

Inibizione enzimatica

Inibizione reversibile e irreversibile

grafico dei doppi reciproci

K_I e IC_{50}

Inibizione enzimatica

1. Fenomeno che consiste nella riduzione della velocità di una reazione catalizzata da un enzima;
2. *L'inibitore* esplica la sua azione legandosi all'enzima
3. *Un inibitore può inibire più enzimi.*
4. *Enzimi di specie biologiche diverse possono avere diversa sensibilità allo stesso inibitore*
5. Gli inibitori possono essere composti fisiologici, ma più spesso sono sostanze tossiche e veleni o sostanze sintetizzate dall'uomo e riversate in ambiente per risolvere determinate situazioni (insetticidi, erbicidi, antibiotici e altri farmaci)

Gli inibitori trovano applicazione principalmente

In medicina (antitumorali, antiinfiammatori,
anticolessterolo, etc...)

In agricoltura, nel controllo delle specie infestanti
(diserbanti, insetticidi, acaricidi, fungicidi)

Nella ricerca di base

Modalità di inibizione

Inibizione reversibile:

- l'inibitore si lega all'enzima mediante legami deboli;
- il sito di legame è spesso ma non sempre il sito catalitico
- l'inibitore può essere rimosso per diluizione o (in alcuni casi) da un eccesso di substrato

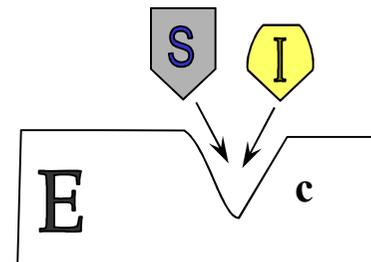
Inibizione irreversibile:

- l'inibitore forma un legame covalente con l'enzima o un suo cofattore legato all'enzima;
- il sito di legame è il sito catalitico;
- l'inibitore non può essere rimosso per diluizione e il substrato ha in genere un effetto protettivo;
- l'enzima è inattivato ma non denaturato

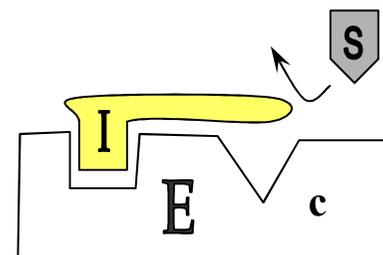
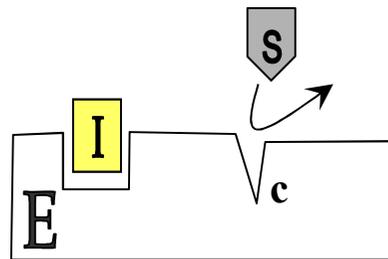
Inibizione semplice: inibizione competitiva

Modalità di interazione di un inibitore competitivo;
c = sito catalitico

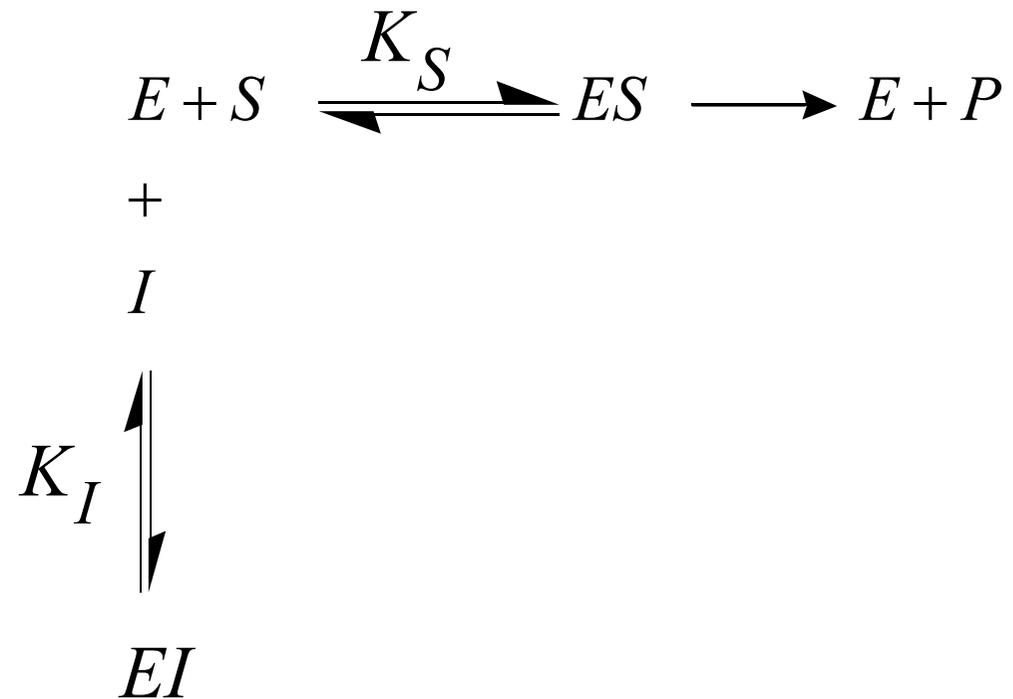
Caso più frequente:
l'inibitore è una sostanza
simile al substrato



Caso meno frequente:
l'inibitore produce una modificazione allosterica o un ingombro:



Inibizione competitiva. Equilibri in gioco



K_I e K_S sono costanti di equilibrio di dissociazione

Derivazione dell'equazione di velocità

$$v_0 = k_2 [ES] \quad \text{Derivazione secondo l'ipotesi dell'equilibrio:}$$

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_2 [ES]}{[E] + [ES] + [EI]}$$

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_2 \frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S} + \frac{[E][I]}{K_I}}$$

Moltiplicando per K_S e dividendo per $[E]$ e poi raggruppando:

$$v_0 = V_{\max} \frac{[S]}{K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

Partendo da un approccio in stato stazionario si ottiene la stessa equazione di velocità

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2}$$

$$\frac{v_0}{[E_T]} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES] + [EI]}$$

$$v_0 = V_{\max} \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

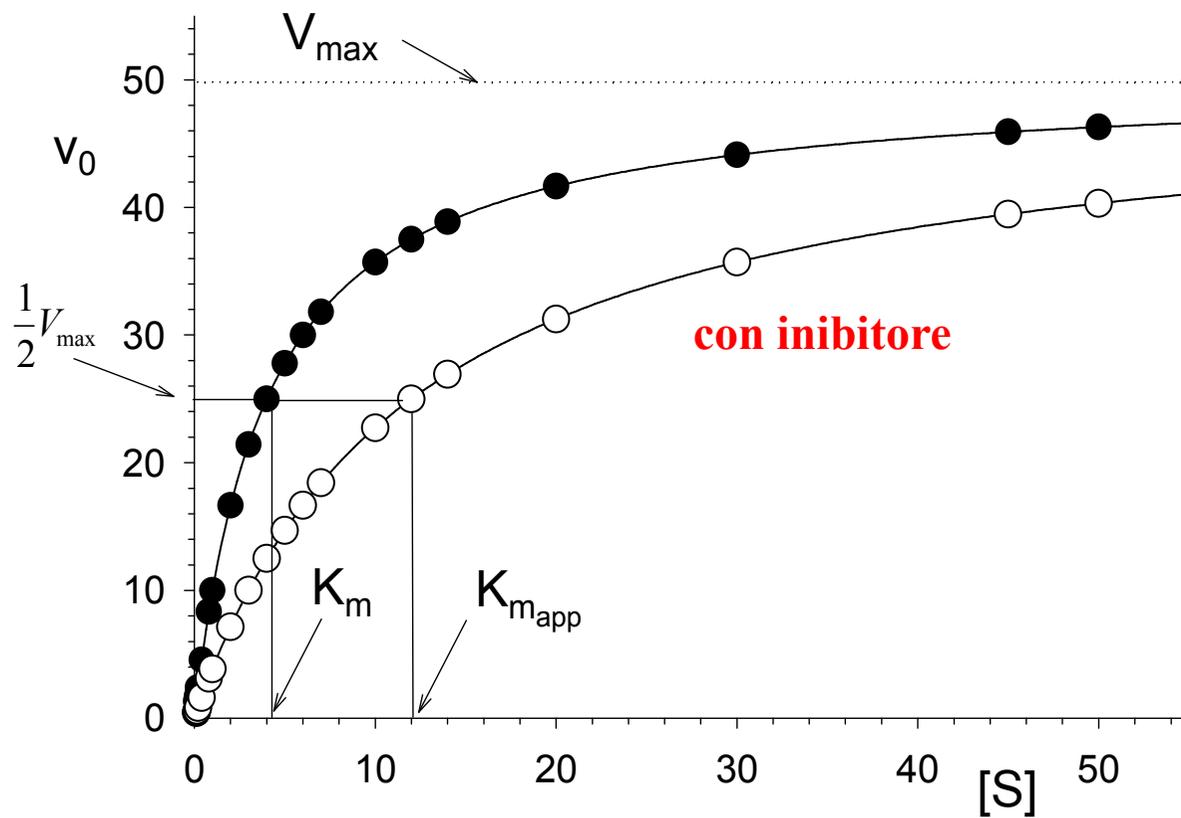
o anche:

$$v_0 = V_{\max} \frac{[S]}{K_{m_{app}} + [S]}$$

dove $K_{m_{app}}$ è detta K_m apparente

$$K_{m_{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

Rappresentazione grafica dell'inibizione competitiva



Stessa V_{max} , ma in presenza di inibitore si raggiunge con una $[S]$ maggiore

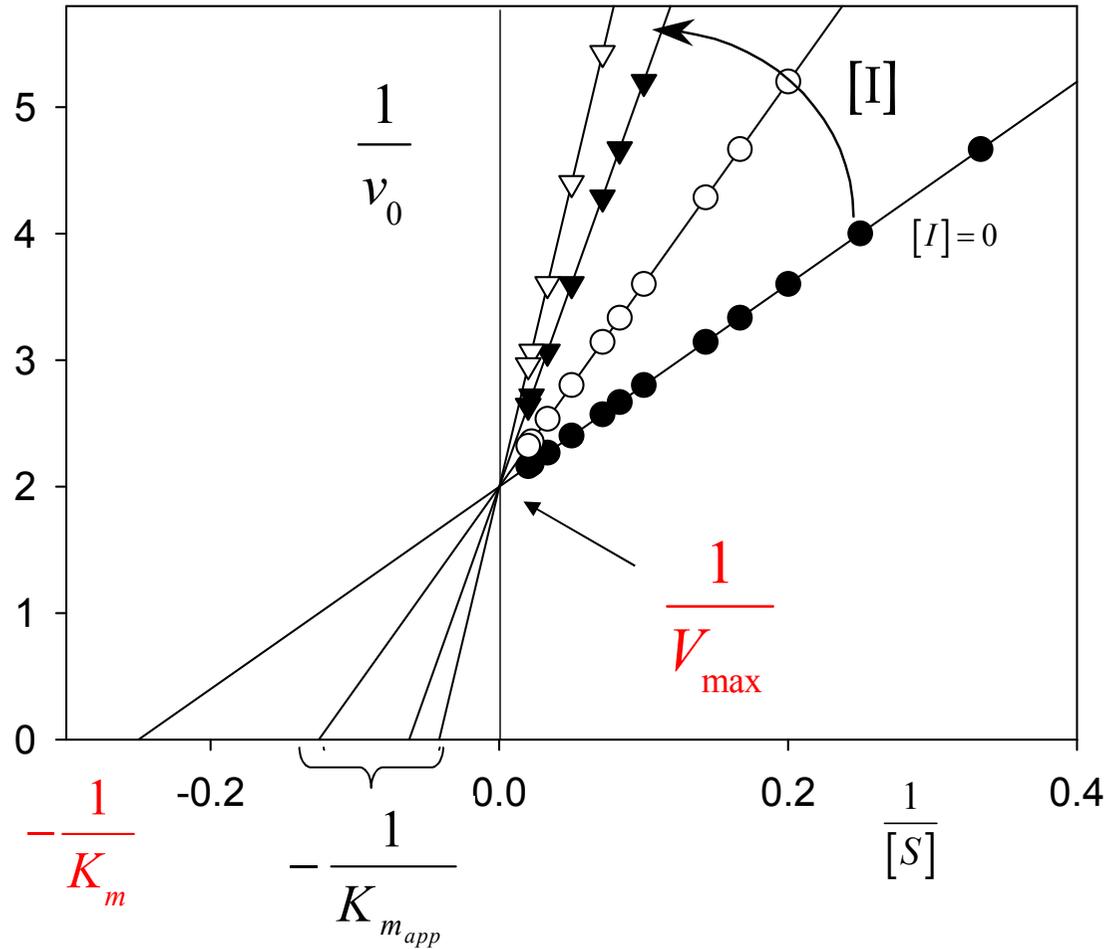
Equazione dei doppi reciproci

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{senza inibitore}$$

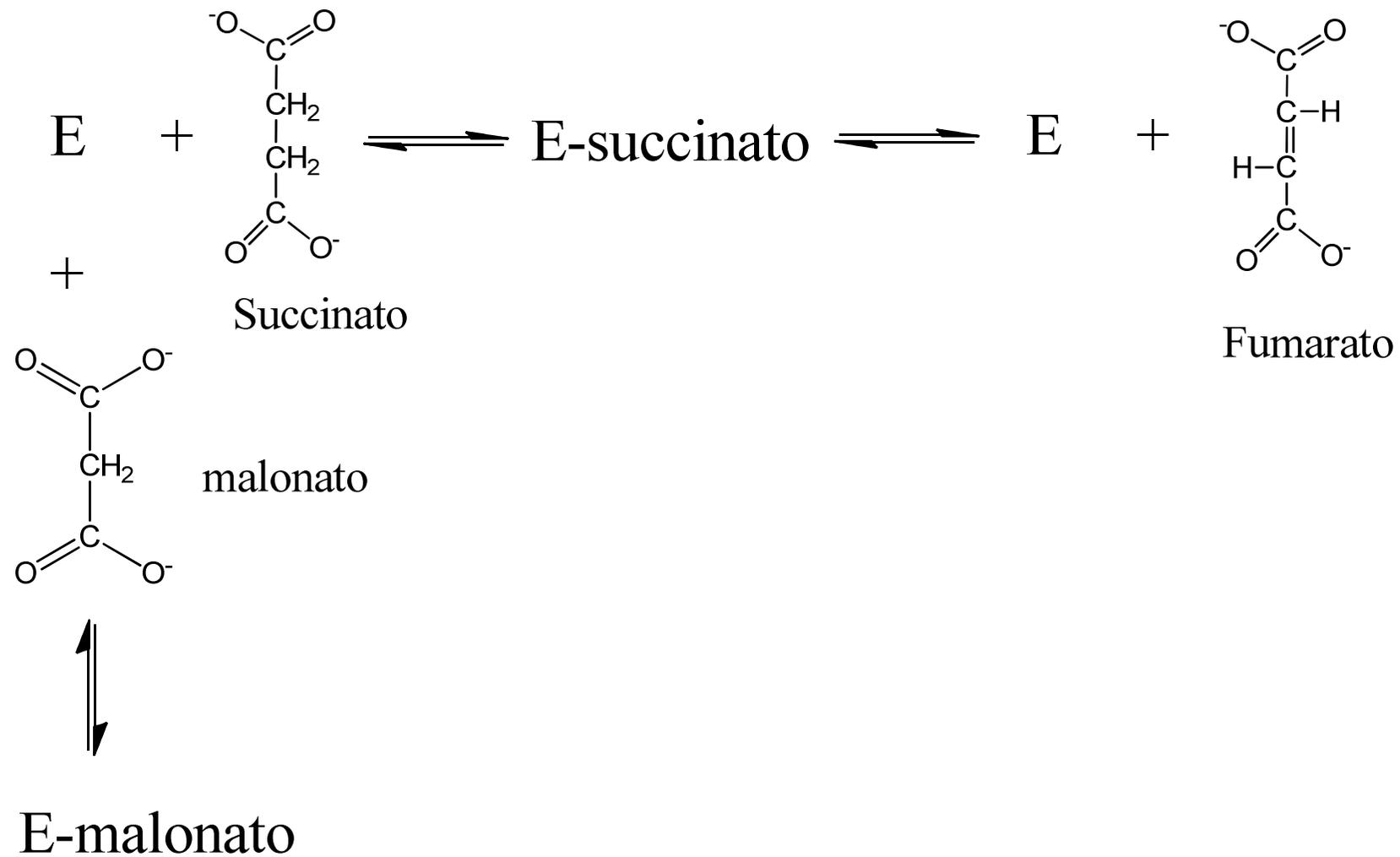
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{con inibitore competitivo}$$

La pendenza è aumentata di un fattore pari a: $\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$

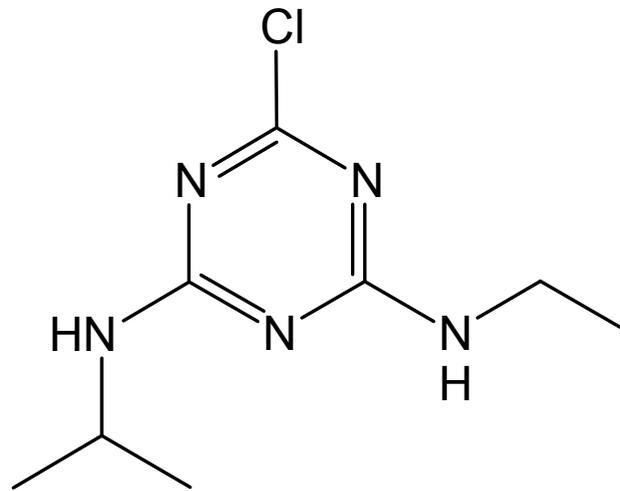
Grafico dei doppi reciproci.



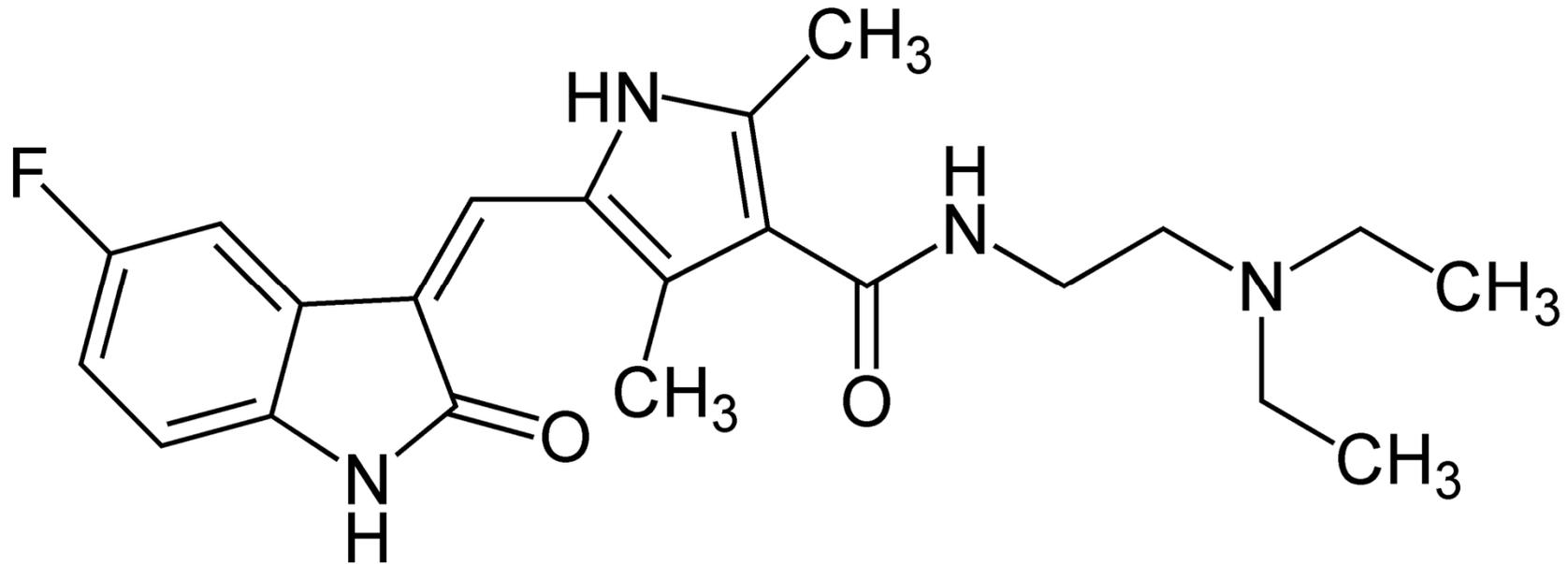
Inibizione competitiva della succinato deidrogenasi



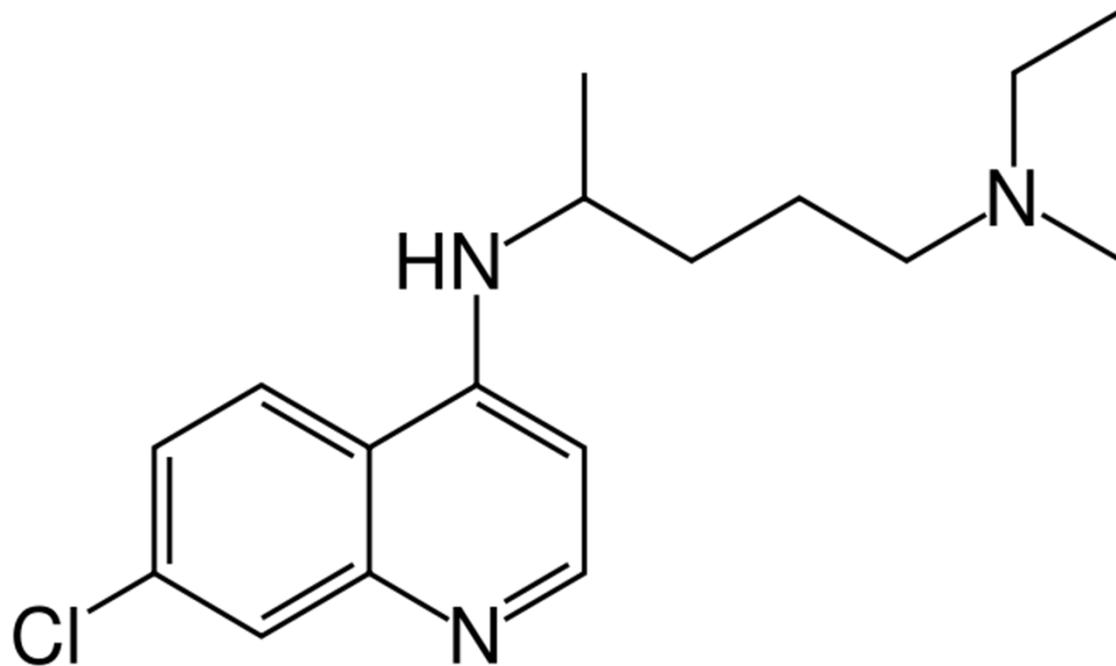
Il **diserbante atrazina** è inibitore competitivo di un enzima dell'apparato fotosintetico delle piante superiori



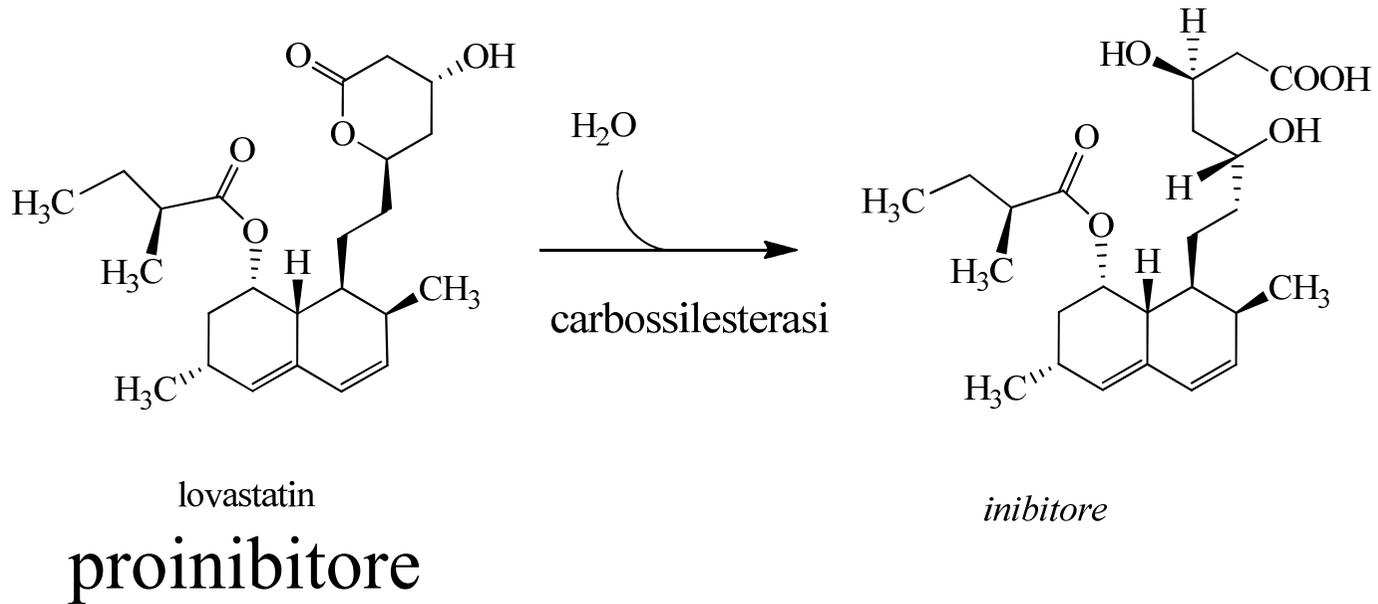
Sunitinib,
antitumorale di nuovissima generazione
Inibitore di tirosina chinasi



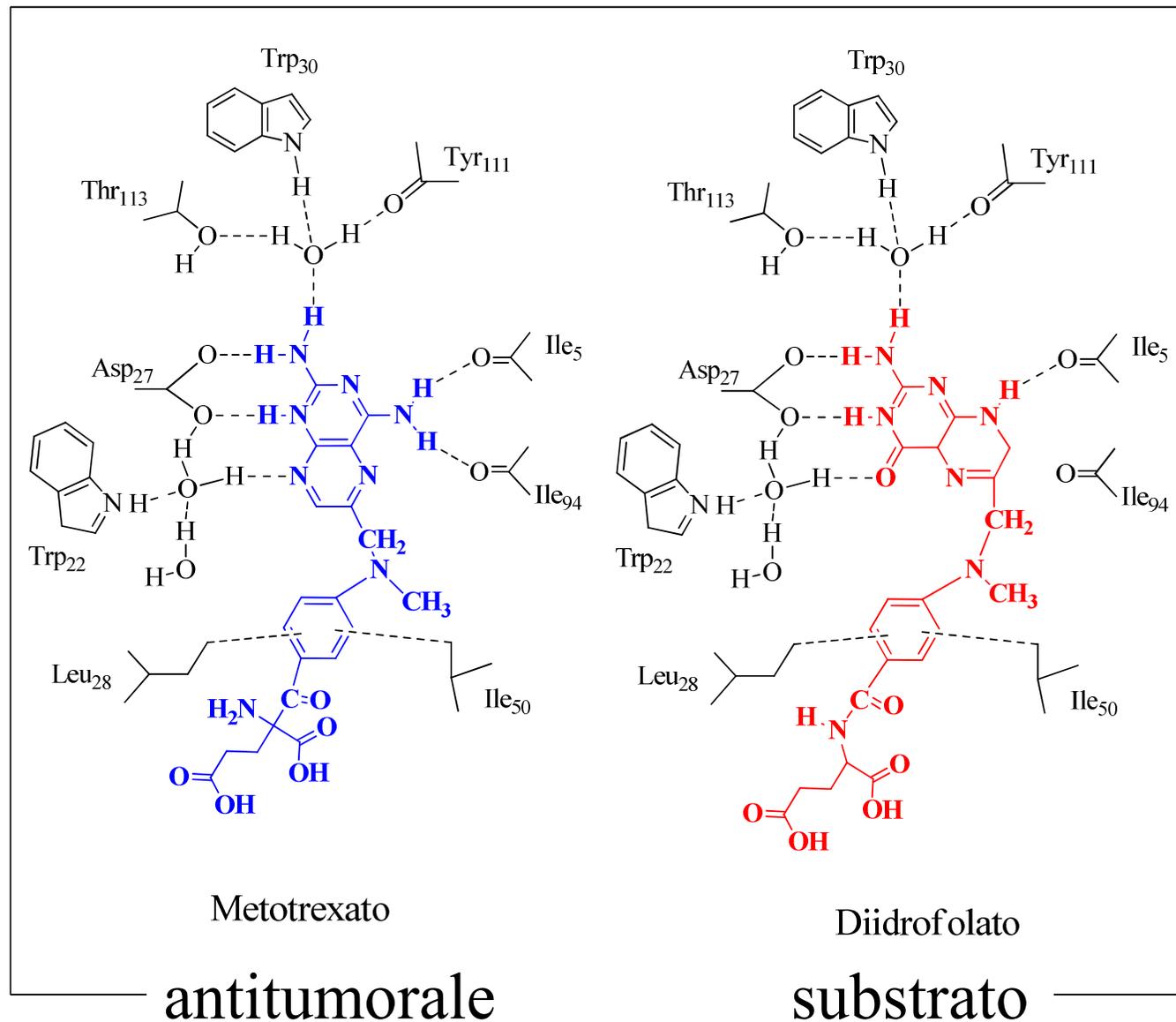
Cloroquina, antimalarico.
Inibitore della lattico deidrogenasi



Farmaci che abbassano il colesterolo



Inibitori ad alta affinità (quasi irreversibili)



IC_{50}

Concentrazione di Inibitore che riduce del
50% la velocità di una reazione catalizzata da
enzima

Relazione tra velocità e concentrazione di inibitore

$$\frac{v_i}{v} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}}$$

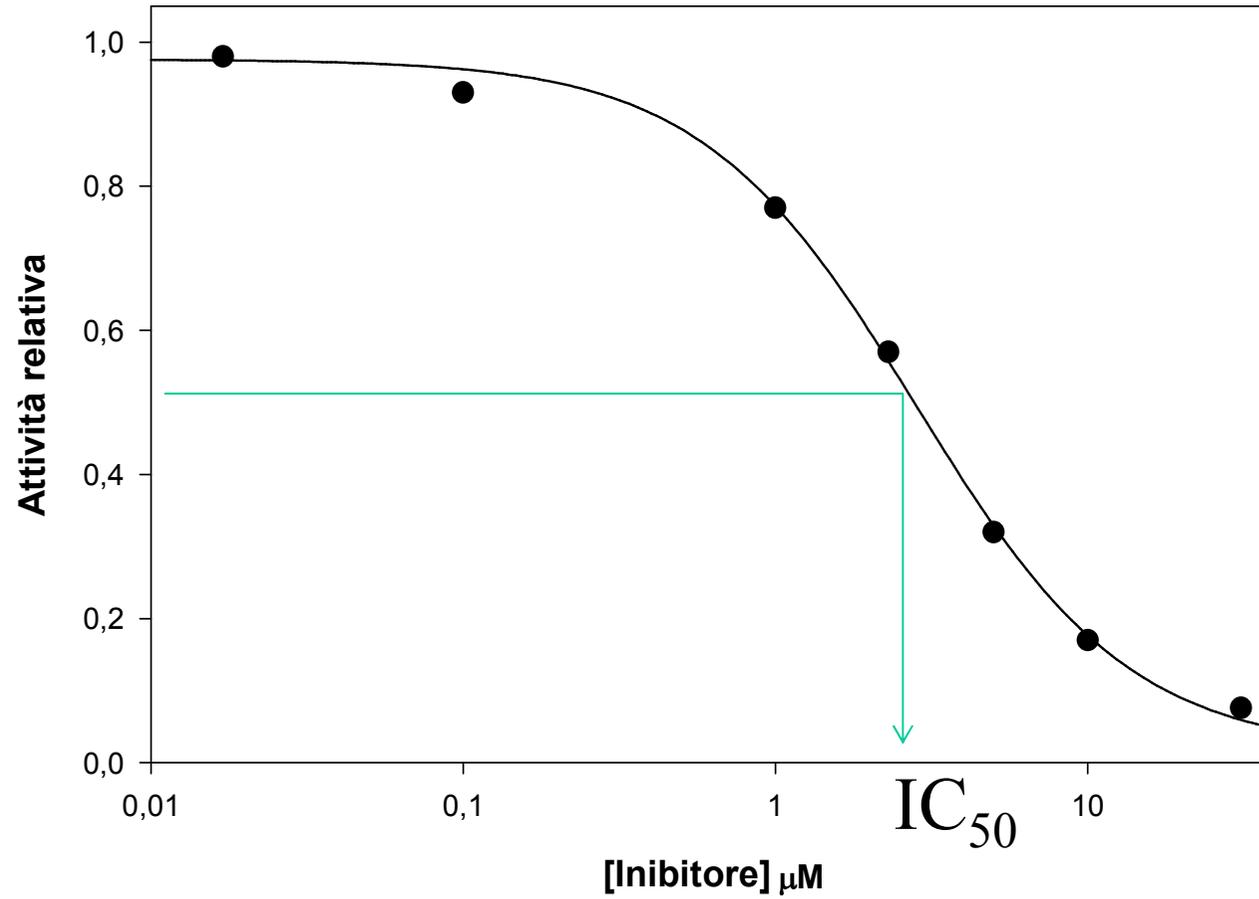
v. appendice

dove v_i e v sono le velocità iniziali in presenza e in assenza di inibitore

Quando I è pari alla IC_{50} il rapporto $\frac{v_i}{v}$ detto attività relativa è pari a $1/2$

ossia la velocità con inibitore è metà della velocità del controllo senza inibitore

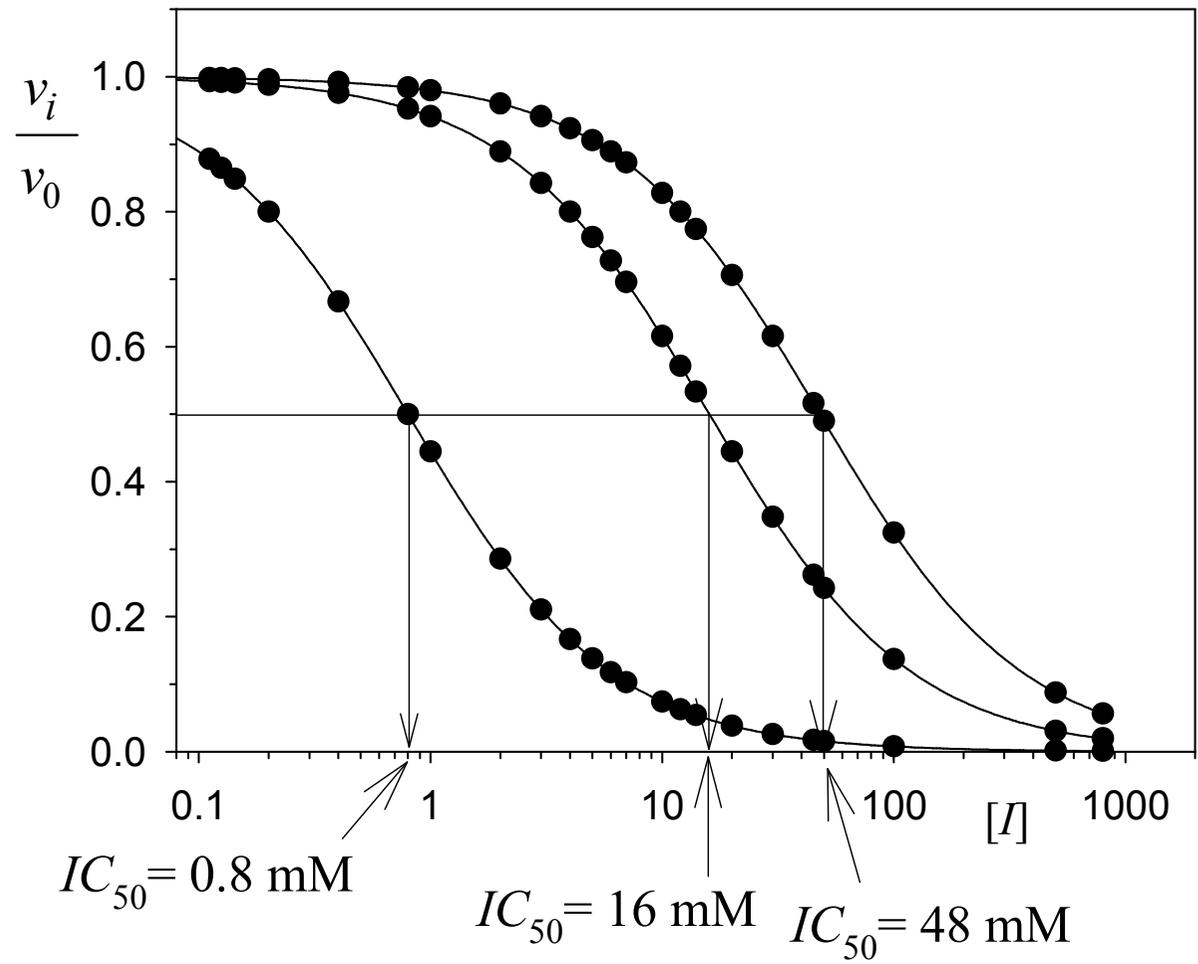
Curva dose-risposta con inibitore



Relazione tra IC_{50} e costante di inibizione nel caso di
Inibizione competitiva

$$IC_{50} = K_I \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

In fase di *screening* l'effetto di inibitori che agiscono sullo stesso enzima può essere confrontato (purché $[S]$ costante).

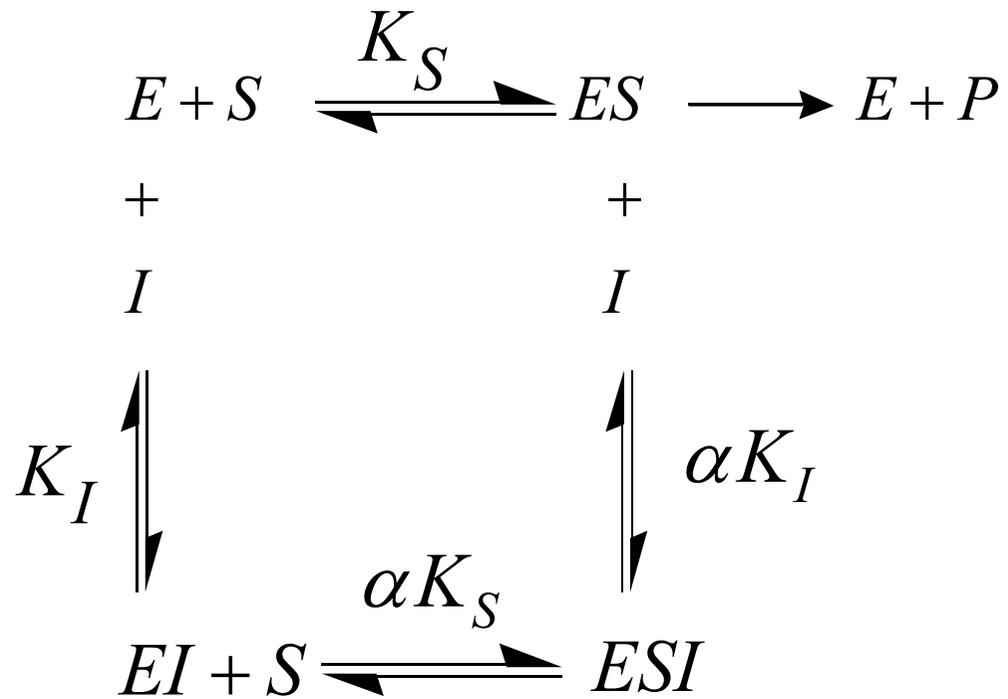


A cosa serve conoscere la K_I ?

Esempio con farmaco.

- $K_I = 1 \mu\text{M}$ peso molecolare = 300; si distribuisce in 30 litri di fluidi corporei del paziente.
- Se assumiamo inibizione competitiva e che la concentrazione di substrato sia pari a $2K_m$ allora $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$, che corrisponde a $900 \mu\text{g/L}$ e quindi a 27 mg totali. **Potrebbe essere troppo!**

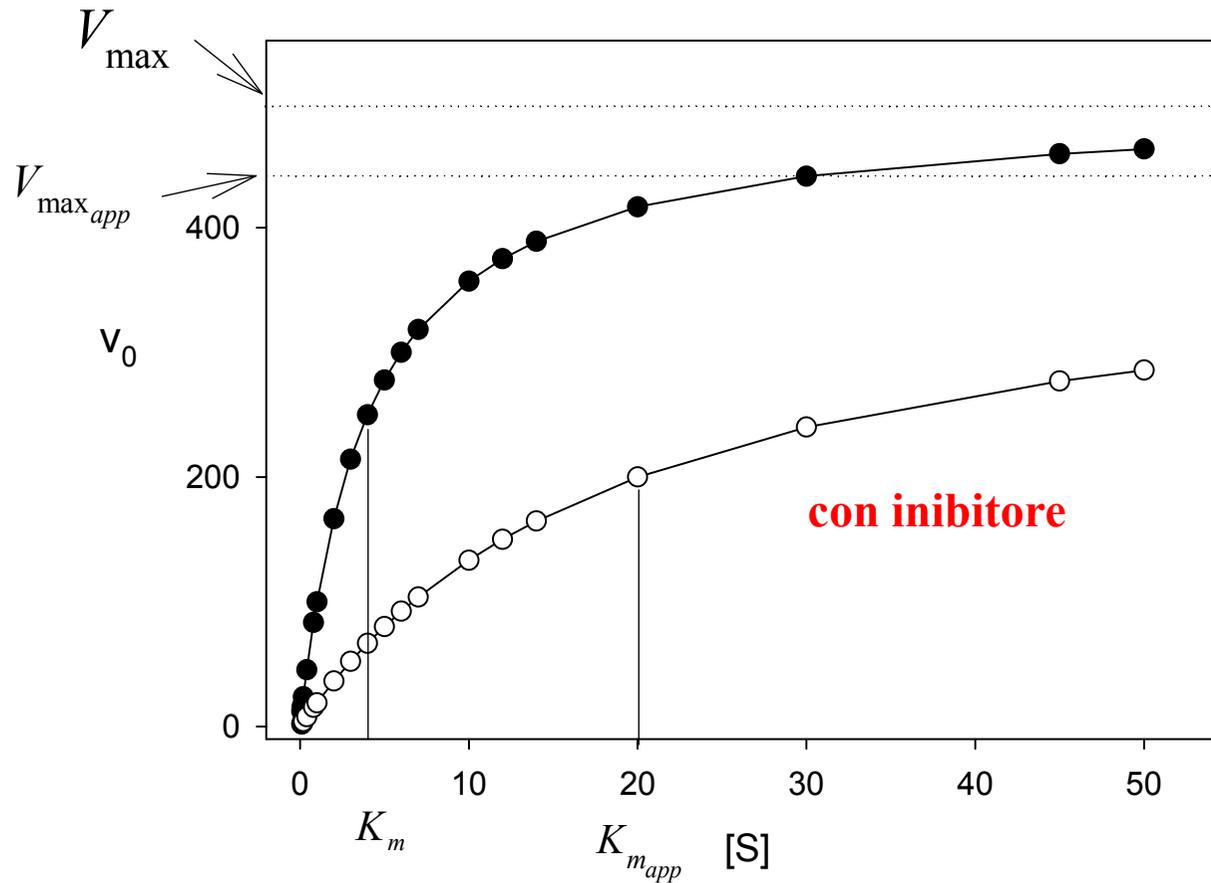
Inibizione mista



dove: $\alpha \geq 1$

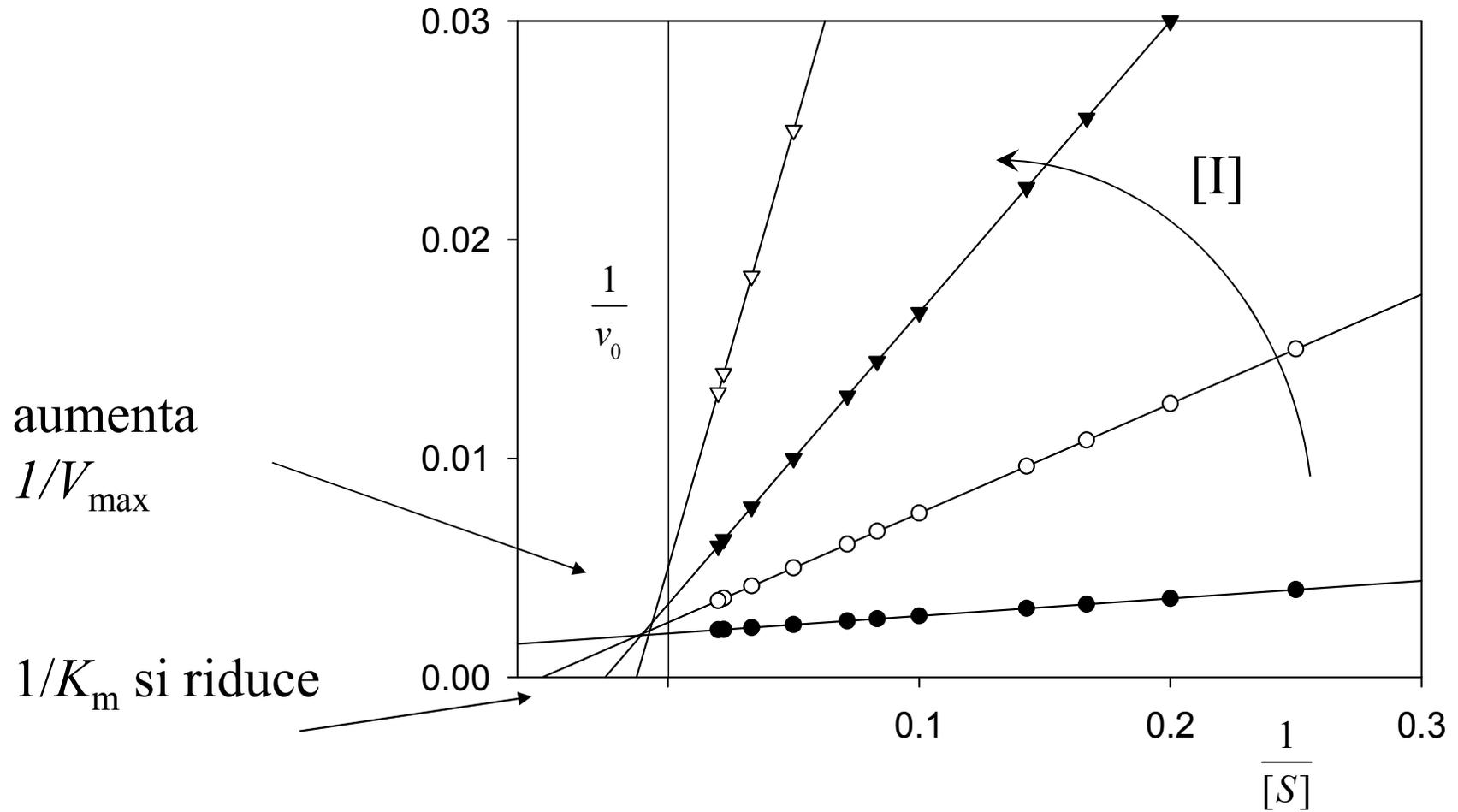
se $\alpha = 1$ l'inibizione è detta **noncompetitiva**

Inibizione mista



1. Non si raggiunge la stessa V_{max} del controllo, anche con $[S]$ molto grande;
2. aumenta la K_m

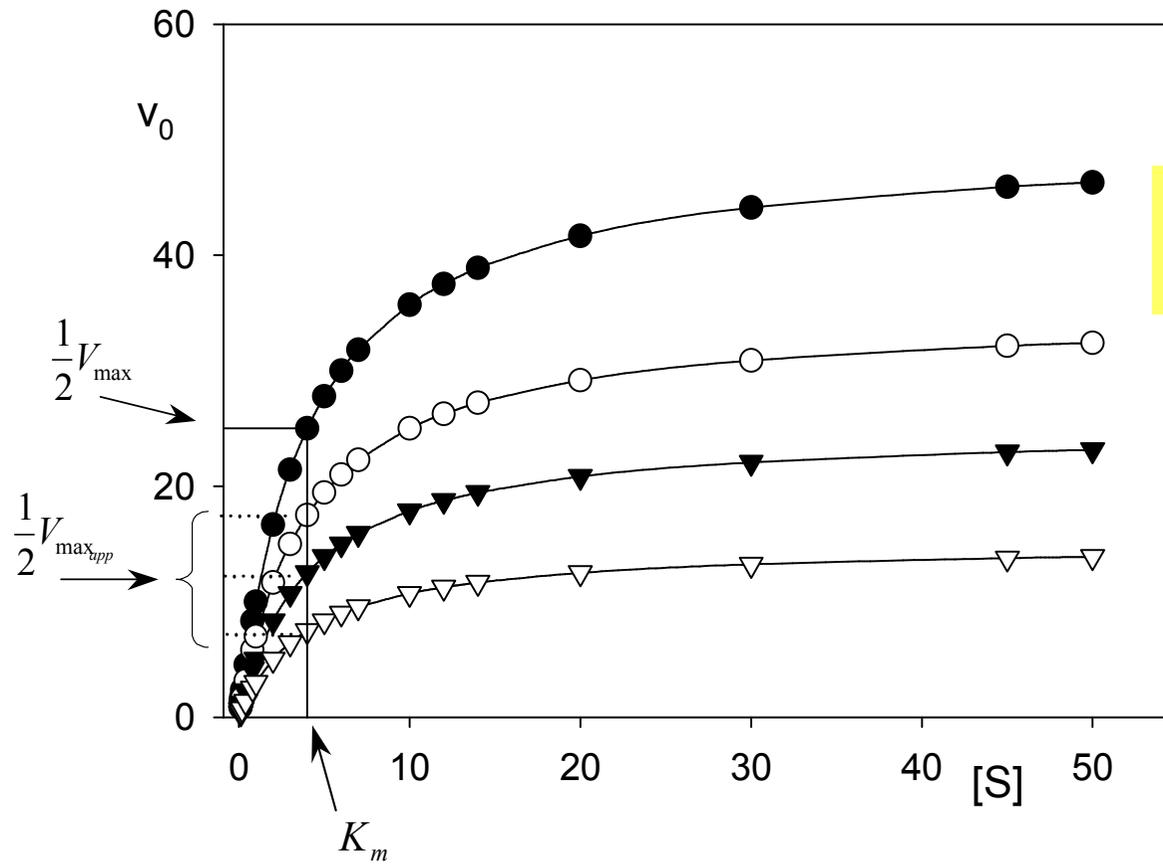
Inibizione mista



Inibizione *noncompetitiva*

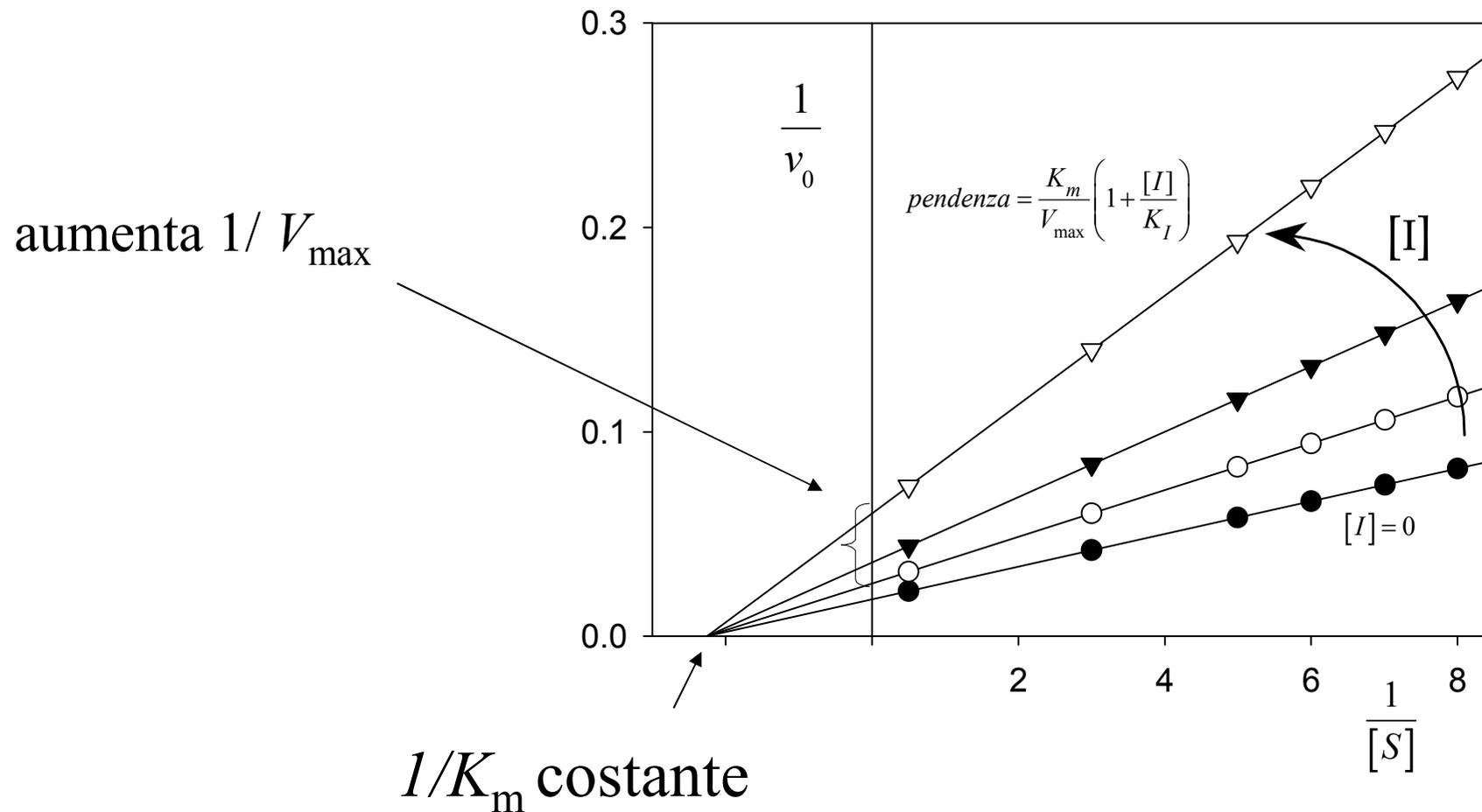
$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) (K_m + [S])}$$

Inibizione non competitiva



Diminuisce solo la V_{max}

Inibizione noncompetitiva



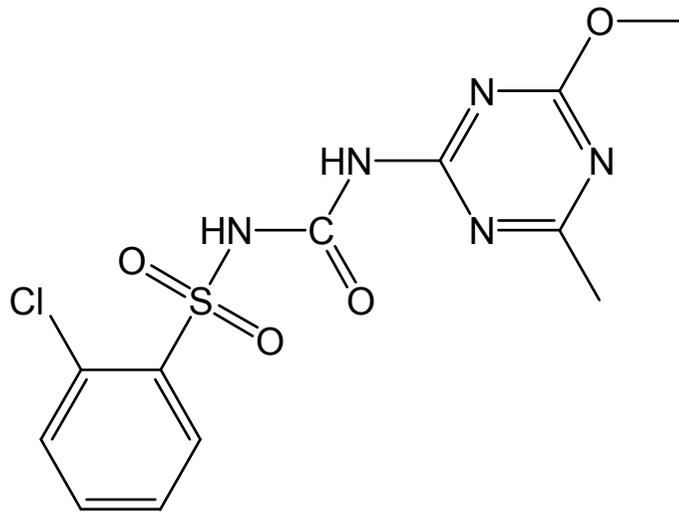
$$IC_{50} = K_I$$

A differenza dell'inibizione competitiva:

- Il grado di inibizione è indipendente da [S] (v. appendice)
- K_I è la concentrazione di inibitore che dà il 50% di inibizione

Considerando l'esempio del farmaco precedente:

Con I non competitivo $IC_{50} = 1 \mu\text{M}$ (9 mg totali *versus* 27 mg totali, I competitivo)

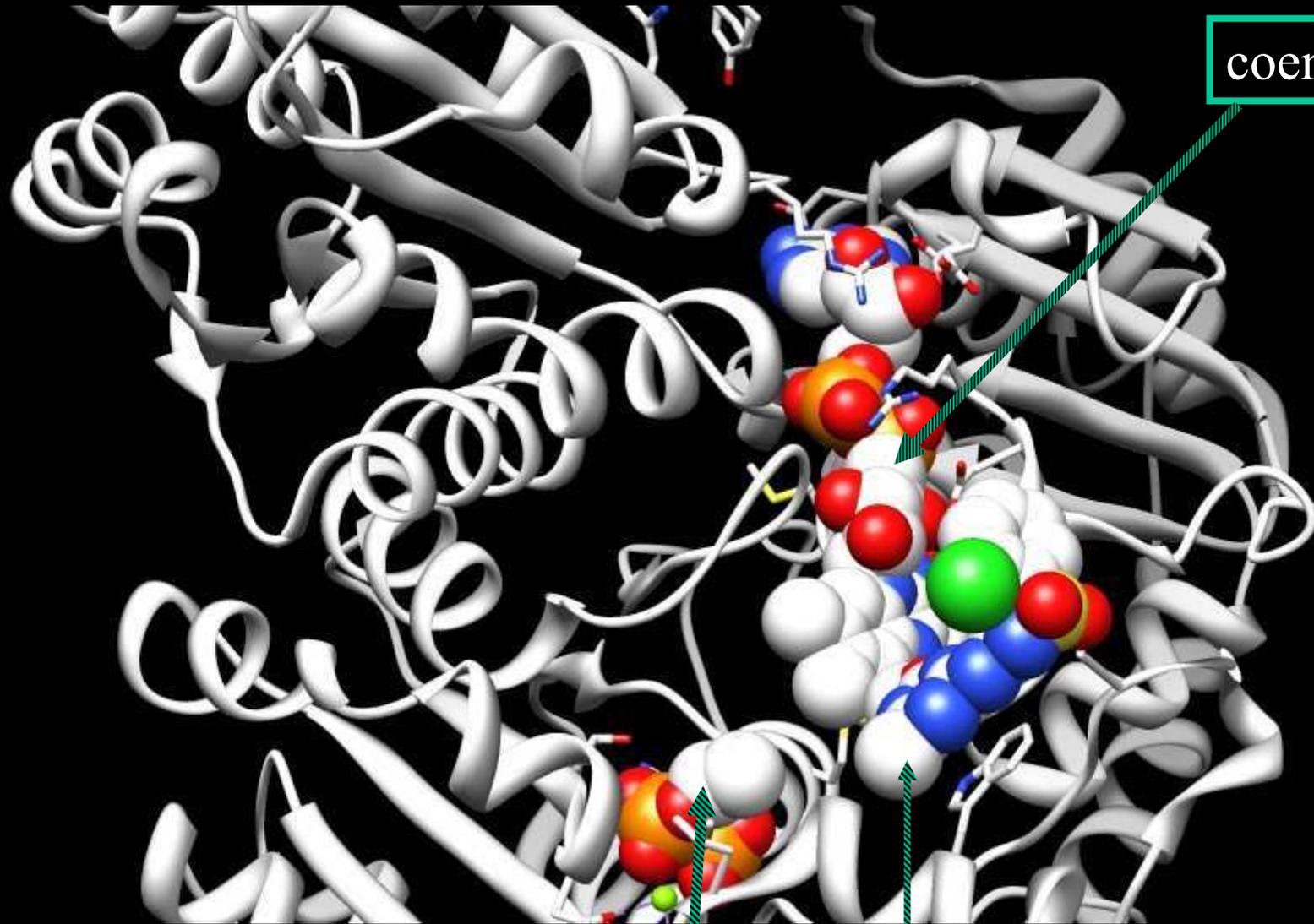


controllo

trattato

Il diserbante **clorsulfuron** è inibitore misto dell'acetolattato sintasi, un enzima presente nelle piante per la biosintesi degli aminoacidi leucina, isoleucina e valina

Acetolattato sintasi

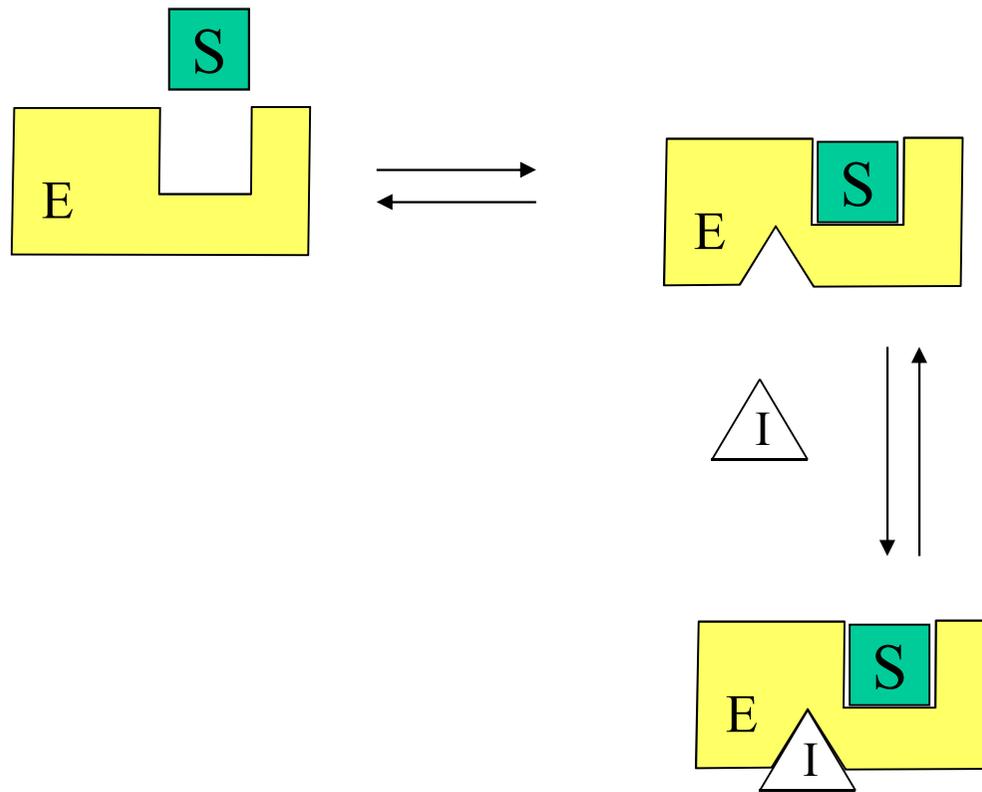


coenzima

intermedio

clorsulfuron

Inibizione acompetitiva o incompetitiva

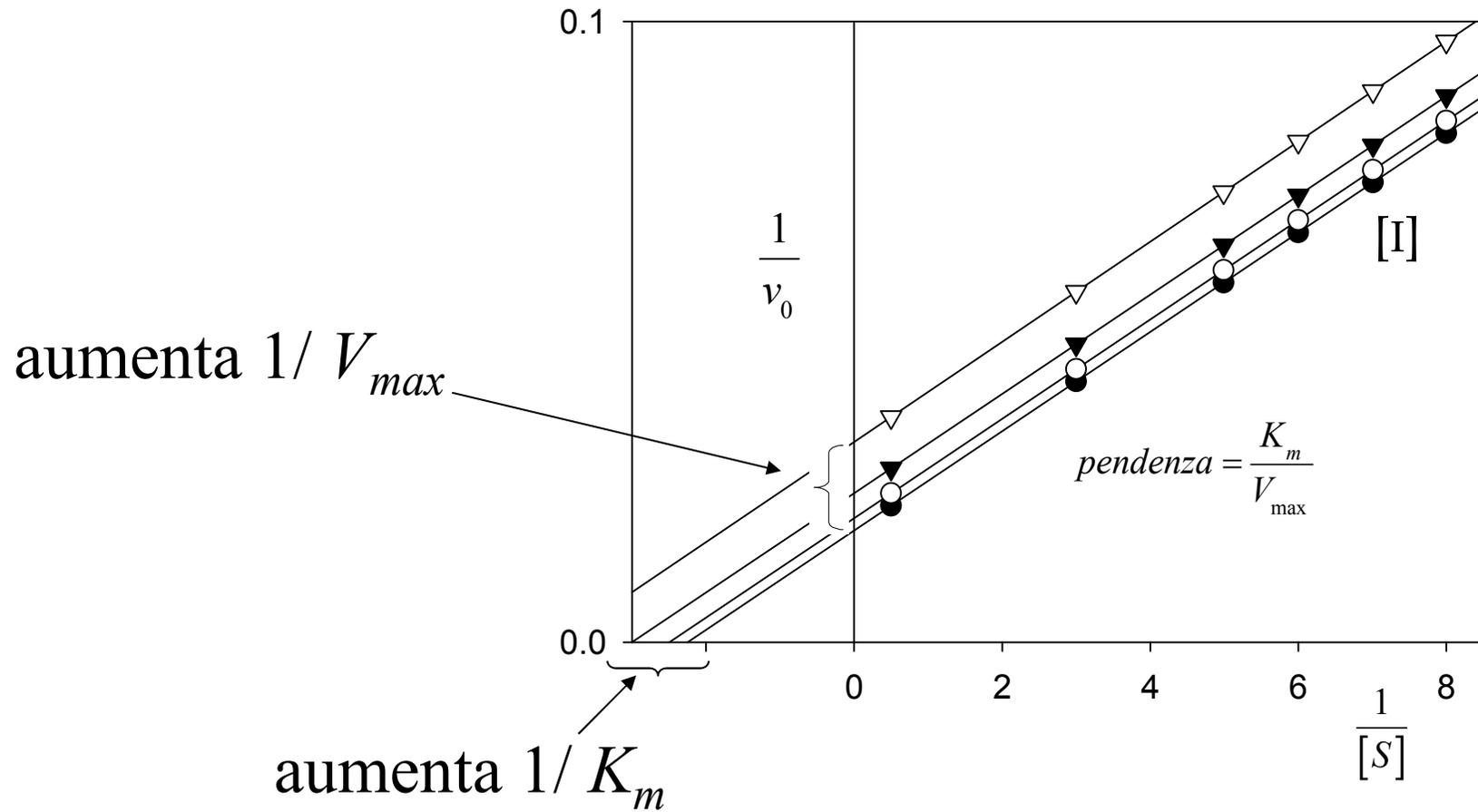


Inibizione acompetitiva

equazione di velocità:

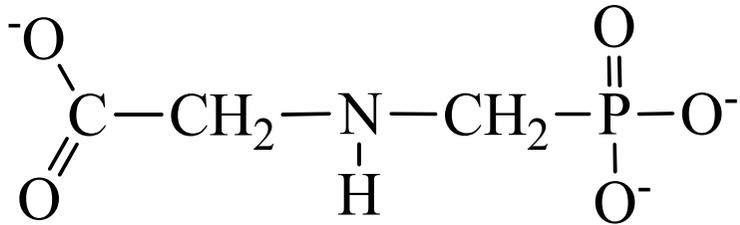
$$v_0 = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} [S]}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} + [S]}$$

Inibizione acompetitiva



$$IC_{50} = K_I \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right)$$

La IC_{50} aumenta al diminuire della concentrazione di substrato (diventa maggiore della K_I)



Glifosato



L'erbicida glifosato è un inibitore acompetitivo di un enzima coinvolto nella biosintesi della fenilalanina nelle piante.

La scoperta del glifosato è equivalente a quella della penicillina in campo medico

Inibitori irreversibili

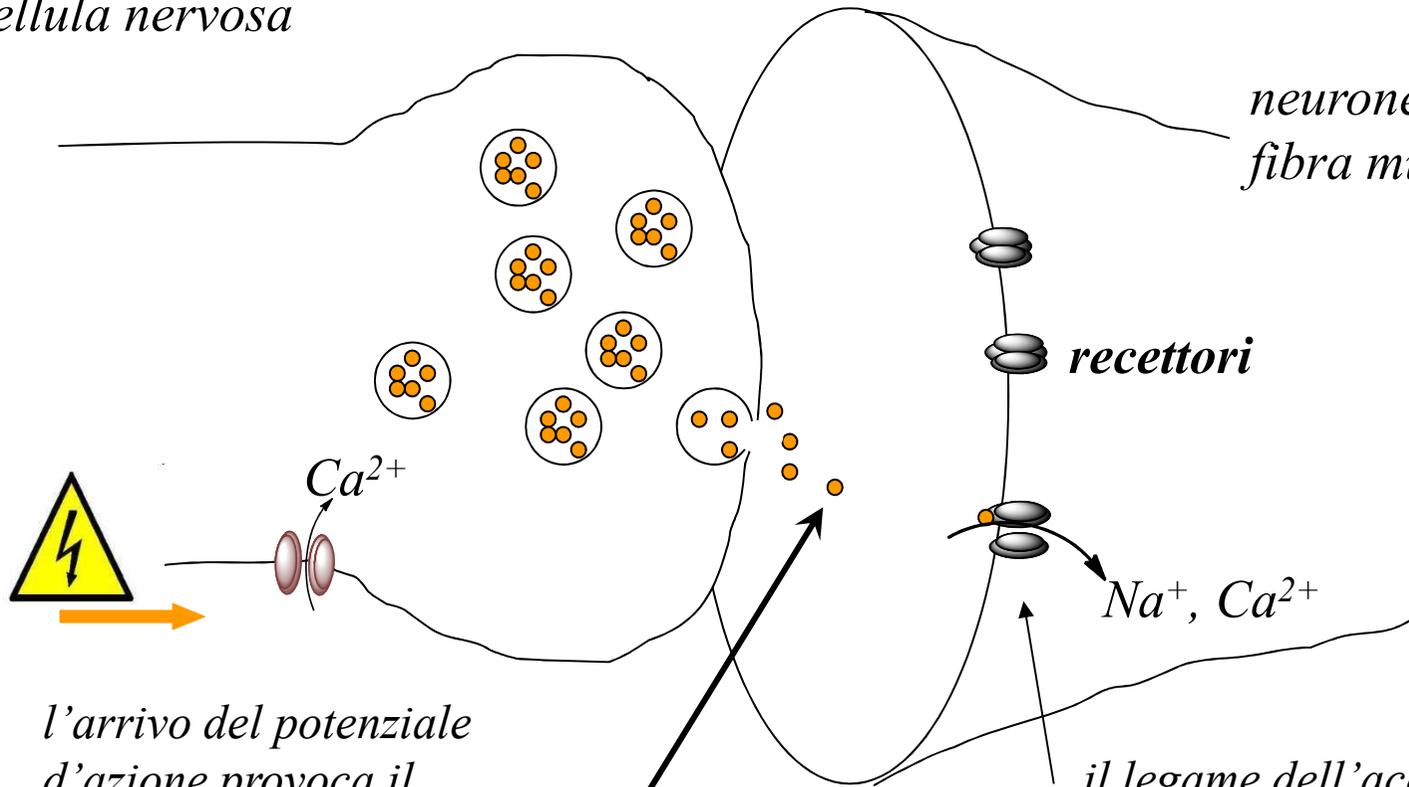


*Gli insetticidi organofosfati
e l'inibizione dell'acetilcolinesterasi*

*terminazione
cellula nervosa*

spazio intersinaptico

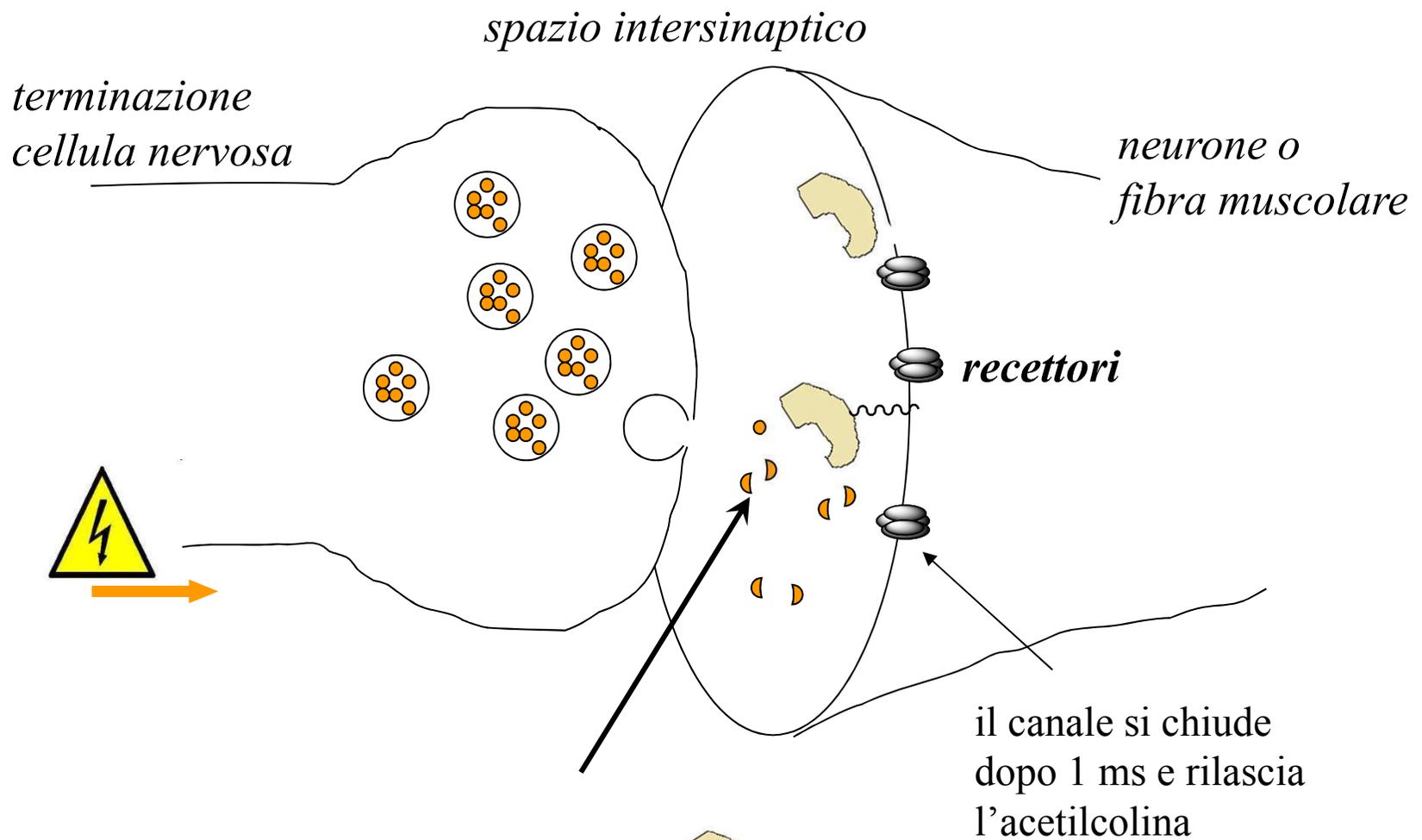
*neurone o
fibra muscolare*



*l'arrivo del potenziale
d'azione provoca il
rilascio di acetilcolina*

acetilcolina

*il legame dell'acetilcolina
ai recettori provoca l'apertura
del canale a sodio e calcio
che a loro volta produrranno
un nuovo segnale elettrico*



*l'acetilcolinesterasi
idrolizza tutta l'acetilcolina
così il sistema è pronto per un
nuovo impulso*

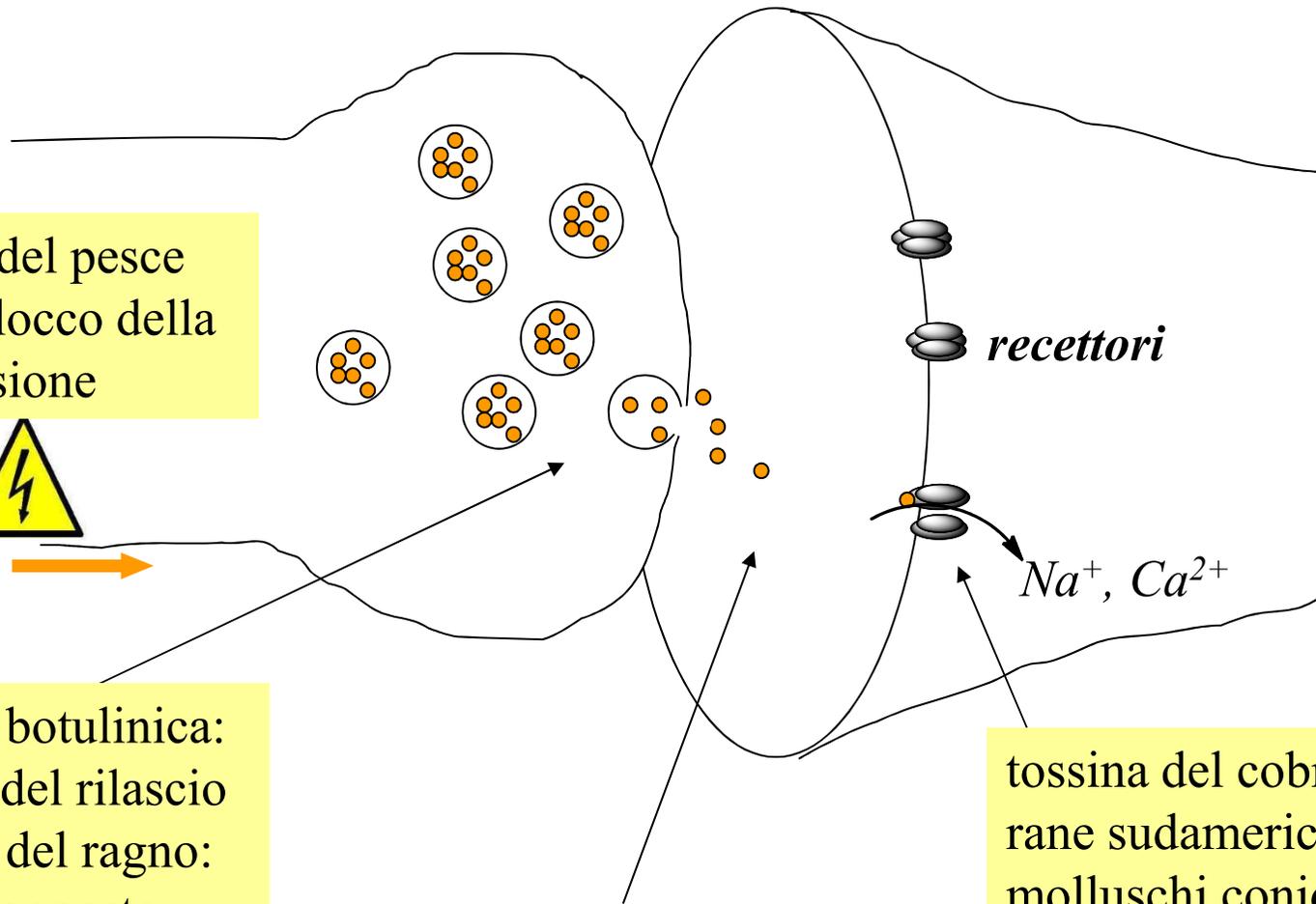
tossina del pesce
palla: blocco della
trasmissione

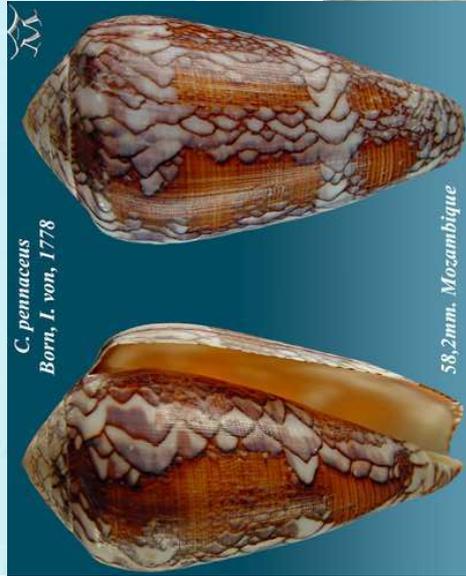
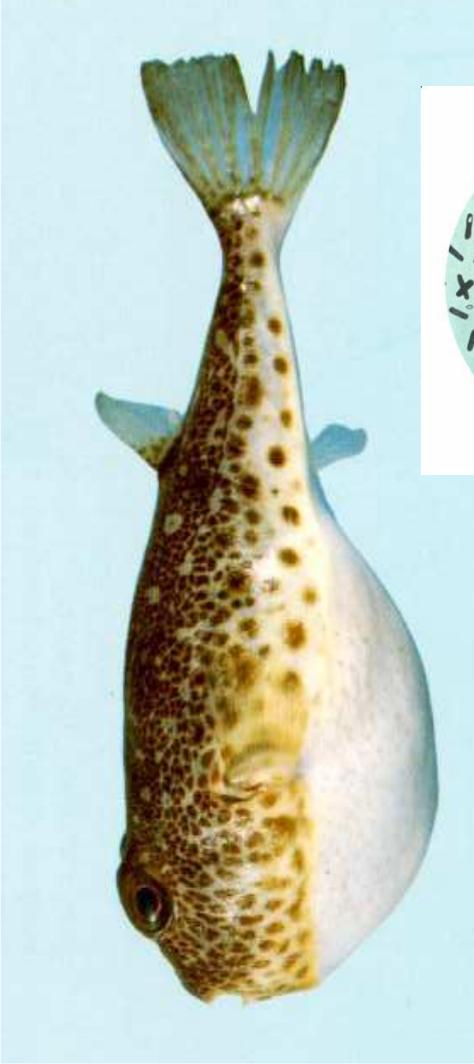


tossina botulinica:
blocco del rilascio
tossina del ragno:
effetto opposto

gas nervini, insetticidi
organofosfati :
inibizione dell'acetilcolinesterasi

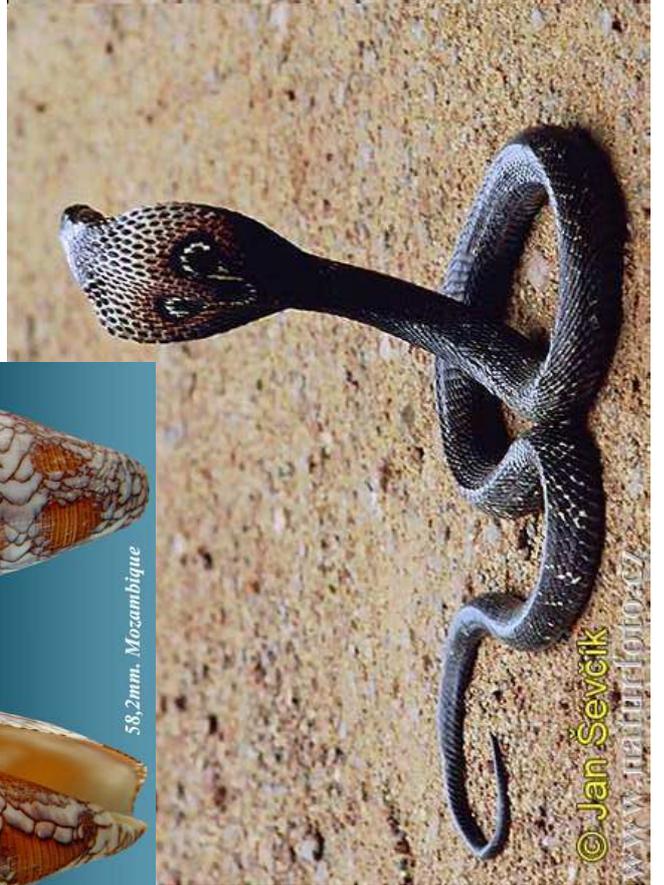
tossina del cobra,
rane sudamericane
molluschi conidi





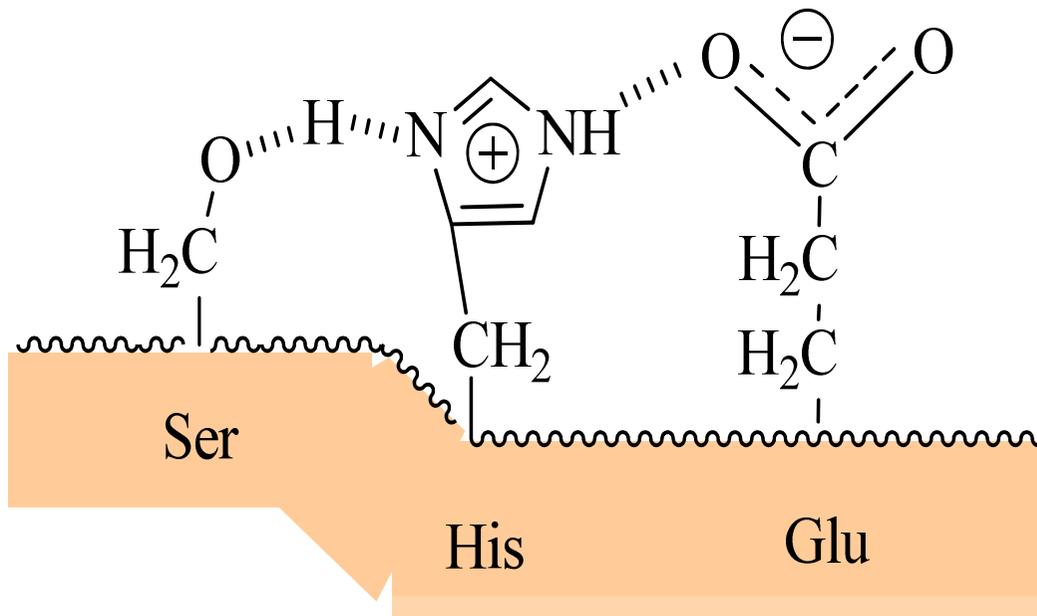
C. pennaceus
Born, L. von, 1778

58,2mm. Mozambique



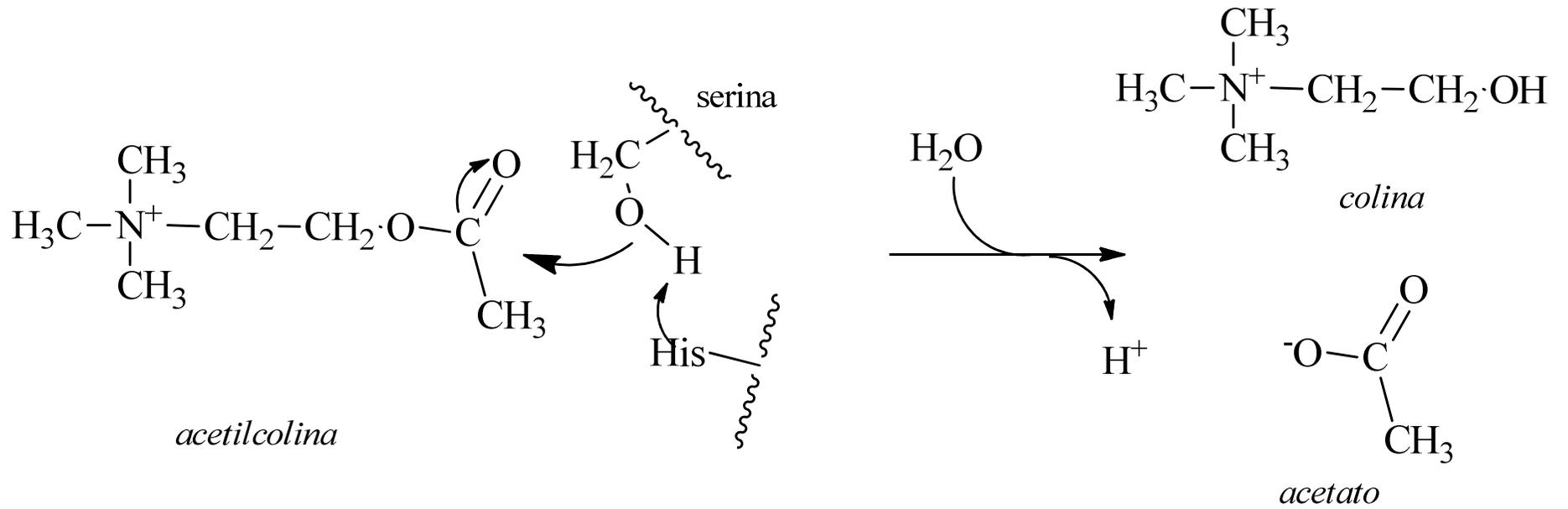
© Jan Ševčík
www.naturephoto.cz

Acetilcolinesterasi

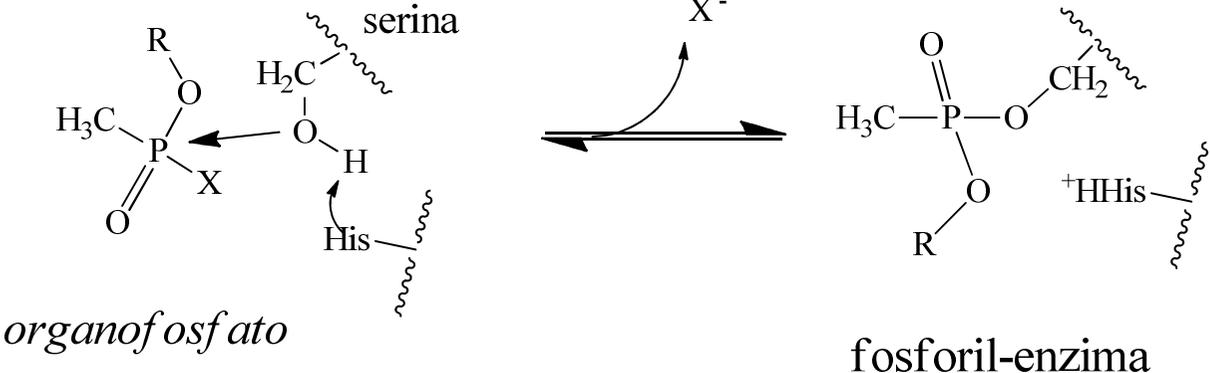


Sito catalitico

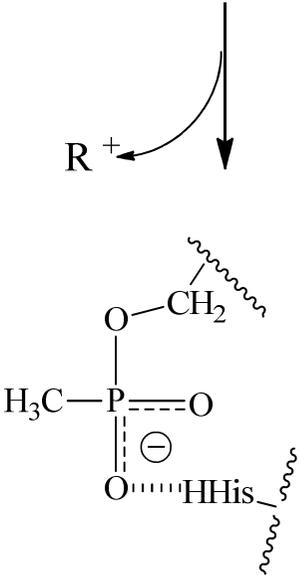
Reazione dell'acetilcolinesterasi



Inibizione irreversibile dell'acetilcolinesterasi da parte degli organofosfati



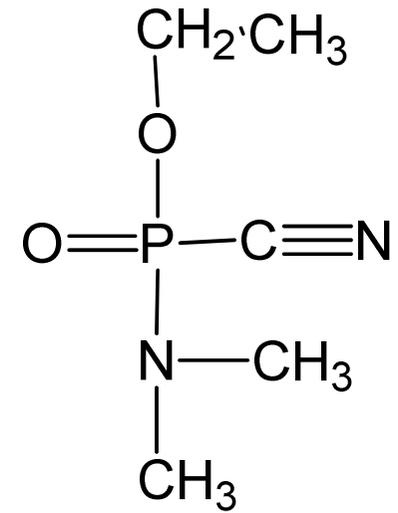
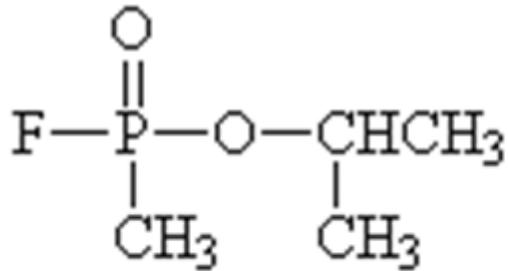
X = buon gruppo uscente
R = gruppo alchilico o arilico
variamente sostituito



acetilcolinesterasi invecchiata

Gerhard Schrader 1936

Tabun



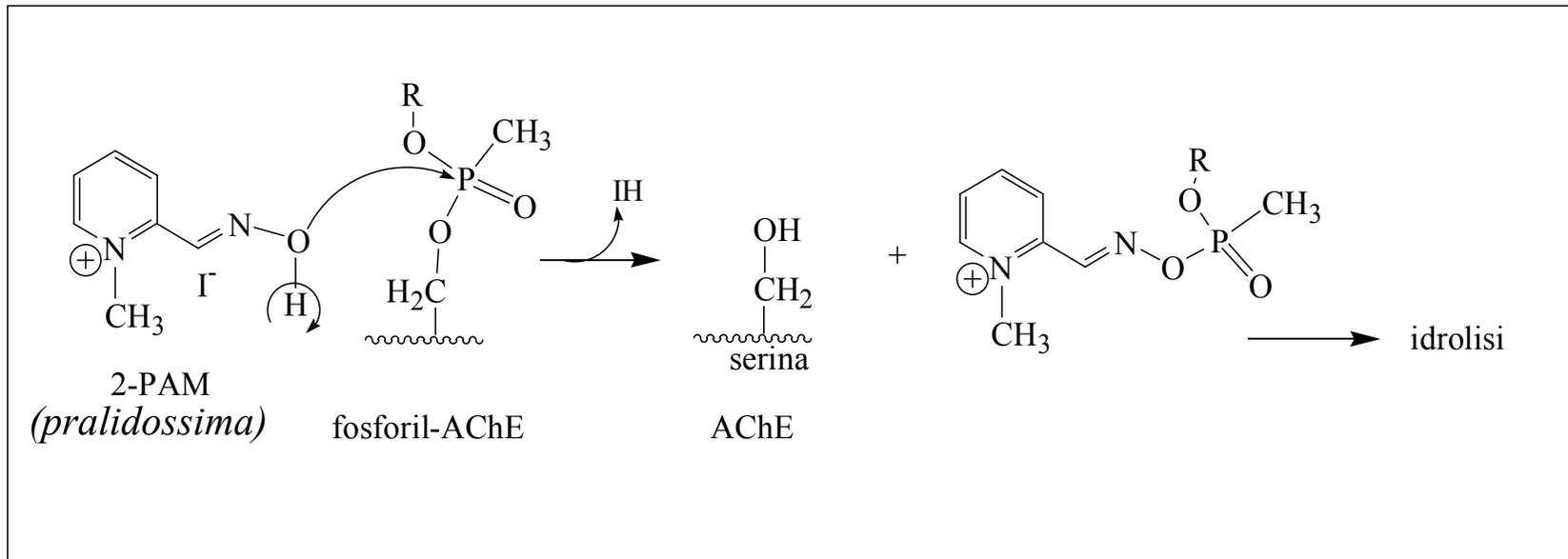
Sarin Gas

Chemical Warfare Agent

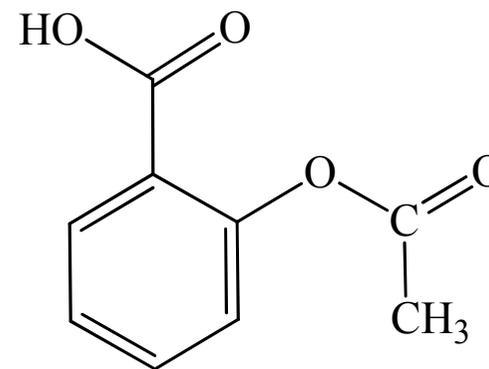
dose letale 10 microgrammi/chilo
morte in 1 minuto

Asahara, Tokyo 1995: 12 morti, 6000 intossicati

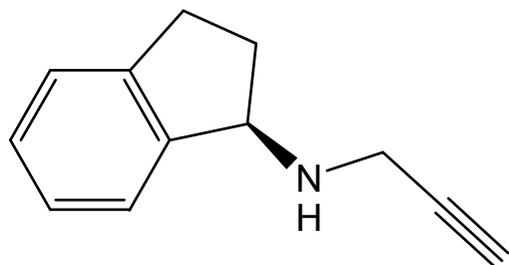
Riattivazione dell'AChE con ossime prima della fase di invecchiamento



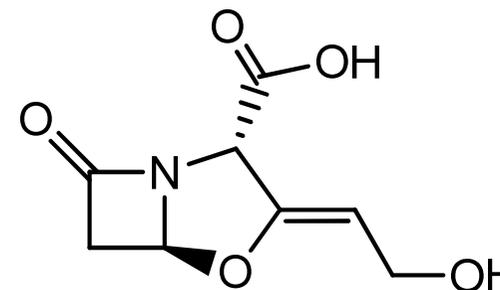
Alcuni farmaci inibitori irreversibili di importanti enzimi



Aspirina, antinfiammatorio



Rasagilina,
nella terapia del morbo di Parkinson

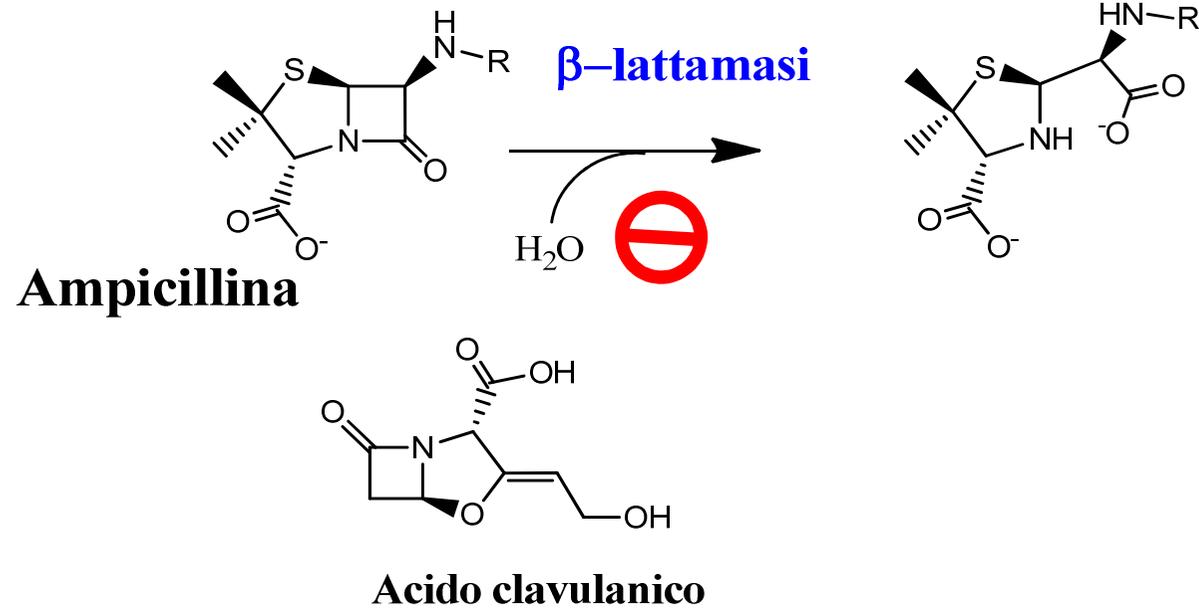


Acido clavulanico,
antibiotico

Meccanismo d'azione dell'augmentin®
(ampicillina + acido clavulanico)

antibiotico attivo

a. inattivo



APPENDICE

Grado di inibizione

Il grado di inibizione, i varia da 0 a 100
- è definito come 1 meno l'attività relativa

$$i = \left(1 - \frac{v_i}{v} \right)$$

Se l'enzima è completamente inibito v_i sarà pari a 0 e $i = 100$

Se l'inibitore non ha effetto $a = 1$ e $i = 0$

Grado di inibizione

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

$$i = \frac{K_m + K_m \frac{[I]}{K_I} + [S] - K_m - [S]}{K_m + K_m \frac{[I]}{K_I} + [S]} = \frac{K_m \frac{[I]}{K_I}}{K_m + K_m \frac{[I]}{K_I} + [S]}$$

Moltiplico per $\frac{K_I}{K_m}$ e riarrangio:

$$i = \frac{[I]}{[I] + K_I \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)}$$

Da cui si ricava che la concentrazione di inibitore che dà $i = 0.5$ (ossia il 50% di inibizione) e che si indica con IC_{50} risulta:

$$IC_{50} = K_I \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

L'equazione del grado di inibizione è quindi:

$$i = \frac{[I]}{[I] + IC_{50}}$$

Tuttavia, a fini pratici occorre esprimere i in termini di velocità misurate

$$i = 1 - \frac{v_i}{v} = \frac{[I]}{[I] + IC_{50}}$$

$$\frac{v_i}{v} = 1 - \frac{[I]}{[I] + IC_{50}}$$

$$\frac{v_i}{v} = \frac{[I] + IC_{50} - [I]}{[I] + IC_{50}} = \frac{IC_{50}}{[I] + IC_{50}}$$

Inibizione noncompetitiva: grado di inibizione

$$i = 1 - \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} [S]}{\frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}} = 1 - \frac{K_I}{K_I + [I]} = \frac{[I]}{K_I + [I]}$$