

Tema 5

Inhibición irreversible

Como ya dijimos en el tema anterior, la inhibición irreversible se diferencia de la reversible en la imposibilidad que presenta para regenerar la actividad enzimática. Esto se debe a la unión covalente que se crea entre el inhibidor y la enzima. No necesariamente se dará esta unión en el centro activo, con unirse a un aminoácido y desconfigurar el C.A. sería suficiente.

El uso que se le da es:

- La identificación de la posición relativa del C.A y de los aminoácidos esenciales para la catálisis. Lo que nos permitirá elaborar un mecanismo de catálisis.
- Como fármacos, insecticidas o plaguicidas.

Aminoácidos diana de modificación covalente.

En general, es obvio que se verán más fácilmente modificados aquellos aminoácidos que sean más reactivos. Estos son aquellos que presenten cadenas laterales polares con electrones apareados, pero no compartidos, es decir, **nucleófilos**. Estos se dividen en dos grupos. Ya que en el C.A. la ionización de los restos es muy variable, exponemos las especies que serían dianas, aunque en disolución acuosa esta fuera extremadamente minoritaria. Estos dos grupos son:

• Bases conjugadas de ácidos débiles

- El **grupo hidroxilo desprotonado**: Presenta carga negativa debido al electrón que deja el hidrógeno y seis electrones sin compartir, lo que lo hace muy nucleófilo.
- El **grupo tiol desprotonado**: Con las mismas características que el anterior, salvo que el mayor tamaño del átomo de azufre hace que sea menos electronegativo.
- El **grupo amino de la lisina**: Como hablamos de bases, presenta sólo dos protones y dos electrones no compartidos.
- El **grupo imino de la histidina**: Sin protonar, pero compartiendo electrones en un doble enlace.
- El **grupo terminal de la arginina**: donde el nitrógeno nucleofílico es el que presenta el doble enlace, al mantener dos electrones no compartidos.

• Bases conjugadas de ácidos fuertes

- El **grupo carboxilo** de los ácidos aspartico y glutámico, que al igual que el hidroxilo presenta seis electrones no compartidos y carga negativa sobre el oxígeno del enlace sencillo.

Si hemos dicho que las dianas de los inhibidores son aminoácidos electrófilos, el inhibidor debe ser, por tanto, **electrofílico**. Estos suelen ser el carbono (C) y el fósforo (P) que, al estar rodeados de átomos más electronegativos, presentan una cierta $+$.

Eficiencia del inhibidor irreversible

En la inhibición competitiva, era la constante de disociación del complejo con inhibidor la que nos daba idea de la eficiencia del inhibidor, y en este caso, también tenemos una constante cinética que nos define la capacidad inhibitoria de la molécula en cuestión. Para hallarla, se realizan unos ensayos de inhibición manteniendo constante en todos $[E]$ (que será concentración catalítica, del orden de nM) y $[I]$ (que será del

orden de mM). En estos tubos se mide la actividad a diferentes tiempos. Esta actividad nos mostrará la enzima activa que nos queda a ese tiempo (E_a), la cual definiremos en tanto por ciento, siendo el 100% de E_a la que había a $t = 0$ y un 100% de inhibición la que nos indica un 0% de E_a .

La representación de los valores obtenidos a diferentes tiempos, se hace en una gráfica E_a Vs t . El resultado es una curva que va descendiendo su pendiente con el tiempo. La razón de este decaimiento progresivo es la diferencia de concentración entre las dos especies reaccionantes, enzima e inhibidor ($[E]_0 \ll [I]_0$). Como hemos dicho, la enzima se encuentra a una concentración del orden de nM, mientras que el inhibidor la presenta del orden de mM, esto hace que **una gran variación en la enzima no signifique ningún descenso aparente de inhibidor**. Ya que la velocidad de reacción es proporcional a ambas concentraciones, una se mantendrá casi constante ($[I]$), mientras que la otra ($[E]$), descenderá tan rápidamente que hará descender paulatinamente a la velocidad. Esta variación rápida con el tiempo, hace que **no podamos medir velocidad inicial**, ya que no podemos definir un tramo lineal.

La velocidad de la que hablamos es **la velocidad de inactivación de la enzima**, y viene definida por la *menos derivada de $[E_a]$ con respecto del tiempo*. Como ya hemos dicho, esta velocidad será proporcional a las concentraciones de enzima activa ($[E_a]$) y de inhibidor, este último lo podemos considerar constante, de modo, que quedará incluido en la constante de velocidad, a la que llamaremos **Kobs**. Esta K_{obs} observada, se trata de una constante de velocidad de primer orden aparente, al llevar incluida la concentración de uno de los sustratos. Como tal constante de primer orden aparente, K_{obs} tiene unidades de tiempo $^{-1}$.

Ya que $V_i = K_{obs} \cdot [E_a]$, cuanto mayor sea la K_{obs} observada, mayor será la velocidad de inactivación. Esta es la razón de escoger **Kobs como marcador de la eficiencia de un inhibidor irreversible**, que será, por tanto, equivalente a K_I y K_i , que nos marcan la **tendencia del inhibidor a modificar la enzima**.

Mediante un ejemplo definiremos lo que significa K_{obs} . Ya que V_i nos marca la cantidad de E_a por unidad de tiempo, podremos relacionarlo con el otro miembro de la ecuación, con K_{obs} .

La inactivación de un 25% de moléculas de enzima en un tiempo dado, será igual a K_{obs} multiplicado por el 100% de E_a que hay en un principio. Despejando K_{obs} , obtenemos gráficamente su significado: **fracción de moléculas de E inactivadas a una concentración dada de I, por unidad de tiempo**. Esto nos recuerda que K_{obs} lleva incluida la concentración de inhibidor, a diferencia de K_i y K_I , que eran independientes de $[I]$. Esto hace que dependa de la cantidad de inhibidor que pongamos, lo que hará a su vez dependiente de $[I]$ a la velocidad, como se observa en la gráfica.

Es evidente que un aumento en la concentración del inhibidor, aumenta la velocidad de inhibición y, por tanto, el grado de inactivación. Hay que decir que nunca podremos llegar a la inactivación total, ya que como cualquier reacción, la inactivación es un equilibrio, y a un porcentaje elevado de EI, empezará a producirse una velocidad de disociación más significativa.

Clasificación de inhibidores irreversibles

Todos los inhibidores irreversibles, tienen la característica común de ser electrófilos, pero los hay por su forma, tamaño o cualquier otra característica, que son específicos de algún grupo lateral o de algún C.A.. Se clasifican de la siguiente forma:

- **Reactivos específicos de grupo.** Son aquellos que por las características del grupo electrófilo, modifican covalentemente sólo un tipo de cadena lateral (Cys, Ser, Glu, etc.) dependiendo, como hemos dicho de las características del inhibidor.
- **Reactivos dirigidos contra el centro activo.** Se denominan también pseudosustratos o marcadores de afinidad. Estos presentan una gran selectividad, ya que al ir dirigidos contra una enzima en concreto, no hay peligro que modificaciones a otras proteínas. Estos nos permiten identificar la posición del centro activo,

además de identificar los aminoácidos que lo componen, siempre y cuando sean modificados. Los hay de dos clases.

- **Activos:** Se caracterizan por ser similares al sustrato, pero presentan desde un principio un centro electrófilo.
- **Activables:** Son similares al sustrato, pero no presentan *a priori* ningún centro electrófilo, sino que este se produce después, mediante una activación, la cual puede ser:
 - Por irradiación: Se activan mediante la irradiación a una determinada longitud de onda.
 - Por la enzima blanco: Se ven activados por el propio proceso de catálisis, lo que implica que han tenido que entrar en el C.A. Estos son, sin duda alguna los más específicos de todos, ya que no son reactivos hasta que se encuentran ya en el centro activo de la enzima blanco, evitándonos así problemas de inactivación a otras enzimas.

Reactivos específicos de grupo

Se trata de moléculas con un grupo electrófilo, más o menos específico de una cadena lateral. Modificará a esta cadena esté donde esté (siempre que no existan impedimentos estéricos, claro). Presentan una especificidad relativa o variable. Si alguno muestra una mayor eficiencia contra una cadena específica, se puede utilizar para identificar los aminoácidos del C.A. Para ello se aísla la enzima una vez ha intencionado con el sustrato, se realiza una proteólisis, y aquel aminoácido que tenga el grupo añadido estará en el C. A., o por lo menos, tendrá una importancia crucial en la actividad de la enzima.

Cinética de inactivación

Para tratar de averiguar el tipo de cinética que siguen, trataremos de integrar la ecuación de velocidad. En primer lugar, como siempre, hay que transformarla. Para ello tenemos en cuenta las aproximaciones que hicimos:

- k_1 es la constante de velocidad de la unión de I a la enzima.
- Ya que $[E]_0 \ll [I]_0$, no podemos considerar V_0 , al decrecer Ea de forma muy significativa ya en tiempos muy cercanos a 0.
- Debido a este decrecimiento significativo de Ea, $[I]$ casi no varía, con lo que podemos considerarla constante en el tiempo: $[I]_0 \approx [I]$.
- Al ser $[I]$ constante, podemos incluirla en la constante de velocidad, a la que denominaremos K_{obs} .

Partiendo entonces de estas premisas, definimos la velocidad de inactivación como la desaparición de $[Ea]$ en el tiempo, que es proporcional a su propia concentración, siendo la constante de proporcionalidad K_{obs} . Una vez así definida, llevamos a uno de los términos todas las concentraciones de Ea y al otro dt. Integramos la ecuación resultante entre $t=0$ y t .

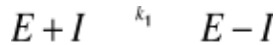
El resultado es el siguiente:

$$-\ln \frac{[Ea]_t}{[Ea]_0} = K_{obs} \cdot t$$

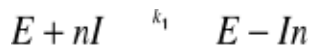
La representación, mediante una gráfica $\%[Ea]$ Vs t , nos da una curva de pendiente decreciente, pero si linealizamos esta ecuación, el resultado es una recta de pendiente " K_{obs} ".

El aumento de K_{obs} al aumentar la concentración de inhibidor, no responde más que a la propia naturaleza de la constante, que lleva incluida $[I]$. De esta forma, cada ensayo se realizará a una concentración dada de I, y nos dará como resultado una pendiente distinta a cada concentración.

Hallando esas Kobs (manteniendo [Ea]o constante y variando la concentración de inhibidor en cada tubo), podemos representar Kobs Vs [I]. El resultado es una línea recta, que parte del punto (0, 0) (en ausencia de inhibidor, Kobs tiene que ser 0) y que tiene como pendiente la constante k1, de unión entre el inhibidor y la enzima. El hecho de ajustarse a una recta, responde al mecanismo de unión entre el inhibidor y la enzima que habíamos propuesto:



Pudiera ser que la razón de uniones de I a E, no fuera 1, sino cualquier otro número. Entonces, el modelo sería el siguiente:



En este caso, la velocidad de inactivación llevará el término [I] elevado a n , lo que implicaría que Kobs también contiene la concentración de inhibidor a la n ª potencia (el hecho de unirse más inhibidor a la enzima no implica que no podamos seguir considerándolo constante). Esta n de la que hablamos, se define como **el nº mínimo de moléculas de I necesarias para inactivar a una única molécula de E**.

La integración de la ecuación de velocidad y la posterior linearización de la misma, da ahora como resultado la siguiente ecuación.

$$\log Kobs = n \log[I] + \log k_1$$

La representación gráfica de esta ecuación en un diagrama log Kobs Vs log I, da como resultado una recta que corta al eje de ordenadas en el log de k1, y que tiene como pendiente (ascendente) el valor de n . De esta forma, si nos encontramos con una unión desordenada de moléculas de I a la enzima, el resultado de la representación no sería una recta, al variar la pendiente.

Podríamos encontrarnos con el problema de distinguir entre un inhibidor irreversible y uno reversible. Pues bien, además de la diálisis, hay una forma matemática de diferenciarlas. La primera diferencia básica es la existencia de una reacción de disociación del complejo EI, que implica a la constante k^{-1} . Pues bien, si representamos %[Ea] Vs t, obtendríamos una curva de pendiente descendente, al igual que si fuera irreversible. La diferencia reside en que en la curva de la gráfica de inhibición reversible, se llega a un estacionario, correspondiente a [Ea]eq, mientras que en la inhibición irreversible, la curva, tenderá al 0%. Aunque, como hemos explicado, nunca se llegará a este valor, al tratarse de un equilibrio.

En esta curva de inhibición irreversible podemos definir $t_{1/2}$, interpolando en el eje de tiempo el valor de 2/3 de variación desde [E]o.

El tratamiento cinético es similar al que hicimos en el sistema preestacionario. Evidentemente, el distinguir entre un tipo de inhibición y otro sólo por la interpretación de un estacionario, parece un poco subjetivo, de modo, que hay que llegar más lejos. Para ello, integramos y linearizamos, al igual que lo hacíamos antes. La única diferencia es que ahora Kobs está formado por [I] (a la que seguimos considerando constante), por k1, y representando la reversibilidad k^{-1} (que se está sumando). Como antes, representamos Kobs Vs [I]. La diferencia entre una inhibición y otra es el punto de corte en ordenadas.

Inhibición irreversible: $Kobs = k_1 \cdot [I]$ Si $[I] = 0$ $Kobs = 0$ La recta corta en (0, 0).

Inhibición reversible: $Kobs = k_1 \cdot [I] + k^{-1}$ Si $[I] = 0$ $Kobs = k^{-1}$ La recta corta en (k^{-1} , 0).

Reactivos dirigidos contra el C.A.

Más específicos que los anteriores y con una mayor utilización terapéutica, al poder minimizar los efectos secundarios derivados de la posible interacción con otras enzimas.

Cinética de inactivación

Consideramos estos inhibidores como **pseudosustratos**, ya que son capaces de competir por el C.A. al ser, por lo menos en parte, análogos estructurales del mismo. De este modo, al definir su cinética de inactivación, tenemos que proponer un modelo similar al de M&M, con una etapa irreversible marcada por las constantes k_1 y k^{-1} para la formación y desaparición del complejo EI; y **una etapa irreversible de unión covalente** del inhibidor a la enzima. Este paso presentará una constante k_2 . Podremos definir ahora una velocidad de inhibición, que se basará (al igual que en el otro tipo de inhibidores irreversibles), en la desaparición de Ea en el tiempo. Ya que podemos seguir considerando [I] constante (no hemos variado la política de concentraciones), esta V_i seguirá siendo proporcional a $[Ea]$, siendo la constante de proporcionalidad, nuevamente Kobs.

Esta constante observada es la que varía, ya que no solo incluye k_1 e $[I]$, sino que ahora se ha transformado en la ecuación de una hipérbola cuadrangular al representar Kobs Vs $[I]$. Esta curva presenta la asíntota k_2 (verdadera constante de proporcionalidad, al tratarse de la modificación covalente, siendo por lo tanto, la etapa lenta) y el valor de $[I]$ para $\frac{1}{2}$ de Kobs será KI. La constante de inhibición es la aglutinación de las constantes de disociación y de transformación ($KI = k^{-1} + k_2 / k_1$), y toma parte en esta cinética de forma equivalente a Km.

En cuanto a V_i , también da como resultado una hipérbola al representar V_i Vs $[I]$, ya que no implica más que multiplicar a la ecuación que nos define Kobs por $[Ea]$. Por esta razón, la asíntota nos define la V_{imax} , que es $k_2 \cdot [Ea]$. El valor de $[I]$ para $\frac{1}{2}$ del valor de la asíntota vuelve a ser K_i , la constante de inhibición que se incluye en Kobs.

Podemos intentar simplificar la ecuación que nos define Kobs (con el fin de generalizarla), llamando al que será valor de la asíntota K' y al valor de $[I]$ para $\frac{1}{2}$ de la asíntota K'' . K' englobará, por tanto, las constantes cinéticas implicadas en la unión covalente entre el inhibidor y la enzima (en este caso sencillo k_2), mientras que K'' , implicará todas las constantes de transformación, mas las propias del equilibrio (en este caso sencillo será KI). Se hace esto porque es extraño encontrar un inhibidor que modifique la enzima en una sola etapa.

Características de la inactivación

Resumiremos y aclararemos conceptos sobre la inactivación, gracias a esta lista:

- Como ya hemos visto, **V_i presenta un patrón hiperbólico**, con saturación a concentraciones crecientes de I.
- El hecho de tener que unirse al centro activo, hace que tenga que competir con sustratos, o incluso con inhibidores irreversibles. Esta es la razón de que **V_i disminuya en presencia de S o de análogos estructurales del sustrato**.
- El estado del centro activo, depende del pH (como veremos en el siguiente tema), siendo esta la razón de la **dependencia de V_i del pH**, esta dependencia no es tanto por sí mismo, como por la inactivación de aminoácidos del C.A. de la enzima.
- Estos inhibidores dirigidos **presentan una estequiometría 1:1** (siendo uno el inhibidor y otro el C.A., ya que pudiera ser que la enzima presentara varios).

Pseudosustratos activos

Se trata de moléculas con varios dominios, por lo menos dos. Uno deberá tener analogía estructural con el sustrato natural de la enzima, necesario para la entrada en el C.A., y el otro, necesario para la unión covalente,

se tratará de un centro electrófilo. Se diferencian de los suicidas en que se unen al C.A. sin modificarse notablemente.

Ilustraremos esto con un varios ejemplos.

Triosa"P"Isomerasa

Es una enzima de la vía glucolítica que se encarga de pasar la DHAP a G3P. Aunque la reacción se suele presentar en esta dirección (debido al drenaje de la vía), se trata de un equilibrio, el cual incluso, en condiciones estandar está más volcado hacia la formación de la cetosa. Estas dos triosas son los sustratos naturales de la enzima. Los inhibidores pseudosustrato para esta enzima, presentan la cola hasta el fosfato igual (dominio análogo), variando los grupos del otro extremo (dominio electrófilo), el cual presentará un haloacetal (yodo), en el pseudosustrato para la cetosa, y un epóxido en el caso de la aldosa.

Serin"enzimas(proteasas, esterases, etc.)

En su caso, se comportan como algo suicidas, pero se incluyen en este grupo. El pseudosustrato es un compuesto organofosforado, que puede presentar unido al fosfato: flúor, cianógenos o para"nitro fenoles. Decimos que se comportan de forma muy parecida a los suicidas, porque, como se ve en el mecanismo de acción del DIFP (di"isopropilfluorofosfato) en el C.A. de la Acetilcolinesterasa, la unión al mismo implica necesariamente la pérdida de un átomo de flúor, con lo que no se conserva la integridad del inhibidor.

Utilidades

La gran utilidad que presentan es la de poder diseñar inhibidores pseudosustrato, sin más que basándonos en la tabla de las hojas. Podremos escoger el compuesto específico para una cadena lateral, y añadirle una análogo del sustrato. De esta forma tendremos los dos dominios necesarios y sabremos a que aminoácido va a atacar.

Esto es bonito, pero no es tan fácil, ya que tenemos que tener suerte de colocar el dominio electrófilo adecuadamente para que interaccione con el grupo del C.A.

Sustratos suicidas

Se caracterizan por no presentar *a priori*, el grupo electrófilo. Su mayor utilidad se encuentra en el campo terapéutico, donde su gran especificidad les hace muy importantes. Como ejemplo, la inhibición enzimática por componentes fluorados, esencial en los tratamientos de quimioterapia.

La terapia consiste en bloquear la síntesis de DNA por la inhibición de la enzima que transforma el dUMP en dTMP por el traspaso de un grupo metilo cedido por la serina. La enzima que se encarga de ello es la **Timidilato sintasa**. Esta enzima requiere ácido tetrahidrofólico (THF), necesario para transferir el grupo metilo de la serina (que pasará a glicina) al dUMP, y NADPH+H⁺.

El sustrato suicida será un derivado fluorado en 5 (lugar de unión del grupo metilo). Este compuesto, al entrar en contacto con el C.A. de la enzima, se une por el carbono 6 al grupo tiol de una cisteína. Entonces se produce una polarización del anillo, adquiriendo propiedades nucleófilas (en el carbono 5), siendo sustrato ahora para el THF, que rompe el anillo pentagonal. Esa ruptura crea un grupo electrófilo (carbono 11) que ataca la zona polarizada del anillo del derivado fluorado, uniéndose covalentemente. Es entonces cuando se forma el compuesto ternario (no olvidemos que el sustrato suicida ya estaba unido con anterioridad a la enzima), que se encuentra unido covalentemente y, por tanto, la inhibición es irreversible.

Marcadores de fotoafinidad

Entran dentro de los sustratos suicidas activables. En este caso, la activación se produce por la excitación del inhibidor a una determinada longitud de onda. Esta excitación produce, normalmente, una ruptura homolítica de un dominio de la molécula al que llamaremos *pro*. Estos inhibidores activables se encuentran en dos grupos principales.

Estos inhibidores son especialmente utilizados en problemas cutáneos, ya que requieren de la activación por radiación, y la que es necesaria, no puede traspasar el cuerpo. No tendría sentido intentar curar una enfermedad provocando un cáncer. Puede utilizarse un láser para conseguir una selectividad zonal de la activación.

Ya en tiempos de los egipcios, se conocían compuestos que requerían de una exposición al sol, después de haberlos ingerido, para que surtieran su efecto.

Diazos

Se caracterizan por el paso de un diazo ($C=N+=N''$) a un carbeno. El carbeno expone un carbono nucleófilo característico. Se trata de una ruptura homolítica del enlace $C=N$.

Azidas

Al igual que en el caso anterior, también presentan un doble enlace $N=N$, sólo que en este caso se denomina azida al entrar un nuevo nitrógeno, también con doble enlace ($N=N+=N''$). La excitación de la azida, hace que salgan dos nitrógenos, quedando un nitreno, caracterizado por un átomo de nitrógeno con dos pares de electrones desapareados, lo que lo hacen bastante nucleófilo.

Este término no está bien utilizado, pero da clara idea de lo que se está hablando, de partes diferenciadas de la molécula.

Referencias: *Suicide substrates: Mechanism-Based enzyme inactivators with therapeutic potential*. C.T. Walsh. TIBS 1983; *Enzyme structure and mechanism*. A. Fersht. Cap 9 256-261. 1985; *Mechanism-Based (suicide) Enzyme Inactivation*. M.A. Ator y P.R. Ortiz de Montellano. The Enzymes. Vol XIX 213-282. 1990.

Este término es mío, de modo, que no es plan de aprendérselo. Sólo quiero que el concepto se entienda bien, y con el término *pro* se da a entender que hay que activarlo.

ENZIMOLOGÍA

52

Inhibición irreversible

0%

$\frac{2}{3} [E]_0$

$[E]_{eq}$

t

E_a

100%

$$-\ln[Ea]_t = -K_{obs} \cdot t + \ln[Ea]_o$$

! [I]

t

"Kobs

Ln [Ea]o

Ln [Ea]t

0%

[I] = 1 mM

[I] = 5 mM

t

Ea

100%