

## - 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:  

$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \quad (\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-)$$
- 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**  


- 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
- $$\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES} \longrightarrow \text{E} + \text{P}$$
- E è + grande di S → solo alcune regioni dell'E sono catalitiche
- SITI CATALITICI o ATTIVI → struttura 3° della proteina e i residui amminoacidici responsabili dell'attività sono: -OH; -SH; -NH<sub>2</sub>; -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  $< E_{att}$ . (enel 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**:  $V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$
- 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:

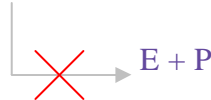
- modificazione della dissociazione dei residui aa del SITO ATTIVO (la sua forma) e della dissociazione dei gruppi del substrato (il suo riconoscimento)
- pH OTTIMALE di funzionamento → **4 – 9**

#### 4) T:

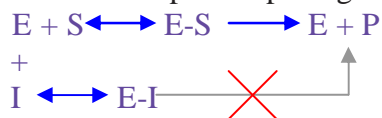
- un aumento di T (temperatura) → crescita esponenziale della V di reazione di un enzima senza però raggiungere la DENATURAZIONE

#### 5) INIBITORI:

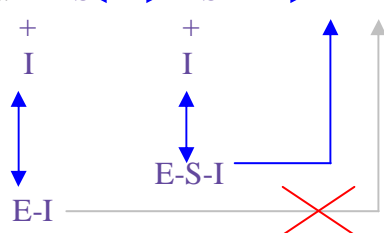
- rallentare la V di una reazione enzimatica e possono essere IRREVERSIBILI o REVERSIBILI
- INIBIZIONE IRREVERSIBILE → le molecole dell'I si legano irreversibilmente ai residui del sito attivo → E-I:  $E + I + S \rightleftharpoons E-I + S$



- 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:

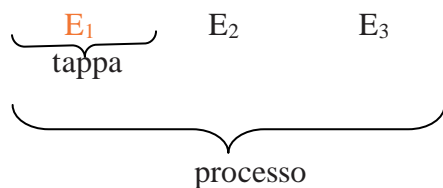


- INIBIZIONE REVERSIBILE NON-COMPETITIVA → le molecole di I possono legarsi con E o ES in un sito diverso da quello catalitico: **allosterico** → deformazione dell'enzima e S interagisce + difficilmente con E. In questo caso indipendentemente da [S] la V di reazione si abbassa:  $E + S \rightleftharpoons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



### REGOLAZIONE OPERATA DA ENZIMI:

ENZIMA REGOLATORE → opera su una tappa irreversibile e fra le prime di un processo metabolico:  $A \xrightarrow{E_1} B \rightleftharpoons E_2 C \rightleftharpoons E_3 P$

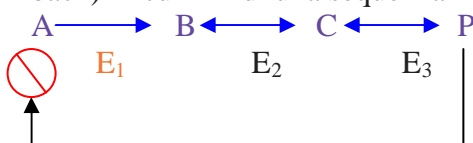


ENZIMI ALLOSTERICI → proteine 4° che hanno  $\swarrow$  SITO ATTIVO  $\searrow$  SITO ALLOSTERICO in cui si inseriscono **modulatori** positivi o negativi del sito attivo catalitico e lo stabilizzano.

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:

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

## - MIOGLOBINA ED EMOGLOBINA -

**Mb** → proteina di immagazzinamento di  $O_2$

**Hb** → proteina trasportatrice di  $O_2$

### TRASPORTO e IMMAGAZZINAMENTO di $O_2$ :

**Hb e Mb**: immagazzinamento e trasporto di  $O_2$  → metabolismo aerobico: - assicurare apporto di  $O_2$   
- Eliminare gli scarti ( $CO_2$ )

**Hb**: proteina trasportatrice che lega l' $O_2$  nei polmoni o branchie e lo distribuisce nei tessuti

**Mb**: proteina che serve ad alcuni tessuti che hanno bisogno di grandi riserve di  $O_2$

**Mb** → singola catena polipeptidica ripiegata attorno ad un *gruppo prostetico*: **EME** → sito legame  $O_2$

**Hb** → proteina tetramerică con le catene simili alla Mb

### MECCANISMO di LEGAME con $O_2$ :

- legare  $O_2$
- impedirne l'ossidazione
- rilasciarlo in risposta a specifiche richieste

### SITO di LEGAME per $O_2$ :

- al centro di un anello tetrapirrolico detto **protoporfirina IX** → **EME**  $Fe^{2+}$
- il Ferro porfirinico → colore rosso del sangue

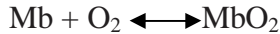
L'**EME** è legato non – covalentemente alla Mb o Hb accomodato in una tasca idrofobia

- il  $Fe$  → **6 ligandi**: 4 con gli atomi di N; 1 con His F8 (prossimale) e 1 con His E7 (distale)
- His E7 —  $O_2$  — **Fe(eme)** — His F8

**Hb e Mb** → protezione di un metallo in grado di legare  $O_2$  ma dall'ossidazione irreversibile

### ANALISI LEGAME $O_2$ dalla Mb:

- **Mb**: lega  $O_2$  rilasciato dall'Hb nei vasi e capillari arteriosi e la Mb lo rilascia agli organuli
- **Legge di HENRY**: la [ ] di un gas disciolto in un liquido è proporzionale alla P parziale di quel gas sopra al liquido →  $[O_2] = PO_2$
- $\theta$  = frazione di siti di Mb legati all'  $O_2$  e dipende dalla  $[O_2]$  = dalla  $PO_2$  dell'ossigeno libero



$$K = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]} \rightarrow [MbO_2] = K * [Mb][O_2]$$

moltiplico e divido per  $1/K$



$$\theta = \frac{\text{siti occupati}}{\text{totale siti disponibili}} \rightarrow \theta = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]} \rightarrow \frac{K[Mb][O_2]}{[Mb] + K[Mb][O_2]} \rightarrow \frac{K[O_2]}{1 + K[O_2]} \rightarrow \frac{[O_2]}{1/K + [O_2]} \rightarrow$$
$$\rightarrow \frac{[O_2]}{[O_2]^{1/2} + [O_2]} \rightarrow \theta = \frac{PO_2}{P_{50} + PO_2}$$

-  $P_{50}$  bassa = alta affinità della Mb per l' $O_2$

### **TRASPORTO DI $O_2$ : Hb:**

#### LEGAME COOPERATIVO e ALLOSTERIA:

**Hb** → accettare efficacemente  $O_2$  alla  $PO_2$  nei polmoni (~100 mm Hg)

→ cederne una frazione ai tessuti a  $PO_2$  ~ 30-40 mm Hg

→  $a < PO_2$ : la proteina si comporta come se legasse  $O_2$  molto debolmente e man mano che l' $O_2$  aumenta → > affinità → interazione cooperativa: l'occupazione dei primi siti aumenta l'affinità all' $O_2$  per gli altri siti

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

→ struttura tetramerica

→ lega 4  $O_2$  in 4 siti simili a Mb

→ grafico di HILL: quando l'Hb inizia a legare  $O_2$  il grafico di Hill ha pendenza = 1 (bassa affinità; alta  $P_{50}$ ) 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' $O_2$  dall'Hb → effetto **allosterico**:  $O_2$  su un ligando → influisce su altri ligandi

#### **VARIAZIONI della Hb che ACCOMPAGNANO il LEGAME dell' $O_2$ :**

**Hb** → 2 catene  $\alpha$  e 2 catene  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ); i legami + forti sono tra  $\alpha$  e  $\beta$

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

- **l'ossigenazione** → una coppia  $\alpha$ - $\beta$  ruota e scivola rispetto all'altra → le catene  $\beta$  + 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  $O_2$  è consumato nei tessuti →  $CO_2$  che deve essere allontanata e causa un abbassamento pH negli eritrociti secondo la seguente reazione:
- $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$  (anidrasi-carbonica)
- in deficit di  $O_2$  nei muscoli → acido lattico → abbassamento pH
- $< pH$  in vasi e tessuti → > apporto di  $O_2$  → EFFETTORI ALLOSTERICI

#### **RISPOSTA ai CAMBIAMENTI di pH: l'EFFETTO BOHR:**

- caduta di pH  $\rightarrow$  <affinità dell'Hb per l'O<sub>2</sub>>  $\rightarrow$  rilascio delle ultime tracce di O<sub>2</sub> presente

#### EFFETTO BOHR

- $\text{Hb} \cdot 4\text{O}_2 + n\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Hb} \cdot n\text{H}^+ + 4\text{O}_2$
- gli H<sup>+</sup> spostano l'equilibrio a destra perché promuovono il rilascio di O<sub>2</sub>
- quando si ha ossigenazione nei polmoni  $\rightarrow$  rilascio di H<sup>+</sup>  $\rightarrow$  equilibrio verso sinistra inoltre gli H<sup>+</sup> liberano il bicarbonato disciolto nel sangue invertendo la reazione: la CO<sub>2</sub> può quindi essere espirata

#### IL BISFOSFOGLICERATO:

- H<sup>+</sup> e CO<sub>2</sub>  $\rightarrow$  effettori che facilitano lo scambio di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> in modo veloce nel ciclo respiratorio
- Un altro effettore allosterico è il 2,3-BPG  $\rightarrow$  diminuisce l'affinità dell'Hb per l'O<sub>2</sub> e favorisce l'adattamento a < pressione di O<sub>2</sub>
- Si lega nella cavità tra le catene  $\beta$  instaurando interazioni allosteriche con i gruppi +  
 $\rightarrow$  stretta nella OSSIHb  $\rightarrow$  2,3-BPG non può adattarsi
- > contenuto di 2,3-BPG negli eritrociti  $\rightarrow$  + stabile la struttura deossiHb
- **HbF**  $\rightarrow$  emoglobina fetale con catene  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ) + affine all'O<sub>2</sub>; < 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  $\rightarrow$  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  $\rightarrow$  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.

