

Modulo 5C

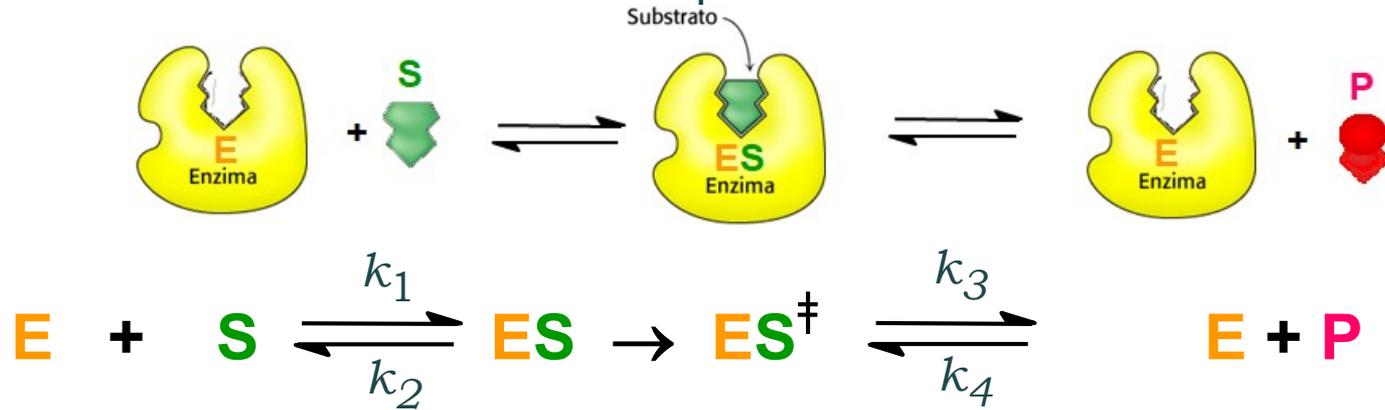
Gli enzimi – cinetica enzimatica

2022-23

CINETICA ENZIMATICA: velocità di reazione

► La velocità di reazione enzimatica è la variazione nel tempo dei substrati e dei prodotti

- dipende dalla velocità di formazione del complesso enzima substrato e dall'efficienza catalitica



k_1 = costante di velocità di associazione

k_2 = costante di velocità di dissociazione

k_3 = costante di velocità di reazione diretta

k_4 = costante di velocità di reazione inversa

- la velocità di reazione è misurata come variazione del prodotto nel tempo

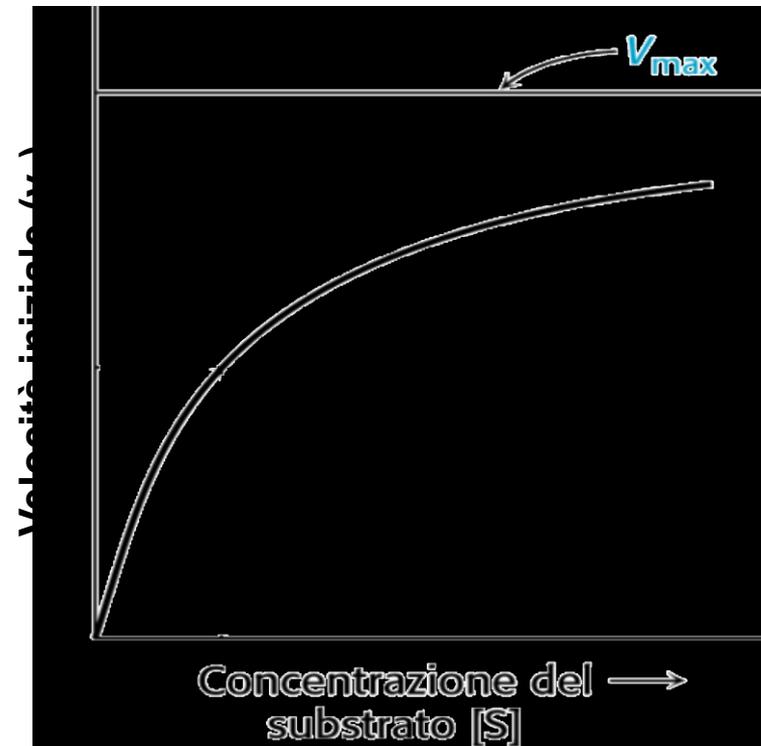
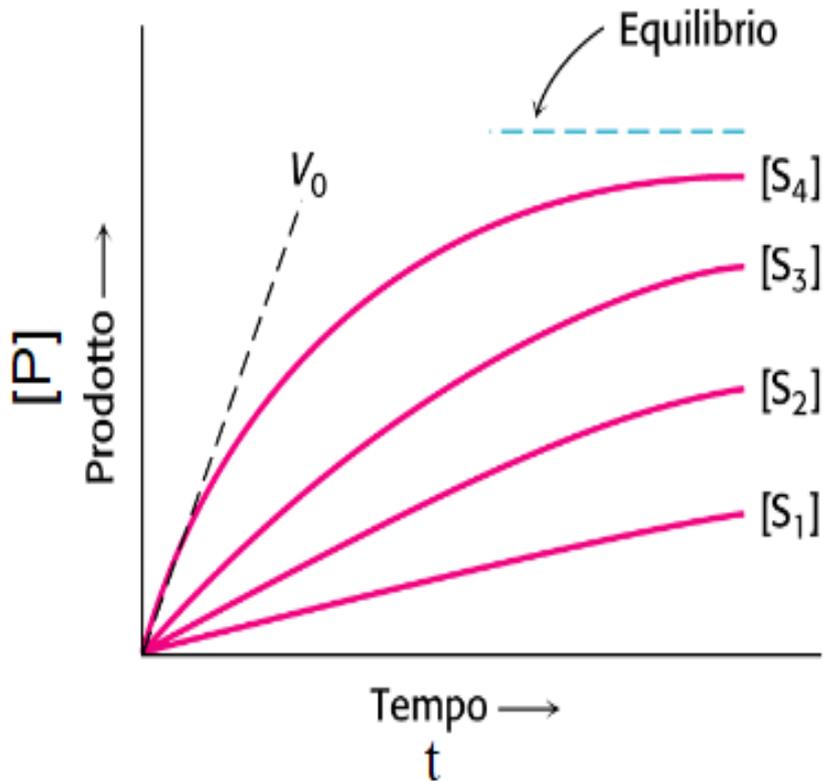
$$v = d[P]/dt = k_3 [ES]$$

eq.1

CINETICA ENZIMATICA: velocità di reazione

► La velocità di reazione dipende dalla concentrazione di substrato

- più elevata la concentrazione iniziale di substrato più elevata la velocità, fino ad arrivare ad una **velocità massima** (V_{\max})
- la velocità di reazione diminuisce col tempo, diventando **zero ad equilibrio**
- la **velocità iniziale** (v_0) si misura all'inizio della reazione quando $[S] \gg [P]$



CINETICA ENZIMATICA: l'equazione di Michaelis-Menten

► Nelle condizioni iniziali:

- $t \rightarrow 0$, $[S] \rightarrow [S]^{\text{tot}}$ $[P] \approx 0$ e quindi $k_4[P] \approx 0$



- la velocità di catalisi $v_0 = k_3 [\text{ES}]$ *eq. 1*

- in **condizioni saturanti** $[S] \gg [E]$, $[\text{ES}] \approx [\text{E}]^{\text{tot}}$ e praticamente tutti i siti attivi dell'enzima sono occupati; in queste condizioni, la costante di velocità di catalisi ($k_{\text{cat}} \equiv k_3$)

$$v_0 \rightarrow V_{\text{max}} = k_3 [\text{E}]^{\text{tot}} \quad \text{eq. 2}$$

- in **condizioni subsaturanti** i siti attivi dell'enzima sono solo parzialmente occupati e la velocità di reazione non è definita solo da k_3

$$d[\text{ES}]/dt = k_1 [\text{E}][\text{S}] - (k_2 + k_3)[\text{ES}]$$

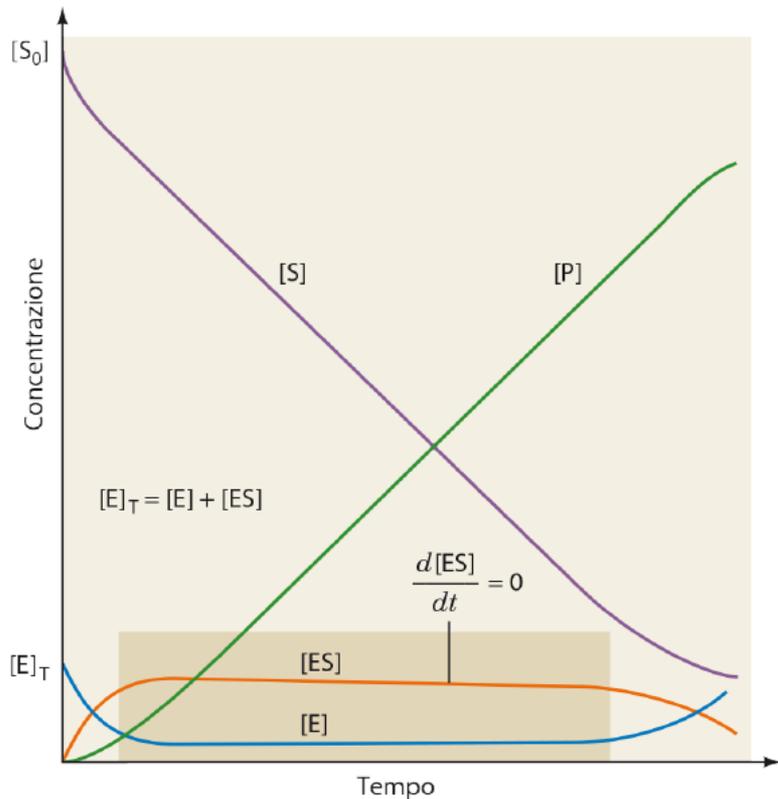
CINETICA ENZIMATICA: l'equazione di Michaelis-Menten (Cont.)

▶ Allo stato stazionario (all'inizio della reazione) $d[ES]/dt = 0$



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

$[ES] = [E][S]/K_M$ (eq. 3) dove $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$ (costante di Michaelis)



$$d[S]/dt = d[P]/dt = v \quad d[ES]/dt = 0$$

- velocità di formazione di ES = vel. di demolizione
- assunzione valida quando si è ancora lontani dall'equilibrio (nelle fasi iniziali della reazione)

$$v \rightarrow v_0$$

- La dissociazione di ES in E + P è la tappa limitante ed è un processo di primo ordine:

$$v_0 = k_3[ES]$$

CINETICA ENZIMATICA: l'equazione di Michaelis-Menten (cont.)

► K_M indica l'affinità dell'enzima per il substrato: $K_M \downarrow$ *affinità* \uparrow

- K_M indica la concentrazione di substrato alla quale l'attività dell'enzima diventa significativa; (in natura, K_M varia da 10^{-1} a 10^{-7} M)

► **Effetto di [S] su v_0 - derivazione della V_{max}**

- V_{max} è raggiunto quando $[ES] \rightarrow [E]^{tot}$ (tutto l'enzima è complessato), poiché la velocità di formazione di P è proporzionale a $[ES]$ (eq.1 $v = k_3 [ES]$)

- questa è una situazione avvicinabile ma non raggiungibile

- nelle **condizioni iniziali** $[S] \gg [E]$ e ne deriva che $[S] \gg [ES]$, quindi $[S] \approx [S]^{tot}$

$$[E]^{tot} = [E] + [ES] \quad \text{quindi} \quad [E] = [E]^{tot} - [ES]$$

$$[ES] = [E][S]/K_M \quad (\text{eq.3}) \quad \text{e sostituendo per [E],} \quad [ES] = ([E]^{tot} - [ES])[S]/K_M$$

$$\text{riarrangiando l'equazione} \quad [ES] = [E]^{tot}[S]/K_M - [ES][S]/K_M$$

$$[ES] K_M = [E]^{tot}[S] - [ES][S] \quad \rightarrow \quad [ES] K_M + [ES][S] = [E]^{tot}[S] \quad \rightarrow$$

$$[ES] (K_M + [S]) = [E]^{tot}[S] \quad \rightarrow \quad [ES] = [E]^{tot} [S]/(K_M + [S]) \quad \text{eq. 4}$$

CINETICA ENZIMATICA: l'equazione di Michaelis-Menten (cont.)

► Derivazione del V_{\max} (cont.)

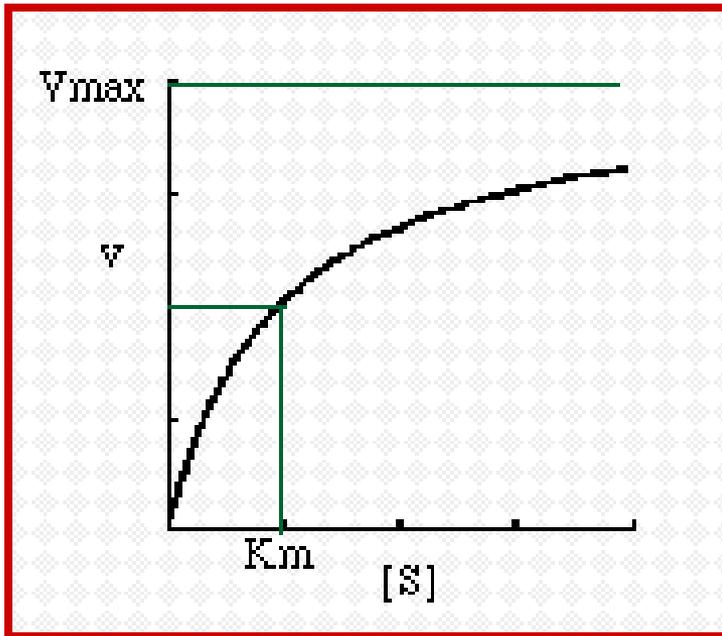
- possiamo ora sostituire $[ES]$ nell'eq. 1 ($v = k_3 [ES]$) usando l'eq.4

$$v = k_3 [E]^{\text{tot}} [S] / (K_M + [S]) \quad \text{eq. 5}$$

- E possiamo sostituire $V_{\max} = k_3 [E]^{\text{tot}}$ (eq. 2) e si ottiene l'equazione di Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{eq. 6}$$

- determina la forma della curva di v_0 verso $[S]$ (una iperbole von V_{\max} all'asintoto)



► L'eq. Di Michaelis-Menten è valida solo:

- per **enzimi non allosterici (omotropici)**
- nelle **condizioni iniziali** ($[S]^i \gg [E]$ e $[P]^i \approx 0$)
- allo **stato stazionario** ($d[ES]/dt \approx 0$)
- per **condizioni costanti** (temperatura, pH, ecc.)

Equazione di Michaelis-Menten (cont.)

► Determinazione del V_{\max}

- V_{\max} non è raggiungibile, ma esiste una $[S]$ dove $v_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$

- A questa $[S]$

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

quindi

$$K_M + [S] = \frac{2 \times V_{\max} \cdot [S]}{V_{\max}}$$

$$K_M + [S] = 2 [S]$$

$$K_M = [S]$$

- K_M equivale alla $[S]$ alla quale $v_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$

- K_M equivale alla $[S]$ alla quale metà dei siti attivi dell'enzima sono occupati

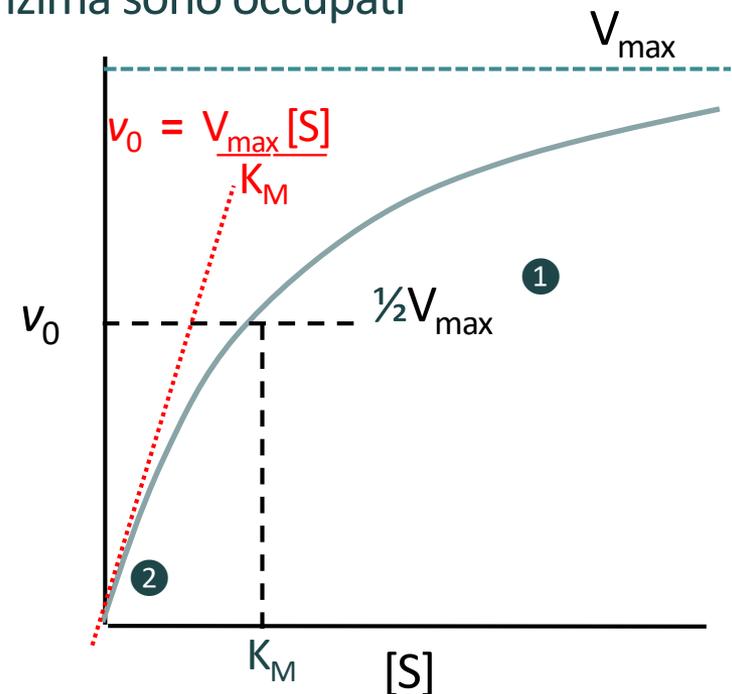
- in condizioni saturanti ① $[S] \gg K_M$

- $(K_M + [S]) \approx [S]$ $v_0 \rightarrow V_{\max}$ ed è indipendente da $[S]$

- In condizioni sub-saturanti ②, se $[S] \ll K_M$

$$v_0 \approx V_{\max} [S] / K_M$$

v_0 è linearmente proporzionale ad $[S]$



Equazione di Lineweaver-Burk: determinazione sperimentale di V_{\max} e K_M

- Considerando il reciproco delle velocità di reazione (v), si ha una relazione lineare fra $1/v$ e $1/[S]$

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

eq. 6

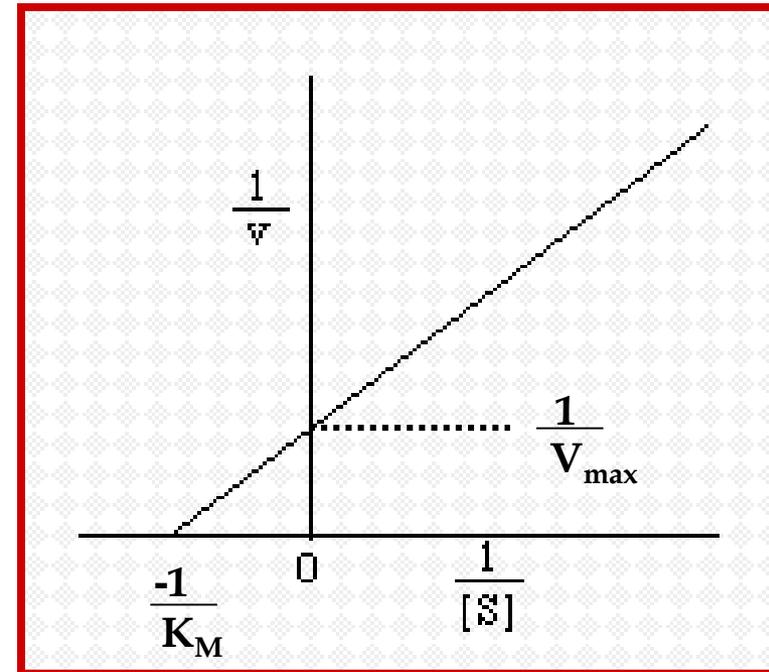
Eq. di Michaelis-Menten

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

eq.7

Eq. di Lineweaver-Burk

- Nel grafico di Lineweaver-Burk, la retta taglia l'asse Y al valore di $1/V_{\max}$ e taglia l'asse X valore di $-1/K_M$
- Si possono quindi derivare sia V_{\max} che K_m con precisione



Efficienza catalitica - k_{cat}

▶ Alle condizioni iniziali, V_{max} dipende da più fattori



- es. le velocità con quale si forma (k_1) o si disfa (k_2) ES, o con quale reagisce per formare P (k_3)
- per enzimi 'michaelissiani', in **condizioni di saturazione** ($[S] \gg K_M$), V_{max} può essere derivata da una sola costante k_{cat} che li raduna, nota come **costante catalitica**
- in queste condizioni $[ES] \rightarrow [E]^{tot}$ quindi $V_{max} = k_{cat}[E]^{tot}$ da cui deriva che $k_{cat} = V_{max} / [E]^{tot}$
- k_{cat} è noto anche come il '**numero di turnover**' dell'enzima (**numero massimo di molecole S convertite per unità di tempo**) ed è una misura della sua **efficienza catalitica**
- il rapporto k_{cat}/K_M consente invece di comparare direttamente l'**efficienza** dell'enzima rispetto a **diversi substrati in condizioni non-saturanti** ($[S] \ll K_M$):

eq. di M-M: $v_0 = V_{max}[S]/(K_M+S)$ ma $(K_M+S) \rightarrow K_M$ e quindi $v_0 \approx \frac{k_{cat}[E]^{tot}[S]}{K_M}$

- **esempio:** la chimotripsina taglia selettivamente dopo residui (Yaa) grandi ed idrofobici (-Xaa-**Yaa**-Xaa-Xaa-)

| | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) |
|-----|----------------------------------|
| Phe | 1×10^5 |
| Val | 3.6×10^2 |
| Gly | 1.3×10^{-1} |

Effetto dell'affinità per il substrato e della efficienza di catalisi

► Possiamo considerare diversi casi dove variano affinità di legame ed efficienza catalitica

- **CASO 1:** l'efficienza della catalisi non è elevata, quindi $k_1, k_2 \gg k_3$

$$K_M = (k_2 + k_3)/k_1 \quad \text{ma} \quad (k_2 + k_3) \approx k_2 \quad \text{e quindi} \quad K_M \approx k_2/k_1 \equiv K_D$$

- associazione e dissociazione sono i passi limitanti (K_M domina il rapporto k_{cat}/K_M)

- **CASO 2:** l'efficienza della catalisi è molto elevata, quindi $k_2 \ll k_3$ quindi $K_M \approx k_3/k_1$

- in condizioni subsaturanti $[S] < K_M$ e $[ES] \ll [E]^{\text{libero}}$ quindi $[E]^{\text{libero}} \approx [E]^{\text{tot}}$

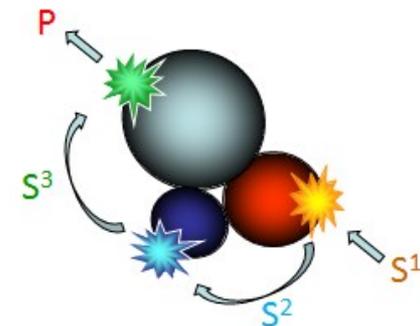
- combinando eq.1 ($v_0 = k_3[ES]$) e eq. 3 ($[ES] = [E][S]/K_M$) abbiamo $v_0 = k_3[E][S]/K_M$ quindi

$$v_0 \approx k_3 [E]^{\text{tot}}[S]/K_M \approx \frac{k_3}{k_3/k_1} [E]^{\text{tot}}[S] \quad \text{quindi} \quad v_0 = k_1 [E]^{\text{tot}}[S]$$

- per un enzima cataliticamente molto efficiente **P si forma subito dopo che si forma ES**

- la velocità di reazione è **limitata dalla velocità di diffusione** di S all'enzima ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in soluzioni acquose) e si dice che l'enzima abbia raggiunto la **perfezione catalitica**

- La velocità di diffusione può essere superata in complessi enzimatici multifunzionali



Effetto dell'affinità per il substrato e della efficienza di catalisi

► Possiamo considerare diversi casi dove variano affinità di legame ed efficienza catalitica

- **CASO 1:** l'efficienza della catalisi non è elevata, quindi $k_1, k_2 \gg k_3$

$$K_M = (k_2 + k_3)/k_1 \quad \text{ma} \quad (k_2 + k_3) \approx k_2 \quad \text{e quindi} \quad K_M \approx k_2/k_1 \equiv K_D$$

- **associazione e dissociazione sono i passi limitanti** (K_M domina il rapporto k_{cat}/K_M)

- **CASO 2:** l'efficienza della catalisi è molto elevata, quindi $k_2 \ll k_3$ quindi $K_M \approx k_3/k_1$

- in condizioni subsaturanti $[S] < K_M$ e $[ES] \ll [E]^{\text{libero}}$ quindi $[E]^{\text{libero}} \approx [E]^{\text{tot}}$

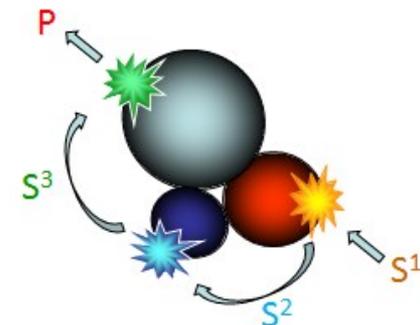
- combinando **eq.1** ($v_0 = k_3[ES]$) e **eq. 3** ($[ES] = [E][S]/K_M$) abbiamo $v_0 = k_3[E][S]/K_M$ quindi

$$v_0 \approx k_3 [E]^{\text{tot}}[S]/K_M \approx \frac{k_3}{k_3/k_1} [E]^{\text{tot}}[S] \quad \text{quindi} \quad v_0 = k_1 [E]^{\text{tot}}[S]$$

- per un enzima cataliticamente molto efficiente **P si forma subito dopo che si forma ES**

- la velocità di reazione è **limitata dalla velocità di diffusione** di S all'enzima ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in soluzioni acquose) e si dice che l'enzima abbia raggiunto la **perfezione catalitica**

- La velocità di diffusione può essere superata in complessi enzimatici multifunzionali



ATTIVITÀ ENZIMATICA

► L'attività dell'enzima (E) è una misura della sua capacità di promuovere la trasformazione di substrato/i in prodotto/i

- sono utilizzate diverse misure dell'attività:

IU (International Unit): 1 IU = quantità di enzima che promuove la **trasformazione di 1 μ mole di S in 1 min.** (in condizioni definite di T, pH, diluizione)

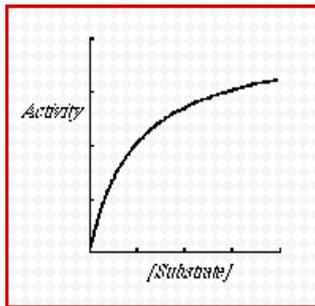
attività specifica: IU/mg di proteina (in condizioni definite)

katal (SI): kat = mol/sec (normalmente espresso in **nkatal**) 1kat = 1mol/sec

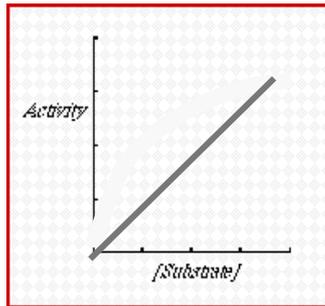
N° di turnover: k_{cat} = moli di S trasformati per minuto per moli di enzima

k_{cat} è il valore limite quando k_3 domina e $v \rightarrow V_{max}$

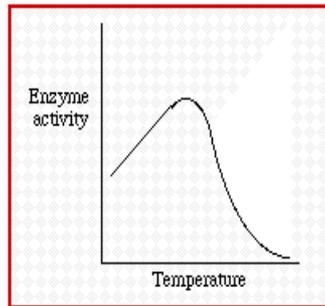
► Fattori che influiscono sull'attività enzimatica



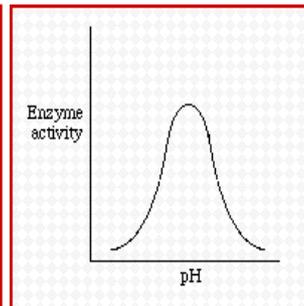
[S]



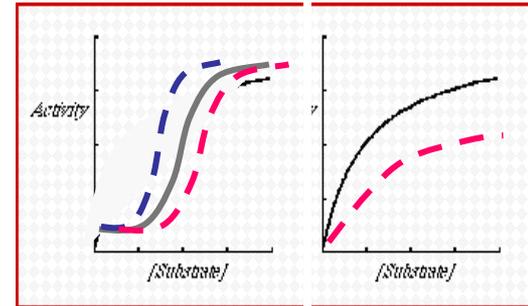
[E]



Temp.



pH

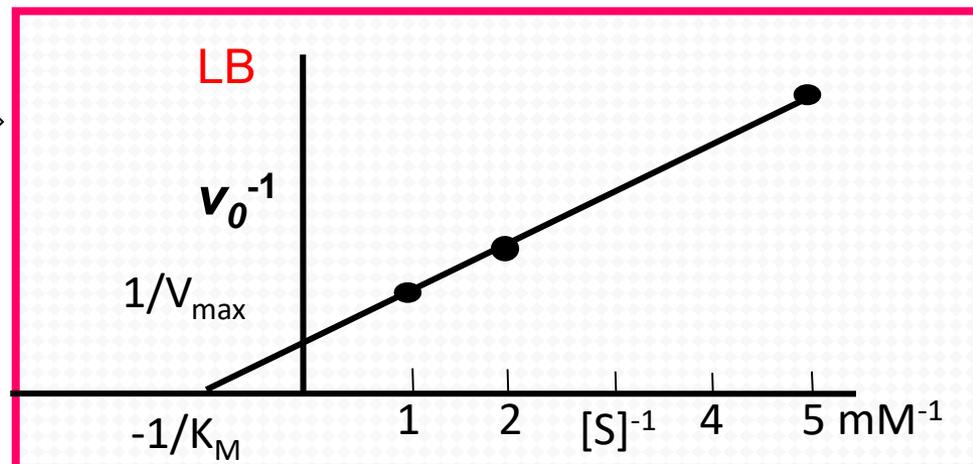
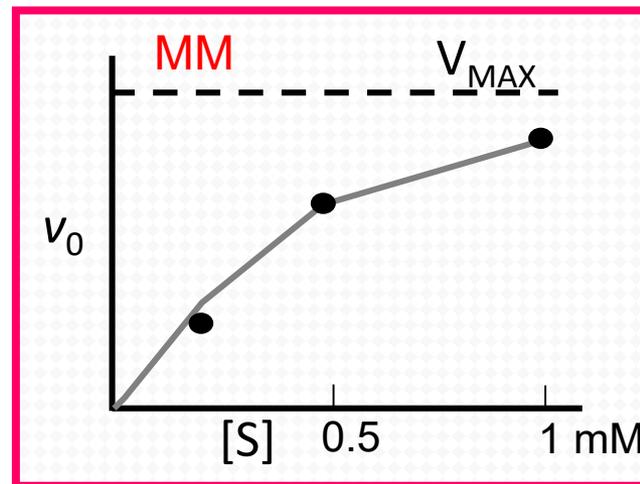
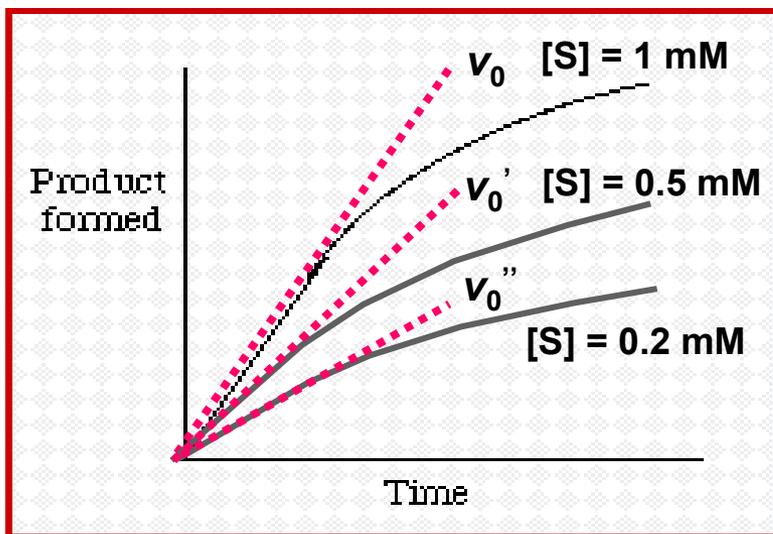


attivatori/inibitori

Saggi di attività enzimatica

► Per determinare la velocità di reazione in presenza di un enzima:

- è necessario misurare la variazione di un determinato parametro correlato con $[S]$ o con $[P]$ (es. assorbanza, fluorescenza, variazione nella massa, radioattività ecc) con il tempo
- dalle curve $d[S]/dt$ o $d[P]/dt$ si determina la **velocità iniziale (v_0)**, alle **condizioni iniziali** e di **stato stazionario** di ES



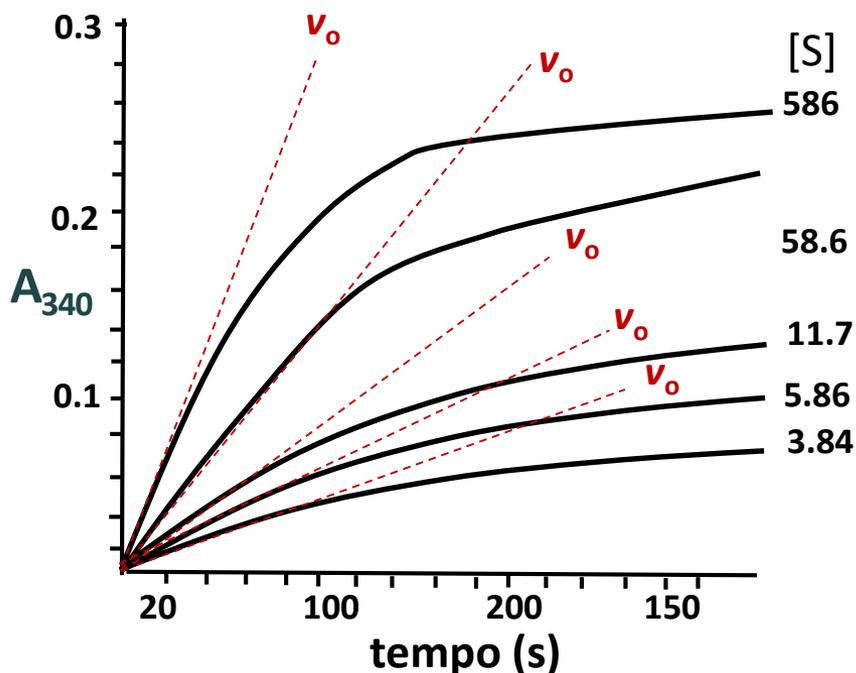
- da v_0 si determina la curva di M-M, o meglio la retta di L-B che permette di determinare direttamente V_{max} e K_M

Saggi di attività enzimatica - esempio

- Dai dati forniti per la reazione dell'*alcol deidrogenasi (AD)*, determinare il V_{\max} e K_M usando il metodo di Lineweaver-Burk



- questa reazione utilizza il coenzima stechiometrico NAD come navetta per il potenziale riduttivo ($\text{H}^+ + 2\text{e}^-$). Il co-prodotto NADH (ma non NAD^+) assorbe luce a 340nm
- $[\text{NADH}] = [\text{P}]$ e $A_{340} = \epsilon cl$ quindi $A_{340} \propto [\text{P}]$
- $A_{340} = \epsilon \times [\text{NADH}] \times l$ $dA/dt \propto d[\text{NADH}]/dt \propto v$

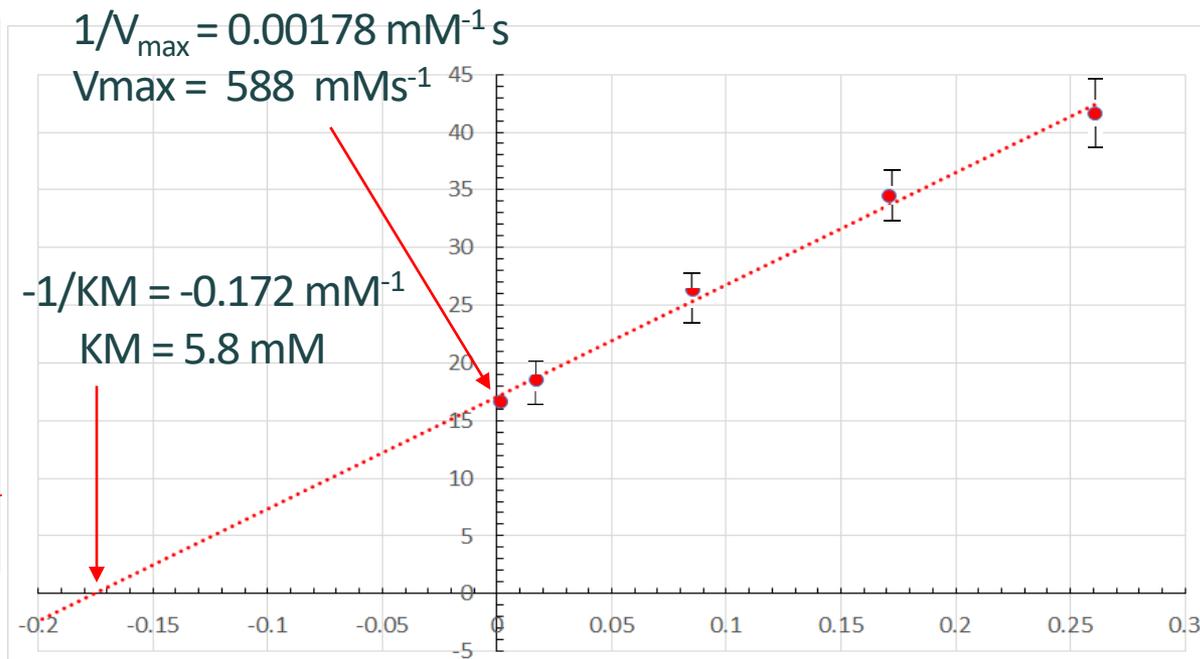


| $[S]$ (mM) | $[S]^{-1}$ (mM ⁻¹) | V_0 (mMs ⁻¹) | V_0^{-1} (mM ⁻¹ s) |
|---------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 586 | 0.0017 | 0.06 | 16.8 |
| 58.6 | 0.017 | 0.054 | 18.5 |
| 11.7 | 0.086 | 0.035 | 28.2 |
| 5.86 | 0.17 | 0.029 | 39.0 |
| 3.84 | 0.26 | 0.024 | 47.5 |

Saggi di attività enzimatica – esempio (cont.)

- ▶ Ponendo i valori di $[S]^{-1}$ (x) e v_0^{-1} (y) su un grafico cartesiano si ottiene la retta di Lineweaver-Burk

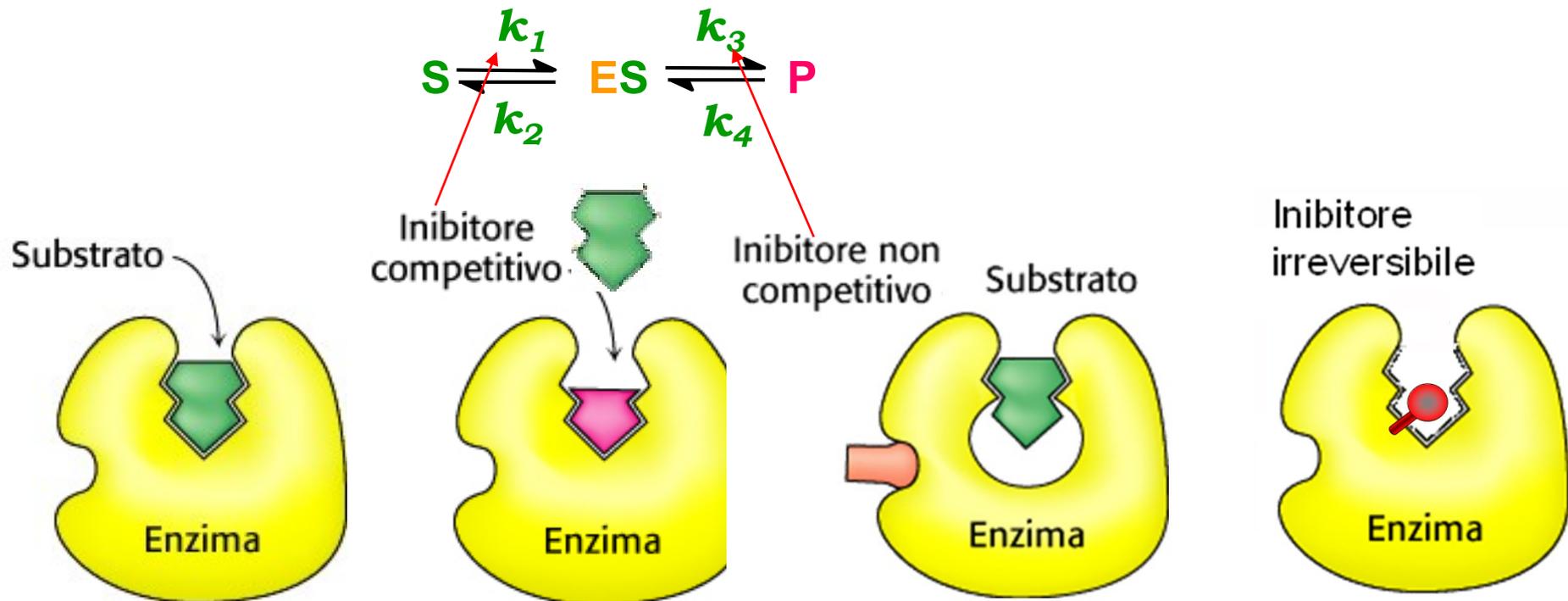
| $[S]$ (mM) | $[S]^{-1}$ (mM ⁻¹) | v_0 (mMs ⁻¹) | v_0^{-1} (mM ⁻¹ s) |
|---------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 585 | 0.0017 | 0.06 | 16.8 |
| 58.6 | 0.017 | 0.054 | 18.5 |
| 11.7 | 0.086 | 0.035 | 28.2 |
| 5.86 | 0.17 | 0.029 | 39.0 |
| 3.84 | 0.26 | 0.024 | 47.5 |



- **AVVERTENZE**
- imposta il valore degli assi correttamente (considera i valori massimi indipendentemente)
- scegli gli intervalli con criterio (0,2,4,8,10 0,5,10,15 OK 0,3,9,12 o 0,7,14,21 non OK)
- il grafico parte sempre da 0,0 all'origine
- attenzione ! alle unità di misura ! all'ordine di grandezza (es. mM, μM , 10^{-6} M)
- tieni conto del fatto che i dati sperimentali sono soggetti ad errore

INIBIZIONE ENZIMATIVA

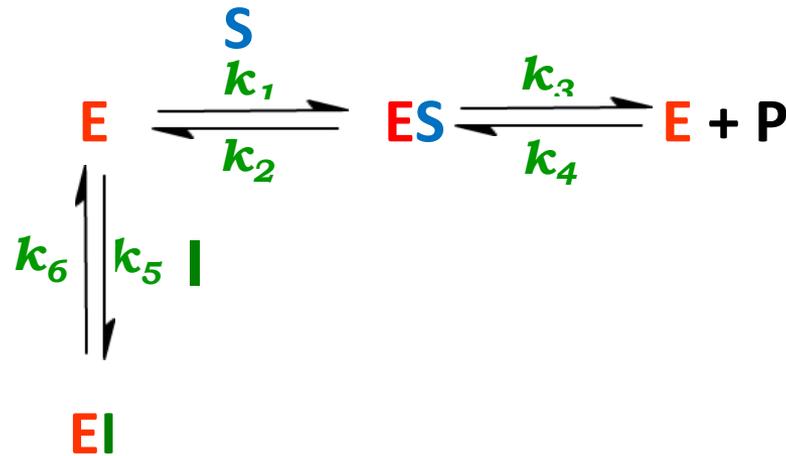
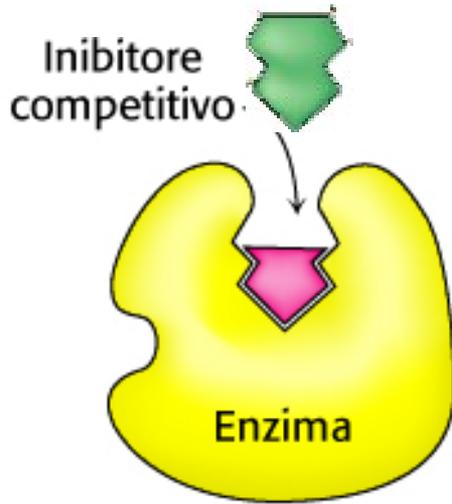
- Gli inibitori riducono l'efficienza della reazione enzimatica. Ce ne sono di diversi tipi:
- **INIBITOR REVERSIBILI** (legano all'enzima mediante legami **non covalenti**) suddivisi in:
 - **Inibitori Competitivi** – legano nel sito di legame del substrato e diminuiscono k_1
 - **Inibitori Noncompetitivi** – legano ad un sito allosterico e diminuiscono k_3 (rari)
 - **Inibitori misti** – legano ad un sito allosterico e diminuiscono sia k_1 che k_3
 - **INIBITOR IRREVERSIBILI** (legano **covalentemente** al sito attivo)



INIBIZIONE COMPETITIVA

► Gli inibitori «competitivi» competono con il substrato per il sito di legame

- Si forma un complesso inibitore/enzima $I + E \rightarrow EI$



- allo stato stazionario:

$$k_5[E][I] = k_6[EI] \quad K_I = k_5/k_6 \quad (\text{M})$$

- nell'*eq.3* $[ES] = [E][S]/K_M$ e analogamente $[EI] = [E][I]/K_I$ *eq.8*

- $[E]^{\text{tot}} = [E] + [ES] + [EI]$ e quindi sostituendo con *eq.3* ed *eq.8* e rielaborando

$$[E] = \frac{K_I K_M [E]^{\text{tot}}}{(K_I K_M + K_I [S] + K_M [I])} \quad \text{eq.9}$$

CINE INIBIZIONE COMPETITIVA (cont.)

► Possiamo ora determinare l'effetto dell'inibizione competitiva sulla velocità di reazione

- usiamo *eq.1* $v = k_3[ES]$, *eq.2* $V_{\max} = k_3[E]^{\text{tot}}$ e *eq.3* $[ES] = [E][S]/K_M$

- troviamo che $v = k_3[E][S]/K_M$ e sostituendo per $[E]$ usando *eq.9*

$$v = \frac{k_3 K_I K_M [E]^{\text{tot}} [S]}{K_M (K_I K_M + K_I [S] + K_M [I])} = \frac{V_{\max} K_I [S]}{(K_I K_M + K_I [S] + K_M [I])}$$

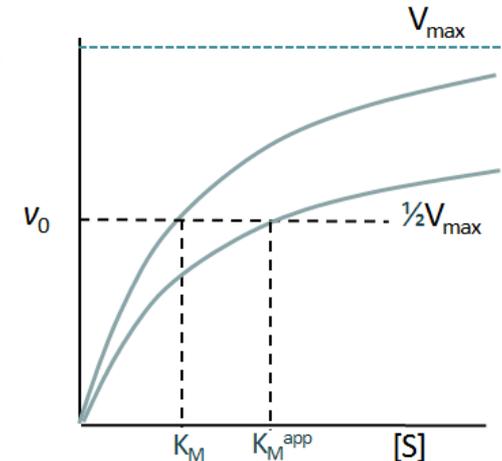
- rielaborando,

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

|-----|
K_M^{app}

- è una variante dell'equazione di M-M con K_M modificata dalla presenza di $[I]$ e tenendo conto del K_I ($K_M \rightarrow K_M^{\text{app}}$)

- a $[S]$ elevata comunque



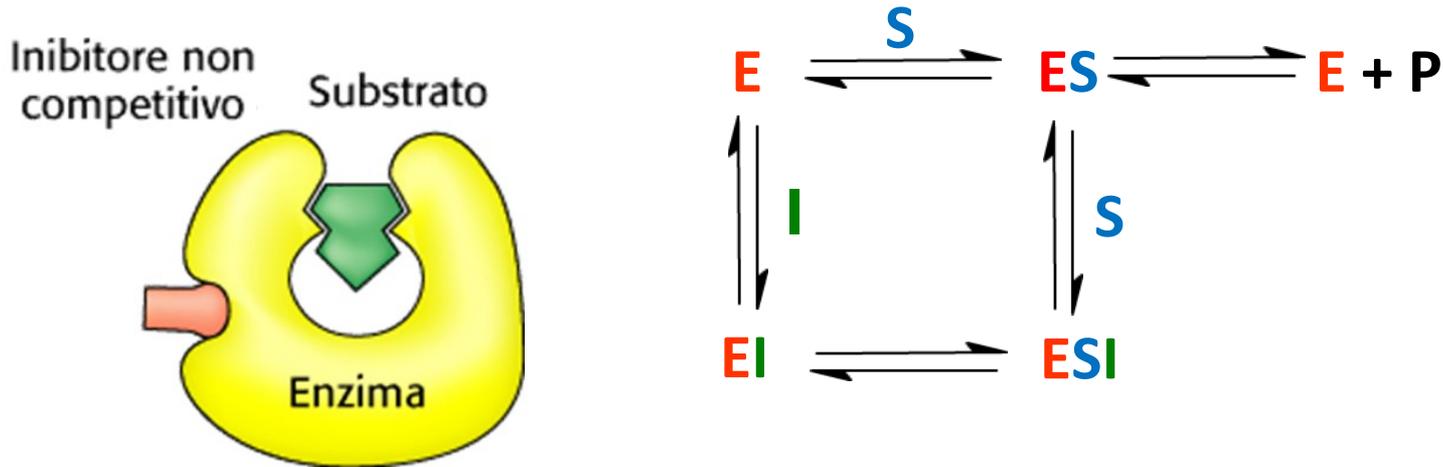
- prendendo l'inverso di v si ottiene la variante dell'equazione di Lineveaver-Burk:

$$v = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M^{\text{app}}}{V_{\max} [S]}$$

INIBIZIONE NON COMPETITIVA

► Questo tipo di inibizione è molto rara ma serve come esempio

- si forma un complesso inibitore/enzima a prescindere della presenza di substrato, poiché l'inibitore lega ad un sito 'allosterico' e non al sito di legame per il substrato
- non ha effetto sull'accesso di S al sito attivo ma diminuisce l'efficienza della catalisi stessa

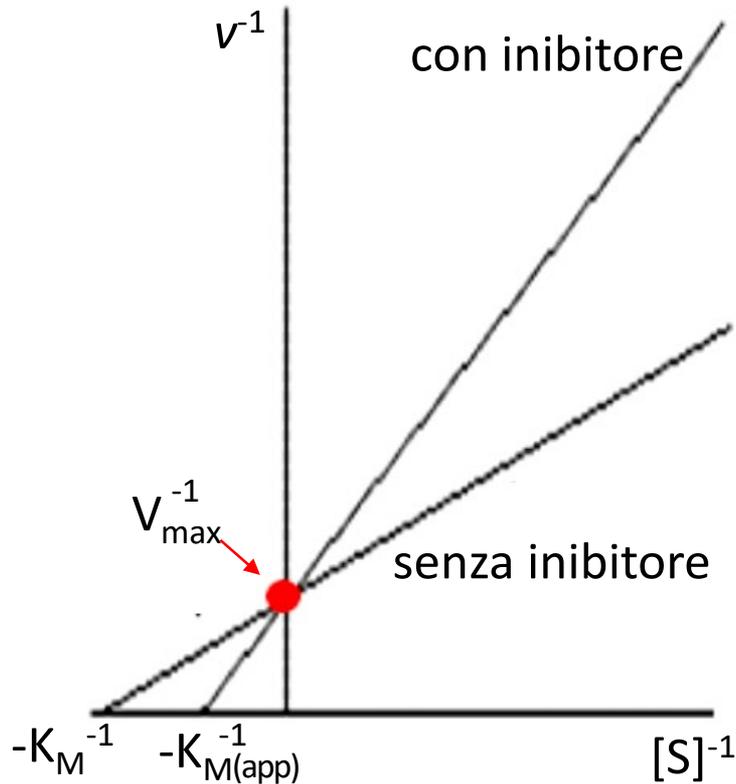


- senza entrare nei dettagli, in questo caso:

$$v = \left[\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \right] \times \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

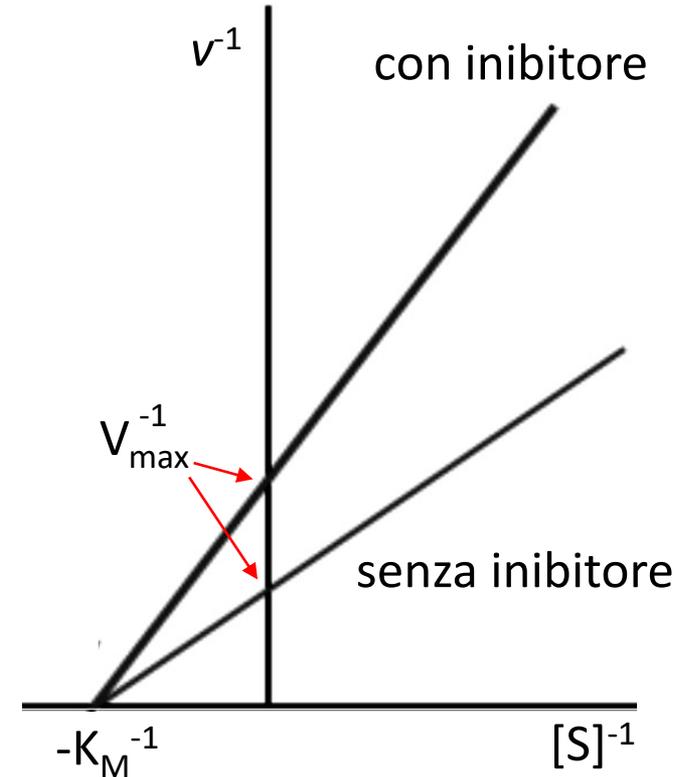
INIBIZIONE COMPETITIVA e NON COMPETITIVA a confronto

INIBIZIONE COMPETITIVA



$$v = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

INIBIZIONE NON COMPETITIVA



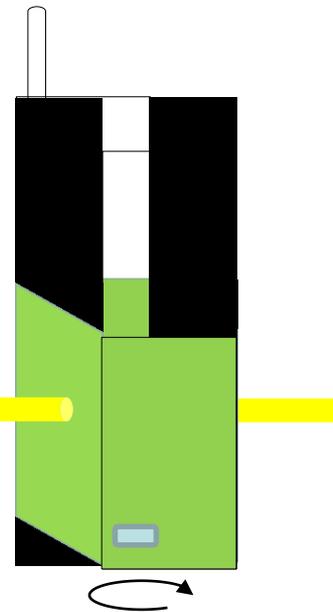
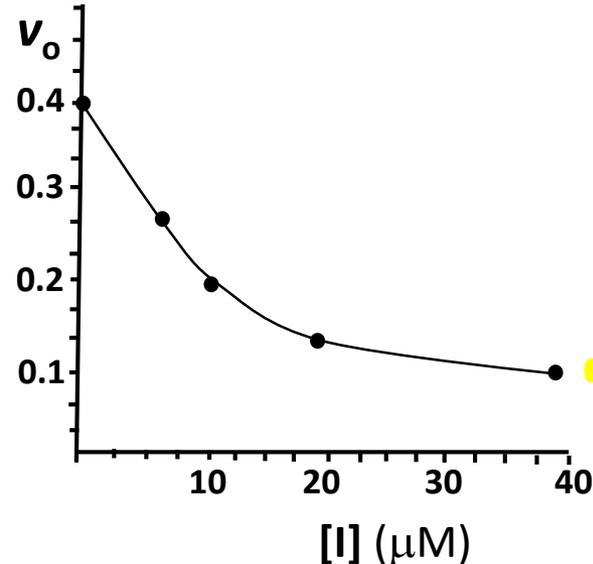
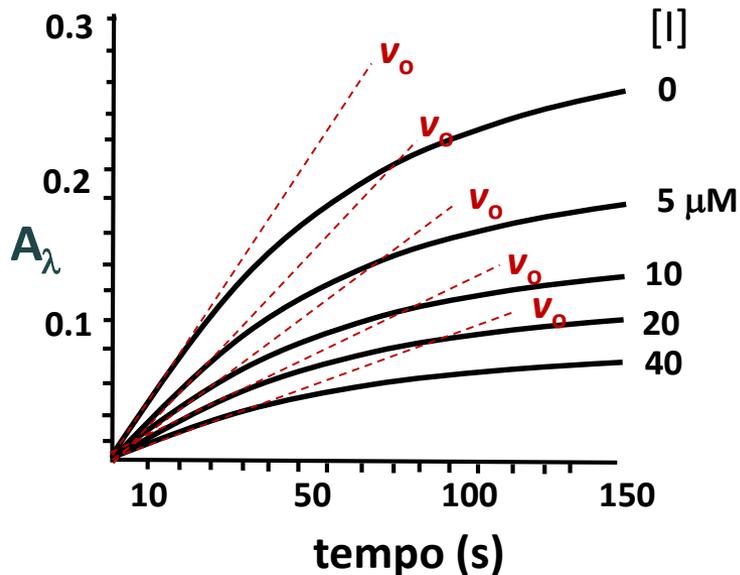
$$v = \left[\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \right] \times \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

- inibizione competitiva: V_{\max} non varia (a $[S]$ sufficientemente elevate I viene spiazzato)
- inibizione non competitiva: K_M non varia poiché I non incide sul sito di legame (raro)

Saggi di inibizione enzimatica

► Per determinare la velocità di reazione catalizzata da un enzima in presenza di un inibitore:

- si decide $[E]$ e si mantiene costante $[S]$ (concentrazione che produce il miglior segnale in tempo utile)
- si varia $[I]$ (preparando la soluzione di $E + I$, e poi aggiungendo S a tempo = 0, mescolando rapidamente)
- si misura la variazione di P nel tempo ($dP/dt = v_o$) monitorando assorbanza o fluorescenza
- questo permette di determinare l' IC_{50} ($[I]$ che dimezza v_o)



- per **inibitori competitivi** che legano strettamente all'enzima, l' IC_{50} è correlato alla costante di inibizione K_i dall'equazione:
$$IC_{50} = \frac{1}{2} [E] + K_i (1 + [S]/K_M)$$
- K_i è universale, IC_{50} è relativo, dipende dalle condizioni e soprattutto da $[E]$

Purificazione di enzimi «assay-guided»

► Il frazionamento procede mediante opportuni metodi di purificazione

- l'enzima si **concentra in una frazione** (aumenta rispetto ad altre proteine)
- si identifica la frazione con saggio enzimatico (es. usando S cromogenico o fluorogenico)
- ogni successivo passaggio di purificazione deve tenere in considerazione i seguenti criteri:

$$1) \text{ Resa} = \frac{\text{attività nella frazione}}{\text{attività estratto originale}} \quad 2) \text{ Grado di purificazione} = \frac{\text{attività specifica frazione}}{\text{attività specifica est. orig.}}$$

$$3) \text{ Attività specifica} = \frac{\text{UI frazione}}{\text{quantità di enzima nella frazione}}$$

Esempio

| Passaggio | Proteina tot. (mg) | Attività tot. (nmol/min) | Attività specifica (mmol min ⁻¹)/mg | Grado purific. | Resa (%) (attività) |
|---|--------------------|--------------------------|---|----------------|---------------------|
| Estratto (siero) | 6420 | 7200 | 1.1 | 1 | 100 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2750 | 6120 | 2.2 | 2 | 85 |
| IEX-HPLC | 54 | 3483 | 64.5 | 54 | 48 |
| HIC-HPLC | 8.5 | 2665 | 313.5 | 285 | 37 |
| SEC-HPLC | 1.7 | 1524 | 896 | 814 | 21 |
| RP-HPLC | 0.029 | 376 | 12965 | 11786 | 5.2 |

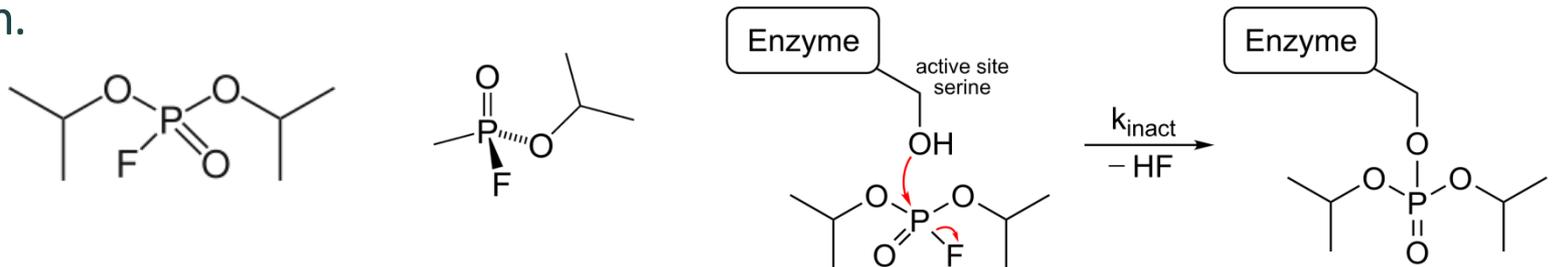
INIBIZIONE IRREVERSIBILE

► Gli inibitori irreversibili legano covalentemente e permanentemente al sito attivo

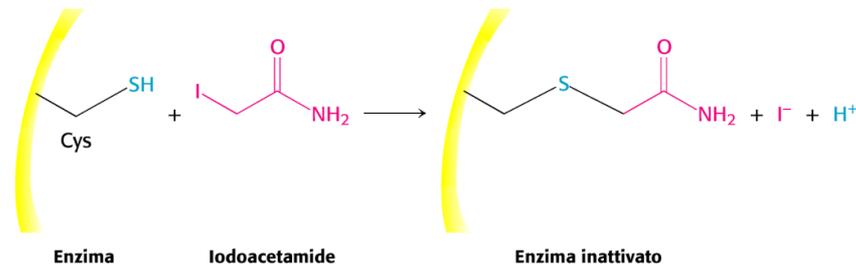
- sono di tre tipi; 1) reagenti gruppo specifici, 2) analoghi del substrato e 3) inibitori a suicidio (basati sul meccanismo)

1) reagenti gruppo specifici: contengono gruppi reattivi elettrofili che reagiscono con gruppi nucleofili di residui nel sito attivi (tipicamente –OH in Ser, Tyr, Thr o –SH in Cys)

- Il diisopropilfluorofosfato (DIPF) è una neurotossina che si lega al gruppo –OH della serina catalitica in enzimi come la *chimotripsina* e *acetilcolinesterasi* ed assomiglia al gas nervino Sarin.



- La iodoacetamide reagisce con residui di cisteina essenziali per la catalisi

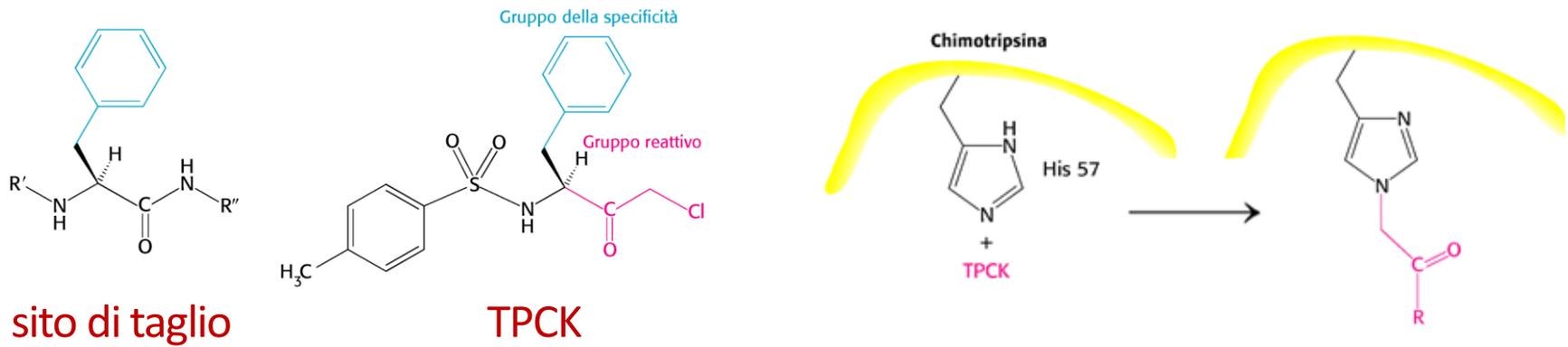


INIBIZIONE IRREVERSIBILE (cont.)

2) **Analoghi del substrato:** sono molecole che **mimano i substrati naturali**, entrano nel sito attivo e poi si legano covalentemente ad un residuo del sito catalitico

- **tosil-L-fenilalanina clorometil chetone (TPCK)** è un analogo del sito di taglio peptidico della chimotripsina

- reagisce irreversibilmente con un residuo di His inibendo l'enzima chimotripsina.



3) **Inibitori a suicidio:** l'inibitore si lega nel sito attivo **dove viene modificato dall'enzima per produrre un gruppo reattivo** che poi forma un legame irreversibilmente

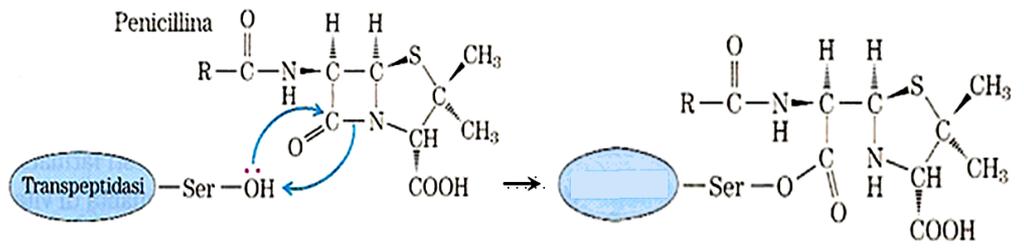
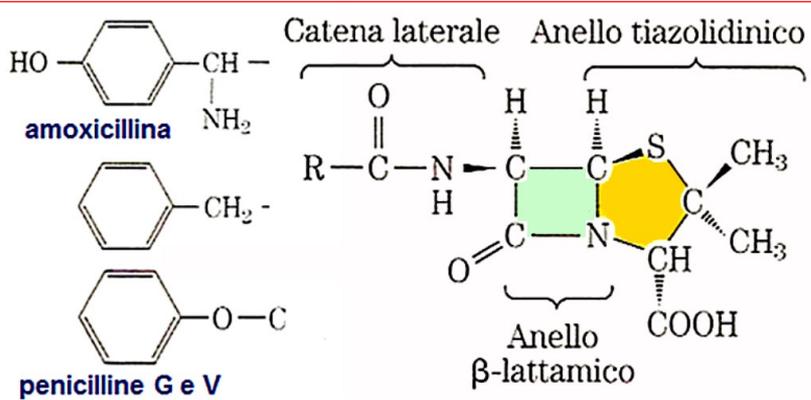
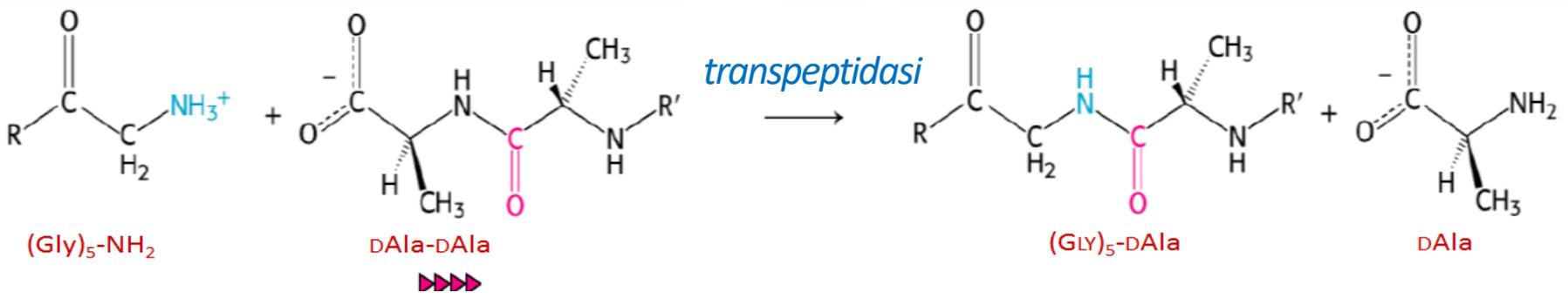
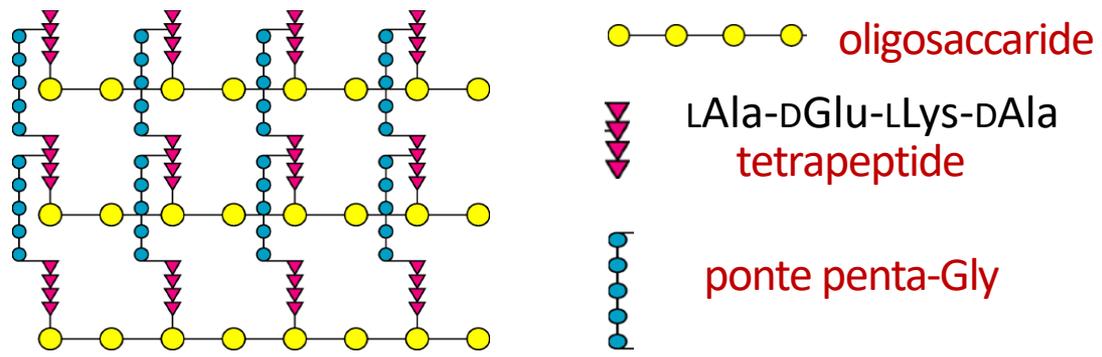
- è nota anche come inibizione «*mechanism-based*» poiché sfrutta il meccanismo catalitico per produrre il gruppo reattivo che poi lega irreversibilmente

- la **penicillina** ne è un buon esempio

INIBIZIONE IRREVERSIBILE – Penicillina

► La penicillina inattiva irreversibilmente un enzima chiave nella sintesi della parete batterica.

(vedi Modulo 5B – strategie catalitiche scheda 13)



INIBIZIONE IRREVERSIBILE – Penicillina (cont.)

- ▶ I batteri hanno presto sviluppato le β -lattamasi, che utilizzano lo stesso meccanismo per inattivare gli antibiotici β -lattamici
- sono una classe di vari enzimi prodotti da batteri che **rompono l'anello beta-lattamico**
- alcune β -lattamasi sono codificate da geni sui cromosomi batterici, altri sono codificate su elementi genetici mobili (plasmidi)

