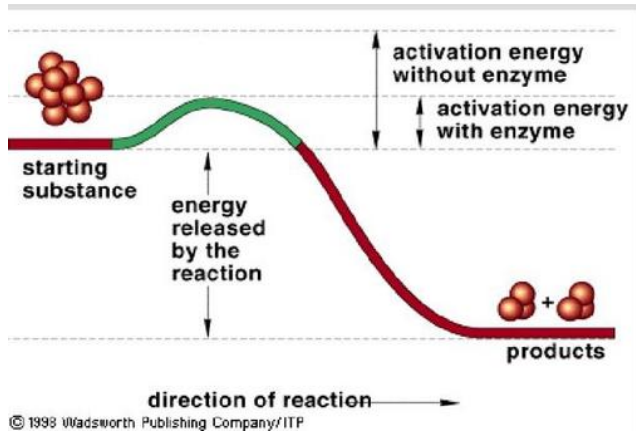


CINETICA ENZIMATICA

CINETICA ENZIMATICA

Sappiamo che una **reazione chimica** è una trasformazione cui va incontro una specie chimica (**reagente**) che modifica la propria struttura e composizione per creare una o più specie chimiche diverse da quella originaria (**prodotto**). Le reazioni chimiche non modificano la natura degli atomi singoli o legati tra loro nelle molecole, ma solo il modo con cui sono legati. Per esempio, la specie HI acido iodidrico si scinde per formare H ed I secondo la reazione $2HI \rightarrow H_2 + I_2$ in cui la freccia indica il verso in cui procede la reazione. La **sostanza reagente** viene consumata nel tempo e contemporaneamente si ottengono i **prodotti**. La velocità con cui i reagenti diminuiscono la loro quantità (espressa sempre come **concentrazione**) nel tempo, viene definita **velocità di reazione**. Esistono reazioni velocissime talmente veloci da essere incontrollabili o addirittura esplosive e reazioni lentissime tanto da non poter essere utilizzate ma tutte quante sono regolate da fattori diversi quali Temperatura, Pressione (solo per i gas), Concentrazione, Capacità dei reagenti di entrare in contatto tra loro. Secondo la *Teoria delle Collisioni*, una reazione avviene in seguito agli urti fra le molecole. Durante il corso di una reazione, si rompono dei legami e se ne formano di nuovi e quindi risulta evidente che solo una frazione degli urti possiede energia sufficiente poter reagire. Perché gli urti siano efficaci, gli atomi o molecole devono possedere un'energia superiore ad un limite minimo detto **Energia di Attivazione**. Se l'energia di attivazione della reazione è alta, si verificano pochi urti e la velocità di reazione è bassa, viceversa se la barriera è bassa la velocità è alta. In relazione alla teoria degli urti è chiaro che un aumento di temperatura provoca l'aumento di velocità degli atomi o molecole aumentando così il numero di urti e quindi la velocità di una reazione. La figura seguente è un grafico che mostra l'avanzamento della reazione (sulle ascisse) e l'energia della molecola (sulle ordinate).



spesso le reazioni avvengono con difficoltà e talvolta non avvengono ma è possibile utilizzare dei coadiuvanti chiamati **catalizzatori** che si ritrovano tali e quali prima e dopo la reazione che abbassano l'energia di attivazione e permettono di realizzare reazioni che altrimenti non potrebbero avvenire.

Nei vari processi metabolici degli esseri viventi si realizzano reazioni che normalmente non potrebbero verificarsi a causa dell'elevata energia di attivazione, e ciò perché esistono sostanze proteiche chiamate **enzimi** che non sono altro che catalizzatori biologici che abbassano l'energia di attivazione rendendo così realizzabili specifiche reazioni. Un esempio tipico è costituito dalla reazione di decarbossilazione dell'orotidina 5'-fosfato che senza l'enzima orotidina 5'-fosfato decarbossilasi non avverrebbe mai ma che in presenza dell'enzima si realizza in millisecondi.

Il nome di un enzima generalmente deriva dal nome del composto su cui reagisce. Per esempio l'enzima che scinde il DNA si chiama DNA polimerasi mentre per la reazione del Glucosio con adenosintrifosfato (ATP) che forma glucosio-6-fosfato + adenosin difosfato (ADP) prende il nome di **ESOCINASI** in cui **eso** si riferisce al glucosio che ha 6 atomi di carbonio e **chinasi** si riferisce al gruppo che viene a reagire.

Gli enzimi sono specifici e vi sono 6 differenti tipi di specificità:

1-transferasi

in cui un gruppo X viene trasferito da una molecola B ad una molecola A per esempio $A + BX \rightarrow AX + B$ un esempio è il trasferimento della lisina al gruppo Metionina-alanina-leucina mediante la lisina- t-RNA per formare il gruppo Metionina-alanina-leucina-lisina che si scrive sinteticamente :

Met-ala-leu + lis-tRNA \rightarrow Met-ala-leu-lis + t-RNA

che utilizza l'enzima **peptidiltransferasi**

2 -ligasi

che favoriscono il legame tra due molecole $A + B \rightarrow AB$. Un esempio è la formazione del DNA da due polimeri separati A e B per formare un singolo strand di DNA in cui l'enzima coinvolto nella sintesi è la **DNA LIGASI**.

3- ossidoriduttasi

in cui elettroni vengono trasferiti dalla molecola A alla molecola B $A: + B \rightarrow A + B:$

ad esempio piruvato + NADH \rightarrow Acido lattico + NAD⁺

in cui gli elettroni sono trasferiti dal piruvato all'acido lattico mediante l'enzima **latticodeidrogenasi** che elimina l'idrogeno dall'NADH.

4-Isomerasi

un esempio è la trasformazione del glucosio 6 fosfato in fruttosio 6 fosfato

l'enzima è la ***fosfoglucoisomerasi***.

5-idrolasi

catalizzano reazioni del tipo $A + H_2O \rightarrow B + C$ come per esempio l'idrolisi

Lis+Ala +H₂O ? Lis + Ala

catalizzata dalla ***serina idrolasi*** che è una proteasi.

6- liasi

catalizza reazioni del tipo $A \rightarrow B + C$ come ad esempio

Argininosuccinato ? Arginina + Succinato

mediante ***argininosuccinato liasi***. Questa tipologia di enzimi forma un doppio legame oppure un anello.

Gli enzimi sono classificati secondo classificazione internazionale con la sigla EC seguita da un numero infatti nelle categorie:

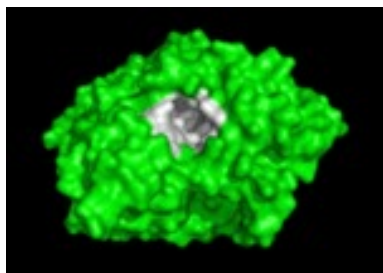
- EC 5.1: sono inclusi gli enzimi che catalizzano la produzione di composti racemici (racemasi) e di epimeri (epimerasi);
- EC 5.2: sono inclusi gli enzimi che catalizzano l'isomerizzazione di isomeri geometrici (cis-trans isomerasi);
- EC 5.3: sono incluse ossidoriduttasi intramolecolari;

- EC 5.4: sono incluse la transferasi intramolecolari (dette anche mutasi);
- EC 5.5: sono incluse Liasi intramolecolari;
- EC 5.99: sono incluse altre isomerasi.

Non tutta la molecola di enzima è interessata alla reazione ma solo uno o più punti di essa chiamati "**siti attivi**" che non sono altro che delle zone ben definite della struttura che sono attivamente implicate nel processo di catalisi. Le proprietà chimiche e la struttura spaziale del sito attivo di un enzima permettono il riconoscimento del substrato ed il successivo legame specifico. Il sito attivo può essere considerato come una piccola concavità posta sulla superficie dell'enzima all'interno della quale vi sono dei punti caratterizzati da una carica oppure idrofobicità oppure ancora substrutture steriche responsabili della specificità. Spesso questi punti agiscono da accettori o donatori di protoni H^+ o sono legati ad un cofattore quale NAD Piridossale o Tiamina. I **cofattori** sono infatti piccole molecole di natura non proteica o uno ione di un metallo **che si lega all'enzima vicino al sito attivo** e ne rende possibile l'attività. In base alla loro natura chimica, **i cofattori sono suddivisi** in **metalli** e **coenzimi** (intesi come piccole molecole organiche). La maggior parte degli enzimi che richiedono il legame a cofattori, infatti, perde ogni funzionalità in caso di loro assenza. Esistono, inoltre, sostanze che inibiscono l'attività enzimatica legandosi direttamente al sito attivo equindi inibendone l'attività. Un enzima privo del cofattore che ne rende possibile l'attività enzimatica è detto **apoenzima**. Il legame tra **cofattore ed apoenzima** dà origine al cosiddetto **oloenzima** (detto anche **oloproteina**). In genere i cofattori metallici sono legati con legami deboli o con legami covalenti mentre i coenzimi se legati in maniera debole sono detti **Coenzimi** ma se sono legati con legami forti si definiscono **gruppi Prostetici**. I **coenzimi** sono in grado di associarsi e dissociarsi agevolmente dall'enzima, e si trovano associati all'enzima solo se stanno catalizzando una reazione, altrimenti sono dissociati.

Qui di seguito è mostrata la colinesterasi (AChE) un enzima del sistema nervoso. L'acetilcolinesterasi (AChE) è l'enzima chiave nel sistema nervoso degli animali. Mediante idrolisi rapida del neurotrasmettitore, acetilcolina (ACh), AChE termina la neurotrasmissione alle sinapsi colinergiche. È un enzima molto veloce, specialmente per una serina idrolasi, che funziona ad un ritmo che si avvicina a quello di una reazione controllata dalla diffusione. Gli inibitori di AChE sono tra i farmaci chiave approvati dalla FDA per la gestione della malattia di Alzheimer (AD). La potente tossicità dei veleni organofosforati (OP) o dei gas nervini è attribuita

principalmente ai loro potenti inibitori dell'AChE.



Meccanismo di azione:

I substrati si legano al sito attivo dell'enzima con legami idrogeno, interazioni idrofobiche, legami covalenti temporanei o una combinazione di questi. I residui del sito attivo agiscono da donatori o accettori di protoni o altri gruppi presenti sul substrato favorendo la reazione. In questo modo il sito attivo modifica il meccanismo di reazione secondo un percorso al quale è associata una **minore energia di attivazione**. Il prodotto legato al sito attivo è solitamente instabile a causa dell'impedimento sterico e quindi tende a essere liberato ricostituendo in tal modo l'enzima originario. Due sono i modelli proposti su come il sito attivo dell'enzima si adatti al suo specifico substrato:

1. modello della chiave-serratura
2. ipotesi dell'adattamento indotto.

meccanismo chiave serratura

ipotesi dell'adattamento indotto.

Il modello chiave serratura in realtà è un modello in cui i siti attivi sono abbastanza rigidi, tuttavia, dal momento che in realtà gli enzimi sono strutture relativamente flessibili nel 1958 Daniel Koshland ha proposto una modifica del modello *chiave-serratura* suggerendo che il sito attivo potesse continuamente modellarsi in base alla presenza o meno del substrato. Il substrato pertanto non si lega ad un sito attivo *rigido*, ma provoca un rimodellamento sterico del sito stesso, che determina un legame più stabile dell'enzima in modo da portare correttamente a termine la sua attività catalitica. In alcuni casi, ad esempio con la glicosidasi, anche il substrato può cambiare leggermente la propria forma all'ingresso nel sito attivo.

Specificità degli enzimi

La maggior parte degli enzimi presenta una notevolissima specificità per la reazione catalizzata e per i substrati coinvolti. Tale specificità è legata a diversi fattori che caratterizzano l'associazione tra il substrato e il sito attivo, come la complementarità

dal punto di vista strutturale, le cariche elettriche, la natura idrofoba o idrofila. Gli enzimi mostrano spesso livelli elevatissimi di stereospecificità, regioselettività e chemioselettività.

Alcuni degli enzimi che mostrano la maggiore specificità sono coinvolti nella replica ed espressione del genoma. Enzimi come le DNA polimerasi catalizzano inizialmente la reazione di allungamento del DNA, quindi valutano in un secondo momento l'efficienza e la correttezza dell'operazione stessa. Questo processo in due passaggi permette di ridurre enormemente gli errori compiuti. Simili meccanismi detti *proof-reading* sono presenti anche nelle RNA polimerasi, aminoacil-tRNA sintetasi e nei ribosomi. Esistono, in ogni caso, diversi enzimi caratterizzati da una specificità relativamente più bassa e che sono in grado di agire su un numero ampio di substrati.

CINETICA ENZIMATICA

Vista la notevole importanza degli enzimi nei processi biochimici degli esseri viventi occorre studiare la velocità con cui avvengono le reazioni enzimatiche in quanto ci permettono di valutare la quantità dei substrati analizzati. Consideriamo la generica reazione

A → B

Questa equazione ci dice che A dà origine al prodotto B. Poiché siamo in grado di misurare con metodiche analitiche le quantità dei partecipanti alla reazione (A, B), vediamo che la concentrazione di A diminuisce col passar del tempo, mentre quella di B aumenta.

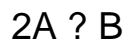
La variazione di concentrazione di un reagente o di un prodotto in un certo intervallo di tempo non è altro che **la velocità** con cui il reagente si consuma ed i prodotti si formano in quell'intervallo di tempo cioè la **VELOCITA' DI REAZIONE**.

Matematicamente la diminuzione della concentrazione del reagente A è espressa da:

$V = -d[A]/t$ oppure $V = d[B]/t$ il segno meno indica che [A] diminuisce nel tempo t.

Poiché la velocità dipende dalla prima potenza della concentrazione di A cioè $[A]^1$ la reazione viene definita del PRIMO ORDINE. Nel caso in cui si ha ad esempio la

reazione



la velocità sarà $V=k [A]^2$ e la reazione è definita del **secondo ordine**. Più in generale se abbiamo una reazione



la reazione dipende da $[A]^m[B]^n$ ed in tal caso l'ordine della reazione è dato da $m+n$.

Cinetica enzimatica ad un solo substrato.

La prima equazione generale di velocità per una reazione enzimatica fu derivata nel 1903 da Victor Henri. L'equazione di Henri era in grado di spiegare l'osservazione che la velocità iniziale della reazione enzimatica è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima tuttavia essa cresce in modo non lineare al crescere della concentrazione del substrato fino ad un valore massimo limite. Gli studi vennero ripresi da Leonor Michaelis e Maud Menten nel 1913 da cui ha preso il nome l'equazione relativa alla reazione ad un substrato. Il principio di base del ragionamento di Michaelis e Menten è che il substrato S e l'enzima E formino un complesso ES in una reazione in equilibrio e che una volta formatosi il complesso si scinde per formare il prodotto ripristinando l'enzima:

essendo la concentrazione totale di E $[E_t] = [E] + [ES]$ allora $[E] = [E_t] - [ES]$

quindi

e dividendo numeratore e denominatore per k_1 si ha:

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

sapendo inoltre che $V = k_2[ES]$ si ha

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

dove $K_m = k_2 + k_1/k_1$ e $V_{max} = K_2 [E_t]$

Il grafico seguente mostra come varia la concentrazione di E, ES, S e P col passare del tempo:

La velocità di variazione della [E] e di [ES] col tempo è minima se paragonata alla velocità di variazione di [S] e di [P] confermando il lavoro di Briggs ed Haldane noto come **Steady State Approximation**: immediatamente dopo l'inizio della reazione enzimatica, viene raggiunto uno stato stazionario in cui la velocità di variazione della concentrazione dell'intermedio ES è essenzialmente zero se paragonata alla velocità di variazione della concentrazione dei reagenti e dei prodotti. In termini matematici

l'espressione

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

può essere semplificata se $[S]$ è molto più grande di K_m così che il contributo di K_m può essere trascurato per cui

$V = K [Et]$ cioè la velocità della reazione enzimatica è direttamente proporzionale alla quantità di enzima totale solo se $[S]$ è molto grande.

L'equazione di Michaelis può essere riscritta $V = V_{max} / (K_m/[S] + 1)$

Sia K_m che V_{max} sono caratteristiche per ogni reazione enzimatica e conoscendo questi valori possiamo calcolare la velocità della reazione per un intero range.

Se poniamo $[S] = K_m$ allora $V = V_{max} [S] / ([S] + [S])$ $V = V_{max} / 2$ per cui possiamo dire che:

K_m è "la concentrazione di substrato che dimezza la velocità della reazione enzimatica".

Riassumendo:

V = velocità della reazione enzimatica

$[S]$ = concentrazione di substrato

K_m = la $[S]$ che riduce della metà la velocità massima della reazione

V_{max} velocità massima che può raggiungere la reazione anche se variamo la $[S]$

V_{max} si esprime in moli/minuto di $[S]$ per mole di enzima cioè ~~mole/mole~~ x minuto = 1/minuto oppure **minuto⁻¹**

Inoltre ricordando che $V_{max} = k_2 [Et]$ se $[Et] =$ unità molare allora **$V_{max} = k_2$**

V_{max} in questo caso rappresenta il numero di molecole catalizzate dall'unità di enzima al minuto.

Se usiamo basse concentrazioni di substrato tali che $[S]$