



NORMAL  
ENZYME  
WORKING



ENZYME WITH  
ACTIVATOR  
HAS IMPROVED  
ABILITIES

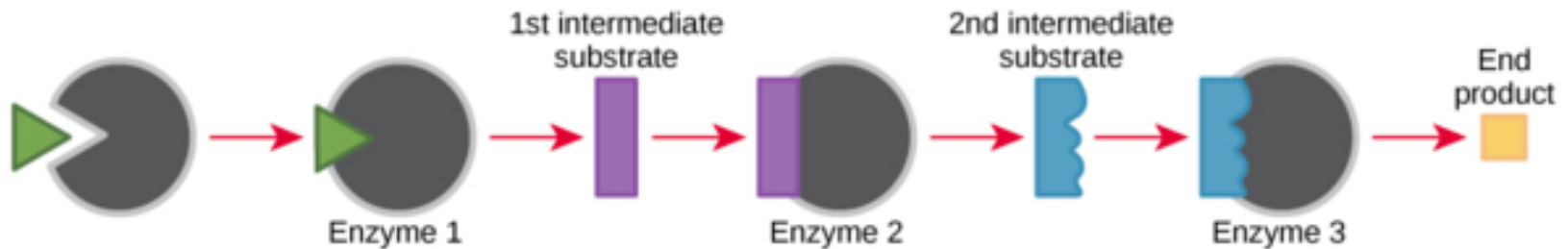
## Modulo 5

### La regolazione degli enzimi

CdS in Medicina e chirurgia ,  
Odontoiatria e protesi dentaria 2025-26

# Logica della Regolazione e Flusso Metabolico

Gli enzimi non catalizzano reazioni isolate, ma reazioni in successione, in cui il prodotto di un enzima diventa il substrato di quello successivo fino a giungere ad un prodotto finale (via metabolica) .



- In ogni via metabolica esiste almeno **un enzima regolatore** che catalizza **la tappa limitante** (la più lenta o la prima tappa irreversibile). Regolando questo enzima, la cellula controlla l'intero **flusso metabolico**.
- La regolazione del flusso metabolico permette di mantenere l'equilibrio interno nonostante le variazioni esterne, rispondendo alla domanda cellulare di energia (ATP) e precursori biosintetici.

# Gerarchia dei sistemi di regolazione

---

I vari meccanismi di regolazione operano su scale temporali differenti per garantire flessibilità e precisione:

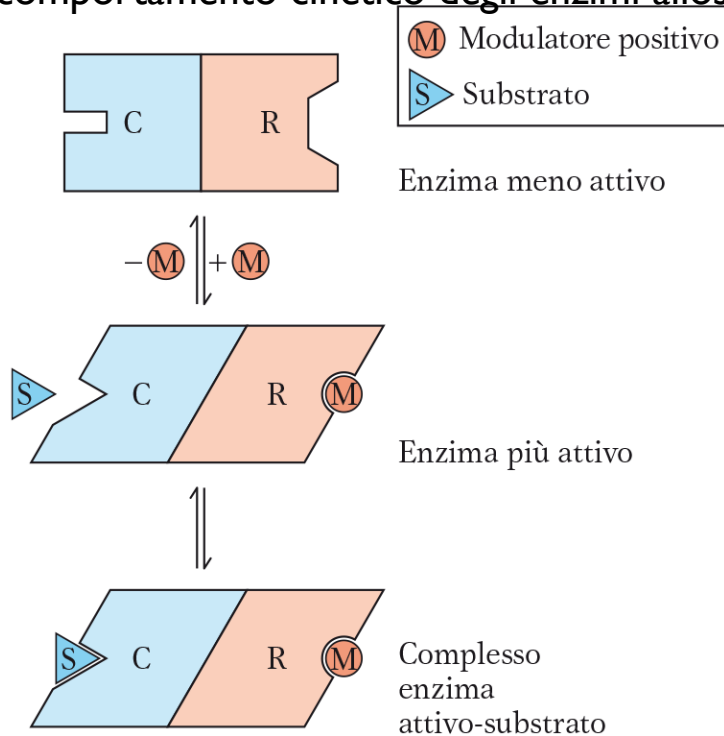
- 1) **Regolazione allosterica** ( $t =$  millisecondi): Risposta immediata a variazioni locali di metaboliti. Basata su interazioni non covalenti.
- 2) **Modifiche covalenti reversibili** ( $t =$  secondi/min): attacco e rimozione di specifici gruppi chimici (acceso/spento).
- 3) **Attivazione irreversibile (proteolisi)** ( $t =$  secondi/min): conversione di precursori inattivi proenzimi o zimogeni) in enzimi attivi tramite il taglio di legami peptidici
- 4) **Isoenzimi (isoforme)** ( $t =$  minuti/ore): espressione di enzimi omologhi con specifiche caratteristiche catalitiche ( $V_{max}$  e  $K_m$ ) e/o regolatorie, espressi in differenti tessuti o compartimenti cellulari o tempi differenti (stadi dello sviluppo).
- 5) **Controllo dell'espressione genica** ( $t =$  ore): Regolazione a lungo termine della quantità di enzima sintetizzato (induzione o repressione genica).



# Meccanismo del Controllo Allosterico

Gli enzimi allosterici sono le "centraline" della cellula.

Sono formati da 2 o più subunità (oligomeri). Il legame di un modulatore in una subunità si trasmette alle altre tramite variazioni conformazionali. Ogni subunità possiede un sito di legame (**sito catalitico**) (C) del substrato ed uno o più **siti regolatori** (siti allosterici) (R). Il comportamento cinetico degli enzimi allosterici non segue l'equazione di Michaelis-Menten.



Esempio di modulatore positivo

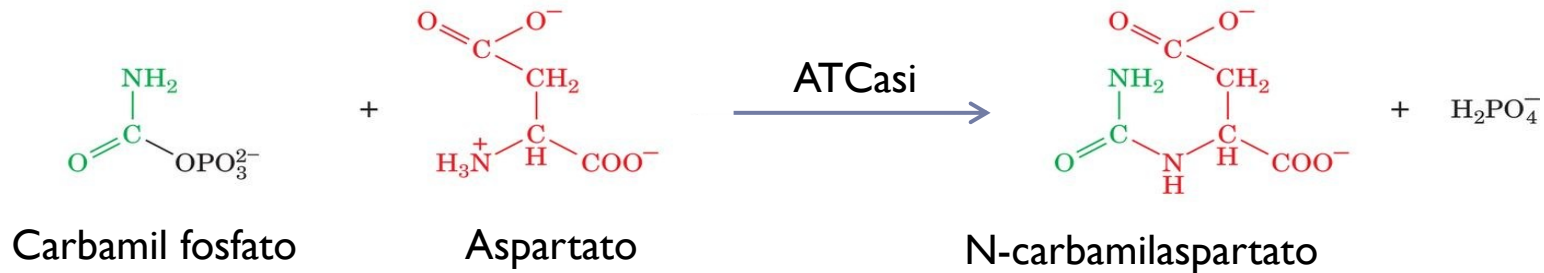
Regolazione avviene tramite il legame non covalente e reversibile di piccole molecole regolatrici **effettori allosterici (modulatori)**.

Il legame di un effettore al sito regolatore determina **un cambiamento conformazionale** della proteina che influenza l'attività del sito catalitico (positivamente o negativamente) delle altre subunità della proteina (**effetto cooperativo**).

Allontanato il regolatore l'enzima ritorna allo stato originale.

# Esempio di enzima regolatore: la aspartato transcarbammilasi (ATCasi)

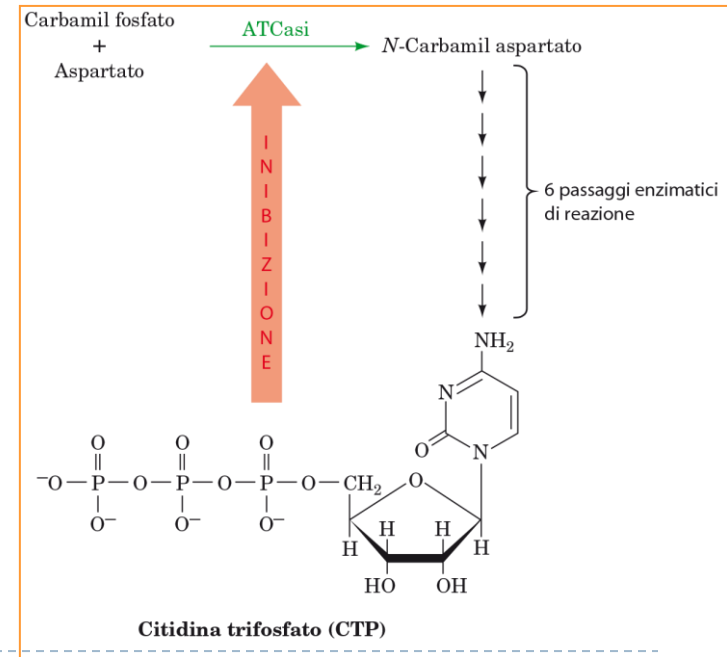
Esempio di enzima regolatore sottoposto a regolazione allosterica.



Catalizza la prima reazione della via di biosintesi dei nucleotidi pirimidinici. Forma N-carbamil aspartato a partire da carbamil fosfato e aspartato.

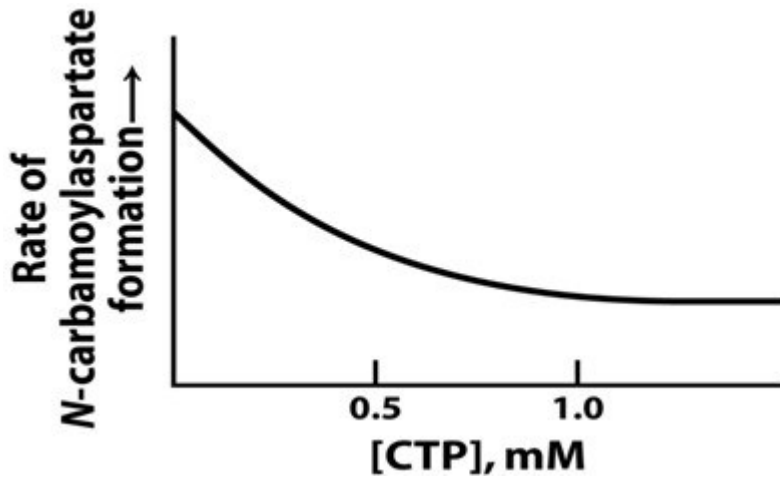
Il prodotto finale è il nucleoside trifosfato **citidina trifosfato (CTP)**.

Quando la concentrazione di CTP è elevata nella cellula determina una inibizione del primo enzima della via metabolica, la ATCase: **inibizione retroattiva o a feedback**.

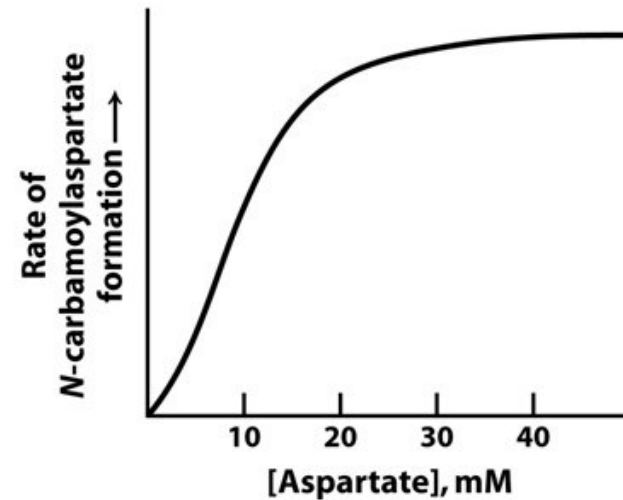


# Comportamento cinetico della ATCasi

---



La velocità di formazione del **N-Carbamilaspartato**, diminuisce all'aumentare del [CTP] quale regolatore negativo (inibitore allosterico)

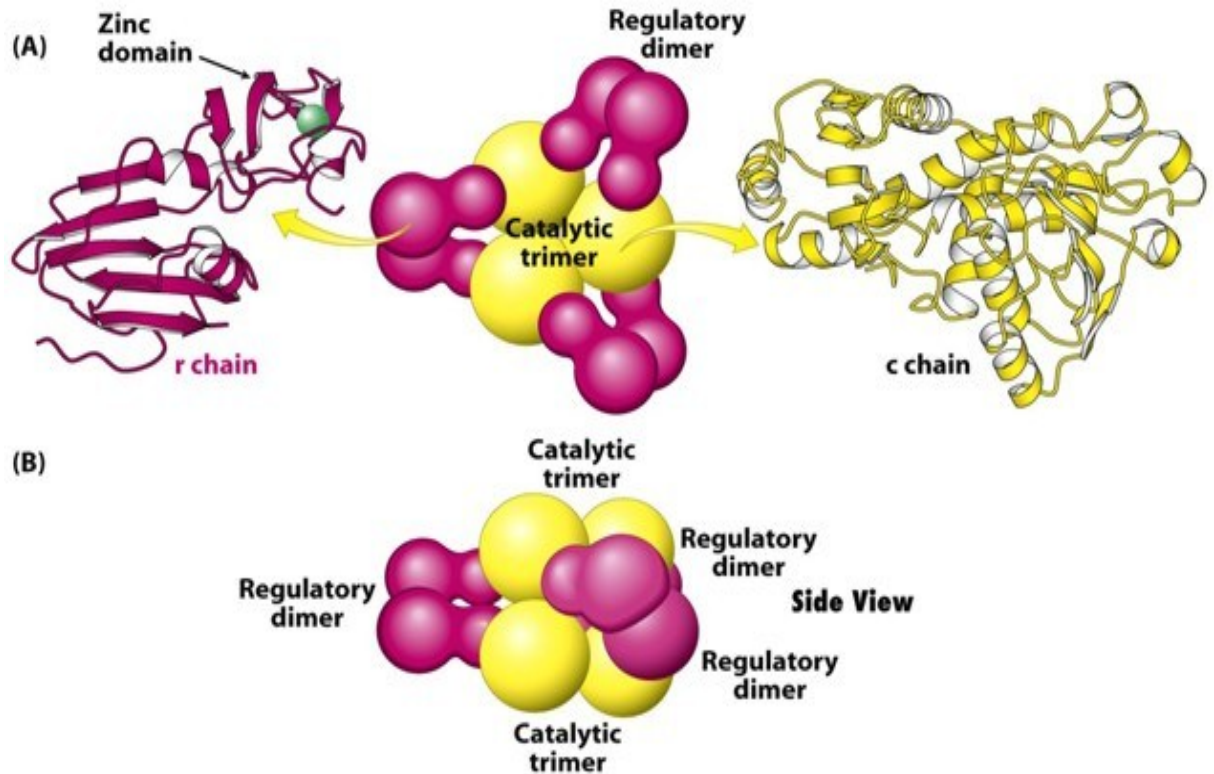


La ATCasi è un enzima con curva della V in funzione del substrato di tipo **curva sigmoidea**: non segue la cinetica secondo M&M.



# Struttura quaternaria dell'ATCasi

Struttura quaternaria: C6R6



6 subunità catalitiche (C)  
identiche tra loro: 2 x C3

6 subunità regolatorie (R)  
identiche tra loro: 3 x C2

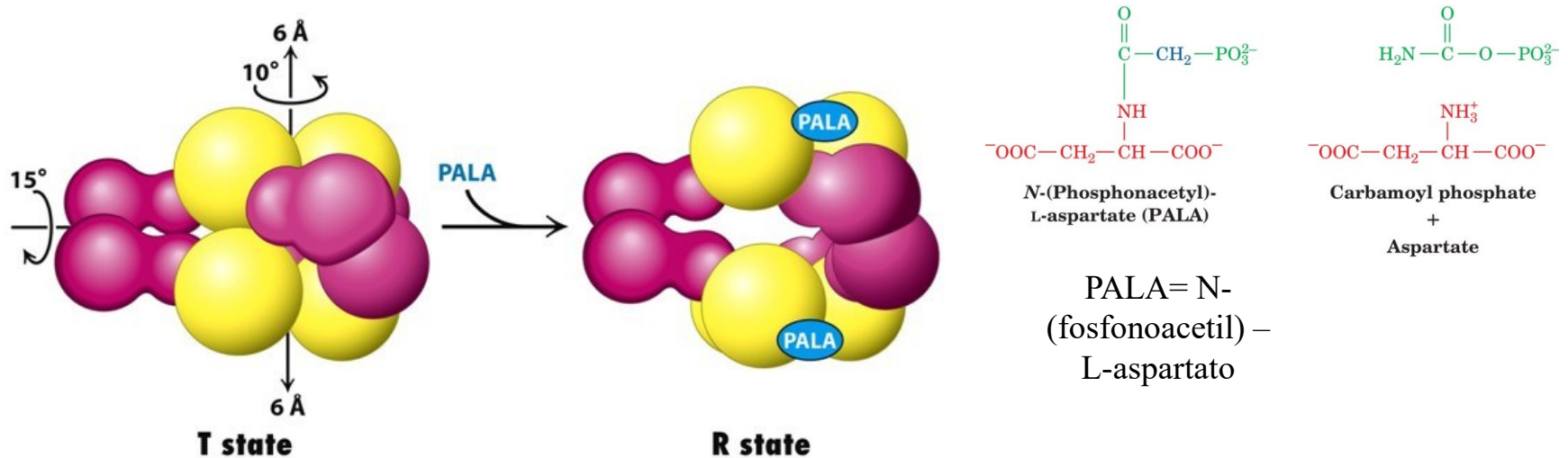
Alcuni trattamenti permettono di separare le subunità C dalle R

Solo Subunità C= mantengono attività catalitica su aspartato ma **non sono regolate da CTP**, seguono cinetica M&M.

Solo subunità R= non hanno attività catalitica, ma legano CTP

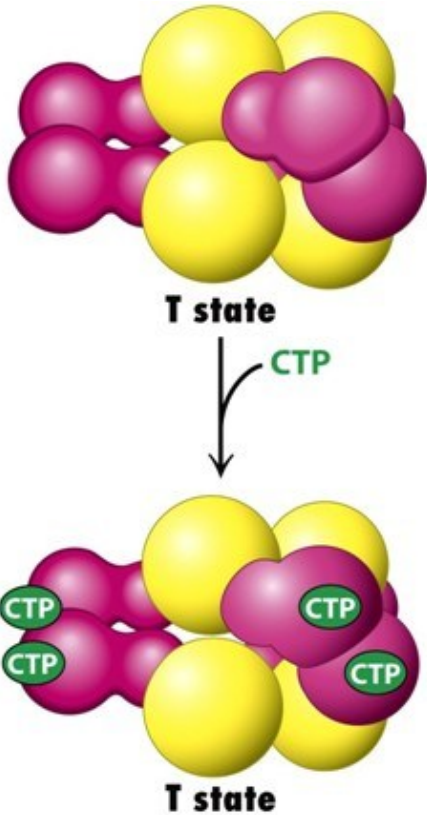
# Il legame ai substrati spinge verso la transizione tra conformazione T ad R nella ATCase

La ATCase si trova in equilibrio tra due conformazioni (stati) T ed R (simile all'Hb) (modello concertato).



L'utilizzo di un inibitore competitivo, **analogo del co-substrato** (PALA) ha permesso di stabilire che il suo legame all'enzima avviene solo allo stato R, e ciò sposta l'equilibrio verso la conformazione R a maggiore affinità per il substrato (cooperatività) dell'intera molecola (tutte le 6 subunità catalitiche). «Scatta» contemporaneamente una transizione dallo stato T allo stato R. Non esiste una via di mezzo: o l'intero complesso è in T o è in R.

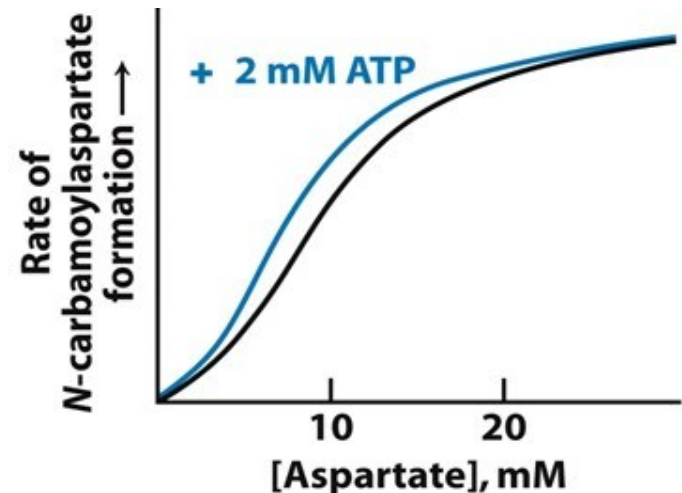
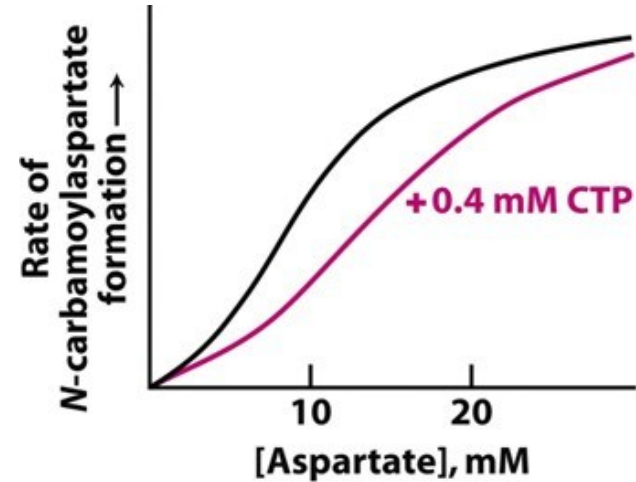
# I regolatori allosterici CTP e ATP modulano l'equilibrio tra forme T e forme R



La CTP si lega e stabilizza la conformazione T rendendo più difficile il legame al substrato (effettore eterotropico negativo)

L'ATP è anche un effettore eterotropico ma l'effetto è stimolatorio sulla ATCase. ATP aumenta la  $V_o$ . L'ATP compete con il CTP per il sito allosterico. E stabilizza lo stato R.

Significato: elevato ATP = metabolismo in salute, cellula sta crescendo, disponibilità di purine.



# Regolazione per modificazione covalente

Oltre che gli enzimi, questo modo di regolazione riguarda moltissime proteine.

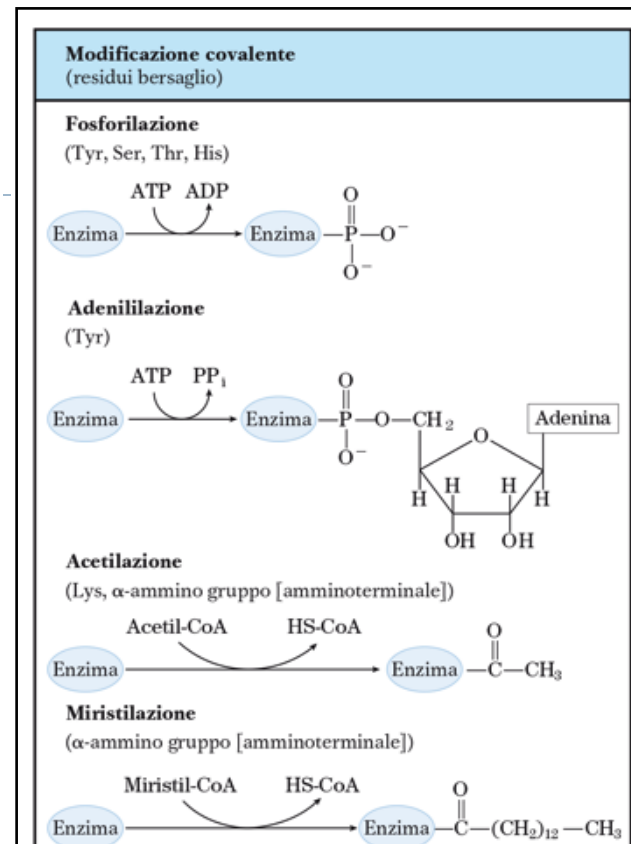
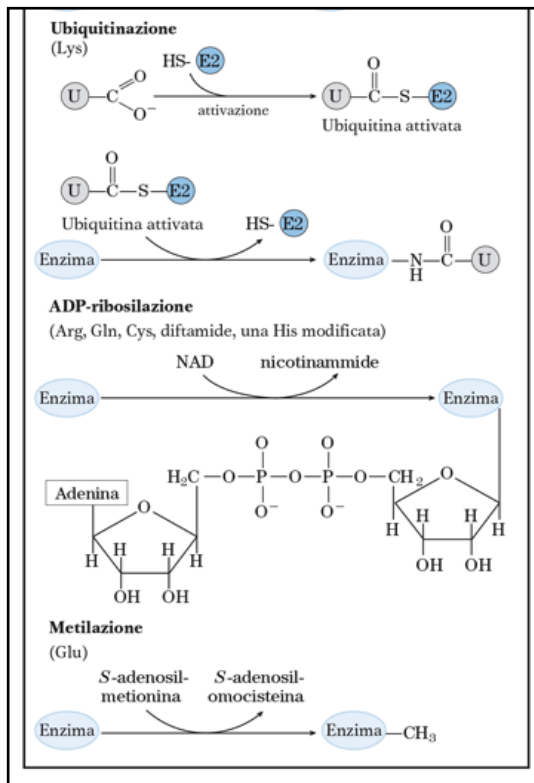
L'attività dell'enzima viene alterata reversibilmente dal legame covalente di **gruppi chimici modificanti** (+ di 500 diverse modificazioni note). Le modificazioni più comuni comprendono

• Modificazioni più comuni:

- la fosforilazione (fosfato),
- l'adenililazione (AMP),
- L'ADP-ribosilazione (ADP),
- la metilazione (metile).
- l'acetilazione (acetile),
- la miristilazione (acido grasso C<sub>14</sub> miristico),
- l'ubiquitinazione (proteina ubiquitina),

I gruppi chimici modificanti sono aggiunti **enzimaticamente** e rimossi da altri enzimi. L'effetto dell'aggiunta del gruppo alla proteina bersaglio può avere un effetto stimolatorio o inibitorio.

La modificazione covalente può modificare anche le proprietà allosteriche di molti enzimi.

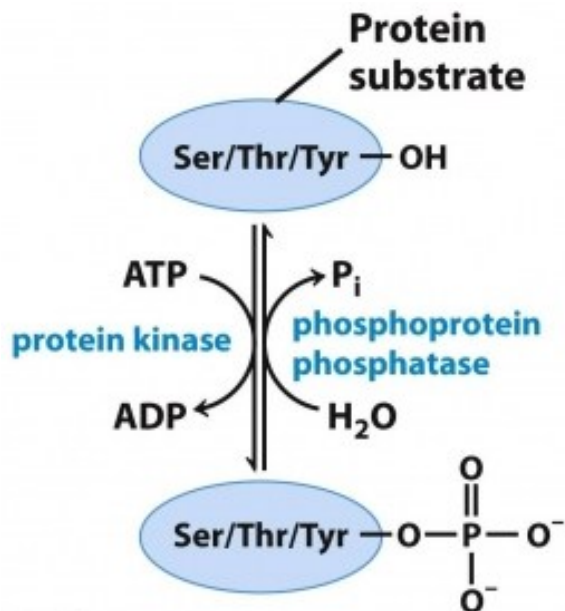


# Modificazione covalente delle proteine: la fosforilazione.

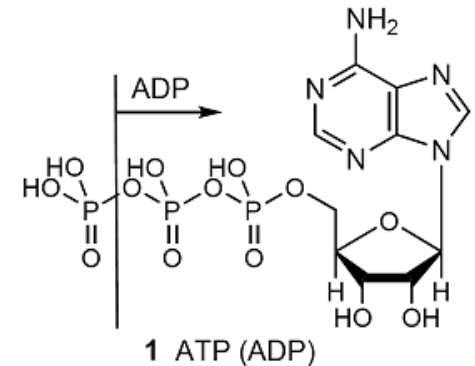
Il tipo di modificazione più largamente utilizzato: **fosforilazione** di un residuo amminoacidico. 25% delle proteine eucariotiche (non solo enzimi) sono fosforilate.

Enzimi fosforilanti: **protein chinasi**. Molto numerose.

I residui a.a. che vengono fosforilati sono: **Ser, Thr e Tyr** (gruppo funzionale = OH-) a seconda della chinasi coinvolta.



Molecola donatrice + comune: **ATP**, gruppo donato è **il fosfato** ( $\gamma$ ). Reazioni termodinamicamente irreversibili



Specificità: ogni protein chinasi riconosce il residuo all'interno di una sequenza "consensus" e lo fosforila. Es: **protein chinasi A** riconosce: Arg-Arg-X-**Ser/Thr**-Ile (X = residuo piccolo)

Enzimi defosforilanti: **(fosfo)protein fosfatasi**. Idrolasi catalizzano reazioni essenzialmente irreversibili.

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

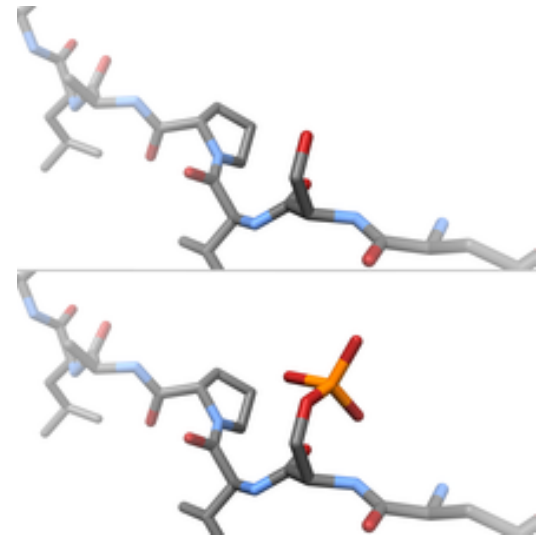
Proteine bersaglio passano ciclicamente da una forma fosforilata ad una non fosforilata.

# La fosforilazione degli enzimi (e proteine)

---

La fosforilazione è un mezzo efficace per modulare l'attività di proteine ed enzimi per questi motivi:

- ▶ L'aggiunta di un gruppo fosfato P **aumenta di 2 le cariche negative** e può formare fino a **3 legami H** con altrettanti donatori di H.
- ▶ La fosforilazione può determinare il **cambiamento conformazionale** e/o l'ingombro sterico con influenze sulla struttura.
- ▶ La fosforilazione e la defosforilazione avviene velocemente (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/e proteina/e bersaglio, che a loro volta potrebbe(ro) agire su altrettanti bersagli e produrre un **effetto a cascata**.

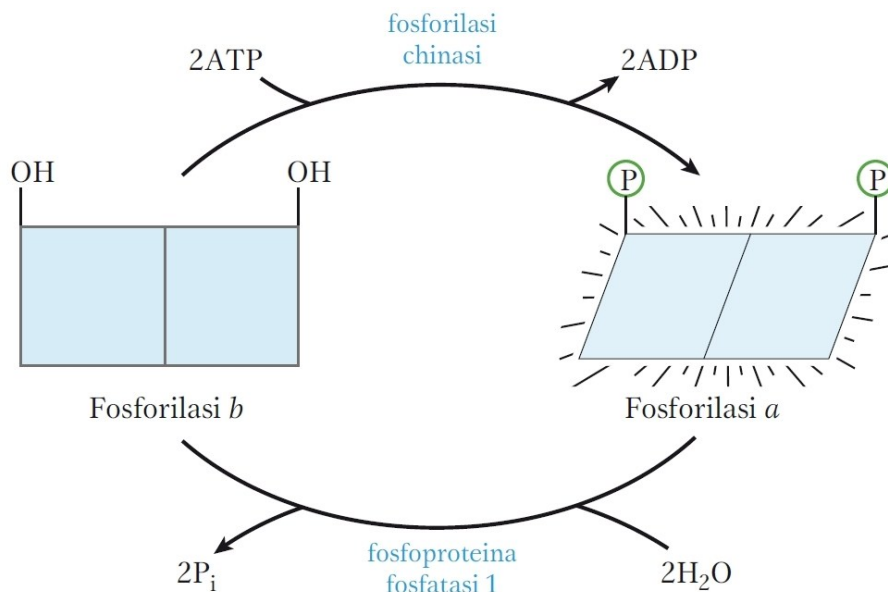


Tratto di polipeptide con una serina non fosforilata e fosforilata ( in basso)



# Esempio: fosforilazione della glicogeno fosforilasi muscolare

**La glicogeno fosforilasi** è un enzima dimerico: catalizza la seguente reazione di demolizione (degradazione) del glicogeno, polimero del glucosio:



Nella sua conformazione più attiva (**fosforilasi a**) presenta due residui di **Ser** fosforilati, uno per ciascuna subunità.

La perdita dei gruppi P ad opera della **fosfoproteina fosfatasi 1** converte la fosforilasi a in una proteina meno attiva (**fosforilasi b**). La riconversione in forma fosforilata avviene per mezzo della (glicogeno) **fosforilasi chinasi**.

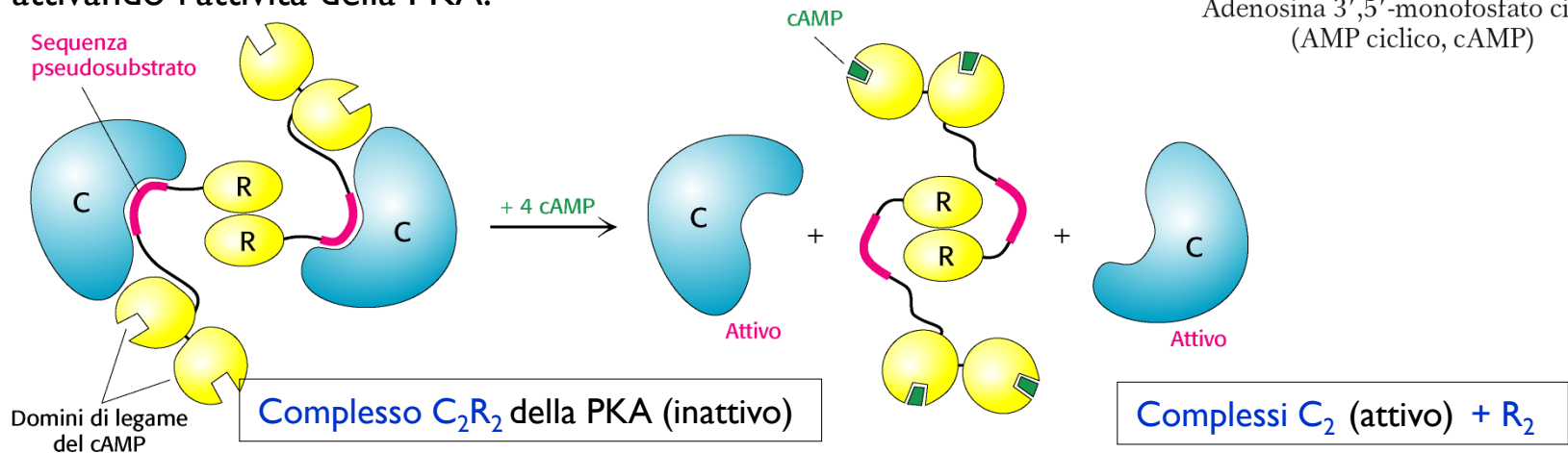
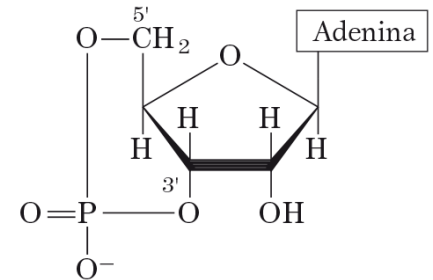
La demolizione del glicogeno nel fegato e nel muscolo dipende dal rapporto delle due forme a e b

# L'AMP ciclico attiva la proteina chinasi A (PKA) alterandone la struttura quaternaria

Esempio di integrazione tra controllo allosterico e fosforilazione.

**Protein chinasi A (PKA):** enzima allosterico, forma complesso tetramerico  $C_2R_2$  con C = subunità catalitiche, R = subunità regolatorie

La PKA inattiva viene attivata dal legame con il regolatore intracellulare **cAMP** che innesca allostericamente la dissociazione delle catene R dalle C attivando l'attività della PKA.



Le subunità C, quando attivate, fosforilano proteine substrato contenenti la sequenza: Arg-Arg-X-**Ser/thr**-Ile. Le subunità R contengono la **sequenza pseudosubstrato** Arg-Arg-Asn-**Ala**-Ile, un peptide inibitore che mima quella del substrato bloccandone l'attività. cAMP fa rilasciare le subunità R da C rendendole attive.

# Gli isoenzimi regolano l'attività enzimatica in diversi tessuti e durante lo sviluppo

**Isoenzimi** (isozimi): forme enzimatiche omologhe con variazioni nella sequenza (duplicazioni geniche e diversificazione) che catalizzano la medesima reazione. Le isoforme differiscono per  $K_M$ , per l'effetto di molecole regolatorie, cofattori, localizzazione tissutale.

Funzioni: regolazione del metabolismo in base al fabbisogno dei diversi tessuti o dello stadio di sviluppo.

Es.: **lattato deidrogenasi** (LDH). Presenti due isoforme: H e M (75% identità). Il tetramero dell' LDH può essere costituito dalle due isoforme in diverso rapporto.  $H_4$  presente nel **muscolo cardiaco** (heart) ,  $M_4$  nel **muscolo scheletrico** (muscle).

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
$H_4$	■	■	■	■	■	—	—
$H_3M$	■	■	■	■	■	—	—
$H_2M_2$	—	■	—	■	■	■	—
$HM_3$	—	—	—	—	■	—	—
$M_4$	—	—	—	—	—	■	■

Distribuzione delle forme H e M della LDH nel tempo e nello spazio nei diversi tessuti di ratto Mobilità elettroforetica

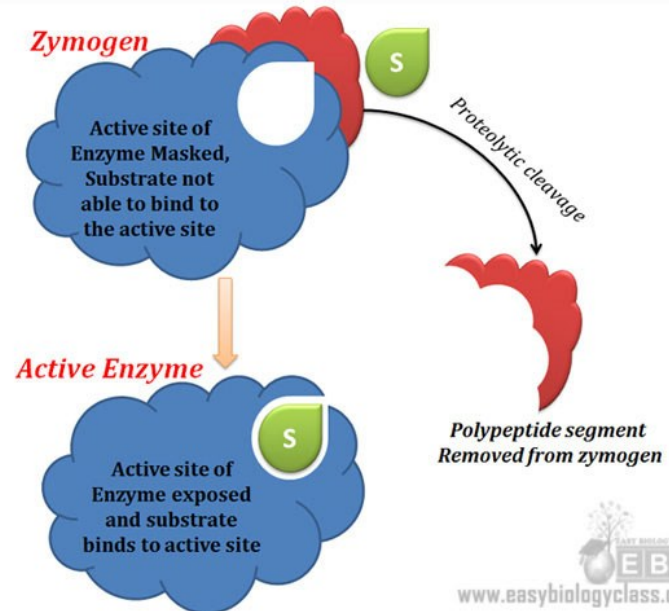
$M_4$  funziona meglio in ambiente con scarso  $O_2$ ,  $H_4$  al contrario. In presenza di  $O_2$ , Isoenzimi, se sono tessuto specifiche, hanno un **significato diagnostico**. Aumento  $H_4$  nel sangue: recente infarto al miocardio;  $M_4$ : epatiti. Falsi positivi

Altri esempi di isoenzimi: citocromo P-450, creatin chinasi, aspartato amminotrasferasi (ASP) citoplasmatica e mitocondriale; esochinasi del fegato (glucochinasi) e del muscolo.



# Attivazione enzimatica per proteolisi regolata

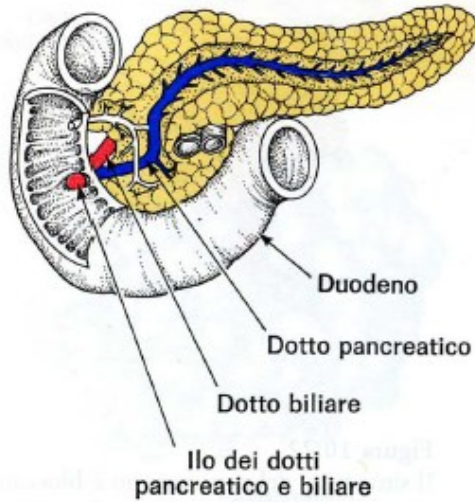
- ▶ Alcuni enzimi (e proteine) sono sintetizzati sotto forma di precursori inattivi (**proenzimi, zimogeni**) di dimensioni maggiori. Vengono resi attivi, in appropriate situazioni, attraverso rottura di specifici legami peptidici.
- ▶ L'**azione proteolitica** con la rottura di legami peptidici ad opera di specifiche **proteasi** permette la formazione definitiva del sito attivo a cui il substrato può legarsi.
- ▶ E' un tipo di **regolazione (attivazione) irreversibile** che avviene una sola volta.



**Zymogen Activation by Proteolytic Cleavage**

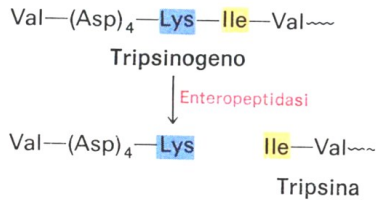
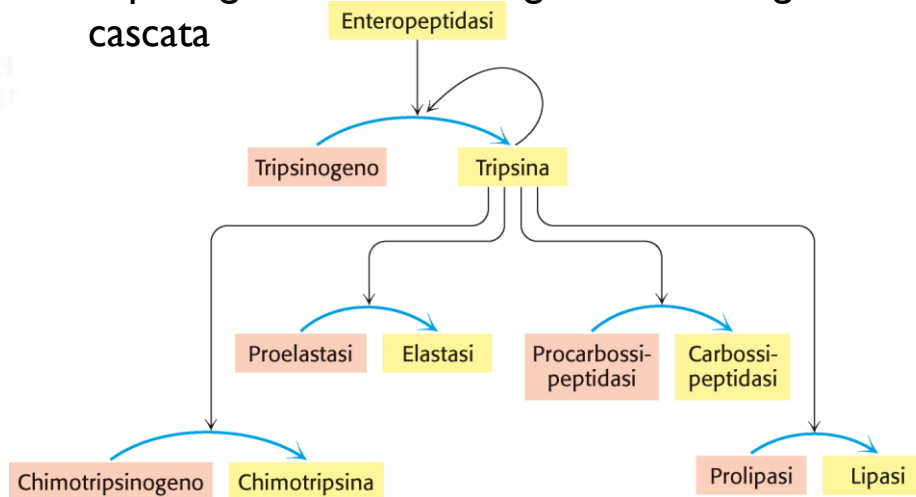
- ▶ Esempi:
- ▶ Attivazione di processi enzimatici complessi: azione coordinata di enzimi digestivi (tripsina, chimotripsina), innesco della coagulazione (cascata di proenzimi), attivazione della apoptosi (caspasi). Attivazione di proteine non enzimatiche: ormoni (proinsulina), collagene (procollagene).

# Le proteasi digestive si attivano a cascata e sono regolate da specifici inibitori proteici



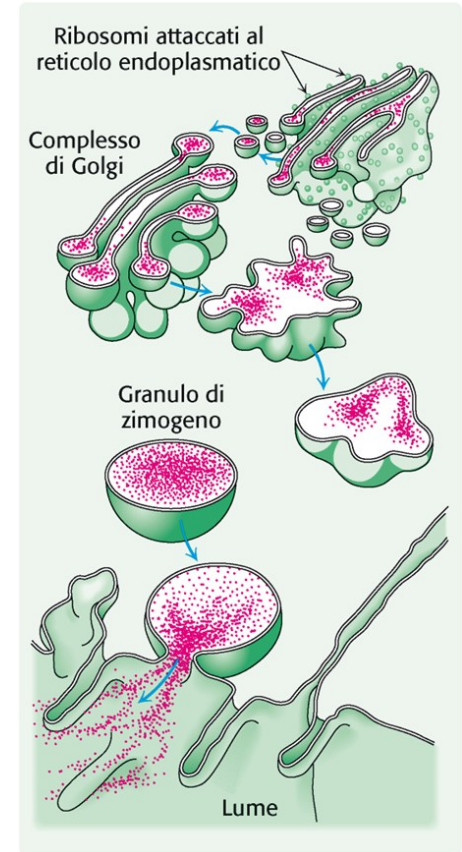
Attivazione coordinata di zimogeni digestivi mediante scissione proteolitica. L'enteropeptidasi (enterochinasi) è prodotta dalla mucosa del duodeno e rilasciata in risposta alla presenza di cibo e segnali ormonali.

L'enteropeptidasi attiva la tripsina dal tripsinogeno attivando gli altri zimogeni a cascata



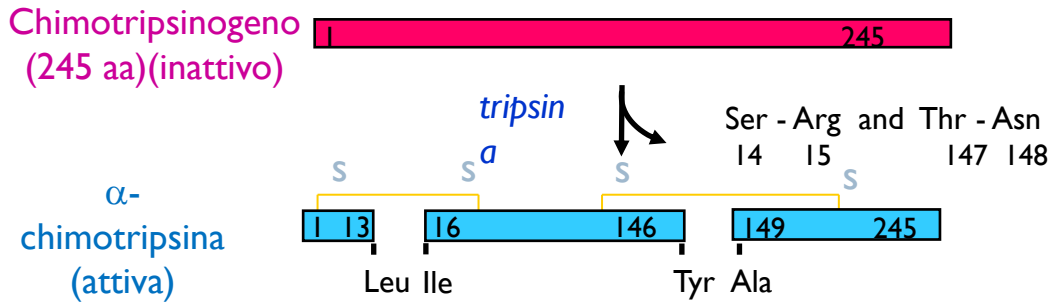
Attivazione della tripsina da parte della enteropeptidasi

Attivazione a cascata degli enzimi digestivi pancreatici dai loro proenzimi

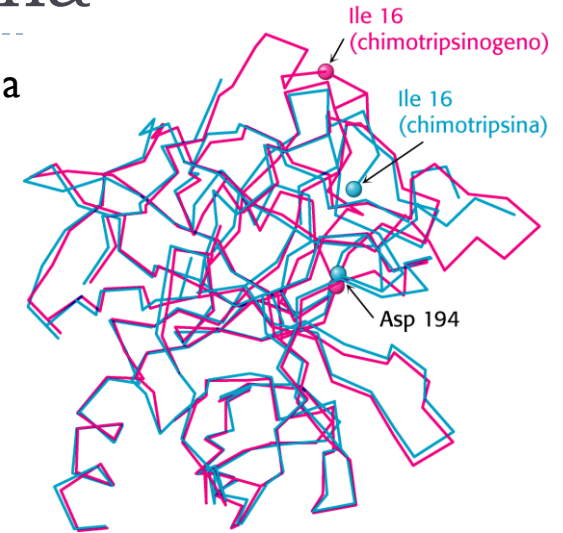


# Proteolisi del chimotripsinogeno genera il sito attivo della chimotripsina

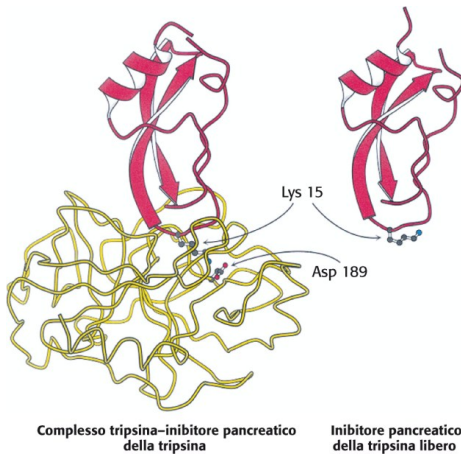
L'idrolisi di alcuni legami peptidici trasforma il zimogeno in enzima attivo:  $\alpha$ -chimotripsina.



Le tre catene risultanti sono unite da ponti S-S. Ile 16 si ripiega verso l'interno e dà inizio a modifiche che portano i residui 189-192 a formare una cavità idrofobica di legame del substrato.



Sovrapposizione delle strutture del chimotripsinogeno (rosso) e della chimotripsina (azzurro).



L'attività delle proteasi è regolata da specifici inibitori di natura proteica che ne limitano l'azione per evitare proteolisi incontrollate.

Es. L'inibitore pancreatico della tripsina (6kD) è un polipeptide che funge da analogo del substrato. Si lega alla tripsina con una affinità molto alta ( $K_d = 0,1 \text{ nM}$ ) formando un complesso inattivo stabile. L'inibitore agisce nel pancreas e nei dotti biliari prevenendo l'attivazione prematura che causerebbe l'autodigestione (pancreatite acuta).

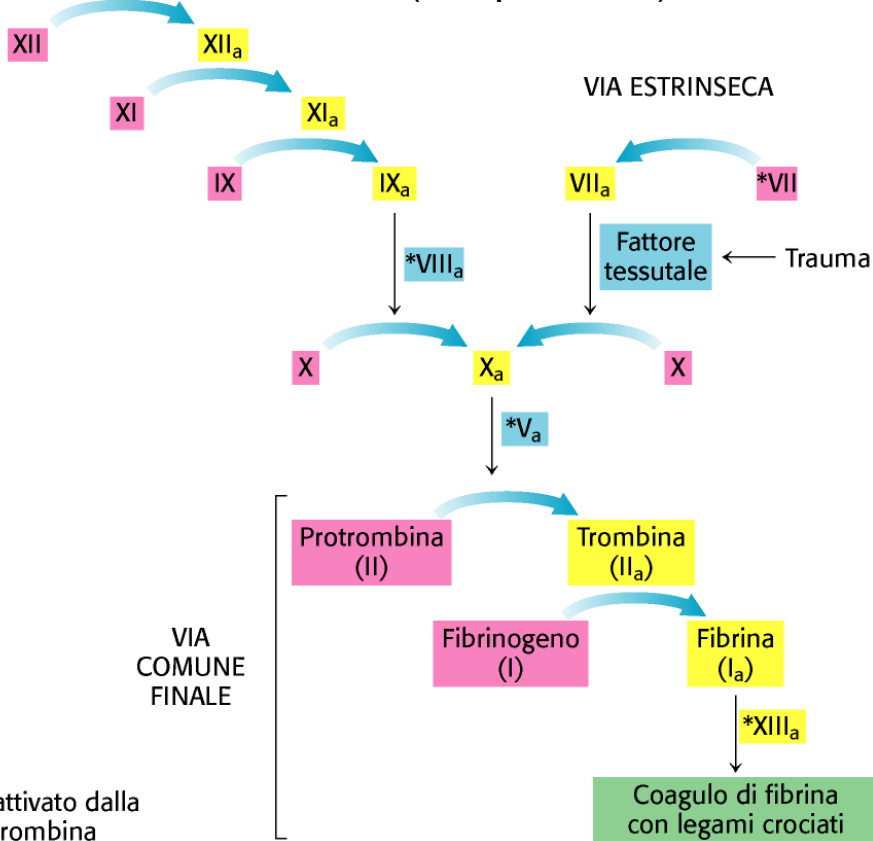
# La coagulazione si realizza tramite una cascata di attivazione di proenzimi

Cascate di attivazione enzimatica in successione sono impiegate nei processi biologici per ottenere risposte **rapide ed amplificate**. Esempio: **coagulazione del sangue**. Attivazione di risposte immunologiche (complemento).

VIA INTRINSECA

Superficie danneggiata

Chinogeno  
Callicreina



I coaguli ematici si formano per attivazione a cascata di **proenzimi** (in rosso) in enzimi attivi (in giallo). Ogni enzima attiva il successivo amplificando il segnale.

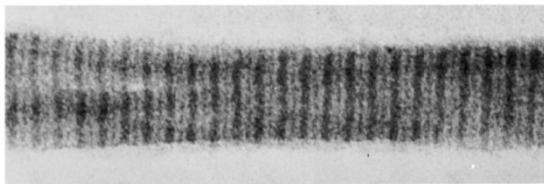
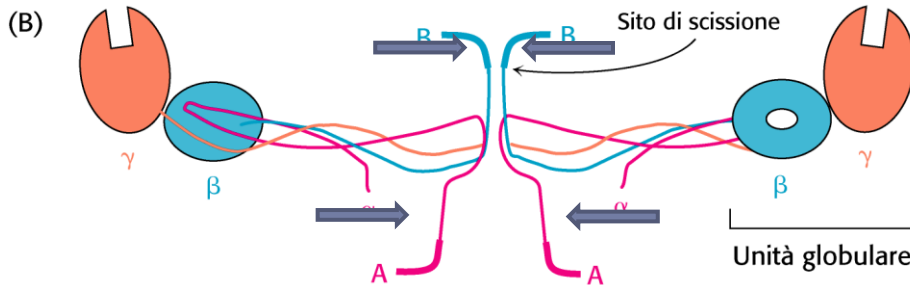
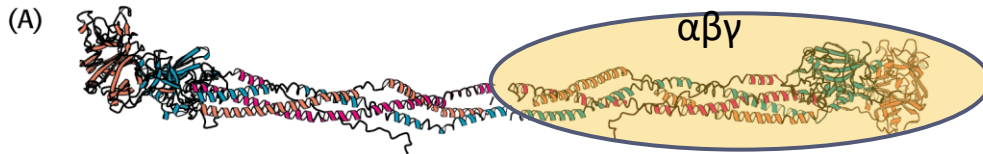
La **fibrina** ottenuta dal processamento del fibrinogeno (proteina) da parte della **trombina** (serin proteasi) forma il coagulo iniziale che si stabilizza successivamente attraverso legami crociati (fattore XIII transglutamminasi).

\* = attivato dalla trombina

# Il fibrinogeno viene convertito dalla trombina in coaguli di fibrina

Struttura del **fibrinogeno** (340kDa) è un dimero dell'eterotrimerico  $\alpha\beta\gamma$ .

Attivazione in 3 fasi:

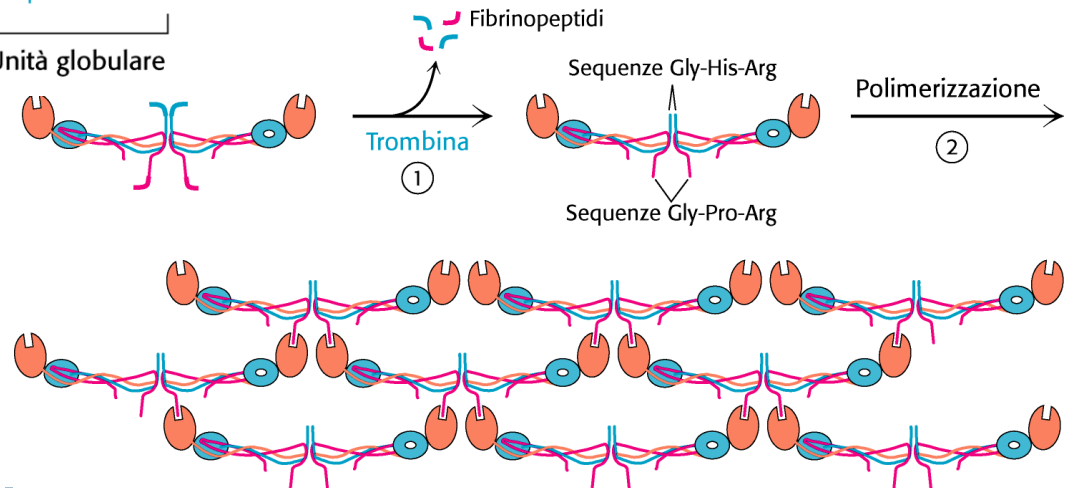


Aggregazione della **fibrina** con periodo 23 nm in un coagulo

1. La **trombina** spezza 4 legami Arg-Gly nella regione centrale del fibrinogeno delle subunità  $\alpha$  e  $\beta$  rilasciando i frammenti peptidici N-terminali A e B (fibrinopeptidi) e la **fibrina**  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ .

2. I nuovi N-terminali creati dalla trombina sono esposti della fibrina si incastrano perfettamente ai domini globulari delle subunità  $\gamma$  formando polimeri.

3. Si formano legami crociati per azine dell'enzima Fattore XIIIa



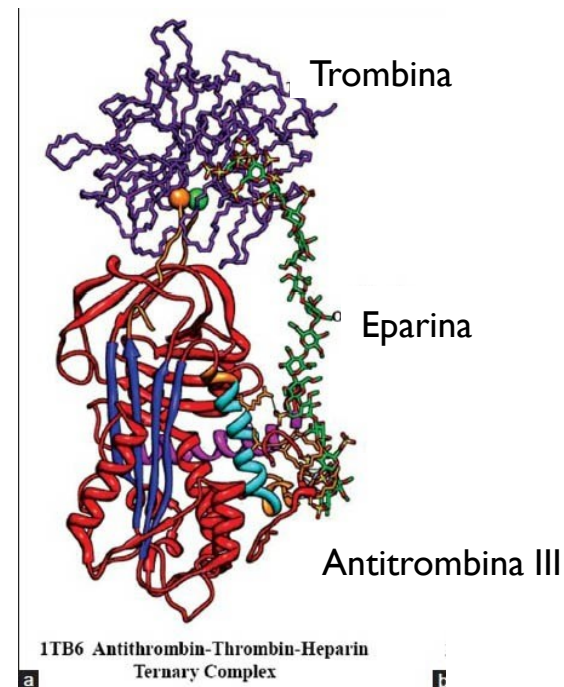
# Equilibrio emostatico e fibrinolisi

Il sistema deve operare lungo una sottile linea di demarcazione tra **emorragia** e **trombosi**.

La coagulazione viene limitata con vari meccanismi per evitare occlusioni vascolari:

- 1) labilità dei fattori della coagulazione (es. proteina C attivata dalla trombina degrada vari fattori).
- 2) Inibitori proteici. **L'antitrombina III** (meccanismo simile ad  $\alpha$ 1-antitripsina) inibisce la trombina ma anche altre proteasi.
- 3) **Eparina**, eteropolisaccaride carico negativamente, anticoagulante che potenzia l'azione dell'antitrombina III.

**Dissoluzione del coagulo:** una volta riparato il danno tissutale, la rete di fibrina viene rimossa dalla **plasmina**, una serin proteasi che viene attivata dal suo zimogeno, il **plasminogeno**.



Il plasminogeno viene convertito in plasmina per azione del **t-PA** (attivatore del plasminogeno) una proteasi che entra in azione solo quando lega direttamente i coaguli di fibrina, assicurando che la plasmina entra in funzione solo quando ci sono coaguli.