


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:** Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}
- **Nucleotidi :** NAD^+ , FAD^+

Alcuni Cofattori sono associati solo temporaneamente

—————→ **COSUBSTRATI o COENZIMI**

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)

Ioni inorganici che svolgono funzione di cofattori per alcuni enzimi, molti sono micronutrienti

TABLE 6-1	Some Inorganic Ions That Serve as Cofactors for Enzymes
Ions	Enzymes
Cu²⁺	Cytochrome oxidase
Fe²⁺ or Fe³⁺	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K⁺	Pyruvate kinase
Mg²⁺	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn²⁺	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni²⁺	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn²⁺	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

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

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

→ NADH, FADH₂ (nucleotidi)

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*

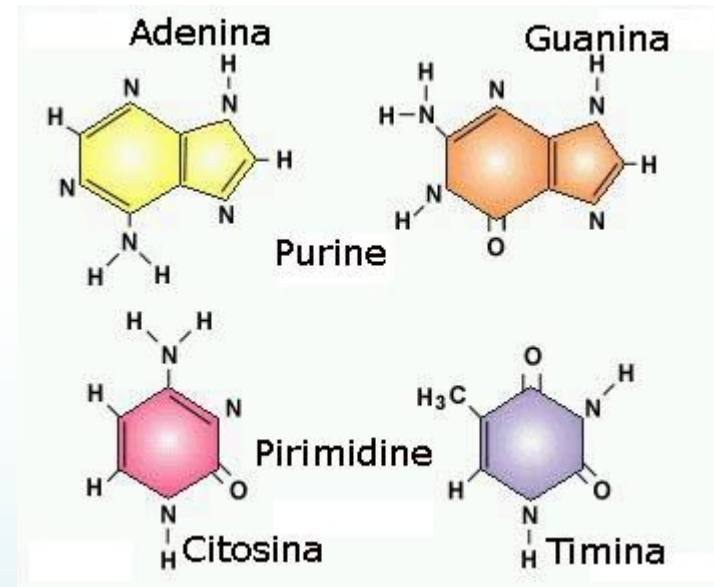
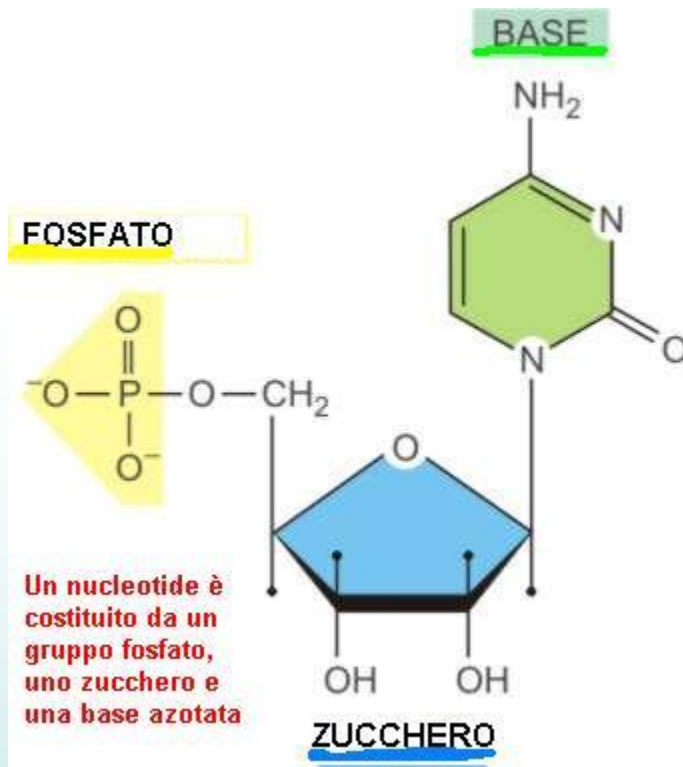
le VITAMINE devono essere presenti nella dieta

I NUCLEOTIDI sono monomeri costituiti da tre sostanze:

1. Una base azotata purinica o pirimidinica
2. Uno zucchero pentoso
3. Un gruppo fosforico

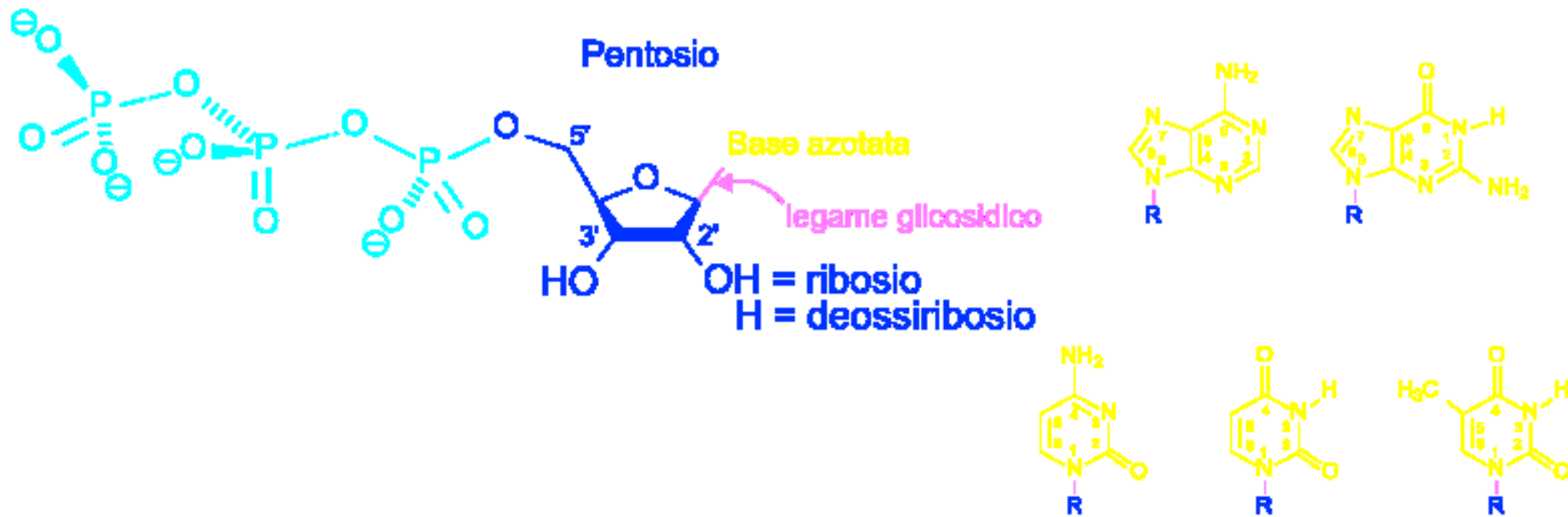
} NUCLEOSIDE

Basi azotate



I Nucleotidi sono i monomeri del DNA e RNA

L'aggiunta di uno o due altri residui fosforici nella catena produce i nucleosidi difosfato e trifosfato (NDP e NTP), fondamentali nel metabolismo energetico della [cellula](#).



I nucleotidi entrano anche a far parte della struttura di coenzimi : *NAD*, *FAD*, *CoA* che entrano a far parte del meccanismo di catalisi enzimatica come trasportatori di atomi (H) o gruppi (acile, acetile..).

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



Per completare il ciclo catalitico,

il coenzima deve tornare al suo stato originale:



reazione di rigenerazione

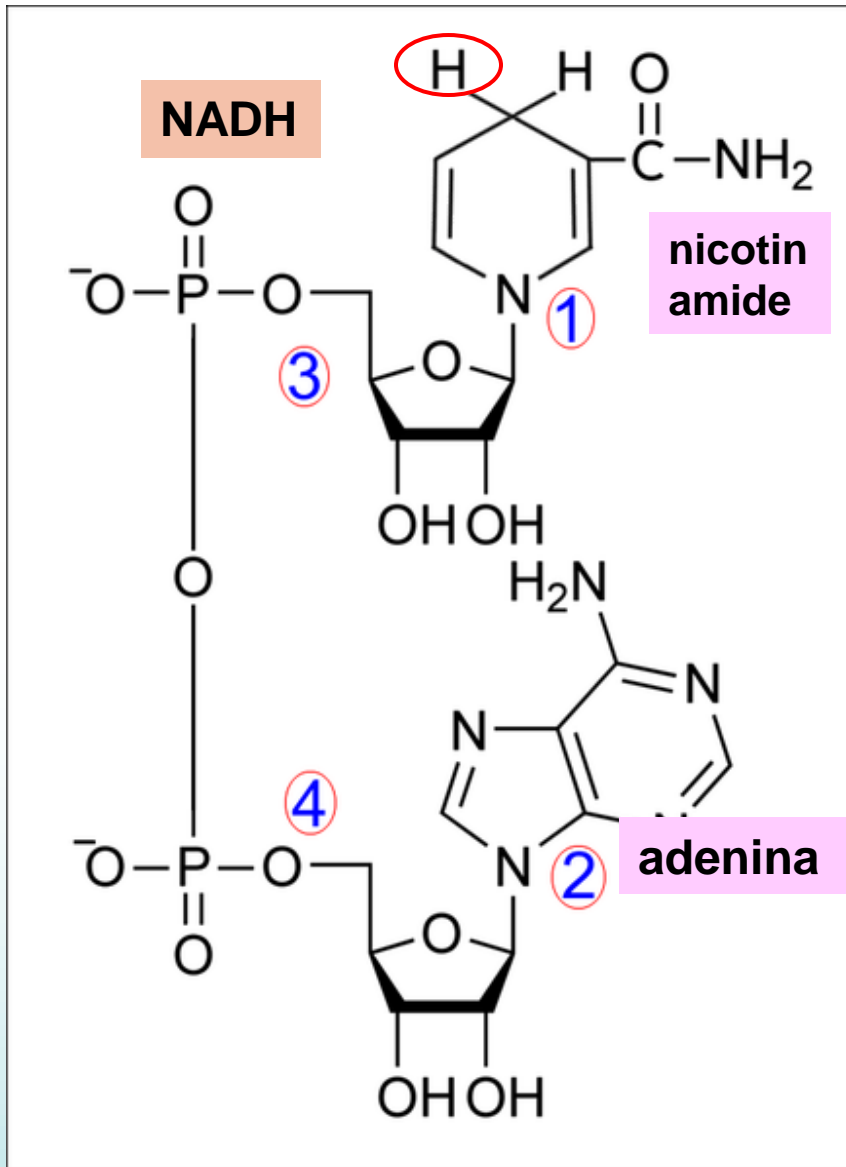
anche a carico di un E. diverso



Alcune **vitamine idrosolubili** sono precursori di coenzimi

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

NAD= Nicotinammide-adenin -dinucleotide è un nucleotide PIRIMIDINICO

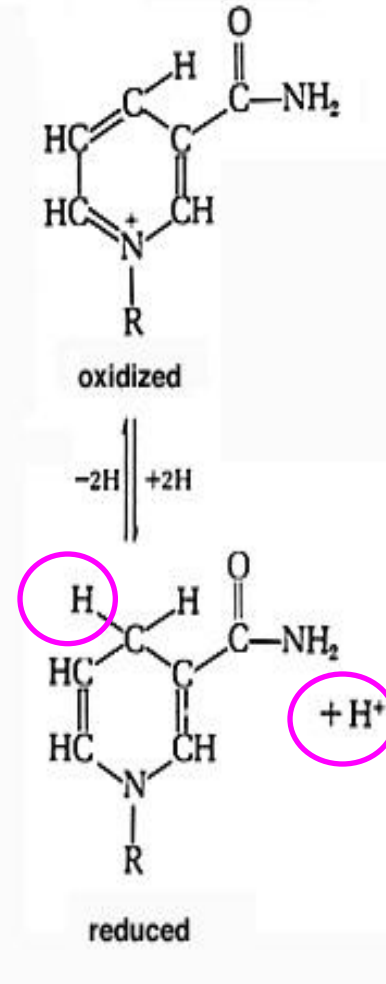
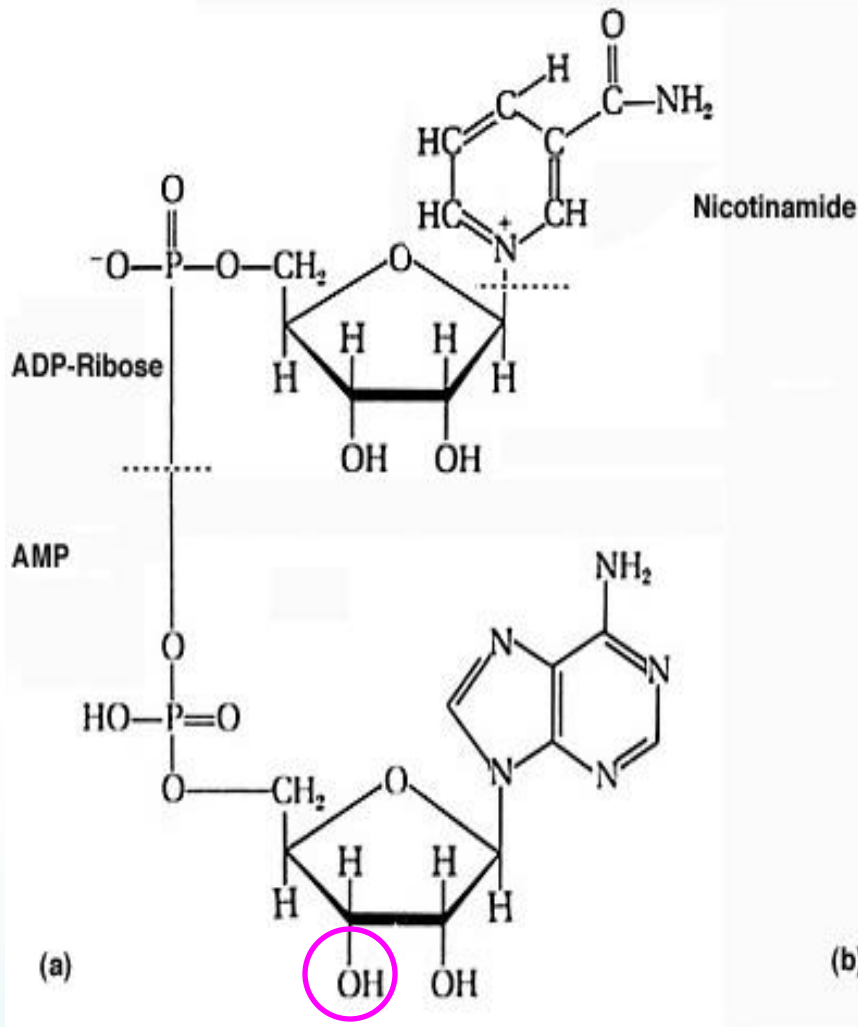


Il gruppo funzionale è la **nicotinammide**, derivata dall'*acido nicotinic* o niacina o vitamina PP, (Pellagra-Preventing) potendo donare/accettare atomi di idrogeno.

Si tratta di un **di-nucleotide**: 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^+ .

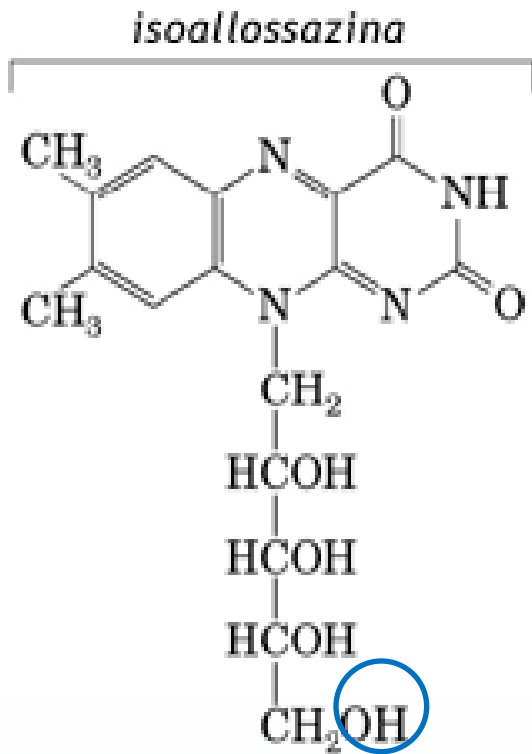


A differenza dalle flavoproteine, i coenzimi pirimidinici non sono legati saldamente alla deidrogenasi, ma funzionano piuttosto come *cosubstrati*.

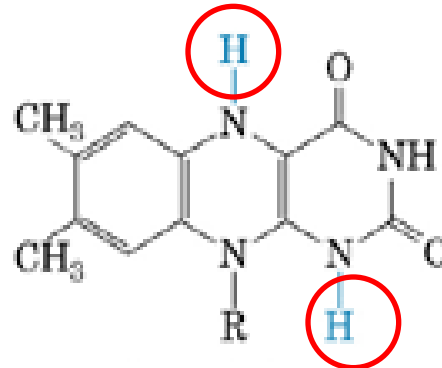
Nucleotidi Flavinici

FMN= Flavin Mono nucleotide

FAD= Flavin Adenin Dinucleotide



Riboflavina



Forma ridotta del gruppo funzionale del coenzima (FADH₂ o FMNH₂)

sono i coenzimi derivanti dalla

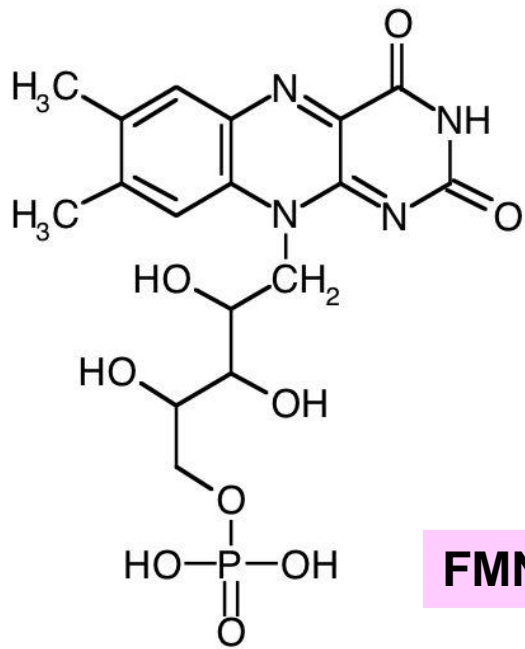
RIBOFLAVINA

(Vit B2)

FAD e FMN sono coenzimi di enzimi che trasferiscono elettroni.

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

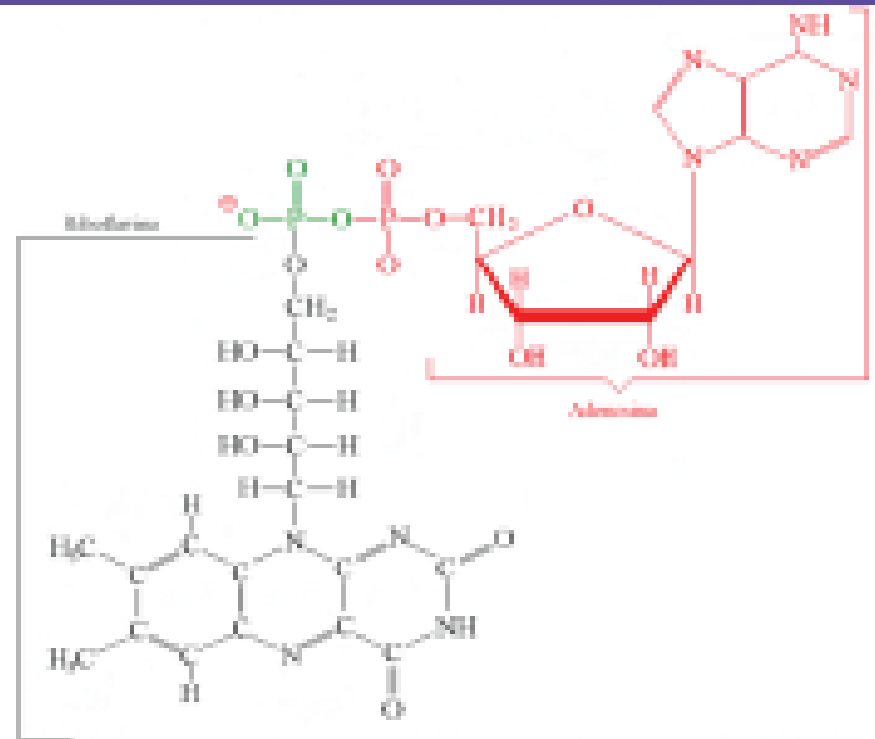
Entrambi i coenzimi sono saldamente legati alla proteina → **gr. prostetici;**



Il **FMN** (Flavin Mono Nucleotide) è semplicemente la riboflavina fosforilata sul CH₂OH terminale. Non è un vero nucleotide, manca dello zucchero pentosio.

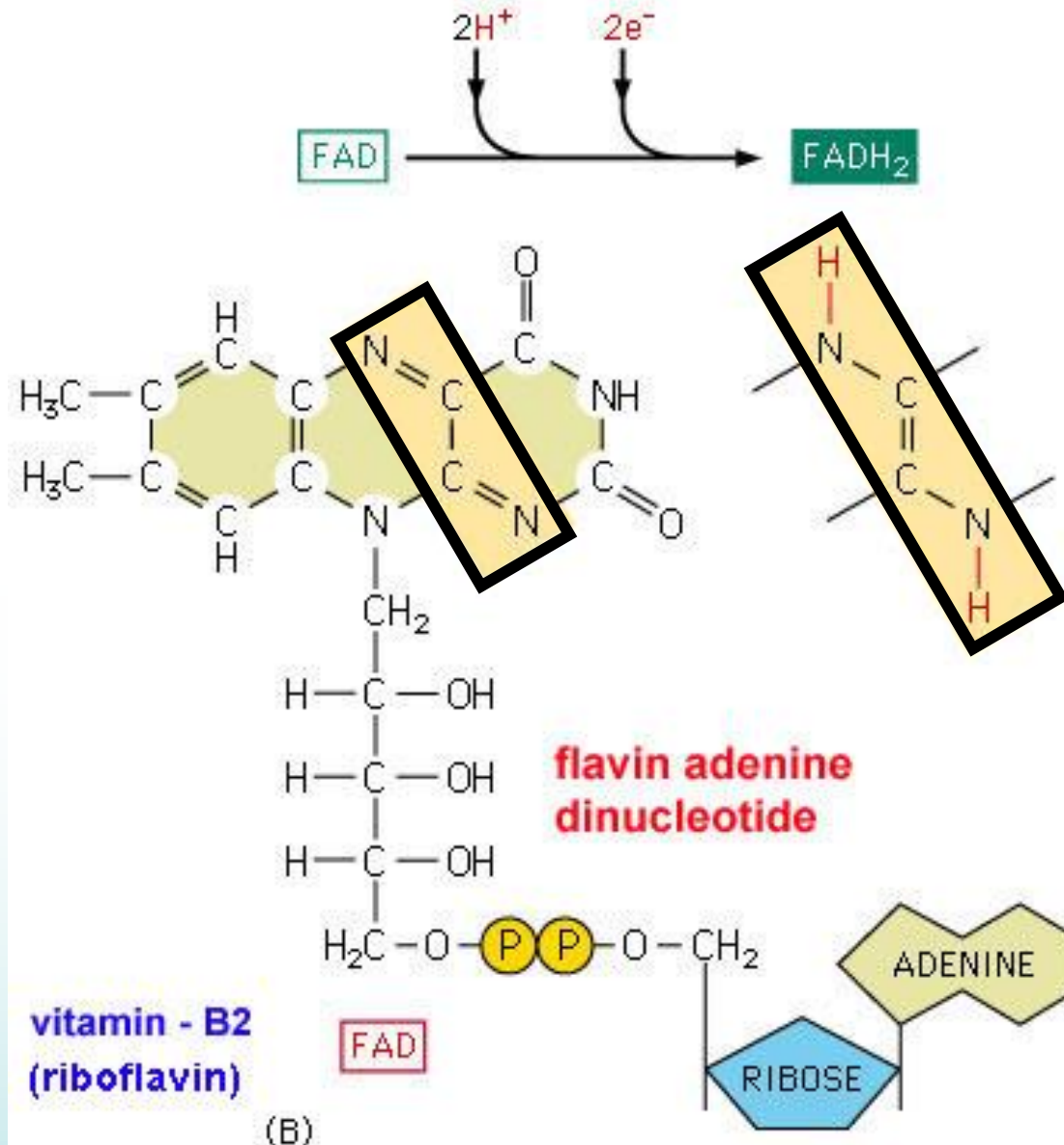
Se l'FMN, reagisce con una molecola di ATP che rilascia sia il *nucleotide adeninico* che il *gruppo fosfato in α*.

➔ **formazione del FAD**



Nucleotidi Flavini

FAD Flavinadenindinucleotide



Nel **FAD** (Flavin Adenin Dinucleotide), la riboflavina è legata tramite il CH₂OH terminale al gruppo pirofosforico di un ADP

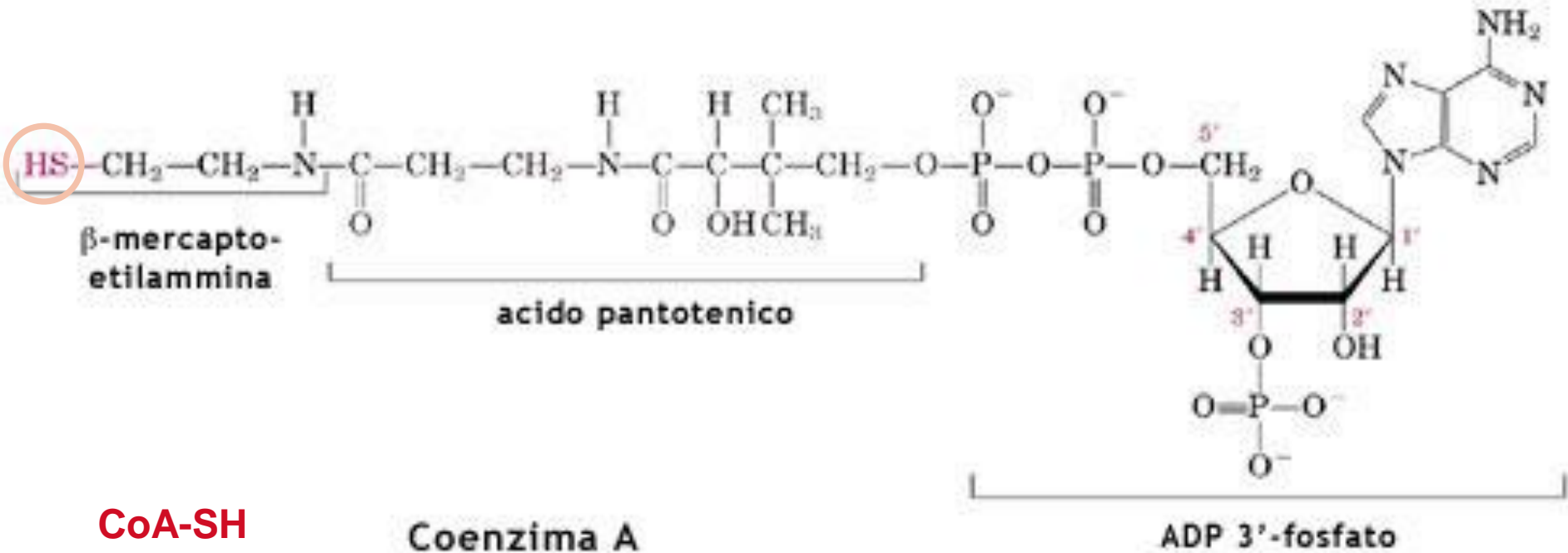
L'acido pantotenico (vitamina B5) è un componente **essenziale del Coenzima A**.
va incontro ad una fosforilazione e **legame con β -mercapto-etilammina**

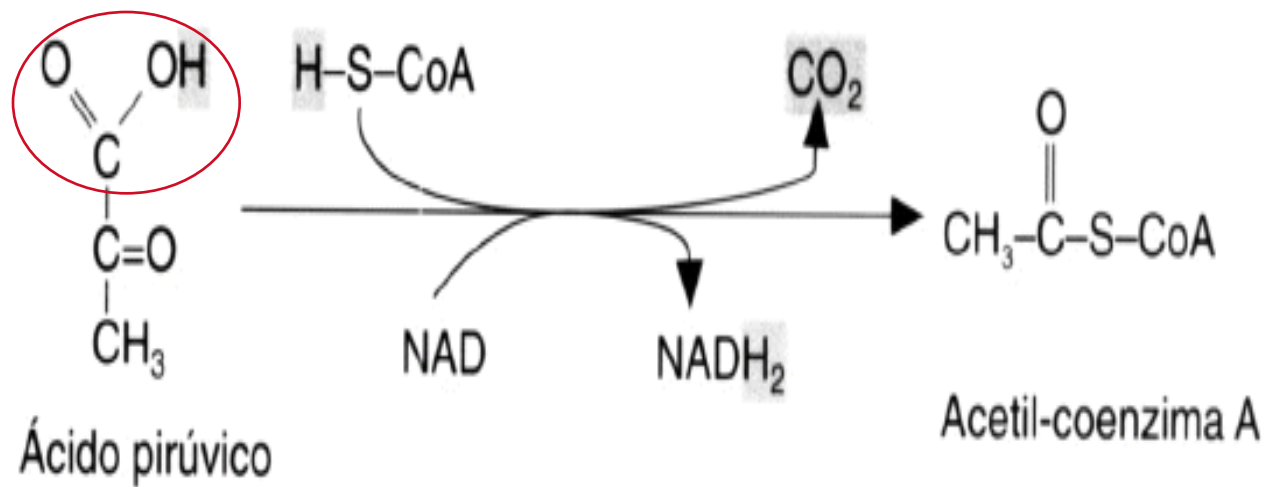
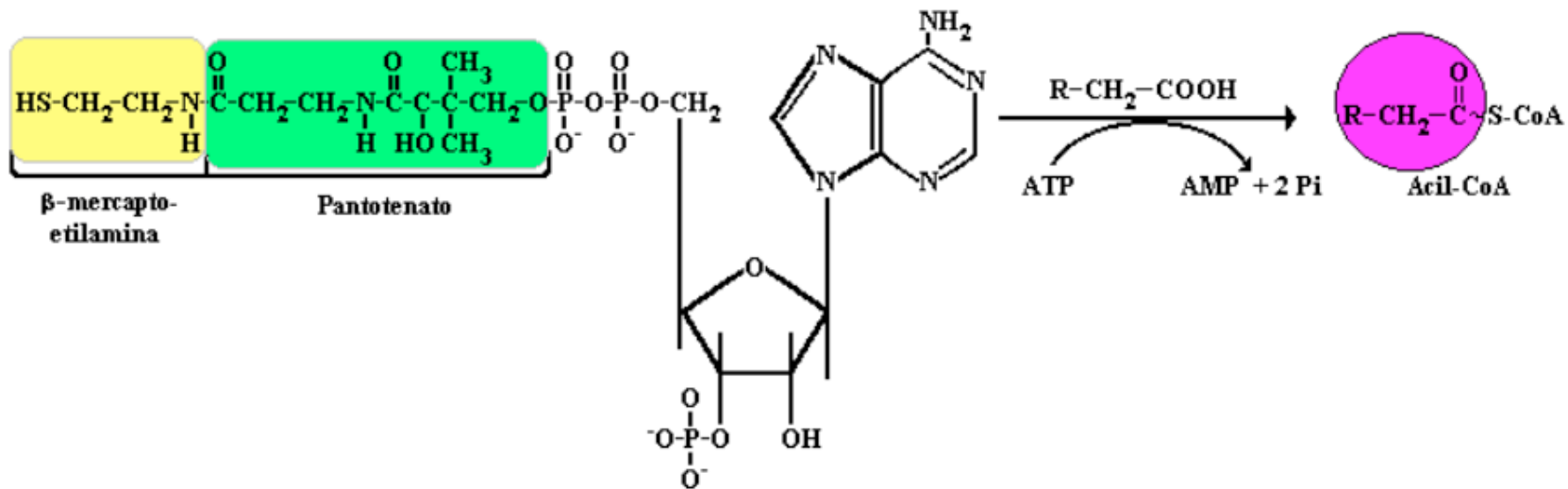
*Il Coenzima A ha la funzione di trasportare
gruppi acetile in forma "attivata".*

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.





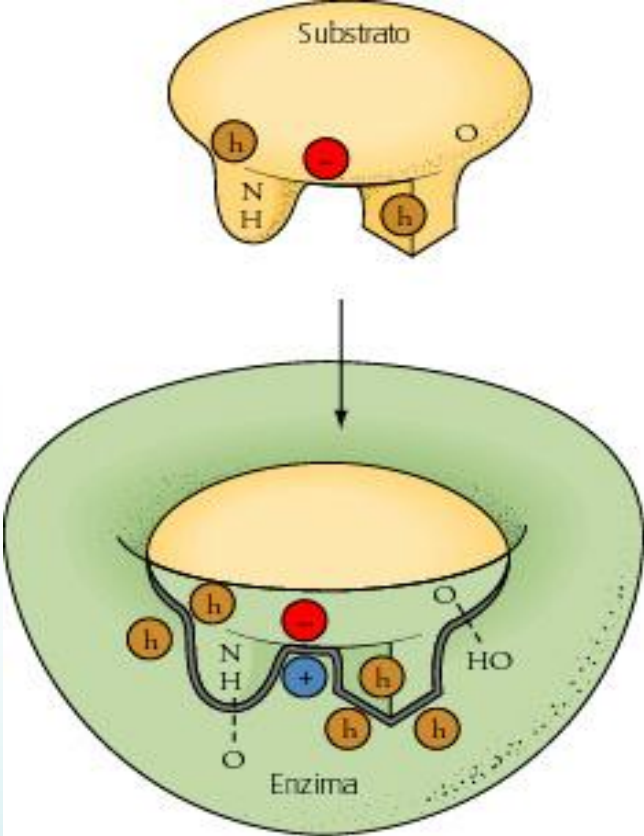
Il piruvato viene decarbossilato e da origine a una forma attivata di acetato :
Acetil-CoA

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

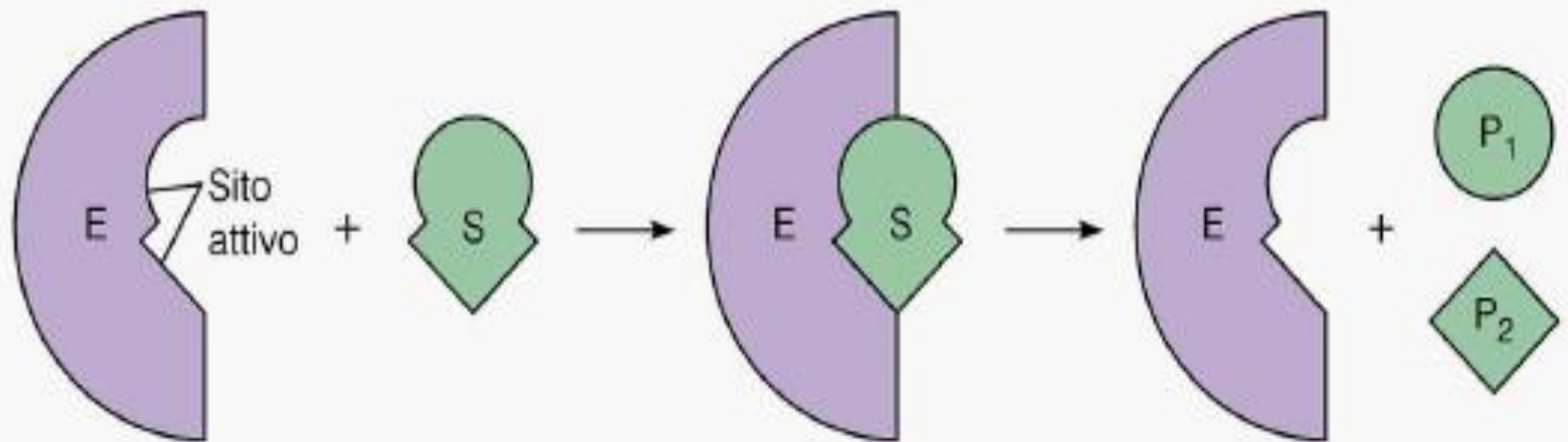
Adattamento indotto



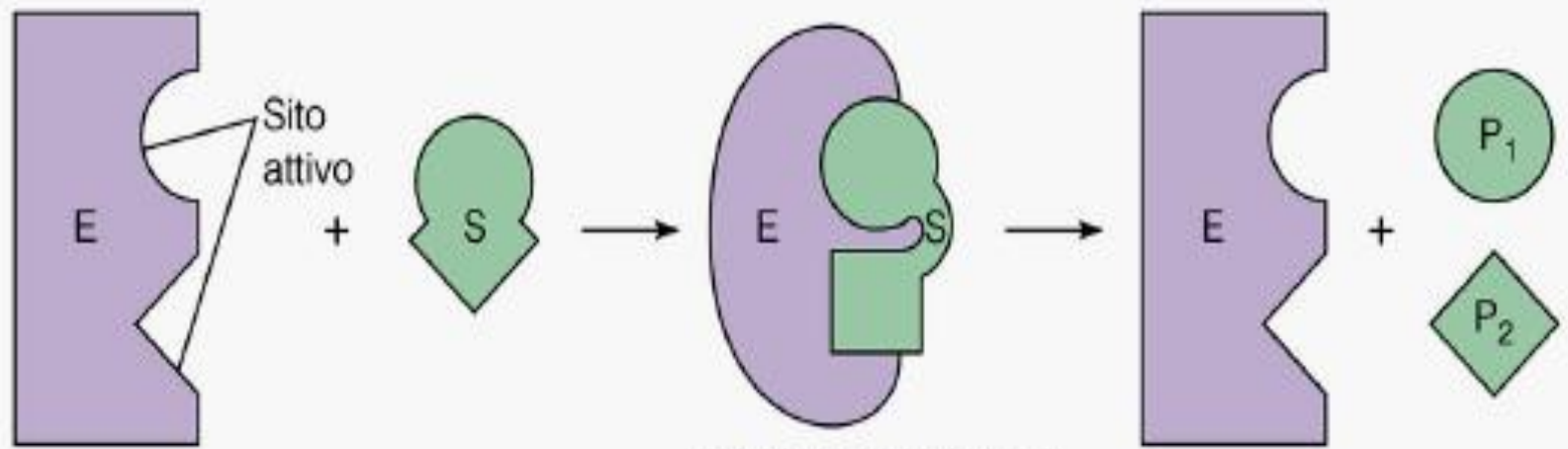
La vicinanza di S o P all'Enzima provoca

modificazioni della conformazione del sito attivo dell'E

Migliore combinazione E-S e E-P

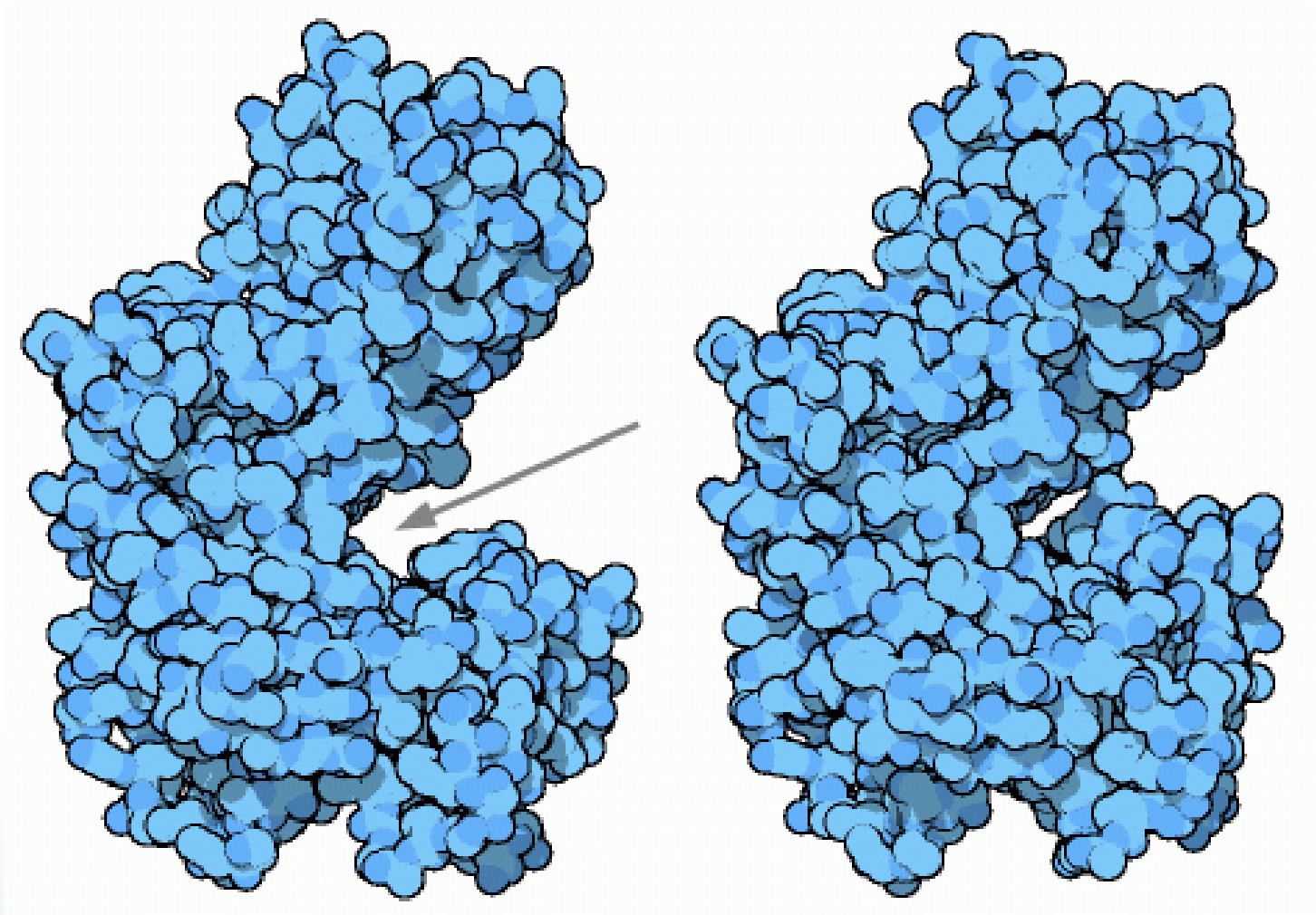


(a) Modello chiave-serratura



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

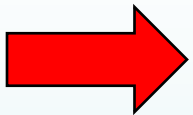
Come agisce un'enzima ?

Modifica la VELOCITÀ DI UNA REAZIONE

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)



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

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

K = cost. di velocità è una 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

ΔG fra reagenti e prodotti

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

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

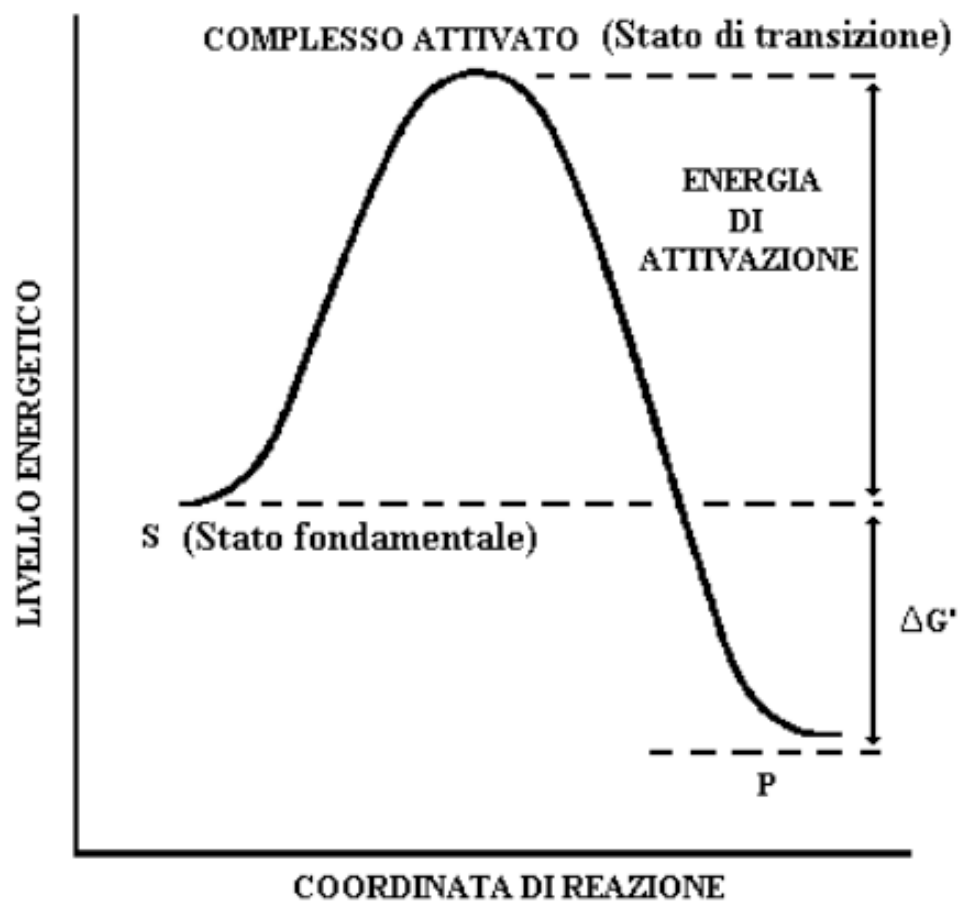
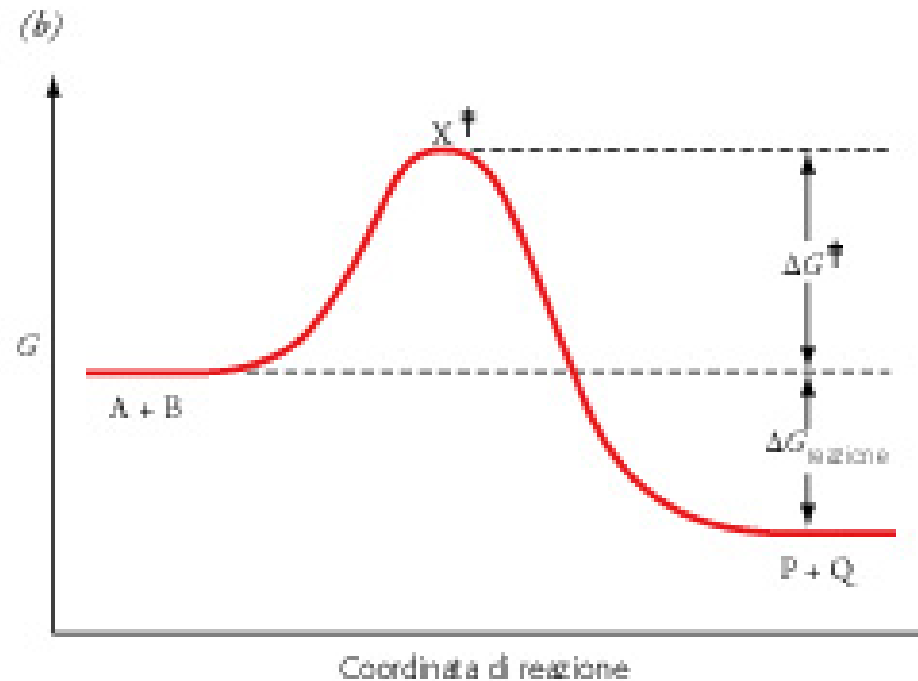
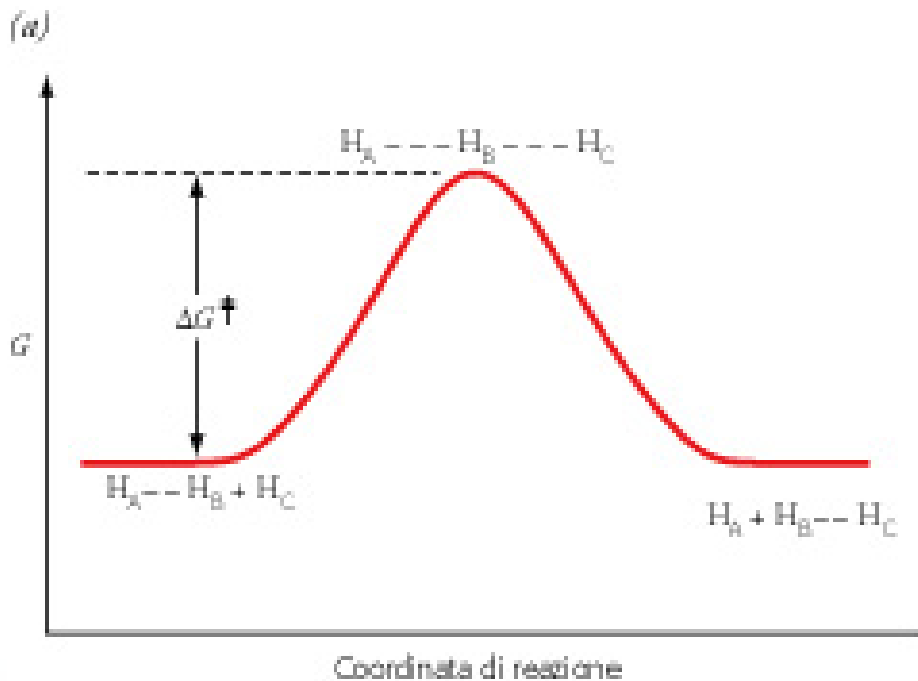


Figura. Profilo energetico di una reazione chimica

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°C

$$Q_{10} = 2$$

2. Impiego di un catalizzatore



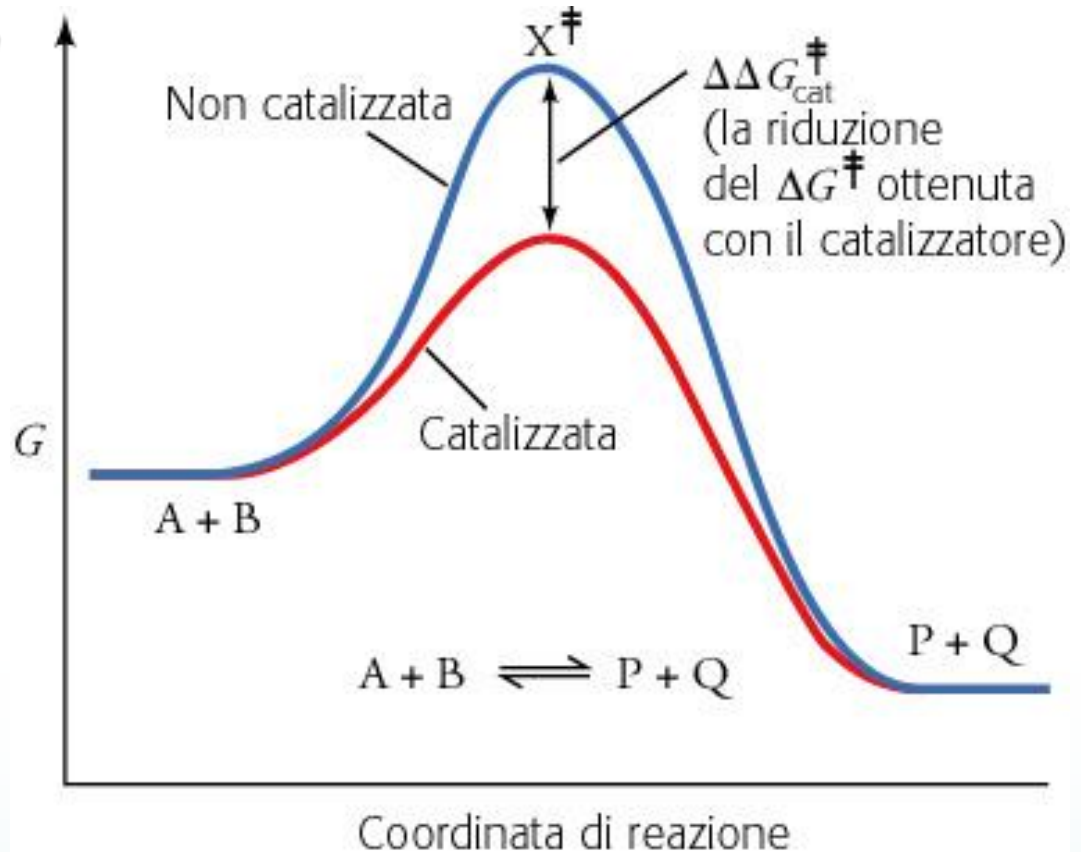
abbassamento della barriera energetica

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

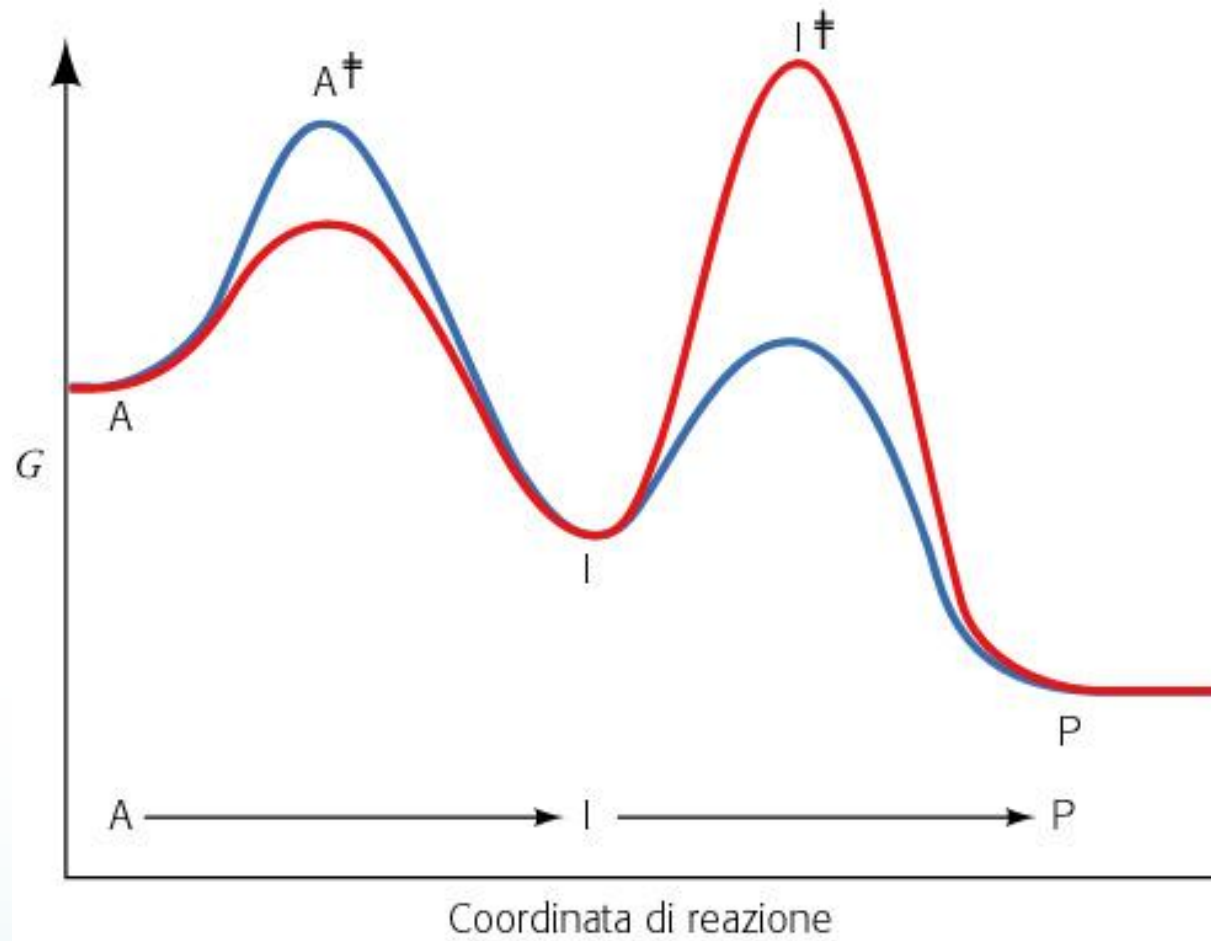
Abbassamento dell'energia di attivazione



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

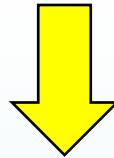


Reazione chimica a 2 tappe

- 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
- Il prodotto di reazione può inibire l'attività dell'enzima
- L'enzima può andare incontro a denaturazione

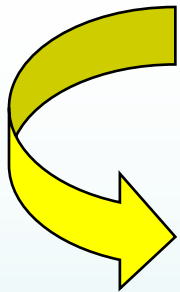


Per misurare la velocità di una reazione enzimatica conviene misurare la velocità iniziale (V_0)

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

$$S \gg E$$

- *Se il tempo di analisi è ridotto misurando la velocità iniziale (V_0)*



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:

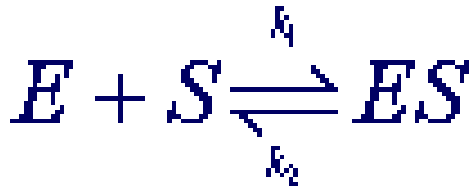


La **prima assunzione** è nota come del "quasi equilibrio" o dello "equilibrio rapido"

- ***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**

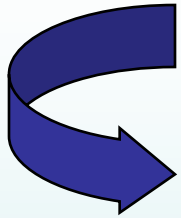


Il complesso ES si scinde in una **reazione lenta** che rappresenta la tappa limitante

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

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:



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

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**

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

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

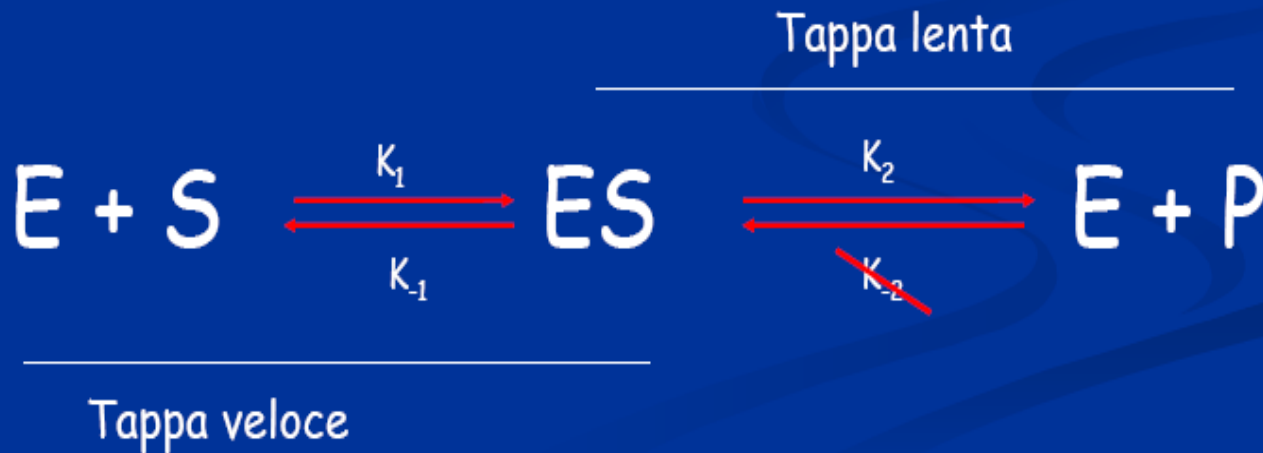
Espressione della massima velocità ottenibile

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



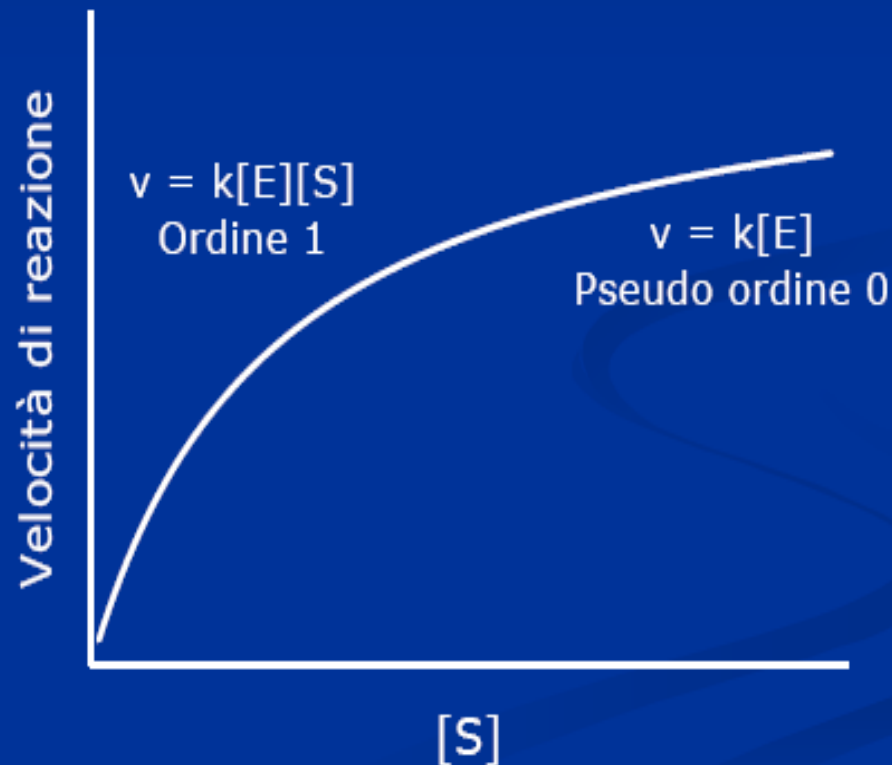
$$k_3 [ES] = V_{max}$$

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

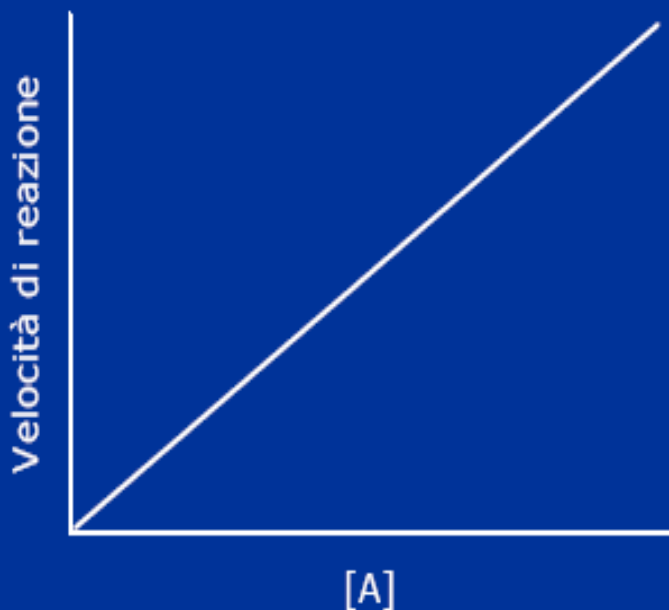
- In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile



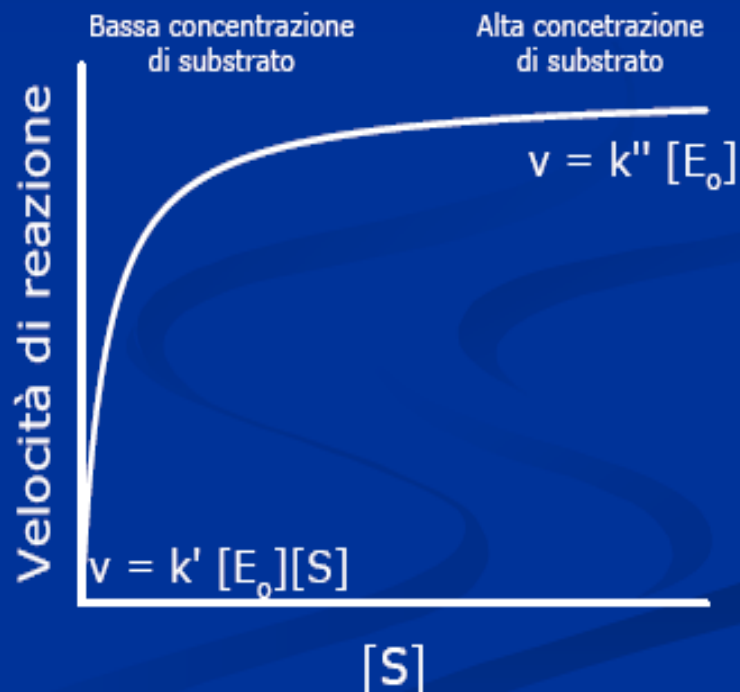
In una reazione chimica



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



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**



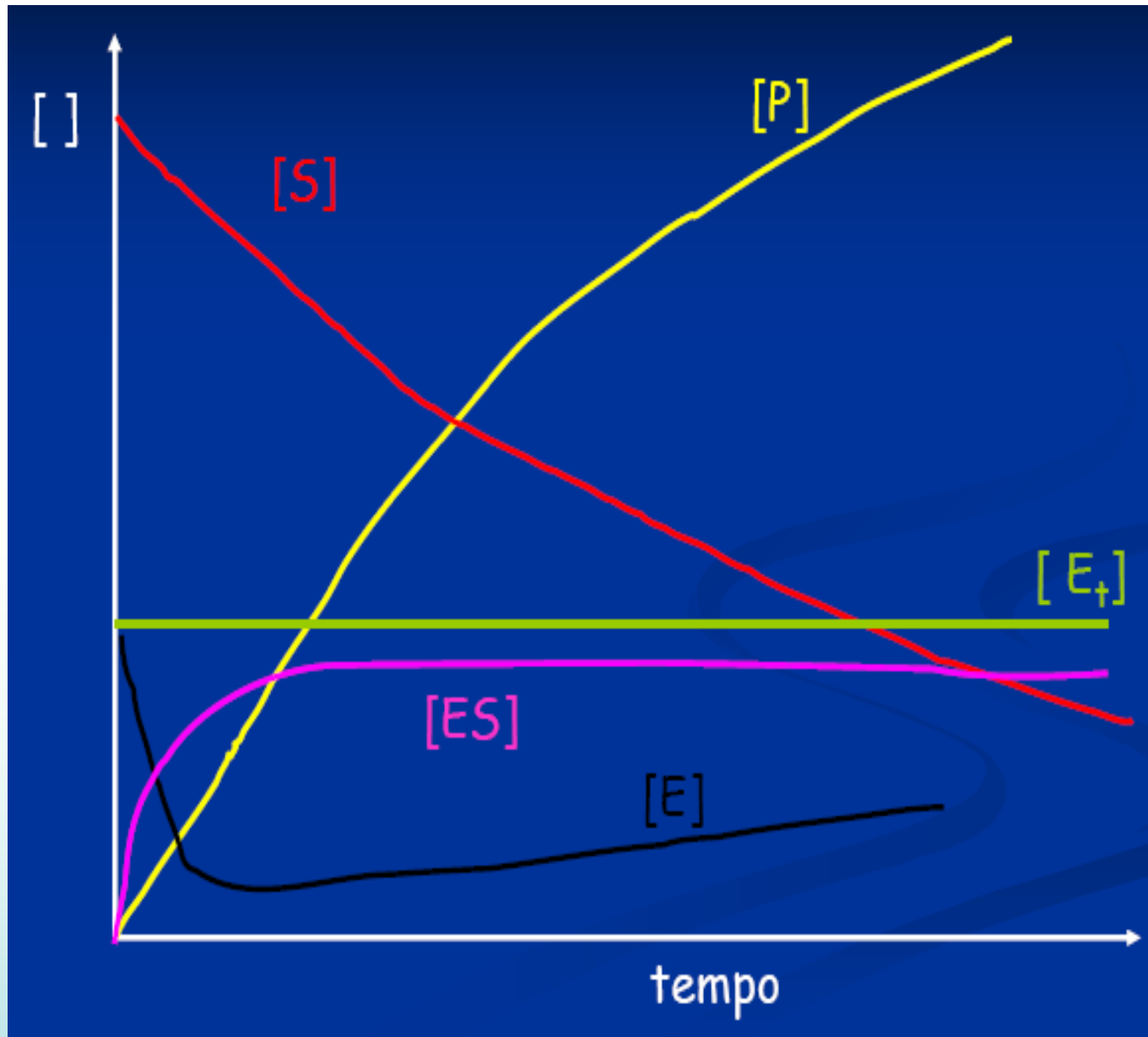
Stato prestazionario

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

Stato stazionario

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

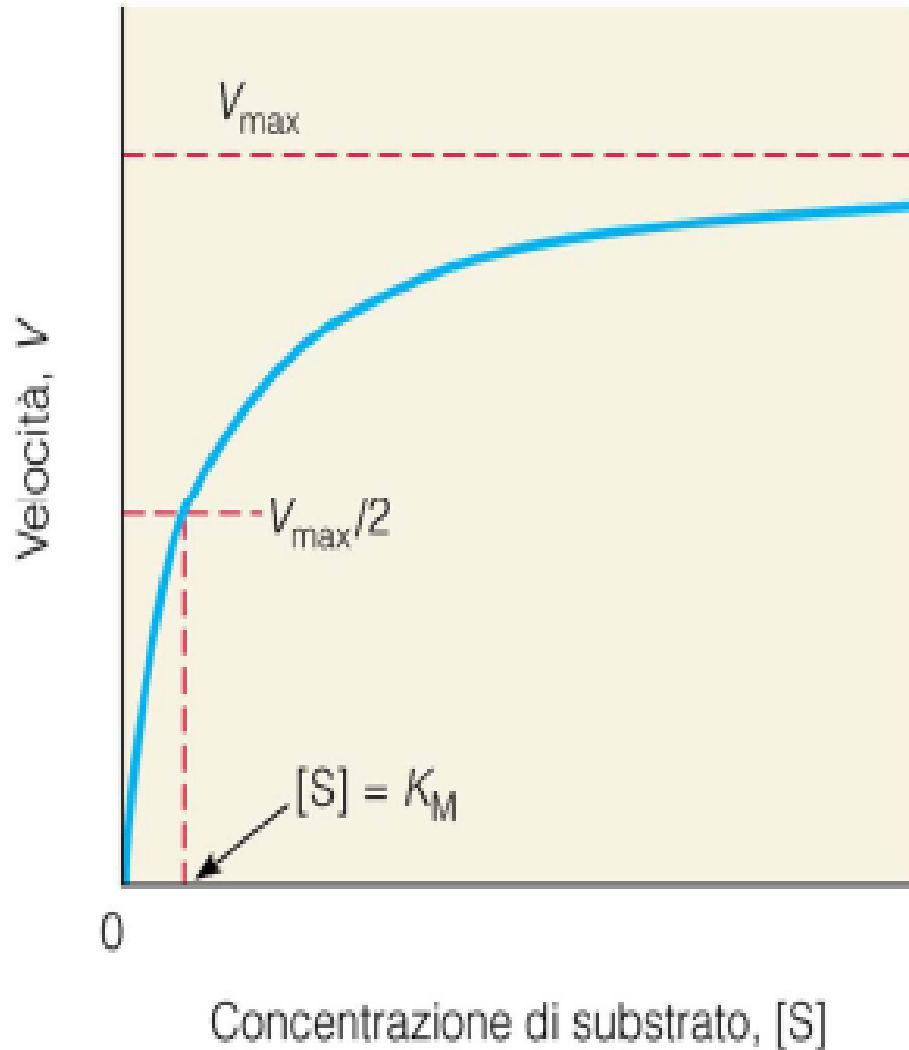
RAPPRESENTAZIONE GRAFICA



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**.

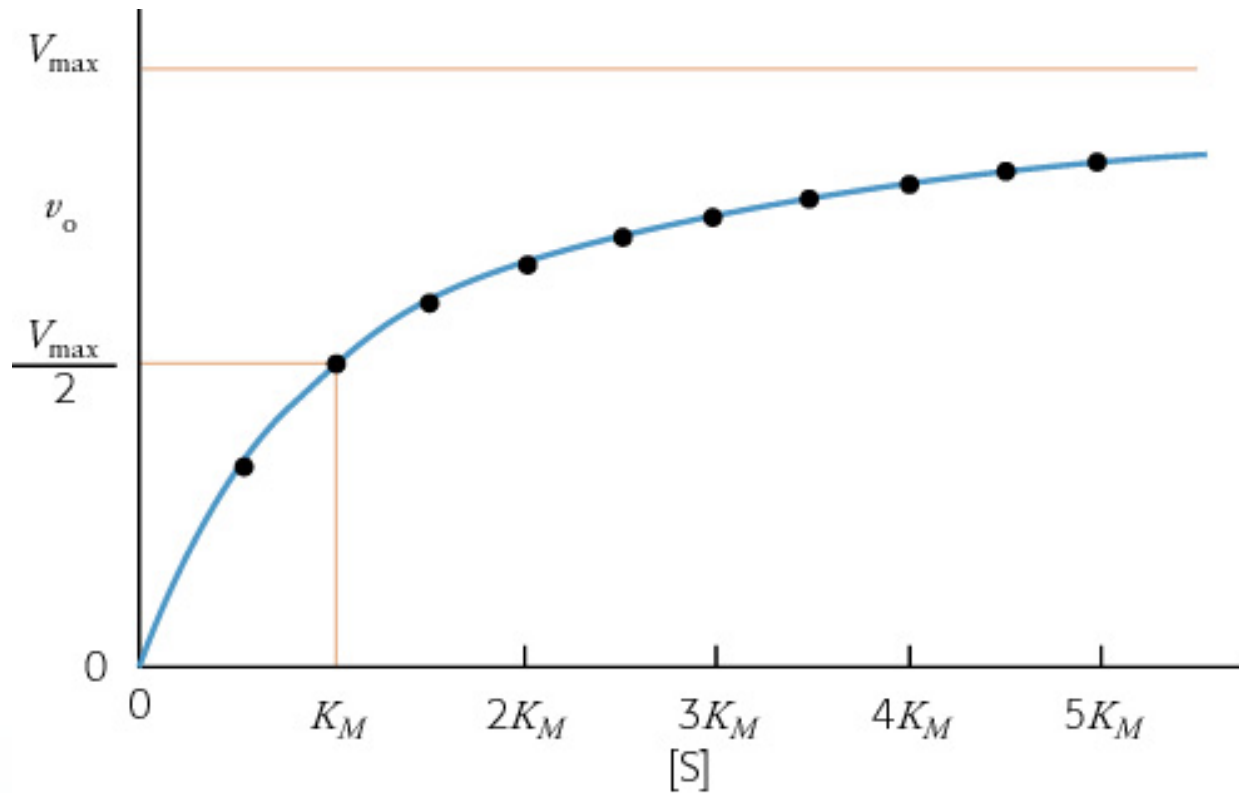


- La **V_{max}** indica la saturazione dell'enzima a $[S]$ infinita
- La **K_M** è una costante
 - dipende dal sistema enzimatico considerato,
 - correlata alla costante di dissociazione di ES .

La **K_M** 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**

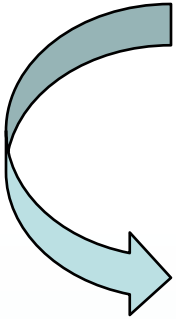
Enzimi che catalizzano reazioni con substrati presenti a **concentrazioni molto basse** (ormoni) \longrightarrow **K_m piccole**

K_{cat} = COSTANTE CATALITICA di un enzima

viene anche definita *numero di turnover*

Rappresenta il numero di volte che l'enzima turnover,

cioè reinizia la sua attività nell'unità di tempo



Rappresenta il numero massimo di molecole di substrato

convertito in prodotto nell'unità di tempo

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_{TOT}]}$$

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:

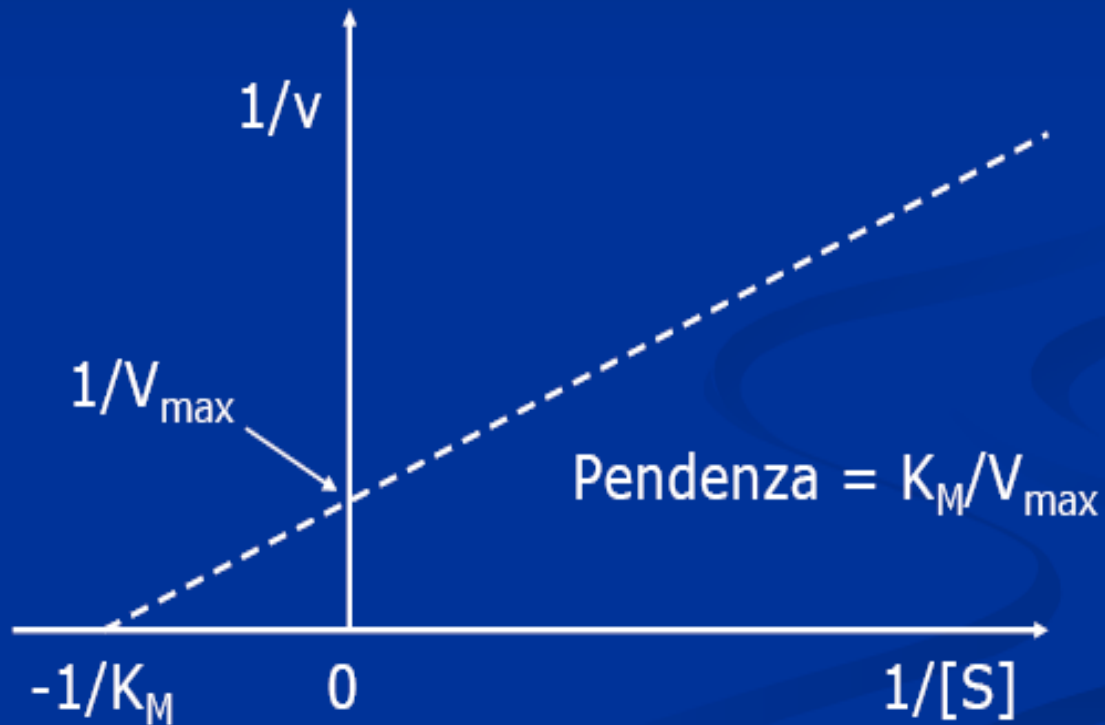
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Inversione

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

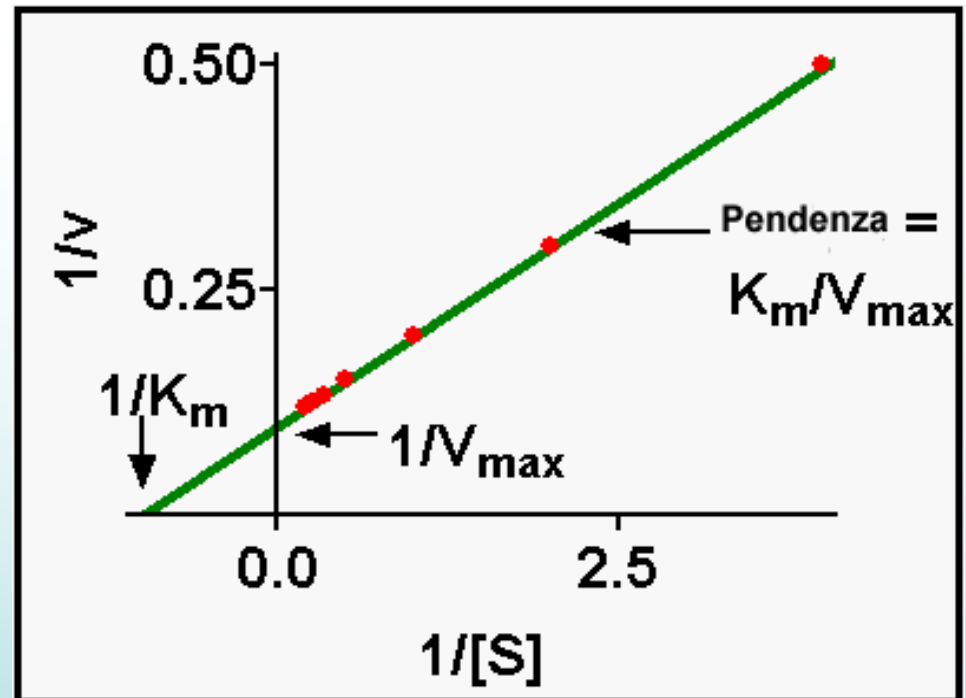
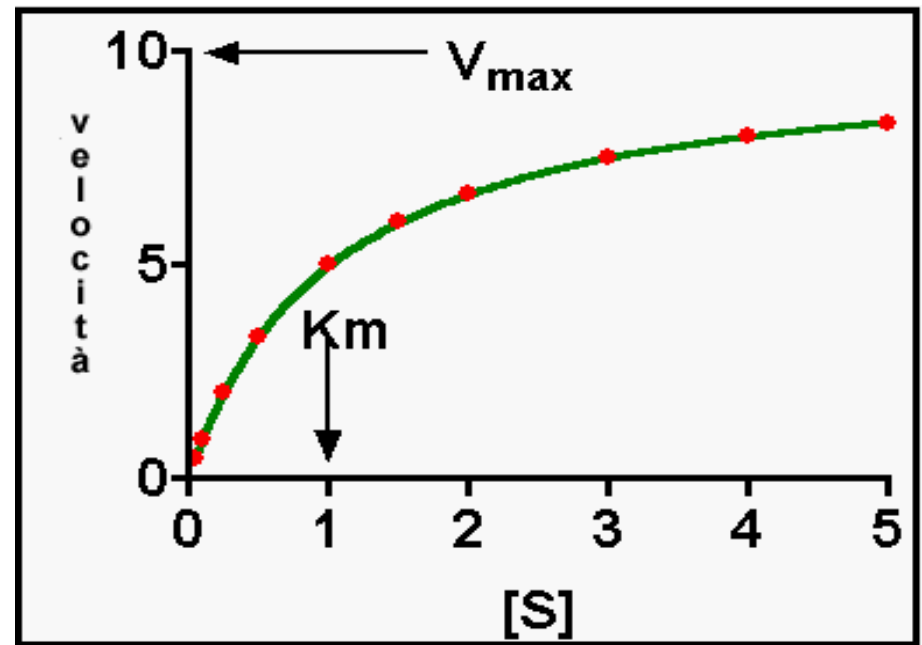
E' l'equazione di una retta

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



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

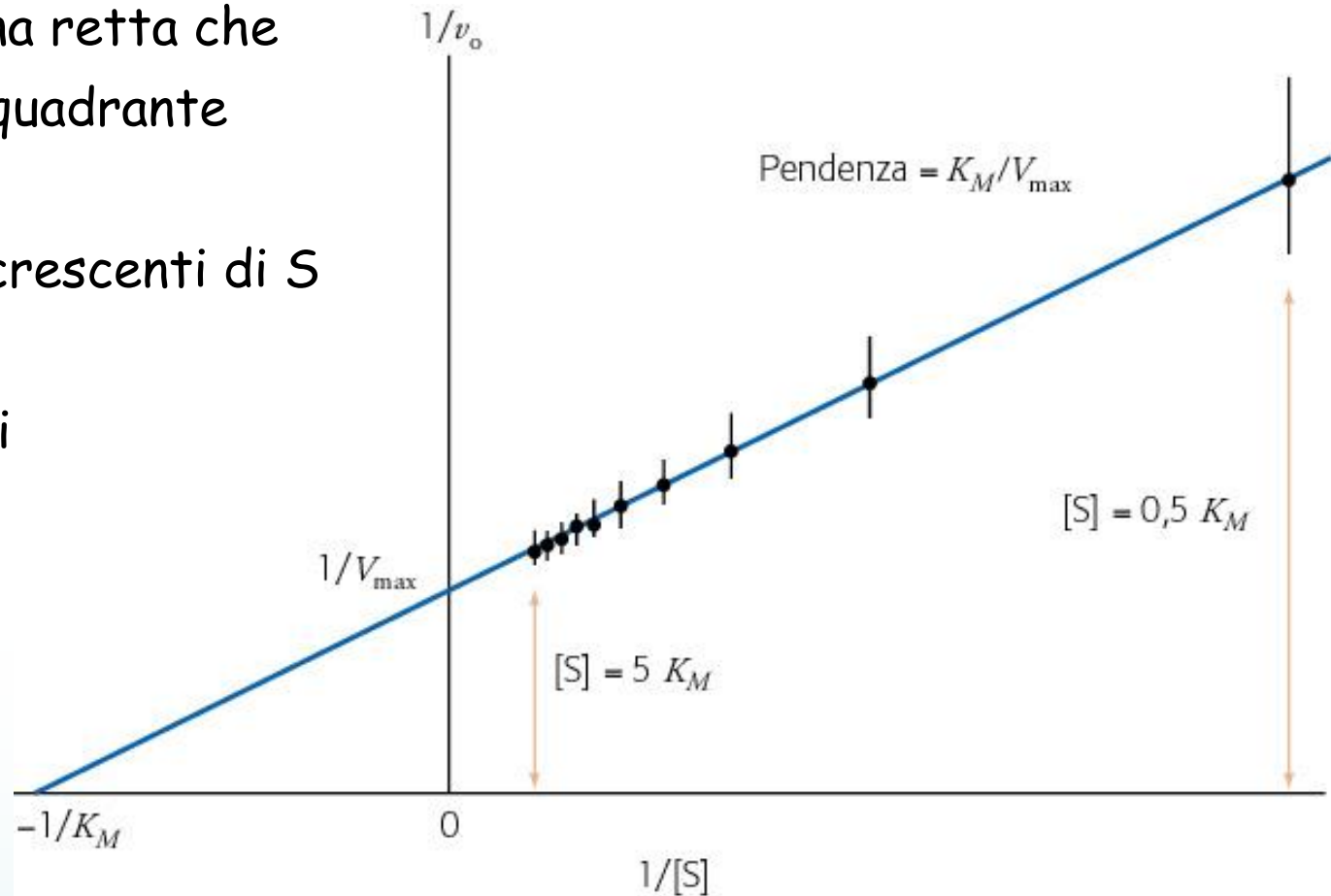
- le variabili sono
 $1/v$ e $1/[S]$
- $1/V_{\max}$ è l'intercetta sull'asse y
- $-1/K_M$ è l'intercetta sull'asse x.



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:

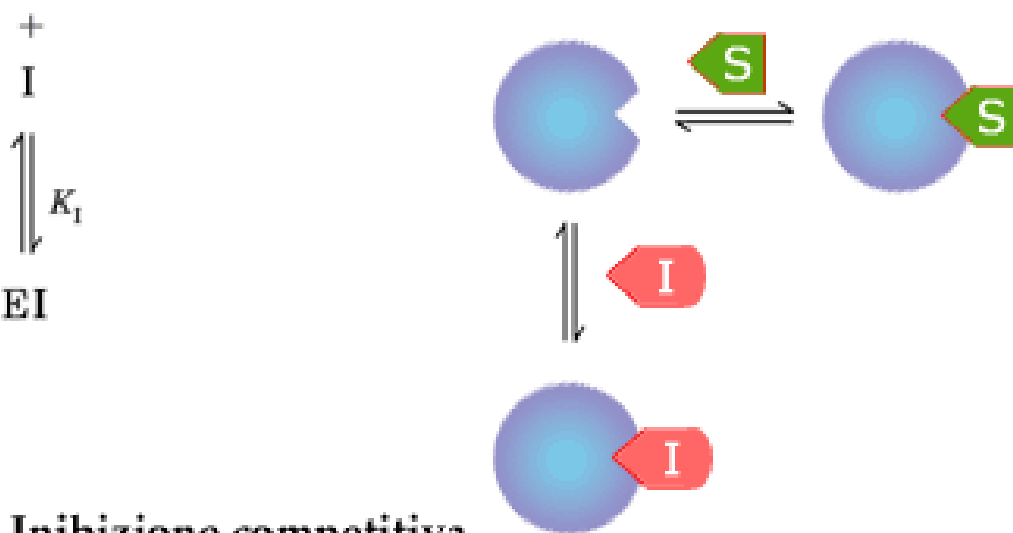
- Inibizione *COMPETITIVA*
Aumenta la K_m e non ha nessun effetto sulla V_{max}
- Inibizione *NON COMPETITIVA*
Diminuisce V_{max} , la K_m resta inalterata
- Inibizione *INCOMPETITIVA*
Diminuiscono K_m e V_{max}

Inibizione competitiva

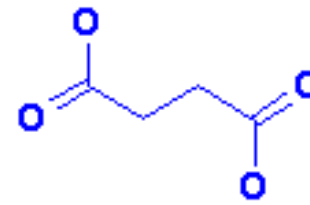
L'inibitore competitivo

compete con S per il sito catalitico

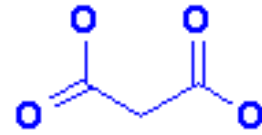
- È una molecola molto simile a S
- Può adattarsi e legarsi al sito dell'E ma non può reagire con l'E



Inibizione competitiva

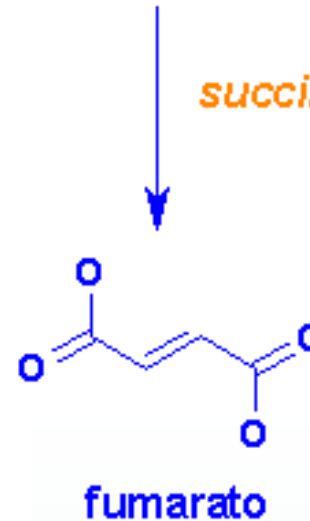


ac. succinico



ac. malonico

succinico deidrogenasi

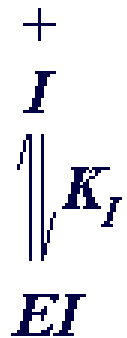


Es. inibizione competitiva:

L'acido malonico è in grado di legarsi nel sito attivo dell'enzima, ma non può essere ossidato avendo un solo gruppo CH_2



per l'assunzione dell'equilibrio rapido

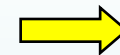


$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

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

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

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



*+ basso è il valore di K_I , maggiore è l'inibizione
Molto E è presente come EI*

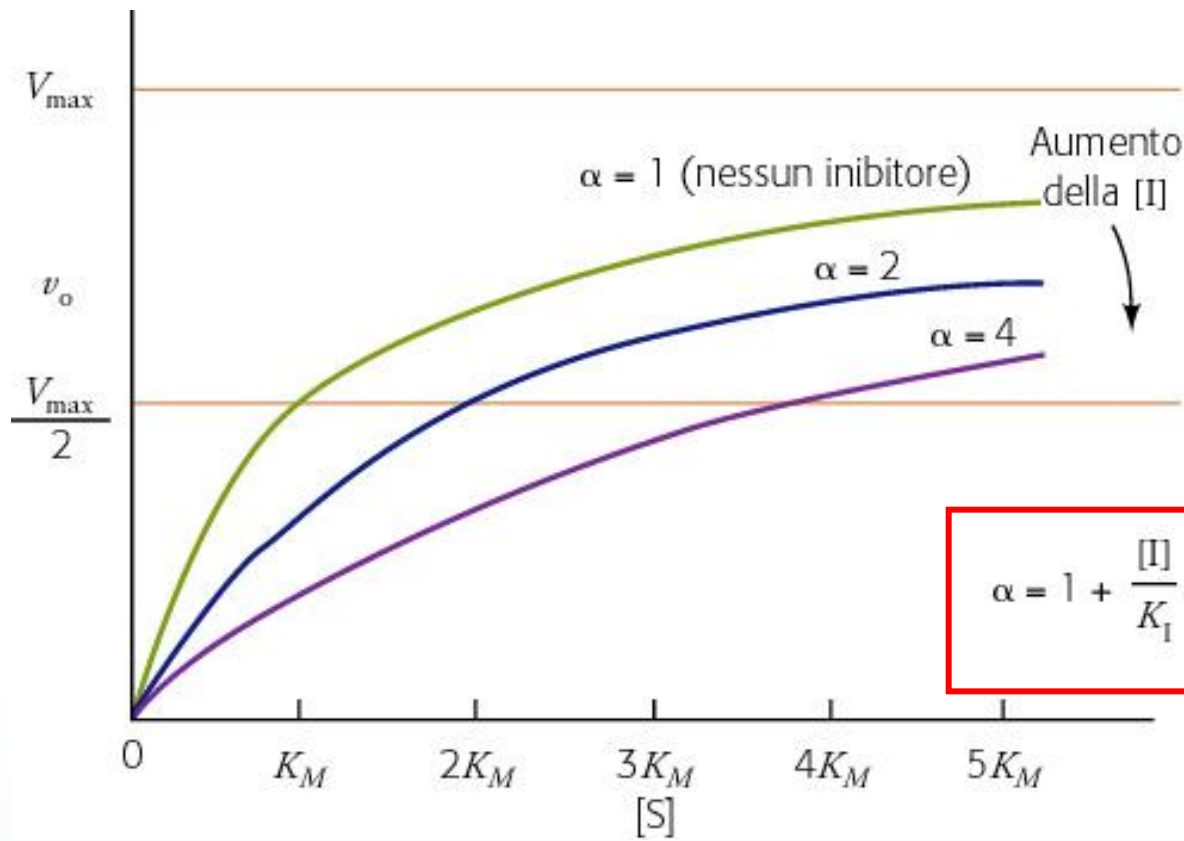


diminuzione dell'affinità per S

aumento della K_m



K_m apparente



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

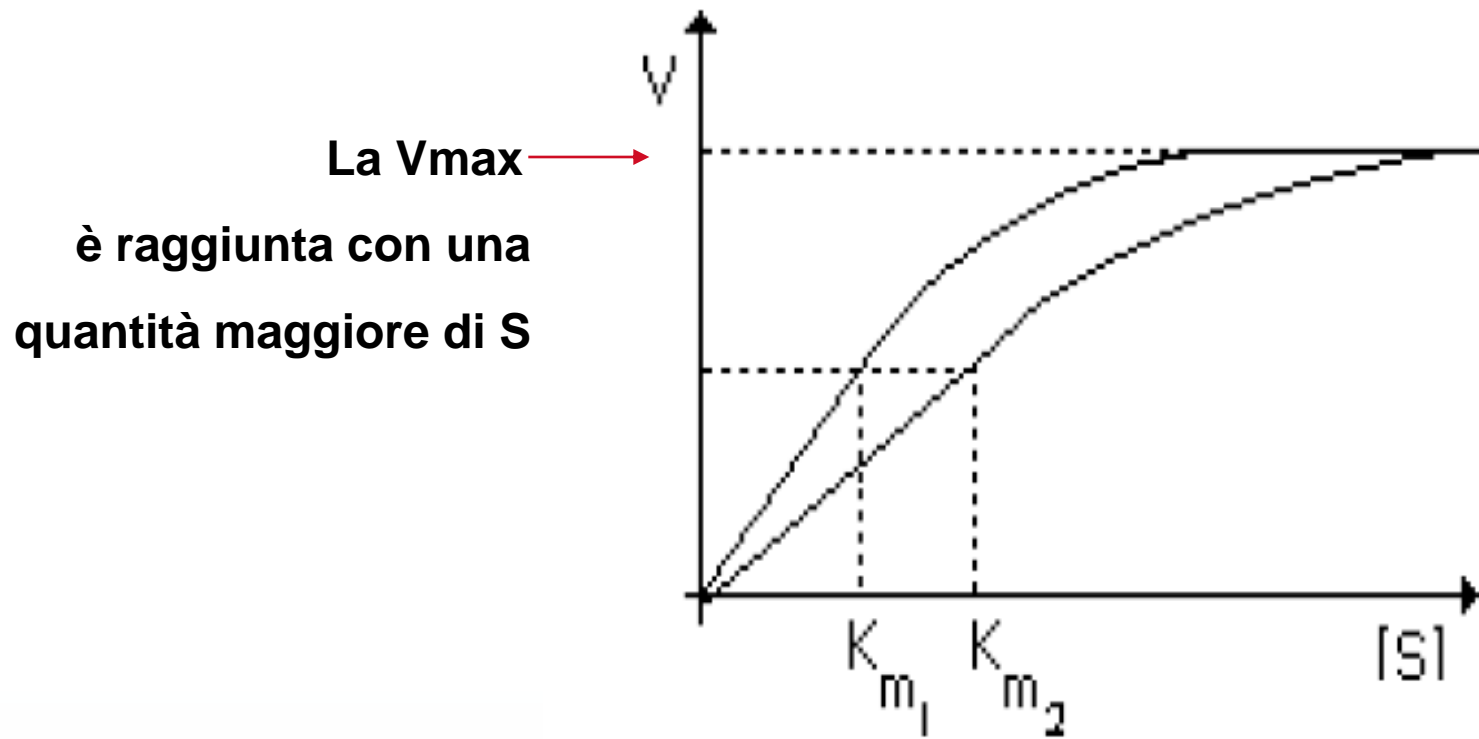
Aumento della Km di un fattore $\alpha = (1 + [I] / KI)$

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

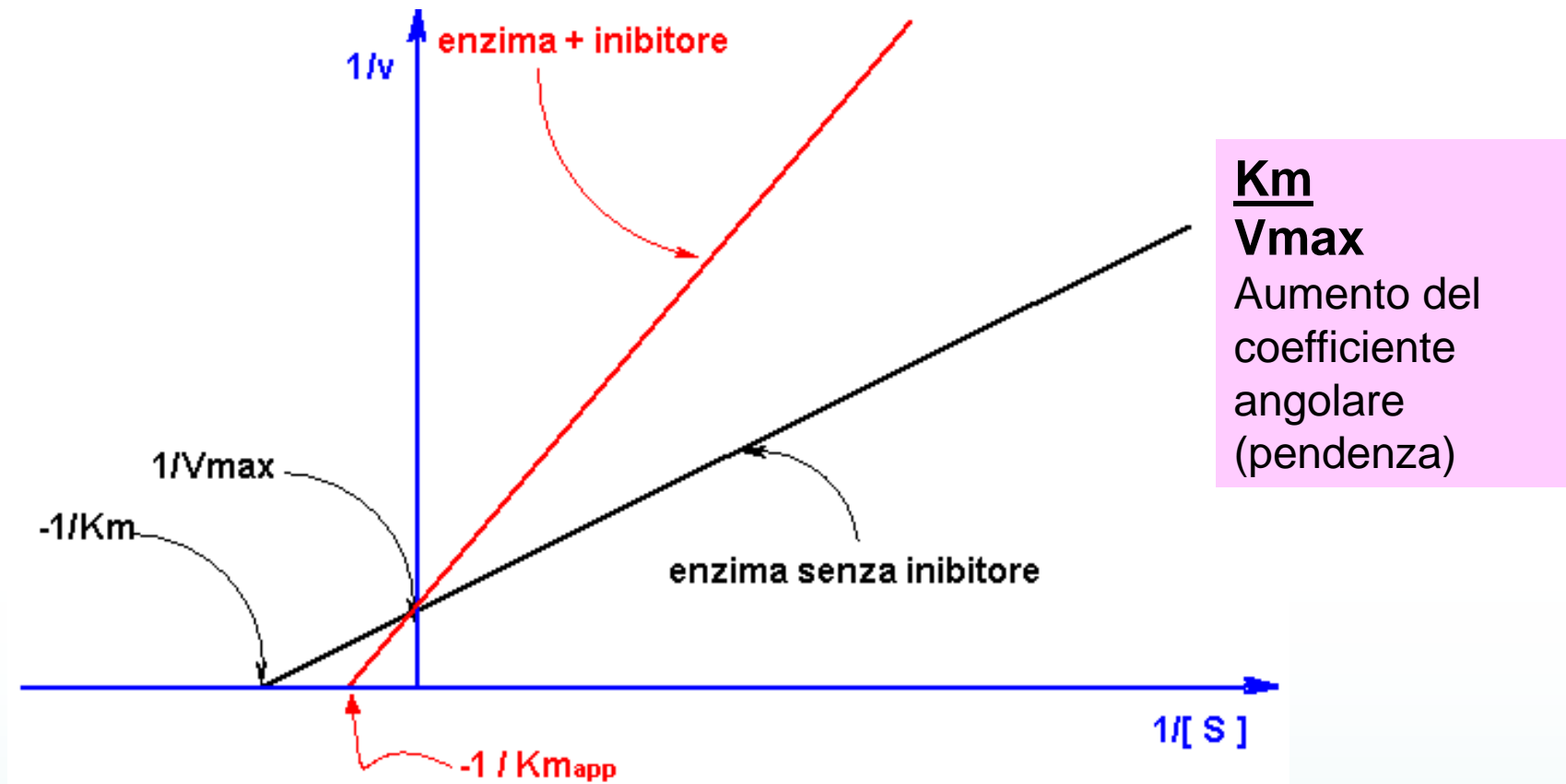


K_{m_1} Enzima non inibito

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

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

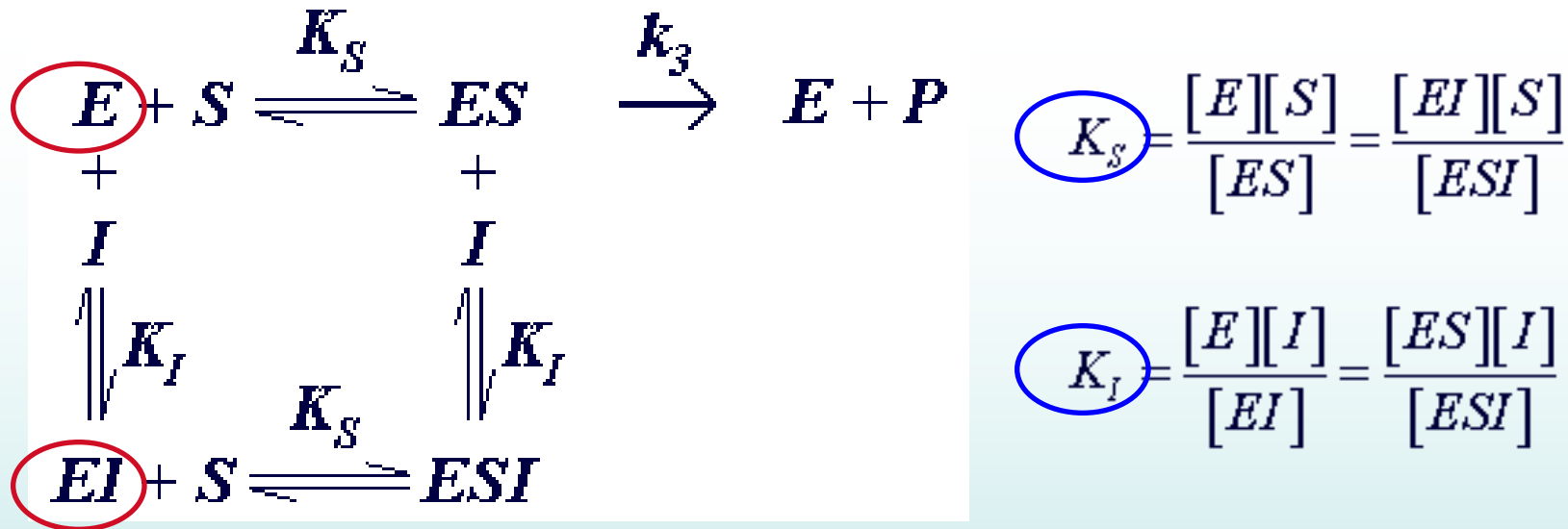
La K_m apparente non è costante
 è in funzione del fattore a che considera $[I]$

• 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)*



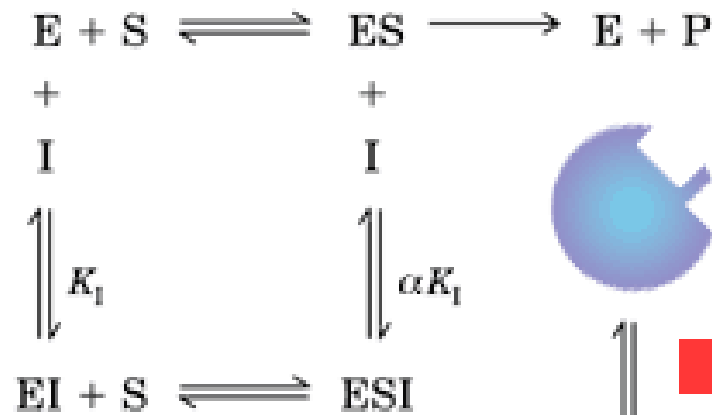
l'inibitore non ha alcun effetto sul legame del substrato con l'enzima, ed il **substrato** non ha alcun effetto sulla formazione del legame tra **inibitore** ed enzima, in quanto entrambi si legano reversibilmente all'enzima in **siti differenti**.



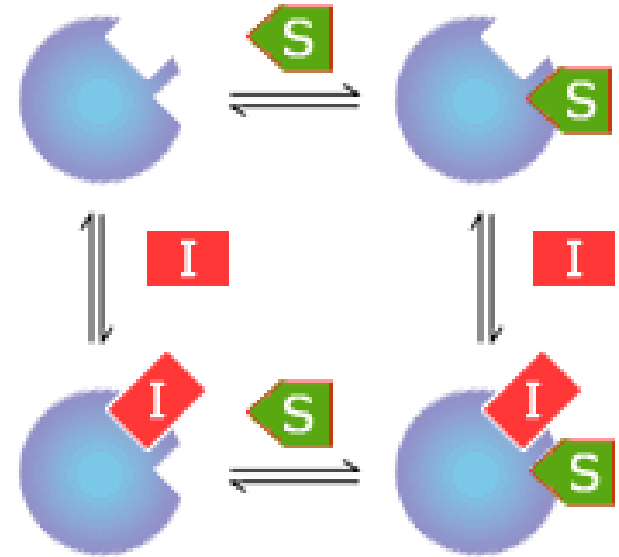
ES ed ESI hanno le stesse costanti di dissociazione

→ **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**.



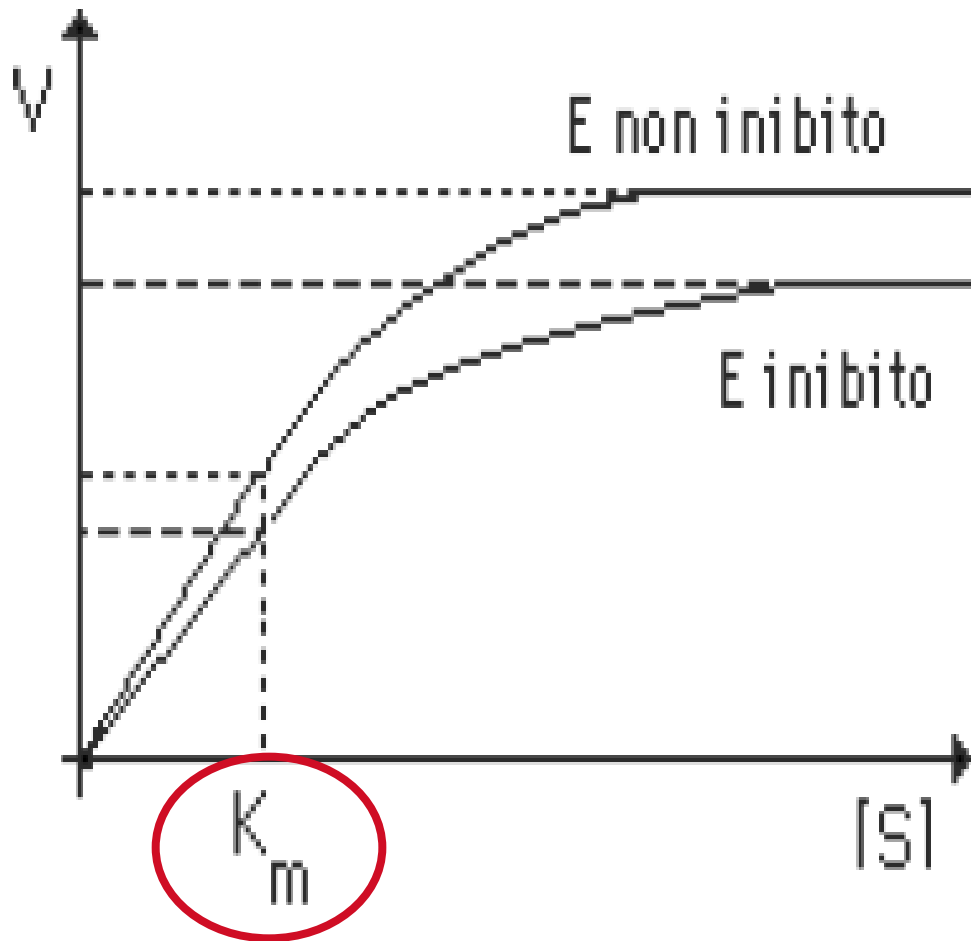
Inibizione mista



➔ 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**

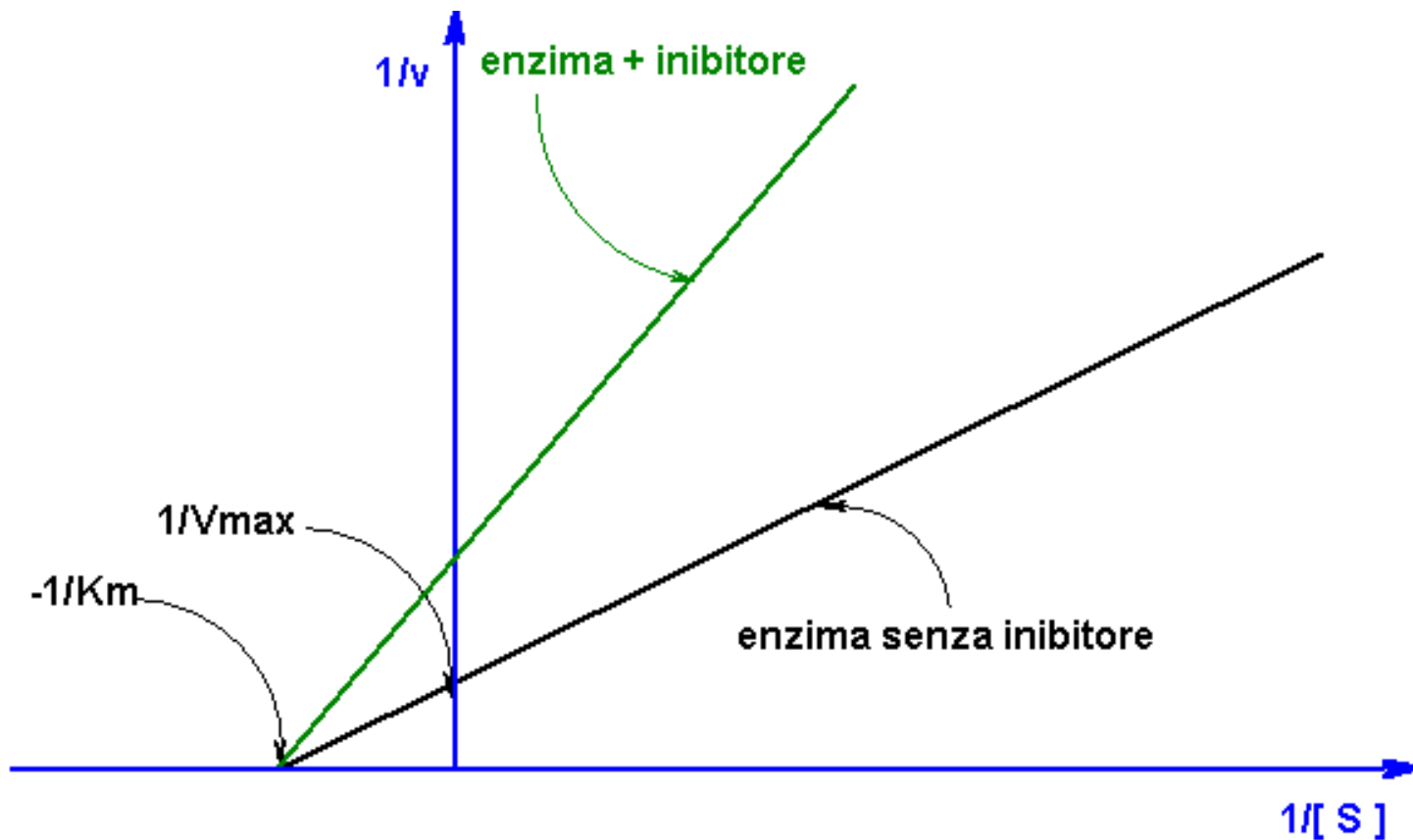


V_{max} sarà più bassa in presenza dell'inibitore;

la K_m 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



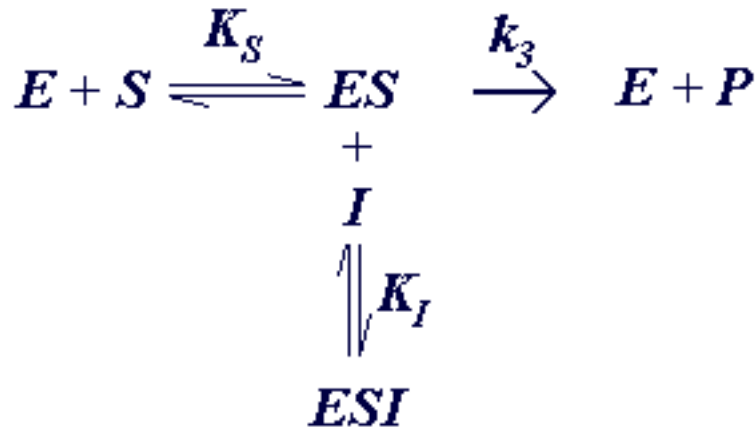
Rottura legami H

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:

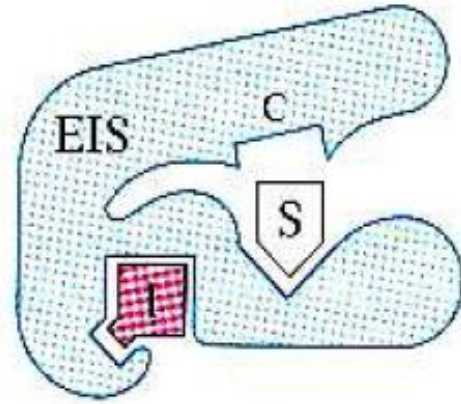
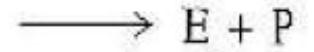
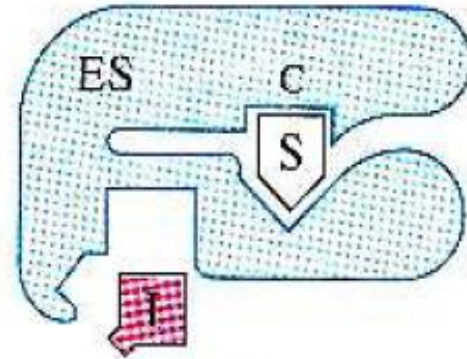
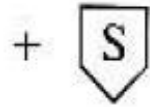
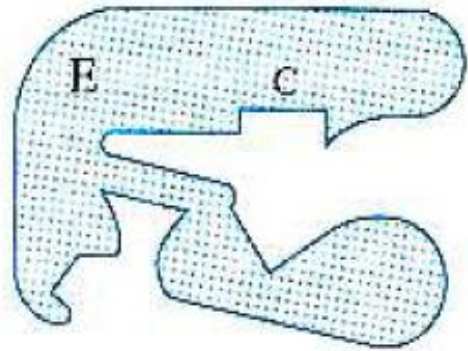


$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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

- 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



Enzima inattivo

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,

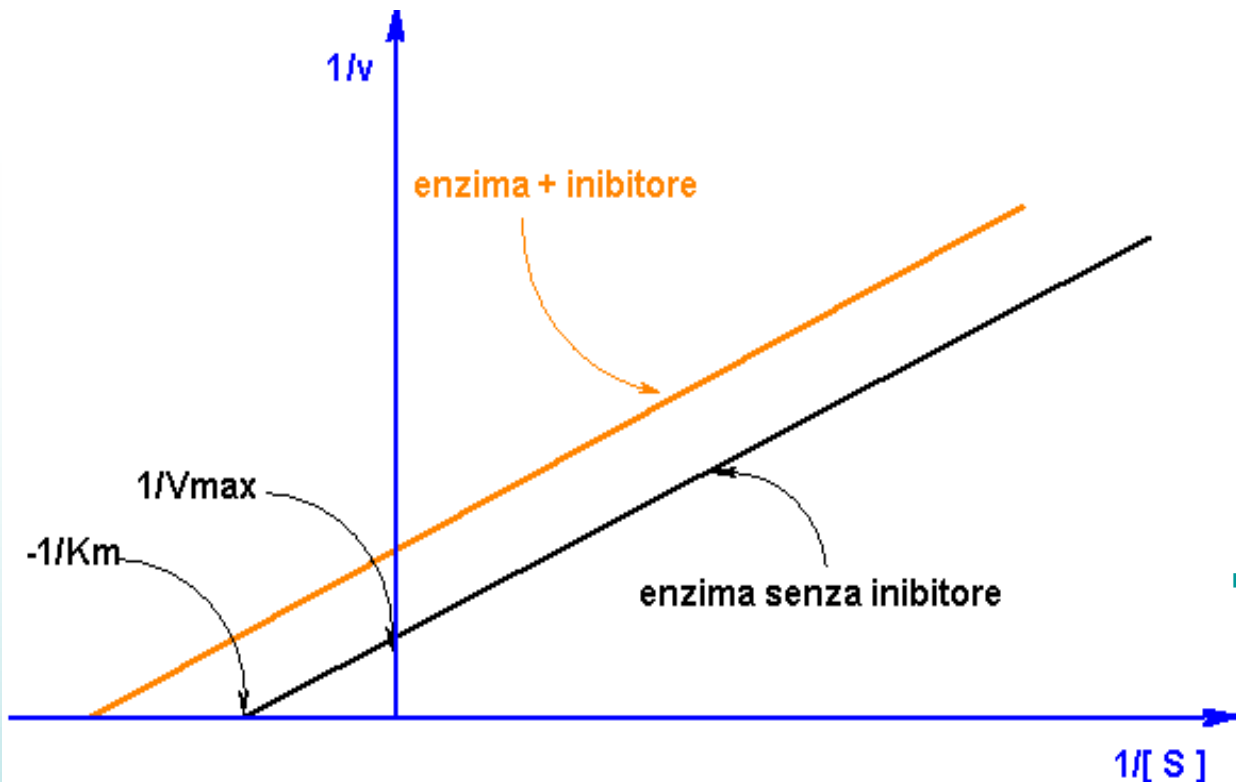
mostrando per esso una affinità infinita



•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:

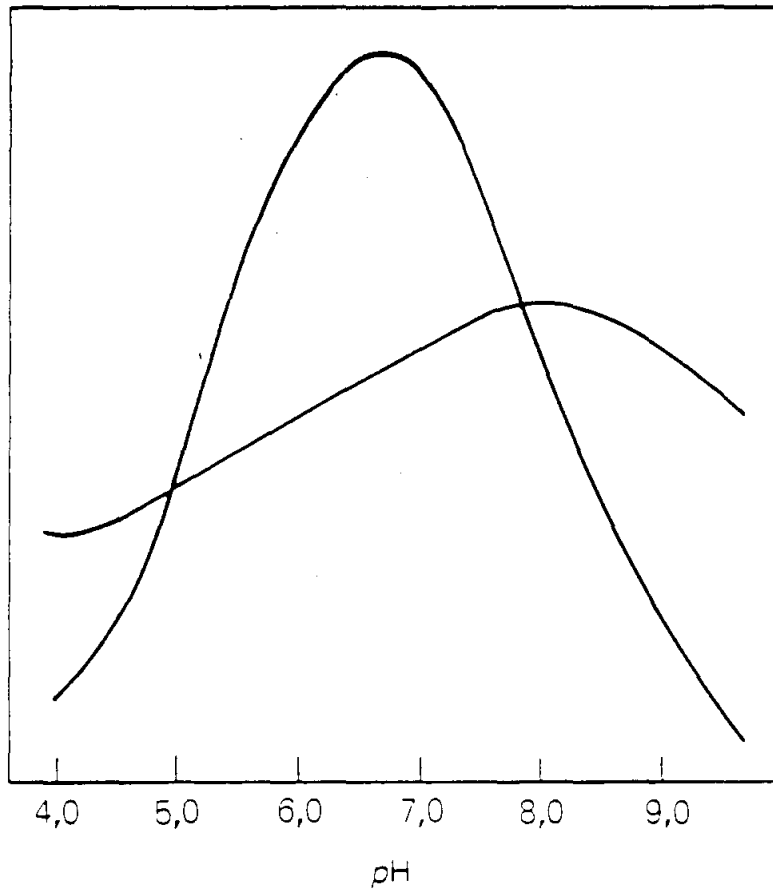
1. **Curve a campana**

2. **Curve quasi piatte**

- a valori estremi di pH

 *Denaturazione dell'enzima*

- *Il pH influenza anche la ionizzazione dei Gruppi COOH e NH₂
importanti per l'attività catalitica*



Temperatura

Le piante non possono regolare la loro temperatura

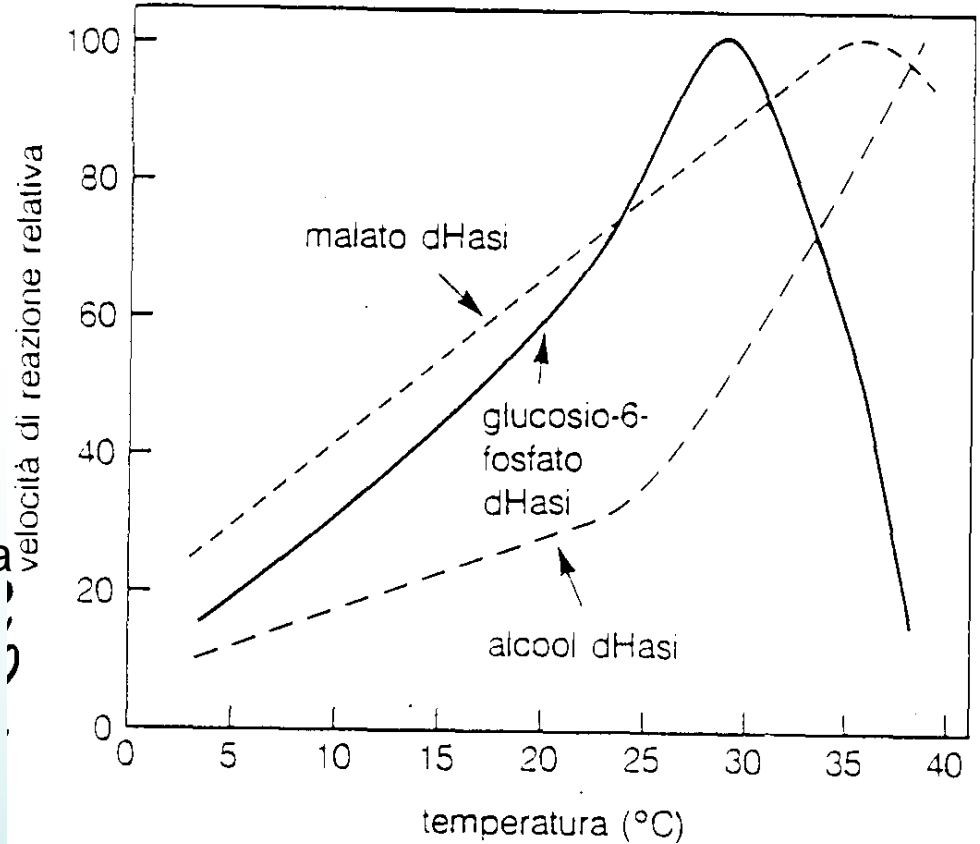
la velocità delle reazioni enzimatiche aumenta da 0° a 35-40°C

➔ 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 -CH₃

Tali modificazioni che possono avvenire nella stessa cellula e in diversi stadi di sviluppo

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

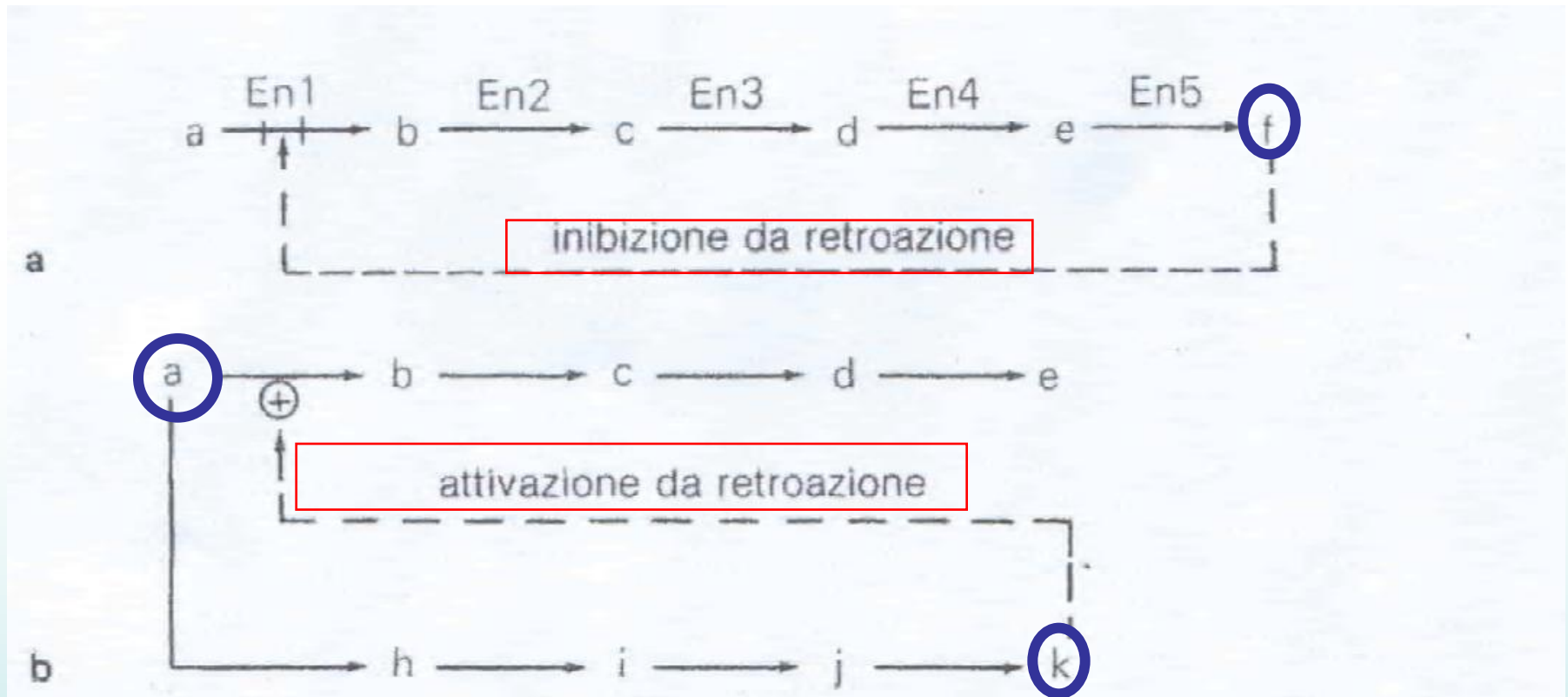


Figura 8.12. (a) *Inibizione da reazione*; (b) *attivazione da retroazione*.

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 si lega al **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**

L'effettore può essere anche il substrato

quando si lega al sito allosterico

- **allosteria omotropica** l'effettore coincide con il suo substrato, agisce in genere come attivatore,
- **allosteria eterotropica** l'effettore è diverso dal suo substrato, 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 il 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 al suo enzima è un legame cooperativo

Si parla di COOPERATIVITA' o EFFETTO COOPERATIVO

Cooperatività =

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

cambiamento della costante di legame dell'enzima

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

Nelle proteine multimeriche per il meccanismo allosterico 2 teorie:

- **modello simmetrico o d'insieme o concertato** o MWC proposto da Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux nel 1965
- **modello 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 interazione tra subunità.**

Ipotesi simmetrica o concertata 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

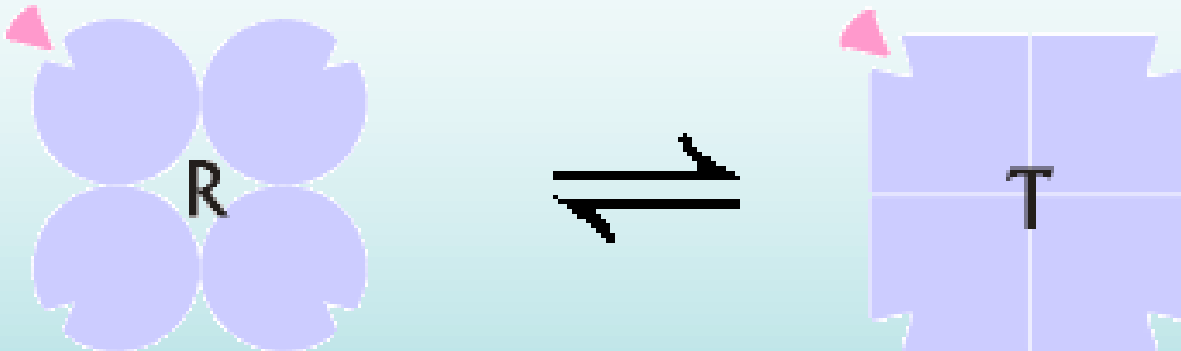
(Conformazione Tesa)

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

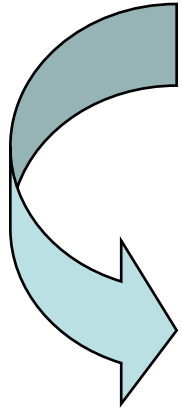
Di conseguenza, **tutte le subunità devono esistere nella stessa conformazione.**



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



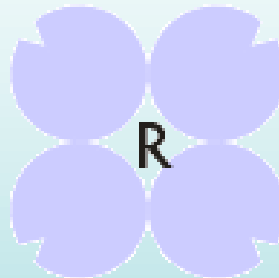
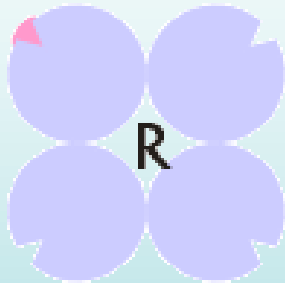
Se il modulatore è il **substrato**:
È più probabile che si leghi alla
conformazione **R** data la maggiore affinità.



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

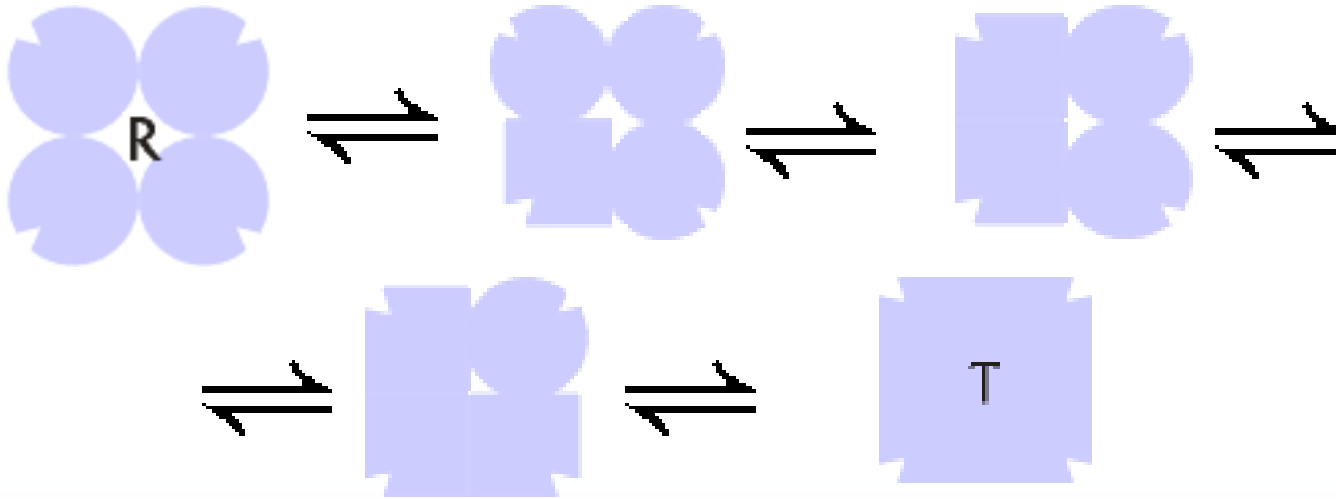
Aumento della probabilità di transizione
dalla forma inattiva a quella attiva

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.



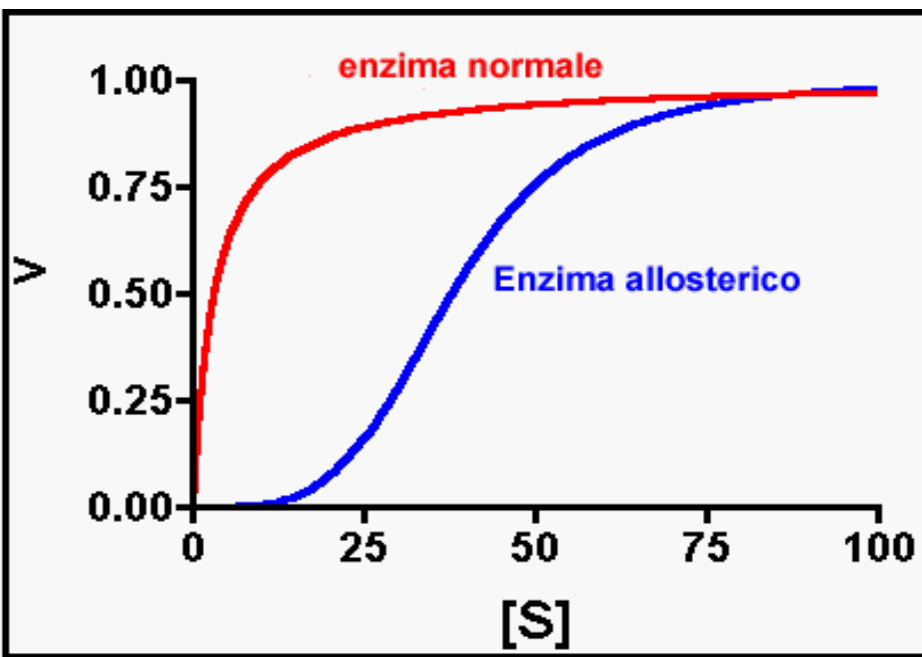
l'effettore ha un'influenza più diretta sulla forma dell'enzima.

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

→ *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).

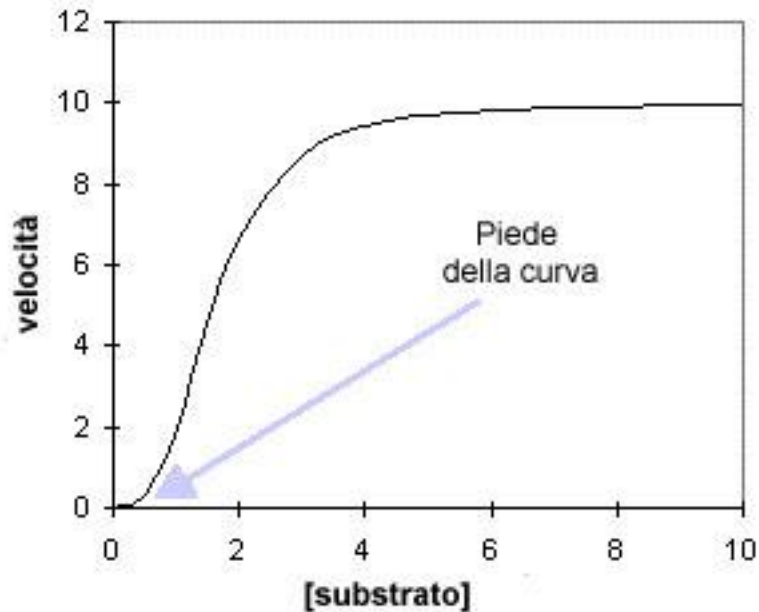
L'effettore non propaga il cambiamento di conformazione alle subunità adiacenti:

- 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***
più unità si potranno trovare nello stato a maggiore affinità.



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

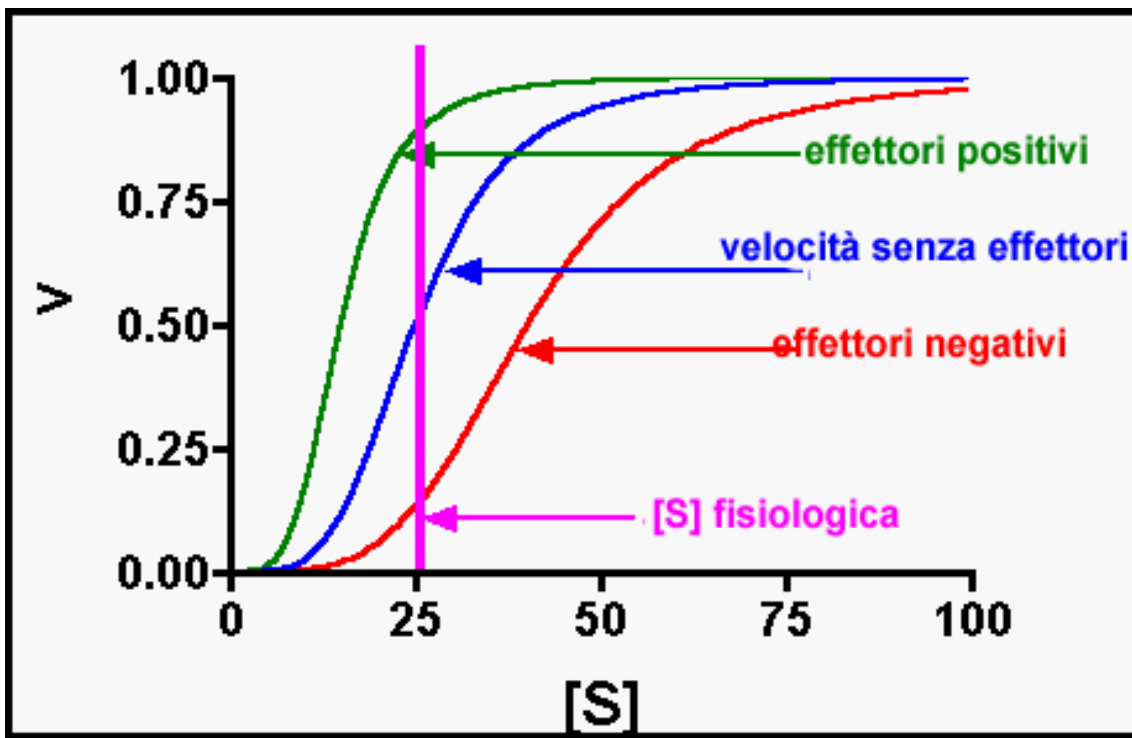
forma sigmoidale della curva:
 a basse concentrazioni di substrato
 un aumento di
 concentrazione del substrato
 lieve incremento della velocità



**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 allo stesso 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