

- CINETICA ENZIMATICA -

ENZIMI:

- CATALIZZATORI → aumenta la V di una reazione chimica senza subire trasformazioni durante l'intero processo
- PROTEINE → gli enzimi sono proteine di struttura 3° o talora 4°
- SUBSTRATO → sostanza su cui agisce l'enzima [S]
- INALTERATO nel processo e NON influiscono sull'equilibrio della reazione ma ne aumentano la velocità
- ALTAMENTE SPECIFICI → un enzima è specifico per un substrato
- TAMPONE → mantengono costante il pH del sangue:
 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ (H_2CO_3 / HCO_3^-)
- NUMERO DI TURNOVER → n° di molecole di S trasformate in P in 1 sec da 1 molecola di E quando è nelle migliori condizioni (saturato)

NOMENCLATURA – CLASSIFICAZIONE:

- nome del substrato + **-asi**
- 4 numeri → codice
- 6 classi:

CLASSE	REAZIONE
1	Ossidoriduttasi
2	Transferasi
3	Idrolasi
4	Liasi
5	Isomerasi
6	Ligasi

STRUTTURA:

- 1 o + proteine globulari
- possono funzionare tal quali (solo struttura proteica) o solo con **COFATTORI** (ioni metallici o molecole organiche)
- **OLOENZIMA = APOENZIMA** (enzima solo proteico) + **COFATTORE**
 - Proteina coniugata
- COFATTORI ORGANICI o COENZIMI → NAD, FAD, ATP, CoASH

SITI ATTIVI:

- l'enzima si lega al substrato → E-S (complesso ATTIVATO)
- il S si trasforma in P e l'E diventa libero
- $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$
- E è + grande di S → solo alcuni regioni dell'E sono catalitiche
- SITI CATALITICI o ATTIVI → struttura 3° della proteina e i residui amminoacidici responsabili dell'attività sono: -OH; -SH; -NH₂; -COOH; e quelli in grado di fare ponti H
- la > parte degli aa degli enzimi → **favoriscono l'ORIENTAMENTO E-S**
- MODELLO di FISCHER → *chiave – serratura*: l'E ha conformazione rigida complementare a quella del S
- MODELLO dell'ADATTAMENTO INDOTTO → l'avvicinarsi di S a E modifica la struttura di E (in modo reversibile) e migliora la reciproca aderenza

ATTIVITA' ENZIMATICA e PARAMETRI REGOLATORI:

- azione catalitica dell'enzima → scelta del percorso con < Eatt. (energia di attivazione)
- fattori chimico – fisici che influenzano l'azione catalitica dell'enzima sono:
 - 1) [S]
 - 2) [E]
 - 3) pH
 - 4) T
 - 5) inibitori
 - 6) attivatori

1) [S]:

- dipendenza della V di reazione dalla [S] → equazione di Michaelis-Menten: $V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$
- alla V_{max} tutti i siti sono saturati
- K_m (costante di Michaelis) → [S] alla quale la V di reazione è = $\frac{1}{2} V_{max}$
 - affinità dell'E nei confronti di S
 - valori piccoli di K_m → E alta affinità per S

2) [E]:

- proporzionalità diretta tra V di una reazione enzimatica in funzione di [E]

3) pH:

- modificazione della dissociazione dei residui aa del SITO ATTIVO (la sua forma) e della dissociazione dei gruppi del substrato (il suo riconoscimento)
- pH OTTIMALE di funzionamento → 4 – 9

4) T:

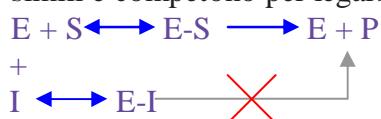
- un aumento di T (temperatura) → crescita esponenziale della V di reazione di un enzima senza però raggiungere la DENATURAZIONE

5) INIBITORI:

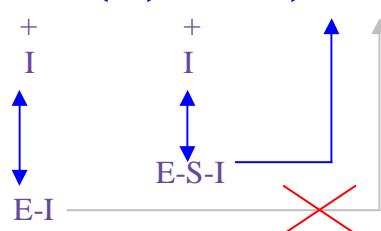
- rallentare la V di una reazione enzimatica e possono essere IRREVERSIBILI o REVERSIBILI
- INIBIZIONE IRREVERSIBILE → le molecole dell'I si legano irreversibilmente ai residui del sito attivo → E-I: $E + I + S \rightleftharpoons E - I + S$



- INIBIZIONE REVERSIBILE → può essere COMPETITIVA o NON-COMPETITIVA
- INIBIZIONE REVERSIBILE COMPETITIVA → molecole di S e I sono strutturalmente simili e competono per legarsi reversibilmente al sito attivo:

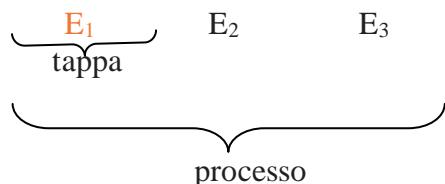


- INIBIZIONE REVERSIBILE NON-COMPETITIVA → le molecole di I possono legarsi con E o ES in un sito diverso da quello catalitico: **allosterico** → deformazione dell'enzima e S interagisce + difficilmente con E. In questo caso indipendentemente da [S] la V di reazione si abbassa: $E + S \rightleftharpoons E - S \xrightarrow{\quad} E + P$



REGOLAZIONE OPERATA DA ENZIMI:

ENZIMA REGOLATORE → opera su una tappa irreversibile e fra le prime di un processo metabolico: A → B ← C ← P

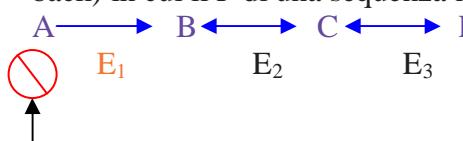


ENZIMI ALLOSTERICI → proteine 4° che hanno inseriscono **modulatori** positivi o negativi del sito attivo catalitico e lo stabilizzano.

Se sono regolati da modulatori diversi da S → ENZIMI AD EFFETTO ETEROTROPO

Se sono regolati da modulatori uguali ad S → ENZIMI AD EFFETTO OMOTROPO

Un esempio di REGOLAZIONE ALLOSTERICA OMOTROPA → **inibizione retroattiva** (feedback) in cui il P di una sequenza metabolica inibisce l'azione del primo E della sequenza stessa:



EFFETTO COOPERATIVO → l'entrata di una molecola di S in una subunità facilita l'entrata delle altre e viceversa:

- < [S] la V di reazione cresce lentamente
- [S] intermedia, piccole aggiunte di S → grande aumento della V di reazione
- > [S] la V di reazione diventa costante e = alla Vmax
- la curva da iperbole diventa perciò sigmoide

- MIOGLOBINA ED EMOGLOBINA -

Mb → proteina di immagazzinamento di O₂

Hb → proteina trasportatrice di O₂

TRASPORTO e IMMAGAZZINAMENTO di O₂:

Hb e **Mb**: immagazzinamento e trasporto di O₂ → metabolismo aerobico: - assicurare apporto di O₂
- Eliminare gli scarti (CO₂)

Hb: proteina trasportatrice che lega l'O₂ nei polmoni o branchie e lo distribuisce nei tessuti

Mb: proteina che serve ad alcuni tessuti che hanno bisogno di grandi riserve di O₂

Mb → singola catena polipeptidica ripiegata attorno ad un *gruppo prostatico*: **EME** → sito legame O₂
Hb → proteina tetramerica con le catene simili alla Mb

MECCANISMO di LEGAME con O₂:

- legare O₂
- impedirne l'ossidazione
- rilasciarlo in risposta a specifiche richieste

SITO di LEGAME per O₂:

- al centro di un anello tetrapirrollico detto **protoporfirina IX** → Fe²⁺
- il Ferro porfirinico → colore rosso del sangue

EME

L'EME è legato non – covalentemente alla Mb o Hb accomodato in una tasca idrofobia

- il Fe → **6 ligandi**: 4 con gli atomi di N; 1 con His F8 (prossimale) e 1 con His E7 (distale)
- His E7 — O₂ — Fe(eme) — His F8

Hb e Mb → protezione di un metallo in grado di legare O₂ ma dall'ossidazione irreversibile

ANALISI LEGAME O₂ dalla Mb:

- **Mb**: lega O₂ rilasciato dall'Hb nei vasi e capillari arteriosi e la Mb lo rilascia agli organuli
 - **Legge di HENRY**: la [] di un gas disiolto in un liquido è proporzionale alla P parziale di quel gas sopra al liquido → [O₂] = PO₂
 - θ = frazione di siti di Mb legati all' O₂ e dipende dalla [O₂] = dalla PO₂ dell'ossigeno libero
- Mb + O₂ ⇌ MbO₂

$$K = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}][\text{O}_2]} \rightarrow [\text{MbO}_2] = K * [\text{Mb}][\text{O}_2]$$

moltiplico e divido per 1/K

$$\theta = \frac{\text{siti occupati}}{\text{totale siti disponibili}} \rightarrow \theta = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{MbO}_2] + [\text{Mb}]} \rightarrow \frac{K[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{Mb}] + K[\text{Mb}][\text{O}_2]} \rightarrow \frac{K[\text{O}_2]}{1 + K[\text{O}_2]} \rightarrow \frac{[\text{O}_2]}{1/K + [\text{O}_2]} \rightarrow$$

$$\rightarrow \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2]^{1/2} + [\text{O}_2]} \rightarrow \theta = \frac{PO_2}{P_{50} + PO_2}$$

- P₅₀ bassa = alta affinità della Mb per l'O₂

TRASPORTO DI O₂: Hb:

LEGAME COOPERATIVO e ALLOSTERIA:

Hb → accettare efficacemente O₂ alla PO₂ nei polmoni (~100 mm Hg)

→ cederne una frazione ai tessuti a PO₂ ~ 30-40 mm Hg

→ a < PO₂: la proteina si comporta come se legasse O₂ molto debolmente e man mano che l'O₂ aumenta → affinità → interazione cooperativa: *l'occupazione dei primi siti aumenta l'affinità all'O₂ per gli altri siti*

→ comunicazione reciproca tra i siti di legame → SUBUNITA' di proteina MULTIMERICA (Hb)

→ struttura tetramerică

→ lega 4 O₂ in 4 siti simili a Mb

→ grafico di HILL: quando l'Hb inizia a legare O₂ il grafico di Hill ha pendenza = 1 (bassa affinità; alta P₅₀) e viceversa. Misura del grado di cooperatività → **coefficiente di Hill: n_H** →

n_H=1: lega in modo non cooperativo

1 < n_H < n: proteina cooperativa

n_H=n: completamente cooperativa

→ Il legame cooperativo dell'O₂ dall'Hb → effetto **allosterico**: O₂ su un ligando → influisce su altri ligandi

VARIAZIONI della Hb che ACCOMPAGNANO il LEGAME dell'O₂:

Hb → 2 catene α e 2 catene β (α₂β₂); i legami + forti sono tra α e β

→ i gruppi EME sono in prossimità della superficie ma non vicini l'uno all'altro

- **l'ossigenazione** → una coppia α-β ruota e scivola rispetto all'altra → le catene β + vicine tra loro e si crea un restringimento della cavità
- la **transizione** da **deossiHb** a **ossiHb** → spiega la cooperatività del legame

EFFETTI DI ALTRI LIGANDI sul COMPORTAMENTO ALLOSTERICO dell'Hb:

- quando O₂ è consumato nei tessuti → CO₂ che deve essere allontanata e causa un abbassamento pH negli eritrociti secondo la seguente reazione:
- CO₂ + H₂O ⇌ HCO₃⁻ + H⁺ (*anidrasi-carbonica*)
- in deficit di O₂ nei muscoli → acido lattico → abbassamento pH
- < pH in vasi e tessuti → apporto di O₂ → **EFFETTORI ALLOSTERICI**

RISPOSTA ai CAMBIAMENTI di pH: l'EFFETTO BOHR:

- caduta di pH → <affinità dell'Hb per l'O₂→> rilascio delle ultime tracce di O₂ presente

EFFETTO BOHR

- $\text{Hb}^*4\text{O}_2 + \text{nH}^+ \rightleftharpoons \text{Hb}^*\text{nH}^+ + 4\text{O}_2$
- gli H⁺ spostano l'equilibrio a destra perché promuovono il rilascio di O₂
- quando si ha ossigenazione nei polmoni → rilascio di H⁺ → equilibrio verso sinistra inoltre gli H⁺ liberano il bicarbonato disiolto nel sangue invertendo la reazione: la CO₂ può quindi essere espirata

IL BISFOSFOGLICERATO:

- H⁺ e CO₂ → effettori che facilitano lo scambio di O₂ e CO₂ in modo veloce nel ciclo respiratorio
- Un altro effettore allosterico è il 2,3-BPG → diminuisce l'affinità dell'Hb per l'O₂ e favorisce l'adattamento a < pressione di O₂
- Si lega nella cavità tra le catene β instaurando interazioni allosteriche con i gruppi + + stretta nella OSSIHb → 2,3-BPG non può adattarsi
- > contenuto di 2,3-BPG negli eritrociti → + stabile la struttura deossiHb
- **HbF** → emoglobina fetale con catene γ (α₂γ₂) + affine all'O₂; < affinità per il 2,3-BPG

IMMUNOGLOBULINE:

LA STRUTTURA degli ANTICORPI:

- 2 catene pesanti e 2 leggere legate le une alle altre con ponti disolfuro
- in ogni catena → domini costanti (= in tutti gli Ab di una stessa classe) e dominio variabile (le variazioni della sequenza aa di questo dominio conferiscono agli Ab diversi tipi di specificità)
- sito di legame per l'antigene → estremità terminale dei domini variabili e coinvolge i residui aa delle regioni variabili sia delle catene pesanti che di quelle leggere
- DOMINI COSTANTI di CATENE PESANTI nella base della molecola a forma di Y servono a tenere unite le catene e fungono da effettori segnalando ai macrofagi nel sistema circolatorio di attaccare particelle o cellule marcate mediante un legame di un anticorpo.

