CAPITOLO

8

Amminoacidi, proteine ed enzimi

Venti lettere, una sola regola di punteggiatura: e con esse la cellula scrive le sue macchine.

OBIETTIVI

1. Riconoscere le classi degli amminoacidi e prevederne la forma e la carica al variare del pH; calcolare il punto isoelettrico.
2. Spiegare la planarità del legame peptidico e leggere una sequenza da N a C.
3. Collegare α-elica, foglietto β e struttura terziaria alle interazioni che li stabilizzano; descrivere proteine fibrose e globulari.
4. Descrivere come agisce un enzima, il ruolo di cofattori e coenzimi e la classificazione degli enzimi.
5. Usare l'equazione di Michaelis–Menten e distinguere i tipi di inibizione dagli effetti su K_M e V_{max}.
6. Spiegare come la cellula regola gli enzimi: allosteria, feedback, fosforilazione, zimogeni.

INDICE DEL CAPITOLO

8.1 Gli amminoacidi 2
8.2 Dal legame peptidico alla forma delle proteine 5
8.3 Proteine fibrose e globulari 11
8.4 Gli enzimi 12
8.5 La velocità delle reazioni enzimatiche 14

Scienze naturali 5 · Parte II · Biochimica: le molecole della vita e il metabolismo · versione 1.0
Capitolo 8: Amminoacidi, proteine ed enzimi · pagine 209–234 del volume completo · estratto per lo studio

Un uovo che cuoce in padella cambia colore e consistenza senza che nessun legame covalente delle sue proteine si spezzi; un capello liscio diventa riccio dal parrucchiere perché alcuni ponti fra atomi di zolfo vengono aperti e richiusi; un solo amminoacido sbagliato su 146 trasforma l'emoglobina e la forma dei globuli rossi. Dietro questi fatti c'è la stessa chimica dei capitoli precedenti: gruppi acidi e basici, ammidi, legami a idrogeno, stereochimica. Le proteine sono la prova più convincente che la biologia è chimica organica al lavoro.

In questo capitolo leggiamo gli amminoacidi come molecole che cambiano carica con il pH e la forma delle proteine come il risultato di interazioni che sai già riconoscere; poi misuriamo la velocità degli enzimi, vediamo come li bloccano farmaci e veleni e come la cellula li regola. Sono gli strumenti per il metabolismo del capitolo 9 e del capitolo 10.

8.1 Gli amminoacidi

DA RICORDARE

Richiamo. Le proteine sono polimeri di 20 tipi di amminoacidi uniti da legami peptidici; la sequenza degli amminoacidi determina la forma e la forma determina la funzione (vedi *Scienze naturali 2*, cap. 2). Nove amminoacidi sono essenziali: l'adulto non li sintetizza e li deve assumere con la dieta (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 7). Lo stereocentro, gli enantiomeri e le proiezioni di Fischer sono nel capitolo 2.

8.1.1 Una struttura comune, venti catene laterali

Tutti gli amminoacidi delle proteine sono *α-amminoacidi*: un atomo di carbonio centrale, il **carbonio α**, porta un gruppo carbossilico –COOH, un gruppo amminico $-NH_2$, un atomo di idrogeno e una **catena laterale** indicata con R. Il nome IUPAC dell'alanina, acido 2-amminopropanoico, lo dice con le regole del capitolo 1: il gruppo con priorità più alta, l'acido carbossilico, dà il suffisso, e l'ammino- è un prefisso sul carbonio 2, cioè proprio sul carbonio α. Ciò che distingue i venti amminoacidi è soltanto R, che va da un atomo di idrogeno (glicina) a un sistema di due anelli (triptofano).

Le catene laterali si raggruppano in base al loro comportamento nell'acqua a pH 7 (Tabella D.1 in appendice). Le **apolari** sono la glicina, con R = H, e le catene idrocarburiche (alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina) o poco polari (metionina, triptofano, prolina, la cui catena si chiude ad anello sull'azoto). Le **polari neutre** contengono gruppi capaci di legami a idrogeno: –OH (serina, treonina, tirosina), ammidi (asparagina, glutammina), –SH (cisteina). Le **acide** (acido aspartico, acido glutammico) hanno un secondo gruppo carbossilico, che a pH 7 è

in forma di carbossilato, $-COO^-$; le **basiche** (lisina, arginina, istidina) hanno un gruppo azotato che a pH 7 porta, del tutto o in parte, una carica positiva. Ogni amminoacido si indica con un'abbreviazione di tre lettere (Gly, Ala...) o di una lettera (G, A...).

Tranne la glicina, in cui R = H, il carbonio α ha quattro sostituenti diversi ed è uno stereocentro. Le proteine di tutti gli organismi contengono solo amminoacidi della serie **L**: nella proiezione di Fischer, con il gruppo carbossilico in alto, il gruppo amminico sta a sinistra. Come hai visto nel capitolo 2, la configurazione L corrisponde a (*S*) per tutti gli amminoacidi chirali tranne la cisteina, che è (*R*) solo perché lo zolfo della sua catena laterale cambia l'ordine delle priorità. Gli enzimi, costruiti con amminoacidi L, sono chirali a loro volta: per questo riconoscono un enantiomero e ignorano l'altro.

8.1.2 Lo zwitterione e il punto isoelettrico

Un amminoacido contiene un acido e una base nella stessa molecola, e i due gruppi reagiscono fra loro. Il gruppo –COOH della glicina ha $pK_a = 2{,}34$, quello dello ione $-NH_3^+$ ha $pK_a = 9{,}60$ (Tabella C.1): in acqua, a pH vicino alla neutralità, il carbossile ha già ceduto il suo protone e il gruppo amminico lo ha acquistato. La molecola porta così una carica positiva e una negativa: è uno **zwitterione** (dal tedesco *Zwitter*, «ibrido»), una specie complessivamente neutra ma con due cariche separate. Lo zwitterione spiega perché gli amminoacidi sono solidi cristallini che fondono, decomponendosi, sopra 200 °C, come i sali.

Cambiando il pH cambia la forma prevalente (Figura 8.1). In soluzione molto acida anche il carbossilato si riprotona e la glicina diventa un **catione**, con carica netta +1; in soluzione molto basica lo ione ammonio perde il protone e la glicina diventa un **anione**, con carica netta −1. Ogni gruppo segue l'equazione di Henderson–Hasselbalch (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 4): quando il pH è uguale al suo pK_a, metà delle molecole ha il gruppo protonato e metà no; per ogni unità di pH più in alto, il rapporto fra forma deprotonata e forma protonata cresce di dieci volte.

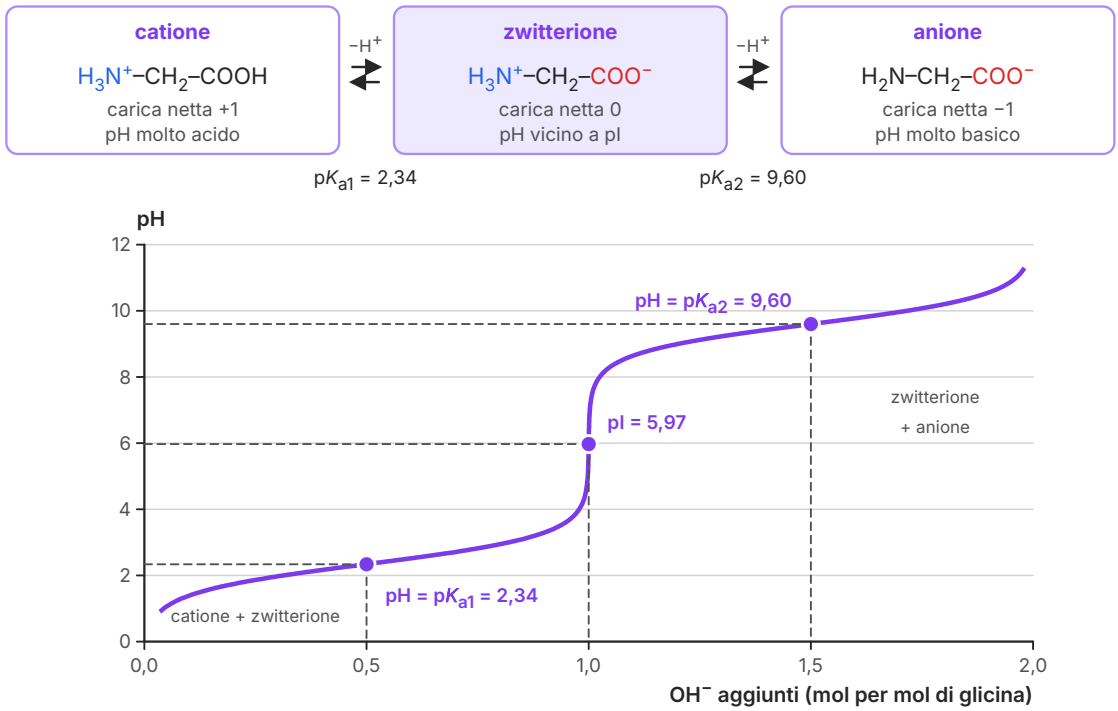

Figura 8.1 Le tre forme della glicina e la sua curva di titolazione con una base forte, calcolata con l'equazione di Henderson–Hasselbalch dai pK_a 2,34 e 9,60 (Tabella C.1), trascurando gli ioni H^+ e OH^- liberi in soluzione. I due tratti quasi piatti sono zone tampone, centrate sui pK_a; il salto centrale cade sul punto isoelettrico.

Il pH al quale la carica netta media dell'amminoacido è zero si chiama **punto isoelettrico**, pI. Per un amminoacido con due soli gruppi ionizzabili è la media dei due pK_a; per un amminoacido con una catena laterale acida o basica è la media dei due pK_a che delimitano la forma con carica netta zero, cioè dei due gruppi acidi per Asp e Glu e dei due gruppi basici per Lys e Arg.

$$\mathrm{pI} = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

ESEMPIO SVOLTO

La glicina a tre valori di pH

Problema. Calcola il punto isoelettrico della glicina e indica la forma prevalente a pH 1,0, a pH 6,0 e a pH 7,4 (il pH del sangue). A pH 7,4, quante molecole hanno il gruppo amminico protonato per ognuna che lo ha libero?

Soluzione. pI = (2,34 + 9,60)/2 = 5,97. A pH 1,0, più basso di entrambi i pK_a, i due gruppi sono protonati: prevale il catione $H_3N^+–CH_2–COOH$. A pH 6,0, quasi uguale al pI, prevale lo zwitterione. A pH 7,4 il carbossile è deprotonato e, per il gruppo amminico, $[–NH_3^+]/[–NH_2] = 10^{9,60\,-\,7,4} = 10^{2,2} \approx 1,6 \times 10^2$: circa 160 molecole protonate per ognuna con il gruppo libero. Anche nel sangue, quindi, la glicina libera è quasi tutta zwitterione.

ERRORE FREQUENTE

«Al punto isoelettrico l'amminoacido non ha cariche». Al pI le cariche ci sono: la forma prevalente è lo zwitterione, con una carica positiva e una negativa. È la *carica netta* media a essere zero, perciò la molecola non si sposta in un campo elettrico. Per la stessa ragione al pI un amminoacido o una proteina sono, di solito, meno solubili: le molecole non si respingono e tendono ad aggregarsi.

Proprio la carica netta permette di separare gli amminoacidi, e più tardi le proteine e il DNA, con l'elettroforesi: in un campo elettrico, a un pH fissato, una molecola con carica netta positiva migra verso il catodo, una con carica netta negativa verso l'anodo, una al suo pI resta ferma. Ritroverai la tecnica, applicata al DNA, nel capitolo 12.

COLLEGAMENTI

Fisica · Cariche in un campo. Su una particella di carica q in un campo elettrico E agisce la forza $F = qE$, diretta come il campo se la carica è positiva e in verso opposto se è negativa (vedi *Fisica 5*). Nel gel dell'elettroforesi la molecola non accelera all'infinito: l'attrito del mezzo la porta presto a una velocità costante, proporzionale alla carica e tanto minore quanto più la molecola è grande. Per questo la tecnica separa insieme per carica e per dimensione; nel DNA, che ha una carica per ogni nucleotide, conta solo la dimensione.

8.2 Dal legame peptidico alla forma delle proteine

8.2.1 Il legame peptidico è un'ammide

Il gruppo carbossilico di un amminoacido e il gruppo amminico di un altro si uniscono per condensazione, con perdita di una molecola d'acqua: il legame peptidico è un legame **ammidi-**

co, come quelli del capitolo 5. Una catena di amminoacidi è un **peptide** (fino a qualche decina di unità; oltre si parla di polipeptide), e ciascun amminoacido inserito nella catena è un **residuo**. La catena ha un verso: a un capo c'è un gruppo amminico libero, l'**estremità N-terminale**, all'altro un gruppo carbossilico libero, l'**estremità C-terminale**. Per convenzione la sequenza si scrive e si legge da N a C, che è anche il verso in cui il ribosoma la costruisce (vedi *Scienze naturali 3*, cap. 14): Gly-Ala e Ala-Gly sono due dipeptidi diversi. Fra i peptidi naturali ci sono ormoni come l'ossitocina, di nove residui (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 12), e il **glutatione**, un tripeptide presente in quasi tutte le cellule: γ-Glu-Cys-Gly, in cui l'acido glutammico è legato con il carbossile della catena laterale (γ) invece che con quello α. Il gruppo –SH della cisteina ne fa un riducente: due molecole di glutatione ridotto (GSH) cedono elettroni a un ossidante, come un perossido, e si uniscono con un legame –S–S– nella forma ossidata, GSSG; un enzima la riduce di nuovo a GSH usando il NADPH (capitolo 10).

Il legame peptidico ha due proprietà che decidono la forma di tutte le proteine. La prima viene dalla risonanza (Figura 8.2a): la coppia solitaria dell'azoto è delocalizzata verso il gruppo carbonilico, e il legame C–N ha in parte il carattere di un doppio legame. È più corto di un normale legame semplice C–N e non ruota; i sei atomi C_α, C, O, N, H e il C_α successivo stanno su un piano. La stessa delocalizzazione spiega, come nel capitolo 5, perché le ammidi non sono basiche e perché il legame peptidico è molto stabile: in acqua, senza enzimi, la sua idrolisi richiederebbe anni. Inoltre il legame è quasi sempre *trans*, con i due C_α da parti opposte.

a) le due strutture di risonanza del gruppo ammidico



il legame C–N ha in parte carattere di doppio legame: non ruota, e i sei atomi stanno su un piano

b) un tripeptide: piani del legame peptidico e rotazioni possibili

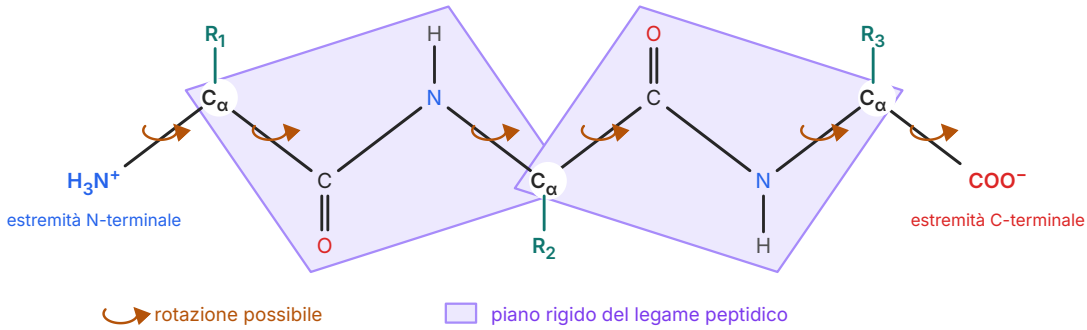

Figura 8.2 Il legame peptidico. a) Le due strutture di risonanza del gruppo ammidico: le frecce curve indicano lo spostamento della coppia solitaria dell'azoto e degli elettroni π del gruppo C=O. b) Un tripeptide nella conformazione distesa: ogni gruppo peptidico (in viola) è planare e rigido, mentre i legami N–C_α e C_α–C possono ruotare; le catene laterali R_1, R_2, R_3 si alternano sui due lati della catena. Il tripeptide è disegnato nella forma che prevale a pH 7.

Una catena polipeptidica è dunque una successione di piani rigidi incernierati sui carboni α: ruotano solo i legami N–C_α e C_α–C (Figura 8.2b), e le forme possibili sono molte meno di quelle di un filo flessibile.

ESEMPIO SVOLTO

Leggere un peptide

Problema. La met-encefalina, un piccolo peptide prodotto nel sistema nervoso, ha sequenza Tyr-Gly-Gly-Phe-Met. Quanti legami peptidici contiene? Quale amminoacido sta all'estremità N-terminale e quale alla C-terminale? Quante molecole d'acqua si liberano nella sua sintesi? Qual è la sua carica netta a pH 7?

Soluzione. I residui sono 5, quindi i legami peptidici sono $5 - 1 = 4$, e si liberano 4 molecole d'acqua. La sequenza si legge da N a C: la tirosina ha il gruppo amminico libero (N-terminale), la metionina il gruppo carbossilico libero (C-terminale). A pH 7 l'estremità N-terminale porta una carica +1 e quella C-terminale −1; le catene laterali di Tyr, Gly, Phe e Met non hanno cariche (l'–OH della tirosina è un acido debolissimo): la carica netta è circa zero.

8.2.2 Il ripiegamento e i legami deboli

Lo scorso anno hai descritto la forma delle proteine con quattro livelli: la struttura primaria (la sequenza), la secondaria (eliche e foglietti), la terziaria (il ripiegamento di una catena intera) e la quaternaria (l'unione di più catene); hai visto anche che una proteina denaturata può riprendere da sola la sua forma, perché l'informazione sta nella sequenza (vedi *Scienze naturali 3*, cap. 14). Ora possiamo nominare, livello per livello, le interazioni che tengono insieme questa architettura: sono le forze intermolecolari che conosci dal terzo anno, ripetute a centinaia nella stessa molecola.

La struttura secondaria è sostenuta da legami a idrogeno fra i gruppi dello **scheletro** della catena, il gruppo C=O di un legame peptidico e il gruppo N–H di un altro. Nell'**α-elica** la catena si avvolge come una scala a chiocciola destrorsa, con circa 3,6 residui per giro e un passo di 0,54 nm; il C=O di ogni residuo forma un legame a idrogeno con l'N–H del residuo che si trova quattro posizioni più avanti, e i legami corrono quasi paralleli all'asse dell'elica (Figura 8.3a). Le catene laterali sporgono verso l'esterno. La prolina, che nel legame peptidico non ha un idrogeno sull'azoto e ha un anello rigido, interrompe le eliche. Nel **foglietto β** tratti di catena quasi distesi, i *filamenti β*, si affiancano e si uniscono con legami a idrogeno da un filamento all'altro; i filamenti possono correre nello stesso verso (paralleli) o in versi opposti (antiparalleli, Figura 8.3b).

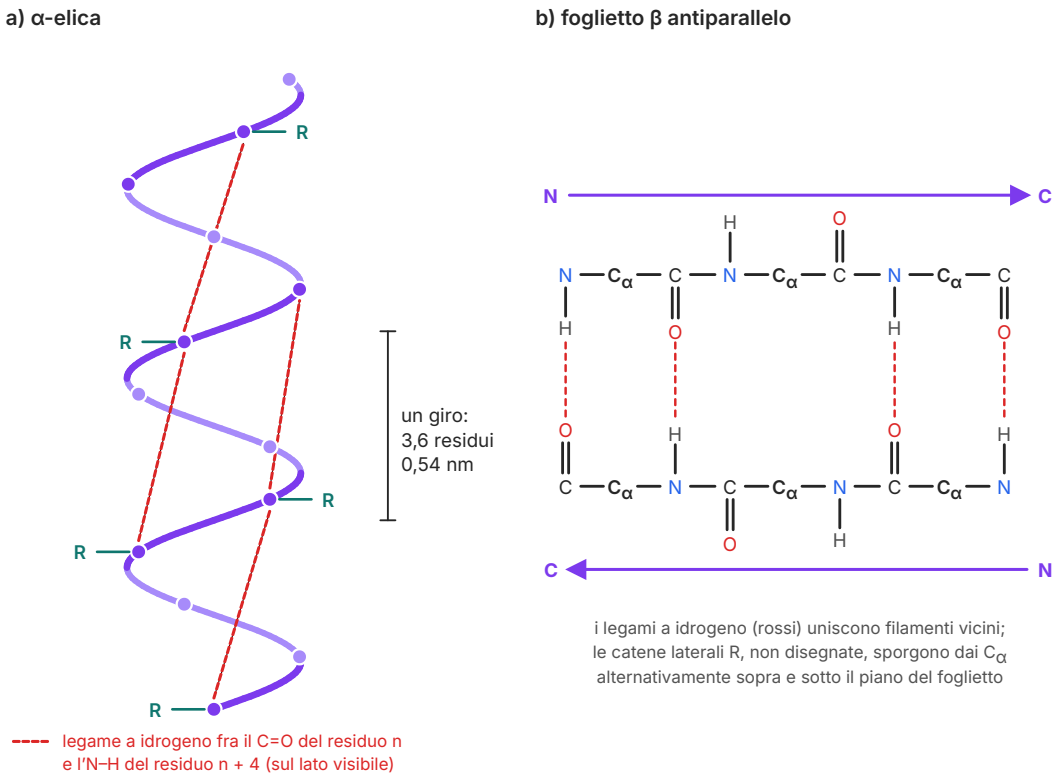

Figura 8.3 Le due strutture secondarie più comuni (schema non in scala per i singoli atomi). a) α-elica destrorsa: i punti sono i carboni α, i tratti chiari sono dietro; ogni giro comprende circa 3,6 residui e sale di 0,54 nm, e il C=O del residuo *n* forma un legame a idrogeno (rosso) con l'N–H del residuo *n* + 4. b) Due filamenti di un foglietto β antiparallelo, visti dall'alto: i gruppi C=O e N–H di un residuo puntano dalla stessa parte, alternandosi da un residuo al successivo, e formano coppie di legami a idrogeno con il filamento vicino.

APPROFONDIMENTO

Approfondimento · Un modello prima dei dati. Nel 1951 Linus Pauling, Robert Corey e Herman Branson proposero l'α-elica e il foglietto β senza aver mai «visto» una proteina: partirono dalle distanze di legame e dalla planarità del gruppo peptidico, misurate con i raggi X su piccoli peptidi, e cercarono le forme con il maggior numero di legami a idrogeno. La conferma venne nel 1958 con la prima struttura di una proteina, la mioglobina, risolta da John Kendrew con la cristallografia a raggi X: era piena di α-eliche. Pauling ebbe il Nobel per la chimica nel 1954, Kendrew e Max Perutz (emoglobina) nel 1962.

La struttura terziaria dipende soprattutto dalle catene laterali (Figura 8.4). In acqua le catene apolari si raccolgono all'interno della proteina, lontano dal solvente, in un *nucleo idrofobico*: non perché si attraggano con forza, ma perché così l'acqua attorno alla proteina è meno vincolata, e

l'entropia del sistema aumenta. Sono le **interazioni idrofobiche**, la forza principale del ripiegamento. Le catene polari e cariche restano in superficie e formano legami a idrogeno con l'acqua e fra loro; una catena con carica positiva (Lys, Arg) e una con carica negativa (Asp, Glu) vicine formano un *ponte salino*, cioè un legame ionico. Infine due cisteine possono unire i loro gruppi –SH con un'ossidazione, formando un **ponte disolfuro**, –S–S–: è l'unico legame covalente fra queste interazioni, frequente nelle proteine che lavorano fuori dalla cellula, come l'insulina e gli anticorpi. Le stesse interazioni tengono insieme le subunità nella struttura quaternaria.

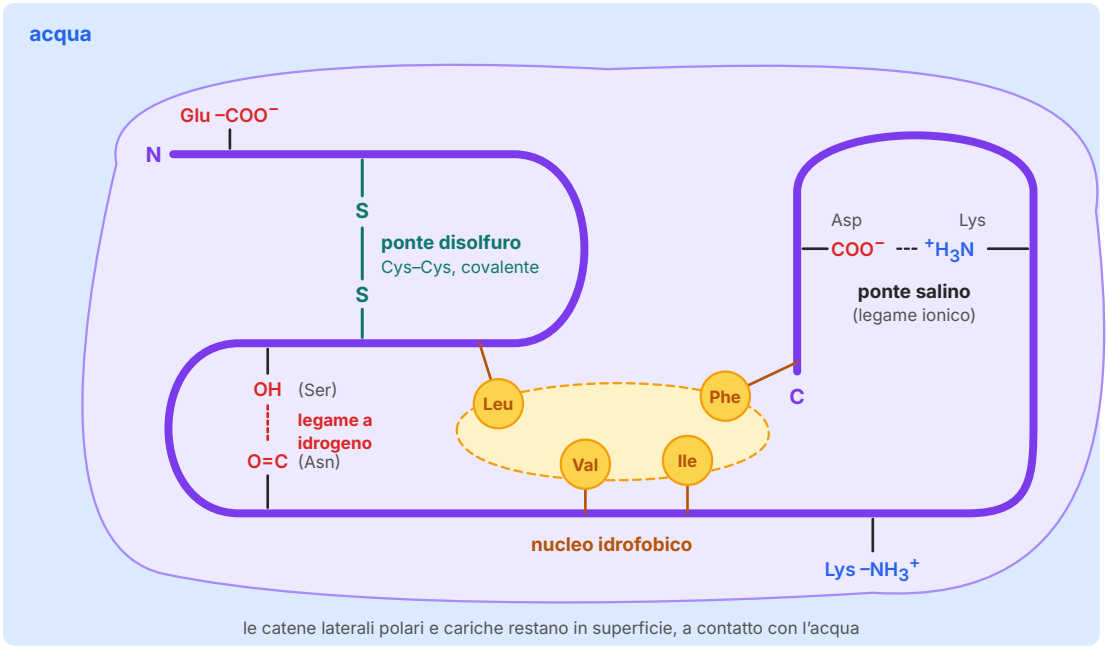

Figura 8.4 Le interazioni che stabilizzano la struttura terziaria, in una proteina globulare schematica (la catena principale è in viola, schema non in scala). Le catene laterali apolari formano il nucleo idrofobico; quelle polari e cariche stanno in superficie, verso l'acqua; un ponte disolfuro, un ponte salino e un legame a idrogeno fra catene laterali uniscono parti lontane della catena.

Nella cellula molte proteine si ripiegano con l'aiuto di altre proteine, gli *chaperon*, che impediscono alle catene nascenti di aggregarsi. Calore, pH estremi, alcol e detergenti rompono le interazioni deboli e la proteina si **denatura**: la sequenza resta intatta, la forma e la funzione si perdono. L'albume che cuoce diventa bianco e solido perché le catene denaturate espongono i gruppi idrofobici e si legano fra loro in un groviglio insolubile; per questo il processo non si inverte raffreddando. Anche un ripiegamento sbagliato può essere dannoso: le proteine dei prioni (vedi *Scienze naturali 3*, cap. 15) e le placche di *amiloide*, aggregati di proteine ricchi di foglietti β che si depositano nei tessuti, come nel cervello dei malati di Alzheimer, sono malattie della forma, non della sequenza.

8.3 Proteine fibrose e globulari

In base alla forma, le proteine si dividono in due grandi gruppi. Le **proteine fibrose** hanno catene allungate, organizzate in fibre o lamine, sono insolubili in acqua e hanno soprattutto funzioni strutturali; le **proteine globulari** hanno catene ripiegate in forme compatte, sono solubili e svolgono funzioni dinamiche: enzimi, trasportatori, anticorpi, ormoni.

8.3.1 Collagene e cheratina

Il **collagene** è la proteina più abbondante dei mammiferi: forma tendini, legamenti, cartilagine e la trama organica di ossa e pelle. Tre catene, ciascuna con un'elica sinistrorsa diversa dall'α-elica, si avvolgono l'una sull'altra in una *tripla elica*. Nella sequenza si ripete il motivo Gly-X-Y, in cui X è spesso prolina e Y spesso idrossiprolina: la **glicina ogni tre residui** è obbligatoria, perché solo la sua catena laterale, un atomo di idrogeno, trova posto al centro della tripla elica, dove le tre catene si toccano. L'idrossiprolina si forma dopo la traduzione, per ossidazione della prolina, ad opera di un enzima che ha bisogno della **vitamina C**. Senza vitamina C il collagene è difettoso e i tessuti cedono: è lo *scorbuto*, con gengive sanguinanti e ferite che non guariscono.

Le **cheratine** di capelli, unghie, lana e penne sono fibre di α-eliche avvolte a due a due e unite da molti ponti disolfuro, tanto più numerosi quanto più la struttura è dura. La «permanente» dei capelli è una reazione redox in due tempi: un riducente rompe i ponti disolfuro, i capelli si avvolgono sui bigodini, e un ossidante li riforma fra cisteine che ora si trovano in posizioni diverse.

8.3.2 Mioglobina ed emoglobina

La **mioglobina**, la proteina che conserva l'ossigeno nei muscoli, è una catena globulare di circa 150 amminoacidi, per lo più ad α-elica, che avvolge un **gruppo eme**: un anello porfirinico con al centro uno ione Fe^{2+}, al quale si lega la molecola di O_2. Il gruppo eme è un esempio di *gruppo prostetico*, una parte non proteica legata stabilmente alla proteina e indispensabile alla sua funzione. L'emoglobina è un tetramero di due catene α e due catene β, simili alla mioglobina, ciascuna con il suo eme.

Lo scorso anno hai visto che la curva di saturazione dell'emoglobina è sigmoide, mentre quella della mioglobina è un'iperbole (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 8). Ora puoi capire perché. Quando una subunità lega O_2, la sua forma cambia un poco, e il cambiamento si trasmette alle altre attraverso le superfici di contatto, rendendo più facile il legame successivo: è la **cooperatività**. Le molecole che, legandosi in un sito diverso da quello dell'O_2, spostano l'equilibrio fra le forme della proteina, come gli ioni H^+ e il CO_2 dell'effetto Bohr, si chiamano **effettori allosterici** (dal greco *állos*, «altro», e *stereós*, «solido, forma»). Cooperatività e allosteria valgono anche per molti enzimi, come vedremo fra poco. L'anemia falciforme (vedi *Scienze naturali 3*, cap. 14) mo-

stra il rovescio: un acido glutammico sostituito da una valina sulla superficie della catena β crea una zona idrofoba che fa aggregare le molecole di emoglobina in fibre.

8.4 Gli enzimi

8.4.1 Catalizzatori che non cambiano l'equilibrio

Gli enzimi sono catalizzatori biologici, quasi tutti proteine (fanno eccezione alcuni RNA catalitici, come l'RNA ribosomiale che forma il legame peptidico). Come ogni catalizzatore (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 2) offrono alla reazione un percorso con un'energia di attivazione più bassa, e possono accelerarla di un fattore che va da circa 10^5 a oltre 10^{15}. Un enzima **non cambia** però né ΔG né la costante di equilibrio: accelera allo stesso modo la reazione diretta e quella inversa e fa raggiungere prima lo stesso equilibrio. Una reazione con ΔG positivo non diventa spontanea perché c'è un enzima; diventa possibile solo se è accoppiata a una reazione con ΔG negativo, come vedremo nel capitolo 9.

Il primo passo della catalisi è il legame del substrato S al sito attivo dell'enzima E: si forma il **complesso enzima-substrato**, ES, dal quale escono il prodotto P e l'enzima intatto, pronto per un nuovo ciclo.

$$E + S \rightleftarrows ES \rightarrow E + P$$

Nel sito attivo poche catene laterali, scelte fra quelle dell'intera proteina e portate vicine dal ripiegamento, orientano il substrato, lo legano con interazioni deboli e lo trasformano: un gruppo acido cede un protone, un gruppo basico lo prende (spesso è l'anello dell'istidina, che a pH vicino a 7 può fare l'una e l'altra cosa: capitolo 3), un nucleofilo attacca, come nei meccanismi della Parte I. Il legame è specifico, perché il sito attivo ha forma e cariche complementari a quelle del substrato, e spesso cambia forma quando il substrato si lega (adattamento indotto, vedi *Scienze naturali 2*, cap. 5). Gli enzimi più veloci, come la catalasi, trasformano milioni di molecole di substrato al secondo.

8.4.2 Cofattori e coenzimi

Molti enzimi funzionano solo con una parte non proteica, il **cofattore**. Può essere uno ione metallico (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}...) oppure una piccola molecola organica, il **coenzima**, che accetta o cede atomi o gruppi durante la reazione; se è legato stabilmente all'enzima è un gruppo prostetico. Molti coenzimi derivano dalle **vitamine del gruppo B**, che il nostro organismo non sintetizza: per questo ne bastano piccole quantità, ma la loro mancanza blocca molte reazioni insieme. Tre coenzimi saranno protagonisti del metabolismo:

- il **NAD^+** (nicotinammide adenina dinucleotide), derivato dalla *niacina* (vitamina B3), che accetta due elettroni e un protone, cioè uno ione idruro, e diventa NADH;

- il **FAD** (flavina adenina dinucleotide), derivato dalla *riboflavina* (vitamina B2), che accetta due elettroni e due protoni e diventa $FADH_2$;
- il **coenzima A** (CoA), derivato dall'*acido pantotenico* (vitamina B5), che trasporta gruppi acilici legati al suo gruppo –SH come tioesteri.

Il NADH formato in una reazione cede i suoi elettroni in un'altra e torna NAD^+: il coenzima è un co-substrato riciclato, e poche molecole lavorano moltissime volte (capitolo 9). Altri coenzimi derivati dalle vitamine B compariranno quando servono, come il piridossal fosfato, dalla vitamina B_6, che lavora nelle trasformazioni degli amminoacidi (capitolo 10).

8.4.3 Nomi e classi

I nomi degli enzimi finiscono di solito in *-asi* e dicono il substrato o la reazione (lattasi, lattato deidrogenasi); restano alcuni nomi storici, come pepsina e tripsina. La classificazione internazionale (IUBMB) raggruppa gli enzimi secondo il **tipo di reazione** (Tabella 8.1): le sei classi tradizionali, a cui nel 2018 si è aggiunta una settima, le traslocasi, che spostano ioni o molecole attraverso le membrane.

Tabella 8.1 Le classi degli enzimi secondo il tipo di reazione catalizzata (classificazione IUBMB), con un esempio che incontrerai in questo volume.

Classe	Reazione catalizzata	Esempio
1 · ossidoreduttasi	ossidoriduzioni: trasferimento di elettroni, spesso come H o ione idruro	lattato deidrogenasi (NAD^+)
2 · transferasi	trasferimento di un gruppo (fosfato, amminico, metilico…) da una molecola a un'altra	esochinasi (fosfato dall'ATP al glucosio)
3 · idrolasi	rottura di un legame con l'acqua	pepsina, lipasi, amilasi
4 · liasi	rottura o formazione di legami senza idrolisi né ossidazione, spesso con formazione di un doppio legame o addizione a un doppio legame (anche di acqua)	aldolasi (glicolisi)
5 · isomerasi	trasformazione di una molecola in un suo isomero	trioso fosfato isomerasi
6 · ligasi	unione di due molecole, accoppiata all'idrolisi di ATP (o di un altro nucleoside trifosfato)	DNA ligasi
7 · traslocasi	trasporto di ioni o molecole attraverso una membrana	ATP sintasi

8.5 La velocità delle reazioni enzimatiche

8.5.1 L'equazione di Michaelis–Menten

Nel volume dello scorso anno hai visto che, aumentando la concentrazione del substrato con una quantità fissa di enzima, la velocità cresce sempre meno fino a un valore massimo, quando tutti i siti attivi sono occupati (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 2). Nel 1913 Leonor Michaelis e Maud Menten, studiando l'idrolisi del saccarosio catalizzata dall'invertasi, descrissero questo andamento con un'equazione. Si misura la **velocità iniziale** v, nei primi istanti, quando il prodotto è ancora così poco che la reazione inversa è trascurabile, per diverse concentrazioni di substrato:

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

Le due costanti hanno un significato preciso. La **velocità massima**, V_{max}, è la velocità che si raggiunge quando l'enzima è saturo; dipende dalla quantità di enzima presente. La **costante di Michaelis**, K_M, è la concentrazione di substrato alla quale la velocità è metà di quella massima: basta porre $[S] = K_M$ nell'equazione per ottenere $v = V_{max}/2$. Ha le dimensioni di una concentrazione e non dipende dalla quantità di enzima, ma è caratteristica della coppia enzima-substrato. Un K_M piccolo significa che l'enzima lavora già a metà della velocità massima con poco substrato: in prima approssimazione, che lo lega con alta affinità.

Il grafico di v in funzione di [S] è un ramo di iperbole (Figura 8.5), una funzione che conosci da Matematica. Si leggono due comportamenti limite. Quando [S] è molto minore di K_M, il denominatore vale circa K_M e $v \approx (V_{max}/K_M)[S]$: la velocità è quasi proporzionale alla concentrazione, come in una reazione del primo ordine. Quando [S] è molto maggiore di K_M, il denominatore vale circa [S] e $v \approx V_{max}$: l'enzima è saturo e la reazione è di ordine zero.

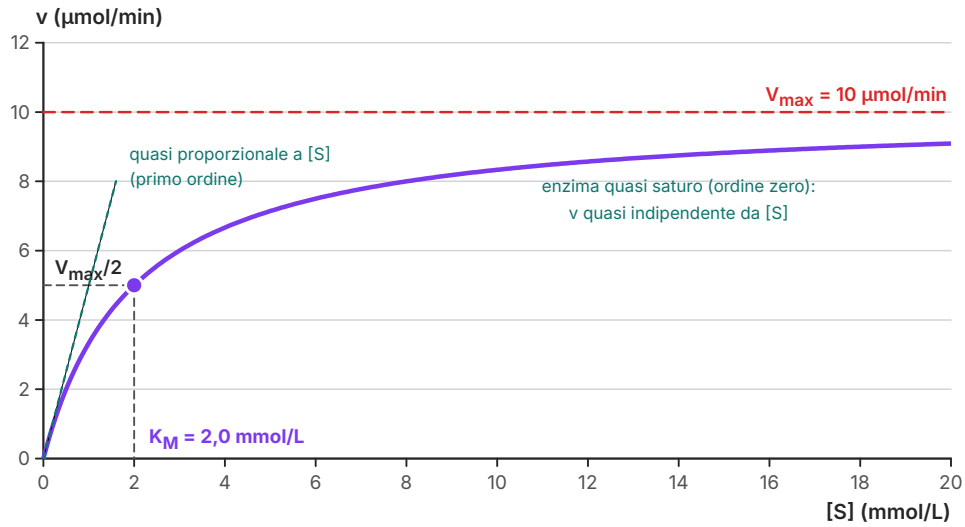

Figura 8.5 Velocità iniziale di una reazione enzimatica in funzione della concentrazione di substrato, calcolata con l'equazione di Michaelis–Menten per V_{max} = 10 µmol/min e K_M = 2,0 mmol/L (dati di esempio). A [S] = K_M la velocità è metà di quella massima; la curva si avvicina a V_{max} senza raggiungerla.

IN SINTESI

Equazione di Michaelis–Menten: $v = \dfrac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$, con v velocità iniziale.

V_{max}: velocità a saturazione, proporzionale alla quantità di enzima. K_M: [S] alla quale $v = V_{max}/2$; caratteristica della coppia enzima-substrato.

$[S] \ll K_M$: $v \approx (V_{max}/K_M)[S]$. $[S] = K_M$: $v = V_{max}/2$. $[S] \gg K_M$: $v \approx V_{max}$. Per trovare [S] da v: $[S] = K_M \cdot v/(V_{max} - v)$.

ESEMPIO SVOLTO

Calcolare con Michaelis–Menten

Problema. Un enzima ha K_M = 2,0 mmol/L e, nelle condizioni dell'esperimento, V_{max} = 10 µmol/min. a) Calcola la velocità iniziale per [S] = 2,0, 6,0 e 18 mmol/L. b) Quale concentrazione di substrato serve per avere v = 8,0 µmol/min? c) Che cosa cambia se si raddoppia la quantità di enzima?

Soluzione. a) Per [S] = 2,0 mmol/L: $v = 10 \cdot 2{,}0/(2{,}0 + 2{,}0) = 5{,}0$ µmol/min, cioè $V_{max}/2$, come deve essere a [S] = K_M. Per [S] = 6,0 mmol/L: $v = 10 \cdot 6{,}0/8{,}0 = 7{,}5$ µmol/min. Per [S] = 18 mmol/L: $v = 10 \cdot 18/20 = 9{,}0$ µmol/min. Triplicare [S] da 6,0 a 18 mmol/L aumenta la velocità solo del 20 %: l'enzima è vicino alla saturazione. b) Risolvendo l'equazione rispetto a [S]: $[S] = K_M \cdot v/(V_{max} - v) = 2{,}0 \cdot 8{,}0/(10 - 8{,}0) = 8{,}0$ mmol/L. c) V_{max} raddoppia (20 µmol/min), K_M resta 2,0 mmol/L: a ogni [S] la velocità raddoppia.

ERRORE FREQUENTE

«K_M è la metà della velocità massima». K_M non è una velocità ma una *concentrazione*: è il valore di [S] al quale $v = V_{max}/2$. Sul grafico si trova partendo da $V_{max}/2$ sull'asse delle velocità, raggiungendo la curva e scendendo sull'asse delle concentrazioni. Si misura in mol/L (o mmol/L), mai in µmol/min.

Temperatura e pH agiscono come sai: oltre la temperatura ottimale l'enzima si denatura, e il pH cambia la protonazione delle catene laterali del sito attivo. La pepsina lavora meglio verso pH 2, la tripsina verso pH 8.

8.5.2 Gli inibitori

Molti farmaci e molti veleni sono inibitori enzimatici (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 2). Le equazioni permettono ora di distinguere i due tipi principali di inibizione reversibile dagli effetti su K_M e V_{max} (Figura 8.6 e Tabella 8.2).

Un inibitore competitivo somiglia al substrato e si lega in modo reversibile al sito attivo, che così non può legare il substrato: inibitore e substrato competono per lo stesso posto. Nell'**inibizione competitiva** basta aumentare abbastanza [S] per spostare l'inibitore, quindi V_{max} non cambia; serve però più substrato per arrivare a metà velocità, cioè il K_M *apparente* aumenta. Se l'inibitore ha costante di dissociazione K_i, il K_M apparente vale $K_M(1 + [I]/K_i)$. Un esempio medico: nell'avvelenamento da metanolo si somministrano sostanze che occupano il sito attivo dell'alcol deidrogenasi del fegato, come l'etanolo stesso; l'enzima trasforma così più lentamente il metanolo nei suoi prodotti tossici, formaldeide e acido formico, e l'organismo ha il tempo di eliminarlo.

Un inibitore non competitivo si lega in un sito diverso da quello attivo, sia all'enzima libero sia al complesso ES, e rende inattiva la molecola di enzima a cui si lega. Nell'**inibizione non competitiva** è come se ci fosse meno enzima: V_{max} diminuisce, e aggiungere substrato non serve a rimediare, mentre K_M non cambia, perché le molecole di enzima rimaste libere legano il substrato come prima.

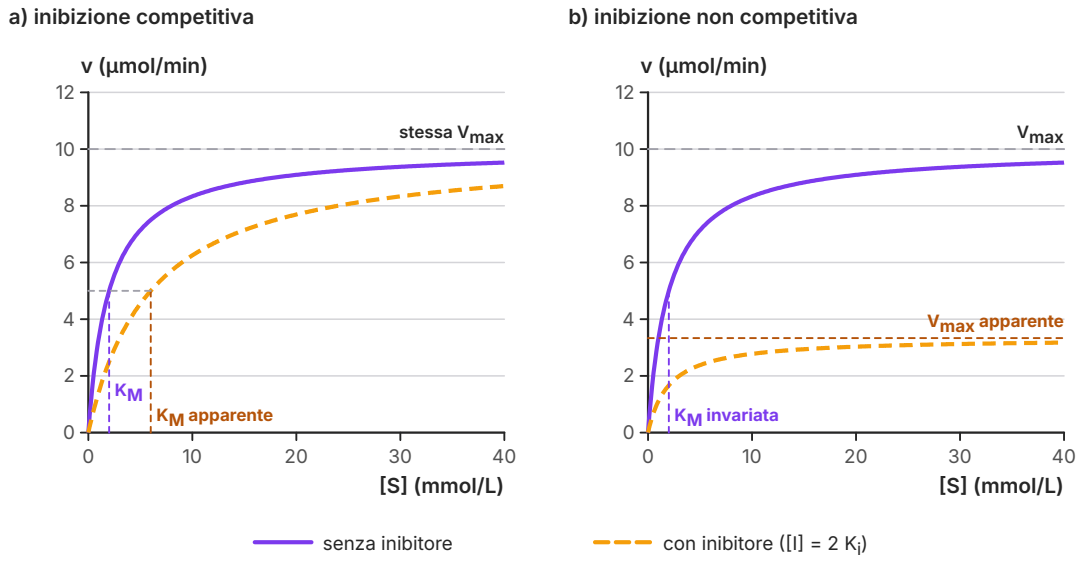

Figura 8.6 Effetto di due inibitori reversibili sulla curva di Michaelis–Menten (curve calcolate, V_{max} = 10 µmol/min, K_M = 2,0 mmol/L, [I] = 2 K_i). a) L'inibitore competitivo triplica il K_M apparente (6,0 mmol/L) ma non cambia V_{max}, che si raggiunge a concentrazioni di substrato più alte. b) L'inibitore non competitivo riduce V_{max} a un terzo e lascia invariato K_M.

Tabella 8.2 Tipi di inibizione enzimatica a confronto.

Tipo	Dove si lega l'inibitore	K_M	V_{max}	Si supera con più substrato?
competitiva	sito attivo, in modo reversibile	aumenta (apparente)	invariata	sì
non competitiva	un altro sito, in modo reversibile	invariata	diminuisce	no
irreversibile	di solito il sito attivo, con un legame covalente	—	diminuisce (meno enzima attivo)	no: serve nuovo enzima

Un inibitore *irreversibile* si lega all'enzima con un legame covalente e lo mette fuori uso per sempre: l'**inibizione irreversibile** finisce solo quando la cellula sintetizza nuove molecole di enzima. L'aspirina acetila una serina del sito attivo della cicloossigenasi, l'enzima che avvia la

sintesi delle prostaglandine, mediatori dell'infiammazione e del dolore: è ancora la chimica degli esteri e delle ammidi del capitolo 5. I gas nervini, come il sarin, fosforilano una serina del sito attivo dell'acetilcolinesterasi, l'enzima che demolisce il neurotrasmettitore acetilcolina nelle sinapsi; l'acetilcolina si accumula, i muscoli si contraggono senza controllo e la morte arriva per paralisi dei muscoli respiratori.

COLLEGAMENTI

Storia ed Educazione civica · Dagli insetticidi alle armi chimiche. Il primo gas nervino, il tabun, fu scoperto per caso alla fine del 1936 da Gerhard Schrader, un chimico dell'industria tedesca che cercava insetticidi più efficaci fra i composti organofosforici: molti insetticidi agiscono proprio inibendo l'acetilcolinesterasi degli insetti. Le armi chimiche erano già comparse nella Prima guerra mondiale, quando il 22 aprile 1915, presso Ypres, l'esercito tedesco usò il cloro in un programma diretto dal chimico Fritz Haber (vedi *Storia 5*). Il Protocollo di Ginevra del 1925 ne vietò l'uso in guerra; la Convenzione sulle armi chimiche del 1993, in vigore dal 1997, ne vieta anche la produzione e lo stoccaggio. La stessa conoscenza chimica può salvare raccolti o uccidere persone.

8.5.3 Come la cellula regola gli enzimi

Oltre a regolare la quantità di un enzima, controllando la trascrizione del suo gene (vedi *Scienze naturali 3*, cap. 15), la cellula ne regola l'attività in tre modi.

Il primo è l'**allosteria**. Gli **enzimi allosterici** sono di solito formati da più subunità e hanno, oltre al sito attivo, uno o più siti regolatori, ai quali si legano effettori allosterici: gli attivatori rendono più facile il legame del substrato, gli inibitori lo rendono più difficile. Come l'emoglobina, questi enzimi mostrano cooperatività: la curva di v in funzione di [S] non è un'iperbole ma una **sigmoide** (Figura 8.7), e la concentrazione a cui la velocità è metà della massima si indica con $K_{0,5}$, non con K_M, perché l'equazione di Michaelis–Menten non vale. Nel tratto ripido della sigmoide una piccola variazione di [S] produce una grande variazione di velocità: l'enzima funziona quasi come un interruttore, e un effettore che sposta la curva a destra o a sinistra lo accende o lo spegne.

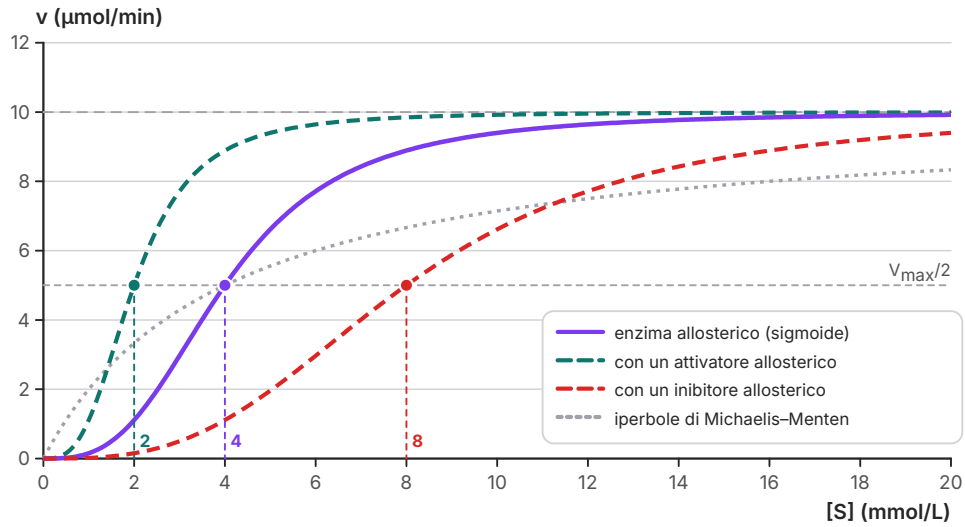

Figura 8.7 Curva di velocità di un enzima allosterico, calcolata con il modello di Hill, $v = V_{max}[S]^n/(K_{0,5}{}^n + [S]^n)$, con $n = 3$ e $V_{max} = 10$ µmol/min (dati di esempio). Un attivatore allosterico sposta la sigmoide a sinistra ($K_{0,5}$ da 4 a 2 mmol/L), un inibitore a destra (a 8 mmol/L), senza cambiare V_{max}. Per confronto, in grigio, l'iperbole di Michaelis–Menten con $K_M = 4$ mmol/L.

Il caso più comune di regolazione allosterica è l'**inibizione a feedback**: il prodotto finale di una via metabolica inibisce il primo enzima della via. Nei batteri l'isoleucina si forma dalla treonina in cinque reazioni, e l'isoleucina inibisce la treonina deidratasi, l'enzima della prima. Quando l'isoleucina abbonda la via si ferma alla prima tappa, senza accumulare intermedi inutili; quando scarseggia, l'inibizione cessa. È la stessa logica del feedback negativo che regola gli ormoni (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 12), applicata a una molecola.

Il secondo modo è la **modificazione covalente**: un enzima viene attivato o inattivato dall'aggiunta o dalla rimozione di un gruppo legato con un legame covalente, quasi sempre un gruppo fosfato su una serina, una treonina o una tirosina. Lo fanno le protein chinasi, che trasferiscono il fosfato dall'ATP, e le fosfatasi, che lo tolgono. È l'ultimo anello della cascata del cAMP che hai studiato con gli ormoni (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 12): l'adrenalina e il glucagone, attraverso la proteina chinasi A, fosforilano gli enzimi che liberano glucosio dal glicogeno, come vedrai nel capitolo 10.

Il terzo modo è irreversibile. Alcuni enzimi sono sintetizzati come precursori inattivi, gli **zimogeni**, che diventano attivi quando un enzima ne taglia un tratto della catena. Lo hai visto per la digestione: il pepsinogeno è attivato in pepsina dall'acido dello stomaco e dalla pepsina stessa, il tripsinogeno in tripsina dall'enteropeptidasi dell'intestino (vedi *Scienze naturali 4*, cap. 7). Così le proteasi non digeriscono le cellule che le producono.

ESPERIENZA DI LABORATORIO

La catalasi e la concentrazione del substrato

Scopo. Misurare come la velocità della reazione $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$, catalizzata dalla catalasi, dipende dalla concentrazione del substrato.

Materiale. Una patata; grattugia o frullatore; acqua fredda; garza o filtro da caffè; perforatrice per carta e carta da filtro (dischetti tutti uguali); pinzette; acqua ossigenata del commercio al 3 %; sei becher o bicchieri trasparenti uguali; cilindro graduato; cronometro; termometro.

1. Grattugia 50 g di patata in 100 mL di acqua fredda, filtra e conserva l'estratto al fresco: contiene la catalasi.
2. Prepara per diluizione 50 mL di acqua ossigenata al 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 % e un controllo di sola acqua, tutti alla stessa temperatura.
3. Immergi un dischetto nell'estratto per 5 s, sgocciolalo per 5 s e lascialo cadere sul fondo del primo becher. L'ossigeno prodotto resta intrappolato nella carta: misura il tempo t che il dischetto impiega a risalire in superficie.
4. Ripeti tre volte per ogni concentrazione, con dischetti nuovi, e calcola la velocità come $1/t$ (s^{-1}).
5. Riporta in un grafico la velocità media in funzione della concentrazione. Se c'è tempo, ripeti con la soluzione al 1,5 % a 10, 20, 30, 40 e 50 °C.

Sicurezza. Occhiali e guanti: l'acqua ossigenata al 3 % irrita gli occhi e la pelle; non usare soluzioni più concentrate. Controllo: dischetti con estratto bollito.

Risultato atteso e domande. La velocità cresce con la concentrazione, prima quasi in proporzione, poi sempre meno. Attenzione però a come interpreti l'appiattimento: la catalasi, a differenza di molti enzimi, non si satura facilmente (la sua velocità resta quasi proporzionale a $[H_2O_2]$ in un ampio intervallo) ed è in parte inattivata dal suo stesso substrato; il dischetto, poi, non può risalire più in fretta di un tempo minimo fissato dal metodo. I valori che stimi sono quindi *apparenti*, validi per il tuo sistema (estratto, carta, altezza del liquido), e non le costanti della catalasi. a) Stima dal grafico la velocità massima apparente e la concentrazione alla quale la velocità ne è la metà. b) Perché occorre usare dischetti tutti uguali e la stessa quantità di estratto? c) Che cosa ti aspetti dalle prove a temperature diverse, e perché a 50 °C la velocità può diminuire durante la prova?

APPROFONDIMENTO

Approfondimento · Il grafico dei doppi reciproci. Dai dati sperimentali non è facile leggere V_{max}, perché la curva vi si avvicina senza mai raggiungerlo. Nel 1934 Hans Lineweaver e Dean Burk proposero di prendere il reciproco di entrambi i membri dell'equazione di Michaelis–Menten:

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

Riportando $1/v$ in funzione di $1/[S]$ si ottiene una **retta**, con pendenza K_M/V_{max}, intercetta sull'asse verticale $1/V_{max}$ e intercetta sull'asse orizzontale $-1/K_M$. Con un inibitore competitivo le rette hanno la stessa intercetta verticale, con uno non competitivo la stessa intercetta orizzontale. Oggi si preferisce adattare la curva ai dati con un programma di calcolo, perché i reciproci esagerano gli errori delle misure a bassa concentrazione.

SINTESI

- Gli amminoacidi delle proteine sono α-amminoacidi della serie L; differiscono per la catena laterale, apolare, polare neutra, acida o basica.
- In acqua un amminoacido è uno zwitterione; in ambiente acido diventa un catione, in ambiente basico un anione. Il punto isoelettrico è il pH di carica netta zero: per la glicina pI = (2,34 + 9,60)/2 = 5,97.
- Il legame peptidico è un'ammide: per risonanza è planare, rigido e quasi sempre *trans*; le catene si leggono dall'estremità N-terminale alla C-terminale.
- L'α-elica (3,6 residui per giro, legami a idrogeno fra C=O del residuo n e N–H del residuo $n + 4$) e il foglietto β sono tenuti insieme da legami a idrogeno dello scheletro.
- La struttura terziaria è stabilizzata da interazioni idrofobiche, legami a idrogeno, ponti salini e ponti disolfuro; la denaturazione distrugge la forma ma non la sequenza.
- Le proteine fibrose (collagene, cheratina) hanno funzioni strutturali; quelle globulari (mioglobina, emoglobina, enzimi) funzioni dinamiche. Nel collagene la glicina ricorre ogni tre residui.
- Gli enzimi abbassano l'energia di attivazione ma non cambiano ΔG né l'equilibrio; agiscono attraverso il complesso enzima-substrato, spesso con l'aiuto di cofattori e coenzimi (NAD^+, FAD, CoA, derivati dalle vitamine B).
- L'equazione di Michaelis–Menten, $v = \dfrac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$, descrive la velocità iniziale; K_M è la [S] alla quale la velocità è metà di V_{max}.
- L'inibitore competitivo aumenta il K_M apparente e lascia invariata V_{max}; il non competitivo abbassa V_{max}; l'irreversibile mette fuori uso l'enzima con un legame covalente.
- La cellula regola gli enzimi con l'allosteria (curve sigmoidi, inibizione a feedback), con la modificazione covalente (fosforilazione) e con l'attivazione degli zimogeni.

ESERCIZI

Comprendere e ricordare

1. ● Il carbonio α di un amminoacido delle proteine è legato a:

   A. due gruppi carbossilici, un gruppo amminico e la catena laterale

   B. un gruppo carbossilico, due atomi di idrogeno e la catena laterale

   C. un gruppo carbossilico, un gruppo amminico, un atomo di idrogeno e la catena laterale

   D. un gruppo amminico, un gruppo ossidrilico, un atomo di idrogeno e la catena laterale

2. ● Quale fra questi amminoacidi non è chirale?

   A. glicina
   B. alanina
   C. cisteina
   D. serina

3. ● Nell'α-elica i legami a idrogeno si formano fra:

   A. le catene laterali di residui consecutivi
   B. gruppi C=O e N–H di catene polipeptidiche diverse
   C. i ponti disolfuro e l'acqua
   D. il C=O di un residuo e l'N–H del residuo quattro posizioni più avanti nella stessa catena

4. ● Un ponte disolfuro si forma fra le catene laterali di due residui di:

   A. metionina
   B. cisteina
   C. serina
   D. tirosina

5. ●● Nel collagene la glicina occupa una posizione ogni tre residui perché:

   A. è l'unico amminoacido che forma legami peptidici *cis*
   B. la sua catena laterale, un atomo di idrogeno, è l'unica abbastanza piccola da stare al centro della tripla elica
   C. è l'unico amminoacido che si lega alla vitamina C
   D. forma ponti disolfuro fra le tre catene

6. ●● Quale coenzima deriva dalla riboflavina (vitamina B2)?

   A. NAD^+
   B. coenzima A
   C. ATP
   D. FAD

7. ●● Un inibitore non competitivo:

   A. diminuisce V_{max} e lascia invariato K_M
   B. aumenta il K_M apparente e lascia invariata V_{max}
   C. si lega al sito attivo con un legame covalente
   D. viene spostato aumentando la concentrazione del substrato

8. ●●● In una via metabolica A → B → C → D, ciascuna tappa catalizzata da un enzima diverso, il prodotto D inibisce per feedback l'enzima della prima tappa. Se nella cellula D si accumula:
   A. si accumulano B e C, perché la via si ferma all'ultima tappa
   B. aumenta la sintesi dell'enzima che trasforma C in D
   C. si riduce la trasformazione di A in B e quindi la produzione di tutti gli intermedi
   D. D si lega al sito attivo di tutti e tre gli enzimi

Vero o falso

9. ● Le proteine umane contengono sia L- sia D-amminoacidi, in proporzioni simili.

10. ● Un enzima sposta l'equilibrio di una reazione verso i prodotti.

11. ●● Al punto isoelettrico una molecola di glicina non porta alcuna carica elettrica.

12. ●● Attorno al legame peptidico C–N la catena può ruotare liberamente.

13. ●● Gli effetti di un inibitore competitivo si possono superare aumentando la concentrazione del substrato.

14. ●●● K_M è la velocità della reazione quando metà dei siti attivi è occupata.

Applicare

15. ● Scrivi la formula della glicina nella forma che prevale a pH 1,0, a pH 6,0 e a pH 12,0, e indica per ciascuna la carica netta.

16. ●● Calcola il punto isoelettrico dell'acido aspartico (pK_a: 1,88 per l'α-COOH, 3,65 per la catena laterale, 9,60 per l'α-NH_3^+) e della lisina (pK_a: 2,18 per l'α-COOH, 8,95 per l'α-NH_3^+, 10,53 per la catena laterale). Valori di Lehninger.

17. ●● Una miscela di acido aspartico, glicina e lisina viene sottoposta a elettroforesi su carta a pH 6,0. Usando i punti isoelettrici della glicina (5,97) e quelli calcolati nell'esercizio precedente, prevedi verso quale elettrodo migra ciascun amminoacido.

18. ● Scrivi la formula di struttura del dipeptide Gly-Ala nella forma che prevale a pH 7, cerchia il legame peptidico e indica le estremità N- e C-terminale. Quanti tetrapeptidi diversi si possono scrivere usando una sola volta ciascuno degli amminoacidi Gly, Ala, Ser e Lys?

19. ●●● L'ossitocina, un ormone di nove residui, ha sequenza Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2 (l'ultimo gruppo carbossilico è trasformato in ammide) e un ponte disolfuro. a) Quanti legami peptidici contiene? b) Fra quali residui si forma il ponte disolfuro, e che cosa forma nella molecola? c) Qual è la sua carica netta approssimativa a pH 7? d) Quale residuo è N-terminale?

20. ●● Un enzima ha K_M = 0,50 mmol/L e V_{max} = 120 µmol/min. Calcola la velocità iniziale per [S] = 0,25 mmol/L e per [S] = 4,5 mmol/L, e la concentrazione di substrato alla quale v = 90 µmol/min.

21. ●●● Per un enzima si misura V_{max} = 50 µmol/min. Con [S] = 3,0 mmol/L la velocità iniziale è 30 µmol/min. Calcola K_M.

22. ●●● Un enzima ha K_M = 2,0 mmol/L. Si aggiunge un inibitore competitivo a una concentrazione [I] = 3 K_i. a) Calcola il K_M apparente. b) A [S] = 8,0 mmol/L, che frazione di V_{max} raggiunge l'enzima senza e con l'inibitore? c) Quale [S] serve, con l'inibitore, per tornare all'80 % di V_{max}? d) Un inibitore non competitivo alla stessa concentrazione relativa ([I] = 3 K_i) riduce V_{max} di un fattore 1 + [I]/K_i: quale frazione della velocità massima originaria si può raggiungere al massimo?

23. ●● Assegna ciascun enzima alla sua classe (Tabella 8.1): a) alcol deidrogenasi (etanolo + NAD^+ → etanale + NADH + H^+); b) lipasi; c) glucosio-6-fosfato isomerasi; d) DNA ligasi; e) esochinasi; f) anidrasi carbonica ($CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$, senza ossidazione e senza idrolisi).

Leggere dati e figure

24. ●● Osserva la Figura 8.1. a) Quanti equivalenti di OH^- servono per arrivare al primo pK_a e quanti al punto isoelettrico? b) In quali intervalli di pH la glicina funziona da tampone? c) Perché al punto isoelettrico il pH cambia rapidamente anche per piccole aggiunte di base?

25. ●●● Una classe ha misurato, con il metodo dei dischetti dell'Esperienza di laboratorio, il tempo medio di risalita a diverse concentrazioni di acqua ossigenata (dati di esempio): 0,25 % → 20,0 s; 0,50 % → 12,5 s; 1,0 % → 8,8 s; 1,5 % → 7,5 s; 2,0 % → 6,9 s; 3,0 % → 6,3 s. a) Calcola la velocità 1/t per ogni concentrazione e disegna il grafico. b) Stima la velocità massima e la concentrazione alla quale la velocità ne è la metà. c) Perché la stima di V_{max} fatta sul grafico è incerta, e perché non è la V_{max} della catalasi?

26. ●●● Osserva la Figura 8.7. a) Leggi $K_{0,5}$ per le tre curve sigmoidi e indica quale corrisponde all'enzima con l'attivatore. b) Con il modello della figura (n = 3, $K_{0,5}$ = 4 mmol/L) calcola la frazione di V_{max} a [S] = 2 e a [S] = 8 mmol/L, e fai lo stesso per l'iperbole con K_M = 4 mmol/L. c) Di quante volte aumenta la velocità, nei due casi, quando [S] passa da 2 a 8 mmol/L? Che cosa ti dice sul ruolo della forma sigmoide?

Indagare e argomentare

27. ●● Progetta un esperimento controllato per misurare l'effetto della temperatura sull'attività della catalasi della patata con il metodo dei dischetti: indica la variabile indipendente, quella dipendente, le variabili da tenere costanti, il controllo e le norme di sicurezza. Quale andamento ti aspetti e come lo spieghi con la struttura della proteina?

28. ●●● Nella «permanente» i capelli vengono trattati prima con un riducente, poi avvolti sui bigodini e trattati con un ossidante. Spiega che cosa accade a livello delle cheratine, quali legami si rompono e si riformano e perché la nuova forma resiste ai lavaggi, a differenza di quella data dal ferro arricciacapelli, che si perde con l'umidità.

29. ●●● Nell'avvelenamento da metanolo si può somministrare etanolo, che compete con il metanolo per il sito attivo dell'alcol deidrogenasi. Spiega perché l'etanolo protegge, che tipo di inibizione rappresenta per la trasformazione del metanolo e perché la dose deve mantenere a lungo una concentrazione alta di etanolo nel sangue. Che cosa succederebbe se l'inibitore fosse irreversibile?

Verso l'esame

30. ●●● **Dal documento al colloquio.** Leggi il testo (scritto per questo libro). «Nelle campagne della pianura padana, per gran parte dell'Ottocento, i braccianti mangiavano quasi solo polenta di mais. In primavera comparivano sulla pelle esposta al sole chiazze rosse e squamose; seguivano diarrea, debolezza, confusione mentale. Il nome della malattia, pellagra, veniva dal dialetto lombardo: «pelle agra», pelle ruvida. Intorno al 1880 i malati censiti in Italia erano circa centomila. Alcuni la attribuivano a una tossina del mais guasto; solo nel Novecento si capì che era una carenza alimentare.» a) Oggi sappiamo che la pellagra è dovuta alla carenza di niacina: quale coenzima deriva da questa vitamina e quale tipo di reazione aiuta a catalizzare? b) Perché la carenza di una sola vitamina può colpire tessuti e funzioni così diversi? c) Collega il documento alla storia sociale dell'Italia postunitaria (condizioni dei contadini, emigrazione) e, per l'Educazione civica, all'obiettivo 2 dell'Agenda 2030 sulla malnutrizione. d) Che cosa insegna la vicenda sul modo in cui la scienza mette alla prova ipotesi diverse (tossina o carenza)?

31. ●●● **Collegare.** «Un catalizzatore cambia la strada, non la meta.» Commenta la frase collegando la cinetica dello scorso anno (energia di attivazione, profili energetici, catalizzatori: *Scienze naturali 4*, cap. 2), gli enzimi di questo capitolo (complesso enzima-substrato, Michaelis–Menten, inibizione, regolazione) e le reazioni accoppiate e i coenzimi del capitolo 9. Spiega perché la cellula regola il metabolismo agendo sulle velocità e non sugli equilibri.

Approfondimento

32. ●●● (Approfondimento) In un grafico dei doppi reciproci la retta interseca l'asse verticale a $1/v = 0{,}10$ min/µmol e l'asse orizzontale a $1/[S] = -0{,}50$ L/mmol. Calcola V_{max} e K_M. Come cambierebbe la retta in presenza di un inibitore competitivo?

PER APPROFONDIRE

- [LEH] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*: i capitoli sugli amminoacidi, sulla struttura tridimensionale delle proteine e sugli enzimi, con le tabelle dei pK_a e molti esempi di meccanismi enzimatici.
- [STR] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*: le pagine sull'emoglobina come modello di proteina allosterica e sulla regolazione degli enzimi.

Glossario del capitolo

Coenzima
Cofattore organico, spesso derivato da una vitamina, che accetta o cede atomi o gruppi durante la reazione e viene poi rigenerato, come NAD^+, FAD e coenzima A (ingl. *coenzyme*).

Cofattore
Componente non proteico, ione metallico o molecola organica, necessario all'attività di un enzima (ingl. *cofactor*).

Complesso enzima-substrato
Associazione temporanea del substrato al sito attivo dell'enzima, tappa intermedia della catalisi: $E + S \rightleftarrows ES \rightarrow E + P$ (ingl. *enzyme–substrate complex*).

Cooperatività
Proprietà delle proteine con più siti di legame per cui il legame di una molecola in un sito facilita (o ostacola) il legame nei siti successivi; dà curve sigmoidi (ingl. *cooperativity*).

Costante di Michaelis
Concentrazione di substrato alla quale la velocità iniziale di una reazione enzimatica è metà della velocità massima; simbolo K_M. È caratteristica della coppia enzima-substrato (ingl. *Michaelis constant*).

Elica α (α-elica)
Struttura secondaria in cui la catena si avvolge in un'elica destrorsa di circa 3,6 residui per giro, stabilizzata da legami a idrogeno fra il C=O del residuo n e l'N–H del residuo $n + 4$ (ingl. *α-helix*).

Enzima allosterico
Enzima, di solito con più subunità, la cui attività è regolata da effettori che si legano a siti diversi dal sito attivo; ha una curva di velocità sigmoide (ingl. *allosteric enzyme*).

Estremità N-terminale / C-terminale
I due capi di una catena polipeptidica: quello con il gruppo amminico libero (da cui si legge la sequenza) e quello con il gruppo carbossilico libero (ingl. *N-terminus / C-terminus*).

Foglietto β
Struttura secondaria formata da tratti di catena distesi, paralleli o antiparalleli, uniti da legami a idrogeno fra filamenti vicini (ingl. *β-sheet*).

Gruppo eme
Gruppo prostetico formato da un anello porfirinico con uno ione Fe^{2+} al centro, che lega l'ossigeno nella mioglobina e nell'emoglobina (ingl. *haem group*).

Inibizione a feedback
Regolazione in cui il prodotto finale di una via metabolica inibisce, di solito allostericamente, l'enzima della prima tappa (ingl. *feedback inhibition*).

Inibizione competitiva
Inibizione reversibile da parte di una molecola che occupa il sito attivo in competizione con il substrato: aumenta il K_M apparente e lascia invariata V_{max} (ingl. *competitive inhibition*).

Inibizione non competitiva
Inibizione reversibile da parte di una molecola che si lega a un sito diverso da quello attivo: riduce V_{max} e lascia invariato K_M (ingl. *non-competitive inhibition*).

Ponte disolfuro
Legame covalente –S–S– fra le catene laterali di due cisteine, formato per ossidazione dei loro gruppi –SH (ingl. *disulfide bridge*).

Proteina fibrosa / globulare
Proteina con catene allungate, insolubile e strutturale (collagene, cheratina) / con catene ripiegate in una forma compatta, solubile e funzionale (enzimi, emoglobina) (ingl. *fibrous / globular protein*).

Punto isoelettrico (pI)
Valore di pH al quale la carica netta media di un amminoacido o di una proteina è zero; per un amminoacido con due gruppi ionizzabili è la media dei due pK_a (ingl. *isoelectric point*).

Residuo
Ciascun amminoacido inserito in una catena peptidica, cioè ciò che ne resta dopo la condensazione (ingl. *residue*).

Velocità massima
Velocità iniziale di una reazione enzimatica quando l'enzima è saturo di substrato; simbolo V_{max}; è proporzionale alla quantità di enzima (ingl. *maximum velocity*).

Zimogeno
Precursore inattivo di un enzima, attivato dal taglio di un tratto della sua catena, come il pepsinogeno e il tripsinogeno (ingl. *zymogen*).

Zwitterione
Molecola elettricamente neutra che porta una carica positiva e una negativa su atomi diversi, come un amminoacido in acqua a pH vicino al suo punto isoelettrico (ingl. *zwitterion*).

Soluzioni

1. C. Il carbonio α porta il gruppo –COOH, il gruppo $–NH_2$, un H e la catena laterale R.

2. A. Nella glicina R = H: il carbonio α ha due sostituenti uguali e non è uno stereocentro.

3. D. Nell'α-elica il C=O del residuo n si lega all'N–H del residuo $n + 4$ della stessa catena; i legami fra catene diverse sono tipici dei foglietti β.

4. B. Due gruppi –SH di cisteina si ossidano a ponte disolfuro –S–S–; la metionina contiene zolfo ma non un gruppo –SH.

5. B. Al centro della tripla elica le tre catene sono così vicine che c'è posto solo per un atomo di idrogeno.

6. D. Il FAD deriva dalla riboflavina; il NAD^+ dalla niacina, il coenzima A dall'acido pantotenico.

7. A. L'inibitore non competitivo si lega in un altro sito e mette fuori uso parte dell'enzima: V_{max} cala, K_M resta lo stesso, e aumentare [S] non serve.

8. C. D inibisce il primo enzima: rallenta la trasformazione di A in B, e con essa la formazione di B, C e D; non si accumulano intermedi.

9. F. Le proteine contengono solo L-amminoacidi; i D-amminoacidi si trovano in casi particolari, per esempio nella parete di alcuni batteri, non nelle proteine sintetizzate dai ribosomi.

10. F. L'enzima accelera allo stesso modo la reazione diretta e l'inversa: fa raggiungere prima l'equilibrio ma non lo sposta, e non cambia ΔG.

11. F. Al pI la glicina è uno zwitterione, con una carica positiva e una negativa: è la carica netta a essere zero.

12. F. Per la risonanza il legame C–N ha in parte carattere di doppio legame ed è rigido; ruotano i legami $N–C_\alpha$ e $C_\alpha–C$.

13. V. A [S] molto alta il substrato sposta l'inibitore dal sito attivo e la velocità torna a V_{max}.

14. F. K_M è una concentrazione: la concentrazione di substrato alla quale la velocità è metà di V_{max}.

15. pH 1,0: $H_3N^+–CH_2–COOH$, carica +1 (pH sotto entrambi i pK_a). pH 6,0: $H_3N^+–CH_2–COO^–$, carica netta 0 (vicino al pI, 5,97). pH 12,0: $H_2N–CH_2–COO^–$, carica −1 (pH sopra entrambi i pK_a).

16. Acido aspartico: la forma con carica netta zero sta fra la perdita del protone dell'α-COOH e quella della catena laterale, quindi pI = (1,88 + 3,65)/2 = 2,77 (2,765, arrotondato). Lisina: la forma neutra sta fra i due gruppi basici, pI = (8,95 + 10,53)/2 = 9,74.

17. A pH 6,0 l'acido aspartico (pI 2,77) ha carica netta negativa e migra verso l'anodo (+); la lisina (pI 9,74) ha carica netta positiva e migra verso il catodo (−); la glicina (pI 5,97) ha carica netta quasi zero (appena negativa, perché il pH supera di poco il pI) e resta praticamente ferma vicino al punto di deposizione.

18. $H_3N^+–CH_2–CO–NH–CH(CH_3)–COO^–$: il legame peptidico è –CO–NH–; a sinistra l'estremità N-terminale (glicina), a destra la C-terminale (alanina). I tetrapeptidi sono le permutazioni di 4 oggetti: $4! = 4 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1 = 24$.

19. a) Nove residui, 9 − 1 = 8 legami peptidici. b) Fra le due cisteine, in posizione 1 e 6: il ponte chiude un anello di sei residui (Cys1–Cys6), da cui pende una «coda» di tre residui (Pro-Leu-Gly-NH_2). c) Circa +1: l'estremità N-terminale è protonata, l'estremità C-terminale è un'ammide senza carica, e nessuna catena laterale è carica a pH 7 (Gln e Asn sono ammidi, Tyr è un acido debolissimo). d) La cisteina in posizione 1.

20. Per [S] = 0,25 mmol/L: $v = 120 \cdot 0{,}25/(0{,}50 + 0{,}25) = 40$ µmol/min. Per [S] = 4,5 mmol/L: $v = 120 \cdot 4{,}5/5{,}0 = 108$ µmol/min $\approx 1{,}1 \times 10^2$ µmol/min. $[S] = K_M \cdot v/(V_{max} - v) = 0{,}50 \cdot 90/30 = 1{,}5$ mmol/L.

21. $K_M = [S](V_{max} - v)/v = 3{,}0 \cdot (50 - 30)/30 = 2{,}0$ mmol/L. Controllo: $50 \cdot 3{,}0/(2{,}0 + 3{,}0) = 30$

μmol/min.

22. a) K_M apparente = 2,0 · (1 + 3) = 8,0 mmol/L. b) Senza inibitore v/V_{max} = 8,0/(2,0 + 8,0) = 0,80; con l'inibitore 8,0/(8,0 + 8,0) = 0,50. c) v/V_{max} = 0,80 richiede [S] = 4 · K_M apparente = 32 mmol/L (infatti 32/(8,0 + 32) = 0,80). d) $V_{max}/(1 + 3) = 0{,}25\ V_{max}$: al massimo il 25 %, qualunque sia [S].

23. a) ossidoreduttasi; b) idrolasi; c) isomerasi; d) ligasi; e) transferasi (trasferisce un fosfato dall'ATP al glucosio); f) liasi (addiziona acqua al doppio legame C=O del CO_2: non spezza un legame con l'acqua, quindi non è un'idrolisi, e non ossida).

24. a) 0,5 equivalenti per arrivare a pH = pK_{a1} = 2,34 (metà dei gruppi –COOH neutralizzati) e 1,0 equivalente per il punto isoelettrico (pH 5,97). b) Attorno a pH 2,3 e attorno a pH 9,6, circa una unità di pH sopra e sotto ciascun pK_a, dove sono presenti in quantità confrontabili la forma acida e quella basica di un gruppo. c) Al pI i –COOH sono quasi tutti deprotonati e gli $–NH_3^+$ quasi tutti ancora protonati: non ci sono coppie acido–base coniugate in quantità confrontabili che assorbano la base aggiunta.

25. a) Velocità (s^{-1}): 0,050; 0,080; 0,11; 0,13; 0,14; 0,16. b) La curva si appiattisce: V_{max} è un po' maggiore dell'ultimo valore, circa 0,2 s^{-1}; la metà, circa 0,10 s^{-1}, si raggiunge verso 0,7–0,8 %. (I dati sono stati costruiti con V_{max} = 0,20 s^{-1} e una costante di 0,75 %.) c) La curva si avvicina a V_{max} senza raggiungerla, e a concentrazioni alte le differenze fra i tempi sono piccole rispetto agli errori di misura; il grafico dei doppi reciproci (Approfondimento) aiuta. Inoltre la curva descrive il sistema dei dischetti, non la sola catalasi: il tempo di risalita ha un minimo fissato dal metodo e la catalasi non si satura facilmente, perciò i valori stimati sono apparenti.

26. a) $K_{0,5}$ = 2, 4 e 8 mmol/L; la curva con $K_{0,5}$ = 2 mmol/L, spostata a sinistra, è quella con l'attivatore. b) Sigmoide: a [S] = 2, $2^3/(4^3 + 2^3)$ = 8/72 = 0,11; a [S] = 8, 512/(64 + 512) = 0,89. Iperbole: 2/(4 + 2) = 0,33 e 8/(4 + 8) = 0,67. c) La sigmoide aumenta di 8 volte, l'iperbole solo di 2: attorno a $K_{0,5}$ l'enzima allosterico risponde in modo molto più brusco alle variazioni di [S], e si comporta come un interruttore regolabile.

27. Traccia. Variabile indipendente: la temperatura (per esempio 10, 20, 30, 40, 50 °C, con bagni termostatati in cui si portano sia l'estratto sia l'acqua ossigenata); variabile dipendente: la velocità 1/*t*. Costanti: concentrazione di acqua ossigenata (per esempio 1,5 %), volume, dischetti uguali, tempo di immersione, stesso estratto. Controllo: dischetti con estratto bollito. Tre prove per temperatura. Sicurezza: occhiali e guanti, soluzioni non più concentrate del 3 %. Atteso: la velocità cresce con la temperatura fino a un ottimo, poi cala perché l'agitazione termica rompe le interazioni deboli della struttura terziaria e l'enzima si denatura.

28. Traccia. La cheratina è fatta di α-eliche unite da molti ponti disolfuro fra cisteine. Il riducente rompe i ponti, –S–S– + 2 H → 2 –SH; avvolti sui bigodini, i fasci di catene scorrono e si dispongono secondo la nuova forma; l'ossidante riforma i ponti disolfuro fra cisteine che ora sono affacciate in posizioni diverse e «fissa» la piega con legami covalenti. Il ferro e l'acqua agiscono solo sui legami a idrogeno, deboli: l'umidità li rompe e li riforma nella disposizione originaria, che i ponti disolfuro rimasti intatti continuano a imporre.

29. Traccia. L'etanolo è un substrato migliore dell'alcol deidrogenasi e occupa il sito attivo: per il metanolo è un inibitore competitivo, che aumenta il K_M apparente della sua ossidazione. Il metanolo viene trasformato più lentamente in formaldeide e acido formico, tossici (danni alla vista, acidosi), e intanto viene eliminato con l'urina e il respiro o con la dialisi. Poiché l'inibizione competitiva è reversibile e dipende dal rapporto fra le concentrazioni, l'etanolo va mantenuto alto per tutto il tempo in cui il metanolo è presente. Un inibitore irreversibile bloccherebbe l'enzima in modo permanente, finché la cellula non ne produce di nuovo: fermerebbe la produzione dei prodotti tossici, ma lascerebbe il fegato a lungo senza quell'enzima, e la dose non si potrebbe più regolare.

30. Traccia. a) Dalla niacina deriva il NAD^+ (e il $NADP^+$), coenzima delle deidrogenasi, cioè delle os-

sidoriduzioni: accetta uno ione idruro e diventa NADH. b) Lo stesso coenzima serve a moltissimi enzimi, in vie centrali come la glicolisi e la respirazione (capitolo 9): la sua mancanza colpisce soprattutto i tessuti con grande ricambio o grande consumo di energia, come la pelle, l'intestino e il sistema nervoso, da cui dermatite, diarrea e disturbi mentali. c) La dieta monotona dei braccianti, la povertà delle campagne e la grande emigrazione di fine Ottocento sono temi di Storia; l'obiettivo 2 dell'Agenda 2030 («sconfiggere la fame») comprende anche la carenza di micronutrienti, che colpisce chi mangia abbastanza calorie ma una dieta povera di varietà. d) Le due ipotesi prevedono cose diverse: una tossina dovrebbe dare la malattia anche a chi mangia mais buono in una dieta varia, una carenza dovrebbe guarire aggiungendo alimenti ricchi del fattore mancante. Furono gli esperimenti sulla dieta, nel Novecento, a decidere fra le due.

31. Traccia. Il catalizzatore abbassa l'energia di attivazione offrendo un percorso diverso, ma non cambia ΔG né la costante di equilibrio (vol. 4, cap. 2). L'enzima lo fa legando il substrato nel complesso ES: la velocità segue Michaelis–Menten e dipende dalle concentrazioni, da K_M e dalla quantità di enzima. Inibitori, effettori allosterici, fosforilazione e zimogeni cambiano le velocità delle singole tappe, cioè la «strada». La «meta» (ΔG) si cambia solo accoppiando le reazioni con l'ATP e con i coenzimi ridotti (capitolo 9). Regolare le velocità permette alla cellula di decidere in pochi secondi quali vie usare, restando lontana dall'equilibrio come un sistema aperto; un enzima che spostasse l'equilibrio violerebbe il secondo principio.

32. $1/V_{max} = 0{,}10$ min/µmol → $V_{max} = 10$ µmol/min; $-1/K_M = -0{,}50$ L/mmol → $K_M = 2{,}0$ mmol/L. Con un inibitore competitivo la retta ruota attorno alla stessa intercetta verticale (stessa V_{max}), diventa più ripida e incontra l'asse orizzontale più vicino all'origine (K_M apparente maggiore).