

Corso per progressione verticale D
Ambito biologico per le esigenze del Polo Scientifico Didattico di Ravenna



*Metodi per la valutazione di attività
enzimatiche e bioindicatori di stress
ambientale*

*Prof. Giorgio Sartor
1 dicembre 2005*

Copyright © 2001-2005 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Di cosa si parla

- Biomonitoraggio
- Enzimologia, ovvero: gli enzimi
 - Cinetica chimica e cinetica enzimatica
- Stress ossidativo
- Biomarkers di genotossicità
- Markers di funzionalità cellulare

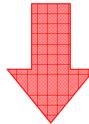
Biomonitoraggio

La regolare e sistematica valutazione delle condizioni dell'ambiente mediante un insieme di metodiche che utilizzano specie animali o vegetali per misurare l'impatto degli agenti inquinanti sull'ambiente.

Biomarcatori di inquinamento

- Le risposte che un organismo genera nei confronti dei composti inquinanti rappresentano potenziali

Biomarkers



- Variazione indotta da un contaminante a livello di componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione.

Biomarkers

Misura funzionale
dell'esposizione ad agenti
stressori espressa a livello sub-
organismico, fisiologico,
comportamentale.

(McCarthy and Munkittrick, 1996)

Perché i biomarkers

- Rapporto costo-risultato
- Rapidi
- Robusti
- Informativi
- Rappresentano differenti livelli biologici
- Generali/specifici
- (Semplici)

Biomarkers

- Biomarkers generali
 - Sono indice di una alterazione generale dell'ambiente.
- Biomarkers specifici
 - Sono la risposta ad uno specifico inquinante.
- Batteria di biomarkers
 - Insieme di biomarcatori in grado di dare risposte integrate.

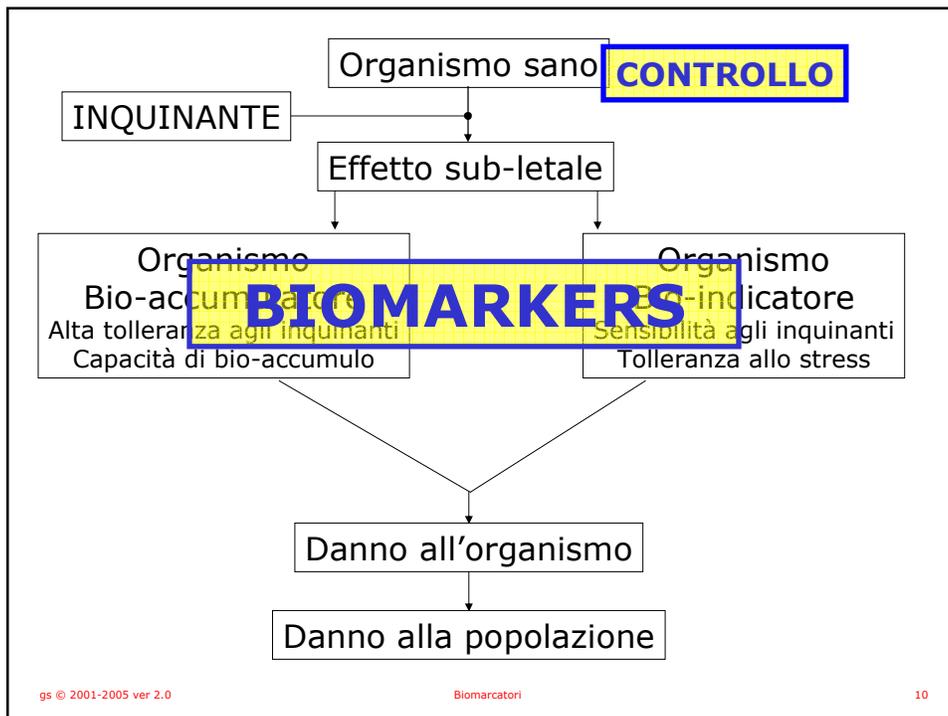
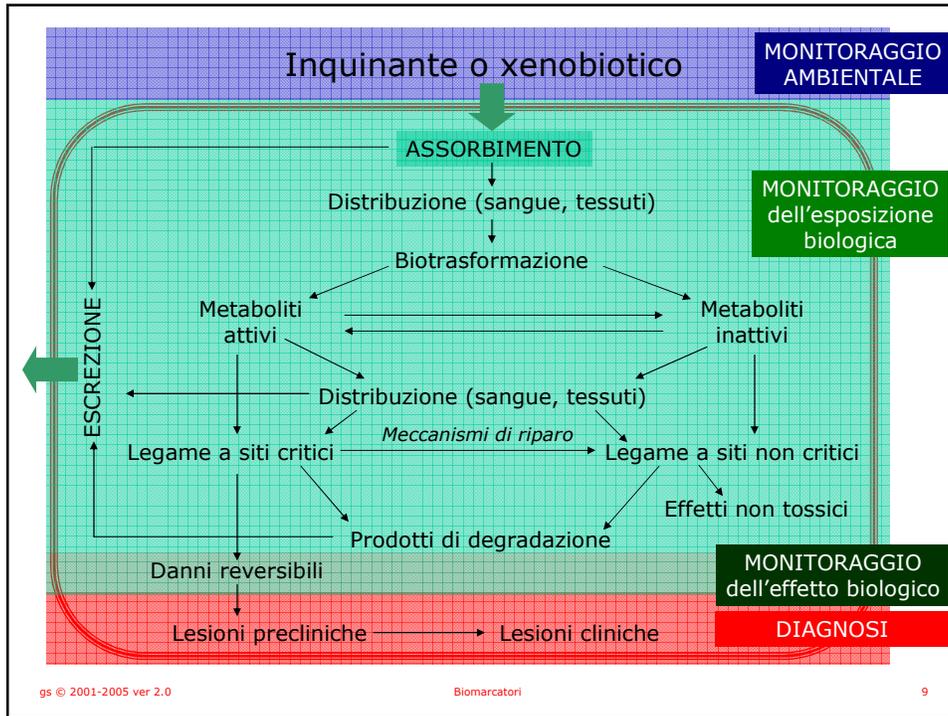
Biomonitoraggio mediante biomarkers

• VANTAGGI

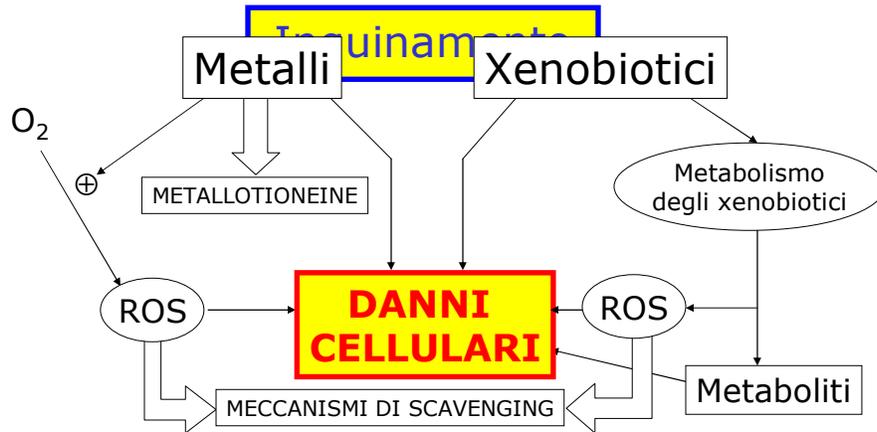
- Precocità della risposta
- Rivela l'effetto sinergico degli inquinanti
- Rivela l'inquinamento anche quando la causa è scomparsa

• SVANTAGGI

- Influenza delle condizioni chimico-fisiche ambientali sugli organismi
- Variabilità biologica
 - Età
 - Genere
 - Stato riproduttivo
 - Stadio di sviluppo
 - Dieta
 - Isoenzimi



Il monitoraggio biologico e l'utilizzo di biomarcatori

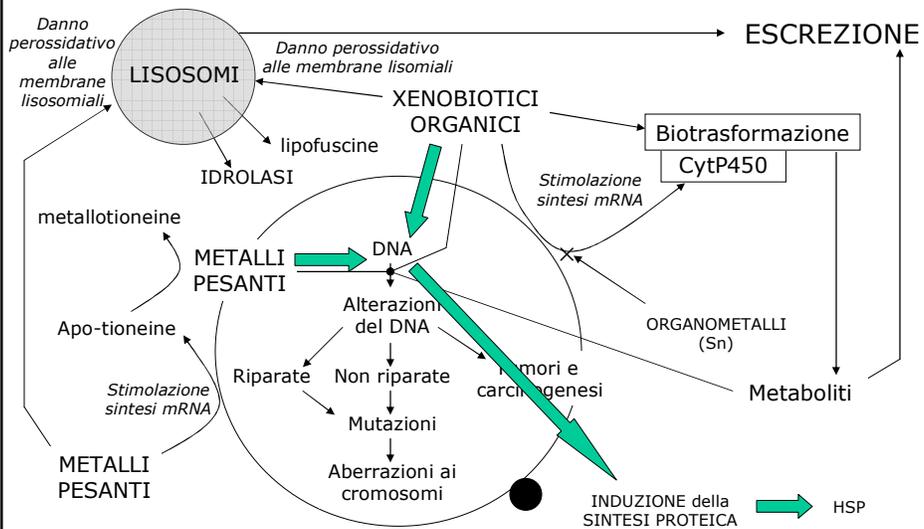


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

11

Effetto sinergico di inquinanti

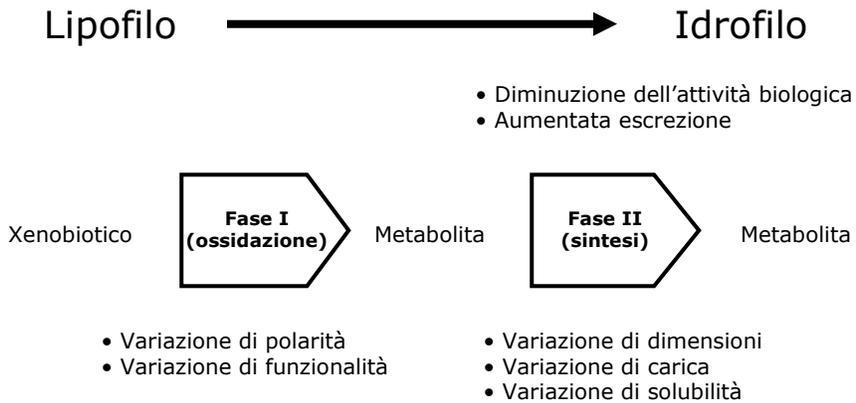


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

12

Schema generale del metabolismo degli xenobiotici

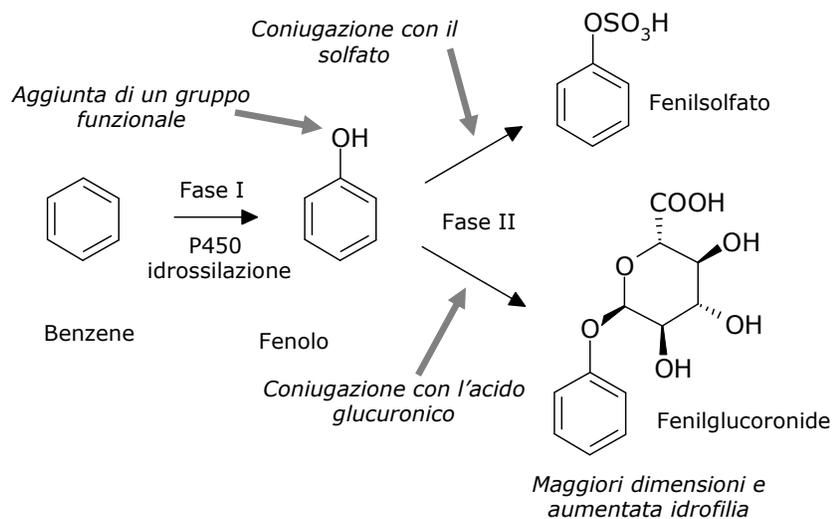


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

13

Per esempio...



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

14

Biomonitoraggio mediante biomarkers

- Effetti sub-letali
 - Alterazioni del DNA
 - Alterazione del sistema immunitario
 - Alterazioni biochimiche
 - Alterazioni morfologiche

Biomonitoraggio mediante biomarkers

- Alterazioni del DNA (genotossicità)
 - Addotti al DNA
 - Danni al DNA
 - Test dei micronuclei
- Alterazione del sistema immunitario
 - Fagocitosi
 - Conteggio degli emociti
 - Ossido di azoto
 - Linfociti
 - Saggi batterici
- Alterazioni morfologiche
 - Stabilità lisosomale
 - Modifica della struttura dei lisosomi
 - Proliferazione dei perossisomi
 - Accumulazione dei lipidi neutri
 - Accumulazione di lipofuscine

Biomonitoraggio mediante biomarkers

- Alterazioni biochimiche
 - Stress ossidativo
 - Catalasi (CAT)
 - Superossido dismutasi (SOD)
 - Glutazione perossidasi (GPX e Se-GPX), Glutazione reduttasi (GR), Stato redox del glutatione, Glutazione totale (GSH)
 - Perossidazione lipidica
 - malondialdeide (MDA), Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS)
 - Biotrasformazione e trasporto
 - Enzimi di fase I
 - Ossidasi a funzione mista
 - Enzimi di fase II
 - Sistemi di protezione cellulare
 - Metallotioneine (MT)
 - Heat-shock proteins (HSP)
 - Neurotossicità
 - Inibizione della acetilcolinesterasi (AChE)
 - Metabolismo energetico

Utilizzo di risposte sub-letali come biomarcatori

- Organismi sentinella
 - Scelta in funzione dell'ambiente da monitorare
- Controllo
 - In siti di controllo
 - Stabulazione
- Prelievi
 - Georeferenziazione
 - Assenza di stress
- Analisi
 - Enzimologia
 - Tecniche di analisi

Enzimologia

Spontaneità

- Una qualunque reazione chimica avviene spontaneamente **se e solo se la variazione di energia libera (ΔG) è negativa:**

$$\Delta G_{T,p} < 0$$

$$\Delta G_T = \Delta H - T\Delta S$$

- A T e p costanti

Spontaneità

- Quindi, data una qualunque reazione chimica



- Essa avviene spontaneamente se le energie libere molari

$$G_B < G_A$$

- Più in generale qualunque trasformazione avviene **se e solo se:**

$$G_{\text{finale}} < G_{\text{iniziale}}$$

Spontaneità ed equilibrio

- Quando

$$G_B = G_A$$

- Quindi

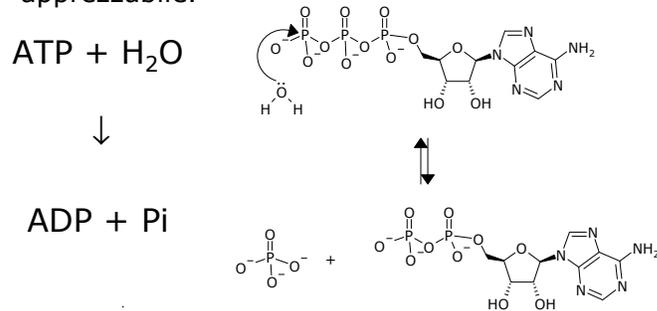
$$\Delta G = 0$$

- La reazione è all'equilibrio



Spontaneità e realtà

- Questo non significa che una reazione chimica (un processo) esoergonica ($\Delta G < 0$) avvenga con velocità apprezzabile.



$$\Delta G^{\circ'} = -7.3 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1} (-30.6 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}) \text{ a pH } 7$$
$$\Delta G^{\circ} = -10 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1} (-42 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}) \text{ a pH } 9$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

23

Energia di attivazione

- In soluzione l'ATP è stabile perché esiste l'energia di attivazione.

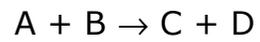
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

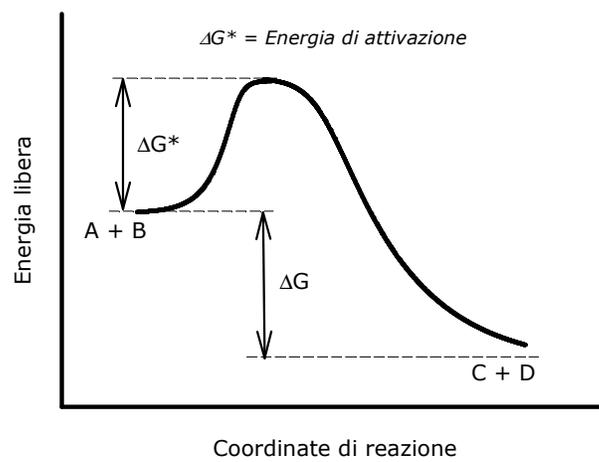
24

Catalisi

- In assenza di catalizzatore:

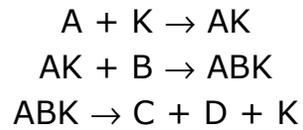


Catalisi

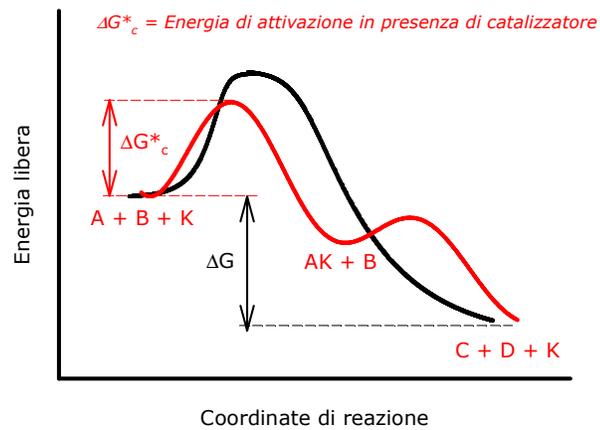


Catalisi

- In presenza di catalizzatore:

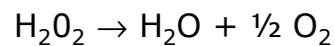


Catalisi



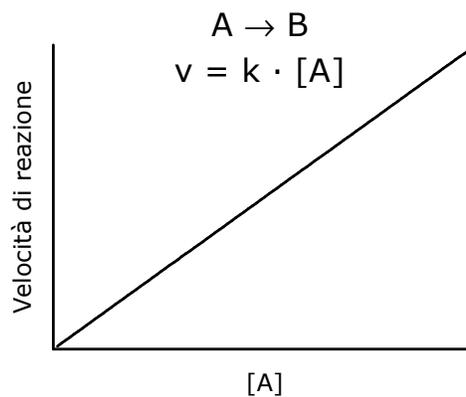
Controllo termodinamica e controllo cinetico di una reazione

- Ogni reazione può avvenire **se e solo se** è termodinamicamente favorita ($\Delta G < 0$),
- Avviene **se e solo se** vi è abbastanza energia per superare l'energia di attivazione:

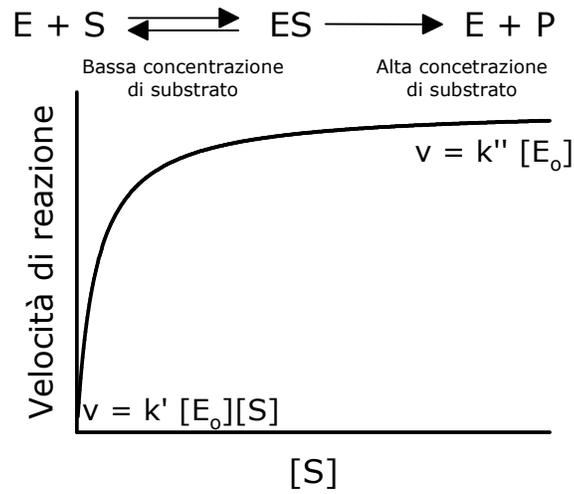


- Catalizzatore:
 - Nessuno $\Delta H^* = 18 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$
 - Platino $\Delta H^* = 11.7 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$
 - Catalasi $\Delta H^* = 5.5 \text{ kcal} \cdot \text{mole}^{-1}$

In una reazione chimica



In una reazione enzimatica



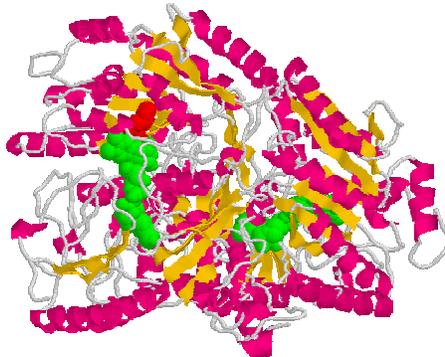
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

31

Enzimi

- Gli enzimi sono sistemi catalitici, in genere...
... **proteine**



gs © 2001-2005 ver 2.0

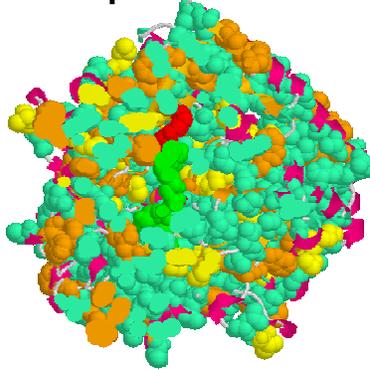
Biomarcatori

32

Enzimi

- Gli enzimi sono sistemi catalitici, in genere...

... **proteine**



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

33

Specificità degli enzimi

- Specificità
 - Stereochimica
 - Assoluta
 - Di gruppo
 - Di legame

gs © 2001-2005 ver 2.0

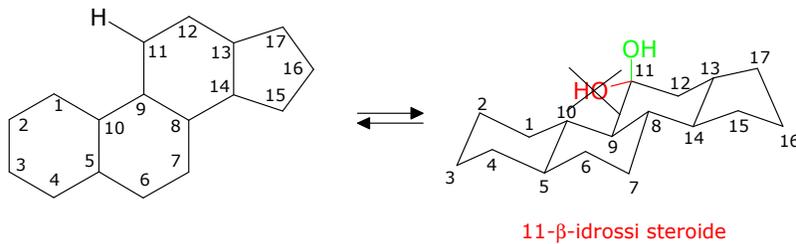
Biomarcatori

34

Specificità degli enzimi

- Specificità stereochimica

steroidi 11-β-monossigenasi



gs © 2001-2005 ver 2.0

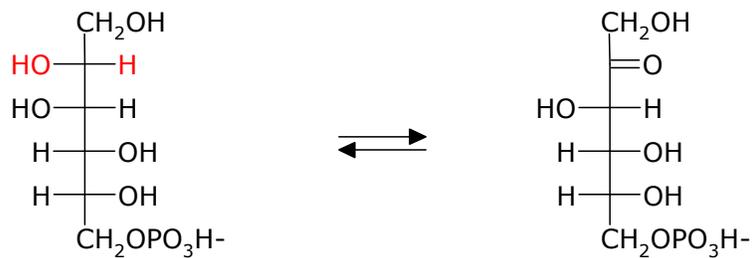
Biomarcatori

35

Specificità degli enzimi

- Specificità assoluta

mannitolo-1-fosfato deidrogenasi



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

36

Specificità degli enzimi

- Specificità di gruppo
 - Proteasi



Specificità degli enzimi

- Specificità di legame
 - Esterasi



Classificazione degli enzimi

- Singolo enzima
 - Ureasi
- Complesso enzimatico
 - Complesso piruvato deidrogenasi

Classificazione gerarchica degli enzimi

- Ogni enzima viene classificato a secondo della **reazione** che catalizza.
- Viene classificato con un numero:
 - EC X.Y.Z.T
 - X = classe
 - Y = sottoclasse
 - Z = sotto-sottoclasse
 - T = numero dell'enzima nella sotto-sottoclasse
 - http://www.genome.jp/dbget-bin/get_htext?ECtable+-f+T+w+A
 - <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>

Classificazione gerarchica degli enzimi

- Classi:
 - 1. Ossidoreduttasi
 - Catalizzano una reazione redox.
 - 2. Transferasi
 - Catalizzano il trasferimento di un gruppo da una molecola ad un'altra:
 $X-Y + Z \rightarrow X-Z + Y$
le chinasi trasferiscono un gruppo fosfato.
 - 3. Idrolasi
 - Catalizzano la scissione idrolitica di legami C=O, C-N, C-C, P-O-P,...

Classificazione gerarchica degli enzimi

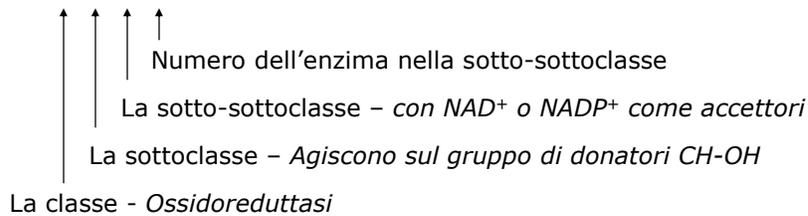
- Classi:
 - 4. Liasi
 - Catalizzano scissioni di legami con meccanismi diversi dalle Ossidoreduttasi e dalle Idrolasi.
 - 5. Isomerasi
 - Catalizzano modificazioni geometriche.
 - 6. Ligasi (Sintetasi)
 - Catalizzano l'unione di due molecole accoppiata al consumo di ATP o di un altro nucleotide trifosfato.

Classificazione gerarchica degli enzimi

- Per esempio:



- Nome comune: **alcool deidrogenasi**
- Nome sistematico: **alcool:NAD⁺ ossidoreduttasi**
- EC **1.1.1.1**



Isoenzimi

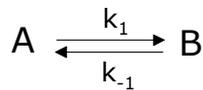
- Questa classificazione NON riguarda gli enzimi in quanto proteine ma in quanto CATALIZZATORI
- La classificazione riguarda quindi gli enzimi che catalizzano una reazione.
- Proteine diverse (con diversa struttura primaria) che catalizzano la stessa reazione, sono

ISOENZIMI

Isoenzimi

- Sono le forme multiple dovute a differenze, determinate geneticamente, di struttura primaria
- Sono anche isoenzimi quelle proteine che svolgono la stessa funzione ma sono geneticamente indipendenti, per esempio:
- EC 1.1.1.37 malato deidrogenasi
 - Citosolica (codificata dal DNA nucleare)
 - Mitocondriale (codificata dal DNA mitocondriale)

Cenni di cinetica chimica



$$\text{Velocità diretta } v_1 = - \frac{d[A]}{dt} = k_1[A]$$

$$\text{Velocità inversa } v_{-1} = - \frac{d[B]}{dt} = k_{-1}[B]$$

- All'equilibrio

$$v_1 = v_{-1}$$

$$k_1[A]_{\text{eq}} = k_{-1}[B]_{\text{eq}}$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[B]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}}} = K_{\text{eq}}$$

Cenni di cinetica chimica

- Ordine di reazione

- **I ordine**

$$v_1 = k_1[A]$$

- **II ordine**

$$v_1 = k_1[A]^2$$

oppure

$$v_1 = k_1[A][B]$$

- I ordine rispetto ad A
 - I ordine rispetto a B
 - II ordine globale

- **Ordine 0**

$$v_1 = k_1$$

- indipendente dalla concentrazione dei reagenti

Dipendenza dalla temperatura

- La velocità di una reazione dipende dalla temperatura attraverso la costante di velocità k

$$v = k[A]$$

$$k = A e^{-\frac{E_{att}}{RT}}$$

- All'equilibrio

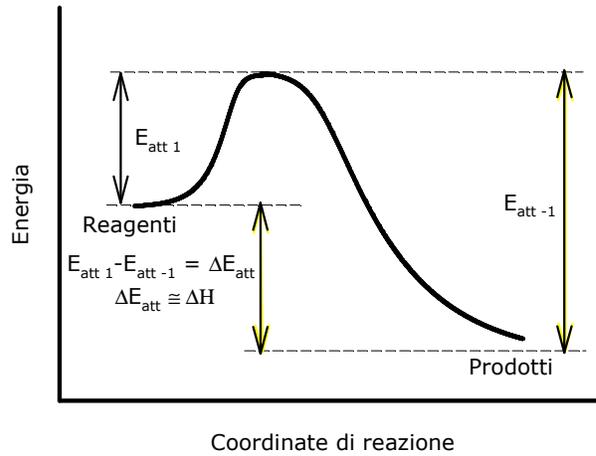
$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{A_1 e^{-\frac{E_{att1}}{RT}}}{A_{-1} e^{-\frac{E_{att-1}}{RT}}} = Z e^{-\frac{\Delta E_{att}}{RT}}$$

Dipendenza dalla temperatura

$$K_{eq} = Z e^{-\frac{\Delta E_{att}}{RT}}$$

$$K_{eq} = e^{-\frac{\Delta H}{RT}}$$

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H}{RT}$$

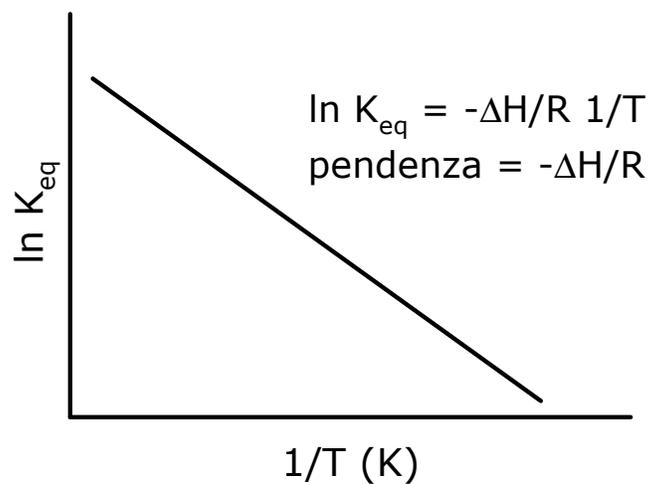


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

49

Dipendenza dalla temperatura



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

50

Dipendenza dalla temperatura

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Prodotti}]}{[\text{Reagenti}]}$$

- All'equilibrio

$$\frac{[\text{Prodotti}]}{[\text{Reagenti}]} = K_{\text{eq}}; \quad \Delta G = 0$$

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln K_{\text{eq}}$$

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K_{\text{eq}}$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Enzima e substrato

- In una reazione tra enzima (E) e substrato (S), possiamo distinguere tre fasi:

1. Legame tra E e S per formare il complesso ES

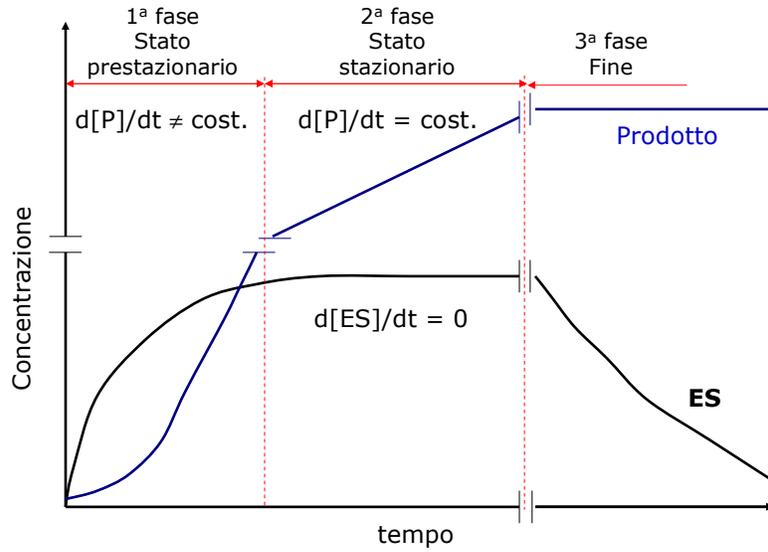


Stato prestazionario

2. $\frac{d[ES]}{dt} = 0$; Stato stazionario

3. Scompare il substrato, [ES] diminuisce, v diminuisce

Enzima e substrato



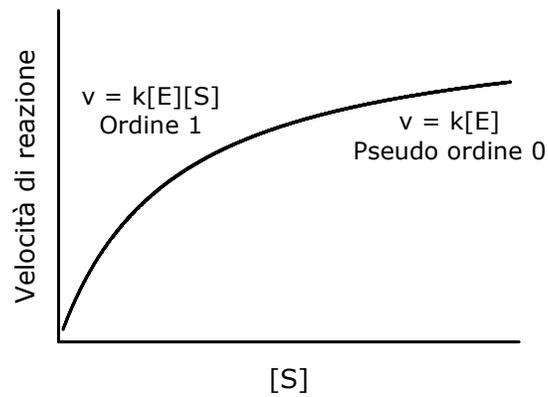
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

53

Enzima e substrato

- In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile



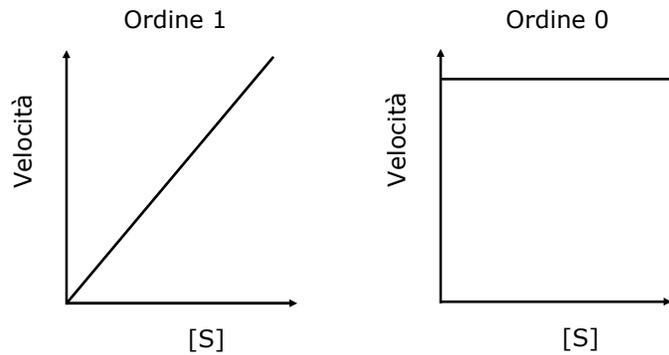
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

54

Enzima e substrato

- In una reazione enzimatica l'ordine di reazione è variabile



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

55

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- In una reazione enzimatica:



$$v_{\text{diretta}} = k_2[ES] \longleftarrow \text{INDETERMINABILE}$$

- Per l'equilibrio veloce (1)

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[ES]}{[E][S]} \longleftarrow \text{INDETERMINABILE}$$

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1}} [E][S]$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

56

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Per l'equilibrio veloce (1)

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[ES]}{[E][S]} \quad \text{INDETERMINABILE}$$

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1}} [E][S]$$

$[E_{\text{tot}}]$ misurabile

$$[E_{\text{tot}}] = [E] + [ES]$$

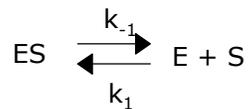
$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1}} ([E_{\text{tot}}] - [ES]) [S]$$

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Da cui

$$[ES] = \frac{[E_{\text{tot}}][S]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [S]}$$

$$\frac{k_{-1}}{k_1} = K_d \quad \text{Costante di dissociazione del complesso ES}$$



$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_d = K_M \quad \text{Costante di Michaelis e Menten}$$

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- La concentrazione del complesso ES

$$[ES] = \frac{[E_{\text{tot}}][S]}{K_M + [S]}$$

- Poiché:

$$v_{\text{diretta}} = k_2[ES]$$

$$v_{\text{diretta}} = \frac{k_2[E_{\text{tot}}][S]}{K_M + [S]}$$

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Quando tutto E_{tot} diventa ES allora la velocità sarà massima.

$$V_{\text{max}} = k_2[E_{\text{tot}}]$$

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

- Quando il substrato satura l'enzima allora la velocità sarà massima

Equazione di Michaelis e Menten

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

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

61

Michaelis e Menten



Leonor Michaelis (1875-1949)



Maud Menten (1879-1960)

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

62

Efficienza catalitica o numero di turnover

- k_2 è detta anche k_{cat} e si ottiene:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_{\text{tot}}]}$$

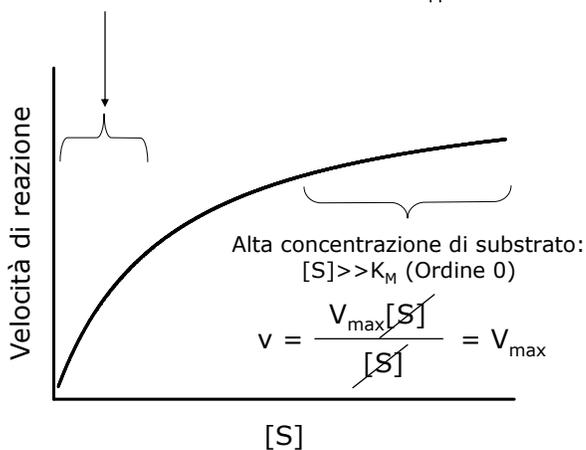
- k_2 è detto anche numero di turnover (Moli di substrato consumate per secondo per moli di enzima) si esprime in s^{-1} .

$$\sim 1 \text{ s}^{-1} < k_2 < 10^6 \text{ s}^{-1}$$

Trattamento secondo Michaelis e Menten

Bassa concentrazione
(relativamente) di substrato:
 $[S] \ll K_M$ (Ordine 1)

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



Trattamento secondo Briggs-Haldane

- Da un punto di vista formale il trattamento è lo stesso di M.M., cambia il significato cinetico di K_M



- Allo stato stazionario:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = \underbrace{k_1[E][S]}_{\text{formazione di ES}} - \underbrace{(k_{-1}[ES] + k_2[ES])}_{\text{scomparsa di ES}}$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{(k_{-1} + k_2)} \quad \longrightarrow \quad v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

65

Significato di K_M

- K_M è una concentrazione:

$$K_M = K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} ; \text{ mol}$$

- È la concentrazione di substrato al quale la velocità della reazione è metà della V_{\max}

$$v = \frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} ; \quad \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]} ;$$

$$K_M = [S]$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

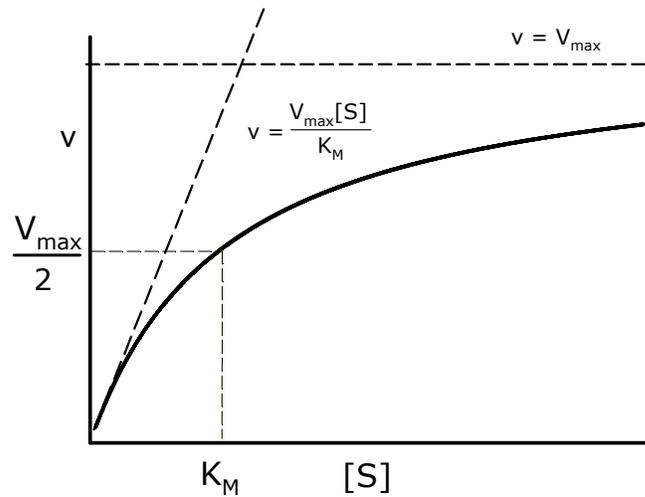
66

Significato di V_{\max}

- V_{\max} è legata a k_2

$$V_{\max} = k_2[E_{\text{tot}}]$$

Significato di K_M e V_{\max}



Linearizzazione dell'equazione di Michaelis e Menten

Lineweaver-Burk

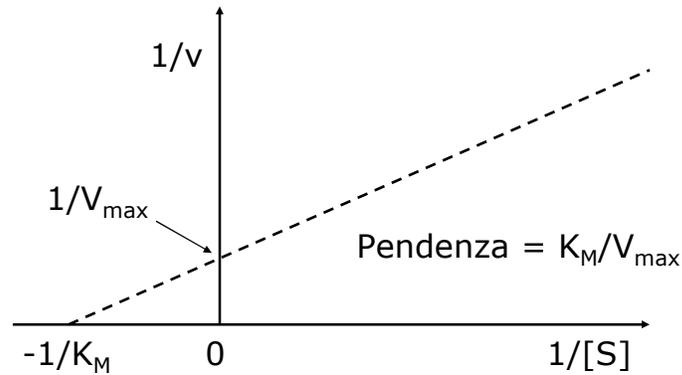
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

- Inversione

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

Lineweaver-Burk

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



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

71

Eadie-Hofstee

- Trasformazione

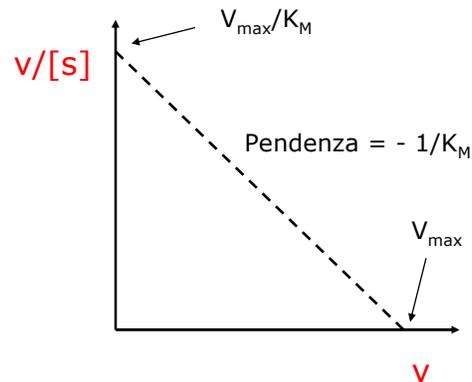
$$v (K_M + [S]) = V_{\max}[S]$$

$$vK_M + v[S] = V_{\max}[S]$$

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

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

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



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

72

Eadie-Hofstee (oppure)

- Trasformazione

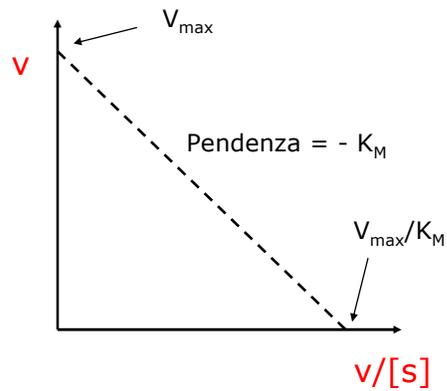
$$v (K_M + [S]) = V_{\max}[S]$$

$$vK_M + v[S] = V_{\max}[S]$$

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

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

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



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

73

Reazioni enzimatiche con più substrati

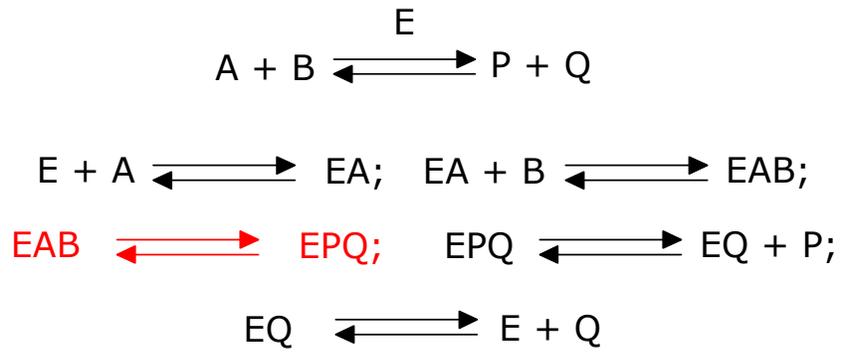
- Meccanismo sequenziale: i substrati si legano in modo sequenziale:
 - Prima uno poi l'altro in ordine preciso:
 - Meccanismo sequenziale ordinato
 - Senza un ordine preciso:
 - Meccanismo sequenziale casuale
- Meccanismo a ping-pong

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

74

Meccanismo sequenziale ordinato

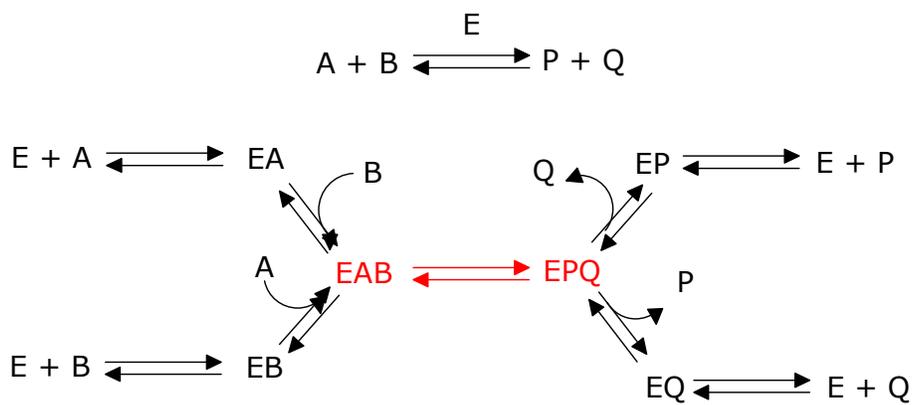


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

75

Meccanismo sequenziale casuale

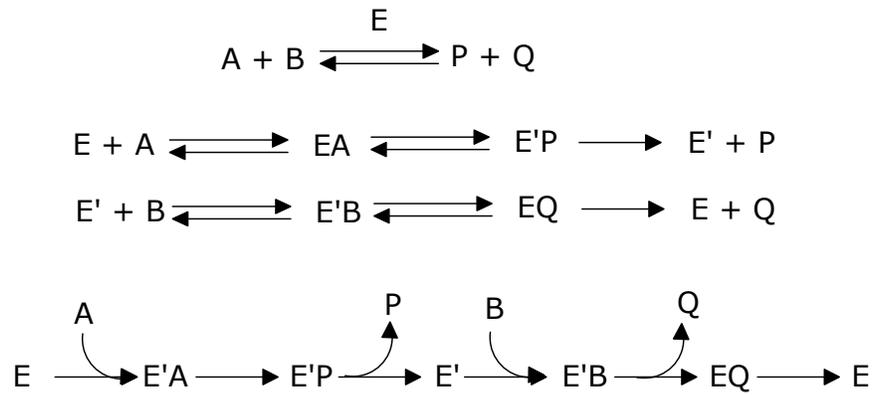


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

76

Meccanismo a ping-pong



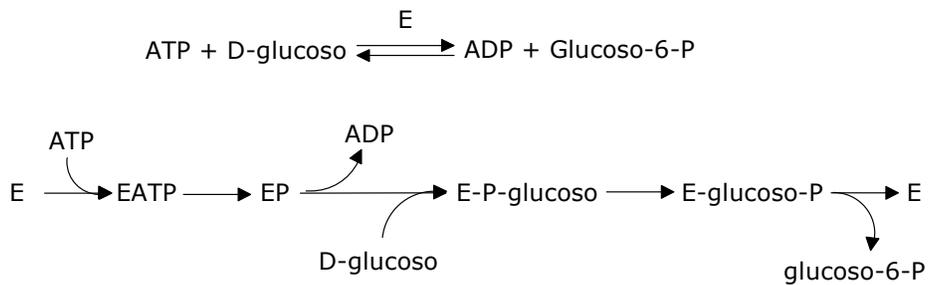
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

77

Meccanismo a ping-pong

- Così funziona l'esochinasi



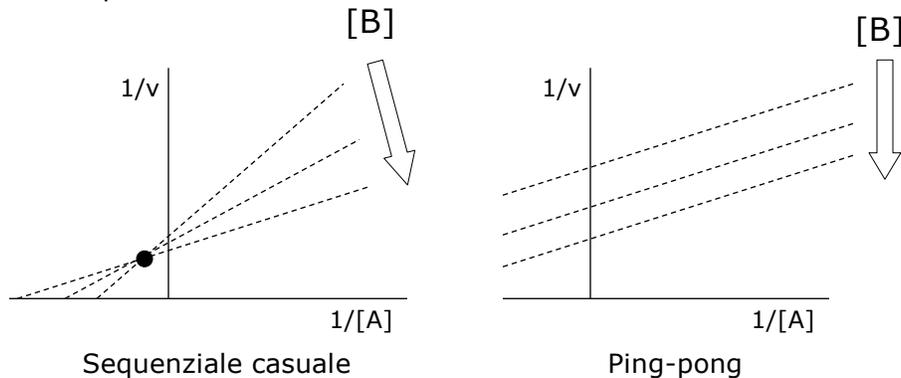
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

78

Reazioni enzimatiche con più substrati

- Il trattamento è complesso, occorre fare lo studio cinetico tenendo fissa la concentrazione di uno dei substrati (B) variando l'altro (A), così, di grafici di Lineweaver-Burk si può avere una descrizione del meccanismo:



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

79

Regolazione dell'attività enzimatica

- I fattori che regolano l'attività enzimatica sono:
 - Temperatura
 - Enzimi solubili o di membrana
 - pH
 - Effettori
 - Inibitori (inattivatori)
 - Attivatori
 - Effetti allosterici
 - Concentrazione di substrati e prodotti
 - Vie metaboliche
 - Repressione o induzione genica

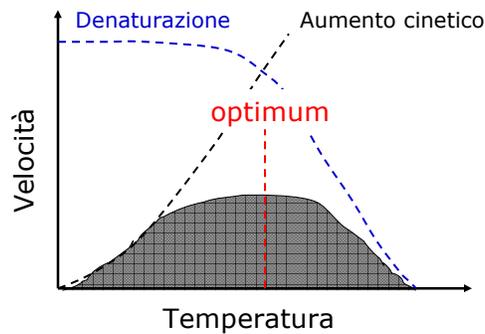
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

80

Temperatura

- La velocità delle reazioni chimiche dipende dalla temperatura.
- La stabilità di una proteina dipende dalla temperatura.



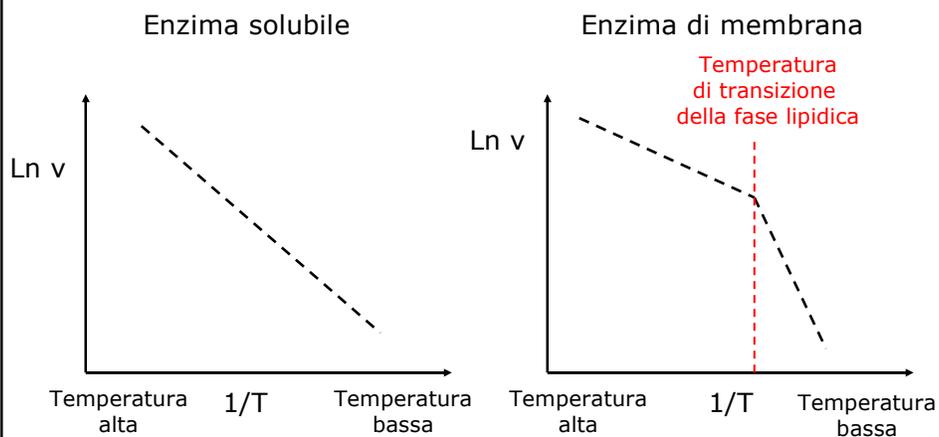
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

81

Temperatura

- La temperatura influenza la fluidità di membrana



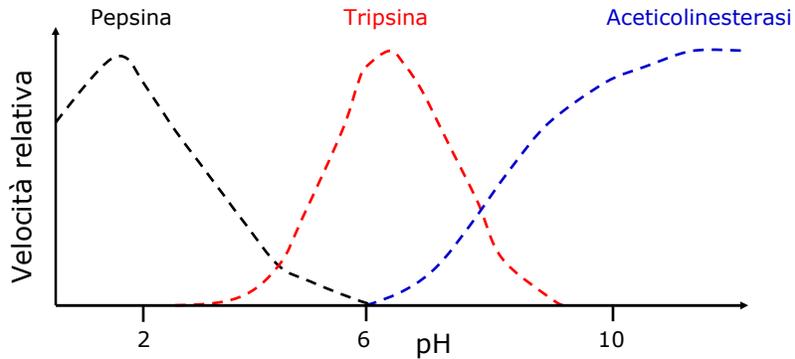
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

82

pH

- La stabilità di una proteina dipende dal pH.
- Alcuni processi coinvolgono valori estremi di pH



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

83

Effettori

- Attivatori
- Inibitori

- La differenza non è netta, la stessa molecola può funzionare in entrambi i modi a seconda delle condizioni
 - Carica
 - Concentrazione
 - Enzima legato ad altre molecole
 - ...

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

84

Inibitori

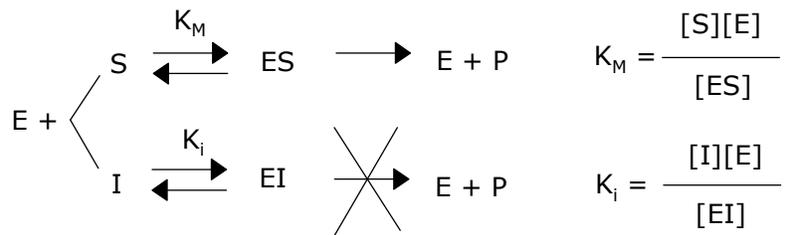
- Si definiscono inibitori quelle molecole che diminuiscono l'attività di un enzima, possono dare
 - Inibizione reversibile
 - Modificano in modo reversibile (in genere attraverso un legame non covalente) l'enzima
 - Inibizione irreversibile
 - Modificano in modo irreversibile l'enzima

Inibitori reversibili

- A secondo delle loro caratteristiche si definiscono:
 - Inibitori competitivi
 - Inibitori non competitivi
 - Inibitori acompetitivi

Inibitori competitivi

- Agiscono competendo con il substrato per lo stesso sito di legame, agiscono quindi sulla formazione del complesso ES.
- L'inibizione è rimossa aumentando la concentrazione di S



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

87

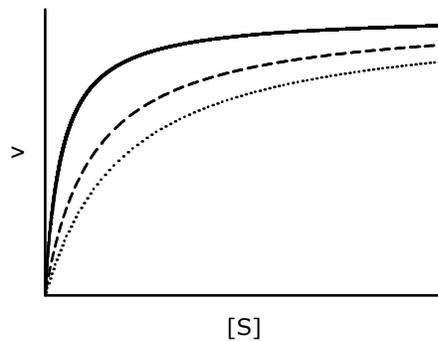
Inibitori competitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$



gs © 2001-2005 ver 2.0

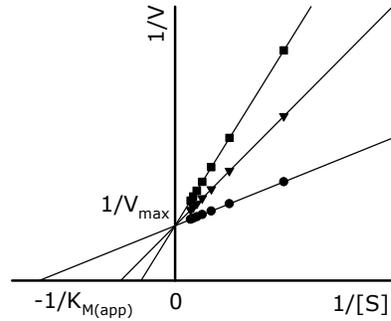
Biomarcatori

88

Inibitori competitivi

- Senza inibitore

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



- Con inibitore

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

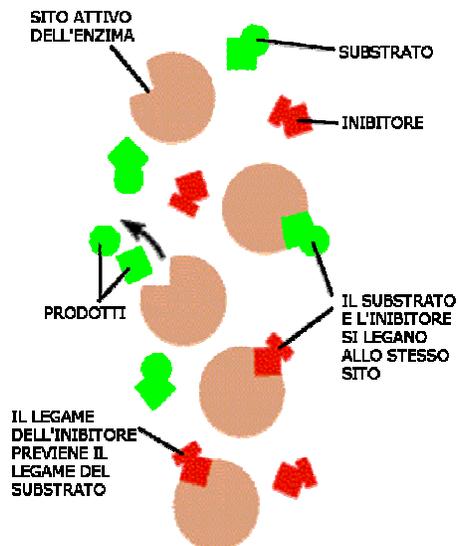
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

89

Inibitori competitivi

- Sono molecole simili al substrato
- Occupano lo stesso sito di legame



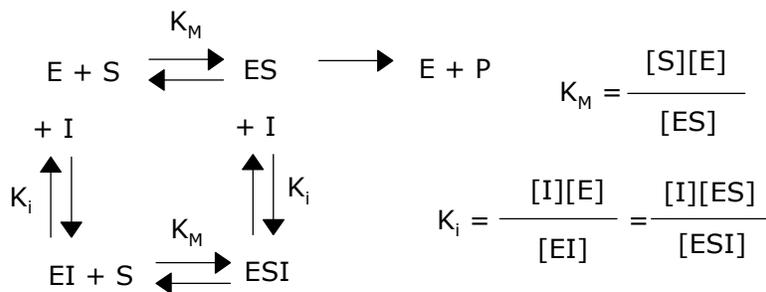
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

90

Inibitori non competitivi

- Agiscono legandosi in un sito diverso dal sito di legame del substrato il quale può comunque legarsi.
- L'inibizione NON è rimossa aumentando la concentrazione di S



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

91

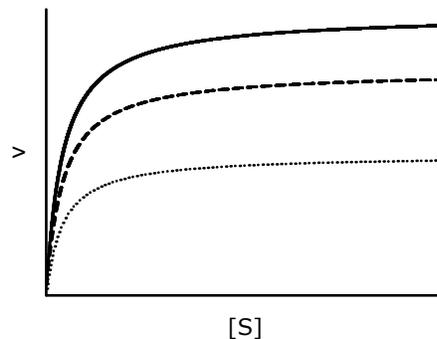
Inibitori non competitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

$$v = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} [S]}{K_M + [S]}$$



gs © 2001-2005 ver 2.0

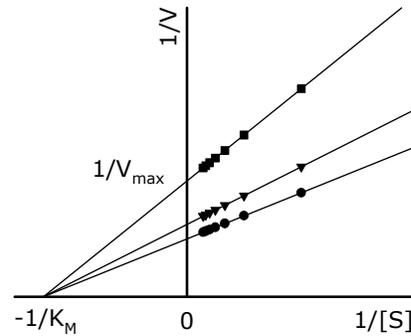
Biomarcatori

92

Inibitori non competitivi

- Senza inibitore

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



- Con inibitore

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

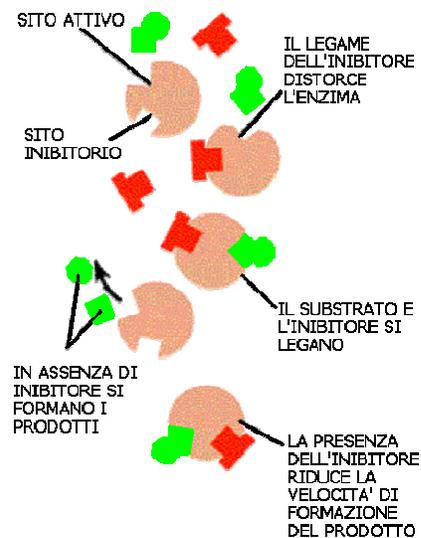
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

93

Inibitori non competitivi

- Sono molecole diverse dal substrato, si legano ad un proprio sito
- Ioni metallici (Cu^{++})
- Complessanti (EDTA)
- Modulatori



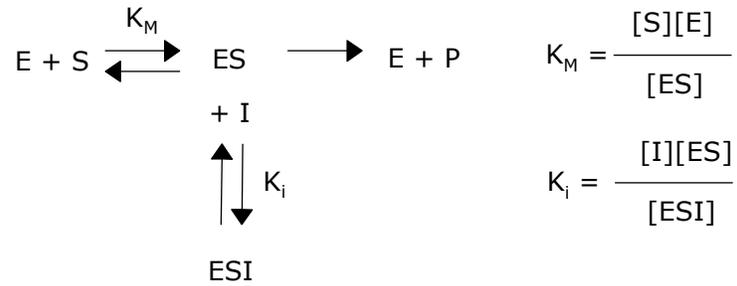
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

94

Inibitori acompetitivi

- Agiscono legandosi e bloccando il complesso enzima-substrato.



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

95

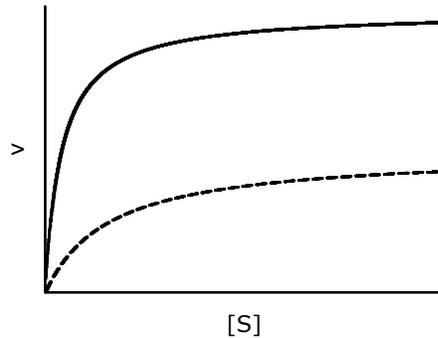
Inibitori acompetitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

$$v = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} [S]}{\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]}$$



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

96

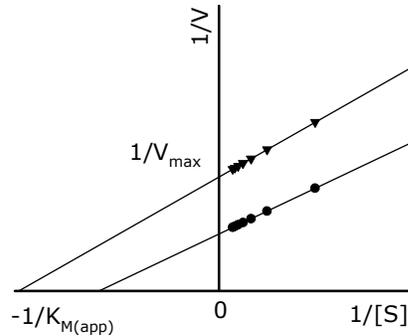
Inibitori incompetitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{[S]} \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$



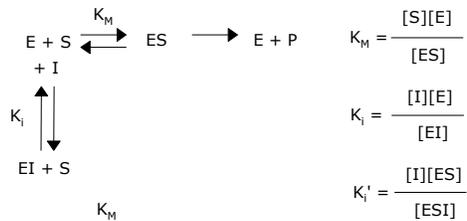
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

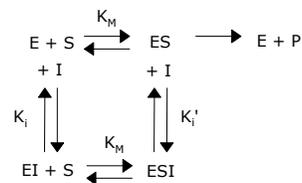
97

Riassumendo...

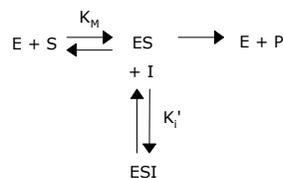
- Inibizione competitiva



- Inibizione non competitiva



- Inibizione incompetitiva



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

98

...riassumendo

Tipo di inibizione	V_{MAX}^{app}	K_M^{app}
Nessuna	V_{MAX}	K_M
Competitiva	V_{MAX}	aK_M
Non competitiva	V_{MAX}/a'	aK_M/a'
Acompetitiva	V_{MAX}/a'	K_M/a'

$$a = \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

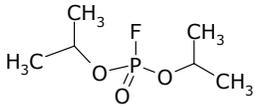
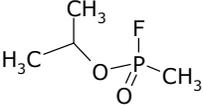
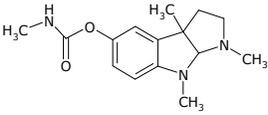
$$a' = \left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right)$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

99

Inibitori irreversibili

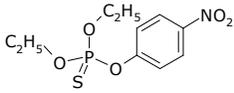
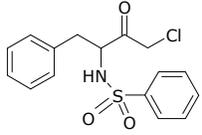
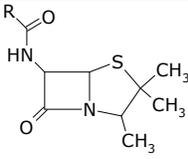
Inibitore	Formula	Origine	Meccanismo
Ione cianuro	CN^-	Mandorle amare	Complessa gli ioni metallici nelle proteine
Diisopropil fluorofosfato (DFP)		Sintetico	Inibisce gli enzimi con serina nel sito attivo
Sarin		Sintetico	Come il DFP
Fisostigmina		Frutto del calabar	Come il DFP

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

100

Inibitori irreversibili

Inibitore	Formula	Origine	Meccanismo
Parathion		Sintetico	Come il DFP (particolarmente attivo su acetilcolinesterasi di insetti)
N-tosil-L-fenilalanina clorometil chetone (TPCK)		Sintetico	Reagisce con l'His-57 della chimotripsina
Penicillina		<i>Penicillium Notatum</i>	Inibisce gli enzimi della sintesi della parete batterica

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

101

Attivatori

- Sono molecole che aumentano (o permettono) l'attività enzimatica

- Protezione dell'enzima
 - Glutazione
 - Ioni metallici
- Attivazione per azione sulle subunità



Enzima inattivo + cAMP → Subunità catalitica + Subunità regolatrice

- Azione proteolitica su proenzimi

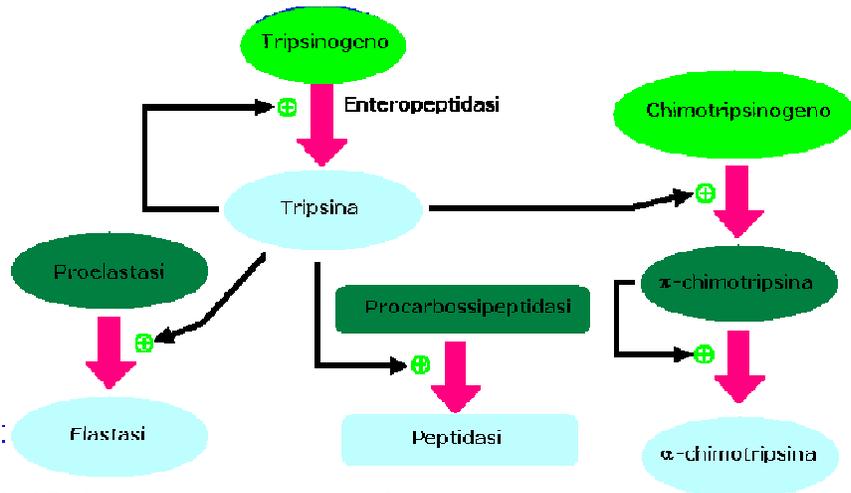
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

102

Attivatori

- Azione proteolitica su proenzimi



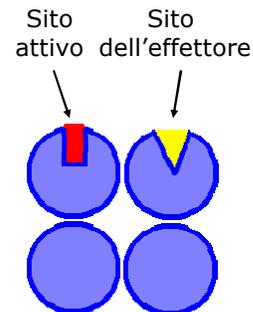
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

103

Effetti allosterici

- Gli effetti allosterici consistono nel legame di un effettore ad un sito diverso da quello del substrato con conseguente variazione delle proprietà dell'enzima
- Sono presenti soprattutto in enzimi multimerici
- L'effettore può essere lo stesso substrato (effettori omotropici) o diverso (effettori eterotropici)



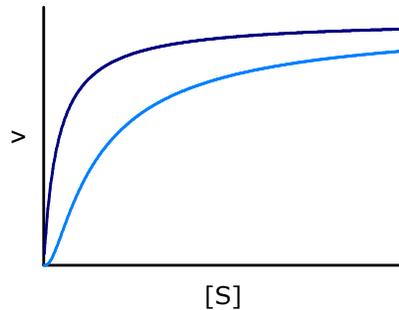
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

104

Effetti allosterici

- Il legame con l'effettore modifica (modula) le proprietà di legame del substrato.
- La velocità dipende da $[S]$ come una sigmoide.



$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{(K + [S])^n}$$

n = indice di cooperatività

gs © 2001-2005 ver 2.0

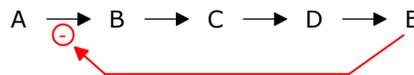
Biomarcatori

105

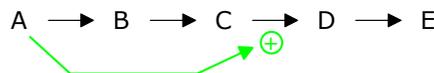
Vie metaboliche

- Una via metabolica è data da un insieme di reazioni catalizzate da enzimi che si susseguono l'una all'altra.
- Le vie metaboliche sono regolate:

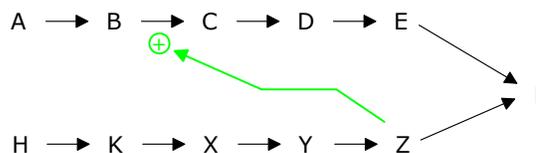
Inibizione da prodotto



Attivazione da substrato



Attivazione compensatoria



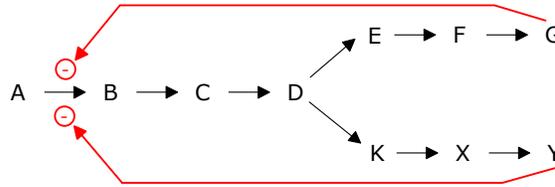
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

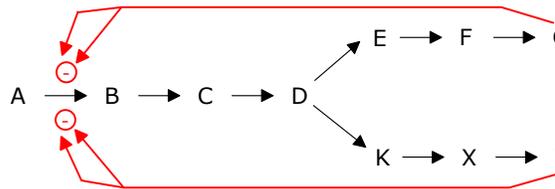
106

Vie metaboliche ramificate

Inibizione multivalente



Inibizione cooperativa



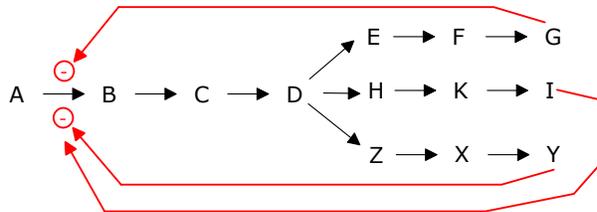
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

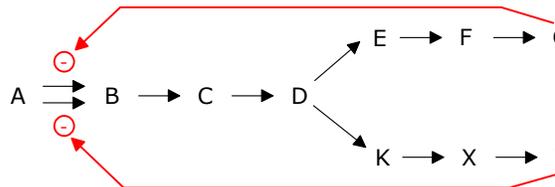
107

Vie metaboliche ramificate

Inibizione cumulativa



Inibizione di enzimi multipli



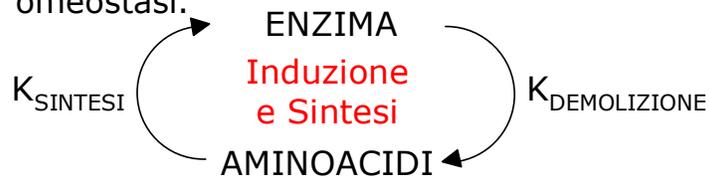
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

108

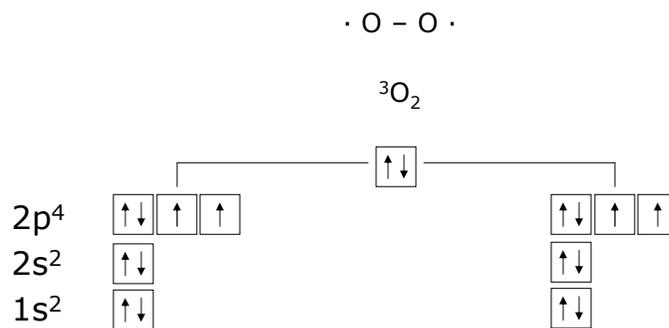
Regolazione genica

- Un'altra via con la quale viene regolata l'attività di uno o più enzimi è attraverso l'induzione o la repressione della sintesi proteica di di quel particolare enzima.
- Anche per gli enzimi esiste una sorta di omeostasi.



Stress ossidativo

Ossigeno tripletto

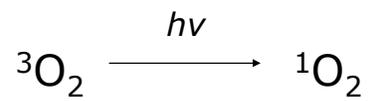


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

111

Fornendo energia

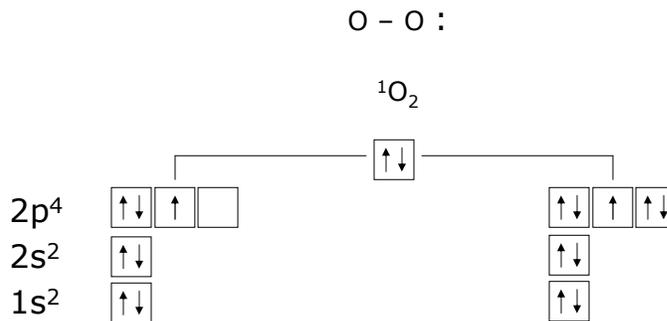


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

112

Ossigeno singoletto

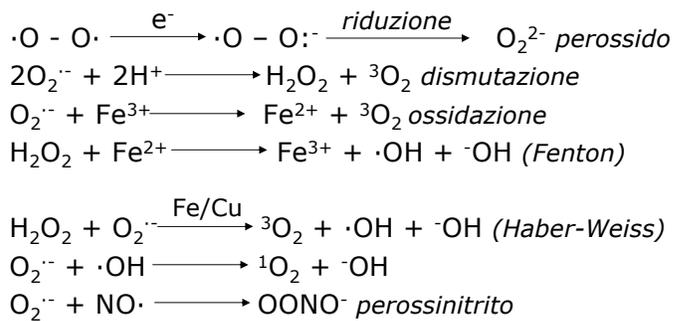


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

113

Anione superossido



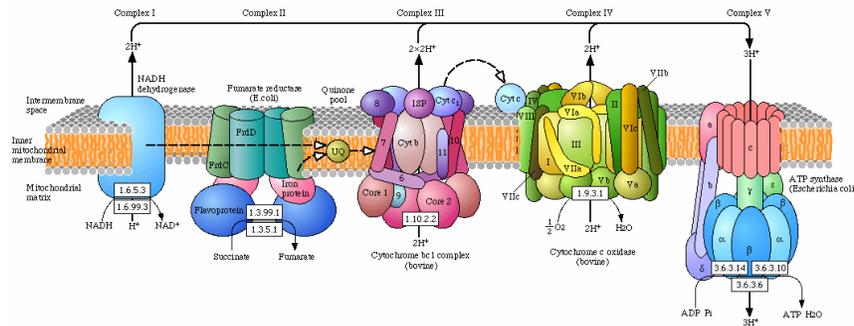
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

114

Specie radicaliche dell'Ossigeno (ROS)

- Prodotte anche dalla catena respiratoria



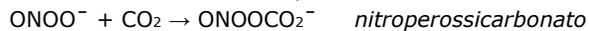
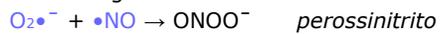
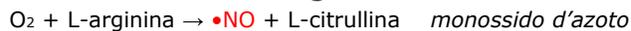
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

115

Specie radicaliche dell'Azoto (RNS)

- Prodotte prevalentemente dallo smog fotochimico
- All'interno dell'organismo vengono prodotte da reazioni dell'ossigeno molecolare



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

116

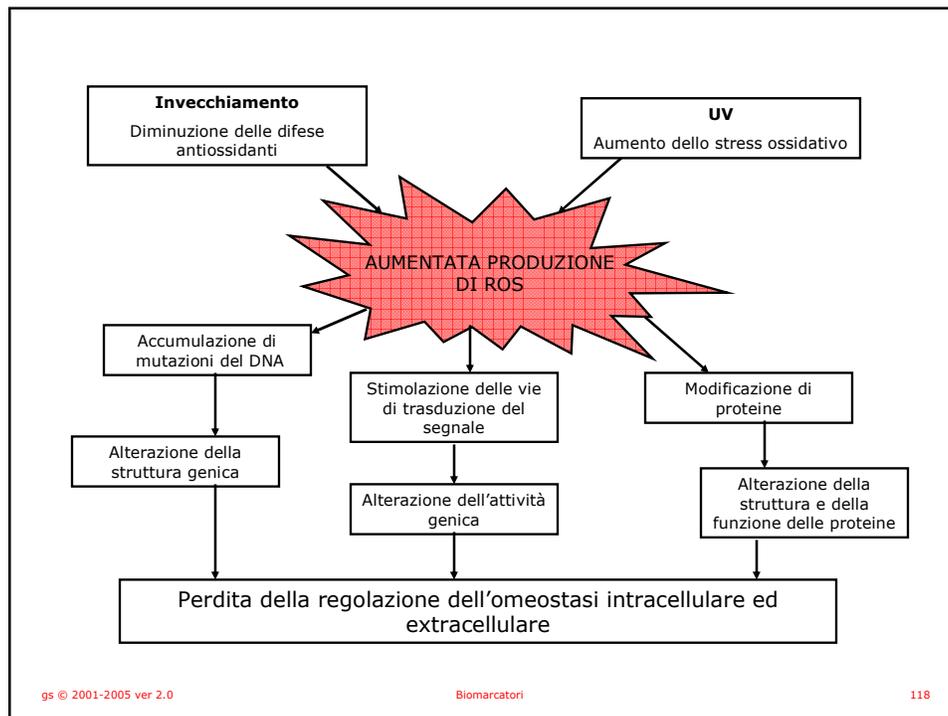
Fonti di Radicali

- Sorgenti endogene:
 - catena respiratoria, fotosintesi, prostaglandine, perossisomi, autossidazione, fagociti, ossiemoglobina, enzimi ossidativi
- Sorgenti esogene:
 - xenobiotici, radiazioni (ionizzanti e UV), calore, infezione, iperossia, inquinamento

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

117

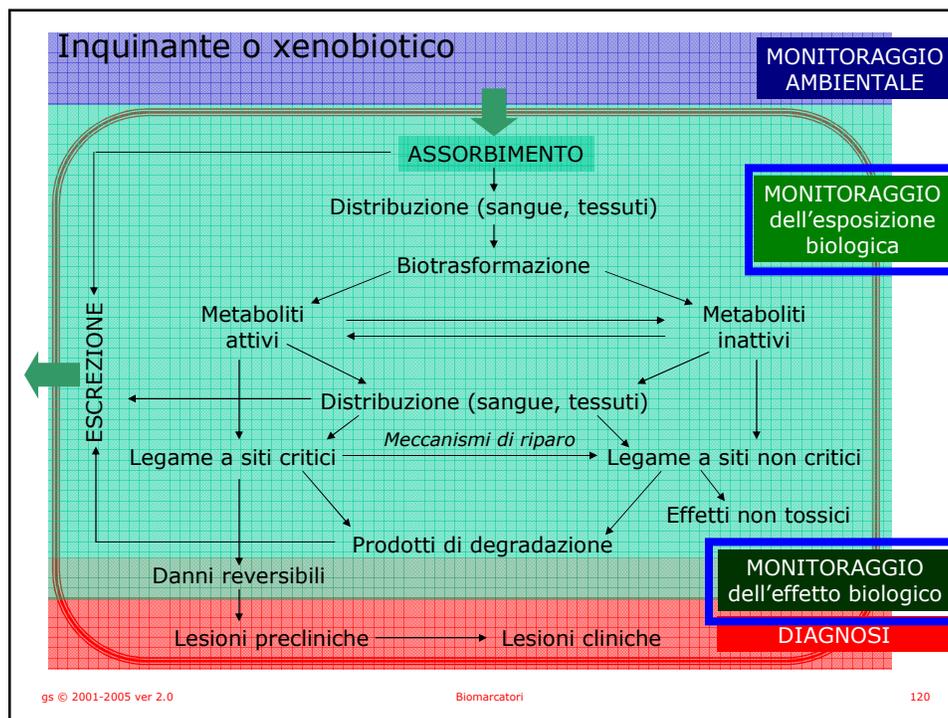


gs © 2001-2005 ver 2.0

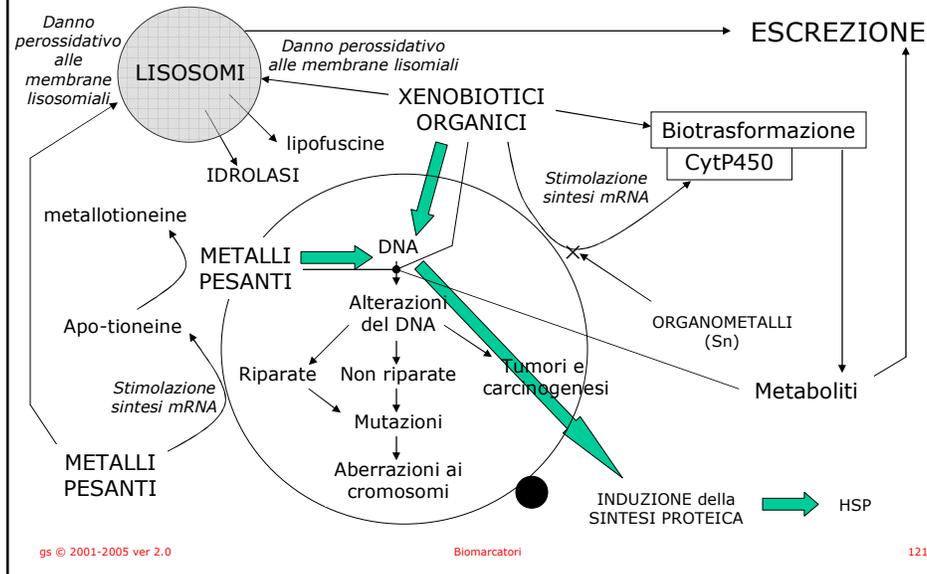
Biomarcatori

118

Biomarkers di genotossicità e loro significato



Effetto sinergico di inquinanti

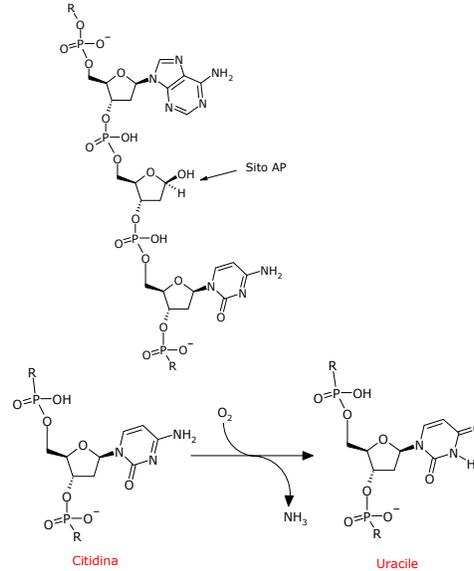


Tipi di danni al DNA

- Danni naturali
 - Mutazioni spontanee
- Danni fisici
 - Da radiazioni ionizzanti e UV
- Danni chimici
 - Da ROS e inquinanti organici

Danni Naturali

- Perdita di basi: il legame glicosidico è labile sotto condizione fisiologiche (formazione di un sito AP).
- Deamminazione: i gruppi amminici primari sono a volte instabili e possono venire convertiti in chetoni.



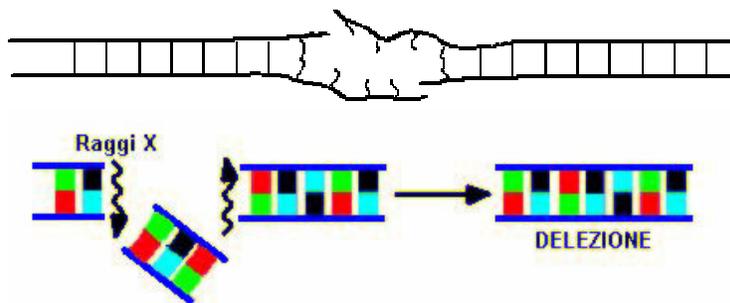
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

123

Danni Fisici: Radiazioni Ionizzanti

- Danni diretti: *Single Strand Break*, *Double Strand Break*, *mismatched bases*.
- Danni indiretti: produzione di ROS.



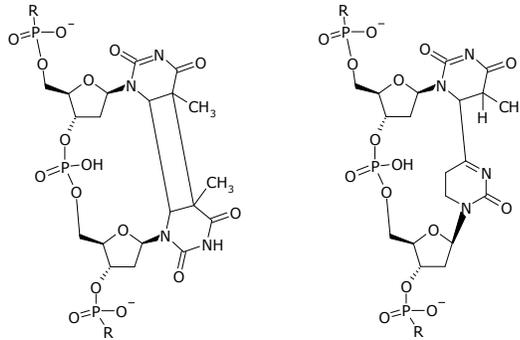
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

124

Danni Fisici: Radiazioni UV

- Stress ossidativo: foto-carcinogenesi e foto-invecchiamento (UV-B)
- Foto-dimerizzazione: formazione di CPD e 6-4PP (UV-C).



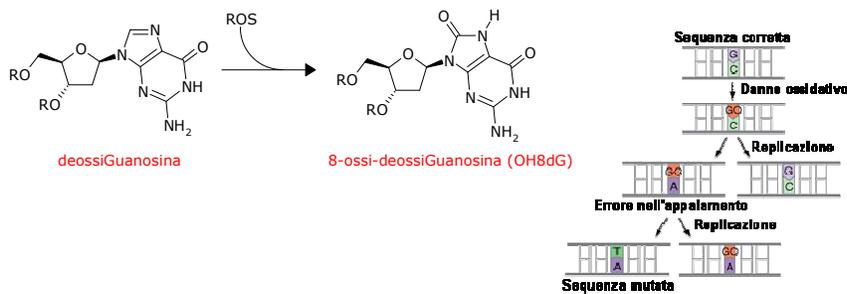
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

125

Danni chimici: ROS

- Causano ossidazione delle basi e **amplificano** deamminazioni e depurinazioni.
 - o Un esempio di composto ossidato è OH8dG: causa trasversioni delle basi GC → TA



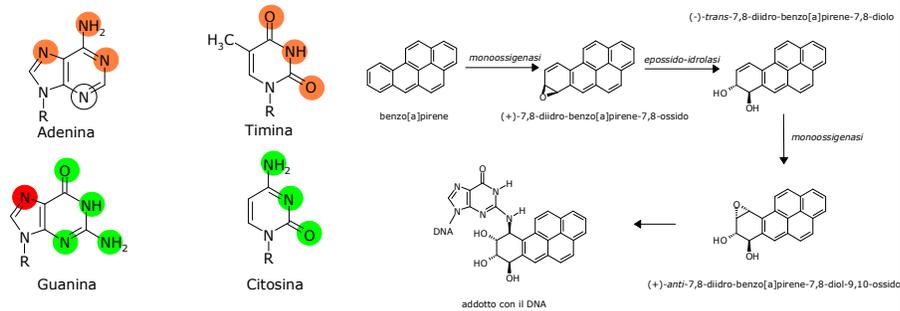
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

126

Danni chimici: inquinanti Organici

- Genotossici: danno diretto al DNA tramite formazione di addotti (alchilanti in posizioni nucleofile).
- Epigenetici: danno indiretto al DNA attraverso stress ossidativo o l'attivazione di composti pericolosi. Es. IPA.



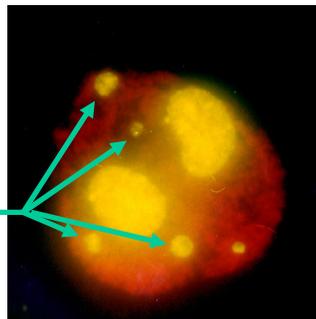
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

127

Formazione di micronuclei

- Durante la divisione cellulare i cromosomi sono trascinati verso i due poli da fibrille. Se il DNA è rotto il cromosoma non ha centromero in grado di attaccarsi alle fibre. Il DNA danneggiato rimane quindi al di fuori del nucleo principale e forma uno o più micronuclei.
- I micronuclei si formano sia per rottura del singolo strand (chimica) che per rottura del doppio strand (radiazioni).

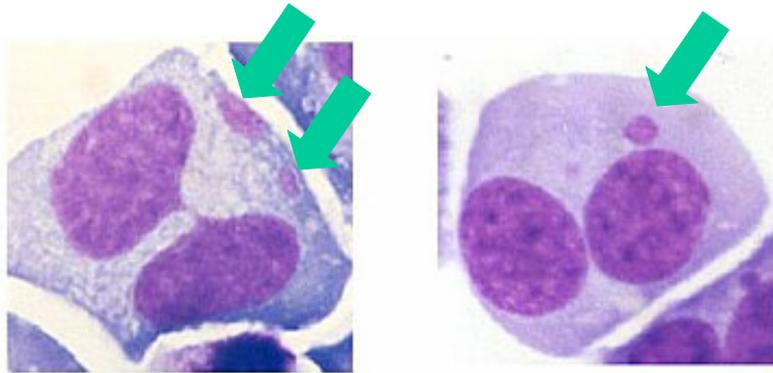


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

128

Formazione di micronuclei



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

129

Test dei micronuclei

- Blocco del ciclo cellulare.
- Calcolo della % dei micronuclei indotti (separazione incorretta di frammenti cromosomici durante l'anafase).
- Vengono considerati positivi i campioni con correlazione dose-risposta che mostrano una % almeno doppia del bianco.
- Spesso utilizzato come bioindicatore di genotossicità in ambiente marino con applicazione in mitili.

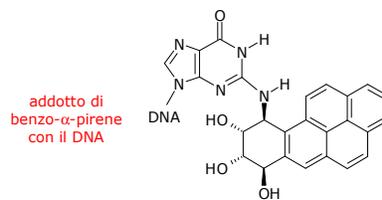
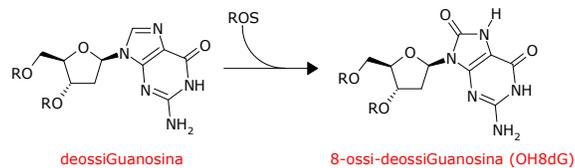
gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

130

Addotti al DNA

- Sono prodotti dall'azione dei ROS e/o degli IPA sul DNA



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

131

OH8dG

- Biomarker clinico del danno ossidativo al DNA.
- Non è assimilata dalla dieta, tutta l'OH8dG urinaria è conseguenza diretta delle lesioni cellulari.
- Facilmente distinguibile da G con tecniche analitiche.
- Problema: OH8dG ha un potenziale di ossidazione più basso di G, quindi diventa il sito preferenziale di ossidazione, e forma la guanidinoidantoina.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

132

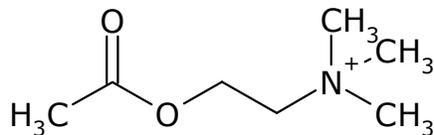
Acetilcolinesterasi

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

133

Acetilcolina



- È stato il primo neurotrasmettitore ad essere identificato
 - da Otto Loewi nel 1921, attraverso la stimolazione del nervo vago nelle rane che, era noto, causa il rallentamento del battito cardiaco.
 - Raccolse il fluido circostante il cuore stimolato e lo applicò ad un cuore non stimolato osservandone il rallentamento.
 - Attribuí l'effetto ad un prodotto chimico che in seguito identificò come acetilcolina.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

134

Recettori per l'acetilcolina

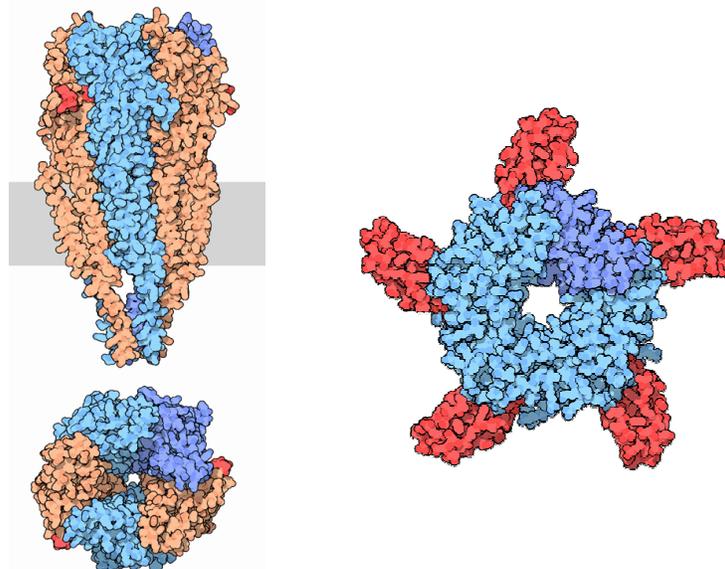
- Due tipi:
- Recettori Nicotinici
 - Canali ionici,
 - Rispondono rapidamente ed hanno effetto eccitatorio
 - Bloccati dal curaro
- Recettori Muscarinici
 - Accoppiati alla proteina G
 - Rispondono lentamente
 - Possono essere sia eccitatori che inibitori
 - Bloccati da atropina e scopolamina.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

135

Il recettore nicotinic per l'acetilcolina



gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

136

Acetilcolinesterasi (AChE) EC 3.1.1.7

- È l'enzima che si occupa di degradare l'acetilcolina per evitare una sovrastimolazione.

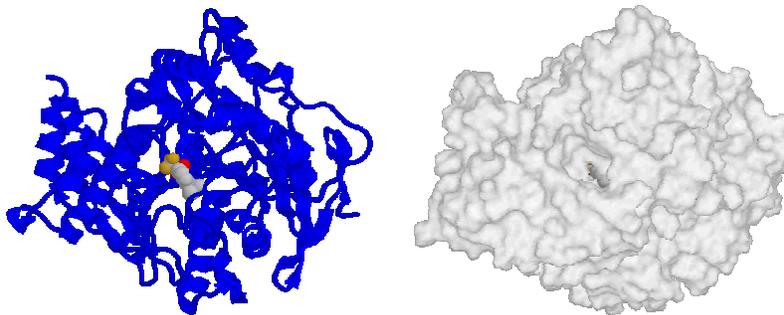


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

137

Acetilcolinesterasi

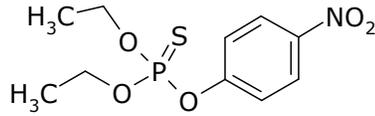
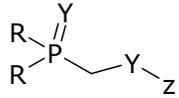


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

138

Inibitori dell'acetilcolinesterasi



Parathion

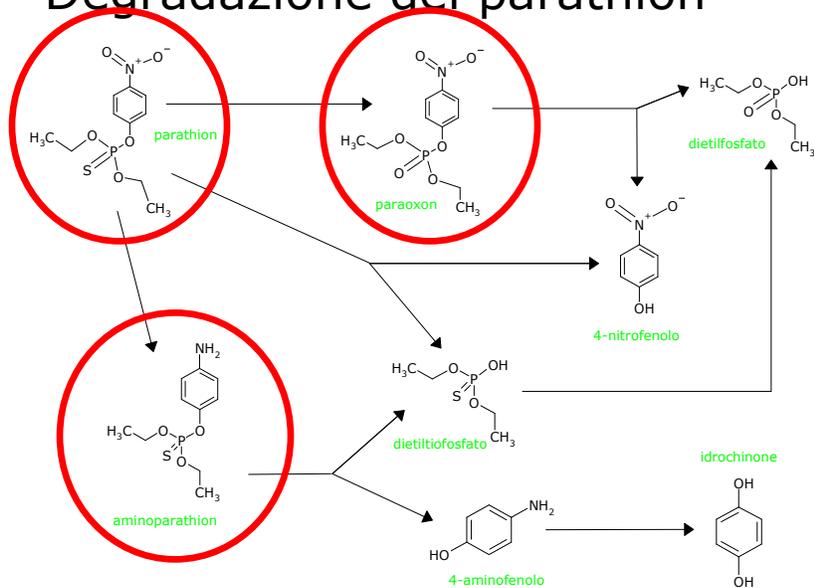
Struttura generale

- R = catena idrocarburica
- Z = gruppo organico
- Y = S o O

- Organofosfati

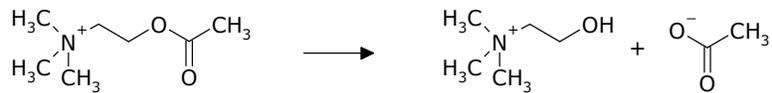
- Poco costosi e poco tossici verso le specie non bersaglio.
- Più solubili in acqua del DDT, più degradabili e meno persistenti.
- Veleno del SN.

Degradazione del parathion®



Determinazione

- L'enzima idrolizza l'acetilcolina in colina e acido acetico rimuovendola così dalle fessure sinaptiche



- Viene valutata l'idrolisi dell'acetil**ti**ocolina (metodo di ELLMAN)

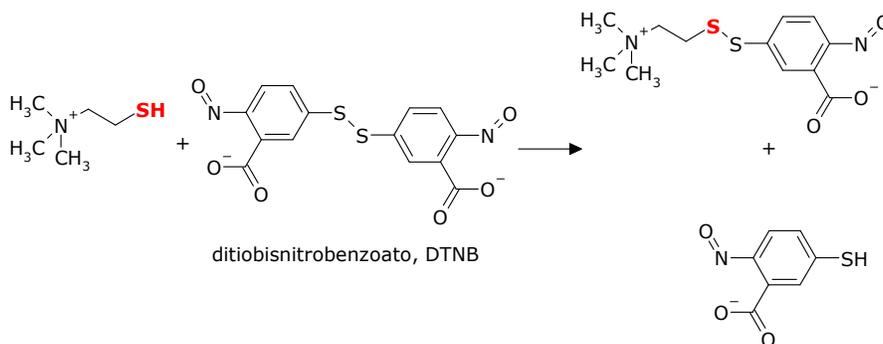


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

141

Reazione di ELLMAN



ditiobisnitrobenzoato, DTNB

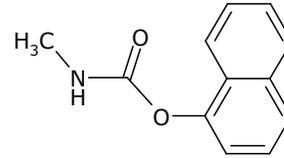
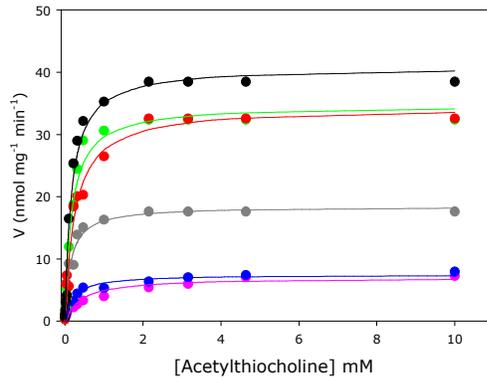
Assorbimento a 412 nm

gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

142

Aceticolinesterasi



- Inibizione non competitiva da carbaryl

Metallotioneine

Metallotioneine

- Le metallotioneine (MT) sono peptidi e proteine ubiquitarie a basso peso molecolare ad alto contenuto in aminoacidi solforati e metalli.
- Si ipotizza che giochino un ruolo:
 - nella fissazione dei metalli in tracce (Zn^{++} , Cu^{++}),
 - nel controllare la concentrazione di questi ioni,
 - nella regolazione dei flussi degli ioni ai distretti cellulari,
 - nella neutralizzazione dei metalli tossici (Cd^{++} , Hg^{++}) e nella protezione dallo stress indotto dai metalli.

Distribuzione

- Le metallotioneine sono presenti in tutti gli organismi: animali, vegetali e microrganismi.
- Negli animali queste proteine posseggono polimorfismo genetico e sono abbondanti nei tessuti parenchimali (fegato, rene, pancreas e intestino).
- La loro concentrazione dipende da specie, tessuto, età, sesso ed altri fattori non ancora completamente identificati
- Nonostante che le metallotioneine siano proteine citoplasmatiche si sono trovate accumulate nei lisosomi e nel nucleo.

Aspetti funzionali

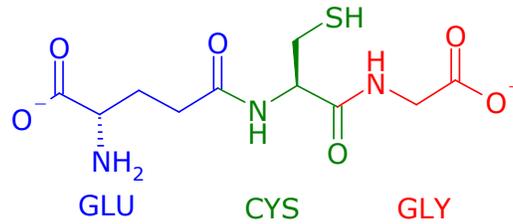
- La più importante delle funzionalità delle metallothioneine è la loro inducibilità da una serie di agenti e condizioni:
 - Ioni metallici d^{10} (Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} , Tl^+ , Pb^{++} ...)
 - Ormoni
 - Citochine
 - Fattori di crescita
 - Promotori tumorali
 - Stress
- È dimostrato il loro aumento fisiologico durante la proliferazione cellulare:
 $MT-Zn^{++} + Apo-Zinc-fingers \rightarrow MT + Zn^{++}$ - Zinc-fingers

Determinazione

- Le MT sono proteine ricche in cisteina con affinità elevata per i metalli pesanti
- La concentrazione di MT è quantificata valutando il contenuto in Cys
- Reazione di ELLMAN (standard GSH)

GSH

- Il glutatione è un tripeptide formato da glicina, cisteina, acido glutamico.

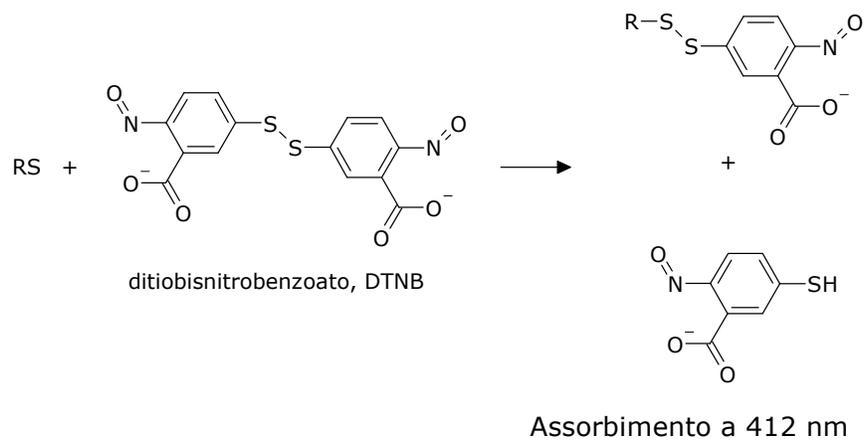


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

149

Reazione di ELLMAN

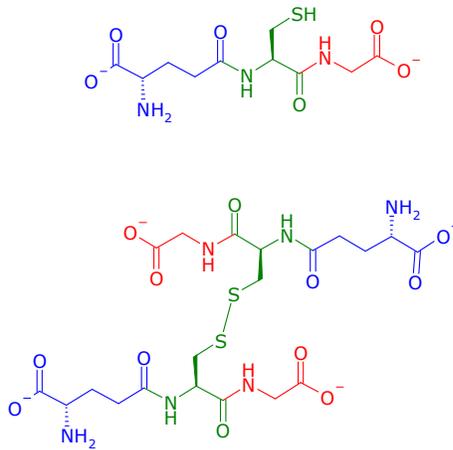


gs © 2001-2005 ver 2.0

Biomarcatori

150

Glutazione



- Il glutazione può essere ridotto o ossidato

Markers di funzionalità cellulare e loro significato

Stabilità lisosomiale

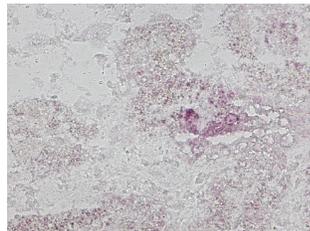
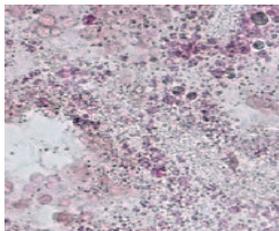
- fettine al criostato
- allestimento di vetrini
- colorazione specifica
- osservazione al microscopio ottico
- analisi di immagine

Stabilità lisosomiale

membrana
lisosomiale
destabilizzata



Lisosomi in
evidenza



membrana
lisosomiale
non
destabilizzata



Lisosomi
non
evidenti

Periodo di labilizzazione:

3-10 min = cattivo stato di salute degli organismi

10-15 min = mediocre stato di salute degli organismi

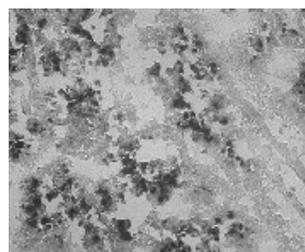
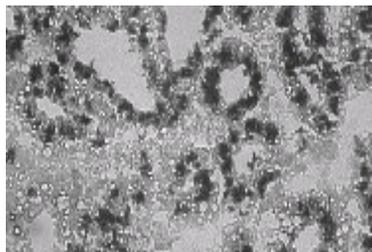
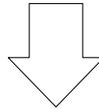
> 20 min = buono stato di salute degli organismi

Lipofuscine

- fettine al criostato
- allestimento di vetrini
- colorazione specifica
- osservazione al microscopio ottico
- analisi di immagine

Lipofuscine

- Accumulo di lipofuscine

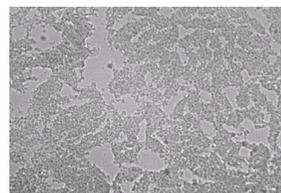
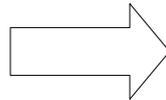


Lipidi neutri

- fettine al criostato
- allestimento di vetrini
- colorazione specifica
- osservazione al microscopio ottico
- analisi di immagine

Lipidi neutri

- Accumulo di lipidi neutri



Grazie a...

- ... Bruna Gravina, Irene Tamburin, Christian Asirelli, Federico Caselli, Francesco Ferretti, Giuseppe Giammanco, Najmi Gambi che, nell'ambito delle loro tesi di laurea in Scienze Ambientali, hanno prodotto testi, immagini, figure e diapositive, utilizzate in questa presentazione.

Giorgio Sartor

...e naturalmente

- Questo ed altro materiale può essere trovato visitando il sito: <http://www1.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:
- **Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**
Università di Bologna a Ravenna
Corso di Laurea in Scienze Ambientali