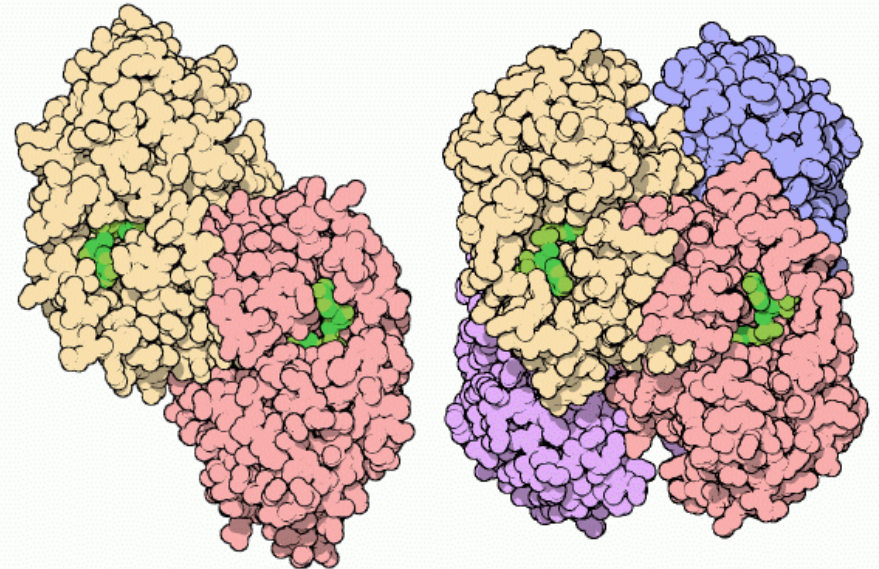


Il comportamento
delle proteine: gli
enzimi

Gli enzimi sono proteine globulari idrosolubili. Queste macromolecole possiedono la specifica funzione di rendere più veloci le innumerevoli reazioni chimiche che si sviluppano all'interno o all'esterno delle cellule dell'organismo, senza consumarsi o alterarsi in modo irreversibile nel corso delle stesse; vengono infatti definiti catalizzatori biologici.

Possono essere costituiti da una sola catena polipeptidica o da più catene unite fra loro da legami generalmente deboli.

Gli enzimi sono localizzati in aree precise all'interno delle cellule a seconda della loro funzione: alcuni sono liberi nel citoplasma, altri sono situati nei mitocondri o costituiscono parte integrante delle membrane cellulari



L'alcol deidrogenasi è l'enzima che durante la fermentazione riduce l'acetaldeide ad etanolo.

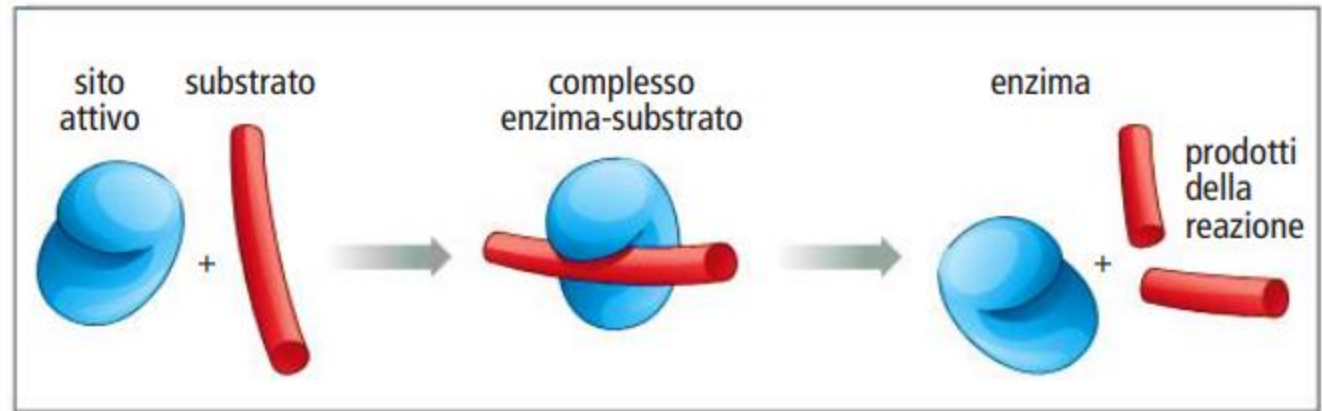
Le principali caratteristiche degli enzimi sono:

- devono essere presenti ed efficaci anche se in piccole quantità;
- alla fine della reazione non devono risultare modificati e, quindi, devono essere pronti per essere riutilizzati;
- non devono influenzare l'equilibrio di una reazione chimica reversibile. La loro funzione infatti è solo quella di rendere più veloce
- devono mostrare un certo grado di specificità, a volte assoluta, altre volte relativa, a seconda che si leghino con un solo tipo di molecola oppure con un numero di composti limitato, ma non unico.

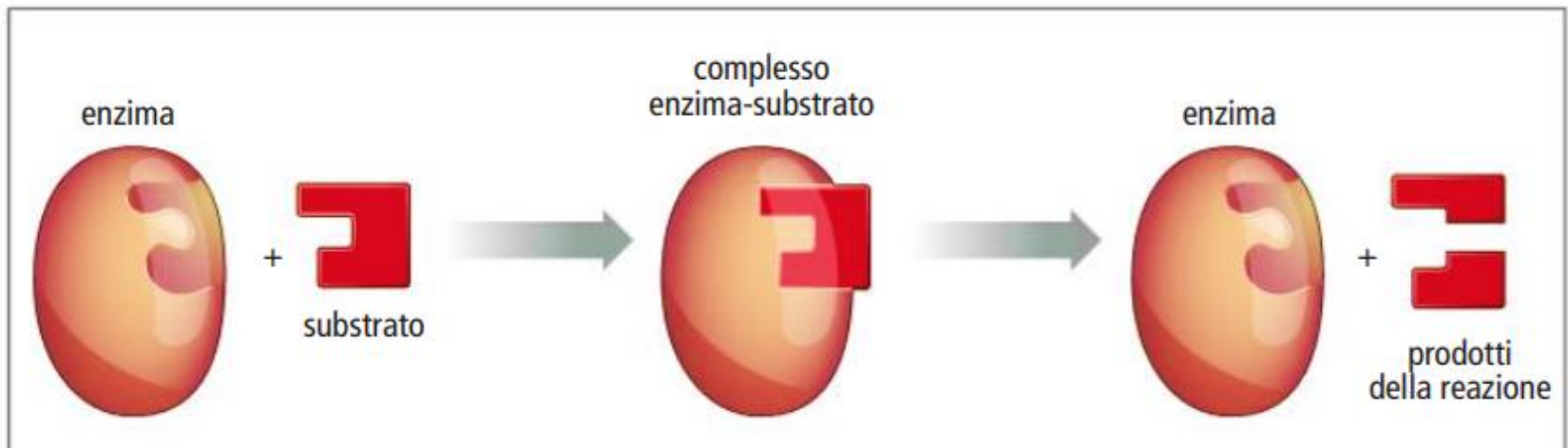
Il **sito attivo** occupa una parte relativamente piccola del volume totale della molecola enzimatica ed è costituito tridimensionalmente da gruppi chimici di aminoacidi appartenenti a parti diverse della proteina globulare. Il legame con il substrato avviene attraverso una serie di attrazioni deboli che permettono la formazione del complesso enzima-substrato (ES).

I siti attivi sono costituiti da una specie di cavità o fenditura, la specificità del legame che avviene fra l'enzima e il substrato dipende dalla precisa disposizione degli atomi del sito attivo. Ne consegue che, per adattarsi a tale sito, il substrato deve possedere una forma appropriata.

Modello a chiave serratura

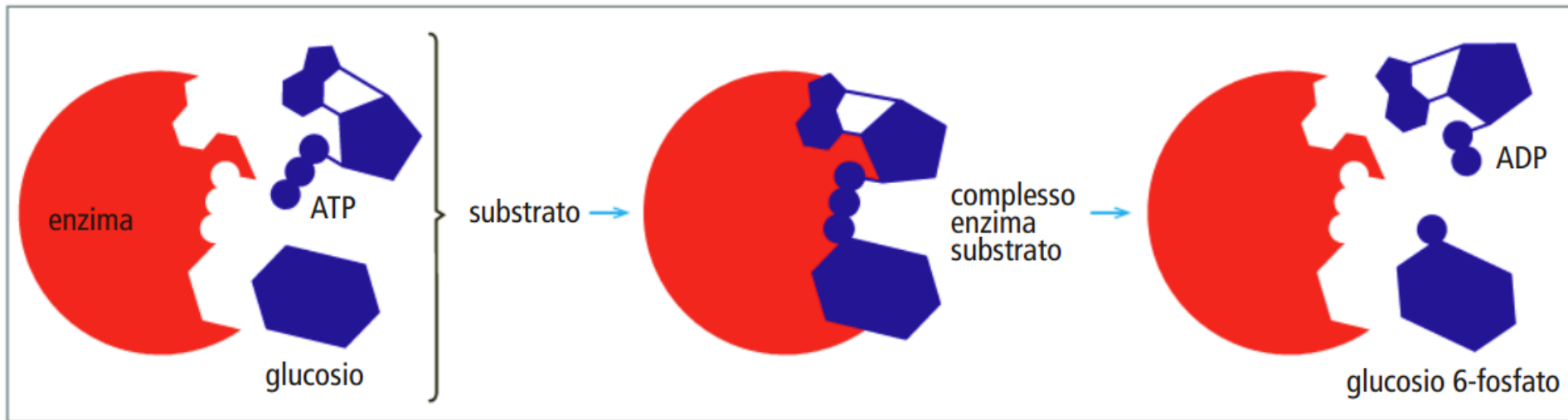


Modello dell'adattamento indotto. Il sito attivo e il substrato non hanno esattamente una forma complementare, ma quando entrano in contatto il sito attivo si adatta alla forma del substrato.



Modello schematico della reazione catalizzata dall'esochinasi.

I siti attivi sono complementari ai substrati glucosio e ATP, permettendo la fosforilazione del glucosio.



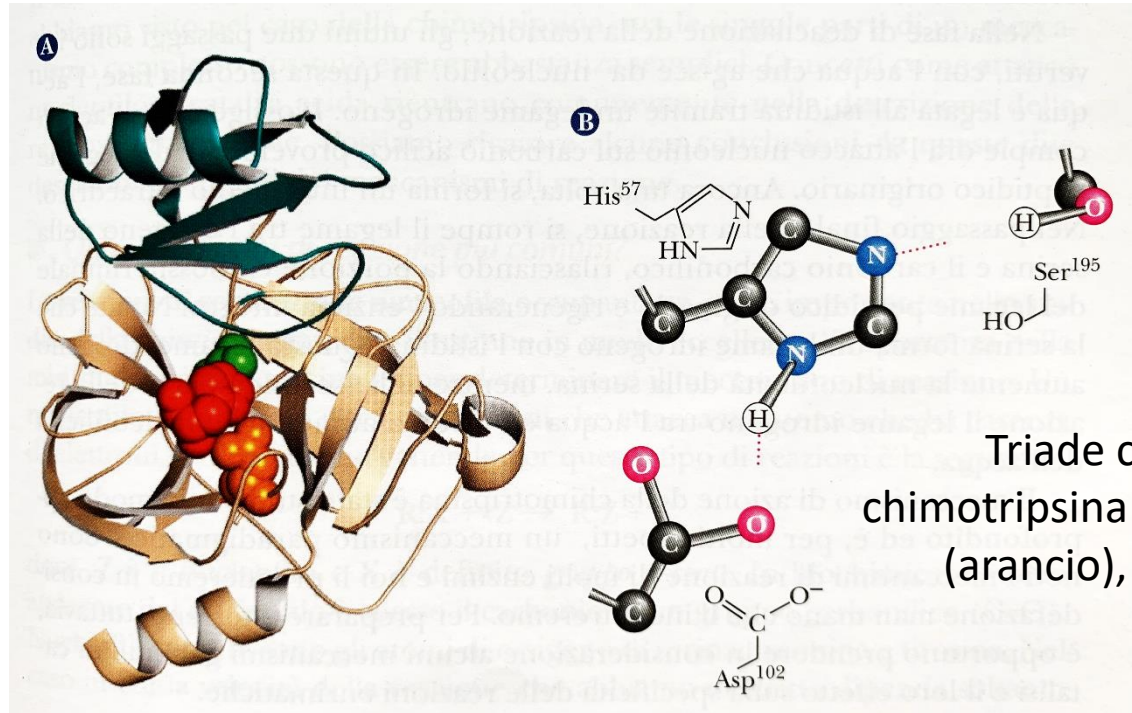
Le caratteristiche del sito attivo

- Quali residui amminoacidici dell'enzima si trovano nel sito attivo e partecipano alla catalisi?
- Qual è la relazione spaziale tra i residui amminoacidici essenziali per l'attività dell'enzima all'interno del sito attivo?
- Qual è il meccanismo con cui questi residui amminoacidici catalizzano la reazione?

Nelle proteine i gruppi α -carbossilici e α -amminici degli amminoacidi non sono liberi perché impegnati a formare i legami peptidici, perciò i **gruppi reattivi delle catene laterali degli amminoacidi sono gli unici ad essere coinvolti nel meccanismo di azione dell'enzima.**

I gruppi funzionali che possono avere un **ruolo catalitico** includono il **gruppo imidazolico dell'istidina**, il **gruppo ossidrilico della serina**, le **catene laterali carbossiliche dell'aspartato e glutammato**, il **gruppo sulfidrilico della cisteina**, la **catena laterale amminica della lisina** e il **gruppo fenolico della tirosina**.

In che modo la geometria del sito attivo influenza la catalisi?



Per svolgere la sua attività catalitica la chimotripsina ha bisogno della serina 195 e dell'istidina 57
la proteina è necessaria per assicurare il corretto posizionamento tridimensionale di questi residui cruciali per l'attività enzimatica.

Classificazione e nomenclatura degli Enzimi

Nel 1961 la Commissione per gli Enzimi CE della IUB (*International Union of Biochemistry*) propose un sistema di nomenclatura e classificazione basato sul tipo di reazione catalizzata e sul nome del substrato a cui ciascun enzima si legava. Questo nuovo sistema raggruppa gli enzimi in 6 classi principali.

| Classi | Sottoclassi | Sotto-sottoclassi |
|----------------------------------|--------------------------------------|--|
| 5. isomerasi | 5.1. racemasi ed epimerasi | 5.1.1 agenti su aminoacidi e derivati |
| | | 5.1.2 agenti su idrossiacidi e derivati |
| | | 5.1.3 agenti su carboidrati e derivati |
| | 5.2. <i>cis-trans</i> -isomerasi | |
| | 5.3. ossidoreduttasi intramolecolari | 5.3.1 interconvertenti aldosi e chetosi |
| 5.4. transferasi intramolecolari | | 5.3.2 interconvertenti gruppi chetonici e gruppi enolici |
| | | 5.3.3 trasferenti legami C=C |
| | | 5.4.1 trasferenti gruppi acilici |
| 5.5. liasi intramolecolari | | 5.4.2 trasferenti gruppi fosforilici |
| | | 5.4.99 trasferenti altri gruppi |

A loro volta le classi sono suddivise in sottoclassi a seconda del tipo di reazione catalizzata; le sottoclassi sono poi divise in sotto-sottoclassi (tabella 1.2) che a loro volta comprendono i singoli enzimi.

| Classi e azione catalitica | Principali sottoclassi |
|---|---|
| 1. ossidoreduttasi catalizzano le reazioni di ossidoriduzione | 1.1. gruppi alcolici 1.2. gruppi chetonici 1.3. alcheni 1.4. gruppi amminici primari 1.5. gruppi amminici secondari 1.6. NADH e NADPH 1.7. altri composti azotati 1.8. gruppi sulfidrilici 1.9. eme 1.10. difenoli 1.11. acqua ossigenata 1.12. idrogeno come donatore 1.13. donatori singoli che accettano O ₂ 1.14. donatori in coppia che accettano O ₂ 1.15. superossidi 1.16. metalli 1.17. gruppi metilenici 1.18. altre ossidoreduttasi |
| 2. transferasi catalizzano il trasferimento di gruppi funzionali | 2.1. gruppi a un atomo di carbonio 2.2. gruppi aldeidici o chetonici 2.3. gruppi acile 2.4. gruppi glicosilici 2.5. gruppi alchilici o arilici 2.6. gruppi azotati 2.7. gruppi fosforici 2.8. gruppi contenenti zolfo |
| 3. idrolasi catalizzano la rottura di legami con l'aggiunta di acqua | 3.1. legami estere 3.2. legami glicosidici 3.3. legami etere 3.4. legami peptidici 3.5. altri legami C—N 3.6. legami anidridici 3.7. legami C—C 3.8. legami con alogeni C—X, P—X 3.9. legami P—N 3.10. legami S—N 3.11. legami P—C |
| 4. liasi catalizzano l'addizione di gruppi a doppi legami o l'inverso | 4.1. legami C—C 4.2. legami C—O 4.3. legami C—N 4.4. legami C—S 4.5. legami C—alogeno 4.6. legami P—O |
| 5. isomerasi catalizzano le reazioni di isomerizzazione | 5.1. racemasi ed epimerasi 5.2. <i>cis-trans</i> -isomerasi 5.3. ossidoreduttasi intramolecolari 5.4. transferasi intramolecolari 5.5. liasi intramolecolari |
| 6. ligasi catalizzano la formazione di legami accoppiati all'idrolisi di ATP | 6.1. legami C—O 6.2. legami C—S 6.3. legami C—N 6.4. legami C—C 6.5. legami C—P |

Classificazione degli enzimi: le 6 classi principali

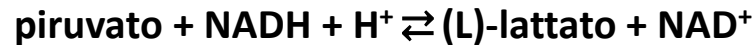
- **Ossidoreduttasi:** Trasferimento di idrogeno ed ossigeno o di elettroni da un substrato all'altro (ioni idruro H^- o atomi di H)
- **Transferasi:** Trasferimento di gruppi funzionali
- **Idrolasi:** Idrolisi di un substrato (trasferimento di gruppi funzionali all'acqua)
- **Isomerasi:** Trasferimento di gruppi all'interno di molecole per formare isomeri
- **Liasi:** Eliminazione di gruppi con formazione di legami doppi
- **Ligasi:** Unione di due molecole con formazione di nuovi legami (C-C, C-S, C-O e C-N) mediante reazioni di condensazione accoppiate alla scissione di ATP

Classificazione degli enzimi

Ogni enzima è indicato con un nome sistematico identificato dalla reazione da esso catalizzata e da un numero di classificazione di quattro cifre, solitamente usato nelle pubblicazioni scientifiche di carattere internazionale.

La prima identifica la classe, la seconda indica la sottoclasse, la terza è la sotto-sottoclasse, mentre la quarta cifra è un numero progressivo assegnato a ciascun enzima nelle sotto-sottoclassi.

Ogni enzima è identificato da un numero unico (E.C., Enzyme Commission number) costituito da quattro sezioni distinte, separate da un punto. **Esempio della lattato deidrogenasi (EC1.1.1.27):**



**Sottoclasse, tipo di substrato:
gruppo H-C-OH donatore di e⁻**

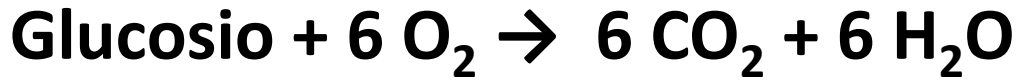
Enzyme Commission → **EC 1.1.1.27**

**sotto-sottoclasse, tipo di accettore, o gruppo
rimosso, eventuale coenzima:
NAD o NADP come accettore**

**Classe di appartenenza, tipo di reazione:
Ossidoreduttasi**

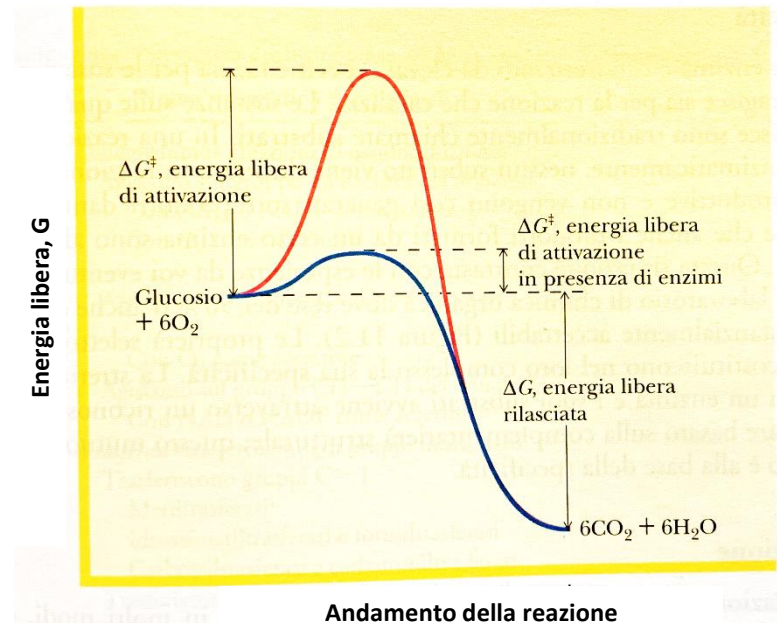
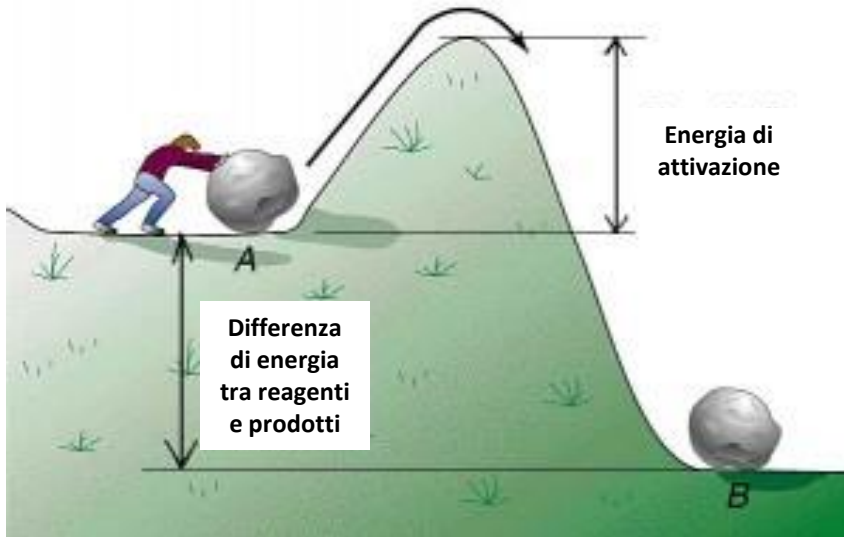
**Numero di serie dell'enzima, la posizione
dell'enzima nella sotto sotto-classe:
27^a posizione nella sotto-sottoclasse**

Se una reazione è spontanea significa che sarà veloce?



$$\Delta G^{\circ} = - 2880 \text{ kJ/mol}$$

Sia nelle reazioni endoergoniche che in quelle esoergoniche il sistema deve ricevere una certa quantità di energia dall'esterno, detta energia di attivazione.



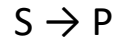
Il catalizzatore aumenta la velocità di reazione abbassando l'energia di attivazione.

Profilo dell'ossidazione del glucosio che evidenzia un'elevata ΔG° di -2880 kJ/mol , il catalizzatore abbassa la ΔG° accelerando la velocità della reazione.

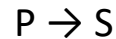
Meccanismo d'azione

Quando il substrato (S) si trasforma in prodotto (P), l'equilibrio chimico della reazione è determinato dalle leggi della termodinamica.

L'equilibrio chimico si raggiunge quando la velocità della reazione diretta:



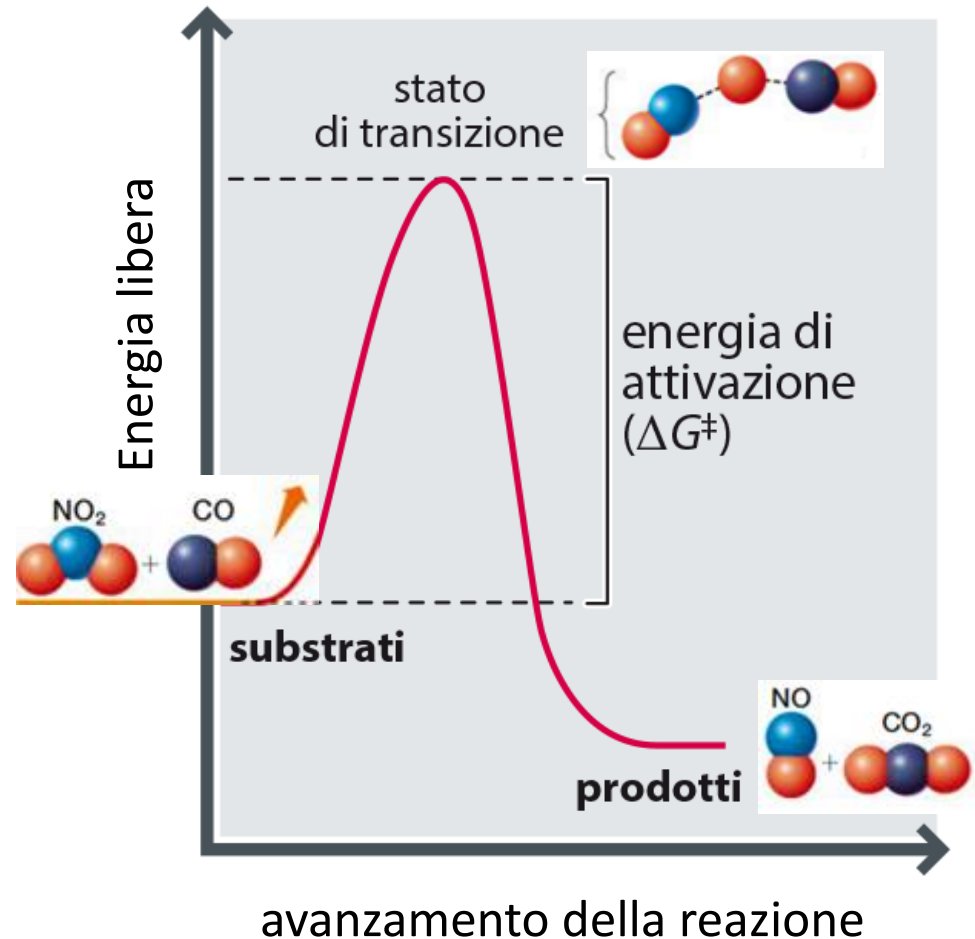
è uguale alla velocità della reazione inversa:



L'equilibrio chimico si scrive: $S \rightleftharpoons P$

In presenza dell'enzima, le velocità di trasformazione sono accelerate, ma l'equilibrio non viene alterato e la catalisi enzimatica funziona aumentando le velocità e abbassando l'energia di attivazione, dove quest'ultima può anche essere considerata come la quantità di energia richiesta per portare i reagenti allo stato di transizione.

In questo modo aumenta di molto il numero di molecole dei reagenti che, in ogni istante, possiedono una quantità di energia sufficiente a superare la barriera dell'energia di attivazione trasformandosi in prodotto.

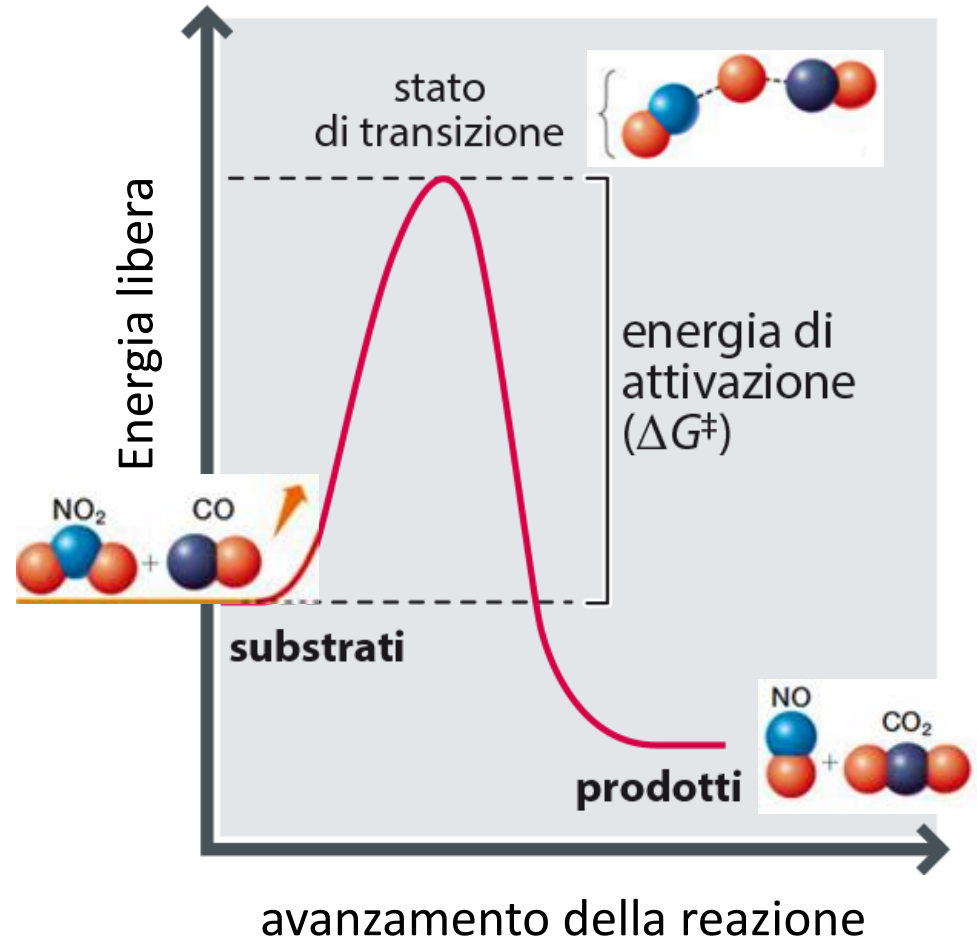


Meccanismo d'azione

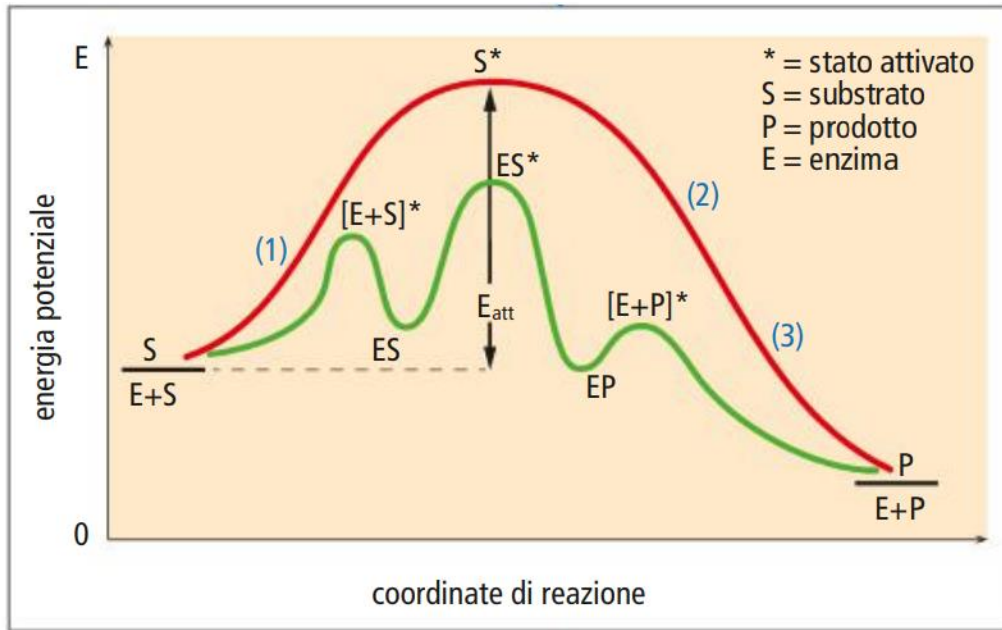
Per far avvenire una reazione è necessario che le molecole dei reagenti si scontrino fra loro, ma gli urti devono anche essere utili, cioè l'energia deve essere sufficientemente elevata per fare reagire gli orbitali di legame e gli stessi devono avvenire in zone specifiche e appropriate della molecola.

Lo stato di transizione è la fase della reazione in cui si stanno rompendo i legami dei reagenti e sono in via di formazione i legami tra le molecole dei prodotti, con la formazione di un composto intermedio detto **complesso attivato**.

Le cellule ricorrono agli enzimi, catalizzatori organici che permettono il raggiungimento dello stesso risultato.



Meccanismo d'azione



L'enzima si lega al substrato formando un intermedio ES , questa parte della reazione ha una propria energia di attivazione (1), ovviamente molto inferiore a quella della reazione in assenza dell'enzima. A questo punto il substrato si trasforma in prodotto, necessitando di una seconda energia di attivazione (2); infine, avviene la totale liberazione tra l'enzima e il prodotto stesso, utilizzando una terza energia di attivazione (3). La somma delle tre energie di attivazione è uguale a quella della reazione totale in assenza di enzima, ma tale energia viene utilizzata in maniera frazionata ed è quindi più facile reperirla.



Un ciclista di fronte a una salita molto ripida preferirebbe scalare tre piccole salite la cui somma corrisponde alla salita nel suo complesso anziché affrontarla tutta d'un fiato.

Considerazioni:

- La variazione di energia standard (ΔG°) della reazione non viene modificata quando si aggiunge un catalizzatore ma l'energia di attivazione diminuisce.
- La presenza di un enzima abbassa l'energia di attivazione necessaria alle molecole di substrato per raggiungere lo stato di transizione e quindi la concentrazione delle specie allo stato di transizione aumenta notevolmente.
- Il risultato è un forte aumento della velocità della reazione catalizzata rispetto alla velocità della reazione non catalizzata.
- I catalizzatori enzimatici aumentano la velocità di reazione di un fattore pari a molte potenze di 10.

Fattori che influenzano le reazioni catalizzate dagli enzimi

Le reazioni catalizzate dagli enzimi sono influenzate in modo positivo da tutta una serie di fattori come:

- concentrazione del substrato;
- concentrazione dell'enzima;
- concentrazione dei cofattori;
- temperatura;
- pH.

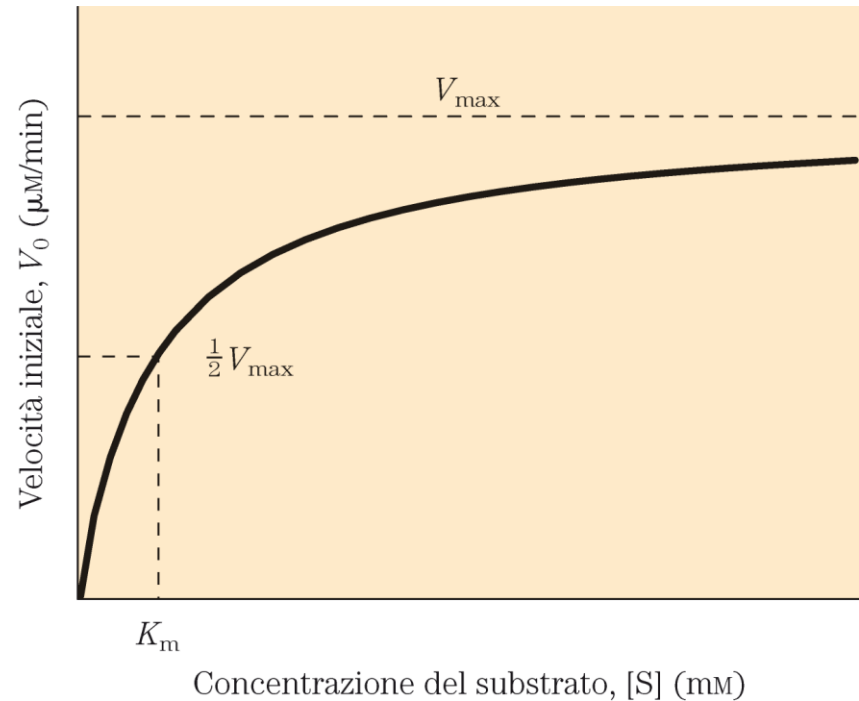
1- Effetto della concentrazione del substrato

La velocità di una reazione chimica (V) aumenta all'aumentare della concentrazione dei reagenti in quanto aumenta il numero degli urti.

La cinetica enzimatica è lo studio della velocità delle reazioni catalizzate da enzimi in relazione a differenti parametri sperimentali.

La velocità iniziale di catalisi (V_0) cambia con la concentrazione del substrato ($[S]$), che varia durante il corso di una reazione:

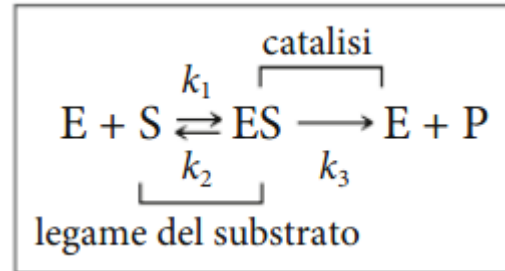
1. quando $[S]$ è bassa, la V_0 aumenta in modo quasi lineare con l'aumento di $[S]$;
2. quando $[S]$ è più elevata, V_0 aumenta in misura sempre minore con l'aumento di $[S]$, avvicinandosi alla velocità massima (V_{\max}), valore al quale il substrato è talmente concentrato da saturare i siti attivi di ogni molecola di enzima presente



La relazione tra velocità di reazione e concentrazione del substrato fu descritta all'inizio del secolo scorso dal biochimico tedesco Leonor Michaelis (1875-1949) e la fisiologa canadese Maud Menten (1897-1960), attraverso una funzione iperbolica nota come equazione di Michaelis-Menten:

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

Quando enzima (E) e substrato (S) si incontrano, danno origine a un intermedio (ES) che successivamente si trasforma in enzima e prodotto (P).



Le fasi di ogni reazione sono caratterizzate da varie costanti di velocità (k_1 , k_2 e k_3), che nell'equazione di Michaelis-Menten sono complessivamente rappresentate dalla costante di Michaelis (K_m), un valore caratteristico per ogni enzima che ne **esprime l'affinità per il substrato** e cioè la forza attrattiva fra E e S.

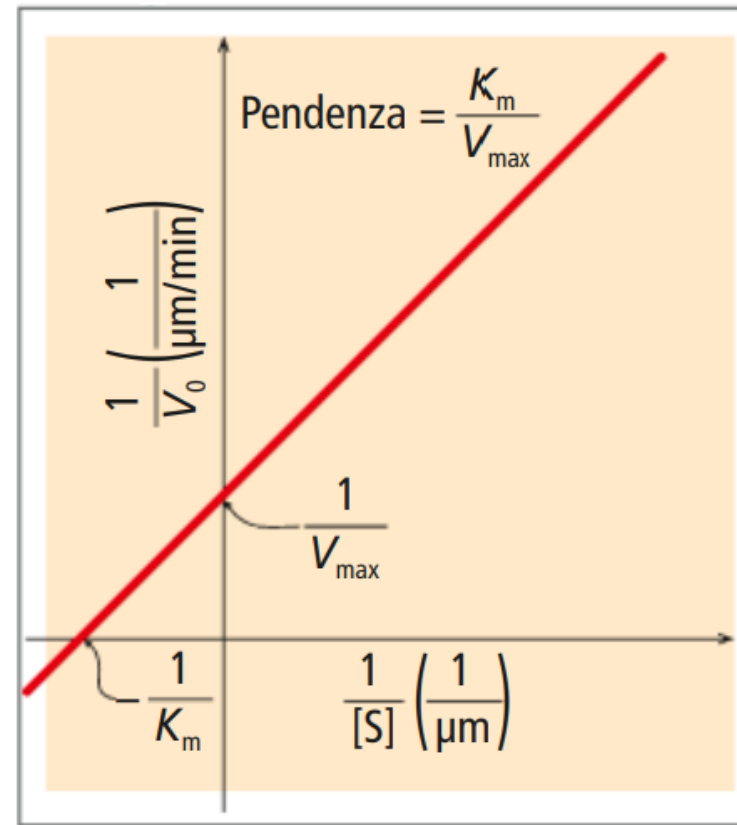
Il valore della K_m dipende dal tipo di substrato e dalle condizioni ambientali, come il pH, la temperatura o la forza ionica dei composti. Numericamente la K_m corrisponde alla concentrazione di substrato che satura la metà dei siti attivi dell'enzima presente, determinando una velocità di reazione pari a metà della V_{max} . Se il valore di K_m è molto grande significa che il legame fra E e S è debole e quindi c'è una bassa affinità; al contrario se la K_m è molto piccola l'affinità fra E e S è assai elevata.

Nella pratica sperimentale, l'equazione di Michaelis-Menten può essere trasformata algebricamente in diversi modi. Per determinare in modo accurato la V_{\max} di una reazione, per esempio, si può procedere facendo il reciproco di entrambi i termini dell'equazione:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \rightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]}$$

Separando ora i termini al numeratore e semplificando si ottiene:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



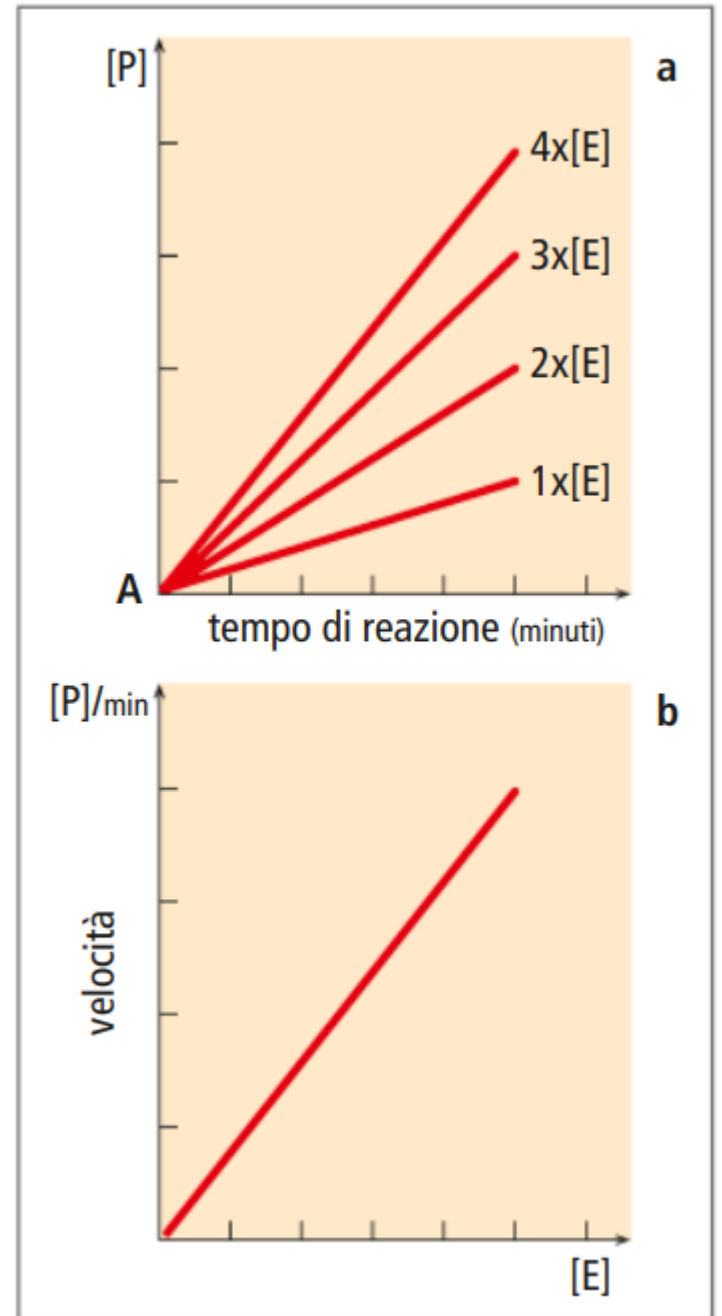
Questa trasformazione dell'equazione prende il nome di equazione di Lineweaver-Burk. Il grafico che si ottiene da tale trasformata è detto grafico dei doppi reciproci o grafico di Lineweaver-Burk e mostra una retta con pendenza pari a K_m/V_{\max} , un punto di intersezione sull'asse $1/[S]$ paria a $-1/K_m$ e punto di intersezione sull'asse $1/V_0$ pari a $1/V_{\max}$. Con il grafico dei doppi reciproci si può definire con precisione il valore di V_{\max} , che si poteva solo approssimare con il grafico di V_0 in funzione di $[S]$.

2- Effetto della concentrazione dell'enzima

La concentrazione dell'enzima influenza la velocità della reazione da esso catalizzata. Se raddoppia la concentrazione dell'enzima, raddoppia anche la velocità della reazione, dunque enzima e velocità sono legati da una relazione di tipo lineare e, all'aumentare dell'uno, aumenta anche l'altra.

Infatti, se desideriamo determinare la quantità di un enzima, possiamo calcolare la sua concentrazione mettendolo in presenza di substrato in eccesso e determinando nel tempo la quantità di prodotto formatosi; ovviamente gli altri fattori che possono influire sulla reazione devono restare costanti.

In (a) effetto della concentrazione di un enzima sulla velocità di reazione con substrato in eccesso. In (b) relazione fra $[E]$ e la quantità di prodotto formato per minuto (V).



3- Effetto della concentrazione dei cofattori

Quando gli enzimi sono proteine coniugate per svolgere la loro attività biologica, necessitano di ioni o molecole più o meno complesse, anche di natura organica, che si leghino covalentemente con l'apoenzima per formare l'oloenzima.

I cofattori dunque possono essere ioni metallici, per esempio Ca, Mg, Mn, Zn, Cu. Essi hanno un importante ruolo in quanto permettono alla proteina di assumere una configurazione terziaria adatta alla funzione che deve svolgere, cioè alla combinazione con il substrato.

Per esempio, tutti gli enzimi che utilizzano ATP necessitano della presenza di ioni Mg^{2+} (esempio la piruvato decarbossilasi che trasforma il piruvato in acetaldeide), mentre le carbossipeptidasi necessitano della presenza di Zn^{2+} , (esempio l'alcol deidrogenasi che trasforma l'acetaldeide in etanolo).

I cofattori possono contribuire all'attività di un enzima facendo parte del sito attivo o formando un ponte fra il substrato e l'enzima, come succede nel caso degli ioni metallici.

Altre volte, il legame con la proteina viene fatto da una molecola organica anche molto complessa, parliamo di coenzimi. Anch'essi si legano covalentemente alla proteina e ne costituiscono il gruppo prostetico, i coenzimi si modificano nel corso della reazione, perché fungono da trasportatori o da intermedi.

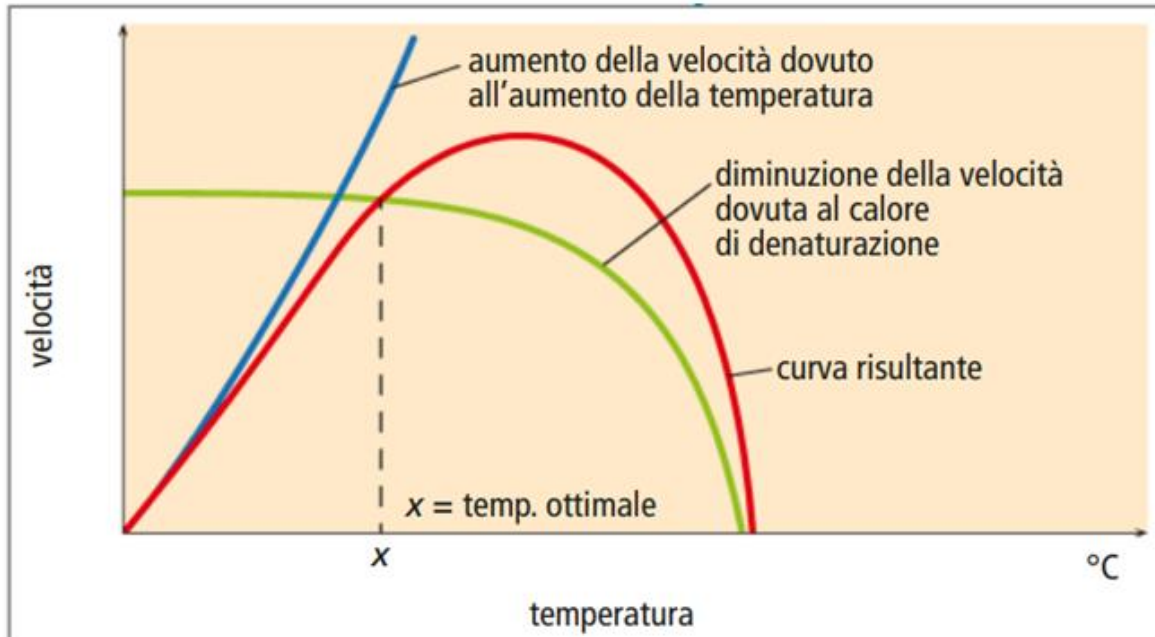
Essi possono legare ioni idrogeno o elettroni, oppure gruppi chimici necessari nel corso della reazione enzimatica.

4- Effetto della temperatura

Gli enzimi sono proteine e, in quanto tali, sono sostanze termolabili. La loro velocità di denaturazione termica raddoppia per ogni aumento di 10 °C di temperatura. La denaturazione delle molecole enzimatiche porta alla loro inattività come catalizzatori.

La temperatura ha due effetti opposti su una reazione chimica: da un lato aumenta l'energia cinetica delle particelle aumentando la velocità con cui reagiscono le molecole, dall'altro, l'aumento di temperatura favorisce la denaturazione delle proteine riducendo la velocità della reazione.

Il grafico che relaziona l'attività dell'enzima con la temperatura ha forma di campana e presenta un massimo di attività. A temperature superiori l'inattivazione è pressoché irreversibile perché la proteina viene denaturata, mentre a basse temperature solitamente gli enzimi non vengono denaturati e possono recuperare la loro attività catalitica quando la temperatura si innalza nuovamente.



Effetto della temperatura sulla velocità di reazione. La linea blu si riferisce all'aumento della velocità in una reazione non enzimatica; la linea verde si riferisce alla relazione fra calore e denaturazione degli enzimi; la linea continua rossa è la risultante delle due.

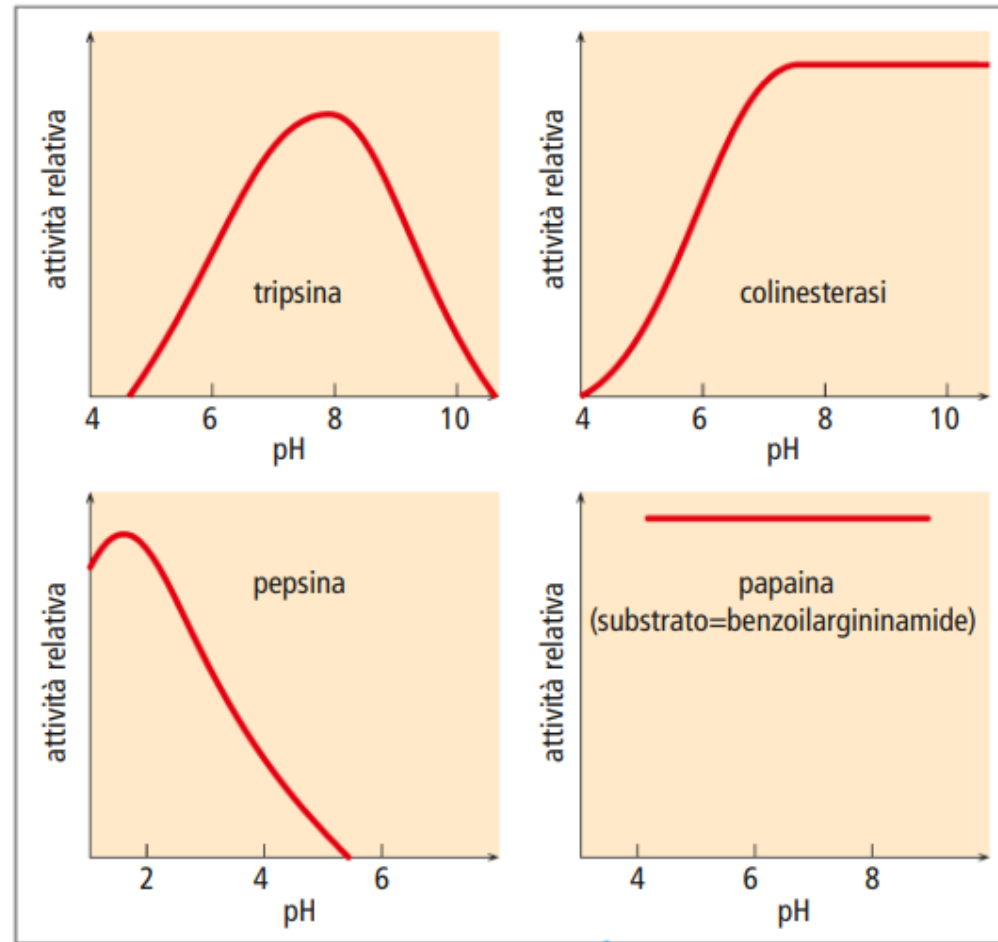
5- Effetto del pH

Il pH influisce sulla geometria del sito attivo, sulle cariche elettriche presenti e sui possibili legami di tipo covalente che si possono formare tra l'enzima e il substrato.

Il pH agisce sul grado di dissociazione degli eventuali gruppi acidi o basici presenti nelle molecole del substrato e dell'enzima che si debbono ionizzare in un modo ben definito per potersi combinare fra loro.

Per la maggior parte degli enzimi esiste un intervallo di valori di pH detto, pH ottimale, in genere abbastanza ristretto, in cui la loro efficienza è massima. Di solito i grafici hanno una forma a campana; in alcuni casi, tuttavia, tale forma può variare notevolmente.

Il valore del pH ottimale varia sensibilmente da enzima a enzima: la pepsina agisce nello stomaco in presenza del HCl e ha un pH ottimale di 1,5; gli enzimi intestinali, invece, agiscono a un pH sensibilmente più elevato, come avviene per la tripsina che ha un pH ottimale di 7,9.



Grafici che mostrano la dipendenza tra pH e attività enzimatica. Il grafico a campana, tipico della tripsina

Regolazione dell'attività enzimatica

- Effetto degli inibitori. Gli enzimi possono subire inibizione reversibile o irreversibile in relazione alla stabilità del legame tra enzima e inibitore. L'inibizione può definirsi anche competitiva, non competitiva o mista, in base alla posizione del sito di legame dell'inibitore rispetto al sito attivo dell'enzima.
- Regolazione degli enzimi allosterici. Molti enzimi possono modificare la loro conformazione strutturale, attivandosi o disattivandosi, a seguito del legame di un effettore in un sito diverso dal sito attivo, detto appunto sito allosterico.
- Regolazione a feedback. In una cellula, gli enzimi lavorano frequentemente in sequenza, dando vita a catene di reazioni in cui un prodotto finale può inibire o attivare un enzima all'inizio della catena. Questi enzimi modulano il procedere della via metabolica in cui sono coinvolti e, per questo, sono detti enzimi regolatori.
- Regolazione tramite modificazione covalente. L'attivazione o lo spegnimento di un enzima spesso dipende da modificazioni covalenti, come la fosforilazione, procurate da altre proteine di controllo.
- Attivazione degli zimogeni. Alcuni enzimi vengono prodotti in forma inattiva e diventano operativi solo dopo modificazioni strutturali irreversibili, come la rimozione di intere porzioni della molecola.
- Compartimentazione degli enzimi. Talvolta, per svolgere la loro funzione, alcuni enzimi devono trovarsi vicini tra loro. Localizzandoli nei vari distretti, la cellula può regolarne l'attività.

Effetto degli inibitori

L'inibizione enzimatica è un meccanismo di regolazione nel quale specifiche molecole o ioni, detti appunto inibitori, si legano all'enzima, provocando un rallentamento o addirittura l'arresto della sua attività catalitica. Il meccanismo inibitorio può essere classificato in due modi diversi, a seconda che si prenda in considerazione la stabilità del legame enzima-inibitore o la posizione del relativo sito di legame.

Se consideriamo la stabilità del legame enzima-inibitore, possiamo suddividere l'inibizione in due modi:

- Un **inibitore reversibile** in questo tipo di regolazione, il legame tra la proteina e l'inibitore può rompersi, permettendo all'enzima di riprendere la propria attività catalitica.
- Un **inibitore irreversibile** l'inibitore si lega sempre al sito attivo dell'enzima in modo talmente stabile (spesso covalente) che l'enzima non può più tornare alle condizioni di partenza, perdendo in modo definitivo la sua capacità di legare il substrato o di catalizzarne la trasformazione.

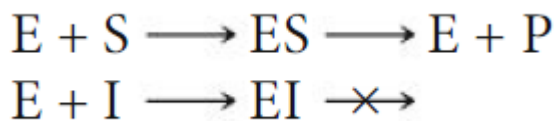
Se invece consideriamo il sito di legame dell'inibitore sull'enzima, possiamo classificare l'inibizione nel seguente modo:

- **Inibizione competitiva:** in questo caso l'enzima può legare il substrato, formando il complesso ES, oppure l'inibitore, formando il complesso EI. Gli inibitori competitivi si legano al sito attivo dell'enzima, grazie a una somiglianza strutturale con il substrato. L'inibizione competitiva, quindi, agisce riducendo il numero di molecole di enzima in grado di legare il substrato e può essere superata proprio da un aumento della concentrazione del substrato che, se presente in grandi quantità, ha la meglio sull'inibitore.

- **Inibizione non competitiva:** in questo caso i siti di legame dell'inibitore e del substrato non coincidono ed entrambe le molecole possono legarsi simultaneamente all'enzima, che vede ridotta sensibilmente la propria attività catalitica. Questo tipo di inibizione agisce riducendo il numero di turnover degli enzimi, ossia il numero di molecole di substrato che vengono trasformate in prodotto nell'unità di tempo (1 secondo). Poiché è la funzionalità dell'enzima a essere compromessa e non la sua capacità di legarsi al substrato, l'inibizione non competitiva non può essere vinta da un aumento della concentrazione di substrato.

- **Inibizione mista:** questo meccanismo inibitorio è più complesso dei precedenti, poiché qui l'inibitore altera contemporaneamente sia il legame del substrato con l'enzima sia il numero di turnover.

inibizione competitiva



In condizioni normali, un enzima (E) si lega con il proprio substrato (S) per dare il prodotto (P), ma in presenza di un inibitore (I) questa catalisi viene inibita.

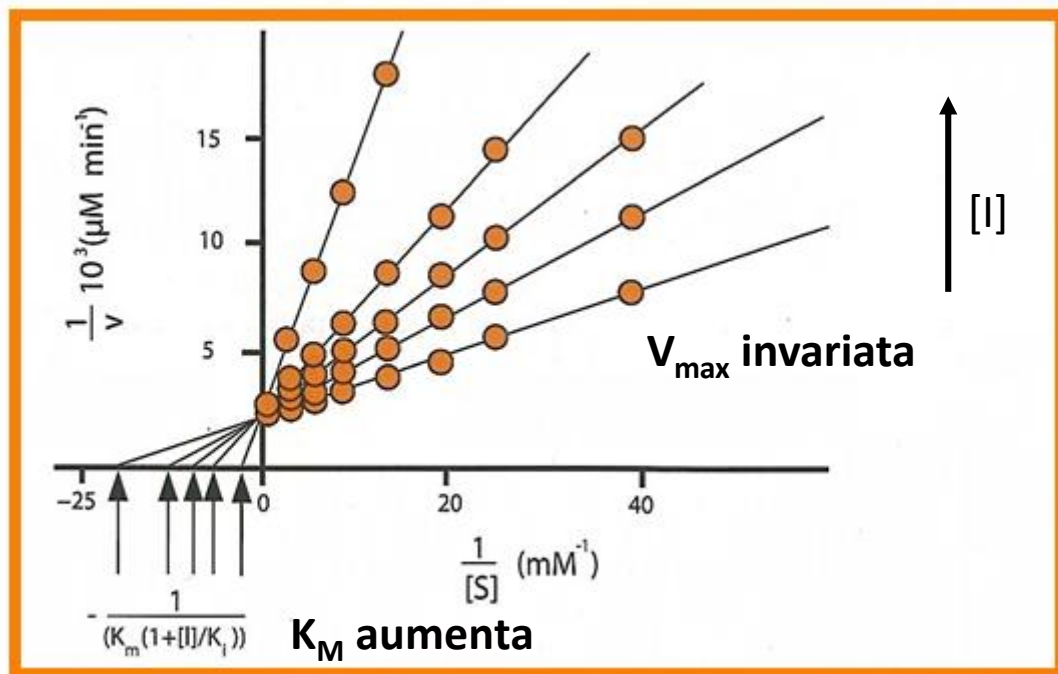
Inibizione competitiva

Come possiamo riconoscere un inibitore competitivo?

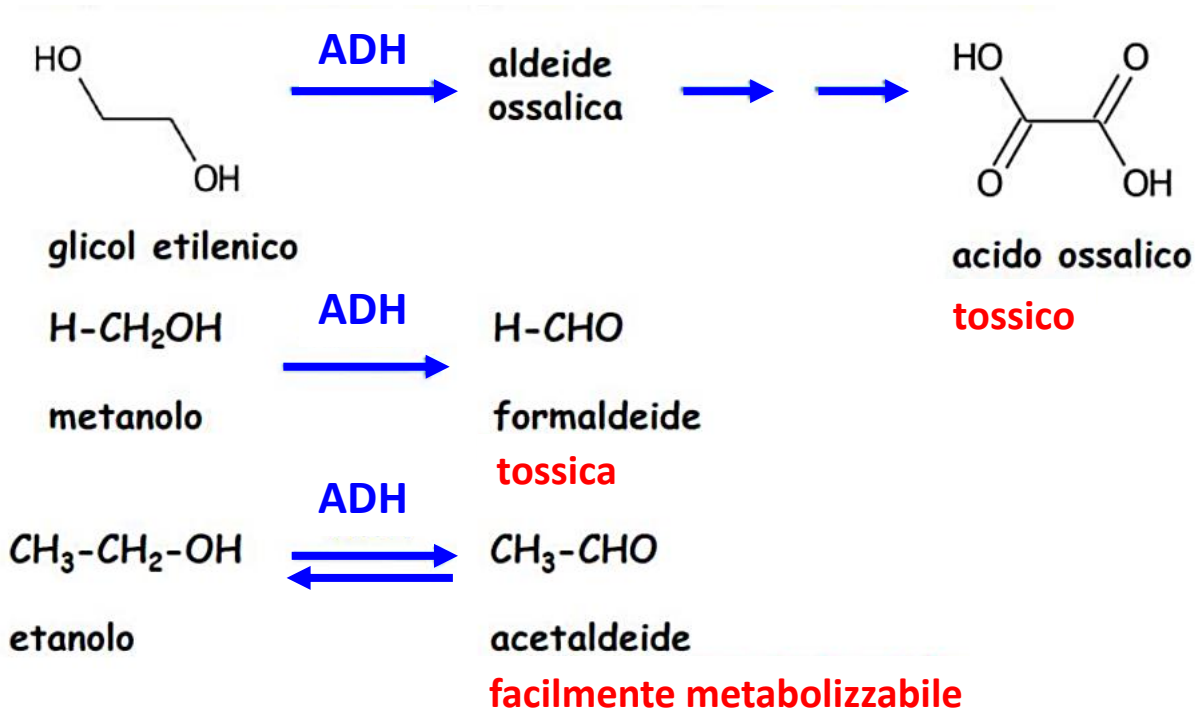
In presenza di un inibitore competitivo la pendenza della retta nel grafico di Lineweaver-Burk cambia: l'intercetta con l'asse delle y non viene modificata mentre cambia l'intercetta con l'asse delle x. Quindi, V_{max} rimane invariata ma la K_M aumenta.

l'inibitore può legarsi al sito attivo e bloccare l'accesso al substrato, perché l'inibitore compete con il substrato per il legame al sito attivo dell'enzima.

L'effetto dell'inibitore competitivo può essere annullato con una concentrazione di substrato sufficientemente alta.



L'etanolo come inibitore competitivo nella terapia dell'avvelenamento da metanolo



L'etanolo è un inibitore competitivo dell'alcol deidrogenasi (ADH)
La terapia consiste in una infusione intravenosa di etanolo che rallenta la formazione del metabolita tossico in modo da permettere un'escrezione lenta in concentrazioni sufficientemente basse da non provocare danni cellulari.

Inibizione non-competitiva

inibizione non competitiva

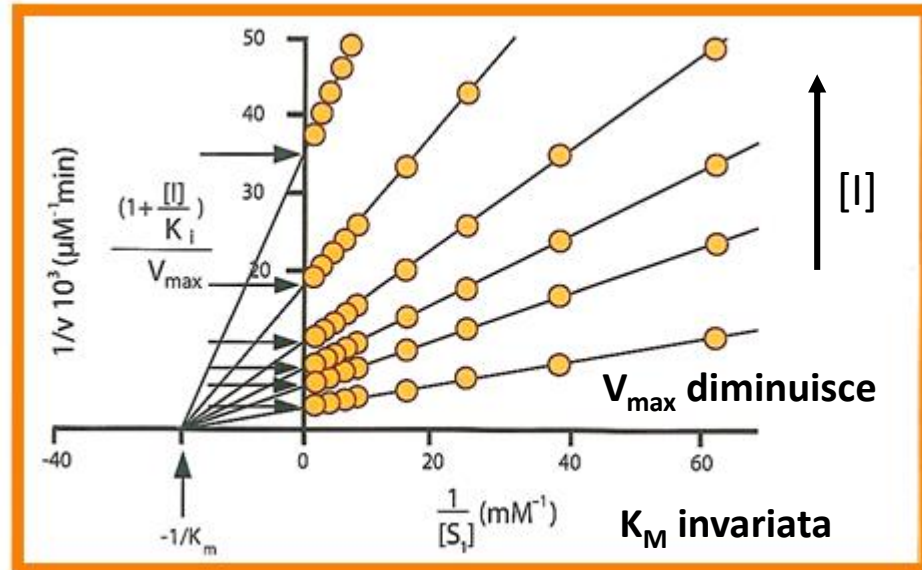


L'enzima ha due distinti siti di legame, uno per il substrato e uno per l'inibitore. Quando si lega all'enzima l'inibitore influenza la velocità di catalisi.

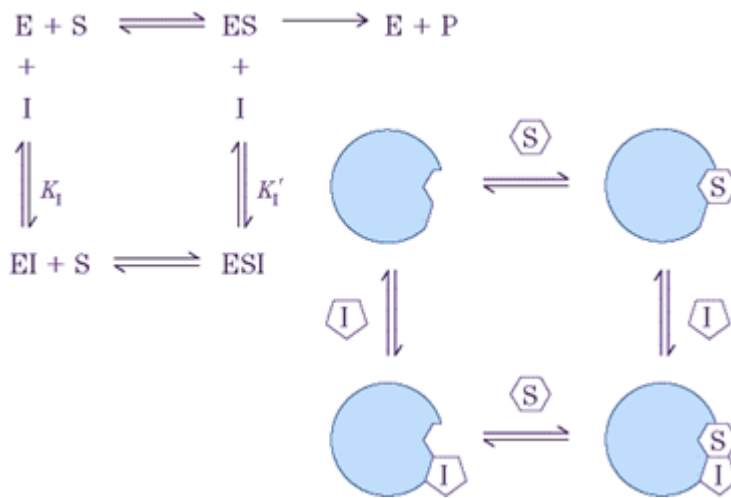
Come possiamo riconoscere un inibitore competitivo?

I grafici di Lineweaver-Burk per una reazione in presenza ed in assenza di un inibitore non competitivo mostrano che sia l'intercetta con l'asse delle y che la pendenza cambiano per la reazione inibita mentre non varia l'intercetta con l'asse delle x. **Il valore di V_{max} diminuisce ma quello di K_M rimane invariato.**

Un inibitore non competitivo si lega all'enzima ad un sito diverso dal sito di legame, porta sempre ad una inibizione dell'attività catalitica.



L'aumento della concentrazione di substrato non può annullare l'inibizione non competitiva perché l'inibitore e il substrato non competono per lo stesso sito. l'esempio più importante è fornito dagli **enzimi allosterici**, nei quali l'inibitore si lega su un sito diverso dal sito attivo, detto appunto sito allosterico.



Inibizione mista

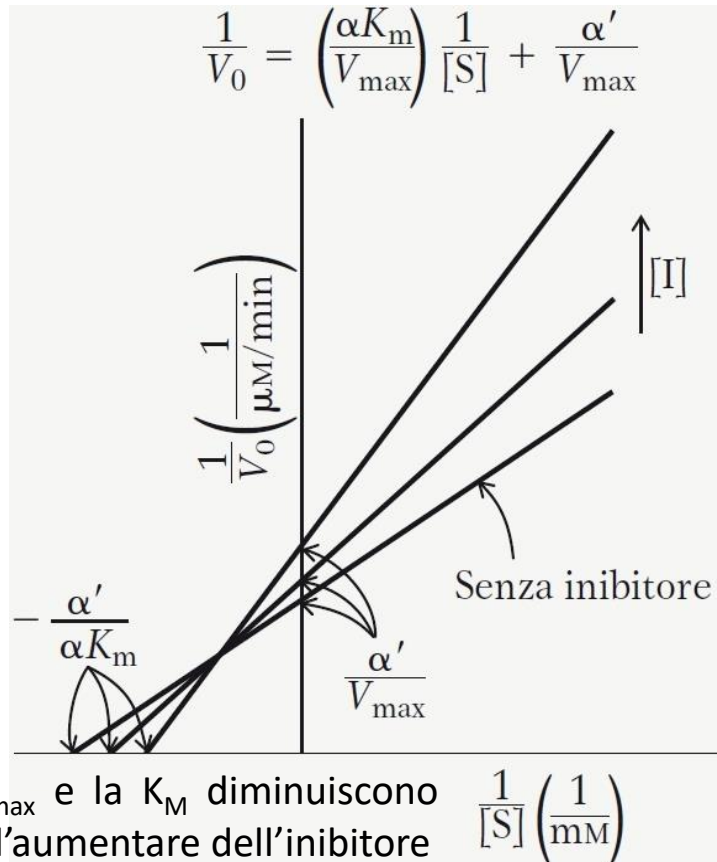
l'enzima lega l'inibitore con affinità differente a seconda che il substrato sia già legato all'enzima o che non sia ancora legato all'enzima.

Se l'inibitore si lega all'enzima senza substrato, l'inibizione avrà un andamento simile all'inibizione competitiva (la V_{max} poco modificata e K_M aumentata). Se l'inibitore si lega all'enzima con il substrato l'inibizione avrà un andamento simile all'inibizione non competitiva (la V_{max} tende a diminuire e K_M non modificata o diminuita).

L'inibizione mista non può essere rimossa aumentando [S].

Nel grafico la V_{max} e la K_M diminuiscono all'aumentare dell'inibitore.

La V_{max} è influenzata perché l'inibitore inattiva una parte delle molecole dell'enzima disponibile, abbassando la [E] attiva da cui dipende la V_{max}



V_{max} e la K_M diminuiscono all'aumentare dell'inibitore

Differenze tra le inibizioni

| 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 |
| Mista | Aumenta o diminuisce * | Diminuisce | Si lega sia all'enzima libero sia al complesso ES |

* La K_M può aumentare o diminuire, in base a quale forma dell'enzima E o ES, viene legata meglio dall'inibitore.

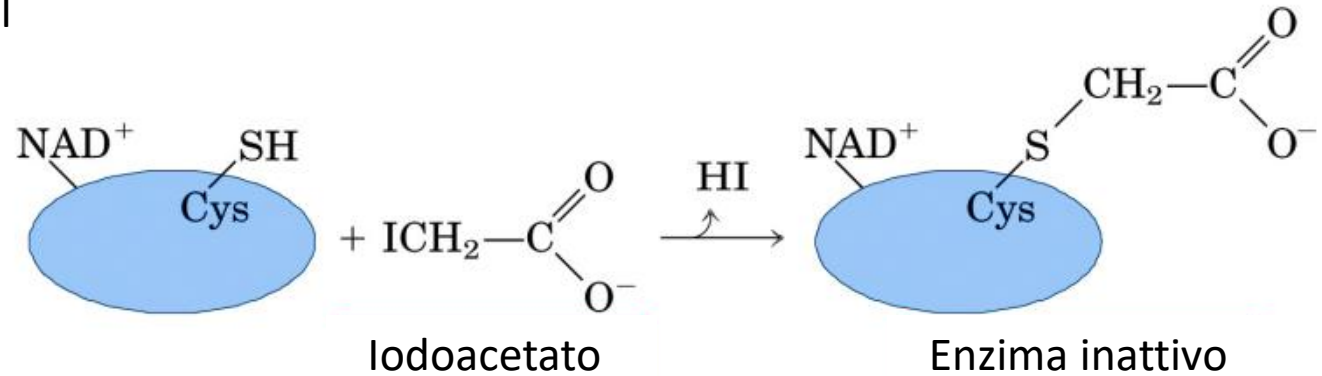
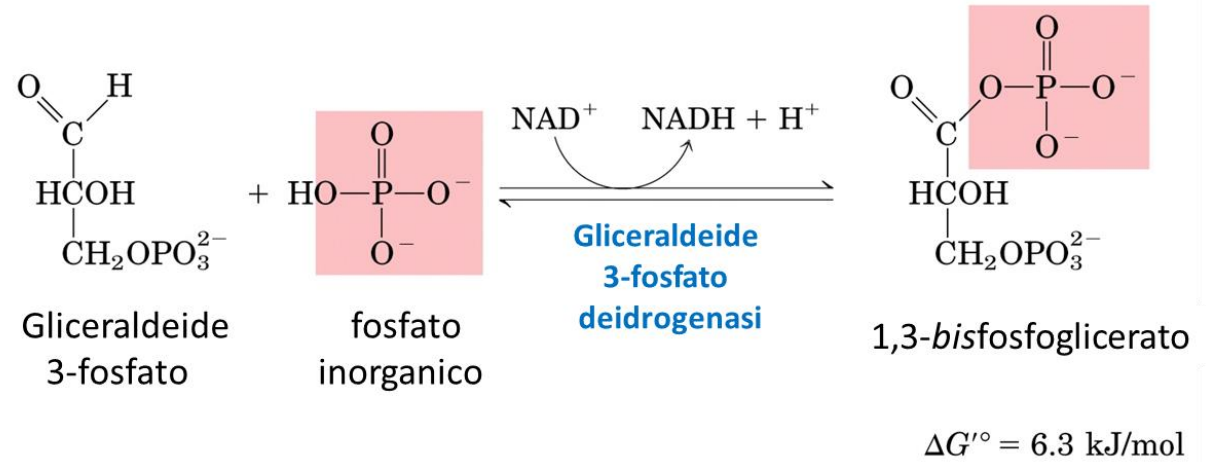
Inibizione irreversibile

- L'inibizione irreversibile l'inibitore **si lega all'enzima permanentemente** e lo inattiva, si combinano o distruggono **un gruppo funzionale dell'enzima che è essenziale per la sua attività catalitica.**
- l'inibitore si **lega covalentemente** all'enzima e non si stacca più. 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.
- Graficamente assomiglia all'inibizione non competitiva dato che qualunque quantità di inibitore ridurrà l'attività dell'enzima.
- Utili nello studio dei meccanismi enzimatici e per individuare i gruppi coinvolti nella catalisi:
 - **reagenti gruppo-specifici**
 - **analoghi del substrato o marcatori di affinità**
 - **inibitori suicidi**

Esempio di inibizione irreversibile

Inibitori gruppo-specifico della gliceraleide 3-fosfato deidrogenasi

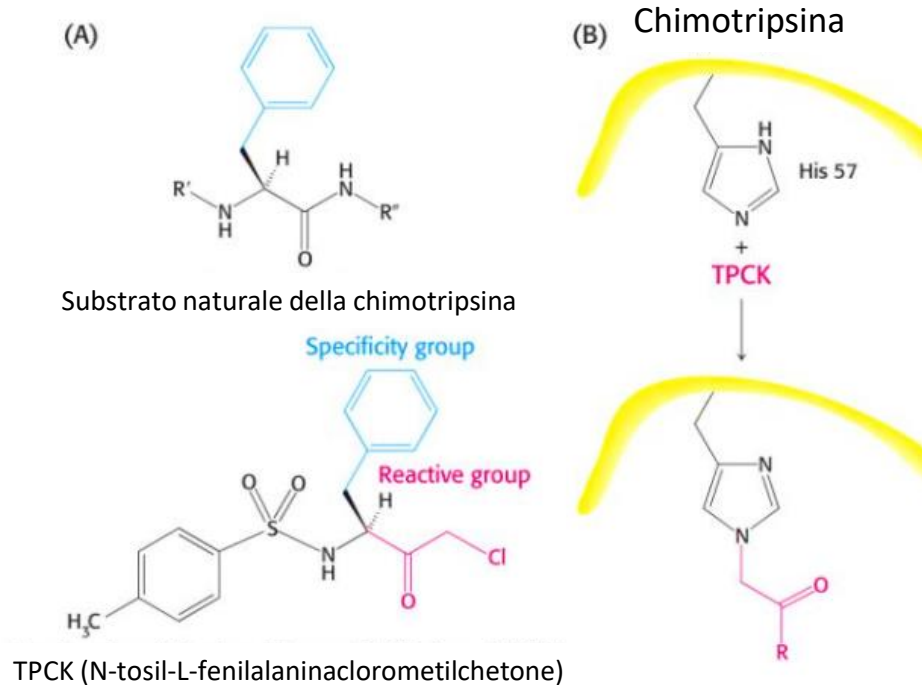
Essi formano legami covalenti con le molecole enzimatiche. Questi inibitori sono quasi tutti sostanze tossiche; la maggior parte di essi reagisce con alcuni gruppi funzionali del sito attivo rendendolo inaccessibile al substrato o inattivandolo.



Lo iodoacetato è un agente alchilante che agisce come potente inibitore di enzimi quali la gliceraleide 3-fosfato deidrogenasi in quanto forma un derivato covalente (carbrossimetilato) con il gruppo SH del sito attivo dell'enzima.

Inibitori analoghi del substrato

Sono inibitori che si legano covalentemente al sito catalitico dell'enzima perché mimano il substrato naturale



TPCK (N-tosil-L-fenilalaninaclorometilchetone) blocca specificatamente la chimotripsina (proteasi a serina)

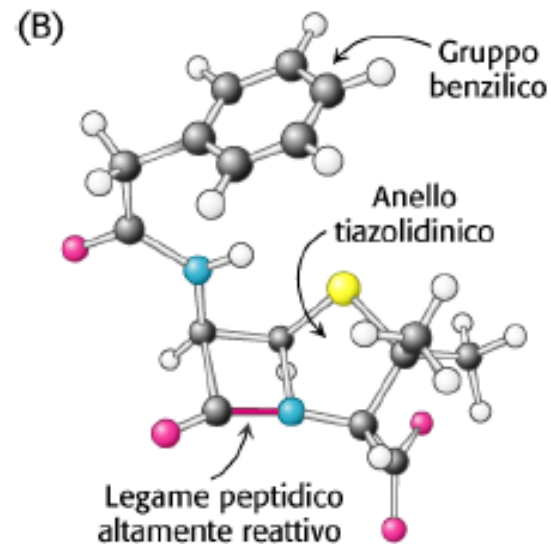
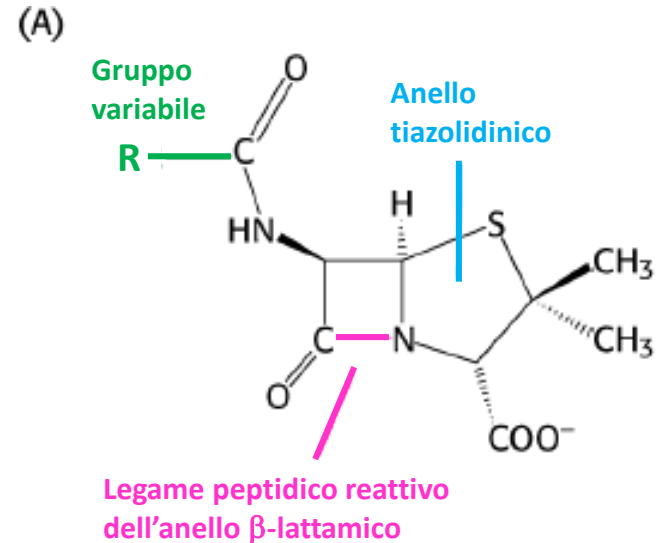
Inibitori suicidi

inibizione irreversibile

Molecole che si legano al sito attivo dell'enzima, dando inizio al ciclo catalitico e quando iniziano ad essere trasformate dall'enzima vi si associano stabilmente inattivandolo.

La penicillina inattiva irreversibilmente un enzima chiave della sintesi della parete batterica.

Le proprietà antibiotiche della penicillina sono basate sulla instabilità dell'anello β -lattamico. L'antibiotico penicillina esercita la sua azione reagendo covalentemente con un residuo di serina del sito attivo della glicoproteina peptidasi durante la sintesi della parete cellulare.



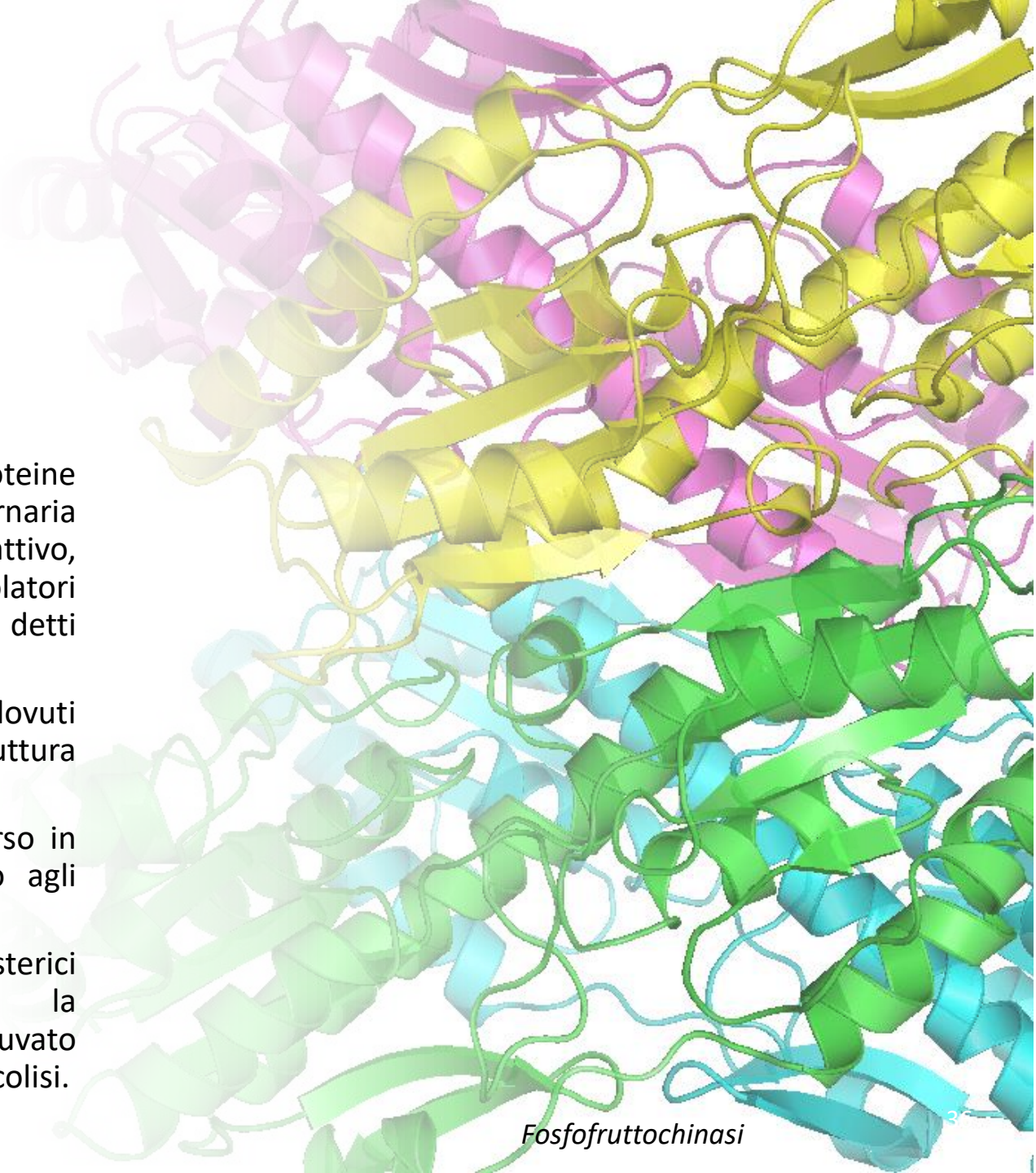
Esempi di inibitori irreversibili

| 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) | $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{O}-\text{P}(\text{F})(\text{O})-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ | Sintetica | Inibisce gli enzimi contenenti serina nel sito attivo |
| Sarin | $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{O}-\text{P}(\text{F})(\text{O})-\text{CH}_3$ | 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.

Il comportamento degli enzimi allosterici

- Gli enzimi allosterici sono proteine dalla struttura quaternaria complessa che, oltre al sito attivo, presentano altri siti regolatori dell'attività enzimatica, detti appunto siti allosterici.
- Mostrano effetti cooperativi dovuti a lievi cambiamenti della struttura quaternaria.
- Si comportano in modo diverso in presenza di inibitori rispetto agli enzimi non allosterici.
- Un esempio di enzimi allosterici sono l'esochinasi, la fosfofruttochinasi 1 e la piruvato chinasi della via metabolica glicolisi.

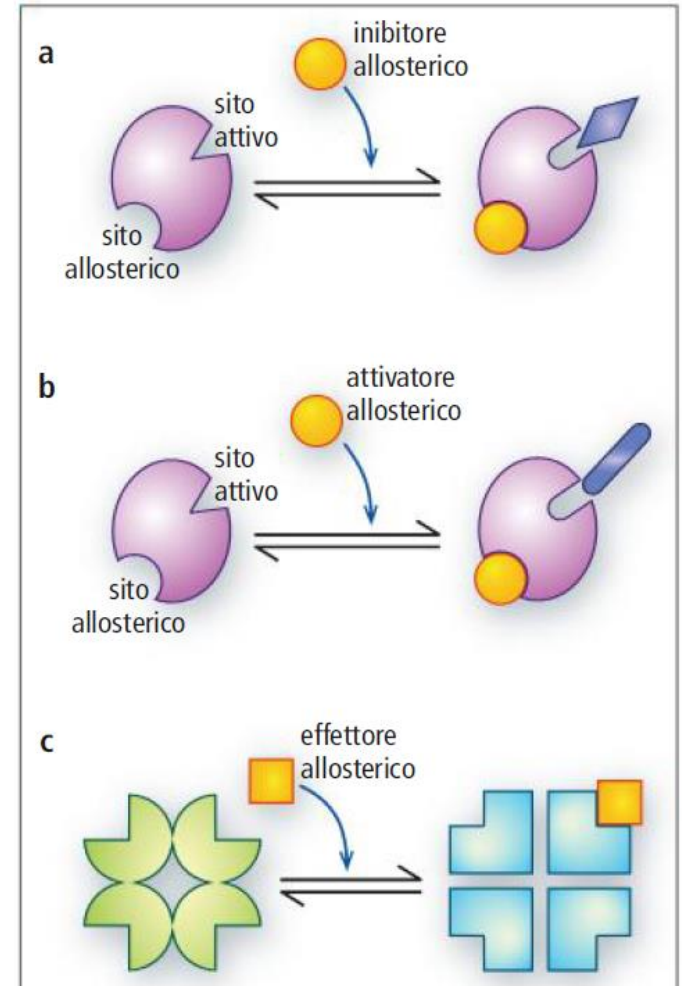


Fosfofruttochinasi

Regolazione degli enzimi allosterici

- Si dicono **effettori o modulatori** le sostanze che vanno a legarsi sui siti allosterici per modulare l'attività dell'enzima (attivazione o inibizione), modificando la conformazione del sito attivo per il legame del substrato. Gli effettori possono essere di vario tipo: molecole, ioni, i substrati stessi o i prodotti delle reazioni catalitiche.
- Spesso gli enzimi allosterici mostrano più siti catalitici posti su diverse subunità, in grado di influenzarsi reciprocamente. In queste molecole, l'attivazione di un sito allosterico provoca alterazioni conformazionali della proteina che favoriscono una riorganizzazione strutturale di tali siti catalitici, sequenziale o simultanea (concertata). È questo il fenomeno della **cooperatività**, che può essere **positiva**, quando si ha un'attivazione allosterica dei siti catalitici, o **negativa**, nel caso di una loro inibizione.

Nella figura effetto allosterico di un inibitore (a) e di un attivatore (b) sul sito attivo di un enzima. In (c), effetto allosterico cooperativo in un enzima con più siti attivi.

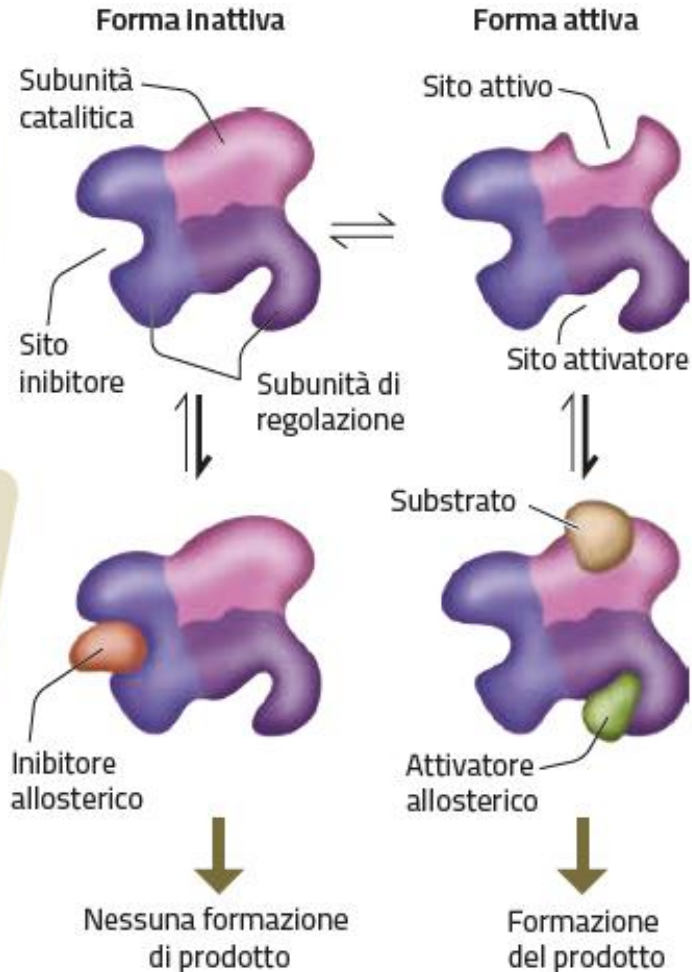


L'effetto allosterico cooperativo si verifica quando, l'effettore legandosi in corrispondenza di un sito di regolazione, induce l'enzima a cambiare forma. Tale cambiamento altera l'affinità del sito attivo per il substrato e influenza la velocità della reazione.

Stato T

Quando l'enzima si trova nella forma inattiva non può legare il substrato.

Il legame di un inibitore riduce la probabilità che nella cellula sia presente la forma attiva dell'enzima.



Stato R

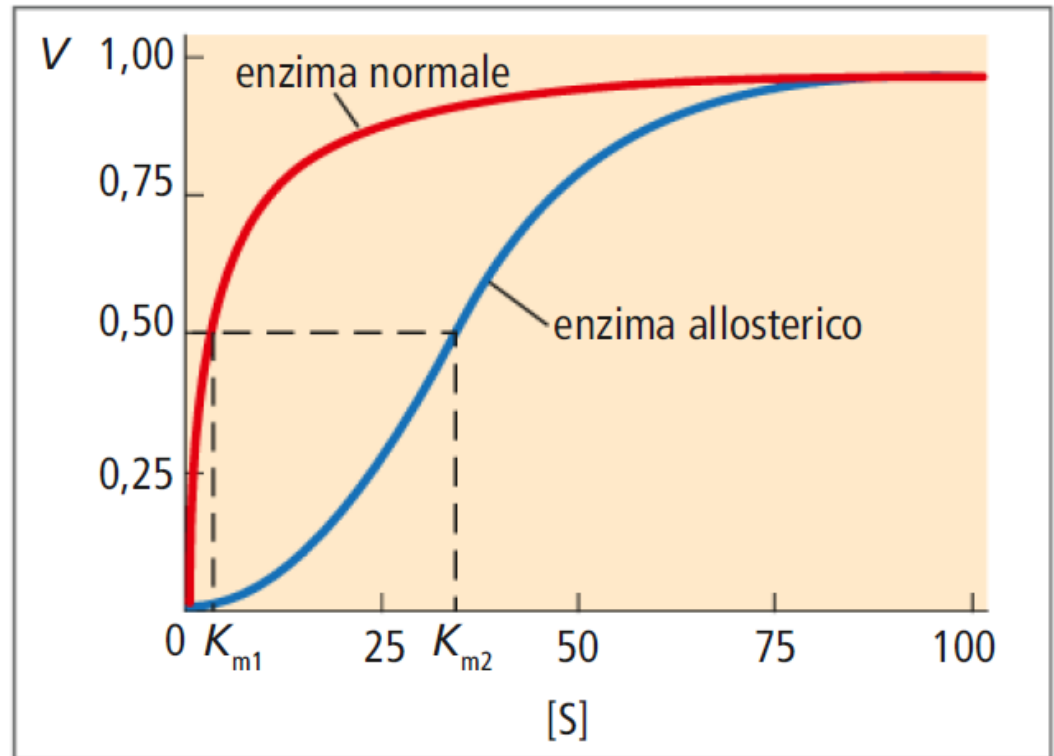
Quando l'enzima si trova nella forma attiva è in grado di legare il substrato.

Il legame di un attivatore fa aumentare la probabilità che sia presente la forma attiva.

la cooperatività positiva è rappresentata da un tipico grafico a **S (andamento sigmoide)**, nel quale sono messe in relazione la concentrazione del substrato e la velocità di reazione. In un enzima normale, la velocità di reazione aumenta direttamente all'aumentare del substrato, fino alla saturazione dei siti di legame (plateau).

Negli enzimi allosterici, l'attività catalitica parte lentamente, ma il legame della prima molecola a una subunità dell'enzima favorisce il legame della seconda molecola di substrato alla seconda subunità e così via. Negli enzimi allosterici le varie parti della macromolecola comunicano fra di loro, è come se il primo legame mandasse un'informazione agli altri siti e ugualmente la ricevesse, modificando positivamente o negativamente il legame di altre molecole con altri siti posti su subunità diverse.

Gli enzimi allosterici non seguono il modello cinetico di Michaelis-Menten, Per la modulazione, numerosi enzimi allosterici rappresentano i principali interruttori regolatori nel metabolismo cellulare.



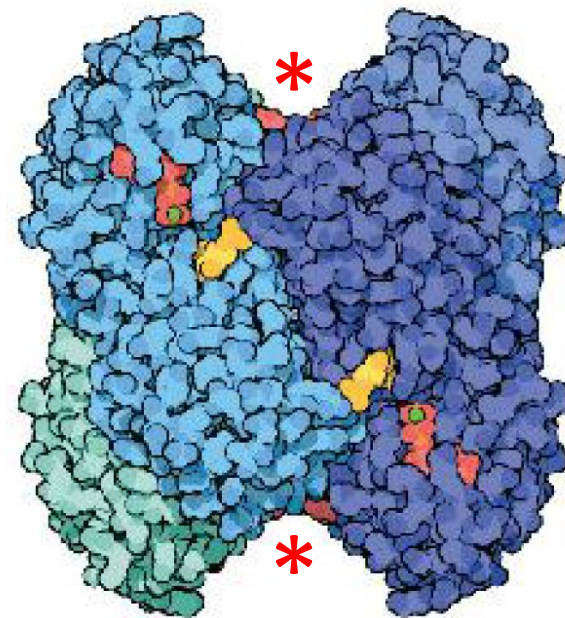
Curve di attività di un enzima normale e un enzima allosterico dove [S] è la concentrazione di substrato e V è la velocità di reazione.

Regolazione a feedback

Gli enzimi sono i principali responsabili del metabolismo cellulare, lavorano da soli o a gruppi per portare a termine specifici processi metabolici. Quando più enzimi lavorano in modo sequenziale, si possono creare delle catene di reazioni o **vie metaboliche** in cui il prodotto del primo enzima diventa substrato per il secondo e così via. In molti sistemi multienzimatici, i primi enzimi della catena regolano l'intera via metabolica in funzione delle necessità cellulari. Tali **enzimi regolatori** aumentano o diminuiscono la loro velocità in risposta a determinati segnali, permettendo alla cellula di adeguarsi alle richieste di energia (processi catabolici) o di biomolecole necessarie per la crescita e la riparazione (processi anabolici).

Gli enzimi regolatori sono molto complessi, formati da diverse subunità e spesso allosterici. In presenza di reazioni concatenate, un tipo molto comune di regolazione enzimatica è quella del **feedback**. Se il prodotto finale di una via metabolica è un inibitore dell'enzima coinvolto nelle prime tappe della catena di reazioni, si ha una regolazione a **feedback negativo**, se invece il prodotto agisce da attivatore, si parla di **feedback positivo**.

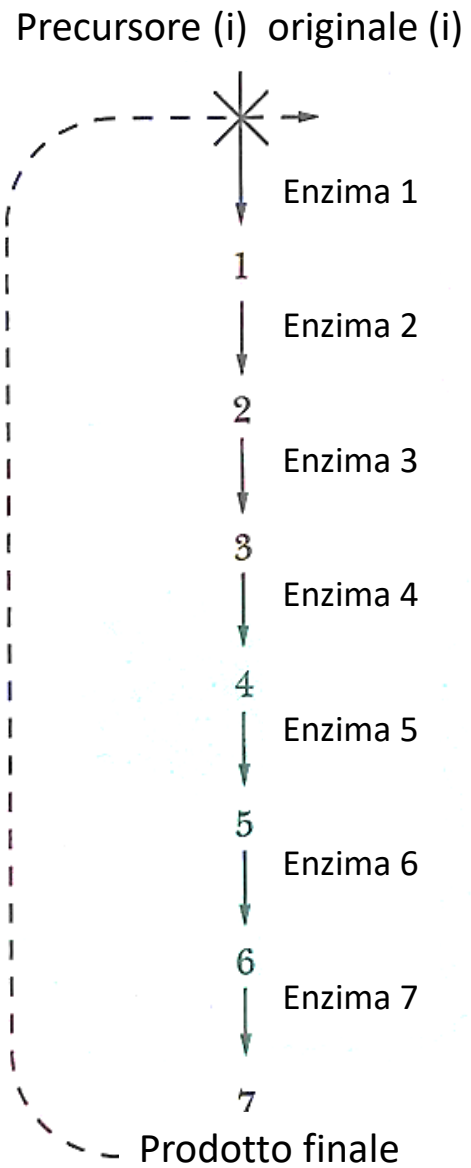
Un esempio di regolazione a feedback è fornito dall'enzima allosterico fosfofruttochinasi, coinvolto nella 3 reazione della glicolisi, la via metabolica che porta alla produzione di energia sotto forma di ATP a partire dall'AMP. Sia l'AMP sia l'ATP possiedono dei siti di regolazione allosterica su questo enzima. L'AMP è un attivatore mentre l'ATP funge da inibitore. Tale regolazione trova significato nel fatto che, in presenza di alti livelli di ATP, non è necessario per la cellula produrne di nuovo.



La fosfofruttochinasi è un esempio di enzima allosterico composto da più unità. In rosso i siti di modulazione allosterica.

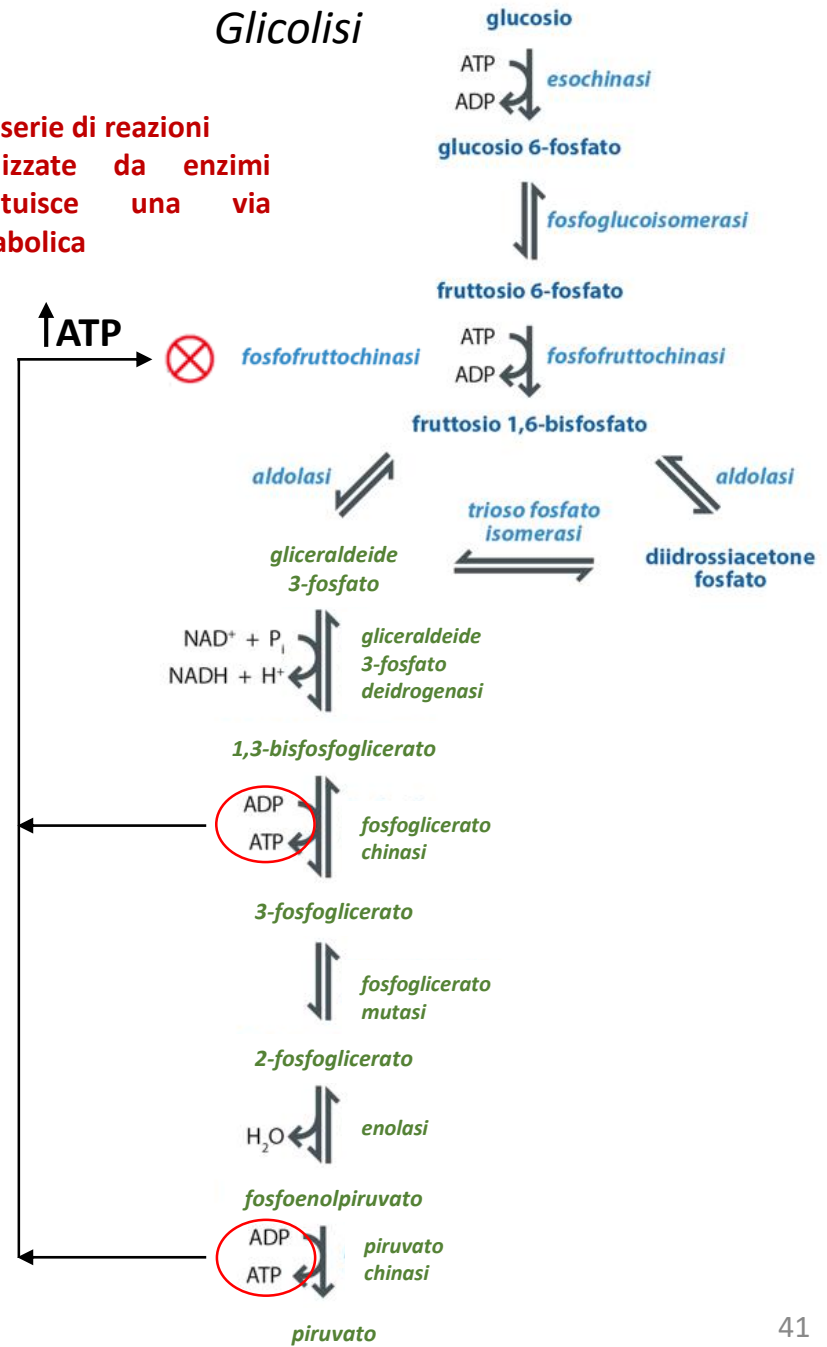
Rappresentazione schematica di una via metabolica in cui viene mostrata l'inibizione a feedback

Regolazione a feedback negativo:
 il prodotto finale inibisce una delle prime reazioni della serie inibendo l'intera via metabolica



Una serie di reazioni catalizzate da enzimi costituisce una via metabolica

Glicolisi

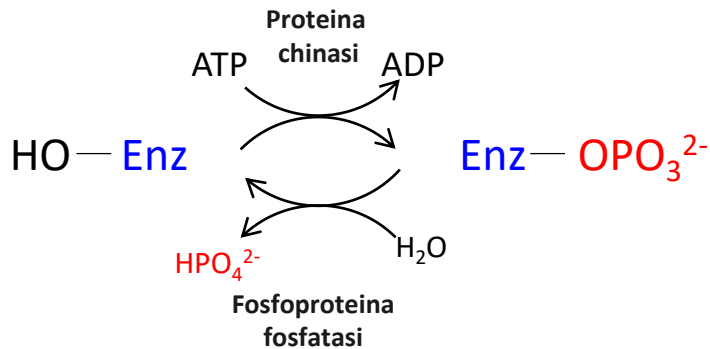


Modificazioni covalenti

L'attività degli enzimi può anche essere regolata da modificazioni covalenti, come l'aggiunta di gruppi fosfato a residui di serina, treonina e tirosina.

La **fosforilazione** è un meccanismo molto comune di regolazione dell'attività enzimatica, in genere l'aggiunta di gruppi fosfato, a opera di enzimi chiamati **chinasi**, stimola l'attività degli enzimi, mentre la loro rimozione, attuata dalle **fosfatasi**, ne causa l'inibizione.

Fosforilazione: (Tyr, Ser, Thr, His)



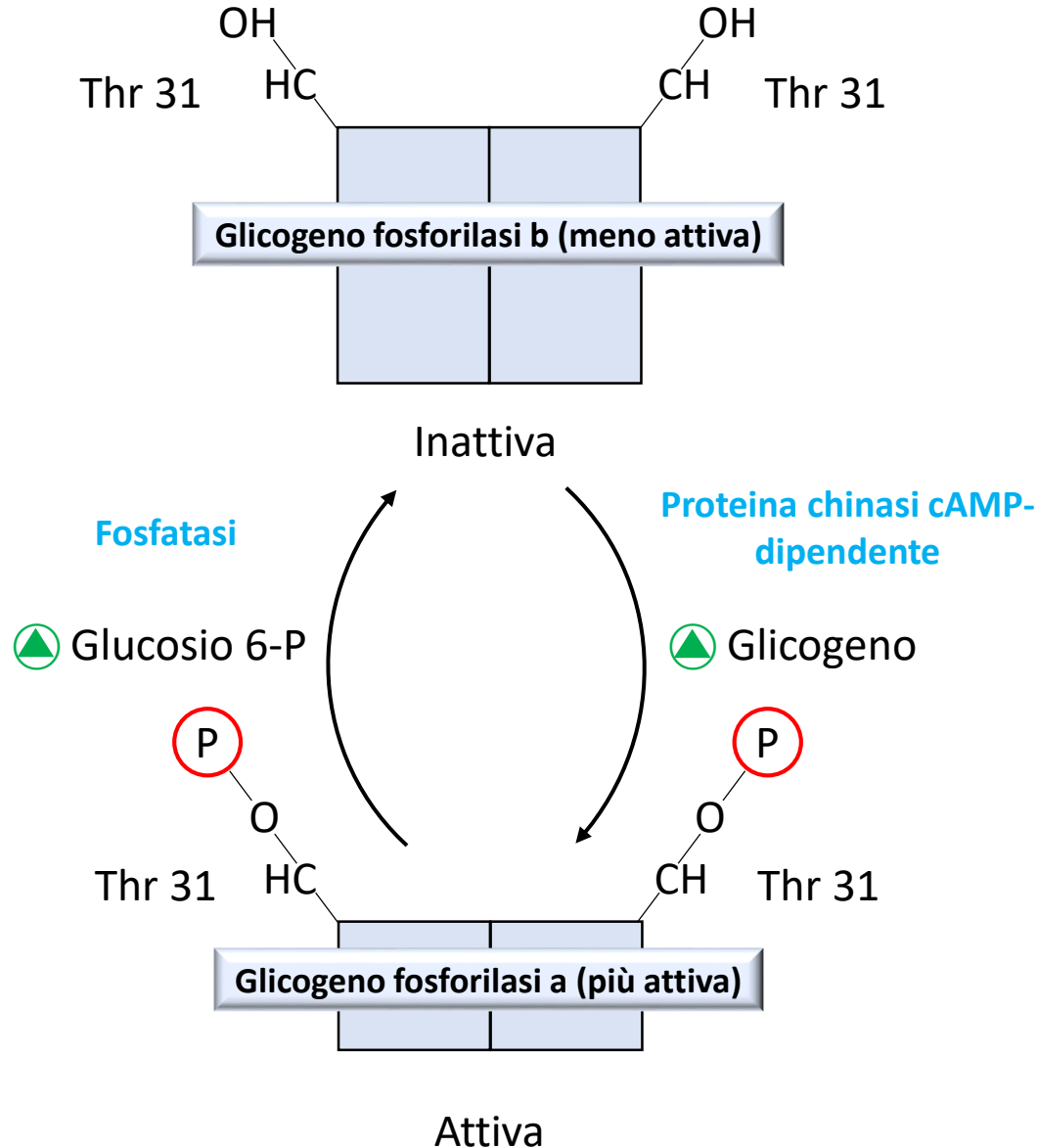
l'attività è modulata da modificazioni covalenti di uno o più residui amminoacidici della molecola enzimatica.

Per modificare le proteine vengono utilizzati i gruppi fosforilico, acetilico, adenilico, uridilico, metilico, ammidico, carbossilico, miristilico, palmitoilico, prenilico, ossidrilico, solforico e l'adenosina difosfato ribosio.

Modificazione covalente per addizione
o rimozione di gruppi fosfato

Fosforilazione della glicogeno fosforilasi:

catalizza la fase iniziale della scissione del glicogeno



L'attività della glicogeno fosforilasi è soggetta sia a regolazione allosterica sia a regolazione per modificazione covalente attraverso la fosforilazione.

Il sito di fosforilazione della fosforilasi del lievito è una treonina situata nella regione N-terminale. Questo enzima è insensibile al glucosio ed è inibita dal glucosio-6-P che facilita la defosforilazione e l'inattivazione dell'enzima.

Un'altra importante sostanza che controlla la glicogeno fosforilasi è il glicogeno che facilita la fosforilazione spostando l'equilibrio dell'enzima da uno stato tetrameric (inattivo-T) a uno dimerico (attivo-R).

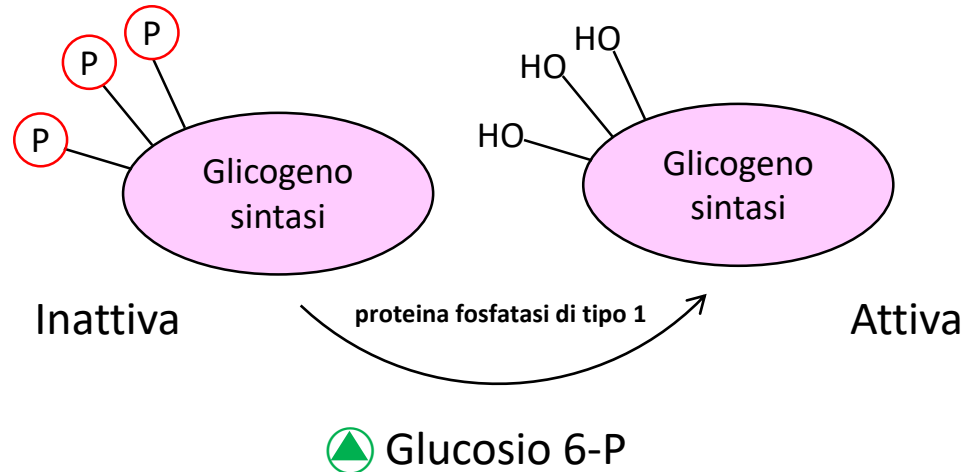
La forma fosforilata è quella più attiva.

L'enzima che trasferisce il gruppo fosfato sulla fosforilasi è detto fosforilasi chinasi

Regolazione della glicogeno sintasi

La regolazione post-traduzionale della glicogeno sintasi implica l'interazione di due meccanismi regolatori, ovvero l'inibizione mediante fosforilazione reversibile e l'attivazione da parte del modulatore allosterico, glucosio-6-P.

La forma inattiva della glicogeno sintasi è la forma fosforilata mentre la forma attiva è la forma defosforilata. La glicogeno sintasi è stimolata dal glucosio 6-P

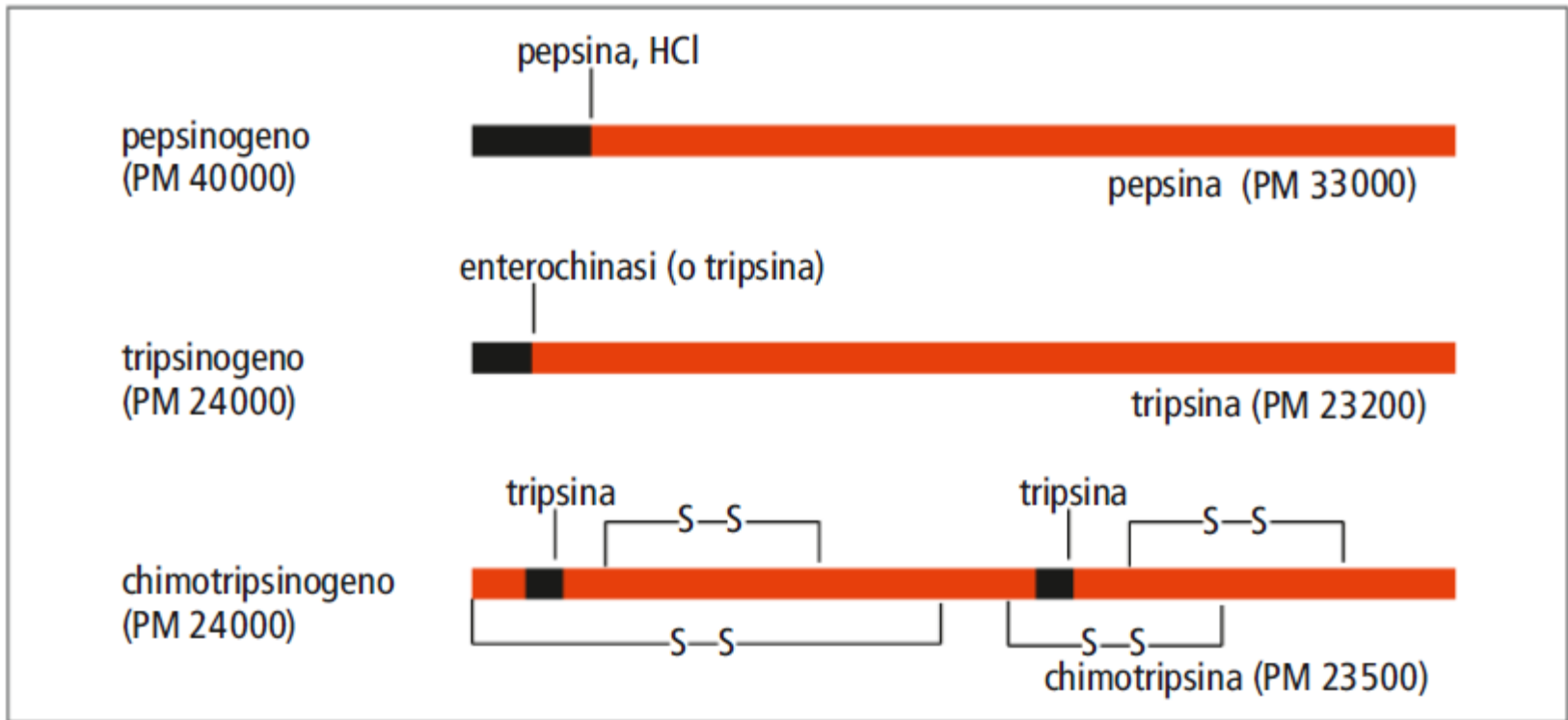


Nei lieviti, la proteina fosfatasi di tipo 1, codificata da GLC7, è la principale fosfatasi che regola l'accumulo di glicogeno, anche se sembra esserci una fosfatasi di tipo 2.

L'attivazione del glicogeno sintasi (aumento glucosio-6-P) comporta aumento e accumulo di glicogeno.

Attivazione proteolitica degli zimogeni

Un altro meccanismo di regolazione degli enzimi è noto con il termine **attivazione degli zimogeni**. Uno zimogeno è un precursore inattivo di un enzima proteolitico, tali enzimi vengono sintetizzati sotto forma di precursori inattivi chiamati zimogeni. La conversione nella forma attiva viene catalizzata, di volta in volta, da altri enzimi e consiste nella rimozione di un frammento peptidico.



Attivazione degli zimogeni della pepsina, tripsina e chimotripsina. In rosso sono rappresentate le sequenze che costituiranno gli enzimi attivi, in nero le porzioni delle molecole che vengono rimosse per taglio proteolitico a opera di vari fattori, come gli stessi enzimi attivi (pepsina o tripsina), enzimi di regolazione (enterochinasi) o altre sostanze (HCl).

Compartimentazione degli enzimi

La cellula può regolare l'attività degli enzimi localizzandoli in specifici distretti cellulari, dove il rilascio del substrato o la formazione del prodotto possono essere controllati. Per svolgere la loro funzione, alcuni enzimi devono lavorare insieme, quindi la cellula li dispone negli stessi compartimenti per assicurarne l'efficienza. La **compartimentazione degli enzimi** garantisce anche le reazioni competitive possano avvenire contemporaneamente all'interno della cellula.

I compartimenti che raccolgono determinati enzimi sono organuli come i mitocondri, i nuclei o i lisosomi.

Un esempio è quello degli enzimi della via metabolica nota come ciclo di Krebs, che permettono la produzione di energia all'interno dei mitocondri.

