

AVVERTENZA

Il presente materiale didattico è messo a disposizione degli studenti per facilitare la comprensione degli argomenti trattati nel corso delle lezioni e lo studio individuale

Non sostituisce il libro di testo che rappresenta lo strumento fondamentale per lo studio della **Biochimica generale e molecolare**

Le immagini utilizzate sono tratte dal libro di testo consigliato e da quelli da consultare indicati nelle diapositive 3-7 del file
INTRODUZIONE

Enzimi

- Catalizzatori delle reazioni che avvengono nei sistemi biologici
- Sono proteine altamente specializzate per le quali è necessaria l'integrità della conformazione nativa e alle volte anche **cofattori**:
 - Ioni inorganici
 - Coenzimi

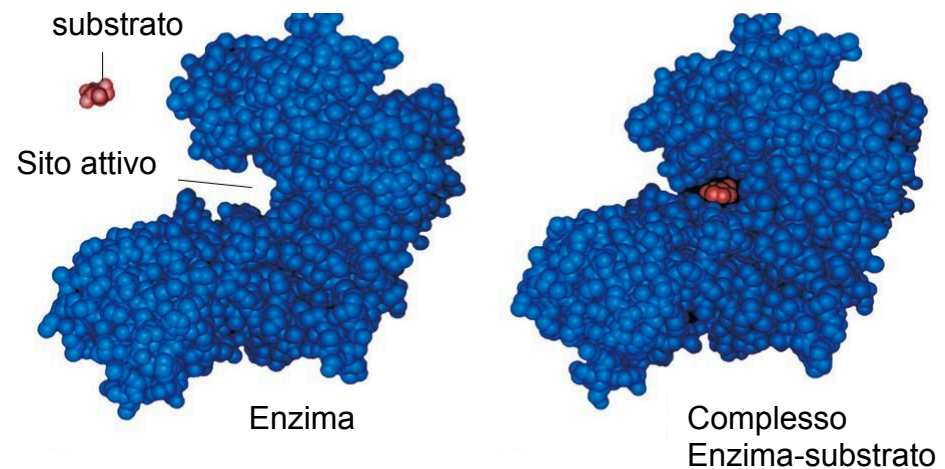
Oloenzima = **coenzima e/o ioni inorganici + apoenzima**

- Hanno elevato potere catalitico
- Lavorano in soluzione acquose e in condizioni blande di T e pH
- Hanno elevato grado di specificità

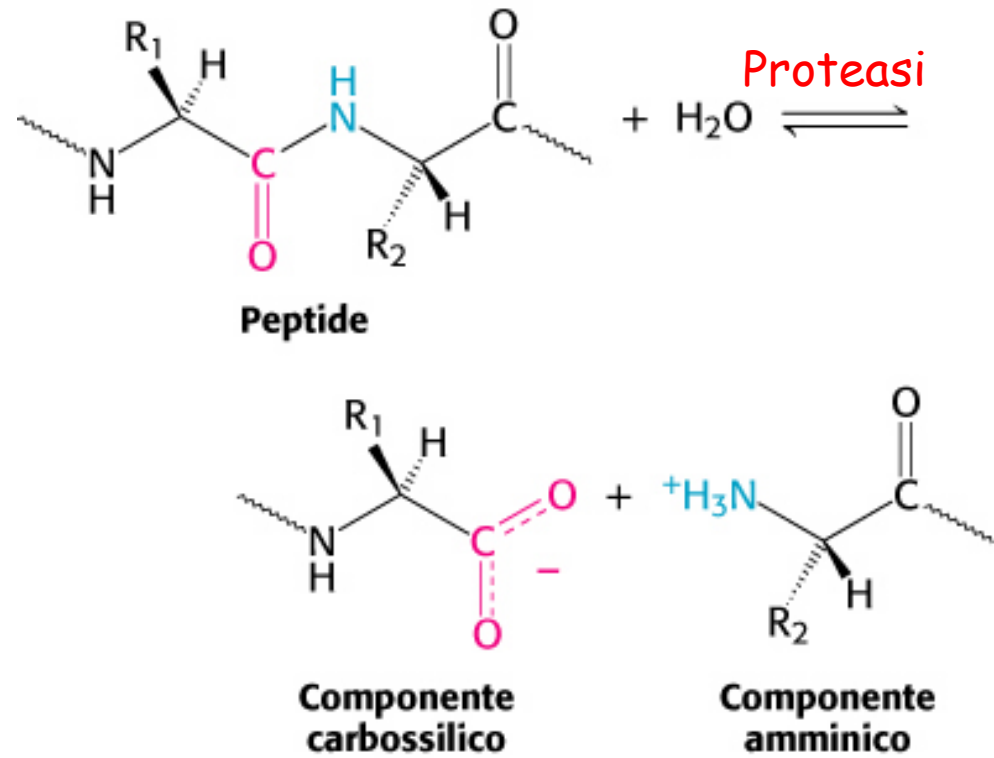
Enzimi

- La funzione di un catalizzatore è quella di aumentare la velocità di una reazione e gli enzimi l'aumentano da 10^5 a 10^{17} volte (alto potere catalitico)
- In condizioni di reazione blande: $37\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7
- Bastano quantità piccolissime di enzima: concentrazioni 10^{-9} M (nanomolari)
- Con alta specificità di substrato

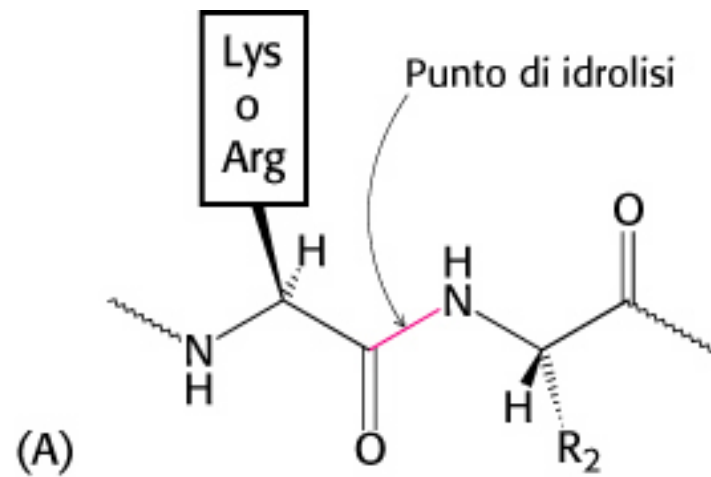
- Il **sito attivo** è una cavità o fenditura
- Il **sito attivo** occupa una piccola parte del volume totale dell'enzima
- Il **sito attivo** è formato da residui anche distanti nella sequenza amminoacidica
- Il **substrato** interagisce con il sito attivo mediante interazioni deboli



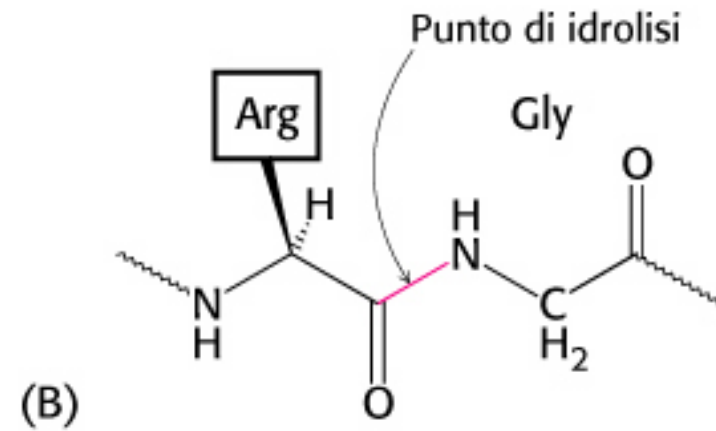
Specificità di substrato



Specificità di substrato



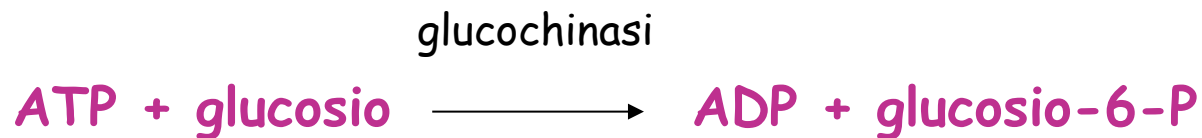
Tripsina



Trombina

Classificazione internazionale degli enzimi

1. Ossidoreduttasi
2. Transferasi
3. Idrolasi
4. Liasi
5. Isomerasi
6. Ligasi



E.C 2.7.1.2 glucochinasi

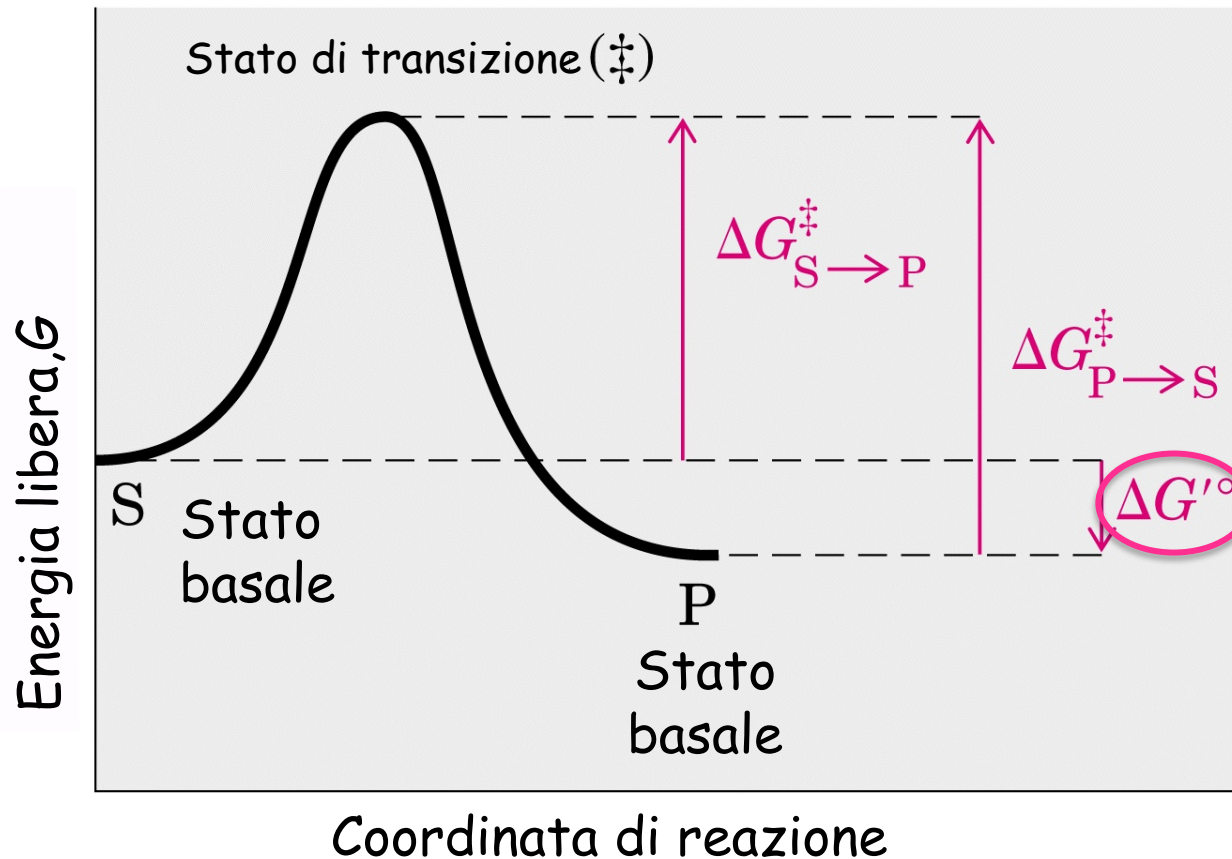
E.C 2.7.1.1 esochinasi

Equilibri delle reazioni



$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$$



$$\Delta G'^{\circ} = G'^{\circ}p - G'^{\circ}s$$

Cinetica delle reazioni

La velocità di una reazione dipende dalla concentrazione del reagente e dalla costante di velocità **k**



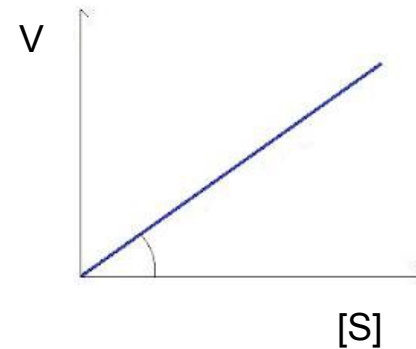
$$V = k[S] \quad \text{Cinetica di I° ordine}$$

k = costante di velocità

$$k = A e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Equazione d'Arrhenius

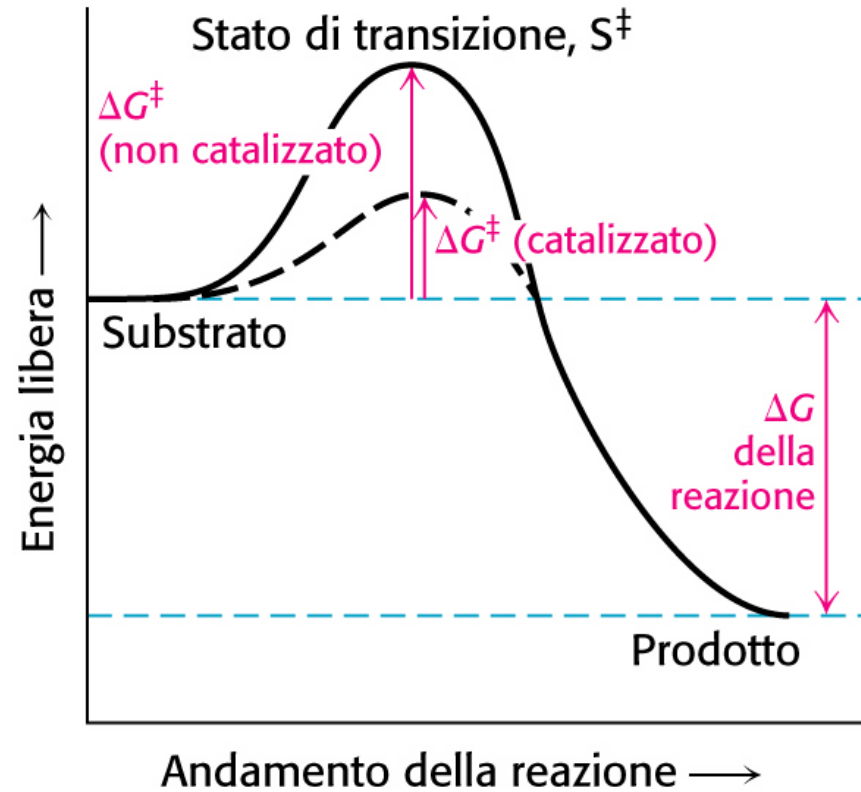
Più è alta l'energia d'attivazione e più è bassa la velocità della reazione e viceversa

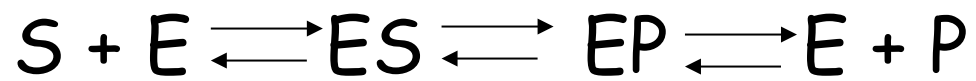
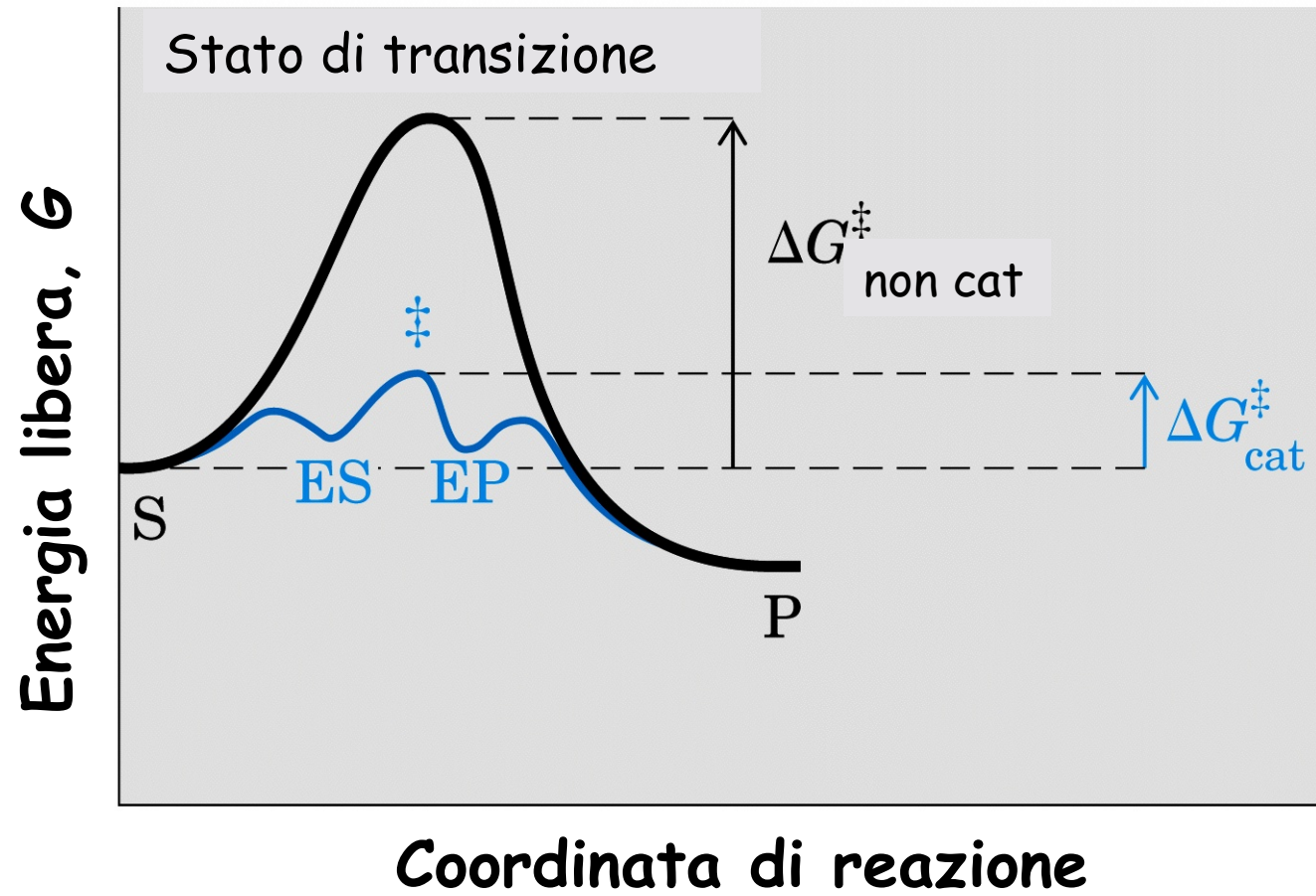


ΔG^\ddagger = energia d'attivazione

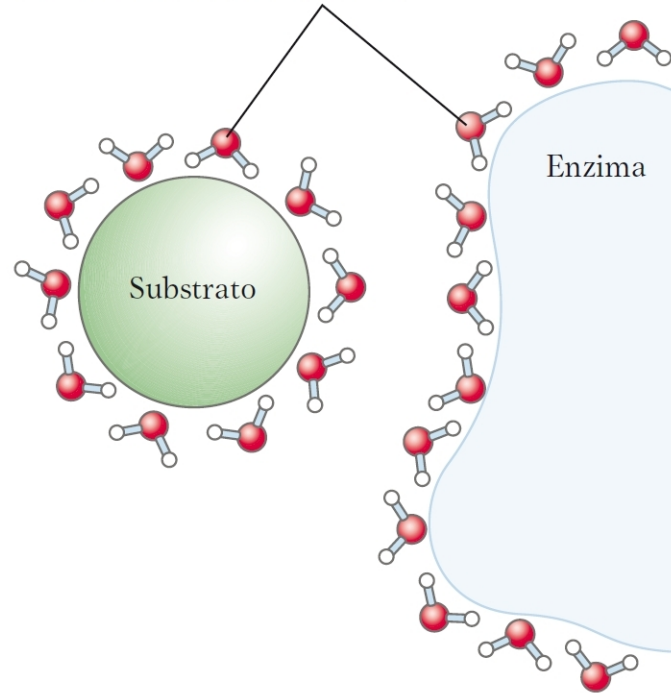
$$A = \frac{kT}{h}$$

reazioni catalizzate

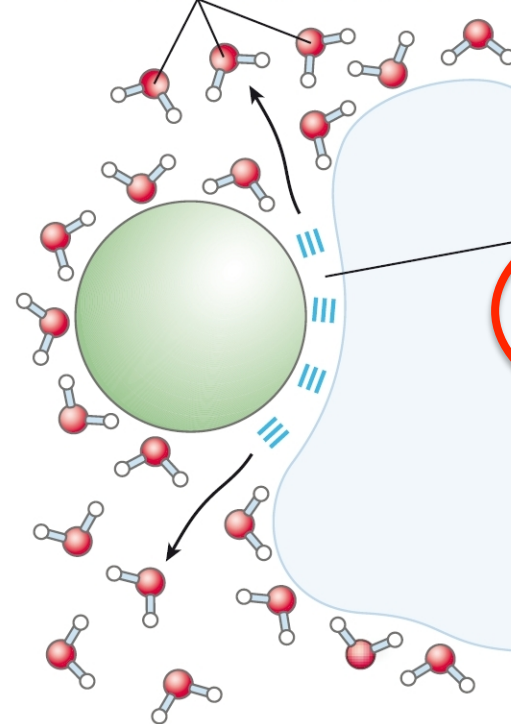




Molecole di acqua ordinate che interagiscono con il substrato e con l'enzima



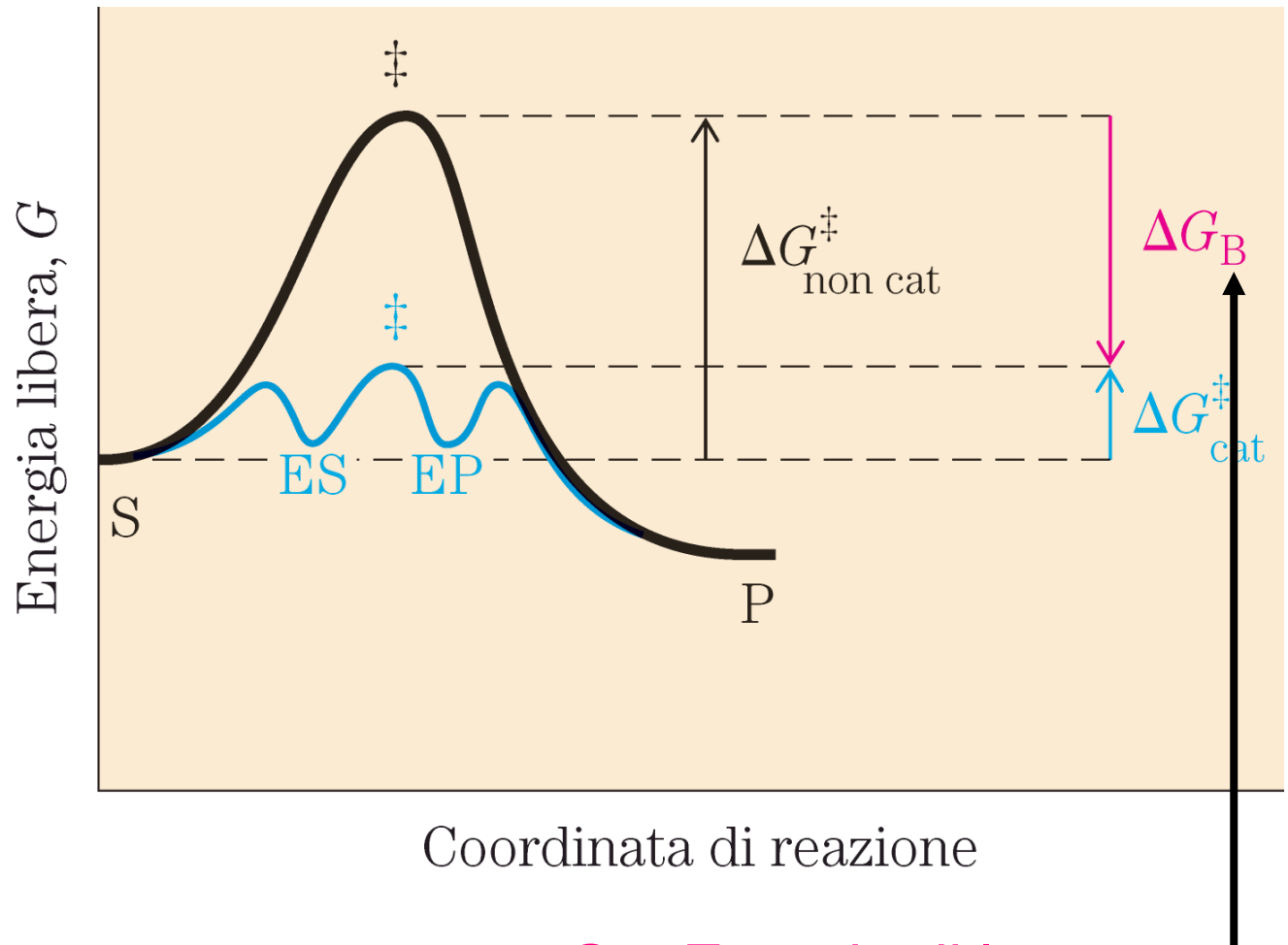
Molecole di acqua disordinate spostate durante la formazione del complesso enzima-substrato



Il complesso enzima-substrato è stabilizzato dalla formazione di legami idrogeno, interazioni ioniche e interazioni idrofobiche

Le interazioni deboli di legame tra l'enzima ed il substrato rappresentano la principale forza trainante della catalisi

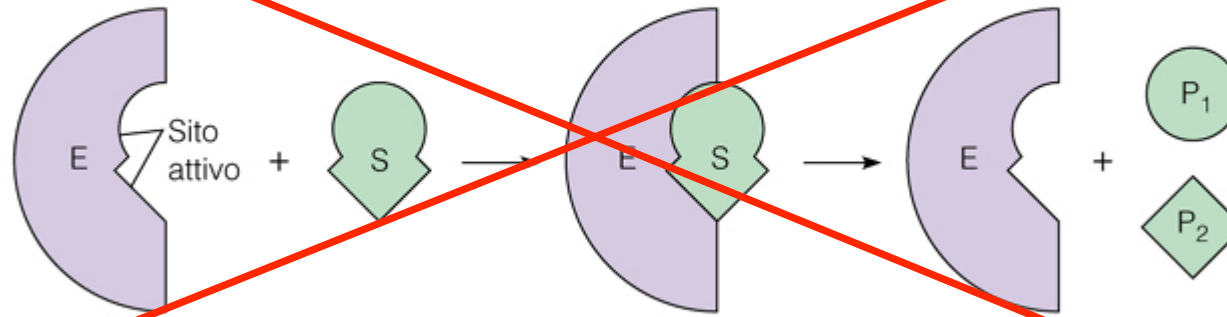
Per abbassare l'energia di attivazione (ΔG^\ddagger) il sistema deve acquisire una quantità di energia libera corrispondente alla diminuzione della energia di attivazione (ΔG_B)



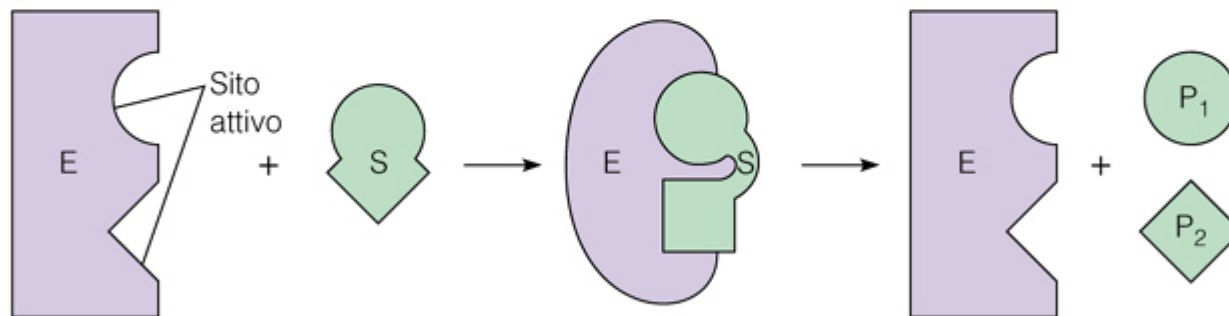
Coordinata di reazione

$\Delta G_B =$ Energia di legame

Cioè la fonte di energia libera che l'enzima utilizza per abbassare l'energia di attivazione (ΔG^\ddagger) della reazione



(a) Modello chiave-serratura



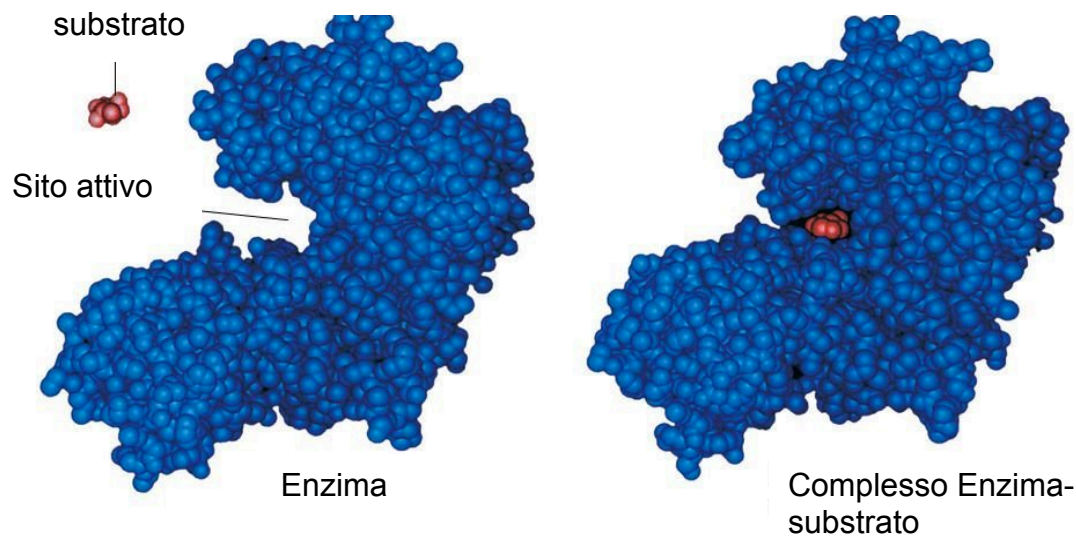
Conformazione dello stato di transizione

(b) Modello dell'adattamento indotto

I siti attivi sono complementari non al substrato ma al substrato modificato presente nello stato di transizione prima di diventare prodotto

Il maggior numero d'interazioni deboli si formano nello stato di transizione e sono quelle che contribuiscono maggiormente alla catalisi.

Le grandi dimensioni delle proteine e di alcuni coenzimi rispetto al substrato sono legate alla necessità di generare numerose interazioni deboli. La proteina enzimatica ed i coenzimi forniscono i gruppi funzionali per le interazioni ioniche, idrofobiche ed i legami idrogeno garantendo il corretto posizionamento del substrato nel sito attivo. **L'energia di legame** diventi ottimale nello stato di transizione



L'energia di legame oltre a determinare l'alto potere catalitico dell'enzima, determina la **specificità** dell'enzima, cioè la capacità di discriminare tra il substrato e molecole simili

Cinetica delle reazioni enzimatiche

La cinetica enzimatica s'interessa di studiare la **velocità di una reazione enzimatica**, ovvero trovare una relazione matematica tra la **velocità iniziale** della reazione enzimatica e la **concentrazione del substrato**

Cinetica delle reazioni

La velocità di una reazione dipende dalla concentrazione del reagente e dalla costante di velocità

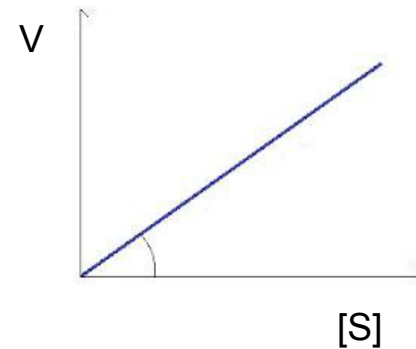


$$V = k[S] \quad \text{Cinetica di I° ordine}$$

$$k = A e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Equazione d'Arrhenius

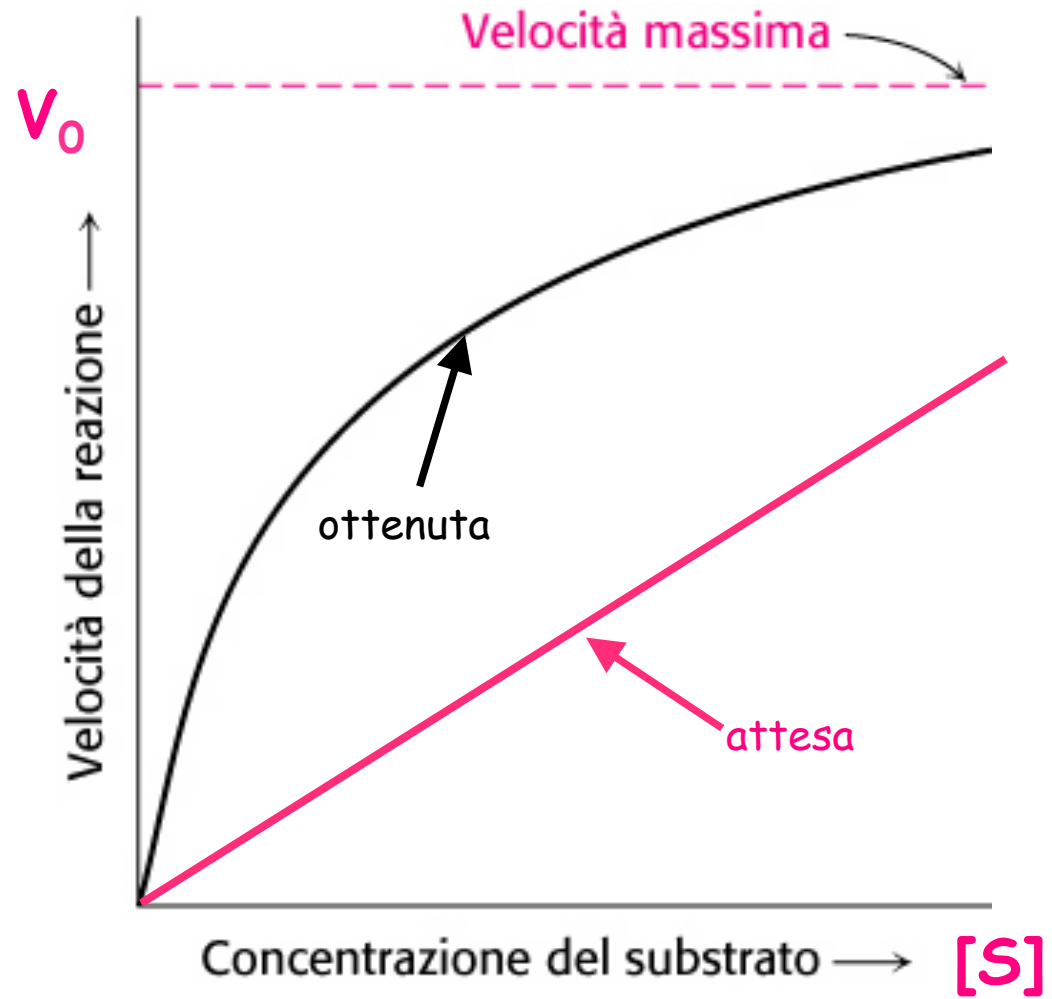
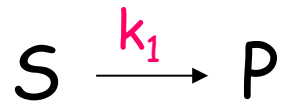
Più è alta l'energia d'attivazione e più è bassa la velocità della reazione e viceversa

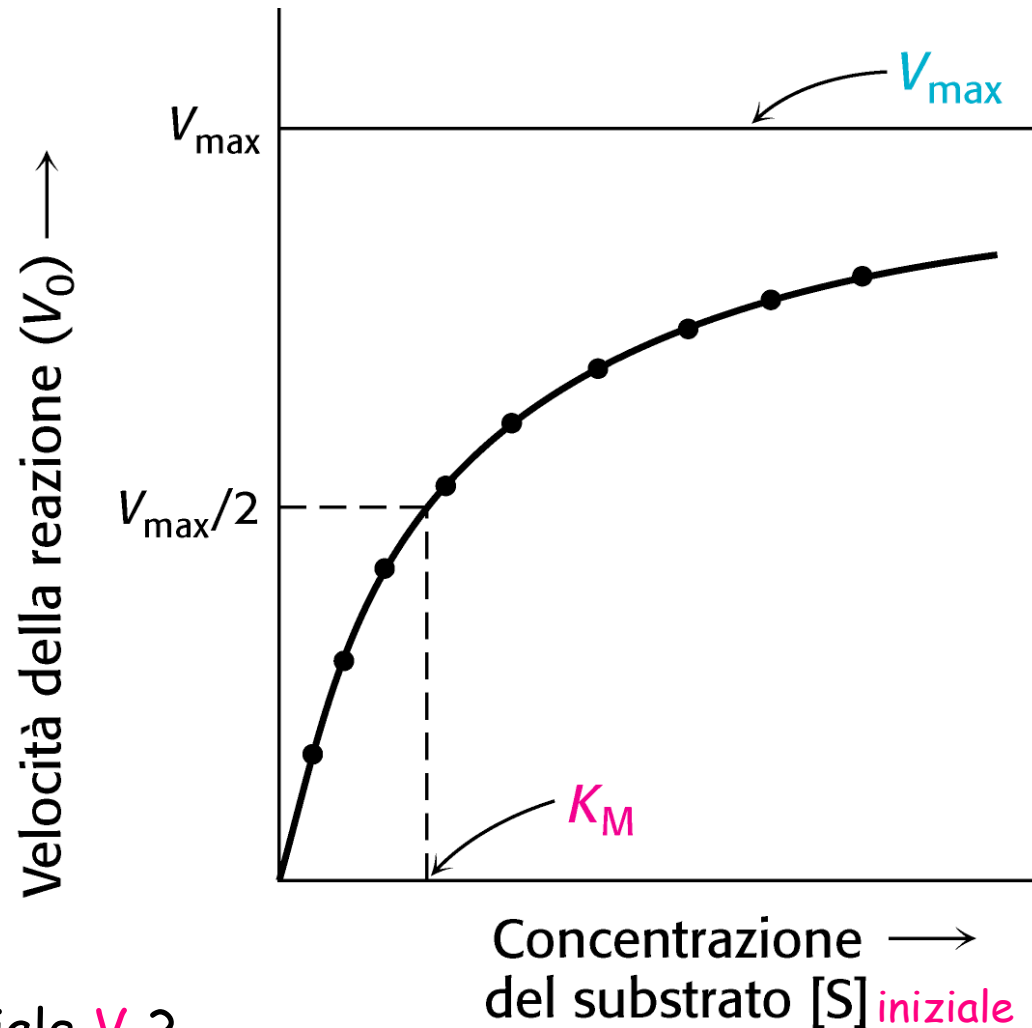


k = costante di velocità

ΔG^\ddagger = energia d'attivazione

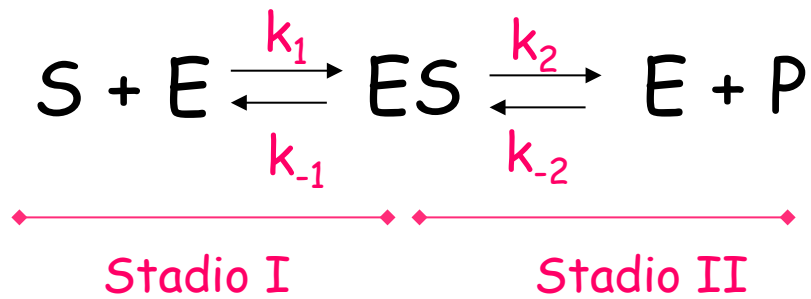
$$A = \frac{kT}{h}$$



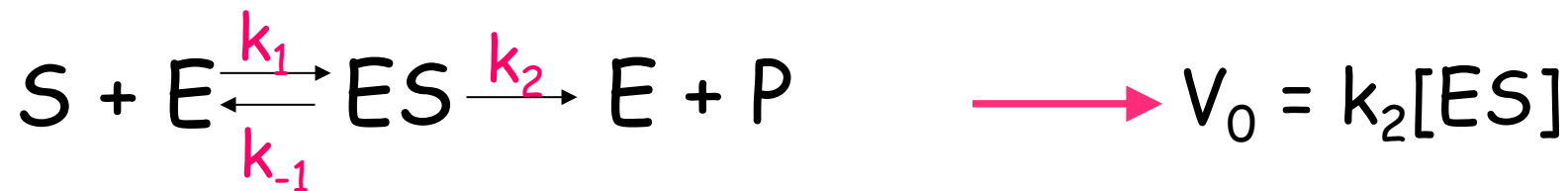


Perché Velocità iniziale V_0 ?

Perché la $[S]$ diminuisce nel corso della reazione man mano che il substrato è convertito in prodotto, invece all'inizio della reazione solo una piccolissima quantità di S è convertita in prodotto e quindi $[S]$ si può considerare pressoché costante,



1. Formazione di un complesso ES
2. Stadio I veloce e reversibile, Stadio II più lento
3. $[P]$ è bassa, praticamente 0, perché si misura la velocità iniziale, quindi si ignora la reazione inversa:



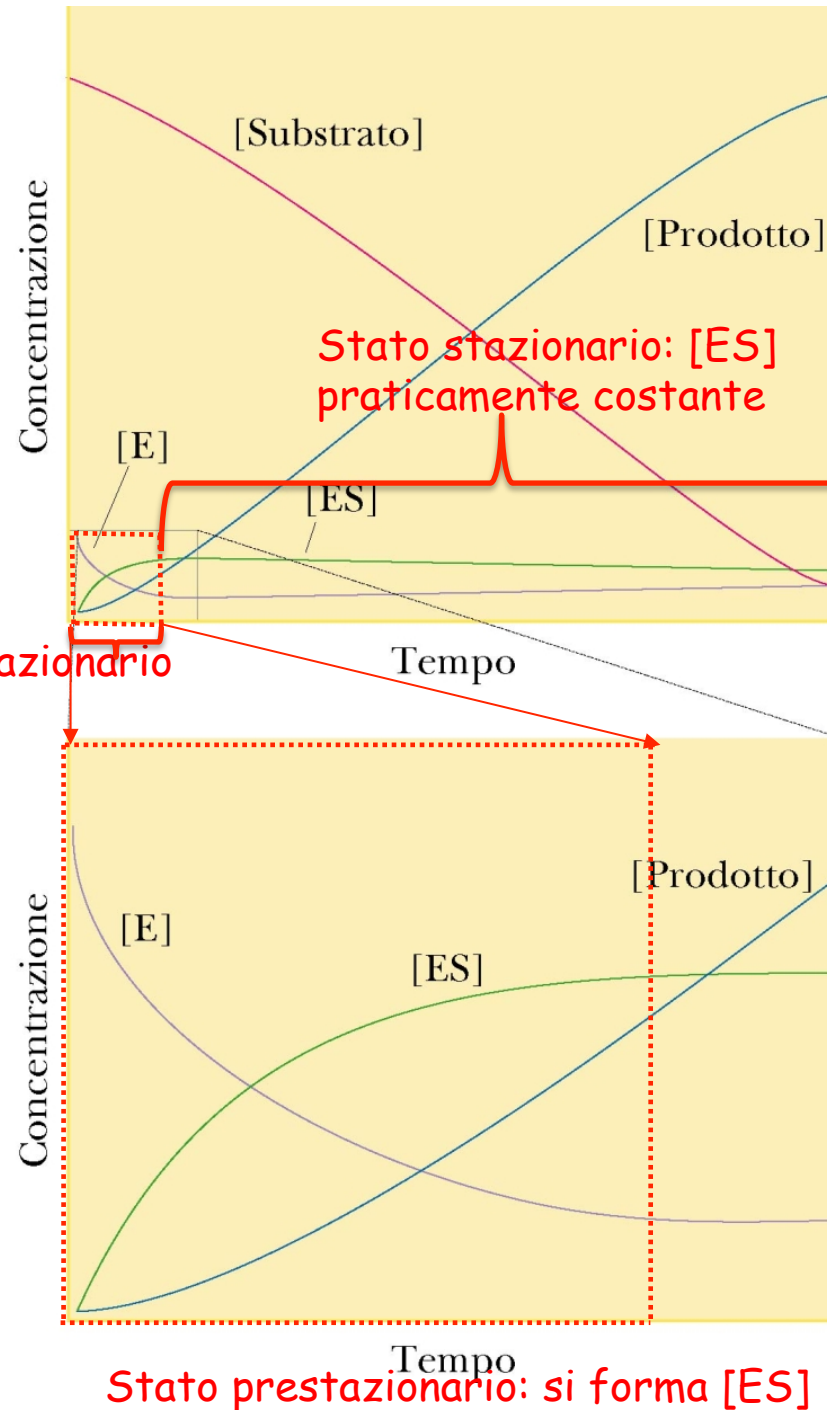
4. $[E] \ll [S]$
5. Cinetica alla stato stazionario

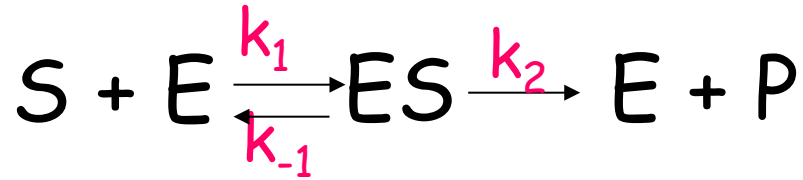
Cinetica dello stato stazionario

$$E_{\text{t}} = ES + E$$

Stato stazionario: [ES] praticamente costante, viene generato P alla stessa velocità con cui viene consumato S

Stato prestazionario





$$\longrightarrow V_0 = k_2 [ES]$$

$$E_{\text{t}} = ES + E$$

$$E = E_{\text{t}} - ES$$

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

Le due velocità sono uguali nello stato stazionario quindi:

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

Sostituisco $E = E_{\text{t}} - [ES]$

$$k_1 [S] (E_{\text{t}} - [ES]) = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

Eseguo i calcoli:

$$k_1 [S] E_{\text{t}} - k_1 [S] [ES] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

Sposto $- k_1 [S] [ES]$ dall'altro lato

$$k_1 [S] E_{\text{t}} = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] + k_1 [S] [ES]$$

Divido tutto per k_1

$$\frac{\cancel{k_1} [S] E_{\text{t}}}{\cancel{k_1}} = \frac{k_{-1} [ES]}{k_1} + \frac{k_2 [ES]}{k_1} + \frac{\cancel{k_1} [S] [ES]}{\cancel{k_1}} = [ES] \left(\frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} + [S] \right)$$

Metto in evidenza $[ES]$

$$[S] E_{\text{t}} = [ES] \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] \right) \xrightarrow{\text{Ricavo } [ES]}$$

$$[ES] = \frac{E_{\text{t}} [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Sostituisco $[ES]$ ricavato

Equazione di Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{k_2 E_t [S]}{\frac{k_{-1} + k_2 + [S]}{k_1}}$$

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

V_0 = velocità iniziale

$$V_{\max} = k_2 E_t$$

massima velocità iniziale a concentrazioni di substrato saturanti l'enzima

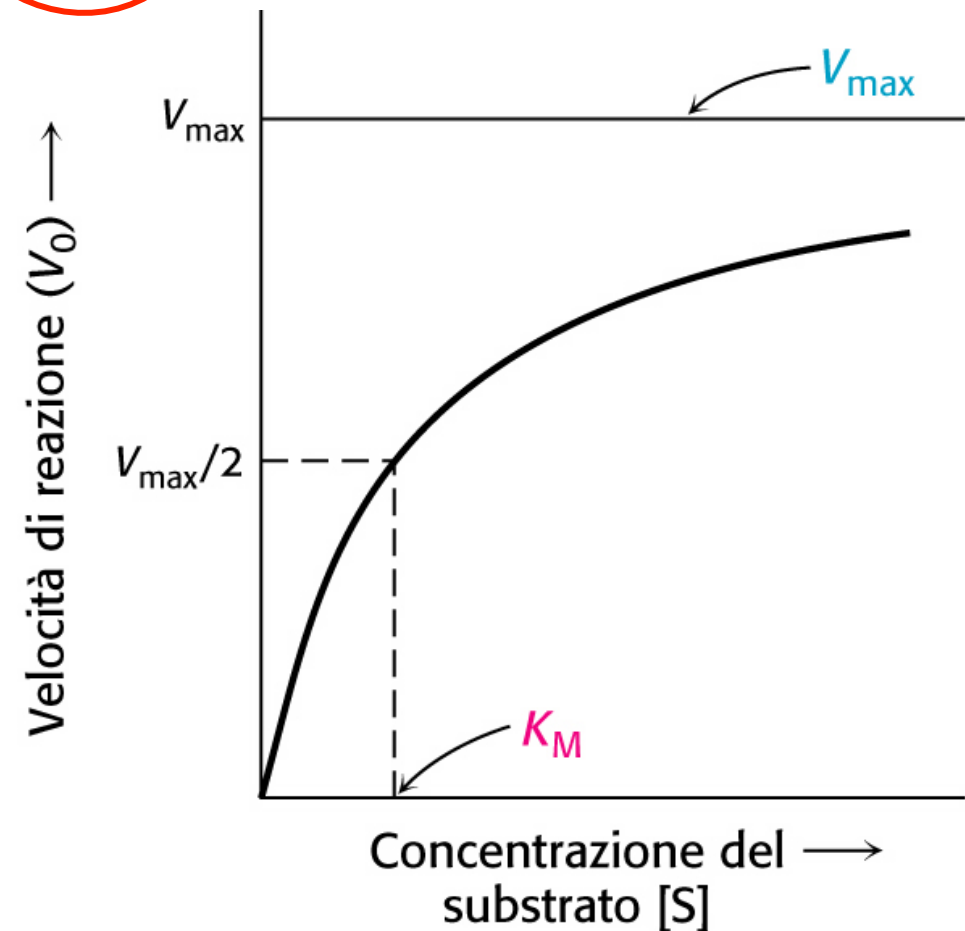
K_m = costante di Michaelis-Menten

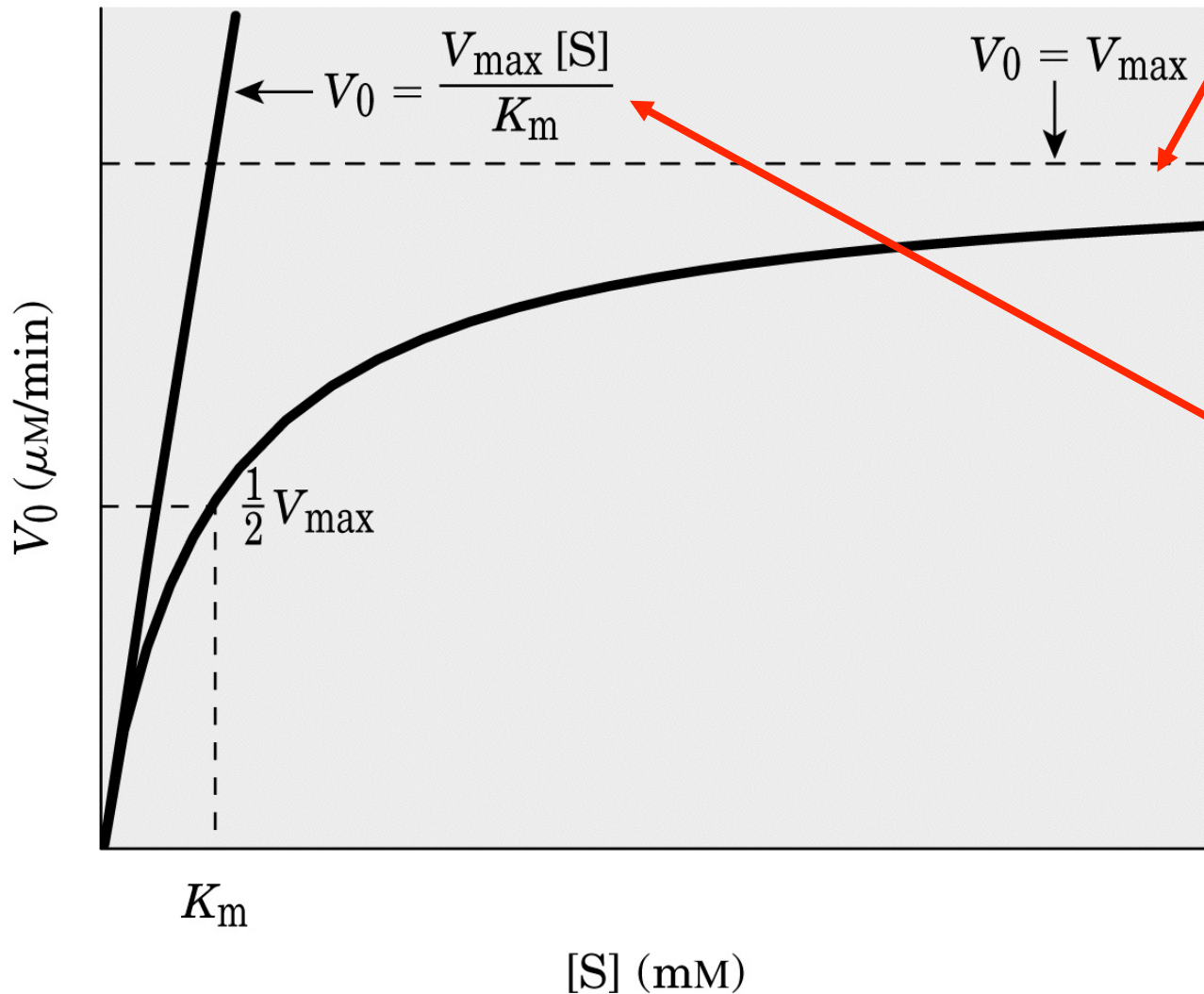
$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$[ES] = \frac{E_t [S]}{\frac{k_{-1} + k_2 + [S]}{k_1}}$$

$$V_0 = k_2 [ES]$$

sostituzione





se $K_m \ll [S]$

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

se $K_m \gg [S]$

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

Se $V_0 = \frac{V_{\max}}{2}$

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

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{\max} = \frac{2V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m + [S] = 2 [S]$$

$$K_m = 2 [S] - [S] = [S]$$

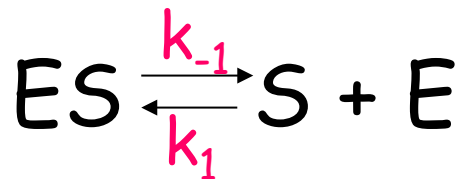
$$K_m$$

- Concentrazione di substrato che determina metà della velocità massima

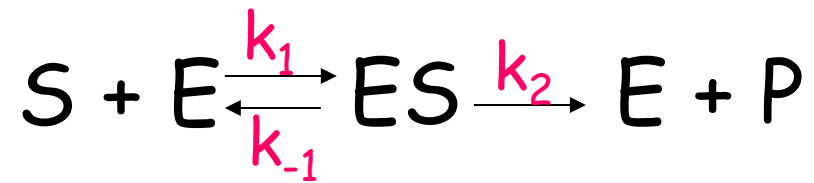
- $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ se $k_2 \ll k_{-1}$

Costante di dissociazione del complesso ES

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d = \frac{[E][S]}{[ES]}$$



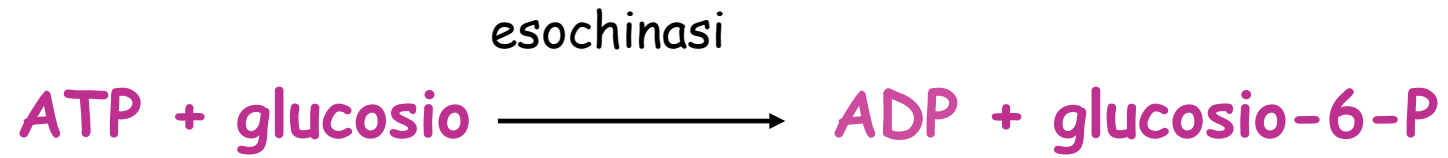
La K_m è in alcuni casi un'indicazione dell'affinità dell'enzima per un substrato perché uguale alla K_d



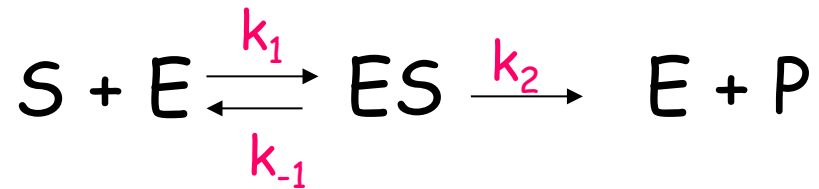
$$K_m = \frac{\cancel{k_{-1}} + k_2}{k_1}$$

se $k_{-1} \ll k_2$

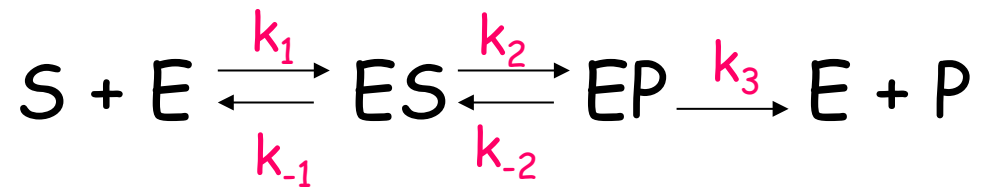
$$K_m = \frac{k_2}{k_1}$$



Enzima	Substrato	Km (mM)
Esochinasi	ATP	0.4
	D-Glucosio	0.05
	D-Fruuttosio	1.5



$$V_0 = k_2 [ES]$$
$$V_{0max} = k_2 [E_t]$$



$$V_0 = k_3 [EP] \longrightarrow V_{max} = k_3 [E_t]$$

$$V_0 = k_2 [ES] \longrightarrow V_{\max} = k_2 [E_+]$$

$$V_0 = k_3 [EP] \longrightarrow V_{\max} = k_3 [E_+]$$

$$k_2, k_3 \dots \text{etc} = k_{\text{cat}}$$

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E_+] \longrightarrow k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E_+]}$$

La k_{cat} è il numero di turnover di un enzima ed è definito come il numero di molecole di substrato convertite in prodotto da una molecola di enzima nell'unità di tempo quando l'enzima è saturato con il substrato

Numero di turnover (k_{cat}) di alcuni enzimi

Enzima	Substrato	k_{cat} (sec ⁻¹)
Catalasi	H ₂ O ₂	40,000,000
Anidrasi carbonica	HCO ₃ ⁻	400,000
Acetilcolinesterasi	Acetilcolina	140,000
β-Lattamasi	Benzilpenicillina	2,000
Fumarasi	Fumarato	800
Lisozima	Glicano	0.5

I parametri cinetici K_m e k_{cat} si usano per valutare l'efficienza catalitica di un enzima

I parametri cinetici

K_m e k_{cat} si usano
anche per confrontare
l'efficienza catalitica
di enzimi diversi o
dello stesso enzima
con substrati diversi

Costante di specificità
o efficienza catalitica

$$= \frac{k_{cat}}{K_m}$$

$$k_{cat} = k_2$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Costante di specificità
o efficienza catalitica

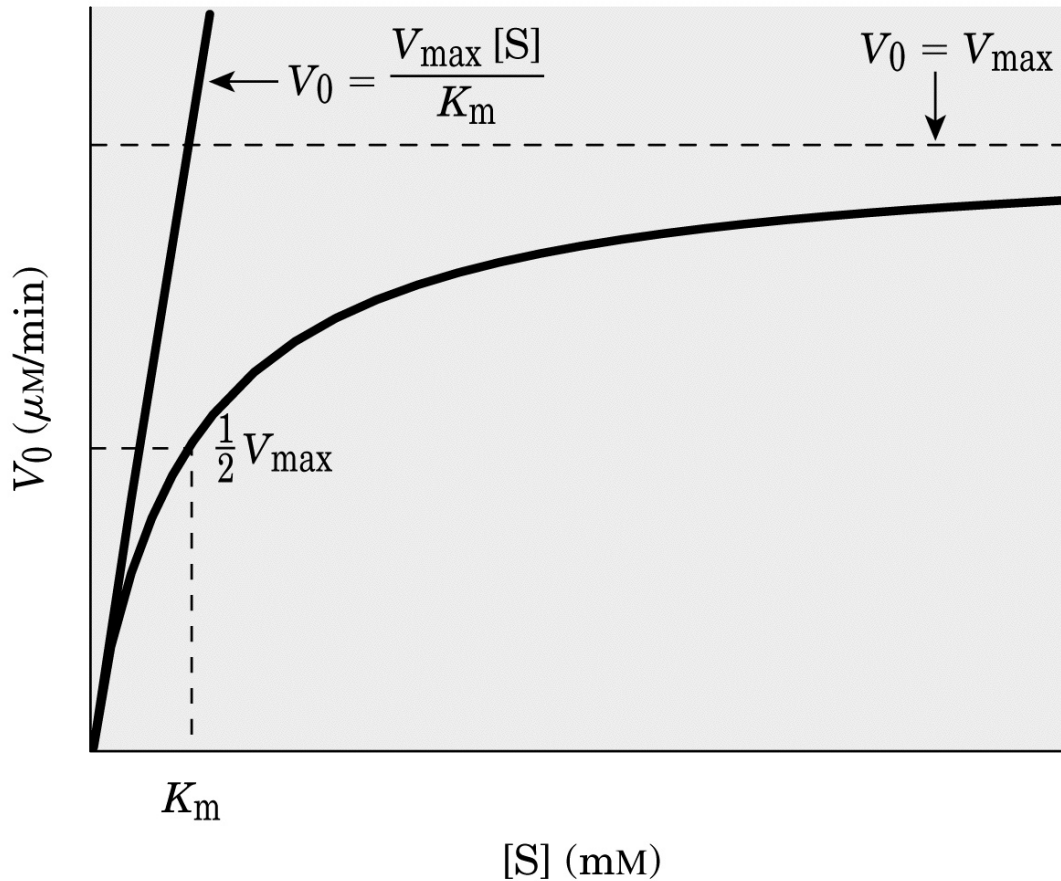
$$= \frac{k_2 \times k_1}{k_{-1} + k_2}$$

Se $k_2 \gg k_{-1}$

Costante di specificità
o efficienza catalitica
massima

$$= \frac{\cancel{k_2} \times k_1}{\cancel{k_{-1}} + \cancel{k_2}} = \frac{k_{cat}}{K_m}$$

Limite superiore:
velocità con cui i due
componenti diffondono
uno verso l'altro



se $K_m \gg [S]$

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

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E_{\text{T}}]$$

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E_{\text{T}}] [S]$$

Costante di specificità o efficienza catalitica ha l'unità di misura di una costante di velocità di una reazione di second'ordine, $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$

La perfezione catalitica si raggiunge per valori di 10^8 $10^9 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$

Equazione di Lineweaver-Burk

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

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

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

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

Grafico di Lineweaver-Burk o dei doppi reciproci

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

Equazione di una retta $y = mx + n$

Se $1/[S] = 0$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot 0 + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}}$$

Se $1/V_0 = 0$

$$0 = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

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

$$-\frac{1}{K_m} = \frac{1}{[S]}$$

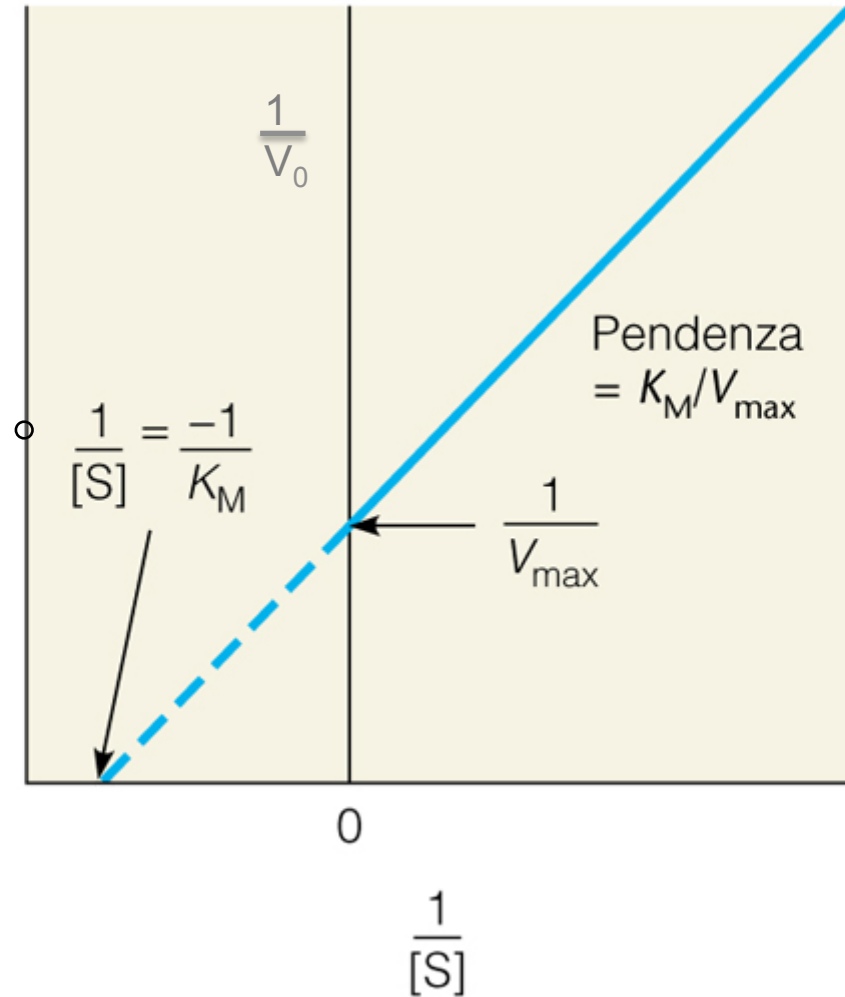


Grafico di Eadie-Hofstee

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

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

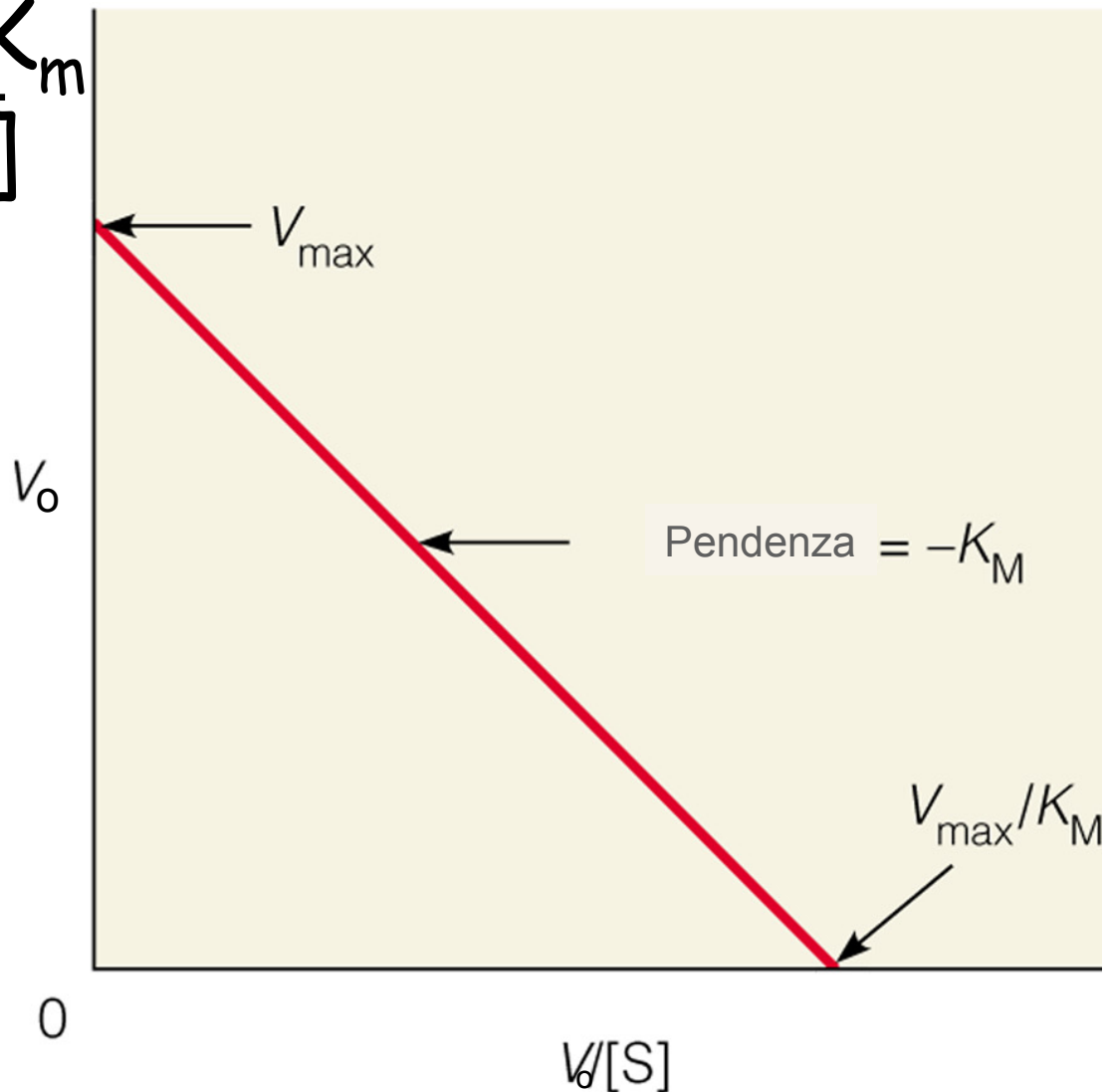
$$V_0 (K_m + [S]) = V_{\max} [S]$$

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

Divido tutto per [S]

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

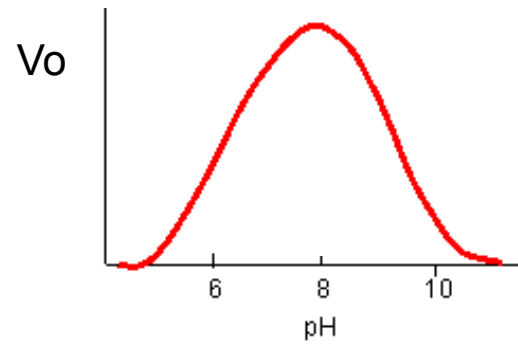
$$V_0 = V_{\max} - \frac{V_0 K_m}{[S]}$$



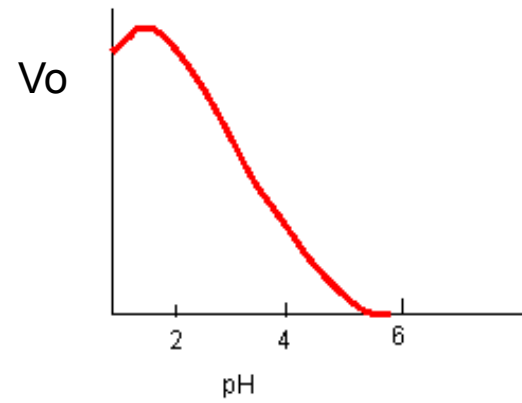
L'Unita' enzimatica è la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di 1 μ mole di substrato in prodotto in un minuto, a 25°C e in condizioni ottimali

Dipendenza di V_0 dal pH

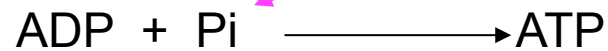
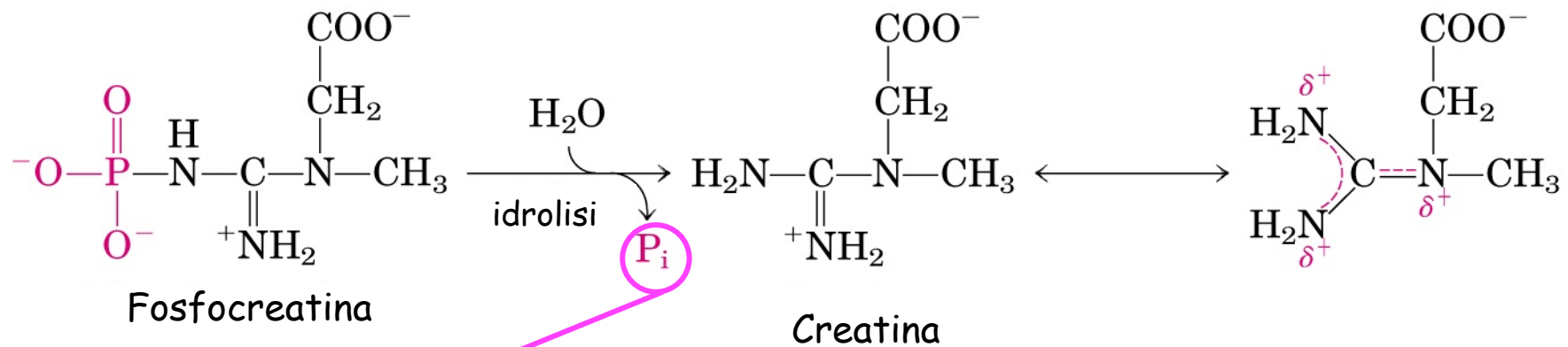
chimotripsina



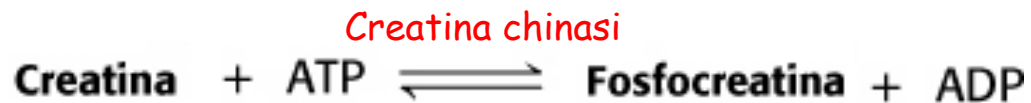
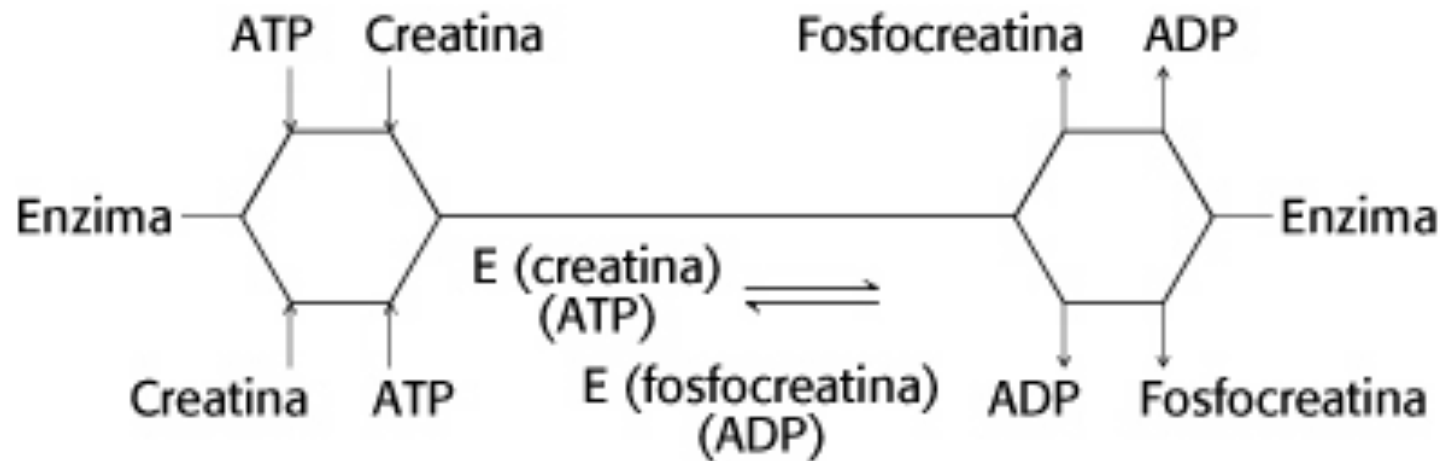
pepsina



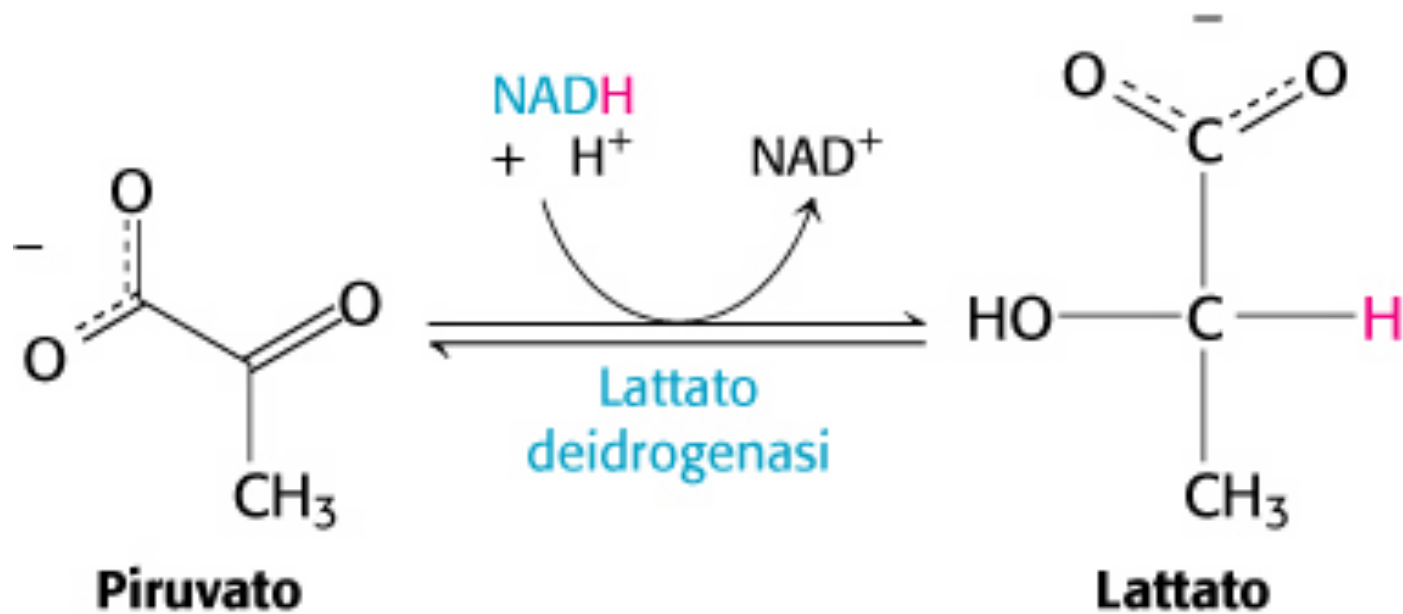
Meccanismo sequenziale casuale



Meccanismo sequenziale casuale

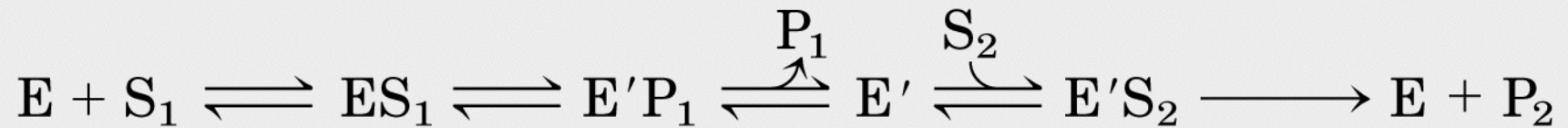


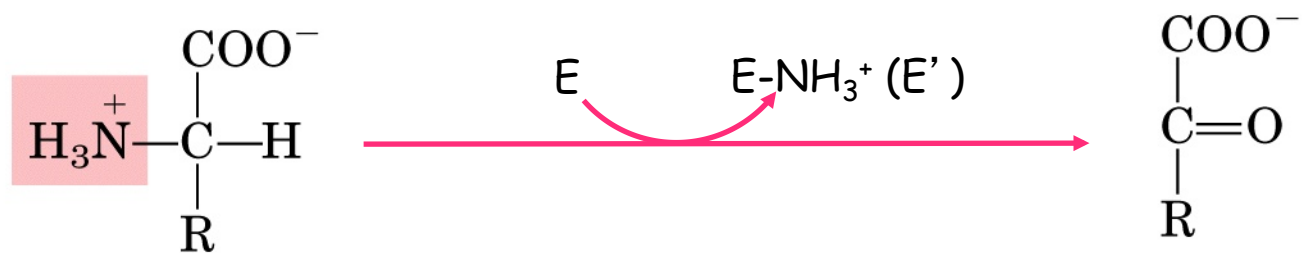
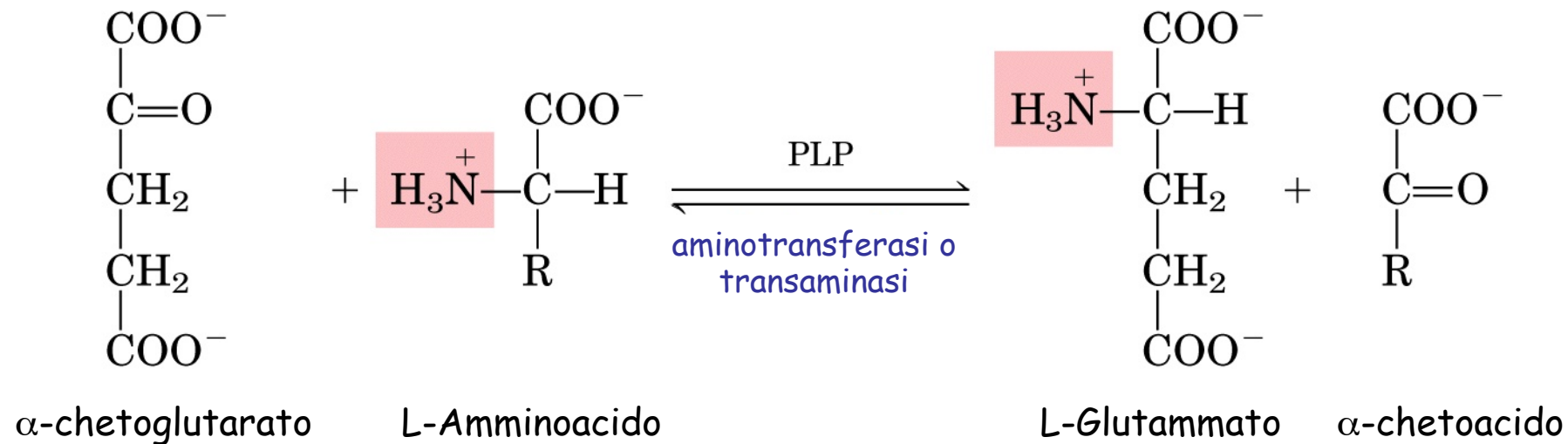
Meccanismo sequenziale ordinato



Meccanismo a doppio spostamento (ping pong)

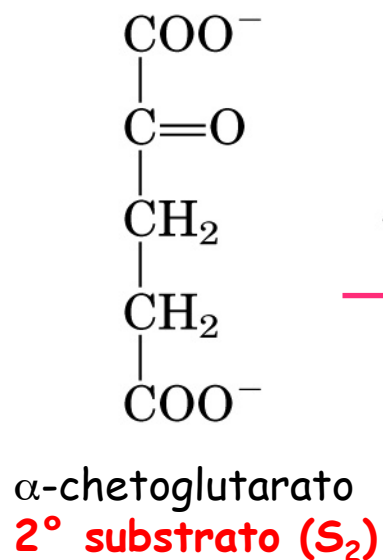
Reazione enzimatica senza formazione di un complesso ternario





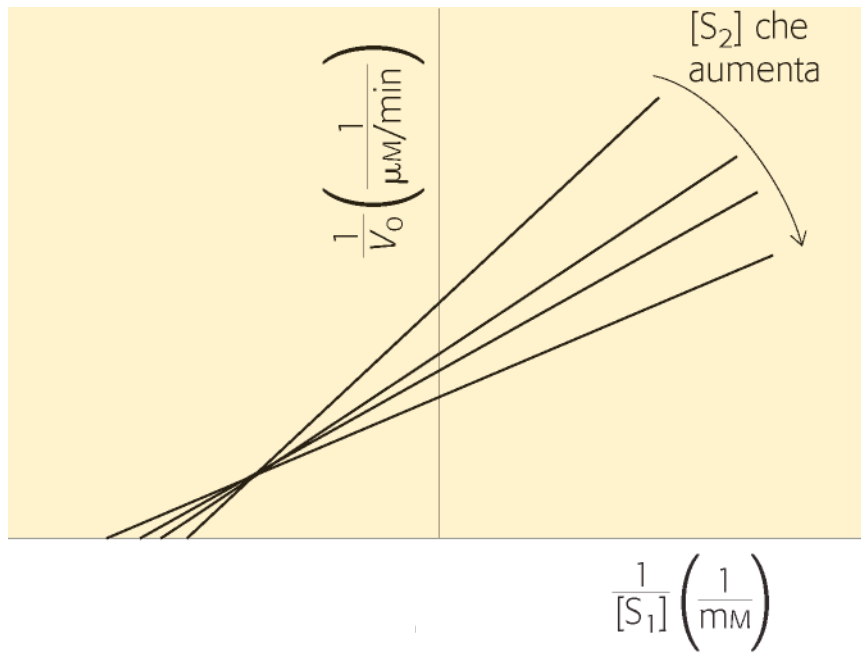
L-Amminoacido
1° substrato (S₁)

α -chetoacido
1° prodotto (P₁)

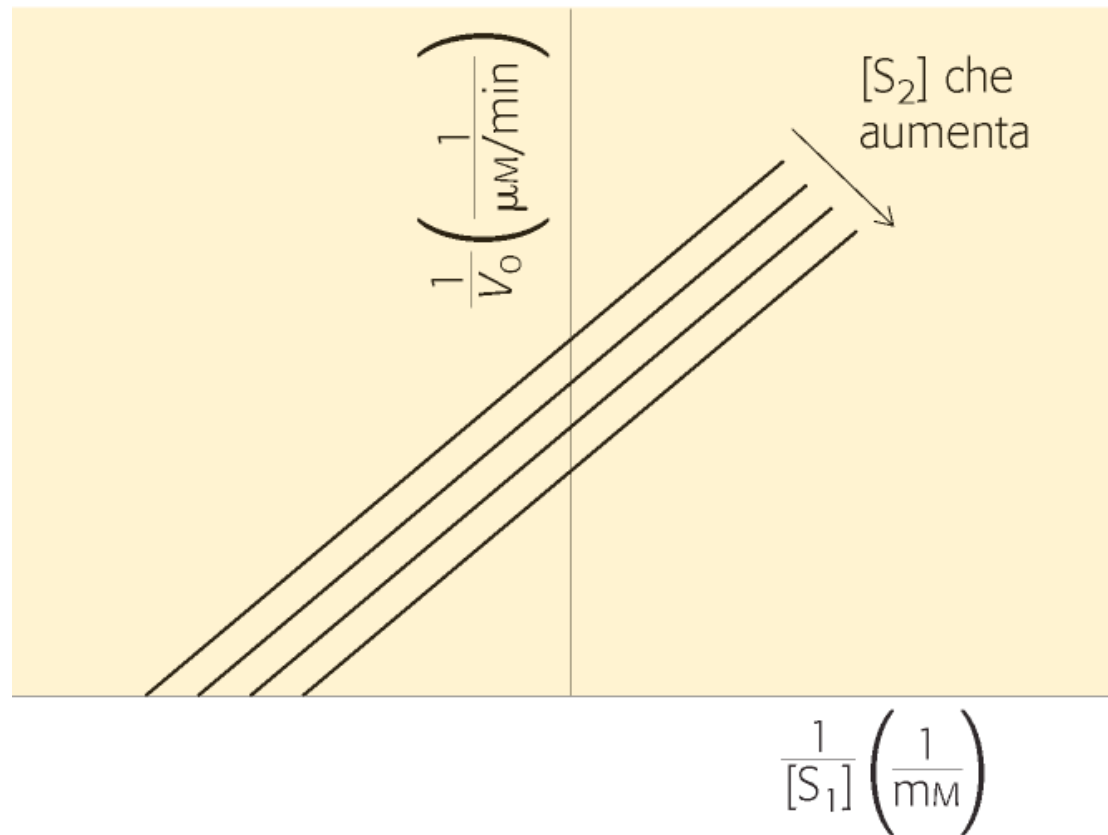


L-Glutammato
2° prodotto (P₂)

Meccanismo sequenziale



Meccanismo a doppio spostamento (ping pong)

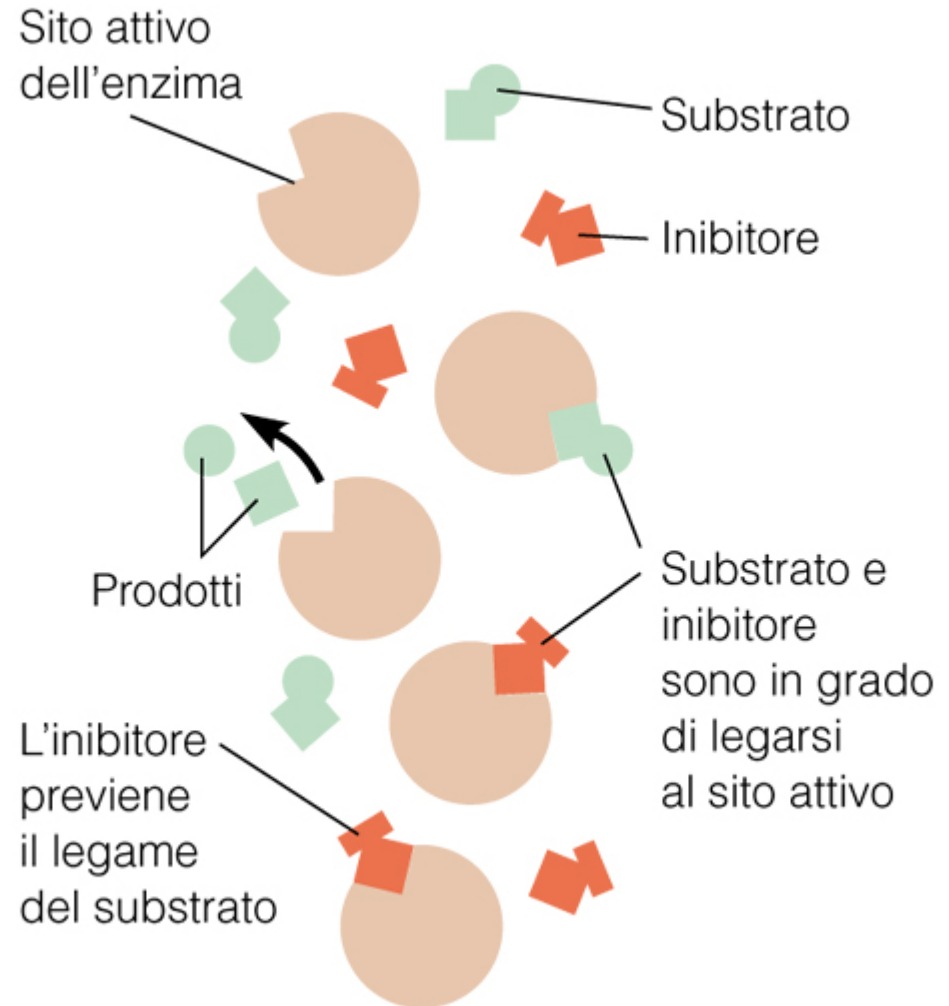


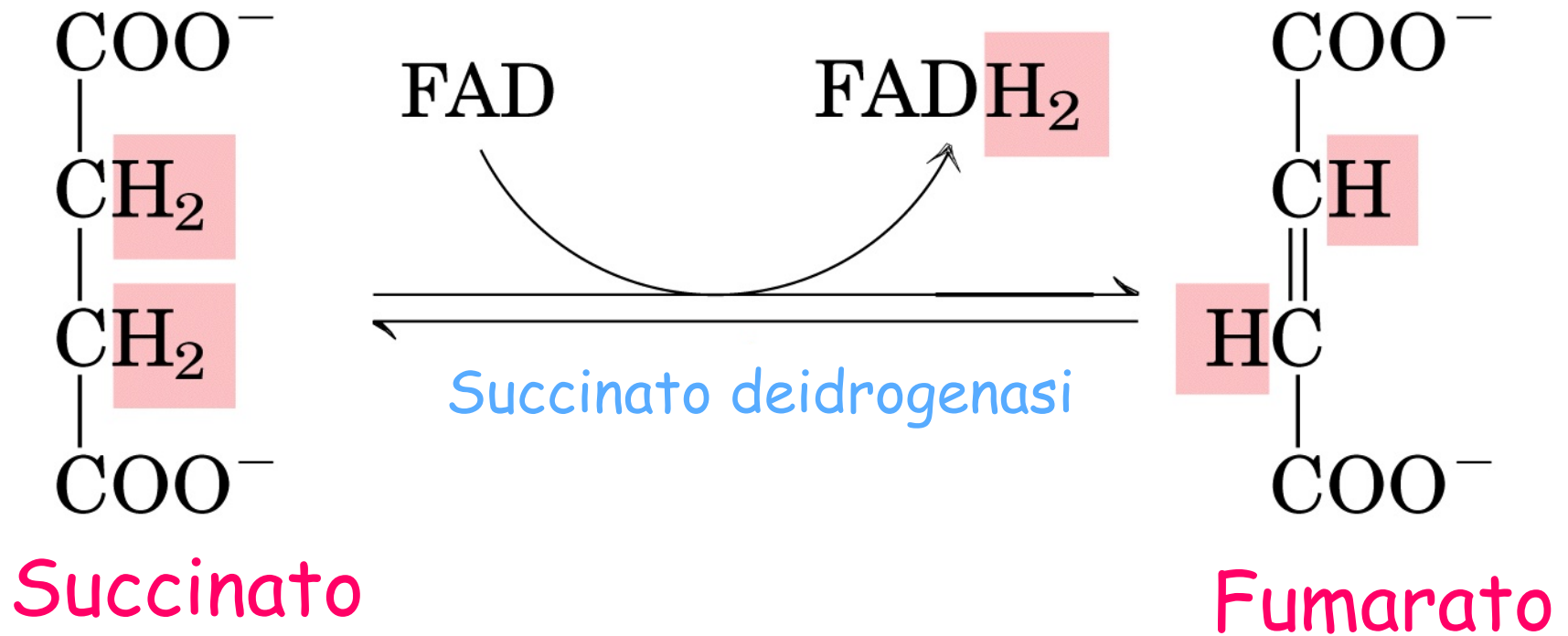
Inibizione

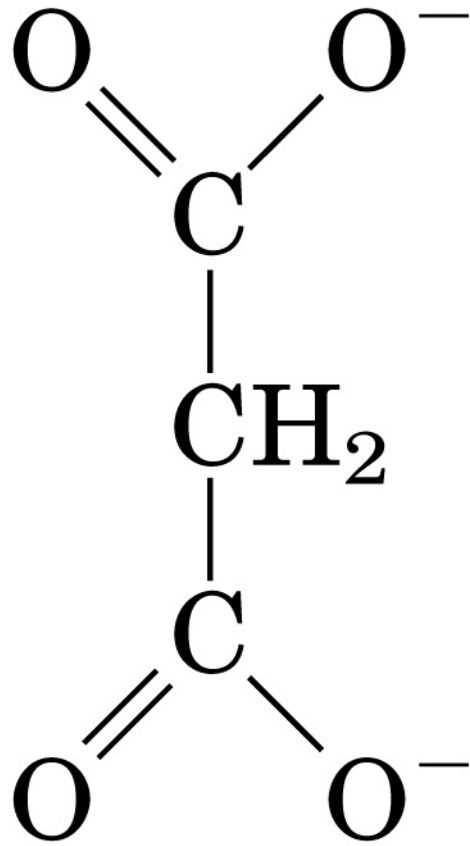
- Reversibile
- Irreversibile

Inibizione competitiva

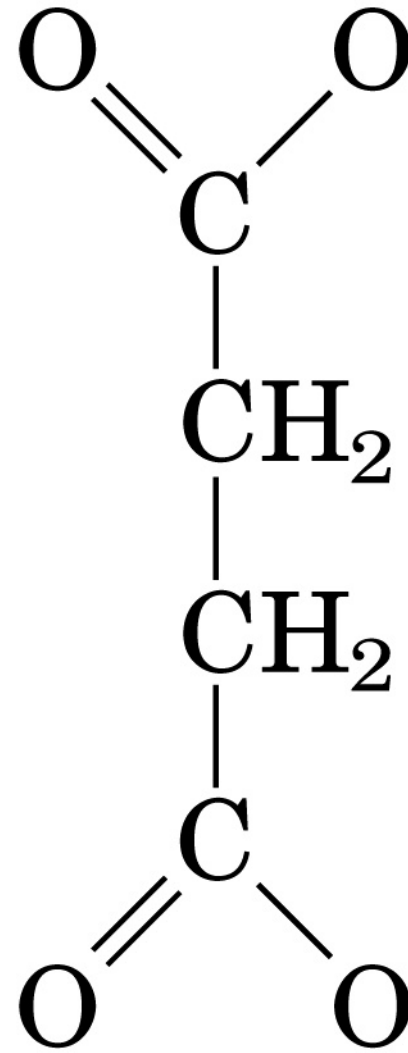
Il substrato e l'inibitore competono per il legame al sito attivo dell'enzima







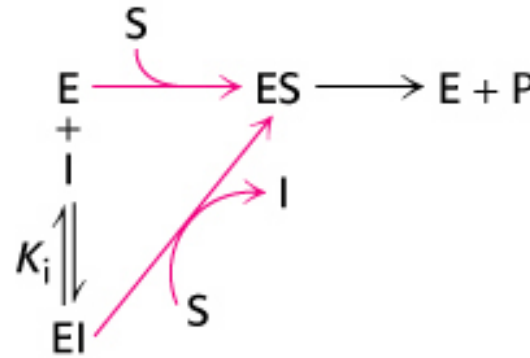
Malonato



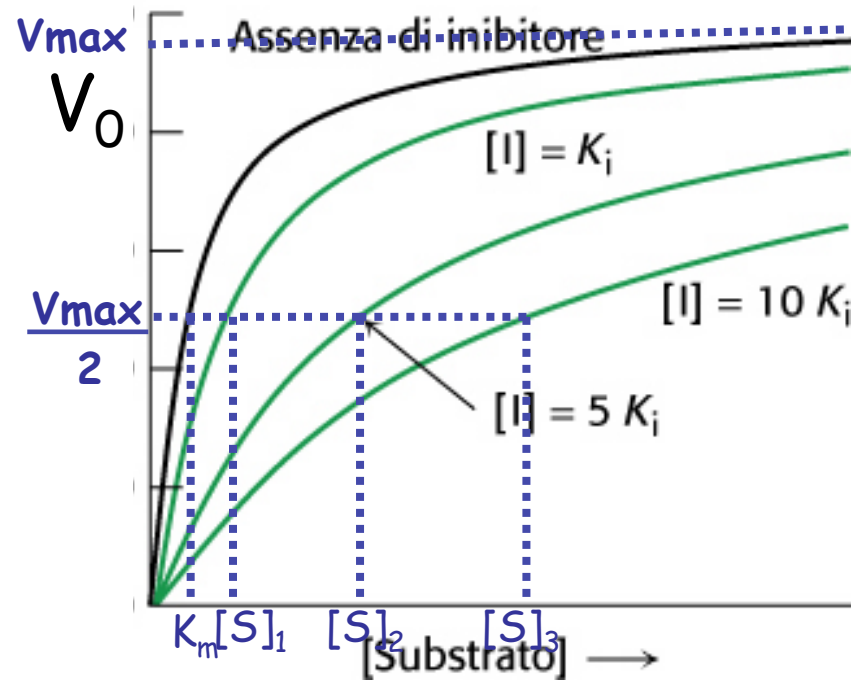
Succinato

Inibizione competitiva

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]}$$



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$



$$V_0 = k_2 [ES]$$

$$V_{\max} = k_2 [E_t]$$

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

$$K_m^i = K_m \text{ apparente}$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

$\underbrace{\hspace{10em}}_{\alpha}$

$$K_m^i = K_m \alpha$$

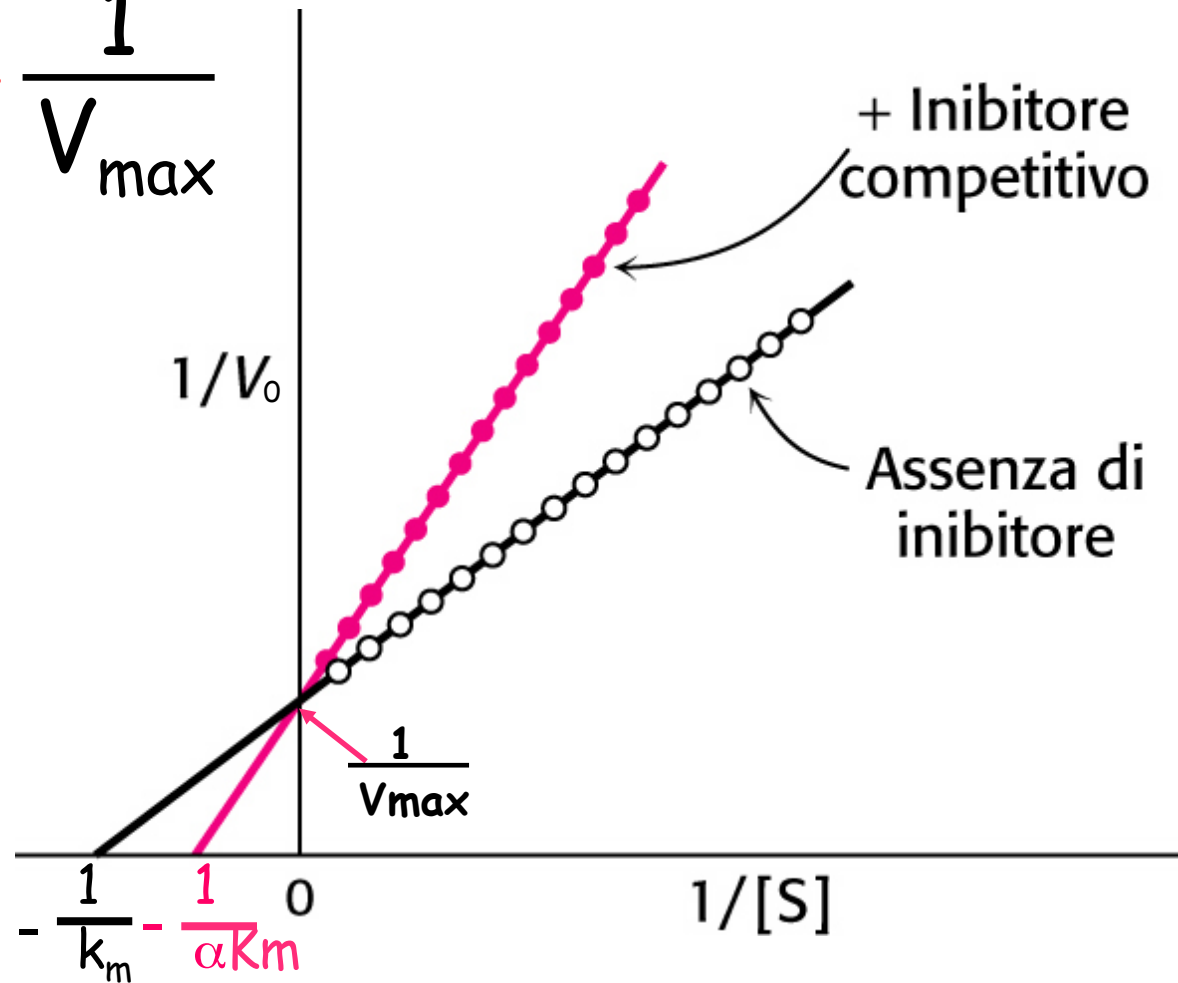
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

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

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

Inibizione competitiva

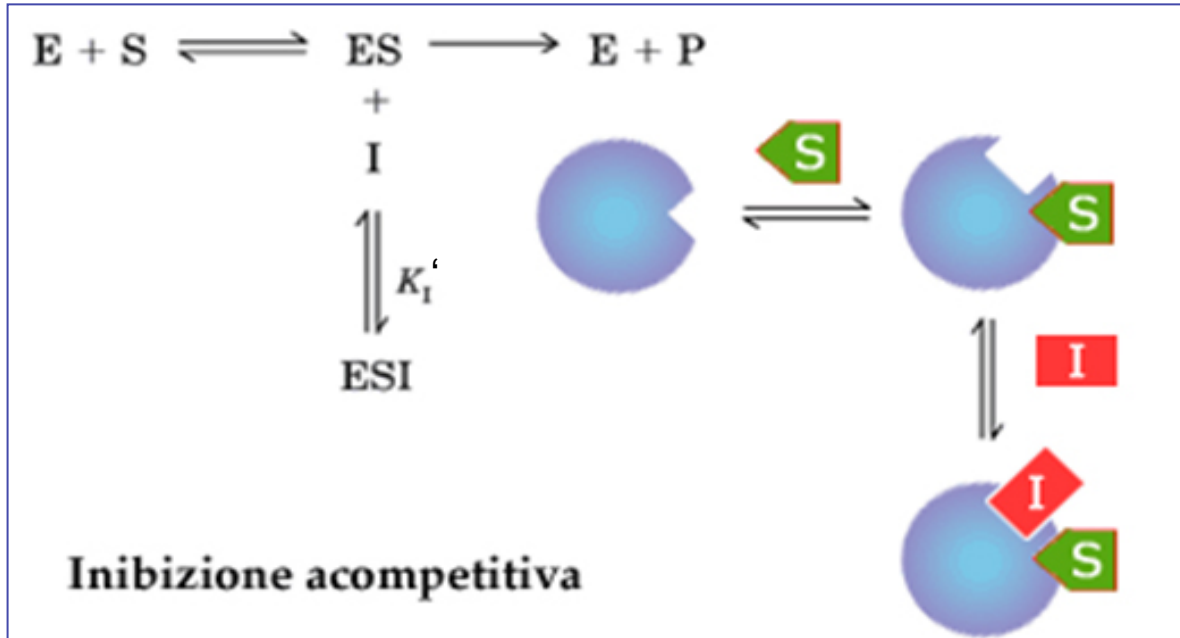
$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Inibizione acompetitiva

$$V_0 = k_2 [ES]$$

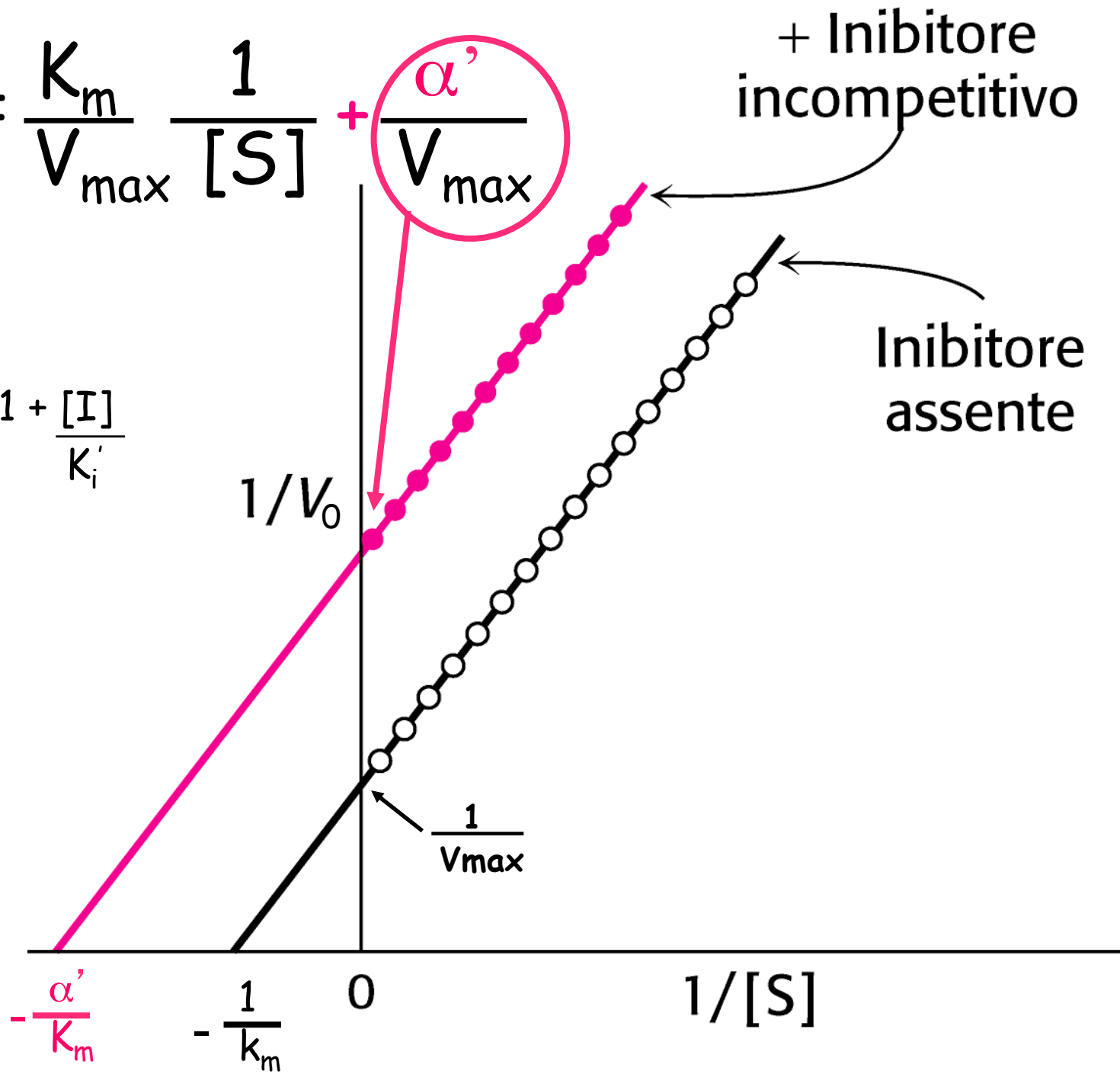
$$V_{\max} = k_2 [E_t]$$



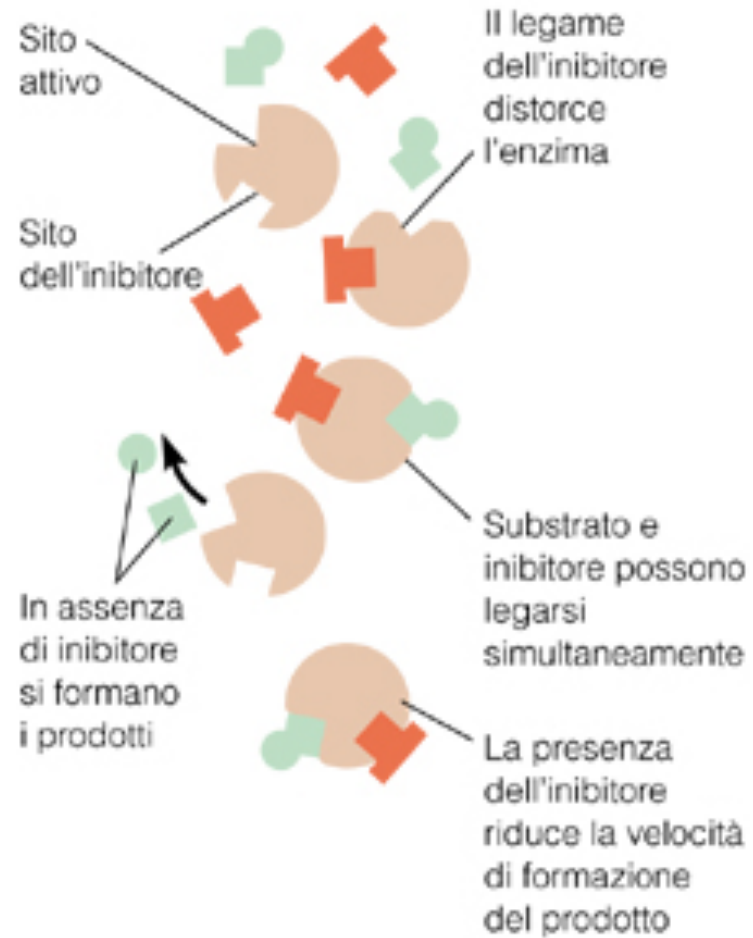
$$K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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

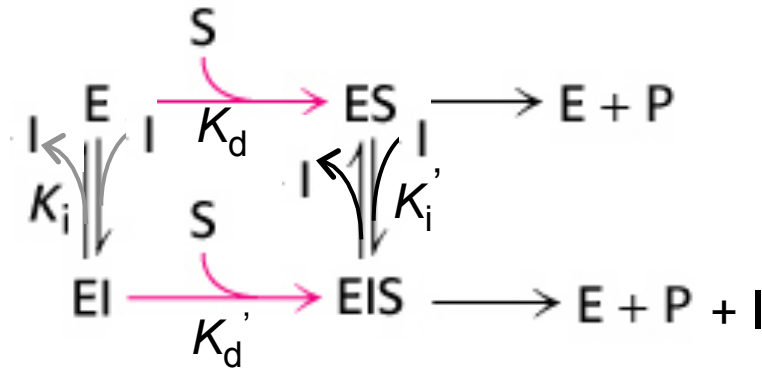
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$$



Inibizione non competitiva mista



Inibizione non competitiva mista



$$K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]}$$

$$K'_i = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{[\text{EIS}]}$$

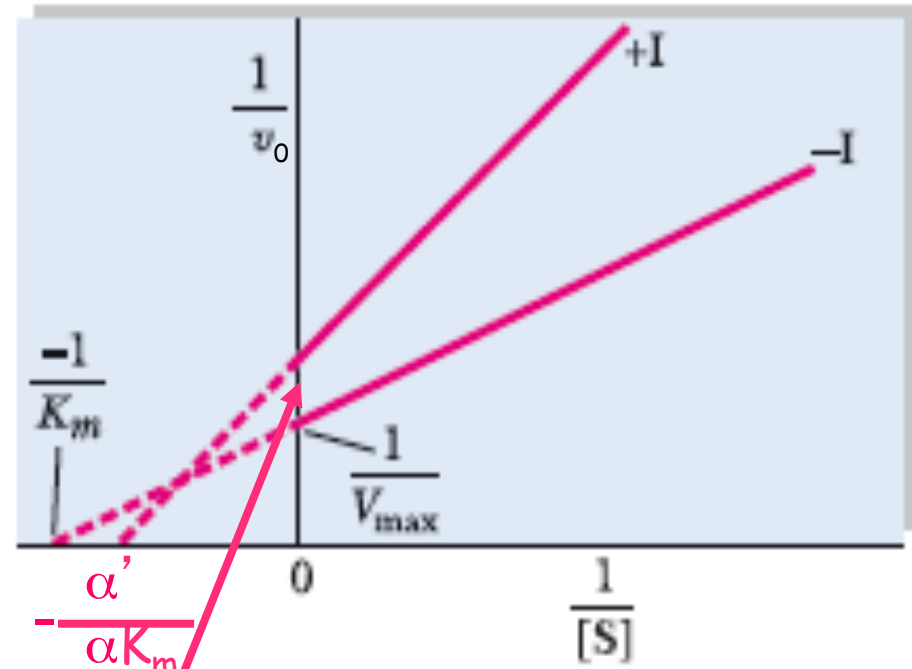
$$\alpha = 1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[\text{I}]}{K'_i}$$

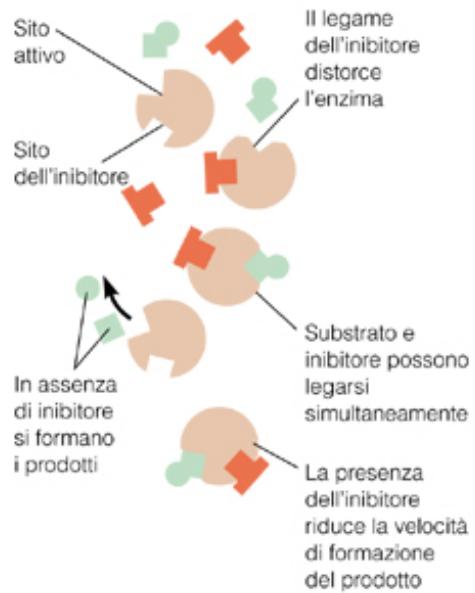
$$K_d = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}$$

$$K'_d = \frac{[\text{EI}][\text{S}]}{[\text{EIS}]}$$

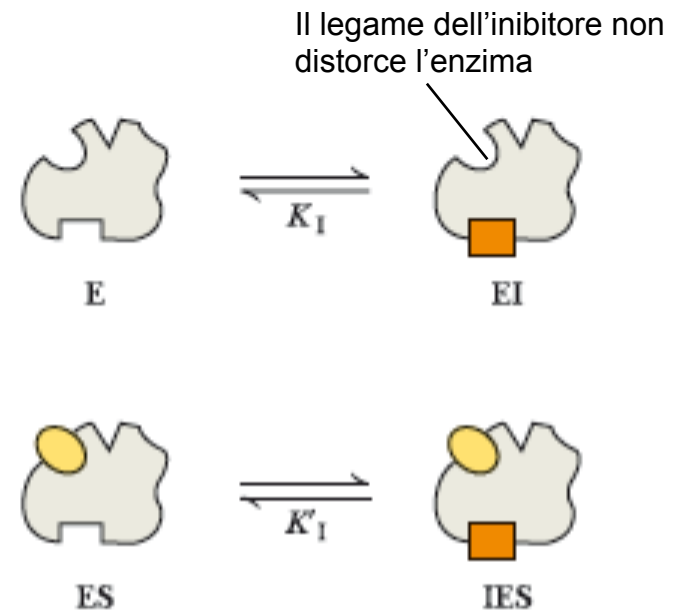
Inibizione non competitiva mista



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

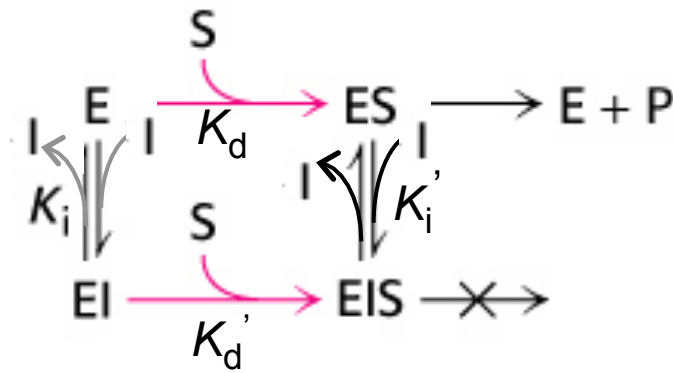


Inibizione non competitiva mista



Inibizione non competitiva pura

Inibizione non competitiva pura



$$K_d = K'_d$$

$$K_i = K'_i$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$K'_i = \frac{[E][I]}{[EIS]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$$

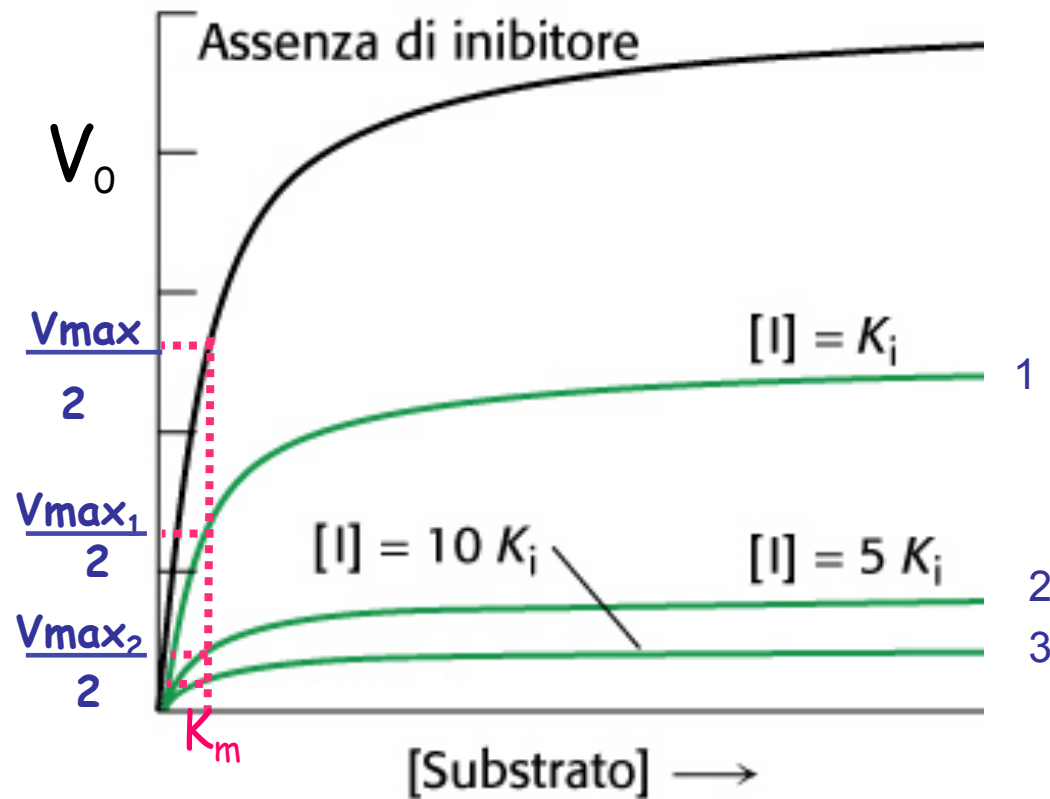
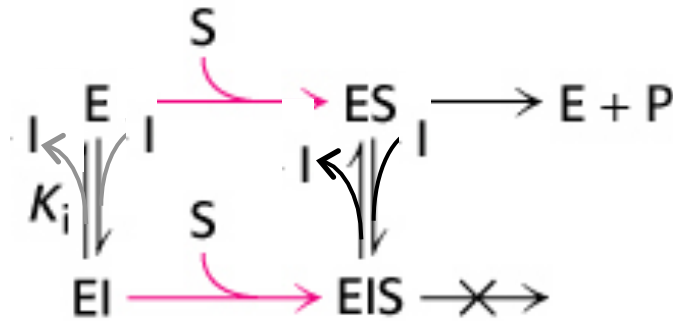
$$K_i = K'_i$$

$$\alpha = \alpha'$$

Inibizione non competitiva pura

$$V_0 = k_2 [ES]$$

$$V_{\max} = k_2 [E_t]$$



$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad V_{\max} = k_{\text{cat}} [E_t]$$

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}} [E_t] [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_{\text{cat}}^i = \frac{K_{\text{cat}}}{\alpha}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

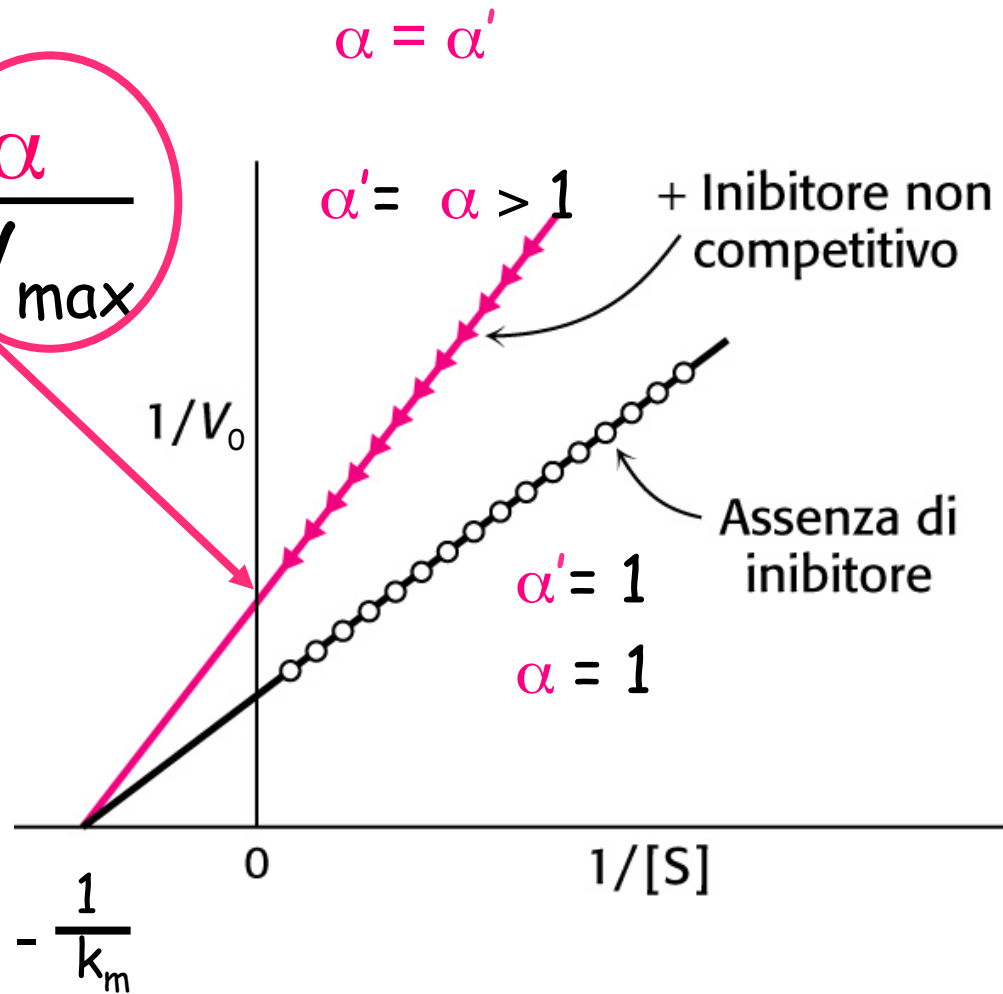
$$V_0 = \frac{K_{\text{cat}}^i [E_t] [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_0 = \frac{K_{\text{cat}} / \overbrace{(1 + [I]/K_i)}^{\alpha} [E_t] [S]}{K_m + [S]}$$

Inibizione non competitiva pura

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

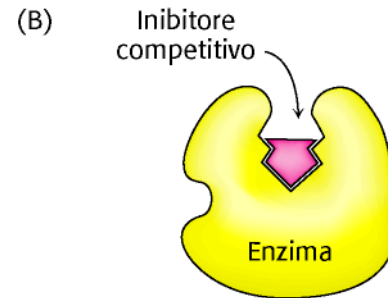
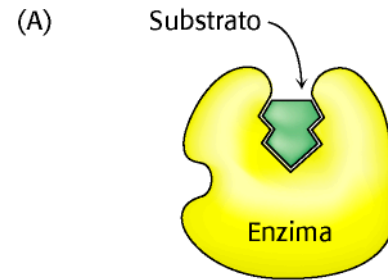
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$



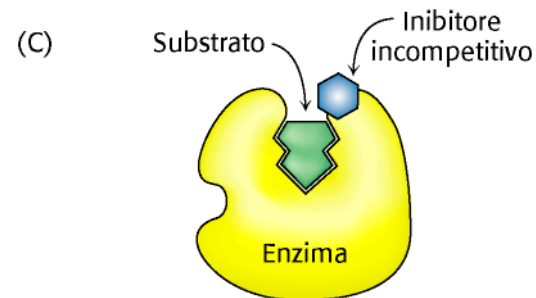
Effetti degli inibitori reversibili su V_{max} e K_m

Tipo d'inibitore	V_{max}	K_m
Nessuno	V_{max}	K_m
Competitivo	V_{max}	αK_m
Incompetitivo	V_{max}/α'	K_m/α'
Misto	V_{max}/α'	$\alpha K_m/\alpha'$
Non competitivo puro	V_{max}/α	K_m

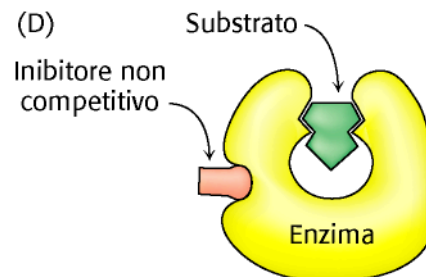
L' inibitore compete con il substrato per il legame al sito attivo



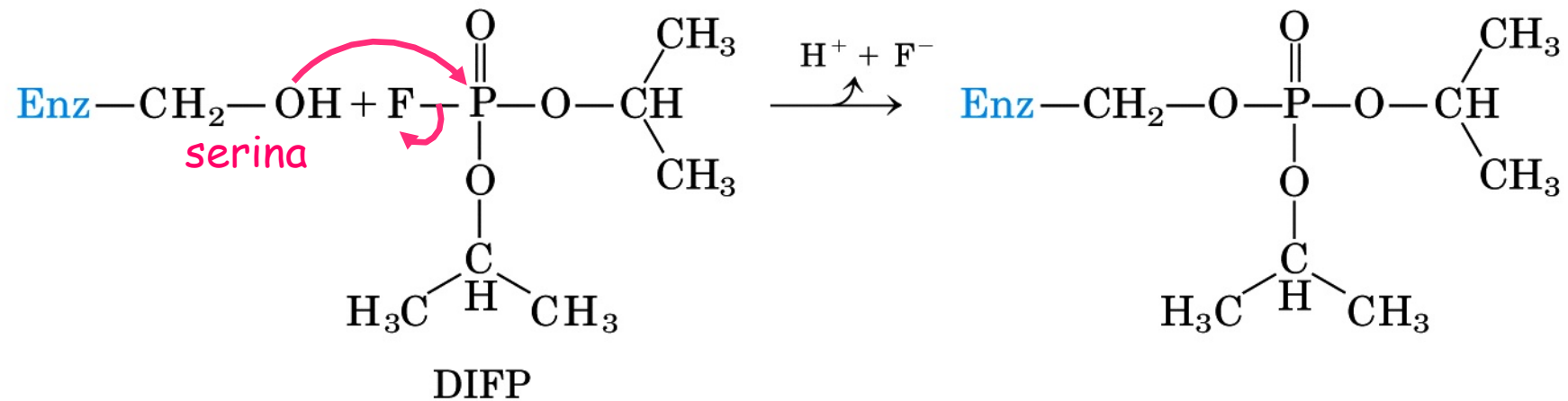
Il legame del substrato permette il legame successivo dell' inibitore



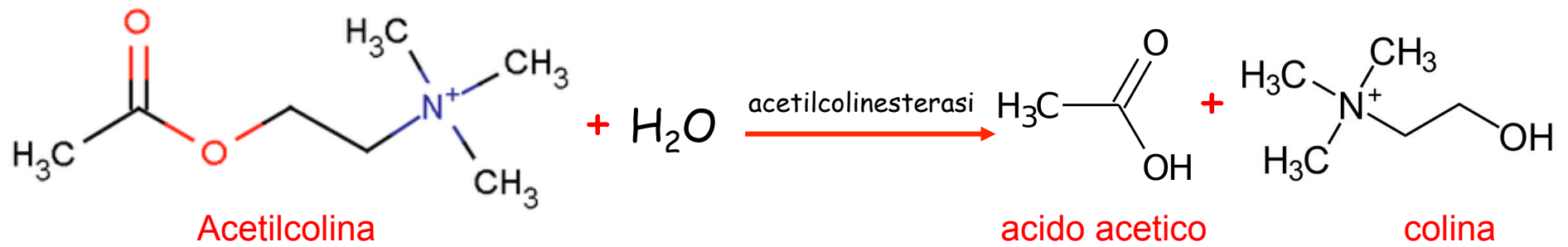
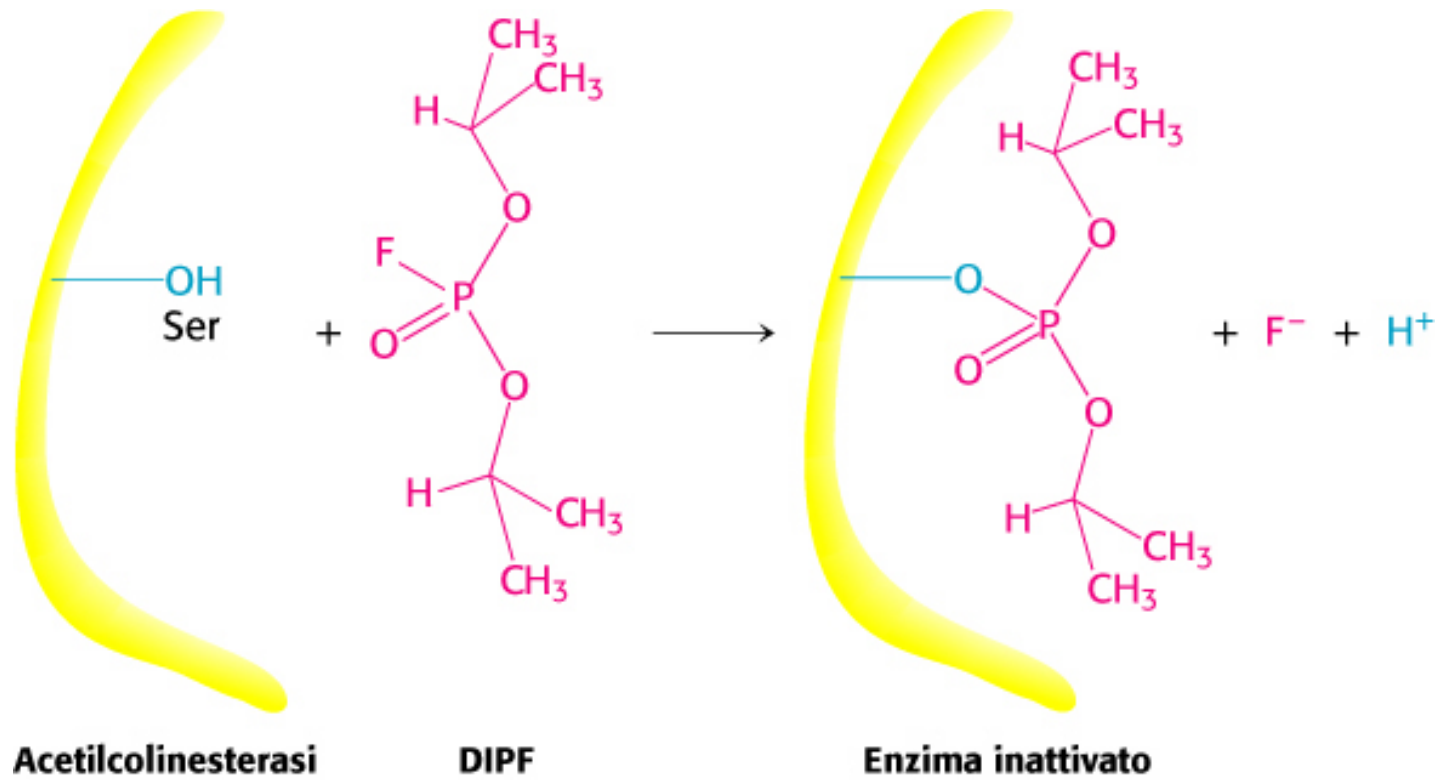
Il legame dell' inibitore ad un sito diverso dal sito attivo distorce l' enzima

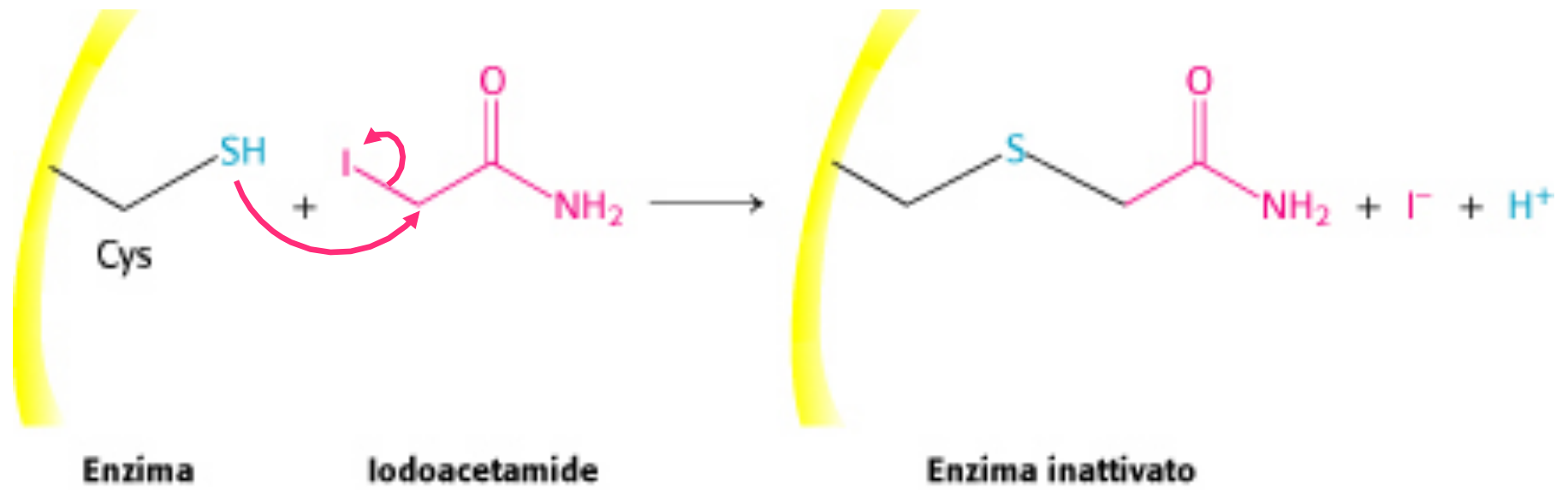


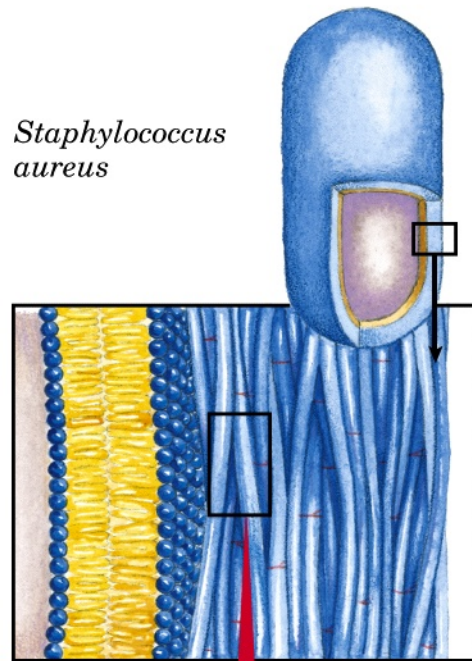
Inibizione irreversibile



Gli **inibitori irreversibili** sono utili per individuare i gruppi funzionali coinvolti nel meccanismo catalitico dell'enzima

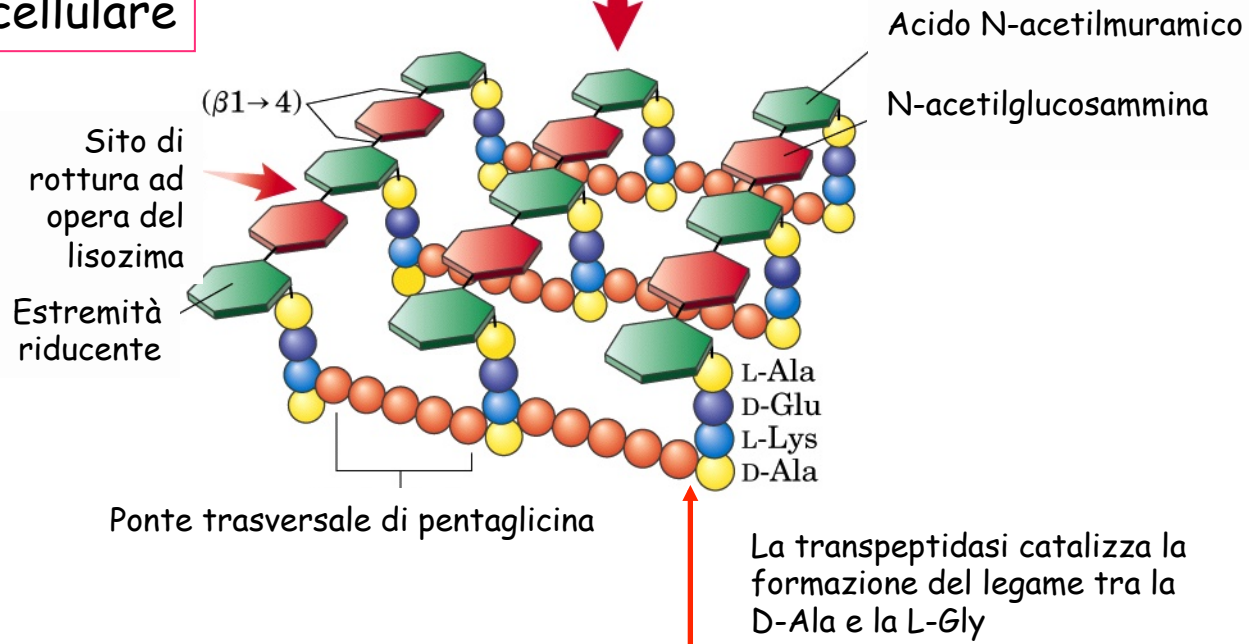


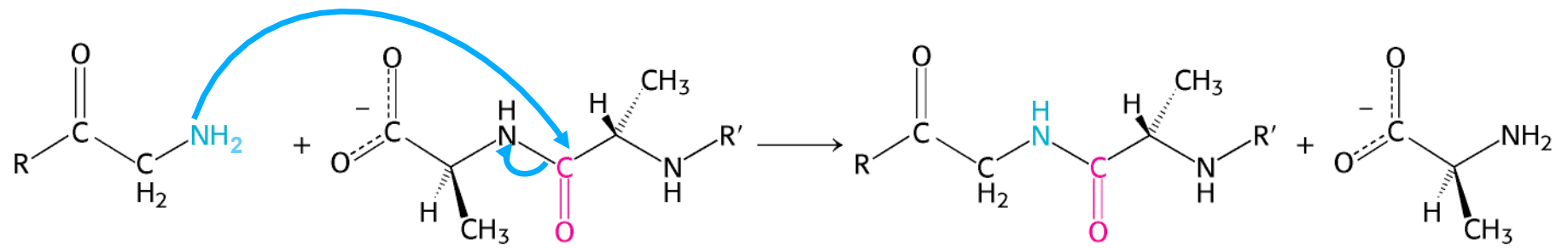




Staphylococcus aureus

Peptidoglicano della parete cellulare



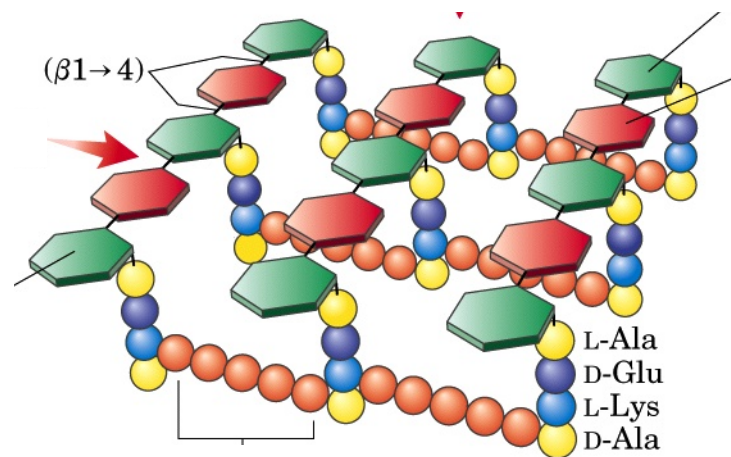


Residuo terminale di glicina del ponte pentaglicina

Unità terminale D-Ala-D-Ala

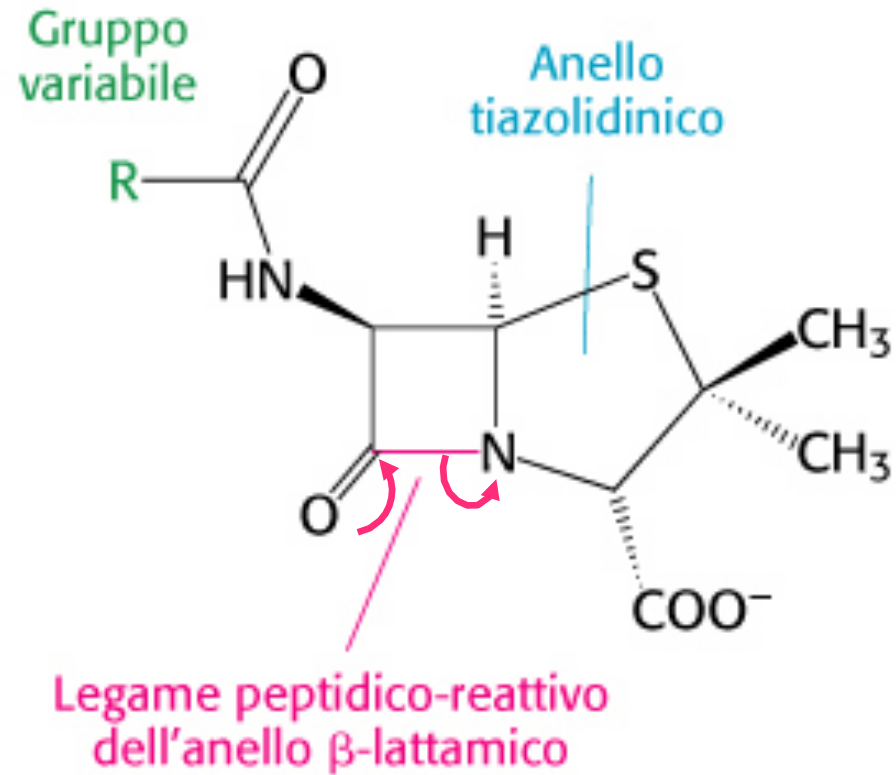
Legame trasversale Gly-D-Ala

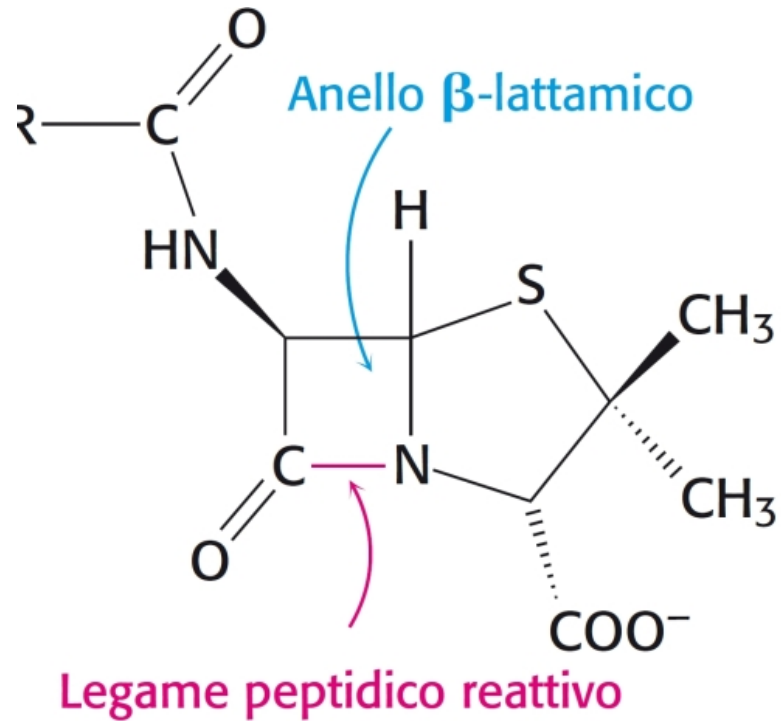
D-Ala



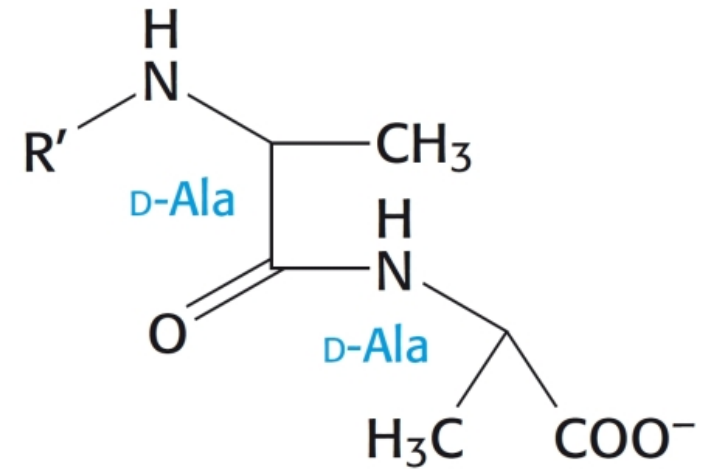
Ponte trasversale di pentaglicina

Penicillina



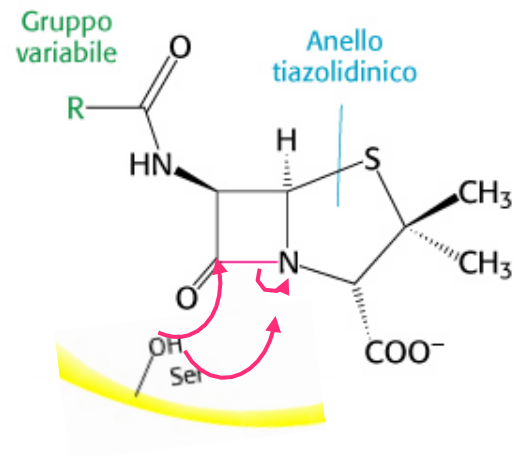
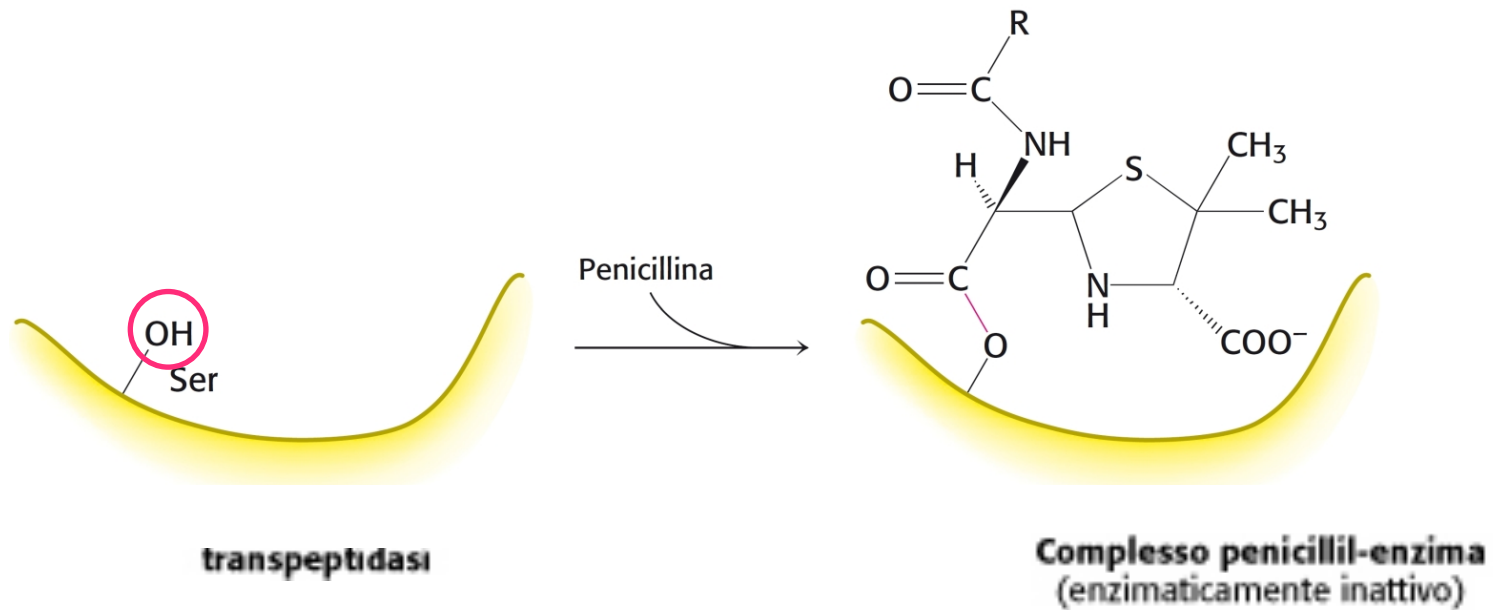


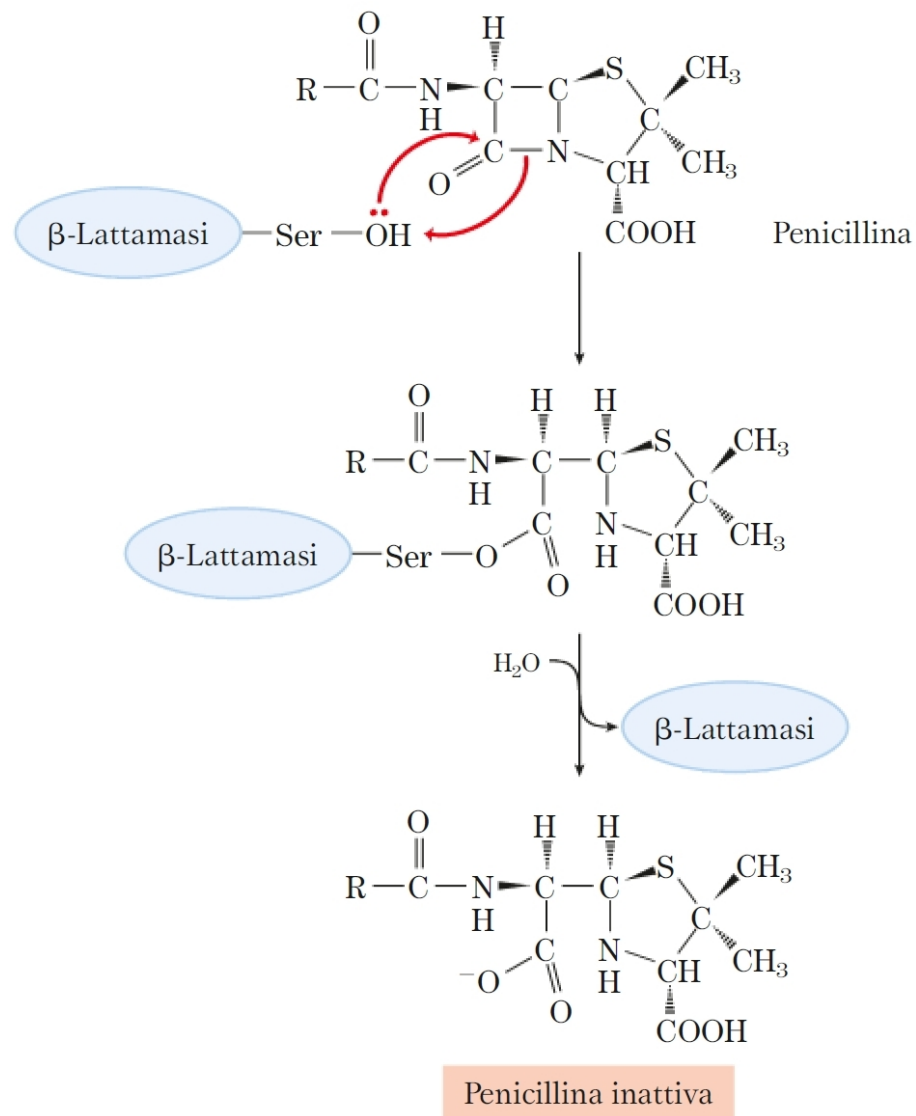
Penicillina



Peptide $\text{R}'\text{-D-Ala-D-Ala}$

Analogia strutturale tra la penicillina
ed il peptide D-Ala-D-Ala





β -Lattamasi: Enzimi prodotti dai batteri resistenti alle penicilline che inattivano questi antibiotici idrolizzando l'anello β -lattamico

Inibitori studiati nella ricerca farmaceutica

- **Inattivatori suicidi**
subiscono passaggi chimici del meccanismo di reazione dell'enzima trasformandosi in un prodotto che si lega covalentemente all'enzima inattivandolo
- **Analoghi dello stato di transizione**
si legano all'enzima con affinità molto più alta rispetto al substrato