


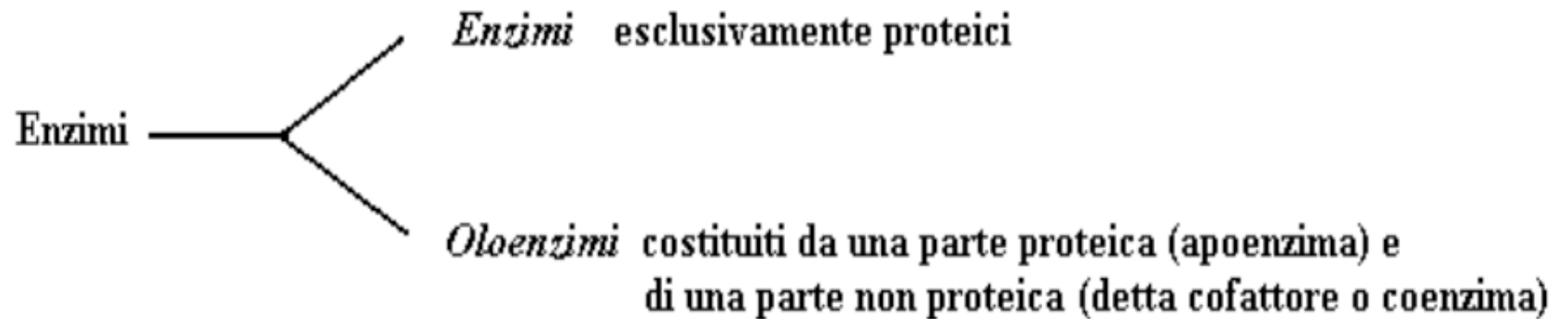
# ENZIMI

- Tutti gli enzimi sono proteine
- Elevata specificità e senza la formazione di sottoprodotti
- Non vengono modificati o consumati durante la reazione  
     alla fine si ritrovano inalterati
- Agiscono in condizioni blande di Temperatura e pH
- Hanno pesi molecolari  $\gg$  dei substrati o gruppi funzionali su cui agiscono
- Alcuni sono costituiti solo da a.a.
- Altri richiedono per la loro attività catalitica la presenza di

**COFATTORI**

L'enzima può essere costituito da un solo polipeptide (monomero) o da più polipeptidi (oligomero). L'oligomero può essere costituito da monomeri (detti anche subunità) identici (portomeli) o da monomeri diversi.

Gli enzimi possono essere classificati sulla base della natura chimica del cofattore a cui sono associati per essere biologicamente attivi.



I **cofattori** possono essere

- **Ioni metallici:**  $\text{Cu}^{2+}$  ,  $\text{Fe}^{3+}$  ,  $\text{Zn}^{2+}$
- **Coenzimi :**  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{FAD}^+$

Alcuni Cofattori sono associati solo temporaneamente

—————→ **COSUBSTRATI**

Alcuni Cofattori sono associati in modo permanente con la proteina,  
anche mediante legami covalenti:

—————→ **GRUPPI PROSTETICI** : il gruppo eme dei citocromi

Il complesso *enzima-cofattore cataliticamente attivo = oloenzima*

La proteina *cataliticamente inattiva = apoenzima*

Apoenzima (inattivo) + cofattore  $\rightleftharpoons$  oloenzima ( attivo)

I cofattori o coenzimi si distinguono in:

***Ioni metallici*** ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , ecc.). Fanno parte del sito attivo partecipando direttamente al meccanismo di catalisi.

***Coenzimi trasportatori***. Molecole organiche che si legano reversibilmente con legami deboli all'apoenzima e partecipano al meccanismo di catalisi. Sono trasportatori di radicali: atomi o gruppi di atomi (es.  $\text{NAD}^{+}$ , CoA....). Avvenuta la reazione un prodotto della reazione rimane legato al coenzima, il coenzima quindi diffonde e si lega ad un altro enzima per cedere in un'altra reazione il radicale trasportato.

***Gruppi prostetici***. Molecole organiche legate stabilmente all'apoenzima mediante legami covalenti o molti legami deboli (es. citocromi, biotina....).

I cofattori svolgono un ruolo fondamentale nella catalisi; in loro assenza l'enzima non è attivo; la reattività dei cofattori è influenzata dalla proteina, senza apoenzima essi sono inattivi per la catalisi.

**TABLE 6-1****Some Inorganic Ions That Serve as Cofactors for Enzymes**

<b>Ions</b>	<b>Enzymes</b>
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>Cytochrome oxidase</b>
<b>Fe<sup>2+</sup> or Fe<sup>3+</sup></b>	<b>Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase</b>
<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Pyruvate kinase</b>
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase</b>
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	<b>Arginase, ribonucleotide reductase</b>
<b>Mo</b>	<b>Dinitrogenase</b>
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	<b>Urease</b>
<b>Se</b>	<b>Glutathione peroxidase</b>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B</b>

**Table 6-1**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

*I **coenzimi** vengono modificati chimicamente durante le reazioni:*



Per completare il ciclo catalitico,

*il coenzima deve tornare al suo stato originale:*



**reazione di rigenerazione**

anche a carico di un E. diverso

Alcune **vitamine idrosolubili** sono precursori di coenzimi



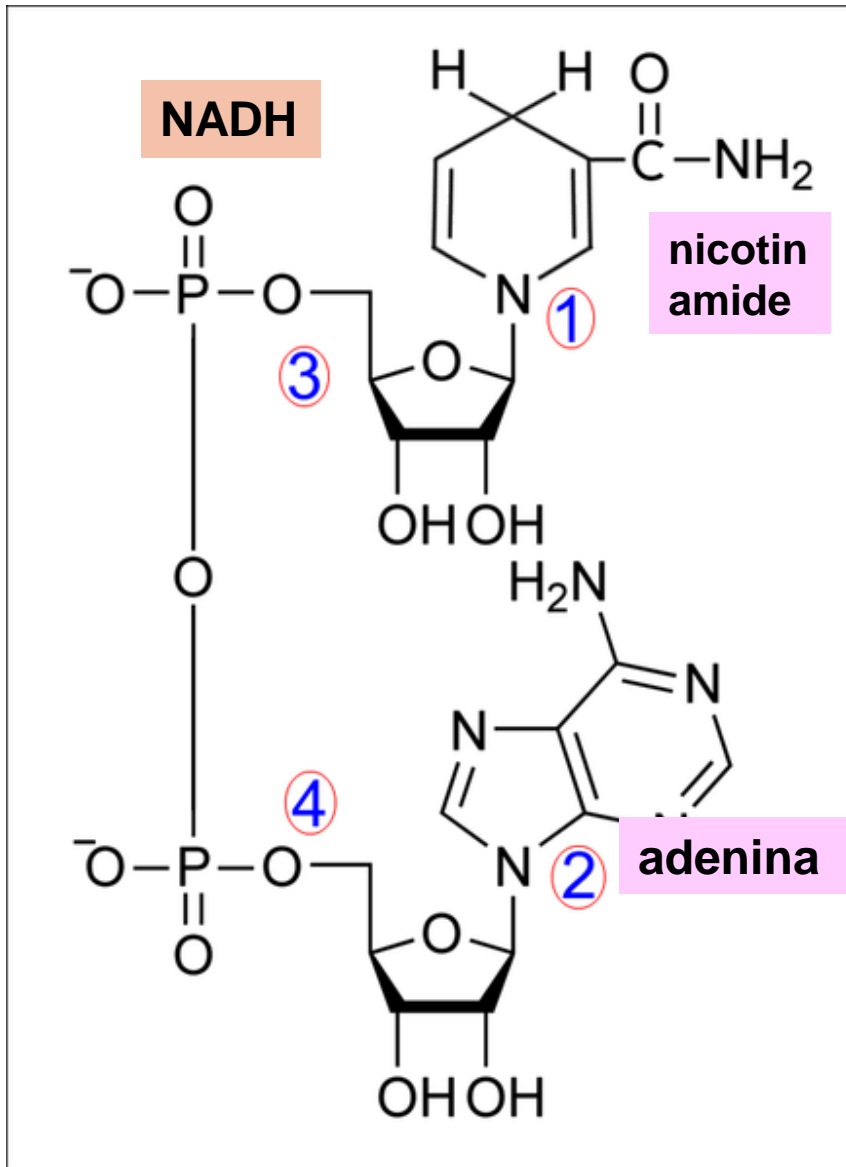
**le VITAMINE devono essere presenti nella dieta**

*Si ritiene che le vie biochimiche per la sintesi delle vitamine siano andate perse negli animali superiori durante il corso dell'evoluzione perché superflue.*

Coenzima	Precursore	Funzione	Enzimi
<u>Tiamina</u> <u>pirofosfato</u>	<b>Tiamina</b> (Vitamina B <sub>1</sub> )	Trasporto gruppo <b>aldeidico</b> "attivato" Decarbossilazione $\alpha$ -chetoacidi	Piruvico deidrogenasi Piruvico decarbossilasi
<u>FAD e</u> <u>FMN</u>	<b>Riboflavina</b> (Vitamina B <sub>2</sub> )	Trasferimento di <b>atomi di H</b> (elettroni)	Succinico deidrogenasi Acil-CoA deidrogenasi
<u>NAD e</u> <u>NADP</u>	<b>Acido nicotinico</b> (Vitamina PP)	Trasferimento di <b>atomi di H</b> (elettroni)	Deidrogenasi piridiniche
<u>Coenzima</u> <u>A</u>	<b>Acido pantotenico</b>	"Attivazione" e trasporto di gruppi <b>acile</b> o <b>acetile</b>	Diidrolipoil transacetilasi Acil-CoA sintetasi

- Le vitamine liposolubili come la D e la A,  
non sono componenti di coenzimi.

# NAD= Nicotinammide-adenin -dinucleotide è un nucleotide PIRIDINICO



Il gruppo funzionale è la **nicotinammide**, derivata dall'*acido nicotinic* o niacina o vitamina PP, (Pellagra-Preventing) potendo donare/accettare atomi di idrogeno.

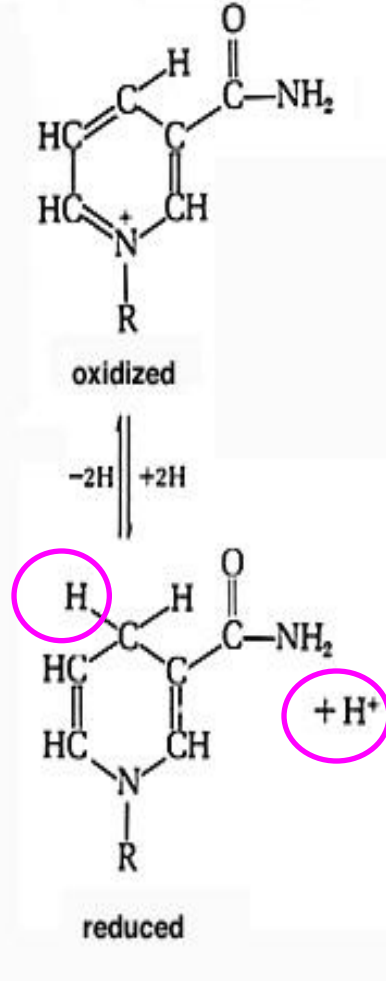
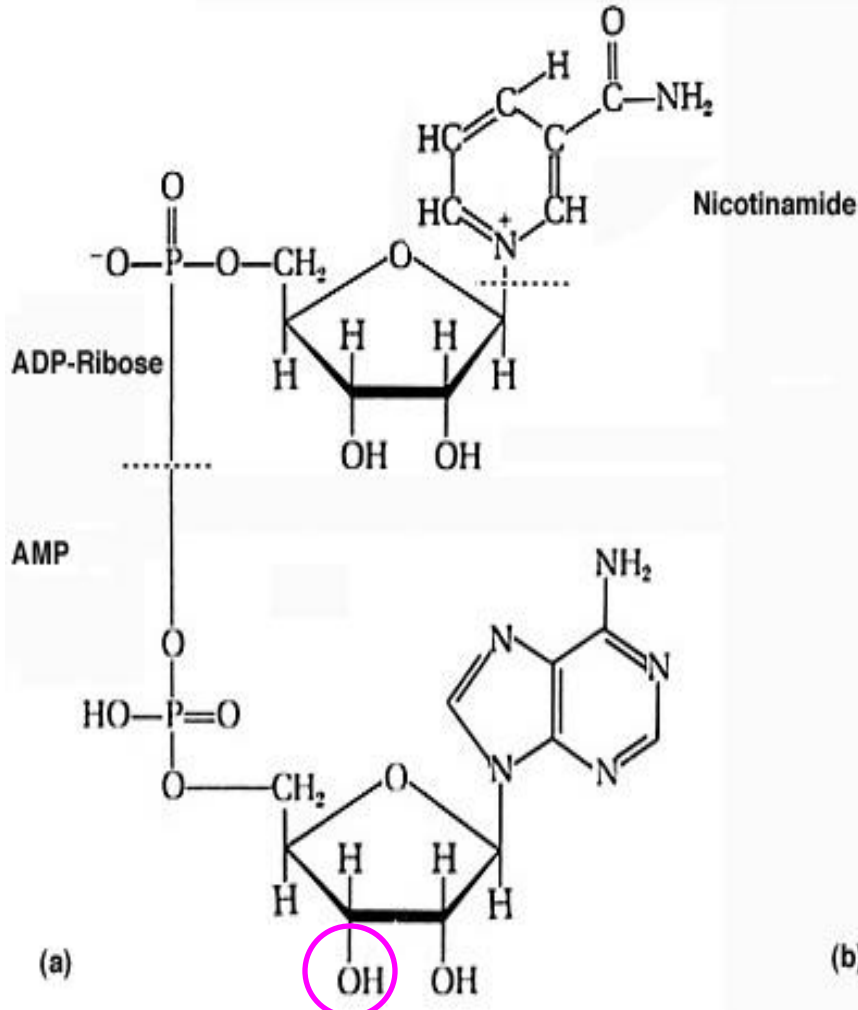
**L'adenina** è presente negli acidi nucleici, essendo una delle cinque basi azotate, e si trova inoltre nell'ATP, nell'ADP e nell'AMP.

Il **di-nucleotide** è contrassegnata dai numeri 3 e 4. In ciascuno di essi è presente un gruppo fosfato ed uno zucchero pentoso, il ribosio.



Il NADP differisce dal NAD per avere il **ribosio adenosinico** fosforilato in posizione 2'.

La nicotinammide accetta **uno ione idruro** (un protone con una coppia di elettroni) dal substrato, riducendosi, il secondo idrogeno viene rilasciato nel mezzo come ione  $H^+$ .



**A differenza dalle flavoproteine, i coenzimi piridinici non sono legati saldamente alla deidrogenasi, ma funzionano piuttosto come *cosubstrati*.**

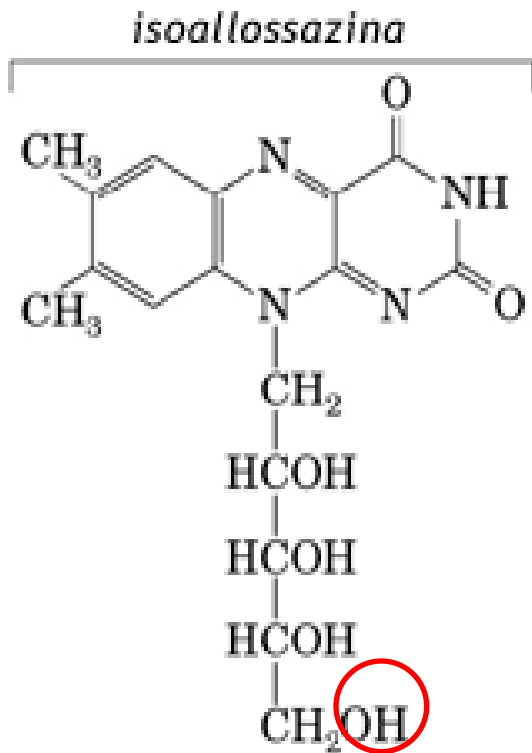
## Nucleotidi Flavini

FMN= Flavin Mono nucleotide

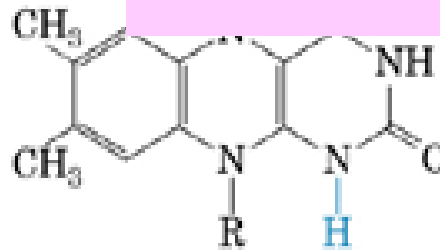
FAD= Favin Adenin Dinucleotide

sono i coenzimi derivanti dalla

RIBOFLAVINA (Vit B2)



Riboflavina



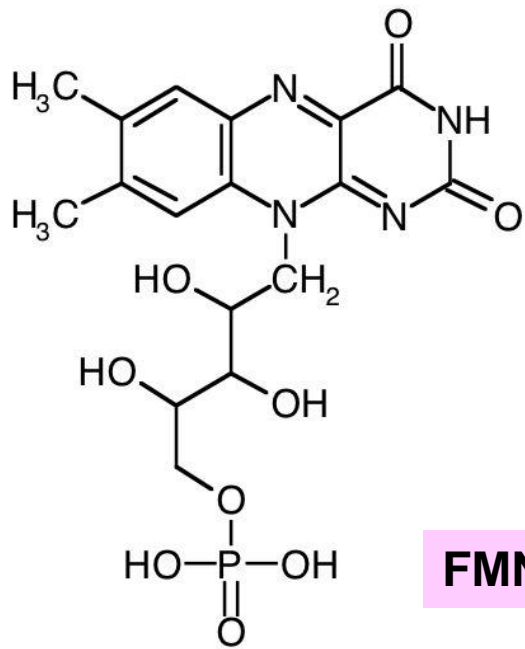
*Forma ridotta del gruppo  
funzionale del coenzima  
(FADH<sub>2</sub> o FMNH<sub>2</sub>)*

FAD e FMN sono i coenzimi tipici delle

**flavoproteine** = enzimi che trasferiscono elettroni.

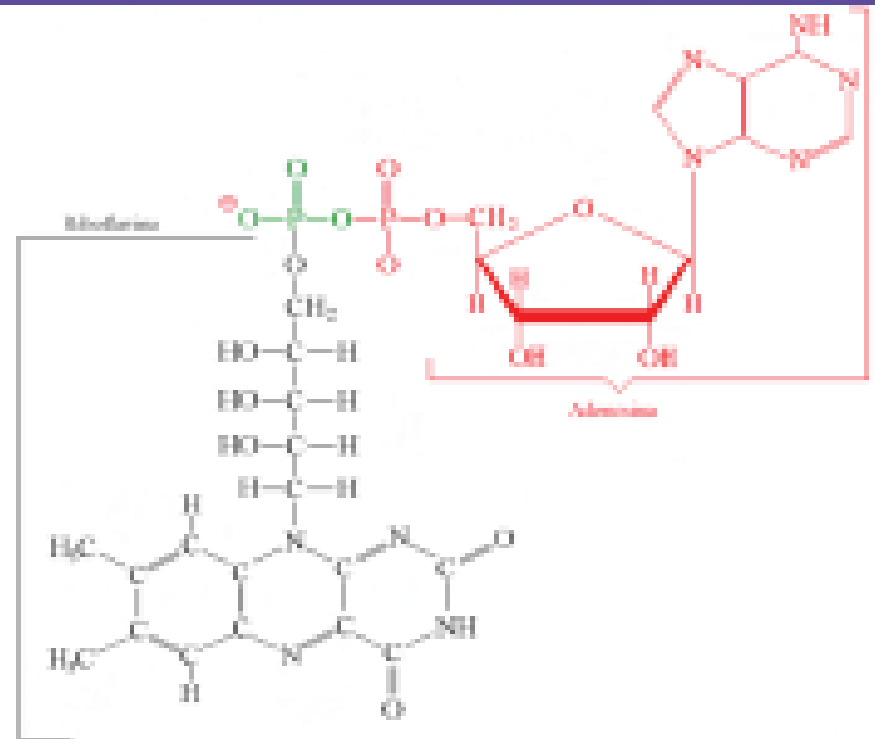
*Gli elettroni (atomi di H) possono essere trasferiti singolarmente o in coppia.*

Entrambi i coenzimi sono saldamente legati alla proteina → **gr. prostetici**;



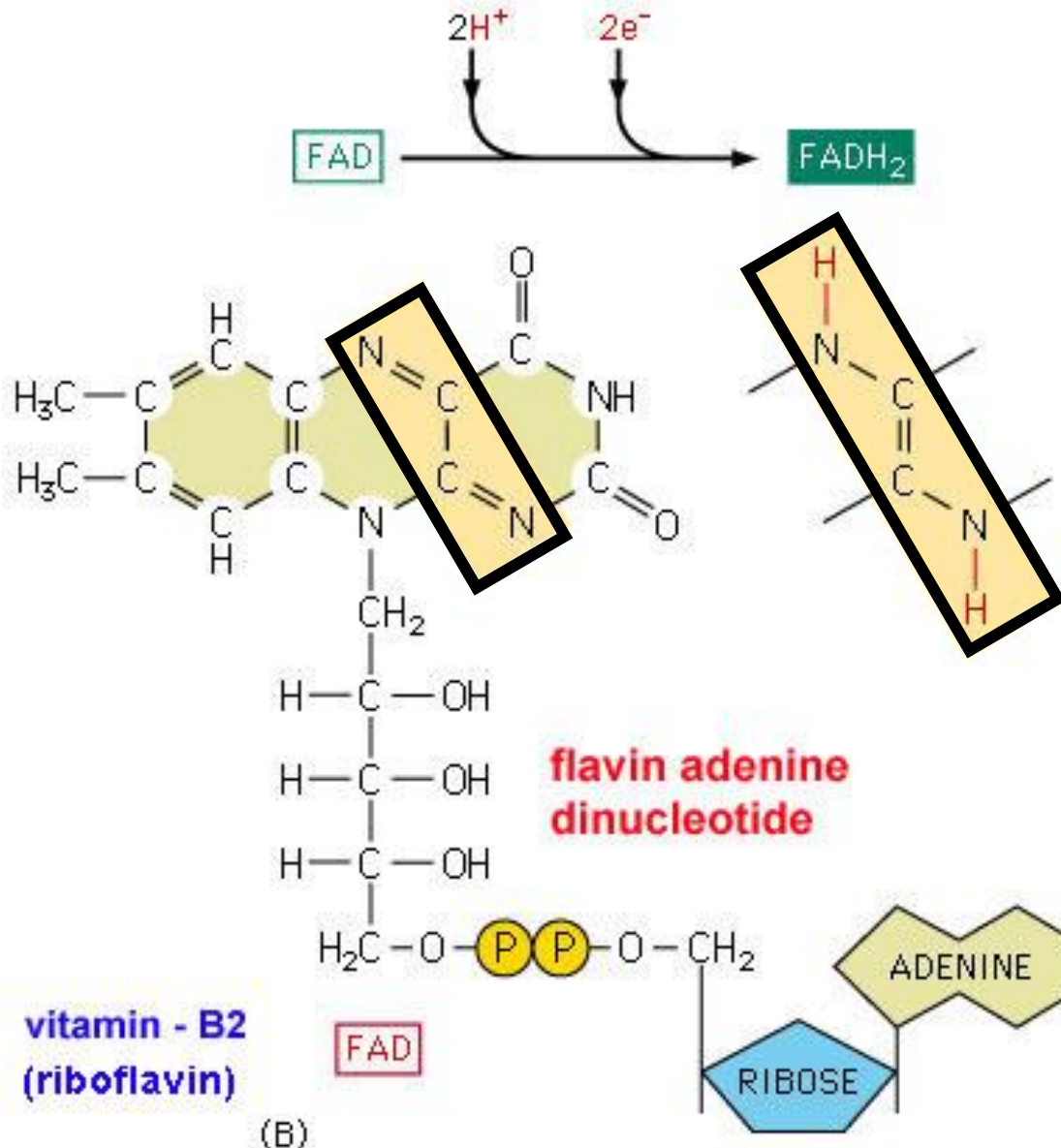
Il **FMN** (Flavin Mono Nucleotide) è semplicemente la riboflavina fosforilata sul  $\text{CH}_2\text{OH}$  terminale. Non è un vero nucleotide, manca dello zucchero pentosio.

Se l'FMN, reagisce con un'altra molecola di ATP, quest'ultimo rilascia sia il *nucleotide adeninico* che il *gruppo fosfato in  $\alpha$* .  
**si forma il FAD**



# Nucleotidi Flavini

# FAD Flavinadenindinucleotide



Nel **FAD** (Flavin Adenin Dinucleotide), la riboflavina è legata tramite il CH<sub>2</sub>OH terminale al gruppo pirofosforico di un ADP

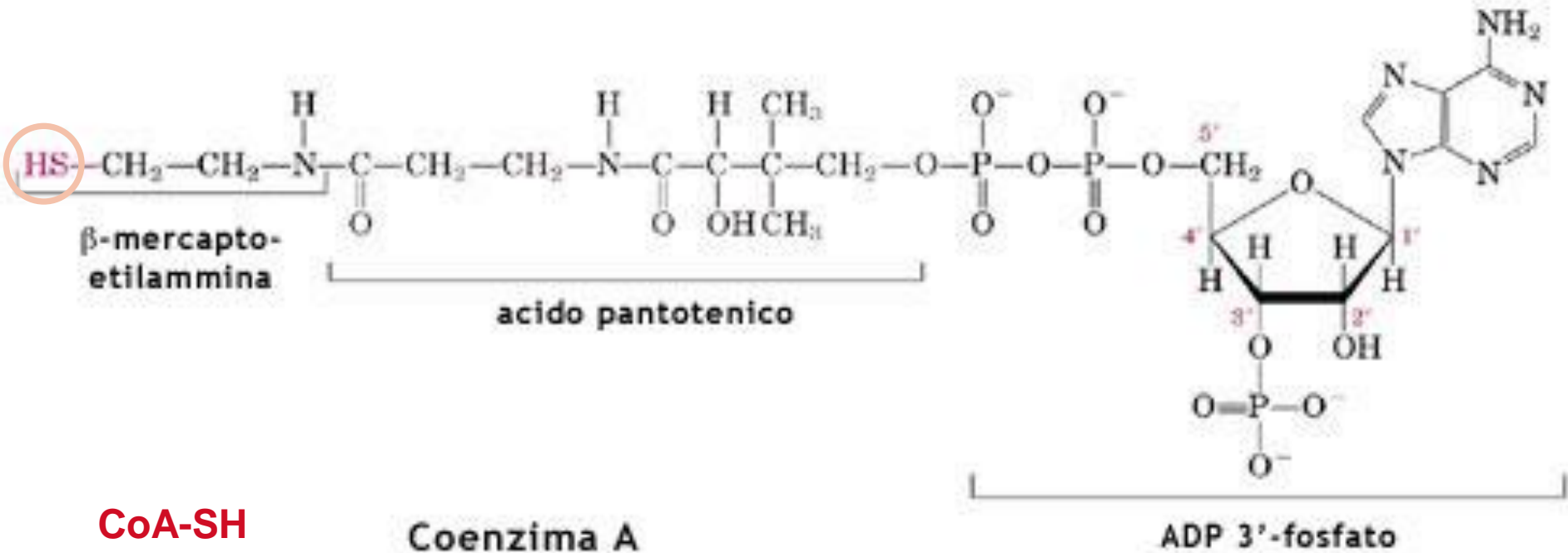
L'acido pantotenico (vitamina B5) è un componente **essenziale del Coenzima A**.  
va incontro ad una fosforilazione e **legame con  $\beta$ -mercapto-etilammina**

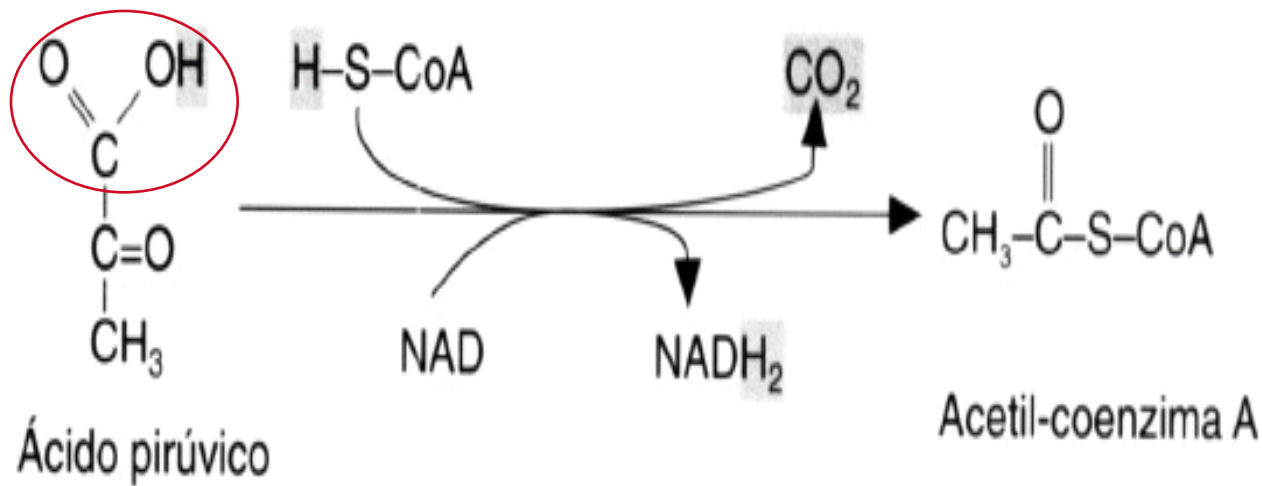
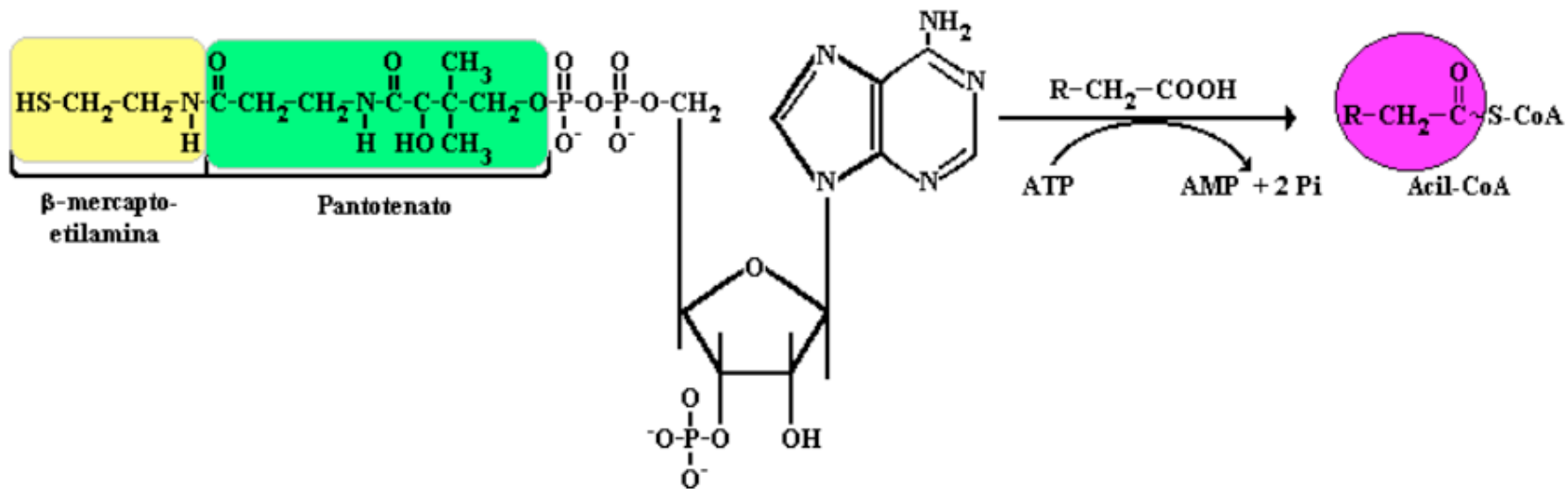
*Il Coenzima A ha la funzione di trasportare  
gruppi acetile in forma "attivata".*

Il gruppo trasportato è legato al gruppo funzionale **tiolico (-SH)**

**legame tioestere** con *elevata energia libera di idrolisi:*

grazie a questa caratteristica le reazioni di trasferimento del  
gruppo acetile possono procedere spontaneamente.





Il piruvato viene decarbossilato e da origine a una *forma attivata di acetato* : **Acetil-CoA**

**Gli enzimi non influiscono sul rapporto dell'equilibrio fra reagenti e prodotti:**

—————> Le velocità delle reazioni, *in entrambe le direzioni*,  
vengono aumentate della stessa entità

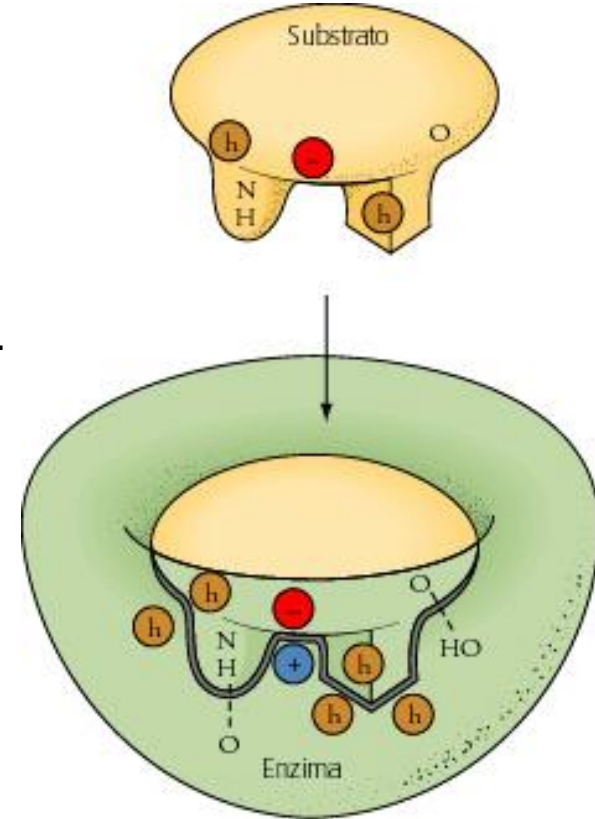
—————> Non sono in grado di fare avvenire una reazione non spontanea,  
(  $\Delta G > 0$  energeticamente in salita )

La reazione dell'enzima (catalisi) avviene nel


**SITO ATTIVO** = Tasca o fenditura sulla superficie dell'E.

sito di legame per il substrato

gruppi catalitici —————> Gr.  $-COOH$  o  
 $NH_2$  di catene laterali di a.a  
-S- di cisteina  
**Cofattori** che garantiscono  
la rottura e formazione di legami



Il legame del substrato con sito attivo coinvolge *interazioni non covalenti*

La **forma** e la **polarità** del sito di legame sono responsabili della *specificità enzimatica*  Esiste complementarità fra la forma e la polarità del substrato con quelle del sito attivo

## Meccanismo della catalisi enzimatica

- Nel 1894 teoria di Emil Fischer

### Modello chiave-serratura



contatto rigido fra E e S

Tale adattamento non consentirebbe una reazione reversibile essendo P diverso da S

- Nel 1958: ipotesi dello

### Adattamento indotto

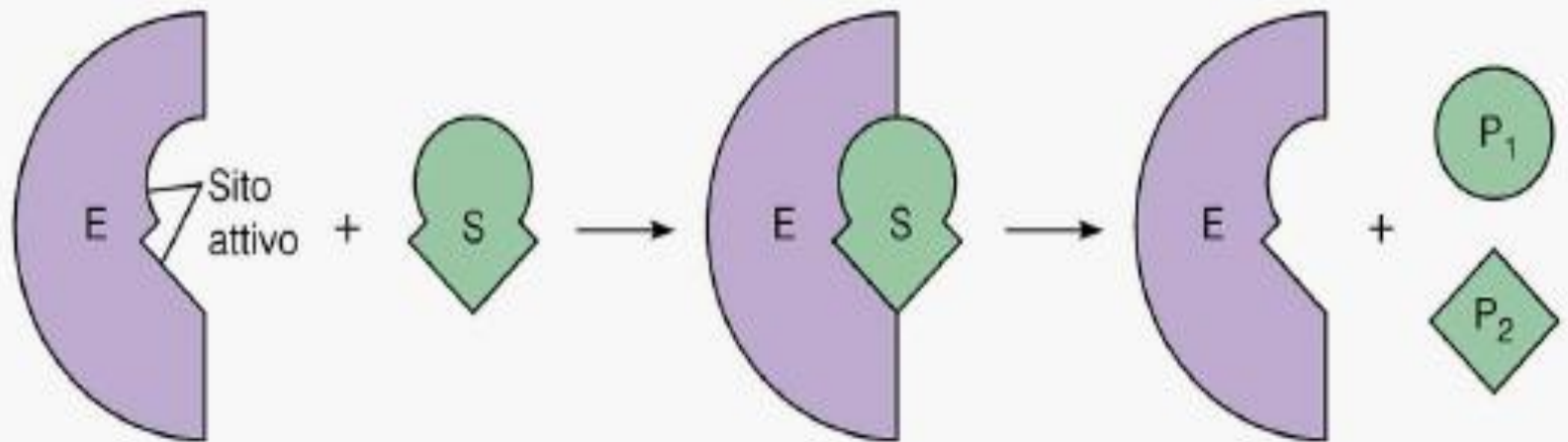


La vicinanza di S o P all'Enzima provoca

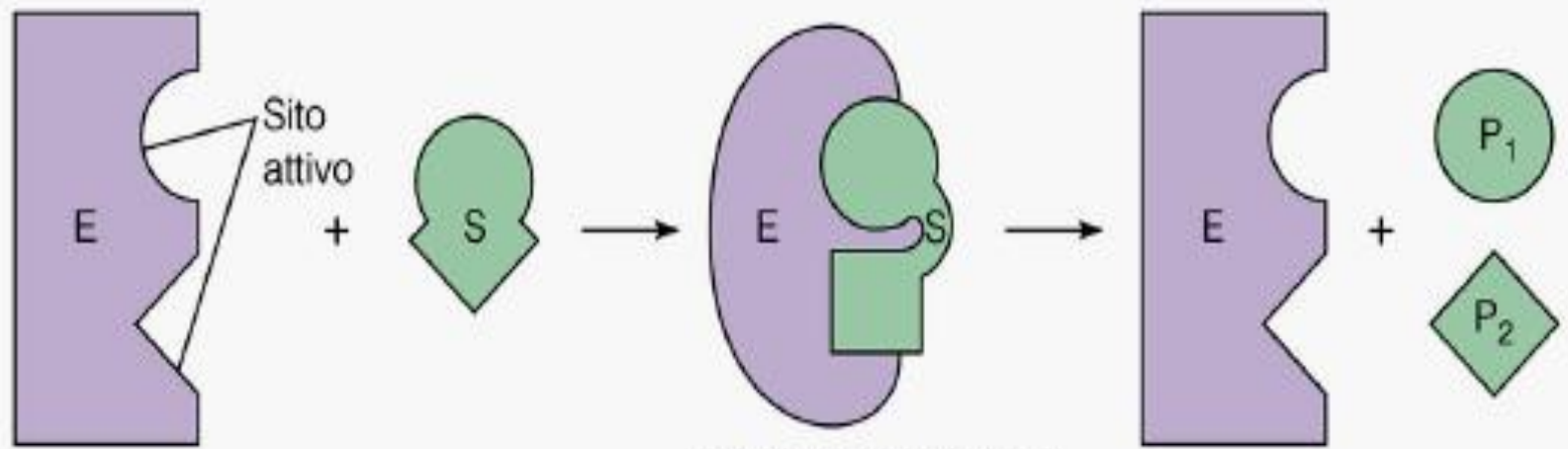
modificazioni della conformazione del sito attivo dell'E

Migliore combinazione E-S e E-P



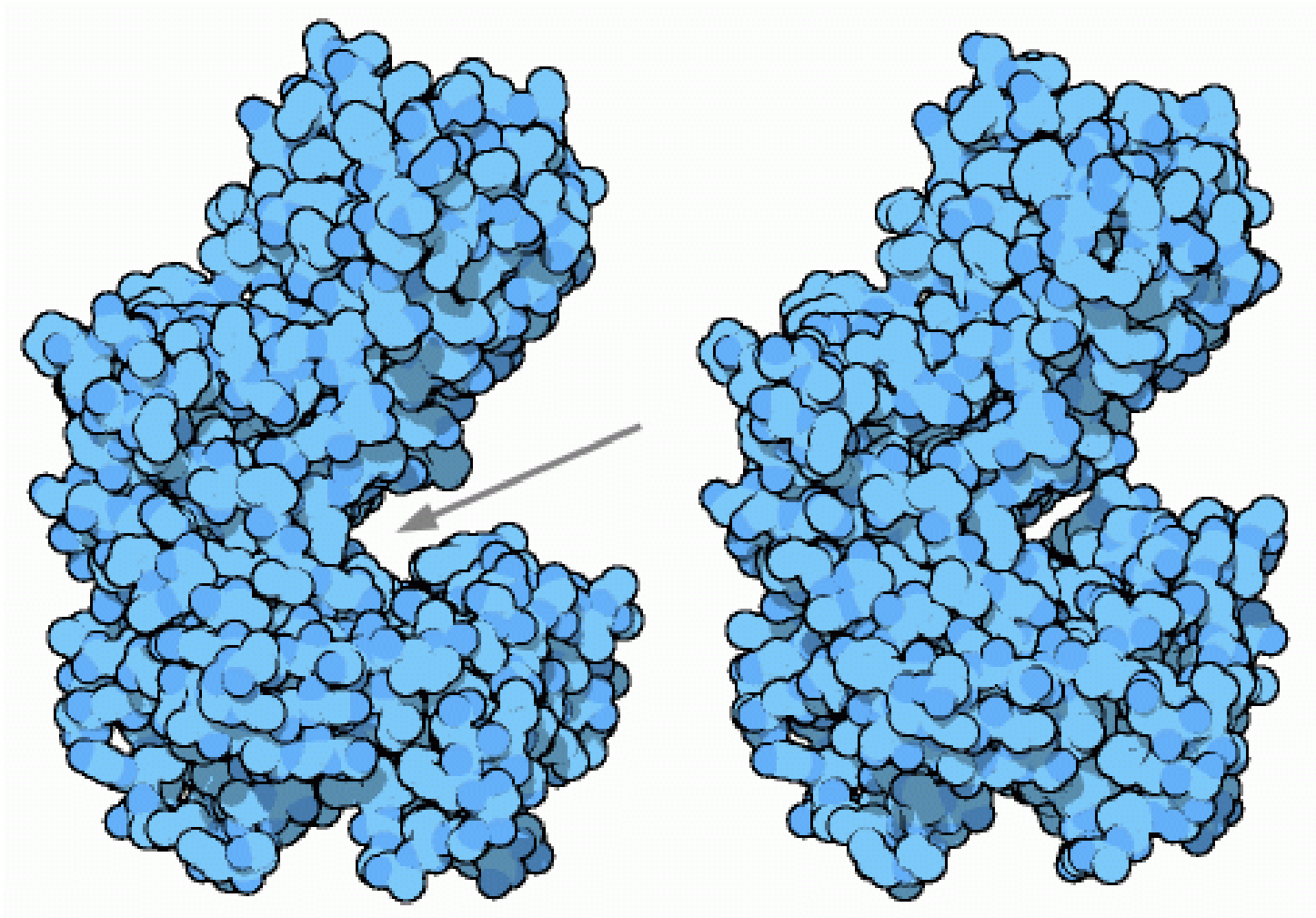


**(a)** Modello chiave-serratura



Conformazione dello stato di transizione

**(b)** Modello dell'adattamento indotto



L'enzima esochinasi è un buon esempio del modello dell'adattamento indotto: quando il glucosio si avvicina al sito attivo, *l'enzima cambia conformazione*, avvolgendosi attorno al substrato

# Come agisce un'enzima ?

Consideriamo la *reazione di 1° ordine* :



A= reagente

P= prodotto

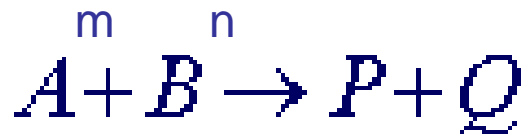
A temperatura costante, *la velocità di reazione è proporzionale alla frequenza con cui le molecole di A si incontrano*

 **La velocità è proporzionale alla concentrazione di A**

**La velocità di reazione** : intesa come comparsa del prodotto P o scomparsa del reagente A

$$V = \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[A]}{dt} = \mathbf{K[A]}$$

**K = cost. di velocità.** E' la costante di proporzionalità



$$v = k[A]^m [B]^n$$

✓  $m$  ed  $n$  *esponenti* determinano l'ordine di reazione, rispetto al proprio componente

✓ la somma  $m+n$  determina *l'ordine globale della reazione*

m	n	ordine globale di reazione	legge cinetica
0	0	0	$v = k$
1	0	1	$v = k [A]$
0	1	1	$v = k [B]$
2	0	2	$v = k [A]^2$
1	1	2	$v = k [A][B]$



**E' una reazione bimolecolare di II° ordine : 2 tipi di reagenti**

*A reagisce con B, dando origine a P e Q.*



2 molecole di reagenti diversi devono incontrarsi simultaneamente

Collisione  $\longrightarrow$  formazione di P e Q

*Le concentrazioni di A e B diminuiscono mentre quelle di P e Q aumentano.*

Esprimiamo **la velocità** in un certo periodo di tempo tramite il

**rapporto tra la variazione di concentrazione di un reagente o di un prodotto e l'intervallo di tempo considerato**

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{d[Q]}{dt} \quad \text{o} \quad v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} \quad v = K[A][B]$$

il segno - indica la variazione negativa della concentrazione dei reagenti

Affinchè la reazione avvenga :

Alcune molecole di A e B devono possedere + energia rispetto alle altre

 **STATO ATTIVATO** raggiungimento dello

## **STATO DI TRANSIZIONE**

- ❖ Punto + alto della barriera energetica
- ❖ E' uno stato instabile, le molecole possono:  
o trasformarsi nei prodotti



o tornare allo stato non eccitato con emissione di energia (calore, luce)

*La probabilità che una reazione avvenga in una direzione dipende dal*

### **$\Delta G$ fra reagenti e prodotti**

**$\Delta G < 0$**  la reazione procede spontaneamente verso i prodotti

**$\Delta G > 0$**  è la reazione inversa a procedere spontaneamente

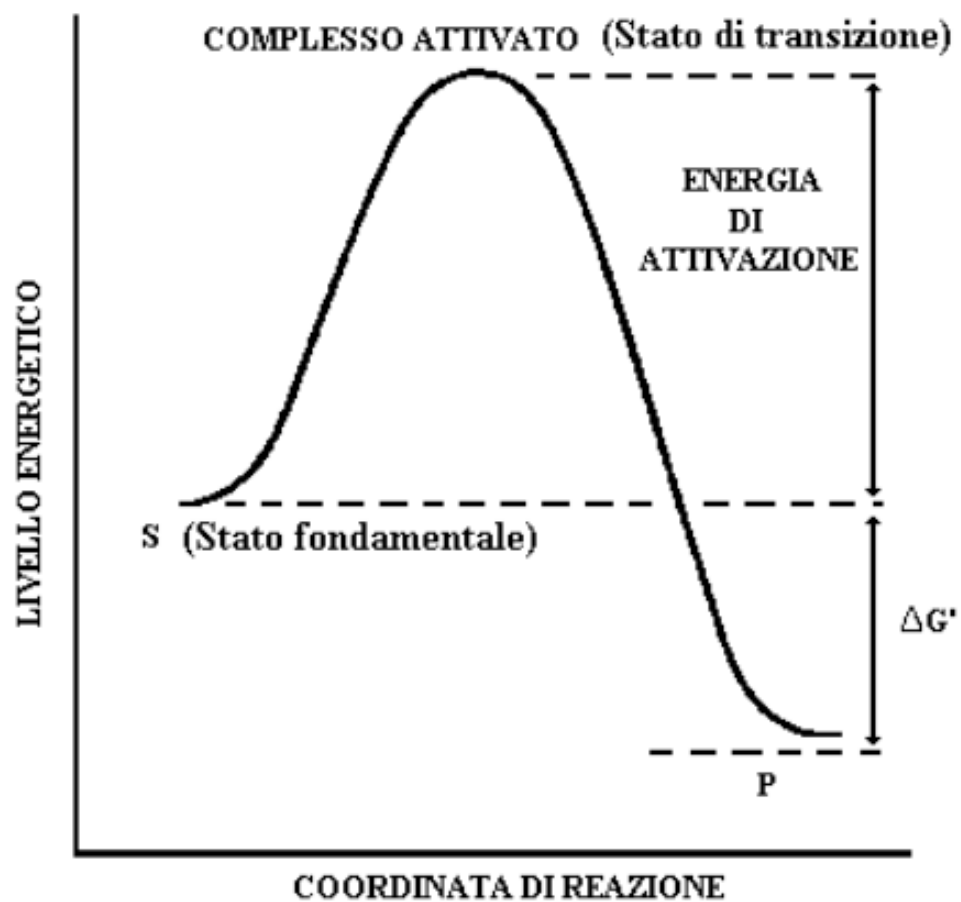
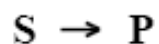
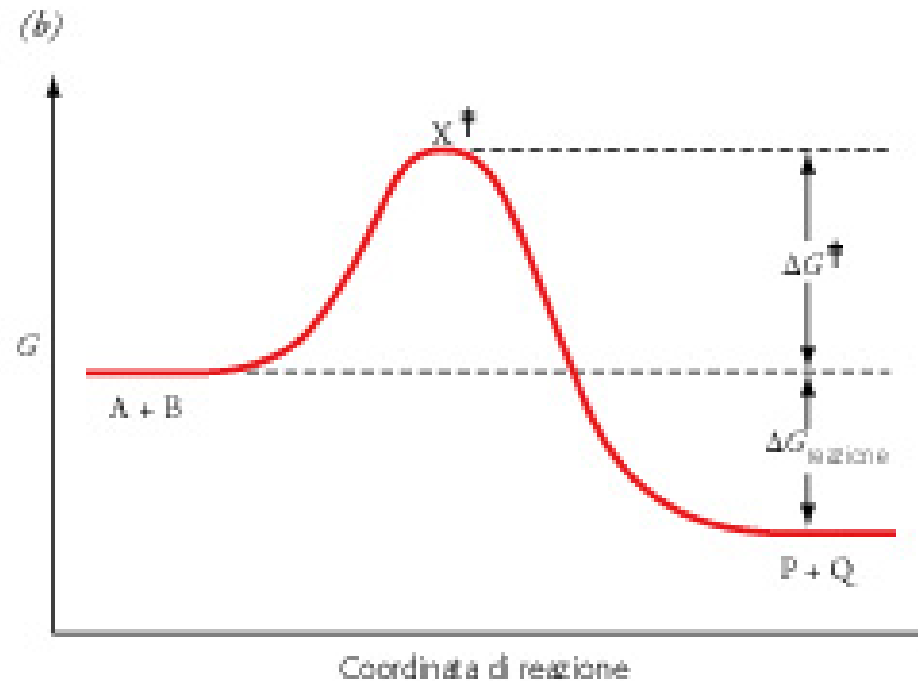
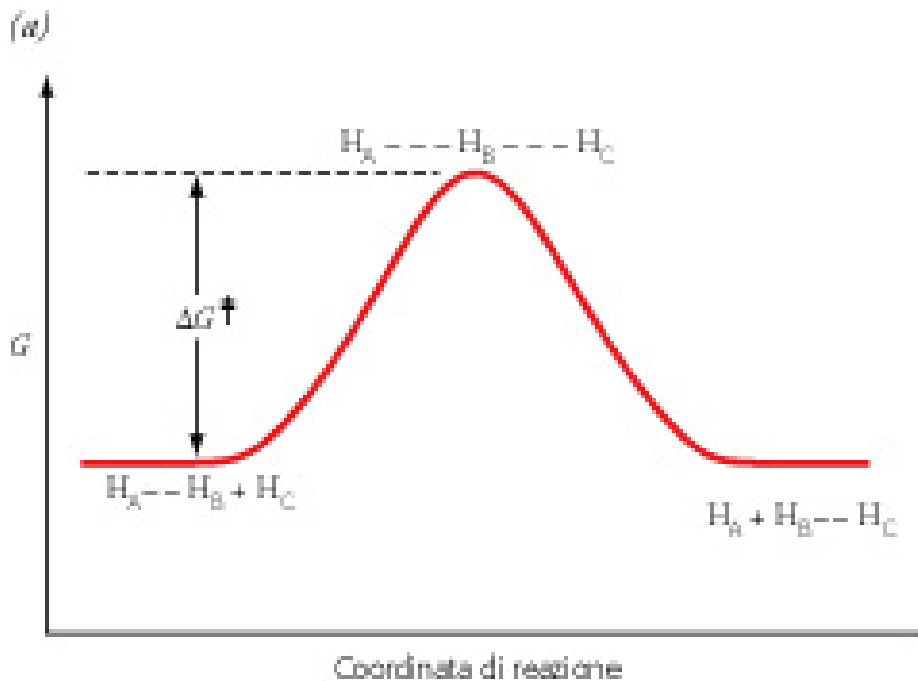


Figura. Profilo energetico di una reazione chimica

Considerando una qualsiasi reazione:



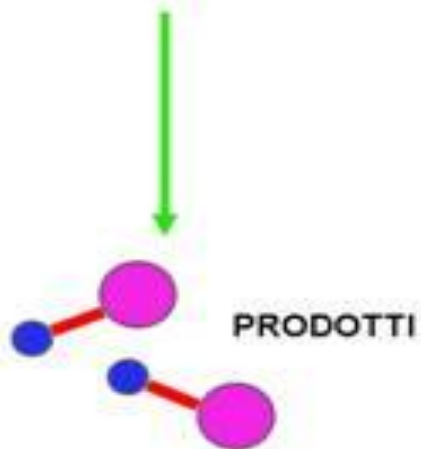
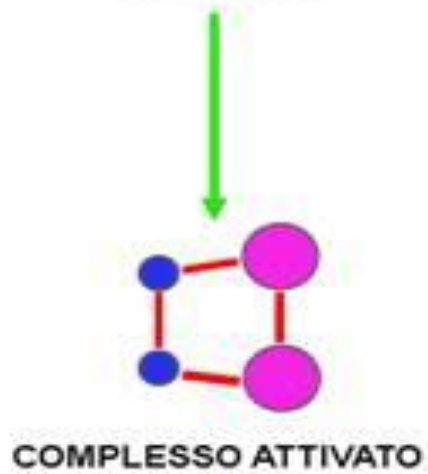
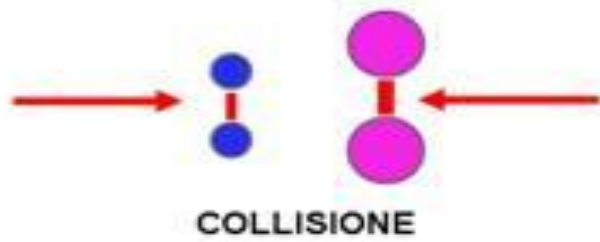


*Nello stato di transizione i reagenti sono parzialmente convertiti in prodotti*

**Energia di attivazione** = energia (calorie) richiesta per portare 1 mole di reagente allo stato di transizione

*La velocità di una reazione chimica è proporzionale alla concentrazione delle molecole allo stato di transizione*





 atomo di iodio


 atomo di idrogeno

Figura 5

*Vi sono 2 vie per aumentare la velocità di reazione*

## 1. Incremento della Temperatura



aumento dei moti termici delle molecole aumento del numero di molecole con en. interna sufficiente a raggiungere lo stato di transizione

*La vel. quasi si raddoppia per ogni aumento di  $T=10^{\circ}\text{C}$*

$Q_{10}$  è il rapporto tra vel di reazione a una data temp.

e la vel della reaz ad una temp inferiore di  $10^{\circ}\text{C}$

$$Q_{10} = 2$$

## 2. Impiego di un catalizzatore



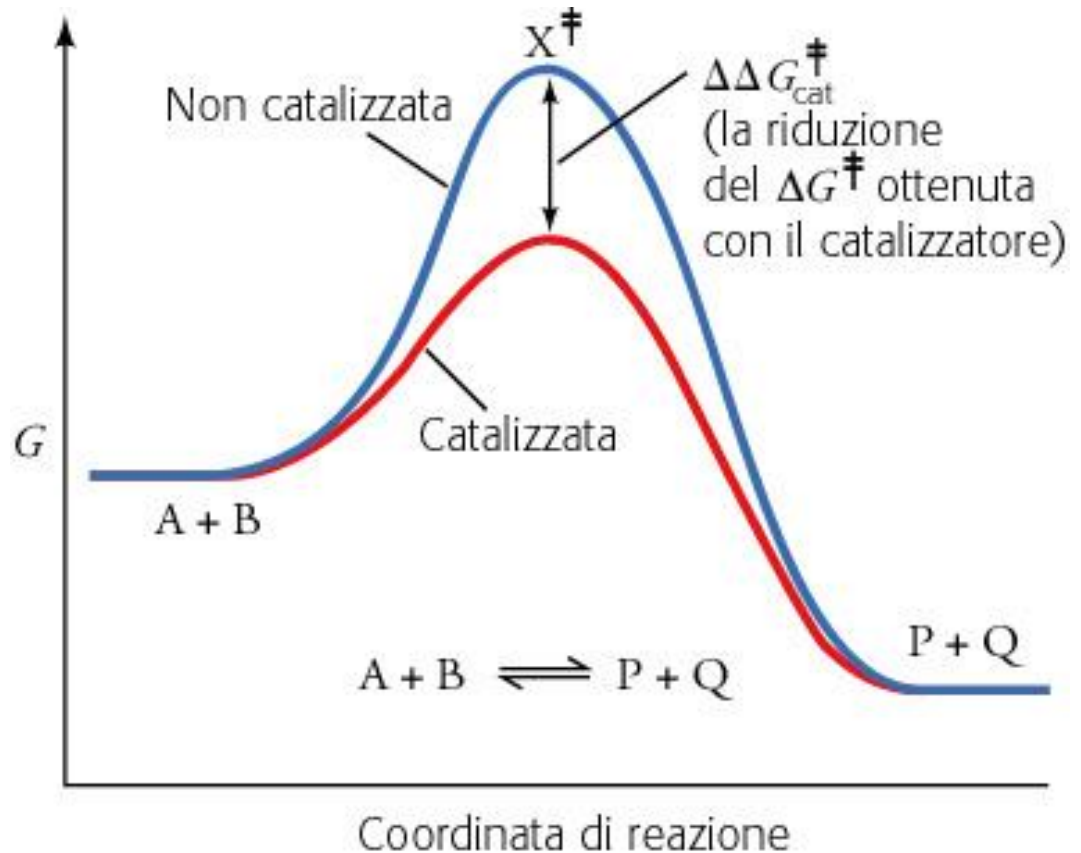
abbassamento della barriera energetica

Il catalizzatore si combina *transitoriamente* con A e B in un complesso con uno stato di transizione energeticamente + basso

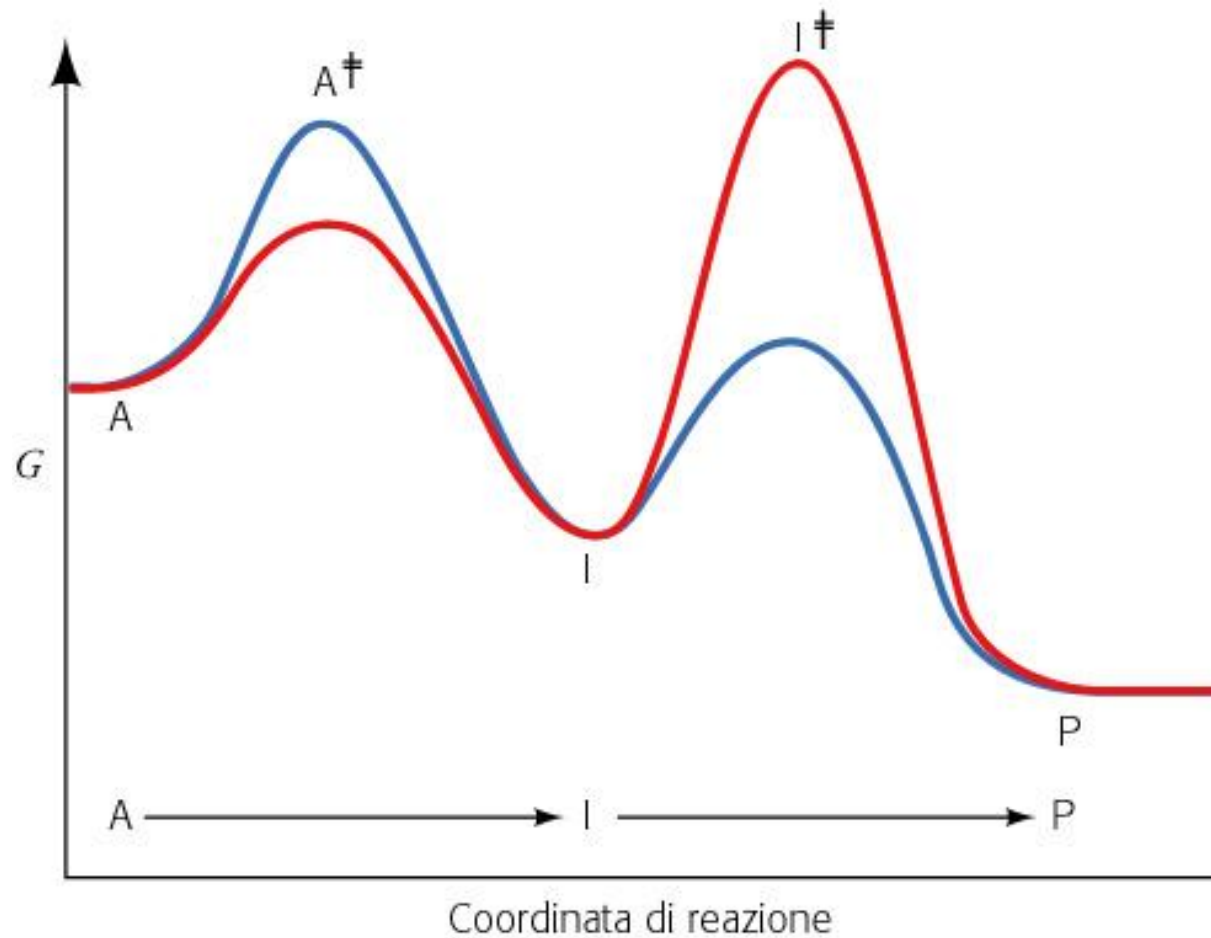
*Abbassamento dell'energia di attivazione*



Maggior numero di molecole nell'unità di tempo in grado di reagire rispetto al numero che reagirebbero in assenza di catalizzatore



Alla fine della reazione il catalizzatore viene rilasciato e può combinarsi con altre molecole di  $A$  e  $B$



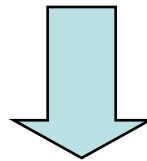
## Reazione chimica a 2 tappe

- 2 stati di transizione
- 2 diverse energie di attivazione

La velocità di una reazione catalizzata si può misurare progressivamente nel tempo mediante **saggi discontinui o saggi continui**

***La velocità di reazione diminuisce con il passare del tempo:***

- Se il substrato si consuma :la concentrazione di substrato non è elevata
- Se la reazione è reversibile : la formazione del prodotto innesca la reazione contraria
- L'enzima può andare incontro a denaturazione
- Il prodotto di reazione può inibire l'attività dell'enzima



***Per misurare la velocità di una reazione enzimatica conviene misurare la velocità iniziale ( $V_0$ )***

- *misurando la velocità iniziale ( $V_0$ ) tutti i fattori prima elencati sono trascurabili*

- *Se la concentrazione del substrato  $S$  è maggiore dell'Enzima*

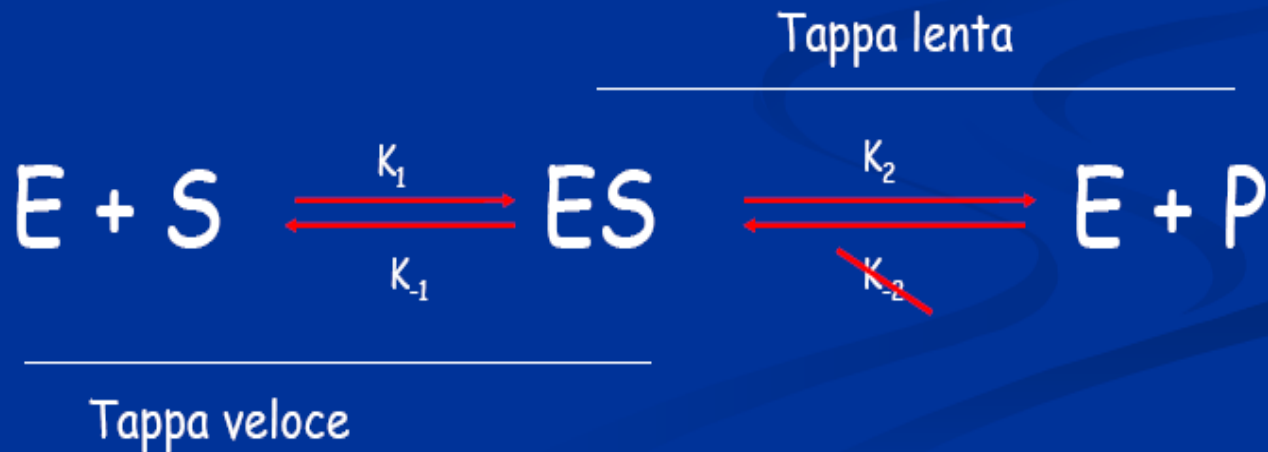
$$S \gg E$$

- *e il tempo di analisi è ridotto*



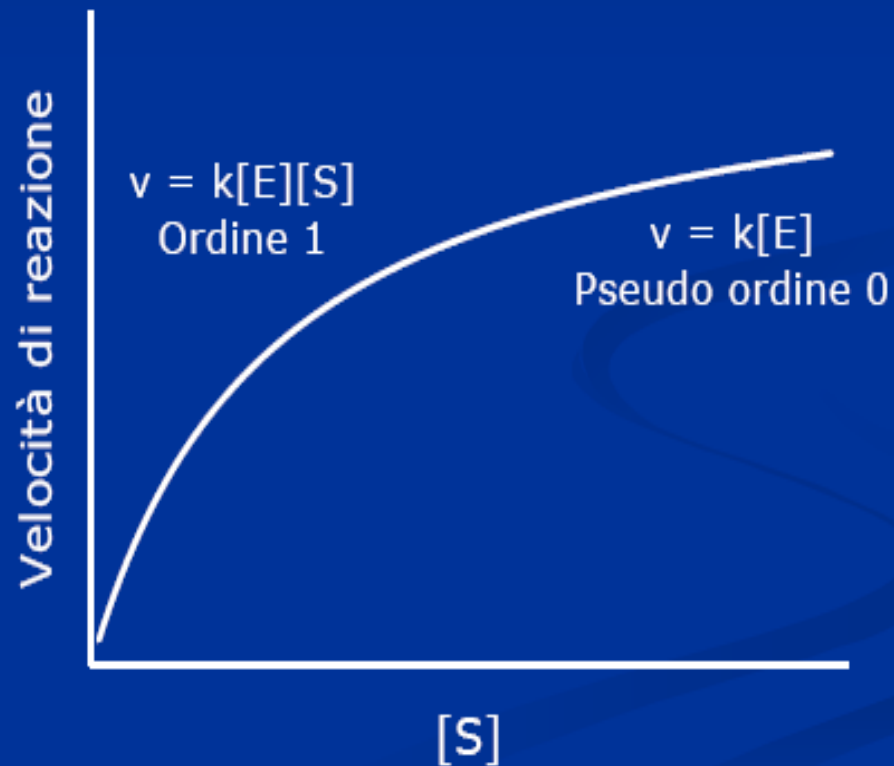
*La quantità di  $S$  trasformato è trascurabile e può essere considerata costante nel tempo*

$$[S] \gg [E_{\text{tot}}]$$



- la prima tappa è quella veloce subito S reagisce con E;
- la seconda tappa è lenta perché si devono rompere legami del complesso enzima substrato ed enzima prodotto;
- concentrazione di P sempre bassa per un margine di tempo (velocità iniziale);
- $[E] \ll [S]$

- In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile

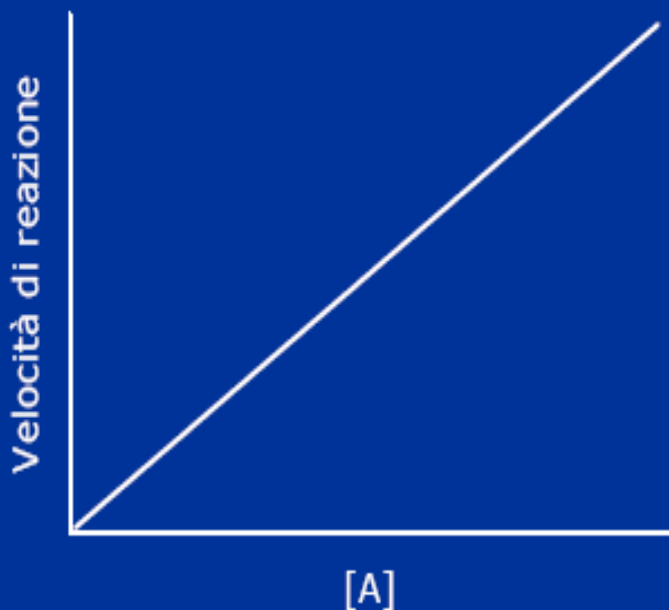




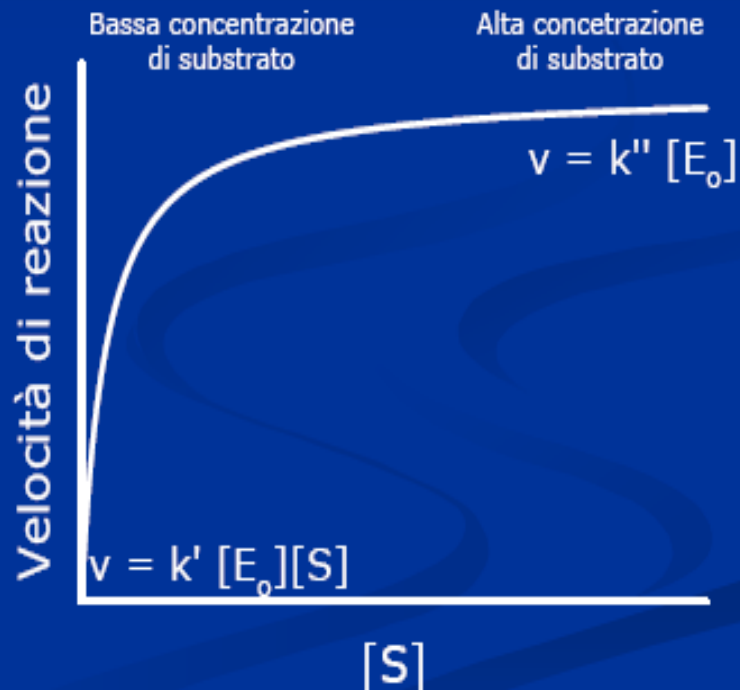
## In una reazione chimica



$$v = k \cdot [A]$$



## In una reazione enzimatica



## Cinetica di reazioni enzimatiche ad un substrato.

La prima equazione generale di velocità per una reazione enzimatica fu derivata nel 1903 da Victor Henri.

*la velocità iniziale della reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima, ma cresce in modo non lineare al crescere della concentrazione del substrato fino ad un valore limite massimo*



Leonor Michaelis  
1875–1949



Maud Menten  
1879–1960

Gli studi di Henri furono ripresi ed ampliati da Michaelis e Menten (1913) che hanno dato il nome alla

*equazione generale di velocità di reazioni enzimatiche ad un substrato.*

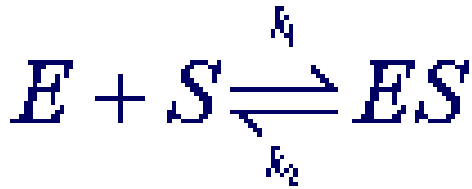
Il meccanismo di reazione proposto prevede:



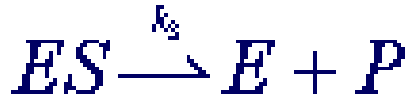
La **prima assunzione** è nota come del "quasi equilibrio" o dello "equilibrio rapido"

- ***la formazione del complesso ES è una reazione molto veloce ed è reversibile*** : Il complesso enzima-substrato è in equilibrio con l'enzima libero ed il substrato
- ***questa situazione di equilibrio non è disturbata dalla formazione del prodotto***: la velocità di formazione del prodotto a partire da ES è molto piccola rispetto alla velocità con cui ES si scinde a dare E+S





L'E si combina reversibilmente con S in una **reazione veloce**



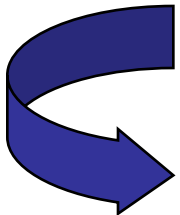
Il complesso ES si scinde in una **reazione lenta** che rappresenta la tappa limitante

**Briggs e Haldane (1925)** introdussero l'assunzione dello "**stato stazionario**"

**[ES] rimane costante**

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

assumendo  **$k_3 \ll k_2$**  cioè la *velocità di trasformazione* di ES in E+P sia trascurabile

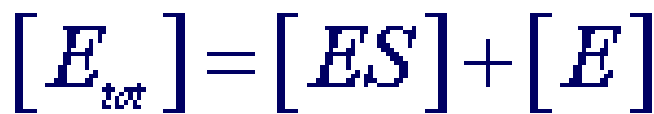


**la concentrazione di ES è costante**

**quando la sua *velocità di formazione* di ES eguaglia la sola *velocità di decomposizione* in E+S (K1=K2)**

In ogni istante l'Enzima è presente in 2 forme

**Forma libera E**  
**Forma legata ES**



Equazione di conservazione di massa per l'enzima

*La velocità della reazione sarà max quando tutto sarà come complesso ES e la concentrazione di enzima libero E sarà minima*

Questa condizione si verifica quando

**[S] >> [E]** la concentrazione del substrato è molto più grande della concentrazione dell'enzima

→ **[S] è elevata l'E reagirà velocemente con S e sarà sempre saturo con il substrato**

→ **Forma ES** → **stato stazionario**

# ENZIMA-SUBSTRATO

- In una reazione tra enzima (**E**) e substrato (**S**), possiamo distinguere tre fasi:

1. Legame tra **E** e **S** per formare il complesso **ES**



Stato prestazionario

2.  $[ES] \approx \text{cost}$

Stato stazionario

3. Scompare il substrato,  $[ES]$  diminuisce,  $v$  diminuisce

## Stato stazionario:

La conc di ES resta costante: *Velocità di sintesi = Vel di consumo*

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

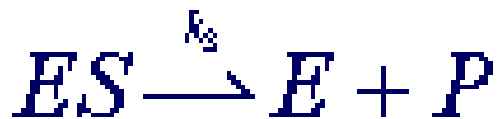
quando tutto S viene consumato

l' E torna ad essere libero



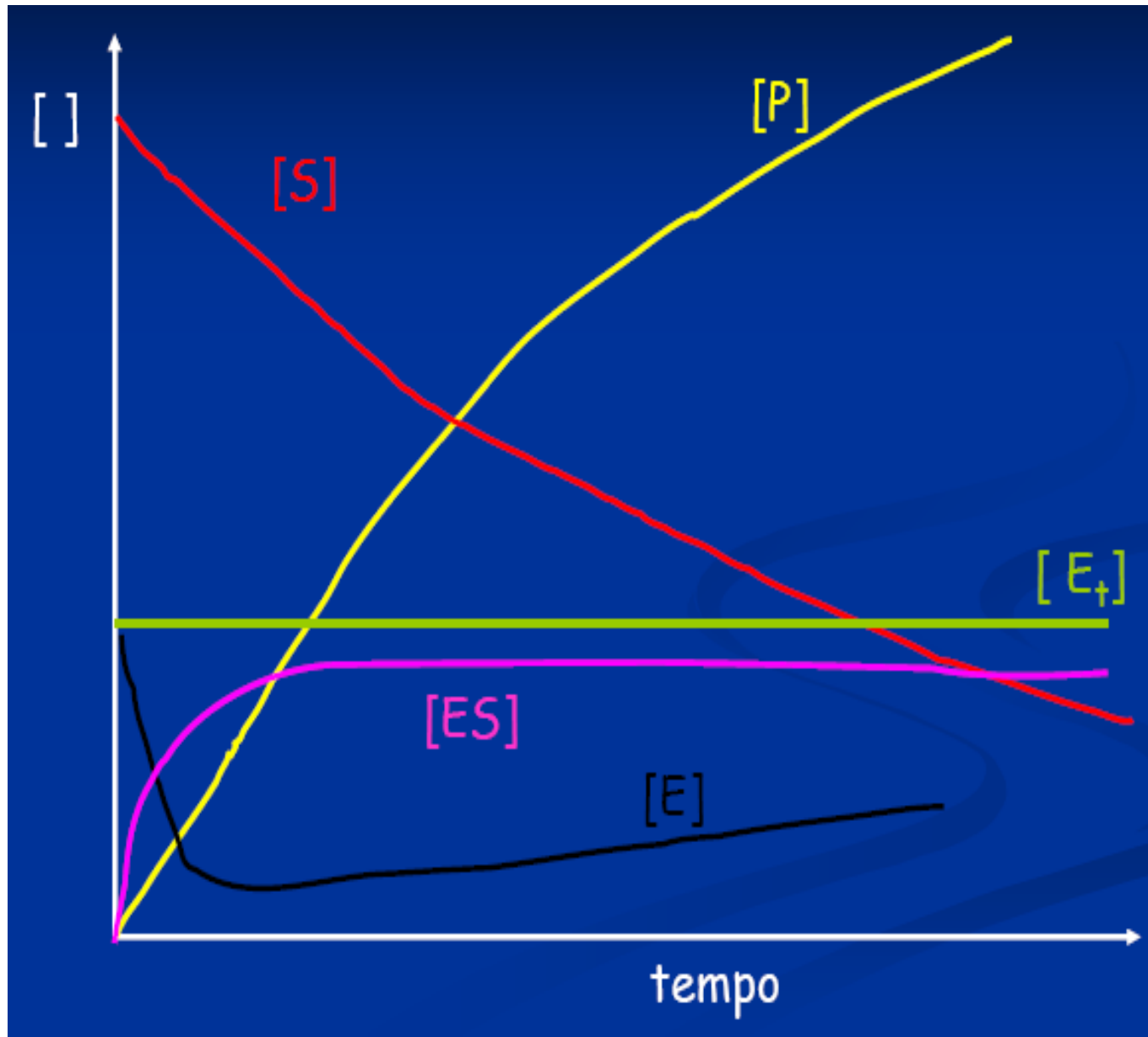
conversione max in P

l'equazione di velocità di formazione del prodotto si può esprimere come funzione della concentrazione di ES:



$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3 [ES]$$

# RAPPRESENTAZIONE GRAFICA





*Le cinetiche enzimatiche vengono di solito determinate in condizioni di Stato stazionario*

*L'assunzione  $[S] \gg [E_{tot}]$  garantisce che tutto l'enzima sia presente in forma di complesso con il substrato,*

$$[E_{tot}] = [ES] + [E]$$

per cui potremo scrivere

$$k_3 [E_{tot}] = k_3 [ES]$$

ma  $k_3 [ES]$  non è altro che la massima velocità ottenibile per una data quantità di enzima in condizioni di saturazione del substrato.



$$k_3 [ES] = V_{max}$$

l'equazione di velocità delle reazioni enzimatiche viene descritta con l'equazione di Michaelis-Menten:

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

- **la velocità iniziale di una reazione enzimatica**

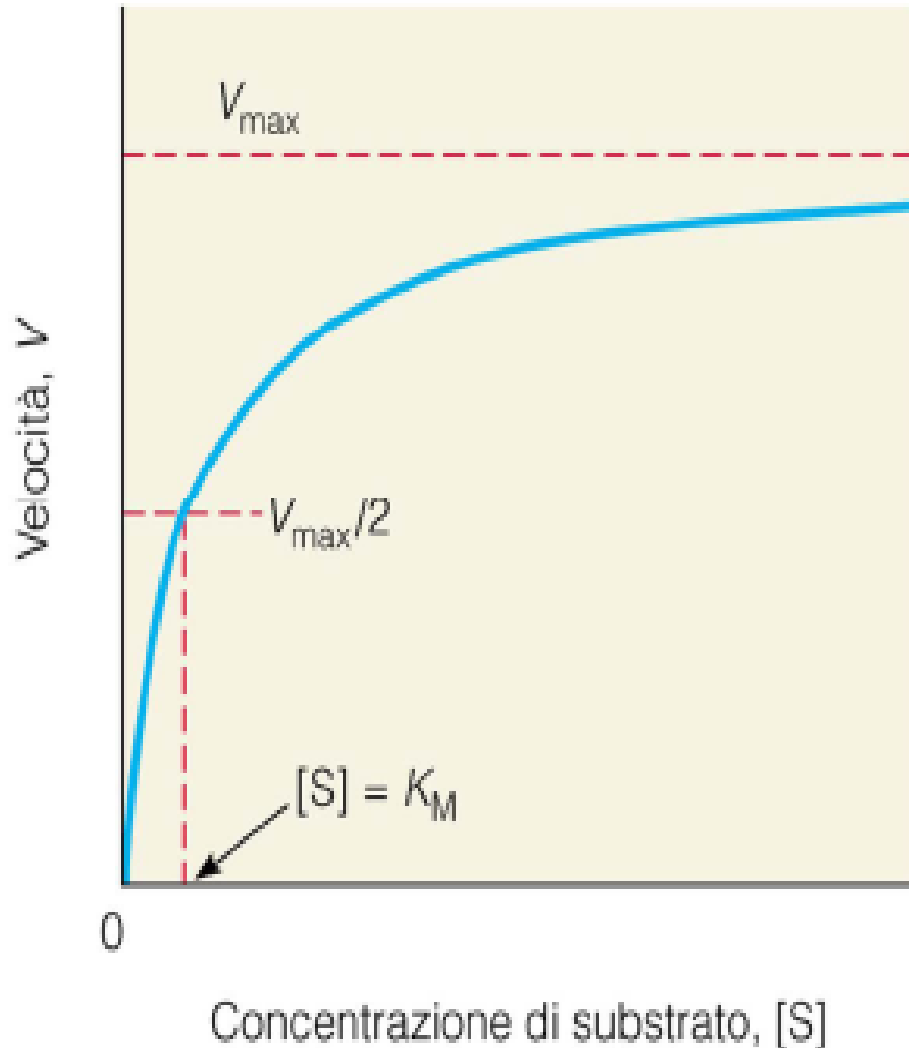
ad un substrato è in relazione tramite due costanti

( $V_{\max}$  e  $K_m$ ) con la sola **concentrazione del substrato**, che

- **La concentrazione del substrato per la assunzione**

$[S] \gg [E_{\text{tot}}]$  è assimilabile sempre alla

concentrazione **iniziale** di substrato.



- La  **$V_{max}$**  indica la saturazione dell'enzima a  $[S]$  infinita
- La  **$K_M$**  è una costante che dipende dal sistema enzimatico considerato, correlata alla costante di dissociazione di ES , rappresenta

la *concentrazione di S* richiesta perché la vel di reazione sia

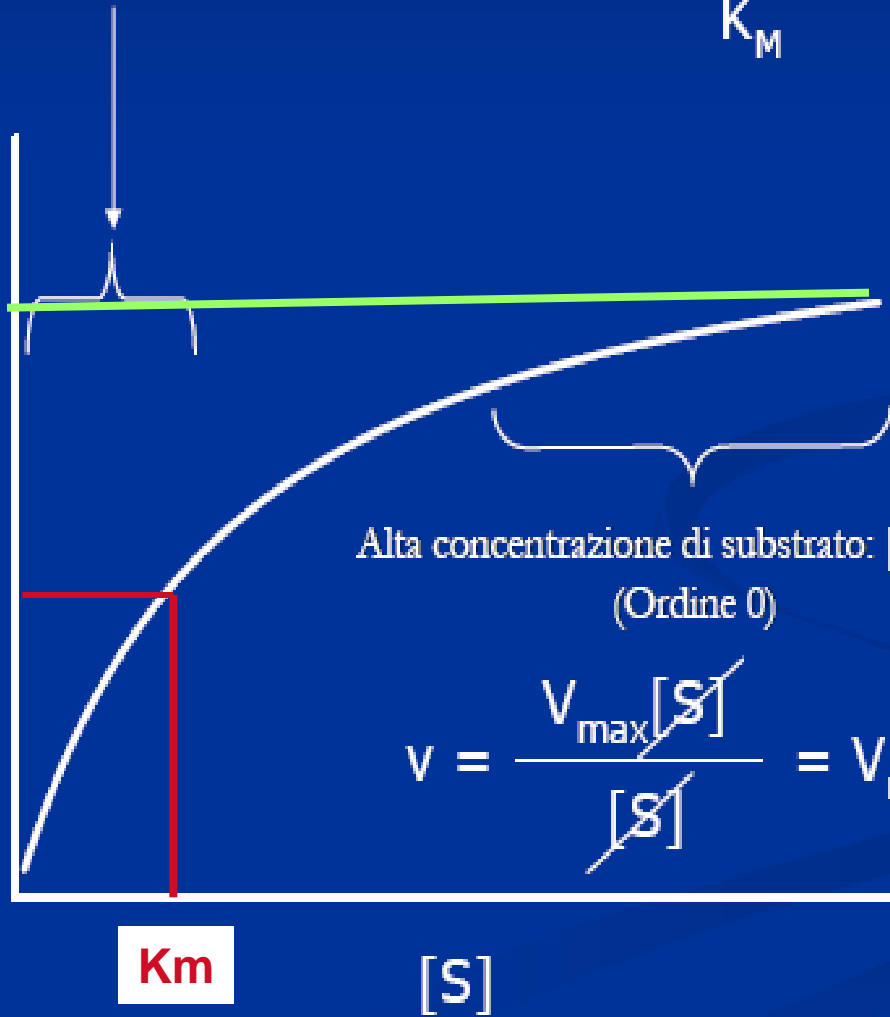
$$V = \frac{1}{2} \text{ della } V_{max}$$

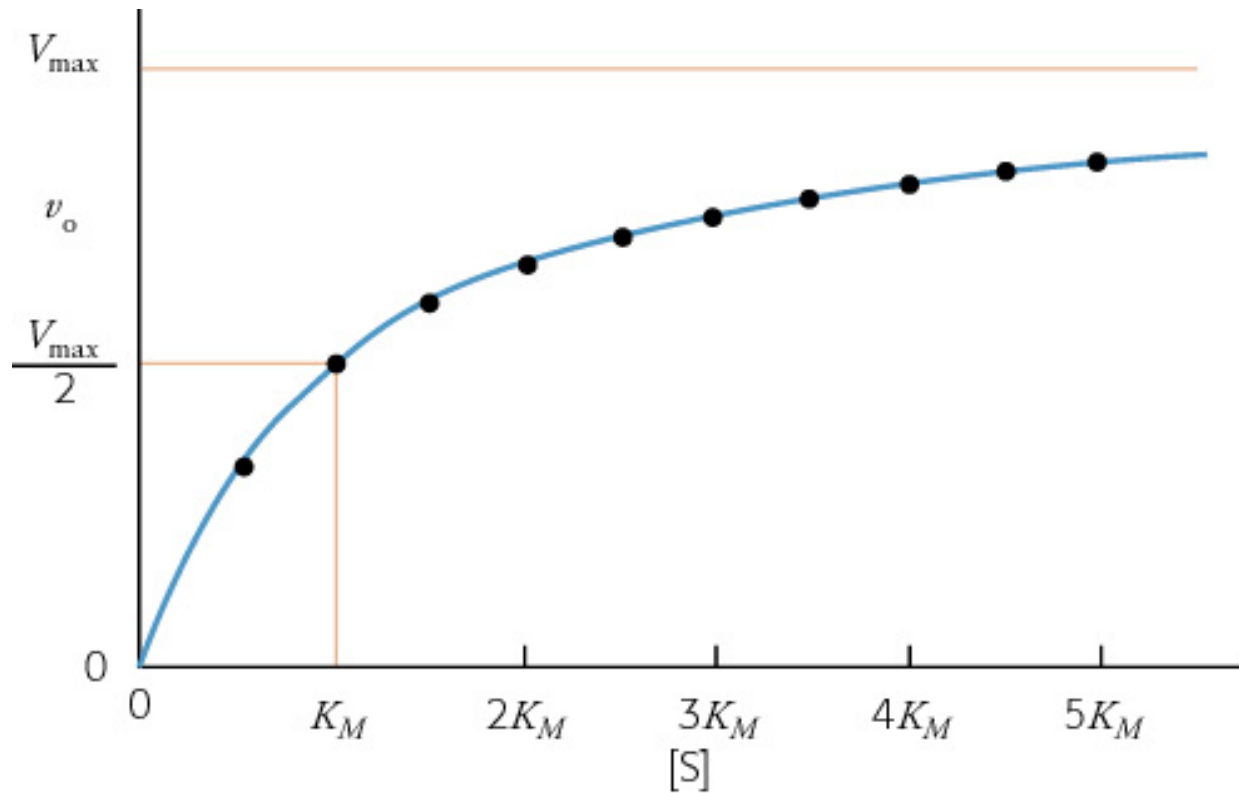
Bassa concentrazione (relativamente) di substrato:  $[S] \ll K_M$  (Ordine 1)

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

**Vmax**

Velocità di reazione





***Minore è il valore di  $K_M$   $\longrightarrow$  maggiore sarà il legame (affinità) fra E e S***

Solitamente  **$1 \mu\text{M} < K_M < 1 \text{mM}$**

- Conoscendo la  $V_{max}$  e la  $K_M$  di un enzima si può calcolare la velocità di reazione ad una data concentrazione di S
- Un E. che catalizza una reazione fra 2 o + substrati diversi avrà una diversa  $K_M$  per ciascun substrato

## Importanza della $K_m$ :

- Rappresenta una misura inversa dell'affinità dell'E per un dato S:

Minore è la  $K_m$   $\longrightarrow$  + stabile è il complesso ES

- Se lo stesso E catalizza una reazione con 2 substrati simili

Es: Glucosio e Fruttosio

$\longrightarrow$  Il substrato su cui agirà + di frequente è quello con  $K_m$  minore

- La  **$K_m$**  dà informazioni sulla concentrazione di un substrato nel comparto cellulare dove avviene la reazione:

Enzimi che catalizzano reazioni a **concentrazioni elevate** di substrato (saccarosio)  $\longrightarrow$  avranno  **$K_m$  elevate**

Enzimi che catalizzano reazioni con substrati presenti a **concentrazioni molto basse** (ormoni)  $\longrightarrow$   **$K_m$  piccole**

## Significato dei parametri di Michaeli-Menten

Significato della Kcat (Kp): La costante catalitica

La costante catalitica è detta spesso numero di turnover dell'enzima perché rappresenta il numero massimo di molecole di substrato convertito in prodotto per sito attivo per unità di tempo, o il numero di volte che l'enzima <turnover> (<reinizia>) per unità di tempo.

La Kcat è una costante di velocità di primo ordine che si riferisce alle proprietà e alle reazioni dei complessi enzima-substrato [ES], enzima-intermedio [EX] e enzima-prodotto [EP].

E' possibile definire la *costante catalitica*, Kcat, di un enzima come:

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

# EQUAZIONE DI LINEWEAVER – BURK O DIAGRAMMA DEI DOPPI RECIPROCI

È il metodo migliore per calcolare  $K_M$  e  $V_{max}$

è il reciproco dell'equazione di Michaelis-Menten:

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

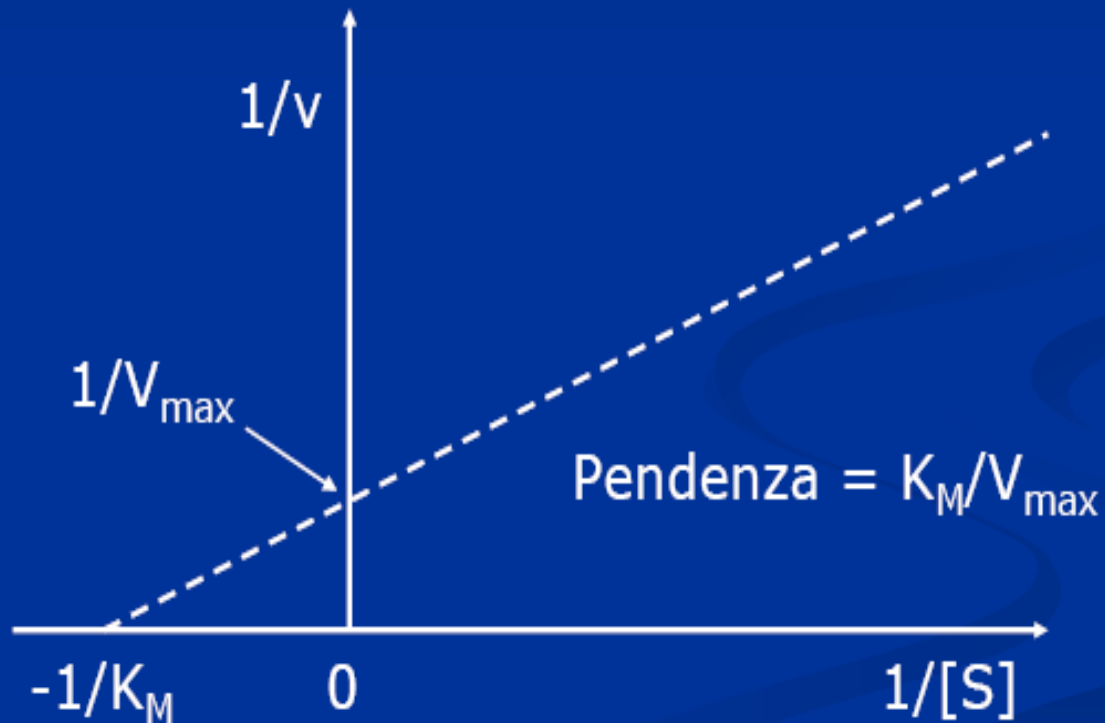
Inversione

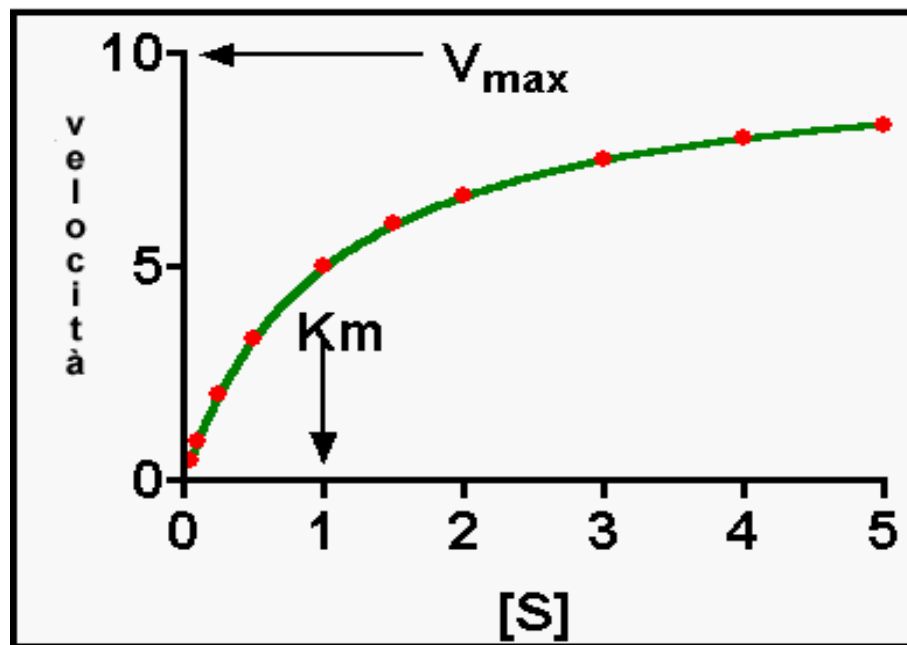
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



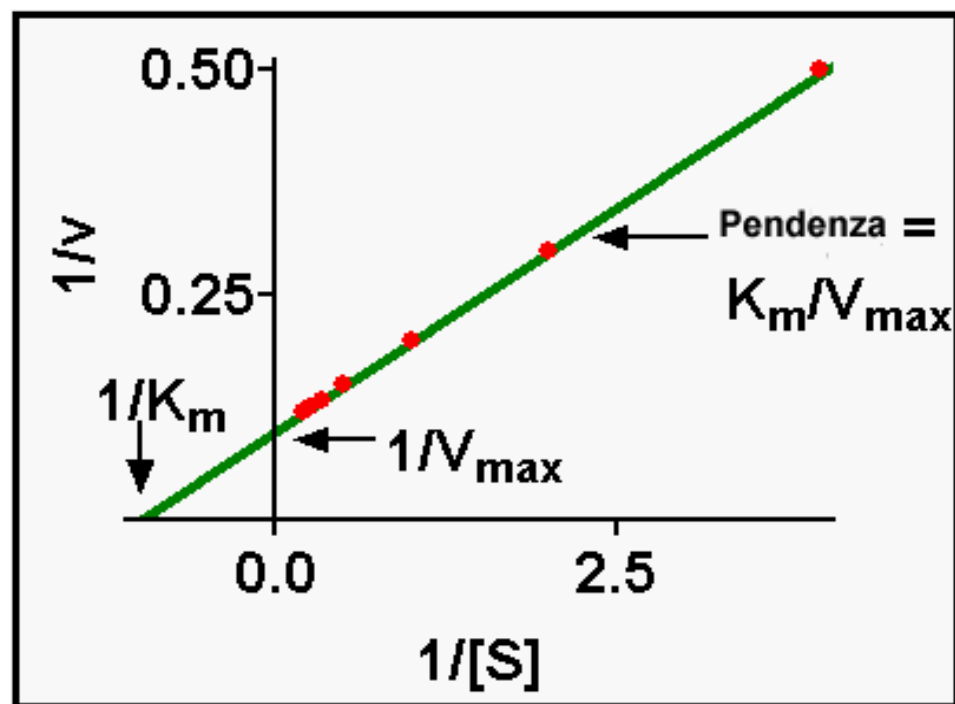
## E' l'equazione di una retta

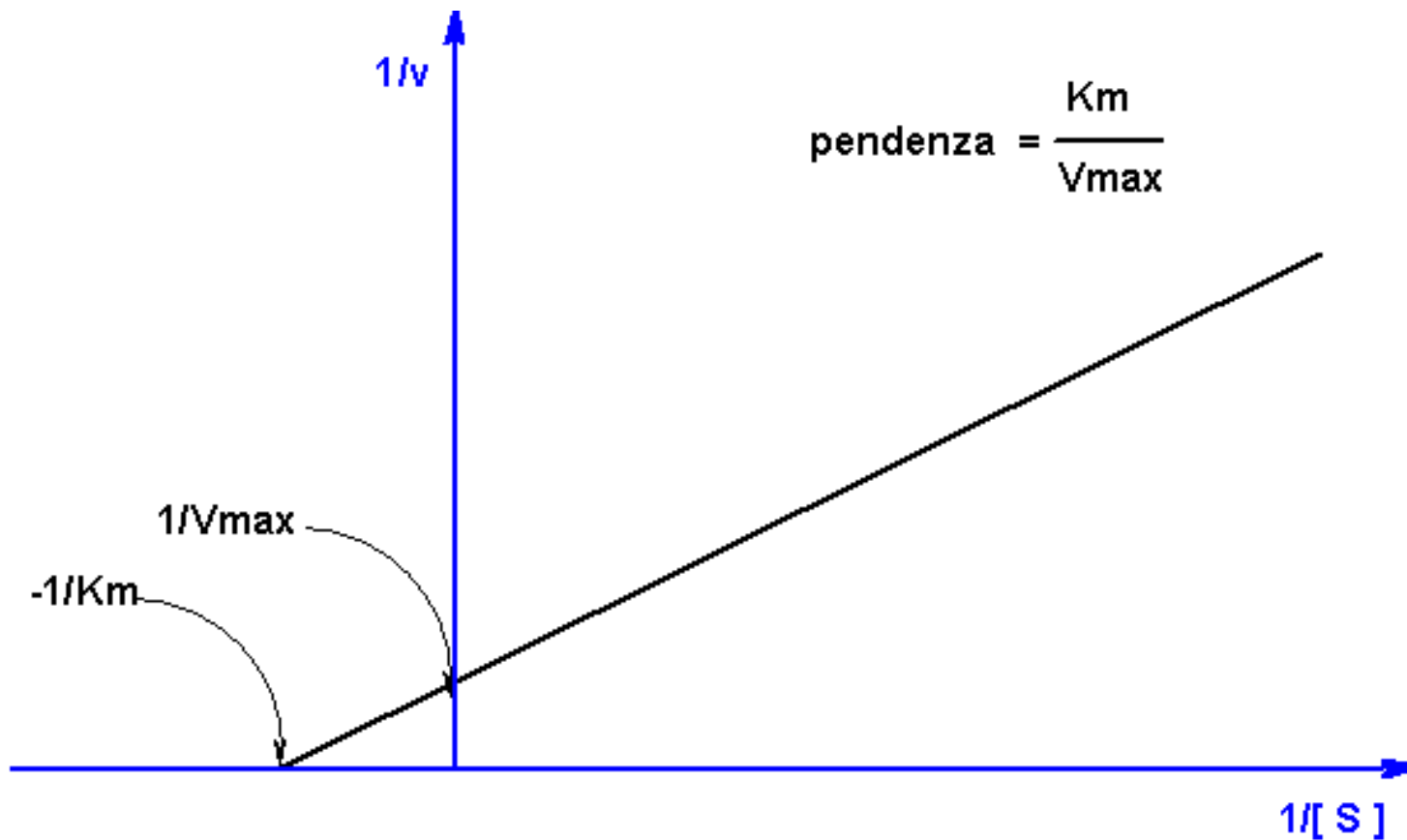
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$





$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M}$$



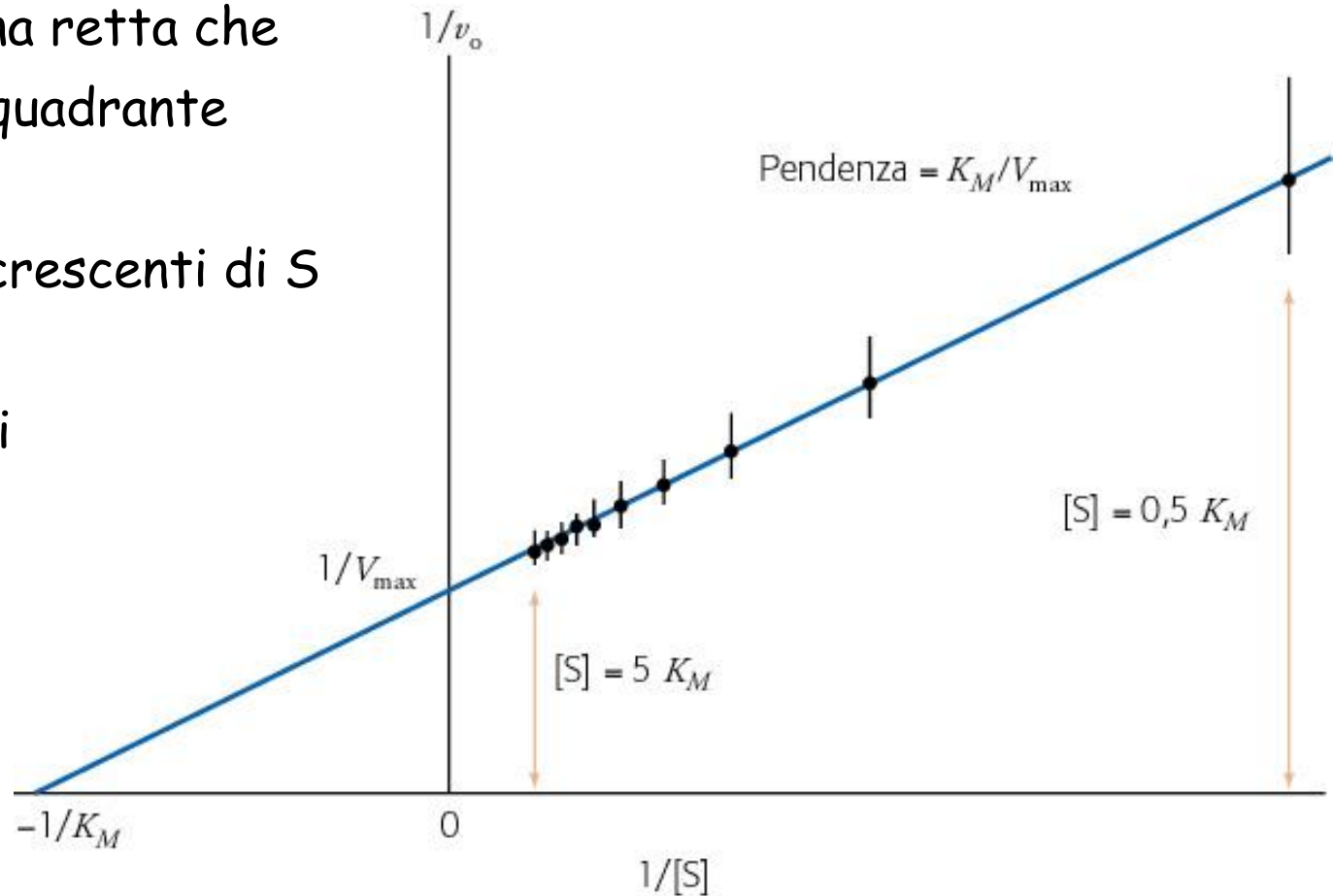


- le variabili sono  $1/v$  e  $1/[S]$
- $1/V_{max}$  è l' intercetta sull' asse  $y$
- $-1/K_m$  è l' intercetta sull' asse  $x$ .

E' l'equazione di una retta che occupa il I° e II° quadrante

A concentrazioni crescenti di S  
la retta assume  
valori decrescenti  
e si può calcolare  
1/Vmax

Migliore situazione  
nell'intervallo



$0,5 K_M < [S] < 5 K_M$

- Quando la  $[S]$  è elevata i punti tendono ad affollarsi

Uno svantaggio è che per molti valori di  $[S]$  si va nel quadrante sinistro del grafico

# INIBIZIONE ENZIMATICA

INIBITORE= qualsiasi agente in grado di diminuire la velocità di una reazione catalizzata

*INATTIVATORE* quando l'inibizione è irreversibile

Inibitori

IRREVERSIBILI



formano legami covalenti con gli enzimi

denaturano gli Enzimi

Inibitori REVERSIBILI



formano legami deboli e non covalenti

## **3 tipi di inibizione reversibile:**

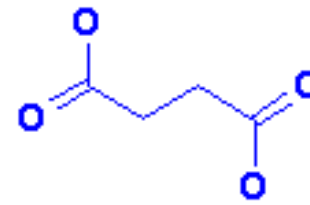
- Inibizione **COMPETITIVA**  
Aumenta la  $K_m$  e non ha nessun effetto sulla  $V_{max}$
- Inibizione **NON COMPETITIVA**  
Diminuisce  $V_{max}$ , la  $K_m$  resta inalterata
- Inibizione **INCOMPETITIVA**  
Diminuiscono  $K_m$  e  $V_{max}$

# Inibizione competitiva

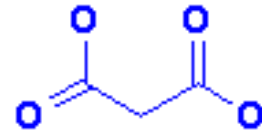
## L'inibitore competitivo

*compete con S per il sito catalitico*

- È una molecola molto simile a S
- Può adattarsi e legarsi al sito dell'E ma non può reagire con l'E

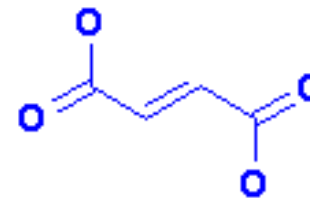


ac. succinico



ac. malonico

succinico deidrogenasi



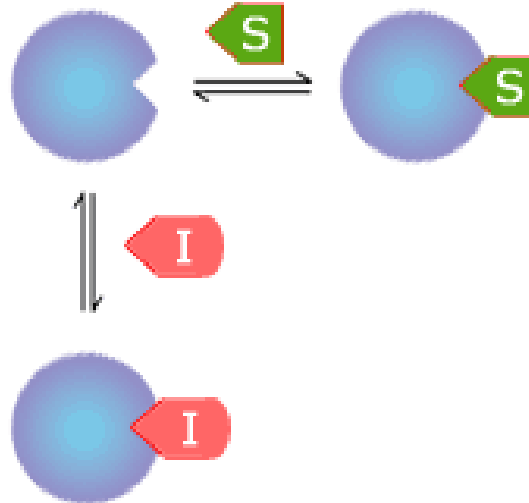
fumarato



+  
I

$\rightleftharpoons$   
 $K_1$

EI



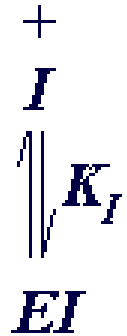
Es. inibizione competitiva:

L'acido malonico è in grado di legarsi nel sito attivo dell'enzima, ma non può essere ossidato avendo un solo gruppo CH<sub>2</sub>

**Inibizione competitiva**



per l'assunzione dell'equilibrio rapido

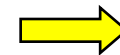


$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad \text{e} \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$$



*+ basso è il valore di  $K_I$ , maggiore è l'inibizione*

Parte dell'enzima è sottratto alla reazione come EI

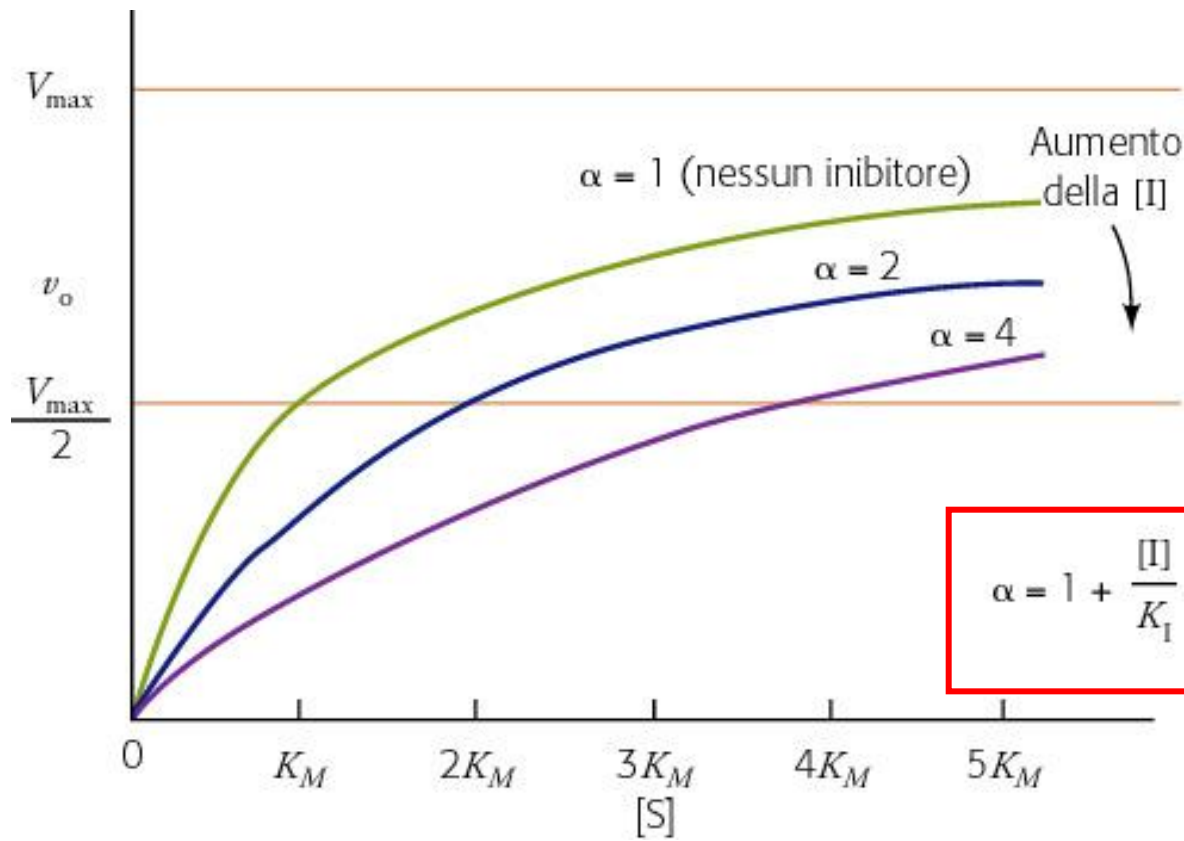
*diminuzione dell'affinità per S*



aumento della  $K_m$



**$K_m$  apparente**



$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_s \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

Aumento della Km di un fattore  $\alpha = (1 + [I] / KI)$

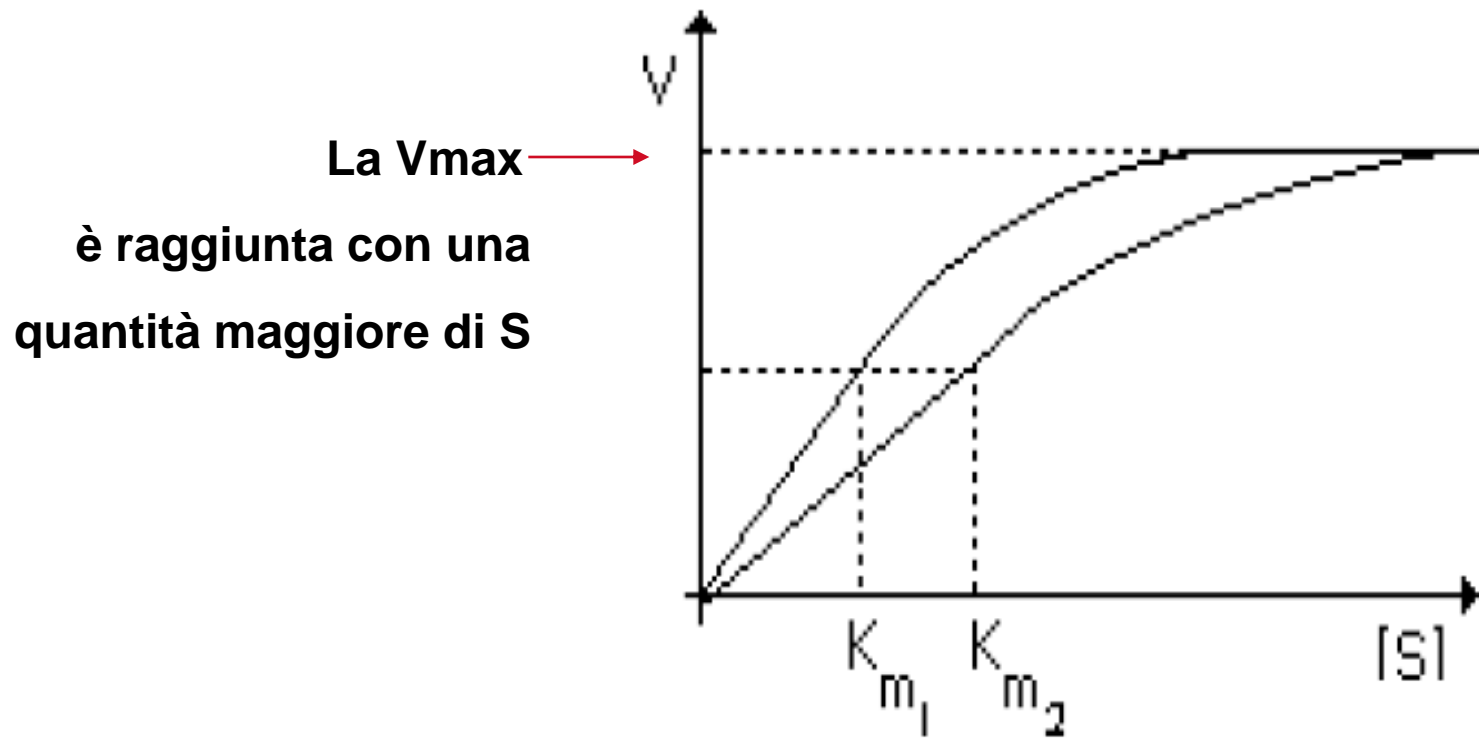
La velocità massima della reazione non è influenzata dalla presenza dell'inibitore ad elevate concentrazioni di substrato tutto l'enzima viene complessato in forma di ES.



**la reazione è rallentata**

**la Vmax è raggiunta + tardi**



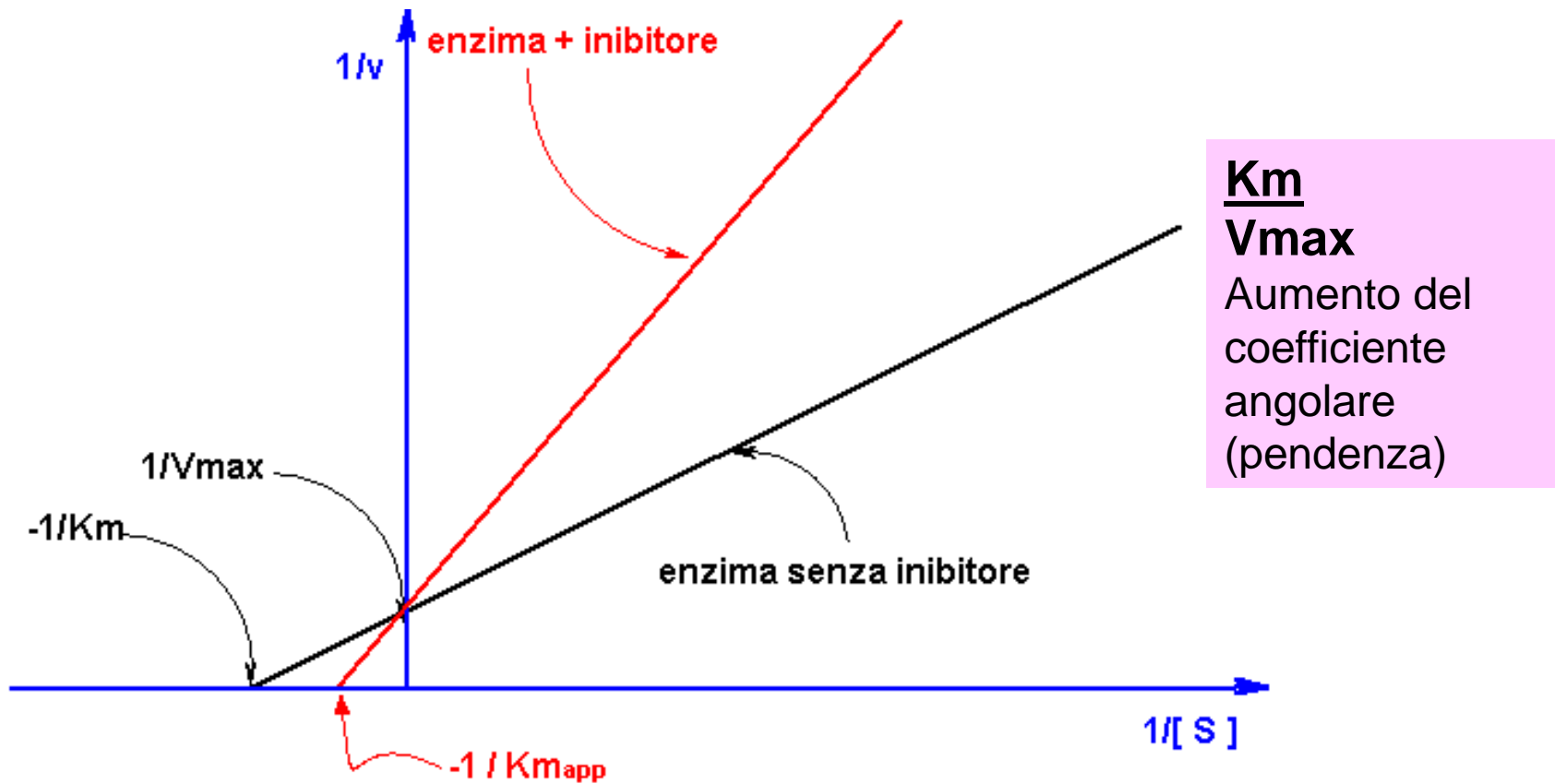


$K_{m_1}$  Enzima non inibito

$K_{m_2}$  Enzima inibito



$$K_{m_1} < K_{m_2}$$



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

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

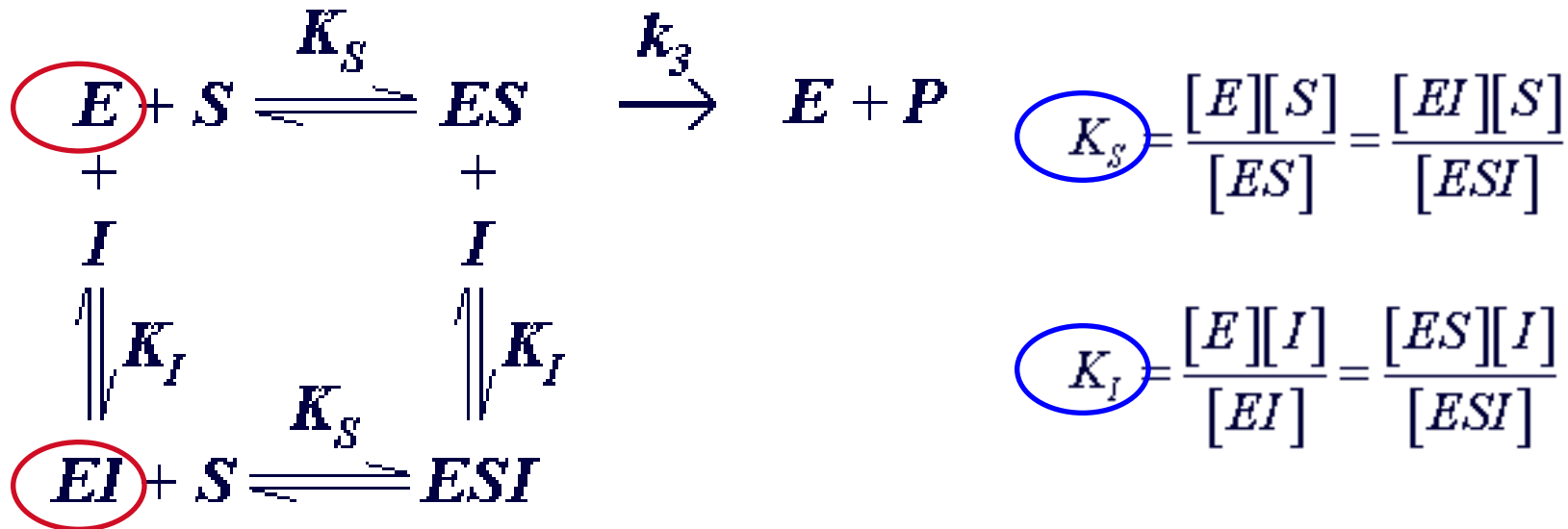
La  $K_m$  apparente non è costante  
 è in funzione del fattore  $a$  che considera  $[I]$

## • Inibizione non competitiva

- Un inibitore non competitivo è una sostanza che si lega sia **all'enzima libero** che al **complesso ES**
- *La presenza di I non impedisce ad S di legarsi ( e viceversa)*



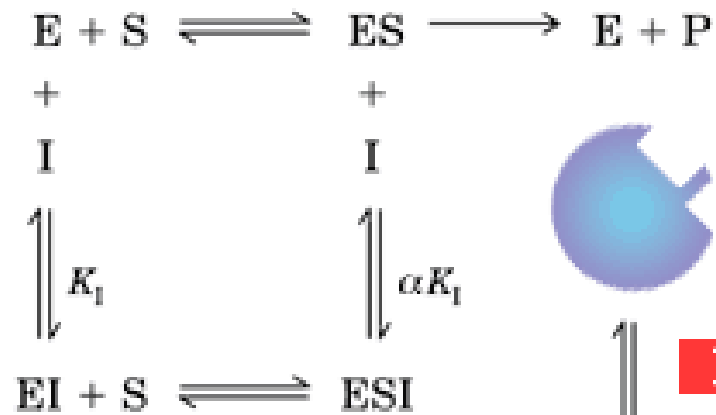
l'inibitore non ha alcun effetto sul legame del substrato con l'enzima, ed il **substrato** non ha alcun effetto sulla formazione del legame tra **inibitore** ed enzima, in quanto entrambi si legano reversibilmente all'enzima in **siti differenti**.



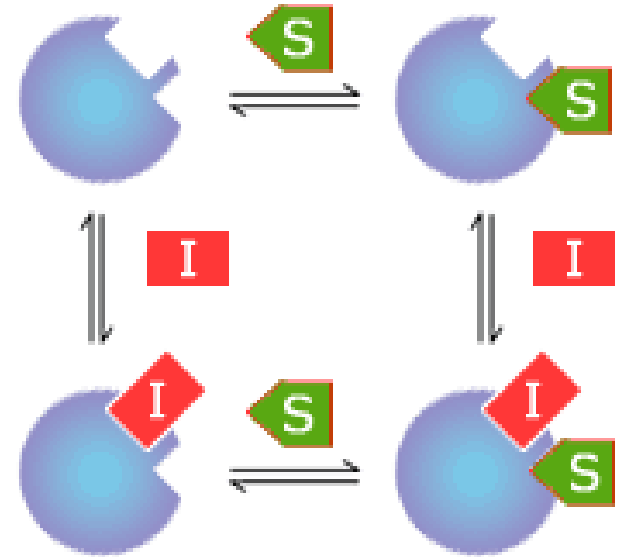
*ES ed ESI hanno le stesse costanti di dissociazione*

→ **E ed EI hanno quindi uguale affinità per S**

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



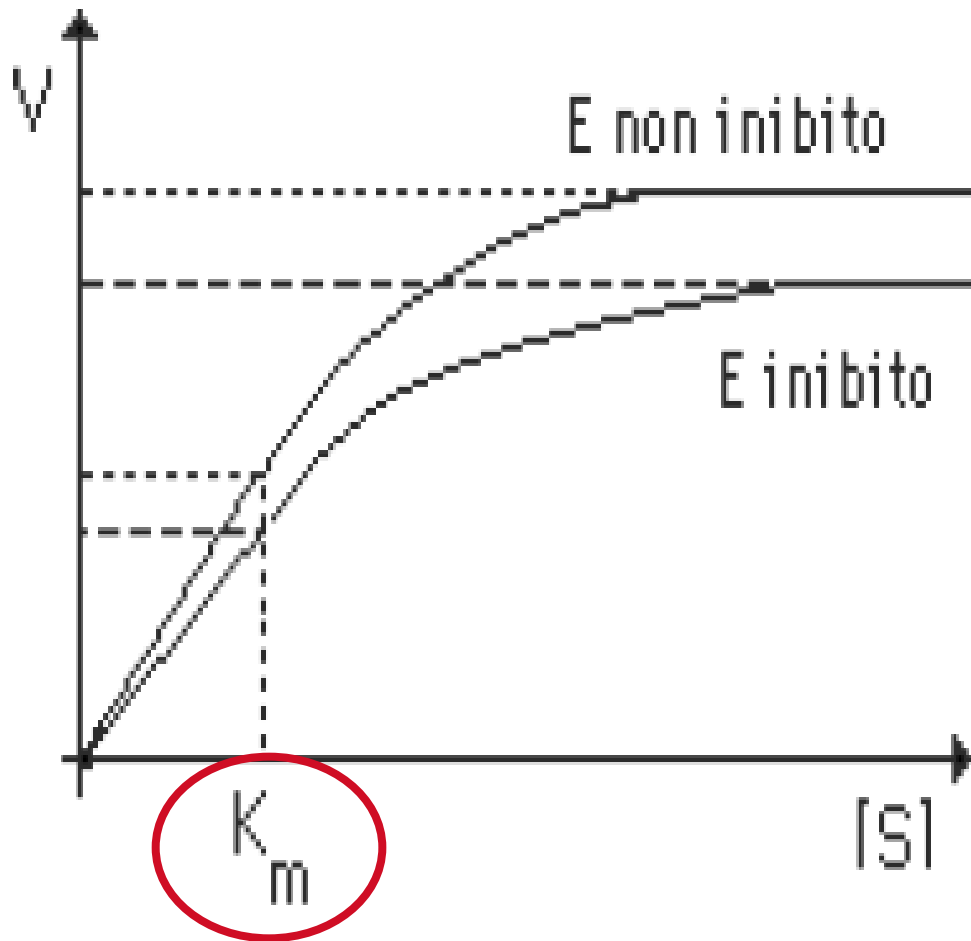
Inibizione mista



➔ La presenza di uno di essi non ha alcun effetto sulla costante di dissociazione dell'altro, ma **il complesso ESI è inattivo**

in presenza di I, anche ad infinite concentrazioni di S, l'enzima non potrà essere tutto sotto forma di ES, ma parte rimarrà come complesso non-produttivo ESI.

➔ **La presenza di un inibitore non competitivo fa sembrare che meno enzima sia presente**



$V_{max 1}$

$V_{max 2}$

$V_{max 2} < V_{max 1}$

**Gli inibitori si legano reversibilmente in un sito diverso dal sito attivo.**

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

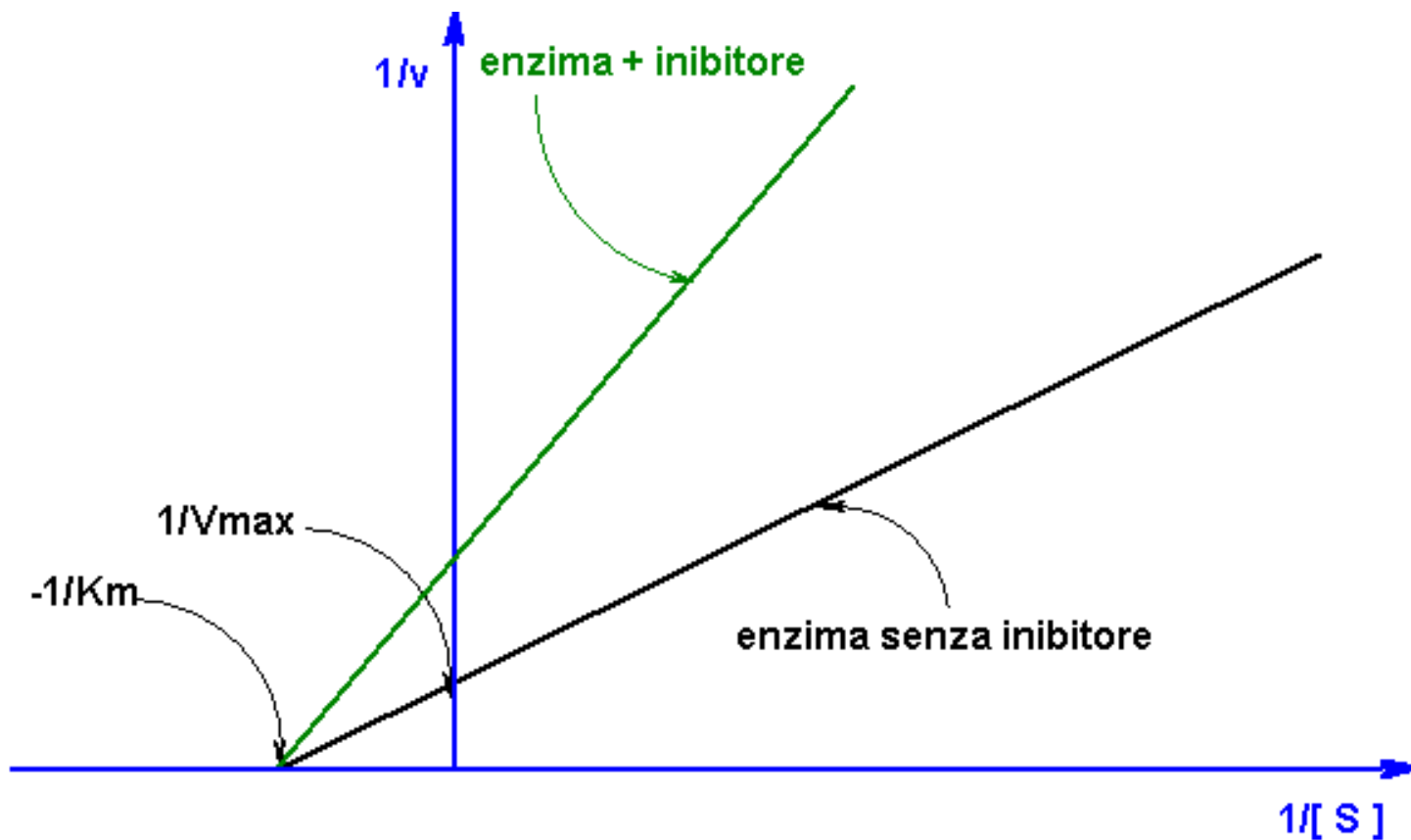


**V<sub>max</sub>** sarà più bassa in presenza dell'inibitore;

**la K<sub>m</sub>** non sarà variata in quanto

i complessi ES ed ESI hanno le stesse costanti di dissociazione

**E ed EI hanno quindi uguale affinità per S**



- *Strutturalmente gli inibitori non competitivi sono meno simili a S rispetto a quelli competitivi* **Sono metalli pesanti, fluoruri**

Es:

l'eccesso di  $O_2$  può provocare l'ossidazione di gruppi -SH vicini :

- rimozione di H
- formazione di ponti S—S



Modificazione della struttura dell'Enzima

Il sito attivo non può + combinarsi con S

Anche gli **agenti denaturanti** per le proteine:

**Acidi e basi forti, detergenti, urea**



Rottura legami H

Inibizione non competitiva



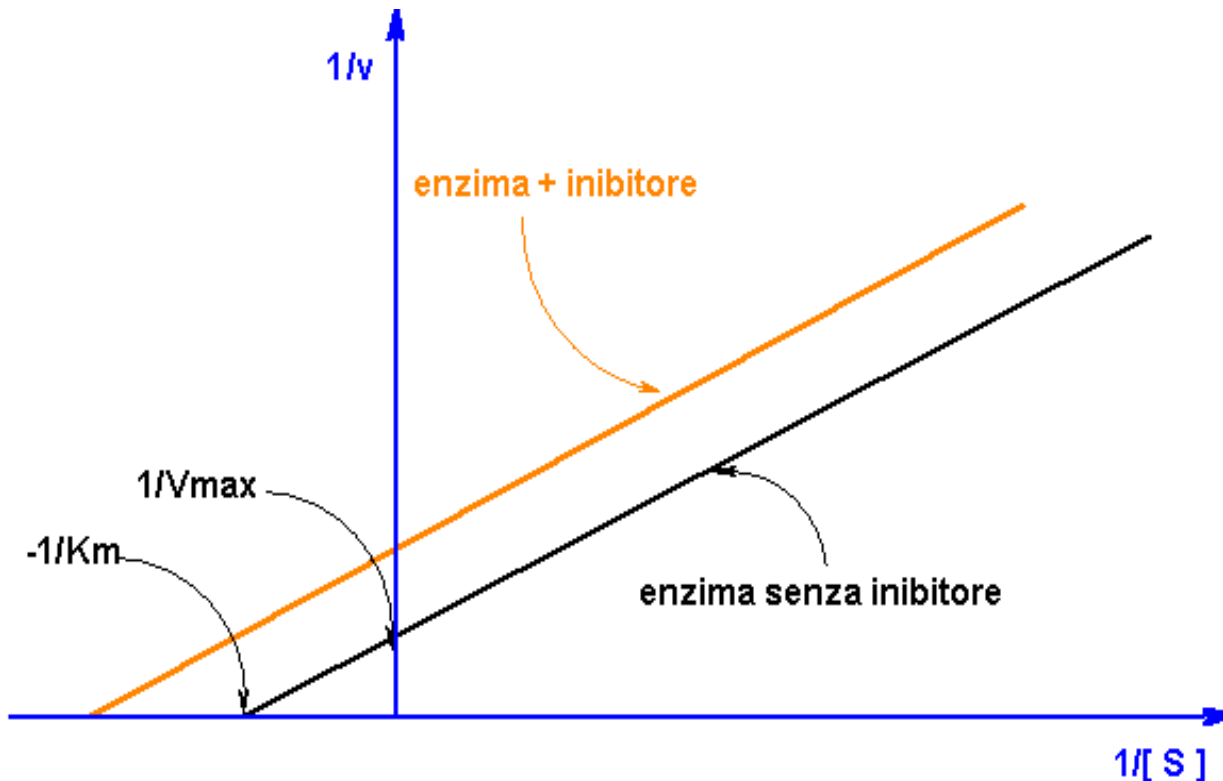


presenza di rette parallele:

- *la  $V_{max}$  e la  $K_m$  sono diminuite dello stesso fattore.*

- La  $V_{max}$  raggiunta è inferiore a quella dell'E non inibito
- *il valore della  $K_m$  apparente sarà più basso:*

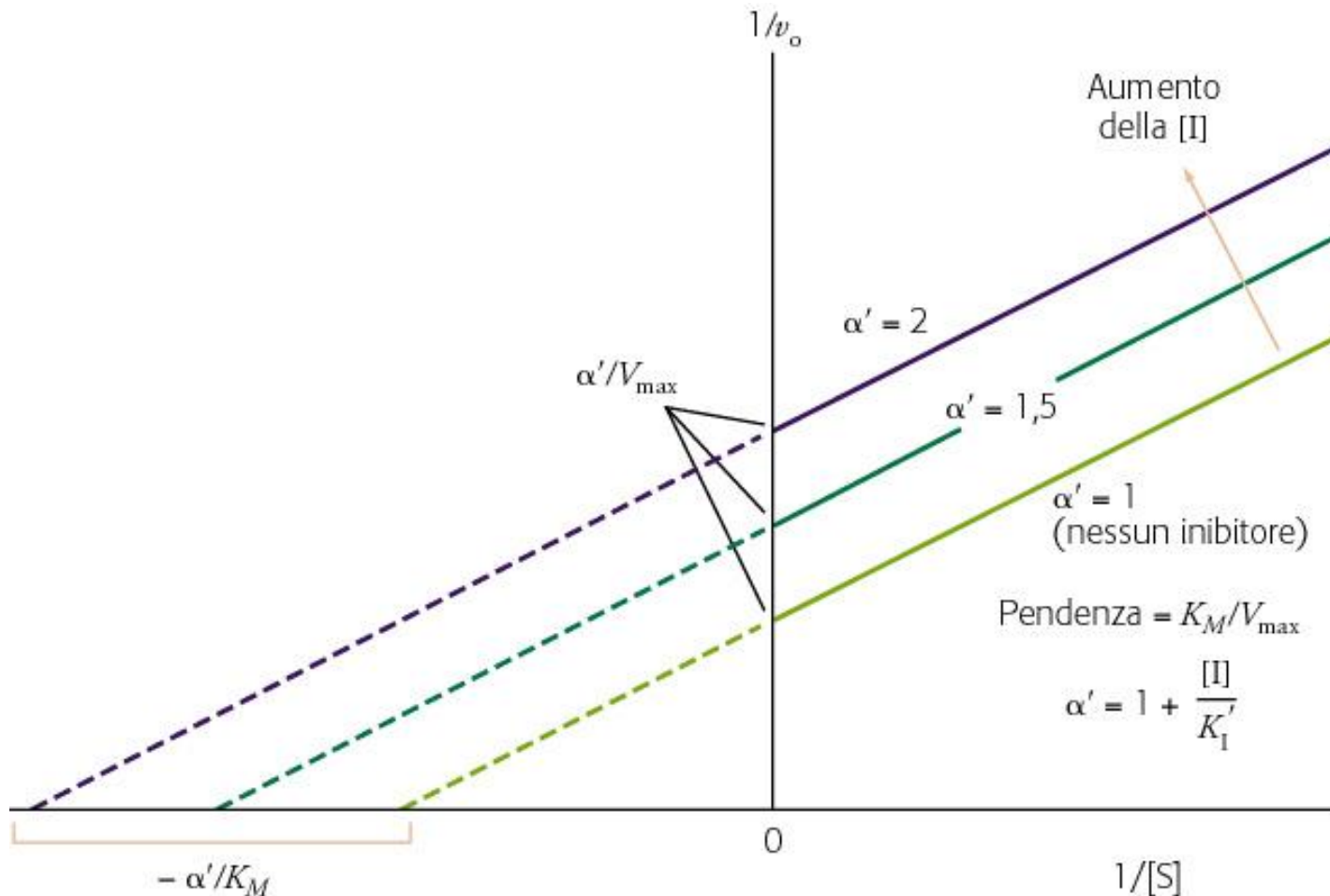
*il complesso  $ESI$  non può liberare il substrato,  
mostrando per esso una affinità infinita ( $K_S = 0$ ).*



• **L'inibizione aumenta con l'aumento della concentrazione di S**, in quanto l'inibitore incompetitivo si lega al solo complesso ES, e la  $[ES]$  cresce al crescere di  $[S]$ .

*L'inibitore incompetitivo è inibitore per il suo effetto sulla  $V_{max}$ , ma è virtualmente un attivatore per quanto riguarda la  $K_M$*

- Gli inibitori incompetitivi sono poco rappresentati:



# pH

Ogni enzima ha il suo valore ottimale di pH

In genere

$$6 > \text{pH ottimale} < 8$$

I diagrammi delle attività enzimatiche in  
Funzione del pH possono essere:

1. **Curve a campana**

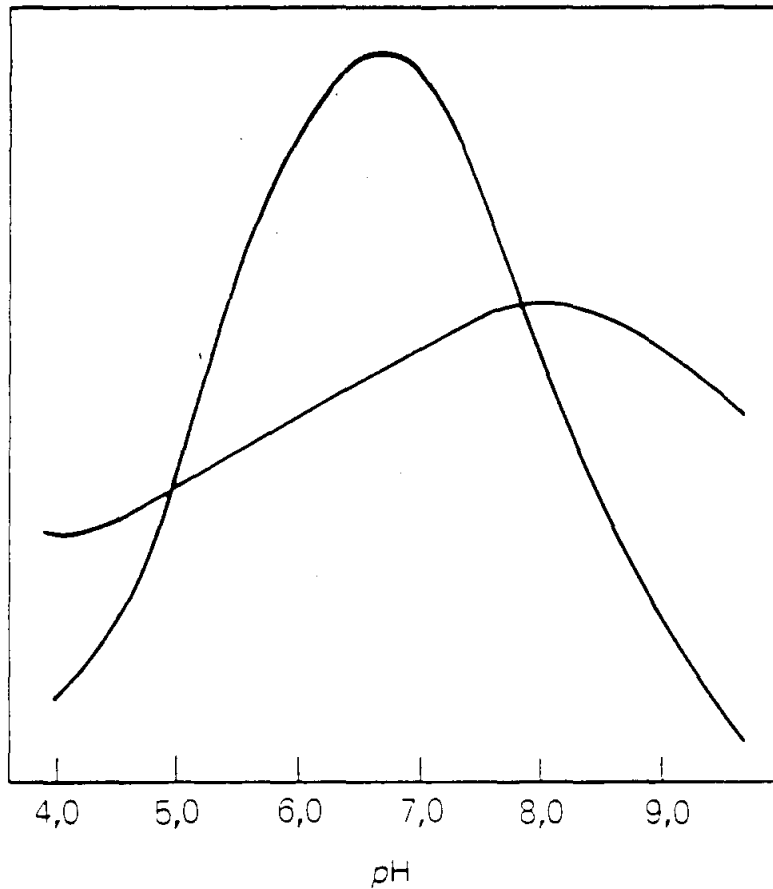
2. **Curve quasi piatte**

- a valori estremi di pH



*Denaturazione dell'enzima*

- *Il pH influenza anche la ionizzazione dei Gruppi COOH e NH<sub>2</sub>  
importanti per l'attività catalitica*



# Temperatura

Le piante non possono regolare la loro temperatura

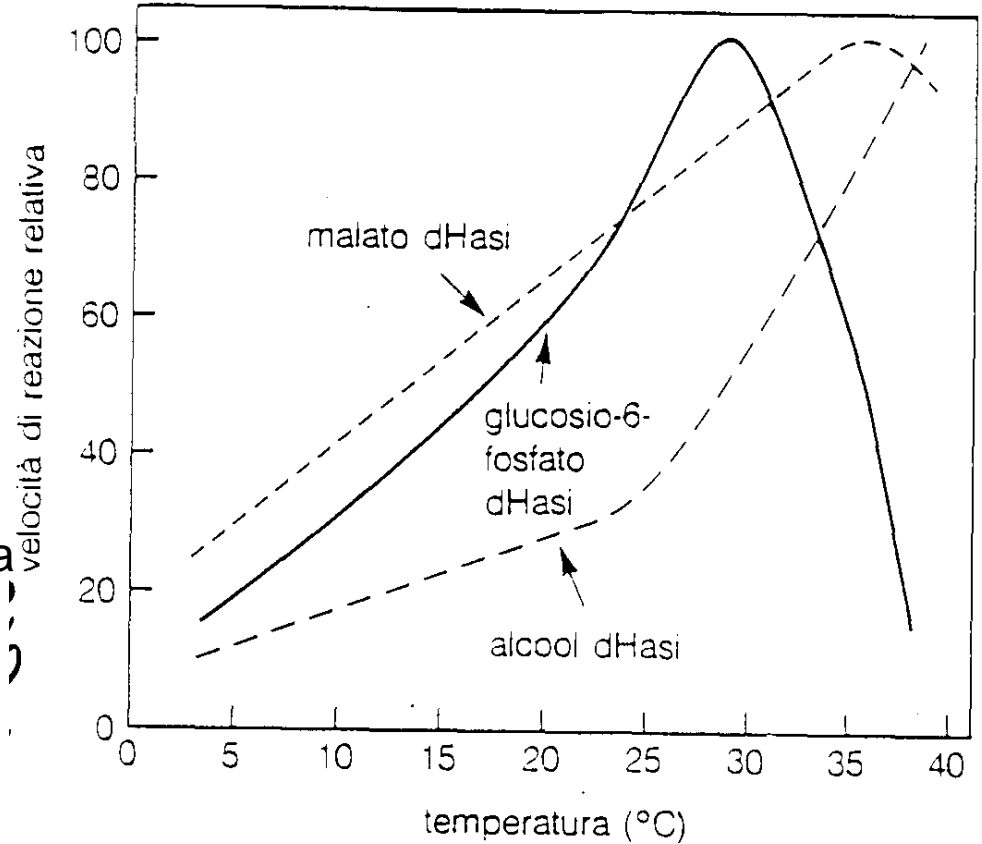
**la velocità delle reazioni enzimatiche aumenta da 0° a 35-40°C**

➔ Aumento dell'energia cinetica delle molecole

- La temperatura può agire modificando la **conformazione** dell'enzima

➔ Effetto sulla  $K_m$  e  $V_{max}$

- Enzimi diversi, ma della stessa famiglia possono rispondere in modo diverso alla temperatura



**A temp > 35-40°C o Temp basse :**

**Denaturazione = Inattivazione dell'enzima**

Le temperature ottimali dipendono dall'habitat delle piante :

- Nelle piante alpine e artiche :

Enzimi fotosintetici con una temp ottimale di 10-15°C

- Nelle piante dei climi temperati ( mais )

la temperatura ottimale per gli stessi enzimi è 30°C

## ISOZIMI

enzimi in grado di agire sullo stesso substrato e di convertirlo nello stesso prodotto, sono molto simili  
*hanno piccole differenze nella sequenza degli a.a*




Differenze **codificate a livello genetico, traduzionale**

Una pianta con isozimi differenti in grado di catalizzare la stessa reazione



Gli isozimi differiscono nella risposta a fattori ambientali

Le **ISOFORME** degli enzimi sono ***modificazioni post-traduzionali*** :  
Gli E. dopo la sintesi subiscono modificazioni chimiche  
 che possono influenzare la loro attività catalitica

Le isoforme sono codificate dallo stesso gene  ***stessa sequenza di a.a.***

Le modificazioni successive sono dovute a:

- ***Fosforilazione*** di un -OH di un a.a.
- ***Glicosilazione*** attacco di 1 o + zuccheri
- ***Metilazione*** attacco di -CH<sub>3</sub>

Tali modificazioni che possono avvenire nella stessa cellula e in diversi stadi di sviluppo inducono un altro tipo di regolazione sull'enzima. Es:

*La luce* induce segnali nelle piante che si traducono in meccanismi di fosforilazione o defosforilazione di certe proteine enzimatiche

 L'enzima modificato risponde meglio all'ambiente

L'azione di enzimi può essere inibita da

- **ioni o molecole estranei**  $\Longrightarrow$  alterazione della configurazione

$\Longrightarrow$  mancata formazione del complesso ES

- **normali costituenti cellulari, prodotti del metabolismo**

$\Longrightarrow$  attivazione o inibizione dell'attività enzimatica



INIBIZIONE da feedback o da prodotto finale

È l'inibizione a carico di un *metabolita non correlato chimicamente* al normale substrato su cui agisce l'enzima inibito

È un importante meccanismo di regolazione metabolica

$\longrightarrow$  gli organismi producono solo quantità adeguate dei composti che utilizzano

**INIBIZIONE da feedback o da prodotto finale** si verifica solo quando **f** è in concentrazione elevata

## ATTIVAZIONE

a è il substrato di 2 enzimi con 2 diverse vie e 2 diversi prodotti finali:

*Una sintesi eccessiva di k viene impedita dall'attivazione di k sull'E della 1° reazione nella sequenza che porta alla formazione di e*

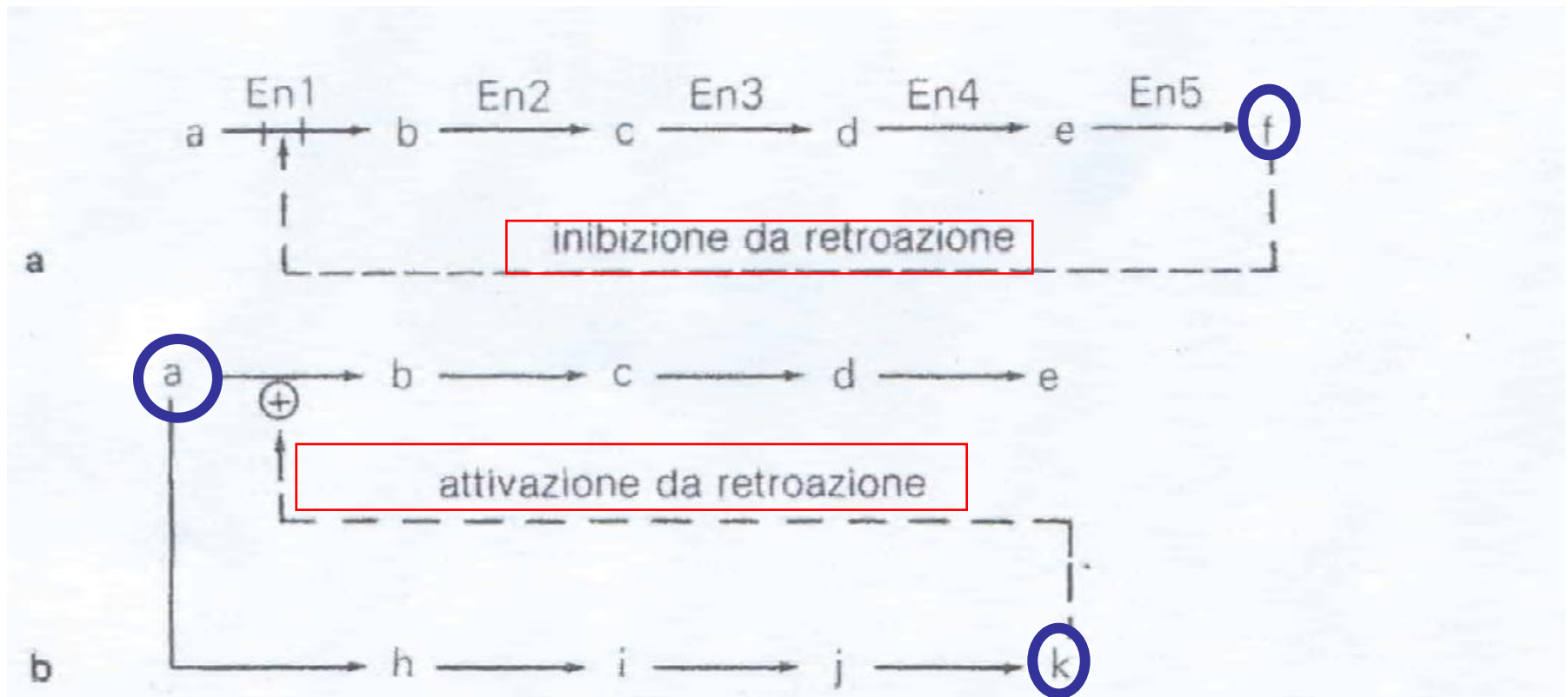


Figura 8.12. (a) *Inibizione da reazione*; (b) *attivazione da retroazione*.



# REGOLAZIONE e CONTROLLO dell'attività enzimatica

**ENZIMI REGOLATORI** = enzimi capaci di modulare la loro attività catalitica positivamente o negativamente in risposta a certi segnali

***Enzimi allosterici*** azione regolata dal legame reversibile, non covalente di piccole molecole (modulatori)

Sono proteine con maggiore complessità (+ subunità) e contengono

- **due o più siti di legame : siti allosterici**

**(diversi e distinti dal sito catalitico)** (*Allo*= diverso; *stereo*= forma)

**Sito attivo e sito regolatore** si trovano spesso su subunità differenti.



**Se il modulatore e il substrato sono gli stessi sulla molecola devono esistere almeno 2 siti dove si lega il substrato**

La formazione del legame con il modulatore nel sito allosterico



- **modificazione transitoria e reversibile della conformazione dell'enzima**

- **Influenza sul sito attivo**

***inibizione o attivazione dell'attività enzimatica***

***effetto omotropico*** : I due leganti che si influenzano l'un l'altro possono essere chimicamente identici, quando un substrato modifica la capacità di legarsi di un'altra molecola di substrato

***effetto eterotropo*** : I due leganti sono differenti chimicamente

***Si parla di COOPERATIVITA' o EFFETTO COOPERATIVO***

**Cooperatività** = cambiamento della costante di legame della proteina nei confronti di piccole molecole a causa di precedente formazione di legami con un'altra piccola molecola

*La costante di legame è analoga al  $K_s$  per il substrato e alla  $K_i$  per l'inibitore*

*il legame di 1 molecola del modulatore (o S) all' E aumenterà o diminuirà la capacità dell' enzima di legare una II<sup>A</sup> molecola di modulatore ( o S).*

<b>cooperatività positiva</b>	Se la modificazione aumenta la capacità di legame (o affinità)
<b>cooperatività negativa</b>	Se questa capacità di legame viene diminuita .

Due meccanismi per spiegare le proprietà delle proteine e degli enzimi allosterici.

1. **ipotesi concertata, o simmetrica, ( o ipotesi MWC),**
2. **ipotesi sequenziale. (o ipotesi KNF).**

## **Ipotesi concertata o simmetrica**

un enzima allosterico è costituito da un certo numero di subunità che possono esistere **solo** in due differenti conformazioni:

**1. stato R, forma attiva, ad alta affinità**

*(Conformazione Rilassata)*

**2. stato T, forma inattiva a bassa affinità**

*(Conformazione Tesa)*

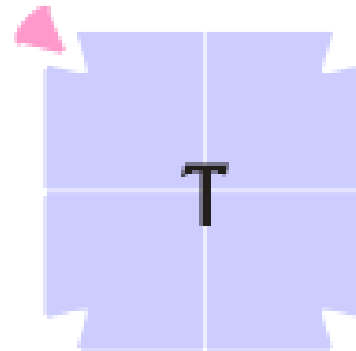
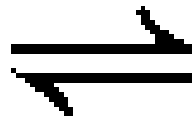
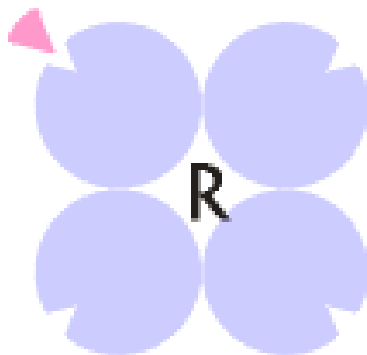
Le subunità di un particolare enzima interagiscono in modo tale da avere tutte la stessa conformazione.



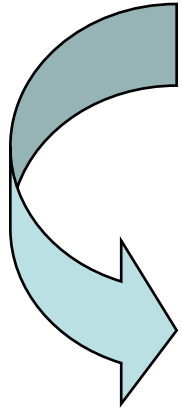
*l'enzima deve essere costituito*

*o da soli R o da soli T, non sono ammesse miscele.*

equilibrio tra due forme consistenti o solo di subunità R o solo di T.



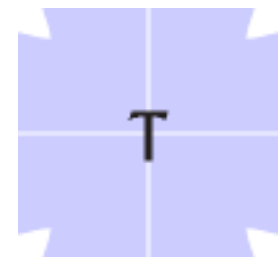
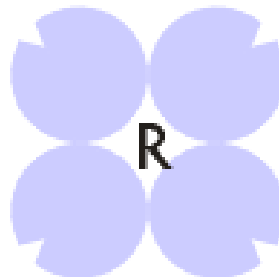
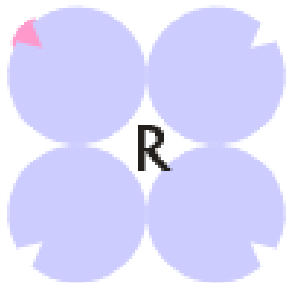
Nel caso in cui S sia il modulatore positivo:  
il **substrato** è più probabile che si leghi alla  
conformazione **R** data la **maggiore affinità**.



Spostamento dell'equilibrio verso sinistra  
*diminuisce la concentrazione della forma T e  
aumenta quella della forma R.*

Aumento della probabilità di transizione  
dalla forma inattiva a quella attiva

***cooperatività positiva***

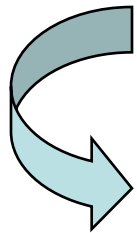


## Nel caso degli **Effettori (o modulatori) Allosterici**

*L'enzima avrà un sito di legame con l'effettore che, come il sito attivo, modificherà le sue proprietà con la conversione tra le forme R e T.*

Un **attivatore** si legherà più fortemente allo stato R, in modo simile a quanto fatto dal substrato, e avrà lo stesso effetto sull'equilibrio, di spostarlo verso la più alta affinità verso il substrato,

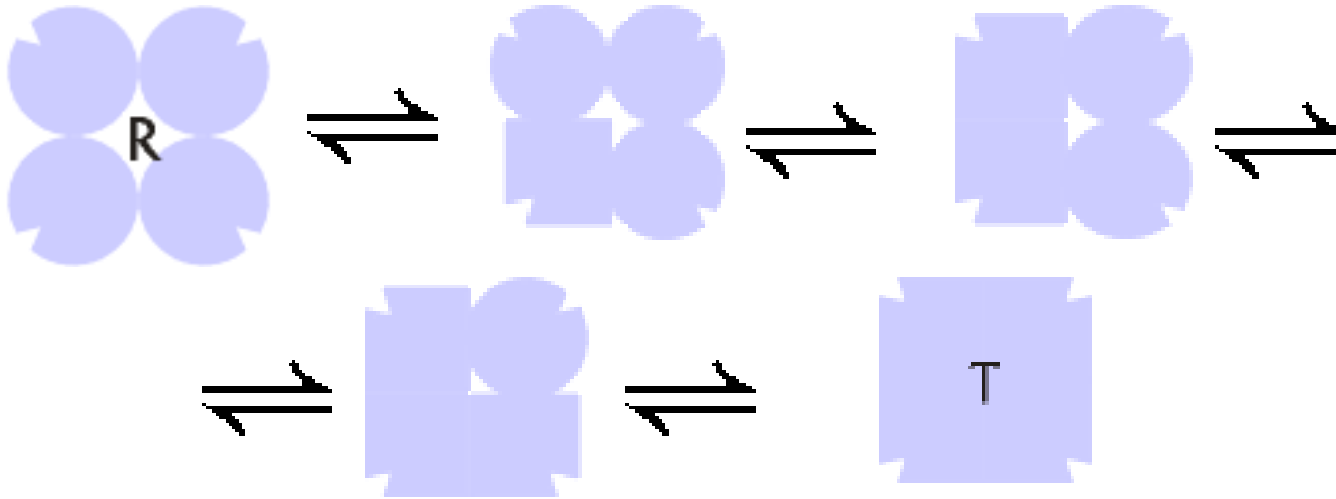
un **inibitore** si legherà alla forma T spostando l'equilibrio in direzione inversa, di minore affinità.



*In seguito alla presenza di un attivatore  
più molecole di enzima si trovano nella conformazione R,  
con conseguente diminuzione di lavoro per convertire T in R.*

L'**ipotesi sequenziale** accetta la possibilità che possano trovarsi **enzimi misti**, contenenti cioè entrambe le subunità.

Le forme pure R e T rappresentano gli estremi di questo equilibrio.



**l'effettore (in questo esempio è il S) ha un'influenza più diretta sulla forma dell'enzima.**

*In assenza di substrato l'enzima esisterebbe quasi interamente nella forma T*

Quando il substrato entra nel sito attivo a causa delle collisioni casuali,

**adattamento indotto** = la subunità a cui si è legato  
il substrato viene convertita nella conformazione R.

**un'unità è stata convertita in R, mentre le altre si trovano ancora nello stato T.**

- le subunità sono legate l'una all'altra e interagiranno tra loro.
- il cambiamento di forma tende a spingere le altre subunità verso la forma R  $\longrightarrow$  **cooperatività positiva da substrato**  
 $\longrightarrow$  più unità si potranno trovare nello stato a maggiore affinità.

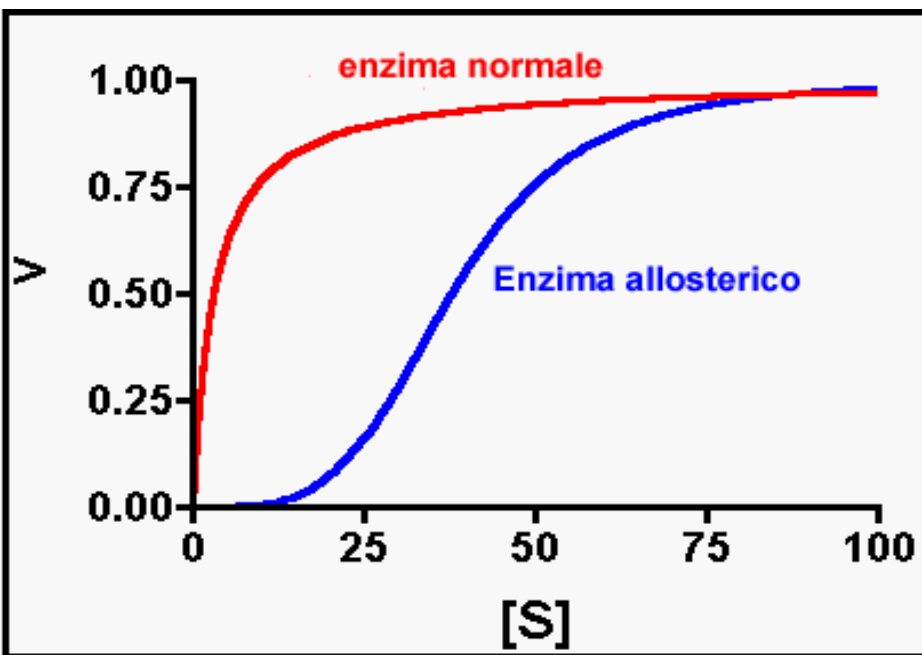
Influenza degli **effettori allosterici**:

Un **attivatore** lavora allo stesso modo del substrato,  
anche se si lega ad un sito differente della subunità,  
un **inibitore** rende l'enzima più rigido e diventa  
più difficile l'adattamento indotto con il cambio da R a T.

**Cooperatività Negativa da substrato** (non è un fenomeno comune) :

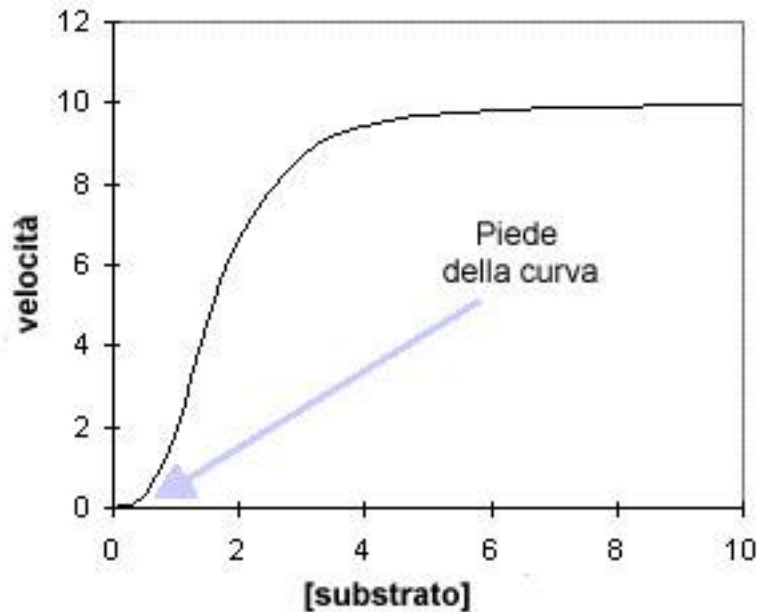
le interazioni tra subunità sono tali che la conversione di una di loro alla forma R per adattamento indotto rende più difficili il cambiamento delle altre.





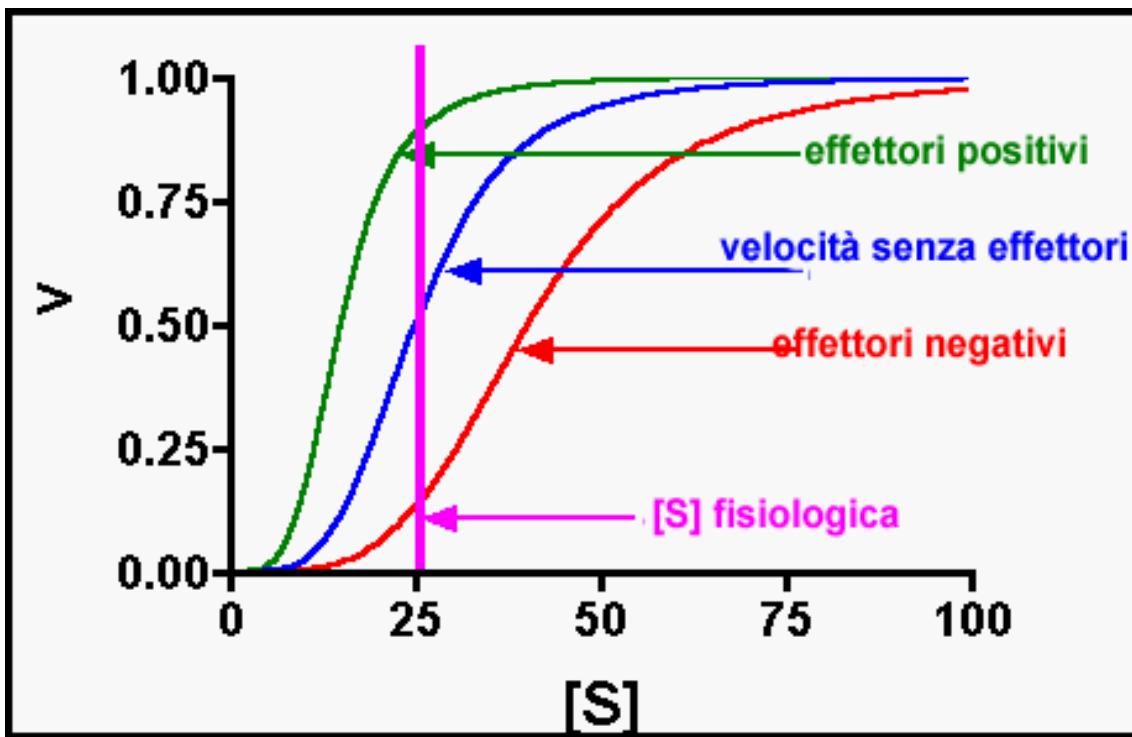
*Gli enzimi allosterici spesso non seguono la cinetica di M.M.*

**forma sigmoidale** della curva:  
 a basse concentrazioni di substrato  
 un aumento di  
 concentrazione del substrato  
 ➔ *lieve incremento della velocità*



**Interazione di tipo cooperativo fra le subunità dell'Enzima** Ad alti livelli di substrato il grafico è molto simile all'iperbolico

➔ Il legame con effettori allosterici positivi o negativi possono influenzare il legame con S ( $K_m$ ,  $V_{max}$ )



La presenza di un attivatore, aumenta la velocità di reazione mentre l'inibitore la deprime,

L'inibitore esalta la forma sigmoidale allungando il piede della curva, mentre l'attivatore ha l'effetto opposto fino alla completa scomparsa del piede per alte concentrazioni di attivatore giungendo ad una curva iperbolica.

- **Tutte le curve tendono al valore di  $V_{max}$ .**
- *Gli effettori operano sulla capacità di legare il substrato cioè sulla  $K_m$ .*

**ATTIVATORI:**  
AMP, ADP,  
FRUTTOSIO,2-6,  
BISFOSFATO

**SITO ALLOSTERICO**

**INIBITORI:**  
ATP, . . . ,  
CITRATO



**Fosfofruttochinasi-1**

FRUTTOSIO-  
6-FOSFATO

FRUTTOSIO-1,6-  
BISFOSFATO