

Gli enzimi

(en-zima = nel-lievito)



1876

Wilhelm Friedrich Kühne (1837-1900)

Caratteristiche degli enzimi

- Incrementano la velocità di reazione di molti ordini di grandezza
- Impediscono reazioni indesiderate (*hanno specificità di substrato*)
- Non danno sottoprodotti
- Si possono riutilizzare molte volte
- La loro attività può essere modulata
- Hanno natura proteica, ma molti richiedono cofattori inorganici o altri fattori organici
- La loro attività è influenzabile da T e pH

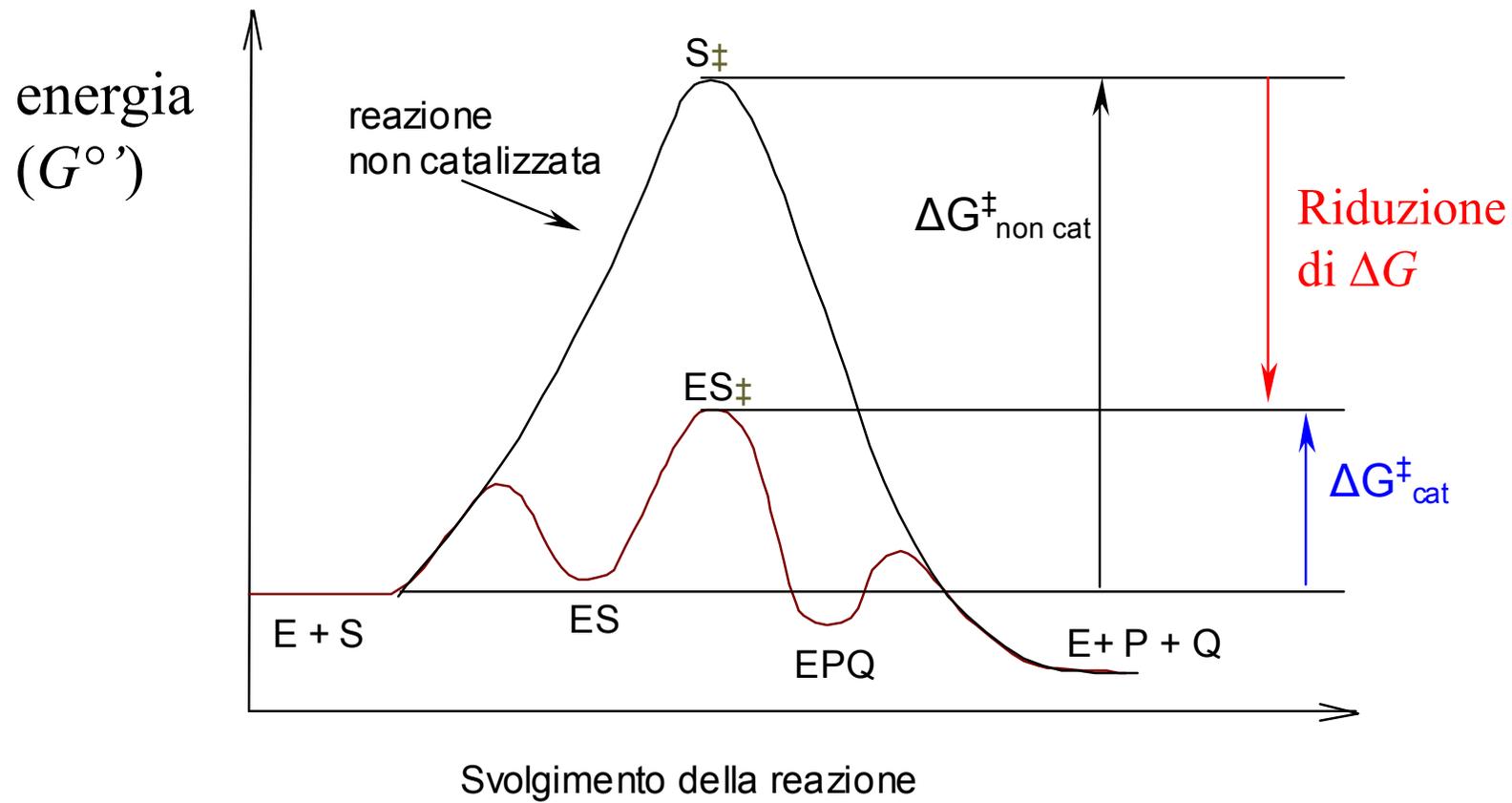
Gli enzimi non modificano il ΔG° della reazione.
Pertanto non modificano neanche la costante di
equilibrio della reazione stessa.

Ricordiamo infatti:

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K_{eq}$$

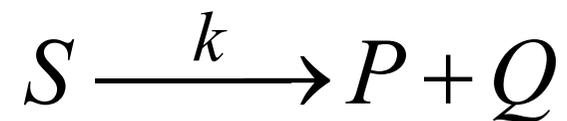
dove $R = 8.3 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ e $T = 298^\circ\text{K}$

Reazione catalizzata e non catalizzata



Quanto è importante l'abbassamento del ΔG di attivazione?

Si consideri la generica reazione:

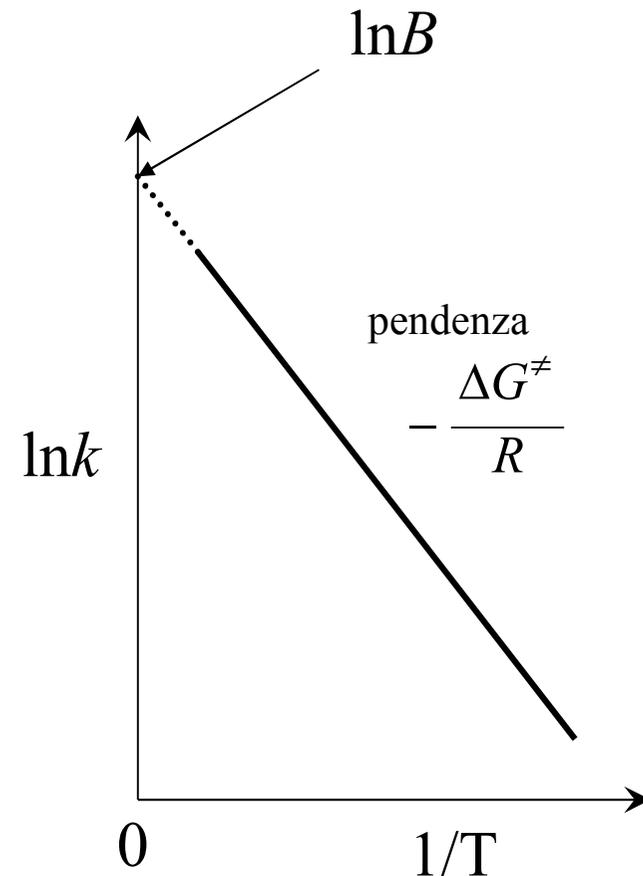


l'equazione di Arrhenius lega la costante di velocità k con la temperatura assoluta T e l'energia di attivazione ΔG^\ddagger :

$$k = B \times e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

$$\ln k = \ln B - \frac{\Delta G^\ddagger}{RT}$$

B è detto *fattore preesponenziale* e misura il tasso di realizzazione degli urti a prescindere dalla loro energia per cui il prodotto k fornisce il tasso degli urti efficaci



Effetto dell'abbassamento di 9 volte dell'energia di attivazione da parte di un catalizzatore (si assume che il fattore preesponenziale sia lo stesso per la reazione catalizzata e non catalizzata)

$$\log k_{noncat} = \log B_{nc} - \frac{75\text{kJ/mol}}{2.3RT}$$

$$\log k_{cat} = \log B_c - \frac{8.2\text{kJ/mol}}{2.3RT}$$

$$\log \frac{k_c}{k_{nc}} = \frac{75 - 8.2}{2.3 \times 0.0083 \times 310} = \frac{66.8}{5.918} = 11.3$$

$$\frac{k_c}{k_{nc}} = 2 \times 10^{11}$$

Tempo di dimezzamento o di emivita.

Consideriamo una reazione di primo ordine:

$$S = S_0 e^{-kt}$$

$$\ln \frac{S}{S_0} = -kt$$

$$\ln \frac{S_0}{S} = kt$$

Quando A è la metà del valore iniziale:

$$0.69 = kt \quad \text{da cui:} \quad t = \frac{0.69}{k}$$

Emivite di alcune reazioni biologiche a 25°C
non catalizzate e **catalizzate da enzima**

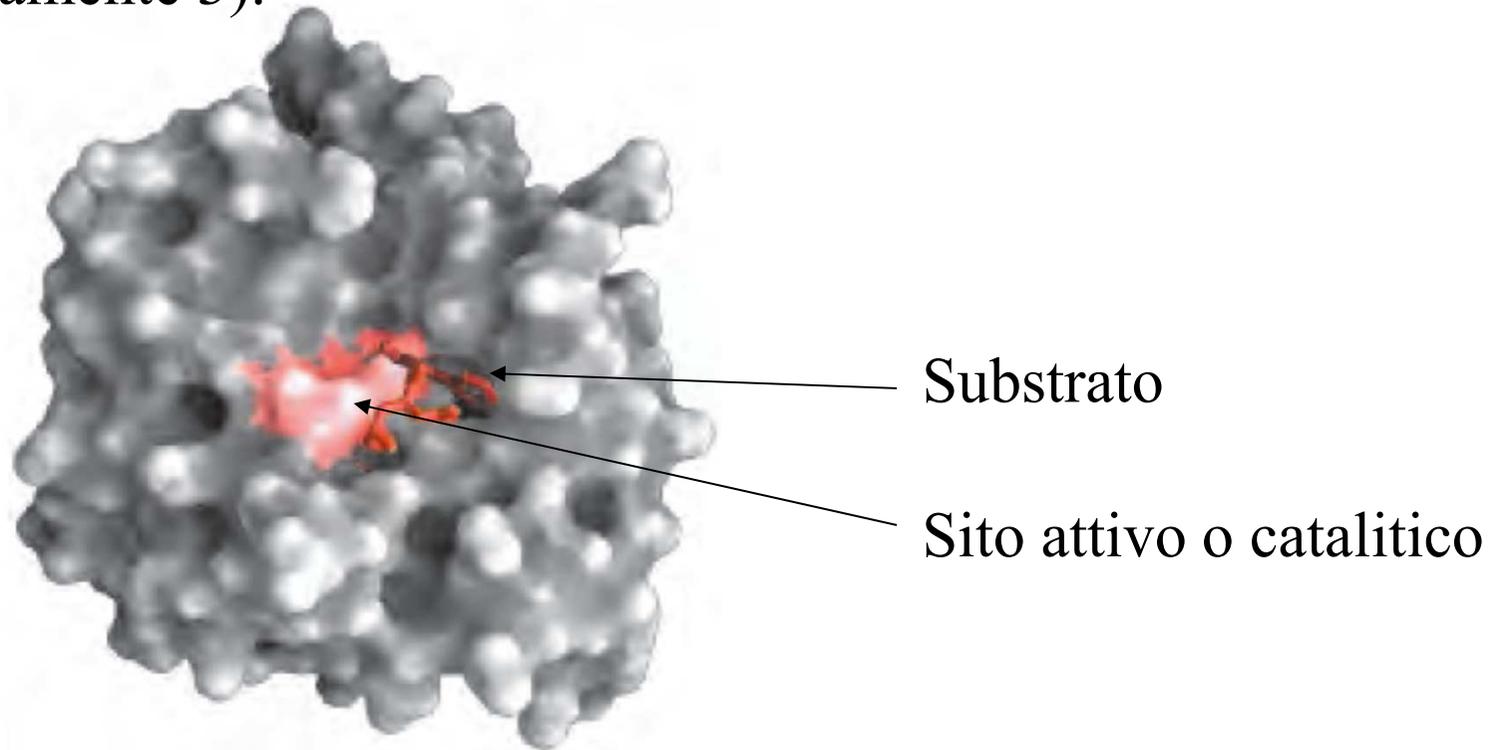
Decarbossilazione dell'arginina 3 miliardi di anni
con enzima *arginina decarbossilasi* **0.7 msec**

Idrolisi del trealosio 6.6 milioni di anni
con enzima *trealasi* **1.7 msec**

Idratazione del fumarato 700.000 anni
con enzima *fumarasi*: **0.86 msec**

Gli enzimi hanno una struttura globulare (terziaria o quaternaria; la catalisi avviene in un punto ben definito, detto **sito attivo o sito catalitico**

La molecola soggetta alla catalisi enzimatica è detta **substrato**; spesso partecipano alla reazione più substrati (in genere 2, raramente 3).



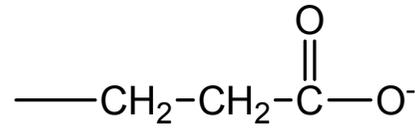
Il sito catalitico contiene:

1. aminoacidi con gruppi R particolarmente reattivi (acidi o basici) arrangiati secondo una precisa disposizione spaziale in modo da ottimizzare sia l'interazione con il substrato sia la catalisi

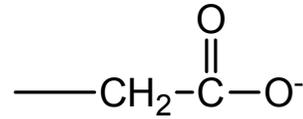
2. in molti casi componenti addizionali sono necessari alla catalisi:

- coenzimi (molecole organiche)
- cofattori (ioni inorganici)

Gruppi aminoacidi reattivi nei siti catalitici degli enzimi



Glutammato



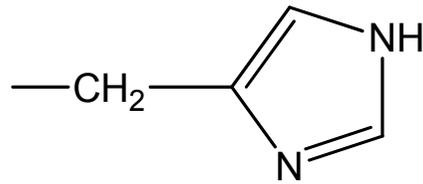
Aspartato



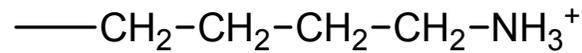
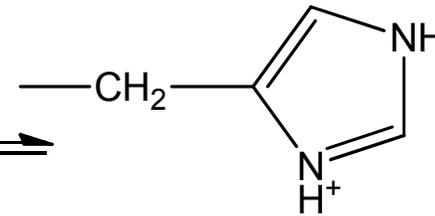
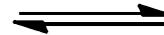
Serina



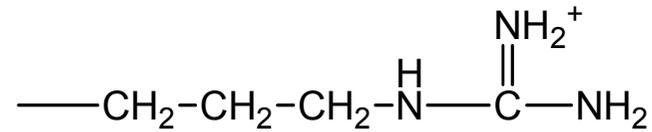
Cisteina



Istidina

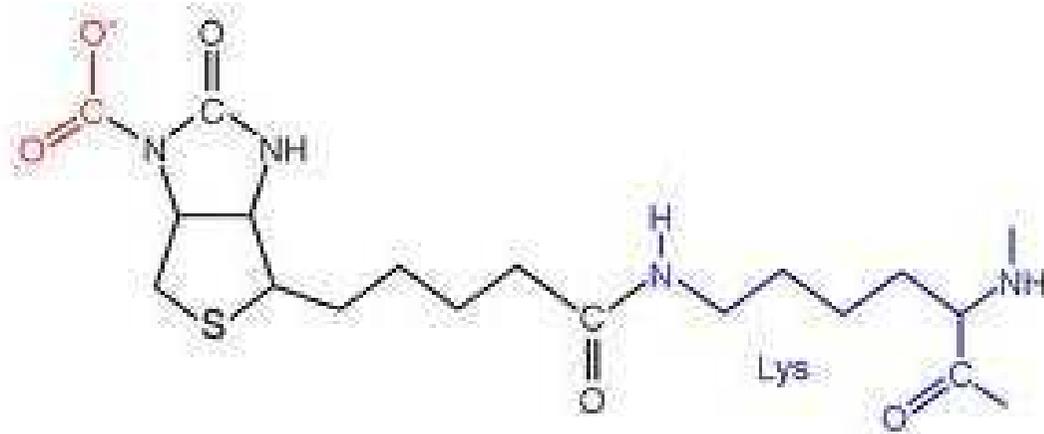
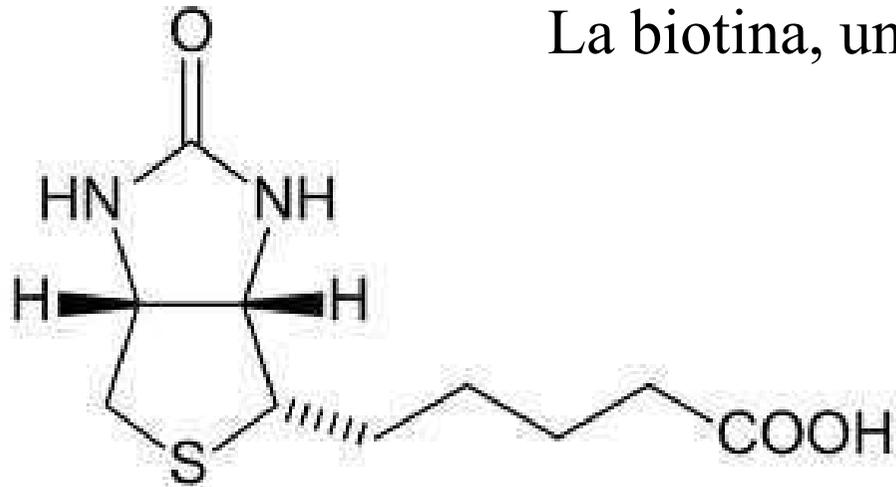


Lisina



Arginina

La biotina, un coenzima



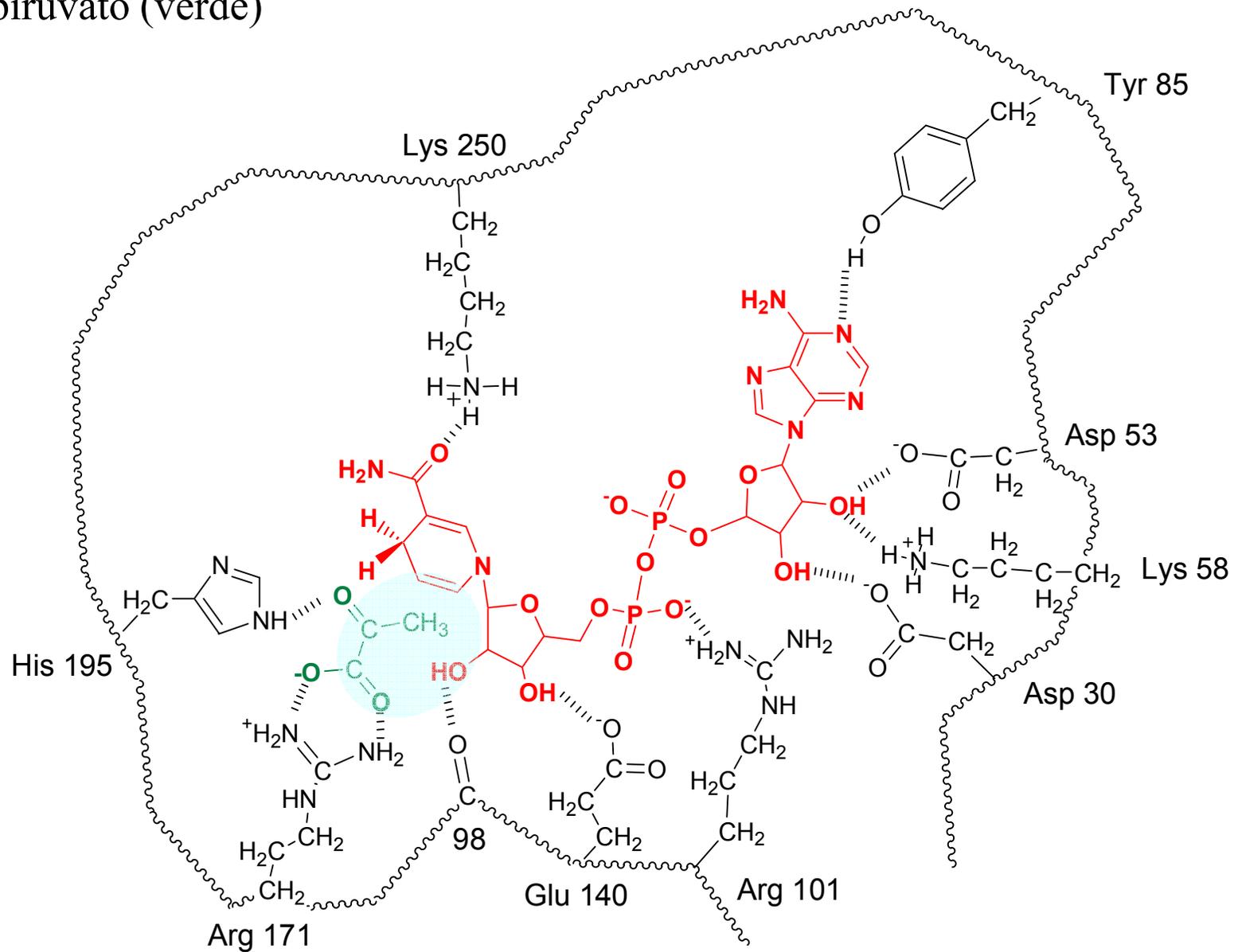
Alcuni ioni inorganici presenti negli enzimi

Ione	Enzima	Via metabolica
Cu ²⁺	Citocromo ossidasi	Fosforilazione ossidativa
Fe ²⁺	Catalasi	Rimozione H ₂ O ₂
Fe ³⁺	Citocromo P450	Catabolismo xenobiotici
Zn ²⁺	Alcool deidrogenasi	Fermentazione alcolica
Mg ²⁺	Enolasi	Glicolisi
Mn ²⁺	Isocitrato deidrogenasi	Ciclo di Krebs
Mo	Nitrogenasi	Fissazione dell'azoto
Ni ²⁺	Ureasi	Degradazione urea
V	Cloroperossidasi	Sintesi di HOCl (suolo)

Nel sito catalitico avvengono i seguenti fenomeni

1. molteplici interazioni deboli tra enzima e substrato con conseguente liberazione di energia (*energia di legame*)
2. desolvatazione
3. riduzione entropica: riduzione del moto con orientamento dei gruppi funzionali e aumento delle collisioni produttive
4. adattamento indotto con formazioni di interazioni deboli aggiuntive durante lo stato di transizione

Sito attivo della lattico deidrogenasi con i substrati NADH (rosso) e piruvato (verde)



Caso della superossido dismutasi (SOD)



Il sito catalitico è circondato da un campo elettrostatico con carica positiva che risucchia il substrato.

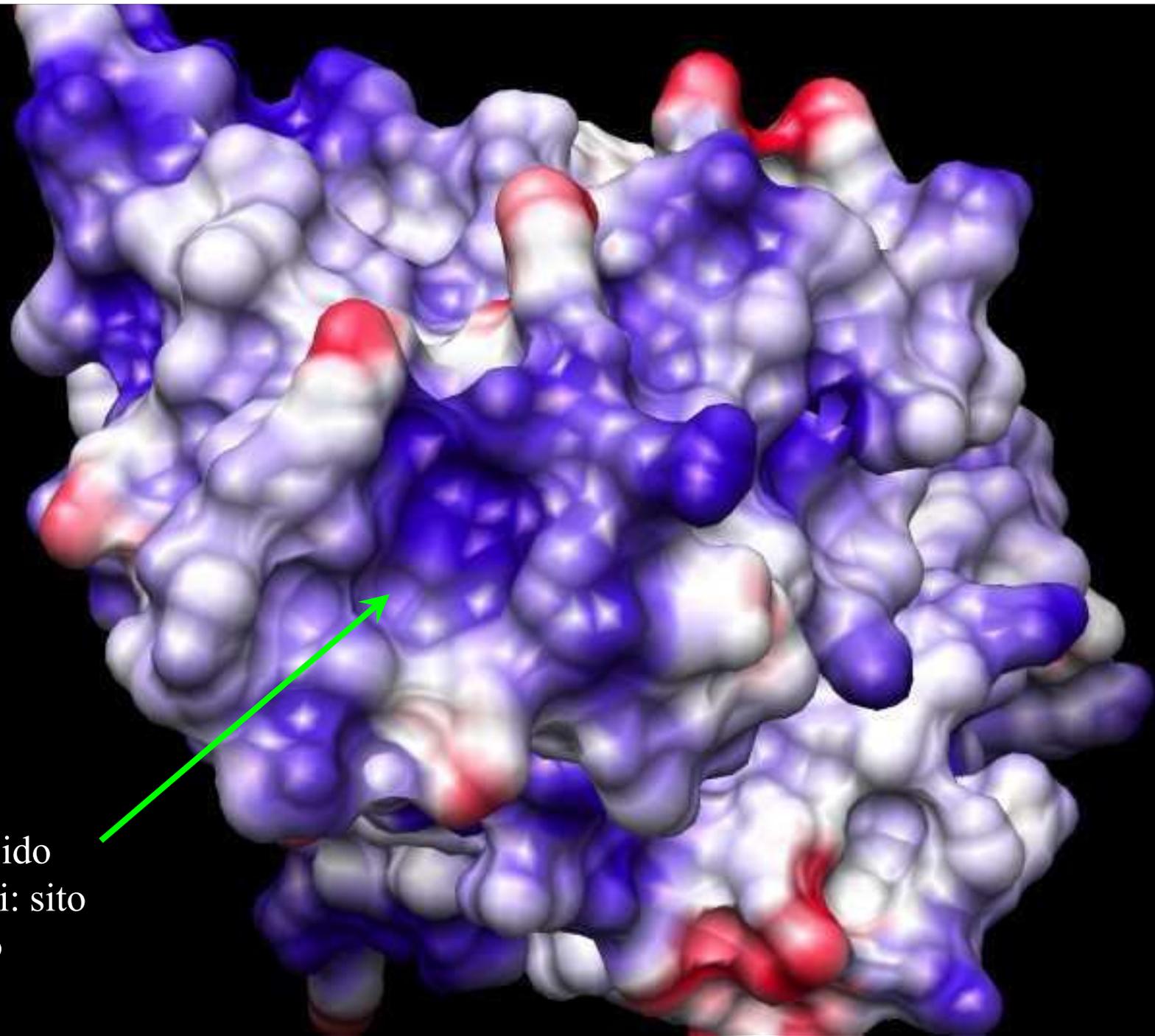
La reazione è controllata dalla diffusione: è così veloce che si ottengono i prodotti prima che la diffusione separi i reagenti:

Questa conclusione si raggiunge dalla stima della costante di velocità di secondo ordine, k :

$$v = k[E][S]$$

che per la SOD è $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

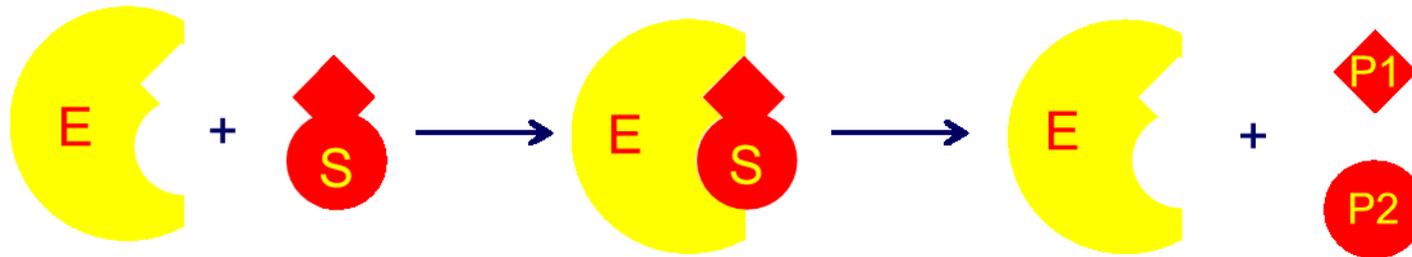
(in acqua il limite del controllo diffusivo è $7.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)



Superossido
dismutasi: sito
catalitico

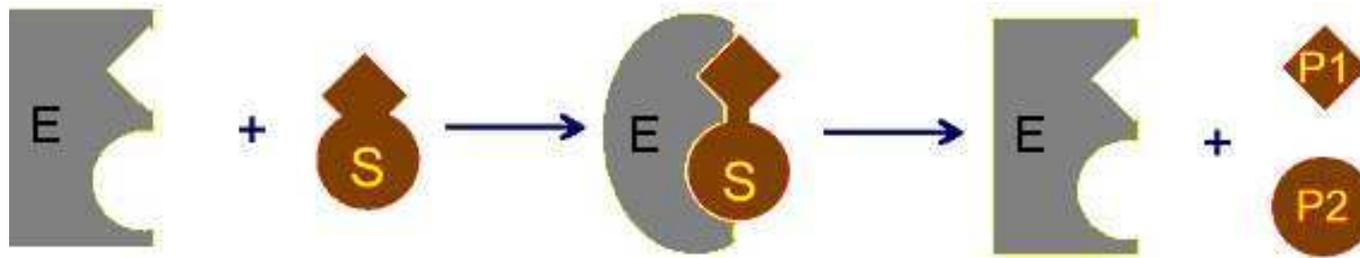
Chiave-serratura o adattamento indotto ?

Modello chiave serratura proposto da Emil Fischer nel 1894



Il complesso ES ha un'energia più bassa dei reagenti E ed S, ma come fa S a raggiungere lo stato attivato?

Modello dell'adattamento indotto (Koshland, 1959)



L'enzima è complementare allo stato di transizione, durante il quale le interazioni tra l'enzima e il substrato sono massime.

Spiega anche perché molti meccanismi di reazione a più substrati seguono un ordine d'ingresso ben definito

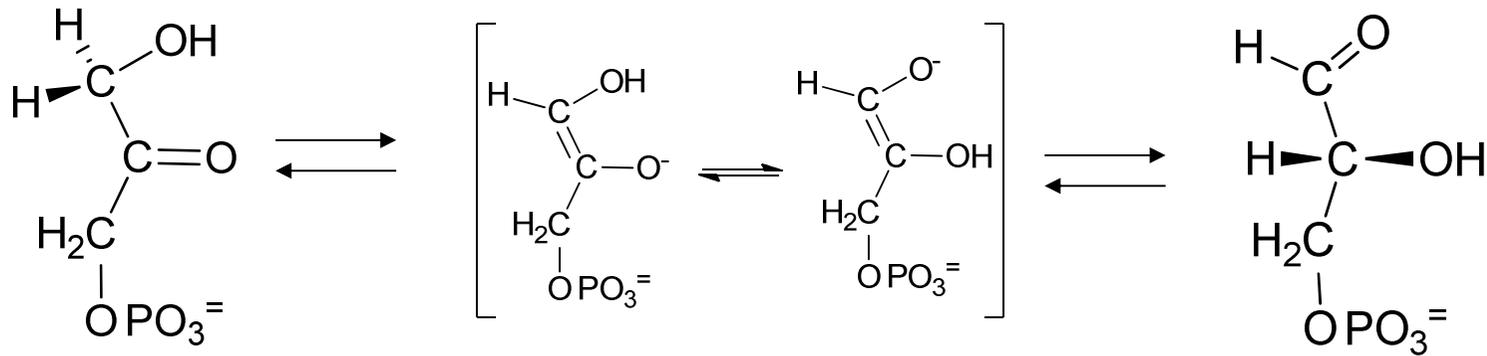


Principali prove a favore dell'adattamento indotto:

Gli analoghi dello stato di transizione si legano più saldamente al sito attivo dei substrati: hanno un'affinità anche 100 volte maggiore

I complessi enzima-substrato (o suo analogo) hanno una struttura tridimensionale diversa da quella dell'enzima libero (prove cristallografiche)

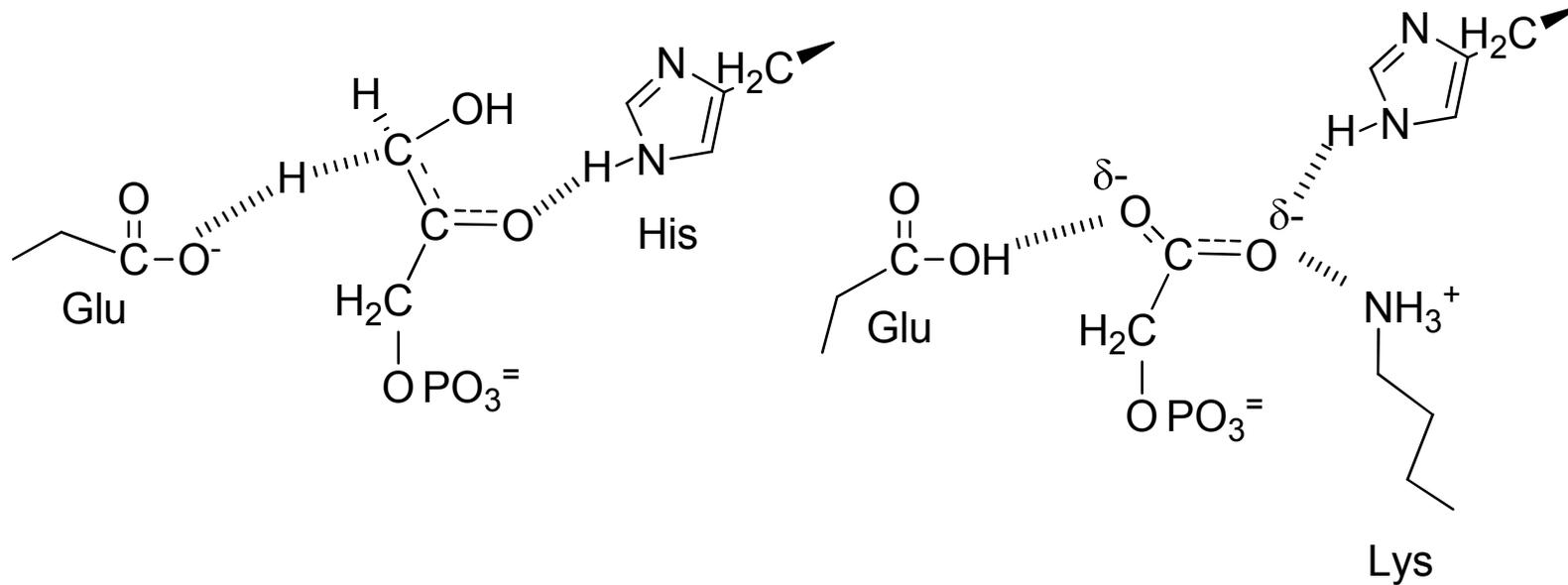
Triosofosfato isomerasi (glicolisi)



diidrossiacetonfosfato

intermedio

gliceraldeide-3fosfato



stato di transizione

**2-fosfoglicolato
(analogo e forte
inibitore)**

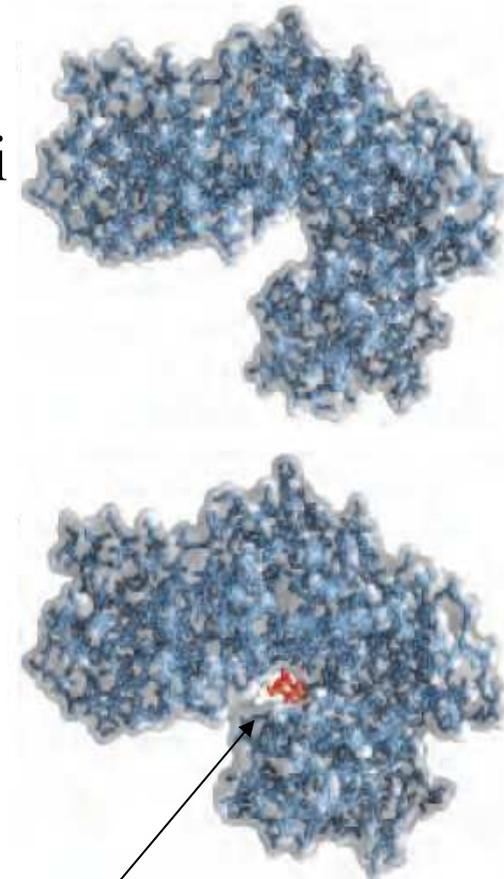
Il carbossile del fosfoglicolato instaura legami più forti

Uno dei fattori che contribuisce ad abbassare l'energia di attivazione dello stato di transizione è il maggior numero di interazioni deboli formate tra Enzima e Substrato attivato (fenomeno della *stabilizzazione dello stato di transizione*)

Prove delle variazioni conformazionali indotte dal substrato

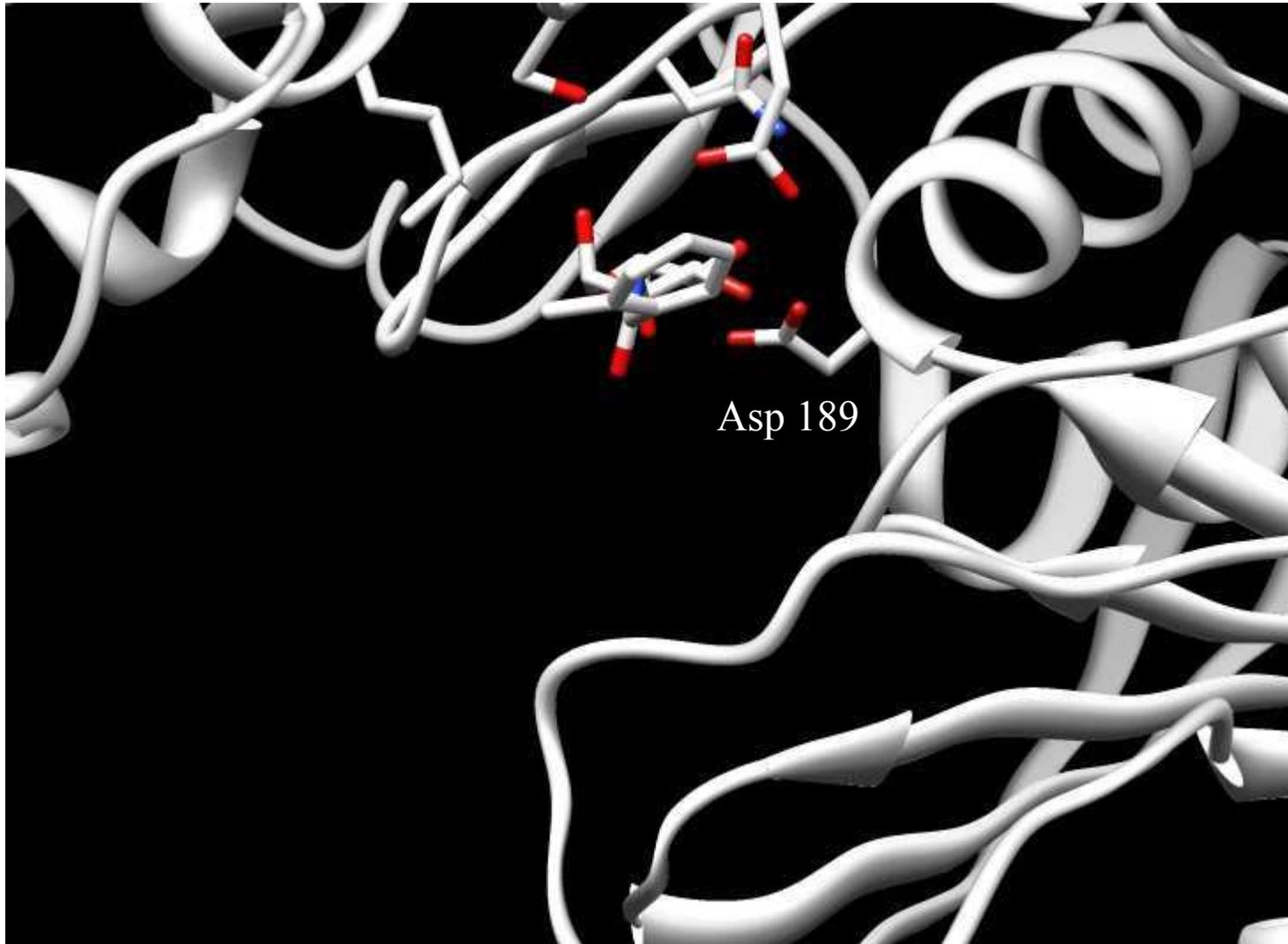
Il fatto che la struttura terziaria sia mantenuta essenzialmente da interazioni deboli rende un enzima molto **flessibile**

Esochinasi



substrato: glucosio

L'adattamento indotto contribuisce a ottimizzare le interazioni deboli durante lo stato di transizione portando i gruppi funzionali dell'enzima nell'orientamento corretto. Esochinasi con un analogo del substrato



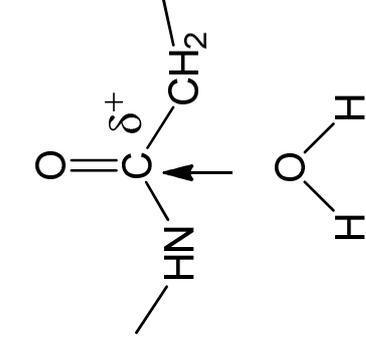
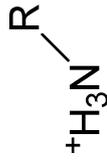
Meccanismi catalitici

Catalisi acido-basica

Catalisi covalente

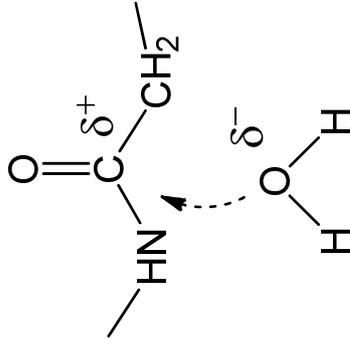
Catalisi mediata da metalli

Catalisi acida
generale



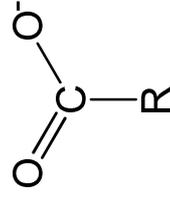
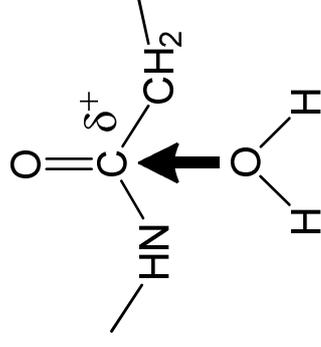
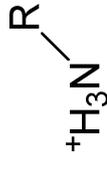
VELOCE

Catalisi acido-
basica specifica

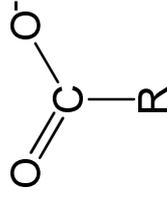
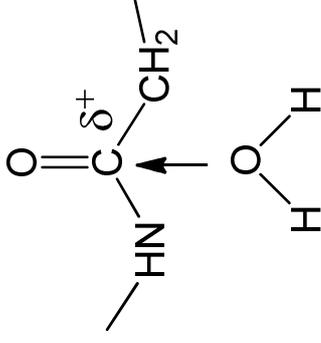


LENTA

MOLTO VELOCE

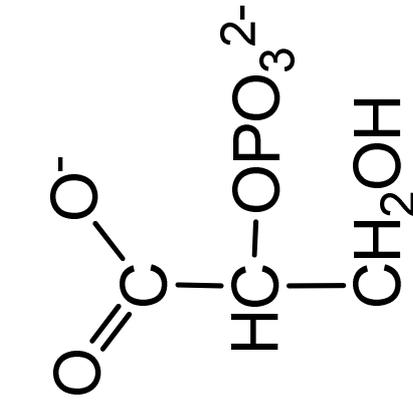


VELOCE

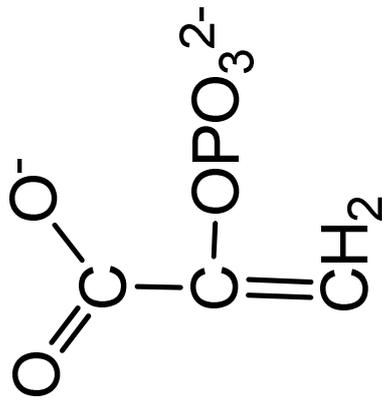
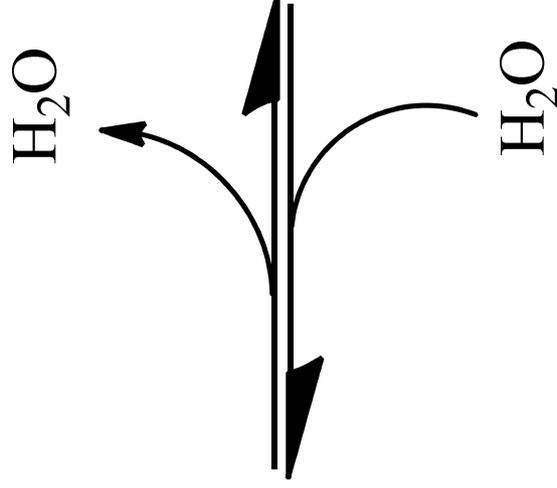


Catalisi basica
generale

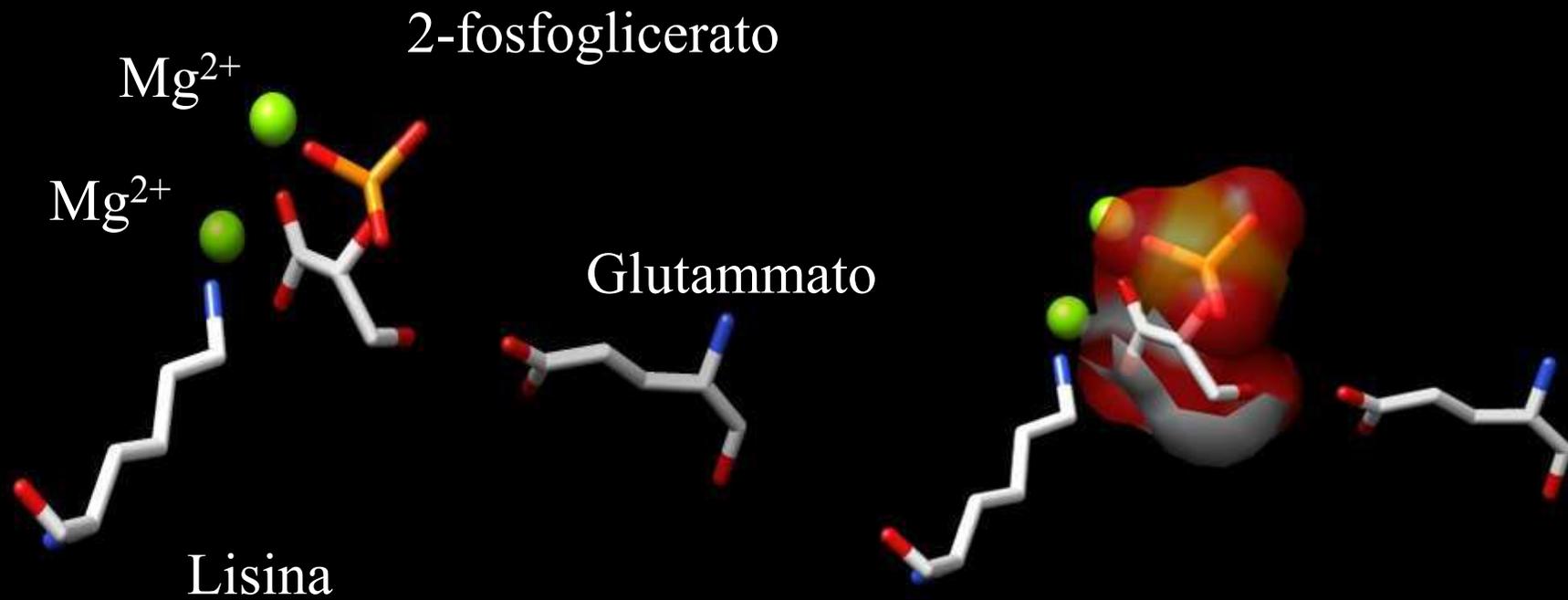
Reazione catalizzata dall'enolasi

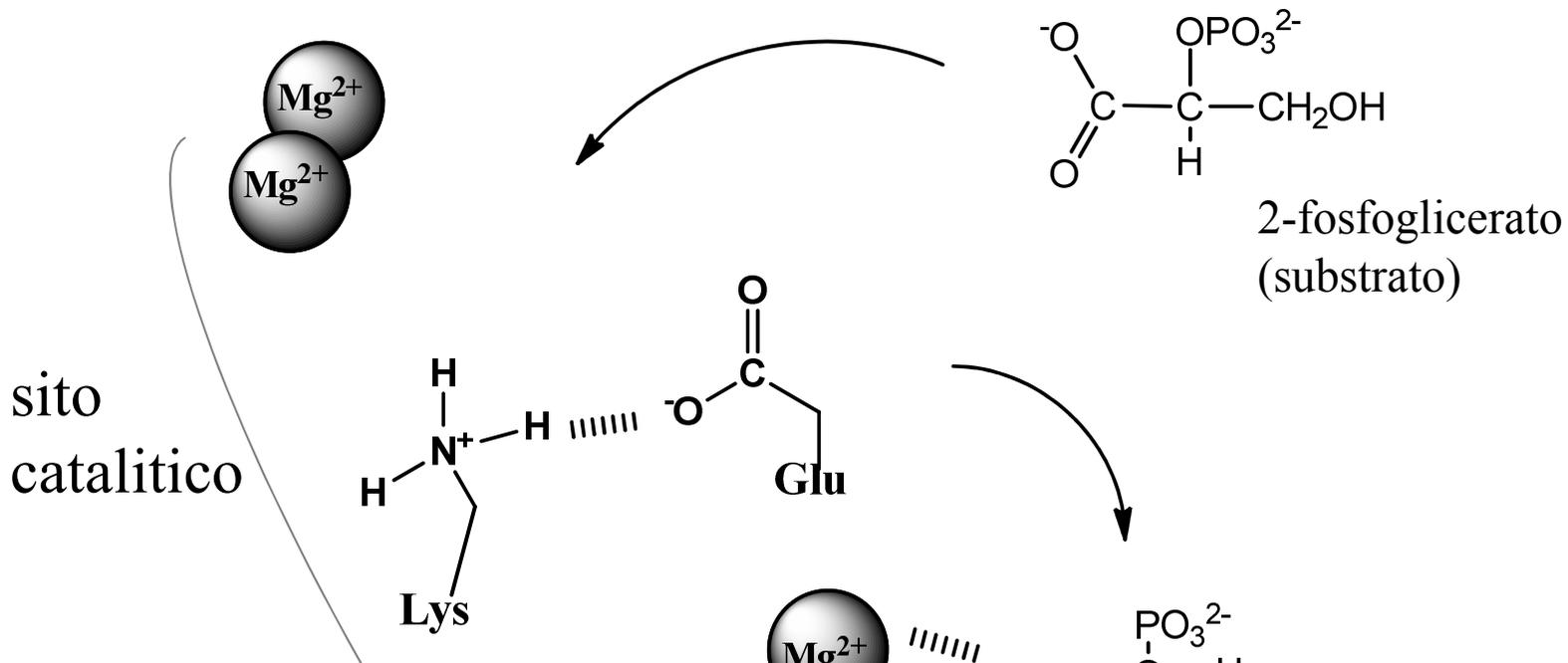


2-fosfoglicerato

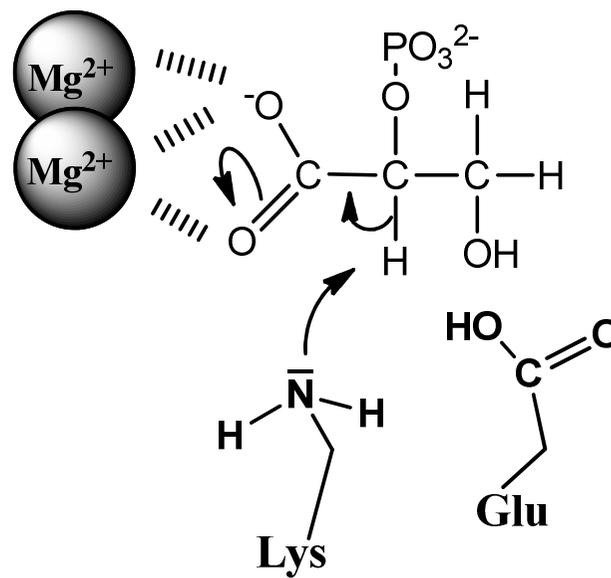


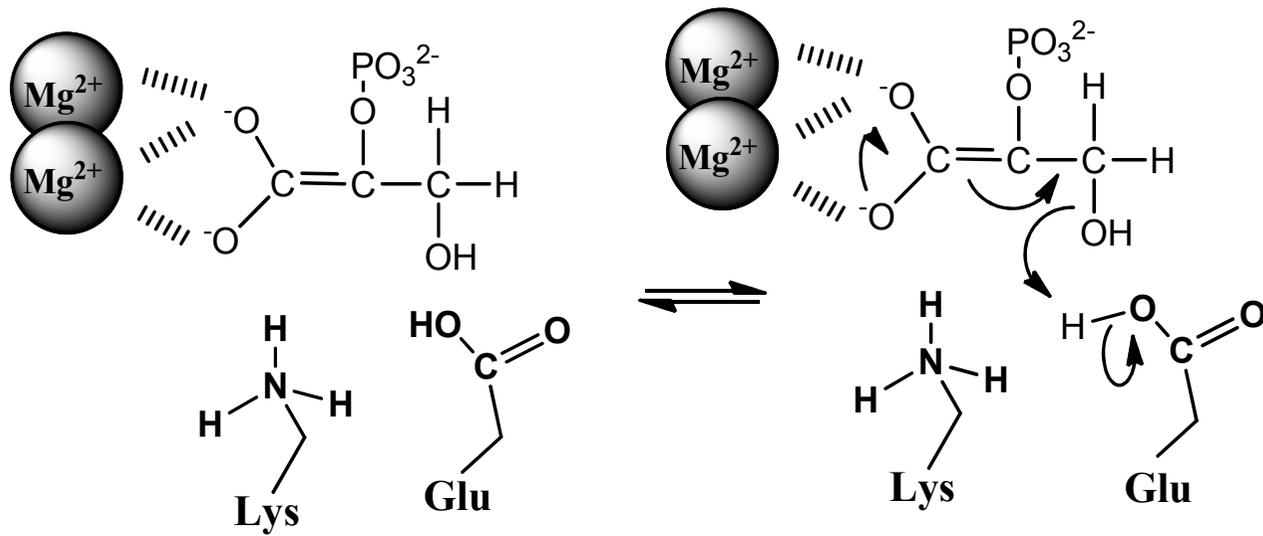
Fosfoenolpiruvato





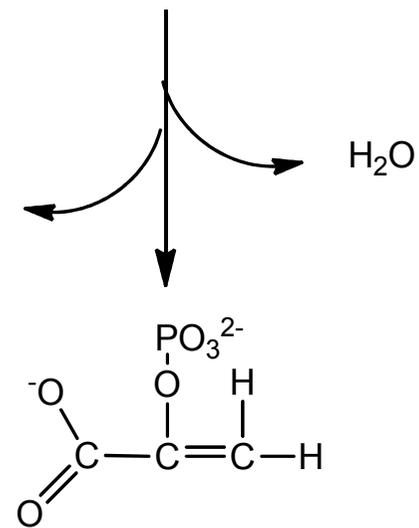
l'ingresso del substrato
scinde l'interazione Lys-Glu
generando un gruppo
fortemente basico e uno acido





Intermedio fosfoendiolico

Enzima
libero

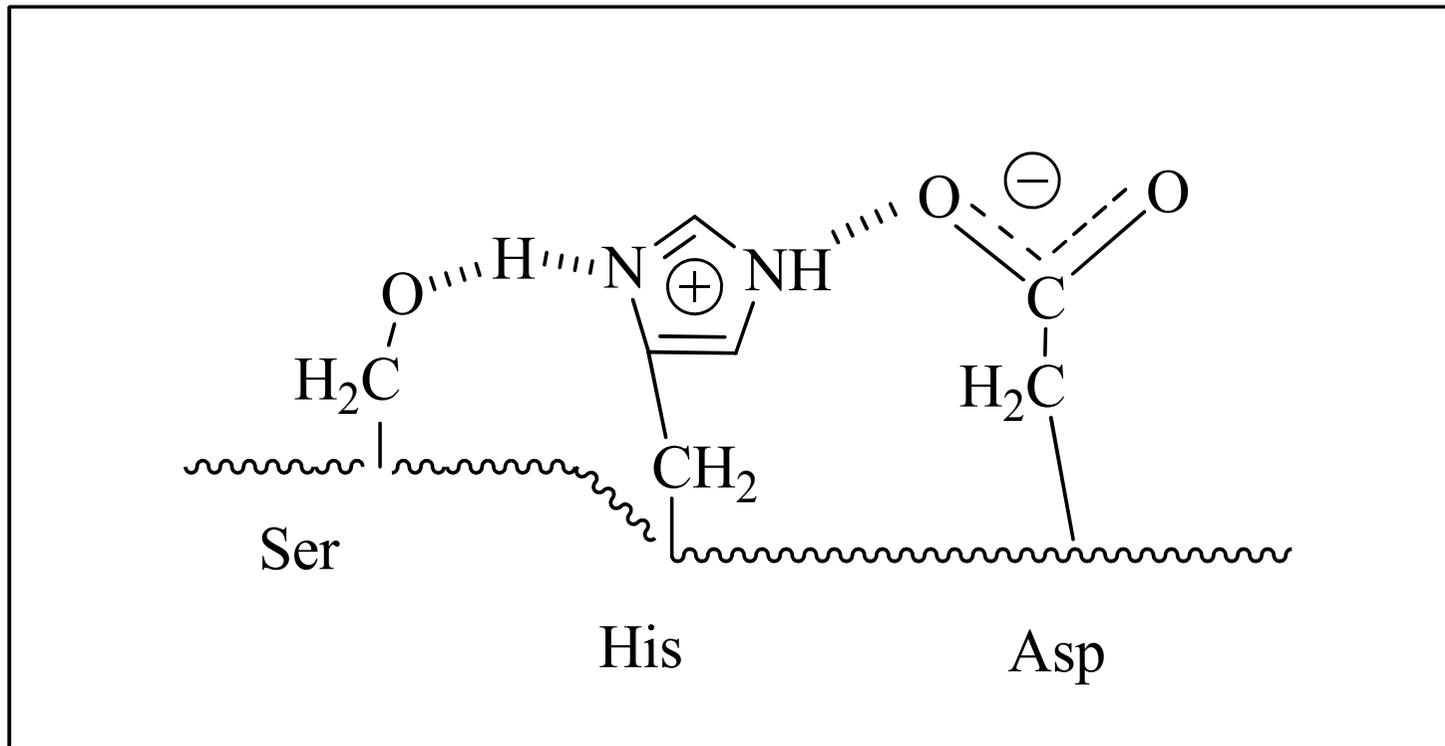


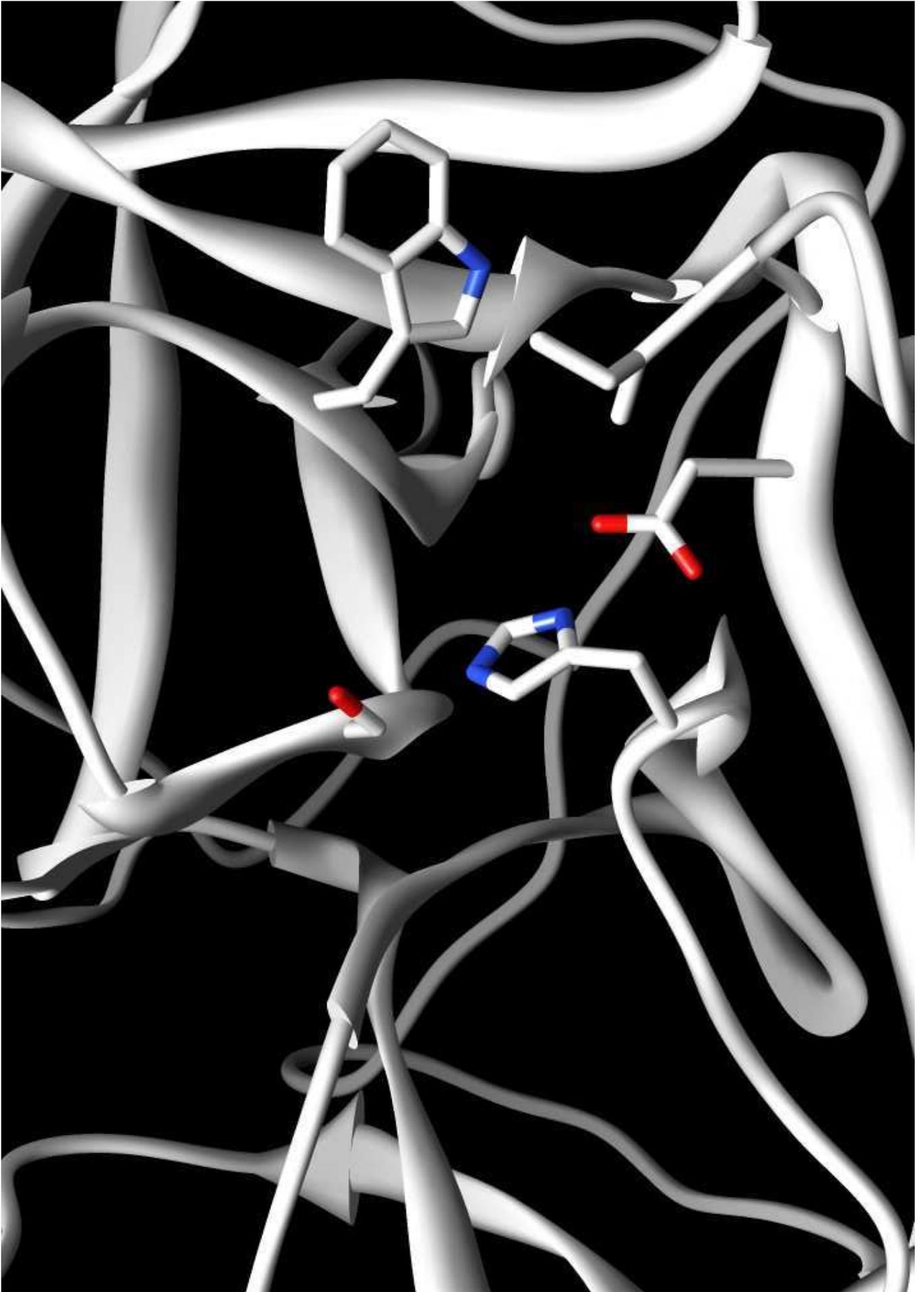
Fosfoenolpiruvato (prodotto)

Metodi di studio della catalisi

1. tecniche spettroscopiche
2. cristallografia e analisi a raggi x
3. cinetica enzimatica
4. reattivi sito specifici
5. mutagenesi sito-specifica

Proteasi seriniche. Es.: chimotripsina

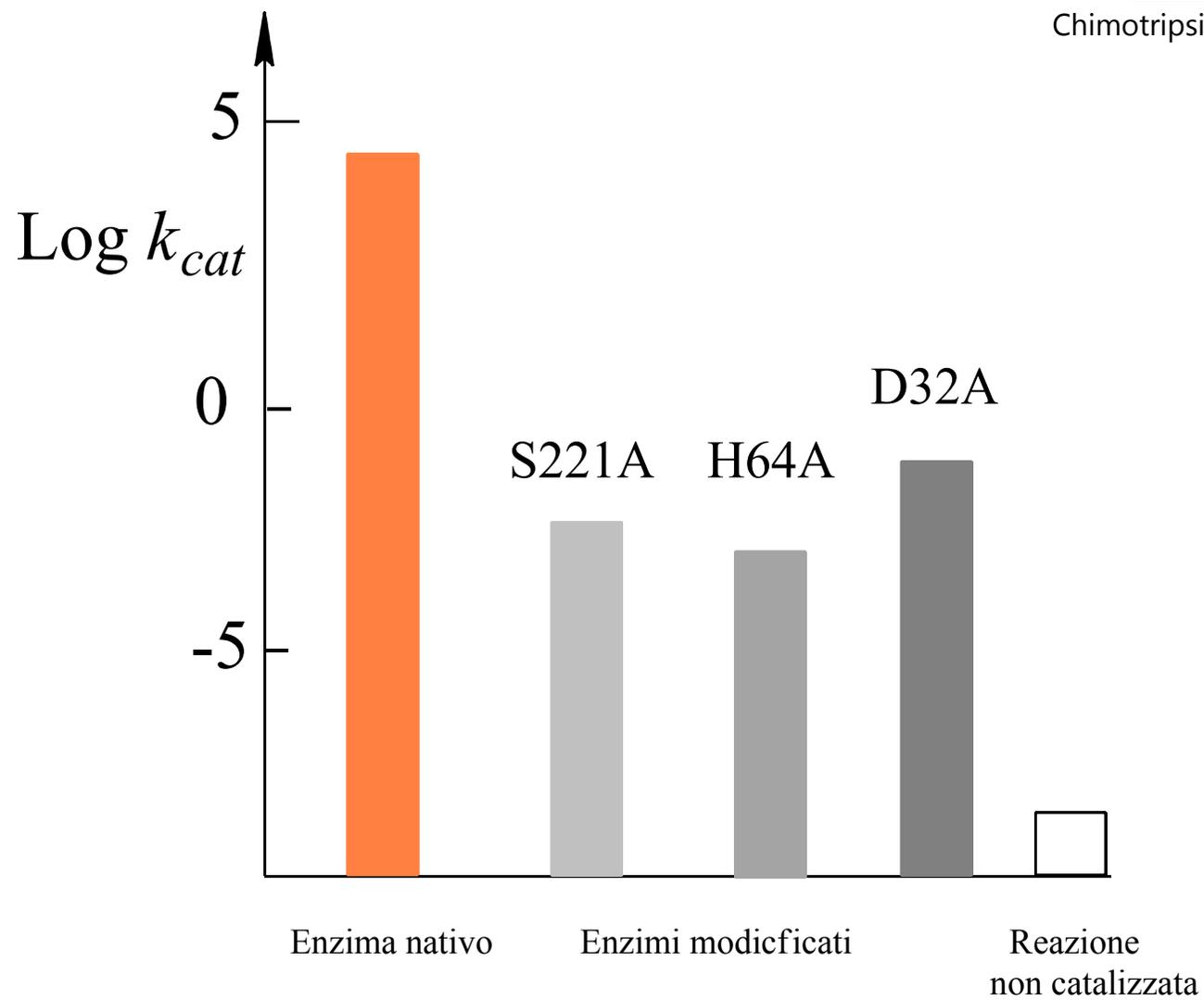




Mutagenesi sito specifica



Chimotripsina.swf



Classificazione degli enzimi

Sito web: <http://www.enzyme-database.org/stats.php>

classe funzionale	n. enzimi
1. Ossidoreduttasi	1344
2. Transferasi	1403
3. Idrolasi	1221
4. Liasi	527
5. Isomerasi	223
6. Ligasi	159
Totale	4867 (al 22 settembre 2012)

International Enzyme Commission (EC) (1956)

1. Gli enzimi sono classificati in base alla reazione che catalizzano
2. Lo stesso enzima di specie biologiche diverse ha lo stesso codice
3. Ad ogni enzima viene dato un nome sistematico, un nome comune e un codice identificativo EC.

Classe 1. Ossidoreduttasi: reazioni di ossido-riduzione; il riducente è considerato il donatore di idrogeno o di elettroni; comprendono deidrogenasi e ossidasi

EC 1.1.1.1

Nome: Alcool deidrogenasi

Nome sistematico: Alcool:NAD⁺ ossidoreduttasi

Reazione: un alcool + NAD⁺ \longrightarrow un'aldeide o chetone + NADH

Classe 2. Transferasi: trasferimento di gruppi funzionali da un composto (donatore) ad un altro (accettore)

EC 2.7.1.1

Nome : Esochinasi

Nome sistematico Esoso:ATP fosfotransferasi

Reazione: $\text{ATP} + \text{D-esoso} \longrightarrow \text{ADP} + \text{D-esoso 6-fosfato}$.

D-glucosio, D-mannosio, D-fruttosio, sorbitolo e D-glucosamina
come accettore.

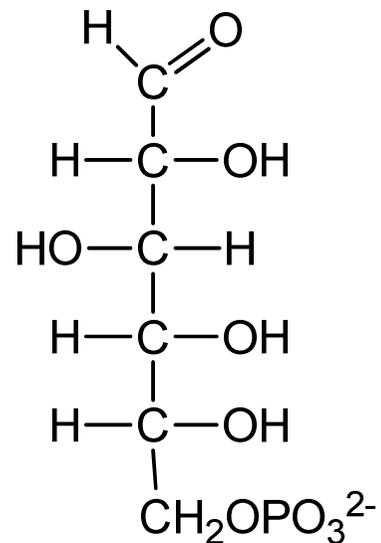
Classe 3. Idrolasi: reazioni di idrolisi

EC 3.1.3.9

Nome : Glucosio-6-fosfatasi

Nome sistematico: D-glucosio-6-fosfato fosfoidrolasi

Reazione: D-glucosio 6-fosfato + H₂O \longrightarrow D-glucosio + fosfato



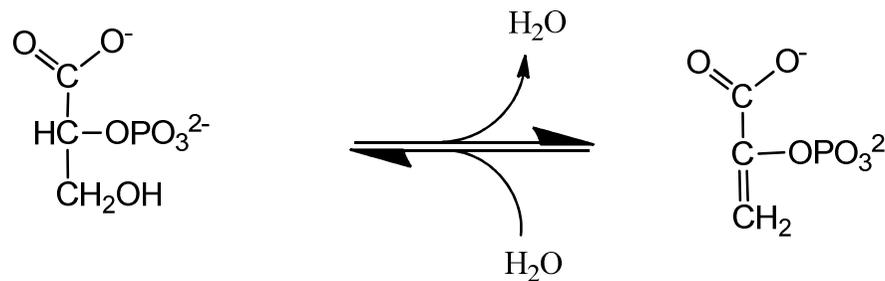
Classe 4. Liasi: reazioni di scissione di legami C-C, C-O, C-N, C-S, C-alogeno, P-O e altri; se il substrato è uno si genera un doppio legame o un anello; comprendono sintasi, decarbossilasi e aldolasi

EC 4.2.1.11

Nome: Enolasi

2-fosfo-D-glicerato idro-liasi (formante fosfoenolpiruvato)

Reazione: 2-fosfo-D-glicerato \longrightarrow fosfoenolpiruvato + H₂O

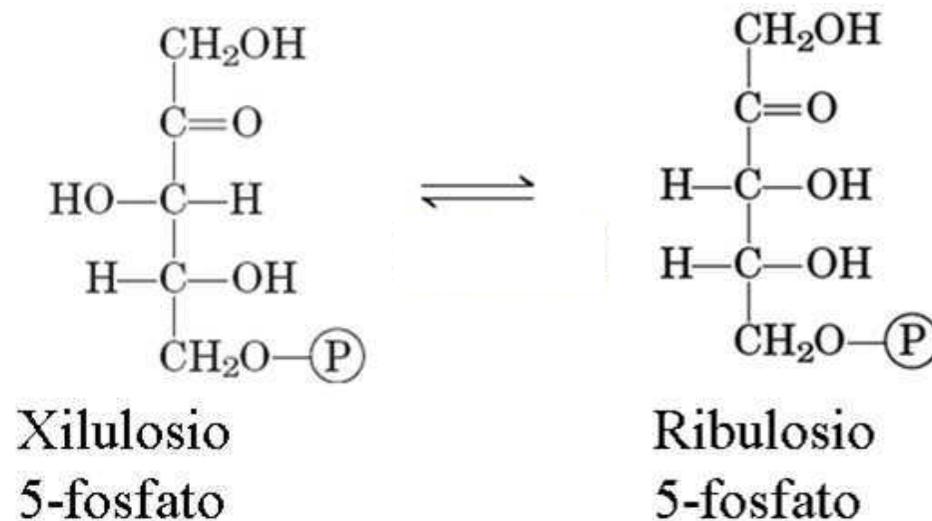


Classe 5. Isomerasi: reazioni di modificazione entro una molecola; comprendono epimerasi, transferasi e ossidoreduttasi intramolecolari

EC 5.1.3.22

Nome : D-ribulosio-5-fosfato 3-epimerasi

Reazione: D-xilulosio 5-fosfato \longrightarrow D-ribulosio 5-fosfato

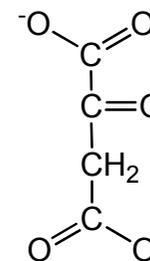
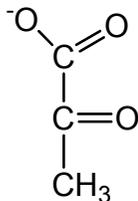
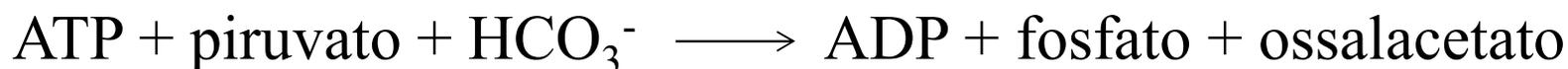


Classe 6. Ligasi: reazioni di formazione di nuovi legami con rottura di ATP. Comprendono sintetasi, carbossilasi, ligasi

EC 6.4.1.1

Nome: Piruvato carbossilasi

Reazione:





BRENDA



Braunschweig ENzyme DAtabase
The Comprehensive Enzyme Information System



<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4>