

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

CORSO MONODISCIPLINARE DI
BIOCHIMICA (6 CFU)

Roberto Giacomini Stuffer

IL CORSO MONODISCIPLINARE DI
"BIOCHIMICA"

È SUDDIVISO IN DUE UNITÀ DIDATTICHE:

A) LE MOLECOLE BIOLOGICHE

B) ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI DI BIOLOGIA
MOLECOLARE

L'UNITÀ DIDATTICA "LE MOLECOLE BIOLOGICHE" COMPRENDE:

- 1) I LIPIDI
- 2) I CARBOIDRATI
- 3) GLI AMMINOACIDI E LE PROTEINE
- 4) LE PROTEINE DEL CONNETTIVO
- 5) LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

L'UNITÀ DIDATTICA "ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI DI BIOLOGIA MOLECOLARE" COMPRENDE:

- 1) ENZIMOLOGIA
- 2) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI
- 3) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI
- 4) L'EVOLUZIONE

UNITÀ DIDATTICA
"ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE"

BIOTEC.

UNITÀ DIDATTICA "ENZIMOLOGIA ED ELEMENTI DI BIOLOGIA MOLECOLARE"

ENZIMOLOGIA

Roberto Giacomini Stuffer

Introduzione all'enzimologia

La tecnologia del DNA ricombinante ha recentemente cambiato le prospettive dell'enzimologia, aumentandone l'importanza.

La clonazione dei geni degli enzimi ha facilitato lo studio di quelli noti ed ha permesso la caratterizzazione di altri precedentemente inaccessibili.

Vi è inoltre la possibilità di "tagliare su misura" la struttura e la attività degli enzimi mediante la manipolazione dei loro geni.

Introduzione all'enzimologia

Gli enzimi sono biocatalizzatori che possono accelerare la velocità delle reazioni chimiche da 10^6 a 10^{12} volte.

Essi sono specifici sia per il tipo di reazione catalizzata sia per la scelta dei reagenti, chiamati substrati.

Normalmente, un enzima catalizza solo un tipo di reazione chimica o una serie di reazioni strettamente correlate. Rispetto ai catalizzatori chimici vi sono condizioni di reazione più moderate.

Nella maggior parte delle reazioni enzimatiche non vi è la formazione di sottoprodotti inutili come avviene spesso nelle reazioni non catalizzate;

gli enzimi hanno capacità di regolazione della loro attività.

La classificazione degli enzimi

classe	tipo di reazione	sottoclassi importanti
1. ossidoriduttasi	<p>○ = equivalente riducente</p>	deidrogenasi ossidasi, perossidasi riduttasi monoossigenasi, diossigenasi
2. transferasi		C ₁ -transferasi glicosil-transferasi amminotransferasi fosfo-transferasi
3. idrolasi		esterasi glicosidasi peptidasi amidasi
4. liasi ("sintasi")		C-C liasi C-O liasi C-N liasi C-S liasi
5. isomerasi		epimerasi <i>cis-trans</i> -isomerasi transferasi intramolecolari
6. ligasi ("sintetasi")		C-C ligasi C-O ligasi C-N ligasi C-S ligasi

Il numero di classificazione è a quattro cifre preceduto da EC (Enzyme Commission):
la prima cifra indica la classe (es. trasferasi),
la seconda indica la sotto-classe (es. fosfo-transferasi),
la terza indica la sotto-sotto-classe (es. -OH come accettore),
la quarta indica il numero seriale (es. D - glucosio come accettore del gr. fosforico).

Classe	Tipo di reazione catalizzata	Esempio specifico
1. Ossidoreduttasi	Reazioni di ossido-riduzione.	$ \begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{Lattato} \end{array} & \xrightarrow[\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+]{\text{Lattato deidrogenasi}} & \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{Piruvato} \end{array} \end{array} $
2. Transferasi	Trasferimenti di gruppi di atomi da un donatore a un accettore.	$ \begin{array}{ccc} \text{Glicogeno fosforilasi (un enzima)} & \xrightarrow[\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}]{\text{Glicogeno fosforilasi chinasi}} & \text{Glicogeno fosforilasi} \\ & & \\ & & \text{fosfato (un enzima fosforilato)} \end{array} $
3. Idrolasi	Idrolisi di legami.	$ \begin{array}{ccc} \text{Glicogeno sintasi} & + \text{H}_2\text{O} & \xrightarrow{\text{Glicogeno sintasi fosfatasi}} \text{Glicogeno sintasi (un enzima)} + \text{fosfato} \\ & & \\ \text{fosfato (un enzima fosforilato)} & & \end{array} $
4. Liasi	Rottura di legami C—C, C—O, C—N ed altri mediante metodi diversi da idrolisi e ossidazione; comprende reazioni che eliminano acqua per produrre doppi legami.	$ \text{H}_2\text{CO}_3 \xrightarrow{\text{Anidrasi carbonica}} \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} $
5. Isomerasi	Interconversioni di isomeri, come cis \rightleftharpoons trans, L \rightleftharpoons D, aldeide \rightleftharpoons chetone.	$ \begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{D-Alanina} \end{array} & \xrightarrow{\text{Alanina racemasi}} & \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{L-Alanina} \end{array} \end{array} $
6. Ligasi	Unione di due molecole con accoppiata l'idrolisi di ATP o di un trifosfato simile.	$ \begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{O}^- \\ \text{Acetato} \end{array} & \xrightarrow[\text{CoASH} \rightarrow \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{fosfato}]{\text{Acetil-SCoA sintetasi}} & \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{SCoA} \\ \text{Acetil-SCoA} \end{array} \end{array} $

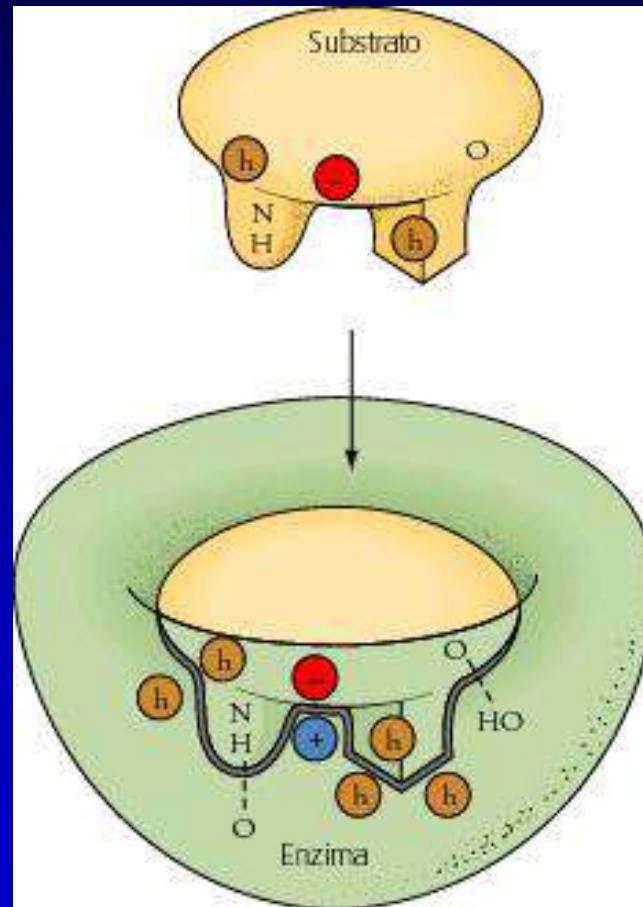
table 8-3

International Classification of Enzymes*

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group-transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

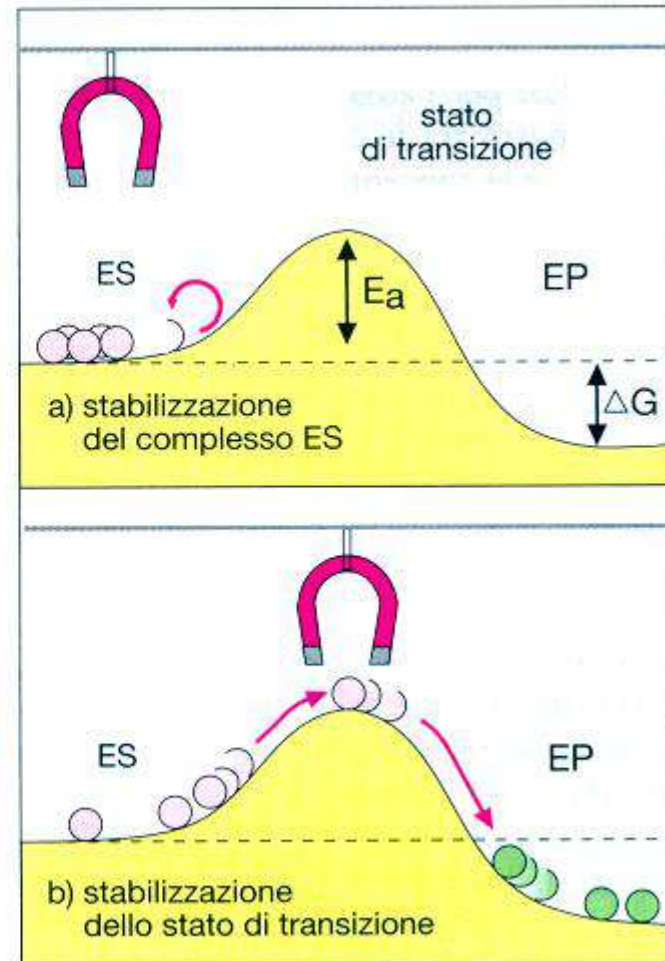
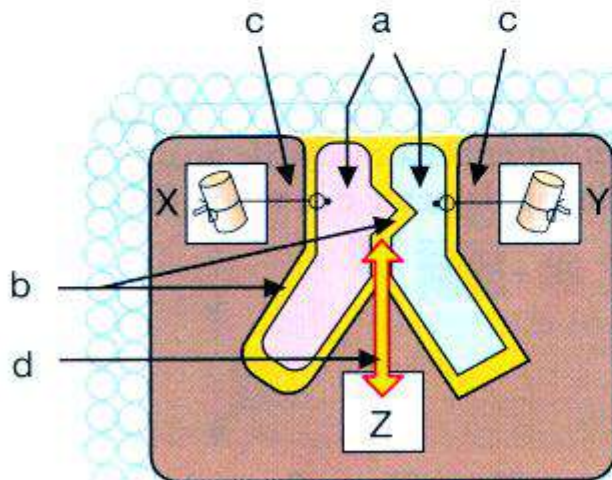
*Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms, or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.

Il complesso enzima-substrato

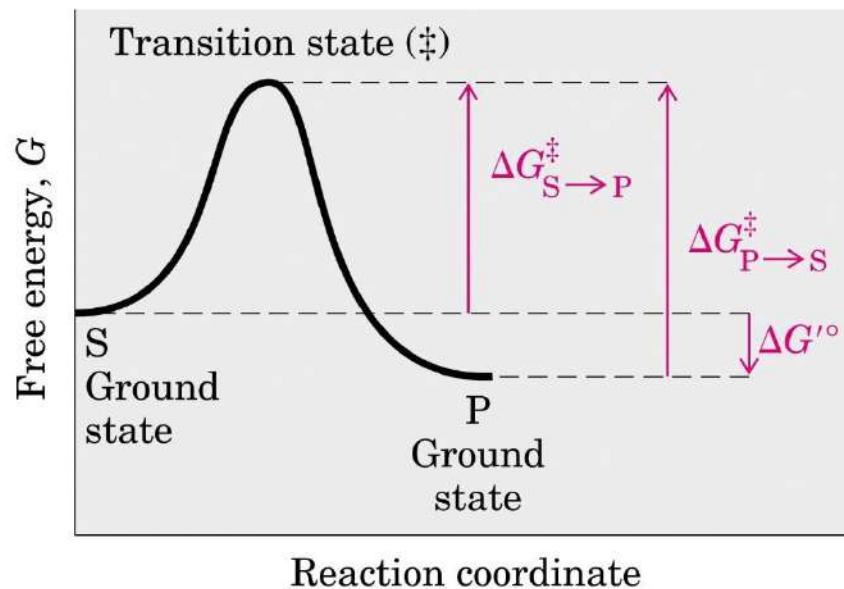
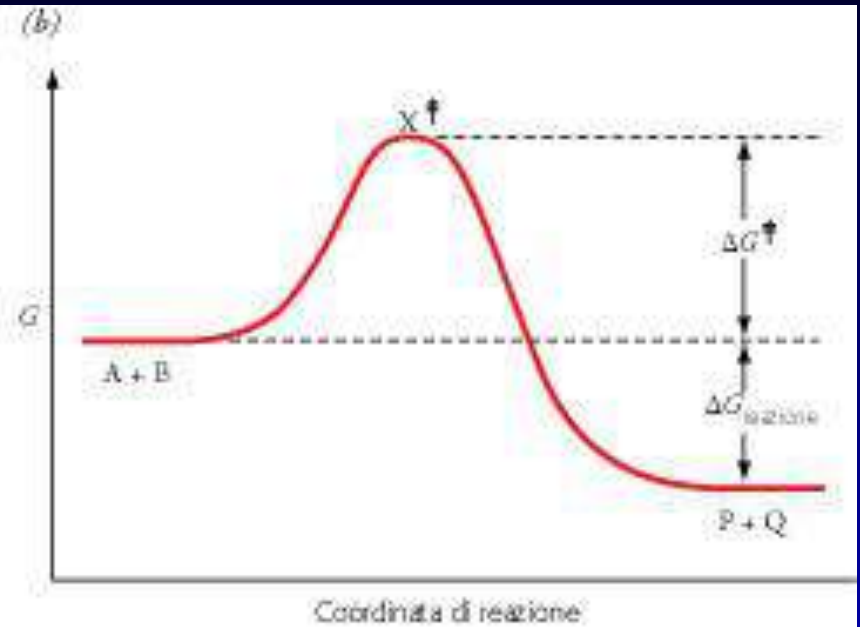
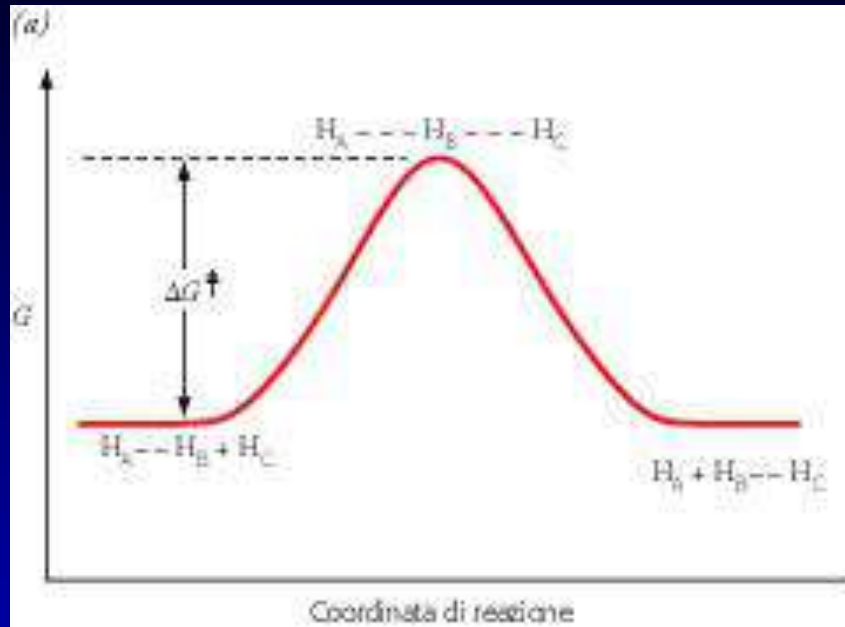


La stabilizzazione dello stato di transizione

- a avvicinamento e orientamento dei substrati
- b esclusione d'acqua
- c stabilizzazione dello stato di transizione
- d trasferimento di gruppi



Il diagramma dello stato di transizione



L'energia d'attivazione

La molecola(e) di reagente deve passare attraverso uno stato di transizione ad alto contenuto energetico per formare il prodotto.

Le proprietà generali degli enzimi

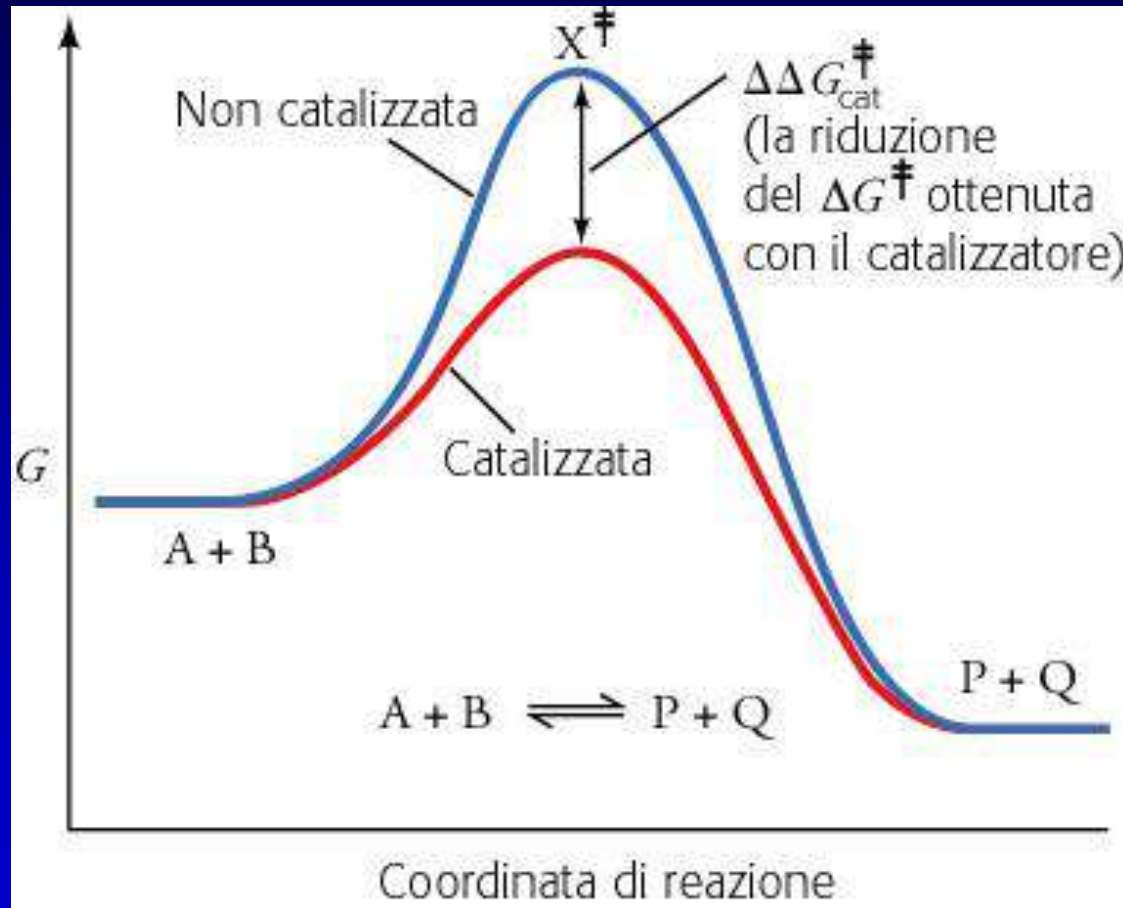
Gli enzimi, come le altre proteine, sono classificati come semplici o complessi. I gruppi prostetici eventualmente presenti all'interno di un enzima complesso vengono detti cofattori.

La maggior parte dei cofattori organici, i coenzimi, sono derivati da vitamine solubili in acqua.

Gli ioni metallici sono i più comuni cofattori inorganici. Gli enzimi la cui forma attiva comprende uno o più metalli saldamente legati alla matrice proteica (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} o Mo^{3+}) sono detti metalloenzimi (un terzo degli enzimi conosciuti).

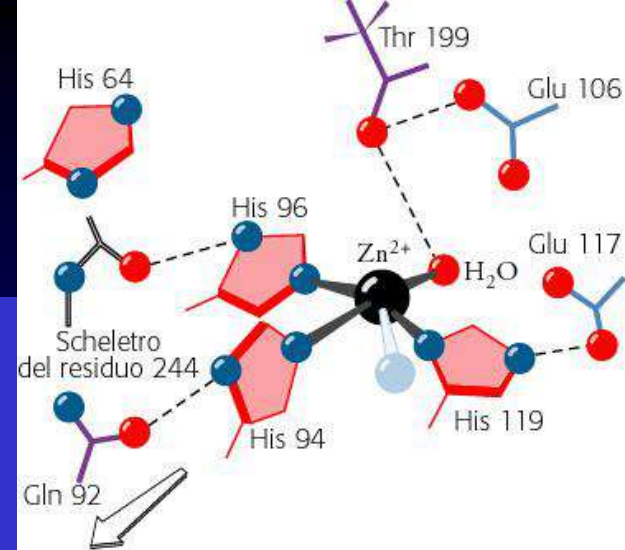
Gli enzimi attivati da metalli (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+}) richiedono solo un legame debole di questi.

L'energia di attivazione e coordinata di reazione

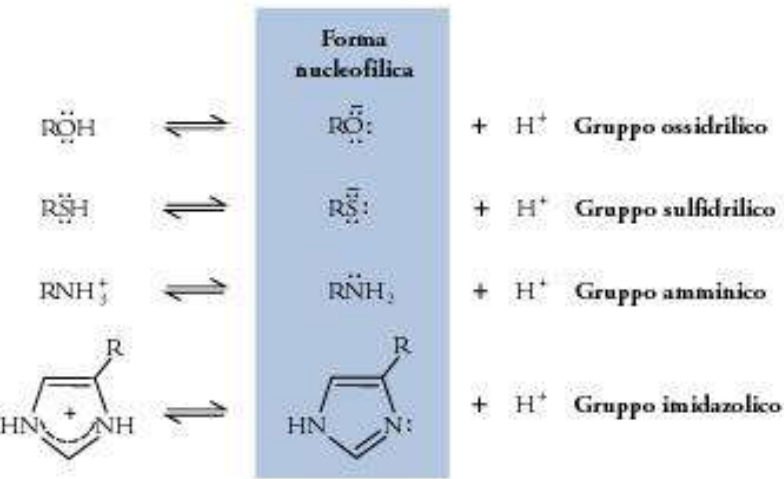


I meccanismi catalitici

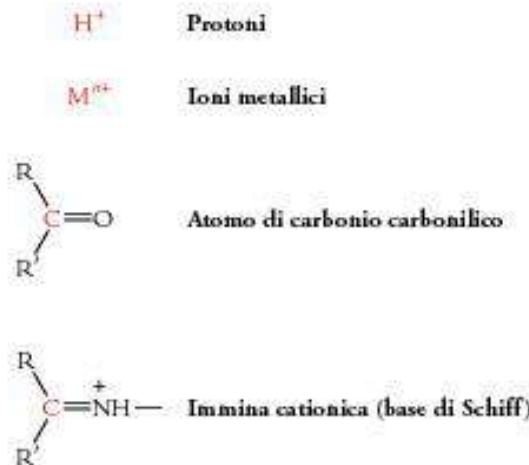
- 1) Catalisi acido-basica;
- 2) Catalisi covalente;
- 3) Catalisi favorita da ioni metallici;
- 4) Catalisi elettrostatica;
- 5) Catalisi favorita da effetti di prossimità e di orientamento.



(a) Gruppi nucleofili

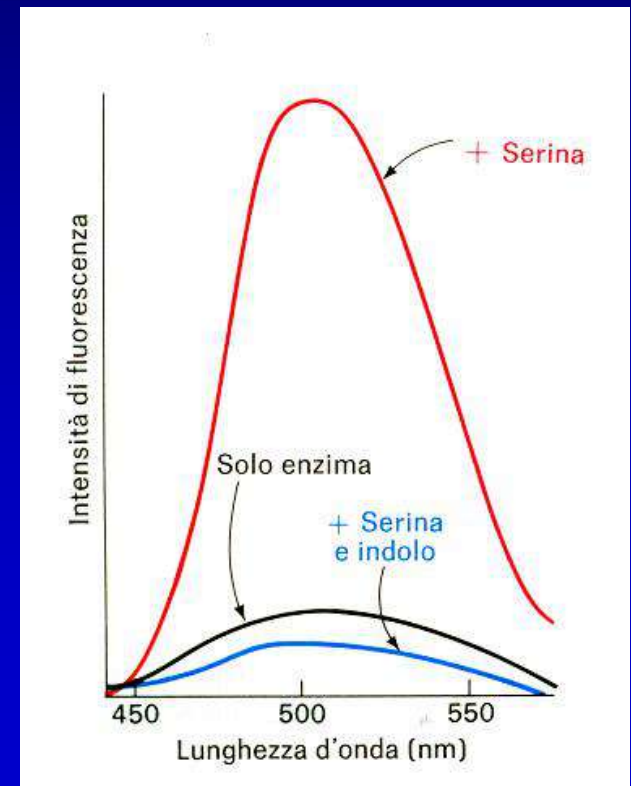
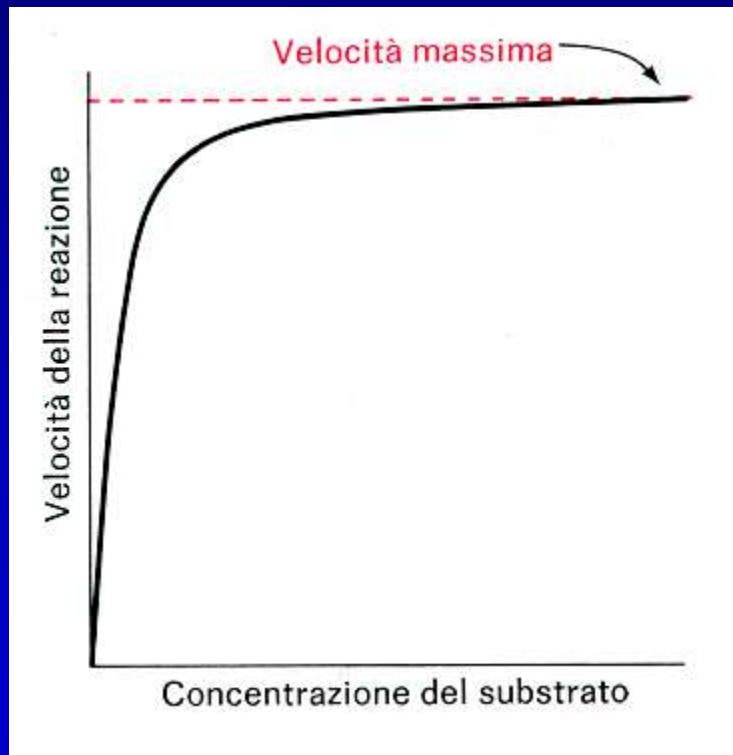


(b) Gruppi elettrofili



Le proprietà generali degli enzimi

La formazione del complesso Enzima-Substrato è dimostrata sia dal fatto che vi è un effetto di saturazione (la velocità della reazione aumenta in modo proporzionale all'aumento della concentrazione del substrato finché non viene raggiunta una V_{max}), sia dalla modificazione delle proprietà spettroscopiche osservabili in alcuni enzimi e substrati durante la formazione del complesso ES.



Unità di attività enzimatica e dosaggio degli enzimi

Katal (kat) è la quantità di enzima che converte 1 mole di reagente nel prodotto in 1 secondo nelle condizioni di reazione standard (ottimali).

L'Unità internazionale (U) corrisponde alla quantità di enzima che converte 1 μ mole di reagente nel prodotto in 1 minuto.

Poiché $1 \mu\text{mole} / \text{min} = 1.67 \times 10^{-8} \text{ moli} / \text{s}$ quindi $U = 1.67 \times 10^{-8} \text{ kat}$.

L'attività specifica è il rapporto tra il numero di U o di kat e la quantità totale di proteina espressa in milligrammi.

L'attività specifica è una misura del grado di purificazione dell'enzima ed il suo valore tende a raggiungere un massimo che rimane costante quando tutte le molecole del campione in esame sono molecole di enzima attivo.

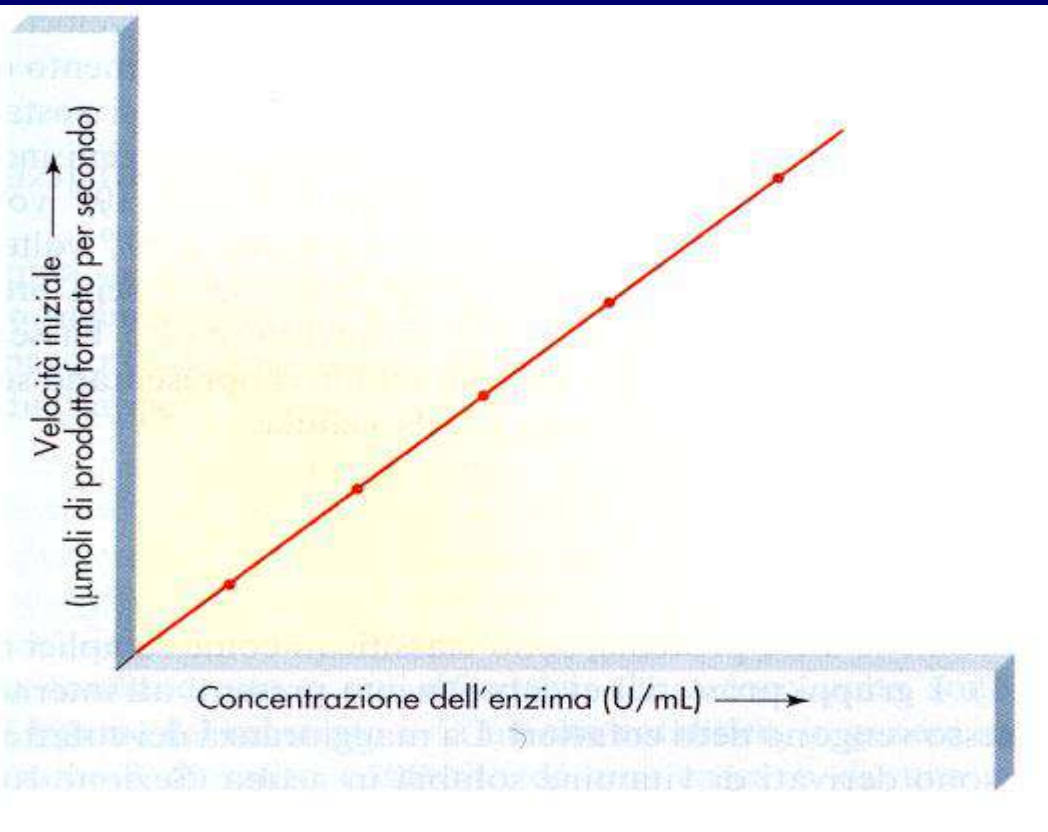
Tappa di purificazione	Proteina (mg totali)	U totali ^a	Attività specifica (U/mg di proteina)
Estratto grezzo isolato	12 000	150 000	12,5
Frazionamento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ^b	4000	140 000	35
Cromatografia per gel filtrazione	500	120 000	240
Cromatografia per scambio ionico (pH 6,0)	75	95 000	1260
Cromatografia per scambio ionico (pH 7,8)	6	80 000	13 300

^a U = unità internazionali. Alcune molecole di enzima vengono denaturate e sono perse ad ogni tappa.

^b Le diverse proteine tendono a precipitare a differenti concentrazioni di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Il dosaggio degli enzimi

In condizioni standard, la quantità di un enzima in una miscela determina la velocità iniziale della reazione catalizzata. Questa velocità può essere usata per determinare la concentrazione enzimatica nella miscela di reazione (curva standard).



Nei casi ideali, la velocità iniziale è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima.

LE CARATTERISTICHE GENERALI DEGLI ENZIMI

Le caratteristiche generali degli enzimi

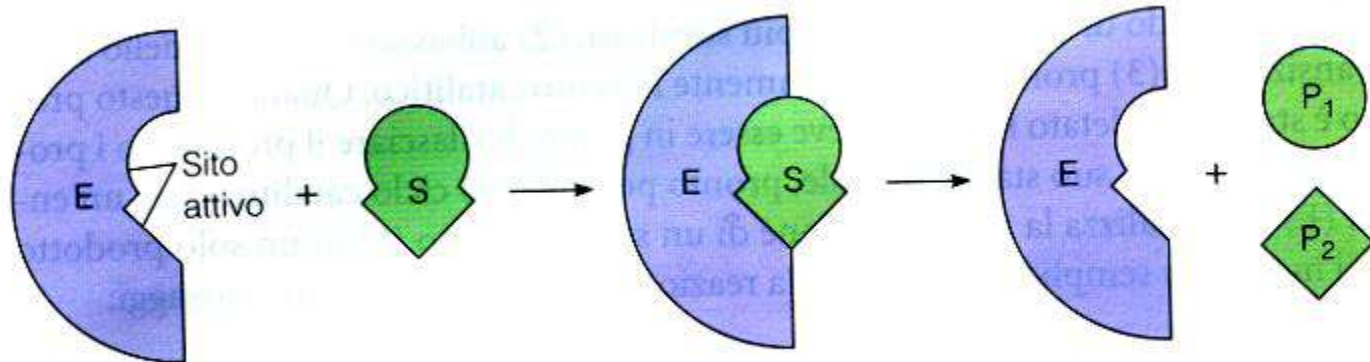
La prima tappa di una reazione enzimatica è la formazione del complesso ES che successivamente si converte in enzima libero (E) e prodotto (P); nel più semplice dei casi il processo avviene in due tappe:



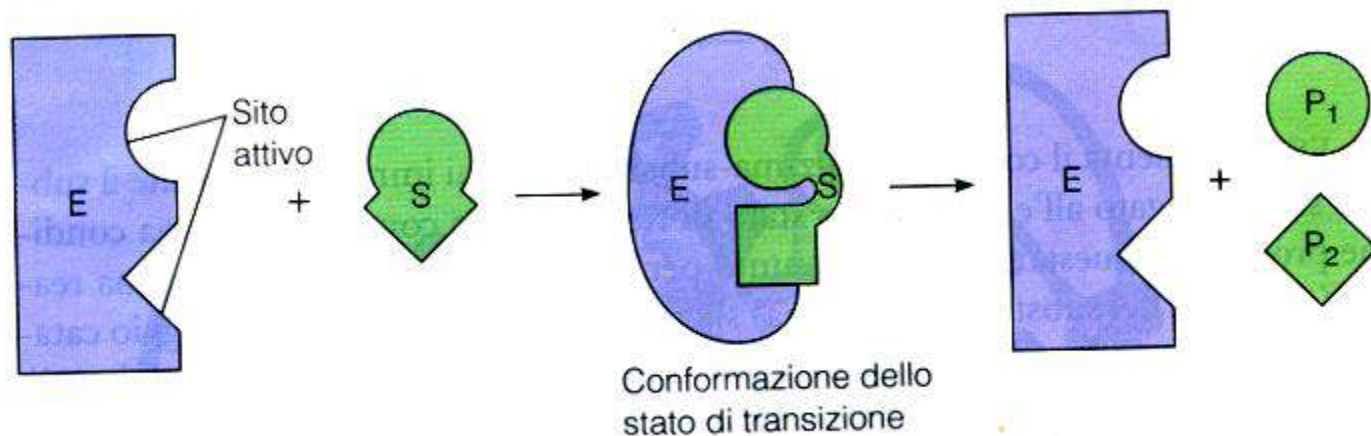
Ogni enzima contiene uno o più siti attivi che a loro volta sono composti da un sito di legame del substrato e da un sito catalitico, in genere sovrapposti. Il sito di legame è di solito costituito da una tasca o scanalatura chiralica, dove catene laterali di AA ed il gruppo prostetico (se presente) possono legare inizialmente le molecole di substrato mediante interazioni covalenti (catalisi covalente).

E. Fischer nel 1894 propose il modello chiave-serratura che descrive in modo adeguato la specificità degli enzimi.

Un'elaborazione successiva (D. Koshland, 1958) consentì di aumentare le conoscenze sui meccanismi catalitici: il modello ad adattamento indotto.

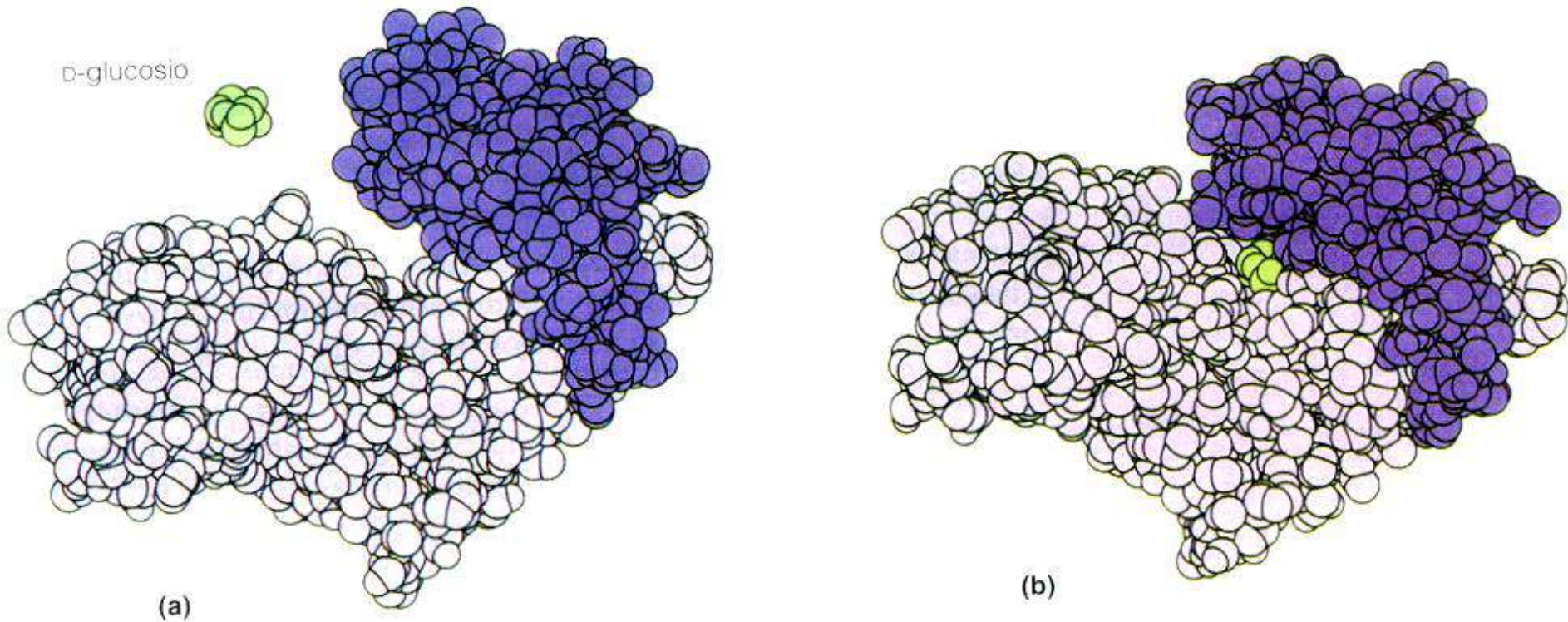


(a) Modello chiave-serratura



(b) Modello dell'adattamento indotto

L'adattamento indotto implica distorsioni a carico sia dell'enzima sia del substrato. Queste possono essere localizzate o comportare una grossa variazione conformazionale dell'enzima come nel caso dell'esochinasi.



Misure sperimentali ed analisi dei dati cinetici

Per misurare la velocità di reazione abbiamo bisogno di un sistema per seguire la formazione del prodotto o il consumo di substrato.

Via via che il substrato viene consumato, la velocità diminuisce fino a quando alla fine viene raggiunto l'equilibrio.

Di regola si preferisce predisporre una serie di esperimenti tutti alla stessa concentrazione di enzima, ma a diverse concentrazioni di substrato e misurare la velocità iniziale (V), di norma con lo spettrofotometro.

Misure Spettrofotometriche

La spettrofotometria rappresenta una tecnica ampiamente utilizzata per il dosaggio di numerosi analiti, permette di risalire alla concentrazione dell'analita stesso.

Legge di Lambert-Beer

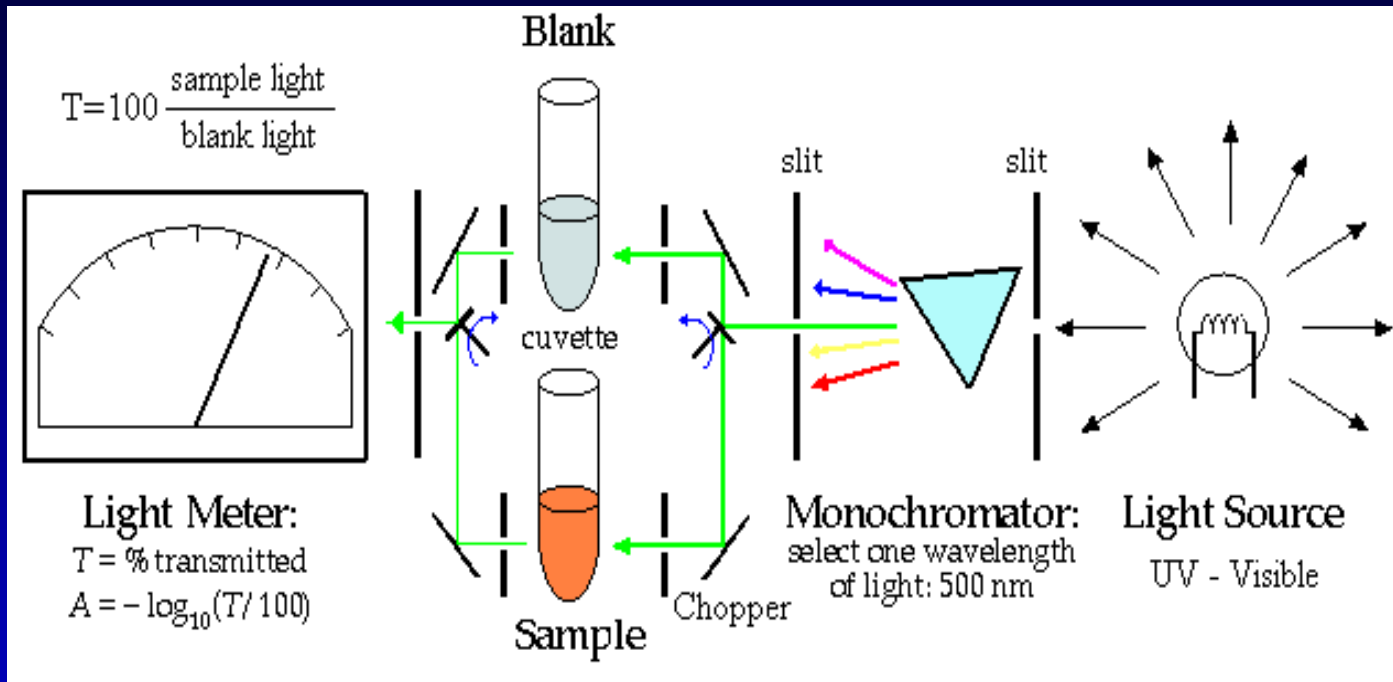
$$A = abc$$



$$c = \frac{A}{ab}$$

A=Assorbimento della soluzione
a=Coefficiente di estinzione molare
b=Cammino ottico della soluzione
c=Concentrazione del campione

Lo Spettrofotometro



Cuvette: - vetro

- quarzo

lampada

visibile : tungsteno

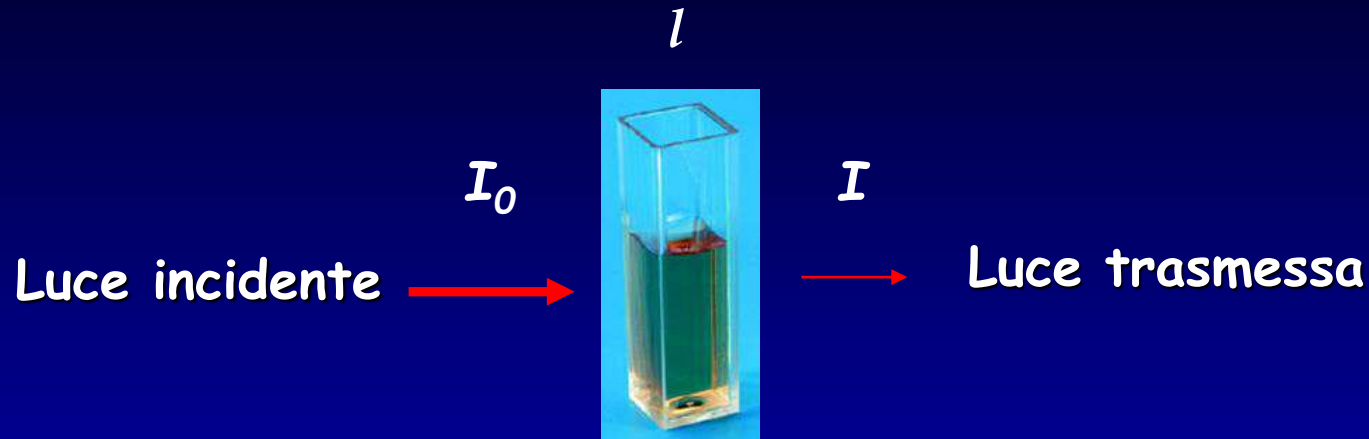
UV : deuterio

Misure Spettrofotometriche

Maggiore é la quantità di molecole che la luce incontra, maggiore é l'assorbimento, minore é l'intensità di luce trasmessa, in una cinetica enzimatica é necessario che substrato e prodotto abbiano un diverso assorbimento in qualche zona spettrale (visibile-ultravioletto);
luce visibile: nm 380-780,
luce ultravioletta: nm 200-380.



Misure Spettrofotometriche



Trasmittanza

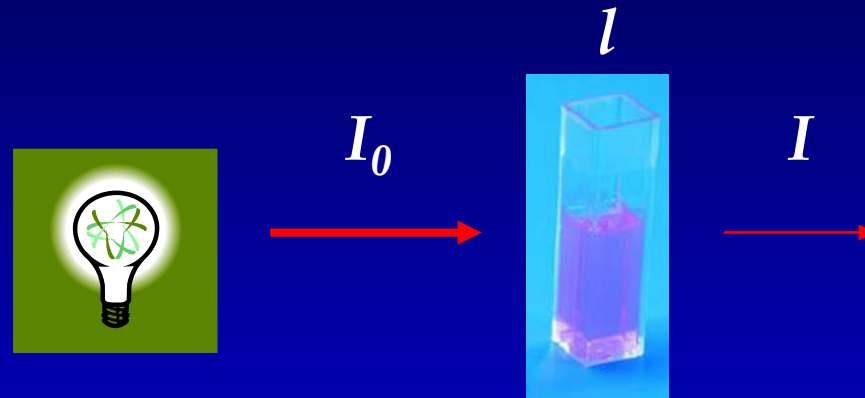
$$T = I/I_0$$

Assorbanza

$$A = -\text{Log } T = \text{Log } I_0 / I$$

Relazione tra Concentrazione ed Assorbimento di una Sostanza ad una certa Lunghezza d'onda

Legge di Lambert-Beer: $A = abc$



c = concentrazione Molare della sostanza che assorbe la luce.

b = lunghezza del cammino ottico espressa in cm.

a = Coefficiente di Estinzione Molare della sostanza che assorbe luce.

Curve Standard

Si può risalire alla concentrazione di un'analita in una soluzione utilizzando uno standard a concentrazione nota.

$$C : C_{st} = A : A_{st}$$

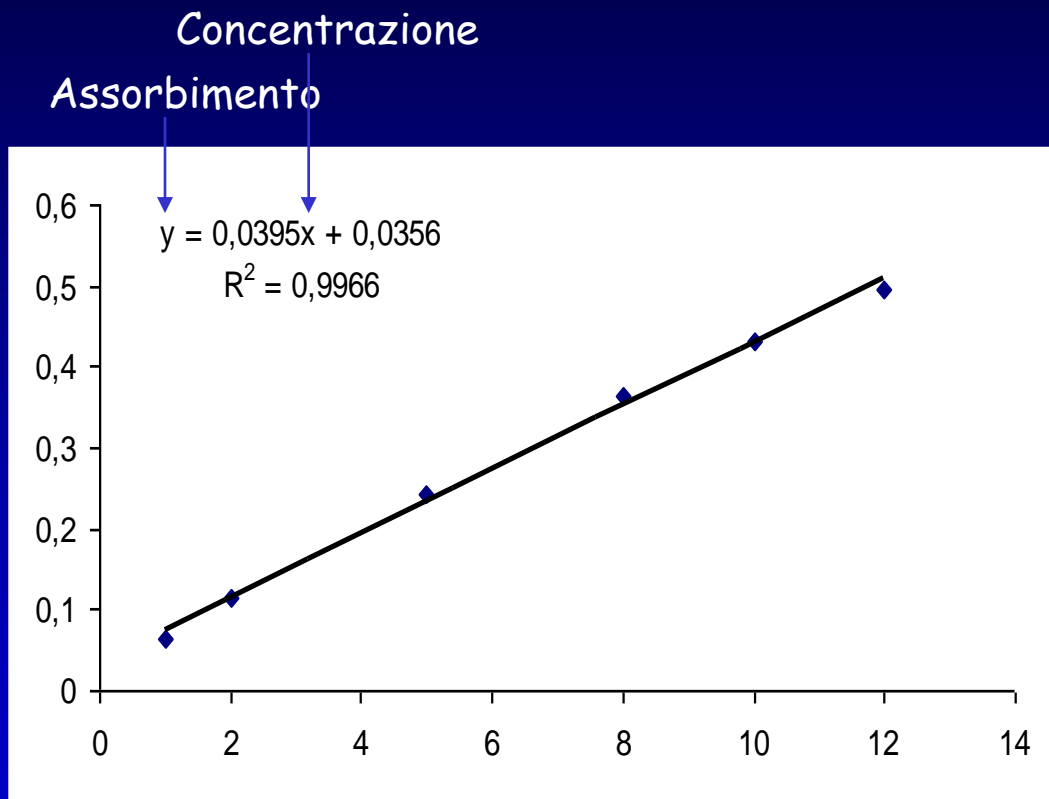


$$C = \frac{A}{A_{st}} \times C_{st}$$

Questo rapporto è valido solo se le concentrazioni dell'analita incognito e dello standard sono comparabili.

Retta di Taratura

E' consigliabile ricavare la concentrazione dell'analita da una serie di standard a concentrazione nota, piuttosto che da un singolo standard.



$$y = mx + b$$



$$x = \frac{y - b}{m}$$

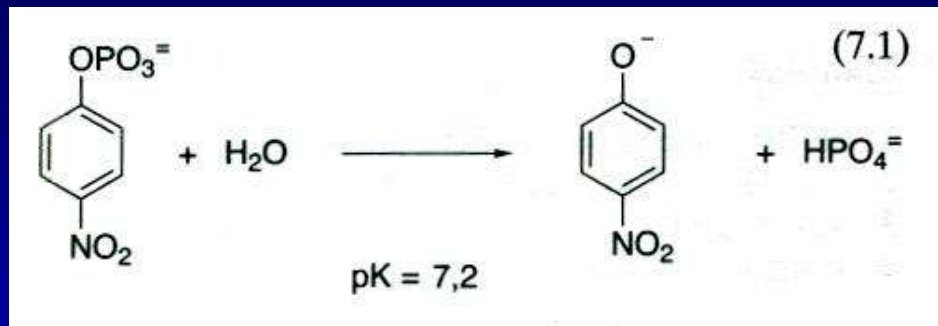
m è il coefficiente angolare ed esprime la pendenza della retta.
 $b = y$ quando $x = 0$.

La formula è applicabile solamente se l'assorbimento del campione incognito è compreso fra il valore minimo e massimo della retta di taratura.

Esempio: la misura dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina

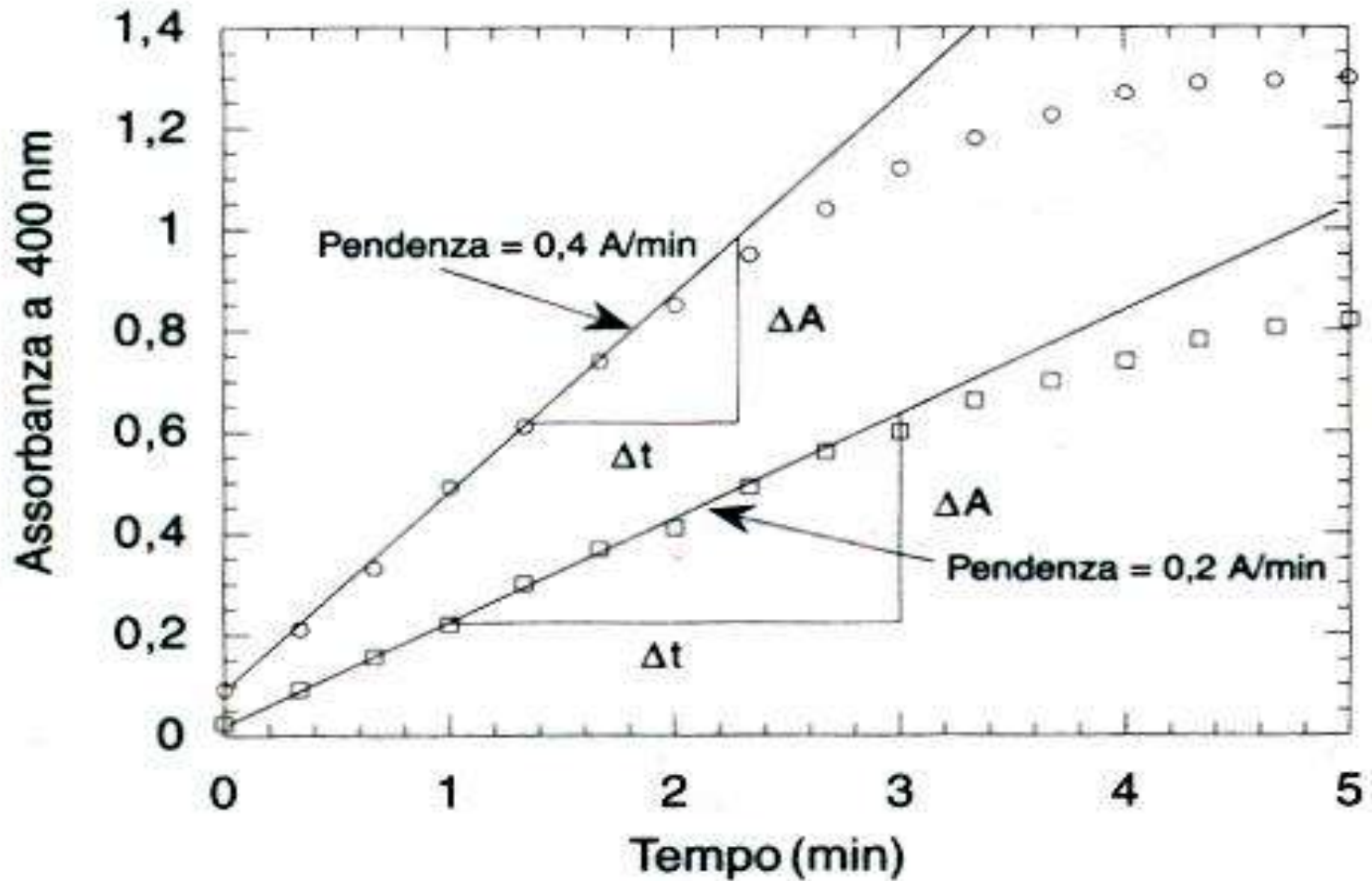
PNPP

PNP



La fosfatasi alcalina catalizza l'idrolisi di tutti i fosfomonoesteri. Si esegue il saggio enzimatico con un composto non naturale sintetizzato chimicamente: il p-nitrofenilfosfato (PNPP) che viene idrolizzato a p-nitrofenolo (PNP) e P_i . La forma ionica del PNP è colorata (410 nm), quindi la reazione può essere misurata spettrofotometricamente.

Poichè la variazione di $[S]$ rispetto a t è pressoché lineare nelle fasi iniziali, è possibile eseguire analisi accurate di V in funzione di $[S]$.



La cinetica enzimatica

La cinetica enzimatica è lo studio delle velocità di reazione.

Il suo studio consente di individuare il meccanismo di catalisi ed imparare a regolare un'attività enzimatica.

L'equazione cinetica é:



La formazione catalizzata del prodotto, accompagnata dalla rigenerazione dell'enzima, rappresenta una reazione di primo ordine (1 reagente) e la sua velocità sarà:

$$V = d[P]/dt = k_2[ES]$$

Tuttavia [ES] non è misurabile, ma ciò che possiamo stimare è la concentrazione del substrato (o del prodotto) e la concentrazione totale dell'enzima che è:

$$[\mathbf{E}]_{\text{tot}} = [\mathbf{E}] + [\mathbf{ES}] \quad 1$$

Allo stato stazionario, le velocità di formazione e di demolizione di ES sono uguali, di conseguenza:

$$k_1[\mathbf{E}][\mathbf{S}] = k_{-1}[\mathbf{ES}] + k_2[\mathbf{ES}] \quad 2$$

che possiamo riarrangiare per dare:

$$[\mathbf{ES}] = (k_1/k_{-1} + k_2)[\mathbf{E}][\mathbf{S}] \quad 3$$

Raggruppando il rapporto tra le costanti di velocità dell'equazione 3 in una singola costante K_M :

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad 4$$

L'equazione 3 può quindi essere riscritta come:

$$K_M [ES] = [E][S] \quad 5$$

Si inserisce $[E]_{tot}$ ricordando che $[E] = [E]_{tot} - [ES]$ sostituendo nella 5:

$$K_M [ES] = [E]_{tot}[S] - [ES][S] \quad 6$$

Trasferendo a sinistra e raccogliendo a fattor comune:

$$[ES] (K_M + [S]) = [E]_{\text{tot}} [S] \quad 6$$

che riarrangiata dà:

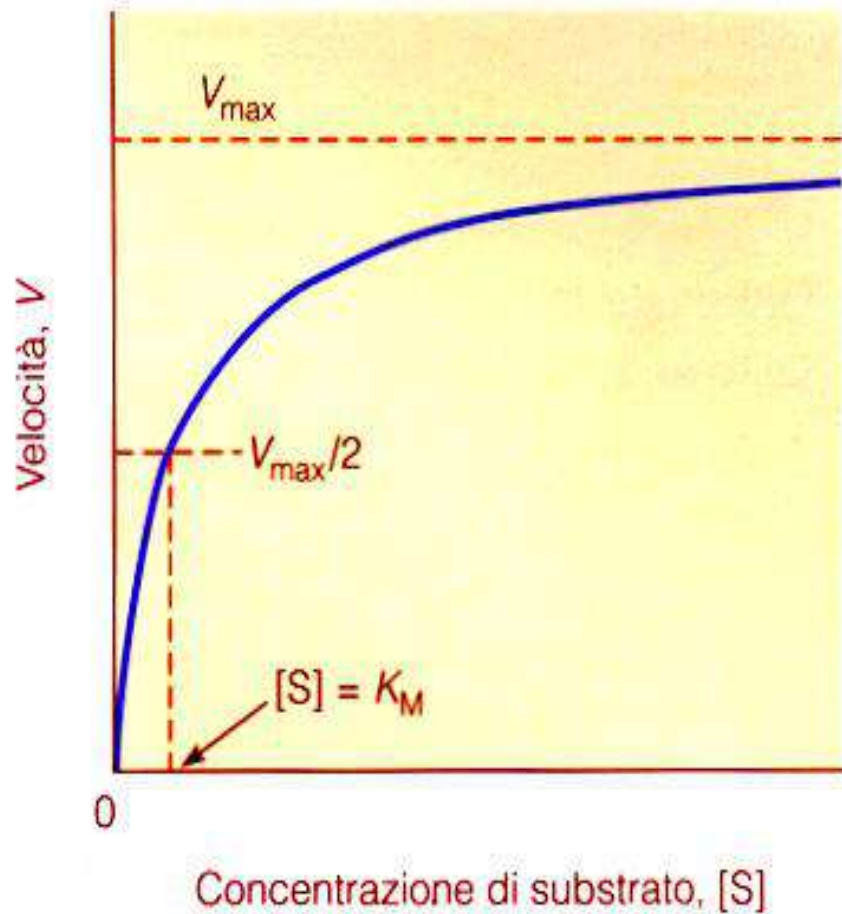
$$[ES] = ([E]_{\text{tot}} [S]) / (K_M + [S]) \quad 7$$

Inserendo questo risultato nell'equazione $V = k_2[ES]$ si ottiene:

$$V = (k_2 [E]_{\text{tot}} [S]) / (K_M + [S]) \quad 8$$

Essa è l'equazione di Michaelis-Menten dove K_M è la costante di Michaelis

L'effetto della concentrazione del substrato sulla velocità di reazione



Nel punto in cui $[S] = K_M$ la reazione avrà esattamente una velocità pari alla metà di quella massima.

Ponendo $[S]$ molto maggiore di K_M nell'equazione 8 otteniamo l'espressione per la V_{\max} :

$$V_{\max} = k_2[E]_{\text{tot}} \quad 9$$

Quindi un modo alternativo di esprimere l'equazione di Michaelis-Menten è:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Il significato della K_M

Enzima	Reazione catalizzata	K_M (mol/L)
Chimotripsina	$\text{Ac-Phe-Ala} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{Ac-Phe} + \text{Ala}$	1.5×10^{-2}
Pepsina	$\text{Phe-Gly} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{Phe} + \text{Gly}$	3×10^{-4}
Tirosil-tRNA sintetasi	$\text{Tirosina} + \text{tRNA} \longrightarrow \text{tirosil-tRNA}$	9×10^{-4}
Ribonucleasi	$\text{Citidin 2', 3' fosfato ciclico} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{citidin 3' - fosfato}$	7.9×10^{-3}
Anidrasi carbonica	$\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$	2.6×10^{-2}
Fumarasi	$\text{Fumarato} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{malato}$	5×10^{-6}

Il significato della K_M

La costante K_M viene spesso associata all'affinità dell'enzima per il substrato. Questa relazione è particolarmente vera nel caso in cui in una reazione a due passaggi $k_2 \ll k_{-1}$ e quindi si ottiene:



$$K_M \cong k_{-1}/k_1 = K_S$$

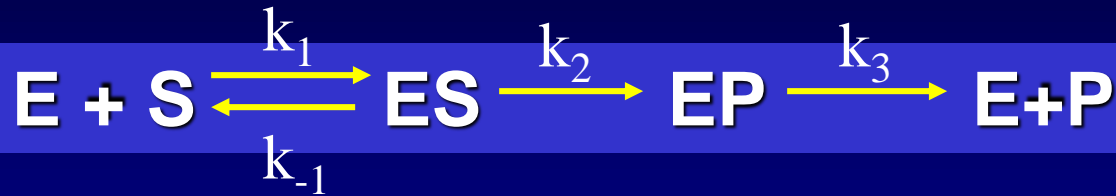
Dove K_S è la costante di equilibrio (di dissociazione) definita dalla seguente equazione:

$$K_S = k_{-1}/k_1 = [E][S]/[ES]$$

Quindi, quando la velocità di formazione del prodotto è molto bassa, la K_M è una misura dell'inverso della forza di legame del substrato.

Le reazioni enzimatiche a più passaggi

Alcune reazioni enzimatiche prevedono più passaggi da ES a E+P:



In questo caso, l'equazione di Michaelis-Menten si può riscrivere sostituendo k_2 con una costante più generale k_{cat} che incorpora le costanti di velocità di tutte le reazioni da ES a E+P, quindi:

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [\text{E}]_{\text{tot}}$$

$$V = (k_{\text{cat}} [\text{E}]_{\text{tot}} [\text{S}] / (K_M + [\text{S}]))$$

Il significato della k_{cat}


La k_{cat} rappresenta una misura diretta della formazione del prodotto operata dalla catalisi in condizioni ottimali (enzima saturato). k_{cat} misura quindi il numero di molecole di substrato trasformate da una molecola di enzima in un secondo. Per questo motivo la k_{cat} viene detta anche numero di turnover.

Quando $[S] \ll K_M$ la maggior parte delle molecole di enzima è in forma libera:

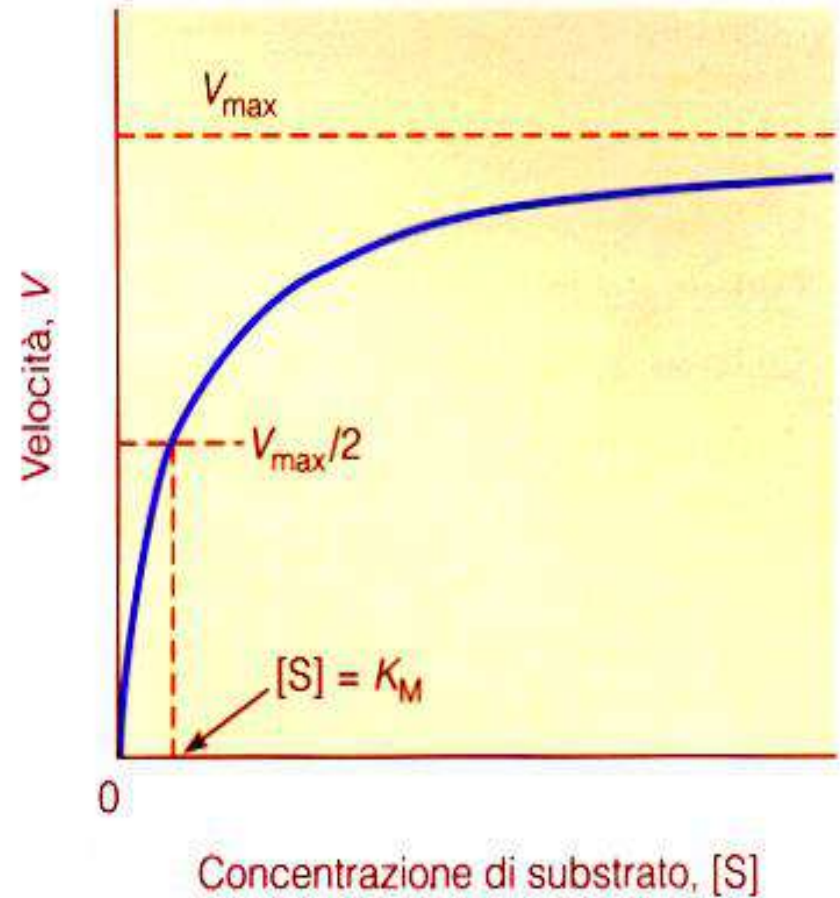
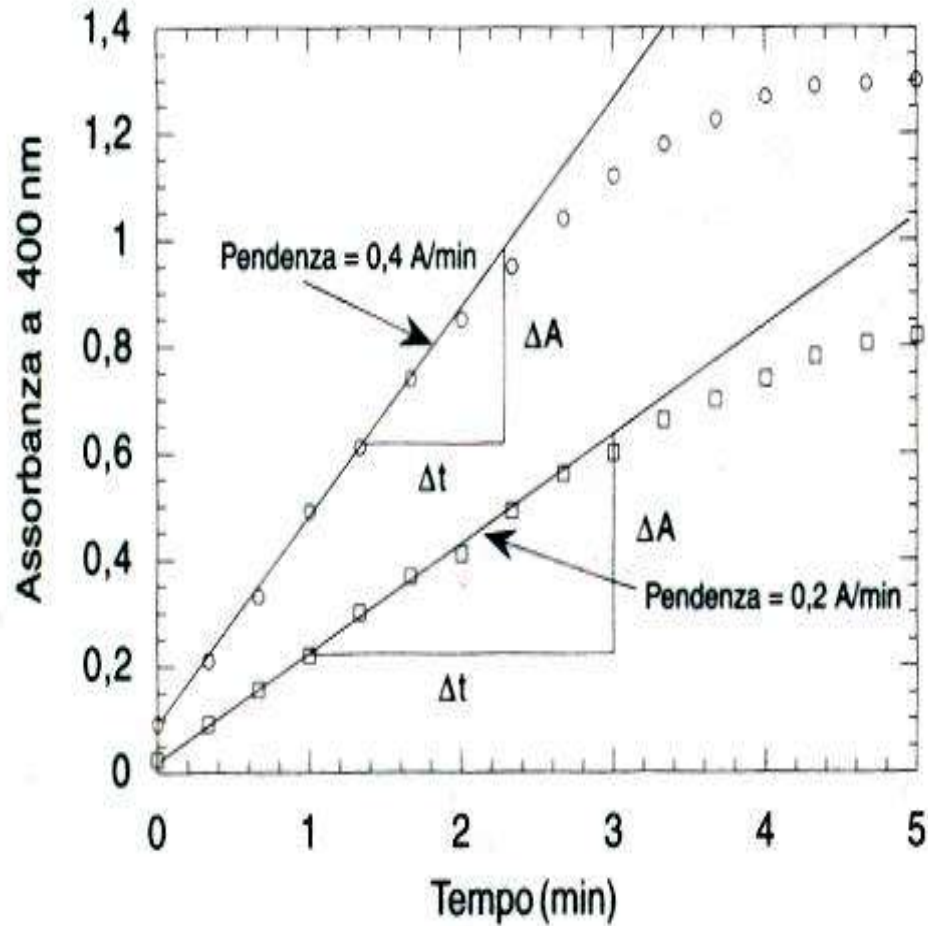
$$V \cong (k_{cat}/K_M)[E][S]$$

Il rapporto k_{cat}/K_M è quindi equiparabile ad una costante di velocità di secondo ordine (per la reazione tra substrato ed enzima libero); esso fornisce una misura dell'efficienza e della specificità dell'enzima.

Il significato di k_{cat}/K_M della chimotripsina per diversi substrati

Aminoacido nell'estere	Catena laterale dell'aminoacido	k_{cat}/K_M [(mol/L) ⁻¹ s ⁻¹]
Glicina	—H	1.3×10^{-1}
Norvalina	—CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.6×10^2
Norleucina	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.0×10^3
Fenilalanina	—CH ₂ — 	1×10^5

L'analisi dei dati cinetici



L'analisi dei dati cinetici

Una volta ottenuti i dati riguardo l'andamento di V in funzione di $[S]$, come è possibile determinare K_M e V_{max} ? Comunemente viene usato il grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk che è un riarrangiamento dell'equazione di Michaelis-Menten:

$$1/V = (K_M + [S]) / (V_{max}[S]) = K_M / (V_{max}[S]) + [S] / (V_{max}[S])$$

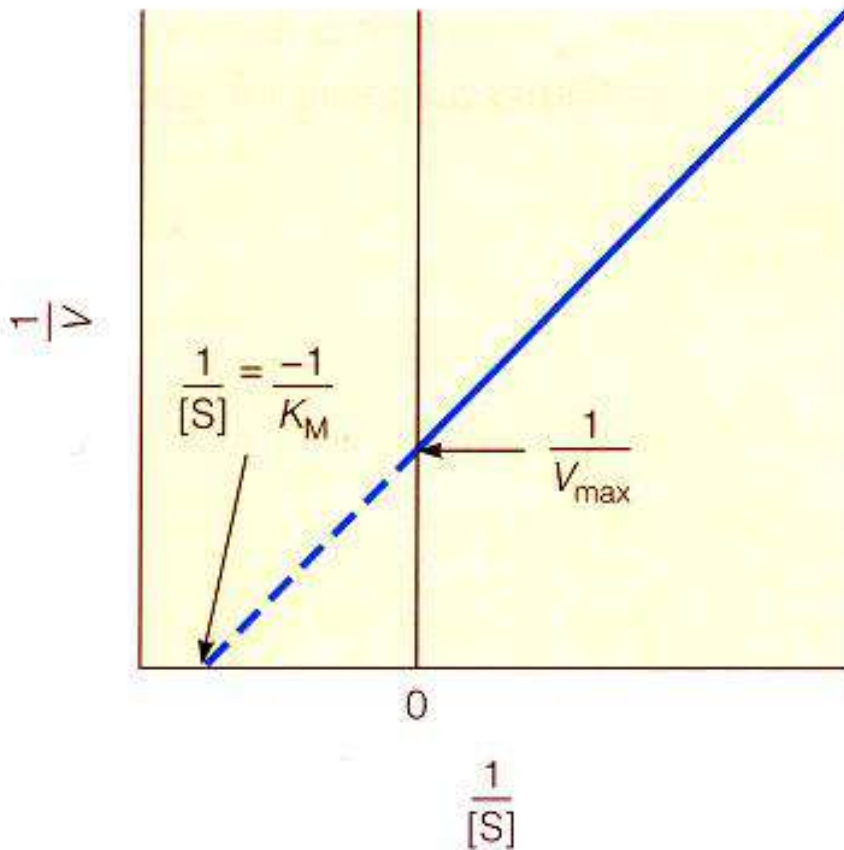
ovvero:

$$1/V = K_M / (V_{max}[S]) + 1 / V_{max}$$

Il grafico di Lineweaver-Burk

Di norma, si predispongono degli esperimenti tutti alla stessa conc. d'enzima, ma a diverse conc. di substrato e si misura la velocità iniziale.

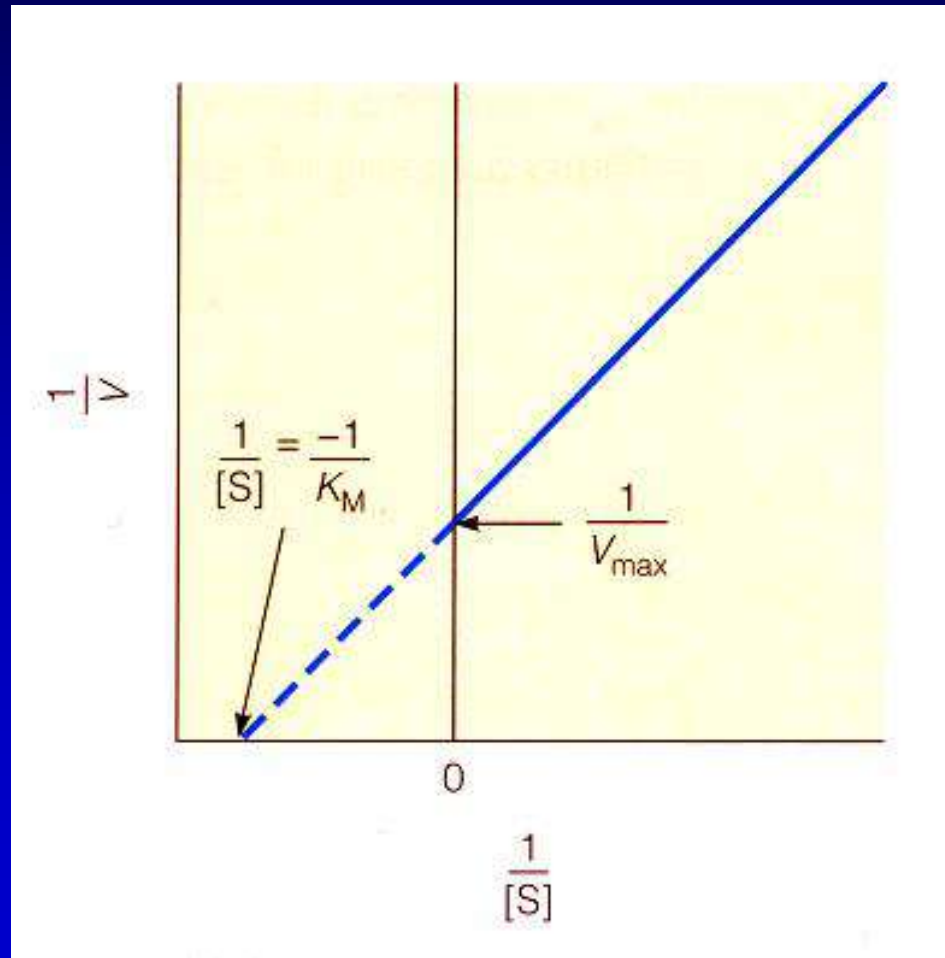
Ottenuti i dati, si pongono nel grafico $1/V$ in funzione di $1/S$ e dovremmo ottenere una linea retta.



Le due intercette permettono di ricavare $1/V_{max}$ e $-1/K_m$, misurando la velocità di catalisi a diverse concentrazioni di substrato.

$$1/V = K_M/(V_{\max}[S])+1/V_{\max}$$

Quando $1/[S]=0$ significa che $[S]$ è infinitamente grande e la velocità di reazione è al suo valore massimo. Avendo V_{\max} e $[E]_{\text{tot}}$ possiamo calcolare k_{cat} sapendo che $V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_{\text{tot}}$.



L'inibizione enzimatica

Molti enzimi vengono inibiti da diverse molecole con svariate caratteristiche.

Vi sono due tipi di inibizioni:

INIBIZIONE REVERSIBILE: implica un legame non covalente dell'inibitore con l'enzima e può quasi sempre essere rimossa allontanando l'inibitore;

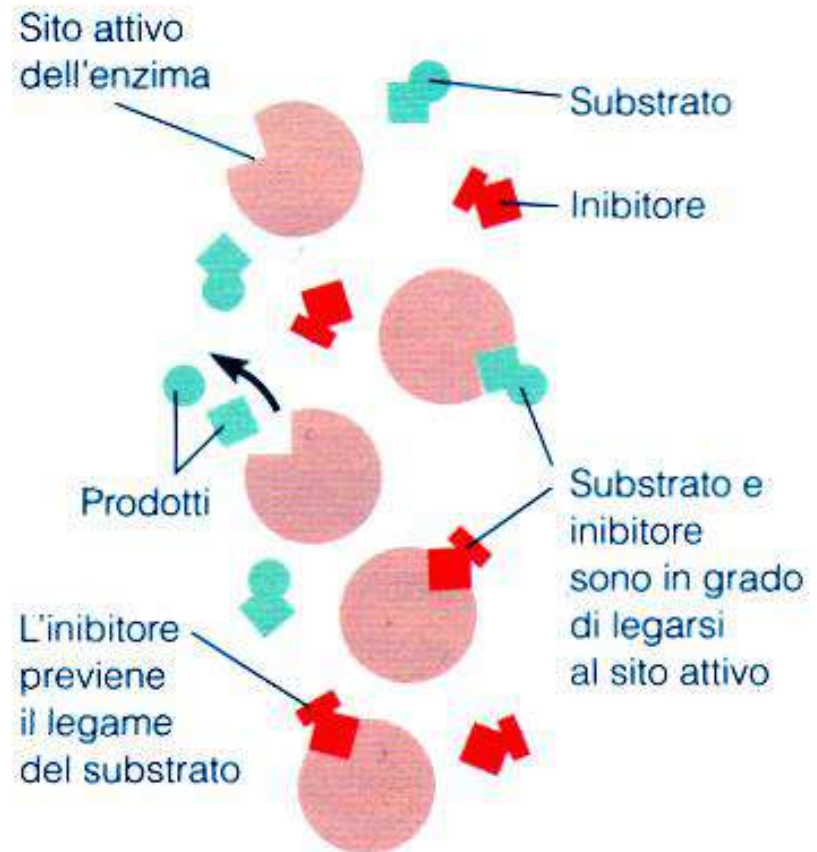
INIBIZIONE IRREVERSIBILE: in cui una molecola si lega covalentemente all'enzima inattivandolo definitivamente.

L'inibizione reversibile

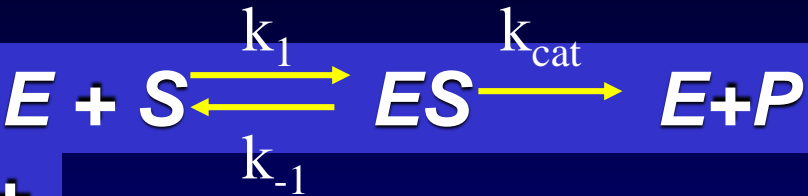
I diversi tipi di inibizione reversibile sono tutti caratterizzati dal legame non covalente dell'inibitore all'enzima, ma differiscono per il meccanismo con cui riducono l'attività enzimatica e per le modalità con cui influenzano la cinetica della reazione.

L'INIBIZIONE COMPETITIVA

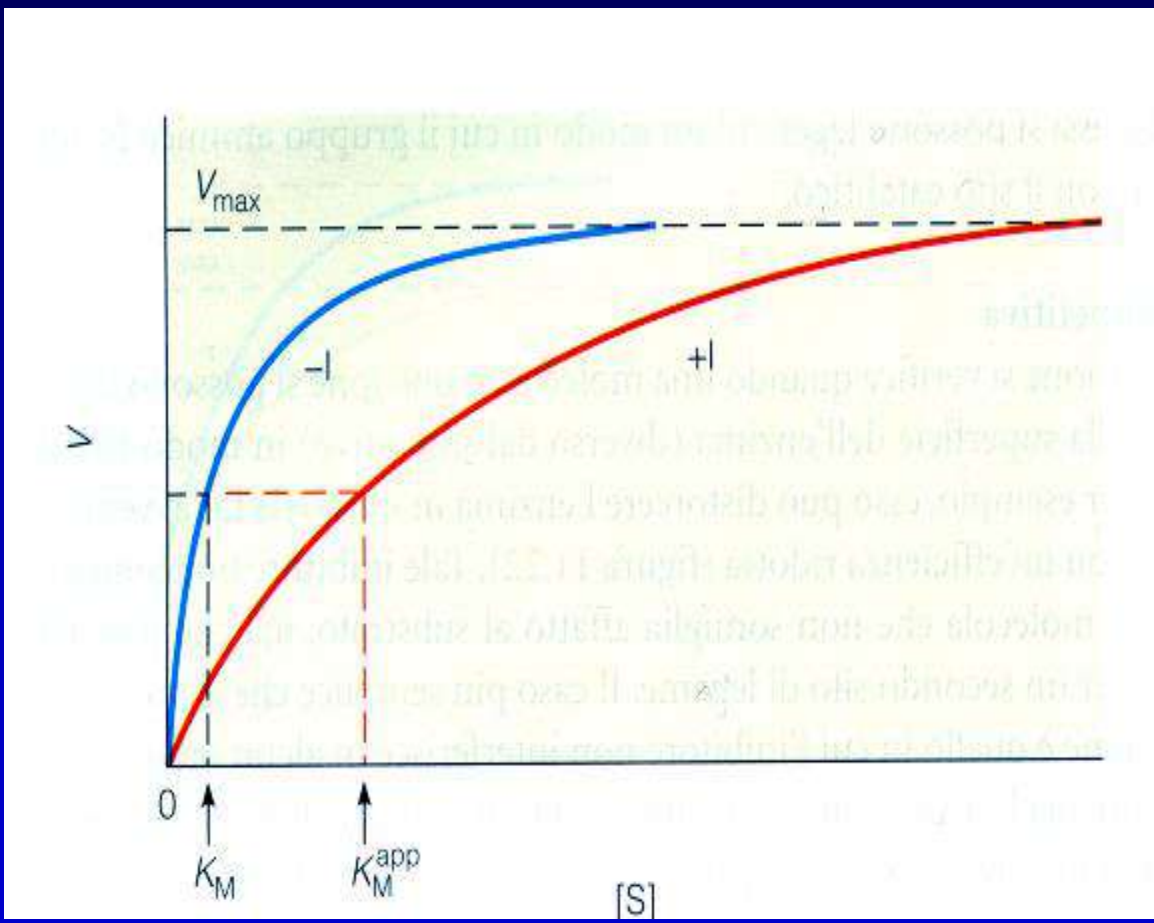
È determinata da molecole simili al substrato che possono quindi essere legate al sito attivo (inibitori competitivi). Per tutto il periodo di tempo in cui l'inibitore occupa il sito attivo, l'enzima non è disponibile per la catalisi.



L'effetto dell'inibizione competitiva sulla cinetica enzimatica



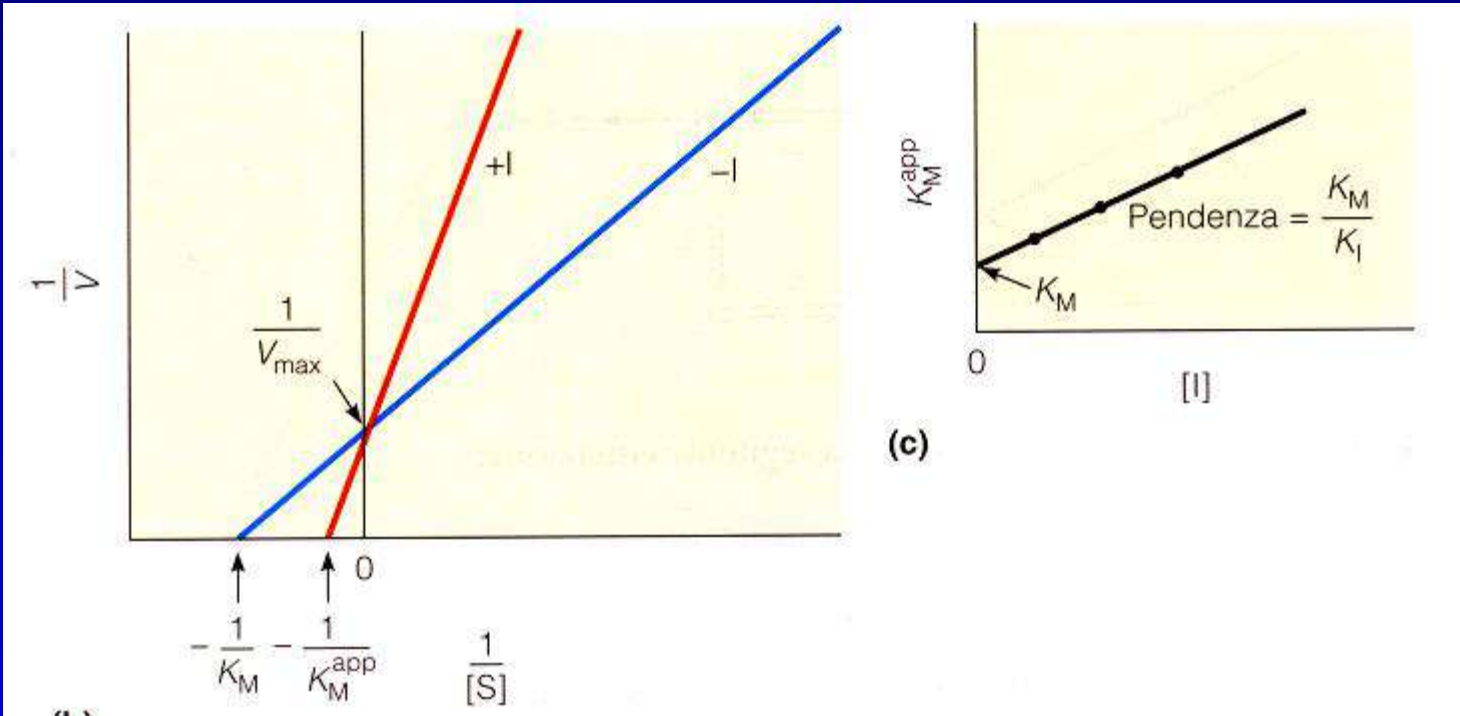
k_I
 \uparrow
 EI



L'enzima pertanto opera come se la sua K_M fosse aumentata per la presenza dell'inibitore. Un aumento di $[I]$ determina un aumento della K_M^{app} .

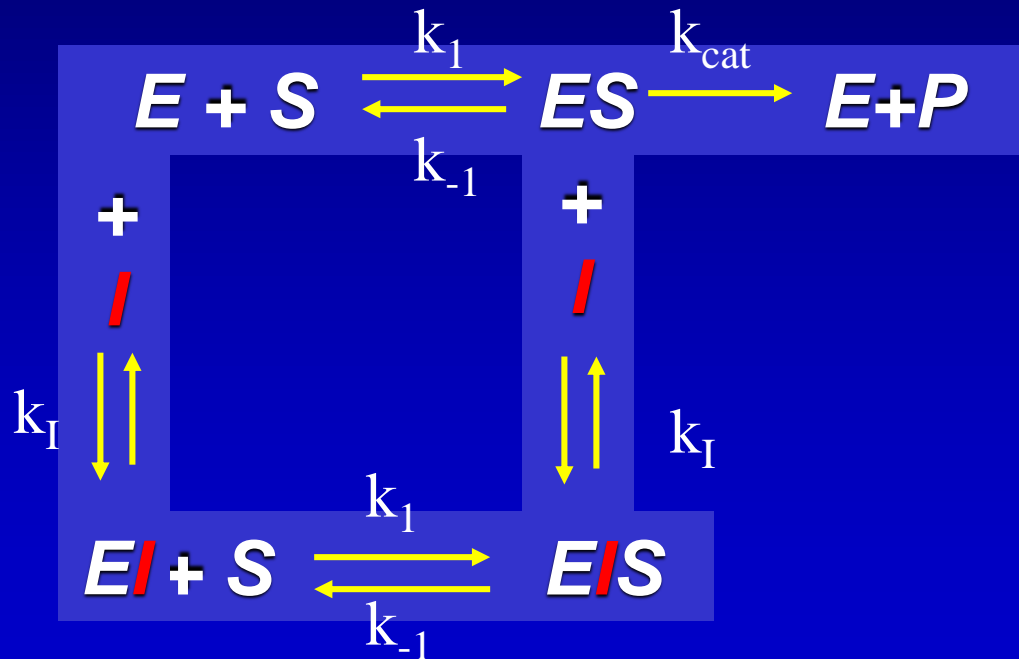
L'effetto dell'inibizione competitiva sulla cinetica enzimatica

É importante notare che V_{max} non varia; infatti quando $[S]$ é molto grande, questa inibizione può essere superata, V si avvicina al valore di V_{max} proprio come in assenza di inibitore. Se le misure di K_m^{app} vengono eseguite a diverse $[I]$ si può determinare la K_I .



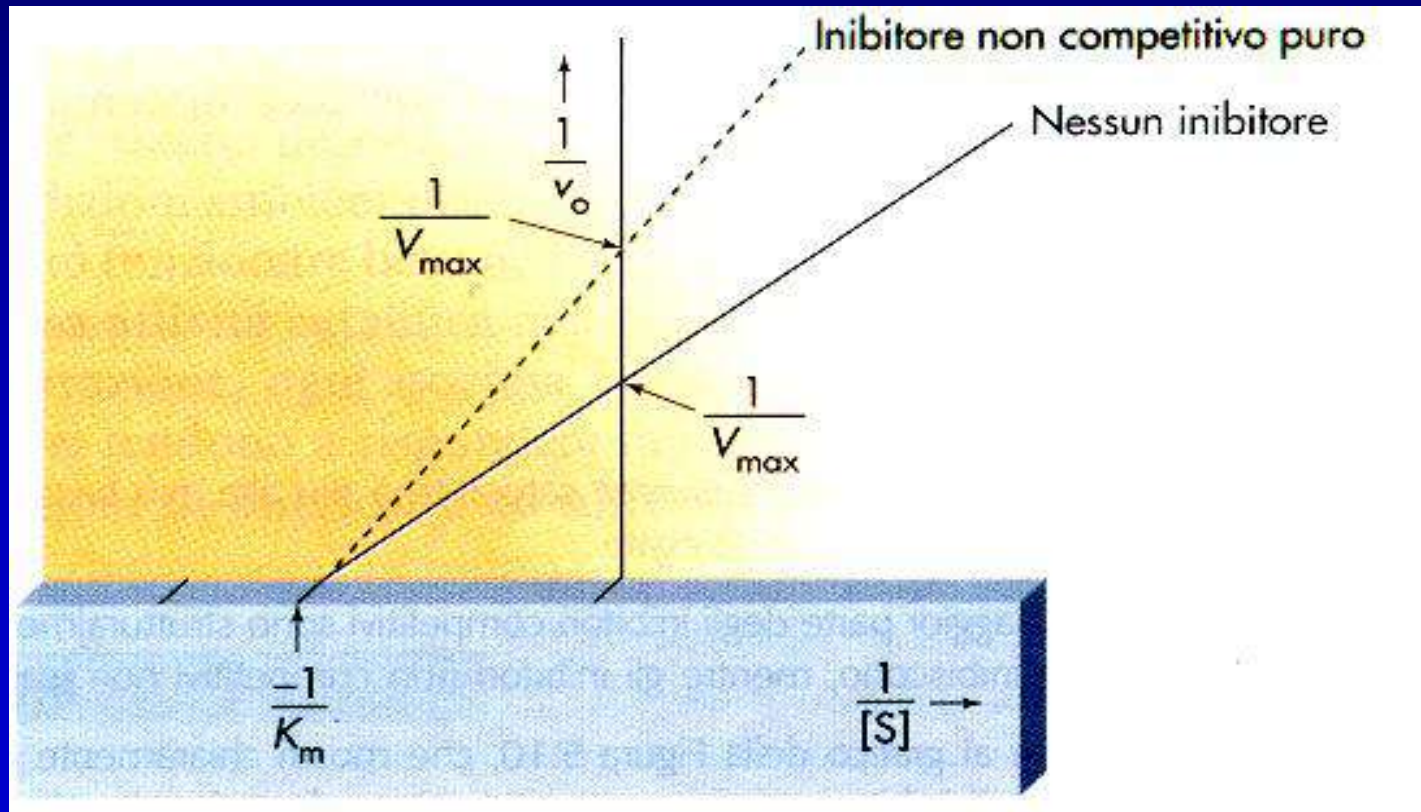
L'inibizione non competitiva

Questo tipo di inibizione si verifica quando una molecola o uno ione si legano ad un secondo sito sulla superficie dell'enzima (diverso dal sito attivo). Quando si lega l'inibitore, l'enzima é inattivo sia che il substrato sia presente o assente. Lo schema di reazione generale è il seguente:



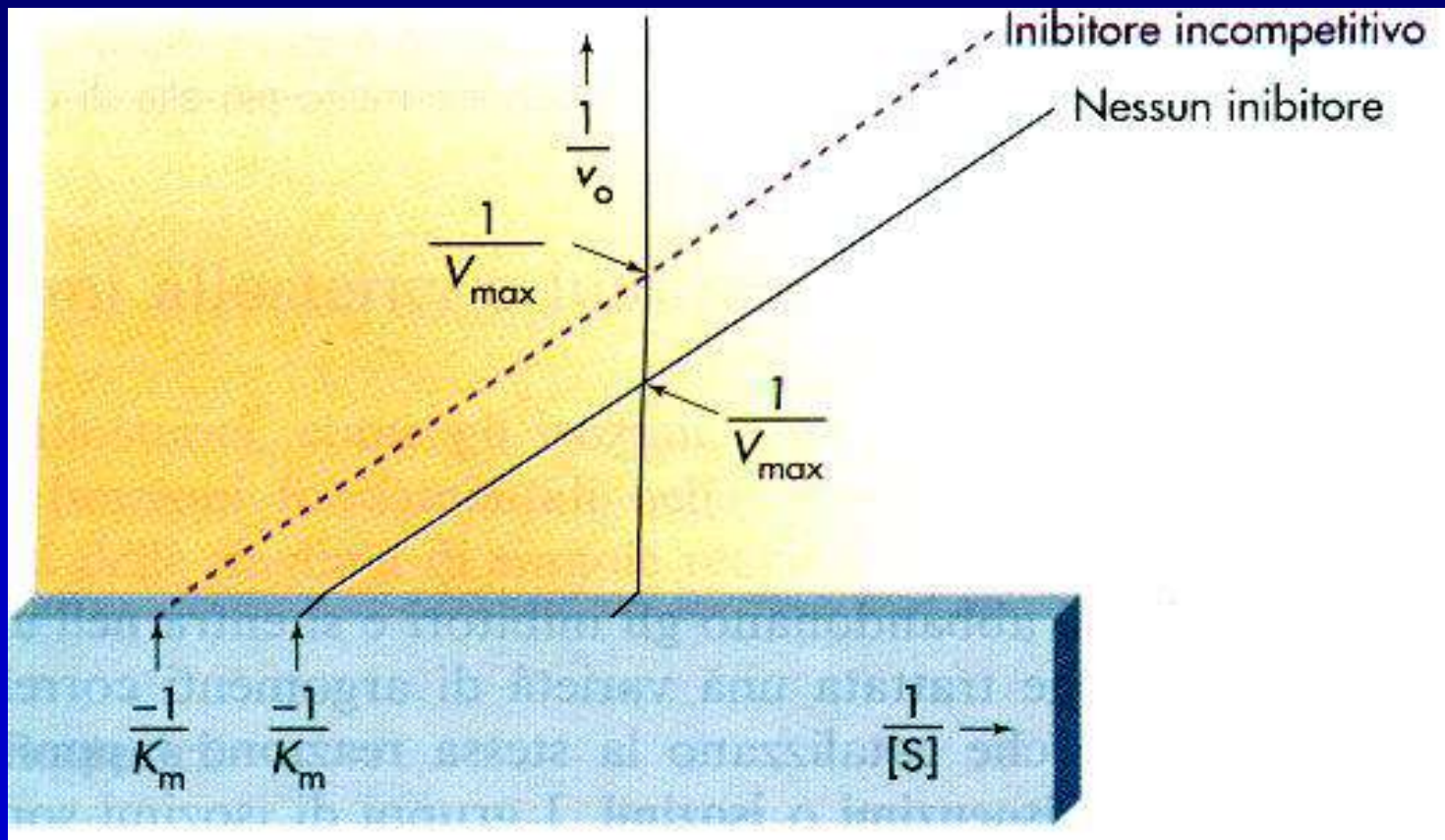
Gli inibitori non competitivi puri

In questo caso, l'inibitore si lega con uguale affinità all'enzima libero ed al complesso ES. Le molecole di enzima che non legano l'inibitore hanno un'affinità normale per il substrato e quindi non vi sono variazioni di K_M , ma solo di V_{max} .



Gli inibitori incompetitivi

Gli inibitori incompetitivi si legano ai complessi ES, ma non agli enzimi in forma libera. Il complesso ESI è cataliticamente inattivo e quindi il valore della V_{\max} diminuisce in presenza dell'inibitore. Anche il valore di K_M tende a diminuire perché la reazione $E+S \rightleftharpoons ES$ viene spinta verso destra.



Lo schema degli inibitori reversibili

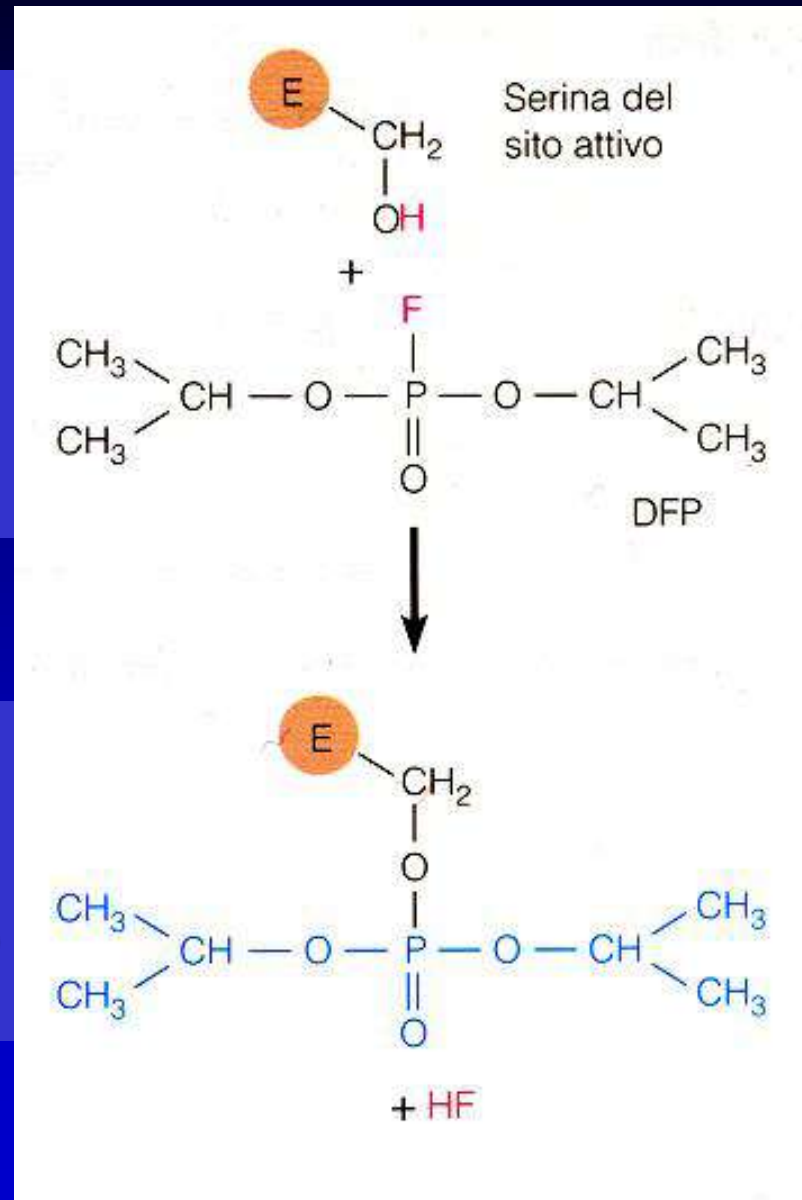
Differenze tra inibitori competitivi, non competitivi e incompetitivi

Classe dell'inibitore	Effetto sulla K_m	Effetto sulla V_{max}	Specificità di legame
Competitivo	Aumenta	Nessuno	Si lega all'enzima libero, ma non al complesso ES
Non competitivo puro	Nessuno	Diminuisce	Si lega sia all'enzima libero sia al complesso ES
Incompetitivo	Diminuisce	Diminuisce	Si lega al complesso ES, ma non all'enzima libero

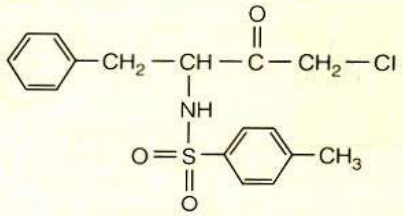
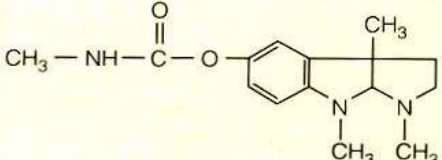
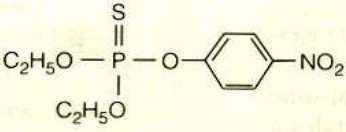
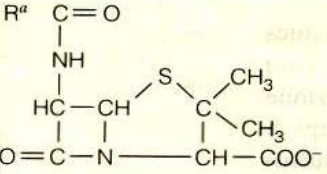
Gli inibitori irreversibili

Essi formano legami covalenti con le molecole enzimatiche. Questi inibitori sono quasi tutti sostanze tossiche; la maggior parte di essi reagisce con alcuni gruppi funzionali del sito attivo rendendolo inaccessibile al substrato o inattivandolo.

Il diisopropilfluorofosfato (DFP) forma un addotto covalente con i residui di serina della proteasi e dell'acetilcolinesterasi a formare un composto tetraedrico analogo dello stato di transizione.



Esempi di inibitori irreversibili

Nome	Formula ^a	Origine	Modalità di azione
Cianuro	CN ⁻	Mandorle amare	Reagisce con gli ioni metallici degli enzimi (ovvero, Fe, Zn, Cu)
Diisopropil fluorofosfato (DFP)	$(CH_3)_2-CH-O-\overset{\overset{F}{ }}{\underset{\underset{O}{ }}{P}}-O-CH-(CH_3)_2$	Sintetica	Inibisce gli enzimi contenenti serina nel sito attivo
Sarin	$(CH_3)_2-CH-O-\overset{\overset{F}{ }}{\underset{\underset{O}{ }}{P}}-CH_3$	Sintetica (gas nervino)	Come per il DFP
N-Tosil-L-fenilalaninaclorometilchetone (TPCK)		Sintetica	Reagisce con His 57 della chimotripsina
Fisostigmina		Fave di Calabar	Forma derivati acilici con l'acetilcolinesterasi e altri enzimi
Parathion		Sintetica (insetticida)	Inibisce l'enzima acetilcolinesterasi
Penicillina		Da funghi del genere <i>Penicillium</i>	Inibisce gli enzimi coinvolti nella sintesi della parete delle cellule batteriche

^aR = gruppo variabile; differisce nelle diverse penicilline.

I metodi enzimatici di analisi

L'analisi enzimatica dei substrati

Gli enzimi vengono usati spesso per identificare e/o quantificare sostanze chimiche specifiche in soluzione.

I vantaggi sono derivati dal fatto che le reazioni enzimatiche sono veloci e molto specifiche per la natura dei substrati e che, anche in condizioni molto blande, catalizzano reazioni che raramente procedono a velocità significative. La specificità degli enzimi può superare la necessità di rimuovere materiali interferenti dai campioni.

In questi saggi, la reazione deve procedere fino a completamento ed il grado, fino al quale procede la reazione, permette la determinazione quantitativa del composto specifico.

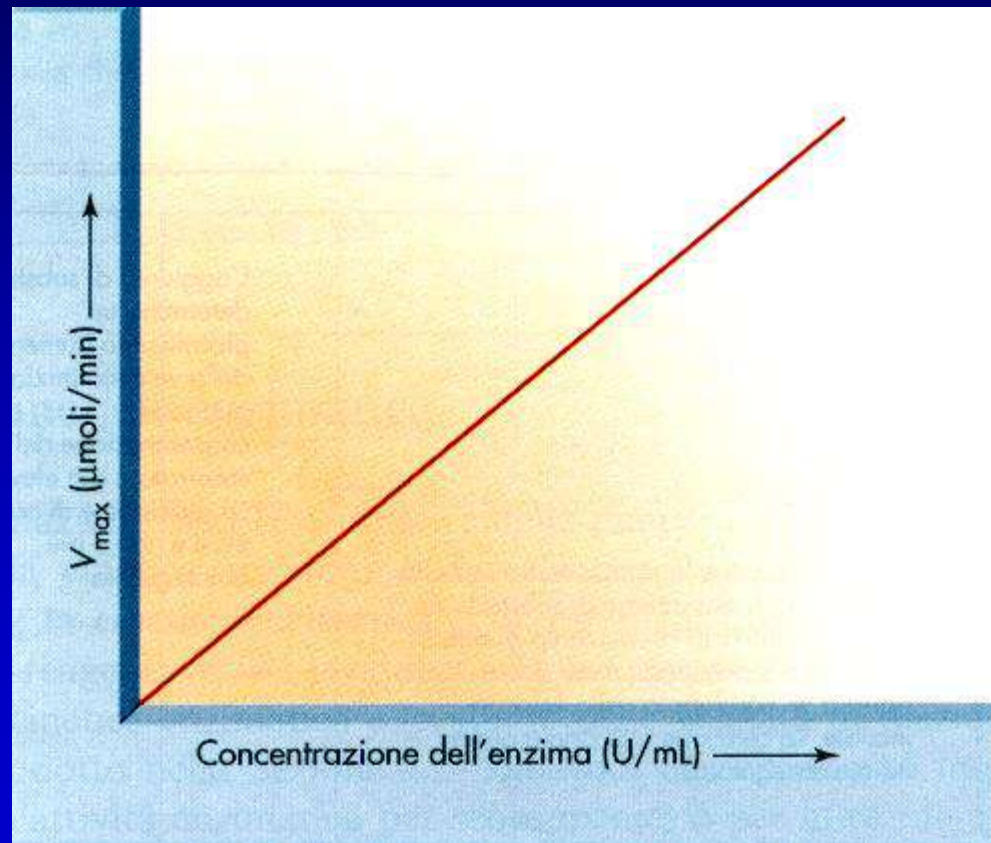
I saggi di attività enzimatica

È possibile determinare (es. fosfatasi alcalina) la quantità di enzimi particolari in fluidi biologici, misurandone l'attività con substrati specifici.

Per queste determinazioni si misura la velocità di conversione di un particolare substrato in prodotto.

Viene impiegato in questo caso una concentrazione di substrato $[S] \gg K_M$ in modo da avere una stima della V_{max} (apparente) in modo da non avere una diminuzione della velocità di reazione con il progredire della stessa.

Queste condizioni sperimentali sono note come cinetica di ordine zero: non c'è alcuna dipendenza dalla concentrazione del substrato, la velocità osservata è proporzionale alla concentrazione di enzima.



Considerazioni pratiche

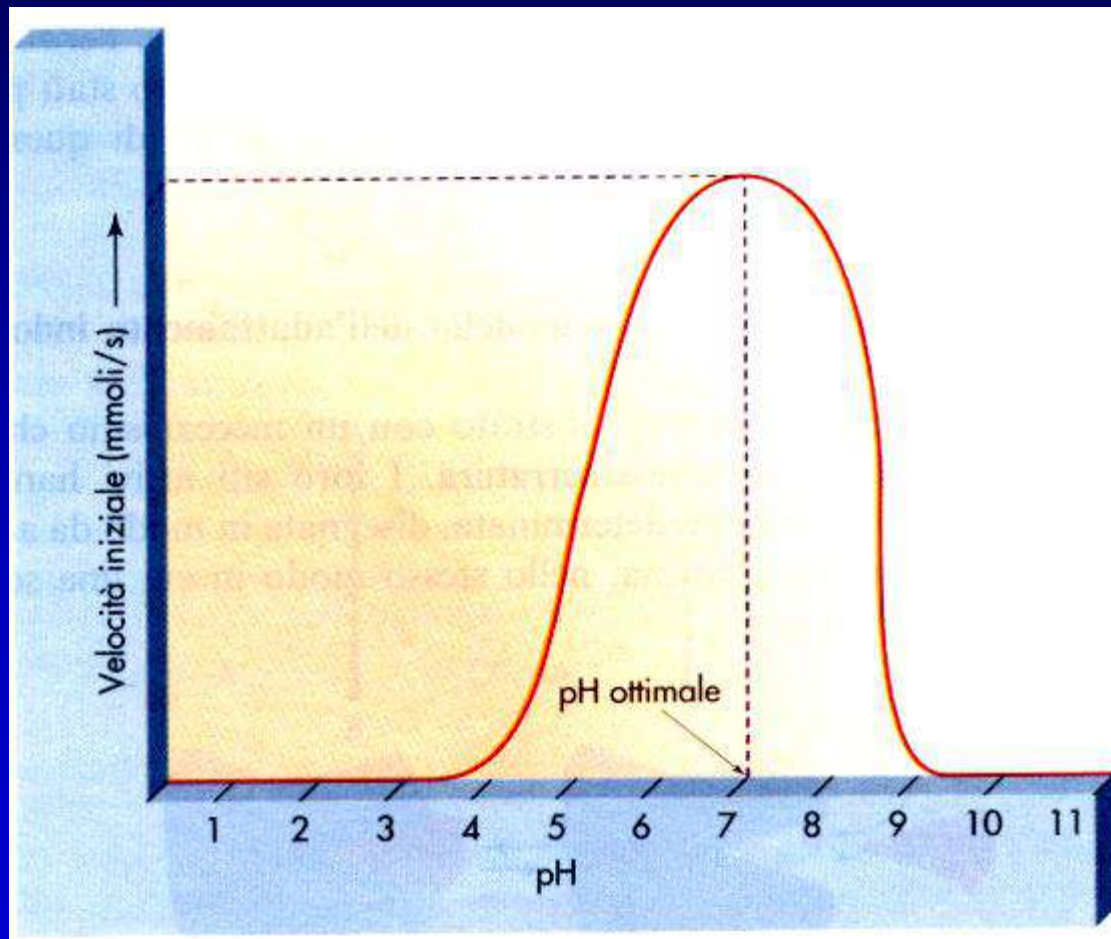
Molti enzimi sono inibiti da varie sostanze, pertanto bisogna tenere conto di questi fattori ed usare dei controlli appropriati.

Esempio: agenti chelanti, come citrato ed altri composti capaci di formare complessi con metalli sono spesso inibitori potenti di alcune proteine metallo-dipendenti come le chinasi.

Se per esempio stiamo misurando la quantità formata di un alcool in un fluido biologico può essere utile aggiungere alla miscela di reazione una quantità nota di alcool: metodo dello standard interno.

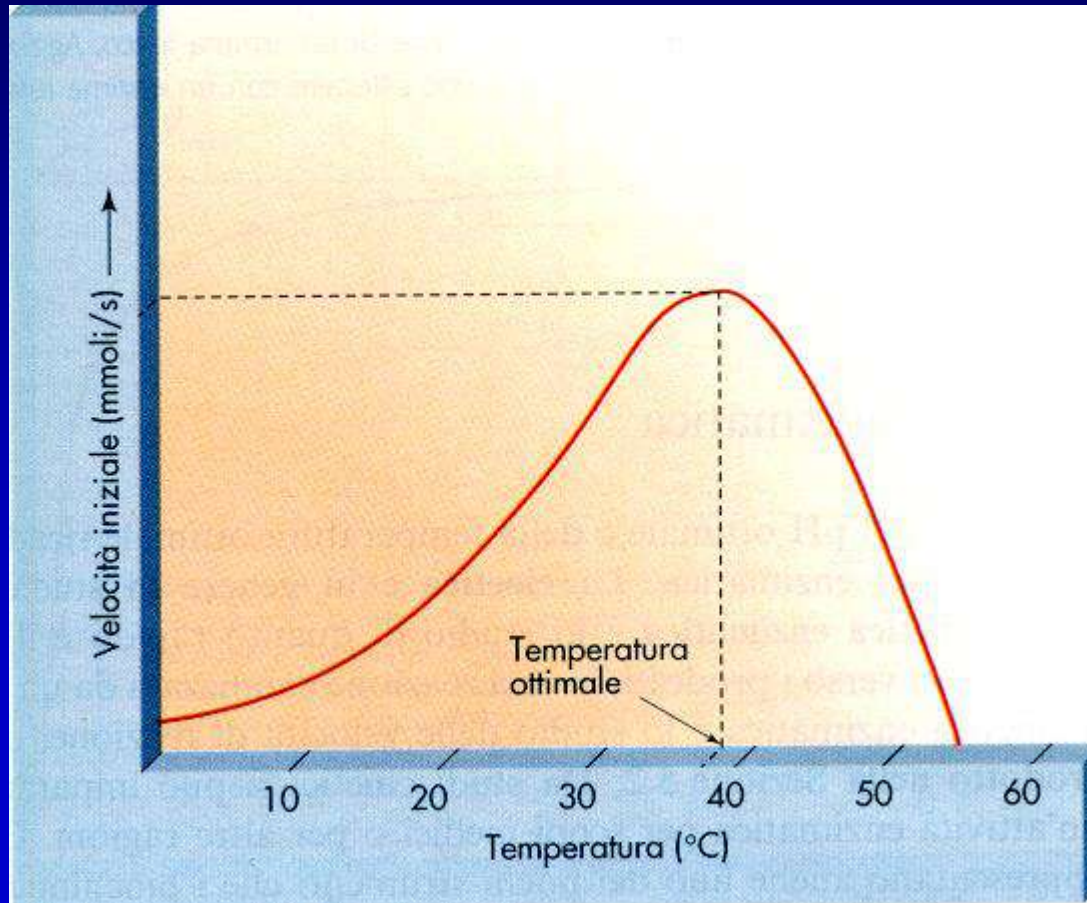
L'effetto del pH

L'attività enzimatica è influenzata dal pH. Ciò può derivare dai valori di pK_a del substrato e/o dell'enzima. Perciò il pH scelto e la selezione di un tampone appropriato sono fondamentali per i saggi di attività enzimatica.



L'effetto della temperatura

Le reazioni enzimatiche, come le reazioni chimiche, dipendono dalla temperatura, inoltre se la temperatura diventa troppo alta, l'enzima può denaturarsi e si avrà perdita di attività.



I saggi accoppiati

Spesso si usano metodi spettrofotometrici per monitorare le reazioni enzimatiche. Questi possono essere molto convenienti se il substrato o il prodotto contengono un gruppo cromoforo (o fluoroforo) distinto.

Se questi non sono evidenziabili, la reazione può essere accoppiata ad un'altra reazione (enzimatica o non enzimatica) che produca un composto colorato.



La quantità di C che si forma sarà equivalente alla quantità iniziale di A presente se le reazioni procedono a completamento.

I saggi accoppiati

Se l'equilibrio della reazione da misurare non è spostato verso destra, la reazione può essere accoppiata con un'altra che la spinge a completamento.



Per determinare A , nel caso in cui sia sfavorita la formazione di B , possiamo accoppiare questa reazione ad un'altra reazione irreversibile (reazione 2), in modo che tutto il composto A sia quantitativamente convertito in C . La determinazione di C ci permette di stimare A .

GLI ENZIMI REGOLATORI

Il controllo della regolazione a livello del substrato

Più alta è la concentrazione di substrato, più rapidamente avviene la reazione enzimatica (fino alla saturazione dell'enzima); al contrario, alte concentrazioni di prodotto tendono a inibire la trasformazione del substrato, in questo caso il prodotto può agire da inibitore competitivo.

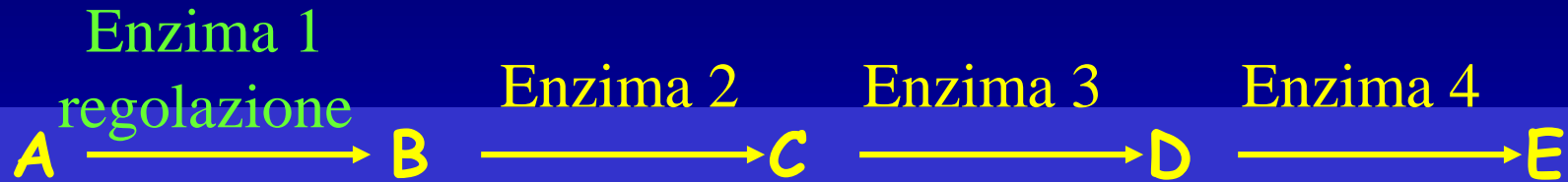
Esochinasi



Tuttavia, il controllo a livello del substrato non è sufficiente per la regolazione di molte vie metaboliche; in altre situazioni è indispensabile che l'enzima sia regolato da alcune sostanze completamente diverse dal substrato o dal proprio prodotto.

Gli enzimi regolatori

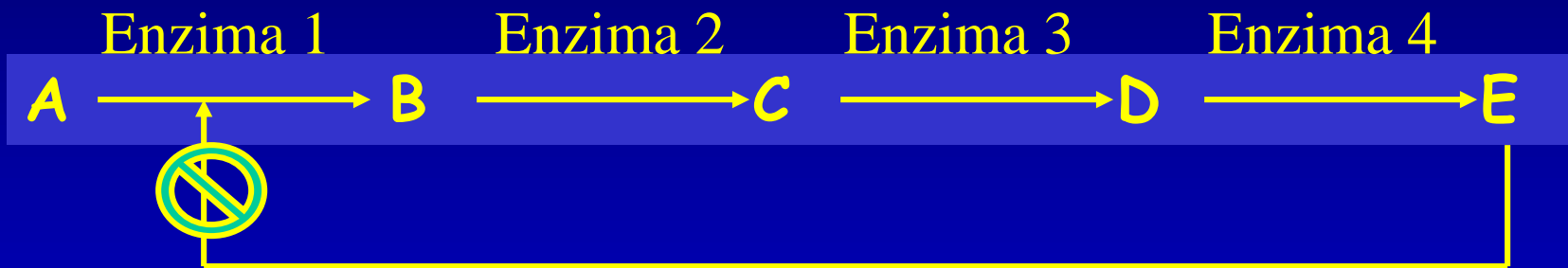
In ogni sistema enzimatico in cui vi sia una sequenza di reazioni catalizzate da diversi enzimi (il prodotto del primo enzima diventa il substrato della seconda), vi è almeno un enzima che influenza in modo determinante la velocità complessiva in quanto catalizza la reazione più lenta.



Inoltre, in generale, il primo enzima della sequenza metabolica è un enzima regolatore, in questo modo si evita di sottrarre metaboliti ed energia ad altre sequenze di reazioni importanti.

La regolazione a feedback

La cellula può controllare la formazione del prodotto finale tramite attivazione o inibizione di un passaggio della via metabolica. Il sistema più efficiente è quello di agire sul primo passaggio.



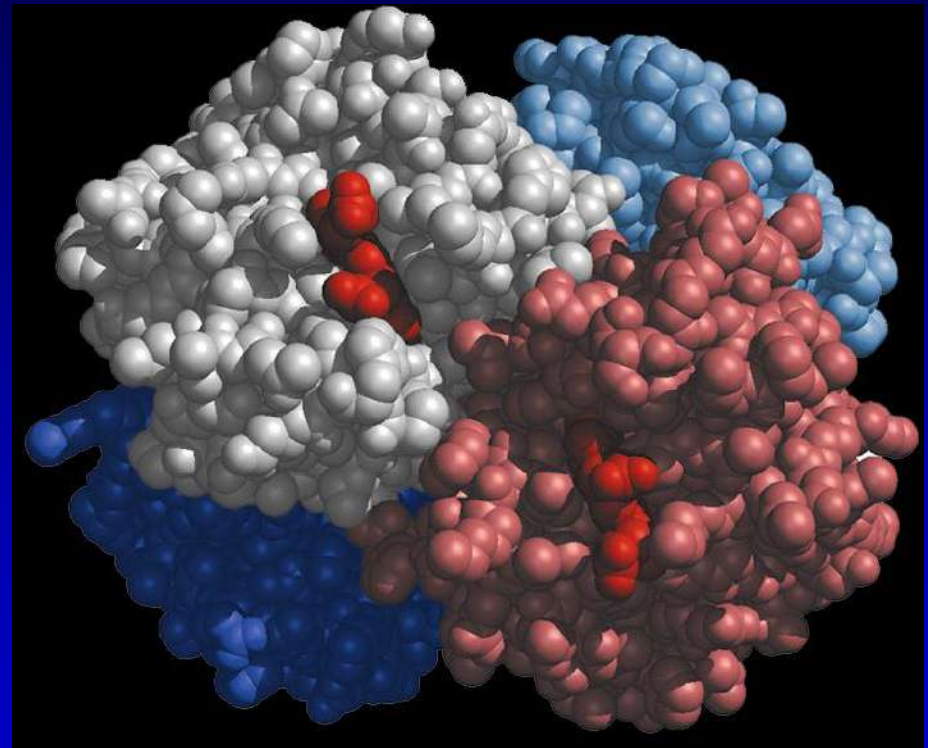
La trasformazione di A in B viene quindi controllata da E: questo processo è chiamato feedback o, più precisamente feedback negativo, in quanto un aumento della concentrazione di E ha come conseguenza una diminuzione della sua velocità di formazione.

La regolazione allosterica

Il termine allosterico deriva dal greco (*állos* = altro; *stereós* = forma). Le proteine così definite possono assumere altre conformazioni indotte dal legame di opportuni modulatori.

In una proteina allosterica, il legame di un ligando ad un sito modifica le proprietà di un altro sito sulla stessa molecola.

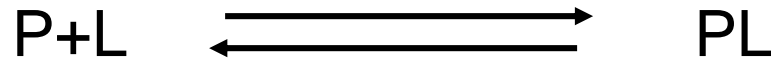
Gli enzimi allosterici sono proteine oligomeriche costituite da due o più subunità e con diversi siti attivi.



Le interazioni allosteriche (cooperative) avvengono quando il legame di un ligando ad un sito specifico viene influenzato dal legame di un altro ligando, detto effettore o modulatore, a livello di siti diversi nella proteina.

L'interazione proteina-ligando può essere descritta in termini quantitativi

Il legame reversibile di un ligando (L) a una proteina (P) può essere descritto dall'espressione all'equilibrio:



La costante di equilibrio K_a di questa reazione è:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (1)$$

Il termine K_a (M^{-1}) è la costante di associazione, cioè una misura dell'affinità del ligando L per la proteina P.

Pertanto, il rapporto tra proteina con il ligando legato e proteina libera è direttamente proporzionale alla concentrazione del ligando libero:

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \quad (2)$$

I modelli Allosterici

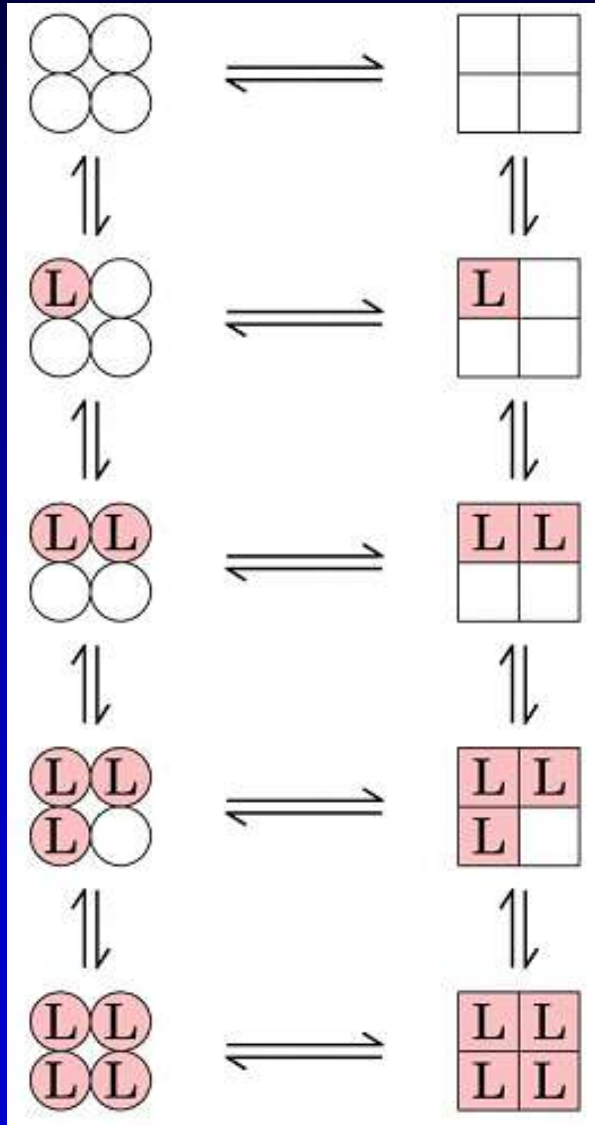
Sono stati sviluppati diversi modelli per cercare di descrivere i meccanismi molecolari alla base dei fenomeni di cooperatività di legame nelle proteine allosteriche.

Il modello più noto che descrive il legame cooperativo di un ligando ad una proteina è il modello MWC sviluppato nel 1965 da J. Monod, J. Wyman e J.P. Changeaux.

Il modello simmetrico MWC (1965)

Protomeri
nello stato T

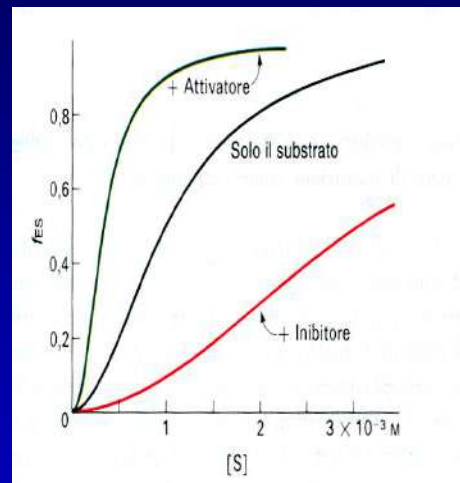
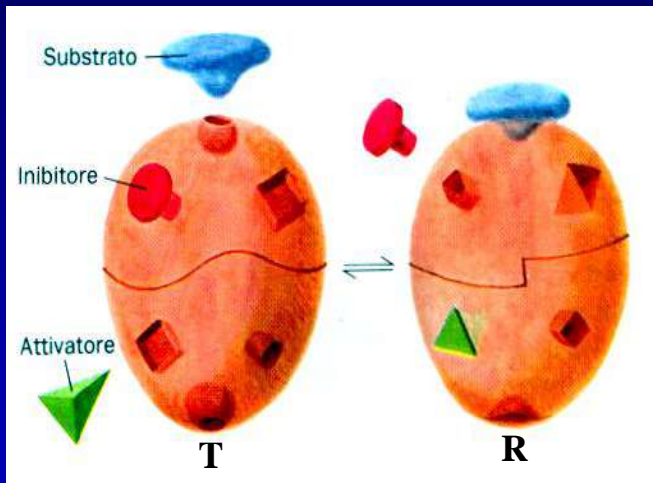
Protomeri
nello stato R



- Una proteina allosterica è un oligomero costituito da protomeri (subunità) simmetricamente correlati;
- ogni protomero può esistere in due stati conformazionali, chiamati T (tensed) e R (relaxed) in equilibrio tra loro;
- il legame del ligando induce un cambiamento conformazionale concertato dalla forma T alla forma R senza formazione di specie intermedie e mantenendo la simmetria della proteina.

Il modello simmetrico MWC (1965)

Nel modello simmetrico dell'allosterismo (MWC), gli effettori omotropici (substrato) ed eterotropici (attivatori) positivi si legano preferenzialmente alla forma R stabilizzandola, mentre gli effettori eterotropici negativi (inibitori) si legano allo stato T rendendolo più stabile.

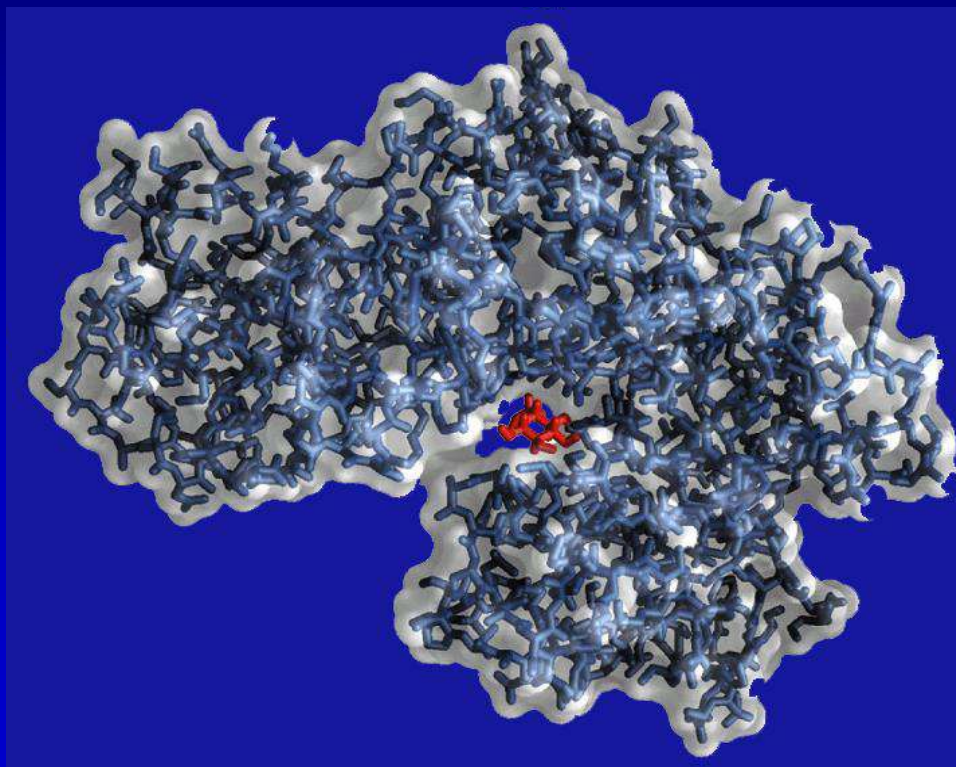


Il modello simmetrico (MWC) fornisce una plausibile razionalizzazione delle proprietà di legame del ligando in parecchie proteine ed enzimi. Tuttavia vi sono diverse valide obiezioni a questo modello:

- 1) è difficile credere che la simmetria sia invariabilmente conservata in tutte le proteine oligomeriche a seguito del legame del ligando;
- 2) Il modello MWC può descrivere solo gli effetti omotropici positivi, non quelli negativi.

Il modello sequenziale KNF (1966)

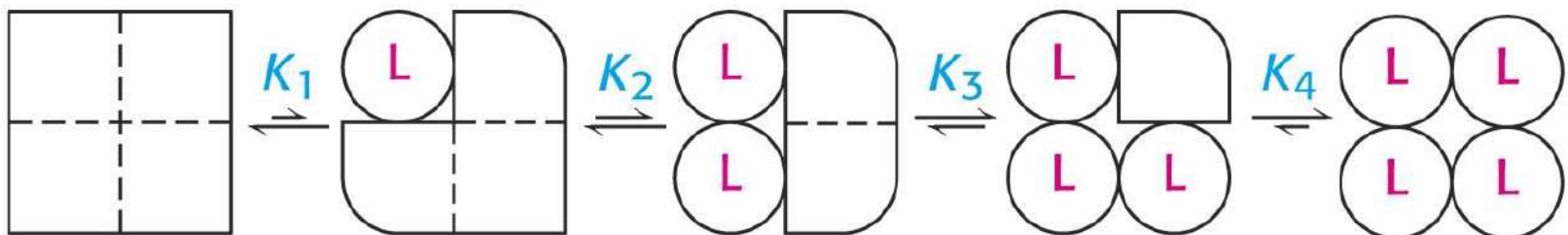
Il modello simmetrico (MWC) implicitamente assume il modello di Fischer a "chiave serratura" per il legame dei ligandi. In questo modello i siti di legame vengono considerati rigidi e complementari come forma al loro ligando. Nell'ipotesi dell'adattamento indotto (sequenziale), più sofisticata, si postula invece che un'interazione flessibile tra substrato ed enzima induca una modificazione conformazionale dell'enzima stesso (trasmessa attraverso l'interfaccia tra le subunità) che porta ad un aumento della sua affinità per il substrato.



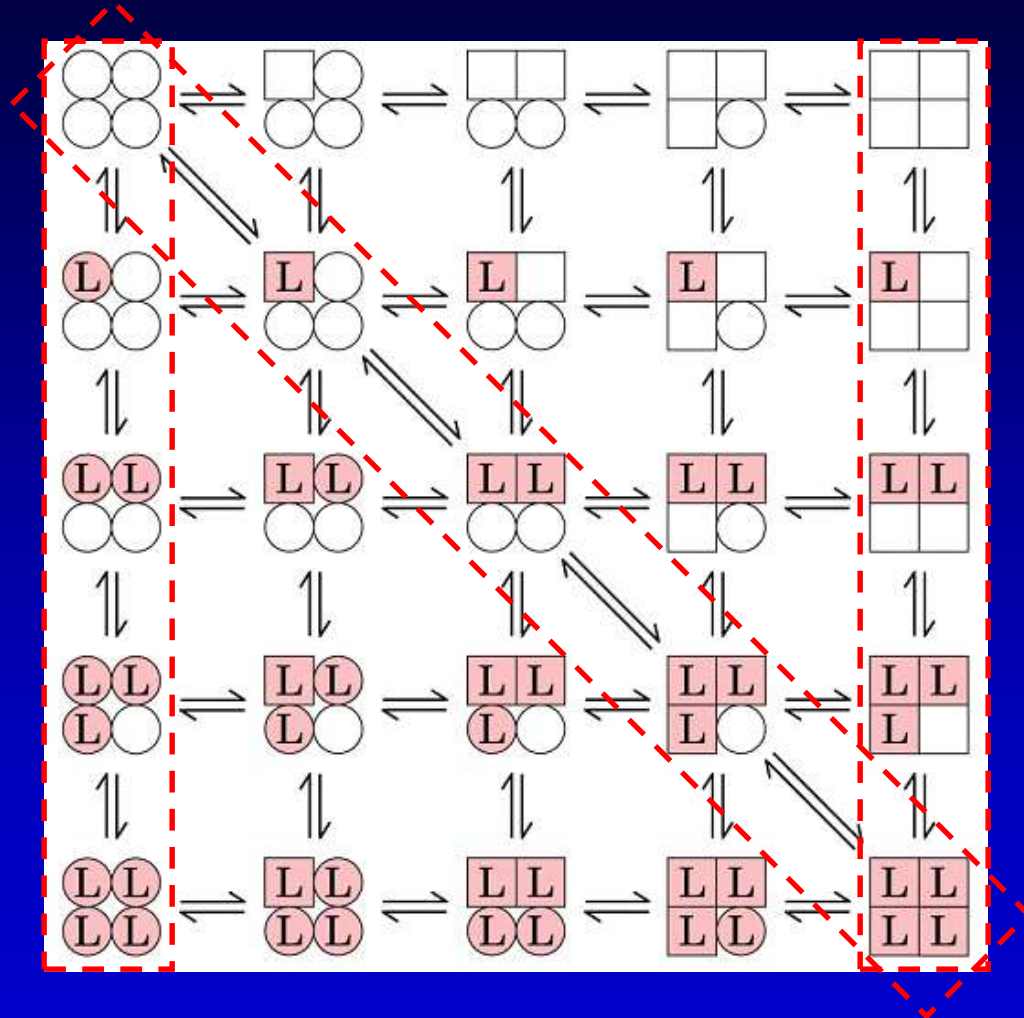
Il modello sequenziale KNF (1966)

Koshland, Nemethy e Filmer nel 1966 proposero un modello confermato in molti enzimi mediante analisi ai raggi X.

Nel modello sequenziale, il legame del ligando induce una modificazione conformazionale in un protomero (subunità); le interazioni cooperative derivano dagli effetti che queste variazioni conformazionali hanno sulle subunità vicine. L'affinità della proteina per il legame del ligando varia con il numero di molecole di ligando legate, passando attraverso una serie di forme intermedie.



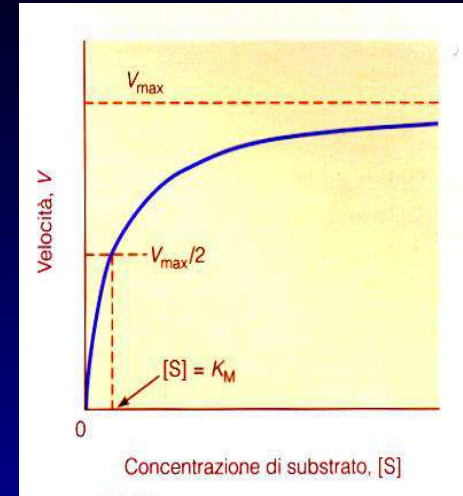
Il modello generale di interazioni allosteriche



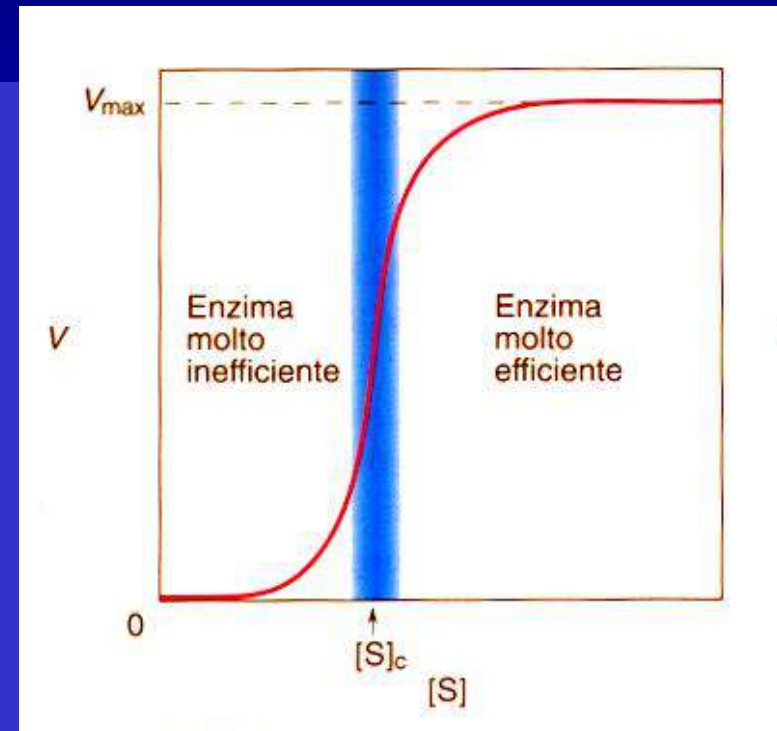
Gli enzimi allosterici

Gli enzimi non allosterici hanno un andamento iperbolico delle curve di V in funzione di $[S]$ descritto dall'equazione di Michaelis Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$



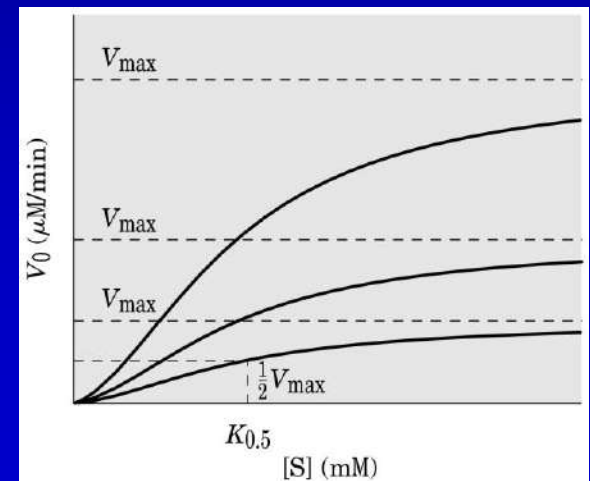
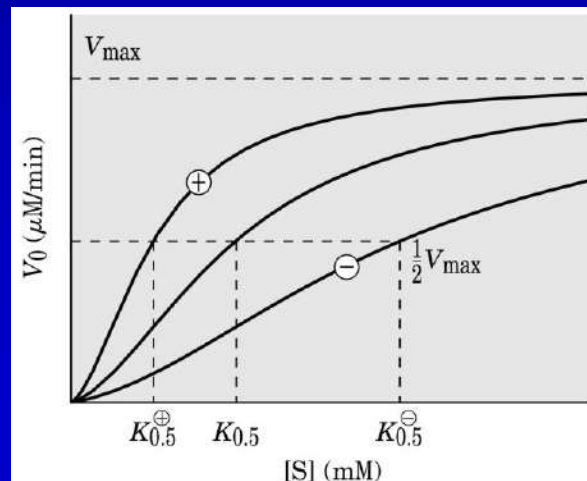
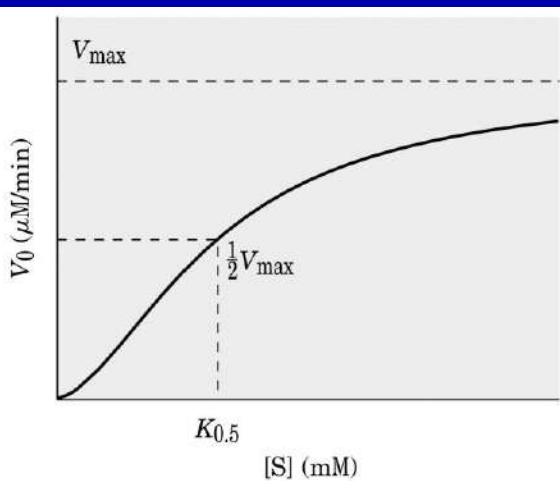
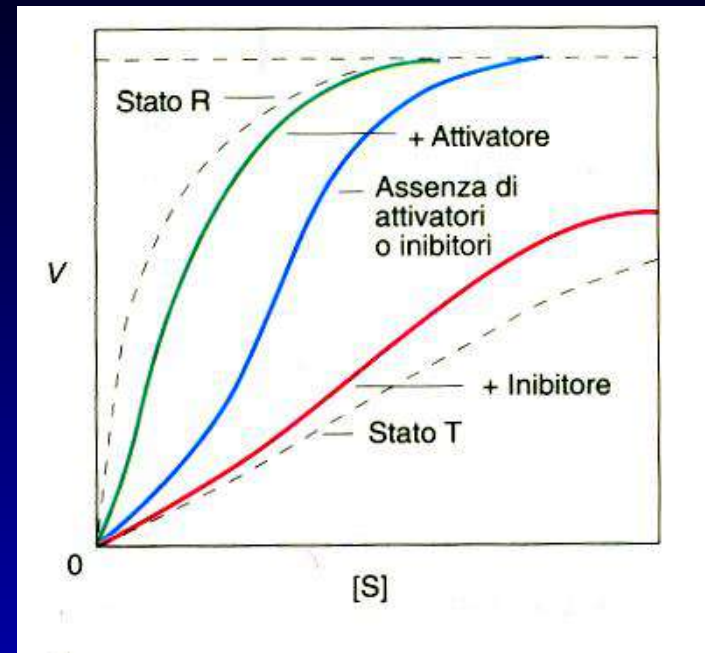
Le proprietà cinetiche degli enzimi allosterici non seguono le cinetiche di Michaelis-Menten. Gli enzimi allosterici, che legano il substrato in modo cooperativo, danno curve di tipo sigmoide. A basse concentrazioni di $[S]$ l'enzima si comporta come se avesse una debole capacità di legame ($K_{0.5}$ elevata), all'aumentare di $[S]$ viene indotto un aumento di quantità di substrato legato e quindi di efficienza catalitica dell'enzima.



La regolazione allosterica

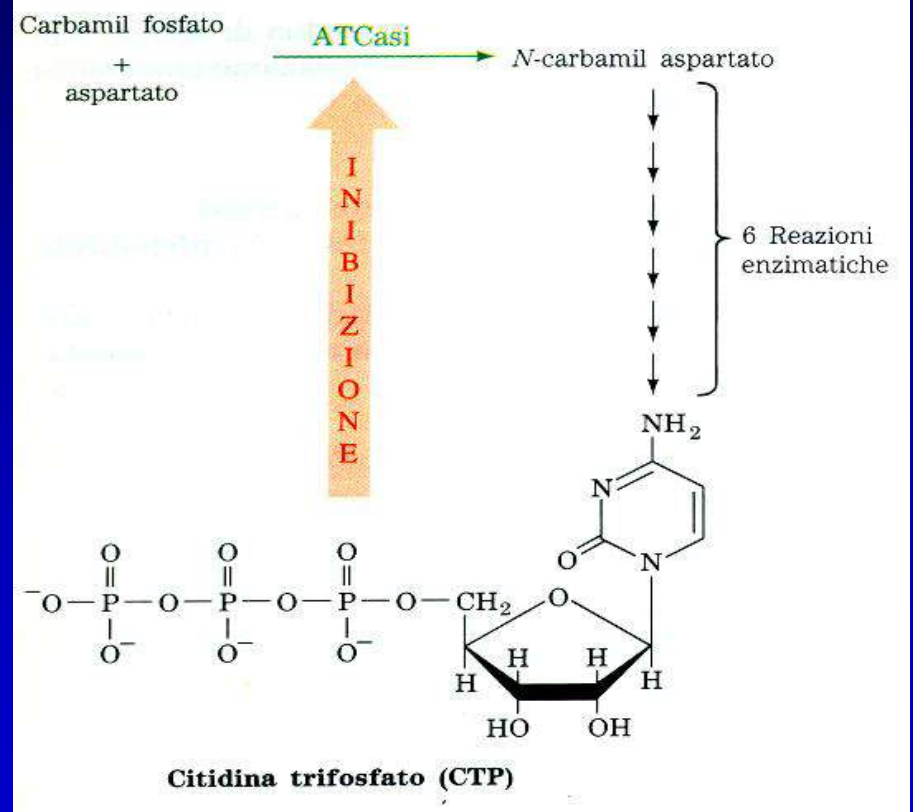
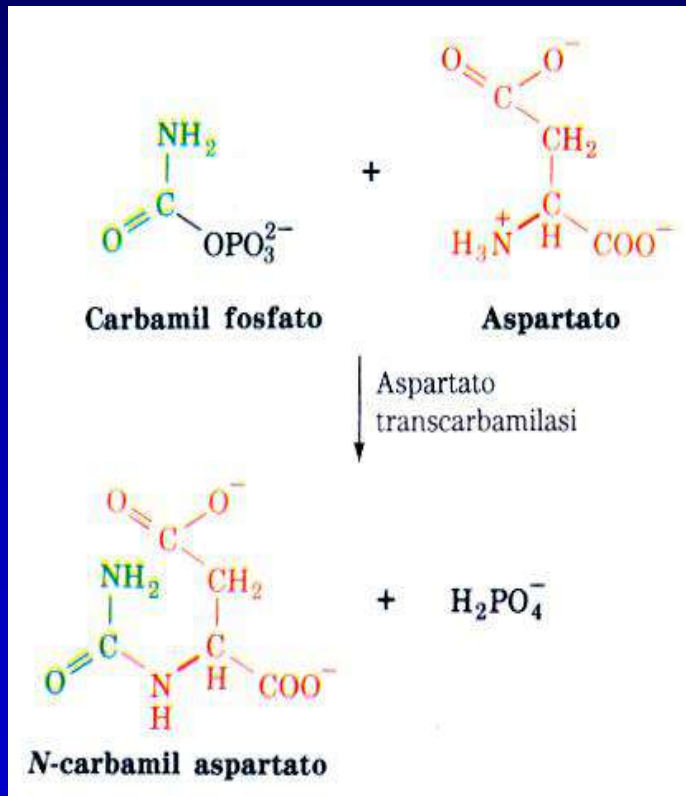
Oltre ad essere regolati omotropicamente, gli enzimi allosterici possono avere effettori eterotropici positivi (attivatori) o negativi (inibitori).

Il valore di concentrazione di substrato a cui si ha una velocità pari a metà della V_{max} viene definito $[S]_{0.5}$ o $K_{0.5}$.



L'aspartato transcarbamilasi (ATCasi)

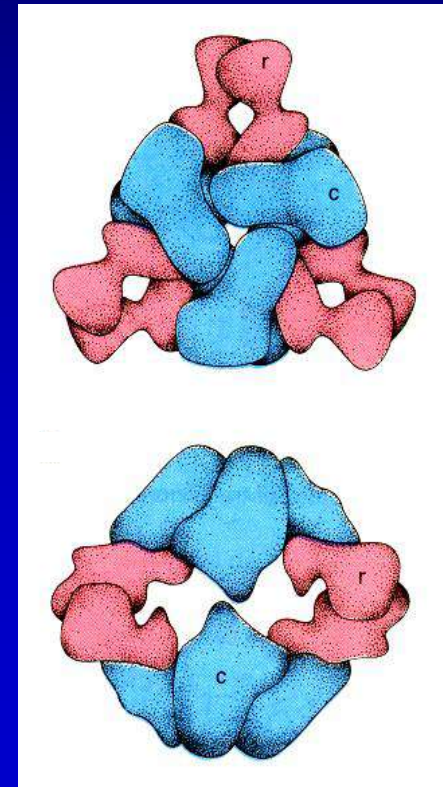
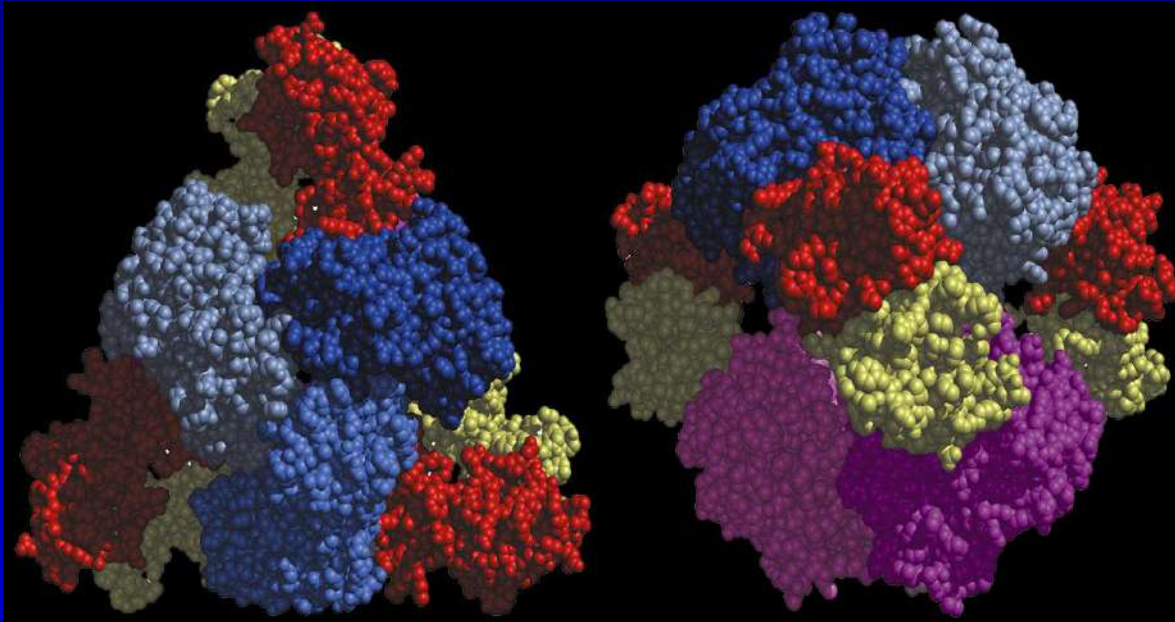
Un esempio di regolazione allosterica dell'attività enzimatica è dato dall'enzima aspartato transcarbamilasi (ATCasi). Esso catalizza la prima tappa della biosintesi delle pirimidine ed è un enzima che presenta una inibizione a feedback negativo.



La struttura quaternaria dell'ATCasi

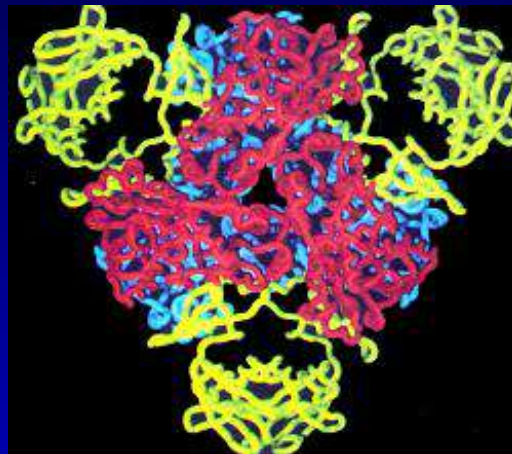
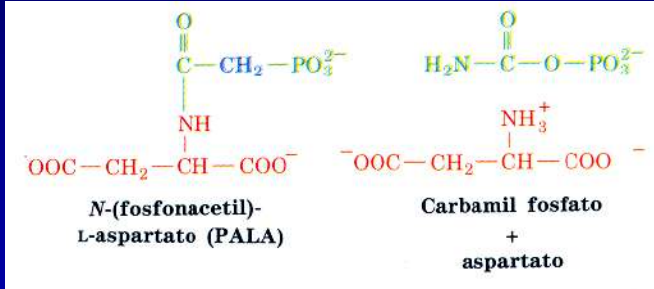
L'ATCasi di *E. coli* ha una composizione in subunità di tipo C_6R_6 dove C ed R sono rispettivamente le subunità catalitiche e regolatrici.

Le subunità catalitiche sono organizzate in due trimeri (C_3) e dissociate mantengono l'attività, ma presentano curve di saturazione da substrato iperboliche non cooperative. Pertanto, solo nell'enzima in forma nativa si manifesta l'attività allosterica e le subunità regolatrici modulano l'attività delle subunità catalitiche.

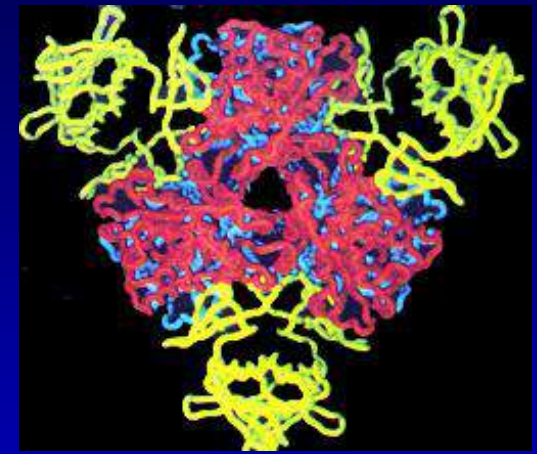


II PALA

Utilizzando l'analogo bisubstrato (PALA) non reattivo che si lega saldamente all'ATCasi bloccandola nella conformazione R, è stato possibile studiare la struttura ai raggi X della proteina nei due stati e conoscere le differenze conformazionali responsabili della modulazione allosterica.

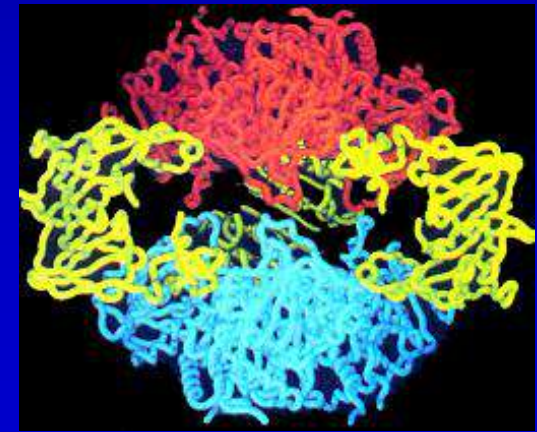
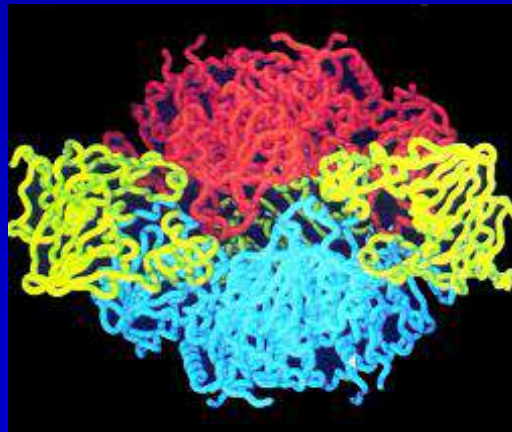


stato T



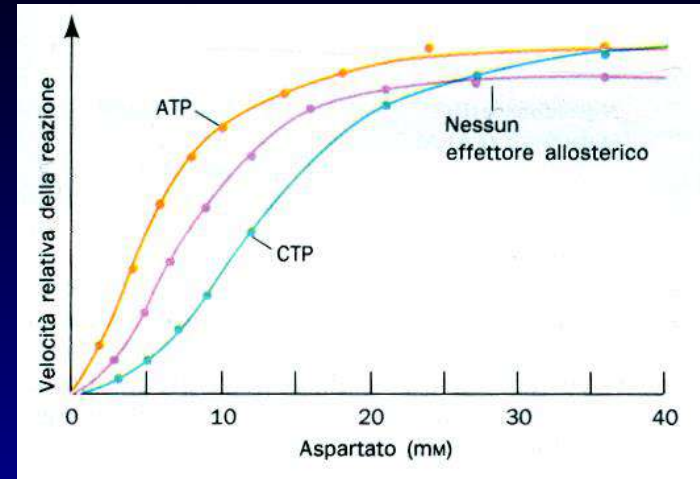
stato R

A causa della sua carica netta negativa, il PALA si lega elettrostaticamente a quattro Arg e una Lys del sito attivo.



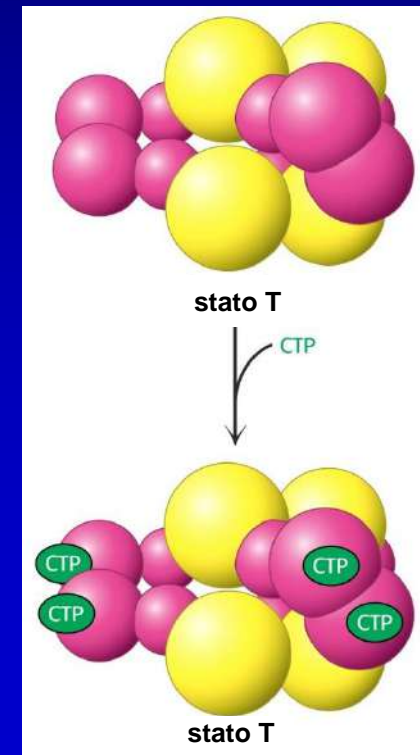
La regolazione allosterica dell'ATCasi

Questo enzima possiede un legame omotropico di tipo cooperativo positivo per entrambi i suoi substrati (aspartato e carbamil fosfato). Inoltre, l'ATCasi viene inibita eterotropicamente dalla citidina trifosfato (CTP), un nucleotide pirimidinico, mentre viene attivata eterotropicamente dall'ATP.



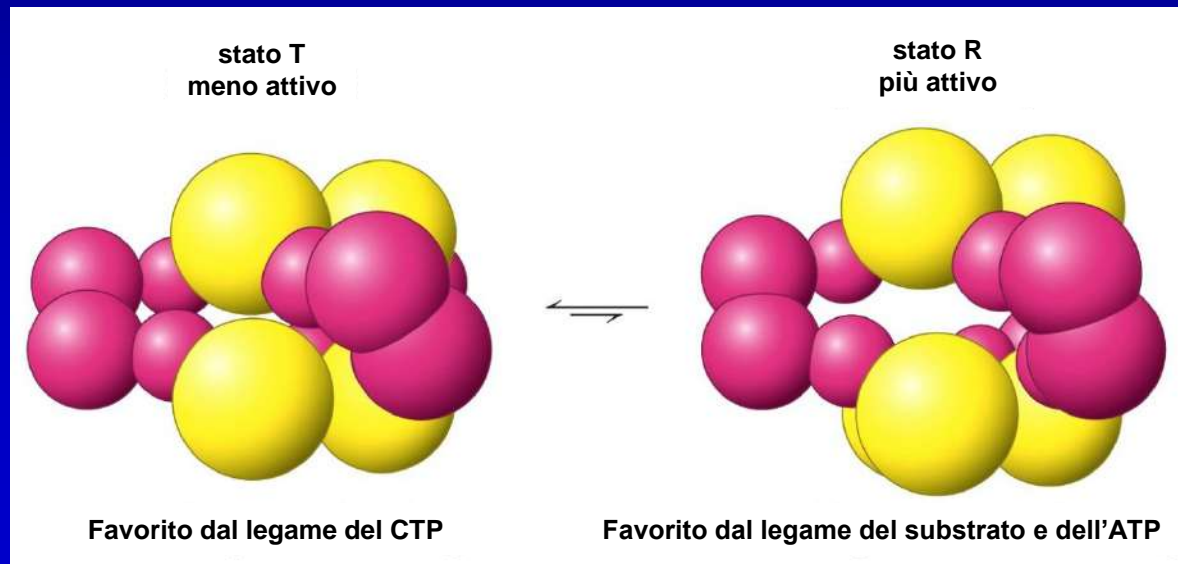
Pertanto, come predetto dalla teoria dell'allosterismo, l'attivatore ATP si lega preferenzialmente alla ATCase attiva (stato R), mentre l'inibitore CTP si lega alla forma meno attiva dell'enzima (stato T).

Ognuno dei sei siti attivi è posto all'interfaccia tra le subunità catalitiche, ogni subunità regolatrice possiede un sito a cui possono legarsi il CTP o l'ATP.



La regolazione allosterica dell'ATCasi

Elevati livelli di CTP segnalano che non sono necessarie altre pirimidine. Alte concentrazioni di ATP sono sintomo sia di una situazione intracellulare di elevata disponibilità di energia, che è necessaria per attivare le biosintesi dell'RNA e del DNA, sia di un elevato livello di purine e pertanto di una necessità di pirimidine.



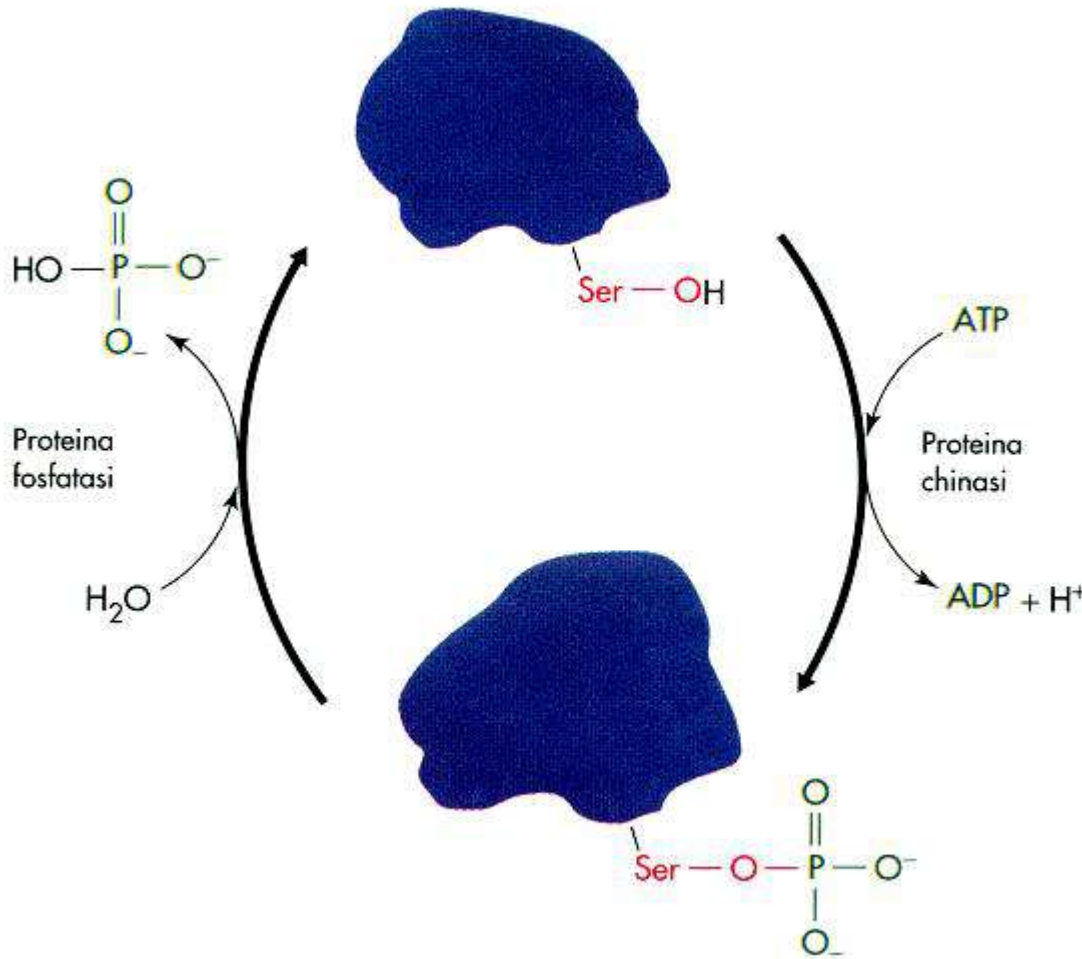
La fosforilazione modifica l'attività delle proteine bersaglio

L'attività di molti canali di membrana, enzimi e altre proteine bersaglio è regolata mediante fosforilazione.

I diretti responsabili delle fosforilazioni sono enzimi detti proteina chinasi. Ognuno di questi enzimi catalizza il trasferimento di un gruppo fosforico dall'ATP a un gruppo ossidrilico di una catena laterale di serina, di una treonina, o di una tirosina di una proteina bersaglio (substrato della chinasi).

Il distacco idrolitico del gruppo fosforico dalla proteina fosforilata viene catalizzato da un enzima noto con il nome di proteina fosfatasi. Una proteina bersaglio (substrato) può essere ripetutamente fosforilata e defosforilata.

La fosforilazione modifica l'attività delle proteine bersaglio



Le chinasi e le fosfatasi sono catalizzatori altamente selettivi: la fosforilazione di catene laterali di AA diversi all'interno della stessa proteina bersaglio avviene ad opera di chinasi differenti.

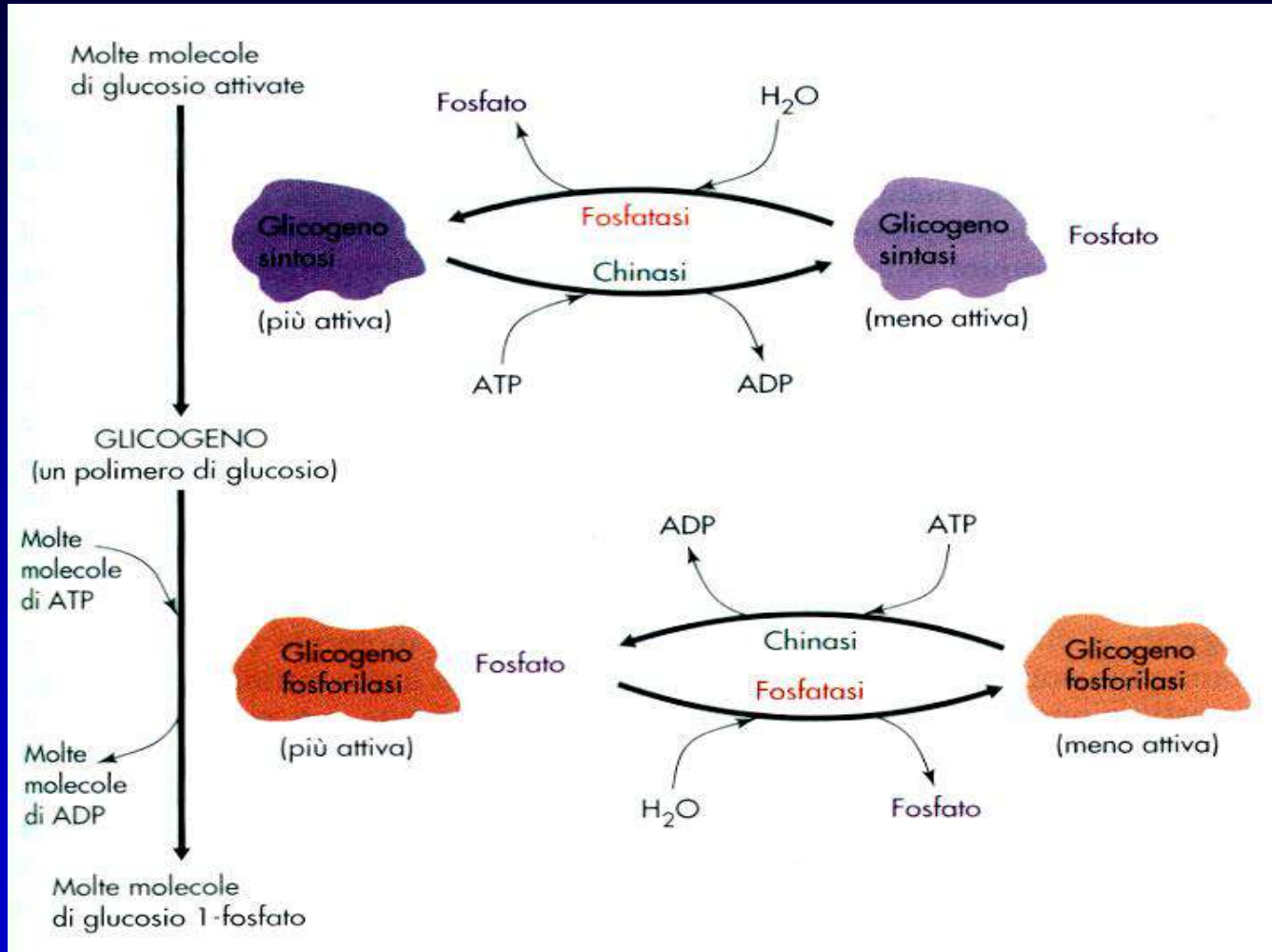
Il sistema glicogeno sintasi glicogeno fosforilasi

L'enzima chiave coinvolto nella costruzione del glicogeno, la glicogeno sintasi, trasferisce un'unità attivata di glucosio alla volta ad una catena di glicogeno in fase di crescita.

Esso può esistere negli stati fosforilato e defosforilato. La forma fosforilata della sintasi è inattiva in vivo, mentre la forma defosforilata è in grado di esprimere il suo potere catalitico.

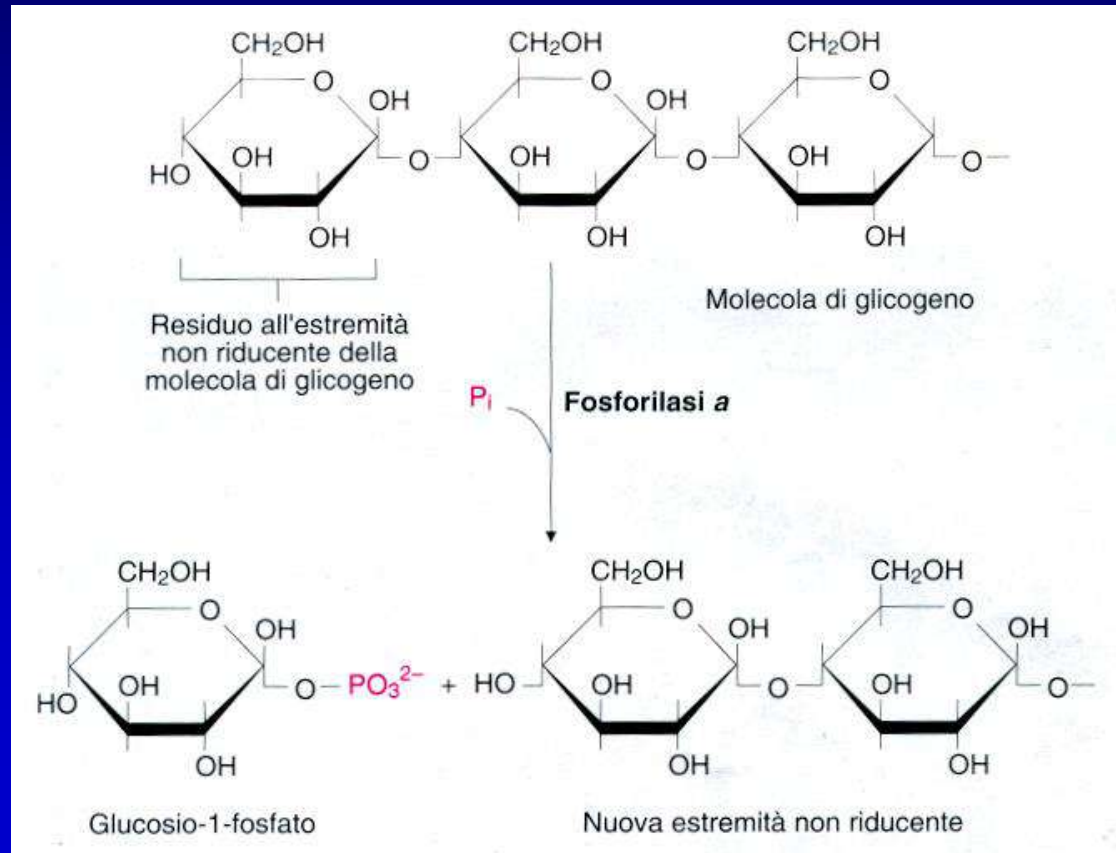
Per la glicogeno fosforilasi è vero invece il contrario: la forma fosforilata della proteina è quella più attiva. Per i due enzimi, il rapporto tra forme attive e forme inattive dipende sostanzialmente dalla concentrazione di proteina chinasi e proteina fosfatasi attive.

Il sistema glicogeno sintasi glicogeno fosforilasi



La glicogeno fosforilasi

La forma attivata della glicogeno fosforilasi, nella glicogenolisi, opera la rimozione dei residui di glucosio dai depositi di glicogeno, scindendo e fosforilando il residuo all'estremità non riducente delle catene di glicogeno; il glucosio-1-fosfato che si libera diventa disponibile come fonte di energia per le cellule.

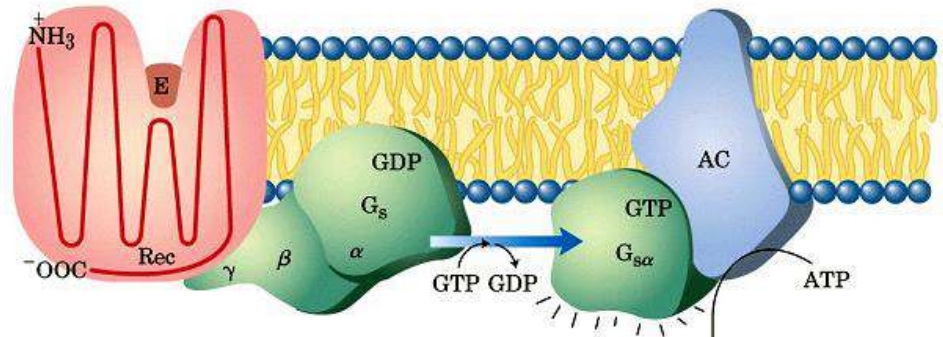


La glicogeno fosforilasi

La conversione della glicogeno fosforilasi dalla forma inattiva (b) a quella attiva (a) è in realtà l'ultimo evento di una serie di reazioni che hanno inizio quando la superficie della cellula viene raggiunta da uno specifico ormone, l'adrenalina.

La sequenza di reazioni è nota come la trasduzione del segnale dell'adrenalina. Il segnale dato da una singola molecola ormonale che prende contatto con la superficie cellulare viene amplificato per trasformare molte molecole di fosforilasi b in fosforilasi a.

1) Legame dell'adrenalina al suo recettore specifico



2) Attivazione della Adenilil ciclasi

3) La PKA Viene attivata dal cAMP

4) Fosforilazione di proteine cellulari da Parte della PKA

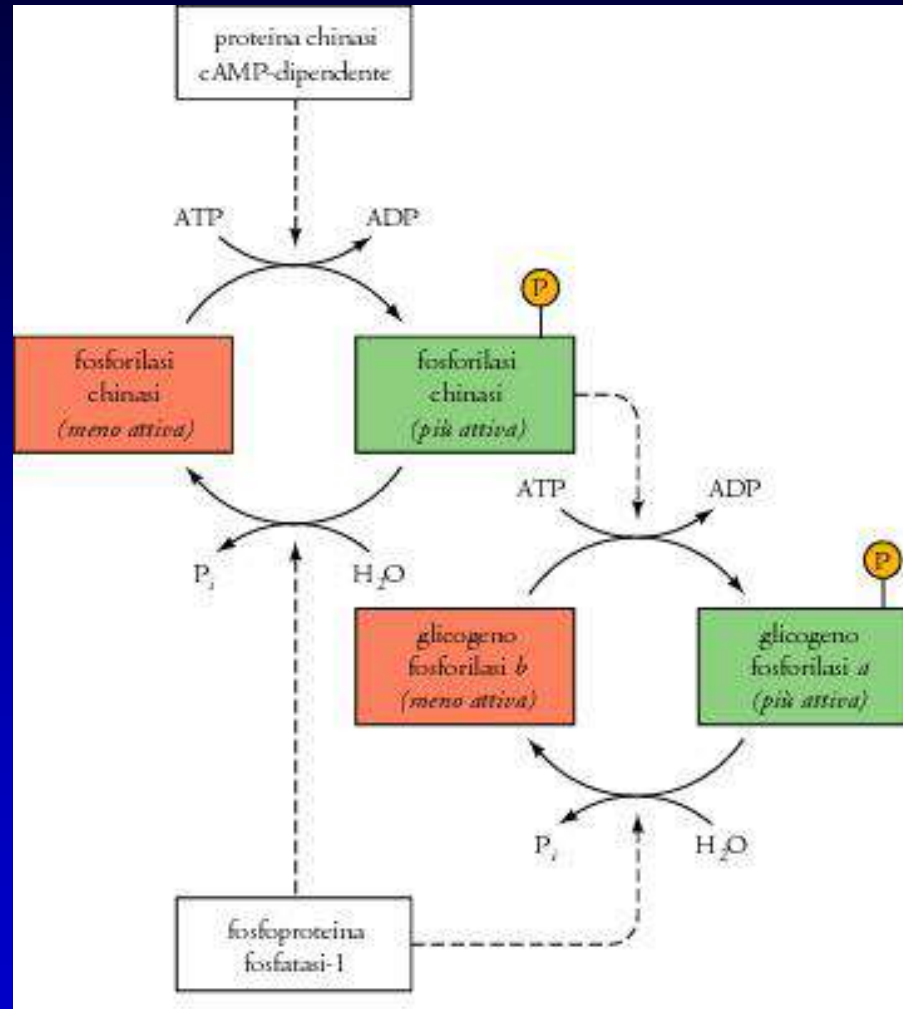
Nucleotide ciclico fosfodiesterasi

5) Degradazione del cAMP Viene a cessare l'attivazione della pKA

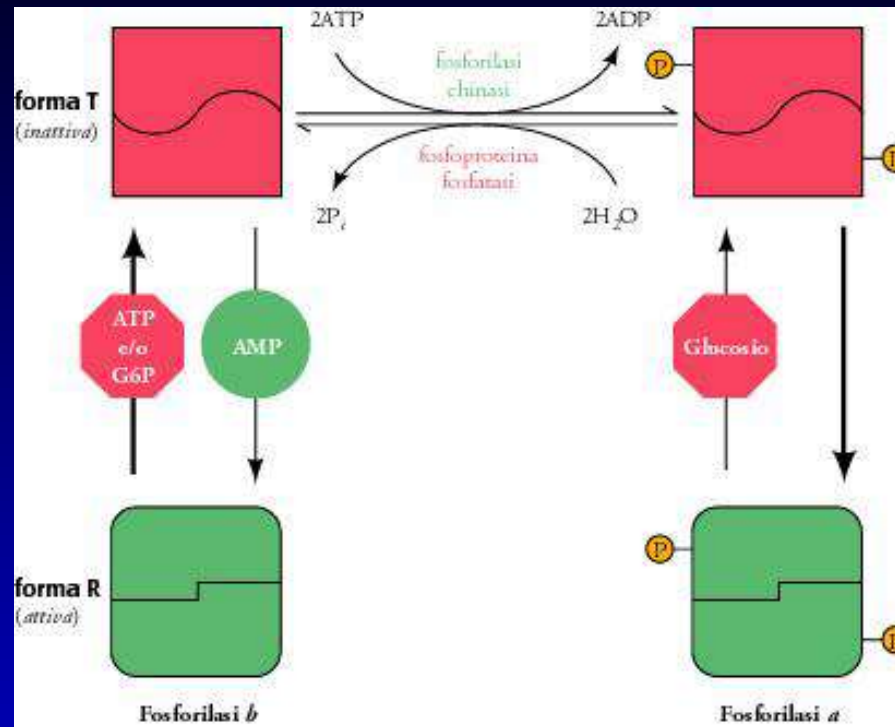
La trasduzione del segnale dell'adrenalina

- Il recettore per l'ormone adrenalina è una proteina le cui 7 eliche attraversano la membrana formando quello che viene chiamato il recettore a serpentina.
- Il legame con l'adrenalina modifica la conformazione del recettore che diviene in grado di catalizzare la sostituzione del GDP, legato ad una proteina stimolatrice, G_s , con il GTP.
- La proteina stimolatrice, composta da tre unità monomeriche, può così lasciare le subunità β e γ e, spostandosi lungo il piano della membrana con la sola subunità α , raggiungere una proteina integrale di membrana chiamata adenil ciclasi (AC) attivandola.
- Il sito attivo della AC è rivolto verso il citosol e catalizza la conversione dell'ATP in AMPc (AMP ciclico).
- L'AMPc è un messaggero secondario che nel citosol stimola l'azione di una proteina chinasi AMPc dipendente (PKA) in grado di fosforilare le proteine cellulari e causare la risposta all'adrenalina.

La glicogeno fosforilasi



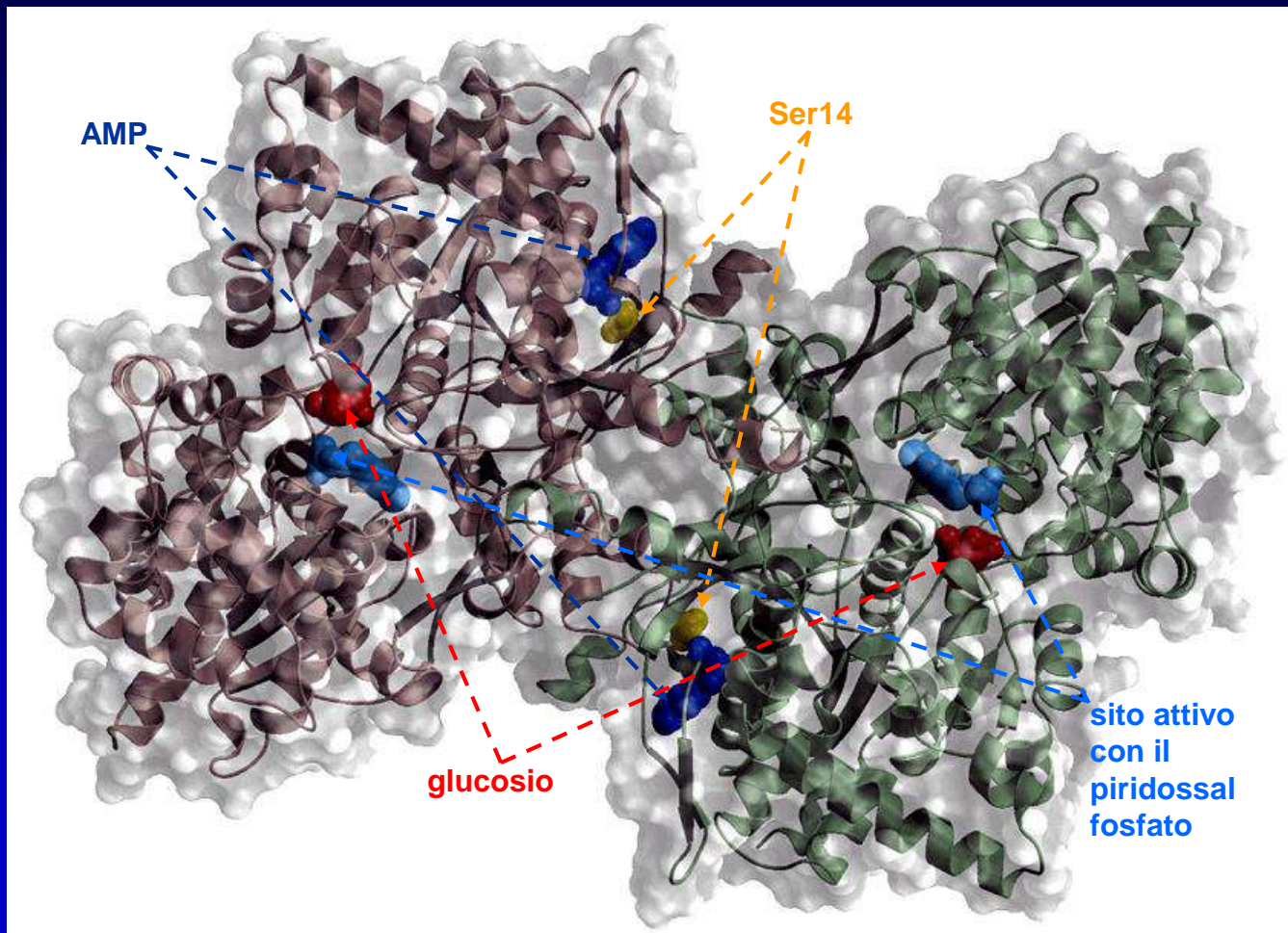
La glicogeno fosforilasi è anche un enzima allosterico



Se ad una cellula che già possiede sufficienti riserve di glucosio arriva un segnale (ormonale) che attiva il sistema delle fosforilasi, l'enzima viene inibito, finché quelle riserve non siano esaurite. Al contrario, alti livelli di AMP significano per la cellula una bassa carica energetica e quindi necessità di mobilitare riserve di energia.

Quindi, a bassi livelli di glucosio e ATP, la fosforilasi b inizia la demolizione del glicogeno anche in assenza di uno stimolo ormonale necessario a convertirla nella forma a.

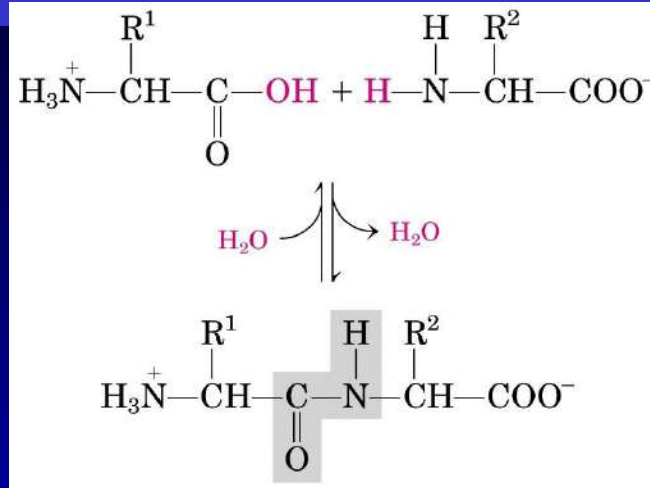
La glicogeno fosforilasi è un enzima con una duplice regolazione: allosterica e covalente



GLI ENZIMI PROTEOLITICI

Gli enzimi proteolitici

Le proteasi catalizzano la scissione idrolitica dei legami peptidici.



Le quattro classi principali di enzimi proteolitici sono:

1) le serina proteasi

2) le metalloproteasi

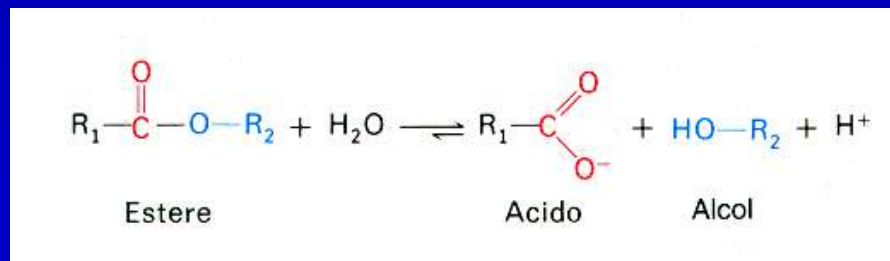
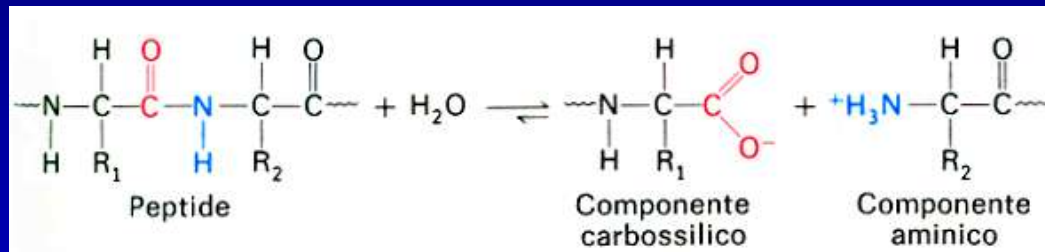
3) le tiol proteasi

4) le aspartil proteasi

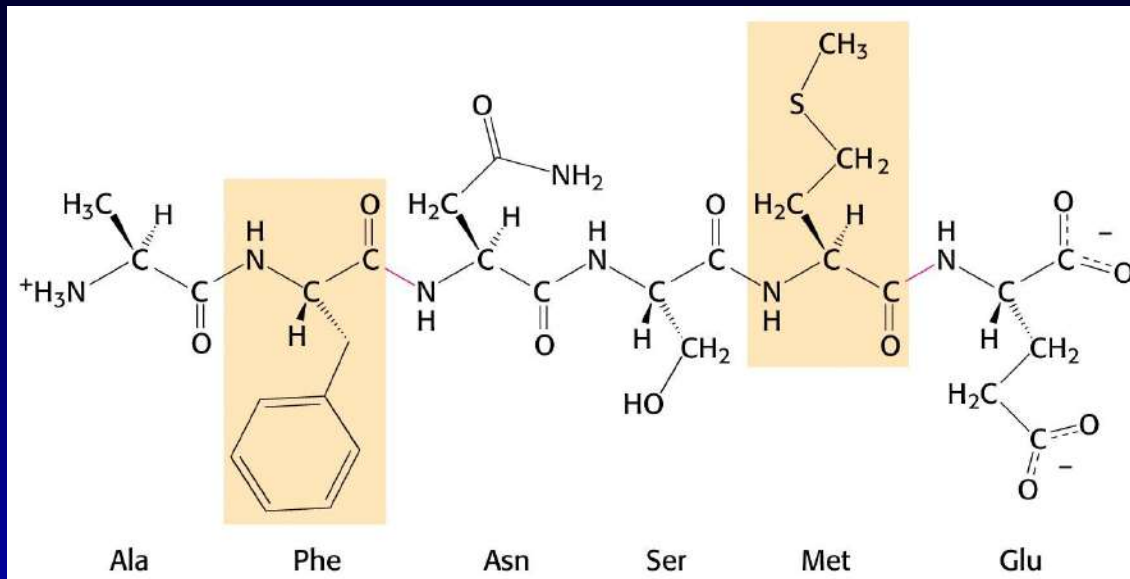
Le serina proteasi

Sono un gruppo di enzimi molto diffusi che hanno in comune il meccanismo catalitico che si basa sulla presenza di un residuo di **ser** particolarmente reattivo.

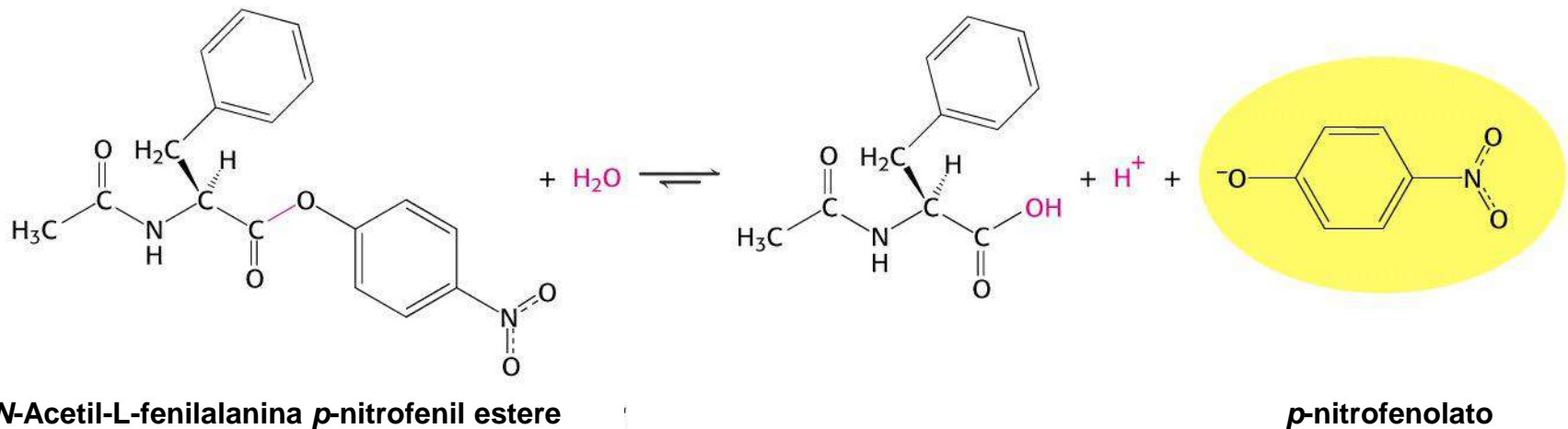
Le principali proteasi a serina sono gli enzimi pancreatici **tripsina**, **chimotripsina** ed **elastasi**. Essi catalizzano l'idrolisi di peptidi ed esteri sintetici.



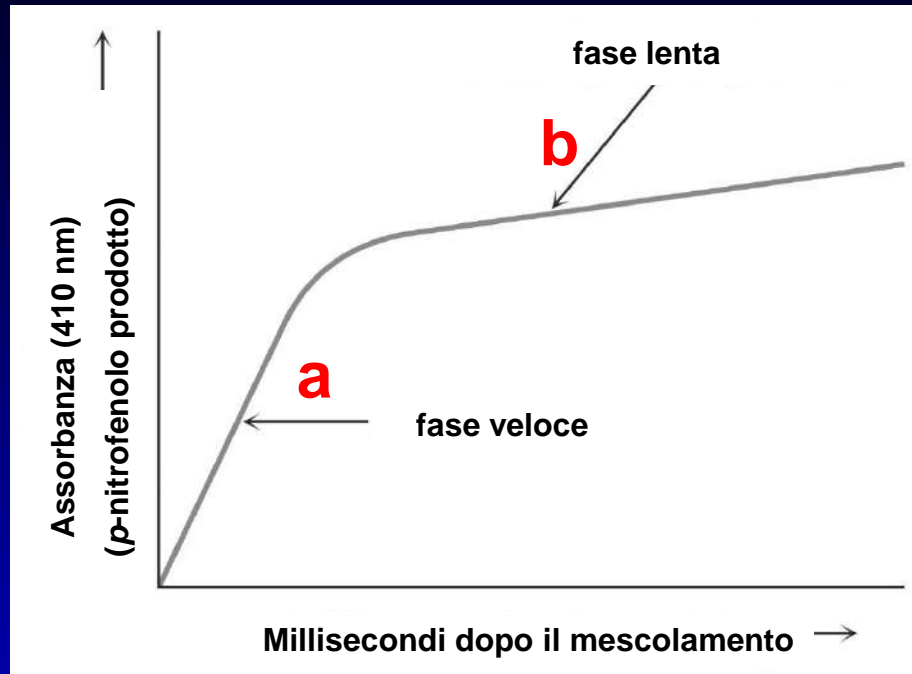
Le conoscenze sul meccanismo catalitico derivano da studi con esteri sintetici



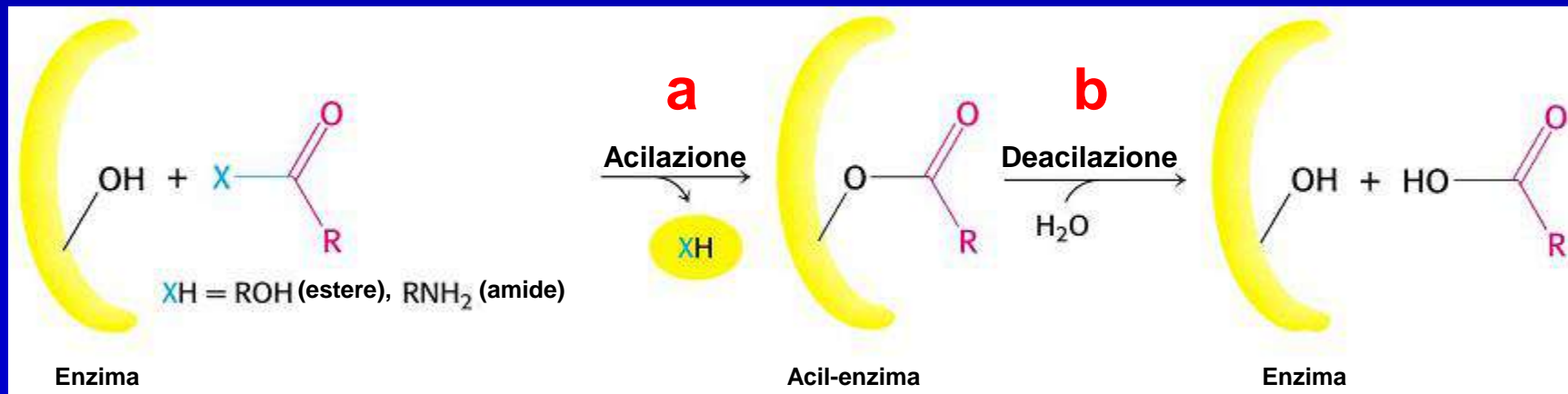
La reazione della chimotripsina con l'*N*-Acetil-L-fenilalanina *p*-nitrofenil estere:



Le due fasi della formazione del p-nitrofenolo



Lo schema generale di reazione che se ne deduce è il seguente:



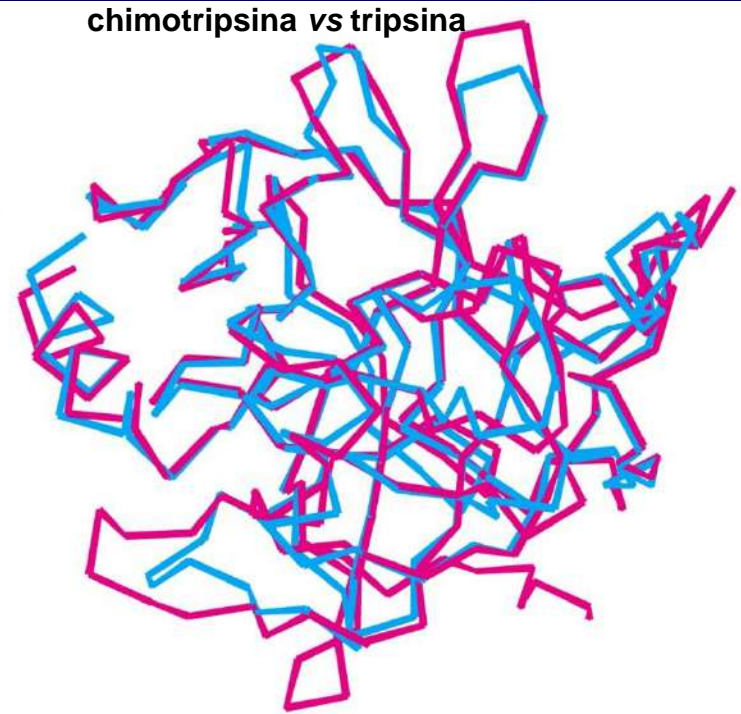
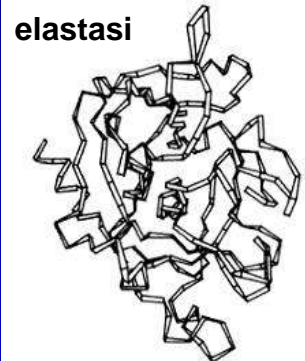
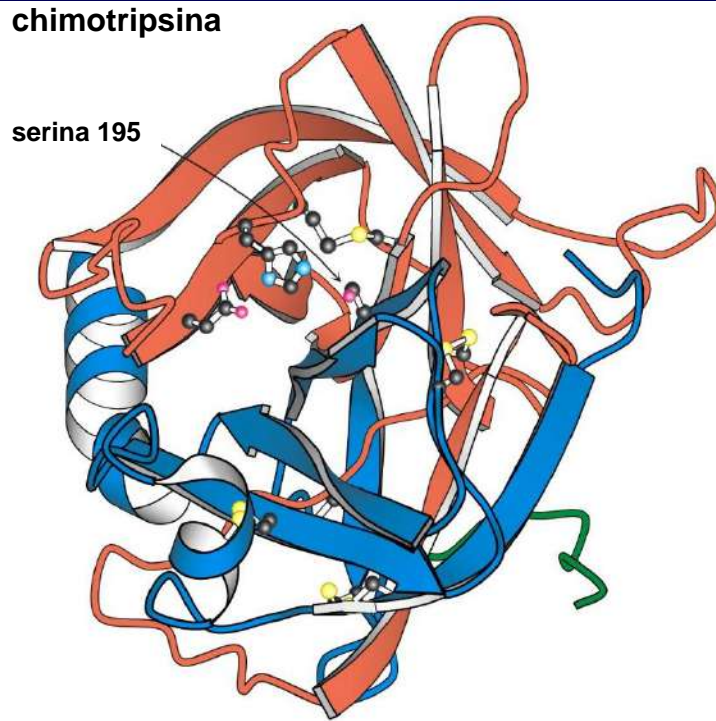
Le due fasi della formazione del p-nitrofenolo da parte della chimotripsina

Acilazione: la formazione iniziale esplosiva del p-nitrofenolo corrisponde alla formazione del complesso enzima-acetile.

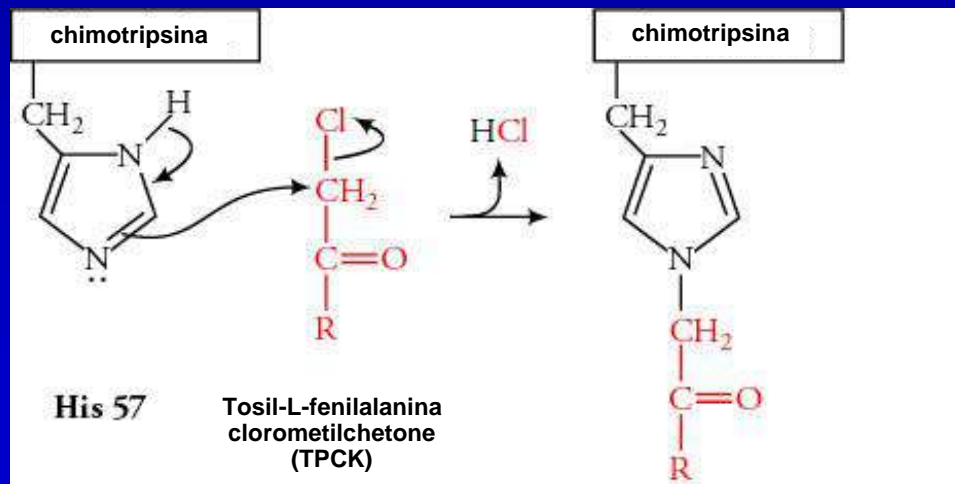
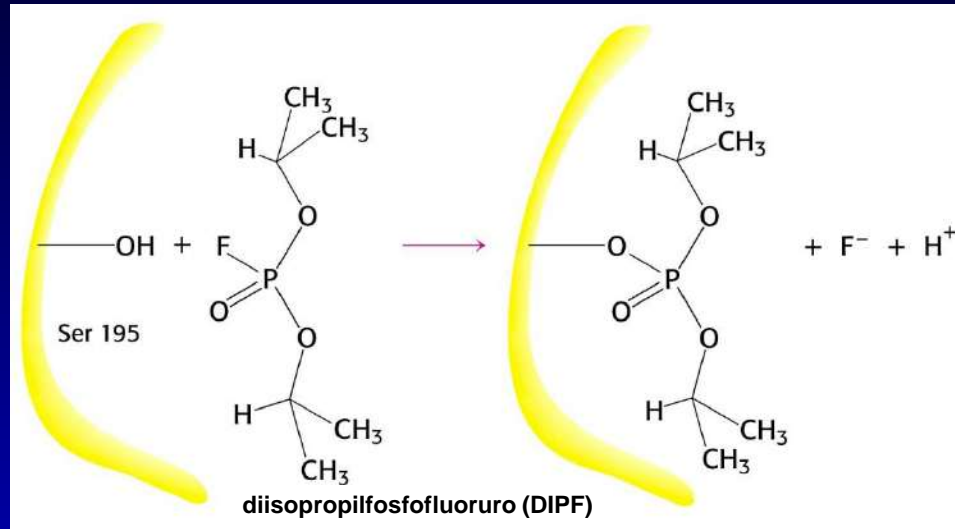
Deacilazione: la produzione del p-nitrofenolo lenta e costante corrisponde all'idrolisi del complesso enzima-acetile che rigenera l'enzima libero;

essa è molto più lenta della prima e quindi determina la velocità complessiva di idrolisi di esteri da parte della chimotripsina.

Le strutture cristallografiche delle serina proteasi sono simili

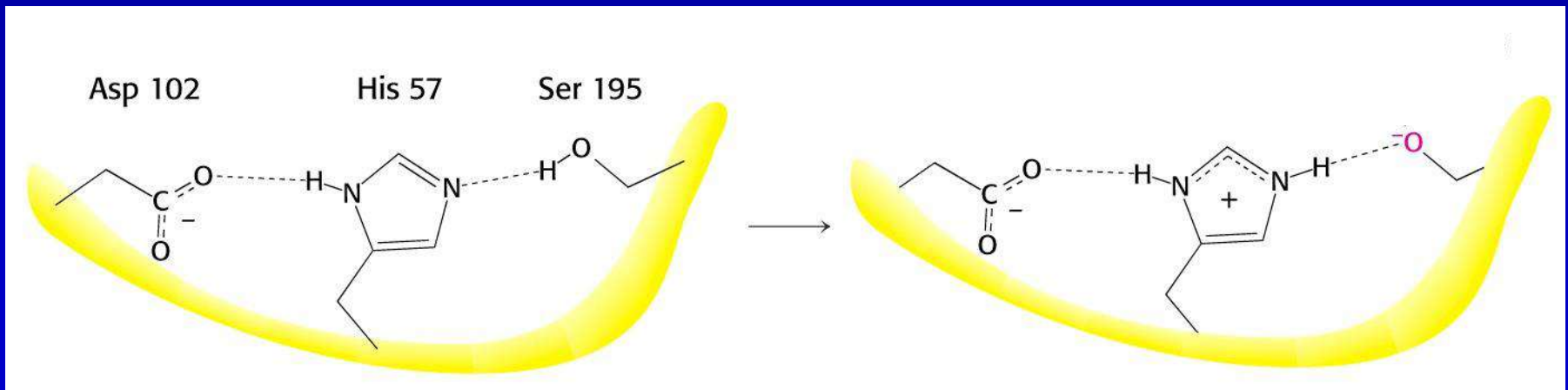
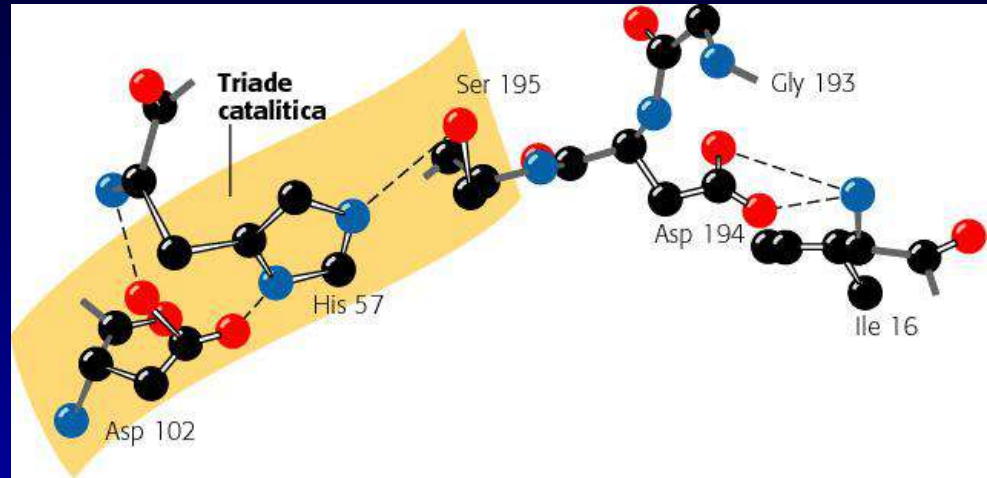
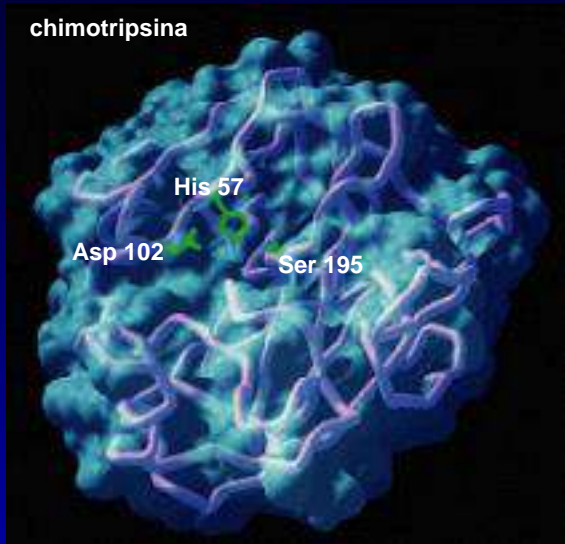


L'identificazione dei residui del sito attivo mediante studi di marcatura



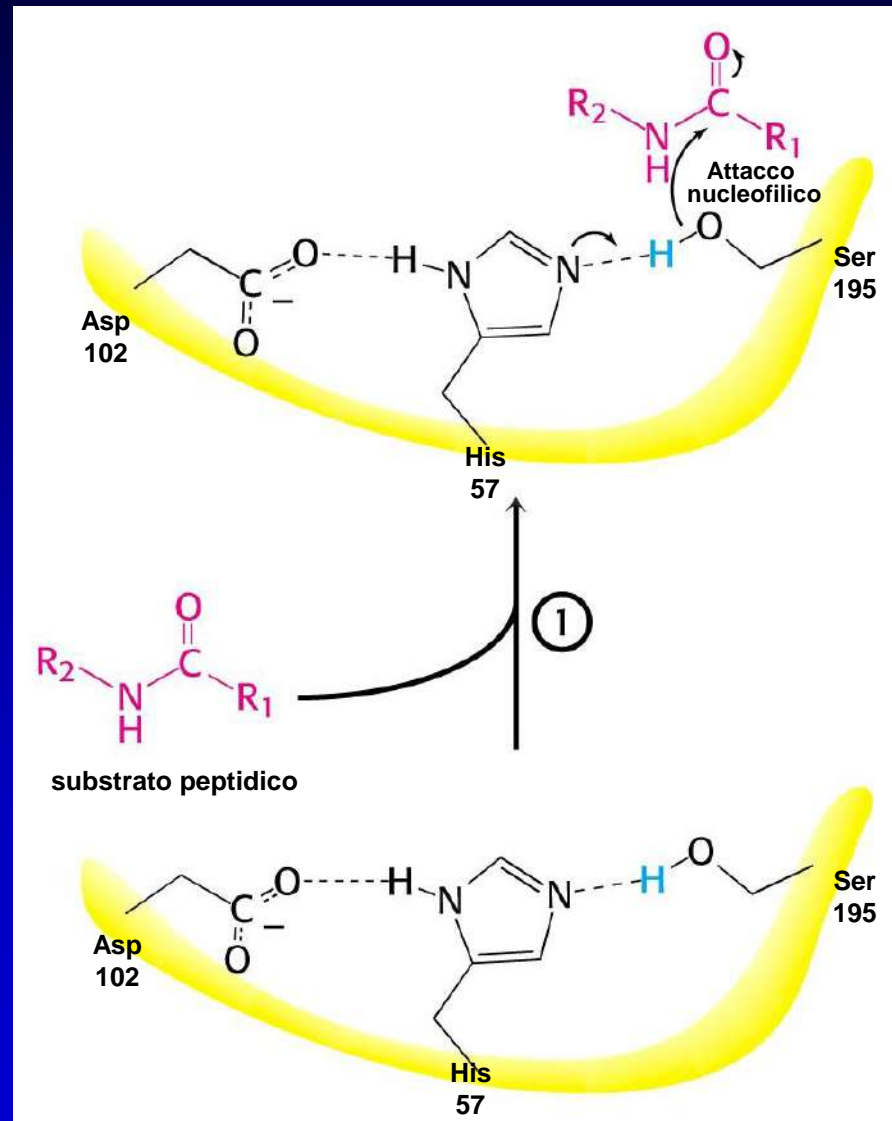
Il sito attivo: la triade catalitica

chimotripsina

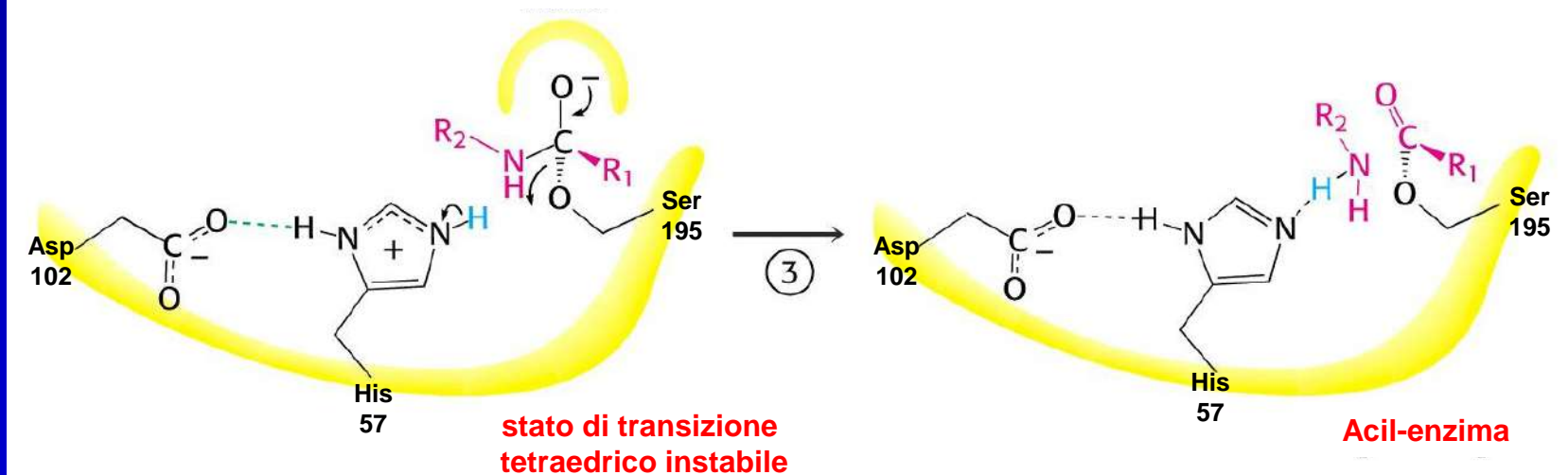
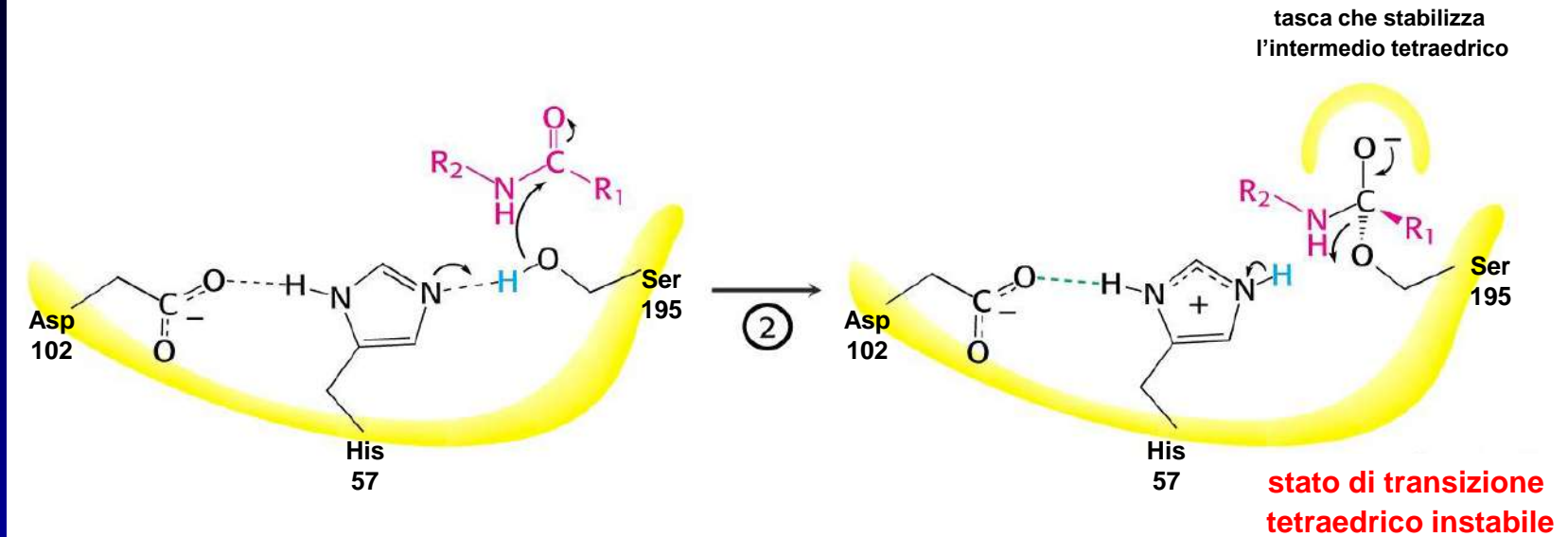


Il meccanismo catalitico della chimotripsina

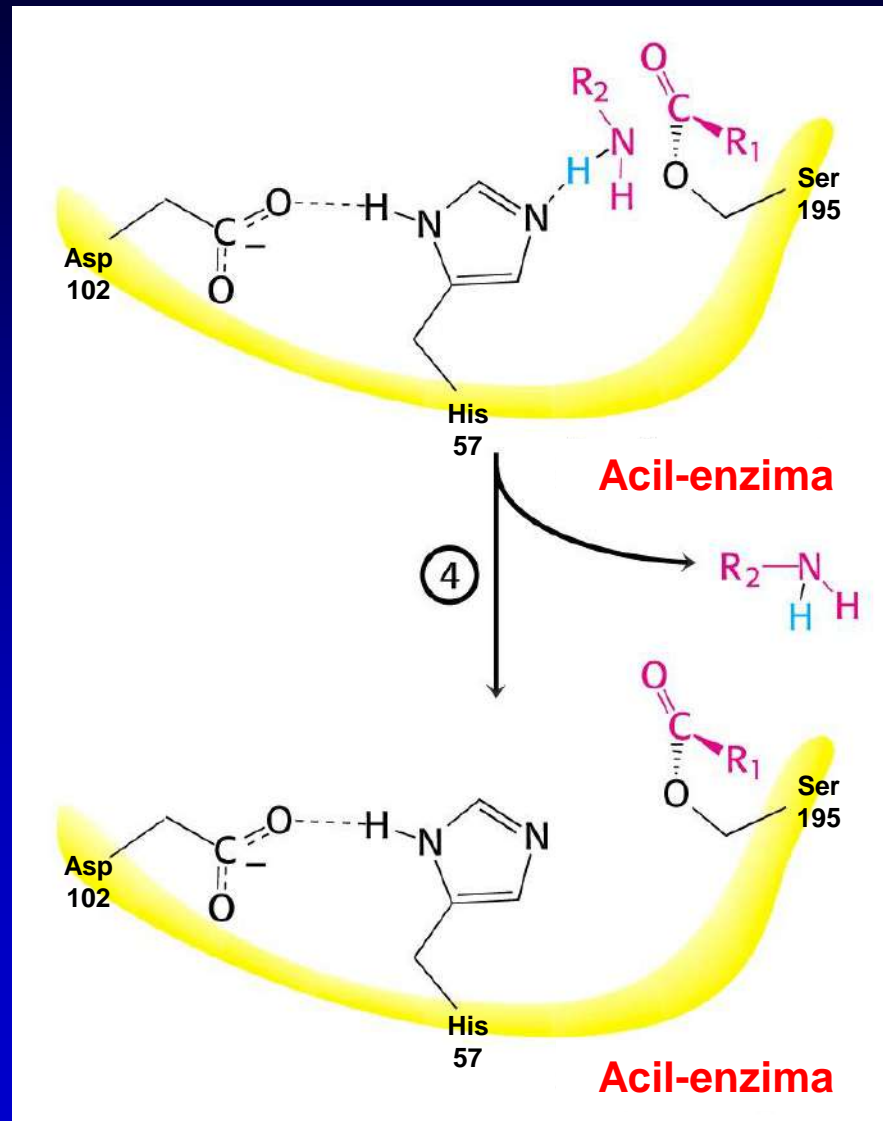
TAPPA 1: esempio di catalisi basica generale



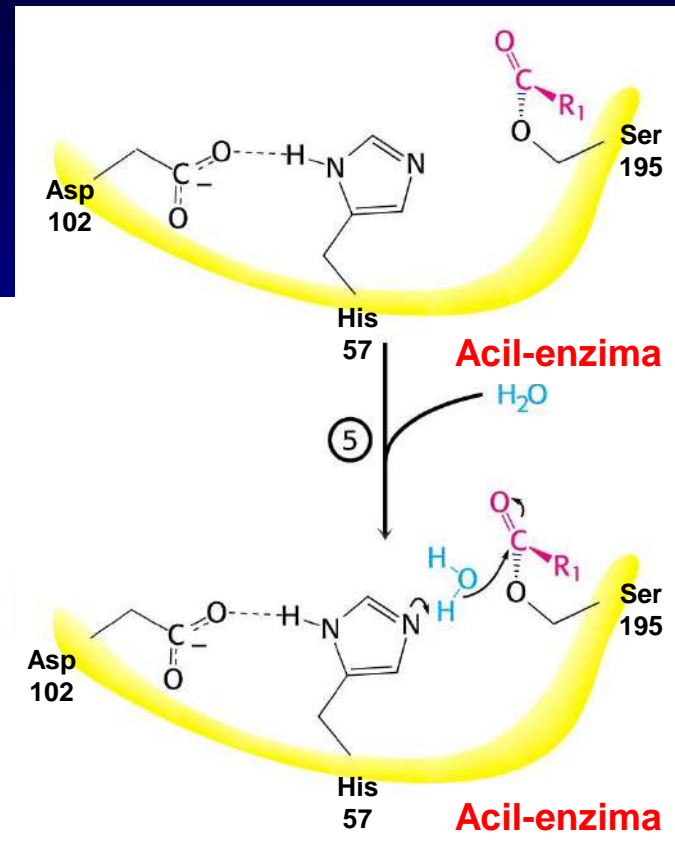
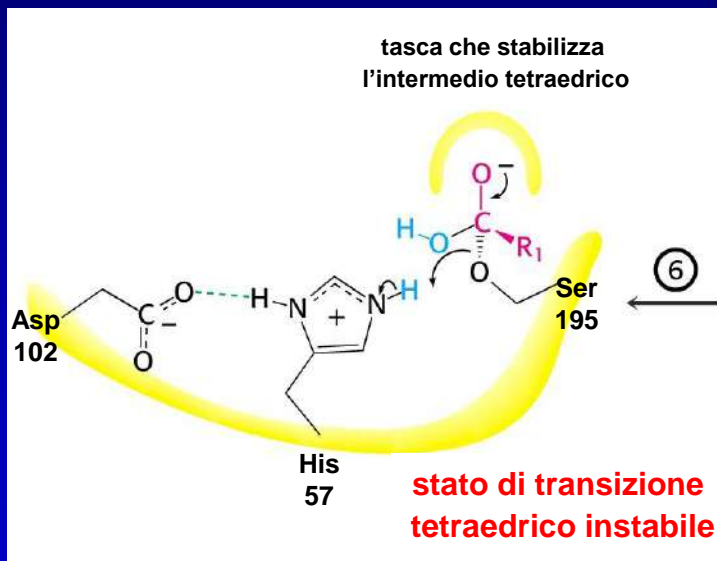
TAPPE 2 e 3: la catalisi acida generale



TAPPA 4

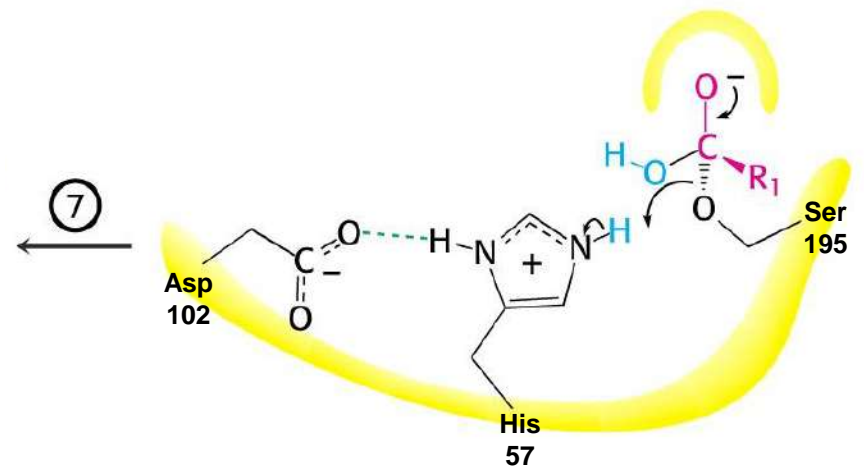
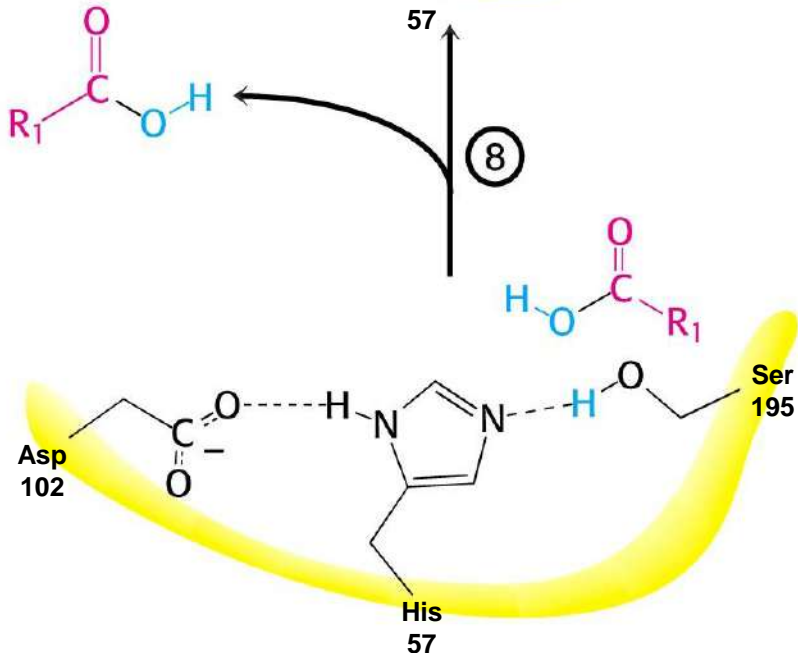
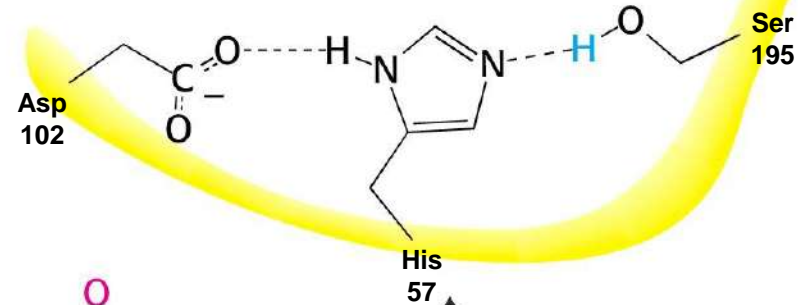


TAPPE 5 e 6: entra l'H₂O



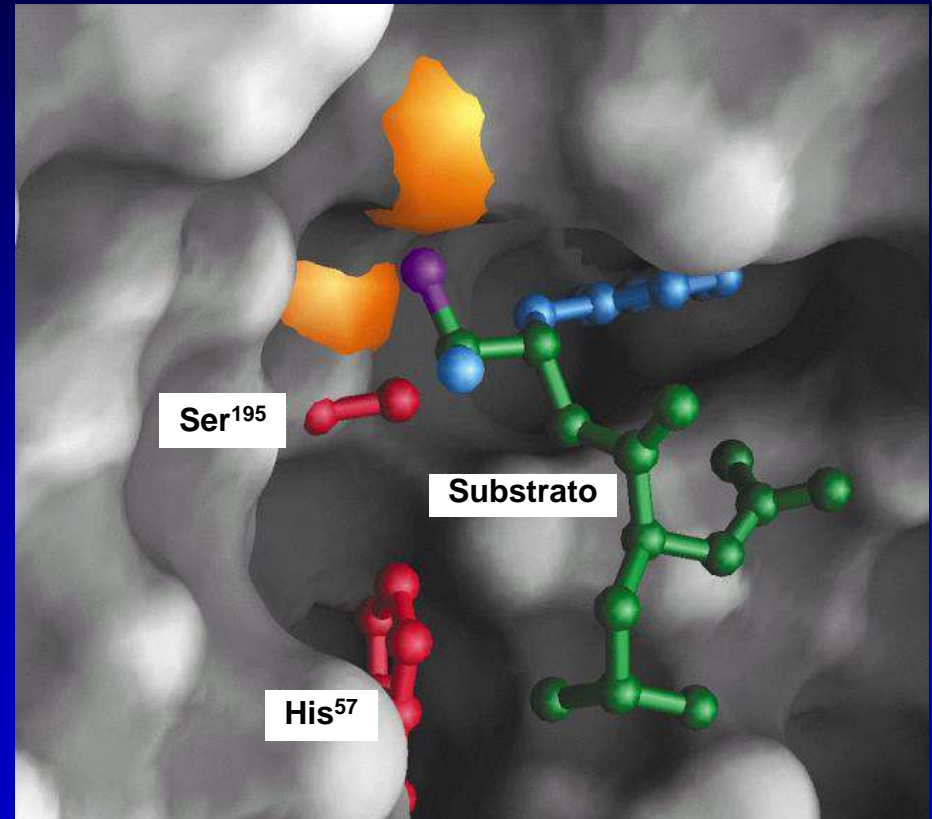
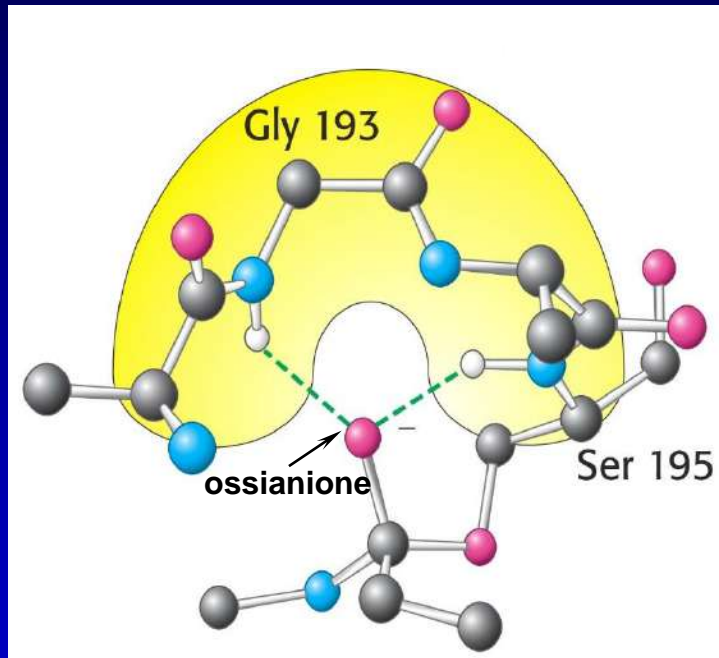
TAPPE 7 e 8

Il legame estere viene rotto, la componente acida del substrato viene rilasciata e la chimotripsina è pronta a legare una nuova molecola di substrato.

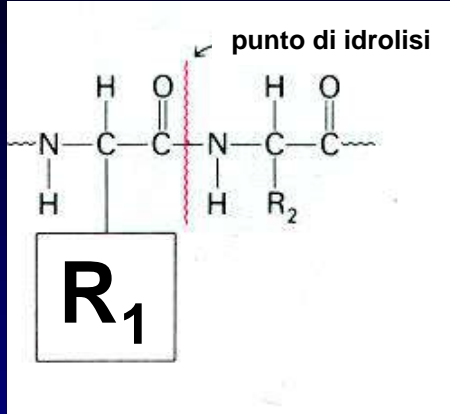


**stato di transizione
tetraedrico instabile**

La tasca di legame che stabilizza gli intermedi tetraedrici é chiamata **sito dell'ossianione**. I legami idrogeno con due gruppi **NH** della catena stabilizzano questa specie molecolare.



La principale differenza tra questi tre enzimi è la specificità



1) Tripsina

$R_1 =$ Lisina e Arginina

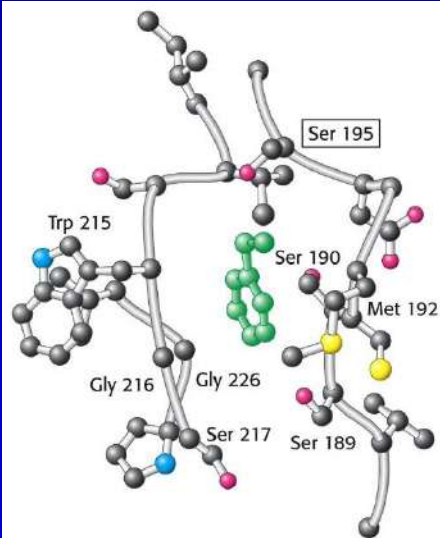
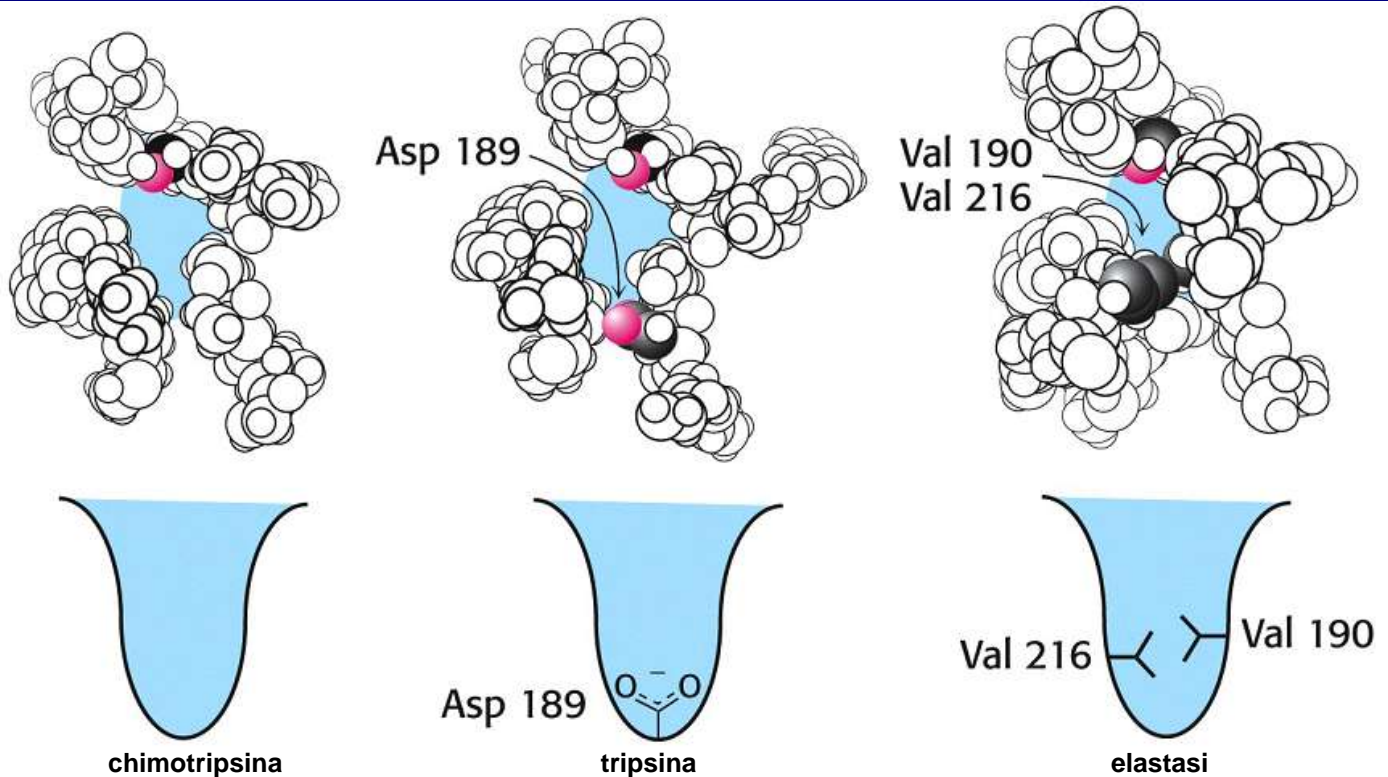
2) Chimotripsina

$R_1 =$ grosse catene laterali idrofobiche della fenilalanina, tirosina, e triptofano

3) Elastasi

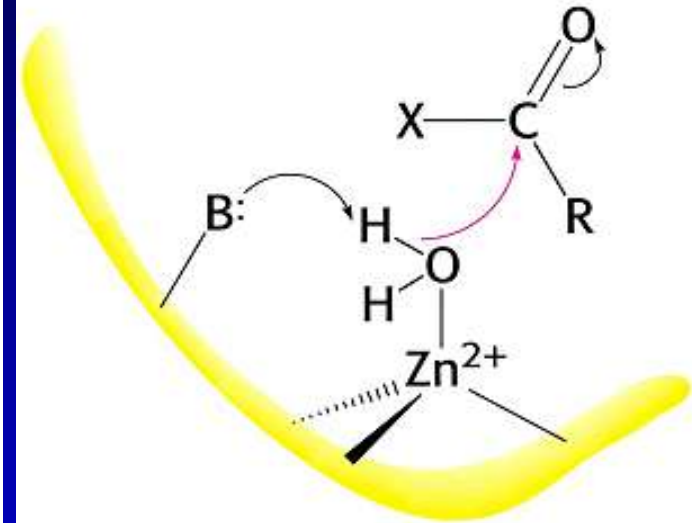
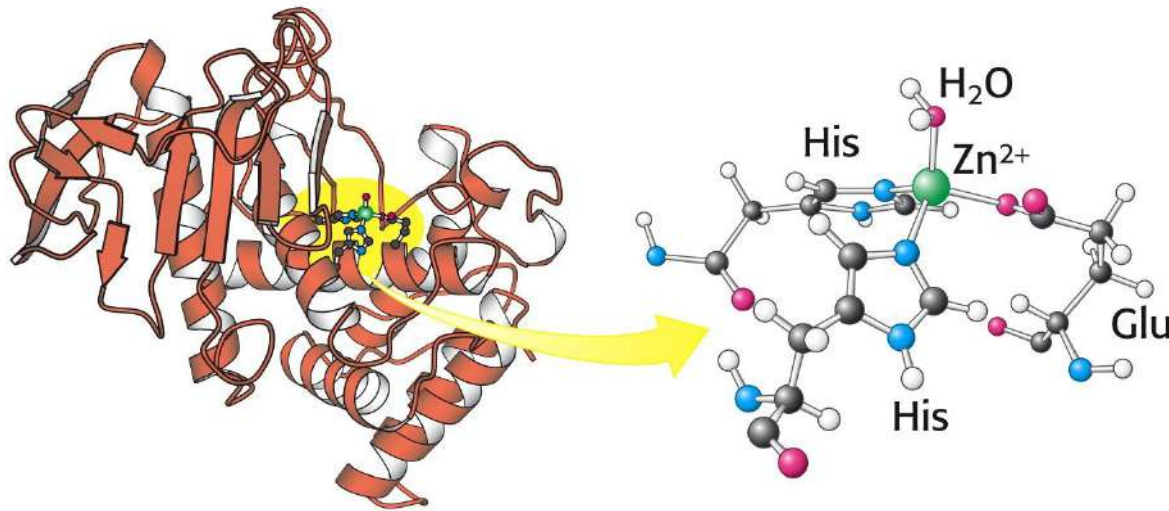
$R_1 =$ piccole catene idrofobiche, come l'alanina.

Diverse tasche di legame



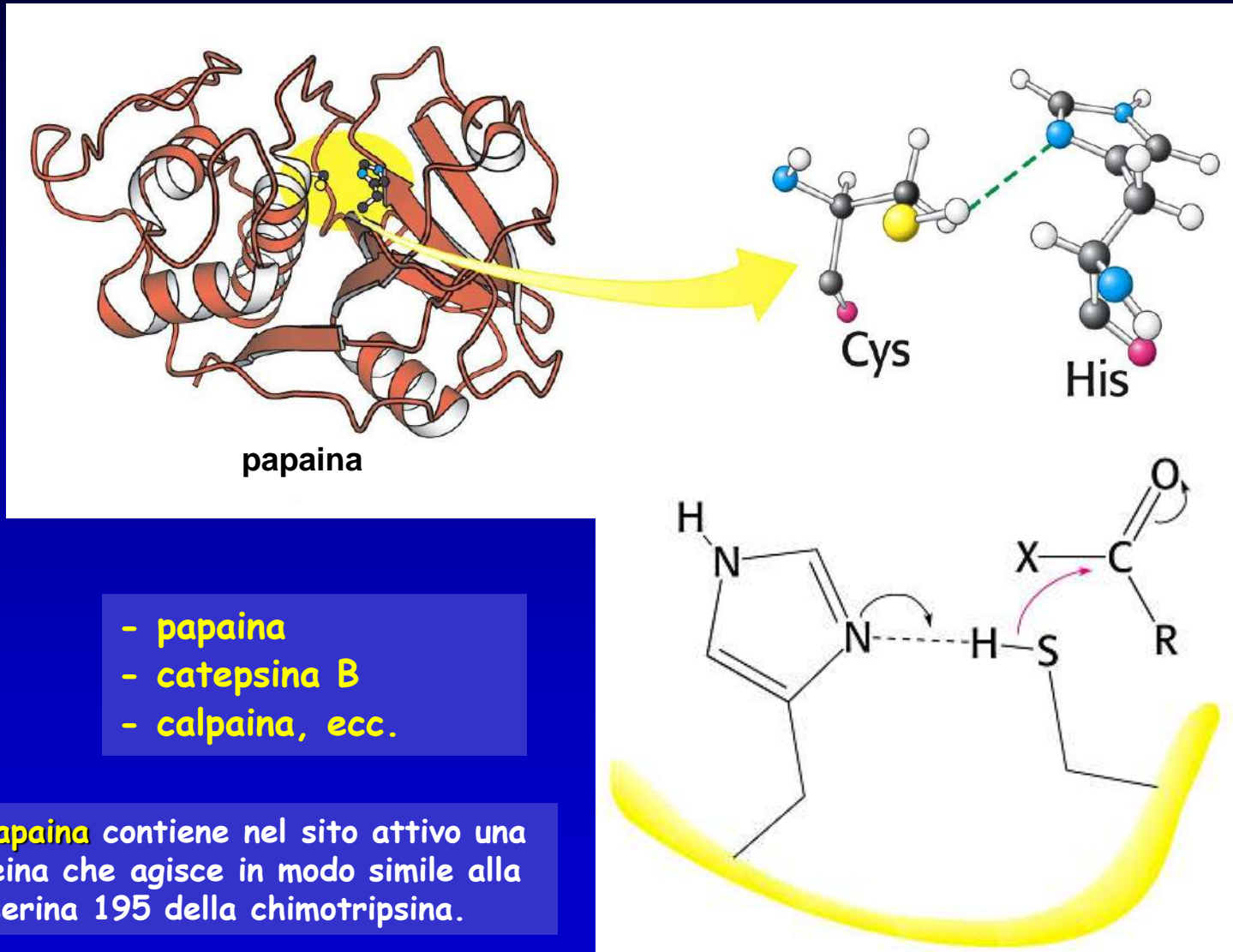
Le zinco proteasi

- carbossipeptidasi A
- termolisina

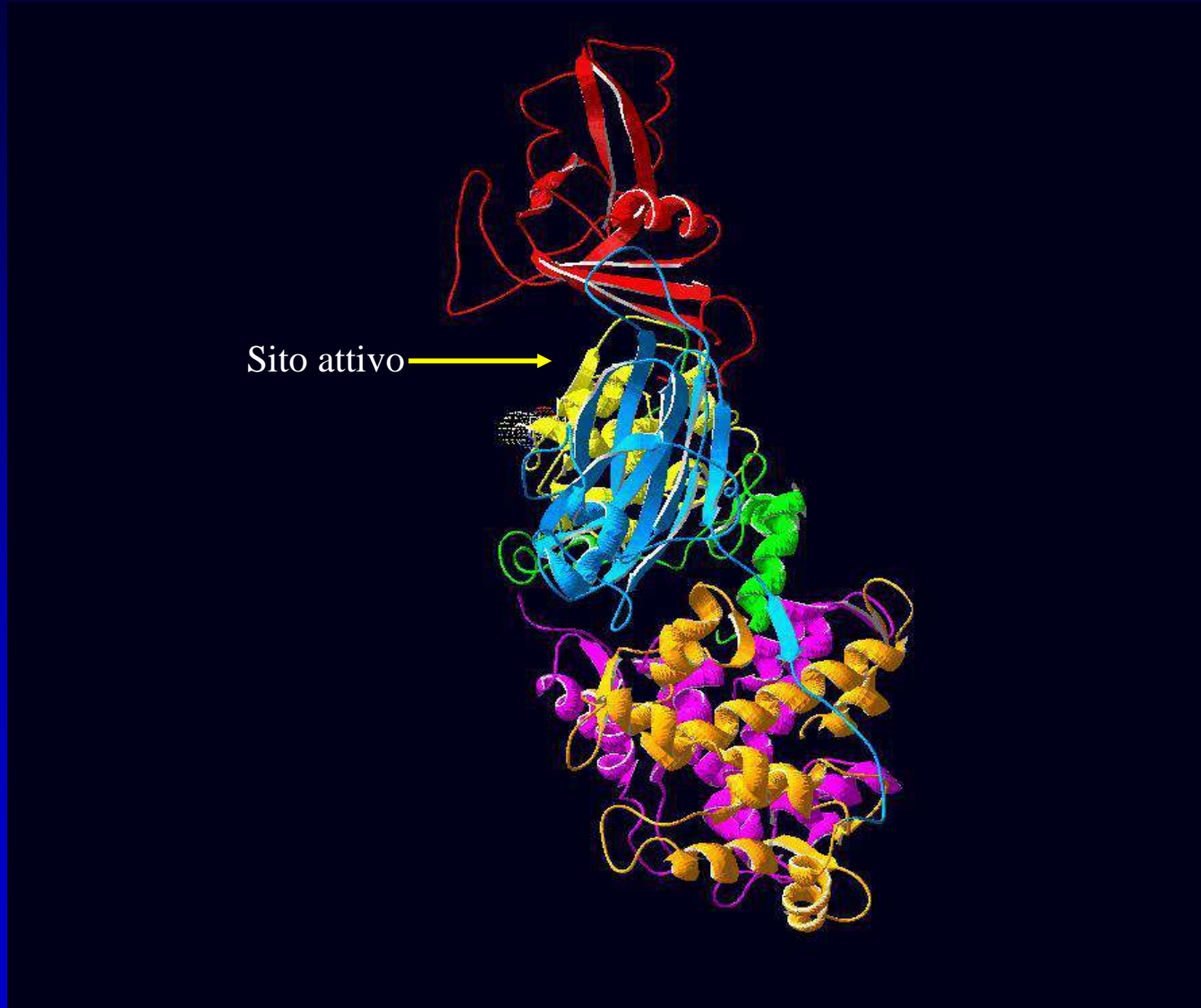


La **carbossipeptidasi A** presenta nel sito attivo uno ione zinco, coordinato da due istidine, un glutammato ed una molecola d'acqua.

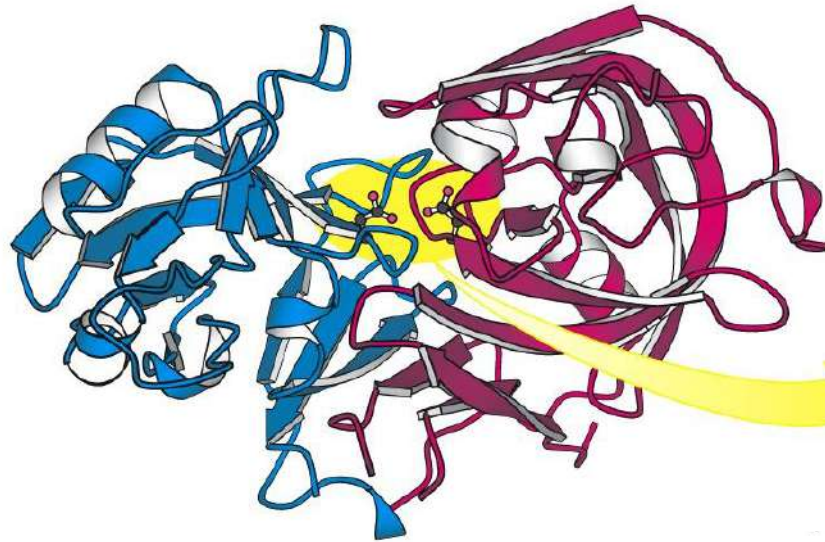
Le tiol proteasi (sulfidril o cisteina proteasi)



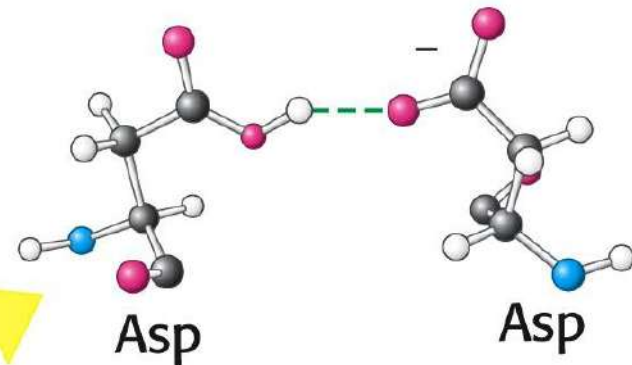
Attivazione della calpaina a seguito del legame del calcio



Le aspartil proteasi (proteasi acide)

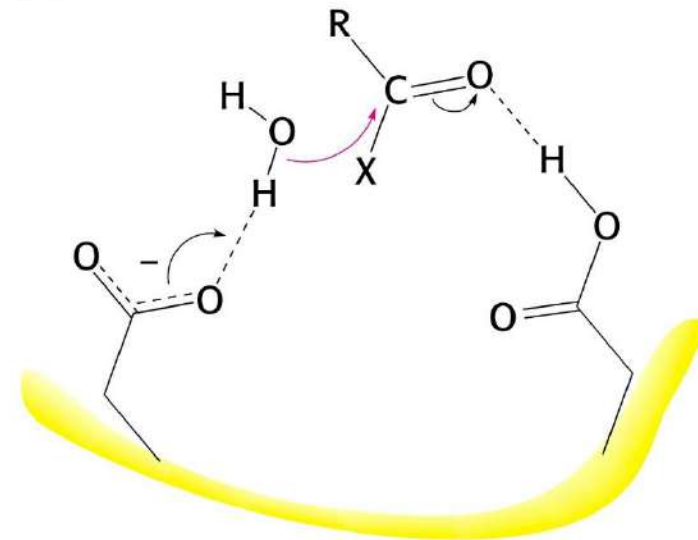


renina

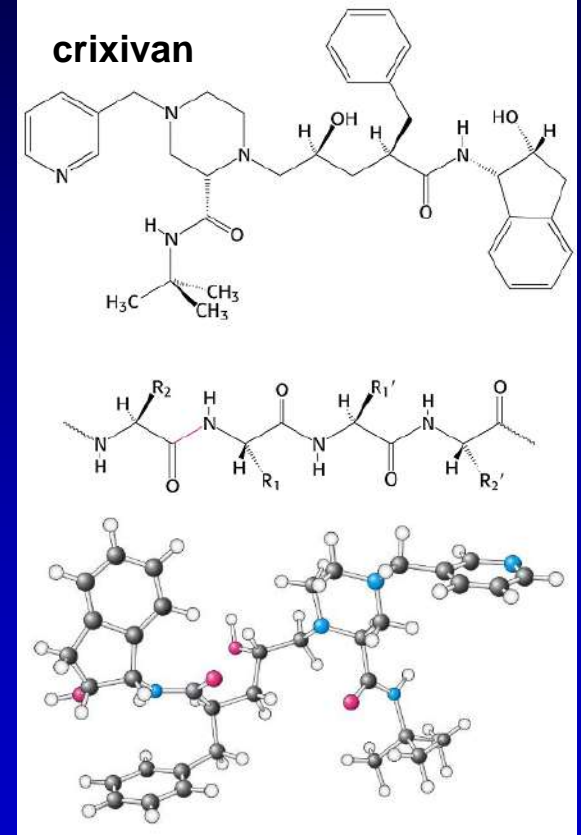
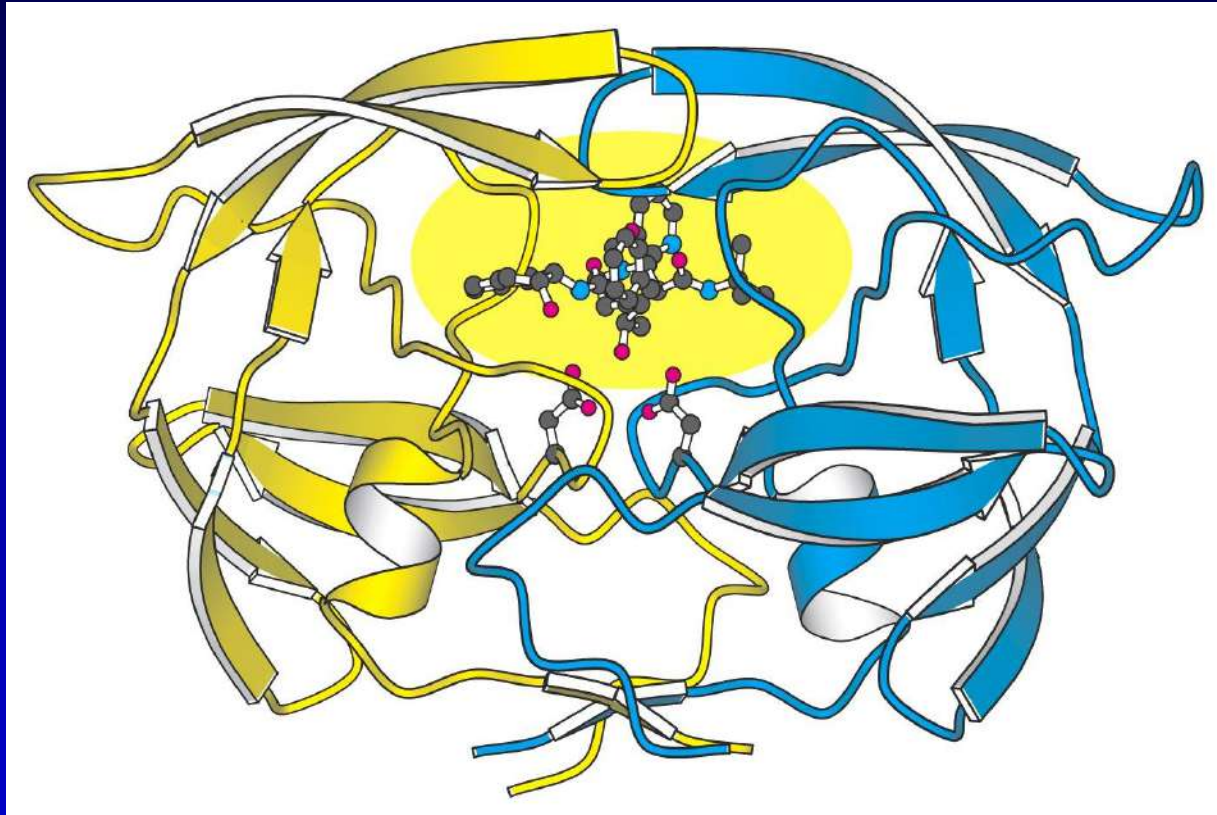


- renina
- pepsina
- chimosina (o rennina)
- penicillopepsina
- proteasi di HIV-1

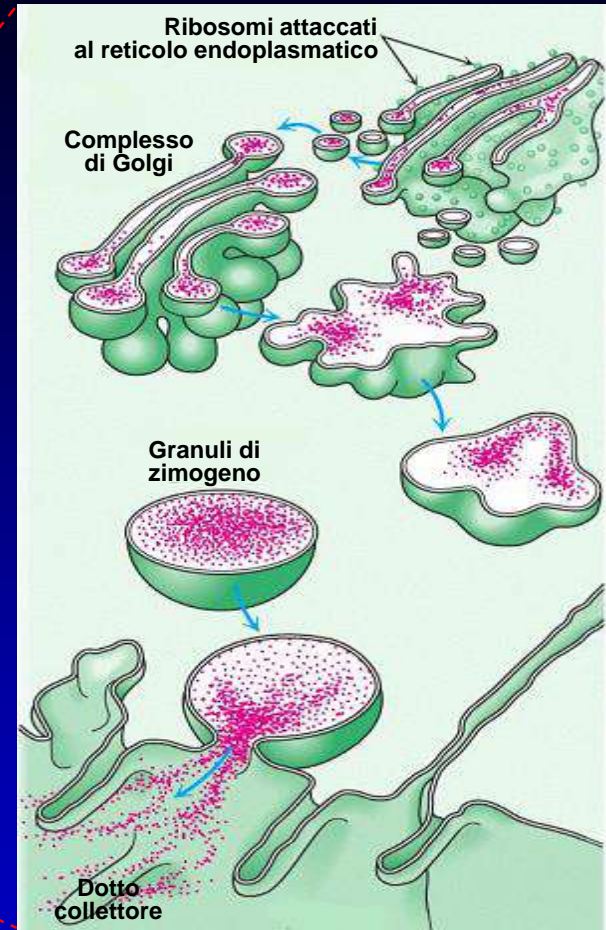
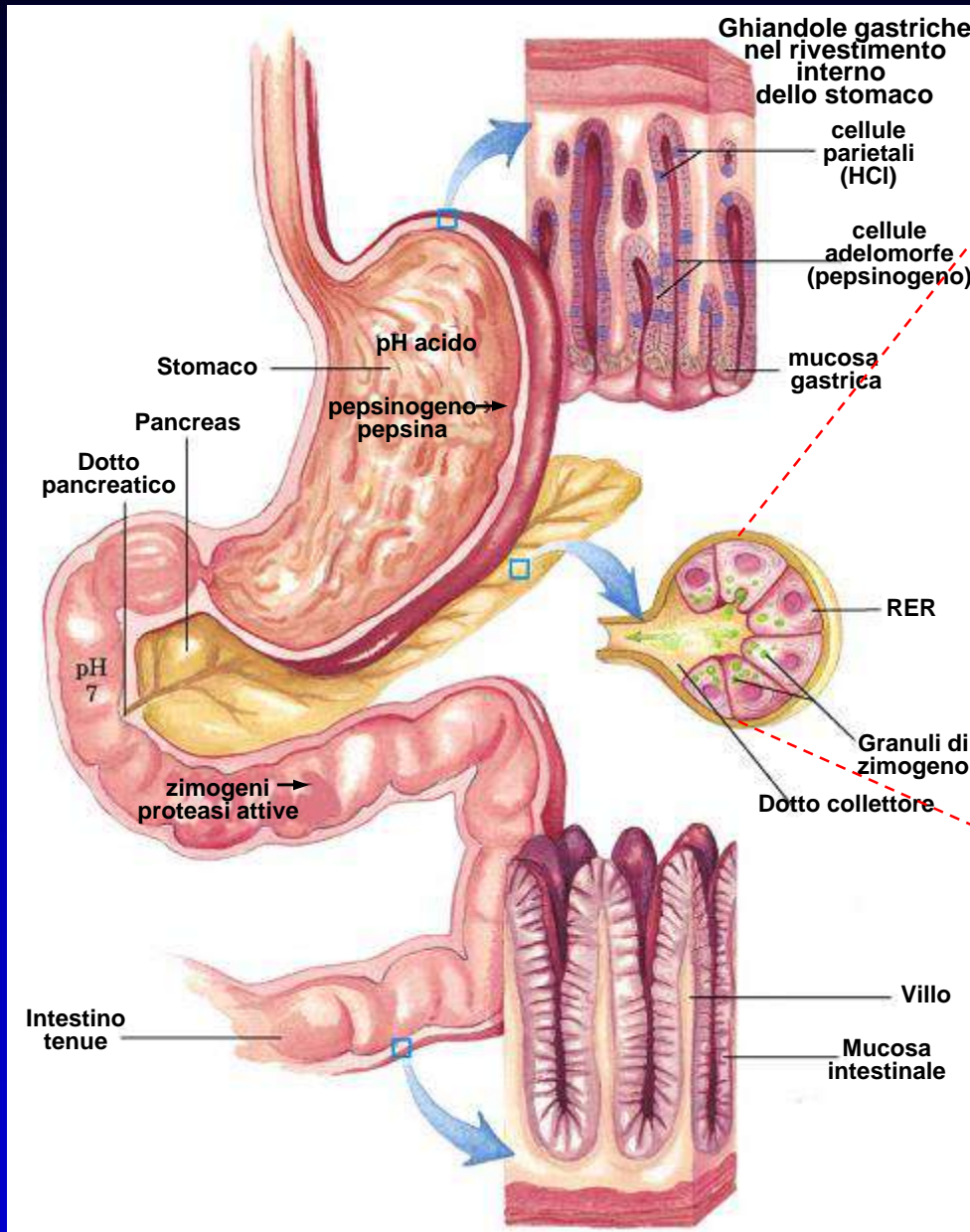
La **pepsina** (succo gastrico) contiene nel sito attivo due residui di ac. aspartico.



La proteasi di HIV

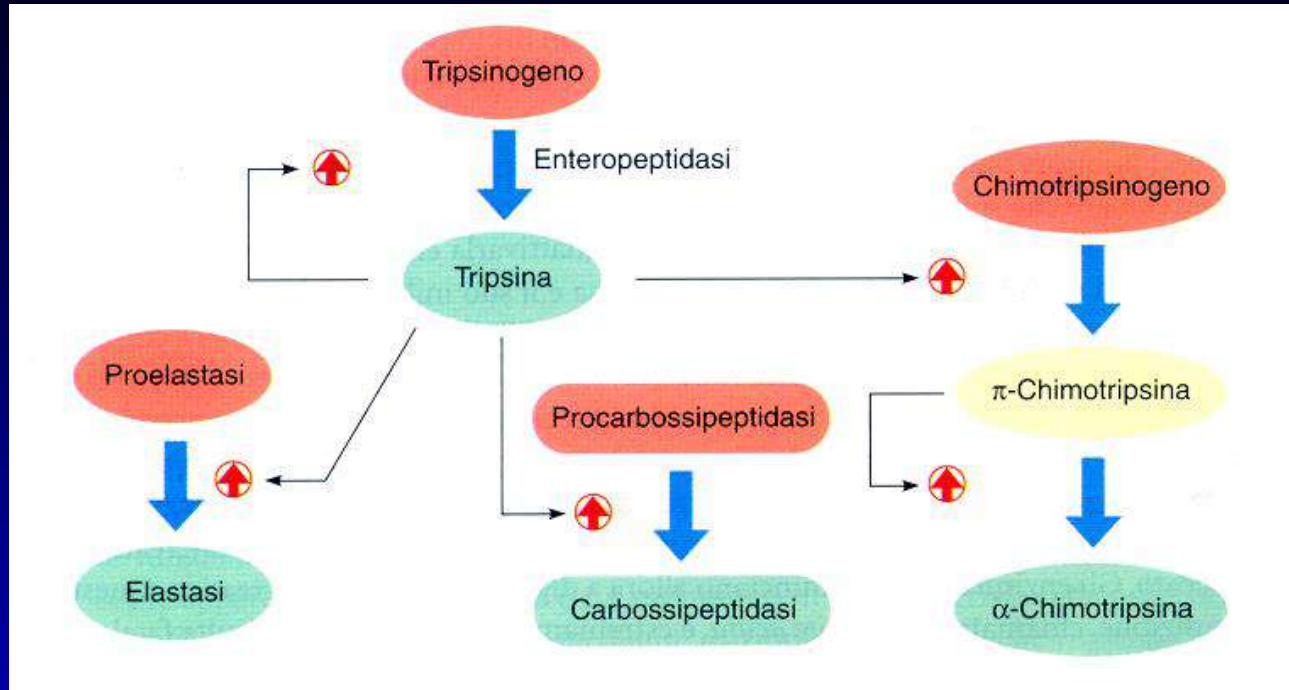


Gli enzimi digestivi: le proteasi gastriche e pancreatiche

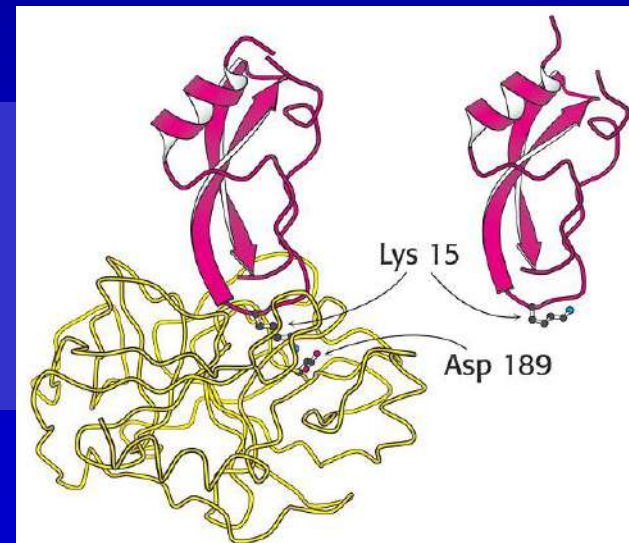


Sito di sintesi	Zimogeno	Forma attiva
Stomaco	pepsinogeno	pepsina
Pancreas	tripsinogeno	tripsina
Pancreas	chimotripsinogeno	chimotripsina
Pancreas	proelastasi	elastasi
Pancreas	procarbossipeptidasi	carbossipeptidasi

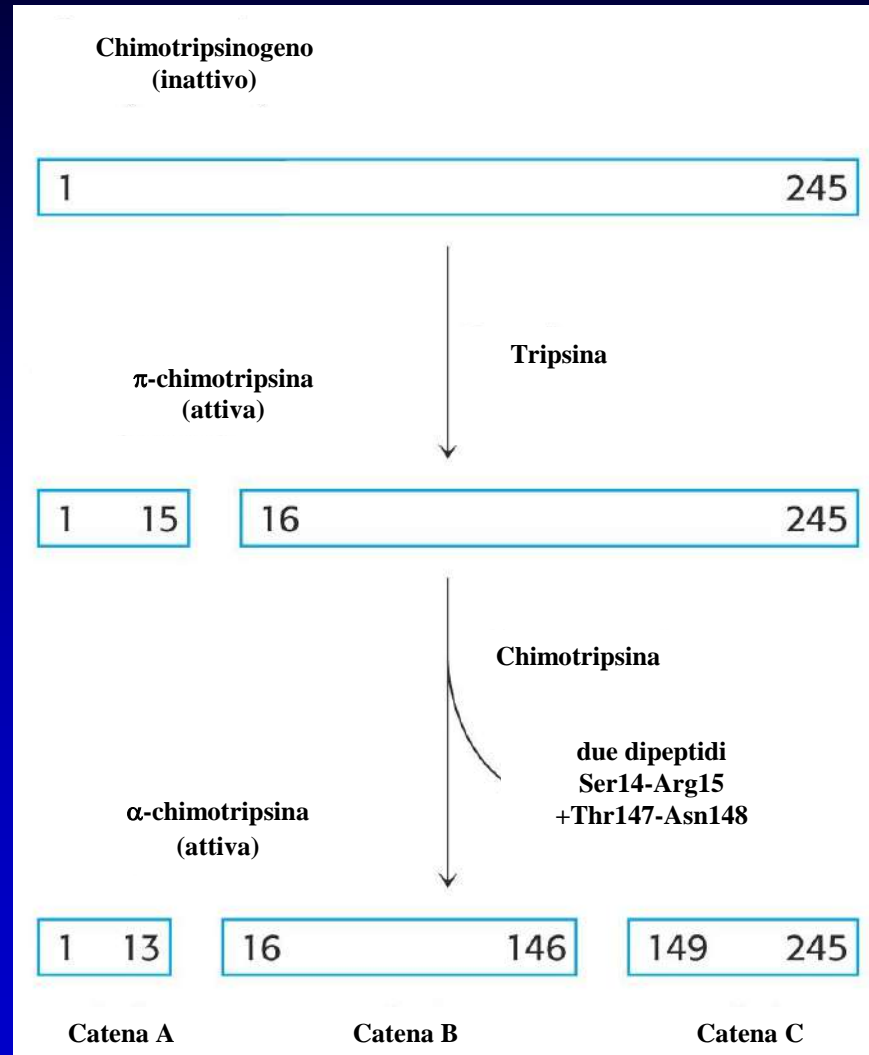
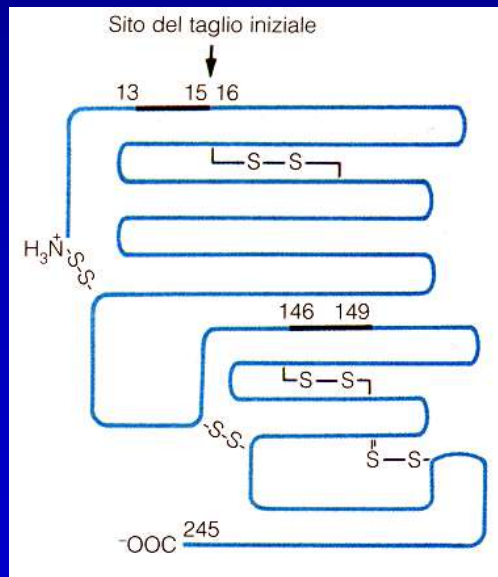
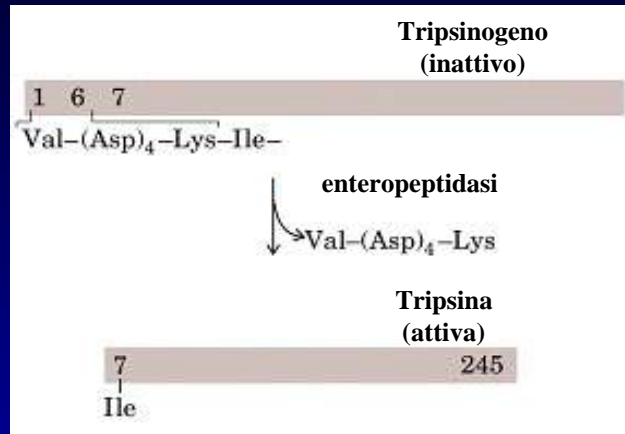
Le proteasi pancreatiche



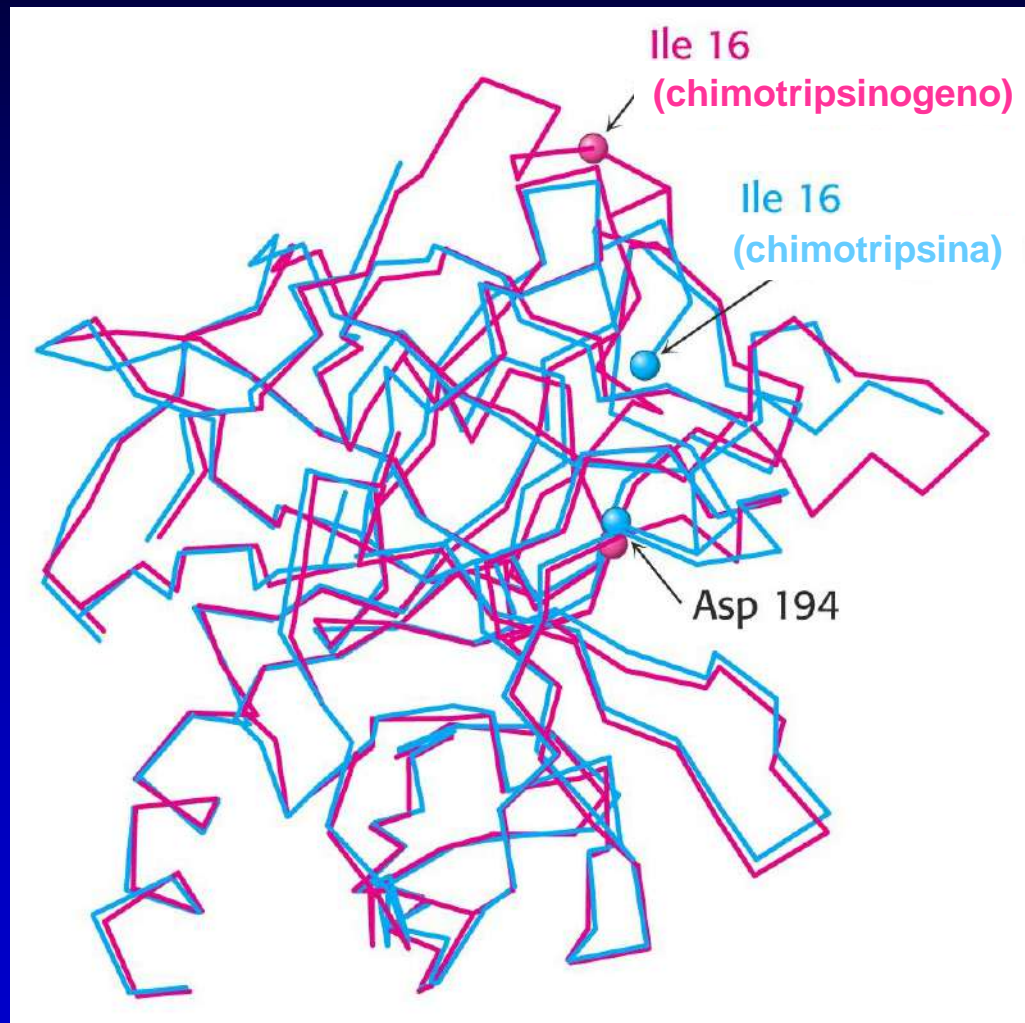
Poiché l'attivazione della tripsina può essere autocatalitica, il pancreas sintetizza anche un forte inibitore competitivo: l'inibitore pancreatico secretorio della tripsina.



L'attivazione della tripsina e della chimotripsina



L'attivazione proteolitica del chimotripsinogeno comporta la formazione del sito che lega il substrato

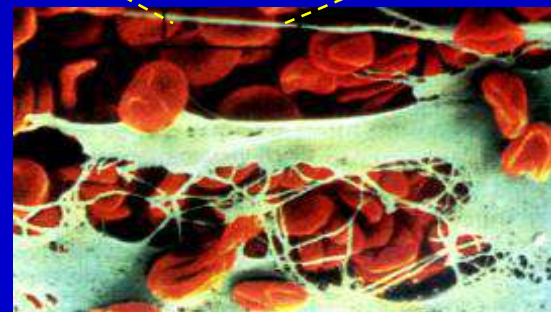
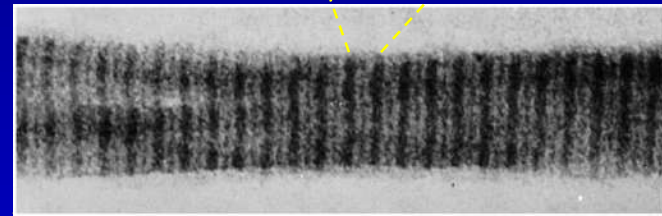
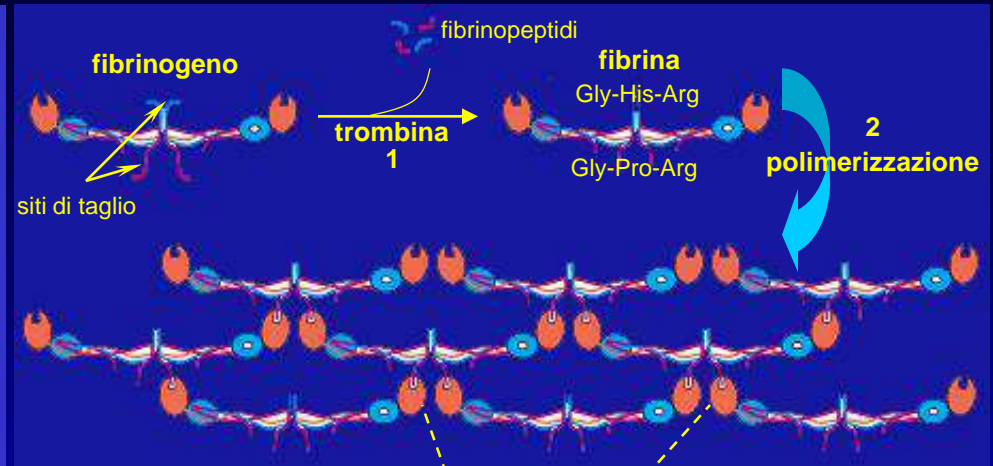


LA COAGULAZIONE DEL SANGUE

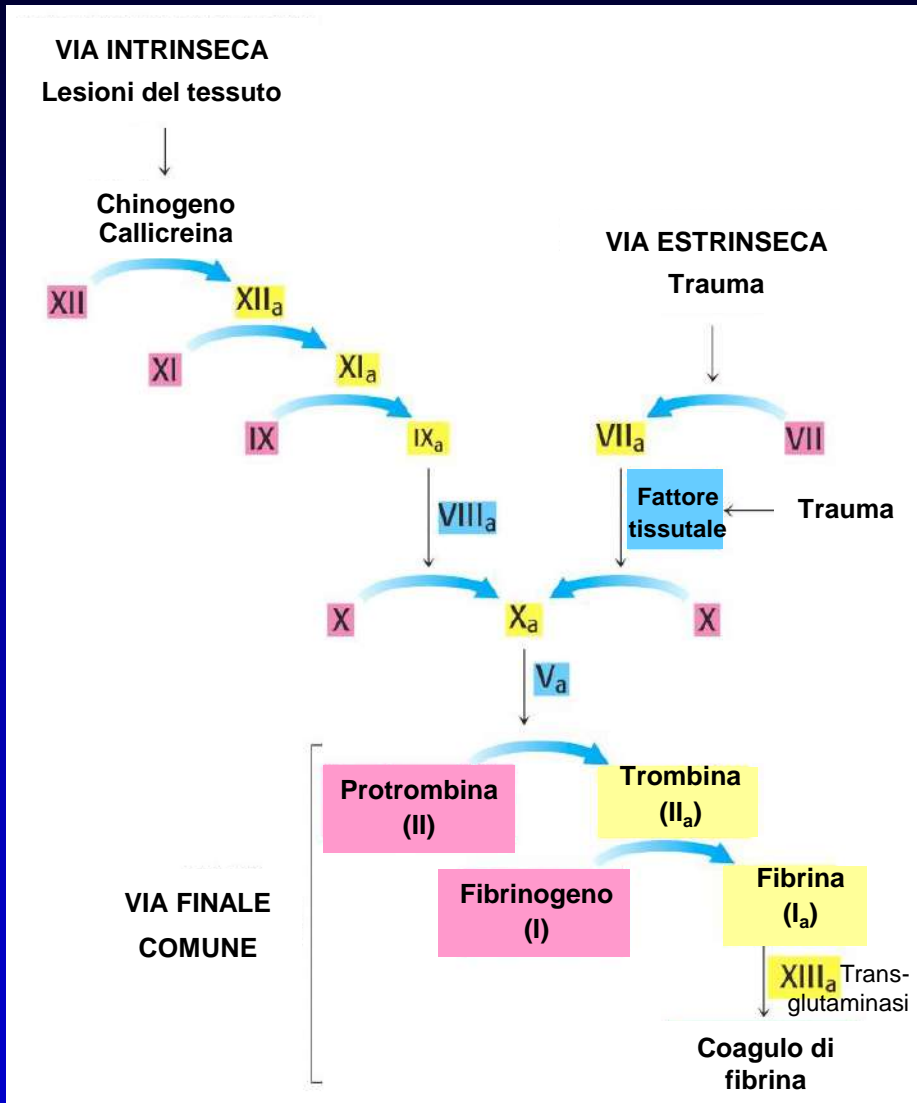
La coagulazione del sangue

I monomeri di fibrina **derivano da un precursore, il fibrinogeno, mediante reazioni di proteolisi che rilasciano piccoli frammenti noti come fibrinopeptidi.**

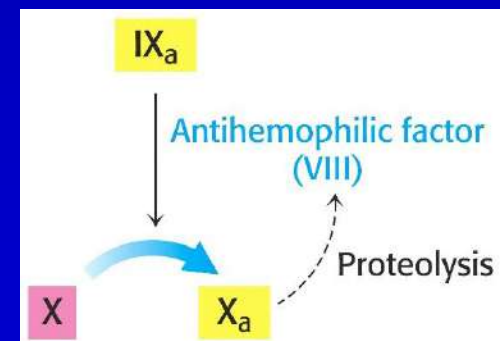
La proteolisi genera l'esposizione di superfici mediante le quali le molecole di fibrina possono aderire tra loro a formare il coagulo. La proteolisi del fibrinogeno in fibrina è catalizzata dalla serina proteasi trombina.



La coagulazione del sangue

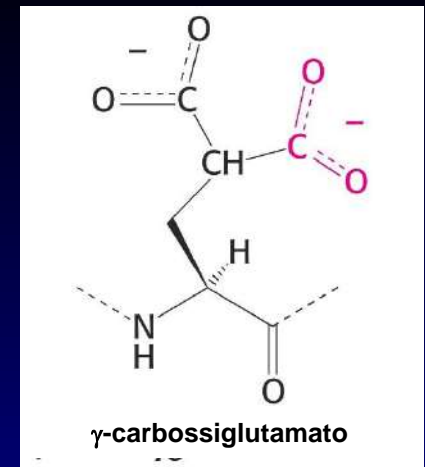


Ogni proteasi della cascata della coagulazione esiste in una forma inattiva o una attiva. La sequenza delle attivazioni avviene quando il sangue viene a contatto con superfici di tessuto lesionate (via intrinseca) o quando vi sono traumi dei vasi sanguigni (via estrinseca). La prima inizia con l'attivazione del fattore XII, mentre la seconda inizia con l'attivazione del fattore VII e con rilascio di una lipoproteina (fattore tissutale).



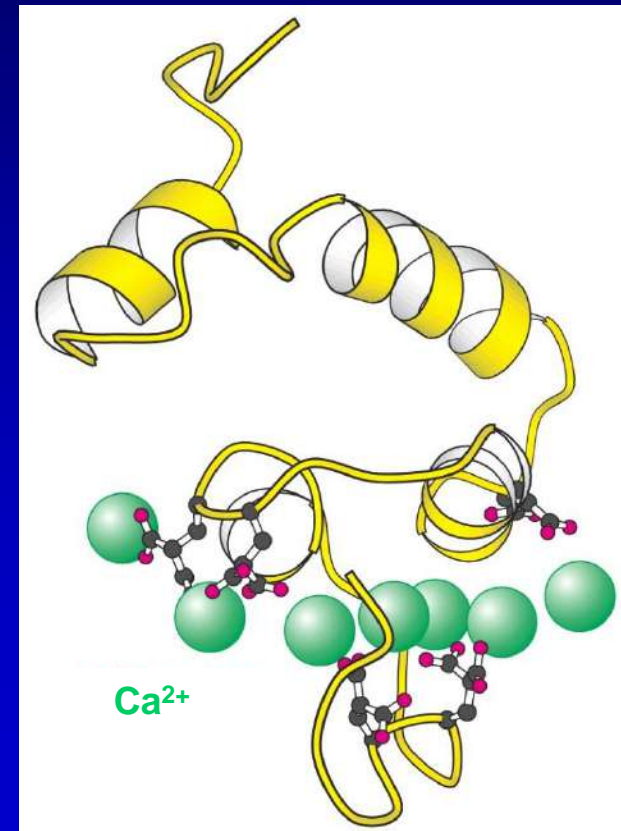
La vitamina K è necessaria per la sintesi di protrombina

I primi 10 residui di glutammato (deboli chelanti del calcio) della regione N-terminale della protrombina vengono carbossilati a γ -carbossiglutamato (un chelante molto più forte) da un sistema enzimatico dipendente dalla vitamina K.



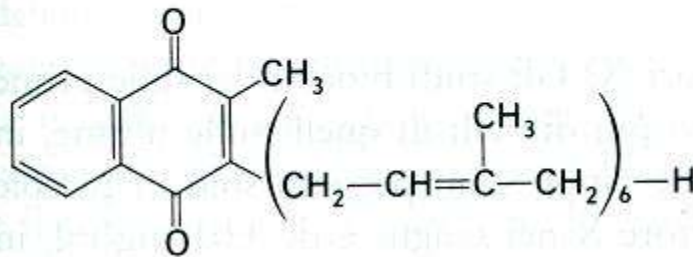
Il legame del Ca^{2+} alla protrombina determina il suo ancoraggio alle membrane fosfolipidiche derivate dalle piastrine a seguito al trauma. In questo modo essa si viene a localizzare in prossimità di due fattori (il fattore X_a e il fattore V) che mediano la sua conversione a trombina.

Il frammento N-terminale viene rimosso dalla protrombina ed in questo modo la proteina si stacca dalle membrane e viene liberata nel plasma trombina nella forma attiva che digerisce (attivandolo) il fibrinogeno.

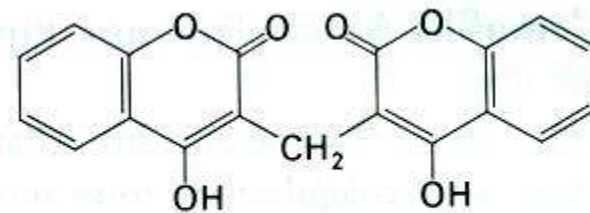


Antagonisti della vitamina K

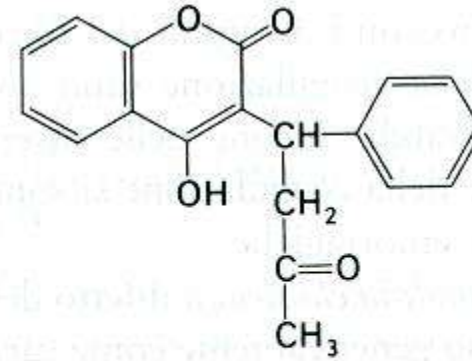
Gli antagonisti della vitamina K sono: il dicumarolo e la warfarina. Il dicumarolo si forma nel trifoglio marcescente e può causare emorragie letali negli animali alimentati con questo foraggio. L'azione avviene mediante inibizione della reazione di carbossilazione del glutamato.



Vitamina K₂



Dicumarolo



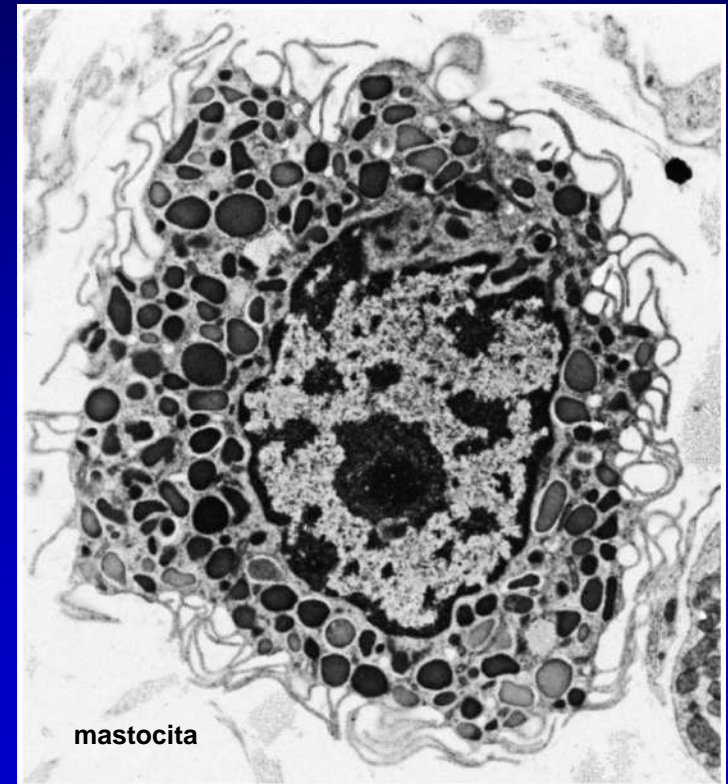
Warfarina

La regolazione della coagulazione

Il processo di coagulazione deve essere regolato in modo molto preciso. L'instabilità dei fattori di coagulazione influisce in modo determinante al controllo del processo. Questi hanno un'emivita breve in quanto vengono diluiti dal flusso sanguigno, rimossi dal fegato e degradati da proteasi.

La trombina stessa determina la deattivazione della cascata della coagulazione (innesco della proteasi C) oltre a catalizzare la formazione della fibrina.

Vi sono inoltre inibitori specifici come l'antitrombina III la cui azione viene incrementata dall'eparina, un polisaccaride carico negativamente che facilita la formazione di complessi irreversibili tra antitrombina III e le serina proteasi della coagulazione. La quantità nel sangue di trombina e antitrombina è finemente regolata.



La lisi del coagulo

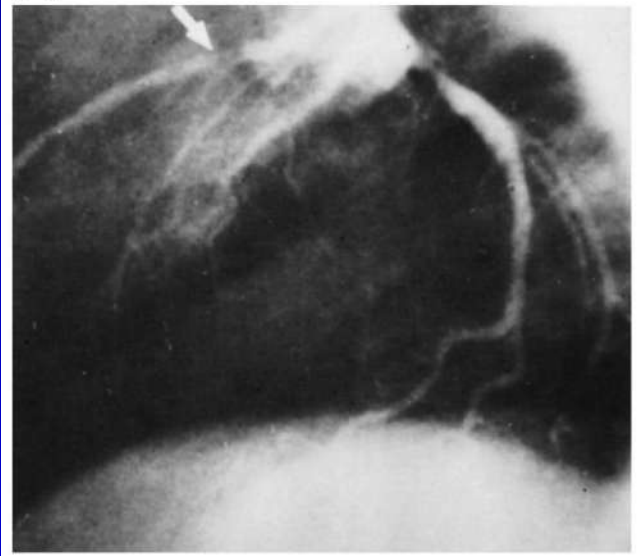
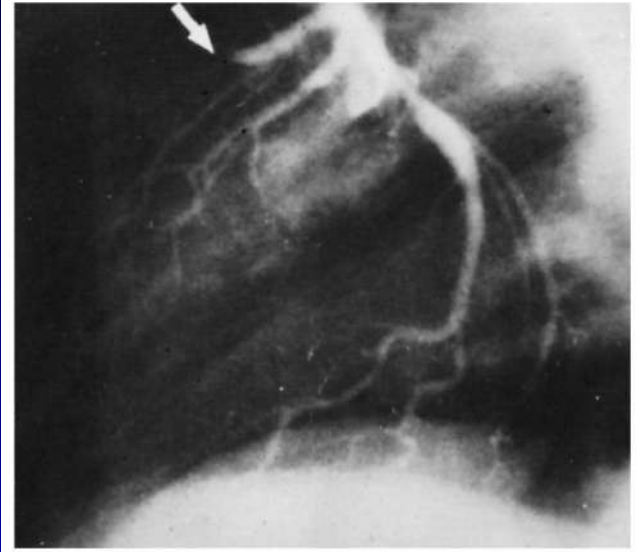
Appena viene ridefinita l'integrità strutturale della parte danneggiata, il coagulo deve essere dissolto.

La fibrina viene demolita dalla plasmina, una serina proteasi che idrolizza i legami peptidici delle regioni di connessione tra le molecole di fibrina.

Essa deriva dal plasminogeno che viene attivato dall'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA).

La somministrazione di tPA ottenuto mediante tecnologia del DNA ricombinante dopo poco tempo dalla formazione del coagulo in un'arteria coronaria aumenta la probabilità di sopravvivenza a un attacco cardiaco.

Arteria coronaria



LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE APPLICATA AGLI ENZIMI

I fattori determinanti che comportarono l'impiego della tecnologia degli enzimi furono:

- 1) le importanti innovazioni nella tecnica delle colture microbiche in fase liquida (II^a guerra mondiale) soprattutto per la produzione di penicillina,
- 2) il rapido espandersi delle conoscenze di base sulle proprietà degli enzimi,
- 3) la possibilità di purificare gli enzimi su larga scala da particolari colture microbiche.

L'impiego di enzimi purificati

Gli enzimi impiegati su scala industriale sono prevalentemente esocellulari (escreti dal microrganismo).

Il brodo di coltura di certi microrganismi come batteri, lieviti e funghi filamentosi è una delle principali fonti di proteasi, di amilasi, di cellulasi, lipasi, ecc.

Gli enzimi usati nei processi industriali sono soprattutto le idrolasi, che possono essere separate dai microrganismi con facilità.

Le applicazioni biotecnologiche degli enzimi

Ambito di applicazione	Enzimi usati	Impiego e vantaggi
Industria del pellame	Tripsina da animali macellati o da microrganismi	Per rimuovere componenti proteiche o peli.
Industria farmaceutica e presidi medici	Tripsina, plasmina, ecc. Diversi enzimi	Per detergere le ferite e dissolvere coaguli. Nel trattamento delle infiammazioni Usati come strumenti diagnostici nella biochimica clinica

Le applicazioni biotecnologiche degli enzimi

Ambito di applicazione	Enzimi usati	Impiego e vantaggi	Problemi
Detersivi biologici	Proteinasi Amilasi	Prelavaggio ed applicazione diretta Rimozione residui amilacei da stoviglie	Allergie negli addetti alla lavorazione
Industria tessile	Amilasi Enzimi batterici	Per togliere l'appretto. Resistono a 100-110°C.	

Le applicazioni biotecnologiche degli enzimi

Ambito di applicazione	Enzimi usati	Impiego e vantaggi
Industria dei prodotti da forno	α-amilasi fungine inattivate a 50°C	Catalizzano la degradazione dell'amido della farina in zuccheri.
	Proteinasi	Nei biscotti per abbassare il contenuto proteico della farina.

Le applicazioni alimentari degli enzimi

Ambito di applicazione	Enzimi usati	Impiego e vantaggi	Problemi
Industria casearia	Rennina da stomaco di giovani ruminanti (vitelli, agnelli, capretti) Lipasi Lattasi	Usata per idrolizzare le proteine per la produzione di formaggi. Per la maturazione di Gorgonzola e Roquefort Scindono il lattosio in glucosio e galattosio	Prezzo elevato.

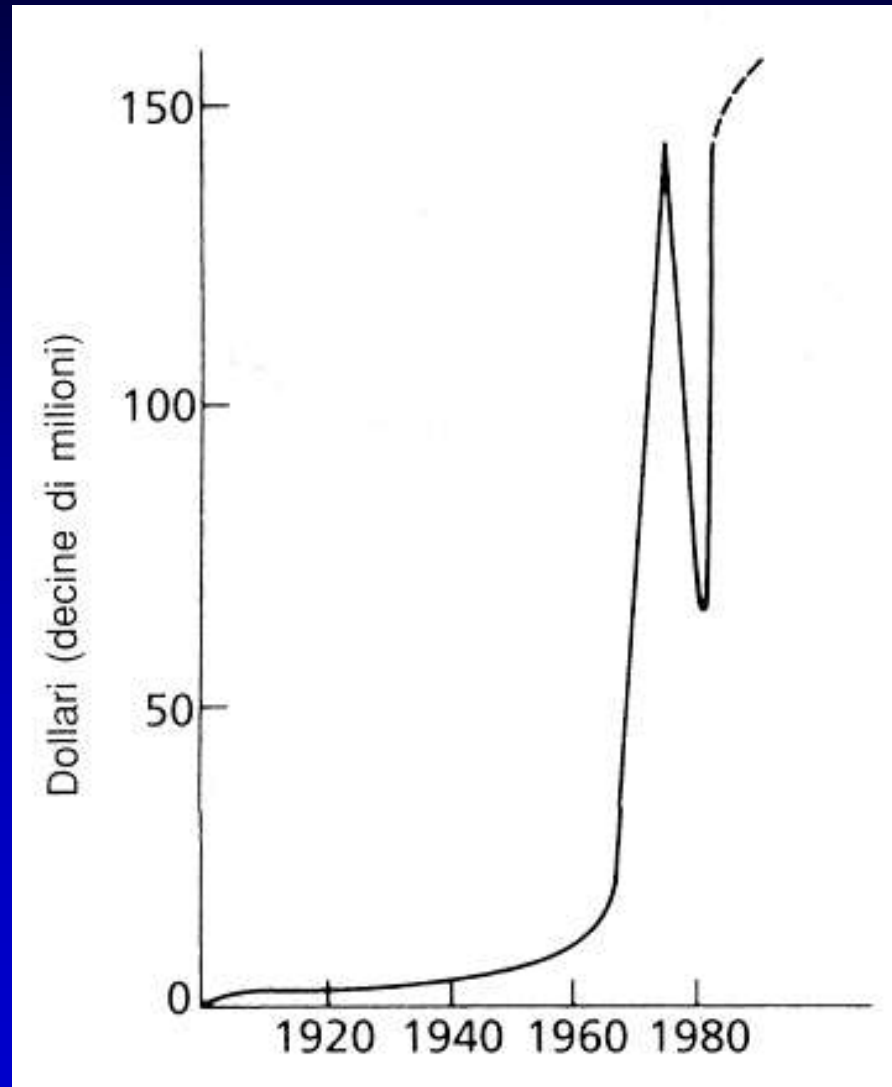
Le applicazioni alimentari degli enzimi

Ambito di applicazione	Enzimi usati	Impiego e vantaggi
Industria della birra	<p>Enzimi prodotti dall'orzo nella fase di macerazione.</p> <p>Enzimi prodotti industrialmente:</p> <p>amilasi, glucanasi, proteinasi.</p> <p>β-glucanasi</p> <p>Amiloglucosidasi</p> <p>Proteinasi</p>	<p>Scindono l'amido e le proteine, formando zuccheri semplici, aminoacidi e peptidi usati poi dai lieviti per produrre alcool.</p> <p>Scindono i polisaccaridi e le proteine del malto.</p> <p>Migliora le caratteristiche della filtrazione.</p> <p>Birre a basso contenuto calorico</p> <p>Rimuovono la torbidità della birra durante l'immagazzinamento.</p>

Le applicazioni alimentari degli enzimi



Ambito di applicazione	Enzimi usati	Impiego e vantaggi
Industria dell'amido	Amilasi, amiloglucosidasi, glucoamilasi. Glucosio isomerasi Enzimi immobilizzati	Convertono l'amido in glucosio (sciroppi). Convertono il glucosio in fruttosio (aumento potere dolcificante) Produzione di sciroppi ad alto contenuto di fruttosio

Il mercato mondiale degli enzimi microbici



La produzione di enzimi industriali nel mondo occidentale

Tre settori di mercato assorbono da soli l'80% delle vendite di enzimi per impiego industriale: la conversione degli amidi (40%), la produzione di detersivi (30%) e l'industria casearia (10%). In questo ultimo settore il mercato si sta ampliando notevolmente.

Nazione	Tonnellate	%
U.S.A.	6360	12
Giappone	4240	8
 Danimarca	24 910	47
Francia	1590	3
Germania	3180	6
 Olanda	10 070	19
Regno Unito	1060	2
Svizzera	1060	2
Altri	530	1
<i>Totale</i>	53 000	100

La produzione di enzimi mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Grazie allo sviluppo delle tecniche del DNA ricombinante, oggi è possibile trasferire i geni che sintetizzano gli enzimi da un organismo ad un altro.

Dopo che un enzima è stato identificato come potenzialmente utile per un processo industriale, il gene che lo codifica può essere clonato nel microrganismo ospite più adatto per la sua produzione su larga scala.

Le modificazioni degli enzimi

La modificazione degli enzimi (attraverso l'ingegneria genetica) é finalizzata a migliorarne o ad alterarne le proprietà catalitiche.

I principali obiettivi in questo ambito sono i seguenti:

Per aumentare l'attività dell'enzima.

Per migliorare la stabilità dell'enzima.

Per consentire all'enzima di agire in condizioni ambientali diverse.

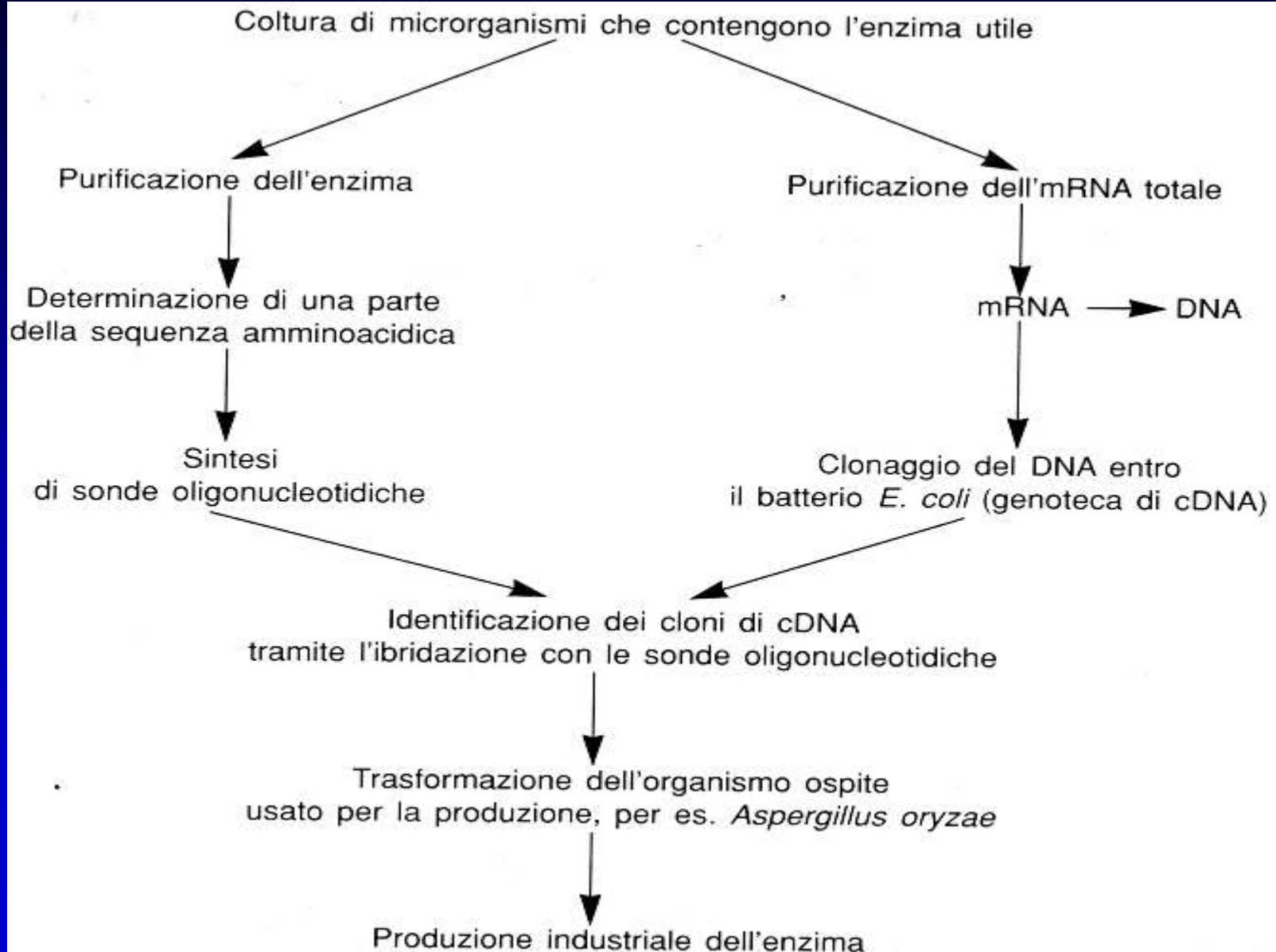
Per cambiare il pH o la temperatura ottimali.

Per modificare la specificità dell'enzima, in modo che catalizzi la conversione di un substrato differente.

Per modificare la reazione catalizzata.

Per aumentare l'efficienza di un processo.

La produzione di enzimi mediante la tecnologia del DNA ricombinante



La tecnologia del DNA ricombinante

La fonte di informazioni molecolari risiede quindi nel deposito di informazioni della cellula: il DNA.

Le voluminose dimensioni del cromosoma hanno costituito per anni un problema insormontabile.

Come è possibile studiare un particolare gene che codifica una proteina tra i 100.000 geni che compongono il genoma di mammifero?

I momenti principali nello sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante

1869	Miescher isola il DNA per la prima volta.
1944	Avery fornisce la prova che il DNA, e non le proteine, porta le informazioni genetiche durante la trasformazione batterica.
1953	Watson e Crick propongono il modello a doppia elica per la struttura del DNA basato su risultati ai raggi X di Franklin e Wilkins .
1957	Kornberg scopre la DNA polimerasi, l'enzima usato oggi per produrre sonde marcate di DNA.
1961	Marmur e Doty scoprono la rinaturazione del DNA, stabilendo la specificità e la fattibilità delle reazioni di ibridizzazione degli acidi nucleici.
1962	Arber fornisce la prima prova dell'esistenza delle nucleasi di restrizione, portando alla loro successiva purificazione e uso nella caratterizzazione di sequenze di DNA da Nathans e H. Smith .
1966	Nirenberg, Ochoa e Khorana chiariscono il codice genetico.
1967	Gellert scopre la DNA ligasi, l'enzima usato per unire i frammenti di DNA.
1972-1973	Vengono sviluppate le tecniche di clonaggio del DNA nei laboratori di Boyer, Cohen, Berg e loro colleghi alla università di Stanford e alla università di California a San Francisco.
1975	Southern sviluppa l'ibridizzazione dopo trasferimento da gel per la rivelazione di sequenze specifiche di DNA.
1975-1977	Sanger e Barrell e Maxam e Gilbert sviluppano metodi rapidi per sequenziare il DNA.
1981-1982	Palmiter e Brinster producono topi transgenici; Spradling e Rubin producono moscerini della frutta transgenici.
1985	Mullis e i suoi collaboratori inventano la reazione a catena della polimerasi (PCR).

I geni ingegnerizzati possono essere inseriti permanentemente nel genoma di batteri ed eucarioti inferiori

Nei batteri, nei lieviti ed in alcune muffe, una molecola di DNA portatrice di un gene mutante può essere introdotta artificialmente, sostituendo la singola copia del gene normale.

Così si producono cellule su misura che sintetizzano una forma alterata di qualunque proteina o RNA, invece della forma normale della molecola.

La produzione industriale degli enzimi

I criteri per la scelta del microrganismo più adatto per una determinata produzione enzimatica dipendono da diversi fattori, i più importanti sono:

- 1) i costi di produzione;
- 2) enzima endocellulare o esocellulare;
- 3) eventuale presenza di enzimi o metaboliti nocivi;
- 4) presenza di odori o colori sgradevoli;
- 5) sensibilità alla temperatura ed a valori estremi di pH;
- 6) facilità di recupero dell'enzima.

La produzione industriale degli enzimi

La produzione industriale degli enzimi dai microrganismi avviene prevalentemente in colture in fase liquida o su substrato solido (es. il siero del latte e molti cereali).

La produzione degli enzimi fungini (amilasi, proteinasi, pectinasi e cellulasi) su substrato solido vede l'impiego, come substrato, di una miscela formata da crusca di grano e nutrienti salini incubati a temperatura costante.

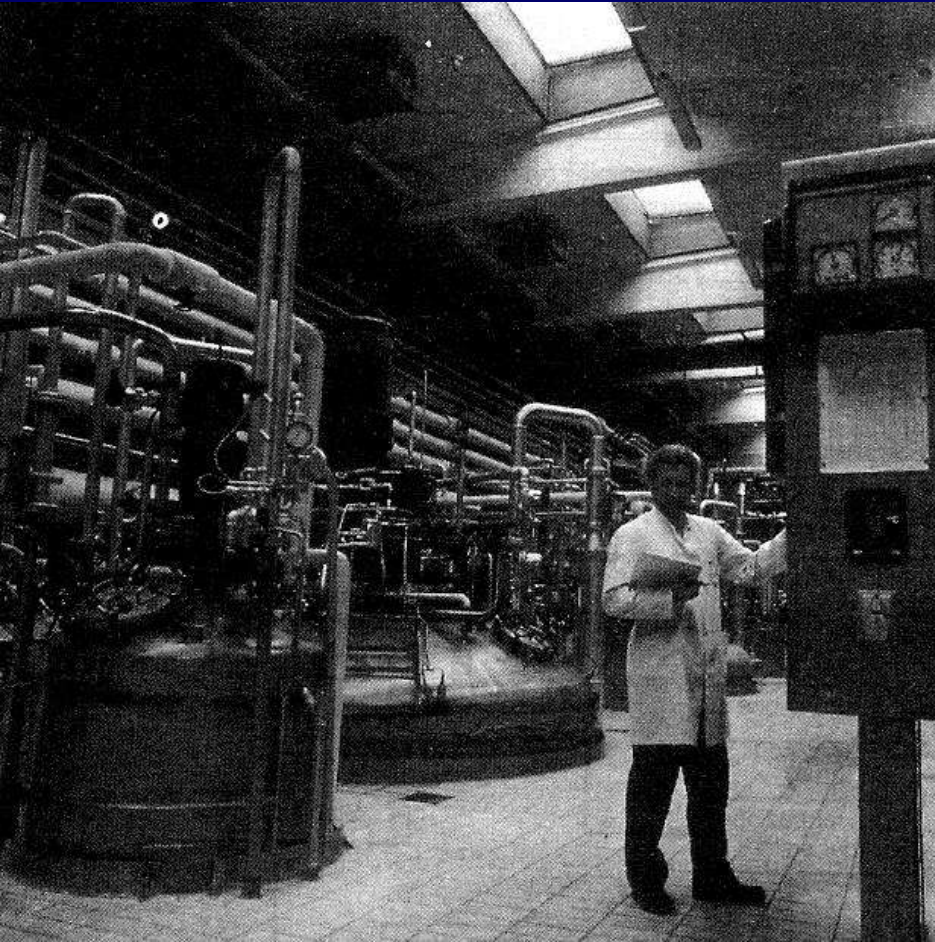
La produzione industriale di enzimi

La produzione degli enzimi microbici avviene generalmente in colture in fase liquida simili a quelle impiegate per la produzione degli antibiotici.

Il terreno di coltura deve soddisfare i fabbisogni energetici dei microrganismi e fornire un apporto adeguato di azoto e carbonio.

La produzione industriale degli enzimi

Per gli enzimi microbici, vengono impiegati dei bioreattori in acciaio inossidabile con una capacità di 10-50 m³.



La crescita dei microrganismi è influenzata dai nutrienti ed i parametri ambientali come la temperatura, il pH e l'ossigenazione sono mantenuti ai livelli ottimali.

La produzione industriale degli enzimi

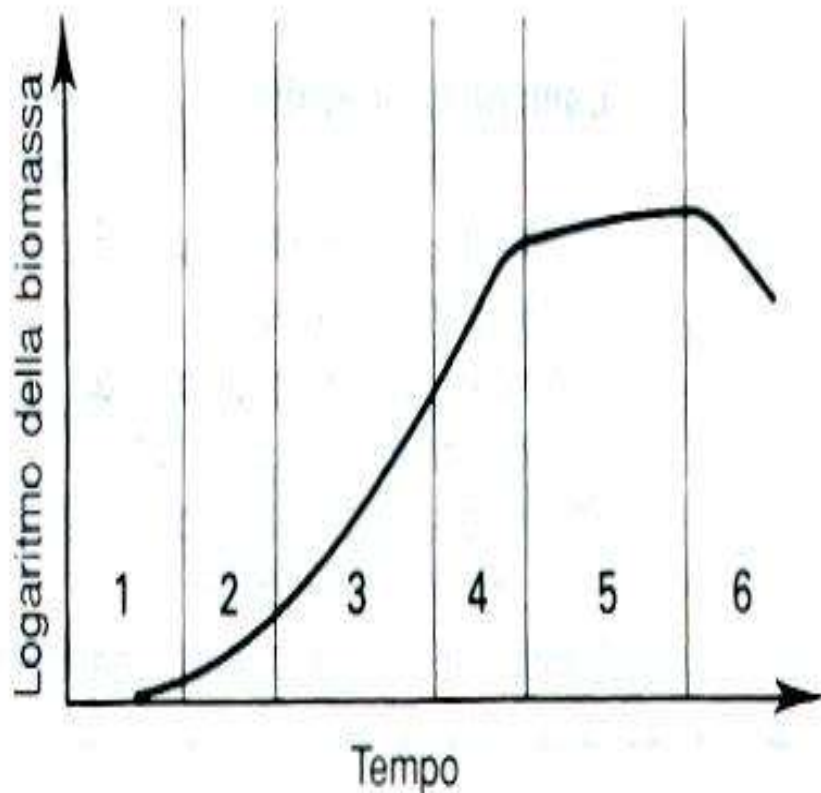
Fonte di carboidrati	Forma	Fonte di azoto (% di azoto sul peso)
Glucosio	Monoidrato di glucosio, amido idrolizzato	Orzo (1,5-2,0) Melassa di barbabietole da zucchero (1,5-2,0)
Lattosio	Lattosio puro, siero in polvere	Spremitura di torsoli di mais (4,5)
Amido	Orzo, farina di castagna di terra, farina d'avena, farina di segale, pasta di soia	Mangimi da tuberi di Papilionacee (8,0) Farina d'avena (1,5-2,0) Pharmamedia (8,0)
Saccarosio	Melassa di barbabietole e di canna da zucchero, zucchero puro	Farina di segala (1,5-2,0) Pasta di soia (8,0) Siero in polvere (4,5)

La produzione industriale degli enzimi

Nelle maggior parte dei casi, gli enzimi vengono prodotti da colture in batch che durano da 30 a 150 ore: è essenziale che entro il bioreattore permangano condizioni di assoluta sterilità in ogni fase della produzione.

La produzione industriale degli enzimi

In una coltura a sistema chiuso (batch culture), vengono inoculati volumi fissi di terreno liquido, contenente i microrganismi; durante la crescita, le sostanze nutritive si consumano ed i metaboliti aumentano, determinando cambiamenti nel metabolismo cellulare.



L'andamento della crescita vede una fase iniziale (1) di latenza (lag phase) di adattamento ambientale delle cellule, una fase transitoria di incremento (2), seguita da una fase esponenziale (3) o logaritmica (log phase), da una fase di decremento (4), una fase stazionaria (5) ed una fase di estinzione (6).

I vantaggi delle colture a sistema chiuso

In certi momenti possono essere necessarie solo quantità relativamente piccole dei prodotti.

La domanda del mercato può essere intermittente.

Certi prodotti possono essere molto deperibili.

La concentrazione del prodotto nel brodo di coltura deve essere alta per ottimizzare le lavorazioni a valle.

Alcuni prodotti metabolici si formano solo nella fase stazionaria del ciclo di crescita.

L'instabilità di certi ceppi usati nella produzione fa sì che debbano essere regolarmente sostituiti con ceppi freschi.

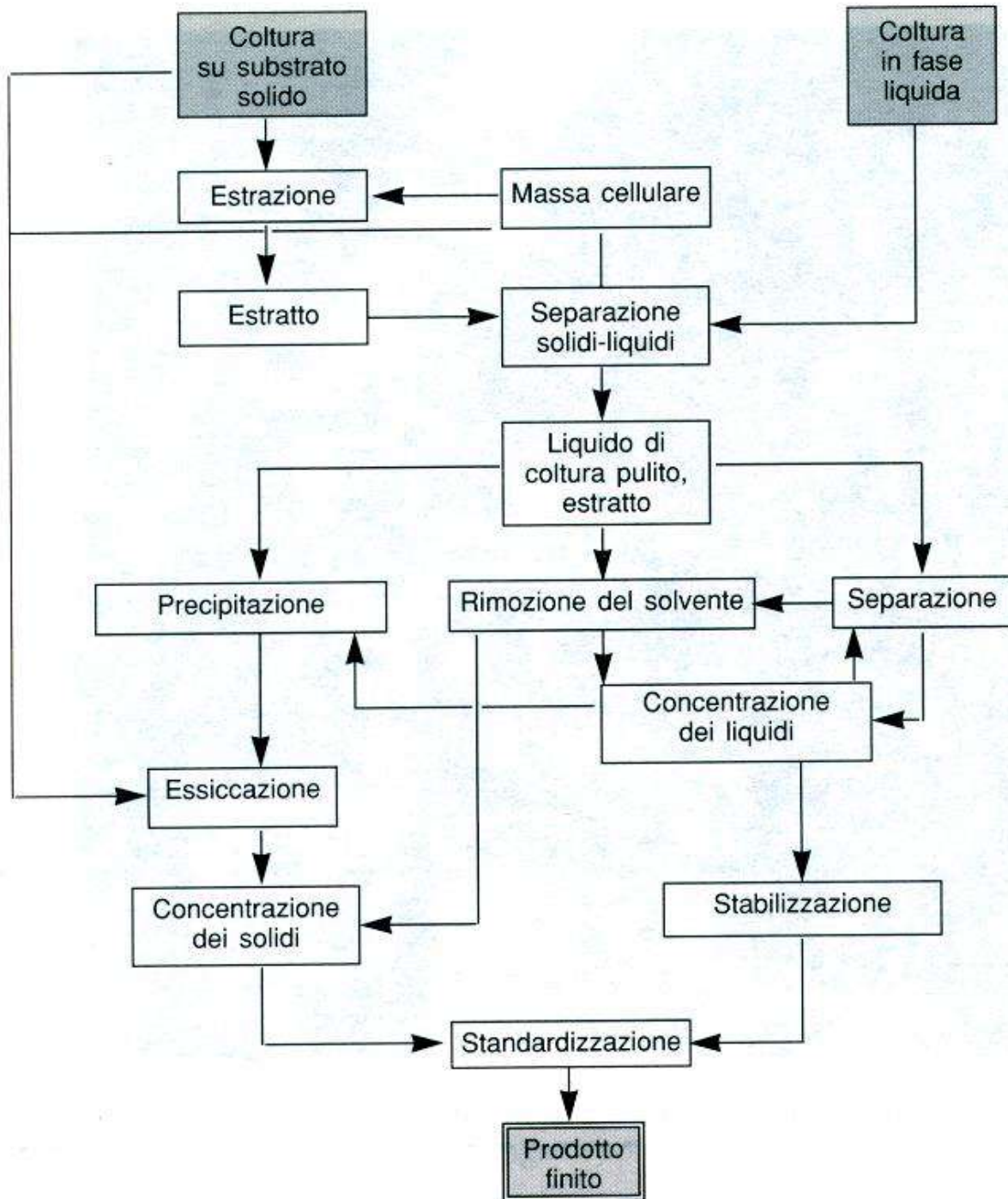
I processi continui possono comportare notevoli difficoltà tecniche.

Inoltre, quando si impiegano organismi geneticamente modificati (OGM), è obbligatorio, per legge, evitare ogni contaminazione da parte di microrganismi indesiderati e la possibilità che l'organismo coltivato diffonda accidentalmente nell'ambiente.

La purificazione degli enzimi nei processi industriali

Tutte le operazioni di estrazione e purificazione del prodotto finale vengono definite "operazioni a valle".

Per essere adatti alla distribuzione commerciale, i prodotti finali dei processi di purificazione devono avere un certo grado di stabilità: per molti enzimi e proteine la forma di elezione è quella disidratata.



I test di sicurezza per gli enzimi per uso alimentare o clinico

Test	Gruppo		
	(a) Microrganismi tradizionalmente usati nei cibi o nella preparazione di alimenti	(b) Microrganismi accettati come contaminanti innocui degli alimenti	(c) Microrganismi che non rientrano né in (a) né in (b)
Patogenicità	In genere non sono necessari test		X
Tossicità orale acuta, nel topo e nel ratto; tossicità orale subacuta		X	X
Tossicità orale a tre mesi, nel ratto		X	X
Mutagenicità in vitro		X	X
Teratogenicità, nel ratto; mutagenicità in vivo, nel topo e nel criceto			(X) ^a (X) ^a
Studi di tossicità del prodotto alimentare finito			(X) ^a
Carcinogenicità, nel ratto; fertilità e riproduzione			(X) ^a (X) ^a

**Test
classificati
dalla
Microbial
Food
Enzyme
Producers**

Gli enzimi immobilizzati

L'uso di un enzima in forma solubile è da considerarsi uno spreco, data l'impossibilità di recuperarlo al termine della reazione.

Un settore promettente della tecnologia enzimatica è rappresentato dalle tecniche di immobilizzazione degli enzimi su polimeri insolubili.

Così, essi possono essere recuperati dalla miscela di reazione e riutilizzati.

Inoltre, alcuni enzimi in forma libera vengono rapidamente inattivati dal calore, mentre diventano più stabili se vengono immobilizzati su supporti inerti di natura polimerica.

Le tecniche di immobilizzazione degli enzimi

Metodo	Vantaggi	Svantaggi
Legame covalente	Non è influenzato dal pH, dalla forza ionica del mezzo o dalla concentrazione del substrato	Il sito attivo può subire modificazioni; processo ad alto costo
Legami covalenti crociati	Legame forte, poco probabile la sua rottura	Perdita di attività enzimatica durante la preparazione; inefficace con substrati macromolecolari; impossibile la rigenerazione del carrier
Adsorbimento	Semplice, senza modificazione dell'enzima; possibile la rigenerazione del carrier; tecnica a basso costo	Cambiamenti di forza ionica possono provocare il deassorbimento; enzima soggetto all'attacco di enzimi proteolitici o microbici
Intrappolamento	Nessuna modificazione chimica dell'enzima	Diffusione del substrato verso, e del prodotto da, il sito attivo; difficile la preparazione, che spesso inattiva l'enzima; continua perdita di enzima attraverso i pori; inefficace con substrati macromolecolari; enzima non soggetto all'azione microbica o proteolitica

Le applicazioni industriali degli enzimi immobilizzati

Settore industriale	Enzima	Metodo di immobilizzazione	Processo
Alimentare	Glucosio isomerasi	DEAE-cellulosa Omogenati di cellule uniti da legami crociati mediante la glutaraldeide	Conversione del glucosio in fruttosio
	Amminoacilasi	DEAE-sefadex	Risoluzione di D,L-amminoacidi alla forma L
Caseario	Lattasi	Fibre di acetato di cellulosa	Idrolisi del lattosio a glucosio e galattosio
Farmaceutico	Penicillin acilasi	BrCN-attivato Sefadex Fibre di triacetato di cellulosa; poliacrilammide	Produzione di 6-APA dalla penicillina G
Chimico	Nitrilasi	Poliacrilammide	Produzione di acrilammide da acrilonitrile