penicillina: inibizione catalitica sul sito attivo dell'enzima **glicopeptidetranspeptidasi**

Glicopeptidetranspeptidasi: enzima necessario per la formazione della parete batterica di peptidoglicano

- **La penicillina esercita la sua azione antibatterica interferendo con la sintesi del peptidoglicano, un componente essenziale della parete cellulare dei batteri.**

- **Questo processo impedisce ai batteri di formare una parete cellulare robusta, causando la loro lisi e morte.**



Nome	Formula ^a	Origine	Modalità di azione
Cianuro	CN ⁻	Mandorle amare	Reagisce con gli ioni metallici degli enzimi (ovvero, Fe, Zn, Cu)
Diisopropil fluorofosfato (DFP)	$(\text{CH}_3)_2 - \text{CH} - \text{O} - \text{P} \begin{array}{l} \text{F} \\ \\ \text{O} \end{array} - \text{O} - \text{CH} - (\text{CH}_3)_2$	Sintetica	Inibisce gli enzimi contenenti serina nel sito attivo
Sarin	$(\text{CH}_3)_2 - \text{CH} - \text{O} - \text{P} \begin{array}{l} \text{F} \\ \\ \text{O} \end{array} - \text{CH}_3$	Sintetica (gas nervino)	Come per il DFP (diisopropilfluorofosfato)
N-Tosil-1-fenilalaninaclorometilchetone (TPCK)		Sintetica	Reagisce con His 57 della chimotripsina
Fisostigmina		Fave di Calabar	Forma derivati acilici con l'acetilcolinesterasi e altri enzimi
Parathion		Sintetica (insetticida)	Inibisce l'enzima acetilcolinesterasi
Penicillina		Da funghi del genere <i>Penicillium</i>	Inibisce gli enzimi coinvolti nella sintesi della parete delle cellule batteriche

Gli inibitori : **Sostanze in grado di bloccare l'attività enzimatica**

IRREVERSIBILI

Non possono essere allontanati dall'enzima (si legano stabilmente in modo covalente)

REVERSIBILI

Possono essere allontanati dall'enzima (normalmente non si legano in modo covalente)

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.



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

Costante di inibizione

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

Gli inibitori : Sostanze in grado di bloccare l'attività enzimatica

REVERSIBILI

Possono essere allontanati dall'enzima (normalmente non si legano in modo covalente)



COMPETITIVI



NON COMPETITIVI



INCOMPETITIVI O ACOMPETITIVI

Gli inibitori

Sostanze in grado di bloccare l'attività enzimatica

REVERSIBILI

Possono essere allontanati dall'enzima (non si legano in modo covalente)

IRREVERSIBILI

Non possono essere allontanati dall'enzima (si legano in modo covalente)

COMPETITIVI

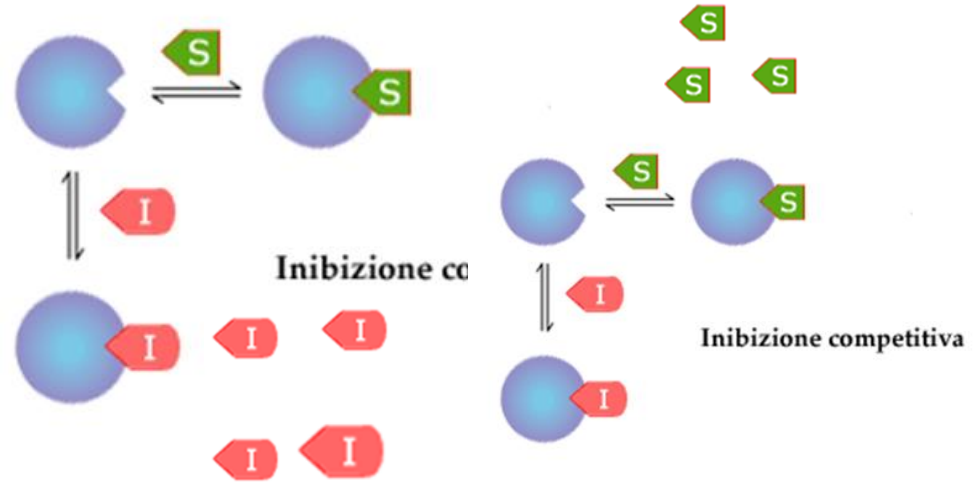
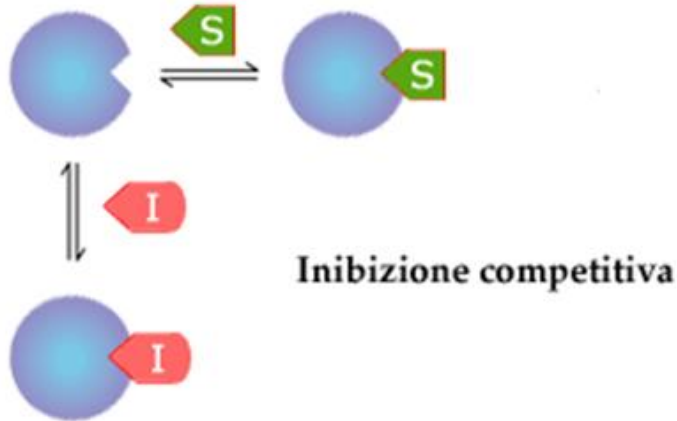
**NON
COMPETITIVI**

**INCOMPETITIVI
O
ACOMPETITIVI**

Inibizione Competitiva

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

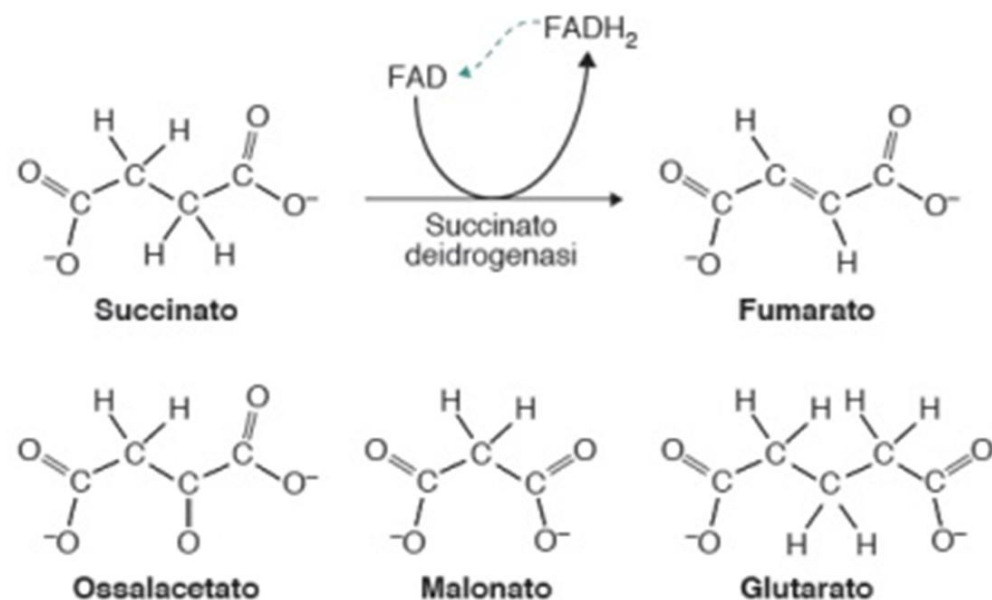
Si lega al sito attivo dell'enzima
impedendo al substrato di legarsi



Una $[I] > [S]$
spiazza il substrato

Una $[S] > [I]$
spiazza l'inibitore

L'inibitore (I) è spesso
simile al substrato (S)



▲ **FIGURA 10.6**

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

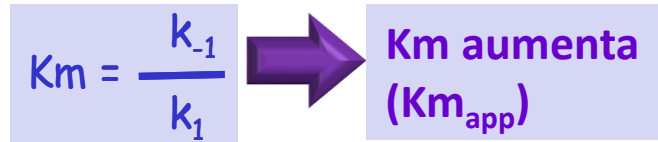


L. Pollegioni
Fondamenti di Biochimica
Edises Edizioni

INIBITORI COMPETITIVI

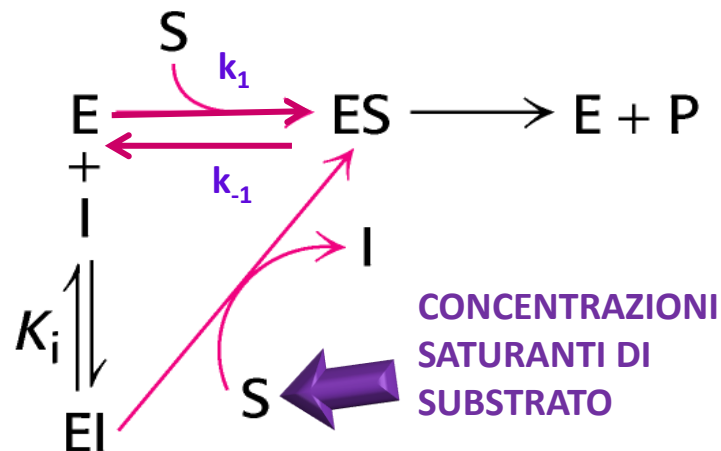
In presenza di Inibitore COMPETITIVO:

Aumenta la dissociazione del complesso ES e quindi aumenta la k_{-1}



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

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



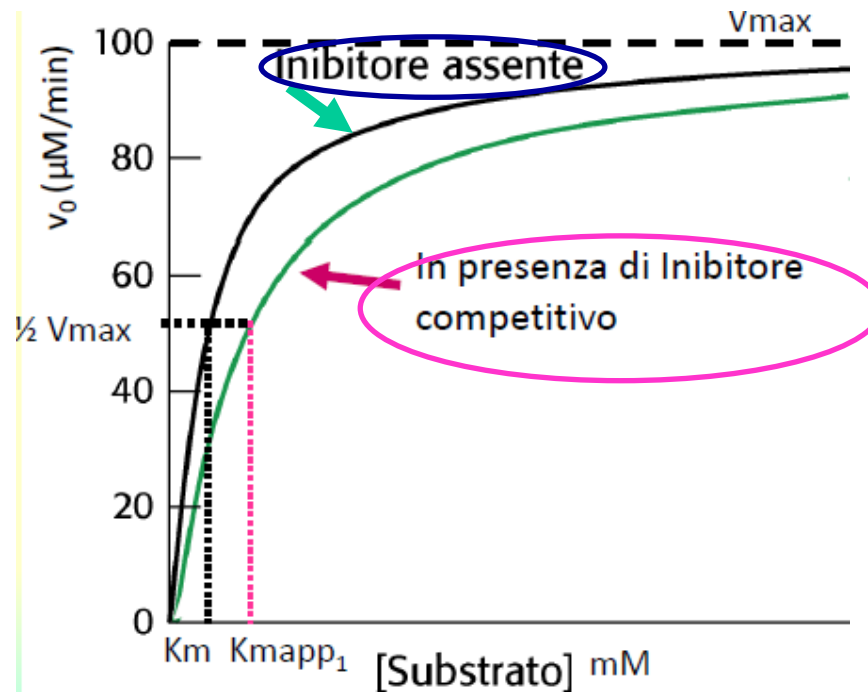
V_{max} rimane inalterata,
In presenza di [S] saturanti
l'inibitore è scalzato dal sito
attivo.

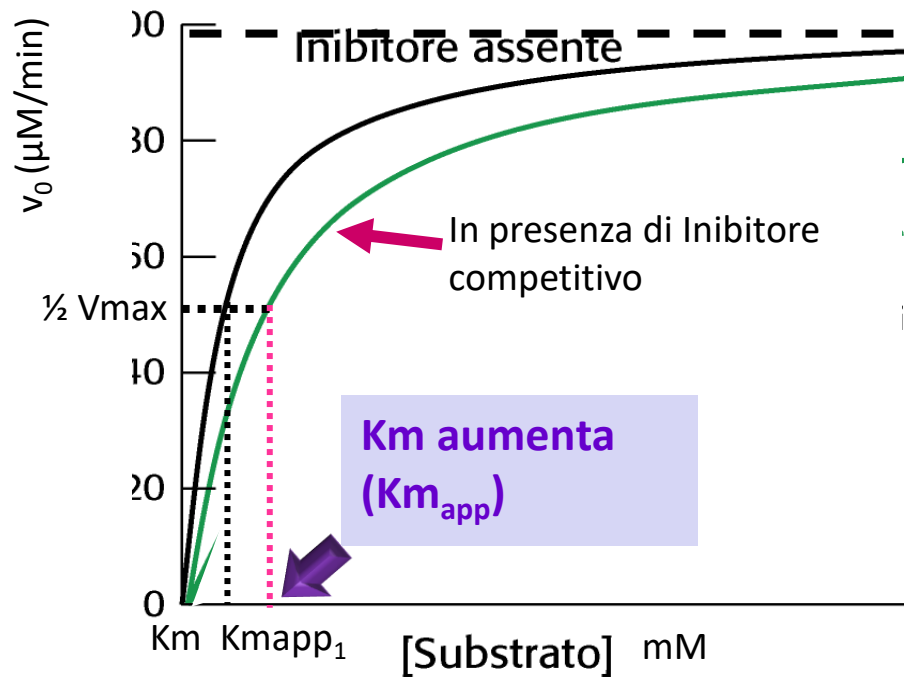
K_m aumenta/ V_{max} rimane invariata

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

il valore aumentato di K_m ci dice che più substrato è necessario per raggiungere la stessa $V_{max} / 2$ che si avrebbe in assenza dell'inibitore

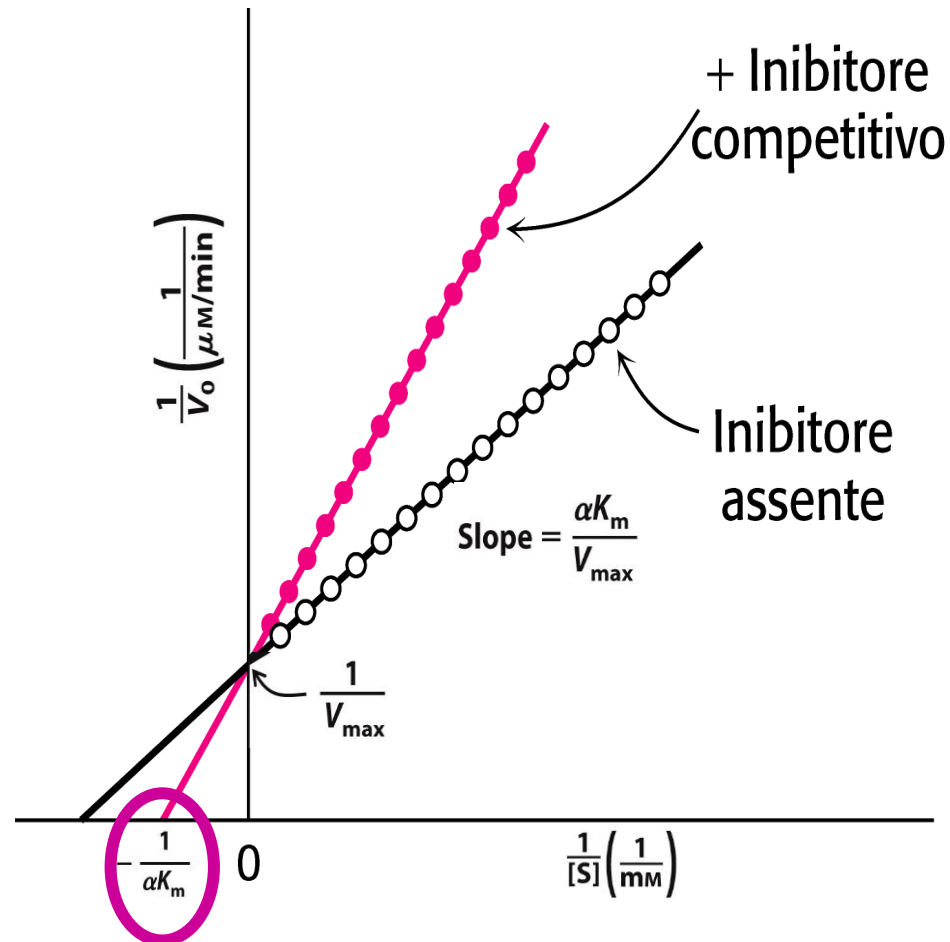
$$K_m \text{ app} > K_m$$





1/ Vmax =invariato

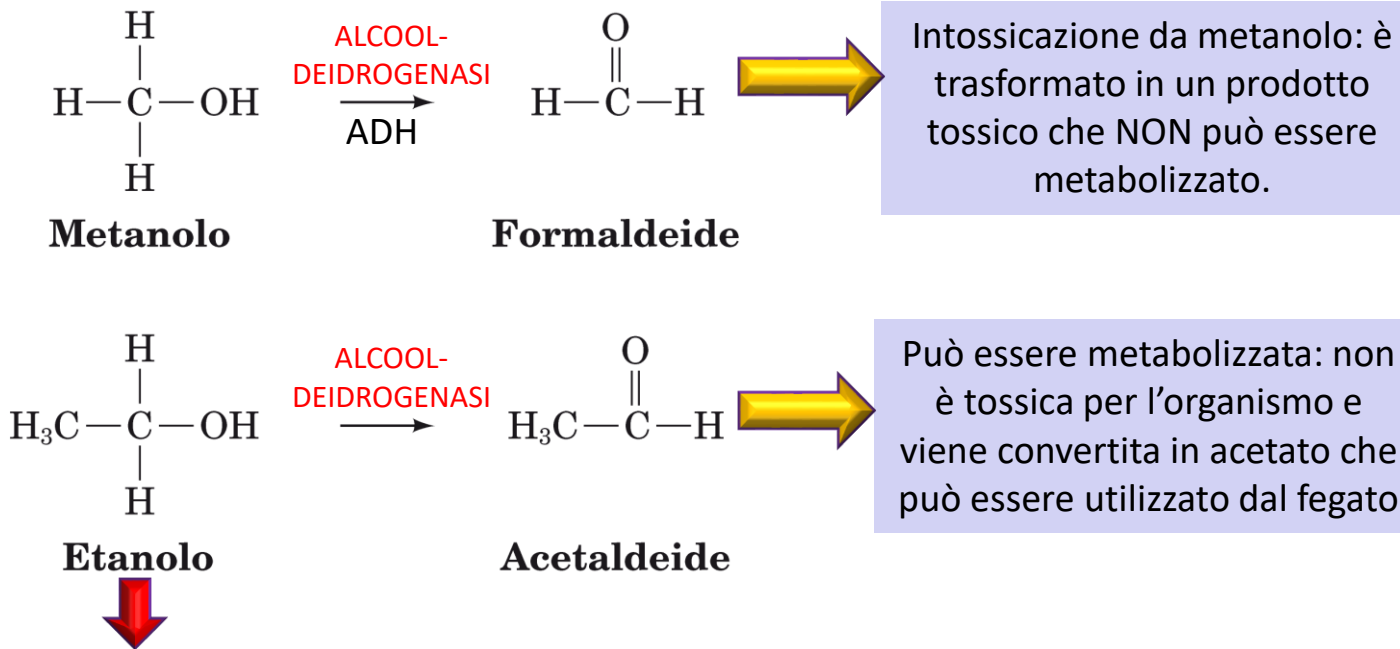
Km
Vmax
Aumento del
coefficiente
angolare
(pendenza)



- 1/Km = diventa meno negativo

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

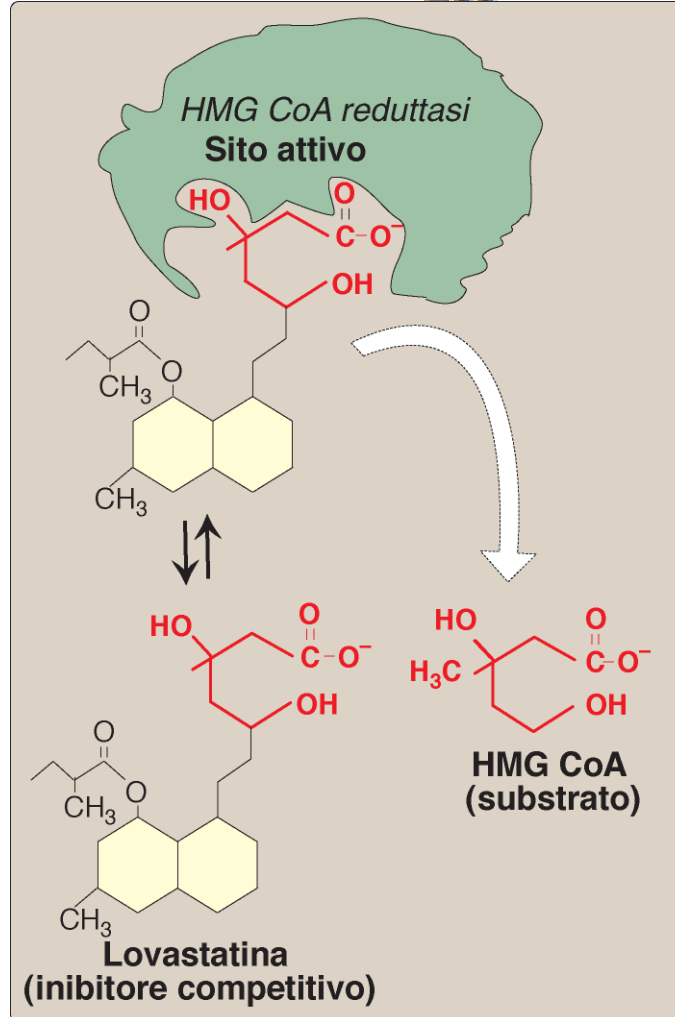
L'Etanolo è il più comune substrato dell'enzima: Alcool deidrogenasi (ADH), presente nel fegato.
Altri alcoli possono essere substrati di quest'enzima: per es. il METANOLO



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.

Enzima chiave della sintesi del colesterolo

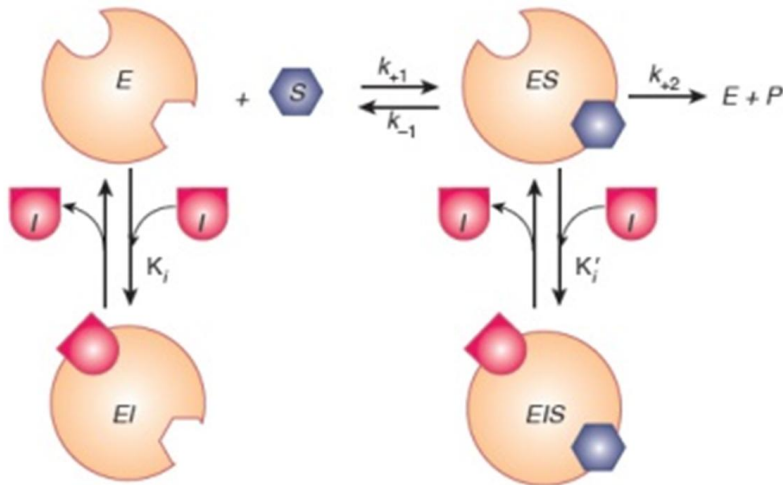
β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA
(HMG-CoA)



Inibitore **competitivo**
reversibile dell'enzima
preposto alla biosintesi
del colesterolo

INIBITORE NON COMPETITIVO PURO

L'inibitore si lega sia 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.

SE K_i e K'_i hanno lo stesso valore

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

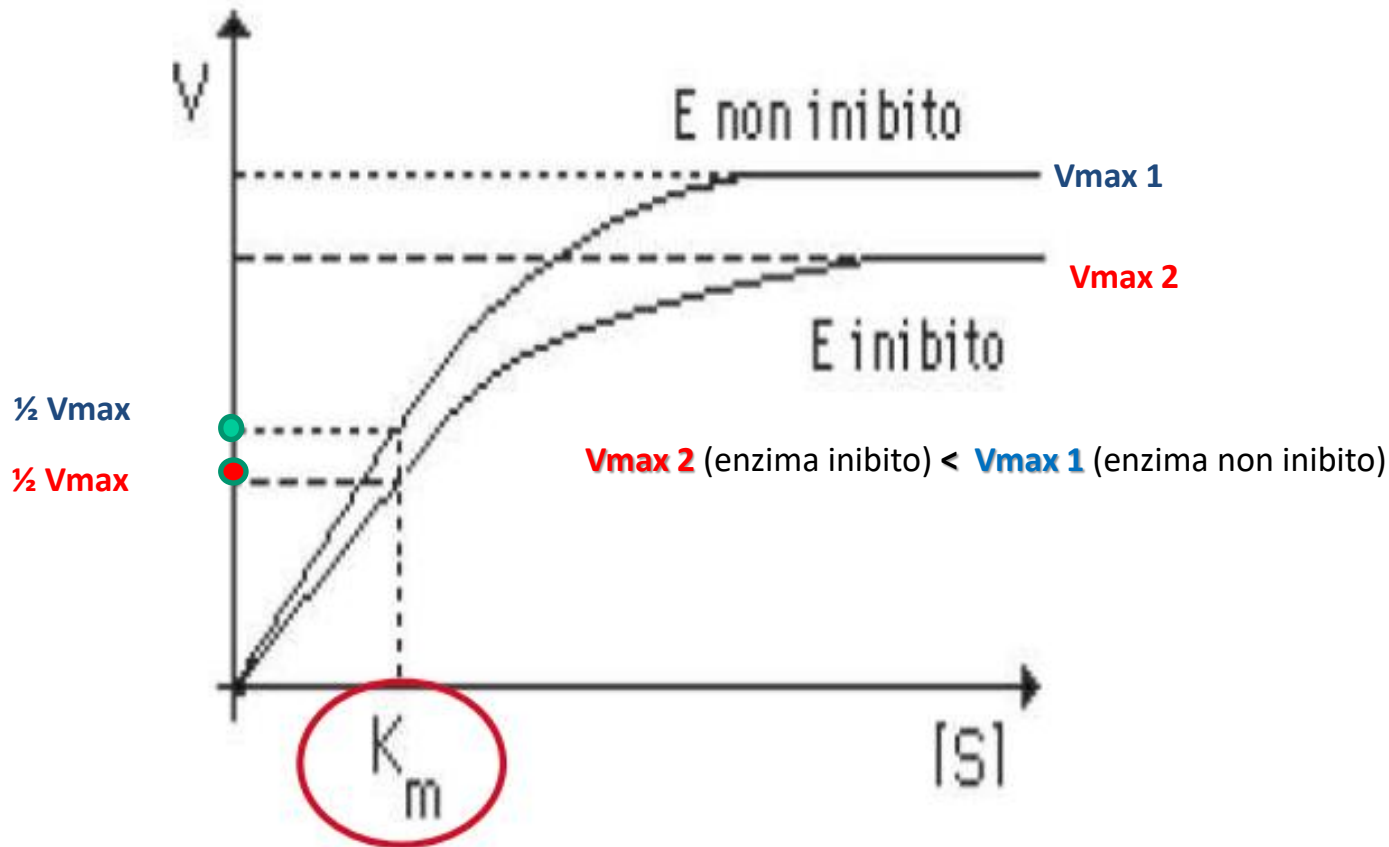
La K_m rimane invariata

La presenza dell'inibitore riduce la velocità di formazione del prodotto

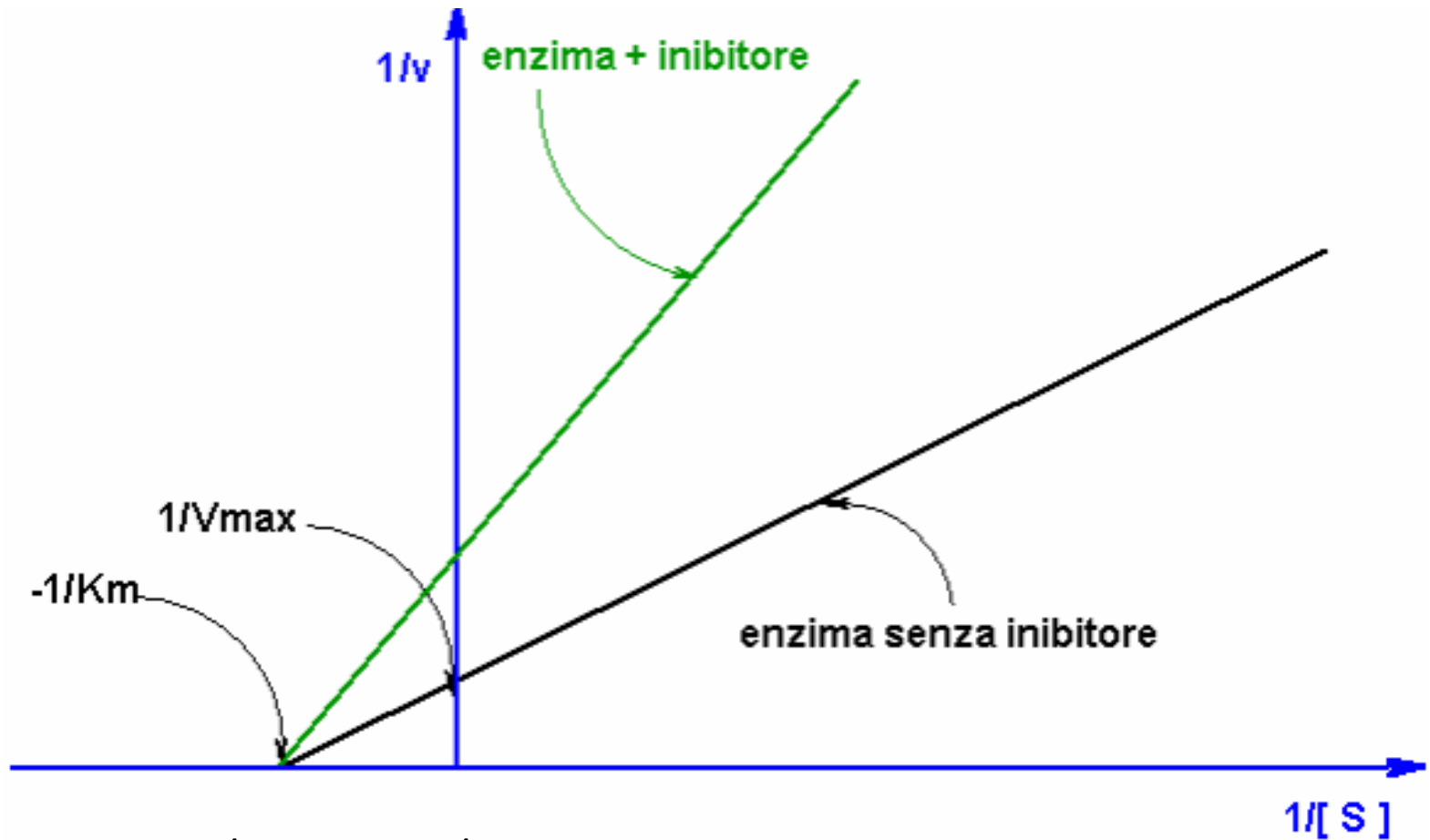
Diminuisce la V_{max} .

In presenza di **Inibitore non competitivo** l'enzima non potrà essere tutto sotto forma di ES, ma parte rimarrà come complesso non-produttivo ESI.

Inibizione non competitiva

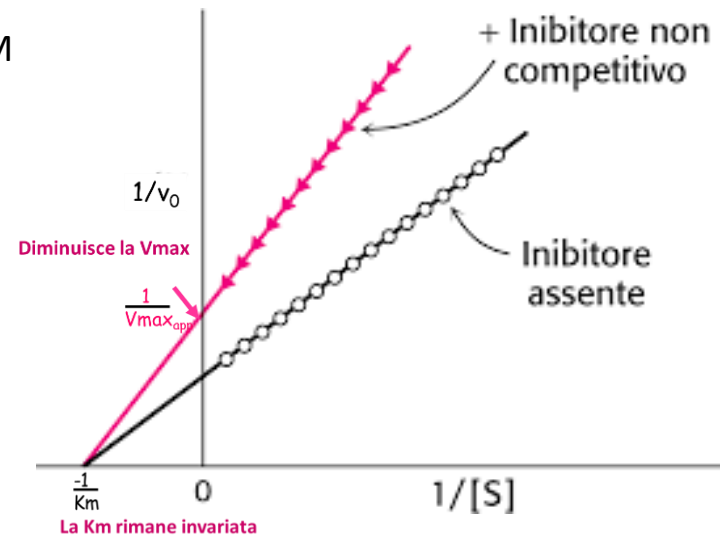
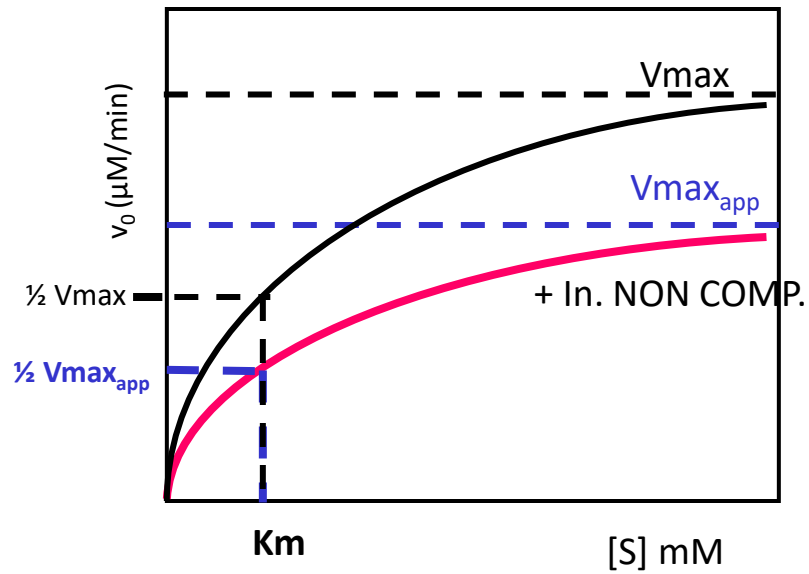


- Una parte dell'enzima resta inattivo
- L'inibizione non è influenzata dalla concentrazione del substrato S



$V_{max} = 100$ $1/V_{max} = 1/100 = 0,01$

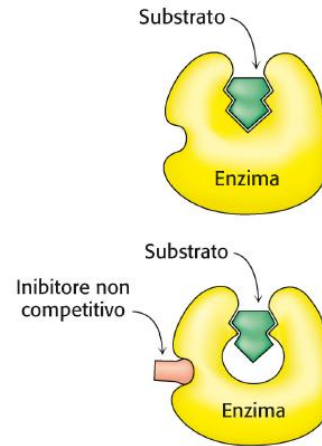
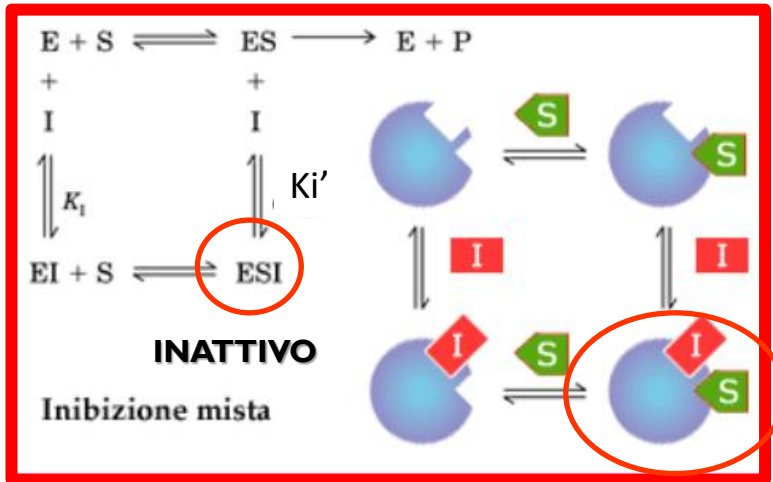
$V_{max} = 10$ $1/V_{max} = 1/10 = 0,1$



Inibizione non competitiva (mista)



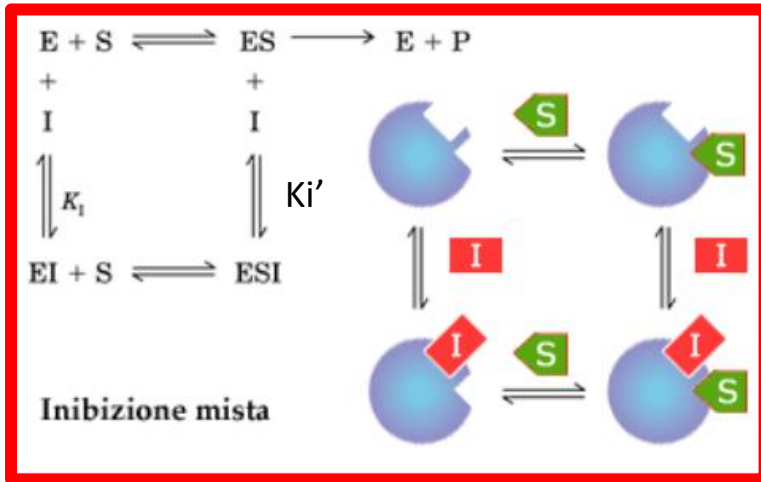
inibitore e substrato si legano in siti diversi dell'enzima



- **I** si lega tanto ad E che a ES
- **S** si lega sia ad E che a EI.

In presenza di Inibitore non competitivo misto, l'enzima non potrà essere tutto sotto forma di ES, ma parte rimarrà come complesso non-produttivo ESI.

INIBITORE NON COMPETITIVO MISTO



La presenza dell'inibitore diminuisce la velocità di formazione del prodotto

Diminuisce la V_{max}

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

SE K_i e K_i' hanno diverso valore

La K_m si modifica,

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

OVVERO

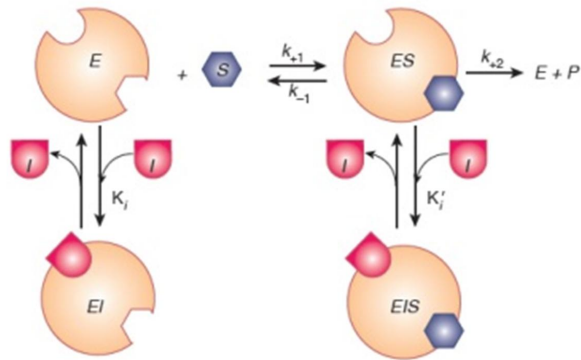
AUMENTA K_M

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

OVVERO

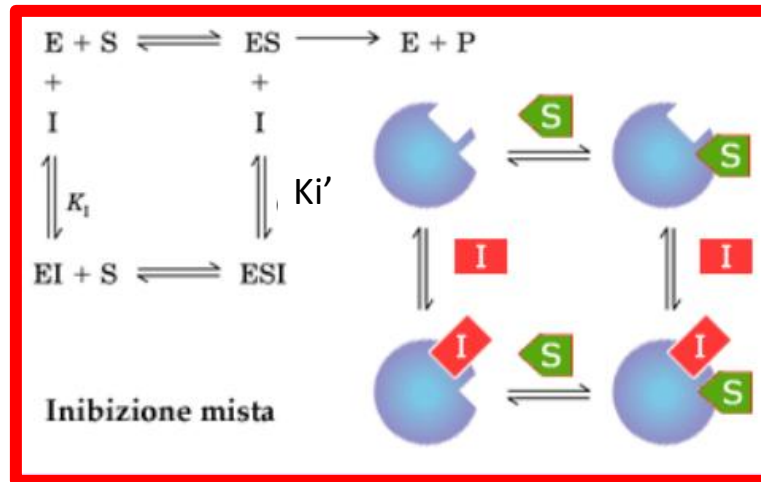
DIMINUISCE K_M

INIBITORE NON COMPETITIVO PURO

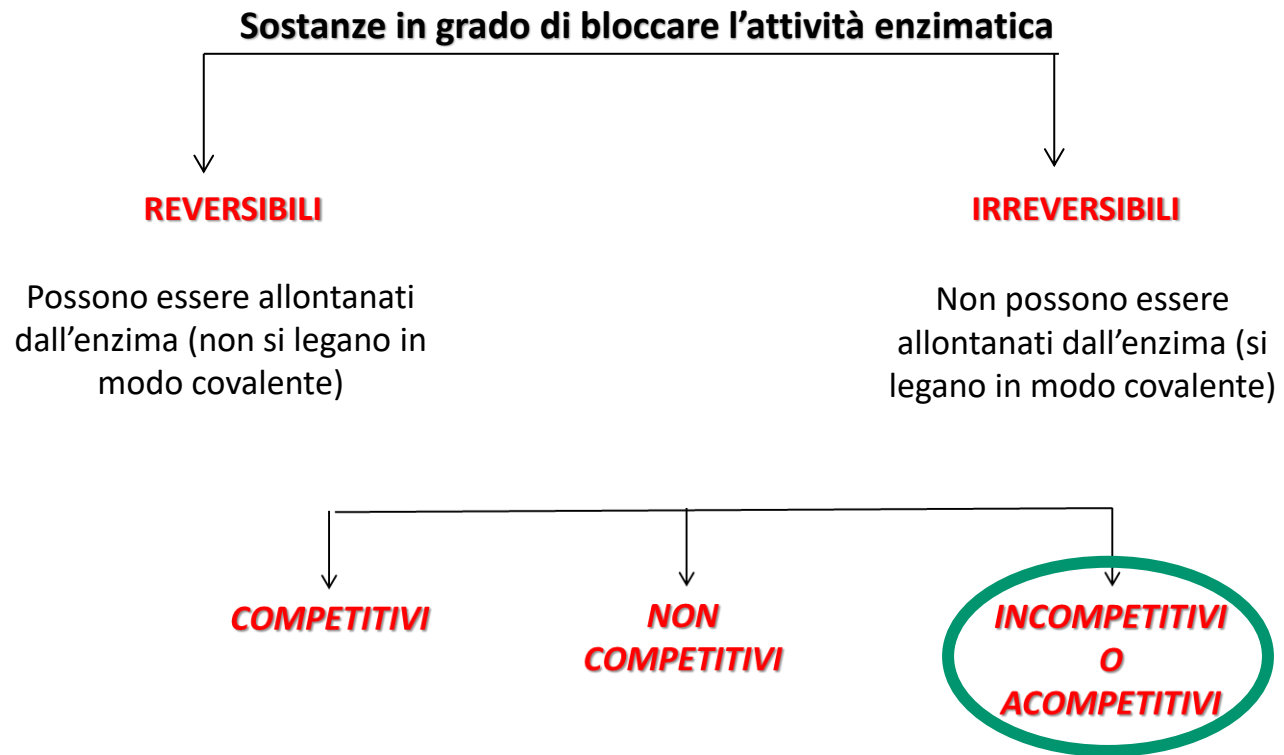


▲ FIGURA 10.5
Schema di riferimento nello studio dell'inibizione reversibile di un enzima ad opera di un effettore diverso dal substrato.

INIBITORE NON COMPETITIVO MISTO

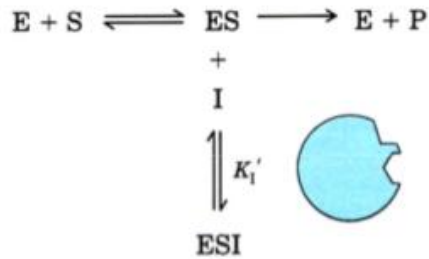


Gli inibitori



Inibizione incompetitiva o incompetitiva

L'inibitore si lega subito dopo il legame del substrato all'enzima



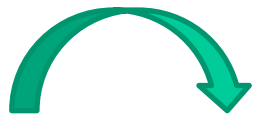
Non è possibile la formazione del solo complesso Enzima-Inibitore

Inibizione incompetitiva

La formazione del complesso ES crea un sito di legame per l'inibitore dando luogo ad un complesso ESI inattivo

Caratteristiche dell'inibizione incompetitiva:

1. L'inibitore distorce il sito attivo dell'enzima inattivandolo.
2. Un aumento di [S] non rimuove gli effetti dell'inibitore.
3. L'effetto dell'inibitore aumenta all'aumentare di [S].
4. Diminuiscono K_m e V_{max}



apparente aumento nell'affinità (diminuzione di K_m) e diminuzione della V_{max} ,

Inibizione incompetitiva o incompetitiva

l'inibitore si lega subito dopo il legame del substrato all'enzima

Un inibitore enzimatico incompetitivo influenza l'attività catalitica diminuendo i valori apparenti sia di K_M sia di V_{max} .

