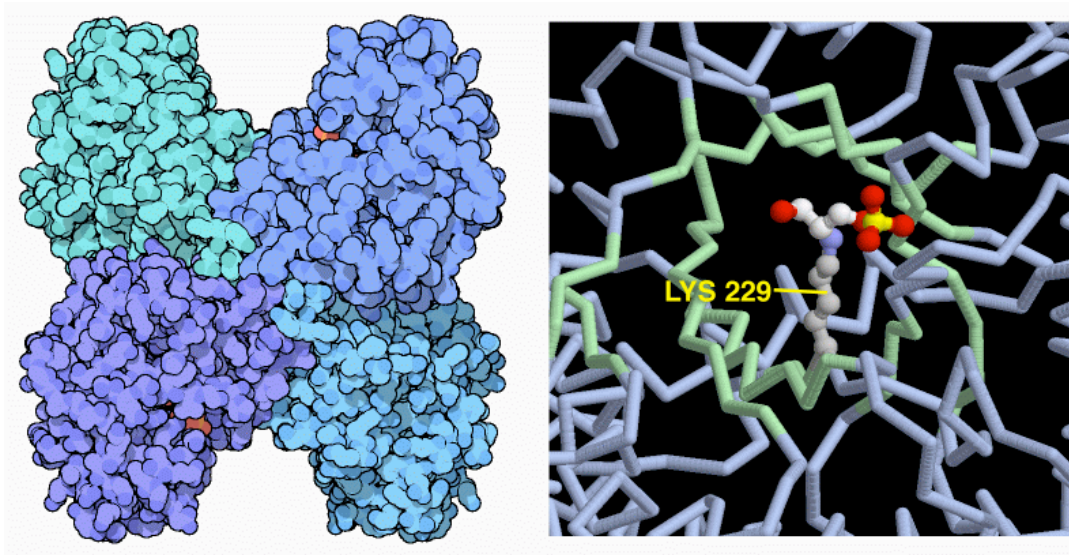


GLI ENZIMI



DISPENSA BASATA SUI MATERIALI DEL PROF. F. GURZONI

Indice

1. La struttura	2
2. Le prestazioni: l'efficienza e la specificità	7
3. L'influenza dell'ambiente	13
4. Il meccanismo di azione	15
5. Gli enzimi regolatori e il metabolismo	19
6. RAQ sugli enzimi (Rarely Asked Questions)	23

1. La struttura

1.1 Che cosa sono gli enzimi?

Gli enzimi sono **PROTEINE** specializzate nella **CATALISI** delle reazioni biologiche.

Sono stati così chiamati perchè sono stati individuati per la prima volta nei lieviti (in greco en zime). Essi controllano praticamente tutti i processi chimici che avvengono negli organismi viventi.

Dopo essersi legati alle molecole che partecipano ad una reazione (**SUBSTRATI**), accelerano la formazione o la rottura di un legame chimico ben determinato.

Il loro nome comune si ottiene spesso aggiungendo il suffisso **-asi** al nome del substrato su cui operano (es. ureasi, arginasi). Altre volte portano nomi di fantasia (es. chimotripsina, papaina, catalasi).

A causa del crescente numero di enzimi scoperti, da qualche anno viene raccomandato l'uso della nomenclatura sistematica, che fa riferimento alla loro classificazione, basata sul tipo di reazione catalizzata:

Numero della classe	Categoria	Tipo di reazione
1	ossido-riduttasi	reazioni redox
2	transferasi	trasferimento di gruppi funzionali
3	idrolasi	idrolisi
4	liasi	addizione ai doppi legami e formazione di doppi legami per eliminazione
5	isomerasi	isomerizzazione
6	ligasi	condensazione con rottura di ATP

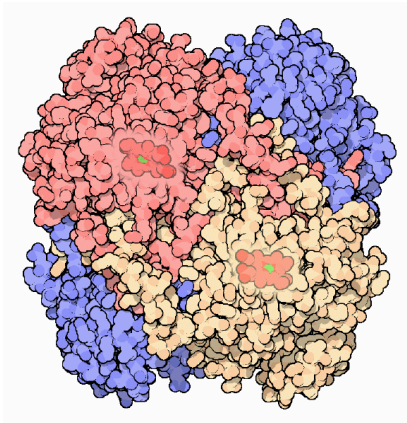
1.2 Come sono fatti gli enzimi?

Come tutte le proteine, gli enzimi sono costituiti da una o più catene polipeptidiche. Descrivere la struttura primaria di un enzima significa elencare gli amminoacidi che lo compongono, da quello N-terminale a quello C-terminale, rispettando la loro sequenza lineare lungo la catena. La posizione di un amminoacido è così determinata da un semplice numero.

Sequenza amminoacidica della carbossipeptidasi

(si legge da sinistra a destra e dall'alto in basso, come un normale testo scritto)

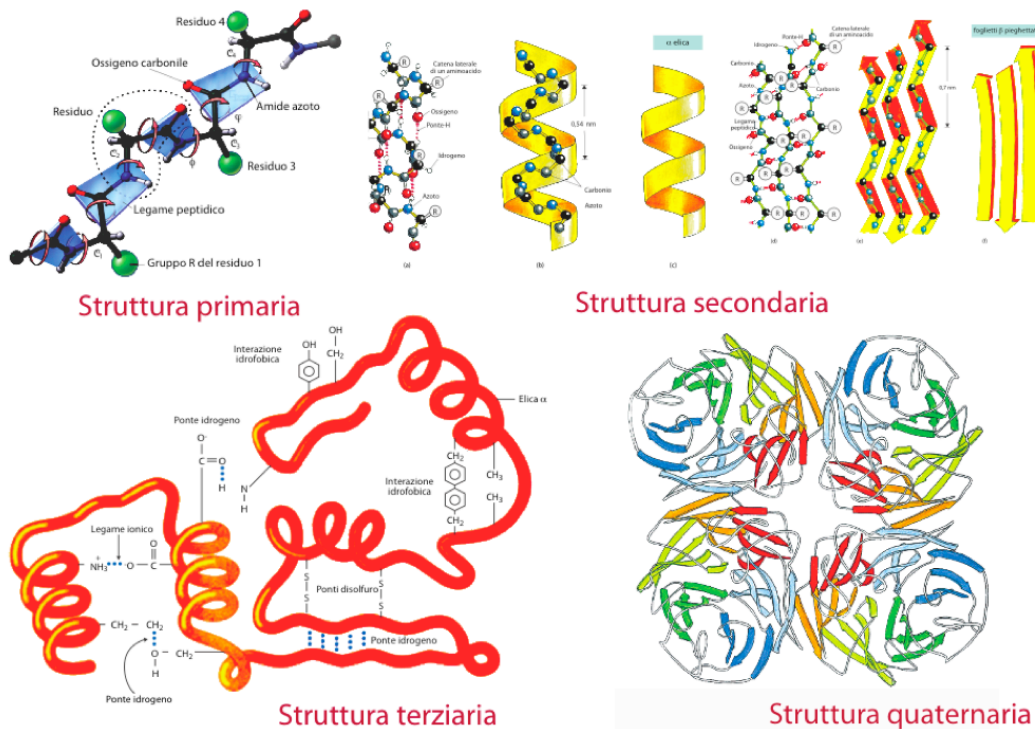
```
ALA ARG SER THR ASN THR PHE ASN TYR ALA THR TYR HIS
THR LEU ASP GLU ILE TYR ASP PHE MET ASP LEU LEU VAL
ALA GLU HIS PRO GLN LEU VAL SER LYS LEU GLN ILE GLY
ARG SER TYR GLU GLY ARG PRO ILE TYR VAL LEU LYS PHE
SER THR GLY GLY SER ASN ARG PRO ALA ILE TRP ILE ASP
LEU GLY ILE HIS SER ARG GLU TRP ILE THR GLN ALA THR
GLY VAL TRP PHE ALA LYS LYS PHE THR GLU ASP TYR GLY
GLN ASP PRO SER PHE THR ALA ILE LEU ASP SER MET ASP
ILE PHE LEU GLU ILE VAL THR ASN PRO ASP GLY PHE ALA
PHE THR HIS SER GLN ASN ARG LEU TRP ARG LYS THR ARG
SER VAL THR SER SER SER LEU CYS VAL GLY VAL ASP ALA
ASN ARG ASN TRP ASP ALA GLY PHE GLY LYS ALA GLY ALA
SER SER SER PRO CYS SER GLU THR TYR HIS GLY LYS TYR
ALA ASN SER GLU VAL GLU VAL LYS SER ILE VAL ASP PHE
VAL LYS ASP HIS GLY ASN PHE LYS ALA PHE LEU SER ILE
HIS SER TYR SER GLN LEU LEU LEU TYR PRO TYR GLY TYR
THR THR GLN SER ILE PRO ASP LYS THR GLU LEU ASN GLN
VAL ALA LYS SER ALA VAL ALA ALA LEU LYS SER LEU TYR
GLY THR SER SER TYR LYS TYR GLY SER ILE ILE THR THR ILE
TYR GLN ALA SER GLY GLY SER ILE ASP TRP SER TYR ASN
GLN GLY ILE LYS TYR SER PHE THR PHE GLU LEU ARG ASP
THR GLY ARG TYR GLY PHE LEU LEU PRO ALA SER GLN ILE
ILE PRO THR ALA GLN GLU THR TRP LEU GLY VAL LEU THR
ILE MET GLU HIS THR VAL ASN ASN
```



Per farsi un'idea della struttura tridimensionale della proteina, tuttavia, è necessario conoscere i successivi tre gradi di organizzazione della catena. Chiamiamo **struttura secondaria** il modo in cui gli amminoacidi adiacenti si dispongono nello spazio, determinando il ripiegamento della catena: le conformazioni preferite sono l'alfa-elica e la conformazione beta, entrambe stabilizzate da numerosi legami a idrogeno.

La forma assunta dalla catena nel suo complesso è detta **struttura terziaria**. L'aspetto generale di un enzima è quello di un gomitolo. Si noti la presenza di tratti della catena meno organizzati (a gomitolo casuale), che intercalano i tratti alfa e beta.

Per capire come sono fatte le proteine oligomeriche, formate da più catene o subunità tenute insieme da legami non covalenti, bisogna descrivere il modo in cui tali subunità sono disposte l'una rispetto all'altra (**struttura quaternaria**).



1.3 I cofattori

Tutti gli enzimi sono costituiti da una o più catene polipeptidiche, aventi una struttura terziaria di tipo globulare. Per l'attività di alcuni di essi, tuttavia, è essenziale la presenza di componenti di natura NON PROTEICA, detti COFATTORI.

Tipo di cofattore	Funzione	Esempi
Ione metallico	Centro catalitico principale	Fe ⁺⁺ della catalasi
	Favorisce il legame tra substrato ed enzima, mediante formazione di un complesso di coordinazione	Zn ⁺⁺ della carbossipeptidasi
	Stabilizza la conformazione cataliticamente attiva dell'enzima	K ⁺ della piruvato chinasi
Coenzima	Trasportatore di atomi	NAD ⁺ , FAD
	Trasportatore di elettroni	NAD ⁺ , FAD
	Trasportatore di gruppi funzionali	ATP, CoASH

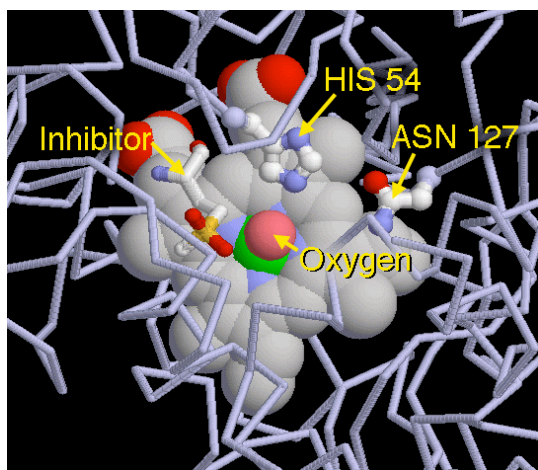
Un coenzima è una molecola organica a basso peso molecolare, che viene sintetizzata a partire da una VITAMINA.

Catalasi

Vivere con l'ossigeno è pericoloso. Noi lo utilizziamo per produrre energia nelle nostre cellule, ma l'ossigeno è una molecola molto reattiva che può provocare problemi seri se non viene tenuta strettamente sotto controllo. Uno dei pericoli maggiori nasce dal fatto che l'ossigeno può essere convertito facilmente in altri composti molto reattivi. Nelle nostre cellule gli elettroni vengono continuamente trasportati da un luogo all'altro da molecole trasportatrici di elettroni, come i citocromi, il coenzima Q o il FAD e il NAD che contengono rispettivamente riboflavina e niacina (vitamina B2 e B3). Se l'ossigeno incontra uno di questi trasportatori, può catturare accidentalmente un elettrone. Questo converte l'ossigeno in composti pericolosi come i radicali superossido e l'acqua ossigenata che attaccano e ossidano i delicati atomi di zolfo e gli ioni dei metalli nelle proteine. A peggiorare la situazione, gli ioni ferro liberi nella cellula talvolta convertono l'acqua ossigenata in radicali idrossido. Questi sono ancora più pericolosi e attaccano e mutano il DNA. Una teoria, ancora controversa, dice che questo tipo di danno ossidativo si accumula negli anni durante la nostra vita, causando l'invecchiamento.

Fortunatamente, le cellule sintetizzano una varietà di enzimi antiossidanti per contrastare gli effetti collaterali pericolosi della vita con l'ossigeno. I due più importanti sono la [superossido dismutasi](#) che converte i radicali superossido in acqua ossigenata e ossigeno molecolare e la catalasi che converte l'acqua ossigenata in acqua e ossigeno molecolare. L'importanza di questi enzimi è dimostrata dalla loro abbondanza, che varia da circa lo 0.1% delle proteine in una cellula di *Escherichia coli* ad un quarto delle proteine nei tipi di cellule più sensibili. Questa moltitudine di molecole di catalasi pattuglia la cellula, aggredisce le molecole di acqua ossigenata che vengono continuamente prodotte e le mantiene ad un livello di sicurezza.

Le catalasi sono tra gli enzimi più veloci che si conoscono. Ogni molecola di catalasi può decomporre milioni di molecole di acqua ossigenata al secondo. La catalasi bovina mostrata qui ([archivio PDB 8cat](#)) e la nostra catalasi usano uno ione ferro per realizzare la loro reazione. L'enzima è composto di quattro subunità identiche, ognuna col suo proprio sito attivo nascosto in profondità. Lo ione ferro, mostrato in verde è legato al centro di un gruppo eme a forma di disco. Siccome le catalasi devono distruggere molecole molto reattive, sono anche enzimi insolitamente stabili. Notate che le quattro atene sono intrecciate e bloccano così l'intero complesso nella forma corretta.



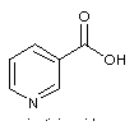
La catalasi compie la sua rapida azione di distruzione dell'acqua ossigenata in due tappe. Nella prima fase, una molecola di acqua ossigenata si lega all'enzima e viene spezzata. Un atomo di ossigeno viene estratto e legato all'atomo di ferro, ed il resto della molecola viene rilasciato come semplice acqua. Nella seconda fase, un'altra molecola di acqua ossigenata si lega all'enzima. Anche questa viene spezzata e l'ossigeno estratto viene combinato con l'atomo di ossigeno legato al ferro. Infine viene rilasciata acqua e ossigeno gassoso O₂.

Nell'archivio PDB [2cag](#) è rappresentata la catalasi nel mezzo di questa reazione a due tappe. L'atomo di ossigeno è legato al ferro, pronto per legarsi alla seconda molecola di acqua ossigenata. Gli amminoacidi istidina e asparagina mostrati qui aiutano la reazione. La piccola molecola sulla sinistra è un inibitore che i ricercatori hanno usato per bloccare l'enzima in questa forma significativa, dando così loro il tempo necessario per studiarla.

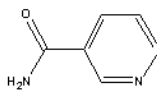
1.4 Perché le vitamine sono importanti?

A questa domanda viene spesso data una risposta un po' vaga: "le vitamine sono essenziali per la regolazione delle funzioni dell'organismo". Ora il mistero può essere svelato: molte vitamine sono indispensabili perché costituiscono parti di molecole più complesse che svolgono la funzione di COENZIMI in stadi cruciali del metabolismo.

Le conseguenze della carenza della VITAMINA PP (acido nicotinico o niacina), ad esempio, nella dieta sono note da molto tempo: la PELLAGRA era una malattia non infettiva endemica tra i bambini poveri, anche nei paesi industrializzati, fino alla seconda guerra mondiale. Per sconfiggerla, basta arricchire la dieta con cibi proteici (carne, uova, latte,...), che forniscono all'organismo il naturale precursore dell'acido nicotinico: l'amminoacido triptofano.



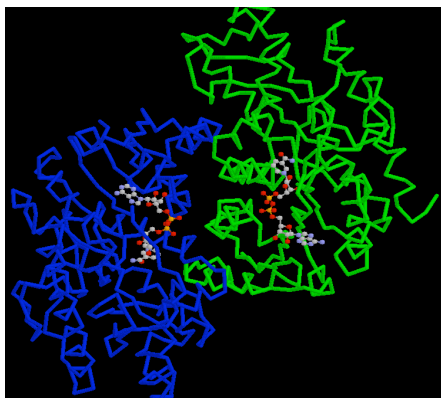
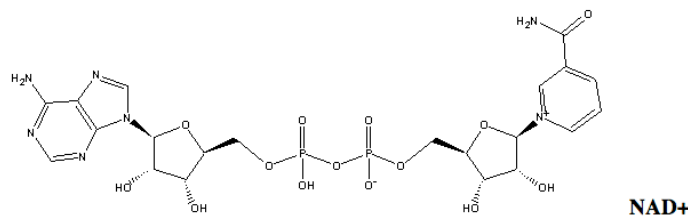
Acido nicotinico



Ammide dell'acido nicotinico

L'acido nicotinico è una delle materie prime necessarie per la sintesi del nicotinammide adenina dinucleotide, più comunemente noto con la sigla NAD⁺.

Il NAD⁺, coenzima di molte ossidoriduttasi (come la *malato deidrogenasi*), funziona da accettore di elettroni durante la rimozione enzimatica di atomi di idrogeno (ossidazione) da specifiche molecole di substrato, trasformandosi nella corrispondente forma ridotta NADH (che ha un atomo di idrogeno in più, legato in posizione 4 dell'anello piridinico).



COMPLESSO TRA L'ENZIMA MALATO DEIDROGENASI E IL NAD

Sono rappresentate (con colori diversi) le catene principali di due subunità, ciascuna delle quali ha legato una molecola del coenzima NAD⁺. Per evidenziare meglio quest'ultimo, è stata scelta una rappresentazione "ball and stick", in cui a colori diversi corrispondono elementi diversi (grigio = carbonio; rosso = ossigeno; azzurro = azoto; giallo = fosforo).

1.5 Il sito attivo

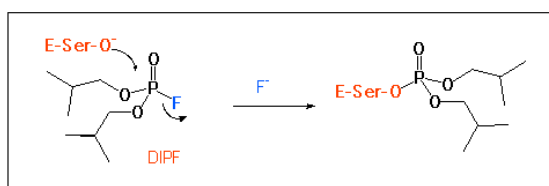
Il **sito attivo** è la **porzione dell'enzima più direttamente coinvolta nella catalisi**. Normalmente le dimensioni di un enzima sono molto superiori a quelle del substrato (almeno dieci volte). Talvolta gli enzimi agiscono su molecole molto grandi (come il DNA), ma anche in questi casi si legano soltanto con una piccola parte di quelle molecole.

Quasi sempre è fisicamente costituito da una cavità che si apre nella superficie della macromolecola; la sua forma è tale che il substrato può adattarsi agevolmente e, una volta entrato, vi viene trattenuto mediante svariati legami di tipo non covalente (legami a idrogeno, forze attrattive tra ioni di carica opposta, forze di Van der Waals). Questi legami sono possibili soltanto grazie alle caratteristiche strutturali del substrato e pertanto contribuiscono ad identificarlo (*modello chiave-serratura*). Inoltre lo mantengono in una posizione favorevole per le successive trasformazioni. Sulle pareti di tale cavità si affacciano le catene laterali degli **amminoacidi** che partecipano attivamente alla catalisi e che contengono:

- gruppi donatori o accettori di ioni idrogeno, cioè acidi o basi di Brønsted (-COOH, imidazolo)
- gruppi capaci di agire da nucleofili (-OH, -SH)
- gruppi idrofobici (anello benzenico), che possono interagire con gruppi apolari del substrato o semplicemente ostacolare l'ingresso dell'acqua, in modo che il substrato si presenti alla reazione non solvatato.

IDENTIFICAZIONE DEI GRUPPI FUNZIONALI ESSENZIALI PER L'ATTIVITA' CATALITICA

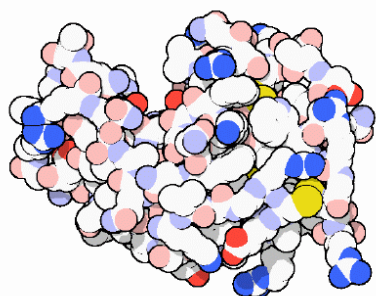
Si tratta l'enzima con un reattivo capace di modificare covalentemente uno dei gruppi funzionali presenti nelle catene laterali dei residui amminoacidi. Se l'attività enzimatica ne risulta danneggiata, è molto probabile che quel gruppo funzionale sia essenziale per la catalisi. Ad es., il diisopropilfluorofosfato (DIPF) è un reagente che ha un'elevata tendenza a combinarsi con gli ossidrili alcolici come quello dell'amminoacido SERINA, trasformandoli in esteri fosforici:



Anche se l'enzima contiene più residui di serina, non tutti saranno modificati, ma soltanto quelli più esposti ed in particolare quelli che si affacciano sul SITO ATTIVO, in quanto più facilmente accessibili dall'esterno. In questo modo è stato possibile confermare l'importanza del ruolo svolto dalla serina nel ciclo catalitico di molti enzimi.

La POSIZIONE dell'amminoacido modificato all'interno della struttura primaria può essere determinata dopo parziale idrolisi della catena polipeptidica e successiva analisi dei frammenti ottenuti.

In un secondo tempo, un'indagine sulla struttura tridimensionale dell'enzima può mettere in evidenza altri gruppi funzionali che vengono a trovarsi SPAZIALMENTE VICINI a quello già individuato e che, grazie alla loro particolare natura, possono appoggiarne l'azione. Comincia così a prendere corpo il modello detto meccanismo di reazione.



Liiozima

Il liiozima ci protegge dal continuo pericolo delle infezioni batteriche. E' un piccolo enzima che attacca la parete cellulare dei batteri. I batteri costruiscono un robusto rivestimento di catene di carboidrati legate trasversalmente da piccole catene peptidiche, che avvolge la loro delicata membrana per difenderla dalla forte pressione osmotica interna della cellula. Il liiozima rompe queste catene di carboidrati, distruggendo l'integrità strutturale della parete cellulare e quindi i batteri esplodono per la loro stessa pressione interna.

Alexander Fleming ha scoperto il liiozima mentre stava svolgendo una ricerca mirata per scoprire farmaci antibiotici. Egli ha continuato per anni ad aggiungere alle colture batteriche tutto quello che gli veniva in mente, cercando qualcosa che ne rallentasse la crescita. Fleming ha scoperto il liiozima per caso, un giorno, mentre aveva un forte raffreddore, ha aggiunto una goccia di muco

ad una coltura e con sua grande sorpresa i batteri sono morti. Egli ha scoperto una delle nostre difese naturali contro le infezioni. Sfortunatamente il liiozima è una molecola troppo grande e non è utilizzabile come medicinale. Può essere applicato localmente, ma non può liberare tutto il corpo dalla malattia, perchè è troppo grande per muoversi tra le cellule. Per fortuna Fleming ha continuato la sua ricerca fino a quando, cinque anni dopo, ha scoperto un vero farmaco antibiotico: la penicillina.

Il liiozima protegge molti posti ricchi di cibo potenziale con il quale potrebbero crescere dei batteri. Il liiozima mostrato qui sopra è stato estratto dall'albume di uovo di gallina, dove protegge le proteine e i grassi che servono a nutrire il pulcino che si sta formando. Questo liiozima è stato il primo enzima di cui è stata risolta la struttura ed ora è disponibile all'archivio PDB [2lyz](#). Le nostre lacrime e il nostro muco contengono liiozima per combattere le infezioni nelle nostre superfici più esposte. Il nostro sangue è il posto peggiore dove i batteri possono crescere, poichè verrebbero trasportati in tutti gli angoli del corpo. Nel sangue il liiozima fornisce una certa protezione, insieme con le armi ancora più potenti utilizzate dal sistema immunitario.

2. Le prestazioni: l'efficienza e la specificità

2.1 L'efficienza

Gli enzimi sono dotati di un **enorme potere catalitico**. La velocità delle reazioni catalizzate da enzimi può essere MILIARDI di volte maggiore di quella delle stesse reazioni non catalizzate.

Cosa vuol dire aumentare la velocità di una reazione di un miliardo di volte? Che se quella reazione va a completezza in 1 secondo in presenza dell'enzima, in sua assenza richiederà quasi 32 anni! Ad es., senza gli enzimi proteolitici, che catalizzano la demolizione delle proteine, occorrerebbero 50 anni per digerire un pasto!

Soltanto tale efficienza può spiegare perchè nelle condizioni cellulari (pH circa neutro, temperature moderate, concentrazioni dei reagenti non molto alte) hanno luogo reazioni che, condotte in laboratorio, richiederebbero condizioni drastiche (pH estremi, temperature molto alte, concentrazioni elevate).

Gli enzimi riescono ad accelerare le reazioni perchè fanno seguire loro un **cammino diverso**, lungo il quale le barriere di energia da superare sono molto più basse.

I FATTORI ritenuti responsabili di tale efficienza sono:

- la PROSSIMITA' e l'ORIENTAZIONE
- la CATALISI COVALENTE
- la CATALISI ACIDO-BASE
- l'AMBIENTE IDROFOBICO del SITO ATTIVO
- la TENSIONE STERICA
- la COOPERATIVITA' di AZIONE dei GRUPPI FUNZIONALI

NESSUN fattore può giustificare DA SOLO l'efficienza di TUTTI gli enzimi. Ogni enzima deve la propria efficienza ad una SPECIFICA COMBINAZIONE di più fattori.

La **cinetica** insegna che:

- affinché due molecole possano reagire, devono venire a contatto tra loro (requisito della **PROSSIMITA'**)
- affinché si verifichi la rottura e/o la formazione di un legame, non basta che due molecole vengano in contatto, ma è necessario che esse siano correttamente orientate (requisito dell'**ORIENTAZIONE**)

Gli **enzimi** applicano quello che la cinetica insegna:

- prima che abbia luogo la reazione vera e propria, l'enzima si lega al substrato, di solito in più punti. Pertanto, la **CONCENTRAZIONE EFFETTIVA** di quest'ultimo nel sito attivo è molto maggiore di quella esistente nella massa della soluzione. Inoltre, il legame destinato a rompersi viene a trovarsi **MOLTO VICINO** ai gruppi funzionali coinvolti nella catalisi.
- l'enzima impone al substrato di orientarsi rispetto ai gruppi cataliticamente attivi in modo tale che gli orbitali di legame si sovrappongano correttamente. Quando la rottura del vecchio legame e la formazione di quello nuovo avvengono in modo concertato, il complesso enzima-substrato evolve più facilmente nello stato di transizione.

INFLUENZA DEI REQUISITI STERICI SULLA VELOCITA' DELLE REAZIONI CHIMICHE

Un esempio famoso di reazione in cui il fattore stereochimico gioca un ruolo importante è fornito dalla **SOSTITUZIONE NUCLEOFILA BIMOLECOLARE** al carbonio saturo (S_N2). Il meccanismo **CONCERTATO** proposto per tale reazione prevede che nello stato di transizione la formazione del nuovo legame tra il nucleofilo ed il carbonio avvenga **SIMULTANEAMENTE** alla rottura del vecchio legame tra il carbonio ed il gruppo uscente.

I risultati stereochimici del processo sono visualizzati a livello molecolare come un avvicinamento del nucleofilo, con in testa il suo orbitale contenente la coppia elettronica non condivisa, **IN LINEA** con l'asse dell'orbitale che porta il gruppo uscente e **DALLA PARTE OPPOSTA** rispetto a quest'ultimo. A mano a mano che il nucleofilo si avvicina, la densità elettronica aumenta gradualmente nella zona compresa tra il carbonio centrale ed il nucleofilo entrante, mentre diminuisce dalla parte del gruppo uscente.

Un **URTO** tra una molecola di substrato ed una di nucleofilo che non rispettasse questi requisiti sarebbe **NON EFFICACE**, cioè non potrebbe portare alla formazione dei prodotti. In generale, quanto maggiori sono le pretese di una reazione riguardo all'orientazione relativa dei reagenti, tanto più difficile sarà che un loro urto casuale, anche se violento, porti al risultato desiderato.

2.1.1 La catalisi covalente

Si parla di catalisi covalente quando il substrato viene convertito dal catalizzatore in un intermedio covalente molto reattivo, che viene successivamente trasformato nel prodotto finale. La reazione avviene pertanto in due stadi, tuttavia entrambi sono PIU' VELOCI del singolo stadio non catalizzato.

Reazione catalizzata a due stadi (veloce)	Reazione non catalizzata a singolo stadio (lenta)
stadio a: chimotripsina + p-nitrofenilacetato → acetilchimotripsina + p-nitrofenolo	p-nitrofenilacetato + acqua → acido acetico + p-nitrofenolo
stadio b: acetilchimotripsina + acqua → acido acetico + chimotripsina	

Talvolta, utilizzando substrati particolari, è stato possibile isolare l'intermedio covalente: l'analisi mediante raggi X dei suoi cristalli ha dimostrato che, nel caso di chimotripsina, tripsina ed elastasi, il substrato si lega all'OH del residuo di Serina 195, portando un'importante prova a favore della partecipazione attiva di quel gruppo alla catalisi.

Tra i GRUPPI FUNZIONALI che consentono agli enzimi di realizzare questo tipo di catalisi spiccano i BUONI NUCLEOFILI:

Natura dell'intermedio	Gruppo funzionale e corrispondente amminoacido	Esempi
Estere	-OH della Serina	proteasi seriniche (chimotripsina, tripsina, elastasi)
Tioestere	-SH della Cisteina	gliceraldeide-fosfato deidrogenasi
Base di Schiff	-NH ₂ della Lisina	fruttosio-difosfato aldolasi
3-fosfoistidina	Imidazolo dell'Istidina	succinil-CoA sintetasi

2.1.2 La catalisi acido-base

Alcune reazioni, per aver luogo a velocità ragionevoli, richiedono concentrazioni di H₃O⁺ o di OH⁻ molto elevate (ad es. l'idrolisi degli esteri e delle ammidi). A pH vicini alla neutralità, invece, esse possono essere accelerate mediante catalisi acido-base di tipo **generale**, cioè esercitata da tutti i donatori o accettori di protoni, capaci di favorire il trasferimento di uno ione idrogeno nello stadio determinante la velocità di reazione. Tali **donatori** e **accettori** sono spesso presenti nei residui degli aminoacidi costituenti gli enzimi:

NH ₃ ⁺ o NH ₂	arginina, lisina
COOH o COO ⁻	acido aspartico, acido glutammico
SH o S ⁻	cisteina
ArOH o ArO ⁻	tirosina
Imidazolo o sua base coniugata	istidina

E' curioso il fatto che l'**istidina** sia un aminoacido piuttosto raro nelle proteine non enzimatiche, mentre è abbastanza comune negli enzimi e risulta molto spesso indispensabile per la loro attività catalitica. Ciò potrebbe essere spiegato col fatto che l'imidazolo contenuto nell'istidina ha un pKa di circa 6: pertanto ai valori fisiologici del pH può essere presente sia nella forma protonata (che agisce da acido) sia nella forma non protonata (che agisce da base).

L'esistenza di un'efficiente catena di trasporto degli ioni idrogeno rappresenta una delle differenze più importanti tra l'idrolisi non enzimatica delle catene polipeptidiche e quella catalizzata dalle proteasi.

2.1.3 La polarità del sito attivo

La separazione di carica in molecole organiche è per lo più associata alla presenza o di cariche formali o di legami covalenti polari. Tuttavia, anche le molecole che non hanno un momento dipolare permanente possono essere polarizzate sotto l'influenza di un campo elettrico esterno. La **polarizzabilità** delle molecole indica la loro capacità di deformare le nubi elettroniche di legame e di non legame in modo tale che la distribuzione media degli elettroni è diversa da quella che si ha in assenza del campo elettrico perturbante.

La polarizzazione delle nuvole elettroniche (permanente o indotta) gioca un ruolo fondamentale nelle reazioni chimiche, in quanto determina l'intensità delle forze attrattive o repulsive che aiutano la rottura dei vecchi legami e la formazione di quelli nuovi. Tale intensità dipende anche dalla **natura del mezzo** in cui le molecole si trovano disperse: in un solvente polare (come l'acqua) essa è molto minore che in un solvente apolare.

Molto spesso la cavità del sito attivo di un enzima è un ambiente poco polare (come nella *catalasi*), caratterizzato cioè da una bassa costante dielettrica: i gruppi cataliticamente attivi ed il legame suscettibile di rottura **risultano più facilmente polarizzabili** di quanto non sarebbero se si trovassero circondati da molecole molto polari, come accade in una soluzione acquosa. In altri casi, invece, alcune molecole d'acqua riescono a penetrare all'interno dell'enzima e a formare, mediante legami a idrogeno, degli utili **ponti** tra l'enzima stesso ed il substrato o il coenzima.

2.1.4 La tensione sterica

Si dice che una molecola è SOTTO TENSIONE quando i suoi atomi sono disposti nello spazio in modo tale che alcuni degli angoli di legame hanno un valore diverso da quello ottimale.

Esempi celebri sono costituiti da alcuni composti ciclici come gli epossidi, in cui l'anello a 3 termini è altamente in tensione e può essere aperto anche in condizioni molto blande: ciò dimostra che i legami C-O sono molto più deboli che nei normali eteri non ciclici. Alcune osservazioni sperimentali fanno pensare che un enzima, coordinandosi al substrato, possa subire un **cambiamento di conformazione** capace di indurre nel substrato stesso una DISTORSIONE che indebolirebbe il legame suscettibile di attacco, **facilitandone la rottura**.

2.1.5 La cooperatività dei gruppi cataliticamente attivi

La DISPOSIZIONE SPAZIALE dei gruppi funzionali che partecipano alla catalisi e la loro ORIENTAZIONE RELATIVA rispetto al substrato fanno sì che ognuno di essi eserciti la propria azione specifica in MODO CONCERTATO con quella degli altri, aumentandone l'efficacia.

L'obiettivo di questo lavoro di squadra è l'ABBASSAMENTO dell'ENERGIA di ATTIVAZIONE della reazione e quindi l'aumento della velocità.

2.2 La specificità

• SPECIFICITA' di SUBSTRATO

Alcuni enzimi agiscono soltanto su un certo substrato, altri attaccano un gruppo di molecole, aventi però almeno un fattore strutturale simile (di solito il legame chimico suscettibile di rottura), anche se con velocità diverse.

• SPECIFICITA' di REAZIONE

Gli enzimi sottopongono il substrato soltanto ad un certo tipo di trasformazione, senza dar luogo a reazioni collaterali.

• STEREOSPECIFICITA'

Rappresenta un livello di ulteriore perfezionamento dei tipi di specificità precedenti. A volte, infatti, reagenti e/o prodotti diversi differiscono tra loro soltanto per la disposizione spaziale dei gruppi. Molti enzimi attaccano uno solo dei membri di una famiglia di diastereoisomeri, oppure riescono a trasformare un substrato non asimmetrico, ma prochirale, in uno solo dei possibili prodotti diastereoisomeri.

• IL MODELLO CHIAVE-SERRATURA

Rappresenta il primo tentativo di spiegazione della straordinaria specificità degli enzimi.

• IL MODELLO dell'ADATTAMENTO INDOTTO

E' un modello più dinamico del precedente, poichè tiene conto dei cambiamenti conformazionali subiti dagli enzimi durante il loro ciclo catalitico.

2.2.1 La specificità di substrato

Non tutti gli enzimi mostrano lo stesso grado di specificità nei confronti del substrato.

Un esempio di enzima altamente specifico è fornito dall'UREASI, che catalizza solamente l'idrolisi dell'urea:



Invece l'ESOCINASI, che catalizza nel primo stadio della glicolisi la fosforilazione del D-glucosio, accetta come substrati anche molti altri esosi (D-fruttosio, D-mannosio,...).

Si preferisce parlare di specificità di legame quando un enzima mostra una spiccata tendenza ad attaccare un certo tipo di legame (ad es. peptidico), indipendentemente o quasi dalla struttura della quale esso fa parte.

Tra gli enzimi proteolitici, la [tripsina](#) idrolizza solo i legami peptidici adiacenti ad un residuo degli amminoacidi lisina ed arginina. La chimotripsina, invece, idrolizza i legami adiacenti a diversi amminoacidi con catene laterali di grosse dimensioni ed idrofobiche. La CARBOSSYPEPTIDASI è molto meno specifica, in quanto catalizza l'idrolisi del legame peptidico C-terminale di peptidi di varia lunghezza, **indipendentemente** dalla natura dell'amminoacido C-terminale.

2.2.2 La specificità di reazione

Gli enzimi favoriscono una particolare reazione tra le molte che potrebbero coinvolgere i medesimi substrati.

In questo modo guidano la sequenza delle reazioni secondo un cammino ben definito, verso la formazione di prodotti che vengono successivamente utilizzati in altri processi.

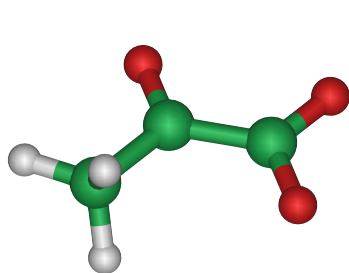
Se gli enzimi catalizzassero, oltre alla reazione principale, anche delle reazioni collaterali, si verificherebbe uno spreco di energia chimica ed i relativi sottoprodotti, metabolicamente inutili se non tossici, ben presto intaserebbero le cellule.

Si pensi che in un'ipotetica sequenza metabolica lineare costituita da dieci passaggi, ognuno dei quali caratterizzato da un rendimento del 90%, la resa complessiva sarebbe solamente di circa il 35% !

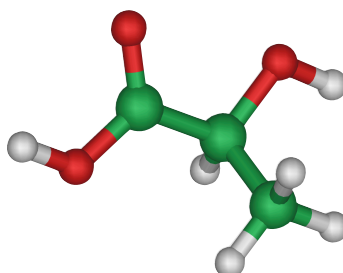
Tale specificità è in gran parte imputabile alla struttura del sito attivo: spesso nelle reazioni chimiche si formano composti intermedi altamente energetici, che, se non sono isolati dall'acqua e da altre sostanze reattive, si decompongono in reazioni collaterali che abbassano il rendimento.

2.2.3 La stereospecificità

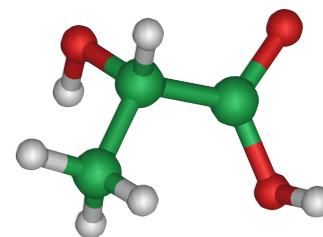
L'enzima [LATTATO DEIDROGENASI](#) catalizza l'ossidazione dell'acido L-lattico, ma NON dell'enantiomero D. Nella reazione inversa il piruvato, molecola PROCHIRALE caratterizzata da un piano di simmetria, viene ridotto SOLAMENTE a L-lattato. Ciò vuol dire che l'atomo di idrogeno ceduto dal coenzima NADH attacca l'atomo di carbonio carbonilico soltanto da UNA PARTE del piano che contiene il gruppo funzionale. Se l'enzima non fosse capace di DISCRIMINARE le due facce della molecola, si otterrebbe una miscela racemica di L- e D-lattato, come accade nelle normali riduzioni di laboratorio. Questa abilità viene spiegata con la caratteristica DISPOSIZIONE SPAZIALE NON SIMMETRICA dei gruppi che nel sito attivo contribuiscono a riconoscere il substrato ed a bloccarlo, prima di sottoporlo alla catalisi vera e propria. E' l'interazione del piruvato con il sito attivo, necessaria per la formazione del complesso enzima-substrato, a rendere le due facce della molecola NON PIU' EQUIVALENTI. Per di più è stato dimostrato che l'atomo di idrogeno trasferito dall'acido lattico al NAD⁺ si lega soltanto da una parte dell'anello nicotinamidico, indicando che nel sito catalitico substrato e coenzima devono possedere una specifica orientazione stereochimica l'uno rispetto all'altro.



ACIDO PIRUVICO

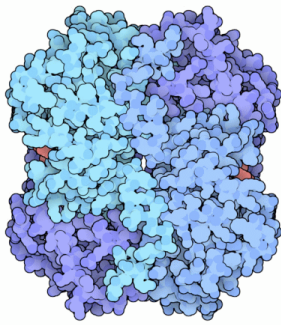


ACIDO L(S)-LATTICO



ACIDO D(R)-LATTICO

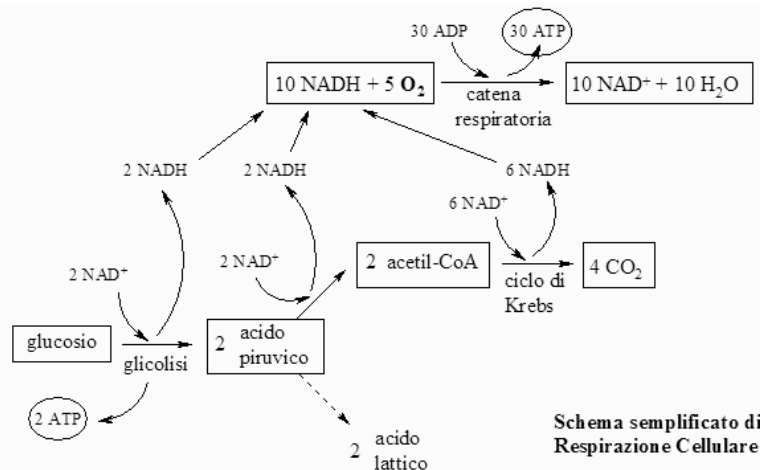
Lattato deidrogenasi



L'enzima lattato deidrogenasi è una valvola di sicurezza nella nostra linea di produzione di energia. Per la maggior parte del tempo le nostre cellule degradano completamente il glucosio trasformandone gli atomi di carbonio in anidride carbonica, CO_2 , e gli atomi di idrogeno in acqua, H_2O .

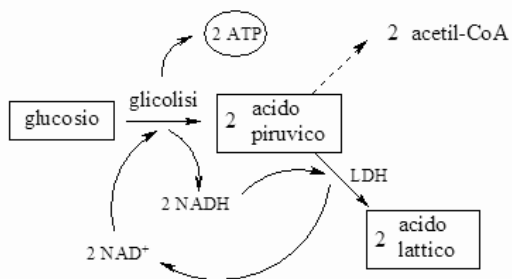
Questo processo di ossidazione, però, richiede molto ossigeno, quindi, quando il suo apporto non è sufficiente, la linea di produzione dell'energia deve essere fermata alla fine della **glicolisi**. L'enzima lattato deidrogenasi è la via con la quale le cellule risolvono, almeno temporaneamente, questo problema.

Quando facciamo un **esercizio fisico aerobico** il nostro respiro si fa più frequente, il cuore batte più velocemente e alle nostre cellule arriva una grande quantità di ossigeno. Questo viene utilizzato come ossidante per trasformare il glucosio in acqua e CO_2 con una sequenza di reazioni che è chiamata **respirazione cellulare** che serve a produrre energia sotto forma di ATP.



Quando, però, l'esercizio fisico è molto intenso, come nella corsa veloce, le cellule non hanno abbastanza ossigeno per produrre tutta l'energia che serve. In questo caso usano la glicolisi come fonte primaria di energia. Anche la glicolisi, però, è un processo ossidativo, in uno dei suoi passaggi un idrogeno è trasferito dal glucosio al NAD^+ per formare NADH . Normalmente questi atomi di idrogeno sono poi trasferiti all'ossigeno per formare acqua. Se, però, l'ossigeno non è disponibile, il NADH si accumula e quindi non c'è abbastanza NAD^+ per continuare la glicolisi e produrre ATP.

A questo punto entra in azione l'enzima lattato deidrogenasi (LDH) che consente di ossidare il NADH a NAD^+ utilizzando come molecola ossidante, al posto dell'ossigeno, il prodotto stesso della glicolisi, l'acido piruvico, che viene ridotto ad acido lattico secondo la reazione:



Anche se si producono solo 2 ATP per ogni glucosio, la reazione è talmente veloce che si ottengono 10 volte più ATP al secondo, l'ideale per una corsa molto veloce!

Il prezzo da pagare per eseguire questa reazione è la formazione di acido lattico: nel giro di uno o due minuti la sua concentrazione nei muscoli è così alta che ci costringe a fermarci, ansimando, per recuperare. Il respiro affannoso serve per convertire l'acido lattico in acido piruvico e quindi in glucosio, in una serie di reazioni che avvengono nel fegato e richiedono ossigeno. Il glucosio torna poi alle cellule dove viene convertito in energia in modo aerobico.

Le nostre cellule sintetizzano due tipi di lattato deidrogenasi: la forma M e la forma H (esiste anche una terza forma che viene prodotta solo nello sperma). Queste forme sono molto simili per dimensioni e struttura, ma hanno diverse proprietà catalitiche. La forma M, che è la più comune nei muscoli scheletrici, è la migliore per convertire il piruvato in lattato. E' sempre pronta ad entrare in funzione se il muscolo deve compiere lavoro anaerobico. La forma H, invece, è la migliore per realizzare la reazione opposta, cioè per convertire lattato in piruvato. E' la forma più comune nel cuore, che ha un costante apporto di ossigeno e quindi può usare l'acido lattico come fonte di energia aerobica. I due tipi hanno una struttura così simile che possono anche formare complessi misti, per esempio con due catene H e due catene M. In questo modo cellule diverse possono costruirsi dei complessi di lattato deidrogenasi su misura a seconda delle loro reali necessità. La molecola mostrata qui, dal file PDB [3ldh](#), è la forma con quattro catene M identiche.

2.2.4 Il modello chiave-serratura

Qual è il miglior substrato per un dato enzima?

È quello che meglio si adatta alla struttura del sito attivo, così come una **chiave** deve adattarsi alla forma della sua **serratura**. Enzima e substrato vengono così paragonati ai pezzi di un gioco ad incastro tridimensionale, dal quale vengono esclusi i composti che non hanno la giusta dimensione, forma o distribuzione delle cariche.

Su quest'ipotesi di complementarità si fonda la **tecnica della mappatura**, che si propone di dedurre la struttura del sito attivo di un enzima dalle caratteristiche strutturali del suo substrato e dei suoi inibitori competitivi. Il modo ideale di studiare le relazioni spaziali tra enzima e substrato sarebbe l'analisi ai raggi X di un cristallo del loro complesso; purtroppo, ciò di solito non è possibile, poiché alla formazione del complesso segue rapidamente la reazione vera e propria, che trasforma il substrato in prodotto.

Nonostante i buoni risultati ottenuti, il modello chiave-serratura è stato criticato perché ipotizza per il sito attivo una struttura **rigida**, che non potrebbe adattarsi altrettanto bene sia al substrato sia al prodotto, come richiesto da un processo reversibile. Alcuni pensano che in realtà il sito attivo si adatti perfettamente soltanto allo stato di transizione, altri propongono un modello alternativo, l'**adattamento indotto**.

2.2.5 Il modello dell'adattamento indotto

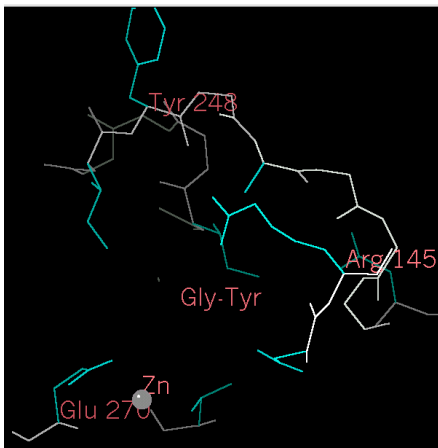
La moderna cristallografia a raggi X ha rivelato che la conformazione dell'enzima **carbossipeptidasi** con il sito attivo libero è significativamente **diversa** da quella dell'enzima saturato con un substrato poco reattivo o con un inibitore competitivo.

Molti enzimi stranamente non attaccano gli omologhi più piccoli dei loro substrati abituali, che pure dovrebbero accedere più facilmente al sito attivo. Ad es. l'esocinasi fosforila l'OH in posizione 6 di molti esosi, ma non quello della gliceraldeide o quelli del glicerolo.

Osservazioni come quelle sopra riportate hanno portato a formulare l'ipotesi che talvolta i gruppi funzionali essenziali del sito attivo nell'enzima LIBERO non si trovino nelle posizioni ottimali per promuovere la catalisi. Sarebbe il LEGAME del substrato all'enzima a provocare il PASSAGGIO ad un'altra conformazione in cui gli stessi gruppi funzionali assumono una disposizione più favorevole. Tale conformazione ATTIVA è tuttavia instabile e, a reazione avvenuta, tende a convertirsi in quella originaria. Questo modello, insomma, assume che molti enzimi siano **flessibili** e che i substrati concorrano a determinarne la FORMA.

Carbossipeptidasi A

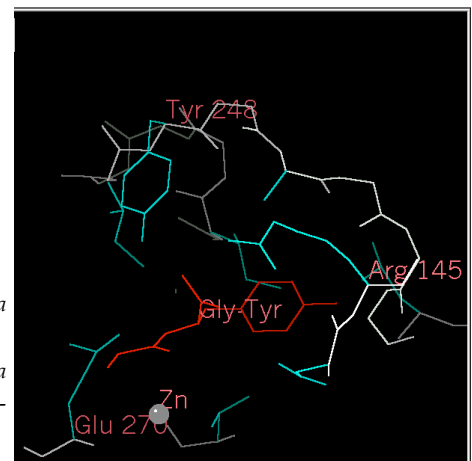
È un enzima digestivo che distacca dalle catene polipeptidiche gli aminoacidi ad uno ad uno, cominciando dall'estremità carbossilica.



Tra le catene laterali che si affacciano sulle pareti del sito attivo quelle più importanti per l'azione catalitica appartengono all'Arginina 145 (che con la sua carica positiva attira lo ione carbossilato del substrato), alla Tirosina 248 e all'Acido glutammico 270 (che mediante legami a idrogeno polarizzano il legame ammidico del substrato facilitandone la rottura). Partecipa all'attivazione ed all'orientazione del substrato anche uno ione Zinco.

Tuttavia nell'enzima libero tali gruppi NON HANNO la disposizione spaziale idonea per la catalisi.

Il legame col substrato (rappresentato nelle immagini da un semplice dipeptide) induce un cambiamento conformazionale che porta le catene laterali nella posizione reattiva.



3. L'influenza dell'ambiente

Se volessimo farci un'idea delle condizioni ambientali in cui gli enzimi si trovano ad operare, avremmo bisogno di conoscere numerosi parametri.

Alcuni tra questi possono influenzare la loro attività in misura rilevante:

- la concentrazione del substrato
- la temperatura
- il pH
- la presenza di inibitori e/o di attivatori.

3.1 La concentrazione del substrato

Viene espressa matematicamente dall'**equazione di Michaelis-Menten**, nella quale:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

v_0 = velocità iniziale
 v_{\max} = velocità iniziale massima
 K_M = costante di Michaelis-Menten
 $[S]$ = concentrazione molare del substrato

Quando la concentrazione del substrato è molto bassa, è possibile trascurare $[S]$ rispetto a K_M senza commettere un grosso errore. La velocità iniziale diventa allora direttamente proporzionale a $[S]$.

$$[S] \ll K_M \quad v_0 = \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot [S]$$

Quando la concentrazione del substrato è molto alta, si può trascurare K_M rispetto a $[S]$. La velocità iniziale raggiunge il suo valore massimo ed è **INDIPENDENTE** da $[S]$. Si dice che l'enzima lavora in condizioni di **SATURAZIONE**, in quanto è stato completamente convertito nel complesso col substrato ed ogni ulteriore aumento di $[S]$ risulta inefficace. Proprio questo fenomeno, caratteristico delle reazioni enzimatiche, ha indotto a formulare l'ipotesi della formazione reversibile del complesso enzima-substrato come 1° stadio della catalisi.

$$[S] \gg K_M \quad v_0 = v_{\max}$$

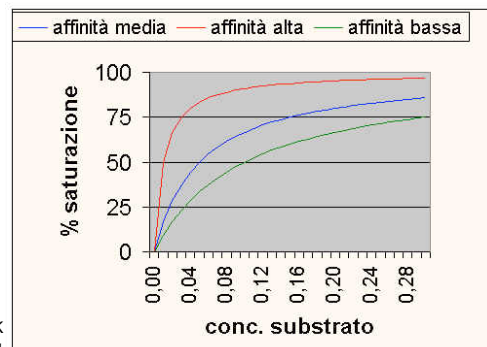
Di solito, nelle condizioni cellulari, la concentrazione del substrato è molto minore dei valori di saturazione. Così, ad es., quando $[S] = K_M$, l'enzima lavora al 50% delle sue possibilità.

$$[S] = K_M \quad v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{2 \cdot [S]} = \frac{v_{\max}}{2}$$

Il grafico completo, che rappresenta e riassume le considerazioni precedenti, è una curva monotona crescente che tende asintoticamente a raggiungere v_{\max} . Tuttavia la sua **FORMA** è profondamente influenzata dal valore di K_M . **MINORE** è K_M , più rapidamente viene raggiunta v_{\max} e quindi la saturazione. Ciò si spiega con una **MAGGIORE AFFINITA'** tra enzima e substrato.

K_M	$[S]$	$(v_0 / v_{\max}) 100$
0,01	0,1	90,9%
0,05	0,1	66,7%
0,1	0,1	50%

DIPENDENZA DELLA FORMA DELLA CURVA DI MICHAELIS-MENTEN DAL VALORE DI K_M
 Affinità alta: $K_M=0,01$; affinità media: $K_M=0,05$; affinità bassa: $K_M=0,1$

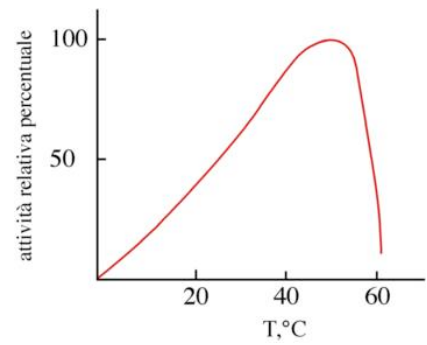


3.2 Effetto della temperatura sulla catalisi enzimatica

Finchè un enzima è stabile (capace di mantenere la conformazione attiva), la velocità della reazione che esso catalizza **AUMENTA CON LA TEMPERATURA** in modo esponenziale, come del resto avviene per ogni reazione normale.

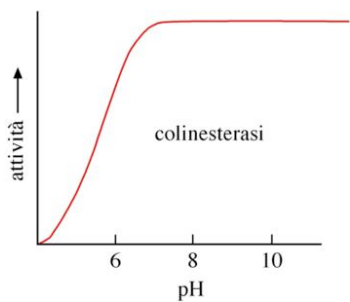
Tuttavia, superata una certa temperatura, si osserva un **RAPIDO CROLLO** dell'attività, dovuto ad un fenomeno comune a tutte le proteine: la **DENATURAZIONE TERMICA**. Il movimento sempre più frenetico degli atomi provoca la rottura dei legami deboli (**NON** dei legami peptidici), che aiutano l'enzima a mantenere la sua struttura terziaria globulare.

La dipendenza dell'attività dalla temperatura viene sfruttata in numerose applicazioni: ad es., nella **PASTORIZZAZIONE** e nella **STERILIZZAZIONE** il trattamento ad alte temperature permette di distruggere parzialmente o totalmente gli enzimi che impediscono la conservazione di molti alimenti.

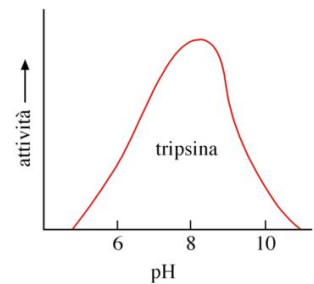


3.3 Effetto della variazione del pH sull'attività enzimatica

La maggior parte degli enzimi mostra un'attività **MASSIMA** ad un valore del pH ben definito, diverso da un enzima all'altro. Allontanandosi dal pH ottimale si provoca una diminuzione dell'attività, che può anche annullarsi: a valori estremi di pH gli enzimi, come tutte le proteine, si denaturano.



Anche se piuttosto rari, esistono comportamenti anomali, come quello dell'enzima idrolitico colinesterasi, al quale si riferisce il grafico riportato qui accanto.



Il pH ottimale NON coincide necessariamente con quello fisiologico: ciò potrebbe consentire alla cellula di utilizzare piccole variazioni di pH per **REGOLARE** l'attività enzimatica a seconda delle necessità metaboliche.

I **fattori strutturali** ritenuti responsabili della dipendenza dell'attività dal pH sono stati individuati nella presenza di gruppi funzionali acidi e/o basici sia nel substrato sia nell'enzima (ed in particolare nel suo sito attivo).

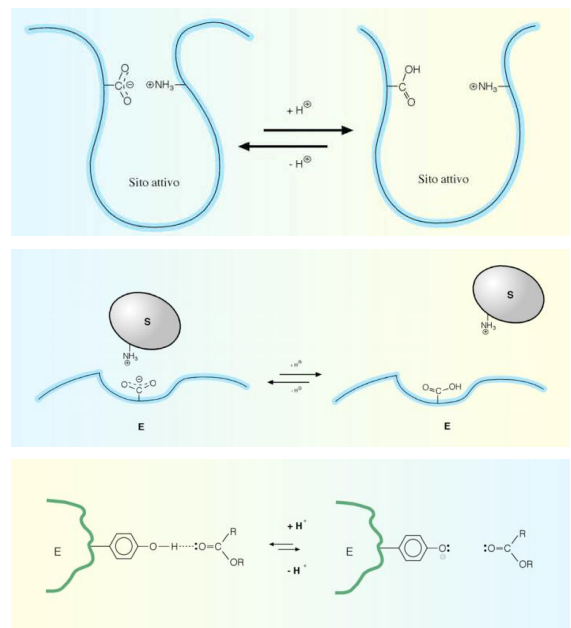
INTERPRETAZIONE STRUTTURALE DELLA DIPENDENZA DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA DAL PH

Se la forza di attrazione tra due gruppi dotati di cariche di segno opposto aiuta a mantenere la conformazione del sito attivo, la protonazione o deprotonazione di uno di essi provocherà inevitabilmente un cambiamento di quella conformazione ed una diminuzione dell'attività.

I legami ionici possono anche stabilirsi tra un gruppo del sito attivo ed uno del substrato. In tal caso, la protonazione o deprotonazione di uno di essi si risolverà in una maggior difficoltà di formazione del complesso enzima - substrato.

I legami a idrogeno, di cui molti gruppi cataliticamente attivi si servono per attivare ed orientare il substrato, sono molto sensibili alle variazioni del pH. Così, ad es., uno spostamento del pH nel campo basico può impedire all'ossidrilico fenolico della tirosina di formare con il carbonile di un substrato un legame idrogeno importante per accelerare un successivo attacco nucleofilo.

Lo ione carbossilato dell'acido aspartico 102 svolge un ruolo importante per il funzionamento delle proteasi seriniche, in quanto ha il compito di accettare uno ione idrogeno in uno stadio del ciclo catalitico. Abbassando il pH al di sotto di 7 il carbossilato si trasforma nel suo acido coniugato e l'enzima si disattiva (reversibilmente).



3.4 Effetto della presenza di attivatori/inibitori enzimatici

Gli INIBITORI/ ATTIVATORI sono composti chimici o ioni metallici capaci di DIMINUIRE/ AUMENTARE la velocità di una reazione enzimatica.

Lo studio della loro influenza ha fornito informazioni preziose sul meccanismo della catalisi enzimatica ed in particolare sulla specificità degli enzimi nei confronti del substrato e sulla natura dei gruppi funzionali coinvolti nella catalisi. Secondo la natura degli effetti che producono, gli inibitori vengono di solito classificati in REVERSIBILI ed IRREVERSIBILI.

GLI INIBITORI REVERSIBILI	
INIBITORI COMPETITIVI	INIBITORI NON COMPETITIVI
<p>Sono molecole che, grazie alla loro somiglianza strutturale col substrato, competono con esso per legarsi reversibilmente al sito attivo dell'enzima.</p> <p>Se sono privi del legame suscettibile di rottura, tipico dei normali substrati, non subiranno modificazioni.</p> <p>Se invece possiedono quel particolare legame, si comporteranno da substrati veri e propri, ma anche da inibitori competitivi nei confronti degli altri substrati.</p>	<p>Queste molecole si legano ad un sito dell'enzima DIVERSO da quello attivo, detto sito allosterico. Così facendo provocano un CAMBIA-MENTO nella CONFORMAZIONE dell'enzima, che lo rende meno attivo.</p>
<p>Questi inibitori non modificano l'affinità tra substrato ed enzima, nè la velocità di trasformazione del relativo complesso nei prodotti. Si riconoscono dal fatto che l'effetto di inibizione può essere attenuato aumentando della concentrazione di substrato. Ciò significa che la velocità massima ottenibile NON cambia, ma viene raggiunta PIU' LENTA-MENTE (tanto più quanto maggiore è la concentrazione di inibitore).</p>	<p>I loro effetti NON scompaiono aumentando la concentrazione del substrato, pertanto la velocità massima DIMINUISCE, in misura tanto maggiore quanto più alta è la concentrazione dell'inibitore. Non cambia invece la costante di Michaelis-Menten, confermando che la presenza dell'inibitore NON modifica l'affinità dell'enzima nei confronti del substrato.</p>

GLI INIBITORI IRREVERSIBILI

Sono i reagenti capaci di legarsi **COVALENTEMENTE** ed **IRREVERSIBILMENTE** ad un **GRUPPO FUNZIONALE ESSENZIALE** per l'attività catalitica, trasformando così l'enzima in un suo derivato **STABILE ED INATTIVO**, ben diverso dal normale complesso enzima - substrato.

A questo meccanismo d'azione è dovuta la pericolosità di certe sostanze:

- il **DIISOPROPILFLUOROFOSFATO** è usato nella preparazione di terribili armi chimiche, dette **GAS NERVINI**. Disattivando l'enzima acetilcolinesterasi, che catalizza l'idrolisi dell'acetilcolina a colina, esso blocca la trasmissione degli impulsi nervosi;
- gli ioni di alcuni **METALLI PESANTI** (Hg, Pb, Ag) possono reagire con i gruppi **-SH** dei residui di **CISTEINA**, ossidandoli ai corrispondenti solfuri **-S-S-**.

Inoltre, l'inibizione o l'attivazione di alcuni enzimi da parte di specifici metaboliti costituisce un importante **FATTORE** di **REGOLAZIONE** del **METABOLISMO**.

4. Il meccanismo di azione

Il meccanismo è un **modello** con cui si cerca di descrivere a livello molecolare l'azione catalitica, tenendo conto di tutte le informazioni raccolte sulla cinetica della reazione e sulle caratteristiche strutturali dell'enzima e del substrato. Infatti, tra tutti i modelli del meccanismo catalitico che vengono proposti, si possono prendere in considerazione **soltanto** quelli che vanno d'accordo con la **struttura tridimensionale** dell'enzima. Si ricordi, tuttavia, che le strutture (ricavate in genere da analisi cristallografiche condotte con i raggi X) sono immagini **statiche**, mentre i meccanismi sono descrizioni **dinamiche**. Alcuni tra i meccanismi più studiati riguardano:

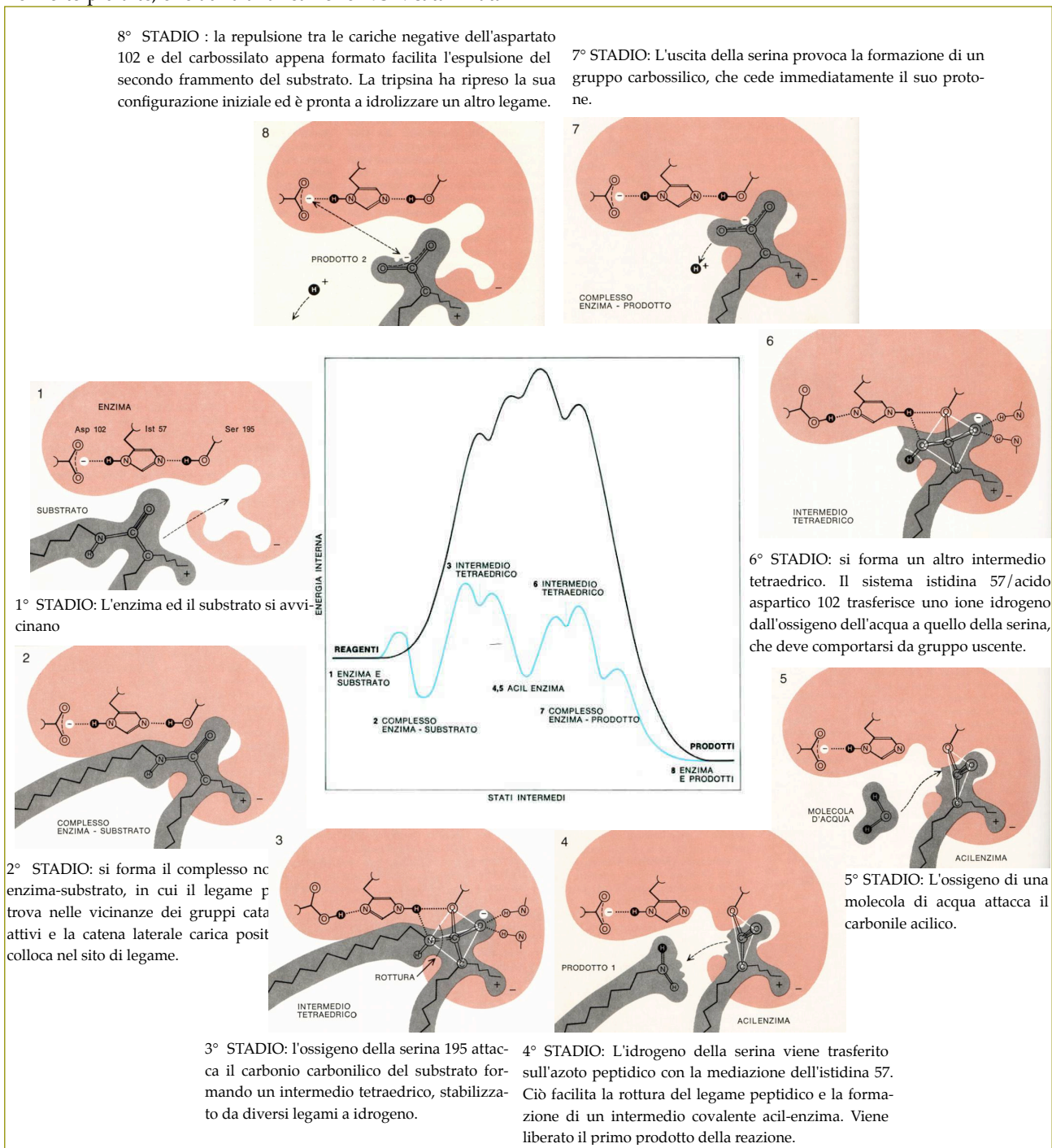
- tripsina
- lisozima

4.1 Il meccanismo d'azione della tripsina

La tripsina demolisce le proteine rompendo alcuni dei legami peptidici interni che uniscono in catena i singoli amminoacidi mediante addizione di acqua (idrolisi): i frammenti ottenuti sono a loro volta dei polipeptidi più piccoli, i cui gruppi terminali COOH e NH₂ erano in origine condensati tra loro.

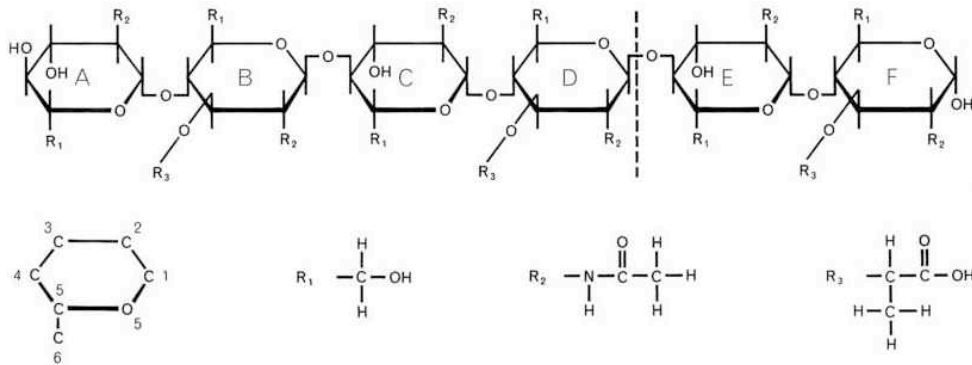
I gruppi funzionali del sito attivo, che **agiscono in modo concertato** nell'idrolisi del legame peptidico attaccato, sono stati individuati nelle catene laterali dei residui di SERINA 195, ISTIDINA 57 ed ACIDO ASPARTICO 102, mentre un'altra cavità detta "tasca di legame" contribuisce in misura decisiva a determinare la **scelta del substrato** e la sua **corretta orientazione**. Essa infatti accoglie solamente le catene laterali di LISINA e di ARGININA, che ai **valori fisiologici di pH** sono cariche positivamente e risultano pertanto attratte dalla carica negativa dell'ACIDO ASPARTICO 189 presente nella suddetta tasca. Ciò spiega perchè la tripsina idrolizza soltanto i legami peptidici adiacenti alle due suddette catene.

Seguiamo passo per passo le varie fasi del meccanismo proposto, con l'aiuto di un diagramma energia - coordinata di reazione: la curva blu si riferisce alla reazione con la tripsina, mentre la curva nera, caratterizzata da energie di attivazione molto più alte, è relativa alla reazione NON catalizzata.



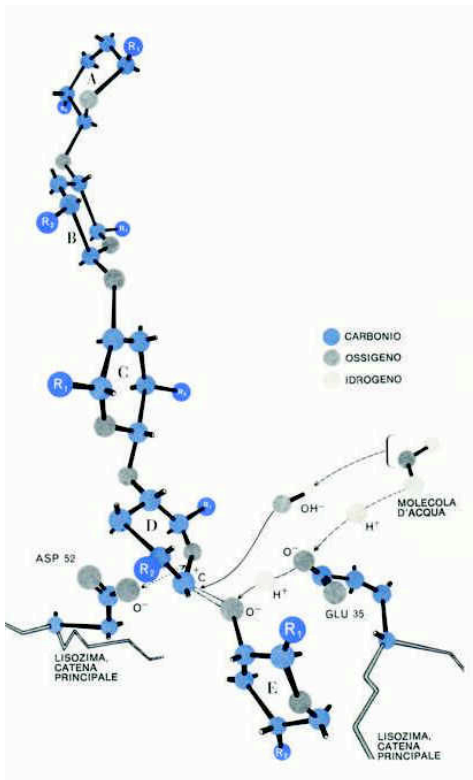
4.2 Il meccanismo d'azione della lisozima

Questo enzima scinde un polisaccaride costituente la parete delle cellule batteriche. Il suo substrato è un copolimero alternato formato da N-acetilglucosammina (NAG) e da acido N-acetilmuramico (NAM), uniti da ponti glicosidici 1,4 analoghi a quelli che legano le unità di glucosio nella cellulosa.



L'azione dell'enzima consiste nello spezzare idroliticamente la catena del substrato in due tronconi, ma **non in modo casuale**: viene rotto sempre il legame che unisce il carbonio 1 del NAM con l'ossigeno glicosidico, unito a sua volta al carbonio 4 del NAG.

Analisi effettuate con i raggi X sui cristalli dell'enzima e dei suoi complessi con substrati lenti o con inibitori competitivi hanno mostrato che il suo **sito attivo è una lunga fenditura**, che può ospitare 6 residui della catena polisaccaridica. Il substrato è trattenuto da una complessa rete di legami a idrogeno e di interazioni non polari. Inoltre, almeno quando certi inibitori sono legati all'enzima, alcune sue parti appaiono spostate l'una rispetto all'altra, facendo pensare ad un **mutamento di conformazione indotto**.



Tra i residui degli amminoacidi che vengono a trovarsi nelle immediate vicinanze del legame da rompere sembra che i gruppi COOH dell'acido glutammico 35 e dell'acido aspartico 52 agiscano in modo concertato, rispettivamente come **donatore ed accettore di protoni**. Mentre GLU 35 trasferisce uno ione idrogeno sull'ossigeno glicosidico favorendo la rottura del legame etero C-O, il gruppo carbossilato di ASP 52 contribuisce a stabilizzare il carbocatione intermedio, finché questo non viene attaccato dall'acqua. La spiegazione del diverso comportamento di due gruppi funzionali identici chiama in causa il loro **ambiente circostante**: ASP 52 ha un buon numero di vicini polari e sembra trovarsi in una rete di legami

a idrogeno che lo collegano a ASN 46 e ASN 59 (ASN = asparagina). Ciò gli consente di restare carico negativamente anche in soluzione decisamente acida. GLU 35, invece, è circondato da gruppi non polari e probabilmente trattiene molto di più il suo idrogeno.

Sembra che il lisozima rappresenti un esempio di **attivazione del substrato per distorsione**: la formazione del carbocatione intermedio sarebbe favorita da una lieve modificazione conformazionale del residuo saccharidico adiacente al legame da rompere.

Tripsina

Il nostro corpo ha bisogno di un consistente apporto di amminoacidi che vengono usati per costruire nuove proteine o per sostituire quelle vecchie. Ogni giorno, un adulto ha bisogno di circa 35-90 grammi di proteine, a seconda del suo peso. Stranamente, però, molte di queste proteine le otteniamo dal nostro stesso corpo. Ogni giorno, infatti, produciamo 20-30 grammi di proteine digestive che vengono a loro volta digerite quando hanno finito il loro compito. Le proteine sono molecole resistenti, così dobbiamo usare molti enzimi per digerirle cioè per tagliarle in pezzi sempre più piccoli fino a liberare gli amminoacidi di cui sono composte. La digestione delle proteine comincia nello stomaco, dove l'acido cloridrico le fa srotolare e l'enzima pepsina esegue i primi tagli. Il grosso del lavoro comincia però più avanti, nell'intestino. Il pancreas produce un insieme di enzimi proteolitici, il più importante dei quali è la tripsina, che taglia le catene proteiche in frammenti lunghi solo alcuni amminoacidi. Poi, altri enzimi, sulla superficie delle cellule intestinali e all'interno delle cellule, li tagliano in amminoacidi, che vengono usati in tutto il corpo per la sintesi di nuove proteine.

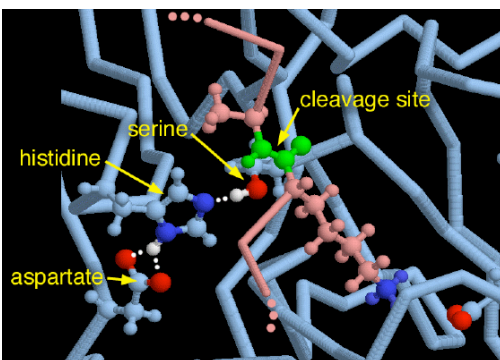
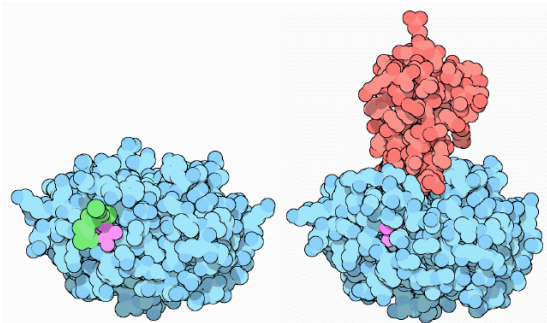
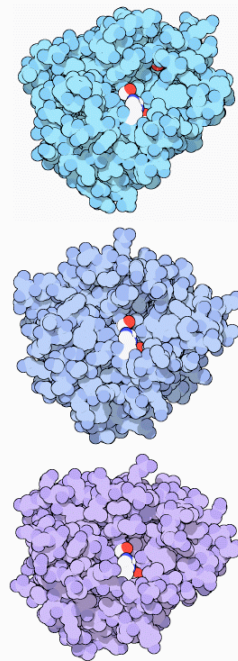
La tripsina usa un particolare amminoacido, la **serina**, per eseguire la reazione di taglio delle proteine, e quindi è conosciuta come **proteasi alla serina**. Questa è, in realtà, una vasta famiglia di enzimi che usano tutti un apparato enzimatico simile. Durante la digestione, tripsina, chimotripsina ed elastasi lavorano insieme per tagliare le proteine. Ognuna ha una sua particolare preferenza per le catene laterali di alcuni amminoacidi.

La tripsina (mostrata in alto, PDB [2ptn](#)) taglia sul carbossile degli amminoacidi basici: lisina e arginina. La chimotripsina (mostrata in mezzo, PDB [2cha](#)) taglia sul carbossile dei grandi amminoacidi apolari: fenilalanina, tirosina, triptofano, leucina e isoleucina. Infine l'elastasi (mostrata in basso, PDB [3est](#)) preferisce le catene laterali degli amminoacidi piccoli come l'alanina.

Nelle tre immagini qui a destra, la serina chiave è mostrata in bianco e rosso al centro del sito attivo, vicino a lei si vede anche una istidina (bianco e blu) ed un acido aspartico (in alto ne è visibile solo un ossigeno rosso). Enzimi simili alla tripsina si trovano anche in molti altri punti del nostro corpo. Alcuni di questi enzimi sono estremamente specifici, tagliano solamente una particolare proteina. Per esempio, la [trombina](#) (mdm 1-2002), è in grado di tagliare in modo specifico il fibrinogeno, creando così un coagulo di sangue.

Le proteasi alla serina hanno avuto un ruolo centrale nella scoperta e nello studio degli enzimi. Si sono rivelati un soggetto ideale da studiare, perchè sono abbondanti nei succhi pancreatici e molto stabili, e quindi sono relativamente facili da isolare. È anche facile studiare la loro funzione: basta introdurre una qualsiasi proteina e osservare quanto velocemente viene digerita. La chimotripsina è stata fra le prime proteine ad essere studiata con la cristallografia a raggi X.

La digestione delle proteine nel nostro corpo è un'operazione molto delicata. Le proteine costituiscono circa un quinto del materiale presente nelle nostre cellule. Con gli enzimi digestivi, il segreto è creare l'enzima in forma inattiva (zimogeno), per poi attivarlo solo dopo che è giunto nell'intestino. La tripsina è costruita con un tratto in più di catena proteica, colorato in verde nella struttura qui a lato (PDB [1tgs](#)). In realtà, in questa struttura cristallina, sono visibili solo due amminoacidi di questo tratto addizionale, quindi dovete immaginare il resto della catenella che sporge fuori dalla proteina. Questa forma più lunga di tripsina, chiamata **tripsinogeno**, è inattiva e non può tagliare catene proteiche. Poi, quando entra nell'intestino, l'enzima enteropeptidasi taglia la piccola coda staccandola della tripsina. Questo permette alla nuova parte terminale della catena, colorata qui di magenta, di infilarsi all'interno della proteina ripiegata per stabilizzare la forma attiva dell'enzima, come mostrato sulla destra (PDB [2ptc](#)). Per una maggiore sicurezza, il pancreas sintetizza anche un inibitore della tripsina, la piccola proteina mostrata in rosso, che si lega ad eventuali tracce di tripsina attiva che potrebbero essere presenti prima che avvenga la secrezione nell'intestino. Questo inibitore si lega al sito attivo della tripsina, bloccandone l'azione, ma solo temporaneamente, infatti nell'intestino sarà tagliato a pezzi dagli altri enzimi proteolitici.



Ci sono molti altri esempi di proteasi alla serina, che vengono sintetizzate per la digestione, l'attivazione di ormoni, la coagulazione del sangue, l'attivazione del sistema immunitario, e per molte altre funzioni. Queste hanno in comune un insolito insieme di tre amminoacidi che si è rivelato molto efficiente nel taglio delle proteine al punto che è stato riscoperto più e più volte nel corso dell'evoluzione. Il cuore di questo meccanismo è un amminoacido serina che viene attivato da una istidina e da un acido aspartico. Insieme questi tre amminoacidi sono stati chiamati **sistema a rilascio di carica**. L'istidina e l'aspartato aiutano a rimuovere l'atomo di idrogeno dalla serina (bianco), questo rende la serina più reattiva al momento di attaccare la catena proteica bersaglio. Questa figura è stata creata usando l'archivio PDB [2ptc](#), che ha una proteina inibitrice (rosa) legata al sito attivo. Il sito di taglio in questo inibitore, qui colorato di verde, è tenuto abbastanza lontano da non essere tagliato nel modo in cui lo sarebbero la maggior parte delle proteine nella stessa posizione. Attraverso questa interazione, la tripsina riconosce la lisina e può tagliare nella posizione corrispondente al suo carbossile.

5. Gli enzimi regolatori e il metabolismo

TUTTI gli enzimi risentono della variazione di qualche parametro ambientale (temperatura, pH,...): la conseguente modifica della loro attività si ripercuote inevitabilmente sulla velocità dei processi metabolici che essi catalizzano e rappresenta pertanto un PRIMO LIVELLO di CONTROLLO.

ALCUNI enzimi, però, oltre ad essere altamente efficienti e specifici, si sono SPECIALIZZATI nello svolgere un ruolo di grande responsabilità: la REGOLAZIONE del METABOLISMO. Essi cioè, dopo aver ricevuto opportuni MESSAGGI CHIMICI, di cui si servono per cogliere le variazioni dello stato metabolico, sanno ADATTARE RAPIDAMENTE la propria attività alle nuove necessità della cellula.

Poichè la reazione che catalizzano occupa una POSIZIONE STRATEGICA all'interno di una via metabolica, essa diventa un vero e proprio PUNTO di CONTROLLO, del quale un organismo vivente si serve per adattarsi alla varietà delle condizioni ambientali.

A seconda del loro meccanismo di azione, questi enzimi "intelligenti" si dividono in :

- enzimi ALLOSTERICI (che interagiscono con i loro modulatori mediante legami NON COVALENTI)
- enzimi MODULATI COVALENTEMENTE

Un tipo particolare di controllo dell'attività metabolica viene esercitato dall'organismo mediante gli ISOENZIMI.

5.1 Gli enzimi allosterici

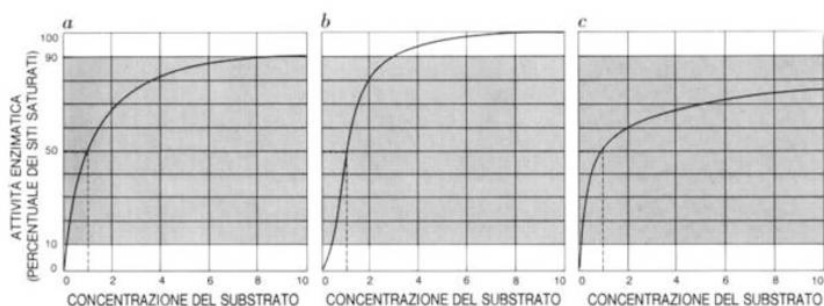
Gli enzimi allosterici possiedono molte PROPRIETA' ANOMALE:

- hanno un PESO MOLECOLARE particolarmente ELEVATO, in quanto sono spesso costituiti da 2 o più subunità (di solito in numero pari come nella glutammina sintetasi);
- la maggior parte di essi mostra una dipendenza della velocità dalla concentrazione di substrato **non interpretabile con la classica equazione di Michaelis-Menten**;
- la loro attività è MODULATA dall'interazione NON COVALENTE e REVERSIBILE di una SPECIFICA molecola a basso peso molecolare con un **sito diverso da quello catalitico** (infatti il loro nome deriva dal greco e vuol dire "altro spazio"). Tale modulatore può essere lo stesso substrato od una molecola diversa (di solito entrambi) e può fungere da attivatore (modulatore positivo) o da inibitore (modulatore negativo).

Queste proprietà consentono agli enzimi allosterici di occupare delle **posizioni chiave** nella complessa rete delle vie metaboliche.

5.1.1 Comportamento cinetico degli enzimi allosterici

Molti enzimi allosterici NON seguono la cinetica del modello di Michaelis-Menten, ma il grafico della velocità iniziale vs. la concentrazione di substrato ha una strana FORMA SIGMOIDE (curva b).



A bassi valori di concentrazione la velocità aumenta molto più lentamente rispetto alla normale curva iperbolica di Michaelis-Menten (curva a). Non appena la concentrazione del substrato aumenta, però, la curva si impenna e ciò consente alla velocità di raggiungere il suo valore massimo più rapidamente. Per un enzima che presenti la classica curva iperbolica occorre un aumento di concentrazione del substrato di circa 81 volte per passare da un livello di attività del 10% ad uno del 90%. Per un enzima che presenti una curva sigmoide basterà che la concentrazione del substrato aumenti di 9 volte o anche meno (secondo la pendenza della curva).

Gli enzimi allosterici sono dunque dotati di una MAGGIORE SENSIBILITA', che diventa un prezioso strumento di AMPLIFICAZIONE: piccoli segnali possono avere così un effetto molto più ampio.

Se si tiene conto del fatto che di solito nelle cellule la concentrazione di un substrato è molto minore del valore di saturazione, questa dote diventa straordinariamente importante per la funzione regolatrice degli enzimi allosterici.

Per l'interpretazione di tale comportamento si chiama in causa la STRUTTURA QUATERNARIA della maggior parte degli enzimi allosterici ed un particolare meccanismo di reciproca influenza tra le diverse subunità che li compongono, detto EFFETTO COOPERATIVO.

Così, ad es., se il legame della prima molecola di substrato ad una subunità FAVORISCE (= rende più veloce) il legame delle molecole successive alle altre subunità, si avrà una COOPERATIVITA' POSITIVA (tipica della curva sigmoide) ; se lo SFAVORISCE, si parla di una COOPERATIVITA' NEGATIVA (la curva conserva una forma che ricorda quella iperbolica, ma tende al valore asintotico più lentamente): il fatto che sia necessario un aumento molto maggiore della concentrazione di substrato perchè l'attività enzimatica passi da un livello del 10% al 90% potrebbe rappresentare un meccanismo di protezione, che serve ad ATTENUARE la SENSIBILITA' di quelle proteine che NON devono essere soggette alle fluttuazioni dell'ambiente.

PRINCIPALI MODELLI PROPOSTI PER SPIEGARE IL COMPORTAMENTO DEGLI ENZIMI ALLOSTERICI

Secondo il **MODELLO della MODIFICAZIONE CONCERTATA** (o di Monod) ogni subunità di un enzima allosterico oligomero ospita un solo sito attivo ed uno o più siti per i modulatori.

Ogni subunità può trovarsi nella conformazione più affine al substrato (R) o in quella meno affine (T).

Le subunità sono simmetriche e tale simmetria deve sempre mantenersi: un cambiamento conformazionale di una subunità comporta un identico e simultaneo cambiamento nelle subunità simmetriche, detto "effetto tutti o nessuno".

Il **MODELLO della MODIFICAZIONE SEQUENZIALE** (o di Koshland), a differenza del modello di Monod, prevede la possibilità che nella stessa macromolecola **possano coesistere subunità aventi conformazioni diverse.**

Poichè le subunità possono subire cambiamenti di conformazione individuali, l'enzima può passare gradualmente dallo stato inattivo a quello di massima attività, attraversando molti stati conformazionali intermedi, con una modulazione più fine dell'attività stessa.

5.1.2 Flessibilità degli enzimi e regolazione

Perchè la flessibilità è importante?

Molti processi vitali sono messi in moto ed interrotti grazie alla capacità delle molecole proteiche di assumere DIVERSE CONFORMAZIONI a seconda delle INFLUENZE ESTERNE. Questa flessibilità accomuna gli enzimi ai recettori sensoriali ed agli anticorpi e permette all'organismo di REAGIRE agli stimoli esterni e di PROTEGGERSI contro le modificazioni ambientali.

Cosa sono le conformazioni?

Per conformazioni intendiamo i diversi modi che hanno i gruppi costituenti la molecola di disporsi nello spazio; si può passare da una conformazione all'altra per semplici rotazioni attorno a legami chimici, ma ciò non vuol dire che tutte le conformazioni abbiano lo stesso contenuto energetico e soprattutto la stessa reattività. In un polipeptide quelle rotazioni provocano dei cambiamenti nell'orientamento relativo delle catene laterali degli amminoacidi, che possono avere importanti conseguenze, ad es. sulla funzionalità del sito attivo.

Quali cause possono indurre un enzima a passare da una conformazione ad un'altra?

Talvolta è sufficiente che il substrato si leghi al sito attivo, ma più spesso intervengono apposite molecole regolatrici (ormoni o metaboliti), che si legano a siti diversi da quello catalitico, poichè non prendono parte alla reazione vera e propria.

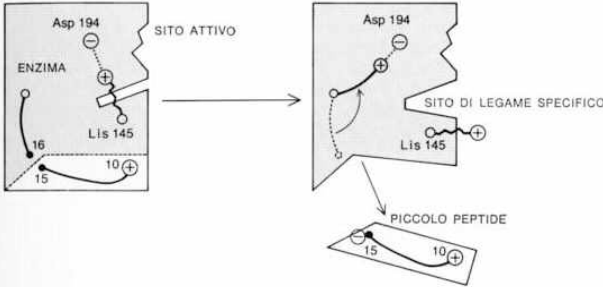
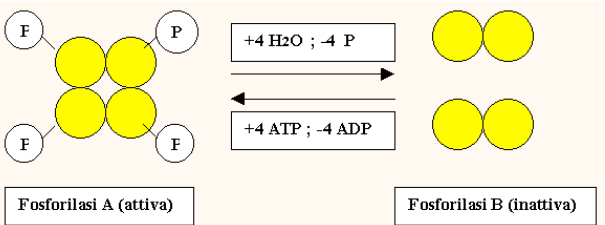
- Il primo effetto di un modulatore positivo o ATTIVATORE sarà quello di stimolare un cambiamento di conformazione nel sito allosterico a cui si è legato.
- Tuttavia, grazie ai numerosi collegamenti tra le diverse parti della macromolecola, questo cambiamento può trasmettersi al sito attivo, determinando un posizionamento più corretto ed efficace dei gruppi catalitici. Come risultato, il substrato può ora legarsi più facilmente. Il legame di un modulatore negativo o INIBITORE metterà in moto una catena di cambiamenti conformazionali analoghi, ma con effetto opposto: la distorsione subita dal sito attivo ostacolerà (= renderà più lento) il legame del substrato e/o la stessa funzione catalitica.

- Se poi l'enzima è formato da più subunità, il cambiamento conformazionale di una di esse potrà trasmettersi ancora più lontano alle subunità adiacenti, inducendo quei passaggi dalla forma attiva a quella inattiva (o viceversa), che giustificano l'effetto cooperativo.

Il più studiato enzima allosterico? L'**aspartiltranscarbamilasi**.

L'inibizione-attivazione e l'effetto cooperativo sono fenomeni distinti, che perseguono obiettivi complementari. Il primo riguarda il RUOLO svolto dal regolatore (dare il via ad una reazione enzimatica oppure interromperla). Il secondo determina la SENSIBILITA' dell'enzima alle fluttuazioni della concentrazione di un regolatore. Pertanto, un attivatore può mostrare un effetto cooperativo positivo o negativo o non avere alcun effetto cooperativo.

5.2 Gli enzimi modulati covalentemente

MODULAZIONE IRREVERSIBILE	MODULAZIONE REVERSIBILE
<p>Alcuni enzimi sono prodotti dalle cellule sotto forma di precursori inattivi (zimogeni o proenzimi) e soltanto in un secondo tempo (QUANDO e DOVE è necessario) sono convertiti nella forma cataliticamente attiva mediante una modificazione covalente catalizzata da altri enzimi (di solito si tratta dell'idrolisi di uno o più legami peptidici). NON ci sono reazioni capaci di riconvertire gli enzimi ottenuti in zimogeni.</p> <p><i>Un esempio di attivazione covalente irreversibile: la conversione del tripsinogeno in tripsina</i></p> <p>Gli ENZIMI DIGESTIVI (ad es. pepsina, tripsina e chimotripsina), sono prodotti dalle cellule sotto forma di precursori inattivi, per evitare che attacchino le stesse proteine intracellulari. Una volta secreti nel tratto gastro-intestinale, subiscono un'idrolisi selettiva di alcuni legami peptidici.</p>  <p>Nel caso della TRIPSINA, l'enzima viene attivato spezzando un solo legame tra gli amminoacidi 15 e 16 e liberando un piccolo peptide. Il nuovo gruppo amminico N-terminale dell'unità 16 interagisce con l'unità di Acido aspartico 194, alterando l'orientamento della Lisina 145 e inducendo una transizione strutturale che provoca la formazione del SITO di LEGAME specifico, assente nel precursore.</p>	<p>L'enzima esiste in due forme, una MENO ATTIVA ed una PIU' ATTIVA. Esse sono convertite l'una nell'altra da una modificazione covalente reversibile di una catena laterale di amminoacidi, naturalmente controllata da un altro enzima.</p> <p><i>Un esempio di modulazione covalente reversibile: la glicogeno fosforilasi</i></p> <p>La GLICOGENO FOSFORILASI dei tessuti animali catalizza la rottura di un polisaccaride di riserva:</p> <p><i>glicogeno + fosfato → glicogeno accorciato + glucosio 1-fosfato</i></p>  <p>La forma attiva (A) è una proteina oligomerica formata da 4 subunità principali, ciascuna delle quali contiene un residuo di Serina con l'OH fosforilato. Quando questi gruppi fosfato (P) sono rimossi per idrolisi (dall'enzima fosforilasi fosfatasi), la proteina si dissocia in 2 DIMERI (B) cataliticamente poco attivi. Tuttavia, la forma A può essere rigenerata per trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP alle Serine della forma B (catalizzato dalla fosforilasi cinasi).</p> <p>In questo caso dunque una modificazione covalente induce un cambiamento di conformazione che si ripercuote a sua volta sulla struttura oligomerica della proteina. Non è un esempio isolato: in molti casi si osserva che una proteina è attiva come monomero, ma inattiva come dimerico, oppure inattiva come dimerico ed attiva come tetramero. E' come se una subunità si comportasse da regolatore nei confronti dell'altra.</p>

Il fatto che alcuni enzimi abbiano come substrati altri enzimi va liquidato come una bizzarria della natura o possiede un significato biologico?

In realtà un enzima è così efficiente che può catalizzare la formazione di migliaia di molecole di prodotto in un secondo: se il suo prodotto è un altro enzima, il risultato finale consisterà in una notevole AMPLIFICAZIONE.

5.2.1 L'amplificazione a cascata nella scissione del glicogeno stimolata dall'adrenalina

L'adrenalina è un ormone prodotto dalle ghiandole surrenali e secreto nel sangue in quantità molto piccole (la sua concentrazione è dell'ordine delle nanomoli), in caso di allarme o di generica sensazione di pericolo. La circolazione del sangue gli permette di arrivare allo specifico recettore collocato sulla superficie delle cellule del fegato. Questo PICCOLO SEGNALE CHIMICO innesca una serie di trasformazioni a catena, molte delle quali costituite da ENZIMI che agiscono su ALTRI ENZIMI.

- L'enzima adenilato ciclasi si converte nella forma attiva e trasforma l'ATP in AMP ciclico.
- L'AMP ciclico si lega alla subunità regolatrice della proteina cinasi, che stimola il passaggio della subunità catalitica dello stesso enzima alla forma attiva.
- La proteina cinasi catalizza la conversione della fosforilasi cinasi dalla forma inattiva alla forma attiva, a spese di ATP.
- La fosforilasi cinasi catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP all'enzima fosforilasi (forma B), per dare la forma A attiva.
- La fosforilasi A catalizza infine la rottura del glicogeno in tante unità di glucosio 1-fosfato, precursore del glucosio 6-fosfato e quindi del glucosio libero, che il sangue trasporterà alle cellule che lo richiedono.

La FUNZIONE BIOLOGICA di questa CASCATA è soddisfare urgentemente un'aumentata richiesta di ENERGIA da parte dell'organismo. La massiccia rottura del glicogeno provoca un aumento della concentrazione di glucosio nel sangue di circa 5 millimoli, corrispondente ad un'AMPLIFICAZIONE del segnale iniziale di circa 3 MILIONI di VOLTE. Non deve trarre in inganno il fatto che la cascata sia formata da molti passaggi: grazie all'efficienza degli enzimi, essa raggiunge il suo obiettivo in POCHI SECONDI.

5.3 Gli isoenzimi

Dell'enzima LATTATO DEIDROGENASI esistono 5 forme, con proprietà chimico-fisiche diverse, anche se catalizzano tutte la stessa reazione. Ognuna di esse è formata da 4 catene, che possono essere di 2 tipi diversi (A e B), che differiscono non per la conformazione ma per la sequenza amminoacidica, in quanto codificate da geni diversi.

L'esistenza dei 5 isoenzimi è giustificata dal numero dei diversi modi in cui si possono combinare i 2 tipi di catene a gruppi di 4:	AAAA o A ₄
	AAAB o A ₃ B
	AABB o A ₂ B ₂
	ABBB o AB ₃
	BBBB o B ₄

Solamente aggregandosi secondo uno dei suddetti rapporti le catene mostrano attività catalitica: SEPARATE le une dalle altre risultano INATTIVE.

5.3.1 Funzione biologica degli isoenzimi

Si è scoperto che cellule dello stesso organismo, ma di tessuti diversi, producono diverse quantità di catene A e B. Di conseguenza, avranno una **diversa distribuzione percentuale** dei vari isoenzimi. Ognuno di questi, tuttavia, mostra una diversa dipendenza della velocità dalla concentrazione del substrato (piruvato). Può così capitare che le cellule del **muscolo scheletrico** siano ricche dell'isoenzima A₄, caratterizzato da un'elevata velocità massima di saturazione, mentre nelle cellule del **muscolo cardiaco** prevalga l'isoenzima B₄, che ha un basso valore di velocità massima e risulta inibito da un eccesso di substrato. Per capire questa differenza, è utile ricordare che la reazione catalizzata dalla lattato deidrogenasi (riduzione del piruvato a lattato) è un passaggio fondamentale della **glicolisi**. Il muscolo scheletrico ha una tendenza ad utilizzare il glucosio anaerobicamente molto maggiore del muscolo cardiaco, che normalmente ossida il piruvato aerobicamente ad anidride carbonica.

6. RAQ sugli enzimi (Rarely Asked Questions)

1) QUANTO COSTA UN ENZIMA ?

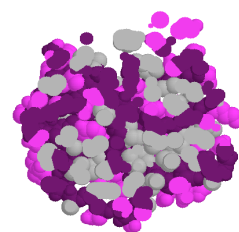
Osservando la forma di una proteina globulare ci verrebbe spontaneo paragonarla ad una cannuccia per bibite accartocciata frettolosamente e gettata via. In realtà dietro l'apparente casualità si nasconde una **struttura altamente organizzata** e soprattutto finalizzata al raggiungimento di un ben preciso scopo.

Come possono formarsi tali strutture in un mondo governato dal secondo principio della termodinamica, cioè caratterizzato dalla tendenza a raggiungere il massimo disordine?

In primo luogo, non dobbiamo dimenticare che la struttura terziaria di una proteina è stabilizzata da numerose interazioni deboli (legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, interazioni elettrostatiche): la loro formazione libera nell'**ambiente** una discreta quantità di energia e ciò favorisce l'aumento dell'entropia. In secondo luogo la catena polipeptidica, ripiegandosi su se stessa, permette ai **gruppi idrofobi di ammassarsi al suo interno**, come fanno le goccioline d'olio quando tentiamo inutilmente di disperderle nell'acqua. L'esposizione di tali gruppi all'esterno costringerebbe l'acqua a formare delle gabbie molecolari ordinate intorno ad essi, con una notevole riduzione dell'entropia. Restano sulla superficie i gruppi idrofili, più compatibili con il solvente.

Un enzima può essere paragonato ad una goccia d'olio racchiusa in un involucro polare

E' piuttosto evidente l'accumulo delle catene laterali idrofobiche all'interno della proteina globulare, mentre le catene polari o dotate di cariche elettriche preferiscono disporsi sulla sua superficie, a contatto con l'acqua. Gli atomi della catena principale sono considerati debolmente idrofili.



Il fragile equilibrio tra le reciproche posizioni delle parti idrofobe ed idrofile della catena fa sì che questa si ripieghi in una forma architettonicamente precisa.

Ma come si è formata la catena? Per costruire un enzima è necessario unire tra loro un gran numero di amminoacidi secondo una sequenza ben definita. La formazione di ogni legame peptidico comporta un aumento dell'energia libera del sistema; potremmo anche dire che provoca una diminuzione dell'entropia dell'universo. Il significato non cambia: in soluzione acquosa la sintesi di un polipeptide NON è un processo spontaneo, perchè la miscela degli amminoacidi separati è più stabile della catena proteica. Pertanto il processo inverso, cioè la scissione idrolitica di una proteina, sarà spontaneo e libererà la stessa quantità di energia assorbita nella sua costruzione. A proposito, qual è il costo energetico della sintesi di una macromolecola proteica? La VALUTA con la quale le cellule pagano la BOLLETTA ENERGETICA è l'adenosintrifosfato (ATP): un legame peptidico si può formare in modo corretto soltanto se contemporaneamente vengono spezzate 3 molecole di ATP. Non è poco, visto che un enzima contiene normalmente centinaia di legami peptidici. La maggior parte degli organismi consuma più energia nella sintesi proteica che in ogni altro processo biosintetico. La grande quantità di energia liberata nell'ambiente dall'idrolisi dell'ATP spiega perchè la sintesi di una proteina avvenga con un aumento dell'ENTROPIA GLOBALE, nel pieno rispetto del secondo principio.

L'accoppiamento di due processi può fare in modo che uno di essi proceda in una direzione non spontanea se l'altro genera una quantità di caos sufficiente ad aumentare nel complesso il caos universale.

2) PERCHE' GLI ENZIMI SONO COSI' GRANDI ?

Il peso molecolare degli enzimi oscilla tra 10.000 e diversi milioni di dalton. In realtà tutte le proteine di notevoli dimensioni sono costituite da subunità, il cui peso varia in genere da 15.000 a 100.000 dalton. Il peso molecolare della maggioranza dei substrati è in genere compreso tra 100 e 1000. In effetti, tra le centinaia di residui di amminoacidi che compongono un enzima soltanto pochi partecipano attivamente alla catalisi: qual è il compito di tutti gli altri? Perchè l'evoluzione non ha selezionato polimeri contenenti soltanto gli amminoacidi più attivi? Non sarebbe più economico utilizzare una molecola più piccola, contenente soltanto i gruppi funzionali cataliticamente necessari?

Il sito attivo è ovviamente importante, ma concentrando la nostra attenzione su di esso rischiamo di perdere di vista la funzione del resto della molecola. Invece, è proprio il particolare ripiegamento della catena polipeptidica su se stessa che permette ai residui coinvolti nella catalisi di trovarsi spazialmente vicini, nonostante che spesso occupino posizioni molto lontane nella sequenza amminoacidica. Inoltre, le interazioni che stabilizzano la struttura terziaria aiutano quei residui a mantenere la distanza e l'orientazione relativa che favoriscono la reazione e quindi aumentano l'efficienza.

Soltanto in una grande molecola possono formarsi delle tasche o cavità che aiutano il legame del substrato ed il suo riconoscimento e dalle quali spesso l'acqua è bandita. Soltanto una macromolecola può ospitare tanti siti, la cui vicinanza favorisce l'accoppiamento delle reazioni successive che si svolgono in ciascuno di essi. In parti diverse di una macromolecola possono addirittura coesistere microambienti nei quali uno STESSO gruppo funzionale può mostrare comportamenti DIVERSI.

La meravigliosa organizzazione della catena polipeptidica non deve tuttavia far pensare che debba essere RIGIDA. Anzi, piccoli ma significativi spostamenti nello spazio di alcuni gruppi, causati dal legame con piccole molecole, possono trasmettersi anche a notevole distanza, grazie alla mediazione della struttura proteica. La comunicazione tra sito allosterico e sito catalitico è il segreto della regolazione, cioè della capacità degli enzimi di ricevere informazioni dall'ambiente esterno riguardo allo stato del metabolismo e di modulare l'attività in modo da rispondere al meglio alle variabili esigenze dell'organismo. Enzimi sensibili a modulatori diversi potranno ricevere diversi tipi di messaggi e controllare così meglio il traffico nell'intricata rete delle vie metaboliche.

La complessità ancora maggiore delle proteine oligomeriche apre ulteriori possibilità: permette la specializzazione di alcune subunità nella funzione regolatrice e di altre nella funzione catalitica; rappresenta la premessa strutturale dell'effetto cooperativo, poichè le modificazioni conformazionali di una subunità possono indurre modificazioni analoghe nelle altre subunità, tramite il cambiamento dei rapporti reciproci.

3) DARWIN CONOSCEVA GLI ENZIMI?

Il grado elevato di perfezionamento e di specializzazione raggiunto dagli enzimi è il risultato di un lungo lavoro di continuo affinamento della struttura, realizzato mediante la SELEZIONE NATURALE delle caratteristiche che li rendono più adatti allo svolgimento del compito loro affidato.

Secondo le ipotesi evuzionistiche più accreditate, i catalizzatori primitivi, antenati degli enzimi odierni, sarebbero stati degli oligopeptidi piuttosto corti, sostanzialmente dei catalizzatori acido-base in senso generale, contenenti un gruppo amminico ed un anello imidazolico od un gruppo carbossilico. La loro efficienza era sicuramente molto modesta. Caratteristiche come la saturazione da substrato e soprattutto la specificità dovrebbero essere comparse solamente in un secondo tempo, associate alla sintesi di polipeptidi ad alto peso molecolare capaci di assumere una ben determinata e stabile conformazione tridimensionale. Infine, la complessità degli enzimi allosterici ed in particolare di quelli oligomerici dotati di effetto cooperativo non può che essersi sviluppata più tardi, ma il suo successo deve essere stato immediato, grazie all'utilità biologica dell'interpretazione e dell'amplificazione dei segnali chimici.

Tutto questo è stato consentito dall'enorme varietà delle strutture realizzabili.

Con i 20 amminoacidi naturali si possono costruire 8.000 tri-peptidi, ma ben 10.240 miliardi di deca-peptidi diversi. Allo sterminato numero di catene polipeptidiche realizzabili corrispondono altrettante strutture tra le quali l'ambiente può scegliere quelle più adatte al soddisfacimento di un certo bisogno. Ogni mutazione del DNA della cellula può provocare la sostituzione in una catena proteica di un amminoacido con un altro: spesso tale sostituzione si somma silenziosamente alle modifiche precedenti, talvolta ha delle conseguenze drammatiche sulla sopravvivenza dell'organismo, talvolta viene premiata dall'ambiente e porterà al miglioramento genetico della specie.