


# 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 >> 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:**  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$
- **Nucleotidi :**  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{FAD}^+$

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** : (FAD)

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**

<b>TABLE 6-1</b>	<b>Some Inorganic Ions That Serve as Cofactors for Enzymes</b>
<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>

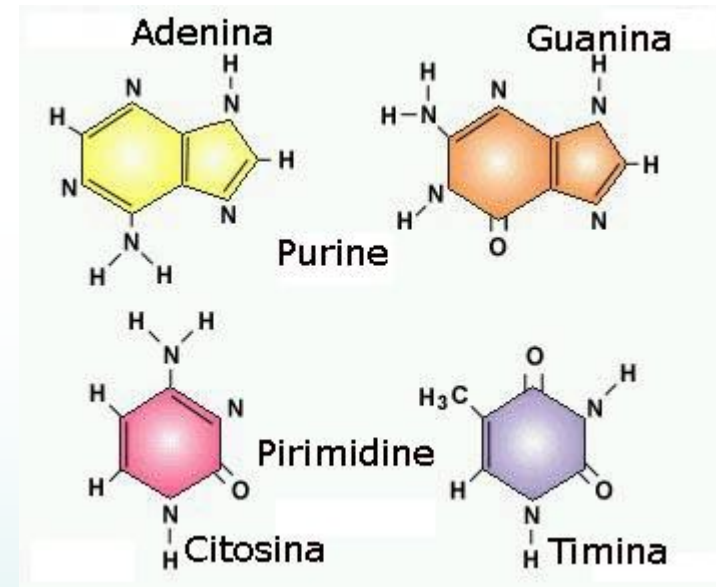
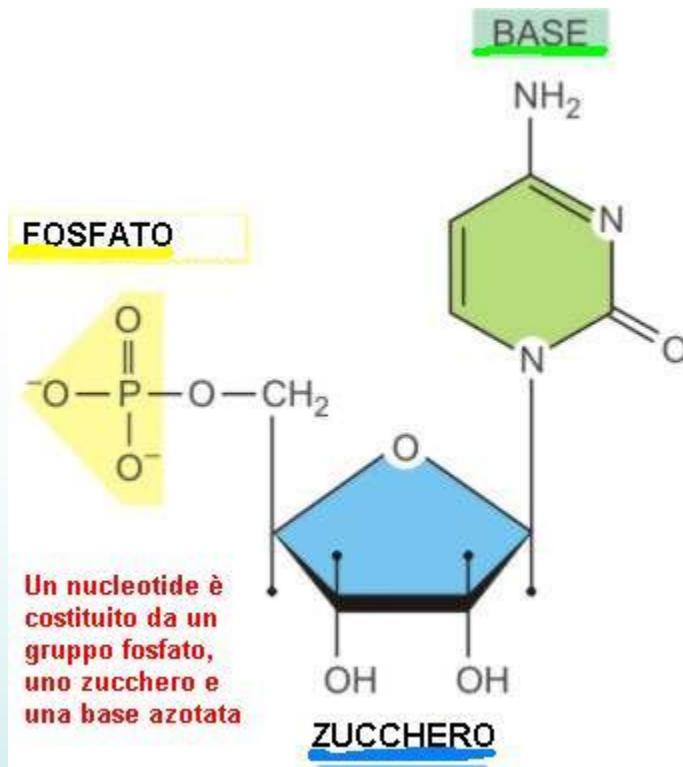
**Table 6-1**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

***I NUCLEOTIDI sono costituiti da tre composti:***

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

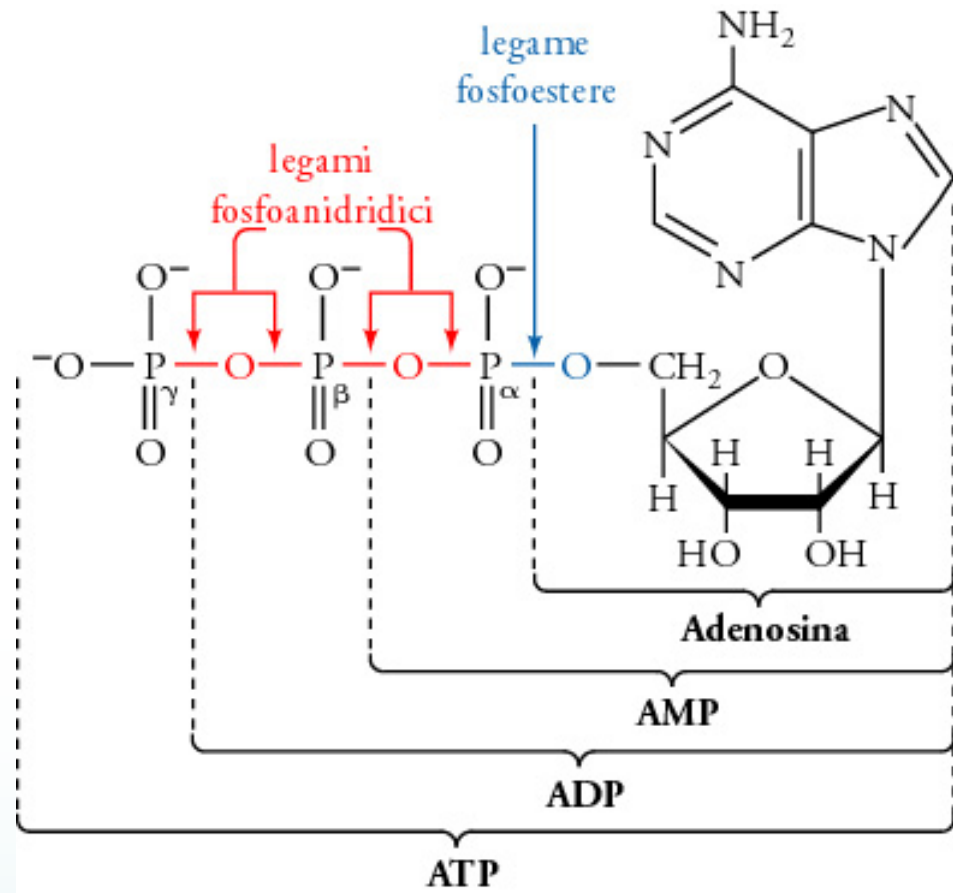
} **NUCLEOSIDE**

### 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



*Alcune vitamine idrosolubili sono precursori di coenzimi*

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 pantotenic</b> o	"Attivazione" e trasporto di gruppi <b>acile</b> o <b>acetile</b>	Diidrolipoil transacetilasi Acil-CoA sintetasi

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

*I coenzimi vengono modificati chimicamente durante le reazioni:*



Per completare il ciclo catalitico,

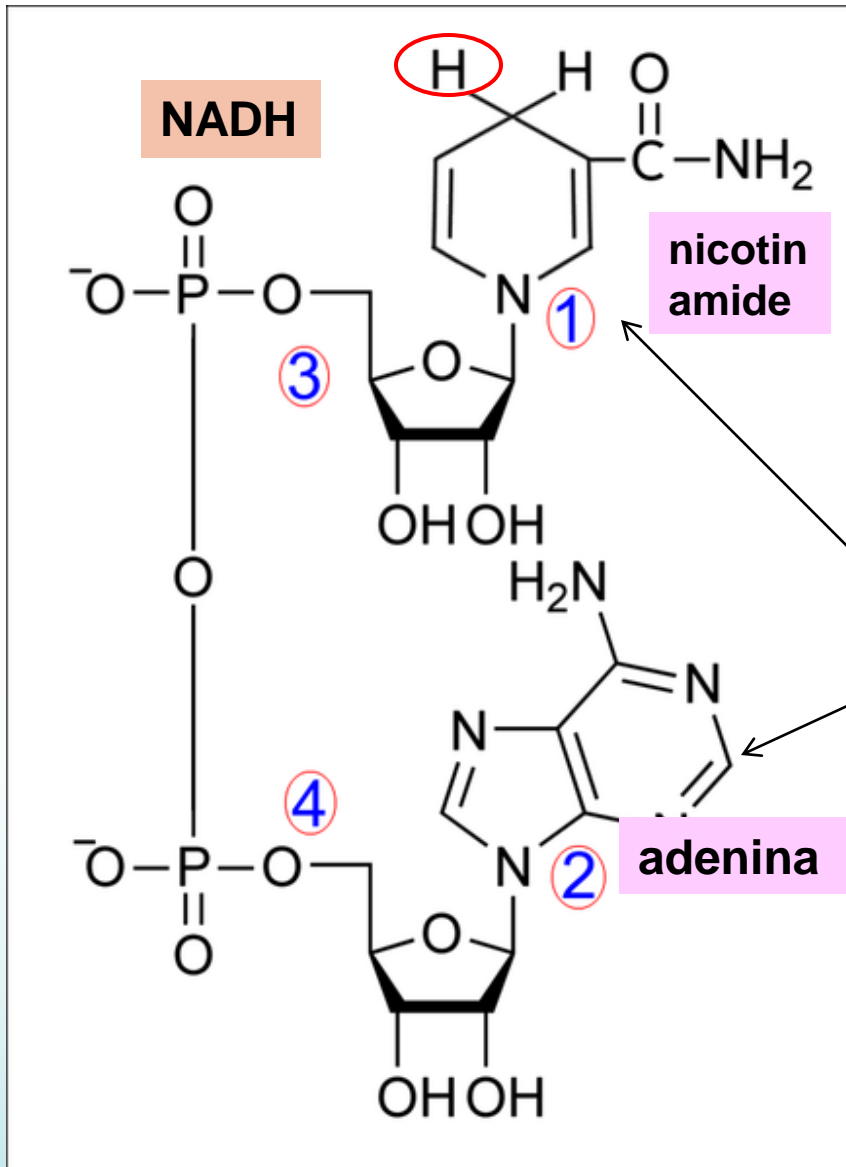
*il coenzima deve tornare al suo stato originale:*



**reazione di rigenerazione**

anche a carico di un E. diverso

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



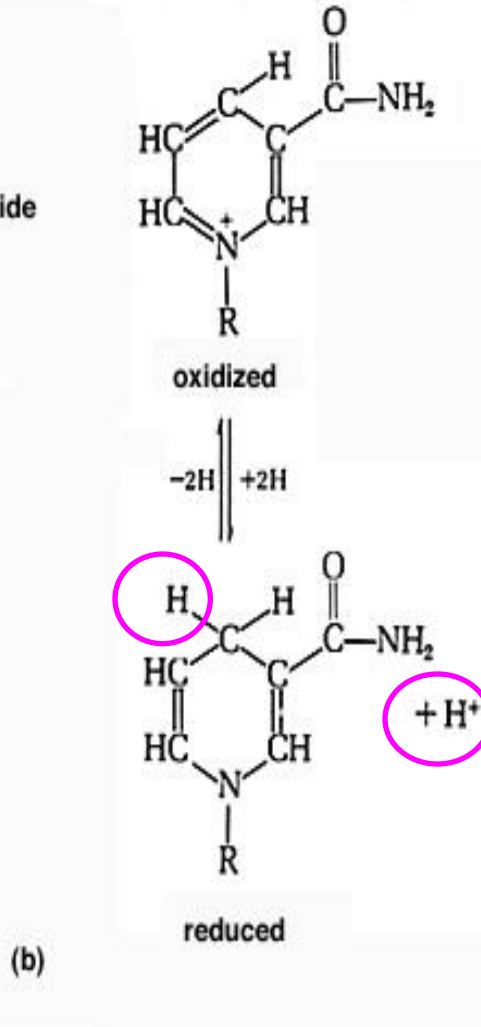
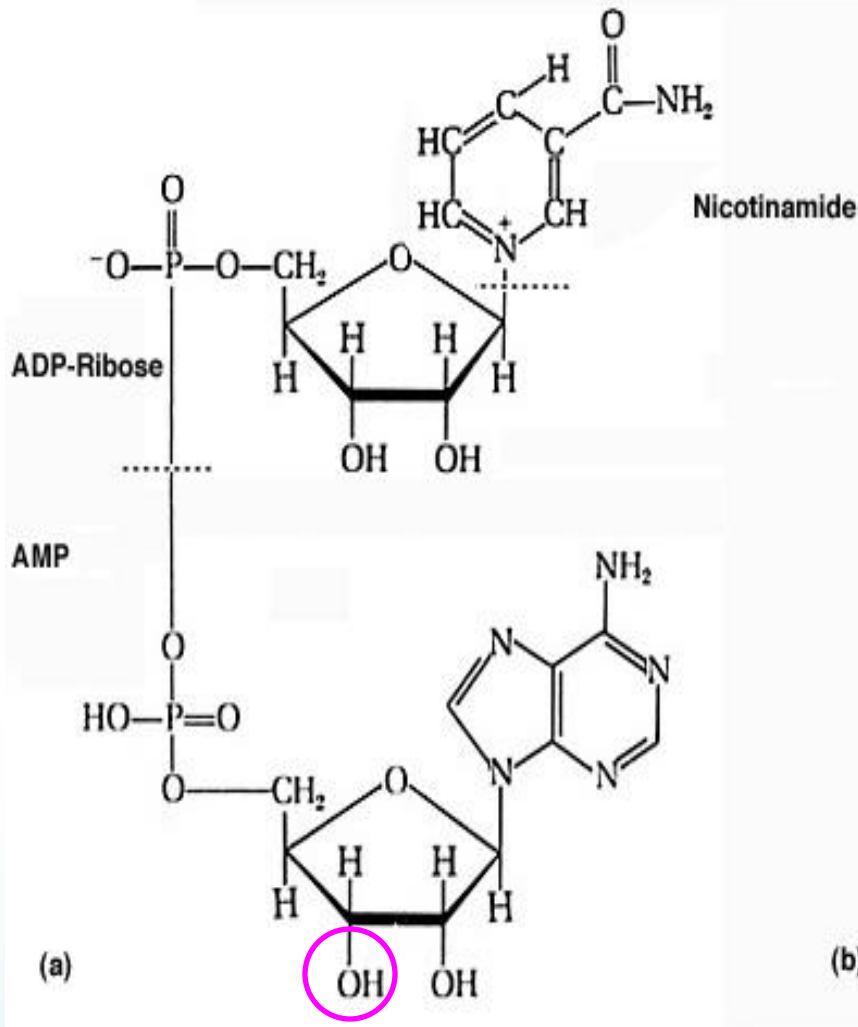
Il gruppo funzionale è la **nicotinammide**, derivata dall'*acido nicotinic* o niacina o vitamina PP, (Pellagra-Preventing) può donare/accettare atomi di idrogeno.

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  $H^+$ .

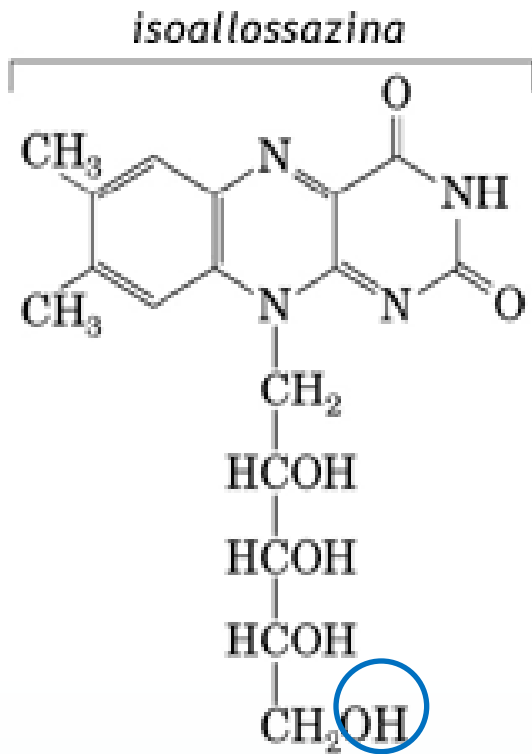


**A differenza dei nucleotidi flavinici, i coenzimi pirimidinici non sono legati saldamente alla deidrogenasi, ma funzionano piuttosto come *cosubstrati*.**

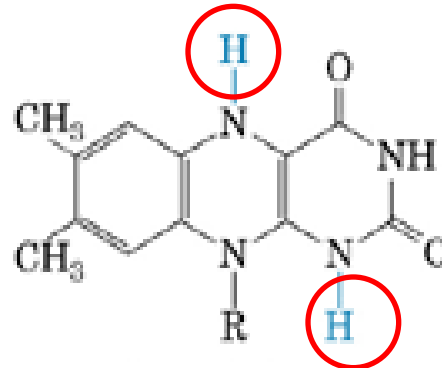
## Nucleotidi Flavinici

FMN= Flavin Mono nucleotide

FAD= Flavin Adenin Dinucleotide



Riboflavina



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

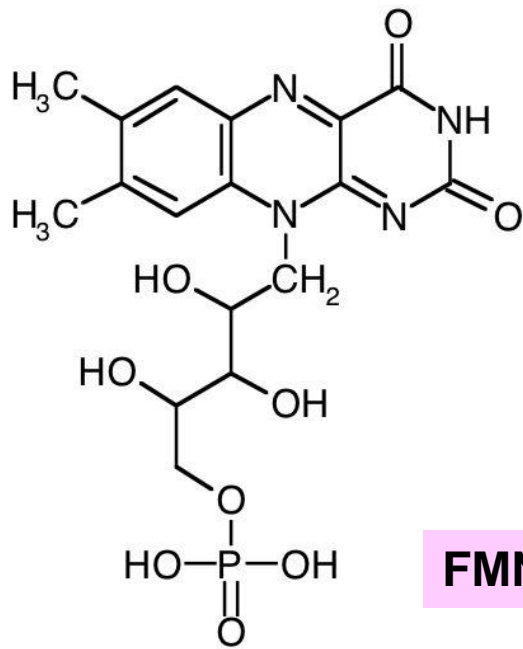
sono i coenzimi derivanti dalla

**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  $\text{CH}_2\text{OH}$  terminale. Non è un vero nucleotide, manca dello zucchero pentosio.

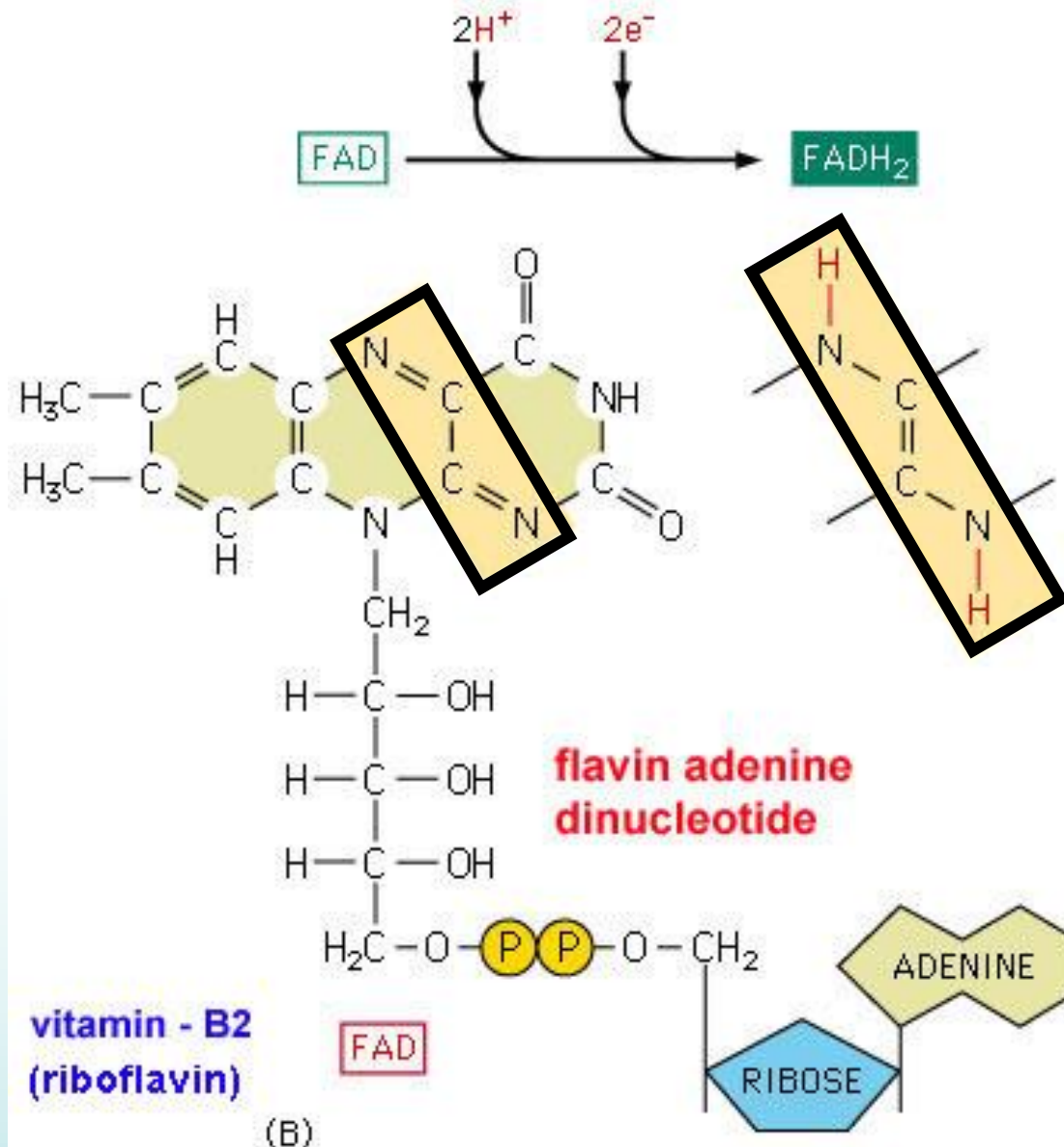
Se l'FMN, reagisce con una molecola di ATP che rilascia sia il *nucleotide adeninico* che un *gruppo fosfato (AMP)*



**formazione del FAD**

# Nucleotidi Flavinici

# 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

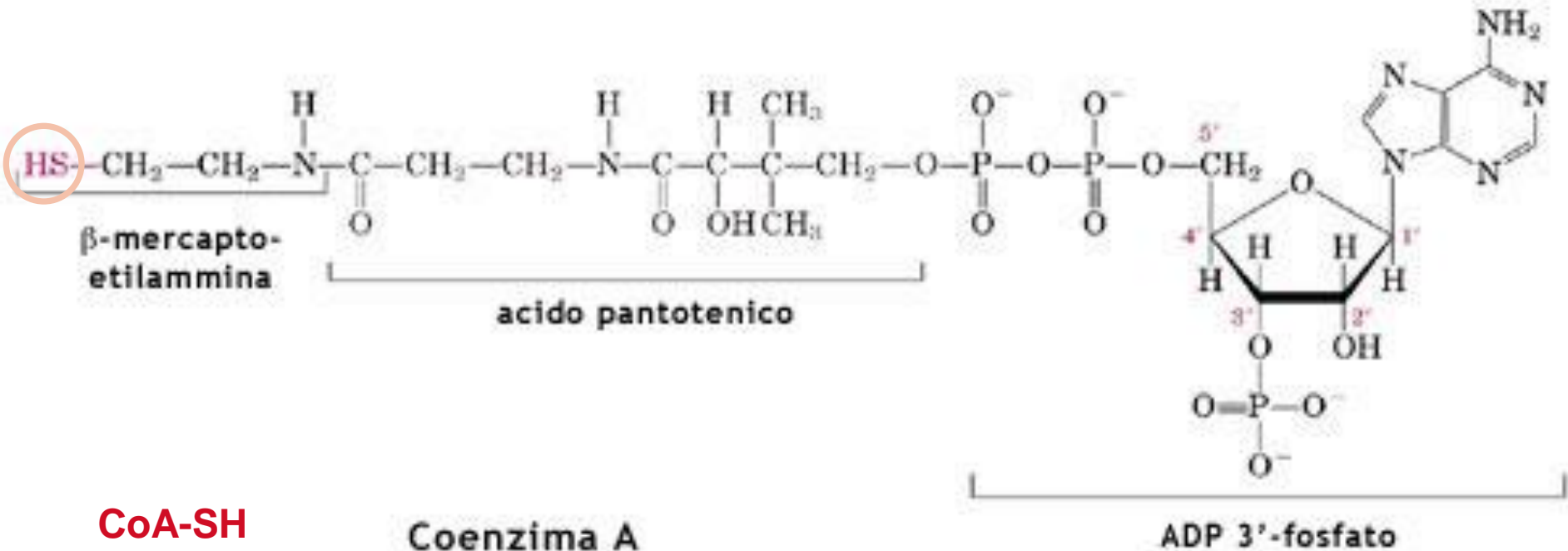
L'acido pantotenico (vitamina B5) è un componente **essenziale del Coenzima A**.  
va incontro ad una fosforilazione e **legame con  $\beta$ -mercapto-etilammina**

*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.

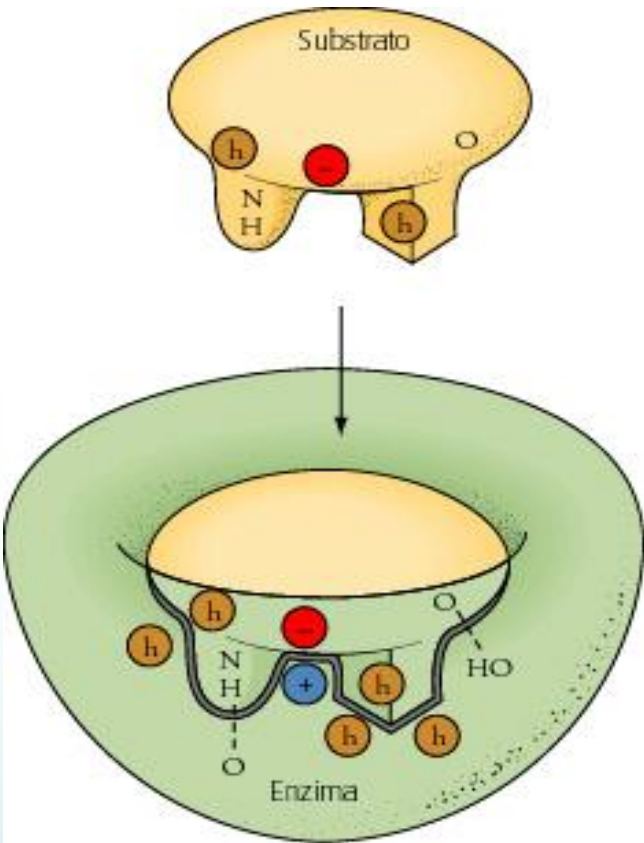


La reazione dell'enzima (catalisi) avviene nel


**SITO ATTIVO =**

Tasca o fenditura sulla superficie dell'E.

- sito di legame per il substrato
- gruppi catalitici
  - Gr. -COOH o NH<sub>2</sub> 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

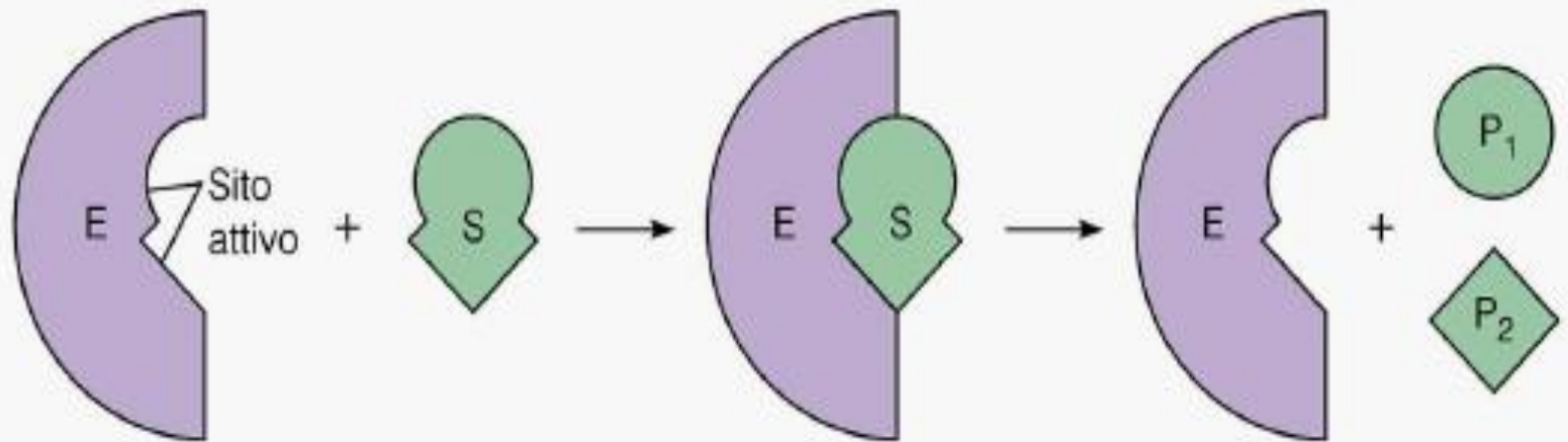
#### Adattamento indotto



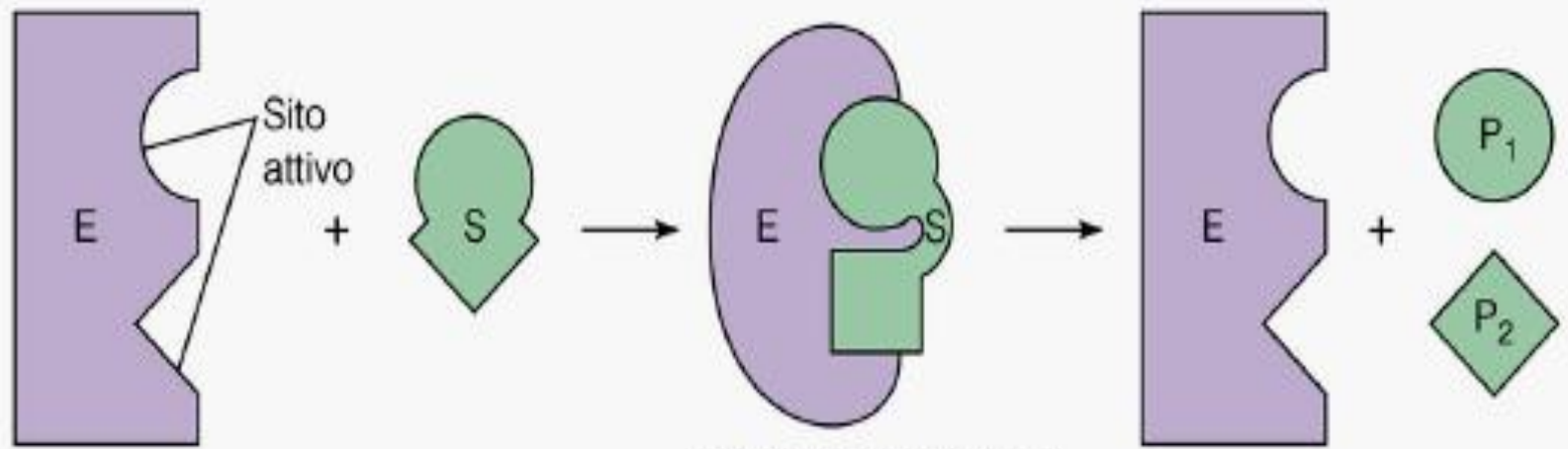
La vicinanza di S o P all'Enzima provoca

modificazioni della conformazione del sito attivo dell'E

Migliore combinazione E-S e E-P



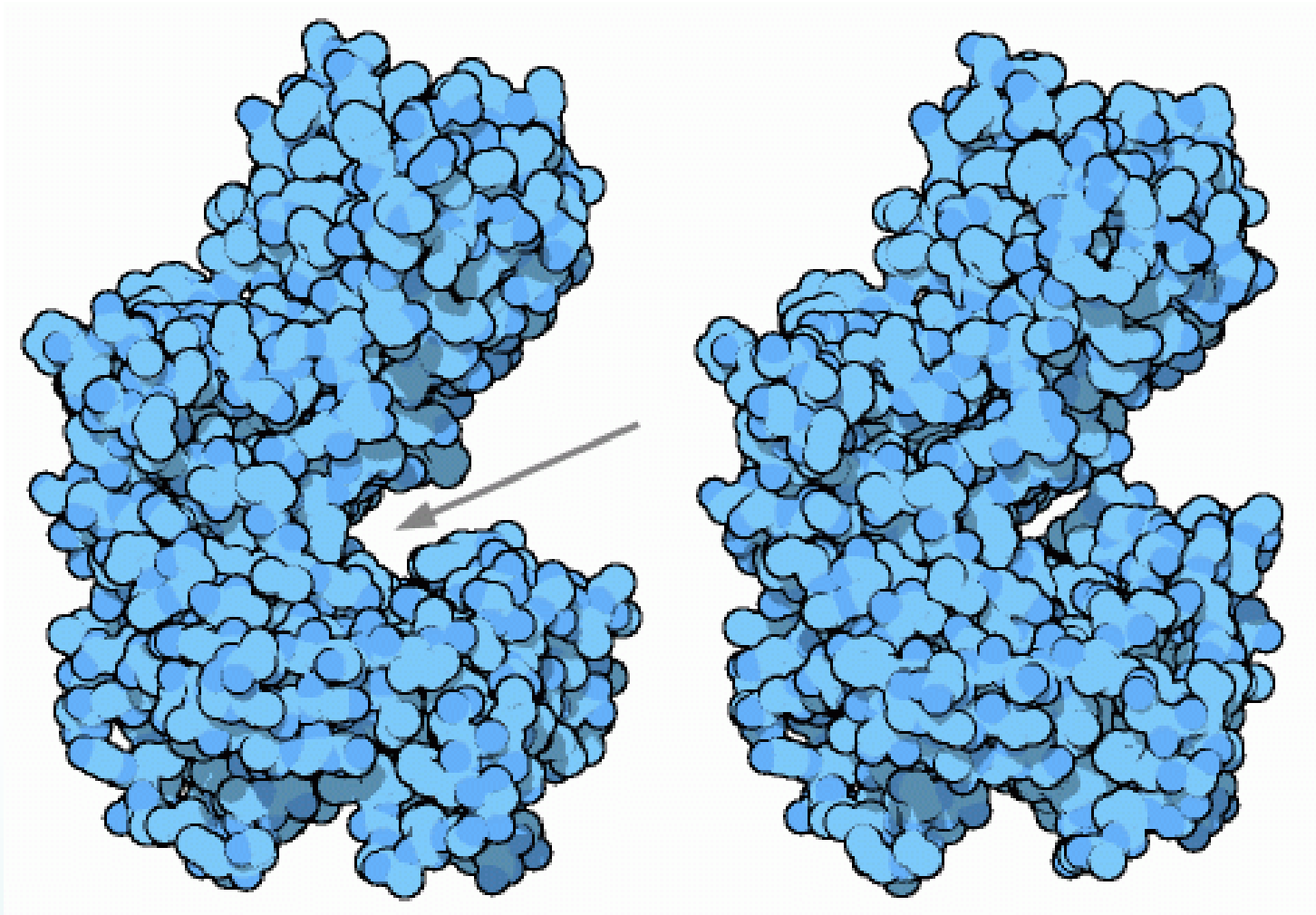
**(a)** Modello chiave-serratura



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

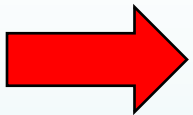
## Come agisce un'enzima ?

### *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 )



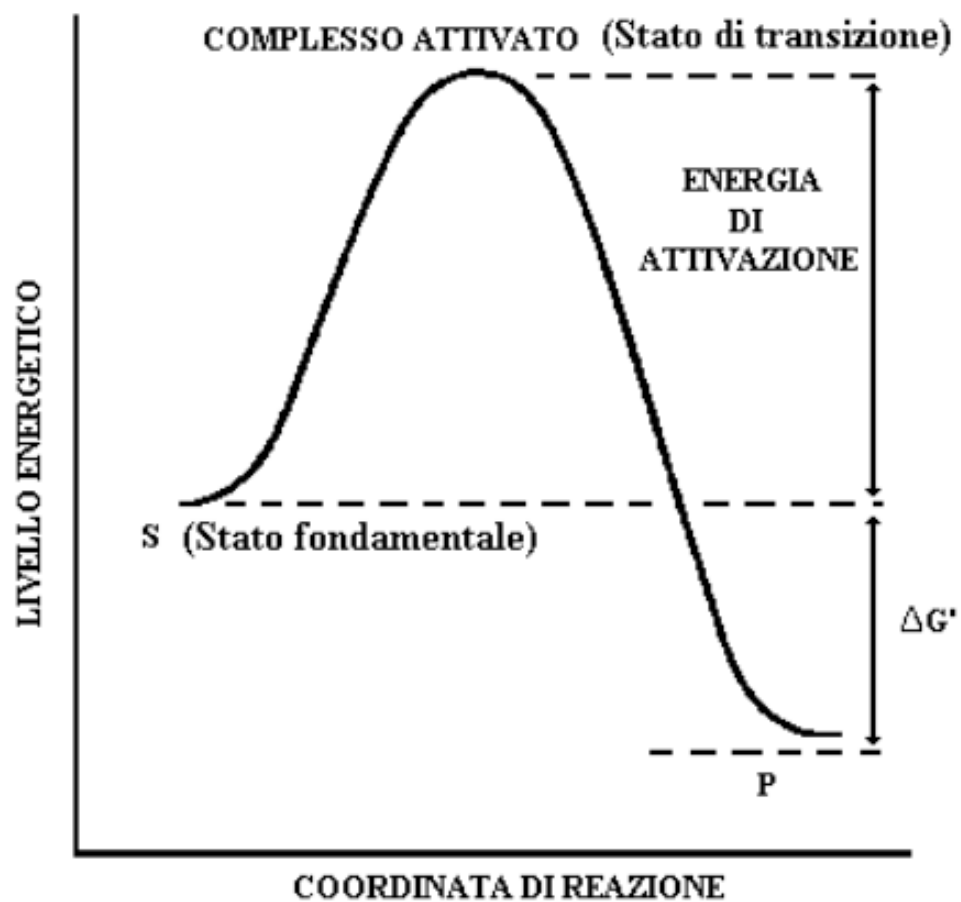


Figura. Profilo energetico di una reazione chimica

Considerando una qualsiasi reazione:



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

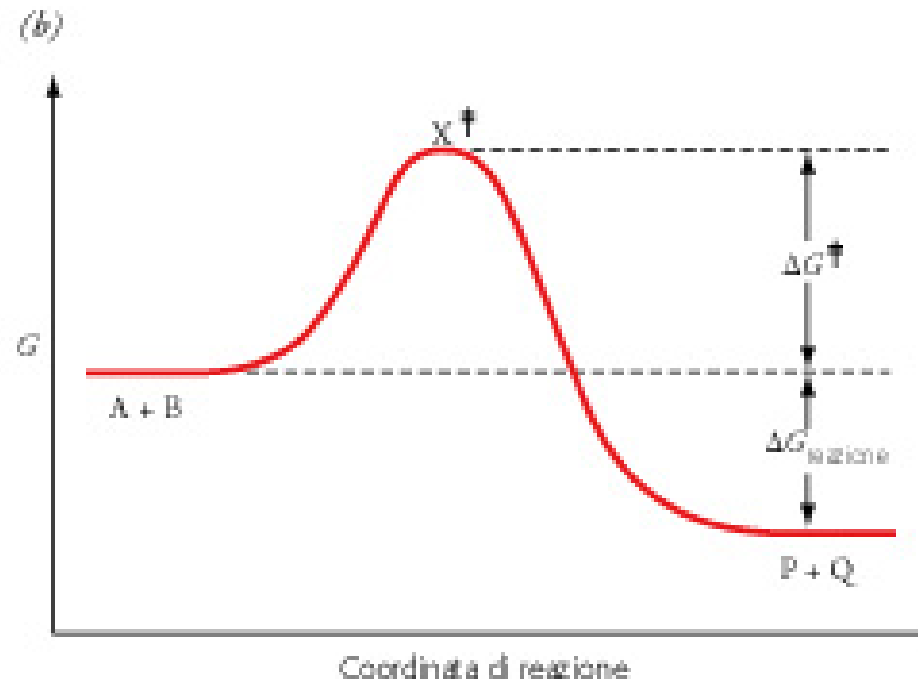
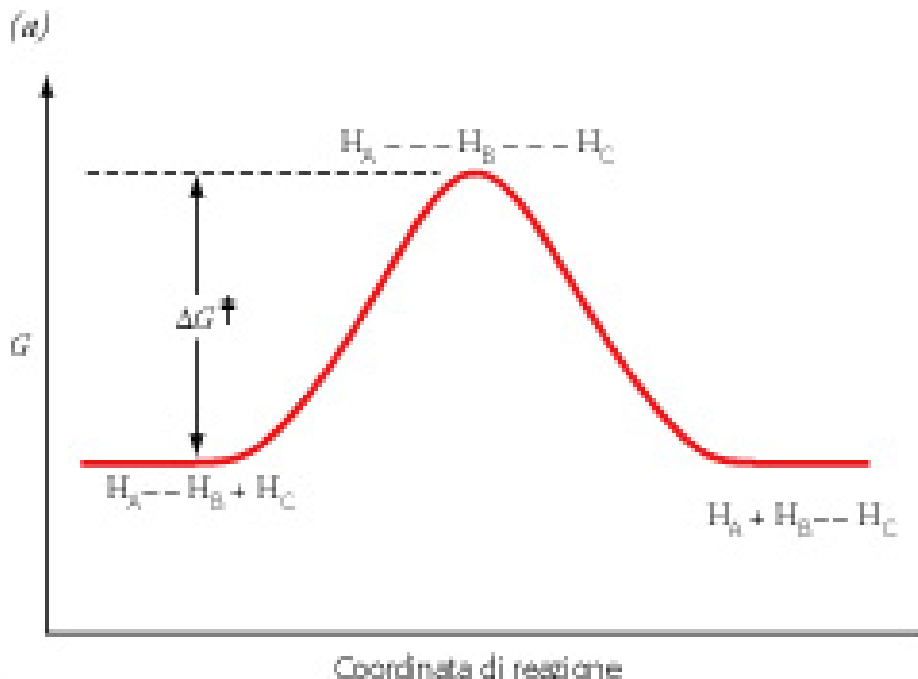
*Le concentrazioni di A e B diminuiscono mentre quelle di P e Q aumentano.*

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



*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*

Alcune molecole di substrato devono possedere + energia rispetto alle altre

→ **COMPLESSO ATTIVATO** e 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

*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



Un enzima favorisce la formazione del **COMPLESSO ATTIVATO**

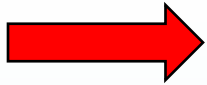
che raggiunge più facilmente lo stato di transizione



*Superamento della barriera energetica*

*per la trasformazione del substrato in prodotto*

- Capacità dell'enzima di formare particolari interazioni con il substrato: legami deboli, non covalenti nel *processo di riconoscimento enzima-substrato*



*Formazione del complesso ES*

- Corretto orientamento del substrato nel sito catalitico
- Stiramenti e distorsioni dei legami nella molecola del substrato favorendo la rottura di alcuni legami e la formazione dei nuovi legami

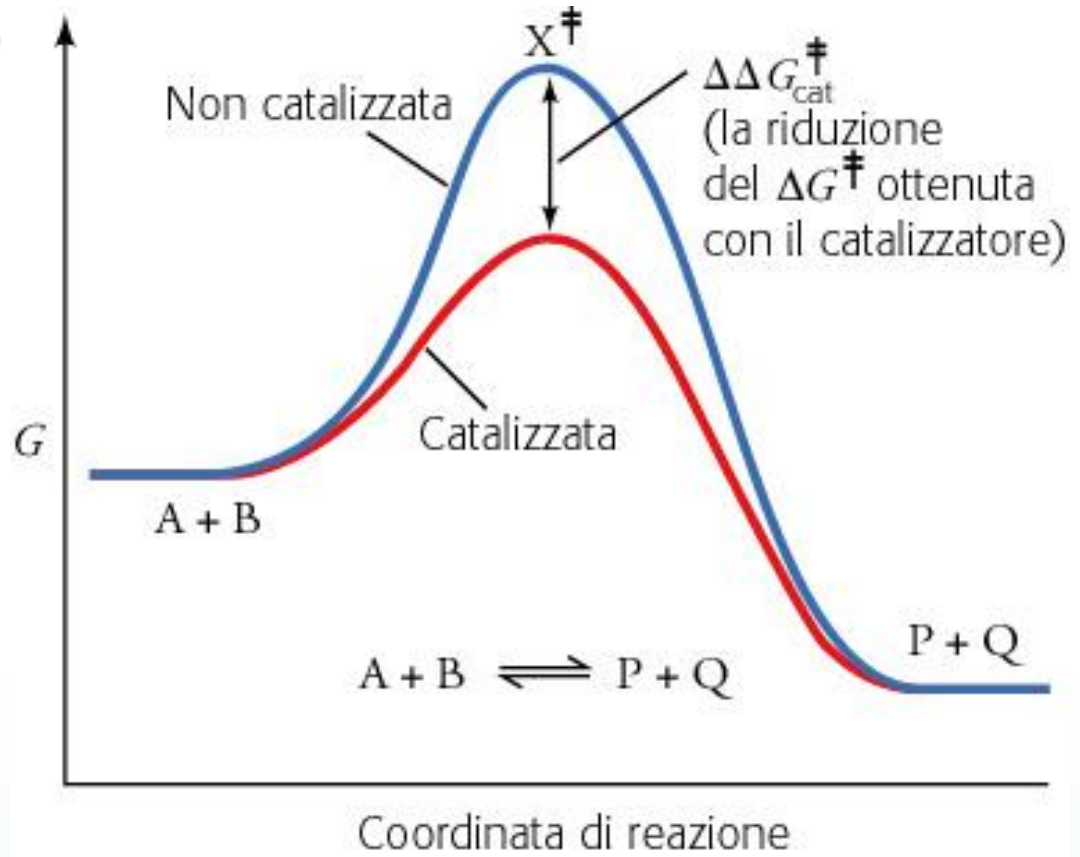


**PRODOTTO DI REAZIONE**

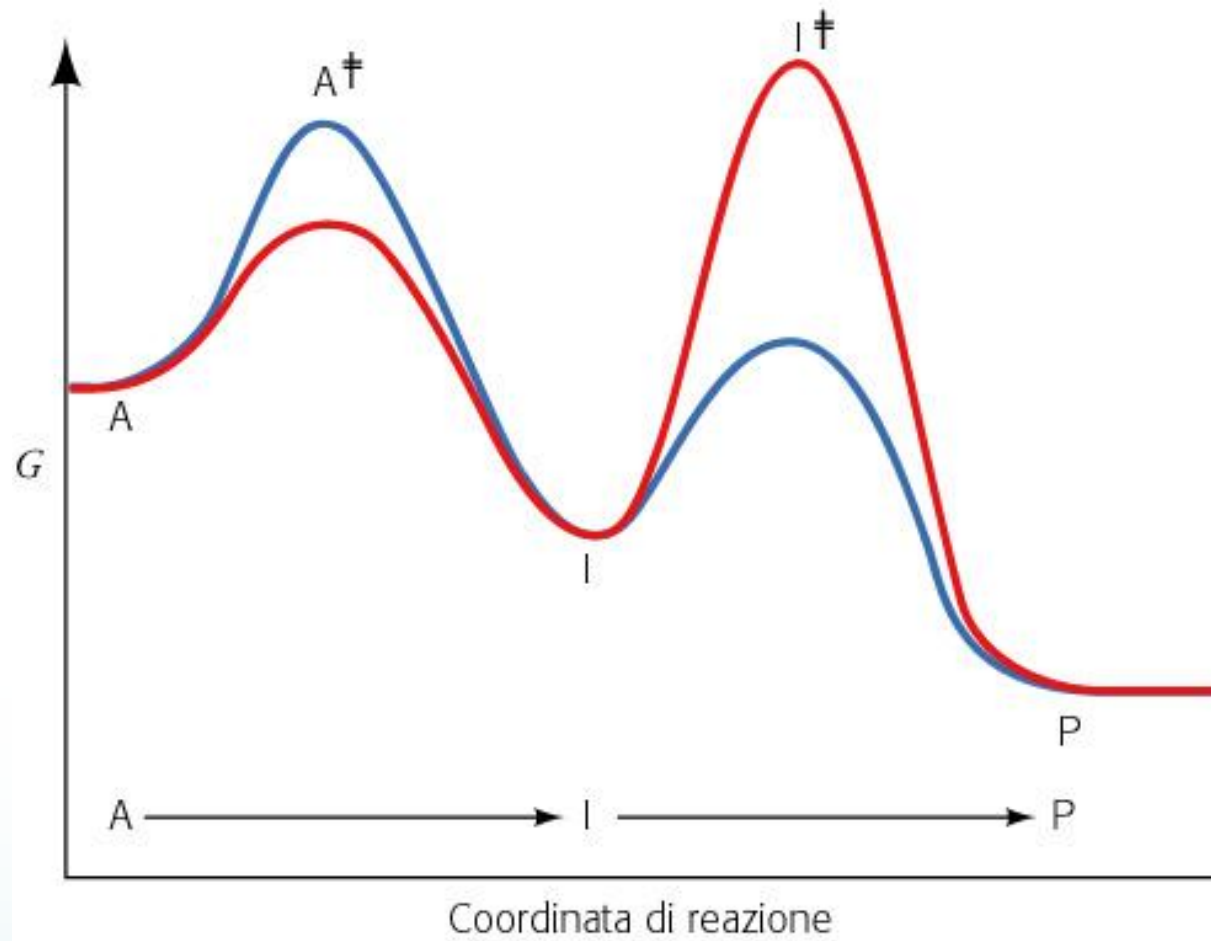
**Abbassamento dell'energia  
di attivazione**



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

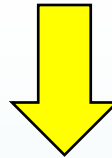


## Reazione chimica a 2 tappe

- 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

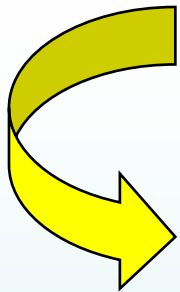


*Per misurare la velocità di una reazione enzimatica conviene misurare la velocità iniziale ( $V_0$ )*

- *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:

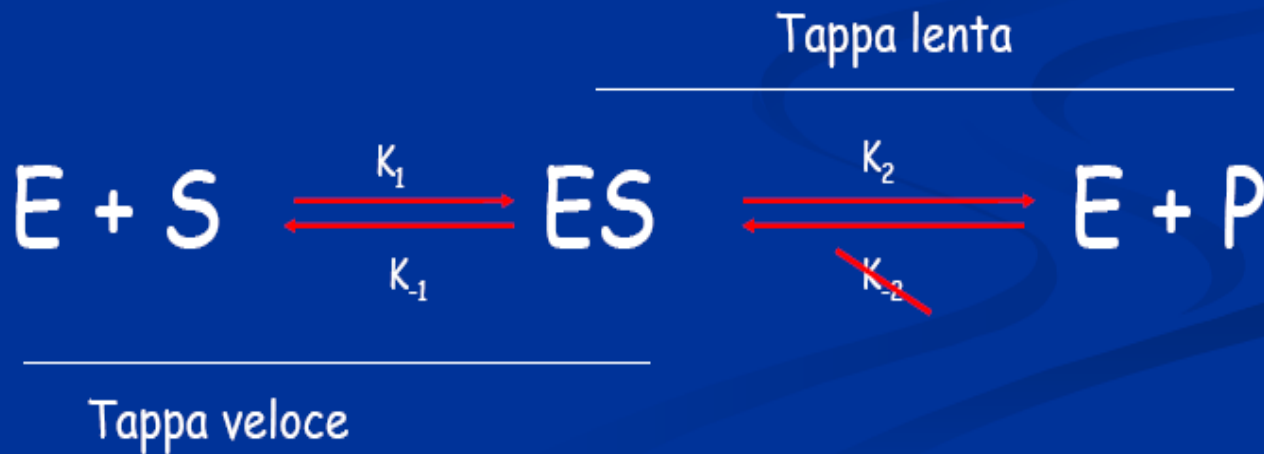


La **prima assunzione** è nota come del "quasi equilibrio" o dello "equilibrio rapido"

- **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
- **La scissione di ES in E+P** è praticamente irreversibile e rappresenta lo **stato lento della reazione**
- *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*



## MECCANISMO PROPOSTO:



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

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

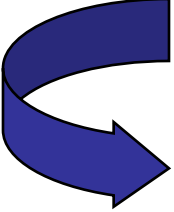
*La scissione di ES in E+P* è praticamente irreversibile



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

[ES] rimane costante

*Velocità di sintesi = Vel di consumo*


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

la velocità con cui il complesso ES si forma è uguale

alla somma delle velocità con cui si scinde a dare E+P ed E+S

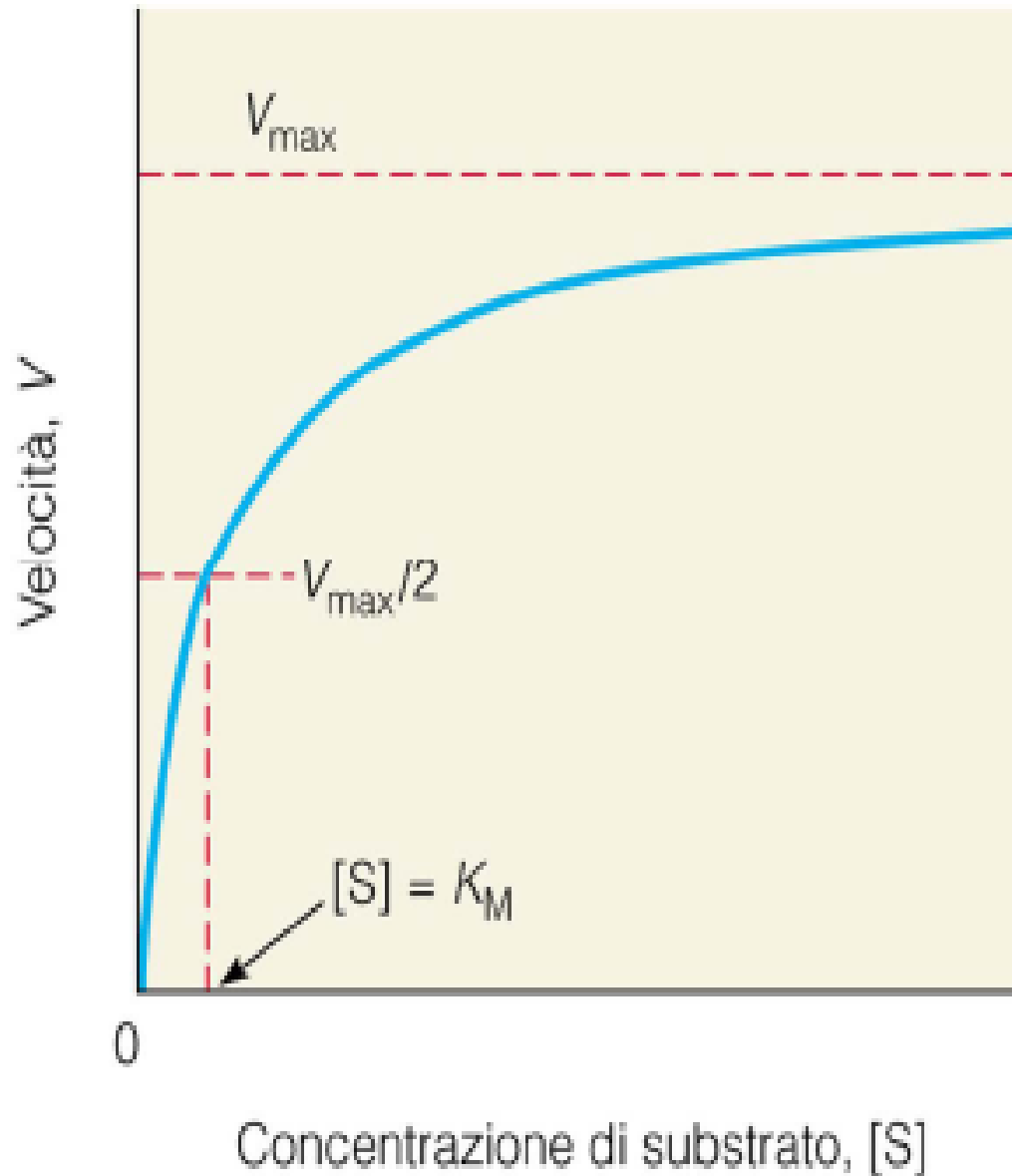


la concentrazione di ES è costante quando la sua *velocità di formazione* di ES eguaglia a sola *velocità di decomposizione* in E+S ( $k_1=k_2$ ) e la *velocità di trasformazione* di ES in E+P è trascurabile assumendo

$$k_3 \ll k_2$$

**GRAFICAMENTE**

**un'iperbole equilatera**



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.

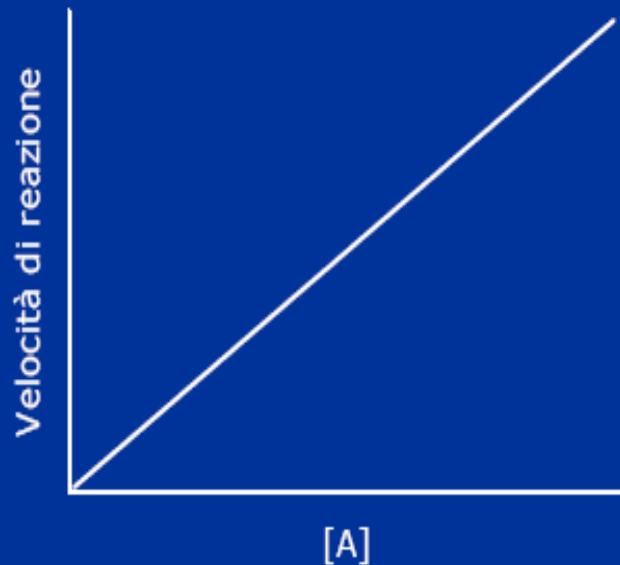


$$k_3 [ES] = V_{max}$$

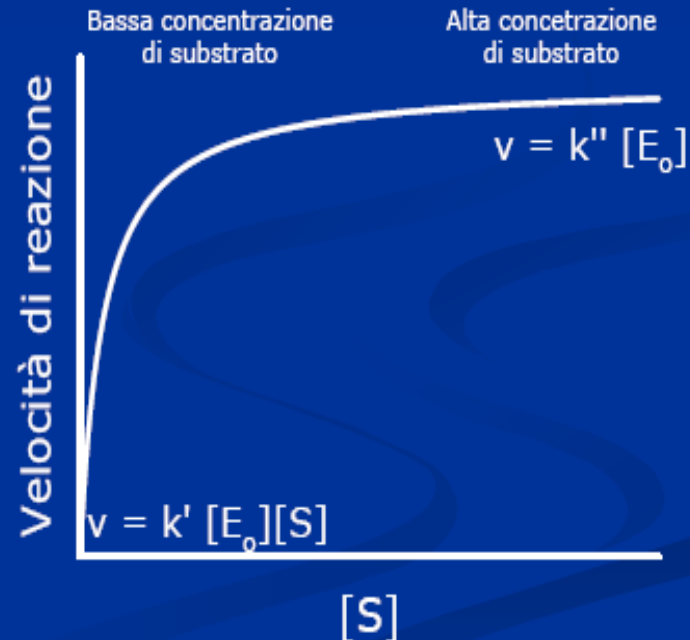
## In una reazione chimica



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



## In una reazione enzimatica



In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile

A bassa conc di S la vel dipende da conc di S e E (ordine 1)

Ad alte conc di S la vel diventa indipendente da conc di S (ordine zero)

## 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**



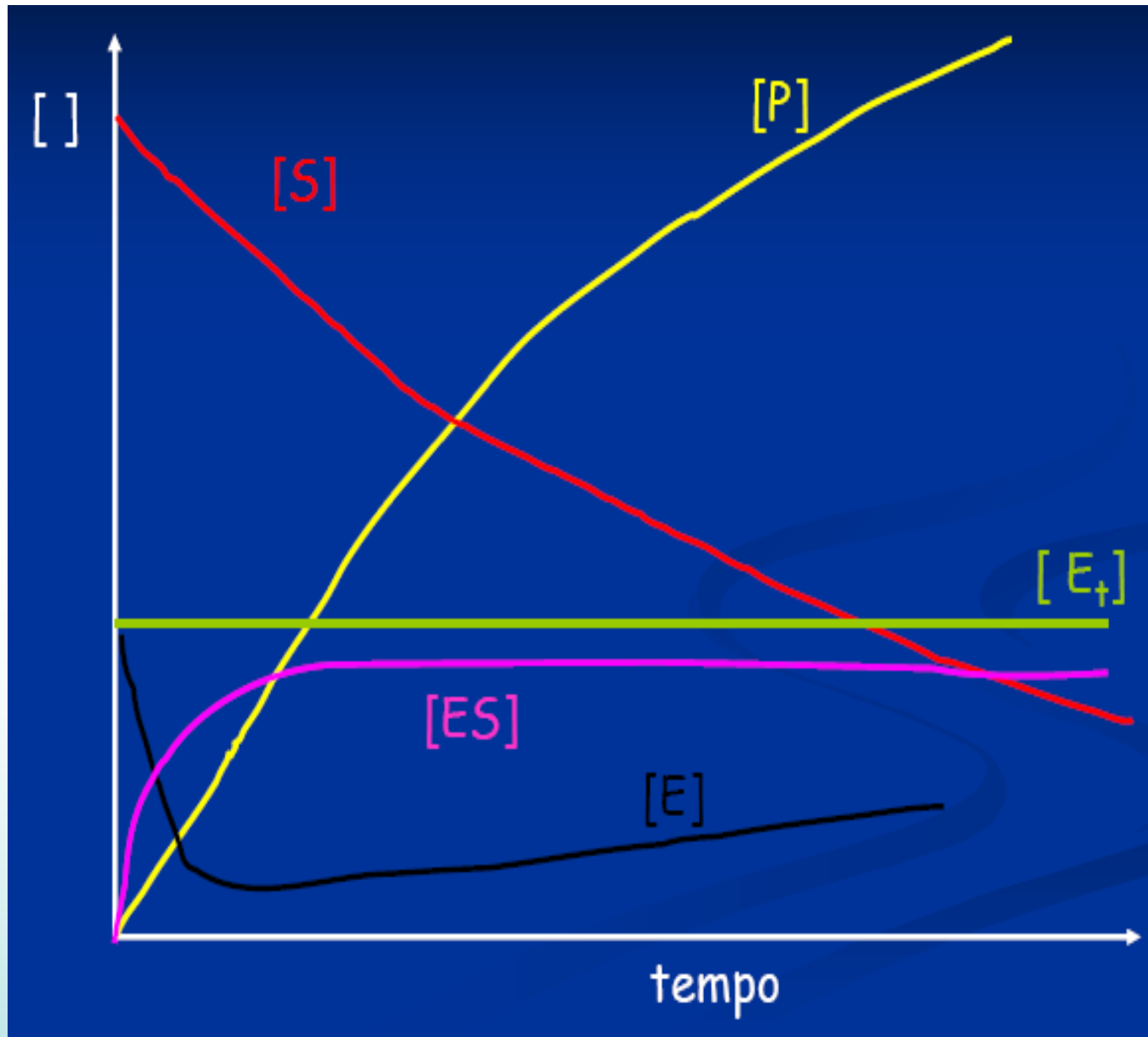
Stato prestazionario

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:

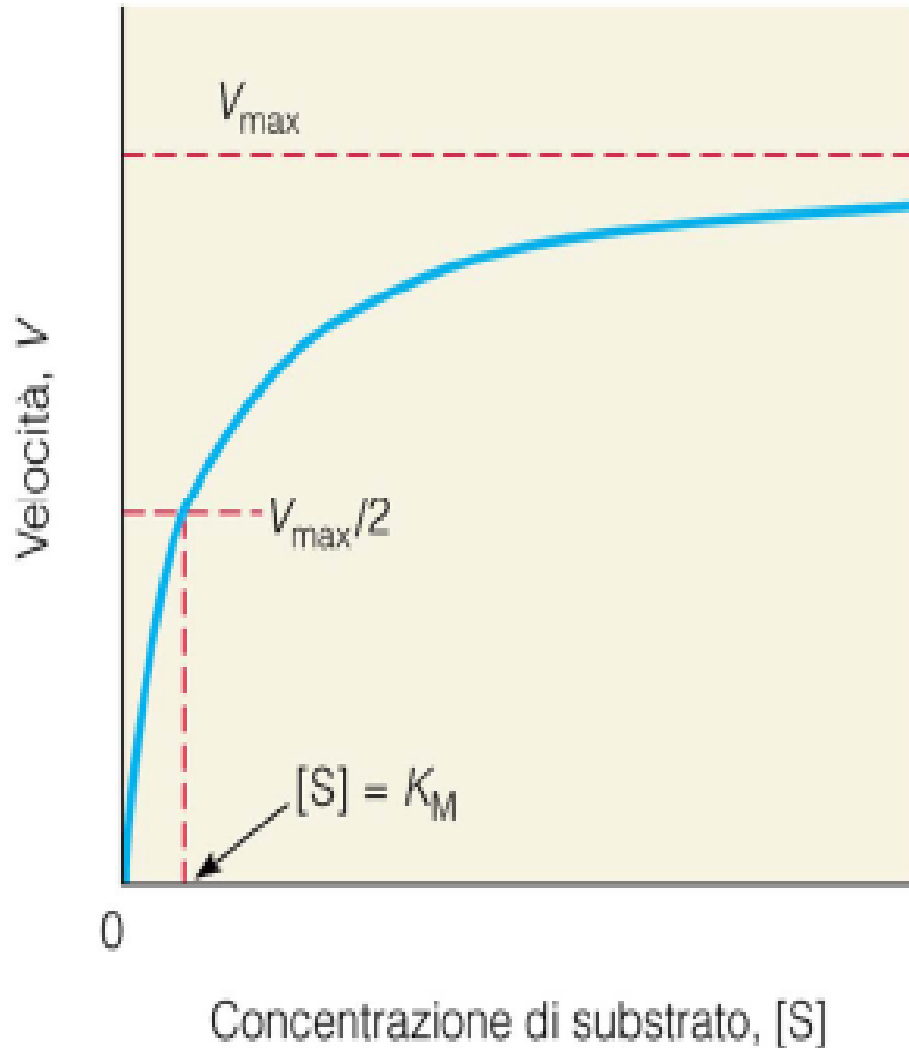
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m}$$

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

ad un substrato è in relazione con la sola **concentrazione del substrato** tramite due costanti ( $V_{\max}$  e  $K_m$ )

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

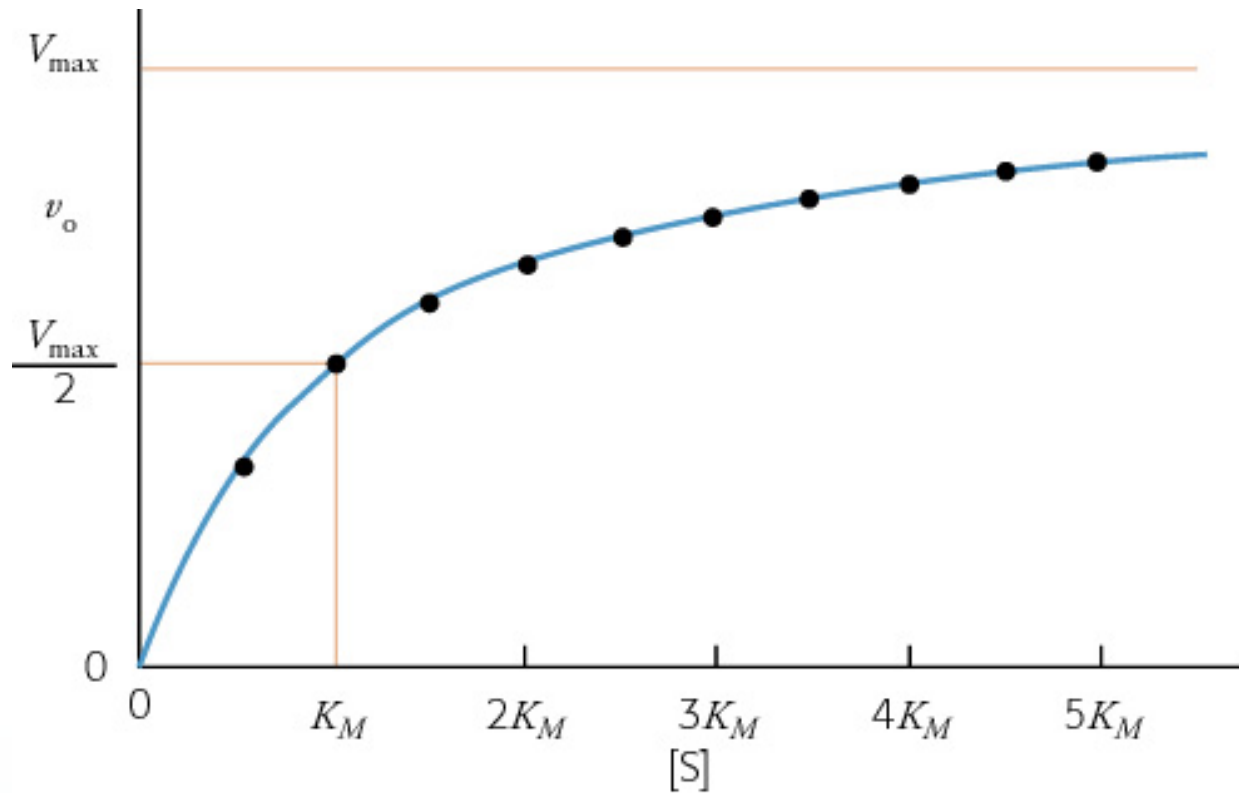
$[S] \gg [E_{\text{tot}}]$  è assimilabile sempre alla **concentrazione iniziale di substrato**.



- La  **$V_{max}$**  dipende dalla **concentrazione dell'enzima**, 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 **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

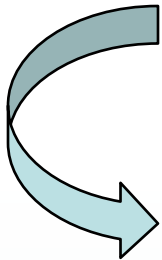
- La  **$K_m$**  dà informazioni sulla concentrazione di un substrato nel comparto cellulare dove avviene la reazione:

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<sub>cat</sub> = COSTANTE CATALITICA*** è la costante della tappa  
limitante la velocità dell'intera reazione

viene anche indicata come *numero di turnover dell'enzima*



*Rappresenta il numero massimo di molecole  
di substrato convertito in prodotto*

*nell'unità di tempo da una molecola di enzima*

*saturato con il substrato*

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

*Il rapporto  $K_{cat}/K_m$  = efficienza catalitica di un enzima*

# 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:

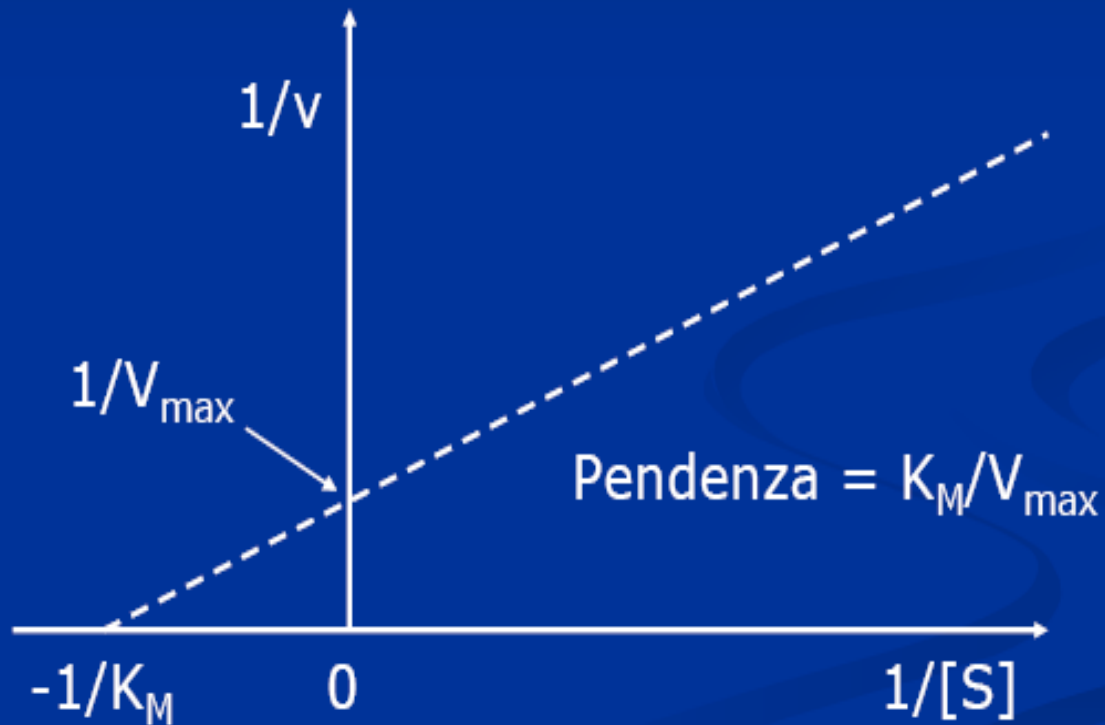
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Inversione

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

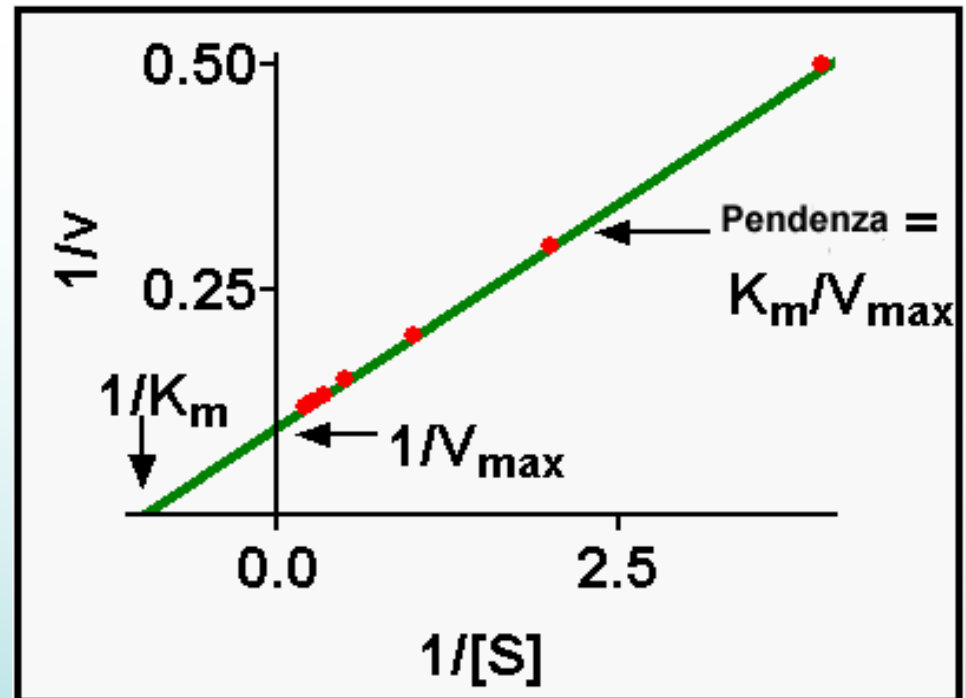
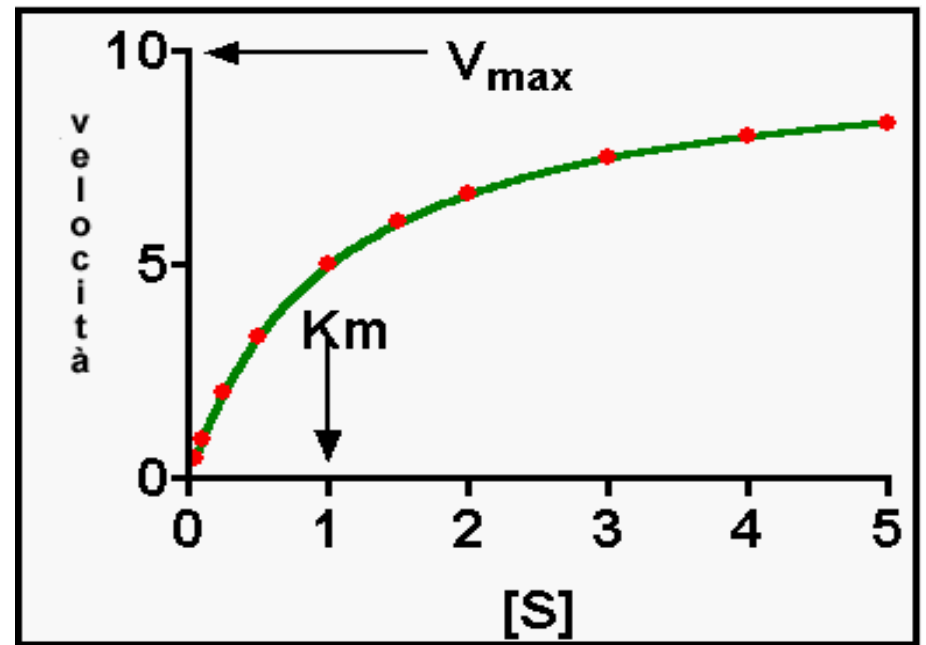
## E' l'equazione di una retta

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



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

- 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.

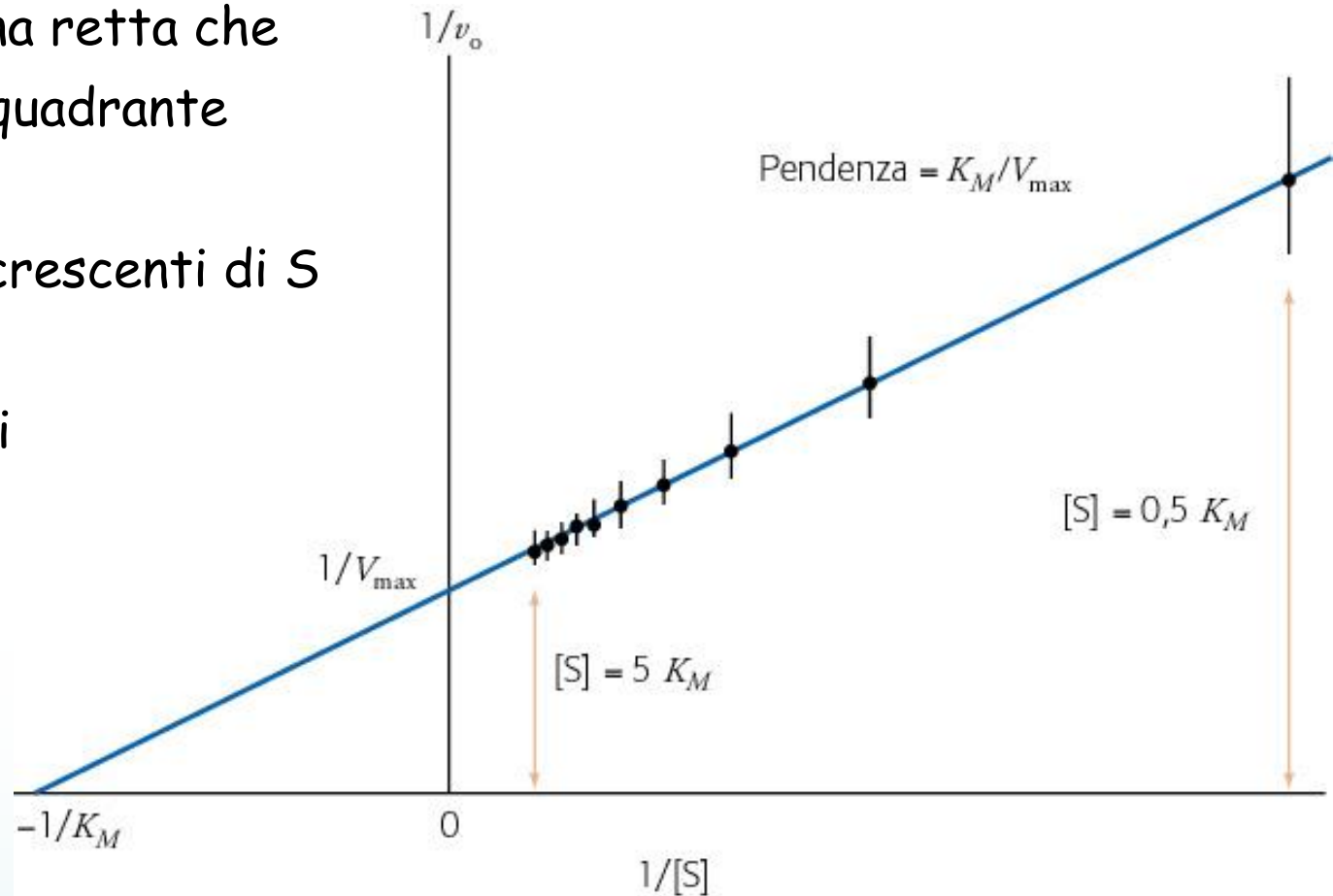




E' l'equazione di una retta che occupa il I° e II° quadrante

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:**

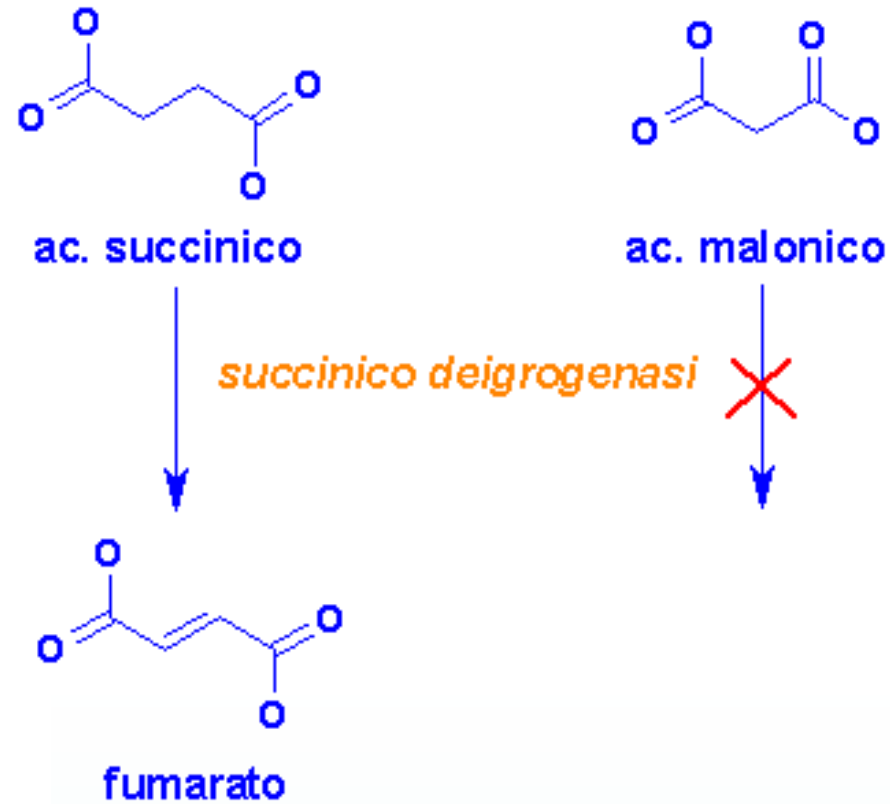
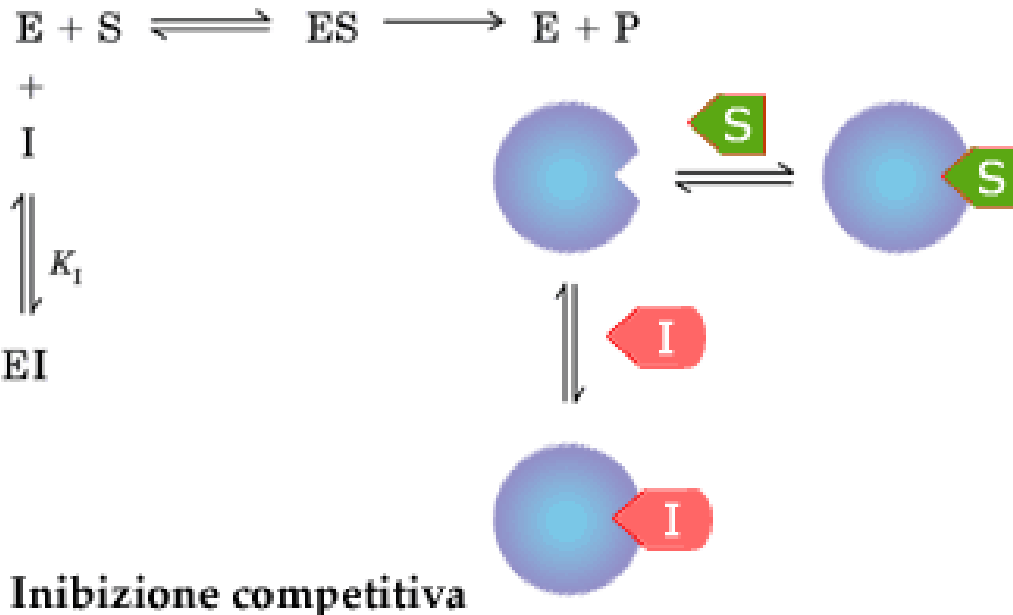
- Inibizione *COMPETITIVA*  
Aumenta la  $K_m$  e non ha nessun effetto sulla  $V_{max}$
- Inibizione *NON COMPETITIVA*  
Diminuisce  $V_{max}$ , la  $K_m$  resta inalterata
- Inibizione *INCOMPETITIVA*  
Diminuiscono  $K_m$  e  $V_{max}$

# 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

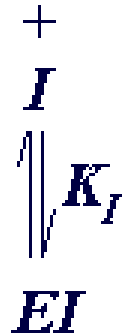


Es. inibizione competitiva:

L'acido malonico è in grado di legarsi nel sito attivo dell'enzima, ma non può essere ossidato avendo un solo gruppo  $\text{CH}_2$



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*

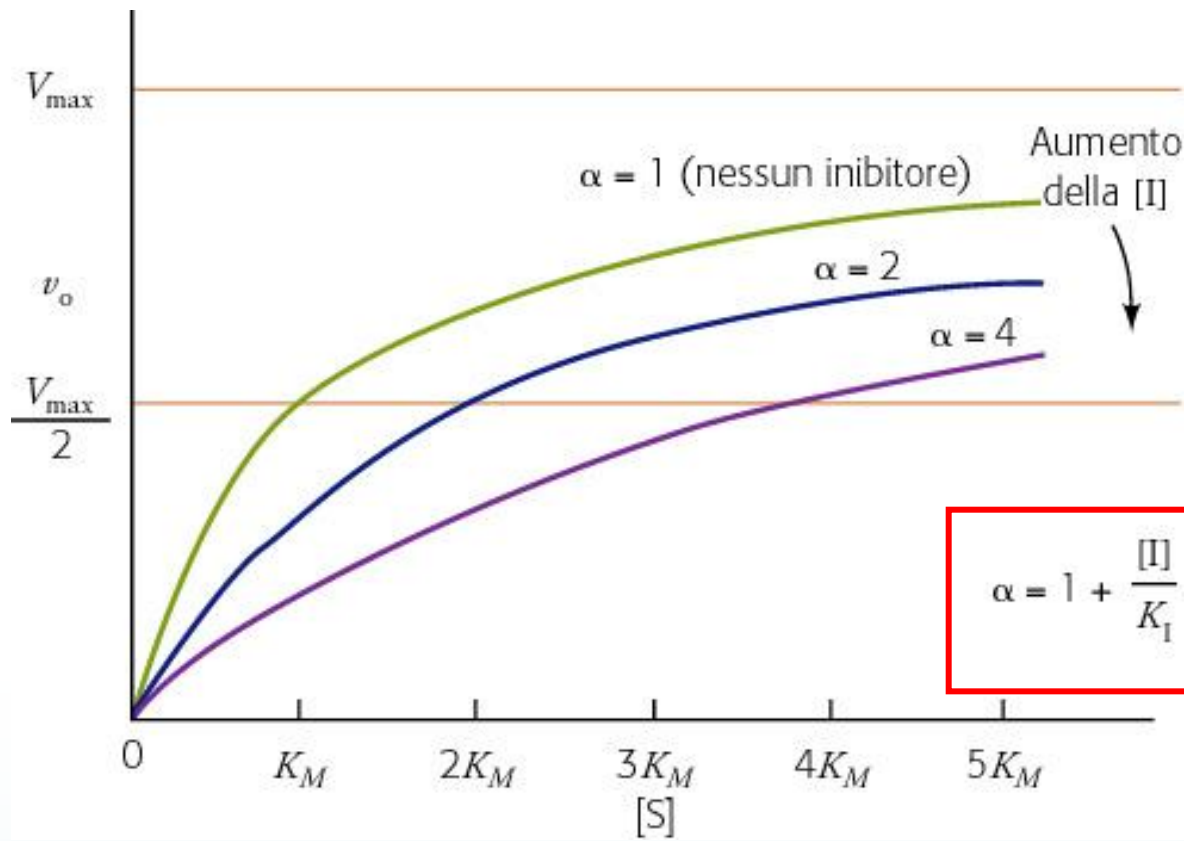


diminuzione dell'affinità per S

aumento della  $K_m$



**$K_m$  apparente**



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

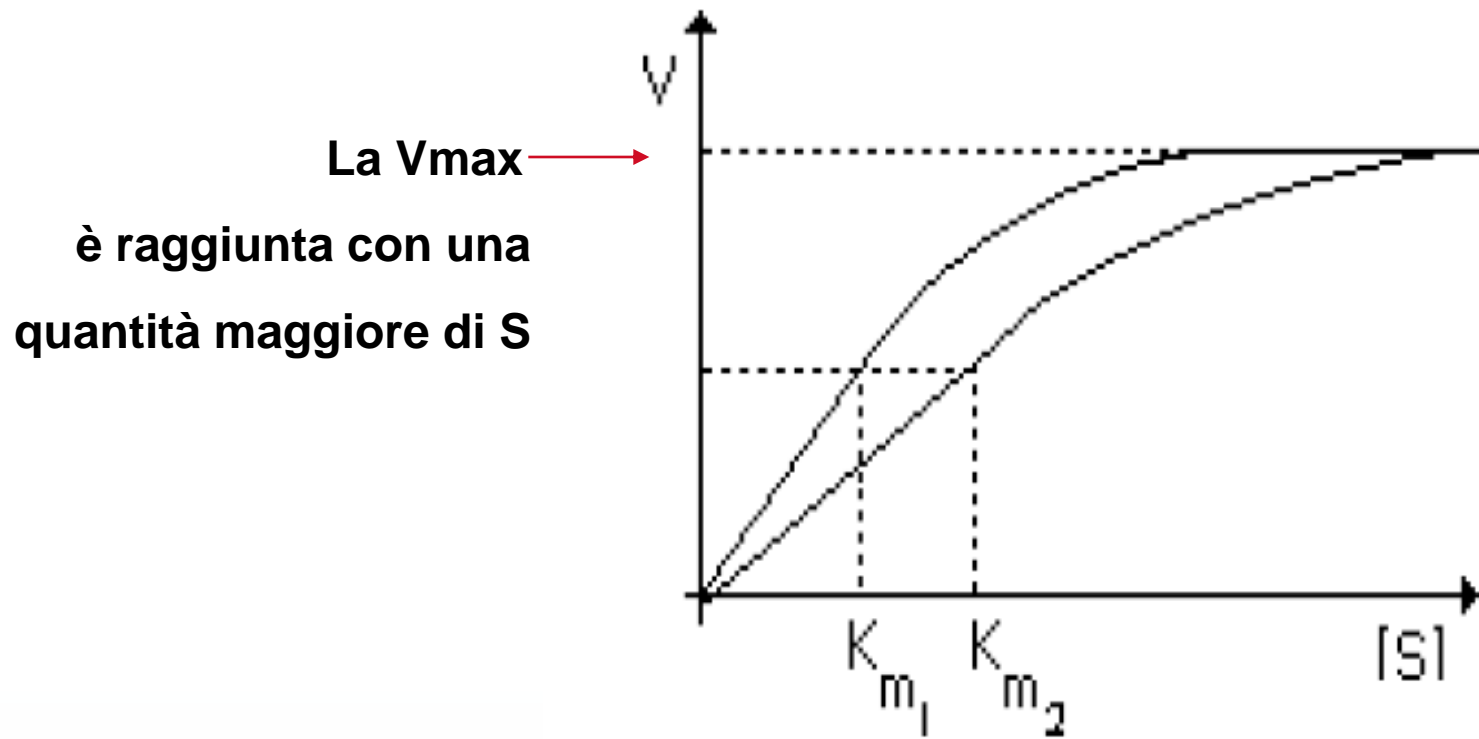
Aumento della  $K_M$  di un fattore  $\alpha = (1 + [I] / K_I)$

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**

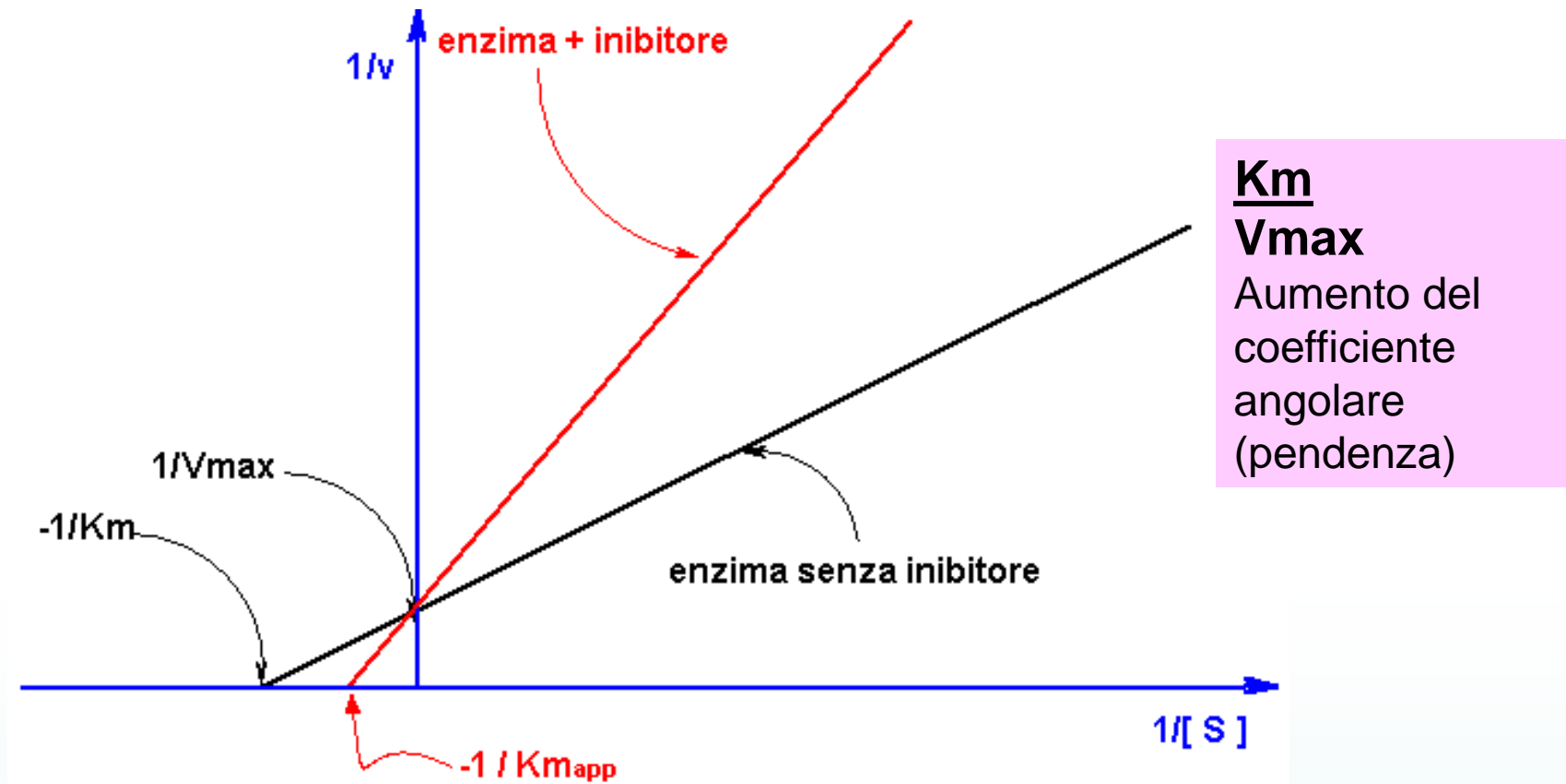


$K_{m_1}$  Enzima non inibito

$K_{m_2}$  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

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

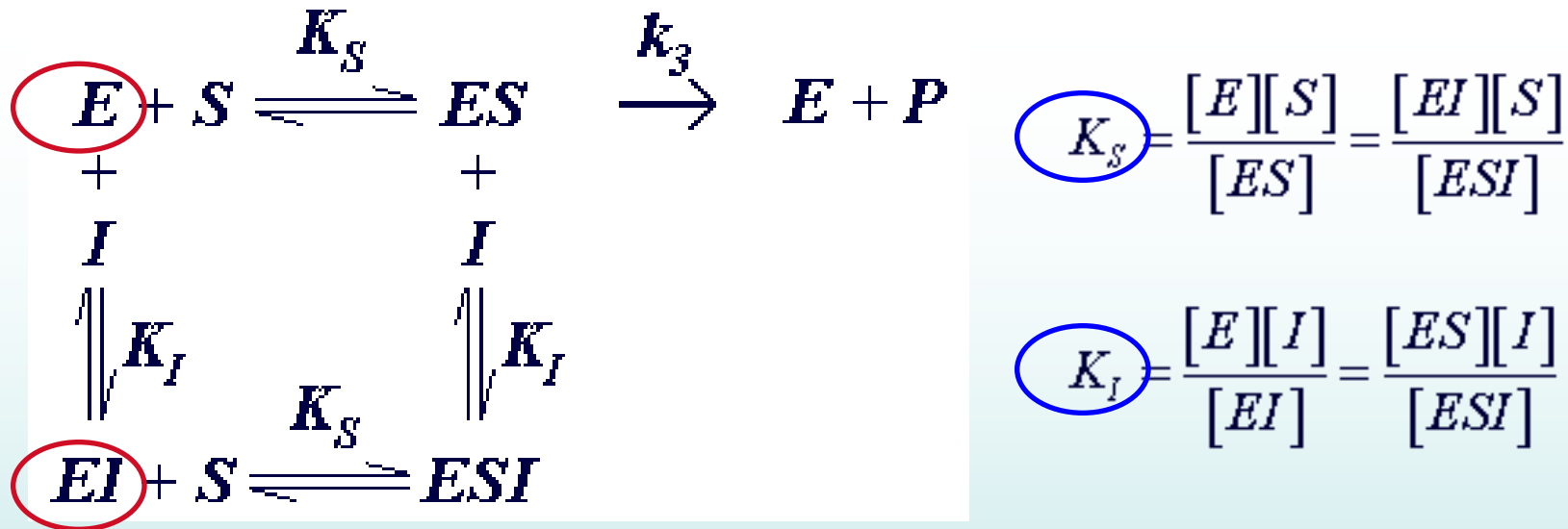
La  $K_m$  apparente non è costante  
 è in funzione del fattore  $a$  che considera  $[I]$

## • 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**.

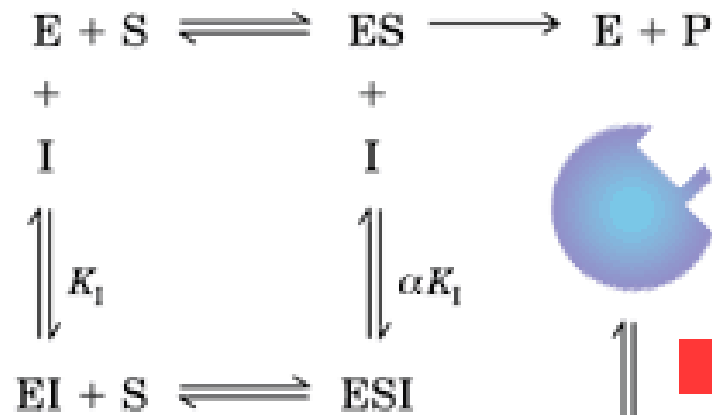


*ES ed ESI hanno le stesse costanti di dissociazione*

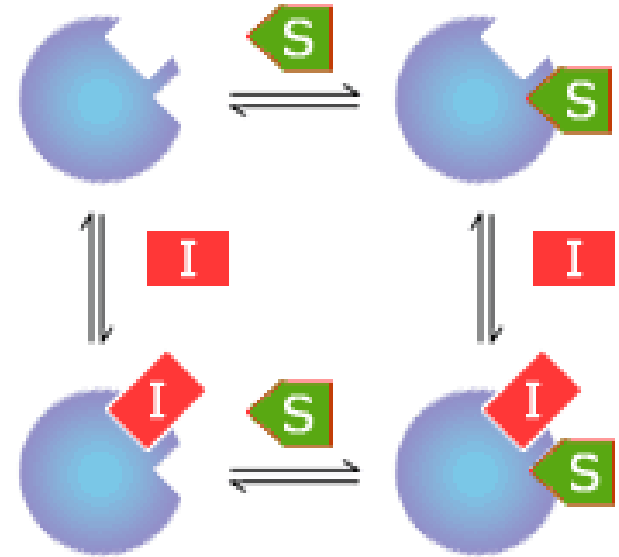
→ **E ed EI hanno quindi uguale affinità per S**



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



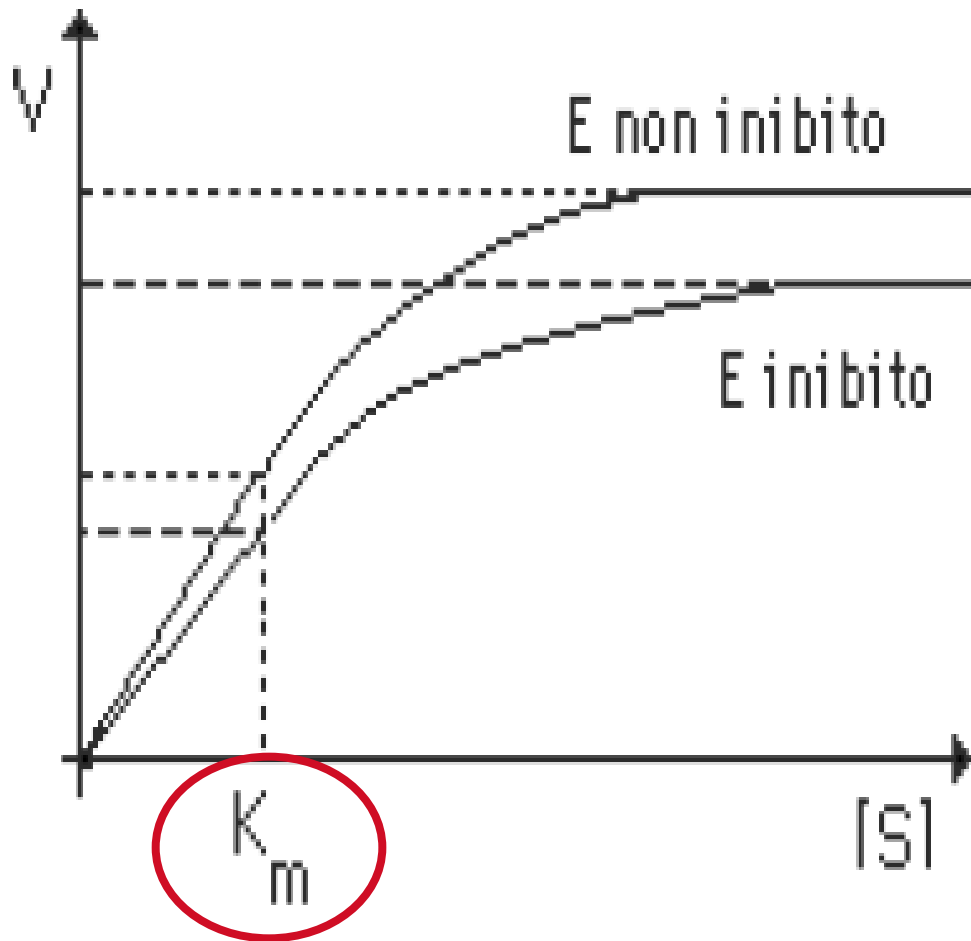
Inibizione mista



➔ 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**

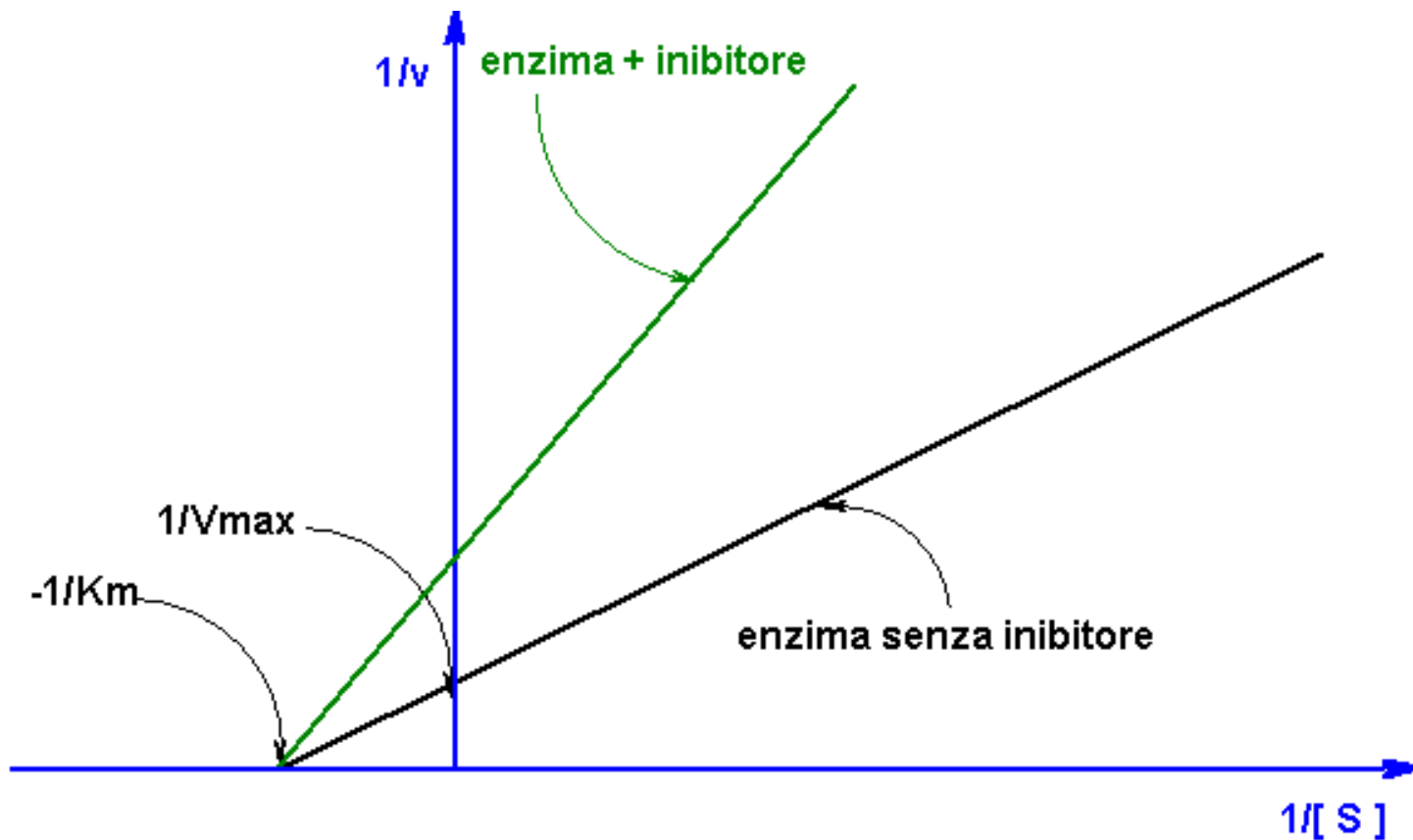


**V<sub>max</sub>** sarà più bassa in presenza dell'inibitore;

**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**



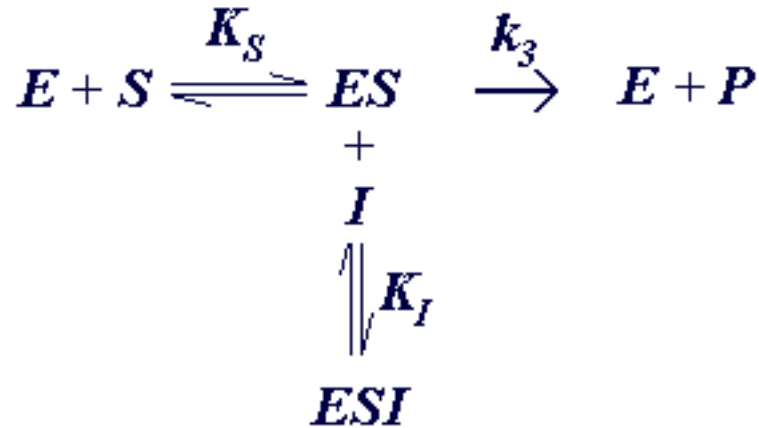
Rottura legami H

Inibizione non competitiva

• **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:

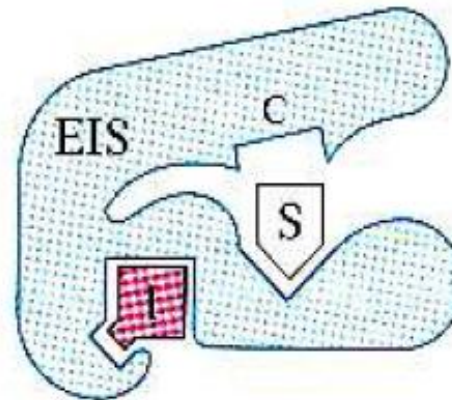
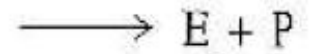
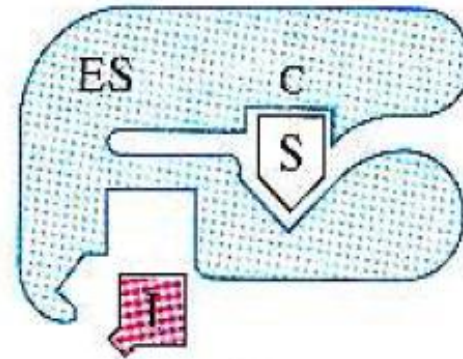
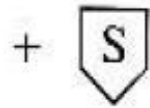
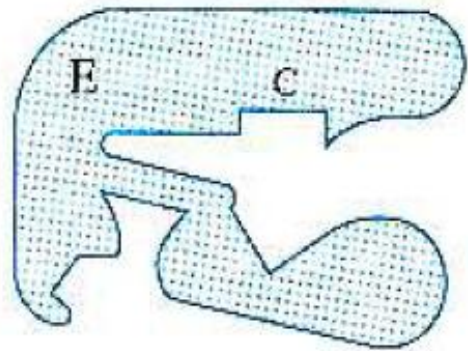


$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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

- 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,*

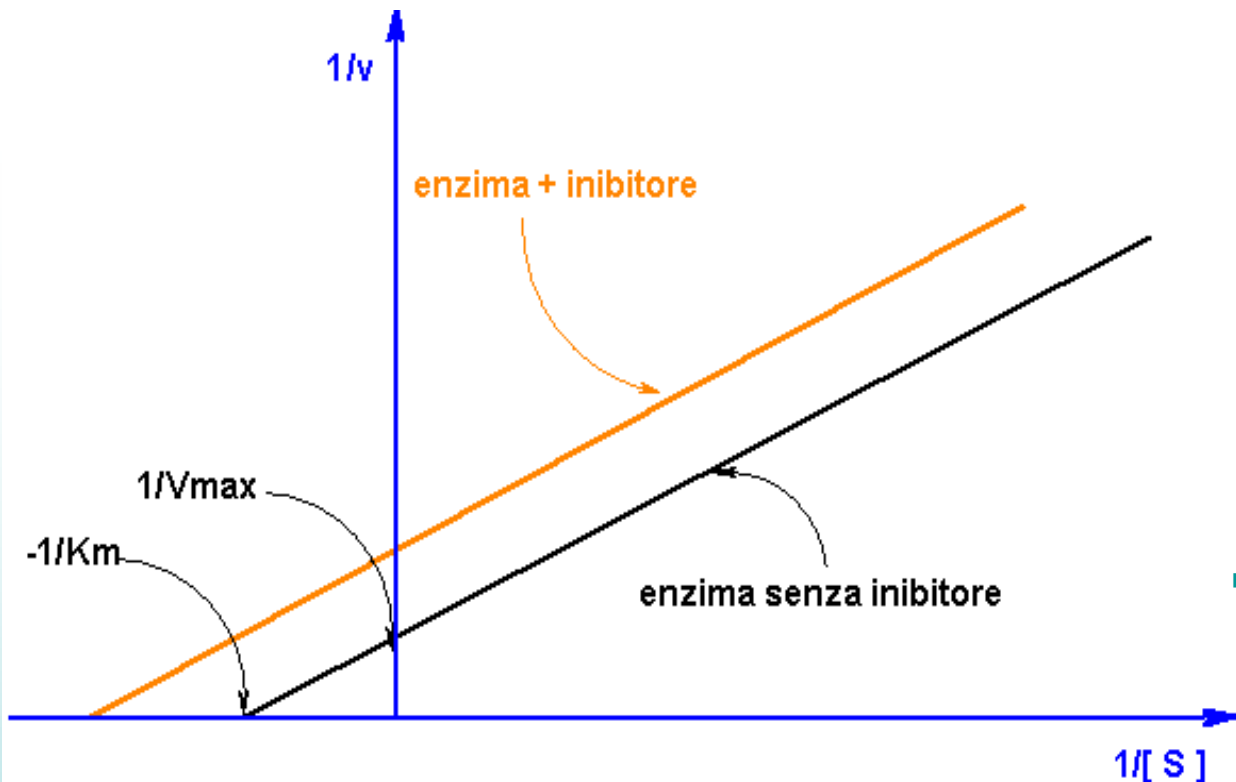
mostrando per esso una affinità infinita



**•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**

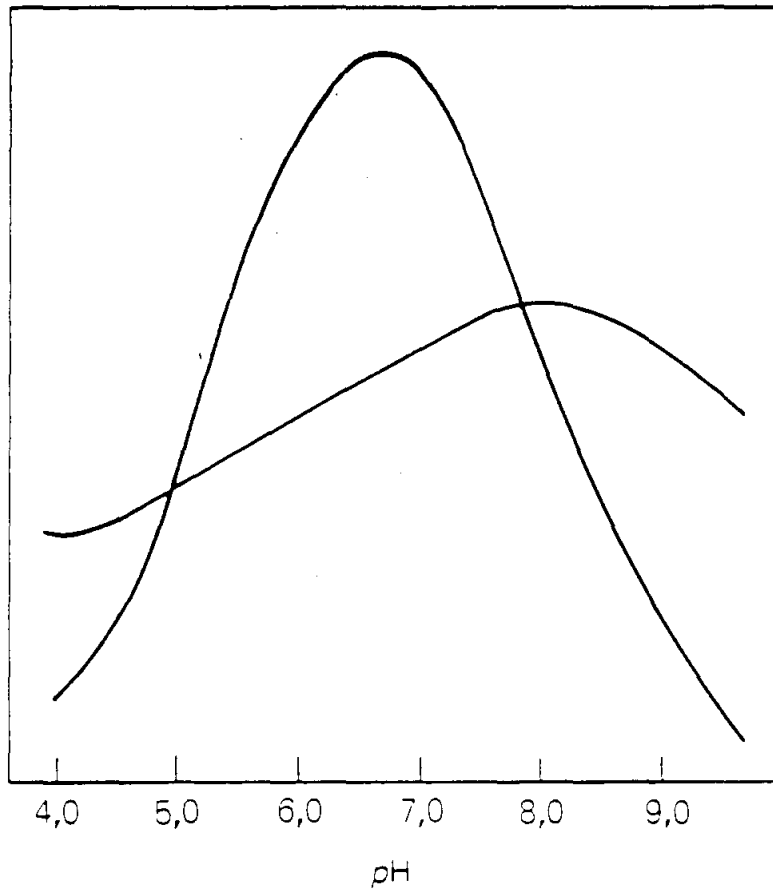
2. **Curve quasi piatte**

- a valori estremi di pH



*Denaturazione dell'enzima*

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





# Temperatura

Le piante non possono regolare la loro temperatura

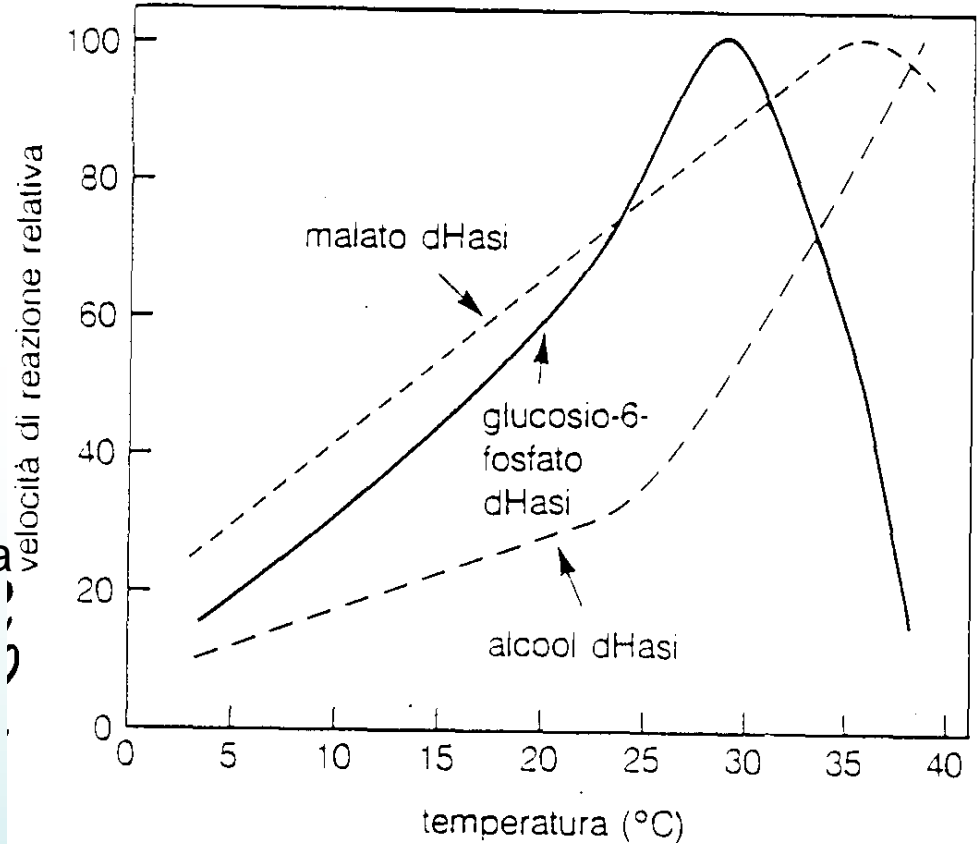
**la velocità delle reazioni enzimatiche aumenta da 0° a 35-40°C**

➔ 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

*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*

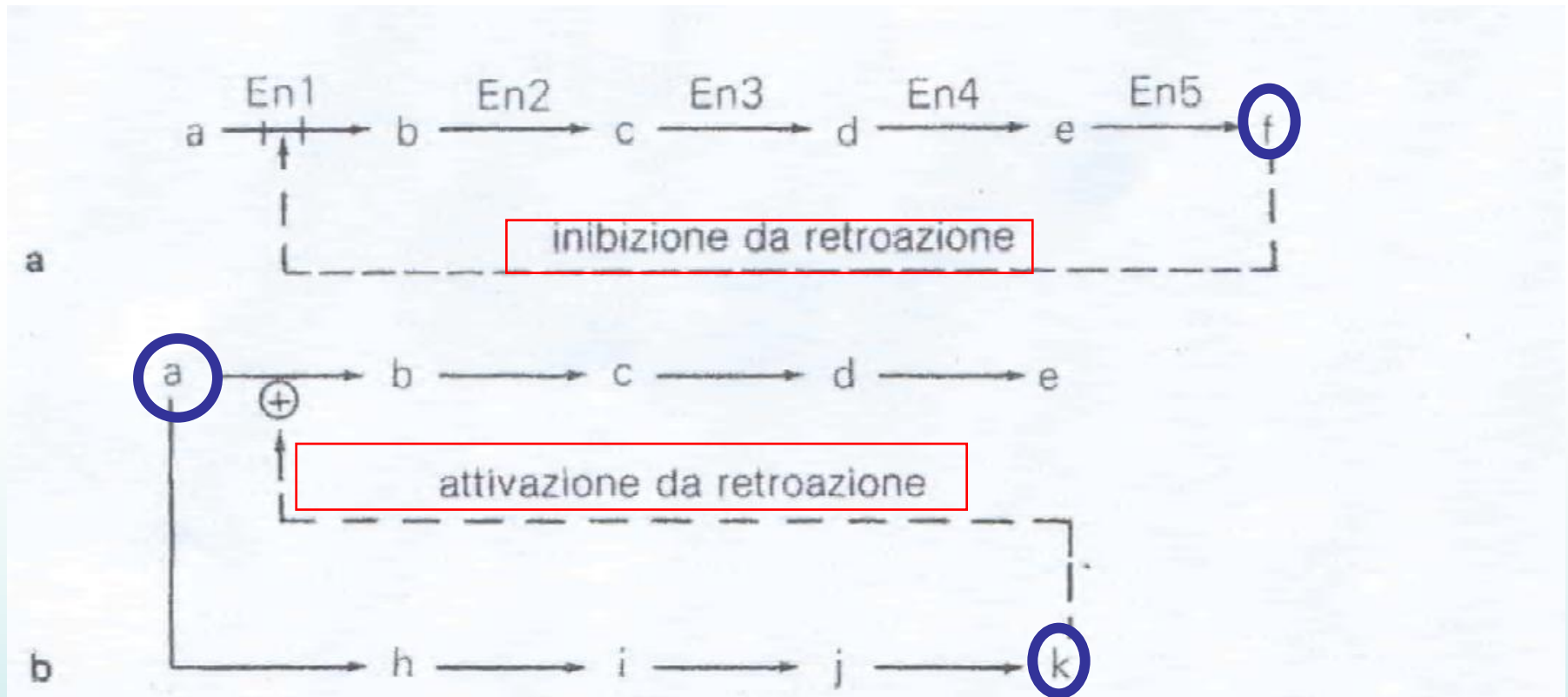


Figura 8.12. (a) *Inibizione da reazione*; (b) *attivazione da retroazione*.

## ***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<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

***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**

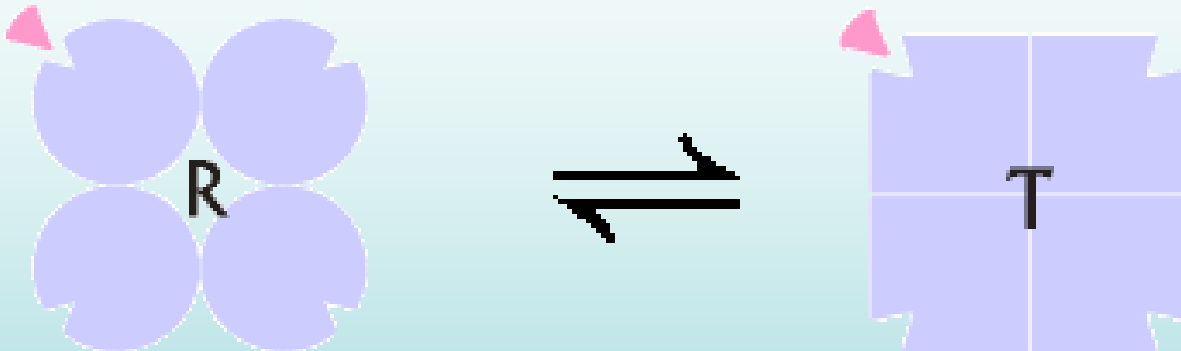
*(Conformazione Tesa)*

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

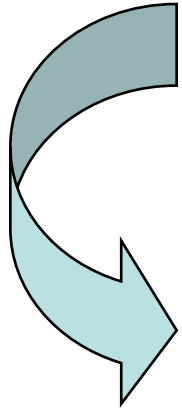
Di conseguenza, **tutte le subunità devono esistere nella stessa conformazione.**



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



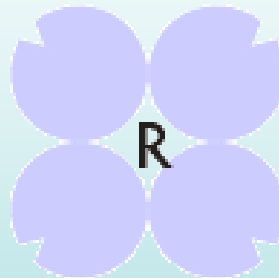
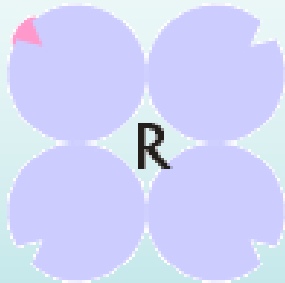
Se il modulatore è il **substrato**:  
È più probabile che si leghi alla  
conformazione **R** data la maggiore affinità.



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

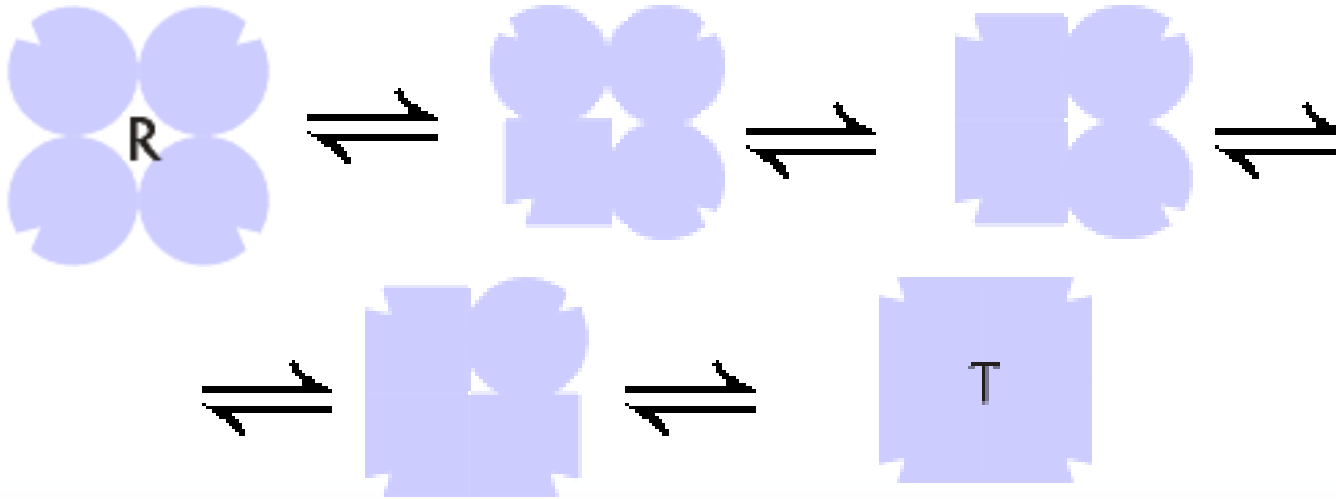
Aumento della probabilità di transizione  
dalla forma inattiva a quella attiva

***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.**



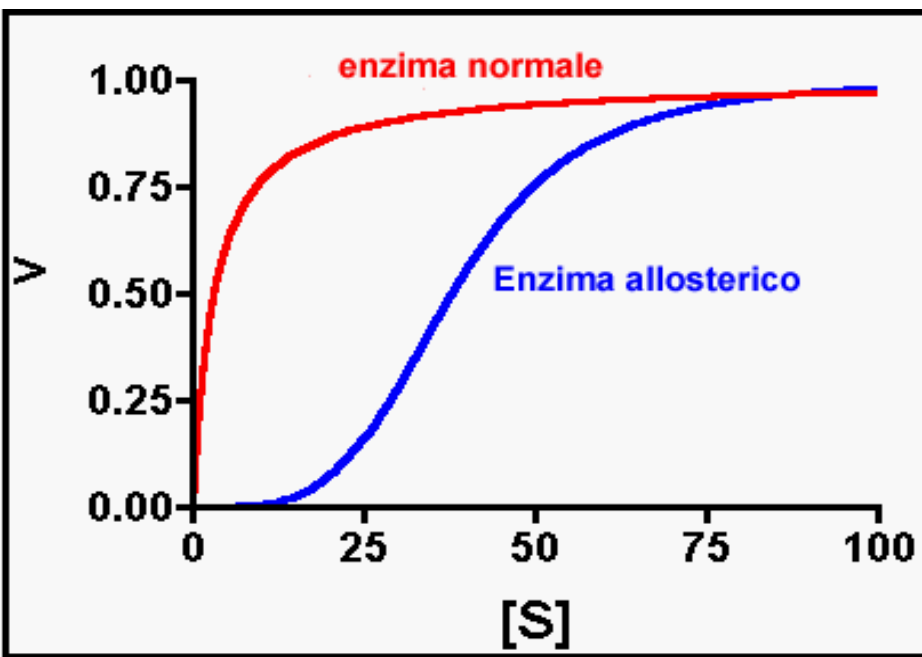
**l'effettore ha un'influenza più diretta sulla forma dell'enzima.**

**→ *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).

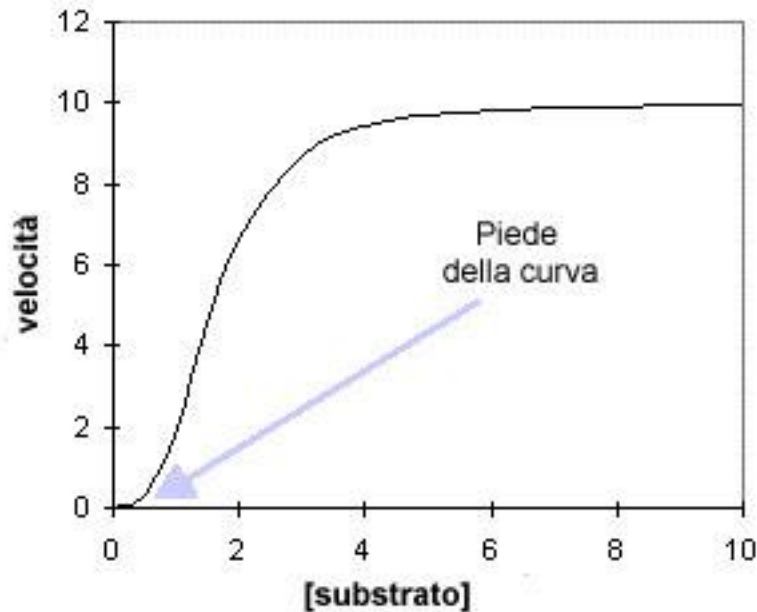
L'effettore non propaga il cambiamento di conformazione alle subunità adiacenti:

- 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.*

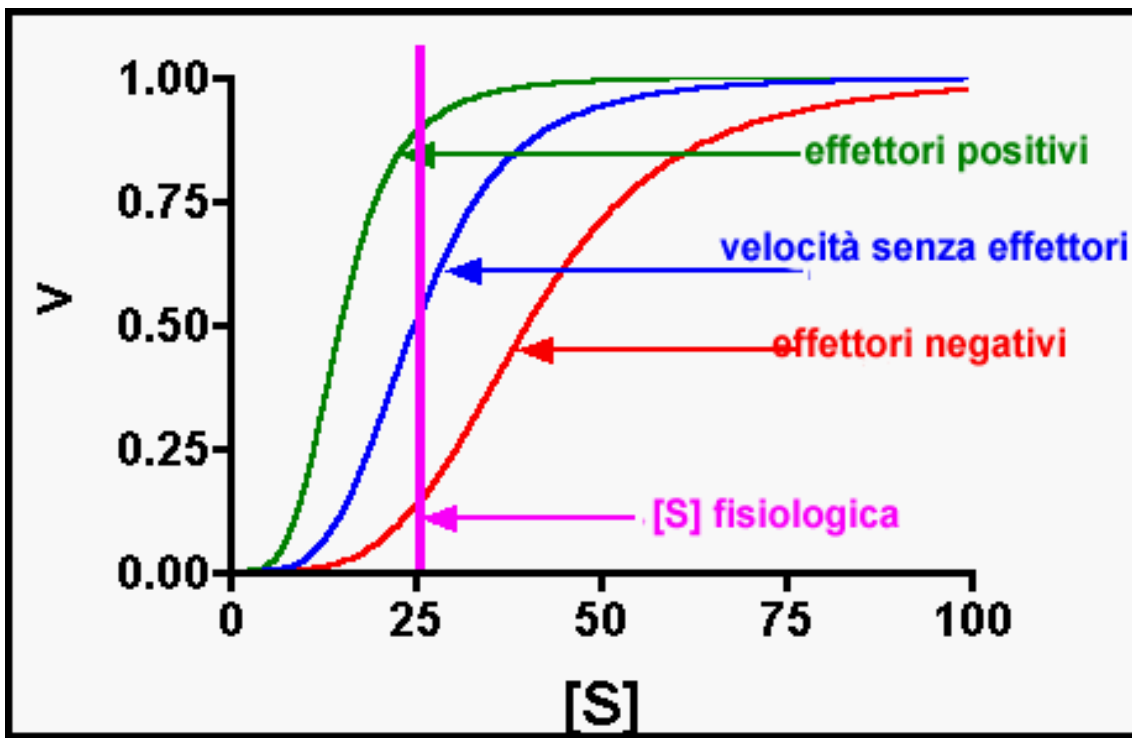
**forma sigmoidale** della curva:  
 a basse concentrazioni di substrato  
 un aumento di  
 concentrazione del substrato  
 lieve incremento della velocità



**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