Prof. Giorgio Sartor
Corso di Laurea Specialistica in Scienze per l'Ambiente e il Territorio

Misure con biomarcatori
II. Enzimologia

Copyright © 2001-2006 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 3.0 - gennaio 2006

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

$$A \rightarrow B$$

- Essa avviene spontaneamente se le energie libere molari

$$G_B < G_A$$

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

$$G_{finale} < G_{iniziale}$$

Spontaneità ed equilibrio

- Quando

$$G_B = G_A$$

- Quindi

$$\Delta G = 0$$

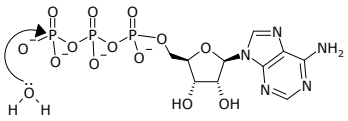
- La reazione è all'equilibrio

$$A \rightleftharpoons B$$

Spontaneità e realtà

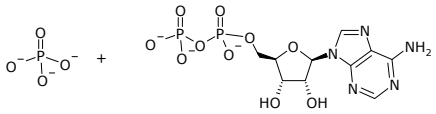
- Questo non significa che una reazione chimica (un processo) esoergonica ($\Delta G < 0$) avvenga con velocità apprezzabile.

ATP + H_2O



↓

ADP + Pi



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

Energia di attivazione

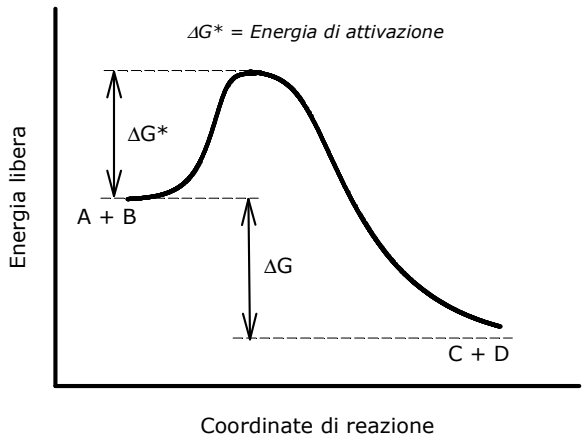
- In soluzione l'ATP è stabile perché esiste l'energia di attivazione.

Catalisi

- In assenza di catalizzatore:

$$A + B \rightarrow C + D$$

Catalisi

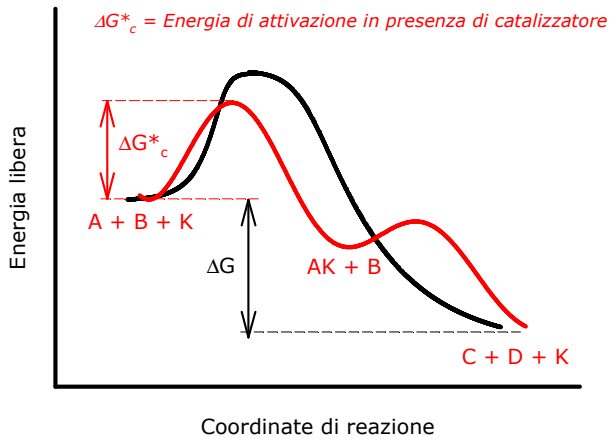


Catalisi

- In presenza di catalizzatore:

$$A + K \rightarrow AK$$
$$AK + B \rightarrow ABK$$
$$ABK \rightarrow C + D + K$$

Catalisi



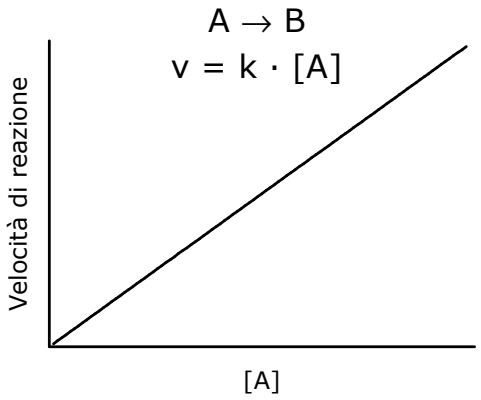
Controllo termodinamica e controllo cinetico di una reazione

- 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:

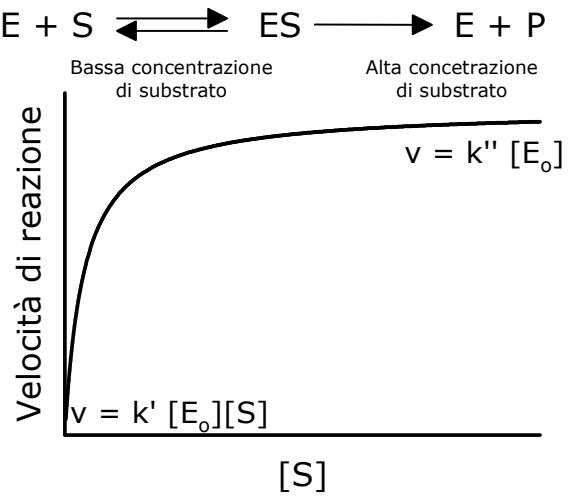
$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$$

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

In una reazione chimica



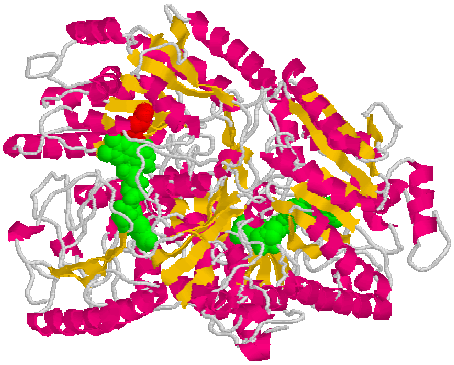
In una reazione enzimatica



Enzimi

- Gli enzimi sono sistemi catalitici, in genere…

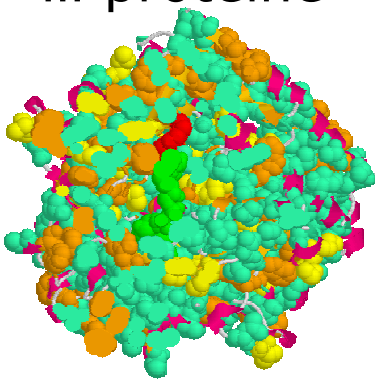
… proteine



Enzimi

- Gli enzimi sono sistemi catalitici, in genere…

… proteine



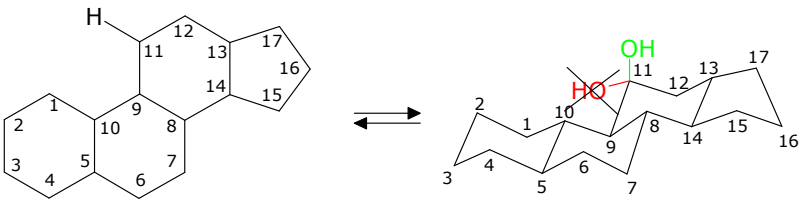
Specificità degli enzimi

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

Specificità degli enzimi

- Specificità stereochimica

steroide 11-β-monossigenasi

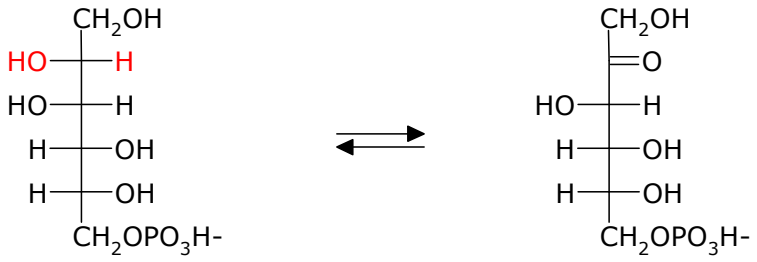


11-β-idrossi steroide

Specificità degli enzimi

- Specificità assoluta

mannitolo-1-fosfato deidrogenasi



mannitolo-1-fosfato

fruttoso-6-fosfato

Specificità degli enzimi

- Specificità di gruppo
  - Proteasi

Specificità degli enzimi

- Specificità di legame
  - Esterasi

Estere $\rightarrow$ Acido + Alcool

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

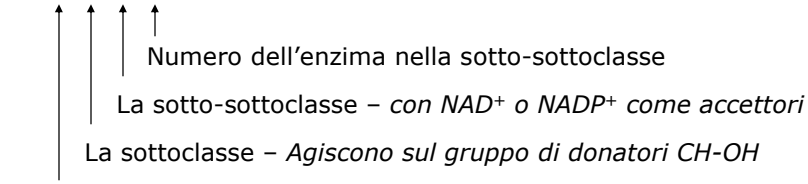
- Classi:
  - 4. Liasi
    - Catalizzano scissioni di legami con meccanismi diversi dalle Ossidoreduttasi e dalle Idrolasi.
  - 5. Isomerasi
    - Catalizzano modificazioni geometriche.
  - 6. Ligasi (Sintetasi)
    - Catalizzano l'unione di due molecole accoppiata al consumo di ATOP o di un altro nucleotide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

Classificazione gerarchica degli enzimi

- Per esempio:

$$\text{Alcool} + NAD^+ \rightarrow \text{Aldeide o chetone} + NADH$$

- 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 enziomi 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

$$A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} B$$

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

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

- All'equilibrio

$$v_1 = v_{-1}$$

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

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

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

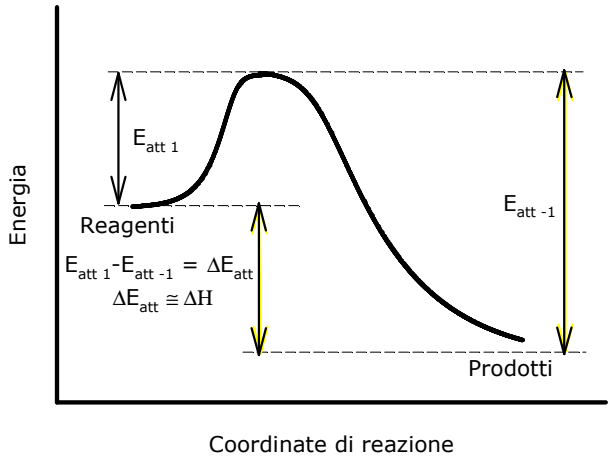
$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{A_1\, e^{-\frac{E_{att1}}{RT}}}{A_{-1}\, e^{-\frac{E_{att-1}}{RT}}} = Z\, e^{-\frac{\Delta E_{att}}{RT}}$$

Dipendenza dalla temperatura

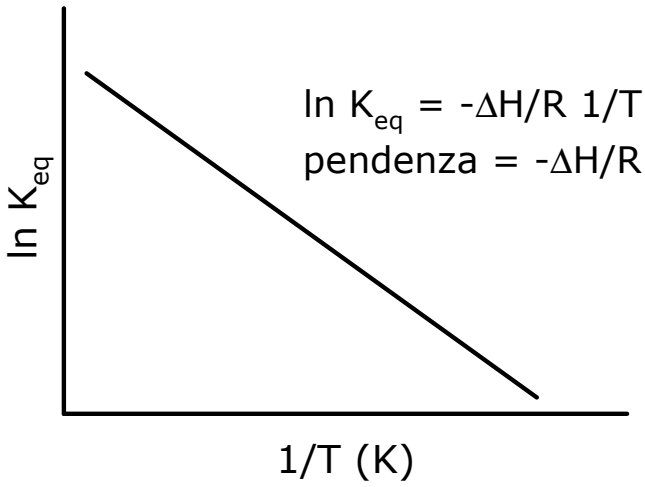
$$K_{eq} = Z\, e^{-\frac{\Delta E_{att}}{RT}}$$

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

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



Dipendenza dalla temperatura



$\ln K_{eq} = -\Delta H/R\ 1/T$

pendenza $= -\Delta H/R$

Dipendenza dalla temperatura

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

- All'equilibrio

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

$$0 = \Delta G° + RT \ln K_{eq}$$

$$\Delta G° = - RT \ln K_{eq}$$

$$\Delta G° = \Delta H° - T\Delta S°$$

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

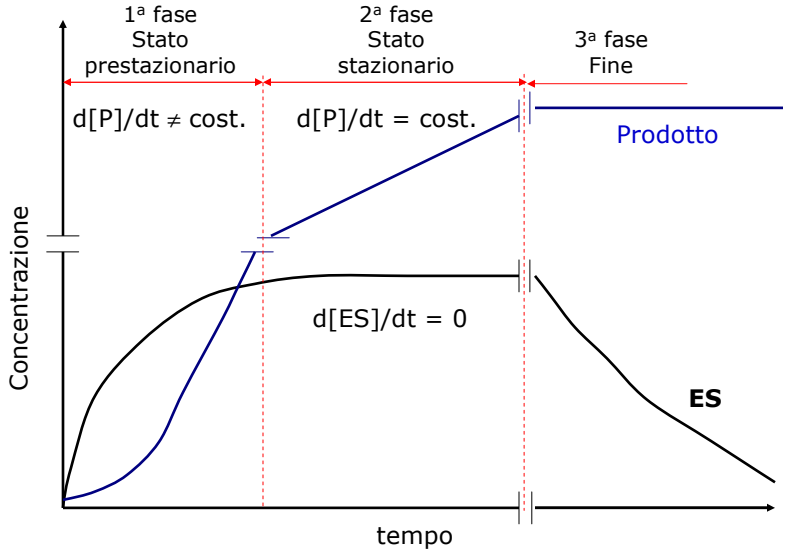
$$E + S \rightarrow ES \quad [E] >> [S]$$

Stato prestazionario

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

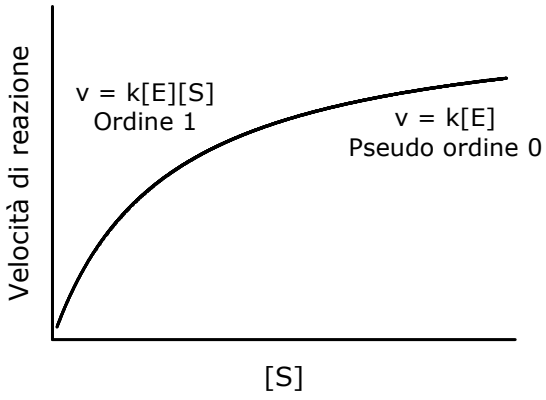
3. Scompare il substrato, [ES] diminuisce, v diminuisce

Enzima e substrato



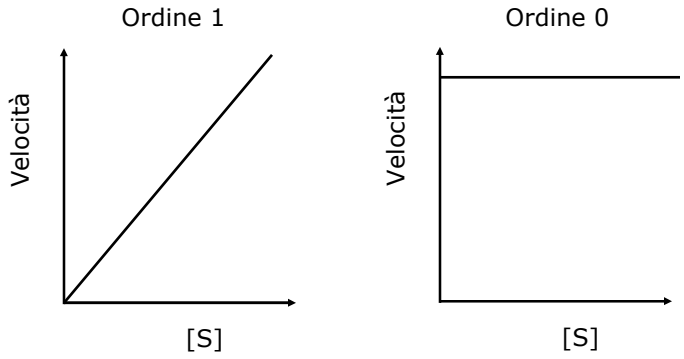
Enzima e substrato

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



Enzima e substrato

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



Trattamento secondo Michaelis e Menten

- In una reazione enzimatica:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \quad \text{(veloce)} \quad (1)$$

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P \quad \text{(lento)} \quad (2)$$

$v_{diretta} = k_2[ES]$ ← INDETERMINABILE

- Per l'equilibrio veloce (1)

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

INDETERMINABILE

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

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Per l'equilibrio veloce (1)

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

INDETERMINABILE

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

$[E_{tot}]$ misurabile

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

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

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- Da cui

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

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

$$ES \underset{k_1}{\overset{k_{-1}}{\rightleftharpoons}} E + S$$

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

Trattamento secondo Michaelis e Menten

- La concentrazione del complesso ES

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

- Poiché:

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

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

Trattamento secondo Michaelis e Menten

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

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

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

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

Equazione di Michaelis e Menten

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

Efficienza catalitica o numero di turnover

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

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

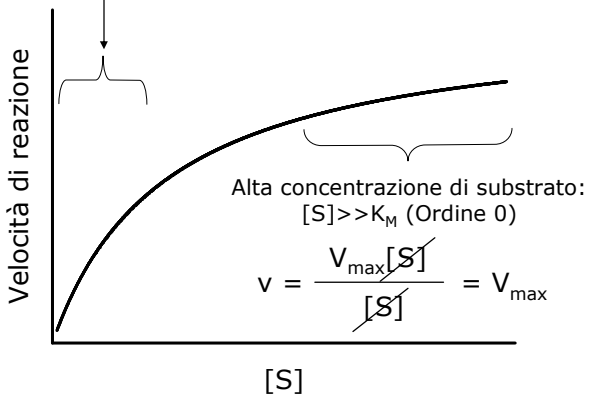
- k_2 è detto anche numero di turnover (Moli di substrato consumate per secondo per moli di enzima) si esprime in s^{-1}.

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

Trattamento secondo Michaelis e Menten

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

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



Alta concentrazione di substrato: $[S] >> K_M$ (Ordine 0)

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

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

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

- Allo stato stazionario:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1}[ES] + k_2[ES])$$

formazione di ES scomparsa di ES

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

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}

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

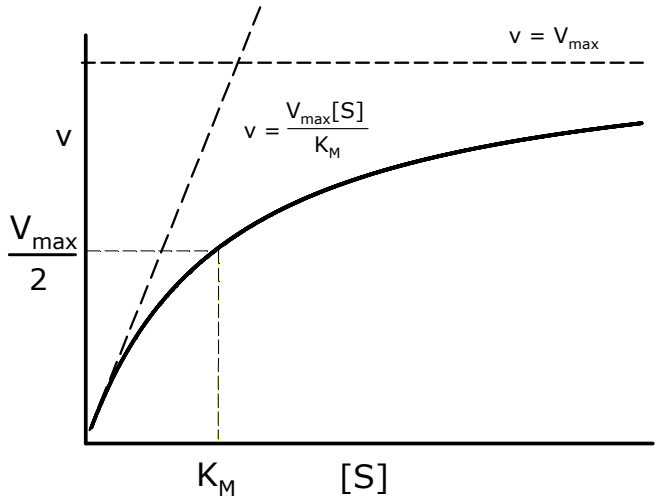
$$K_M = [S]$$

Significato di V_{max}

- V_{max} è legata a k_2

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

Significato di K_M e V_{max}



Linearizzazione dell'equazione di Michaelis e Menten

Lineweaver-Burk

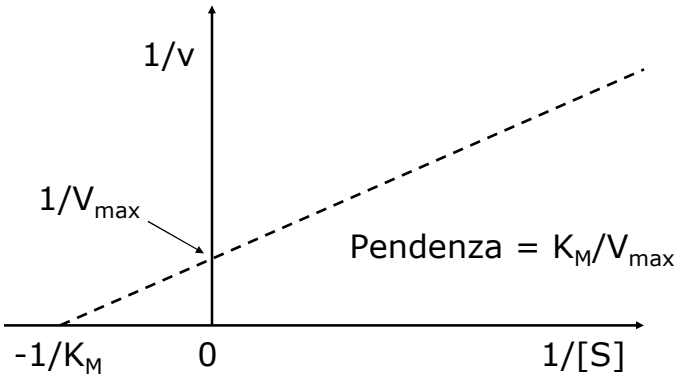
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

- 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

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



Eadie-Hofstee

- Trasformazione

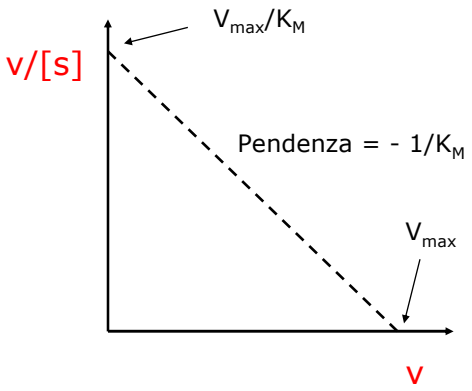
$$v\,(K_M + [S]) = V_{max}[S]$$

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

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

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

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



Eadie-Hofstee (oppure)

- Trasformazione

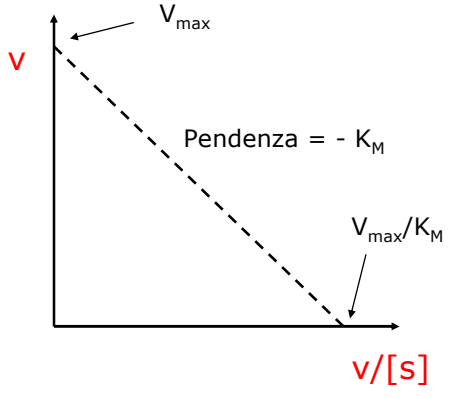
$$v\,(K_M + [S]) = V_{max}[S]$$

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

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

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

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



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

Meccanismo sequenziale ordinato

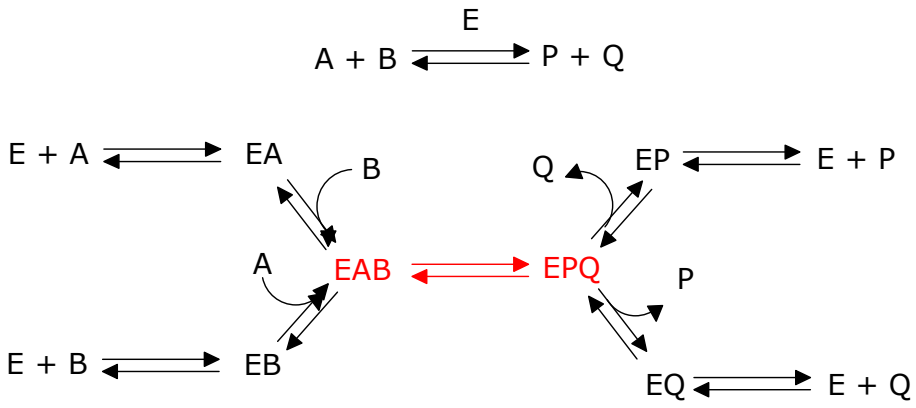
$$A + B \overset{E}{\rightleftharpoons} P + Q$$

$$E + A \rightleftharpoons EA; \quad EA + B \rightleftharpoons EAB;$$

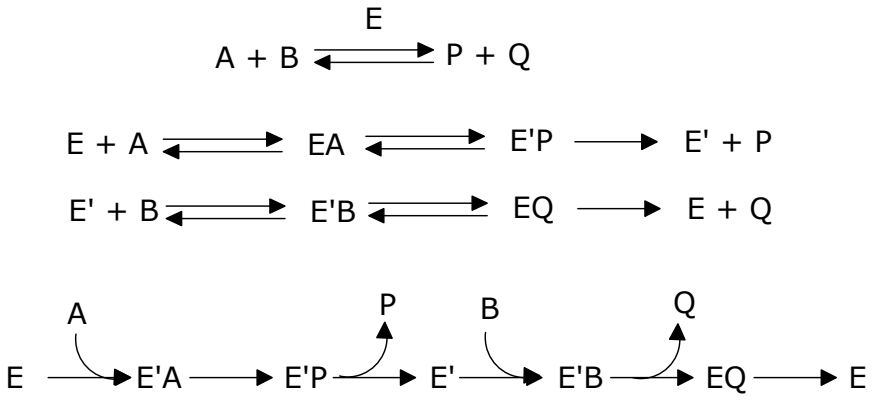
$$EAB \rightleftharpoons EPQ; \quad EPQ \rightleftharpoons EQ + P;$$

$$EQ \rightleftharpoons E + Q$$

Meccanismo sequenziale casuale

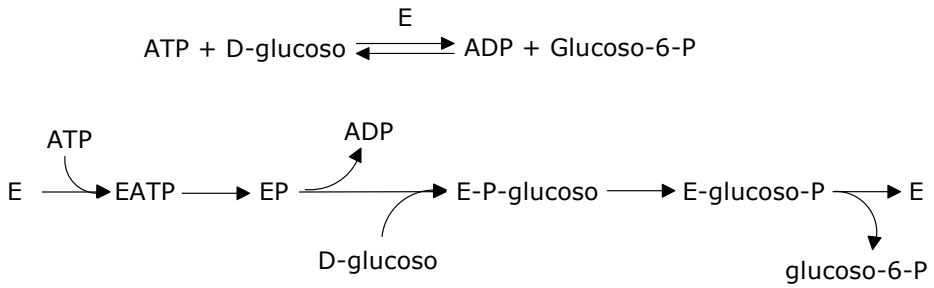


Meccanismo a ping-pong



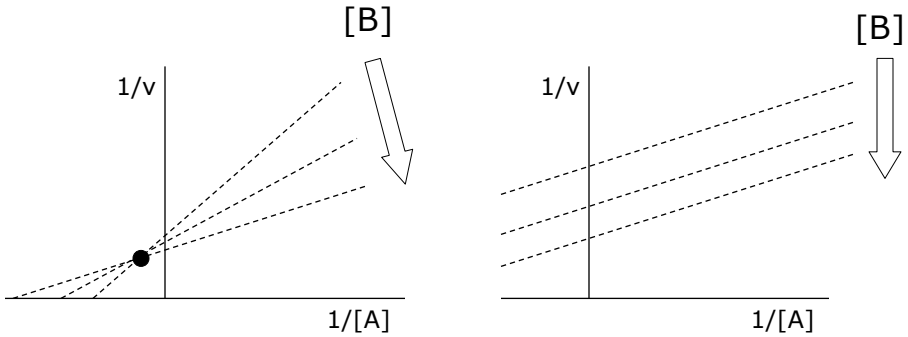
Meccanismo a ping-pong

- Così funziona l'esochinasi



Reazioni enzimatiche con più substrati

- Il trattamento è complesso, occorre fare lo studio cinetico tenedo 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:



Sequenziale casuale

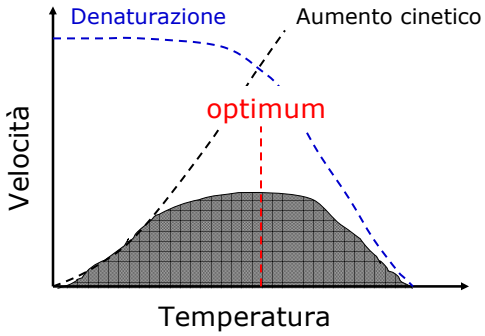
Ping-pong

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

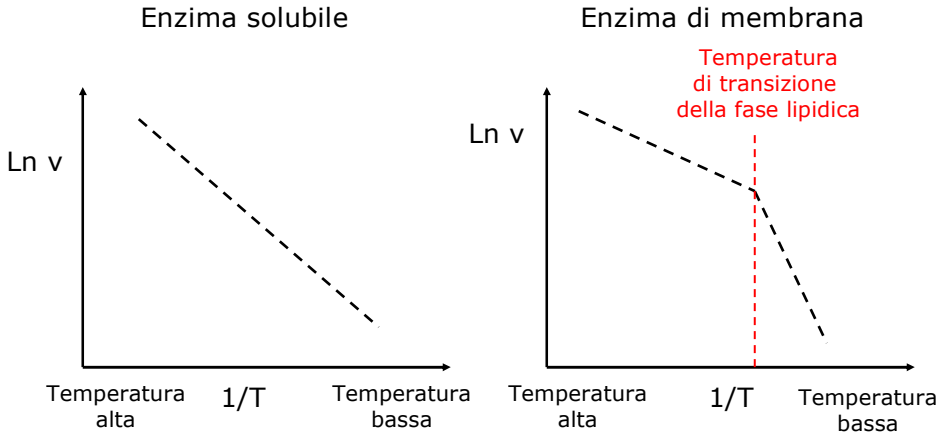
Temperatura

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



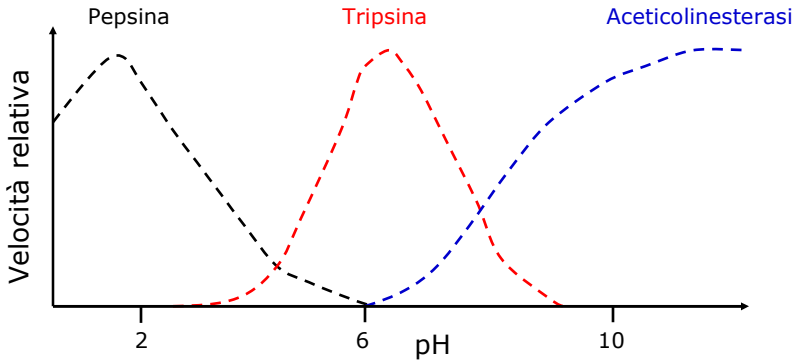
Temperatura

- La temperatura influenza la fluidità di membrana



pH

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



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
  - …

Inibitori

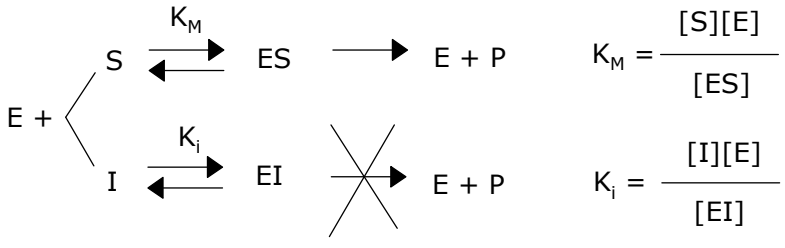
- Si definiscono inibitori quelle molecole che diminuiscono l'attività di un enzima, possono dare
- Inibizione reversibile
  - Modificano in modo reversibile (in genere attraverso un legame non covalente) l'enzima
- Inibizione irreversibile
  - Modificano in modo irreversibile l'enzima

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



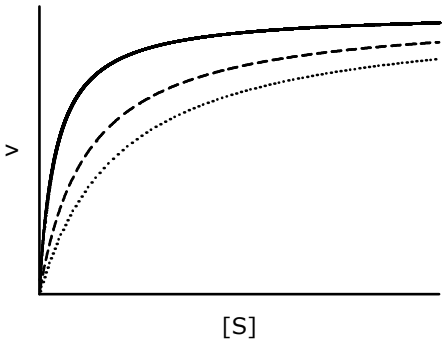
Inibitori competitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

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

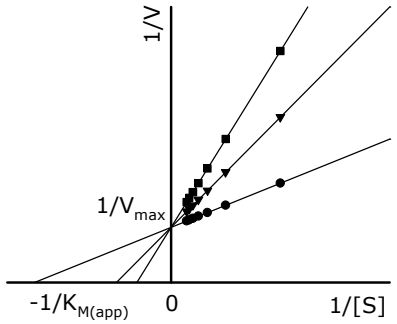


[S]

Inibitori competitivi

- Senza inibitore

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

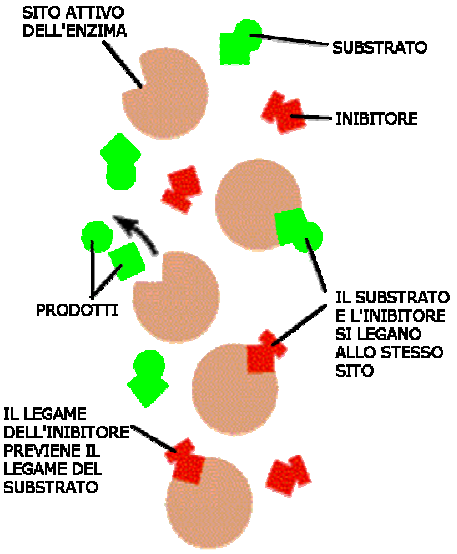


- Con inibitore

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

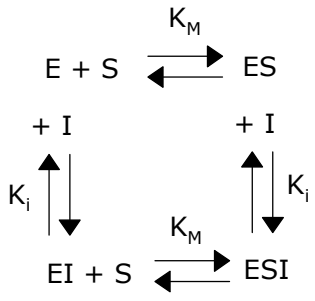
Inibitori competitivi

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



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



$$K_M = \frac{[S][E]}{[ES]}$$

$$K_i = \frac{[I][E]}{[EI]} = \frac{[I][ES]}{[ESI]}$$

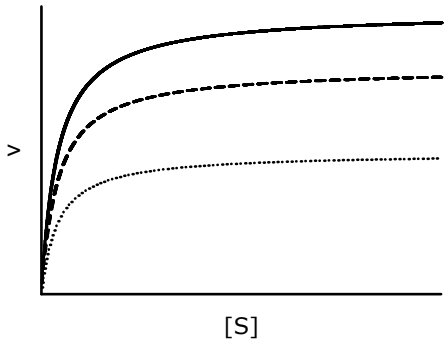
Inibitori non competitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

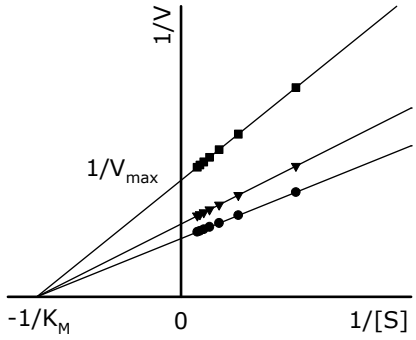
$$v = \frac{\frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}[S]}{K_M + [S]}$$



Inibitori non competitivi

- Senza inibitore

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



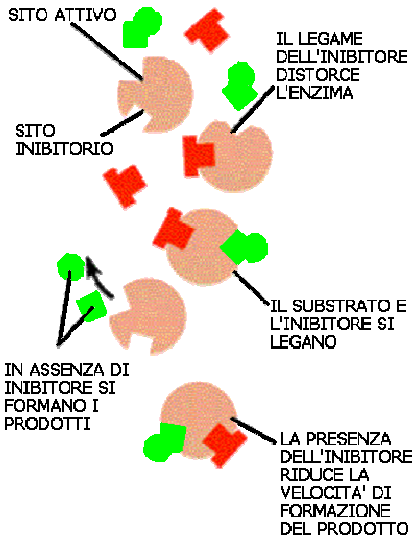
- Con inibitore

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

Inibitori non competitivi

- Sono molecole diverse dal substrato, si legano ad un proprio sito

- Ioni metallici (Cu^{++})
- Complessanti (EDTA)
- Modulatori



Inibitori acompetitivi

- Agiscono legandosi e bloccando il complesso enzima-substrato.

$$E + S \underset{}{\overset{K_M}{\rightleftharpoons}} ES \rightarrow E + P \qquad K_M = \frac{[S][E]}{[ES]}$$

$$ES + I \overset{K_i}{\rightleftharpoons} ESI \qquad K_i = \frac{[I][ES]}{[ESI]}$$

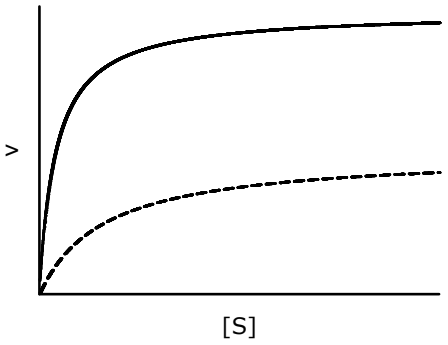
Inibitori acompetitivi

- Senza inibitore

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

- Con inibitore

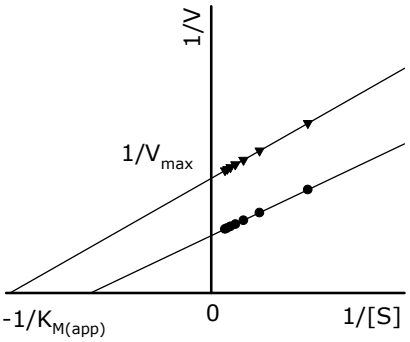
$$v = \frac{\frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}[S]}{\frac{K_M}{(1 + \frac{[I]}{K_i})} + [S]}$$



Inibitori acompetitivi

- Senza inibitore

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

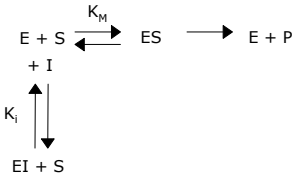


- Con inibitore

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

Riassumendo…

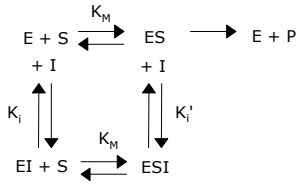
- Inibizione competitiva
- Inibizione non competitiva
- Inibizione acompetitiva

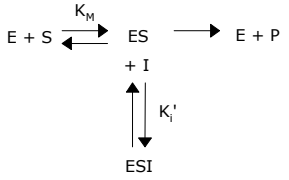


$$K_M = \frac{[S][E]}{[ES]}$$

$$K_i = \frac{[I][E]}{[EI]}$$

$$K_i' = \frac{[I][ES]}{[ESI]}$$



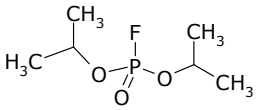
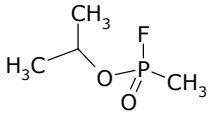
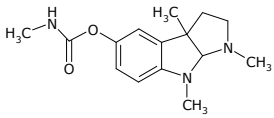


…riassumendo

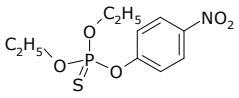
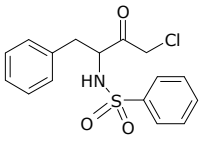
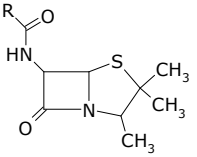
Tipo di inibizione	V_{MAX}^{app}	K_M^{app}
Nessuna	V_{MAX}	K_M
Competitiva	V_{MAX}	aK_M
Non competitiva	V_{MAX}/a'	aK_M/a'
Acompetitiva	V_{MAX}/a'	K_M/a'

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

Inibitori irreversibili

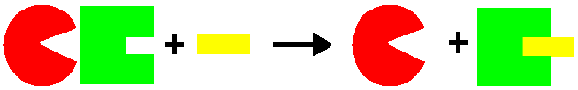
Inibitore	Formula	Origine	Meccanismo
Ione cianuro	CN^-	Mandorle amare	Complessa gli ioni metallici nelle proteine
Diisopropil fluorofosfato (DFP)		Sintetico	Inibisce gli enzimi con serina nel sito attivo
Sarin		Sintetico	Come il DFP
Fisostigmina		Frutto del calabar	Come il DFP

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		*Penicillum Notatum*	Inibisce gli enzimi della sintesi della parete batterica

Attivatori

- Sono molecole che aumentano (o permettono) l'attività enzimatica
  - Protezione dell'enzima
    - Glutatione
    - Ioni metallici
  - Attivazione per azione sulle subunità

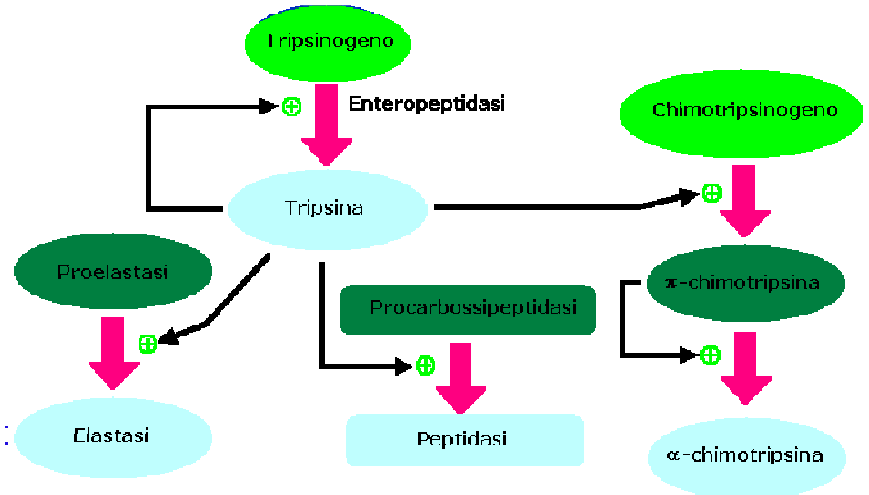


Enzima inattivo + cAMP → Subunità catalitica + Subunità regolatrice

  - Azione proteolitica su proenzimi

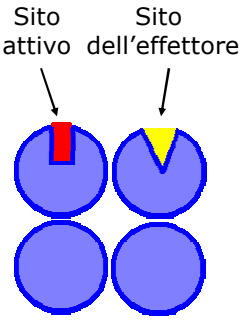
Attivatori

- Azione proteolitica su proenzimi



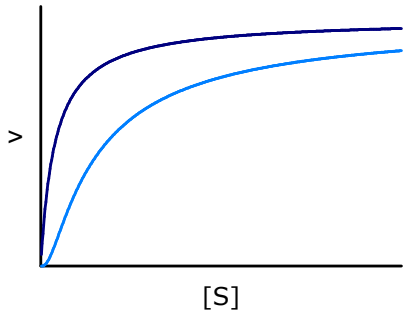
Effetti allosterici

- 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)



Effetti allosterici

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



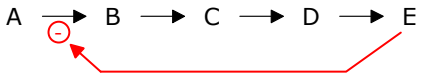
$$v = \frac{V_{max}[S]^n}{(K + [S])^n}$$

n = indice di cooperatività

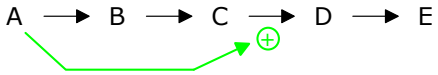
Vie metaboliche

- 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:

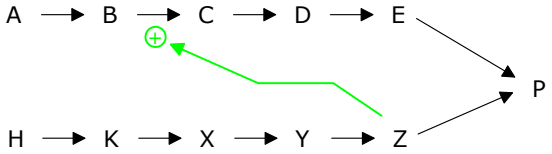
Inibizione da prodotto



Attivazione da substrato

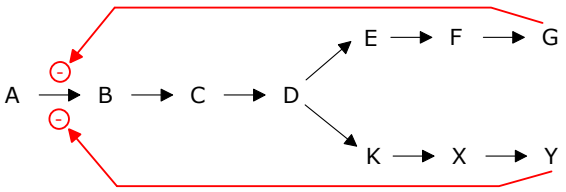


Attivazione compensatoria

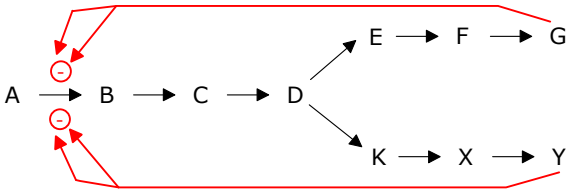


Vie metaboliche ramificate

Inibizione multivalente

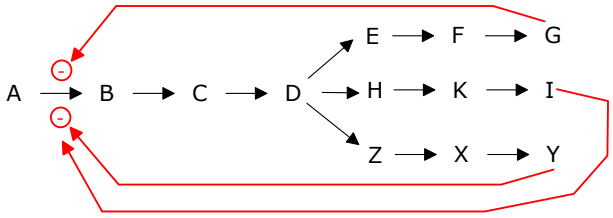


Inibizione cooperativa

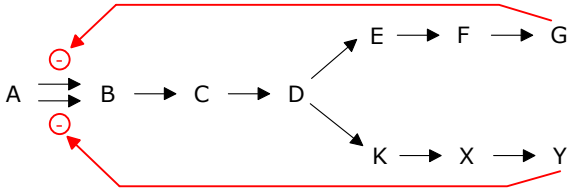


Vie metaboliche ramificate

Inibizione cumulativa

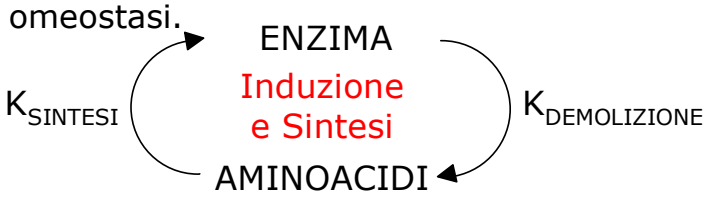


Inibizione di enzimi multipli



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.



Referenze sul WEB …

- Vie metaboliche
  - KEGG: http://www.genome.ad.jp/kegg/
    - Degradazione degli xenobiotici: http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html
- Struttura delle proteine:
  - Protein data bank (Brookhaven): http://www.rcsb.org/pdb/
  - Hexpasy
    - Expert Protein Analysis System: http://us.expasy.org/sprot/
    - Prosite (protein families and domains): http://www.expasy.org/prosite/
    - Enzyme (Enzyme nomenclature database): http://www.expasy.org/enzyme/
  - Scop (famiglie strutturali): http://scop.berkeley.edu/
- Enzimi:
  - Nomenclatura - IUBMB: http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/
  - Proprietà - Brenda: http://www.brenda.uni-koeln.de/
  - Expasy (Enzyme nomenclature database): http://www.expasy.org/enzyme/
- Database di biocatalisi e biodegradazione: http://umbbd.ahc.umn.edu/
- Citocromo P450: http://www.icgeb.org/~p450srv/
- Metallotioneine: http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry http://www.atsdr.cdc.gov

…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