


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:** 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** : (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

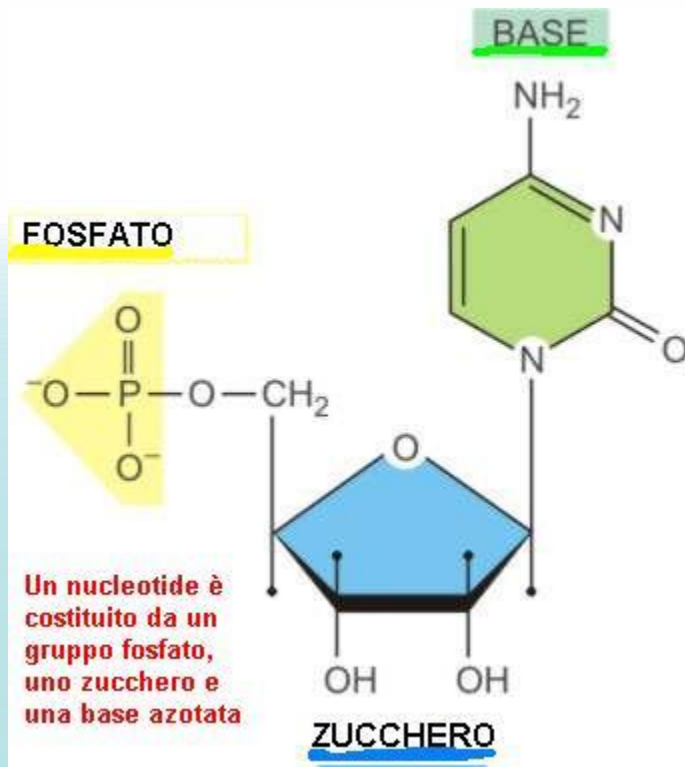
TABLE 6-1	Some Inorganic Ions That Serve as Cofactors for Enzymes
Ions	Enzymes
Cu²⁺	Cytochrome oxidase
Fe²⁺ or Fe³⁺	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K⁺	Pyruvate kinase
Mg²⁺	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn²⁺	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni²⁺	Urease
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

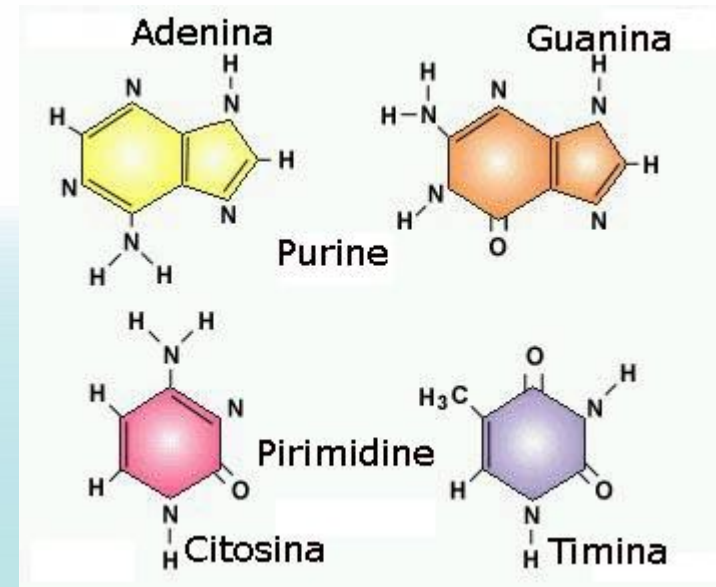
I NUCLEOTIDI sono costituiti da tre composti:

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

} **NUCLEOSIDE**

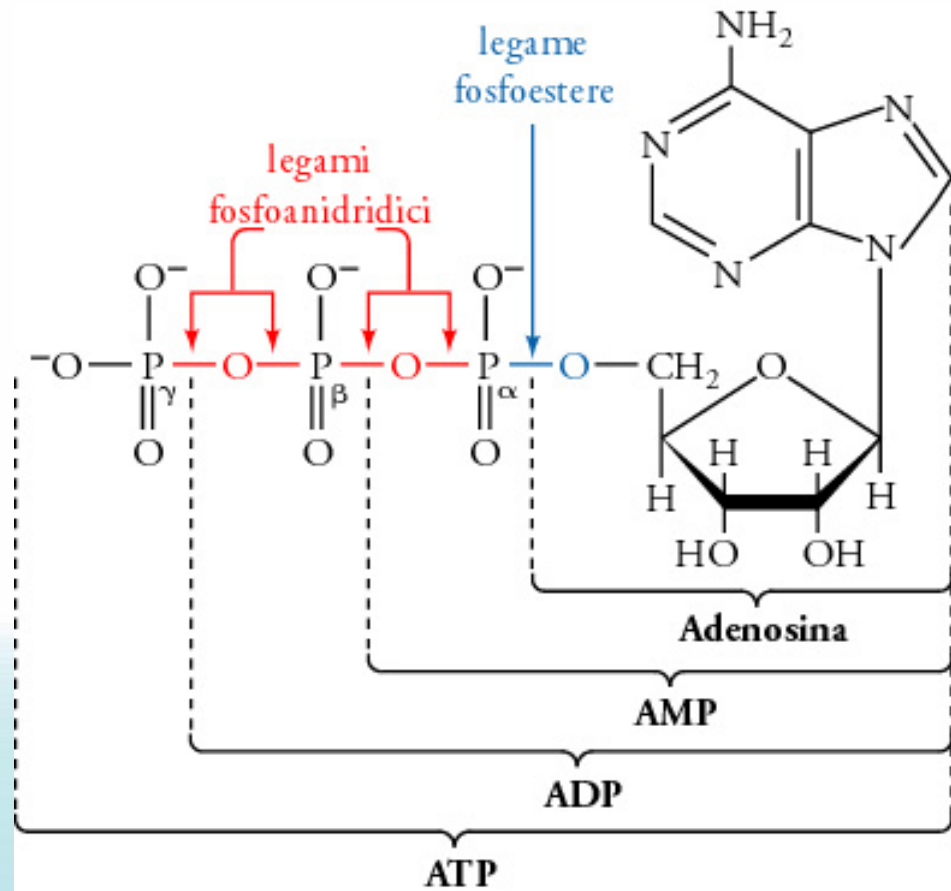


Basi azotate



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



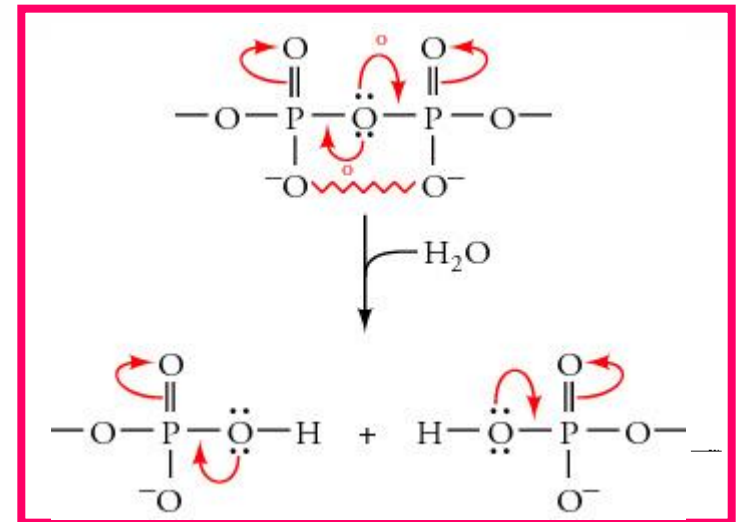
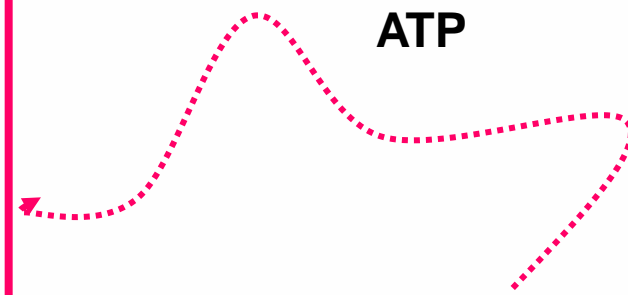
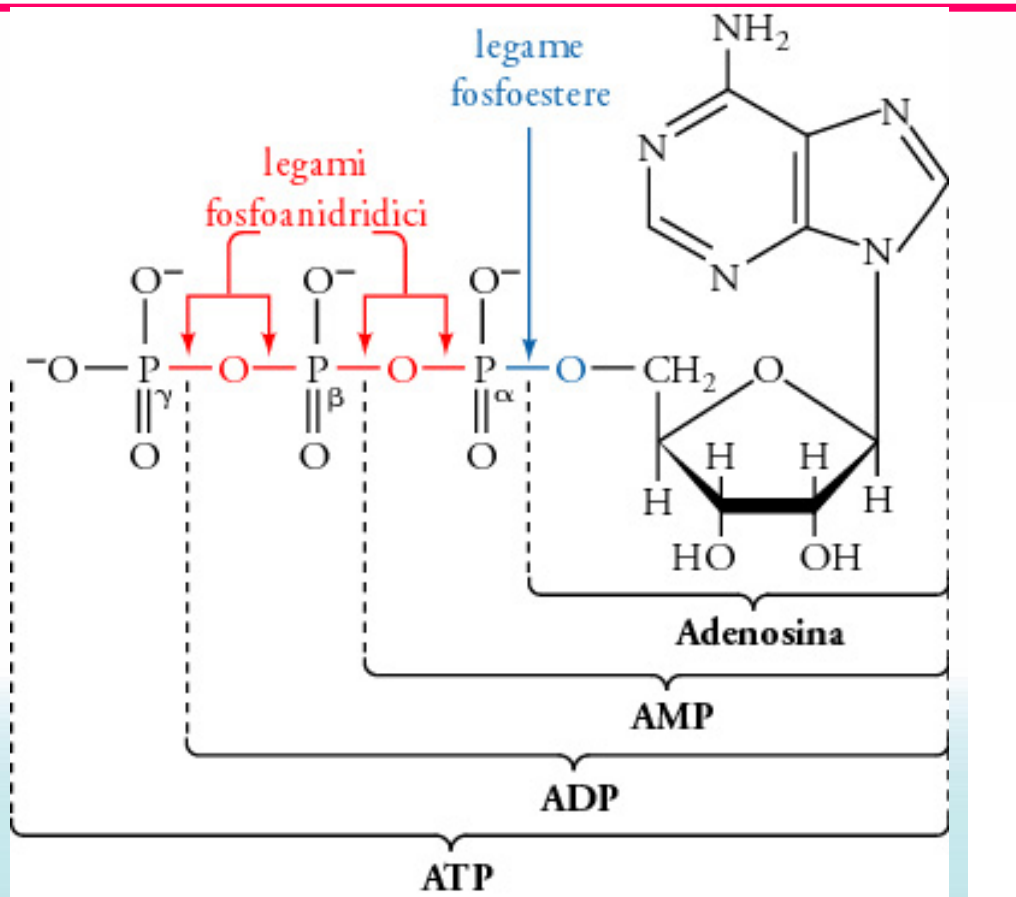


Figura 13.4

I legami anidride dell'ATP sono ad alta energia
La loro rottura porta a forti riduzioni di en.libera
 ΔG di idrolisi = -30,5 kJ/mole o -7 Kcal/mole

Risonanza e stabilizzazione elettrostatica in una fosfoanidride e nei suoi prodotti di idrolisi. Le risonanze in competizione tra loro (freccie curve che partono dall'O centrale) e le repulsioni carica-carica (linea rossa a zig zag) tra i gruppi fosforici diminuiscono la stabilità della fosfoanidride rispetto ai suoi prodotti di idrolisi.

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 pantote nico	"Attivazione" e trasporto di gruppi acile o acetile	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,

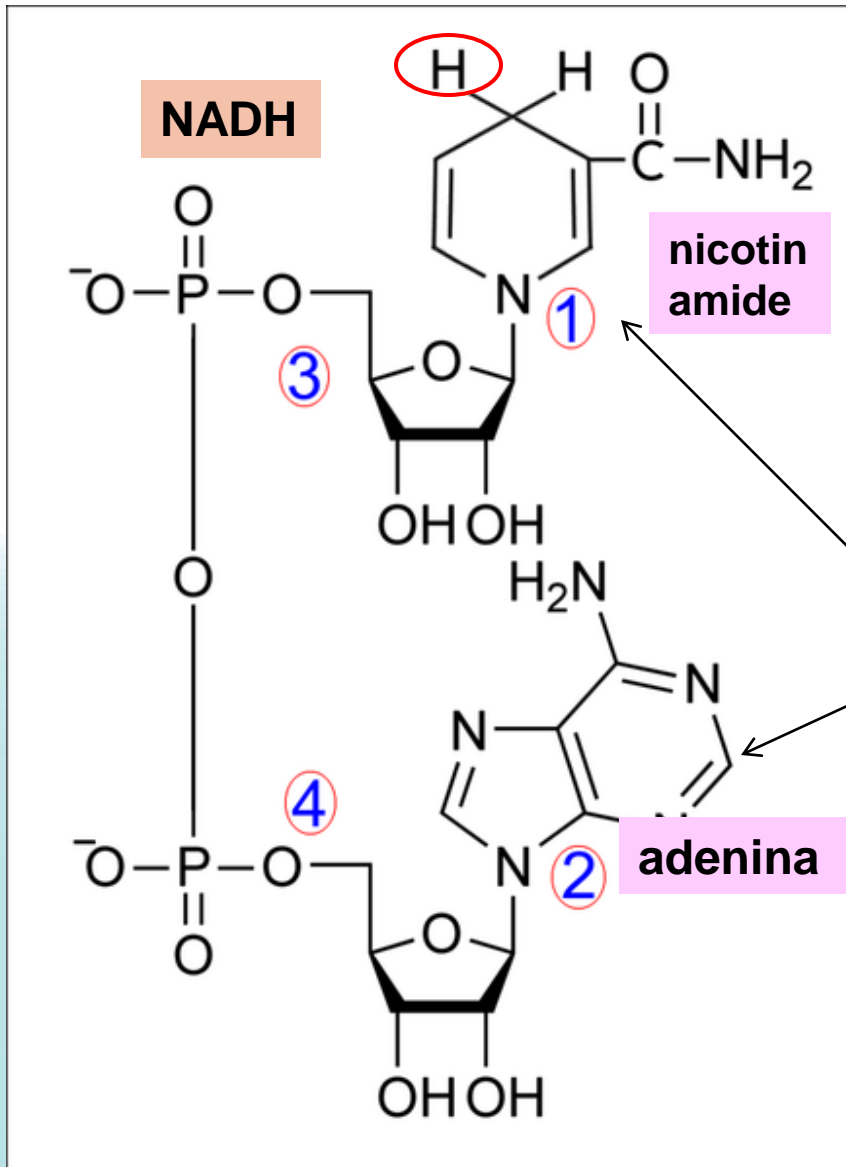
il coenzima deve tornare al suo stato originale:



reazione di rigenerazione

anche a carico di un E. diverso

NAD= Nicotinammide-adenin -dinucleotide è un nucleotide PIRIMIDINICO

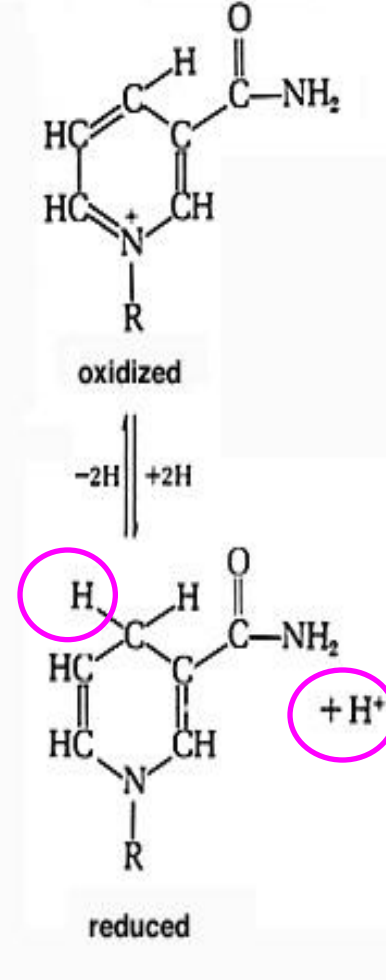
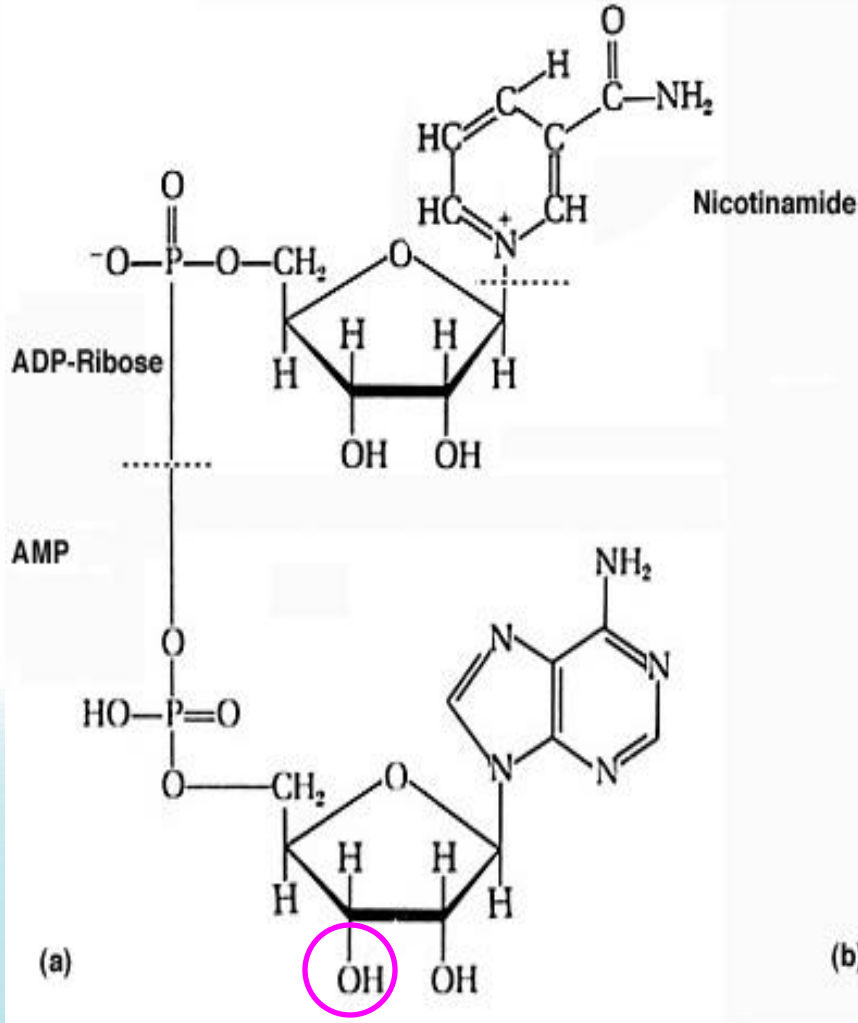


Il gruppo funzionale è la **nicotinammide**, derivata dall'*acido nicotinic* o niacina o vitamina PP, (Pellagra-Preventing) può donare/accettare atomi di idrogeno.

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^+ .

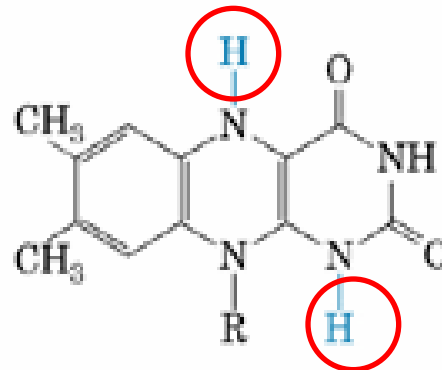
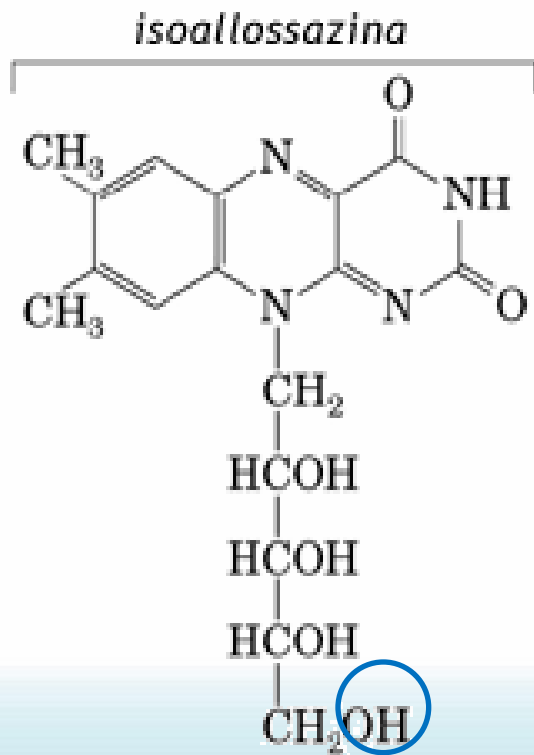


A differenza dei nucleotidi flavinici, i coenzimi pirimidinici non sono legati saldamente alla deidrogenasi, ma funzionano piuttosto come *cosubstrati*.

Nucleotidi Flavinici

FMN= Flavin Mono nucleotide

FAD= Flavin Adenin Dinucleotide



sono i coenzimi derivanti dalla

RIBOFLAVINA
(Vit B2)

FAD e FMN sono coenzimi di enzimi che trasferiscono elettroni.

Entrambi i coenzimi sono saldamente legati

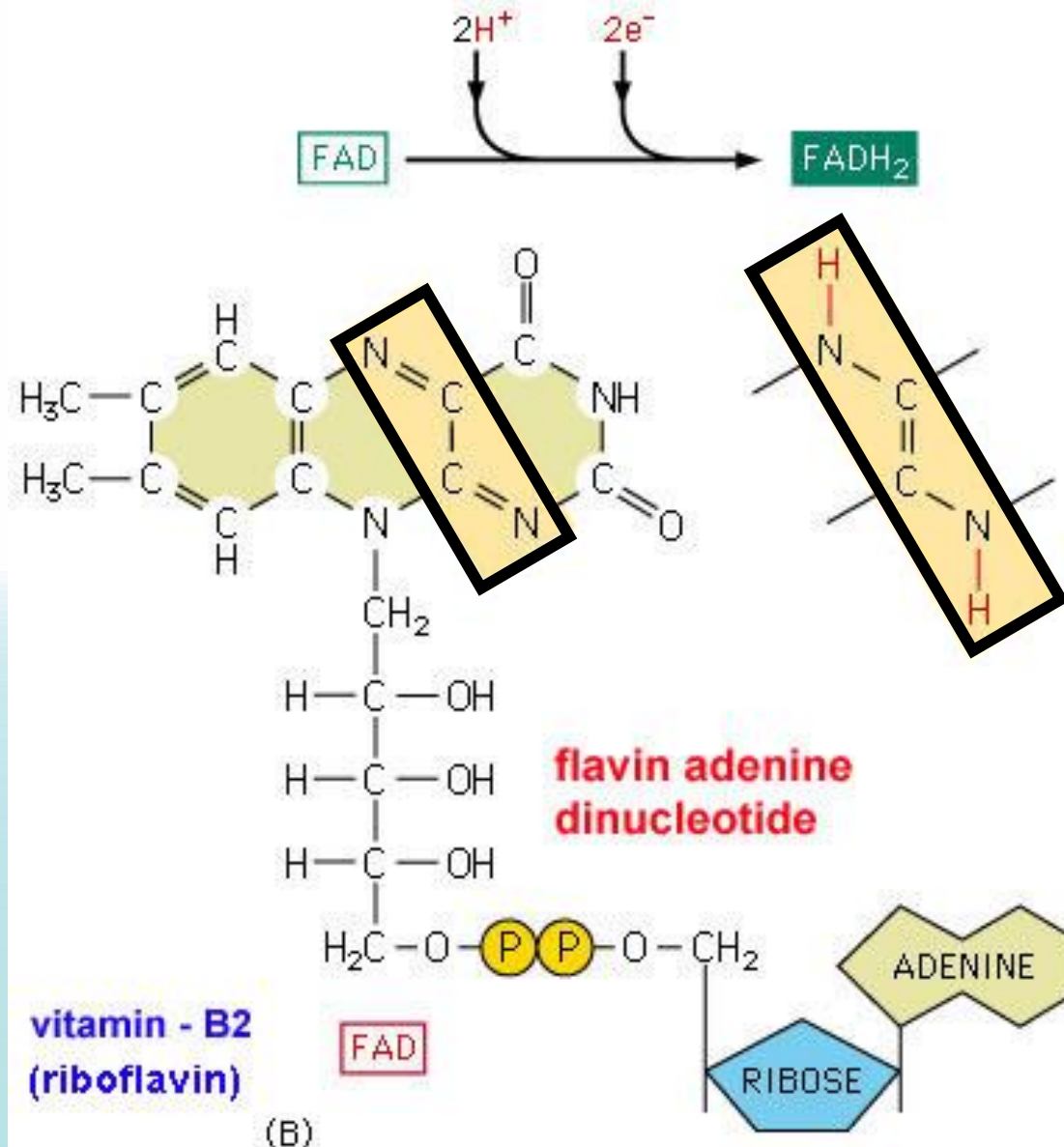
alla proteina



gr. prostetici;

Nucleotidi Flavinici

FAD Flavinadenindinucleotide



Nel **FAD** (Flavin Adenin Dinucleotide), la riboflavina è legata tramite il CH_2OH 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

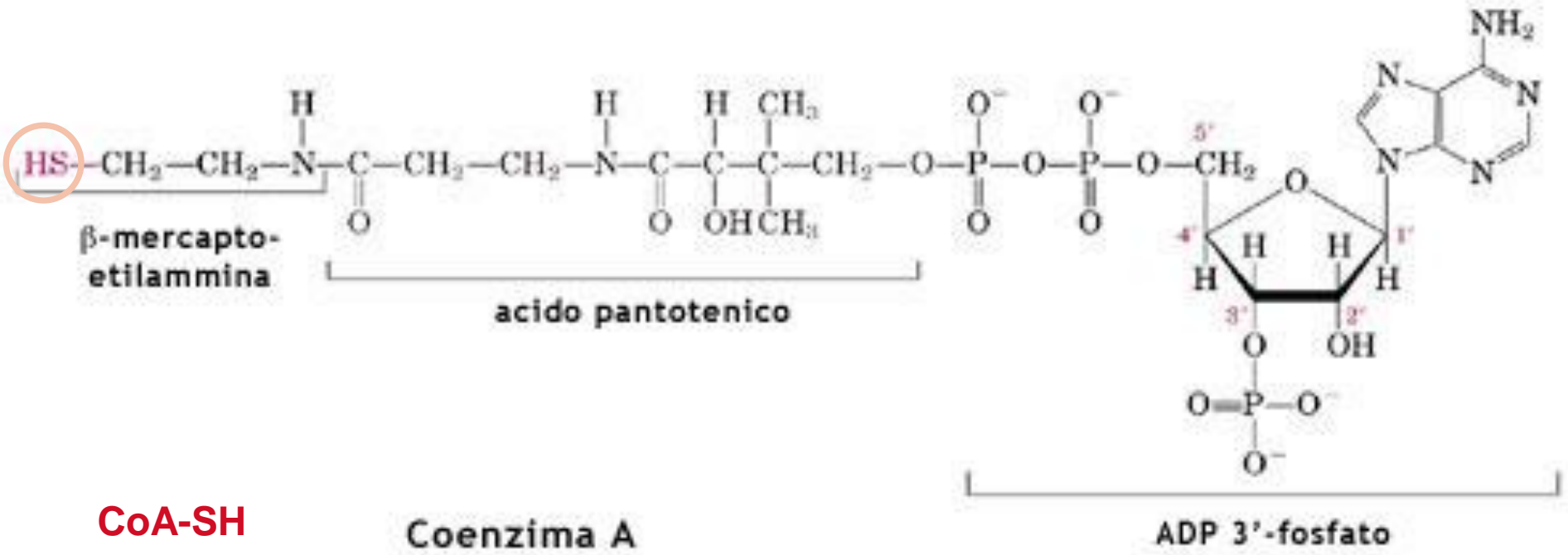
*Il Coenzima A ha la funzione di trasportare
gruppi acetile in forma "attivata".*

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.

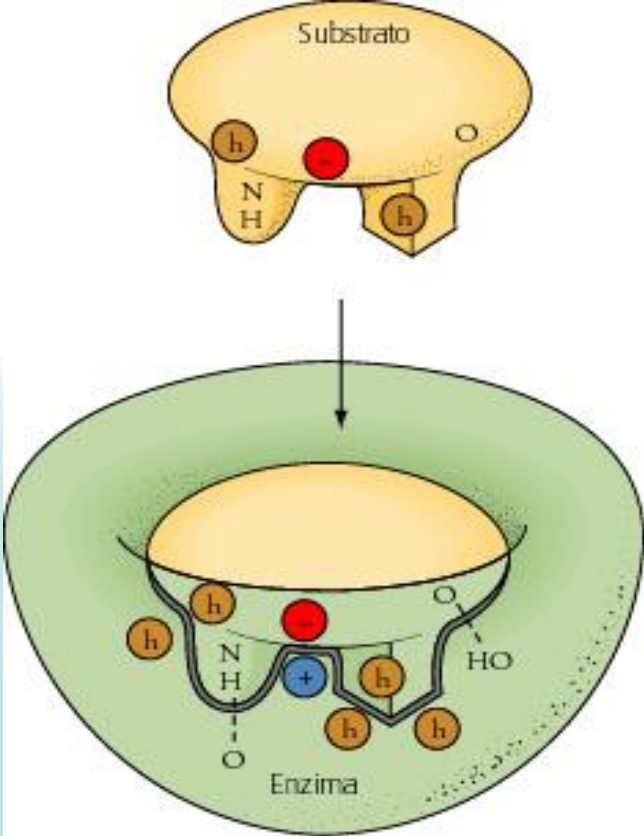


La reazione dell'enzima (catalisi) avviene nel


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

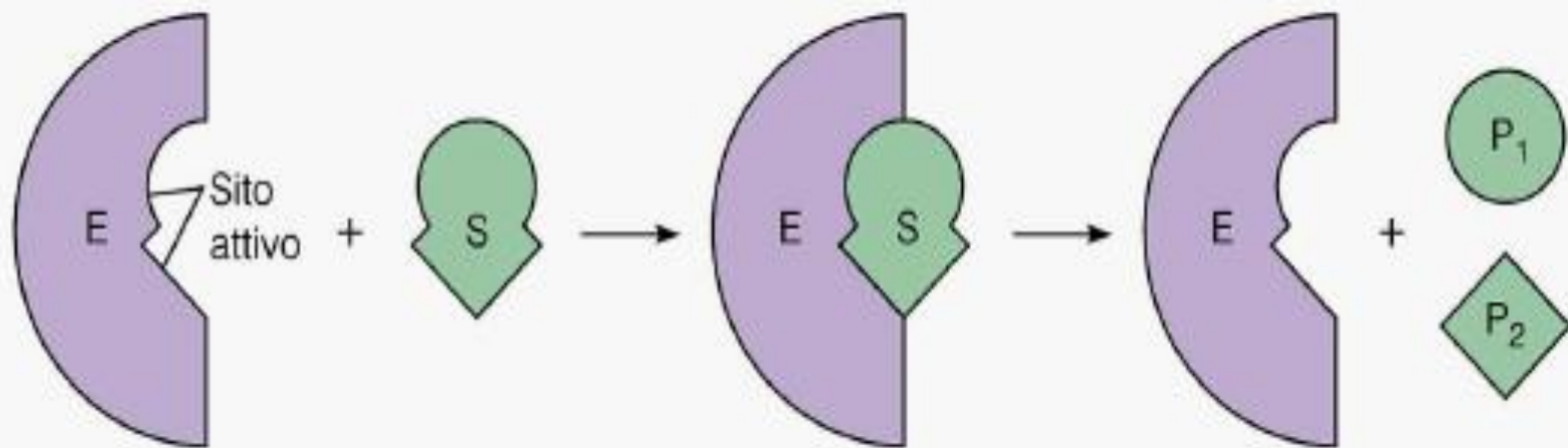
Adattamento indotto



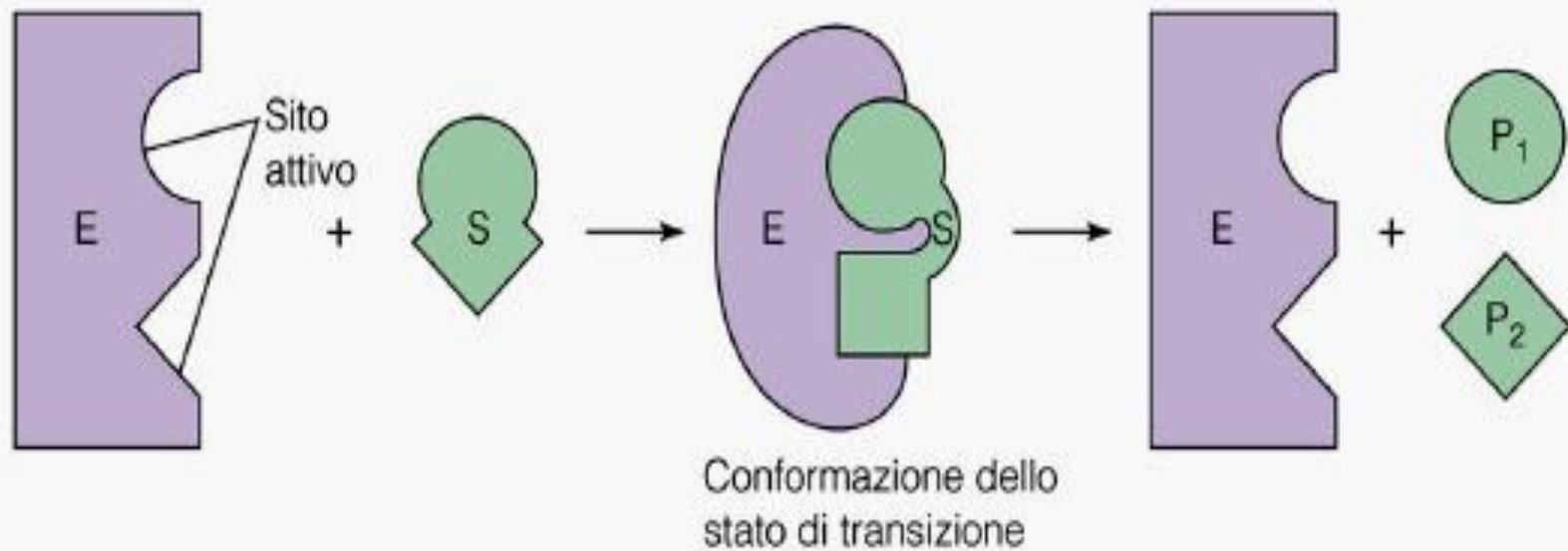
La vicinanza di S o P all'Enzima provoca

modificazioni della conformazione del sito attivo dell'E

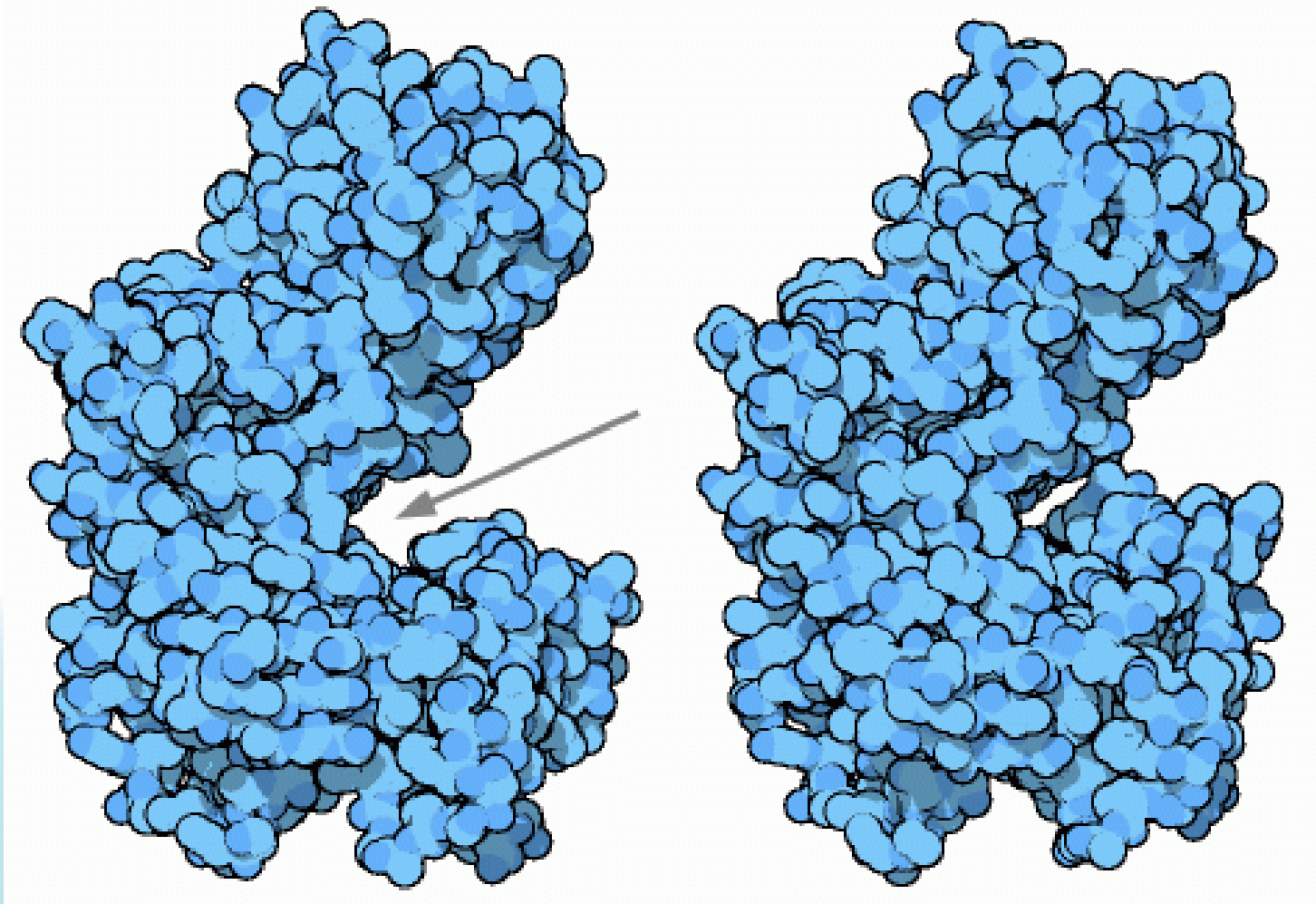
Migliore combinazione E-S e E-P



(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

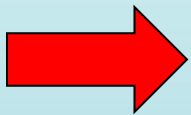
Come agisce un'enzima ?

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)



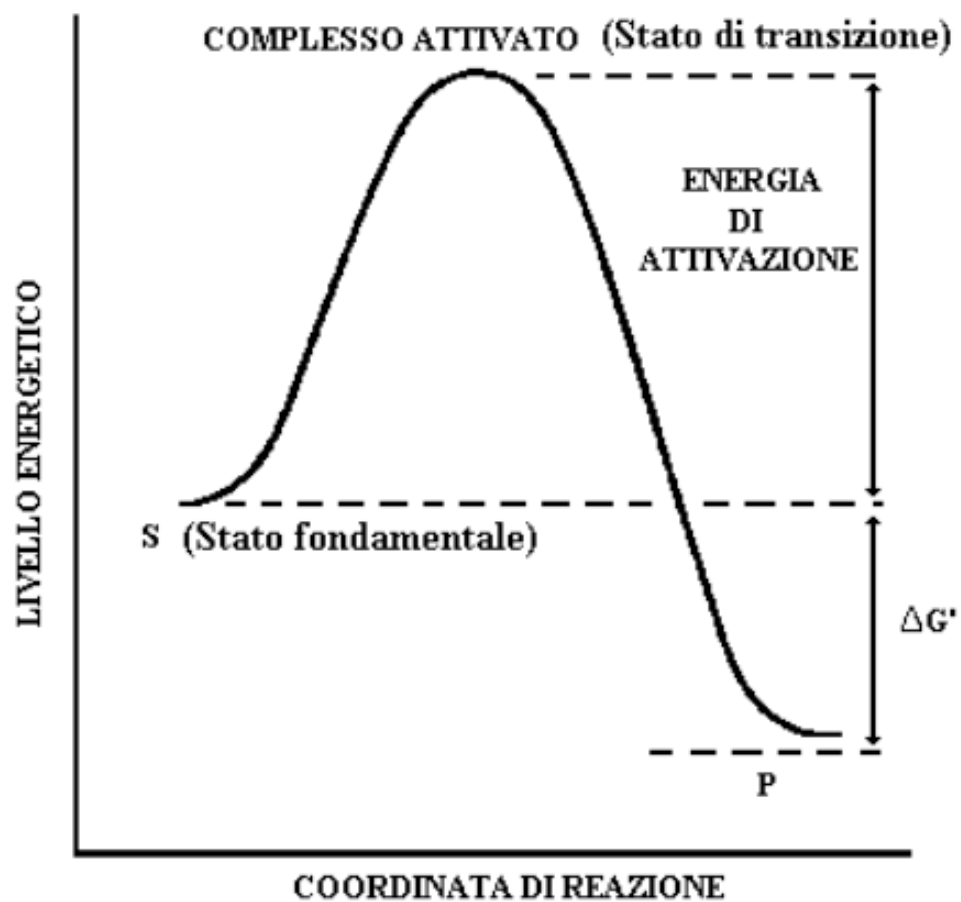
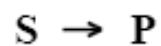


Figura. Profilo energetico di una reazione chimica

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

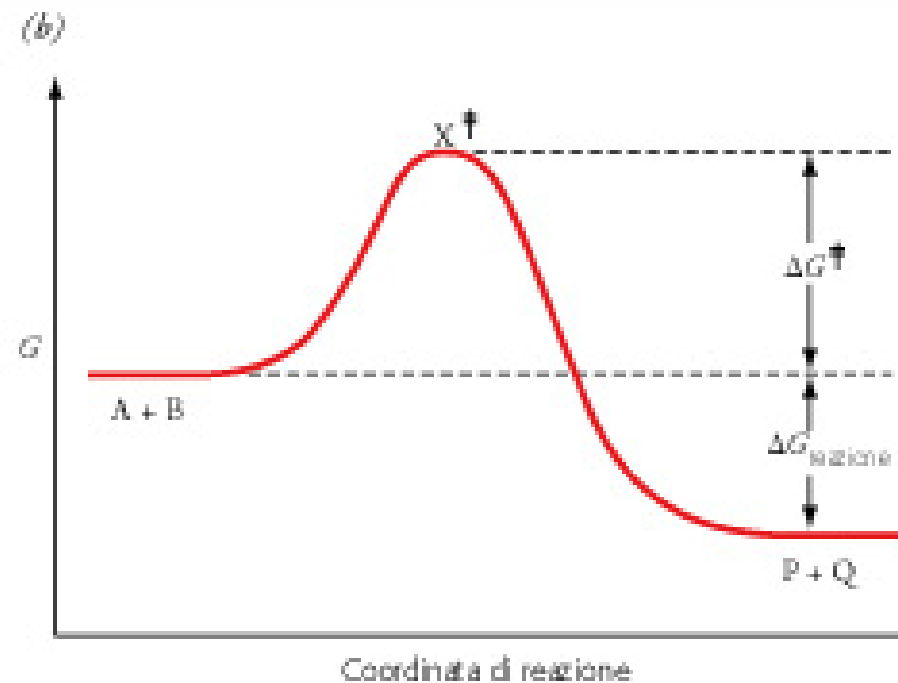
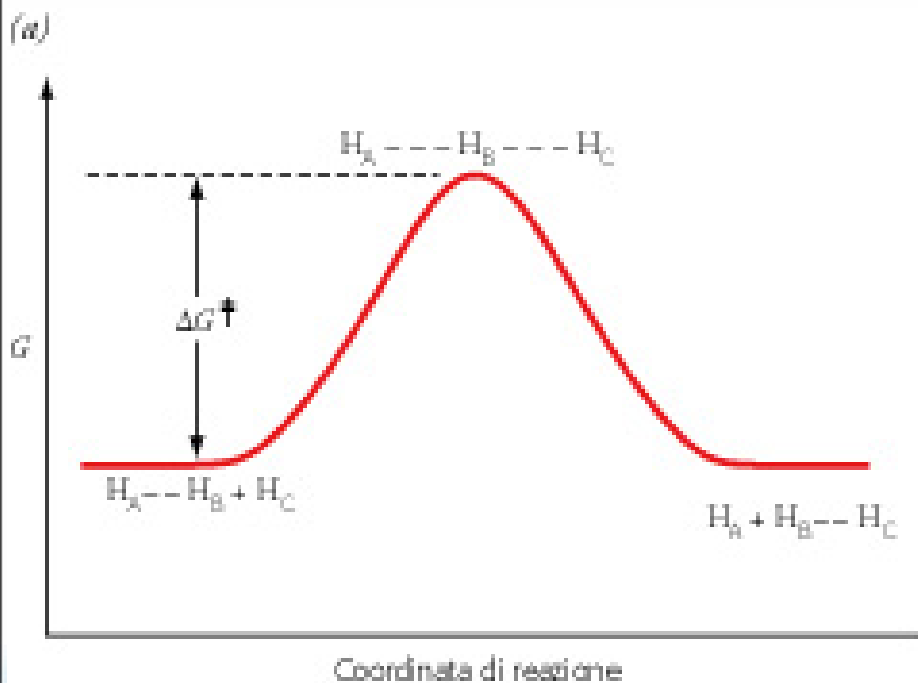
Le concentrazioni di A e B diminuiscono mentre quelle di P e Q aumentano.

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

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

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

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

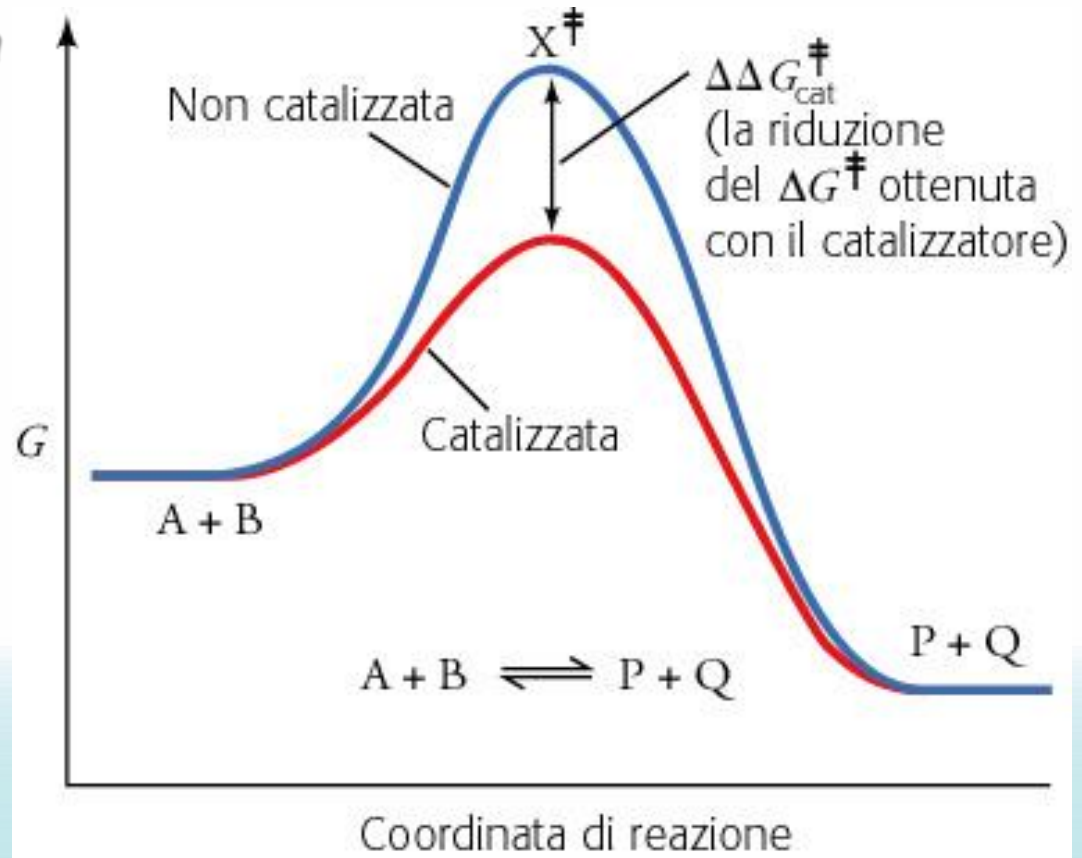
Abbassamento dell'energia di attivazione



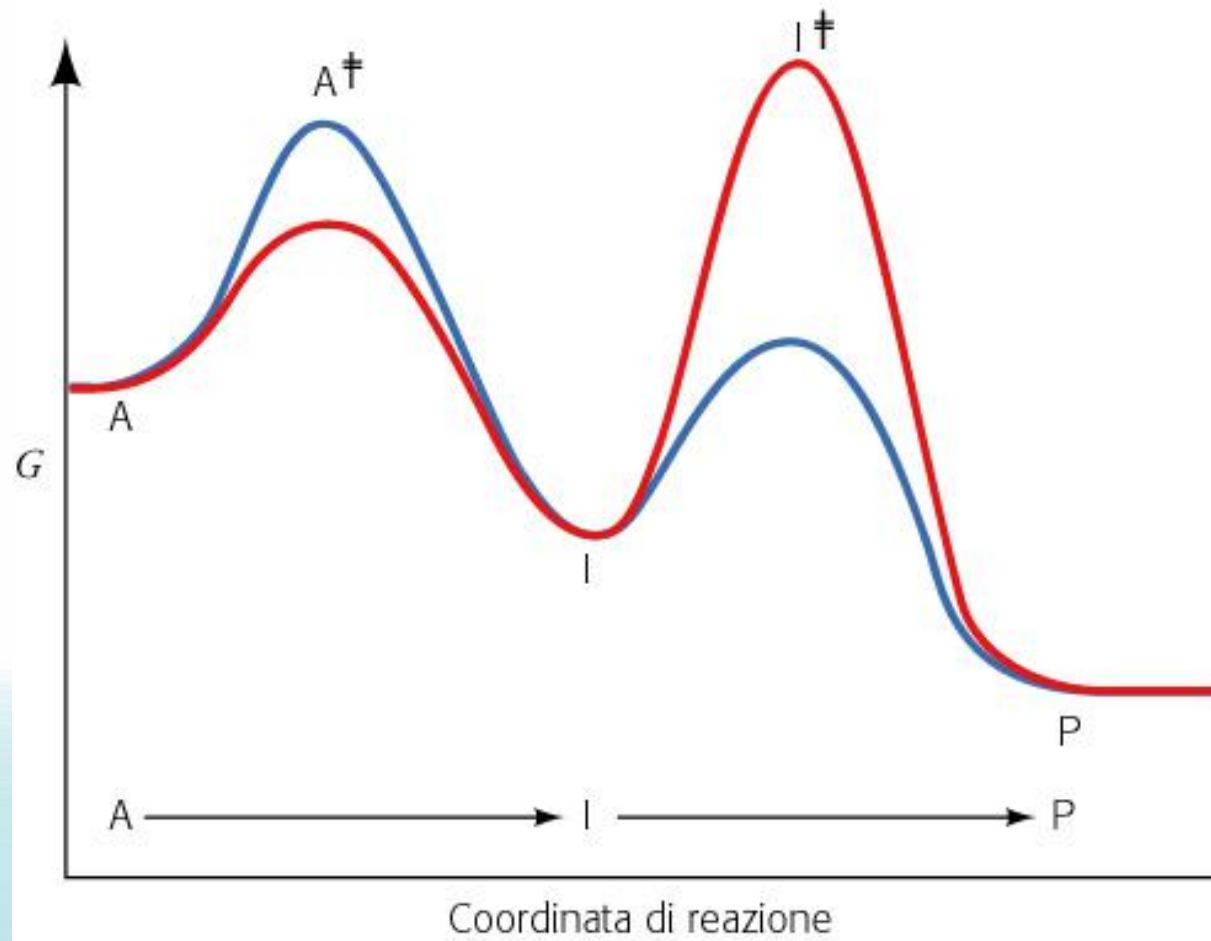
Formazione di ulteriori legami che stabilizzano il complesso di transizione.



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

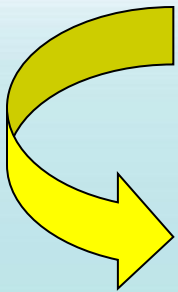


*Per misurare la velocità di una reazione enzimatica conviene misurare la **velocità iniziale (V_0)***

- *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

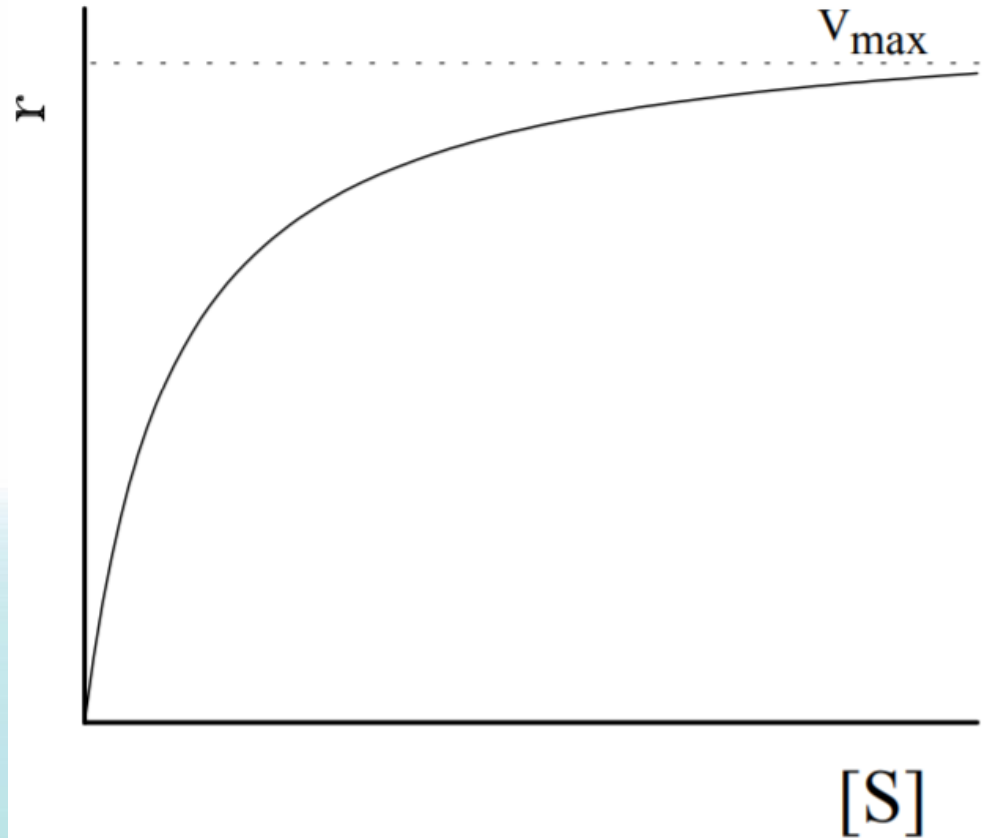
Gli studi di Henri furono ripresi ed ampliati da **Michaelis e Menten (1913)** che hanno dato il nome alla

Equazione generale di velocità di reazioni enzimatiche ad un substrato.
E' la legge cinetica più comunemente seguita da più di 1500 enzimi conosciuti

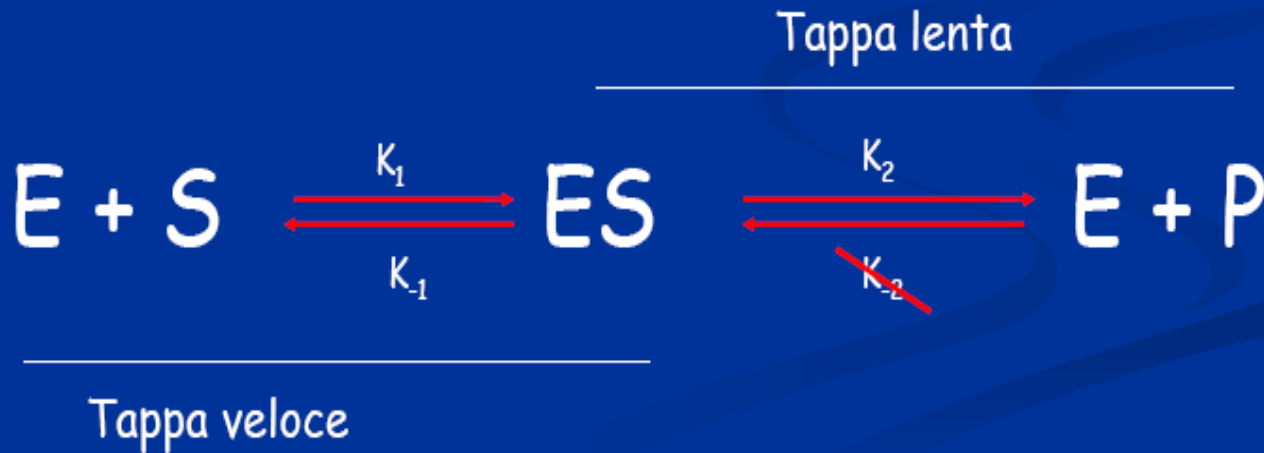
Henri osservò che:

-la velocità iniziale di reazione è **direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima**

- La velocità iniziale di reazione **crece al crescere di S** ,
ma non è direttamente
proporzionale perché **tende ad un valore limite**



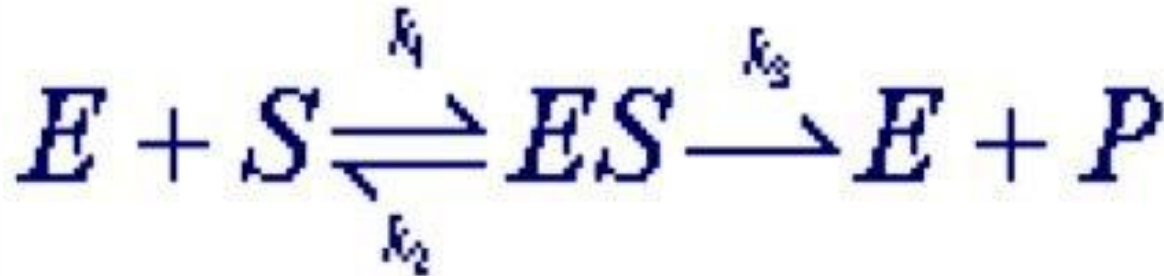
MECCANISMO PROPOSTO da Michaelis e Menten:



- 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."

Il meccanismo di reazione proposto prevede:



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

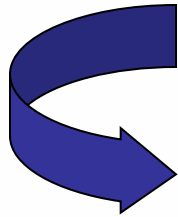
- **la formazione del complesso ES è una reazione molto veloce ed è reversibile** : Il complesso enzima-substrato è in equilibrio con l'enzima libero ed il substrato
- **La scissione di ES in E+P** rappresenta lo **stato lento della reazione**
- *la velocità di formazione del prodotto a partire da ES è molto piccola rispetto alla velocità con cui ES si scinde a dare E+S*



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 concentrazione di ES è costante quando la sua *velocità di formazione di ES* eguaglia a sola *velocità di decomposizione in E+S*

(K1=K2)



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

assumendo *k3 << k2*

In ogni istante l'Enzima è presente in 2 forme

Forma libera E
Forma legata ES

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

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

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

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

per cui potremo scrivere

Espressione della massima velocità ottenibile

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



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

quando tutto S viene consumato

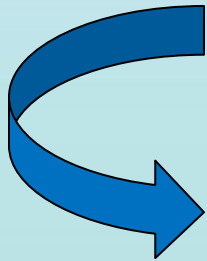
l' E torna ad essere libero



conversione max in P

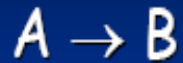


l'equazione di velocità di formazione del prodotto si può esprimere come funzione della concentrazione di ES:

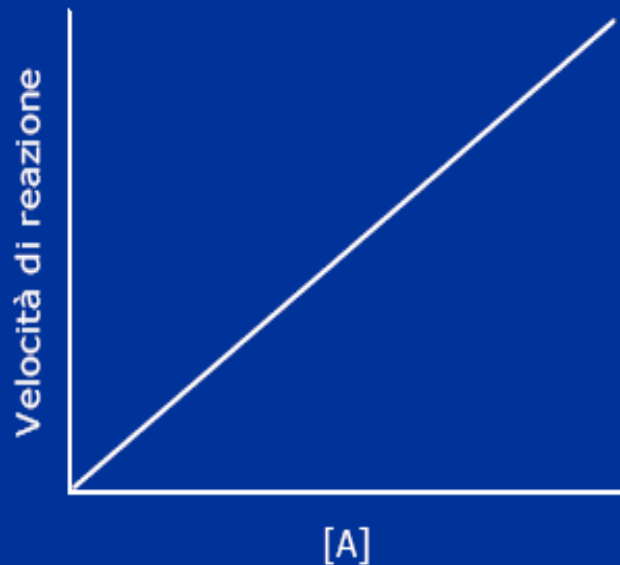


$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3 [ES]$$

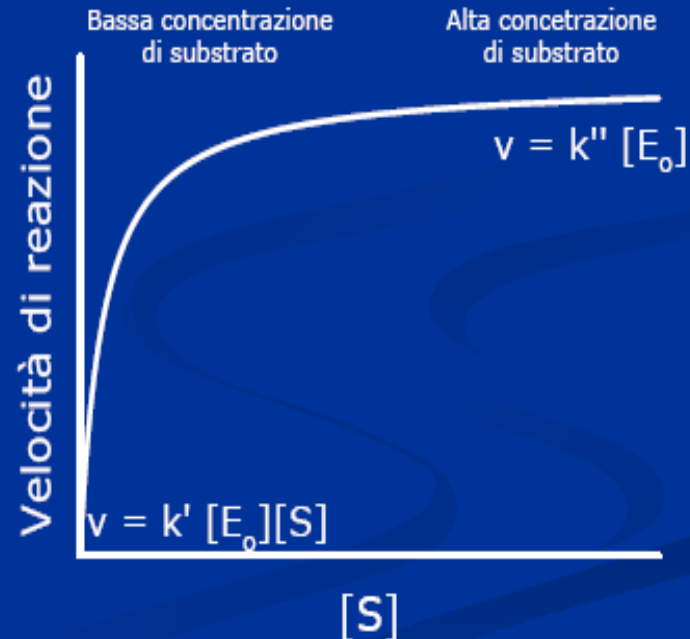
In una reazione chimica



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



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**



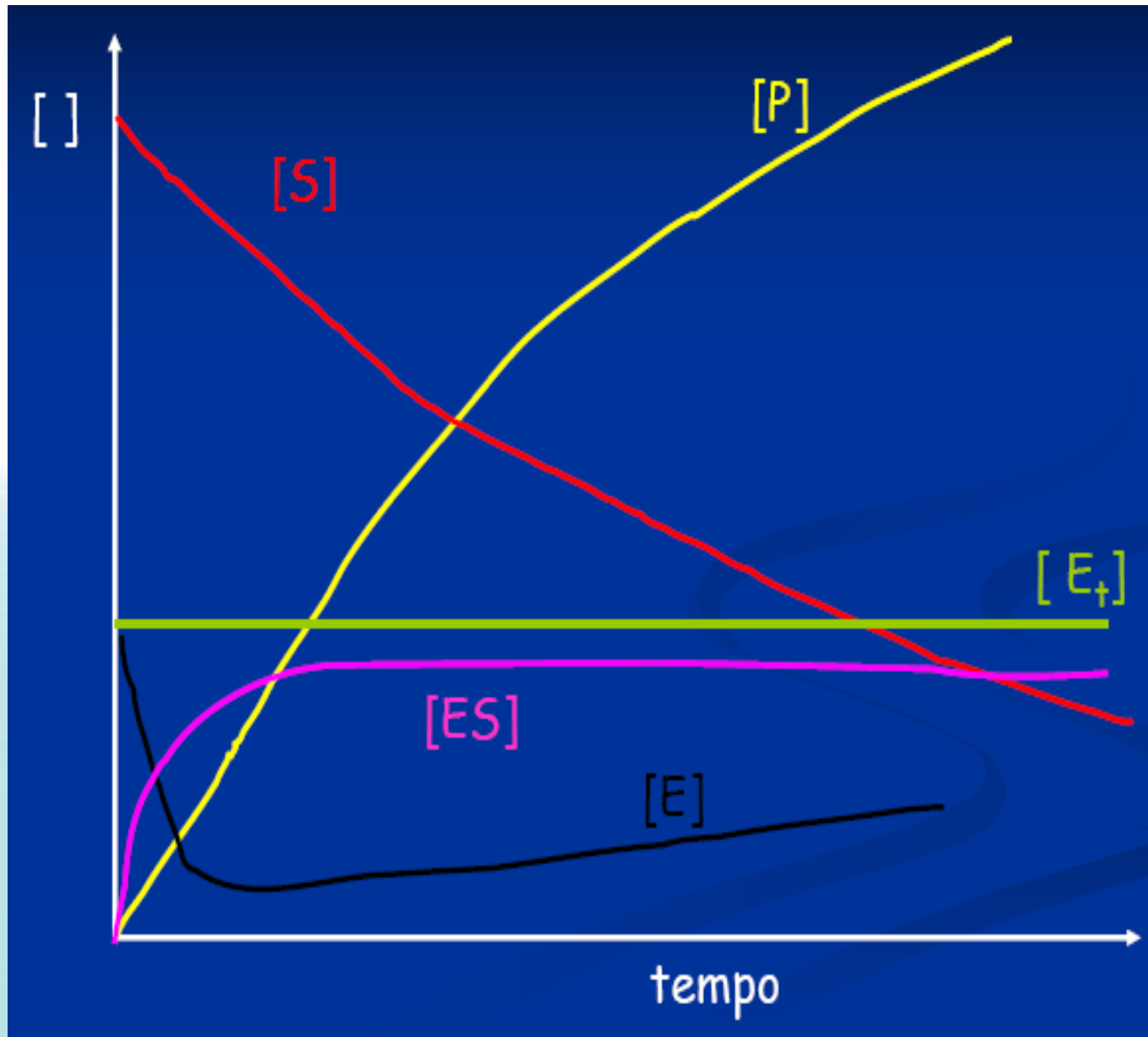
Stato prestazionario

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

Stato stazionario

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

RAPPRESENTAZIONE GRAFICA delle concentrazioni



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

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

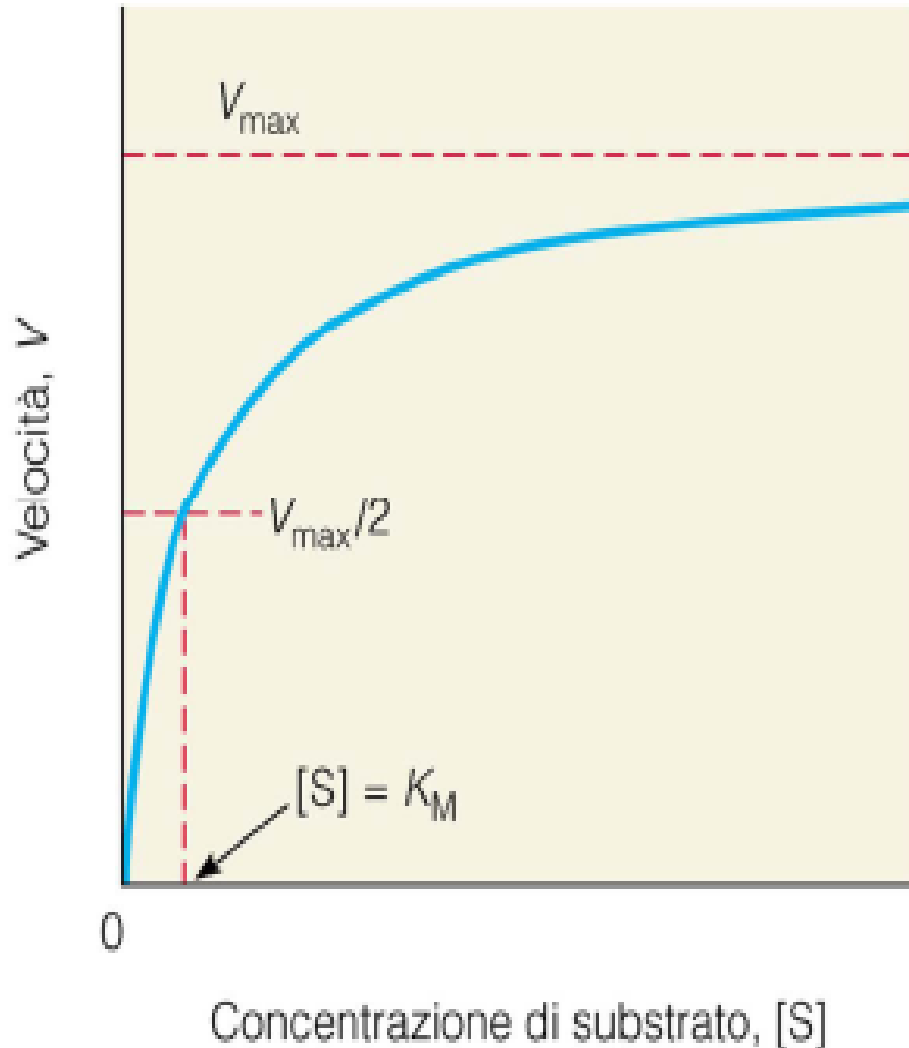
- **la velocità iniziale** di una reazione enzimatica

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

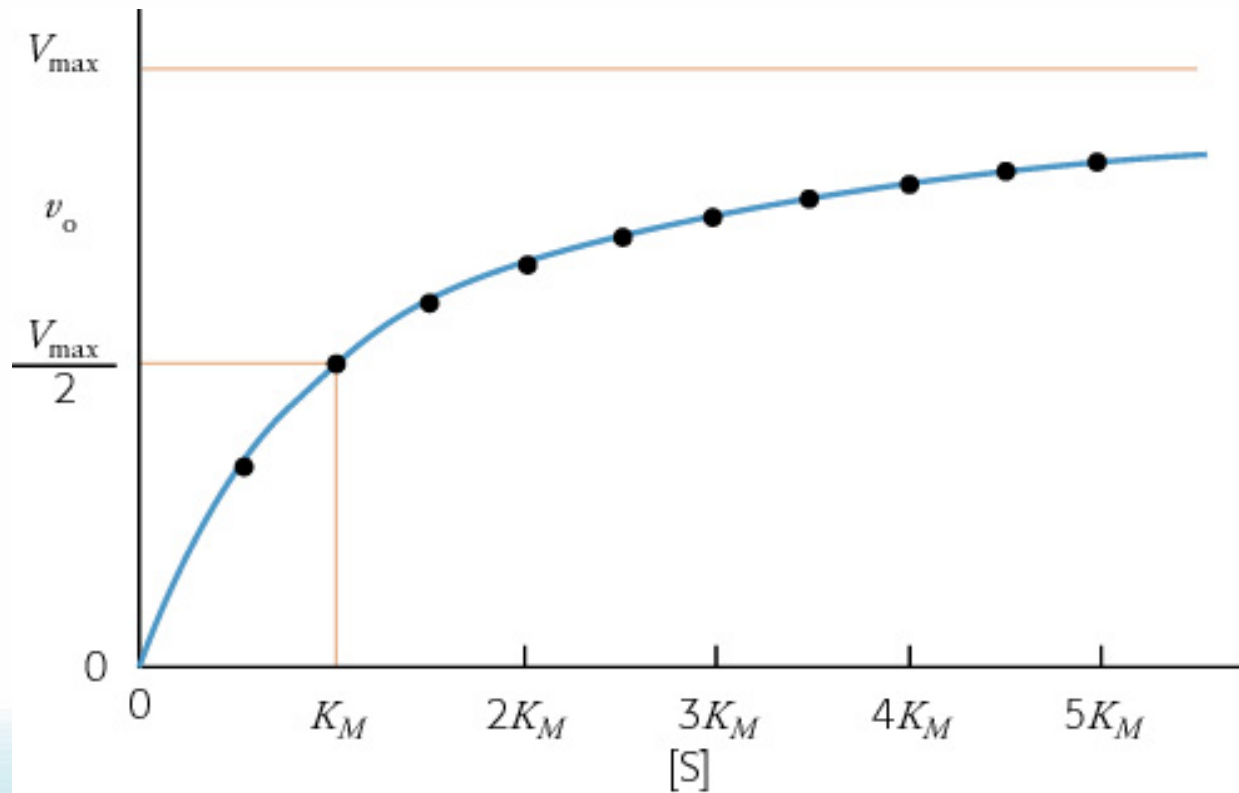
concentrazione iniziale di substrato.



- 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* .
 e 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

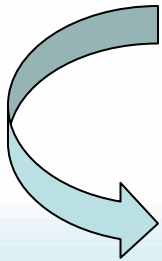
- La **K_m** dà informazioni sulla concentrazione di un substrato nel comparto cellulare dove avviene la reazione:

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 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:

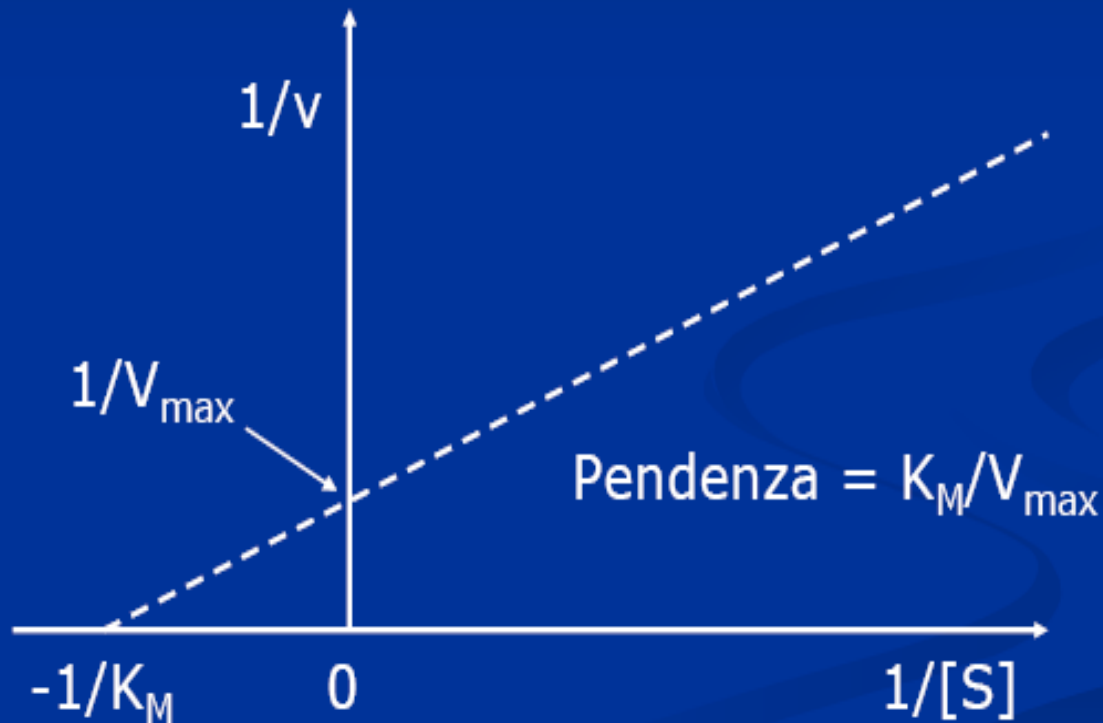
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Inversione

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

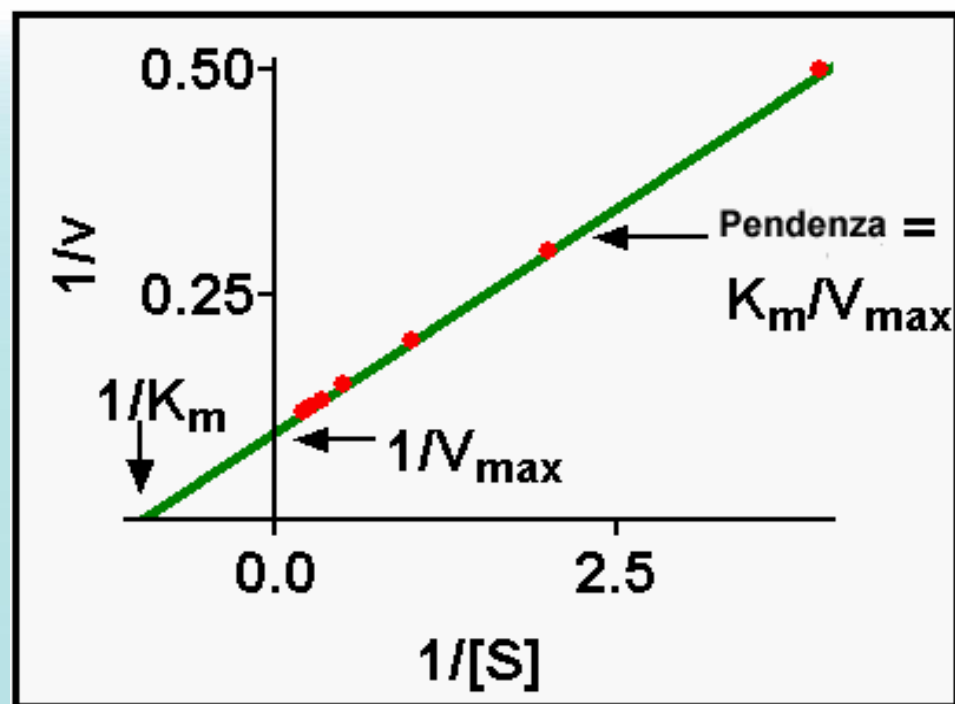
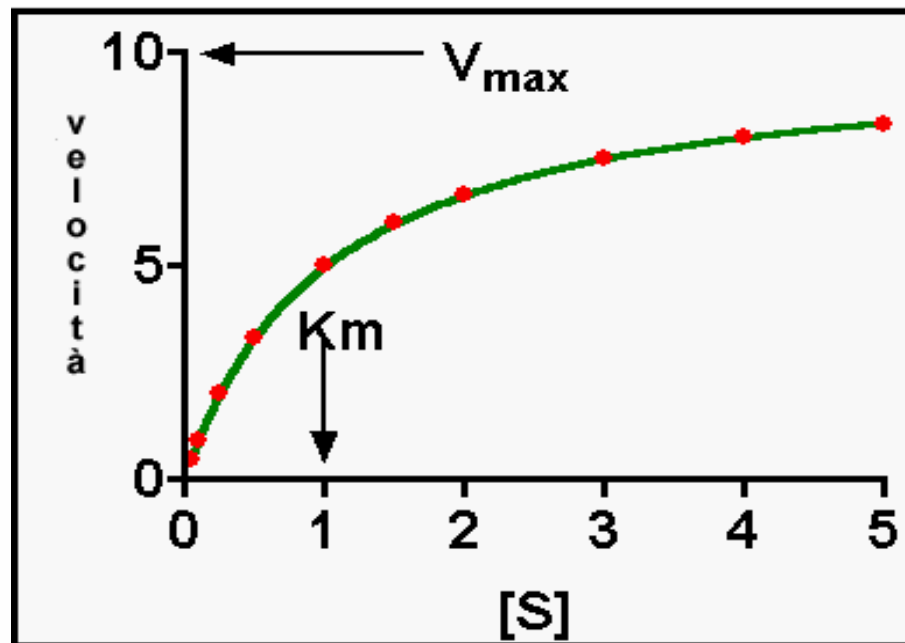
E' l'equazione di una retta

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



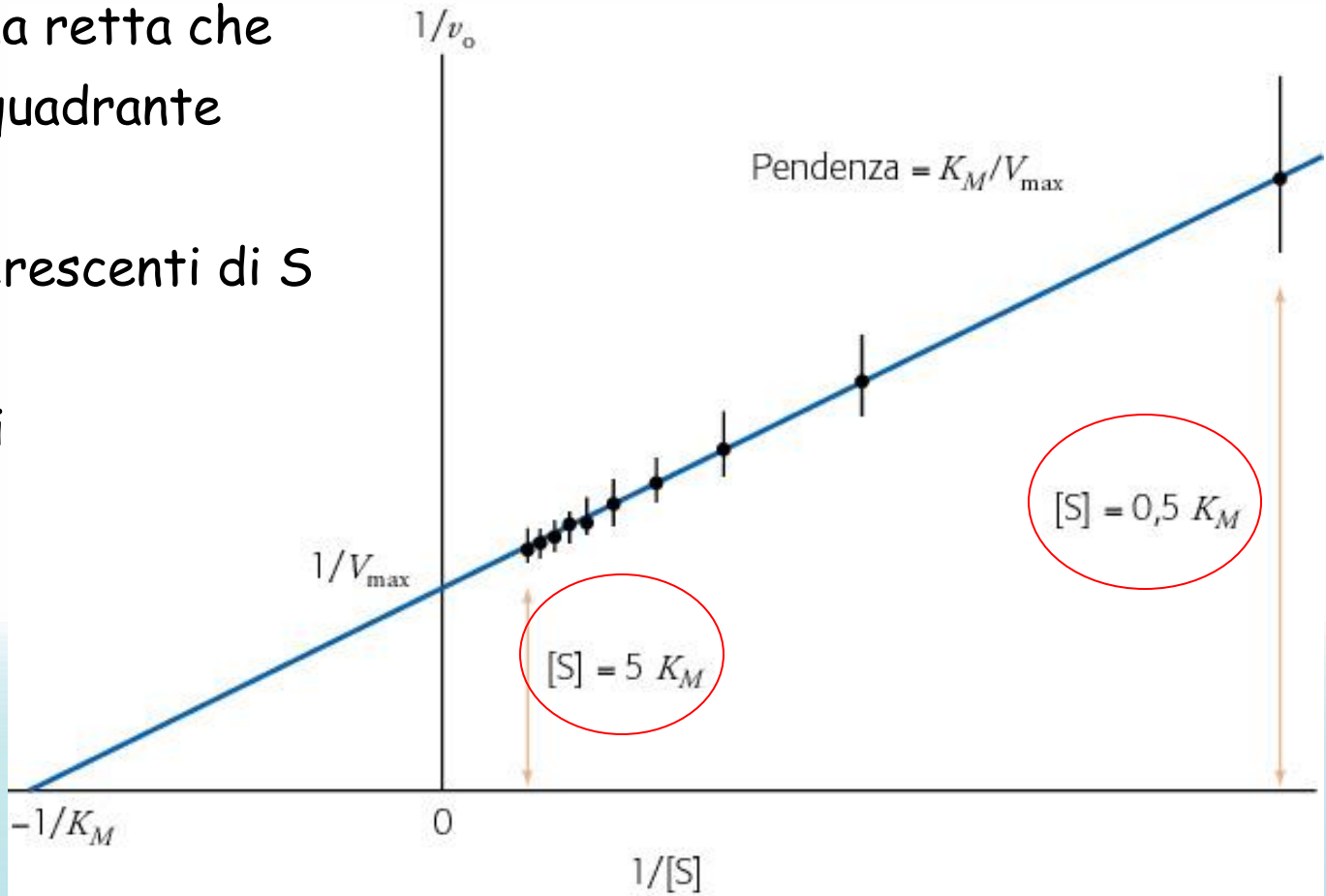
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M}$$

- 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 $1/V_{max}$



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:

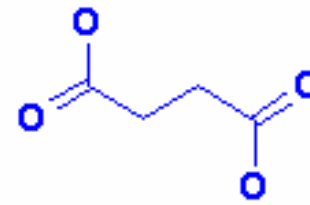
- Inibizione *COMPETITIVA*
Aumenta la K_m e non ha nessun effetto sulla V_{max}
- Inibizione *NON COMPETITIVA*
Diminuisce V_{max} , la K_m resta inalterata
- Inibizione *INCOMPETITIVA*
Diminuiscono K_m e V_{max}

Inibizione competitiva

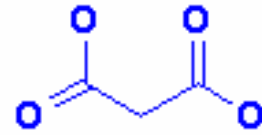
L'inibitore competitivo

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

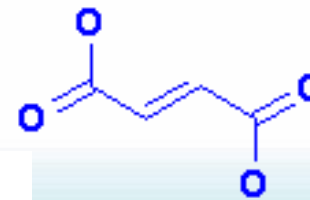


ac. succinico



ac. malonico

succinico deidrogenasi

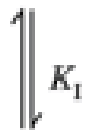


fumarato

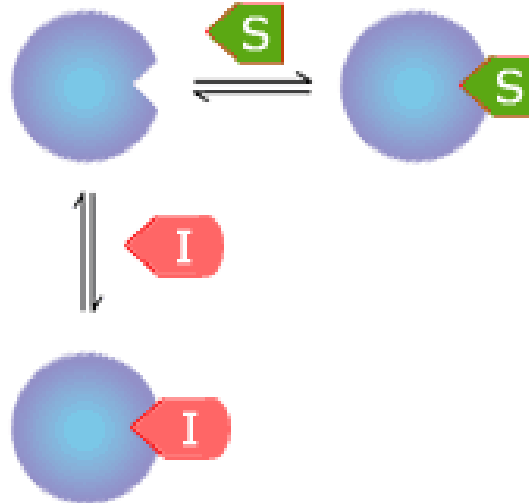


+

I



EI

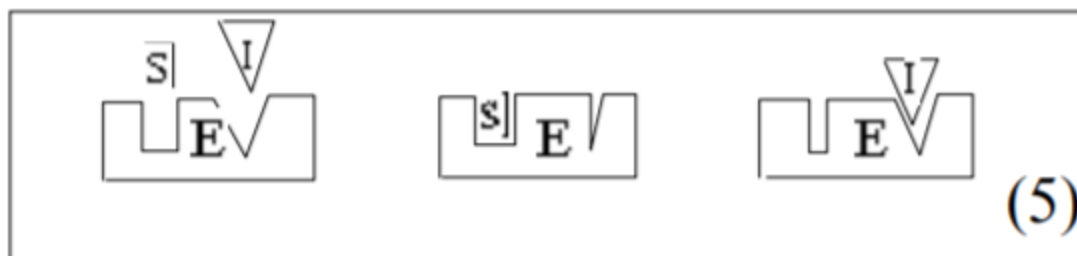
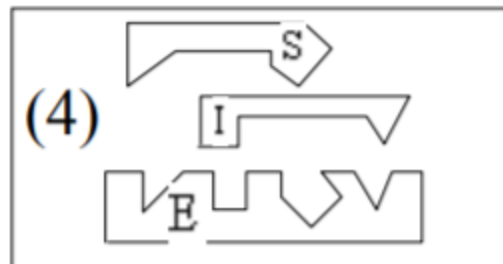
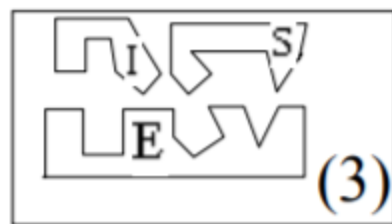
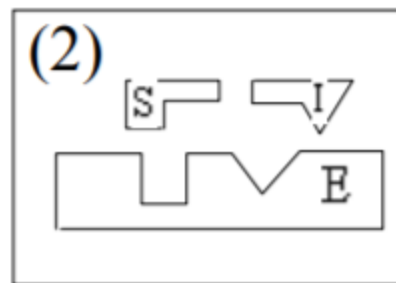
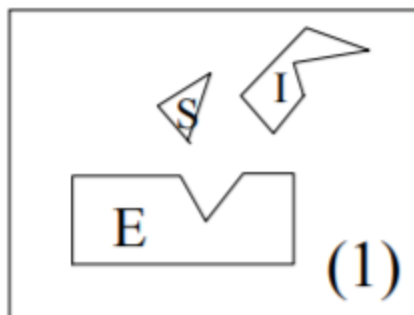


Es. inibizione competitiva:

L'acido malonico è in grado di legarsi nel sito attivo dell'enzima, ma non può essere ossidato avendo un solo gruppo CH₂

Inibizione competitiva

POSSIBILI CASI DI INIBIZIONE CCOMPETITIVA





+
I

K sono le costanti di dissociazione:



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

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

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



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

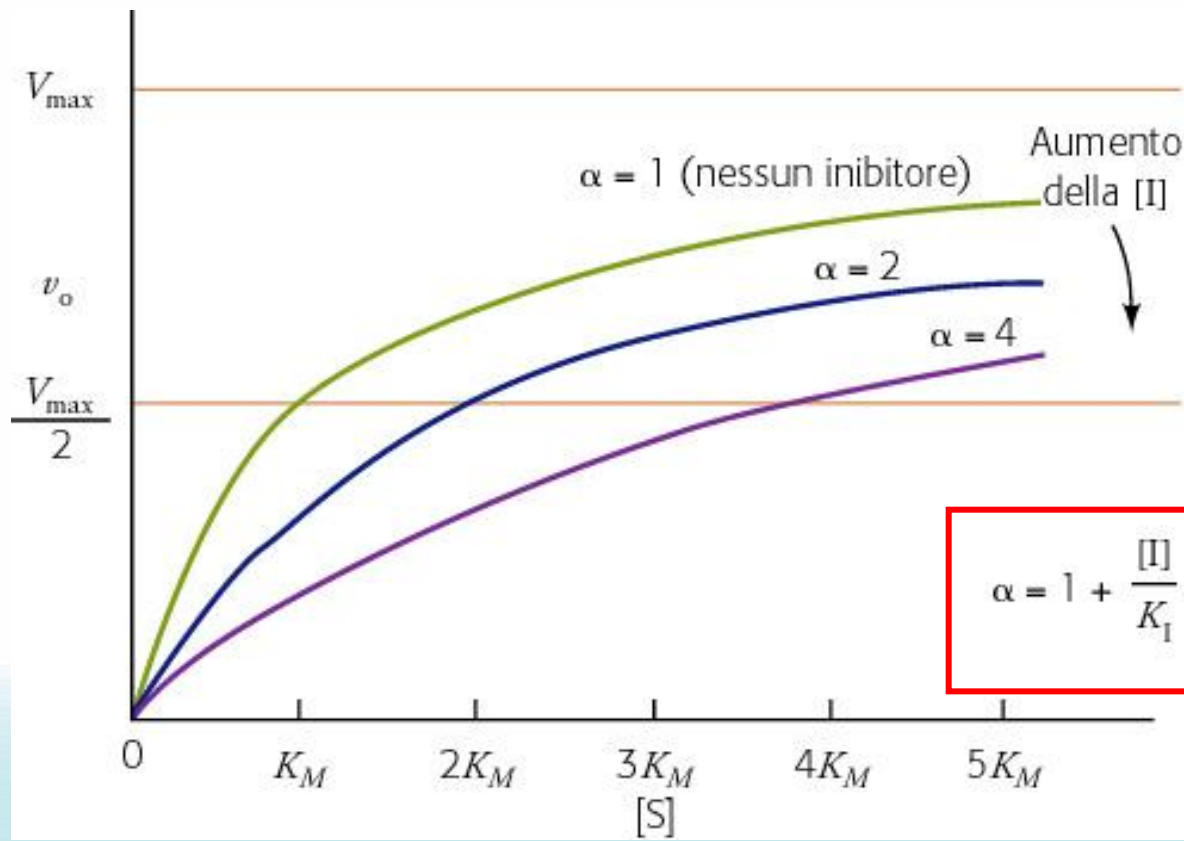


diminuzione dell'affinità per S

aumento della K_m



K_m apparente



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

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

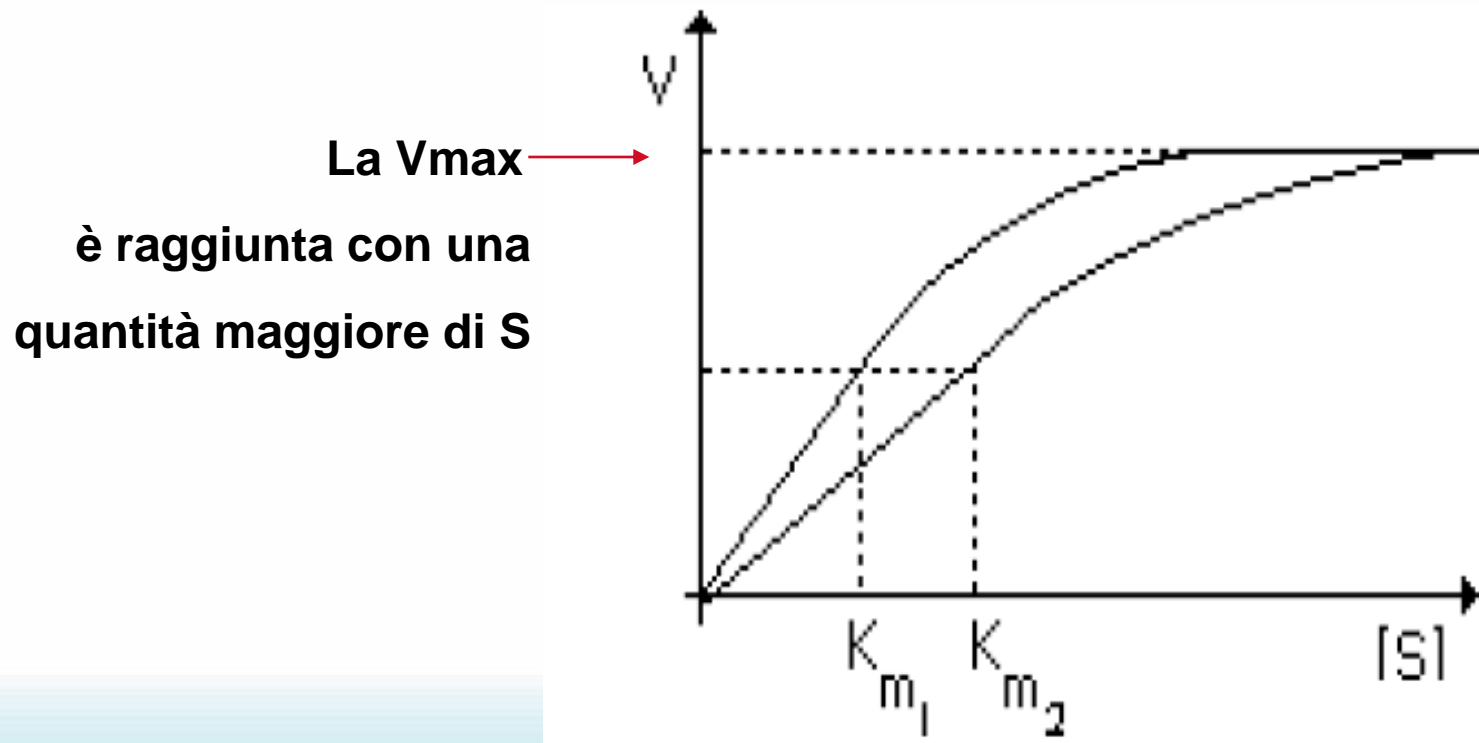
Aumento della K_M di un fattore $\alpha = (1 + [I] / K_I)$

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

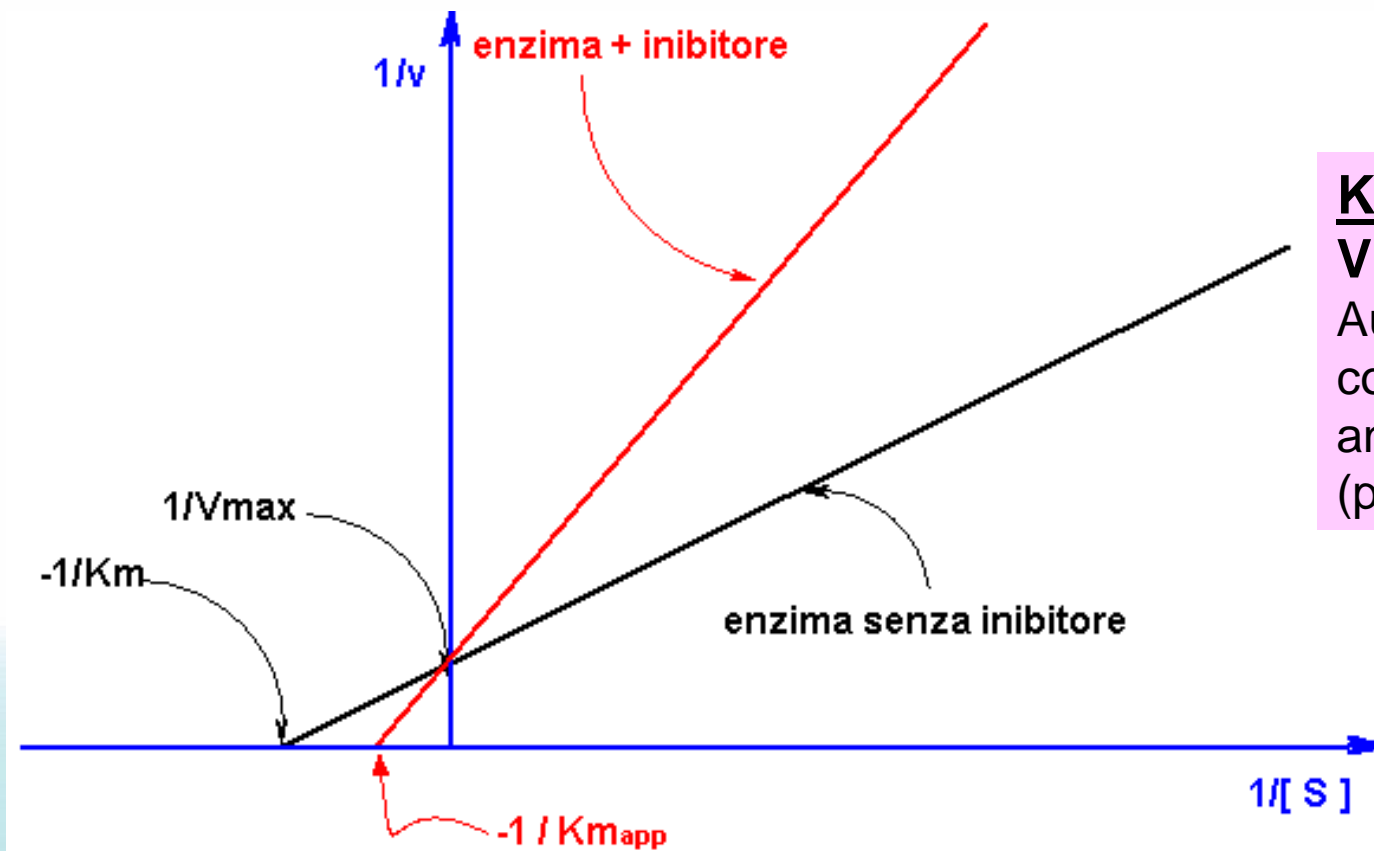


K_{m_1} Enzima non inibito

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

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

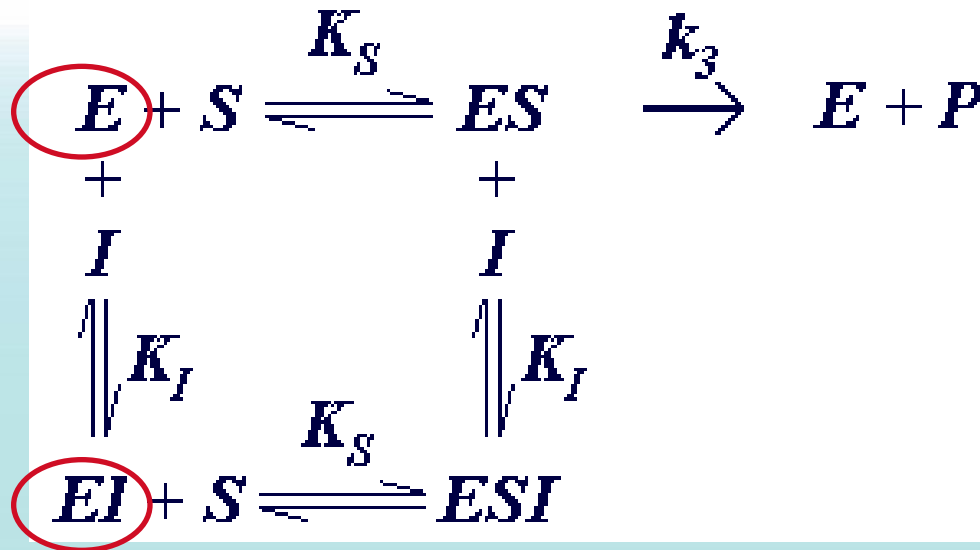
La K_m apparente non è costante
 è in funzione del fattore a che considera $[I]$

• 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**.

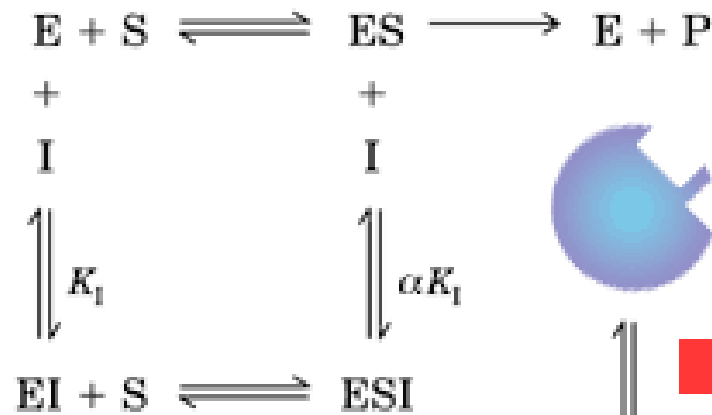


$$\textcircled{K_S} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

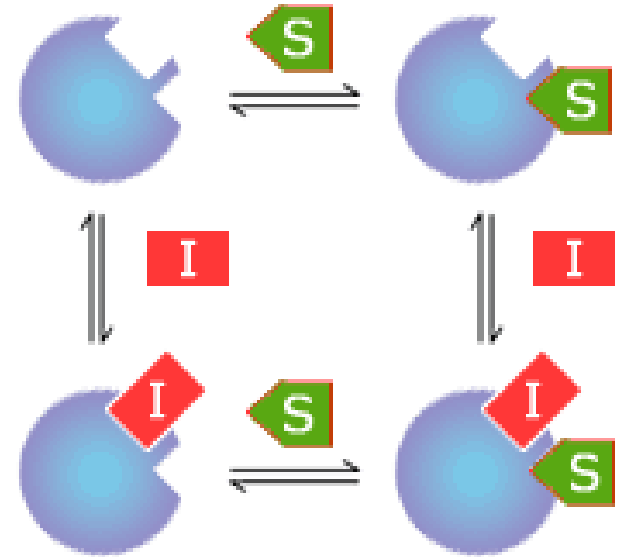
$$\textcircled{K_I} = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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**.



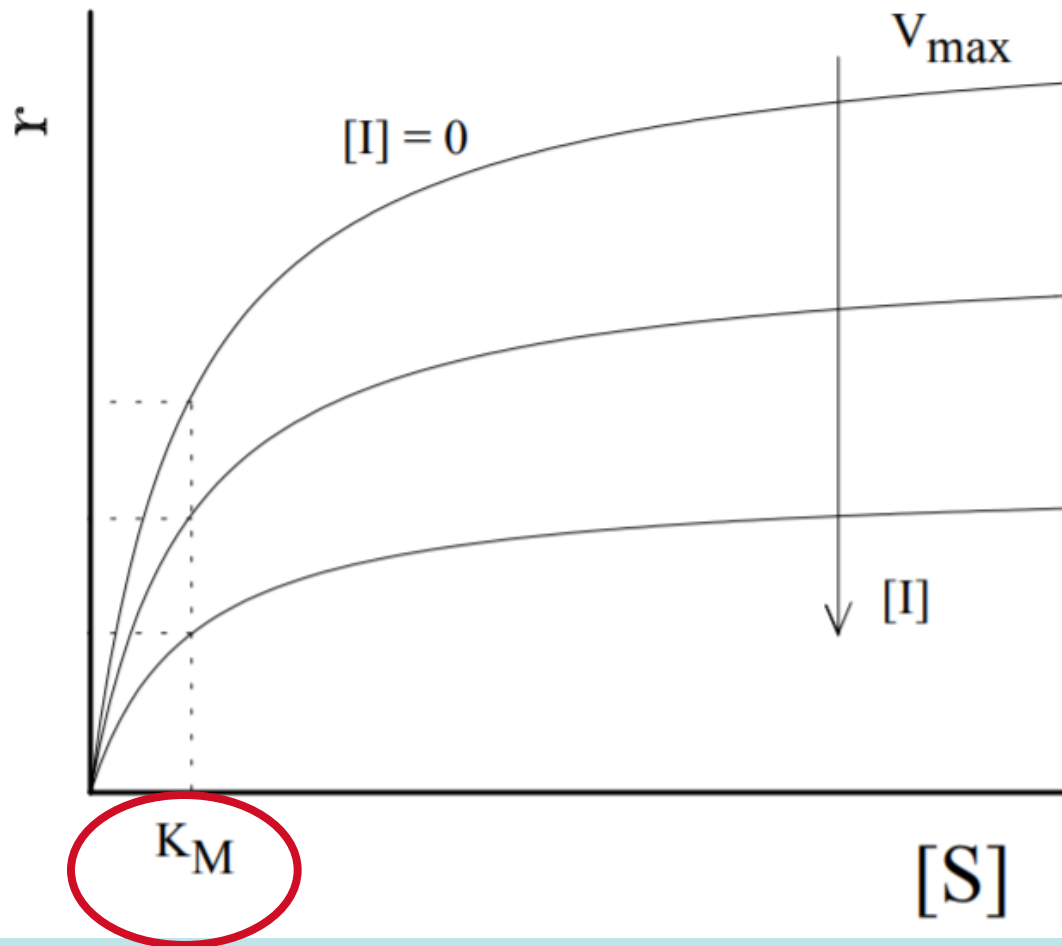
Inibizione mista



➔ 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***



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**

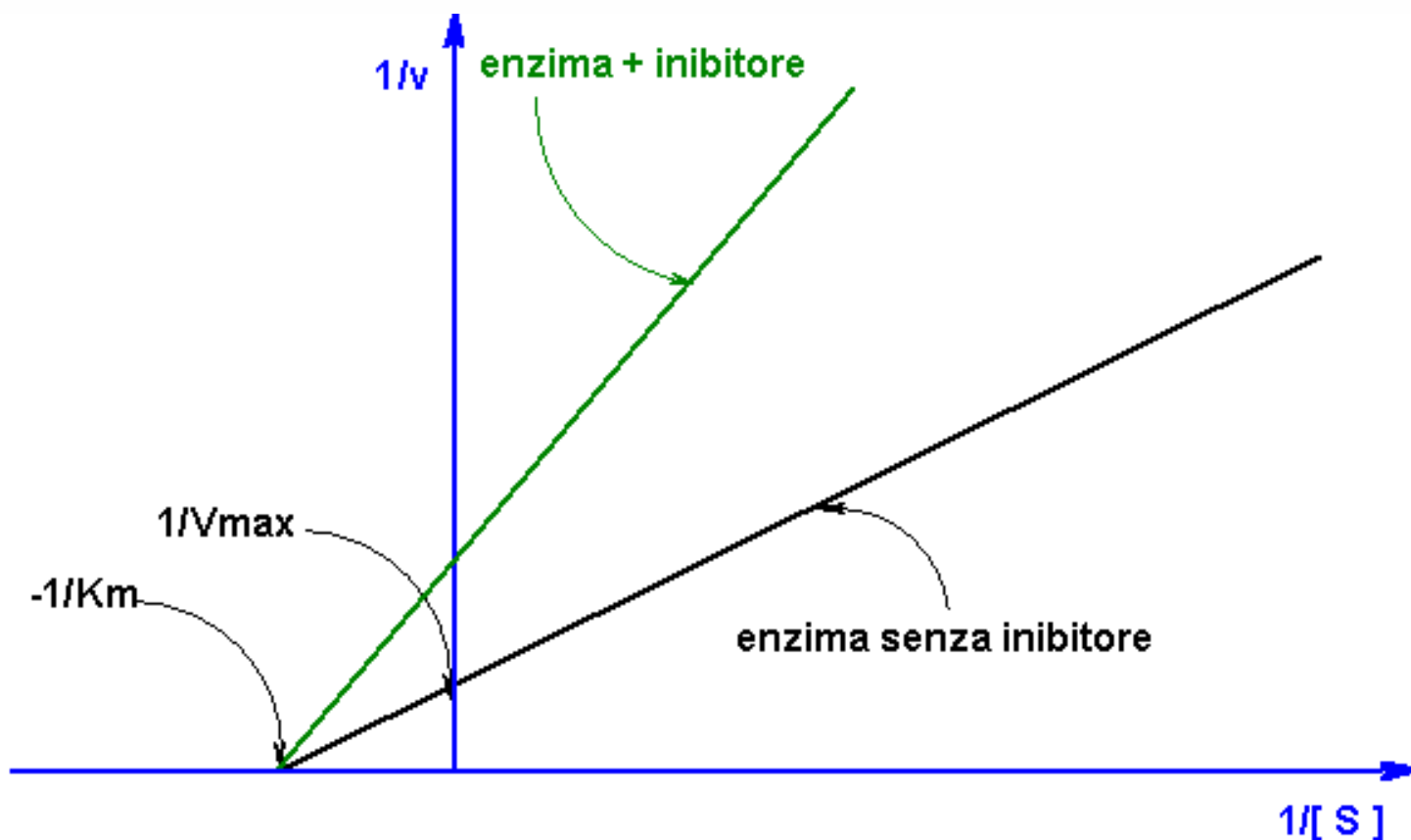


V_{max} sarà più bassa in presenza dell'inibitore;

la K_m non sarà variata in quanto

i complessi ES ed ESI hanno le stesse costanti di dissociazione

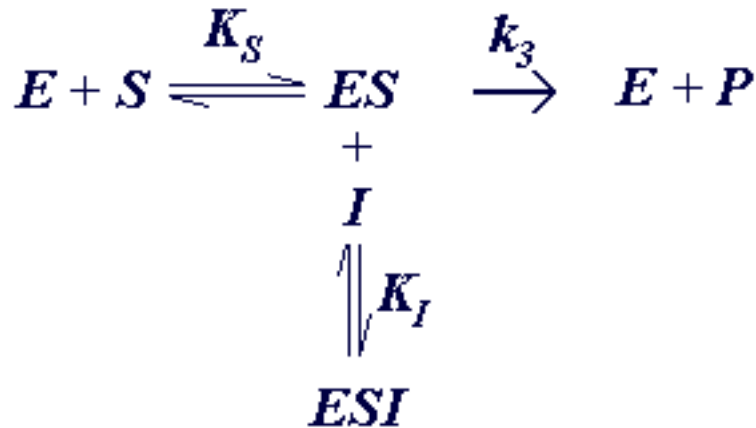
E ed EI hanno quindi uguale affinità per S



- **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:

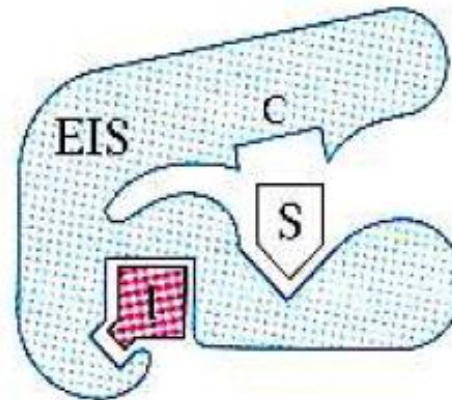
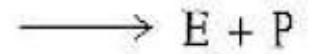
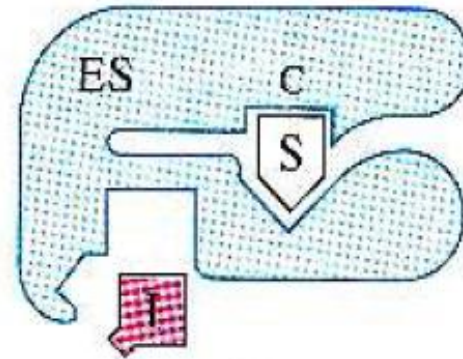
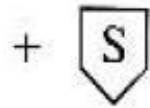
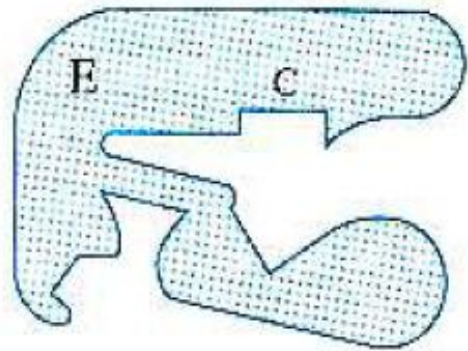


$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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

- 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.*

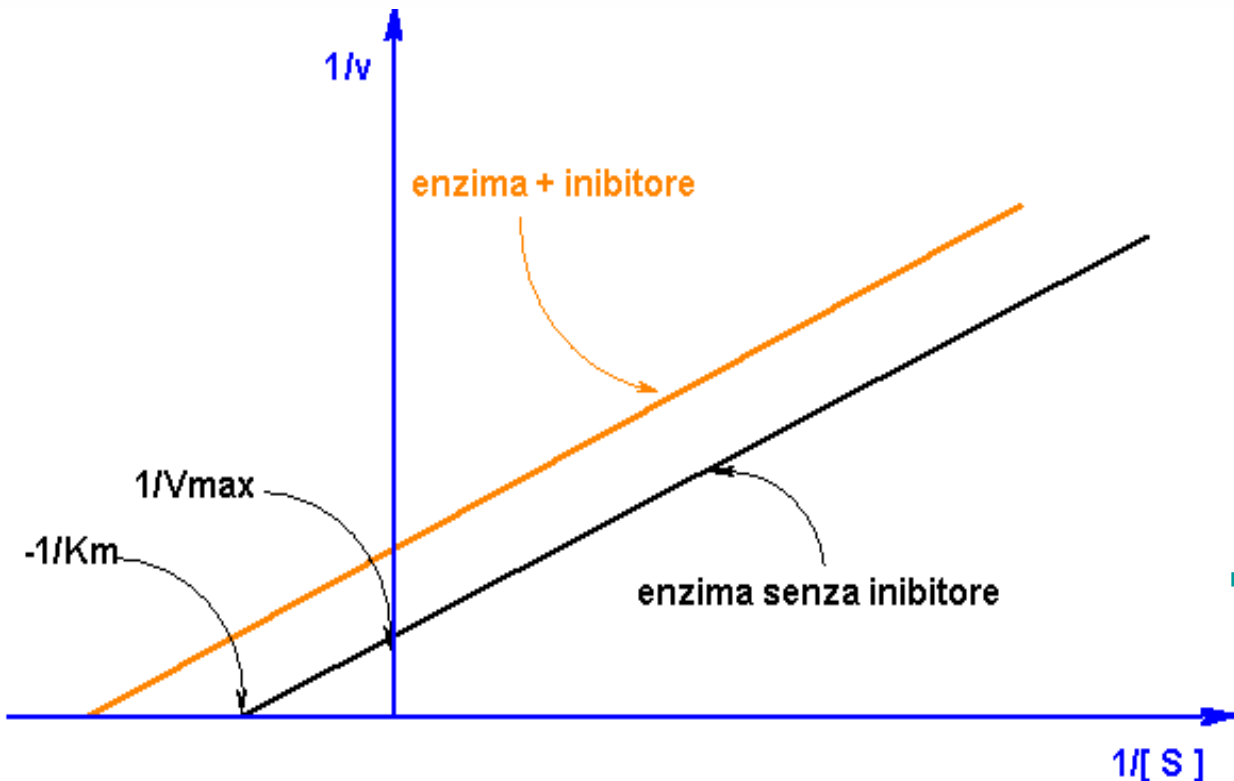
- La V_{max} raggiunta è inferiore a quella dell'E non inibito
- *il valore della K_m apparente sarà più basso:*

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

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***

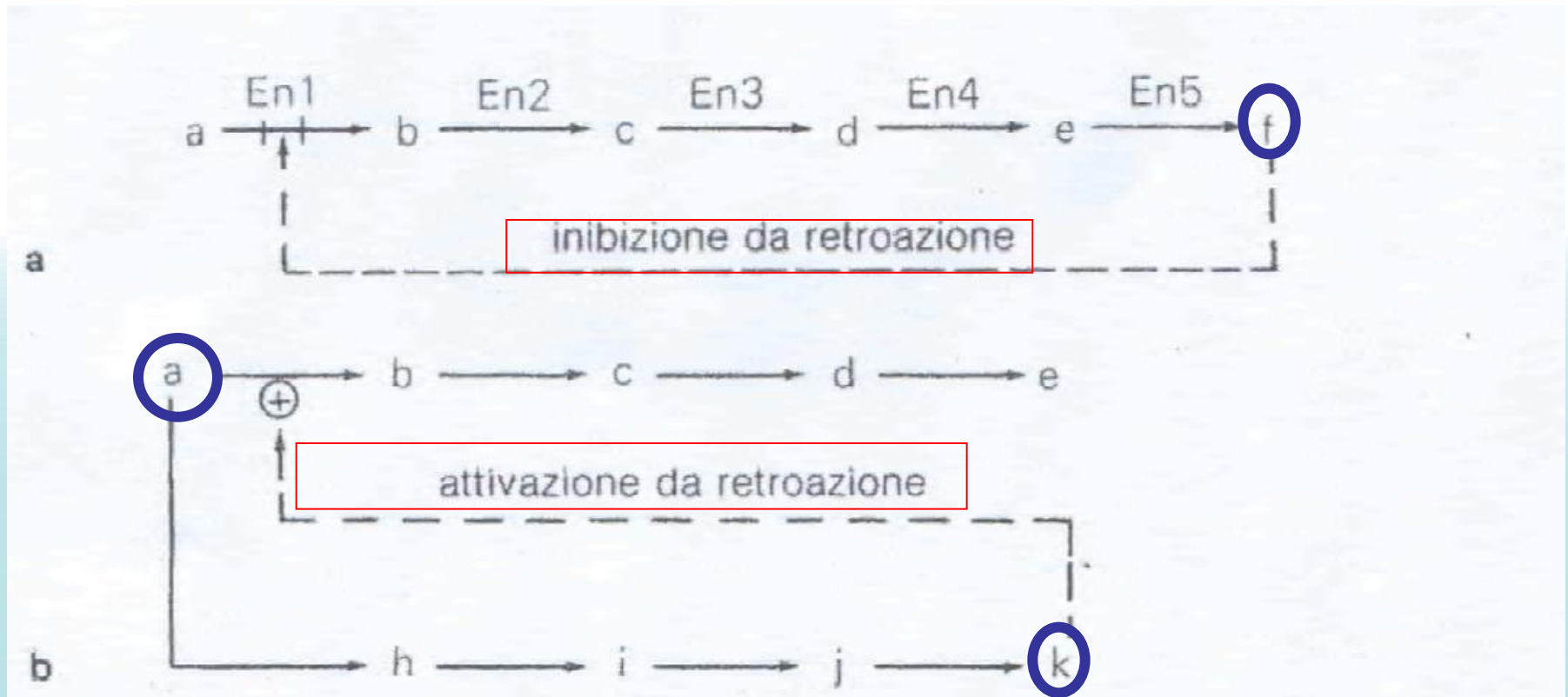


Figura 8.12. (a) *Inibizione da reazione*; (b) *attivazione da retroazione*.

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:

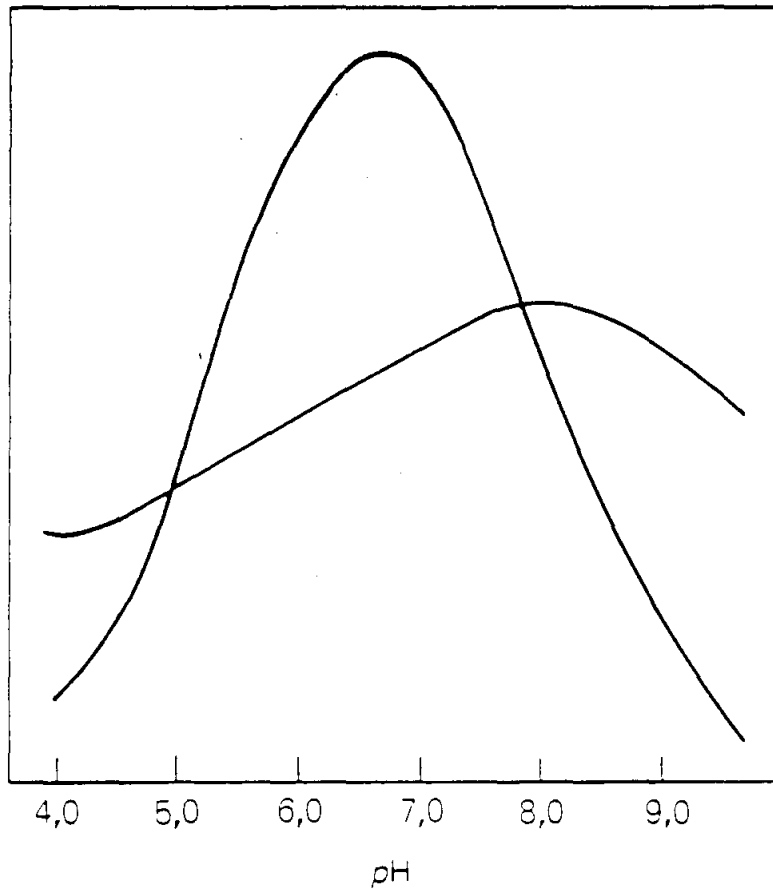
1. **Curve a campana**

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

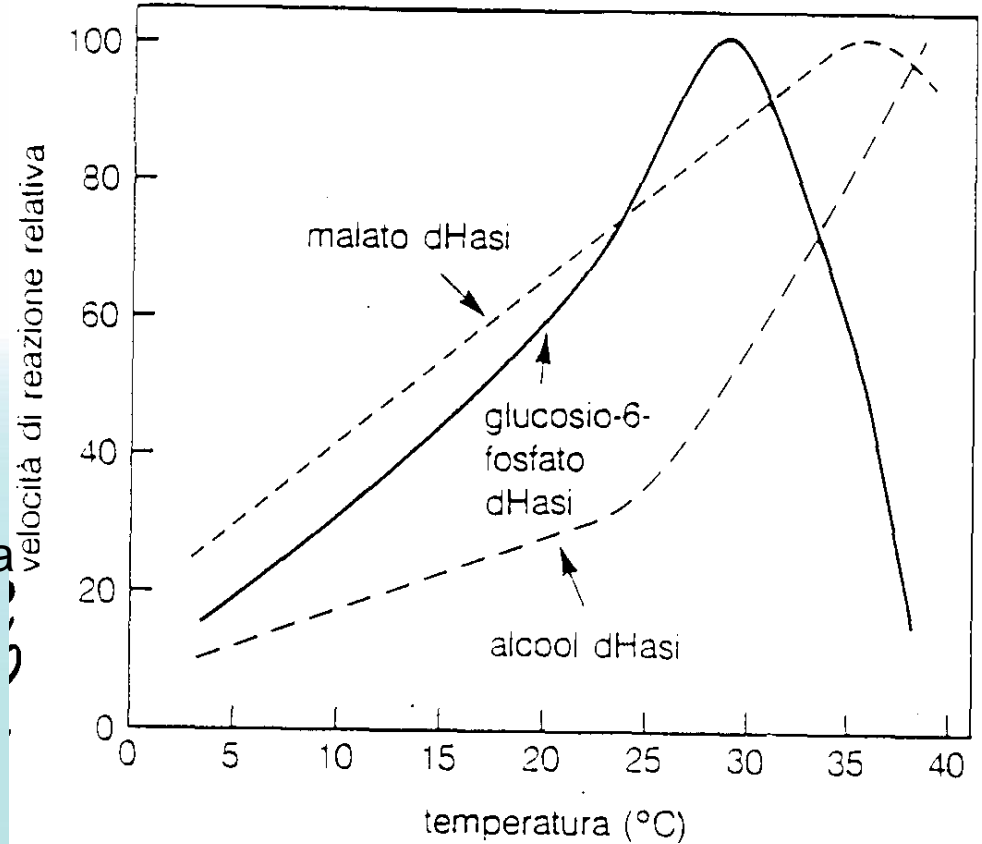
- La temperatura può agire modificando la **conformazione** dell'enzima

➔ 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 :

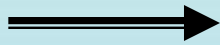
Enzimi fotosintetici con una temp ottimale di 10-15°C

- 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

ENZIMI ALLOSTERICI

Sono proteine con maggiore complessità (+ subunità) e contengono **siti di legame detti 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**

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



Gli enzimi allosterici sono sistemi cooperativi=

Il legame dell'effettore al sito allosterico è in grado di modificare leggermente la struttura terziaria dell'enzima
modificazione conformazionale del sito attivo che diventa più o meno accessibile al substrato



Variazione dell'affinità (K_m) dell'enzima per il substrato.

La velocità di reazione, viene ridotta o incrementata, a seconda delle esigenze della cellula.

L'effettore può essere anche il substrato

quando si lega al sito allosterico

- ***allosteria omotropica*** l'effettore coincide con il suo substrato,
- ***allosteria eterotropica*** l'effettore è diverso dal suo substrato,

Se il modulatore è il substrato:

*il legame di 1 molecola del modulatore (S) all' E
aumenterà o diminuirà la capacità dell' enzima di legare
una 11^A molecola di modulatore (S).*

- A volte la regolazione allosterica può fungere da controllo retroattivo =

Quando l' ***inibitore*** è il ***prodotto*** della reazione enzimatica (***feedback negativo***).

Cooperatività =

cooperatività positiva

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

cooperatività negativa

Se questa capacità di legame viene diminuita

Esistono 2 modelli che spiegano la cooperatività fra le subunità di un enzima allosterico costituito da una proteina tetramerica (4 subunità)

- **modello simmetrico (on-off o d'insieme)** proposto da Jacques Monod, e collaboratori nel 1965
- **modello sequenziale** descritto da Koshland e collaboratori 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 legano i substrati molto più prontamente di quelle nello stato teso.

I due modelli differiscono soprattutto per le interazione tra subunità.

Ipotesi simmetrica (modello on-off)

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

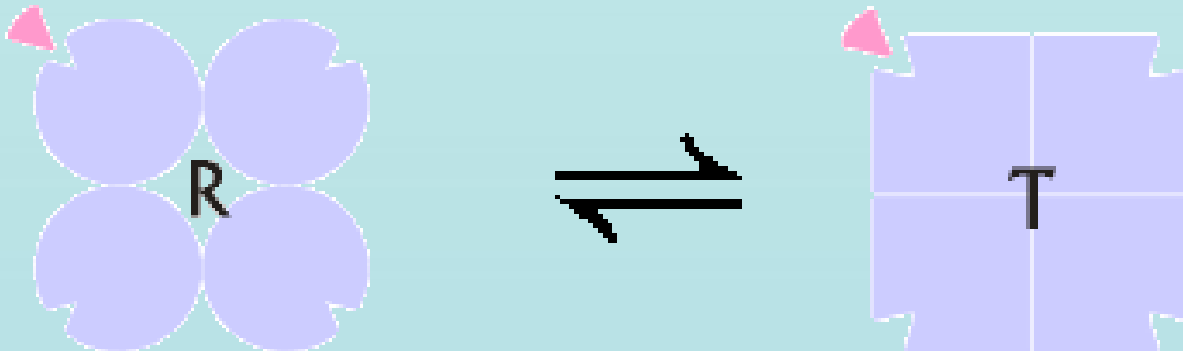
(Conformazione Tesa)

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.**



ES: 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**:

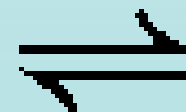
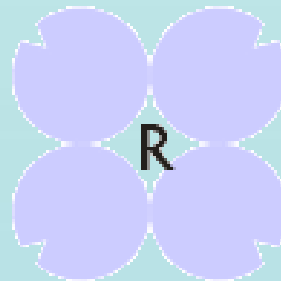
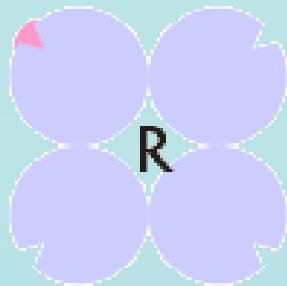
È più probabile che si leghi alla conformazione **R** data la maggiore affinità.

Spostamento dell'equilibrio:

*diminuisce la concentrazione della forma T e
aumenta quella della forma R.*

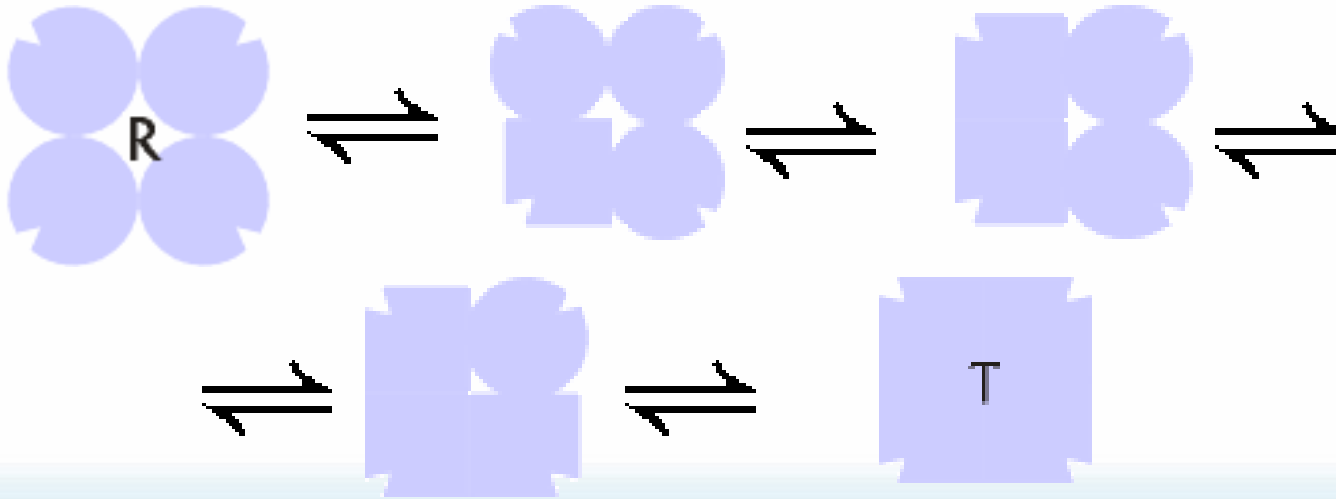
Aumento della probabilità di transizione
dalla forma inattiva a quella attiva

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.



il modulatore 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

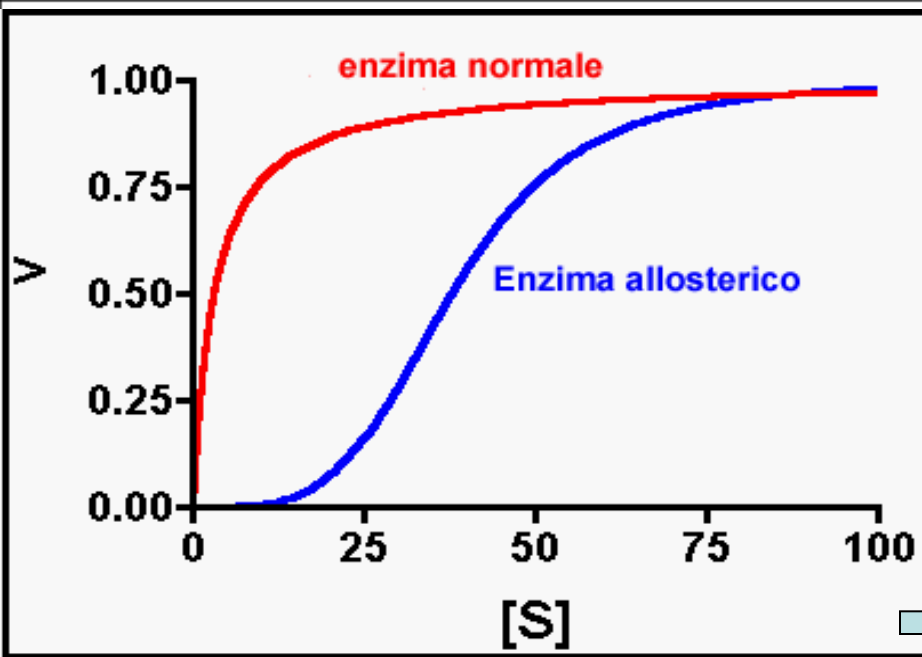
L'effettore provoca una **lieve alterazione** nella struttura delle subunità adiacenti (*no legami covalenti*) in modo che i loro siti leganti siano più recettivi per i substrati (maggiore affinità).

- **il cambiamento di forma tende a spingere le altre subunità verso la forma R**



cooperatività positiva

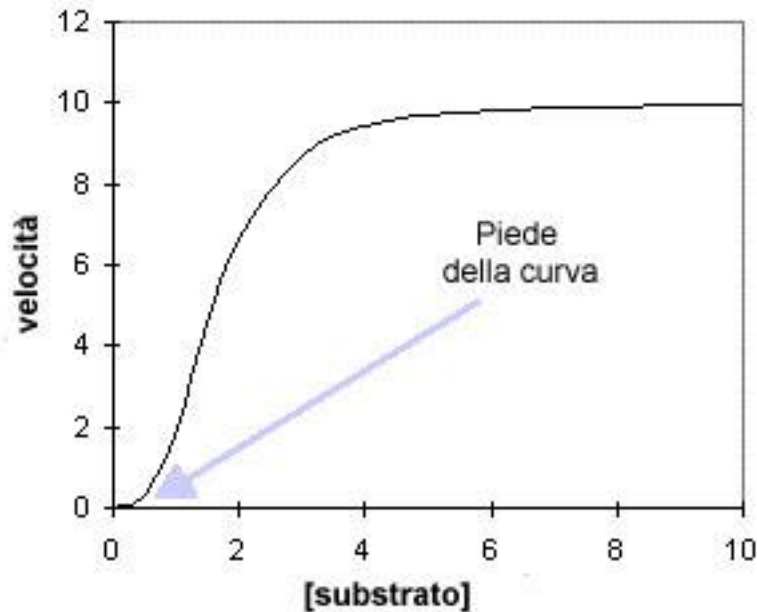
più unità si potranno trovare nello stato a maggiore affinità.



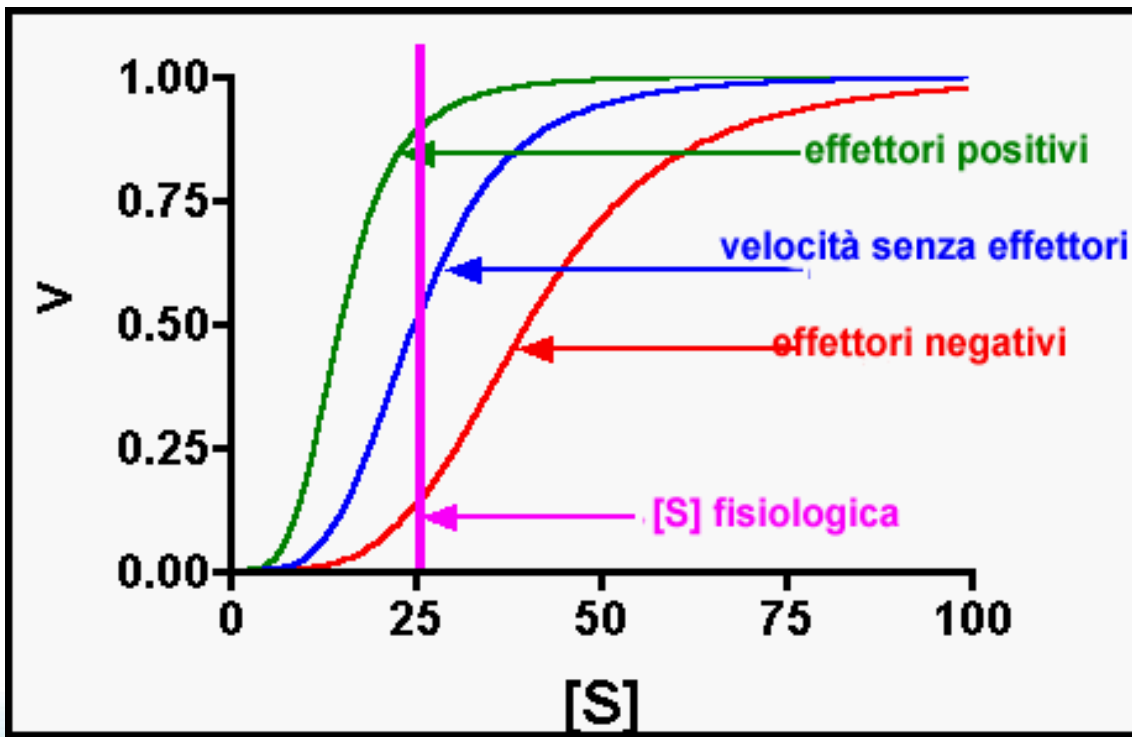
*Gli enzimi allosterici spesso non seguono la cinetica di M.M.
forma sigmoidale della curva:
Il legame è di tipo cooperativo:*

La cinetica di un enzima allosterico descrive una curva sigmoidale.

A basse concentrazioni di substrato si osserva una bassa affinità tra enzima e substrato, perché solo pochi siti attivi sono legati al substrato. Le prime molecole di substrato si legano lentamente poi sempre più rapidamente



➡ Ad alti livelli di substrato il grafico è molto simile all'iperbolico



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 Vmax.*
- *Gli effettori operano sulla capacità di legare il substrato cioè sulla Km.*

ATTIVATORI:

AMP, ADP,
FRUTTOSIO,2-6,
BISFOSFATO

SITO ALLOSTERICO

INIBITORI:

ATP, . . . ,
CITRATO



Fosfofruttochinasi-1

FRUTTOSIO-
6-FOSFATO

FRUTTOSIO-1,6-
BISFOSFATO