

Biochimica I - ENZIMI

La grande varietà di reazioni biochimiche che cooperano al mantenimento della vita sono praticamente tutte mediate da una serie di catalizzatori biologici fondamentali, noti come **enzimi**. Le caratteristiche più importanti di questi catalizzatori sono:

- **Velocità di reazione elevate:** la velocità delle reazioni catalizzate enzimaticamente sono più elevate di quelle delle reazioni non catalizzate di un fattore che può variare da 10⁶ a 10¹²;
- **Condizioni di reazioni moderate:** le reazioni catalizzate enzimaticamente avvengono in condizioni relativamente moderate, la temperatura è al di sotto dei 100 °C, la pressione è atmosferica e il pH è pressoché neutro;
- **Elevate specificità della reazione:** gli enzimi hanno un elevatissimo grado di specificità sia nei confronti dell'identità chimica dei loro substrati (reattanti), sia per quella dei prodotti;
- **Capacità di regolazione:** l'attività catalitica di molti enzimi varia in funzione alla concentrazione di sostanze diverse dai loro substrati. I meccanismi di questi processi di regolazione comprendono il controllo allosterico, la modificazione covalente degli enzimi e variazioni nella quantità di enzima sintetizzato.

Velocità delle reazioni enzimatiche

La **cinetica** è lo studio della **velocità** a cui procede una reazione chimica. Lo scopo fondamentale è quello di comprendere e definire il meccanismo di reazione, cioè le varie tappe di un processo e la sequenza con cui esse avvengono.

Lo studio della cinetica enzimatica, è molto importante in quanto:

- con studi cinetici è possibile determinare l'affinità di legame dei substrati e degli inibitori ad un enzima e valutarne la velocità catalitica massima;
- il meccanismo catalitico di un enzima può essere chiarito osservando come si modifica la velocità della reazione enzimatica al variare delle condizioni di reazione;
- porta a comprendere anche il ruolo dell'enzima nel processo metabolico complessivo;

Nelle condizioni appropriate, la velocità di una reazione catalizzata enzimaticamente è **proporzionale** alla quantità di enzima presente.

Nomenclatura degli enzimi

Il nome degli enzimi è di norma formato da un **suffisso "asi"** aggiunto al nome del substrato oppure ad una frase che descrive l'azione catalitica dell'enzima.

La classificazione e la nomenclatura degli enzimi viene effettuata in base alla natura delle reazioni chimiche che essi catalizzano. Le classi principali di reazioni a cui gli enzimi partecipano sono sei, e vi sono sottoclassi all'interno della prima divisione. In questo modo ad ogni enzima vengono assegnati due nomi e un codice di classificazione a quattro numeri.

Il primo identifica la classe, il secondo indica la sottoclasse, il terzo è la sotto-sottoclasse, mentre la quarta cifra è un numero progressivo assegnato a ciascun enzima nelle sotto-sottoclassi.

CLASSIFICAZIONE	TIPO DI REAZIONE CATALIZZATA
1. ossidoreduttasi	ossido-riduzione
2. transferasi	trasferimento gruppi funzionali
3. idrolasi	idrolisi
4. liasi	eliminazione gruppi per doppi legami
5. isomerasi	isomerizzazione
6. ligasi	formazione legami + idrolisi ATP

Definizioni

1. Le molecole che si legano all'enzima, delle quali l'enzima catalizza la trasformazione, sono generalmente di natura organica e vengono dette **substrati**, prima della reazione, e **prodotti**, dopo la trasformazione.
2. Il **sito attivo** è l'area sulla superficie dell'enzima dove si lega il substrato per effettuare la catalisi a prodotto. Questa zona, spesso paragonata a una *tasca*, è in genere di dimensioni assai limitate.
3. Nel caso in cui gli enzimi siano **proteine coniugate**, la parte proteica del complesso viene detta **apoenzima**, mentre quella **non proteica** (molecole, ioni organici o inorganici ecc.) si dice **cofattore**. L'insieme dell'**apoenzima** e del **cofattore** viene detto **oloenzima**. Il cofattore, indispensabile affinché l'enzima possa svolgere la sua funzione catalitica, può cambiare il nome in **coenzima**, quando è una molecola organica particolarmente complessa, oppure viene detto **gruppo prostetico** quando risulta legato all'apoenzima in modo assai stabile, in genere con legami covalenti.
4. Vengono detti **zimogeni** o **proenzimi** alcuni enzimi sintetizzati dalla cellula in **forma inattiva** e successivamente trasportati nei distretti dove devono agire e trasformati nelle forme attive.
5. La velocità della reazione catalizzata dall'enzima corrisponde al **numero di moli di prodotto** che si formano nell'unità di tempo, cioè in un secondo.
6. L'**efficienza catalitica** di un enzima è misurata dal suo numero di **turnover** o attività molecolare che esprime il numero di molecole di substrato di cui una molecola di enzima catalizza la trasformazione nei prodotti nell'unità di tempo e in condizioni di reazioni ottimali.

Il sito attivo

Il sito attivo occupa una parte relativamente piccola del volume totale della molecola enzimatica ed è costituito tridimensionalmente da gruppi chimici di aminoacidi appartenenti a parti diverse della proteina globulare. A seguito del **folding** (ripiegamento) della proteina, questi residui si ritrovano funzionalmente vicini, pur essendo collocati in posizioni anche molto distanti nella struttura primaria. Il legame con il substrato avviene attraverso una serie di attrazioni deboli che permettono la formazione del complesso **enzima-substrato (ES)**. I siti attivi sono costituiti da una specie di cavità o fenditura, la cui natura apolare favorisce il legame con il substrato; in particolari condizioni, tuttavia, anche i residui polari possono contribuire alla formazione del sito attivo. La specificità del legame che avviene tra l'enzima e il substrato dipende dalla precisa disposizione degli atomi del sito attivo. Ne consegue che, per adattarsi a tale sito, il substrato deve possedere una **forma appropriata**. La forma del sito attivo di alcuni enzimi si modifica profondamente quando viene legato il substrato. In questo caso, i siti attivi degli enzimi presentano forme complementari al substrato solamente dopo che il legame si è verificato (*adattamento indotto*: processo di riconoscimento dinamico)

Meccanismo d'azione

Quando il substrato (S) si trasforma in prodotto (P), l'equilibrio chimico della reazione è determinato dalle leggi della termodinamica ed è rappresentato dal rapporto fra la velocità della reazione all'andata e quella al ritorno. Dunque, in presenza dell'enzima, le velocità di trasformazione sono accelerate, ma l'equilibrio non viene alterato e la catalisi enzimatica funziona come quella inorganica in presenza di un catalizzatore, cioè entrambe aumentano le velocità **abbassando l'energia di attivazione**. In questo modo aumenta di molto il numero di molecole dei reagenti che, in ogni istante, possiedono una quantità di energia sufficiente a superare la barriera dell'energia di attivazione trasformandosi in prodotto. Il presupposto perché una reazione avvenga è che le molecole dei reagenti si scontrino fra loro, ma gli urti devono anche essere utili, cioè l'energia deve essere sufficientemente elevata per fare reagire gli orbitali di legame e gli stessi devono avvenire in zone specifiche e appropriate della molecola. Gli enzimi funzionano rendendo il percorso più frazionato e quindi più percorribile da parte delle molecole coinvolte nella reazione. L'enzima si lega al substrato formando un intermedio **ES** e questa parte della reazione ha sua propria energia di attivazione (1), ovviamente molto inferiore a quella della reazione in assenza dell'enzima. A questo punto il substrato si trasforma in **prodotto**, necessitando di una seconda energia di attivazione (2); infine, avviene la totale **liberazione** tra l'enzima e il prodotto stesso, utilizzando una terza energia di attivazione (3). La somma delle tre energie di attivazione è uguale a quella della reazione totale in assenza di enzima, ma tale energia viene utilizzata in maniera frazionata ed è quindi più facile reperirla. (paragone x capire: è meno stancante percorrere una salita in tre step diversi e separati che farla tutta d'un fiato)

Ma come agisce realmente l'enzima? **Quando il substrato si lega al sito attivo, la restante parte della molecola del substrato viene orientata correttamente in modo tale che gli urti siano utili alla sua**

trasformazione in prodotto. Il frazionamento dell'energia di attivazione e il corretto orientamento del substrato si traducono in un numero molto maggiore di urti favorevoli per unità di tempo e quindi in un aumento della velocità di reazione.

Specificità

La differenza principale fra la catalisi inorganica e la catalisi enzimatica è data dalla specificità degli enzimi. Gli enzimi hanno sempre una specificità di substrato, che può essere estremamente elevata (possono arrivare a riconoscere solo un particolare isomero tra quelli di una molecola) o minore, (la pepsina che agisce su tutti i legami peptidici) ma, in generale, la specificità di un enzima è sempre nettamente superiore a quella di un catalizzatore inorganico. Gli enzimi, inoltre, hanno sempre una specificità di reazione, infatti, una volta legati al substrato, possono catalizzare solo un tipo di trasformazione.

Fattori che influenzano le reazioni catalizzate dagli enzimi

Le reazioni catalizzate dagli enzimi sono influenzate in modo positivo da una serie di fattori:

1. concentrazione del substrato
2. concentrazione dell'enzima
3. pH
4. inibitori
5. se allosterici, presenza di modulatori
6. modificazioni covalenti

1.

La velocità di una reazione chimica (V) aumenta all'aumentare della concentrazione dei reagenti in quanto aumenta il numero degli urti; le reazioni catalizzate da enzimi non fanno eccezione. È noto che per molti enzimi la velocità iniziale di catalisi (V₀) cambia con la concentrazione del substrato ([S]), che varia durante il corso di una reazione;

- quando [S] è bassa, la V₀ aumenta in modo quasi lineare con l'aumento di [S];
- quando [S] è più elevata, V₀ aumenta in misura sempre minore con l'aumento di [S], avvicinandosi alla velocità massima (V_{max}), valore al quale il substrato è talmente concentrato da saturare i siti attivi di ogni molecola di enzima presente.

La relazione tra velocità di reazione e concentrazione del substrato fu descritta attraverso una funzione nota come equazione di Michaelis-Menten:

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

Quando enzima (E) e substrato (S) si incontrano, danno origine a un intermedio (ES) che successivamente si trasforma in enzima e prodotto (P). Le fasi di ogni reazione sono caratterizzate da varie costanti di velocità (k₁, k₂ e k₃), che nell'equazione di Michaelis-Menten sono complessivamente rappresentate dalla costante di Michaelis (K_m), un valore caratteristico per ogni enzima che ne esprime l'affinità per il substrato e cioè la forza attrattiva fra E e S. Il valore della K_m non è legato alla concentrazione dell'enzima, ma dipende dal tipo di substrato e dalle condizioni ambientali, come il pH, la temperatura o la forza ionica dei composti. K_m rappresenta la quantità di substrato necessaria affinché la reazione avvenga con velocità pari a metà della velocità massima raggiungibile.

- K_m alta, il legame fra E e S è debole e quindi c'è una bassa affinità
- K_m bassa, il legame fra E e S è molto forte, l'affinità è assai elevata.

Nella pratica sperimentale, l'equazione di Michaelis-Menten può essere trasformata algebricamente in diversi modi per analizzare più agevolmente i dati di interesse. Per determinare in modo accurato la V_{max} di una reazione si può procedere facendo il reciproco di entrambi i termini dell'equazione ottenendo l'equazione di Lineweaver-Burk; il grafico, che viene detto dei doppi reciproci, converte la curva iperbolica in una retta con pendenza pari a K_m/V_{max}, intercetta all'asse x -1/K_m e intercetta all'asse y 1/V_{max}

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

2.

Ovviamente anche la concentrazione dell'enzima influenza la velocità della reazione da esso catalizzata. Se raddoppia la concentrazione dell'enzima, raddoppia anche la velocità della reazione,

dunque enzima e velocità sono legati vicendevolmente da una relazione di tipo **lineare** e, all'aumentare dell'uno, aumenta anche l'altra.

3.

La struttura di tutte le proteine e quindi degli enzimi è condizionata dal **pH**. Esso influisce sulla geometria del sito attivo, sulle cariche elettriche presenti e sui possibili legami di tipo covalente che si possono formare tra l'enzima e il substrato. Il pH, inoltre, agisce sul grado di dissociazione degli eventuali gruppi acidi o basici presenti nelle molecole del substrato e dell'enzima che si debbono ionizzare in un modo ben definito per potersi combinare fra loro. Per la maggior parte degli enzimi esiste un intervallo di valori di pH, detto **pH ottimale**, in genere abbastanza ristretto, in cui la loro efficienza è massima. Il valore del pH ottimale varia sensibilmente da enzima a enzima e non sempre coincide con quello del distretto cellulare nel quale l'enzima si trova, la cellula può sfruttare il rapporto fra l'attività dell'enzima e il pH presente per regolare l'azione enzimatica.

4.

L'inibizione enzimatica è un meccanismo regolatorio nel quale specifiche molecole o ioni, detti appunto **inibitori**, si legano all'enzima, provocando un rallentamento o addirittura l'arresto della sua attività catalitica. In base alla stabilità del **legame enzima-inibitore** si ha:

- **Inibizione irreversibile:** l'inibitore si lega sempre al sito attivo dell'enzima in modo talmente stabile (spesso covalente) che l'enzima non può più tornare alle condizioni di partenza, perdendo in modo definitivo la sua capacità di legare il substrato o di catalizzarne la trasformazione.
- **Inibizione reversibile:** il legame tra la proteina e l'inibitore può rompersi, permettendo all'enzima di riprendere la propria attività catalitica. A differenza del caso precedente, nell'inibizione reversibile il legame enzima-inibitore può non avvenire sul sito attivo.

5.

Gli **enzimi allosterici** sono proteine dalla complessa struttura quaternaria che, oltre al sito attivo, presentano altri siti regolatori dell'attività enzimatica, detti **siti allosterici**. Si dicono **effettori o modulatori** le sostanze che vanno a legarsi sui siti allosterici per modulare l'attività dell'enzima (attivazione o inibizione), modificando la conformazione del sito attivo per il legame del substrato. Gli effettori possono essere di vario tipo: molecole, ioni, i substrati stessi o i prodotti delle reazioni catalitiche. Spesso gli enzimi allosterici mostrano più siti catalitici posti su diverse subunità, in grado di influenzarsi reciprocamente. In queste molecole, l'attivazione di un sito allosterico provoca alterazioni conformazionali della proteina che favoriscono una riorganizzazione strutturale di tali siti catalitici, sequenziale o simultanea (concertata). È questo il fenomeno della cooperatività, che può essere positiva, quando si ha un'attivazione allosterica dei siti catalitici, o negativa, nel caso di una loro inibizione. In un enzima normale, la velocità di reazione aumenta direttamente all'aumentare del substrato, fino alla saturazione dei siti di legame. Negli enzimi allosterici, invece, l'attività catalitica parte lentamente, ma il legame della prima molecola a una subunità dell'enzima favorisce il legame della seconda molecola di substrato alla seconda subunità e così via. Gli enzimi allosterici, quindi, non seguono il modello cinetico di Michaelis-Menten. In sintesi, negli enzimi allosterici le varie parti della macromolecola comunicano fra di loro. È come se il primo legame mandasse un'informazione agli altri siti e ugualmente la ricevesse, modificando positivamente o negativamente il legame di altre molecole con altri siti posti su subunità diverse.

6.

L'attività degli enzimi può anche essere regolata dall'interazione con altre proteine e da **modificazioni covalenti**, la fosforilazione è la più importante; è un meccanismo molto comune di regolazione dell'attività enzimatica, infatti da un terzo a metà delle proteine di una cellula eucariote è nello stato fosforilato. In genere, l'aggiunta di gruppi fosfato a opera di enzimi deputati, detti **chinasi**, stimola l'attività degli enzimi, mentre la loro rimozione, attuata dalle **fosfatasi**, ne causa l'inibizione.