

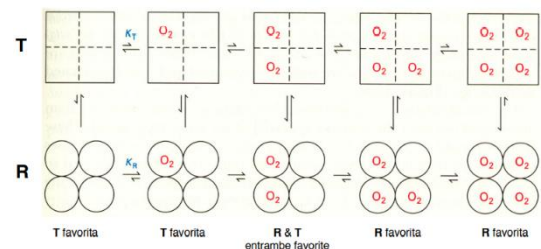
Argomento: cinetica enzimatica.

Si definiscono due stati conformazionali dell'emoglobina: lo **stato T** o stato teso e lo **stato R** o stato rilassato. Lo stato teso dell'emoglobina è quello che la proteina assume a livello dei tessuti dove si carica di CO₂ e finisce nel sangue venoso, in questo stato l'emoglobina è anche detta **deossiemoglobina**. Lo stato rilassato al contrario è quello che l'emoglobina assume a livello dei polmoni dove si carica di ossigeno.

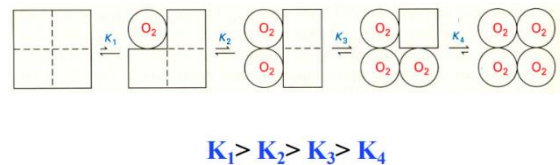
Il legame di una molecola di ossigeno con una subunità dell'emoglobina, in linea di massima, aumenta l'affinità delle altre subunità con l'ossigeno permettendo così il passaggio dallo stato T allo stato R, ovviamente succede il contrario quando la proteina si carica di CO₂, questo fenomeno prende il nome di **adattamento indotto**.

Per rappresentare il fenomeno dell'adattamento indotto sono stati ipotizzati due modelli: il **modello concertato** e il **modello sequenziale**.

Nel modello concertato si ipotizza che tutte e quattro le subunità dell'emoglobina abbiano sempre lo stesso stato conformazionale (T o R) e che la quantità di ossigeno favorisca il passaggio di tutte le subunità contemporaneamente da uno stato all'altro.



Nel modello sequenziale invece si suppone che ciascuna subunità cambi il suo stato conformazionale passando da uno stato T quando non ha nessuna molecola di ossigeno ad uno stato R quando ne lega una, anche in questo caso troviamo una serie di equilibri che spingono l'emoglobina nello stato R man mano che le subunità legano ossigeno.



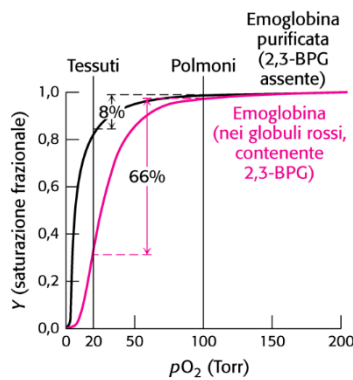
$$K_1 > K_2 > K_3 > K_4$$

Un'altra caratteristica dell'emoglobina, ma in realtà della maggior parte degli enzimi, è che possono legare varie molecole che legandosi possono fungere da attivatori o inibitori, nel caso dell'emoglobina un attivatore favorirebbe il legame con l'ossigeno mentre un inibitore lo sfavorirebbe, questo tipo di interazione è chiamata **regolazione allosterica**.

Gli attivatori possono essere di due tipi: **attivatori omotropici** e **attivatori eterotropici**.

Per attivatore omotropico si intende lo stesso substrato che, nel caso dell'emoglobina, è l'ossigeno mentre per attivatore eterotropico si intende una molecola diversa dal substrato.

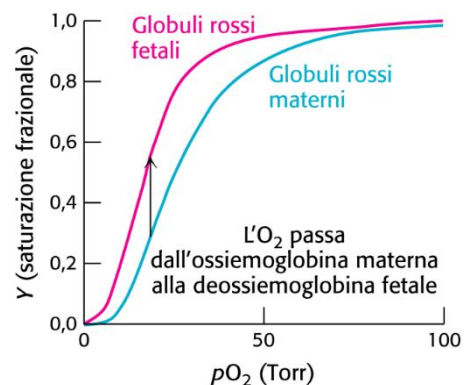
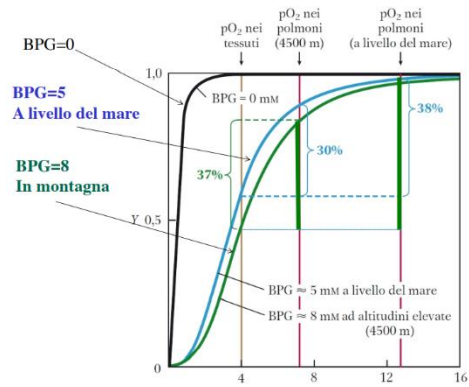
Un attivatore oppure un inibitore di tipo allosterico si lega ad un sito diverso del substrato e determinano un cambio conformazionale che ne favorisce o inibisce l'affinità.



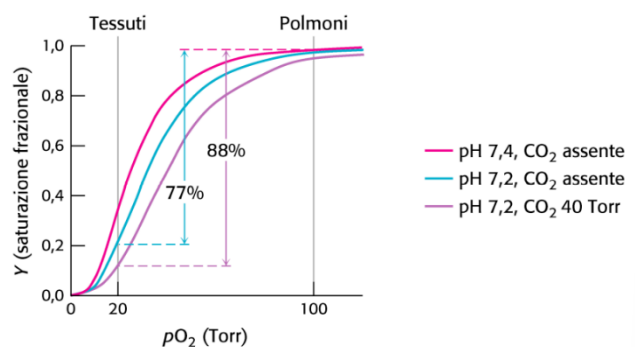
L'inibitore eterotropico associato all'emoglobina è il **2-3-bifosfoglicerato** che si ottiene ad opera dell'enzima mutasi a partire da uno degli intermedi della glicolisi ovvero il 1-3-bifosfoglicerato. Questo

inibitore è fondamentale per non permettere all'emoglobina di assumere un andamento iperbolico, di saturazione, tipico della mioglobina che non potrebbe assolvere alle funzioni che di fatto competono alla emoglobina, ovvero di rilasciare grandi quantità di ossigeno nei tessuti. Con l'inibitore invece la curva viene nettamente modificata e permette all'emoglobina di rilasciare a livello dei tessuti (con una pressione di circa 20 torr) il 66% di ossigeno. Il nostro organismo è anche in grado di rispondere alle variazioni di pressione dell'aria, ad esempio se respiriamo in alta quota oppure a livello del mare, variando la curva dell'emoglobina grazie ad una produzione più o meno intensa del 2-3-bifosfoglicerato.

Un'altra caratteristica dell'emoglobina è quella di essere presente a livello di tutti i tessuti e anche nel feto, se l'emoglobina fetale fosse uguale a quella materna però non potrebbe esserci scambio fra le due emoglobine per favorire l'ossigenazione del feto, di conseguenza mentre l'emoglobina materna come noi sappiamo è composta da due subunità alfa e due beta, quella fetale è composta da due subunità alfa e due gamma, quest'ultime hanno una minore affinità per il 2-3-bifosfoglicerato e quindi la curva si sposterà più a sinistra, questo comporta che l'affinità con l'ossigeno dell'emoglobina fetale sarà più alta di quella dell'emoglobina materna.



Un altro effetto che l'emoglobina subisce è l'**effetto Bohr**: questo effetto è dovuto al cambio di pH in particolare dei tessuti a rapido metabolismo, in questo caso all'aumentare della concentrazione di CO₂ e di ioni H⁺ il pH nel tessuto diminuisce, bisogna ricordare che i protoni e la CO₂ sono ligandi dell'emoglobina e che la loro affinità è inversamente proporzionale a quella dell'ossigeno.



L'equilibrio fra le forme T e R è regolato dalle varie concentrazioni dei ligandi dell'emoglobina nel tessuto, l'abbassamento di pH favorisce il rilascio di ossigeno e il legame con i protoni. La CO₂ quindi agisce sull'emoglobina secondo due diversi meccanismi, abbassando il pH del tessuto, la CO₂ al livello dell'organismo si lega all'acqua grazie ad un enzima detto anidrasi-carbonica che poi

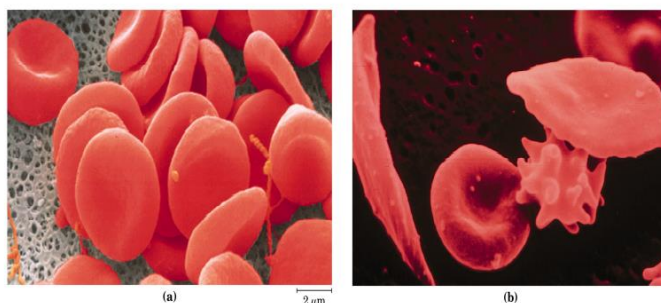
si dissocia spontaneamente rilasciando ioni H^+ , e interagendo direttamente con l'emoglobina come ligando formando la carbammino-emoglobina.

L'emoglobina ha un effetto tampone al livello del sangue dovuto a due meccanismi, un **meccanismo molecolare** che si basa sulla capacità dell'emoglobina di legare, al variare del pH, i protoni sulle sue catene laterali R e un **meccanismo funzionale** dovuto sempre all'effetto Bohr.

Per quanto non sia molto fisiologico l'emoglobina può legare come substrato il monossido di carbonio, che è presente nell'aria ed è spesso la causa di morte, ad esempio, in caso di intossicazione per una fuga di gas. L'affinità del CO per l'emoglobina dovrebbe essere di 200.000 volte maggiore rispetto a quella per l'ossigeno, ma se così fosse anche le minime concentrazioni di monossido di carbonio presenti nell'aria determinerebbero il soffocamento dato che questa molecola si legerebbe ma non verrebbe mai rilasciata. Per capire perché questo non avviene dobbiamo ritornare alla struttura che circonda il ferro dell'emoglobina, questo lega oltre l'anello protoporfirinico, un'istidina detta prossimale e un'istidina distale, la presenza dell'istidina distale modifica l'affinità del monossido di carbonio abbassandola a solo 250 volte maggiore rispetto all'ossigeno, questo è sufficiente dato che in condizioni normali quest'affinità comunque enormemente elevata è bilanciata dalla maggiore concentrazione di O_2 rispetto al CO.

L'emoglobina è anche la causa dell'anemia falciforme, questa malattia è dovuta alla mutazione di un unico residuo di valina in glutamato in una subunità beta, questo comporta una modifica negli eritrociti che prendono una forma "a falce", gli eritrociti che assumono questa struttura tendono ad aggregarsi e a precipitare, sottraendo così molecole di emoglobina allo scambio gassoso.

Anemia falciforme Val β Glu nella subunità β



Principali caratteristiche degli enzimi e cinetica enzimatica

Per quanto riguarda le principali caratteristiche degli **enzimi**, questi aumentano la velocità di reazione, non modificano l'equilibrio della reazione, non sono modificati al termine della reazione ma vengono rilasciati nella stessa forma, hanno un'elevata specificità di substrato, richiedono condizioni di reazione blande e inoltre molti enzimi sono soggetti a regolazione, ovvero è possibile regolare la loro attività enzimatica. Le reazioni enzimatiche avvengono all'interno di una particolare tasca, detta sito attivo che lega in maniera specifica il **substrato**. Il substrato interagisce con le catene laterali R che sono presenti nel sito attivo attraverso interazioni deboli, non vi sono quindi legami covalenti tra il substrato e l'enzima. Alcuni enzimi necessitano per la loro attività di **cofattori**. Si definisce cofattore dell'enzima un substrato che sia legato covalentemente all'enzima oppure anche uno ione può essere considerato cofattore dell'enzima ma se ha una tale affinità per l'enzima tanto da rendere irreversibile il suo legame anche se teoricamente dovrebbe essere reversibile. I cofattori, quindi, possono essere ioni inorganici come il ferro, il manganese, il magnesio (lo ritroviamo sempre in una reazione in cui vi è idrolisi di ATP), lo zinco oppure sono cofattori dell'enzima molecole organiche complesse quali NADH, FADH₂ o l'ATP stessa. I cofattori

spesso trasferiscono gruppi chimici quindi quando abbiamo un certo tipo di cofattore sappiamo che quell'enzima catalizzerà un certo tipo di reazione chimica.

COENZIMI

| Coenzima | Gruppi chimici trasferiti | Precursore nella dieta |
|---|----------------------------|--|
| Biotina | CO ₂ | Biotina |
| Coenzima A | Gruppi acilici | Acido pantotenico e altri composti |
| Flavin adenin dinucleotide (FAD) | Elettroni | Riboflavina (vitamina B ₂) |
| Lipoato | Elettroni e gruppi acilici | Non necessario nella dieta |
| Nicotinammide adenin Dinucleotide (NAD) | :H ⁺ | Acido nicotinico (niacina) |
| Piridossal fosfato | Ammino-gruppi | Piridossina (vitamina B ₆) |
| Tiamina pirofosfato | Aldeidi | Tiamina (vitamina B ₁) |

I coenzimi possono essere legati covalentemente alla proteina e in questo caso prendono il nome di gruppi prostetici. I gruppi prostetici possono essere ad esempio il FAD, lipoato o gli altri coenzimi presenti in tabella oppure possono essere considerati gruppi prostetici anche ioni che non siano legati covalentemente alla proteina ma che abbiano un'affinità talmente alta per la proteina da essere inamovibili.

CLASSIFICAZIONE INTERNAZIONALE DEGLI ENZIMI

| No. | Classe | Tipo di reazione catalizzata |
|-----|-----------------|--|
| 1 | Ossidoreduttasi | Trasferimento di elettroni |
| 2 | Transferasi | Reazioni di trasferimento di gruppi |
| 3 | Idrolasi | Reazioni di idrolisi (trasferimento di gruppi funzionali all'acqua) |
| 4 | Liasi | Addizione di gruppi a legami doppi o formazione di doppi legami mediante rimozione di gruppi |
| 5 | Isomerasi | Trasferimento di gruppi all'interno di molecole formando isomeri |
| 6 | Ligasi | Formazione di legami C-C, C-S, C-O e C-N mediante reazioni di condensazione accoppiate alla scissione di ATP |

Per gli enzimi esiste una nomenclatura che classifica gli enzimi in base alla reazione catalizzata. La nomenclatura internazionale degli enzimi li classifica in base a dei numeri e in base alla reazione chimica che catalizzano.



Questa è la reazione di fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato. È la prima delle reazioni della glicolisi dove un gruppo fosfato viene ceduto dall'ATP con fosforilazione del glucosio e formazione del glucosio-6-fosfato e rilascio di ADP. Questa reazione è catalizzata da un enzima che nella nomenclatura internazionale prende il nome di:

ATP: D-glucosio-6-fosfotransferasi

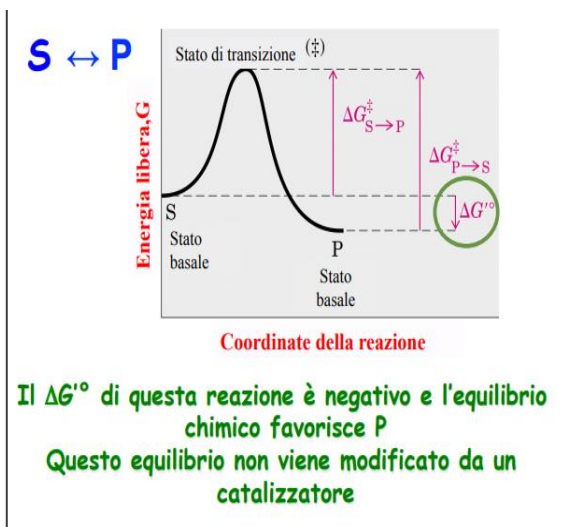
e possiede il seguente numero: E.C.2.7.1.2 (utilizzando questo numero ci riferiamo all'enzima che catalizza questa reazione e a seconda del tessuto in cui la reazione avviene l'enzima prende il nome di glucochinasi o esochinasi). Per quanto riguarda i numeri che compongono questo enzima, fanno riferimento a:

- 2: il trasferimento di fosfato sulla molecola del glucosio è classificato 2 perché vi è un trasferimento, quindi appartiene alla classe delle transferasi.

All'interno delle varie classi vi sono poi le sottoclassi:

- 7: sottoclasse 7 delle transferasi, contiene quegli enzimi che trasferiscono gruppi contenenti fosfato.
- 1: sotto-sottoclasse 1, comprende le transferasi che hanno un gruppo alcolico come accettore.
- 2: nella sotto-sottoclasse 1 la ATP:D-glucosio-6-transferasi è il secondo membro.

La nomenclatura internazionale permette a chi la studia di capire quale reazione è catalizzata da quell'enzima e identifica l'**isoforma** specifica dell'enzima. Gli enzimi però nelle varie reazioni, vengono chiamati con nomi di fantasia e non con i numeri come visto in precedenza. In biochimica lo studio della velocità di una reazione catalizzata da un enzima, e di come essa varia in funzione delle modificazioni dei parametri sperimentali (pH, pressione...) prende il nome di **cinetica enzimatica**. Gli enzimi modificano la velocità delle reazioni, non gli equilibri. Per comprendere la catalisi o cinetica enzimatica bisogna distinguere l'equilibrio chimico dalla velocità di reazione.



Abbiamo riportato in questo grafico il substrato (ogni substrato avrà un'energia libera) e il prodotto. Quello che deve accadere affinché il substrato si trasformi in prodotto, è che il substrato si carichi di energia e arrivi in quello che viene chiamato stato di transizione. È sullo stato di transizione che agisce l'enzima. La velocità di una reazione dipende da un parametro diverso dall'equilibrio ovvero dall'energia d'attivazione che è quell'energia che bisogna fornire al substrato per portarlo nel suo stato di transizione.

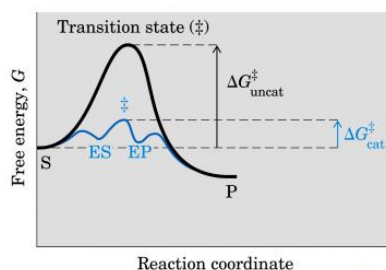
L'energia di attivazione è la quantità minima di energia cinetica che le molecole di un reagente o di un substrato devono possedere per consentire le collisioni, che portano alla formazione del prodotto. Per velocizzare una reazione enzimatica, gli enzimi agiscono su questa energia di

attivazione. Il catalizzatore (enzima) aumenta la velocità della reazione abbassando l'energia di attivazione.

La velocità delle reazioni e gli equilibri chimici hanno precise definizioni termodinamiche. La velocità della reazione ES sarà:

$V = k[S]$ dove k è la costante dell'equilibrio.

Man mano che il substrato diminuisce la reazione diminuisce la propria velocità perché la velocità è direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato.



La velocità complessiva è data dalla tappa (o dalle tappe) con l'energia di attivazione più alta detta "TAPPA CHE LIMITA LA REAZIONE"

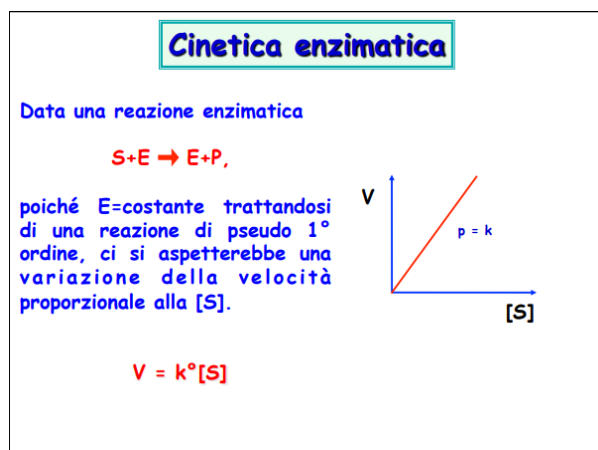
$V = k[S]$ → k è la costante cinetica di 1° ordine che esprime la velocità intrinseca della reazione a concentrazioni unitarie di substrato; la reazione $S \rightarrow P$ è di 1° ordine. L'equazione $V = k[S]$ equivale all'equazione di una retta bisettrice ovvero passante per l'origine in cui k è la pendenza della retta.

Si definisce **ordine di una reazione** la somma degli esponenti con cui le concentrazioni dei reagenti nelle equazioni di velocità.

- $A \rightarrow B$ 1° ordine
- $A + B \rightarrow C + D$ 2° ordine
- $2A \rightarrow B$ 2° ordine
- $A + 2B \rightarrow C + D$ 3° ordine

Se consideriamo la reazione chimica $A + B \rightarrow C + D$:

- $V = k[A][B]$ se nella reazione la $[B]$ si mantiene costante la velocità di reazione risulta proporzionale solo ad A : $V = k^o[A]$, si parla quindi di reazione di pseudo 1° ordine.



- Dal punto di vista grafico, essendo una reazione di pseudo 1° ordine, ci si aspetta di vedere l'equazione di una retta bisettrice; invece, se siamo in presenza di una cinetica enzimatica la curva che osserviamo di velocità al variare della concentrazione del substrato è un'iperbole.

Una **reazione chimica** che sia catalizzata da un enzima prevede la formazione di un complesso enzima substrato che poi si scinde a dare l'enzima più prodotto. Per studiare la cinetica enzimatica, quindi, bisogna tenere presente che non è un semplice equilibrio ma sono due equilibri, uno che porta alla formazione del complesso enzima substrato e l'altro che porta alla scissione del complesso enzima substrato per dare il prodotto. La formazione del complesso enzima substrato è fondamentale per comprendere la catalisi ed è anche il punto di partenza per la quale si deriva la cinetica enzimatica di **Michaelis-Menten**.