

Regolazione dell'attività enzimatica

Allosteria

Modificazioni covalenti

Isoenzimi

Regolazione della attività enzimatica

L'attività enzimatica deve potere essere regolata in base alle specifiche richieste della cellula (le varie reazioni devono avvenire solo quando e dove sono necessarie).

In particolare, gli enzimi coinvolti nelle varie vie metaboliche (catalizzando le reazioni chimiche coinvolte) devono potere essere regolati in maniera coordinata per consentire una ottimizzazione delle risorse energetiche

L'attività di un enzima risente di variazioni dei parametri ambientali (pH, temperatura) che possono modificare la velocità dei processi metabolici catalizzati.

Tuttavia questo rappresenta solo un possibile livello di controllo.

Regolazione della attività enzimatica

Molti enzimi oltre ad essere estremamente specifici sono anche altamente regolati attraverso una serie di processi che dipendono da specifici e opportuni messaggi chimici.

Regolazione del metabolismo: rapido adattamento delle attività enzimatiche in funzione di variazioni dello stato metabolico

In genere questi enzimi catalizzano una reazione posta in una posizione strategica all'interno della via metabolica (**punto di controllo**)

La regolazione fine di questi punti di controllo consente alla cellula di adattarsi continuamente alle variazioni delle condizioni ambientali o cellulari

Meccanismi di regolazione

- **enzimi allosterici** (interazione mediante legami non covalenti con sostanze chimiche dette modulatori che ne alterano l'attività)
- **modificazione covalente** (l'enzima subisce delle modifiche chimiche covalenti che ne alterano l'attività)
- **isoenzimi** (enzimi che catalizzano la stessa reazione ma con proprietà e parametri cinetici diversi) ISOENZIMI.

Enzimi regolatori

In una via metabolica più enzimi lavorano insieme per catalizzare le varie reazioni chimiche che costituiscono le singole tappe dell'intera via.

In questo modo il prodotto di una reazione diventa il substrato della reazione successiva e così via.

L'enzima che catalizza la reazione più lenta determina la velocità complessiva della via.

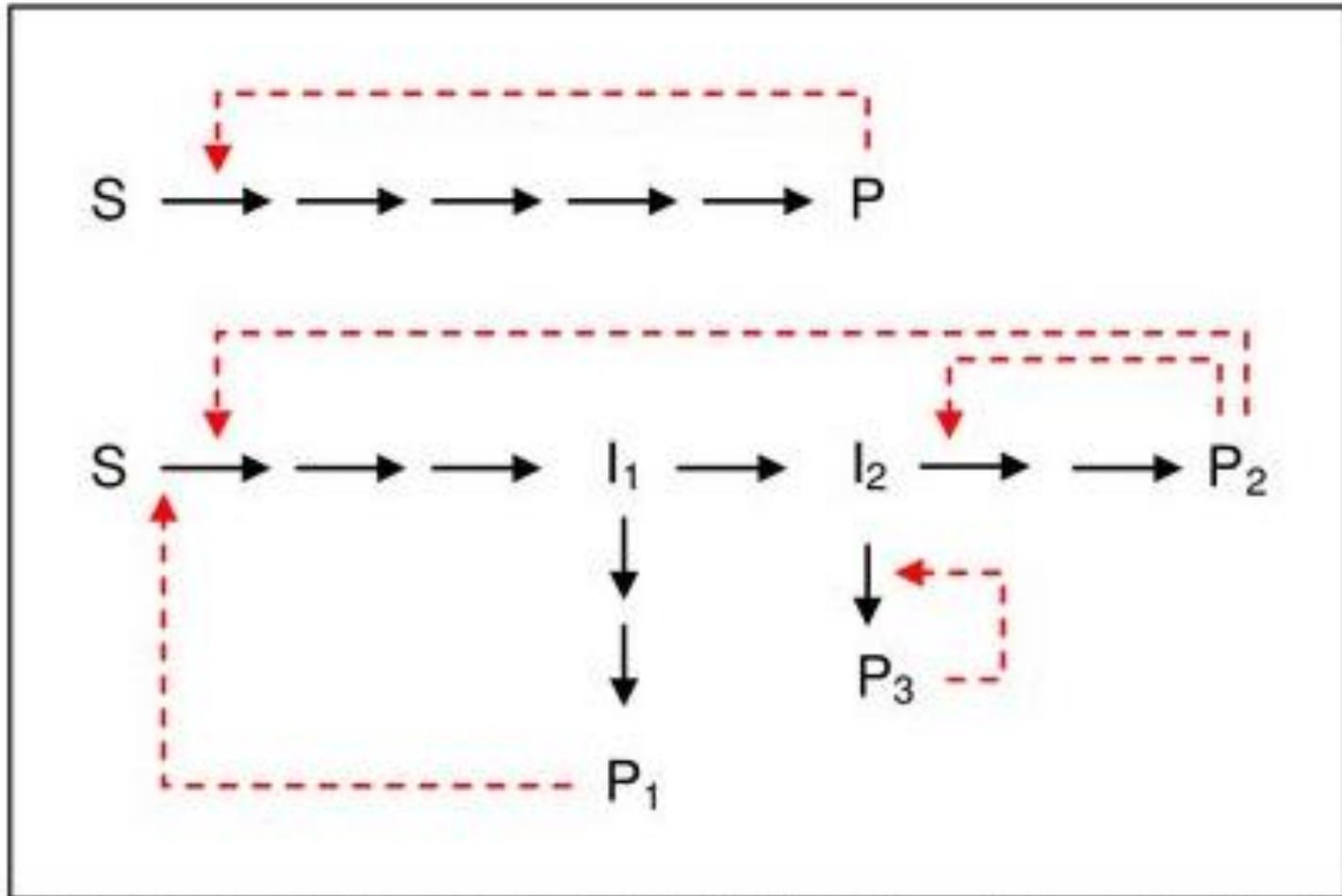
In una via metabolica un ruolo importante è svolto dagli **enzimi regolatori**, enzimi che consentono di controllare la velocità dell'intera via

L'enzima regolatore è controllato in risposta a determinati segnali mentre gli altri enzimi della via si limitano a trasformare i substrati non appena sono resi disponibili dagli enzimi che catalizzano la reazione precedente

In questo modo la velocità di ogni sequenza metabolica si adegua alla domanda cellulare di energia e di biomolecole attraverso la regolazione di un singolo enzima dell'intera via.

Nella maggior parte dei casi l'enzima regolatore è quello che catalizza la prima reazione.

Regolazione di una via metabolica



Allosteria

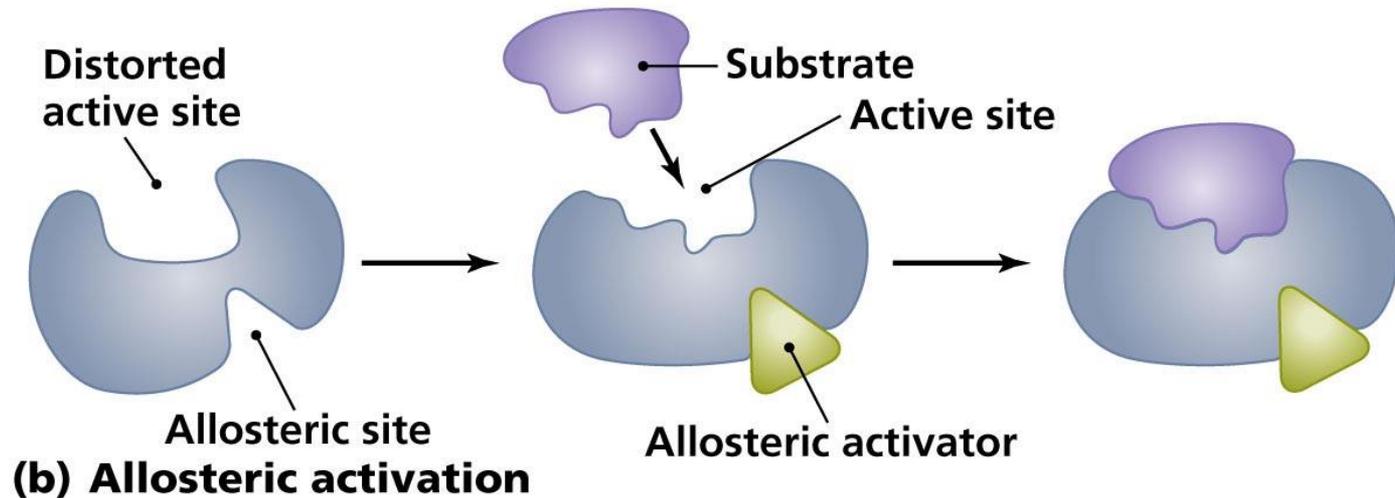
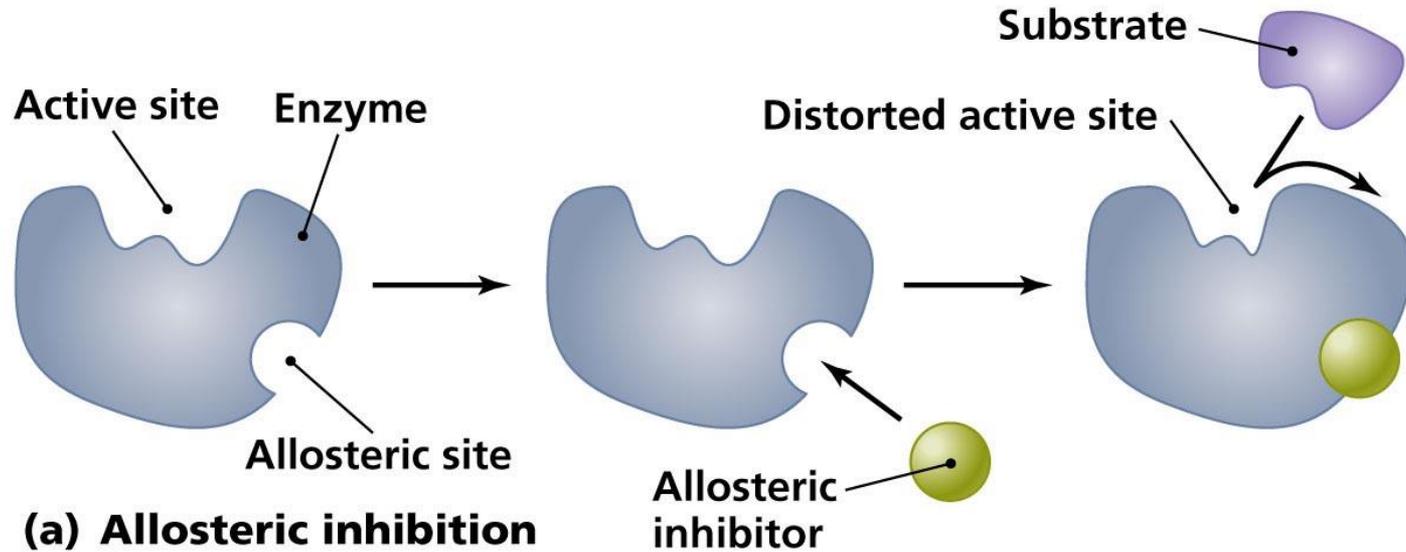
L'attività degli enzimi allosterici è modulata dall'interazione non covalente e reversibile di specifiche molecole (**modulatori allosterici**) che si legano a dei siti diversi da quello catalitico (**siti allosterici**).

Questa interazione determina dei cambiamenti nella struttura tridimensionale e una variazione nei parametri cinetici della reazione catalizzata dall'enzima.

Queste proprietà consentono agli enzimi allosterici di occupare delle posizioni chiave nella complessa rete delle vie metaboliche.

Substrati e prodotti a volte possono agire anche da modulatori allosterici

Allosteria



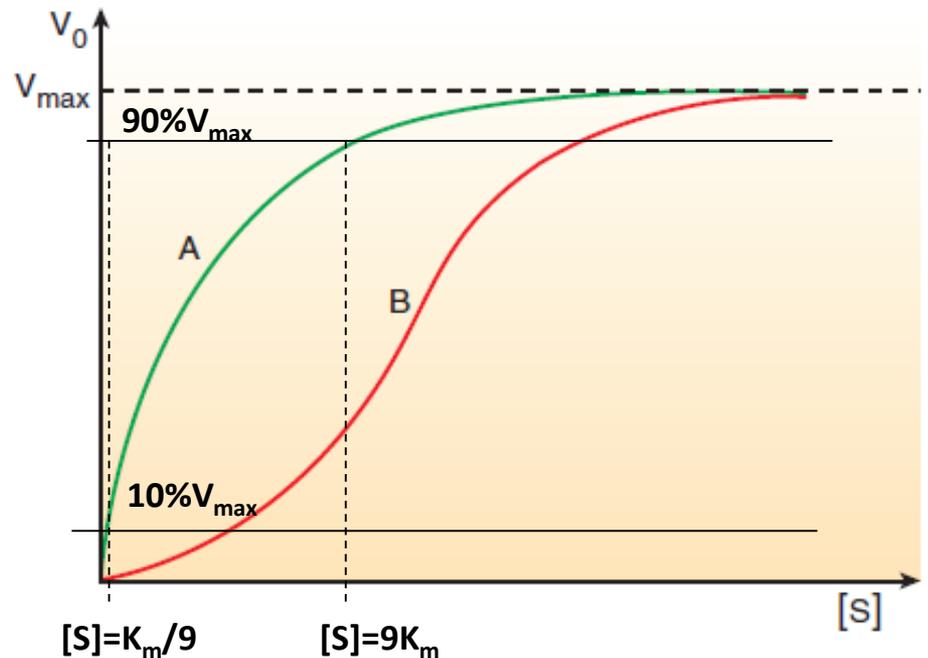
Allosteria

A bassi valori di concentrazione dei substrati la velocità aumenta molto più lentamente rispetto alla normale curva iperbolica di Michaelis-Menten

All'aumentare della concentrazione del substrato si ha un migliore aumento nella velocità di reazione che porta ad una impennata della curva (flesso) consentendo di raggiungere più rapidamente il valore della velocità massima rispetto al comportamento iniziale a basse concentrazioni di substrato.

Per un enzima con comportamento non allosterico (curva iperbolica) la velocità passa dal 10% del valore massimo al 90% del valore massimo con un aumento della concentrazione di substrato fisso e paria a circa 80 volte

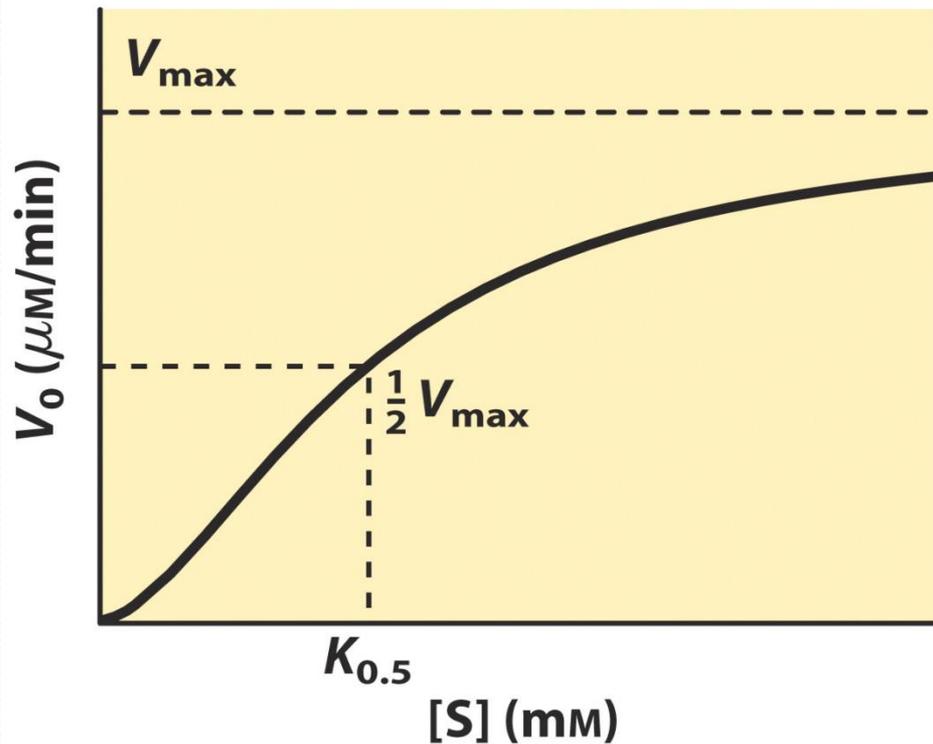
Per un enzima con comportamento allosterico questo aumento della velocità può avvenire con un aumento variabile della concentrazione di substrato anche dieci volte inferiore



Allosteria

Gli enzimi allosterici non seguono un comportamento descrivibile con l'equazione di Michaelis-Menten.

La maggior parte degli enzimi allosterico sono costituiti da più subunità



L'andamento sigmoide della cinetica indica la presenza di interazioni cooperative tra le diverse subunità della proteina

La K_m non ha un vero significato ma rimane la definizione operativa $[S]$ per cui $V = \frac{1}{2} V_{\text{max}}$

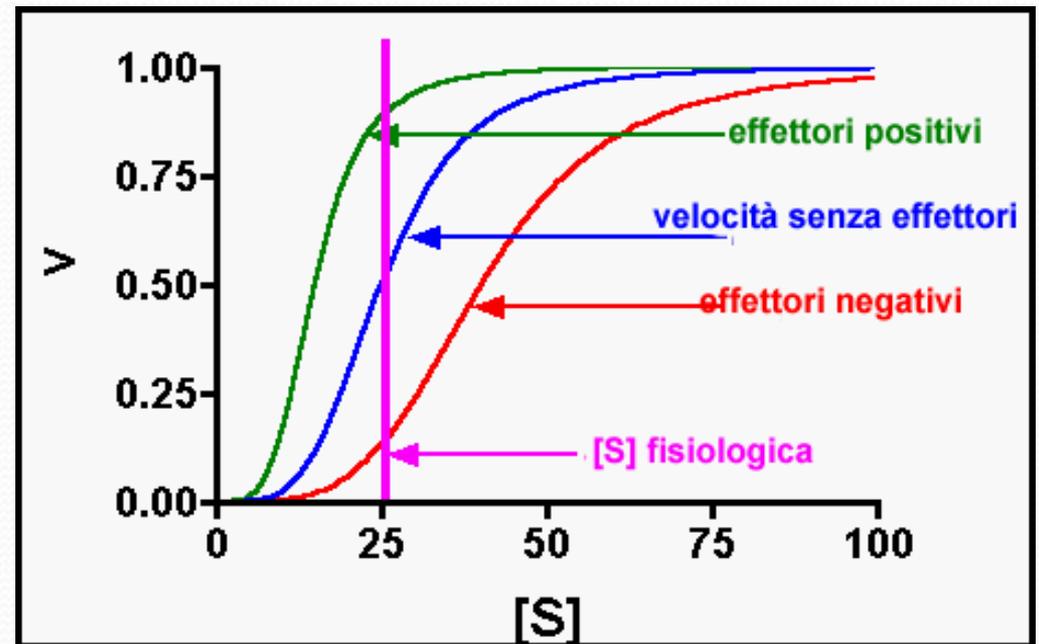
Enzimi allosterici

Nella cellula la concentrazione dei substrati è spesso inferiore ai valori richiesti per la saturazione. Il comportamento allosterico consente agli enzimi di operare a velocità più elevate anche a concentrazione di substrato molto più basse dei valori di saturazione. Questa proprietà è fondamentale per la regolazione delle vie metaboliche

Molto del comportamento allosterico si basa sulla struttura quaternaria degli enzimi coinvolti. I cambiamenti conformazionali che subisce una subunità si trasmettono alle subunità adiacenti attraverso un effetto cooperativo.

Cooperatività positiva: il legame della prima molecola di substrato ad una subunità favorisce il legame del substrato alle subunità adiacenti (curva sigmoide con rapida impennata)

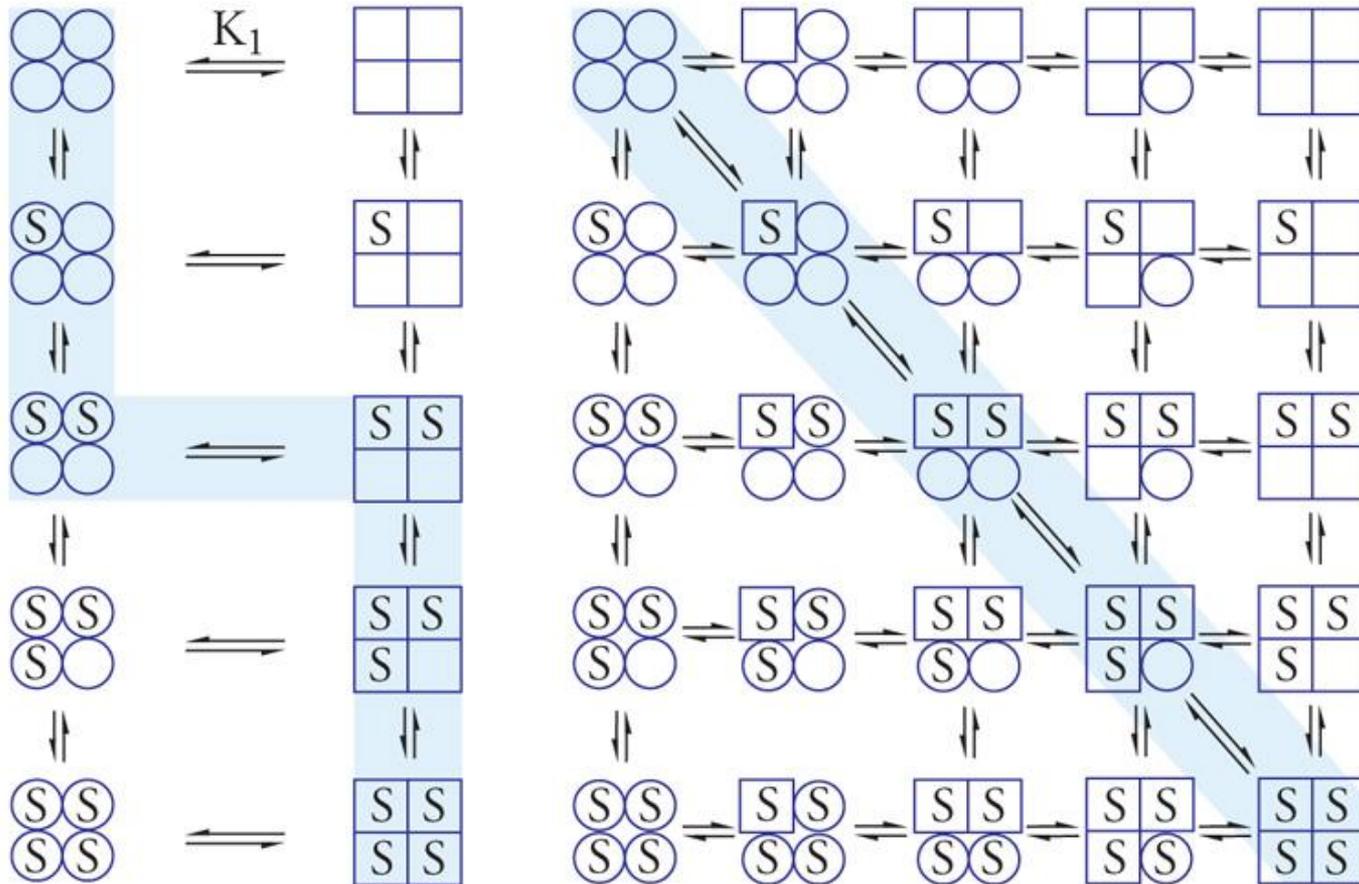
Cooperatività negativa: il legame della prima molecola di substrato ad una subunità sfavore il legame del substrato alle subunità adiacenti (curva sigmoide più allungata)



Enzimi allosterici

Modelli proposti:

Modifica concertata (Monod): ogni subunità può trovarsi nella conformazione più affine al substrato (R) o in quella meno affine (T). Esiste una simmetria per cui le varie subunità devono trovarsi tutte nello stesso stato e quindi la modifica conformazionale di una subunità comporta la simultanea modifica nelle subunità adiacenti



Modifica sequenziale (Koshland): è possibile la presenza di subunità con conformazione differente nello stesso enzima, che passa gradualmente da uno stato a bassa attività ad uno ad alta attività attraversando stati conformazionali intermedi,

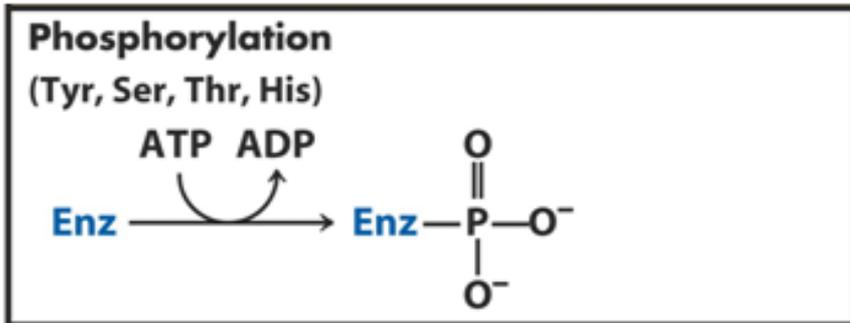
Regolazione per modifica covalente

La regolazione covalente può consistere in:

- aggiunta o rimozione di un piccolo gruppo chimico (fosfato, acetile, metile, ADP-ribosilazione, adenilazione ecc.) che altera la conformazione dell'enzima modificandone i parametri cinetici
(modificazione reversibile)
- rimozione di una piccola porzione della catena polipeptidica attraverso l'idrolisi specifica di uno o più legami peptidici. La proteina risultante possiede una conformazione e proprietà enzimatiche diverse
(modifica irreversibile)

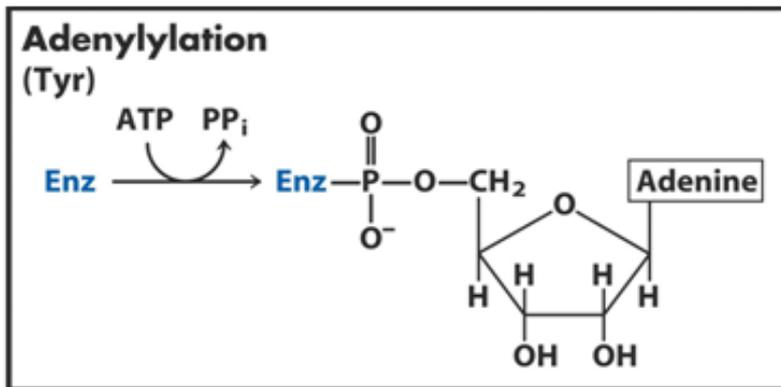
Modifiche covalenti reversibili

Fosforilazione

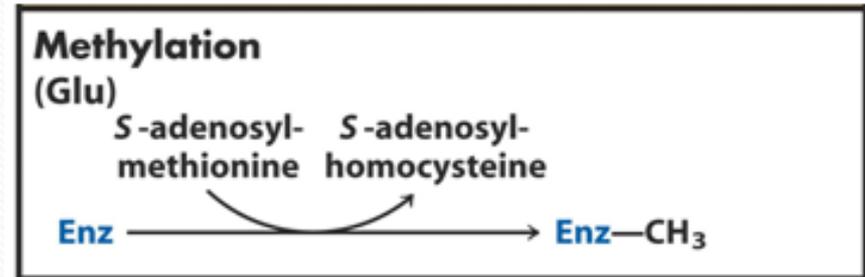


La fosforilazione è coinvolta in diversi meccanismi di regolazione e molte proteine cellulari si trovano nello stato fosforilato.

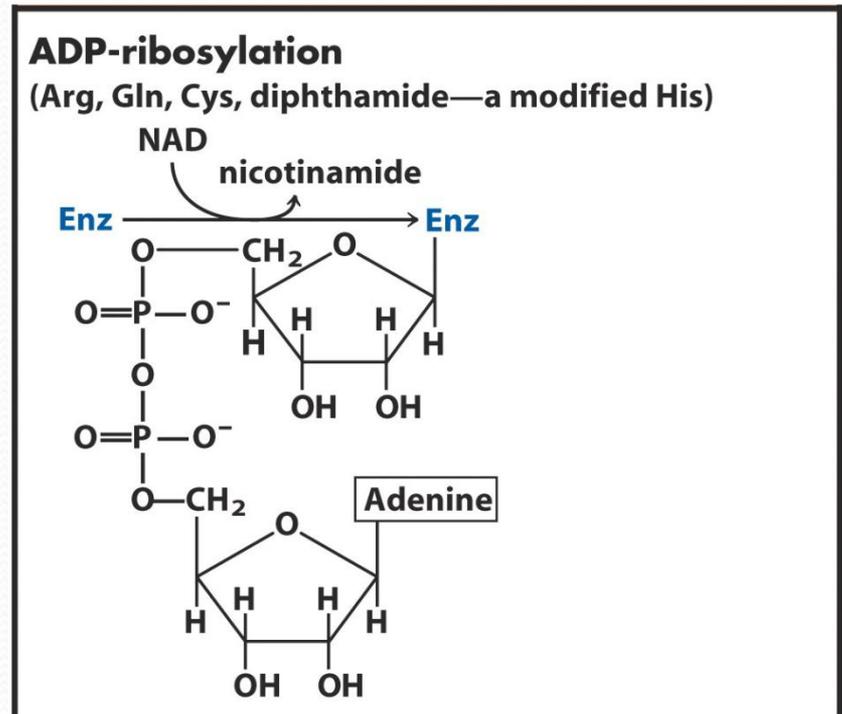
Adenilazione



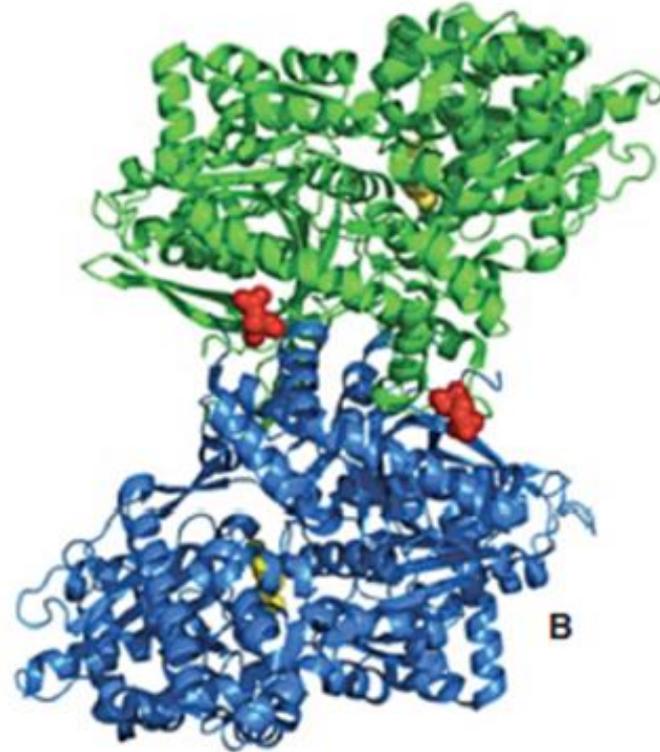
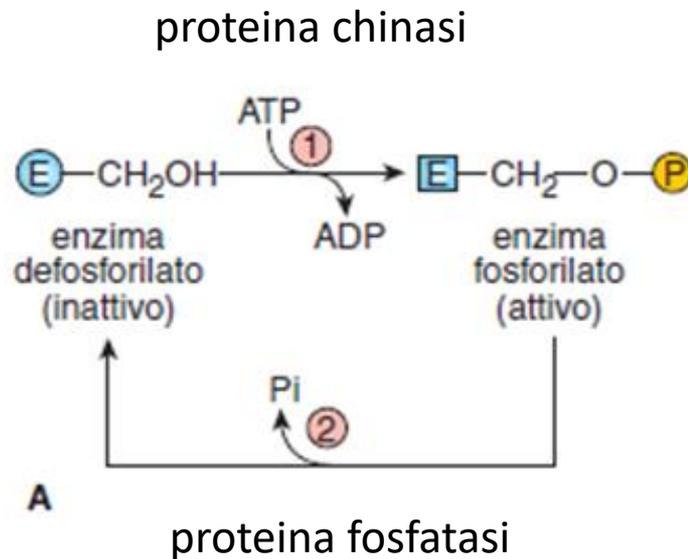
Metilazione



ADP-ribosilazione



Modulazione reversibile



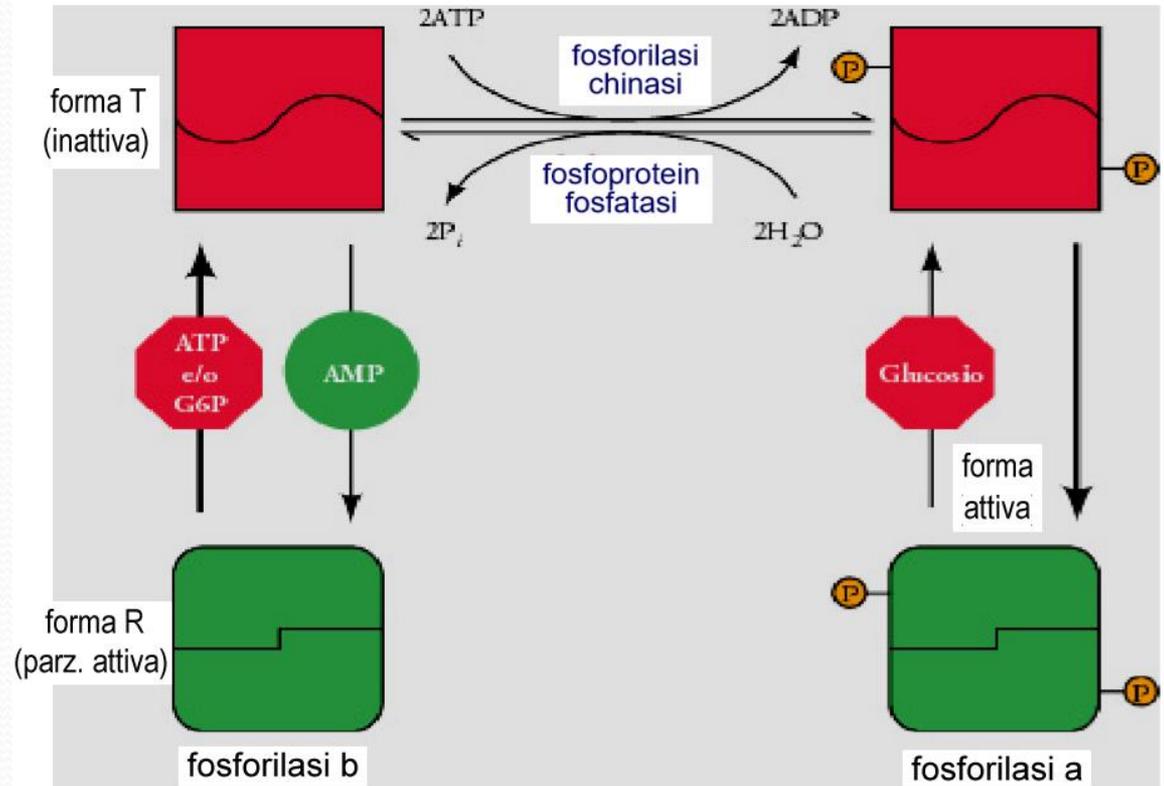
L'enzima esiste in due forme, una meno attiva (o inattiva) ed una più attiva. Il cambiamento conformazionale che converte l'enzima nell due forme è innescato da una modifica covalente reversibile della catena laterale di uno specifico residuo aminoacidico (anche distante dal sito catalitico).

La modifica covalente e la sua rimozione sono catalizzate da specifici enzimi (nel caso della modifica con l'aggiunta di un gruppo fosfato gli enzimi coinvolti sono una proteina chinasi ed una proteina fosfatasi e i residui coinvolti sono Ser, Thr e Tyr)

Modulazione reversibile

La glicogeno fosforilasi è un classico esempio di enzima soggetto a regolazione covalente reversibile e allosterica

glicogeno (n) + fosfato \rightarrow
glicogeno (n-1) + glucosio 1-P



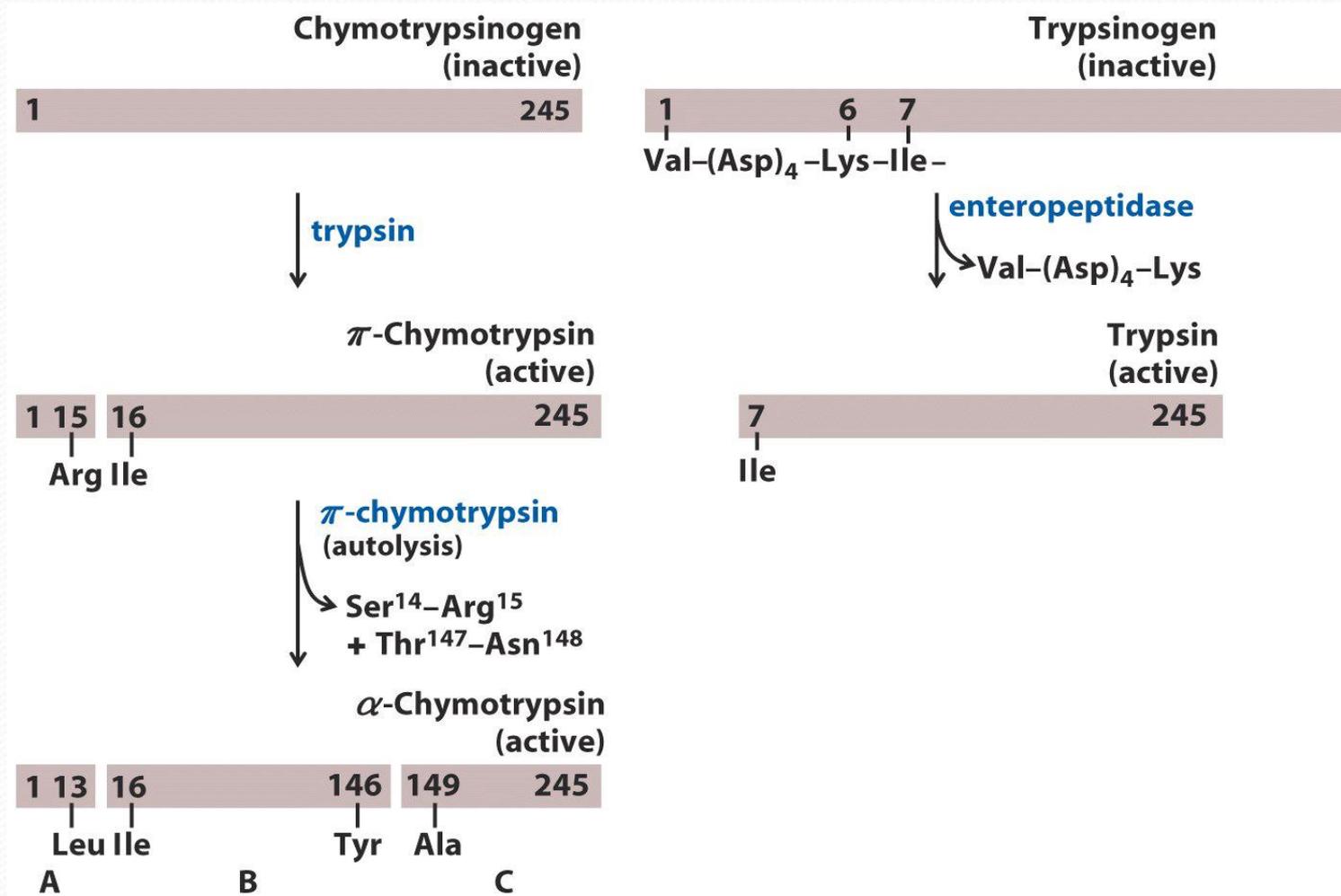
Forma inattiva (b): dimero cataliticamente inattivo o poco attivo

Forma attiva (a): ogni subunità è fosforilata su uno specifico residuo di Serina (azione operata dalla glicogeno fosforilasi chinasi mentre la rimozione dei residui di fosfato è catalizzata dalla fosforilasi fosfatasi)

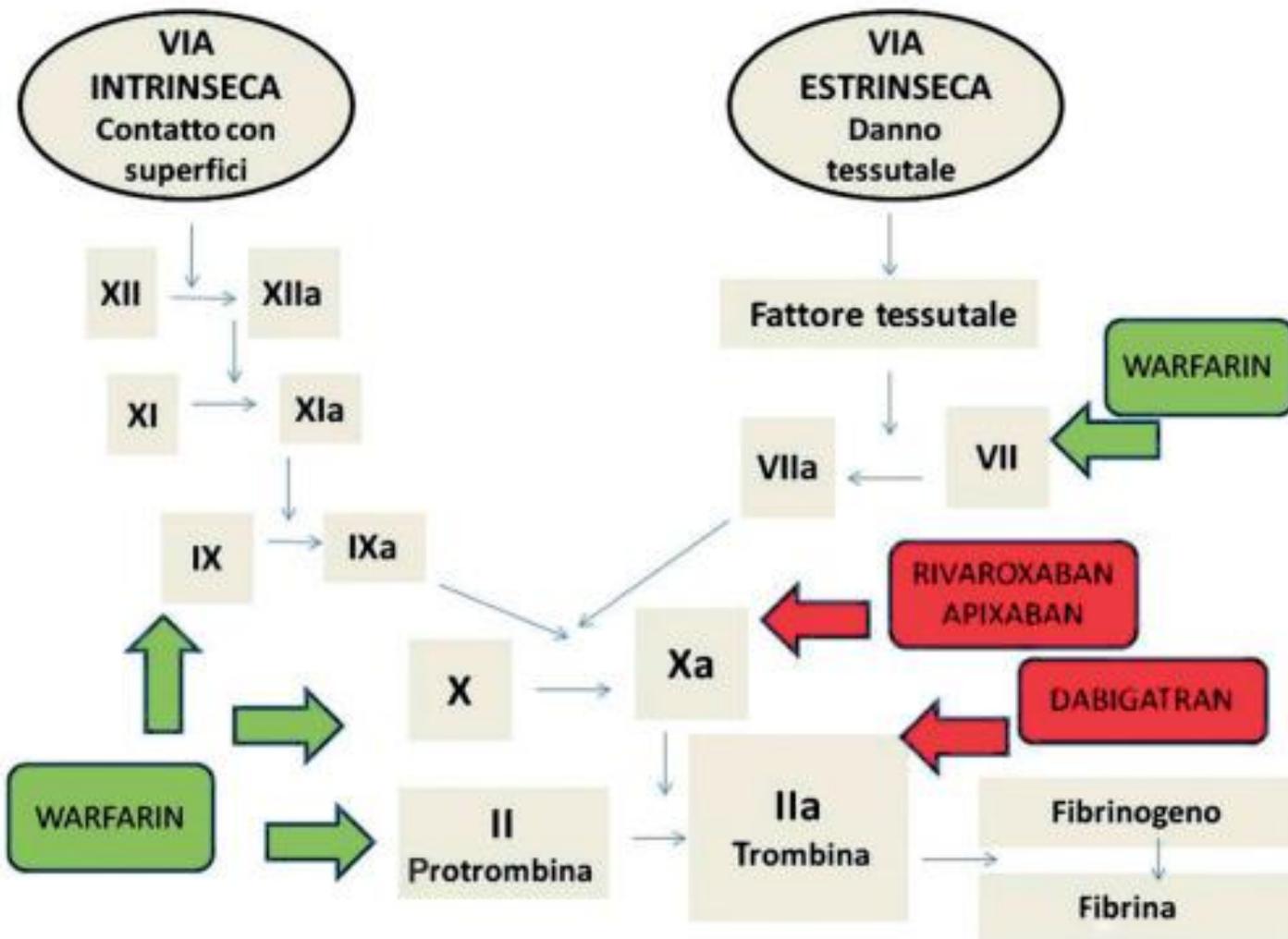
Le due forme sono soggette ad ulteriore controllo allosterico (differente per la forma a rispetto a quella b)

Attivazione proteolitica

Attivazione degli zimogeni, enzimi idrolitici prodotti in forma inattiva e attivati attraverso un taglio proteolitico



La cascata coagulativa



Ogni fattore attiva il successivo attraverso un taglio proteolitico specifico

Rivaroxaban,
Apixaban:
Inibitori del
fattore Xa

Dabigatran:
Inibitore della
trombina

Warfarin: antagonizza le funzioni della vitamina K (partecipa a modifiche essenziali per i fattori II, VII, IX e X) .

Isoenzimi

Proteine differenti (ma simili) in grado di catalizzare la stessa reazione. Hanno sequenze aminioacidiche simili ma non identiche (sono codificate da geni diversi oppure sono il risultato di un diverso riarrangiamento delle sequenze codificanti o splicing alternativo)

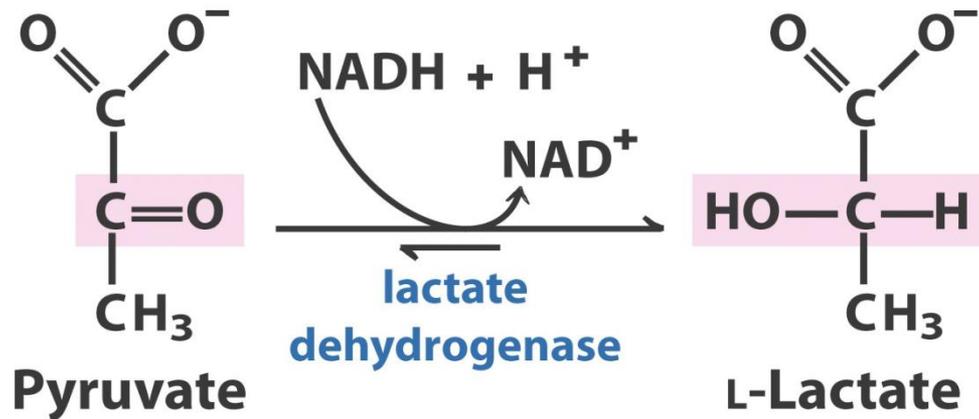
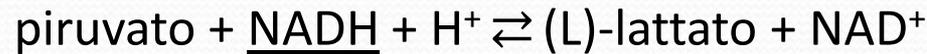
Differiscono in:

- proprietà cinetiche o regolatorie
- distribuzione subcellulare
- struttura quaternaria

L'uso di forme isoenzimatiche diverse di un enzima consente:

- Un utilizzo diverso nei differenti organi o tessuti
- Una diversa localizzazione e/o ruolo metabolico nei vari tipi di cellule
- Diversa espressione ed utilizzo durante il differenziamento e/o lo sviluppo embrionale
- Consentire un controllo più fine sulle velocità metaboliche grazie alla diversa risposta dei vari isoenzimi a modulatori allosterici diversi

Isoenzimi della lattato deidrogenasi



$$\Delta G'^{\circ} = - 25.1 \text{ kJ/mol}$$

L'enzima ha una struttura tetramericata ed è formato da due tipi di subunità (H e M) con diversa sequenza aminoacidica.

Ogni subunità possiede delle differenti proprietà cinetiche e chimico-fisiche (la subunità H è maggiormente sensibile all'ossigeno mentre la subunità M può agire in condizioni di anaerobiosi)

Isoenzimi della lattato deidrogenasi

Si possono così generare 5 isoforme diverse (H_4 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 , M_4) che sono diversamente espresse dai vari tessuti

- nel muscolo scheletrico è favorita la rapida riduzione di piruvato a lattato
- nel muscolo cardiaco è favorita la rapida ossidazione di lattato a Piruvato

La determinazione del contenuto delle varie isoforme della lattato deidrogenasi nel siero ha un significato clinico

