

A 3D ribbon diagram of an enzyme protein structure, rendered in light gray. The protein is shown in a complex, folded conformation with several alpha-helices and beta-sheets. A red stick model of a substrate molecule is bound to the enzyme's active site. Two blue stick models of small molecules are also visible near the active site. The background is white.

Gli enzimi

Proprietà generali
Classificazione e nomenclatura
Catalisi enzimatica

En-zima

εν ζυμη

“nel lievito”

Enzima - termine generico per definire un catalizzatore biologico

Tranne che diversamente indicato, **tutti gli enzimi sono proteine e** mostrano in soluzione le proprietà delle proteine.....

...ad eccezione dei **ribozimi**, molecole di RNA coinvolte nelle catalisi

RIBOZIMA
è l'abbreviazione di
Ribonucleo-enzima
o **RNA-enzima**

Nei primi anni '80 sono stati scoperti alcuni esempi di catalisi biologica mediata da molecole di RNA.

- RNasi P batterica è coinvolta nel processamento dei trascritti primari di tRNA (Sidney Altman, Università di Yale)

-gli introni presenti nel trascritto primario di alcuni mRNA e rRNA sono ribozimi che possono catalizzare il processo di auto-splicing (Thomas Cech, Università del Colorado)

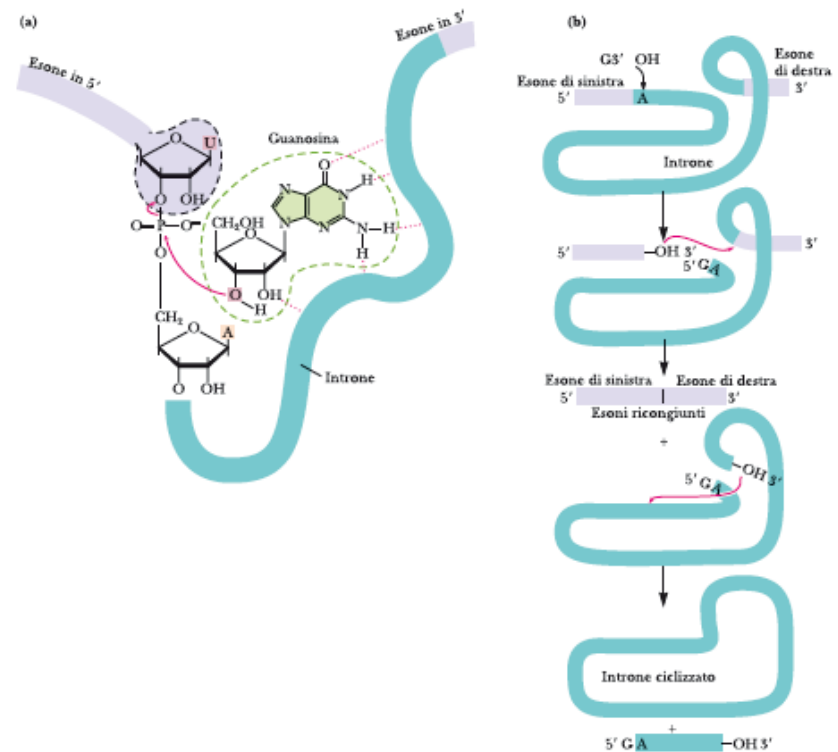


FIGURA 13.25 Splicing dell'RNA nella maturazione dell'rRNA di *Tetrahymena*: (a) reazione mediata dalla guanosina responsabile dell'escissione autocatalitica dell'introne dell'rRNA di *Tetrahymena* e (b) processo di splicing nel complesso. L'introne ciclizzato si forma a seguito dell'attacco nucleofilo dell'estremità 3'-OH dell'introne liberata al legame fosfodiesterico che si trova 15 nucleotidi dall'estremità 5'-GA dell'introne rimosso. La ciclizzazione libera un frammento lineare di 15 nucleotidi con una estremità 5'-GA.

Il ribosoma è un ribozima

Nella sintesi proteica, la reazione della peptidil-transferasi è catalizzata da rRNA 23S della subunità 50S dei ribosomi

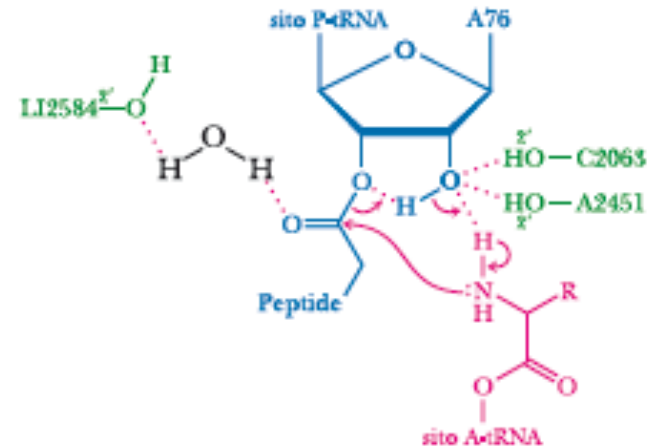


FIGURA 13.27 Reazione della peptidil transferasi. L'allontanamento di un protone ammidico dal gruppo α -ammino dell'amminoacil-tRNA_A (mostrato in rosso), attraverso il 2'-O dell'A terminale del peptidil-tRNA_P (blu), è facilitato da interazioni via legami idrogeno con i nucleotidi vicini dell'rRNA 23S (verde). Queste interazioni facilitano l'attacco nucleofilo dal gruppo α -ammino dell'amminoacil-tRNA_A al carbonio carbonilico del peptidil-tRNA_P, e la formazione di un legame peptidico tra l'amminoacido entrante e la catena peptidica crescente, dando origine ad una catena peptidica attaccata al tRNA_A più lunga di un residuo. (Adattato dalla Figura 3 in Beringer, M., and Rodnina, M. V., 2007. The ribosomal peptidyl transferase. *Molecular Cell* 26:311-321).

GLI ENZIMI PROTEICI

Le proteine enzimatiche hanno diversi livelli strutturali

Molte hanno solo struttura terziaria, altri posseggono anche una struttura quaternaria

L'attività catalitica delle proteine enzimatiche dipende dall'integrità della conformazione nativa

Se un enzima viene denaturato o dissociato in subunità perde la sua attività catalitica

Quindi le strutture primaria, secondaria, terziaria e quaternaria sono essenziali per l'espressione dell'attività catalitica

Il PM degli enzimi varia da 12.000 Da (12 kDa) a oltre 1.000.000 Da (1000 kDa)

CLASSIFICAZIONE E NOMENCLATURA DEGLI ENZIMI

Inizialmente i nomi venivano assegnati arbitrariamente...

..sulla base del nome del substrato

Es.: **ureasi**, enzima che catalizza l'idrolisi dell'urea

..sulla base del ruolo svolto in determinati processi

Es.: **Pepsina**, dal greco pepsis (digestione)

Lisozima, per la sua capacità di lisare la parete batterica

..ma una volta che il numero di enzimi è aumentato si è creata confusione.

La **IUB = International Union of Biochemistry** si è occupata allora di dare le basi nella classificazione degli enzimi, anche se alcuni nomi tradizionali come pepsina e papaina, restano ancora in uso

Nel caso degli enzimi non è praticabile un tipo di nomenclatura basata sulla struttura chimica (come IUPAC) a causa della notevole complessità delle strutture enzimatiche

Criteri IUB

- La caratteristica più importante per un enzima è il suo potere catalitico, quindi il nome fornisce informazioni sulla reazione catalizzata e non sulla struttura
- Gli enzimi vengono nominati prima di conoscere in dettaglio la loro struttura primaria
- Enzimi catalizzanti reazioni simili provenienti da organismi diversi devono avere nomi simili, anche se le strutture primarie sono diverse

Gli enzimi vengono posti in 6 classi:

TABLE 6–3 International Classification of Enzymes

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Note: Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms, or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.

Le 6 classi sono suddivise in sottoclassi ed in sotto-sottoclassi per specificare in maniera più dettagliata il tipo di reazione e la natura chimica delle specie coinvolte

TABELLA 13.1 Classificazione sistematica degli enzimi secondo la commissione per gli enzimi

Numero E.C.	Nome sistematico e sottoclassi	Numero E.C.	Nome sistematico e sottoclassi
1	<i>Ossidoriduttasi</i> (reazioni di ossido-riduzione)	4	<i>Liasi</i> (scissione del legame con mezzi diversi dall'idrolisi o dall'ossidazione)
1.1	Azione sul gruppo CH-OH dei donatori		
1.1.1	Con NAD o NADP come accettore	4.1	Liasi C-C
1.1.3	Con O ₂ come accettore	4.1.1	Carbossi liasi
1.2	Azione sul gruppo $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array}$ dei donatori	4.1.2	Aldeide liasi
1.2.3	Con O ₂ come accettore	4.2	Liasi C-O
1.3	Azione sul gruppo di donatori CH-CH	4.2.1	Idrolasi
1.3.1	Con NAD o NADP come accettore	4.3	Liasi C-N
2	<i>Transferasi</i> (trasferimento di gruppi funzionali)	4.3.1	Ammonio liasi
2.1	Trasferimento di gruppi C-1	5	<i>Isomerasi</i> (reazioni di isomerizzazione)
2.1.1	Metiltransferasi	5.1	Racemasi ed epimerasi
2.1.2	Idrossimetiltransferasi e formiltransferasi	5.1.3	Azione sui carboidrati
2.1.3	Carbossiltransferasi e carbamoiltransferasi	5.2	Isomerasi <i>cis-trans</i>
2.2	Trasferimento di residui aldeidici o chetonici	6	<i>Ligasi</i> (formazione di legami con scissione di ATP)
2.3	Aciltransferasi	6.1	Formazione di legami C-O
2.4	Glicosiltransferasi	6.1.1	Amminoacido-RNA ligasi
2.6	Trasferimento di gruppi contenenti N	6.2	Formazione di legami C-S
2.6.1	Amminotransferasi	6.3	Formazione di legami C-N
2.7	Trasferimento di gruppi contenenti P	6.4	Formazione di legami C-C
2.7.1	Con un gruppo alcolico come accettore	6.4.1	Carbossilasi
3	<i>Idrolasi</i> (reazioni di idrolisi)		
3.1	Scissione del legame estere		
3.1.1	Idrolasi di esteri carbossilici		
3.1.3	Idrolasi monoesterica fosforica		
3.1.4	Idrolasi diesterica fosforica		

Ogni enzima è identificato da un numero unico (E.C., Enzyme Commission number) costituito da quattro sezioni distinte, separate da un punto:

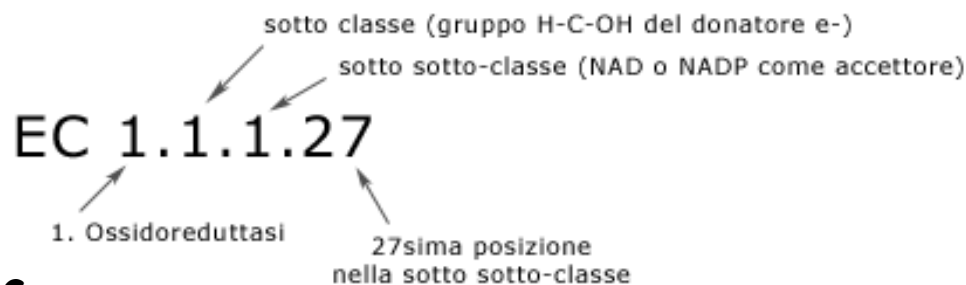
A.B.C.D.

A: classe di appartenenza (tipo di reazione)

B: sotto classe (tipo di substrato)

C: sotto sotto-classe (tipo di accettore, o gruppo rimosso, eventuale coenzima)

D: numero di serie dell'enzima (la posizione dell'enzima nella sotto sotto-classe)



Esempio di numerazione di un enzima.

L'enzima è la lattico deidrogenasi; nome sistematico: L-lattato:NAD ossidoreduttasi

La reazione è : $L\text{-lattato} + \text{NAD}^+ = \text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Per evitare ambiguità spesso è opportuno specificare, insieme all'E.C., anche la fonte da cui l'enzima è stato purificato.

Gli enzimi hanno una doppia nomenclatura:

un nome sistematico

e un nome corrente di uso comune

Il nome sistematico ha lo scopo di definire con maggior precisione la reazione catalizzata.

Ad esempio, con L-lattato:NAD ossidoreduttasi, si specifica l'*enantiomero* su cui l'enzima agisce e il *coenzima* utilizzato.

Nella nomenclatura sistematica l'enzima è indicato con il nome della classe di appartenenza (ossidoreduttasi).

Viceversa, il nome comune è generalmente costituito dal nome del substrato e da un termine (con suffisso -asi) che tende a specificare la reazione, ma talvolta con qualche variante rispetto al nome della classe di appartenenza (Lattico deidrogenasi).

Gli enzimi possono inoltre essere indicati con una **abbreviazione**

Es.:Lattico deidrogenasi = LDH

Gli abzimi

**Anticorpi che possiedono attività catalitica
Individuati in malattie autoimmunitarie**

- Sclerosi multipla (MS): graduale distruzione della guaina mielinica che circonda i neuroni in cervello e midollo spinale.

Il siero di pazienti MS contiene anticorpi capaci di distruggere proteoliticamente la proteina basica della mielina. Sono proteasi.

- Emofilia A: disturbo della coagulazione dovuto a mancanza del fattore VIII.

Il siero di pazienti emofilici contiene anticorpi con attività proteolitica contro il fattore VIII

Come lavorano gli enzimi

Molte reazioni chimiche richiedono condizioni non compatibili con i sistemi viventi:

- alti valori di temperatura e pressione**
- valori di pH acidi o alcalini**
- solventi non acquosi**

Le reazioni biochimiche avvengono in condizioni “speciali”:
valori di temperatura, pressione e pH fisiologici
soluzione acquosa

In queste condizioni, la maggior parte delle reazioni che si verificano nelle cellule sarebbero estremamente lente

La catalisi enzimatica di questo tipo di reazioni è un processo essenziale per gli organismi viventi

Gli Enzimi sono catalizzatori biologici

cioè hanno il potere di accelerare enormemente le reazioni chimiche tipiche dei processi vitali.

Gli enzimi hanno molte caratteristiche in comune con tutti gli altri catalizzatori:

- Non fanno avvenire reazioni che non siano termodinamicamente possibili**
- Modificano la velocità della reazione ma non ne alterano l'equilibrio**
- Si ritrovano inalterati alla fine del processo di catalisi**

Ma si distinguono dai catalizzatori chimici per molti aspetti:

Sono straordinariamente efficienti

La velocità di una reazione catalizzata da un enzima può aumentare di un fattore fino a 10^{15} , rispetto a quella della reazione non catalizzata

Sono spesso altamente specifici

Molti enzimi sono stereospecifici, essendo attivi su uno solo di due enantiomeri. Altri, anche se dotati di specificità meno stretta, agiscono solo su molecole molto simili e lo fanno comunque con affinità e velocità diverse

Sono modulabili

La velocità di una reazione enzimatica può essere regolata in maniera fine e selettiva, sia in senso positivo che negativo, mediante l'interazione con altre molecole, attivatori o inibitori

Velocità di una reazione: *variazione della concentrazione dei reagenti o dei prodotti nell'unità di tempo*

Ogni reazione chimica procede con una determinata velocità, che dipende dalla temperatura, oltre che dalla natura stessa dei reagenti

Anche una reazione termodinamicamente spontanea può richiedere moltissimo tempo per generare i prodotti

Non vi è infatti nessuna correlazione specifica fra termodinamica e cinetica di una reazione

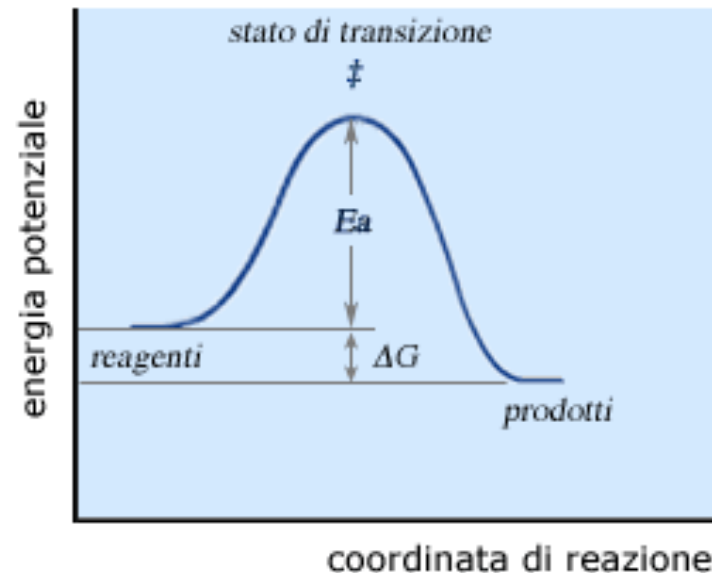
Ciò che impedisce ad una reazione, sia pur spontanea, di avvenire istantaneamente, è una "**barriera energetica**" definita **energia di attivazione**

Teoria cinetica delle collisioni: due particelle, per reagire, devono collidere fra loro e affinché l'urto sia *efficace*, devono farlo con sufficiente energia (almeno pari all'energia di attivazione) e con la giusta orientazione

Teoria del complesso attivato o stato di transizione

Nel corso della reazione, le particelle (reagenti), a partire da una condizione di energia potenziale minima (definita dalla loro energia configurazionale stabile), devono attraversare uno *stato di transizione* in cui esse formano un "complesso attivato", altamente instabile, caratterizzato da un massimo di energia potenziale. Nel complesso attivato i legami originali si deformano, si allungano e si indeboliscono, mentre vanno abbozzandosi i nuovi legami che saranno definitivamente consolidati nei prodotti finali, stabili, caratterizzati da un nuovo minimo di energia configurazionale.

La condizione necessaria per raggiungere lo stato di transizione, è che le particelle possiedano una energia cinetica almeno pari all'energia di attivazione.



Quindi, l'energia di attivazione è l'energia necessaria per:

- allineare i gruppi reagenti
- formare cariche transitorie instabili
- riorganizzare legami
- operare tutte le trasformazioni necessarie per far avvenire una reazione

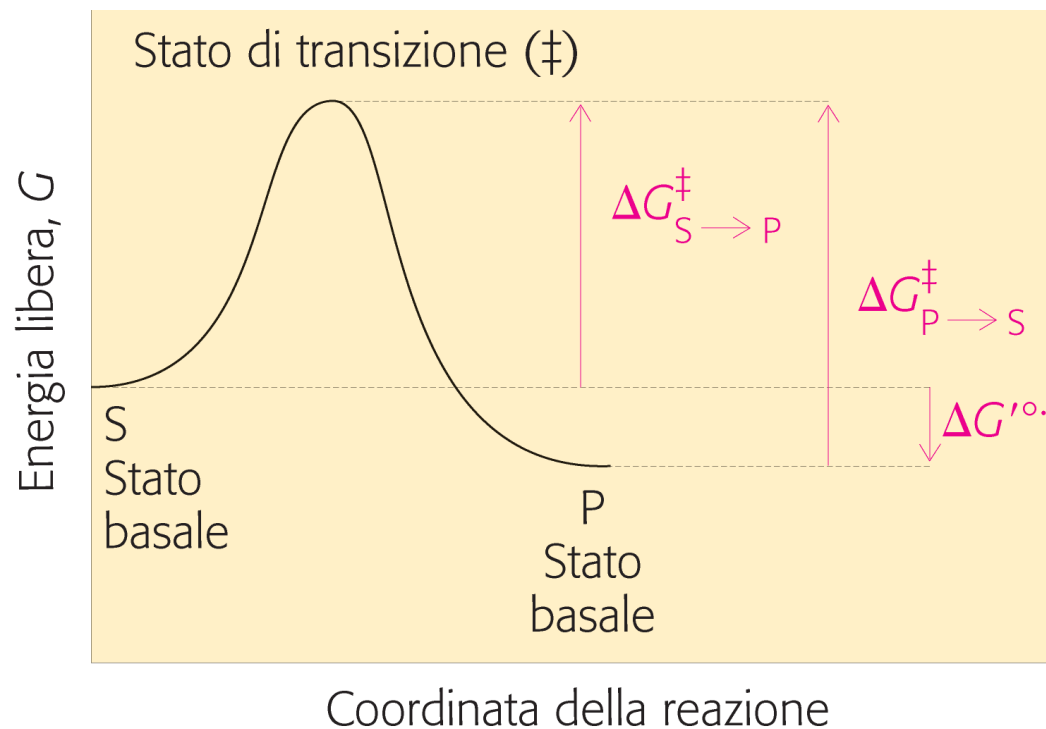
Nei sistemi biologici l'energia viene espressa come **energia libera G**

Per una data reazione



Il punto di partenza in un senso o nel senso opposto è definito

stato basale: valore medio di energia posseduto dalla popolazione S o P



$\Delta G^\circ =$ **variazione di energia libera standard** (variazione di energia libera di una reazione in condizioni standard)

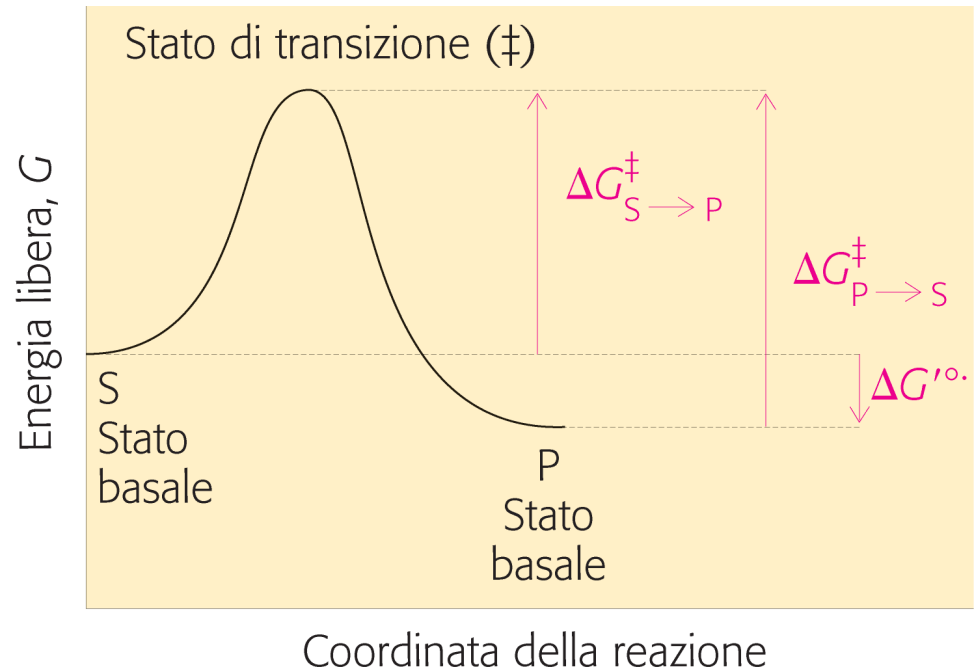
Temperatura: 298°K

Pressione parziale di ogni gas: 1 atm o 101,3 kPa

Concentrazione di ogni soluto: 1M

Poiché nei sistemi biologici $[H^+]$ è molto lontana da 1M, per le reazioni biochimiche si usa

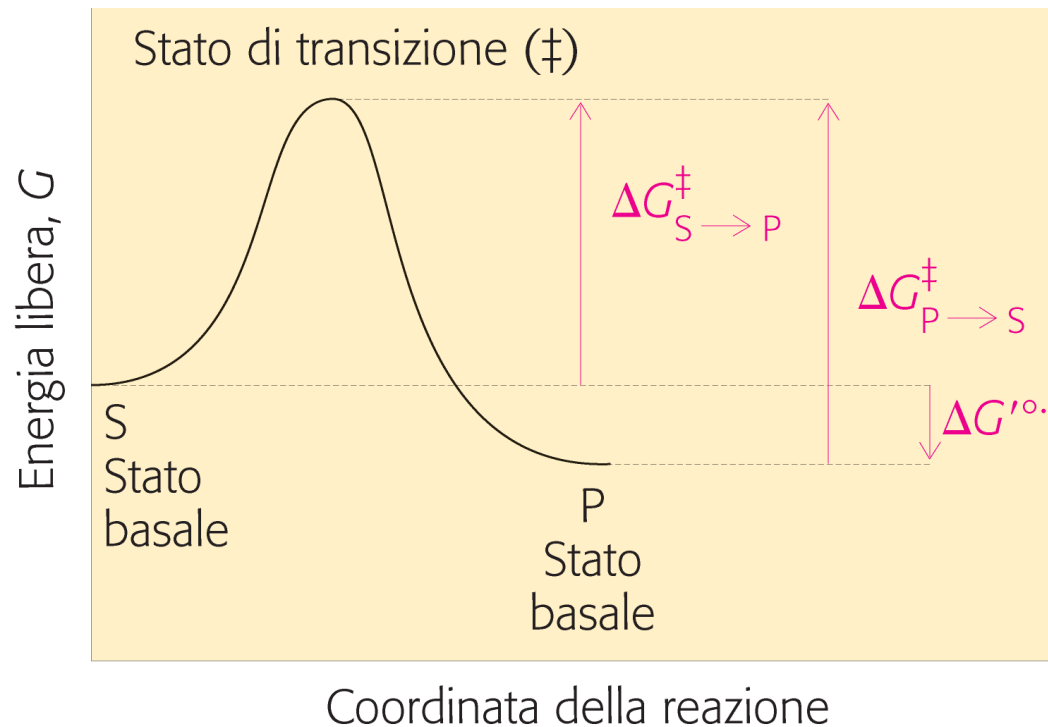
$\Delta G'^\circ =$ **variazione di energia libera standard biochimica** (variazione di energia libera standard a pH 7)



GLI ENZIMI MODIFICANO LA VELOCITÀ DELLE REAZIONI

L'equilibrio tra S e P dipende dalla differenza tra i livelli di energia libera dei due composti ai loro stati basali.

Questo equilibrio non viene modificato da un catalizzatore



La velocità della reazione dipende dall'energia di attivazione ΔG^*

La velocità di una reazione può essere teoricamente aumentata innalzando la temperatura. In condizioni isotermeche, può essere aumentata aggiungendo un catalizzatore.

Il catalizzatore aumenta la velocità della reazione abbassando l'energia di attivazione

L'energia di attivazione può essere abbassata aggiungendo un catalizzatore

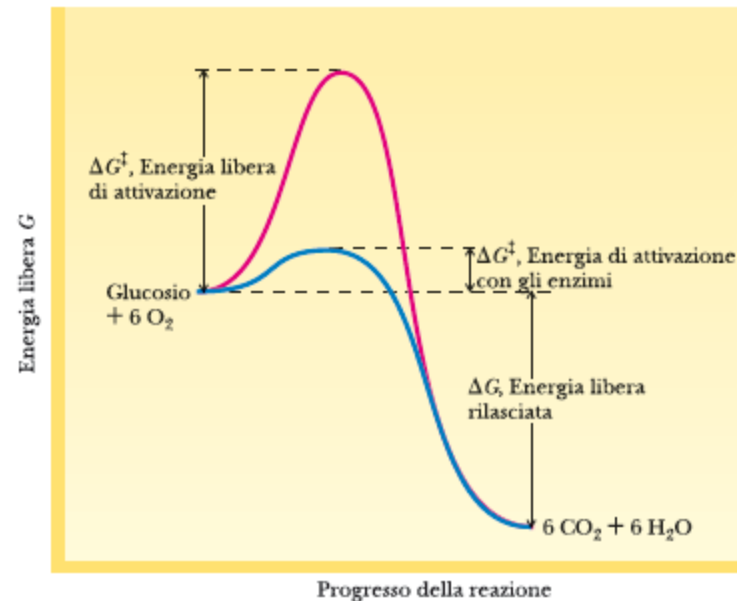


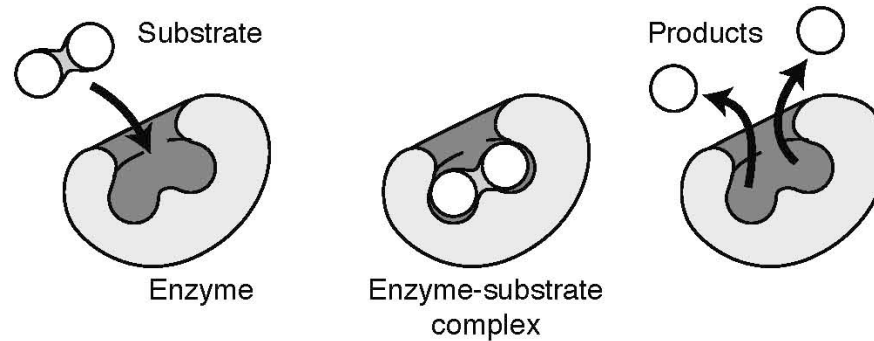
FIGURA 13.1 Profilo di reazione che mostra il grande ΔG^\ddagger per l'ossidazione del glucosio. Gli enzimi abbassano il ΔG^\ddagger , accelerando così la velocità.

In presenza di un catalizzatore, la reazione raggiunge l'equilibrio molto più rapidamente perché la velocità della reazione è molto superiore.

La reazione è caratterizzata da valori di ΔG^* inferiori corrispondenti alla formazione di specie chimiche transitorie (complesso Enzima-Substrato, ES)

Quali sono gli elementi che contribuiscono alla catalisi enzimatica?

Mechanism of enzyme activity



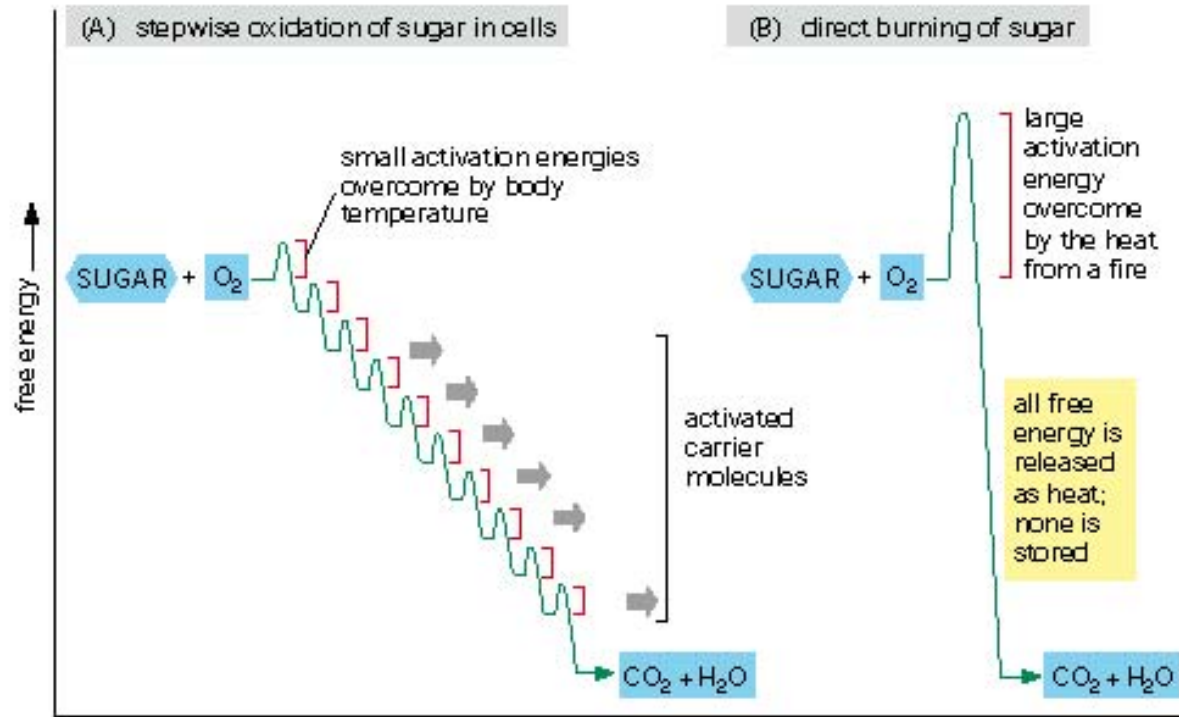
- I gruppi funzionali catalitici di un enzima interagiscono temporaneamente con un substrato e lo “preparano” alla reazione.

Si forma il complesso ES.

L'interazione tra enzima e substrato è mediata da legami deboli non covalenti.

La formazione di tali legami è accompagnata da rilascio di energia libera che viene detta **ENERGIA DI LEGAME** e che costituisce la principale fonte di energia libera usata dall'enzima per abbassare l'energia di attivazione della reazione.

- In alcuni casi si generano vie alternative a più bassa energia



L'ossidazione completa *in vitro* del glucosio in CO₂ e H₂O richiede tempi lunghissimi oppure alte temperature.

Nella cellula il glucosio viene completamente convertito in CO₂ e H₂O attraverso una serie di reazioni catalizzate da enzimi.

Questi enzimi non solo accelerano le reazioni, ma le organizzano in modo che l'energia liberata dall'intero processo possa essere recuperata in forme utilizzabili dalla cellula.

Aumento della velocità di reazione prodotto da alcuni enzimi:

TABLE 6-5 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}

L'energia di attivazione è una barriera per la reazione biochimica, ma è fondamentale per la vita

La stabilità delle molecole aumenta con l'aumentare della barriera di attivazione. Senza questa barriera le molecole complesse tenderebbero a convertirsi spontaneamente in forme molecolari più semplici

Gli enzimi hanno sviluppato la capacità di abbassare in modo selettivo solo l'energia di attivazione delle reazioni necessarie per la sopravvivenza della cellula

Come è stata dimostrata l'esistenza dei complessi ES?

- visualizzati direttamente tramite microscopia elettronica o cristallografia a raggi X
- attraverso la variazione delle caratteristiche spettroscopiche di enzima o substrato conseguente alla formazione del complesso ES (spettroscopia a fluorescenza, NMR, EPR)

La regione dell'enzima che lega il substrato si chiama **SITO ATTIVO** e contiene i residui AA che partecipano direttamente alla formazione e rottura dei legami.

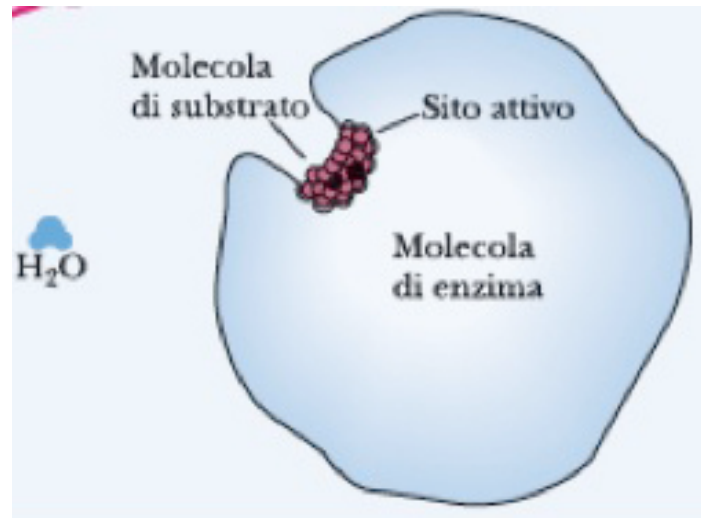
Questi residui sono chiamati **GRUPPI CATALITICI**.

Sebbene gli enzimi differiscano notevolmente in struttura, specificità, meccanismo di catalisi, essi **condividono caratteristiche generali comuni a livello del sito attivo**.

**Proprietà
del
sito catalitico**

1. Il sito attivo interessa una parte relativamente piccola del volume totale di un enzima.

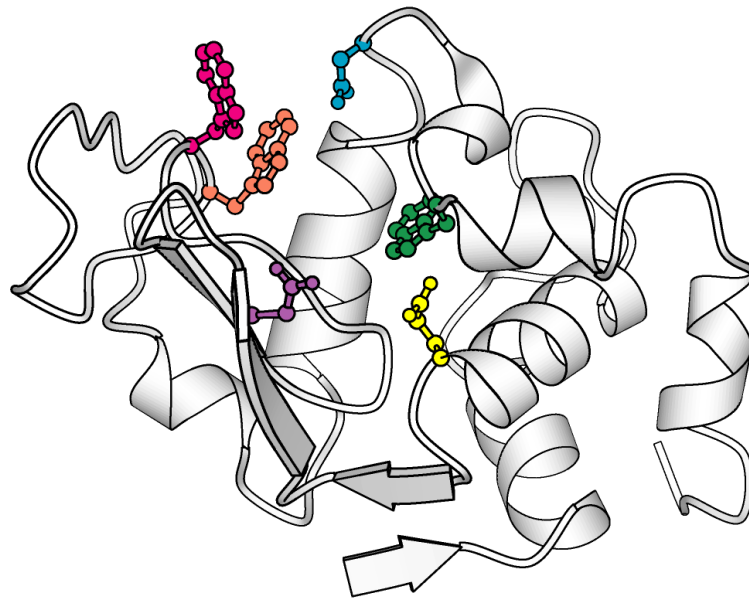
La maggior parte dei residui AA di un enzima non sono in contatto con il substrato.



La molecola di acqua fornisce una scala approssimativa delle dimensioni

2. Il sito attivo è un'entità tridimensionale formata da gruppi che provengono da zone diverse e lontane nella sequenza amminoacidica

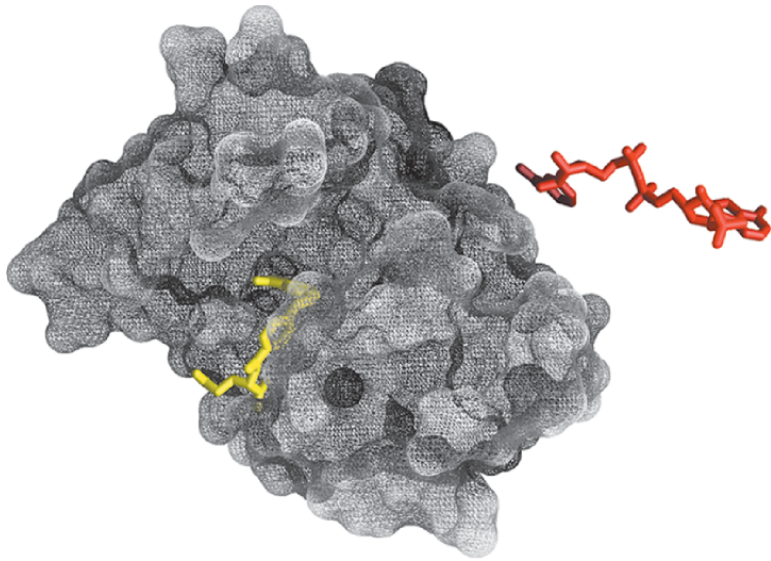
(A)



Lisozima



Le catene laterali degli aa all'interno del sito attivo possono comportarsi come **acidi**, **basi** o **nucleofili** (elettron ricchi).
Con l'introduzione di un metallo che si legni all'enzima si possono creare centri **elettrofili** (elettron poveri)



3. I siti attivi sono delle fenditure

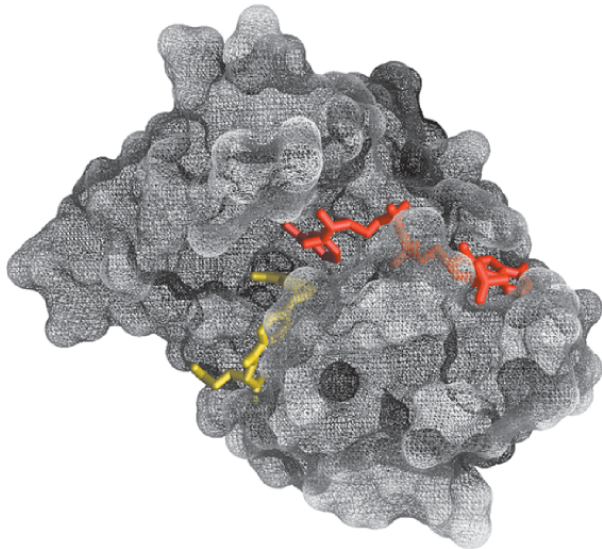
In tutti gli enzimi a struttura nota, le molecole di substrato sono legate a livello di fenditure

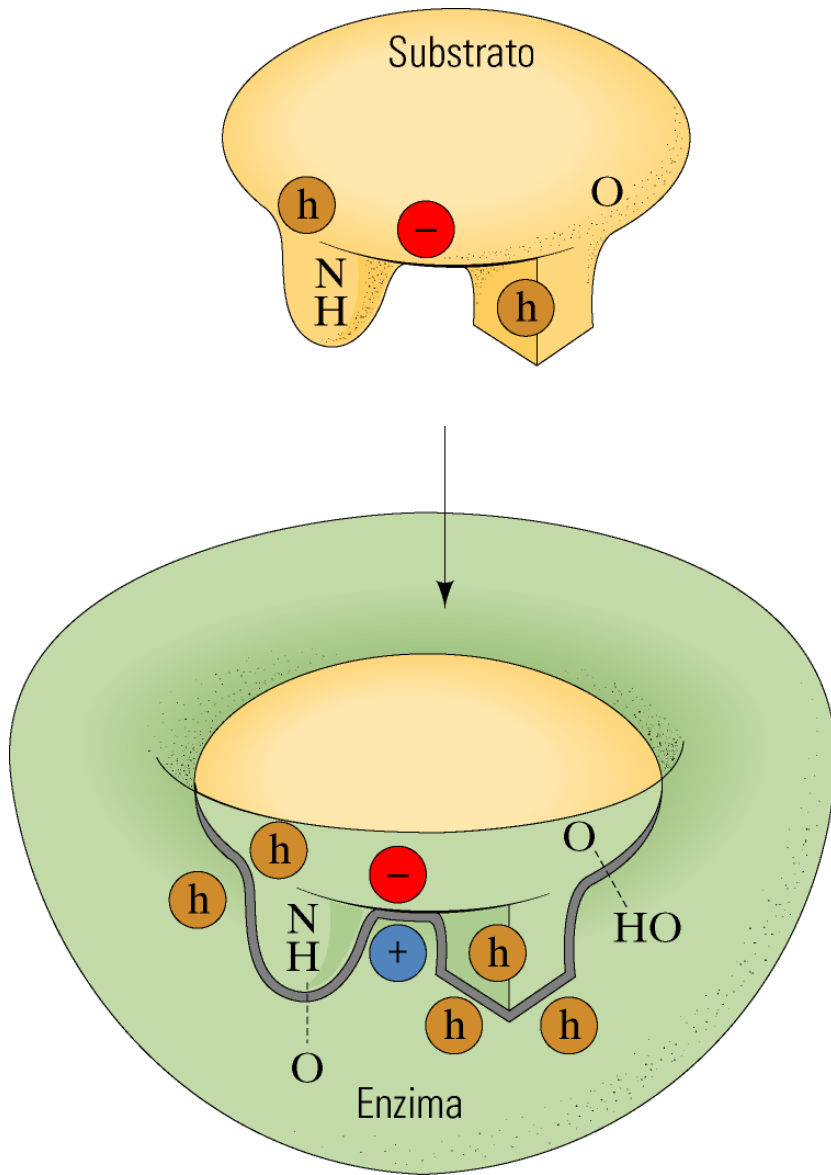
L'acqua è generalmente esclusa, a meno che non sia un reagente

La fenditura ha quindi un carattere apolare, che incrementa il legame con il substrato, ma allo stesso tempo può contenere gruppi polari

Si crea un microambiente nel quale sono contenuti i residui essenziali per la catalisi

La posizione interna di questi residui polari costituisce un'eccezione biologicamente importante alla regola generale che dice che i residui polari sono esposti all'acqua

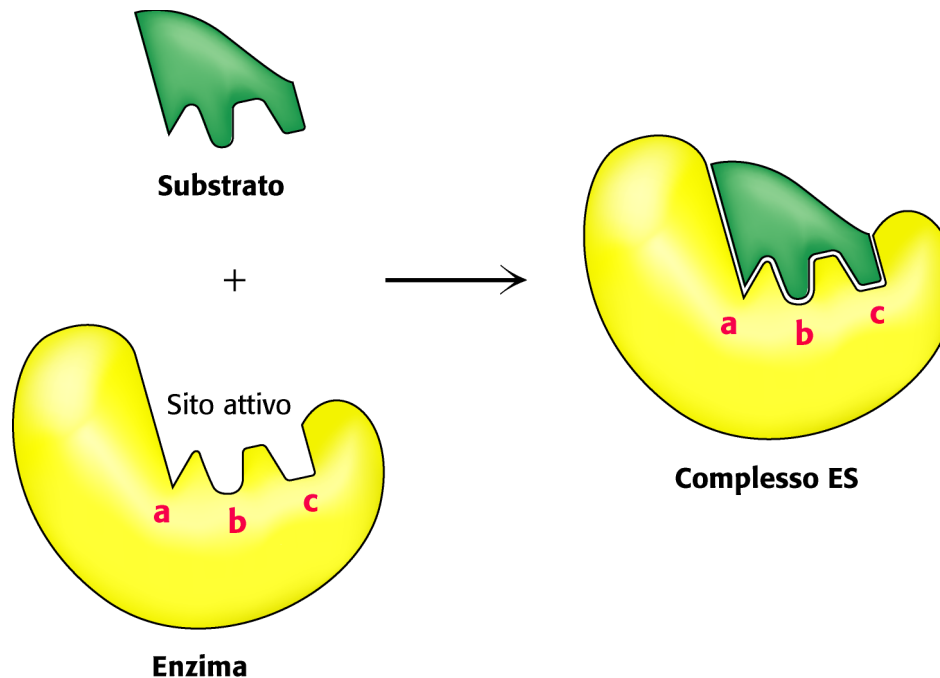




4. Il substrato è legato all'enzima tramite interazioni deboli multiple che richiedono complementarietà strutturale tra il sito attivo catalitico dell'enzima ed il substrato
La specificità del legame E-S è una caratteristica peculiare di questo tipo di interazione molecolare

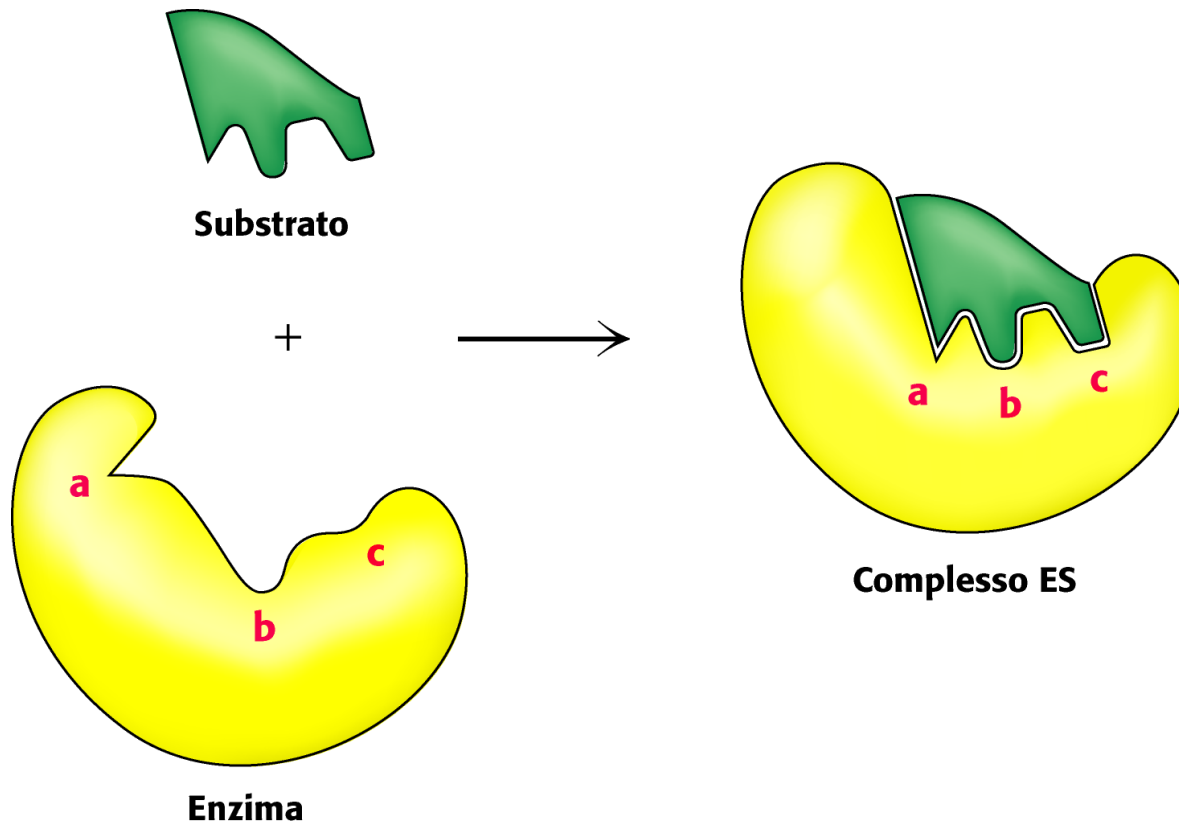
5. La specificità di legame dipende dalla disposizione degli atomi nel sito attivo

Modello chiave-serratura (Fischer, 1890): Il sito attivo di un enzima non legato ha una forma complementare a quella del substrato



Primo modello elaborato per spiegare l'interazione enzima-substrato, ma non più esauriente perché è ora evidente che la forma del sito attivo di molti enzimi è modificata in maniera marcata dal legame con S

Modello dell'adattamento indotto (Koshland, 1958): Il sito attivo di un enzima assume una forma complementare a quella del substrato solo dopo che il substrato si è legato



Specificità degli enzimi

Specificità assoluta: l'enzima catalizza solo una reazione

Specificità di gruppo: l'enzima agisce solo su molecole che hanno uno specifico gruppo chimico

Specificità di legame: l'enzima agisce solo su un particolare tipo di legame chimico senza tenere conto del resto della molecola di substrato

Specificità stereochimica: l'enzima agisce solo su un particolare isomero sterico o ottico