

| 1. Enzimi e Catalisi

| Introduzione di enzimi

Gli enzimi sono per lo più proteine, fatta eccezione per alcuni RNA catalitici. La loro funzione principale è quella di catalizzare reazioni, dato che le molecole biologiche sono relativamente stabili a pH neutro temperatura ambiente ed ambiente acquoso della cellula, alcune reazioni sarebbero estremamente lente senza l'utilizzo di fattori enzimatici. Molte reazioni inoltre possono non essere spontanee o anche molto improbabili nell'ambiente cellulare, come la formazione transitoria di un intermedio catalitico instabile o la collisione tra due o più molecole con un certo orientamento, essenziale per la reazione.

Le reazioni necessarie per digerire le sostanze nutritive, per inviare segnali nervosi o per contrarre un muscolo non avvengono a velocità sufficiente senza enzimi.

Un enzima supera questi problemi generando un ambiente specifico in cui una data reazione è energeticamente favorita. Una caratteristica delle reazioni catalizzate dagli enzimi è proprio quella di avvenire all'interno dei confini di una tasca dell'enzima chiamata sito attivo. La molecola che si lega al sito attivo è detta substrato.

Spesso il substrato è sequestrato dal sito attivo. La formazione complesso-substrato è essenziale per la catalisi ed è anche il punto di partenza per l'elaborazione matematica che definisce il comportamento cinetico delle reazioni catalizzate da enzimi.

| Enzimi cofattori e coenzimi

Alcuni enzimi possono funzionare in isolamento, senza l'aiuto di altri fattori. Tuttavia altri necessitano la presenza di fattori esterni, tra cui troviamo:

- Cofattori → Componenti chimici, costituiti da uno o più ioni quali:
 - Fe^{2+}
 - Mg^{2+}
 - Mn^{2+}
 - Zn^{2+}
- **Coenzimi** → I coenzimi sono trasportatori transitori di specifici gruppi funzionali. La maggior parte deriva da vitamine e nutrienti organici presenti nella dieta in piccole quantità.

Alcuni enzimi necessitano sia di cofattori (ioni metallici) sia di coenzimi.

Enzima + cofattore è definito gruppo prostetico.

Oloenzima → Enzima + tutti i cofattori necessari

Apoenzima / Apoproteina / Proteina forma Apo → Presa in considerazione solo la parte proteica, senza cofattori

| Enzimi modificano la velocità di reazione

Gli enzimi alterano unicamente la velocità di reazione. Essendo catalizzatori, essi non si consumano, catalizzano anche la reazione inversa ($R \rightarrow P$ e $P \rightarrow R$). I catalizzatori non modificano gli equilibri, quindi concentrazione dei reagenti e dei prodotti rimangono uguali, quindi non ci sono cambiamenti di concentrazione tra reagenti e prodotti.

L'equilibrio dipende dalla differenza nei livelli di energia libera tra R e P (reagenti e prodotti). Anche se la ΔG di reazione è a favore dei prodotti (è negativo; allo stato basale (punto di partenza di una reazione in un senso o nell'altro), l'energia libera di P è minore di quella di R), questo non significa che la velocità di conversione sia elevata.

Tra R e P esiste una barriera energetica che corrisponde all'energia libera necessaria ad allineare i gruppi reagenti a formare cariche transitorie instabili, a riorganizzare i legami e a produrre altre trasformazioni che servono alla reazione per procedere in una delle due direzioni.

Perché possa avvenire la reazione, le molecole devono superare la barriera e quindi devono raggiungere un livello energetico più elevato di quello basale. AL punto più alto della curva, la molecola ha la stessa probabilità di decadimento verso S o verso P, dato che entrambe le vie sono in discesa.

Questo stato è detto **stato di transizione**, non corrisponde ad una specie chimica con una stabilità significativa, quindi non è un intermedio di reazione.

È più semplicemente un momento molecolare transitorio in cui alcuni eventi come la rottura di un legame, la formazione di un legame o la comparsa di una carica devono procedere fino al punto preciso in cui il composto acquista la probabilità di diventare il prodotto o tornare al substrato.

La differenza di energia tra stato base e transitorio è detta energia di **attivazione**.

La velocità dipende dalla energia di attivazione. Ad elevate energie di attivazione corrispondono basse velocità di reazione.

Velocità di reazione → Aumenta con aumentare di T, p ecc...

Energia di attivazione → Abbassata aggiungendo un catalizzatore

I catalizzatori quindi aumentano la velocità di reazione. Come detto, i catalizzatori non si consumano, non alterano l'equilibrio, funzionano in entrambe le direzioni, aumentano la velocità di una reazione che sarebbe altrimenti estremamente lenta.

Ogni reazione è costituita quindi da diverse tappe, in cui si ha la formazione e la scomparsa di specie chiamati intermedi di reazione.

Intermedio di reazione → Specie chimica transitoria con tempo di vita finito.

Quando $R \rightarrow P$ viene catalizzata da un enzima, i complessi ES ed EP sono intermedi stabili, essi occupano i punti più bassi della curva energetica del grafico della coordinata della reazione catalizzata.

L'interconversione di due intermedi sequenziali costituisce una tappa di reazione.

Se sono presenti più tappe, la velocità di reazione è determinata dalla tappa con

l'energia di attivazione più elevata, che viene chiamata limitatore di velocità o limitante.

La tappa che limita la velocità può variare con le condizioni in cui avviene la reazione, e per molti enzimi tappe diverse possono avere un'energia di attivazione simile, quindi sono tutte limitanti.

Senza le energie di attivazione, le macromolecole complesse potrebbero convertirsi spontaneamente in forme molecolari più semplici. Inoltre le strutture ordinate e complesse e i processi metabolici di ogni cellula non potrebbero esistere. Nel corso dell'evoluzione gli enzimi hanno sviluppato la capacità di abbassare le energie di attivazione in modo selettivo soltanto per le reazioni necessarie per la sopravvivenza.

| Velocità di reazioni

Equilibri di reazione → correlati alla variazione di energia libera standard della reazione stessa

Velocità di reazione → correlata all'energia di attivazione

Un equilibrio $R \leftrightarrow P$ è descritto dalla sua costante di equilibrio K_{eq} , o K .

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$$

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$$

La velocità di una reazione dipende dalla concentrazione del reagente e da una costante di velocità indicata con k . Per la reazione $R \rightarrow P$ la velocità della reazione viene espressa dall'equazione della velocità

$$V = k[S]$$

in questa reazione la velocità dipende solo da $[S]$. k indica che la reazione avviene ad una data T , p ecc..., è una costante del primo ordine e viene espressa come il reciproco del tempo s^{-1} .

Se dipende da due composti diversi, la reazione è di secondo ordine e k è una costante

di velocità del secondo ordine espressa in $M^{-1}s^{-1}$

$$V = k[S_1][S_2]; \quad k = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta G}{RT}}$$

dove k è la costante di Boltzmann, h la costante di Planck.

La relazione tra velocità k ed energia di attivazione ΔG è inversa ed esponenziale.

| Specificità enzimatica

Gli enzimi sono catalizzatori molto efficaci, dato che aumentano la velocità di reazioni da 5 a 17 ordini di grandezza.

Essi sono anche estremamente specifici e possono distinguere tra molecole anche molto simili.

L'aumento della velocità, così come l'energia necessaria ad abbassare così tanto l'energia di attivazione di una specifica reazione derivano da:

1. I legami covalenti subiscono un riarrangiamento di legami covalenti che si ha durante una reazione catalizzata. Tra gruppi funzionali del substrato e dell'enzima hanno luogo molti tipi di reazioni chimiche. I gruppi funzionali catalitici di un enzima possono formare un legame covalente transitorio con il substrato, rendendolo più attivo e reattivo, oppure un gruppo può essere trasferito momentaneamente dal substrato all'enzima. In molti casi queste reazioni avvengono nel sito attivo degli enzimi. Le interazioni covalenti tra enzimi e substrato sono in grado di abbassare l'energia di attivazione generando una via alternativa a bassa energia per la reazione
2. Nelle interazioni non covalenti che si instaurano tra enzima e substrato, che aiutano a stabilizzare la struttura di una proteina e di un complesso proteina-proteina. Queste interazioni sono essenziali anche per la formazione dei complessi tra proteina e piccole molecole, compresi i substrati. L'energia delle interazioni deboli che si instaurano tra enzima e substrato serve ad abbassare l'energia di attivazione. Il fattore che distingue gli enzimi da tutti gli altri catalizzatori è la formazione di un specifico complesso ES. L'interazione tra substrato ed enzima è mediata dalle stesse forze che stabilizzano la struttura delle proteine. La formazione del complesso ES è accompagnata da un piccolo rilascio di energia libera, da cui dipende il grado di stabilità dell'interazione. L'energia che si libera dalle interazioni enzima-substrato viene detta energia di lega ΔG_B . L'energia di legame è la fonte principale di energia libera usata dall'enzima per abbassare l'energia di attivazione della reazione

Quindi:

- Il potere catalitico degli enzimi deriva sostanzialmente dall'energia rilasciata durante la formazione di molti legami e interazioni deboli tra substrato ed enzima
- Le interazioni deboli diventano ottimali nello stato di transizione della reazione. I siti attivi non sono complementari al substrato come tale, ma allo stato di transizione che il substrato deve raggiungere per convertirsi nel prodotto durante la reazione enzimatica

Nei primi studi sulla specificità enzimatica, si ipotizzò che gli enzimi fossero interamente complementari al loro substrato, secondo un meccanismo chiave serratura.

Tuttavia questa ipotesi può non essere corretta quando applicata alla catalisi enzimatica, dato che un enzima complementare al suo substrato potrebbe essere un enzima non molto efficace.

Questo perché un enzima che si adatta perfettamente al suo substrato, ma non al suo stato di transizione, agisce come impeditore della reazione, in quanto si ha una stabilizzazione del substrato.

In seguito si arrivò alla conclusione che un enzima è complementare al stato di transizione della reazione. Le interazioni infatti diventano ottimali solo quando il substrato raggiunge lo stato di transizione.

Nel complesso ES si formano alcune interazioni deboli, ma tutte le possibili interazioni si generano soltanto quando il substrato raggiunge lo stato di transizione.

L'energia libera rilasciata durante la formazione di queste interazioni controbilancia almeno in parte l'energia necessaria per arrivare in cima alla curva energetica.

La somma di energia di attivazione ΔG^* positiva, sfavorevole, e dell'energia di legame ΔG_B negativa e quindi favorevole, porta ad un abbassamento dell'energia di attivazione netta.

Anche se si forma legato all'enzima, lo stato di transizione non è una specie stabile, ma rappresenta una forma di substrato che per un breve periodo di tempo si viene a trovare in cima alla curva energetica. La reazione catalizzata da un enzima è molto più veloce di quella non catalizzata, in quanto la curva energetica è più bassa.

Le interazioni deboli di legame tra enzima e substrato rappresentano la forza trainante della catalisi. I gruppi del substrato coinvolti in queste interazioni deboli devono essere ad una certa distanza dai legami che si devono rompere o modificare. Le interazioni deboli che si formano soltanto nello stato di transizione sono quelle che contribuiscono maggiormente alla catalisi.

La necessità di avere numerose interazioni deboli per guidare la catalisi è una delle ragioni per cui gli enzimi e alcuni coenzimi sono così grandi.

L'enzima deve fornire i gruppi funzionali per le interazioni ioniche, o di altro tipo, e i

legami idrogeno, ed inoltre deve stabilire la loro giusta posizione, in modo che l'energia di legame diventi ottimale durante lo stato di transizione.

L'inserimento corretto viene raggiunto grazie al posizionamento del substrato in una cavità, il sito attivo, dove è di fatto allontanato dall'acqua. La dimensione delle proteine riflette la necessità di creare superstrutture idonee a consentire ai gruppi interagenti il corretto posizionamento e ad impedire alla cavità di collassare.

L'energia di legame che favorisce la catalisi favorisce anche la specificità dell'enzima, cioè la capacità di discriminare tra le diverse molecole simili. Catalisi e Specificità derivano dallo stesso fenomeno. Se il sito attivo di un enzima possiede gruppi funzionali disposti in modo da formare diverse interazioni ottimali con un dato substrato nello stato di transizione, l'enzima non sarà in grado di interagire altrettanto bene con un'altra molecola.

Esempio: Il substrato normale ha un gruppo ossidrilico che forma un legame idrogeno con un specifico residuo Glu dell'enzima. Qualsiasi molecola priva di questo specifico gruppo funzionale non sarà un substrato. Se invece ha un gruppo funzionale in più, e l'enzima non ha una tasca per esso, allora verrà esclusa dal sito attivo.

Affinchè la reazione avvenga, bisogna considerare i fattori in gioco.

La barriera che rallenta la reazione viene impattata da:

- L'entropia delle molecole in soluzione, che riduce la probabilità che queste interagiscano tra loro
- Le molecole di acqua di solvatazione legate con legami idrogeno che circondano e stabilizzano le biomolecole
- La distorsione del substrato
- La necessità di raggiungere un corretto allineamento tra gruppi funzionali catalitici dell'enzima

L'energia di legame può essere utilizzata per superare tutte queste barriere.

1. Una notevole riduzione dei moti relativi dei due substrati che devono reagire tra loro, detta riduzione entropica, è uno degli aspetti vantaggiosi del legame dei substrati con l'enzima. L'energia di legame mantiene i substrati nella posizione ed orientamento corretti per la reazione; questo è uno dei contributi maggiori alla catalisi, in quanto le collisioni produttive tra due molecole in soluzione possono essere molto rare. I substrati si trovano nel giusto allineamento con l'enzima grazie a numerose interazioni deboli tra substrato ed enzima. Riducendo i moti dei reagenti è possibile aumentare la velocità di reazioni di molti ordini di grandezza

2. La formazione di legami deboli tra enzima e substrato porta a desolvatazione del substrato. Le interazioni enzima-substrato sostituiscono la maggior parte dei legami idrogeno tra molecole di substrato che impediscono la reazione
3. L'energia di legame che coinvolge le interazioni deboli che si formano soltanto con lo stato di transizione aiuta a compensare termodinamicamente qualsiasi stiramento o distorsione, soprattutto la redistribuzione degli elettroni cui può andare incontro il substrato durante la reazione
4. Quando un enzima lega il substrato può andare incontro a modifiche conformazionali, indotte dalle interazioni deboli che si generano tra proteina e ligando. Questo processo si chiama adattamento indotto, e può interessare una piccola parte dell'enzima in prossimità del sito attivo, o l'intero dominio. Di solito all'interno dell'enzima si verificano piccoli cambiamenti, che portano il sito attivo nella corretta struttura. Ha lo scopo di posizionare i gruppi funzionali dell'enzima nell'orientamento corretto perché possa avvenire il processo catalitico. Questa variazione conformazionale del sito attivo permette anche la formazione di ulteriori interazioni deboli con lo stato di transizione. La nuova conformazione dell'enzima viene così a possedere una maggiore capacità catalitica. L'adattamento indotto è una proprietà comune a tutte le proteine.

2. Enzimi Regolatori

| 3. Cinetica Enzimatica

| Cinetica degli Enzimi

Uno dei fattori che modificano la velocità di una reazione catalizzata da un enzima purificato è la concentrazione del substrato $[S]$.

Gli studi sull'effetto del substrato vengono complicati ulteriormente dal fatto che la concentrazione di S varia durante il corso di una reazione, man mano che il substrato viene convertito in prodotto. Per eliminare questo problema, si può valutare V_0 la velocità iniziale.

In una tipica reazione l'enzima è presente in quantità nanomolari, mentre $[S]$ può essere 5 o 6 ordini di grandezza più elevato. Se si monitora solo l'inizio della reazione, in un tempo in cui solo una piccola percentuale del substrato è convertita in prodotto, $[S]$ può essere considerata approssimativamente costante. V_0 può essere quindi studiata come funzione di $[S]$.

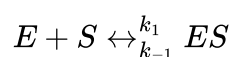
L'effetto della variazione di $[S]$ su V_0 quando la concentrazione dell'enzima viene mantenuta costante:

- Per concentrazioni basse di substrato V_0 aumenta praticamente in modo lineare con l'aumento di $[S]$
- Per concentrazioni elevate di substrato V_0 aumenta in misura sempre minore in funzione dell'aumento di $[S]$
- Alla fine si arriva ad un punto di cui gli aumenti di velocità iniziale in funzione di $[S]$ diventano sempre di entità minore
- Nella regione più piatta della curva, la velocità si avvicina alla velocità massima V_{max} .

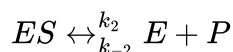
Il complesso ES è quindi la chiave per la comprensione del comportamento cinetico degli enzimi.

Secondo Michaelis e Menten:

- La prima tappa è la combinazione enzima-substrato reversibile, formando il complesso ES velocemente e reversibilmente



- Il complesso ES si decompone poi in una seconda tappa più lenta, che produce enzima libero ed il prodotto della reazione P:



- Questa reazione è più lenta e quindi limita la velocità della reazione complessiva. La velocità della reazione complessiva deve quindi essere proporzionale alla concentrazione delle specie chimiche che reagiscono nella seconda tappa, cioè ad ES

In qualsiasi reazione catalizzata, l'enzima è presente in due forme, e quella libera E e quella combinata con substrato ES.

Se $[S]$ è bassa, la maggior parte dell'enzima sarà nella forma libera. La velocità quindi è proporzionale a $[S]$ dal momento che in base all'equilibrio man mano che $[S]$ tende ad aumentare viene favorita la formazione del complesso ES.

La velocità iniziale massima della reazione catalizzata (V_{max}) si osserva quando praticamente tutto l'enzima è presente nella forma di complesso ES e la concentrazione di E libero diventa trascurabile. In queste condizione l'enzima è saturo di substrato, e quindi ulteriore substrato non avrà effetti sulla velocità di reazione.

Questo rimane vero solo se la concentrazione di S rimane elevata abbastanza da saturare l'enzima.

Man mano che si forma il prodotto ed il complesso ES si dissocia, gradualmente parte dell'enzima torna ad essere libero e pronto ad una nuova reazione catalitica.

L'effetto saturante del substrato è una proprietà dei catalizzatori enzimatici ed è responsabile del plateau della curva. Chiamato anche cinetica di pre-saturazione.

Quando l'enzima si mescola con un grande eccesso di substrato, vi è un periodo iniziale, chiamato stato pre-stazionario, durante il quale avviene la formazione di ES. In genere questo periodo è troppo breve per poter essere osservato, poichè dura solo microsecondi.

La reazione raggiunge rapidamente lo stato stazionario, in cui [ES] rimane approssimativamente costante nel tempo.

Gli enzimi sono potenti catalizzatori presenti in concentrazioni inferiori a quelle del substrato. Una volta superata la fase pre-stazionaria, il prodotto P viene generato alla stessa velocità con cui viene consumato S solo se la concentrazione dell'intermedio ES rimane costante. La V_0 misurata in genere riflette lo stato stazionario, anche se V_0 è limitata ai primi istanti della reazione.

Questa viene chiamata **cinetica dello stato stazionario**.

| Equazione di Michaelis Menten

L'equazione venne formulata sulla base dell'ipotesi che la tappa limitante di una reazione enzimata fosse la demolizione del complesso ES per formare enzima libero e prodotto:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$K_m \rightarrow$ Costante di Michaelis Menten

Includendo anche lo stato stazionario precedente:

La derivazione inizia con le due reazioni di base di formazione e di demolizione del complesso ES.

Nei primi momenti della reazione la concentrazione del prodotto [P] è molto bassa e quindi possiamo semplificare l'equazione supponendo che la velocità di reazione $P \rightarrow S$ inversa sia trascurabile.

La reazione complessiva si riduce a



V_0 dipende dalla demolizione di ES per dare origine al prodotto e quindi è direttamente proporzionale a [ES]

$$V_0 = k_2[ES]$$

Il termine $[ES]$ non è facilmente misurabile.

$[ES]$ può essere approssimato:

$[E]$ è trascurabile rispetto a $[S]$ dato che $[S]$ è sempre molto più grande della concentrazione dell'enzima.

$[E_t]$ rappresenta la concentrazione di enzima totale, ovvero $[ES] + [E]$, enzima libero + impegnato con il substrato.

Si ottengono quindi le seguenti equazioni per approssimare V_0 data la difficile misurazione di $[ES]$:

Velocità di Formazione di ES: $k_1([E_t] - [ES])[S]$

Velocità di Demolizione di ES: $k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

Bisogna ora fare un'assunzione, ovvero che la velocità iniziale della reazione riflette uno stato stazionario in cui $[ES]$ è costante; in queste condizioni, la velocità di formazione di ES diventa uguale a quella della sua demolizione. Questa assunzione si chiama **assunzione dello stato stazionario**:

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

con il termine $\frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1}$ detto Costante di Michaelis K_m si può risolvere l'equazione per $[ES]$ ed ottenere:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

quindi:

$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

Che può essere ulteriormente semplificata dato che la velocità massima viene raggiunta quando tutto l'enzima è stato saturato. In condizioni di saturazione $[ES]$ diventa uguale ad $[E_t]$ e quindi

$$V_{max} = k_2[E_t]$$

Sostituendo V_{max} a $[E_t]$

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + S}$$

Che è l'equazione di Michaelis-Menten, ovvero l'equazione della velocità di reazione a singolo substrato catalizzato da un enzima, ovvero la relazione quantitativa tra velocità iniziale, velocità massima e la concentrazione iniziale del substrato, termini tra loro correlati dalla costante di Michaelis K_m , misurata con la stessa u.m della

concentrazione.

Dall'equazione di Michaelis-Menten si osserva che se V_0 è uguale a $\frac{1}{2} V_{max}$:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = [S]$$

Utile questa definizione per definire K_m come equivalente alla concentrazione del substrato a cui V_0 è la metà di V_{max} .

Michaelis-Menten descrive la cinetica di tutti gli enzimi che presentano una relazione di tipo iperbolico tra velocità della reazione catalizzata e concentrazione del substrato.

Molti enzimi che seguono cinetica di Michaelis-Menten hanno meccanismi di reazione abbastanza diversi e quelli che catalizzano reazione con sei o otto tappe identificabili hanno molto spesso il comportamento tipico dello stato stazionario.

V_{max} e K_m possono variare considerevolmente passando da un enzima all'altro, il che è una grossa limitazione per questo tipo di approccio allo studio della cinetica dello stato stazionario.

Questi sono parametri che si possono determinare sperimentalmente, ma non sono indicativi del numero e della velocità o natura chimica delle tappe attraverso cui avviene la reazione. La cinetica dello stato stazionario rappresenta comunque un sistema standard per valutare caratterizzare e confrontare l'efficienza catalitica di enzimi diversi.

| K_m

K_m può variare considerevolmente da un enzima ad un altro, anche per substrati diversi di uno stesso enzima.

K_m non è indicativo dell'affinità di un enzima per il suo substrato. K_m dipende da aspetti specifici del meccanismo di reazione, come il numero e le velocità relative delle tappe della reazione.

Per una reazione a due tappe, K_m si esprime come:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Se k_2 è la costante che limita la velocità, si ha che $k_2 \ll k_1$ e K_m si riduce a k_{-1}/k_1 che viene detta costante di disassociazione K_d del complesso ES.

Quando si verificano queste condizioni K_m rappresenta una misura dell'affinità dell'enzima per il suo substrato nel complesso ES.

Questa situazione non si applica per la maggior parte degli enzimi.

In alcuni casi si ha che $k_2 \gg k_{-1}$ e quindi $K_m = k_2/k_1$.

In alcuni casi k_2 e k_{-1} sono simili e K_m diventa ancora più complessa diventando una funzione delle tre costanti di velocità.

Michaelis-Menten e la saturazione da substrato degli enzimi restano valide, ma K_m non può essere considerata come indicazione per l'affinità del substrato.

Sono frequenti i casi in cui le reazioni procedono per molte tappe dopo la formazione di ES e K_m diventa una funzione molto complessa di numerose costanti di velocità.

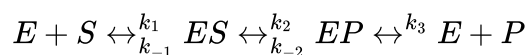
I valori di V_{max} variano considerevolmente passando da un enzima all'altro.

Se un enzima reagisce con un meccanismo a due tappe, secondo Michaelis-Menten, la V_{max} equivale a $k_2[E_t]$ e k_2 diventa la costante che limita la velocità.

Il numero delle tappe della reazione e l'identità di quella che limitano la velocità della reazione variano da enzima a enzima.

Considerando $EP \rightarrow E + P$, diventa la tappa limitante della velocità.

Quando $[P]$ è bassa, la reazione può essere scritta come:



In questo caso la maggior parte degli enzimi è a saturazione nella forma EP e V_{max} diventa uguale a $k_3[E_t]$.

k_{cat} è la costante di velocità generale necessaria per descrivere la tappa che limita la velocità di una reazione catalizzata da un enzima in condizioni di saturazione.

Se la reazione è costituita da diverse tappe e una di queste è chiaramente quella limitante, k_{cat} diventa uguale alla costante di velocità della tappa limitante.

Mentre in alcune equazioni la tappa limitante è evidente, in equazioni in cui le tappe limitanti sono molteplici, k_{cat} può diventare una funzione complessa delle costanti di velocità delle varie tappe della reazione.

$k_{cat} = V_{max}/[E_t]$ per Michaelis-Menten, quindi $V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]}$

k_{cat} è una costante del primo ordine espressa come reciproco del tempo.

k_{cat} viene chiamata anche numero di turnover ed equivale al numero di molecole di substrato che vengono convertite in prodotto nell'unità di tempo da una singola molecola enzimatica quando l'enzima è saturo con il substrato.

Il modo migliore per confrontare l'efficienza catalitica di enzimi diversi o dello stesso enzima con substrati diversi è paragonare il rapporto k_{cat}/K_m delle due reazioni.

Questo parametro è chiamato costante di specificità, è la costante di velocità della conversione di E+S in E+P.

Quando $[S] \ll K_m$:

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_t][S]$$

In questo caso la velocità iniziale dipende dalla concentrazione dei due reagenti, Et ed

S. Questa è quindi una reazione del secondo ordine e la costante k_{cat}/K_m è una costante di secondo ordine espressa in $m^{-1}s^{-1}$.

Esiste un limite superiore al valore della costante k_{cat}/K_m imposto dalla velocità con cui i due reagenti diffondono l'uno verso l'altro nelle soluzioni acquose. Questo limite controllato dalla diffusione varia da 10^8 a $10^9 m^{-1}s^{-1}$ e molti enzimi hanno valori di costante di specificità compresi in questo intervallo. Si può dire che questi enzimi hanno raggiunto la perfezione catalitica.

Nella maggior parte delle reazioni enzimatiche partecipano due substrati e si formano due prodotti. Queste reazioni includono, ad esempio, il trasferimento di gruppi funzionali o reazioni redox. Un esempio è la reazione catalizzata dall'esochinasi, in cui un gruppo fosfato viene trasferito dall'ATP al glucosio $ATP + \text{glucosio} \rightarrow ADP + \text{glucosio-6-fosfato}$

Anche per le reazioni con due substrati si può applicare Michaelis-Menten, considerando un valore di K_m per ciascun substrato.

Le reazioni bi-bi (due substrati-due prodotti) seguono diversi meccanismi:

1. Formazione di un complesso ternario, dove entrambi i substrati si legano contemporaneamente all'enzima
 1. L'ordine di legame può essere casuale o ordinato
2. Meccanismo a Ping-Pong, o doppio spiazzamento
 1. Il primo substrato si lega, viene trasformato, ed un intermedio covalente si forma con l'enzima
 2. Questo intermedio reagisce poi con il secondo substrato per formare il secondo prodotto
 3. Il substrato A e B non sono mai legati contemporaneamente sull'enzima

Per descrivere queste reazioni si usa la nomenclatura di Cleland, dove:

- I substrati sono indicati con A, B, C ecc...
- I prodotti sono indicati con P, Q, S
- Enzima come E, e le sue forme modificate come F, G ecc...
- Viene anche utilizzata una rappresentazione grafica con:
 - Linee orizzontali → sequenza della reazione
 - Linee verticali → legami e rilasci
 - Biforcazioni → legami o rilasci casuali

Michaelis-Menten può fornirci solo poche informazioni sul numero di passaggi ed intermedi di una reazione enzimatica, ma può essere utilizzata per distinguere i meccanismi di reazione che hanno un intermedio ternario e quelli che non lo hanno, come i meccanismi a ping-pong.

La cinetica dello stato stazionario può aiutare a distinguere anche tra legame ordinato o casuale dei substrati e dei prodotti in reazioni con intermedi ternari.

| pH ed attività enzimatica

L'attività enzimatica dipende fortemente dal pH. Ogni enzima ha un pH ottimale, cioè un intervallo di pH in cui la sua attività catalitica è massima.

Al di fuori di questo intervallo, l'attività enzimatica diminuisce fino a cessare del tutto se il pH è troppo acido o troppo basico.

Il pH può alterare la struttura tridimensionale dell'enzima, denaturandolo.

Inoltre le catene laterali degli amminoacidi sono sensibili a cambiamenti del pH, dato che la variazione modifica la carica elettrica di queste catene. Ad esempio, la rimozione di un protone dalle catene laterali da His può causare l'eliminazione di una interazione ionica essenziale per la stabilizzazione della conformazione dell'enzima. Meno comuni sono casi in cui la dipendenza dal pH è data dalla titolazione (il rilascio o il legame di un protone) di un gruppo appartenente al substrato.

1. Glicolisi

| 2. Enzimi Regolatori

| Enzimi Regolatori

In molti processi metabolici, gruppi di enzimi catalizzano reazioni sequenziali per far avanzare processi metabolici, come la demolizione a molte tappe del glucosio in lattato o la sintesi di un amminoacido. Il prodotto di reazione di un enzima diventa il substrato dell'enzima successivo.

Sebbene la maggior parte degli enzimi rispetta la cinetica descritta da Michaelis-Menten. Ciascuna via però comprende uno o più enzimi che hanno un notevole effetto sulla velocità dell'intera sequenza di reazioni. L'attività catalitica di questi enzimi regolatori aumenta o diminuisce in base ai segnali. La modulazione della velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi regolatori.

La modulazione della velocità delle reazioni catalizzate dagli enzimi regolatori, e quindi della velocità dell'intera sequenza metabolica, permette alla cellula di adeguarsi alle

richieste di energia e di biomolecole necessarie per la crescita e per la riparazione dei danni subiti.

Le attività degli enzimi regolatori possono essere modulate secondo varie modalità:

- Enzimi allosterici → Legame irreversibile, non covalente, di composti regolatori chiamati effettori o modulatori allosterici, in genere piccoli metaboliti o cofattori
- Modificazione Covalente reversibile
Entrambe le classi sono costituite per lo più da proteine con molte subunità. Sito regolatore e sito attivo possono essere molto distanti.
Molti enzimi hanno due aggiuntivi meccanismi di regolazione enzimatica:
 - Alcuni sono stimolati ed inibiti da *proteine regolatrici* legate ad essi
 - Altri sono attivati solo quando vengono rimosse porzioni della proteina mediante *scissione proteolitica*. Differentemente dagli effettori, questa è permanente ed irreversibile
La crescita cellulare dipende strettamente dall'uso efficiente delle risorse energetiche.

In uno stesso enzima possono coesistere diversi tipi di regolazione. Le modificazioni possono essere del tipo tutto o niente come la scissione proteolitica, oppure possono permettere sottili variazioni dell'attività enzimatica.

| Enzimi allosterici e Modulatori

Spesso il substrato è anche il modulatore dell'enzima. In questo caso gli enzimi sono detti **omotropici**. Similmente all'emoglobina, il legame enzima substrato può causare una variazione conformazionale da uno stato T teso inattivo ad un stato R rilassato attivo. Queste variazioni conformazionali si riflettono sull'attività di altri siti della proteina.

Se il modulatore è diverso dal substrato, l'enzima è detto **eterotropico**.

I modulatori allosterici non vanno confusi con gli inibitori incompetitivi e misti. Questi inibitori si legano ad un sito diverso dal sito attivo, non mediano necessariamente variazioni conformazionali tra forme attive ed inattive, e gli effetti sulla cinetica enzimatica sono diversi.

Le proprietà degli enzimi allosterici differiscono notevolmente da quelle degli enzimi non regolatori.

Strutturalmente:

- Gli enzimi allosterici possiedono uno o più siti di legame del modulatore, o allosterici, cioè siti per il legame del modulatore. Così come il sito attivo è specifico per il substrato, il sito regolatore è specifico per il suo modulatore
 - Gli enzimi che interagiscono con diversi modulatori di solito possiedono siti di legame specifici per ognuno di essi. Negli enzimi omotropici il sito attivo ed il sito regolatore coincidono
- Gli enzimi allosterici sono in genere di maggiori dimensioni e più complessi degli enzimi non allosterici. La maggior parte contiene due o più subunità.

Esempio → Aspartato transcarbamilasi

- ATCase. 12 catene polipeptidiche organizzate in 6 subunità catalitiche (due complessi trimerici) e 6 regolatrici. Le proprietà allosteriche dell'enzima dimostrano che le subunità catalitiche funzionano in modo cooperativo. Le subunità regolatrici contengono siti per il legame di ATP (regolatore positivo) e CTP (regolatore negativo). Il CTP è uno dei prodotti finali della via, quindi la sovrappresenza di CTP serve a limitare l'azione dell'ATCase, in condizioni in cui non serve ulteriore CTP.
 - Ovviamente alte concentrazioni di ATP sono il segnale opposto, e quindi l'ATP è un regolatore positivo perché la sua sovrappresenza indica la necessità di produrre CTP. Indica che il metabolismo cellulare è in salute, e che la cellula sta crescendo, quindi potrebbero essere necessari ulteriori NTP o dNTP per supportare la trascrizione dell'RNA e la replicazione del DNA

| Cinetica degli enzimi regolatori

La relazione tra V_0 ed $[S]$ degli enzimi allosterici non obbedisce alla cinetica di Michaelis-Menten.

Gli enzimi allosterici mostrano curve di saturazione con il substrato quando la $[S]$ è sufficientemente elevata, però per alcuni di essi la curva di V_0 in funzione di $[S]$ ha una forma a sigmoide invece che iperbolica, come quella osservata per enzimi non regolatori.

Dalla sigmoide di saturazione si può ricavare il valore di $[S]$ corrispondente ad una V_0 pari alla metà della velocità massima, ma non è possibile equipararla a K_m perché l'enzima non segue cinetica di Michaelis-Menten.

Viene usato quindi il simbolo $[S]_{0.5}$ o $K_{0.5}$ per indicare la concentrazione del substrato corrispondente alla metà della velocità massima di una reazione catalizzata da un enzima allosterico.

La cinetica sigmoide riflette la presenza di interazioni cooperative fra le subunità della proteina enzimatica.

La variazione di struttura di una subunità si traduce in variazioni strutturali delle subunità adiacenti. Questo effetto è mediato da interazioni non covalenti che si verificano in corrispondenza dell'interfaccia tra diverse subunità.

L'ATCasi è un esempio di comportamento cinetico allosterico eterotropico ed omotropico.

Nel suo comportamento omotropico:

Il legame all'enzima dei substrati, aspartato e carmail fosfato, innesca la conversione del suo stato conformazionale relativamente inattivo T nello stato più attivo R.

In questo caso, i cambi conformazionali seguono la curva a sigmoide.

In base al sigmoide, piccole variazioni nella concentrazione di un modulatore possono portare a vaste variazioni dell'attività enzimatica. Piccole variazioni di $[S]$ corrispondono a un aumento corrispondentemente elevato di V_0 .

Il comportamento eterotropico è mediato dalle interazione tra ATCasi e ATP e CTP.

Il legame con un modulatore per gli enzimi allosterici eterotropici causa il cambiamento della curva da sigmoide ad uno stato quasi iperbolico. Determina un aumento della velocità di reazione a una data concentrazione di substrato. Una diminuzione nel contempo del valore di $K_{0.5}$ ma senza una variazione apprezzabile di V_{max} .

Per l'ATCasi, il legame con l'ATP e l'ATC genera queste modificazioni cinetiche.

Con l'ATP la curva di V_0 in funzione di $[S]$ diventa sostanzialmente simile a quella dello stato R, se la concentrazione di ATP è elevata.

Con concentrazioni elevate di ATC invece la curva di V_0 in funzione di $[S]$ diventa ancora più sigmoide, essendo un modulatore negativo, con un aumento della $K_{0.5}$.

Altri enzimi allosterici eterotropici rispondono ad un attivatore con un aumento della velocità massima V_{max} e con una piccola variazione di $K_{0.5}$. Presentano curve di saturazione diverse in risposta ai loro modulatori, in quanto alcuni rispondono solo ad effetti positivi, altri solo ad effetti negativi.

| Regolazione tramite modifiche chimiche covalenti

Alcuni enzimi vengono regolati mediante la modificazione covalente di uno o più residui amminoacidici. Le modificazioni sono:

- Fosforilazione

- Ubiquitazione
- Sumoilazione
- ADP-Ribosilazione
- Acetilazione
- Adenililazione
- Miristilazione
- Metilazione

Le modificazioni possono essere gruppi, come il fosfato, oppure intere proteine, come l'ubiquitina o le sumo (small ubiquitin-like modifier).

Vengono inseriti o rimossi ad opera di altri enzimi. Modifica le proprietà di un residuo amminoacidico. L'introduzione di una carica può alterare le proprietà locali dell'enzima e indurre un cambiamento di conformazione.

L'introduzione di un gruppo idrofobico può favorire l'associazione con la membrana.

Numero e tipo di modificazioni a cui vanno incontro gli enzimi sono elevatissime, non è possibile descriverle dettagliatamente.

Ad esempio, il gruppo amminico terminale è acetilato nell'80% delle proteine eucariotiche solubili in acqua.

L'ubiquitina viene utilizzata per marcare le proteine per indirizzarle verso la degradazione proteolitica.

Le sumo sono legate a proteine nel nucleo, che operano come regolatori di trascrizione e riparazione.

L'ADP ribosilazione è una modificazione covalente particolarmente importante.

L'ADP ribosio viene donato dal NAD. Questo tipo di reazione viene effettuata da un enzima batterico Dinitrogenasi reductasi. È importante per la fissazione dell'azoto.

La tossina difterica e del colera catalizzano l'ADP-Ribosilazione provocando la inattivazione di enzimi e proteine essenziali per la cellula.

La fosforilazione è la più comune regolatoria. Un terzo di tutte le proteine eucariotiche è fosforilato, e quindi uno o più di uno di questi eventi di fosforilazione ha luogo durante un processo regolatorio.

| Chinasi

La fosforilazione di residui viene catalizzata da un enzima chiamato proteina chinasi. Questi enzimi vengono codificati da più di 500 geni.

Nelle reazioni catalizzate, il gruppo fosforico in posizione γ di un nucleoside trifosfato viene trasferito a un particolare residuo di Ser, Thr o Tyr presente sul bersaglio.

Gli atomi di ossigeno del gruppo fosforico possono formare legami idrogeno con uno o

più gruppi di una proteina, generalmente il gruppo ammidico dello scheletro polipeptidico all'inizio di un α elica, o il gruppo guanidinico carico di un residuo di arginina.

Le due cariche negative della catena laterale fosforilata possono respingere residui vicini anch'essi carichi negativamente.

Quando la catena laterale modificata è localizzata in una regione dell'enzima cruciale per il mantenimento della sua struttura tridimensionale, la fosforilazione può avere effetti sostanziali sulla conformazione dell'enzima, e quindi sul legame del substrato e sulla catalisi.

La rimozione di gruppi fosfato avviene mediante la fosfoproteina fosfatasi, o proteina fosfatasi.

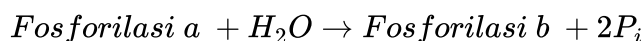
| Esempio: Glicogeno Fosforilasi (Muscolo e Fegato)

Reazione: $(Glucosio)_n + P_i \rightarrow (Glucosio)_{n-1} + Glucosio - 1 - fosfato$

La glucosio 1-fosfato può essere usato per la sintesi di ATP nel muscolo o convertito in glucosio libero nel fegato. Non è considerabile chinasi perchè non usa NTP per la donazione del gruppo fosfato.

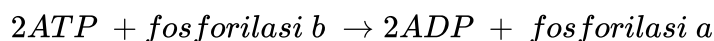
La glicogeno fosforilasi può assumere due forme:

- a → Più attiva → due subunità, ognuna con un Ser in grado di legare un gruppo fosfato
- b → Meno attiva →
I residui Ser-P sono necessari per l'espressione della massima attività enzimatica. I gruppi fosfato possono essere rimossi idroliticamente dalla fosforilasi a mediante un altro enzima chiamato fosfoproteina fosfatasi 1 (PP1):



Secondo questa reazione, la fosforilasi a viene convertita in b dalla rottura di due legami covalenti Ser-P, una per ciascuna subunità.

La fosforilasi b può essere riattivata da una fosforilasi chinasi, che dona un gruppo fosfato dall'ATP al gruppo ossidrilico di due specifici residui di serina nella molecola di fosforilasi b



La demolizione del glicogeno nel muscolo scheletrico e nel fegato viene regolata dalla variazione del rapporto tra queste due forme enzimatiche. Forma a e b hanno strutture diverse. Il sito attivo subisce modifiche strutturali e di conseguenza si osservano variazioni dell'attività catalitica quando le due forme tendono ad interconvertirsi.

| Regolazione delle chinasi

I residui Ser Thr e Tyr sono localizzati in motivi strutturali comuni, chiamate sequenze consenso, che sono riconosciute poi da alcune proteine chinasi specifiche.

Alcune chinasi sono basofile e preferiscono fosforilare un residuo che si trova nelle vicinanze di amminoacidi basici, altre hanno preferenze diverse per il substrato, per esempio un residuo vicino alla prolina.

Oltre alla struttura primaria, è importante il folding della proteina, che avvicina residui che sono molto lontani. La struttura terziaria può quindi stabilire se una certa chinasi può avere accesso ad un dato residuo e riconoscerlo come substrato. La vicinanza di altri residui fosforilati è un altro fattore che influenza la specificità di un substrato.

La regolazione mediante fosforilazione è spesso complicata.

Alcune proteine hanno più sequenze consenso riconosciute da più proteine chinasi, ognuna delle quali può fosforilare la proteina ed alterare la sua attività enzimatica. Spesso la regolazione è gerarchica, ovvero un residuo può essere fosforilato solo se quelli vicini sono già fosforilati.

Affinchè sia un meccanismo di regolazione utile, la fosforilazione deve essere reversibile. Infatti, le fosfoproteine presenti nelle cellule sono in grado di idrolizzare specifici esteri fosforici Ser-P Thr-P e Tyr-P, rilasciando fosfato inorganico.

Le fosfoproteine agiscono solo su un sottogruppo di proteine fosforilate, e mostrano una specificità di substrato inferiore a quella delle proteine chinasi.

| Proteoliti

Nel processo di attivazione di alcuni enzimi proteolitici, un precursore inattivo, chiamato zimogeno, viene scisso in modo da generare l'enzima attivo.

Molti enzimi proteolitici di stomaco e pancreas sono regolati attraverso questo processo.

La chimotripsina e tripsina sono inizialmente generate come chimotripsogeno e tripsogeno.

La rottura dei legami covalenti espone il sito attivo. Poichè la rottura è ovviamente irreversibile, la disattivazione di questi enzimi richiede processi alternativi.

Le proteasi infatti sono disattivate da inibitori con affinità elevatissima per il sito attivo della proteasi.

L' α_1 antiproteinasi è un inibitore per l'elastasi. L'elastasi è una proteasi per l'elastina, componente di alcuni tessuti connettivi.

Il fumo di sigaretta porta ad insufficienza di antiproteinasi, causa dell'enfisema, ed altri

danni ai polmoni.

Le proteasi non sono le sole proteine attivate per proteolisi. Negli altri casi i precursori non sono zimogeni ma *proproteine* o *proenzimi* (esempio: Proinsulina → insulina).

| Coagulo

Il coagulo è un aggregato di frammenti cellulari chiamati piastrine, tenuti insieme da legami crociati e stabilizzati da fibre proteiche, costituite principalmente da fibrina. La fibrina deriva da un zimogeno solubile chiamato fibrinogeno. È il terzo tipo proteico più abbondante nel plasma sanguigno.

La formazione del coagulo è uno degli esempi maggiori di cascata regolatoria, un meccanismo che permette una risposta ad un segnale molecolare molto sensibile ed anche amplificato. Le vie sono sottoposte a diversi tipi di regolazione.

In una cascata regolatoria, un segnale determina l'attivazione della proteina X. La proteina X catalizza l'attivazione della proteina Y. La proteina Y catalizza l'attivazione di proteina Z e così via.

Dato che X Y e Z sono dei catalizzatori e attivano molte copie della proteina seguente nella catena, la risposta al segnale iniziale viene amplificata ad ogni tappa. In alcuni casi, le tappe di attivazione coinvolgono una scissione proteolitica e sono irreversibili. In altri casi l'attivazione avviene attraverso altre forme di modificazione delle proteine, come la fosforilazione, facilmente reversibile.

Le cascate regolatorie governano una vasta gamma di processi biologici, compresa crescita cellulare, apoptosi ecc....

Il fibrinogeno è il precursore della fibrina. È costituito da eterotrimeri $A\alpha_2B\beta_2\gamma_2$, con 3 tipi di subunità differenti ma collegate evolutivamente. Viene convertito in fibrina $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ e quindi attivato per la coagulazione sanguigna, mediante rimozione proteolitica di 16 a.a. all'estremità amminotermine di ciascuna subunità α e di 14 residui all'estremità amminotermine della subunità β .

La rimozione del peptide è catalizzata dalla trombina, una serina proteasi.

I residui amminoterminali che vengono esposti dalle modificazioni delle subunità α e β si adattano perfettamente ai siti di legame presenti rispettivamente nelle porzioni globulati carbossiterminali delle subunità γ e β di un'altra fibrina.

La fibrina quindi polimerizza e forma una matrice gelatinosa ed un coagulo morbido.

Le fibrine associate vengono stabilizzate da legami crociati covalenti generati da condensazione catalizzata da una transglutaminasi chiamata fattore XIIIa. La fibra generata dai legami crociati, detta fibrina, aiuta a stabilizzare il coagulo.

L'attivazione del fibrinogeno è la tappa finale di due cascate regolatorie parallele ma interconnesse. Dato che tutti i componenti sono presenti nel plasma sanguigno, questa via è detta **intrinseca**.

La seconda via è quella **estrinseca**, ed è quella del fattore tissutale. Componente principale di questa via è il fattore tissutale TF non presente nel plasma.

La coagulazione inizia con l'attivazione delle piastrine circolanti, all'altezza di un trauma. Il danneggiamento del tessuto causa l'esposizione delle molecole di collagene presenti all'interno dello strato di cellule epiteliali che circonda ogni vaso sanguigno.

L'attivazione delle piastrine è innescata principalmente dall'interazione con queste fibre di collagene. L'attivazione porta alla presentazione dei fosfolipidi anionici sulla superficie di ciascuna piastrina e al rilascio di molecole segnale come i **trombossani**, che stimolano l'attività di altre piastrine.

Le piastrine attivate si aggregano all'altezza del sito della ferita, formando un coagulo non compatto. La stabilizzazione richiede la fibrina generata dalle cascate di coagulazione.

La via estrinseca si attiva per prima:

- Il danno tissutale espone il plasma sanguigno al TF ampiamente immerso nelle membrane dei fibroblasti e delle cellule della muscolatura liscia che si trovano nello strato endoteliale
- Si forma un complesso di inizio tra TF e fattore VII presente nel plasma sanguigno. VII è uno zimogeno di una serina proteasi, TF è un suo regolatore
- VII viene convertito nella sua forma attiva, VIIa grazie ad un taglio proteolitico effettuato da Xa, un'altra serina proteasi
- TF-VIIa taglia poi X nella sua forma attiva, Xa

Un piccolissimo quantitativo di VIIa è sempre presente nel sangue, sufficiente a formare una altrettanto piccola quantità di TF-VIIa dopo il danneggiamento del tessuto ed iniziare la produzione di Xa.

- Una volta che i livelli di Xa sono sufficienti, si complessa con il Va, ed Xa-Va idrolizza la protrombina in trombina, che a sua volta scinde il fibrinogeno
- Questa via estrinseca genera una scarica di trombina
- TF-VIIa viene spento da TFPI (proteina inibitore del fattore tissutale)

La formazione del coagulo è sostenuta dall'attivazione dei componenti della via intrinseca.

- Fattore IX viene convertito in IXa da TF-VIIa durante le prime fasi della sequenza del processo di coagulazione

- IXa si complessa con VIIIa, è un alternativo per la conversione di X in Xa
- La maggior parte di XIa viene generato dalla scissione proteolitica dello zimogeno fattore XI operata dalla trombina

Una coagulazione incontrollata può portare al blocco dei vasi, causando infarti o ictus. È richiesta quindi una regolazione accurata. Nell'istante in cui si forma il coagulo rigido, parte già la regolazione.

La trombomodulina interviene complessandosi con la trombina per scindere lo zimogeno della serina proteasi **proteina C**.

La proteina C nella sua forma attiva, in complesso con la proteina regolatrice S, rompe i fattori Va e VIIa, inattivandoli. Si ha quindi la soppressione dell'intera cascata.

Un'altra proteina, antitrombina III, è un inibitore delle serina proteasi.

Forma un complesso con le serina proteasi in rapporto 1 a 1, in particolar modo con Xa e trombina.

Questi due sistemi di regolazione, insieme a quello di TFPI, aiutano a stabilire un livello o una soglia di esposizione al TF da raggiungere per attivare la cascata della coagulazione.

I portatori di difetti genici che riducono i livelli di proteina C o di ATIII presentano rischi alti di trombosi.

3. Cinetica Enzimatica