



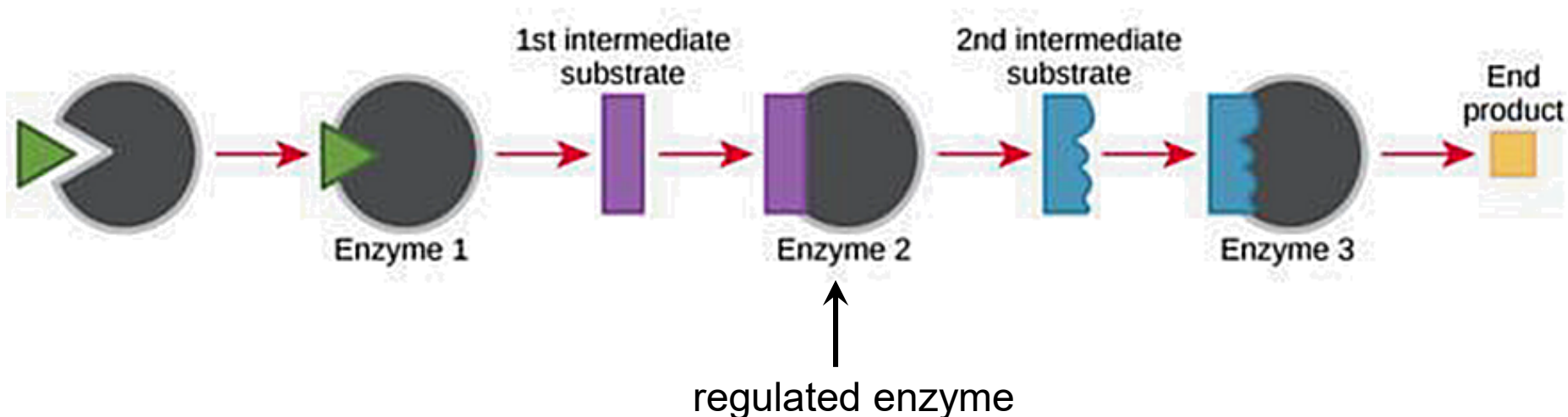
Modulo 3D

Gli enzimi – strategie regolatorie

2022-23

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

- ▶ Gli enzimi spesso lavorano in successione in modo che il prodotto di un enzima diventa il substrato di quello successivo (vie metaboliche)
 - alcuni enzimi **regolatori** sono soggetti al controllo della propria attività catalitica, e determinano la velocità complessiva della sequenza di reazioni (**flusso metabolico**)
 - il **flusso metabolico** varia attraverso questa regolazione enzimatica in funzione delle necessità cellulari contingenti (domanda cellulare di energia, biomolecole per la crescita ecc.)
 - esistono molteplici sistemi di regolazione che agiscono in tempi e modalità differenti



PRINCIPALI FORME DI REGOLAZIONE

► La natura proteica degli enzimi permette diversi tipi di regolazione

- Possono avvenire contemporaneamente o in diversi contesti e con diverse tempistiche:

1) CONTROLLO ALLOSTERICO ETEROTROPICO (molto rapido: millisecondi)

presenza di **siti sensori** per l'ambiente chimico

2) COMPARTIMENTAZIONE / ISOZIMI

enzimi omologhi con specifiche caratteristiche catalitiche (efficienza, regolazione), espressi in **specifici tessuti, compartimenti cellulari o stadi dello sviluppo**

3) CONTROLLO GENICO (lento: diversi minuti/ore)

espressione dell'enzima solo quando serve mediante **regolazione della trascrizione genica**, e rimozione di enzimi non espressi per senescenza

4) FOSFORILAZIONE/DEFOSFORILAZIONE (rapida: sec./min.)

- **modificazione covalente reversibile** utilizzata per regolare enzimi chiave in vie metaboliche
- regolazione di molti **enzimi intracellulari** effettuata da specifiche *proteina chinasi/fosfatasi*

5) ATTIVAZIONE PER TAGLIO PROTEOLITICO (ZYMOGENI) (rapida e permanente)

- una forma di **attivazione irreversibile**, l'enzima deve essere poi inattivato con un inibitore

6) INIBIZIONE COMPETITIVA

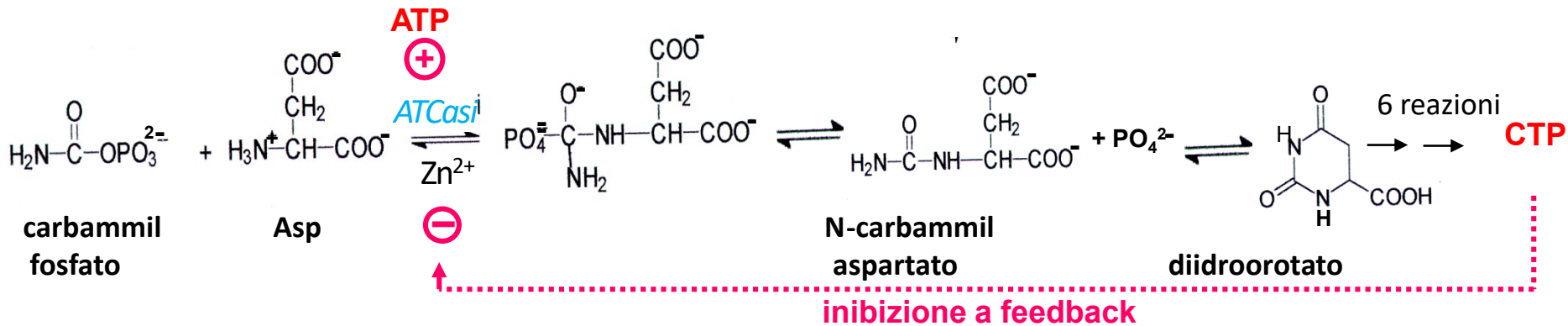
- **blocco dell'accesso al sito attivo** da parte di analoghi del substrato/stato di transizione

CONTROLLO ALLOSTERICO

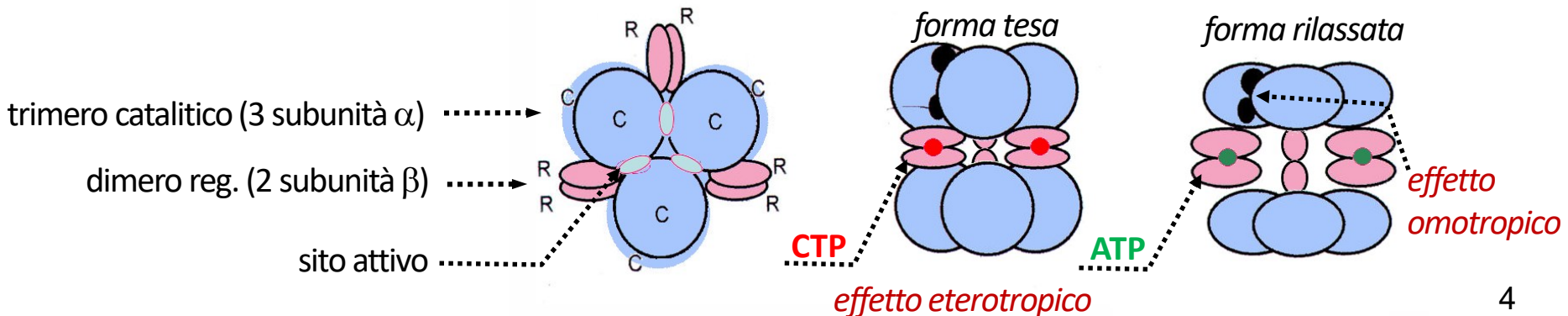
► *L'aspartato transcarbammilasi* fornisce un buon esempio di controllo allosterico

- questo enzima catalizza la prima tappa nella sintesi di CTP (via metabolica)
- È regolato allostericamente da ATP (sensore per la carica energetica della cellula) e inibito dal prodotto finale della catena enzimatica (controllo a feedback per saturazione)
- Serve per evitare saturazione a valle della via (CTP non viene usato e si accumula)

seniore per livello energetico



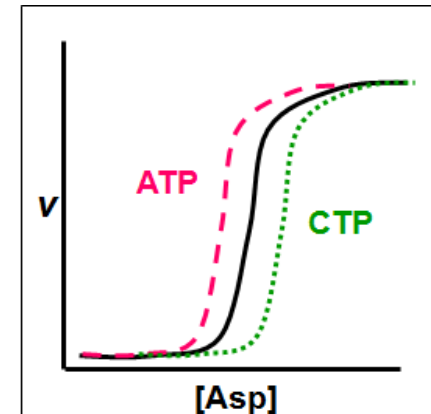
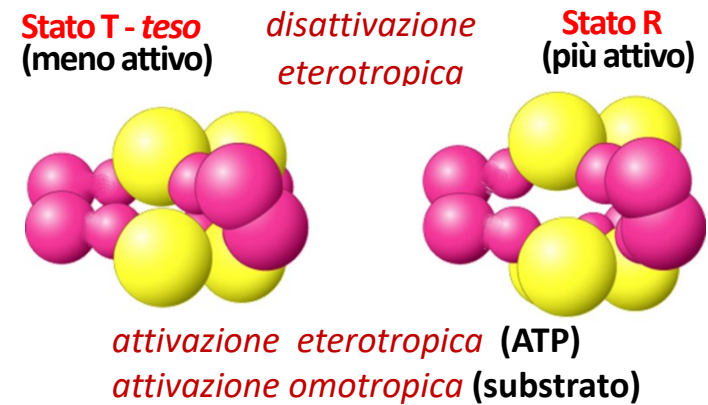
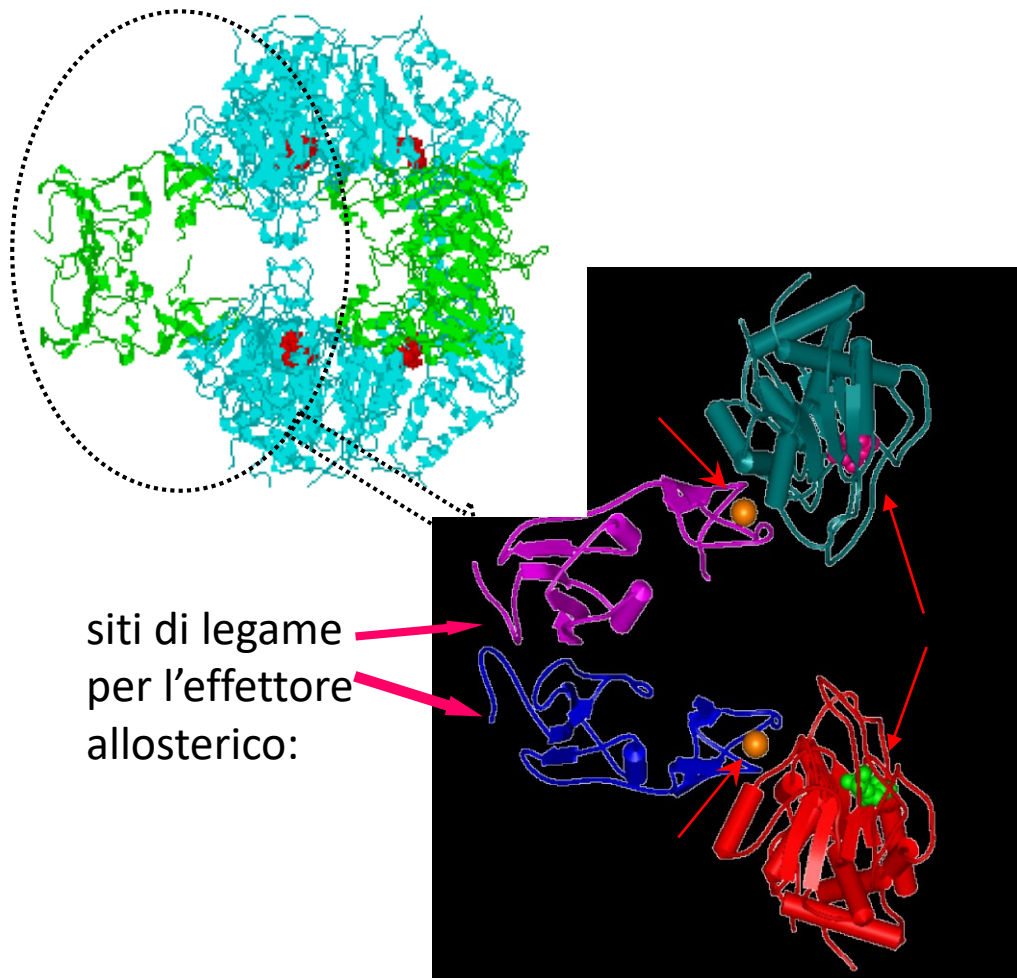
- *l'ATCase* batterica è formata da 12 subunità, formando 2 trimeri catalitici (C) e 3 dimeri regolatori (R)



CONTROLLO ALLOSTERICO (cont.)

► Meccanismo di regolazione della *aspartato transcarbammilasi*

- l'enzima richiede la presenza di ioni Zn^{2+} , che hanno un **ruolo strutturale** piuttosto che catalitico (fanno da perno fra le catene α e β)
- **ATP e CTP hanno azione eterotropa**, rispettivamente attivante e disattivante

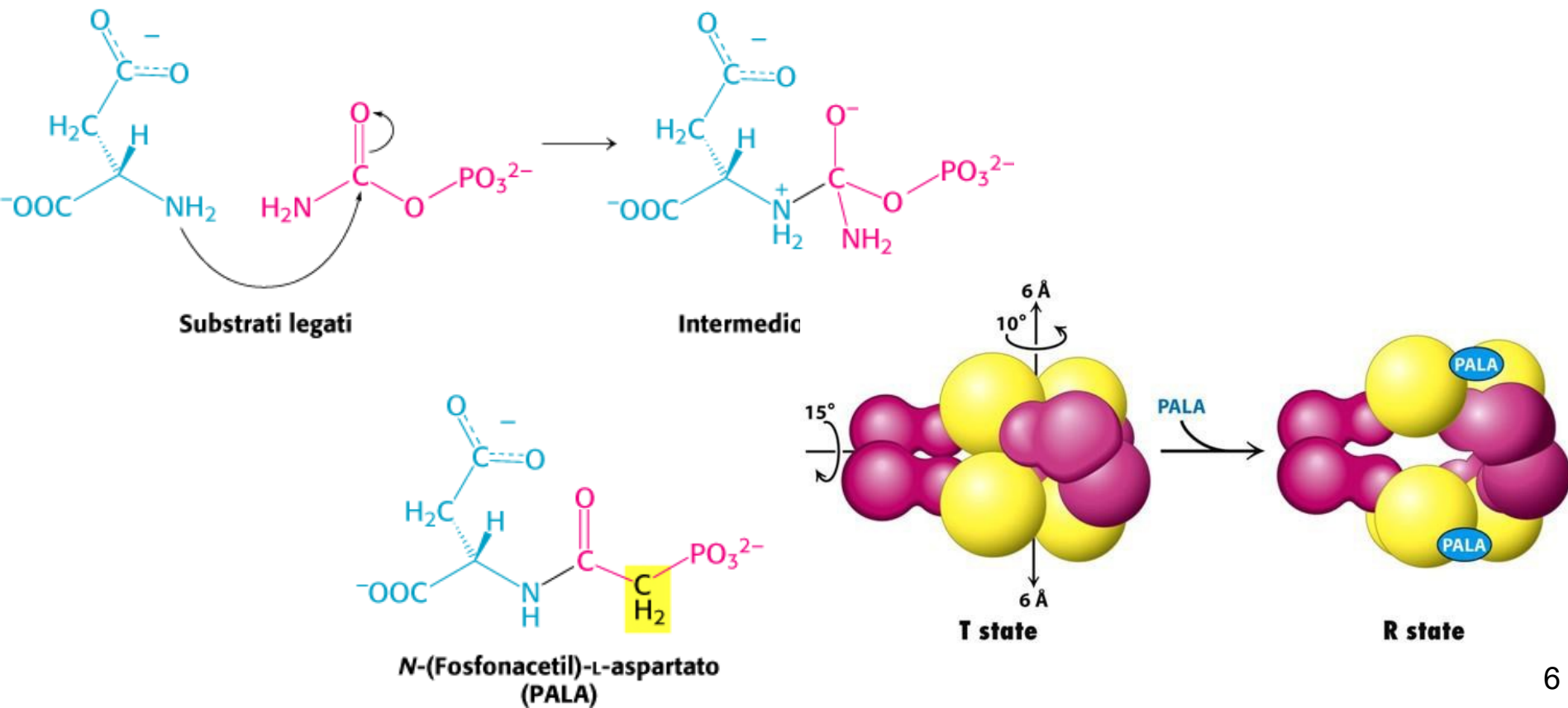


effetto omotropico - andamento sigmoide
effetto eterotropico - spostamento curve

CONTROLLO ALLOSTERICO (cont.)

► Reazione catalizzata dalla *aspartato transcarbammilasi*

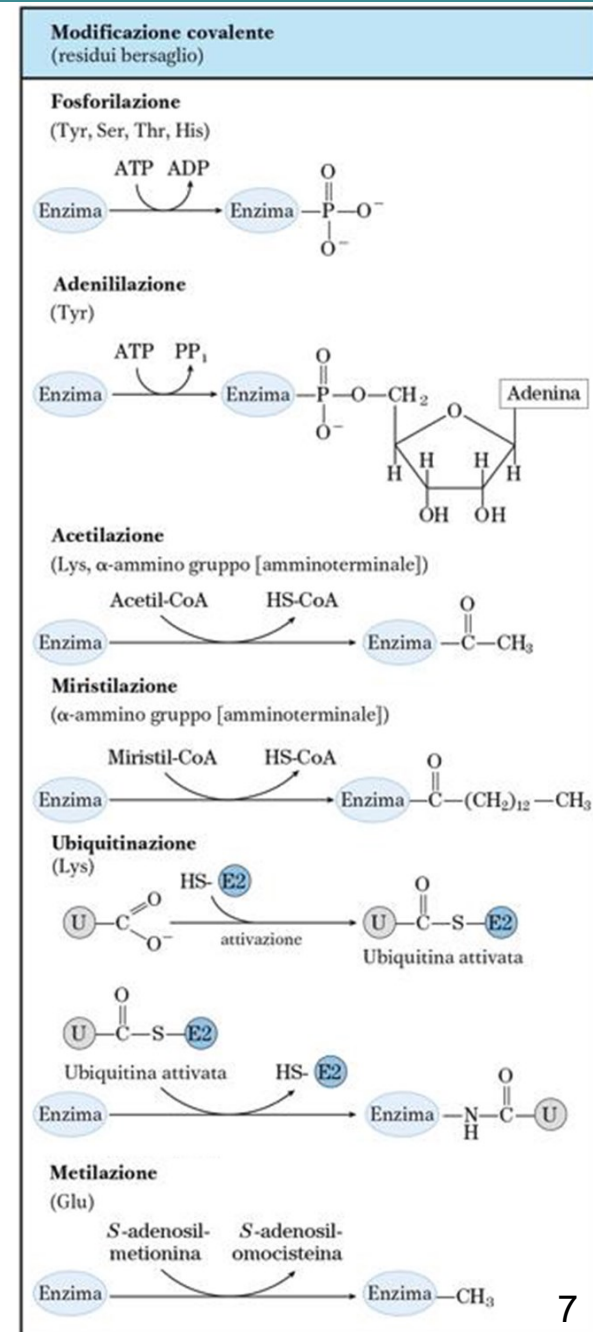
- la reazione procede con la formazione di un **intermedio di reazione**
- l'**N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA)** è un esempio di un **analogo dello stato di transizione** (in questo caso bi-substrato), che non può reagire ed è quindi un inibitore dell'enzima
- il legame con PALA spinge il complesso enzimatico verso la **forma rilassata** ; più PALA si lega più l'equilibrio pende verso lo stato R



CONTROLLO PER MODIFICAZIONE COVALENTE

► Forma di regolazione che riguarda molte proteine, non solo enzimi

- l'attività viene **alterata reversibilmente** dal legame covalente di gruppi chimici modificanti
- sono noti **oltre 400 diversi** tipi di modificazioni
- Le modificazioni più comuni comprendono: **fosforilazione**, l'acetilazione, miristilazione, ubiquitinazione ADP-ribosilazione, metilazione
- I gruppi chimici sono aggiunti enzimaticamente e rimossi da altri enzimi
- l'effetto può essere sia stimolatorio che inibitorio.
- la modificazione covalente può modificare anche le proprietà allosteriche di molti enzimi (es. l'effetto allosterico di una molecola regolatoria può essere aumentato o diminuito dalla fosforilazione)



MODIFICAZIONE COVALENTE: Fosforilazione

- ▶ La fosforilazione è la modificazione covalente più largamente utilizzata
 - **25% delle proteine eucariotiche** (non solo enzimi) possono essere fosforilate.
 - richiedono l'attività delle *Protein chinasi*, che sono molto numerose.
 - i residui affetti (Ser/Thr e Tyr ; gruppo funzionale -OH) **richiedono specifiche chinasi** per essere *fosfatasi* per essere defosforilati
 - la **molecola donatrice più comune è ATP** che dona il γ -fosfato; la reazione è irreversibile in assenza di una *Protein fosfatasi* (specifica per Ser/Thr e Tyr)
 - ogni *Protein chinasi* riconosce il residuo all'interno di una **sequenza "consenso"** e lo fosforila.; es: la *Protein chinasi A* riconosce: Arg-Arg-X-Ser/Thr-Ile (dove X = residuo piccolo)
 - le proteine bersaglio **passano ciclicamente** da una forma fosforilata ad una non fosforilata

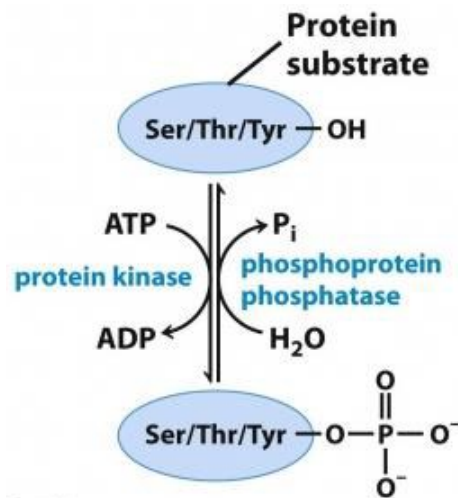
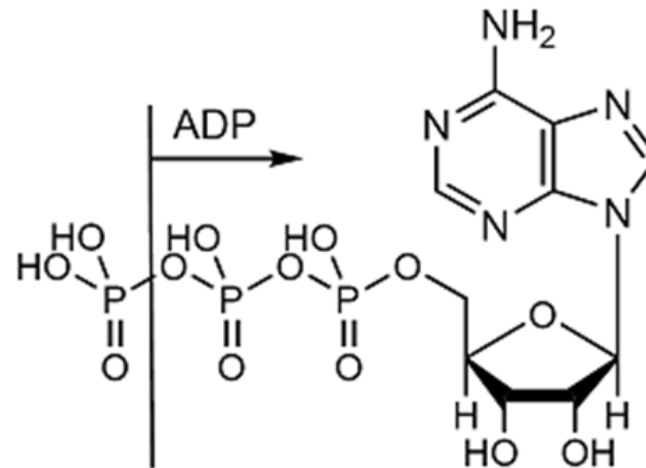
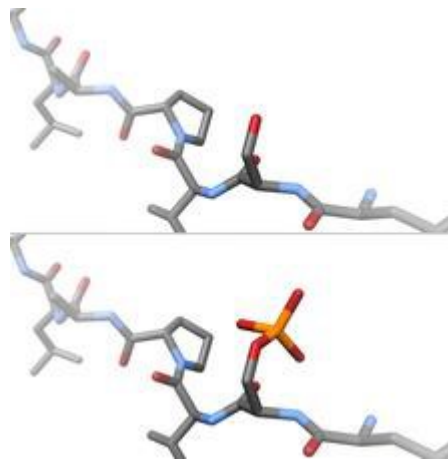


Figure 15-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

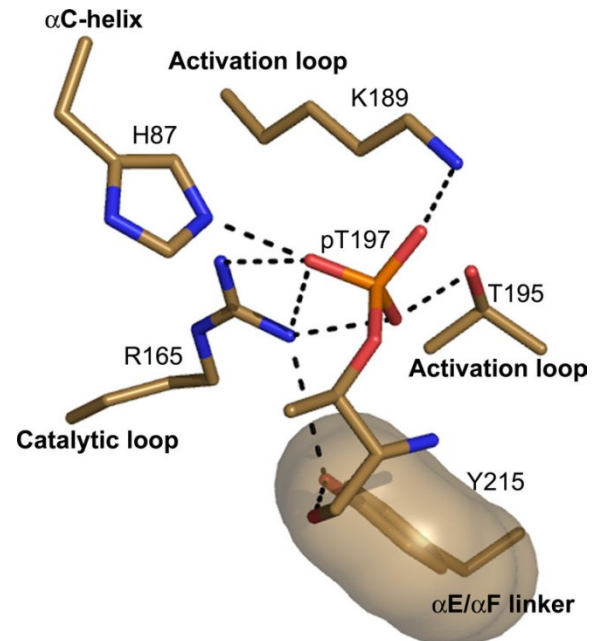


MODIFICAZIONE COVALENTE: Fosforilazione (cont.)

- ▶ La fosforilazione è un metodo efficace per modulare l'attività di proteine ed enzimi
- l'aggiunta di un gruppo fosfato **augmenta di 2 le cariche negative** presenti e può formare fino a **tre legami-H** con altrettanti proton donatori
- può determinare una variazione conformazionale (struttura) che si riflette sulla funzione
- la fosforilazione e la defosforilazione **sono processi veloci** (minuti) e la proteina è sottoposta ad un **doppio controllo** (*chinasi* e *fosfatasi*).
- produce effetti **amplificati**: una singola chinasi può fosforilare centinaia/migliaia di unità della proteina bersaglio, che a sua volta può agire su altrettanti bersagli (effetto a cascata)

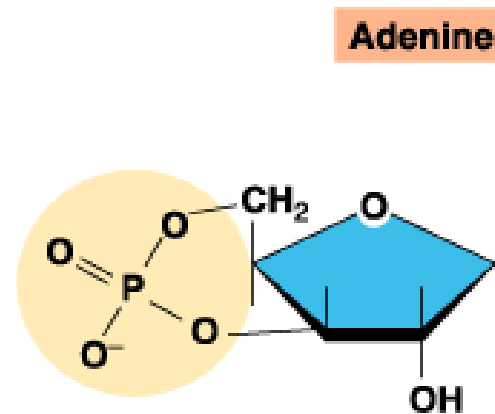
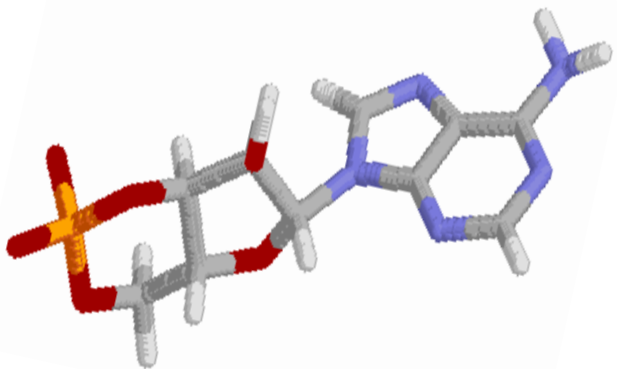
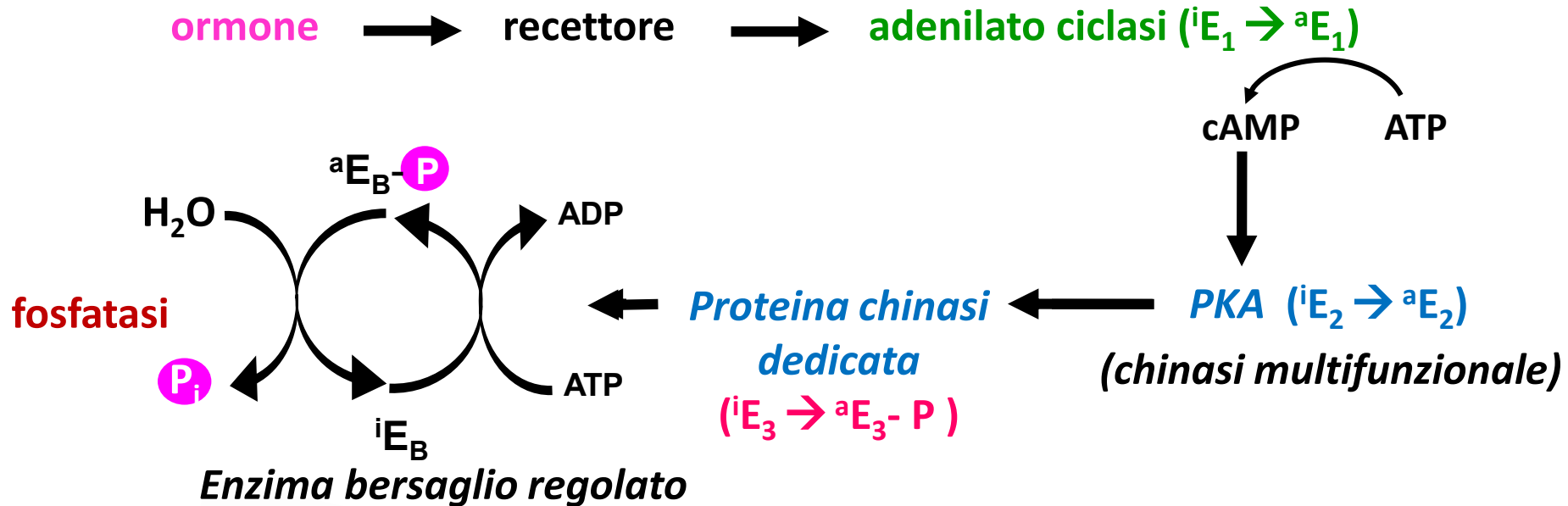


tratto di polipeptide con una serina non fosforilata e fosforilata (in basso)



MODIFICAZIONE COVALENTE: Fosforilazione

- ▶ La *proteina chinasi A (PKA)* è un importante enzima regolatorio multifunzionale
- è inserito in una cascata enzimatica (amplificazione) attivata da un segnale extracellulare

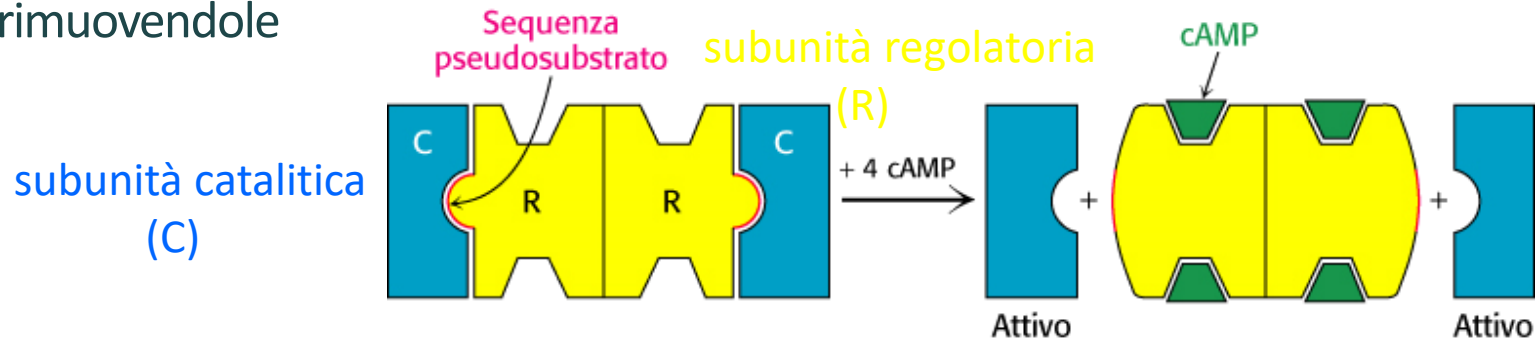


cAMP = adenosina-3',5'-monofosfato ciclica

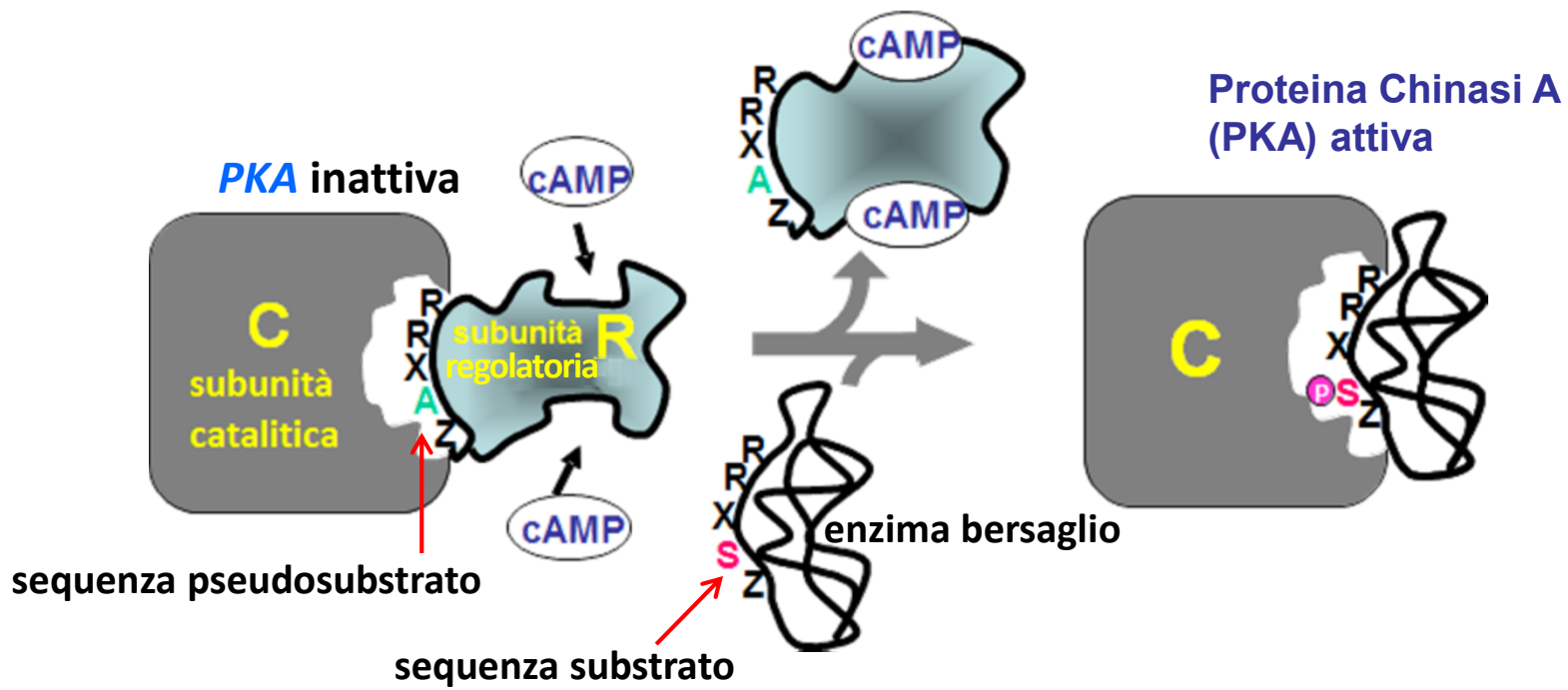
CONTROLLO PER INIBIZIONE – proteine di controllo

► La regolazione della *proteina chinasi A (PKA)* stessa è un esempio di controllo per inibizione da parte di un analogo del substrato

- a concentrazioni di ~ 10 nM, 4 molecole di cAMP interagiscono con 2 subunità regolatorie di *PKA*, rimuovendole

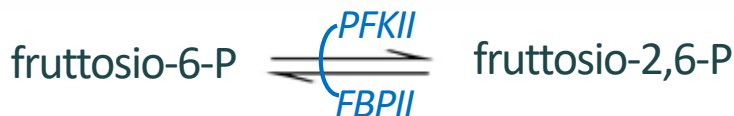
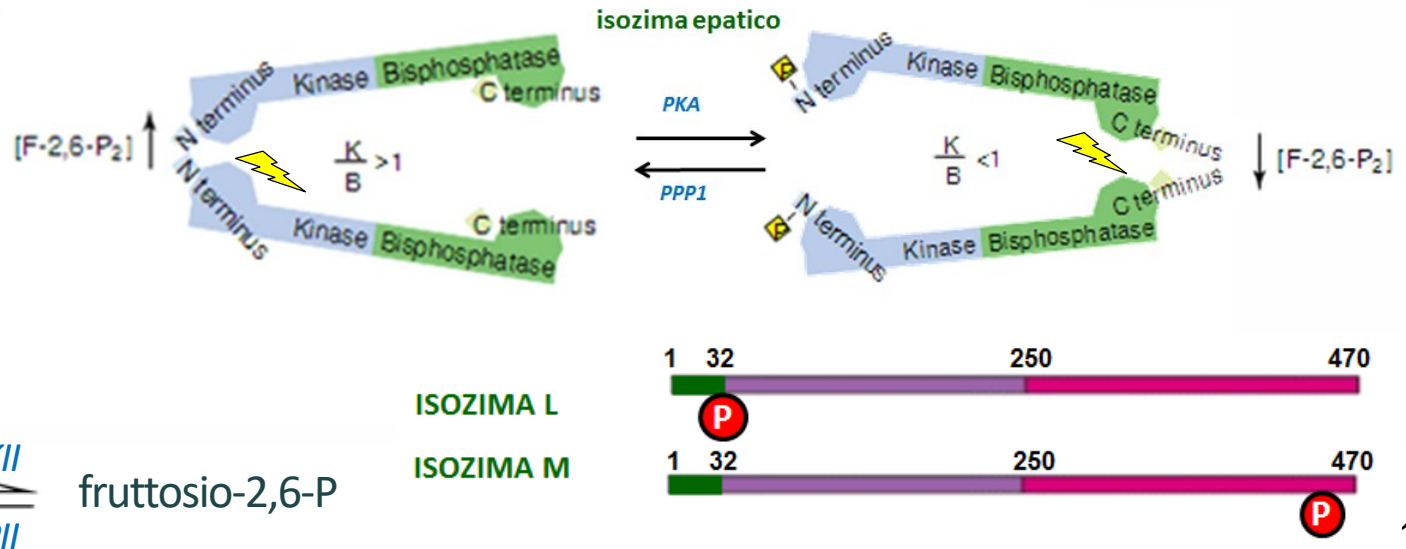


-le subunità regolatorie hanno sequenze pseudosubstrato, che mimano quelle fosforilate



COMPARTIMENTAZIONE/ISOZIME

- Gli isoenzimi regolano l'attività enzimatica in diversi tessuti e durante lo sviluppo
 - gli isozimi (o isoenzimi) sono forme enzimatiche **omologhe** con diversità nella sequenza (duplicazioni geniche e diversificazione) che catalizzano la stessa reazione
 - differiscono tra loro per K_M , efficienza catalitica e regolazione, e **regolano il metabolismo in diversi compartimenti cellulari/tessuti** in base al **fabbisogno** o dello **stadio di sviluppo**.
 - per esempio, l'enzima tandem *fosfofruttochinasi II/fruttosio bisfosfatasi II (PFKII/FBP II)* catalizza la **produzione/rimozione del fruttosio-2,6-bisfosfato**, molecola che regola allostericamente un importante enzima della glicolisi (*fosfofruttochinasi I*)
 - la fosforilazione nel **fegato** (*PKA* attivata dal glucagone) attiva PFKII e disattiva FBPII mentre la fosforilazione nel **muscolo** (*PKA* attivata dall'adrenalina) ha l'**effetto opposto**



ATTIVAZIONE PER TAGLIO PROTEOLITICO – Enzimi digestivi

► Il taglio proteolitico è una modificazione permanente

- enzimi (o proteine in generale) possono essere sintetizzati sotto forma di **precursori inattivi (proforme, proenzimi o zimogeni)** che vengono resi attivi, in appropriate situazioni, attraverso la **rottura di specifici legami peptidici**
- Il **taglio proteolitico** è la rottura di legami peptidici per azione di **specifiche proteasi** che permettono al substrato di legarsi al sito attivo
- è un tipo di **regolazione irreversibile** che avviene una sola volta

► Esempi:

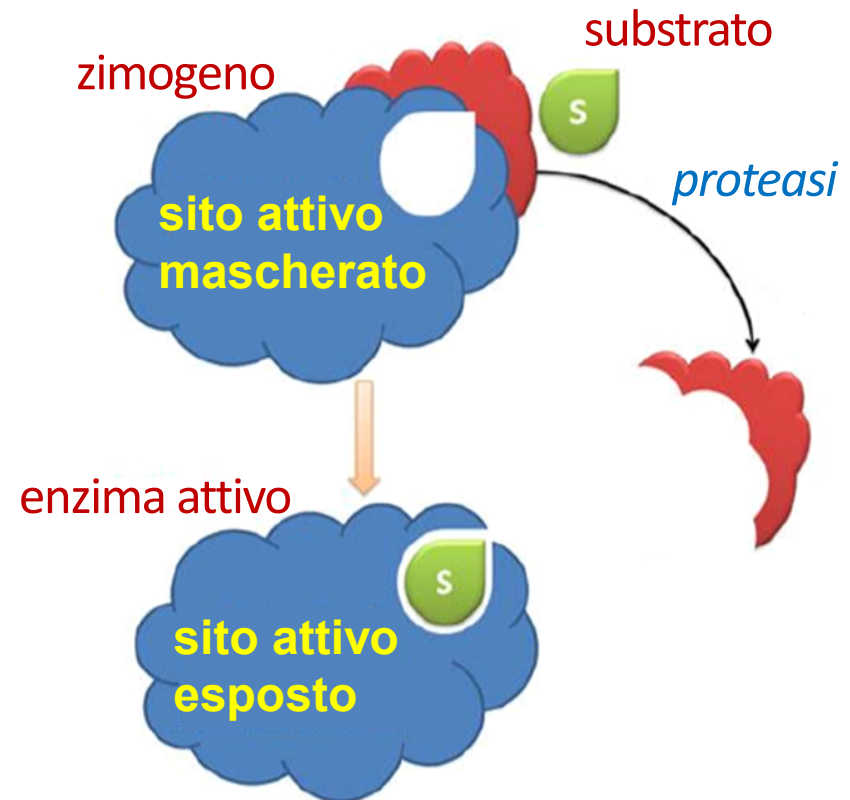
enzimi digestivi (tripsina, chimotripsina)

fattori coagulazione (cascata di proenzimi)

proteine non enzimatiche (molte)

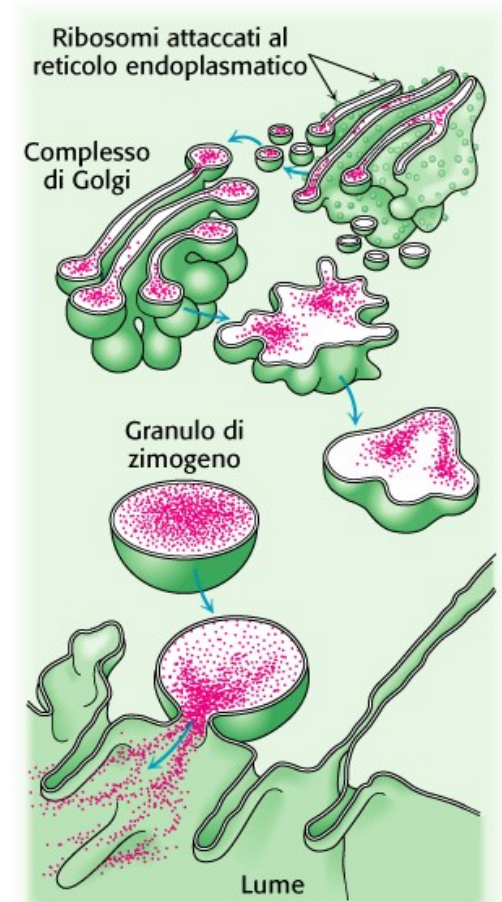
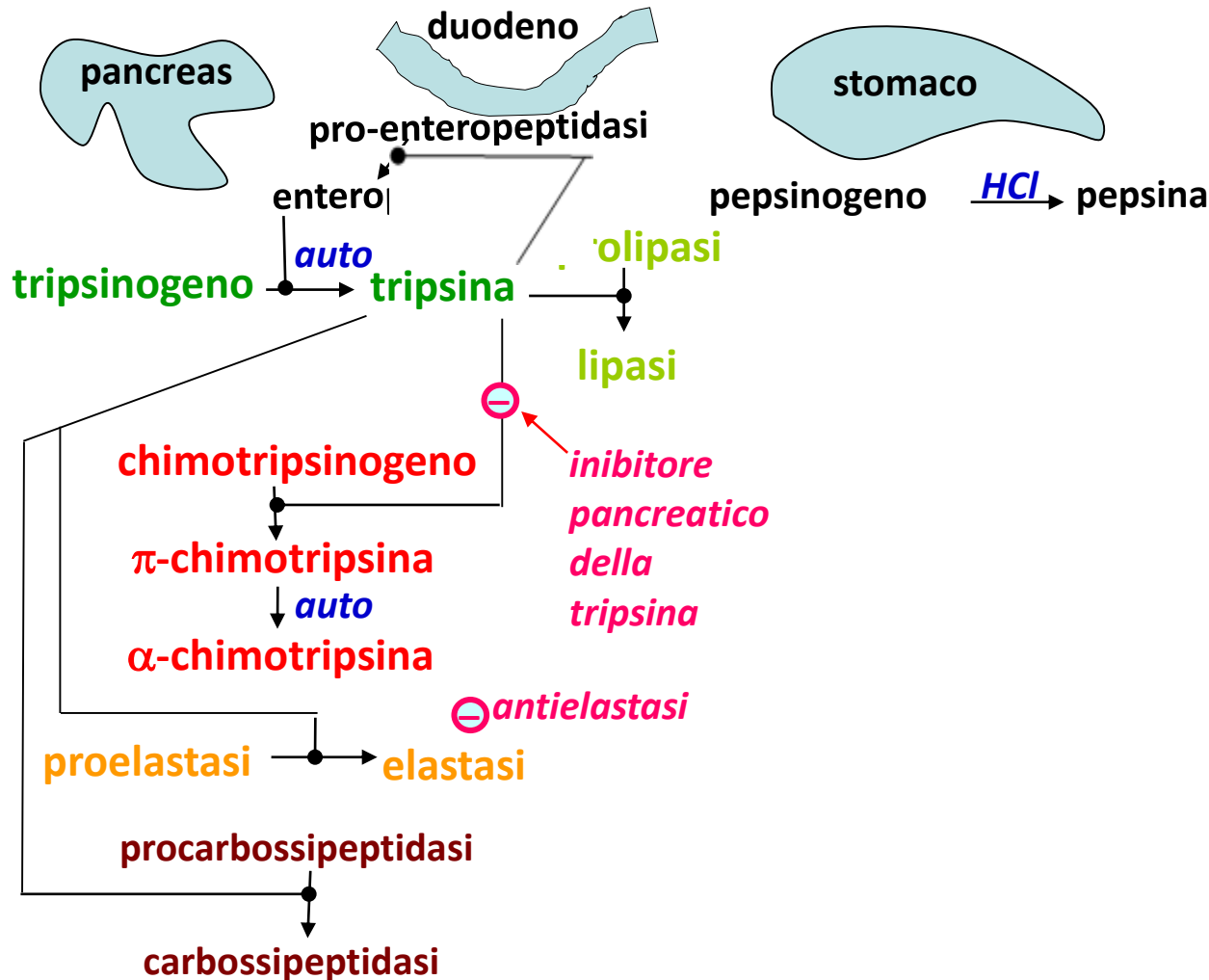
- ormoni peptidici (proinsulina, proglucagone)

- collagene (procollagene)



ATTIVAZIONE PER TAGLIO PROTEOLITICO – Enzimi digestivi

- ▶ Gli enzimi digestivi sono prodotti come zimogeni ed attivati al rilascio
 - il **pepsinogeno** è attivato dalle **condizioni acide dello stomaco** dopo un pasto
 - gli **zimogeni pancreatici** sono rilasciati dal pancreas e il tripsinogeno è attivato dalla **enteropeptidasi** duodenale, e poi attiva tutti gli altri (proteasi, carbossipeptidasi e lipasi)

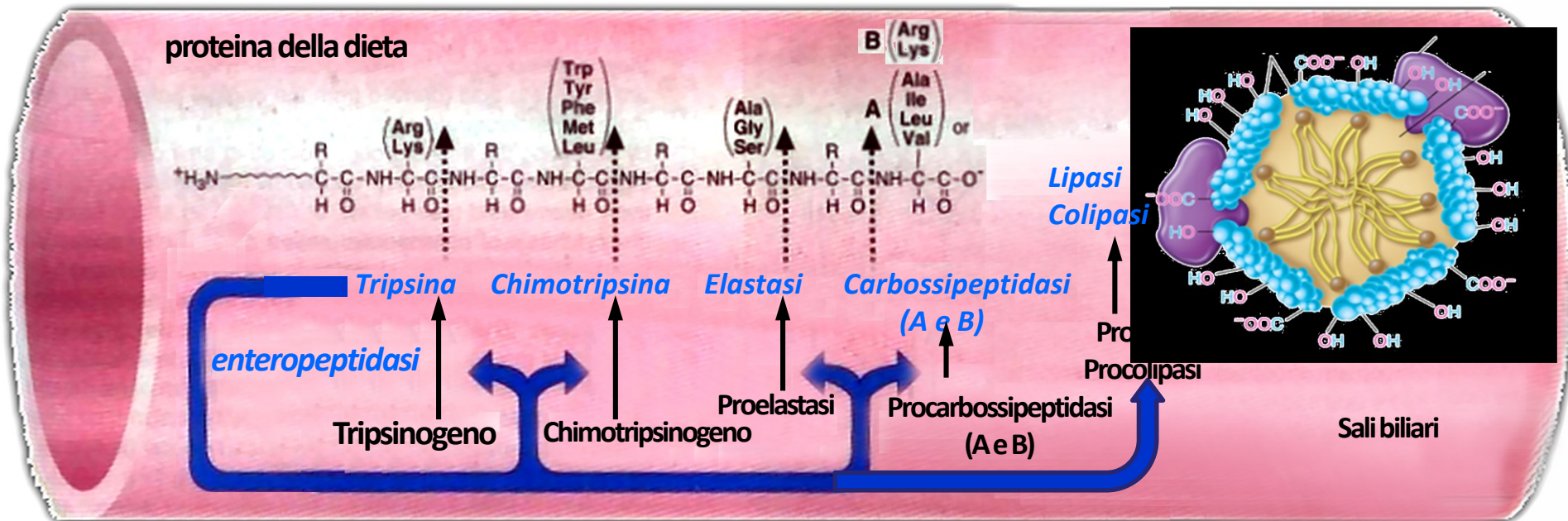


ATTIVAZIONE PROTEOLITICA – enzimi digestivi (cont.)

► Basta un enzima attivo (*enteropeptidasi*) per attivare tutti gli altri

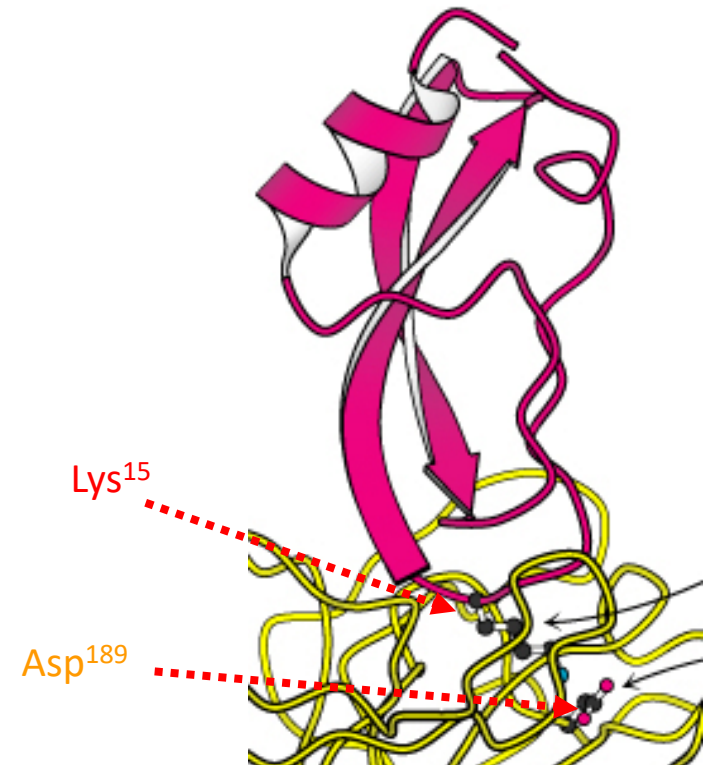
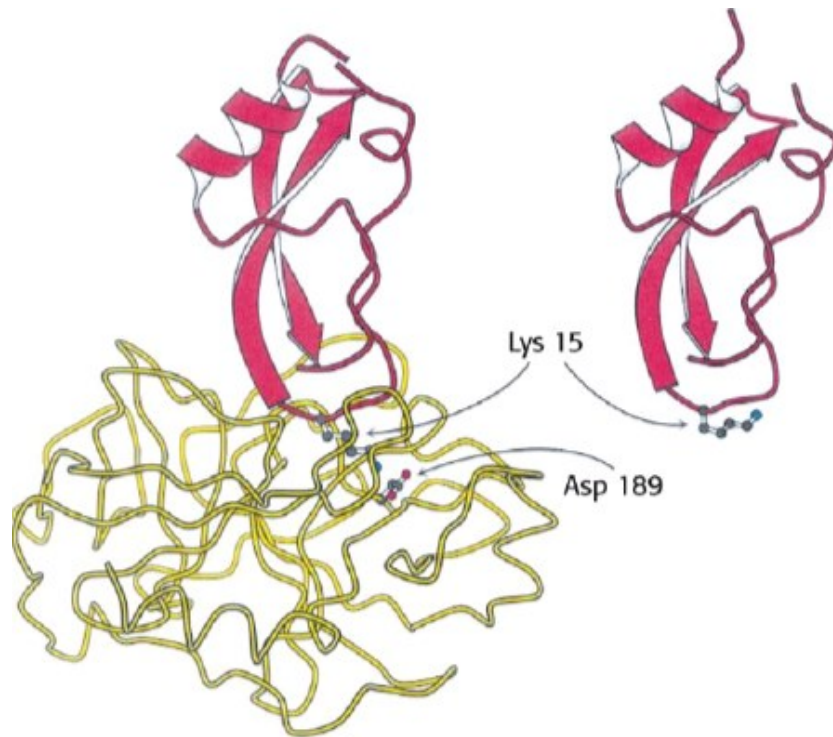
- l'**enteropeptidasi** è una serina proteasi legata alla membrana delle cellule duodenali anch'essa è prodotta come zimogeno, attivata da un'altra proteasi o dalla tripsina
- a sua volta **attiva il tripsinogeno a tripsina** che poi **attiva tutti gli altri enzimi digestivi**

intestino tenue



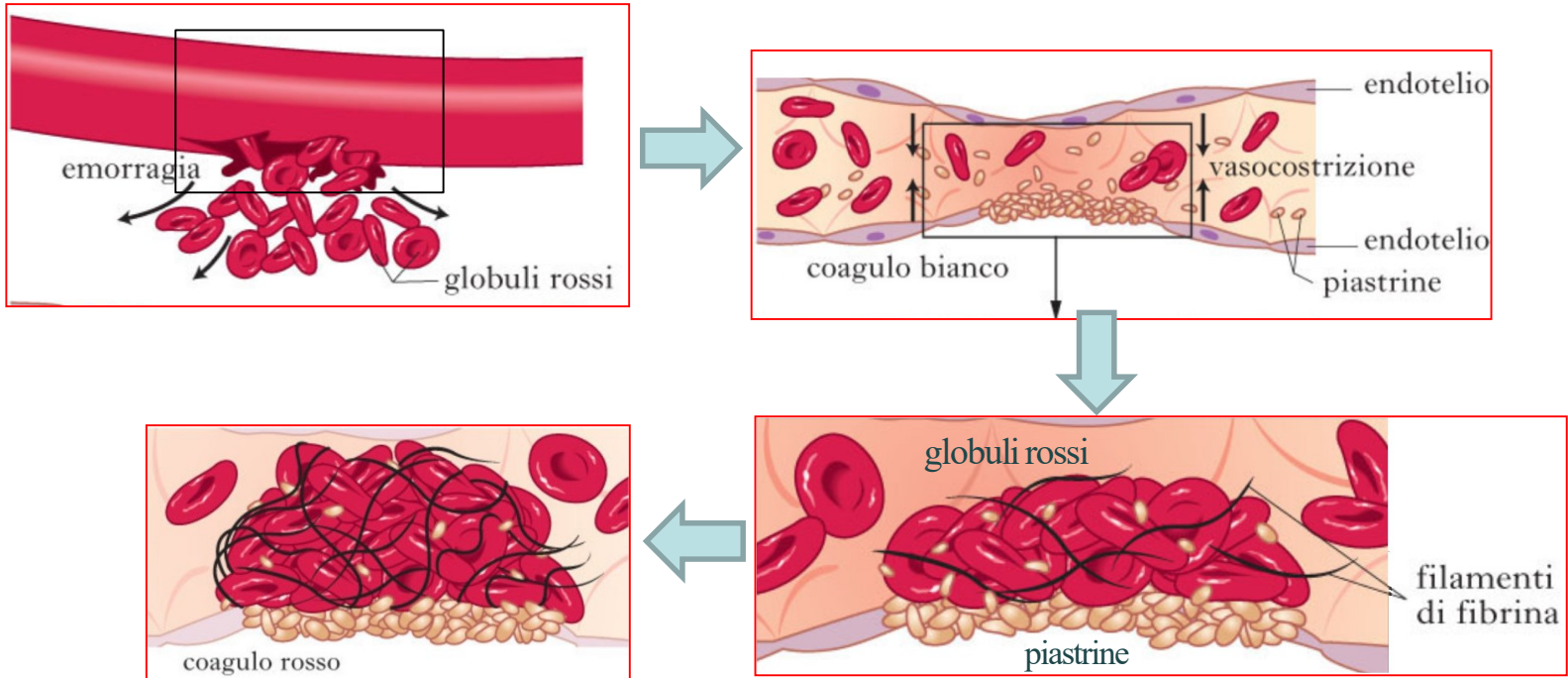
ATTIVAZIONE PROTEOLITICA – regolazione

- ▶ Le proteasi digestive sono attivate permanentemente e regolate da specifici inibitori proteici
- l'**inibitore pancreatico della tripsina** (antitripsina, 6kD) è un polipeptide ed analogo del substrato della tripsina molto efficace
- si lega al sito attivo (interazione con Asp 189 della tripsina) con una **affinità molto elevata** ($K_d = 0,1 \text{ nM}$)
- previene danni ai tessuti (es. pancreatite acuta).



ATTIVAZIONE PROTEOLITICA – Cascata della coagulazione

- ▶ La coagulazione è il risultato di una serie di reazioni che avvengono come risultato di danno ad un vaso sanguigno e che portano a formare un coagulo (emostasi).
- in condizioni fisiologiche di emostasi il sangue è in uno stato fluido nei vasi sanguigni sani mentre **si forma molto rapidamente un 'tappo' emostatico** a livello di **lacerazioni**
- la coagulazione risulta da una **cascata di reazioni enzimatiche** con l'attivazione in successione di *serina proteasi* (zimogeno → enzima attivo), l'ultima delle quali **attiva la fibrina**.
- **la fibrina polimerizza** (forma un **multimero stabilizzato da legami covalenti** intercatena)
- scattano anche i **sistemi di controllo** della coagulazione e **riassorbimento del coagulo**



ATTIVAZIONE PROTEOLITICA – Cascata della coagulazione (cont.)

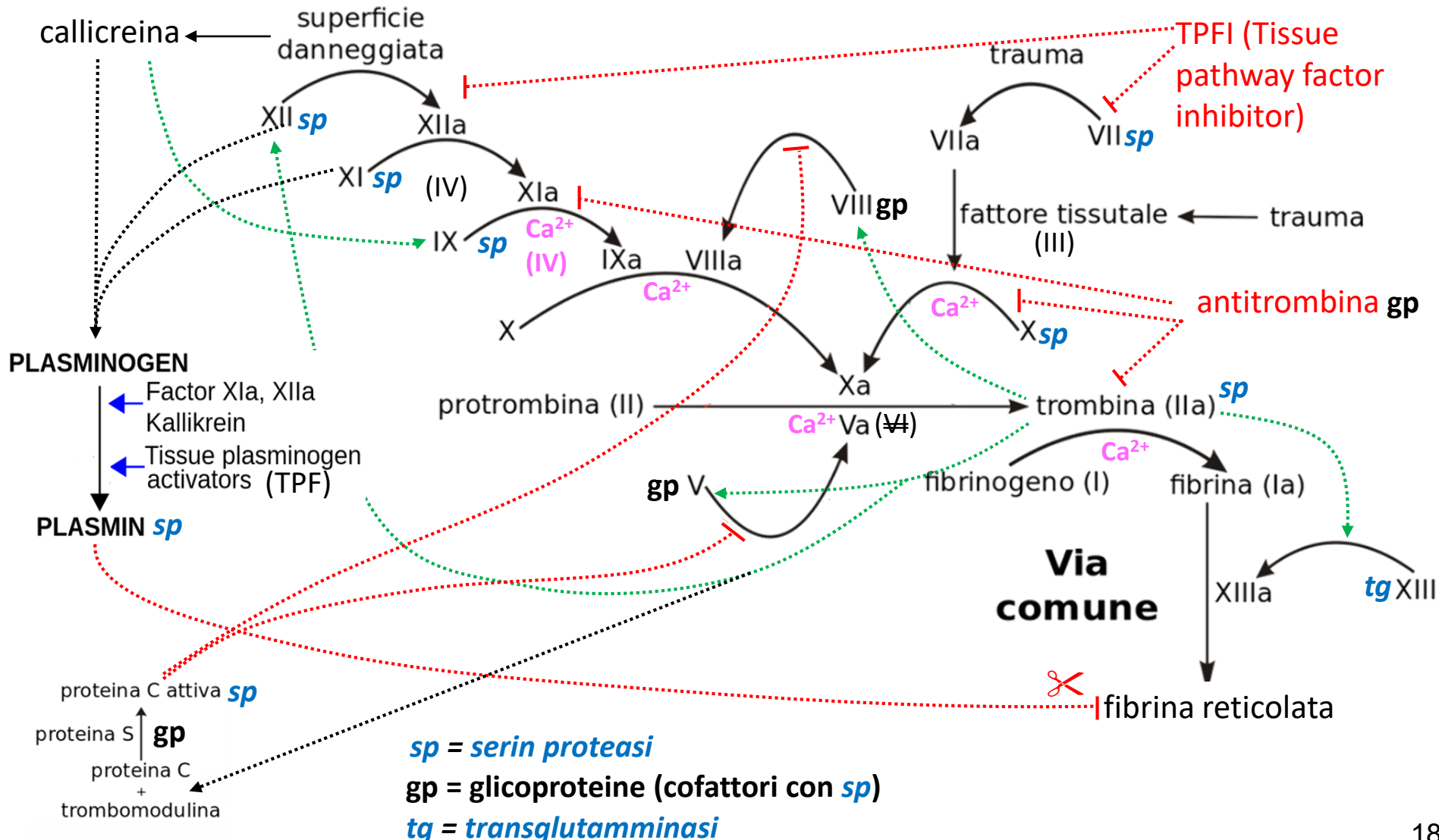
► I fattori della coagulazione agiscono uno sull'altro a cascata

Via intrinseca

(contatto con superficie non endoteliale)

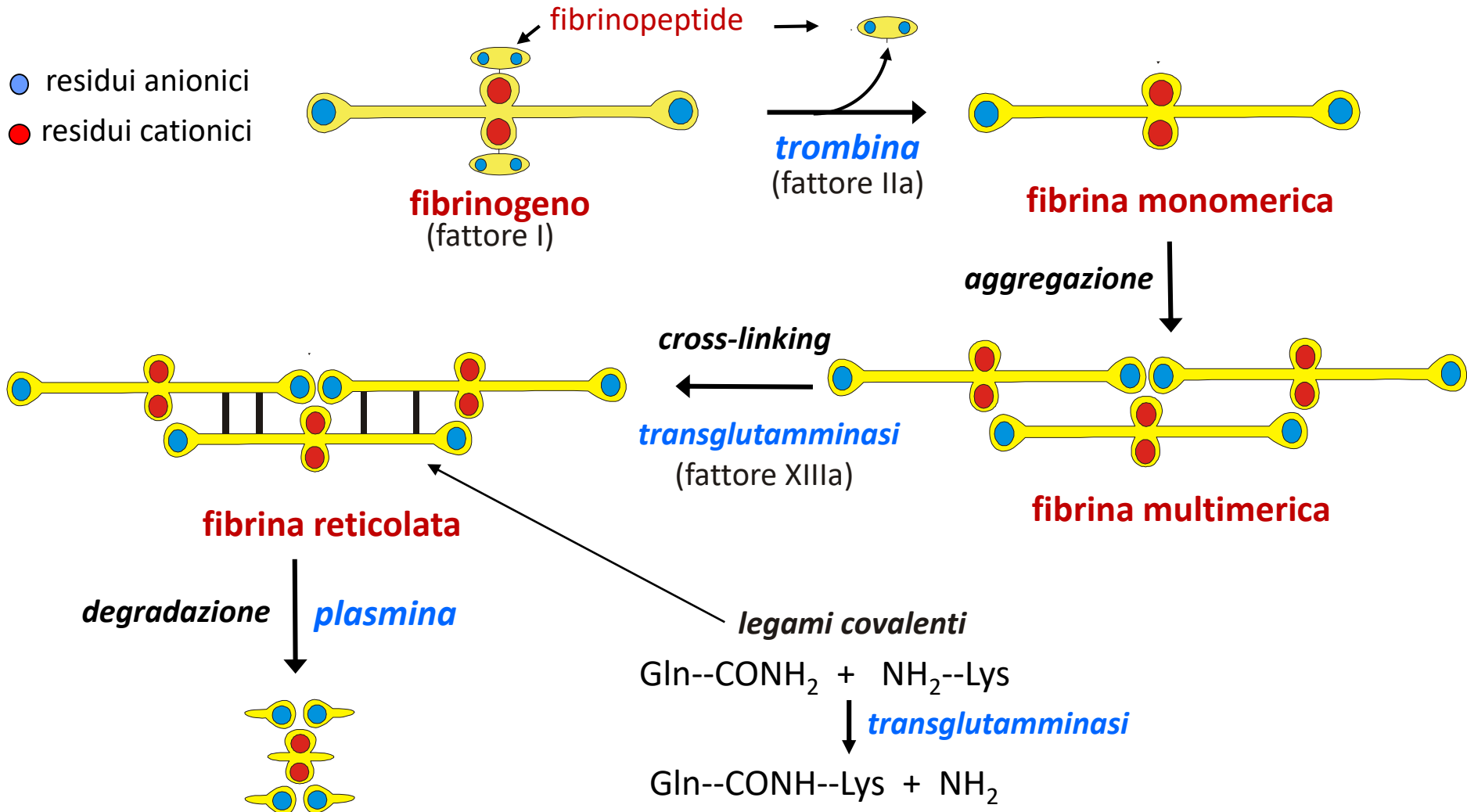
Via estrinseca

(trauma a livello tissutale)



COAGULAZIONE – Formazione del coagulo di fibrina

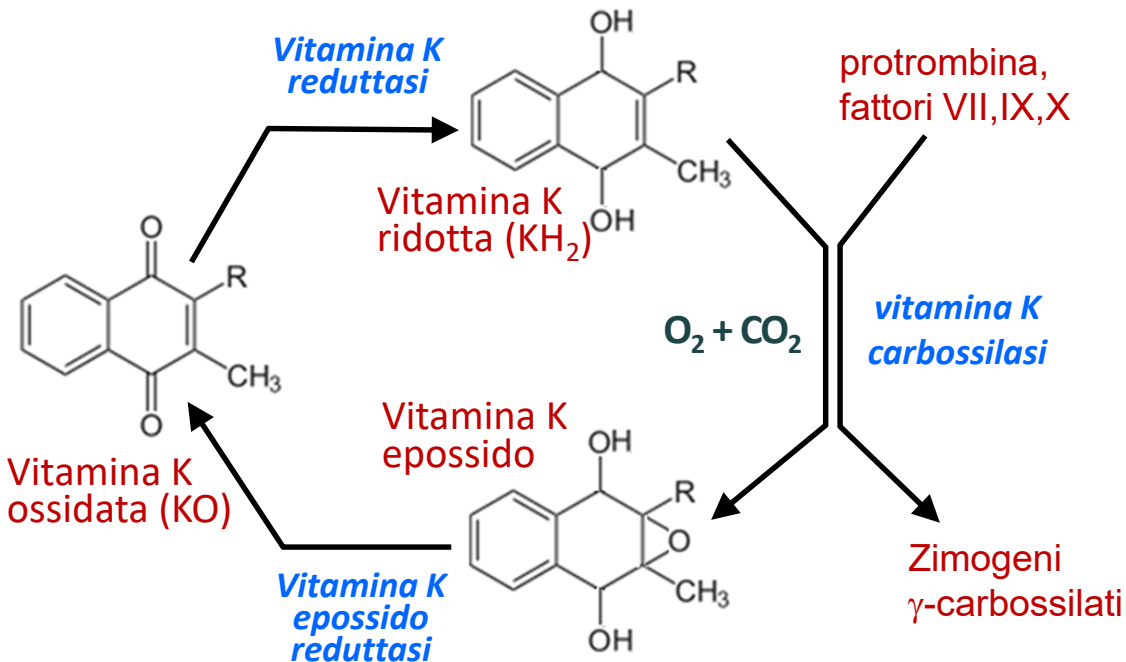
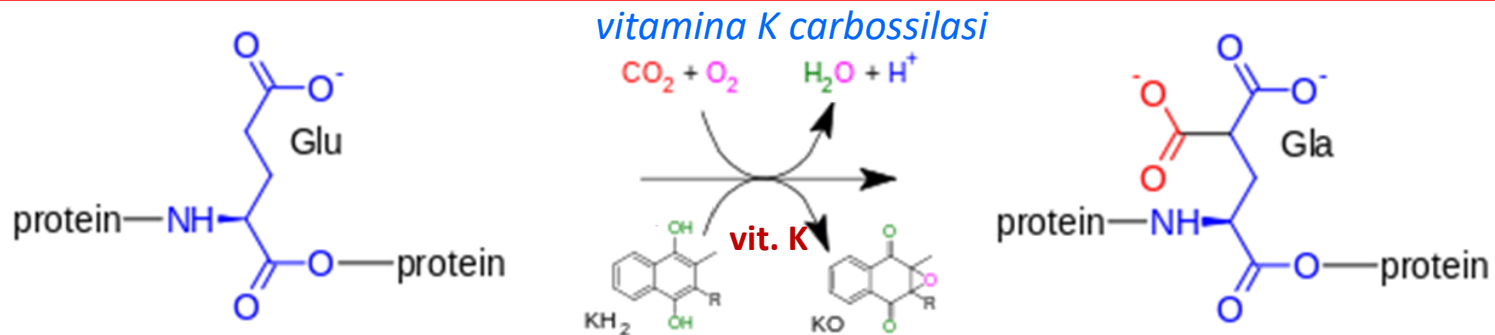
- ▶ La cascata della coagulazione porta alla polimerizzazione della fibrina.
- la **trombina** attivata **rimuove i fibrinopeptidi** dal fibrinogeno (impediscono la polimerazione)
- il **fattore XIII** (transgluttaminasi) poi **forma legami covalenti intercatena** (reticolazione)



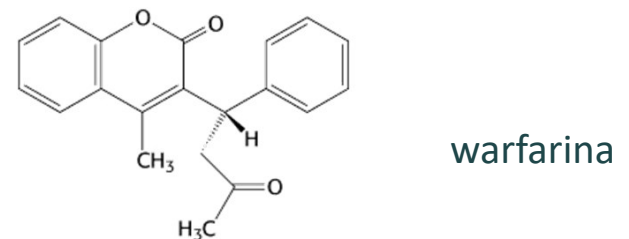
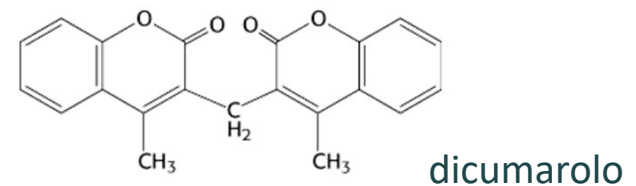
COAGULAZIONE – Ruolo della vitamina K

► *Diversi fattori della coagulazione richiedono Ca^{2+} per funzionare*

-i fattori VII, IX, X e trombina sono serin-proteasi nelle quali residui Glu sono soggetti a PTM in acido γ -carbossigluttamico (Gla), processo che richiede la vitamina K



analoghi della vitamina K sono anti-coagulanti

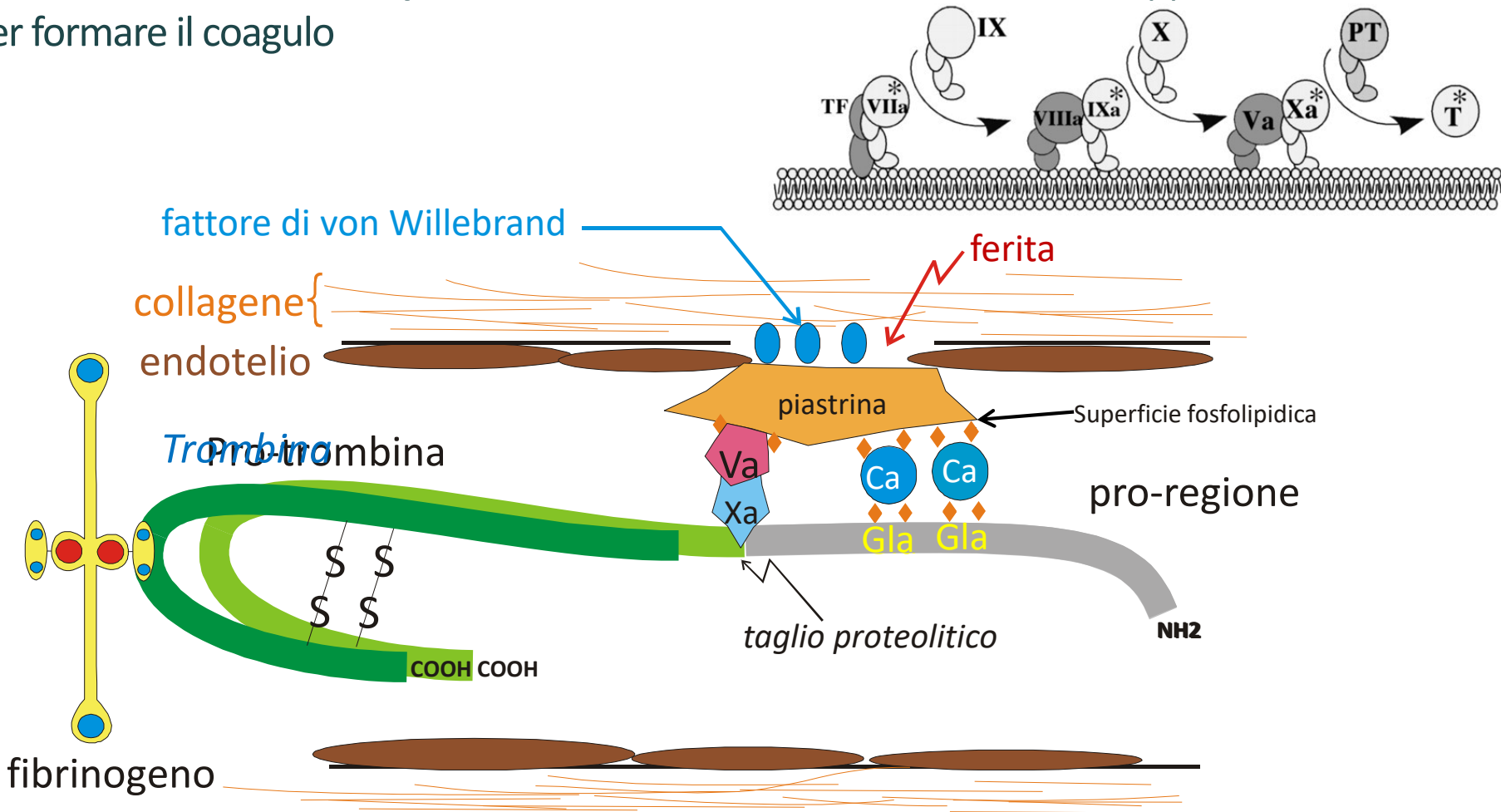


COAGULAZIONE – formazione del coagulo

► La presenza di Gla permette a fattori della coagulazione di ancorare alle membrane fosfolipidiche delle piastrine, una interazione mediata da Ca^{2+}

- le piastrine adese rilasciano sostanze (es. trombossani) che **reclutano altre piastrine**

- i filamenti di **fibrina sono prodotti solo localmente**, e reticolando intrappolano eritrociti per formare il coagulo



COAGULAZIONE – regolazione

► La coagulazione è finemente regolata per prevenire emorragia da un lato e trombosi dall'altro

- la linea di demarcazione è sottile; la coagulazione deve essere limitata rimuovendo o inibendo diversi fattori di coagulazione:

- 1) la **trombina** con la proteina di membrana **tromboregulina** attiva la **proteina C**, che assieme alla **proteina S** degrada i fattori V e VIII necessari per l'attivazione dei fattori X e II (trombina)
- 2) **inibitori proteici** (es. **antitrombina III**, con meccanismo simile alla antitripsina) inibiscono la trombina ed altre serin proteasi (fattore XIIa, XIa, Xa e IXa)
- 3) l'**eparina** (eteropolisaccaride anionico) potenzia l'azione dell'antitrombina III ed è un anticoagulante
- 4) I coaguli già formati dalla fibrina sono rimossi dalla **plasmina**, serin proteasi, che degrada la fibrina

