

## **Proteine specializzate: gli ENZIMI**

**Sono macromolecole deputate alla catalisi delle reazioni biologiche. Rimangono inalterati alla fine della reazione.**

**Si differenziano dai catalizzatori utilizzati nelle reazioni chimiche per le seguenti proprietà.**

- **Molto più efficaci**
  - ★ **Aumentano la velocità di una reazione di alcuni ordini di grandezza in più rispetto alla catalisi chimica**
- **Condizioni di reazione molto più moderate**
  - ★  **$T_{\max} < 100^{\circ} \text{ C}$ ;     $\text{pH} \sim \text{neutro}$ ;    Pressione atmosferica**
- **Specificità della reazione**
- **Possibilità di regolazione della loro attività**

## Gli ENZIMI: nomenclatura

- Nella nomenclatura comune si aggiunge il suffisso “-asi” alla reazione catalizzata o al composto su cui agisce (proteasi, lipasi, ATPasi, DNA polimerasi, ecc.)
- Oppure, il nome è stato assegnato dai loro scopritori e ricorda la loro funzione, ad es. la pepsina, dal greco *pepsis*, “digestione”.
- Oppure il nome deriva dalla loro origine, ad es. tripsina dal greco *tryein*, “consumare” perché ottenuta sfregando il tessuto pancreatico con glicerina.
- Qualche volta lo stesso enzima ha due o più nomi, oppure due enzimi diversi hanno lo stesso nome

# ENZIMI: Classificazione (1)

Visto il numero elevato di enzimi conosciuti, il loro nome viene identificato in tre modi diversi.



1. Nome tradizionale: breve per l'uso comune (ambiguo)

*Creatina chinasi*

2. Nome sistematico: identifica la reazione (più specifico)

*ATP: creatina fosfotransferasi*

3. Numero di identificazione: identificazione univoca

**EC 2.7.3.2**

## ENZIMI: Classificazione (2)

**Nel numero di classificazione, il termine di riferimento è il meccanismo della reazione catalizzata.**

**Sono state identificate sei classi di reazioni principali indicate con numeri arabi.**

- 1. Ossidoriduttasi:** reazioni redox (trasferimento di elettroni sotto forma di ioni idruro o atomi di H)
- 2. Transferasi:** trasferimento di gruppi funzionali
- 3. Idrolasi:** reazioni di idrolisi
- 4. Liasi:** eliminazione di gruppi (doppi legami)
- 5. Isomerasi:** isomerizzazioni
- 6. Ligasi:** formazione di legami con idrolisi di ATP

## ENZIMI: Classificazione (3)

Vengono quindi identificate delle sottoclassi e delle sotto-sottoclassi con lo stesso criterio. Infine, si aggiunge un numero che identifica lo specifico enzima



### Creatina chinasi (EC 2.7.3.2)

**EC: Commissione Internazionale per gli enzimi**

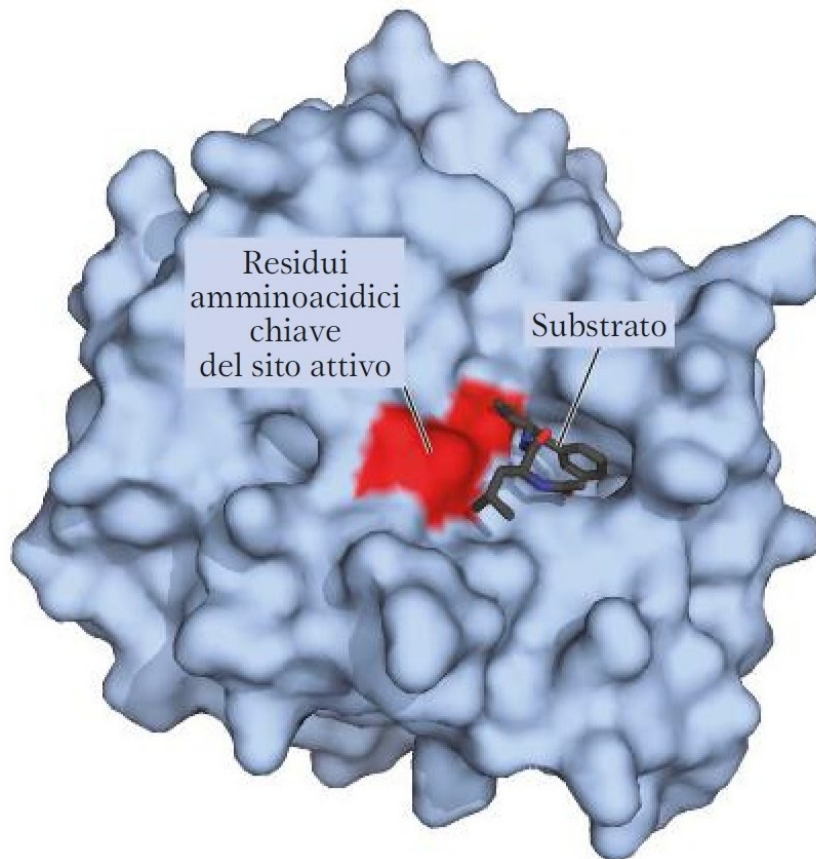
**2. Transferasi**

**7. Sottoclasse: fosfotransferasi**

**3. Sotto-sottoclasse: accettore gruppo azotato**

**2. Creatina chinasi**

# ENZIMI: specificità



**Figura 6.1** Legame di un substrato al sito attivo di un enzima. L'enzima mostrato è la chimotripsina, col substrato legato. Alcuni residui importanti nel sito attivo sono indicati dalla macchia rossa sulla superficie dell'enzima. [Fonte: PDB ID 7GCH, K. Brady et al., *Biochemistry* 29:7600, 1990.]

*Nelson & Cox "Introduzione alla biochimica" VI Ed*

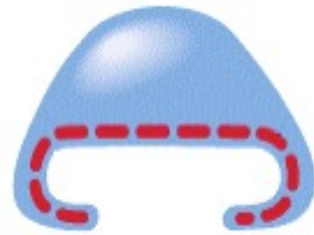
La molecola su cui agisce l'enzima, viene definita **substrato** per sottolineare la sua specificità, cioè la capacità di interagire con un solo tipo di molecola o con una classe molto ristretta di esse.

La porzione dell'enzima che interagisce con il substrato è detta: **sito catalitico o sito attivo.**

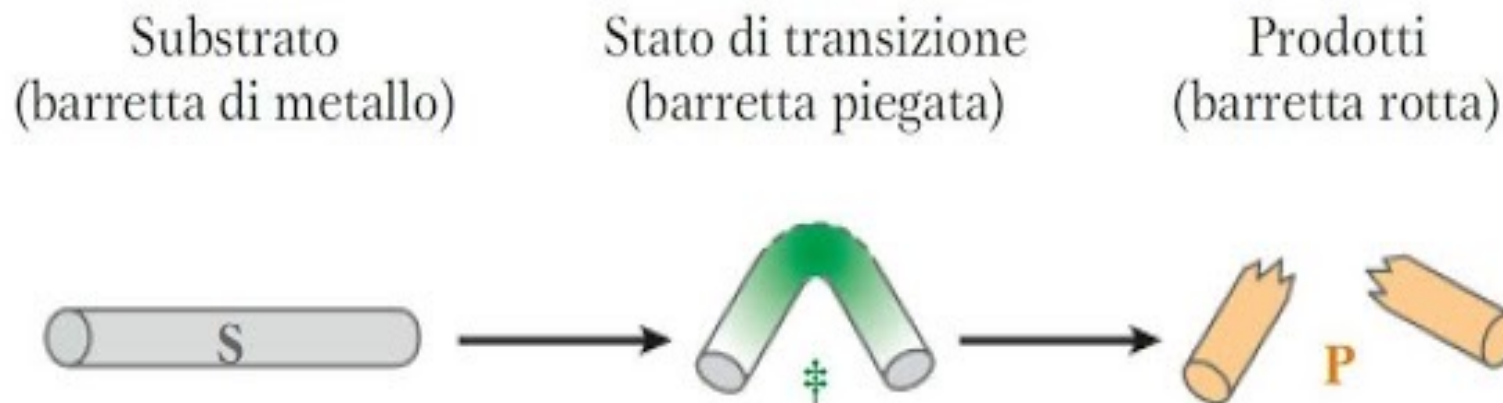
# Il sito catalitico

## Ipotesi di Fischer o “chiave-serratura”

Enzima



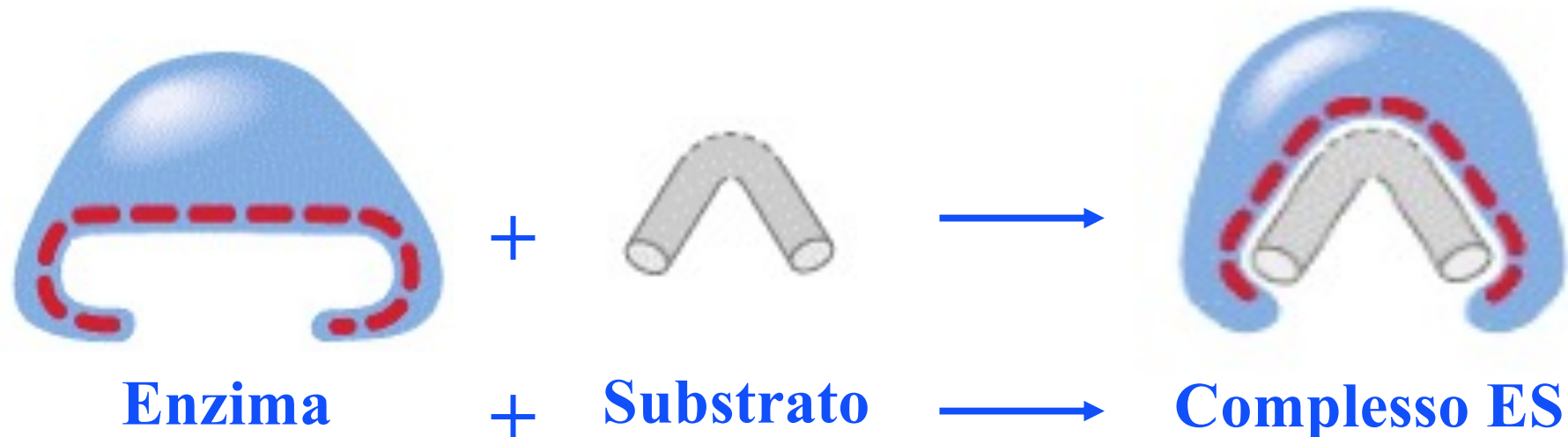
Però, la rigidità intrinseca di un sito attivo così fatto non giustifica i cambiamenti dinamici alla base della catalisi enzimatica.



*Nelson & Cox "Introduzione alla biochimica" VI Ed*

## Adattamento indotto del sito catalitico

Nell'ipotesi di Koshland, in seguito alla interazione con il substrato, l'enzima può subire un cambio conformazionale (**adattamento indotto**) che stabilizza il legame del substrato.



L'interazione viene mediata da legami deboli reversibili che si instaurano tra i gruppi funzionali di alcune catene R nel sito attivo dell'enzima ed il substrato: **“complementarità elettrostatica”**.



# Cofattori, coenzimi e gruppi prostetici

Molto spesso gli enzimi hanno bisogno di elementi o molecole relativamente piccole che partecipano al meccanismo della catalisi enzimatica. Possono essere di diverso tipo e vengono denominati in maniera diversa anche in dipendenza di come sono legati all'enzima

**Cofattori:** ioni metallici, molecole inorganiche (es.  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ).

**Coenzimi:** molecole organiche più complesse (es.  $NAD^+$ ).

**Gruppi prostetici:** cofattore o coenzima (es. FAD)

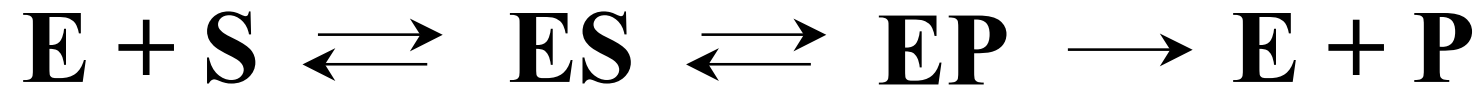
Cofattori e coenzimi si legano all'enzima attraverso interazioni deboli;  
**i gruppi prostetici sono legati covalentemente.**

La loro presenza è essenziale per l'attività dell'enzima.

Il complesso enzima-cofattore viene definito **oloenzima (forma attiva)**

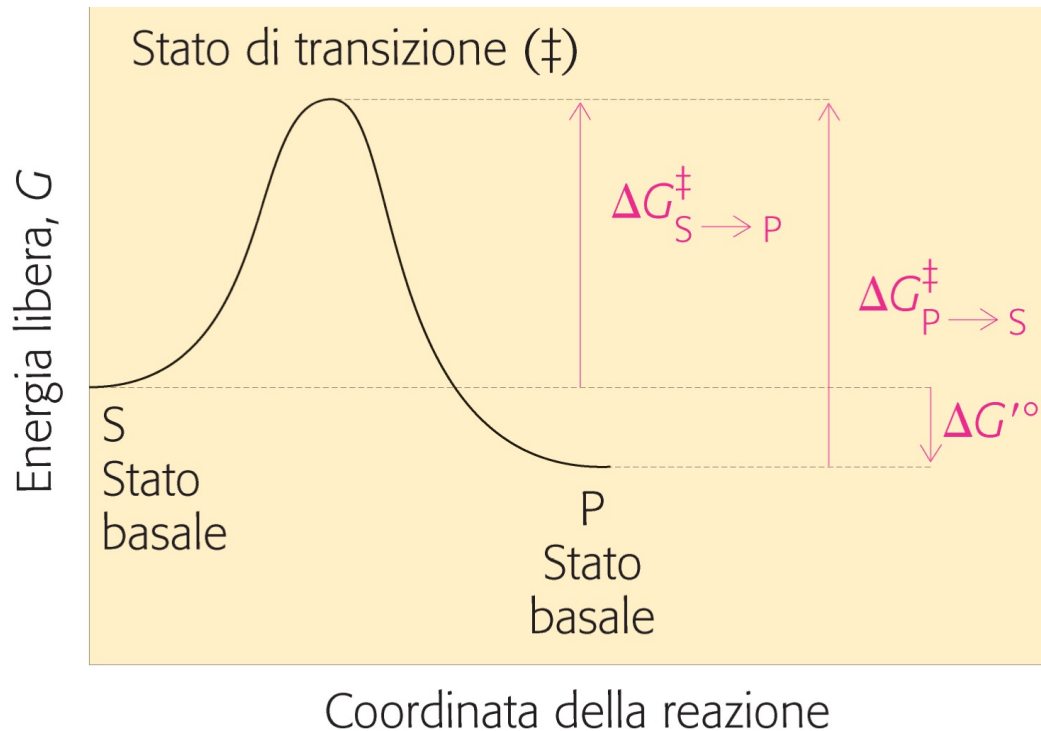
L'enzima privo del cofattore viene definito **apoenzima (forma inattiva)**

## Come lavorano gli enzimi ?



**Modificano la velocità delle reazioni ma  
non gli equilibri**

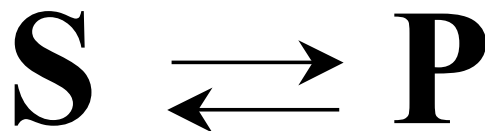
# ENZIMI: energetica



**G°** Variazione d'energia libera standard:

- Temperatura: 298 °K;
- pressione parziale 1 atm o 101,3 kPa;
- concentrazione di ogni soluto: 1 M

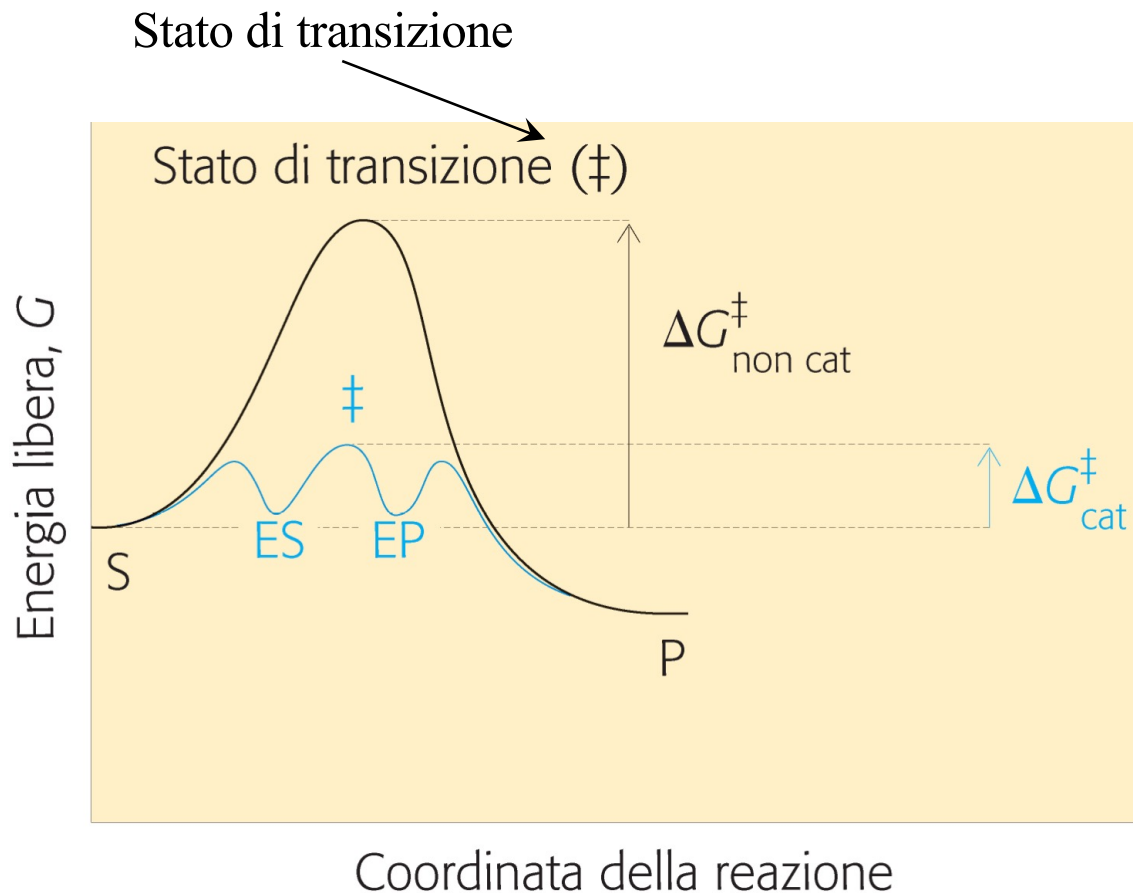
**G'°** Variazione d'energia libera standard biochimica:  
concentrazione di H<sup>+</sup> molto inferiore a 1 M, pH 7,0



**G‡** Energia d'attivazione:  
differenza tra i livelli d'energia dello stato di base e dello stato di transizione

## ENZIMI: energetica

**Gli enzimi accelerano la velocità di una reazione abbassando l'energia libera dello stato di transizione, stabilizzandone la sua struttura.**



**Una riduzione di circa 6 kJ/mole dell'energia libera dello stato di transizione (quella relativa ad un legame a idrogeno) provoca un aumento di più di 10 volte della velocità di reazione.**

**Non hanno nessun effetto sull'andamento globale della reazione e non influenzano la costante di equilibrio.**

**Fanno raggiungere l'equilibrio chimico più rapidamente.**

# Meccanismi di catalisi enzimatica

I meccanismi di catalisi enzimatica sono gli stessi dei catalizzatori chimici, con l'aggiunta della specificità.

1. **Catalisi acido-base**
2. **Catalisi covalente**
3. **Catalisi favorita da ioni metallici**
4. **Catalisi elettrostatica**
5. **Catalisi di prossimità e di orientamento**
6. **Catalisi favorita dal legame preferenziale del complesso di transizione**

# Cinetica enzimatica

Studio della velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi e dei parametri che la influenzano (**parametri cinetici**).

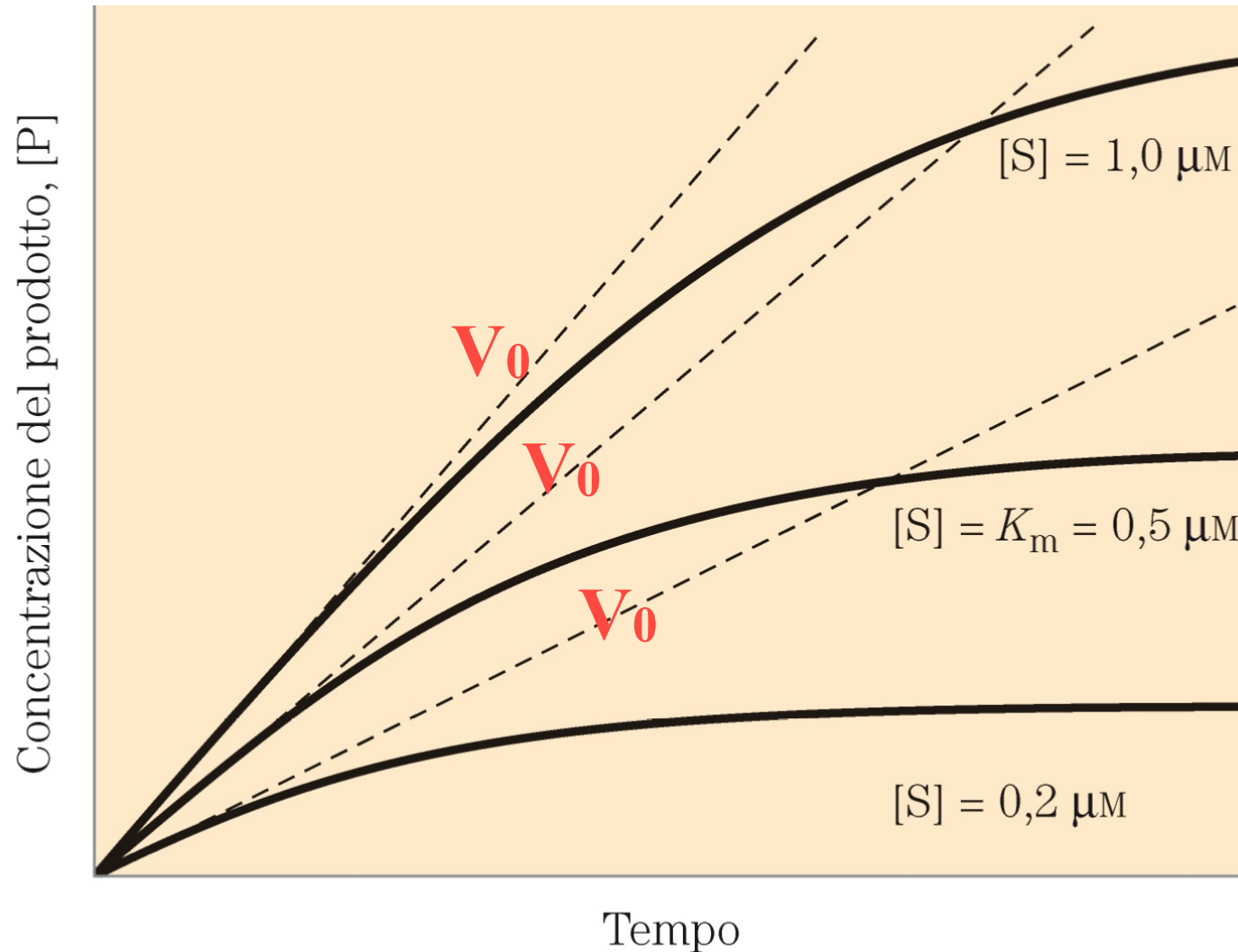
Reazione sequenziale:

- 1) formazione del complesso enzima-substrato (ES)
- 2) Successiva trasformazione di ES nell'enzima libero e prodotto



Se [S] è tale da trasformare tutto l'enzima nel complesso ES, la seconda tappa della reazione complessiva è quella che ne regola la velocità. *Questa tappa si può considerare irreversibile.*

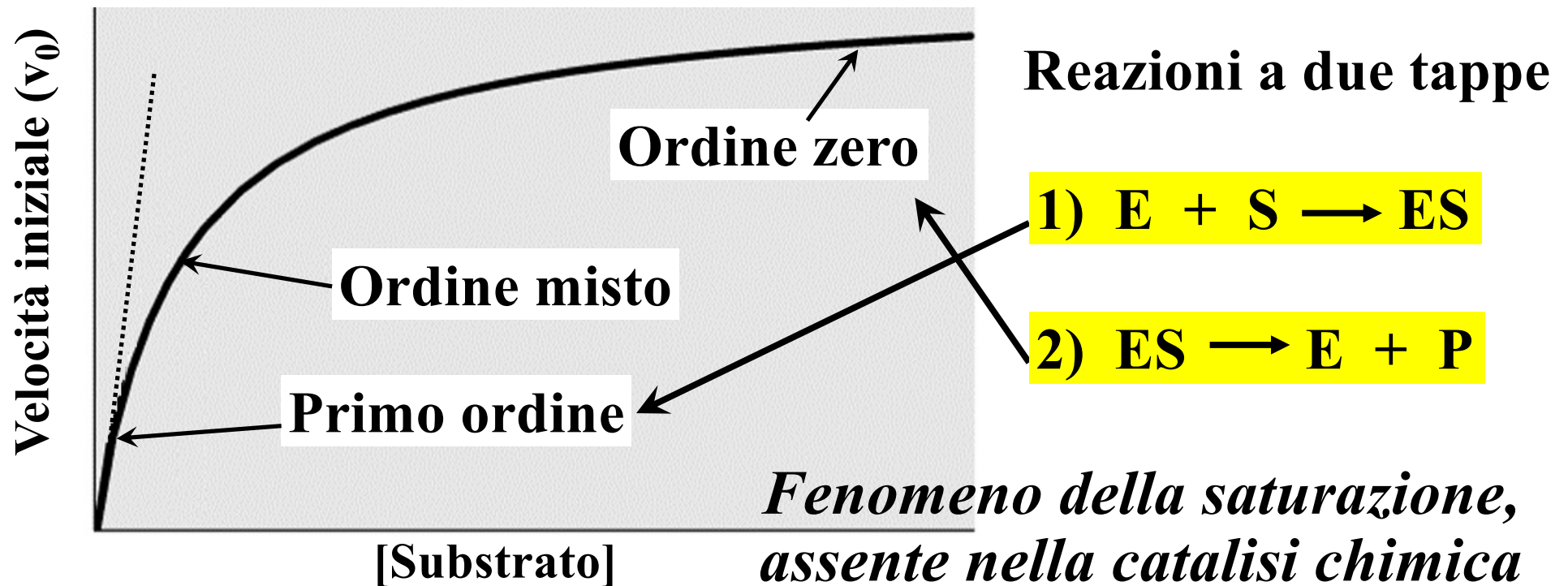
## Velocità iniziali ( $V_0$ ) delle reazioni catalizzate dagli enzimi



**La tangente ad ogni curva corrisponde alla  $V_0$**

# Cinetica enzimatica

In questo tipo di reazioni, la velocità dipende dalla concentrazione di substrato in maniera non univoca. Inoltre, la concentrazione di substrato è nella realtà molto maggiore di quella dell'enzima.



$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

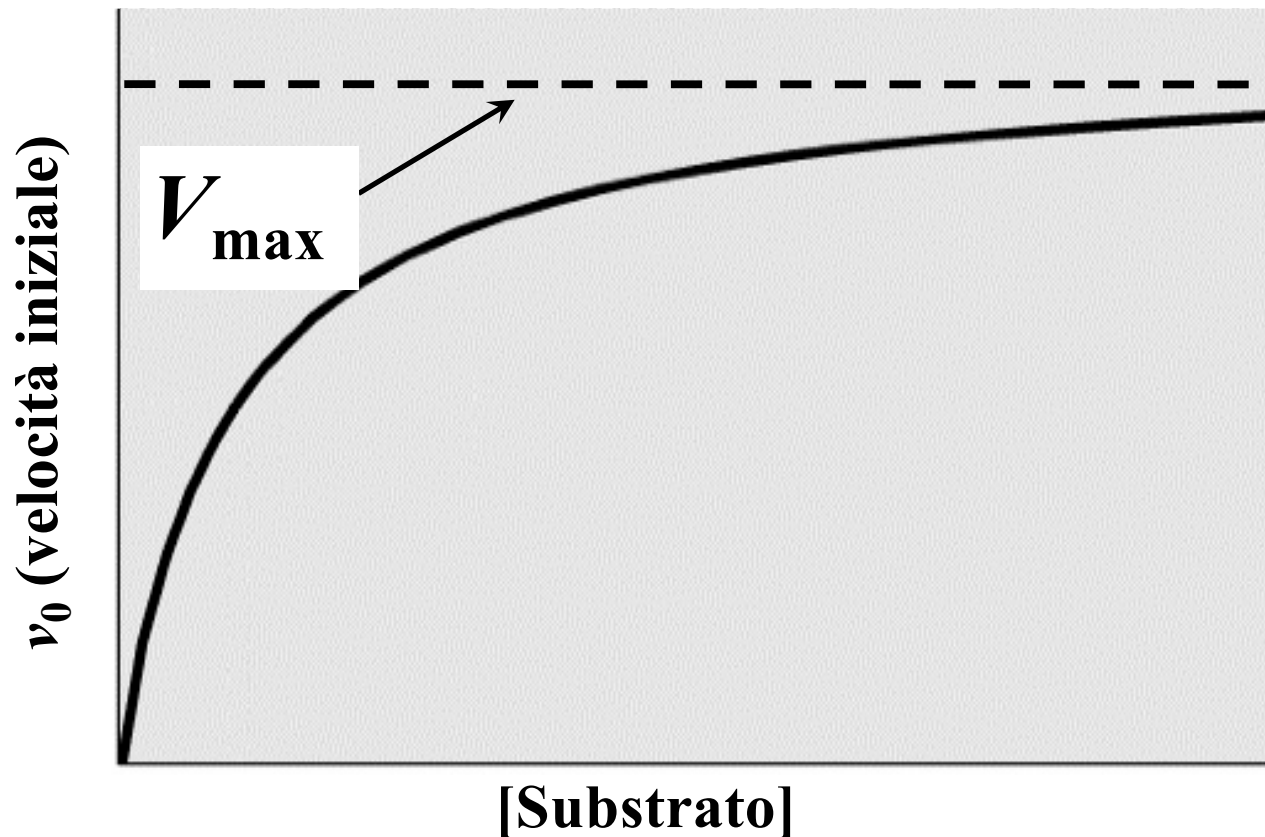
**Equazione di Michaelis-Menten**



## Significato di $V_{\max}$

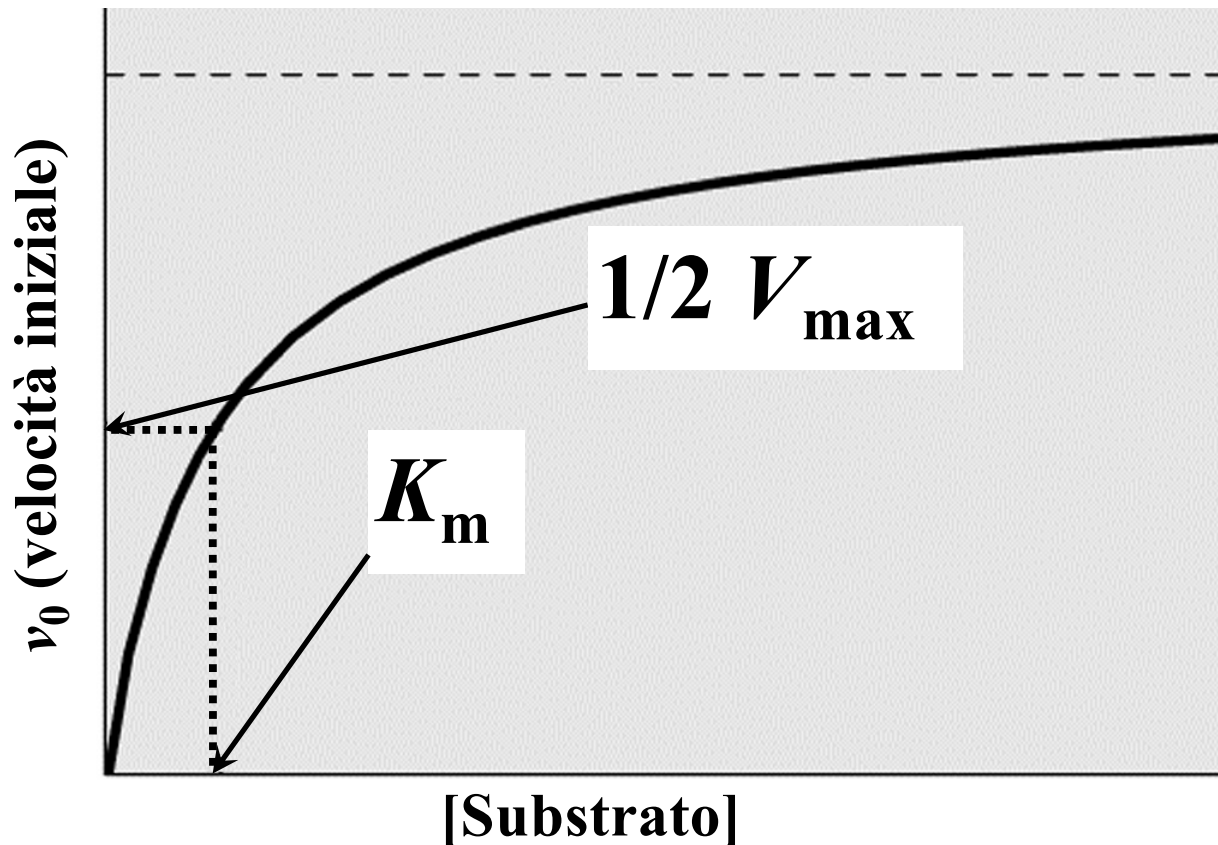
$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$V_{\max}$  rappresenta l'asintoto dell'equazione di Michaelis-Menten



**Essendo un asintoto non è ricavabile dai dati sperimentali**

## Significato di $K_m$



$K_m$  corrisponde alla concentrazione di substrato alla quale la velocità di reazione è metà di quella massima

$$a) \quad v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$b) \quad \text{Se } v_0 = V_{max} / 2$$

$$c) \quad \frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$d) \quad \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$e) \quad K_m + [S] = 2 [S]$$

$$K_m = [S]$$

## $k_{\text{cat}}$ ed efficienza catalitica

Questo parametro è un indice del modo di funzionamento di un enzima. Tiene conto sia di  $K_m$  sia di  $V_{\text{max}}$ .

$$k_{\text{cat}} = \text{costante catalitica} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_{\text{tot}}]}$$

$k_{\text{cat}}$  viene anche definita come *numero di turnover*, e rappresenta il numero di volte che la reazione viene catalizzata da ogni sito attivo dell'enzima.

$$\text{Efficienza catalitica} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$$

## Grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk (1)

Come ricavare i parametri cinetici ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) dalla determinazione della velocità di una reazione catalizzata da un enzima

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Si ricorre ad una trasformazione algebrica della legge di Michaelis-Menten: il reciproco di entrambi i membri.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]}$$

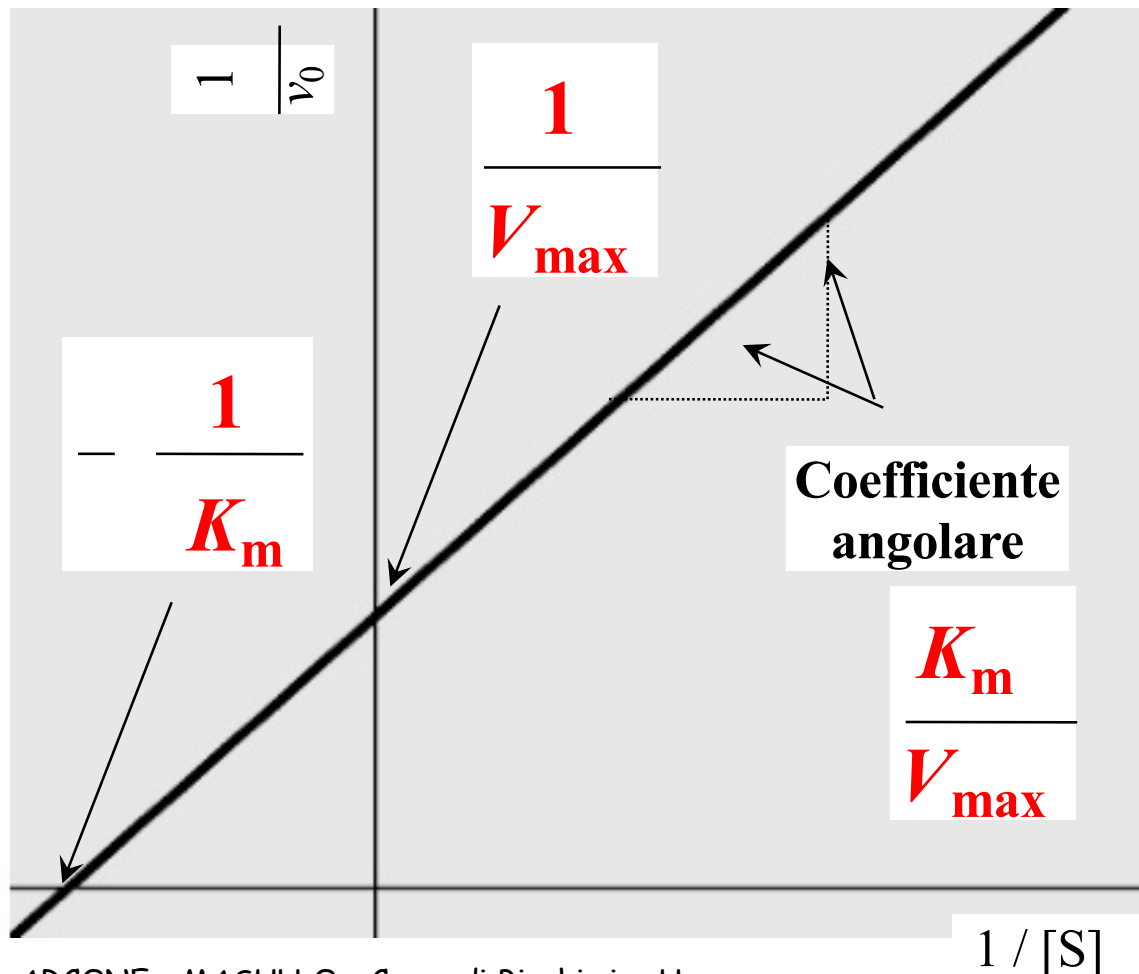
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

**Equazione di  
Lineweaver-Burk**

## Grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk (2)

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

**Equazione di  
Lineweaver-Burk**



**Permette di  
ricavare il valore  
di  $V_{\max}$  dal reciproco  
dell'intercetta sull'asse  
delle ordinate.**

**Inoltre, si può ricavare  
la  $K_m$  dal reciproco  
cambiato di segno  
di quello delle ascisse.**

## **Reazioni a due substrati**

**Sono le più comuni reazioni catalizzate da enzimi e il modello di Michaelis-Menten non è di semplice applicazione.**

### **Reazioni a spostamento singolo (sequenziali)**

**Entrambi i substrati devono legarsi all'enzima per poter generare il prodotto(i).**

### **Reazioni a spostamento doppio (o ping-pong)**

**Uno dei prodotti viene rilasciato prima che l'enzima leghi il secondo substrato**

# Reazioni a spostamento singolo (sequenziali)

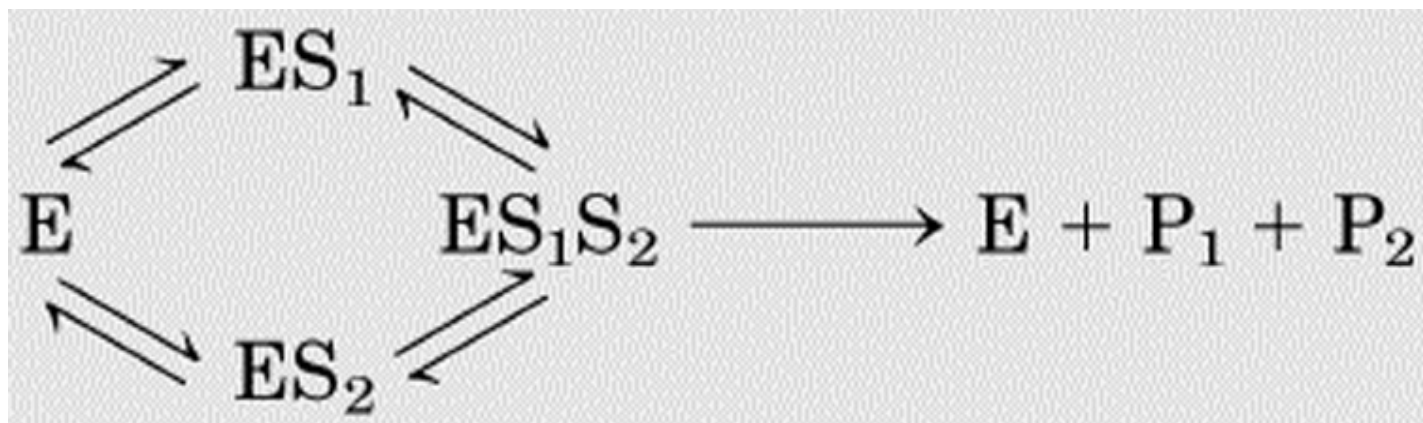
23

**Formazione di un complesso ternario: reazioni sequenziali con meccanismo ordinato o casuale**

## 1) Meccanismo ordinato

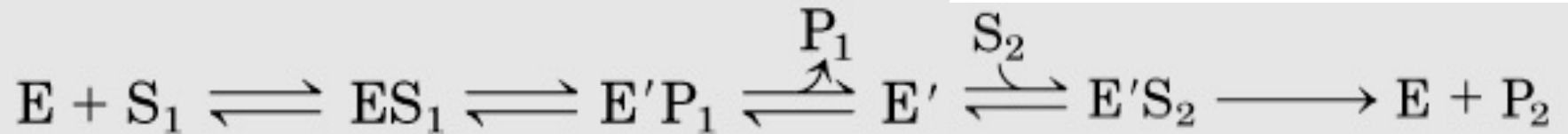


## 2) Meccanismo casuale



## Reazioni a spostamento doppio (ping-pong)

In queste reazioni i due substrati non sono mai legati contemporaneamente all'enzima. In genere un gruppo funzionale viene trasferito dal primo substrato all'enzima al quale si lega covalentemente; si dissocia quindi il primo prodotto.



Si lega quindi il secondo substrato, al quale l'enzima trasferisce il gruppo funzionale. Il secondo prodotto viene rilasciato.