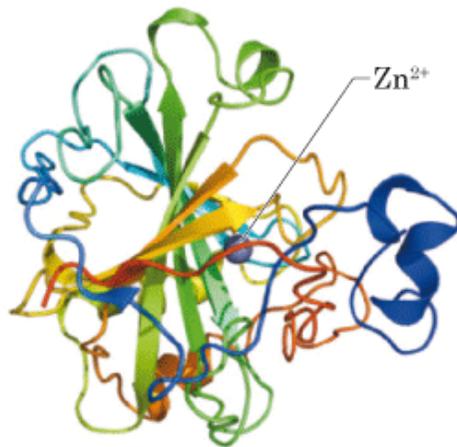


ENZIMI : catalizzatori biologici

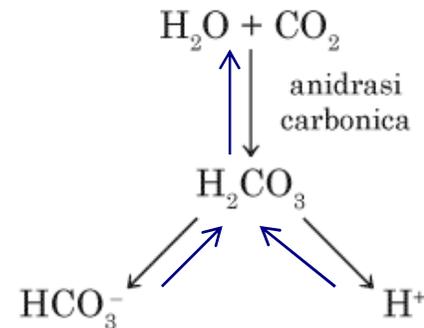
Nell'organismo sono indispensabili alla vita:

per esempio le reazioni chimiche connesse con un singolo respiro, in assenza di enzimi, durerebbero ore.

L'enzima anidrasi carbonica accelera la reazione



anidrasi carbonica di tipo II



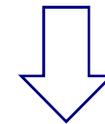
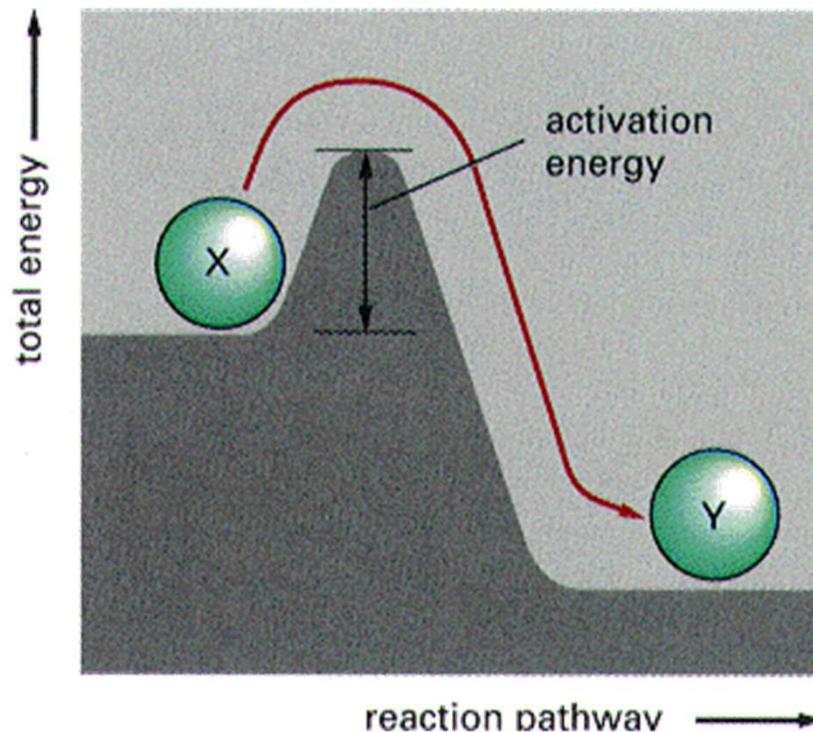
AUMENTANO
la
VELOCITA' DI
REAZIONE
da
1 MILIONE A
1 MILIARDO
di **VOLTE**

■ FIGURA 17.1

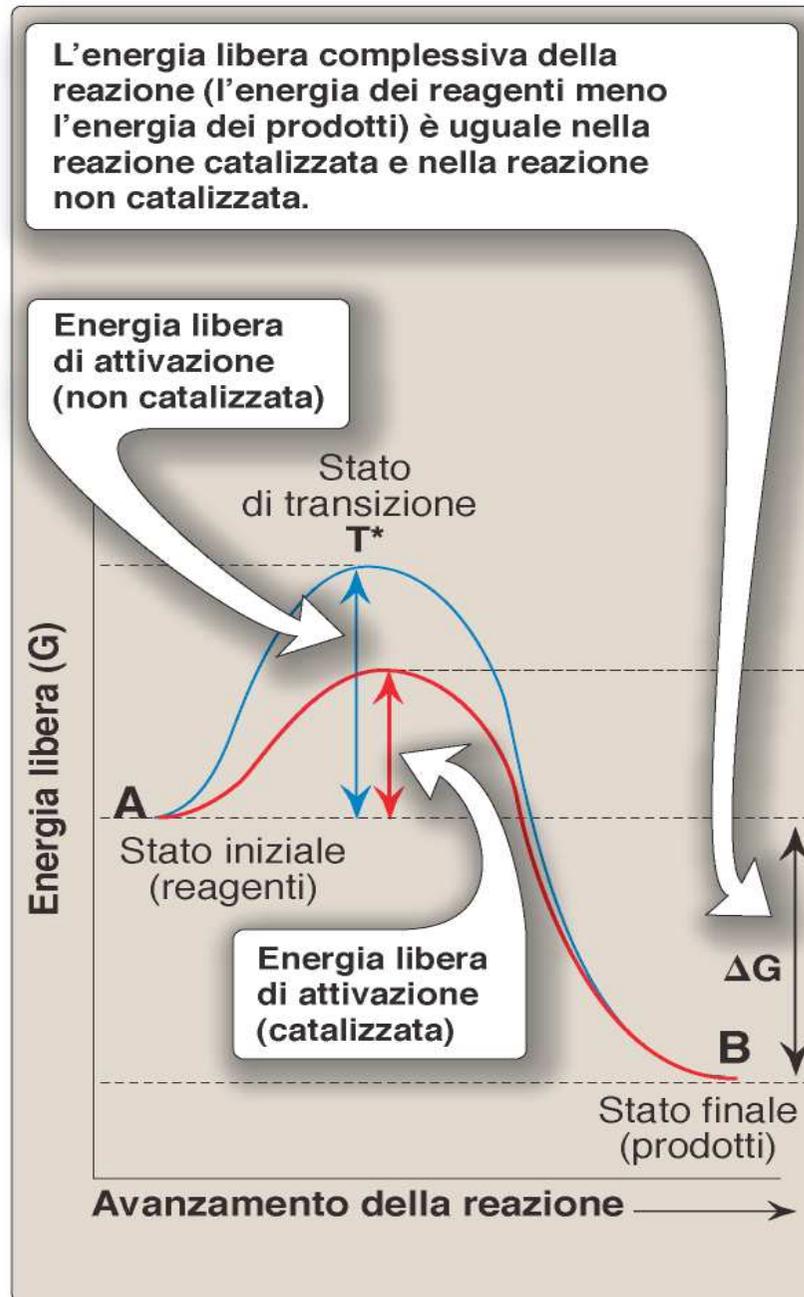
L'enzima anidrasi carbonica ha un'ampia distribuzione nei tessuti, dove è presente in oltre 10 isoforme. L'attività catalitica richiede la presenza dello ione Zn^{2+} . Nei globuli rossi la conversione dell'anidride carbonica prodotta dai tessuti in acido carbonico serve per tamponare il pH del sangue.

Energia di attivazione

- Y si trova ad uno stato energetico inferiore rispetto a X
 - Conversione $X \rightarrow Y$ termodinamicamente favorevole
- Ma la reazione non avviene se X non acquisisce sufficiente energia per superare la barriera dell'energia di attivazione



L'ENERGIA CHE SERVE PERCHÉ LE MOLECOLE SI INCONTRINO, E NEL PUNTO GIUSTO, E L'URTO SIA EFFICACE: faccia avvenire la trasformazione



Energia di attivazione

ENZIMI

Stabilizzano lo stato di transizione e riducono la barriera dell'energia di attivazione

Nelle reazioni catalizzate i reagenti si chiamano substrati

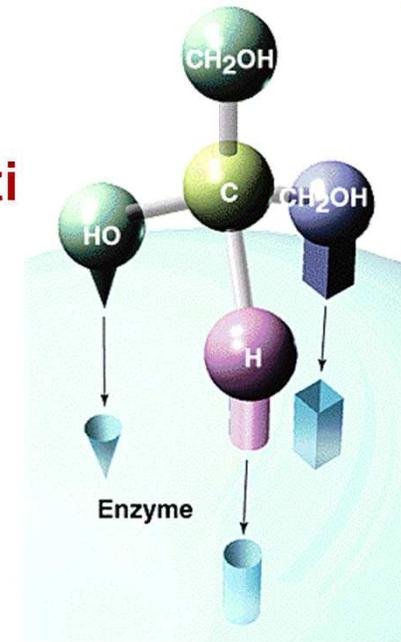
Specificità

- Gli enzimi riconoscono selettivamente i propri **substrati**
- Gli enzimi catalizzano specifiche **reazioni**
- La specificità è controllata dalla struttura

Riconoscimento spesso tridimensionale

Gli enzimi possono distinguere gli stereoisomeri

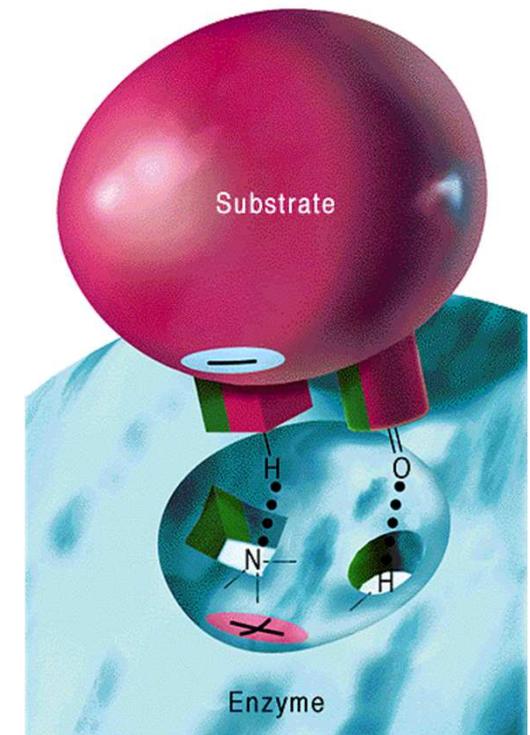
D-e L- degli aminoacidi



Modello Lock and Key (= chiave e serratura):
l'enzima si combina chimicamente col substrato

Il **sito attivo o catalitico** è costituito dal “negativo” del substrato

Si formano legami ionici e elettrostatici esatti fra enzima e substrato



Enzimi

- **Si combinano transientemente col substrato e ne abbassano l'energia di attivazione**
- **Infatti stabilizzano lo stato di transizione**
- **Non modificano l'equilibrio della reazione, ma solo la velocità con la quale l'equilibrio viene raggiunto**
- **Non vengono modificati nella reazione, e al termine della reazione sono subito disponibili per catalizzare una nuova reazione**
- **vengono usati in quantità non stechiometriche e non compaiono nella reazione né tra i reagenti né tra i prodotti**

Migliaia di molecole di substrato trasformate ogni secondo



Classificazione internazionale degli enzimi

- **1 - ossidoreduttasi: reazioni di ossido-riduzione = trasferimento di atomi d'idrogeno)**
- **2 - transferasi: trasferimento di gruppi chimici da una molecola ad un'altra**
- **3 - idrolasi: reazioni di idrolisi (= rottura di legami mediante aggiunta di acqua)**
- **4 - liasi: reazioni di addizione a doppi legami**
- **5 - isomerasi: reazioni di trasformazione di una molecola nel suo isomero (= trasferimento intramolecolare di gruppi)**
- **6 - ligasi: reazioni di formazione di nuovi legami con rottura di ATP in AMP e pirofosfato o ADP e Pi**

Alcuni enzimi sono coadiuvati da Coenzimi (vedi diapositive successive)

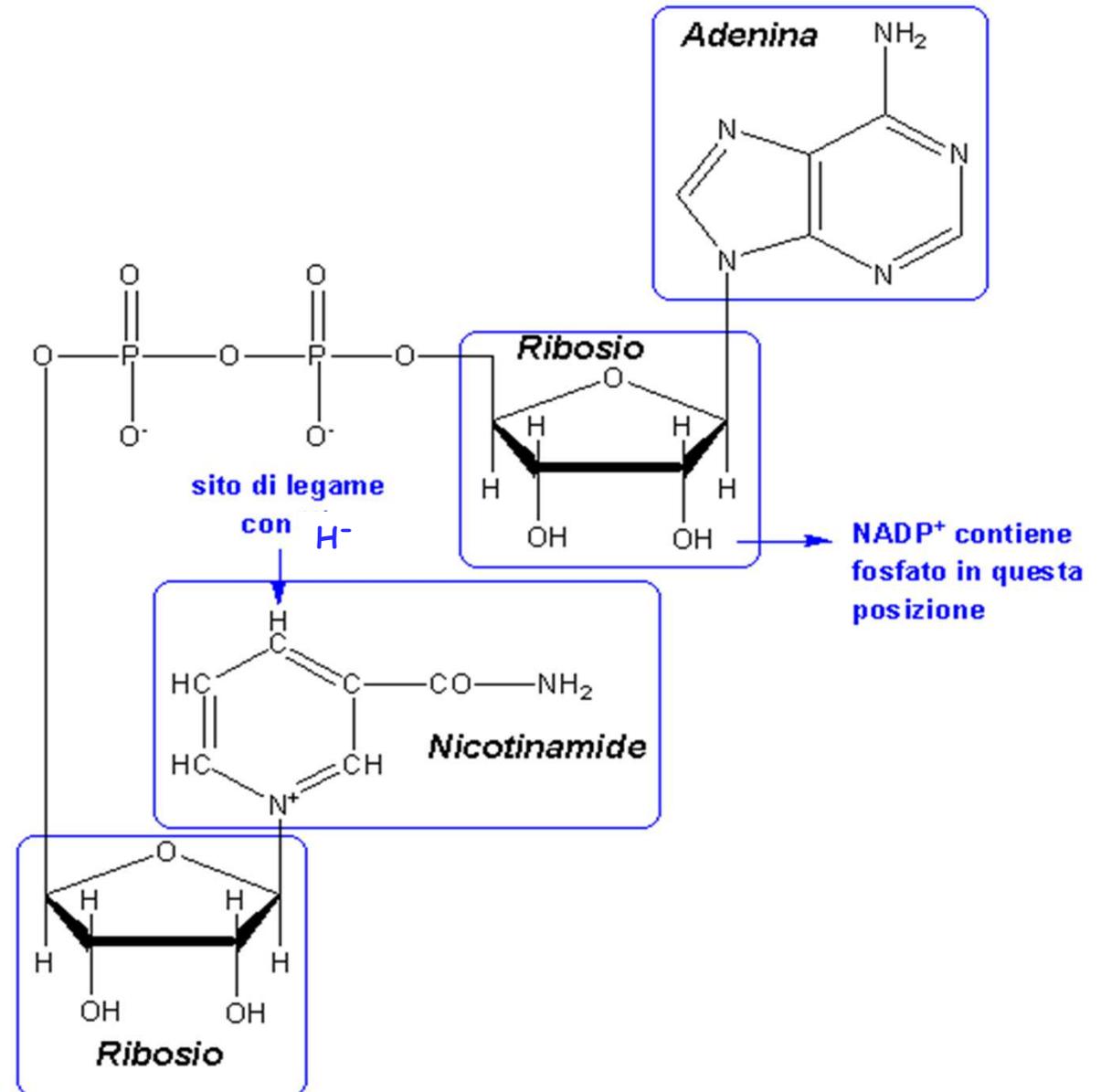
- **Piccole molecole organiche, spesso derivate da vitamine**
- **Si legano con forte affinità a enzima e substrato**
- **Spesso fungono da secondo substrato**
- **Determinano la specificità della reazione catalizzata**

Alcuni enzimi posseggono legati Metalli di transizione (Fe, Zn, Cu, Mn...)

- **Si chiamano Cofattori più che coenzimi**
- **Presenti in 2/3 degli enzimi**
- **Agiscono come stabilizzatori della proteina e come donatori/accettori di elettroni**

Nicotinamide Adenina Dinucleotide (NAD⁺)

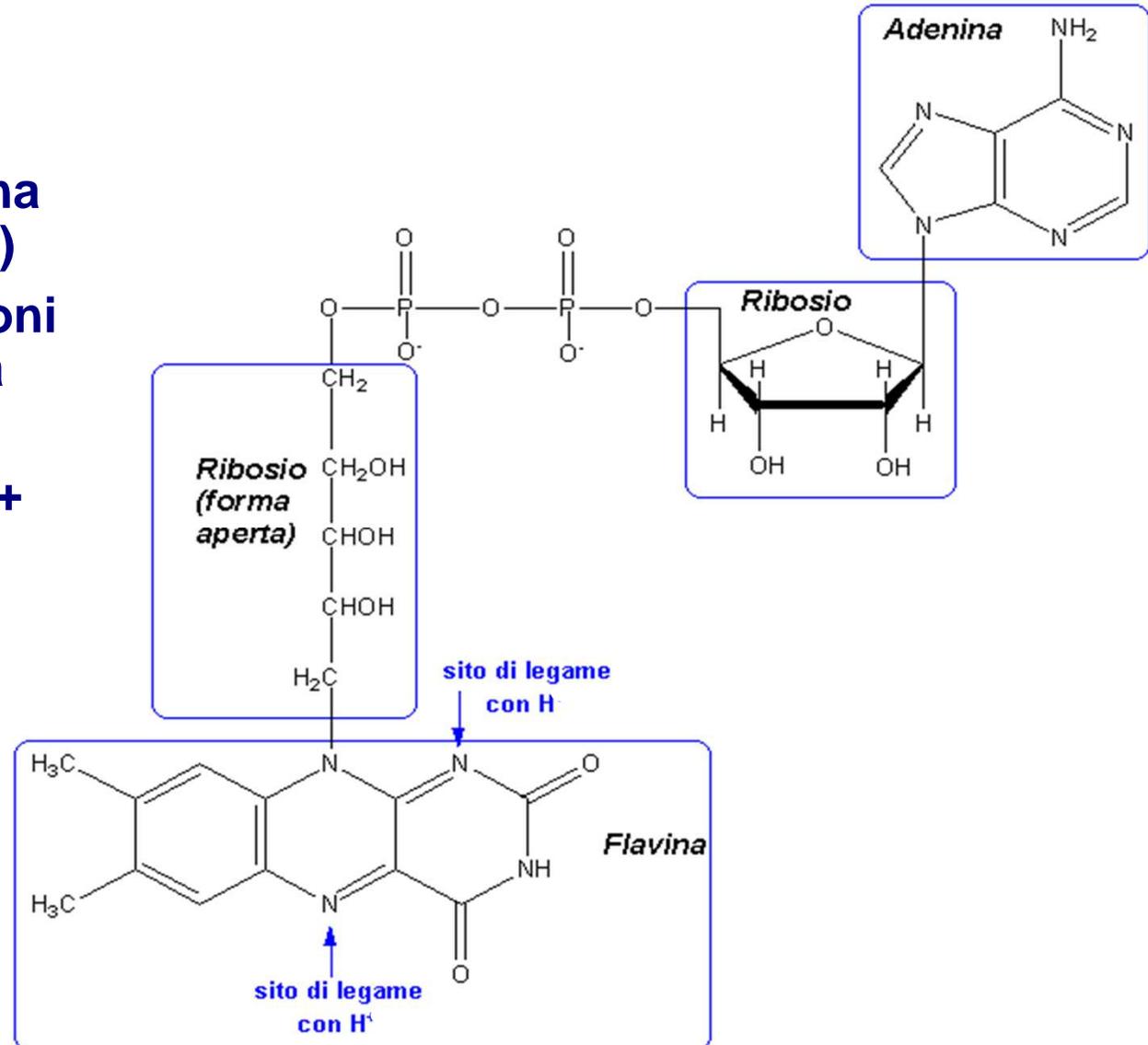
- Coenzima di deidrogenasi
- Derivato da niacina (Vitamina del complesso B)
- Trasferisce un H⁻ da/a substrati:
- $\text{lattato} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$
- Esiste una forma fosforilata NADP⁺



Flavina adenina dinucleotide (FAD)

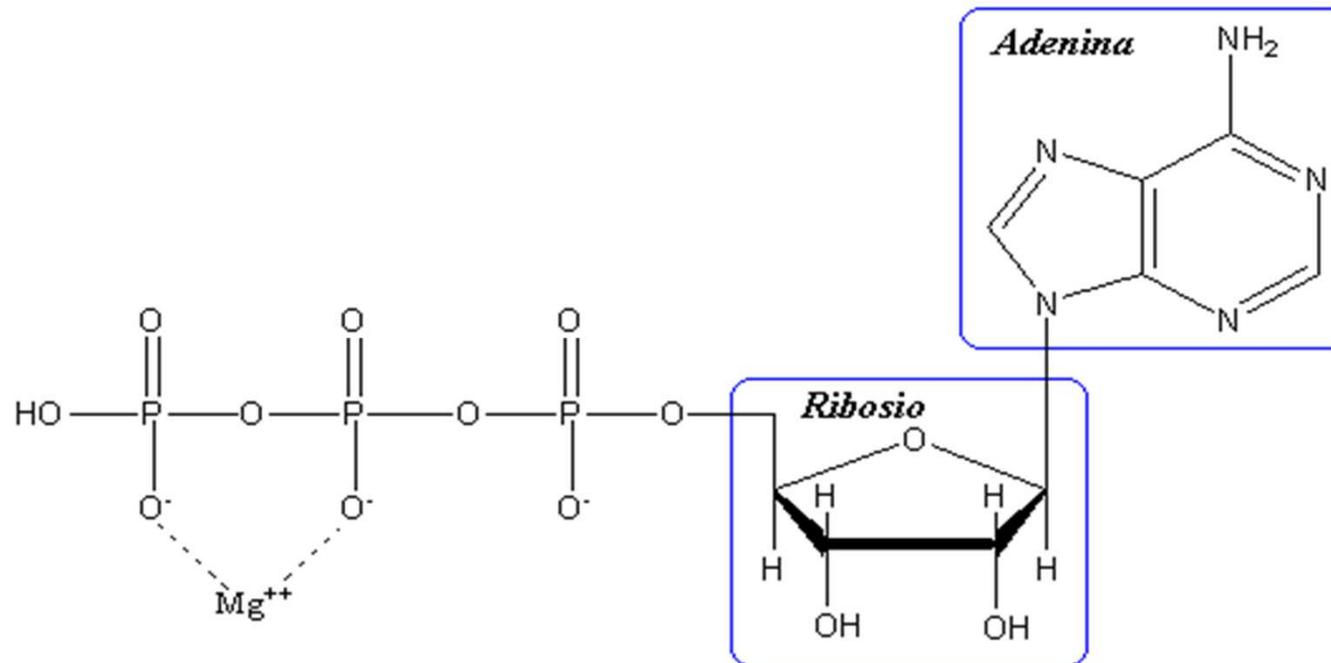
- Coenzima di deidrogenasi
- Derivato da riboflavina (vit. del complesso B)
- Trasferisce due protoni e 2 elettroni (2H) da/a substrati
- Esempio: Succinato + FAD \rightleftharpoons Fumarato + FADH₂

Questo FADH₂ entra poi nella catena respiratoria



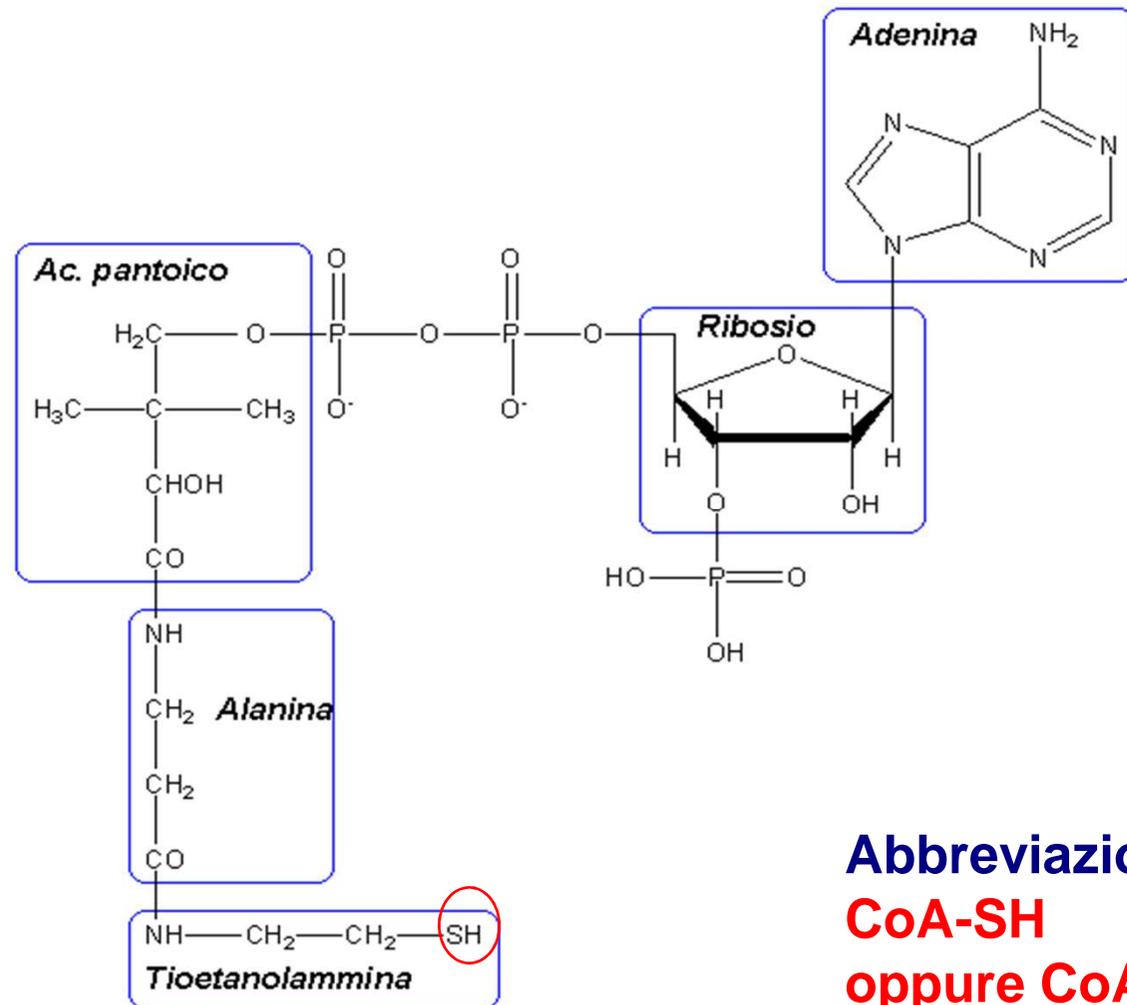
Adenosin trifosfato (ATP)

- **Coenzima delle chinasi, trasferisce un gruppo Pi al substrato**
- **Esempio: Glucosio + ATP \Rightarrow Glucosio-6-fosfato + ADP**
- **In molte chinasi, il substrato vero è Mg-ATP**



Coenzima A

- **Trasportatore e attivatore di gruppi acilici (acidi grassi) e di acetato**



Abbreviazione
CoA-SH
 oppure **CoA**

Si può schematizzare così il funzionamento degli enzimi
N.B.: [S] >> [E]



- **L'enzima si lega col substrato per formare ES: reazione reversibile**
- **Il complesso ES subisce il cambiamento conformazionale che induce la formazione di P**
- **L'enzima rilascia P e torna nello stato iniziale**
- **La velocità globale è regolata dallo stadio più lento che spesso è la conversione di ES in EP**

Le reazioni enzimatiche sono spesso in cascata (vie metaboliche)



Reversibilità delle reazioni enzimatiche

- L'enzima favorisce il raggiungimento dell'equilibrio, quindi in teoria catalizza anche la reazione inversa



- Ma, se B è substrato di una reazione successiva, la prima reazione diventa praticamente irreversibile

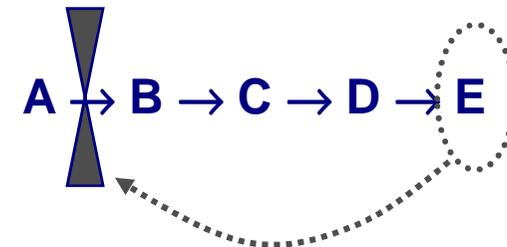


- Ciò vale per catene anche molto lunghe di reazioni (catene enzimatiche)



- Spesso il prodotto terminale di una sequenza di reazioni (E) inibisce il deflusso della stessa catena a livello della prima reazione $A \rightarrow B$

- L'accumulo di E "chiude il rubinetto"
- La mancanza di E "riapre il rubinetto"



Velocità di reazione ed attività enzimatica

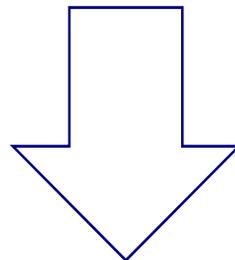
- **Velocità di reazione:** quantità di substrato trasformato nel tempo
- **Attività enzimatica:** è espressa in base alla velocità della reazione promossa dall'enzima:
 - 1 Unità internaz. (IU):** quantità di enzima che converte **1 μ mol** substrato in 1 min

La « carta d'identità di un enzima » è costituita

- dal **nome**
- dalla **K_m** (= concentrazione di substrato a cui si ha metà della velocità massima (= V_{max}))
- dalla **V_{max}**

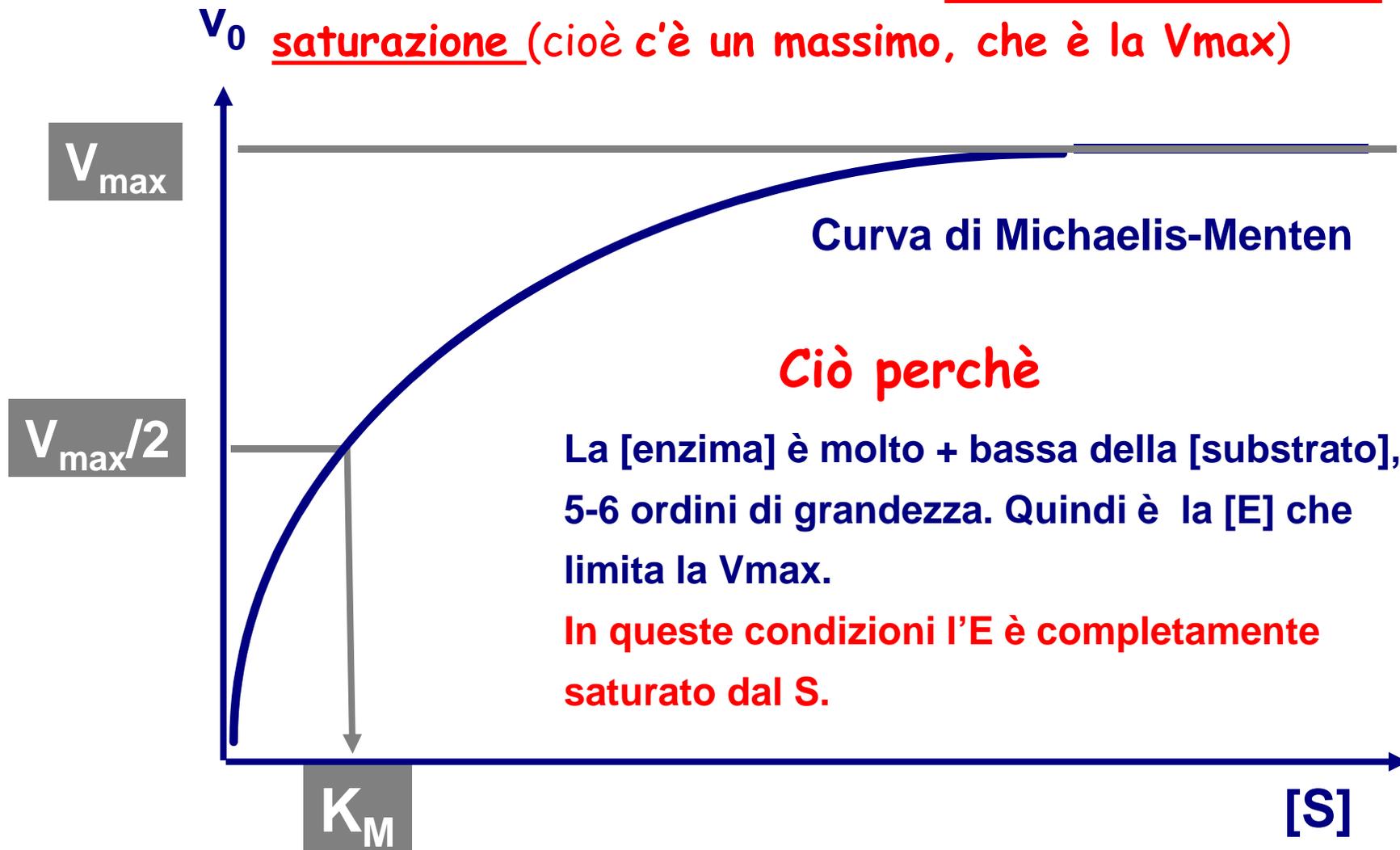
Vediamo ora una

**RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DELLE REAZIONI
ENZIMATICHE**



Nelle reazioni chimiche la velocità iniziale ($=V_0$) aumenta, aumentando la concentrazione dei reagenti

Ma nelle reazioni catalizzate la cinetica è definita di saturazione (cioè c'è un massimo, che è la V_{max})



La [enzima] è molto + bassa della [substrato], di 5-6 ordini di grandezza. Quindi è la [E] che limita la V_{max} .

In queste condizioni l'E è completamente saturato dal S.

La cinetica è lo studio della velocità (delle reazioni)

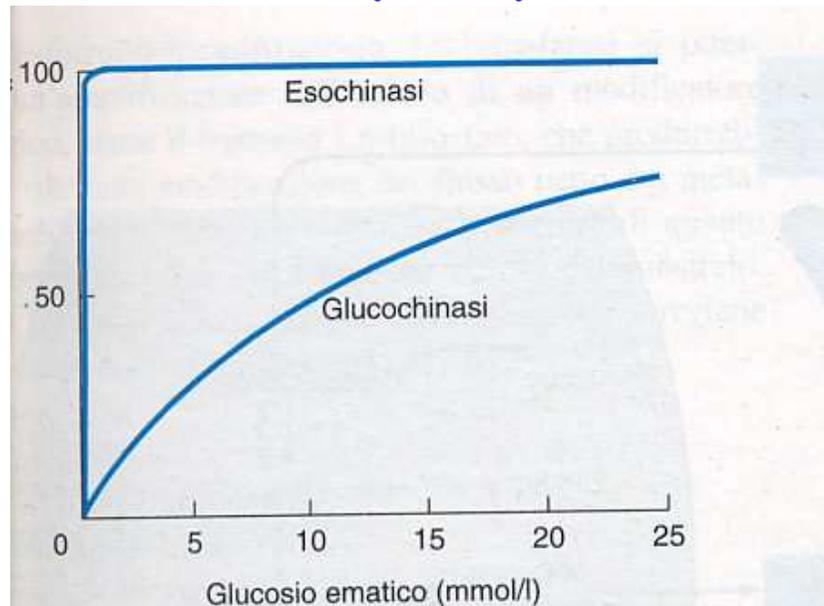
2 isoforme dello stesso enzima, catalizzante la fosforilazione del glucosio

ESOCHINASI K_m bassa (=0,05 mM) → affinità alta

Lavora sempre al max

GLUCOCHINASI K_m alta (=10 mM) → affinità bassa

Lavora solo dopo i pasti



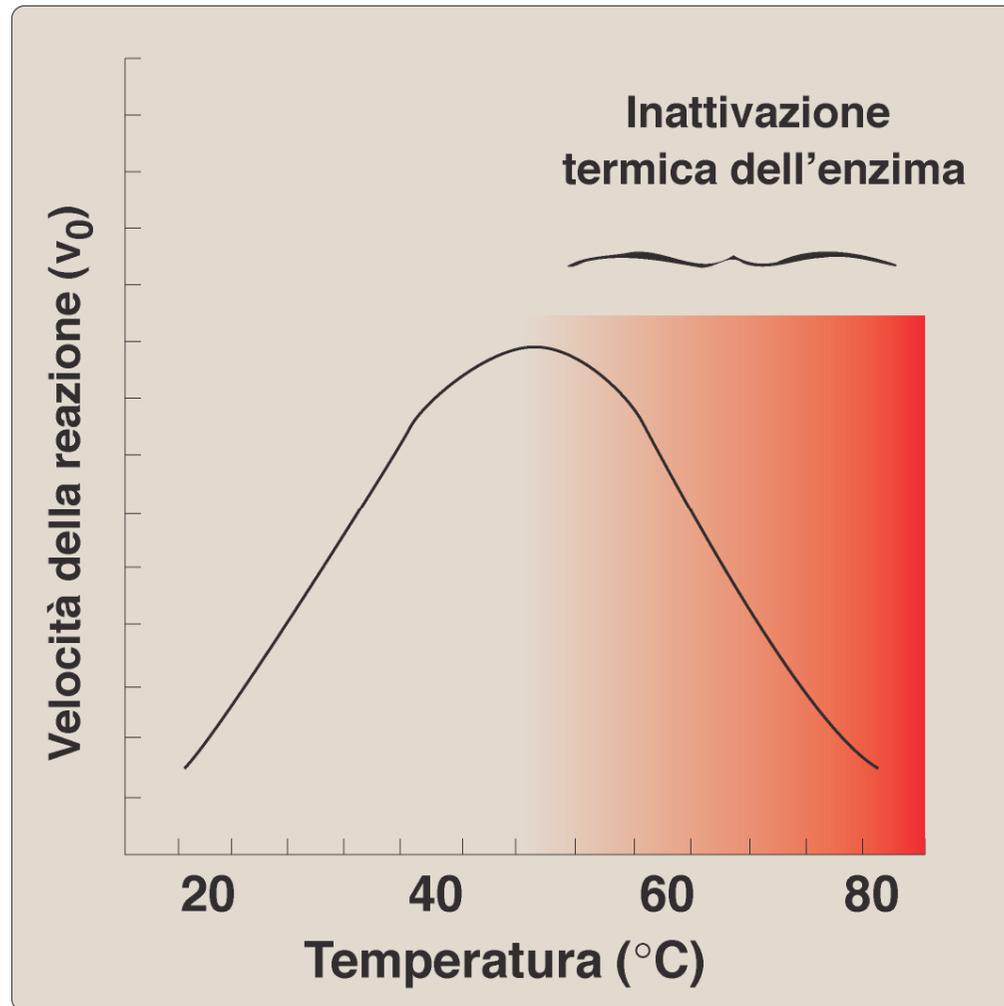
a 21.5 Variazioni della fosforilazione del glucosio, dente dall'attività dell'esochinasi e della glucochinasi
umento della glicemia. La K_m per il glucosio dell'esochinasi è 0,05 mmol/l, quella della glucochinasi è 10 mmol/l.

NORMALE GLICEMIA A DIGIUNO
3,9-6 mM

Modulazione dell'attività dell'enzima

- **pH**
- **Temperatura**
- **Inibizione reversibile ed irreversibile:**
 - **Competitiva**
 - **Non-competitiva**
- **Modificazioni allosteriche**
- **Modificazioni covalenti**

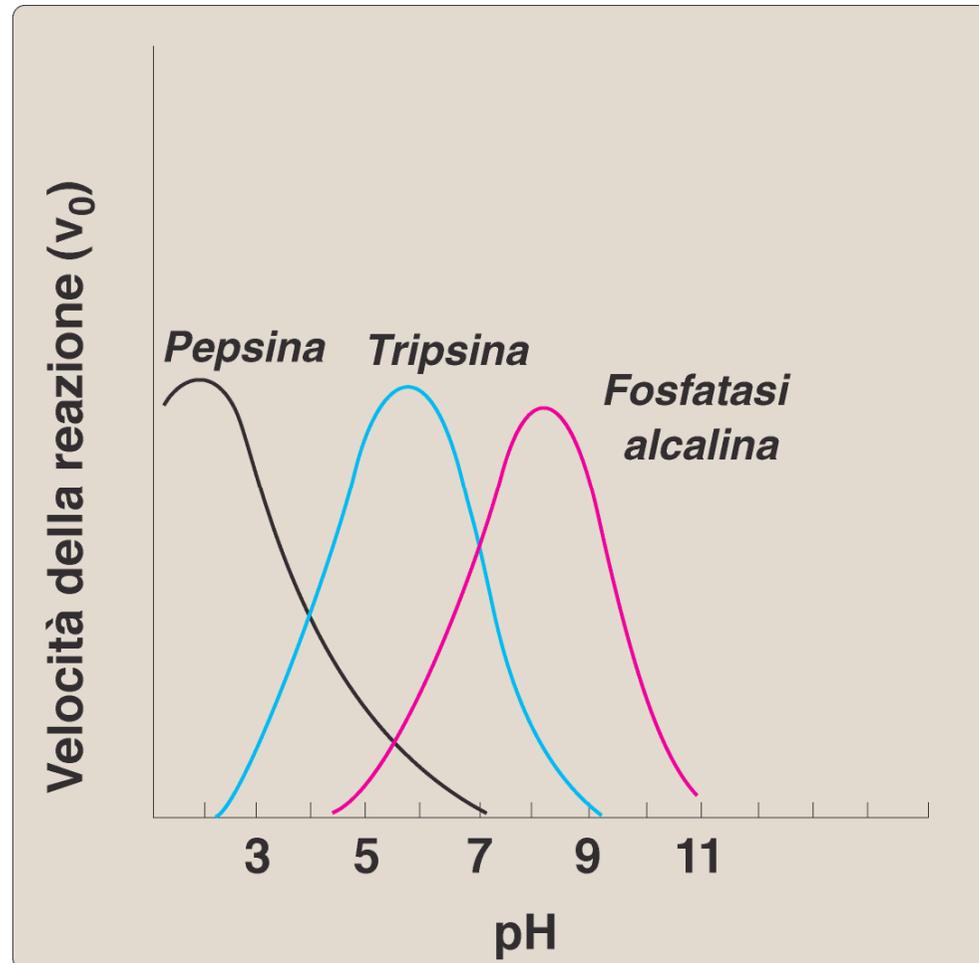
Temperatura e attività enzimatica



➤ Per ogni enzima esiste una temperatura ottimale

pH e attività enzimatica

Gli enzimi digestivi
lavorano bene a pH
acido



Inibizione enzimatica

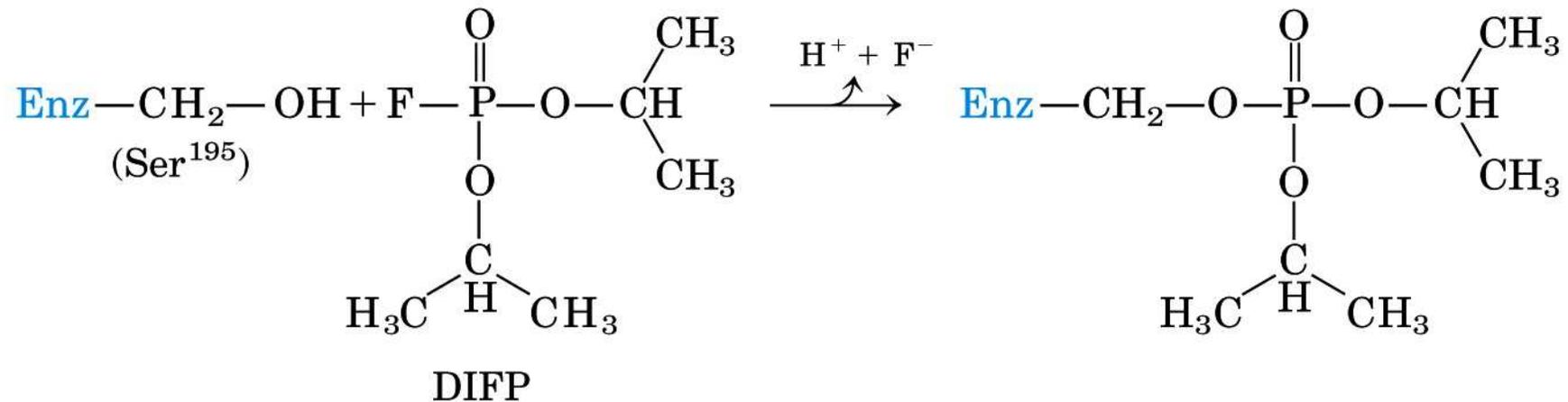
- **Reversibile**
 - **Competitiva**
 - **Non competitiva**

- **Irreversibile**

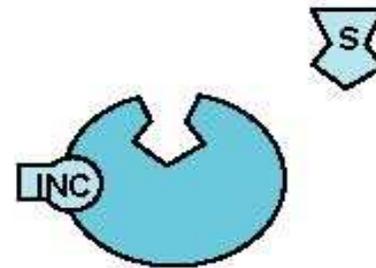
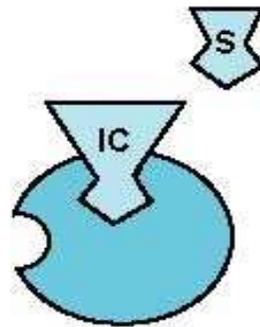
Esempi di **Inibitori irreversibili**

DIFP, esteri fosforici (Parathion), gas nervini (Sarin)

**inibiscono gli enzimi contenenti serina nel sito attivo
(acetilcolinesterasi)**



Inibizione competitiva e non-competitiva



Competitiva:
S e I si legano al sito attivo,
E_I è inattivo

Non-competitiva:
Quando E lega I, cambia la
conformazione e diventa
inattivo

Esempi di inibizione enzimatica competitiva

CH₃OH
Metanolo



CH₃-CH₂OH
Etanolo (è anche
l'antidoto)

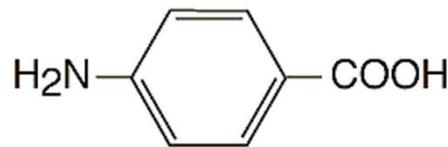


, compete con



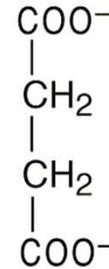
Sulfanilamide

Batteriostatico



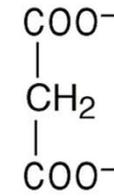
p-Aminobenzoic Acid

metabolita importante per la crescita batterica



Succinate

**Intermedio
metabolico**



Malonate



Inibitori come farmaci: i sulfamidici

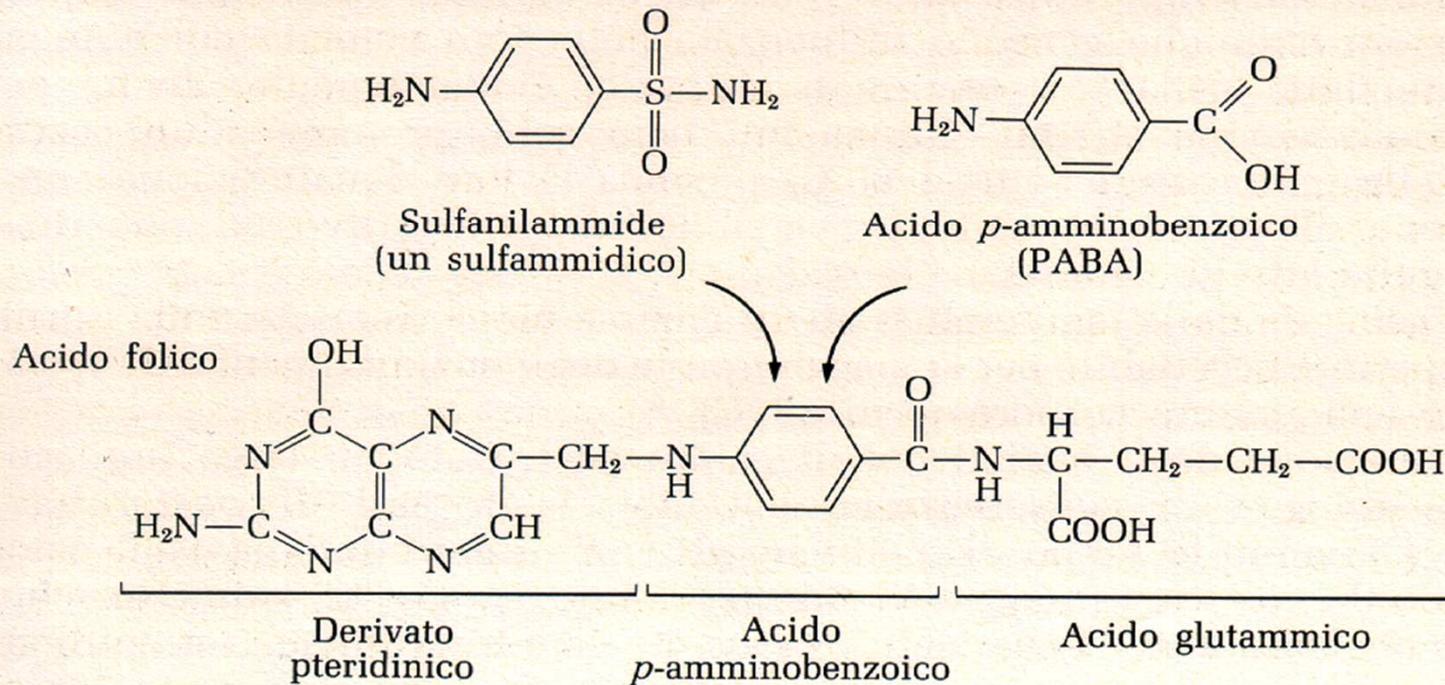
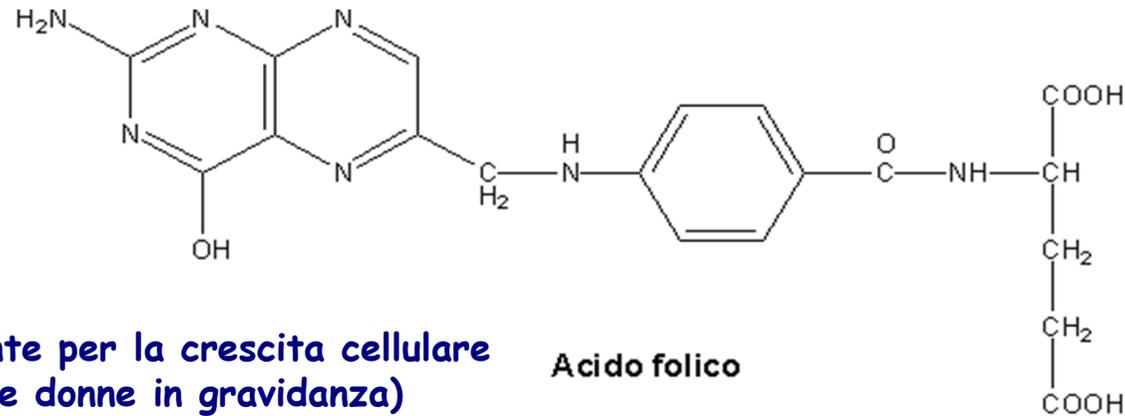


Figura 9. I sulfamidici sono farmaci che inibiscono competitivamente l'enzima che permette ai batteri di utilizzare l'acido *p*-amminobenzoico per formare l'acido folico, una molecola indispensabile alla loro crescita. La figura mette in evidenza la somiglianza strutturale del sulfamidico e dell'acido *p*-amminobenzoico.

Esempi di inibizione enzimatica competitiva

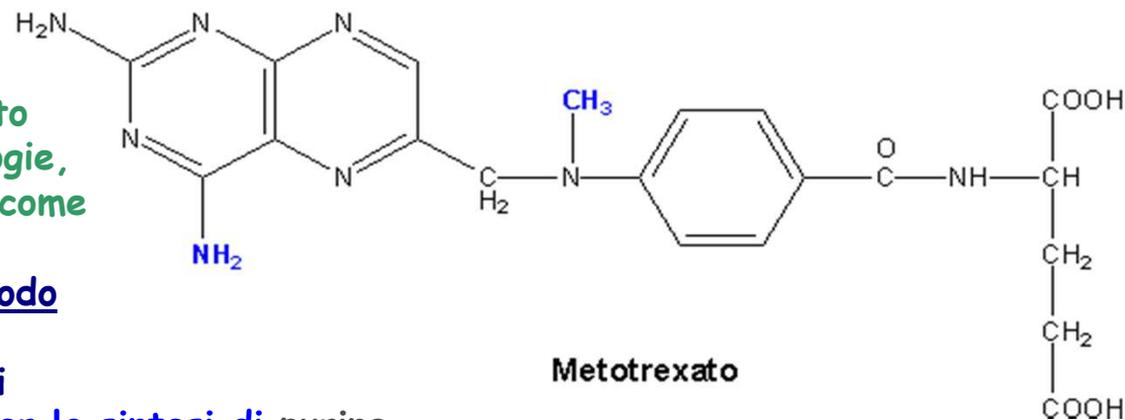
Metotrexato o antifolato, antileucemico che rallenta la biosintesi di purine e pirimidine



sviluppato come antitumorale ma usato anche in altre patologie, x es. infiammatorie come l'artrite reumatoide.

L'enzima inibito in modo competitivo è la didrofolato reduttasi

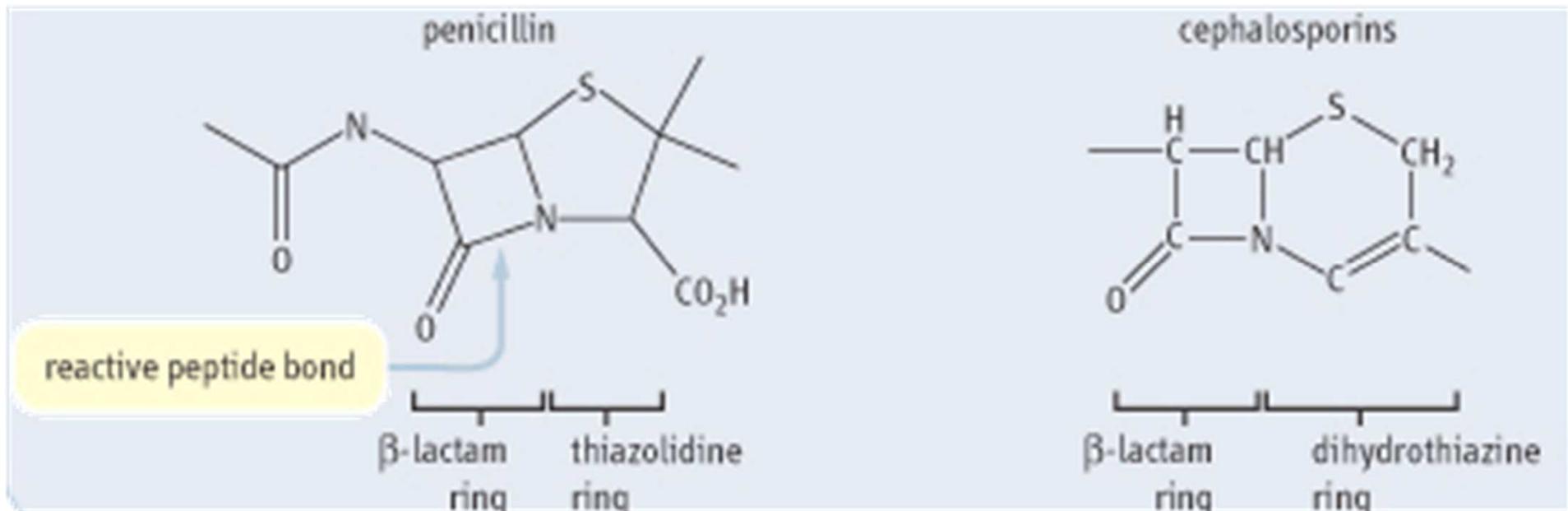
Enzima necessario per la sintesi di purine, pirimidine, timidina, metionina, target anche di altri farmaci



Esempi di inibizione enzimatica competitiva

Substrati suicidi o antimetaboliti, prevengono la reazione col substrato e/o disattivano l'enzima

Penicillina inibisce transpeptidasi che stabilizza le membrane batteriche



Altri

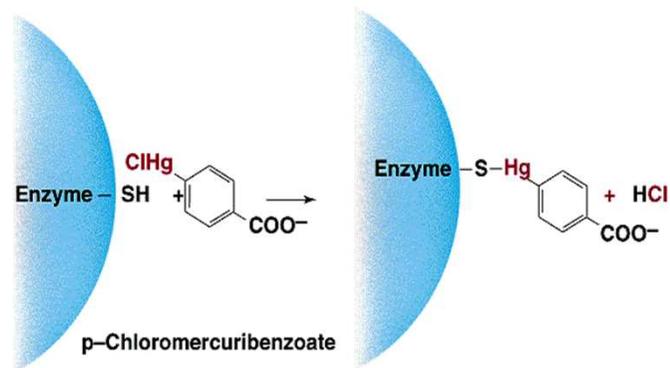
Farmaci come inibitori enzimatici clinicamente utili

Alcuni esempi:

- **Inibitori della Cyclooxygenase** come antiinfiammatori, particolarmente utili es nella terapia artrite (aspirina; ibuprofen)
- **Inibitori di HMG-CoA Reductase** per il trattamento della ipercolesterolemia (atorvastatin; pravastatin)
- **Inibitori dell' Angiotensin Converting Enzyme (ACE)** per il controllo della pressione arteriosa, terapia malattie cardiovascolari e dell'insufficienza renale cronica (captopril; ramipril)

Esempi di inibizione non-competitiva

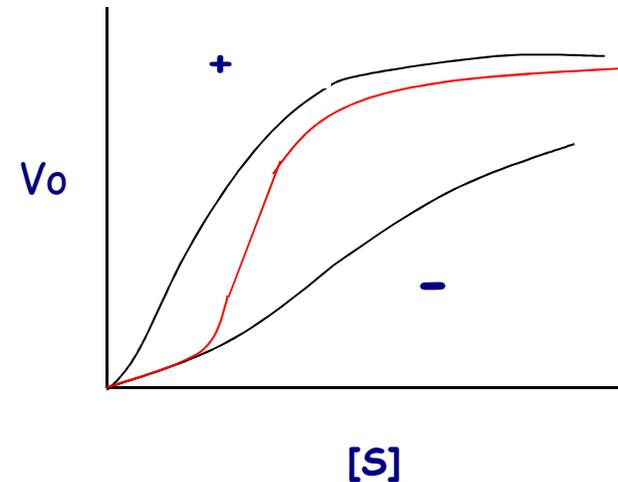
- Molti veleni e composti mercuriali (reagiscono con -SH dei residui di Cys)
- Cianuro, reagisce con gli ioni metallici degli enzimi della catena respiratoria



La > parte degli enzimi ha la tipica cinetica iperbolica di Michaelis

Alcuni però hanno una **cinetica sigmoideale** anziché iperbolica, un modulatore positivo

(+) può poi modificarla in iperbolica, abbassandone la K_m o a volte alzando la V_{max} mentre un modulatore negativo (-) può abbassare la curva, aumentando il valore della K_m o calando la V_{max} .



CINETICA SIGMOIDALE (curva **rossa** centrale)

in certi intervalli di $[S]$ curva + ripida, la V aumenta + rapidamente con piccoli aumenti della $[S]$, rispetto all'intervallo di $[S]$ precedente.

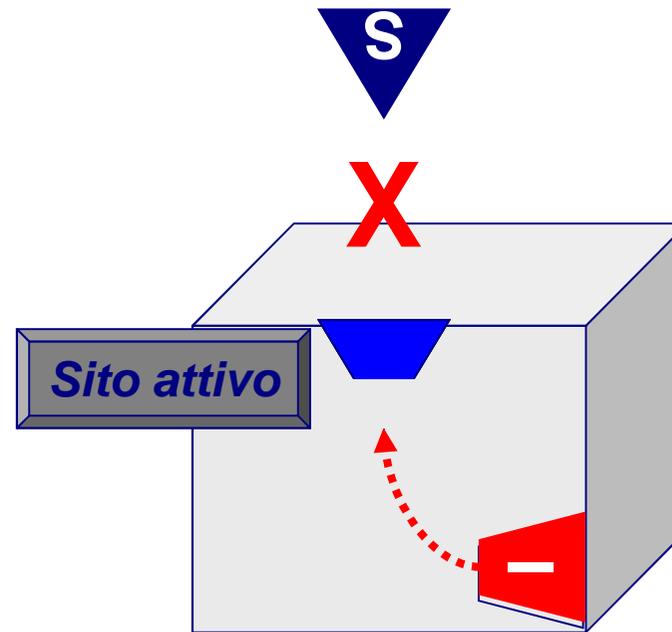
In questo caso IL LEGAME SI DICE

COOPERATIVO Questo tipo di enzimi appartiene alla classe degli **ENZIMI REGOLATORI**

Sono anche chiamati **ENZIMI ALLOSTERICI**, XCHÈ OLTRE AL SITO ATTIVO VI È UN **SITO REGOLATORE**. Il legame di un ligando a questo sito regolatore modifica le proprietà del sito attivo, x es. inducendo modifiche conformazionali.

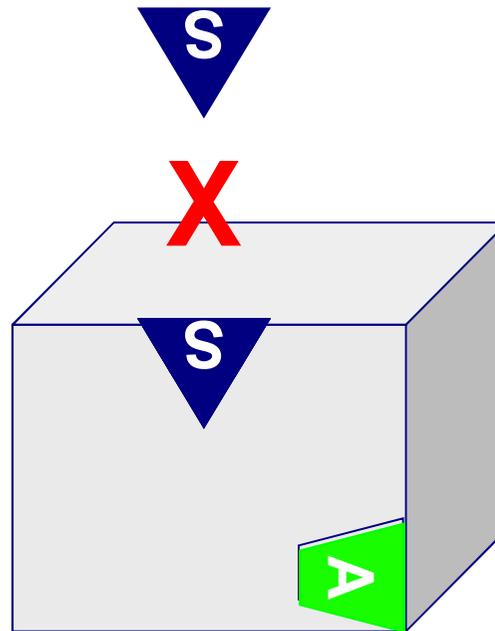
Modello di enzima allosterico: effetto negativo

Gli inibitori
a volte sono
regolatori
fisiologici



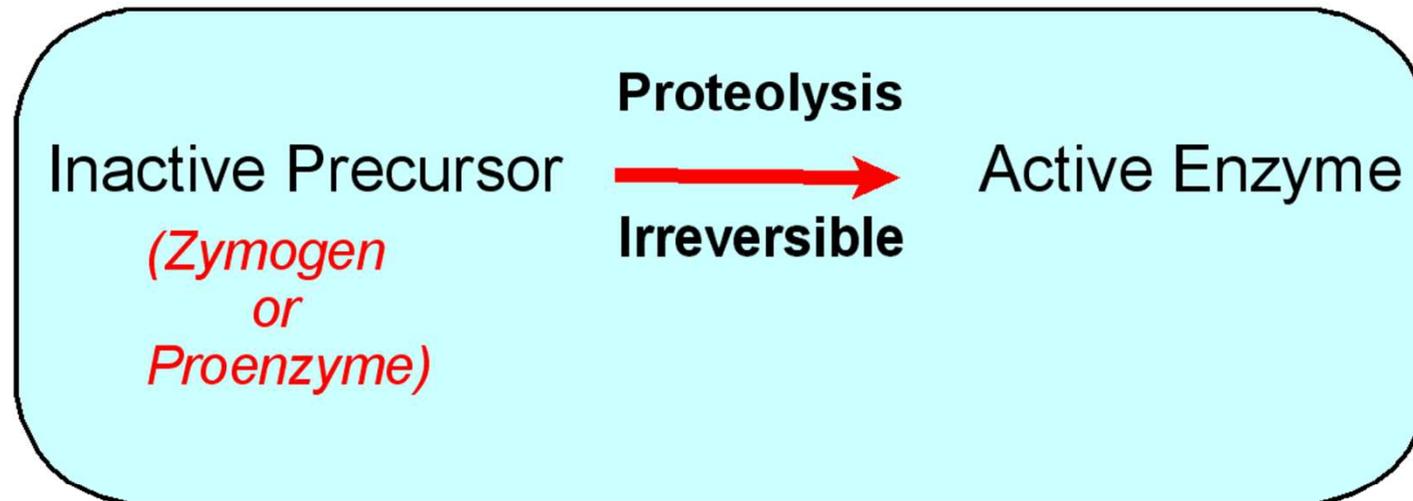
Modello di enzima allosterico: effetto positivo

a volte sono
invece
attivatori

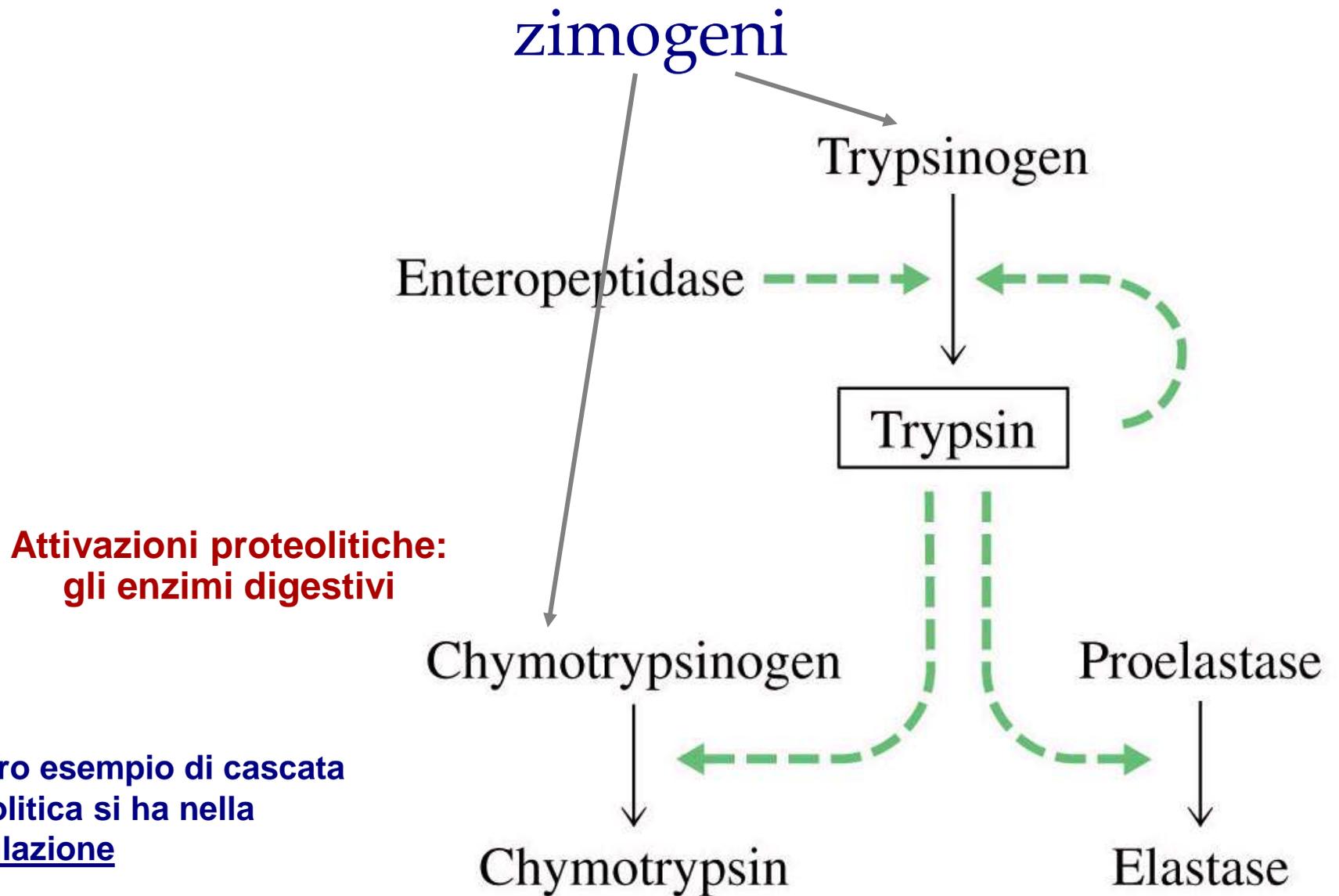


- **Modificazione covalente: taglio di un legame**

**Regolazione dell'attività enzimatica mediante proteolisi
Attivazione di zimogeni**



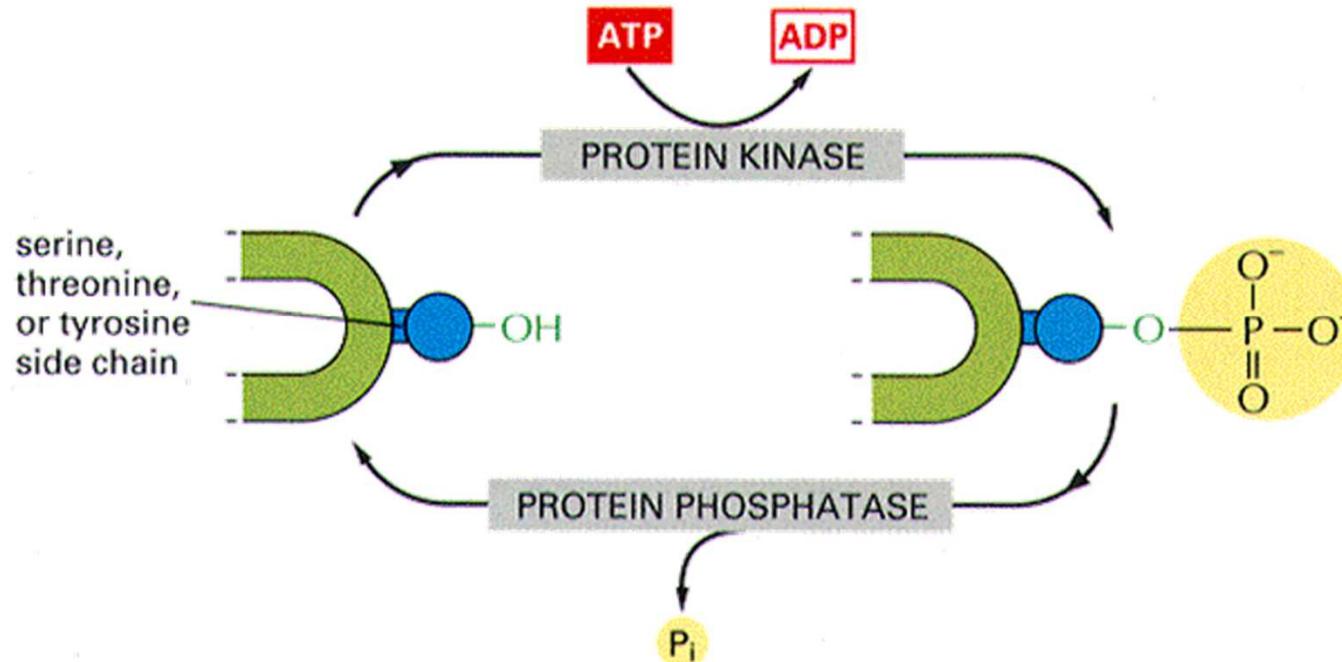
*Specific **proteolytic activation** mechanisms recur frequently in biological systems.*



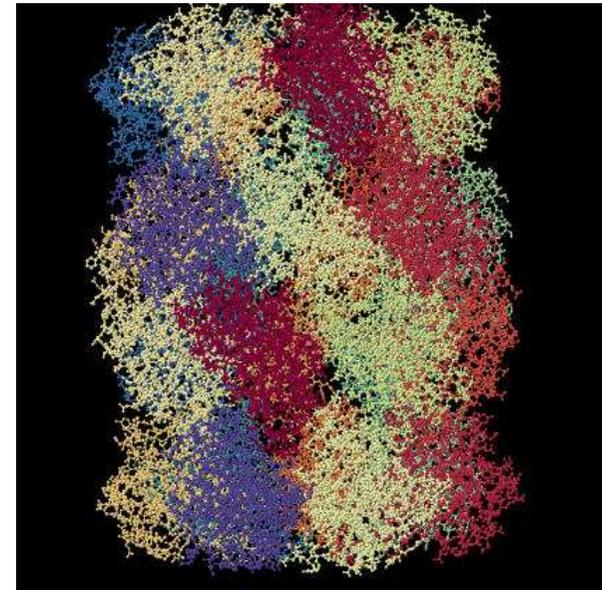
- **Regolazione dell'attività enzimatica: Modificazioni covalenti degli enzimi, formazione di un nuovo legame**

➤ La fosforilazione **AUMENTA** l'attività di alcuni enzimi

➤ La fosforilazione **DIMINUISCE** l'attività di altri enzimi



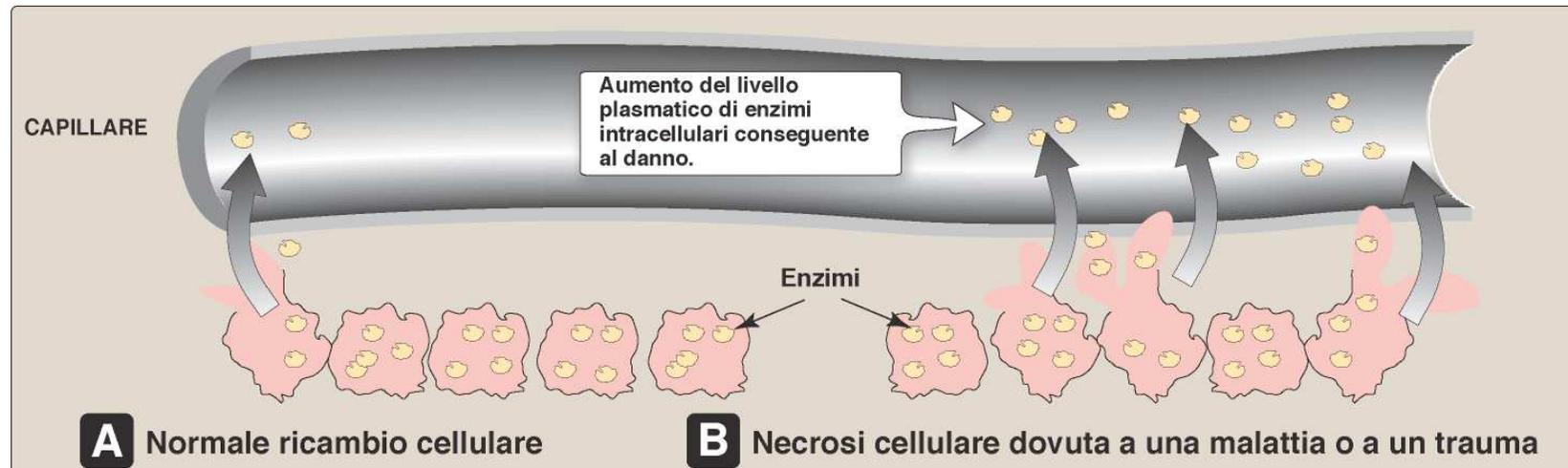
La fosforilazione è la regolazione covalente più comune
ma ve ne sono altre: acetilazioni, glicosilazioni,
attacco di lipidi o addirittura piccole proteine come
l'ubiquitina, che segnala che la proteina è da demolire
(all'interno del proteasoma,
grosso complesso proteico)



Enzimi del plasma

- Specifici del plasma, con un ruolo ben definito (es: enzimi della coagulazione)
- Specifici di un tessuto, si ritrovano nel plasma solo in seguito alla lesione di quel tessuto
- Significato della presenza di enzimi intracellulari nel plasma
 - Aumento del turnover cellulare —→ **anche nella crescita**
 - Proliferazione cellulare (neoplasia)
 - Aumento di sintesi enzimatica (induzione)
 - Ostruzione della secrezione
 - Diminuzione della eliminazione (clearance)

**IMPORTANZA
DIAGNOSTICA**



Infarto miocardico (MARCATORE PRINCIPALE è LA TROPONINA, proteina importante per la contrazione, per es. muscolare) ma anche enzimi come CK (creatina kinasi) e LDH (lattico deidrogenasi) possono essere importanti

