

* Lezione 7

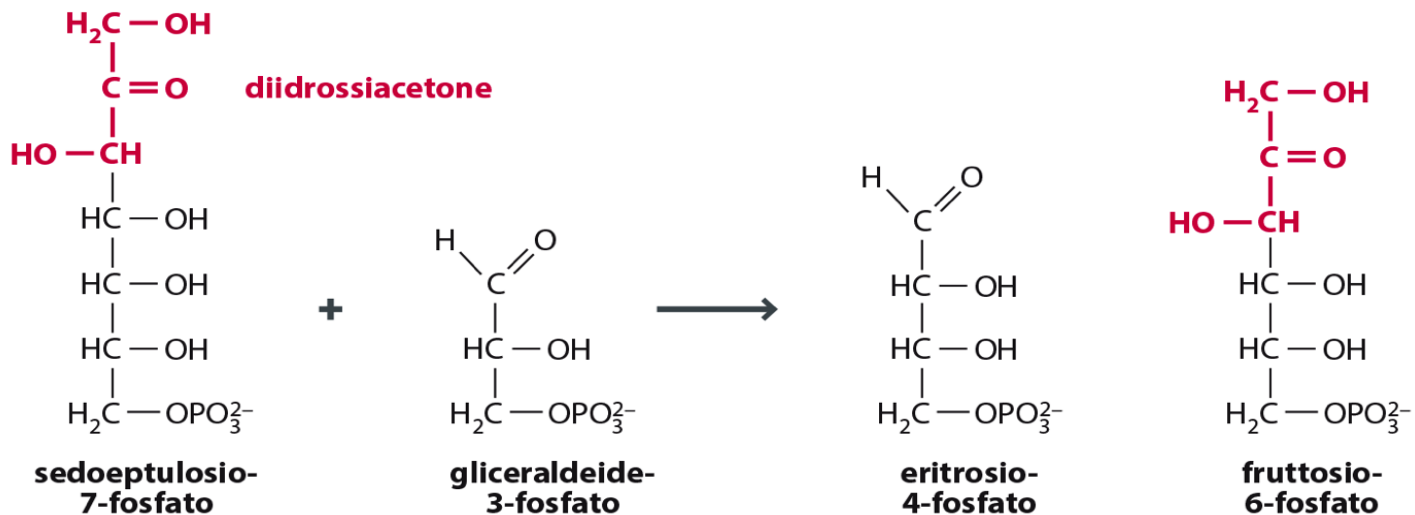
FUNZIONAMENTO DEGLI ENZIMI

- ENZIMA: catalizzatore biologico ovvero sostanza che aumenta la velocità di una reazione chimica senza essere consumata nella reazione.
- La maggior parte delle reazioni biochimiche determina una variazione di energia libera.

(A) reazione catalizzata da una trasferasi



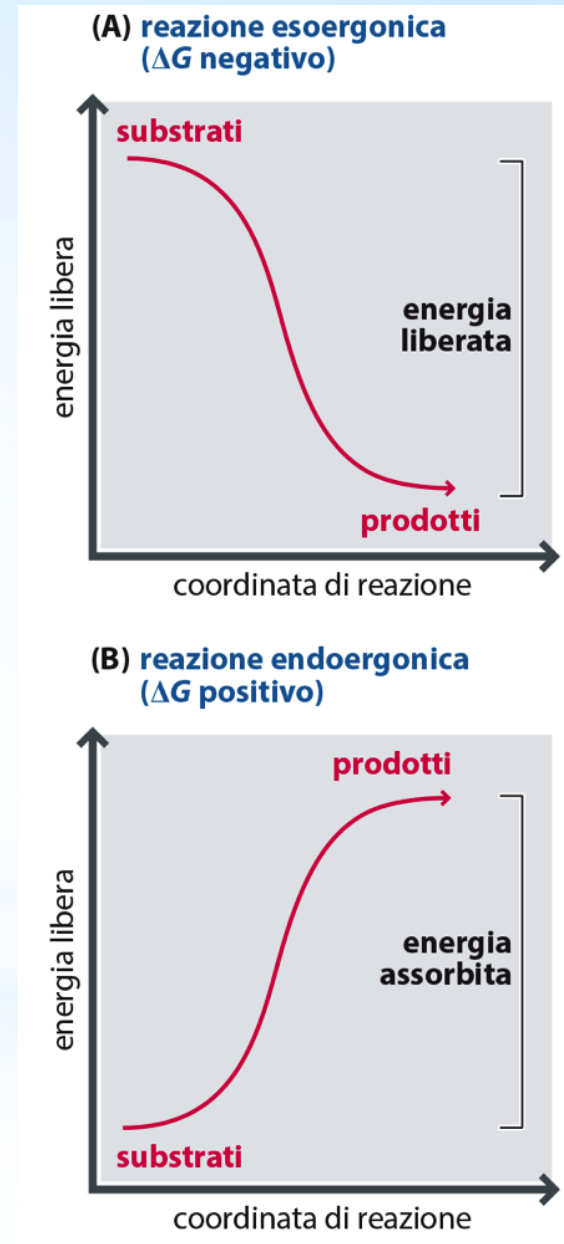
(B) la reazione catalizzata dalla transaldolasi



DIFFERENZA FRA REAZIONI ESOERGONICHE ED ENDOERGONICHE

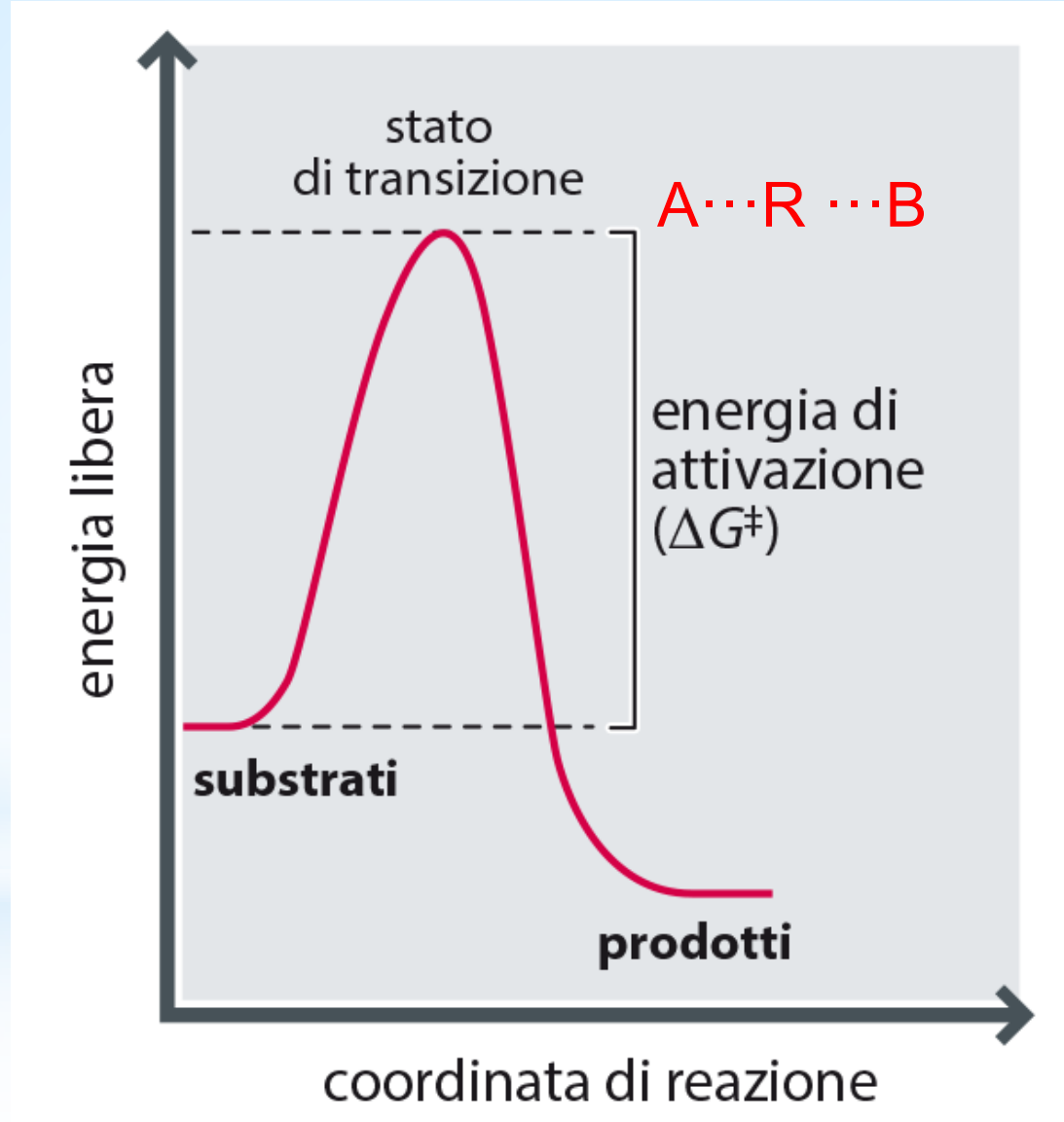
G= misura del contenuto energetico di un «sistema»; un sistema con basso valore di G più stabile di un sistema con alto valore di G.

ΔG : variazione di contenuto energetico tra substrati e prodotti.



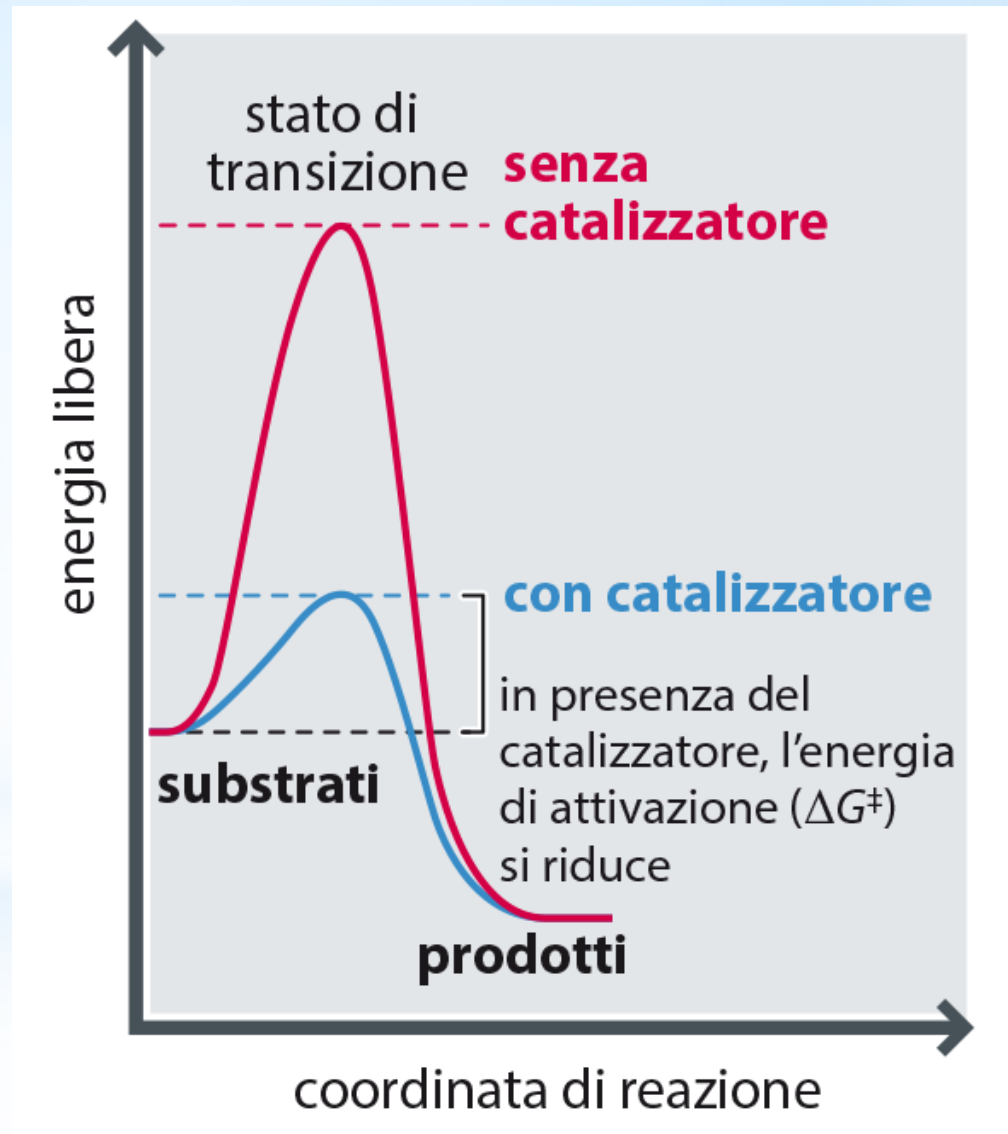
STATO DI TRANSIZIONE E SUE IMPLICAZIONI ENERGETICHE

L'energia di attivazione è necessaria per spingere la reazione oltre la barriera rappresentata dallo stato di transizione; La barriera energetica limita la velocità della maggior parte delle reazioni biochimiche.

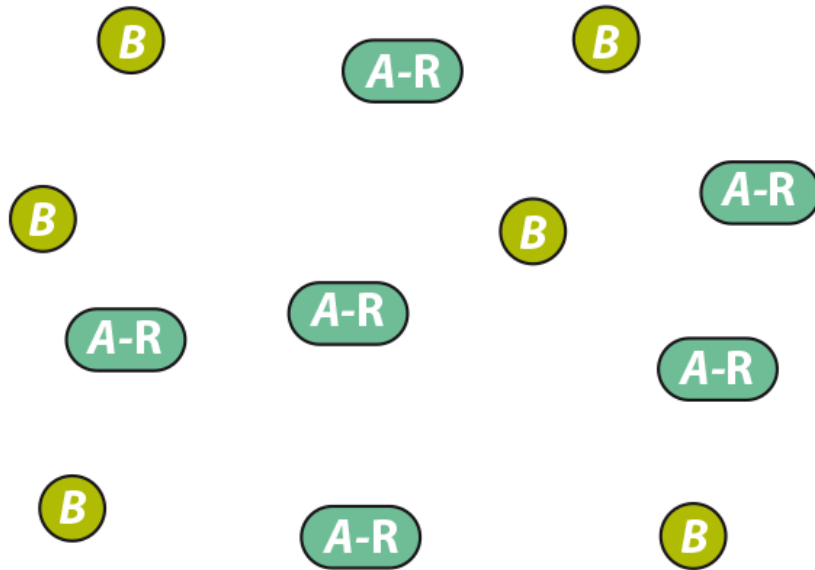


UN CATALIZZATORE RIDUCE L'ENERGIA LIBERA DELLO STATO DI TRANSIZIONE

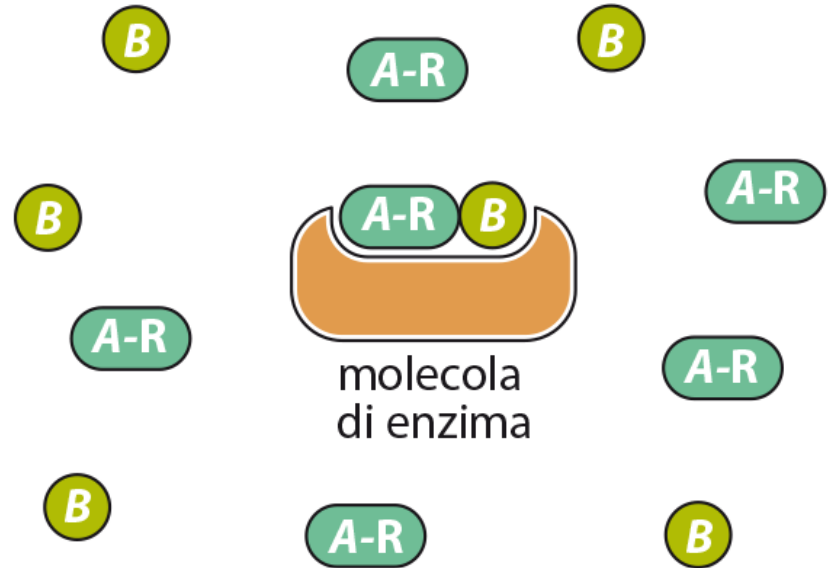
Un catalizzatore stabilizza la struttura intermedia dello stato di transizione mediante la riduzione dell'entropia (misura del grado di disordine del sistema) che determina una riduzione del ΔG^\ddagger



(A) le collisioni casuali sono rare

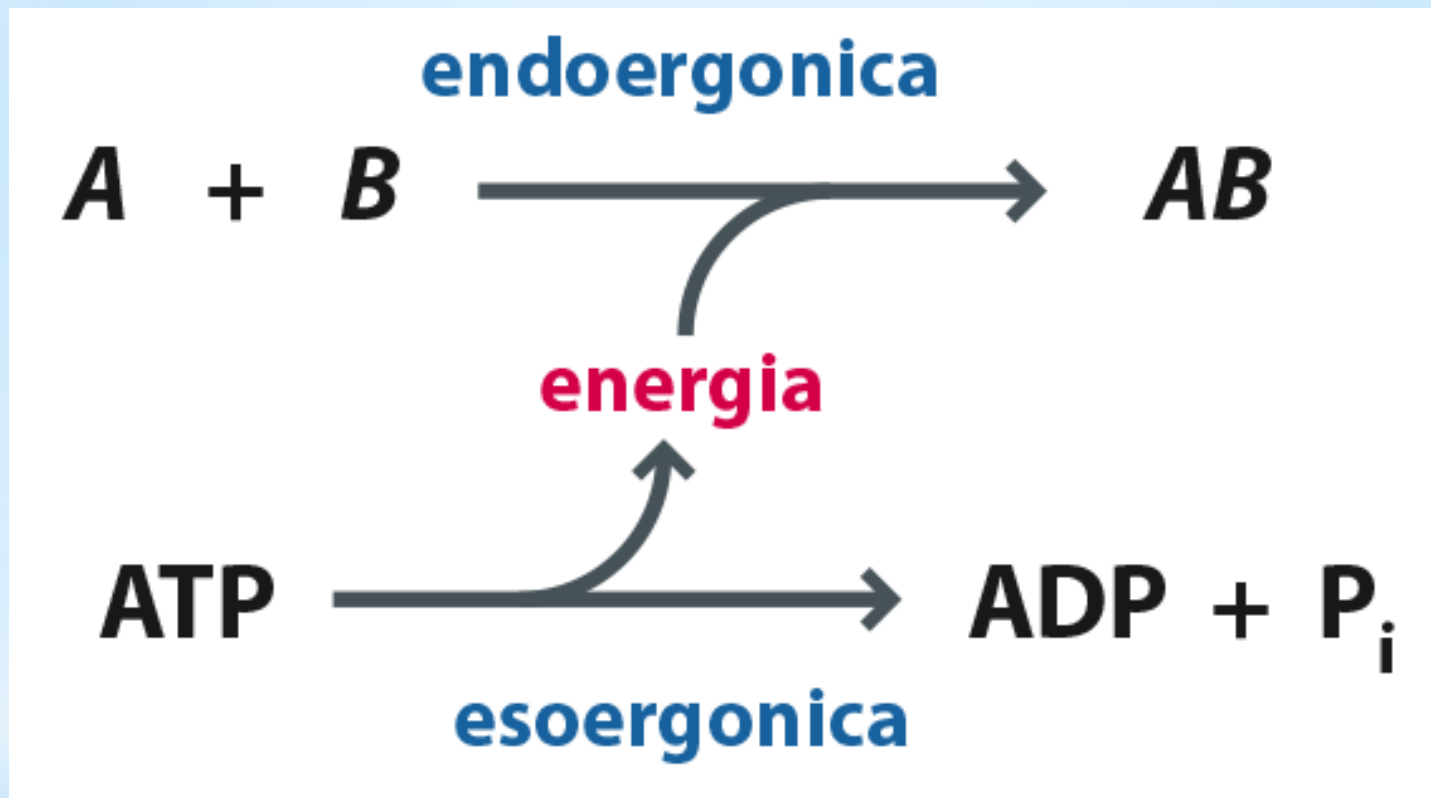


(B) l'enzima avvicina i reagenti fra loro



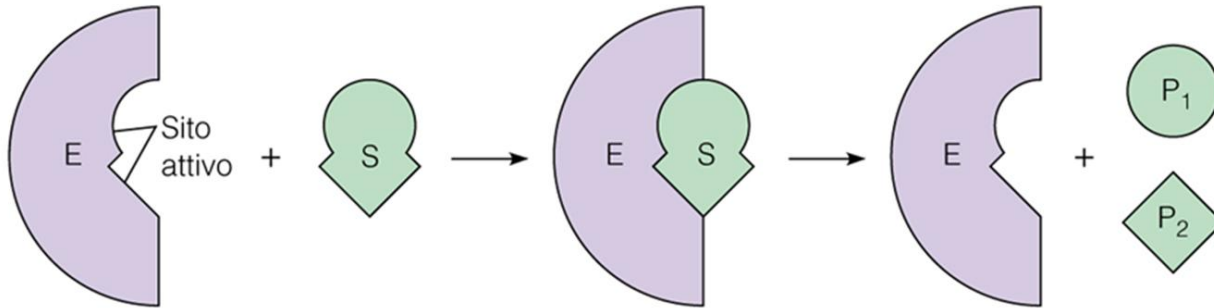
(A) In una miscela di reagenti, lo stato di transizione si forma solo grazie alle collisioni casuali; (B) l'enzima lega i reagenti e riduce l'entropia del sistema, aumentando la velocità di trasformazione dei reagenti in prodotti.

ACCOPPIAMENTO ENERGETICO

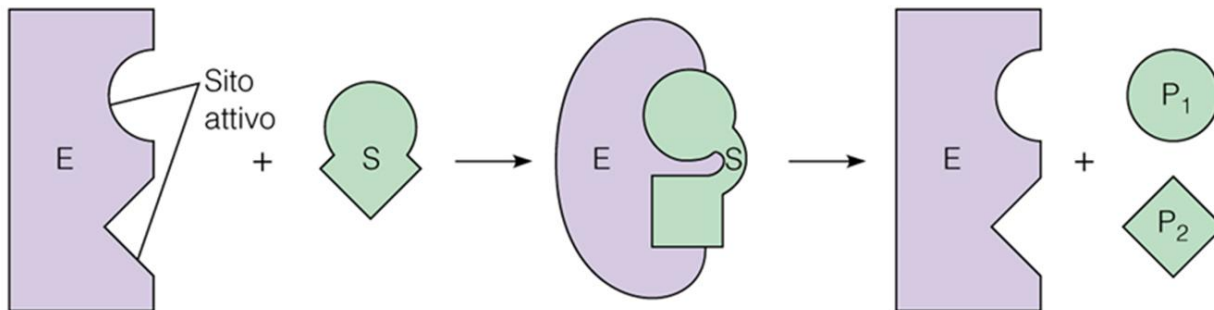


L'energia libera necessaria per la reazione endoergonica, in cui i reagenti A e B si combinano per formare il prodotto AB, è fornita dall'idrolisi dell'ATP ad ADP e fosfato inorganico (Pi).

SPECIFICITA' DI LEGAME DEL SUBSTRATO



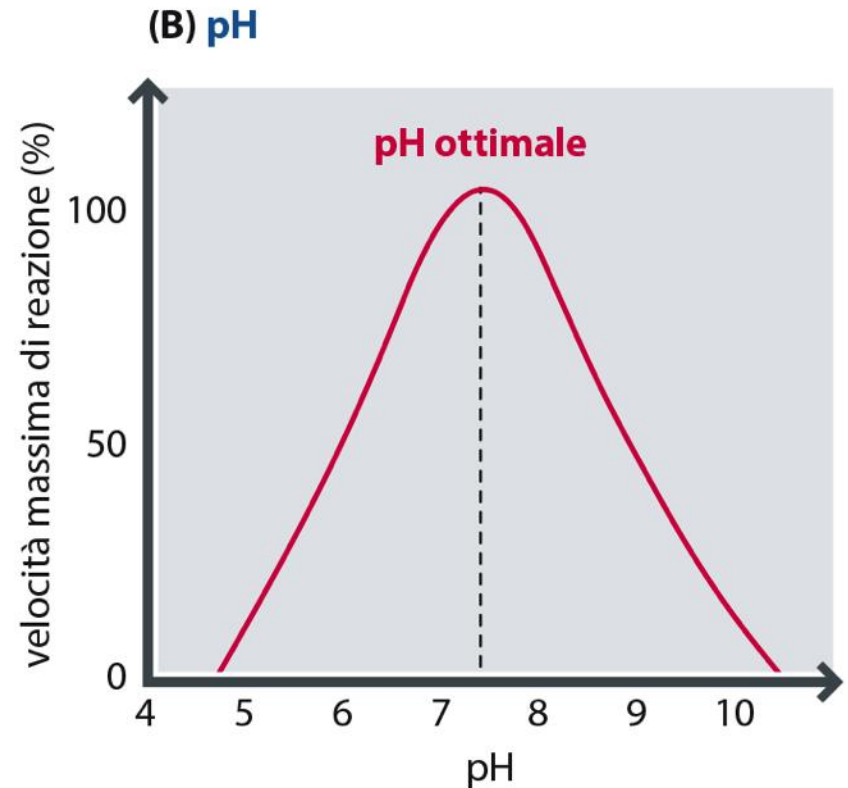
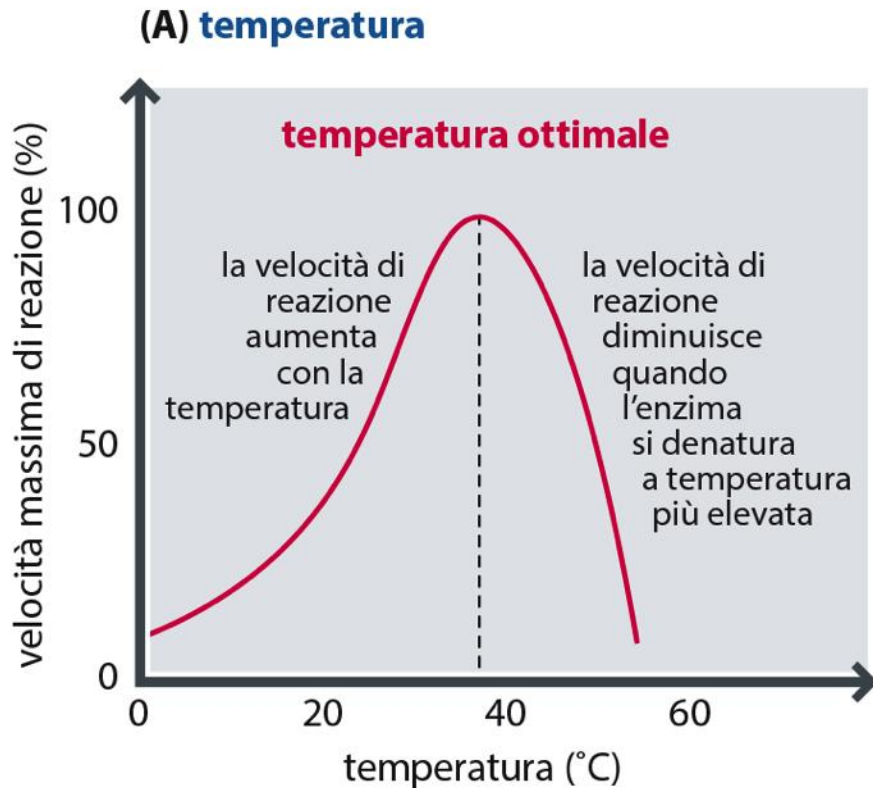
(a) Modello chiave-serratura



Conformazione dello stato di transizione

(b) Modello dell'adattamento indotto

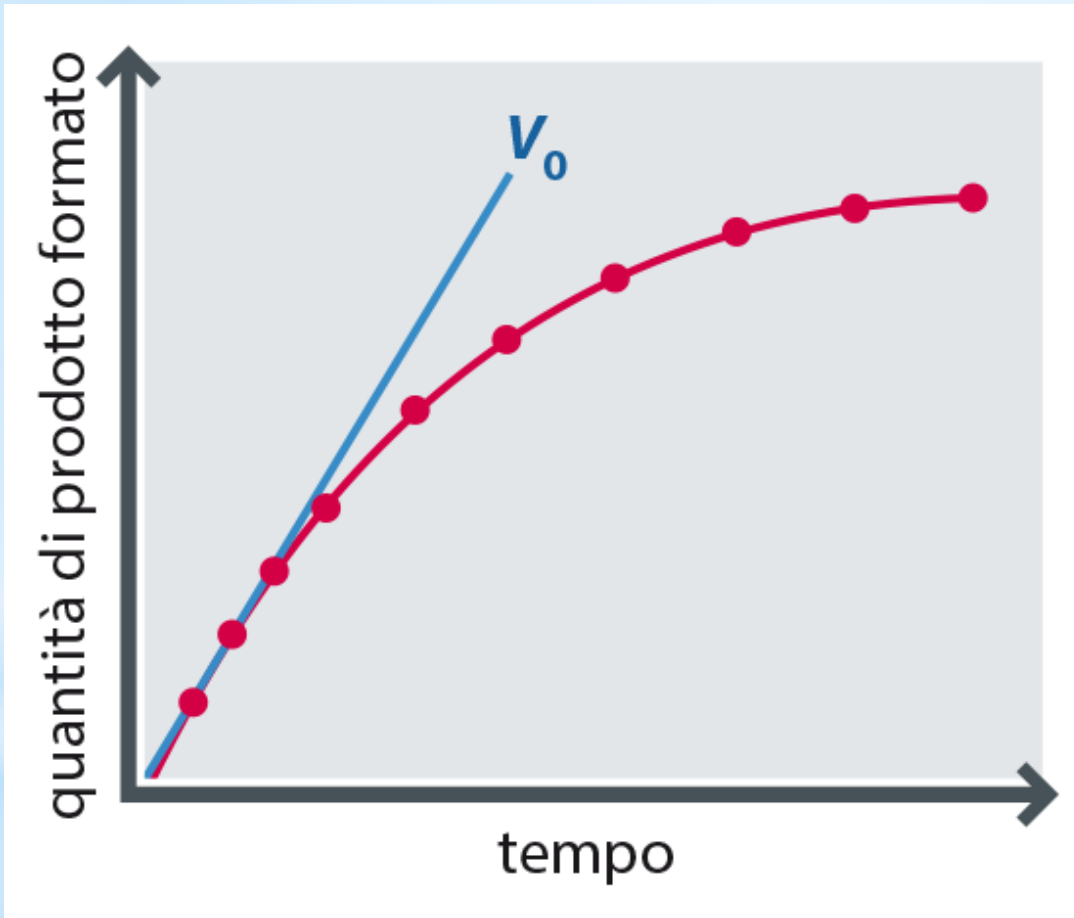
LA VELOCITA' DELLA REAZIONE CATALIZZATA E' INFLUENZATA DA DIVERSI FATTORI



La velocità enzimatica aumenta all'aumentare della t fino a raggiungere un valore max; a t più elevate la velocità diminuisce a causa della perdita di struttura dell'enzima.

La maggior parte degli enzimi mostra un pH ottimale di 6,8-7,4; a valori estremi di pH le proteine si denaturano

DECORSO DI UNA TIPICA REAZIONE ENZIMATICA



La reazione procede ad una velocità lineare, detta VELOCITA' INIZIALE o V_0 che diminuisce poi al diminuire della quantità di substrato disponibile

VELOCITA' DI UNA REZIONE ENZIMATICA IN PRESENZA DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI SUBSTRATO

VELOCITA' MASSIMA O V_{max}

Velocità massima a cui l'enzima può catalizzare la reazione;

COSTANTE DI MICHAELIS o K_m

concentrazione di substrato a cui la velocità della reazione è pari a metà della velocità massima ($0,5 \times V_{max}$)

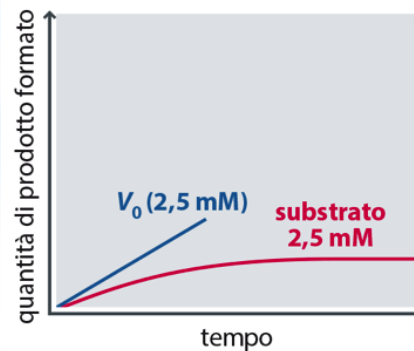
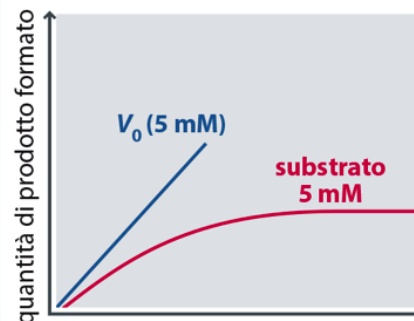
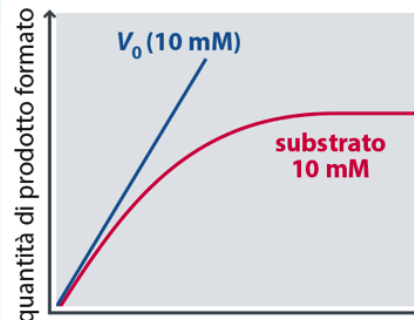


Misura dell'affinità dell'enzima per il suo substrato:

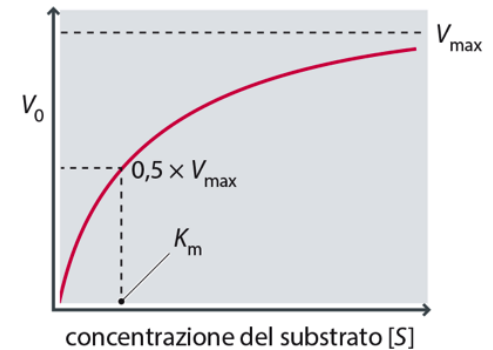
K_m bassa \rightarrow elevata affinità,

K_m alta \rightarrow affinità bassa

(A) V_0 dipende dalla concentrazione del substrato



(B) relazione fra V_0 e concentrazione del substrato



EQUAZIONE DI MICHAELIS MENTEN

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

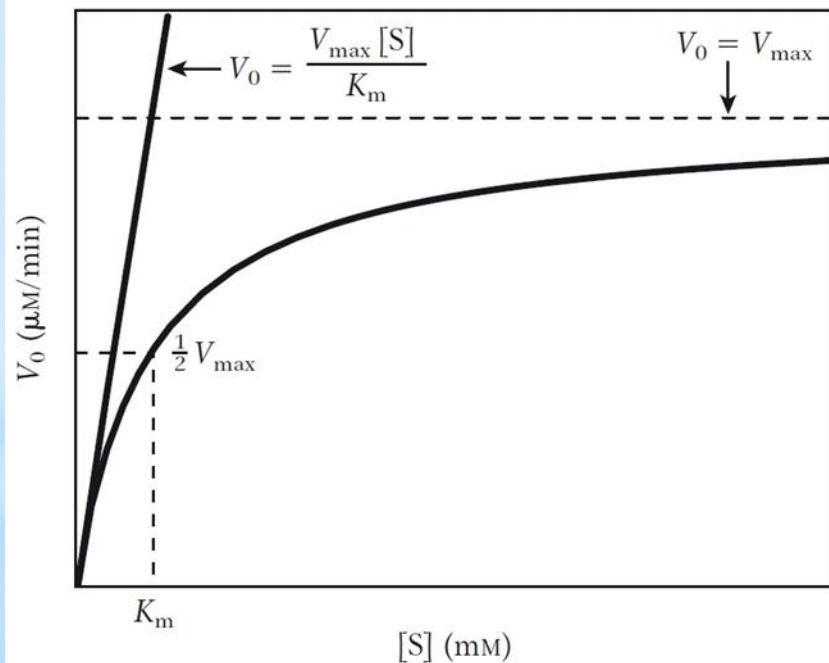
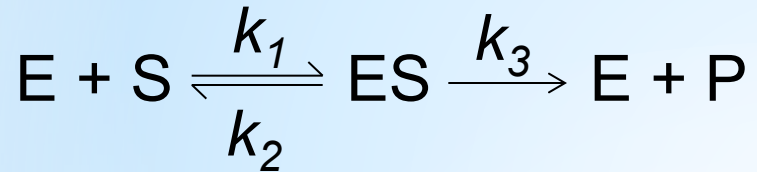


Figura 6.12 Dipendenza della velocità iniziale dalla concentrazione del substrato. Questo grafico mostra alcuni parametri cinetici che definiscono l'andamento della funzione ad alta e a bassa concentrazione di substrato $[S]$. Quando $[S]$ è bassa, si ha che $K_m \gg [S]$ e il termine $[S]$ al denominatore dell'equazione di Michaelis-Menten (Equazione 6.9) diventa irrilevante; l'equazione può essere semplificata in questo modo: $V_0 = V_{\max}[S]/K_m$, e V_0 presenta una dipendenza lineare da $[S]$, cioè varia proporzionalmente all'aumento di $[S]$. Ad alta $[S]$, quando cioè $[S] \gg K_m$, il termine K_m al denominatore dell'equazione di Michaelis-Menten diventa trascurabile e l'equazione può essere semplificata come $V_0 = V_{\max}$; ciò spiega il plateau della curva quando $[S]$ è elevata. L'equazione di Michaelis-Menten verifica quindi la dipendenza della velocità iniziale dalla concentrazione del substrato, e l'andamento della curva è definito dai termini V_{\max}/K_m a bassa $[S]$, e da V_{\max} ad alta $[S]$.

CATALISI ENZIMATICA



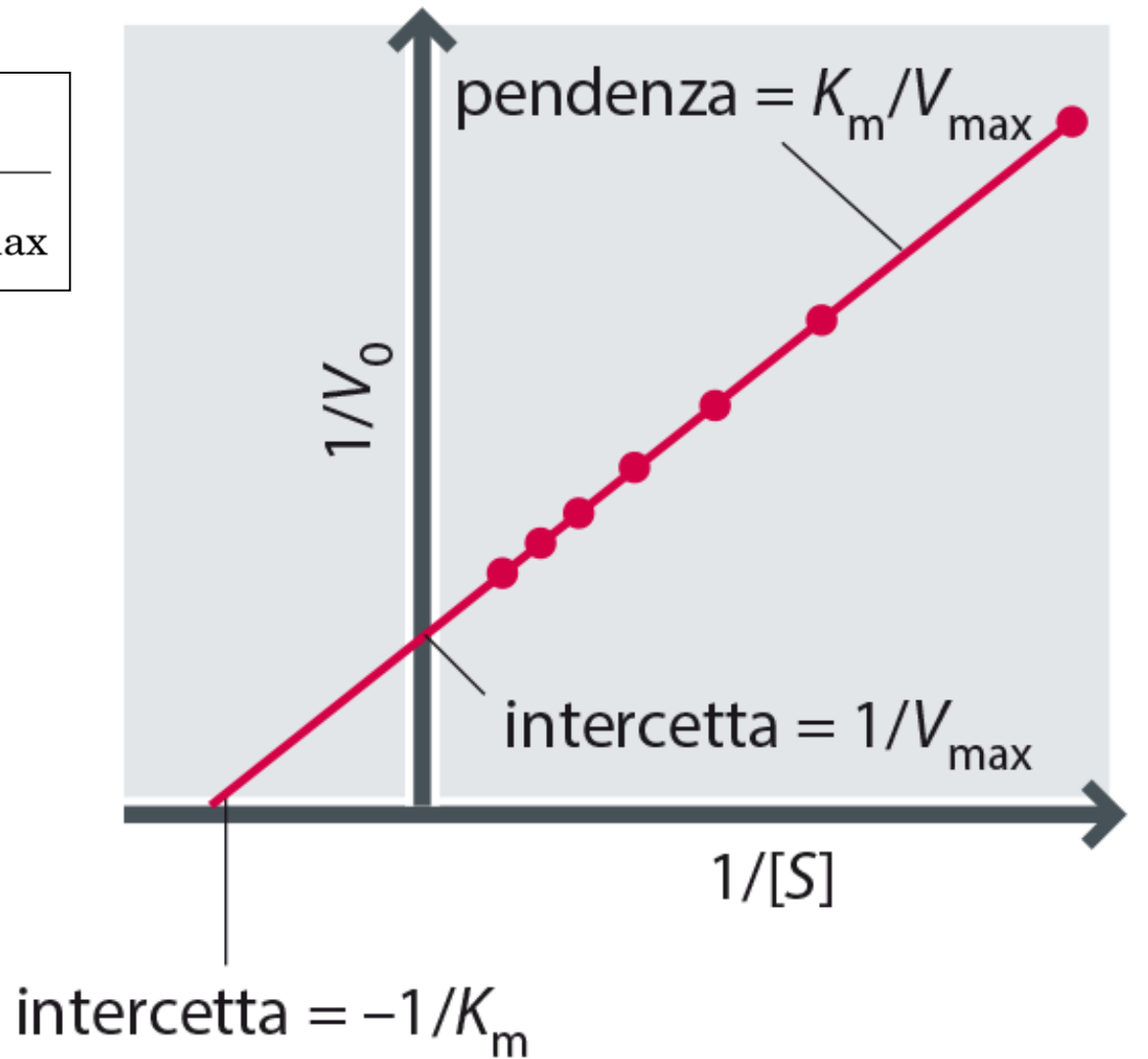
$$k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

- ❖ Se un enzima ha una debole affinità per il suo substrato, k_2 (dissociazione di ES in E e S) sarà maggiore di k_1 (associazione di E e S a formare ES); K_m elevato
- ❖ Un enzima con elevata affinità per il suo substrato mostrerà un basso valore di k_m perché in questo caso k_1 sarà maggiore di k_2 .

GRAFICO DI LINEWEAVER -BURK

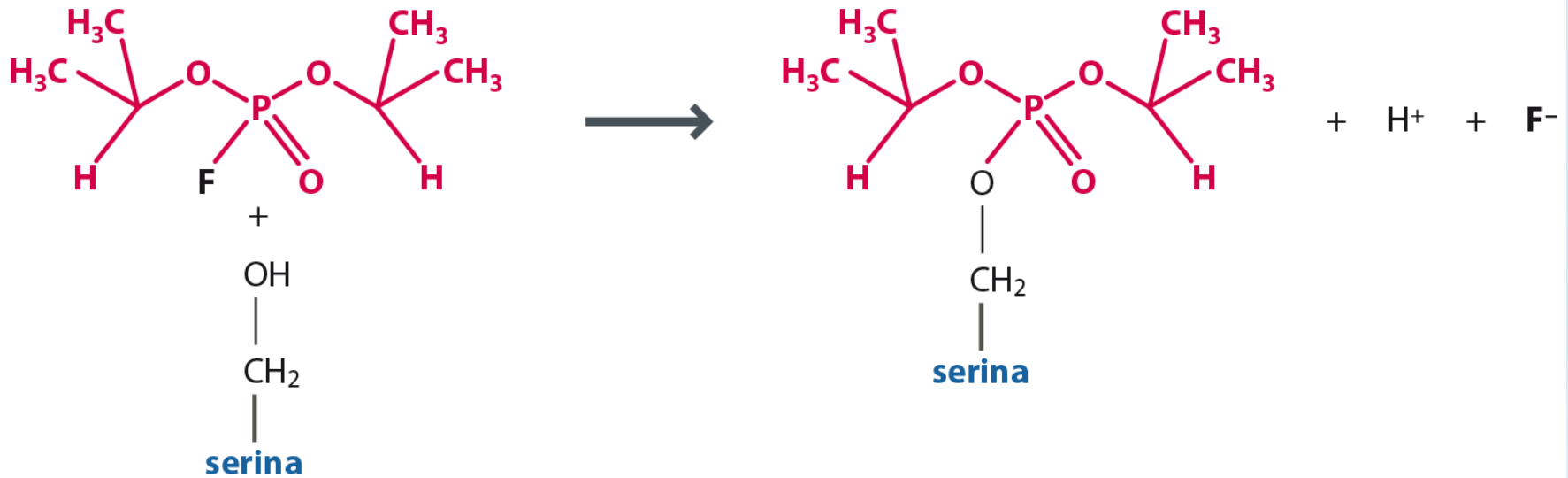
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

1	K_M	1	1
V_0	V_{\max}	[S]	V_{\max}
x	=	ay	+ b



ESEMPIO DI INIBITORE IRREVERSIBILE: DIISOPROPIL FLUOROFOSFATO (DIFP)

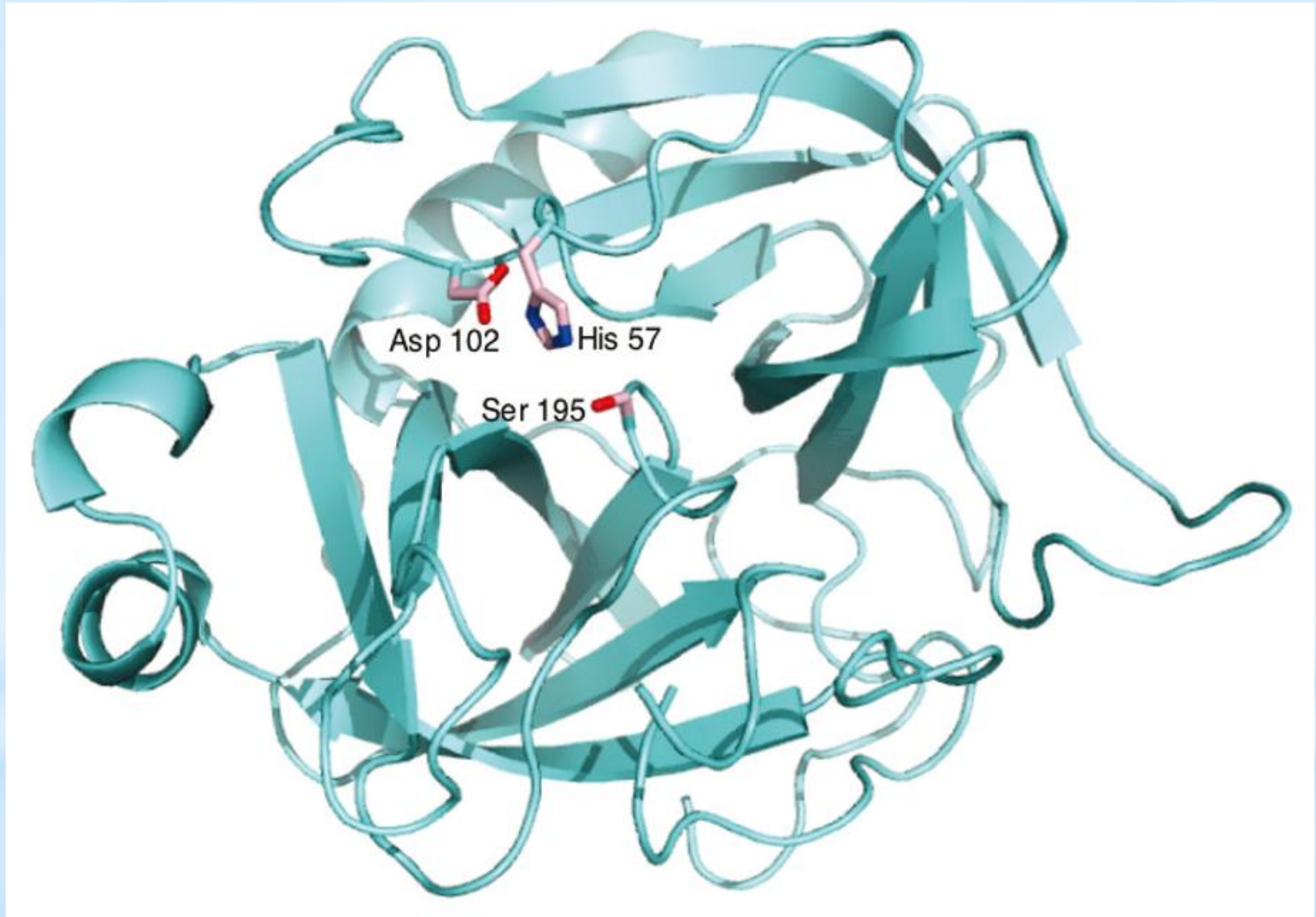
DIFP



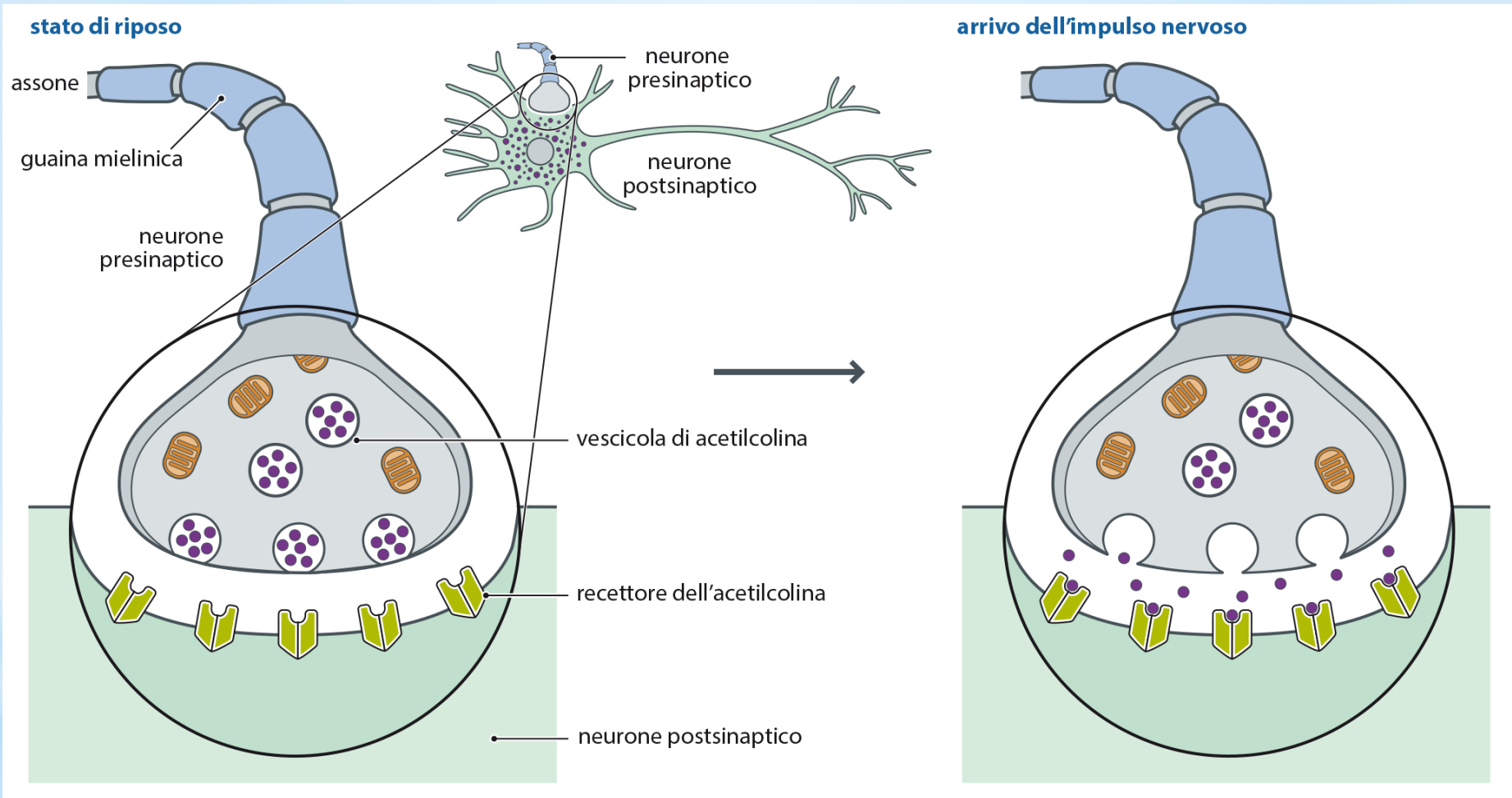
INIBITORE: composto che interferisce con l'attività dell'enzima, riducendo la sua capacità di catalisi.

Inibitore irreversibile: modifica il sito attivo di un enzima attraverso la formazione di un legame covalente con aa contenenti gruppi –OH e –SH, impedendo così l'ingresso del substrato.

CHIMOTRIPSINA

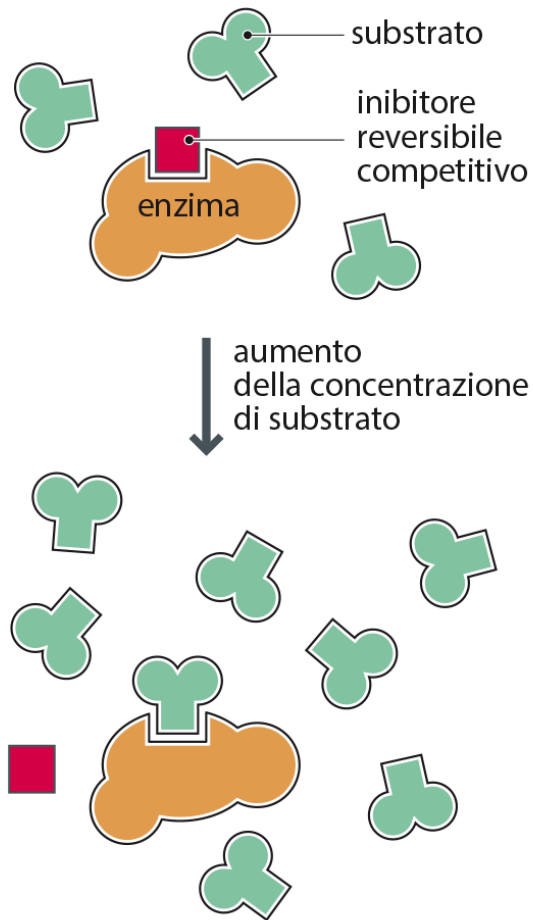


SINAPSI COLINERGICA

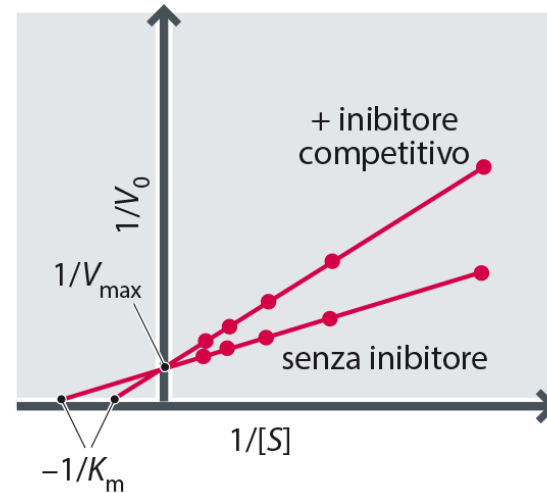


INIBIZIONE REVERSIBILE COMPETITIVA

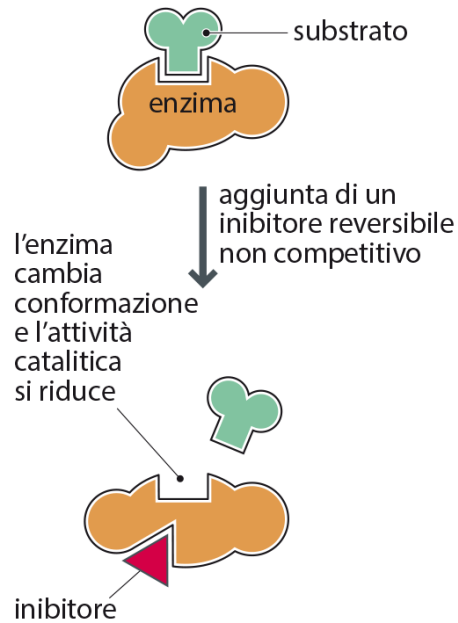
(A) l'effetto della concentrazione del substrato



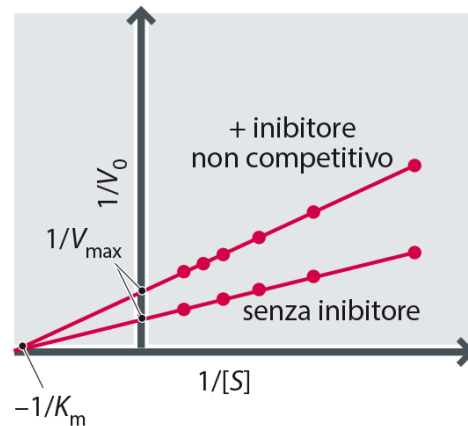
(B) l'effetto su V_{max} e K_m



(A) l'effetto del legame dell'inibitore



(B) l'effetto su V_{max} e K_m

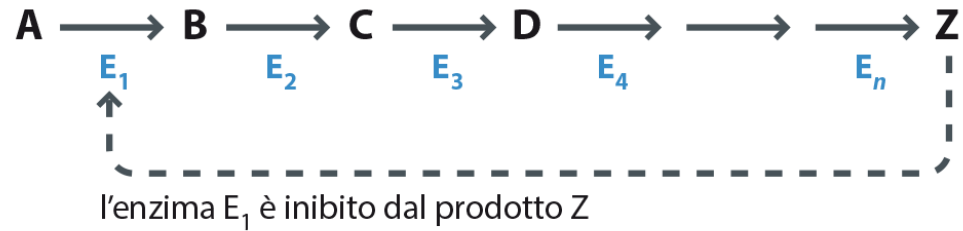


INIBIZIONE REVERSIBILE NON COMPETITIVA

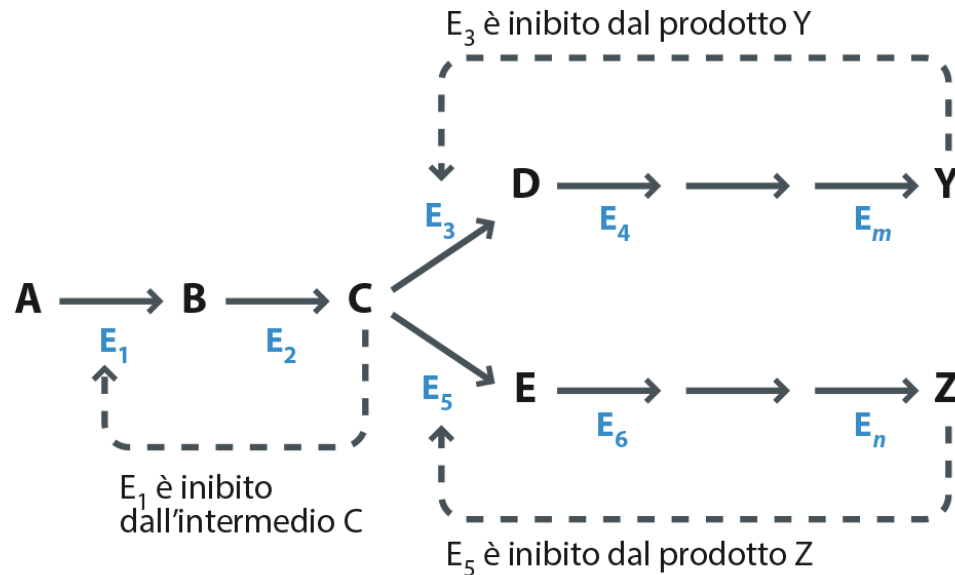
INIBIZIONE ALOSTERICA: l'inibitore si lega ad un sito allosterico e non al sito attivo, causando un cambiamento conformazionale che riduce l'attività catalitica dell'enzima.

INIBIZIONE A FEEDBACK DI UNA VIA METABOLICA

(A) regolazione a *feedback* di una via lineare



(B) regolazione a *feedback* di una via ramificata



Concetti chiave

1. Enzima

Un enzima è un catalizzatore biologico: aumenta la velocità di una reazione chimica senza essere consumato nella reazione stessa. La maggior parte delle reazioni biochimiche determina una variazione di energia libera (G).

2. Energia libera (G) e ΔG

G misura il contenuto energetico di un sistema: minore è G, più stabile è il sistema. ΔG è la variazione di energia libera tra substrati e prodotti. Le reazioni si distinguono in esoergoniche ($\Delta G < 0$, rilasciano energia) ed endoergoniche ($\Delta G > 0$, richiedono energia).

3. Stato di transizione ed energia di attivazione

Lo stato di transizione è un intermedio instabile ($A \cdots R \cdots B$) che si forma durante una reazione. L'energia di attivazione (ΔG^\ddagger) è la barriera energetica che la reazione deve superare: essa limita la velocità della maggior parte delle reazioni biochimiche.

4. Come agisce il catalizzatore

Un enzima stabilizza lo stato di transizione riducendo l'entropia del sistema, abbassando così il ΔG^\ddagger . Invece di affidarsi a collisioni casuali tra reagenti, l'enzima li lega orientandoli correttamente e accelerando la loro trasformazione in prodotti.

5. Accoppiamento energetico (ATP)

Le reazioni endoergoniche possono avvenire grazie all'accoppiamento energetico con l'idrolisi dell'ATP in ADP + Pi, che fornisce l'energia libera necessaria.

6. Specificità di legame del substrato

Ogni enzima riconosce e lega in modo selettivo il proprio substrato attraverso il sito attivo, garantendo alta specificità di reazione.

7. Fattori che influenzano la velocità enzimatica

Temperatura: la velocità aumenta con la temperatura fino a un massimo; oltre tale soglia l'enzima si denatura e perde attività. pH: la maggior parte degli enzimi ha un pH ottimale compreso tra 6,8 e 7,4; valori estremi causano denaturazione.

8. Cinetica enzimatica (Michaelis-Menten)

V_0 (velocità iniziale): velocità lineare con cui procede la reazione all'inizio. V_{max} : velocità massima raggiungibile dall'enzima. K_m (costante di Michaelis): concentrazione di substrato alla quale $V = \frac{1}{2} V_{max}$. Indica l'affinità dell'enzima per il substrato:

K_m bassa → alta affinità

K_m alta → bassa affinità

La relazione è descritta dall'equazione di Michaelis-Menten e visualizzabile con il grafico di Lineweaver-Burk (doppio reciproco).

9. Inibitori

Un inibitore è un composto che riduce l'attività dell'enzima. Si distinguono in:

Tipo	Meccanismo
Irreversibile	Forma un legame covalente con il sito attivo (es. DIFP su residui -OH o -SH). Esempio: chimotripsina e sinapsi colinergica.
Reversibile competitivo	Compete con il substrato per il sito attivo; aumenta il K_m apparente.
Reversibile non competitivo (allosterico)	Si lega a un sito allosterico, causando un cambiamento conformazionale che riduce l'attività catalitica senza modificare il K_m .

10. Inibizione a feedback

In una via metabolica, il prodotto finale può inibire un enzima a monte della via stessa (inibizione a feedback), regolando così l'intera cascata metabolica in modo efficiente.