

A 3D ribbon diagram of an enzyme protein structure, rendered in light gray. The protein is shown in a complex, folded conformation with several alpha-helices and beta-sheets. A red stick model of a substrate molecule is bound to the enzyme's active site. A blue stick model of an inhibitor molecule is also bound to the enzyme, overlapping with the substrate. The text "Cinetica enzimatica" and "Inibitori enzimatici" is overlaid in the center of the image.

**Cinetica enzimatica**  
**Inibitori enzimatici**

# CINETICA ENZIMATICA

Determinazione della velocità della reazione e di come questa cambia in risposta a modificazioni dei parametri sperimentali

E' il metodo più vecchio, ma ancora importante, per la comprensione del meccanismo enzimatico, affiancato oggi da

- studi della struttura tridimensionale (statici e dinamici) con
  - metodi chimico-fisici
  - molecular modelling
- chimica classica delle proteine
- mutagenesi sito specifica (studio del contributo di singoli aminoacidi alla funzione e/o alla struttura)
- combinazione delle tecniche precedenti

*Velocità di una reazione: variazione della concentrazione dei reagenti o dei prodotti nell'unità di tempo.*

Uno dei fattori chiave che in un sistema ricostruito (*in vitro*) modificano la velocità di una reazione catalizzata da un enzima è la **quantità del substrato presente**, che però **cambia durante il corso della reazione**, man mano che  $S$  viene convertito in  $P$ .

In un esperimento di cinetica, per semplificare il problema si può valutare la **velocità iniziale  $V_0$** , quando la **concentrazione del substrato è in genere molto maggiore della concentrazione dell'enzima**.

In una reazione tipica:

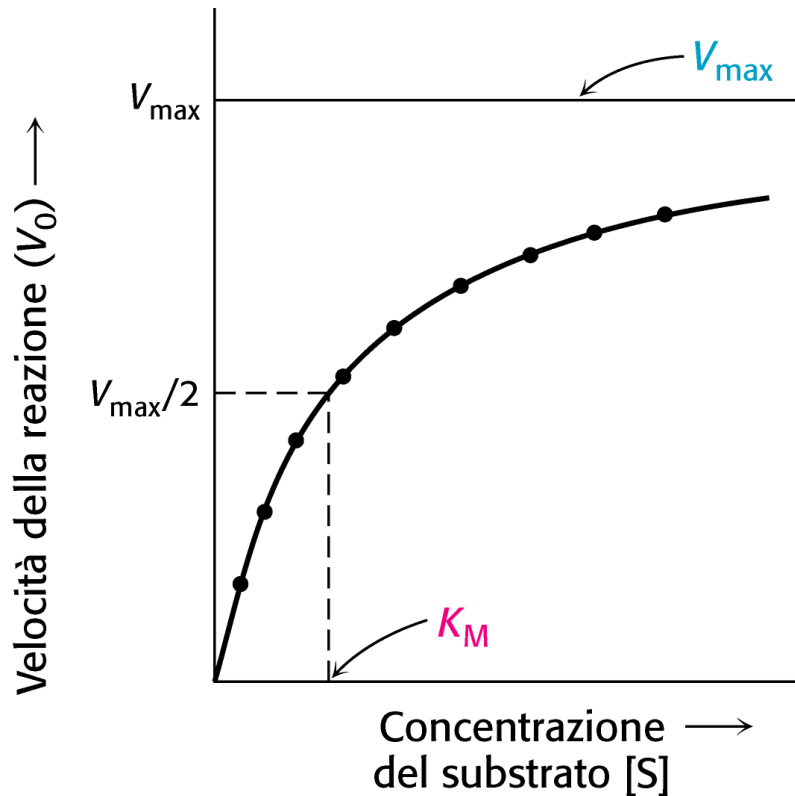
[E]: nanomolare

[S]: 5 o 6 ordini di grandezza superiore

Se il tempo in cui si effettua la misura è sufficientemente breve (<60"), la variazione di [S] è minima e quindi può essere considerata costante

La valutazione di  $V_0$  viene effettuata utilizzando diverse [S] e mantenendo costante [E]

# Effetto della concentrazione del substrato sulla velocità iniziale di una reazione catalizzata da un enzima



$V_{\max}$  = velocità iniziale massima della reazione catalizzata

La chiave per interpretare questo comportamento cinetico è stata la teoria della formazione del complesso ES (esattamente come ha rappresentato il punto di partenza per la discussione sulla catalisi)



Leonor Michaelis  
1875–1949



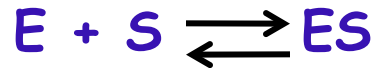
Maud Menten  
1879–1960

**1903:** Victor Henri propone per la prima volta la formazione di un complesso ES come tappa necessaria per iniziare la catalisi

**1913:** l'idea di Henri diventa una teoria generale sugli enzimi ad opera di Leonor Michaelis e Maud Menten

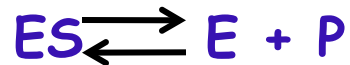
# Teoria di Michaelis-Menten

In una reazione catalizzata da un enzima, l'enzima forma inizialmente un complesso con il substrato:



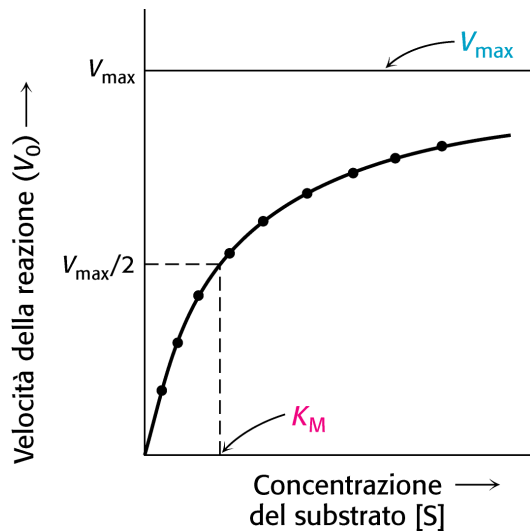
I tappa veloce e reversibile

ES si decompone successivamente per produrre E e P



II tappa lenta  
(tappa limitante)

quindi la velocità della reazione complessiva è proporzionale alla concentrazione di ES



In qualsiasi istante, E è presente in due forme, E ed ES

**[S] bassa:  $E \gg ES$**   $V_0$  è proporzionale a  $[S]$  (man mano che  $[S]$  aumenta viene favorito ES)

**[S] alta: tutto l'enzima è nella forma ES e  $[E]$  è trascurabile**

in queste condizioni si osserva  $V_{max}$ : l'enzima è saturato con il suo substrato e ulteriori aggiunte di S non variano  $V_0$ .

Quando ES si dissocia per formare P, E torna libero e pronto ad iniziare un nuovo ciclo catalitico

**Cinetica di saturazione** (effetto saturante del substrato, proprietà caratteristica dei catalizzatori enzimatici)

# Cinetica dello stato stazionario

(G.E.Briggs - J.B.S.Haldane, 1925)



Quando  $[S] \gg [E]$ , la prima reazione (**stato prestazionario**) è molto veloce e difficile da valutare

La reazione raggiunge rapidamente **lo stato stazionario** ( $[ES]$  costante)

Quindi  $V_0$  che viene misurata dipende dallo stato stazionario, anche se la misurazione viene fatta nei primi istanti della reazione



La relazione tra  $[S]$  e  $V_0$  può essere espressa in modo quantitativo dall'equazione di Michaelis-Menten

L'equazione di Michaelis-Menten deriva dall'integrazione della teoria di M-M con l'ipotesi dello stato stazionario di Briggs-Haldane

e dall'ipotesi di base che la tappa limitante di una reazione enzimatica è la demolizione di ES per formare E e P

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

Equazione della velocità di una reazione catalizzata da un enzima con un solo substrato

Relazione quantitativa tra  $V_0$ ,  $V_{\max}$  e  $[S]$ . I tre termini sono correlati tra loro da  $K_m$  (costante di Michaelis)

# Significato di $K_m$

Nel caso particolare in cui

$$V_0 = \frac{1}{2} V_{\max} :$$

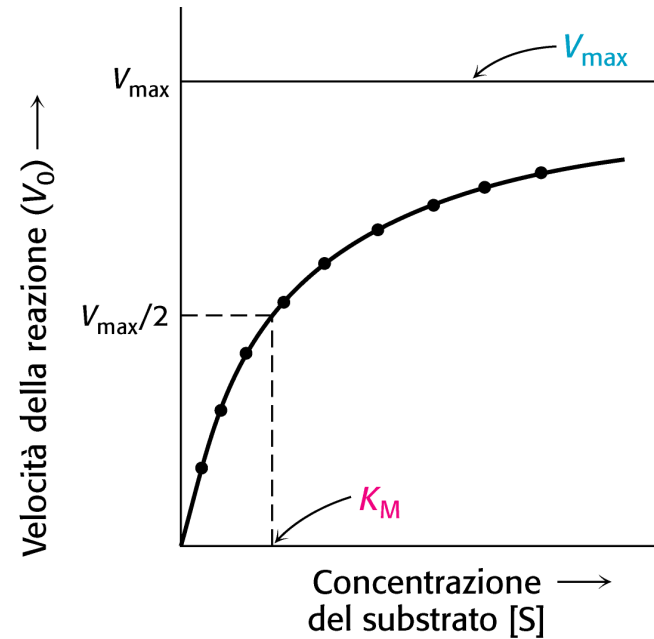
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{diventa:}$$

$$V_{\max}/2 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$1/2 = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m + [S] = 2[S]$$

$$K_m = [S]$$



Quindi  $K_m = [S]$  quando  $V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$

La costante di Michaelis si definisce come la **concentrazione del substrato** in corrispondenza della quale  $V_0$  è la metà di  $V_{\max}$

$K_m$  viene espressa in molarità

**C' è corrispondenza tra l'equazione di Michaelis-Menten e le osservazioni sperimentali?**

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

**Bassa [S]:  $K_m \gg [S]$**

il termine [S] al denominatore diventa trascurabile

si ottiene l'equazione di una retta

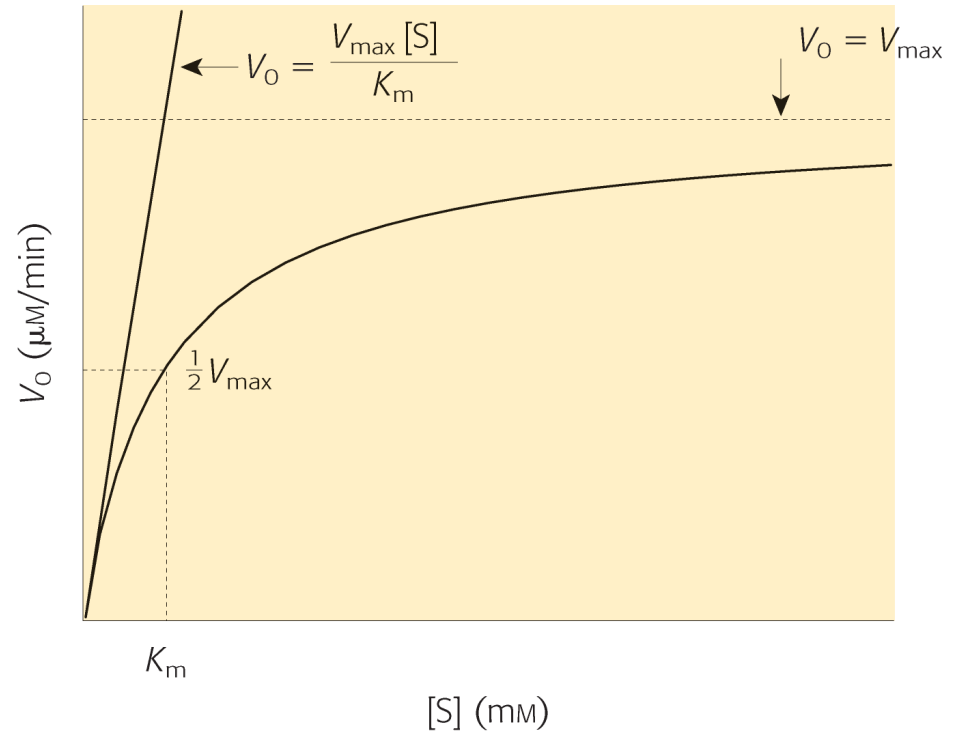
dipendenza lineare

(proporzionalità diretta) di  $V_0$  da [S]

**Alta [S]:  $[S] \gg K_m$**

il termine  $K_m$  al denominatore diventa trascurabile

si ottiene l'equazione di una retta parallela all'asse delle ascisse



- l'equazione di M-M descrive il comportamento cinetico di tutti gli enzimi che presentano una relazione di tipo iperbolico tra velocità iniziale e concentrazione del substrato
- la regola  $K_m = [S]$  quando  $V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$  è valida per tutti gli enzimi che seguono la cinetica di M-M
- i valori  $V_{max}$  e  $K_m$ , si possono calcolare sperimentalmente e possono variare notevolmente da un enzima all'altro  
sono quindi funzioni tipiche di ogni enzima e possono servire per valutare e confrontare l'efficienza catalitica di enzimi diversi
- $K_m$  può variare anche per substrati diversi dello stesso enzima

TABELLA 13.3 Valori di $K_m$ per alcuni enzimi		
Enzima	Substrato	$K_m$ (mM)
Anidrasi carbonica	CO <sub>2</sub>	12
Chimotripsina	<i>N</i> -benzoiltirosinammide	2,5
	Acetil-L-triptofanammide	5
	<i>N</i> -formiltirosinammide	12
	<i>N</i> -acetiltirosinammide	32
	Gliciltirosinammide	122
Esochinasi	Glucosio	0,15
	Fruttosio	1,5
$\beta$ -galattosidasi	Lattosio	4
Glutammato deidrogenasi	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	57
	Glutammato	0,12
	$\alpha$ -chetoglutarato	2
	NAD <sup>+</sup>	0,025
	NADH	0,018
Aspartato amminotransferasi	Aspartato	0,9
	$\alpha$ -chetoglutarato	0,1
	Ossalacetato	0,04
	Glutammato	4
Treonin deamminasi	Treonina	5
Arginil-tRNA sintetasi	Arginina	0,003
	tRNA <sup>Arg</sup>	0,0004
	ATP	0,3
Piruvato carbossilasi	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,0
	Piruvato	0,4
	ATP	0,06
Penicillinasi	Benzilpenicillina	0,05
Lisozima	Esa- <i>N</i> -acetilglucosammina	0,006

$K_m$  viene in genere usata come indicazione dell'affinità di un enzima per il suo substrato

Il realtà il significato reale di  $K_m$  dipende da aspetti specifici del meccanismo della reazione, come il numero e le velocità relative delle tappe della reazione

## Il numero di turnover definisce l'attività di una molecola di enzima

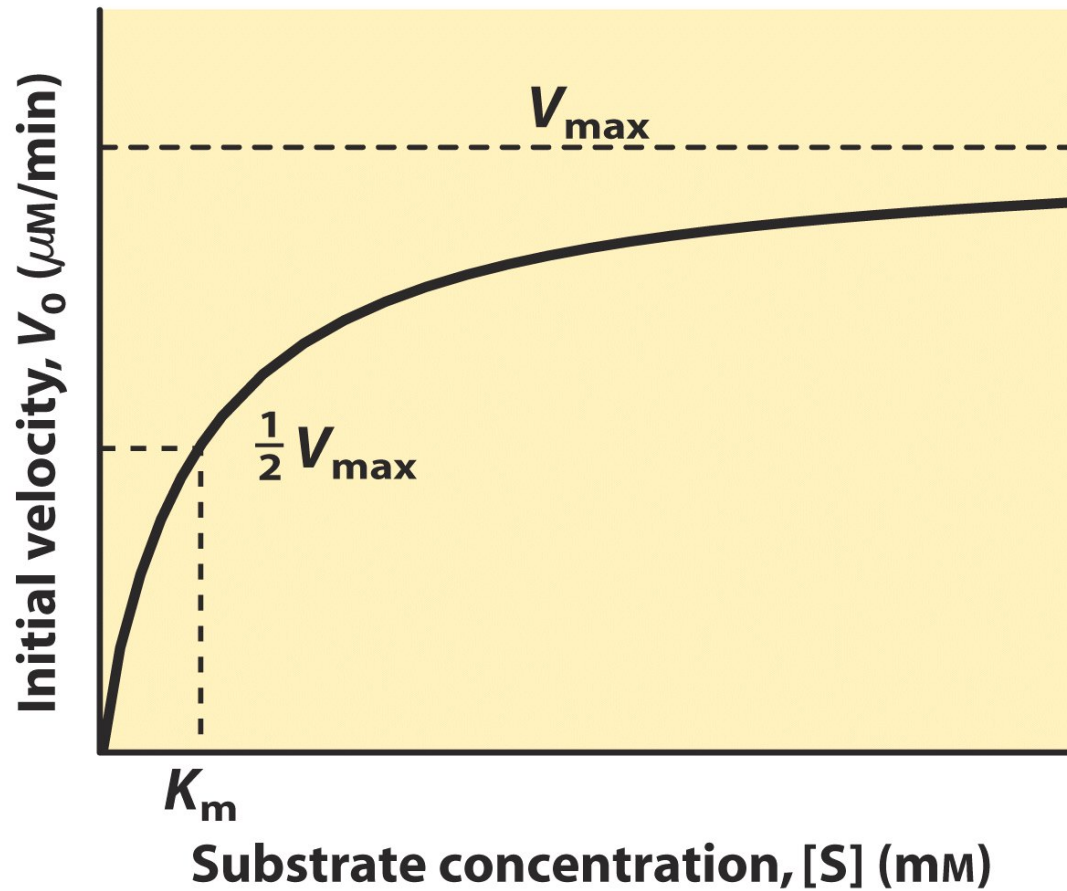
Numero di turnover ( $k_{cat}$ ) : numero di molecole di substrato convertite in prodotto per molecola di enzima per unità di tempo quando l'enzima è saturato con il substrato

Misura della massima attività catalitica di un enzima

TABELLA 13.4 Valori di $k_{cat}$ (numero di turnover) per alcuni enzimi	
Enzima	$k_{cat}$ (sec <sup>-1</sup> )
Catalasi	40.000.000
Anidrasi carbonica	1.000.000
Acetilcolinesterasi	14.000
Penicillinasi	2.000
Lattato deidrogenasi	1.000
Chimotripsina	100
DNA polimerasi I	15
Lisozima	0,5

La quantità di un enzima può essere espressa in termini di attività osservata.

**Unità internazionale:** quantità di enzima che catalizza la formazione di una micromole di prodotto in un minuto



Tutti i parametri cinetici presenti nell'equazione di M-M possono essere determinati sperimentalmente con sufficiente precisione eccetto  $V_{\text{max}}$  che rappresenta un valore asintotico.

# Il grafico dei doppi reciproci (equazione di Lineweaver-Burk)

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

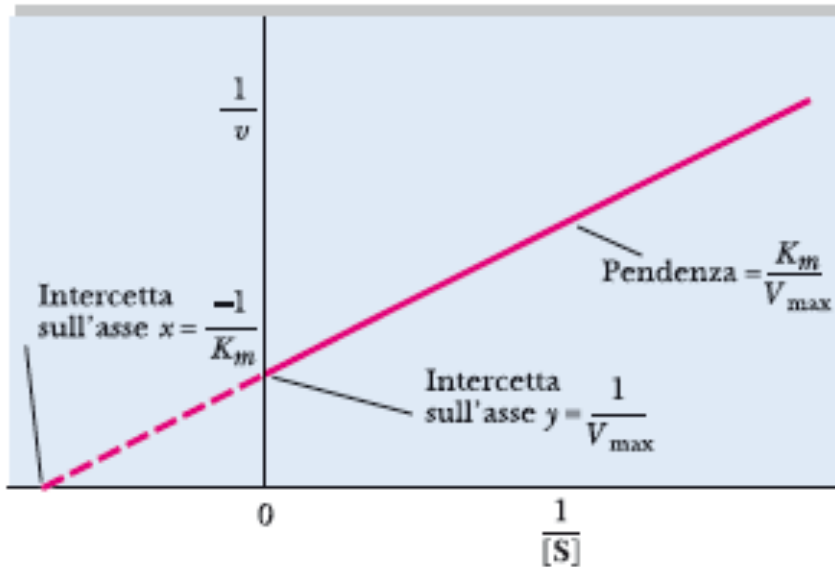


FIGURA 13.9 Grafico dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk.

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

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

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

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



# Inibizione enzimatica

**Inibitori enzimatici: molecole che interferiscono con la catalisi rallentando o bloccando le reazioni catalizzate da enzimi**

**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**

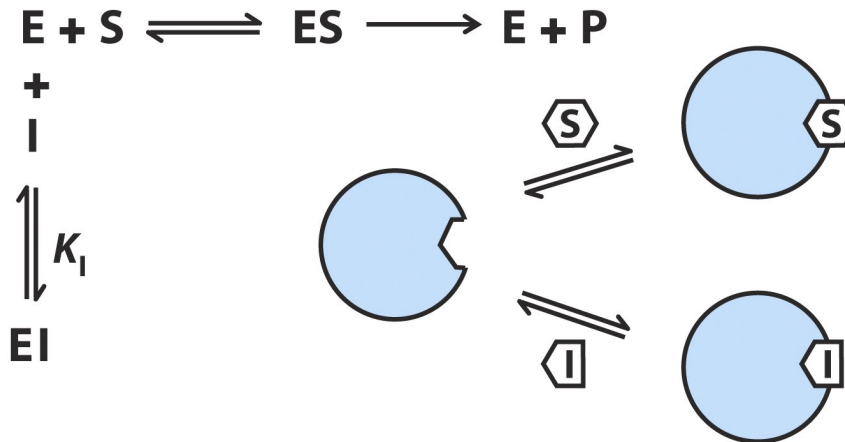
**Gli inibitori sono suddivisi in due classi:**

**inibitori reversibili**

**inibitori irreversibili**

# INIBITORI REVERSIBILI

## (a) Competitive inhibition

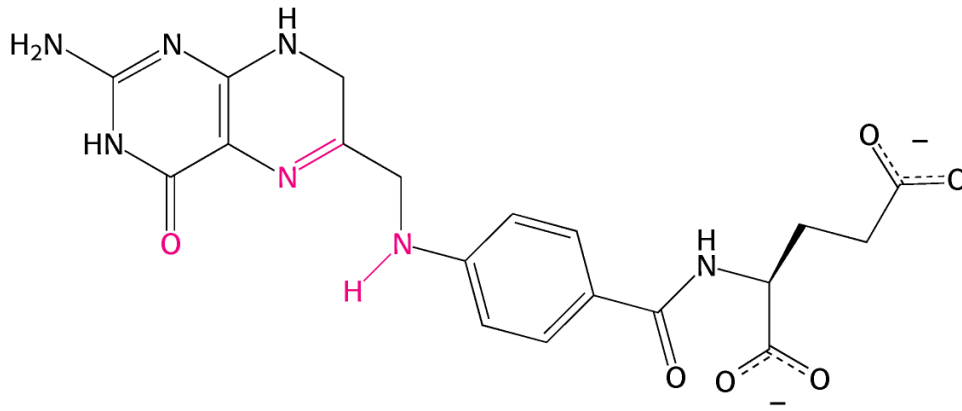


L' inibitore compete con il substrato per il legame al sito attivo dell' enzima

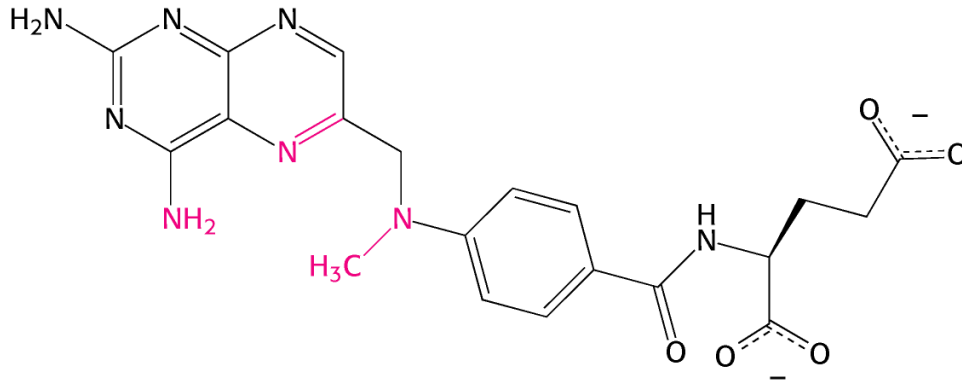
Il legame ad S ed il legame ad I sono processi competitivi e mutualmente esclusivi

In genere l'inibitore è un analogo strutturale del substrato che forma un complesso EI senza subire la catalisi  
può essere rimosso aggiungendo altro substrato

Un inibitore competitivo diminuisce la velocità della reazione catalizzata diminuendo la frazione di molecole enzimatiche disponibili per il legame con il substrato



**Dihydrofolato**



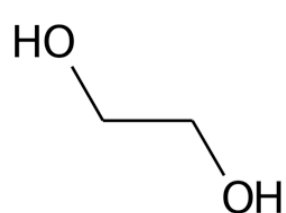
**Metotrexato**

**Il metotressato è un analogo strutturale del diidrofolato, coenzima della diidrofolato reduttasi (biosintesi dei nucleotidi)**

**Si lega all'enzima 1000 volte più saldamente del suo substrato naturale**

**Viene usato come farmaco antitumorale**

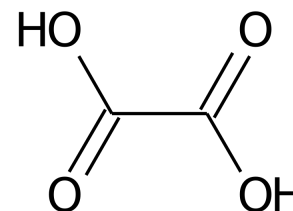
## L'etanolo come inibitore competitivo nella terapia dell'avvelenamento da glicol-etilenico e da metanolo



glicol etilenico



aldeide  
ossalica



acido ossalico  
**tossico**



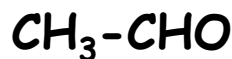
metanolo



formaldeide  
**tossica**



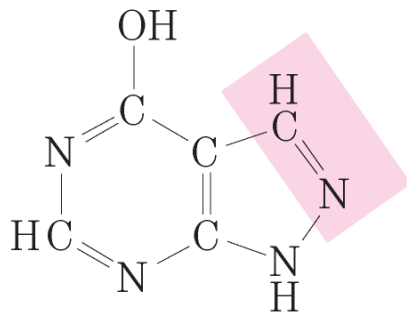
etanolo



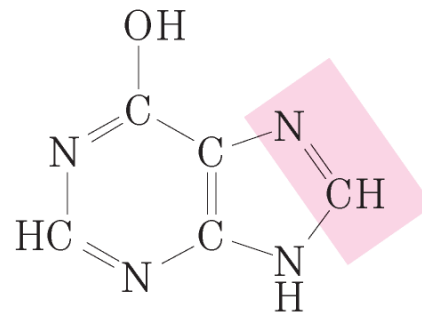
acetaldeide  
**facilmente metabolizzabile**

L'etanolo è un inibitore competitivo di ADH

La terapia consiste in 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

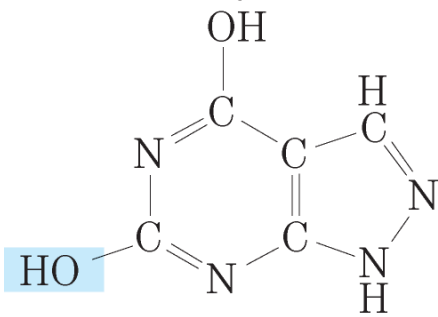


Allopurinolo



Ipxoxantina  
(forma enolica)

xantina  
ossidasi

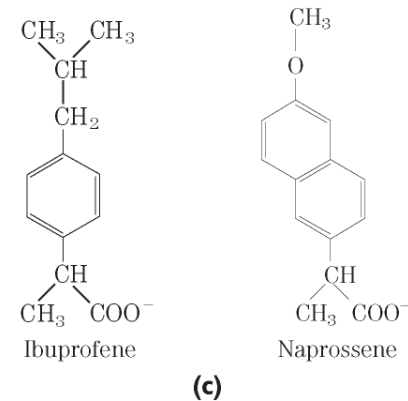
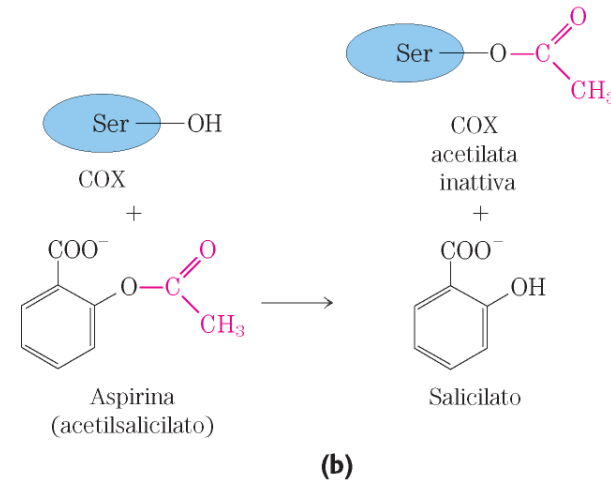
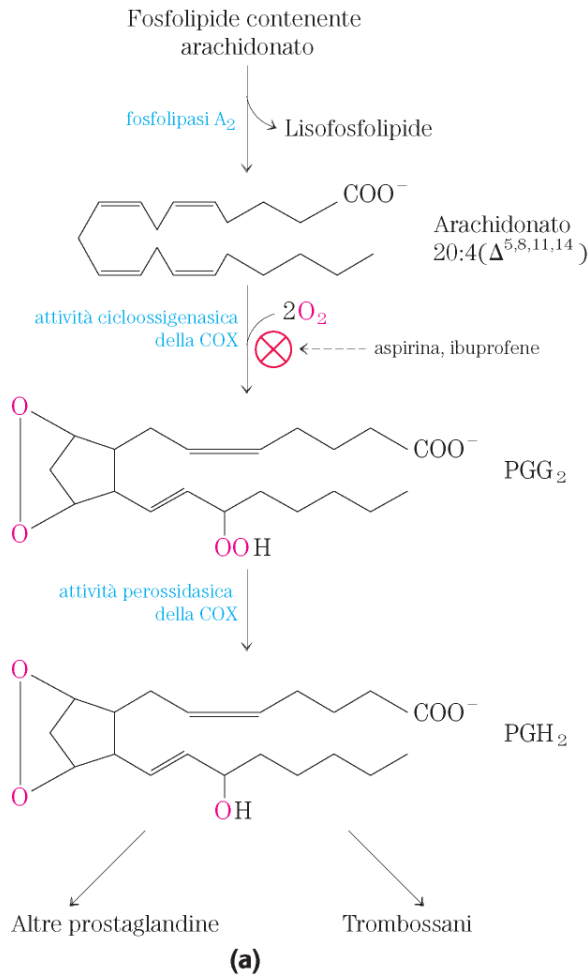


Ossipurinolo

## Allopurinolo farmaco antigottoso

Inibitore competitivo della  
**xantina ossidasi** (catabolismo  
delle basi puriniche)

La gotta è causata da alti  
livelli di acido urico nel sangue  
e nei tessuti, prodotto da un  
carico troppo alto di purine che  
si deposita nelle giunture delle  
articolazioni e nei tubuli renali  
sotto forma di cristalli di urato  
di sodio



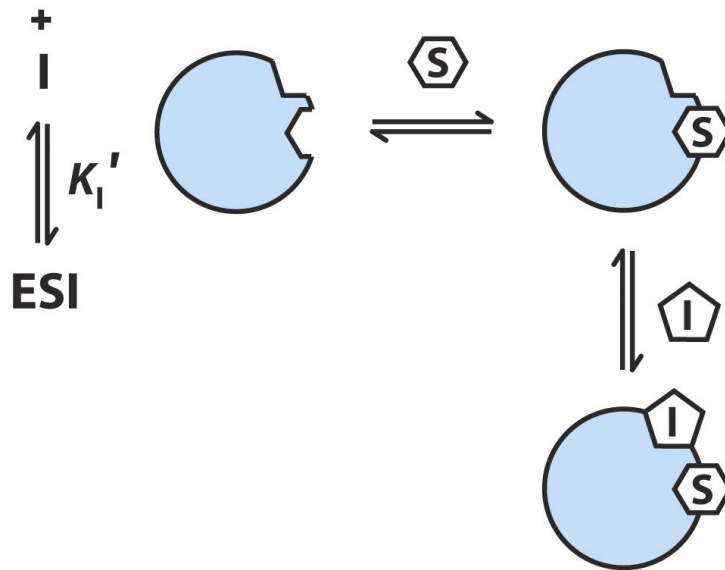
L' **aspirina** (acetilsalicilato) è un inibitore della **cicloossigenasi (COX)** (sintesi prostaglandine)

Le prostaglandine regolano diversi processi cellulari tra cui:

- l'instaurarsi di processi infiammatori, febbrili e dolorosi
- la secrezione di mucina, protettore della mucosa gastrica dai danni degli acidi e delle proteasi

# INIBIZIONE INCOMPETITIVA

## (b) Uncompetitive inhibition



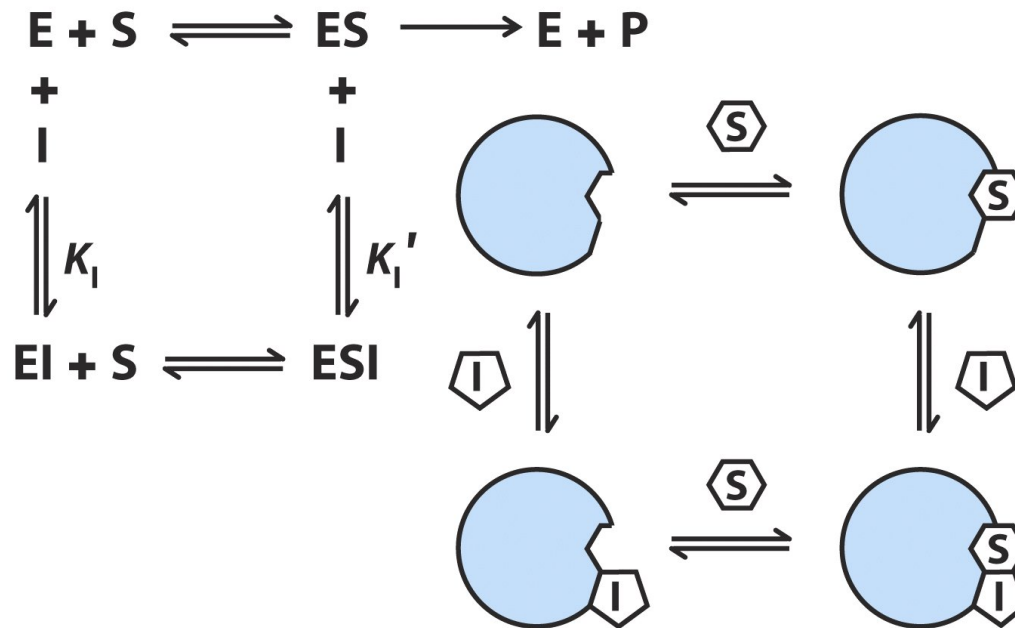
L'inibitore si lega a un sito diverso da quello del substrato quando si è già formato il complesso E-S, ma il complesso E-I-S non procede verso la formazione dei prodotti.

Riduzione della [ES]

L'inibizione incompetitiva non può essere rimossa aumentando [S]



### (c) Mixed inhibition



L'inibitore si lega a un sito distinto da quello che lega il substrato ma si può legare sia ad E sia ad ES

Come per l'inibizione incompetitiva, l'inibizione mista non può essere rimossa aumentando [S]

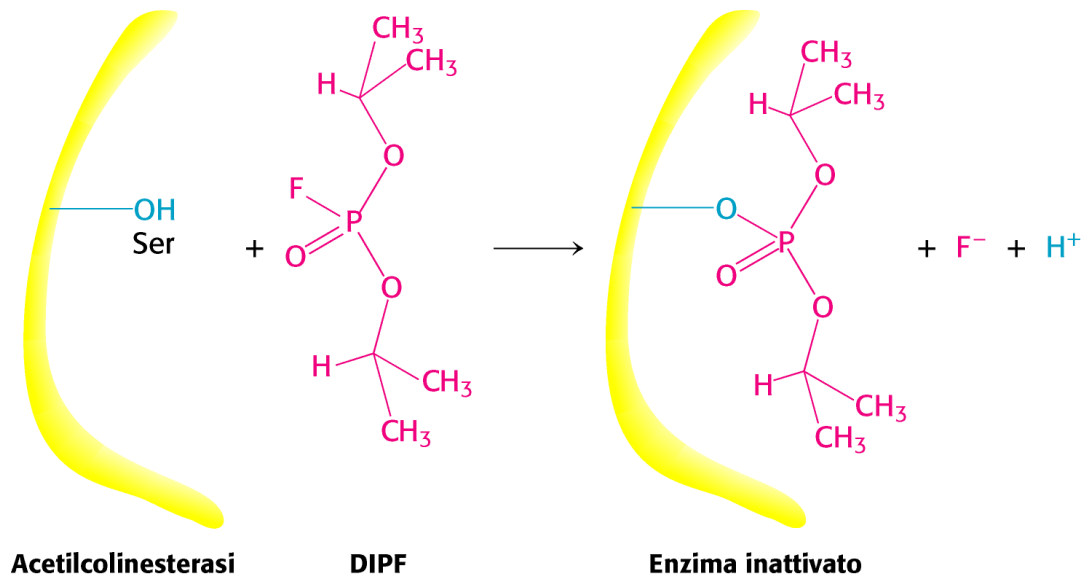
# INIBIZIONE IRREVERSIBILE

Gli inibitori irreversibili si combinano o distruggono un gruppo funzionale dell'enzima che è essenziale per la sua attività catalitica.

Utili nello studio dei meccanismi enzimatici e per individuare i gruppi coinvolti nella catalisi

- reagenti gruppo-specifici
- analoghi del substrato
- inibitori suicidi

# Reagenti gruppo-specifici

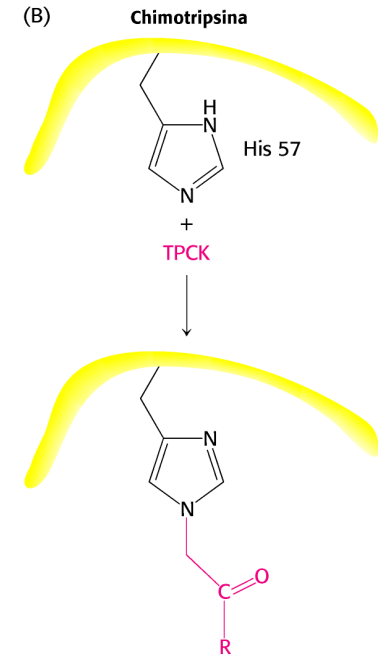
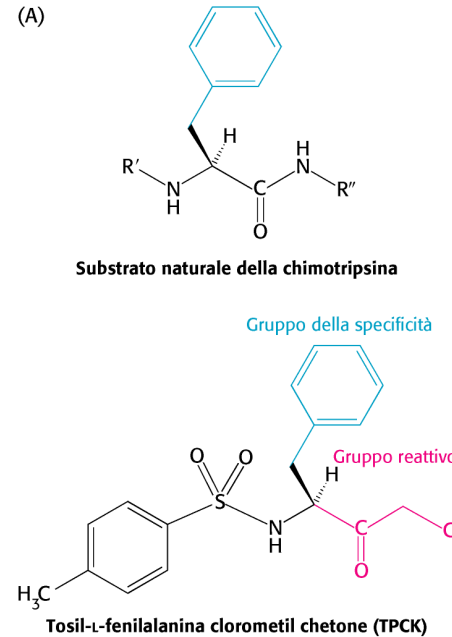
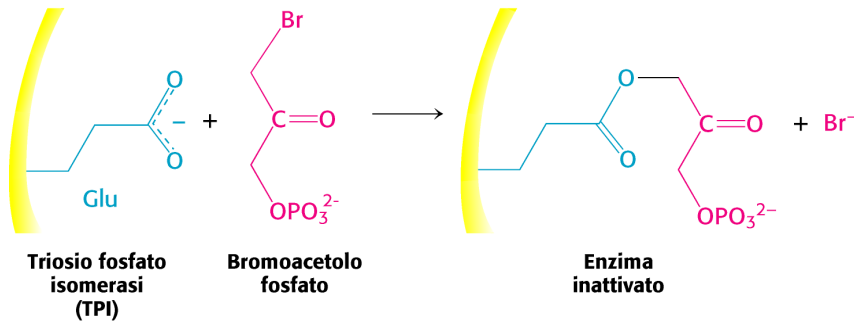


**Diisopropilfluorofosfato (DIFP): è un potente gas nervino**

**DIFP disattiva irreversibilmente l'enzima acetilcolinesterasi, sistema fondamentale per il funzionamento del sistema nervoso**

# Analoghi del substrato o marcatori per affinità

analoghi strutturali del substrato  
si legano covalentemente ai residui AA del sito attivo  
più specifici dei reagenti gruppo-specifici



# Inibitori suicidi

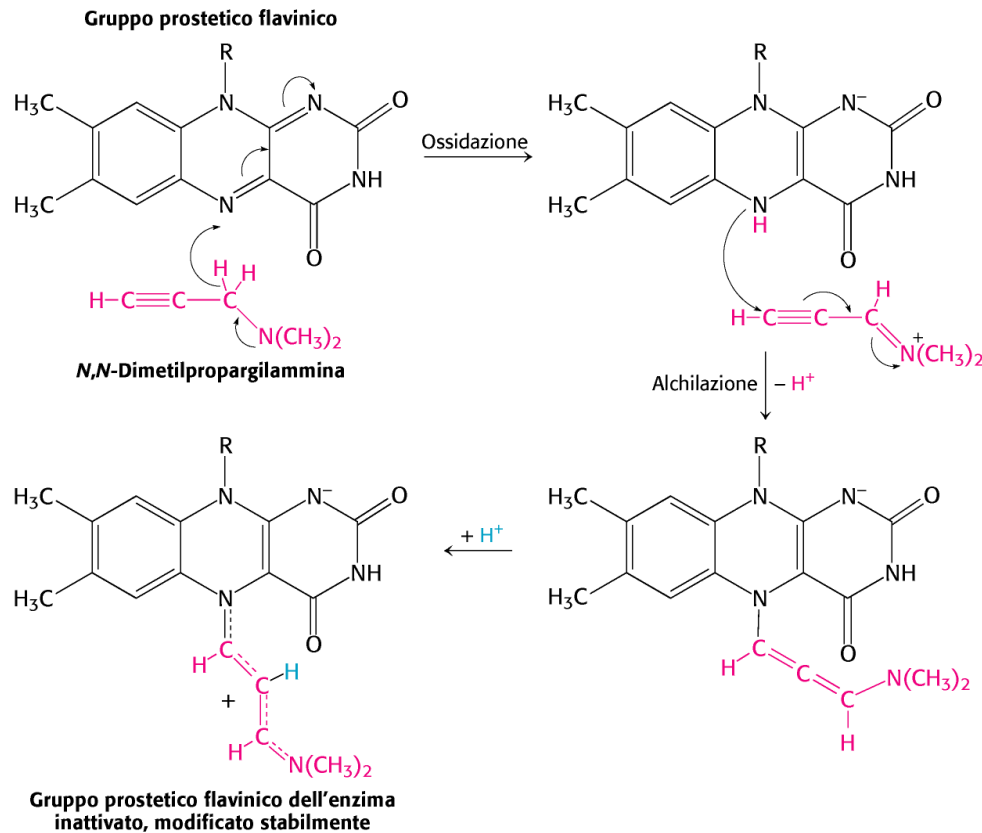
portano avanti le prime tappe della reazione enzimatica normale, ma, invece di essere trasformati nel prodotto normale della reazione, vengono convertiti in composti molto reattivi che si combinano in modo irreversibile con l'enzima

definiti anche

## inattivatori basati sul meccanismo

in quanto utilizzano il meccanismo normale della reazione enzimatica per inattivare l'enzima

La produzione di questo tipo di inibitori è uno dei campi di ricerca che la moderna farmacologia sta esplorando per ottenere nuovi agenti terapeutici efficaci, specifici e privi di effetti collaterali



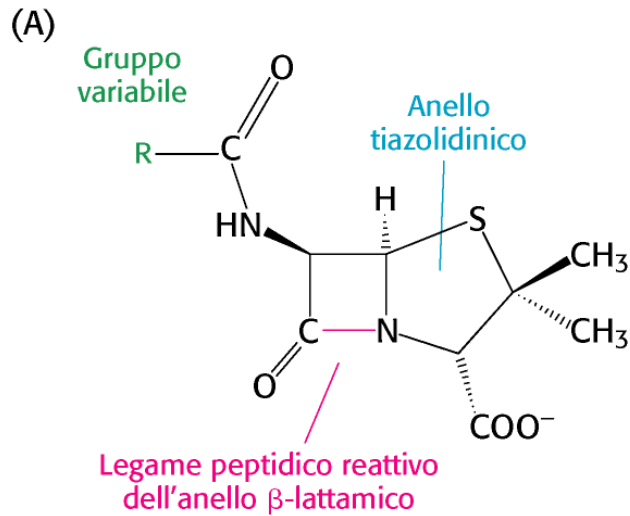
## N,N-dimetilpropargilamina

Inibisce l'enzima Monoammina ossidasi (MAO) legandosi covalentemente al gruppo prostetico dell'enzima

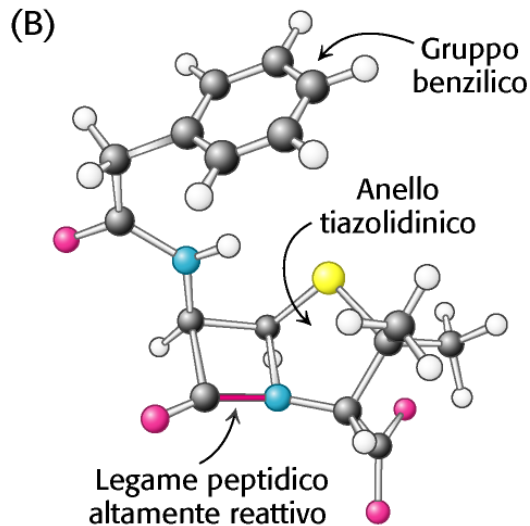
MAO agisce sui neurotrasmettitori dopamina e serotonina abbassando i loro livelli nelle cellule cerebrali

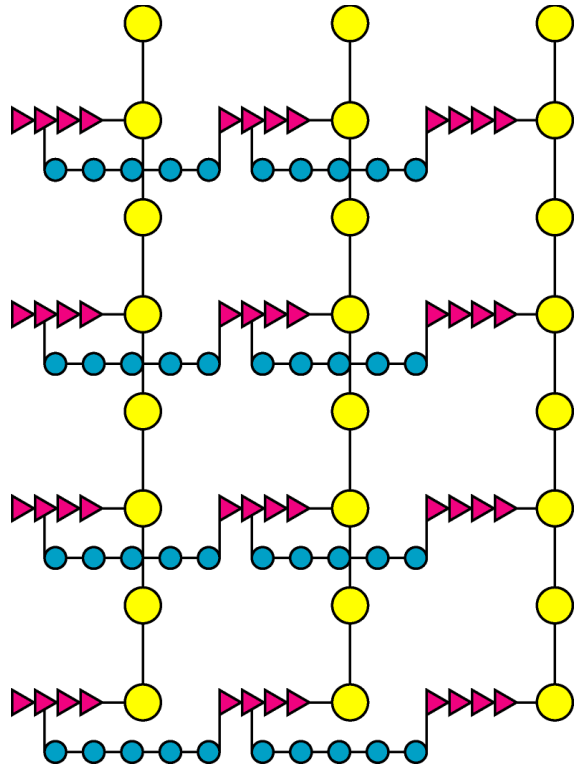
meccanismo sfruttato nella terapia del morbo di Parkinson (associato a bassi livelli di dopamina) e nella depressione (associata a bassi livelli di serotonina)

# La penicillina inattiva irreversibilmente un enzima chiave della sintesi della parete batterica

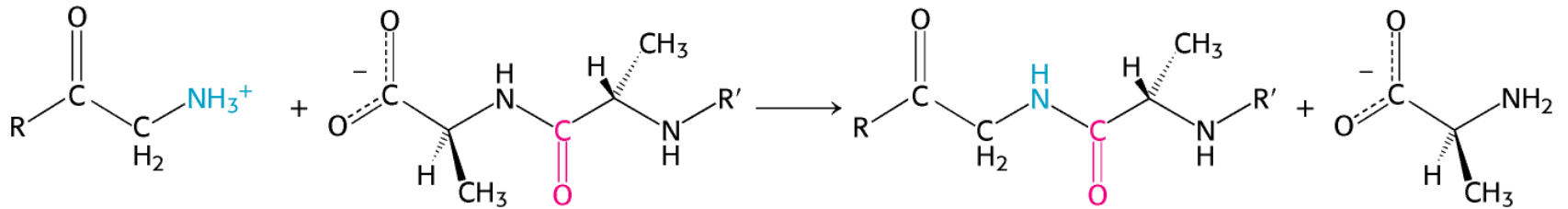


Le proprietà antibiotiche della penicillina sono basate sulla instabilità dell'anello  $\beta$ -lattamico





Peptidoglicano di *Staphylococcus aureus*



Residuo terminale di glicina del ponte pentaglicina

Unità terminale D-Ala-D-Ala

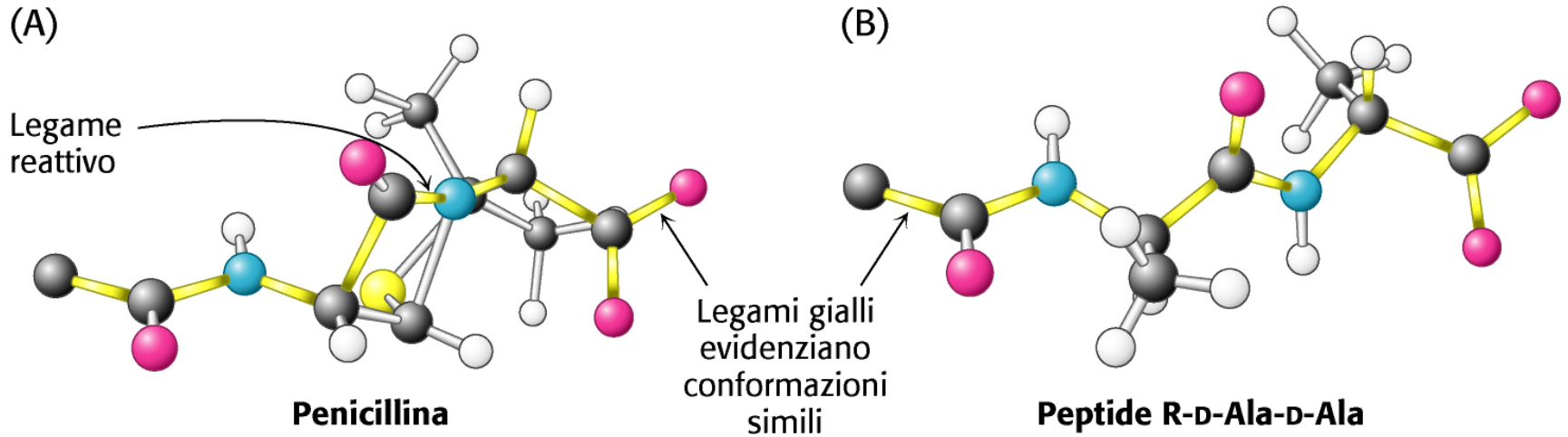
Legame trasversale Gly-D-Ala

D-Ala

**Formazione dei legami trasversali nel peptidoglicano**

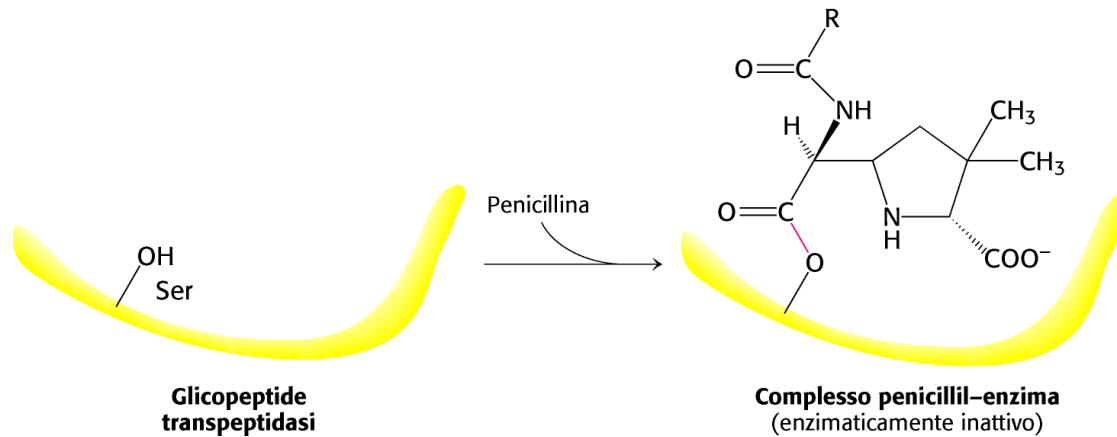
**La reazione è catalizzata da una transpeptidasi che riconosce un residuo D-Ala-D-Ala**





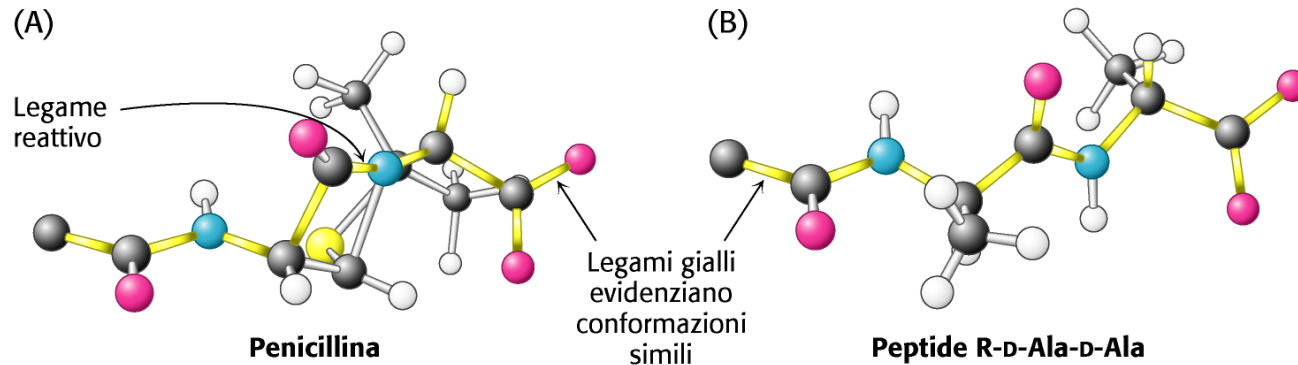
**La conformazione della penicillina in vicinanza del legame peptidico reattivo è molto simile alla conformazione proposta per lo stato di transizione della reazione transpeptidasica...**

... può così entrare facilmente nel sito attivo dell'enzima dove si lega in maniera irreversibile



**Il complesso penicillil-enzima non procede oltre, la transpeptidasi è inibita irreversibilmente e la sintesi della parete batterica si arresta.**

# Resistenza alla penicillina



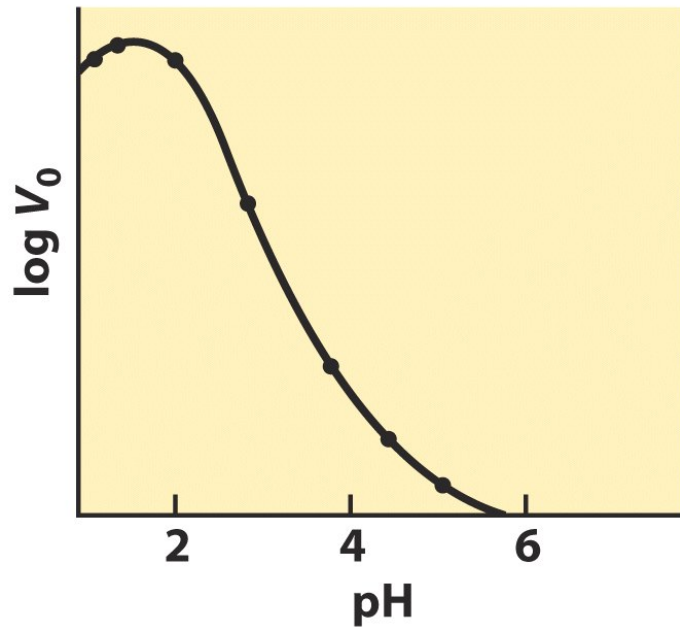
La maggior parte dei batteri resistenti alla penicillina esprimono la **penicillinasi**, una  $\beta$ -lattamasi che inattiva la penicillina rompendo l'anello  $\beta$ -lattamico

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

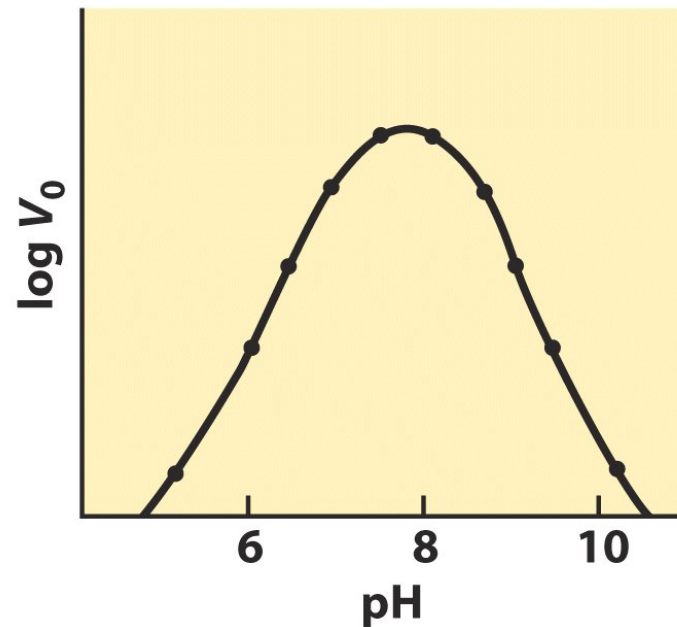
**Lo stato di transizione di una reazione enzimatica è difficilmente identificabile in quanto instabile**

**Utilizzando molecole simili allo stato di transizione (analoghi dello stato di transizione) con affinità molto più elevata ( $10^2$ - $10^6$  volte) nei confronti dell'enzima si possono avere informazioni sulla struttura dello stato di transizione e sul meccanismo della catalisi**

## L'attività enzimatica viene modificata dal pH



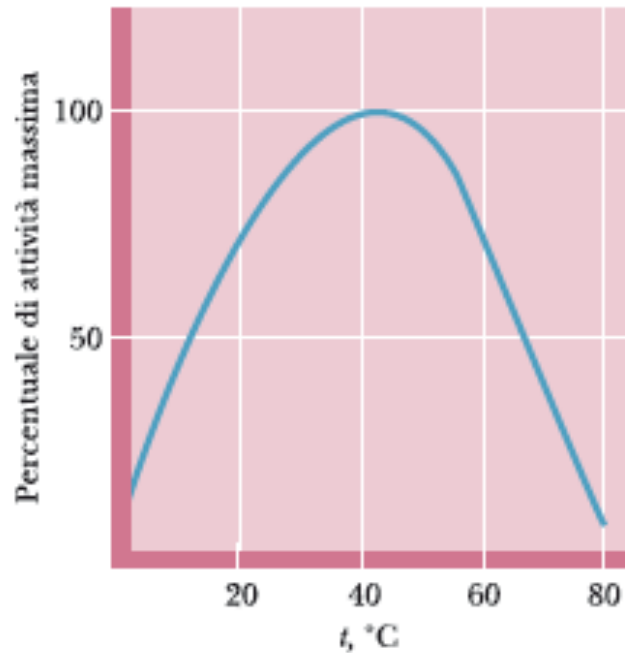
**(a) Pepsin**



**(b) Glucose 6-phosphatase**

Gli enzimi hanno un valore (o un range) di pH ottimale in corrispondenza del quale la loro attività è massima

Variazione in funzione del pH dello stato di ionizzazione delle catene laterali di AA critici per il mantenimento della conformazione attiva o per l'attività catalitica



**FIGURA 13.12** Effetto della temperatura sull'attività enzimatica.

**Come la maggior parte delle reazioni chimiche, la velocità delle reazioni catalizzate da enzimi generalmente aumenta con l'aumentare della temperatura.**

**A temperature superiori a 50°C l'attività diminuisce a causa della denaturazione termica della struttura proteica**