

BASI DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO · LEZIONE 1 DI 5

Presentazione del corso e ripasso di enzimologia

Catalisi biologica, cinetica di Michaelis-Menten e l'enzima come futuro biomarcatore diagnostico

Contenuti

I	Presentazione del corso	15 min
II	Cosa sono gli enzimi	10 min
III	Le reazioni catalizzate e il meccanismo d'azione	20 min
IV	Cinetica enzimatica: Michaelis-Menten, K_M e V_{max}	20 min
V	Ruolo centrale nel metabolismo	15 min
VI	Visione moderna: enzimi in medicina e veterinaria	10 min

SEZIONE PRIMA · 15 MINUTI

Presentazione del corso

Cosa imparerete, con quali risorse, e come verrete valutati.

Il modulo nel corso integrato

Basi di Diagnostica di Laboratorio è un modulo del corso integrato "Semeiotica, Patologia e Diagnostica Medica Veterinaria" (14 CFU), dedicato alla diagnostica enzimatica in medicina veterinaria.

2 CFU

SSD BIOS-07/A · Biochimica

14 ore

10h frontali + 4h laboratorio

7 incontri

da 2 ore: 5 lezione + 2 laboratorio

Obiettivi formativi e Descrittori di Dublino

Comprendere come e perché gli enzimi vengono dosati nei fluidi biologici, e interpretarne le variazioni in chiave diagnostica e prognostica.

Conoscenza

Fondamenti di enzimologia clinica, enzimi e isoenzimi di interesse diagnostico, matrici biologiche, principi di dosaggio

Applicazione

Impostare e interpretare un dosaggio spettrofotometrico; calcolare attività e attività specifica; correlare profili enzimatici a quadri clinici

Autonomia di giudizio

Distinguere cause analitiche, fisiologiche e patologiche di una variazione enzimatica

Comunicazione

Descrivere un profilo enzimatico e refertare il risultato con terminologia corretta

Apprendimento

Integrare il dato di laboratorio con le altre discipline del corso integrato

I · IL CORSO

Prerequisiti

Chimica e biochimica generale

generale
Termodinamica ed equilibrio chimico,
cinetica di reazione

Struttura delle proteine

Livelli strutturali e relazione struttura-
funzione

Enzimologia generale

Catalisi, cinetica di Michaelis-Menten, K_M ,
 V_{max} , inibizione — richiamati oggi

Risorse didattiche

Testo di riferimento (consultazione)

Biochimica medica - Strutturale, metabolica e funzionale.
Siliprandi e Tettamanti – Ed. PICCIN

Piattaforma e-learning UNITE

Slide e dispense delle lezioni su Piattaforma e-learning UNITE
<https://elearning.unite.it/>

Report di sintesi

Un riassunto strutturato per ciascuna delle 5 lezioni

Flashcard, infografiche, quiz

Materiali di autovalutazione, scaricabili dal sito del corso

Modalità d'esame

- 01 Prova scritta con quesiti a **risposta multipla**, estratti da un database di domande **inedite**
- 02 Erogazione e correzione automatica sulla piattaforma e-learning di Ateneo
- 03 Risposta errata: penalità proporzionale alla gravità dell'errore
- 04 Soglia di sufficienza: **18/30**

SEZIONE SECONDA · 10 MINUTI

Cosa sono gli enzimi

Definizione, natura chimica e origine della specificità catalitica.

Definizione di enzima

Proteina — in rari casi RNA — dotata di attività catalitica, capace di accelerare una specifica reazione chimica senza alterarne l'equilibrio termodinamico.

Non è né reagente né prodotto: partecipa alla reazione senza essere consumato.

Agisce sul *meccanismo* di reazione, non sulla sua termodinamica.

TABELLA 11.1 Potere catalitico riferito ad alcuni enzimi

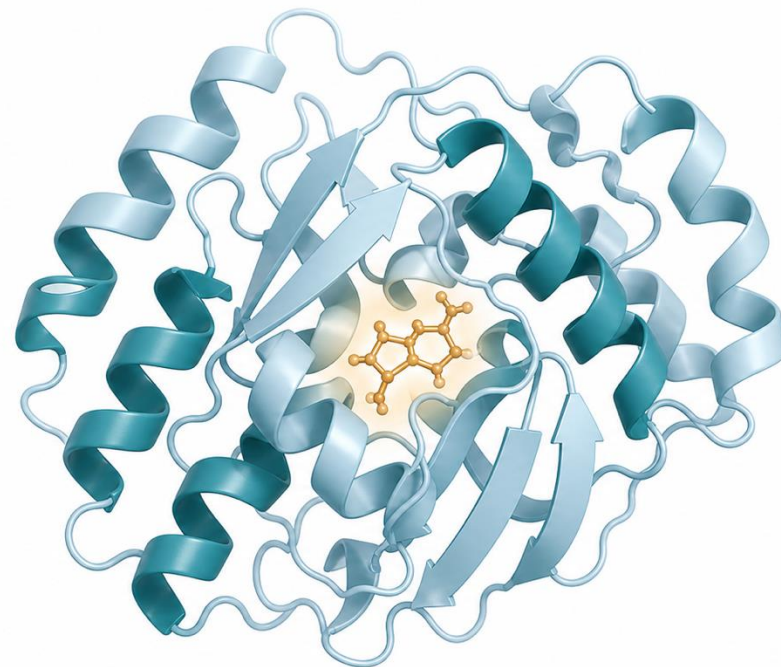
Enzima	Velocità della reazione non enzimatica (s^{-1})	Velocità della reazione enzimatica (s^{-1})	Accelerazione della velocità
Anidrasi carbonica	$1,3 \times 10^{-1}$	1×10^6	$7,7 \times 10^6$
Corismato mutasi	$2,6 \times 10^{-5}$	50	$1,9 \times 10^6$
Triosio fosfato isomerasi	$4,3 \times 10^{-6}$	4300	$1,0 \times 10^9$
Carbossipeptidasi A	$3,0 \times 10^{-9}$	578	$1,9 \times 10^{11}$
Nucleosidasi AMP	$1,0 \times 10^{-11}$	60	$6,0 \times 10^{12}$
Nucleosidasi di stafilococco	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$

Fonte: Radizcka, A., Wolfenden, R. (1995). *Science* 267, 91.

Specificità: il sito attivo

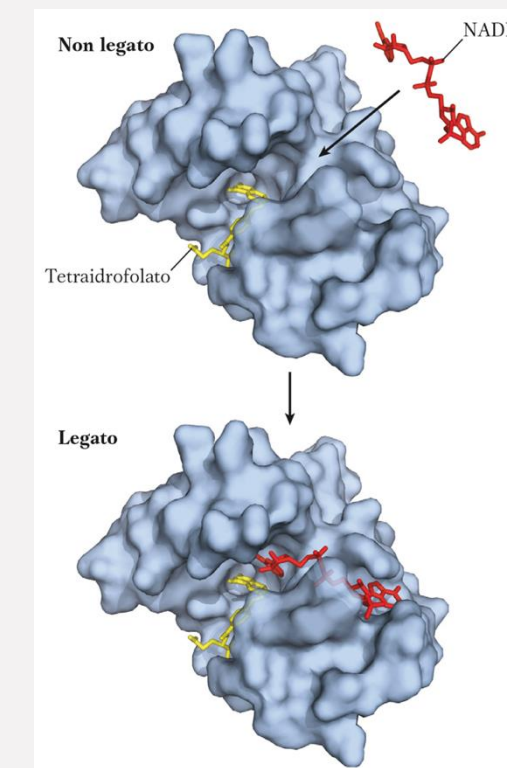
Relazione struttura-funzione

Il sito attivo è una regione tridimensionale complementare al substrato, non un semplice punto di contatto.



Struttura nativa

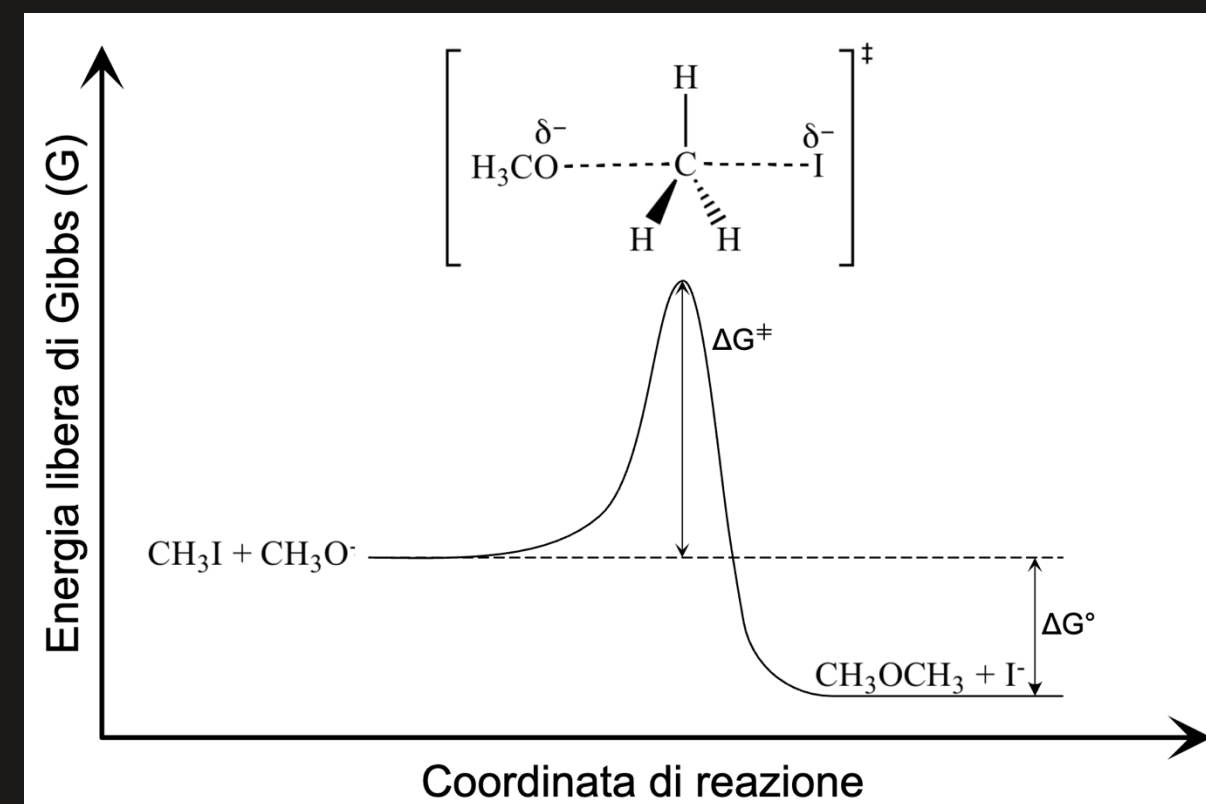
La complementarità è codificata dalla sequenza aminoacidica, tradotta nella conformazione tridimensionale nativa.



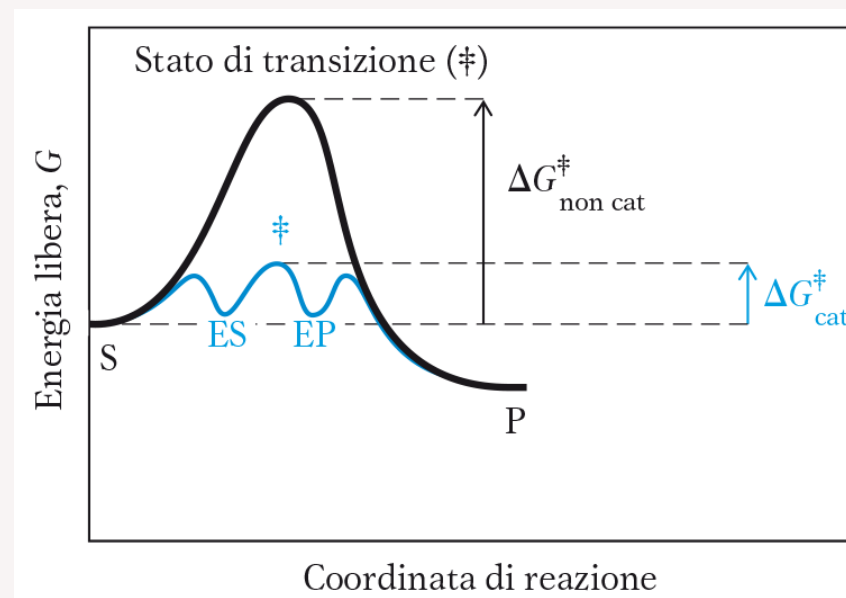
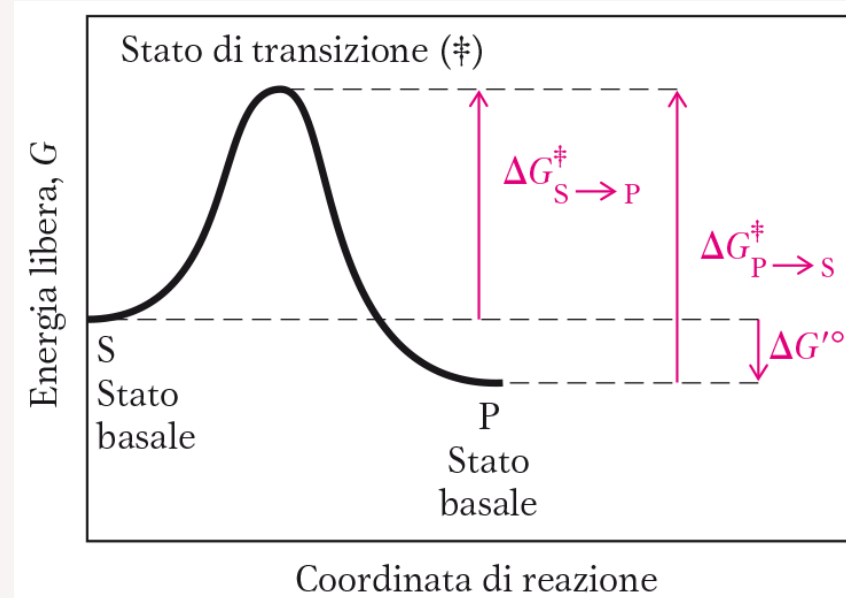
SEZIONE TERZA · 20 MINUTI

Le reazioni catalizzate e il meccanismo d'azione

Come un enzima accelera una reazione senza alterarne l'esito termodinamico.



Energia di attivazione



L'enzima abbassa la barriera cinetica $\Delta G^\ddagger$, accelerando la reazione.

Il $\Delta G'^\circ$ della reazione resta identico: né la stabilità termodinamica né il punto di equilibrio della reazione cambiano.

Si abbrevia il *tempo* per arrivare all'equilibrio, non si sposta il punto di equilibrio.

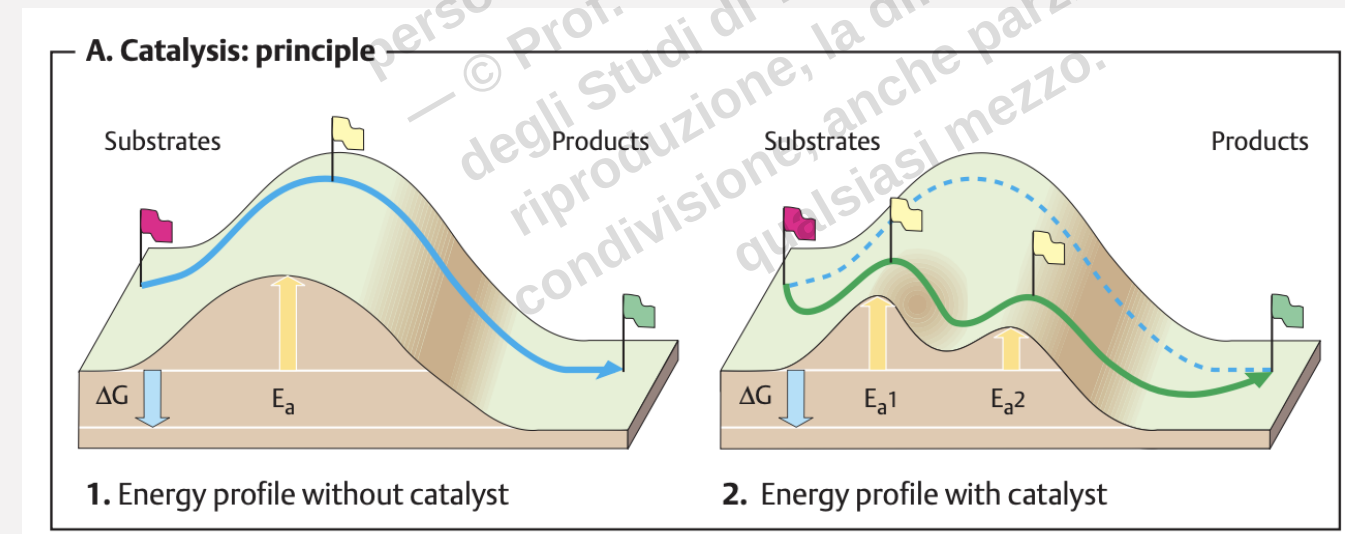
Stabilità termodinamica e stabilità cinetica

Termodinamica

Stabilisce se e *quanto* una reazione può procedere ($\Delta G'^{\circ}$, $\Delta G'$). Fuori dalla portata dell'enzima.

Cinetica

Stabilisce *quanto rapidamente* ($\Delta G^{\ddagger}$). Unico livello su cui l'enzima interviene.



Conseguenza Con enzima presente in quantità sufficiente e attività massima, la reazione raggiunge il proprio equilibrio reversibile — non oltre.

Complesso enzima-substrato

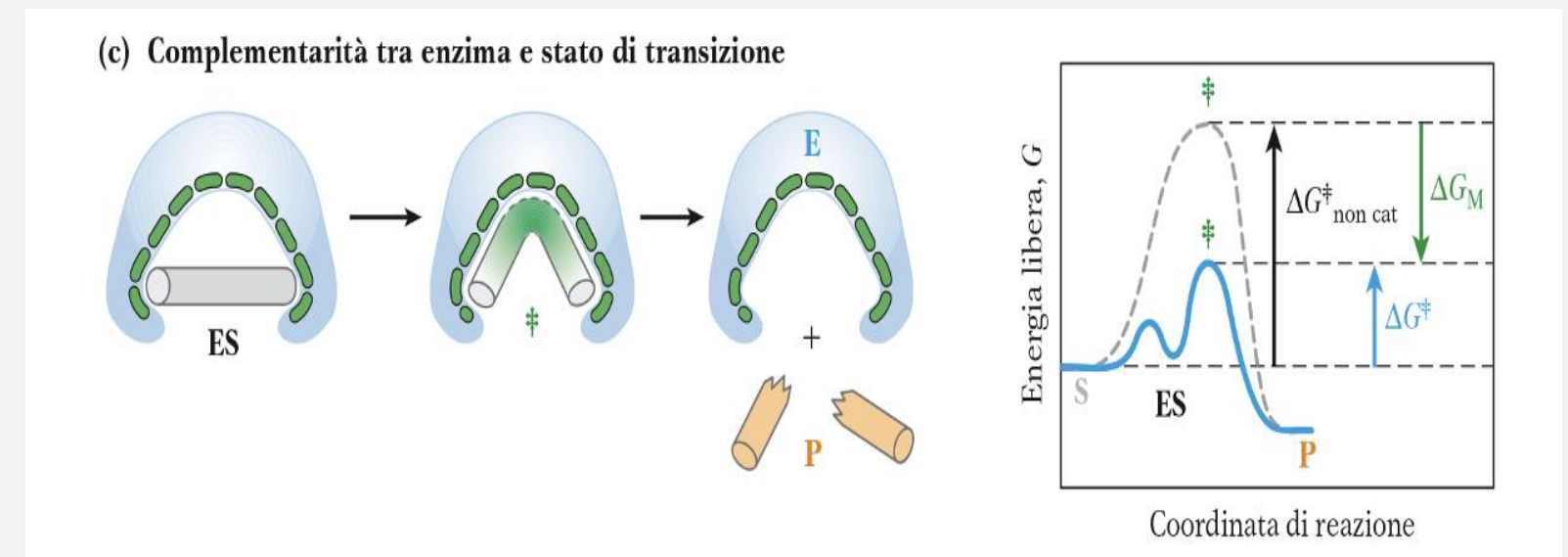
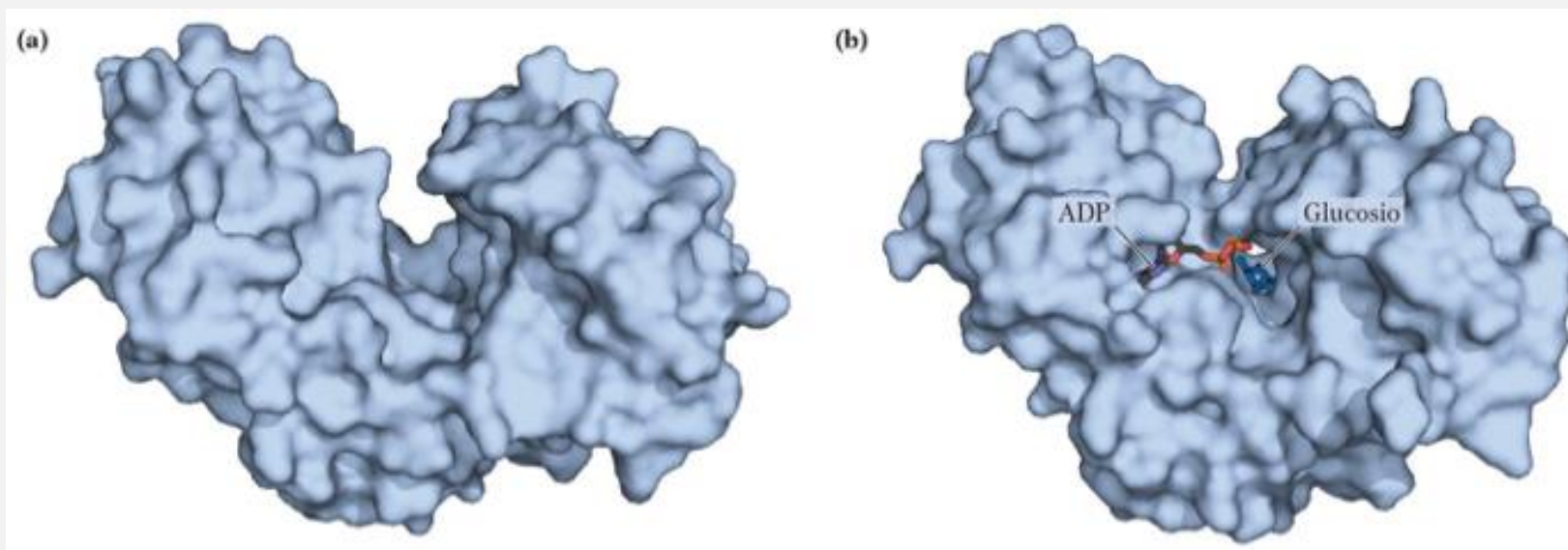


Adattamento indotto

Il legame del substrato rimodella reciprocamente enzima e substrato — non un incastro rigido preformato.

Stabilizzazione dello stato di transizione

La complementarità massima è verso lo stato di transizione: da qui deriva l'accelerazione della reazione.



III · MECCANISMO

Condizioni fisiologiche della catalisi

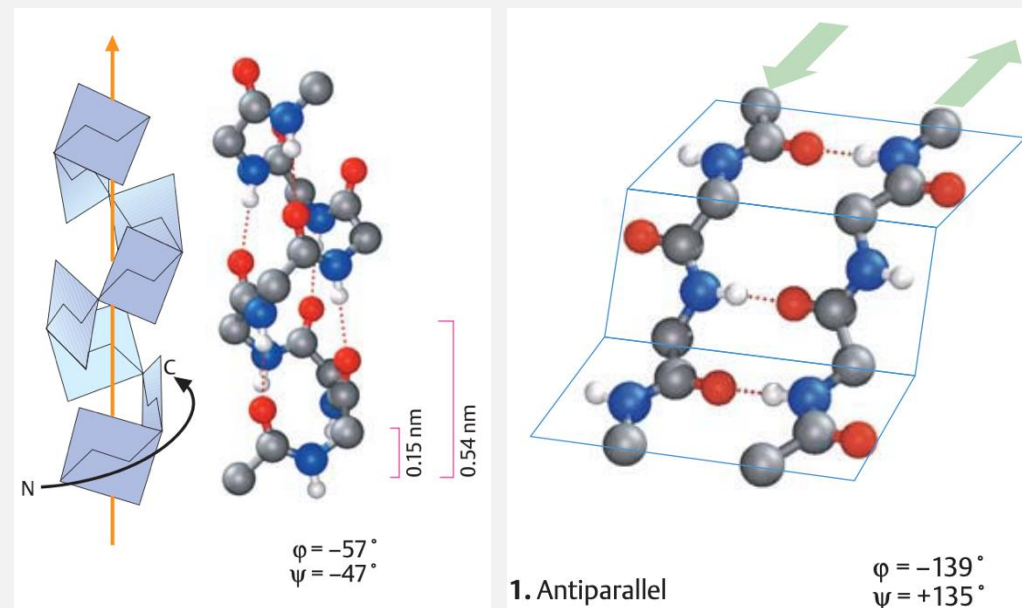
Senza catalisi, la chimica delle reazioni biologiche sarebbe difficilmente realizzabile in soluzione acquosa diluita, a temperatura, pressione e pH ordinari.

Eppure, in ogni istante, una cellula realizza migliaia di reazioni diverse — tutte coordinate e integrate tra loro.

I livelli di struttura come supporto della funzione

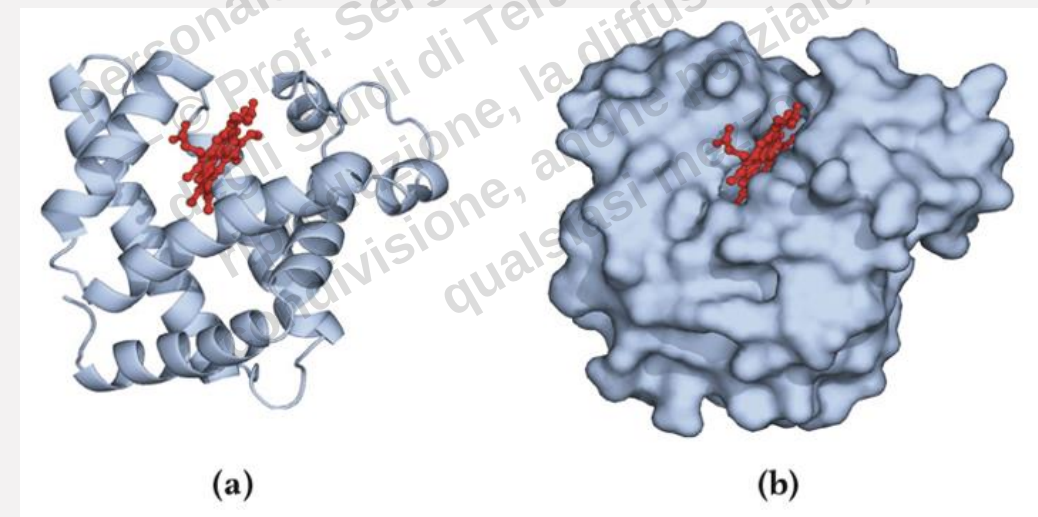
Secondaria

Eliche e foglietti che organizzano localmente la catena polipeptidica



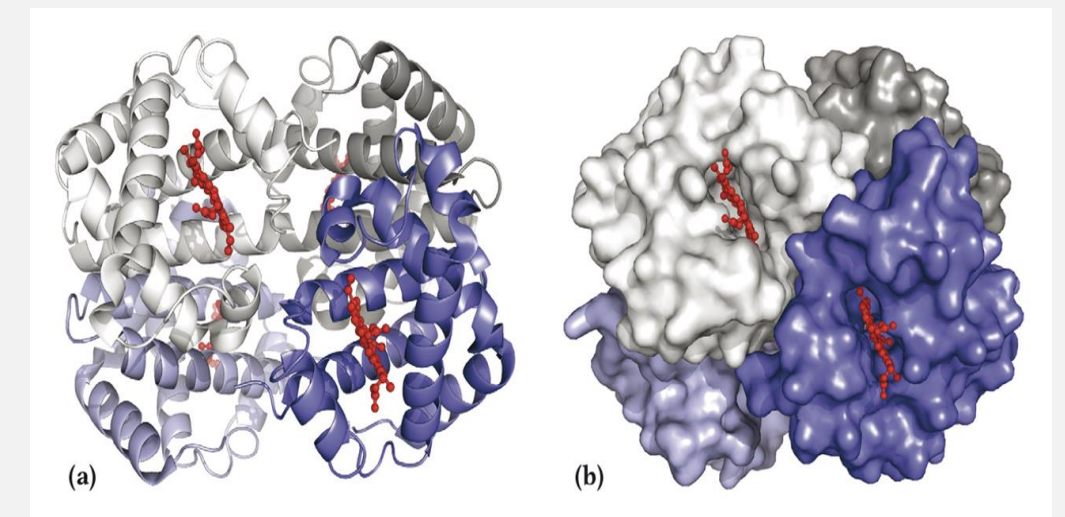
Terziaria

Ripiegamento tridimensionale completo: definisce forma e sito attivo



Quaternaria

Assemblaggio di più subunità — rilevante per molti isoenzimi (Lezione 03)



Questa disposizione tridimensionale — la *struttura nativa* — è ciò che chiameremo, in sezione V, l'informazione dell'enzima.

SEZIONE QUARTA · 20 MINUTI

Cinetica enzimatica: Michaelis-Menten, K_M e V_{max}

Prerequisito esplicito del syllabus: da qui dipende la logica di ogni dosaggio enzimatico che vedremo dalla prossima lezione.

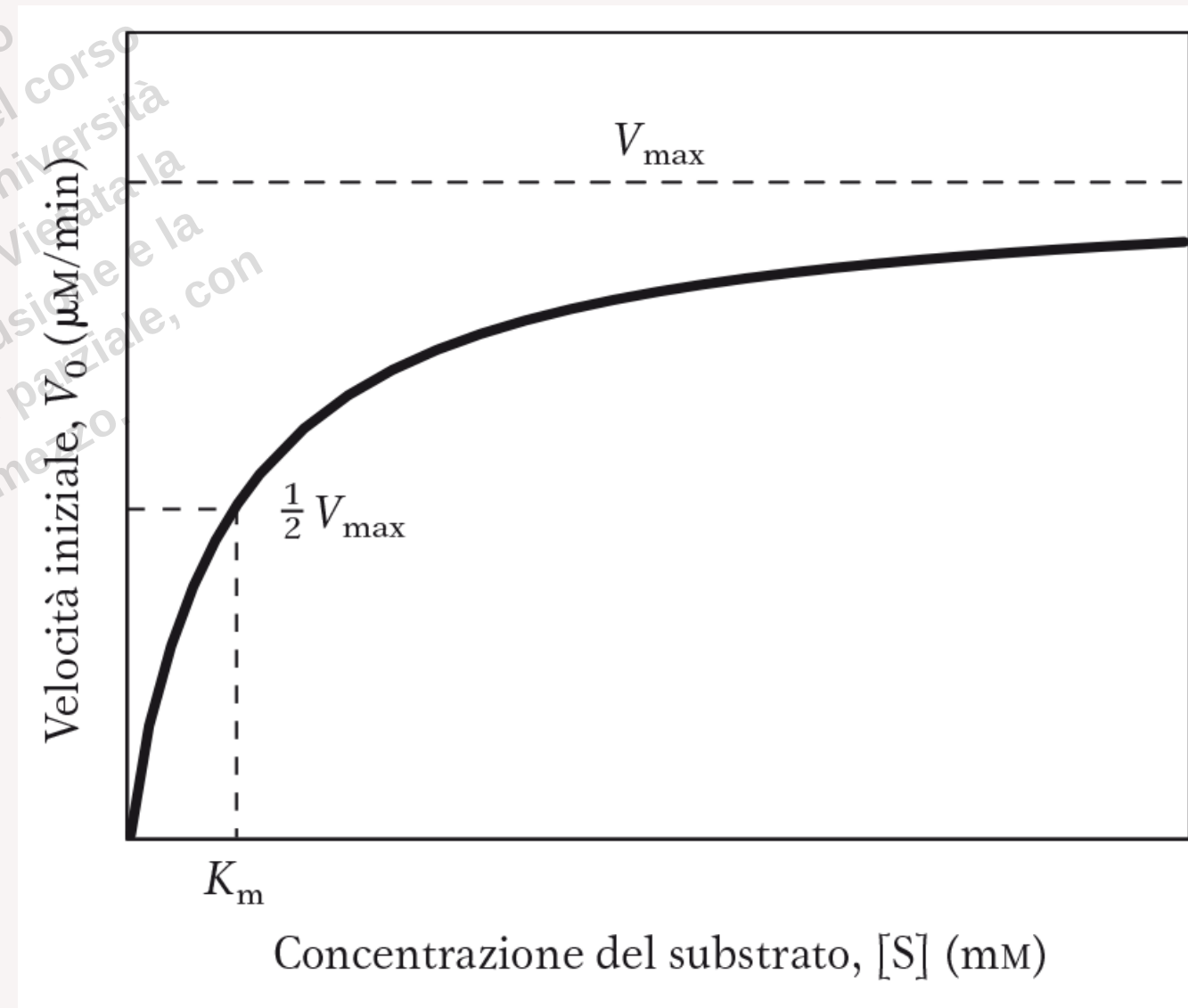
IV

L'equazione di Michaelis-Menten

$$V_0 = V_{\max} [S] / (K_M + [S])$$

Descrive la relazione tra velocità iniziale di reazione (V_0) e concentrazione di substrato $[S]$, a concentrazione di enzima fissata.

L'andamento è *iperbolico* : crescita quasi lineare a basso $[S]$, plateau a $[S]$ elevato (condizione di saturazione).



IV · CINETICA

$V_{\max}$: substrato saturante

Velocità massima raggiunta quando il substrato è in eccesso: ogni sito attivo disponibile è occupato, l'enzima lavora al massimo regime.

È questa la condizione che un dosaggio diagnostico deve riprodurre: solo a $V_{\max}$ la velocità osservata dipende esclusivamente dalla concentrazione di enzima — non da quella di substrato.

$$V_{max} = k_{cat}[E]_T$$

IV · CINETICA

K_M : affinità enzima-substrato

Definizione

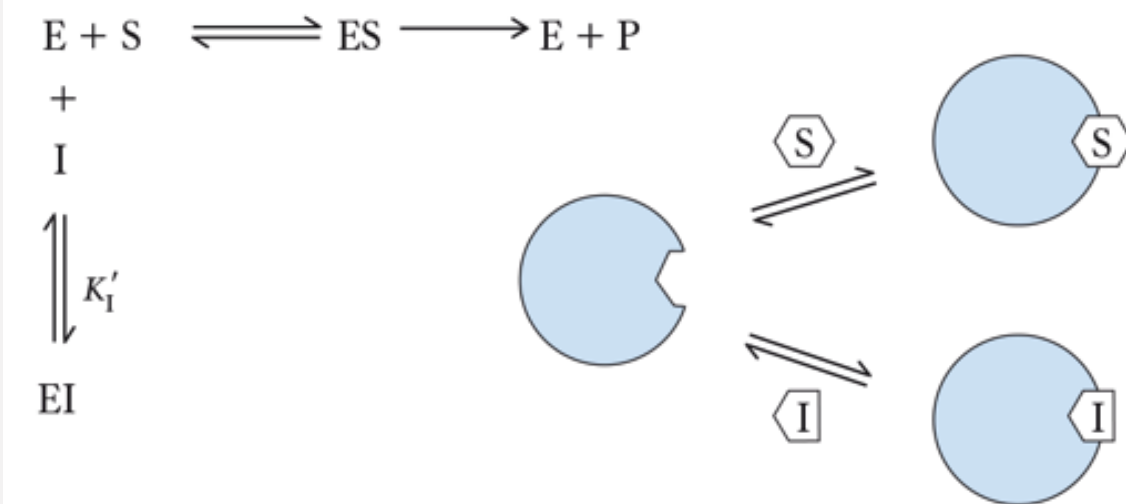
Concentrazione di substrato alla quale $V_0 = V_{\max}/2$.

Interpretazione

Indice *inverso* di affinità: K_M basso $\Rightarrow$ alta affinità enzima-substrato.

Inibizione competitiva

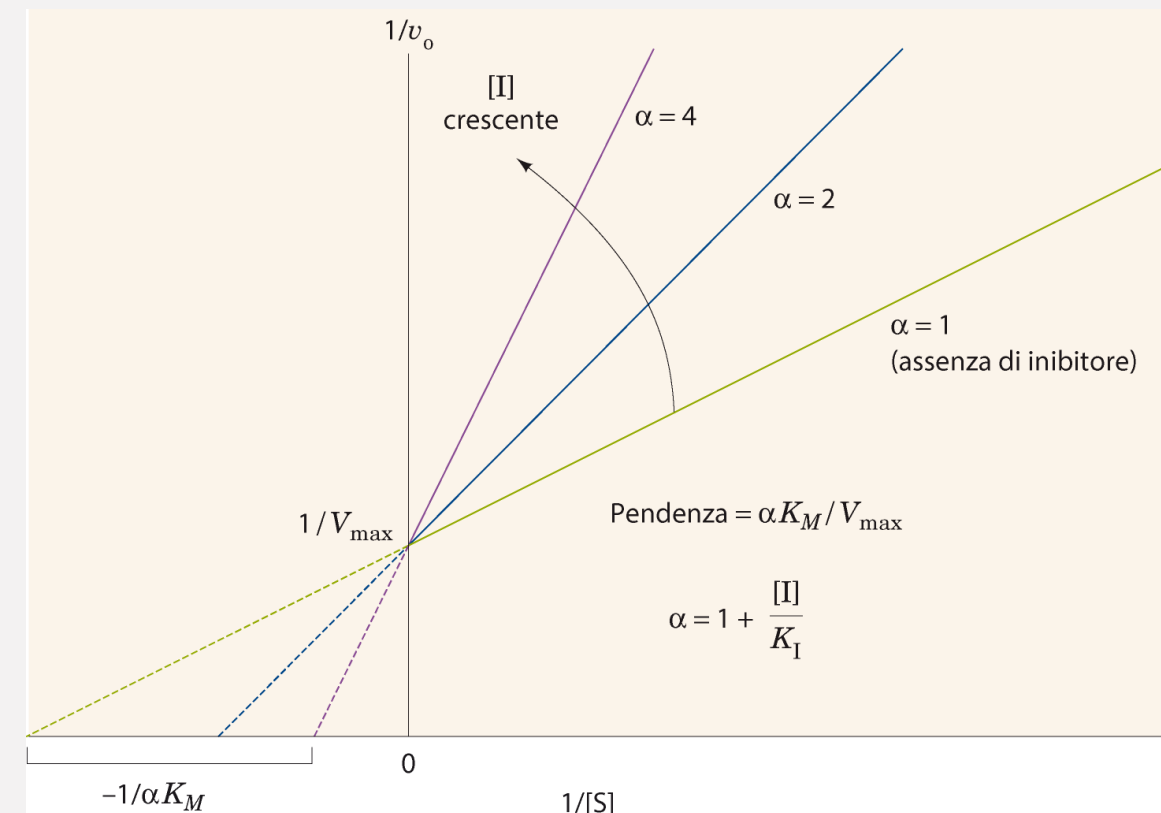
(a) Inibizione competitiva



L'inibitore compete con il substrato per lo stesso sito attivo, spesso per somiglianza strutturale.

K_M apparente **aumenta**; V_{max} resta **invariata**.

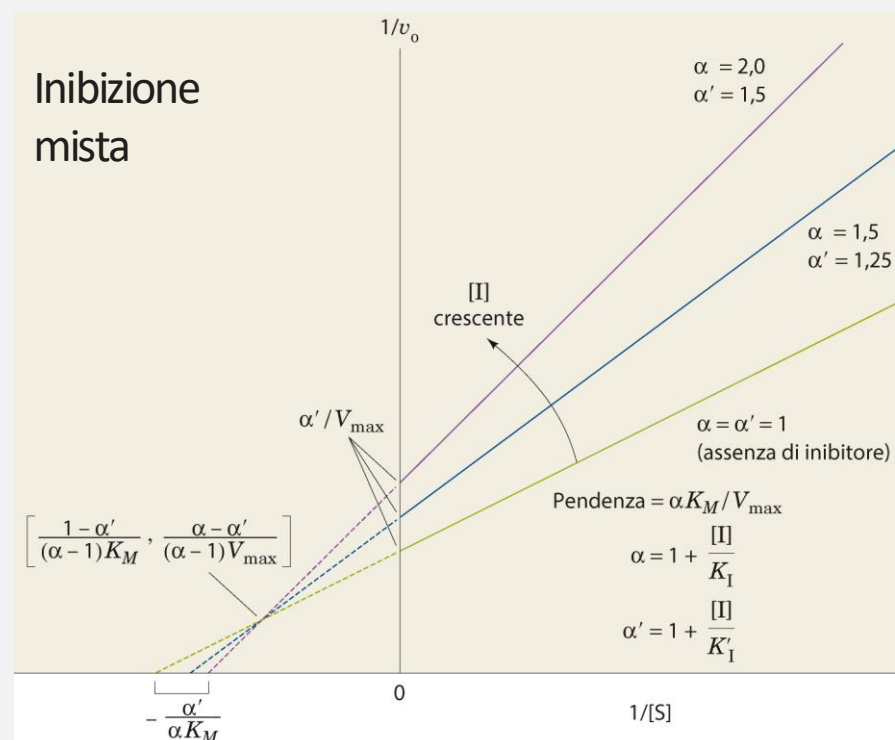
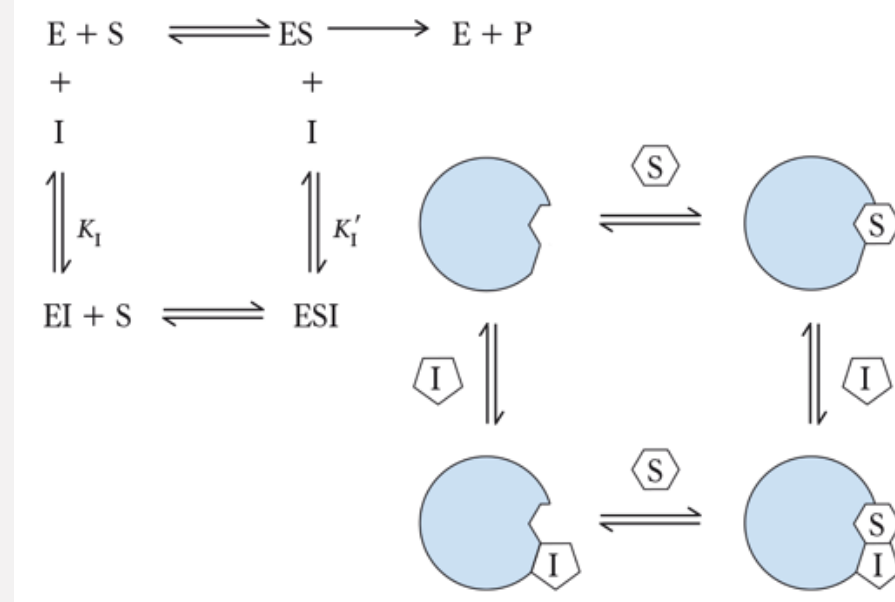
Effetto superabile aumentando la concentrazione di substrato.



ESEMPIO: metotrexato, che compete con l'**acido folico** per la **diidrofolato reduttasi**.

Inibizione noncompetitiva pura

(c) Inibizione mista



L'inibizione noncompetitiva può essere di due tipi:

1. **pura** (caso particolare: $K_I = K'_I$)

2. **mista** (caso $K_I \neq K'_I$)

L'inibitore **noncompetitivo puro** si lega a un sito diverso da quello attivo, su E o su ES indifferentemente ($K_I = K'_I$).

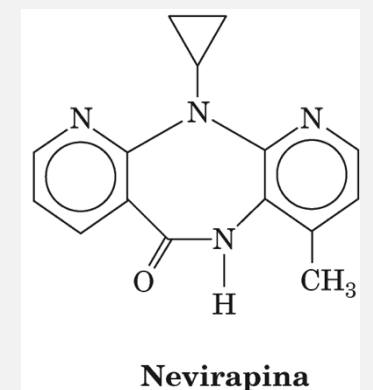
Esempio:

K_M resta **invariata**; $V_{\max}$ **diminuisce**.

Effetto non superabile aumentando il substrato.

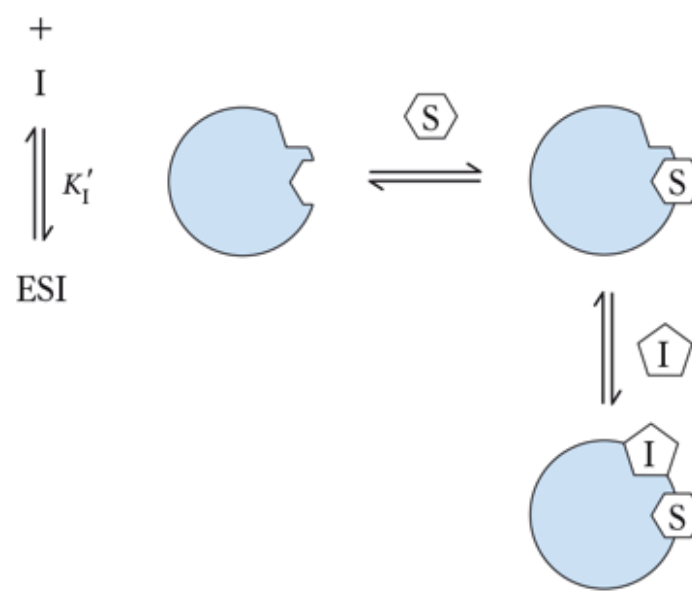
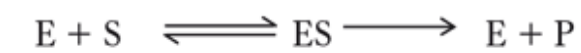
ESEMPIO: Nevirapina sulla trascrittasi inversa di HIV-1

Si lega a una tasca idrofobica allosterica ~10 Å dal sito catalitico. Il legame è indipendente dalla presenza del dNTP e del templat: nevirapina si lega con la stessa affinità a E e a ES ($K_I = K'_I$). Non impedisce l'ingresso dei substrati — ma distorce la geometria della triade catalitica di aspartati, bloccando il passo chimico di trasferimento del fosforile.



Inibizione incompetitiva (o incompetitiva)

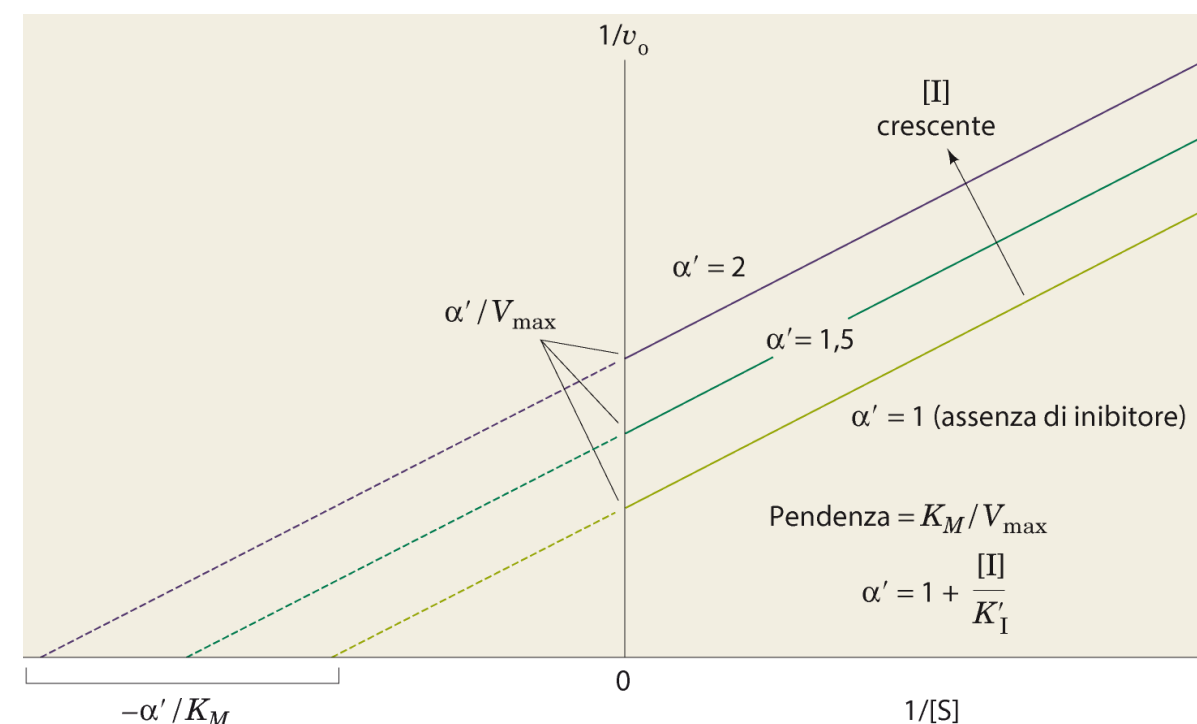
(b) Inibizione incompetitiva



L'inibitore incompetitivo si lega esclusivamente al complesso enzima-substrato (ES), mai all'enzima libero: lo stabilizza e lo sottrae alla catalisi.

K_M apparente **diminuisce**; V_{max} **diminuisce**.

Effetto non superabile aumentando la concentrazione di substrato.



ESEMPIO: L-fenilalanina, che inibisce selettivamente l'isoenzima placentare della fosfatasi alcalina.

Confronto tra i tipi di inibizione

TIPO	SITO DI LEGAME	K_M	V_{MAX}	SUPERATA DA ECCESSO DI [S]
Competitiva	Sito attivo (E)	aumenta	invariata	Sì
Noncompetitiva pura	Sia su E che ES	invariata	diminuisce	No
Incompetitiva (o acompetitiva)	Solo su ES	diminuisce	diminuisce	No

TABELLA 12.2 Effetti degli inibitori sulle reazioni di Michaelis-Menten^a

Tipo di inibizione	Equazione di Michaelis-Menten	Equazione di Lineweaver-Burk	Effetto dell'inibitore
Nessuna	$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$	Nessuno
Competitiva	$v_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$	Determina un aumento di K_M^{app}
Incompetitiva	$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_M + \alpha' [S]} = \frac{(V_{max} / \alpha') [S]}{K_M / \alpha' + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$	Provoca una diminuzione di K_M^{app} e V_{max}^{app}
Mista (non competitiva)	$v_o = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} = \frac{(V_{max} / \alpha') [S]}{(\alpha / \alpha') K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$	Causa un abbassamento di V_{max}^{app} ; può far aumentare o diminuire K_M^{app}
^a $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$ e $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$.			

IV · CINETICA

Perché l'inibizione conta in clinica

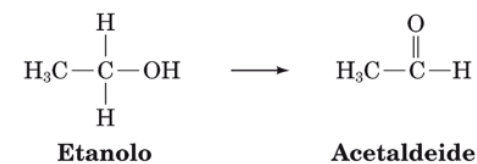
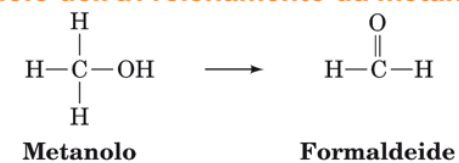
Tossicologia

Farmaci, veleni e insetticidi organofosforici agiscono spesso come inibitori enzimatici — ne ripareremo con la colinesterasi in NB05.

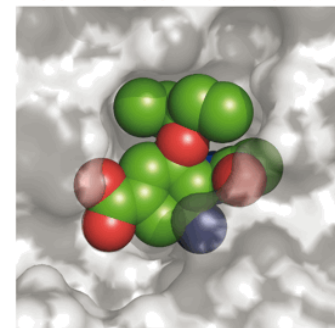
Strumento analitico

L'inibizione selettiva (chimica, termica, immunologica) distingue isoenzimi nello stesso campione — tema di Lezione 03.

Inibizione competitiva: il trattamento con etanolo dell'avvelenamento da metanolo



Il complesso Oseltamivir (Tamiflu®)-neuroamminidasi del virus dell'influenza aviaria



Oseltamivir (Tamiflu)
PDBid 2HU4

SEZIONE QUINTA · 15 MINUTI

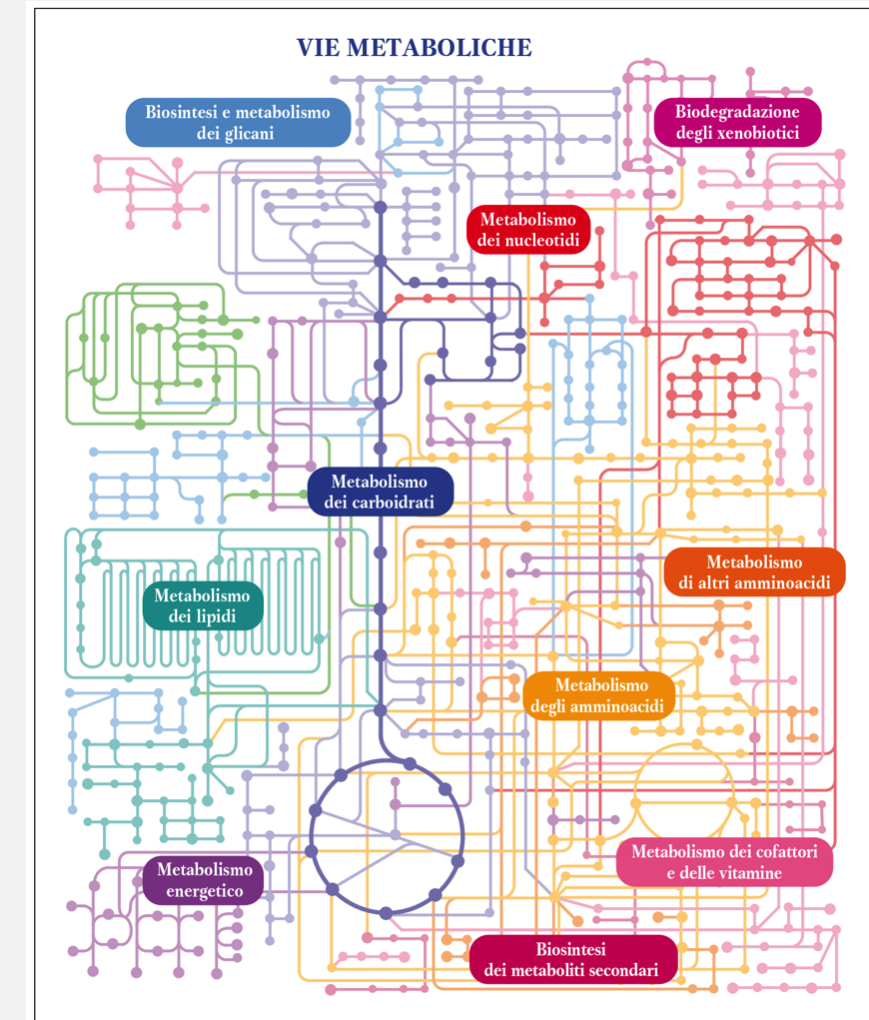
Ruolo centrale nel metabolismo

Dall'enzima singolo alla rete coordinata di reazioni che è il metabolismo.

V · METABOLISMO

Il metabolismo come rete coordinata

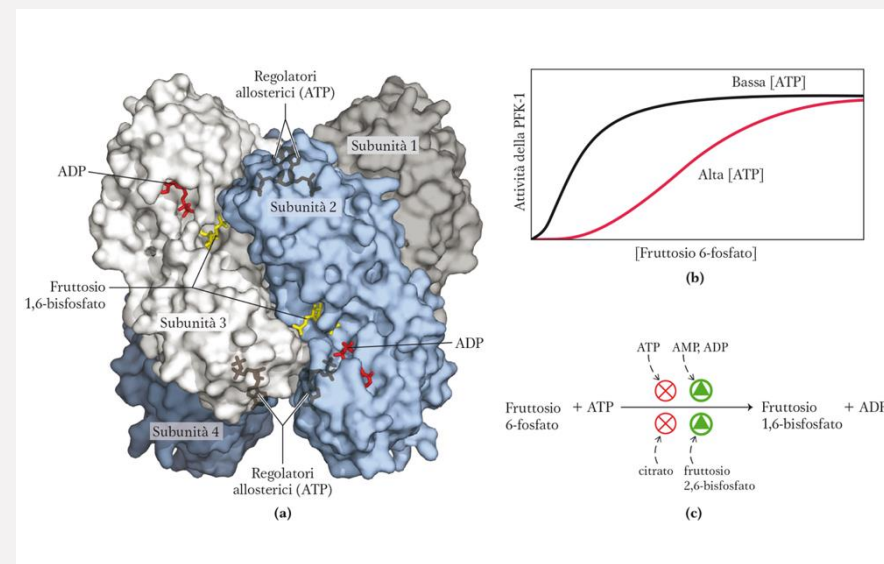
Gli enzimi definiscono e regolano l'intricata rete di reazioni chimiche di un sistema vivente, facendo avvenire nel posto e al momento opportuno ciò che serve alla cellula.



Regolazione dell'attività enzimatica

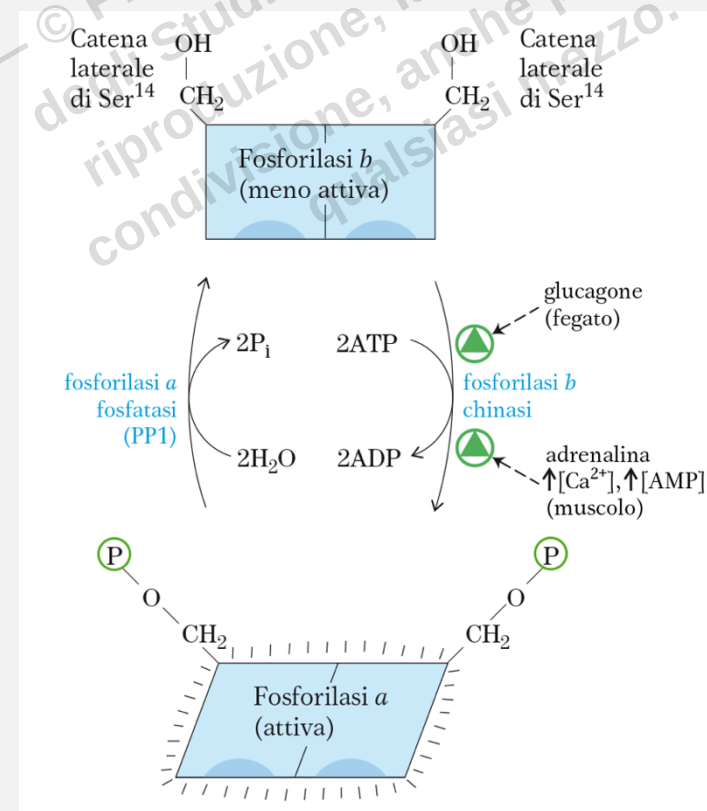
Allosteria

Legame di un effettore a un sito diverso da quello attivo, che modula la conformazione e l'attività dell'enzima



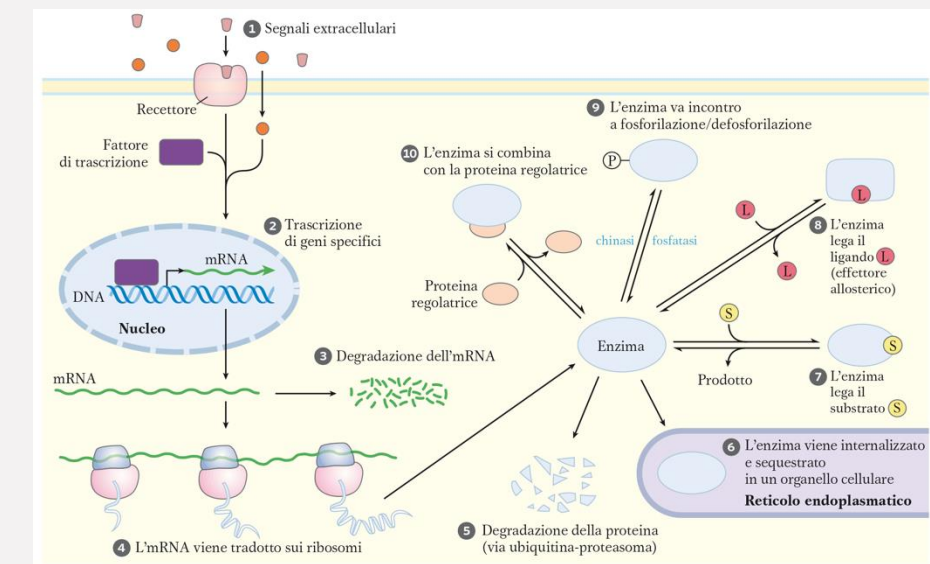
Modificazioni covalenti

Fosforilazione, altre modifiche reversibili che attivano o inattivano rapidamente l'enzima



Espressione genica

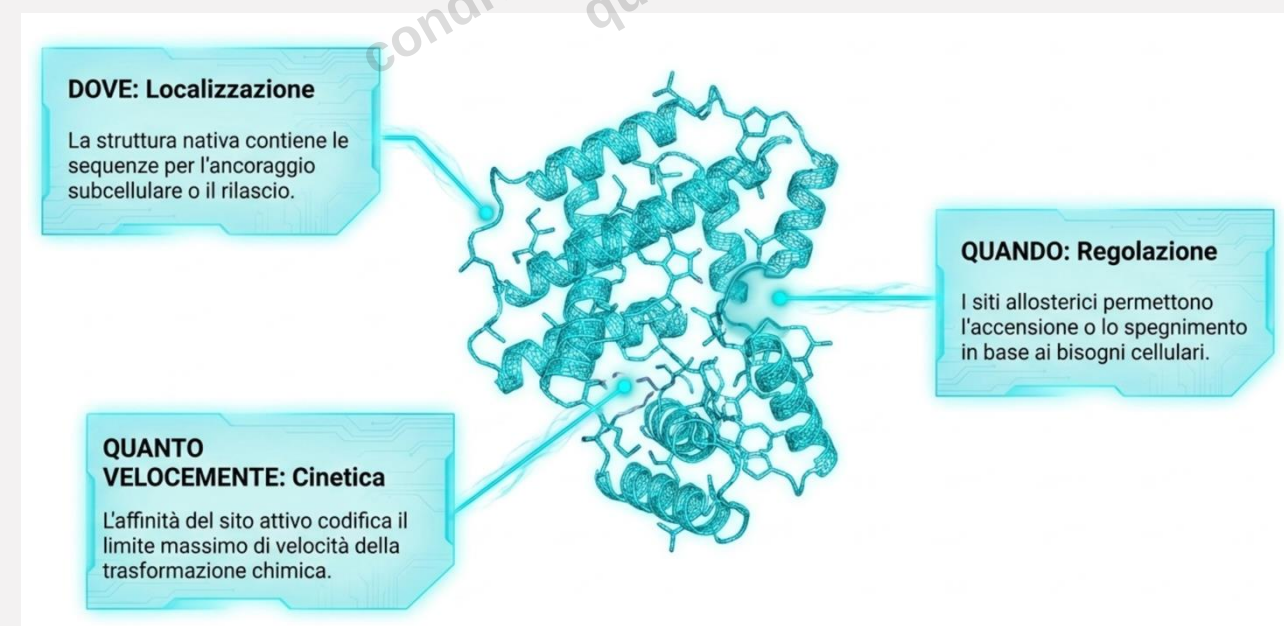
Controllo di quanto enzima viene sintetizzato — base dell'induzione che rivedremo in Lezione 04



Per fare c'è bisogno di energia, per sapere cosa fare c'è bisogno di informazione.

— Seth Lloyd

L'enzima fornisce l'energia (abbassando $\Delta G^\ddagger$) e insieme l'informazione strutturale che stabilisce dove, quando e a quale velocità una reazione avviene.



V · METABOLISMO

Isoenzimi: un'anticipazione

La stessa reazione può essere catalizzata da *forme molecolari diverse* dello stesso enzima, espresse in modo tessuto-specifico. Questa varietà — gli **isoenzimi** — sarà il ponte verso la seconda metà del corso: la forma molecolare rilevata nel plasma comincia a dire da quale organo l'enzima proviene.

SEZIONE SESTA · 10 MINUTI

Visione moderna: enzimi in medicina e medicina e veterinaria

Dalla biochimica di base alla diagnostica clinica veterinaria.

VI · PROSPETTIVE

Dalla biochimica alla clinica: l'enzima come biomarcatore

Un enzima intracellulare che compare nel plasma, o un'attività enzimatica plasmatica che cambia, è un **segnale indiretto** di danno o di funzione d'organo — non un semplice dato biochimico.

Questo principio guiderà le prossime quattro lezioni.

Applicazioni biotecnologiche moderne

Reagenti diagnostici

La specificità enzimatica è alla base dei dosaggi spettrofotometrici accoppiati che vedremo dalla prossima lezione

Ingegneria enzimatica

Modifica mirata di enzimi naturali per ottimizzarne stabilità e selettività in ambito industriale e diagnostico

Terapie enzimatiche

Terapie sostitutive per deficit enzimatici congeniti, laddove l'enzima manca invece di essere in eccesso

VI · PROSPETTIVE

Perché la diagnostica enzimatica in veterinaria

Specie diverse esprimono **pattern enzimatici organo-specifici diversi** : intervalli di riferimento, isoenzimi dominanti e persino l'affidabilità diagnostica di un singolo enzima cambiano da specie a specie.

Questa variabilità di specie sarà un filo conduttore delle prossime quattro lezioni.

Le prossime quattro lezioni

Lezione 02 Contesti diagnostici, matrici biologiche, unità di attività catalitica e condizioni del dosaggio enzimatico

Lezione 03 Spettrofotometria, isoenzimi, origine degli enzimi nel sangue e compartimentazione subcellulare

Lezione 04 Enzimi di citolisi: transaminasi, LDH, CK e i marcatori dell'infarto del miocardio

Lezione 05 Fosfatasi, colestasi, pancreas, colinesterasi e lettura integrata dei profili enzimatici

SINTESI

Punti chiave

- 01** L'enzima agisce sulla cinetica, mai sulla termodinamica: abbassa $\Delta G^\ddagger$, non altera ΔG .
1
- 02** K_M e V_{max} descrivono affinità e velocità massima: la logica di ogni dosaggio parte da qui.
2
- 03** L'enzima è un processore di informazione: struttura e regolazione decidono dove, quando, quanto.
3
- 04** Da qui in avanti: l'enzima nel plasma come biomarcatore, non solo come catalizzatore.
4