

Inibizione enzimatica

Gli enzimi possono essere soggetti ad inibizione reversibile o irreversibile

Gli inibitori enzimatici sono molecole che interferiscono con la catalisi

Rallentano o **bloccano** le reazioni enzimatiche

Perché è importante conoscere i meccanismi di inibizione enzimatica?

molti **farmaci** sono **inibitori enzimatici**

gli inibitori enzimatici hanno dato **importanti informazioni** sui **meccanismi** delle **singole reazioni enzimatiche** e delle **vie metaboliche**

Esistono due tipi di inibizione:

1) Reversibile

Competitiva

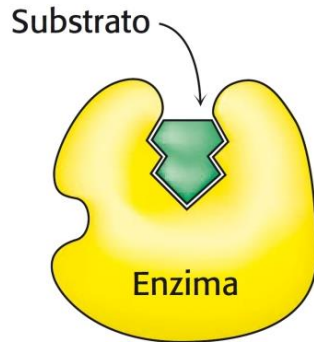
Incompetitiva

Mista o non Competitiva

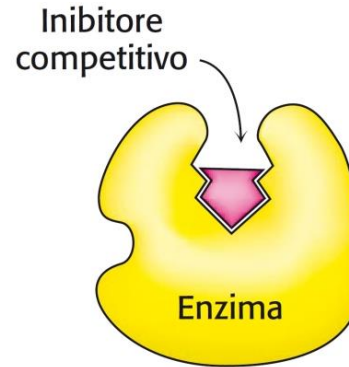
2) Irreversibile

Inibizione Reversibile

(A)



(B)



Inibizione Competitiva

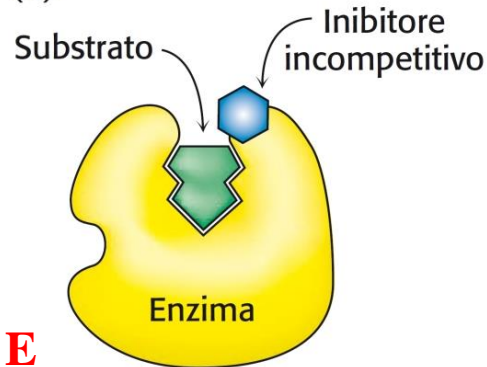
S e **I** si legano a **stesso sito**

I *interferisce* nel legame del substrato **S**

I *non influenza* l'attività catalitica dell'enzima **E**

Inibizione Incompetitiva

(C)



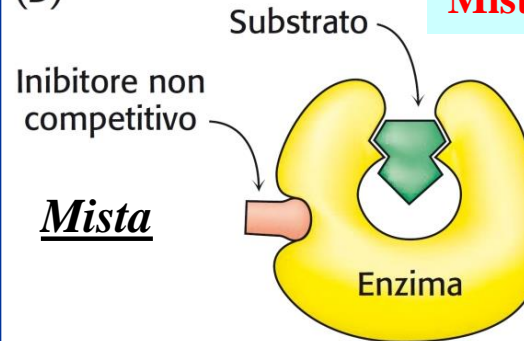
S e **I** si legano in **siti diversi**

I si lega solo **dopo** che **S** si è legato ad **E**

I *non influenza* il legame del substrato **S**

I *influenza* l'attività catalitica dell'enzima **E**

(D)



Inibizione Mista o non Competitiva

I si lega ad **E** ed induce *modifiche conformazionali* nel sito attivo

Mista

I *interferisce* sia nel legame del substrato **S** che nell'attività catalitica di **E**

Inibizione Reversibile Competitiva

Gli inibitori competitivi **competono** con il **substrato** per il **sito attivo**

Quando **l'inibitore I occupa il sito attivo**, impedisce il legame dell'enzima con il substrato

Gli *inibitori competitivi sono strutturalmente simili al substrato* e si combinano con l'enzima formando complessi **EI**

L'inibizione da prodotto della reazione ne è un esempio. Il prodotto che si accumula compete con il substrato



+ K_i è la costante di
I equilibrio della
reazione di
**dissociazione del
complesso EI**

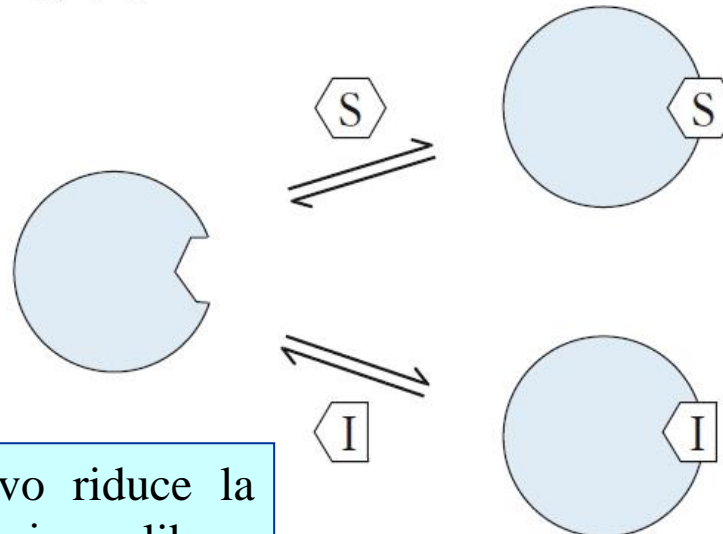


K_i

EI

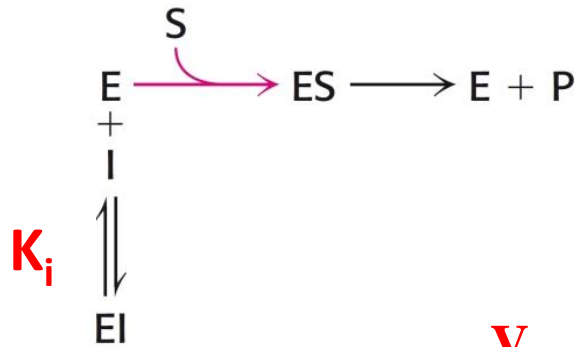
In pratica

Un inibitore competitivo riduce la concentrazione dell'enzima libero disponibile per il legame al substrato

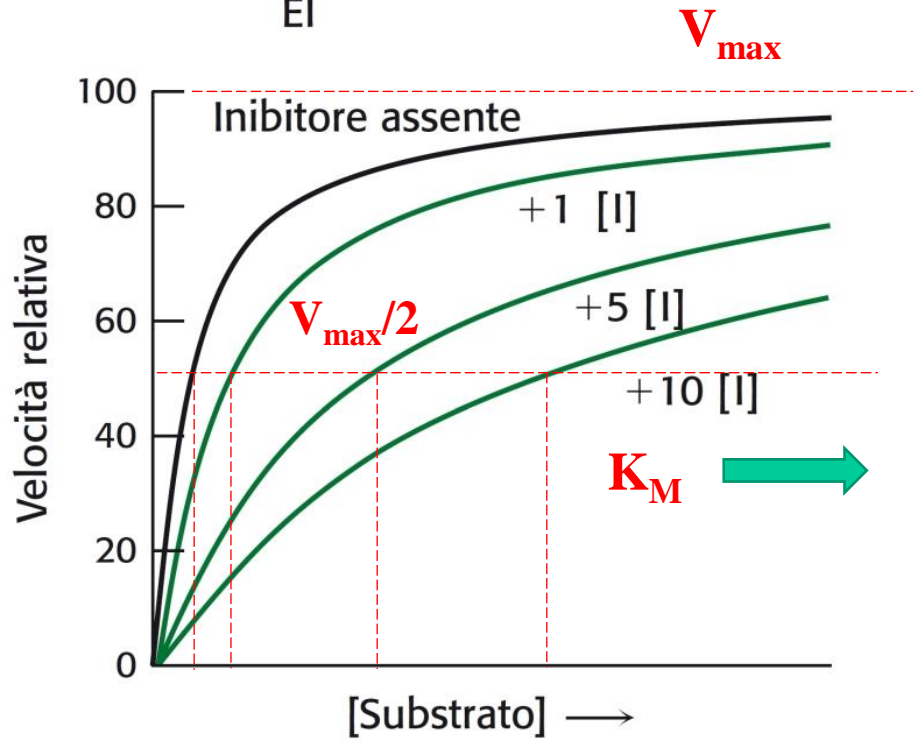


L'inibizione può essere superata **aumentando** la concentrazione del **substrato**

Inibizione Reversibile Competitiva



V_{\max} non cambia
 K_M aumenta



Aumentando la concentrazione dell'inibitore, sono *richieste concentrazioni di substrato più elevate* per raggiungere una determinata velocità.

Concentrazioni di *substrato* sufficientemente *elevate* possono **rimuovere l'inibizione competitiva**

Analisi quantitativa della Inibizione Competitiva

αK_M corrisponde alla K_M osservata in presenza dell'inibitore, detta **K_M apparente**

V_{max} non cambia
 K_M aumenta

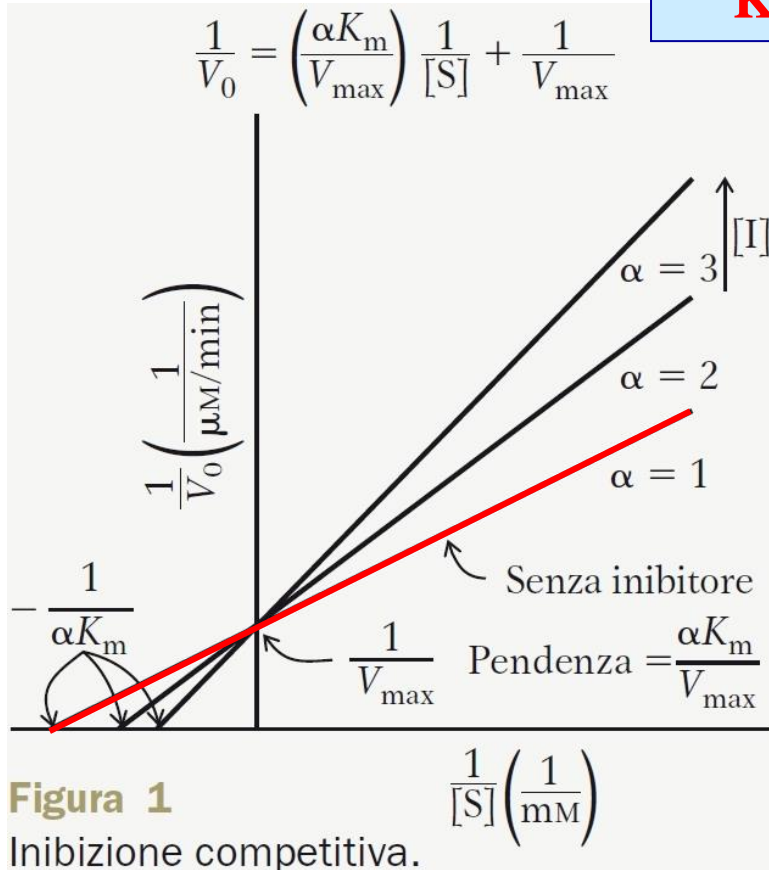


Figura 1
Inibizione competitiva.

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

K_i costante equilibrio reazione di dissociazione complesso **EI**

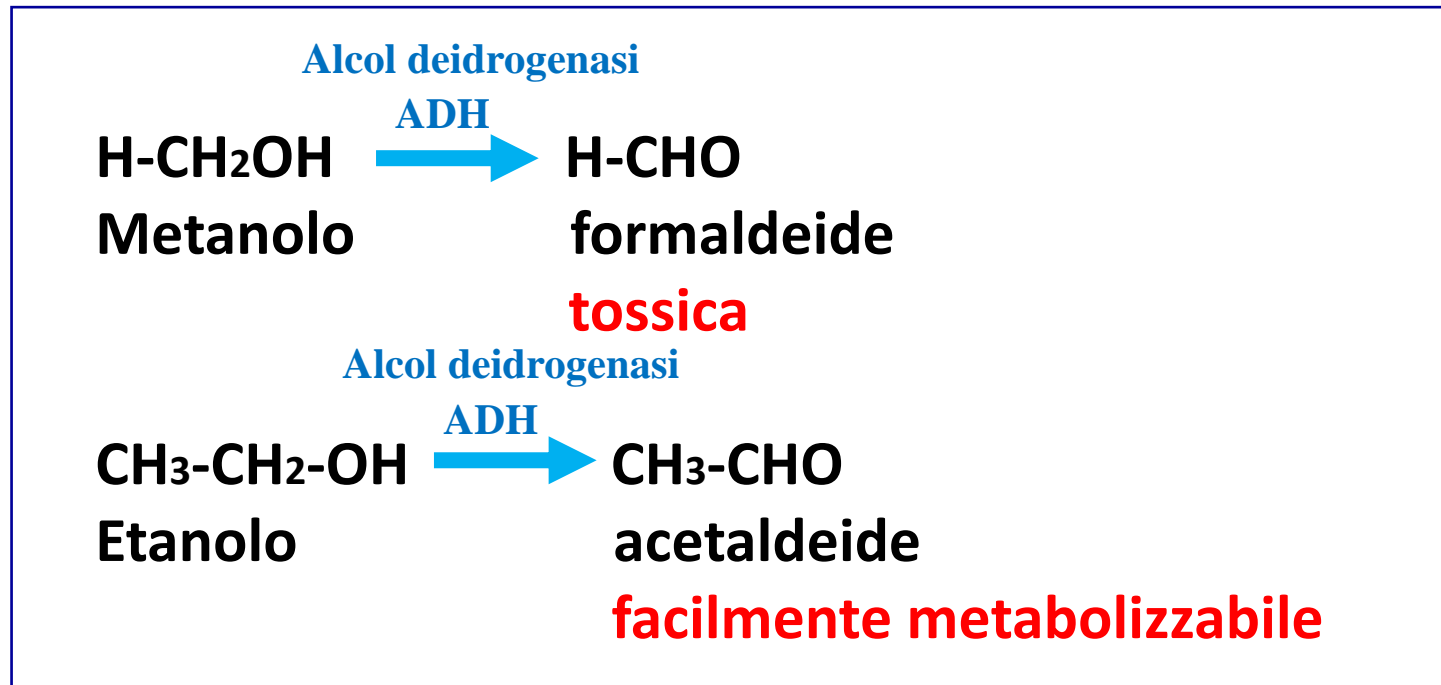
$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

I aumenta la pendenza del grafico

Il grafico dei doppi reciproci in presenza ed in assenza di inibitore mostra che l'inibitore competitivo *non ha effetto* su V_{max} , mentre *aumenta* il valore di K_M

Concentrazioni di *substrato* sufficientemente *elevate* possono **rimuovere l'inibizione competitiva**

L'etanolo come inibitore competitivo nella terapia dell'avvelenamento da metanolo



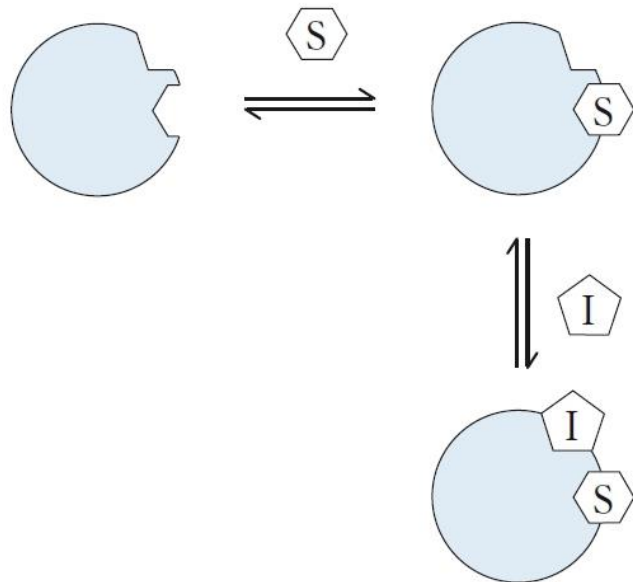
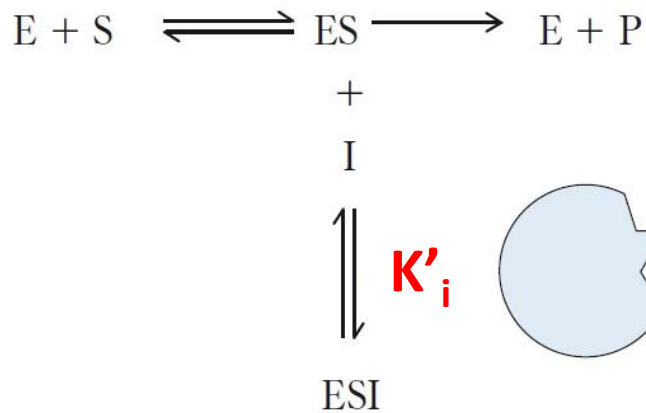
L'**etanolo** è un **substrato** della **ADH** ma anche **inibitore competitivo** di ADH
La terapia consiste un una **infusione intravenosa** di **etanolo** che *rallenta la formazione del metabolita tossico* in modo da permettere un'**escrezione lenta** in concentrazioni sufficientemente basse da non provocare danni cellulari

I **reni** *eliminano* il *metanolo* residuo

Inibizione Reversibile Incompetitiva

Gli inibitori incompetitivi si legano ad un **sito distinto** da quello del **substrato** che si **rende disponibile** solo **dopo il legame** del **substrato**

Prevalentemente Enzimi a **2** o **più substrati**



I Si lega solo al complesso **ES**
dopo che si è legato **S**

Il legame con il **substrato**
non rimuove gli effetti della
inibizione incompetitiva

Analisi quantitativa della Inibizione Incompetitiva

V_{\max} diminuisce
 K_M diminuisce

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + \alpha' [S]}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$$

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

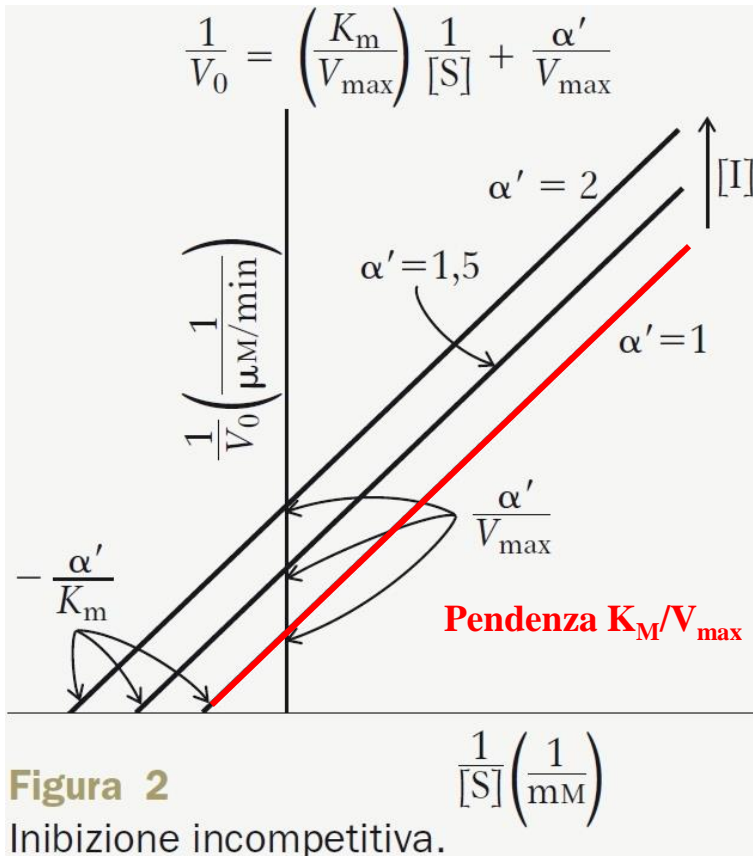


Figura 2
 Inibizione incompetitiva.

L'**inibitore** si **lega** solo al complesso **ES**.
 Quindi V_{\max} *non può mai essere raggiunta*,
 anche a concentrazioni elevate di substrato.
 Il valore apparente di K_M *diminuisce* al
crescere della concentrazione di inibitore.

Un inibitore incompetitivo *non ha effetto* sulla
pendenza del grafico dei doppi reciproci, mentre
 V_{\max} e K_M *diminuiscono in egual misura*

Inibizione Reversibile Mista o non Competitiva

Gli inibitori misti si legano ad un **sito distinto** dal **sito attivo**

Prevalentemente Enzimi a **2** o **più substrati**

I lega sia a **E** che al complesso **ES**

Il legame con il **substrato**
non rimuove gli effetti
della **inibizione mista**

(c) Inibizione mista

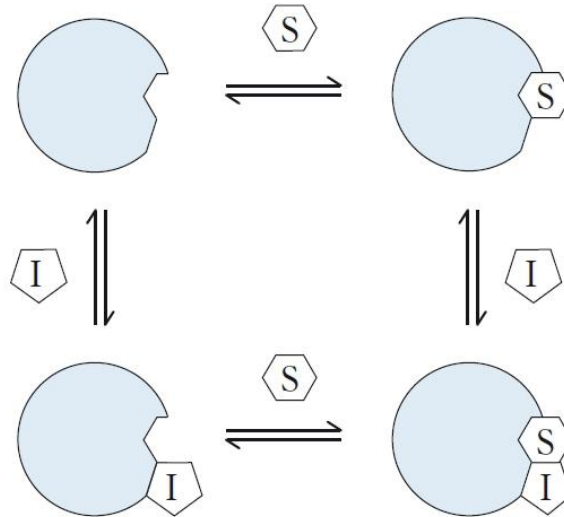
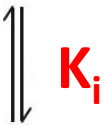


+

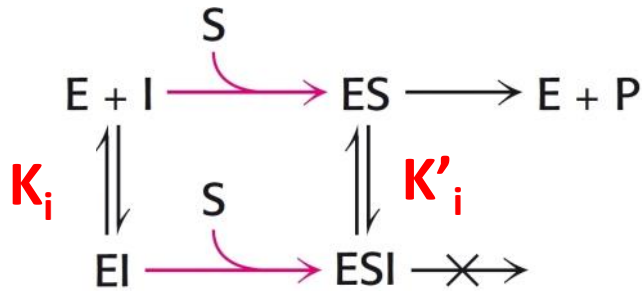
+

I

I

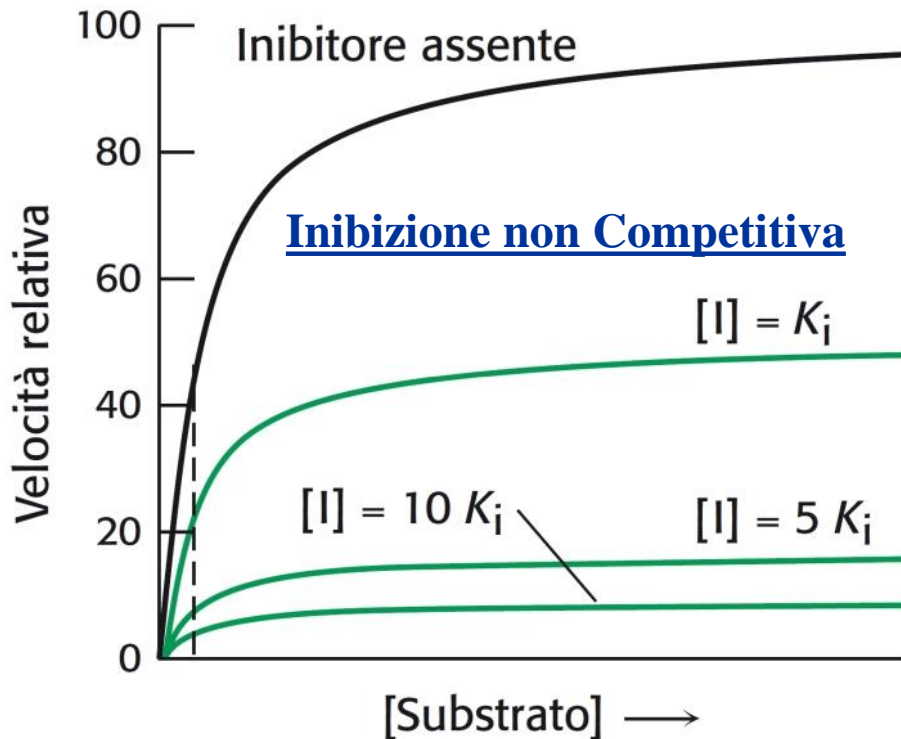


Inibizione Reversibile Mista o non Competitiva



L'inibitore si lega all'enzima libero (E) e al complesso ES.

Di conseguenza, come per l'inibizione incompetitiva, V_{\max} non può *mai essere raggiunta*.



Inibizione Mista

K_M *aumenta*

Inibizione non Competitiva

K_M *rimane invariato*

Analisi quantitativa della Inibizione Mista o Non Competitiva

Mista

V_{\max} diminuisce
 K_M aumenta

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

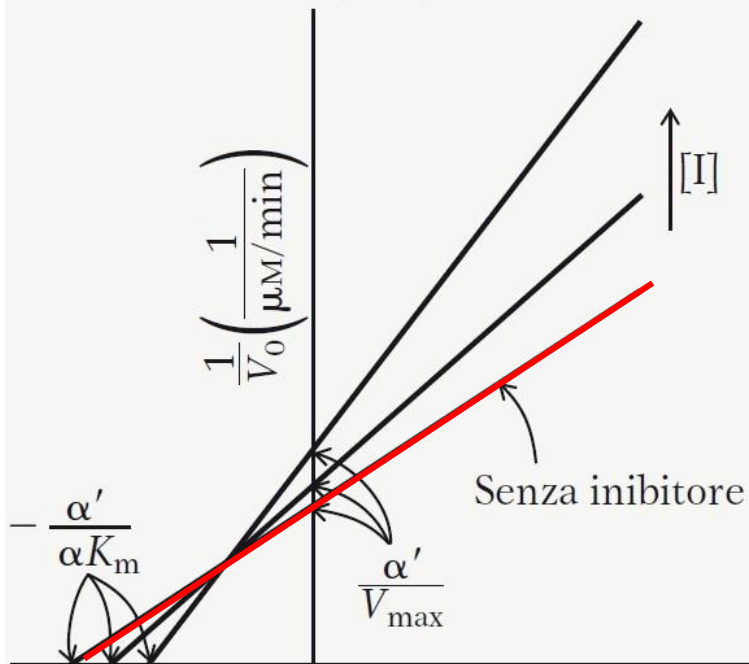


Figura 3
 Inibizione mista.

$$\frac{1}{[S]} \left(\frac{1}{\text{mM}} \right)$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]}$$

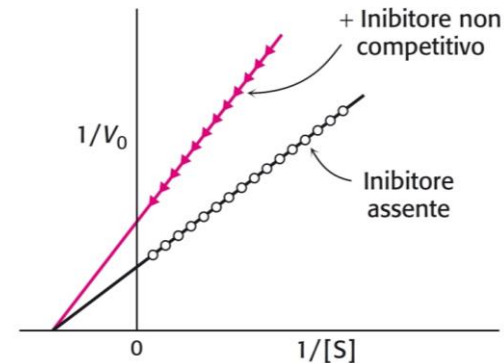
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$$

Se $\alpha = \alpha' \longrightarrow K_i = K'_i$

Si definisce inibizione non Competitiva

V_{\max} diminuisce
 K_M non cambia



Schema Inibizione Reversibile

Competitiva

Incompetitiva

Mista

**non
Competitiva**

V_{\max} non cambia
 K_M aumenta

V_{\max} diminuisce
 K_M diminuisce

V_{\max} diminuisce
 K_M aumenta

V_{\max} diminuisce
 K_M non cambia

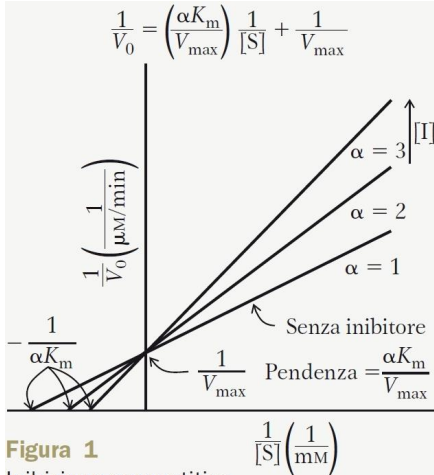


Figura 1
Inibizione competitiva.

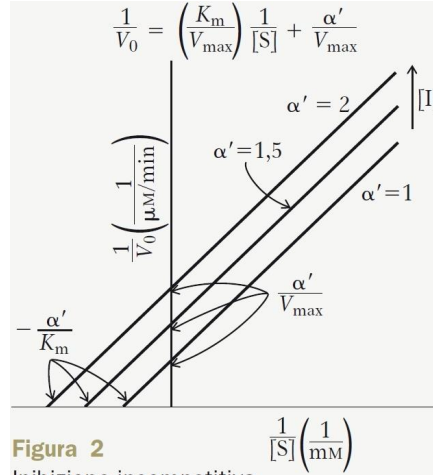


Figura 2
Inibizione incompetitiva.

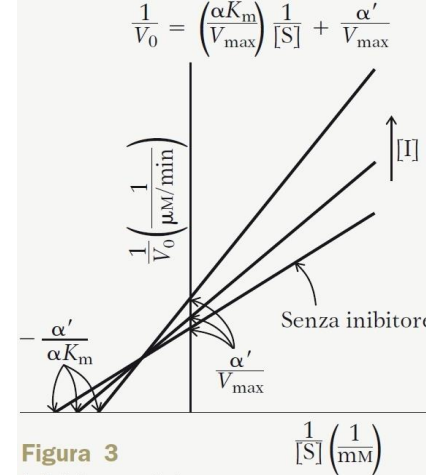
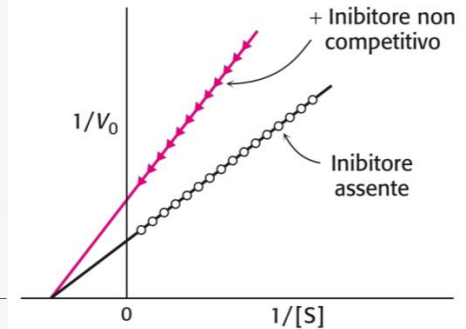


Figura 3
Inibizione mista.



Inibizione Irreversibile

Gli inibitori irreversibili si **legano stabilmente al sito attivo** mediante associazioni **covalenti** o **non covalenti**

- analoghi del substrato
- inibitori suicidi

Inibitori suicidi

portano avanti le prime tappe della reazione enzimatica normale, ma, invece di essere trasformati nel prodotto normale della reazione, **vengono convertiti** in **composti molto reattivi** che **si combinano** in modo **irreversibile** con l'enzima.

Analoghi dello stato di transizione

Gli enzimi si sono evoluti per **legarsi saldamente** allo **stato di transizione**

Tali molecole sono chiamate **analoghi** dello **stato di transizione**

Gli analoghi dello stato di transizione sono **potenti inibitori** degli enzimi

Le strategie catalitiche

•**Catalisi covalente**: il sito attivo contiene un gruppo reattivo, generalmente un nucleofilo, che si lega temporaneamente ad una regione del substrato nel corso della catalisi (es. **CHIMOTRIPSINA**)

•**Catalisi generale acida o basica**: il meccanismo catalitico prevede la presenza di una molecola che dona protoni (acida) o accetta protoni (basica)

•**Catalisi da ioni metallici**: gli ioni metallici possono partecipare alla catalisi in vari modi:

Facilitano la formazione di un nucleofilo,

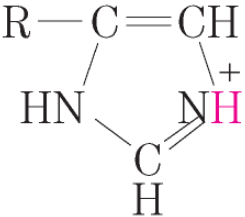
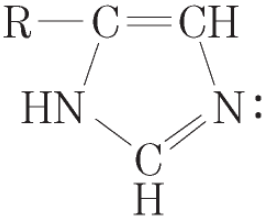
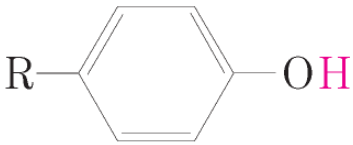
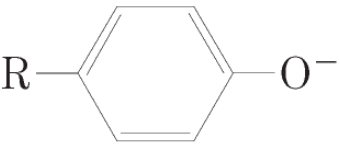
Stabilizzano cariche negative di intermedi di reazione

Fungono da ponte tra l'enzima ed il substrato mantenendo il substrato in una conformazione appropriata per la catalisi

•**catalisi elettrofila**: il meccanismo è elettrofilo e generalmente dipende da **ioni metallici**;

•**catalisi nucleofila**: il meccanismo della reazione è nucleofilo

ESEMPI DI GRUPPI DI UN ENZIMA IMPLICATI NELLA CATALISI ACIDO-BASE

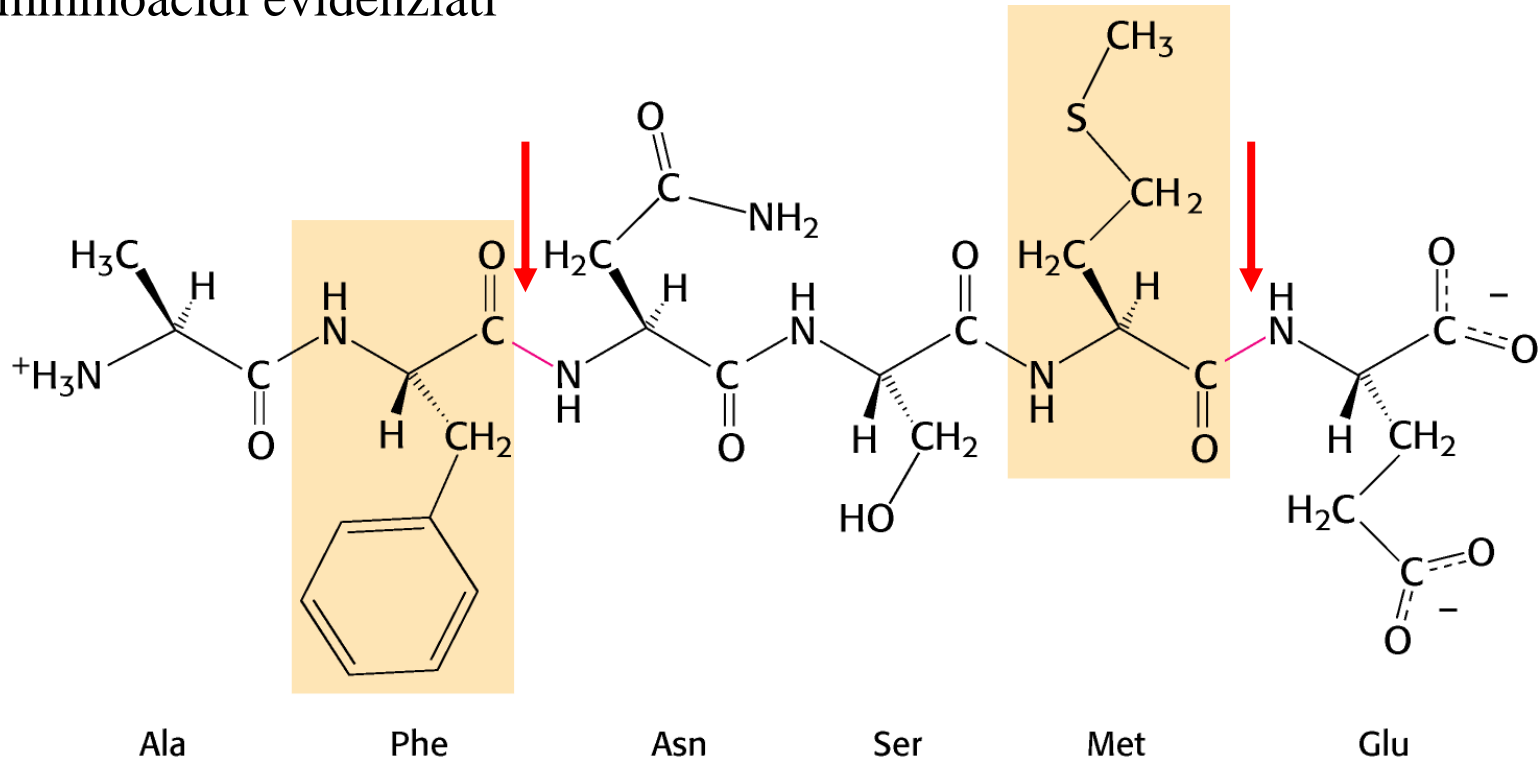
Residui amminoacidici	Forma acida generale (donatore di protoni)	Forma basica generale (accettore di protoni)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}(H)_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His		
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr		

Catalisi Covalente Catalisi Acido-Base

CIMOTRIPSINA

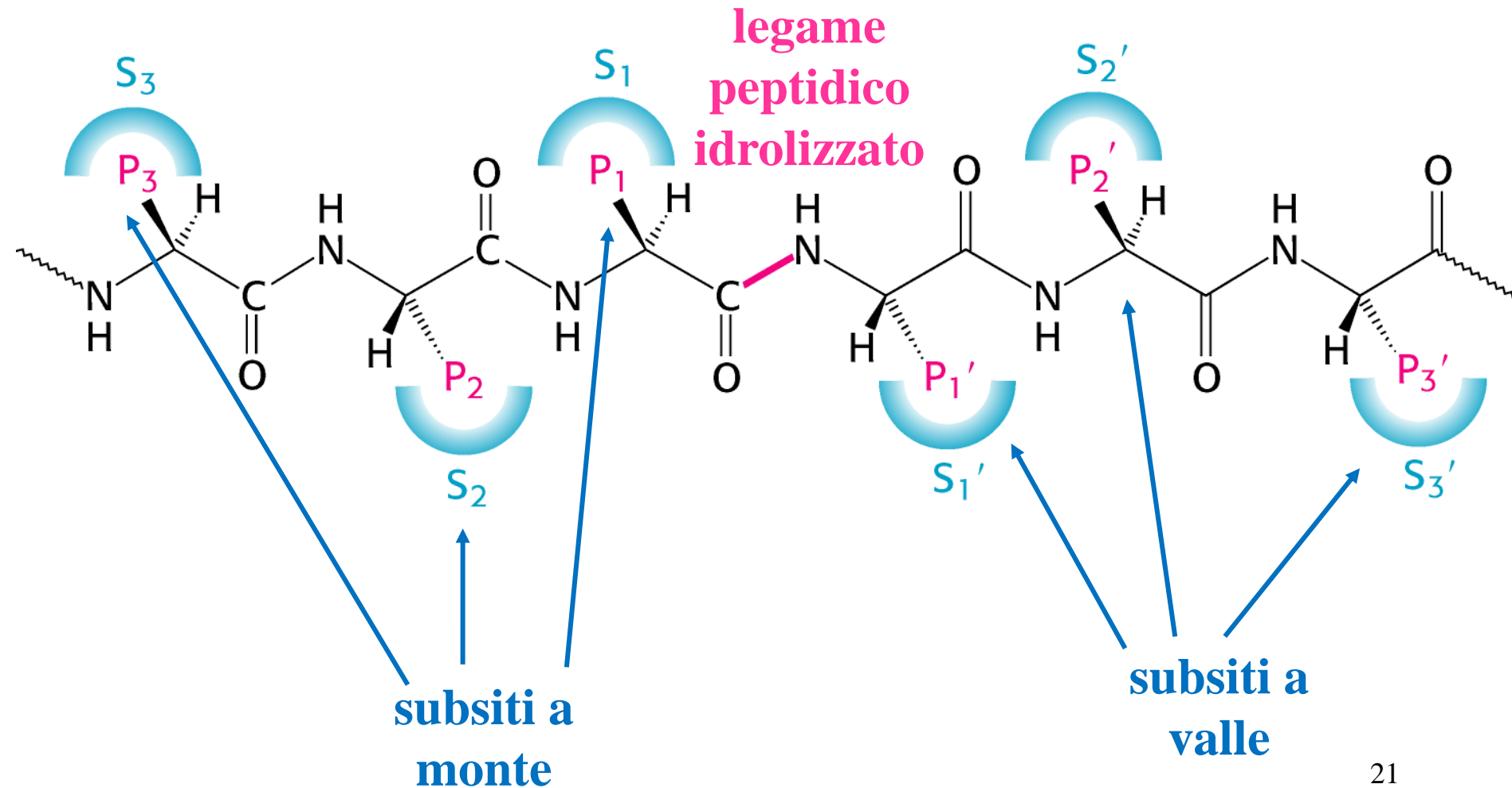
La specificità di substrato

La chimotripsina catalizza la *scissione dei legami peptidici* solo accanto agli amminoacidi evidenziati

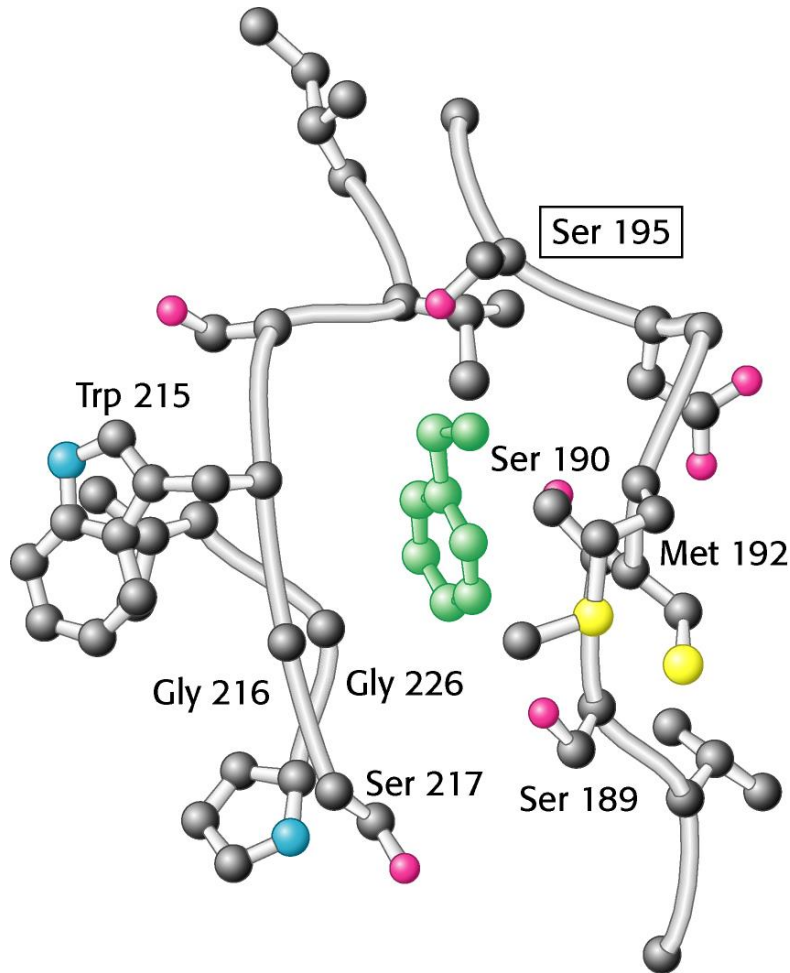


Catena laterale **grande** e **idrofobica** : **triptofano, tirosina, fenilalanina e metionina**

la **specificità di substrato** di tutte le **proteasi** dipende dall'esistenza di «**subsiti**» che riconoscono le **catene laterali** dei residui a monte e a valle del **legame peptidico idrolizzato**



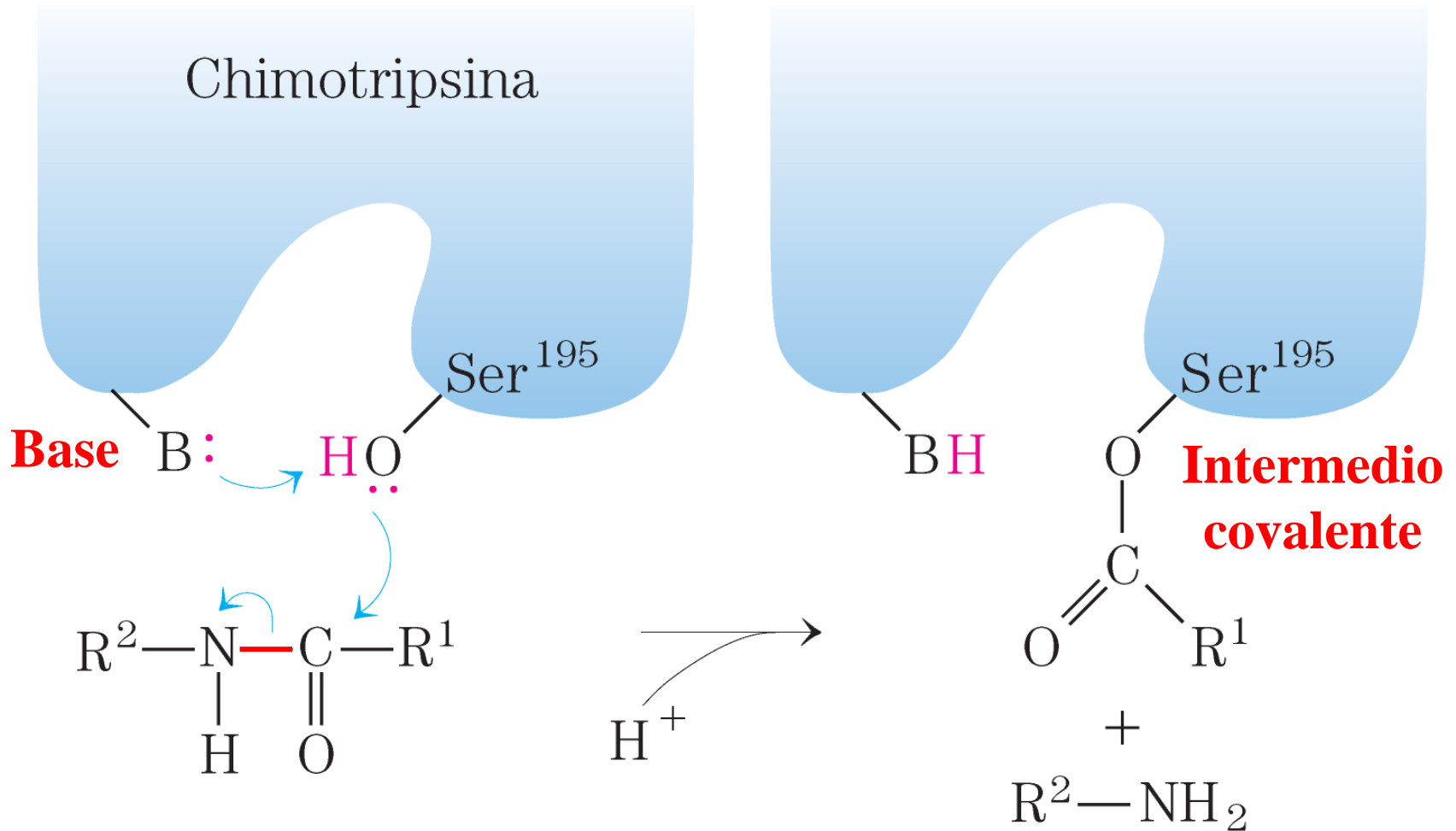
LA SPECIFICITA' DI SUBSTRATO DELLA CHIMOTRIPSINA DIPENDE DALLA "TASCA" IN CUI SI ALLOGGIA IL SUBSTRATO



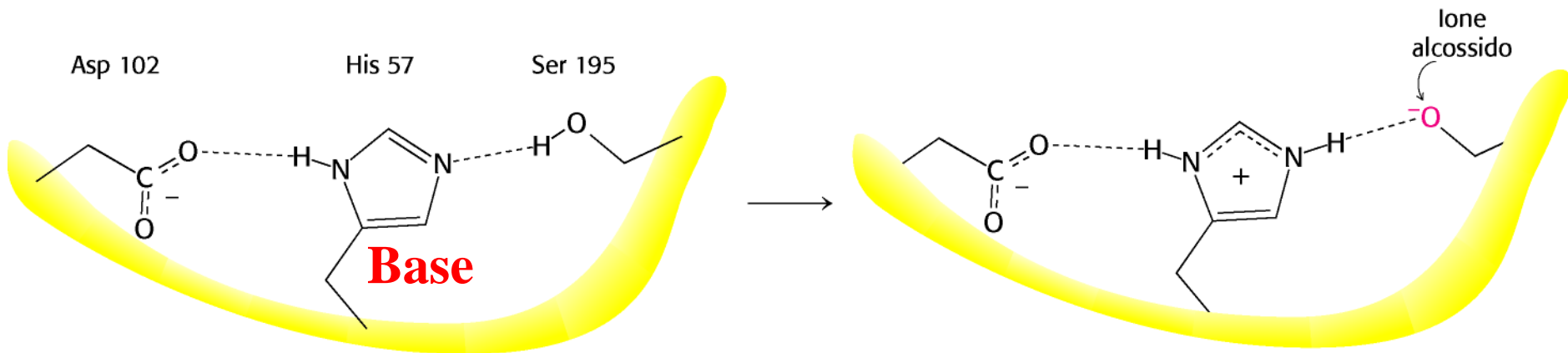
L'enzima impiega un potente **nucleofilo** (**Ser 195**) per attaccare il **carbonio carbonilico poco reattivo**

Catalisi Covalente
Catalisi Acido-Base

LA CHIMOTRIPSINA

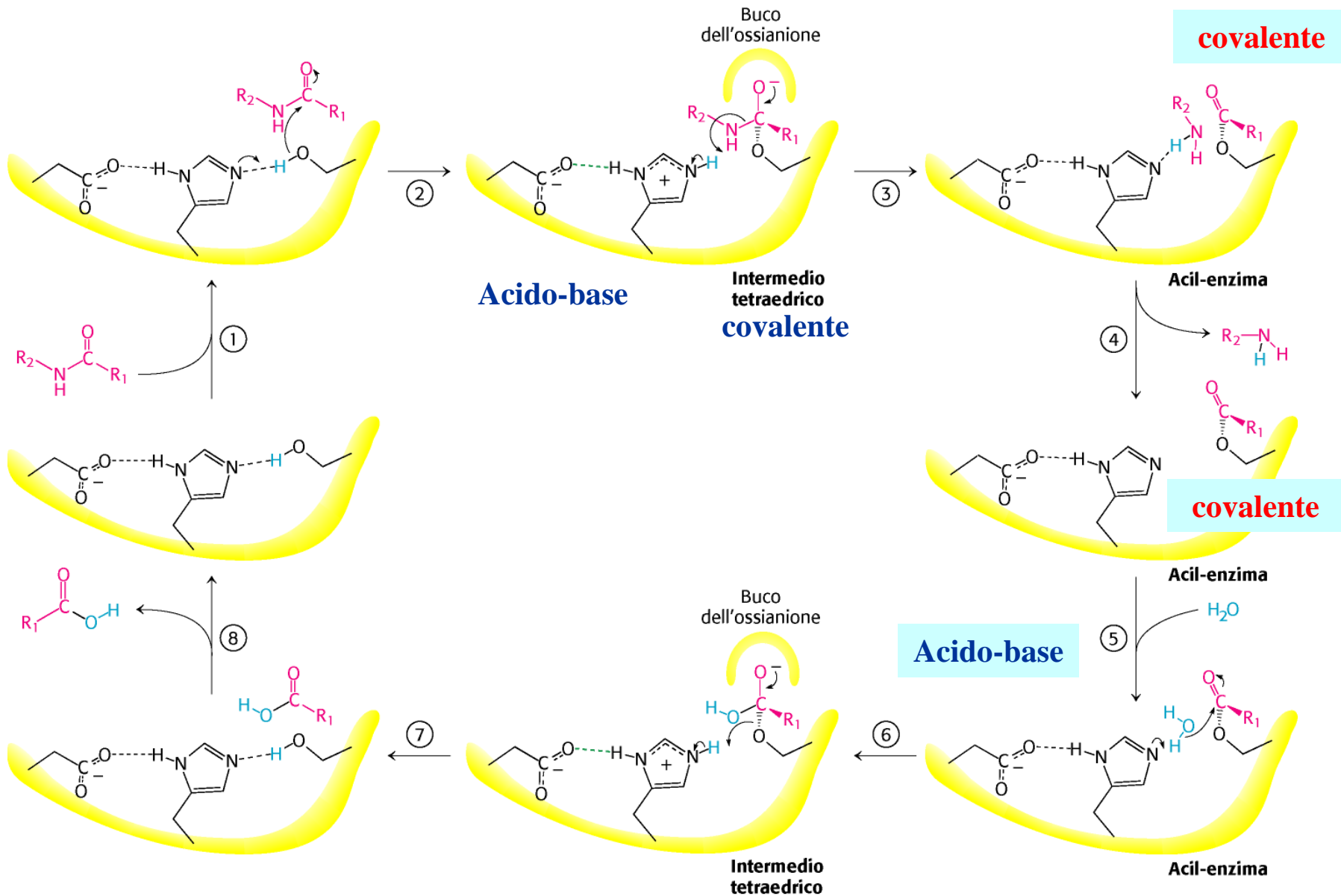


Nel sito attivo della chimotripsina si può evidenziare una “**triade catalitica**”



La funzione della “triade catalitica” è di **aumentare** la **nucleofilicità** della **serina 195**

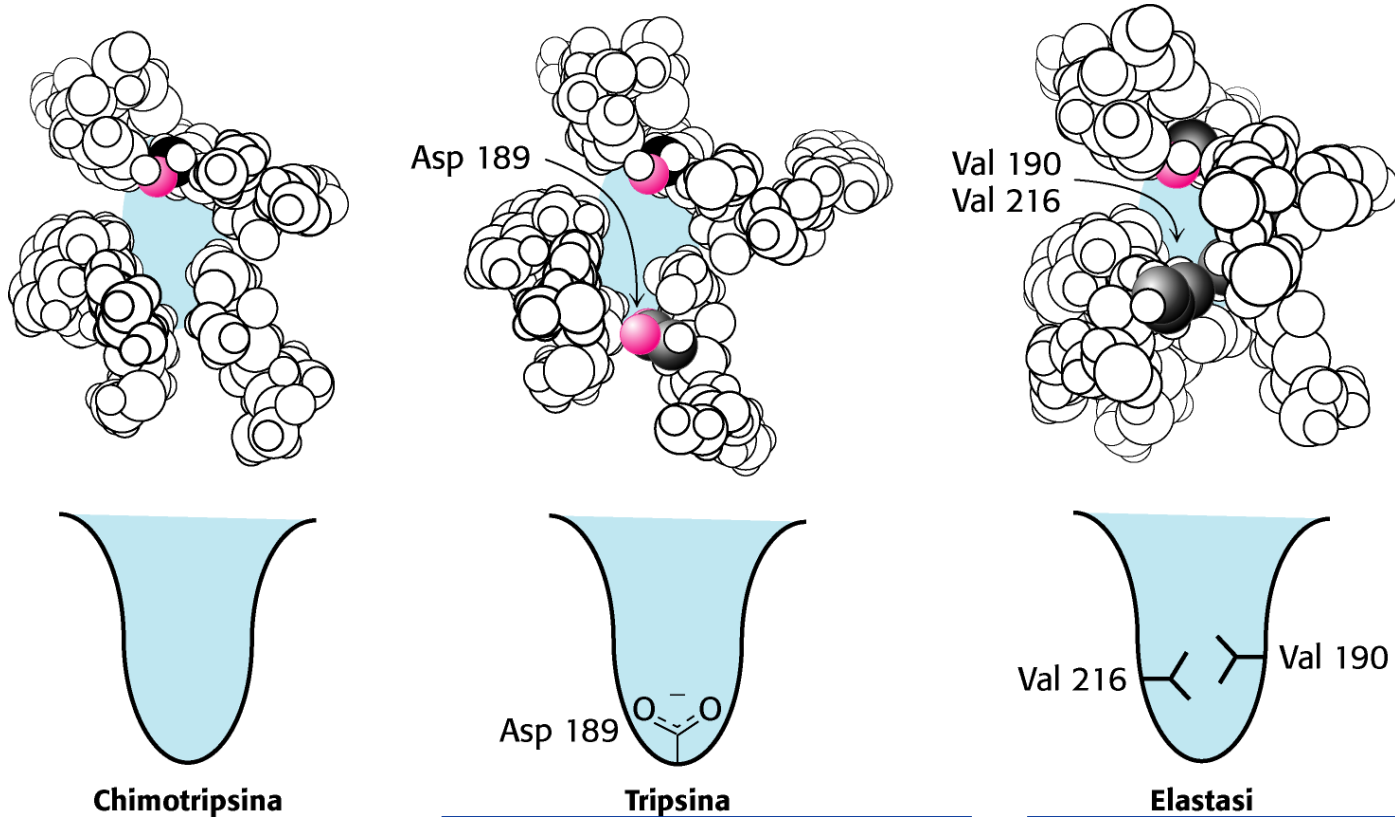
Chimotripsina: il meccanismo molecolare della scissione del legame peptidico



Serina-protesi

La “triade catalitica” è presente anche in altre proteasi

LA SPECIFICITA' DI SUBSTRATO DI TUTTE LE PROTEASI DIPENDE DALLA “TASCA” IN CUI SI ALLOGGIA IL SUBSTRATO

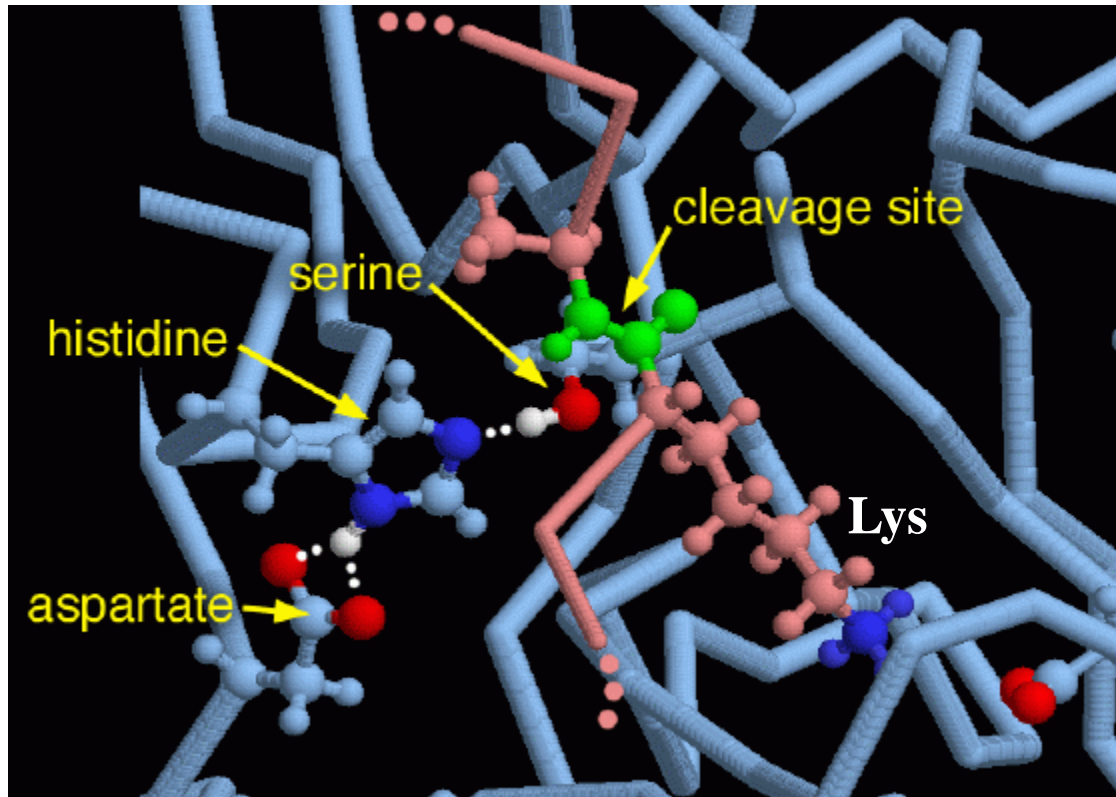


Scinde legame peptidico dopo residui **idrofobici aromatici (Phe) e alifatici (Met)**

Scinde legame peptidico dopo residui **carichi positivamente** come **Lys** e **Arg**

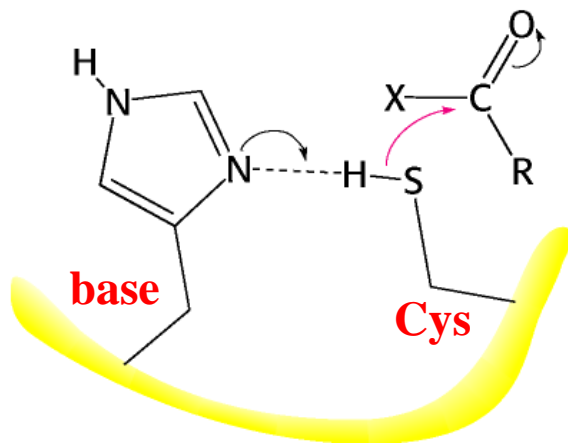
Scinde legame peptidico dopo residui **piccoli** quali **Ala** e **Ser**

Tripsina



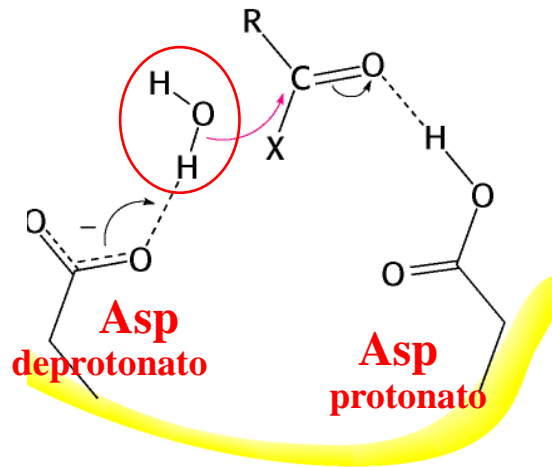
Il nucleofilo delle proteasi non è solo il residuo di **serina**

Cisteina proteasi



papaina

Aspartil proteasi



pepsina

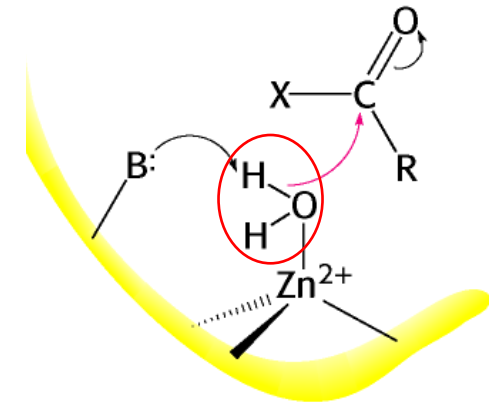
Asp deprotonato

H₂O deprotonata da carbossilato
potenzia il nucleofilo OH⁻

Asp protonato

Polarizza il gruppo carbonilico
per renderlo suscettibile
all'attacco

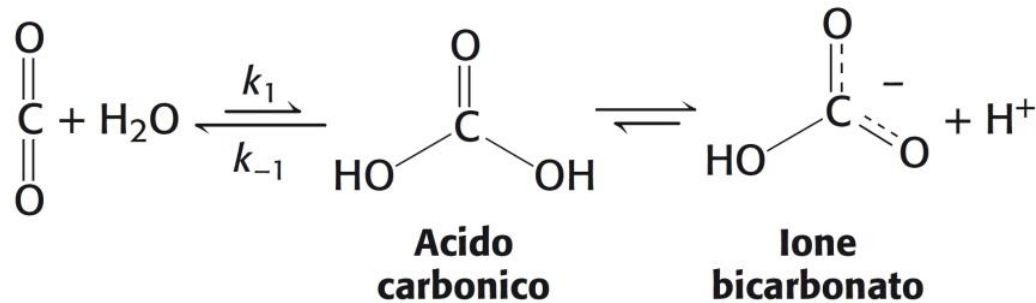
Metallo proteasi



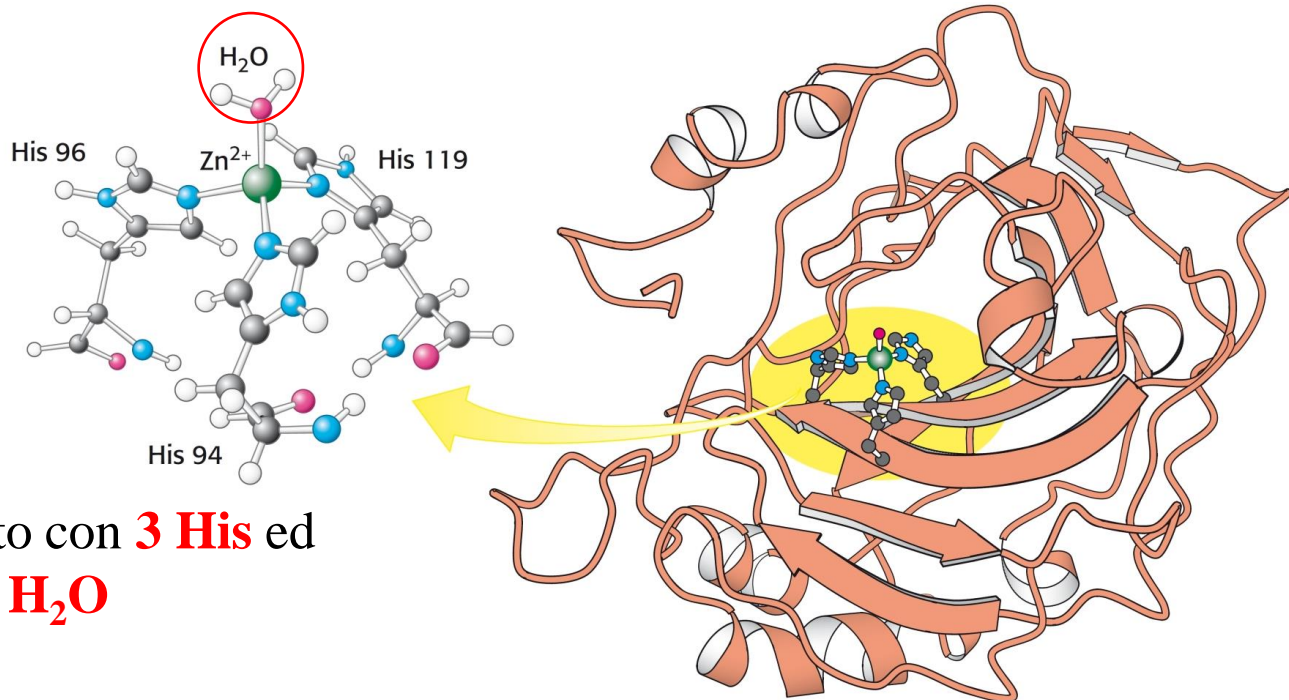
Contengono uno ione
metallico (**Zn²⁺**).

Zn²⁺Attiva una
molecola di **H₂O**
perché faccia da
nucleofilo

Anidrasi carbonica



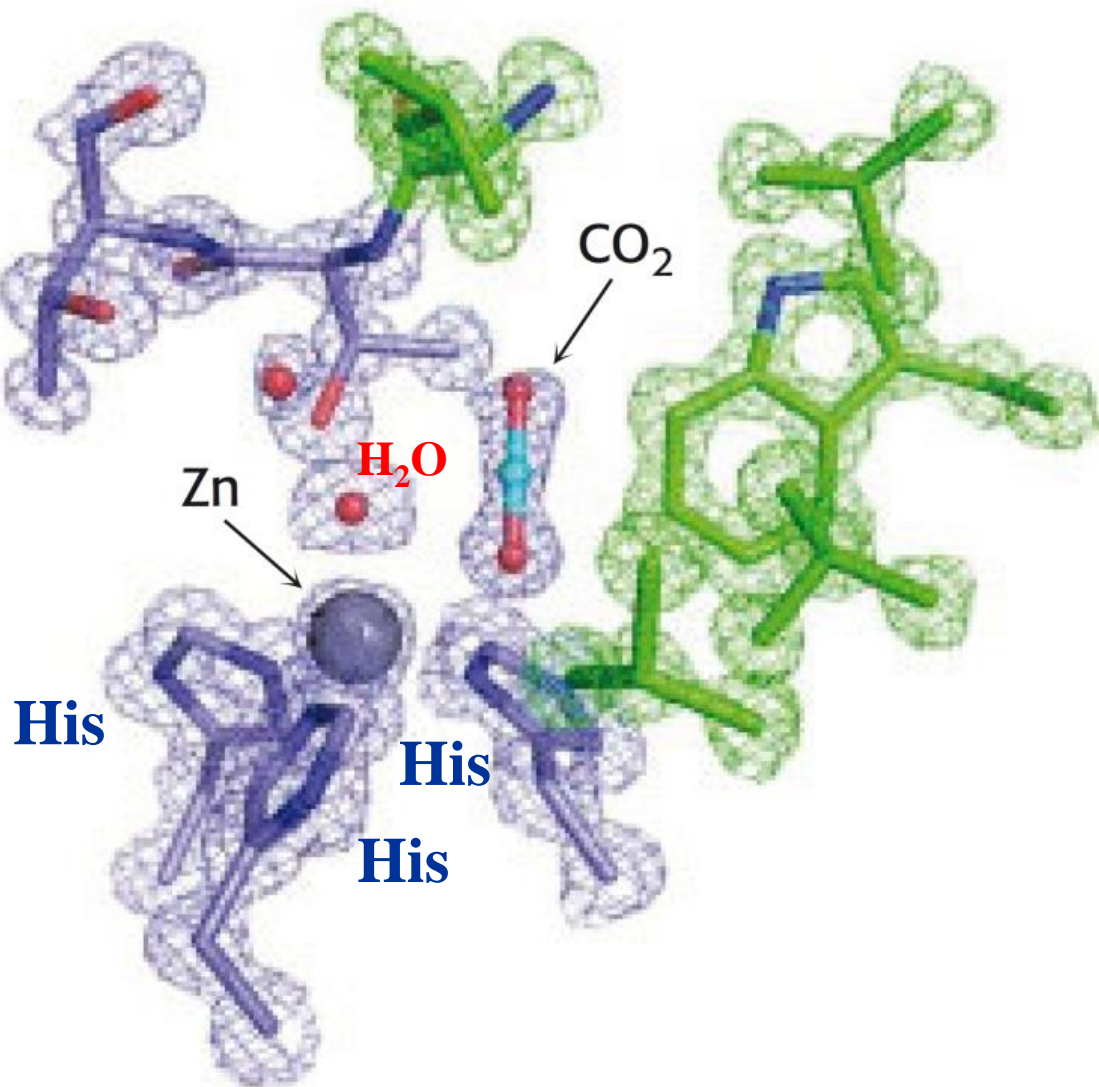
Contiene uno ione **Zn²⁺** essenziale per l'attività catalitica



Zn²⁺ è coordinato con **3 His** ed una molecola di **H₂O**

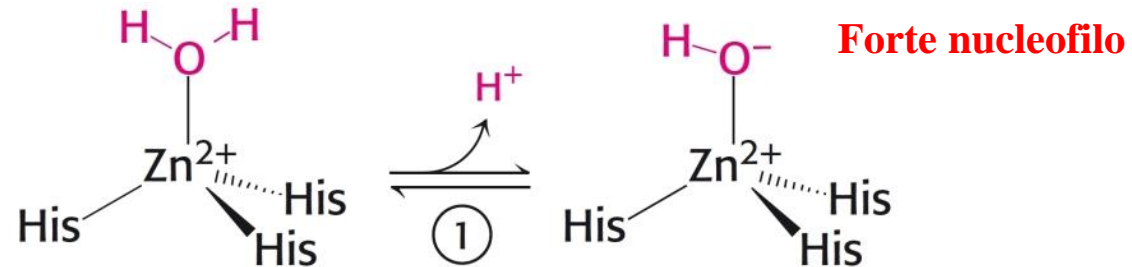
1CA2 pdb

Sito di legame Anidrase carbonica

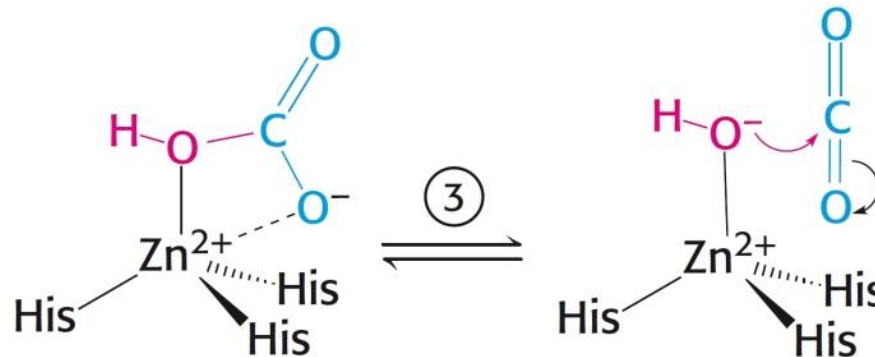
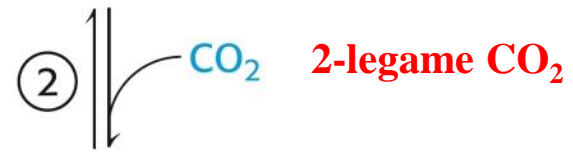
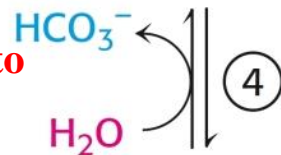


Meccanismo di azione Anidrasi carbonica

1-deprotonazione di H_2O
facilitata dallo ione Zn^{2+}



4-rilascio ione bicarbonato
 HCO_3^- per intervento di
una molecola di H_2O



Zn^{2+} stabilizza la carica - su CO_2

Il legame con lo Zinco abbassa il valore del pKa dell'acqua da a 7

