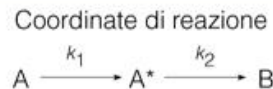
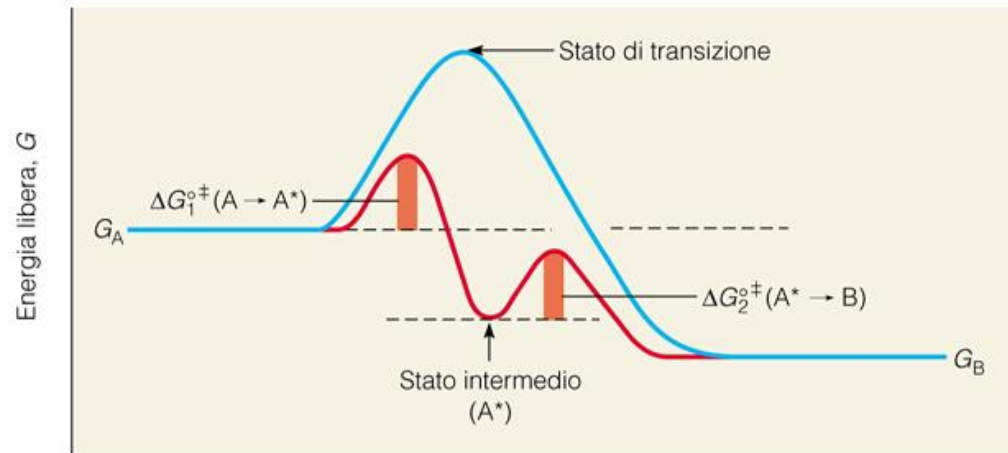
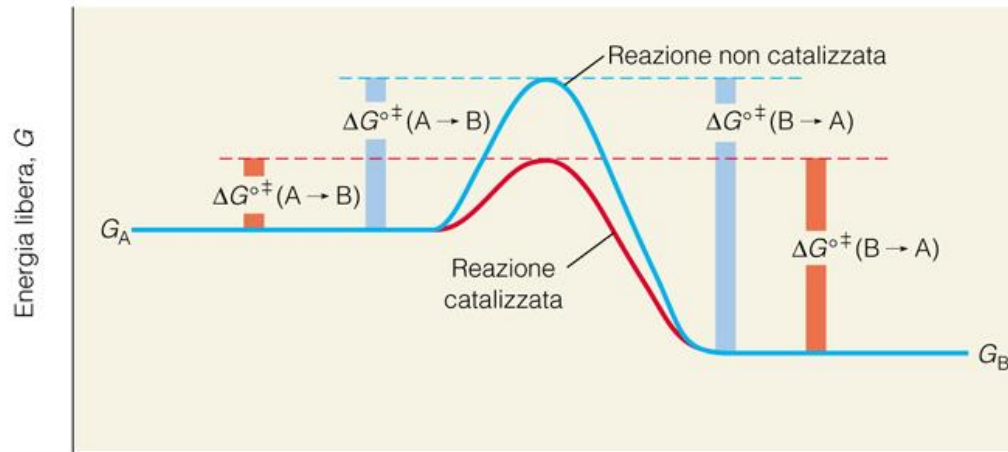


Gli enzimi e l'inibizione
enzimatica.

Catalisi enzimatica



La velocità di una reazione è descritta dall'equazione di Arrhenius:

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

in cui

A è il fattore pre-esponenziale

R è la costante dei gas

T è la temperatura

E_a è l'energia di attivazione (ΔG^+)

$$\Delta G^+ = \Delta H^+ - T\Delta S^+$$

I MECCANISMI CATALITICI UTILIZZATI DAGLI ENZIMI

Un enzima abbassa l'energia di attivazione sia abbassando l'energia dello stato di transizione che aumentando l'energia dello stato di partenza mediante la capacità di formare un **complesso enzima-substrato**

1. Legame preferenziale dello stato di transizione
2. Effetti di prossimità e orientamento
3. Catalisi acido-base
4. Catalisi covalente
5. Catalisi da ioni metallici
6. Catalisi elettrostatica

CLASSIFICAZIONE DEGLI ENZIMI

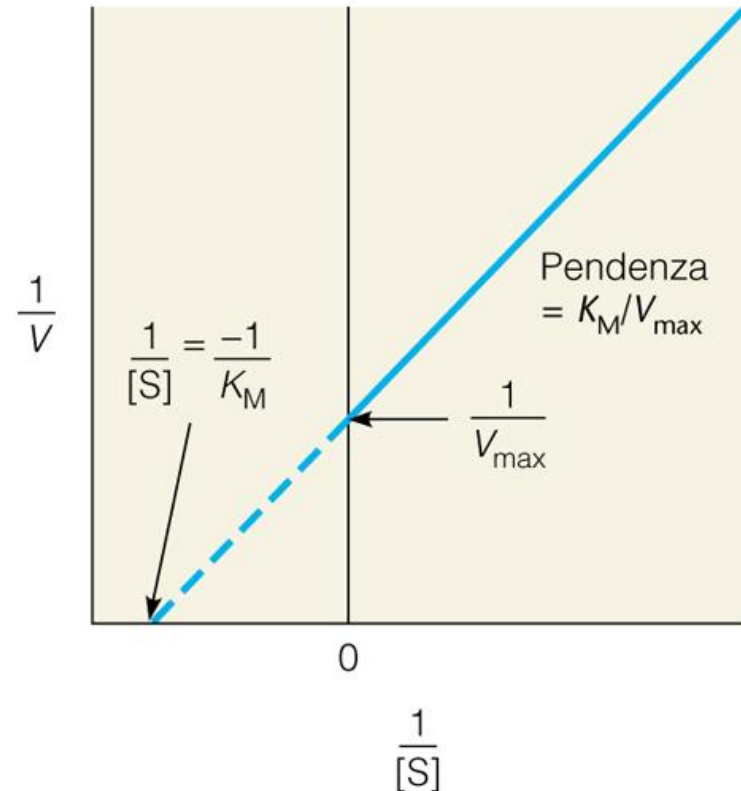
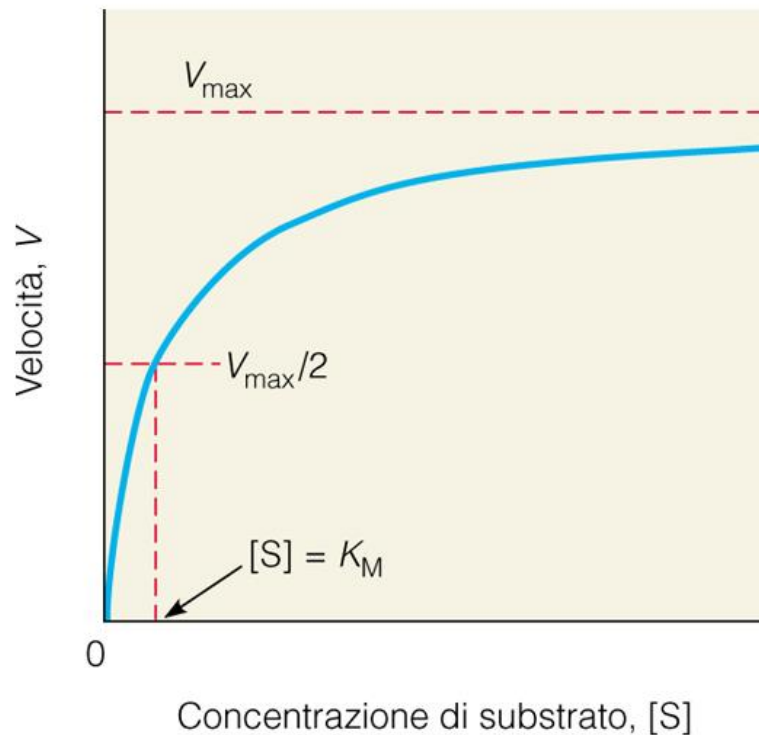
- **Ossidoreduttasi**
 - Reazioni di trasferimento di elettroni
- **Transferasi**
 - Reazioni di trasferimento di un gruppo da una molecola ad un'altra
- **Idrolasi**
 - Reazioni di idrolisi (scissione di un legame utilizzando una molecola d'acqua)
- **Liasi**
 - Reazioni non-idrolitiche di rimozione o addizione di gruppi
- **Isomerasi**
 - Reazioni di spostamento di un gruppo all'interno di una molecola
- **Ligasi**
 - Reazioni di sintesi di un legame utilizzando ATP
- **Translocasi**
 - *Traslocazione attraverso una membrana*

Cinetica enzimatica

Equazione di Michaelis-Menten

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

Parametri cinetici: K_M , $V_{\max}$, k_{cat} e k_{cat}/K_M



Parametri cinetici

- K_M
 - Concentrazione di substrato alla quale la velocità della reazione è metà della V_{max} .
 - Paragonabile alla K_D dell'equilibrio $E + S \leftrightarrow ES$
- V_{max}
 - Velocità massima raggiungibile quando l'enzima è saturato (tutto l'enzima è in complesso ES)
 - Dipende dalla concentrazione di enzima
- k_{cat}
 - Numero di *turnover*: numero di molecole di substrato trasformate nell'unità di tempo
 - È definita da $V_{max}/[E]$ quindi è indipendente dalla concentrazione di enzima
- k_{cat}/K_M
 - Rapporto tra frequenza di catalisi e affinità per il substrato, definisce la costante di specificità
 - Esprime l'efficienza catalitica dell'enzima

Saggi di attività enzimatica

- Misura della **formazione del prodotto** o del **consumo del substrato**
- Come?
 - saggi continui
 - saggi discontinui
 - saggi accoppiati
- Con quali tecniche?
 - spettrofotometria
 - spettrofluorimetria
 - ... dipende dalle caratteristiche del substrato/prodotto

Tecniche spettroscopiche

- Interazione delle macromolecole con la radiazione elettromagnetica

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

- Nella regione UV-Vis si osservano transizioni di elettroni degli strati esterni delle molecole

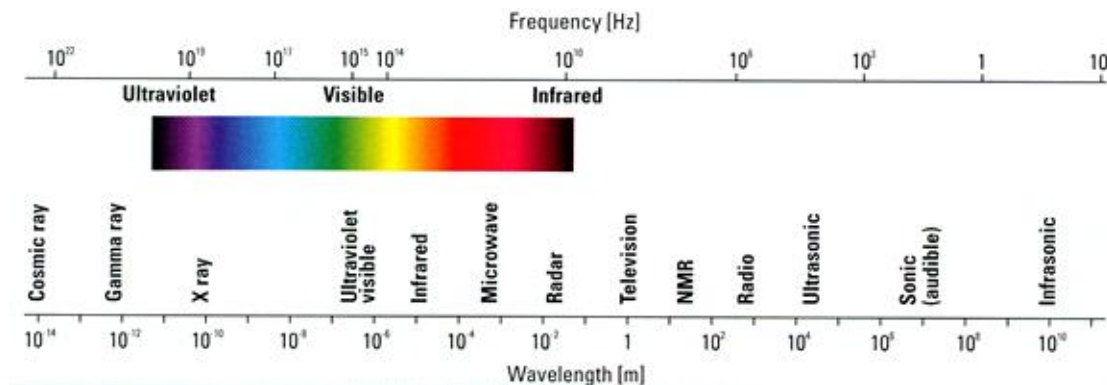
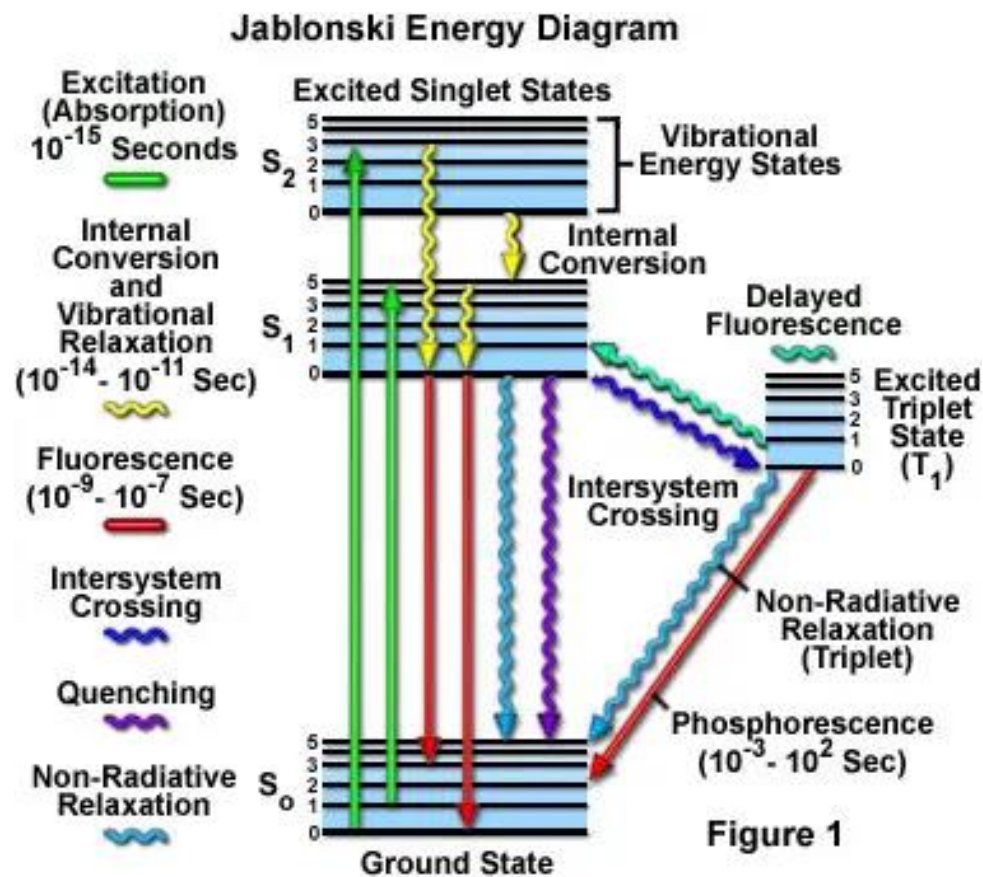


Diagramma degli stati energetici molecolari

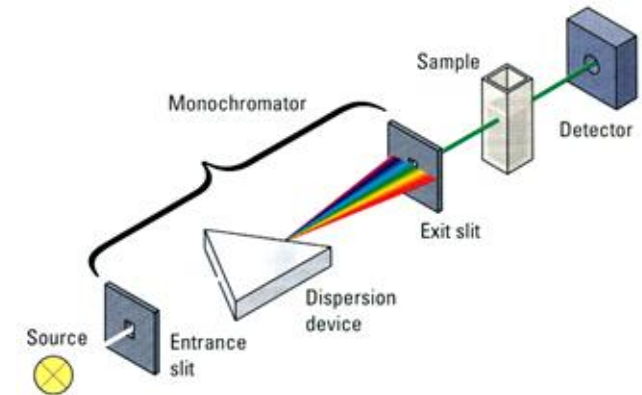


Spettroscopia di assorbimento UV-Vis

- Legge di Lambert e Beer

$$A = \log I_0/I = \varepsilon_\lambda c l$$

- A è l'assorbanza
- ε_λ è il coefficiente di estinzione molare
- c è la concentrazione
- l è il cammino ottico
- I_0 e I sono l'intensità della luce incidente e trasmessa



- Cromofori nelle proteine

- Amminoacidi aromatici (Trp, Tyr, Phe) assorbono a circa 280 nm
- Cofattori e gruppi prostetici

Spettroscopia di Fluorescenza

- La fluorescenza è un processo fotofisico per cui si ha l'emissione di **luce** dovuta alla transizione di elettroni da un livello energetico maggiore ad uno minore
- La *lunghezza d'onda* della radiazione emessa ha valori maggiori rispetto a quella assorbita (*shift* di Stokes) perchè parte dell'energia viene dissipata sotto forma di calore
- Fluorofori nelle proteine
 - Triptofano e tirosina
 - Fluorofori derivanti da modificazioni post-traduzionali (GFP e varianti)
 - Sonde fluorescenti che possono essere coniugate alla proteina
- La fluorescenza è sensibile al microambiente in cui si trova il fluoroforo

Spettroscopia di Fluorescenza

- Si definisce **RESA QUANTICA**

$$Q = \frac{\text{quanti} \cdot \text{di} \cdot \text{fluorescenza} \cdot \text{emessi}}{\text{quanti} \cdot \text{assorbiti}}$$

- La resa quantica è *indipendente* dalla lunghezza d'onda di eccitazione
- A basse concentrazioni del fluoroforo l'intensità della fluorescenza (I_f) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = 2.3I_0\varepsilon_\lambda cdQ$$

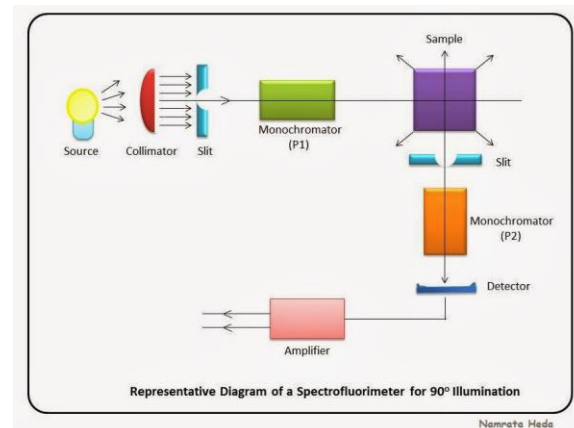
$$\text{Brillantezza} = \varepsilon_\lambda Q$$

c è la concentrazione del fluoroforo

d è il cammino ottico

ε_λ è il coefficiente di estinzione molare del fluoroforo

I_0 è l'intensità della radiazione incidente



SELETTIVITA' DEGLI ENZIMI

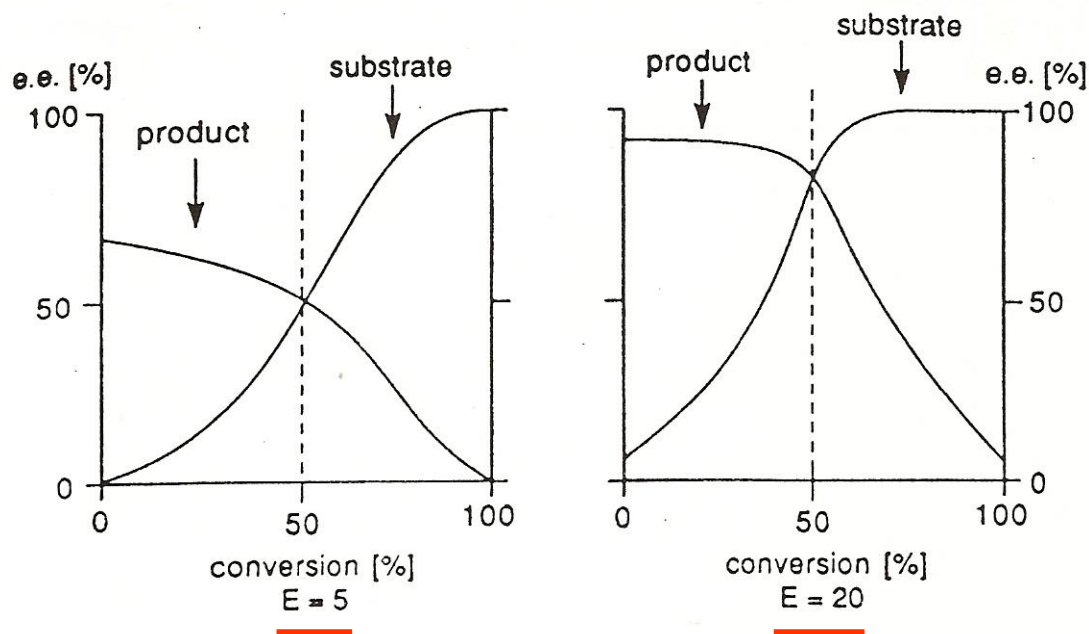
- **Chemioselettività**: specificità per il substrato, attività verso uno specifico tipo di composto (gruppo) chimico
- **Regioselettività**: capacità di discriminare tra gruppi funzionali identici che fanno parte della stessa molecola
- **Enantioselettività**: capacità di discriminare tra singoli enantiomeri o gruppi funzionali identici legati ad un centro prochirale.

La selettività dipende: dall'enzima

dalla struttura del substrato

dalle condizioni di reazione

Valutazione della purezza chirale di prodotti e substrati per reazioni catalizzate da un enzima enantioselettivo



L'enantioselettività viene valutata misurando:

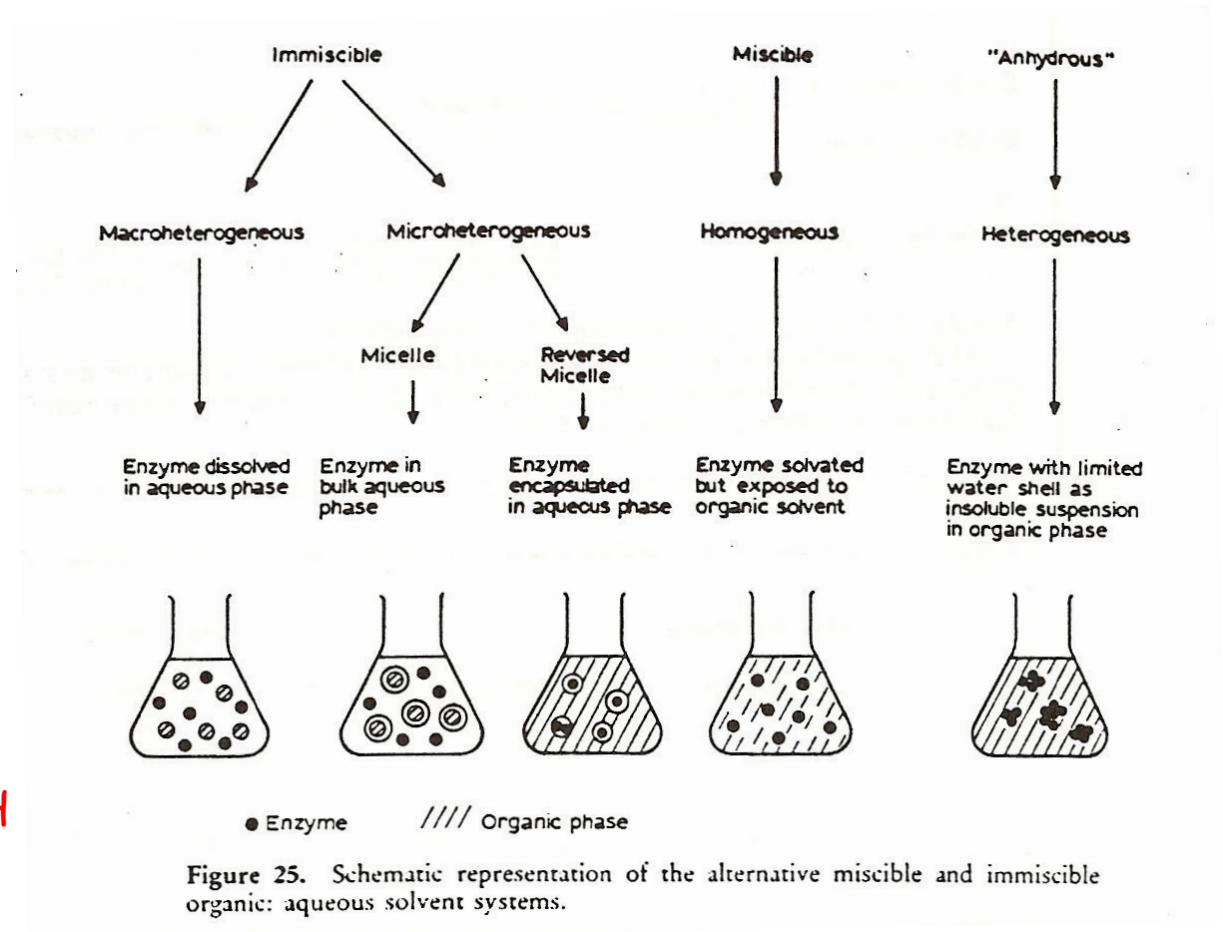
- il rapporto enantiomerico $E = (k_{\text{cat}}/K_M)S / (k_{\text{cat}}/K_M)R$
- l'eccesso enantiomerico ee ($ee\% = (S-R)/(S+R)*100$)

Alcuni enzimi mantengono attività catalitica in solvente organico

Gli enzimi sono in grado di mantenere la loro attività in solventi organici perché mantengono un sottile guscio di molecole di acqua.

Gli enzimi conservano lo stato di ionizzazione esistente prima del trasferimento in solvente organico

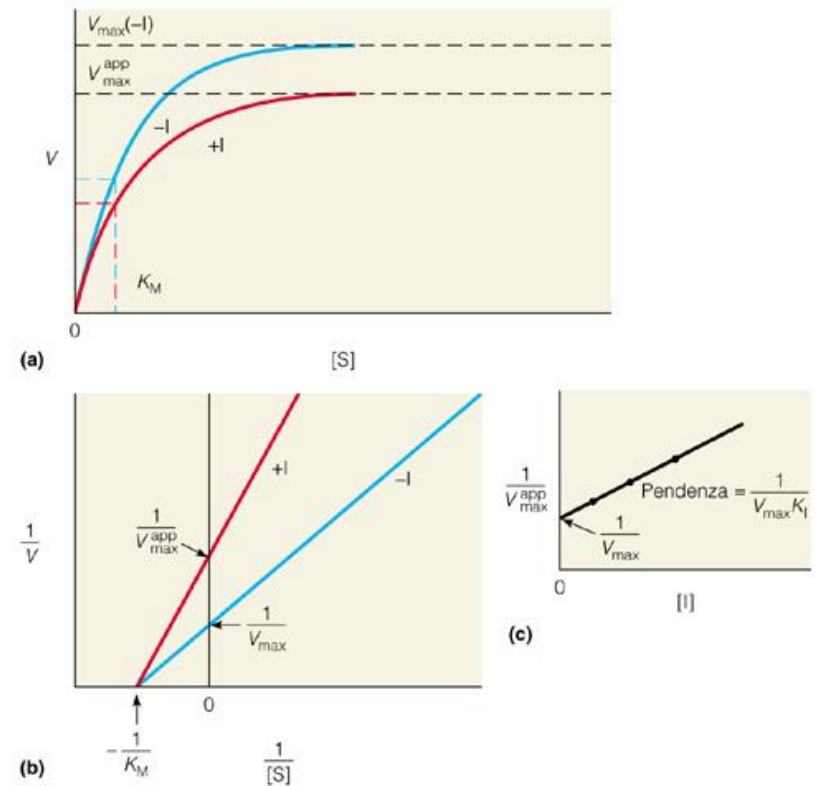
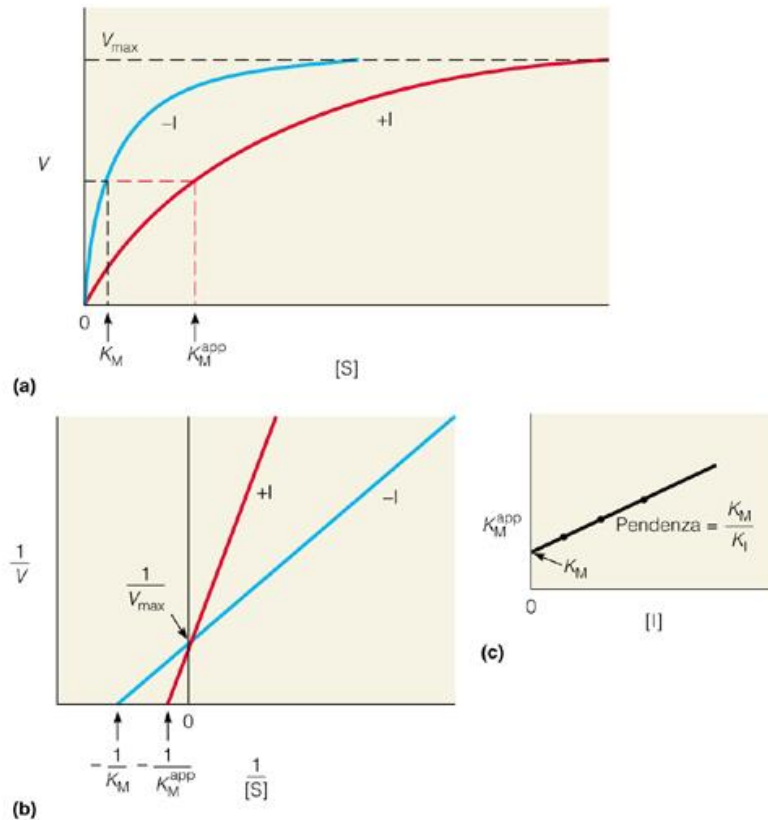
➡ memoria del pH



Inibizione **reversibile**

competitiva

non competitiva



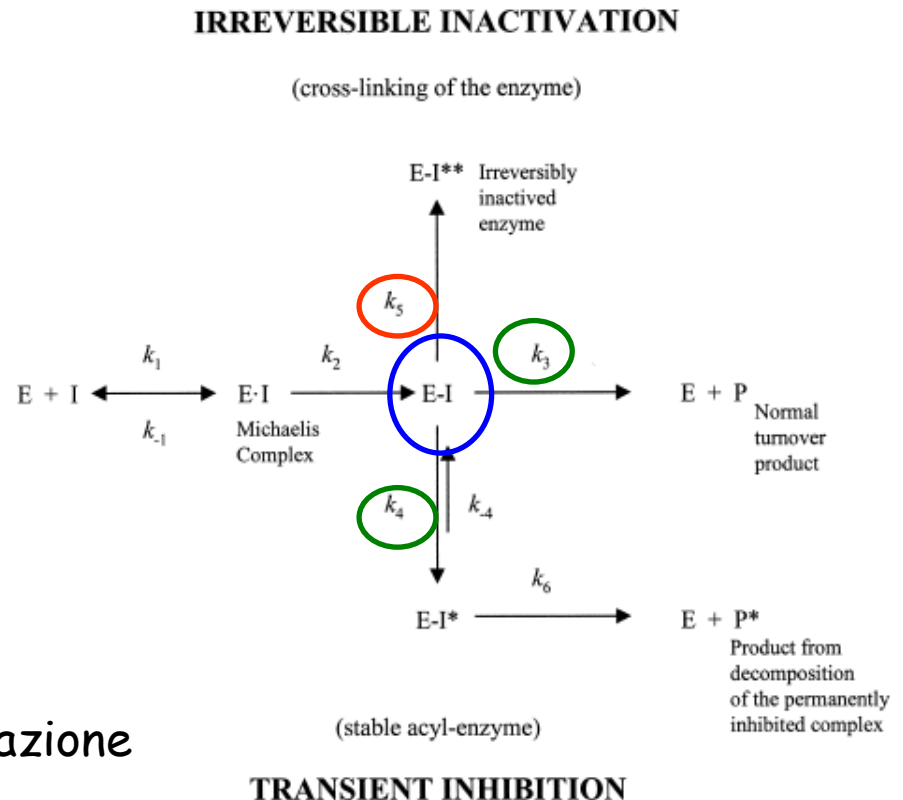
Inibizione **irreversibile**: inibitori suicidi o basati sul meccanismo

Gli inibitori suicidi sono molecole che vengono 'attivate' dall'enzima durante il ciclo catalitico diventando così in grado di inibire l'enzima stesso. L'intermedio E-I può ripartirsi attraverso due vie, che portano all'inibizione transiente o irreversibile.

Il parametro per valutare l'efficienza di un inibitore suicida è il rapporto

molecole di prodotto/eventi di inattivazione

$$\frac{K_3 + K_4}{K_5}$$



Come individuare un'inibizione irreversibile?

L'attività dell'enzima incubato con l'inibitore diminuisce nel tempo: il saggio di attività enzimatica viene eseguito dopo aver incubato l'enzima con l'inibitore per tempi crescenti

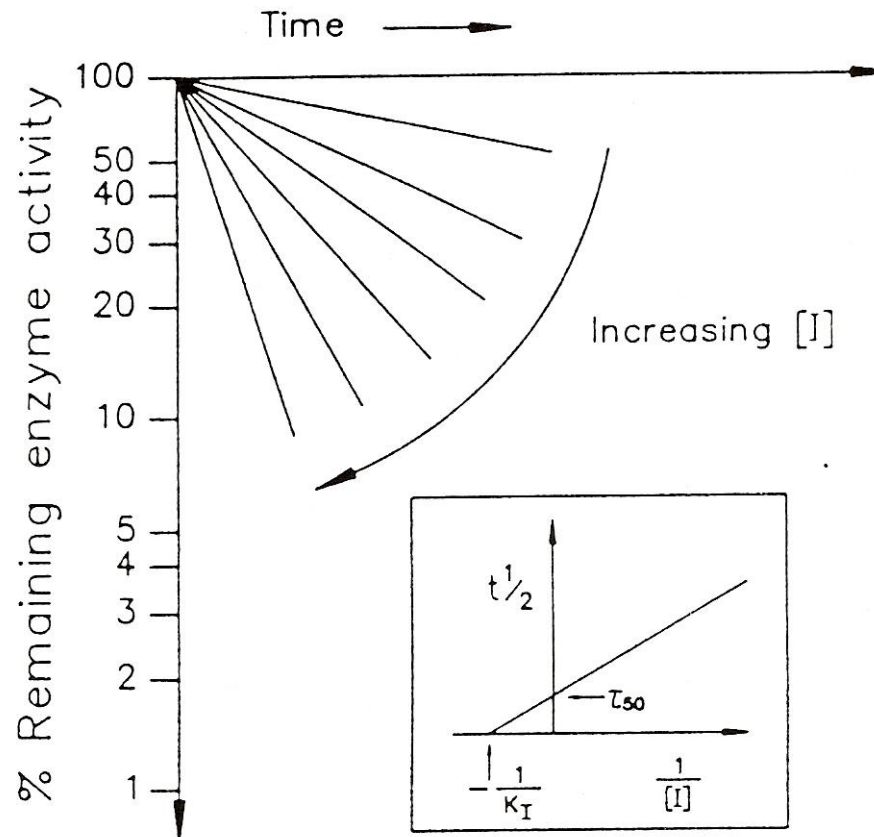
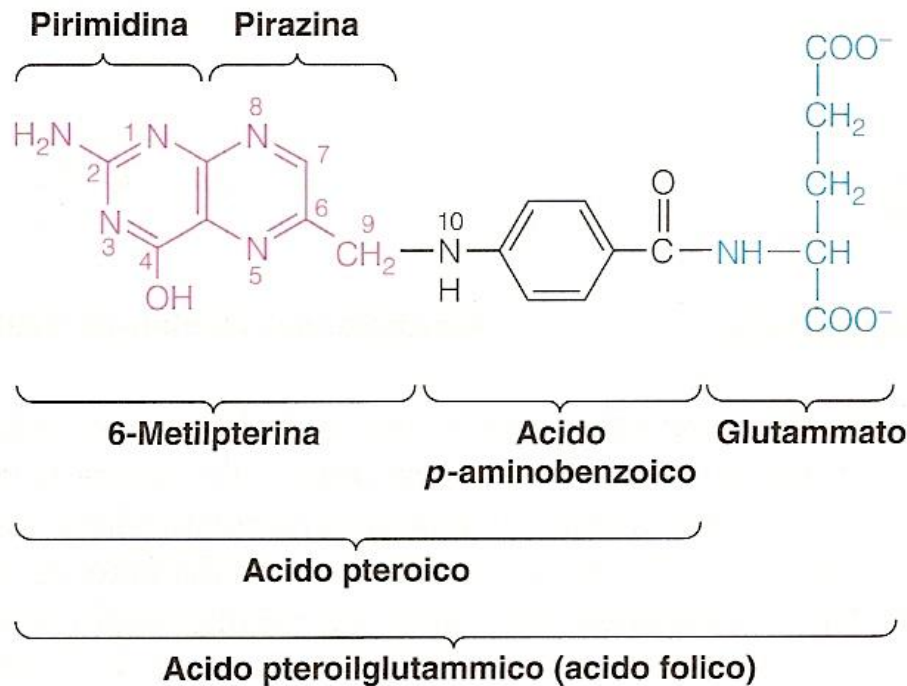
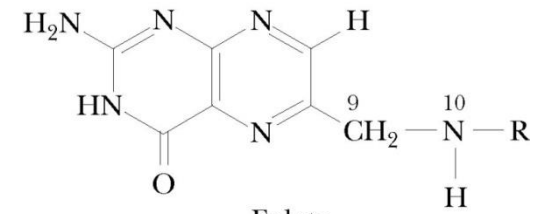


Fig. 1. Semilog plot of remaining enzyme activity against time as a function of various inhibitor concentrations.

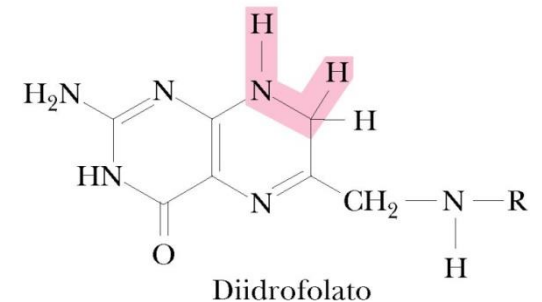
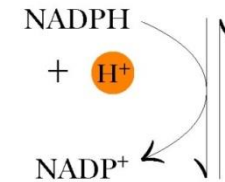
Un bersaglio per inibitori enzimatici: gli enzimi della sintesi e del metabolismo del tetraidrofolato (THF)



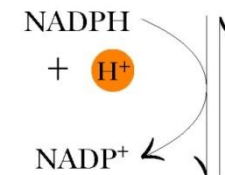
Vitamina B9



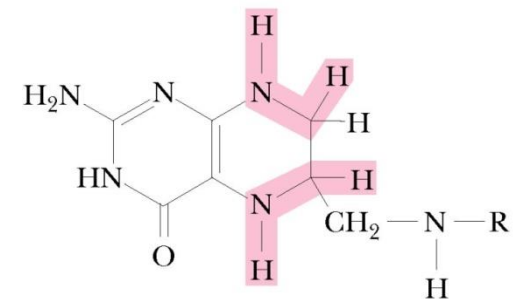
Folato



Diidrofolato

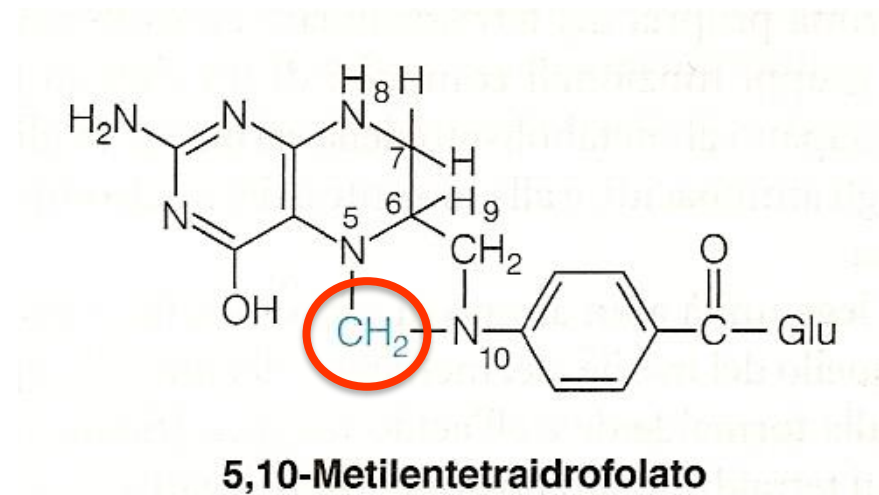
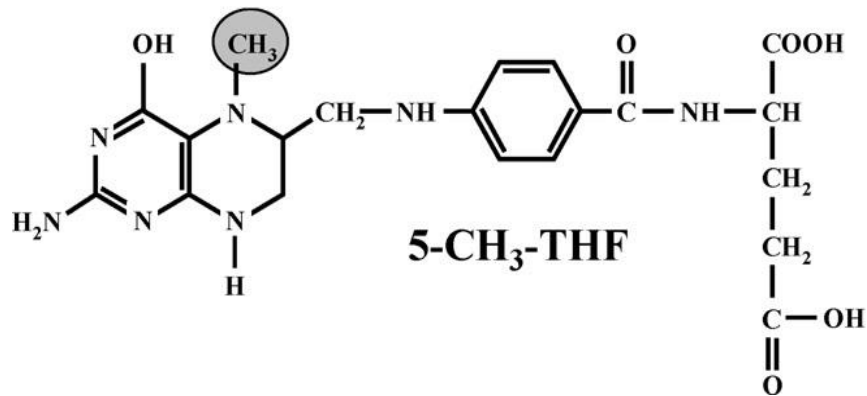
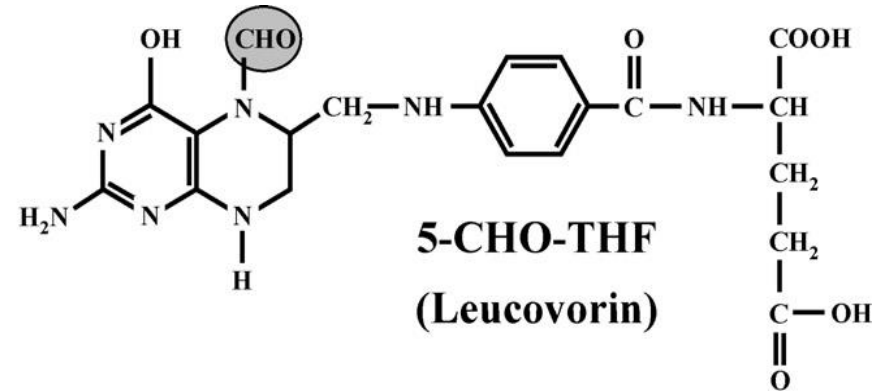
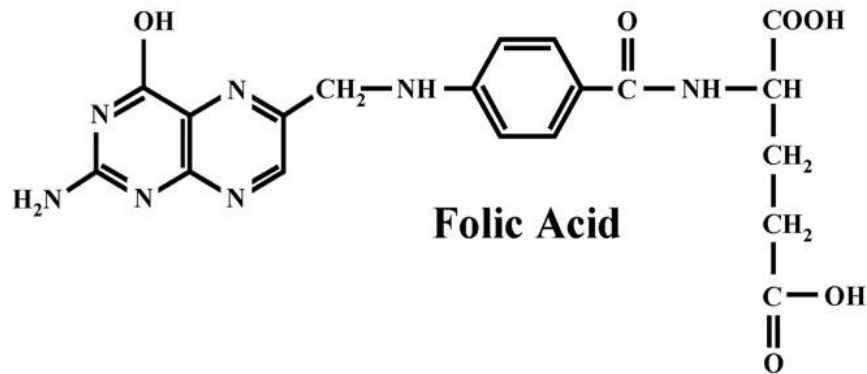


DHFR

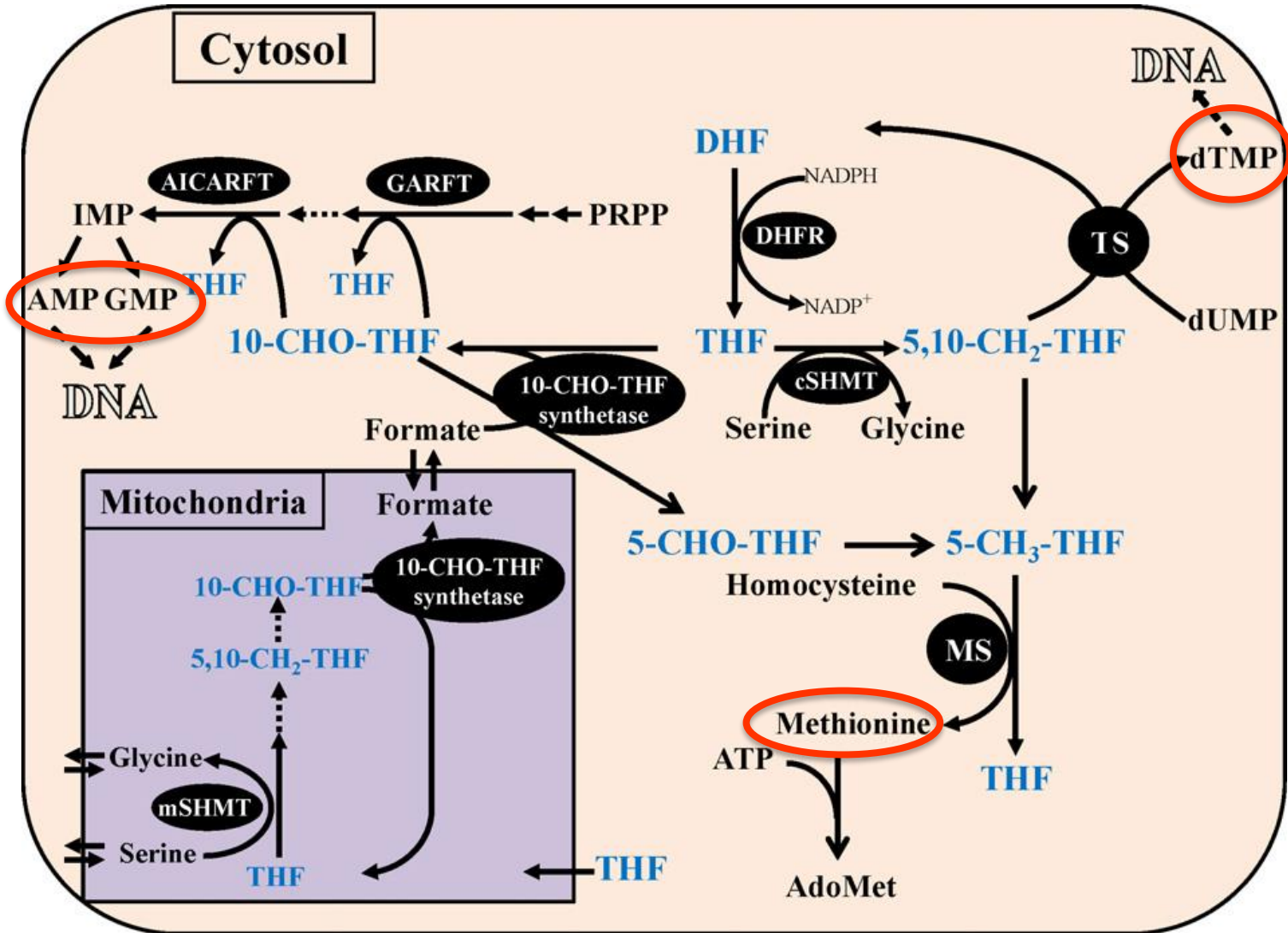


Tetraidrofolato

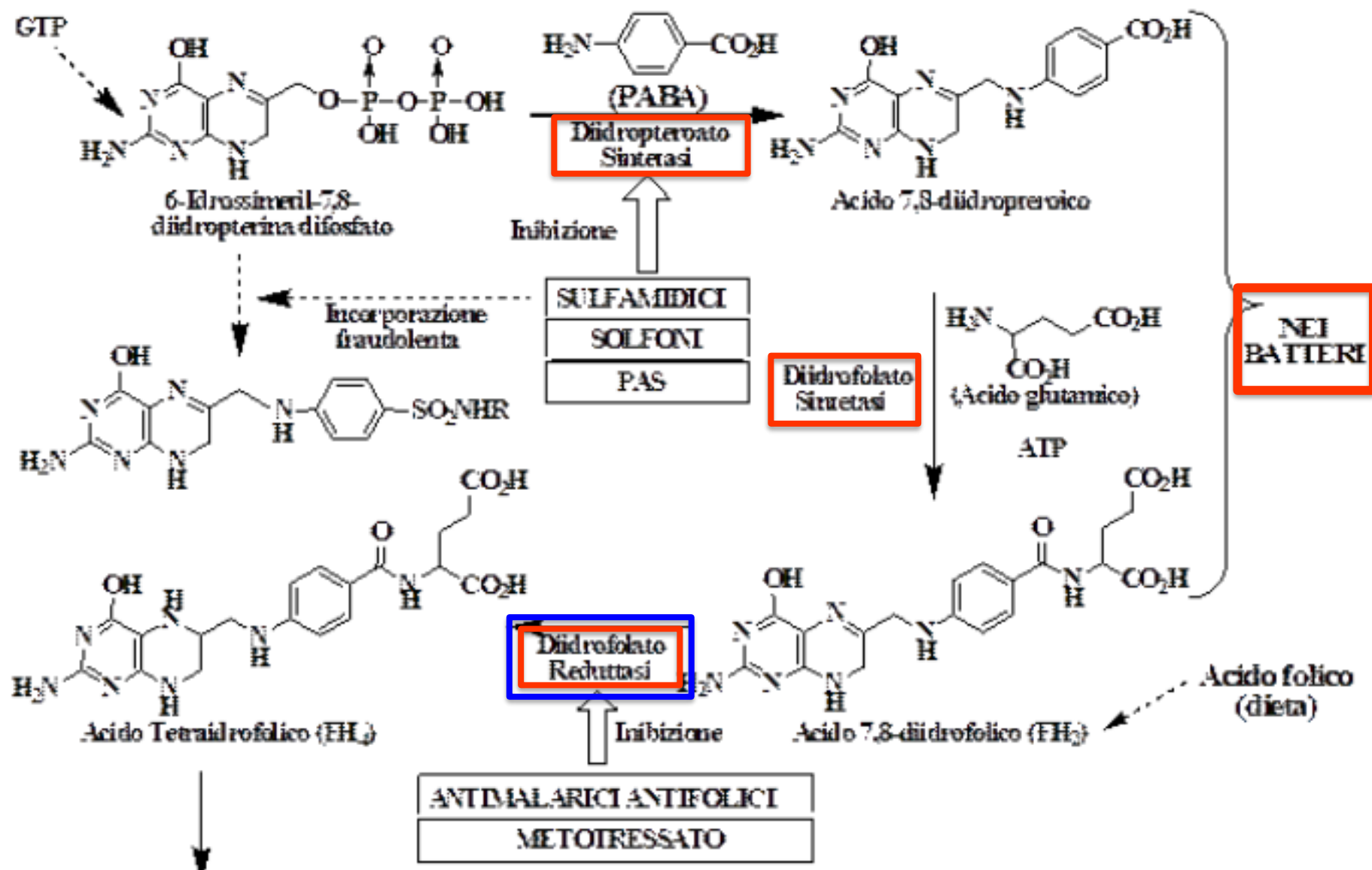
Principali addotti ad un atomo di carbonio del tetraidrofolato



Metabolismo cellulare del THF: sintesi di nucleotidi e ammino acidi

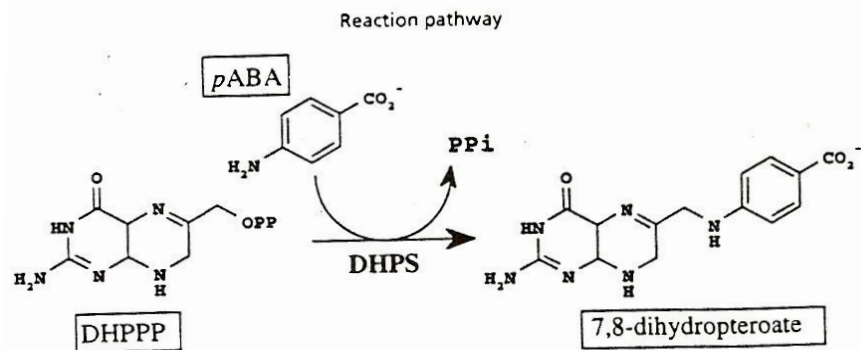


Biosintesi del tetraidrofolato



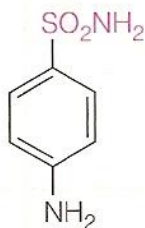
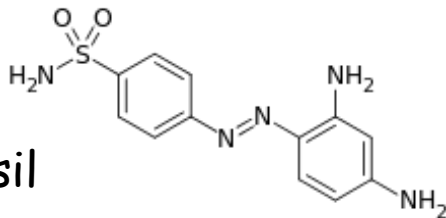
I SULFAMIDICI

Inibitori **competitivi** della sintesi dell'acido folico

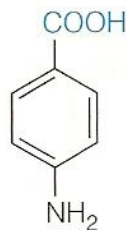


- Competizione con l'acido *p*-aminobenzoico (p-ABA) per la 7,8-diidropterina nel sito attivo della **Diidropteroato sintasi (DHPS)**
- Dimostrazione di inibizione competitiva da misure cinetiche.
- Dimostrazione della formazione del prodotto della reazione di inibizione: i prodotti della reazione pteroato + inibitore sono stati isolati da cellule di *E. coli* cresciute in presenza di inibitore marcato con ^{35}S

Prontosil



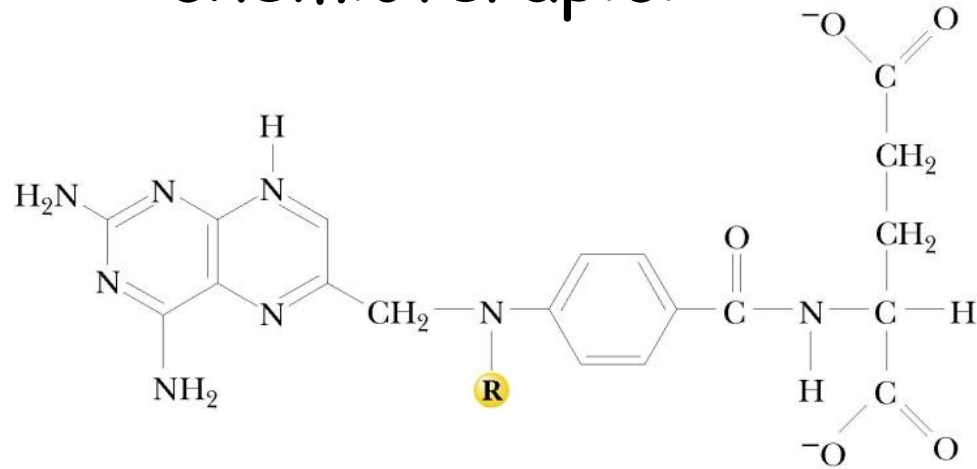
Sulfanilamide



Acido *p*-aminobenzoico (PABA)

L'inibitore può essere incorporato al posto del substrato e forma un prodotto inattivo. Il prodotto inibisce la **diidrofolato sintasi** (inibizione competitiva)

Inibitori competitivi della **diidrofolato reduttasi** (**DHFR**) sono utilizzati come antibatterici e chemioterapici

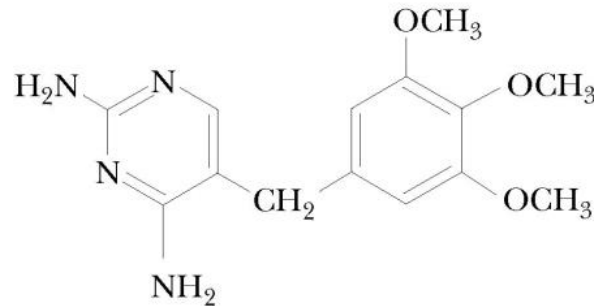


2-Ammino, 4-ammino analoghi dell'acido folico

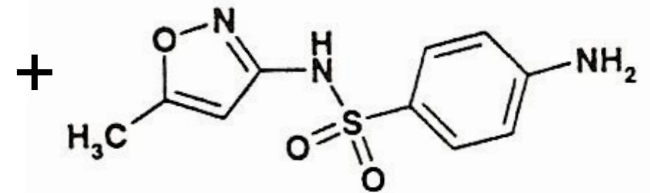
R = H **Amminopterina**

R = CH₃ **Ametopterina (metotressato)**

Bactrim

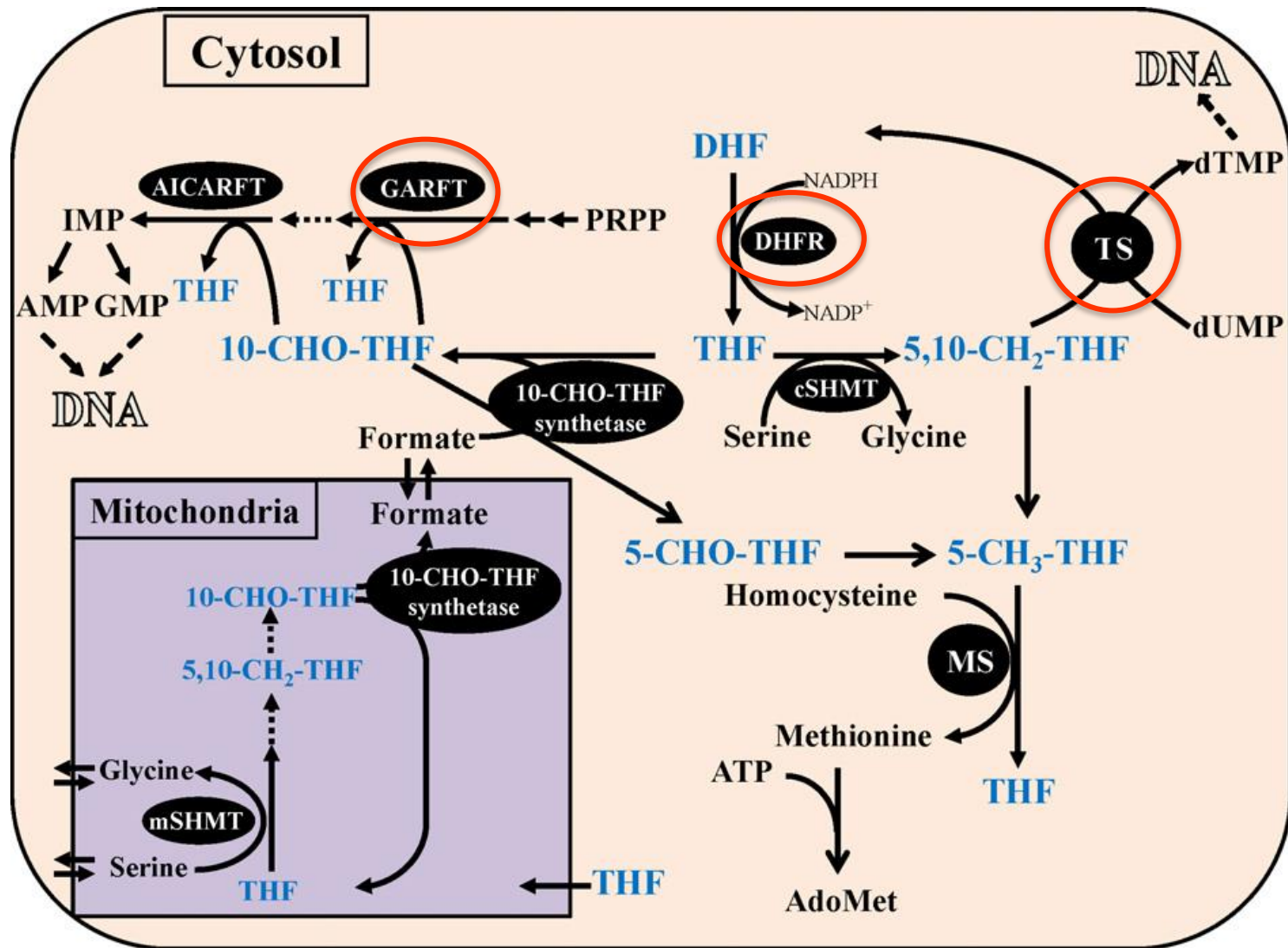


Trimetoprim



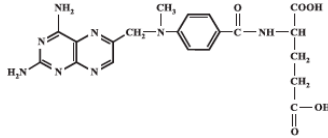
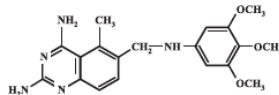
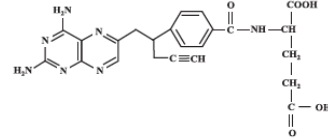
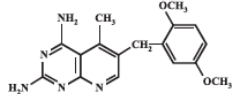
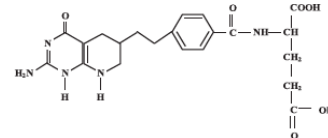
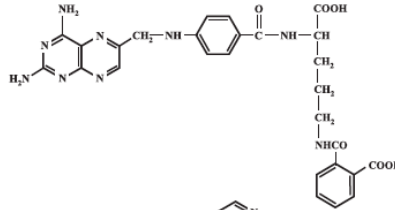
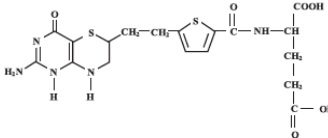
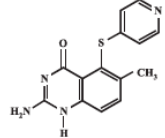
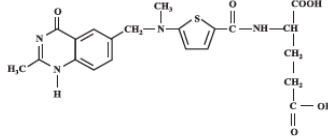
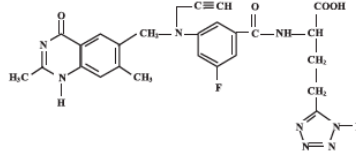
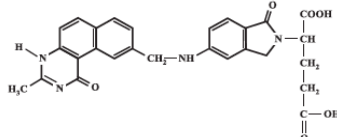
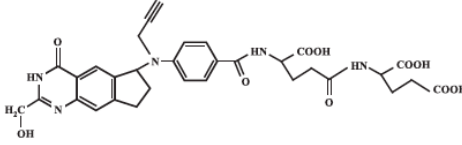
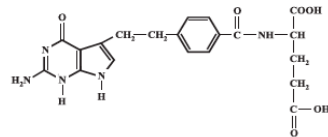
Sulfamethoxazole

Metabolismo cellulare del THF: sintesi di nucleotidi e ammino acidi



Gli anti-folati.

Una classe di farmaci usati nella terapia anti-cancro

Polyglutamatable Antifolate			Non-Polyglutamatable Antifolate		
Antifolate	Chemical Structure	Target Enzyme	Antifolate	Chemical Structure	Target Enzyme
Methotrexate		DHFR	Trimetrexate		DHFR
Pralatrexate		DHFR	Piritrexim		DHFR
Lometrexol		GARFT	Talotrexin		DHFR
AG2034		GARFT	Nolatrexed		TS
Raltitrexed		TS	Plevitrexed		TS
GW1843		TS	BGC 945		TS
Pemetrexed		TS DHFR GARFT			

Gli anti-folati: una classe di farmaci usati nella terapia anti-cancro

Table 1
Summary of transport, polyglutamylation and target enzyme properties of various antifolates.

Antifolate	Synonyms	Target enzyme	Polyglutamylation	Transport system	Approved for treatment
<i>Polyglutamatable</i>					
Methotrexate	MTX	DHFR	+	RFC	+
Pralatrexate	Folotyn®	DHFR	+	RFC	+
Lometrexol	DDATHF	GARFT	+	RFC/FR α	—
AG2034		GARFT	+	RFC/FR α	—
Pemetrexed	Alimta®/PMX/MTA/LY231514	TS/DHFR/GARFT	+	PCFT/RFC	+
Raltitrexed	Tomudex®/ZD1694	TS	+	RFC/FR α	+
GW1843	GSL7904L/BW1843/1843U89/OSI-7904	TS	+	RFC	—
<i>Non-polyglutamatable</i>					
Trimetrexate	TMQ/Neutrexin®	DHFR	—	PD*	—
Piritrexim	PTX/BW3014	DHFR	—	PD	—
Talotrexin	PT523	DHFR	—	RFC	+
Nolatrexed	AG337/Thymitaq®	TS	—	PD	+
Plevitrexed	ZD9331/BGC9331	TS	—	RFC/FR α	—
BGC 945	ONX-0801	TS	—	FR α	—

*PD—Passive diffusion.

Gli anti-folati sono inibitori competitivi di diversi enzimi

DHFR: diidrofolato reduttasi

TS: timidilato sintasi

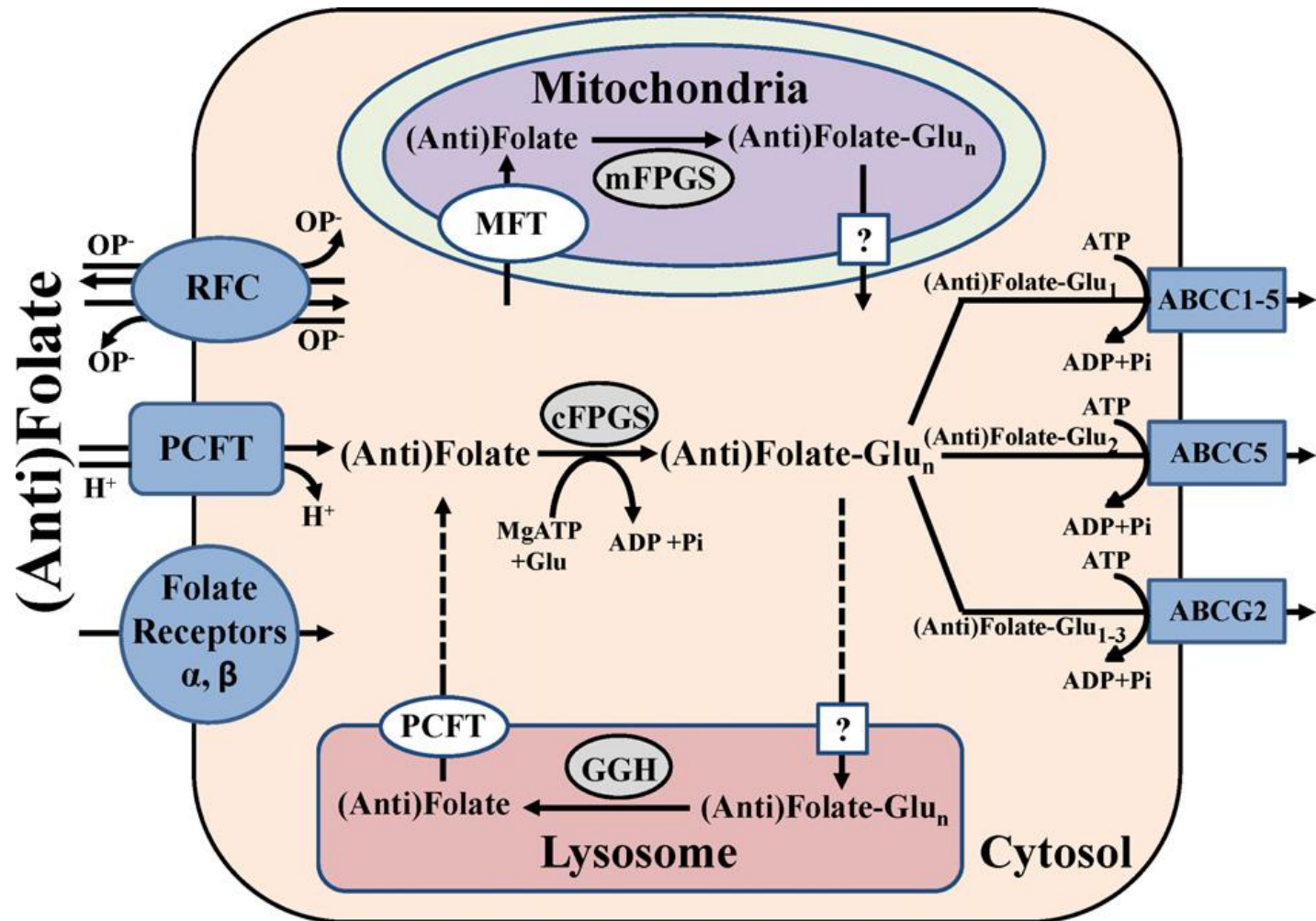
GARFT: glicinamide ribonucleotide formiltrasferasi

sintesi THF

sintesi timina

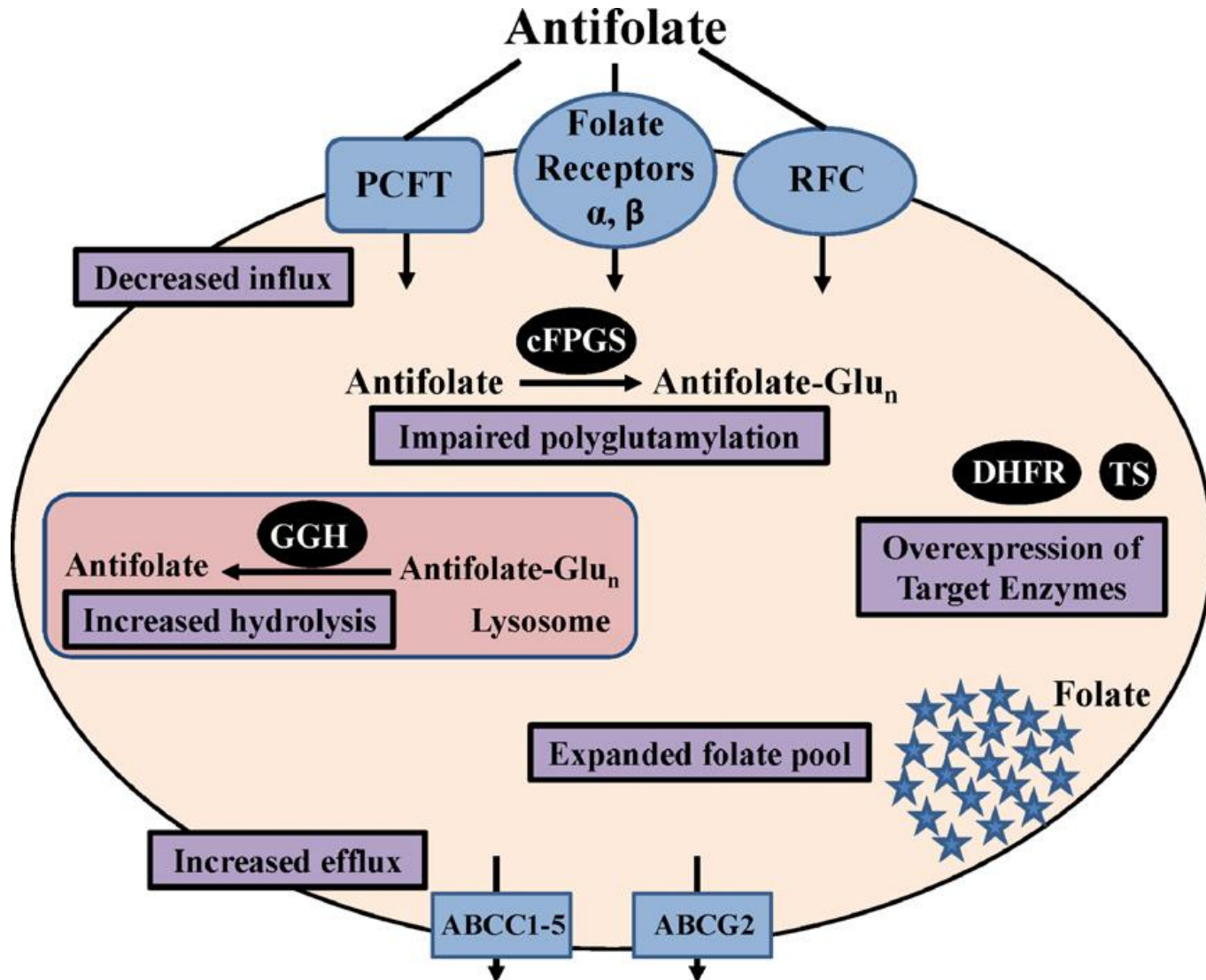
sintesi purine

Omeostasi cellulare dei folati e degli anti-folati



OP⁻ Organic Phosphate

Meccanismi di resistenza agli anti-folati



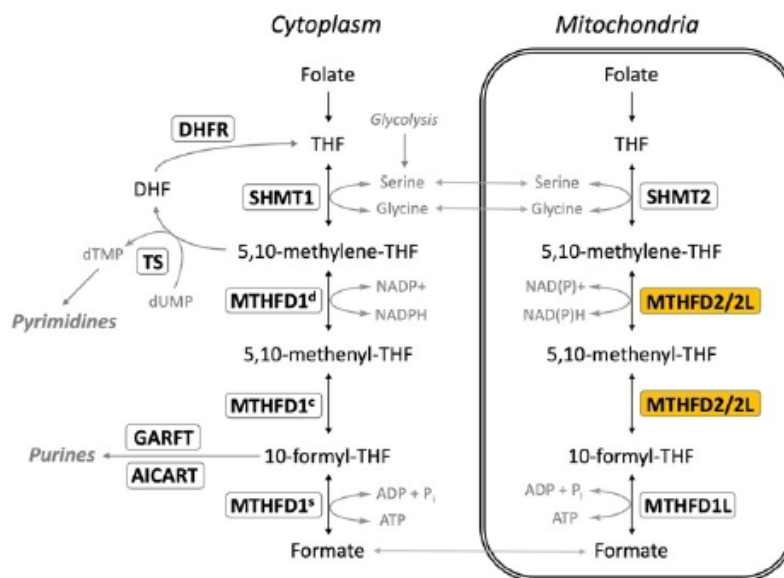
 Very Important Paper


The First Structure of Human MTHFD2L and Its Implications for the Development of Isoform-Selective Inhibitors

Emma R. Scaletti^{+, [a]} Robert Gustafsson Westergren^{+, [a]} Yasmin Andersson,^[b] Elisee Wiita,^[c] Martin Henriksson,^[c] Evert J. Homan,^[c] Ann-Sofie Jemth,^[c] Thomas Helleday,^{*, [c, d]} and Pål Stenmark^{*, [a]}

Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2) is a mitochondrial 1-carbon metabolism enzyme, which is an attractive anticancer drug target as it is highly upregulated in cancer but is not expressed in healthy adult cells. Selective MTHFD2 inhibitors could therefore offer reduced side-effects during treatment, which are common with antifolate drugs that target other 1C-metabolism enzymes. This task is challenging however, as MTHFD2 shares high sequence identity with the constitutively expressed isozymes cytosolic MTHFD1 and mito-

chondrial MTHFD2L. In fact, one of the most potent MTHFD2 inhibitors reported to date, TH7299, is actually more active against MTHFD1 and MTHFD2L. While structures of MTHFD2 and MTHFD1 exist, no MTHFD2L structures are available. We determined the first structure of MTHFD2L and its complex with TH7299, which reveals the structural basis for its highly potent MTHFD2L inhibition. Detailed analysis of the MTHFD2L structure presented here clearly highlights the challenges associated with developing truly isoform-selective MTHFD2 inhibitors.



Saggio di inibizione dell'attività enzimatica di MTHFD2L

Saggio accoppiato
 $\text{Folixorin}_{\text{RED}} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Folixorin}_{\text{OX}} + \text{NADPH}$

in presenza di concentrazioni crescenti di
inibitore TH7299

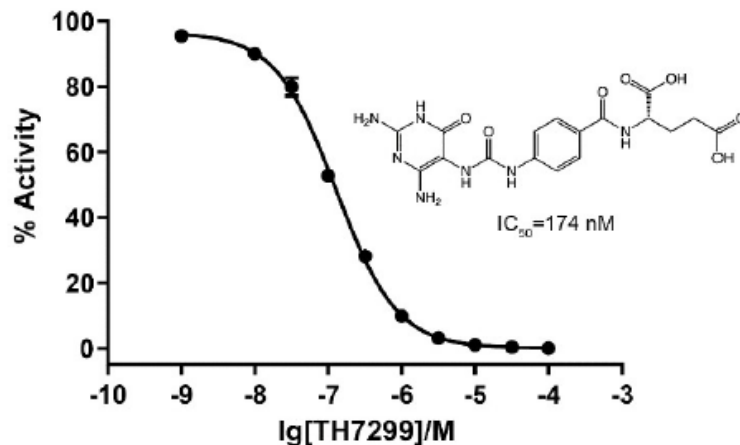
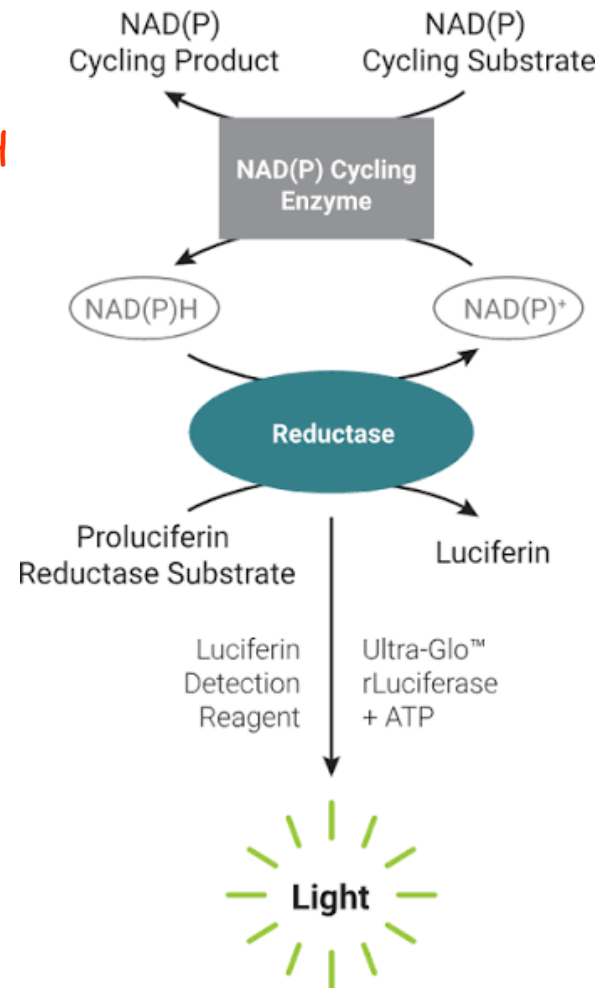
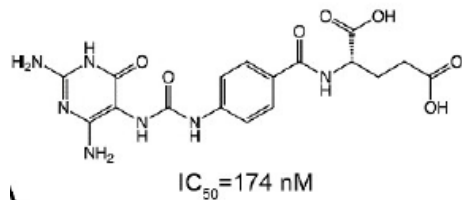


Figure 2. TH7299 dose-response curve for MTHFD2L. IC₅₀ = 174 nM (n = 3).



Analisi del legame di TH7299 a MTHFD2L



TH7299 si lega nella tasca di legame del folato

La tasca di legame del cofattore NAD(P)⁺ è molto conservata

La tasca allosterica differisce tra MTHFD1 e MTHFD2 e in parte tra MTHFD2 e MTHFD2L

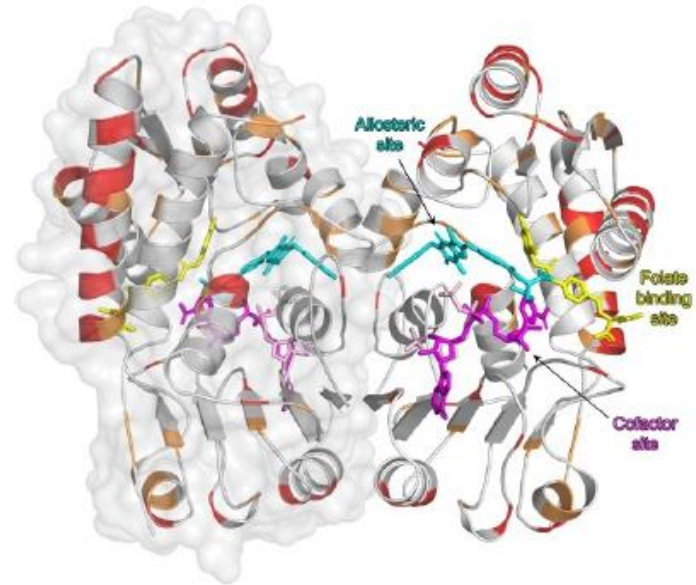
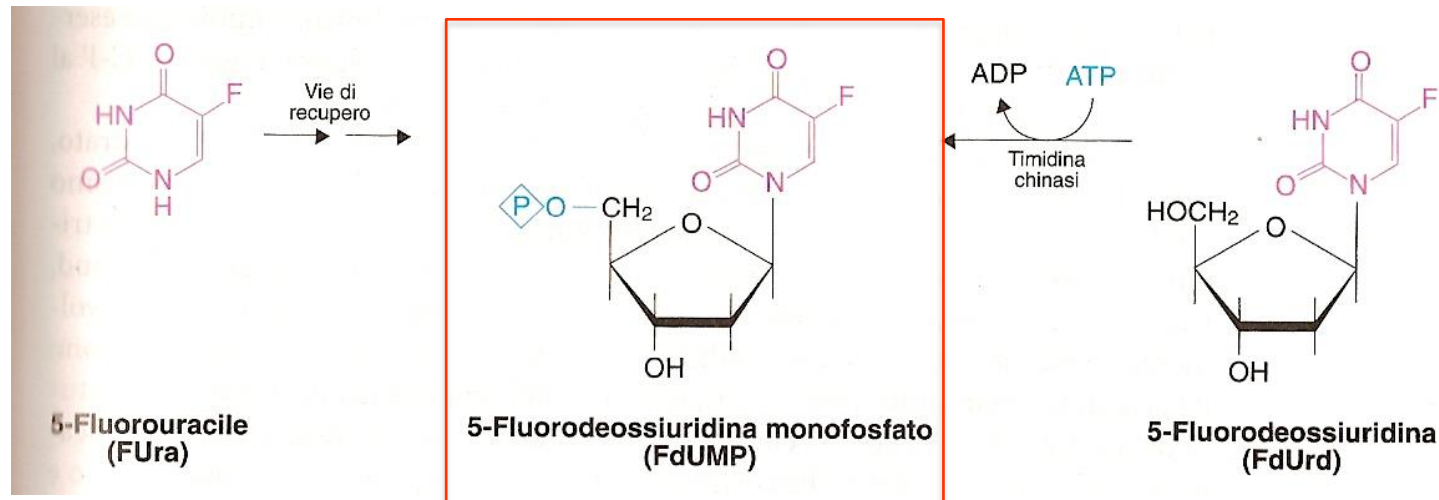
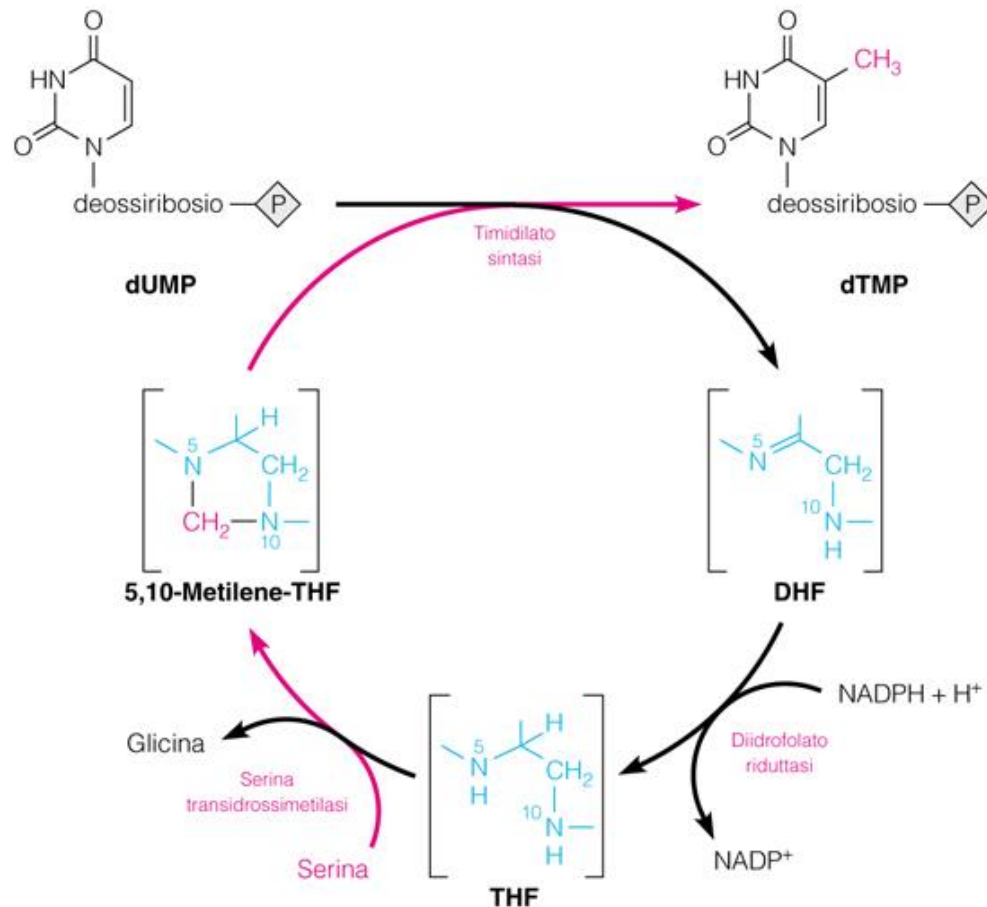


Figure 8. Structure of the hMTHFD2L dimer highlighting the three different ligand binding sites. The surface of one monomer is shown at 80 % transparency. The structure was superimposed with that of MTHFD2–TH7299 (PDB ID: 6S4E) and MTHFD2–J4C (PDB ID: 7EHM), however only the ligands of the compared structures are shown. TH7299 which binds in the MTHFD2L folate binding site is shown as yellow sticks. Partial NADP⁺ (MTHFD2L) and NAD⁺ (MTHFD2) which bind in the cofactor binding site are shown as light pink and magenta sticks, respectively. The allosteric inhibitor J4C (MTHFD2) is shown as cyan sticks. Amino acid differences between MTHFD2L and MTHFD2 are highlighted. Red coloring indicates non-conserved differences and orange coloring indicates differences with conserved physicochemical properties. Figures were produced with PyMOL (v.2.3.3, Schrödinger).

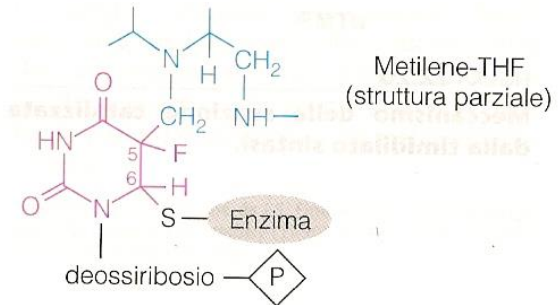
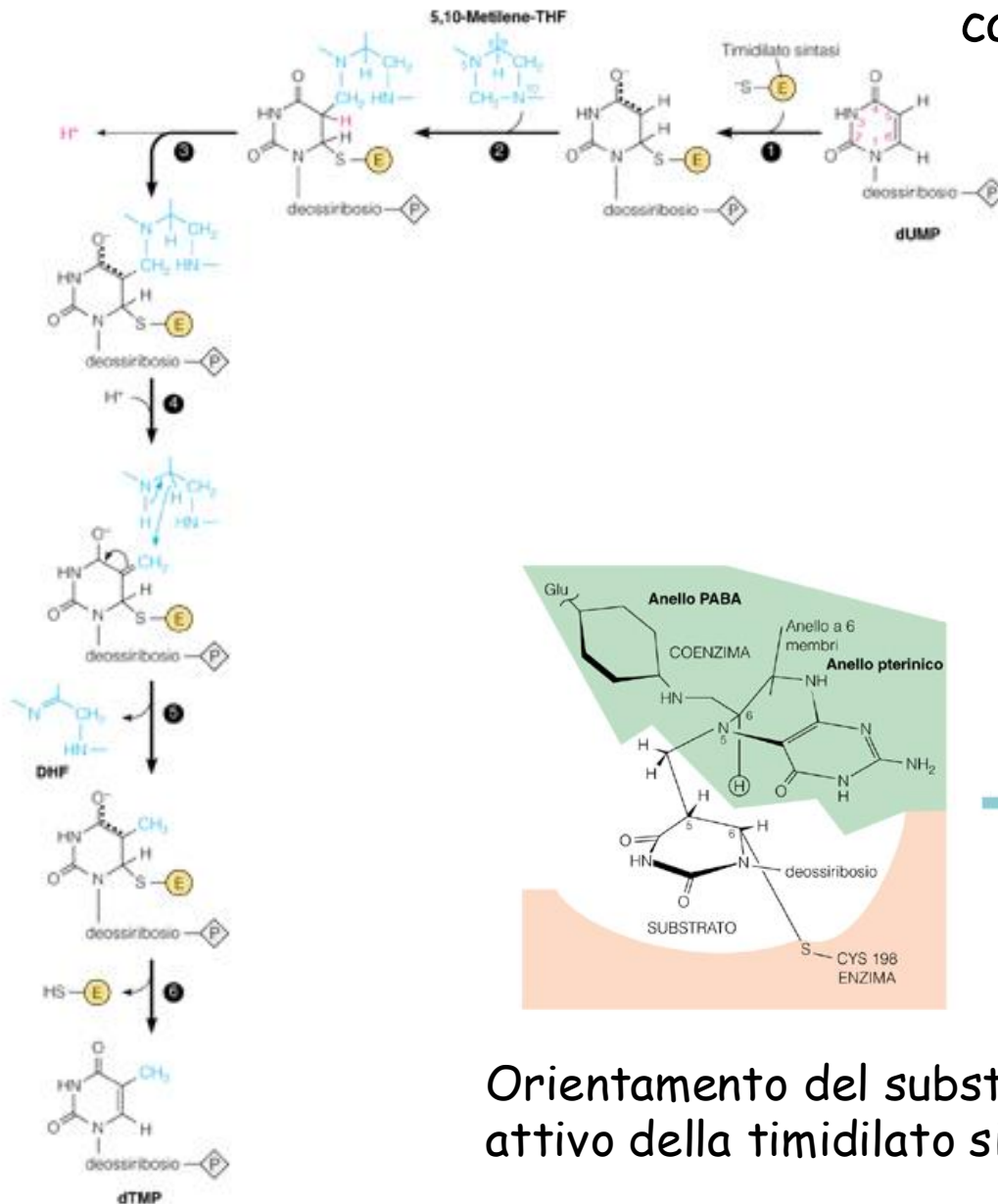
Il 5-fluorouracile: un inibitore suicida della timidilato sintasi



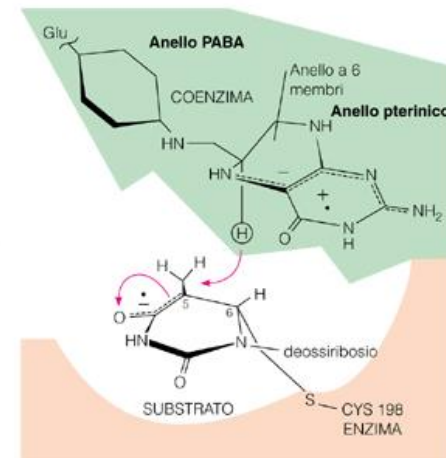
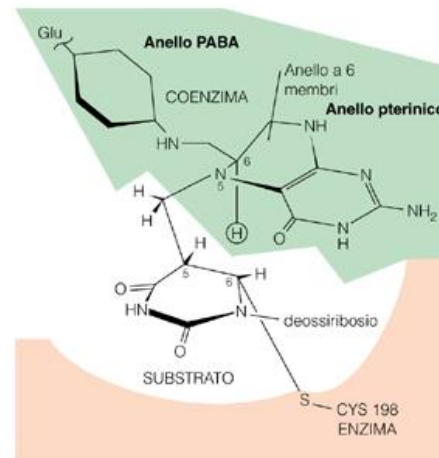
Il 5-fluorouracile: un inibitore suicida della timidilato sintasi



Meccanismo della reazione catalizzata dalla timidilato sintasi

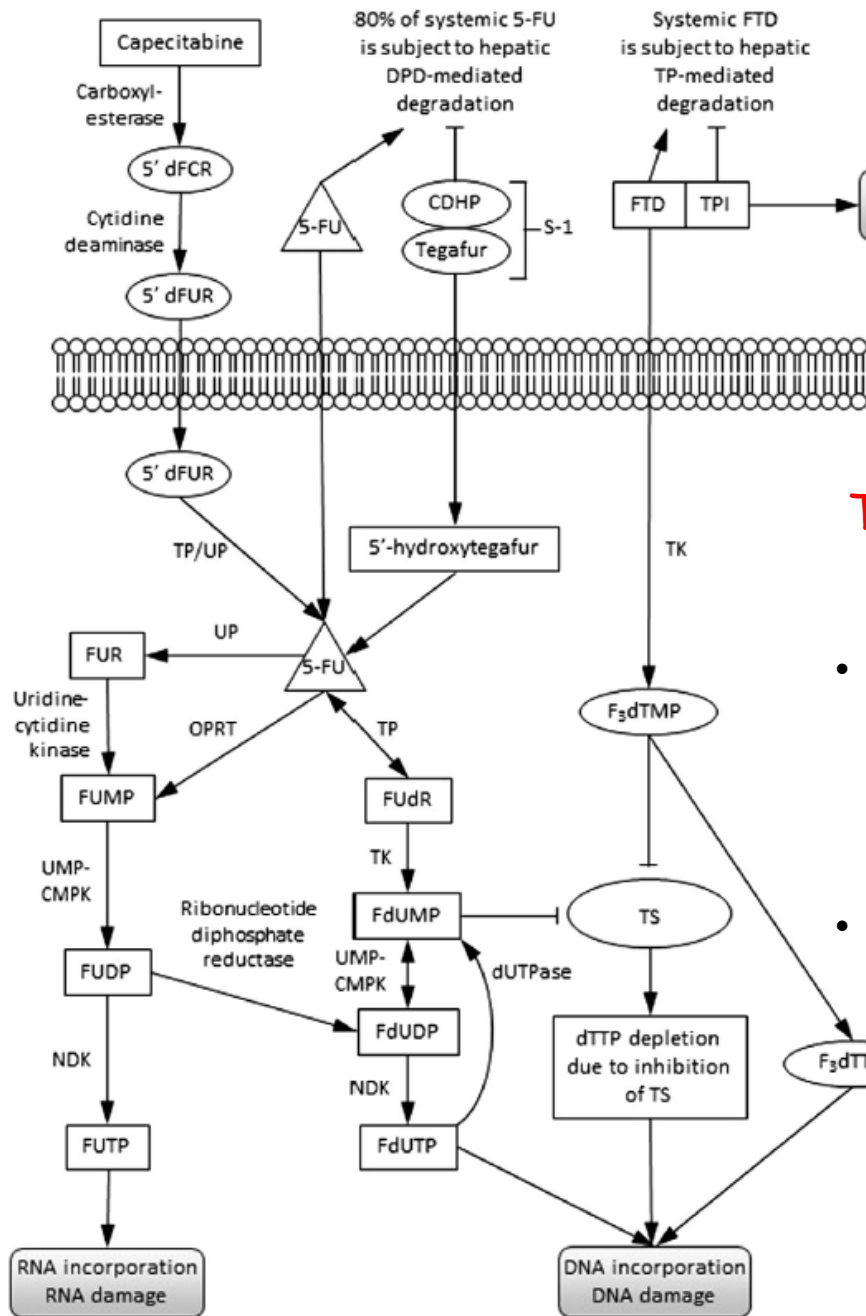


Complesso tra dUMP legato all'enzima e il 5,10-metilene-THF



Orientamento del substrato e del coenzima nel sito attivo della timidilato sintasi

5-FU-based fluoropyrimidines



TAS-102

Systemic FTD is subject to hepatic TP-mediated degradation

FTD TPI

Antiangiogenic effects

Table 1

Overview of TAS-102 and 5-FU-based chemotherapy agents [2].

Agent	Route of administration	Active metabolites and their functions
5-FU-based agents		
5-FU	IV	FdUMP: Irreversible inhibitor of TS
Capecitabine	Oral	FUTP: Incorporated into RNA
Tegafur-uracil	Oral	FdUTP: Incorporated into DNA
S-1	Oral	
FTD-based agents		
TAS-102 (FTD + TPI)	Oral	F ₃ dTMP: Reversible inhibitor of TS F ₃ dTTP: Incorporated into DNA TPI: TP inhibition

5-FU: 5-fluorouracil; F₃dTMP: trifluoromethyl deoxyuridine 5'-monophosphate; F₃dTTP: trifluoromethyl deoxyuridine 5'-triphosphate; RdUMP: fluorodeoxyuridine monophosphate; FdUTP: fluorodeoxyuridine triphosphate; FTD: α,α,α -trifluorothymidine (trifluridine); FUTP: fluorouridine triphosphate; IV: intravenous; TP: thymidine phosphorylase; TPI: tipiracil hydrochloride; TS: thymidylate synthase.

TAS-102: un nuovo farmaco anti-tumorale

- Trifluridina (FTD): viene convertita in F3dTTP e incorporata nel DNA, è anche un debole **inibitore** timidilato sintasi (TS),
- Tipiracile: **inibitore** timidina fosforilasi (TP), l'enzima che catabolizza FTD

