


# 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**

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)

**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**

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

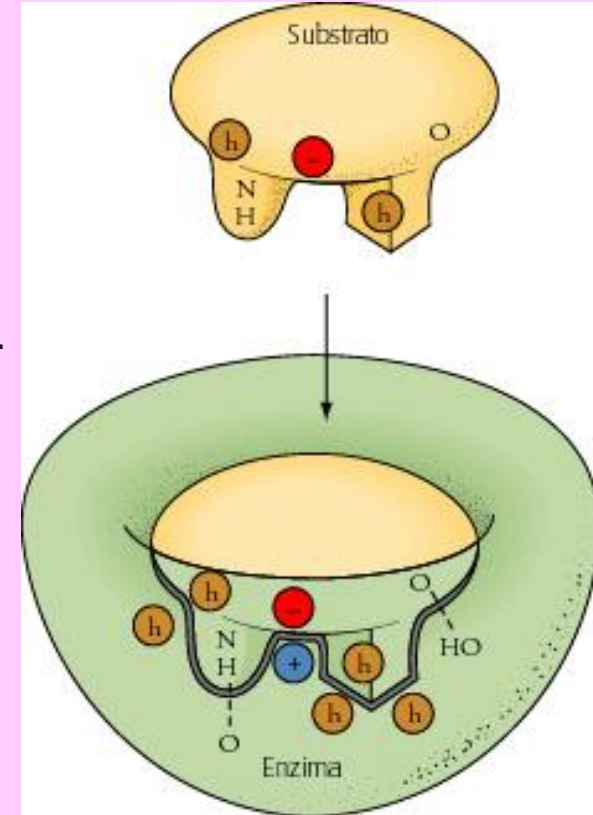
→ Non sono in grado di fare avvenire una reazione non spontanea,  
(  $\Delta G > 0$  energeticamente in salita )

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

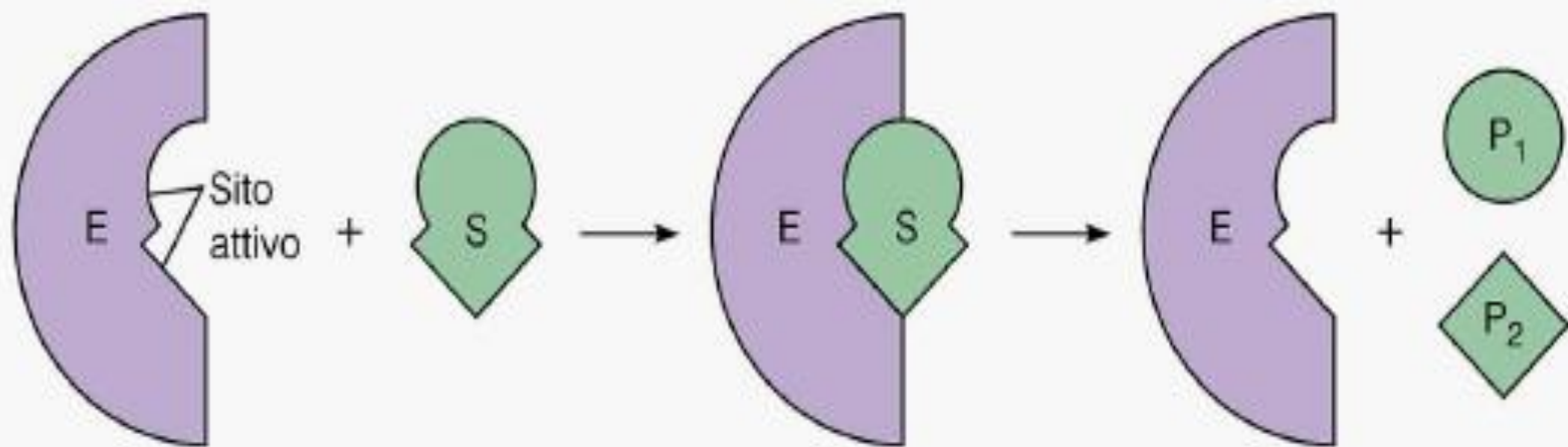
- Nel 1958: ipotesi dello

#### Adattamento indotto

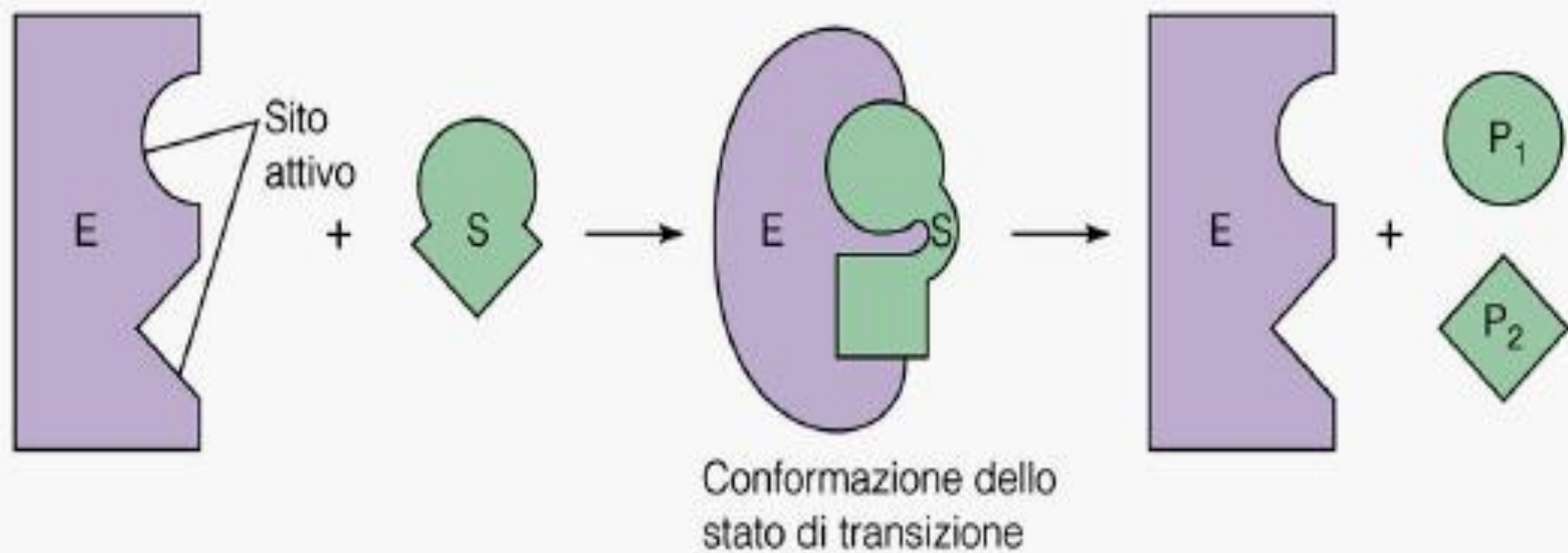


La vicinanza di S o P all'Enzima provoca modificazioni della conformazione del sito attivo dell'E

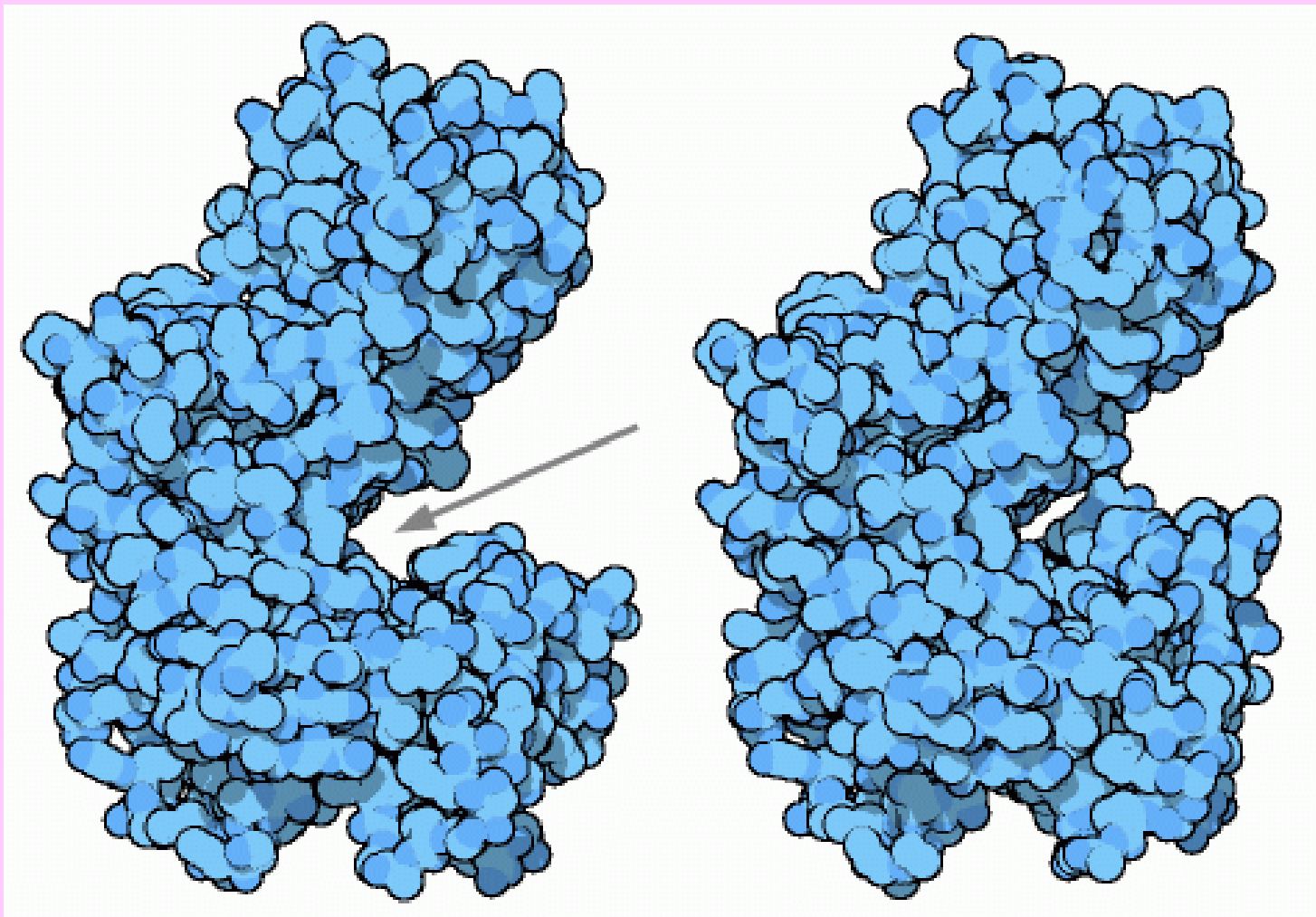
Migliore combinazione E-S e E-P



**(a)** Modello chiave-serratura



**(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

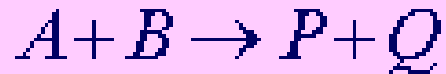
A temperatura costante, *la velocità di reazione è proporzionale alla frequenza con cui le molecole di A si incontrano*

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

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

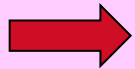
$$V = \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[A]}{dt} = \mathbf{K [A]}$$

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



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

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

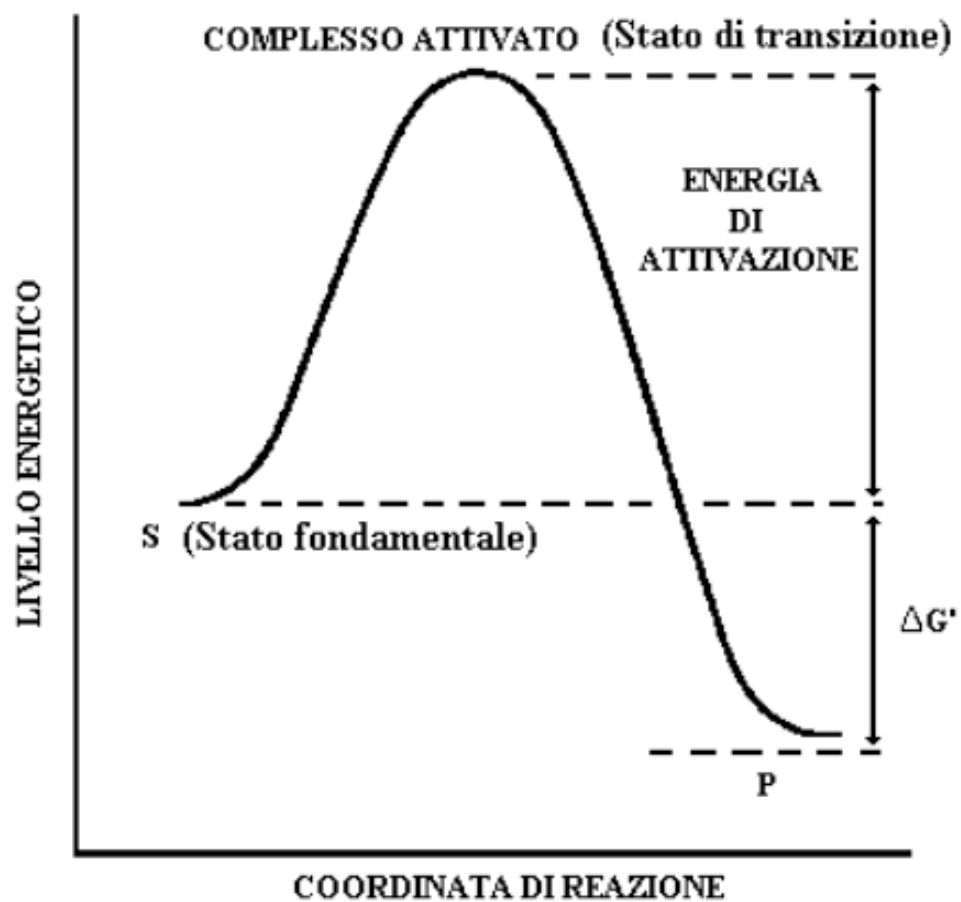
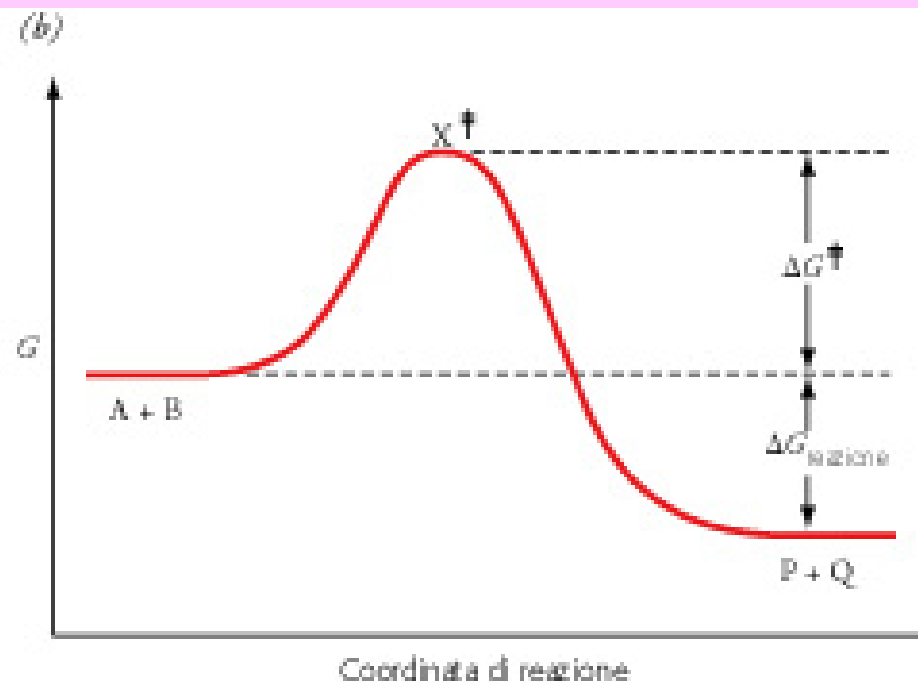
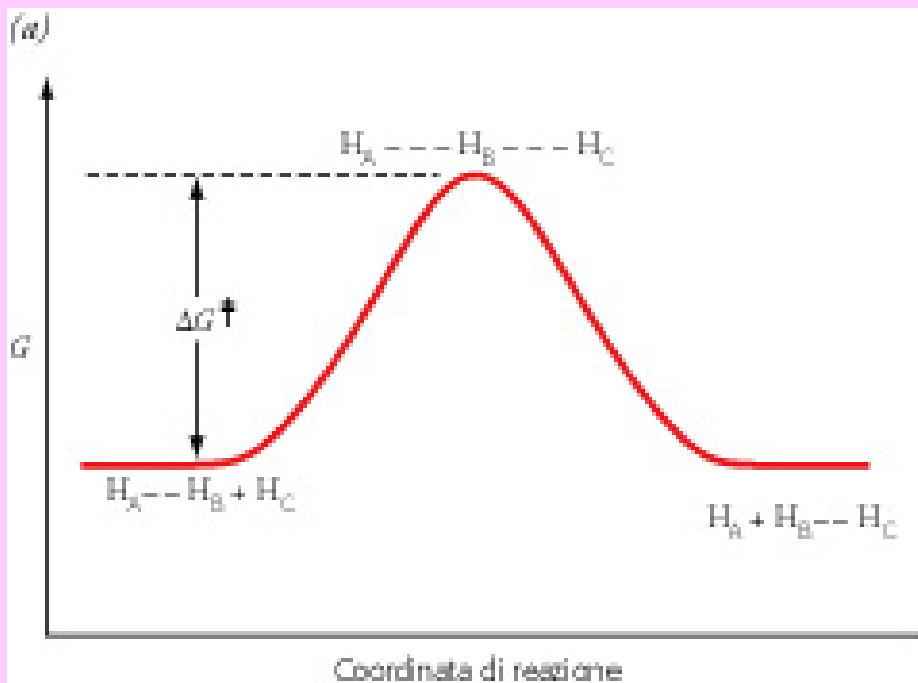


Figura. Profilo energetico di una reazione chimica

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*

*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  $10^{\circ}\text{C}$

$$Q_{10} = 2$$

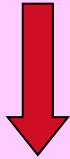
## 2. Impiego di un catalizzatore



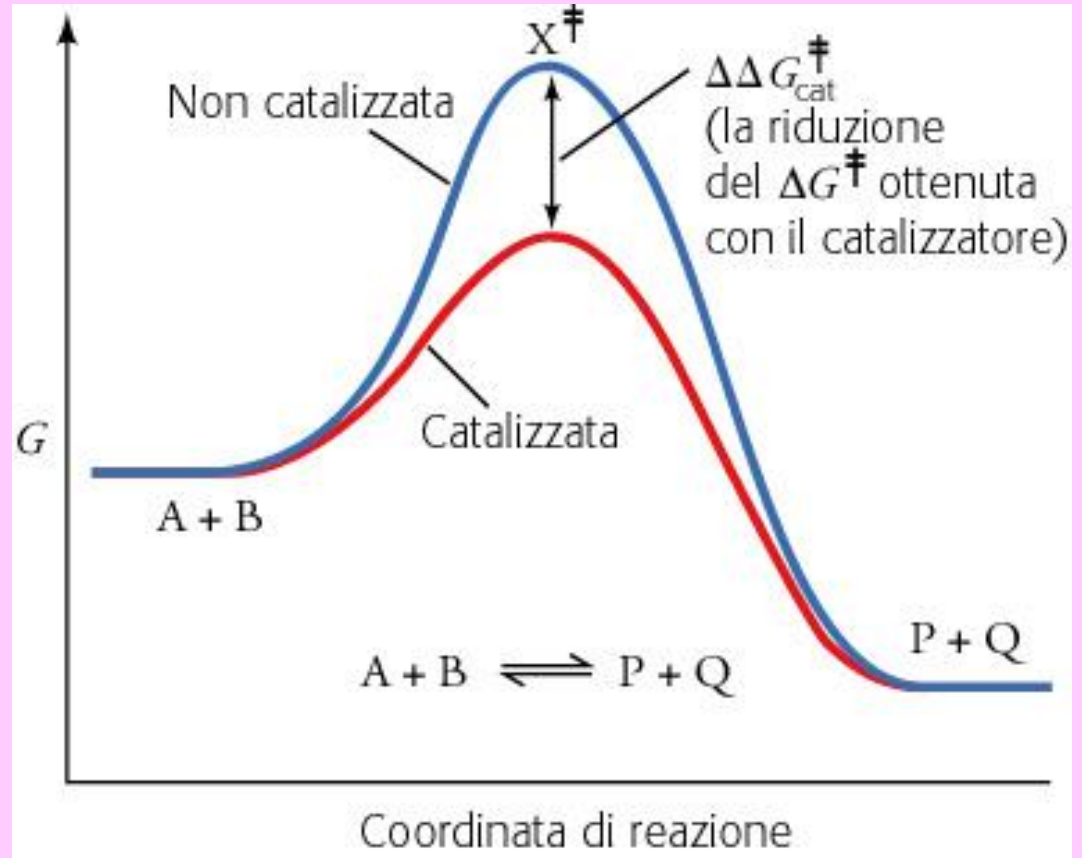
abbassamento della barriera energetica

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

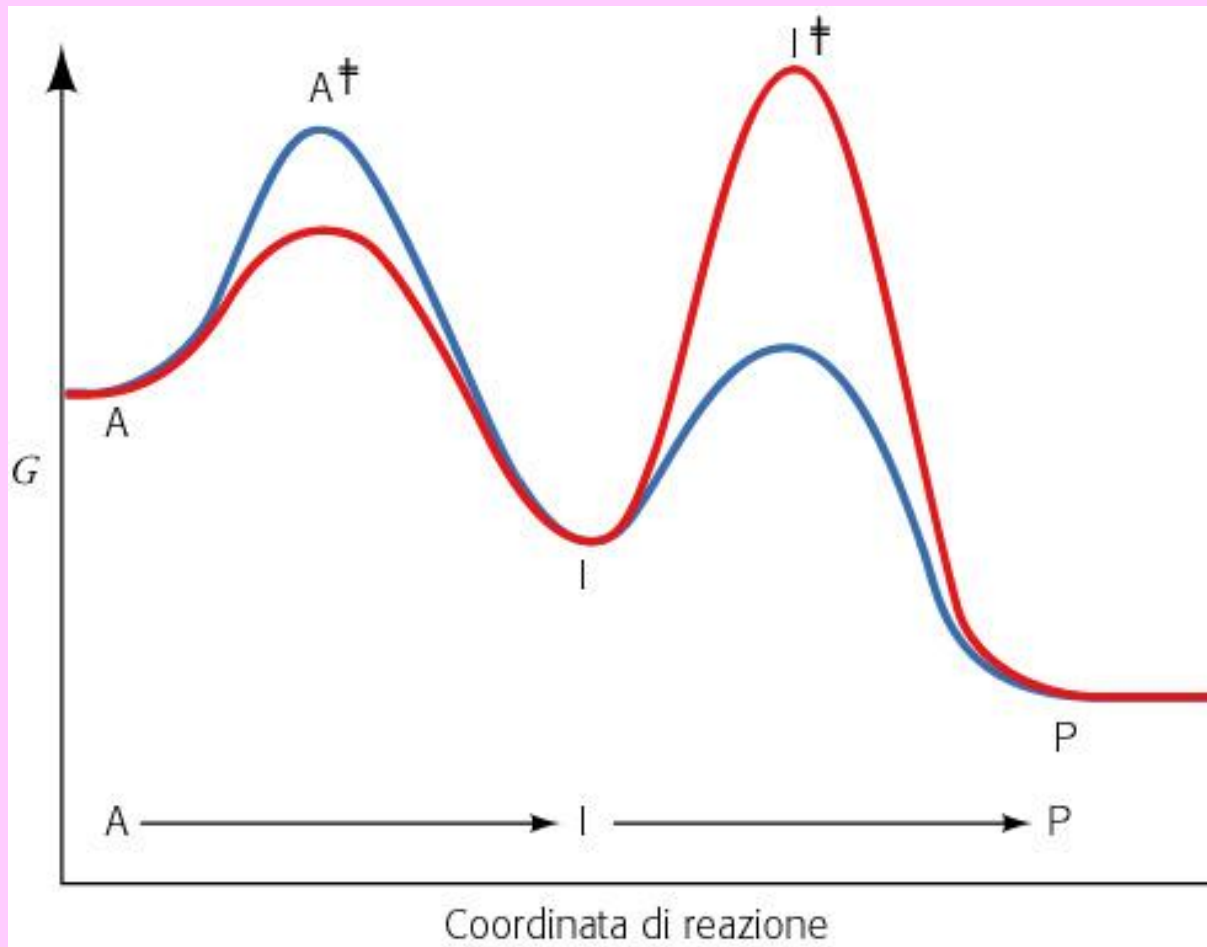
*Abbassamento dell'energia di attivazione*



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  $B$



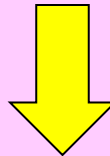
## Reazione chimica a 2 tappe

- 2 stati di transizione
- 2 diverse energie di attivazione



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

- Il substrato si consuma
- La reazione è reversibile e 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*

## 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:

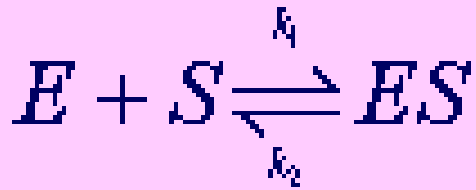


La **prima assunzione** è nota come del "quasi equilibrio" o dello "equilibrio rapido"

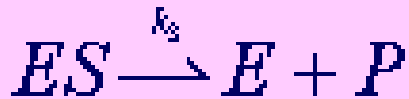
- ***la formazione del complesso ES è una reazione molto veloce ed è reversibile*** : Il complesso enzima-substrato è in equilibrio con l'enzima libero ed il substrato
- ***questa situazione di equilibrio non è disturbata dalla formazione del prodotto***: la velocità di formazione del prodotto a partire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



$$k_3 \ll k_2$$



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

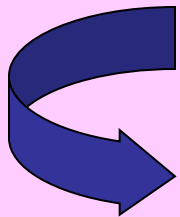


Il complesso ES si scinde in una **reazione lenta** che rappresenta la tappa limitante

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

[ES] rimane costante

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



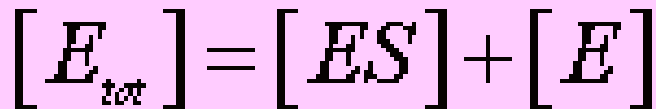
la concentrazione di ES è costante  
quando la sua *velocità di formazione* di ES eguaglia  
la sola *velocità di decomposizione* in E+S (K1=K2)

Questo si verifica assumendo  $k_3 \ll k_2$

la *velocità di trasformazione* di ES in E+P sia trascurabile

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**

## Stato stazionario:

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

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

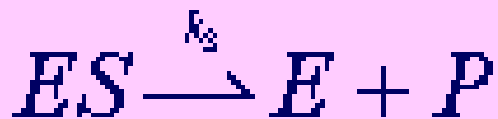
quando tutto S viene consumato

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:



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

*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,*

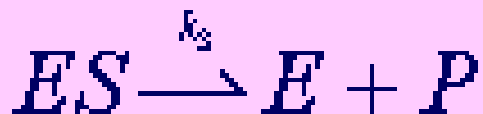
$$[E_{tot}] = [ES] + [E]$$

per cui potremo scrivere

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

Espressione della massima velocità ottenibile

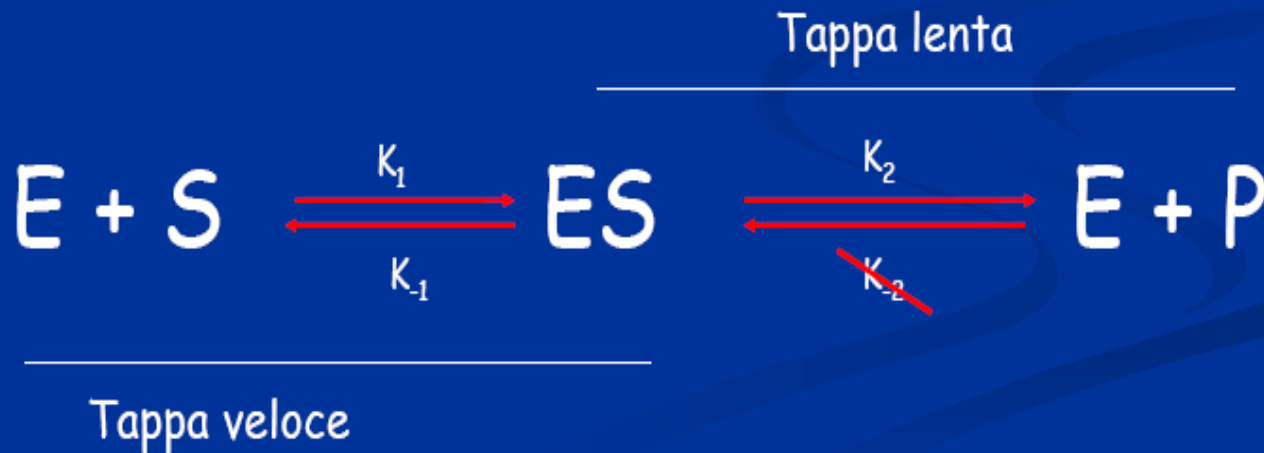
per una data quantità di enzima in condizioni di saturazione del substrato.



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

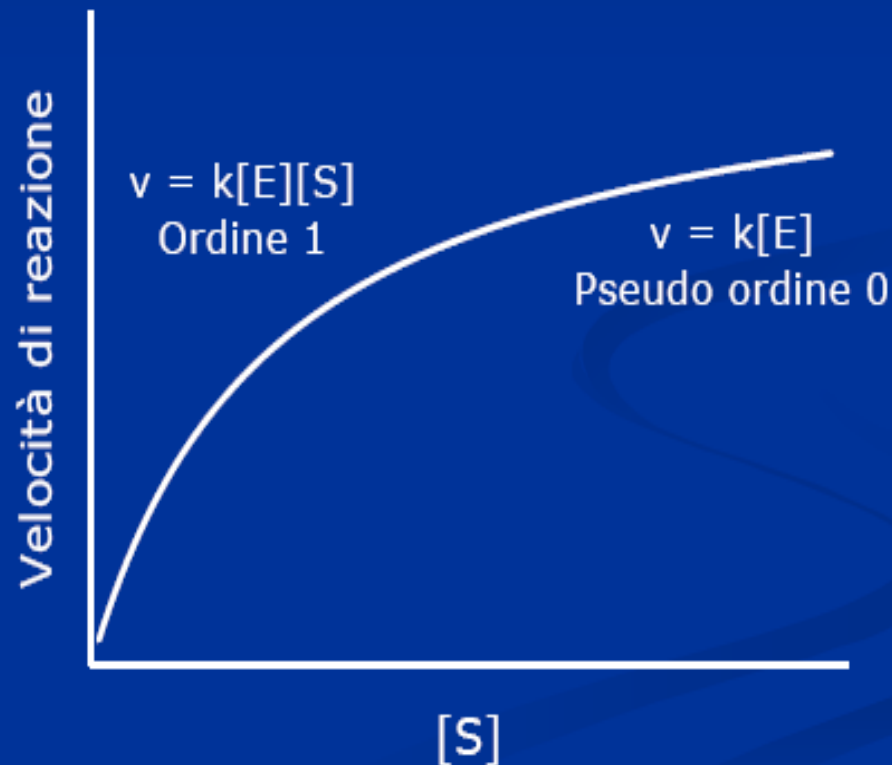


## RIASSUMENDO



- 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);
- $[E] \ll [S]$

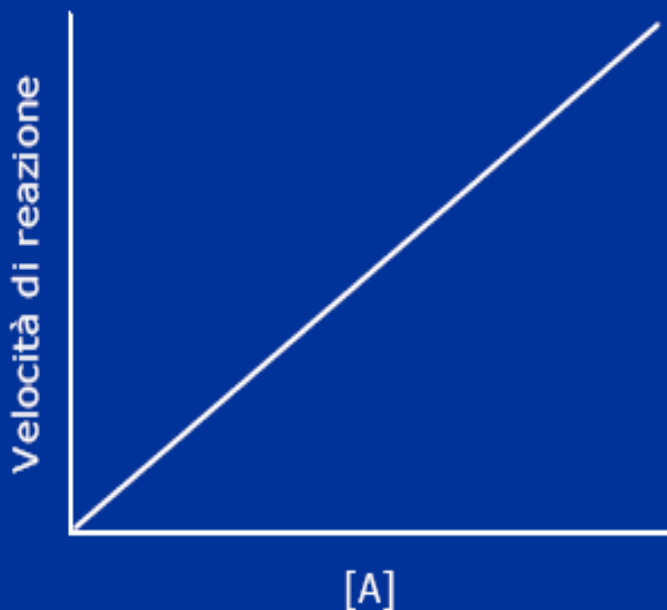
- In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile



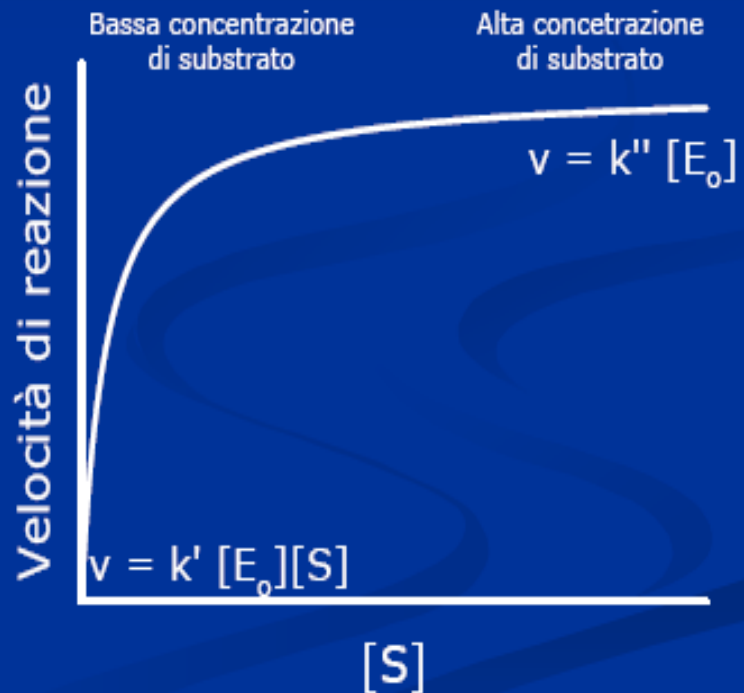
## In una reazione chimica



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



## In una reazione enzimatica



## RIASSUMENDO :

### 3 FASI NEL RAPPORTO E-S

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

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



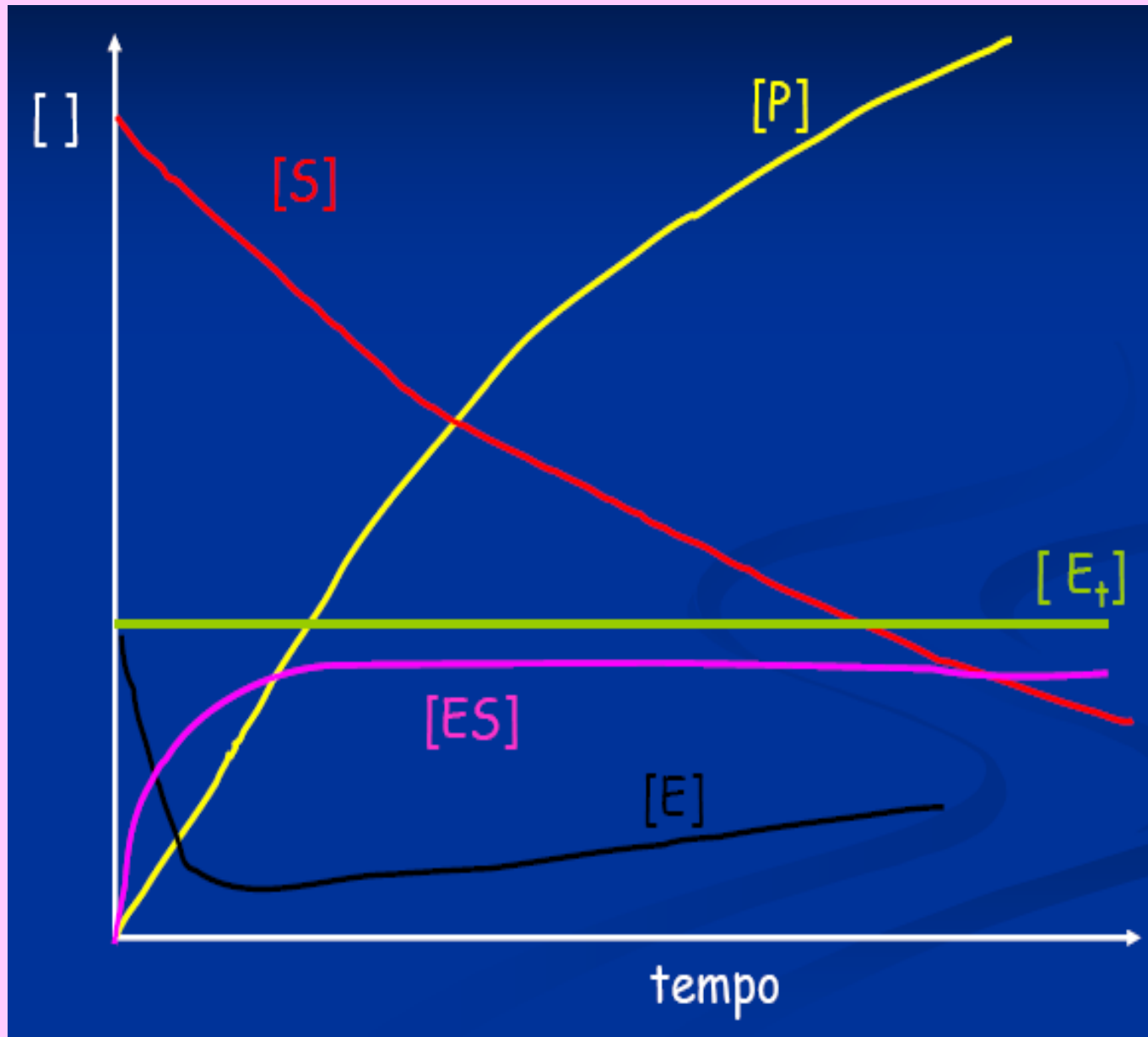
Stato prestazionario

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

Stato stazionario

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

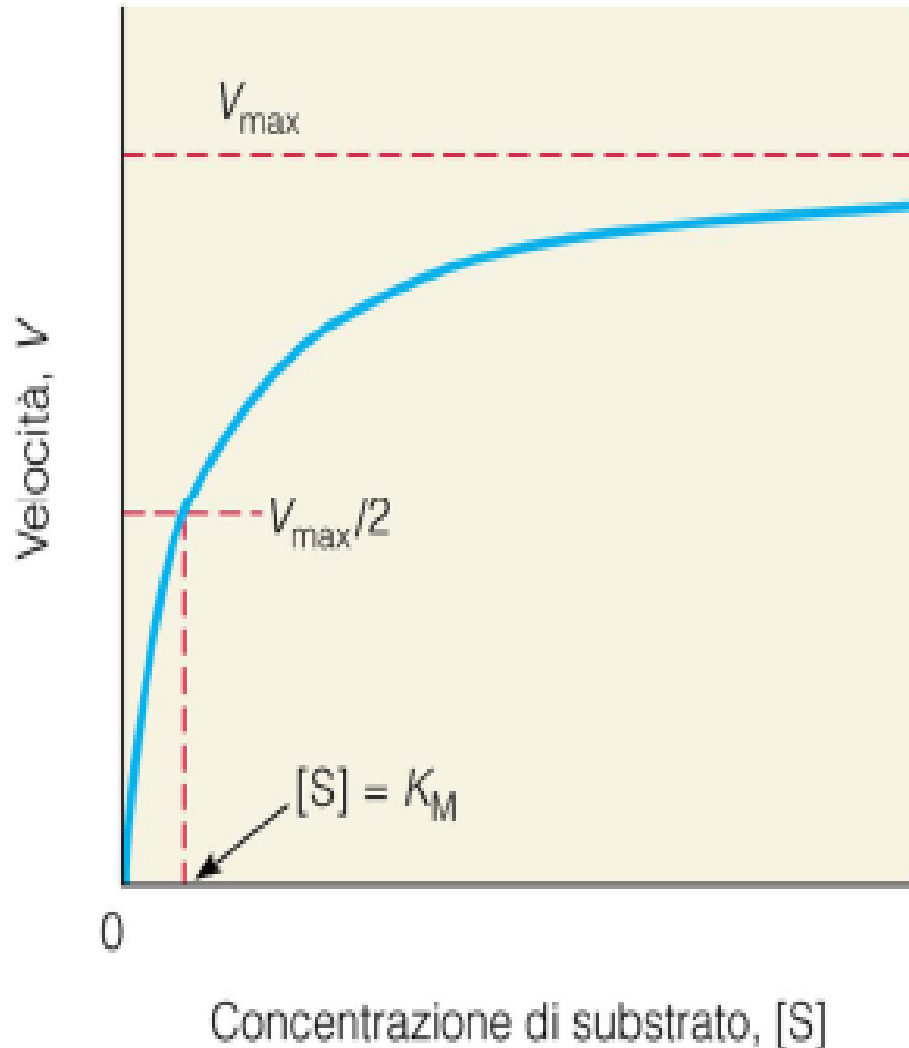
# RAPPRESENTAZIONE GRAFICA



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

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

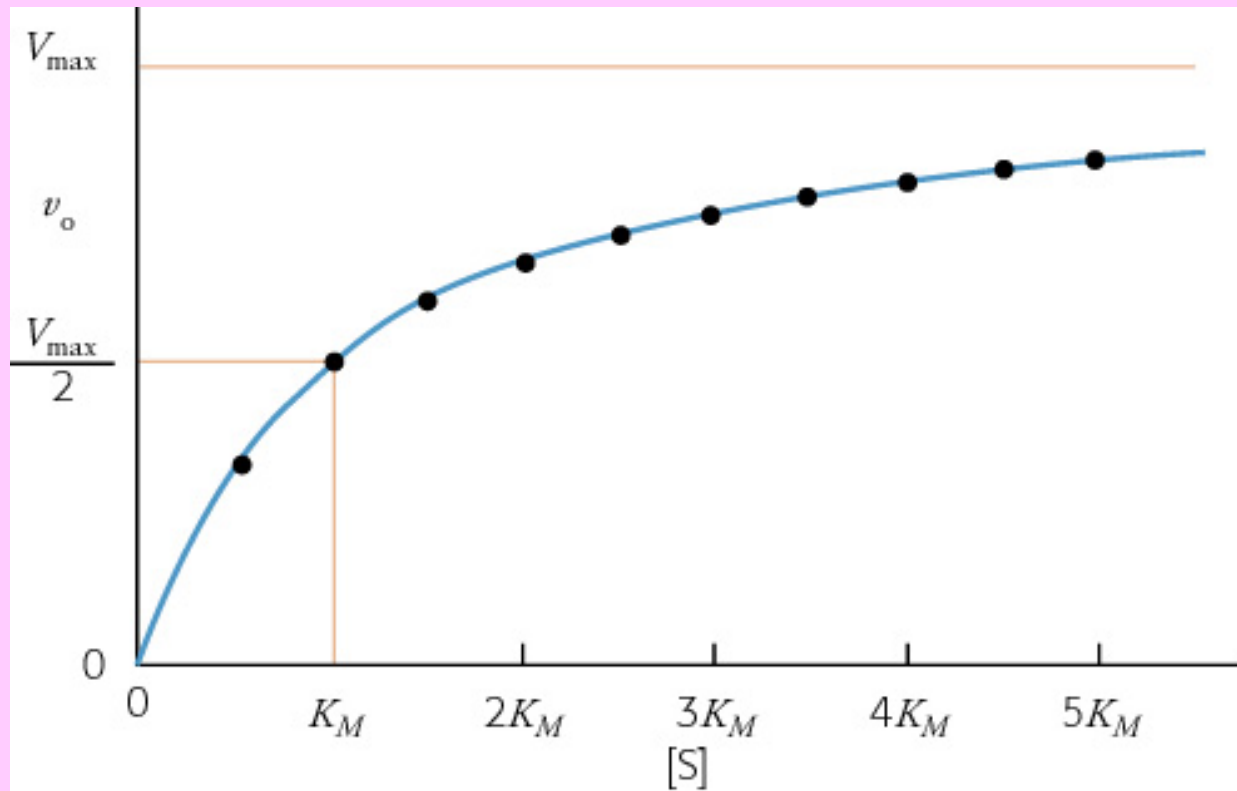
- **la velocità iniziale di una reazione enzimatica** ad un substrato è in relazione tramite due costanti ( $V_{\max}$  e  $K_m$ ) con la sola **concentrazione del substrato**, che
- **La concentrazione del substrato per la assunzione**  $[S] \gg [E_{\text{tot}}]$  è assimilabile sempre alla **concentrazione iniziale di substrato**.



- La **V<sub>max</sub>** indica la saturazione dell'enzima a [S] infinita
- La **K<sub>M</sub>** 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

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



***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:

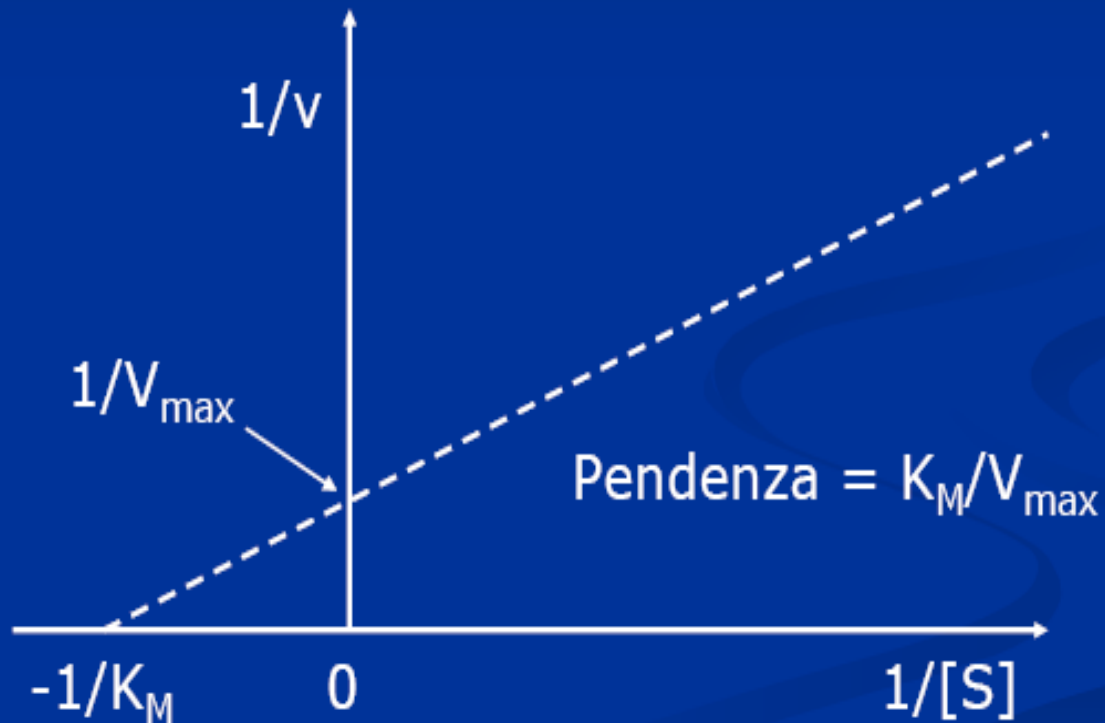
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Inversione

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

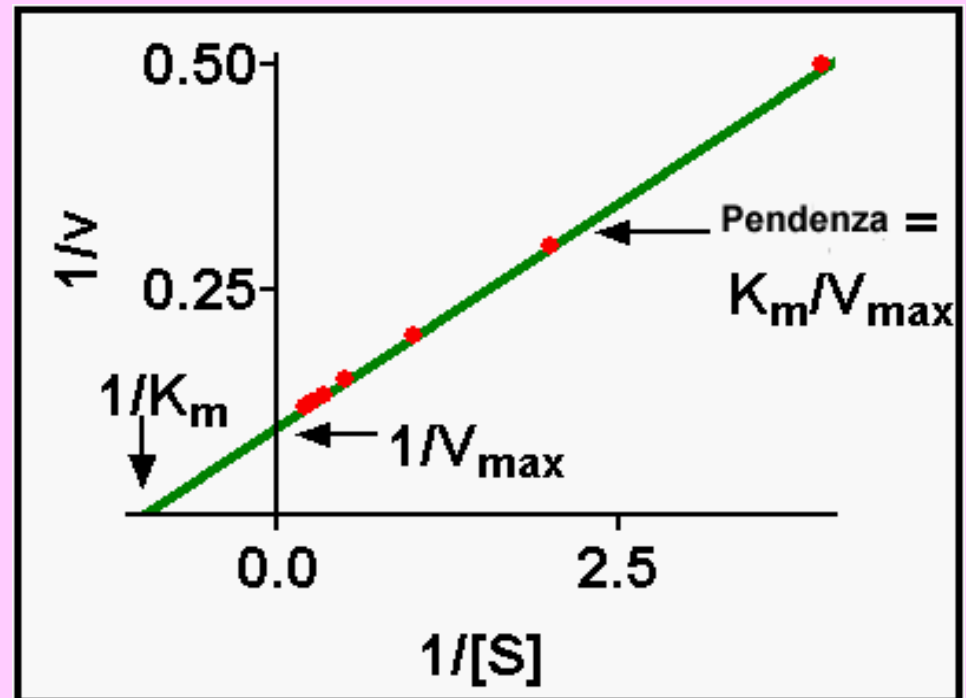
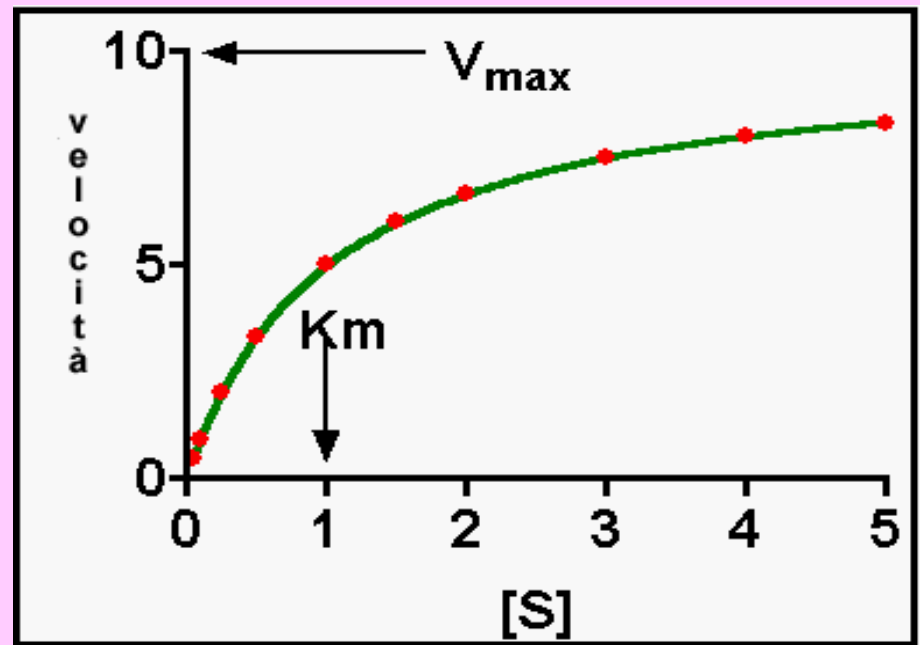
## E' l'equazione di una retta

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



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

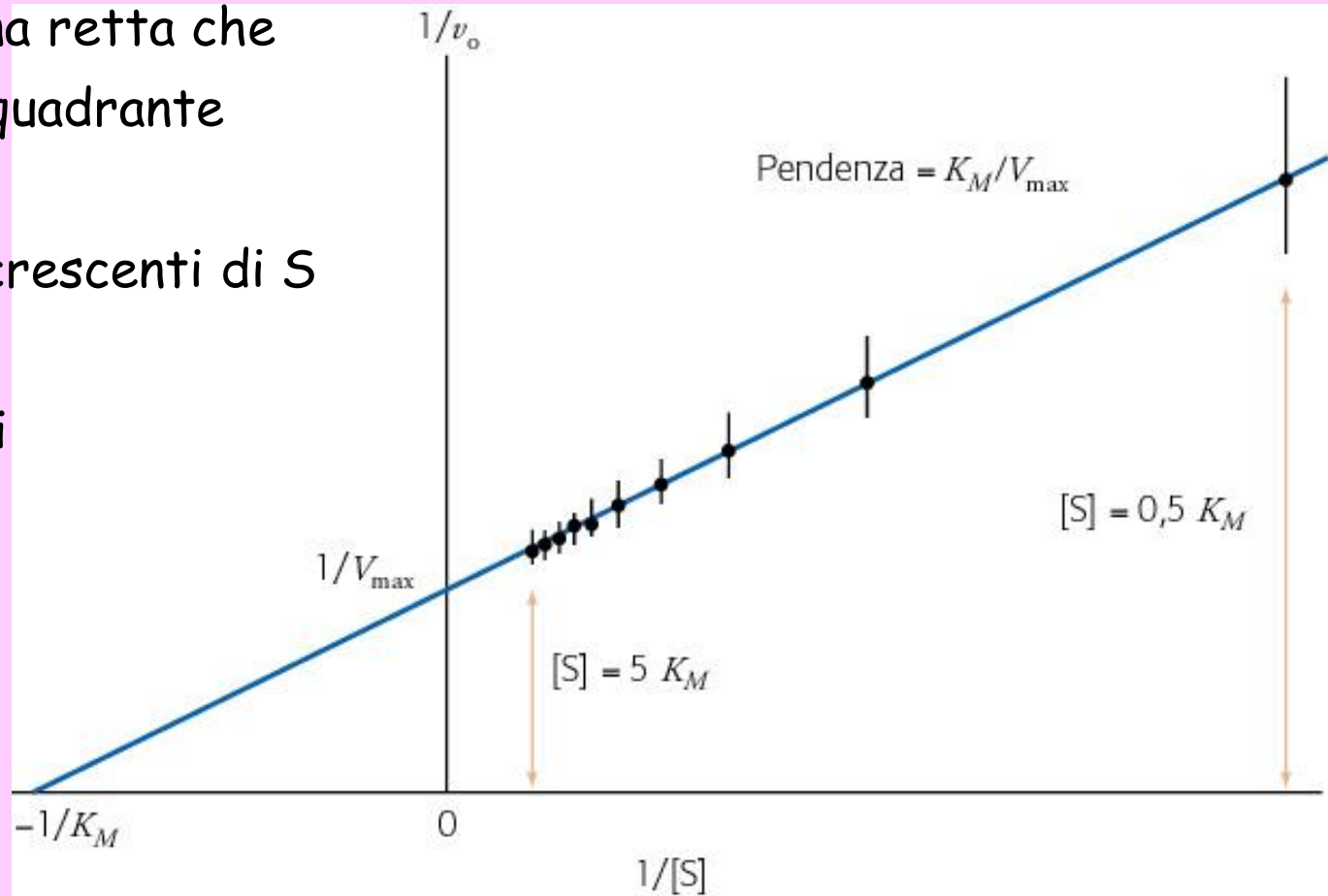
- le variabili sono  $1/v$  e  $1/[S]$
- $1/V_{\max}$  è l'intercetta sull'asse y
- $-1/K_M$  è l'intercetta sull'asse x.



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  $1/V_{max}$

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:**

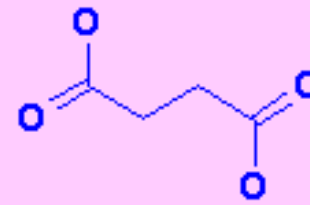
- Inibizione *COMPETITIVA*  
Aumenta la  $K_m$  e non ha nessun effetto sulla  $V_{max}$
- Inibizione *NON COMPETITIVA*  
Diminuisce  $V_{max}$ , la  $K_m$  resta inalterata
- Inibizione *INCOMPETITIVA*  
Diminuiscono  $K_m$  e  $V_{max}$

# Inibizione competitiva

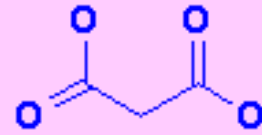
## L'inibitore competitivo

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

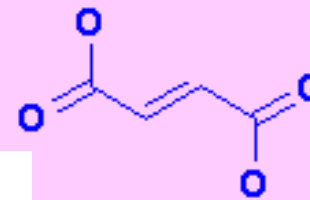


ac. succinico

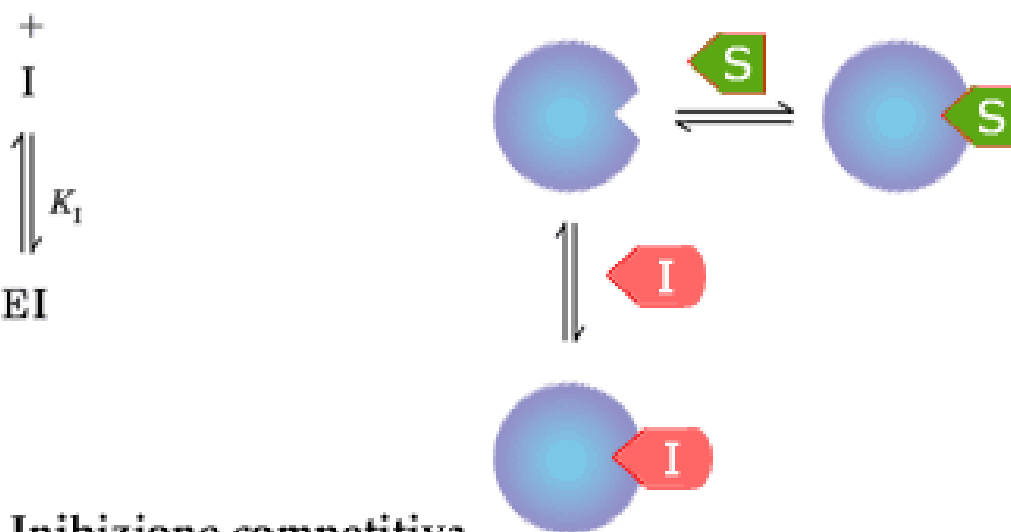


ac. malonico

succinico deidrogenasi



fumarato

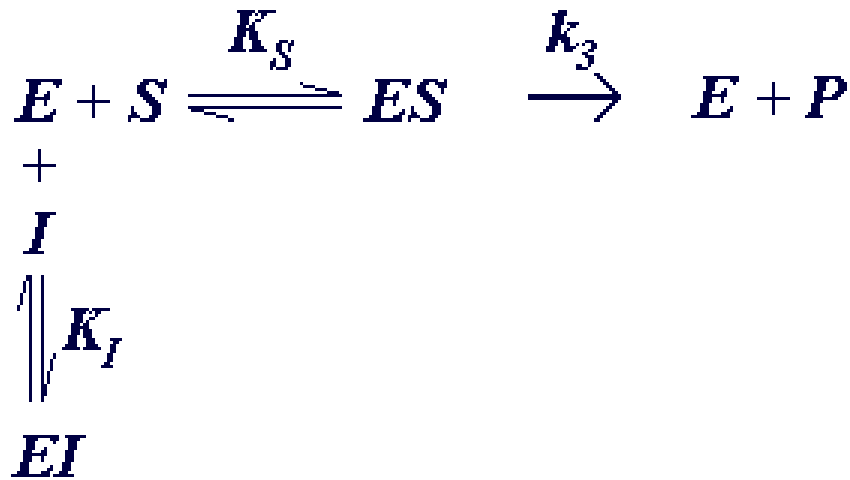


Inibizione competitiva

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>





per l'assunzione dell'equilibrio rapido

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

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

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

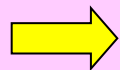
$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad \text{e} \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$$



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

Parte dell'enzima è sottratto alla reazione come EI

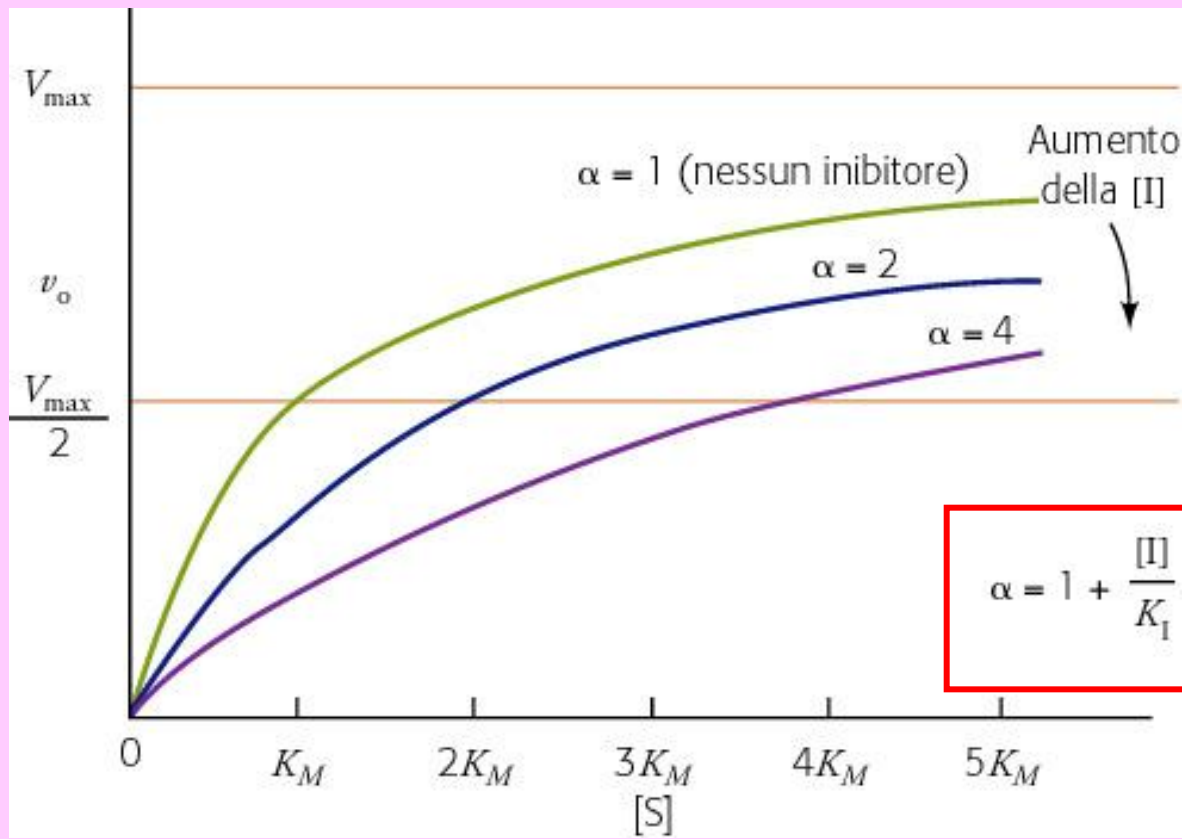
*diminuzione dell'affinità per S*



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  $K_m$  di un fattore  $\alpha = (1 + [I] / K_I)$

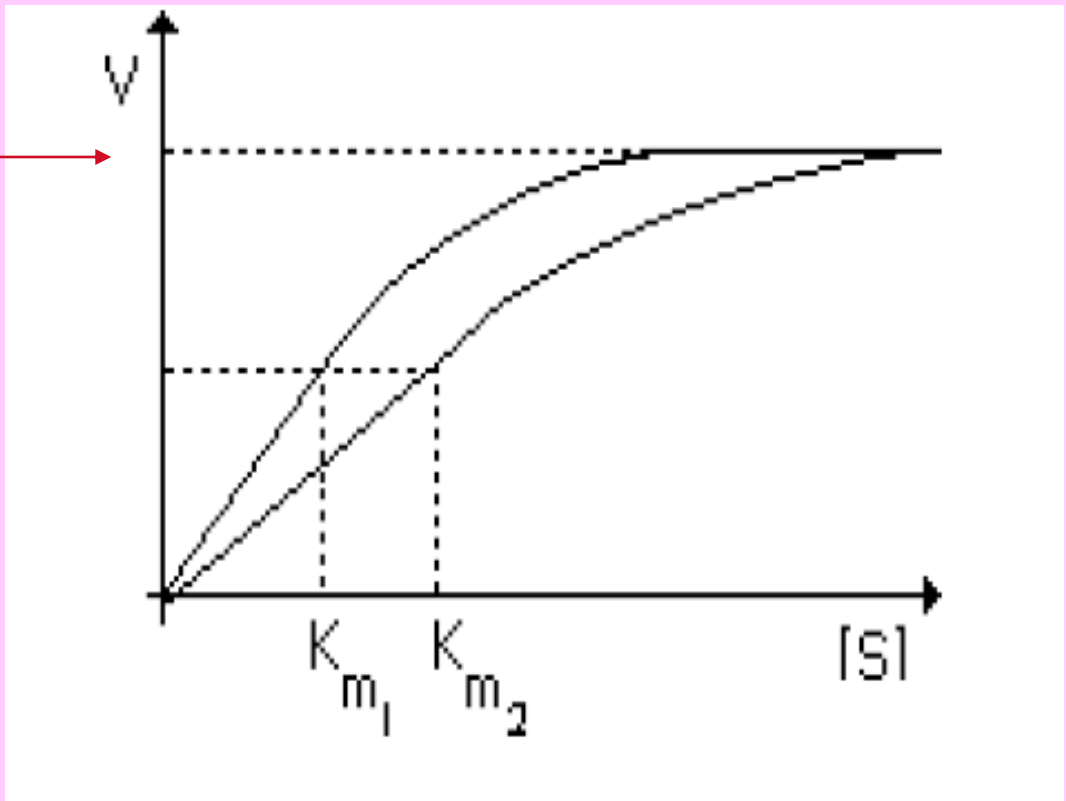
La velocità massima della reazione non è influenzata dalla presenza dell'inibitore ad elevate concentrazioni di substrato tutto l'enzima viene complessato in forma di ES.



**la reazione è rallentata**

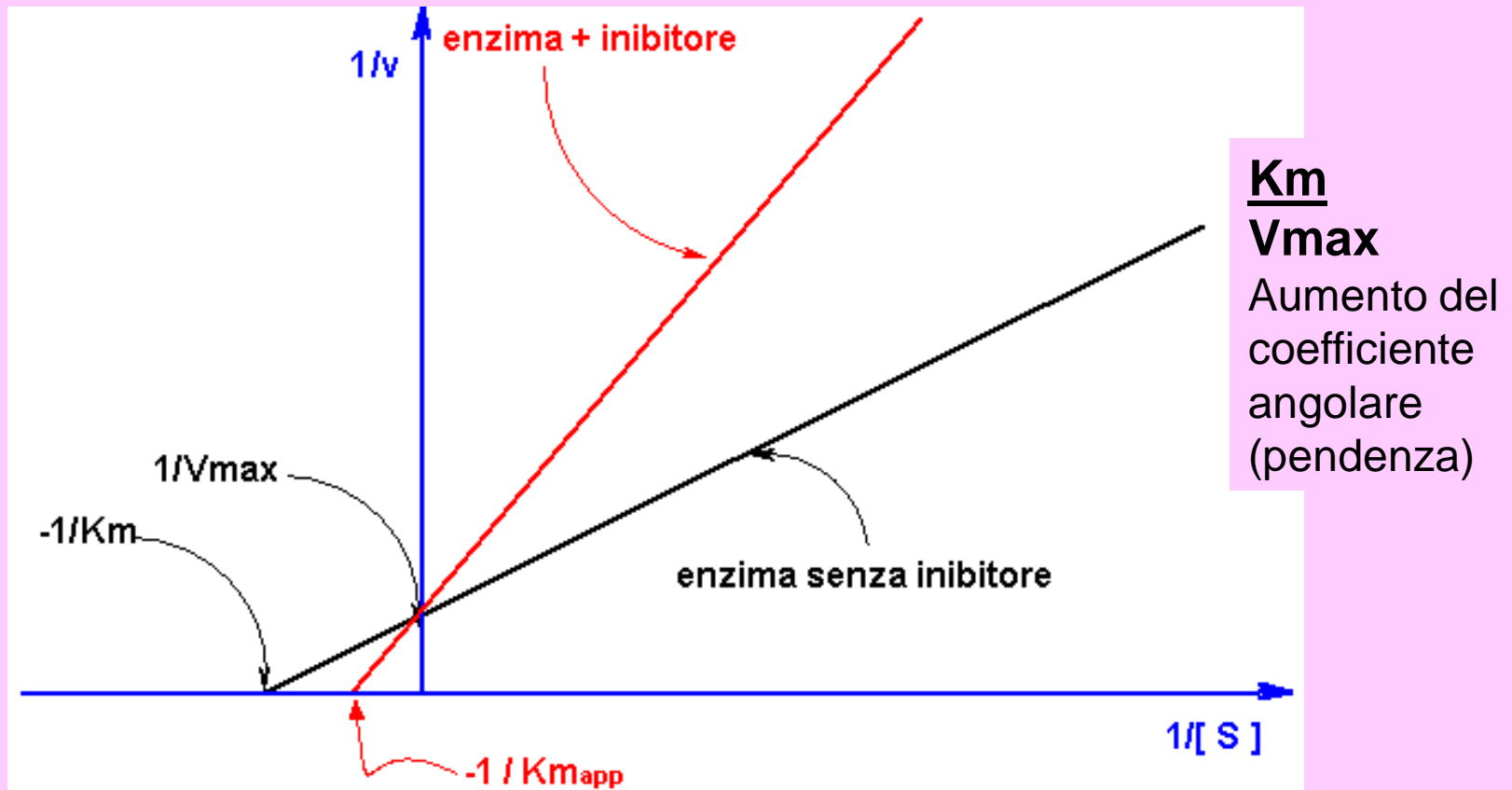
**la  $V_{max}$  è raggiunta + tardi**

La  $V_{max}$   
è raggiunta con una  
quantità maggiore di S



$K_{m_1}$  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

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

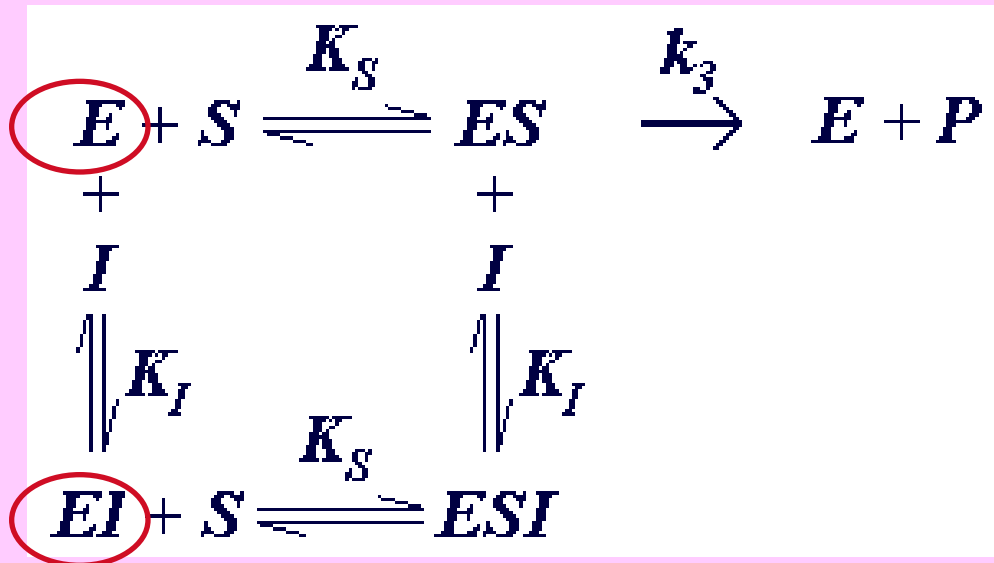
La  $K_m$  apparente non è costante  
 è in funzione del fattore  $a$  che considera  $[I]$

## • 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**.



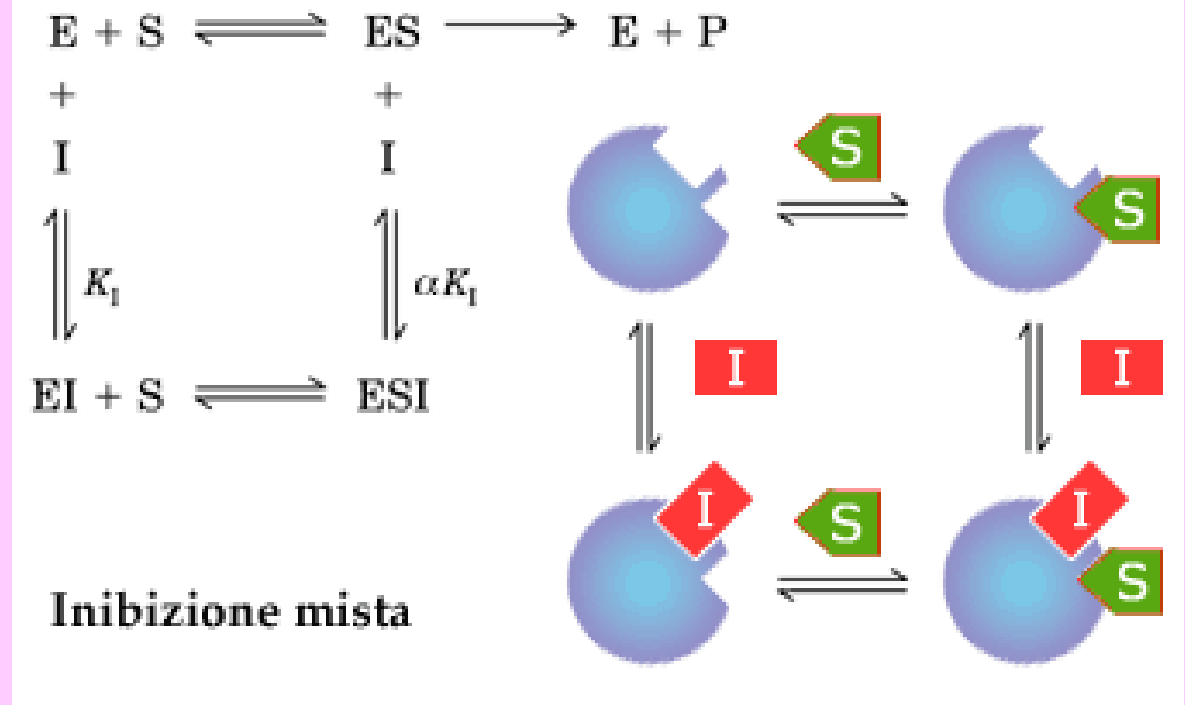
$$\textcircled{K_S} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

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

*ES ed ESI hanno le stesse costanti di dissociazione*

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

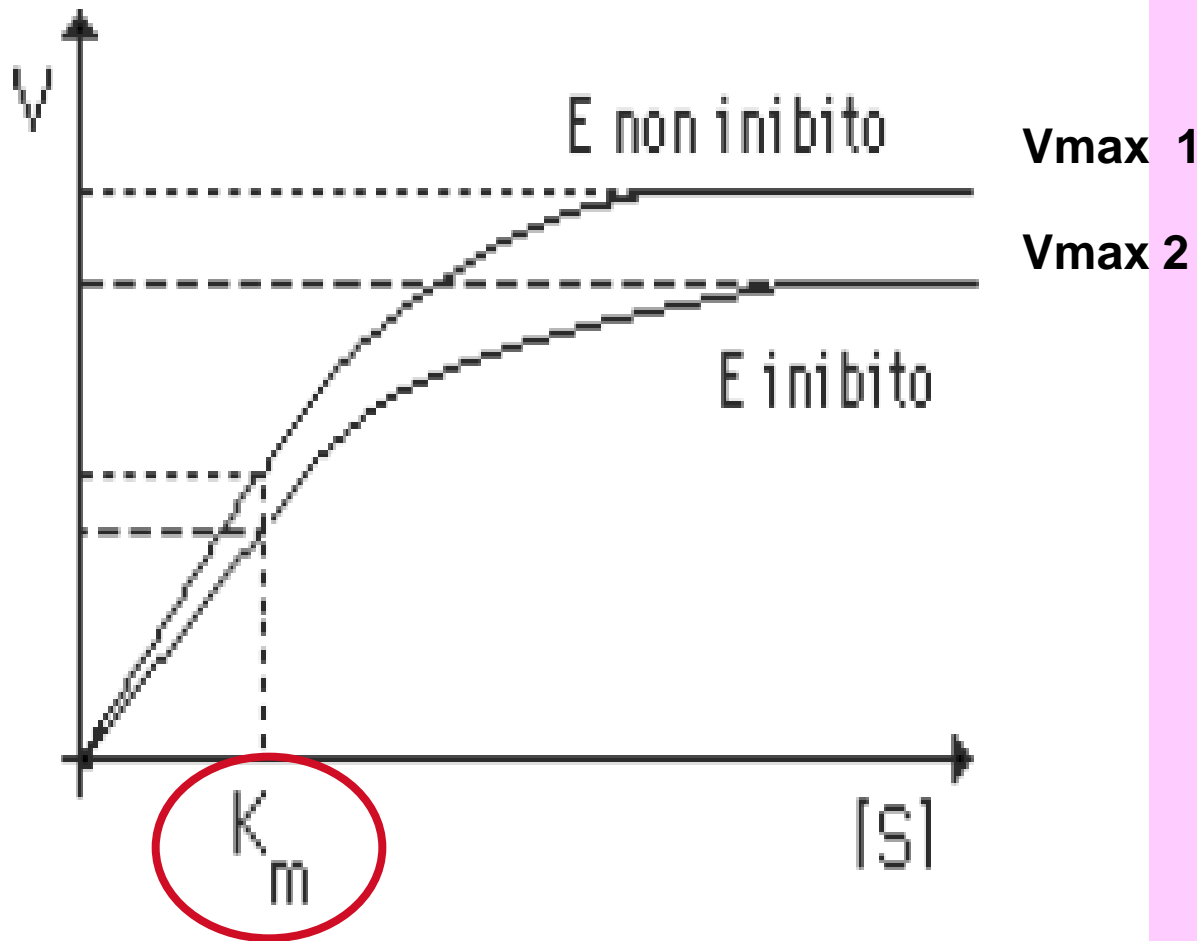
- **I** si lega tanto ad **E** che a **ES**
- **S** si lega sia ad **E** che a **EI**.



➔ 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**

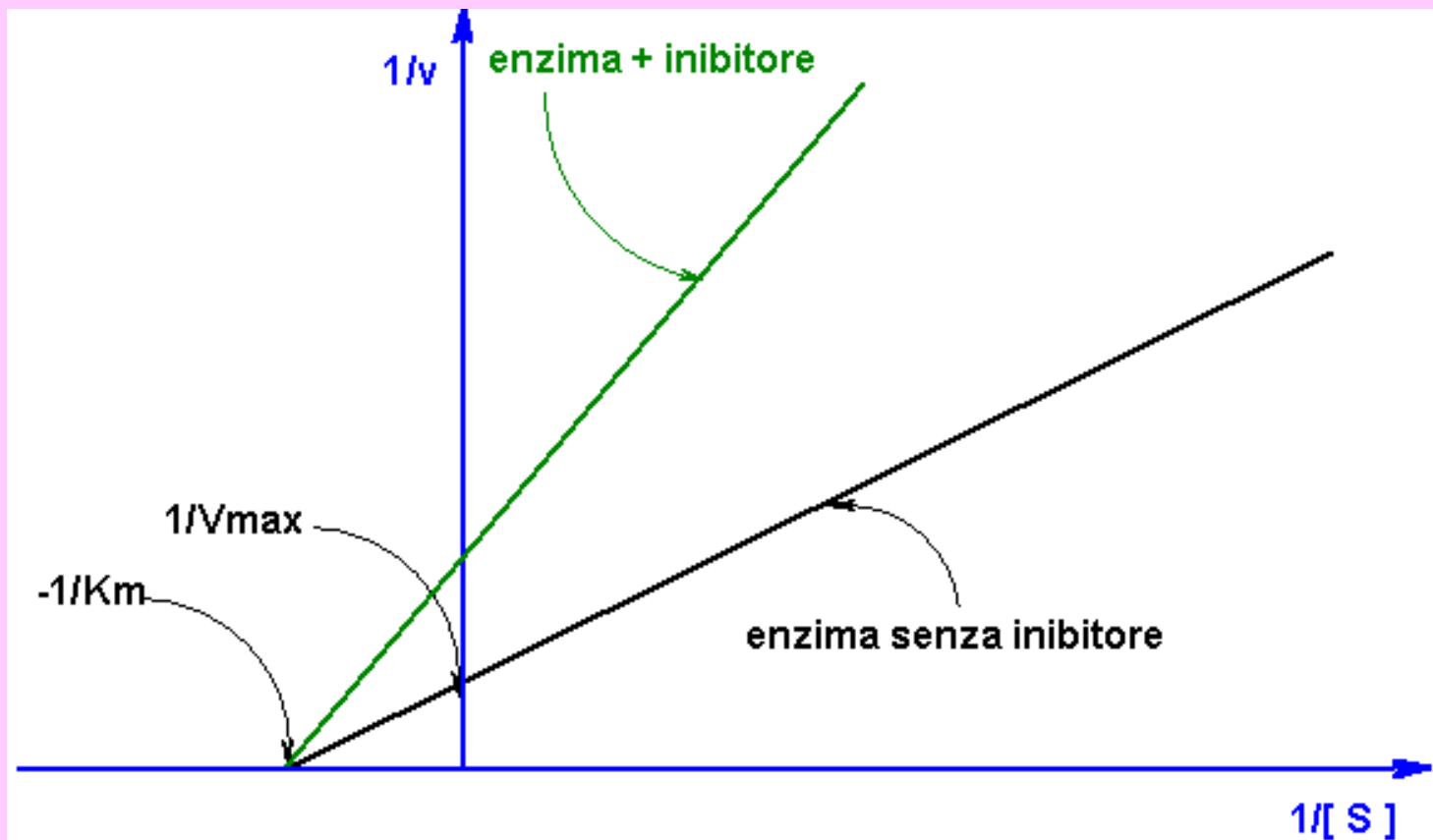


**V<sub>max</sub>** sarà più bassa in presenza dell'inibitore;

**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**



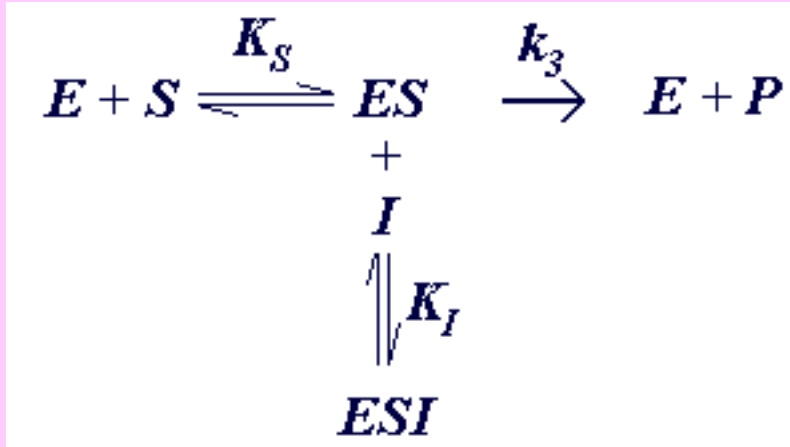
Rottura legami H

Inibizione non competitiva

- **Inibizione incompetitiva o Acompetitiva**

- Un **inibitore incompetitivo** è una sostanza che si lega reversibilmente **solo al complesso ES** dando origine al complesso non produttivo **ESI**

i rispettivi valori all'equilibrio:

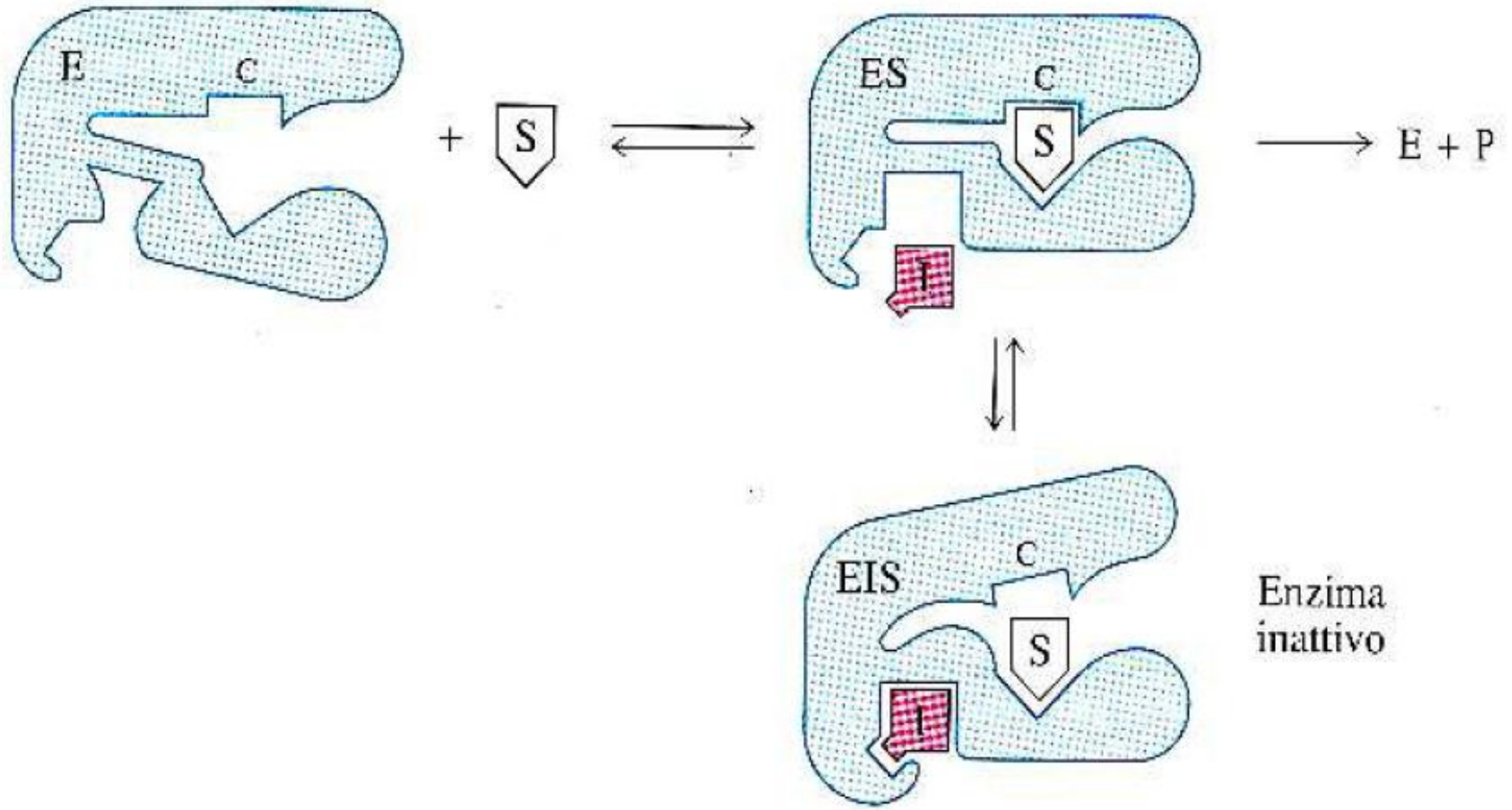


$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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

- La causa può essere:
  - o il substrato sia direttamente coinvolto nel legare l'inibitore,
  - o il substrato produca dei cambiamenti conformazionali nel sito dell'inibitore da permettergli di entrare.
- In presenza di una qualsiasi concentrazione di I , per quanto elevata possa essere la concentrazione di S,

**l'enzima non può essere presente solo come ES**

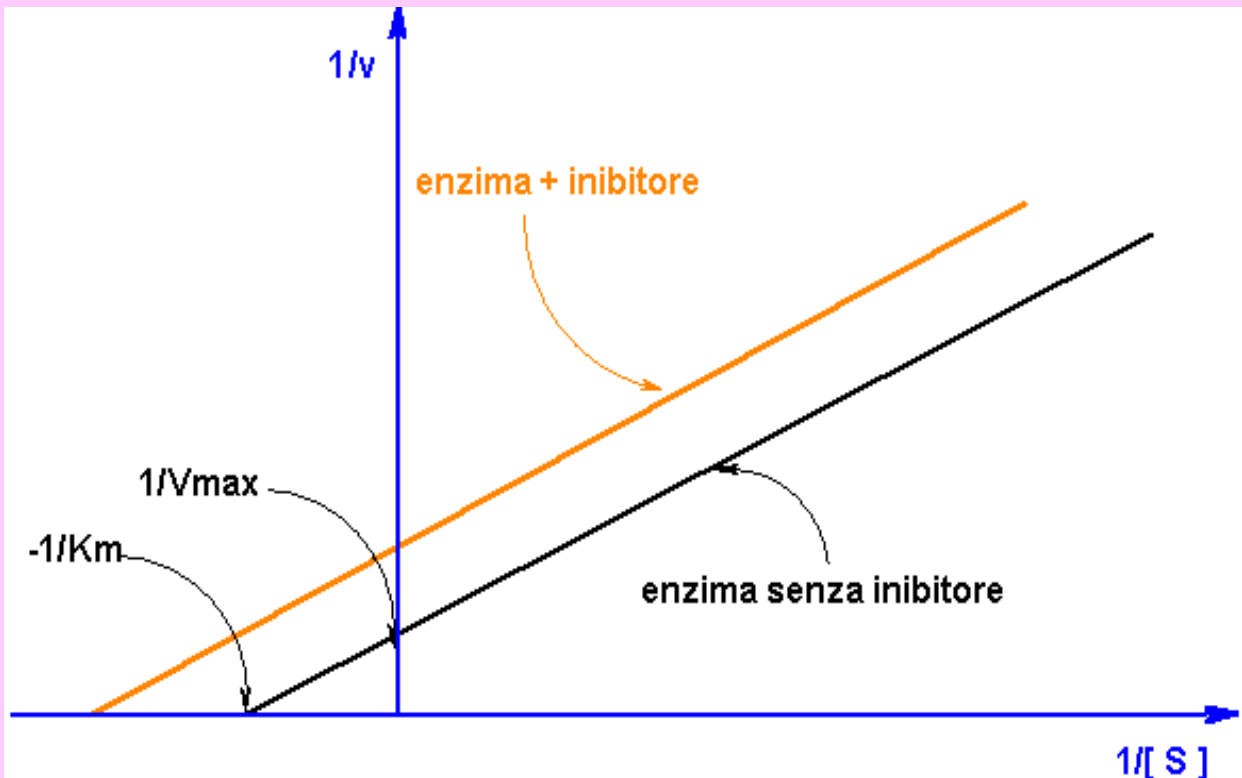


presenza di rette parallele:

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

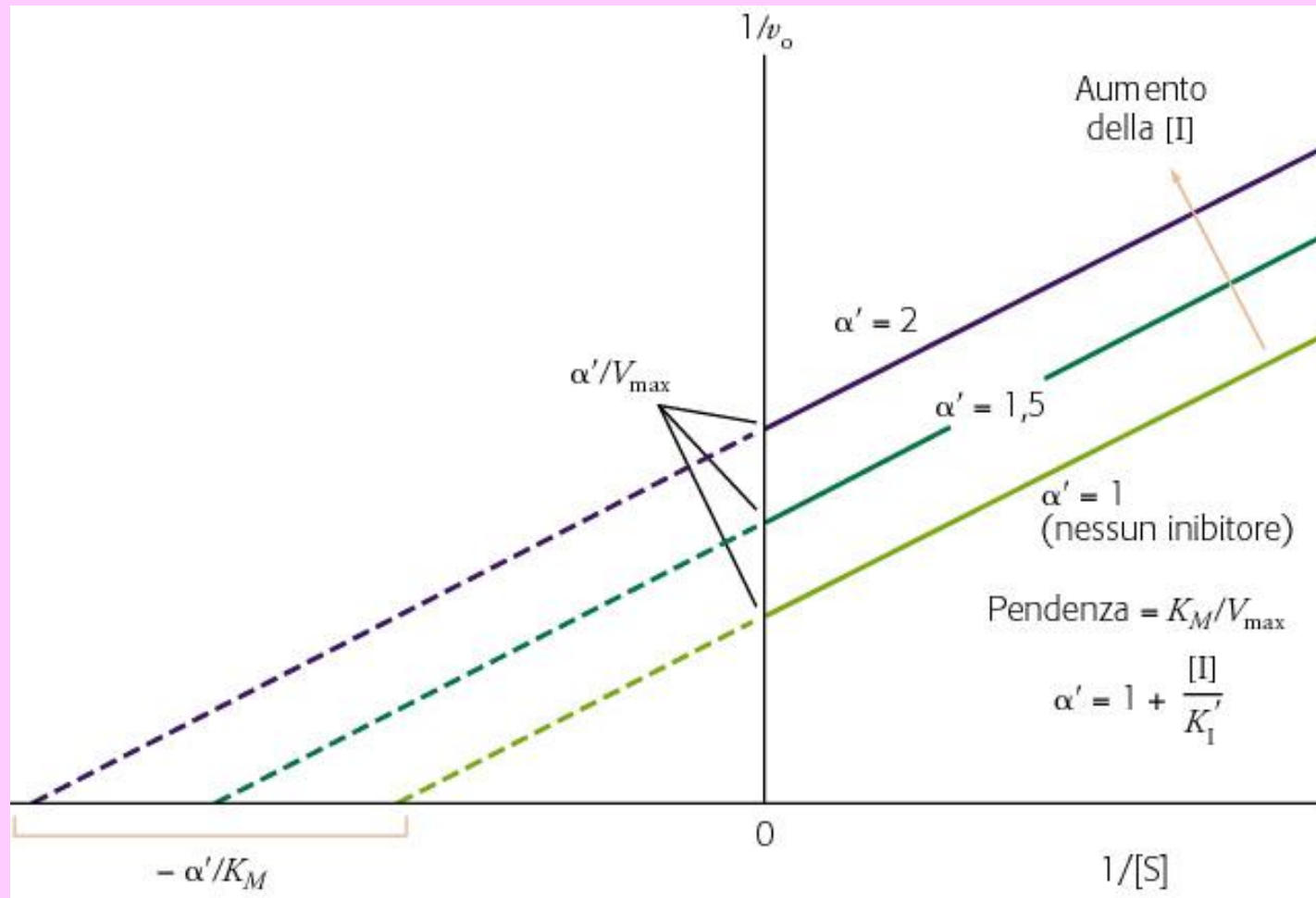
- La  $V_{max}$  raggiunta è inferiore a quella dell'E non inibito
- *il valore della  $K_m$  apparente sarà più basso:*

*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  $[S]$ .

- 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**

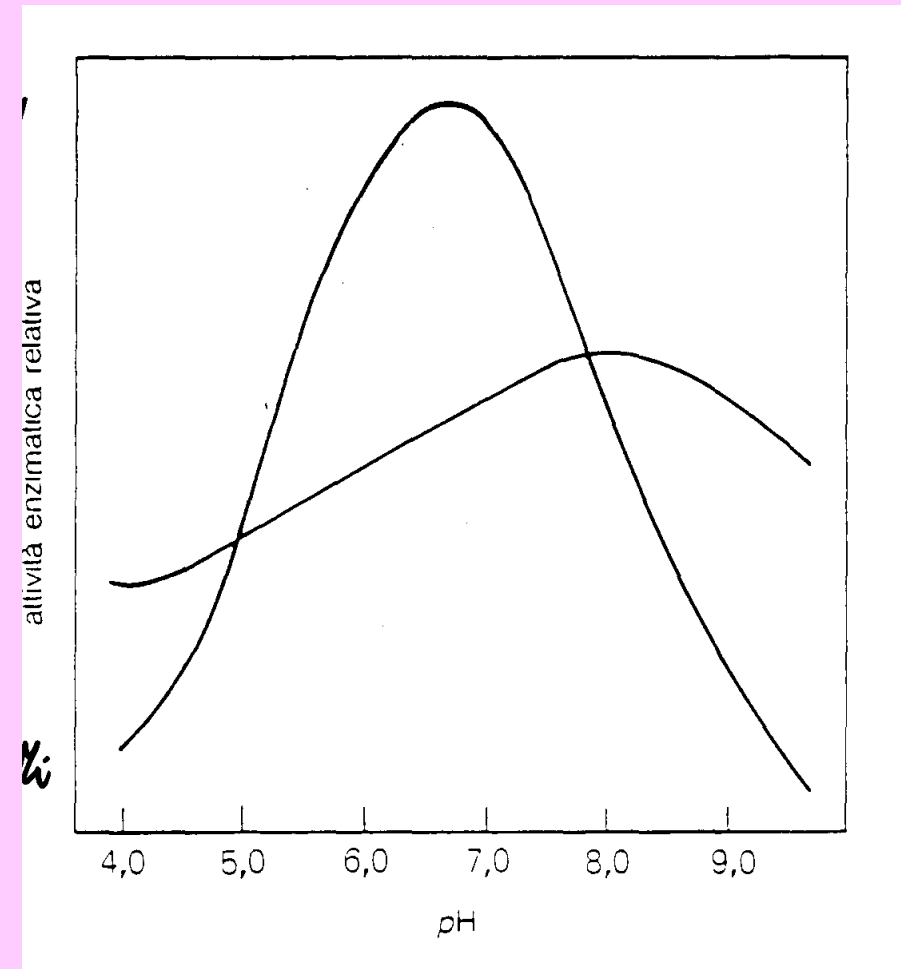
2. **Curve quasi piatte**

- 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

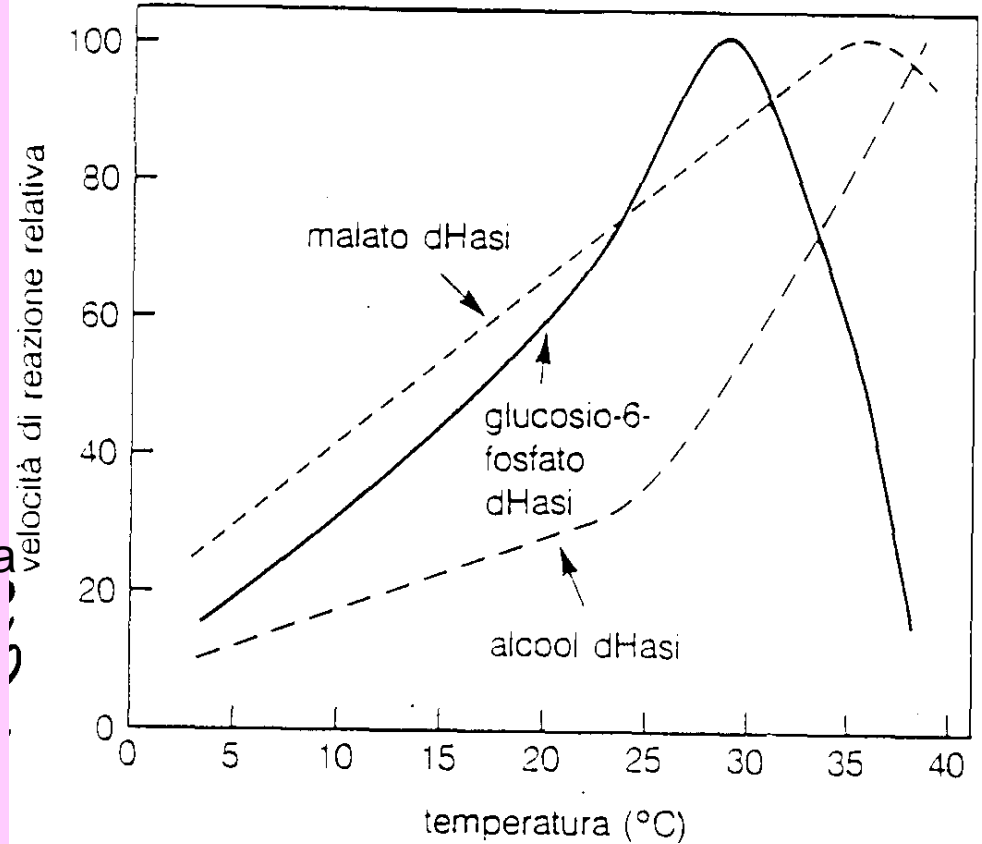
**la velocità delle reazioni enzimatiche aumenta da 0° a 35-40°C**

➔ 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 :

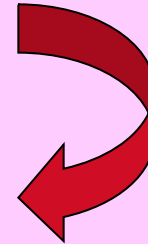
Enzimi fotosintetici con una temp ottimale di 10-15°C

- 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*

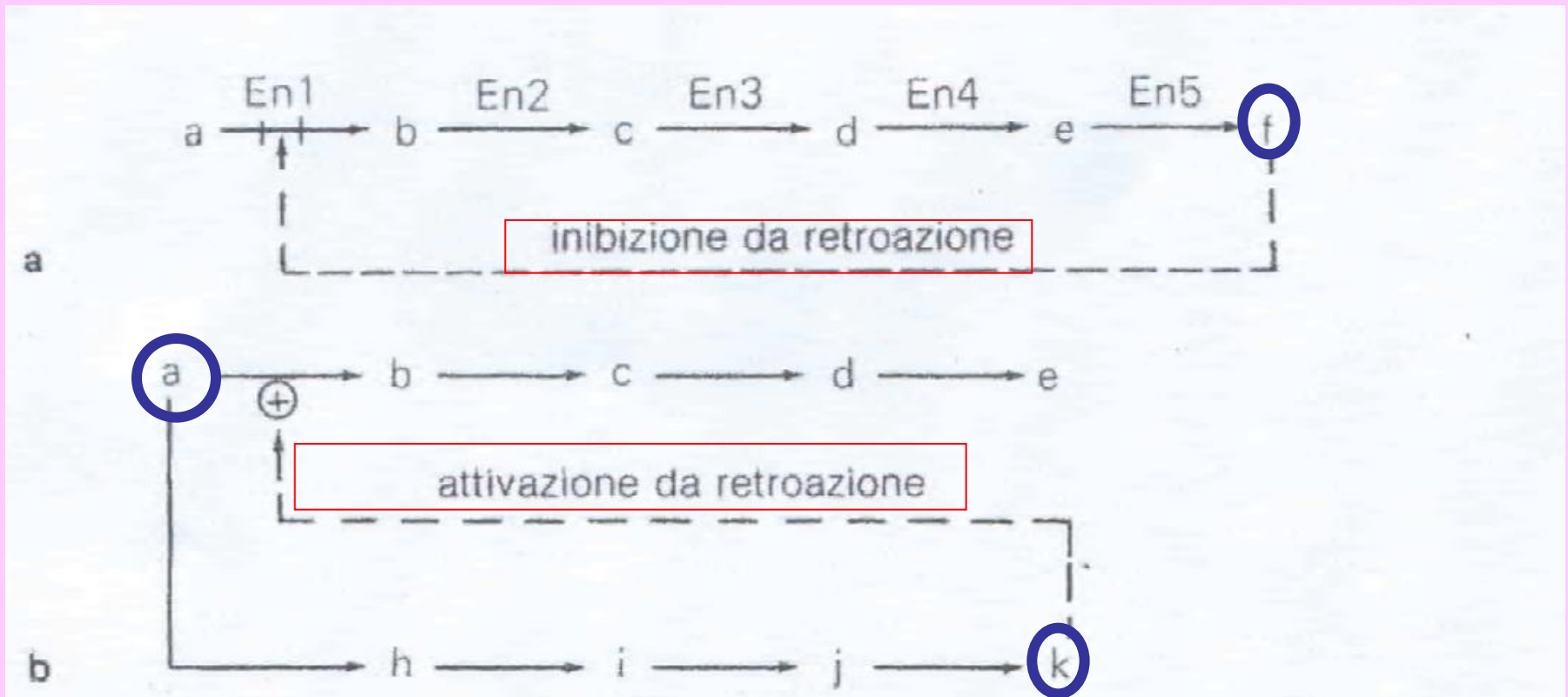


Figura 8.12. (a) *Inibizione da reazione*; (b) *attivazione da retroazione*.

# REGOLAZIONE ALLOSTERICA

## *Enzimi allosterici*


Sono proteine con maggiore complessità (+ subunità) e contengono

- **due o più siti di legame : siti allosterici**  
**(diversi e distinti dal sito catalitico)**


*Il termine allosteria deriva dal greco allos, cioè "altro", e stereos, "struttura, solido", in riferimento alla separazione del sito allosterico di una proteina dal suo sito attivo*

**la regolazione allosterica** (o allosteria) è la regolazione di un enzima mediata da una molecola detta effettore, che svolge tale funzione legandosi presso il sito allosterico.

- Gli effettori che intensificano l'attivazione della proteina vengono detti **attivatori allosterici**, quelli che al contrario diminuiscono l'attivazione sono gli **inibitori allosterici**.
- Se l'effettore di una proteina è diverso dal suo substrato si parla di **allosteria eterotropica**, quando coincide si parla di **allosteria omotropica**.
- Un modulatore allosterico omotropico è tipicamente un attivatore, un modulatore allosterico eterotropico può essere un attivatore o un inibitore
- A volte la regolazione allosterica può fungere da controllo retroattivo (*feedback negativo*) quando l'effettore allosterico inibitore è rappresentato dal prodotto della reazione enzimatica.



***Il legame dell'effettore presso il sito allosterico è in grado di modificare leggermente la struttura terziaria dell'enzima quindi di variare la sua affinità per il substrato, consentendo di incrementare o di ridurre l'attività catalitica a seconda delle esigenze della cellula.***



**• Il legame è reversibile, non covalente : **modificazione transitoria e reversibile della conformazione dell'enzima****

**• Il legame di un effettore o di un substrato al suo enzima con effetti allosterici è un legame cooperativo.**

***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).*

**cooperatività positiva**

Se la modificazione aumenta la capacità di legame (o affinità)

**cooperatività negativa**

Se questa capacità di legame viene diminuita .

Una parte degli effetti allosterici nelle proteine multimeriche può essere spiegata sia

- dal ***modello simmetrico o d'insieme o concertato*** o **MWC** proposto da Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux nel 1965
- sia da quello ***sequenziale*** descritto da Daniel Koshland e dai suoi collaboratori George Némethy e David Filmer nel 1966

**Entrambi ipotizzano che**

1. le subunità di un enzima esistano in una delle due conformazioni: **Tesa (T)** o **Rilassata (R)**,
2. le subunità rilassate leghino i substrati molto più prontamente di quelle nello stato teso.

**I due modelli differiscono soprattutto per le affermazioni sull'interazione tra subunità.**



## **Ipotesi concertata o simmetrica o d'insieme**

Le subunità 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**

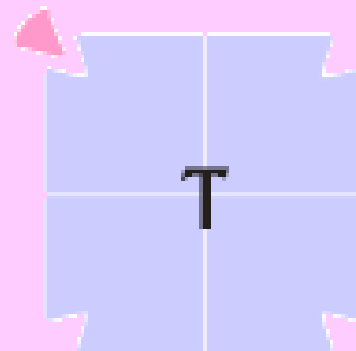
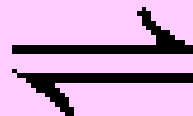
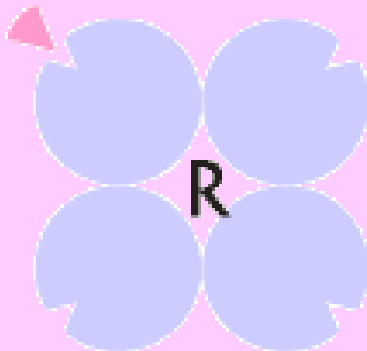
*(Conformazione Tesa)*

Se avviene un cambiamento di conformazione in un solo protomero, la stessa trasformazione è indotta negli altri in maniera concertata.

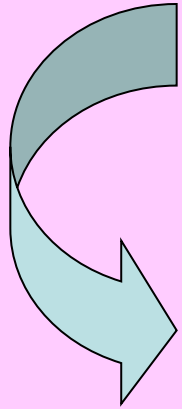
Di conseguenza, **tutte le subunità devono esistere nella stessa conformazione.**



L'assenza del ligando sposta l'equilibrio verso lo stato T,  
l'attacco del ligando lo sposta verso R.



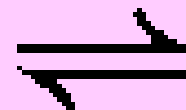
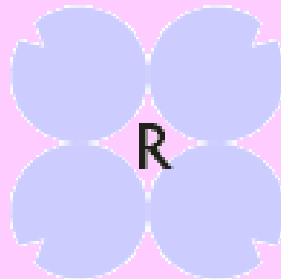
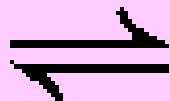
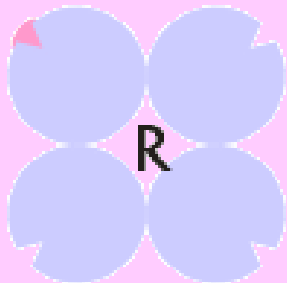
Nel caso in cui S sia il modulatore positivo:  
il **substrato** è più probabile che si leghi alla  
conformazione **R** data la **maggiore affinità**.



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

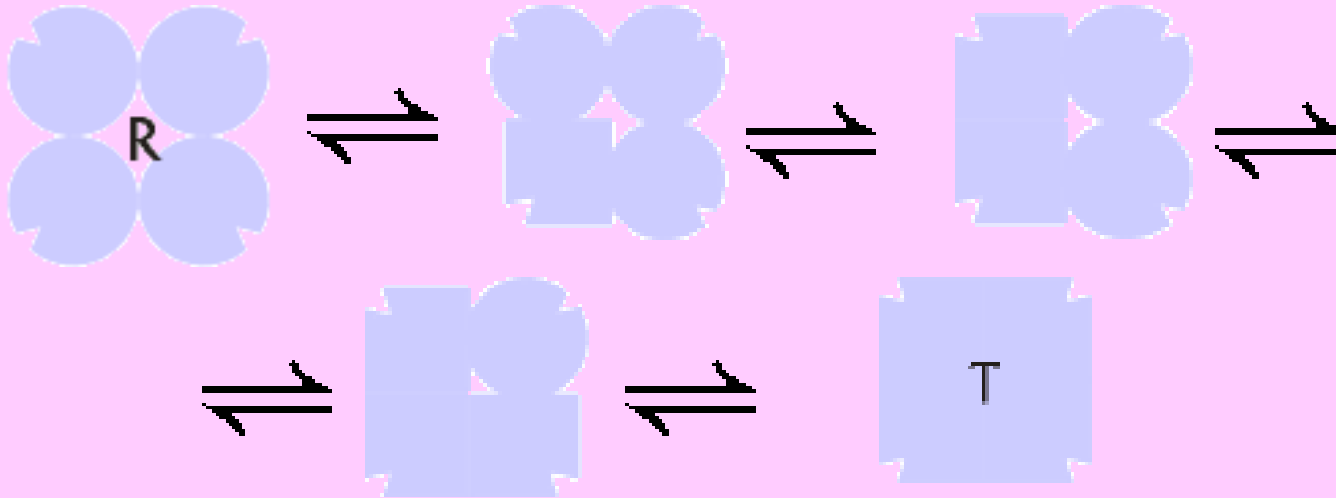
Aumento della probabilità di transizione  
dalla forma inattiva a quella attiva

***cooperatività positiva***



**L'ipotesi sequenziale:** possono trovarsi **enzimi misti**, contenenti cioè entrambe le subunità.

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



**l'effettore ha un'influenza più diretta sulla forma dell'enzima.**

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

**→ non propaga il cambiamento di conformazione alle subunità adiacenti, ma provoca una lieve alterazione nella loro struttura in modo che i loro siti leganti siano più recettivi per i substrati (maggiore affinità).**

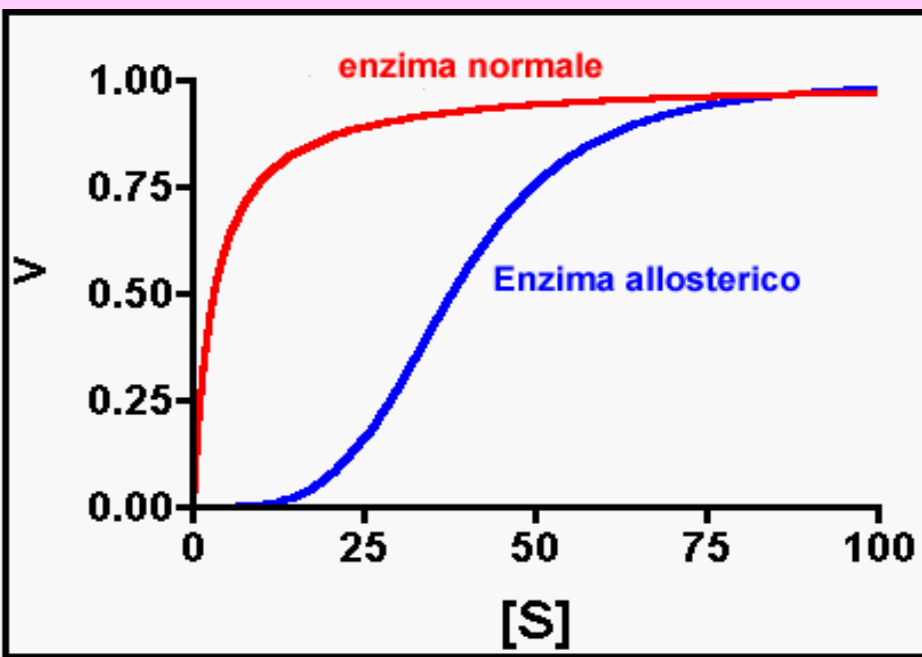
- il cambiamento di forma tende a spingere le altre subunità  
→ verso la forma R  
*cooperatività positiva da substrato*  
→ più unità si potranno trovare nello stato  
a maggiore affinità.

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.

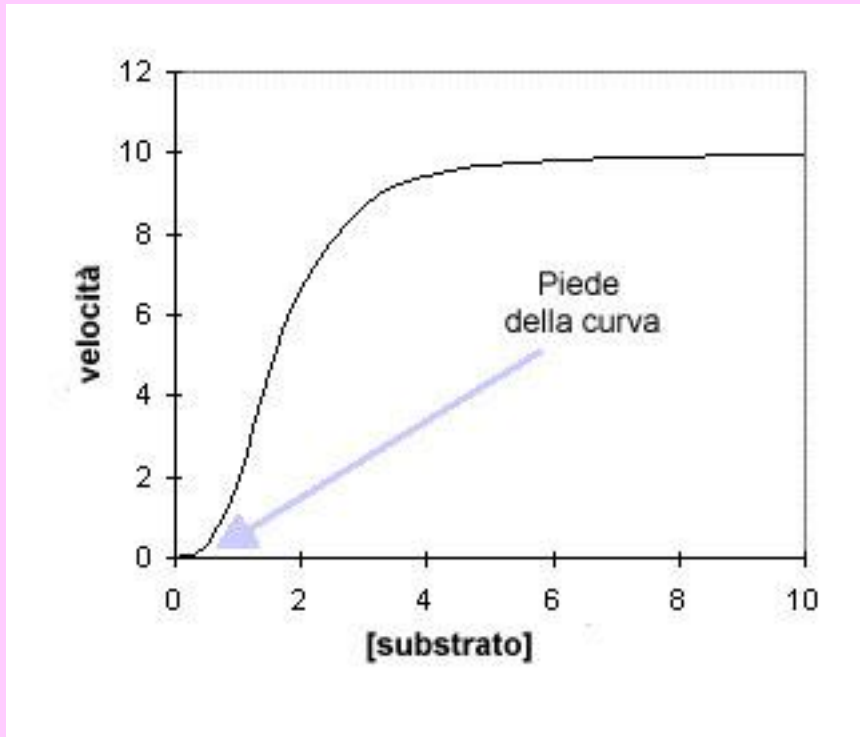
***Cooperatività Negativa da substrato*** (non è un fenomeno comune) :

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.*

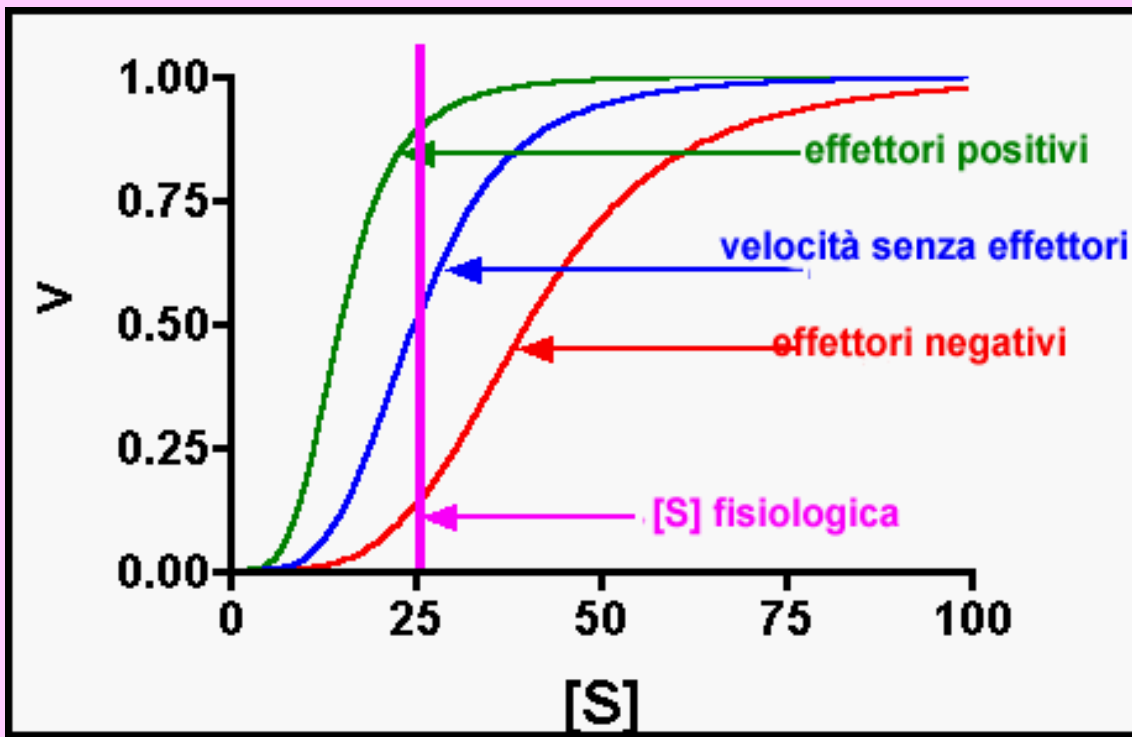
**forma sigmoidale** della curva:  
 a basse concentrazioni di substrato  
 un aumento di  
 concentrazione del substrato  
 ➔ *lieve incremento della velocità*



**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 ( $K_m$ ,  $V_{max}$ )



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 si giunge 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