

Inibizione e regolazione dell'attività enzimatica 1

- Oltre al substrato altre specie chimiche possono combinarsi con gli enzimi alterandone o modulandone l'attività catalitica sia inibendola che incrementandola
- Queste sostanze definite modulatori o **inibitori** possono essere costituenti normali delle cellule o entrare dall'ambiente nelle cellule
- La combinazione di un enzima con un inibitore è una reazione chimica e come tale può essere completamente reversibile, parzialmente reversibile o essenzialmente irreversibile
- I veleni sono tipici inibitori irreversibili: in questo caso l'approccio di Michaelis-Menten per la descrizione dell'effetto dell'inibitore sulla cinetica enzimatica non può essere utilizzato in quanto esso si basa sull'assunzione della formazione di un complesso reversibile tra enzima ed enzima complessato

Inibizione e regolazione dell'attività enzimatica 2

- La modulazione reversibile dell'attività enzimatica è uno dei meccanismi base utilizzati dalla cellula per un'utilizzazione ottimale dei nutrienti nelle diverse vie biosintetiche
- Un esempio tipico di regolazione è l'inibizione a feedback, in cui il controllo di una catena di reazioni enzimatiche è effettuato tramite l'inibizione del prodotto finale sul primo enzima della catena stessa
- Nel caso di inibizioni reversibili l'approccio di Michaelis-Menten risulta utile nella descrizione degli effetti cinetici della regolazione
- Gli inibitori sono quindi generalmente classificati in base al loro effetto sulle costanti cinetiche del modello di Michaelis-Menten.

Inibizione e regolazione dell'attività enzimatica 3

INIBITORE

Competitivo



la sua presenza determina
un aumento di K_m ma non
altera v_{max}



Il suo effetto può essere
contrastato aumentando la
C di substrato

Non competitivo



la sua presenza determina
una diminuzione di v_{max} ma
non altera K_m



inattiva il complesso ES,
quindi la sua azione non può
essere annullata incrementando
la C di substrato

Inibizione e regolazione dell'attività enzimatica 4

I meccanismi di modulazione enzimatica reversibile variano essenzialmente in funzione del tipo di inibizione:

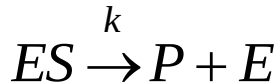
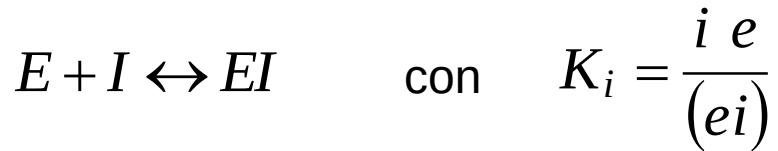
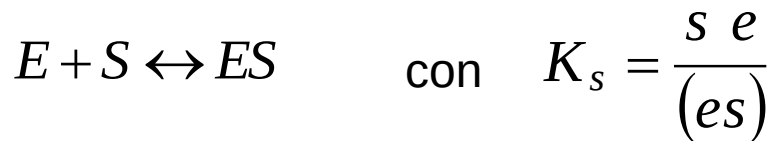
- 1) Nel caso di **inibizione competitiva** gli inibitori sono in genere degli analoghi strutturali del substrato che occupando il sito attivo abbassano la concentrazione di enzima disponibile per la reazione con il substrato;
- 2) Nel caso di **inibizione non-competitiva** il meccanismo tipico è il controllo allosterico: l'inibitore si lega ad un sito attivo diverso da quello del substrato, determinando una variazione conformazionale dell'enzima che ne riduce l'attività nei confronti del substrato.

Inibizione Competitiva 1



Diminuisce la quantità di enzima disponibile

Nessun inibitore presente, il substrato si lega



Utilizzando il bilancio dell'enzima e sostituendovi dentro le espressioni per e ed (ei) in funzione di (es) si ottiene

$$e_0 = e + (es) + (ei) = \frac{K_s}{s} (es) + (es) + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s} (es) = (es) \left(\frac{K_s}{s} + 1 + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s} \right)$$

Inibizione Competitiva 2

$$e_0 = e + (es) + (ei) = \frac{K_s}{s}(es) + (es) + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s}(es) = (es) \left(\frac{K_s}{s} + 1 + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s} \right)$$

da cui

$$v = \frac{ke_0}{\frac{K_s}{s} + 1 + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s}} = \frac{ke_0 s}{K_s + s + \frac{i}{K_i} K_s} = \frac{ke_0 s}{s + K_s \left(1 + \frac{i}{K_i} \right)}$$

$$V = \frac{V_{\max} s}{K_M \left(1 + \frac{i}{K_I} \right) + s}$$

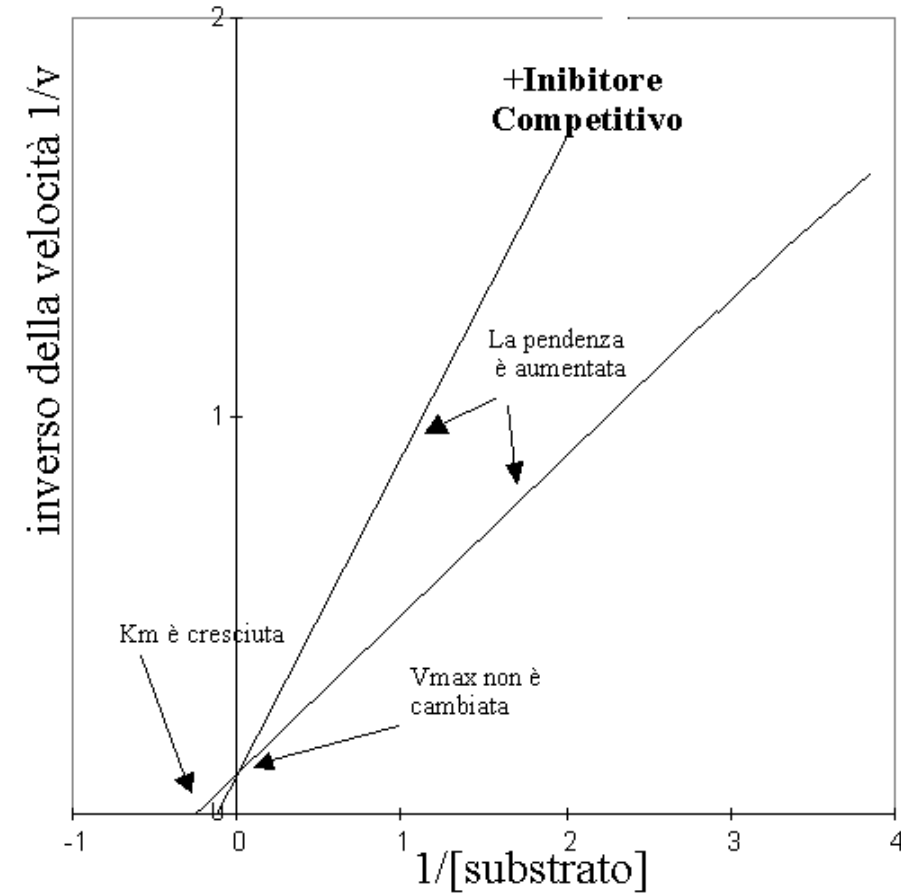
Inibizione agisce sulla K_M

Con inibitore

$$V = \frac{V_{\max} s}{K_M + s}$$

Senza inibitore

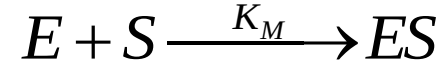
Inibizione Competitiva 3



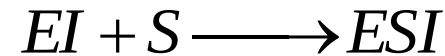
K_M indica l'affinità Enzima-Substrato:
avrà un valore medio tra

$$K_M = \frac{c_E c_S}{c_{ES}}$$

E^0



Affinità massima



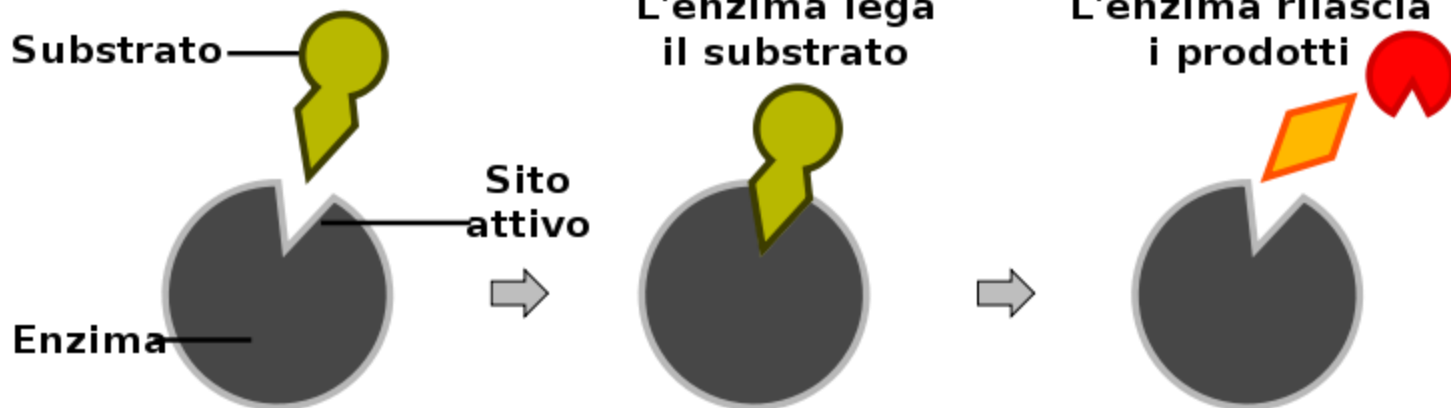
Affinità nulla

V_{max} è la velocità di reazione ad alte concentrazioni di substrato.

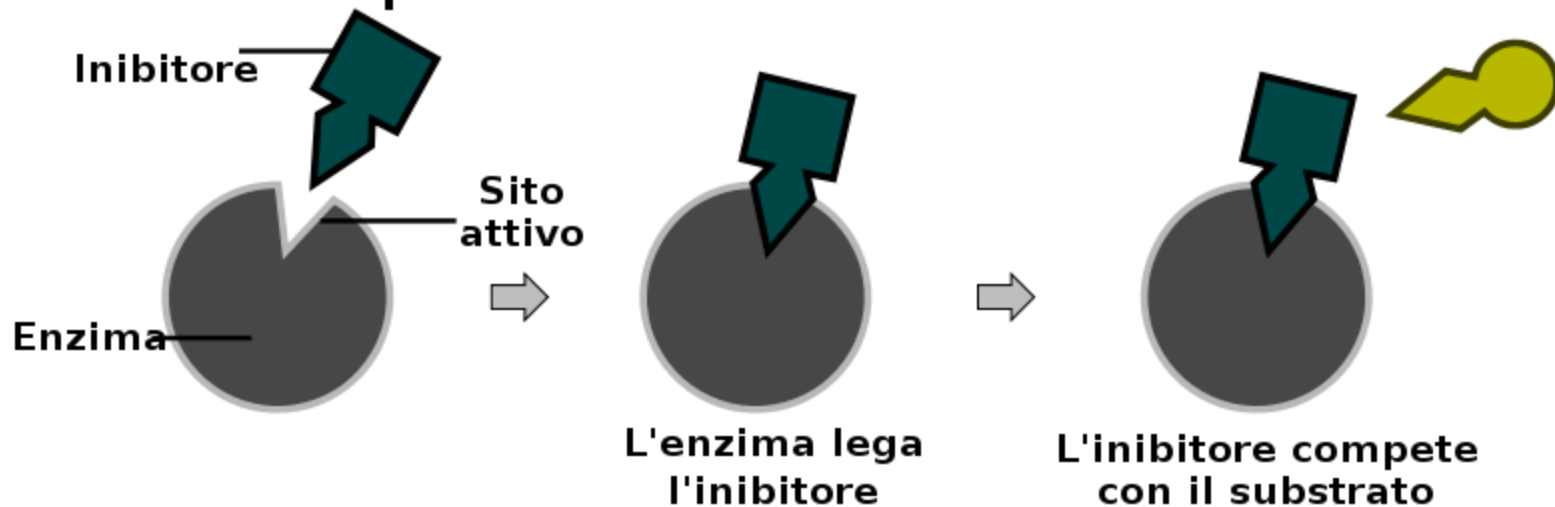
Ad alte concentrazioni di substrato l'inibitore non inibisce più l'enzima.

Quindi la velocità massima di reazione non viene rallentata

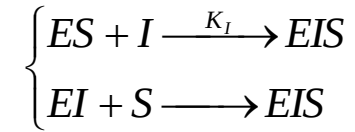
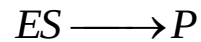
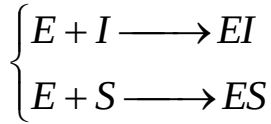
Reazione



Inibizione competitiva



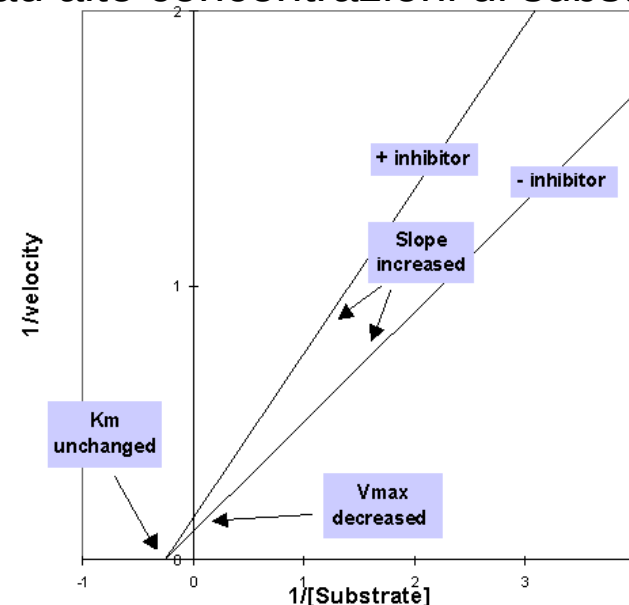
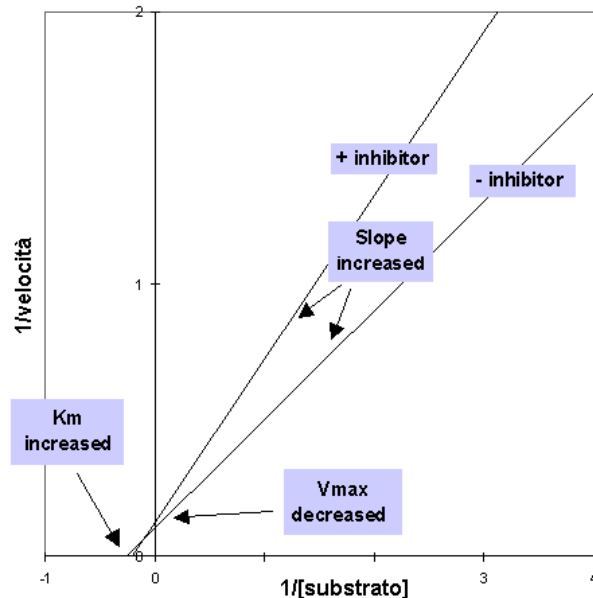
Inibizione non Competitiva 1



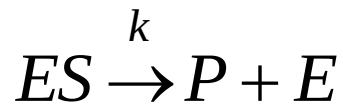
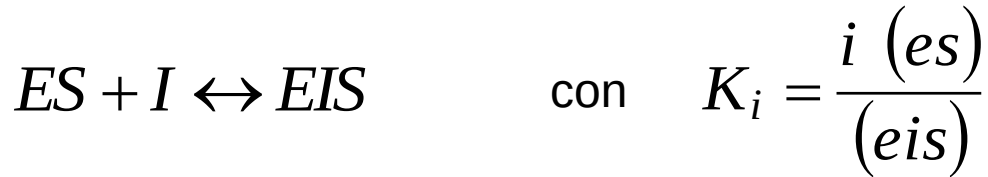
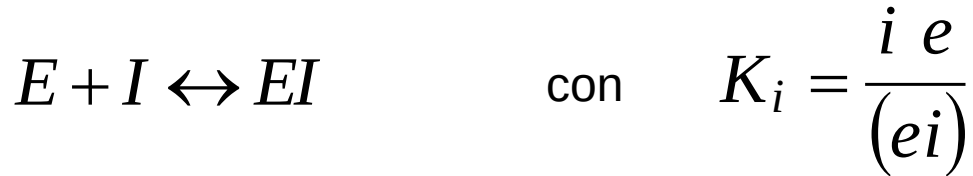
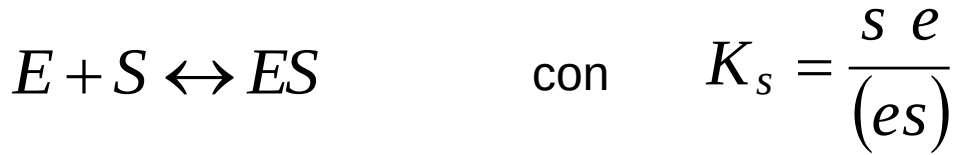
L'inibitore non influenza la capacità del substrato di legarsi all'enzima, ma inattiva il complesso ES

K_M : rimane invariato

V_{max} diminuisce perché gli inibitori agiscono anche ad alte concentrazioni di substrato



Inibizione non Competitiva 2



Utilizzando il bilancio dell'enzima e sostituendovi dentro le espressioni per e , (ei) ed (eis) in funzione di (es) si ottiene

$$e_0 = e + (es) + (ei) + (eis) = \frac{K_s}{s}(es) + (es) + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s}(es) + \frac{i}{K_i}(es) = (es) \left(\frac{K_s}{s} + 1 + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s} + \frac{i}{K_i} \right)$$

Inibizione non Competitiva 3

$$e_0 = e + (es) + (ei) + (eis) = \frac{K_s}{s}(es) + (es) + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s}(es) + \frac{i}{K_i}(es) = (es) \left(\frac{K_s}{s} + 1 + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s} + \frac{i}{K_i} \right)$$

da cui

$$v = \frac{ke_0}{\frac{K_s}{s} + 1 + \frac{i}{K_i} \frac{K_s}{s} + \frac{i}{K_i}} = \frac{ke_0 s}{K_s + s + \frac{i}{K_i} K_s + \frac{i}{K_i} s} = \frac{ke_0 s}{s \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) + K_s \left(1 + \frac{i}{K_i} \right)} = \frac{ke_0 s / \left(1 + \frac{i}{K_i} \right)}{s + K_s}$$

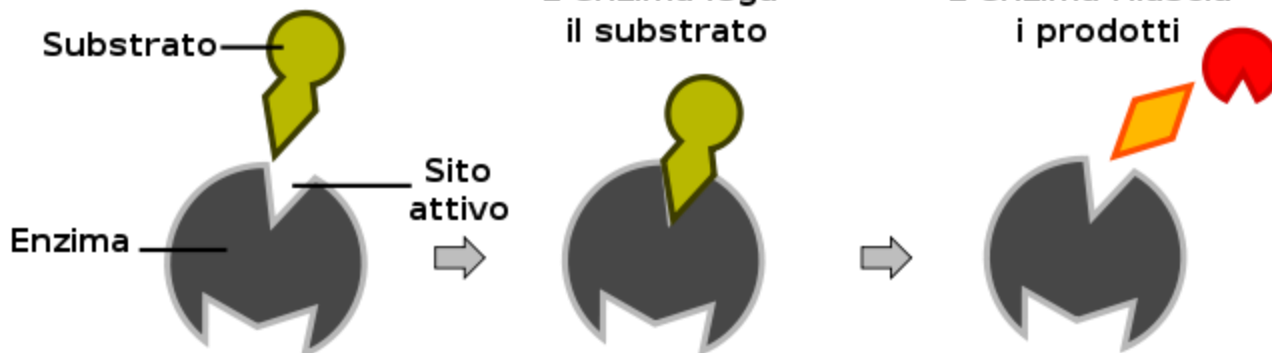
$$V = \frac{V_{\max} s}{(K_M + s) \left(1 + \frac{i}{K_i} \right)}$$

Con inibitore

$$V = \frac{V_{\max} s}{K_M + s}$$

Senza inibitore

Reazione



Inibizione non competitiva



Inibizioni miste 1

- Nell' **inibizione parzialmente competitiva**, l'inibitore e il substrato complessano differenti siti attivi ma il legame con l'inibitore influisce sulla affinità dell'enzima per il substrato;
- Nell' **inibizione parzialmente non-competitiva**, il modello non competitivo precedente è modificato per tener conto della formazione di prodotto anche per degradazione del complesso ternario ma con una velocità ridotta;
- Nel **modello di inibizione mista** si combinano i modelli totalmente non-competitivo e parzialmente competitivo

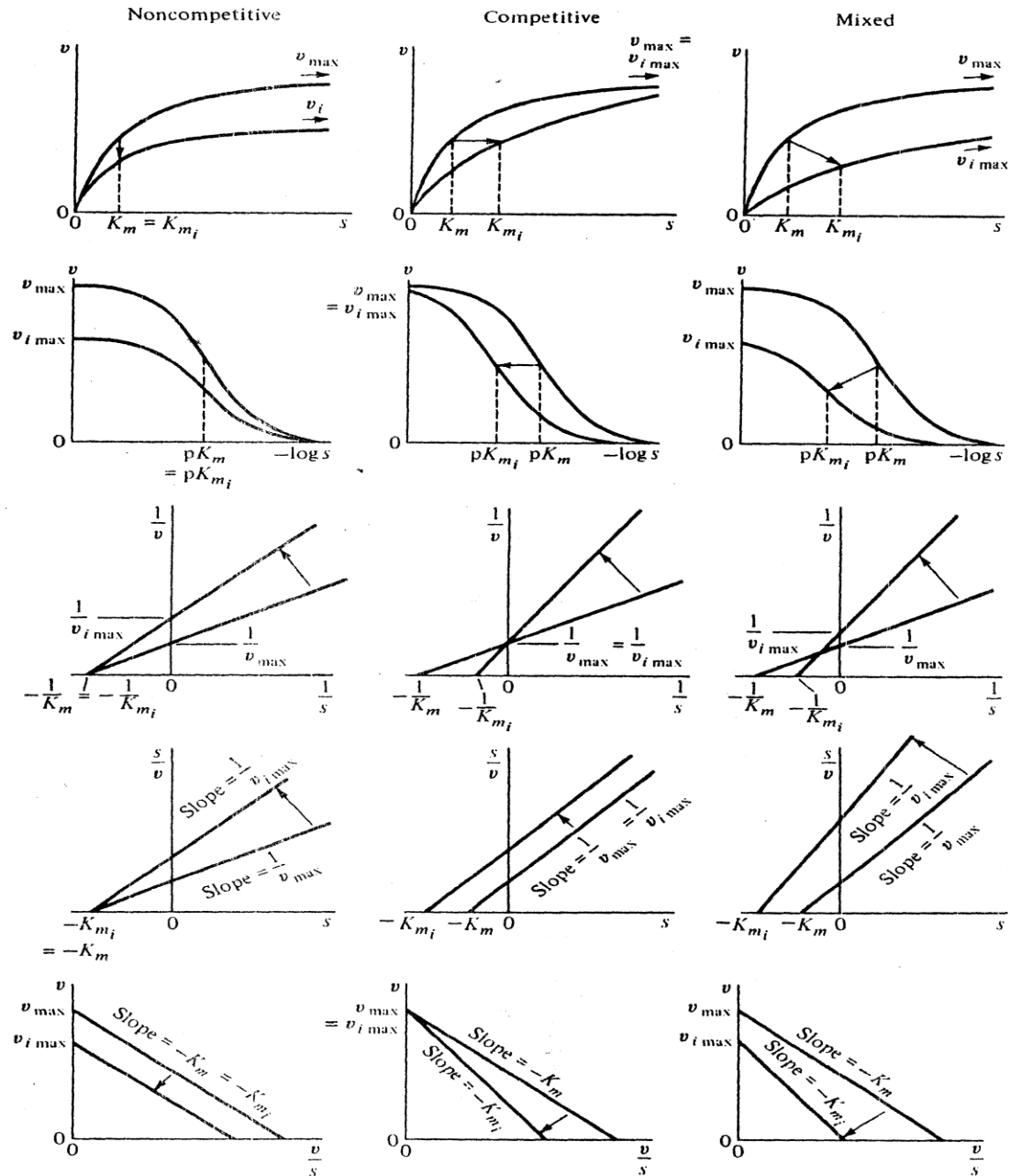
Inibizioni miste 2

	Type	Description	Result
Ia	Fully competitive	Inhibitor adsorbs at substrate binding site	Increase in apparent value of K_m
b	Partially competitive	Inhibitor and substrate combine with different groups; inhibitor binding affects substrate binding	Increase in apparent value of K_m
IIa	Noncompetitive	Inhibitor binding does not affect ES affinity, but ternary EIS (enzyme-inhibitor-substrate) complex does not decompose into products	No change in K_m , decrease of v_{max}
b	Noncompetitive	Same as IIa except that EIS decomposes into product at a finite rate different from that of ES	No change in K_m , decrease of v_{max}
III	Mixed inhibitor		Affects both K_m and v_{max}

Inibizioni miste 3

Type			
Ia	Purely competitive	$\frac{1}{v_{\max}}$	$\frac{1}{K_s(1 + i/K_i)}$
Ib	Partially competitive	$\frac{1}{v_{\max}}$	$\frac{1 + iK_s/K_i K_{is}}{K_s(1 + i/K_i)}$
IIa	Purely noncompetitive	$\frac{1 + i/K_i}{v_{\max}}$	$\frac{1}{K_s}$
IIb	Partially noncompetitive	$\frac{1 + i/K_i}{v_{\max} + k^i e_0/K_i}$	$\frac{1}{K_s}$
Ib and IIa	Mixed	$\frac{1 + iK_s/K_i K_s}{v_{\max}}$	$\frac{1 + iK_s/K_i K_{is}}{K_s(1 + i/K_i)}$

Inibizioni miste 4



Inibitori sintetici e naturali

- Dal momento che il blocco o l'inibizione dell'attività enzimatica può causare la morte selettiva di microrganismi patogeni o correggere uno sbilanciamento metabolico, la maggior parte dei farmaci in commercio sono proprio inibitori enzimatici.
- Inibitori comunemente usati in campo agro-alimentare sono gli erbicidi e pesticidi.
- Gli inibitori enzimatici non sono però esclusivamente molecole sintetiche: essi sono spesso composti naturali, coinvolti nella regolazione del metabolismo. Ad esempio, gli enzimi di un pathway metabolico spesso sono inibiti dai prodotti finali del pathway stesso. Questo tipo di feedback negativo rallenta il flusso attraverso un pathway quando i prodotti cominciano a formarsi ed è un'importante strategia per mantenere l'omeostasi in una cellula.
- Altri inibitori enzimatici cellulari sono proteine che si legano ed inibiscono uno specifico enzima bersaglio. Questo permette di controllare gli enzimi che potrebbero danneggiare la cellula, come le proteasi o le nucleasi.
- Inibitori enzimatici naturali possono anche essere veleni ed essere usati come difesa contro i predatori o come arma per uccidere una preda.

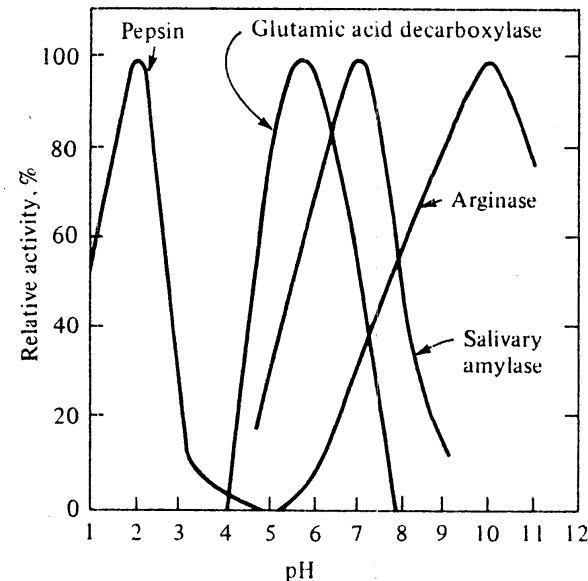
Altri fattori influenzanti l'attività enzimatica

- pH
- temperatura
- forze idrodinamiche, di pressione idrostatica e di tensione interfacciale
- agenti chimici (quali alcol, urea e perossido di idrogeno)
- irradiazione mediante luce, suoni o radiazioni ionizzanti

Effetto del pH sulle cinetiche enzimatiche in soluzione

- Gli amminoacidi sono costituiti da gruppi basici, neutri e acidi che determinano la presenza sull'enzima di siti carichi sia positivamente che negativamente per un dato pH
- Questi gruppi ionizzabili sono spesso parte integrante del sito attivo in modo tale che la catalisi avviene propriamente solo se tali gruppi possiedono specifiche cariche
- L'effetto del pH sulla dissociazione dei gruppi ionizzabili è quindi responsabile dell'eventuale riduzione delle proprietà catalitiche dell'enzima diminuendo la frazione di siti attivi caratterizzati dalle proprietà di carica idonee alla corretta formazione del complesso attivato

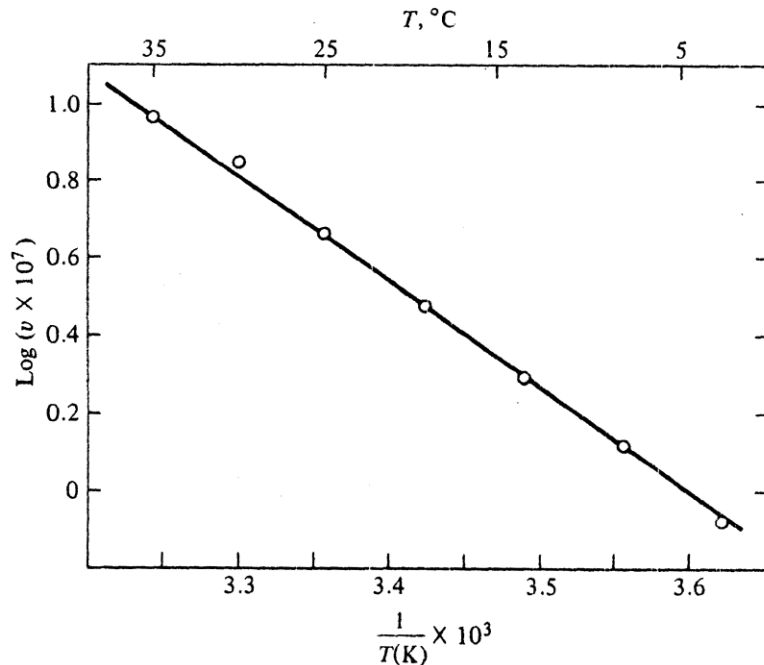
Effetto del pH sull'attività di differenti enzimi



Effetto della temperatura sulla velocità delle reazioni enzimatiche

L'equazione di Arrhenius fornisce la relazione tra temperatura e costante cinetica di una reazione

$$k = Ae^{-E_a / RT}$$



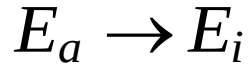
Il tipico andamento lineare del diagramma di Arrhenius è osservabile per molti sistemi la cui cinetica è catalizzata da enzimi. Tuttavia l'intervallo di temperatura per cui tale dipendenza lineare è osservata è spesso molto limitato in quanto al di sopra di 45-50°C inizia la denaturazione delle proteine. La deattivazione termica degli enzimi può essere reversibile o irreversibile.

Deattivazione degli enzimi 1

Denaturant	Target	Driving force	End product
Physical denaturants			
Heat	Hydrogen bonds	Increase of denatured conformations due to increased thermal movement and decreased solvent structure Irreversible covalent modification (e.g., disulfide interchange)	HD Aggregates
Cold	Hydrophobic bonds solvated groups	Altered solvent structure Dehydration	Aggregates Inactive monomers
Mechanical forces	Solvated groups void volume	Changes in solvation and void volume Shearing	HD Inactive monomers
Radiation	Functional groups (e.g., cySH, peptide bonds)	Decrease of structure-forming interactions after photooxidation or attack by radicals	HD Aggregates
Chemical denaturants			
Acids	Buried uncharged groups (e.g., his, peptide bonds)	Decrease of structure-forming ionic interactions	RC
Alkali	Buried uncharged groups [e.g., tyr, cySH, (cyS) ₂]	Decrease of structure-forming ionic interactions	RC
Organic H-bond-formers	Hydrogen bonds	Decrease of structure-forming H bonds between water and native conformation	RC
Salts	Polar and nonpolar groups	"Salting in"/"salting out" bias of polar and nonpolar groups in solvent of increased DK	HD
Solvents	Nonpolar groups	Solvation of nonpolar groups	Highly ordered Peptide-chains with large helical regions
Surfactants	Hydrophobic domains (all surfactants) and charged groups (ionic surfactants only)	Formation of partially unfolded substructures including micellelike regions	ID Large helical regions
Oxidants	Functional groups (e.g., cySH, met, try, and others)	Decrease of structure-forming and/or functional interactions	Inactivated enzyme Sometimes disordered structure
Heavy metals	Functional groups (e.g., cySH, his, and others)	Masking of groups pertinent to structure or function	Inactivated enzyme
Chelating agents	Cations important for structure or function	Ligand substitution or cation removal	Inactivated enzyme
Biological denaturants			
Proteases	Peptide bonds	Hydrolysis of terminal or other peptide bonds	Oligopeptides, amino acids

Deattivazione degli enzimi 2

Il modello più semplice considera l'enzima attivo (E_a) che subisce una deattivazione irreversibile e passa nella forma inattiva (E_i)



con una velocità (r_d) proporzionale alla concentrazione di enzima in forma attiva

$$r_d = k_d e_a$$

Conseguentemente in un sistema chiuso ben miscelato la concentrazione di enzima attivo nel tempo può essere descritto dal modello

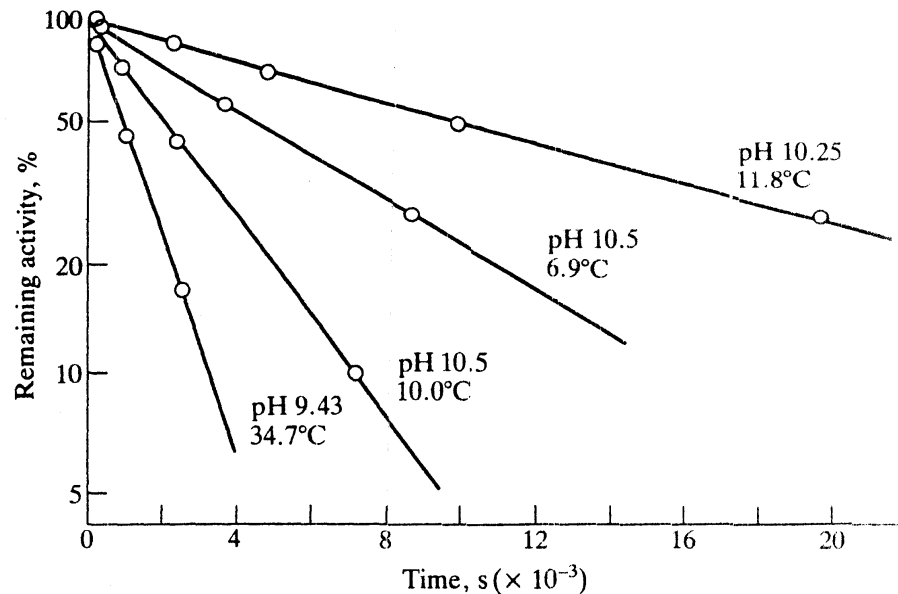
$$\frac{de_a}{dt} = -k_d e_a$$

che integrato da

$$\ln \left[\frac{e_a(t)}{e_a(0)} \right] = -k_d t$$

Deattivazione degli enzimi 3

$$\ln \left[\frac{e_a(t)}{e_a(0)} \right] = -k_d t$$



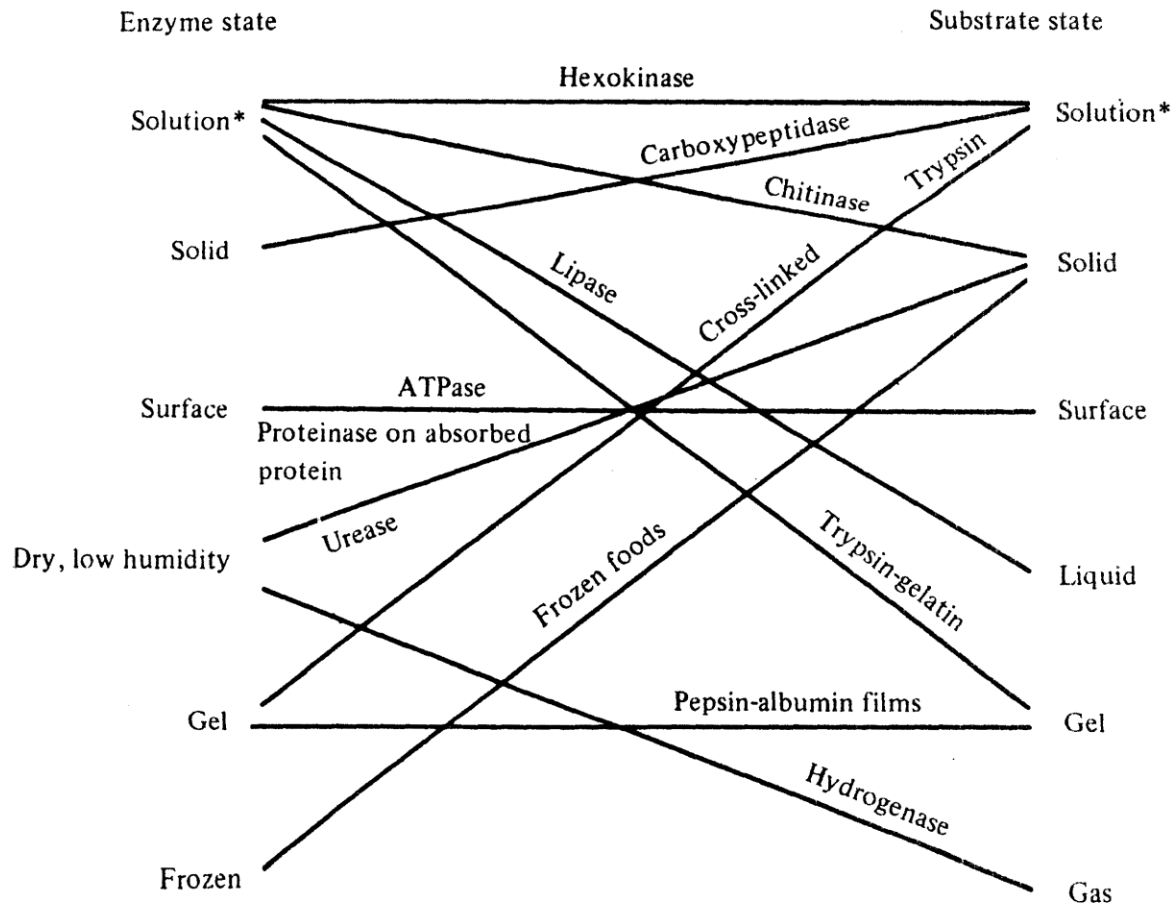
dati sperimentali in accordo con questo modello di deattivazione

Le cinetiche di deattivazione enzimatica vengono generalmente determinate esponendo prima l'enzima senza substrato a specifiche condizioni denaturanti per un certo intervallo di tempo, e riportando poi l'enzima a contatto con il substrato in condizioni standard.

In realtà però la cinetica di deattivazione enzimatica può essere fortemente influenzata dallo stato in cui l'enzima si trova nel sistema: ad esempio l'enzima libero e il complesso enzima-substrato possono deattivarsi con differenti cinetiche.

Reazioni enzimatiche in sistemi eterogenei 1

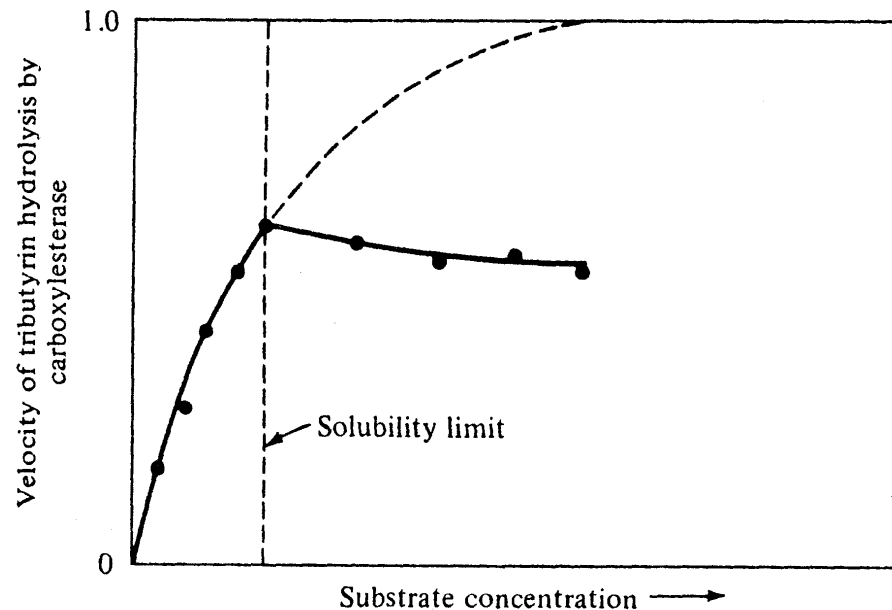
- Tutti i modelli finora considerati prevedevano l'interazione tra un enzima in soluzione e un substrato anch'esso disciolto in soluzione.
- Si tratta di una situazione usuale ma non universale.



Enzimi in differenti stati che catalizzano reazioni di substrato in differenti forme

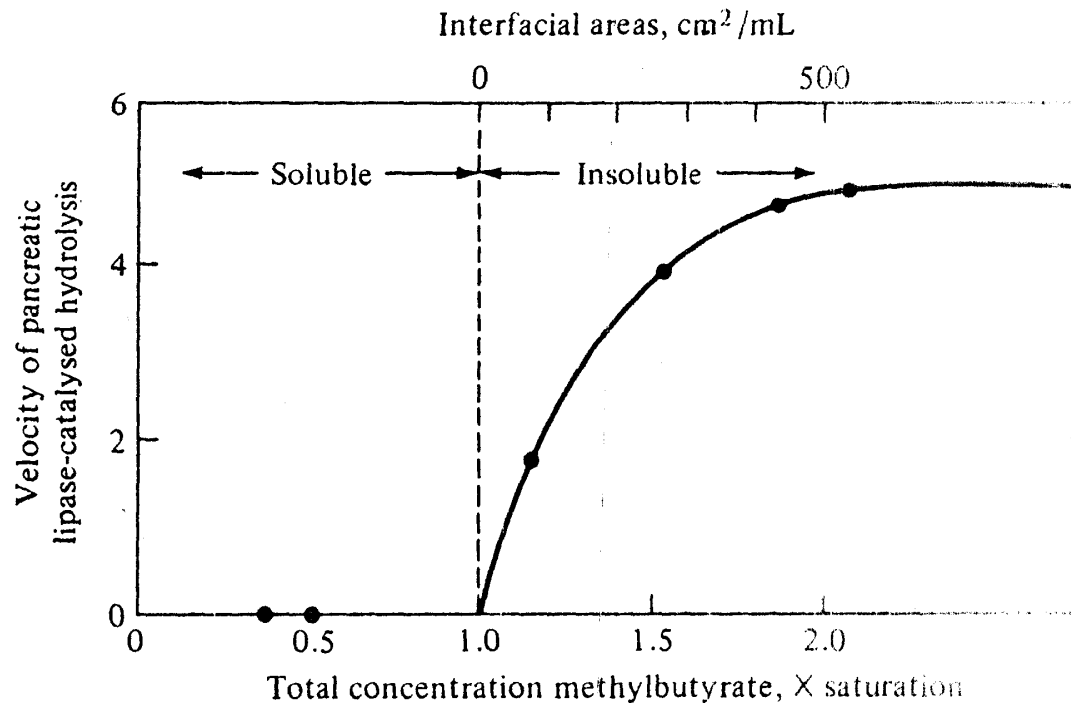
Reazioni enzimatiche in sistemi eterogenei 2

- In questi casi il modello per la reazione enzimatica dovrà essere quindi adeguato in modo tale da considerare eventuali altri fenomeni limitanti la cinetica.
- Se ad esempio l'enzima può interagire solamente con il substrato nella sua forma solubile, la cinetica procederà con una forma tipo Michaelis-Menten solo fin quando la concentrazione del substrato è al di sotto della sua solubilità massima
- Non potendo il substrato essere presente a concentrazione superiore alla sua solubilità, anche aumentando la sua concentrazione in soluzione questo passa nella forma insolubile su cui l'enzima non ha effetto. La cinetica rimane quindi costante al valore caratteristico del limite di solubilità.



Reazioni enzimatiche in sistemi eterogenei 3

- Alcuni enzimi presentano un comportamento opposto rispetto al precedente, divenendo attivi solo sul substrato insolubile. E' il caso della lipasi pancreatica che agisce sulla forma insolubile dei grassi all'interfaccia liquido-liquido



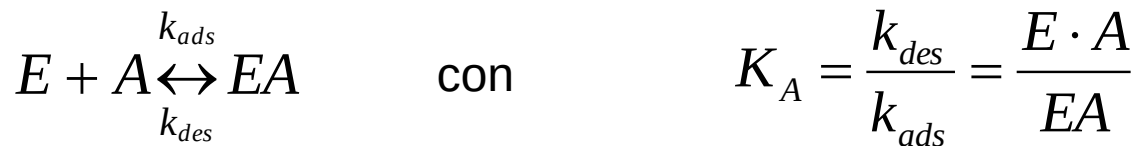
- Infine esistono enzimi attivi sia sul substrato in forma solubile che insolubile tipo la tripsina o il lisozima.

Cinetica enzimatica per enzima adsorbito su substrato solido 1

- Una variazione interessante delle equazioni cinetiche derivate per sistemi enzima-substrato entrambe solubili, è quella in cui l'enzima in soluzione interagisce su un substrato solido, previo adsorbimento sulla superficie del substrato stesso.
- In contrapposizione con il caso classico, aumentando la concentrazione di enzima in soluzione la velocità non aumenta linearmente con essa ma raggiunge un limite.
- Questo comportamento è interpretabile in termini di saturazione dei siti attivi del substrato solido come fattore limitante superiormente la cinetica enzimatica.

Cinetica enzimatica per enzima adsorbito su substrato solido 2

Per sviluppare un modello ragionevole di questo sistema eterogeneo si considera l'equilibrio di adsorbimento dell'enzima sul substrato



dove A è il sito attivo per l'adsorbimento sul substrato solido ed EA è il complesso superficiale sito attivo-enzima con costante di equilibrio di dissociazione $K_A = k_{des}/k_{ads}$.

Il bilancio dei siti attivi per l'adsorbimento sul substrato può essere scritto come

$$a_0 = a + (ea)$$

dove a_0 è la concentrazione totale di siti adsorbenti.

Cinetica enzimatica per enzima adsorbito su substrato solido 3

Combinando il bilancio di siti adsorbenti con la costante di equilibrio K_A si ottiene un'espressione di ea da cui dipende la cinetica di formazione del prodotto

$$a_0 = a + (ea) = \frac{K_A}{e} (ea) + (ea) = (ea) \left(\frac{K_A}{e} + 1 \right)$$

$$(ea) = \frac{a_0}{\frac{K_A}{e} + 1}$$

$$(ea) = \frac{a_0 e}{K_A + e}$$

$$v = k_3(ea) = \frac{k_3 a_0 e}{K_A + e}$$

Cinetica enzimatica per enzima adsorbito su substrato solido 4

$$v = k_3(ea) = \frac{k_3 a_0 e}{K_A + e}$$

La concentrazione di enzima libero e è correlata alla concentrazione totale di enzima aggiunto al sistema dal bilancio totale di E

$$e_0 = e + (ea)$$

Se come accade generalmente nel caso di substrati solidi la concentrazione iniziale di enzima aggiunto è molto superiore alla capacità adsorbente del prodotto ($e_0 \gg a_0$), si può approssimare

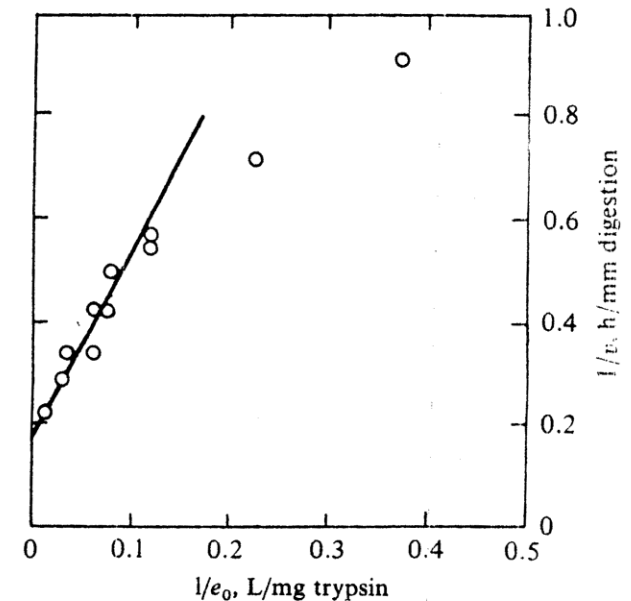
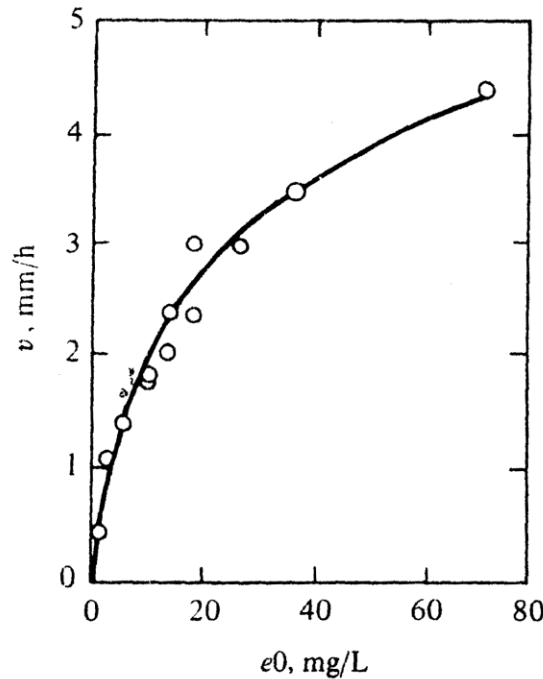
$$e_0 \cong e$$

Da cui

$$v = \frac{k_3 a_0 e_0}{K_A + e_0}$$

Cinetica enzimatica per enzima adsorbito su substrato solido 5

$$v = \frac{k_3 a_0 e_0}{K_A + e_0}$$



- L'espressione mostra la dipendenza non lineare ma di tipo iperbolico della velocità enzimatica dalla concentrazione di enzima.
- Questo modello è stato utilizzato per rappresentare i dati sperimentali di dipendenza della velocità enzimatica su substrato solido al variare della concentrazione enzimatica iniziale.
- La dipendenza iperbolica dalla concentrazione enzimatica è ulteriormente valicata dall'andamento lineare osservato per un diagramma dei reciproci.