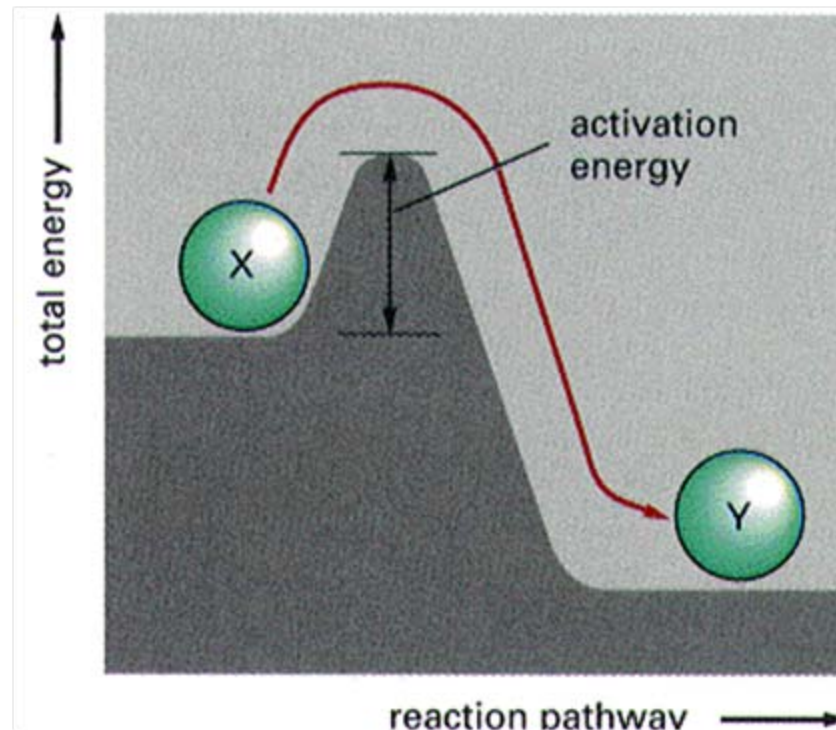
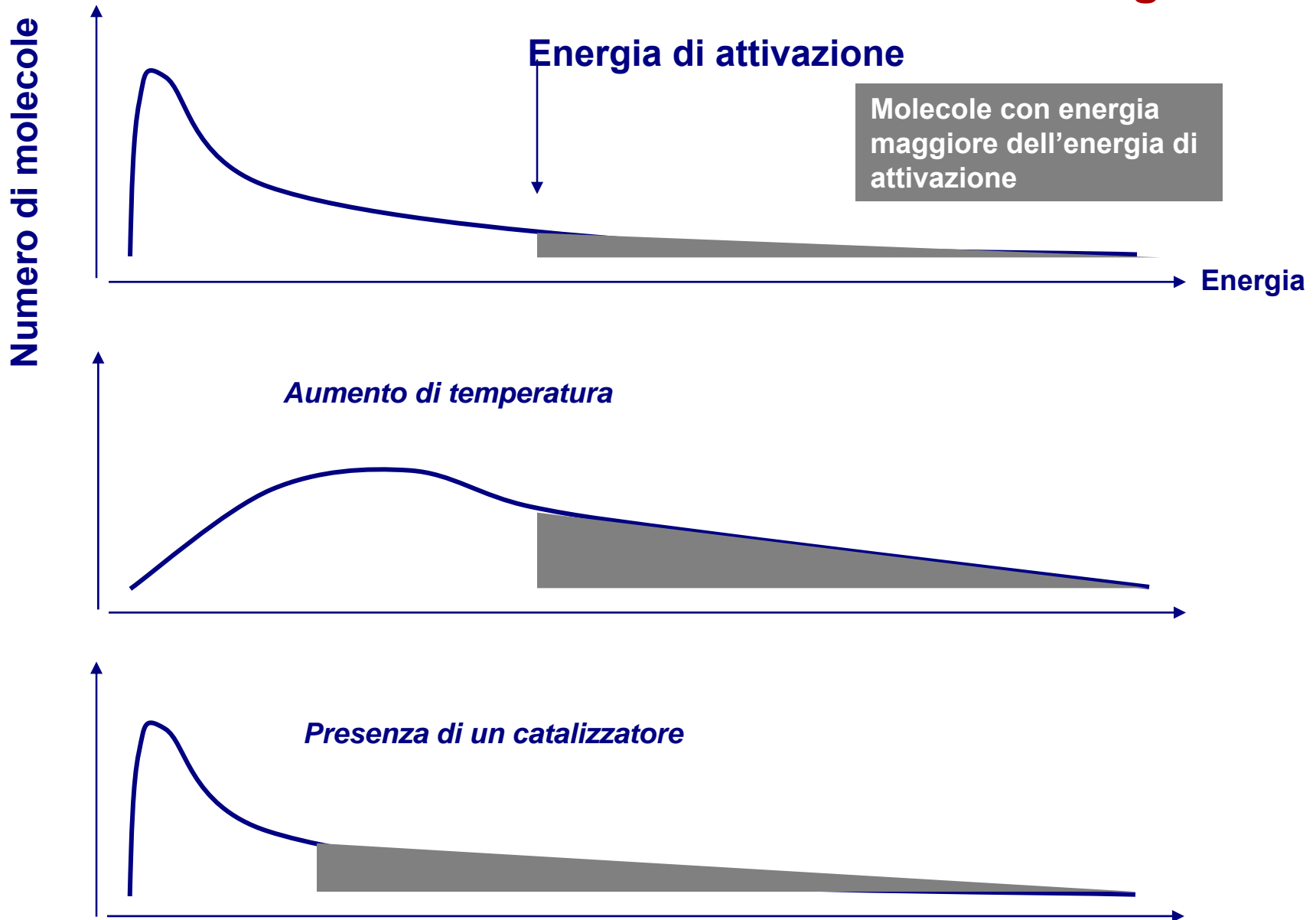


Energia di attivazione

- Y si trova ad uno stato energetico inferiore rispetto a X
 - Conversione $X \rightarrow Y$ termodinamicamente favorevole
- Ma la reazione non avviene se X non acquisisce sufficiente energia per superare la barriera dell'energia di attivazione

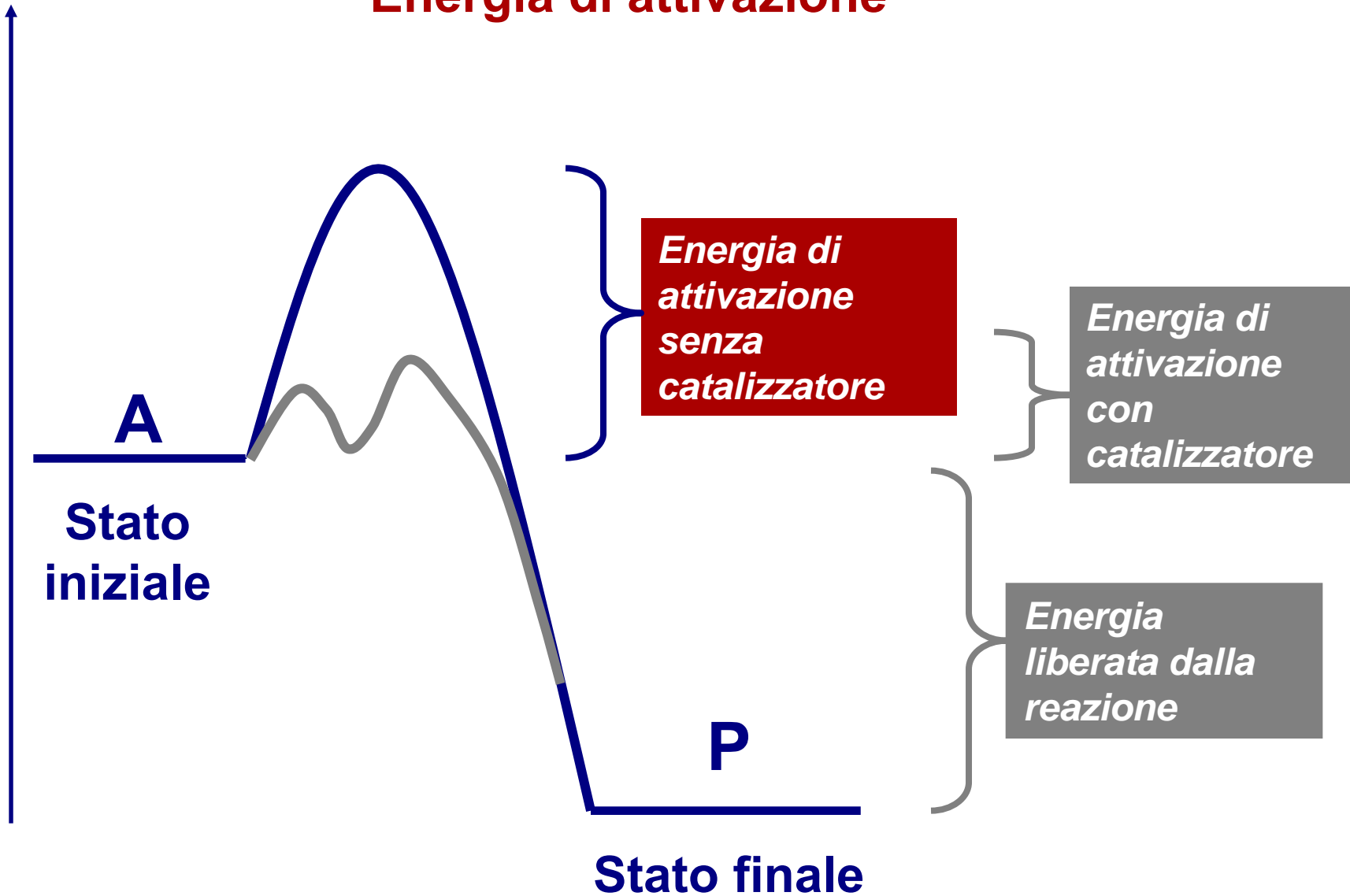


Distribuzione delle molecole a vari livelli di energia



Energia

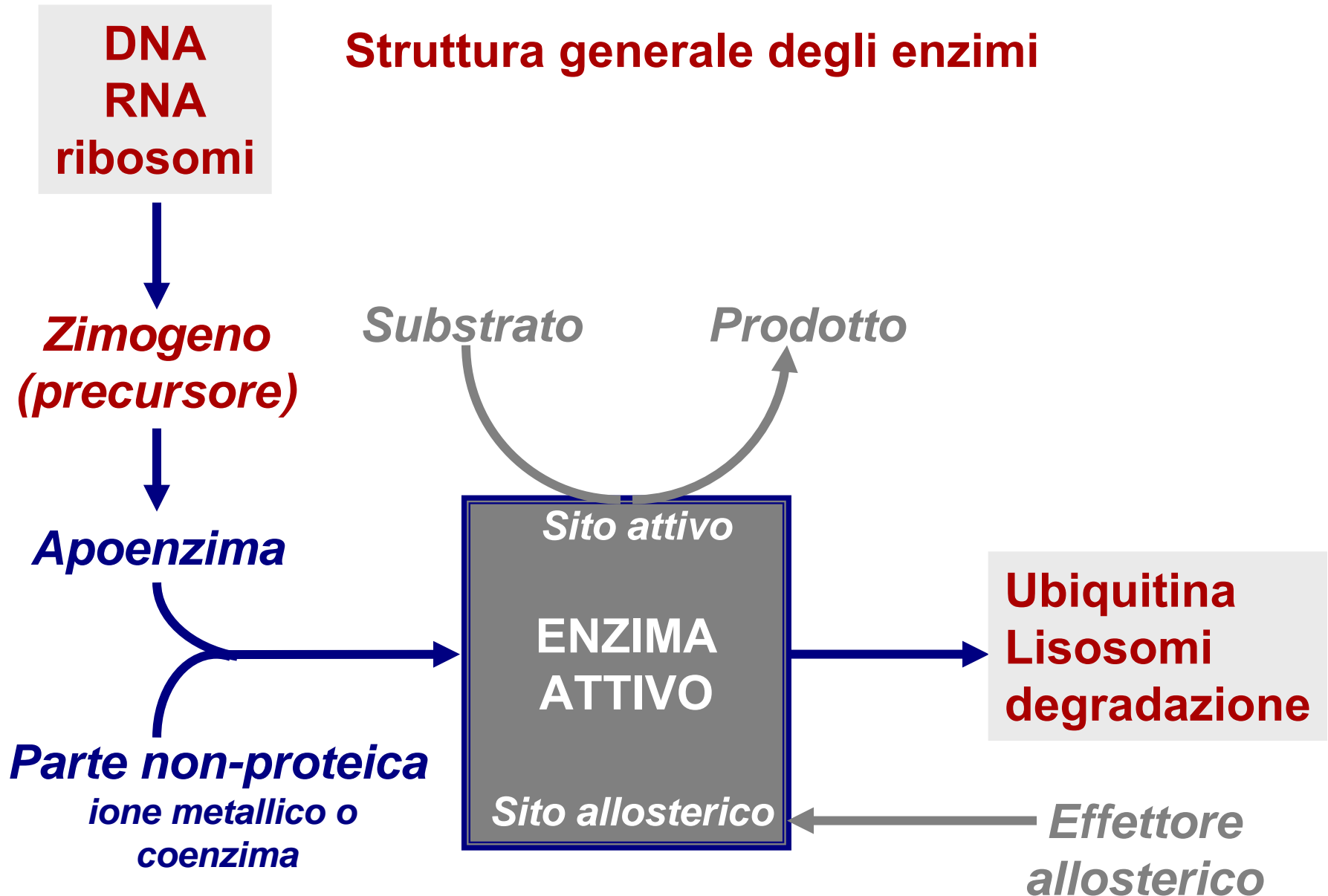
Energia di attivazione



Enzimi: catalizzatori biologici

- **Si combinano transientemente col substrato e ne abbassano l'energia di attivazione**
- **Non modificano l'equilibrio della reazione, ma solo la velocità con la quale l'equilibrio viene raggiunto**
- **Non vengono modificati nella reazione, e al termine della reazione sono subito disponibili per catalizzare una nuova reazione**
- **Stabilizzano lo stato di transizione e riducono la barriera dell'energia di attivazione inserendo stati di transizione di livello energetico più basso**

Struttura generale degli enzimi



Nomenclatura degli enzimi

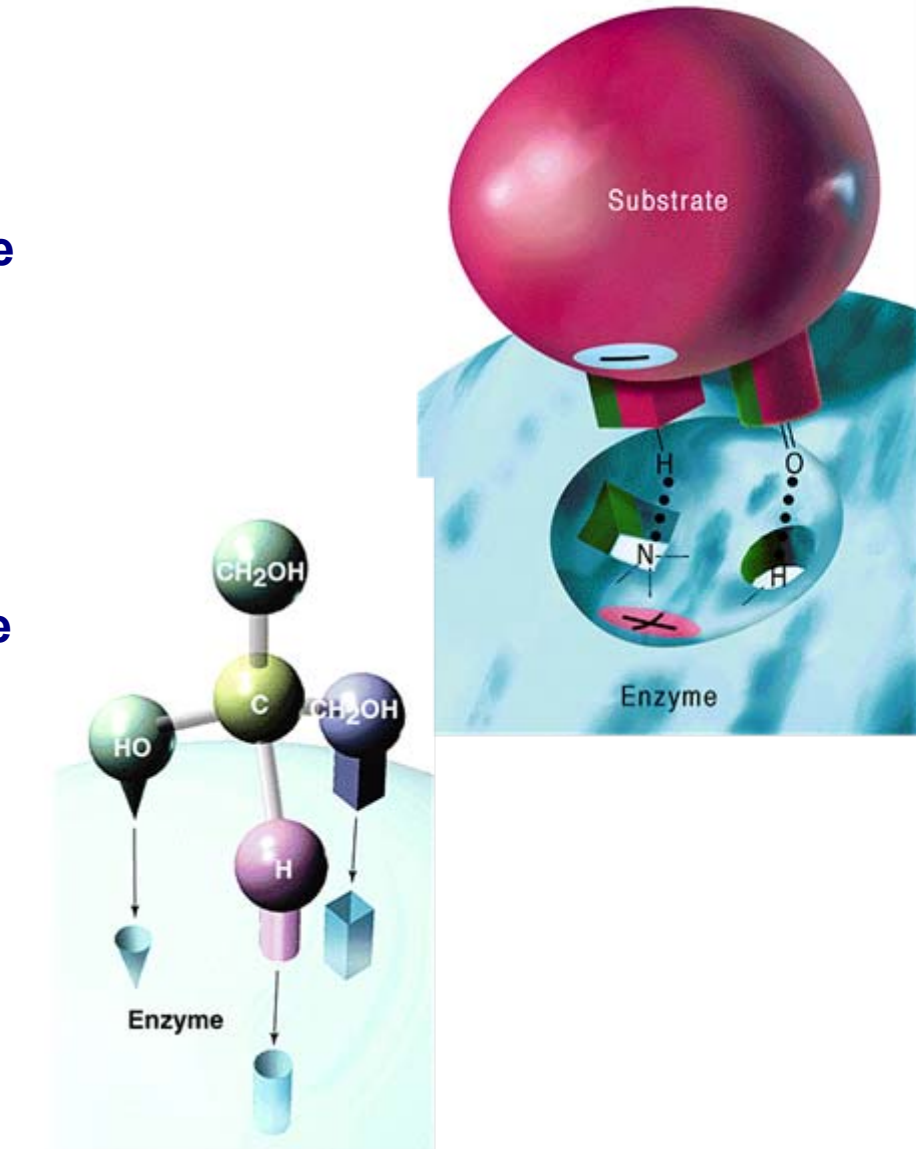
- Denominazione classica costituita da 3 parti:
 - Nome del substrato
 - Nome del coenzima
 - Nome della reazione catalizzata + “asi”
Esempio: Lattico-NAD-deidrogenasi
- International Enzyme Commission, fondata nel 1956 da Prof. M. Florkin, International Union of Biochemistry:
 - Classificazione degli enzimi secondo il sistema delle classi EC
Esempi:
 - Creatin kinasi: EC 2.7.3.2, adenosintrifosfato : creatin N-fosfo trasferasi
 - Lattato deidrogenasi: EC 1.1.1.27, lattato : NAD⁺ ossidoreduttasi
 - Ha funzionato bene fino agli anni '90 (circa 3200 enzimi)
- Progetto genoma umano (HUGO):
 - Esistono circa 20,000 geni, di cui almeno 1/4-1/3 sono enzimi

Struttura primaria e mutazioni genetiche

- **Tutte le funzioni delle proteine necessitano del riconoscimento fra zone della proteina e altre molecole o parti di molecola:**
 - **Enzima-substrato, molecole di adesione-membrane, anticorpo-antigene etc**
- **Il riconoscimento è basato sulla distribuzione dei gruppi R e quindi sulla sequenza degli aminoacidi**
 - **La zona di riconoscimento e la molecola da riconoscere devono essere complementari in termini di struttura e di carica**
- **Ogni alterazione della struttura primaria può impedire il riconoscimento o renderlo difficile, causando disfunzioni più o meno gravi**
 - **Se ne deriva uno stato patologico, quella mutazione interessa la zona di riconoscimento**
 - **Se la mutazione è silente (non genera malattie o disfunzioni), è possibile che l'aminoacido mutato non è nella zona di riconoscimento**

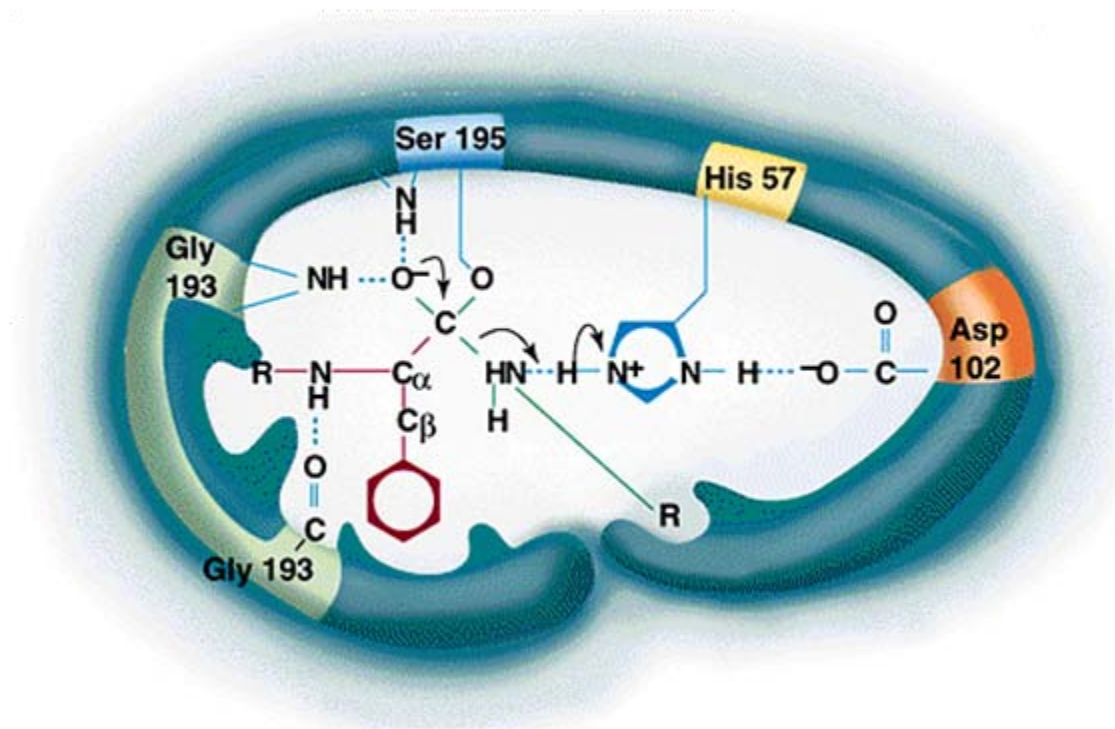
Interazione enzima-substrato

- Il sito attivo è costituito dal “negativo” del substrato
 - Si formano legami elettrostatici esatti fra enzima e substrato
- Riconoscimento tridimensionale
 - Esempio: glicerol kinasi (lega solo glicerolo in forma alfa)
 - Gli enzimi possono distinguere gli stereoisomeri D-e L- degli aminoacidi



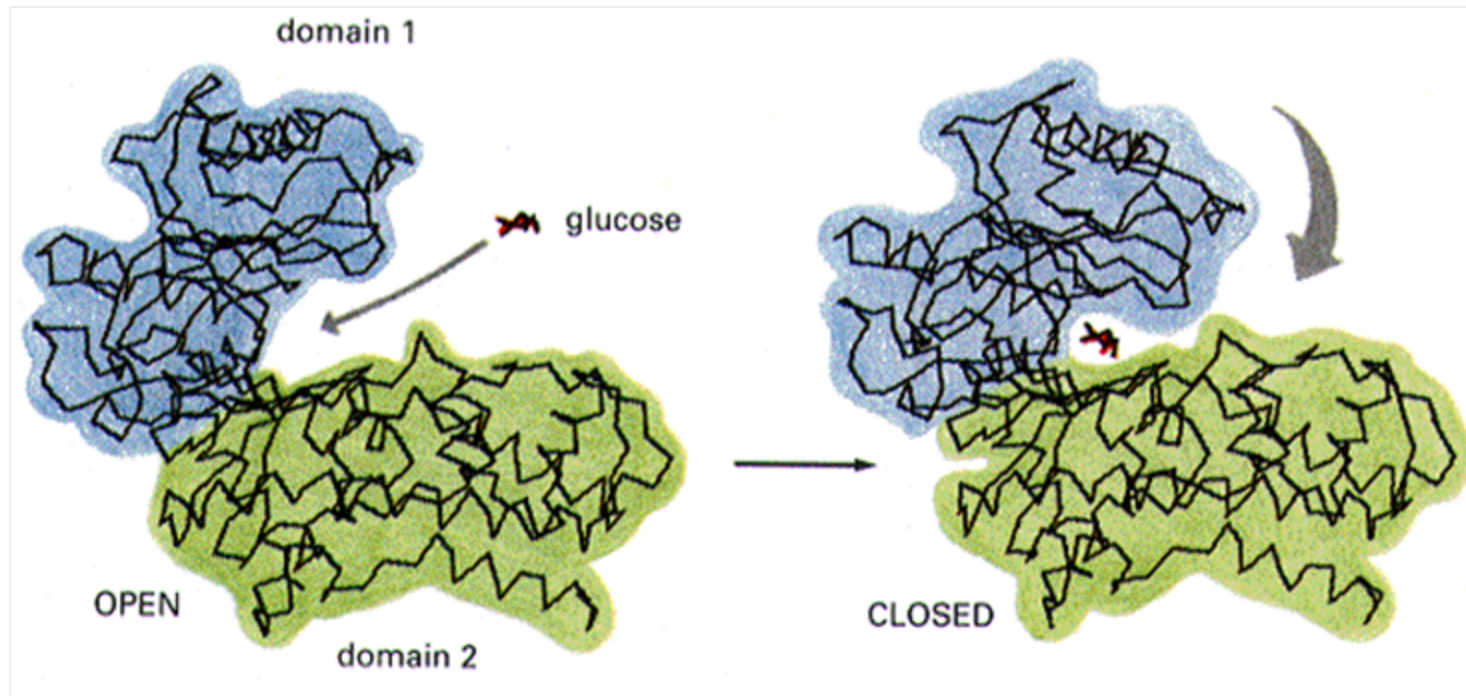
Il legame enzima-substrato avviene tramite l'interazione delle cariche del substrato con alcuni aminoacidi del sito attivo

- Esempio: proteasi a serina
- Modifiche della struttura primaria di un enzima possono mutarne l'attività causando malattie genetiche



Il legame enzima-substrato induce un cambiamento conformazionale nell'enzima

Esempio: esochinasi senza e con glucosio

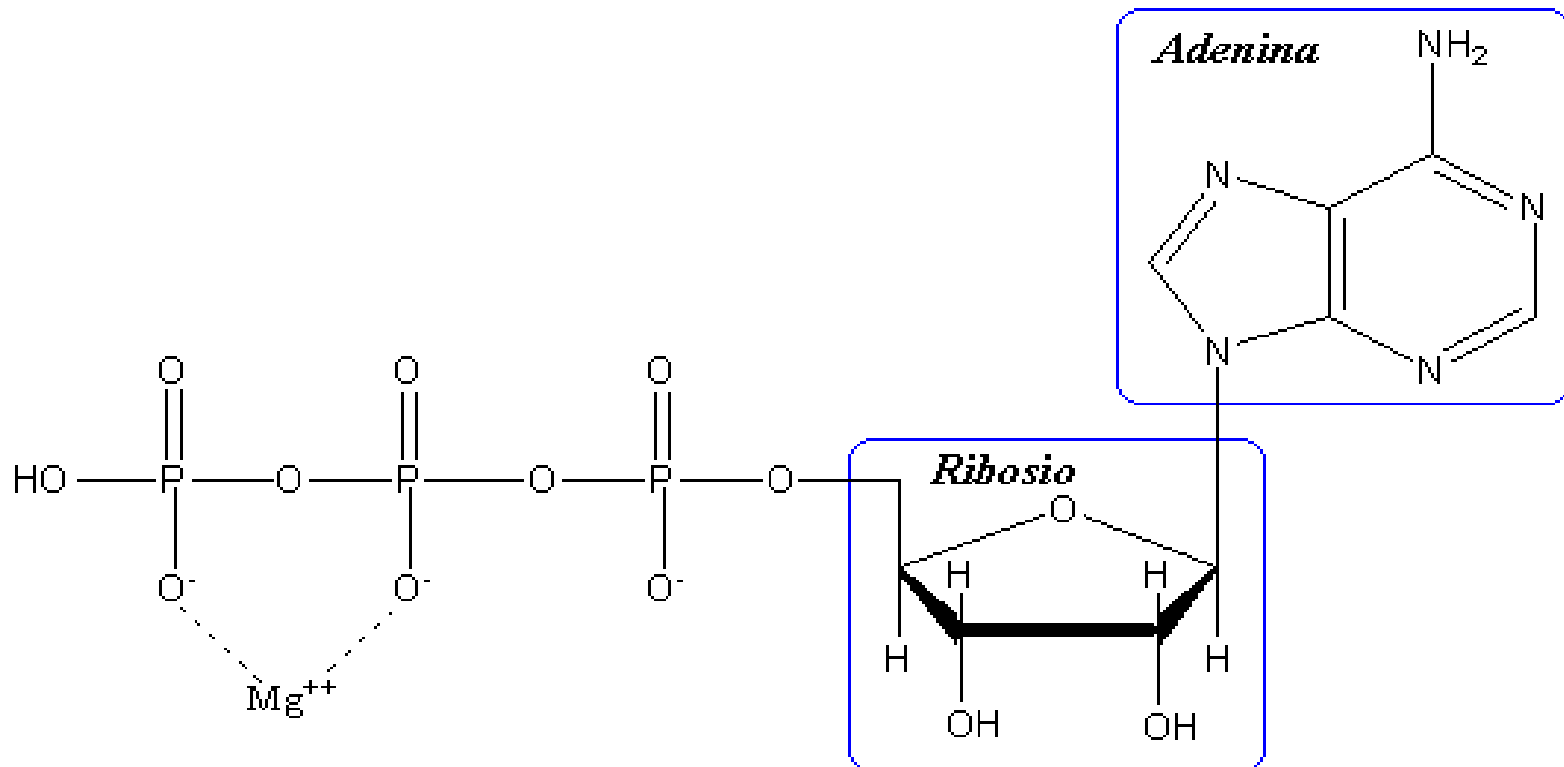


Coenzimi

- **Piccole molecole organiche, spesso derivate da vitamine**
- **Si legano con forte affinità a enzima e substrato**
- **Spesso fungono da secondo substrato**
- **Determinano la specificità della reazione catalizzata**

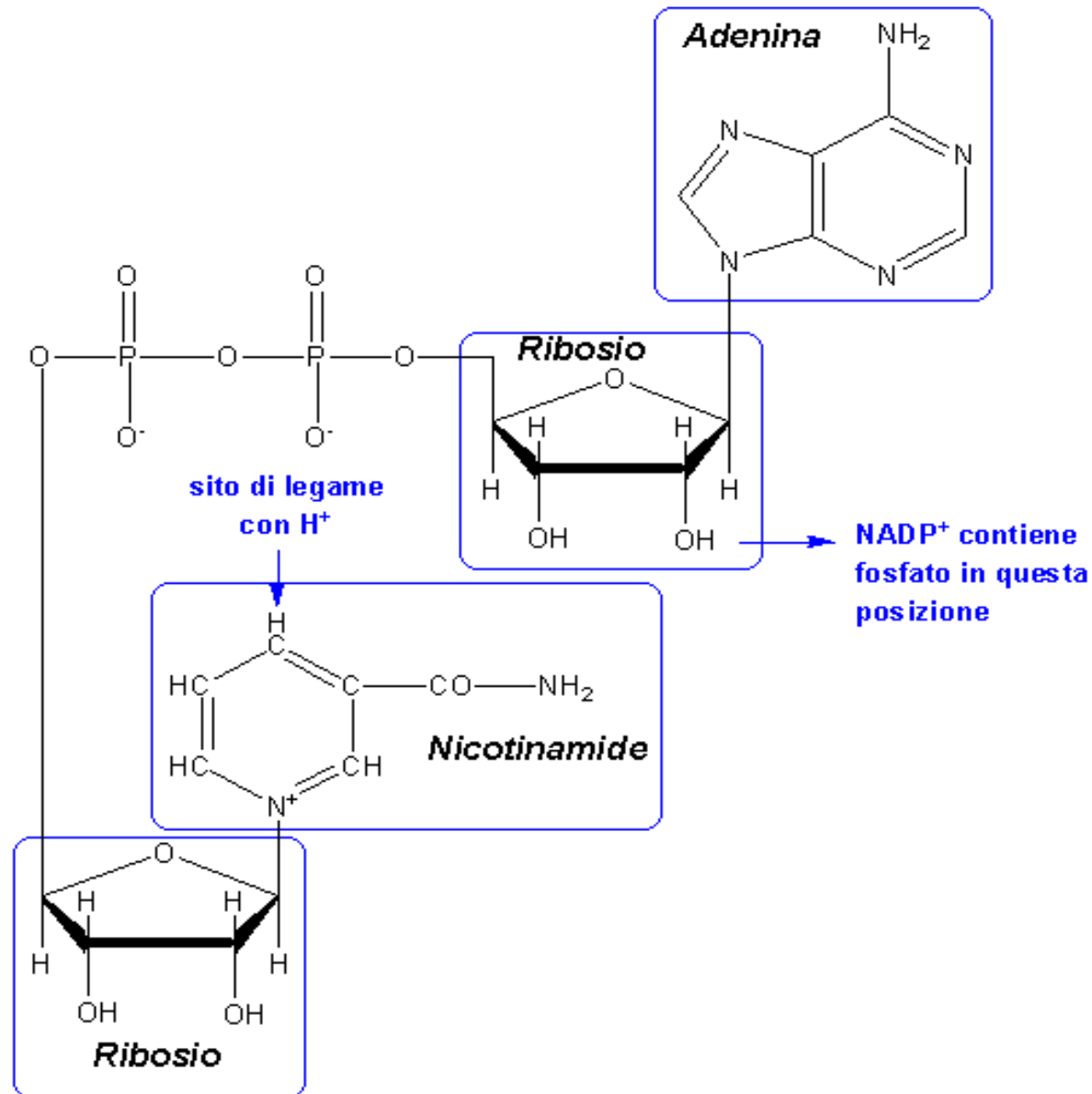
Adenosin trifosfato (ATP)

- **Coenzima delle chinasi, trasferisce un gruppo Pi al substrato**
- **Esempio: Glucosio + ATP \Rightarrow Glucosio-6-fosfato + ADP**
- **In molte chinasi, il substrato vero è Mg-ATP**



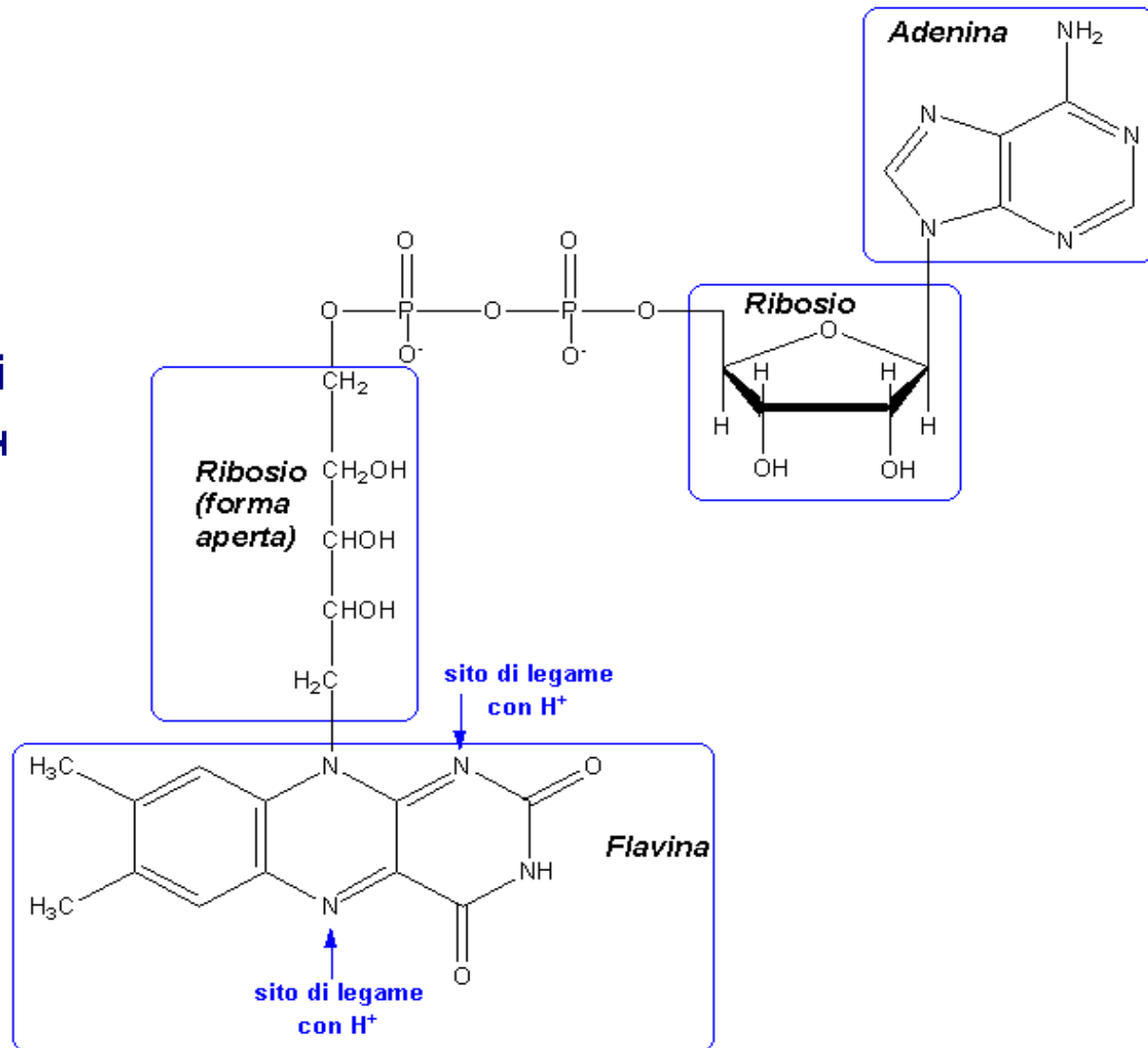
Nicotinamide Adenina Dinucleotide (NAD⁺)

- **Coenzima di deidrogenasi**
- **Derivato da niacina**
- **Trasferisce un protone da/a substrati:**
- **lattato + NAD⁺ ⇌ piruvato + NADH + H⁺**
- **Esiste una forma fosforilata NADP⁺**



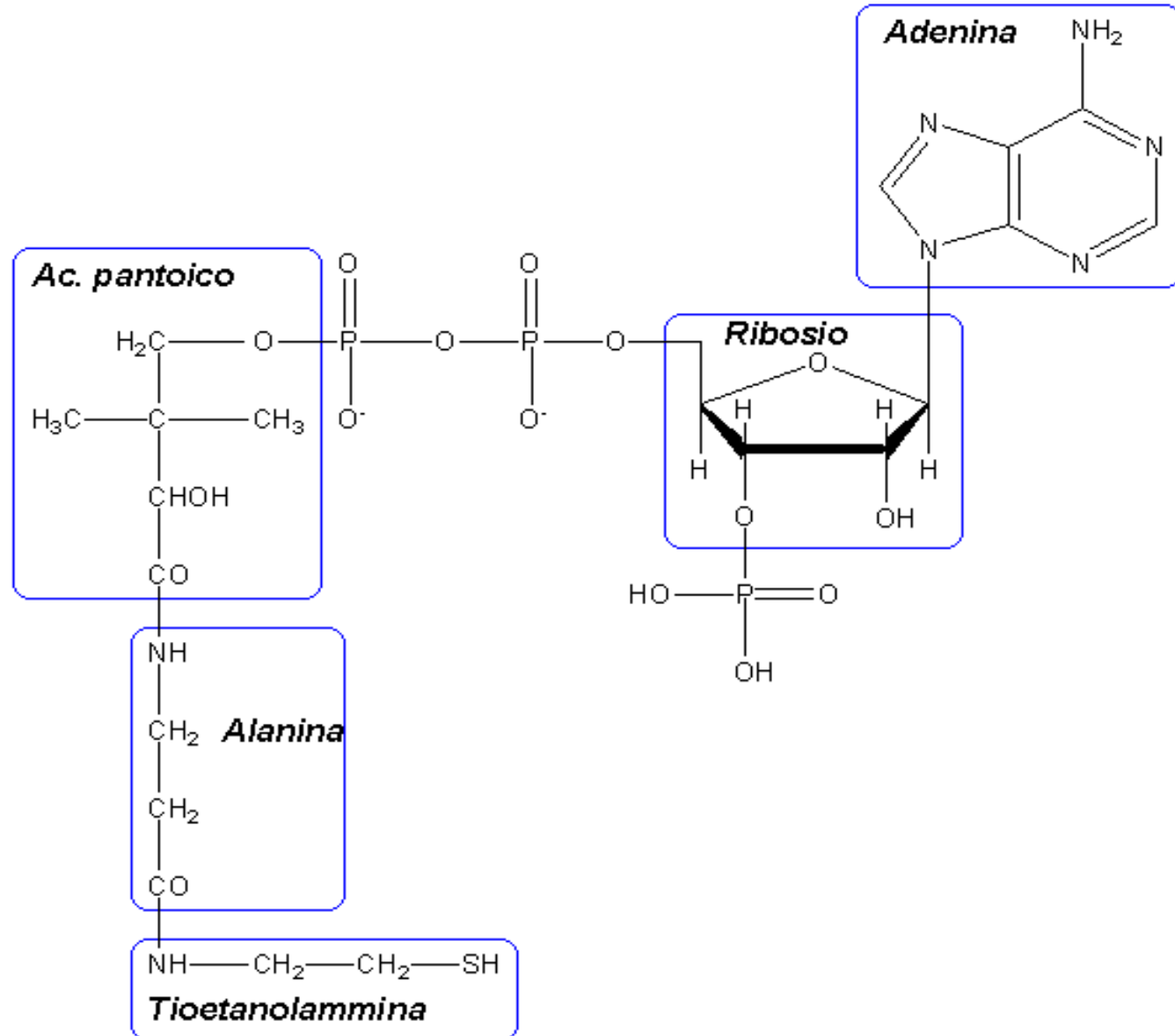
Flavina adenina dinucleotide (FAD)

- Coenzima di deidrogenasi
- Derivato da riboflavina (vit. B₆)
- Trasferisce due protoni da/a substrati
- Esempio: Succinato + FAD \rightleftharpoons Fumarato + FADH₂



Coenzima A

- **Trasportatore e attivatore di gruppi acilici (acidi grassi) e di acetato**

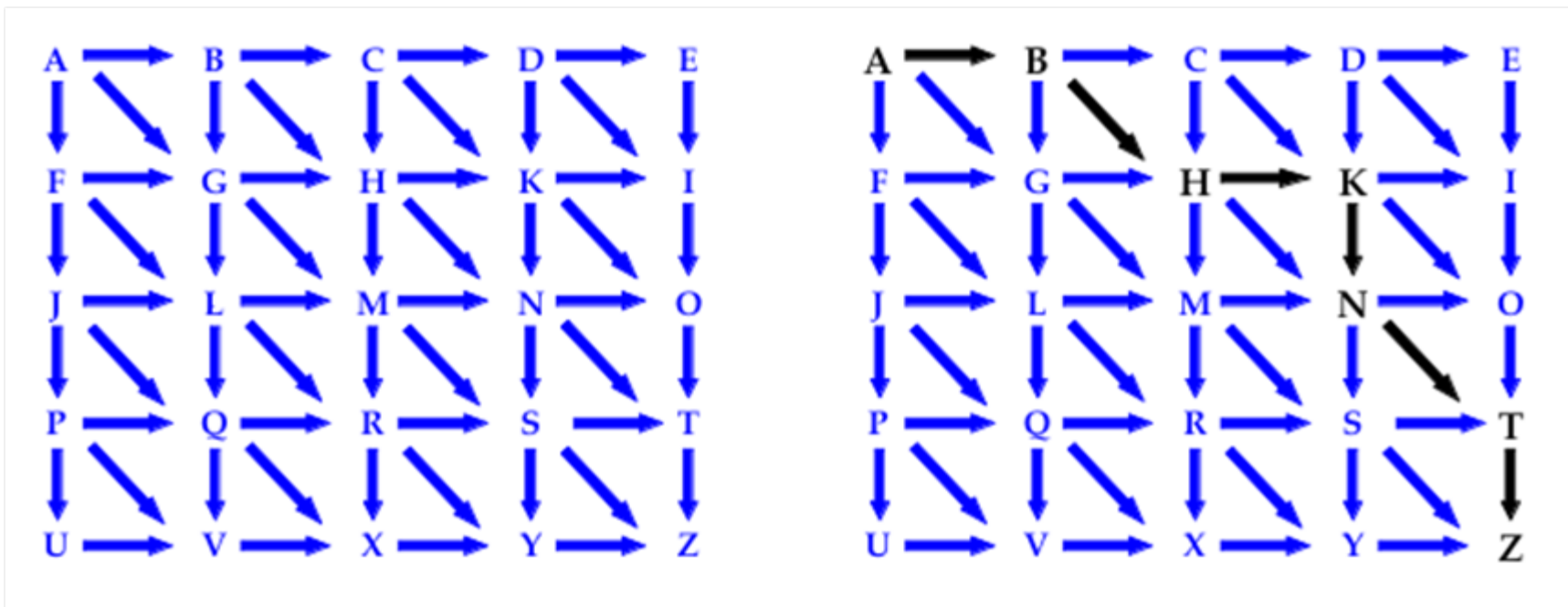
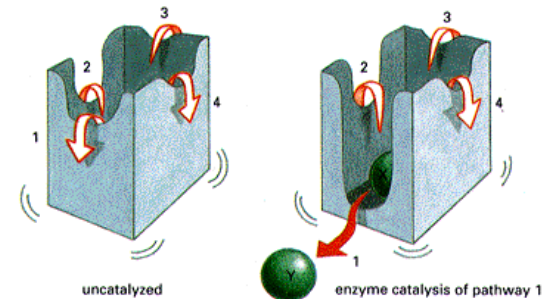


Metalli di transizione (Fe, Zn, Cu, Mn...)

- **Cofattori più che coenzimi**
- **Presenti in 2/3 degli enzimi**
- **Agiscono come stabilizzatori della proteina e come donatori/accettori di elettroni (acidi di Lewis), per esempio i citocromi**

Di tutte le reazioni possibili per un substrato, l'enzima ne favorisce una sola

- Gli enzimi forzano le vie metaboliche attraverso reazioni selezionate (ad es: $A > B > H > K > N > T > Z$) favorendo il flusso unidirezionale di materiale



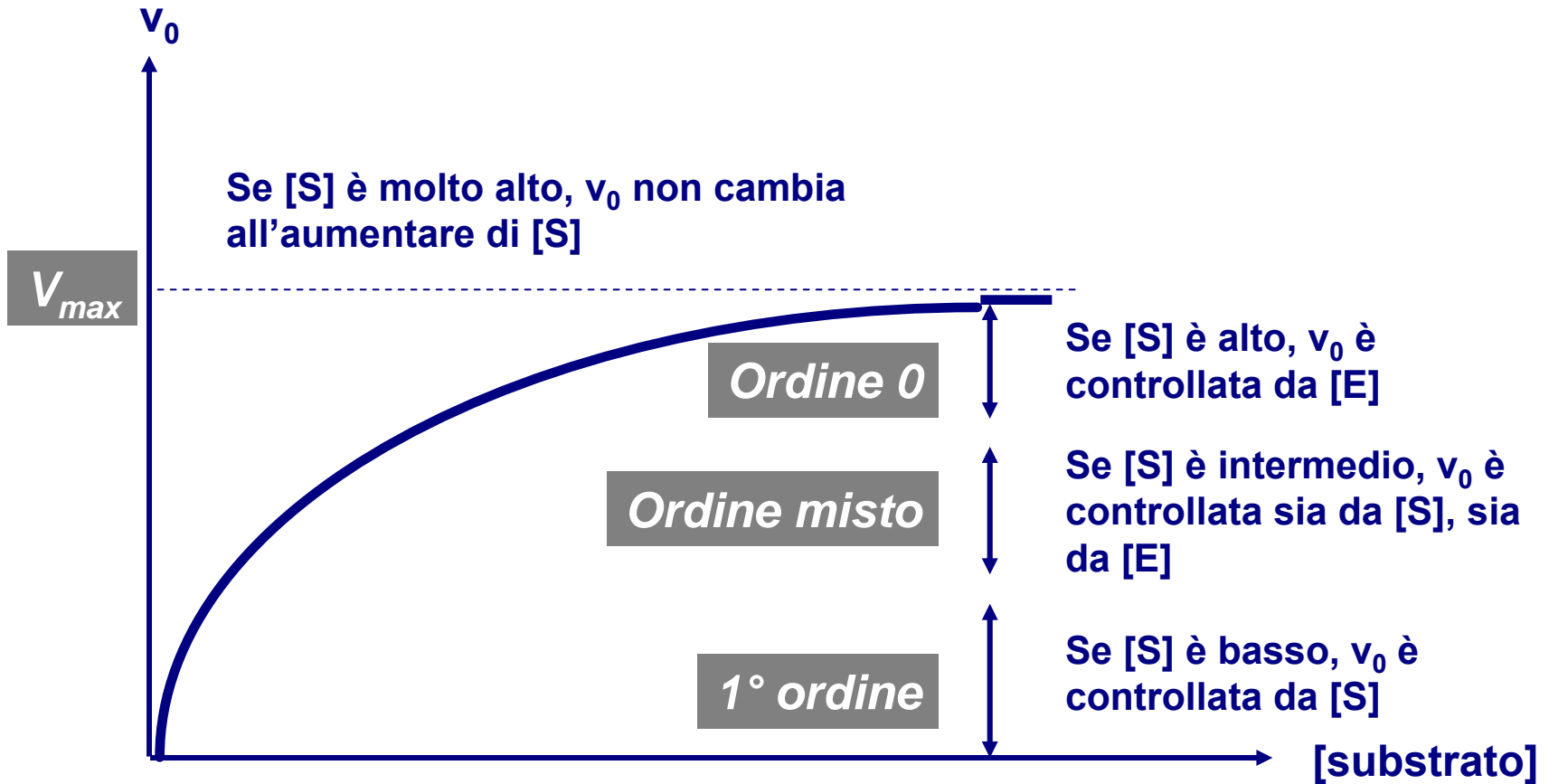
Ipotesi per l'azione degli enzimi

N.B.: $[S] \gg [E]$



- L'enzima si lega col substrato per formare ES: reazione reversibile e relativamente lenta
- Il complesso ES subisce il cambiamento conformazionale che induce la formazione di P
- L'enzima rilascia P e torna nello stato iniziale
- La velocità globale è regolata dalla formazione di ES

Interazione enzima-substrato

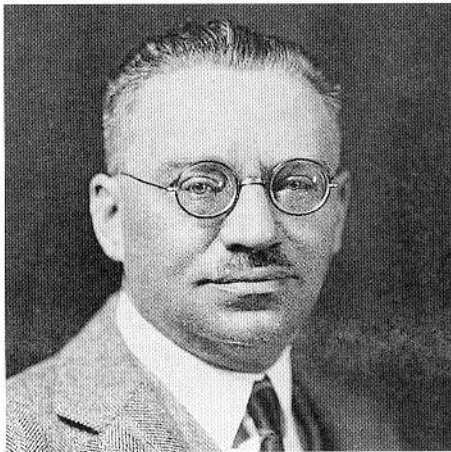


Nomenclature of the International Union of Biochemistry

- **Attività enzimatica: quantità di substrato convertito per minuto in condizioni standard di temperatura, pH e forza ionica (moli/tempo)**
 - 1 katal = 1 mol/s
 - 1 IU = 1 micromole/min
- **Costante catalitica o numero di turnover: attività enzimatica per mole di enzima (moli/tempo/mole enzima)**
- **Attività specifica di un enzima: attività enzimatica per mg di proteina (moli/tempo/mg proteina)**
 - Espressione di purezza in una preparazione

Equazione di Michaelis-Menten (1913)

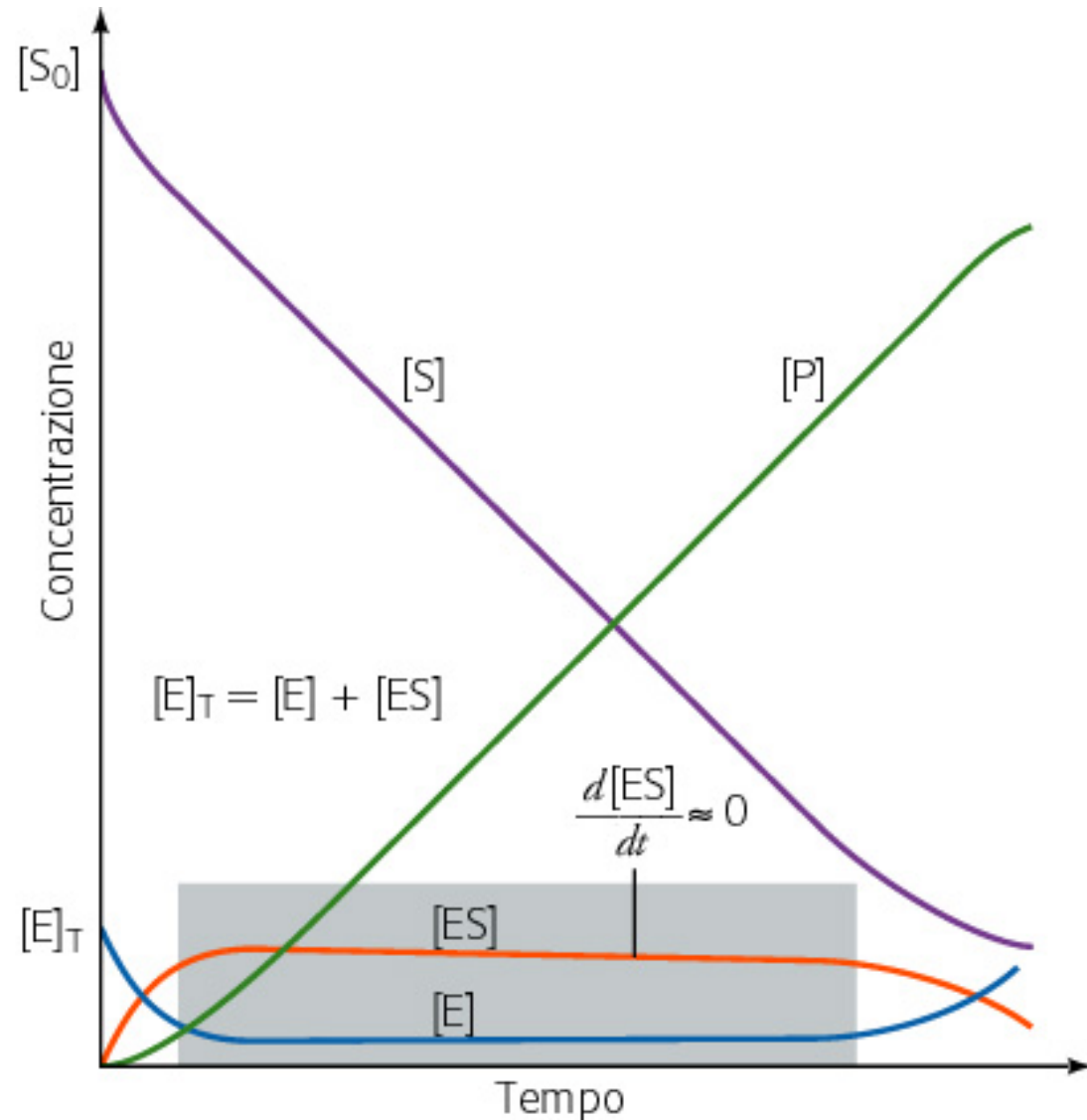
$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$



Leonor Michaelis & Maud Menten

Assunzioni di Michaelis-Menten

- $E + S \rightleftharpoons ES \Rightarrow E + P$
- 1 solo substrato
- Fattore limitante: formazione di ES
- Tutto $E \Rightarrow ES$
 - Non esiste E libero
 - E saturo di S
- ES stazionario



Ipotesi $v_0 = V_{max}/2$

- $K_M = [S]$ quando $v_0 = V_{max}/2$
- E' una concentrazione (dimensioni moli/litro)
- E' indipendente da $[E]$

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

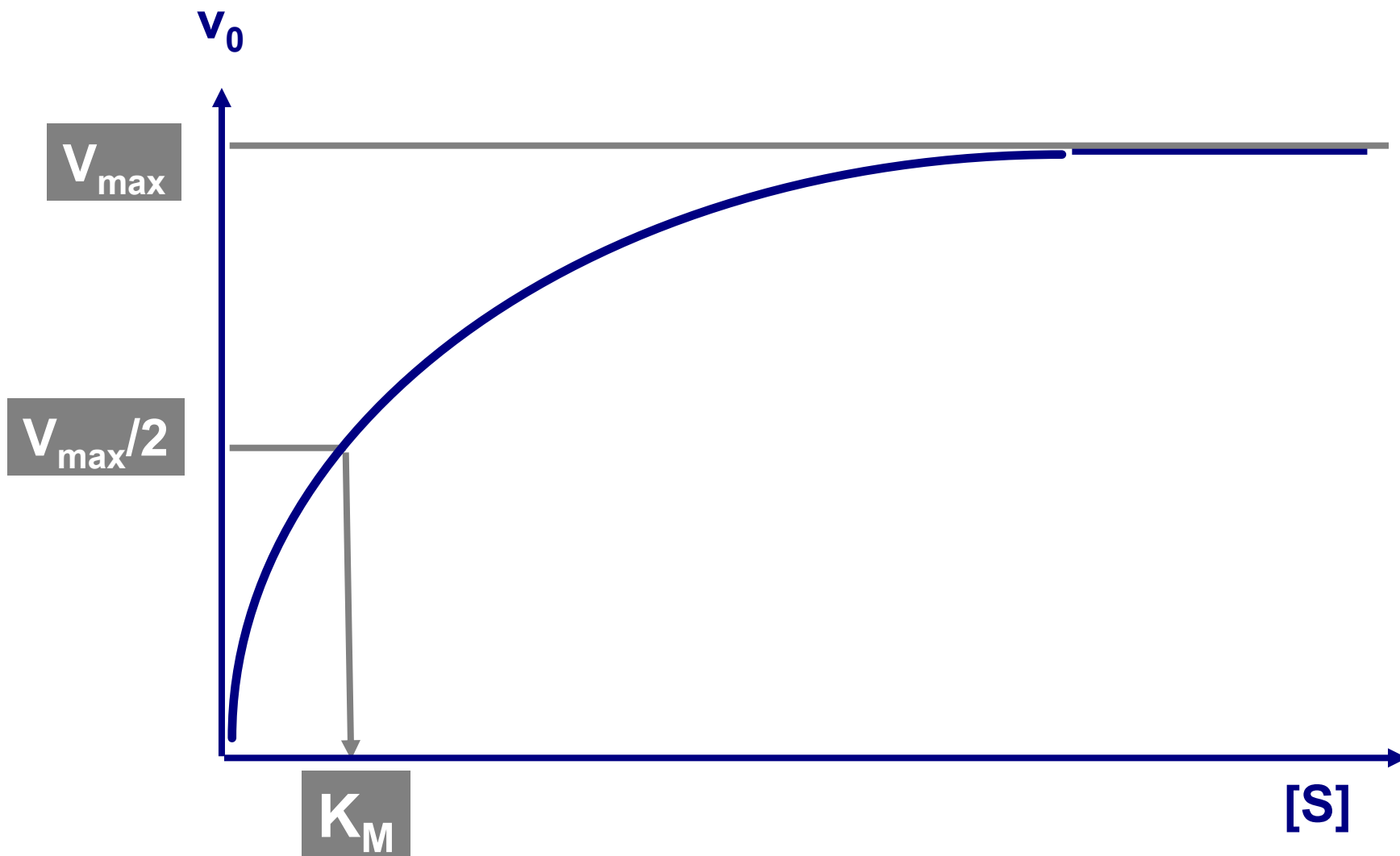
$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$K_M + [S] = 2 \cdot [S]$$

$$K_M = [S]$$

Rappresentazione grafica delle reazioni enzimatiche



Trasformazione di Lineweaver-Burk

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

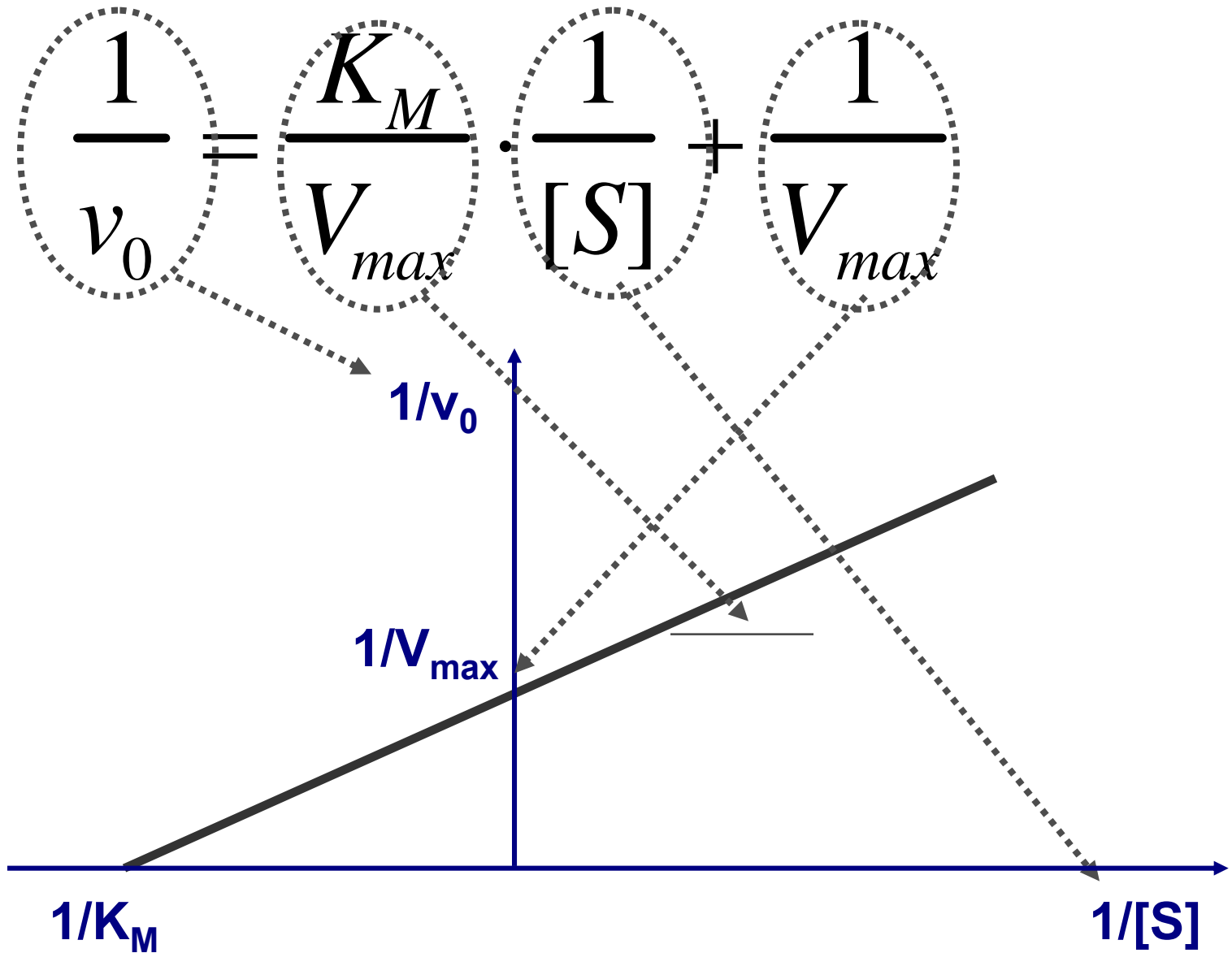
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

Y → $\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$

X →

Rappresentazione grafica delle reazioni enzimatiche



Rappresentazione grafica delle reazioni enzimatiche

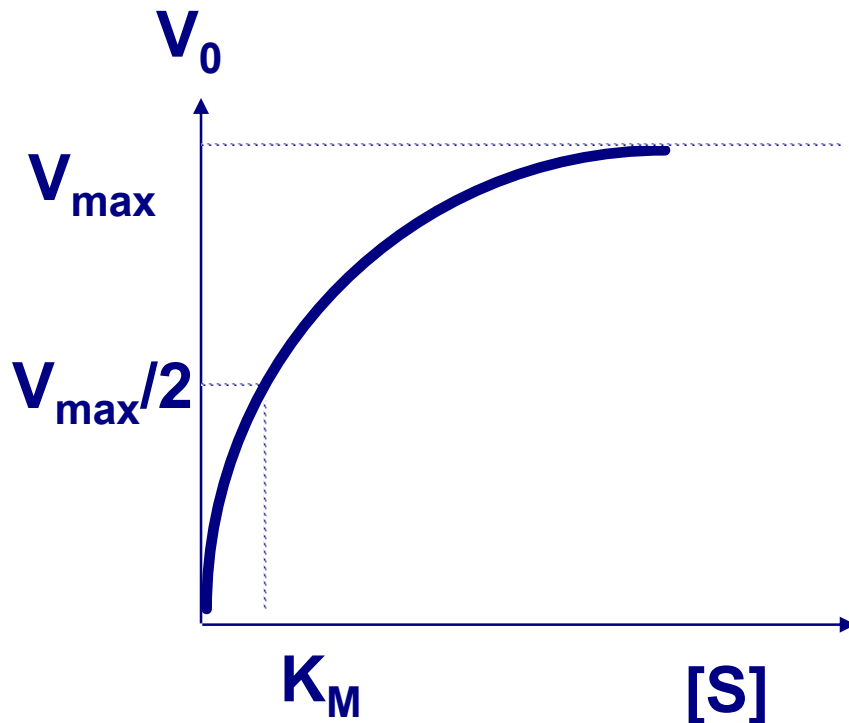
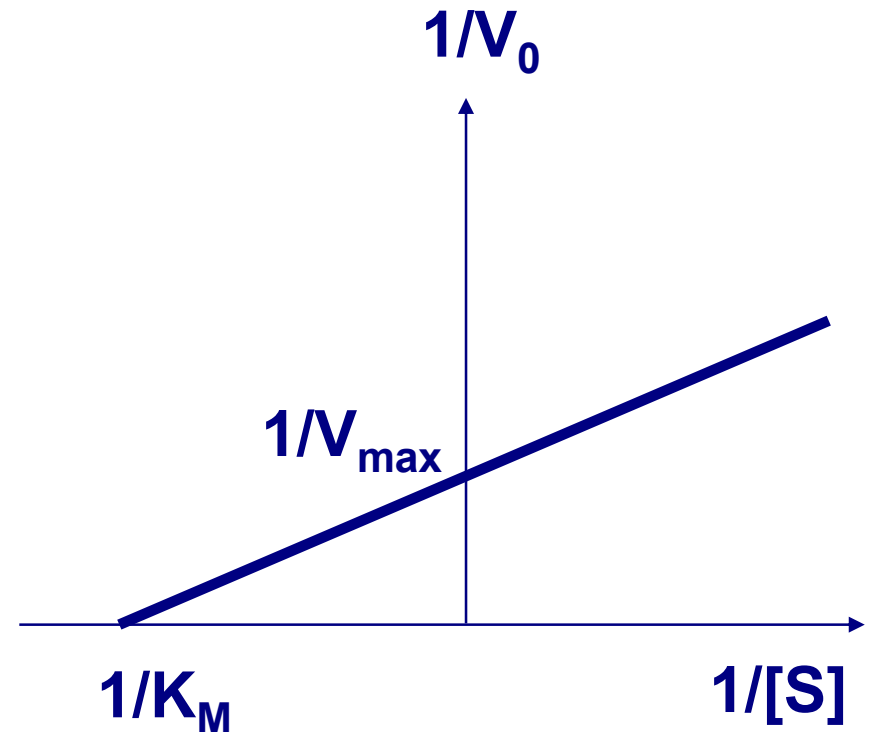


Grafico di Lineweaver-Burk



REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

Necessità fisiologica della regolazione dell'attività enzimatica

Controllo del livello di enzima

Modulazione dell'attività dell'enzima

Il buon funzionamento della cellula richiede che le varie attività enzimatiche siano regolate

- **In condizioni di stato stazionario, i processi cellulari non funzionano mai al massimo delle loro capacità, ma possono anche venire completamente disattivati in alcune condizioni**

- **Ciò consente di:**
 - **non produrre prodotti inutili**
 - **economizzare l'energia cellulare**
 - **umentare rapidamente l'attività quando necessario**

Reversibilità delle reazioni enzimatiche

- L'enzima favorisce il raggiungimento dell'equilibrio, quindi in teoria catalizza anche la reazione inversa



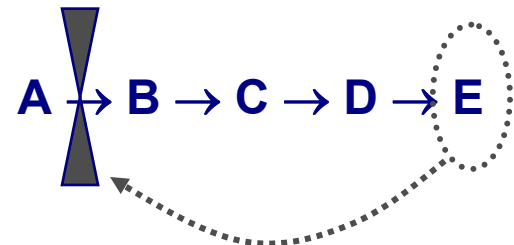
- Ma, se B è substrato di una reazione successiva, la prima reazione diventa praticamente irreversibile



- Ciò vale per catene anche molto lunghe di reazioni (catene enzimatiche)



- Anche se le singole reazioni enzimatiche sono reversibili (specie quelle con $\Delta G \approx 0$), in pratica il flusso è unidirezionale perché il prodotto di una reazione funge da substrato per la reazione successiva
- Spesso il prodotto terminale di una sequenza di reazioni (E) inibisce il deflusso della stessa catena a livello della prima reazione $A \rightarrow B$
 - L'accumulo di E "chiude il rubinetto"
 - La mancanza di E "riapre il rubinetto"



Caratteristiche generali delle reazioni regolatorie

- $\Delta G \ll 0$ (maggior efficacia)
 - All'inizio della catena enzimatica
 - Inibizione o regolazione da parte del prodotto finale
 - Gli enzimi coinvolti sono spesso multimerici
-
- Capacità catalitica = (concentrazione di enzima) x (efficienza catalitica)

Controllo della concentrazione di enzima (regolazione lenta)

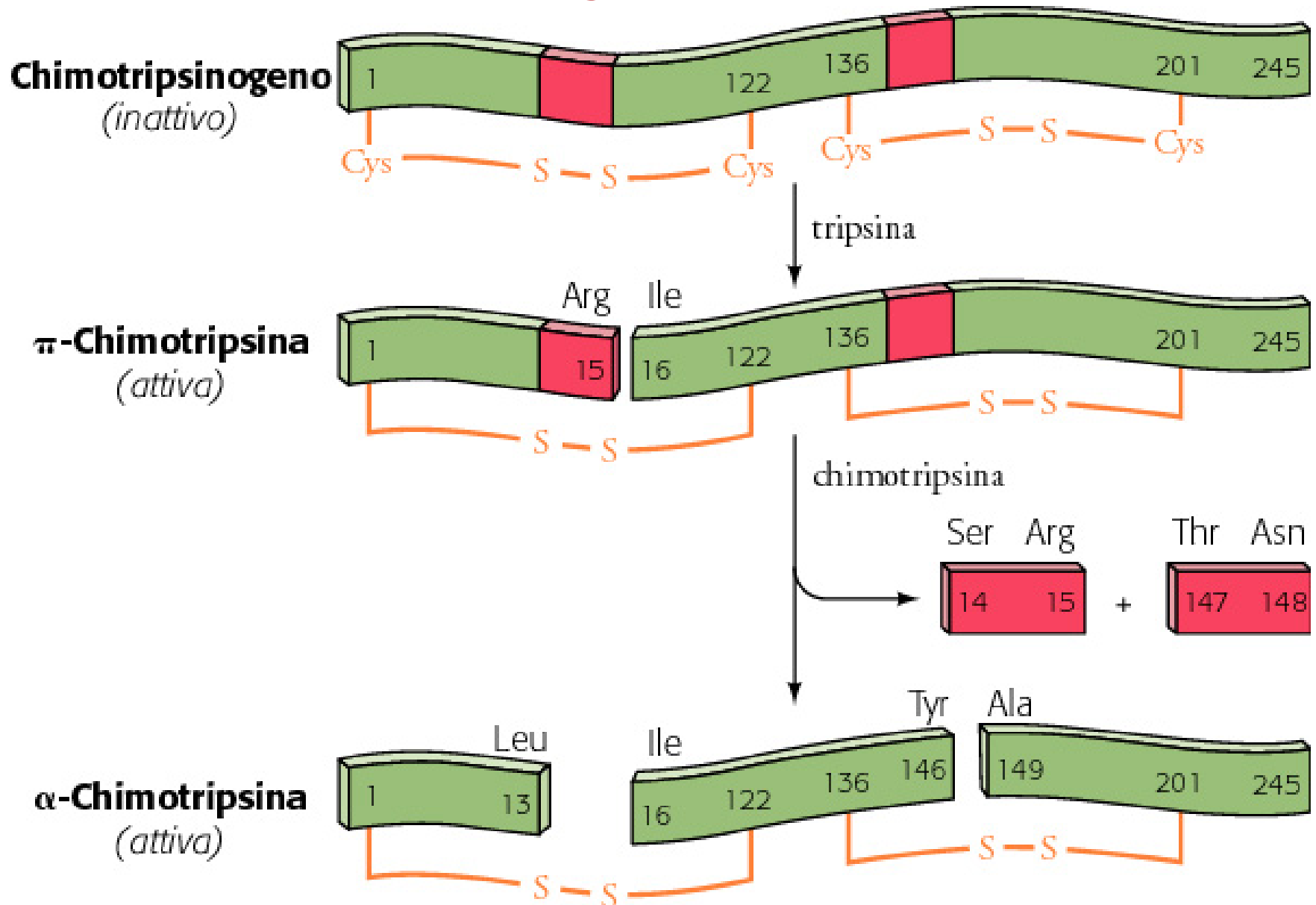
Ad ogni istante, il livello di un enzima dipende da:

- **Velocità di sintesi della proteina**
- **Velocità di trasformazione da zimogeno (o pro-enzima) in enzima attivo**
- **Velocità di degradazione**

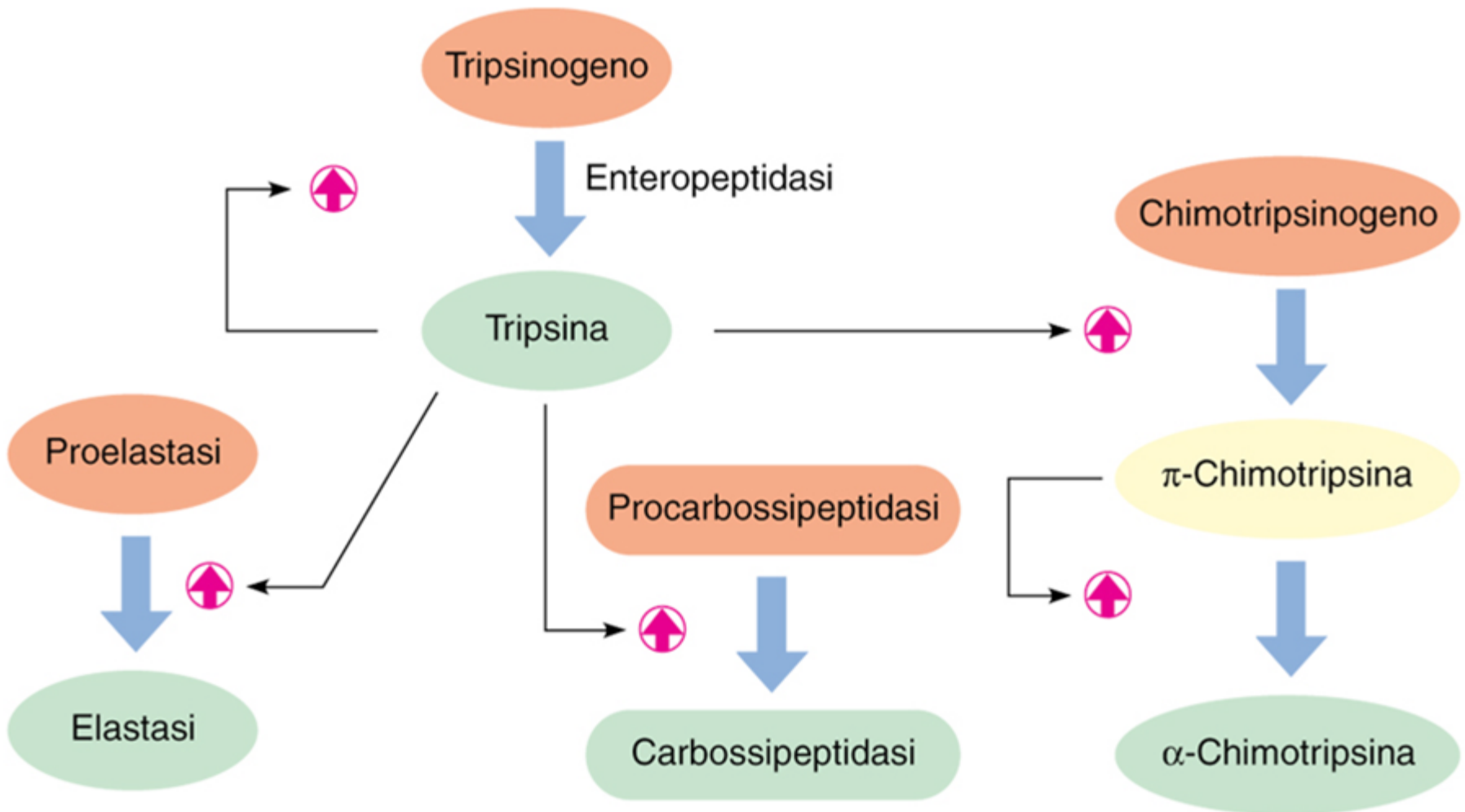
Velocità di sintesi

- **Può aumentare in seguito all'accumulo intracellulare del substrato**
- **Può aumentare in presenza di induttori senza relazione col substrato**
- **Può essere repressa dai prodotti terminali della catena enzimatica**

Chimotripsinogeno → chimotripsina



Attivazione degli zimogeni pancreatici mediante taglio proteolitico



Funzioni biologiche della proteolisi ubiquitina-dipendente

➤ **Regolazione del ciclo cellulare**

- **Essenziale per uscire dalla fase mitotica e separare i cromosomi durante mitosi e meiosi**
- **Malfunzionamenti causano formazione di cellule con numero anomalo di cromosomi (Down e tumori solidi)**

➤ **Riparazione del DNA, cancro e apoptosi**

- **Essenziale per mantenere il livello di p53 (il guardiano del genoma)**

➤ **Risposte immunologiche e infiammatorie**

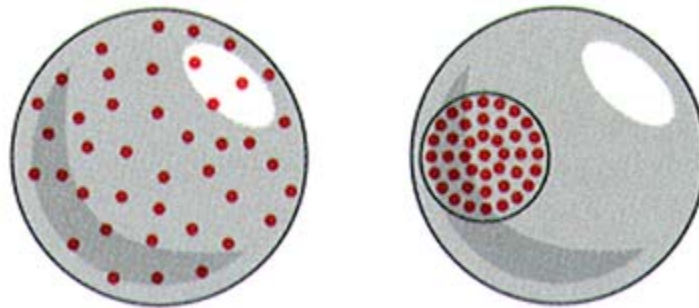
- **Regolazione di NF- κ B (fattori di trascrizione) per attivare l'espressione genica**
- **Generazione di peptidi MHC (difesa contro le infezioni virali)**

➤ **Fibrosi cistica**

- **Coinvolta nella mutazione di CFTR (transmembrane conductance regulator)**

Compartimentalizzazione

Si può ottenere un forte aumento di concentrazione di molecole compartimentalizzandole in una zona delimitata da una membrana

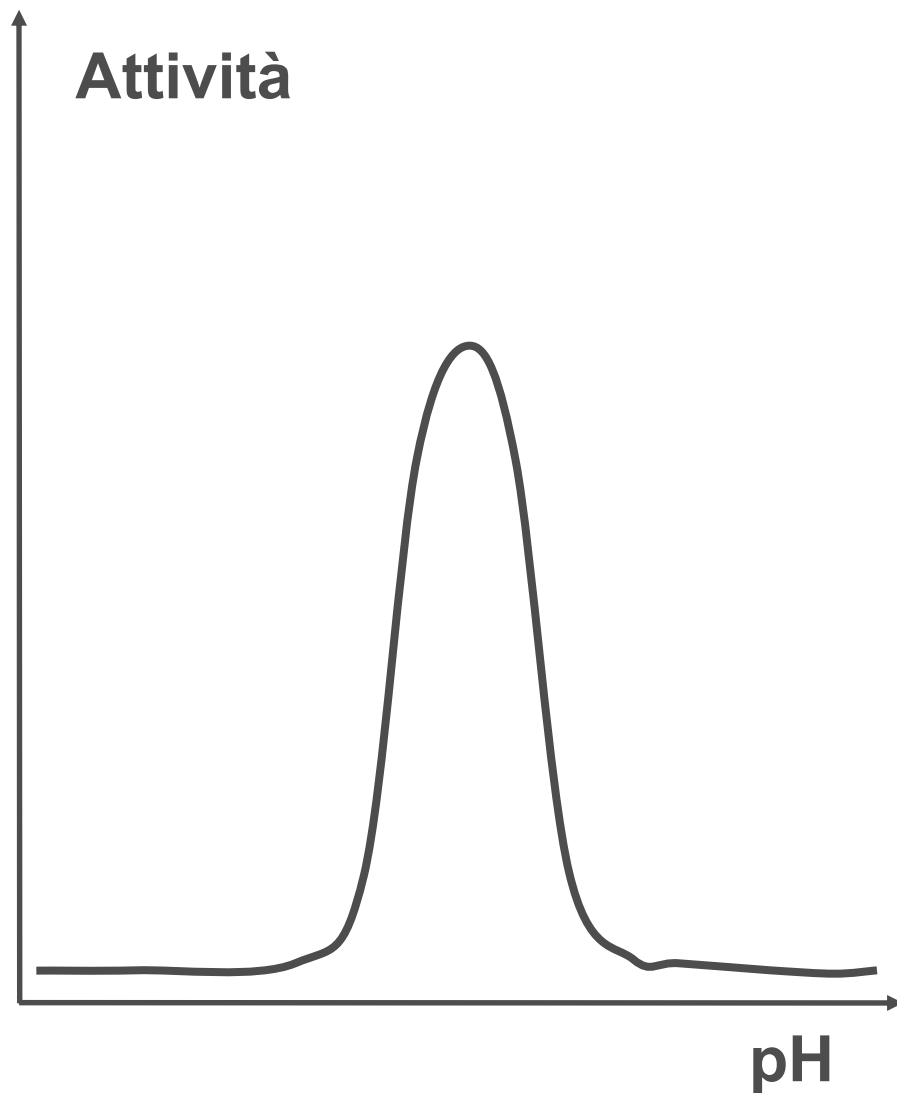


Modulazione dell'attività dell'enzima (regolazione veloce)

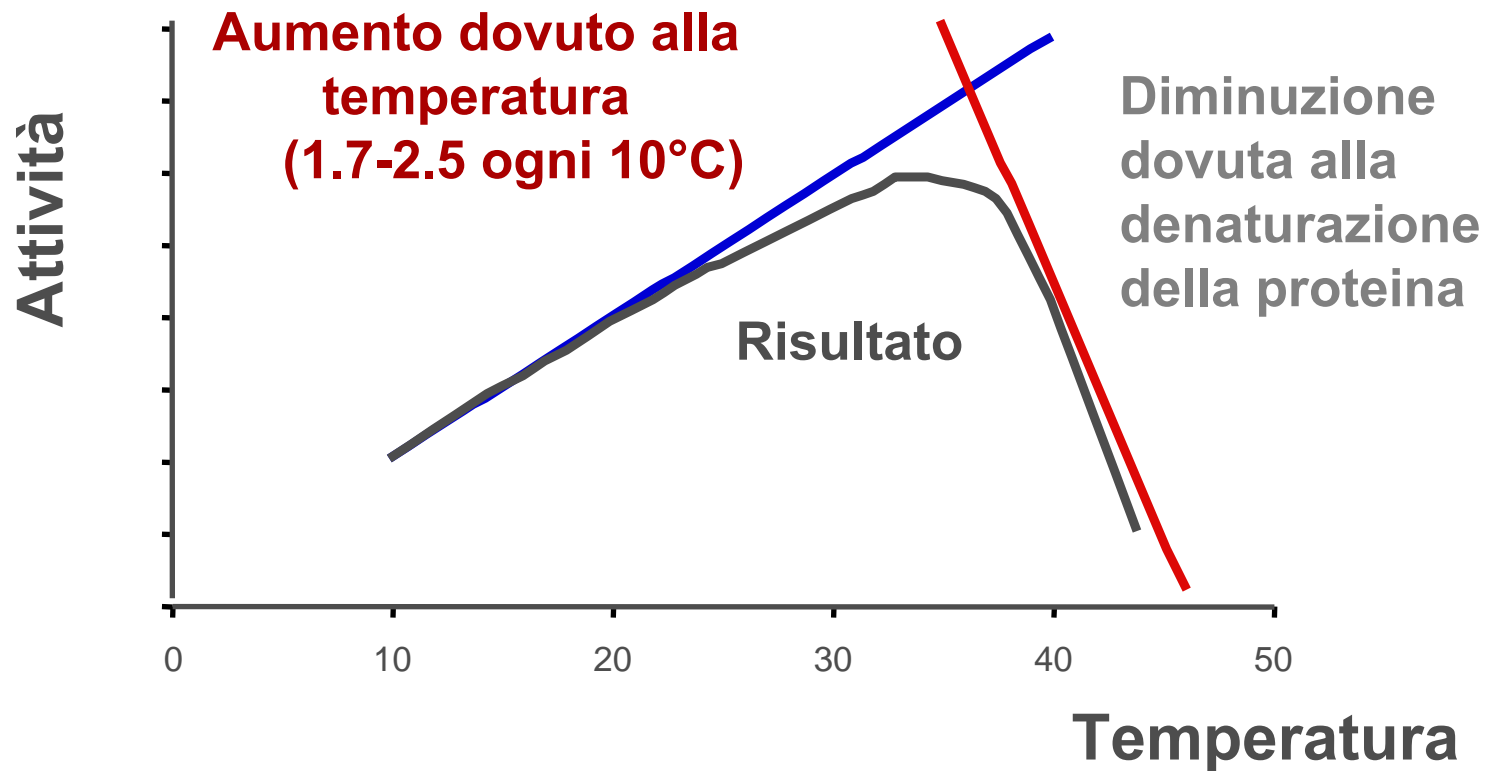
- **pH**
- **Temperatura**
- **Inibizione reversibile ed irreversibile:**
 - **Competitiva**
 - **Non-competitiva**
 - **Uncompetitiva**
- **Modificazioni allosteriche**
- **Modificazioni covalenti**

pH e attività enzimatica

- **Ogni enzima ha il suo pH ottimale**
- **Il pH ottimale può non corrispondere col pH in cui si trova l'enzima**



Temperatura e attività enzimatica



- Per ogni enzima, esiste una temperatura ottimale
- La temperatura ottimale può non corrispondere con la temperatura in cui si trova l'enzima (37°C)