

## Enzimi

Gli enzimi sono catalizzatori biologici, generalmente proteici, la cui funzione è quella di catalizzare le reazioni chimico-biologiche abbassandone l'energia di attivazione velocizzando la reazione senza alterare l'equilibrio di reazione.

Rispetto ai catalizzatori chimici:

- *Lavorano in condizioni più moderate ( $T < 100\text{ C}^\circ$ , pressione atmosferica e  $\text{pH} = 7$ )*
- *Aumentano la velocità di reazione sino  $10^{12}$  rispetto a reazioni non catalizzate*
- *Presentano alta capacità di regolazione al fine di agire in funzione di esigenze fisiologiche*
- *Presentano alta specificità che consente loro il riconoscimento di specifiche molecole con le quali interagire.*

Ipotizzando la reazione:  $A \rightleftharpoons B + C$

E ipotizzando che questa necessiti di un'energia di attivazione troppo alta per essere raggiunta in tempi utili, risulta necessario l'uso di un catalizzatore biologico, l'**enzima**. Di conseguenza:

- 1) L'enzima specifico per la molecola A, e per il tipo di reazione da eseguire, legherà il suo **substrato** (A) mediante il suo **sito attivo**.
- 2) Si costituisce il complesso **enzima-substrato**
- 3) L'enzima catalizza la reazione trasformando il substrato in nei prodotti B e C
- 4) Alla fine della reazione i prodotti si staccheranno dal sito attivo lasciando intatto l'enzima che risulta **riutilizzabile**.

L'alta **specificità** degli enzimi deriva dalla presenza del sito attivo, una fenditura presente sulla superficie del catalizzatore, all'interno della quale sono presenti gruppi catalitici, ed adatta ad aderire esclusivamente ad una specifica molecola grazie ad affinità:

- Morfologica = *che può avvenire secondo i modelli*
  - **chiave-serratura**: *in cui la forma del sito attivo è uguale al substrato.*
  - **adattamento indotto**: *modificazione del sito attivo mediante co-fattore.*
- Stereochimica = *enzimi specifici per substrati chirali che catalizzano reazioni chirali.*
- Elettronica

Gli enzimi possono essere:

- semplici: e presentare sito attivo perfettamente complementare al substrato
- complessi: e necessitare di co-fattori per legare il substrato. Un enzima complesso è detto **apoenzima** (enzima inattivo) quando non è legato a nessun co-fattore, diventa un **oloenzima** (enzima attivo) quando avviene il legame con quest'ultimo.

I **co-fattori** sono generalmente ioni metallici  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . In base alla modalità di associazione all'enzima si definiscono:

- **co-substrati** = *se associati in modo temporaneo e solo durante la catalisi*
- **co-enzimi** = *se legati solo temporaneamente e mediante legami deboli*
- **gruppi prostetici** = *se associati in modo permanente mediante legame covalente*

La **classificazione enzimatica** prevede che ogni enzima possenga:

- Un nome d'uso raccomandato = generalmente di origine storica e di uso comune
- Un nome sistematico = composto da **nome del substrato** + **tipo di reazione** + **suffisso -asi**.
- Un numero sistematico = composto dalla (IUBMB) **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. Ogni numero di compone di un modello definito EC x.y.z.w, dove:
  - EC → Enzyme Commission
  - X → classe, tra le quali:
    - Ossidoreduttasi = catalizzano reazioni redox
    - Transferasi = catalizzano il trasferimento di un gruppo da una molecola all'altra
    - Idrolasi = catalizzano la scissione idrolitica di legami C=O/ C-N/ C-O/ P-O-P
    - Liasi = catalizzano scissione di legami
    - Isomerasi = catalizzano reazioni di modificazione geometrica

- Ligasi = ( o sintetasi) catalizzano l'unione di due molecole a seguito di consumo di ATP
  - Y → sottoclasse
  - Z → sotto-sottoclasse
  - W → numero nella sotto-sottoclasse

La **cinetica enzimatica** studia la velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi e l'effetto di determinati parametri che possono influire su di essa. Grazie alla cinetica enzimatica è possibile:

- Ricevere informazioni sul meccanismo d'azione dell'enzima
- Ricevere informazioni sulla regolazione di un dato enzima
- Utile a livello diagnostico nel discriminare forme enzimatiche fisiologiche (isoenzimi), o anomale

La velocità di una reazione catalizzata può essere influenzata da:

- **Concentrazione del substrato**
- **Concentrazione dell'enzima**
- **Temperatura**
- **Ph**

Quando si studia l'effetto della variazione di uno dei seguenti parametri è necessario che tutti gli altri rimangano costanti. La **cinematica enzimatica** di una specifica reazione viene generalmente determinata in condizione di **stato stazionario** ovvero durante la fase centrale della reazione in cui la velocità di formazione del complesso ES (enzima-substrato) è uguale alla velocità di decomposizione dello stesso complesso.

**Effetto della variazione di concentrazione di substrato** = in una reazione:

*Non catalizzata* = la velocità di reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato [S], più molecole sono presenti maggiore sarà la quantità di urti efficaci per effettuare la reazione.

*Catalizzata* = ad un graduale aumento di [S] si osserva un iniziale aumento della velocità di reazione; tuttavia, man man che [S] aumenta l'enzima comincia a saturarsi e la velocità cresce ad un ritmo sempre inferiore sino a stabilizzarsi su un preciso valore, viene quindi definita velocità massima.

Questo avviene poiché dopo che l'enzima si satura il processo di disgiunzione del complesso ES è più lento del processo di formazione dello stesso.

**Effetto della variazione del Ph** = ogni enzima presenta il suo valore ideale di Ph, spesso vicino alla neutralità, generalmente i grafici dell'attività enzimatica in funzione del Ph sono a curve a "campana" in quanto a elevati valore di Ph si ha la denaturazione dell'enzima.

Il Ph influenza anche la ionizzazione dei gruppi catalitici -COOH e NH<sup>2+</sup>.

**Effetto della variazione di temperatura** = la velocità di reazione aumenta da 0 C° fino a 35 - 40C°, al di fuori di questo intervallo si può incorrere nella denaturazione enzimatica. La temperatura può inoltre modificare la conformazione dell'enzima stesso producendo un effetto sui parametri cinetici, è importante ricordare che enzimi diversi appartenenti a stesse famiglie possono reagire in modo diverso ad una stessa temperatura.

**Effetto della variazione di concentrazione dell'enzima** = la velocità di reazione aumenta in modo direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima [E].

L'equazione di **Michaelis-Menten** descrive la velocità iniziale di reazione:

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

La velocità iniziale  $V_0$  si intende il momento di reazione in cui  $[S] \gg [E]$  e viene calcolata in un tempo infinitesimo per ridurre al minimo la variazione di [S] che a quel punto può considerarsi costante. La velocità iniziale dipende da 4 parametri:

- *Concentrazione dell'enzima*  $[E] = V_0$  è direttamente proporzionale a [E]
- *Concentrazione del substrato*  $[S] =$  assimilabile come inversamente proporzionale a  $V_0$  a [E] costante
- $V_{max}$  = saturazione dell'enzima a [S] infinita
- $K_M = [S]$  alla quale si osserva la metà della velocità massima ( $\frac{1}{2} V_{max}$ ),

“La **velocità iniziale** di reazione è direttamente proporzionale alla [E], ma cresce in modo non lineare al crescere della [S] fino ad un livello limite detto  $V_{max}$ ”

La  $V_{mx}$  e la **KM** sono i parametri cinetici dell'equazione di Michaelis-Menten, la  $K_m$  è particolarmente importante poiché:

- *Minore è il valore di  $K_m$ , maggiore sarà l'affinità tra enzima e substrato e la stabilità del complesso ES*
- *Se un enzima è specifico di più substrati avrà una  $K_m$  diversa per ognuno di loro e tagirà più frequentemente con il substrato a  $K_m$  minore*
- *Da informazioni su [S] in quanto:*
  - **Enzimi con  $KM$  elevata** catalizzeranno reazioni a [S] elevata
  - **Enzimi con  $KM$  ridotta** catalizzeranno reazioni a [S] bassa

Per linearizzare la curva ottenuta dall'equazione si usa il **diagramma dei doppi reciproci**, il quale sfrutta l'equazione di Lineaweaver-Burk, equazione reciproca di quella di Michaelis-Menten consentendo di trovare valori più precisi di  $KM$  e  $V_{max}$ . Si costruisce un grafico in cui

- **Asse Y** (ordinata) —> presenta i valori reciproci di  $V_o$  ( $1/V_o$ )
- **Asse X** (ascisse)—> presenta i valori reciproci della [S] ( $1/[S]$ )

Il punto in cui la retta intersecherà l'asse Y indicherà il **reciproco della  $V_{max}$**  ( $1/V_{max}$ )

Il punto in cui la retta intersecherà l'asse X indicherà l'opposto del reciproco della  $K_m$  ( $-1/KM$ )

## Inibitori

Gli **inibitori enzimatici** sono sostanze che interferiscono l'attività catalitica dell'enzima riducendola drasticamente o eliminandola. L'inibizione può essere:

- Irreversibile = quando l'inibitore si lega covalentemente e in modo definitivo all'enzima rendendolo *non riutilizzabile*, può agire in 2 modi:
  - Impedire la formazione del complesso ES
  - Interferire con i gruppi catalitici del sito attivo impedendo la catalisi
- Reversibile = tipo di inibizione che può presentarsi come:
  - **Competitiva**—> l'inibitore compete con il substrato per occupare il sito attivo enzimatico. Ciò avviene poiché gli inibitori competitivi sono molecole simili al substrato naturale e sono quindi compatibili con il sito attivo. Questo tipo di inibizione può essere rimossa o contenuta aumentando la [S]. In questa tipologia inibitoria:
    - $KM$  = aumenta, poche è necessaria una maggiore [S] per raggiungere  $1/V_{max}$
    - $V_{max}$  = invariata
  - **Mista**—> l'inibitore si lega all'enzima in corrispondenza del sito allosterico, ne consegue che può legarsi sia al singolo enzima che al complesso ES già formato. In questa tipologia inibitoria:
    - $V_{max}$  = *diminuisce*
    - $KM$  = può:
      - ❖ Aumentare
      - ❖ Diminuire
      - ❖ Rimanere invariata —> NON COMPETITIVA
  - **Incompetitiva** —> il sito allosterico per l'inibitore compare solo a seguito della formazione del complesso ES, di conseguenza questi inibitori si legano componendo un **ESI** (complesso enzima-substrato-inibitore) che riduce la quantità di enzima capace di catalisi. In questa tipologia inibitoria:
    - $V_{max}$  = *diminuisce*

- $KM = APPARE$  diminuita, in quanto l'inibitore sposta l'equilibrio di reazione verso i prodotti spingendo l'enzima a legare il substrato provocando un aumento dell'affinità con conseguente diminuzione di  $K_m$ .

Lo **studio dell'inibizione mediante grafico** permette di identificare l'effetto o il tipo di inibizione, per costruirlo è necessario analizzare la stessa reazione sia in presenza di catalizzatore enzimatico, che in sua assenza. Ipotizzando una reazione:  $A \rightleftharpoons B + C$

Si misura la velocità iniziale a concentrazione di substrato  $[A]$  sempre più alta, sia in presenza che in assenza di inibitore per poi costruire un grafico che studi la velocità di reazione in funzione di un aumento della concentrazione di substrato, con:

- **Asse X** → i reciproci delle varie concentrazioni di substrato  $[A]$
- **Asse y** → i reciproci delle varie  $V_0$

Si ottengono 2 rette, di cui una riguardante lo studio della reazione non catalizzata. Confrontando i punti d'inserzione delle due rette fra:

- *Retta e asse Y* = si ottiene il reciproco della  $V_{max}$  ( $1/V_{max}$ )
- *Retta e asse X* = si ottiene l'opposto del reciproco della  $KM$  ( $-1/KM$ )

Che

A seguito dei calcoli per ottenere  $V_{mx}$  e  $K_m$  si può dedurre il tipo di inibizione:

- $V_{max}$  *invariata* → inibizione **competitiva**
- $KM$  *invariata* → inibizione **non competitiva**
- $V_{max}$  *diminuita* → inibizione **Incompetitiva**

## Regolazione enzimatica

La cellula regola finemente l'attività enzimatica attraverso due *modalità*:

- Attraverso la **modulazione della quantità d'enzima** → prevede la produzione d'enzima solo in presenza del suo substrato
- Attraverso la **regolazione dell'attività enzimatica** → che avviene mediante:
  - *Enzimi allosterici*
  - *Modificazioni covalenti della proteina*
  - *Fosforilazione*
  - *Feedback*
  - *Proenzimi*

Gli **enzimi regolatori** sono capaci di modulare l'attività catalitica in risposta ad un segnale, generalmente il primo enzima di reazioni metaboliche sequenziali multienzimatiche è proprio un enzima regolatore che gestisce il ritmo dell'intera reazione catalizzando la **reazione più lenta**. Sono proteine a struttura quaternaria che posseggono sito attivo e sito regolatore su due **sub-unità diverse**, inoltre si dicono:

- **Omoprotici** = se il substrato stesso si comporta da regolatore (modulatore)
- **Eteroprotici** = se legano oltre il substrato una molecola diversa

Gli enzimi regolatori si dividono in 2 classi:

- **Enzimi allosterici** → agiscono mediante il legame reversibile tra un metabolita chiamato **modulatore** (o regolatore) e il *sito di regolazione* che provoca un'alterazione di conformazione del *sito attivo*, ne può derivare:
  - Un allosterismo positivo = se il sito attivo prende una conformazione *attiva* che consente il legame con il substrato.
  - Un allosterismo negativo = se il sito attivo prende una conformazione *inattiva* che non consente il legame con il substrato.

Generalmente gli enzimi allosterici si trovano in una forma d'equilibrio tra due conformazioni dette **R** (rilassata e attiva) e **T** (tesa e meno attiva), quando un **regolatore** si lega all'enzima favorisce una conformazione piuttosto che l'altra.

Il comportamento degli enzimi allosterici si spiega mediante 2 modelli:

- **Modello concentrato** = basato sulla perturbazione dell'equilibrio fra le forme T e R, in presenza di legame con un **attivatore** è favorita la forma **R**. Se il legame avviene mediante con un **inibitore** viene favorita la forma **T**.
- **Modello sequenziale** = Il legame con un **attivatore** o un **inibitore** provoca il cambiamento di conformazione fra le forme T ed R di una singola **sub-unità** che induce lo induce a tutte le altre in maniera sequenziale, questo fenomeno è definito **cooperatività di legame**. In questo modello anche lo stesso **substrato** può indurre **cooperatività negativa**, riducendo la capacità dell'enzima di legare molecole analoghe al substrato stesso.

- **Gli enzimi regolati mediante modificazioni covalenti reversibili.** *Le modificazioni covalenti della proteina* sono un altro importante mezzo di regolazione enzimatica, in cui una particolare classe di enzimi subisce modificazioni di uno o più **residui amminoacidici** dell'aggiunta o sottrazione di alcuni gruppi funzionali come:

- Fosforico
- Acetilico
- Adenilico
- Uridilico
- Metilico
- Ossidrilico
- Solforico
- Carbossilico
- Miristoilico
- Palmitilico

La modificazione aminoacidica avviene ad opera di altri enzimi, inoltre provoca il cambiamento delle proprietà dell'enzima che ne inducono il **cambio di conformazione**.

La **fosforilazione** è il meccanismo più comune di controllo dell'attività enzimatica, generalmente prevede la formazione tra un *gruppo fosfato* e un residuo di *serina, treonina o tiroina* in quanto questi aminoacidi presentano gruppo OH capace di formare *esteri fosforici*.

In alcuni enzimi, come il **glicogeno fosforilasi**, la fosforilazione favorisce la **forma attiva**, a differenza di altri enzimi, come il **piruvato chinasi**, in cui la

fosforilazione favorisce la forma **inattiva**. Gli enzimi che utilizzano la fosforilazione sono detti **chinasi** ed un esempio sono i trasportatori cellulari, i quali regolano il trasporto attraverso il plasmalemma come la **Na,K-ATPasi**, comunemente chiamata *pompa sodio-potassio*, un trasportatore antiporto che porta  $\text{Na}^+$  all'esterno della cellula e  $\text{K}^+$  all'interno. L'ATP viene **idrolizzata** con conseguente rilascio di energia utile ad alimentare il trasporto attivo, il gruppo *fosfato idrolizzato* si lega all' **aspartato 369** dell'enzima con conseguente *cambio di conformazione*.

Il **controllo feedback**, definito anche "*inibizione da prodotto finale*" è un'ulteriore modalità di controllo **retroattiva** dell'attività enzimatica. Particolarmente utile in un sistema di reazione complesso in cui **più enzimi lavorano contemporaneamente**, in quanto, il **prodotto finale** dell'ultima reazione della sequenza è un **inibitore competitivo** dell'enzima che catalizza **la prima reazione** della sequenza. Ne deriva che ad un aumento della concentrazione del prodotto finale, diminuisce, per **inibizione competitiva**, la **velocità di reazione** fino all'arresto completo del processo.

I **proenzimi**, detti anche *zimogeni* sono enzimi **inattivi** prodotti dalla cellula stessa, e costituiscono una modalità di controllo dell'attività enzimatica. Per indurre la forma **attiva** necessitano dell'**asportazione** di una piccola porzione di catena polipeptidica comportando una **scissione dei legami covalenti**. Un esempio sono la **Tripsina** e **Chimotripsina** enzimi attivi che hanno come *precursore inattivo* rispettivamente il **tripsinogeno** e il **chimotripsinogeno**, sintetizzati nel pancreas e attivati per scissione dei legami covalenti nell'intestino tenue.

### Isoenzimi

Gli **Isoenzimi** sono caratterizzati da presentare varie possibili combinazioni di **subunità**, che consentono loro l'adattamento a varie tipologie di tessuto mantenendo tuttavia la stessa attività di

reazione, ovvero, uno stesso enzima presente in **forme diverse** nei **vari tessuti**. Un esempio è la **lattato-idrogenasi (LDH)** che catalizza l'ossidazione del lattato a piruvato e *viceversa*, è un **tertamero** comprendente 2 tipologie di sub-unità:

- Subunità H (heart)
- Subunità M (muscolo)

Le diverse tipologie di sub-unità appartenente ad un isoenzima conferiscono piccole differenze strutturali al fine di specializzare l'enzima all'attività in quel particolare tessuto, posseggono inoltre cariche diverse che consentono di analizzare la distribuzione degli isoenzimi mediante **elettroforesi**. Importante ricordare che i vari Isoenzimi posseggono diversi valori di **Vmax** e **Km**.