CDL BIOTECNOLOGIE FARMACEUTICHE [60/97]

CI Biochimica e laboratorio di biochimica 108 ore (12 CFU)

Biochimica 48 ore (6 CFU) Prof.ssa Alessandra Olianas (1 semestre)

Laboratorio di biochimica 60 ore (6 CFU) Prof.ssa Francesca Pintus (2 semestre)
[24 ore (3 CFU) lezioni frontali + 36 ore (3 CFU) laboratorio]

Lezioni : Lunedì- 9-11 aula 7 Blocco H2 (ex H - D2)
Mercoledì 11-13 aula 202 blocco F
Venerdì 9-11 aula 7 Blocco H2 (ex H - D2)

Prof.ssa Alessandra Olianas

Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente
Sezione Biomedica (laboratorio di Biochimica)
Blocco D scala C
Tel. 070/6754507 (studio)

Ricevimento studenti: si riceve per appuntamento

olianas@unica.it



Alessandra Olianas

Dipartimento di Scienze della vita e dell'ambiente

Ruolo	Professore associato
Area scientifico disciplinare	Scienze biologiche
Settore scientifico disciplinare	BIO/10 BIOCHIMICA
Email	olianas@unica.it
Telefono	070/675-4507
Indirizzo	cittadella universitaria 09046 Monserrato

Curriculum

Insegnamenti

Materiale didattico

Altre Attività

Tesi

Ricerca

Avvisi

Agenda

Materiale didattico Biochimica CDL Biotecnologie farmaceutiche

Lezioni di Biochimica applicata

Data: 09 marzo 2026

Materiale didattico di Biochimica CDL Chimica

Data: 09 marzo 2026

ACS lessons 2025-2026

Data: 29 ottobre 2025

Curriculum

Insegnamenti

Materiale didattico

Altre Attività

Tesi

Ricerca

Avvisi

Agenda

Prof. Alessandra Olianas

.

E’ vietata la copia e la riproduzione dei contenuti e immagini in qualsiasi forma. E’ inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

Di seguito titolo, autore e editore delle fonti da cui sono state prese le immagini e i video mostrati durante le lezioni di Biochimica come supporto didattico e utili per la preparazione dell'esame:

Nelson, Cox.
I Principi di Biochimica di Lehninger. Zanichelli

Voet, Voet. Pratt.
Fondamenti di Biochimica. Zanichelli

Berg, Tymoczco, Stryer. Biochimica. Zanichelli

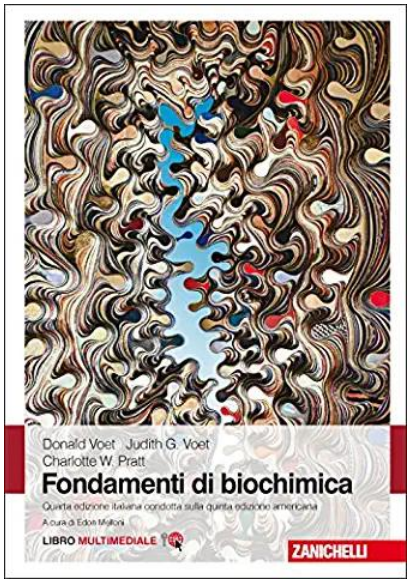
Adesione e l’utilizzo dei canali WhatsApp

Gli studenti troveranno le istruzioni nel primo post del nostro profilo instagram

UNICA_BIOFARM



Nelson, Cox.
I Principi di Biochimica di Lehninger. Zanichelli



Voet, Voet. Pratt.
Fondamenti di Biochimica. Zanichelli

PROGRAMMA DEL CORSO

-Glucidi. nomenclatura e classificazione, richiami di stereoisomeria. Anomeria, mutarotazione. Legame glicosidico. Disaccaridi di interesse biologico. Polisaccaridi.

- Aminoacidi: nomenclatura e classificazione, proprietà acido-base degli aminoacidi, pKa, pI. Curve di distribuzione ionica. Legame peptidico proprietà acido-base di peptidi e proteine

-Proteine: struttura secondaria, terziaria, e quaternaria. Modificazioni post-traduzionali, glicosilazione.

-- Eme e emoproteine. Mioglobina ed emoglobine, caratteristiche strutturali e ruoli biologici. Curve di ossigenazione, cooperatività e allosteria.

- Lipidi: Acidi grassi. Nomenclatura. Classificazione e struttura dei lipidi. Trigliceridi, fosfoglicerolipidi, sfingolipidi, colesterolo.
- Le basi puriniche e pirimidiniche. I nucleotidi.

-Enzimi. Cinetica enzimatica. Catalisi enzimatica. Equazione di Michaelis e Menten, Km, Vmax, V0. Equazione dei doppi reciproci. Interpretazione dei grafici. Inibitori reversibili e irreversibili. Modulazione covalente e allosterica dell'attività enzimatica.

-Vitamine e coenzimi: vitamina A, D e C. Coenzimi nicotinammidici e flavinici, coenzima A, Tiamina pirofosfato, piridossal-fosfato, biotina. Struttura e meccanismi di reazione.

-

Metabolismo e metabolismo energetico, anabolismo, catabolismo. Produzione di energia, trasporto, stoccaggio dell'energia metabolica: ATP e analoghi.

- Metabolismo glucidico: glicolisi e gluconeogenesi, cenni di regolazione ormonale, glicolisi aerobica e anaerobica. Sistemi navetta del NADH e fermentazioni lattiche e alcoliche. Metabolismo del piruvato.

-Ciclo dell'acido citrico, reazioni e meccanismi catalitici.

- Metabolismo lipidico: Mobilizzazione degli acidi grassi. beta-ossidazione, reazioni e regolazione. Chetogenesi.

- Metabolismo proteico: ruoli biologici degli amminoacidi, transaminazione, deaminazione ossidativa, destino dell'ammoniaca, ciclo dell'urea.

-Fosforilazione ossidativa: Catena respiratoria, organizzazione dei complessi redox, ATP sintasi e suo meccanismo, controllo respiratorio, agenti disaccoppianti.

ENZIMI:

- Le reazioni nei sistemi biologici avverrebbero troppo lentamente senza la catalisi.
- Assicurare un efficiente metabolismo
- Enzimi funzionano da catalizzatori biologici nelle reazioni cellulari
- Sono PROTEINE GLOBULARI (fanno eccezione i ribozimi a RNA)

- Aumentano la velocità di una reazione =favoriscono una reazione
- .Aumentano la Velocità di una reazione di 10^6-10^{20} volte rispetto alla velocità delle reazioni non catalizzata)
- I catalizzatori non enzimatici aumentano le velocità di una reazione di 10^2-10^4 volte.

table 8–5

Some Rate Enhancements Produced by Enzymes

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

Proprietà degli Enzimi

Specificità molto elevata:

- Distinguono tra stereoisomeri di uno stesso composto
- Catalizzano un solo tipo di reazione o reazioni affini.

- lavorano in condizioni blande di temperatura e pH

Condizioni di reazione più blande rispetto alla catalisi chimica

(T<100°C; pH neutro, pressione atmosferica).

- Le reazioni avvengono all'interno di siti specifici «siti attivi»

Proprietà degli Enzimi

Molti enzimi sono regolati
. Le attività catalitiche variano in risposta alla concentrazione di sostanze ddiverse dal substrato

•Quando un enzima funziona correttamente non si formano mai prodotti secondari di reazione (che potrebbero essere potenzialmente tossici per la cellula)

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

Importanza della catalisi:

ENZIMI:

Saccarosio-------→ $CO_2 + H_2O$

Presenza di ossigeno

Reazione estremamente ESOERGONICA



Rilascia energia per le funzioni del nostro organismo In pochi secondi.

Tempi lunghissimi (anni)

$CO_2 + H_2O$

Gli enzimi sono Proteine globulari

Struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria



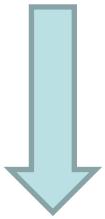
Fondamentali per l’attività catalitica

Enzimi non hanno necessità di gruppi chimici

Enzimi che hanno necessità di gruppi chimici (Cofattori)

- Cofattori inorganici: Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}
- se debolmente legati (K, Mg, o Ca) partecipano al legame del substrato (enzimi attivati da metallo).
- se strettamente legati (Fe, Zn, e Co) partecipano direttamente alla reazione (metalloenzimi).

- Cofattori organici (Coenzimi): molecole organiche o metallorganiche



Precursori di vitamine o metaboliti.

Legano covalentemente la proteina viene definito ***gruppo prostetico***

TABELLA 11.6 Metalli ed elementi presenti in tracce che risultano importanti come cofattori enzimatici

Metallo	Enzima	Ruolo del metallo
Fe	Citocromo ossidasi	Ossidazione/riduzione
Cu	Acido ascorbico ossidasi	Ossidazione/riduzione
Zn	Alcol deidrogenasi	Favorisce il legame del NAD^+
Mn	Istidina ammonio-liasi	Contribuisce alla catalisi per sottrazione di elettroni
Co	Glutammato mutasi	Co è parte del coenzima cobalamina
Ni	Ureasi	Sito catalitico
Mo	Xantina ossidasi	Ossidazione/riduzione?
V	Nitrato riduttasi	Ossidazione/riduzione?
Se	Glutatione perossidasi	Sostituisce un S in una cisteina del sito attivo

Vitamin	Coenzyme	Reactions Involving These Coenzymes
Thiamine (vitamin B_1)	Thiamine pyrophosphate	Activation and transfer of aldehydes
Riboflavin (vitamin B_2)	Flavin mononucleotide; flavin adenine dinucleotide	Oxidation–reduction
Niacin (B3)	Nicotinamide adenine dinucleotide; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Oxidation–reduction
Pantothenic acid (B5)	Coenzyme A	Acyl group activation and transfer
Pyridoxine (B6)	Pyridoxal phosphate	Various reactions involving amino acid activation
Biotin (B7)	Biotin	CO_2 activation and transfer
Lipoic acid	Lipoamide	Acyl group activation; oxidation–reduction
Folic acid (B9)	Tetrahydrofolate	Activation and transfer of single-carbon functional groups
Vitamin B_{12} Cobalamina	Adenosyl cobalamin; methyl cobalamin	Isomerizations and methyl group transfers

MOLTI COENZIMI SONO DERIVATI DALLE VITAMINE

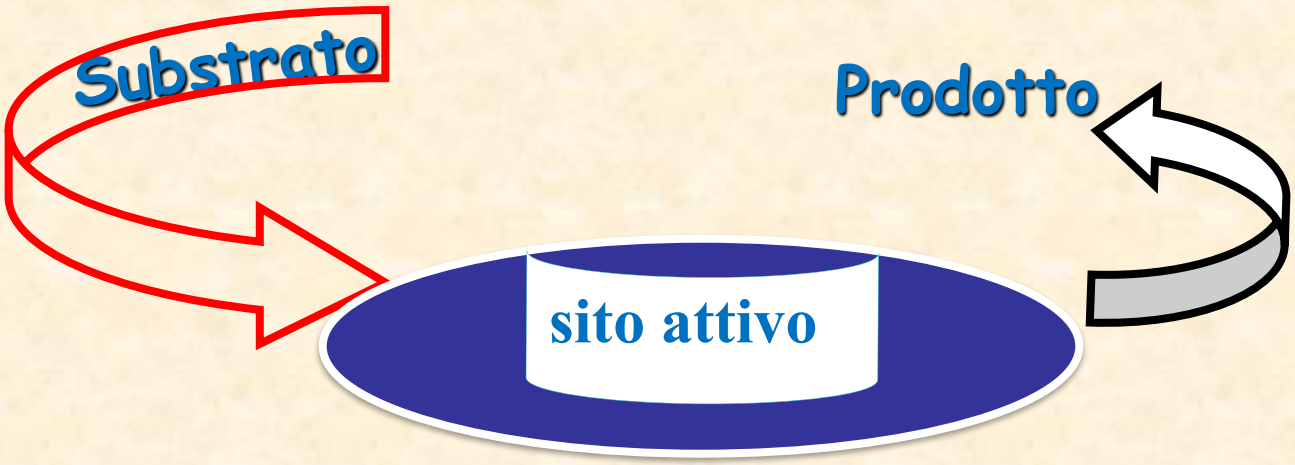
Coenzyme	*Reaction catalyzed*	*Vitamin source*
Thiamine pyrophosphate	Aldehyde transfers-decarboxilation	Thiamine (Vitamin B_1)
Flavin adenine dinucleotide	Oxidation-reduction reactions (electron transfers)	Riboflavin (Vitamin B_2)
Nicotinamide adenine dinucleotide	Oxidation-reduction reactions (hydride transfers)	Nicotinamide (niacin) (B3)
Coenzyme A	Acyl transfers	Pantothenic acid (B5)
Pyridoxal phosphate	Amino group transfers	Pyridoxine (Vitamin B_6)
Coenzyme B_{12}	Alkylation reactions	Cobalamin (Vitamin B_{12})
Biocytin	Carboxylation reactions	Biotin (B7)
Tetrahydrofolic acid	One-carbon transfers	Folic acid
Lipoic acid	Acyl transfers	—

Struttura generale degli enzimi

Parte proteica:
Apoenzima o aproteina

+ Parte non-proteica

Oloenzima





Sito attivo: rivestito da residui aminoacidici che legano il substrato e catalizzano la reazione

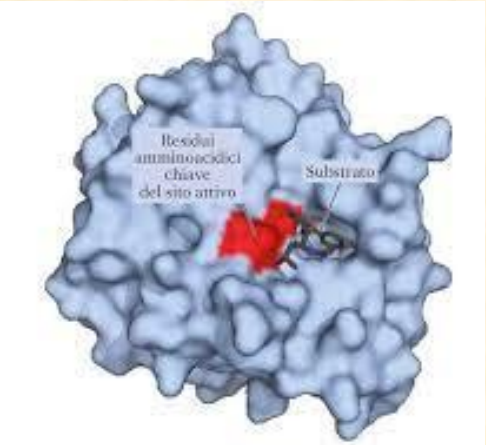


Figura 6.1 Legame di un substrato al sito attivo di un enzima. L'enzima mostrato è la chimotripsina, col substrato legato. Alcuni residui importanti nel sito attivo sono indicati dalla macchia rossa sulla superficie dell'enzima. [Fonte: PDB ID 7GCH, K. Brady et al., Biochemistry 29:7600, 1990.]

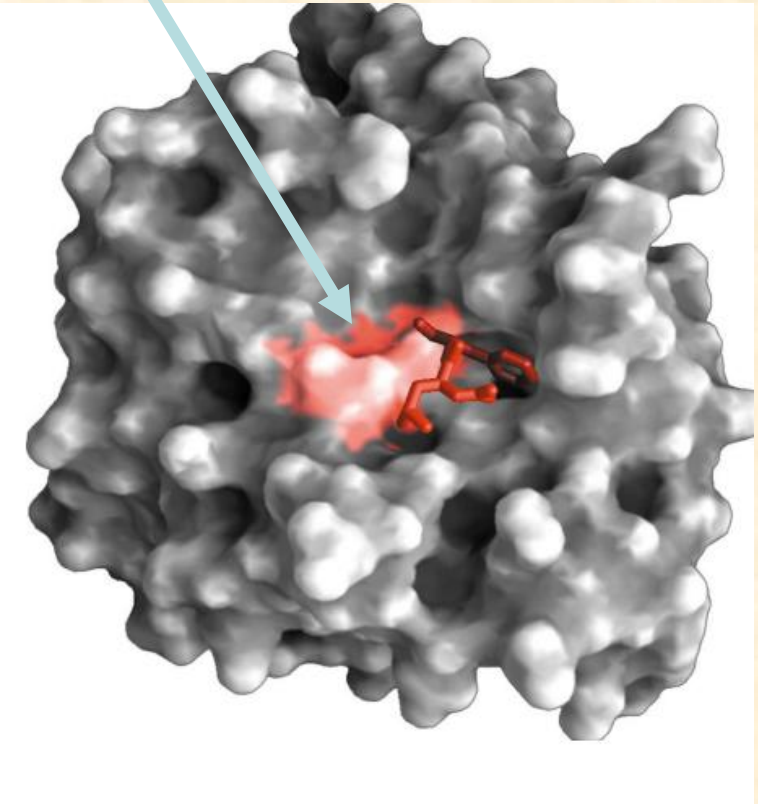
Gli enzimi sono Proteine globulari

Struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria

Fondamentali per l'attività catalitica

Possono avere dimensioni variabili

sito attivo o sito catalitico



Alterazioni in siti distanti dal sito attivo possono ridurre o annullare l'attività dell'enzima

Nomenclatura enzimi

I nomi venivano assegnati sulla base del nome del substrato

Ureasi (catalizza l'idrolisi dell'urea)

Pepsina (dal greco digestione)

Lisozima (capacità di lisare la parete batterica)

DNA polimerasi (catalizza la polimerizzazione dei nucleotidi per formare il DNA)

Il numero degli enzimi identificati aumentavano …….

IUB= International Union of Biochemistry

Classificazione degli enzimi

Alcuni nomi tradizionali ancora utilizzati:

Pepsina

Enzima proteolitico del succo gastrico.
Deriva dal *pepsinogeno*.
La trasformazione del pepsinogeno in pepsina è indotta dall'acido cloridrico gastrico

Papaina

Enzima proteolitico della classe delle idrolasi (proteasi).
Prodotta dai frutti della papaia,



Nomenclatura enzimi

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

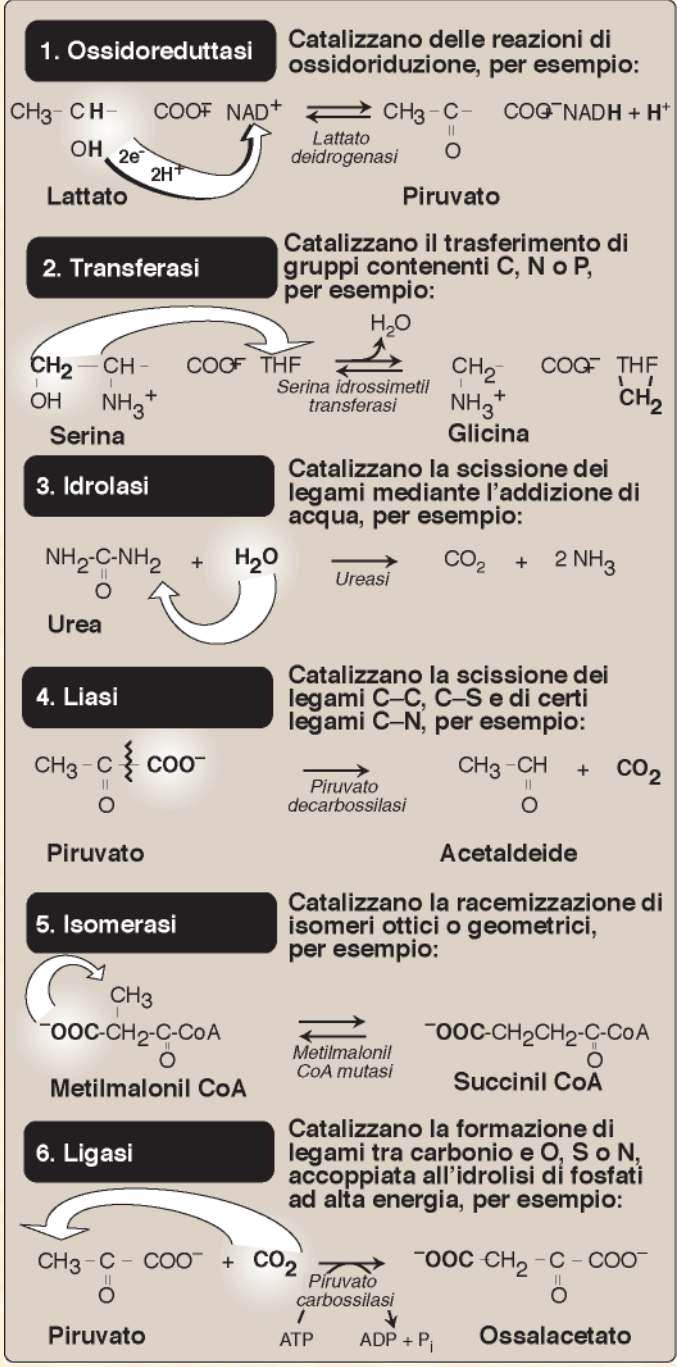
Suffisso –asi dal nome del substrato.

Nomenclatura enzimi

Suffisso –asi dal nome del substrato.

Gli enzimi sono suddivisi in 6 classi (sulla base della reazione chimica catalizzata)

-NOME SISTEMATICO (classificazione EC a quattro cifre)
-NOME COMUNE



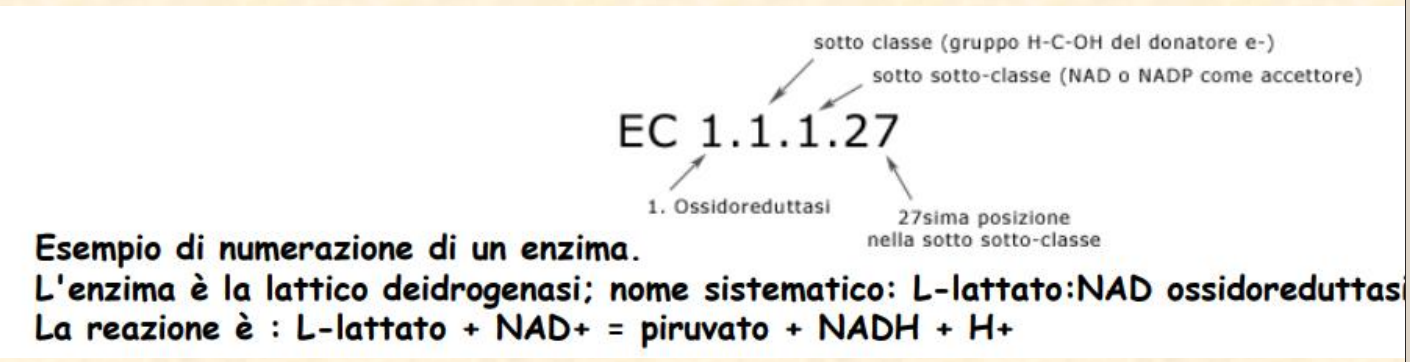
Classificazione EC a quattro cifre E.C: A,B,C,D)

A: classe di appartenenza

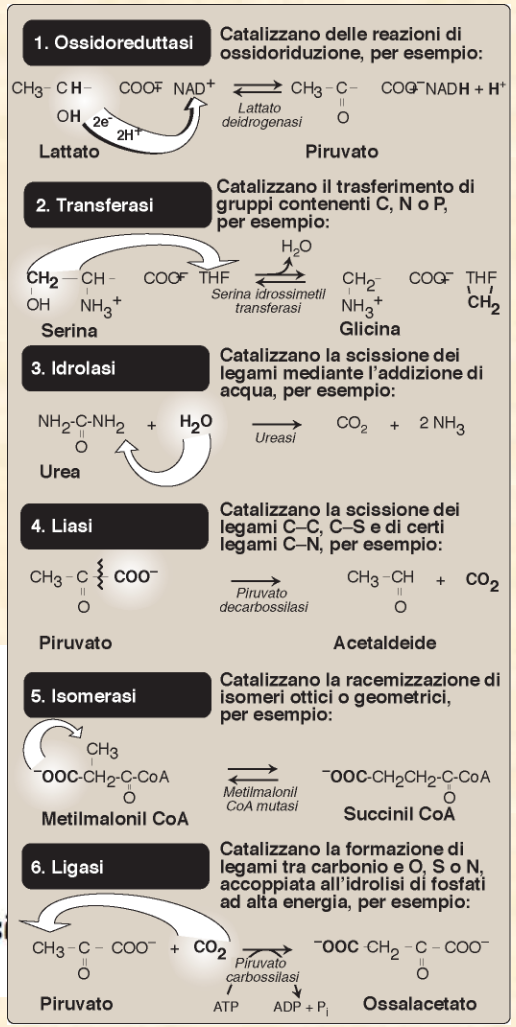
B: sottoclasse (tipo di substrato)

C: sotto sotto-classe (tipo di accettore, coenzima

D: numero di serie dell'enzima (posizione dell'enzima nella sotto sottoclasse)

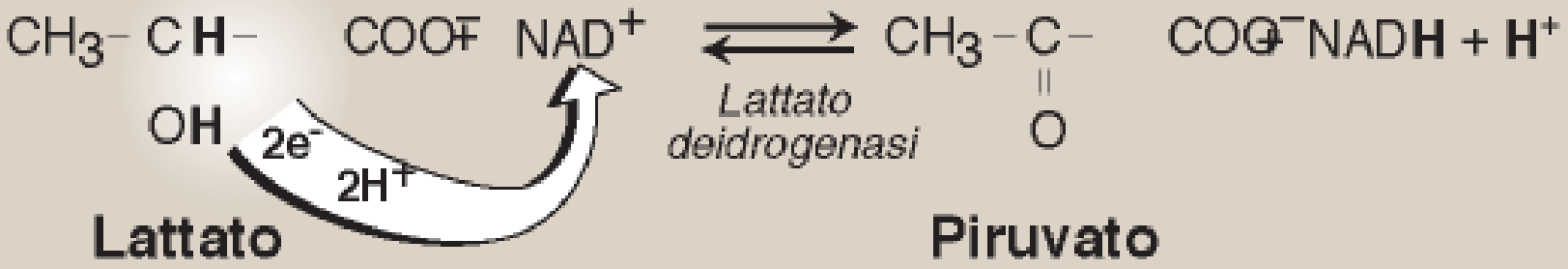


Esempio di numerazione di un enzima.
L'enzima è la lattico deidrogenasi; nome sistematico: L-lattato:NAD ossidoreduttasi
La reazione è : L-lattato + NAD+ = piruvato + NADH + H+



1. Ossidoreduttasi

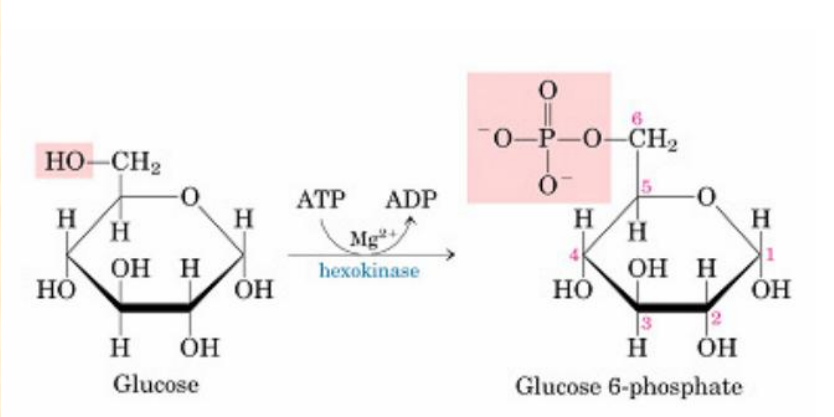
Catalizzano delle reazioni di ossidoriduzione, per esempio:



2. Transferasi

Catalizzano il trasferimento di gruppi contenenti C, N o P, per esempio:

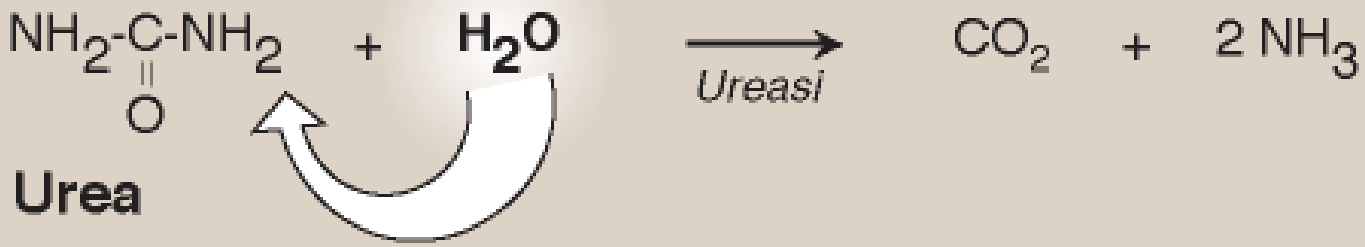
ATP + Glucosio -→ ADP + Glucosio 6-fosfato
Enzima: transferasi (E.C. ., 2.7.1.1)
Nome comune: Esochinasi



- classe (reazione catalizzata): transferasi **2**
- sottoclasse (substrato o legame coinvolto): fosfotransferasi **7**
  trasferimento di un gruppo fosfato
- sotto-sottoclasse: un gruppo **ossidrilico** come accettore **1**
- numero di serie nell'ambito della sotto-sottoclasse **1**

3. Idrolasi

Catalizzano la scissione dei legami mediante l'addizione di acqua, per esempio:



4. Liasi

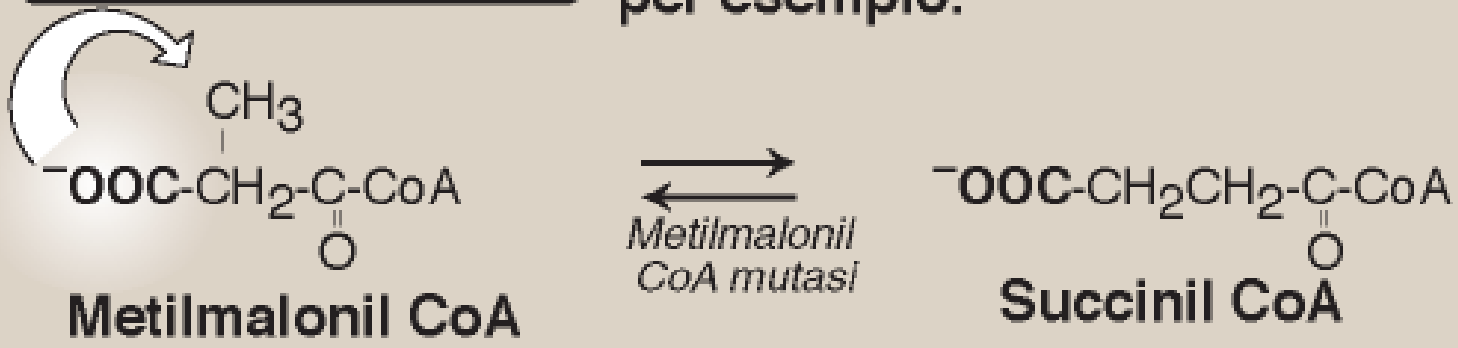
Catalizzano la scissione dei legami C–C, C–S e di certi legami C–N, per esempio:



Piruvato **Acetaldeide**

5. Isomerasi

Catalizzano la racemizzazione di isomeri ottici o geometrici, per esempio:



6. Ligasi

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

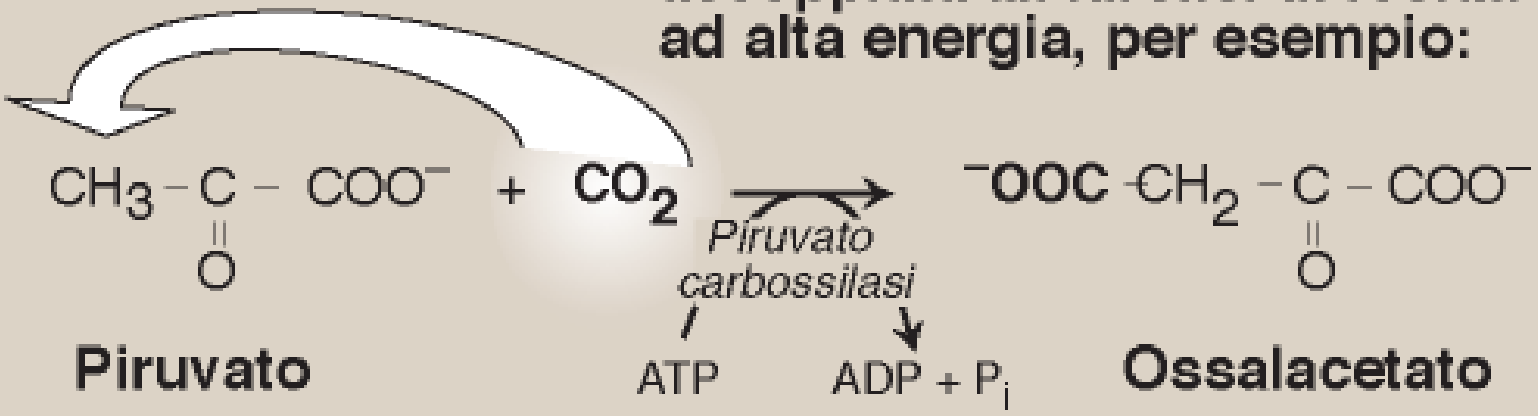


TABELLA 13.1 Classificazione sistematica degli enzimi secondo la commissione per gli enzimi

Numero E.C.	Nome sistematico e sottoclassi
1	*Ossidoriduttasi* (reazioni di ossido-riduzione)
1.1	Azione sul gruppo CH−OH dei donatori
1.1.1	Con NAD o NADP come accettore
1.1.3	Con O_2 come accettore
1.2	Azione sul gruppo $\rangle C{=}O$ dei donatori
1.2.3	Con O_2 come accettore
1.3	Azione sul gruppo di donatori CH-CH
1.3.1	Con NAD o NADP come accettore
2	*Transferasi* (trasferimento di gruppi funzionali)
2.1	Trasferimento di gruppi C-1
2.1.1	Metiltransferasi
2.1.2	Idrossimetiltransferasi e formiltransferasi
2.1.3	Carbossiltransferasi e carbamoiltransferasi
2.2	Trasferimento di residui aldeidici o chetonici
2.3	Aciltransferasi
2.4	Glicosiltransferasi
2.6	Trasferimento di gruppi contenenti N
2.6.1	Amminotransferasi
2.7	Trasferimento di gruppi contenenti P
2.7.1	Con un gruppo alcolico come accettore
3	*Idrolasi* (reazioni di idrolisi)
3.1	Scissione del legame estere
3.1.1	Idrolasi di esteri carbossilici
3.1.3	Idrolasi monoesterica fosforica
3.1.4	Idrolasi diesterica fosforica
4	*Liasi* (scissione del legame con mezzi diversi dall'idrolisi o dall'ossidazione)
4.1	Liasi C-C
4.1.1	Carbossi liasi
4.1.2	Aldeide liasi
4.2	Liasi C-O
4.2.1	Idrolasi
4.3	Liasi C-N
4.3.1	Ammonio liasi
5	*Isomerasi* (reazioni di isomerizzazione)
5.1	Racemasi ed epimerasi
5.1.3	Azione sui carboidrati
5.2	Isomerasi *cis-trans*
6	*Ligasi* (formazione di legami con scissione di ATP)
6.1	Formazione di legami C-O
6.1.1	Amminoacido-RNA ligasi
6.2	Formazione di legami C-S
6.3	Formazione di legami C-N
6.4	Formazione di legami C-C
6.4.1	Carbossilasi

Gli enzimi sono i Catalizzatori biologici

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

Specificità degli enzimi

Enzimi che catalizzano una sola reazione (assoluta)

Enzimi che agiscono su molecole con uno specifico gruppo chimico (di gruppo)

Enzimi che agiscono su un tipo di legame chimico (di legame)

Reazione enzimatica



E: enzima
S: substrato
P: prodotto
ES: complesso transitorio enzima-substrato
EP: complesso transitorio enzima-prodotto

LA VARIAZIONE DI ENERGIA LIBERA STANDARD E' CORRELATA ALLA Keq

Consideriamo la generica equazione:

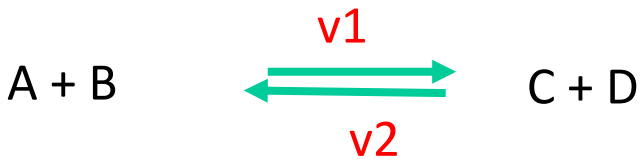
$$a\,A + b\,B \rightleftharpoons c\,C + d\,D$$

Definiamo costante di equilibrio K_{eq}

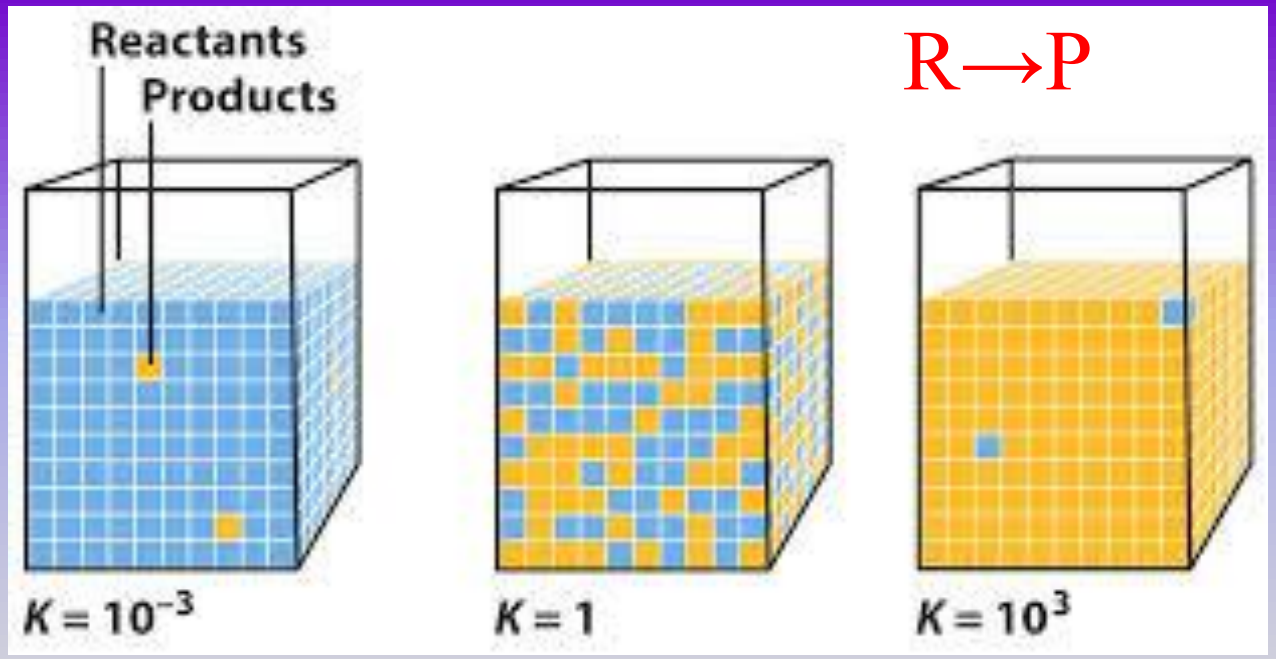
$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}^{\,c}\,[D]_{eq}^{\,d}}{[A]_{eq}^{\,a}\,[B]_{eq}^{\,b}}$$

a temperatura costante!

Una reazione è all'equilibrio quando la velocità della reazione diretta è uguale alla velocità della reazione inversa



v1 = v2



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

Keq < 0.1 = la [R]>>[P] l'equilibrio favorisce nettamente i reagenti: Reazione spostata a sinistra

0.1< Keq < 10 = l'equilibrio non favorisce fortemente né i prodotti, né i reagenti

Keq > 10 = la [P]>>[R] equilibrio favorisce nettamente i prodotti. Reazione spostata a destra

La K equilibrio è correlata alla **variazione di energia libera standard**

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

ΔG°= in condizioni standard: 25°C (298 K), 1M, 1 atm

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

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

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

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

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

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

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

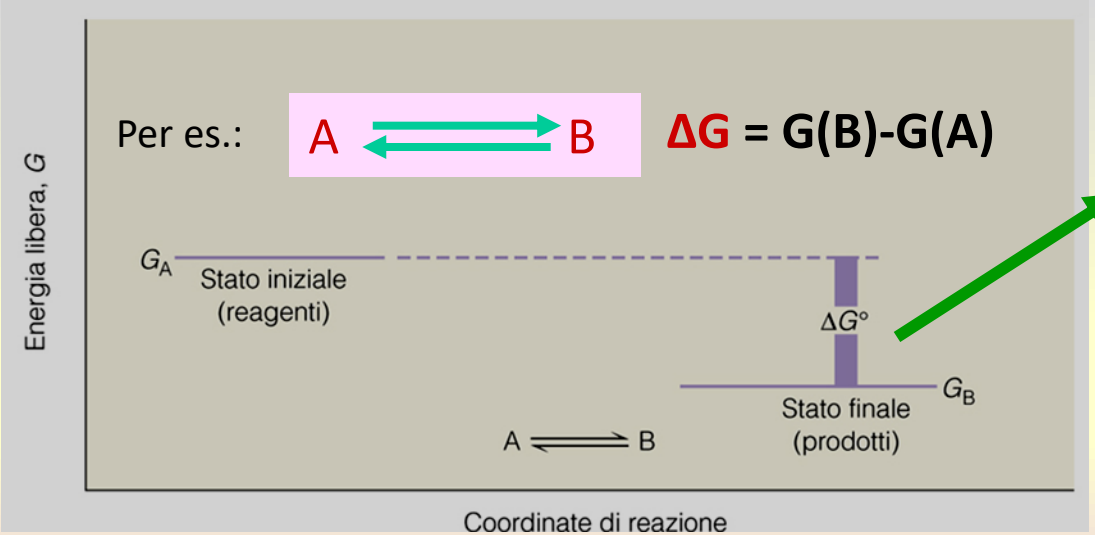
LA ENERGIA LIBERA MISURA LA SPONTANEITA' DI UNA REAZIONE

ma non fornisce informazioni sulla velocità della reazione

L'enzima partecipa alla reazione che catalizza:

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

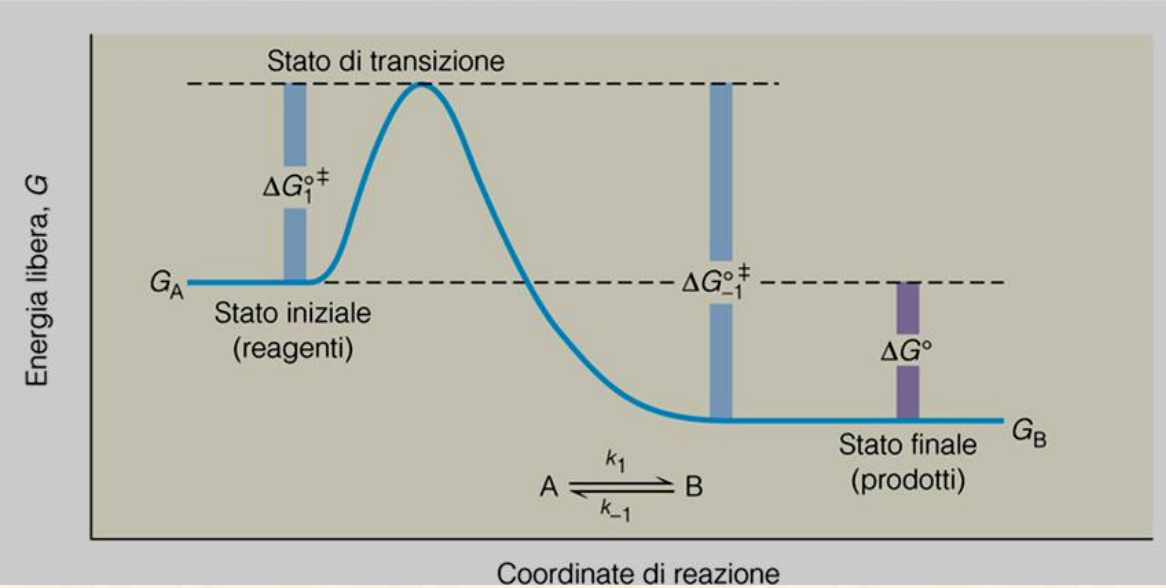
La **coordinata di reazione** **analizza le variazioni di energia libera che avvengono nel corso della reazione chimica**.



G_A = Energia libera reagenti
G_B = Energia libera prodotti

ΔG^0 = variazione di energia libera della reazione (indica la spontaneità della reazione, non della sua velocità)
$\Delta G^0 < 0$ = reazione esoergonica (spontanea) (A→B)
$\Delta G^0 > 0$ = reazione endoergonica (non spontanea) (è spontanea la reazione inversa B→A)

I catalizzatori non modificano gli equilibri di una reazione

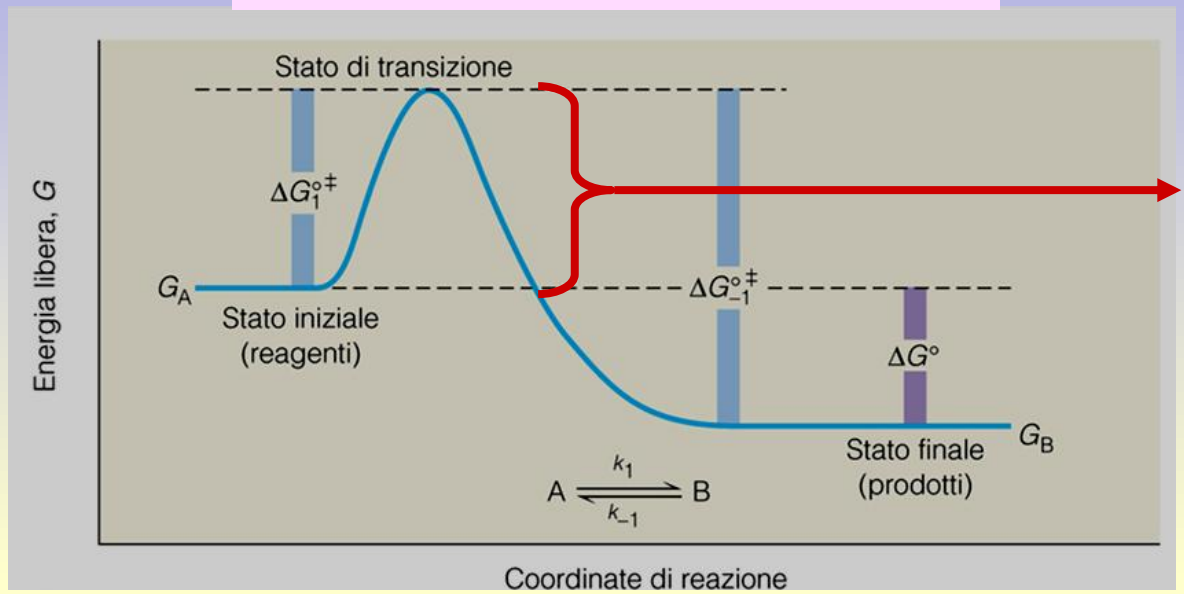


G_A = Energia libera reagenti
G_B = Energia libera prodotti

ΔG^0 = variazione di energia libera della reazione (indica la spontaneità della reazione, non della sua velocità)
$\Delta G^0 < 0$ = reazione esoergonica (spontanea) (A→B)
$\Delta G^0 > 0$ = reazione endoergonica (non spontanea) (è spontanea la reazione inversa B→A)

Diagramma dello stato di transizione o diagramma della coordinata di reazione

A → X* → B

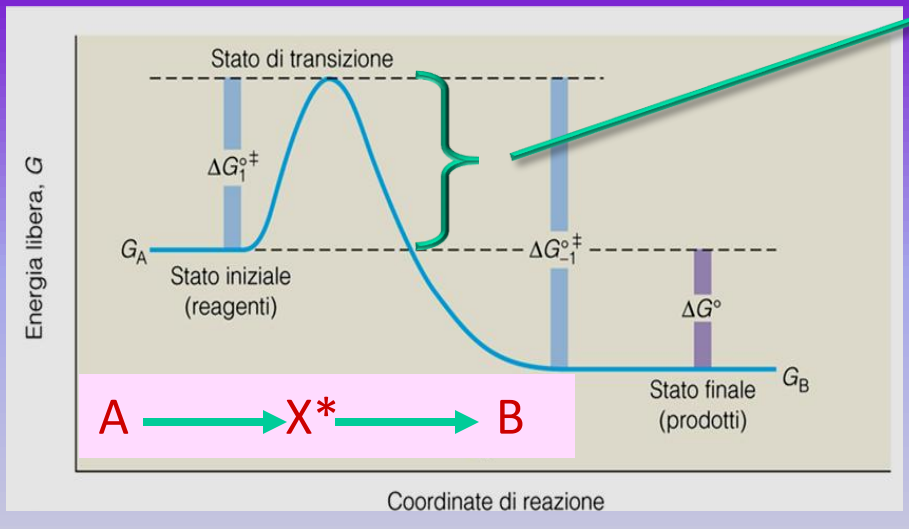


Affinché avvenga la trasformazione dei reagenti in prodotti è necessario superare un dislivello energetico:
ENERGIA DI ATTIVAZIONE ($\Delta G^{0\ddagger}$)
(correlata alla velocità della reazione)

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

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

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



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

Nella reazione solo le molecole che hanno l'energia sufficiente per superare gli «ostacoli» alla loro trasformazione vengono convertite
Cioè quelle molecole che possiedono, quindi,
un'energia ≥ all'E. ATTIVAZIONE ($\Delta G^{0\ddagger}$).

Ostacoli da superare

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

L'energia che le molecole di reagente devono possedere per essere trasformate in prodotto è fornita dalla **E. cinetica che le molecole stesse possiedono**.

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

- Se l'E_{att} è BASSA: un gran numero di molecole avrà E. cinetica media ≥ all'E_{att} → **La reazione sarà VELOCE**

- Se l'E_{att} è ALTA: un piccolo numero di molecole avrà E.cinetica media ≥ all'E_{att} → **La reazione sarà LENTA**

LA VELOCITÀ DELLA REAZIONE DIPENDE DALL'ENERGIA DI ATTIVAZIONE

Struttura generale degli enzimi



apoenzima
Parte proteica:

Parte non-proteica

Oloenzima

LE REAZIONI CHIMICHE

NEI SISTEMI BIOLOGICI

Le reazioni si realizzerebbero in tempi molto lunghi!

Gli enzimi aumentano la velocità le reazioni cellulari



Gli enzimi abbassano l'energia di attivazione della reazione

Velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi:

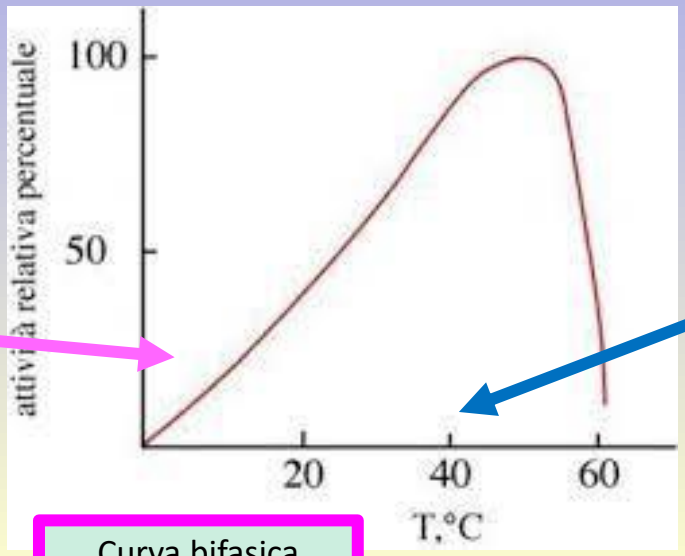
La velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi è influenzata da diversi fattori:

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

Effetto della temperatura sulla velocità di una reazione enzimatica mantenendo costanti *pH, [E] e [S]*

Parte ascendente della curva

la velocità di reazione aumenta all'aumentare della *T* sino a raggiungere un valore massimo



Curva bifasica

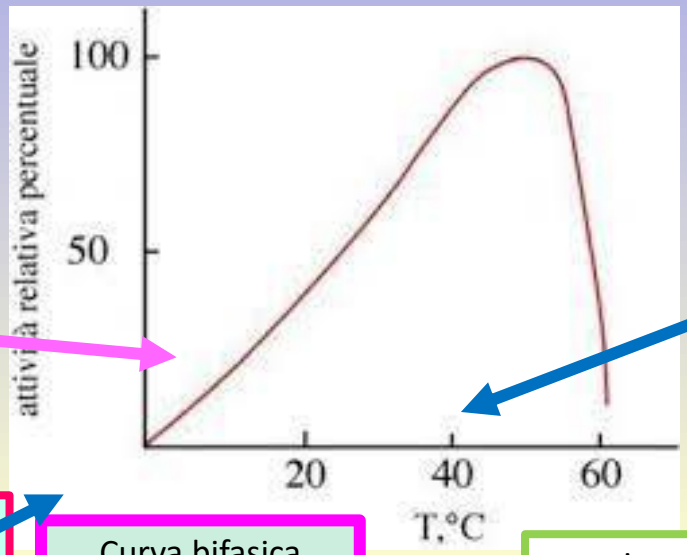
Parte discendente della curva

A *T* superiori a quella ottimale (parte più alta della curva) viene alterato lo stato energetico del sistema e l'enzima va incontro a modificazioni strutturali (rottura dei legami idrogeno)

Effetto della temperatura sulla velocità di una reazione enzimatica mantenendo costanti *pH, [E] e [S]*

Parte ascendente della curva

la velocità di reazione aumenta all'aumentare della *T* sino a raggiungere un valore massimo



Parte discendente della curva

A *T* superiori a quella ottimale (parte più alta della curva) viene alterato lo stato energetico del sistema e l'enzima va incontro a modificazioni strutturali (rottura dei legami idrogeno)

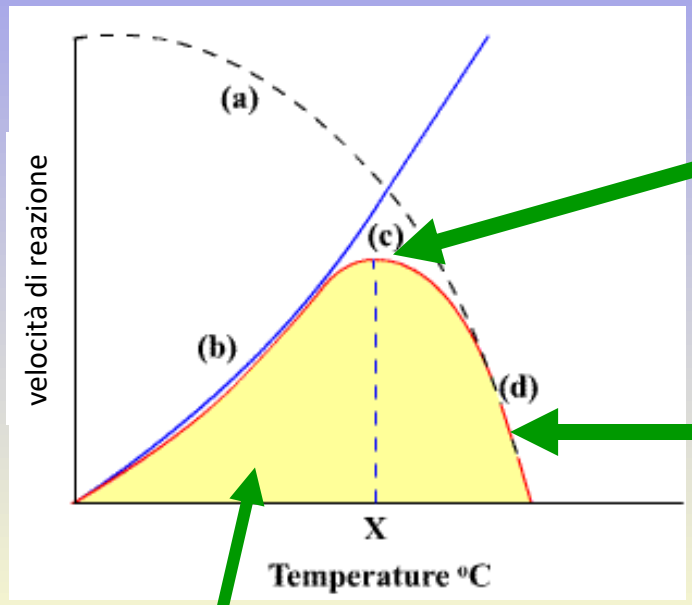
Inattivazione Reversibile a basse temperatura

Curva bifasica

L'*optimum* di temperatura degli enzimi intracellulari è intorno ai 37°C

in generale, a temperature **superiori ai 50 °C** l'attività di un enzima si arresta in modo irreversibile

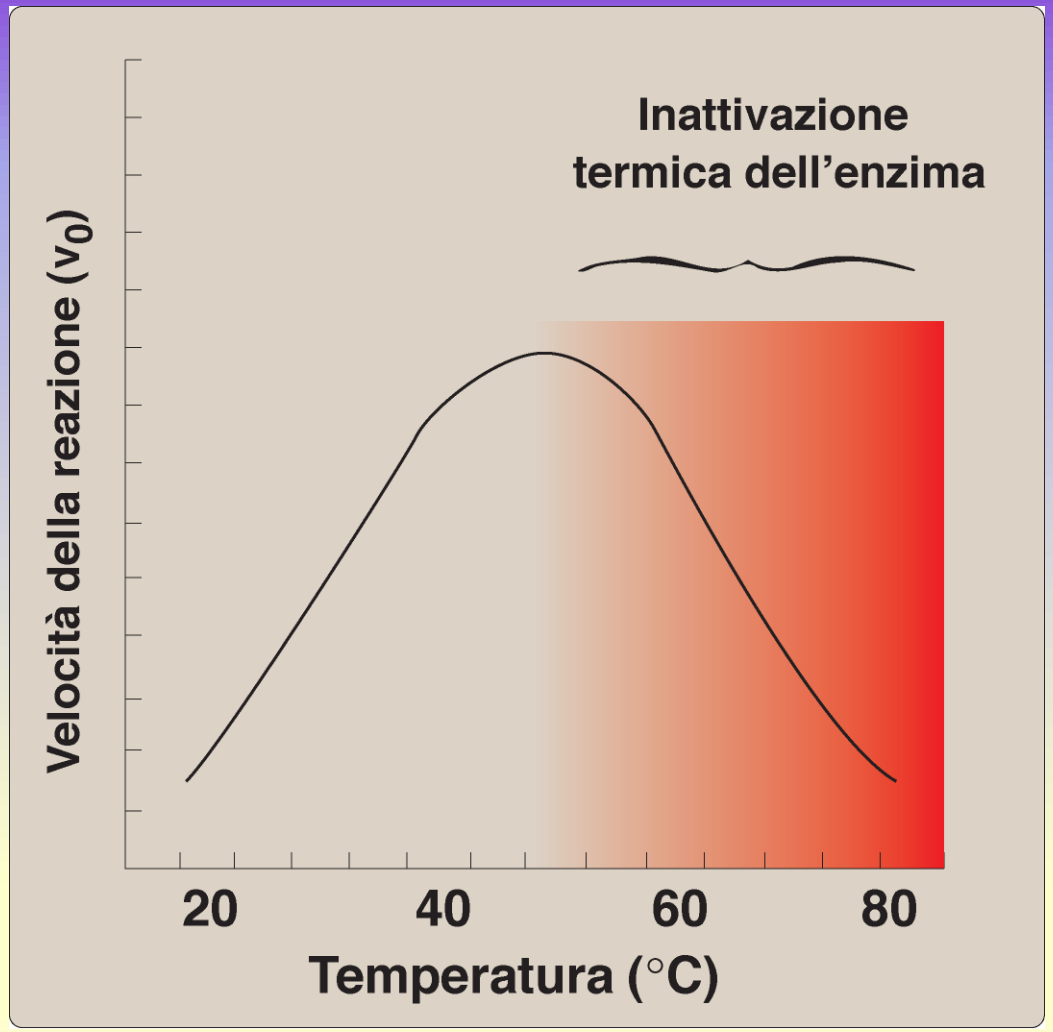
Effetto della temperatura sulla velocità di una reazione enzimatica >> CURVA BIFASICA



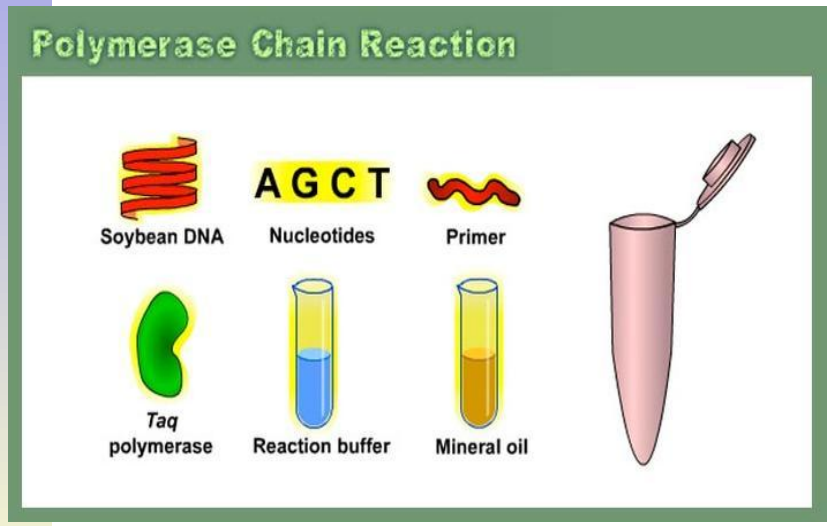
Optimum di temperatura: è diverso per i diversi enzimi

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 (°C)

Una proteina che ha rivoluzionato le tecniche biotecnologiche: la Taq Polimerasi.





La DNA polimerasi del batterio termofilo *Thermus aquaticus*.

Il batterio *Thermus aquaticus fu* fu identificato nel 1969 da Thomas D,Brock e Hudson Freeze ed è diventato famoso perchè produce numerosi enzimi che non si denaturano ad alte temperature. La DNA polimerasi di questo batterio (chiamata "Taq polymerase" o semplicemente Taq) fu isolata nel 1976. Si scoprì che l'enzima aveva un optimum di temperatura ad 80 °C.

Velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi:

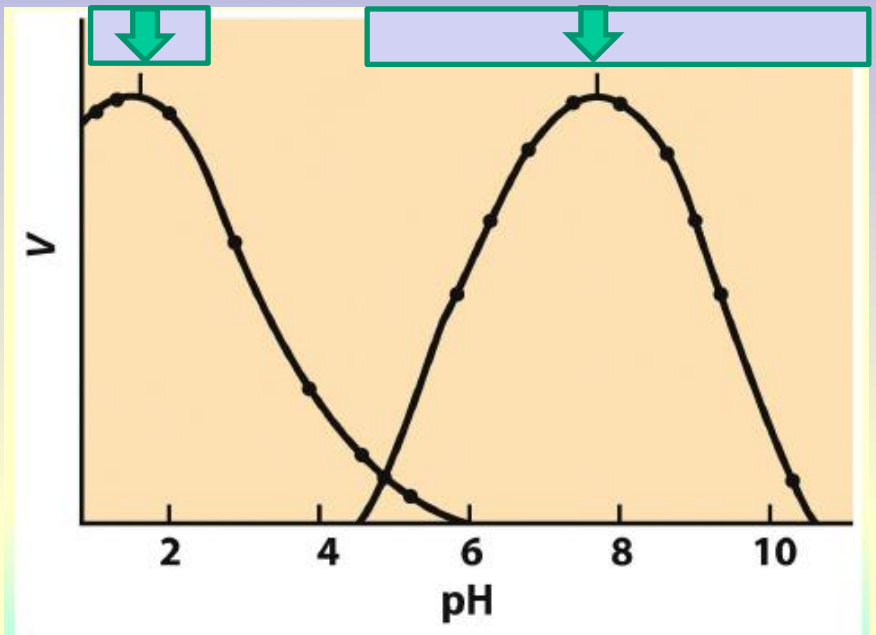
La velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi è influenzata da diversi fattori:

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

L'attività enzimatica e pH

Gli enzimi hanno pH ottimale in cui la loro attività è massima

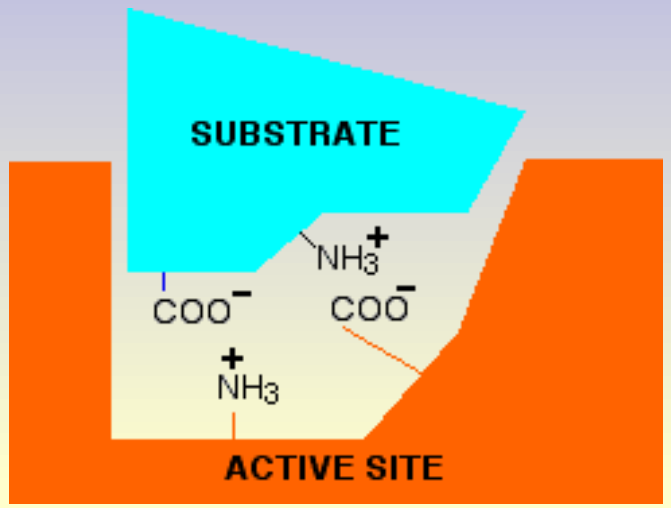
A valori più alti o più bassi di pH l'attività dell'enzima diminuisce



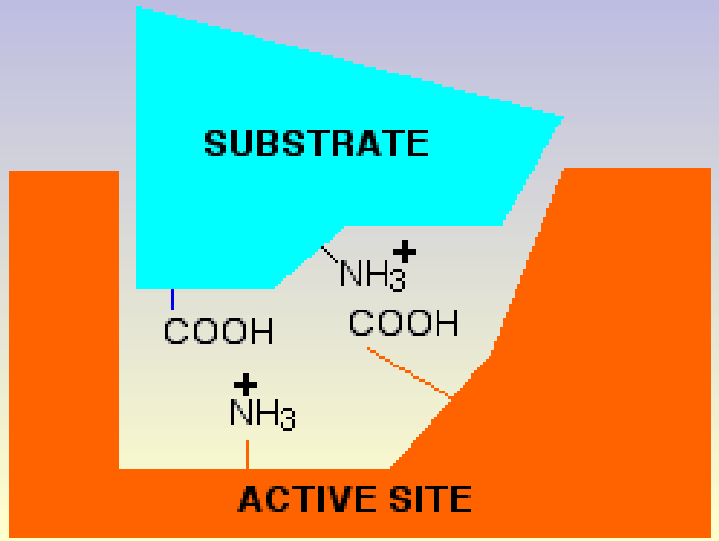
L'attività enzimatica e pH

Le catene laterali degli aminoacidi possono agire da acidi o basi deboli

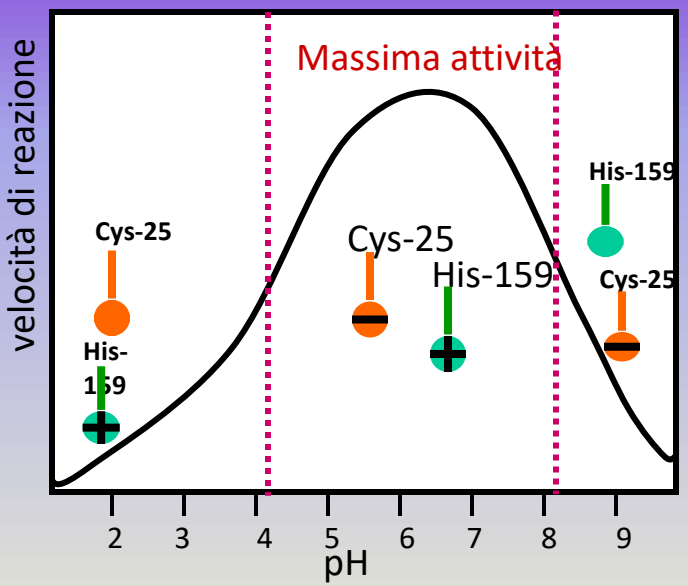
Può riguardare sia l'enzima che il substrato



Un pH molto acido non influenzerà il gruppo - NH_3^+ ma il gruppo -COO^- sarà protonato.

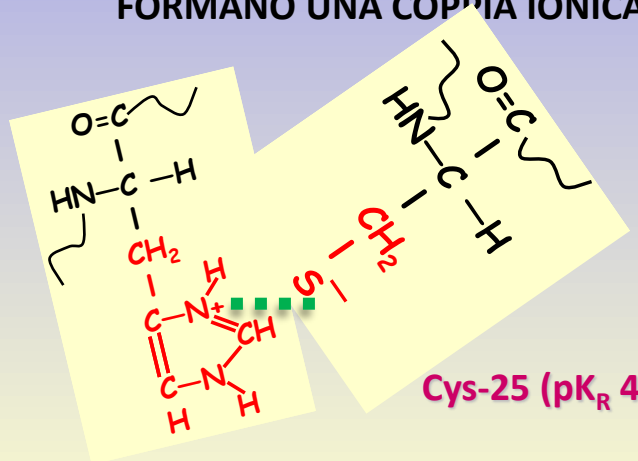


Potrà quindi destabilizzare una interazione elettrostatica necessaria per il legame enzima-substrato



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.

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

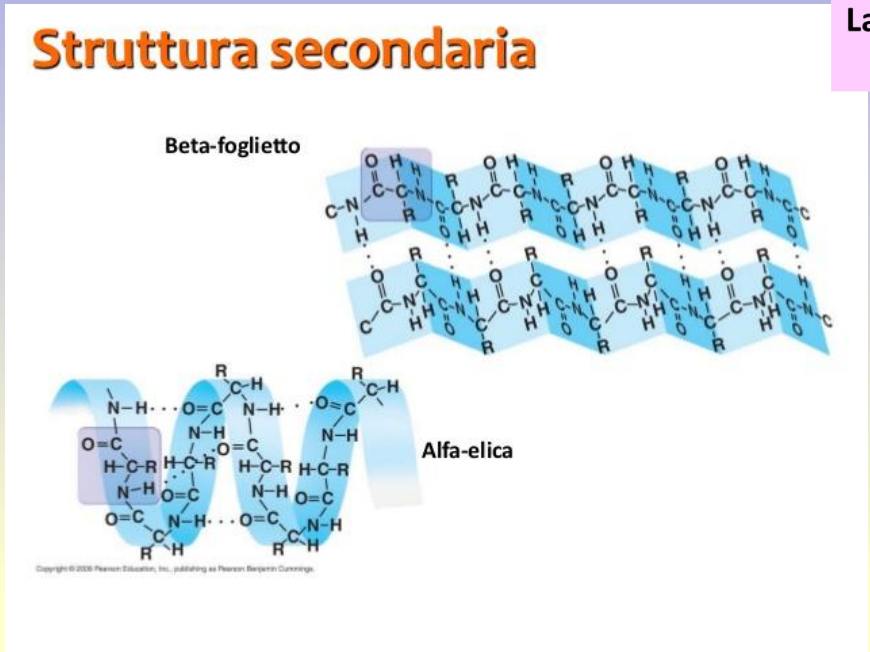


His-159 (pK_R 8.2)

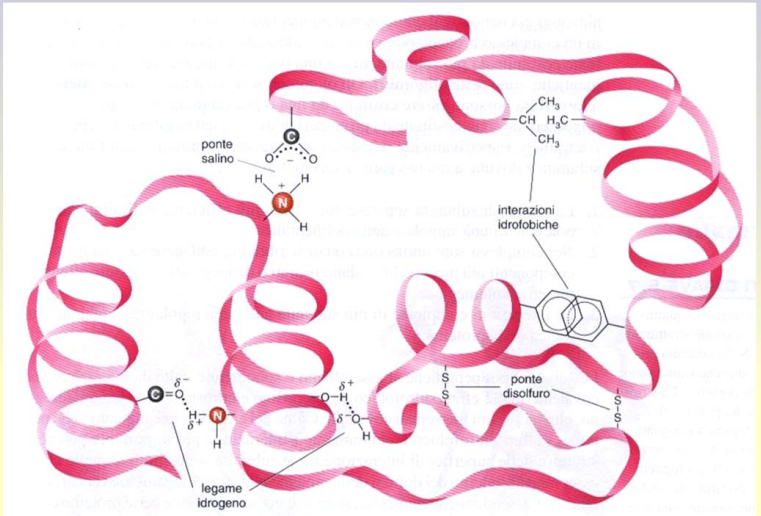
Cys-25 (pK_R 4.2)

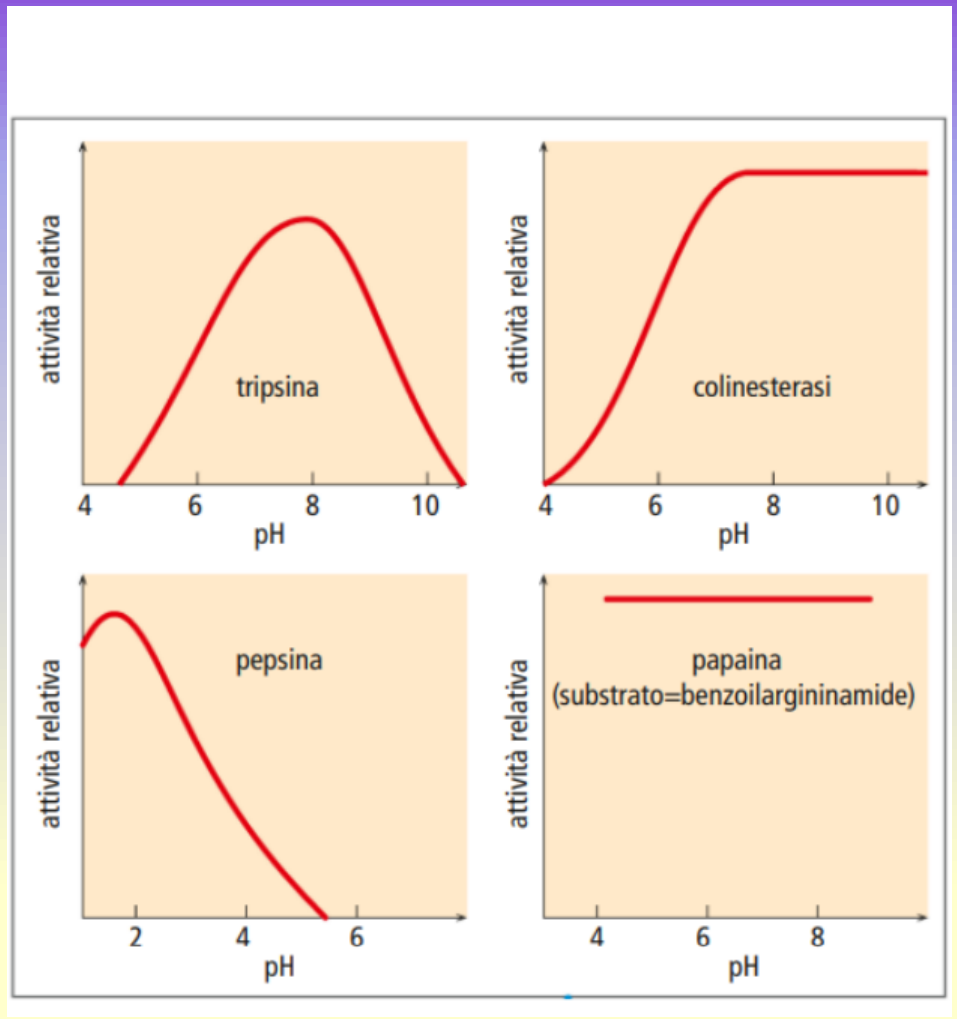
Effetto del pH sulla velocità di una reazione enzimatica

Può compromettere la struttura nativa delle proteine

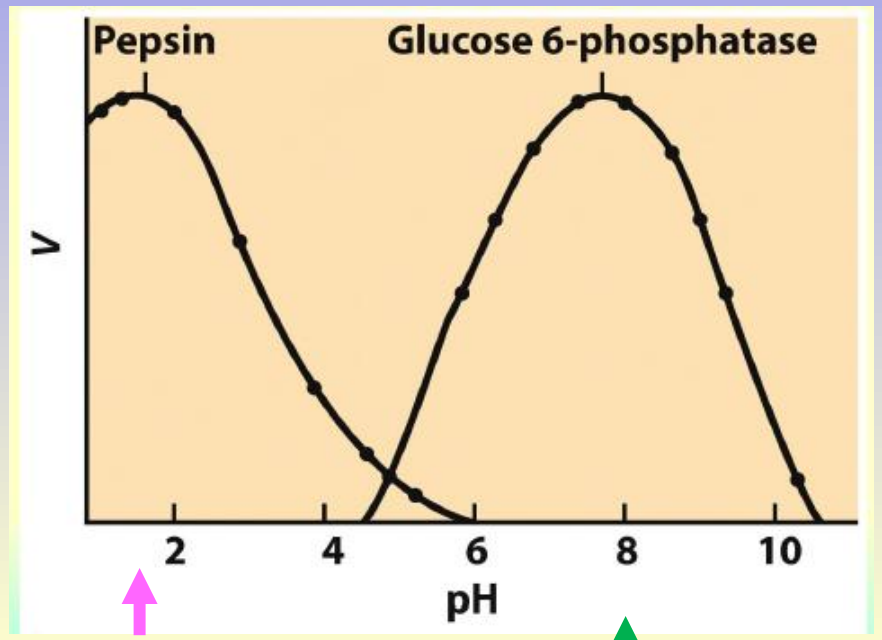


La struttura terziaria è stabilizzata dalle seguenti interazioni tra le catene laterali R dei residui amminoacidici




attività relativa
tripsina
4
6
8
10
pH
attività relativa
colinesterasi
4
6
8
10
pH
attività relativa
pepsina
2
4
6
pH
attività relativa
papaina
(substrato=benzoilargininamide)
4
6
8
pH

Effetto del pH sulla velocità di una reazione enzimatica



Enzima succo gastrico

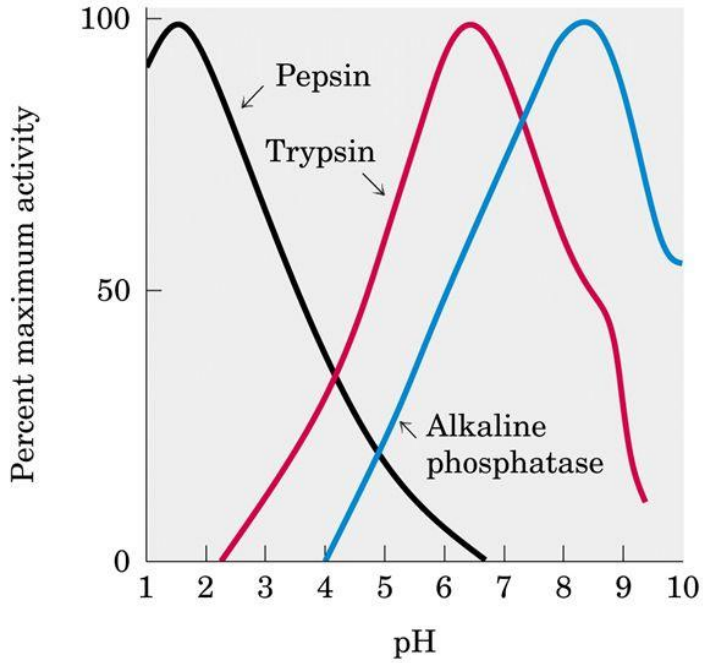
Enzima intracellulare

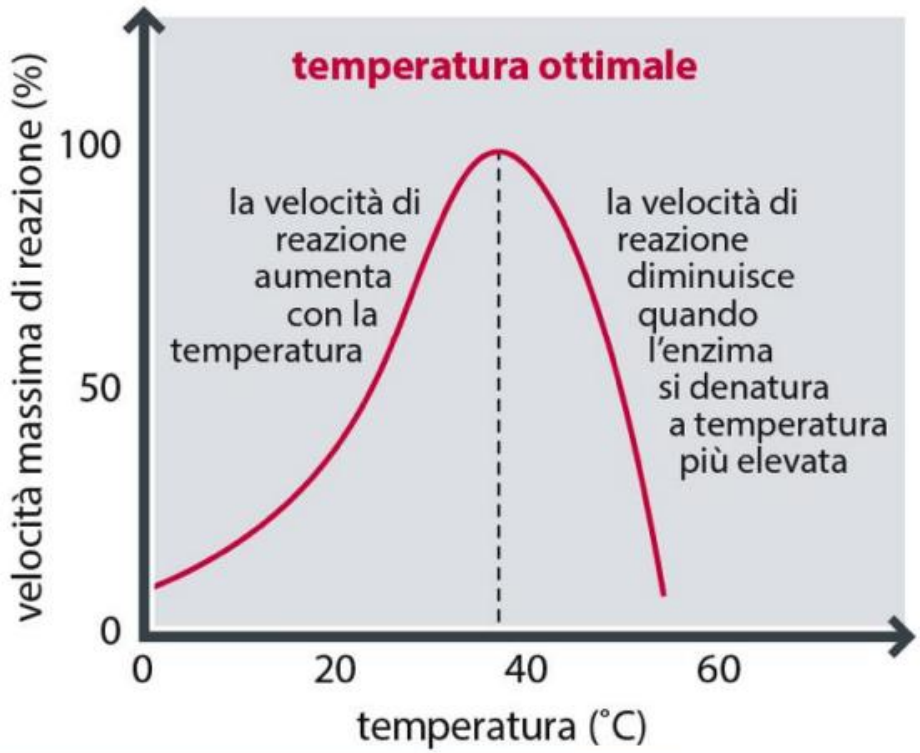
Curva a campana

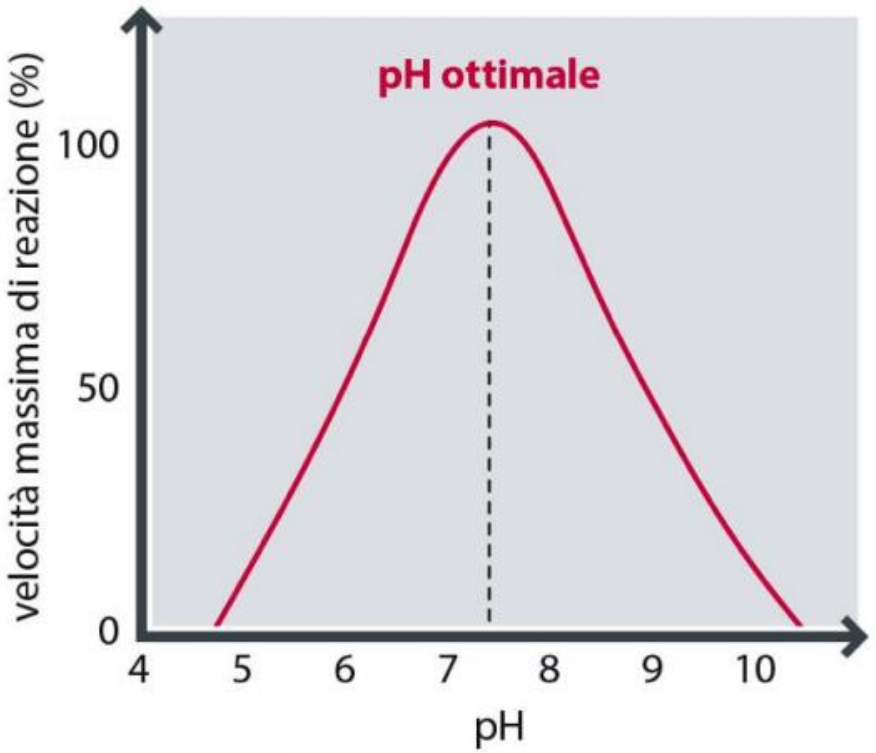
Optimum di pH degli enzimi intracellulari è intorno ai valori di pH 7

L'attività catalitica è correlata al diverso stato di protonazione delle catene laterali dei residui amminoacidici che costituiscono il sito di legame tra il substrato ed il sito catalitico

L’attività enzimatica dipende dal pH







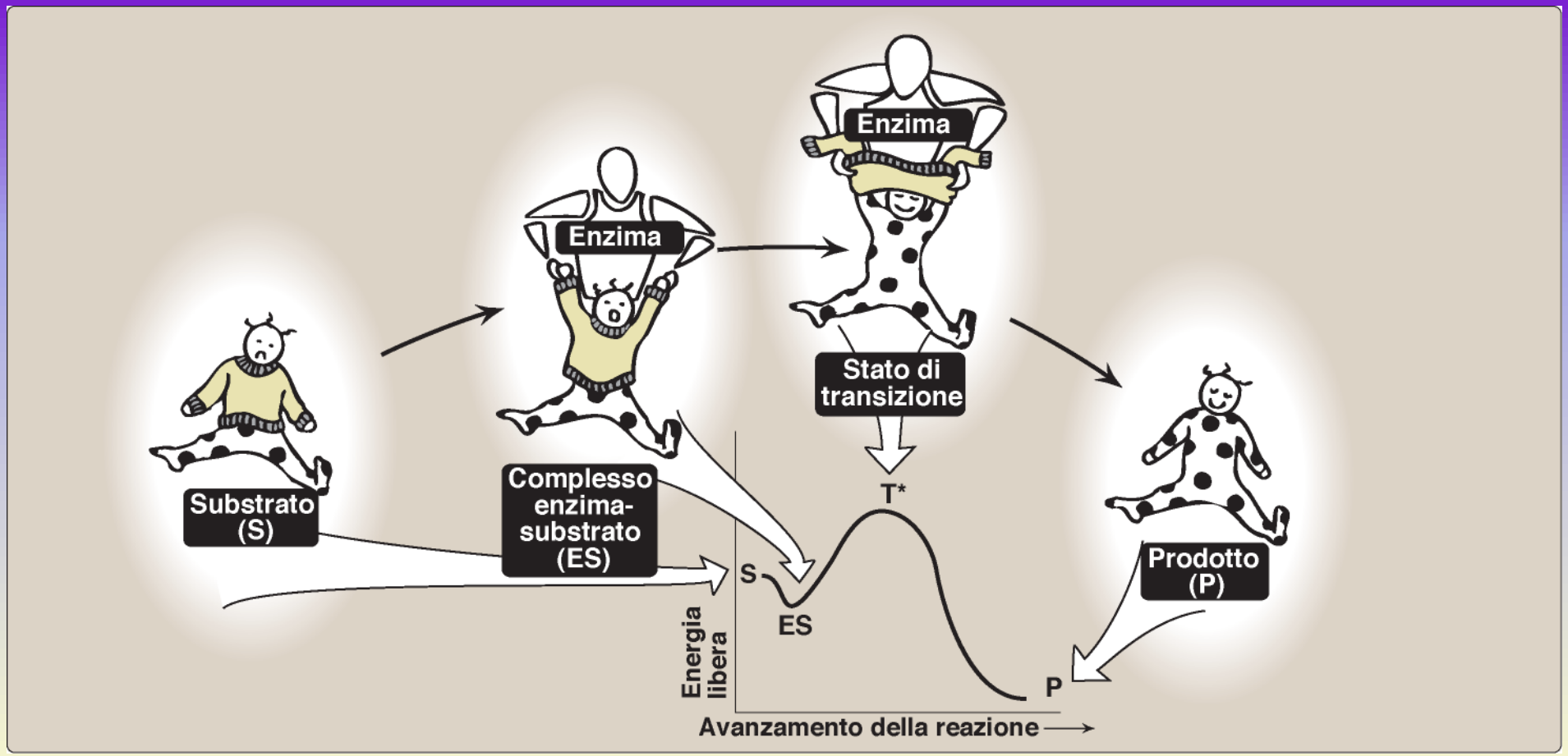
La velocità enzimatica aumenta all'aumentare della t fino a raggiungere un valore max; a t più elevate la velocità diminuisce a causa della perdita di struttura dell'enzima.

La maggior parte degli enzimi mostra un pH ottimale di 6,8-7,4; a valori estremi di pH le proteine si denaturano

velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi: aspetti generali

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

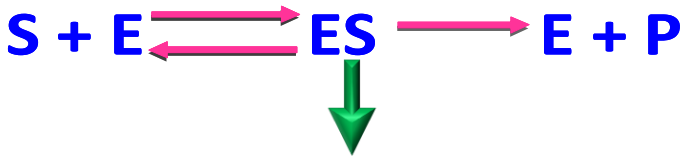
1. temperatura
2. pH.
3. concentrazione del substrato ⇐
4. concentrazione dell'enzima
5. concentrazione dei cofattori



$$S \rightleftharpoons P$$

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

L'enzima lega il reagente (o i reagenti) >> SUBSTRATO/I.
Abbassa l'E_{att} nella formazione di un complesso enzima/substrato (ES)
Promuove direttamente l'evento catalitico rilasciando il prodotto e ritornando inalterato nel suo stato originario



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

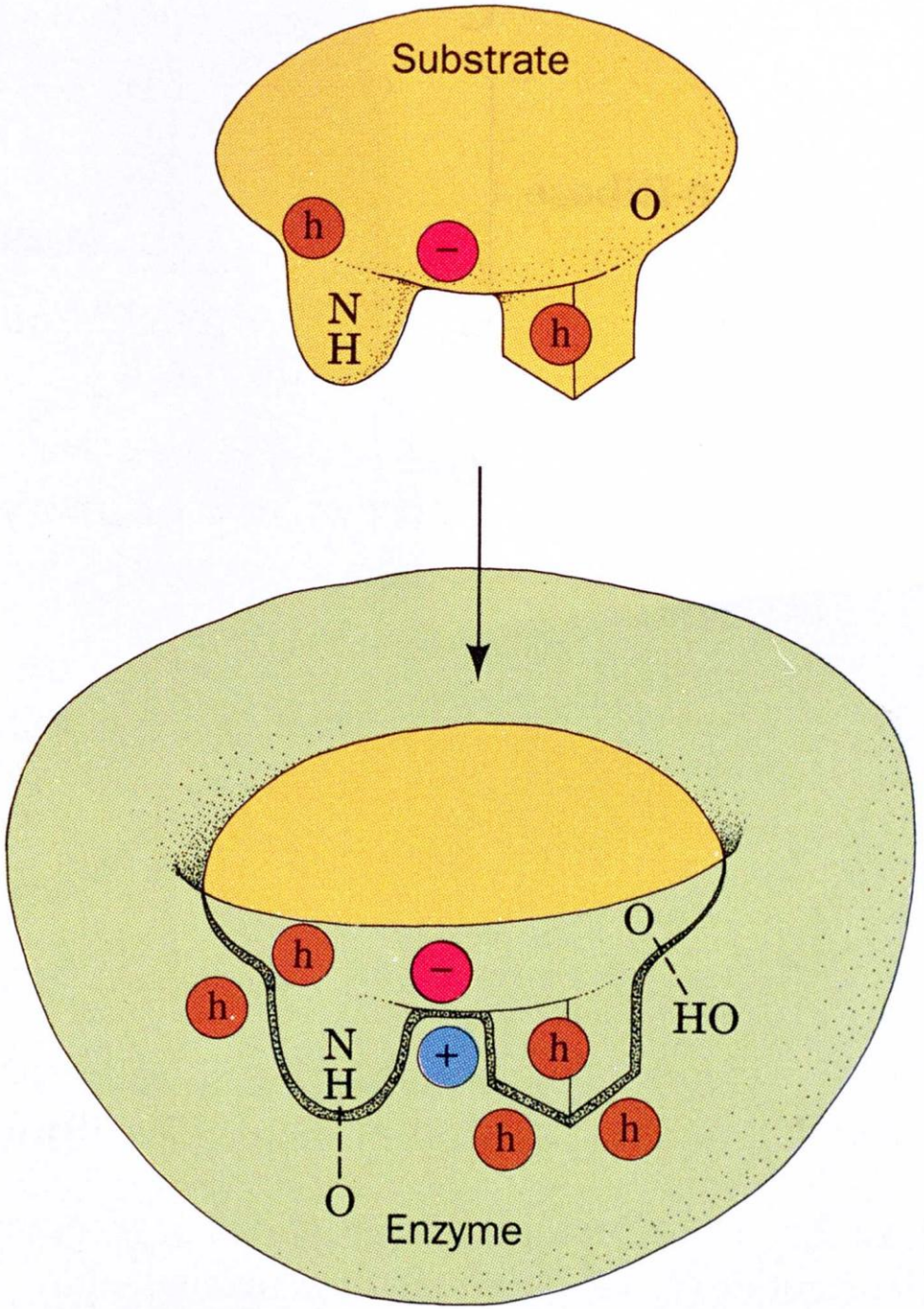
Tasca della proteina in cui sporgono le catene laterali di alcuni residui amminoacidici che costituiscono il **sito di legame** per il substrato (responsabile della specificità) e di altri residui amminoacidici, o cofattori che costituiscono il **sito catalitico** (responsabile dell'evento catalitico)

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

Complesso Enzima-Substrato

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

ENERGIA di LEGAME



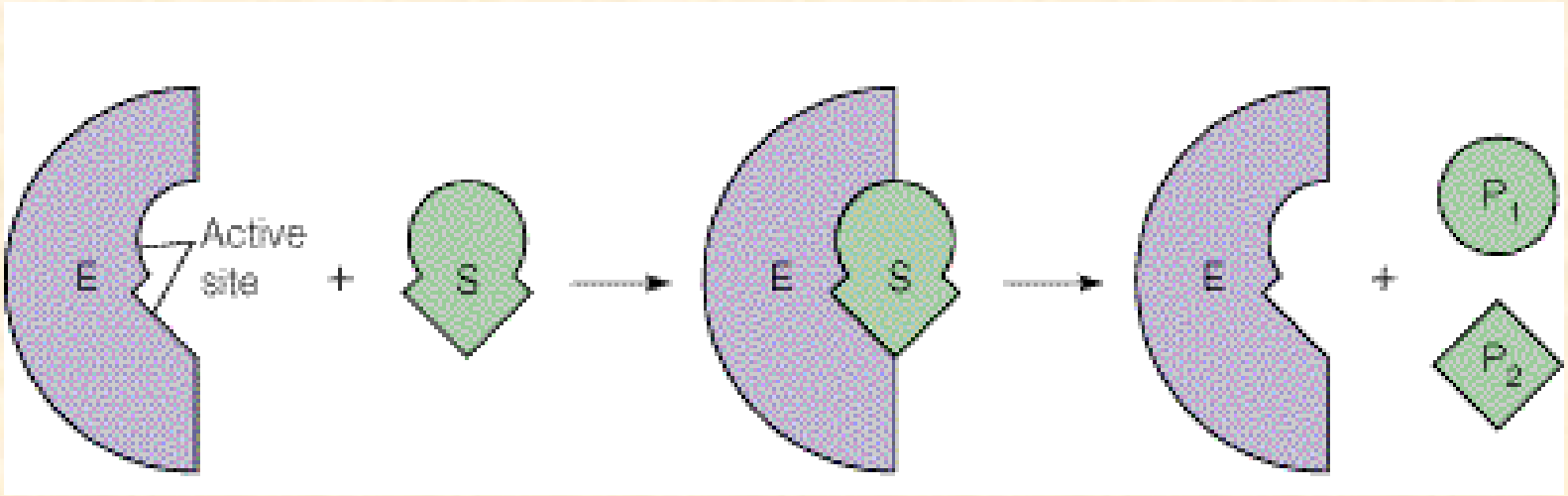
In quale modo l'enzima utilizza l'energia di legame per ridurre l'energia di attivazione??

Il primo modello per spiegare l'interazione Enzima-substrato

Modello chiave-serratura, (Fisher 1894):

- L'enzima ospita nel sito attivo il substrato.
  (come una serratura ospita la propria chiave)

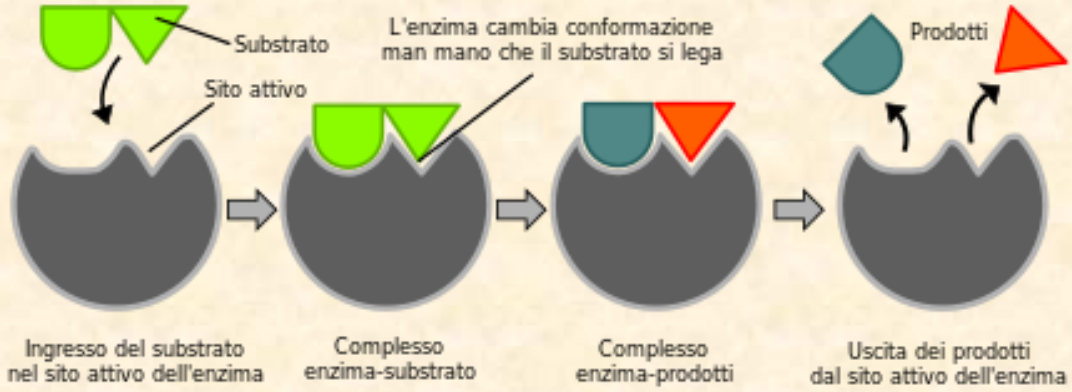
Con questo modello si spiega la specificità ma non la catalisi



Attuale modello per le interazioni substrato-enzima

Teoria dell'adattamento indotto (Koshland 1958)

Il sito attivo dell'Enzima assume una forma complementare a quella del substrato solo dopo che il substrato si è legato:

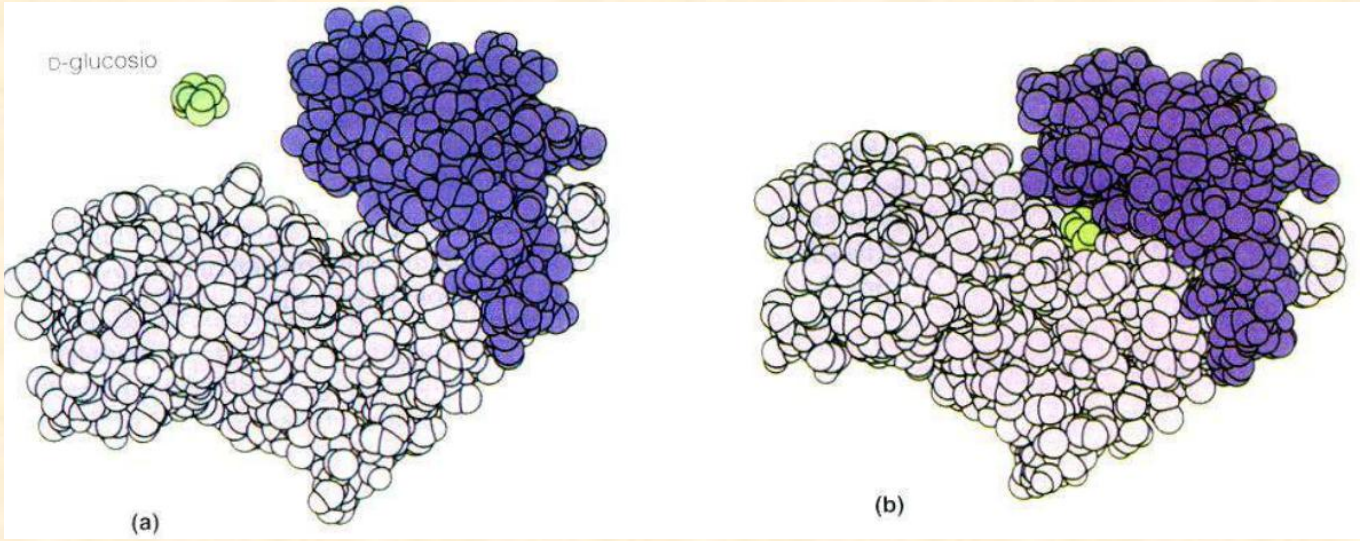


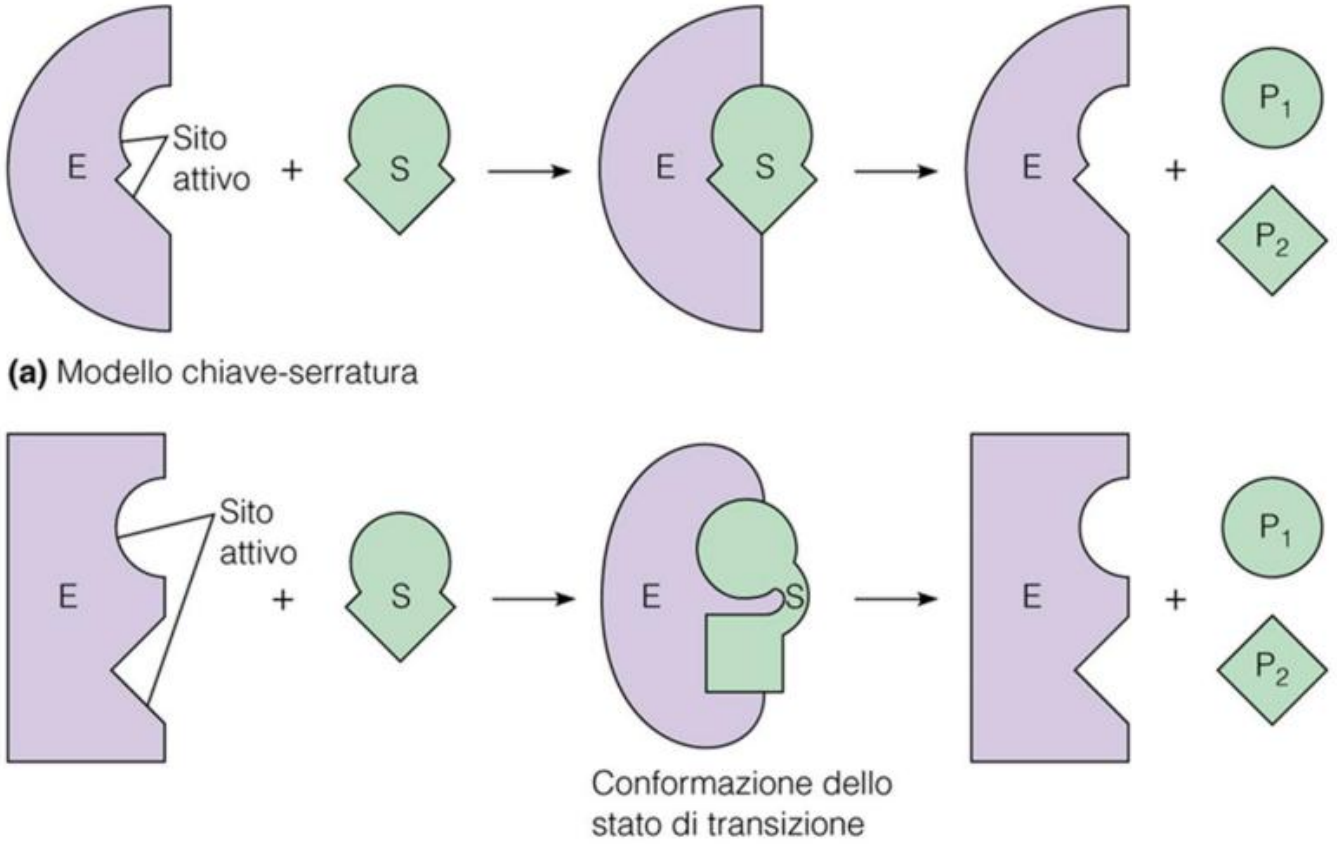
Il substrato induce modificazioni conformazionali sull'enzima per stabilizzare lo stato di transizione

Adattamento indotto determina delle distorsioni a carico sia dell'enzima sia del substrato.

Distorsioni localizzate

Distorsioni che determinano una grande variazione conformazionale dell'enzima (esochinasi).




E
Sito
attivo
+
S
E
S
E
+
P1
P2
(a) Modello chiave-serratura
E
Sito
attivo
+
S
E
S
E
+
P1
P2
Conformazione dello
stato di transizione
(b) Modello dell'adattamento indotto

ENZIMI:

- Le reazioni nei sistemi biologici avverrebbero troppo lentamente senza la catalisi.
- Assicurare un efficiente metabolismo
- Enzimi funzionano da catalizzatori biologici nelle reazioni cellulari
- Sono PROTEINE GLOBULARI (fanno eccezione i ribozimi a RNA)

- Aumentano la velocità di una reazione =favoriscono una reazione
- .Aumentano la Velocità di una reazione di 10^6-10^{20} volte rispetto alla velocità delle reazioni non catalizzata)
- I catalizzatori non enzimatici aumentano le velocità di una reazione di 10^2-10^4 volte.

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)

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

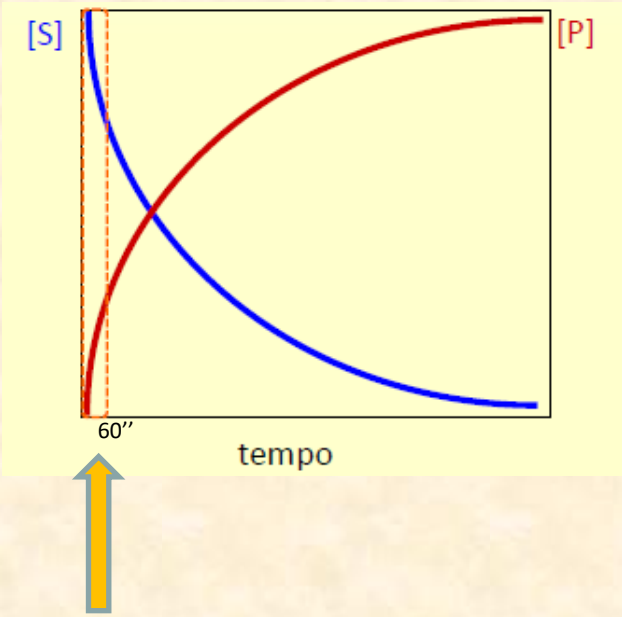
-

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

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

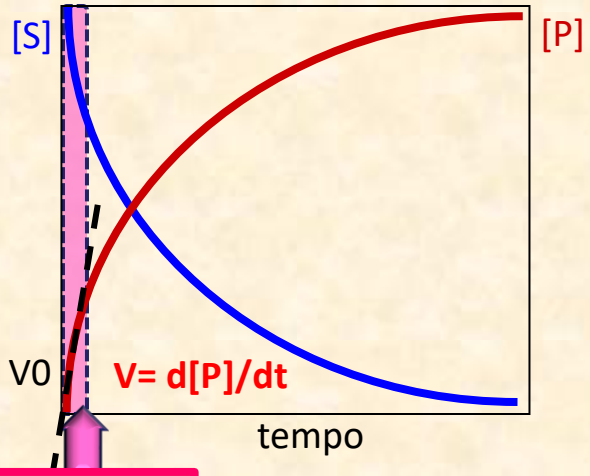
[P] = aumenta nel tempo
[S]= diminuisce nel tempo

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



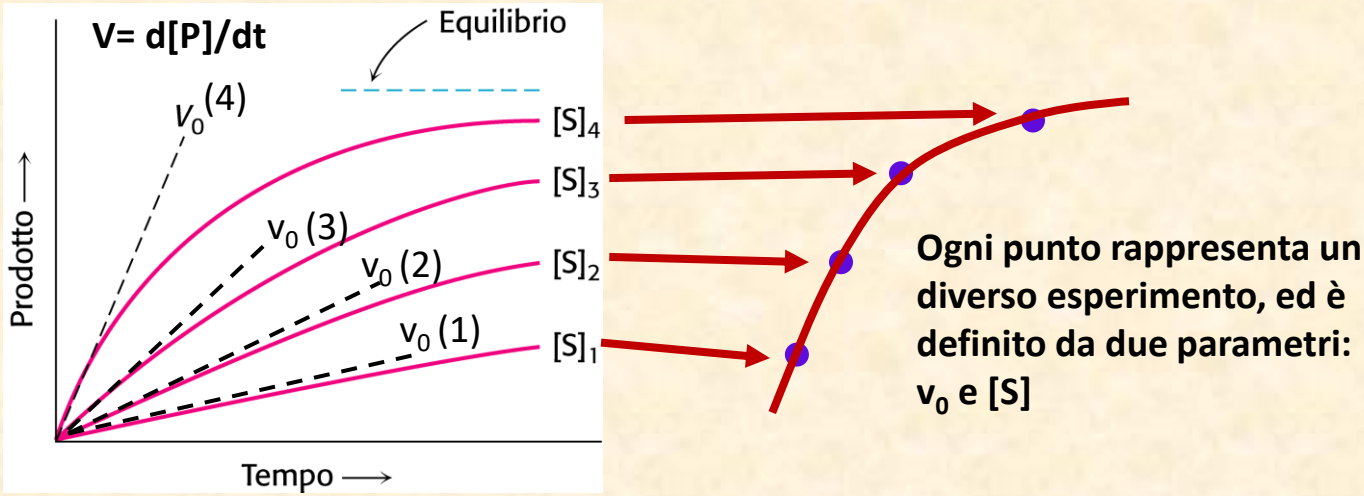
S → P

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 V_0 (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 T0 alla curva cinetica.
Per ognuna delle curve cinetiche ottenute a diverse [S] viene calcolata la v_0



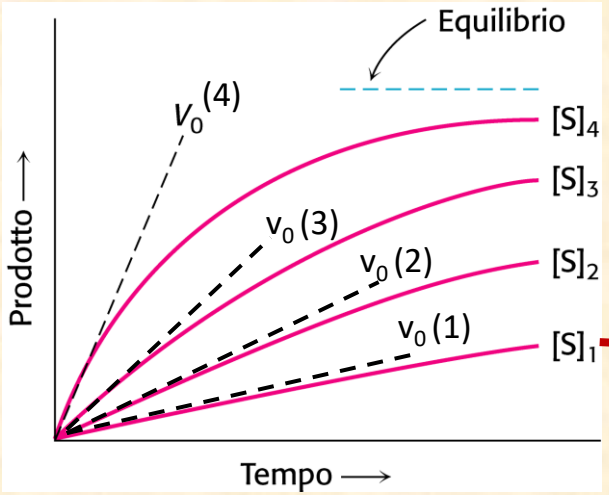
S → P

$v_0 = k\,[S]$

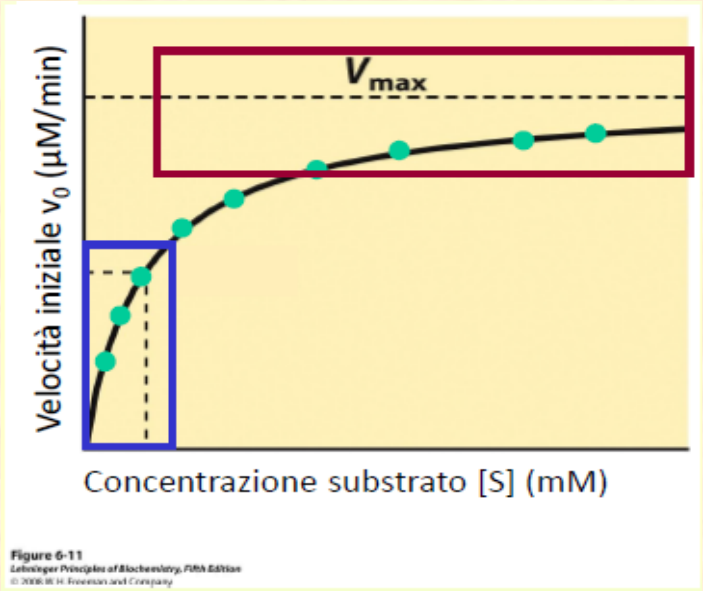
- **La v_0 è direttamente proporzionale alla concentrazione di reagente [S] usata per la reazione.**
- **Per gli enzimi che seguono la cinetica di Michaelis-Menten la dipendenza della v0 dalla [S] è descritta da una curva iperbolica**

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

Cinetica enzimatica (S→P)



Mettendo in relazione graficamente i valori di *V0* ottenuti con le diverse [S] utilizzate, ottengo una **curva iperbolica**



V0 = numero di moli substrato consumate in un minuto

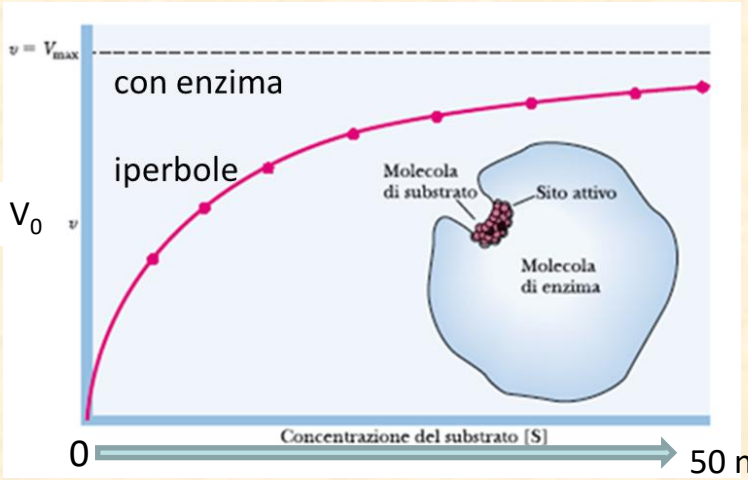
1. Quando [S] è bassa, la V0 aumenta in modo quasi lineare con l'aumento di [S];
2. Quando [S] è più elevata, V0 aumenta in misura sempre minore rispetto all'aumento di [S], avvicinandosi alla **velocita massima** (**Vmax**), valore al quale il substrato è talmente concentrato da saturare i siti attivi di ogni molecola di enzima presente.

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

LA VELOCITÀ INIZIALE DI CATALISI **V_0**

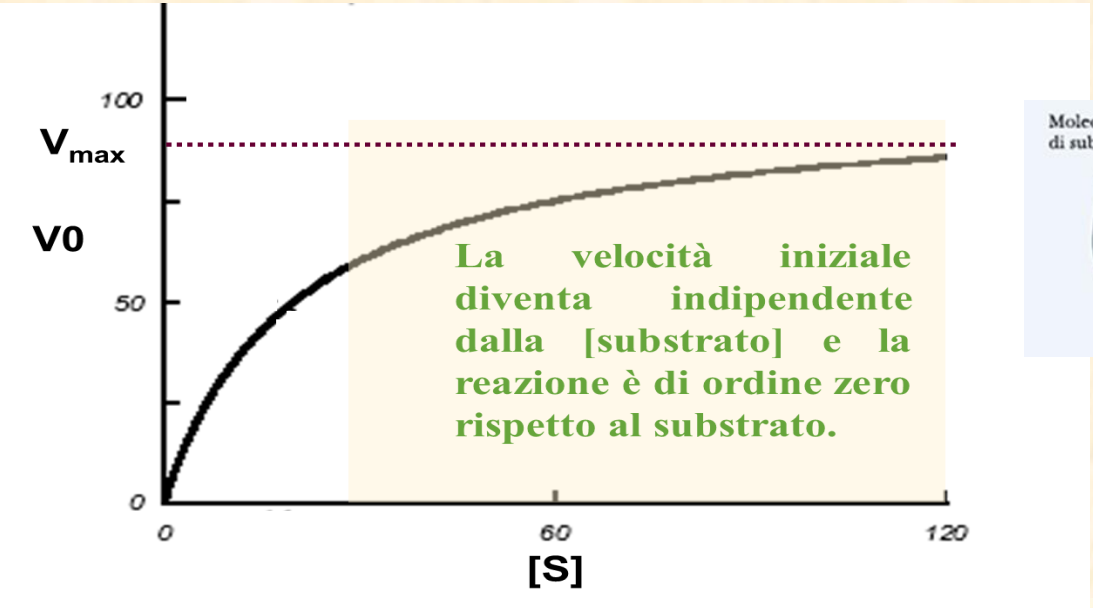
↓

definita come numero di moli substrato consumate in un minuto



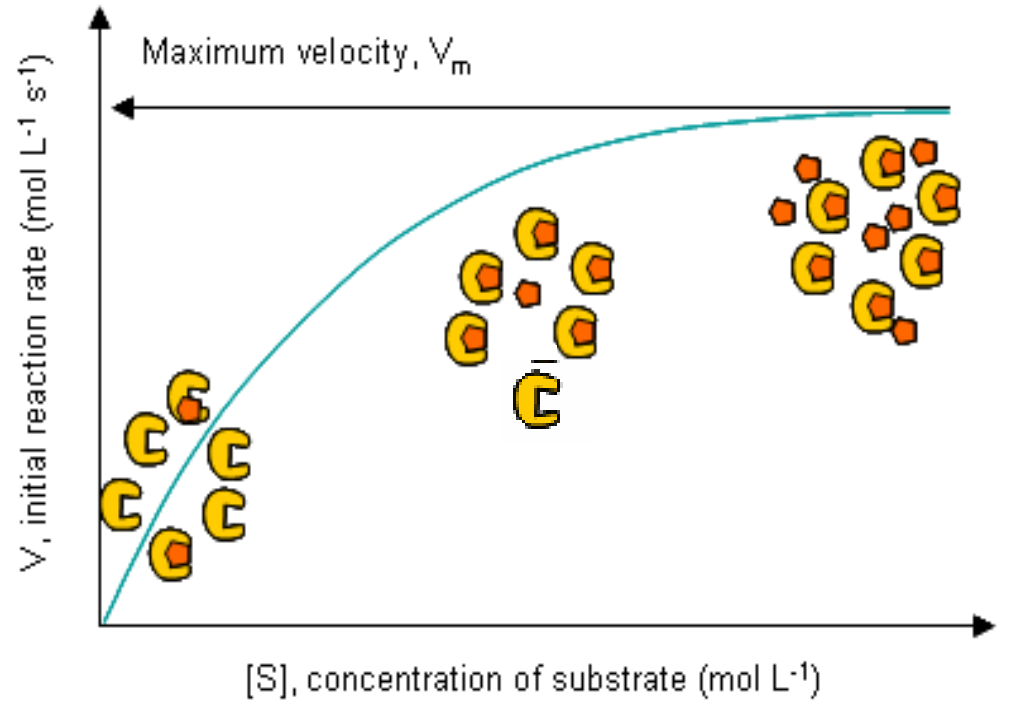
Immaginiamo di registrare tante V_0 quante sono le [S] utilizzate in un determinato esperimento

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

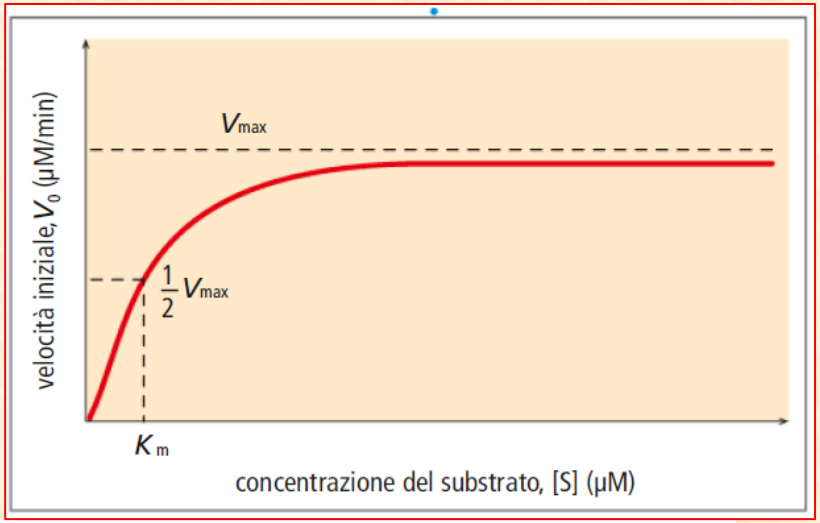




- Questa condizione esiste solo quando [S] è elevata.
- L'effetto saturante del substrato è una proprietà caratteristica degli enzimi responsabile dell'appiattimento della curva.


Maximum velocity, V_m
V, initial reaction rate (mol L^{-1} s^{-1})
[S], concentration of substrate (mol L^{-1})

La relazione tra velocità iniziale di reazione e concentrazione del substrato fu descritta all'inizio del secolo s**corso 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**:



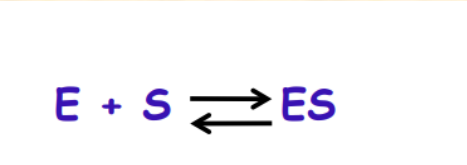

Leonor Michaelis
1875–1949


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:



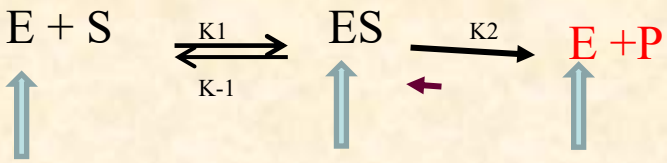
prima tappa veloce e reversibile



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

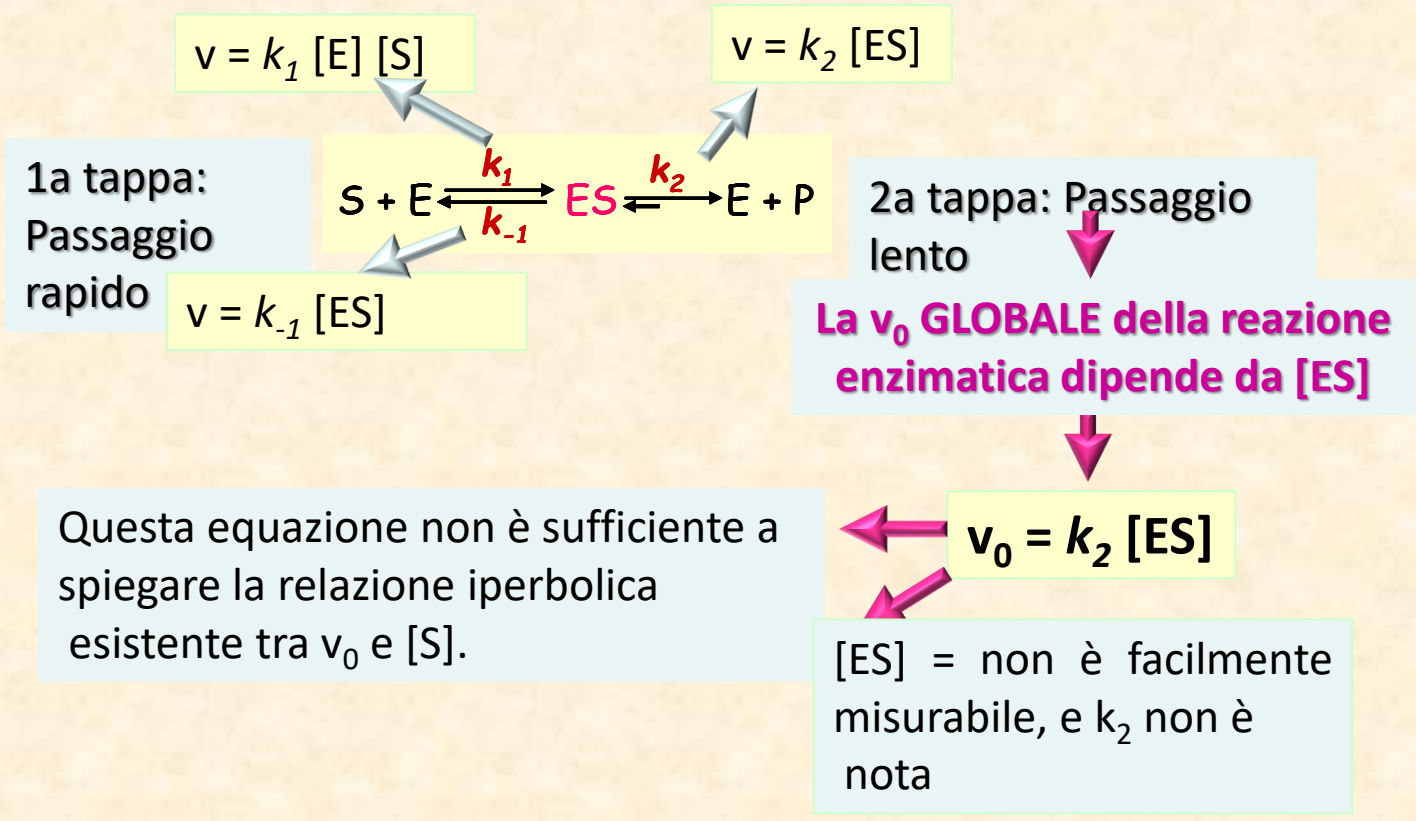


k_1 = cost cinetica velocità di formazione del complesso ES
k_{-1} = cost cinetica velocità di decomposizione del complesso ES in E + S
k_2 = cost cinetica velocità di decomposizione del complesso ES in E + P
k_{-2} = talmente piccola da essere trascurabile

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

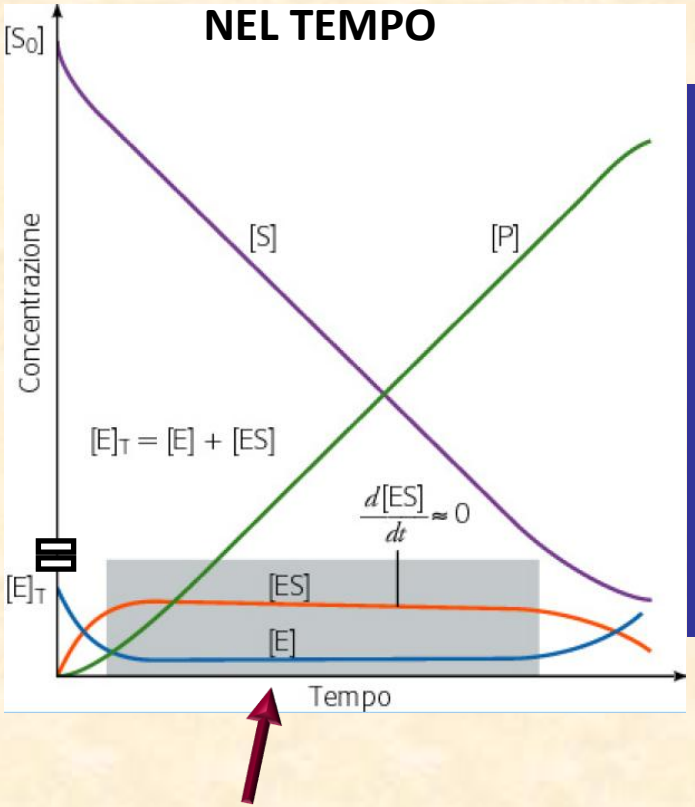
Quando la [S] è bassa, l'enzima sarà per lo più nella forma libera E.

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



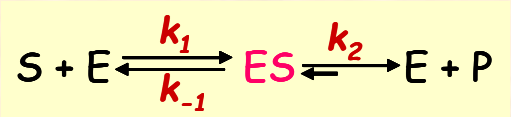
La concentrazione dell'enzima libero [E] in soluzione diminuisce man mano che aumenta la concentrazione del complesso [ES].

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

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} E + P$$

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

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

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

Poiché la v_0 globale di reazione è :

$v_0 = k_2\,[ES]$ e quindi:

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

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

$$\frac{([E]_T - [ES])\,[S]}{[ES]} = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} = Km$$

Costante di Michaelis e Menten

1) può essere riscritta così

$$\frac{([E]_T - [ES])\,[S]}{[ES]} = Km$$

$$[E]_T\,[S] - [ES][S] = Km\,[ES]$$

$$[E]_T\,[S] = [ES]\,(Km + [S])$$

$$[ES] = \frac{[E]_T\,[S]}{Km + [S]}$$

.....inizialmente abbiamo postulato che la **velocità** di reazione valutata **nei primi istanti** è definita **V0 ed è uguale a k2 [ES]**

V0= K2 [ES] **[ES] =Vo K2**

$$V0 = \frac{K2\,([E]_T\,[S])}{Km + [S]}$$

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

$$k_2\,[E]_{TOT} = Vmax$$

Concentrazioni saturanti di substrato,

tutto l'enzima è complessato col substrato:

$[E]_{TOT} = [ES]$ **e** $v0 = Vmax$

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

$v_0 = k_2 [ES]$ **diventa** $Vmax = k_2 [E]_{TOT}$

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

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

Equazione di Michaelis-Menten

equazione fondamentale della cinetica enzimatica



$$Vo = \frac{Vmax\ [S]}{Km + S}$$

consideriamo la condizione quando
Vo= ½ Vmax

Dividendo per Vmax:

sostituiamo nella equazione di Michaelis-Menten.

$$\frac{Vmax}{2} = \frac{Vmax\ [S]}{Km + S}$$

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

Km+[S] = 2 [S]

Km= [S] quando Vo = 1/2 Vmax

Quindi Km è equivalente alla concentrazione del substrato quando Vo è metà della Vmax

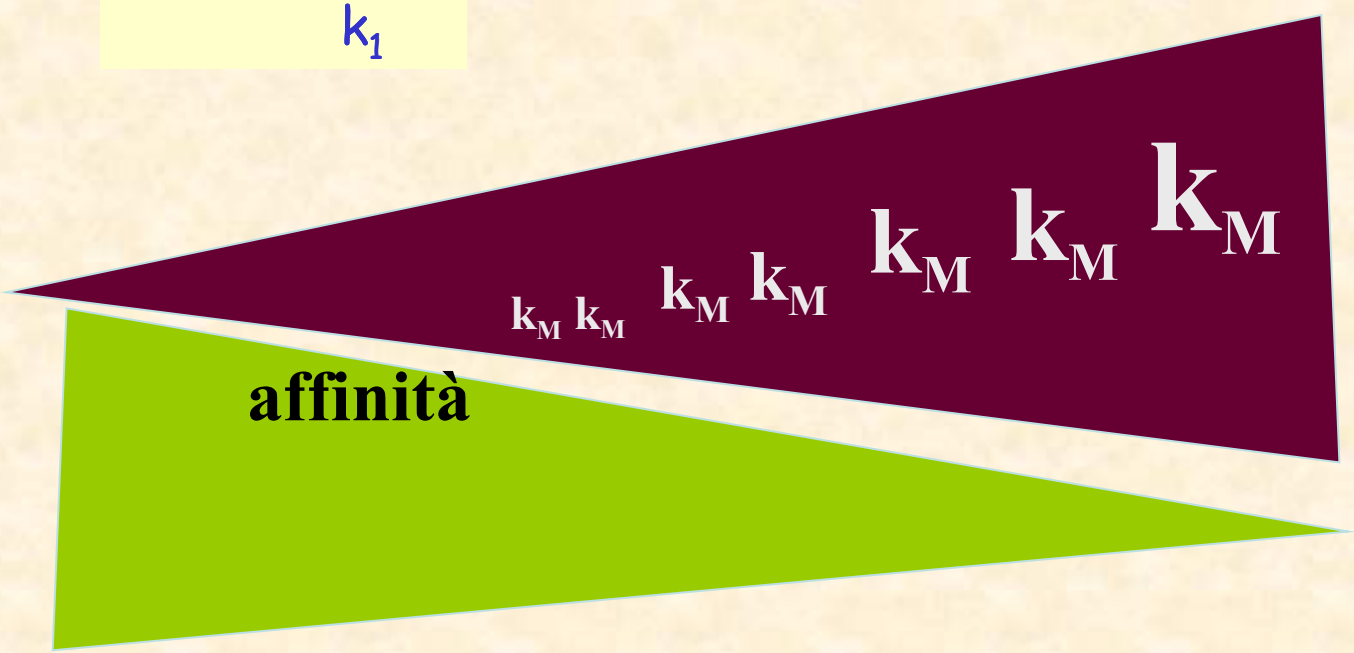
costante di **Michaelis-Menten**

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

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

La costante di Michaelis (K_M)

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

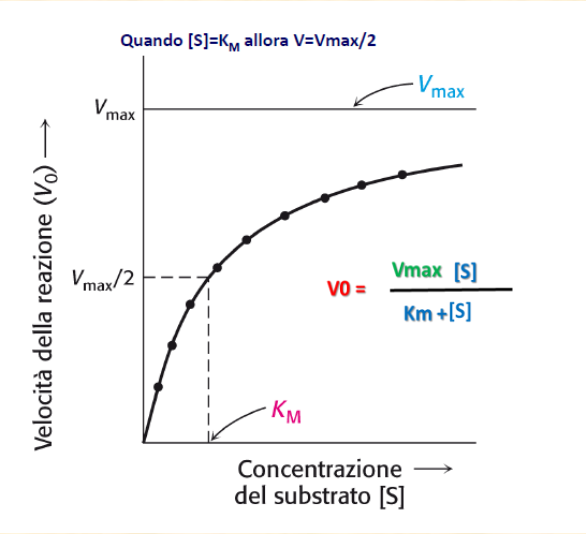


K_M è la concentrazione del substrato alla quale la metà dei siti per il substrato sono saturati.

<u>Quindi K_M fornisce una misura della conc di substrato richiesta affinchè la catalisi abbia luogo</u>

Come posso calcolare Km e Vmax da una curva iperbolica?

È molto difficile calcolare la Vmax e di conseguenza Km (1/2 di Vmax)



Poichè si raggiunge asintoticamente

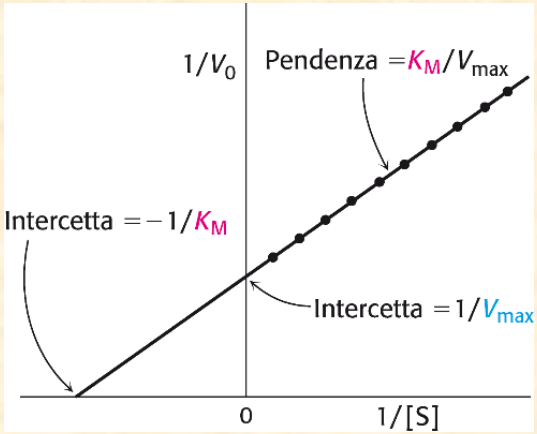
$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

È molto più utile trasformare l'iperbole in una retta

GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI (Eq. di Lineweaver-Burk, 1934)

(linearizzazione della curva iperbolica)

Equazione di una retta nel piano Cartesiano → Y= mx+q



$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{Km}{Vmax}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$

Y m X q

Intercetta asse y — Coefficiente angolare — Intercetta asse x

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

$$v_0 = \frac{Vmax\,[S]}{Km + [S]}$$

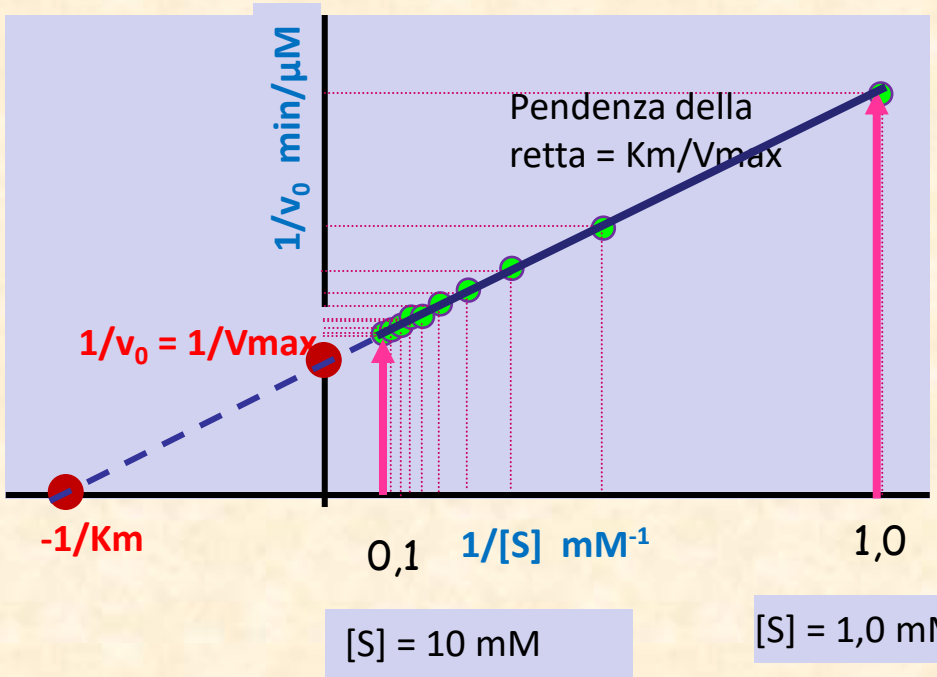
Determinazione sperimentale di Km e Vmax per una reazione enzimatica:
GRAFICO DEI DOPPI RECIPROCI (Eq. di Lineweaver-Burk)

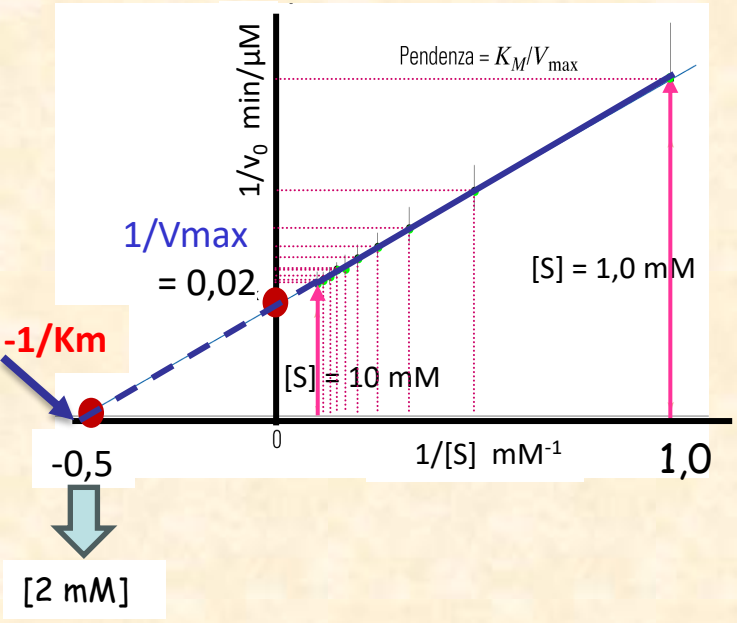
(linearizzazione della curva iperbolica) >>>>

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{Km}{Vmax}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$

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 Km e Vmax, e quindi anche k_{cat}





Per calcolare la Vmax devo fare il reciproco del reciproco =

$\frac{1}{Vmax}$ = 0,02 min/µM → Vmax = $\frac{1}{0{,}02 \text{ min/ µM}}$

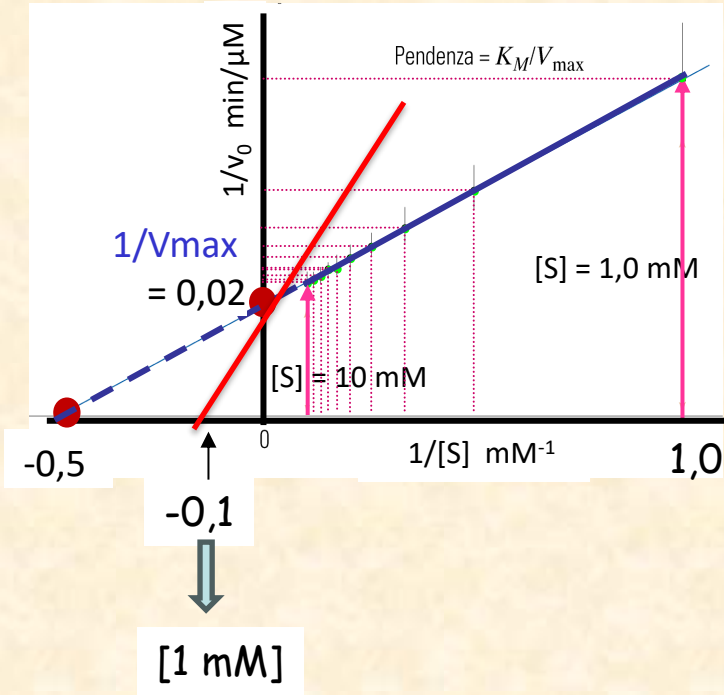
Vmax = 50 µM/min

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

-1/Km = -0,5 mM^{-1} → Km = $\frac{-1}{-0{,}5\ mM^{-1}}$ = 2mM

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

-1/Km = -0,1 mM^{-1} → Km = $\frac{-1}{-0{,}1\ mM^{-1}}$ = 1mM

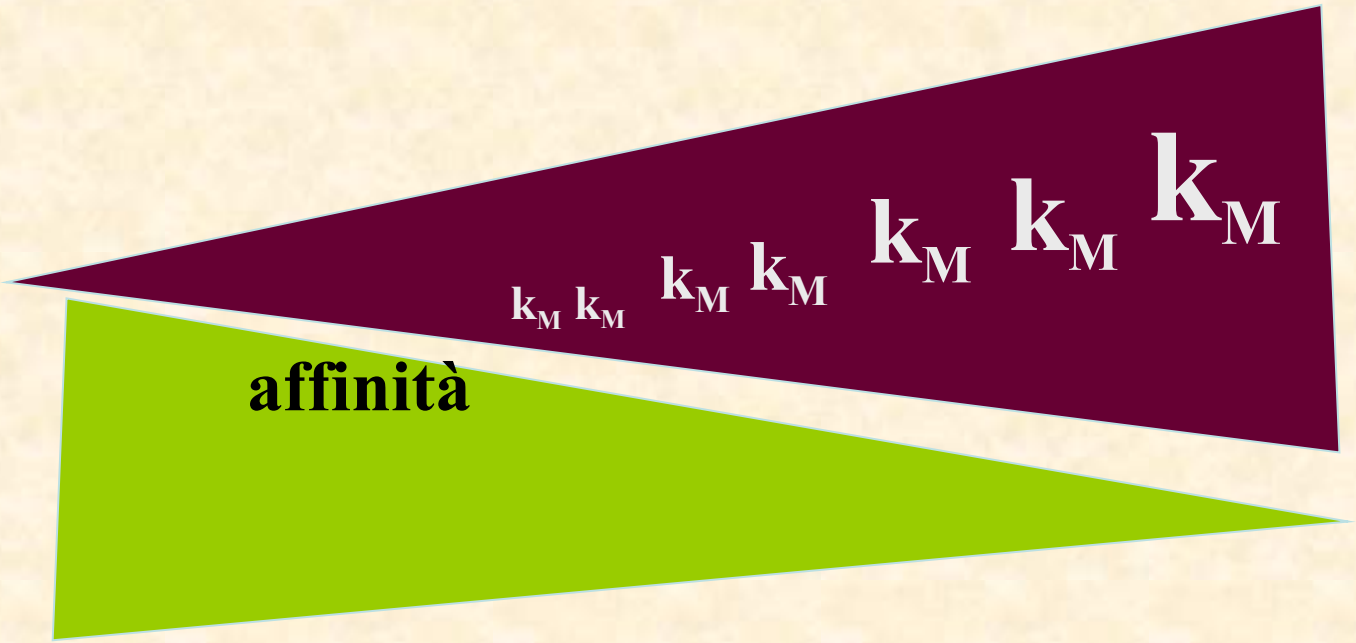


$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{Km}{Vmax}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax} \qquad v_0 = \frac{Vmax\,[S]}{Km + [S]}$$

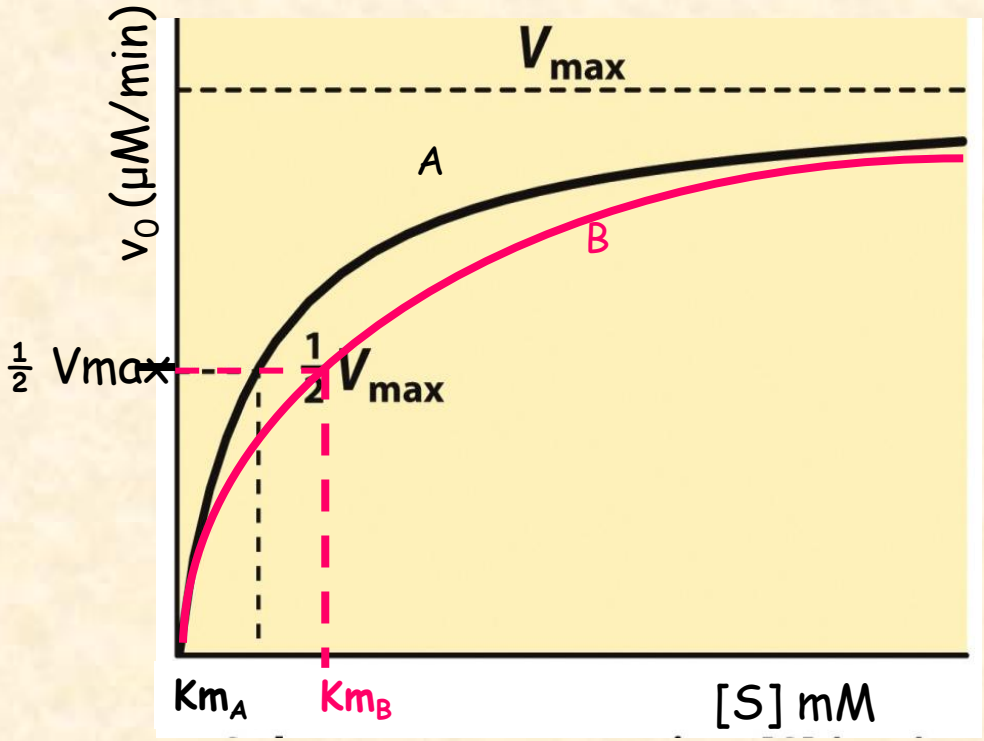
Costante di Michaelis (K_M)

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

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



1 enzima
2 substrati simili A e B
medesime condizioni di reazione
Verso quale dei due l'enzima è più affine? A

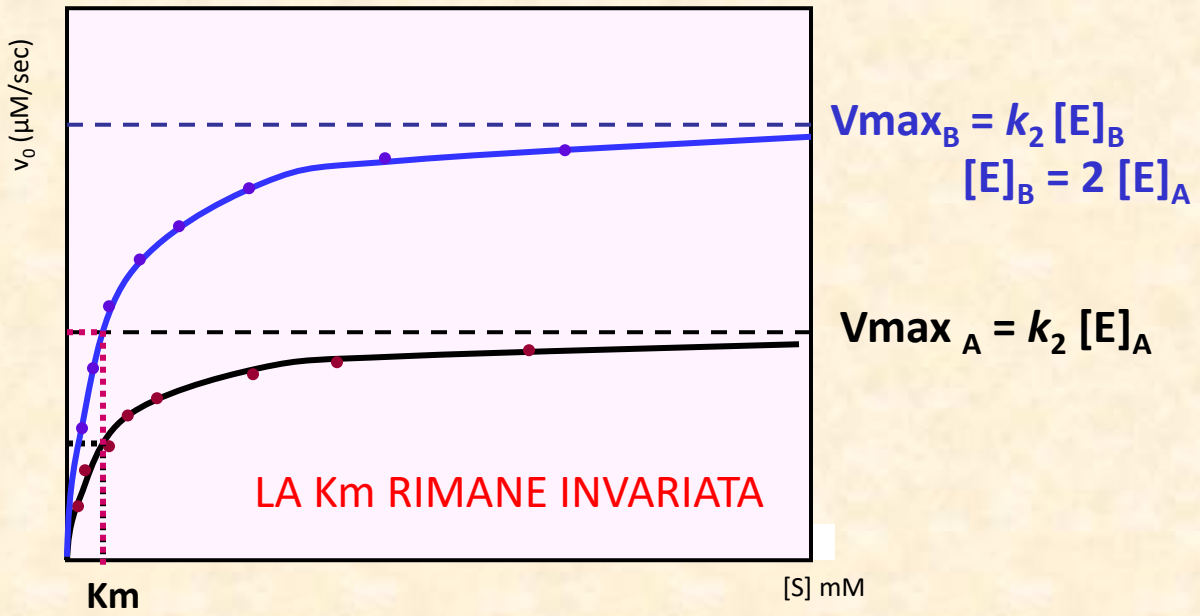


Se lavoro con una miscela di reazione enzimatica in cui utilizzo una [S] saturante e voglio raddoppiare la velocità di reazione cosa devo modificare nella miscela di reazione? In che modo?

A [S] saturante la v_0 raggiunge il suo valore massimo (Vmax), 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.

$Vmax = k_2 [E]_{tot}$

per raddoppiare la velocità di reazione (Vmax) 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)

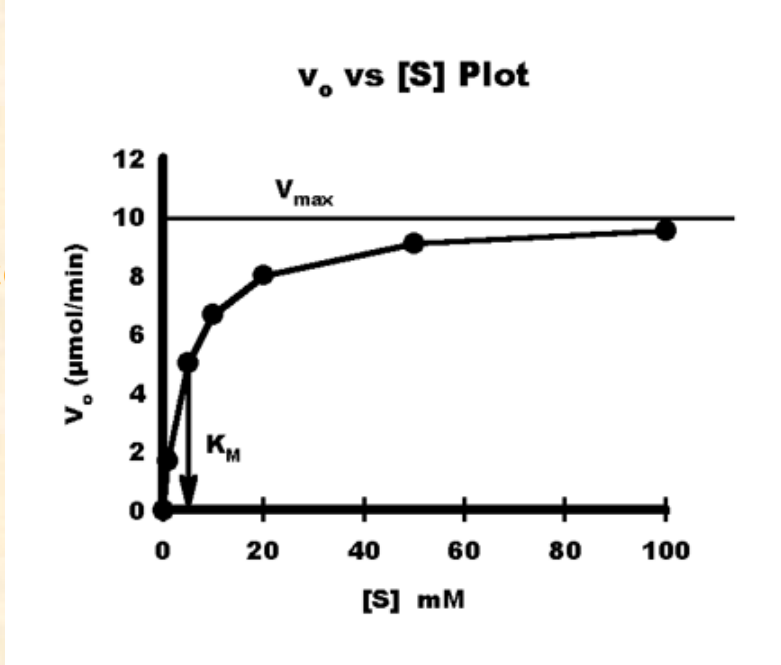
3) Quali informazioni ottengo dalla cinetica di una reazione enzimatica?

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 *Km* e *Vmax*, sono di estrema importanza per capire come gli enzimi si coordinano tra loro a livello metabolico
4) Può essere usata a scopo clinico-diagnostic

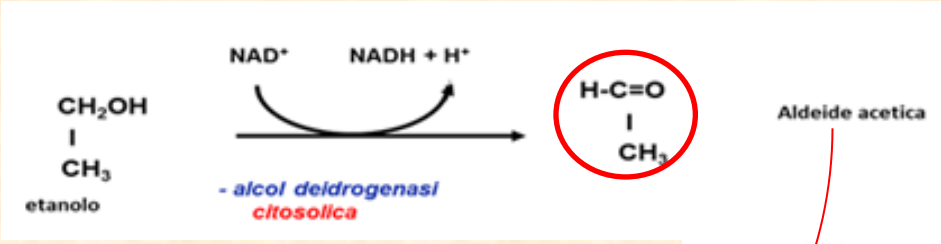
Grafico di Michaelis-Menten



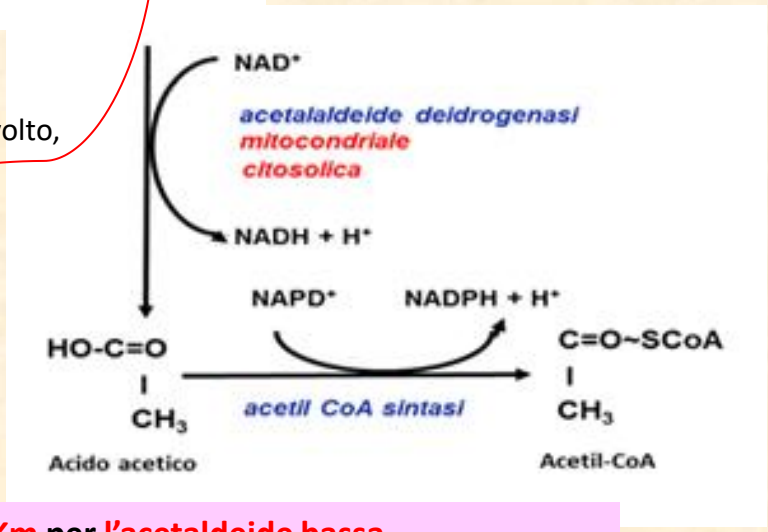
Le variazioni della Km possono avere implicazioni fisiologiche



Es. metabolismo dell'etanolo



Composto reattivo e tossico (accumulo ematico).
I gravi effetti tossici si manifestano con arrossamento al volto, nausea, vomito, tachicardia, cefalea

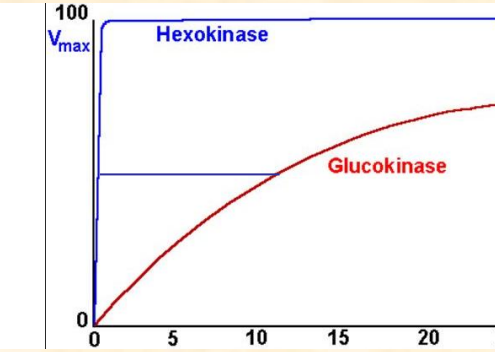


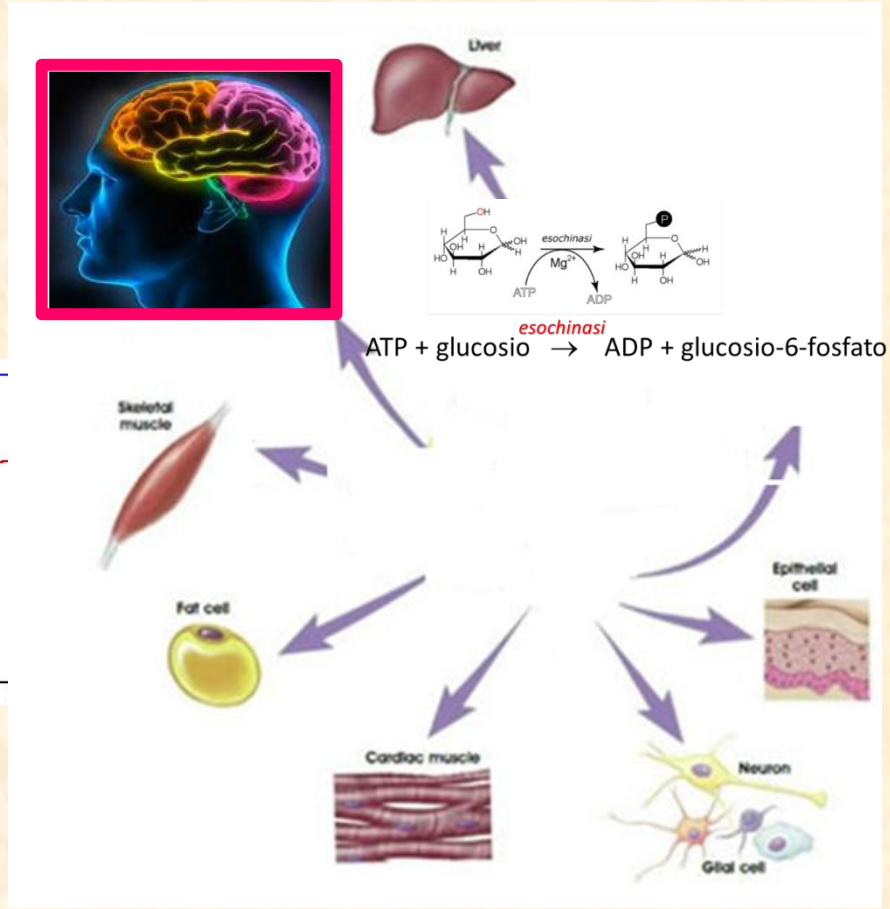
L'Acetaldeide deidrogenasi mitocondriale ha la Km per l'acetaldeide bassa
L'Acetaldeide deidrogenasi citosolica ha la Km per l'acetaldeide alta

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……





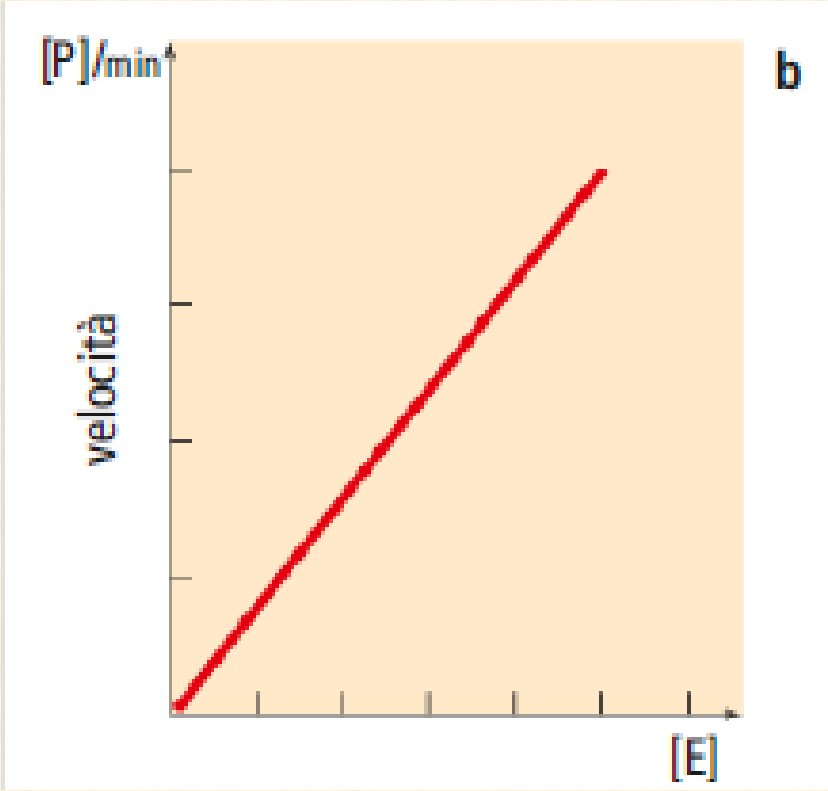
L'esochinasi presente nel cervello e nel muscolo ha valori di Km molto bassi

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

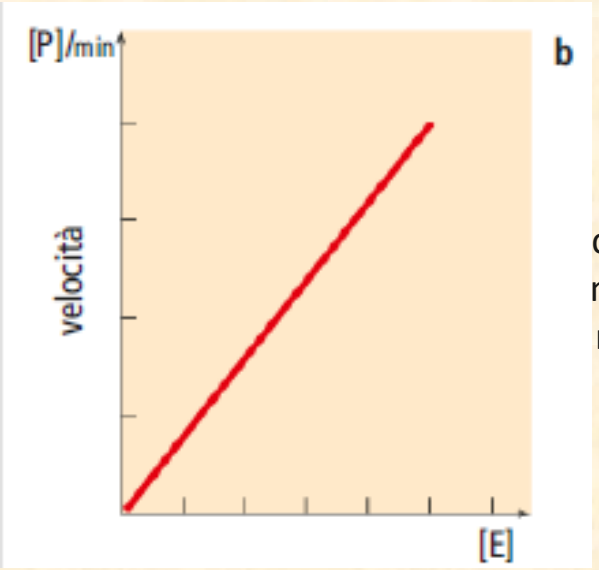
Effetto delle variazioni della concentrazione dell'enzima rispetto ad una costante di [S]



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

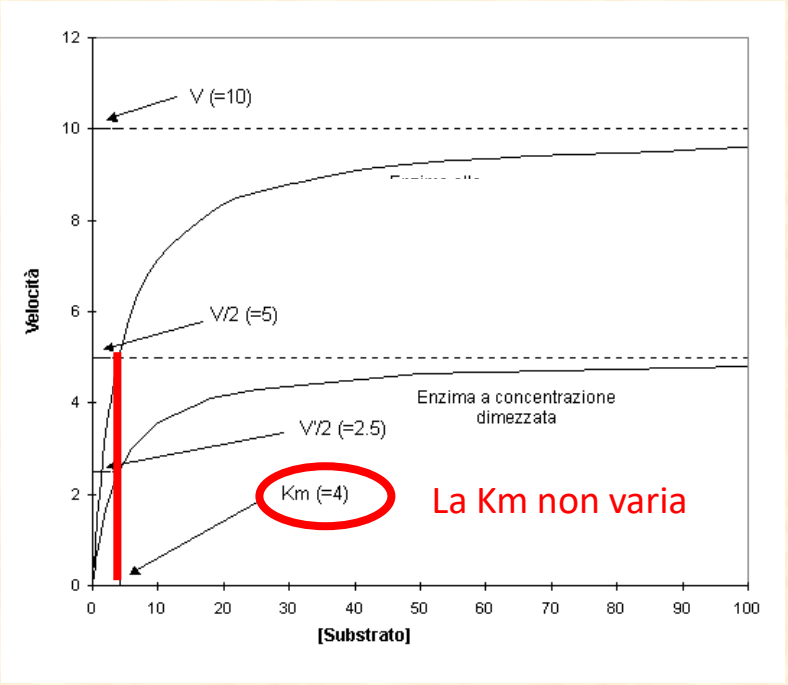
relazione lineare

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]

$$Vmax = k_2 [ES] = k_2 [E]_{TOT}$$

$$v_0 = \frac{Vmax\,[S]}{[S] + K_m}$$

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:

Km è la concentrazione del substrato quando Vo è metà della Vmax





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.

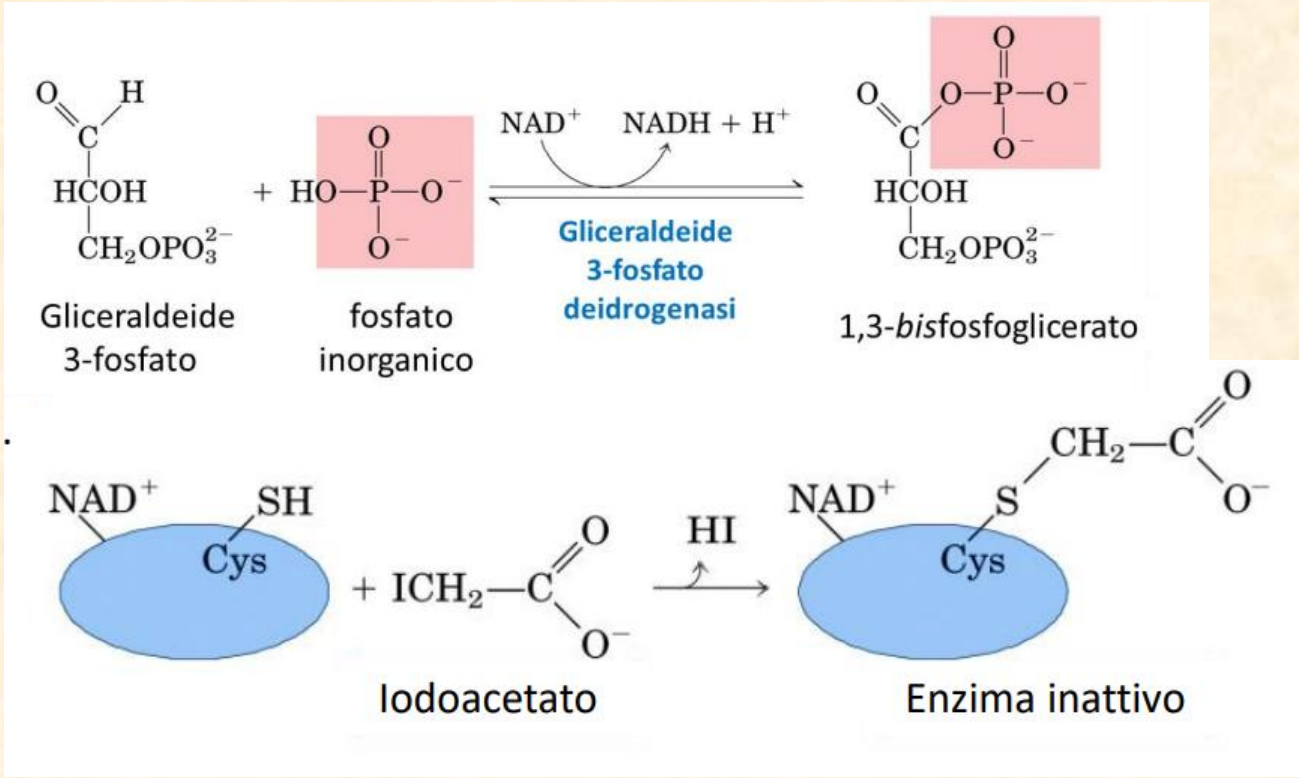
Utilizzati per lo studio dei meccanismi enzimatici o per studiare i gruppi coinvolti nelle catalisi:

Possono essere suddivisi:

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

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

- Reagenti gruppo-specifici

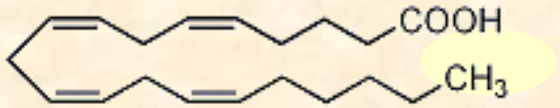


Esempi di inibitori enzimatici di uso comune

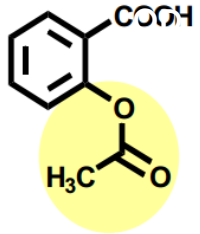
Acido acetilsalicilico → Inibitore **competitivo irreversibile** dell'enzima cicloossigenasi

Cicloossigenasi

Acido arachidonico



st



Aspirina

Prostaglandine

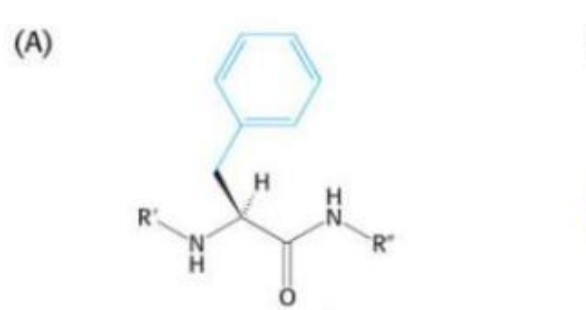
↓

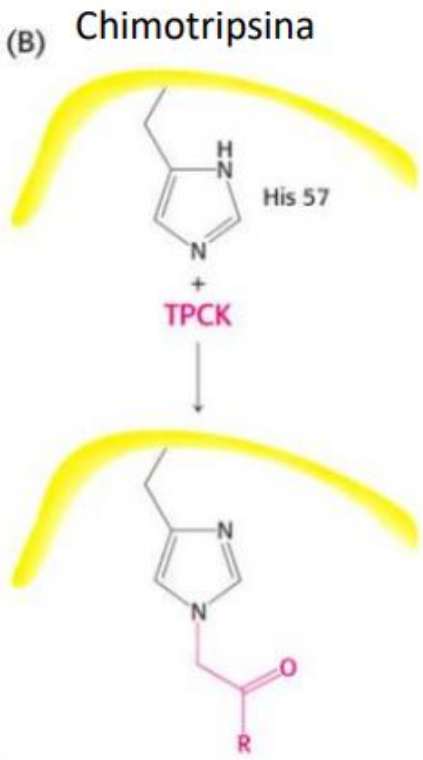
Infiammazione

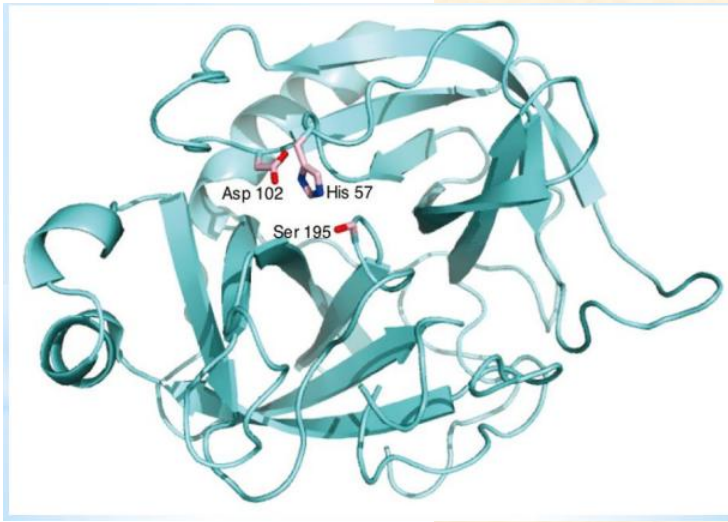
INIBIZIONE IRREVERSIBILE

Analoghi del SUBSTRATO

Bloccano enzimi con residui di Ser nel sito attivo:
Proteasi seriniche (chimotrispina…);



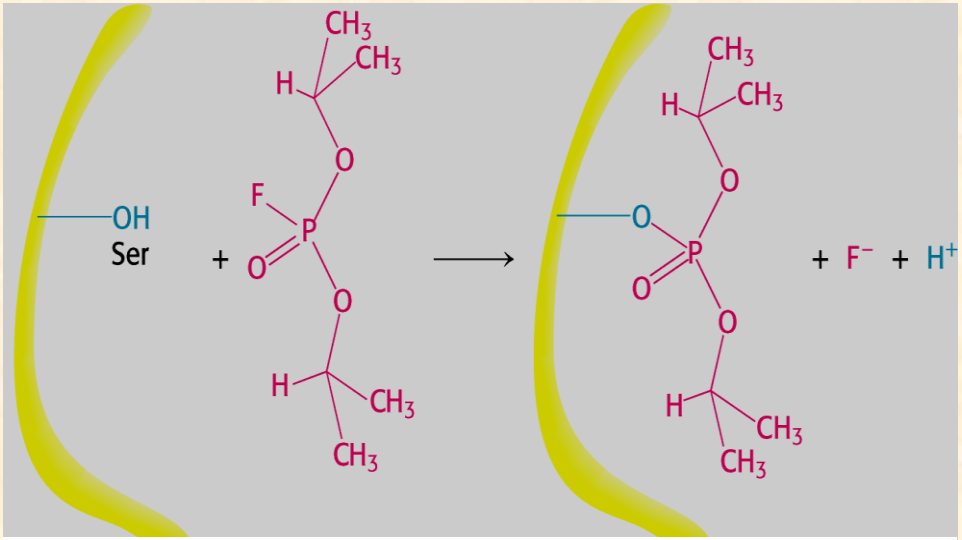




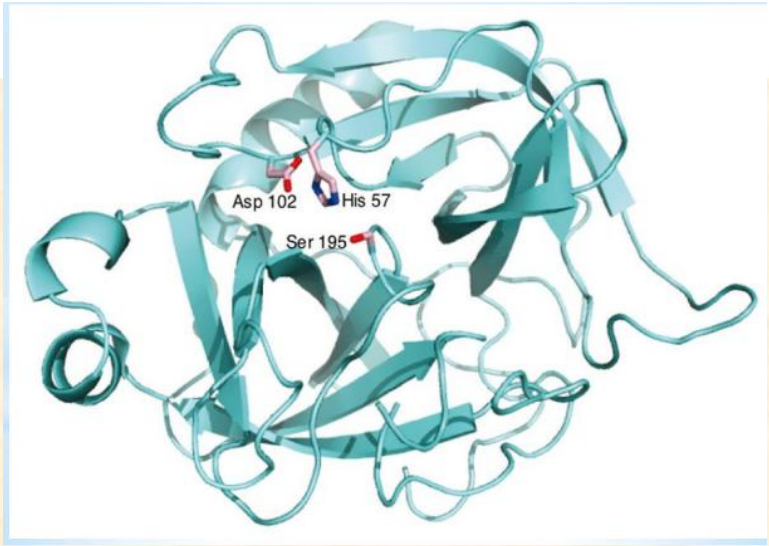
TPCK (N-tosil-L-fenilalaninaclorometilchetone) blocca specificatamente la chimotripsina (proteasi a serina)

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

Bloccano enzimi con residui di Ser nel sito attivo:
Proteasi seriniche (chimotrispina…);



DFP addotto inattivo



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

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

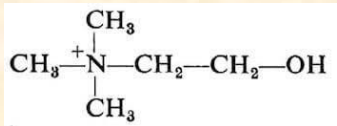
Stabiliscono interazioni con il sito attivo che sono molto più forti di quelle che si otterrebbero nel complesso ES.

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

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

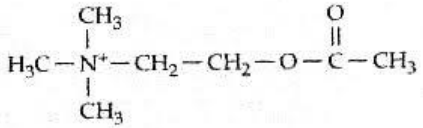
Esterasi a serina (Acetilcolinesterasi)

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.

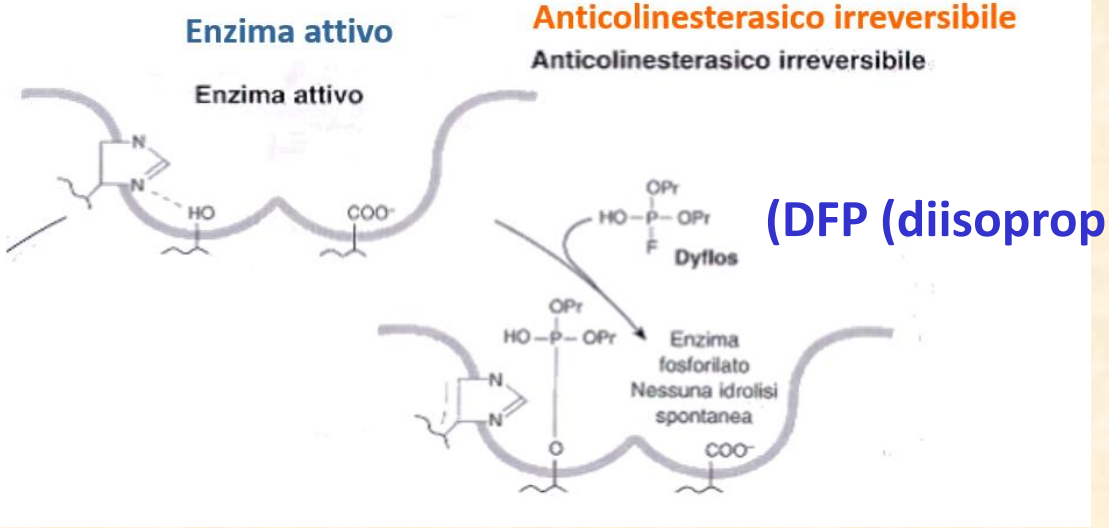


Colina + Acetil-CoA

Colina acetil transferasi → CoA



acetilcolina

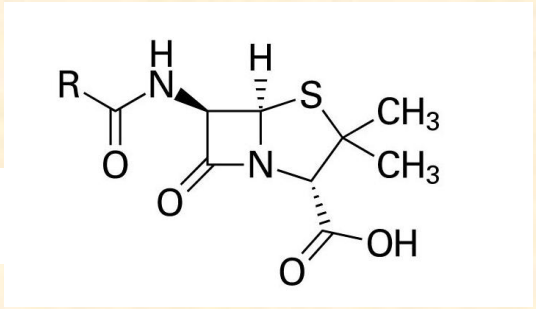


(DFP (diisopropilfluorofosfato),

INIBIZIONE IRREVERSIBILE

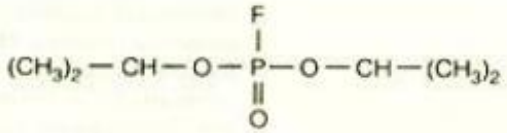
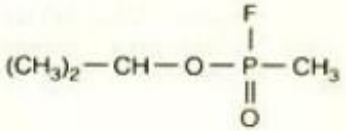
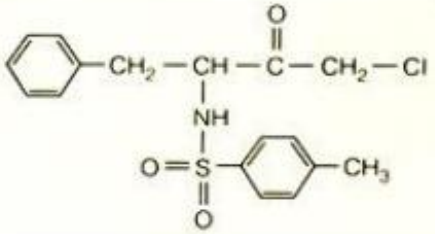
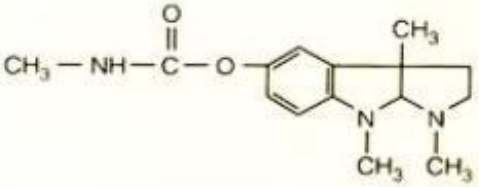
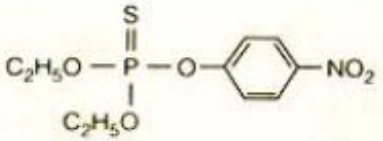
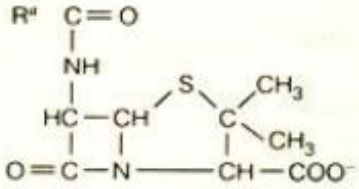
Pennicillina: inibizione catalitica sul sito attivo dell'enzima glicopeptidetranspeptidasi

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)		Sintetica	Inibisce gli enzimi contenenti serina nel sito attivo
Sarin		Sintetica (gas nervino)	Come per il DFP (diisopropilfluorofosfato)
N-Tosil-L-fenil-alaninacloro-metilchetone (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 *Penicillium*	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 Vmax, la Km o entrambe.

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

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

$$Kdiss = K_i = \frac{[E]\,[I]}{[EI]}$$

Costante di inibizione

Tanto più piccola è la Ki (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

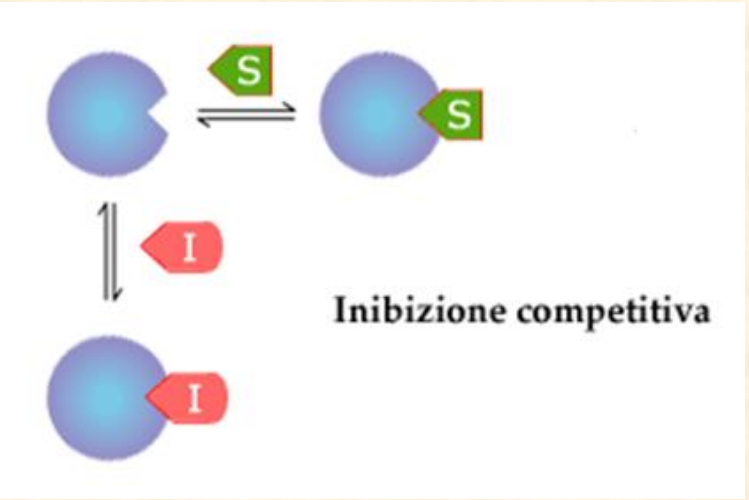
INCOMPETITIVI O ACOMPETITIVI

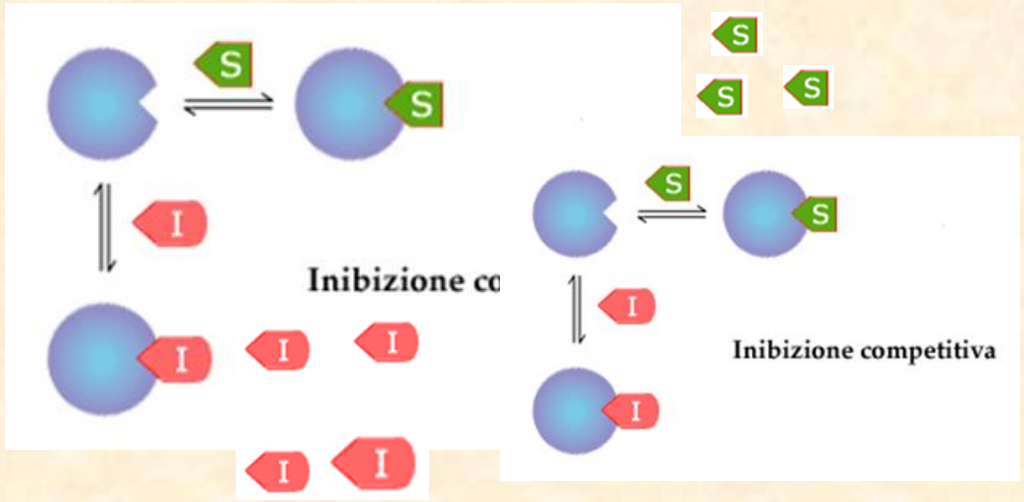
Inibizione Competitiva

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

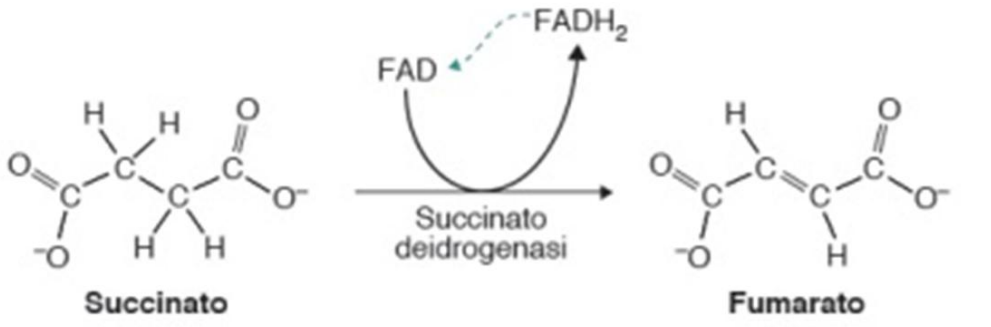




L'inibitore (I) è spesso simile al substrato (S)

Una [I] > [S] spiazza il substrato

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

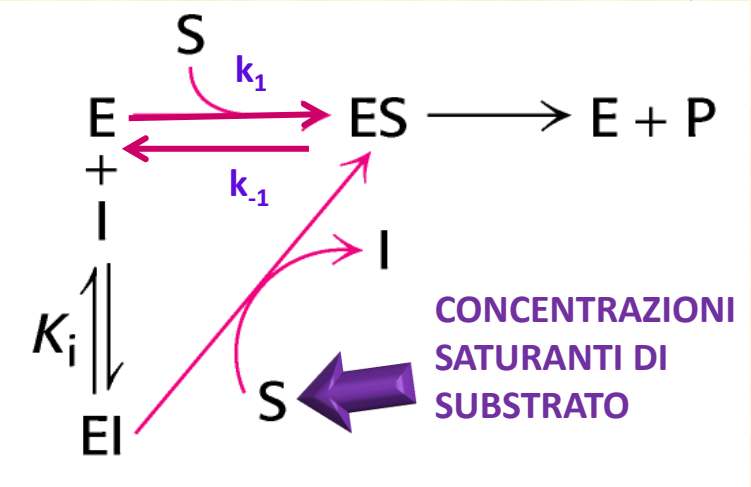


▲ **FIGURA 10.6**
La reazione catalizzata dalla succinato deidrogenasi e alcuni metaboliti strutturalmente analoghi al substrato che agiscono da inibitori competitivi dell'enzima.

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



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

Km aumenta (Km_{app})

Sarà necessaria una maggiore [S] per raggiungere ½ Vmax

$$v_0 = \frac{Vmax\,[S]}{Km_{app} + [S]}$$

αKM

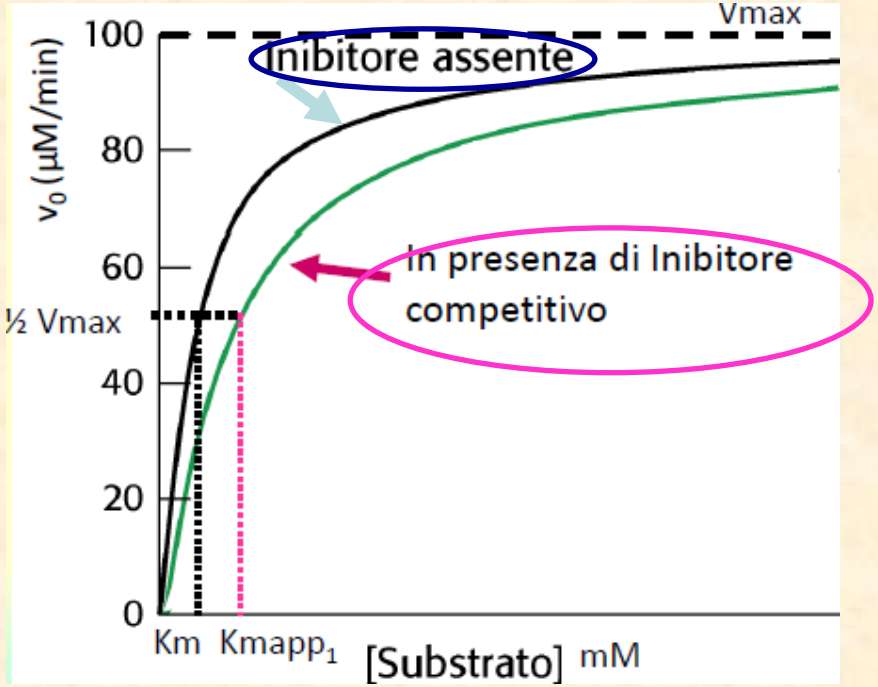
Vmax rimane inalterata,
In presenza di [S] saturanti l'inibitore è scalzato dal sito attivo.

Km aumenta/Vmax rimane invariata

Sarà necessaria una maggiore [S] per raggiungere ½ Vmax

il valore aumentato di Km ci dice che più substrato è necessario per raggiungere la stessa ***Vmax / 2*** che si avrebbe in assenza dell'inibitore

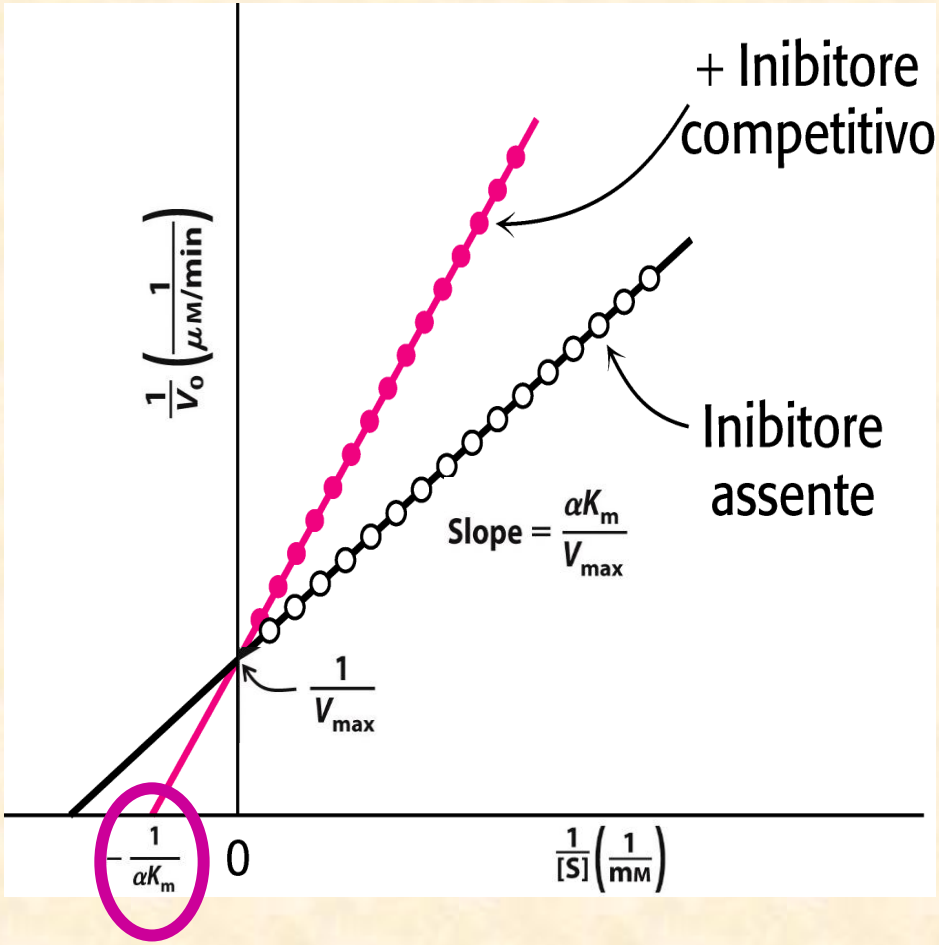
Km app> Km



aumenta la k-1 **Km aumenta** **1/ Vmax =invariato**

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

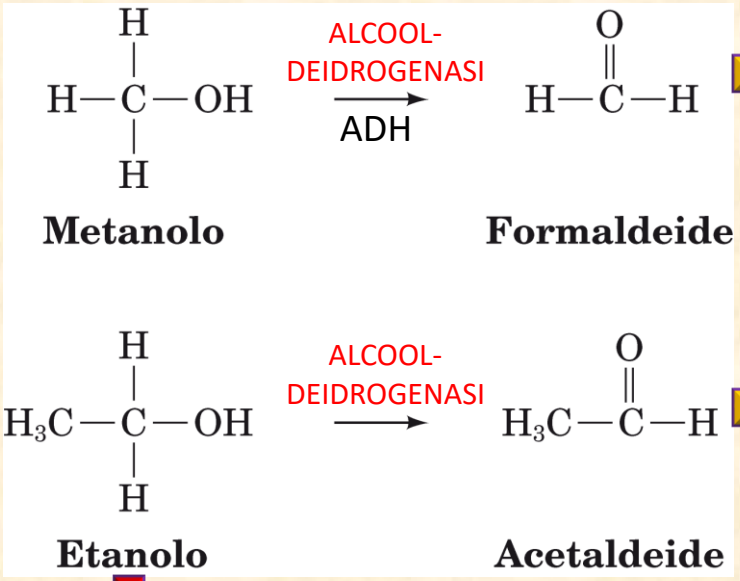
Km
Vmax
Aumento del coefficiente angolare (pendenza)



- 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



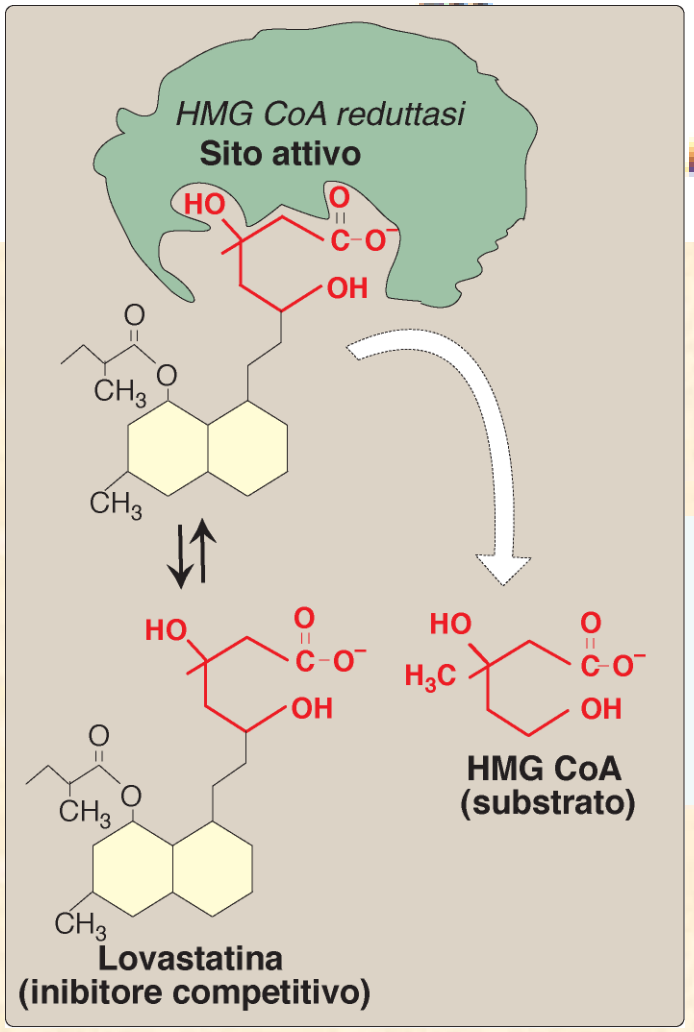
Intossicazione da metanolo: è trasformato in un prodotto tossico che NON può essere metabolizzato.

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.

Enzima chiave della sintesi del colesterolo

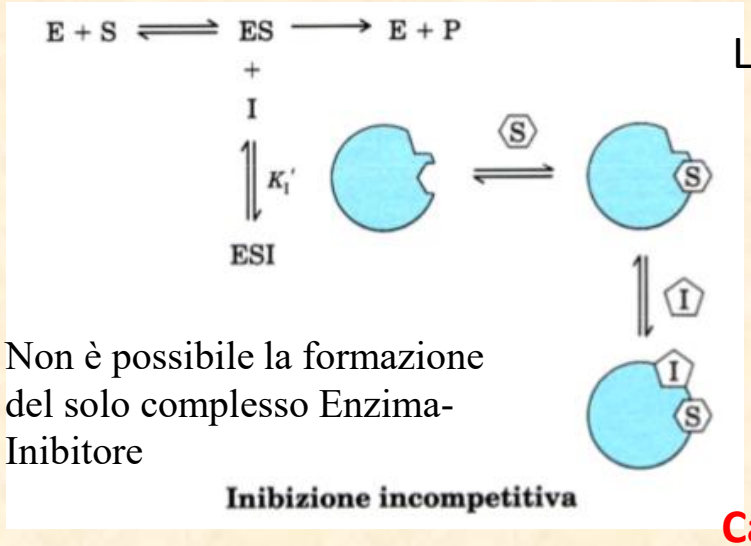
β-Hydroxy-β-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)



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

Inibizione incompetitiva o acompetitiva

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

. Diminuiscono Km e Vmax

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

. Aumenta la k1

Caratteristiche dell'inibizione acompetitiva:

1. L'inibitore distorce il sito attivo dell'enzima inattivandolo.

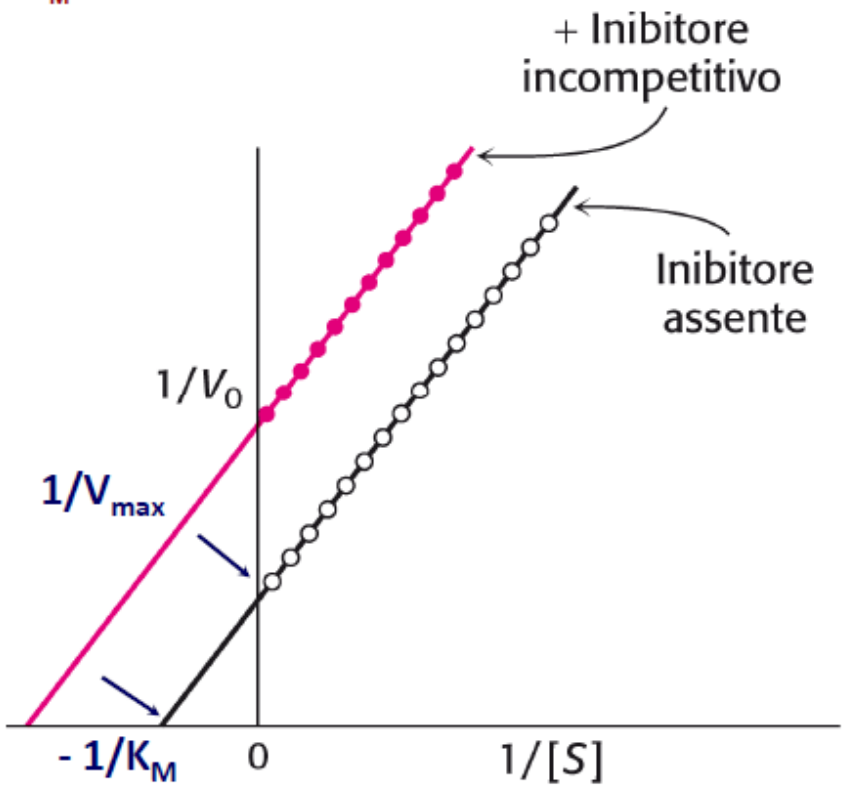
2. Un aumento di [S] non rimuove gli effetti dell'inibitore.

3. L'effetto dell'inibitore aumenta all'aumentare di [S].

Inibizione incompetitiva o acompetitiva

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

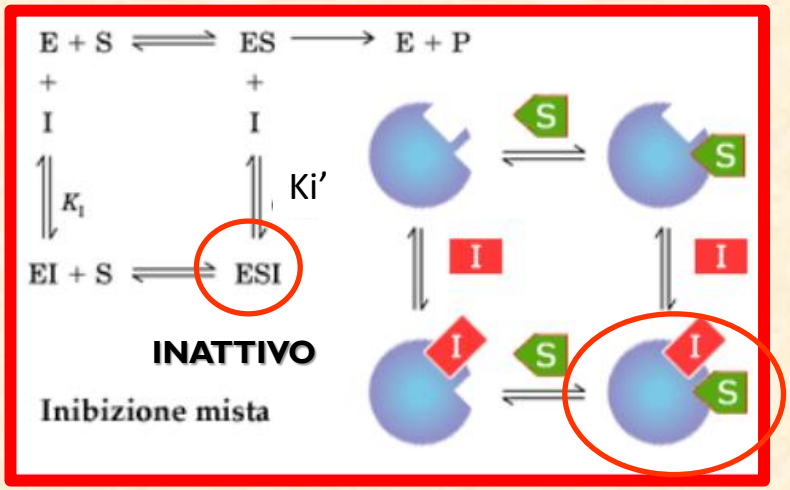
Un inibitore enzimatico incompetitivo influenza l'attività catalitica diminuendo i valori apparenti sia di K_M sia di Vmax.

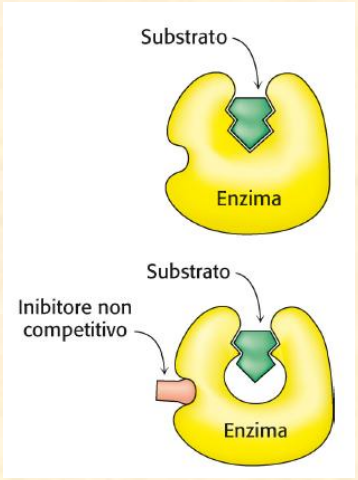


. Diminuiscono Km e Vmax

Inibizione non competitiva (mista)

inibitore e substrato si legano in siti diversi dell'enzima

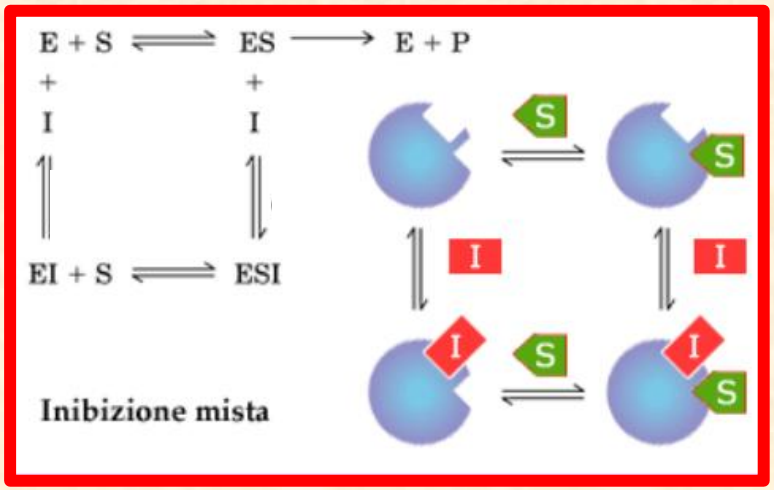




- **I** si lega tanto ad E che a ES
- **S** si lega sia ad E che a EI.

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



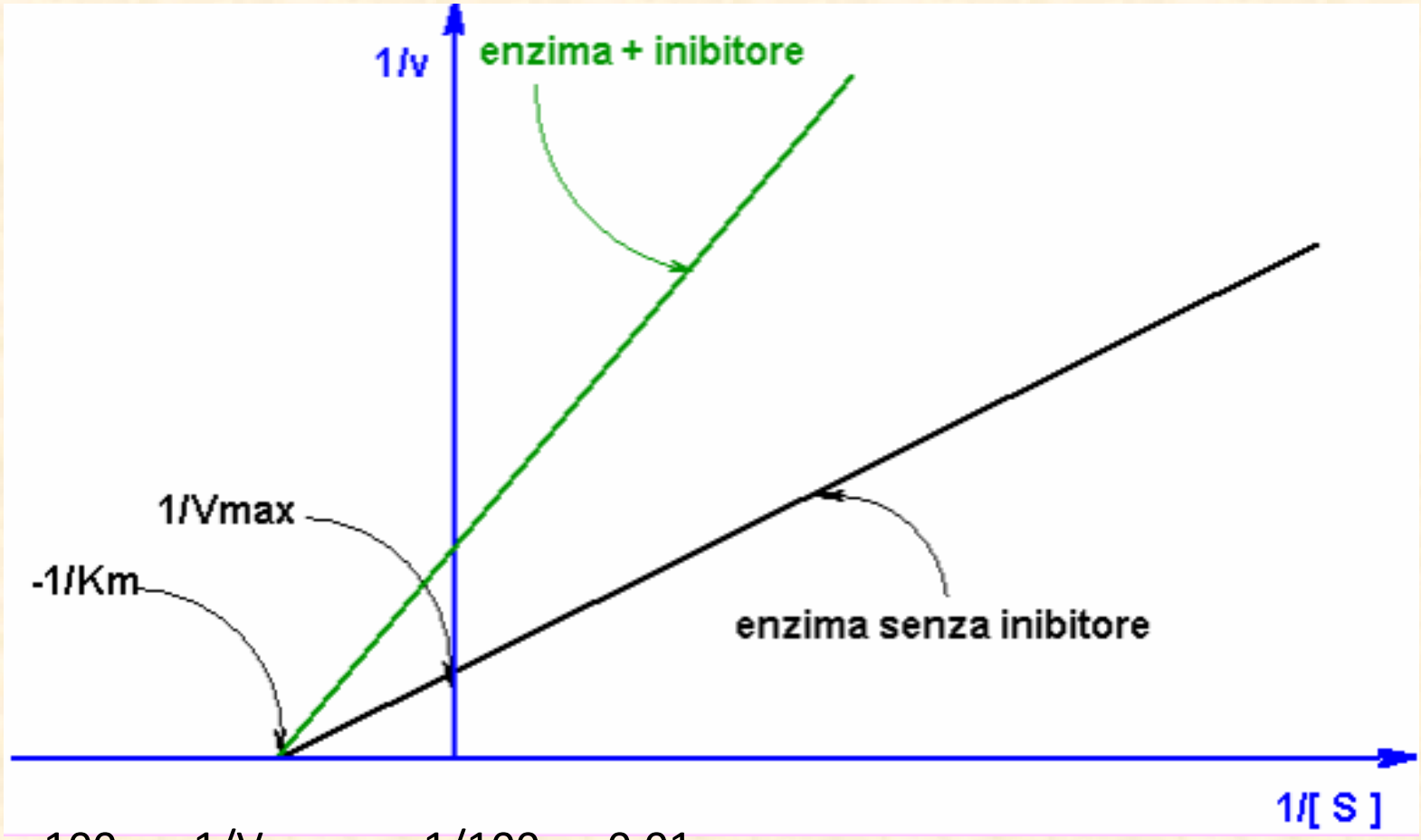
La presenza dell'inibitore diminuisce la velocità di formazione del prodotto

Vmax diminuisce

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

1) **L'enzima è più affine per EI --→ aumenta la K-1 --→ aumenta la Km**

2) **L'enzima è più affine per ES--→ aumenta la K1--→ diminuisce la Km**

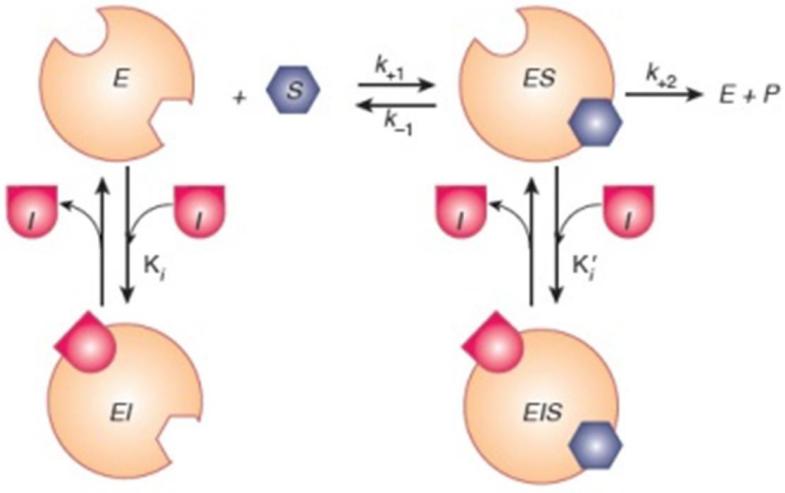


Vmax = 100 1/Vmax = 1/100 = 0,01

Vmax = 10 1/Vmax = 1/10 = 0,1

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.

L. Pollegioni
Fondamenti di Biochimica
EdiSES Edizioni

L'inibitore ha la stessa affinità per E e ES

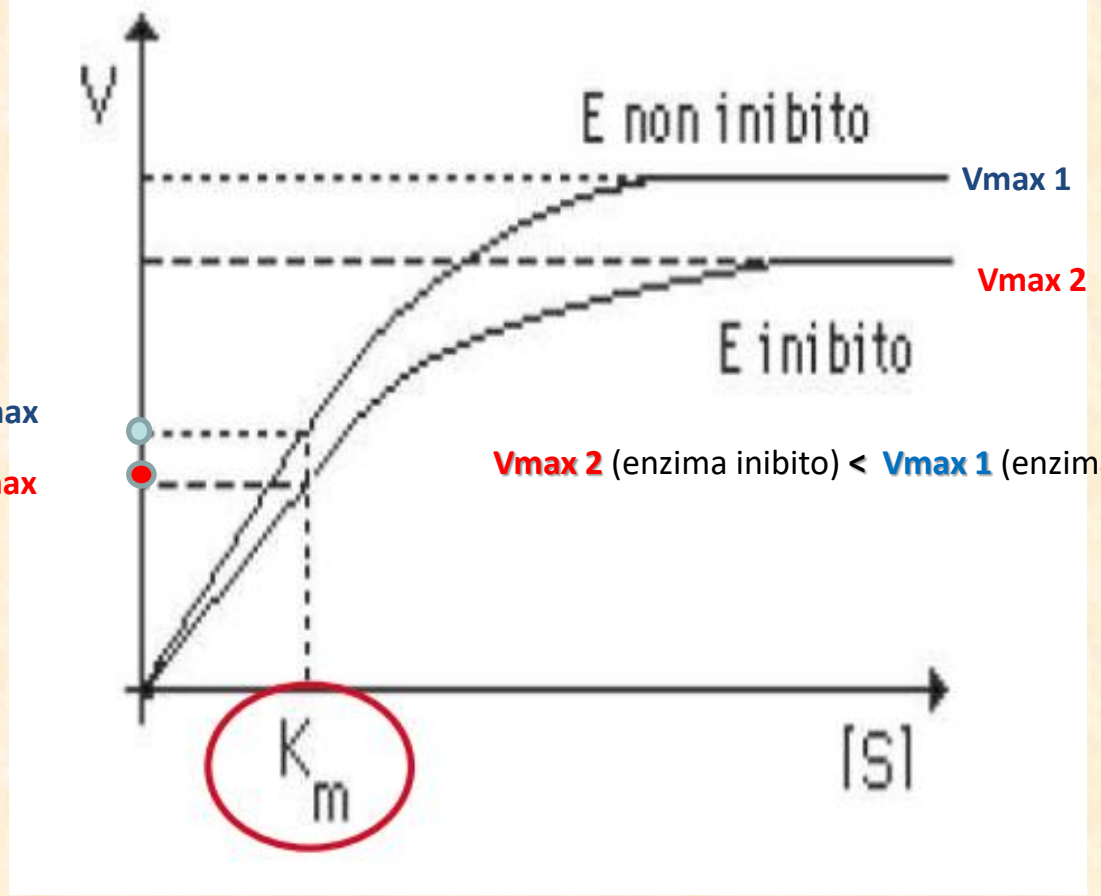
$$Km = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

La Km rimane invariata

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

Diminuisce la Vmax.

Inibizione non competitiva puro

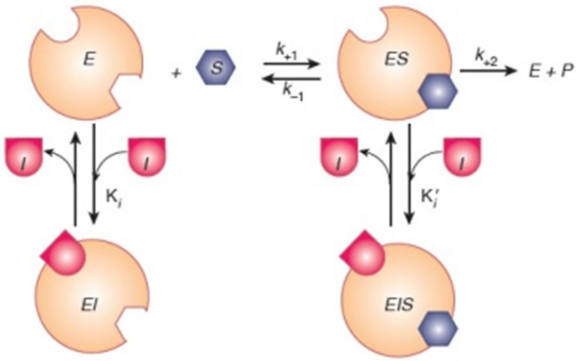


Vmax 2 (enzima inibito) **<** **Vmax 1** (enzima non inibito)

- Una parte dell'enzima resta inattivo

- L'inibizione non è influenzata dalla concentrazione del substrato S

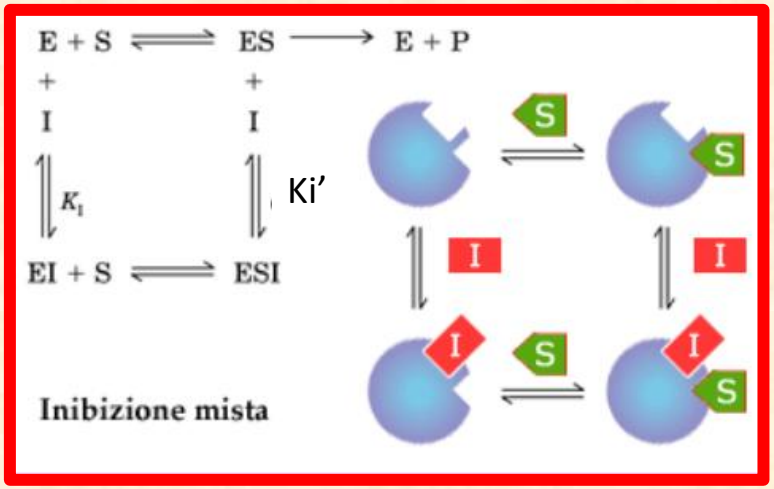
INIBITORE NON COMPETITIVO PURO



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

L. Pollegioni
Fondamenti di Biochimica
EdiSES Edizioni

INIBITORE NON COMPETITIVO MISTO



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

ALCUNI ENZIMI possono andare incontro a

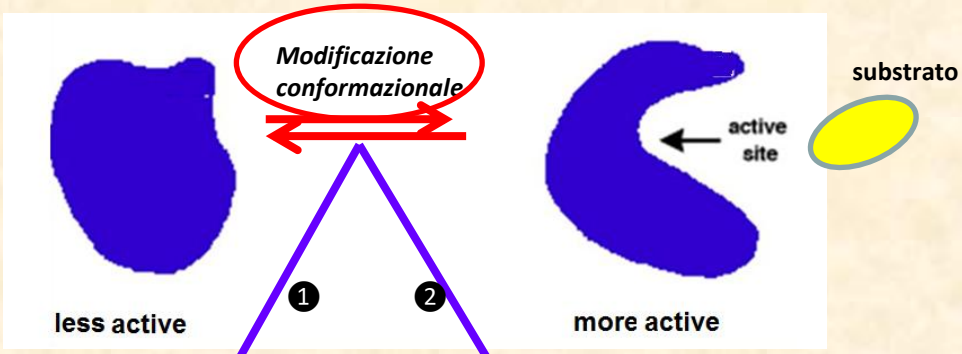
modificazioni conformazionali le quali

condizionano la attività catalitica stessa

Le modificazioni conformazionali possono modificare l'attività catalitica di un enzima

❶ Enzimi cataliticamente più attivi

❷ Enzimi cataliticamente meno attivi



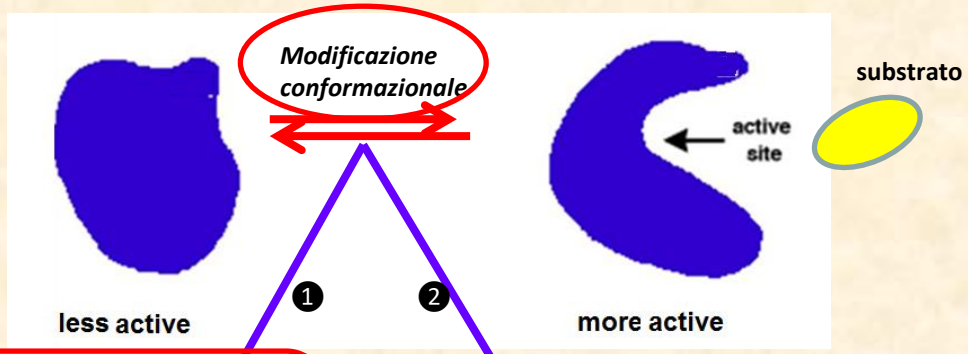
Modificazione chimica di alcuni residui amminoacidici in seguito a fosforilazione (legami fosfoestere)

Interazioni non covalenti dell'enzima con alcune molecole (effettori allosterici)

le modificazioni conformazionali possono modificare l'attività catalitica di un enzima

❶ Enzimi cataliticamente più attivi

❷ Enzimi cataliticamente meno attivi

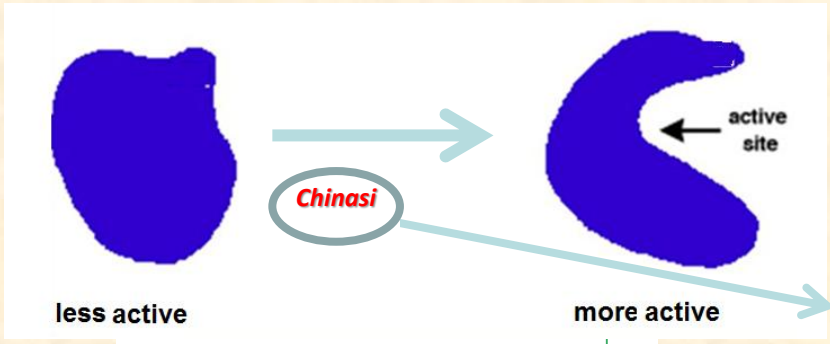


Modificazione chimica di alcuni residui amminoacidici in seguito a fosforilazione (legami fosfoestere)

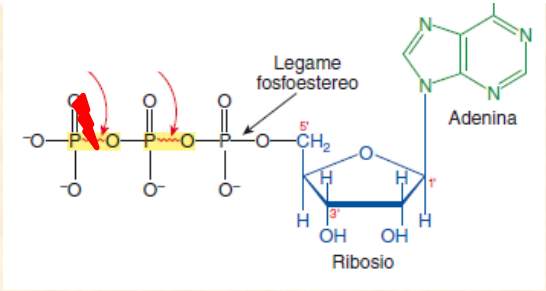
Interazioni non covalenti dell'enzima con alcune molecole (effettori allosterici)

La fosforilazione degli enzimi è catalizzata dagli enzimi *Chinasi*

La molecola «donatrice» di gruppi fosfato è l'Adenosin trifosfato (ATP)



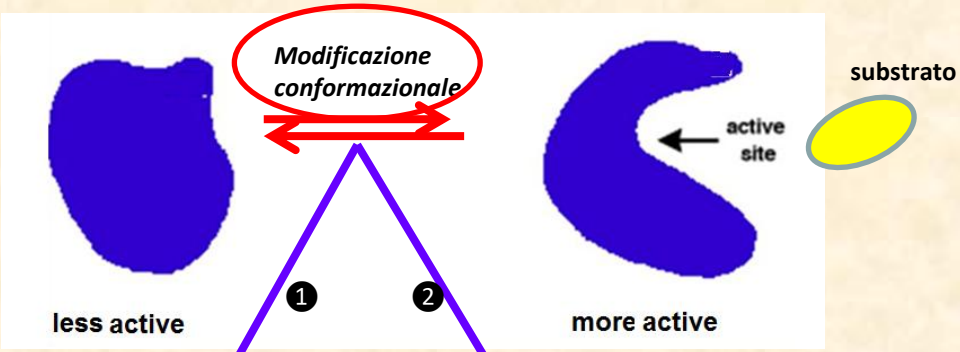
Classe 2 (Trasferasi)



le modificazioni conformazionali possono modificare l'attività catalitica di un enzima

❶ Enzimi cataliticamente più attivi

❷ Enzimi cataliticamente meno attivi



Modificazione chimica di alcuni residui amminoacidici in seguito a fosforilazione (legami fosfoestere)

Interazioni non covalenti dell'enzima con alcune molecole (effettori allosterici)

Gli **effettori allosterici** non si legano al sito attivo dell'enzima



positivi

aumentano l'attività dell'enzima

negativi

riducono l'attività dell'enzima

sono molecole endogene prodotte a livello fisiologico per modulare l'attività di enzimi che operano all'interno di vie metaboliche

Anche un inibitore spegne l'attività di un enzima

- ☑ Non è prodotto a livello fisiologico
- ☑ Molecola esogena (farmaco o altra sostanza chimica)


Gli effettori allosterici non si legano al sito attivo dell'enzima
positivi
negativi
aumentano l'attività dell'enzima
spengono l'attività dell'enzima
Anche un inibitore spegne l'attività di un enzima
☑ Non è prodotto a livello fisiologico
☑ Molecola esogena (farmaco o altra sostanza chimica)
Sono molecole endogene prodotte a livello fisiologico per modulare l'attività di enzimi che operano all'interno di vie metaboliche

ENZIMI REGOLATORI

- un enzima regolatore è quello che controlla le quantità di sostanze che devono essere trasformate in una via metabolica

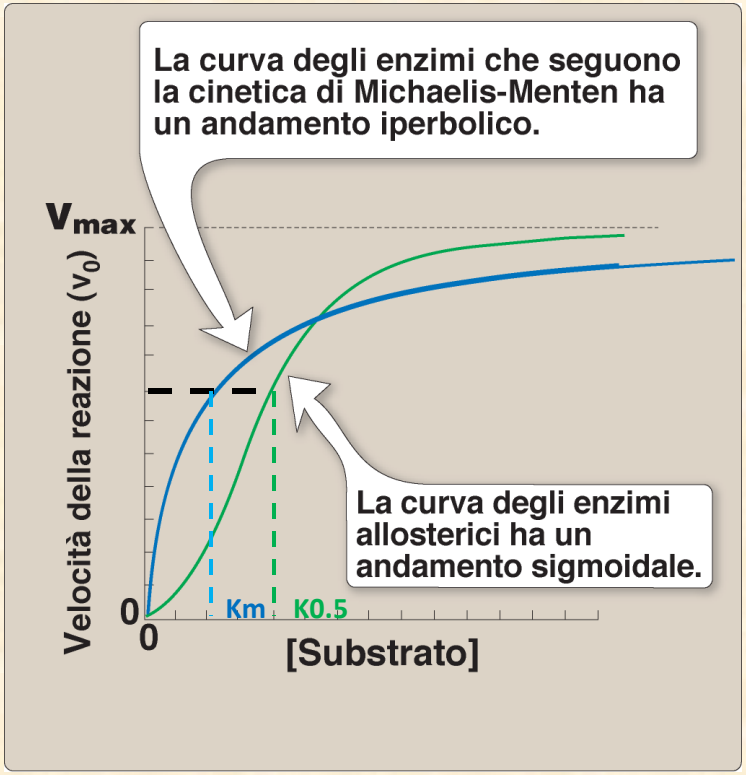
(catalizza la reazione più lenta in genere la prima di una serie)

- tali enzimi non seguono la cinetica di Michaelis – Menten e sono responsabili della modulazione della velocità con cui decorre l'intero processo metabolico

SONO ENZIMI REGOLATORI 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)



Champe et al., Le basi della biochimica, Ed. Zanichelli

Meccanismi di regolazione degli enzimi REGOLATORI

Modificazione non covalente o allosterica

MODULAZIONE COVALENTE REVERSIBILE

MODULAZIONE COVALENTE IRREVERSIBILE

Modulatori eteroallosterici

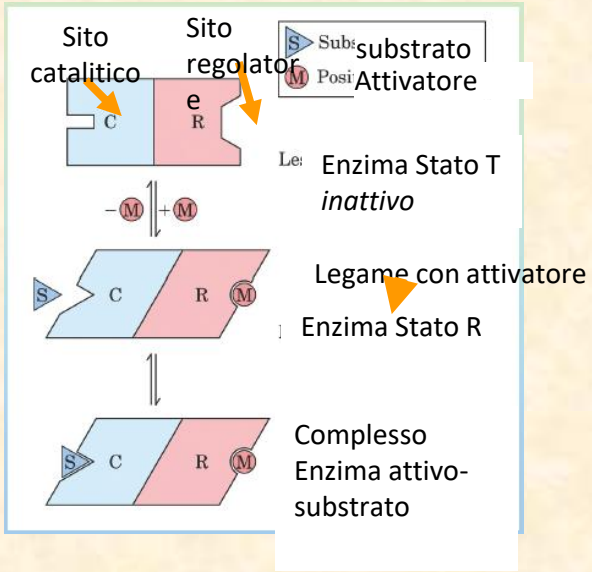
1) Modificazione non covalente o allosterica

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)
MODULARORI ALLOSTERICI NEGATIVI (INIBITORI)

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

Cambia la $K_{0,5}$ ma non la Vmax

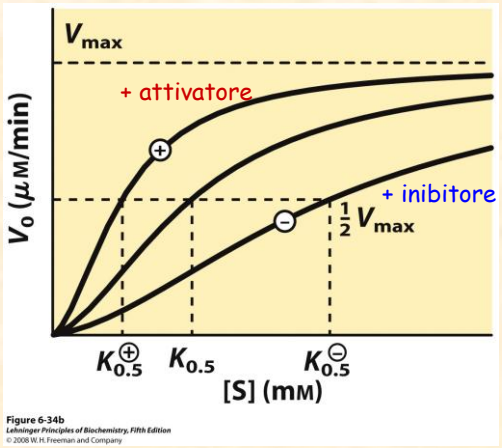


Figure 6-34b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Cambia la Vmax ma non la $K_{0,5}$

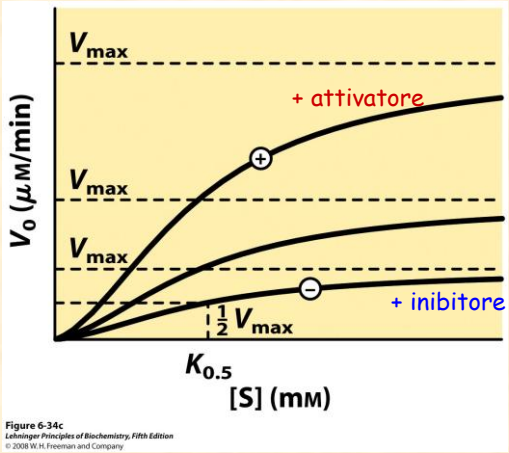


Figure 6-34c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

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)

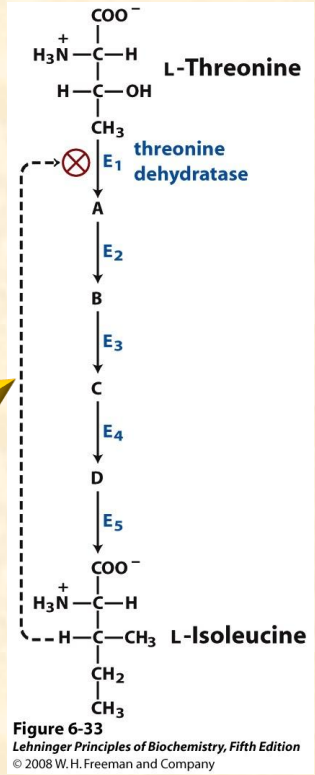
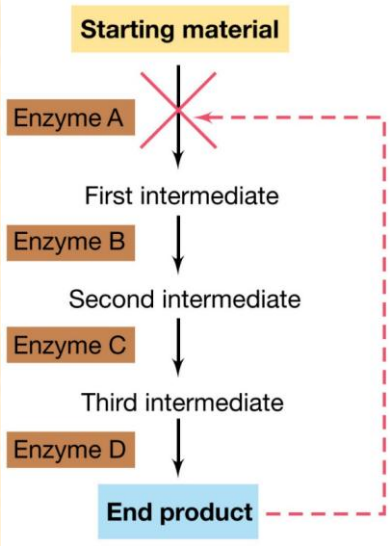


Figure 6-33
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

INIBIZIONE da feedback o da prodotto finale

si verifica solo quando **P** è in concentrazione elevata

→ viene impedita una sintesi eccessiva e inutile di **P**



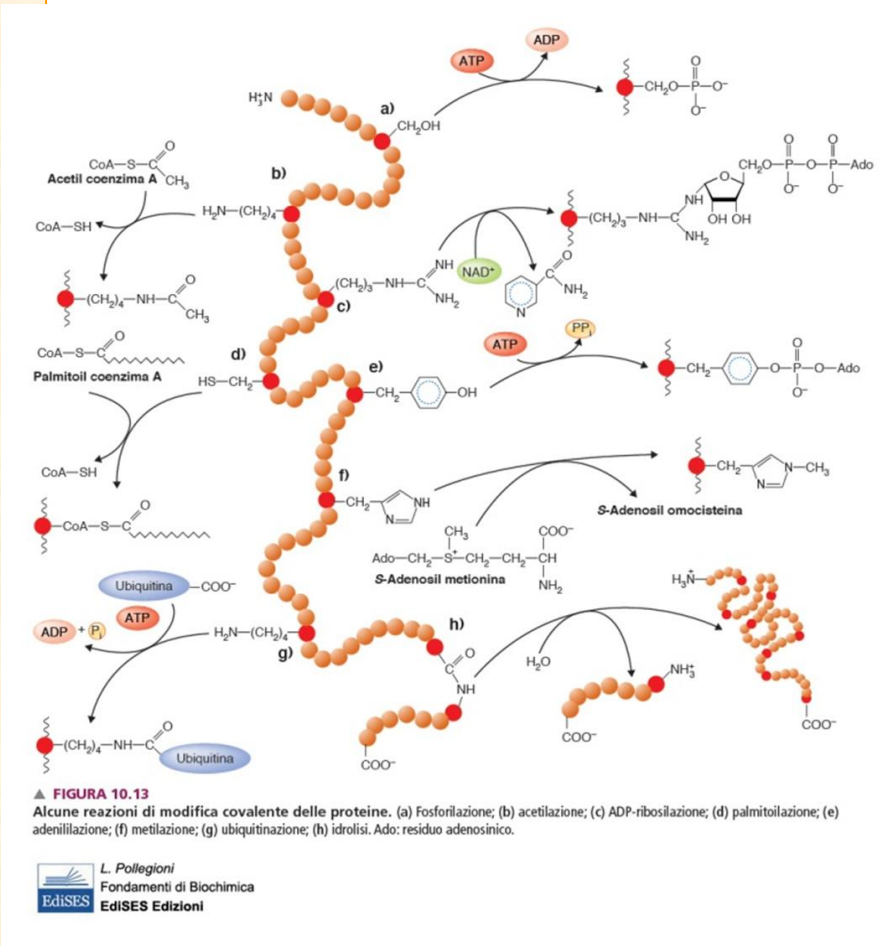
Meccanismi di regolazione degli enzimi REGOLATORI

Modificazione non covalente o allosterica

MODULAZIONE COVALENTE REVERSIBILE

MODULAZIONE COVALENTE IRREVERSIBILE

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.



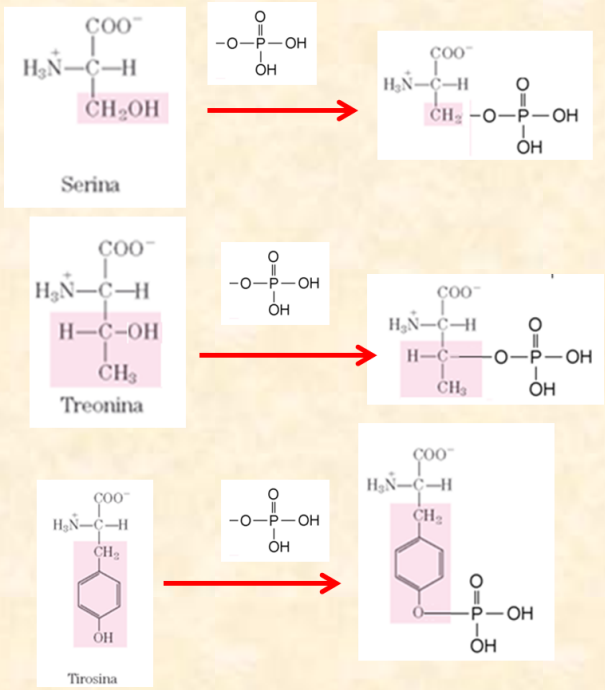
▲ **FIGURA 10.13**
Alcune reazioni di modifica covalente delle proteine. (a) Fosforilazione; (b) acetilazione; (c) ADP-ribosilazione; (d) palmitoilazione; (e) adenililazione; (f) metilazione; (g) ubiquitinazione; (h) idrolisi. Ado: residuo adenosinico.

L. Pollegioni
Fondamenti di Biochimica
EdiSES Edizioni

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

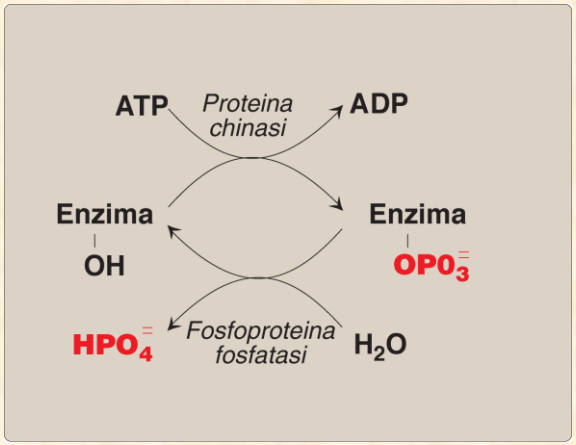
Altre……..

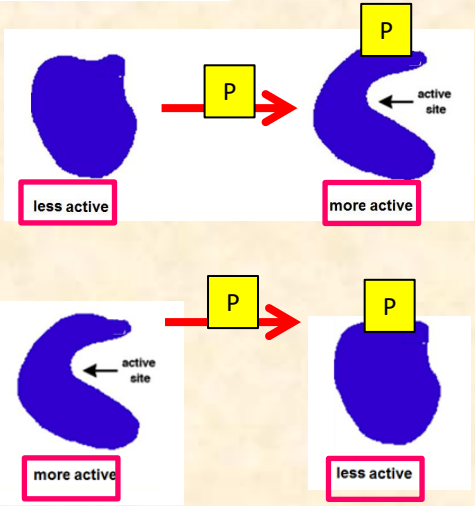
Ad opera di
- ► Chinasi
- ► Acetilasi
- ► Metilasi


Serina
Treonina
Tirosina

Modificazione chimica di alcuni amminoacidi : aggiunta di gruppi fosfato

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

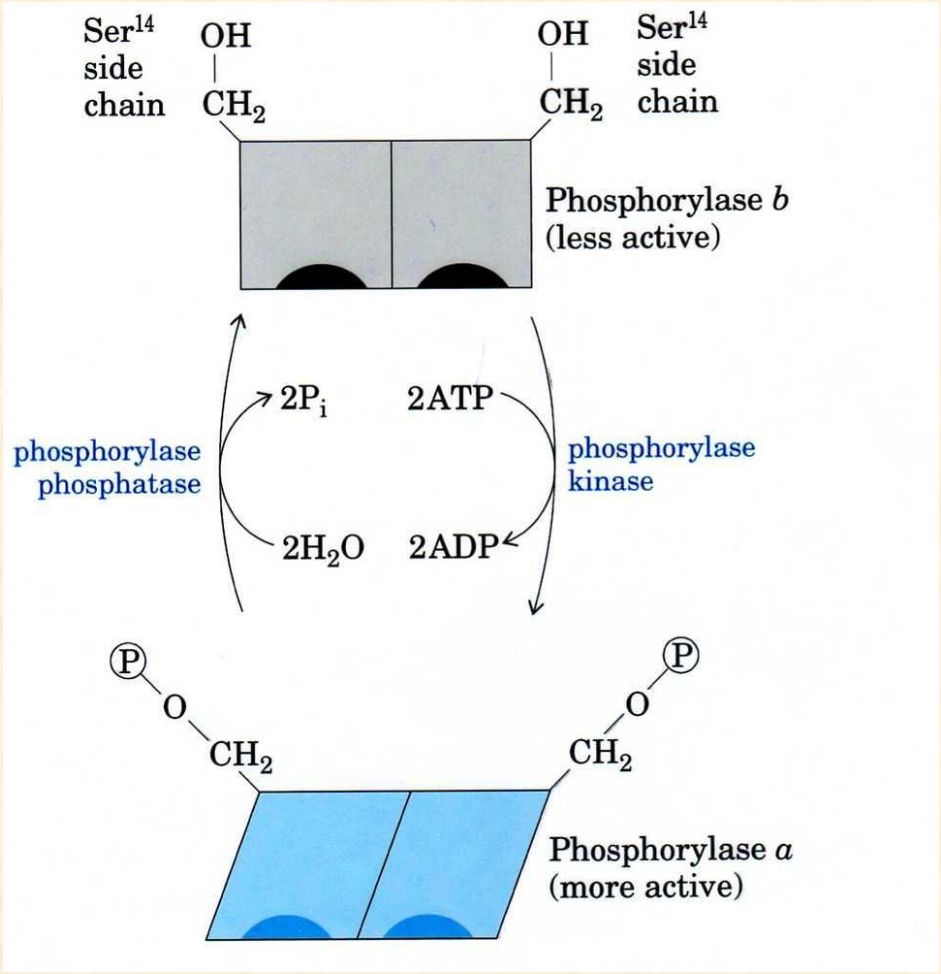




❷**FOSFORILAZIONE→ l'aggiunta di un *gruppo fosfato***

può *peggiorare* o migliorare l'attività di specifici enzimi

fosforilazione → è promossa dalle Chinasi


Ser14 side chain
OH
CH2
OH
CH2
Ser14 side chain
Phosphorylase b (less active)
2Pi
2ATP
phosphorylase phosphatase
phosphorylase kinase
2H2O
2ADP
P
O
CH2
P
O
CH2
Phosphorylase a (more active)

Meccanismi di regolazione degli enzimi REGOLATORI

Modificazione non covalente o allosterica

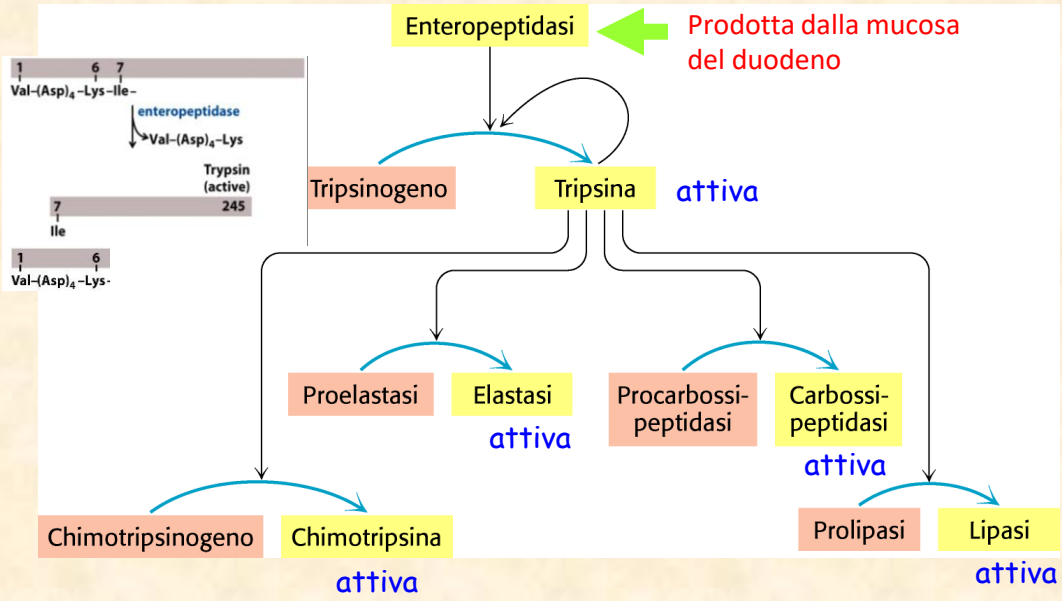
MODULAZIONE COVALENTE REVERSIBILE

MODULAZIONE COVALENTE IRREVERSIBILE

MODULAZIONE COVALENTE IRREVERSIBILE MEDIANTE TAGLIO PROTEOLITICO

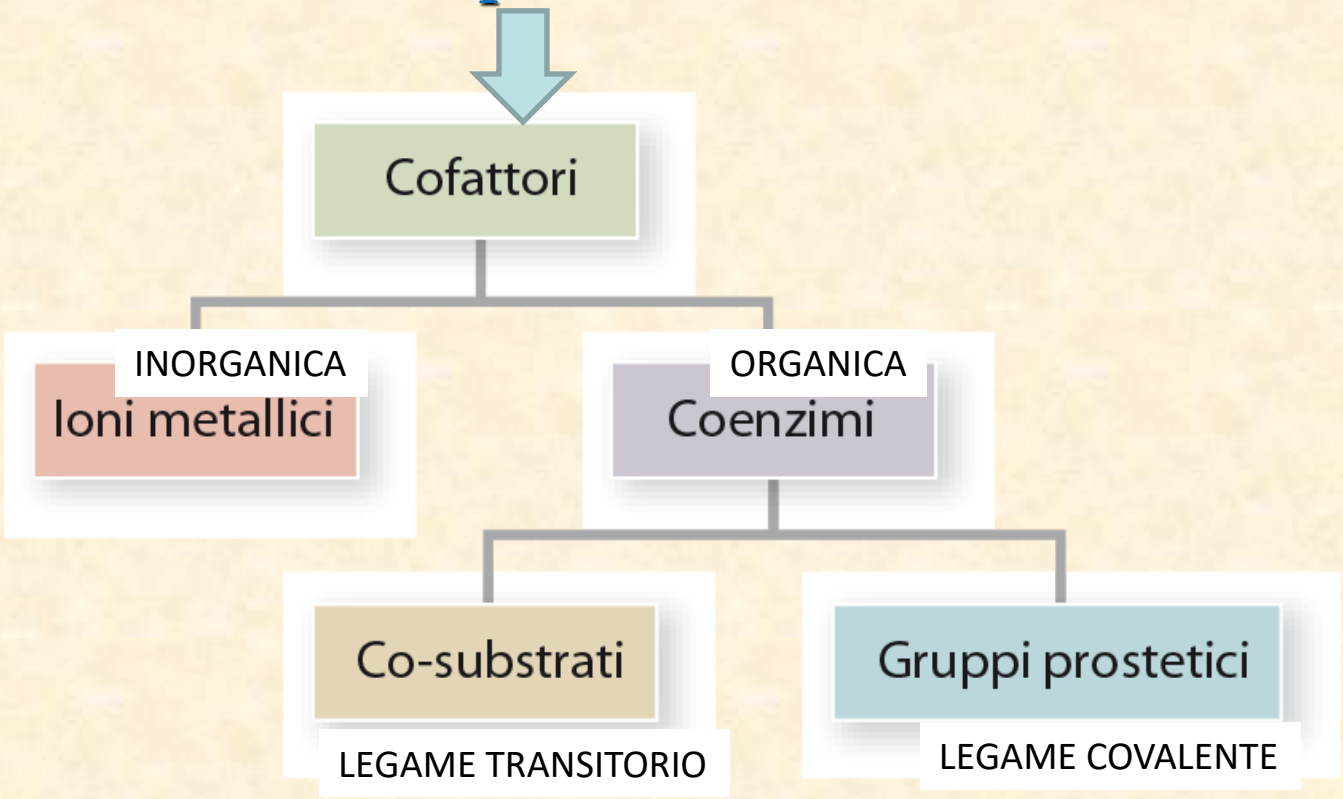
-ZIMOGENI (proteasi)/PROPROTEINE (es Procollagene)

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

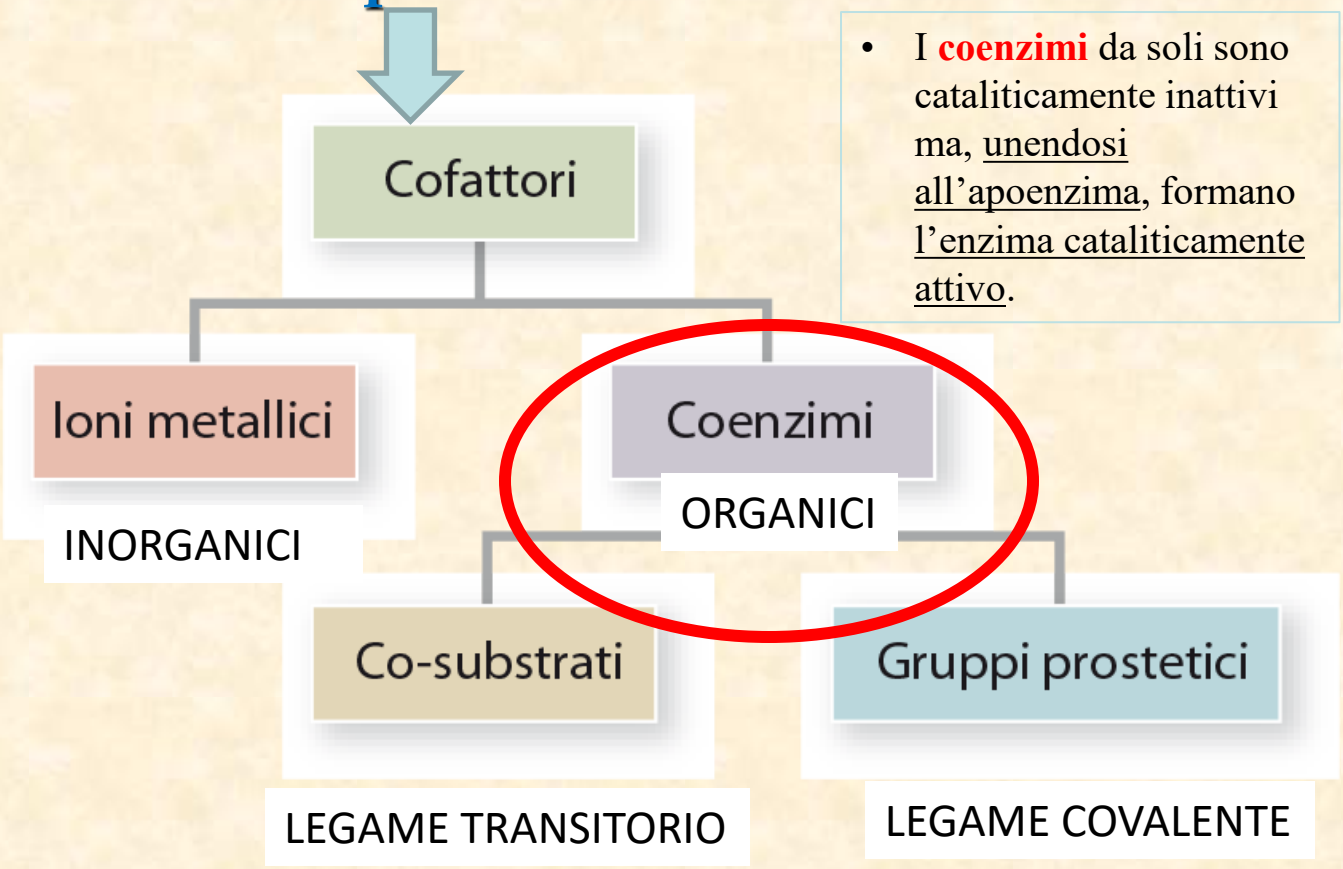
Parte non-proteica



Parte non-proteica

Parte proteica: apoenzima

- I **coenzimi** da soli sono cataliticamente inattivi ma, unendosi all'apoenzima, formano l'enzima cataliticamente attivo.



COENZIMI

La maggior parte dei coenzimi deriva dalle vitamine.

Per diventare coenzima, la vitamina subisce delle trasformazioni che vanno dalla semplice fosforilazione (uno dei casi più comuni) a trasformazioni più complesse.

La trasformazione della vitamina in coenzima avviene all'interno delle cellule ed è di natura enzimatica.

VITAMINE

Molecole organiche non sintetizzabili

idrosolubili

Vitamina C

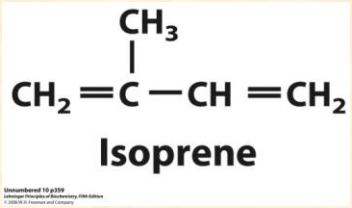
Vit. Complesso B
Tiamina (B1)
Riboflavina (B2)
Niacina (B3)
Biotina (B7)
Ac. Pantotenico (B5)
Ac. Folico
Piridossina (B6)
Cobalamina (B12)

Ac. Lipoico

liposolubili

Vitamina A (retinolo, β-carotene)
Vitamina D (colecalciferolo)
Vitamina K (fillochinone)
Vitamina E (tocoferolo)
Coenzima Q (Ubichinone)

Altamente idrofobiche, contengono anelli e lunghe catene alifatiche (costituite dal ripetersi di unità isoprenoidi).
Sono assunte con la dieta
Sono modificate e attivate nell'organismo



Isoprene

Vitamin	Coenzyme	Reactions Involving These Coenzymes
Thiamine (vitamin B_1)	Thiamine pyrophosphate	Activation and transfer of aldehydes
Riboflavin (vitamin B_2)	Flavin mononucleotide; flavin adenine dinucleotide	Oxidation–reduction
Niacin (B3)	Nicotinamide adenine dinucleotide; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Oxidation–reduction
Pantothenic acid (B5)	Coenzyme A	Acyl group activation and transfer
Pyridoxine (B6)	Pyridoxal phosphate	Various reactions involving amino acid activation
Biotin (B7)	Biotin	CO_2 activation and transfer
Lipoic acid	Lipoamide	Acyl group activation; oxidation–reduction
Folic acid (B9)	Tetrahydrofolate	Activation and transfer of single-carbon functional groups
Vitamin B_{12} Cobalamina	Adenosyl cobalamin; methyl cobalamin	Isomerizations and methyl group transfers

MOLTI COENZIMI SONO DERIVATI DALLE VITAMINE

Coenzyme	*Reaction catalyzed*	*Vitamin source*
Thiamine pyrophosphate	Aldehyde transfers-decarboxilation	Thiamine (Vitamin B_1)
Flavin adenine dinucleotide	Oxidation-reduction reactions (electron transfers)	Riboflavin (Vitamin B_2)
Nicotinamide adenine dinucleotide	Oxidation-reduction reactions (hydride transfers)	Nicotinamide (niacin) (B3)
Coenzyme A	Acyl transfers	Pantothenic acid (B5)
Pyridoxal phosphate	Amino group transfers	Pyridoxine (Vitamin B_6)
Coenzyme B_{12}	Alkylation reactions	Cobalamin (Vitamin B_{12})
Biocytin	Carboxylation reactions	Biotin (B7)
Tetrahydrofolic acid	One-carbon transfers	Folic acid
Lipoic acid	Acyl transfers	—

NAD, FAD, UBICHINONE

COENZIMI che coadiuvano l'azione di enzimi che catalizzano reazioni di ossidoriduzione (ossidoriduttasi, deidrogenasi)

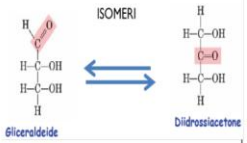
FAD

B_2 *(riboflavina)*

B_3 *(niacina)*

NAD

enzimi che calatizzano le reazioni di ossido-riduzione di molte vie metaboliche

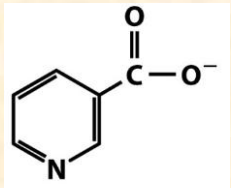
Classificazione	Tipo di reazione catalizzata
1. Ossidoreduttasi	Reazioni di ossidoriduzione (*ossidasi reduttasi*)
2. Trasferasi	trasferimento di gruppi funzionali
3. Idrolasi	idrolisi (utilizzano acqua per rompere i legami)
4. Liasi	lisi del substrato con formazione di doppi legami
5. Isomerasi	isomerizzazione 
6. Ligasi	formazione di legami accoppiata all'idrolisi di ATP (anche denominate "sintetasi")

Coenzimi nicotinammidici

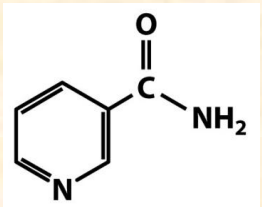
NAD^+ (NICOTINAMMIDE ADENINA DINUCLEOTIDE)

$NADP^+$ (NICOTINAMMIDE ADENINA DINUCLEOTIDE FOSFATO)

Derivano dall'acido nicotinico (niacina) o dalla nicotinammide (vitamina B_3)



Niacina
Ac. nicotinico



Nicotinamide
(vitamina B_3)

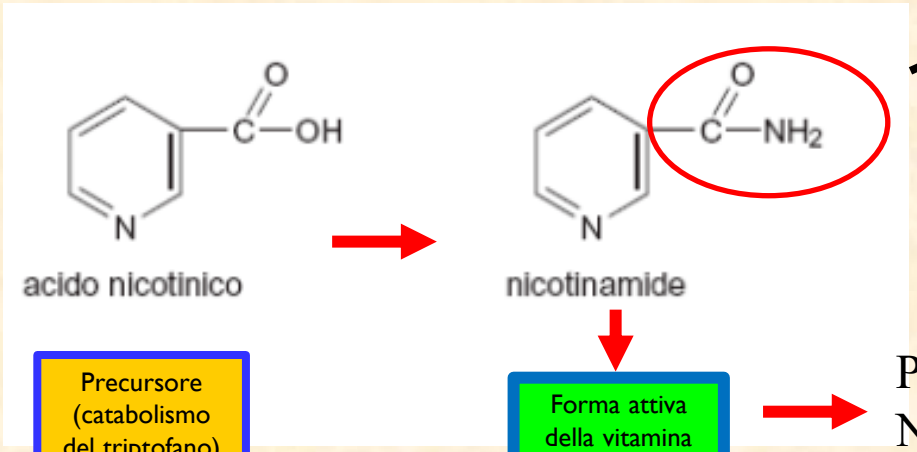


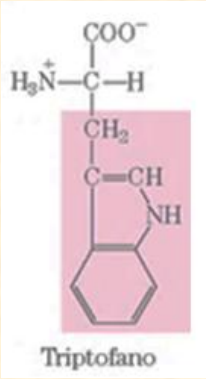
Sono coinvolti nelle reazioni di ossido-riduzione catalizzate dalle DEIDROGENASI

Trasferiscono **2 elettroni e 1 protone** al substrato sotto forma di ione idruro (**$:H^-$**)

Sono associati al sito attivo dell'enzima attraverso interazioni elettrostatiche (co-substrato)

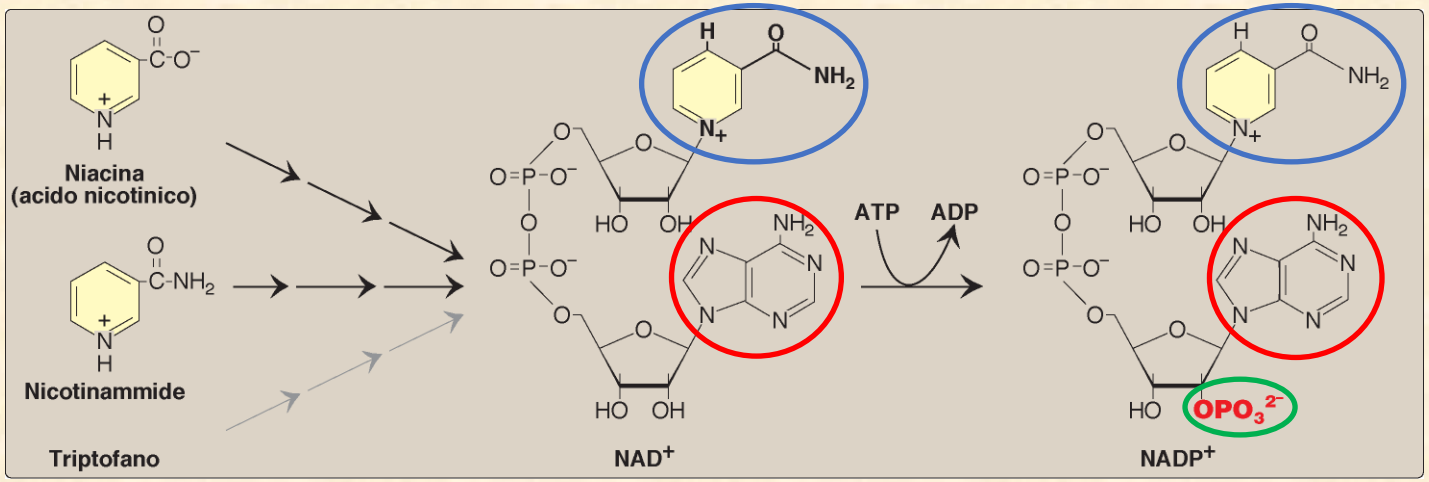
NIACINA o acido nicotinico o Vitamina B3 (o PP, Pellagra Preventing)





Struttura e biosintesi del NAD^+ e del $NADP^+$.





NAD+ (NICOTINAMMIDE ADENINA DINUCLEOTIDE)

NADP+ (NICOTINAMMIDE ADENINA DINUCLEOTIDE FOSFATO)

Champe et al., Le basi della biochimica, Ed. Zanichelli

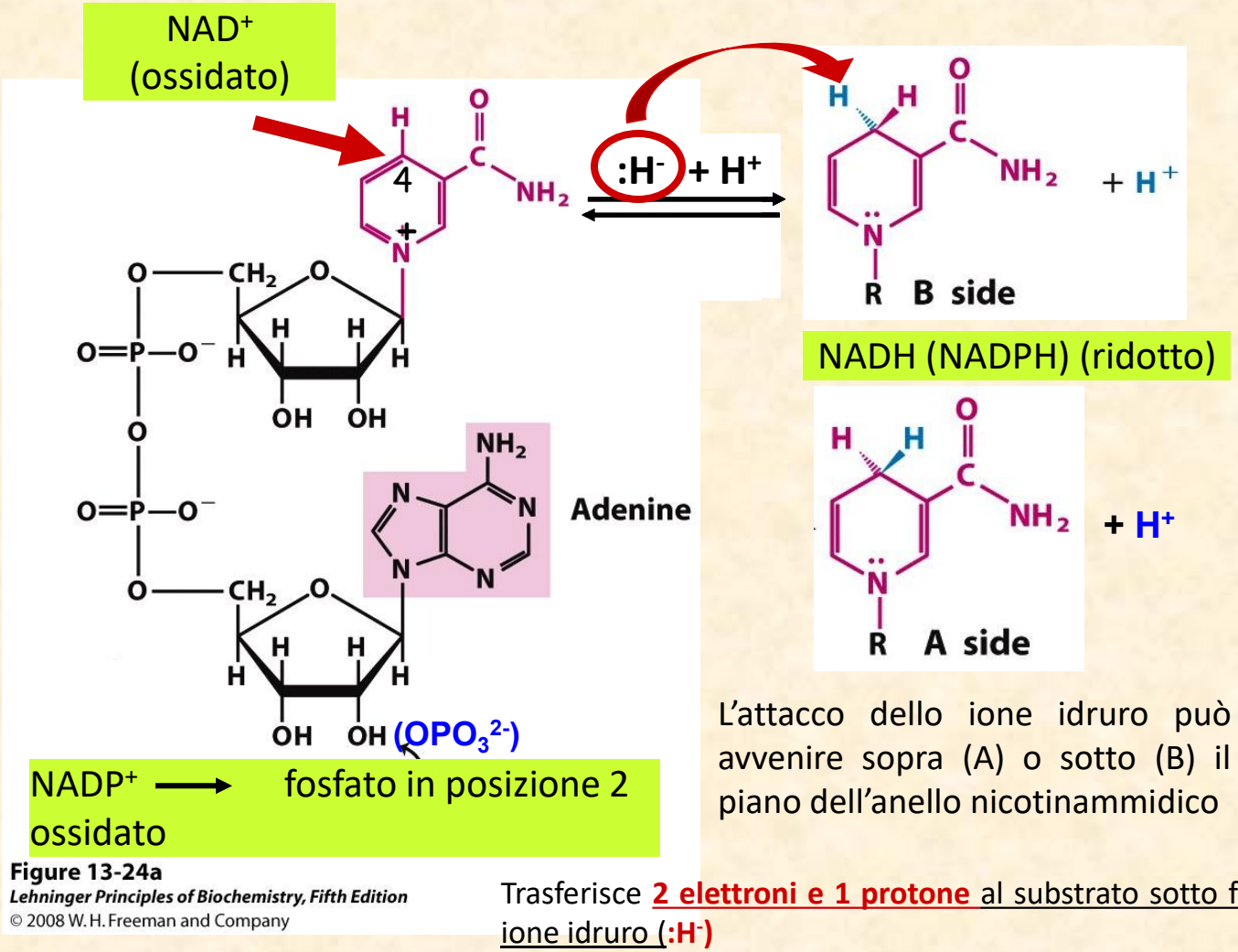
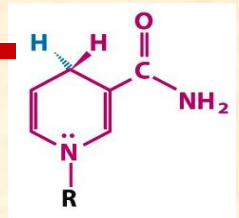


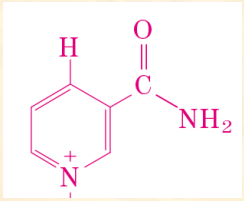
Figure 13-24a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

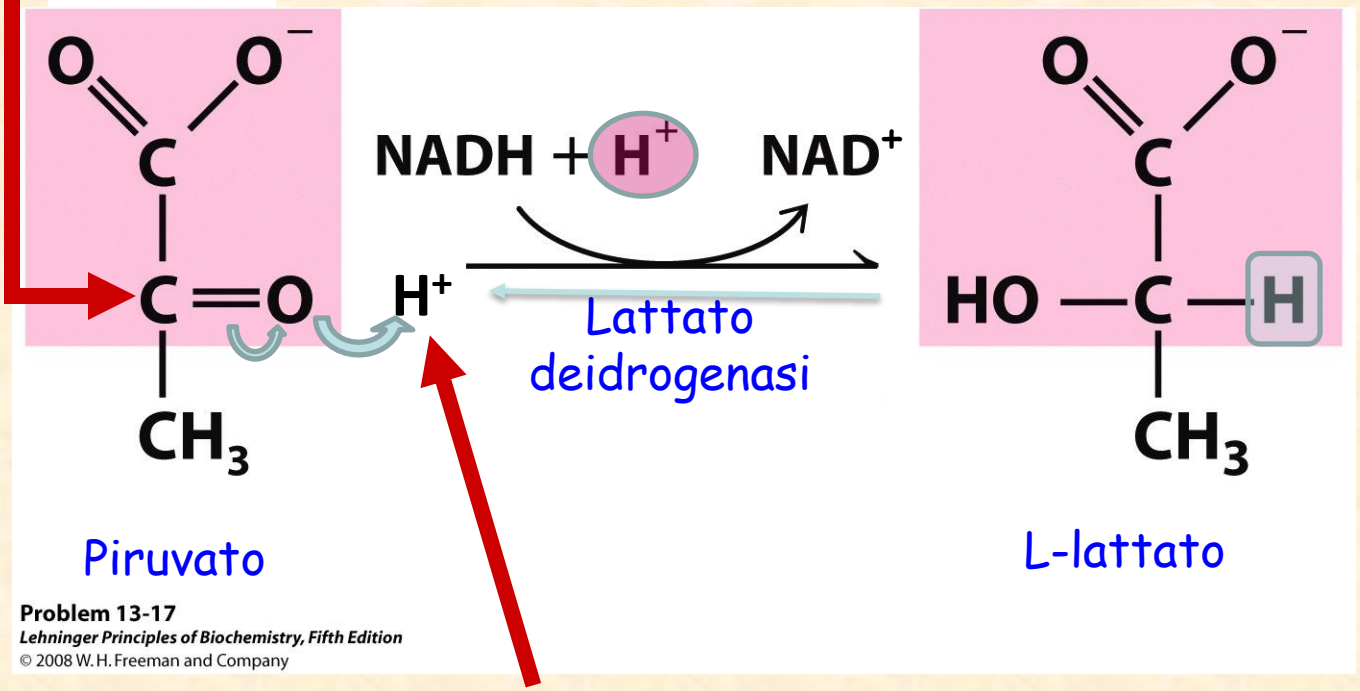
L'attacco dello ione idruro può avvenire sopra (A) o sotto (B) il piano dell'anello nicotinammidico

Trasferisce **2 elettroni e 1 protone** al substrato sotto forma di ione idruro (**$:H^-$**)

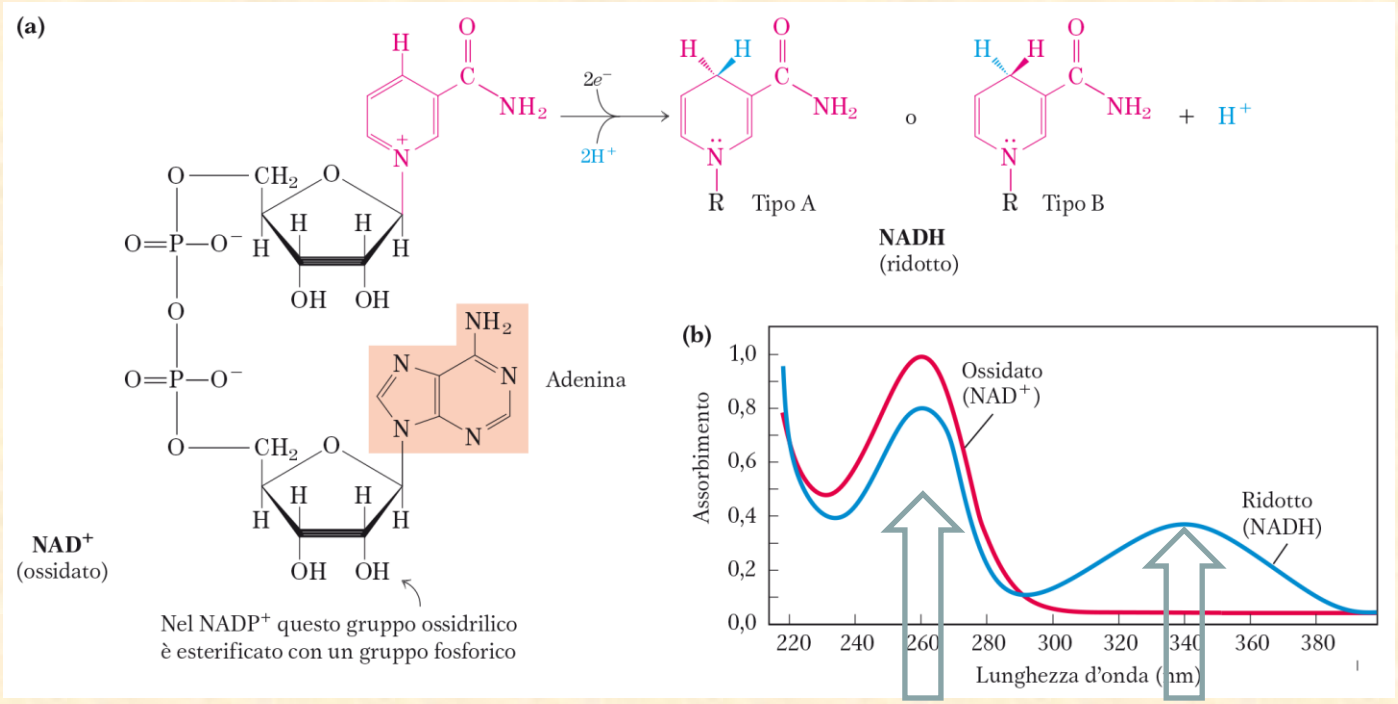


Uno ione idruro **:H⁻** è trasferito dal C-4 del NADH al C-2 del piruvato





Uno ione H^+ è trasferito da un residuo di His del sito attivo dell'enzima sull'ossigeno carbonilico che diventa un ossidrile

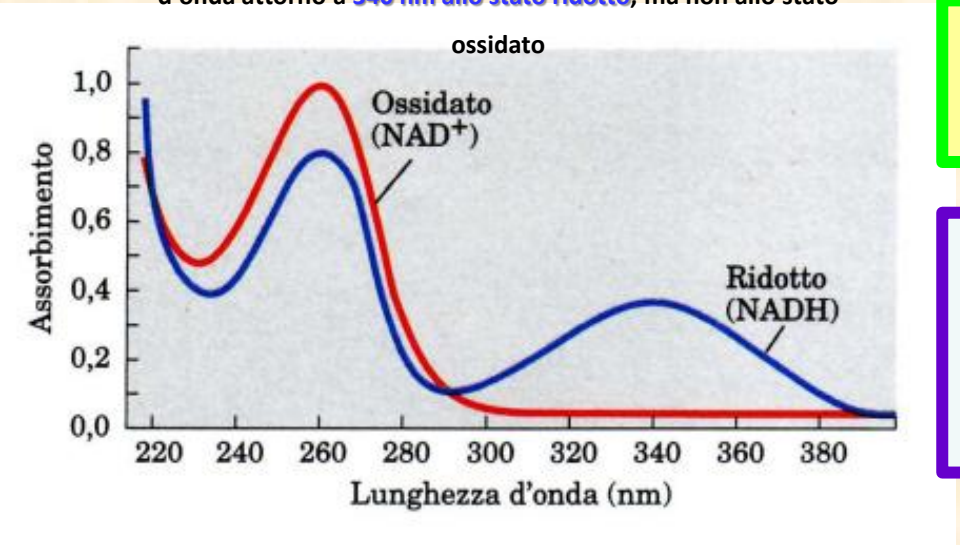


Assorbimento della base azotata

Assorbimento dell'anello nicotinammidico ridotto

Gli enzimi contenenti $NAD^+/NADH + H^+$ possono essere monitorati mediante l'utilizzo di tecniche spettrofotometriche

Una proprietà di notevole importanza per quanto riguarda i coenzimi piridinici è la loro capacità di assorbire le lunghezze d'onda attorno a 340 nm allo stato ridotto, ma non allo stato ossidato



☞picco a 270 nm è caratteristico della porzione adenosinica e non si modifica con lo stato riduttivo

☞Il picco a 340 nm è caratteristico esclusivo dello stato ridotto. È determinato dal differente assetto elettronico dell'anello piridinico della nicotinammide

$NADH + H^+ \rightleftharpoons NAD^+$ $NADPH + H^+$ $NADP^+$

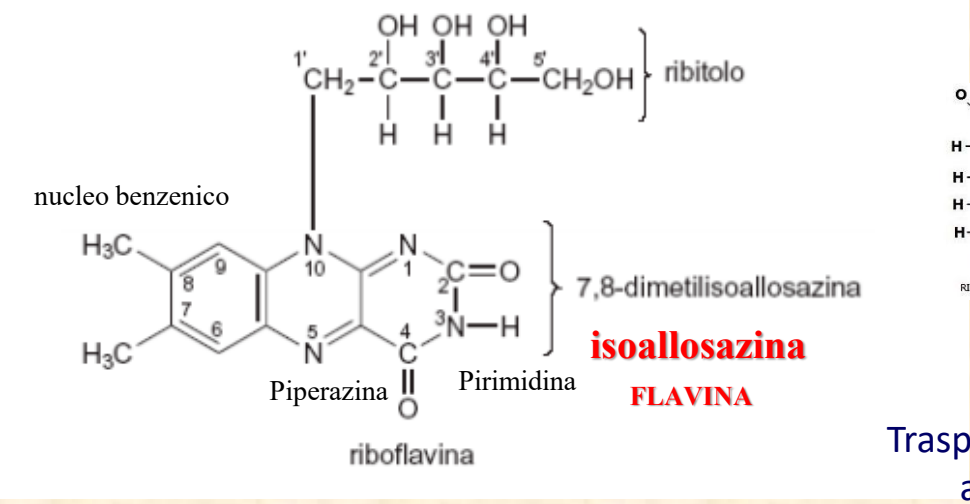


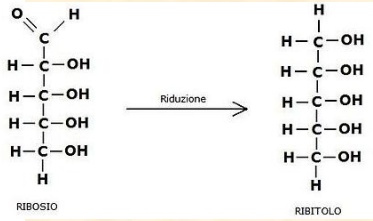
Malattia delle 3 D

Alcuni enzimi NAD(P^+) dipendenti

Enzima	Coenzima	Reazione catalizzata (via metabolica)
Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi	NAD^+	Ossidazione della 3-gliceraldeide in 1,3-bisfoglicerato (**glicolisi**).
Lattato deidrogenasi	NADH	Riduzione del piruvato a lattato (**fermentazione lattica**).
Alcol deidrogenasi	NADH	Riduzione dell'acetaldeide ad etanolo (**fermentazione alcolica**).
Isocitrato deidrogenasi	$NAD(P)^+$	Ossidazione dell'isocitrato ad α-chetoglutarato (**ciclo di Krebs**).
α-Chetoglurato deidrogenasi	NAD^+	Ossidazione dell'α-chetoglutarato a succinil-CoA (**ciclo di Krebs**).
Malato deidrogenasi	NAD^+	Ossidazione del malato ad ossalacetato (**ciclo di Krebs**).
Glutammato deidrogenasi	$NAD(P)^+$	Deamminazione ossidativa del glutammato ad α-chetoglutarato.
β-Chetoacil-ACP reduttasi	NADPH	Riduzione dell'acetoacetil-ACP in D-β–idrossibutirril-ACP (**biosintesi degli acidi grassi**).
Enoil-ACP reduttasi	NADPH	Riduzione del trans-Δ^2-butenil-ACP a butirril-ACP (**biosintesi degli acidi grassi**).

Vitamina B2 (riboflavina)





COENZIMI FLAVINICI →

Trasportata al fegato (legata all'albumina) viene successivamente trasformata in **flavin-mononucleotide (FMN)** e **flavin-adenin-dinucleotide (FAD)**, le due forme coenzimatiche

COENZIMI FLAVINICI

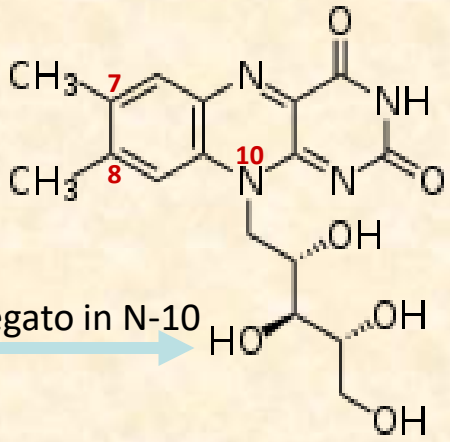
FAD (FLAVINA ADENINA DINUCLEOTIDE)
FMN (FLAVINA MONONUCLEOTIDE)

Derivano dalla riboflavina (vitamina B2)

7,8-dimetil-isoallossazina

Ribitolo legato in N-10

Vitamina B2

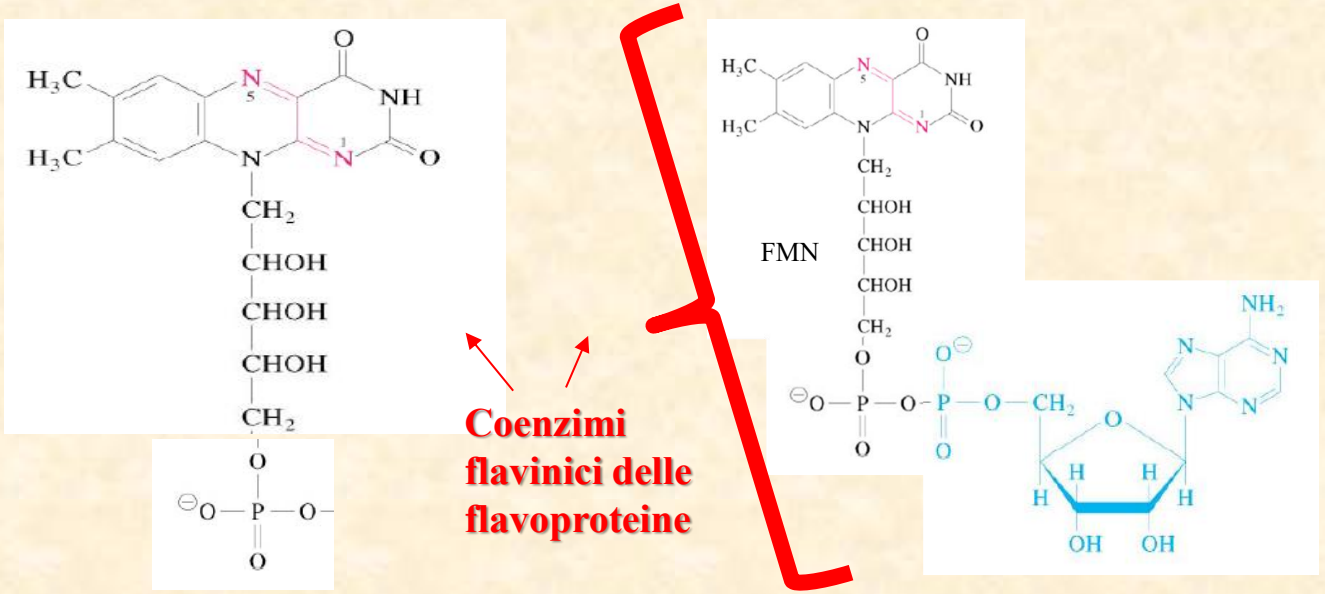


Sono saldamente associati (in qualche caso anche covalentemente) al sito attivo di DEIDROGENASI chiamate *flavoproteine*.

Partecipano a reazioni di ossidoriduzione in cui possono accettare o rilasciare 2 elettroni e 2 protoni (due atomi di idrogeno)

La riboflavina fa parte del coenzima di alcune ossido-reduttasi, nelle forme di:

flavina-mononucleotide (FMN) **flavina-adenina-dinucleotide (FAD)**



Riboflavina + fosfato

AMP

Forma completamente ossidata

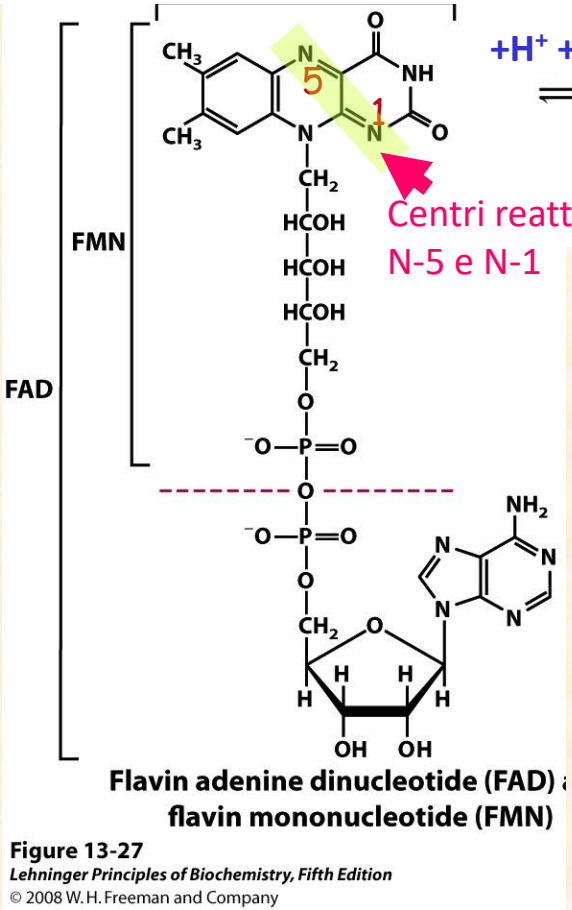
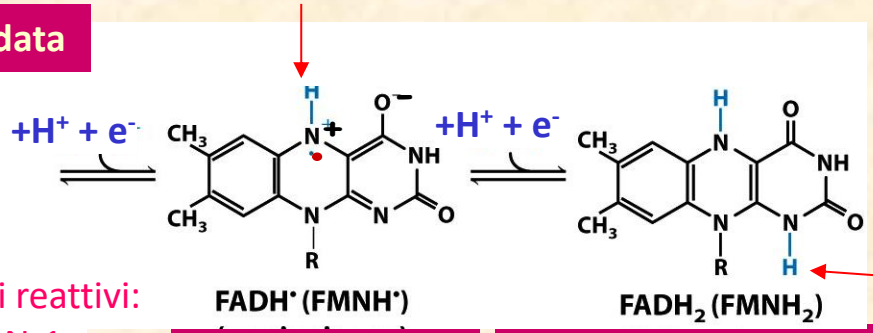


Figure 13-27
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



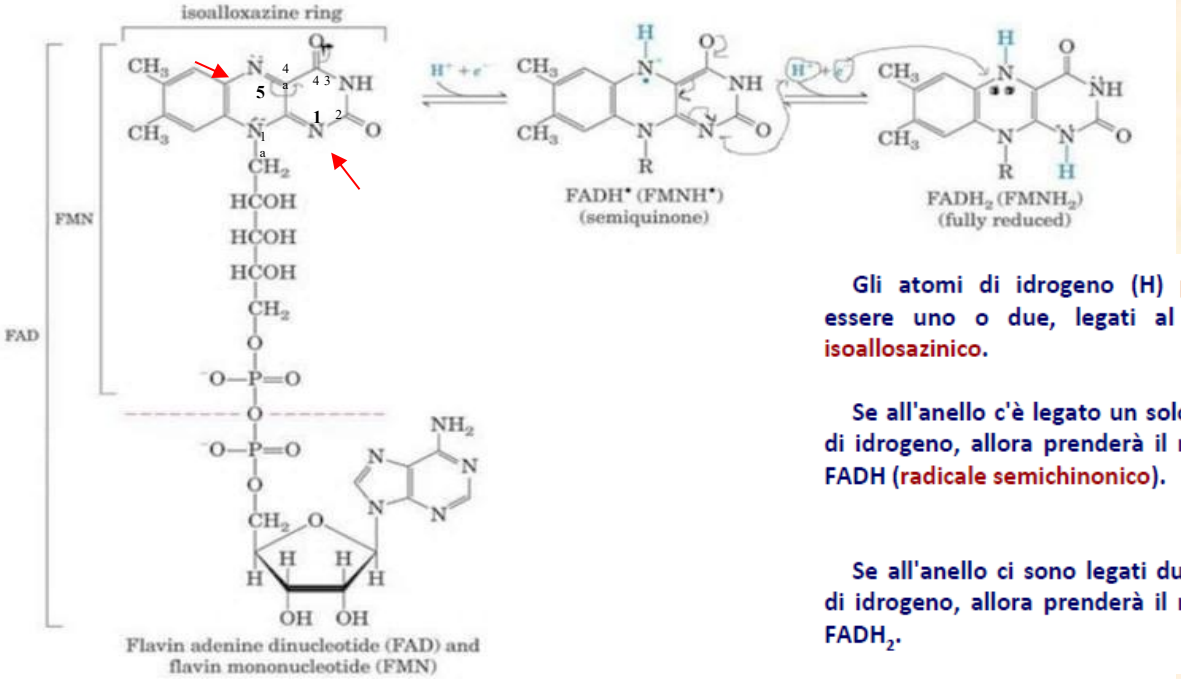
Centri reattivi:
N-5 e N-1

Semichinone

Forma completamente ridotta

Accetta 1 atomo di idrogeno alla volta oppure 2 insieme

Sono coenzimi delle ossidoreduttasi: possono acquistare e cedere elettroni e protoni



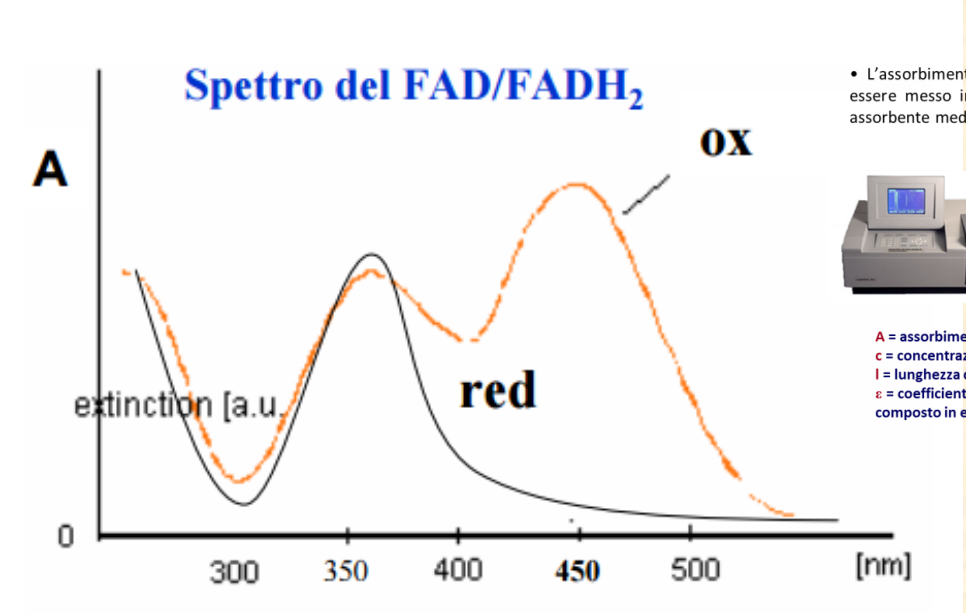
Struttura del FAD e del FMN.

Gli atomi di idrogeno (H) possono essere uno o due, legati al gruppo isoallosazinico.

Se all'anello c'è legato un solo atomo di idrogeno, allora prenderà il nome di FADH (radicale semichinonico).

Se all'anello ci sono legati due atomi di idrogeno, allora prenderà il nome di $FADH_2$.

Gli enzimi contenenti FAD/FADH possono essere monitorati mediante l'utilizzo di tecniche spettrofotometriche



- L'assorbimento di luce alla lunghezza d'onda a 280 nm può essere messo in relazione con la concentrazione della sostanza assorbente mediante la LEGGE DI LAMBERT E BEER

$$A = \varepsilon c l$$

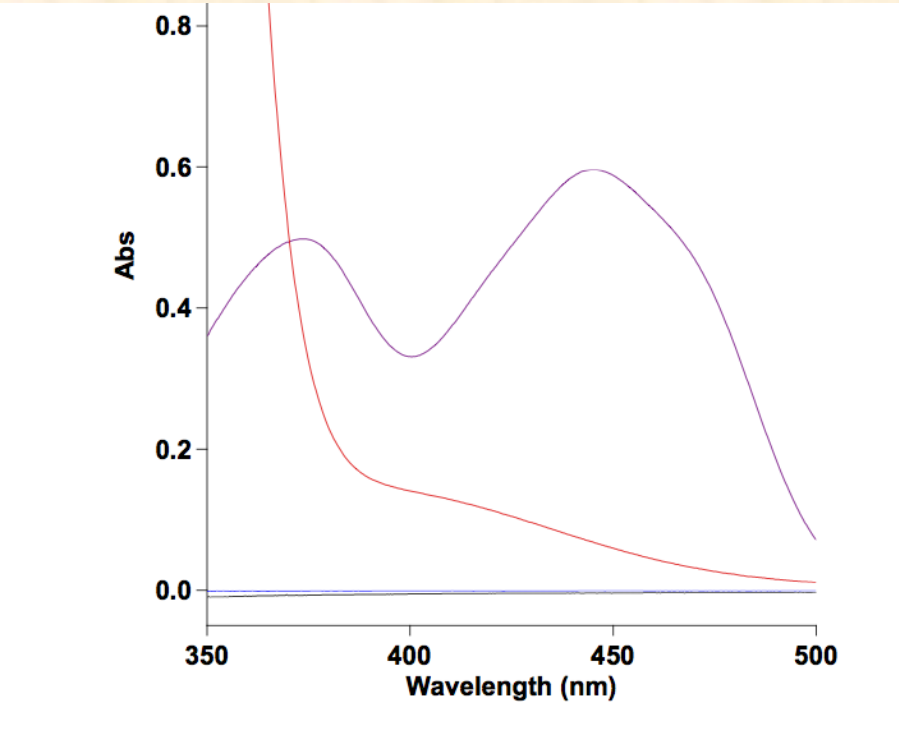
A = assorbimento ad una determinata lunghezza d'onda;
c = concentrazione della sostanza espressa in moli per litro di soluzione;
l = lunghezza del cammino ottico espressa in cm;
ε = coefficiente di estinzione molare (assorbimento di una soluzione 1M del composto in esame, quando questa e attraversata per 1cm dalla luce incidente).

$$FAD + H_2 \rightleftharpoons FADH_2$$

370 nm e 440 nm

$FAD + H_2 \rightleftharpoons FADH_2$ $FMN + H_2 \rightleftharpoons FMNH_2$

370 nm e 440 nm



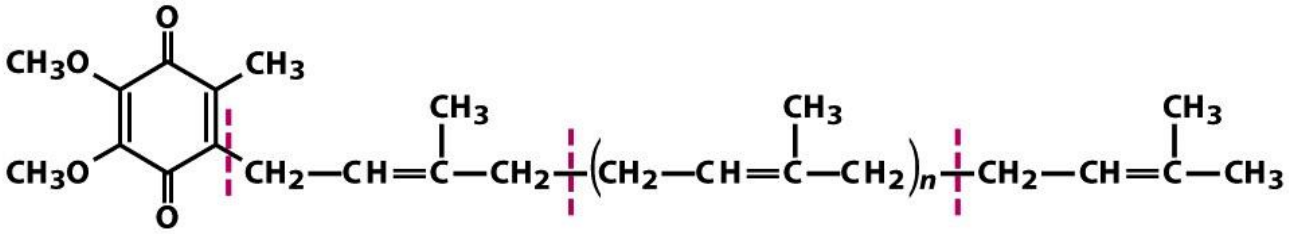
Vitamina B2 o riboflavina

Fonte alimentare: Carne, Frutta secca e legumi

Carenza di vitamina B2:

- Infiammazione degli angoli della bocca (stomatite angolare)
- Infiammazione della lingua (glossite)

UBICHINONE (COENZIMA Q): benzochinone (polare) liposolubile con 4 sostituenti uno dei quali è una lunga catena isoprenoide (10 unità nei mammiferi).



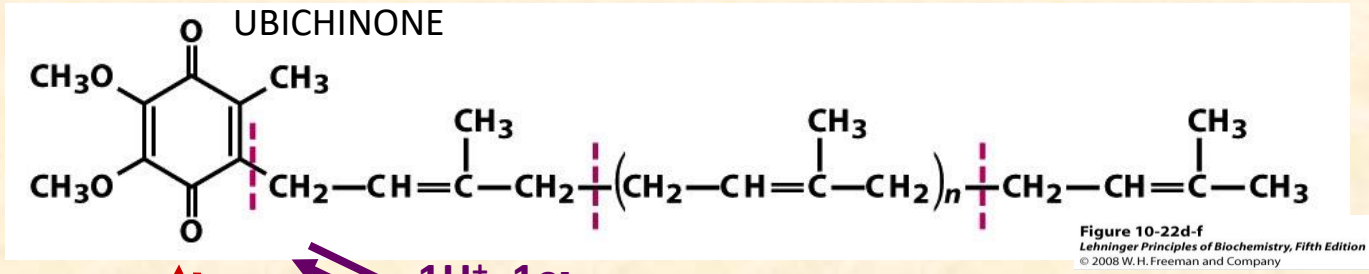
UBICHINONE
(completamente ossidato)

Figure 10-22d-f
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Ha 3 stati di ossidazione (Ubichinone, semichinone e ubichinolo
Ubichinolo (forma completamente ridotta) QH_2

-Molecola molto piccola
-Può solubilizzarsi nel doppio strato lipidico delle membrane.
-Può diffondere nella membrana mitocondriale interna.
-Trasporta sia elettroni che protoni (Importante ruolo nella catena di trasporto mitocondriale)-

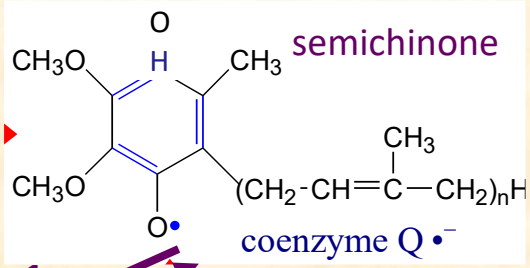
(completamente ossidato) Accetta 2 elettroni e due protoni



$1H^+, 1e^-$

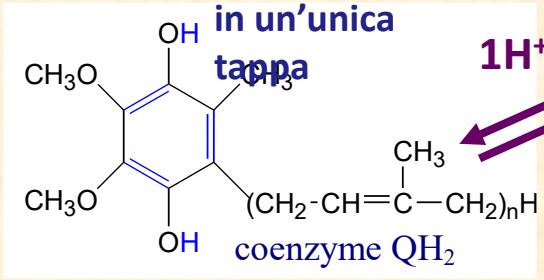
$2H^+, 2e^-$

Ossido-riduzione in 2 tappe oppure in un'unica tappa



Radicale semichinonico

$1H^+, 1e^-$

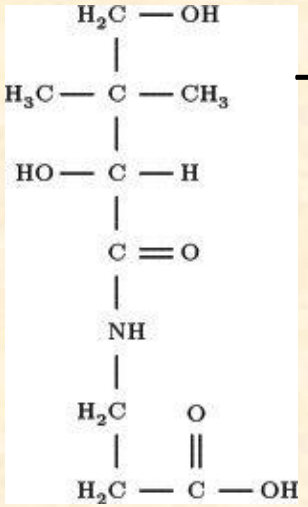


UBICHINOLO
(completamente ridotto)

COENZIMA A (CoA)

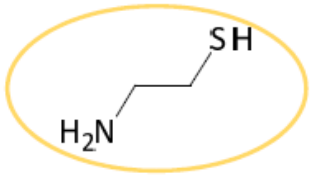
Trasportatore di gruppi acilici

Deriva dalla vitamina B5 (ac. pantotenico)



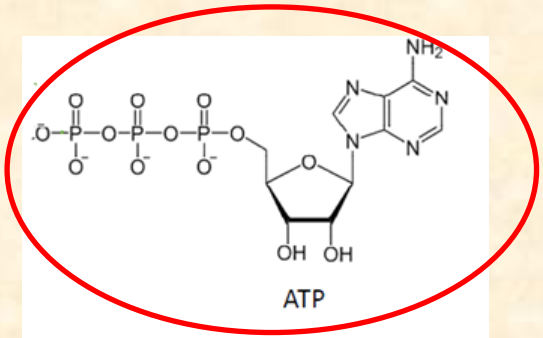
acido pantotenico
(vitamina B_5)

+



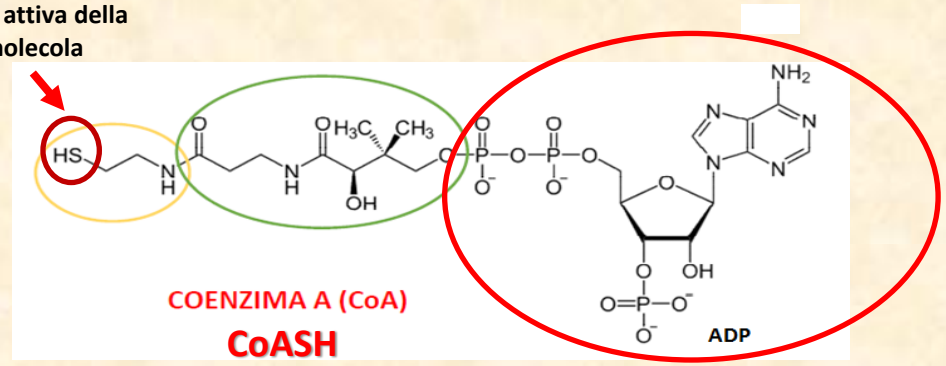
mercaptoetilammina

+



ATP

Parte attiva della molecola



COENZIMA A (CoA)

CoASH

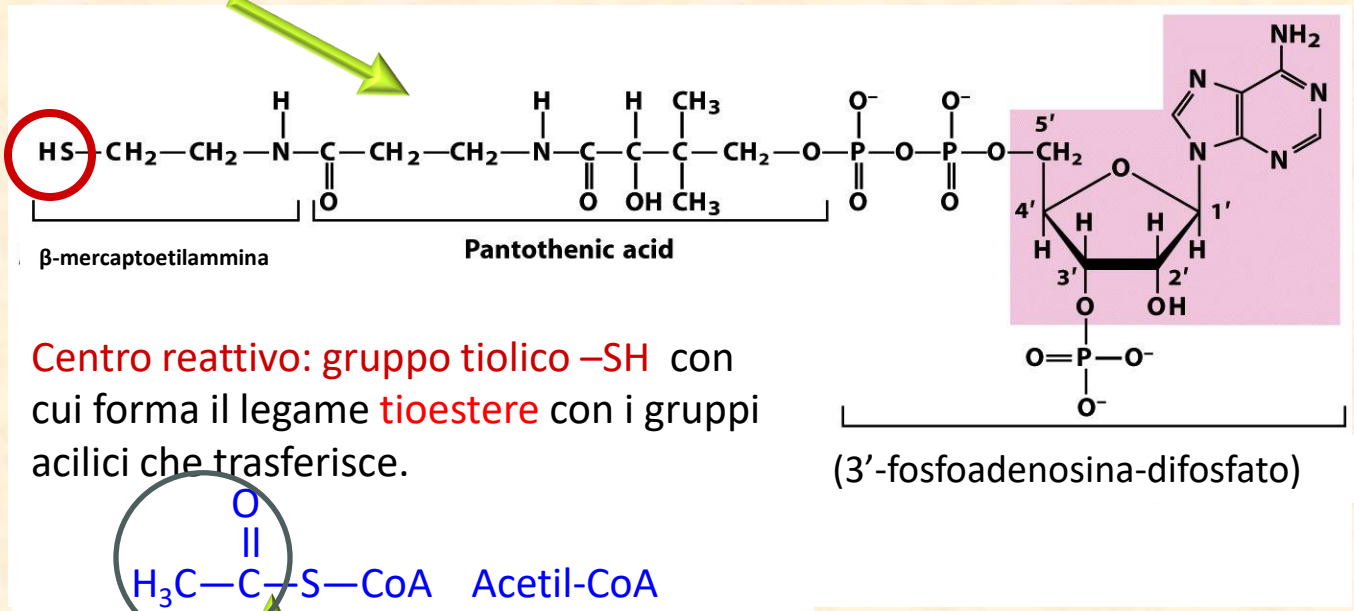
(3’-fosfoadenosina-difosfato)

L’acido pantotenico lega una molecola di **mercaptoetilammina** e una molecola di **ADP a partire dall’ATP**

COENZIMA A (HS-CoA)

Trasferimento di gruppi acilici in reazioni di ossidazione di molecole energetiche e di biosintesi di carboidrati e lipidi.

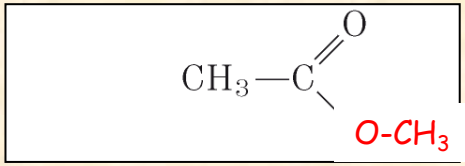
Deriva dalla vitamina B5 (ac. pantotenico)



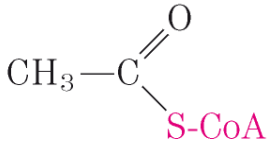
Centro reattivo: gruppo tiolico –SH con cui forma il legame tioestere con i gruppi acilici che trasferisce.

Quando si forma un legame tioestere viene conservata energia metabolica che può essere utilizzata per promuovere altri processi.

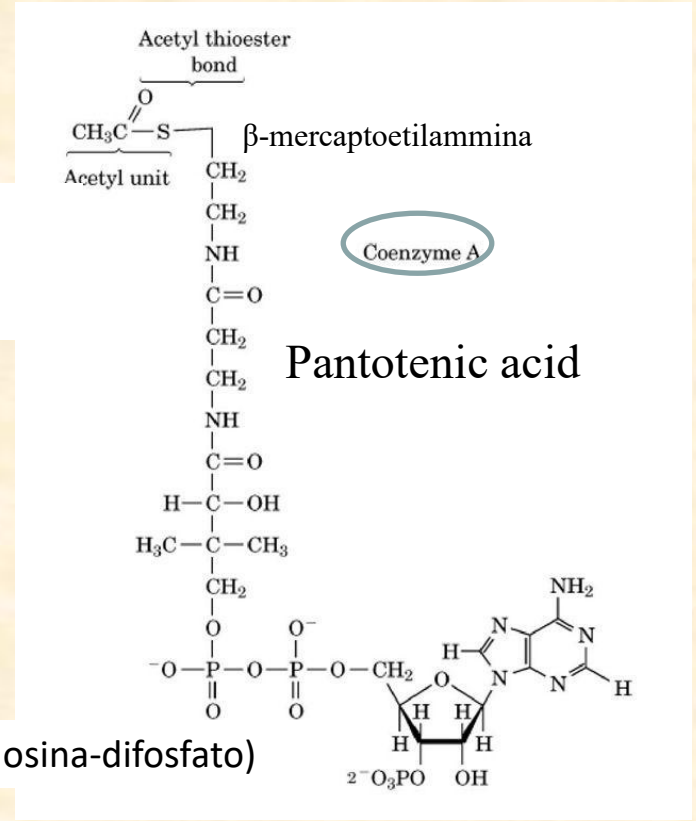
Estere



Tioestere

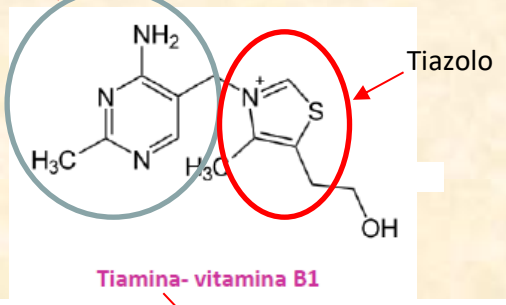


Acetil-coenzima A, o acetil-CoA è uno dei tioesteri più importanti del metabolismo



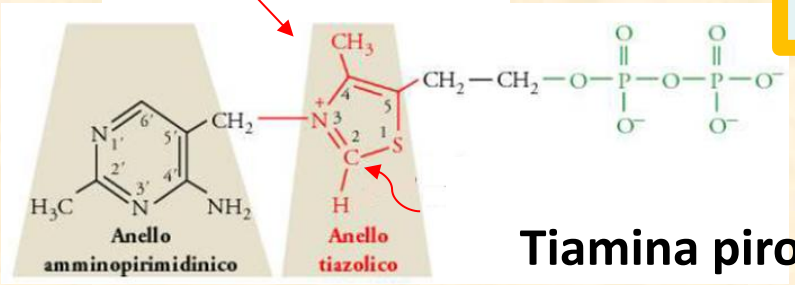
Tiamina (Vitamina B1)

pirimidina



Tiazolo

Tiamina- vitamina B1

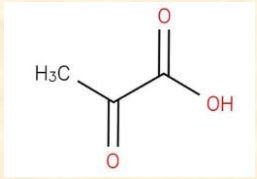


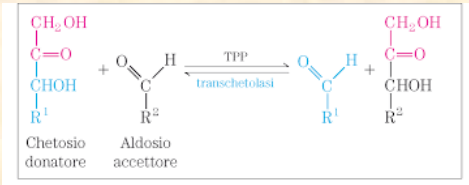
Una volta arrivata nei tessuti viene fosforilata a tiamina difosfato (o pirofosfato), la forma attiva, dalla tiaminapirofosfato sintetasi.

La tiamina pirofosfato (TPP) è il coenzima di numerosi enzimi (piruvato decarbossilasi, complesso della piruvato deidrogenasi)

Tiamina pirofosfato (TPP)

TIAMINA PIROFOSFATO (TPP)





Deriva dalla tiamina (vitamina B_1)

Ruolo importante nella rottura di legami adiacenti ai gruppi carbonilici

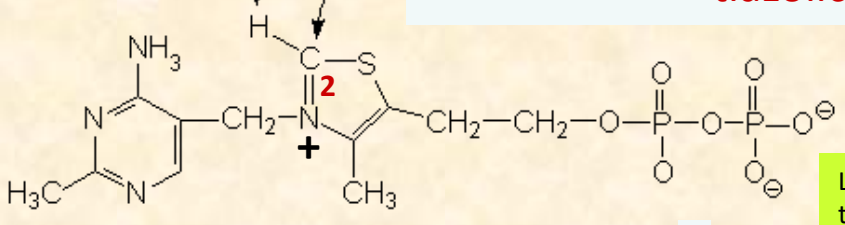
È il gruppo prostetico delle decarbossilasi (decarbossilazione degli α-chetoacidi).

È' anche il gruppo prostetico delle transchetolasi

(trasferimento di un gruppo a 2 atomi di carbonio contenente una funzione C=O)

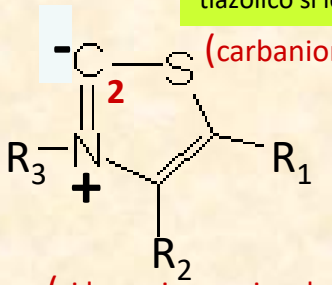
Protone dissociabile

Centro reattivo: C-2 dell'anello tiazolico



Thiamine pyrophosphate (TPP)

L'atomo di C2 dell'anello tiazolico si ionizza



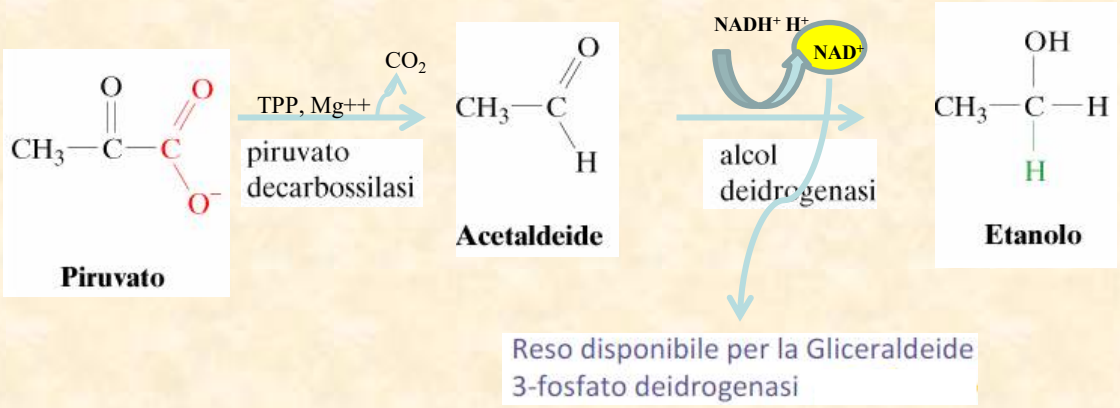
(carbanione dipolare)

Il carbonio 2 dell'anello tiazolico è molto acido a causa dell'effetto elettronattrativo esercitato dall'N con carica positiva e dallo zolfo in 1

(si lega ai gruppi carbonilici)

LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

Molti batteri intestinali e molti lieviti possono sopravvivere in assenza di ossigeno, metabolizzando il piruvato attraverso la fermentazione alcolica



Vitamina B1 o Tiamina

- Importante ruolo nel metabolismo energetico
- Sintesi di ATP
– Co-fattore nella via del pentoso fosfato (transchetolasi) –
Essenziale nella neurotrasmissione e nella conduzione nervosa

Fonte alimentare: Semi, Frutta secca, legumi, carne magra

Carenza di vitamina B1: Beri-beri

Perdita di appetito, costipazione, nausea
Depressione, neuropatia periferica
Perdita della memoria a breve termine
Perdita della coordinazione dei movimenti oculari

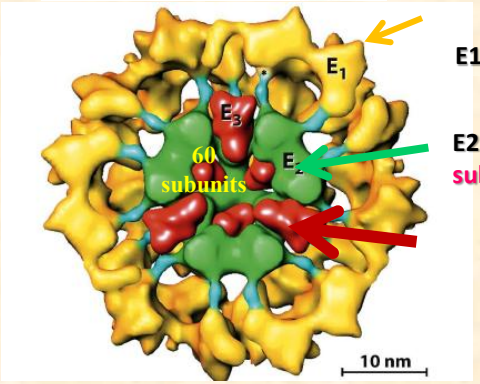
Complesso della Piruvato Deidrogenasi

Disponibilità di O_2 **Piruvato**



Acetil-CoA

Complesso proteico in cui risiedono 3 differenti attività enzimatiche



E1= Piruvato deidrogenasi (24 subunità)

TPP (vit B1)

E2=Diidrolipoammide acetiltransferasi (24 subunità)

Ac. Lipoico

E3= Diidrolipoammide deidrogenasi (12 subunità)

FAD (riboflavina –vit B2)

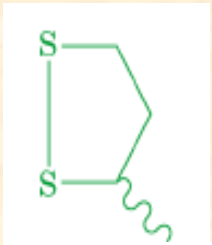
Intervengono inoltre:

- ☞NAD (niacina- vit. B3)
- ☞Coenzima A (CoA-SH) (vit B5)

Acido lipoico

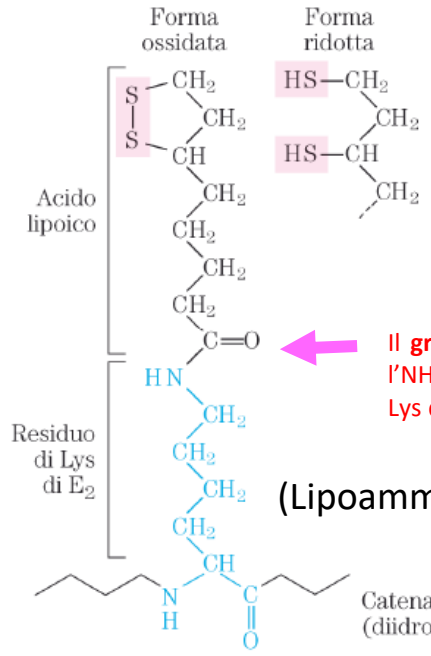
-8 atomi di carbonio uno di questi è un carbonio carbossilico

-2 atomi di zolfo impegnati in un ponte disolfuro (forma ossidata) o come tioli liberi (forma ridotta)



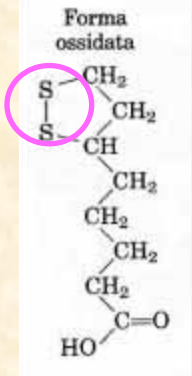
Enzima

Rappresentazione semplificata della lipoammide (acido lipoico legato all'enzima)

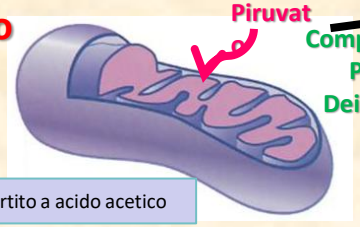


(Lipoammide)

Il **gruppo carbossilico** reagisce con l'NH_2 dell'ε-ammino gruppo di una Lys dell'enzima (**lipoammide**)



Meccanismo di reazione:

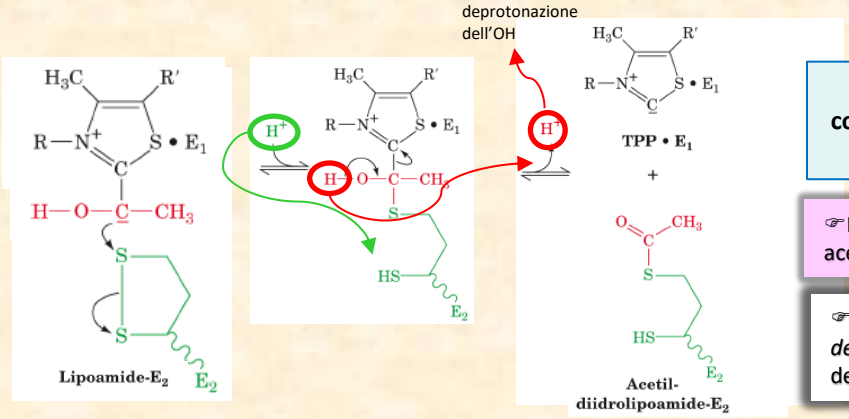


Piruvat → Acetil-CoA

Complesso della Piruvato Deidrogenasi (PDH)

- E1 Piruvato deidrogenasi
- E2 Diidrolipoammide acetiltransferasi
- E3 Diidrolipoammide deidrogenasi

L'idrossietile deve convertito a acido acetico



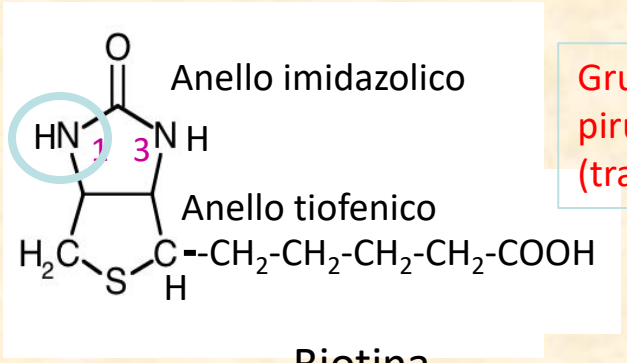
Questa reazione, catalizzata ancora dalla componente piruvato deidrogenasi E1, produce acetil-diidrolipoammide.

☞E1 trasferisce sull'acido lipoico di E2 il gruppo acetilico (formazione di un tioestere)

☞Il trasferimento è accoppiato: ❶ all'***ossidazione*** *dell'idrossietile ad acetato* ❷ e quindi alla **riduzione** dell'acido lipoico

BIOTINA (vitamina B7)

Vitamina sintetizzata dai batteri intestinali e poi assorbita

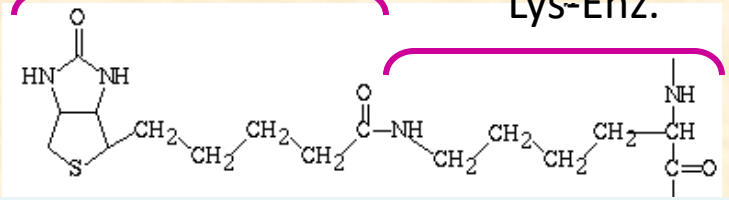


Centro reattivo

Gruppo prostetico della piruvato carbossilasi (trasportatore di CO2)

Biotina

Lys-Enz.

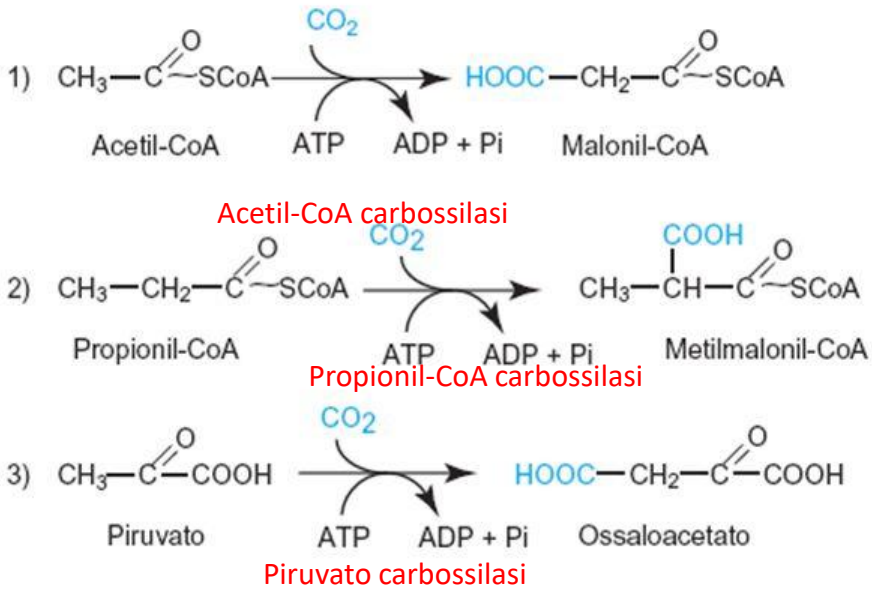


Si lega al sito attivo attraverso un legame carboammidico con un residuo di Lys dell'enzima.

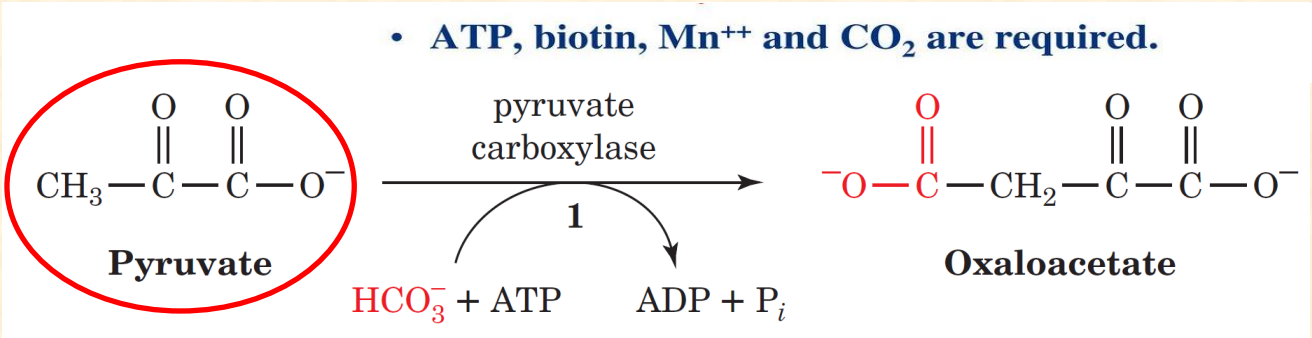
È il **gruppo prostetico** di enzimi che catalizzano reazioni di carbossilazione ATP-dipendenti.

Vitamina B7 (Biotina) (3)

Carbossilasi che utilizzano biotina come cofattore



Reazione della piruvato carbossilasi



Carboxylation involving pyruvate, bicarbonate ion, biotin and ATP

Gluconeogenesi

mitochondria cytosol

PYRUVATE $\xrightarrow{1}$ OXALOACETATE $\xrightarrow{2}$ PEP

Vitamina B7 o Biotina

Fonte alimentare: Lievito, tuorlo d'uovo, Frutta secca, legumi.

Carenza di vitamina B7: disordini diffusi

Depressione
Allucinazioni
Dolori muscolari
Dermatite

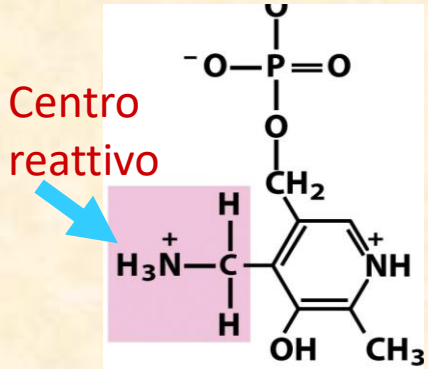
L'ingestione di uova crude può indurre una carenza di Vit. B7, perché una proteina , l'avidina, si lega alla biotina e impedisce il suo assorbimento.

Vitamina B6 (Piridossina) (2)

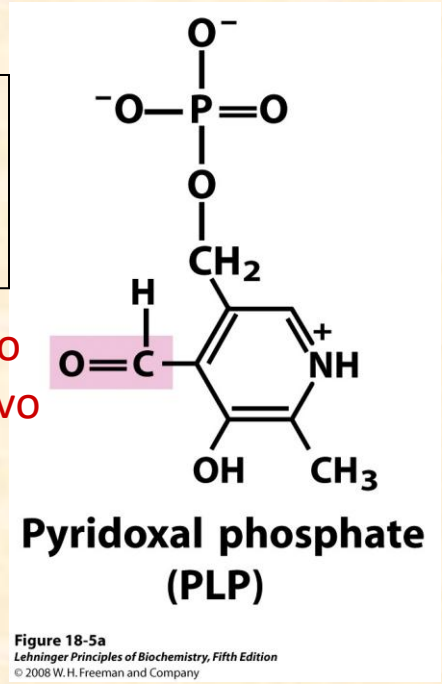
La forma attiva della vitamina B6 è il coenzima **piridossalfosfato** (PLP)

Il PLP è il gruppo prostetico di enzimi che catalizzano transamminazione, decarbossilazione, racemizzazione (L→D) che coinvolgono amminoacidi.

Centro reattivo

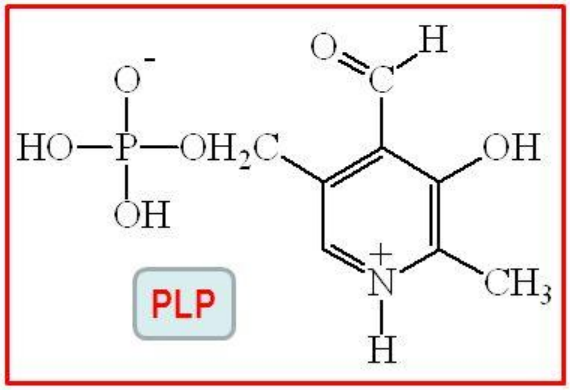


Centro reattivo

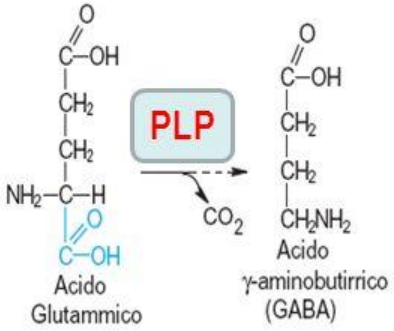


Vitamina B6 (Piridossina) (2)

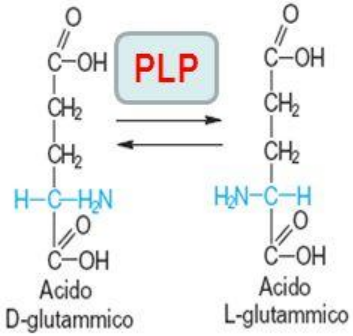
La forma attiva della vitamina B6 è il coenzima **piridossalfosfato** (PLP)



DECARBOSSILAZIONE:



RACEMIZZAZIONE:



La richiesta di vitamina B6 è proporzionale alla attività del metabolismo proteico. E' importante durante la gravidanza e l'allattamento

Le reazioni di **TRANSAMMINAZIONE PLP dipendenti** catalizzate dalle transamminasi o ammino-transferasi

Il gruppo amminico di un amminoacido è trasferito su un α-chetoacido, l'amminoacido diventa α-chetoacido e l'α-chetoacido diventa amminoacido.

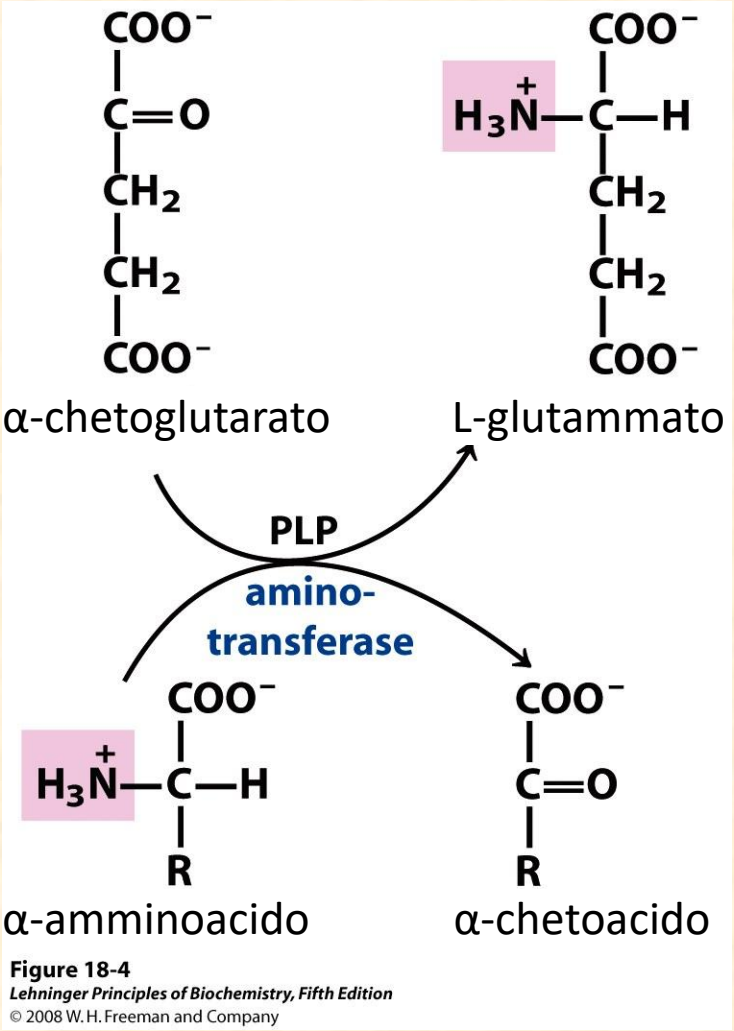


Figure 18-4
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Vitamina B6

Fonte alimentare: Lievito, fegato, Frutta secca, fagioli, banane

La richiesta di vitamina B6 è proporzionale alla attività del metabolismo proteico. E' importante durante la gravidanza e l'allattamento

Carenza di vitamina B6: malattia neurologica

Irritabilità
Depressione
Neuropatia periferica
Convulsioni
Coma

E' importante nella sintesi dei neurotrasmettitori (serotonina, noradrenalina) e della sfingosina e altri sfingolipidi

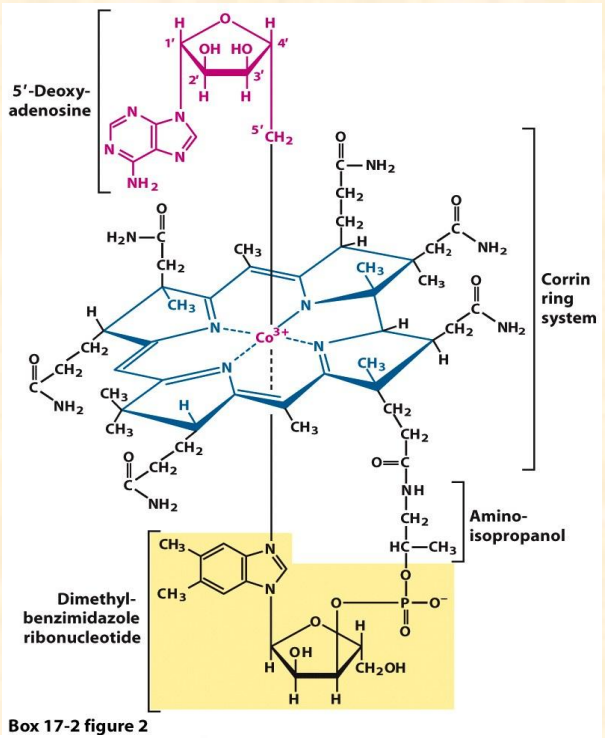
Necessaria per la biosintesi dell'eme.-→ Anemia

COBALAMMINA

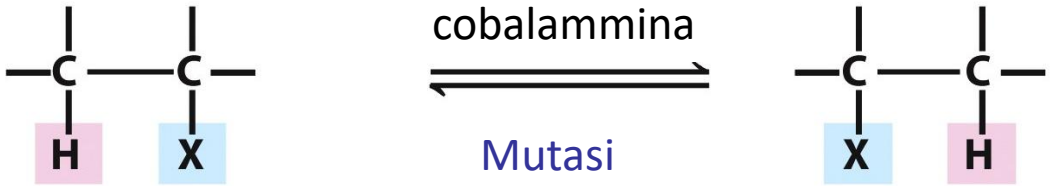
Vitamina B_{12}

Sintetizzata da alcune specie di batteri e assunta dall'uomo con alimenti di origine animale.
È assorbita dalla mucosa intestinale.

Prende parte a reazioni di ri-arrangiamento intramolecolare di tipo radicalico, catalizzate da mutasi o transferasi



Box 17-2 figure 2



Box 17-2 figure 1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company