

* Capitolo 7

Gli enzimi

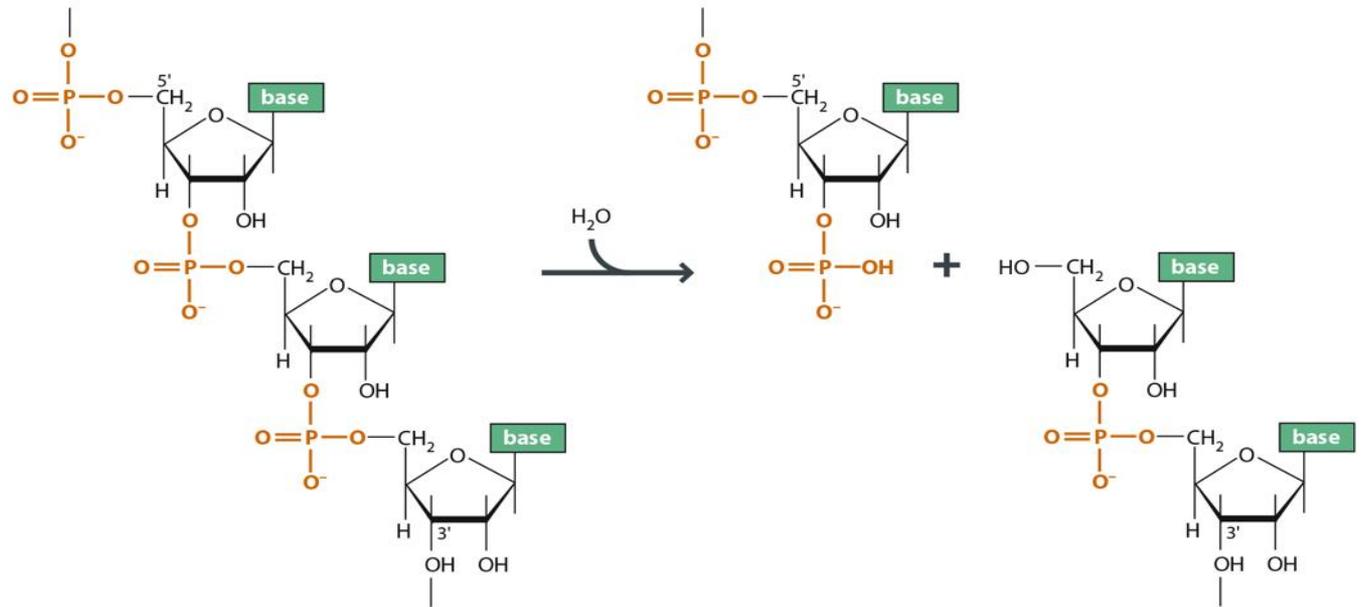
OBIETTIVI

- Enzimi ruolo chiave come catalizzatori delle reazioni
- Enzimi proteici e a RNA
- Tipi di cofattori
- Classificazione enzimi in base alle reazioni
- Variazione di energia libera, reazioni esoergoniche e endoergoniche
- Modulazione della velocità di una reazione chimica
- Accoppiamento energetico
- Temperatura e pH nella velocità di una reazione chimica
- Effetto della concentrazione del substrato (V_{\max} e K_m)
- Inibitori irreversibili e reversibili
- Inibizione competitiva e non competitiva

GLI ENZIMI CATALIZZANO LE TAPPE DI UNA VIA BIOCHIMICA

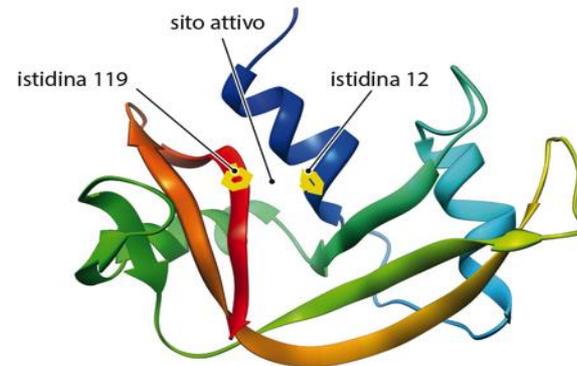


(A) reazione catalizzata dalla ribonucleasi A

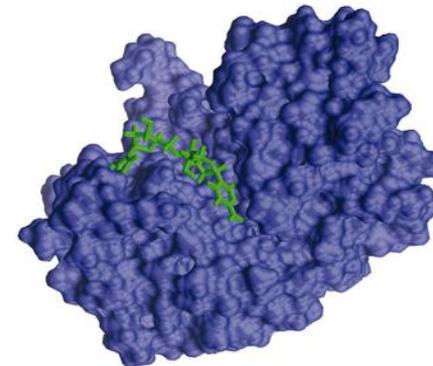


REGIONE DELL'ENZIMA IN CUI SI SVOLGE LA REAZIONE BIOCHIMICA

(B) le due istidine del sito attivo

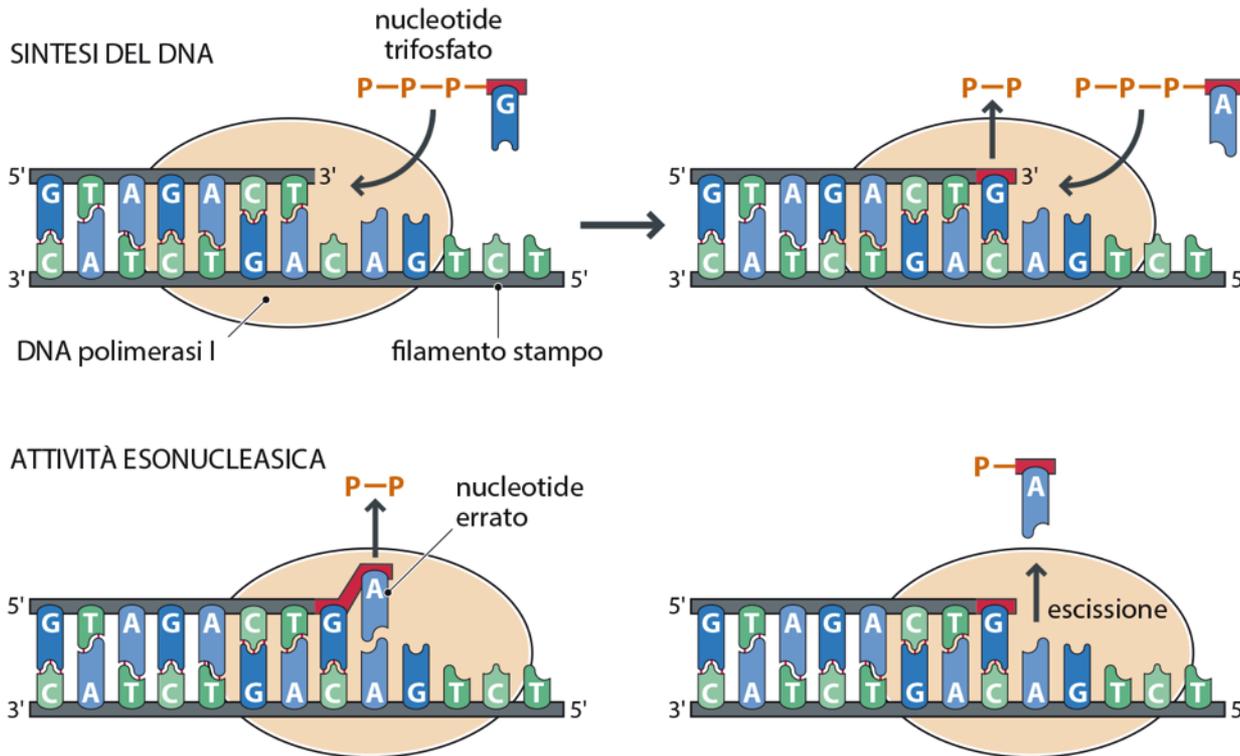


(C) RNA legato all'enzima

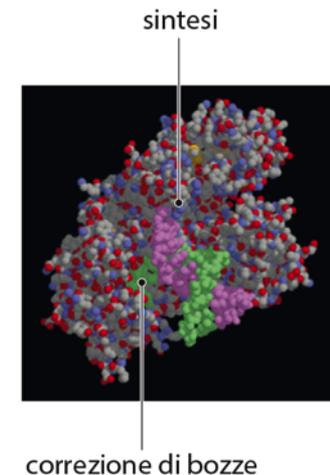


SINTESI DEL DNA E ATTIVITA' DI CORREZIONE DEGLI ERRORI NELLA DNA POLIMERASI I

(A) attività di sintesi del DNA e attività esonucleasica

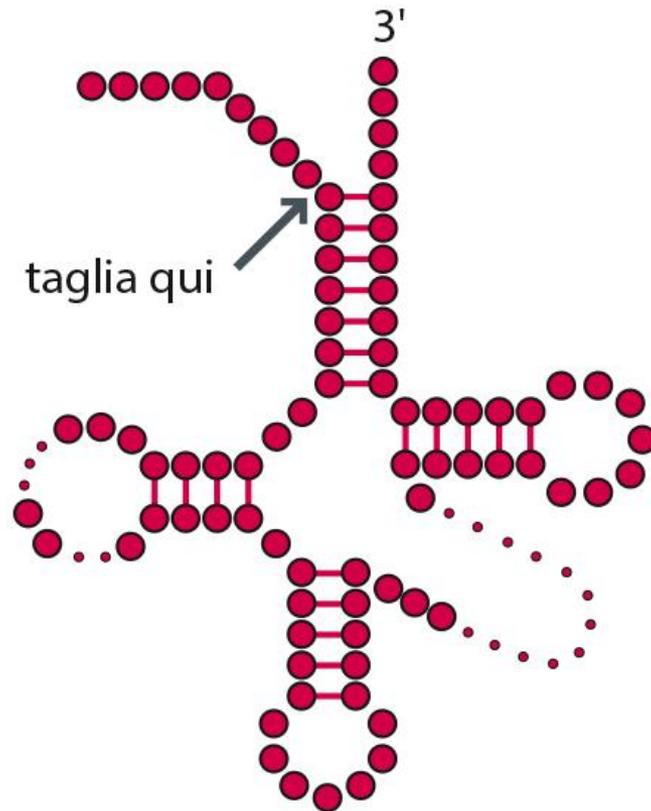


(B) struttura della DNA polimerasi I

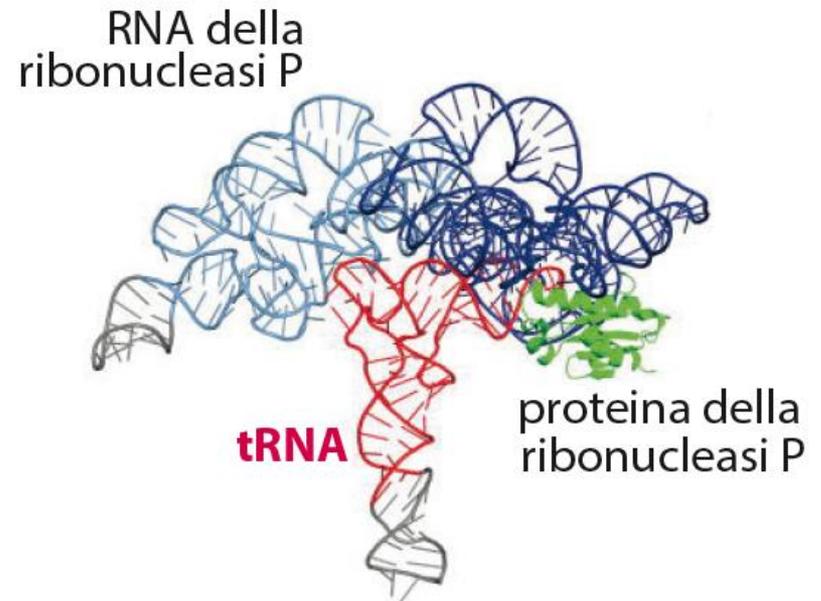


DNA POLIMERASI: enzima multifunzionale in cui coesistono più attività svolte da regioni distinte del polipeptide

(A) ruolo della ribonucleasi P



(B) ribonucleasi P legata a un tRNA



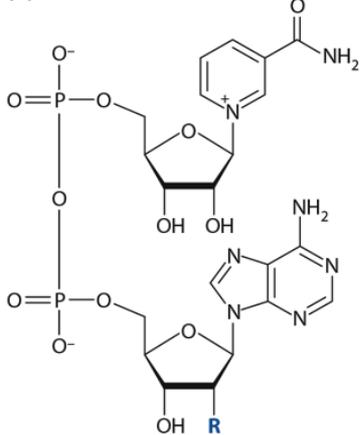
RIBOZIMA: enzima costituito da RNA. **Ribonucleasi P** costituita da due subunità : una proteica (120 aa) e una di RNA (400 nucleotidi) con attività ribonucleasica.

* Cofattori

Cofattore	Enzima che richiede il cofattore
ioni metallici	
Cu^{2+}	Citocromo ossidasi
$\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	Catalasi, nitrogenasi
Mg^{2+}	Esochinasi
Mn^{2+}	Arginasi
Ni^{+}	Ureasi
Zn^{2+}	Carbossipeptidasi, anidrasi carbonica
Cofattori organici (coenzimi)	
NAD^{+}	Ossidoreduttasi
NADP^{+}	Enzimi della sintesi degli acidi grassi
FAD	Succinato deidrogenasi
FMN	NADH deidrogenasi
Coenzima A	Enzimi della sintesi degli acidi grassi
Acido ascorbico	Enzimi di difesa antiossidante

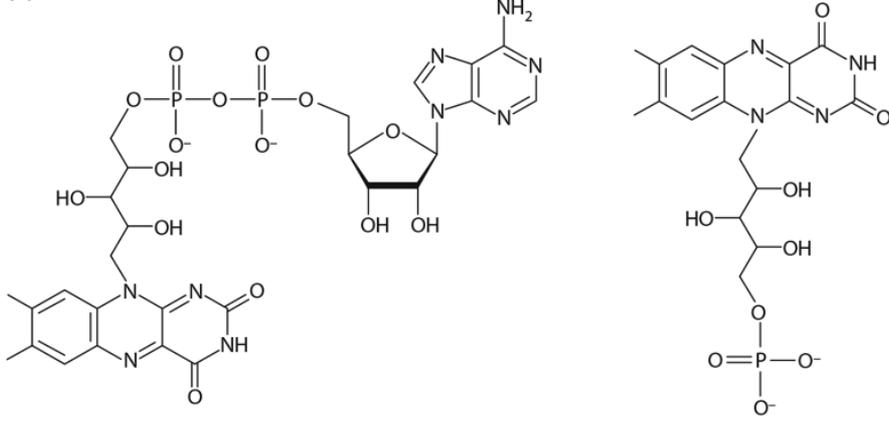
STRUTTURA DI ALCUNI COFATTORI ORGANICI

(A) NAD⁺ e NADP⁺



NAD⁺: R = OH
 NADP⁺: R = PO₄²⁻

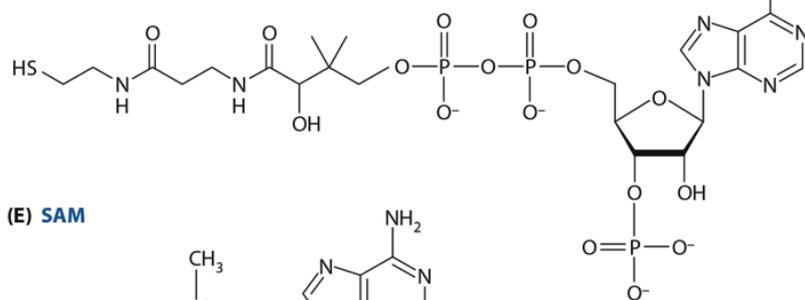
(B) FAD e FMN



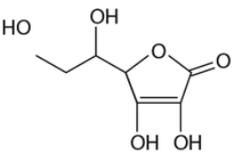
FAD

FMN

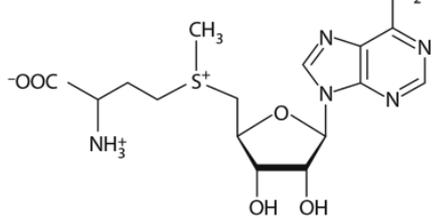
(C) coenzima A



(D) acido ascorbico



(E) SAM



* **CARATTERISTICHE COFATTORI**

Chiamati anche **COENZIMI**:

- Alcuni partecipano alla catalisi attraverso un legame transitorio con l'enzima;
- Altri formano un legame permanente o semipermanente, per cui divengono parte integrante della struttura dell'enzima (GRUPPI PROSTETICI) Es. *COFATTORI METALLICI*
- ENZIMA + COFATTORE: OLOENZIMA
- Se viene allontanato il cofattore si ha l'APOENZIMA

Tab. 1 Classificazione internazionale degli enzimi, basata sulla reazione catalizzata

CLASSE	TIPO DI REAZIONE CATALIZZATA
ossidoreduttasi	trasferimento di elettroni
transferasi	trasferimento di gruppi
idrolasi	idrolisi (trasferimento di gruppi funzionali all'acqua)
liasi	addizioni di gruppi a doppi legami o l'inverso
isomerasi	trasferimento di gruppi all'interno di una molecola
ligasi	formazione di legami C-C, C-S, C-O, C-N per mezzo di reazioni di condensazione accoppiate all'idrolisi di ATP

Esempio: L-LATTATO: NAD OSSIDO REDUTTASI

REAZIONE: L-LATTATO + NAD⁺ = PIRUVATO + NADH + H⁺

EC 1.1.1.27

1. Ossidoreduttasi

sotto classe (gruppo H-C-OH del donatore e-)

sotto sotto-classe (NAD o NADP come accettore)

27sima posizione
nella sotto sotto-classe

1° Gruppo: OSSIDORIDUTTASI							
Sottogruppo		Sotto-sottogruppo		Sottogruppo			
1.1	Attive su gruppi CH—OH dei donatori	1.1.1	Con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore	1.8	Attive su gruppi solforati dei donatori		
		1.1.2	Con un citocromo come accettore			1.8.1	Con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore
		1.1.3	Con l'ossigeno come accettore			1.8.2	Con un citocromo come accettore
		1.1.99	Con altri accettori			1.8.3	Con l'ossigeno come accettore
1.2	Attive su gruppi aldeidici o chetonici dei donatori	1.2.1	Con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore	1.8.4	Con un composto contenente un ponte disolfuro come accettore		
		1.2.2	Con un citocromo come accettore			1.8.5	Con un chinone o un composto affine come accettore
		1.2.3	Con l'ossigeno come accettore			1.8.6	Con un composto azotato come accettore
		1.2.4	Con un composto contenente un ponte disolfuro come accettore			1.8.7	Con una ferro-solfo-proteina come accettore
		1.2.7	Con una ferro-solfo-proteina come accettore			1.8.99	Con altri accettori
		1.2.99	Con altri accettori			1.9	Attive su gruppi eminici dei donatori
1.3	Attive su gruppi CH—CH dei donatori	1.3.1	Con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore	1.9.6	Con un composto azotato come accettore		
		1.3.2	Con un citocromo come accettore	1.9.99	Con altri accettori		
		1.3.3	Con l'ossigeno come accettore	1.10	Attive su difenoli e sostanze affini come donatori	1.10.2	Con un citocromo come accettore
1.3.7	Con una ferro-solfo-proteina come accettore	1.10.3	Con l'ossigeno come accettore				
1.3.99	Con altri accettori	1.11	Attive sul perossido d'idrogeno come accettore	1.12	Attive sull'idrogeno come donatore		
1.4	Attive su gruppi CH—NH ₂ dei donatori					1.4.1	Con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore
		1.4.3	Con l'ossigeno come accettore			1.12.2	Con un citocromo come accettore
		1.4.4	Con un composto contenente un ponte disolfuro come accettore	1.12.7	Con una ferro-solfo-proteina come accettore		
1.4.99	Con altri accettori	1.13	Attive su donatori singoli con incorporazione di ossigeno molecolare (Ossigenasi)	1.13.11	Con incorporazione di due atomi di ossigeno		
1.5	Attive su gruppi CH—NH dei donatori			1.5.1	Con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore	1.13.12	Con incorporazione di un atomo di ossigeno (monoossigenasi interne o ossidasi interne a funzione mista)
				1.5.3	Con l'ossigeno come accettore	1.13.99	Miscellanee (non ancora completamente caratterizzate)
		1.5.99	Con altri accettori	1.14	Attive su donatori accoppiati, con incorporazione di ossigeno molecolare	1.14.11	Con 2-chetoglutarato come uno dei due donatori e incorporazione di un atomo di ossigeno in ciascuno dei due donatori
1.6	Attive su NADH o NADPH	1.6.1	Con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore			1.14.12	Con NADH o NADPH come uno dei due donatori, e incorporazione di due atomi di ossigeno in un donatore
		1.6.2	Con un citocromo come accettore			1.14.13	Con NADH o NADPH come uno dei due donatori, e incorporazione di un atomo di ossigeno
		1.6.4	Con un composto contenente un ponte disolfuro come accettore			1.14.14	Con una flavina o una flavoproteina ridotta come uno dei due donatori, e incorporazione di un atomo di ossigeno
		1.6.5	Con un chinone o un composto affine come accettore				
1.6.6	Con un composto azotato come accettore						
1.6.7	Con una ferro-solfo-proteina come accettore						
1.6.99	Con altri accettori						
1.7	Attive su altri composti azotati come donatori	1.7.2	Con un citocromo come accettore				
		1.7.3	Con l'ossigeno come accettore				
		1.7.7	Con una ferro-solfo-proteina come accettore				
		1.7.99	Con altri accettori				

(Da Enzyme nomenclature, 1965).

Le reazioni di ossido-riduzione

- ❖ Il flusso di elettroni nelle reazioni di ossido-riduzione è responsabile di tutto il lavoro prodotto dagli organismi viventi;
- ❖ Sono reazioni metaboliche di trasferimento di elettroni che implicano:
 1. perdita di elettroni da una specie chimica che diventa ossidata;
 2. acquisizione di elettroni da un'altra specie chimica che si riduce;
- ❖ La molecola che dona elettroni in una reazione di ossido-riduzione viene detta *agente riducente*, essa si ossida trasferendo elettroni all'altro substrato; la molecola che accetta gli elettroni viene detta *agente ossidante*;
- ❖ Quando due specie chimiche hanno una diversa affinità per gli elettroni, il flusso di elettroni procede spontaneamente in un circuito verso la specie chimica con maggiore affinità per gli elettroni, guidato da una forza proporzionale alla differenza tra le due affinità;
- ❖ La tendenza di un riducente a perdere elettroni è data dal **potenziale standard di riduzione E'**

Trasferimento di elettroni

- ❖ **Gli elettroni vengono trasferiti da un donatore ad un accettore in quattro modi:**
 - direttamente come elettroni: $(\text{Fe}_2^+ + \text{Cu}_2^+ \leftrightarrow \text{Fe}_3^+ + \text{Cu})$;
 - atomi di idrogeno ($:\text{H}^+ + \text{e}^-$), $(\text{AH}_2 + \text{B} \leftrightarrow \text{A} + \text{BH}_2)$;
 - ione idruro (H^-);
 - in combinazione diretta con un riducente organico come l'ossigeno.
- ❖ **Un equivalente riducente corrisponde ad un singolo elettrone che partecipa ad una reazione di ossido-riduzione.**

Le sostanze nutrienti vanno spesso incontro a deidrogenazioni enzimatiche che coinvolgono due “equivalenti riducenti” per volta e l'ossigeno può accettare due “equivalenti riducenti”; l'unità di ossidazione biologica corrisponde per convenzione al passaggio di due equivalenti riducenti da un substrato all'ossigeno.

I potenziali di riduzione misurano l'affinità per gli elettroni

Quando due coppie redox coniugate sono presenti nella stessa soluzione il trasferimento di elettroni avviene spontaneamente e dipende dall'affinità relativa dell'accettore di elettroni di ogni coppia.

Il potenziale di riduzione standard o potenziale redox standard (E_0), misura (in volt) questa affinità, relativamente all'elettrodo standard di idrogeno (misurato a 25° C; ogni soluto alla concentrazione di 1M ed ogni gas alla pressione di 1atm); lo stato standard biochimico è definito a pH 7 (E'_0). Ogni valore rappresenta la differenza di potenziale che si genera quando la coppia coniugata redox viene collegata all'elettrodo standard di idrogeno.

Gli elettroni tenderanno a fluire dalla coppia coniugata con il potenziale redox più basso a quella con il potenziale redox più elevato (più positivo) e questa tendenza è proporzionale alla differenza ΔE .

I potenziali di riduzione standard permettono di calcolare la variazione di energia libera.

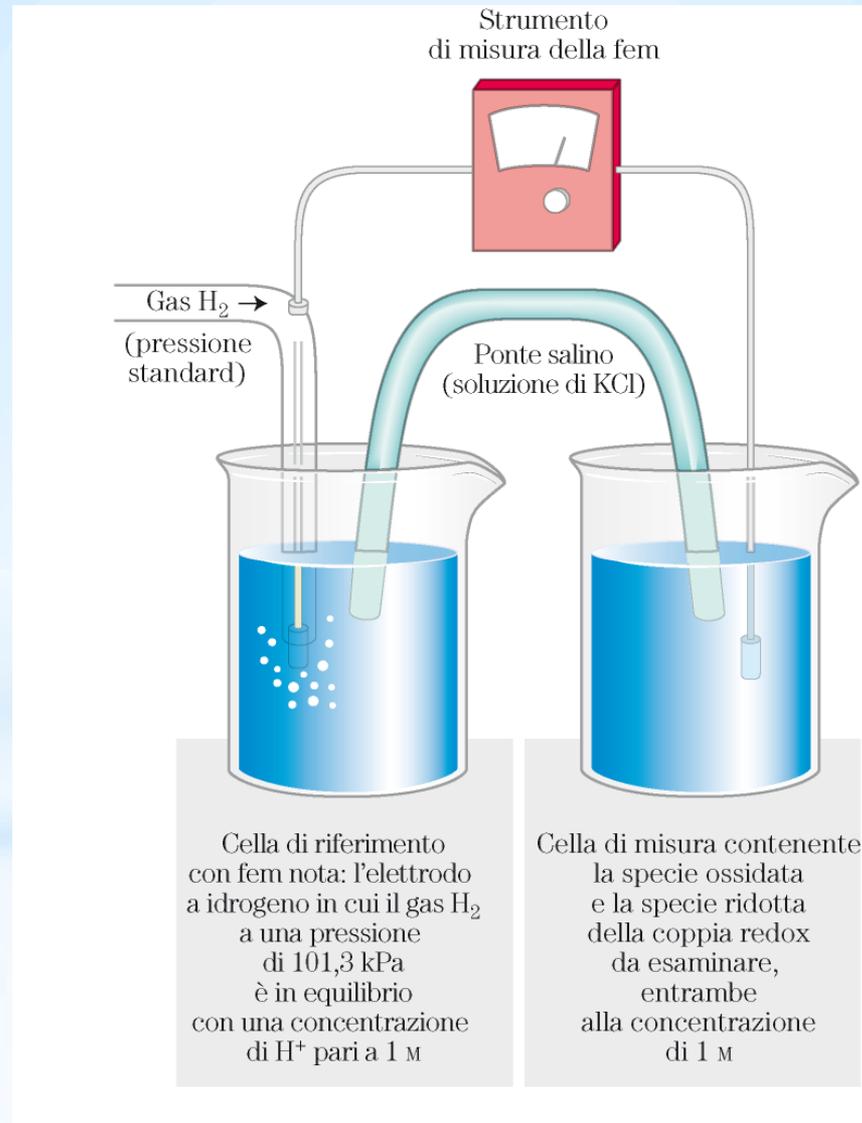
La variazione di energia libera delle reazioni di ossido-riduzione è proporzionale al ΔE (differenza tra il valore di E dell'accettore e quello del donatore di elettroni) secondo la relazione:

$$\Delta G = -nZ \Delta E, \text{ oppure } \Delta G'_0 = -nZ \Delta E'_0$$

dove: n = numero di elettroni trasferiti durante la reazione;

Z = costante di Faraday.

Misura del potenziale di riduzione standard (E'°) di una coppia redox



Coenzimi Redox

La loro riduzione nei processi catabolici consente di conservare l'energia libera rilasciata dall'ossidazione dei substrati.

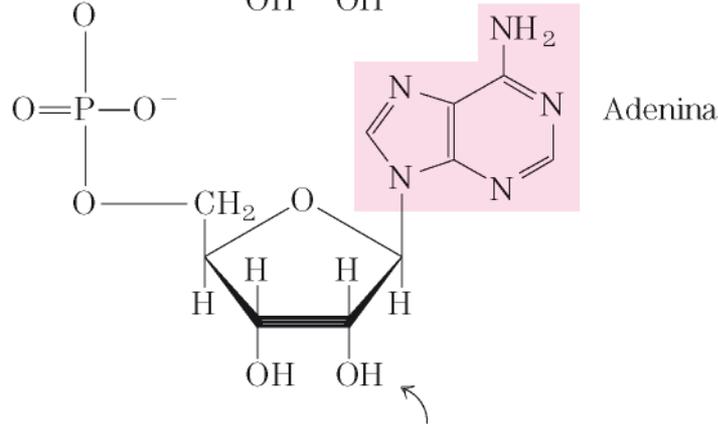
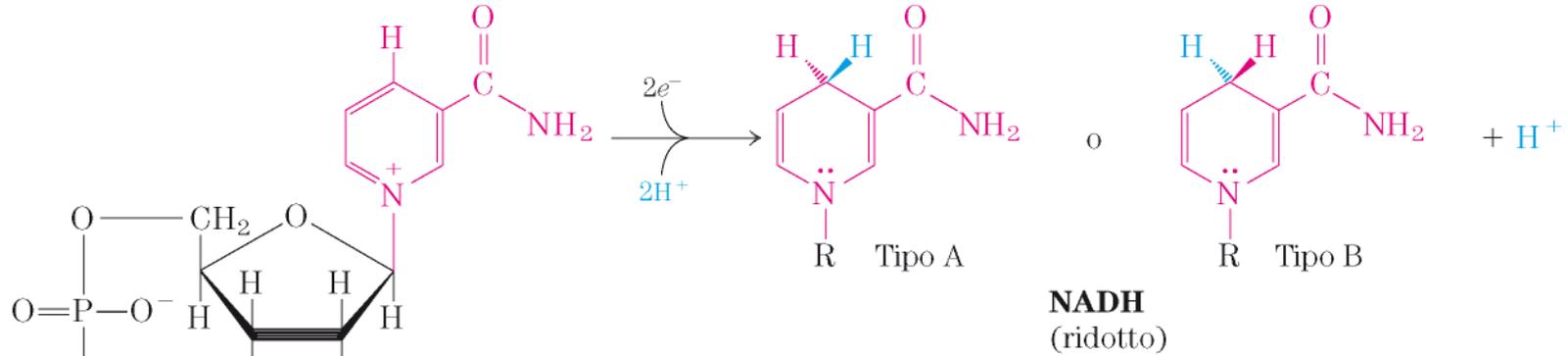
NAD, NADP: solubili in acqua si spostano rapidamente da un enzima all'altro.

FAD, FMN: solubili in acqua sono legati saldamente agli enzimi chiamati flavoproteine.

Chinoni (ubichinone): solubili nei lipidi, operano nell'ambiente non acquoso della membrana come trasportatori di elettroni e donatori di protoni.

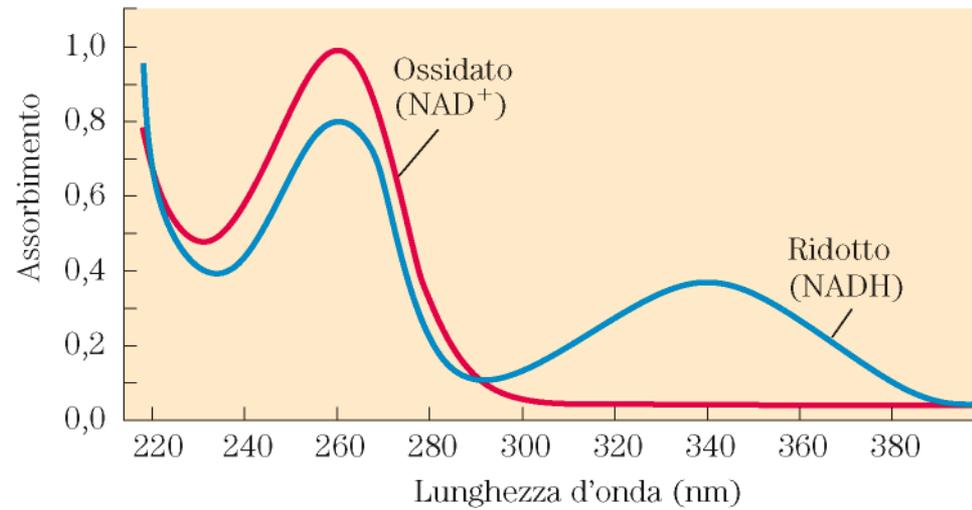
Proteine ferro – zolfo e citocromi: contengono gruppi prostetici saldamente legati che possono ossidarsi o ridursi reversibilmente.

NAD e NADP



Nel NADP⁺ questo gruppo ossidrilico è esterificato con un gruppo fosforico

(a)

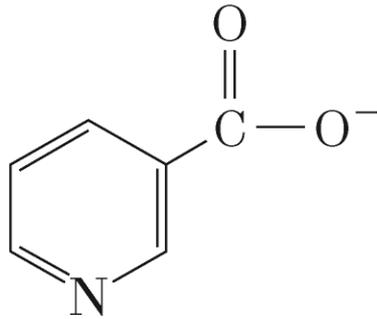


(b)

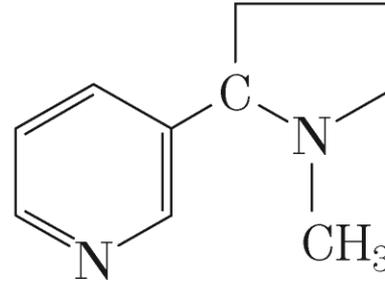
NAD, NADP

- La parte reattiva di entrambi i coenzimi è l'anello benzenoico della nicotinammide che può subire una riduzione reversibile;
- Nell'ossidazione di un substrato questo perde due atomi di idrogeno, l'anello nicotinamidico accetta un protone (H^+) e due elettroni, che equivalgono ad uno ione ioduro ($:H^-$) e si trasforma nella forma ridotta; il secondo H^+ rimosso dal substrato viene rilasciato nel solvente acquoso.
- Le forme ridotte dei trasportatori sono **NADH** e **NADPH**, mentre le forme ossidate sono **NAD⁺** e **NADP⁺**; il segno + non indica che ci sono cariche nette positive sulla molecola, ma piuttosto che l'anello nicotinamidico è nella sua forma ossidata, con una carica positiva sull'azoto.
- Il **NAD⁺** è il principale accettore di elettroni nelle ossidazioni di molecole combustibili; il rapporto intracellulare $NAD^+/NADH$ è generalmente elevato.
- Il **NADP⁺** è il principale cofattore nelle biosintesi riduttive; il rapporto intracellulare $NADPH/NADP^+$ è generalmente elevato.

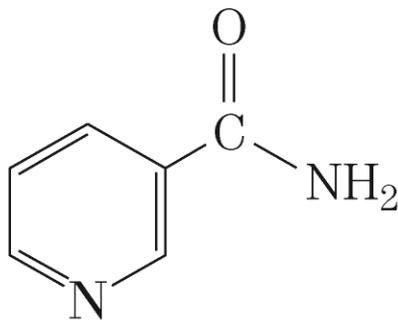
Struttura della niacina e dei suoi derivati nicotinamidici



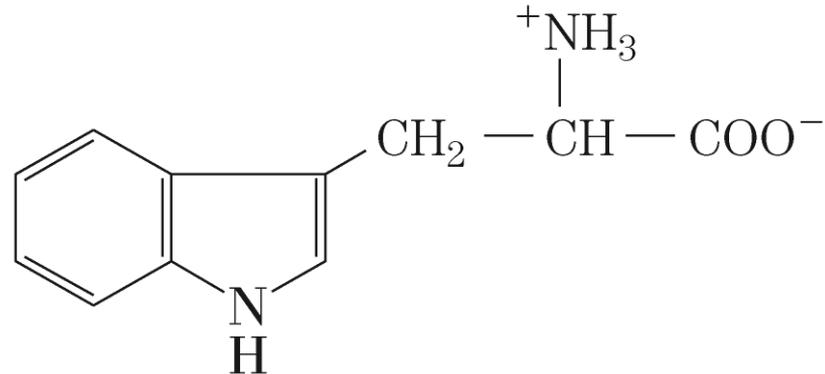
Niacina
(acido nicotinic)



Nicotina



Nicotinamide

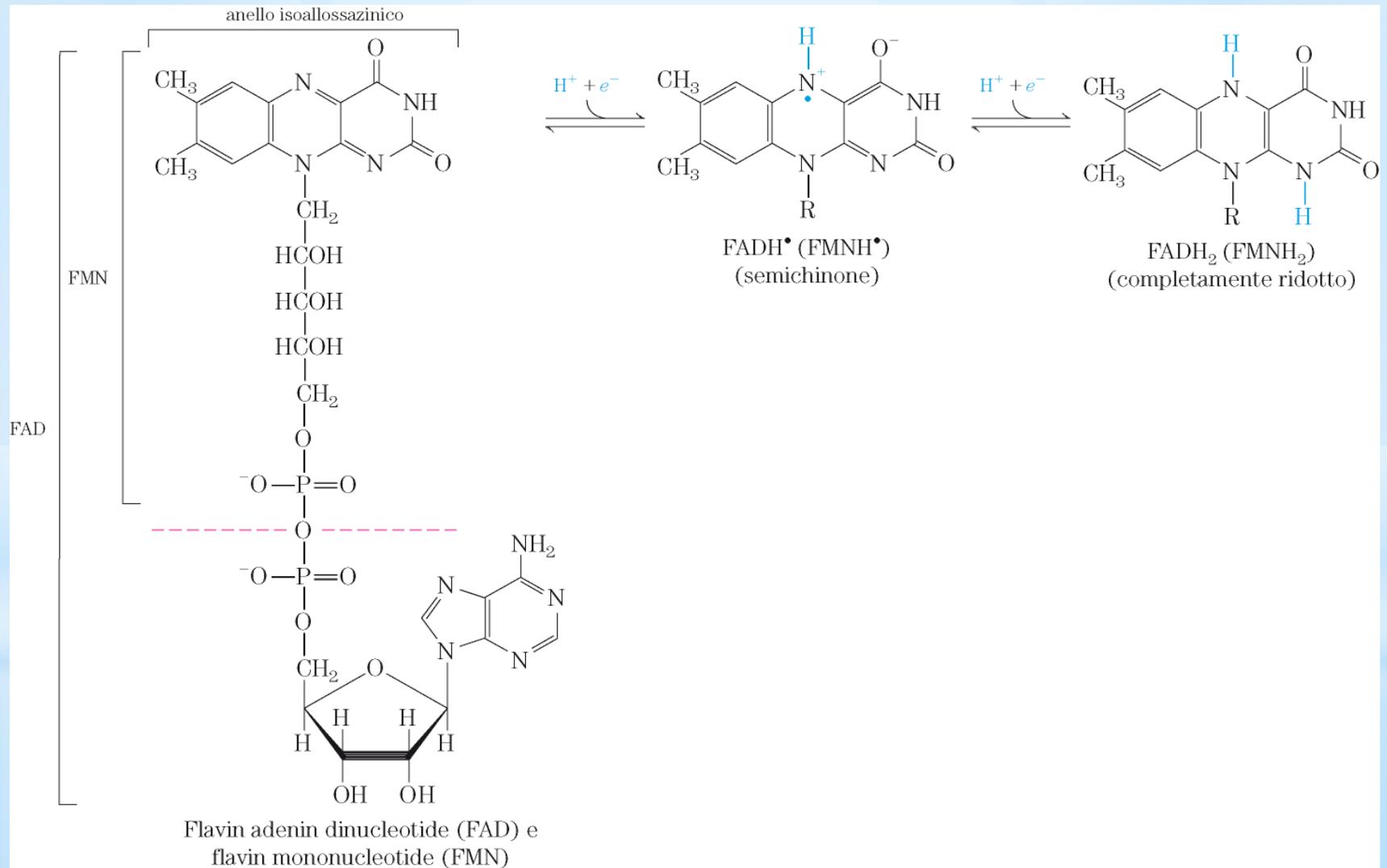


Triptofano

I nucleotidi flavinici: flavin mononucleotide (FMN) e flavin adenin dinucleotide (FAD)

- ❖ Altri trasportatori di elettroni implicati nelle ossidazioni dei substrati sono i nucleotidi flavinici, cofattori delle flavoproteine, flavin mononucleotide (FMN) e flavin adenin dinucleotide (FAD), le cui forme ridotte sono FMNH_2 e FADH_2 .
- ❖ I nucleotidi flavinici sono legati piuttosto saldamente alle flavoproteine (anche covalentemente) e rappresentano dei gruppi prostetici con cui le flavoproteine possono temporaneamente trattenere equivalenti riducenti.
- ❖ L'associazione tra il gruppo prostetico e l'enzima conferisce all'anello flavinico un potenziale di riduzione standard diverso in ogni flavoproteina.

Forme ossidate e ridotte del FAD e dell'FMN



Flavin adenin dinucleotide FAD

- ❖ La parte reattiva del FAD è l'anello isoallossazinico che subisce riduzioni reversibili accettando **uno o due elettroni** sotto forma di atomi di idrogeno.
- ❖ Quando un nucleotide flavinico accetta un solo elettrone (un solo atomo di idrogeno), si genera la forma semichinonica dell'anello isoallossazinico (FADH e FMNH).
- ❖ Anche in questo caso i nucleotidi ridotti, ma non le forme ossidate, assorbono la luce ad una lunghezza d'onda di 360 nm; le forme parzialmente ridotte (un elettrone) hanno il massimo di assorbimento intorno a 450 nm, mentre la forma completamente ossidata (la flavina) assorbe tra 370 e 440 nm.