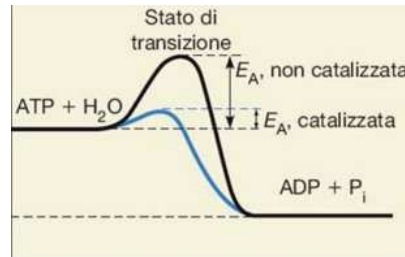


GLI ENZIMI

La misura dell'energia libera permette di definire la spontaneità di quella reazione, ma non dice se quella reazione avviene. I sistemi biologici sono in una condizione cosiddetta *meta-stabile* (stato stazionario), cioè sono termodinamicamente stabili ma non hanno comunque una quantità di energia sufficiente per dare il via a una reazione esoergonica: le reazioni esoergoniche hanno bisogno di una energia di attivazione che mantiene il sistema fisso → la barriera imposta dall'energia di attivazione si può superare fornendo energia (aumentando la temperatura) o grazie agli enzimi (catalizzatori), che la abbassano.



Occorre stabilire dei criteri che controllino tutti i processi chimici e le attività che avvengono a livello cellulare: una reazione, dove il substrato si trasforma in un prodotto, e che ha una più bassa energia interna, avviene solo se superata l'energia di attivazione → l'enzima accelera la reazione e forma questo complesso transiente e reversibile in cui c'è interazione tra enzima e substrato, da cui poi deriva il prodotto finale.

⇒ Si passa attraverso una condizione intermedia in cui l'enzima è una proteina che interagisce con il substrato, consentendo l'abbassamento dell'energia di attivazione.

Gli enzimi catalizzano reazioni che sono già energeticamente favorite, non hanno alcun effetto su reazioni endoergoniche.

Le proprietà degli enzimi

- diminuendo la barriera di attivazione, aumentano la velocità di una reazione di un fattore 10^{14}
- formano complessi reversibili e transitori con il substrato
- non forniscono energia
- non rendono spontanea una reazione endoergonica
- sono continuamente attivi e non si alterano irreversibilmente durante la reazione (non vengono consumati)
- sono proteine altamente specifiche per il substrato → si distinguono diverse classi di enzimi, che sono tutte proteine caratterizzate da una funzione ben precisa

Come funzionano

Gli enzimi sono caratterizzati dalla presenza di un *sito attivo*, una porzione dell'enzima (non necessariamente formata da una sequenza vicina di amminoacidi) che crea un punto dove viene

accolto il substrato; a volte l'enzima è un'unica proteina, a volte è unita ad altre molecole, i *coenzimi* (spesso vitamine), che ne definiscono la funzionalità.

Il sito attivo è complementare con il substrato; le interazioni sono legami transienti, non forti, non covalenti; molto spesso il sito attivo è in una cavità idrofobica, che allontana la componente acquosa e interagisce con una porzione altrettanto idrofobica del substrato.

La loro funzionalità dipende dalla loro struttura e quindi è un esempio di come le condizioni ambientali ne possano alterare la funzionalità → sono molto sensibili alla temperatura: gli enzimi umani funzionano bene a temperatura corporea intorno ai 37°, ma esistono in natura organismi come batteri che vivono in ambienti estremi, ad elevate temperature (batteri termofili), che hanno enzimi che funzionano bene anche a temperature

ben sopra i 37°, dove gli enzimi umani non hanno più capacità di funzionare.

⇒ la temperatura denatura la struttura proteica (alte temperature rompono i legami a idrogeno), così come il pH.

Anche negli esseri umani ci sono esempi di enzimi che funzionano a pH differenti: la gran parte degli enzimi funziona a pH neutro, ma abbiamo ambienti, soprattutto nell'apparato gastrointestinale, che sono tipicamente caratterizzati dalla presenza di enzimi come la *pepsina*, che si attiva a pH 2 (molto acido) grazie a cellule che secernono acido cloridrico rendendo acido l'ambiente → la pepsina idrolizza i legami dei composti organici (proteine) che assumiamo con la dieta ed è prodotta da cellule specifiche dello stomaco e viene accumulata nel lume gastrico.

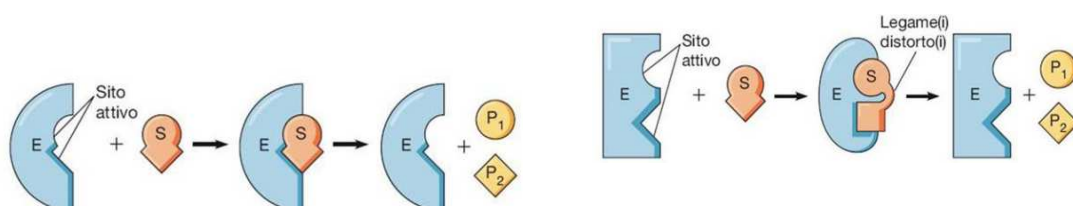
Un altro esempio di attività enzimatica pH-dipendente è la *tripsina*, un altro enzima idrolitico che spezza i legami, che è attivo nell'intestino tenue e lavora a pH fortemente basico → il primo tratto del duodeno, dove agisce la tripsina, è infatti caratterizzato da un ambiente molto alcalino, il che serve ad attivare questo enzima in questa regione.

⇒ è vero che il pH destabilizza la struttura proteica, ma esistono esempi in cui variazioni del Ph sono funzionali a modificare la struttura della proteina e determinarne l'attivazione.

Si tratta di enzimi che vengono secreti sotto forma di *proenzimi*, enzimi inattivi (la pepsina viene secreta sotto forma di pepsinogeno, che viene poi convertito; la tripsina sotto forma di tripsinogeno e poi convertito).

Ci sono due tipi di interazioni tra sito attivo e substrato:

- *modello a chiave e serratura*: un substrato è accolto in maniera specifica da un particolare enzima → l'enzima ha un sito attivo capace strutturalmente di accogliere un determinato substrato; l'interazione tra enzima e substrato attiva l'enzima e porta al procedere di una reazione che viene catalizzata
- *modello dell'adattamento indotto*: quando il substrato interagisce con l'enzima si crea un cambio conformazionale, sia del substrato che dell'enzima, quindi c'è un processo definito come un effetto di tipo allosterico



Un esempio è l'interazione che si ha tra il saccarosio (disaccaride) e l'enzima saccarasi: si forma il complesso enzima-substrato, il legame tra glucosio e fruttosio viene idrolizzato e si ha la liberazione del glucosio, che viene utilizzato per le reazioni metaboliche.

La funzionalità degli enzimi è molto importante perché il malfunzionamento anche solo di un enzima può avere conseguenze gravi (es: fenilchetonuria, malattia epatica in cui c'è un'alterazione della funzionalità di un enzima che deve convertire la fenilalanina in tirosina → il processo non avviene, non si accumula questo amminoacido, provocando dei ritardi mentali, delle alterazioni nello sviluppo del sistema nervoso).

Le reazioni enzimatiche

Un enzima è tanto più efficiente tanto più rende veloce la formazione del prodotto; questo processo può essere rappresentato dal grafico:

vale l'equazione di
Michaelis-Menten (1913)

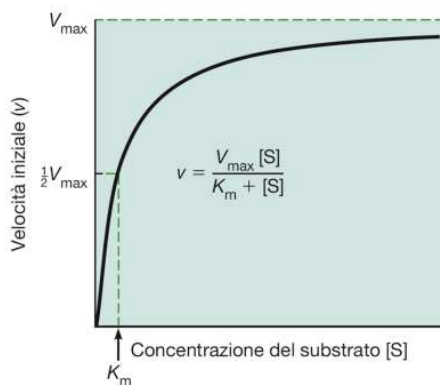
$$v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

La velocità di una reazione enzimatica è pari a quella che è la velocità massima moltiplicata per il rapporto tra le concentrazioni e una costante K_M , che è la *costante di Michaelis*, che è il valore di concentrazione di quel substrato che corrisponde a una velocità di

reazione enzimatica pari alla metà della velocità massima (= una concentrazione di $S = \frac{1}{2} V_{\max}$); varia a seconda dell'enzima ed è espressa in numero di moli.

L'andamento è esponenziale → la velocità non è proporzionale in maniera diretta, non è descritta da una retta, ma, per valori bassi di concentrazione del substrato (inferiori a K_M) si ha una proporzionalità diretta: raddoppia la concentrazione del substrato, raddoppia la velocità...; quando aumenta il valore di concentrazione la linearità non viene più mantenuta e si ha un andamento esponenziale nel complesso espresso dalla legge.

Si possono infatti distinguere due porzioni nel grafico: una a bassa concentrazione del substrato e una ad alta concentrazione.



La velocità di una reazione dipende dalla concentrazione del substrato: a concentrazioni molto elevate la velocità raggiunge il suo valore massimo.

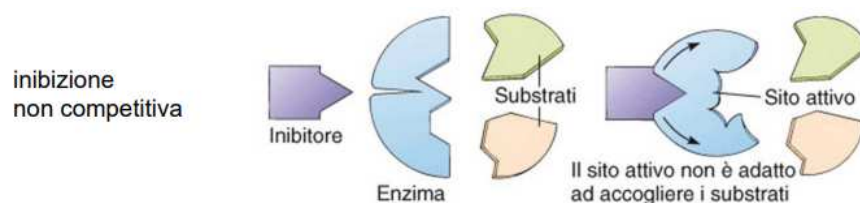
Questo andamento è caratteristico di tutte le reazioni enzimatiche (distinte dal valore di K_M).

Inibitori enzimatici

La velocità di una reazione si può modulare, perché gli enzimi funzionano anche grazie al fatto che esistono dei modulatori della loro attività, che sono degli *inibitori enzimatici* → vanno ad agire cambiando l'andamento della velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato (si legano all'enzima e ne diminuiscono l'attività).

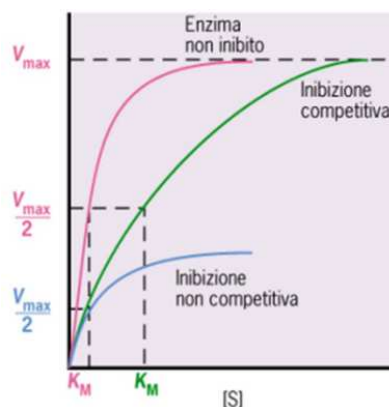
Ne distinguiamo di due tipologie:

- inibitore *reversibile*: forma legami deboli con il substrato; vi si può legare, svolgere la sua funzione e staccarsi; ne esistono di due tipi: inibitore competitivo, che compete con il substrato interagendo e occupando il sito attivo dell'enzima, e inibitore non competitivo, ha un altro punto di interazione che non è il sito attivo → interagisce con l'enzima ma non nel sito attivo.



Quando si parla di inibitore competitivo, aumenta il valore della costante, perché parte dell'enzima è reso non disponibile e quindi per ottenere maggior effetto devo aumentare la concentrazione del substrato per ottenere la velocità massima → il valore di K_M aumenta, ma non V_{max} .

Nel caso dell'inibitore non competitivo, invece, V_{max} diminuisce notevolmente, mentre K_M non cambia → siccome non compete per lo stesso sito attivo del substrato sottrae l'enzima al substrato e ha questo effetto sull'andamento dell'equazione.



- inibitori *irreversibili*: formano legami di tipo covalenti con i residui amminioacidici. Sono tali per cui, una volta che hanno interagito con l'enzima, ne inibiscono la funzione → da qui si possono sviluppare anche composti letali; il gas nervino è inibitore competitivo irreversibile dell'*acetilcolinesterasi*, un enzima presente a livello sinaptico che serve per controllare i valori di concentrazione di un neurotrasmettitore molto importante del sistema nervoso centrale che è l'*acetilcolina*, mediatore di tante funzioni importanti e controllore della

contrazione volontaria muscolare → rilasciamo, attraverso i neuroni, acetilcolina e contraiamo in maniera volontaria il muscolo scheletrico.

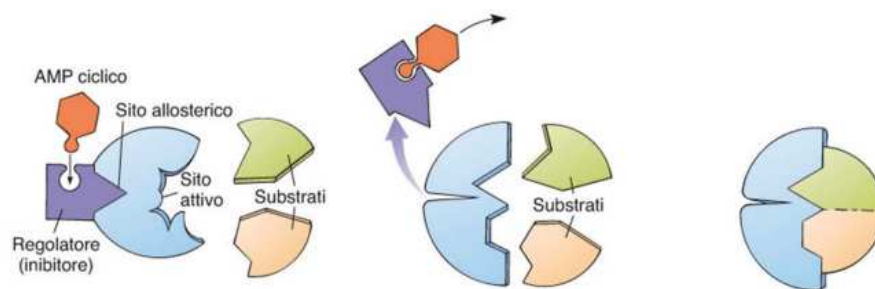
La muscolatura scheletrica è presente anche a livello intercostale: gli atti respiratori sono atti volontari → se rilasciamo acetilcolina avviamo un processo di contrazione muscolare, che prevede anche il processo di inspirazione → la concentrazione di acetilcolina deve poi diminuire se voglio completare l'atto respiratorio: un modo per farlo è la modalità utilizzata dall'enzima acetilcolinesterasi, che idrolizza il legame tra colina e acetato rendendo inattiva l'acetilcolina e consente un corretto proseguimento dell'atto respiratorio. Il gas nervino inibisce l'enzima, che non funziona più, si accumula acetilcolina, e l'individuo subisce una paralisi muscolare (muscoli rimangono contratti) e respiratoria.

L'acetilcolinesterasi è anche uno dei bersagli importanti di un farmaco che serve per trattare l'Alzheimer, che evolve portando alla morte graduale dei neuroni centrali: i primi destinati a morire sono i neuroni colinergici, che rilasciano acetilcolina → diminuisce la quantità di acetilcolina.

Regolazione dell'attività enzimatica: siti allosterici

L'interazione degli inibitori non competitivi con il sito attivo, che prevede un cambio conformazionale e che porta modifiche di tipo allosterico all'enzima non è necessariamente solo un'inibizione, ma può anche essere utilizzata per attivare l'enzima: quando c'è un'interazione con siti diversi dal sito attivo, le molecole coinvolte possono essere o degli *inibitori allosterici* o degli *attivatori enzimatici* (l'enzima può essere inibito ma anche attivato).

C'è un enzima fondamentale, che è una proteina chinasi-A (PKA), un enzima normalmente inattivo a causa della presenza di una proteina regolatrice legata al sito allosterico; è attivata dall'AMP ciclico, che legandosi alla proteina regolatrice l'allontana dal sito allosterico → il distacco ha un effetto di cambio conformazionale, un'interazione di tipo allosterica → la PKA risulta attiva, può interagire con il substrato e catalizzare la reazione di fosforilazione.



Modificazioni dell'attività enzimatica per aggiunta o rimozione di gruppi chimici

Un altro esempio di come un enzima può essere attivato è mediante modifica covalente (rimozione o aggiunta) di gruppi chimici dall'enzima stesso che lo rendono inattivo.

Una modalità è *fosforilare* o *defosforilare* l'enzima stesso: ad esempio, la glicogeno fosforilasi, che catalizza la conversione di glicogeno in glucosio, è un enzima che normalmente non è attivo e che deve

essere fosforilato→ ci deve essere la formazione di legami covalenti con gruppi fosfato, che permette la sua attivazione.

Riassumendo: ci sono una serie di enzimi che possono essere inibiti o per inibizione che funziona mediante un meccanismo allosterico o mediante modificazioni di legami covalenti, che passano o per la formazione di gruppi fosfato, che attivano l'enzima, il quale viene nuovamente inattivato quando questi legami vengono idrolizzati, o mediante l'idrolisi di legami e conversione da proenzima a enzima.

Classi funzionali degli enzimi

Esistono diverse classi di enzimi, che sono distinti non solo secondo le modalità di funzionamento, ma anche secondo la loro funzione.

- IDROLASI: catalizzano scissioni di tipo idrolitico;
- NUCLEASI: degradano acidi nucleici idrolizzando i legami tra nucleotidi;
- PROTEASI: degradano proteine idrolizzando i legami peptidici tra gli amminoacidi;
- SINTASI: catalizzano sintesi di molecole unendo due molecole più piccole;
- ISOMERASI: catalizzano la redistribuzione dei legami all'interno di una stessa molecola;
- POLIMERASI: catalizzano reazioni di polimerizzazione, come sintesi di DNA, RNA;
- CHINASI: catalizzano l'aggiunta di un gruppo fosfato alle molecole;
- FOSFATASI: catalizzando la rimozione idrolitica di un gruppo fosfato dalle molecole;
- OSSIDO-REDUTTASI: catalizzano reazione di ossido-riduzione
- ATPasi: idrolizzano l'ATP (ATP non liberata continuamente, ma enzima che consente di superare energia di attivazione idrolizzare il legame e liberare energia, 7,3 kCal/mol)

Il lisozima

Il lisozima è il primo enzima che aggredisce il cibo che inseriamo nella bocca perché è un antibiotico naturale: è un enzima presente nelle secrezioni (saliva, lacrime, che sono punti di accesso dei batteri che possono aggredirci), che serve a catalizzare l'idrolisi delle catene polisaccaridiche della parete cellulare batterica (agisce inserendo una molecola d'acqua tra due zuccheri adiacenti).