



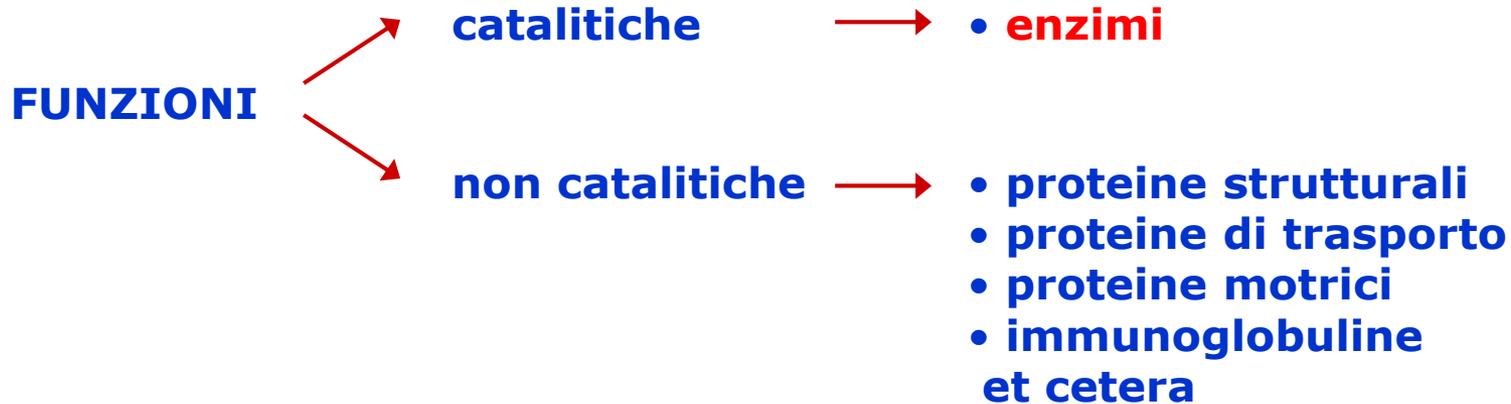
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

**Corso di "Biochimica con Laboratorio"
9 CFU**

LEZIONE 7

Prof. Paola Di Donato
Stanza 520, V piano lato NORD
Tel. 081 547 6625
E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

LE FUNZIONI DELLE PROTEINE

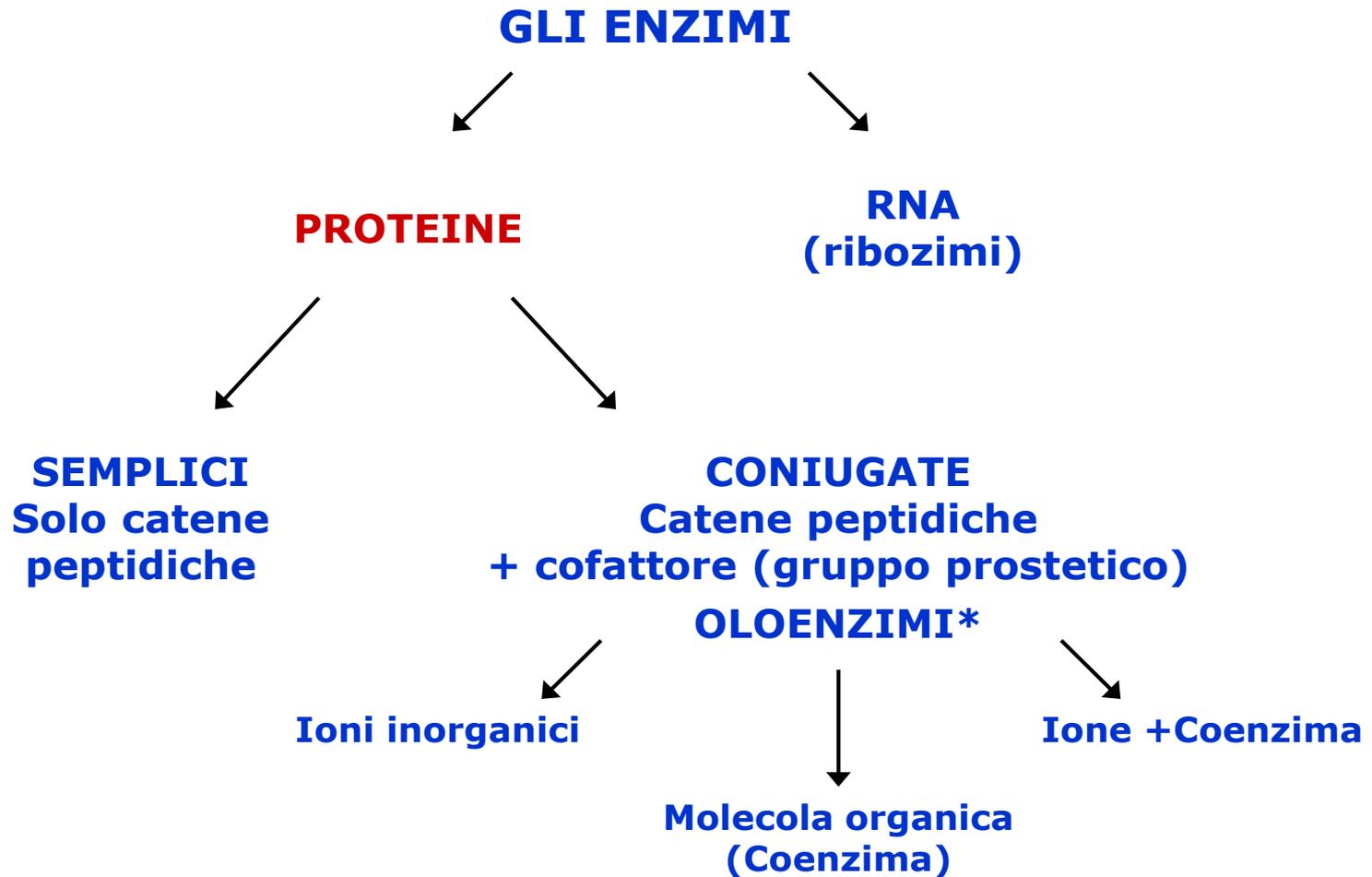


INTERAZIONI PROTEINA ⇔ MOLECOLA

- **Aspetto rilevante dei processi biochimici**
- **Regolate e coordinate dalla dinamica della struttura proteica**
- **Mediano le funzioni delle proteine**

GLI ENZIMI

- **Catalizzatori biologici: comprendono proteine (per la maggior parte) e molecole di RNA (piccoli gruppi)**
- **La loro attività catalitica dipende dalla conformazione nativa → dall'organizzazione strutturale della proteina**
- **Le reazioni biologiche sono catalizzate per avvenire a velocità compatibile con i tempi di vita della cellula**
- **L'eccesso o la diminuzione/mancanza di certe attività enzimatiche può causare condizioni anormali o patologiche**



* **OLOENZIMA: APOenzima + cofattore**

COFATTORI

IONE	Attività enzimatica
Cu²⁺	→
Citocromo ossidasi	
Fe²⁺ / Fe³⁺	→
Citocromo ossidasi, catalasi, perossidasi	
K⁺	→
Piruvato chinasi	
Mg²⁺	→
Esochinasi, glucosio-6-fosfatasi, piruvato chinasi	
Mn²⁺	→
Arginasi, ribonucleotide reduttasi	
Mo	→
Dinitrogenasi	
Ni²⁺	→
Ureasi	
Se	→
Glutazione reduttasi	
Zn²⁺	→
Anidrasi carbonica, alcol deidrogenasi, carbossipeptidasi	

COFATTORI

COENZIMI		Gruppi chimici trasferiti
Biotina	→	CO ₂
Coenzima A	→	Gruppi acilici
Coenzima B	→	Atomi di H, gruppi alchilici
Flavin adenin dinucleotide (FAD)	→	Elettroni
Acido lipoico	→	Elettroni e gruppi acilici
Nicotinamide adenin dinucleotide (NAD)	→	Ioni idruro (:H ⁻)
Piridossal fosfato	→	Gruppi amminici
Tiamina pirofosfato	→	Aldeidi

COENZIMI: trasportatori temporanei di atomi o gruppi chimici

CARATTERISTICHE DELLE PROTEINE COME CATALIZZATORI

- a. specificità** **Capacità di riconoscere un substrato tra migliaia di molecole a volte molto simili**
- b. efficienza** **Capacità di dare, a velocità molto maggiore della reazione non catalizzata, un solo prodotto**
- c. controllo** **L'attività degli enzimi può essere controllata, modulata (modulabilità degli enzimi)**
- d. versatilità** **Tutti i tipi di reazione del metabolismo sono catalizzati dall'apposito enzima**

CLASSIFICAZIONE DEGLI ENZIMI SULLA BASE DELLA REAZIONE CATALIZZATA

- 1. Ossidoreduttasi** **Trasferimento di elettroni (ioni idruro H^- , atomi di idrogeno)**
- 2. Trasferasi** **Trasferimento di gruppi funzionali da molecole che fungono da donatore ad altre che fungono da accettore**
- 3. Idrolasi** **Idrolisi: aggiunta di acqua ad un legame con contestuale rottura**
- 4. Liasi** **Addizione di gruppi a legami doppi o formazione di legami doppi per rimozione di gruppi (rottura di legami C-C, C-O, C-N ed altri con modalità differenti dall'idrolisi o ossidazione)**
- 5. Isomerasi** **Isomerizzazione cis-trans, cheto-enolica, aldoso-chetoso (isomerasi). Epimerizzazione (epimerasi e racemasi).**
- 6. Ligasi** **Formazione di legami C-C, C-S, C-O, C-N mediante condensazione accoppiata alla scissione di ATP**

CLASSIFICAZIONE DEGLI ENZIMI SULLA BASE DELLA REAZIONE CATALIZZATA

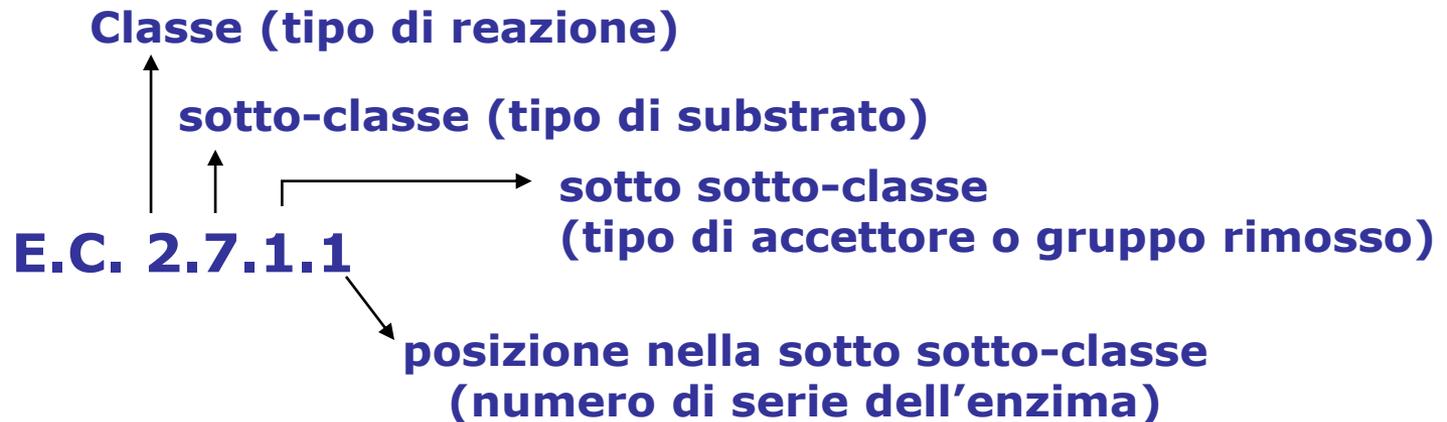
Numero di E.C. (*Enzyme Commission number*)



Nome formale: ATP glucosio fosfotrasferasi

Nome corrente: esochinasi

Numero di E.C. 2.7.1.1



2 → trasferasi

7 → fosfotrasferasi

1 → OH gruppo accettore

1 → D-glucosio come accettore

INTERAZIONI PROTEINA ⇔ MOLECOLA

- Aspetto rilevante dei processi biochimici
- Regolate e coordinate dalla dinamica della struttura proteica
- Mediano le funzioni delle proteine

MOLECOLA → **ligando**, si lega reversibilmente e specificamente alla

PROTEINA → su sito specifico detto **sito di legame**, complementare al ligando in virtù della sua forma, carica, carattere idrofilo/idrofobo

INTERAZIONI ENZIMA ⇔ SUBSTRATO

Nel caso degli **ENZIMI**

ligando → **substrato**

sito di legame → **sito catalitico** o **sito attivo**, sito specifico dell'enzima atto alla catalisi

INTERAZIONI ENZIMA ⇔ SUBSTRATO

substrato: molecola che subisce la trasformazione catalizzata dall'enzima, viene sottratto all'ambiente di reazione

sito catalitico o sito attivo:

- tasca dell'enzima all'interno della quale avviene la trasformazione del substrato in prodotto
- dalla superficie della tasca sporgono i gruppi funzionali dei residui amminoacidici che costituiscono il sito attivo e che partecipano al processo di catalisi
- spesso il sito ingloba il substrato per formare un complesso enzima-substrato (**ES**)
- **la formazione di ES è l'evento essenziale per la catalisi enzimatica**

ENZIMA: CATALIZZATORE BIOLOGICO

la formazione di ES garantisce



Specificità
Potere Catalitico

Dipendono dalle interazioni $E \leftrightarrow S$
ovvero dalla formazione del
complesso enzima-substrato (**ES**)

La reazione catalizzata dall'enzima avviene all'interno del sito attivo nel quale si lega il substrato

Il legame enzima-substrato si instaura sulla base di:

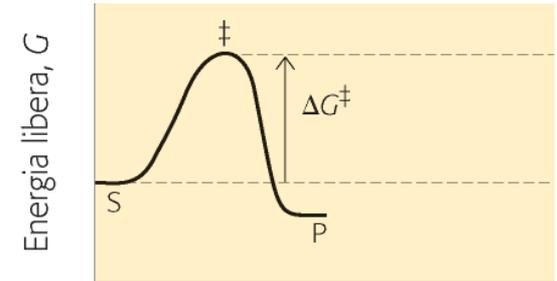
- caratteristiche geometriche, ovvero struttura tridimensionale del sito attivo e del substrato
- interazioni tra substrato e sito che comprendono sia interazioni deboli che formazione di legami covalenti

MODELLI PER L'INTERAZIONI ENZIMA \leftrightarrow SUBSTRATO

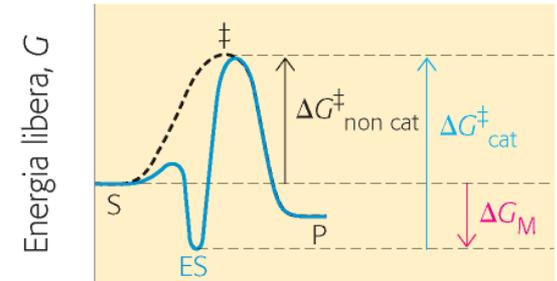
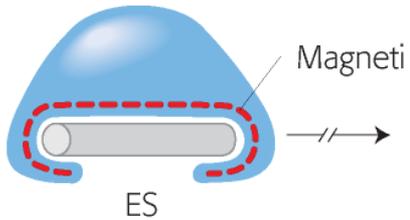
Specificità
Potere Catalitico

Dipendono dalle interazioni E \leftrightarrow S
ovvero dalla formazione di **ES**

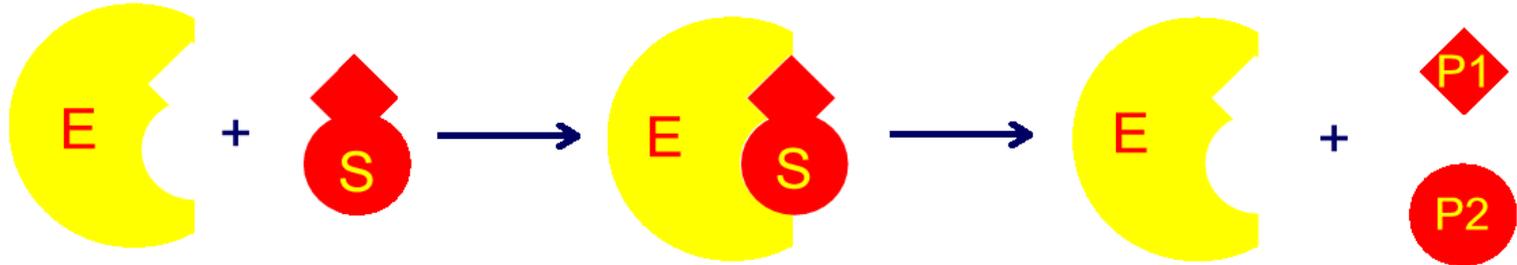
(a) Senza enzima



(b) Complementarità tra enzima e substrato



MODELLI PER L'INTERAZIONI ENZIMA ⇔ SUBSTRATO



“modello della serratura e della chiave”

(complementarità tra enzima e substrato)

Nel 1894 Fischer propose la sua "ipotesi della serratura e della chiave" (*lock and key hypothesis*) implicante una complementarità tra substrato ed enzima legata a rigide conformazioni molecolari: secondo tale modello il riconoscimento avviene principalmente su base geometrica.

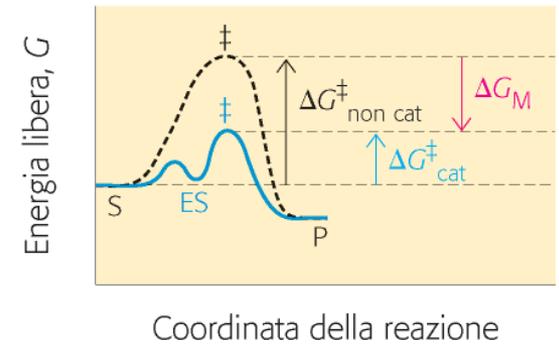
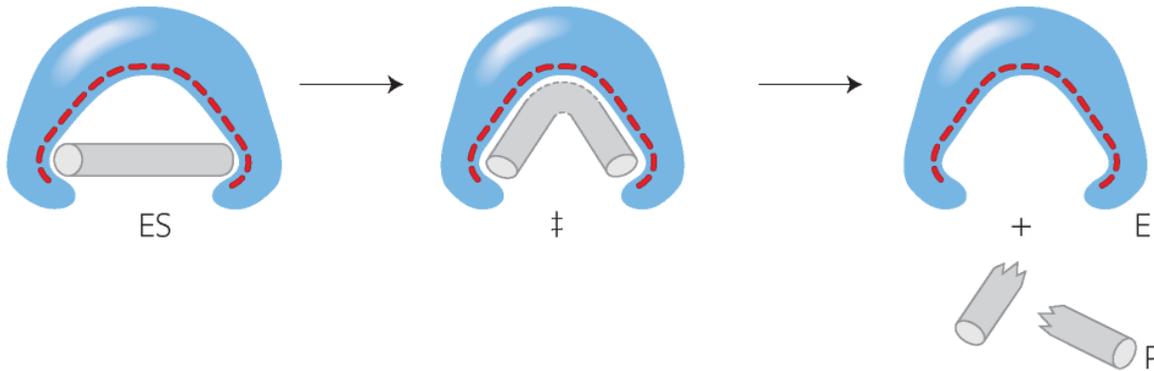
Sebbene valido per molti enzimi, esso non spiega come composti chimicamente molto simili al substrato ma che posseggono gruppi meno voluminosi spesso non reagiscono con l'enzima, sebbene dovrebbero facilmente adattarsi allo stampo rappresentato dal sito attivo.

MODELLI PER L'INTERAZIONI ENZIMA \leftrightarrow SUBSTRATO

Specificità
Potere Catalitico

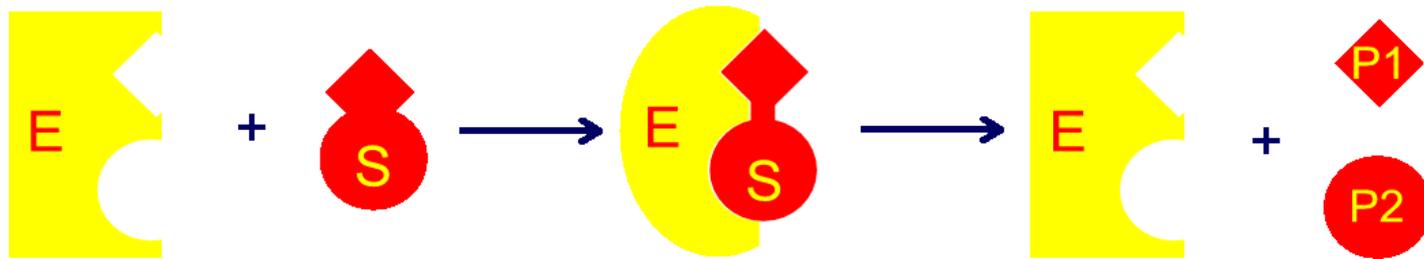
Dipendono dalle interazioni E \leftrightarrow S
ovvero dalla formazione di **ES**

(c) Complementarità tra enzima e stato di transizione



MODELLI PER L'INTERAZIONI ENZIMA ⇔ SUBSTRATO

Nel 1958 Koshland dedusse che il legame del substrato all'enzima induce una variazione conformazionale in quest'ultimo che in tal modo raggiunge la sua conformazione attiva e propose la "ipotesi dell'adattamento indotto" (induced fit).



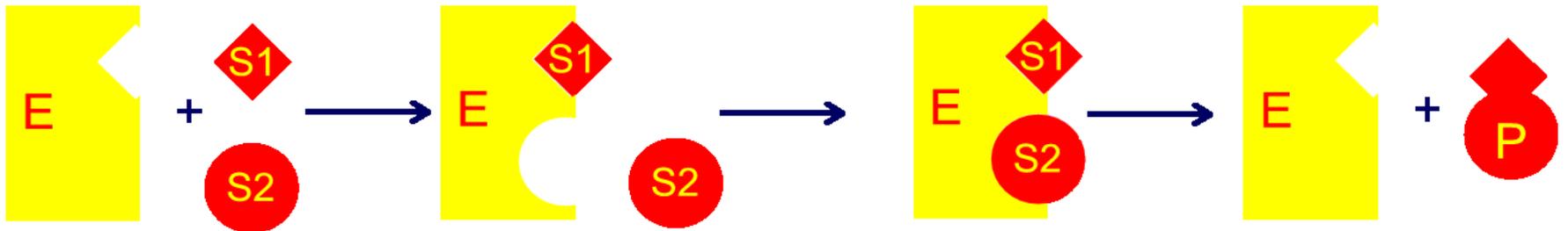
“modello dell'adattamento indotto”
enzima e substrato si modificano a vicenda

(complementarità tra enzima e stato di transizione)

A differenza di molecole chimicamente simili, soltanto la struttura del vero substrato è in grado di far funzionare l'enzima in maniera completa, in quanto in grado di orientare i gruppi catalitici dell'enzima nella corretta posizione nei confronti dei gruppi reagenti del substrato all'interno del sito attivo.

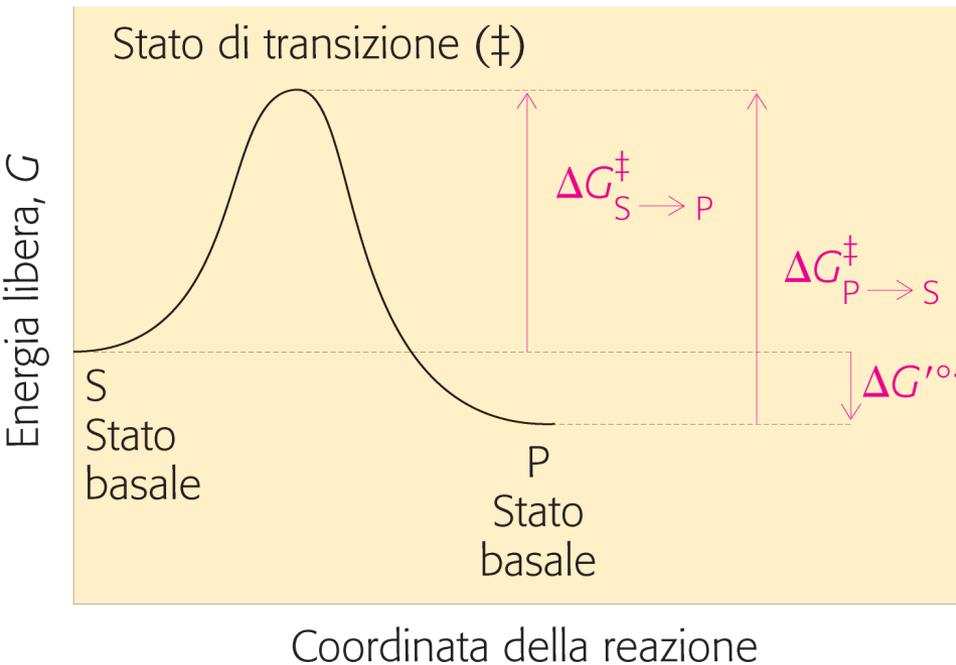
MODELLI PER L'INTERAZIONI ENZIMA ⇔ SUBSTRATO

“modello dell'adattamento indotto”
enzima e substrato si modificano a vicenda



reazioni a due substrati: solo il cambiamento conformazionale indotto nell'enzima dal legame con il primo substrato permette al secondo substrato di legarsi.

L'ENZIMA MODIFICA LA VELOCITA' DELLA REAZIONE



$$\Delta G'^{\circ} = G'_P - G'_S$$

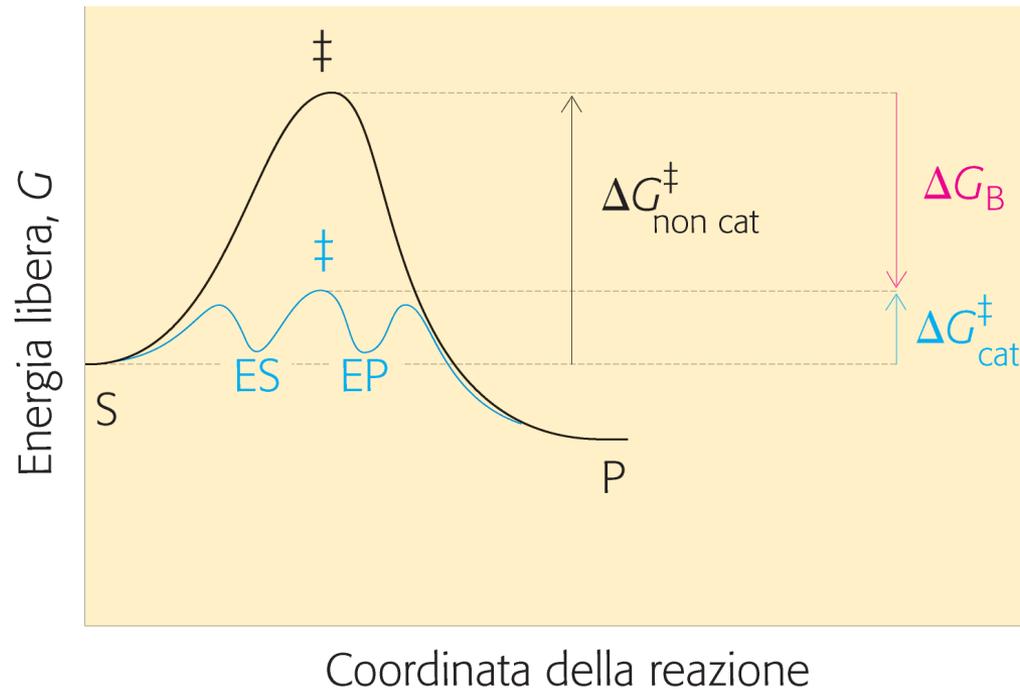
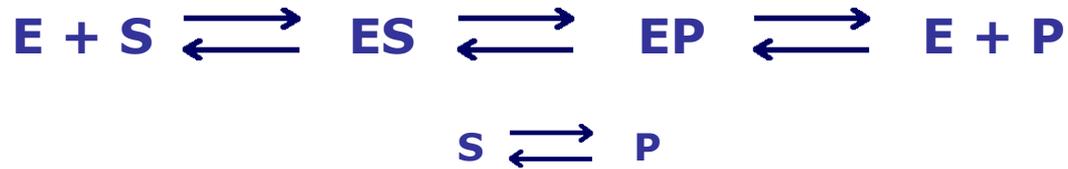
G' = energia libera, funzione che descrive le variazioni energetiche che avvengono durante la reazione

$\Delta G'^{\circ} < 0$, l'equilibrio è favorevole alla formazione dei prodotti

$\Delta G^{\ddagger}_{S \rightarrow P}$ energia di attivazione per la formazione del prodotto

$\Delta G^{\ddagger}_{P \rightarrow S}$ energia di attivazione per la reazione inversa alla formazione del prodotto

L'ENZIMA MODIFICA LA VELOCITA' DELLA REAZIONE



L'enzima stabilizza lo stato di transizione, rispetto a quello relativo alla reazione non catalizzata, abbassandone il livello energetico

L'enzima stabilizza lo stato di transizione, rispetto a quello relativo alla reazione non catalizzata, abbassandone il livello energetico

mediante

- reazioni chimiche tra residui AA o cofattori presenti nel sito attivo: formazione di legami covalenti, trasferimento di gruppi chimici, equilibri che generano una via di reazione alternativa più veloce**
 - interazioni non covalenti tra substrato e sito: sono responsabili del riconoscimento enzima-substrato, sono pienamente complementari al substrato solo nello stato di transizione**
- ΔG_B energia libera di legame enzima-substrato: energia guadagnata dal sistema nel momento in cui si instaurano le interazioni, determina anche la specificità del riconoscimento**

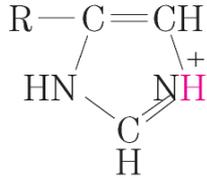
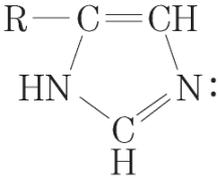
L'ENZIMA MODIFICA LA VELOCITA' DELLA REAZIONE

mediante reazioni chimiche tra residui AA o cofattori presenti nel sito attivo:

•Catalisi acido-base generale

•Catalisi covalente

•Catalisi da ioni metallici

Residui amminoacidici	Forma acida generale (donatore di protoni)	Forma basica generale (accettore di protoni)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}(H)_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His		
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr		

LA VELOCITA' DELLA REAZIONE DIPENDE DALLA CONCENTRAZIONE DEL SUBSTRATO

Equazione di Michaelis-Menten

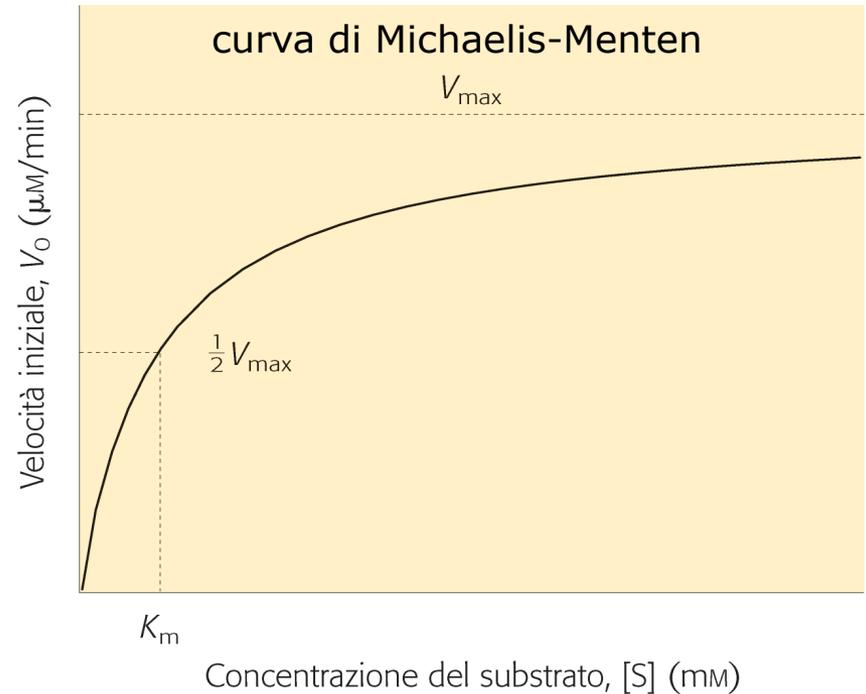
$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

equazione della velocità di una reazione catalizzata da un enzima

V_o = velocità iniziale della reazione misurata in un intervallo di tempo breve

V_{\max} = velocità massima della reazione

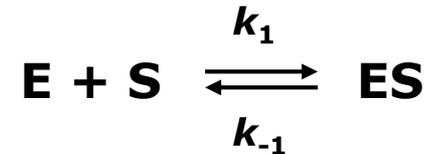
K_m = costante di Michaelis



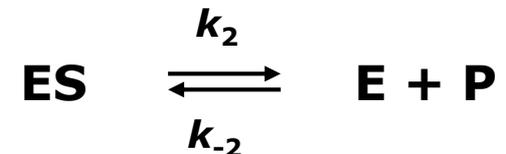
Equazione di Michaelis-Menten – Cinetica dello stato stazionario



La tappa necessaria per iniziare la catalisi è rappresentata dalla formazione di **ES**



La seconda tappa è rappresentata dalla scissione di **ES** (tappa lenta)



1° assunzione: all'inizio la formazione di **P** è trascurabile, dunque lo è anche la reazione che rigenera **ES** ovvero considero K_{-2} trascurabile

Dunque la velocità del processo sarà:

$$V_o = k_2 [\text{ES}]$$

ma **[ES]** non è facilmente misurabile!!

Equazione di Michaelis-Menten – Cinetica dello stato stazionario

ma [ES] non è facilmente misurabile!!

2° assunzione: la V_0 riflette uno stato stazionario in cui [ES] è costante (assunzione dello stato stazionario) e quindi $V_f = V_s$:



Velocità di formazione di **ES** $V_f = k_1 [E][S]$

Velocità di scissione di **ES** $V_s = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$

Esprimendo [E] (enzima libero, non complessato) come

$$[E] = [E_t] - [ES]$$

Esprimendo [E] (enzima libero, non complessato) come

$$[E] = [E_t] - [ES]$$

•L'espressione di V_f diventa:

Velocità di formazione di **ES** $V_f = k_1 [E][S] \longrightarrow V_f = k_1 ([E_t] - [ES]) [S]$

•L'espressione di V_s resta invariata:

Velocità di scissione di **ES** $V_s = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$

•2° assunzione: allo stato stazionario [ES] è costante e quindi $V_f = V_s$:

$$k_1 ([E_t] - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

V_f

V_s

E quindi eguagliando V_f e V_s si ottiene:

$$k_1 ([E_t] - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

Svolgendo il prodotto dei termini a sinistra dell'uguaglianza:

$$k_1 [E_t][S] - k_1 [ES][S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

Risolviendo l'espressione per [ES]

$$k_1 [E_t][S] = k_1 [ES][S] + (k_{-1} + k_2) [ES]$$

Mettendo in evidenza [ES] nel termine a destra dell'uguaglianza

$$k_1 [E_t][S] = (k_1 [S] + k_{-1} + k_2) [ES]$$

Equazione di Michaelis-Menten – Cinetica dello stato stazionario

$$k_1 [E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2) [ES]$$

Risolviendo per [ES]

$$[ES] = \frac{k_1 [E_t][S]}{(k_1[S] + k_{-1} + k_2)}$$

Dividendo per k_1

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1}$$

Costante di Michaelis

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

↓
indipendente dalle concentrazioni di enzima e di substrato

Quindi

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]} \quad \text{ma} \quad V_o = k_2 [ES]$$

Equazione di Michaelis-Menten – Cinetica dello stato stazionario

Quindi: $[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]}$ ma $V_o = k_2 [ES]$

L'espressione di V_o come funzione di $[ES]$ quindi sarà

$$V_o = \frac{k_2 [E_t][S]}{K_M + [S]} \quad k_2 [E_t] = V_{MAX}$$
$$[E_t] = [ES]_{MAX}$$

Quando tutto l'enzima è saturato ovvero quando tutti i siti catalitici sono occupati la velocità della reazione raggiunge il valore massimo: in questa condizione si verifica che $[ES] = [E_t]$ e quindi

$$V_{MAX} = k_2 [E_t]$$



$$V_o = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

- dipende dalla concentrazione totale di enzima
- si raggiunge quando tutti i siti catalitici disponibili sono saturati da S

Equazione di Michaelis-Menten – Cinetica dello stato stazionario

Equazione di Michaelis-Menten

$$V_o = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

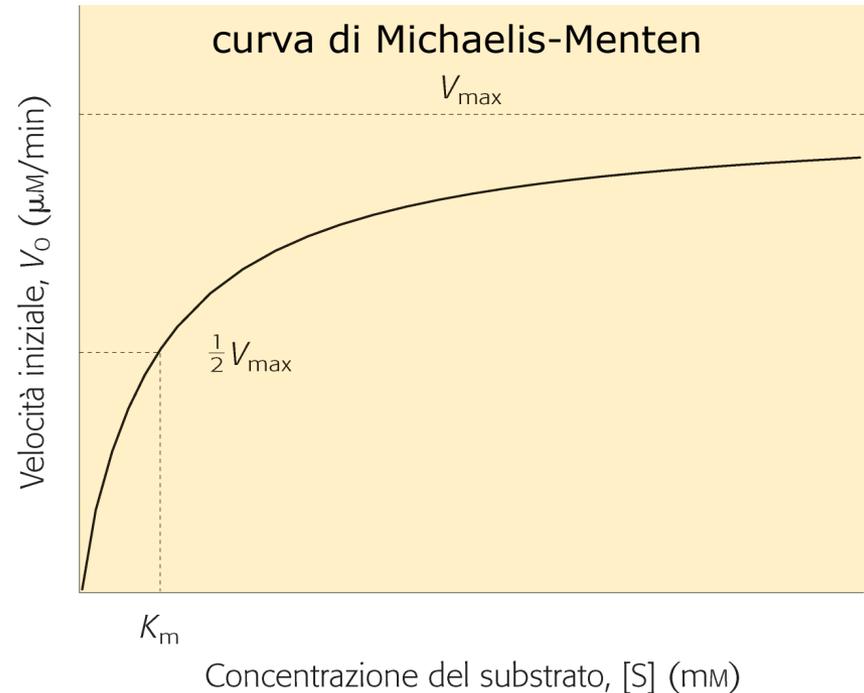
equazione della velocità di una reazione catalizzata da un enzima

V_o = velocità iniziale della reazione misurata in un intervallo di tempo breve

V_{max} = velocità massima della reazione

K_m = costante di Michaelis

- $[S]$ a cui la velocità è pari alla metà di V_{max}
- concentrazione minima affinché l'enzima riconosca il substrato (misura dell'affinità del substrato per l'enzima)



LA VELOCITA' DELLA REAZIONE DIPENDE DALLA CONCENTRAZIONE DEL SUBSTRATO

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

- [S] molto bassa $K_m \gg [S]$

la velocità varia linearmente con [S]
(condizione che si riscontra in ambiente fisiologico)

- [S] molto alta $K_m \ll [S]$

la velocità è indipendente da [S] ed è pari al valore massimo che può raggiungere (condizioni saturanti di substrato, anche aumentando [S] la velocità della reazione non varia)

