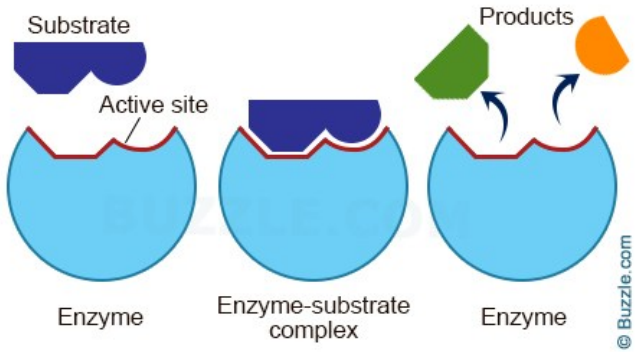


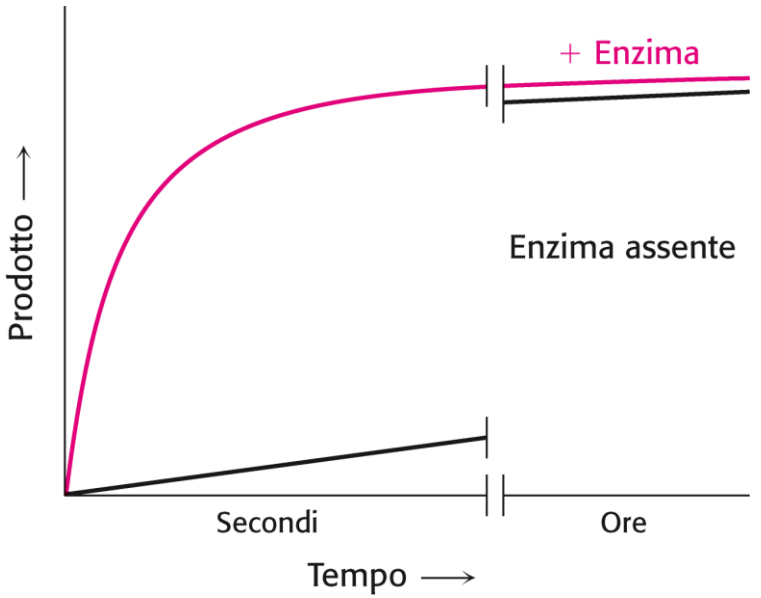
Modulo 4: Gli enzimi

CdS in Medicina e chirurgia ,

Odontoiatria e protesi dentaria 2025-26

Gli enzimi: catalizzatori biologici

- Gli enzimi sono i catalizzatori biologici essenziali per la vita, capaci di orchestrare migliaia di reazioni metaboliche simultanee in condizioni fisiologiche.
- Natura Chimica: Sono quasi esclusivamente proteine (con l'eccezione dei ribozimi, molecole di RNA con attività catalitica).
- Condizioni di reazione: Operano in "condizioni blande" (pH neutro, temperatura corporea di 37°C e pressione atmosferica), dove le reazioni non catalizzate sarebbero troppo lente per sostenere la vita.



Velocità (comparsa di prodotto/tempo) di una reazione catalizzata e non catalizzata

- Ruolo nel Metabolismo: Funzionano come "valvole" che controllano il flusso delle vie biochimiche, regolando le attività cellulari in risposta alle necessità contingenti dell'organismo.

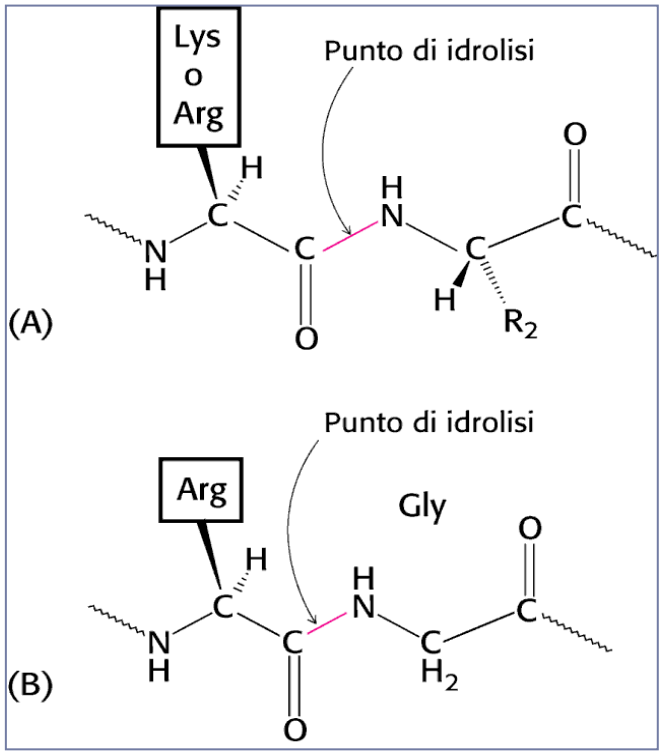
Efficienza e Specificità della Catalisi

Le tre proprietà cardine che distinguono gli enzimi dai catalizzatori inorganici sono:

Potere catalitico: accelerano le reazioni chimiche di 10^6 - 10^{12} volte.
Eempio: l'anidrasi carbonica idrata 10^6 molecole/sec di CO_2 rendendo il processo 10^7 volte più rapido il processo.

Specificità: sono selettivi sia per il tipo di reazione che per il substrato (reagente). Il riconoscimento molecolare avviene nel sito attivo tramite interazioni deboli e precise. Resa: Elevatissima (> 95%), senza produzione di sottoprodotti tossici.

Regolazione: A differenza dei catalizzatori chimici, l'attività enzimatica è finemente controllata: controllo della quantità: modifica dell'espressione genica (sintesi/degradazione); controllo dell'attività: interazione con attivatori o inibitori e modifiche post-traduzionali (es. fosforilazione).



Es. specificità: (A) La tripsina taglia la catena solo in corrispondenza del lato C di arginina o lisina (B) La trombina idrolizza solo legami Arginina-glicina.

Classificazione degli enzimi

Gli enzimi sono suddivisi in 6 classi principali in base al tipo di reazione chimica catalizzata:

Ossidoreduttasi: reazioni di ossidoriduzione. Es.: deidrogenasi, ossidoreduttasi, ossidasi …

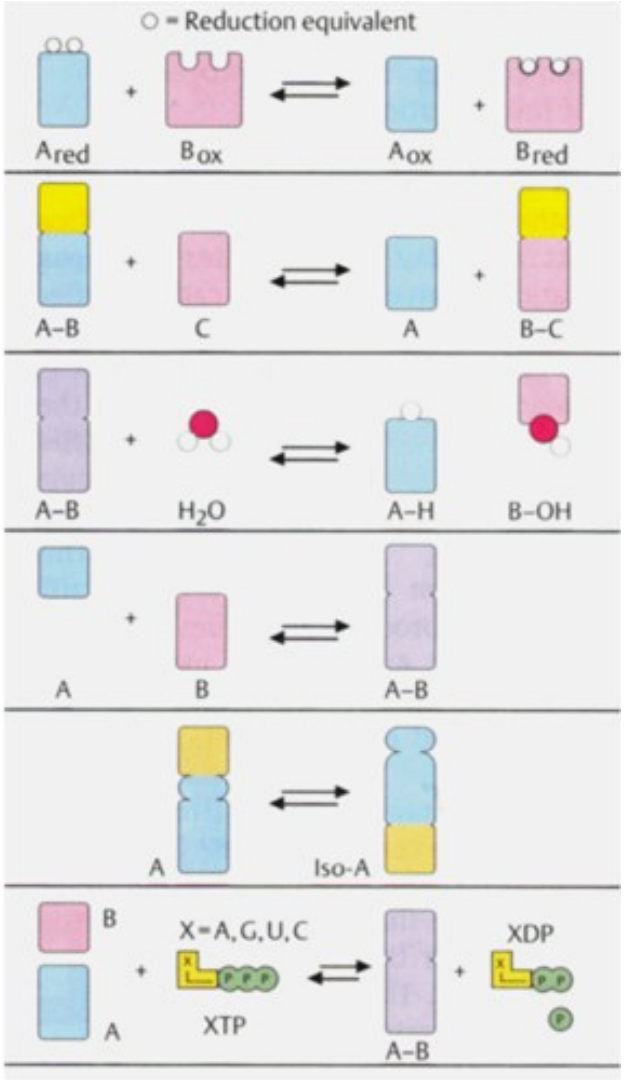
Transferasi: trasferimento di gruppi funzionali. Esempi: acetiltransferasi, metilasi, chinasi (P) …

Idrolasi: rottura di legami tramite aggiunta di H_20. Esempi: proteasi, nucleasi, lipasi, fosfatasi …

Liasi: formazione di legami C-C C-O C-S e C-N o loro rottura con meccanismo diverso dall'idrolisi. Esempi: decarbossilasi, deidratasi, aldolasi, anidrasi carbonica …

Isomerasi: trasferimento di gruppi all'interno della stessa molecola. Esempi: isomerasi, mutasi.

Ligasi (Sintetasi) Formazione di legami C-C, C-O, C-S, C-N accoppiata all'utilizzo dell'ATP. Esempi: DNA ligasi, polimerasi, carbossilasi, sintetasi etc



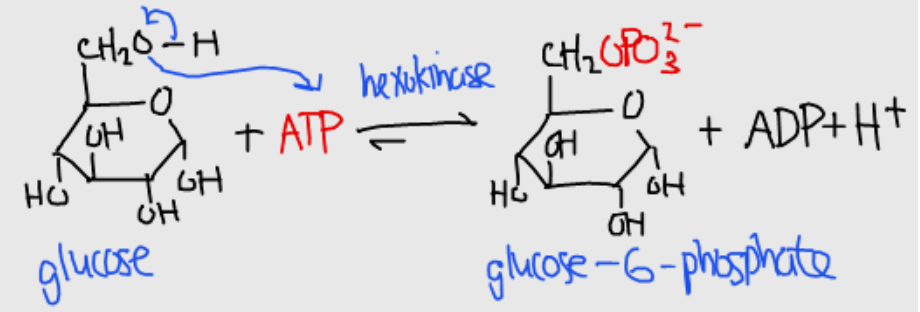
Nomenclatura degli enzimi

Per evitare ambiguità, ogni enzima è identificato da un nome sistematico e da un codice numerico univoco: il numero E.C. (enzyme commission)
Il codice E.C. È composto da **4 cifre** separate da punti, che descrivono la reazione con precisione crescente.
Esempio: **Glucosio + ATP → glucosio-6-P + ADP E.C. 2.7.1.1**

codice E.C. 2.7.1.1
- 2 (Classe): Transferasi
- 7 (Sottoclasse): Trasferimento di gruppi P (chinasi)
- 1 (sotto-sottoclasse): I gruppo accettore è un ossidrile (OH-)
- 1 (numero seriale) : Isdentifica spcecificatamente l'enzima (esochinasi)

Il sistema IUBMB distingue tra il nome sistematico (rigore chimico) dall'uso pratico:

- *Nome sistematico*: nome substrato(i) + tipo di reazione + suffisso – asi
  Esempio: ATP:D-esoso-6-fosfotransferasi
- *Nome comune:*
  Esempio: Esochinasi

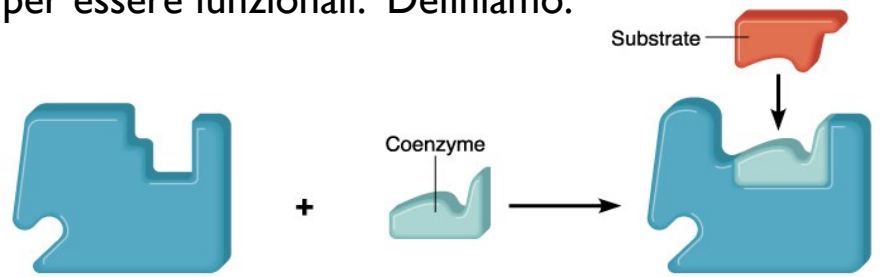


I cofattori: i partner di catalisi

Molti enzimi richiedono componenti non proteiche per essere funzionali. Definiamo:

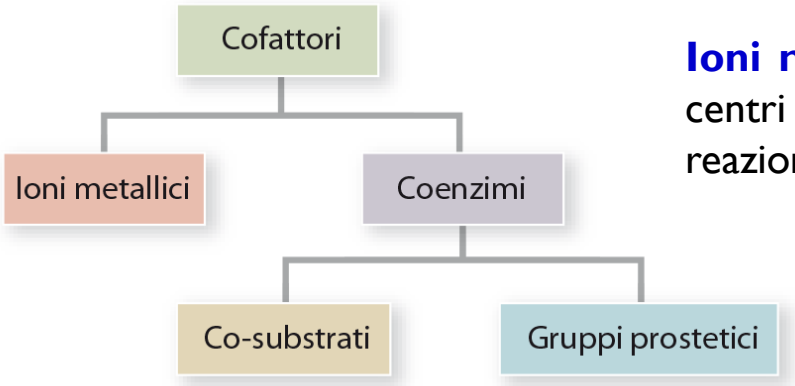
•Apoenzima: La parte proteica (inattiva).

•Oloenzima: Il complesso cataliticamente attivo (Apoenzima + Cofattore).



Apoenzima (forma inattiva) + Cofattore → oloenzima (forma attiva)

I cofattori si dividono in due categorie basate sulla loro natura chimica:



Ioni metallici - Fe^{2+} Mg^{2+} Zn^{2+} Cu^{2+} Possono fungere da centri elettrofili, stabilizzare cariche negative o partecipare a reazioni di ossidoriduzione. Es: Lo Zn^{2+} nell'anidrasi carbonica

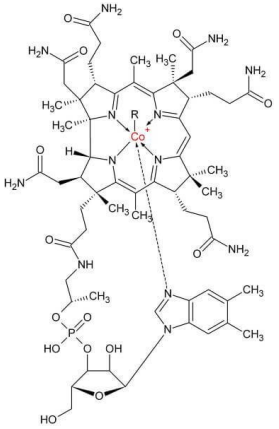
Coenzimi: molecole organiche complesse si distinguono per i tipo di legame con l enzima: in soluzione (cosubstrati) o legate all'enzima (gruppi prostetici).

Cosubstrati: si legano in modo debole e transitorio. Vengono modificati durante la reazione e poi rilasciati per essere rigenerati da un altro enzima (es. NAD, Coenzima A).

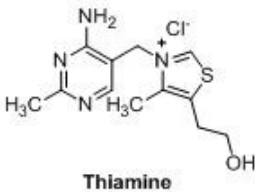
Gruppi Prostetici: sono legati saldamente (spesso covalentemente) all'apoenzima in modo permanente. Non lasciano mai il sito attivo (es. Eme, FAD, Biotina).

Coenzimi: trasportatori di gruppi chimici e derivati dalle vitamine idrosolubili

È fondamentale ricordare che la maggior parte dei coenzimi deriva dalle vitamine idrosolubili del gruppo B. Una carenza vitaminica si traduce clinicamente in una perdita di attività enzimatica

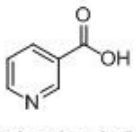


cobalamina (B12)

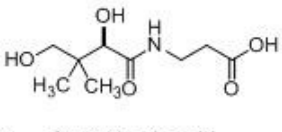


Thiamine

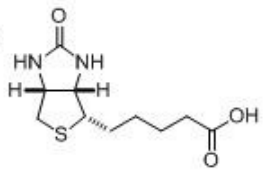
Riboflavin (vitamin B_2)



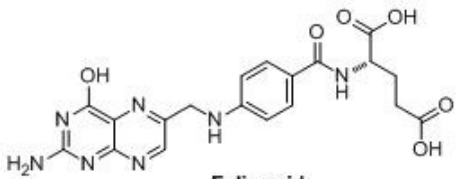
Niacin (vitamin B_3)



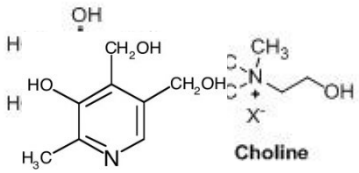
Pantothenic acid (vitamin B_5)



Biotin (vitamin B_7)

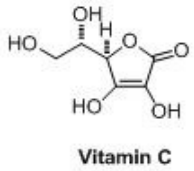


Folic acid



Piridossina (B6)

Choline



Vitamin C

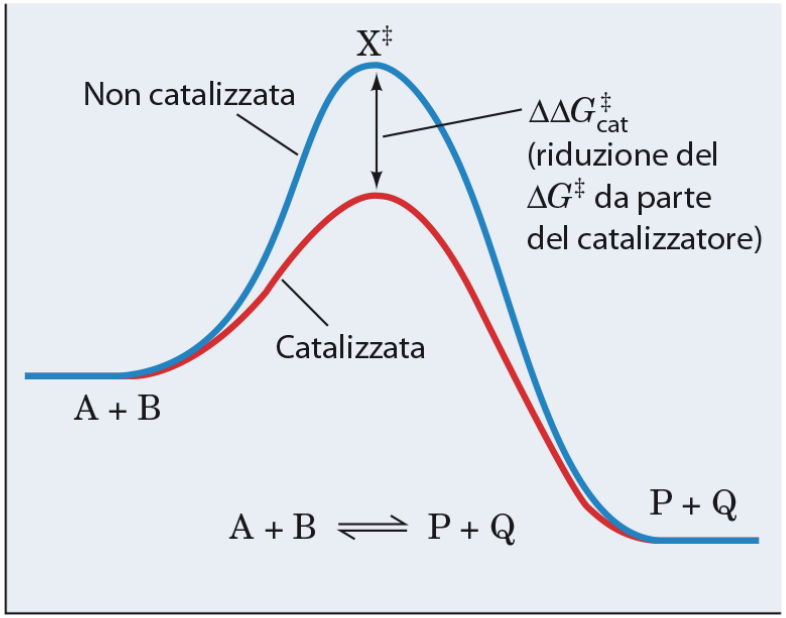
Coenzima	Vitamina da cui derivano	Gruppi trasportati
Tiamina pirofosfato	Tiamina (B1)	C come aldeide
FAD	Riboflavina (B2)	atomi di H
NAD+	Acido nicotinico (B3)	ioni idruro (H-)
Biotina	Biotina (B7)	CO_2
Coenzima A	Acido pantotenico (B5)	acetili/acili
Piridossal fosfato	Piridossina (B6)	gruppi amminici
5'-deossiadenosil-cobalamina	Cobalamina (B12)	metili
Tetraidrofolato	Acido folico (B9)	composti monocarboniosi

Energia di attivazione e stato di transizione

La spontaneità di una reazione (ΔG) indica se essa può avvenire, ma non dice nulla sulla sua velocità.
Una reazione passa attraverso lo **stato di transizione** ($X^{\ddagger}$): struttura molecolare transitoria instabile e non isolabile, in cui i legami chimici sono in fase di rottura/formazione. Rappresenta il "punto di massima energia" del percorso di reazione.

$$A+B \leftrightarrow X^{\ddagger} \rightarrow P+Q$$

$\Delta G^{\ddagger}$ = **energia (libera) di attivazione.** Energia supplementare che le molecole devono possedere per raggiungere lo stato di transizione.



La velocità di una reazione è inversamente proporzionale alla sua $\Delta G^{\ddagger}$
Più alta è la barriera, minore è il numero di molecole che possiedono energia sufficiente per superarla.

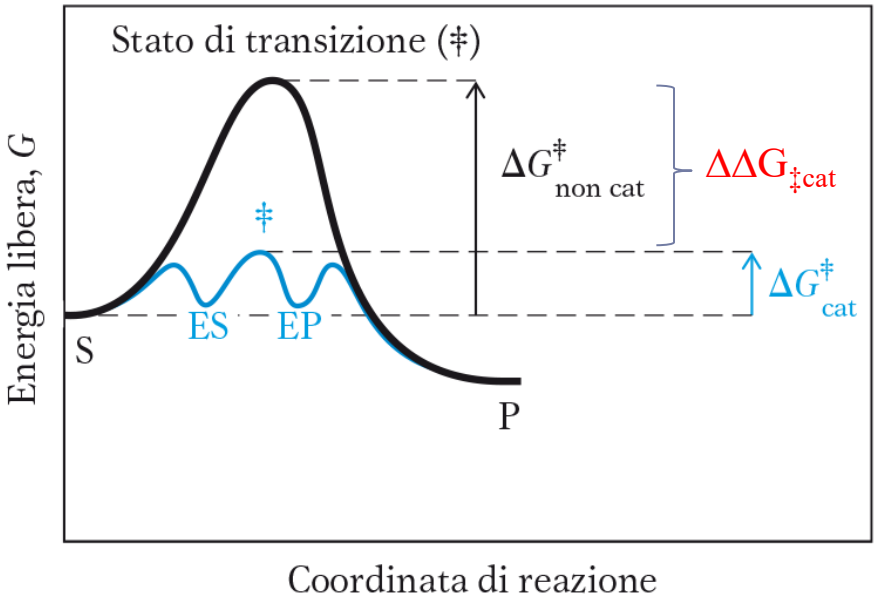
.

Meccanismo d'Azione: Facilitare la Catalisi

Gli enzimi aumentano la velocità di reazione abbassando drasticamente **il valore di** $\Delta G^{\ddagger}$. **(energia di attivazione)** offendo un percorso di reazione alternativo (in azzurro), più favorevole.

Una reazione enzimatica presenta intermedi di reazione ES e EP che, a differenza dello stato di transizione, i complessi Enzima-Substrato (ES) ed Enzima-Prodotto (EP) sono intermedi reali che occupano minimi relativi di energia nella coordinata di reazione. Una reazione enzimatica può essere scritta:

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E+P$$



Potere dell'Abbassamento Energetico $\Delta\Delta G^{\ddagger}$

L'aumento della velocità è esponenziale rispetto alla riduzione della barriera energetica.

Dato Clinico/Biochimico: Una riduzione di soli 5,7 kJ/mol (pari a un legame idrogeno debole) aumenta la velocità di 10 volte.

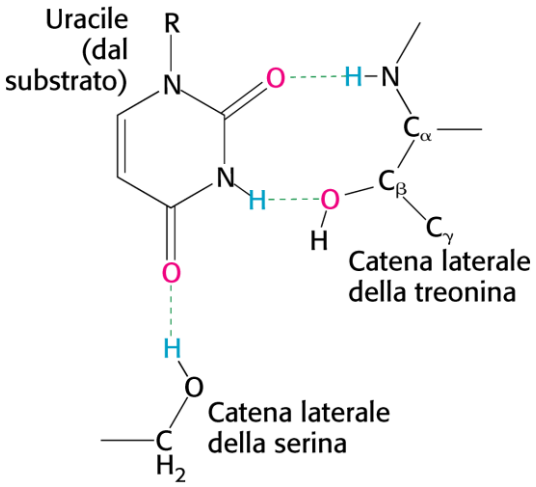
Direzionalità: L'enzima riduce la $\Delta G^{\ddagger}$ in entrambe le direzioni. Un catalizzatore non altera l'equilibrio finale (ΔG della reazione), ma permette di raggiungerlo in tempi molto più brevi.

Il Sito Attivo e la Formazione del Complesso ES

Sito attivo: il "cuore pulsante" dell'enzima, una regione tridimensionale specifica dove avviene il riconoscimento molecolare e la trasformazione chimica.

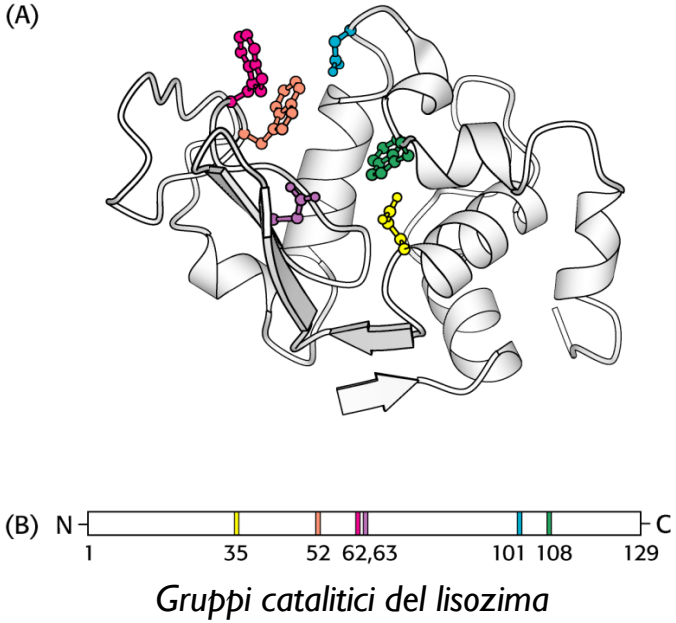
Architettura: zona dell'enzima, Una tasca o solco formato da pochi residui amminoacidici. Sebbene siano distanti nella sequenza primaria, essi si trovano vicini grazie al ripiegamento terziario della proteina.

Contiene gruppi catalitici (catene laterali di AA, ioni metallici o coenzimi) che partecipano direttamente alla rottura e formazione di legami.



Legami H tra Ribonucleasi e uracile, parte della molecola substrato

Le zone esterne al sito attivo servono per la stabilità strutturale, la regolazione e l'interazione con altre molecole.



Gruppi catalitici del lisozima

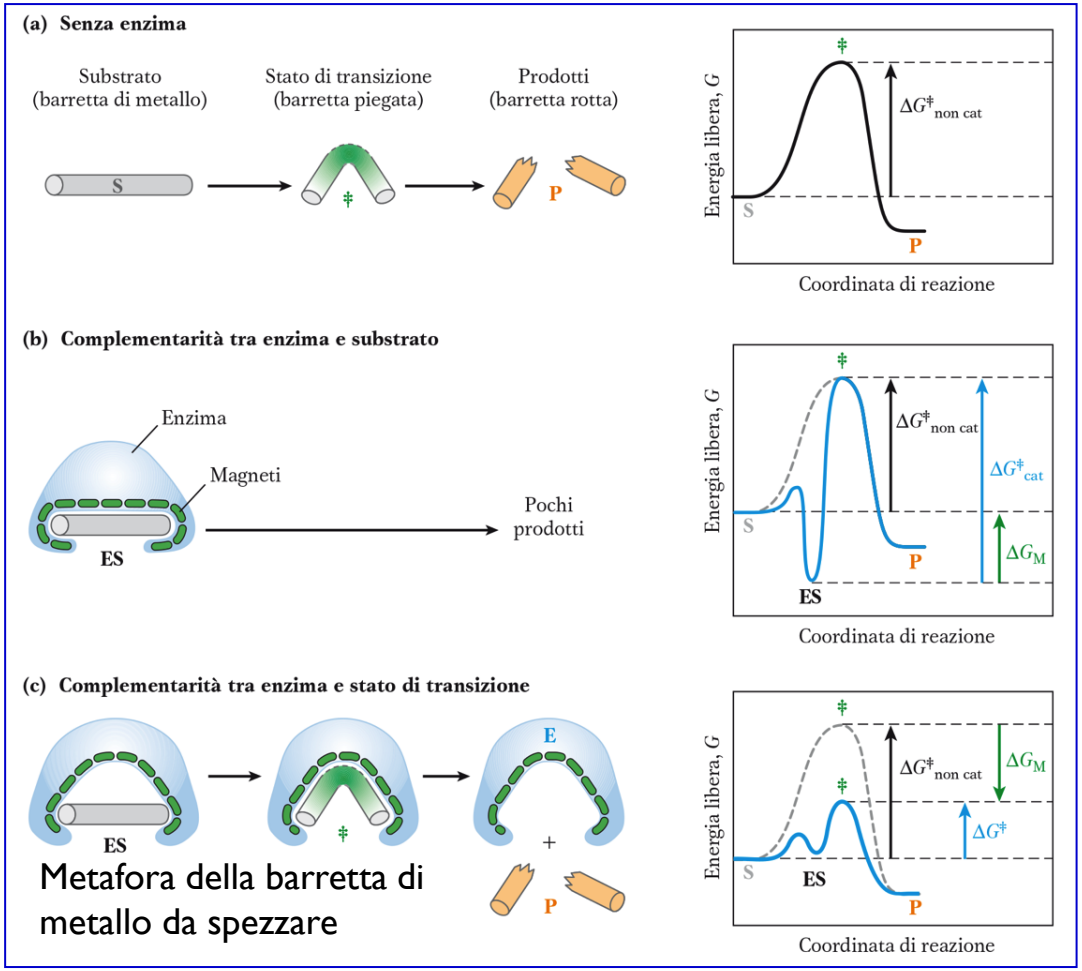
La formazione del complesso tra enzima e substrato ES rilascia energia (interazioni deboli come legami H, van der Waals e idrofobiche). Questa energia è la "moneta" che l'enzima usa per abbassare l'energia di attivazione.

Complementarietà e Stato di Transizione

Il potere catalitico non deriva dalla semplice attrazione per il substrato, ma dalla capacità dell'enzima di "distorcerlo". Se un enzima fosse perfettamente complementare al substrato (modello chiave-serratura), il complesso ES sarebbe troppo stabile ("intrappolato" in un minimo energetico), rendendo difficile il raggiungimento dello stato X‡

In figura: se il sito attivo è complementare alla barretta dritta (S), non la spezzerà. Se il sito attivo è complementare alla barretta piegata (S‡), costringerà la barretta a piegarsi per adattarsi, facilitandone la rottura.

Il sito attivo raggiunge la massima complementarietà solo quando il substrato si trova nello stato di transizione.



L'enzima non è un ricevitore passivo, ma una macchina molecolare che spinge il substrato verso la sua forma più instabile e reattiva.

Le strategie di catalisi: Come l'Enzima abbassa la $\Delta G^{\ddagger}$

Una volta formato il complesso ES, l'enzima utilizza diverse strategie chimiche (spesso simultaneamente) per convertire il substrato in prodotto. I più comuni:

Catalisi Acido-base: Coinvolge il trasferimento di protoni (H+). Gruppi amminoacidici nel sito attivo fungono da acidi (donatori) o basi (accettori) per stabilizzare cariche instabili nello stato di transizione. Spesso l'Istidina, grazie al suo pK vicino alla neutralità, agisce efficacemente in questa strategia.

Catalisi Covalente: I sito attivo contiene un gruppo nucleofilo reattivo che forma un legame covalente transitorio con il substrato. Questo crea un intermedio di reazione più reattivo, "spezzando" la barriera energetica originale in più passaggi più piccoli.

Catalisi da metalli: Gli ioni Zn2+, Fe2+, Mg2+ intervengono in vari modi, possono: orientare correttamente il substrato, e/o stabilizzare cariche negative indotte e/o partecipare a reazioni redox cambiando stato di ossidazione.

Catalisi per prossimità e orientamento: Nelle reazioni con più substrati, l'enzima agisce come un «organizzatore». Prossimità: avvicina le molecole aumentandone la concentrazione locale. Orientamento: Le blocca nella geometria perfetta per l'urto efficace. Da solo, questo effetto può accelerare la reazione di migliaia di volte.

Introduzione alla cinetica enzimatica

La cinetica enzimatica studia la velocità delle reazioni biologiche e i fattori che la influenzano (T, pH, inibitori etc).

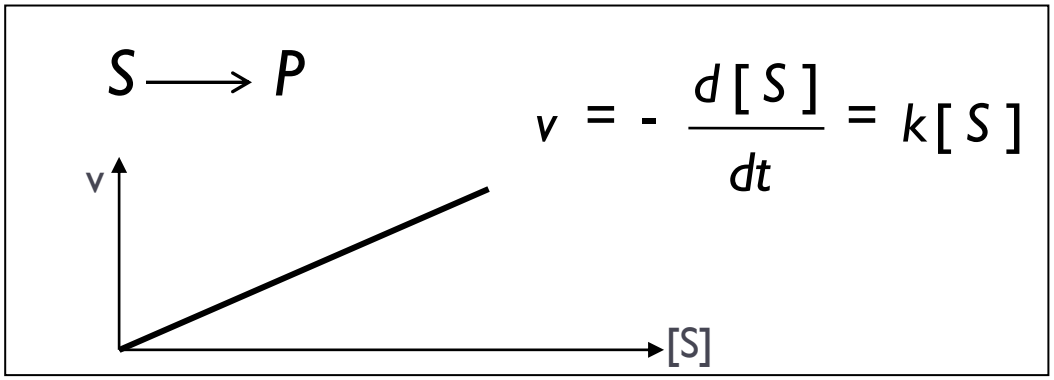
Importanza medica: molte patologie sono causate da deficit enzimatici o alterazioni della velocità metabolica.

Un enzima che non funziona non è solo una reazione lenta; è un « ingorgo metabolico ». Il substrato a monte aumenta pericolosamente, mentre il prodotto a valle viene a mancare, paralizzando la cellula.

Gran parte della farmacologia moderna si basa sul design di molecole che agiscono come inibitori enzimatici per modulare processi patologici.

Confronto tra Reazione Chimica ed Enzimatica

Il comportamento di un enzima si differenzia drasticamente da una semplice reazione chimica per il fenomeno della saturazione.

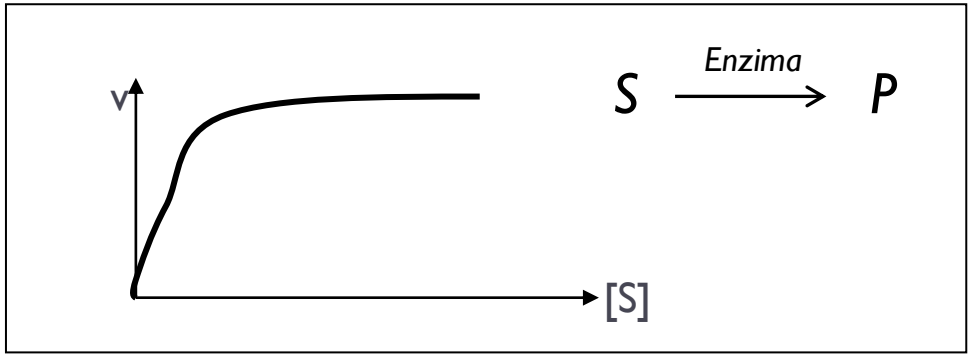


Reazione non catalizzata:

La v di una reazione chimica semplice S →P, è proporzionale a [S].

È una reazione di primo ordine: la velocità aumenta indefinitamente all'aumentare di [S]

Reazione catalizzata da enzima: L'enzima segue un comportamento diverso che si divide in due fasi:
A basse [S] La velocità è proporzionale a [S] (Primo ordine).
Ad alte [S]: La velocità smette di aumentare e tende asintoticamente a una Velocità Massima (Vmax) .



Saturazione: Quando tutti i siti attivi dell'enzima sono occupati dal substrato (complesso ES), l'enzima è "saturo". La velocità diventa indipendente da [S] (Ordine zero).

Curve di progressione di una reazione enzimatica

Descriviamo la relazione tra la velocità di reazione e la concentrazione del substrato.
Consideriamo un modello semplificato con un solo substrato S basato sulla formazione di ES.
La reazione avviene in due stadi governati da costanti di velocità specifiche:

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

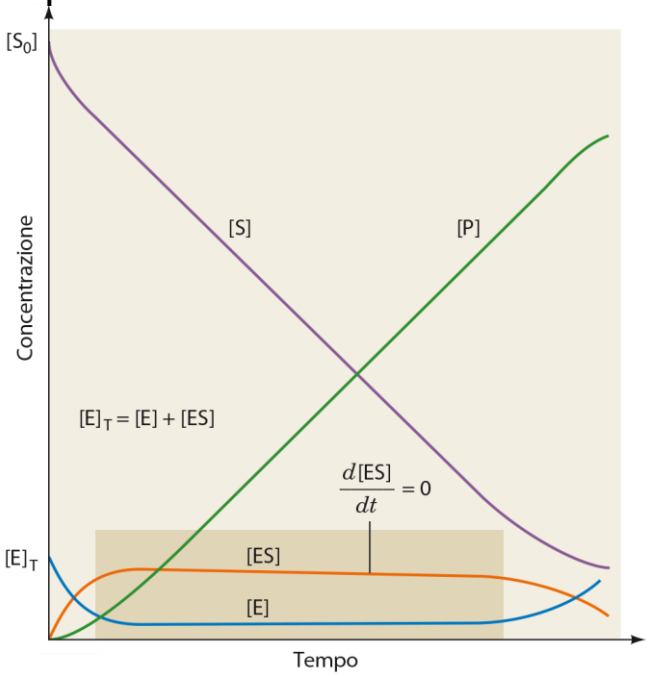
k_1 costante di associazione di [ES]

k_{-1} costante di dissociazione di ES in S ed E

k_2 costante catalitica che porta a formare P (tappa limitante)

Ipotesi del modello: condizioni sperimentali:
1) che [ES] rimanga costante, d[ES]/dt = 0 (ipotesi dello stato stazionario)

2) La velocità è misurata all'inizio (V_0 = velocità iniziale) quando [P] è trascurabile e quindi anche la riconversione E+ P → ES.



Si assume anche che T e pH siano costanti.

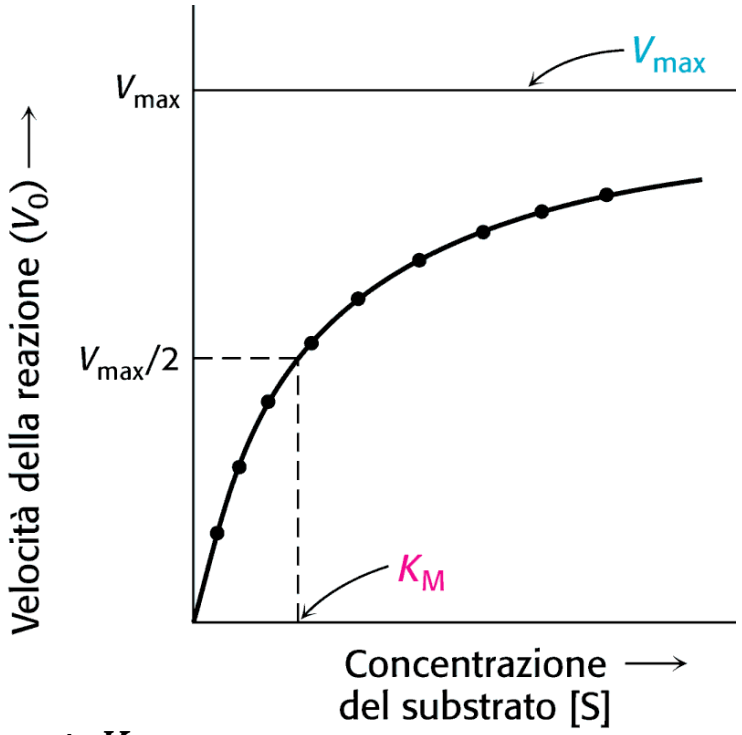
3) Che [S] >>> [E] in modo da garantire che ES non riduca significativamente la quota di S libero.
4) Che la formazione di prodotto (k_2) sia il passaggio lento e che quindi la V_0 dipende solo dalla concentrazione del complesso attivo $V_0 = k_2[ES]$

L'equazione di Michaelis-Menten

Combinando le assunzioni dello stato stazionario e della tappa limitante, otteniamo l'equazione che descrive l'andamento della velocità di una reazione enzimatica:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Equazione di **Michaelis-Menten:** descrive la relazione tra la velocità iniziale V_0 di una reazione enzimatica e la concentrazione di substrato.



Vmax (Velocità massima): è il valore asintotico a cui tende la V_0 quando l'enzima è completamente saturo dal substrato [ES] = [E_{tot}]. Dipende dalla concentrazione totale di enzima presente.

Km (Costante di Michaelis-Menten): È una misura dell'affinità dell'enzima per il suo substrato. Matematicamente, è definita come:

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

Definizione pratica: La K_m corrisponde alla concentrazione di substrato alla quale la V_0 della reazione è metà della velocità massima Vmax.

Cinetica enzimatica. Analisi Grafica: L'Iperbole Rettangolare

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Eq. Di Michaelis-Menten

Equazione in accordo con l'andamento in figura

Il grafico della velocità iniziale V_0 in funzione di [S] è un'iperbole: consideriamo i seguenti casi:

1. Quando [S] << K_m :

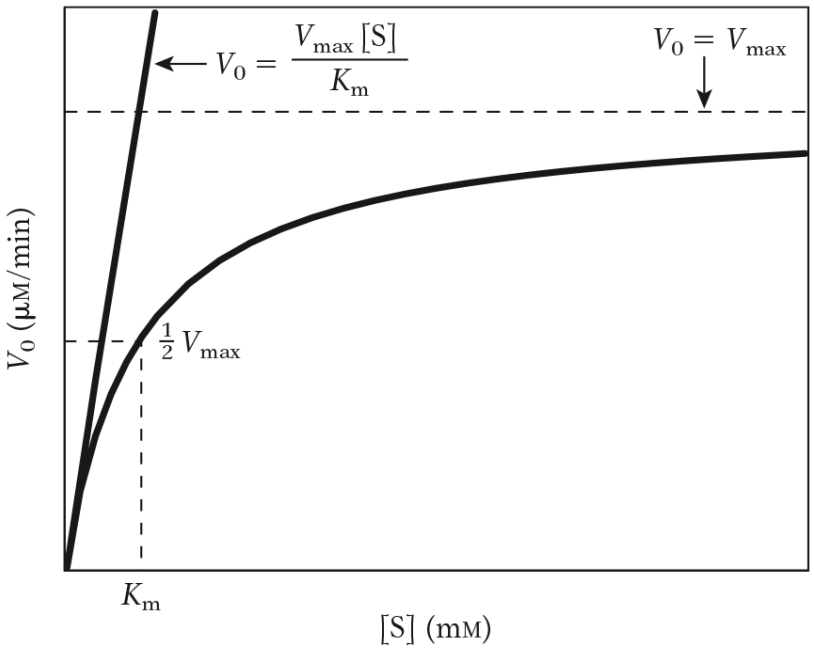
allora v = Vmax[S]/K_m con V_0 proporzionale ad [S] (reazione di 1° ordine)

2. Nel caso in cui [S] = K_m

allora l'equazione 1 diventa V_0 = 1/2 Vmax

3. Quando [S] >> K_M;

K_m + [S) ~ [S]; $V_0 \rightarrow V_{max}$ la velocità diventa indipendente da [S] e l'enzima lavora alla sua massima capacità.



Significato fisiologico della K_m

I valori di K_M degli enzimi nei confronti dei loro substrati variano da 10^{-1} M a 10^{-7} M. .

K_M fornisce una misura della concentrazione di S richiesta per la catalisi , spesso coincide con la concentrazione in vivo.

Comunemente k_2 è lo step lento del processo (in cui $k_2 << k_{-1}$), allora

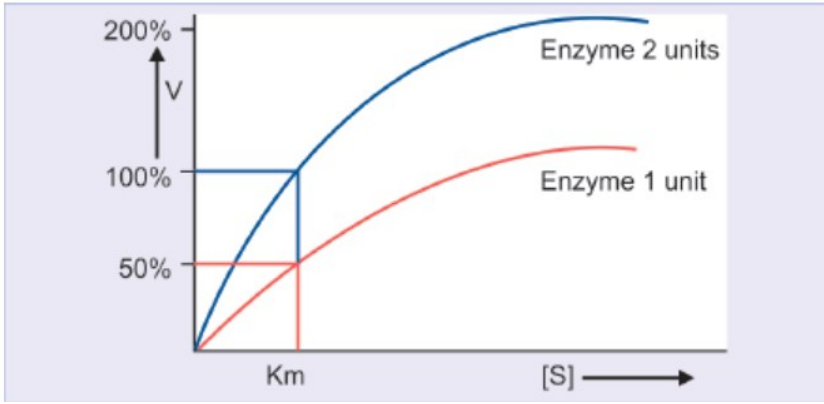
$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$ se $k_2 << k_{-1}$ allora $K_m \approx K_{-1} / K_1 \rightarrow \approx K_d$ del complesso ES

Quindi K_m è una misura dell'affinità di E per S.

Se valore K_m piccolo, → alta affinità per il substrato, cioè l'enzima raggiunge la saturazione a basse dosi di substrato.

Se valore di Km è elevato, indica bassa affinità per il substrato. L'enzima viene saturato solo a concentrazioni elevate di substrato.

Nota: anche quando [E] cambia (esempio raddoppia), il valore di Km per la coppia enzima-substrato rimane costante



K_M e V_{max} sono calcolati sperimentalmente

Il valore di V_{max} e quello di K_M sono sperimentalmente calcolabili per ogni coppia enzima-substrato dalla v di catalisi a diverse concentrazioni di substrato:

Dall'equazione: $$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

E' difficile calcolare sia il valore di Vmax (è un valore asintotico), sia K_m

Si utilizza, quindi, il sistema doppi dei reciproci x per linearizzare l'equazione di una retta in cui $1/V_0$ è espresso in funzione di 1/S.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

questa è l'equazione della retta

retta: $y = mX + q$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} \qquad q = \frac{1}{V_{max}}$$

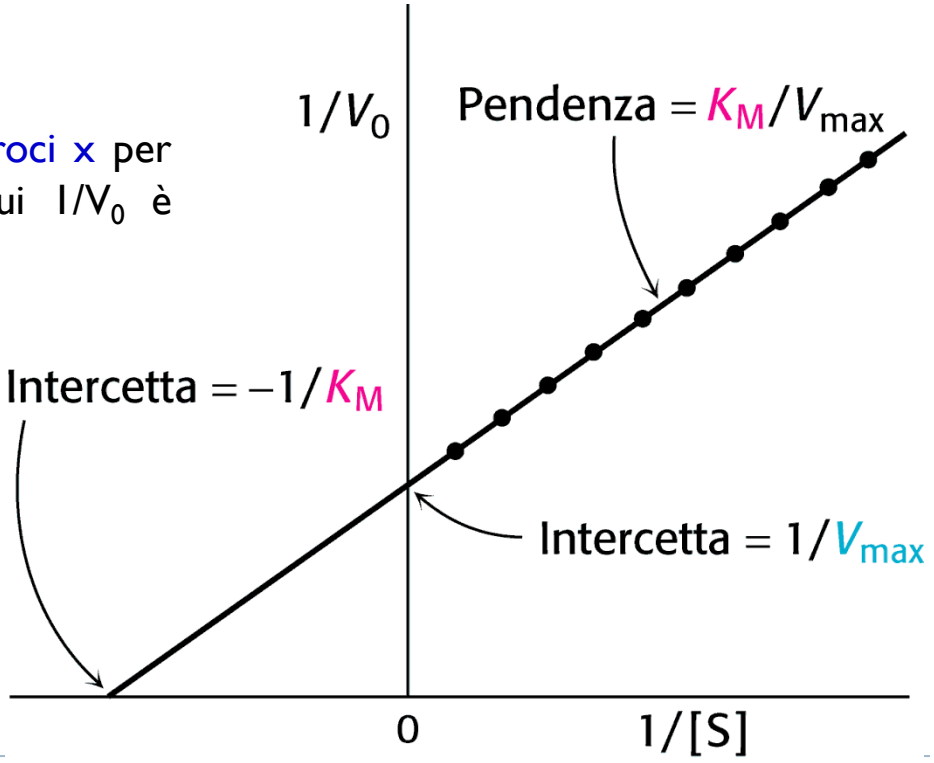
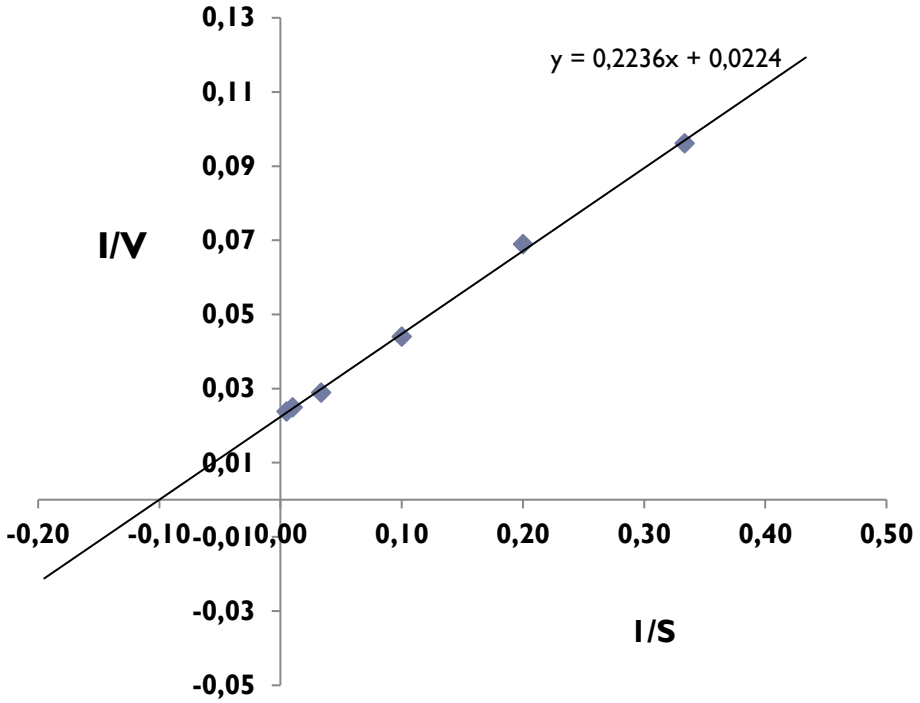


Grafico dei doppi reciproci (Lineweaver-Burk)

Esempio di calcolo della Km e Vmax tramite il metodo dei doppi reciproci

[S] µM	V_o mmol/min	1/S	$1/V_o$
3,00	10,40	0,33	0,10
5,00	14,50	0,20	0,07
10,00	22,70	0,10	0,04
30,00	34,50	0,03	0,03
100,00	40,00	0,01	0,03
200,00	42,00	0,01	0,02



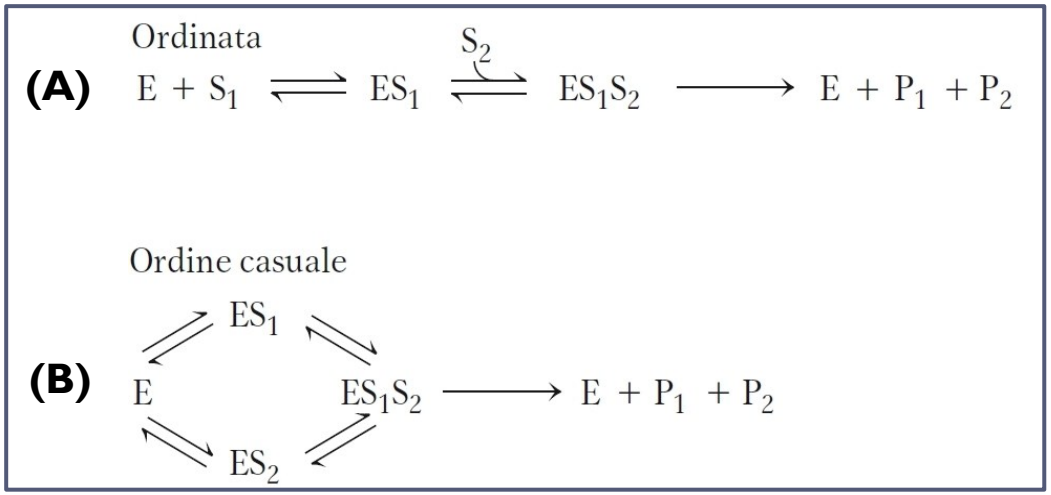
$-1/K_M = -0.1$ $K_M = 10$ µM

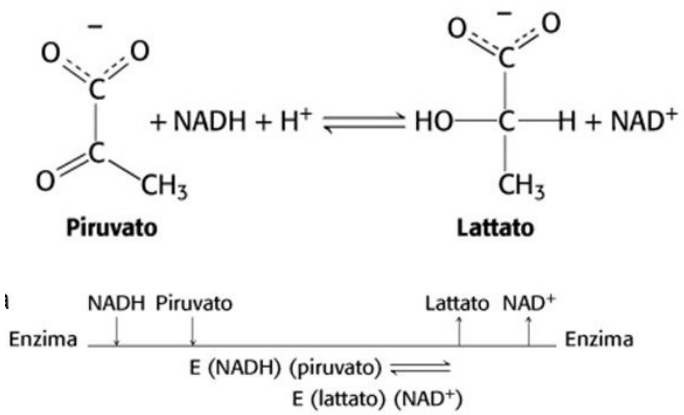
$1/v_{max} = 0.022$ $v_{max} = 45.5$ mmoli/min

Reazioni enzimatiche a due substrati con complessi ternari

Molti enzimi (60%) catalizzano reazioni a due o più substrati. Seguono la cinetica di M.M. in cui si calcola una Km per ogni substrato.

Quando entrambi i substrati devono legarsi all'enzima prima che avvenga la catalisi, si forma un Complesso Ternario $E\text{-}S_1\text{-}S_2$. Esistono due modalità principali per la formazione di questo complesso: (A) ordinata, I substrati si legano all'enzima in una sequenza obbligata; (B): ordine casuale. Non esiste una gerarchia di legame.

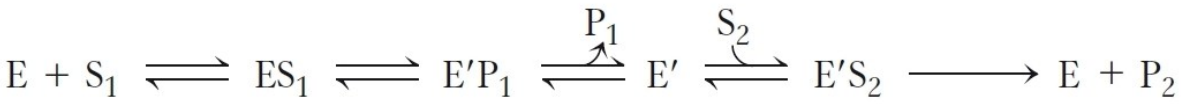




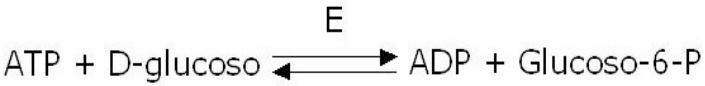
Esempio di meccanismo **ordinato (sequenziale)**: La lattato deidrogenasi (e altre deidrogenasi NADH-dipendenti) lega prima il coenzima NADH, poi il piruvato che viene convertito in lattato e rilasciato per primo, il NAD+ lascia l'enzima per ultimo.

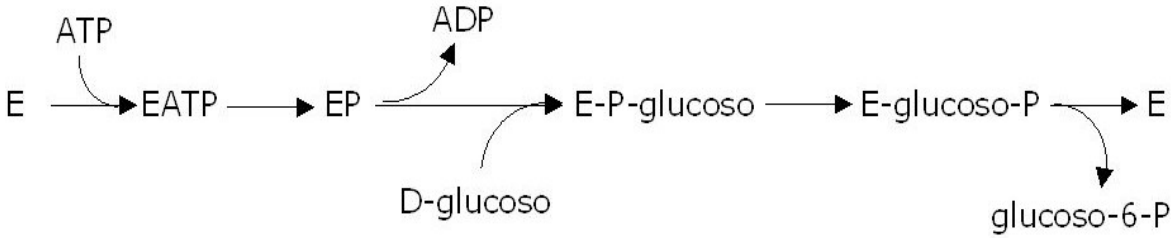
Reazioni a due substrati – Meccanismo a doppio spostamento (ping-pong)

In questi enzimi non si forma un complesso ternario ma il primo substrato S_1 trasferisce all'enzima un gruppo funzionale modificando l'enzima (E'), e il primo prodotto viene rilasciato (P_1). Il secondo substrato (S_2) entra, preleva il gruppo rimasto sull'enzima modificato E', torna alla forma originale E e rilascia il secondo prodotto P_2. (reazione ping-pong)



Esempio: esochinasi





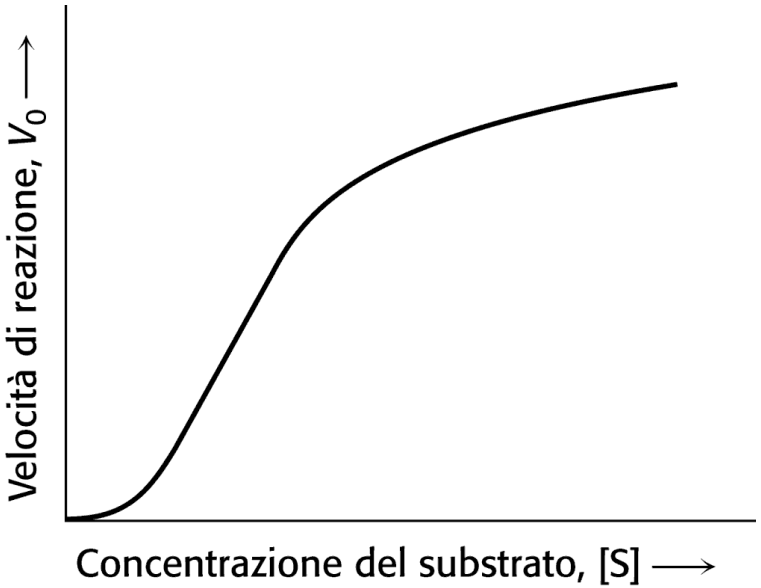
Il gruppo P viene legato covalentemente all'enzima (EP), il primo prodotto (ADP) viene rilasciato e poi entra il secondo substrato (glucosio) a cui viene aggiunto il P e l'enzima viene rigenerato.

Gli Enzimi Allosterici e la Cinetica Sigmoidale

Gli enzimi allosterici sono un gruppo di enzimi che non obbedisce alle modello cinetico iperbolico di M & M. Possiedono più subunità, e quindi più siti attivi che "comunicano" tra loro.

Gli enzimi allosterici presentano una curva a sigmoide (forma a "S"), che riflette una regolazione molto più sensibile alle variazioni di concentrazione del substrato.

Il legame del substrato ad un sito attivo altera le proprietà degli altri siti attivi nella stessa molecola enzimatica: effetto cooperativo (similmente a quanto visto per l' emoglobina).



La forma a sigmoide permette all'enzima di rispondere in modo estremamente brusco a piccole variazioni [S] in un intervallo critico. Nell'iperbole di Michaelis-Menten, per passare dal 10% al 90% della Vmax serve un aumento di [S] di circa 80 volte.

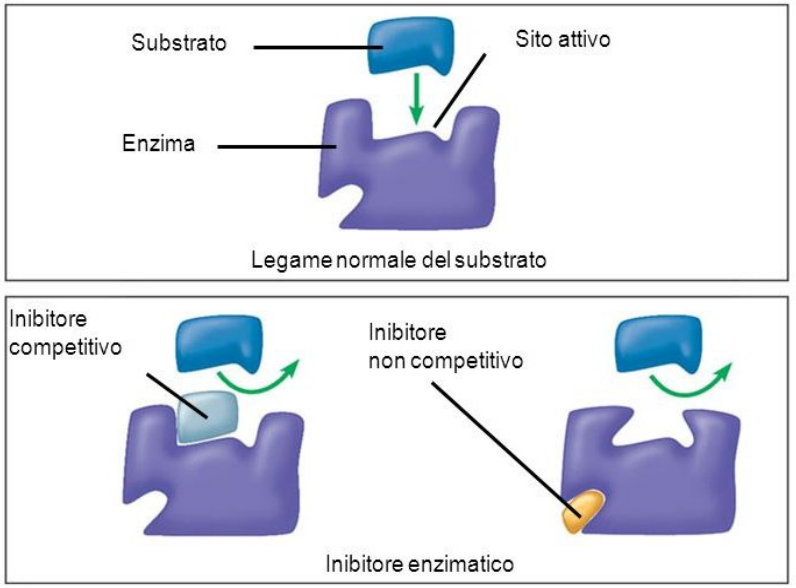
In un enzima allosterico, bastano incrementi di 3-4 volte per passare da un'attività minima a una massima. Questo funge da vero e proprio interruttore metabolico.

L'attività degli enzimi allosterici sono regolate da effettori allosterici, che si legano a siti distinti dal sito attivo (vedi modulo 5)

Introduzione all'Inibizione Enzimatica

Inibitori enzimatici: Gli inibitori sono molecole che riducono l'attività enzimatica, fondamentali per la regolazione metabolica, la farmacologia e/o la tossicologia.

Inibitori reversibili: Si legano mediante interazioni deboli (non covalenti). L'attività enzimatica viene ripristinata rimuovendo l'inibitore.
Vari sottotipi: inibitori competitivi, non competitivi, misti etc



Inibitore Competitivo: somiglia strutturalmente al substrato e contende ad esso l'accesso al **sito attivo**.

Inibitore NON competitivo: si lega a un sito (diverso dal sito attivo), sia sull'enzima libero E che sul complesso ES.

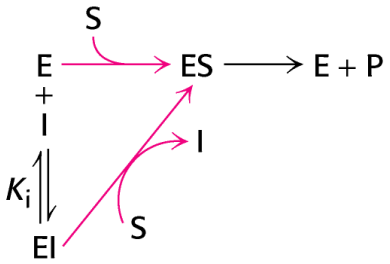
Inibitori irreversibili: alterano fisicamente gli enzimi bersaglio legandosi in maniera stabile attraverso legami forti (spesso covalenti). Alterano permanentemente l'enzima, riducendo la concentrazione totale di enzima attivo [Et].

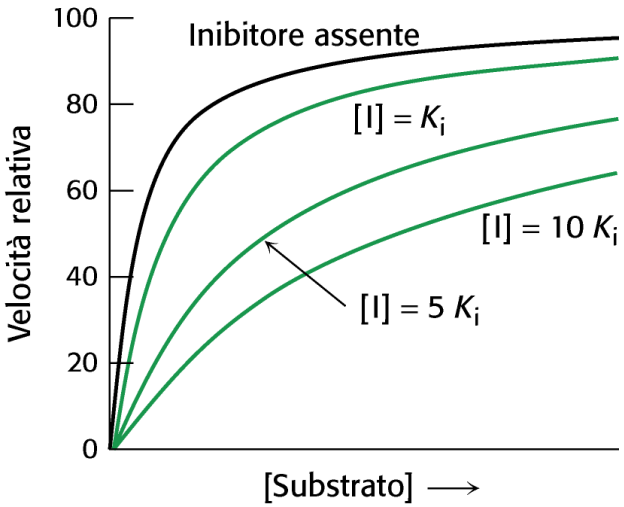
Esempi di inibitori enzimatici che sono farmaci

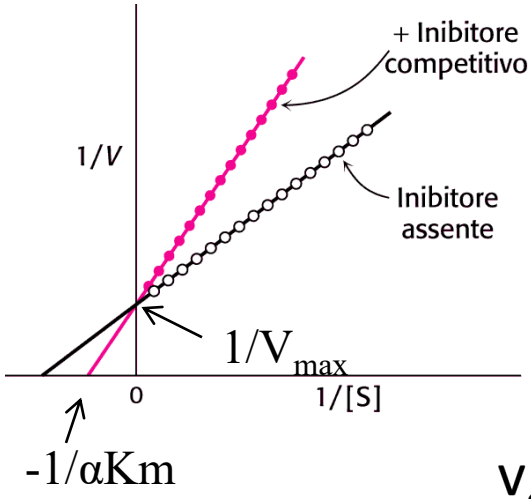
Enzima	Inibitore	Funzione
Diidrofolato reduttasi	Metotrexate	Antitumorale
Timidilato sintasi	Fluorouracile	Antitumorale
Glicopeptide transpeptidasi	Penicilline	Battericida
Fosfodiesterasi 5 (PDE5I)	Sildenafil	Trattamento della disfunzione erettile
Trascrittasi inversa (HIV)	Zidovudina (azidotimidina, AZT)	Antivirale (AIDS)
Cicloossigenasi	Aspirina	Antiinfiammatorio
HMG-Coa reduttasi	Statine	Riduzione del colesterolo
Xantina ossidasi	Allopurinolo	contrasto alla gotta

Inibizione competitiva

L'inibitore (I) si lega solo all'enzima libero E nello stesso sito di legame del substrato. Diminuisce la frazione di molecola enzimatiche legate al substrato (ES). Si analizza con la cinetica dello stato stazionario:







K_M aumenta
v_{max} non varia

$$\alpha = 1+[I]/Ki$$

$$Ki = \frac{[E]\,[I]}{[EI]}$$

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

Km app

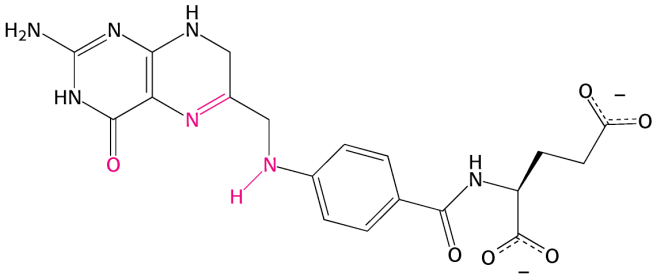
Il valore Km apparente aumenta di un fattore pari ad α

L'inibizione può essere rimossa aumentando la concentrazione di substrato

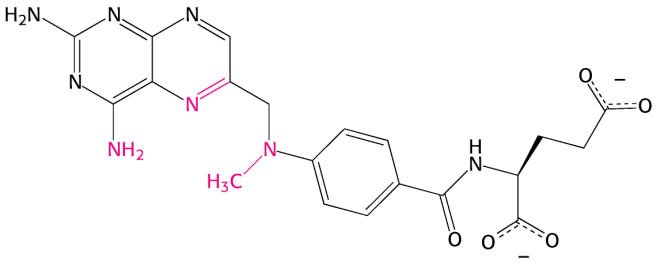
Gli inibitori competitivi sono strutturalmente simili al substrato

Inibitori competitivi: per competere con il substrato al legame al sito attivo assomigliano strutturalmente al substrato. Comprendono sia composti metabolizzabili, cioè trattati come substrati (metotrexato, ibuprofene, etanolo) sia non metabolizzabili (malonato).

Esempio: Il metotrexato è un inibitore competitivo della diidrofolato reduttasi



Diidrofolato



Metotrexato

L'antitumorale metotrexato si lega alla diidrofolato reduttasi, bloccando l'enzima che partecipa alla sintesi dei nucleotidi (DNA) con affinità 1000 volte maggiore al diidrofolato, il substrato naturale.

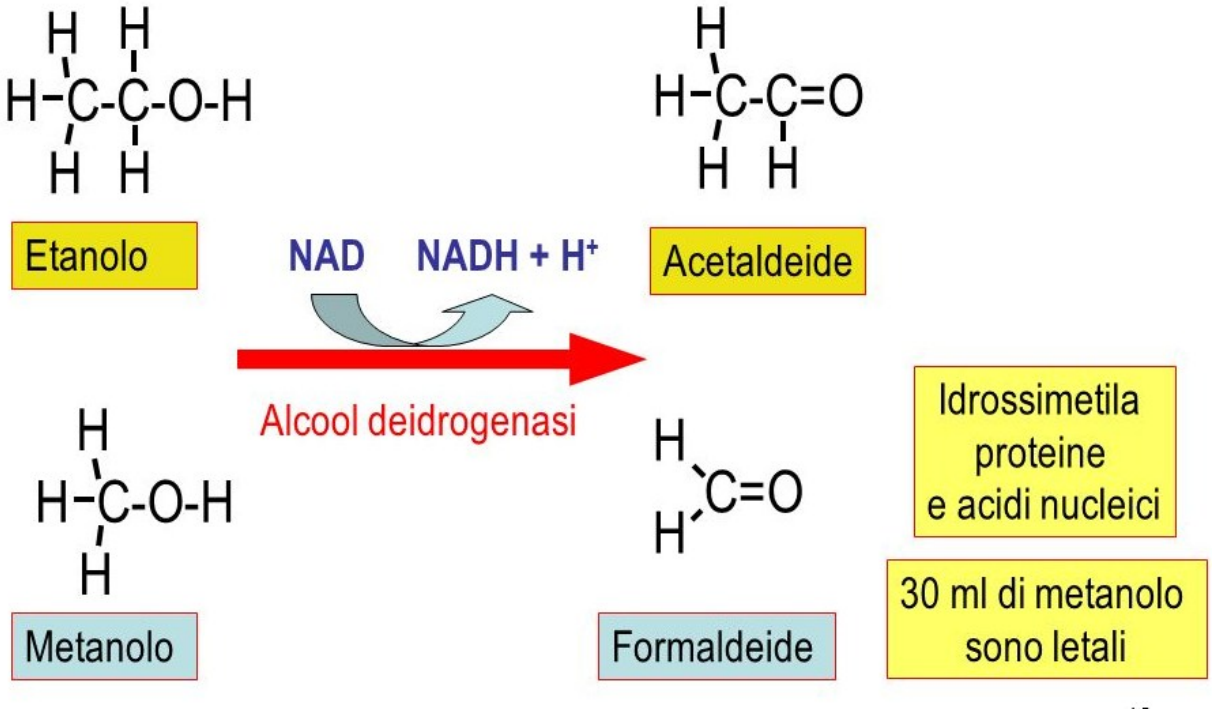
In rosso le differenze strutturali

Altro esempio: Statine: Inibiscono competitivamente la HMG-CoA reduttasi per ridurre il colesterolo.

L'etanolo è usato come antidoto nell'avvelenamento da metanolo

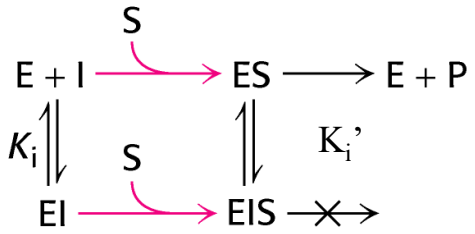
L'etanolo ed il metanolo competono per lo stesso sito attivo presente nell'enzima alcool deidrogenasi.

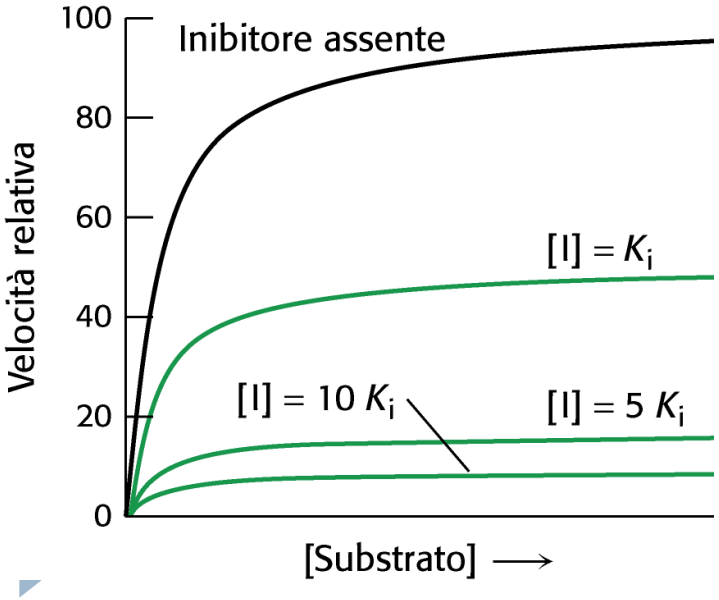
Il trattamento con etanolo, che funge da inibitore competitivo dell' enzima, rallenta la formazione della formaldeide (altamente tossica) mentre i reni eliminano il metanolo.

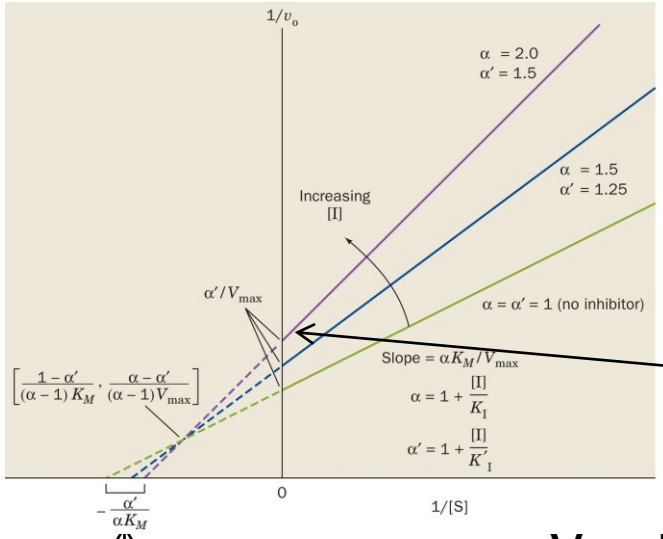


Inibizione non competitiva

L'inibitore (I) si lega sia all'enzima libero E, che al complesso ES presso un sito diverso dal sito attivo. Meccanismo: Il legame di I distorce la conformazione dell'enzima, impedendo la catalisi anche se S è presente. L'inibitore abbassa la concentrazione dell'enzima attivo: abbassa il valore di Vmax







α‘ /V_{max}

- α‘ /αKm

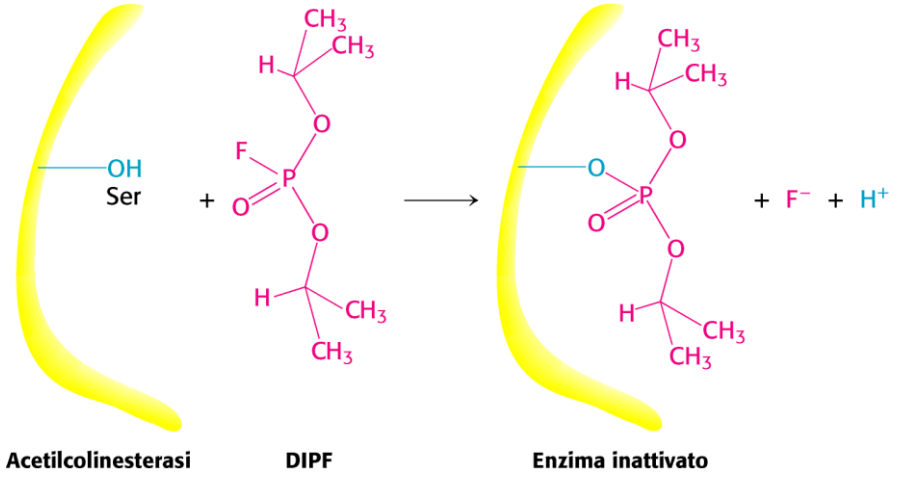
$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]}$$

K_m resta uguale (raro, solo se α = α') o aumenta (caso comune, inibizione mista)
v_{max} decresce

Gli inibitori irreversibili: inibizione permanente

Gli inibitori irreversibili si legano in maniera permanente ai gruppi catalitici dell'enzima.
Classificati in base al meccanismo di inibizione: reagenti gruppo-specifici, analoghi del substrato, analoghi dello stato di transizione, inibitori basati sul meccanismo (inibitori suicidi).

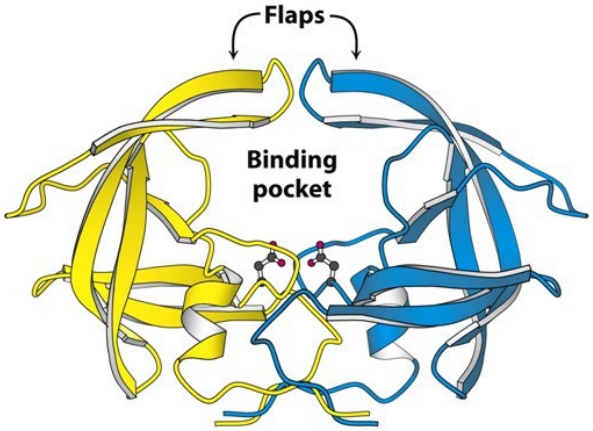
Gli inibitori: reagenti gruppo specifici



Il diisopropilfluorofosfato (DIPF) (gas nervino) si lega irreversibilmente ad un gruppo -OH di serina presente nel sito attivo di enzimi bersaglio (serin-proteasi) inattivandoli.

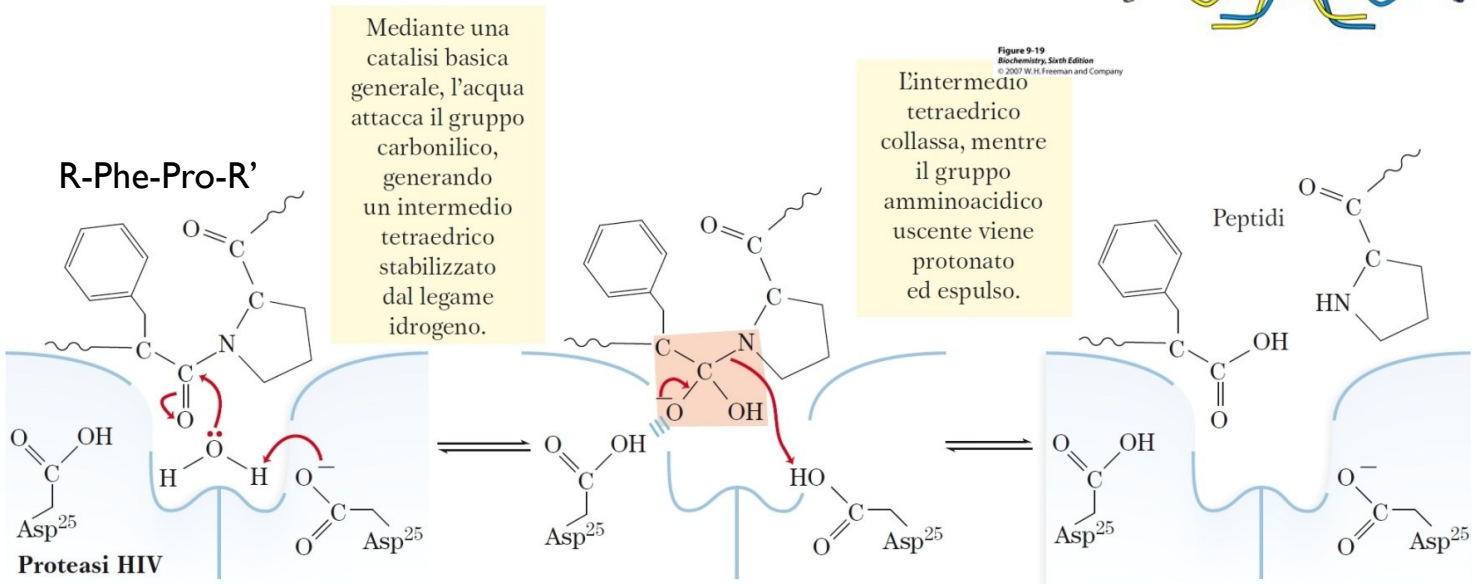
DIPF enzimi come la tripsina e la chimotripsina, ma soprattutto le acetilcolinesterasi bloccando le sinapsi alle giunzioni neuromuscolari. La presenza continua dell'acetilcolina porta ad una costante stimolazione dei recettori colinergici causando contrazioni muscolari.

Gli analoghi dello stato di transizione sono potenti inibitori



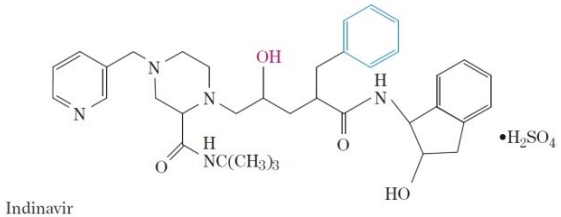
Gli analoghi dello stato di transizione sono i più potenti inibitori conosciuti perché l'enzima è evoluto per legare con la massima affinità la conformazione dello stato di transizione X‡

Numerosi inibitori sono stati progettati per inibire la aspartil proteasi HIV e impedire la replicazione del virus.

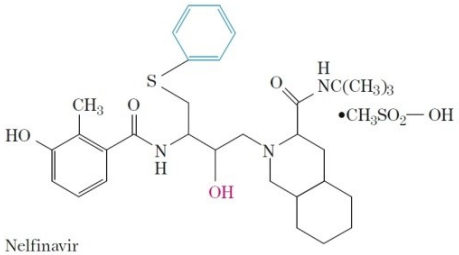


La aspartil proteasi HIV è una idrolasi dimerica che scinde la poliproteina virale nelle sue componenti. Meccanismo: 2 residui di Asp (1 per subunità) nel sito catalitico facilitano l'attacco dell'acqua al carbonio del legame peptidico da scindere tra un residuo di Phe ed uno di Pro.

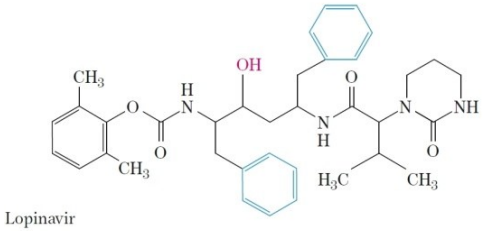
Inibitori della aspartil proteasi HIV



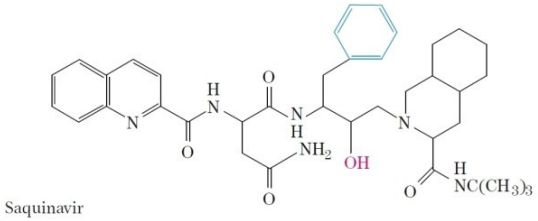
Indinavir



Nelfinavir



Lopinavir



Saquinavir

Sono stati progettati razionalmente numerosi inibitori sintetici che sono degli analoghi dello stato di transizione per inibire la aspartil proteasi HIV e impedire la replicazione del virus.

Questi inibitori sono farmaci utilizzati per la terapia antiretrovirale contro l' HIV.

Caratteristiche degli inibitori:

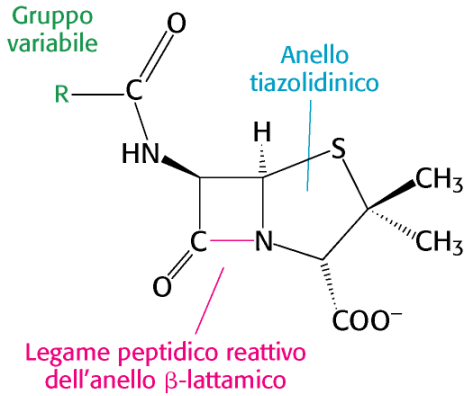
Contengono un gruppo ossidrilico, OH (in rosso) che simula l'attacco della molecola d'acqua (analogo dello stato di transizione). Il fenile, (in azzurro) simula l'anello della fenilalanina e aiuta a posizionare correttamente il farmaco nel sito attivo.

La parte rimanente serve a legare l'inibitore a varie fessure lungo la superficie dell'enzima stabilizzando il legame.

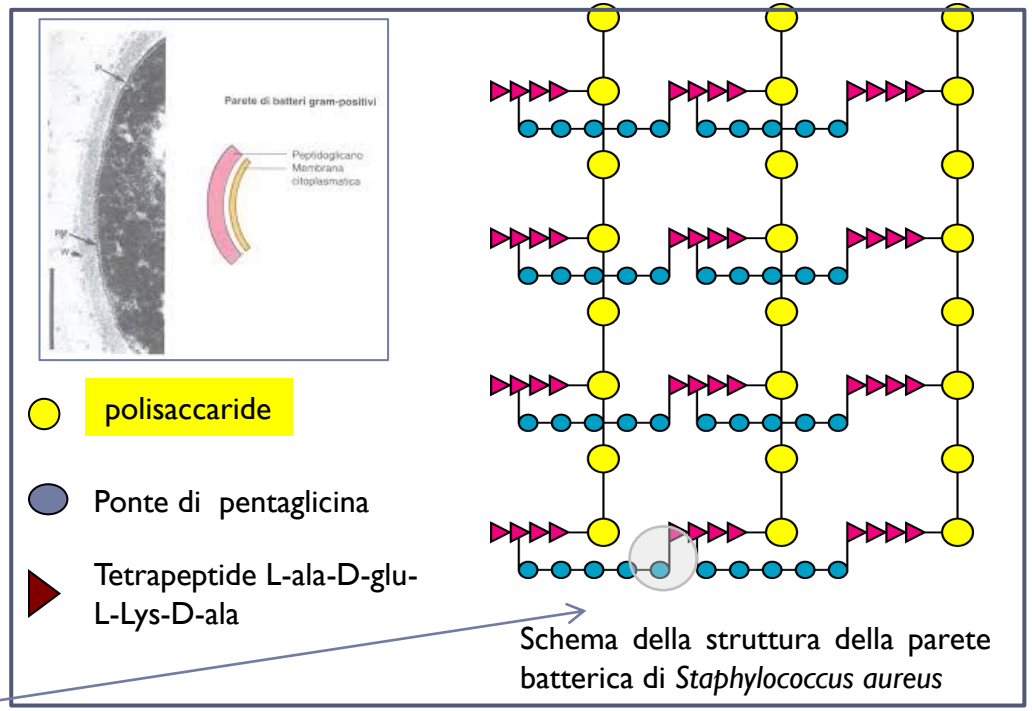
Alcuni inibitori antivirali di uso clinico

Inibitori irreversibili: la penicillina, un inibitore basato sul meccanismo (inibitore suicida).

L'antibiotico penicillina è un inibitore irreversibilmente dell'enzima batterico necessario per la sintesi della parete batterica. L'enzima si «suicida» legandosi stabilmente alll'antibiotico durante il meccanismo di catalisi.



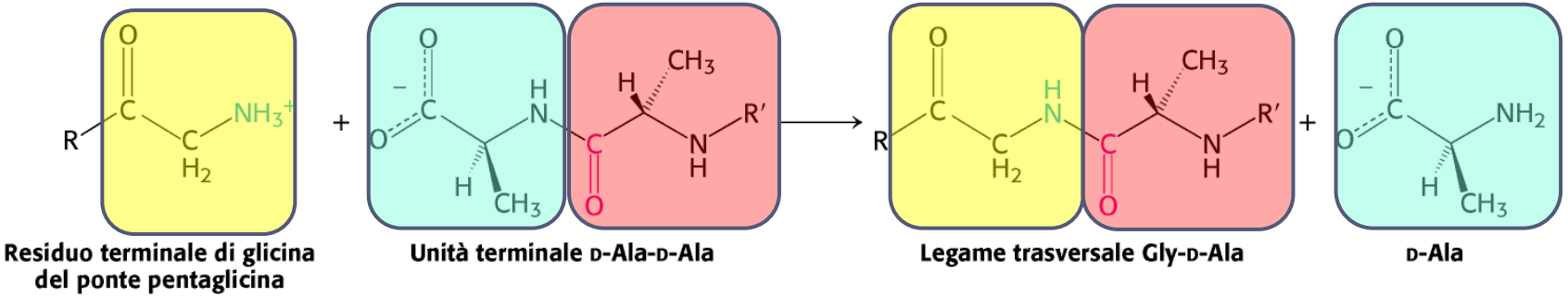
La struttura degli antibiotici β-lattamici



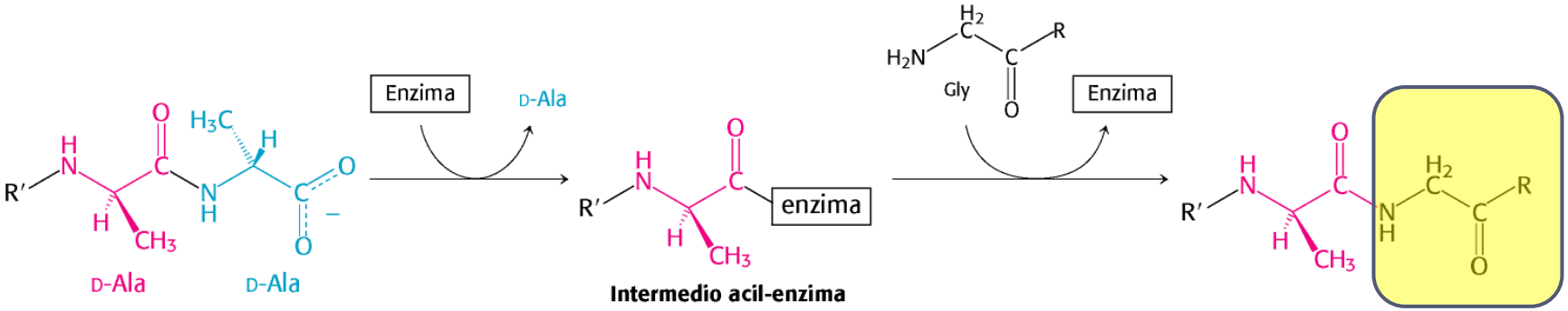
L'enzima glicopeptide transpeptidasi catalizza la formazione dei ponti trasversali del peptidoglicano legando tra loro un residuo di glicina di una pentaglicina con uno di D-alanina formando dei ponti trasversali.

Gli antibiotici beta lattamici, inibendo la glicopeptide transpeptidasi. bloccano la formazione dei ponti trasversali di pentaglicina

L'azione della transpeptidasi e la formazione dei legami trasversali



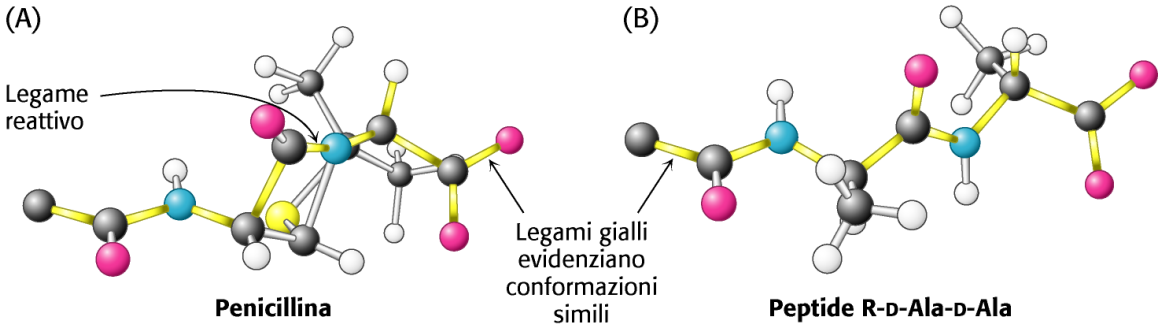
Nella parete della cellula il gruppo -NH_2 della pentaglicina attacca il legame peptidico tra due residui consecutivi di D-ala (L-ala-D-glu-L-Lys-D-ala-*D-ala*) per formare un legame trasversale ed il rilascio della *D-Ala* terminale.

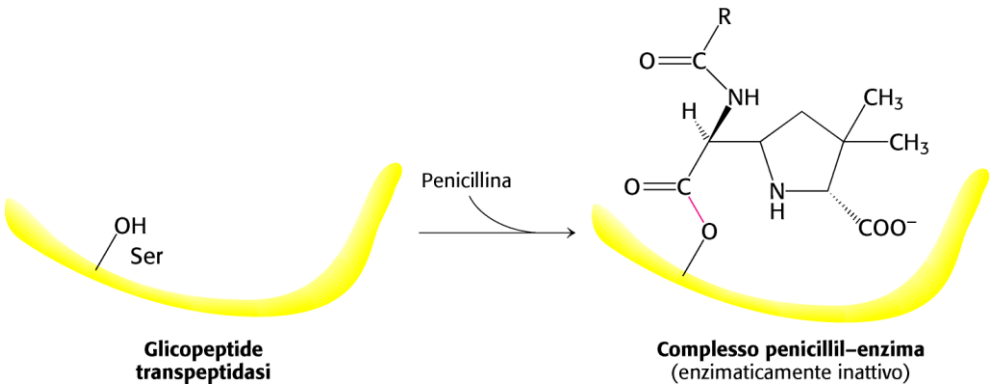


Nel corso della reazione transpeptidasica si forma un intermedio (catalisi covalente) acil-enzima tra il residuo di D-ala del tetrapeptide e l'enzima glicopeptide transpeptidasi.

La penicillina mima il dipeptide D-ala-D-ala e si lega alla peptidasi

La struttura della penicillina è simile a quella del dipeptide terminale D-Ala-*D-Ala*





La penicillina, mimando il dipeptide, è in grado di legarsi al sito attivo dell'enzima formando un complesso covalente penicillil-enzima: il residuo di Ser attacca il carbonio carbonilico dell'anello lattamico, molto reattivo (tende ad aprirsi), per formare il derivato penicillil-enzima (complesso suicida).

Il complesso non procede oltre nella reazione, la transpeptidasi è inibita provocando l'arresto della sintesi della parete e il blocco della crescita batterica.