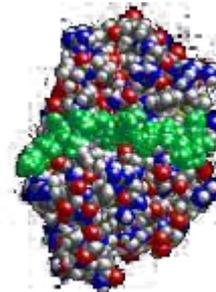
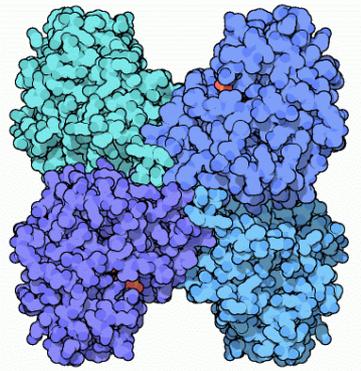


Determinazione dell'attività enzimatica



- Gli enzimi sono una percentuale rilevante delle proteine cellulari anche se ciascun tipo di enzima è presente nella cellula in quantità molto bassa.
- Controllano tutti gli eventi metabolici dell'organismo.
- Agiscono da ***catalizzatori***, aumentando notevolmente la velocità delle reazioni ma risultando immutati al termine del processo.

Differiscono dai catalizzatori chimici per alcuni aspetti:

- 1) Velocità di reazioni più elevate.
- 2) Condizioni di reazioni più blande.
- 3) Maggiore specificità di reazione.
- 4) Possibilità di regolazione.

Enzima	Velocità reazione non enzimatica (s ⁻¹)	Velocità reazione enzimatica (s ⁻¹)	Accelerazione velocità
Anidraasi carbonica	1,3x10 ⁻¹	1x10 ⁶	7,7x10 ⁶
Mutasi	2,6x10 ⁻⁵	50	1,9x10 ⁶
Trioso fosfato isomerasi	4,3x10 ⁻⁶	4300	1,0x10 ⁹
Carbossipeptidasi A	3,0x10 ⁻⁹	578	1,9x10 ¹¹
Nucleosidasi AMP	1,0x10 ⁻¹¹	60	6,0x10 ¹²

Nomenclatura

Denominati ponendo il suffisso **-asi** (esempio fosfatasi) al nome del substrato dell'enzima o a un'espressione che ne descrive l'azione catalitica.

Possiedono due nomi, uno **corrente** (nome volgare) ed uno **sistematico** (per ridurre le ambiguità), ed **un numero costituito da 4 parti**, che ne identificano classe e sottoclassi.

6 classi principali, divise in ulteriori sottoclassi e sotto-sottoclassi.

Classificazione	Tipo di reazione catalizzata
1. Ossidoreduttasi	Reazione di ossidoriduzione
2. Trasferasi	Trasferimento di gruppi funzionali
3. Idrolasi	Reazioni di idrolisi
4. Liasi	Eliminazione di gruppi per generare doppi legami (no H ₂ O)
5. Isomerasi	Isomerizzazione
6. Ligasi	Formazione di legami accoppiata all'idrolisi di ATP

Esempio:

Carbossipeptidasi A (nome corrente e raccomandato)



Peptidil-L-amminoacido idrolasi (nome sistematico)



EC 3.4.17.1 (numero identificativo: EC = Enzyme Commission)

Cofattori e coenzimi

Alcuni enzimi necessitano di particolari molecole detti cofattori o coenzimi.

Cofattore → Ioni o molecole non proteiche.

Coenzima → cofattore organico che si può associare in via transitoria (es. NAD^+ per le ossidazioni mediate dalla alcol deidrogenasi ADH) e fungere da **cosubstrato**, oppure associato in modo permanente: **gruppo prostetico** (es. *eme* nei citocromi e nelle perossidasi).

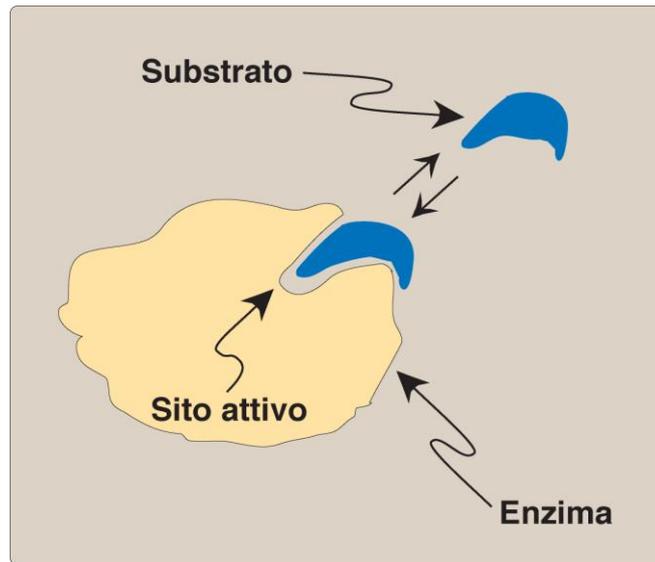
NB. *Al fine di completare il ciclo di catalisi, il coenzima deve ritornare al suo stato iniziale.*

Coenzima	Reazione mediata	Vitamina di origine	Malattia da carenza
Biocitina	Carbossilazione	Biotina	-
Coenzima A	Trasferimento di gruppi acilici	Pantotenato	-
Coenzimi cobalamminici	Alchilazione	Cobalamina (B_{12})	Anemia perniciosa
Coenzimi flavinici	Ossidoriduzione	Riboflavina (B_2)	-
Acido lipoico	Trasferimento di gruppi acilici	-	-
Coenzimi nicotinamidici	Ossidoriduzione	Nicotinamide (niacina)	Pellagra
Piridossalfofato	Trasferimento di gruppi amminici	Piridossina (B_6)	-
Tetraidrofolato	Trasferimento gruppi monocarboniosi	Acido folico	Anemia megaloblastica
Tiamina pirofosfato	Trasferimento aldeidi	Tiamina (B_1)	Beriberi

Specificità di substrato

L'enzima interagisce con il substrato tramite legami non covalenti deboli.

Nelle molecole enzimatiche è presente una speciale tasca o solco, chiamato **sito attivo**: contiene catene laterali di amminoacidi che creano una superficie tridimensionale **complementare al substrato**. Il legame del substrato modifica leggermente la struttura del sito attivo (**adattamento indotto**).



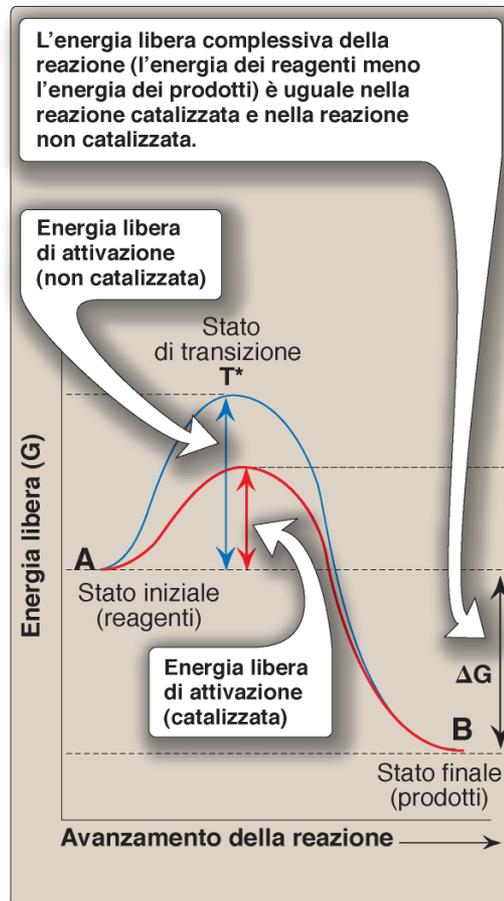
Fonte: internet

La specificità dell'enzima è dovuta alla conformazione del sito attivo (specificità geometrica).

Il sito attivo lega il substrato, formando un complesso enzima-substrato (**ES**). L'ES si converte in enzima-prodotto (**EP**) che si dissocia poi in enzima (**E**) e prodotto (**P**).

Come funzionano gli enzimi?

Gli enzimi agiscono **generando un nuovo percorso di reazione che ha uno stato di transizione con energia inferiore** → aumentano la velocità di reazione **abbassando l'energia di attivazione** (la differenza di energia tra i reagenti e lo stato di transizione).



L'enzima **non modifica l'equilibrio della reazione**, ma offre solamente un percorso alternativo alla reazione non catalizzata.

Come si misura l'attività enzimatica?

Attività enzimatica → l'attività catalitica di una preparazione enzimatica.

Si manifesta come ***aumento della velocità di reazione*** → ogni determinazione quantitativa presuppone una misura della velocità di reazione.

2 modi:

- a) Misurare la quantità di substrato che scompare;
- b) Misurare la quantità di prodotto che si forma.

In genere è più comodo determinare uno dei prodotti di reazione: è più precisa la misura quantitativa di qualcosa che compare ed è assente all'inizio, rispetto a qualcosa che può calare di poco durante la reazione.

Oppure si può valutare la modifica di un coenzima → es. NAD^+ e NADH hanno diverso assorbimento a 340 nm (il NAD^+ non assorbe).

Velocità di reazione: quantità di substrato trasformato nel tempo o di prodotto che si forma nel tempo.

$$v = - d [S] / dt = d [P] / dt$$

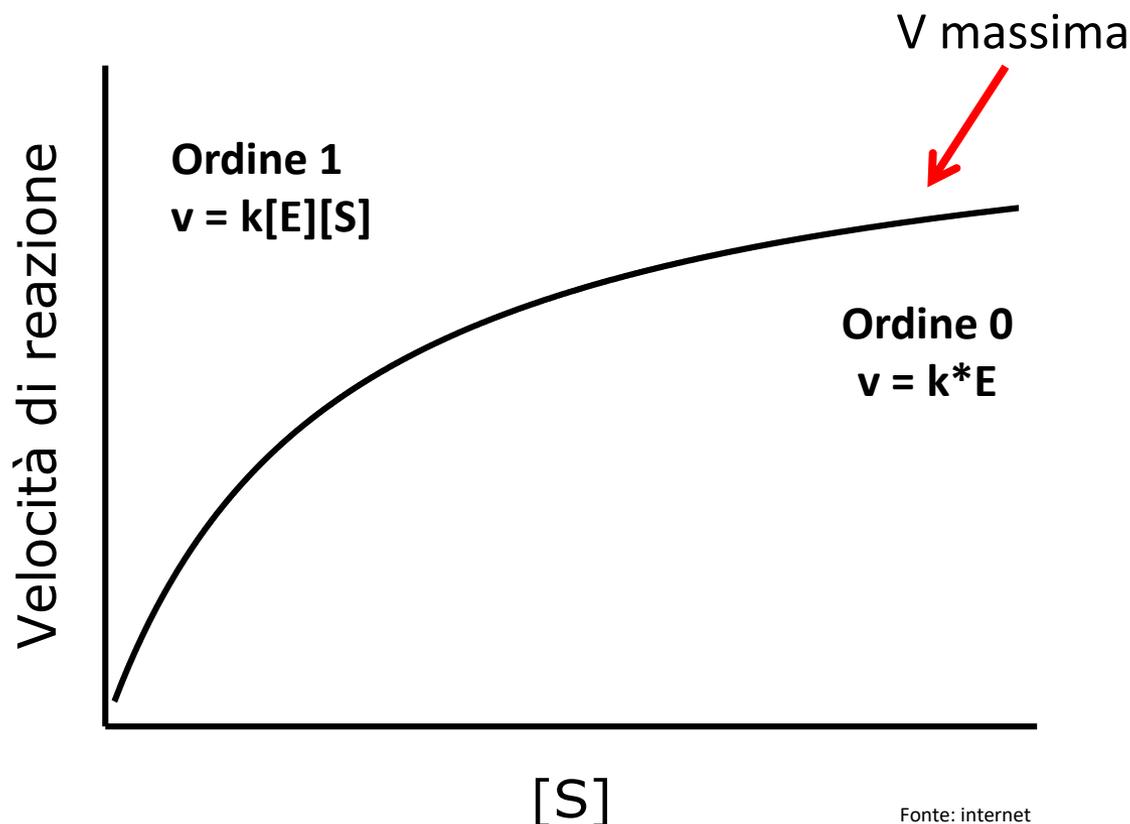
La velocità di reazione si misura di solito tramite **dosaggi colorimetrici** o fluorimetrici → comparsa di colore (colorimetrico) o di fluorescenza (fluorimetrico) dovuto alla comparsa di un prodotto.

La variazione dell'assorbanza della soluzione nel tempo misura la velocità di reazione.

Per un dosaggio enzimatico, l'attività deve essere basata sulla **velocità iniziale di reazione** (in cui la [S] non varia) ed effettuata in **condizioni saturanti di substrato** (così la cinetica è dell'ordine zero → indipendente dal substrato).

In una reazione enzimatica, l'ordine della reazione (dipendenza dalla concentrazione dei substrati) è variabile:

- Per $[S] \gg K_M$ la reazione è di ordine zero rispetto ad S.
- Per $[S]$ basse, la reazione diventa di primo ordine rispetto ad S, dipendente dalla concentrazione sia di S che di E (e del complesso ES).



La velocità di una reazione catalizzata da un enzima aumenta all'aumentare della concentrazione del substrato fino a raggiungere una velocità massima che riflette la saturazione con il substrato dei siti attivi delle molecole di enzima presenti.

UNITA' DI MISURA DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA

Unità internazionale (U): enzima che catalizza la trasformazione di 1 μ mole di substrato al minuto.

katal (kat): enzima che catalizza la trasformazione di 1 mole di substrato al secondo.

Conversione:

$$1 \mu\text{Katal} = 60 \text{ U}$$

Attività specifica (U/mg) \rightarrow numero di *unità* di attività per *milligrammo* (mg) di proteine.

Concentrazione di un enzima \rightarrow in soluzione, quando possibile, si esprime in *unità per millilitro* (U/ml).

Oppure, si può esprimere come quantità di enzima per unità di volume (es. ng/ml)

Tipologie di dosaggio enzimatico

1) CONTINUO

- SEMPLICE, si misura continuamente la variazione nel tempo della concentrazione del substrato o la comparsa del prodotto di una reazione enzimatica → il prodotto che si forma è colorato, o il substrato assorbe.
- ACCOPPIATO, sfrutta una seconda reazione enzimatica per la quantificazione del primo enzima (il primo prodotto non assorbe, mentre il prodotto Q sì).



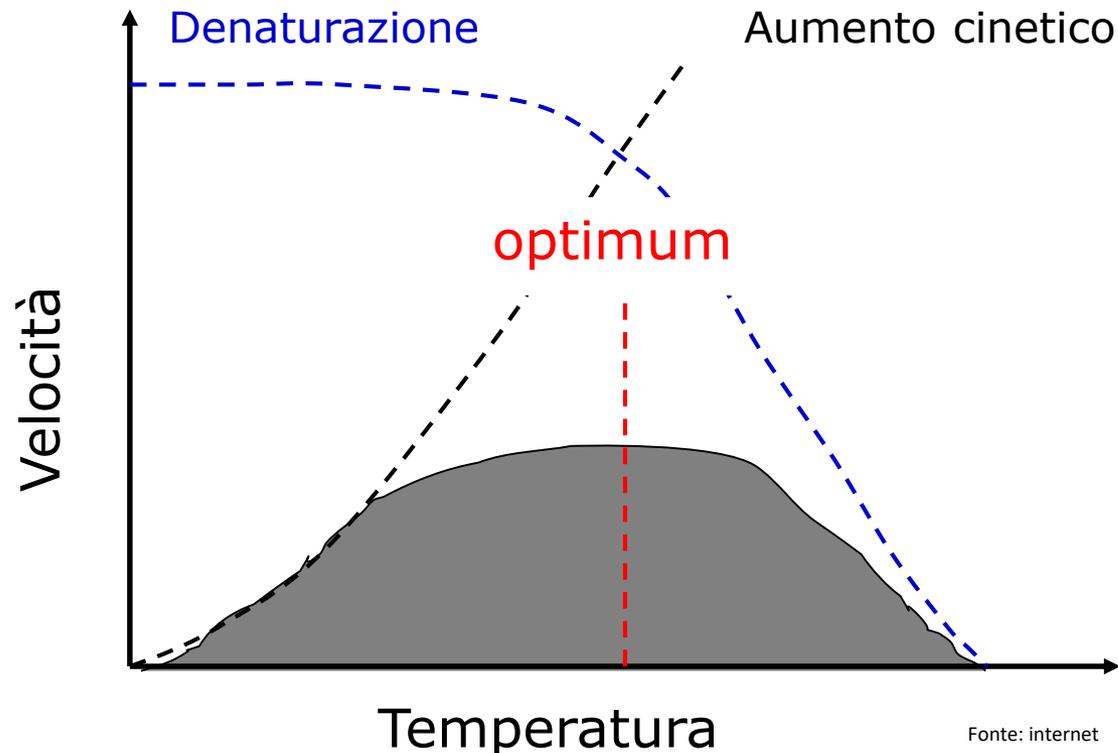
- ## 2) DISCONTINUO
- durante la reazione non si sviluppano o consumano cromofori o fluorofori e le condizioni per sviluppare colore o fluorescenza sono diverse da quelle del dosaggio.

Fattori che influenzano l'andamento della reazione enzimatica

- 1. Concentrazione del substrato:** la diminuzione del substrato fa diventare la reazione del primo ordine e quindi dipendente anche da $[S]$.
- 2. Prossimità all'equilibrio:** le reazioni per i dosaggi enzimatici non devono mai raggiungere l'equilibrio, e i prodotti non si devono ritrasformare in substrati.
- 3. Inibizione da prodotto:** Per alcuni enzimi il prodotto è un inibitore competitivo della reazione. L'aggiunta di una reazione accessoria che ne provoca la rimozione facilita la determinazione dell'attività.
- 4. Instabilità dell'enzima nelle condizioni di dosaggio.**
- 5. Instabilità dei componenti della miscela di dosaggio.**
- 6. Variazioni di pH.**
- 7. Variazioni di temperatura.**
- 8. Contaminazione della miscela con inibitori.**

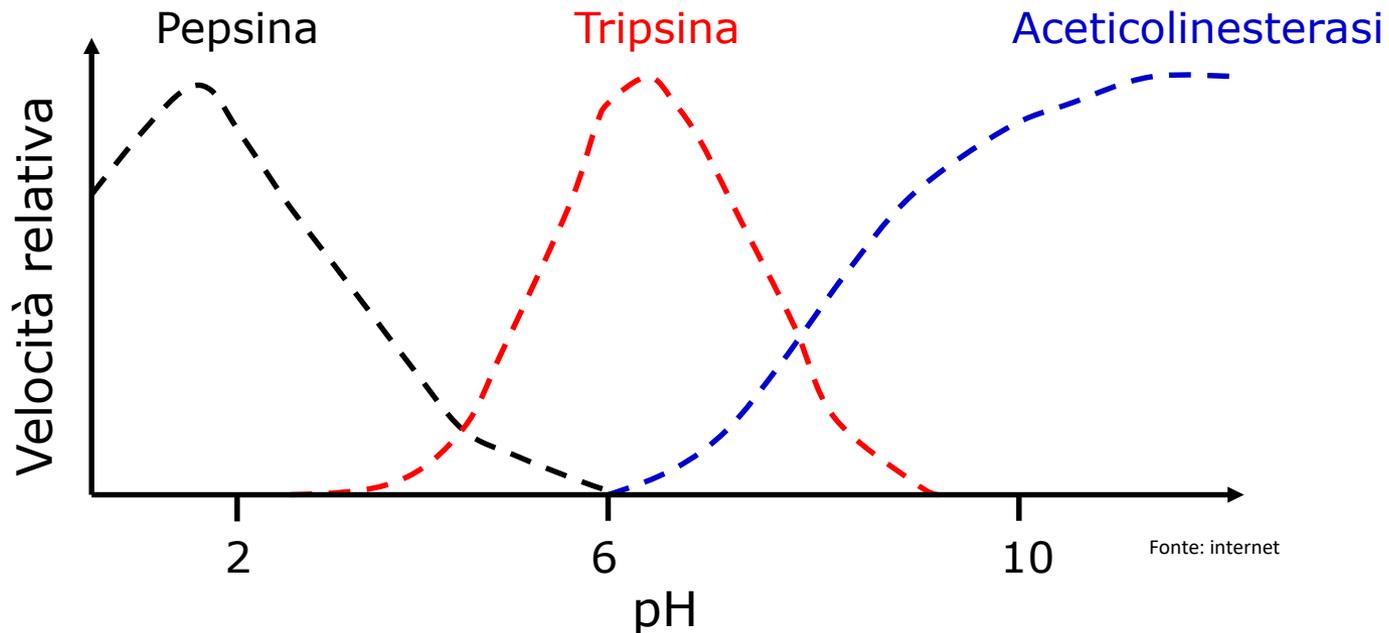
TEMPERATURA

- La **velocità** di reazione **aumenta** con **l'aumentare della temperatura** fino a raggiungere un picco.
- Un **ulteriore innalzamento** della temperatura provoca una **diminuzione** della velocità di reazione a causa della **denaturazione** dell'enzima.



pH

- Ciascun enzima ha un ***pH ottimale*** al quale la reazione è catalizzata con la **massima efficienza**: in genere rispecchia quello dell'ambiente in cui l'enzima si trova.
- *La concentrazione degli H^+ (pH) influenza l'attività enzimatica modificando la geometria del **sito attivo** e la distribuzione delle cariche elettriche dei gruppi coinvolti nel legame del substrato o nel processo catalitico stesso.*
- *Valori di pH estremi in genere possono provocare la **denaturazione** dell'enzima.*



Inibitori

Inibitore → qualsiasi sostanza capace di far diminuire la velocità di una reazione catalizzata da un enzima.

- ***Inibitori reversibili***: si legano agli enzimi con legami deboli, non covalenti. La diluizione del complesso enzima-inibitore provoca la dissociazione dell'inibitore e il recupero dell'attività enzimatica.
- ***Inibitori irreversibili o (inattivatori)***: si legano in modo stabile all'enzima, spesso con interazioni covalenti, inattivandolo.

Diversi tipi di inibizione:

- 1) Competitiva**: l'inibitore compete con il substrato per lo stesso sito di legame (agiscono, quindi, sulla formazione del complesso ES). Si rimuove l'inibizione aumentando [S].
- 2) Non competitiva**: l'inibitore si lega ad un sito diverso dal sito di legame del substrato, il quale non si lega (a causa di modifiche conformazionali). L'inibizione non si rimuove aumentando [S].
- 3) Incompetitiva (o incompetitiva)**: l'inibitore si lega solo al complesso enzima-substrato ma non all'enzima libero.