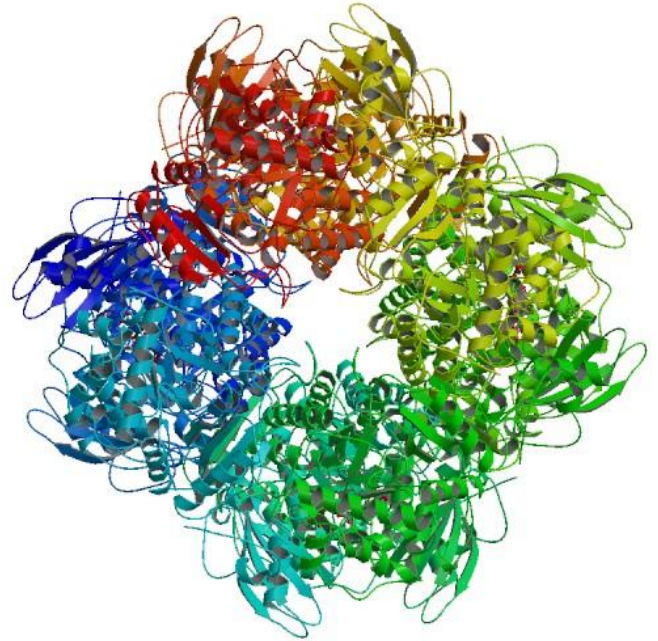


# Enzimi

---

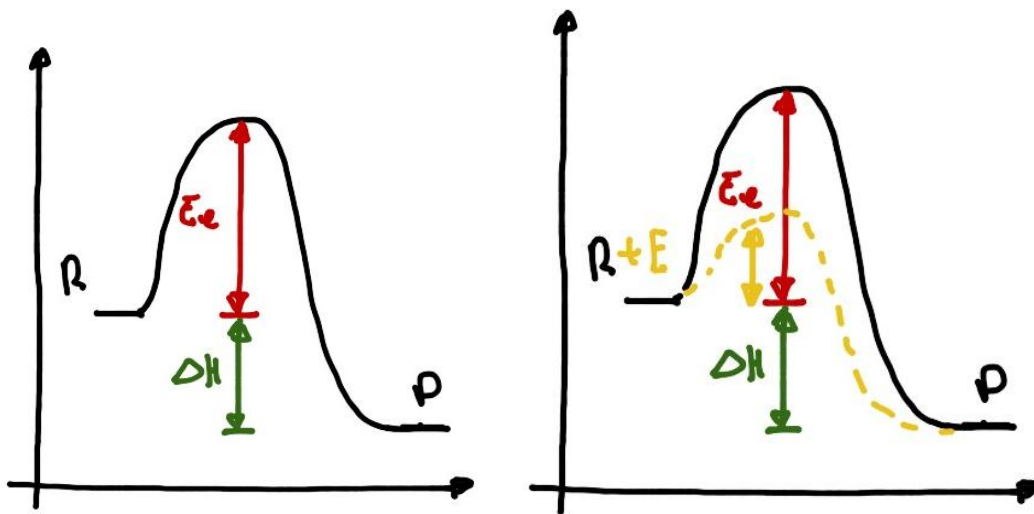
1. Definizione
2. Numero di Turn-over
3. Nomenclatura
4. Cofattori
5. Sito attivo
6. Specificità
  - Modello di Fischer (chiave-serratura)
  - Modello dell'adattamento indotto
7. Cinetica enzimatica
  - Equazione di Michaelis-Menten
  - Interpretazione grafica
  - Calcolo dei parametri cinetici con il metodo dei doppi reciproci
8. Fattori che determinano la velocità di reazione
9. Inibizione enzimatica
  - Reversibile competitiva
  - Reversibile non competitiva
  - Irreversibile
10. Controllo dei processi metabolici
  - Enzimi allosterici
  - Meccanismo concertato di Monod-Wyman-Changeux (MWC)
  - Meccanismo sequenziale di Koshland-Nemethy-Filmer (KNF)
  - Inibizione retroattiva (feed-back)
  - La regolazione allosterica dell'emoglobina



## 1. Definizione

Gli enzimi sono catalizzatori biologici che consentono alle reazioni che avvengono nelle cellule viventi di procedere con sufficiente velocità nelle condizioni di vita proprie di un organismo. Dal punto di vista organico essi sono proteine globulari (macroproteine) prodotte dall'organismo e presenti in quantità minime all'interno delle cellule.

Essendo dei catalizzatori, gli enzimi diminuiscono l'energia di attivazione della reazione come è possibile dedurre dai seguenti grafici :



R = reagenti , P = prodotti , E = enzima ,  $E_a$  = energia di attivazione della reazione

È opportuno ricordare che il catalizzatore risulta essere immutato al termine della reazione e quindi può essere "usato nuovamente", inoltre esso non modifica le concentrazioni dei reagenti e dei prodotti in una reazione di equilibrio ma aumenta soltanto la velocità di reazione.

Rispetto ai catalizzatori inorganici, i catalizzatori biochimici sono altamente specifici e si attivano soltanto in determinate condizioni.

Per esempio il glutammato di sodio (che essendo un carboidrato si riscontra in due forme, destrosa e sinestrosa) viene usato come sostanza sapida nei "dadi da cucina", la cosa curiosa è che solo la forma sinestrosa ha effetto sulle nostre papille gustative.

## 2. Numero di Turn-over

Il numero di Turn-over rappresenta la capacità di una molecola di enzima di trasformare  $n$  molecole di reagenti in un secondo.

Come abbiamo visto gli enzimi diminuiscono notevolmente l'energia di attivazione, quindi il numero di molecole di reagenti che vengono trasformate in prodotti è notevolmente maggiore se la reazione biochimica è catalizzata da un enzima.

Un esempio è fornito dall'enzima anidrasi carbonica che aumenta di sette ordini di grandezza la velocità col quale l'anidride carbonica viene trasformata in acido carbonico, ciò permette che il tampone  $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-$  (acido carbonico/ idrogeno carbonato) mantenga il valore del pH del sangue tra 7,1 e 7,5 .

### 3. Nomenclatura

Il termine enzima proviene dal greco e letteralmente significa "nei lieviti". Inizialmente furono usati nomi di fantasia per denominare i vari tipi di enzimi, oggi si è soliti usare il nome del substrato su cui agisce l'enzima, seguito dalla desinenza *-asi* (es. amilasi, ureasi, esterasi ecc.) . Nel 1961 la Commissione Internazionale sugli Enzimi propose un metodo generale di nomenclatura, secondo il quale gli enzimi sono suddivisi in sei classi secondo la tipologia della reazione che catalizzano.

Gli enzimi si suddividono in:

1. **Ossido-riduttasi**: catalizzano le reazioni di ossidoriduzione (redox)
2. **Transferasi**: catalizzano il trasferimento di gruppi funzionali.
3. **Idrolasi**: catalizzano le reazioni di idrolisi.
4. **Liasi**: (da *Liason*, che in francese significa legame) catalizzano le reazioni ove avviene una rottura di un legame, tali reazioni non devono essere né idrolisi né redox.
5. **Isomerasi**: catalizzano la formazione di isomeri.
6. **Ligasi**: catalizzano la formazione di un legame fra due molecole, a spese dell'energia fornita dal legame pirofosforico di una molecola di ATP, in parole più semplici possiamo affermare che operano reazioni di condensazione in cui si libera una molecola di ATP.

### 4. Cofattori

Alcuni enzimi possiedono la facoltà di reagire tal quali, sono immediatamente attivi e funzionanti come nel caso del lisozima, l'enzima contenuto nelle lacrime che è capace di idrolizzare il legame glicosidico della parte polisaccaride delle pareti cellulari è quindi capace di rompere le membrane cellulari batteriche e svolgere una funzione disinfettante.

Molti enzimi per svolgere l'azione catalitica richiedono la presenza di alcuni gruppi, non proteici che hanno basso peso molecolare, detti **cofattori** o attivatori.

Il complesso enzima-cofattore viene definito **oloenzima** , mentre se si rimuove il cofattore rimane l'**apoenzima** inattivo. In altri termini possiamo affermare che cofattore e apoenzima costituiscono la proteina coniugata, denominata oloenzima.

I cofattori possono essere:

- Ioni inorganici (cationi metallici, specialmente dei metalli alcalino terrosi, come:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ), si ricordi il magnesio che attiva i processi neurologici e produce una maggiore attenzione nell'individuo.
- Molecole organiche denominate anche **coenzimi**. Queste agiscono comunemente come trasportatori di atomi o di gruppi funzionali specifici. Alcuni esempi sono: nicotinamide-adenin-dinucleotide  $NAD^+$ , nicotinamide-adenin-dinucleotidofosfato  $NADP^+$ , flavin-adenin-dinucleotide FAD, che funzionano come accettori e trasportatori di atomi di idrogeno. L'adenosin-trifosfato è invece coinvolto nel trasferimento di gruppi fosforici, l'ultimo esempio è l'acetilcoenzima A.

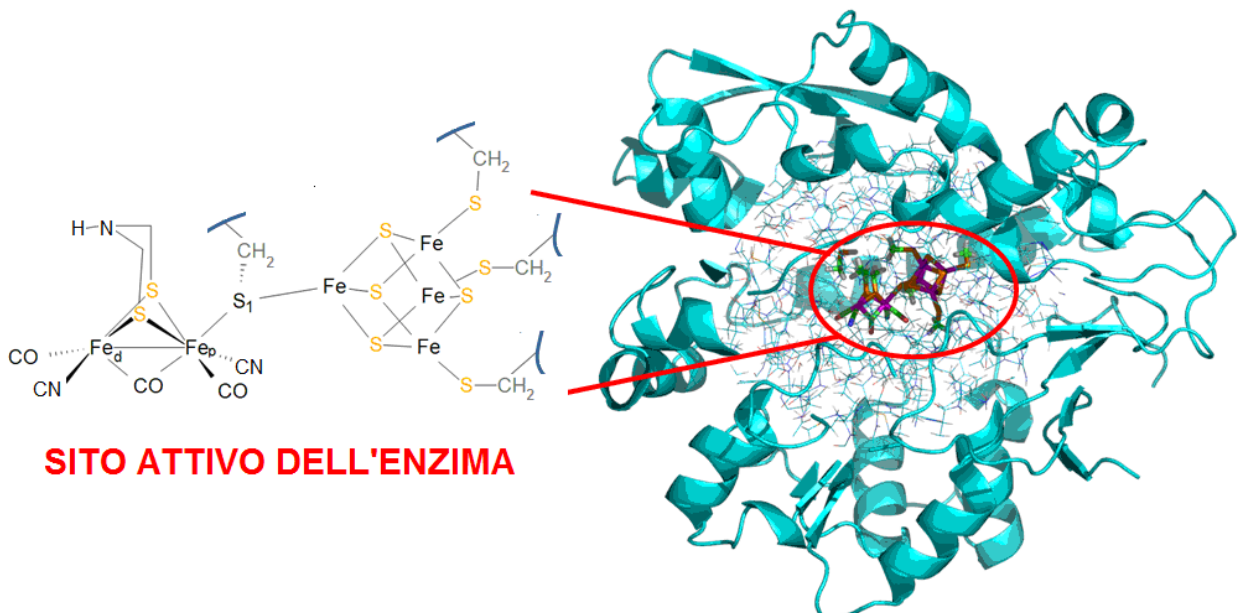
Nel nostro organismo sono presenti circa quindicimila apoenzimi e soltanto poche decine di cofattori, quindi è facile intuire che un cofattore attivi più tipi di enzimi.

### 5. Sito attivo

Il peso molecolare del substrato è in genere molto inferiore rispetto a quello dell'enzima (che può arrivare a misurare anche migliaia di Dalton). Ciò ci suggerisce che le dimensioni della molecola enzimatica siano molto superiori rispetto a quelle del substrato su cui essa agisce quindi solo alcune piccole regioni dell'enzima sono responsabili della catalisi, queste vengono denominate **siti attivi** o siti catalitici. Tali siti sono una sorta di ripiegatura o tasca, causata dalla struttura terziaria della proteina enzimatica.

La rappresentazione sottostante mostra come nel sito attivo si trovino gruppi polari ossidrilici, sulfidrilici, amminici, carbossilici, in generale gruppi capaci di formare legami ponte idrogeno. Agli estremi del sito attivo sono presenti gruppi apolari così che l'acqua possa essere facilmente espulsa da questo e si crei una maggiore concentrazione del substrato.

La maggior parte della molecola proteica non entra in contatto con il substrato, ma essa ha comunque un ruolo fondamentale in quanto costituisce l'impalcatura adatta a favorire il corretto posizionamento del substrato nel sito attivo.



## 6. Specificità

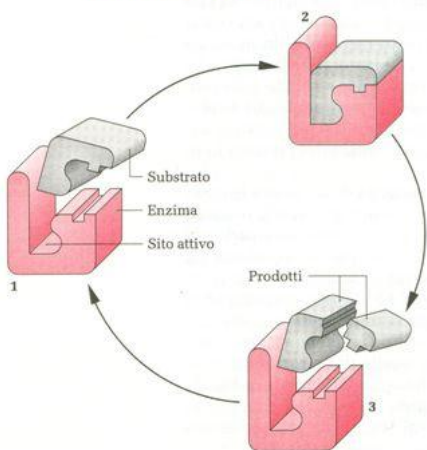
Abbiamo visto come gli enzimi siano altamente specifici, cioè riconoscono un solo substrato o un gruppo ristretto di substrati simili tra loro (come nel caso dell'esochinasi, un enzima capace di riconoscere tutti gli zuccheri di tipo D).

Ci sono due teorie che spiegano come avviene il riconoscimento fra l'enzima e il substrato:

- **Modello di Fischer o chiave serratura**, secondo il quale l'enzima ha una configurazione rigida che si adatta perfettamente al substrato
- **Modello dell'adattamento indotto**, secondo il quale mentre il substrato si avvicina, modifica l'enzima così che i due possano "impaccarsi".

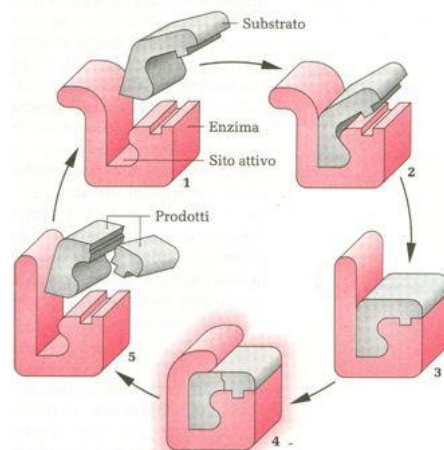
**SITO ATTIVO** regione specifica delle molecole enzimatiche dove il substrato si lega e reagisce per formare il prodotto. Esistono due modelli per interpretare l'interazione sito attivo-substrato

**modello chiave-serratura (Fischer 1894)**



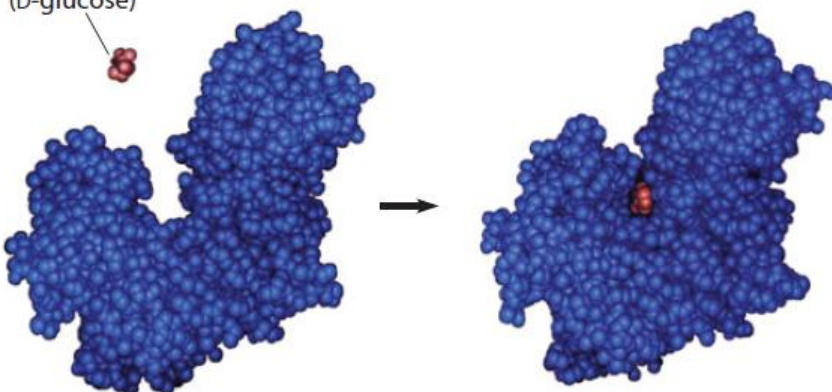
(modello eccessivamente semplificato)  
l'enzima è una serratura in cui può girare solo la chiave specifica; infatti, solo una determinata molecola di substrato ha la forma che le permette di entrare nella fessura del sito attivo dell'enzima in modo che la reazione possa avvenire

**modello adattamento induttivo (Koshland 1954)**



la forma assunta dall'enzima è adatta a far avvenire la reazione solo dopo che questo si è legato al substrato: tale fenomeno serve a portare i gruppi funzionali specifici dell'enzima nell'orientamento corretto necessario per la catalisi della reazione

Substrate (D-glucose)

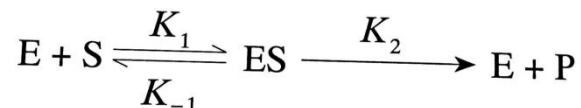


L'enzima esochinasi è un esempio del modello dell'adattamento indotto, quando il glucosio si avvicina al sito attivo (immagine di sinistra) l'enzima cambia conformazione avvolgendosi attorno al substrato (destra).

## 7. Cinetica di reazione

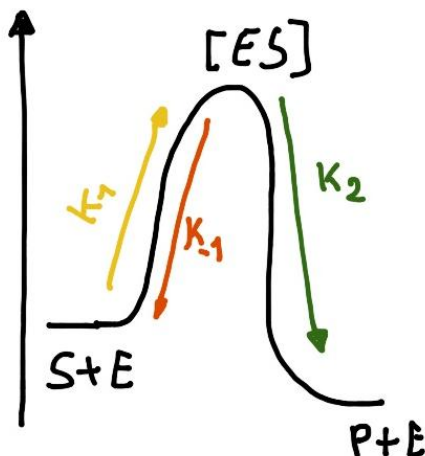
La cinetica enzimatica si occupa di sviluppare delle equazioni che descrivano la velocità delle reazioni catalizzate e confrontare le previsioni con i valori ottenuti sperimentalmente. Per poter fare previsioni occorre capire come agisce un enzima, il modello attualmente in uso è il seguente:

l'enzima (E) si lega con il substrato (S) formando un complesso intermedio enzima-substrato (E-S), successivamente il substrato si trasforma in prodotto (P) e l'enzima viene rilasciato "intatto" capace di catalizzare un altro substrato.



Per tale relazione è opportuno fare delle considerazioni:

1. Con  $K_1$  si indica la costante della reazione diretta che porta alla formazione di ES
2. Con  $K_{-1}$  si indica la costante della reazione inversa alla precedente che da ES riforma il substrato e l'enzima
3.  $K_2$  indica costante della reazione che porta alla formazione del prodotto e dell'enzima "inalterato". A differenza della precedente tale reazione avviene in un verso solo
4. La concentrazione del complesso enzima-substrato [ES] rimane costante nel tempo, questo concetto è definito stato stazionario.



Nel 1913 due ricercatori, L. Michaelis e M. Menten hanno formulato un'equazione sulla dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione del substrato :

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{KM + [S]}$$

Per dimostrare come si ricava questa equazione occorre ricordare alcuni concetti di cinetica:

- La reazione diretta per la formazione di [ES] è una reazione del secondo ordine, la cui velocità si calcola quindi come:  $V = K_1 \cdot [E] \cdot [S]$
- La reazione inversa è del primo ordine, quindi la sua velocità è calcolata come:  $V = K_{-1} \cdot [ES]$
- La reazione per la formazione del prodotto è di primo ordine e la sua velocità è calcolata come:  $V = K_2 \cdot [ES]$

Dato che la concentrazione del complesso attivato è costante nel tempo, la velocità con cui esso si forma deve essere uguale alla velocità col quale esso si decompone, avremo quindi :

$$K_1 \cdot [E] \cdot [S] = K_{-1} \cdot [ES] + K_2 \cdot [ES]$$

Raccogliendo [ES] al secondo membro otteniamo :

$$K_1 \cdot [E] \cdot [S] = [ES] \cdot (K_{-1} + K_2)$$

Indicando con [E<sub>0</sub>] la concentrazione totale dell'enzima possiamo scrivere:

$$[E_0] = [E] + [ES] \text{ da cui}$$

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

Ed impostare un sistema con la precedente equazione, sostituendo [E] otteniamo:

$$K_1 \cdot ([E_0] - [ES]) \cdot [S] = [ES] \cdot (K_{-1} + K_2) \text{ svolgiamo i prodotti:}$$

$$K_1 \cdot [E_0] \cdot [S] - K_1 \cdot [ES] \cdot [S] = [ES] \cdot (K_{-1} + K_2)$$

$$K_1 \cdot [E_0] \cdot [S] = K_1 \cdot [ES] \cdot [S] + [ES] \cdot (K_{-1} + K_2) \text{ raccogliamo [ES] al secondo membro}$$

$$K_1 \cdot [E_0] \cdot [S] = [ES] \cdot (K_1 \cdot [S] + K_{-1} + K_2) \text{ quindi ricaviamo [ES]}$$

$$[ES] = \frac{K_1 \cdot [E_0] \cdot [S]}{K_1 \cdot [S] + K_{-1} + K_2}$$

Ricordando che la velocità di formazione del prodotto era:

$$V = K_2 \cdot [ES] \text{ sostituiamo, } V = \frac{K_2 \cdot K_1 \cdot [E_0] \cdot [S]}{K_1 \cdot [S] + K_{-1} + K_2} \text{ dividiamo entrambi i membri per } K_1$$

$$V = \frac{K_2 \cdot [E_0] \cdot [S]}{[S] + \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}}$$

Il termine  $\frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$  è chiamato costante di Michaelis-Menten e si indica con KM, tale fattore ingloba tutti e tre le costanti della reazione.

$$V = \frac{K_2 \cdot [E_0] \cdot [S]}{[S] + KM}$$

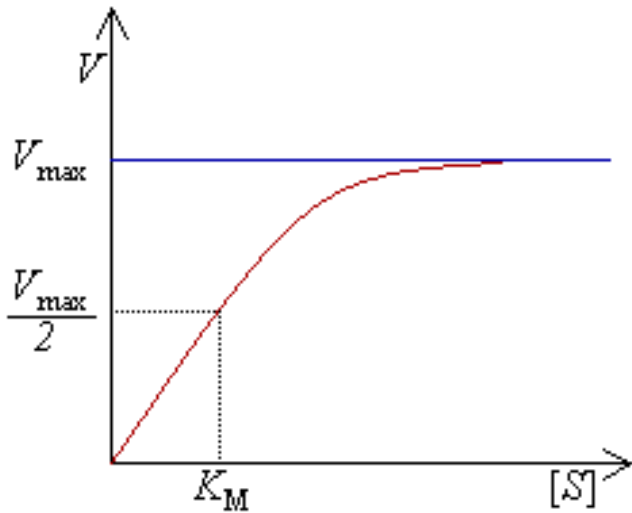
Dato che, una volta raggiunto lo stato stazionario il valore della velocità massima, V<sub>max</sub> è dato dal prodotto V<sub>max</sub> = K<sub>2</sub> · [E<sub>0</sub>], l'equazione di Michaelis-Menten può anche essere espressa nella forma alternativa:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + KM}$$



## Interpretazione grafica

Sperimentalmente si ottiene un grafico di questo tipo:



Si verifica che quando la concentrazione del substrato è uguale al valore di  $K_M$  allora il valore della velocità è uguale alla metà della velocità massima.

Riepilogando:

$$[S] = K_M$$

$$V = V_{\max} / 2$$

La costante di Michaelis-Menten è una grandezza caratteristica di ogni enzima. Essa è un termine che indica l'affinità tra un enzima e il suo substrato, in quanto più basso è il valore di  $K_M$  e più bassa sarà la concentrazione di substrato necessaria per raggiungere una velocità di reazione pari alla metà della velocità massima. Quindi quando  $K_M$  è un valore basso significa che l'enzima mostra un'elevata affinità per il substrato, al contrario se  $K_M$  è un valore alto l'enzima possiede poca affinità per il substrato e per raggiungere la velocità massima servirà un'elevata concentrazione di substrato.

Dal grafico risultano evidenti le seguenti considerazioni:

- Per basse concentrazioni di substrato notiamo che la retta ha tendenza lineare, la velocità è proporzionale alla concentrazione del substrato, quindi la reazione è praticamente del primo ordine.
- Per alte concentrazioni di substrato la velocità non tende all'infinito, ma assume un valore massimo, oltre quel valore anche se aumentiamo  $[S]$  non aumenta la velocità. Si dice che l'enzima è saturato, non ci sono più molecole di enzima disponibili e quindi la velocità diventa un valore costante. Una tale cinetica di reazione è di ordine zero e in questo caso risulta  $V_{\max} = k_2$ .

## Calcolo dei parametri cinetici con il metodo dei doppi reciproci

Dal grafico di Michaelis-Menten non è facile calcolare la velocità massima perché ad alte concentrazioni di substrato essa assume un comportamento asintotico, per ovviare al problema Lineweaver e Burk hanno istituito un metodo chiamato dei doppi reciproci che permette di linearizzare l'equazione, calcolando semplicemente i reciproci.

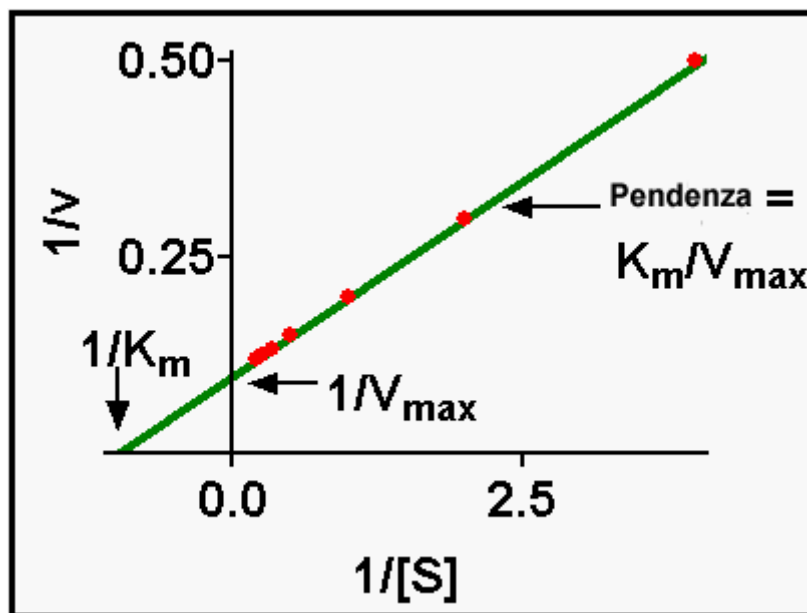


$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M}$$

ne calcoliamo il reciproco  $\frac{1}{V} = \frac{[S] + K_M}{V_{max} \cdot [S]} = \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} =$

$$\frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]}$$

Ponendo  $1/V = y$ ,  $1/V_{max} = q$  e  $1/[S] = x$  otteniamo  $y = mx + q$  che è l'equazione di una retta, dove  $m$  che è il coefficiente angolare corrisponde a  $K_M/V_{max}$ . Dal grafico ricaviamo alcuni punti significativi:



### 8. Fattori che determinano la velocità di reazione

La velocità di reazione non dipende soltanto dalla concentrazione del substrato e dal valore delle costanti, come descritto nell'equazione di Michaelis-Menten, ci sono molteplici fattori e parametri che possono modificarla.

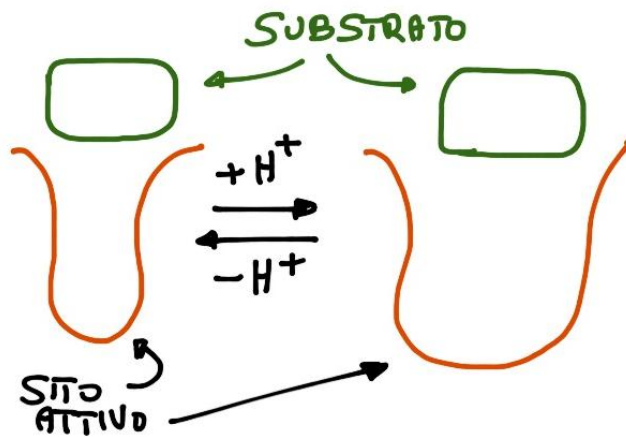
#### pH

Ogni enzima è stabile e lavora in modo ottimale per un determinato valore di pH, a quel valore si ottiene la velocità massima. Se questo valore si allontana dal *pH ottimale di funzionamento* la velocità decresce e l'enzima può addirittura denaturarsi.

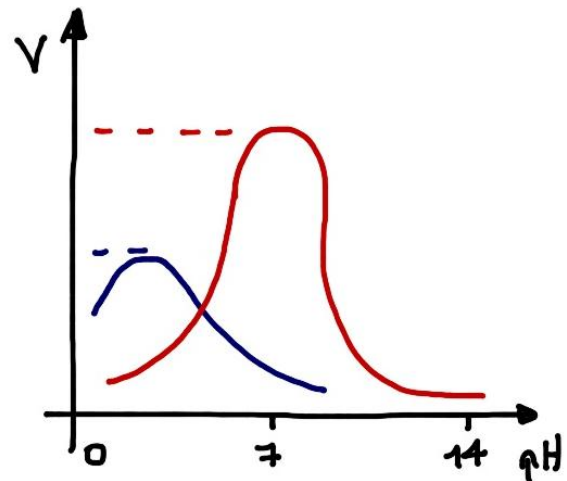
Occorre infatti ricordare che gli enzimi sono costituiti da proteine, le quali sono una sequenza di amminoacidi, una variazione di pH provoca un cambiamento dei gruppi legati agli amminoacidi, gruppi come  $-NH_3^+$ ,  $-COO^-$ ,  $-SH$  si possono protonare o deprotonare, cambiando le attrazioni elettrostatiche che tengono unita la proteina globulare e quindi cambiano la forma della proteina

stessa. Per cui avremmo che il sito attivo può essere più o meno grande rispetto alle condizioni ottimali, quindi meno adatto a impacciarsi col substrato.

Inoltre un cambiamento del pH può provocare anche un cambiamento dei gruppi acidi o basici presenti nella molecola del substrato che quindi non è più adatta a formare il complesso attivato con l'enzima.



*Modificazione del sito attivo al variare del pH*



*Il valore del pH ottimale di funzionamento dell'enzima carbossipeptidasi è 7,5.*

## Temperatura

Una reazione enzimatica è influenzata dalla temperatura come ogni reazione chimica, infatti la costante di reazione è direttamente proporzionale alla temperatura secondo la legge di Arrhenius:

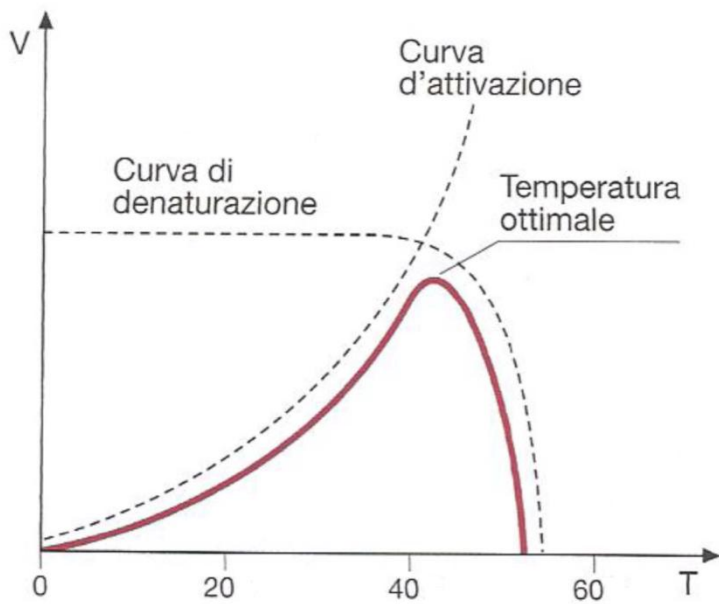
$$k = A e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)}$$

Dove:

- A , è un fattore pre-esponenziale, una costante numerica specifica per ogni reazione
- e , è il numero di nepero
- $E_a$  , è l'energia di attivazione
- R , è la costante dei gas
- T , è la temperatura espressa in Kelvin.

Se tuttavia cercassimo di aumentare la velocità di una reazione enzimatica aumentando la temperatura, l'effetto sarebbe in molti casi disastroso, in quanto la denaturazione dell'enzima (che è una proteina) inizia a circa 45-50 °C e a 55 °C è quasi completa.

Per questo motivo febbri molto alte sono dannose all'organismo umano, superata una certa soglia il malfunzionamento degli enzimi porta un rallentamento dei processi metabolici e in casi estremi anche la morte.



La curva rappresenta l'andamento della velocità della reazione in funzione della temperatura. Come si può facilmente notare la velocità aumenta fino ad una temperatura ottimale, oltre la quale inizia l'effetto negativo dovuto alla denaturazione con una rapida discesa della velocità fino a 0 zero.

## 9. Inibizione enzimatica

Gli enzimi sono inibiti da aspecifiche sostanze dette inibitori, questi sono capaci di rallentare la velocità di una reazione enzimatica o di impedire la reazione stessa. Esistono due tipologie di inibizione, quella irreversibile e quella reversibile (che a sua volta è suddivisa in inibizione competitiva e non competitiva)

### Inibizione irreversibile

L'inibizione irreversibile è la disattivazione definitiva di un enzima e può essere provocata da numerose cause.

Dato che gli enzimi sono proteine, tutti gli agenti denaturanti disattivano gli enzimi. Queste sostanze si legano in modo irreversibile (con legami forti spesso di tipo covalente) ai gruppi presenti nel sito attivo, formando un composto molto stabile enzima-inibitore.

Un esempio di tali sostanze sono i cationi metallici pesanti ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) che legandosi con lo zolfo presente nell'amminoacido cisteina, provocano la precipitazione dei relativi solfuri, composti estremamente stabili, inibendo in modo definitivo l'enzima.

Un secondo esempio di un'inibizione irreversibile è quella causata dal gas nervino che inibisce l'acetilcoenzima A, uno degli enzimi responsabili della trasmissione dell'impulso nervoso.

Gli inibitori irreversibili sono sostanze molto studiate per la loro potenziale applicazione in campo medico. Esiste però il problema che essendo sostanze molto reattive subiscono modificazioni nell'organismo che le rendono inutili.

## Inibizione reversibile competitiva

Nell'inibizione competitiva un inibitore si lega con l'enzima, impedendo il legame con il substrato. Tuttavia l'inibitore reagisce in modo reversibile, quindi l'efficacia dell'inibizione dipende dalla concentrazione dell'inibitore rispetto a quella del substrato; l'enzima si lega con la sostanza presente in quantità maggiore.

Affinchè ciò avvenga le molecole di inibitore e quelle di substrato devono essere strutturalmente simili.

Es. Le intossicazioni da metanolo sono molto pericolose, in quanto nel fegato il metanolo viene ossidato a formaldeide la quale crea gravi lesioni (scioglie i tessuti della ghiandola epatica). L'enzima che catalizza l'ossidazione del metanolo a formaldeide e quella dell'etanolo a acetaldeide è il medesimo, quindi i pazienti vengono curati con una grossa dose di etanolo che ad alte concentrazioni si ossida al posto del metanolo.

Un secondo esempio è fornito dai sulfamidici, prima dell'avvento degli antibiotici le infezioni batteriche venivano curate con queste sostanze in quanto inibiscono l'enzima che nei batteri

produce l'acido folico.

Quest'acido è necessario per la costruzione della membrana batterica, quindi i batteri non possono dividersi e crescere in numero, così che l'infezione si arresta.

### Inibizione competitiva



## Inibizione reversibile non competitiva

Nell'inibizione non competitiva una molecola di inibitore si lega alla proteina (enzima) modificando la conformazione del sito attivo e impedendo quindi la formazione del complesso enzima-

substrato. L'inibitore

non si lega direttamente al sito attivo dell'enzima ma in un altro punto della proteina, formando il **sito allosterico** e così si modifica anche il sito attivo. La competizione non è competitiva in quanto non dipende dalla concentrazione dell'inibitore.

### Inibizione non competitiva



## 10. Controllo dei processi metabolici

I processi metabolici sono la sequenza delle molteplici reazioni che avvengono in una cellula e che ne permettono la vita.

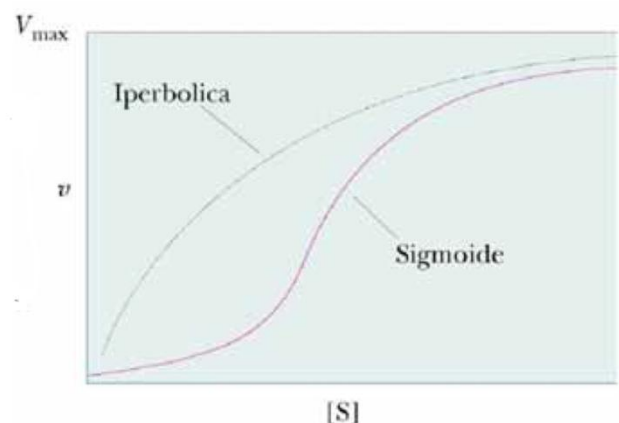
### Enzimi allosterici

Esistono alcuni enzimi a struttura quaternaria la cui attività può essere modificata reversibilmente da sostanze chiamate **modulatori** o **attivatori**. Tali enzimi sono chiamati **enzimi allosterici**, questi presentano oltre al sito attivo, altri siti detti allosterici ove si inseriscono i modulatori. Il modulatore legandosi con l'enzima nel sito allosterico provoca l'attivazione o la disattivazione dell'enzima. I modulatori positivi agevolano e migliorano il riconoscimento enzima-substrato e quindi aumentano la velocità di reazione, viceversa i modulatori negativi diminuiscono la velocità di reazione o la annullano.

Quando il substrato stesso dell'enzima può essere un modulatore, l'enzima è detto **omotropico**, mentre se il modulatore è una molecola diversa dal substrato, l'enzima è detto **eterotropico**. All'interno di un processo metabolico che può richiedere una sequenza di molte reazioni, catalizzate quindi da molti enzimi, gli enzimi allosterici catalizzano la prima reazione così che si possa avere un controllo su tutto il processo; se si interrompe la prima reazione è ovvio che si arrestano anche quelle seguenti. Tale reazione viene chiamata *tappa metabolica* e l'enzima che la catalizza, *enzima chiave regolatore*.

Risulta chiaro che un modello di questo tipo non obbedisce al modello semplificato di Michaelis-Menten, consideriamo come cambia la cinetica di una reazione catalizzata da un enzima allosterico:

- A basse concentrazioni di substrato, un aumento di questo causa solo un lieve incremento di velocità.
- A più alte concentrazioni di substrato si ha un accentuato incremento di velocità, in quanto man mano che si lega il substrato aumenta l'attività dell'enzima (siamo nel caso in cui il substrato stesso è il modulatore attivatore dell'enzima allosterico, tale caso è definito operatività positiva)
- Ad alte concentrazioni di substrato, come nel modello semplificato, la velocità detiene un andamento asintotico verso la velocità massima.
- Sul grafico notiamo come il cambiamento dell'andamento da iperbolico a sigmoide evidenzia l'effetto cooperativo: se tutte le subunità sono tali da contribuire alla catalisi ci sarà una brusca crescita della velocità.



La maggior parte degli enzimi è costituita da macromolecole complesse formate da più subunità, dotate ognuna del proprio sito allosterico. Grazie a tale disposizione, il legame dell'effettore a uno dei siti allosterici innesca un cambiamento nella conformazione dell'enzima che viene trasmesso alle altre subunità. Il risultato è che le altre subunità vengono maggiormente attivate o disattivate, il concetto è definito azione cooperativa.

### **Meccanismo concertato di Monod-Wyman-Changeux (MWC)**

La proteina allosterica è formata da due subunità che esistono in due stati differenti:

- Stato R (rilassato) che ha alta affinità per il substrato
- Stato T (teso) ha bassa affinità per il substrato

Le subunità devono essere tutte nello stesso stato (o R o T). In assenza di modulatori i due stati sono in equilibrio. Quando si aggiunge un modulatore attivatore l'equilibrio si sposta verso lo stato R e quindi abbiamo una maggiore affinità tra enzima e substrato che dà origine alla cooperatività positiva.

### **Meccanismo sequenziale di Koshland-Nemethy-Filmer (KNF)**

Riassumiamo per punti:

- Le subunità possono essere sia nello stato R che nello stato T
- Il substrato S ha un'influenza diretta sulla forma dell'enzima
- **Adattamento indotto**, il substrato entra nel sito attivo a causa di collisioni casuali e la subunità si sistema attorno al substrato per produrre un buon adattamento, così avremo la conversione nello stato R
- Il cambio T → R in una subunità tende a spingere le altre subunità ad assumere la forma R, quindi avremo una cooperatività positiva.

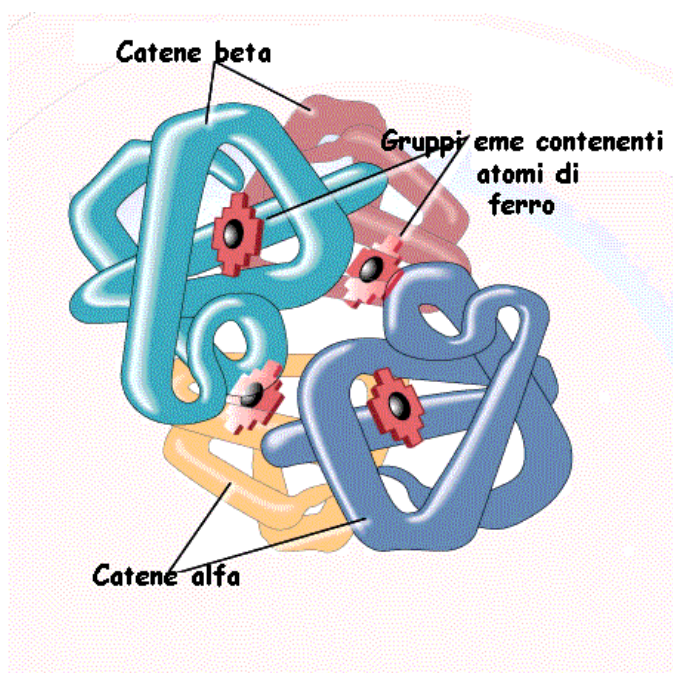
### **Inibizione retroattiva (feed-back)**

L'inibizione retroattiva è un importante caso di regolazione allosterica, dove il prodotto finale della sequenza di reazioni è il modulatore della prima reazione (tappa metabolica), questo mostra la sorprendente capacità di autocontrollo delle reazioni stesse. In altre parole il prodotto finale è colui che "controlla" il primo enzima affinché questo catalizzi o arresti la prima reazione così che inizi o si arresti l'intero processo metabolico.

Ciò significa che le cellule interrompono la produzione di un dato composto quando esso è già presente in quantità sufficiente e la riprendono quando la sua concentrazione è troppo bassa.

## La regolazione allosterica dell'emoglobina

Un esempio classico di allosteria è l'emoglobina, la proteina responsabile del trasporto di ossigeno nel sangue. Sebbene l'emoglobina sia una proteina di trasporto e non un enzima il suo caso viene studiato in quanto esempio di regolazione allosterica. La struttura dell'emoglobina è a quattro subunità disposte in modo simmetrico. La sua capacità di legare l'ossigeno è influenzata da un modulatore, il DPG, 2,3-difosfoglicerato. Il DPG, legandosi al sito allosterico di una delle quattro subunità, è in grado di ridurre l'affinità per l'ossigeno negli altri siti attivi comportandosi quindi come un inibitore allosterico; tanto più alta è la sua concentrazione quanto più velocemente decresce l'affinità fra ossigeno e le quattro subunità dell'emoglobina.



*Rappresentazione delle quattro subunità dell'emoglobina ( $\alpha\beta\beta$ ) e dei relativi "siti attivi" ove si legano le molecole di ossigeno.*