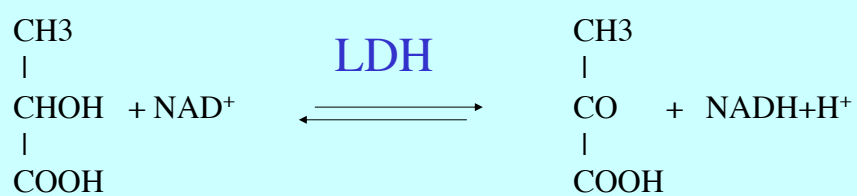


ENZIMI

1

Lattico deidrogenasi



2

VIA METABOLICA

Gli enzimi controllano tutte le reazioni della via metabolica



T.A. Brown, *Conoscere la biochimica*, Zanichelli editore 2018

3

ZANICHELLI

3

Enzimi

- Catalizzatori biologici
- Proteine (con l'eccezione di piccoli gruppi di molecole di RNA catalitico)
- Specificità
 - di reazione
 - di substrato
- Regolabilità
 - allosterici
 - modificazioni covalenti reversibili

4

- **Cofattori:** ione inorganico
- **Coenzima:** molecole organiche
- **Gruppo prostetico:** coenzima o cofattore legato covalentemente all'enzima
- **Apoenzima o Apoproteina:** parte proteica dell'enzima
- **Oloenzima:** Enzima cataliticamente attivo

5

Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu ²⁺	Cytochrome oxidase
Fe ²⁺ or Fe ³⁺	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K ⁺	Pyruvate kinase
Mg ²⁺	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn ²⁺	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni ²⁺	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn ²⁺	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

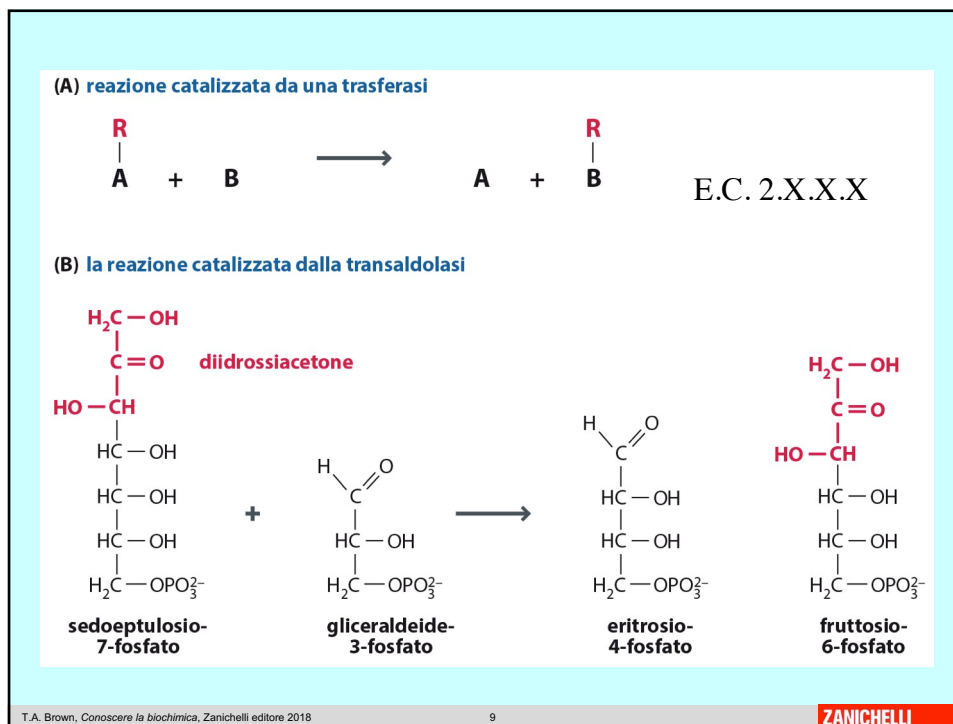
6

Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups*		
Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biocytin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

7

Classificazione internazionale degli enzimi	
E.C. = Enzyme Commission	
1. <u>Ossidoreduttasi</u>	Trasferimento di elettroni (ione idruro o atomi di H)
2. <u>Transferasi</u>	Reazioni di trasferimento di gruppi
3. <u>Idrolasi</u>	Reazioni di idrolisi (rottura di legami chimici per effetto di una molecola d'acqua, trasferimento di gruppi funzionali dell'acqua)
4. <u>Liasi</u>	Rottura di legami chimici con processi diversi dalle ossidoriduzioni e idrolisi
5. <u>Isomerasi</u>	Trasferimento di gruppi all'interno di una molecola per formare isomeri
6. <u>Ligasi</u>	enzimi che uniscono insieme molecole mediante reazione di condensazione accoppiate alla scissione di ATP o cofattori simili

8



9

ENZIMI

Catalizzatori biologici di natura proteica

- Specificità di substrato
- pH ottimale
- Temperatura ottimale
- Resa elevata di reazione
- Dipendenza della velocità dalla [substrato]

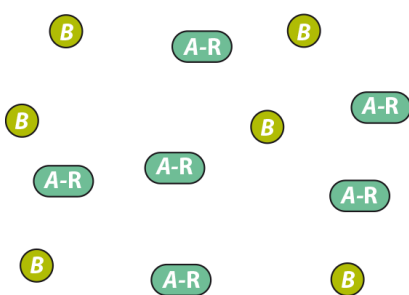
10

Some Rate Enhancements Produced by Enzymes

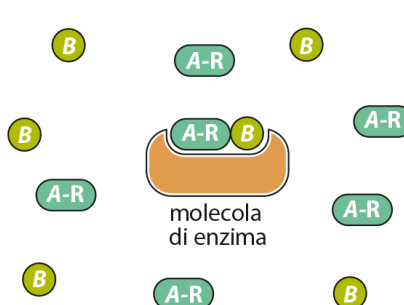
Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

11

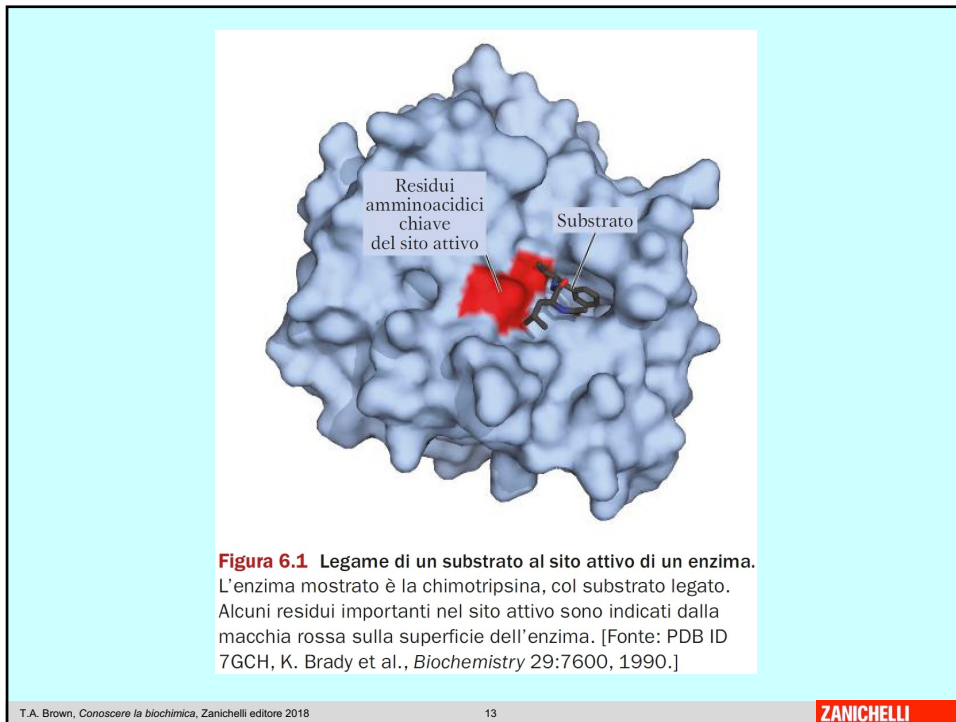
(A) le collisioni casuali sono rare



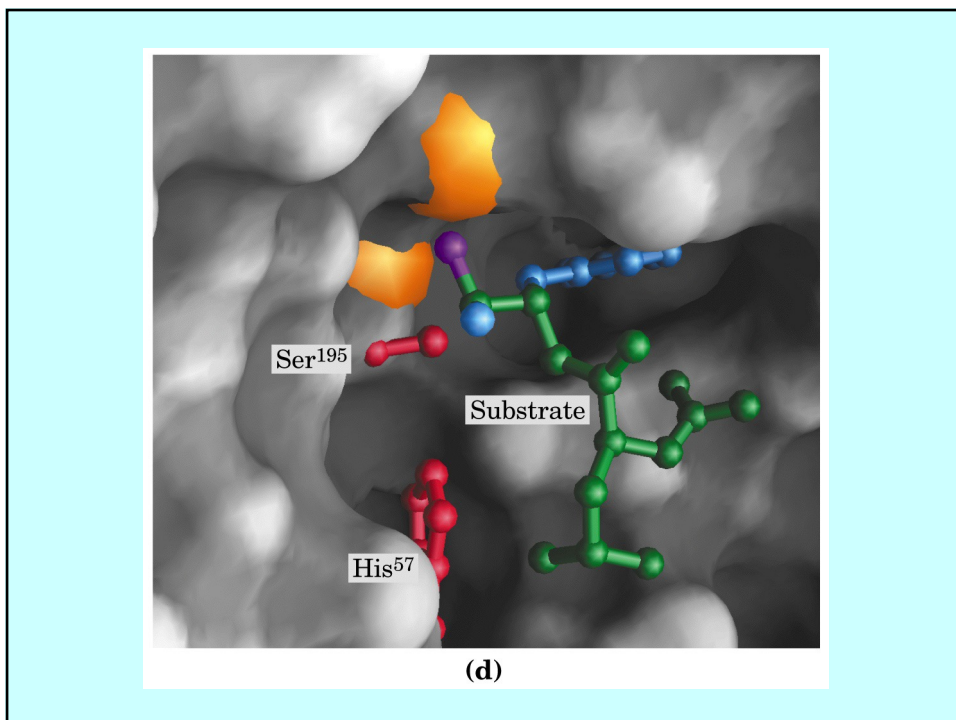
(B) l'enzima avvicina i reagenti fra loro



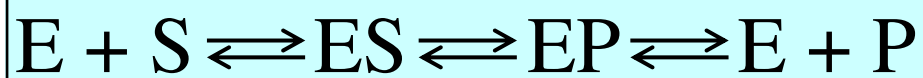
12



13



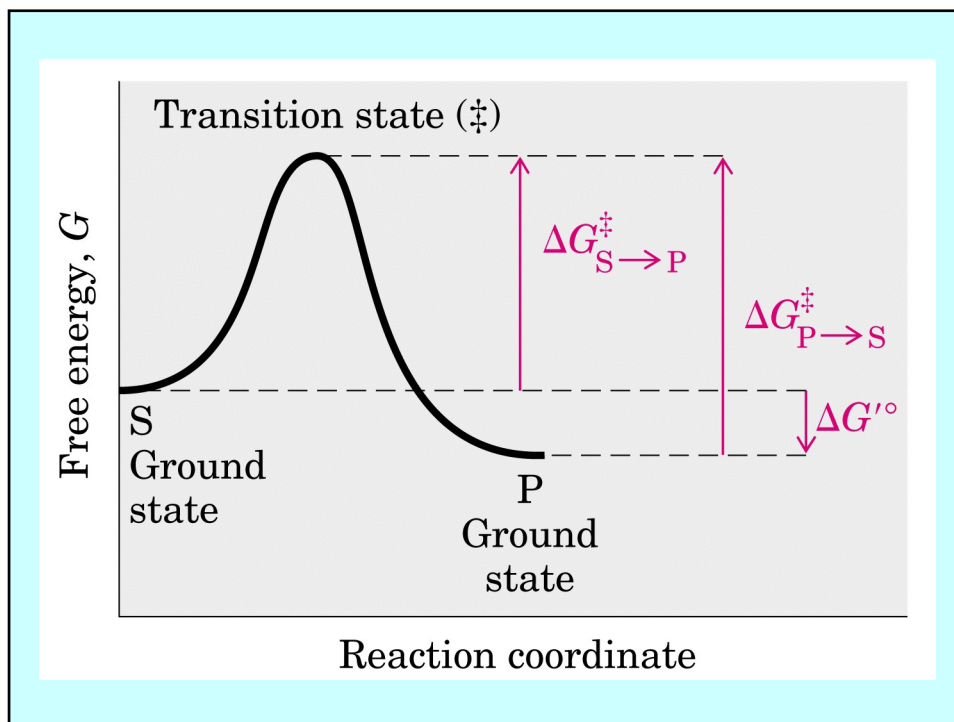
14



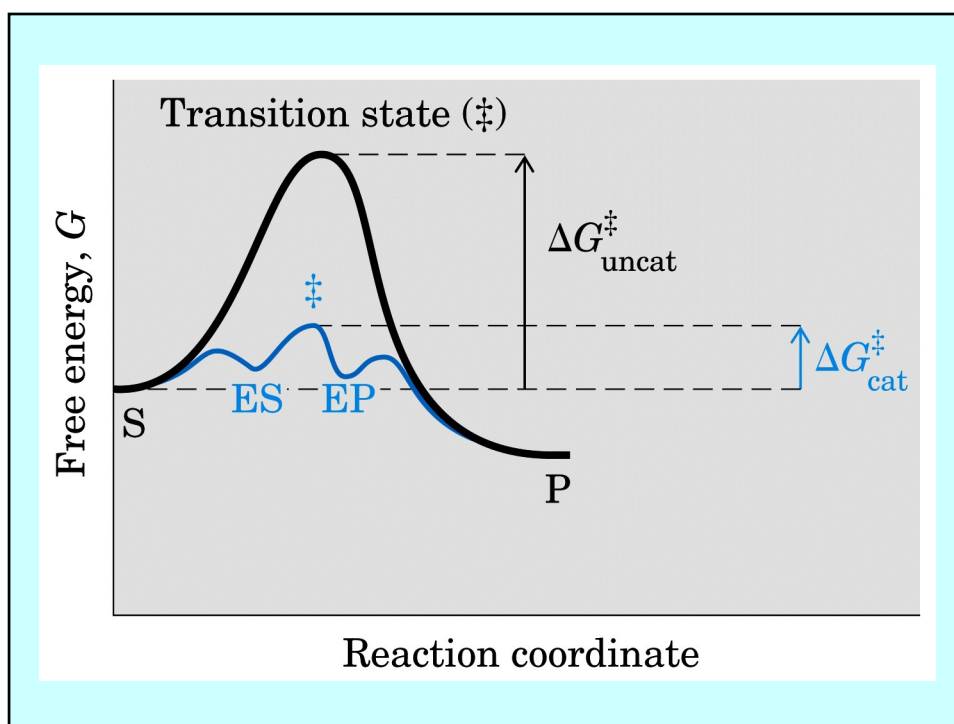
15

Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{H}{\underset{H}{\overset{+}{N}}}$	$R-\overset{\cdot\cdot}{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$\begin{array}{c} R-C=CH \\ \diagup \quad \diagdown \\ HN \quad NH^+ \\ \diagdown \quad \diagup \\ C \\ \\ H \end{array}$	$\begin{array}{c} R-C=CH \\ \diagup \quad \diagdown \\ HN \quad N: \\ \diagdown \quad \diagup \\ C \\ \\ H \end{array}$
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr	$R-\text{C}_6\text{H}_4-OH$	$R-\text{C}_6\text{H}_4-O^-$

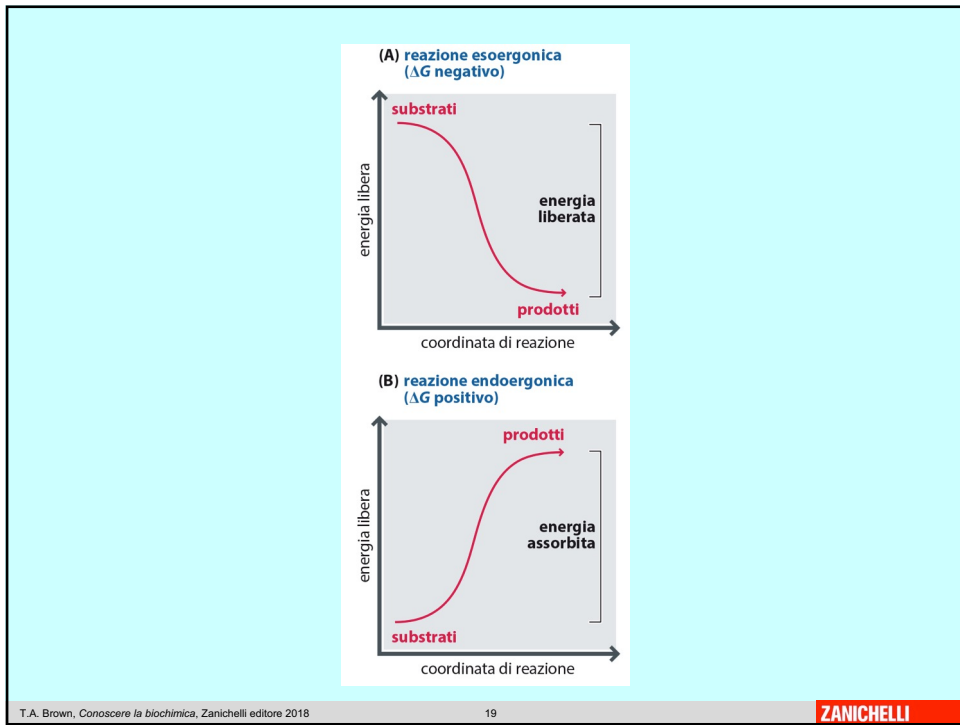
16



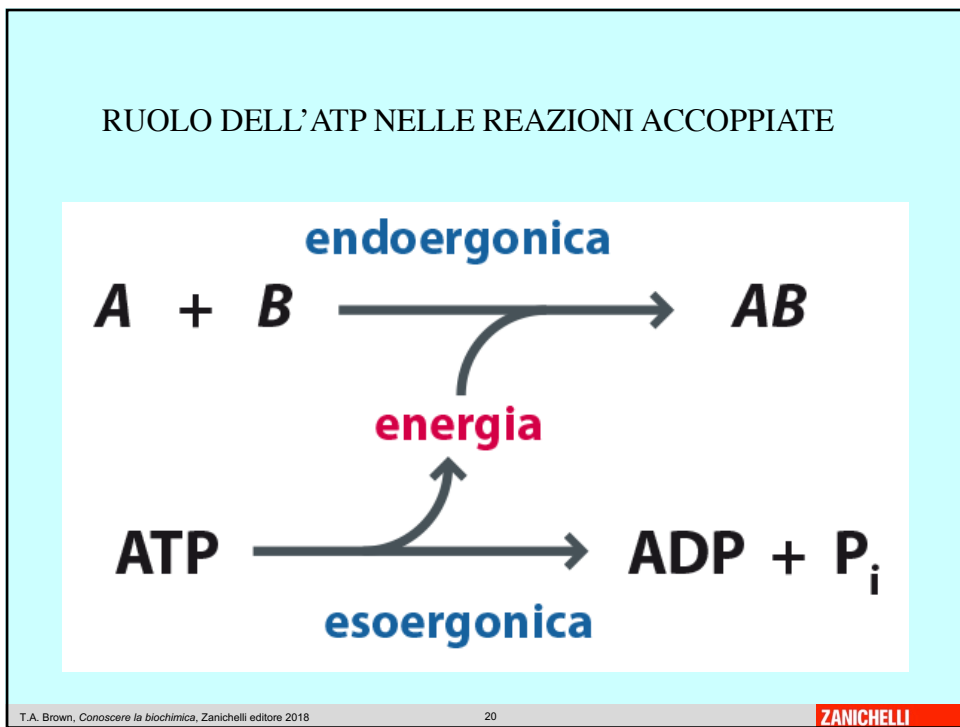
17



18

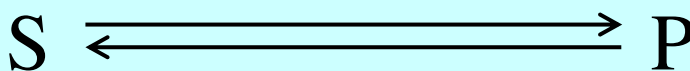


19

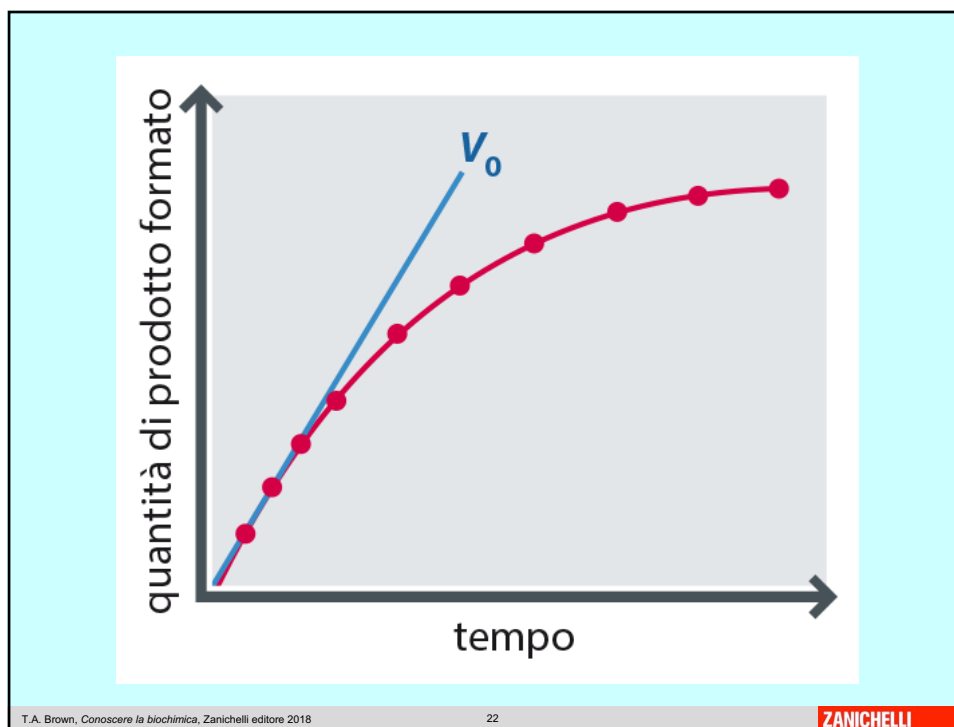


20

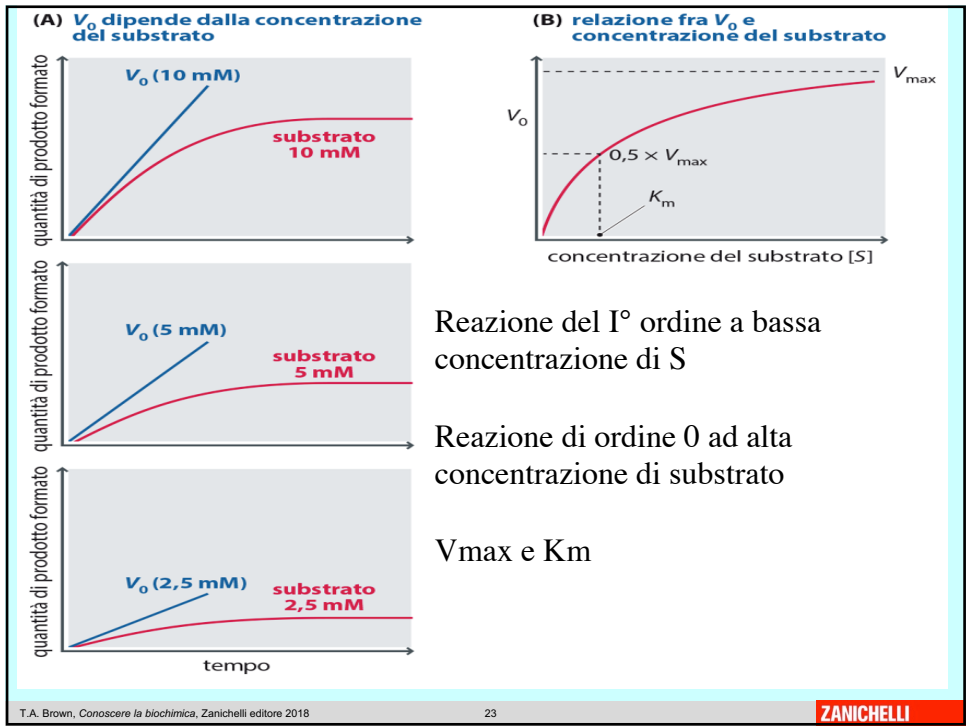
STUDIO DELLE VELOCITÀ DI REAZIONE CATALIZZATE DA ENZIMI
CINETICA ALLO STATO STAZIONARIO
MODELLO DI MICHAELIS E MENTEN



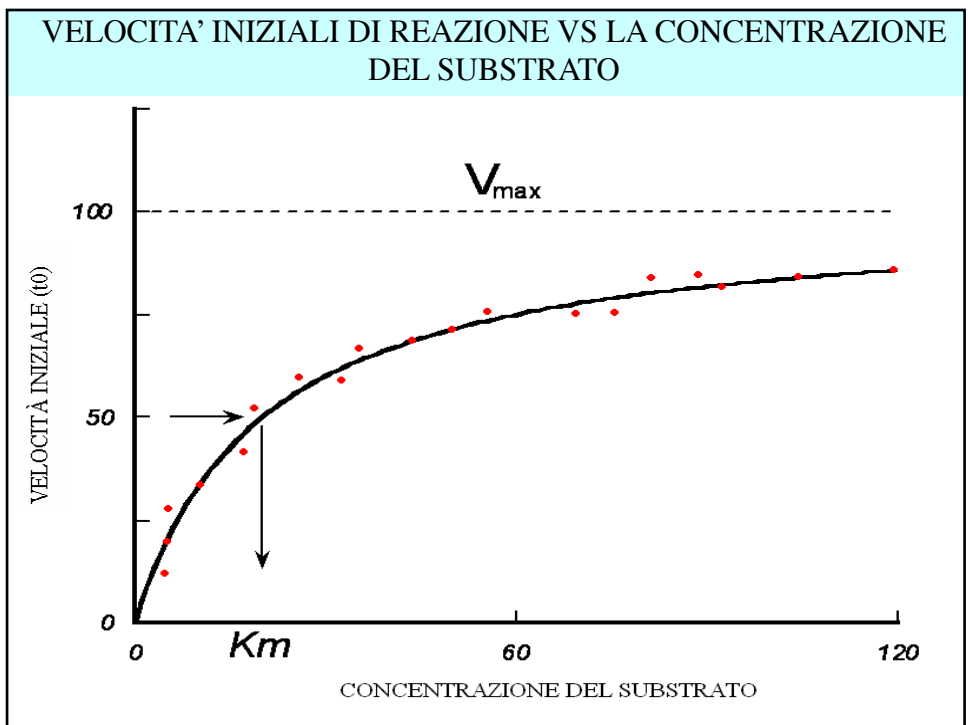
21



22



23



24

CINETICA DELLO STATO STAZIONARIO

IPOTESI DEL MODELLO DI MICHAELIS E MENTEN:

- 1) Durante la reazione enzimatica si forma il complesso ES
- 2) Esiste un periodo della reazione enzimatica durante il quale la concentrazione di ES è costante (stato stazionario)

25

Relazione tra la concentrazione del substrato e la velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi ⁽¹⁾



$$v_f = k_1 [E] [S] \qquad v_{enzimatica} = k_3 [ES]$$

$$v_s = (k_2 + k_3) [ES]$$

Stadio Stazionario $v_f = v_s$

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

L'enzima libero può essere indicato anche come enzima totale meno l'enzima legato al substrato $[E] = [Et] - [ES]$

$$k_1 ([Et] - [ES]) [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

26

Relazione tra la concentrazione del substrato e la velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi (2)

$$k_1 ([Et] - [ES]) [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

$$k_1 [Et] [S] - k_1 [ES] [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

$$k_1 [ES] [S] + (k_2 + k_3) [ES] = k_1 [Et] [S]$$

$$(k_1 [S] + k_2 + k_3) [ES] = k_1 [Et] [S]$$

$$[ES] = \frac{k_1 [Et] [S]}{k_1 [S] + k_2 + k_3}$$

27

Relazione tra la concentrazione del substrato e la velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi (3)

$$[ES] = \frac{k_1 [Et] [S]}{k_1 [S] + k_2 + k_3}$$

$$[ES] = \frac{[Et] [S]}{[S] + \frac{k_2 + k_3}{k_1}} \quad \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m$$

$$[ES] = \frac{[Et] [S]}{[S] + K_m} \quad v = k_3 [ES]$$

28

Relazione tra la concentrazione del substrato e la velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi (4)

$$k_3[\text{ES}] = \frac{k_3[\text{Et}][\text{S}]}{[\text{S}] + K_m}$$

$$k_3[\text{ES}] = v$$

$$k_3[\text{Et}] = V_{\text{max}}$$

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

29

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

30

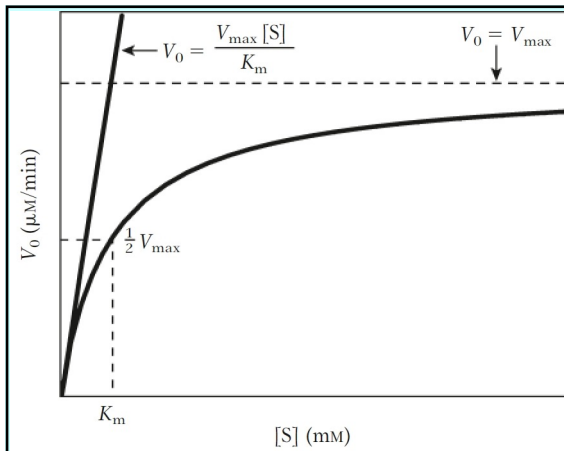


Figura 6.6 Dipendenza della velocità iniziale dalla concentrazione del substrato. Questo grafico mostra alcuni parametri cinetici che definiscono l'andamento della funzione ad alta e a bassa concentrazione di substrato $[S]$. Quando $[S]$ è bassa, si ha che $K_m \gg [S]$ e il termine $[S]$ al denominatore dell'equazione di Michaelis-Menten (Equazione 6.8) diventa irrilevante; l'equazione può essere semplificata in questo modo: $V_0 = V_{\text{max}}[S]/K_m$, e V_0 presenta una dipendenza lineare da $[S]$, cioè varia proporzionalmente all'aumento di $[S]$. Ad alta $[S]$, quando cioè $[S] \gg K_m$, il termine K_m al denominatore dell'equazione di Michaelis-Menten diventa trascurabile e l'equazione può essere semplificata come $V_0 = V_{\text{max}}$; ciò spiega il plateau della curva quando $[S]$ è elevata. L'equazione di Michaelis-Menten verifica quindi la dipendenza della velocità iniziale dalla concentrazione del substrato, e l'andamento della curva è definito dai termini V_{max}/K_m a bassa $[S]$, e da V_{max} ad alta $[S]$.

T.A. Brown, *Conoscere la biochimica*, Zanichelli editore 2018

31

ZANICHELLI

31

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

32

$$v = \frac{V_{\max} [S] k_{\text{cat}} [Et]}{K_m + [S]}$$

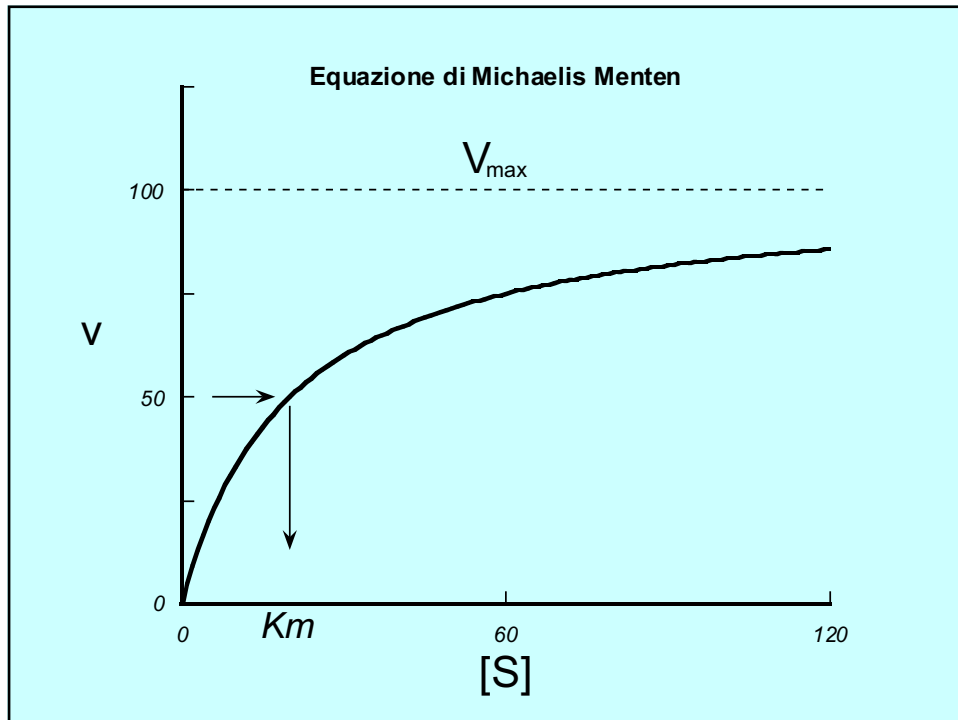
PER $S \gg K_m$

33

SIGNIFICATO BIOLOGICO DEI
PARAMETRI CINETICI

K_m , K_{cat} e K_{cat}/K_m

34



35

K_m for Some Enzymes and Substrates		
Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Catalase	H_2O_2	25
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
Carbonic anhydrase	D-Fructose	1.5
	HCO_3^-	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	<i>N</i> -Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

36

Nella cellula gli enzimi non sono in saturazione

Le concentrazioni intracellulari dei substrati sono spesso simili ai valori di K_m

37

La K_m è una misura dell'affinità enzima substrato

Valori inferiori di K_m indicano maggiore affinità

38

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

PER $S \gg K_m$

39

$$k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E_t]$$

k_{cat} = NUMERO DI TURNOVER
 NUMERO DI MOLECOLE DI
 SUBSTRATO CONVERTITE IN
 PRODOTTO NELL'UNITÀ DI
 TEMPO

40

Turnover Numbers (k_{cat}) of Some Enzymes		
Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	140,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

41

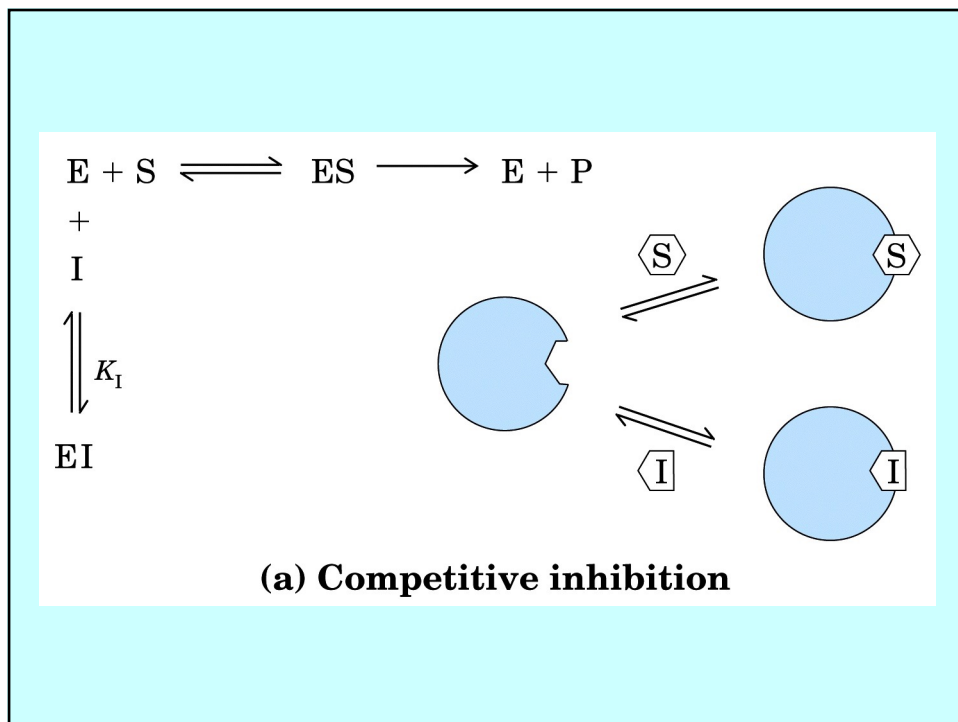
Costante di specificità: k_{cat} / K_m				
Indica quanto il substrato è specifico e quindi è il vero substrato dell'enzima				
Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)				
Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8
Triose phosphate isomerase	Glyceraldehyde 3-phosphate	4.3×10^3	4.7×10^{-4}	2.4×10^8

Enzimi cataliticamente perfetti: quando la velocità di formazione del prodotto è limitata solo dalla velocità di diffusione

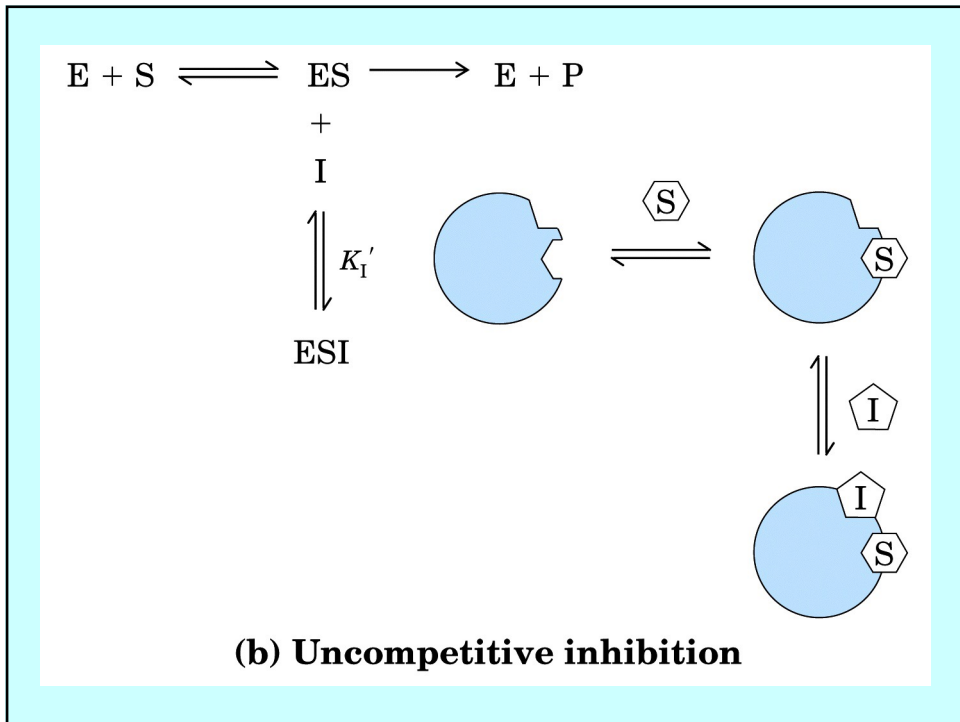
42

INIBIZIONE ENZIMATICA

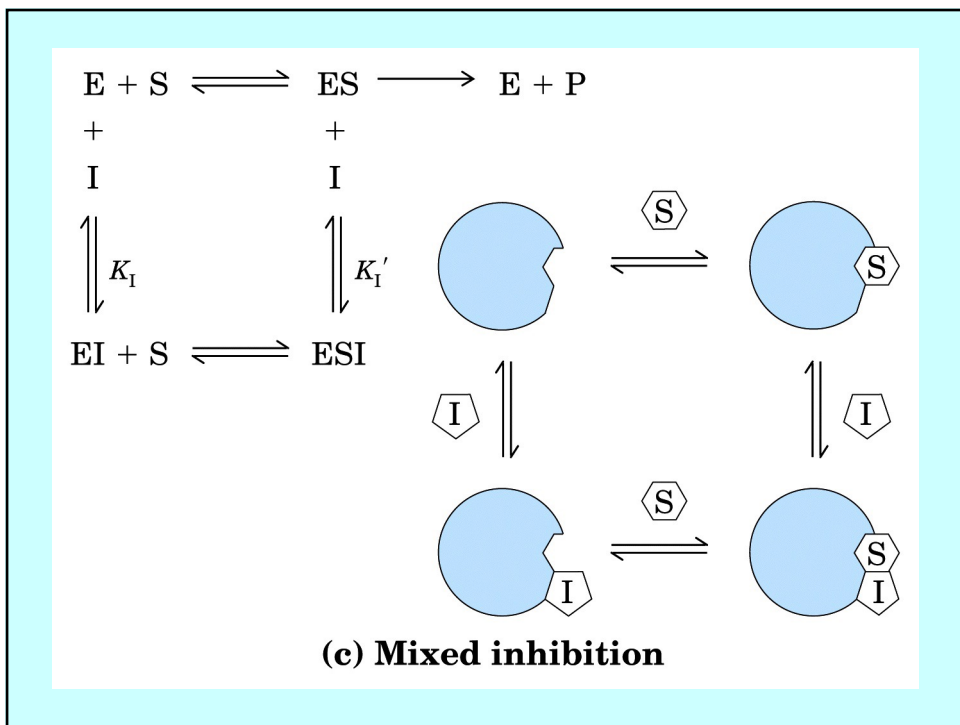
43



44



45



46

Inibizione competitiva:

la K_m aumenta
la V_{max} non cambia

Inibizione non competitiva:

la K_m non cambia
La V_{max} diminuisce