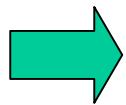
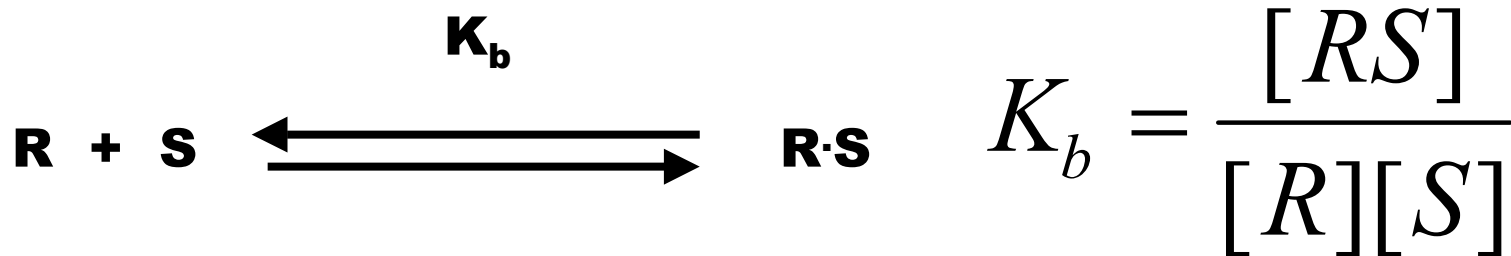


Trattamento quantitativo della complessazione e della reattività nei sistemi supramolecolari

Assunzione di principio: i sistemi si trovano in condizioni di controllo termodinamico e non cinetico (tutti i processi di formazione dei complessi sono veloci nella scala dei tempi usata per compiere le misure)

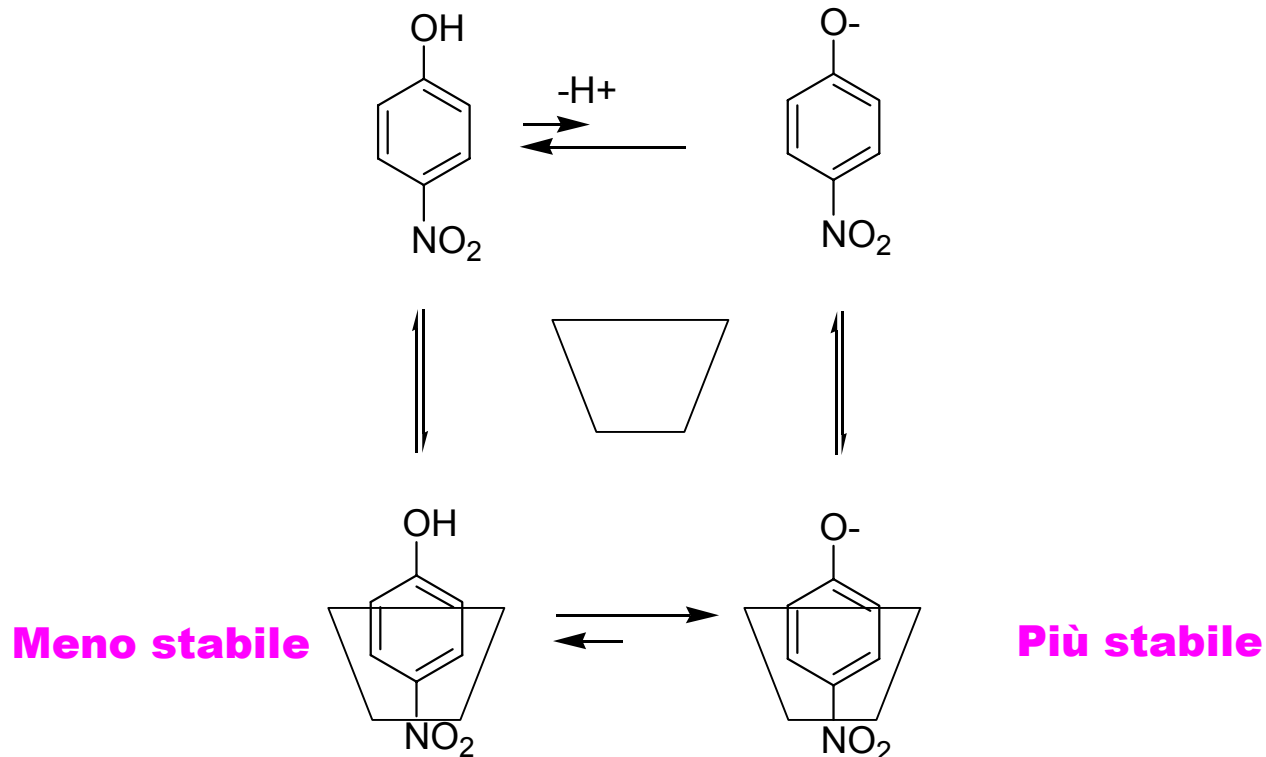


Ci si trova sempre all'equilibrio

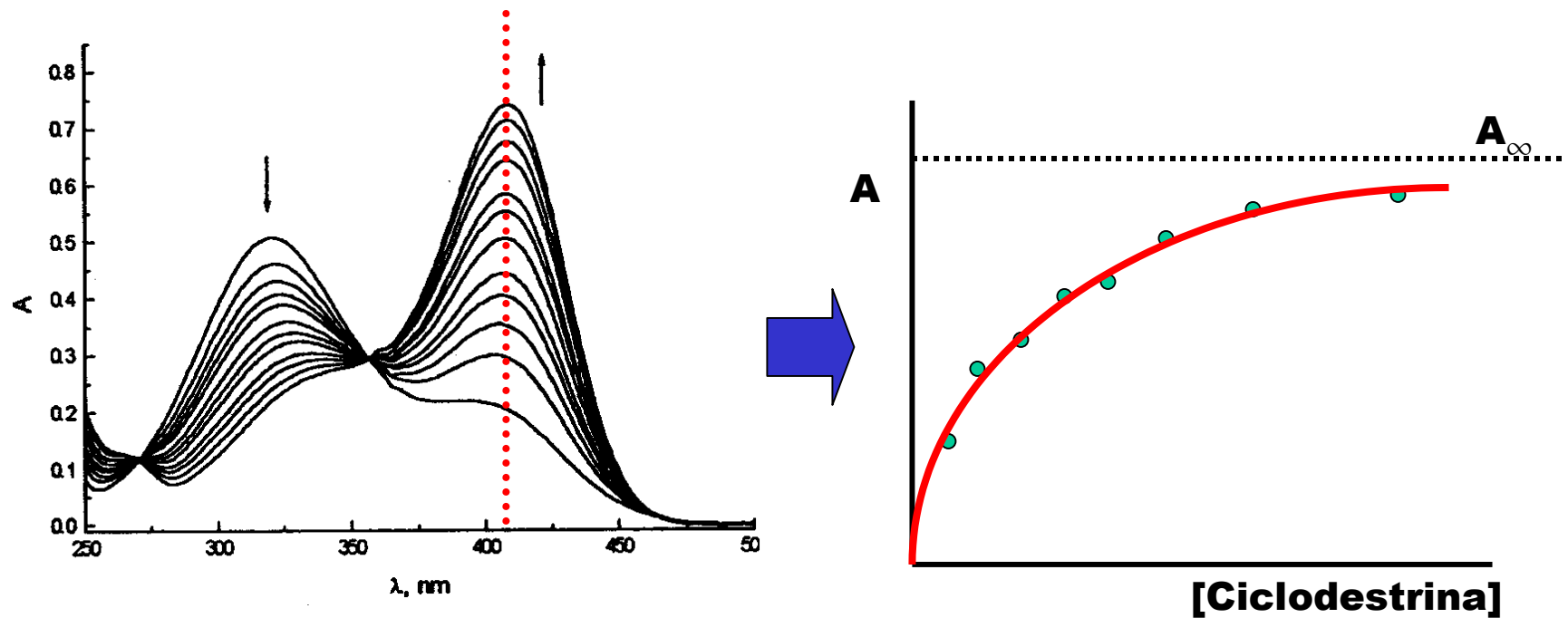


Uno dei metodi più usati per misurare la complessazione di una molecola con un recettore molecolare è quello di seguire la variazione di una proprietà fisica come l'assorbanza o la fluorescenza

Ad esempio l'aggiunta di α -ciclodestrina ad una soluzione di p-nitrofenolo provoca, in seguito alla formazione del complesso, la scomparsa della banda di assorbimento a ca. 330 nm e la formazione di una nuova banda a ca. 400 nm. In questo caso la formazione del complesso favorisce l'anione coniugato (fenato) e questo dà ragione di ciò che si osserva



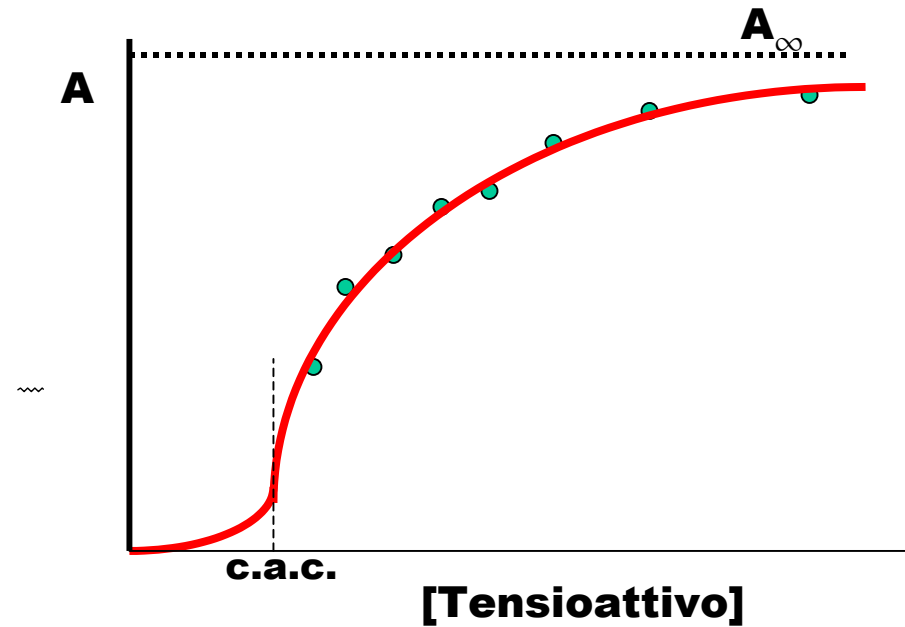
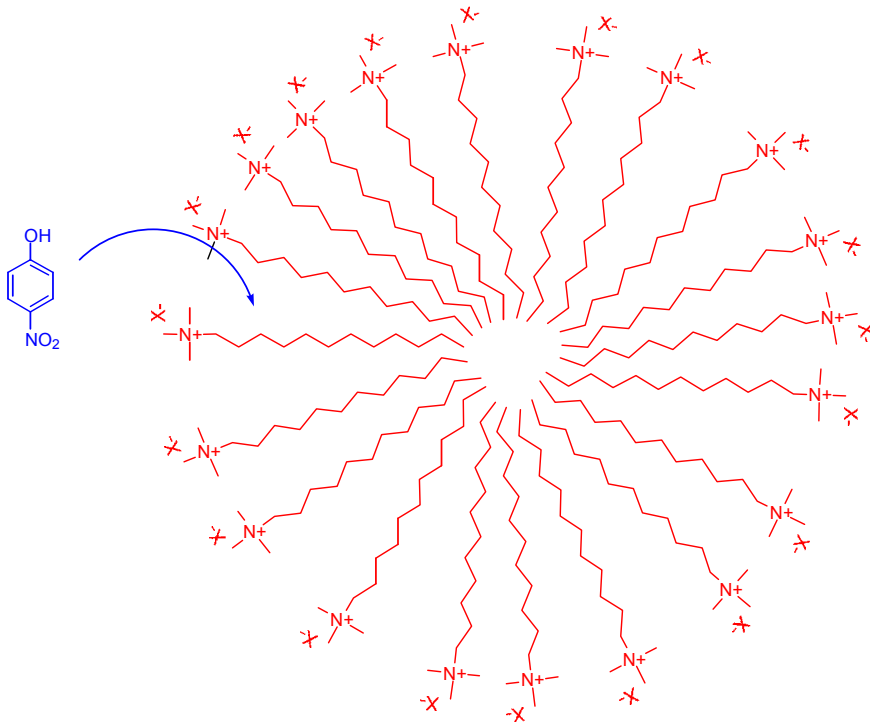
Riportando l'andamento dell'assorbanza (a 400 nm nel caso del fenato) in funzione della concentrazione di ciclodestrina si ottiene una curva di complessazione che può essere utilizzata per determinare la relativa costante (K_b)



(Condizione: [ciclodestrina] \gg [substrato])

Questo tipo di curva di complessazione è assolutamente analogo a quello che si osserva nel caso della formazione di un complesso enzima-substrato

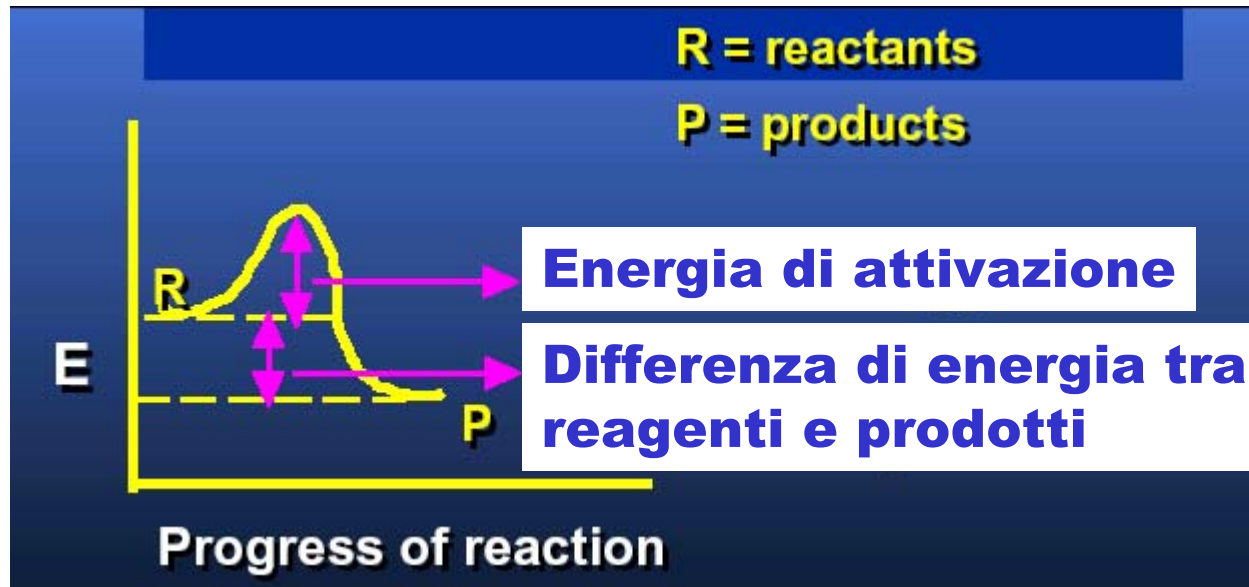
Una situazione analoga si verifica quando si prende in esame la complessazione di una molecola con un aggregato di tensioattivi (o lipidi); in questo caso però bisogna considerare che l'aggregato si forma solo al di sopra della concentrazione critica di aggregazione (c.a.c.)



(Condizione: $[tensioattivo] \gg [substrato]$)

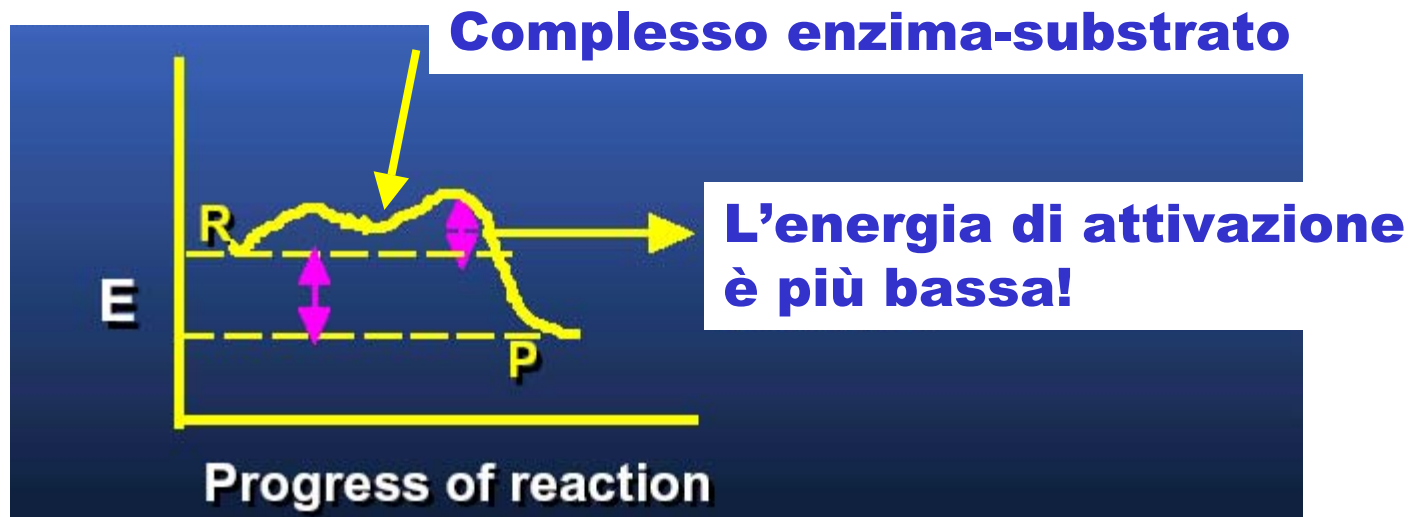
Possiamo trattare la reattività nei sistemi supramolecolari come con gli enzimi?

Da dove arriva e come possiamo trattare la reattività enzimatica?

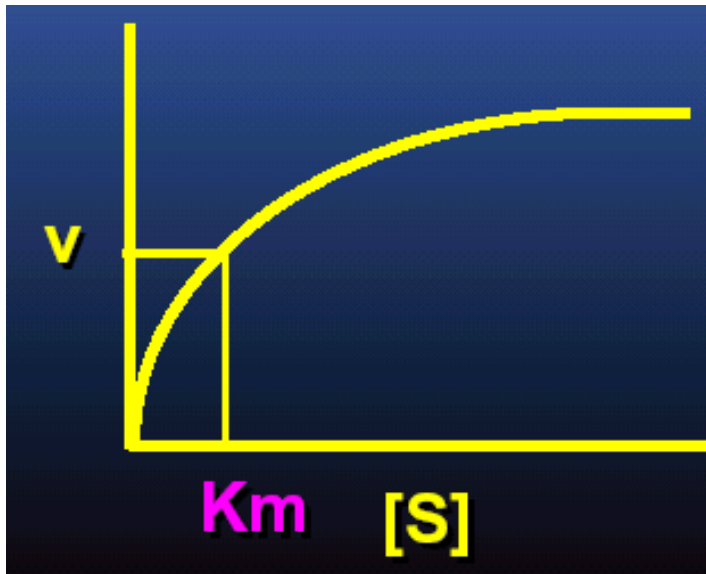


Reazione non catalizzata

Nella reazione catalizzata da un enzima prima si forma il complesso con il substrato e poi quest'ultimo viene trasformato (lo stesso può verificarsi con un catalizzatore supramolecolare)



Reazione catalizzata



Questo grafico rappresenta l'andamento della velocità di una reazione catalizzata da un enzima in funzione della concentrazione di substrato

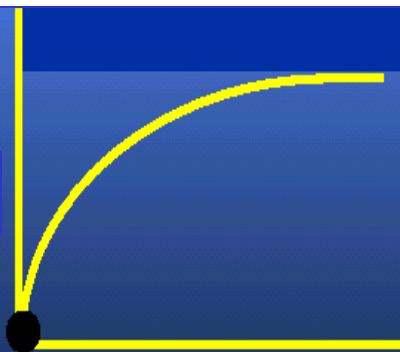
La concentrazione di enzima è molto inferiore rispetto a quella del substrato: l'enzima è un ottimo catalizzatore

Altrettanto non si può dire della maggioranza dei catalizzatori supramolecolari: in genere si opera con un eccesso di catalizzatore rispetto al substrato!

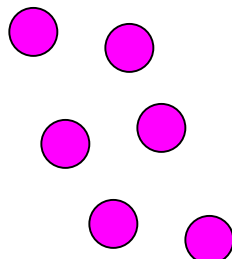
Quindi nel caso di un catalizzatore supramolecolare ecco che cosa si verifica in soluzione mano a mano che cresce la concentrazione di catalizzatore e la (costante) di velocità aumenta

1

k

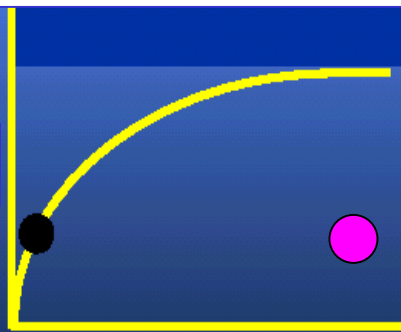


[catalizzatore]

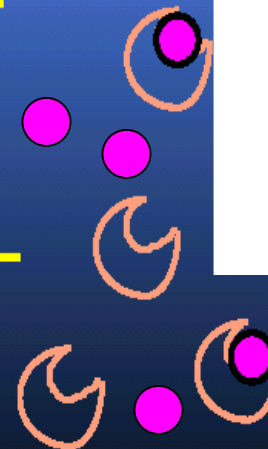


2

k

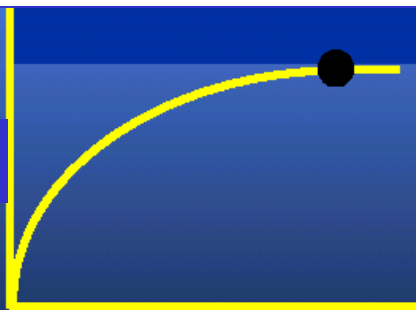


[catalizzatore]

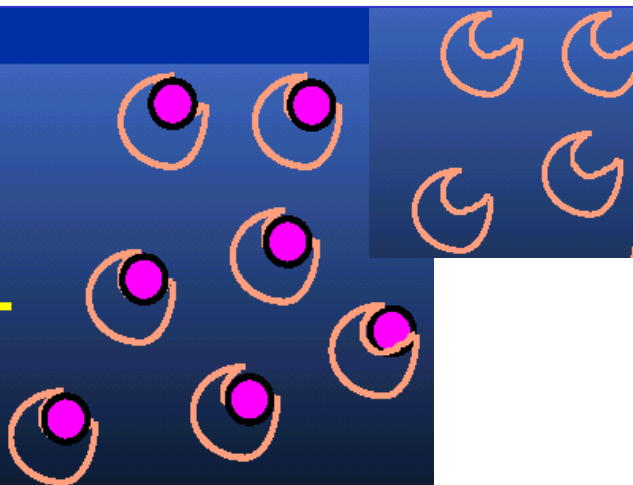


3

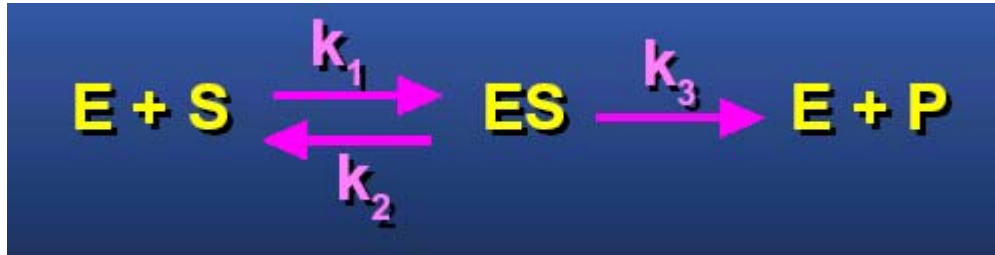
k



[catalizzatore]



Nel caso di un enzima la reattività è espressa dalla equazione di Michaelis Menten.....



$$V = k_3[ES]$$

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

Condizione dello stato stazionario

$$[ES] = \frac{k_1 [E] [S]}{(k_2 + k_3)} = [E] [S] / \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} = [E] [S] / K_m$$

$$[E] = [E_{\text{total}}] - [ES];$$

$$[ES] = \frac{([E_t] - [ES]) [S]}{K_m}$$

$$V = k_3 [ES]$$

$$V = k_3 [Et] \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

$$V_{\text{max}} = K_3 [Et]$$

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

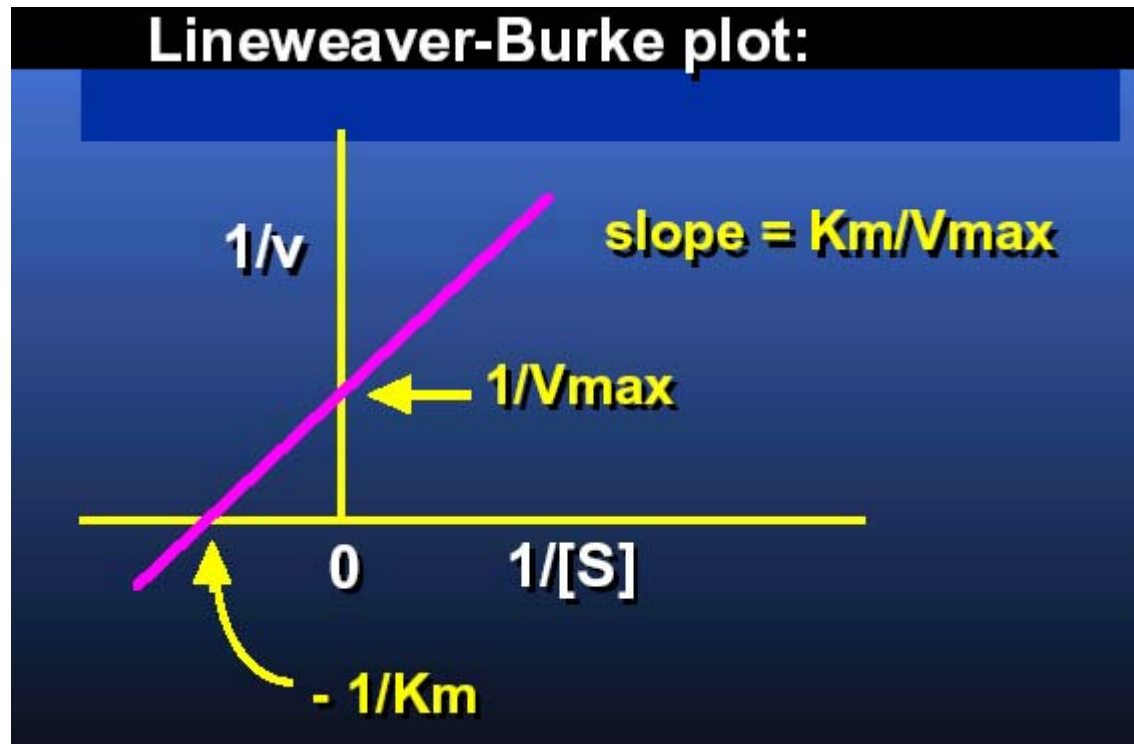
L'equazione di
Michaelis Menten!

...e questa è la variante
che spesso si trova con i
catalizzatori supramolecolari

$$k = \frac{k_{\text{max}} [C]}{[C] + K_d}$$

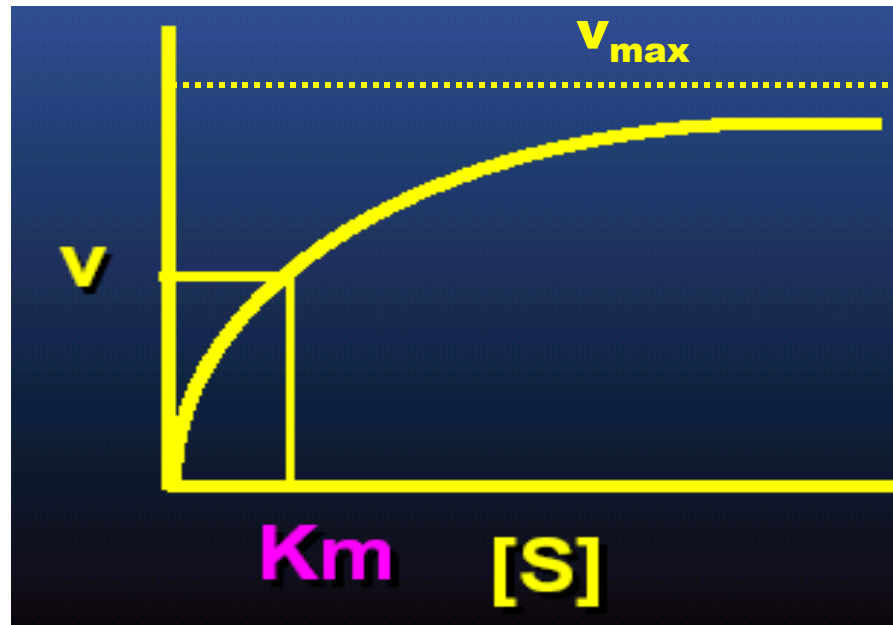
molto spesso l'equazione di MM si riarrangia in forma lineare

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]}$$
$$y = b + m X$$

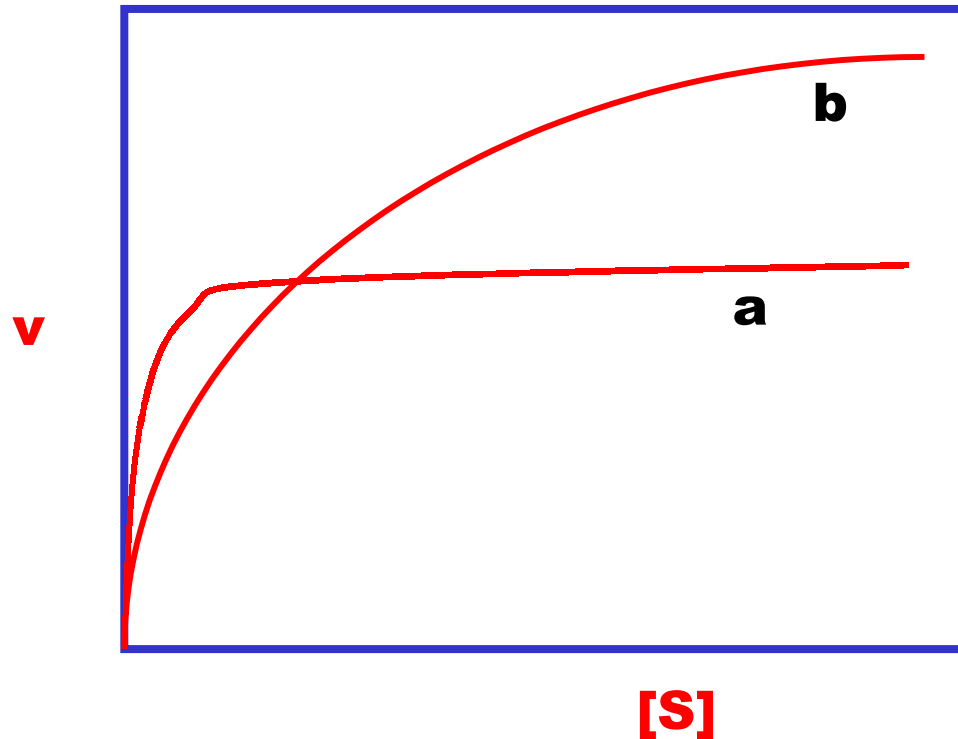


I parametri che si ricavano dall'analisi della reattività di un catalizzatore enzimatico o supramolecolare sono quindi:

$K_m \approx K_d = 1/K_b v_{max}$: la velocità massima che si realizza quando tutto il substrato è complessato all'enzima (o al catalizzatore supramolecolare)



Un substrato che si lega molto fortemente ad un enzima o ad un catalizzatore molecolare è sempre un buon substrato?



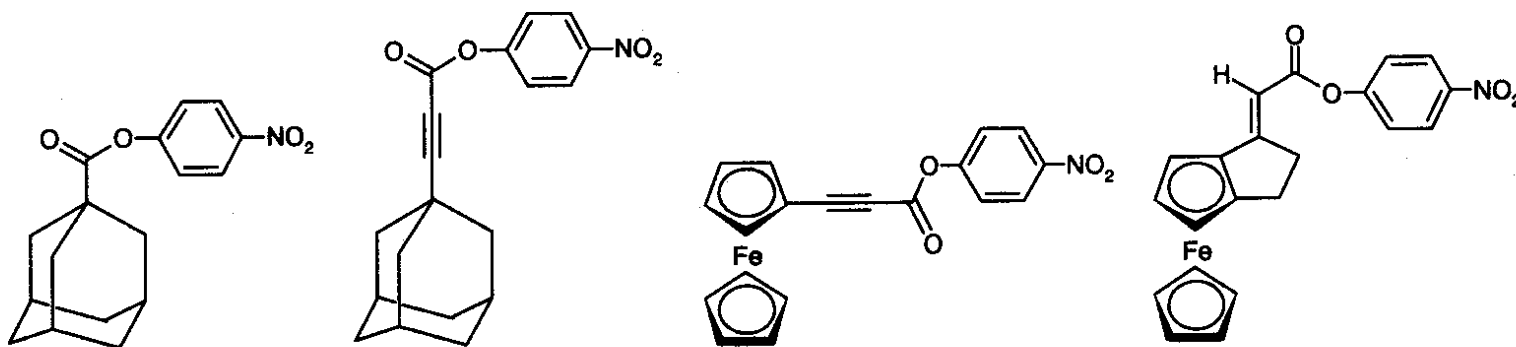
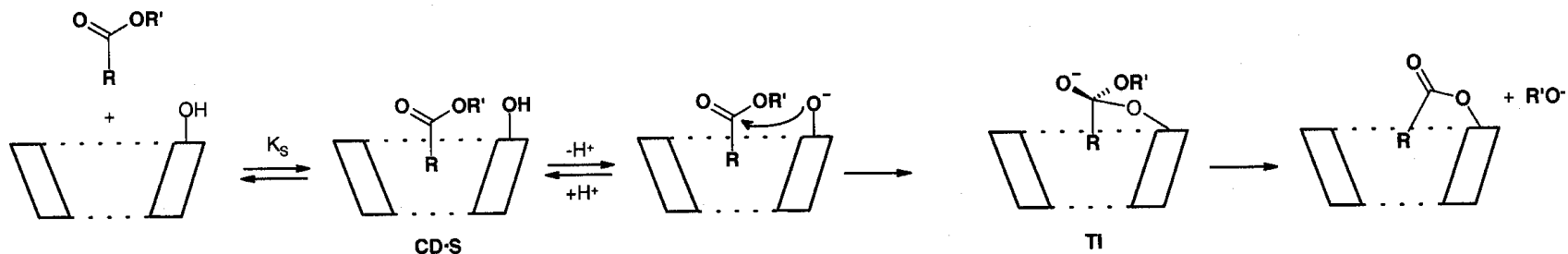
a: il substrato si complessa molto fortemente ma v_{\max} è piccola;

b: il substrato non si complessa fortemente ma v_{\max} è grande



NON C'E' CORRELAZIONE DIRETTA TRA COMPLESSAZIONE ED EFFICIENZA DI UN ENZIMA O DI UN CATALIZZATORE SUPRAMOLECOLARE

Prendiamo in esame la reazione di un estere con una ciclodestrina



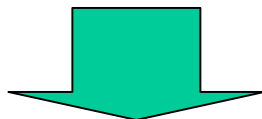
k_C/k_0 : *	0.3	2.15×10^3	1.4×10^5	5.9×10^6
$K_S(\text{M}^{-1})$:	210	3300	200	175

* rappresenta l'accelerazione

Il substrato che reagisce più velocemente è quello che si lega più debolmente!

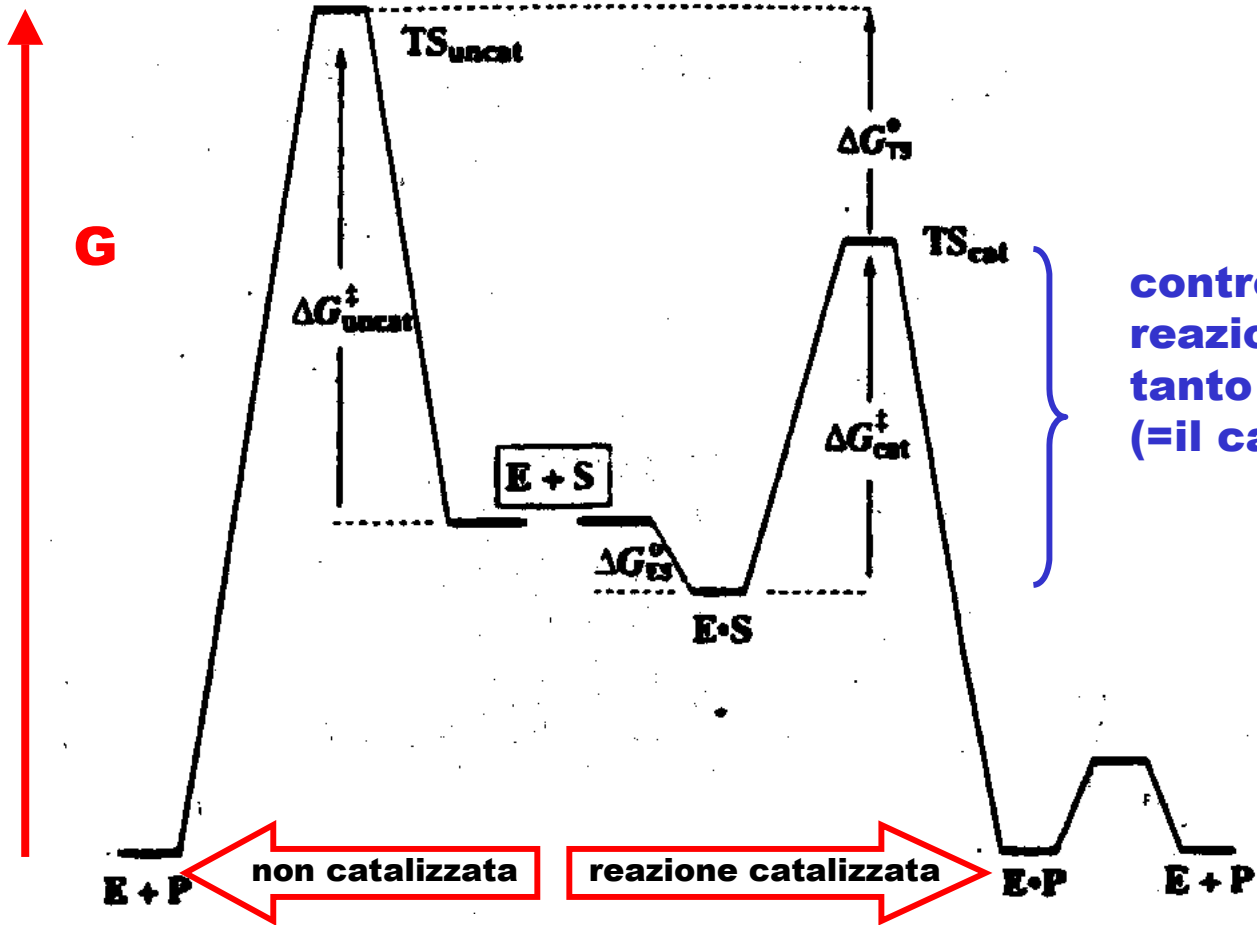
Ma allora che cosa rende un substrato ottimale per un enzima (o per un catalizzatore supramolecolare)?

Che cosa devo ottimizzare per sintetizzare un ottimo catalizzatore supramolecolare?



**NON l'interazione catalizzatore substrato
MA l'interazione catalizzatore stato di transizione**

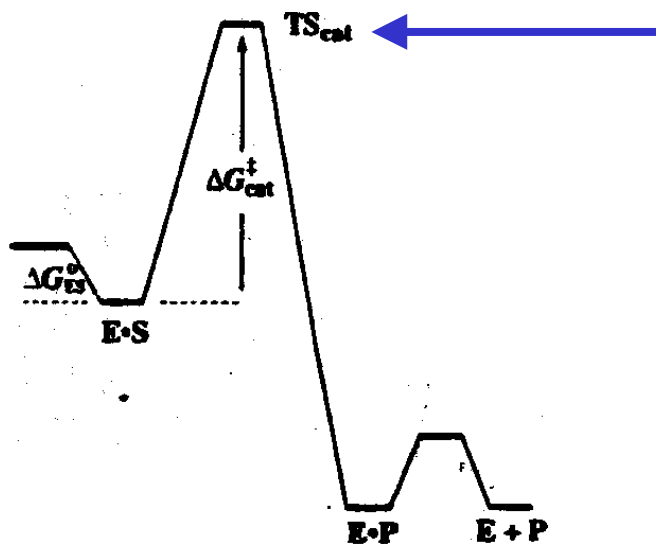
Se G_{ES} cala (complesso più stabile) e G_{TS} rimane invariato la reazione diviene più lenta;
Se G_{ES} rimane invariato e G_{TS} diminuisce la reazione diviene più veloce



controlla la velocità della reazione: tanto più è piccola tanto più la reazione è veloce (=il catalizzatore è efficiente)

Ottimizzare un catalizzatore supramolecolare richiede quindi ottimizzare la sua interazione con lo stato di transizione della reazione che voglio catalizzare.

MA LO “STATO DI TRANSIZIONE” NON E’ UNA MOLECOLA STABILE: BISOGNA COSTRUIRE UN MODELLO



non è un minimo di energia!

Per costruire un modello bisogna conoscere il meccanismo della reazione catalizzata

Un enzima riconosce lo stato di transizione meglio del substrato



Poichè il sistema immunitario è estremamente efficiente nel riconoscere molecole possiamo sviluppare antigeni che riconoscano “stati di transizione” (modelli)?



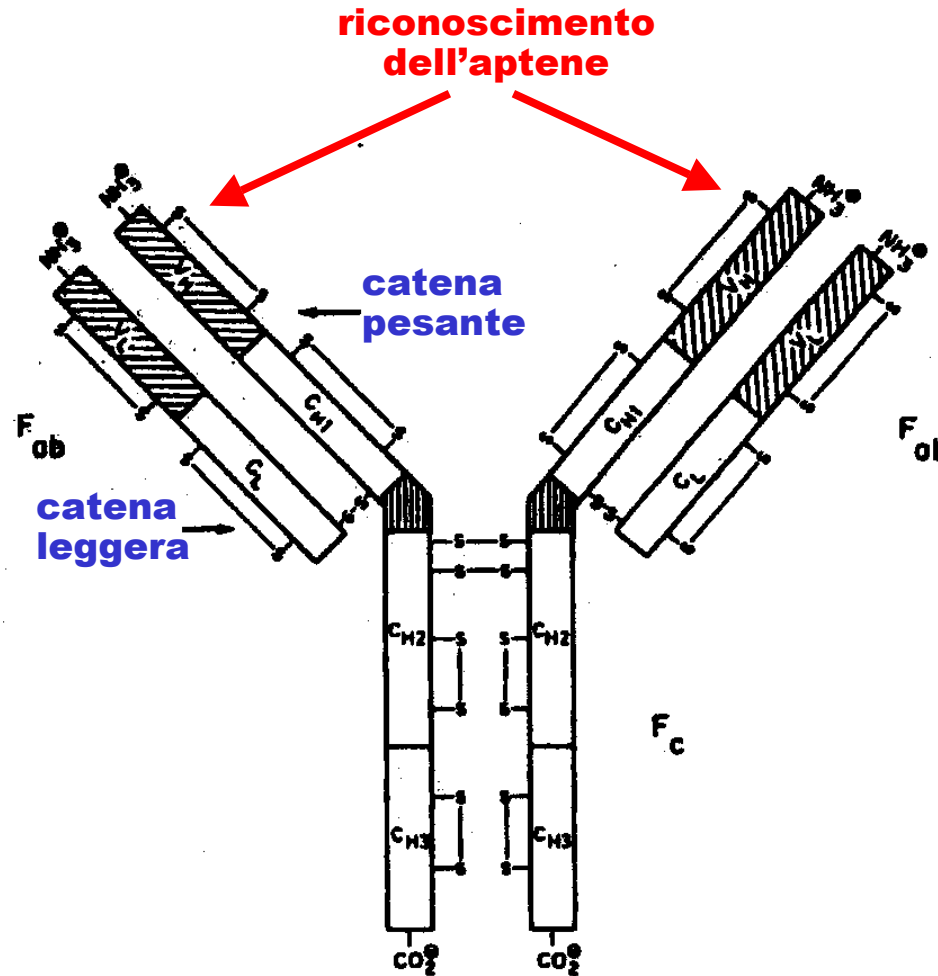
ANTICORPI CATALITICI

In questo caso il sistema biologico costruirebbe il catalizzatore “artificiale” e a noi resterebbe il compito di realizzare un modello corretto dello stato di transizione

Caratteristiche di un anticorpo:

- proteina di ca. 150 kDa**
- alta affinità per un aptene (K_b fino a $10^{14} M^{-1}$)**

Un anticorpo è una proteina dimerica costituita da due subunità uguali; le due subunità sono a loro volta costituite da due catene peptidiche



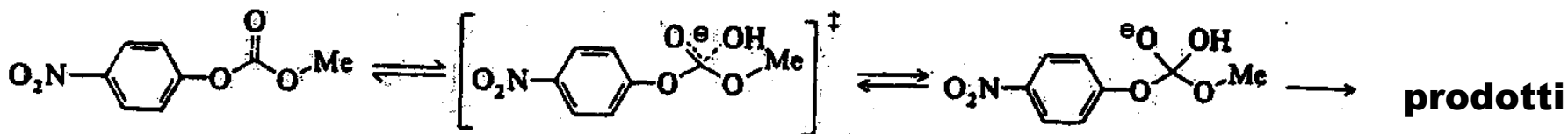
Un antigene induce l'espressione di un numero enorme di anticorpi diversi. La produzione di anticorpi monoclonali permette di esprimere un singolo anticorpo in quantità utili per il suo studio

Per ottenere anticorpi catalitici l'aptene dovrà:

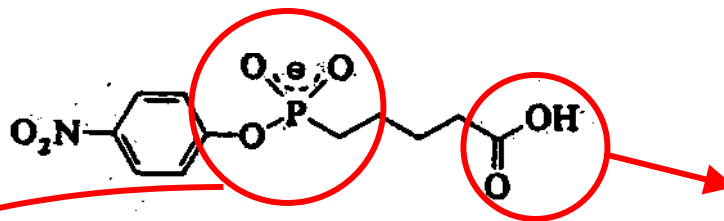
- **mimare lo stato di transizione della reazione che si vuol catalizzare;**
- **mimare la situazione che si verifica quando due partners della reazione vengono portati in contatto;**
- **indurre la presenza di specifici gruppi funzionali;**
- **portare (se del caso) al riconoscimento di un cofattore**

Il progetto dell'aptene è fondamentale!

Immaginiamo di voler accelerare l'idrolisi di questo carbonato per la quale è noto il meccanismo di reazione (si possono cioè fare delle ipotesi verosimili sulla struttura dello stato di transizione)



Dobbiamo progettare un aptene che ci permetta di esprimere anticorpi adeguati per poi verificarne l'attività



**simile allo stato di transizione
ma stabile (cioè isolabile)**

**serve per legarlo
ad un opportuno "carrier"**

Funziona?

Tra le proteine selezionate la migliore presenta le seguenti caratteristiche:

- **comportamento cinetico “enzimatico” (c'è riconoscimento del substrato);**
- **forte inibizione dell'aptene (l'aptene si lega in modo più forte del substrato alla proteina);**
- **accelerazione fino a 10^5 rispetto alla reazione non catalizzata.**

Siamo ancora lontani dalle accelerazioni enzimatiche (10^{15} - 10^{20}) ma l'enzima che catalizza la stessa reazione **PRIVATO DEGLI AMMINO ACIDI CHE PORTANO I GRUPPI FUNZIONALI nel sito catalitico ha una reattività confrontabile**

Abbiamo mimato la stabilizzazione dello stato di transizione ma non abbiamo una molecola che opera con lo stesso meccanismo dell'enzima originale