

Modulo A4

Regolazione degli enzimi metabolici ed integrazione del metabolismo



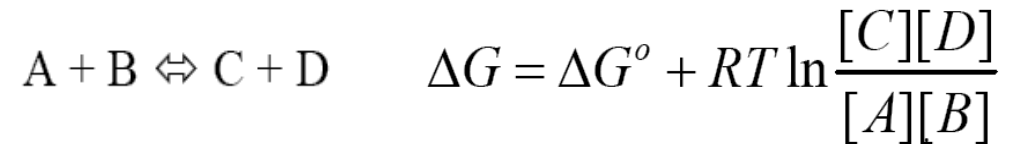
Modulo A4_A

Regolazione degli enzimi metabolici

2023-24

Diverse forme di regolazione enzimatica

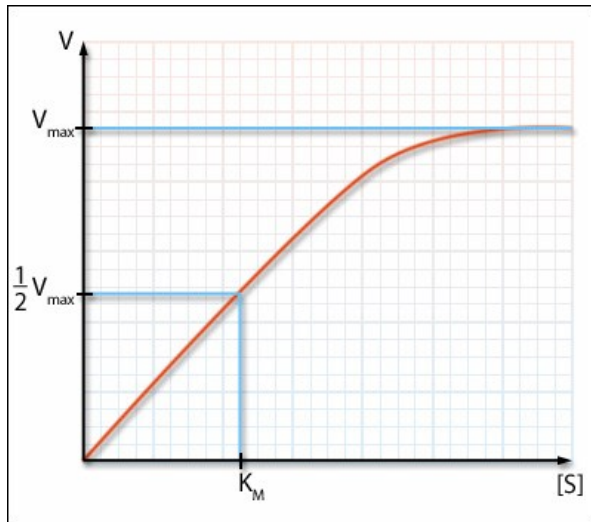
- ▶ Gli enzimi non alterano l'equilibrio delle reazioni che catalizzano ma alterano la velocità con la quale è raggiunto



- ▶ Diversi fattori ne regolano l'attività:

- 1) controllo da substrato
 - equazione di Michaelis/Menten e di Hill
- 2) controllo dell'espressione
 - variazione nella quantità di enzima
- 3) controllo allosterico
 - sensori molecolari per l'ambiente chimico
- 4) interazione con proteine regolatorie
 - regolatori attivanti o disattivanti/sequestranti
- 5) modificazioni covalenti reversibili
 - fosforilazione, metilazione, altre
- 6) modificazioni covalenti irreversibili
 - attivazione di zimogeni / degradazione
- 7) compartimentazione
 - isozimi in diversi comparti/tessuti
 - diversa regolazione in diversi tessuti

1) Controllo da substrato



► Equazione di Michaelis e Menten 4 variabili

$$v_1 = \frac{V_{\max}[S]}{\{K_m + [S]\}} \longrightarrow v = \frac{k_{\text{cat}}[E]_o[S]}{K_m + [S]}$$

- 4 variabili: K_M , k_{cat} , $[E]$ e $[S]$

K_M descrive l'interazione substrato-enzima, a livello del sito di legame

- valore di $[S]$ al quale **50% dei siti sono occupati** e $v = \frac{1}{2} V_{\max}$

- è una misura di **quanto strettamente** l'enzima lega il substrato

- tanto maggiore sarà il valore di K_M , tanto più debole è l'interazione tra S ed E tanto più S serve per una funzione efficiente

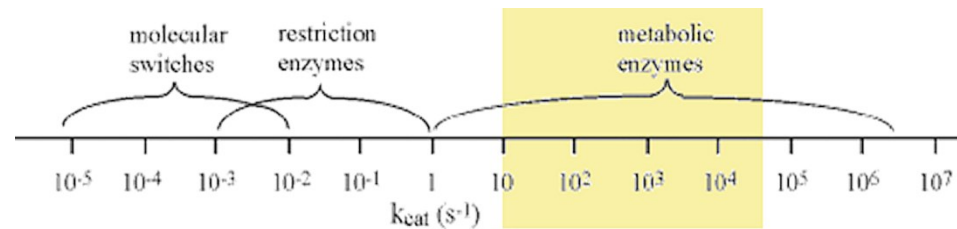
k_{cat} è il numero di turnover (molecole di S convertite per sito catalitico per unità di tempo)

Normale arco di valori per enzimi metabolici:

$[E] = 0.1\text{--}100 \mu\text{M}$;

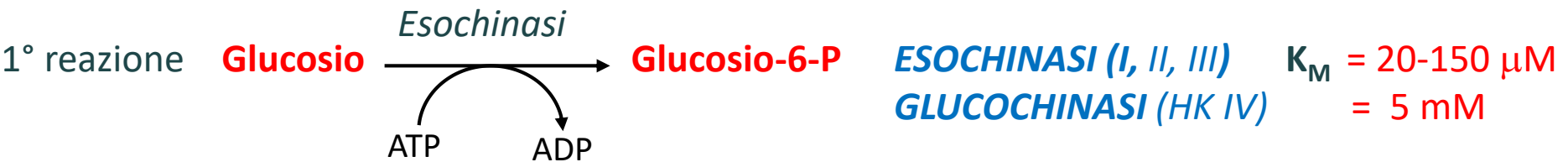
$k_{\text{cat}} = 10\text{--}10^4 \text{ molecole s}^{-1}$

$[S] 0.1\text{--}2 \text{ mM} \rightarrow K_m 50\mu\text{M}\text{--}1\text{mM}$;



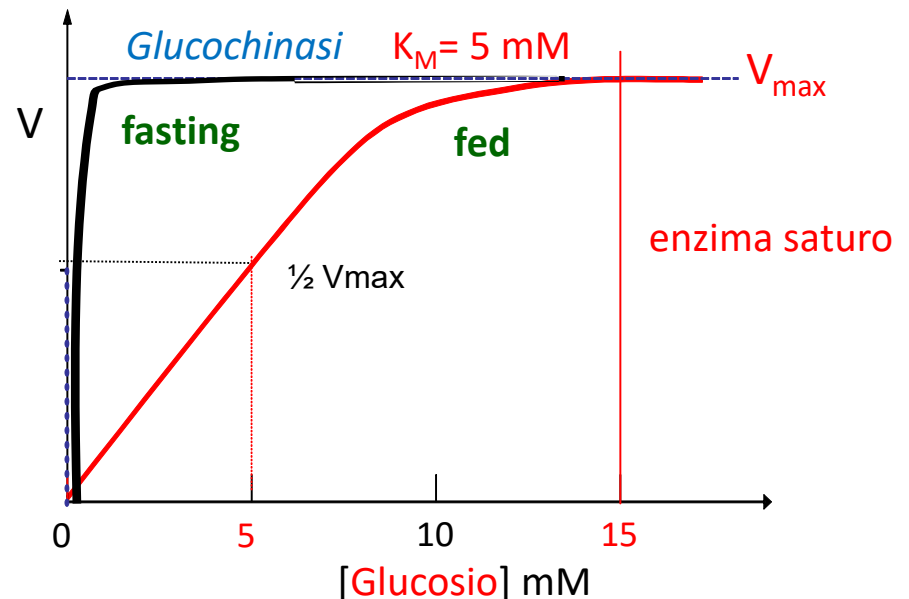
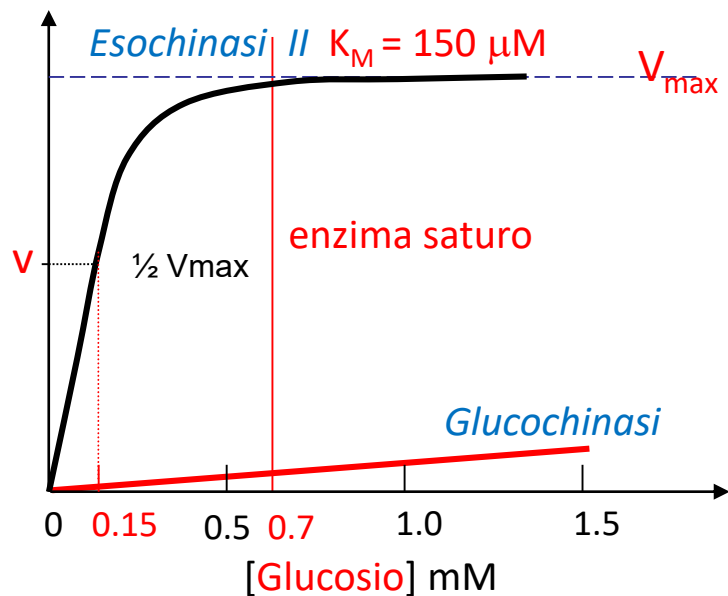
1) Controllo da substrato – esempio nella Glicolisi epatica

- **Esochinasasi e Glucochinasasi** - stessa reazione, diverso K_M



- il legame del glucosio alla **Glucochinasi** è 30 - 250 volte più debole di quello alle altre **Esochinasi**

- **Motivi per l'esistenza di isozimi** – hanno diverse caratteristiche catalitiche/regolatorie
 - si adattano a particolari ruoli metabolici
 - espressione selettiva e differenziata in diversi tessuti
 - sequenze segnale dirette a diversi compartimenti



2) Controllo Genico (espressione/concentrazione dell'enzima)

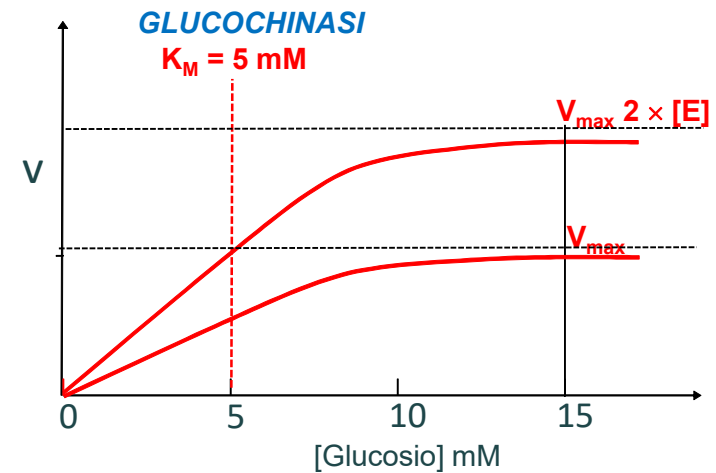
► Controllo mediante switch trascrizionali

- attivazione/inattivazione di **fattori di trascrizione** che agiscono su promotori dei geni per enzimi controllati
- variazione trascrizione → **variazione traduzione** - livelli variano relativamente lentamente (10^e min – ore)
- **processo reversibile**

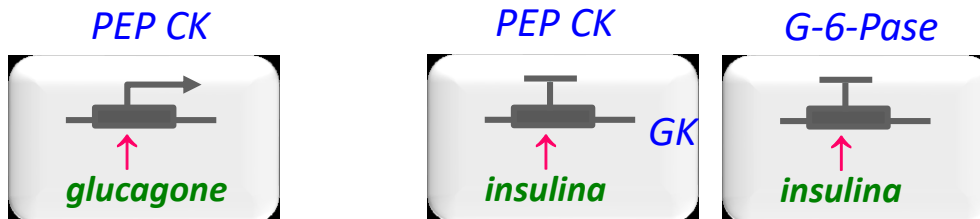
► Esempi nella glicolisi – *la Glucochinasi*

- l'**insulina** stimola la trascrizione di circa 20 volte in 30 min
- Il K_M dell'enzima è ovviamente invariato, ma se raddoppia [E] raddoppia V_{max}
- Il **glucagone** invece sopprime la trascrizione

Glucokinase

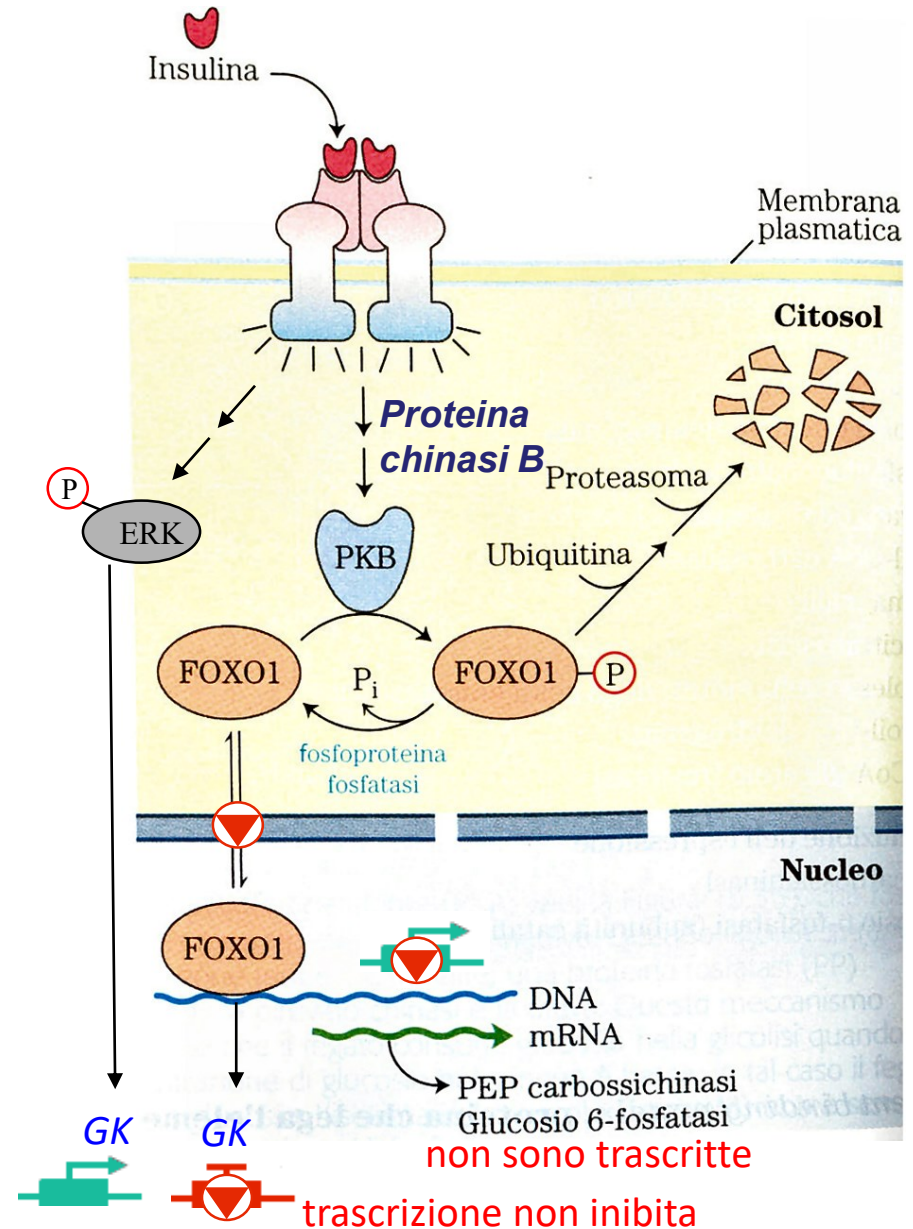
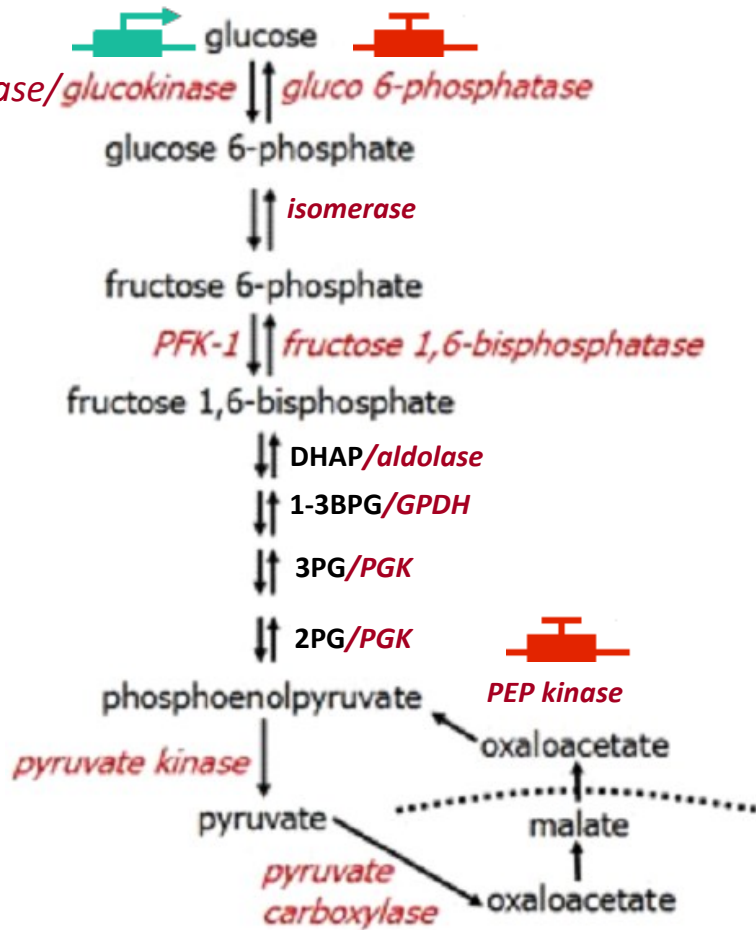


► Esempi nella gluconeogenesi – *PEP carbossichinasi e Glucosio-6-fosfatasi*



2) Controllo Genico (cont.)

- Insulina ha effetti opposti sull'espressione di enzimi catabolici ed anabolici

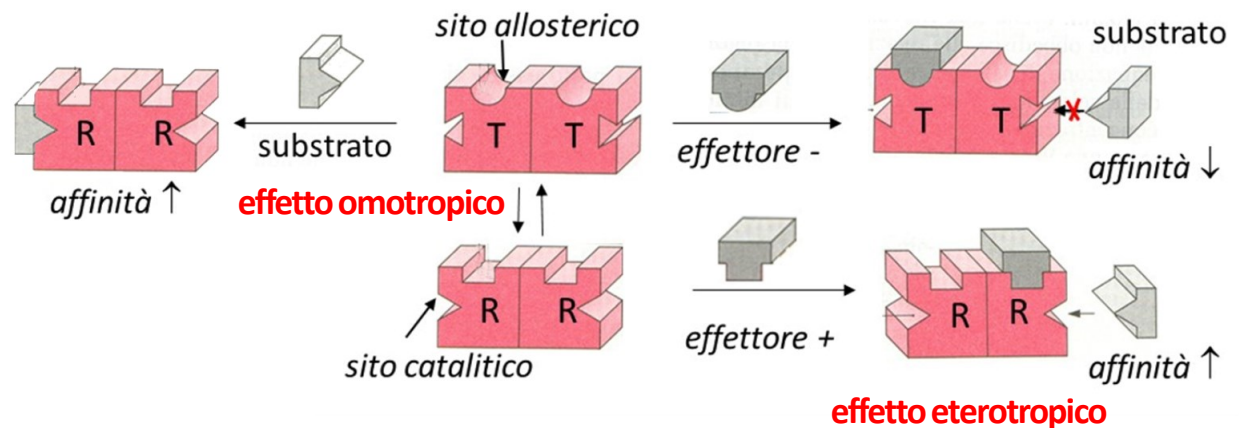


3) Controllo allosterico

- ▶ **Allosterismo: alterazione strutturale** e quindi **funzionale** del sito catalitico (**attivazione/disattivazione**)
 - **omotropico**: causato dall'interazione di una molecola di substrato con uno dei siti catalitici in un enzima oligomero, che attiva gli altri siti catalitici
 - **eterotropico** causata dall'interazione di molecola (effettore) **diversa dal substrato** con un sito allosterico **diverso da quello catalitico** (*allos* = *altro*)
 - gli enzimi allosterici hanno spesso una **struttura 4^a (oligomero)** o **multi-dominio**
 - effetto **istantaneo**: i siti allosterici sono **sensori per l'ambiente chimico**

▶ Forme Tese (T) e Rilassate (R)

- variazione conformazionale da una forma **Tesa (meno attiva)** a una forma **Rilassata (più attiva)**



▶ Esempio nella glicolisi:

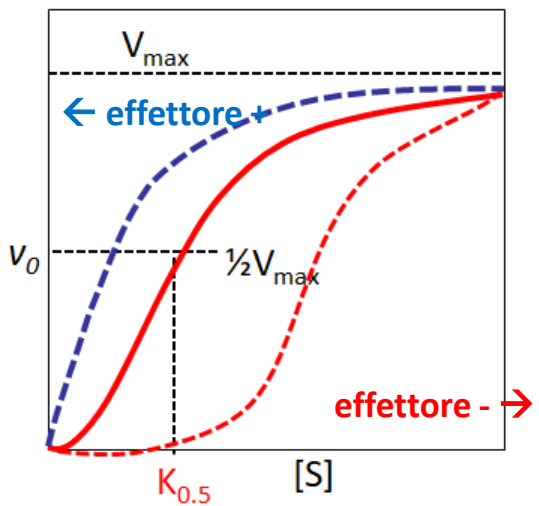
- la **glucochinasi (HK IV)** ha **un solo dominio** e **non è allosterica**
- l'**esochinasi I (HK I)** ha **due domini**, per duplicazione di un gene ancestrale simile a quello della **GK**; **uno è catalitico** per il glucosio (substrato), **l'altro è allosterico** per **G-6-P** (effettore allosterico)
- forma di **regolazione a feedback** dal prodotto stesso (evita saturazione della via a valle)

Enzimi allosterici

Cinetica

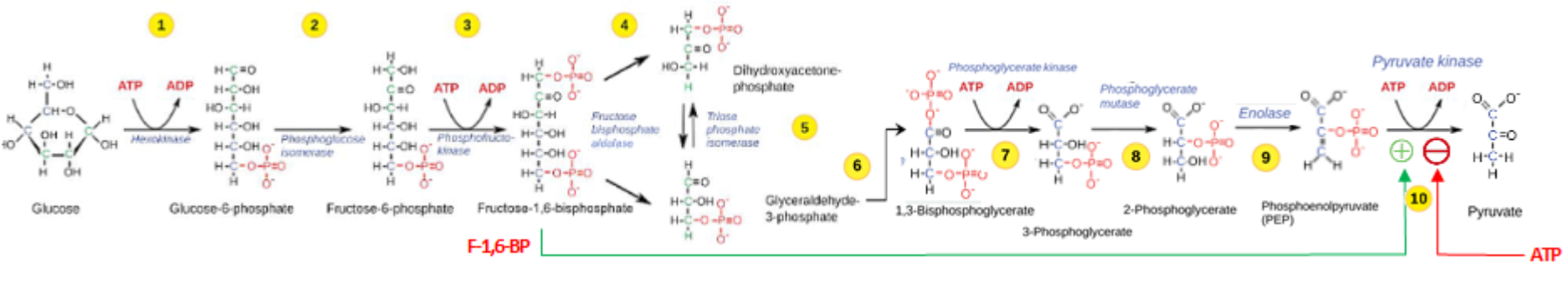
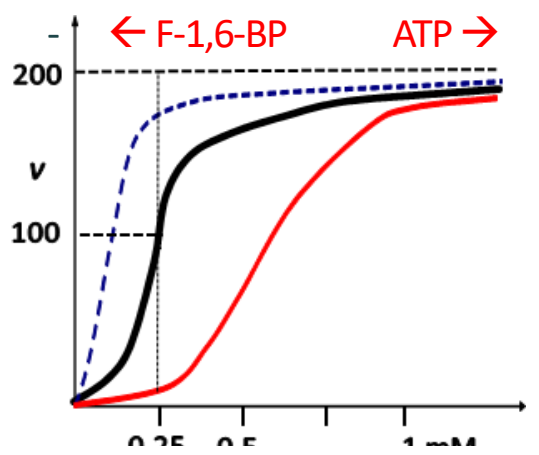
- enzimi con più siti catalitici (**allosterismo omotropico**) non seguono la cinetica M-M
- la dipendenza della velocità di catalisi (v) su $[S]$ non è iperbolica ma sigmoide (cooperatività)
- effettori eterotropici spostano la curva rendendo l'enzima più o meno efficiente
- la cinetica è descritta dall'equazione di Hill
dove $K_M \rightarrow K_{0.5}$ $n \sim N^\circ$ siti di legame
 L = ligando (vale non solo per enzimi ma anche trasportatori e recettori)

$$v = \frac{V_{\max} [L]^n}{K_{0.5}^n + [L]^n}$$



Esempio nella glicolisi Piruvato Chinasi

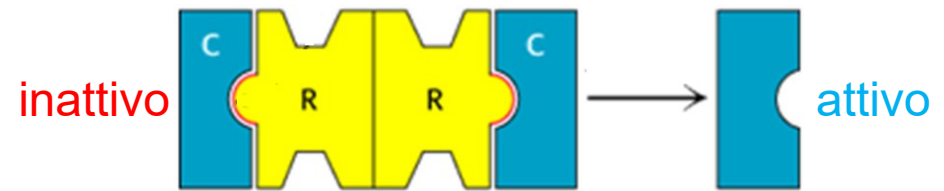
- effettore allosterico + **fruttosio-1,6-P** (abbondante materia prima)
- effettore allosterico - **ATP** (abbondante energia)
- controllo a **feed-forward** e **feed-back**



4) Interazione con altre proteine

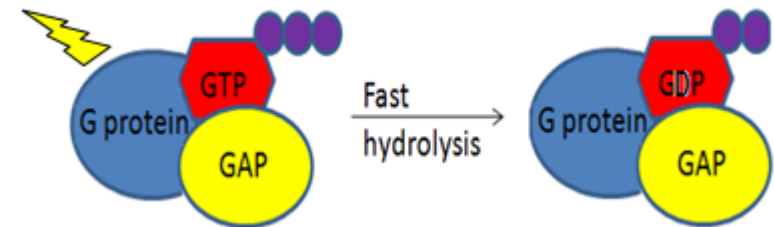
► Inibizione: *Proteina chinasi A*

- la subunità regolatoria della *PKA* la inibisce fintanto che non è rimossa da **cAMP**



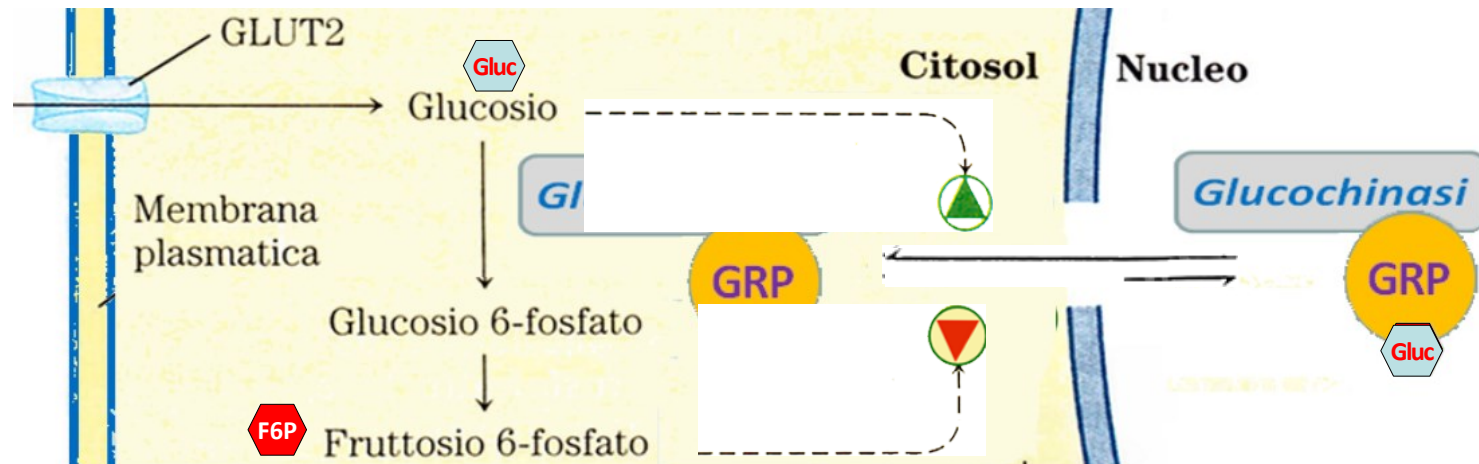
► Attivazione: *Proteina G_α/Ras* e **GAP**

- le *Proteina G_α* hanno una cinetica di idrolisi lenta ma che è modulata dalle *GTPase activating proteins (GAP)*



► Sequestro : *Glucokinase (HK IV)* regulatory protein (**GRP**)

- Glicolisi epatica in saturazione **F6P** ↑ attiva **GRP** per legare *HK IV*
- **GK/GRP/F6P** trasloca al nucleo, e la Glicolisi adesso utilizza *HK I* o *II* (saturabili e regolabili)
- se **Gluc** ↑ spiazza **F6P** da **GRP**, che si stacca dalla *Glucokinasi*, che ritorna nel citoplasma



5) Modificazioni covalenti reversibili

► FOSFORILAZIONE

- forma di regolazione **veloce** (millesec. – sec.) determinata da segnali esterni:
es. **Adrenalina** → GPCR → **Adenilato ciclasi** → cAMP → **Proteina chinasi A**
- usata per regolare **attività enzimatica**, **emivita enzima** (es. degradazione), **interazione con altre proteine** (recognition domains), **localizzazione cellulare** (es. traslocazione citoplasma/nucleo)
- **reversibile**: legame **fosfoestere** formato per condensazione tra fosfato (fornito da ATP o GTP) e l'ossidrile su residui Ser, Thr o Tyr nell'enzima regolato da parte di specifiche **chinasi** e rimosso per idrolisi da specifiche **fosfatasi**

es. **Chinasi**

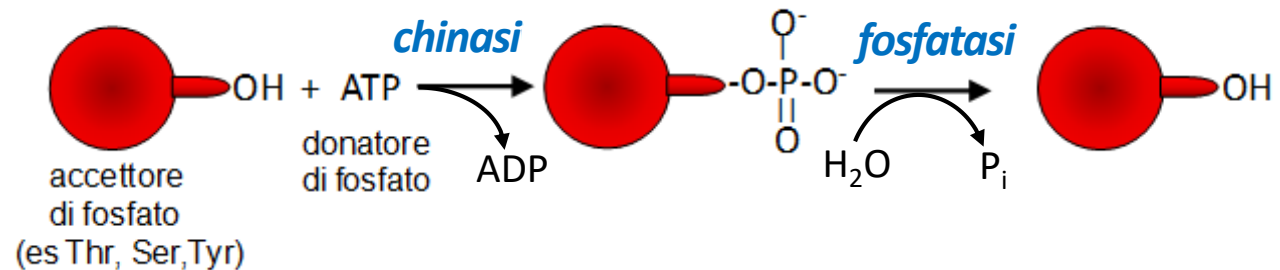
PKA

PKB

PKC

CamK

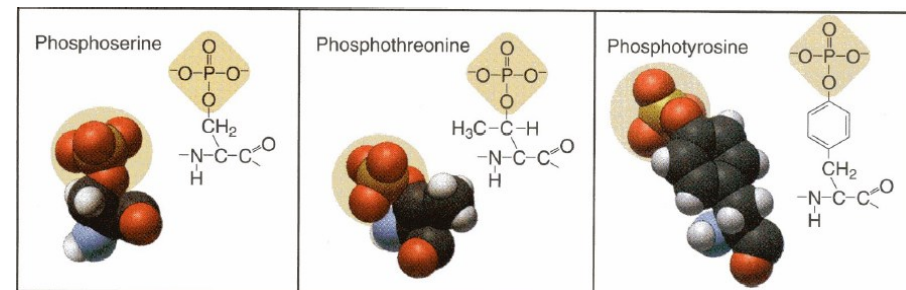
AmpK



es. **Fosfatasi**

PP1

Ser > Thr > Tyr



► Chinasi multifunzionali e dedicate

- alcune **proteina chinasi (PK)** sono **multifunzionali** – agiscono su molte proteine bersaglio (es. *PKA*, *PKB* ecc.), altre **proteina chinasi** invece sono DEDICATE; hanno una precisa proteina bersaglio

Specificità delle Proteina chinasi

► Le *chinasi* agiscono su residui Y o S/T in specifici siti di fosforilazione nelle proteine bersaglio

Selettività di alcune *chinasi*

Protein kinase	Consensus sequence*
Protein kinase A	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-X-
Protein kinase G	-X-(R/K) ₂₋₃ -X-(S/T)-X-
Protein kinase C	-X-(R/K ₁₋₃ , X ₀₋₂)-(S/T)-(X ₀₋₂ , R/K ₁₋₃)-
Ca ²⁺ /calmodulin kinase II	-X-R-X-X-(S/T)-X-
Phosphorylase <i>b</i> kinase	-K-R-K-Q-I-(S/T)-V-R-

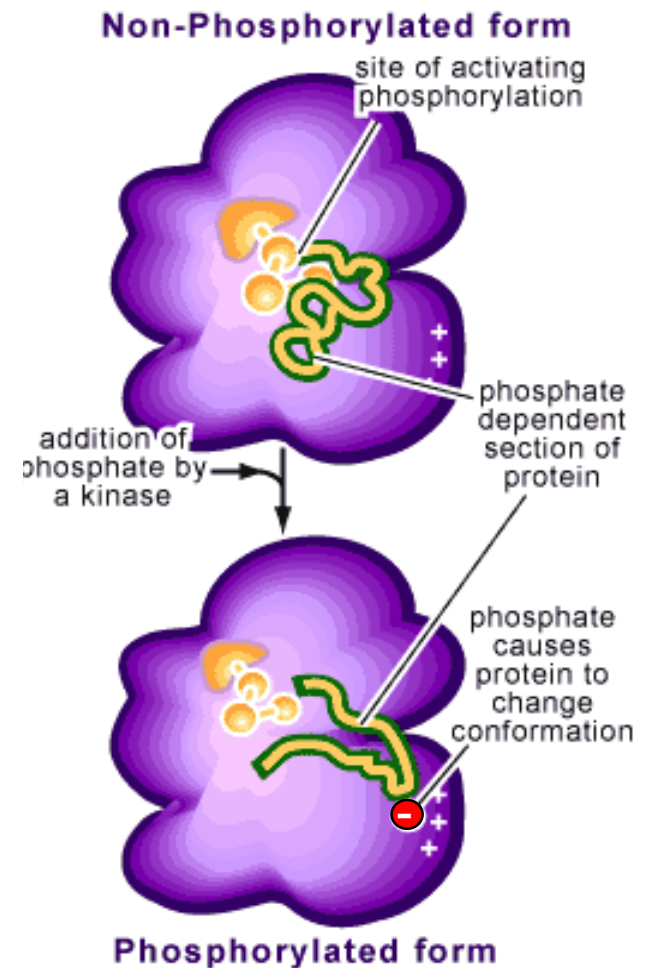
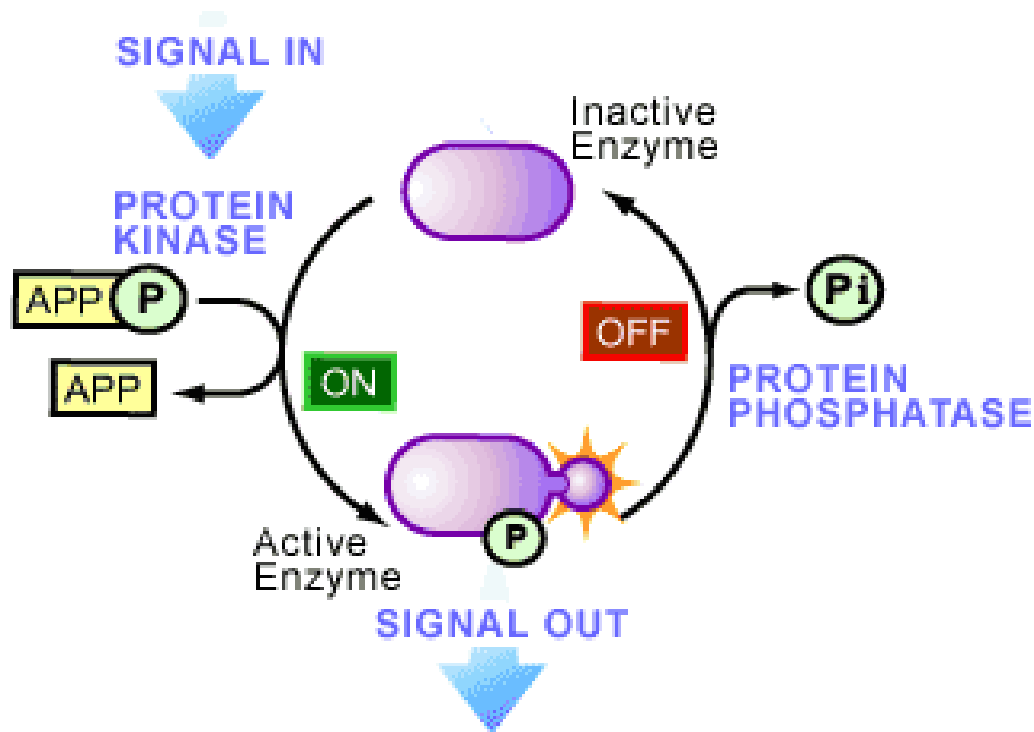
Ne consegue che:

- 1) **Non tutte** le proteine sono soggette a fosforilazione
- 2) **Non tutti** i residui S/T o Y in una proteina che ne è soggetta sono fosforilati
- 3) Alcune proteine hanno **siti multipli** di fosforilazione per *chinasi* diverse

Effetto della fosforilazione

► La fosforilazione può attivare o disattivare un enzima e spesso fa parte di una cascata di trasduzione del segnale

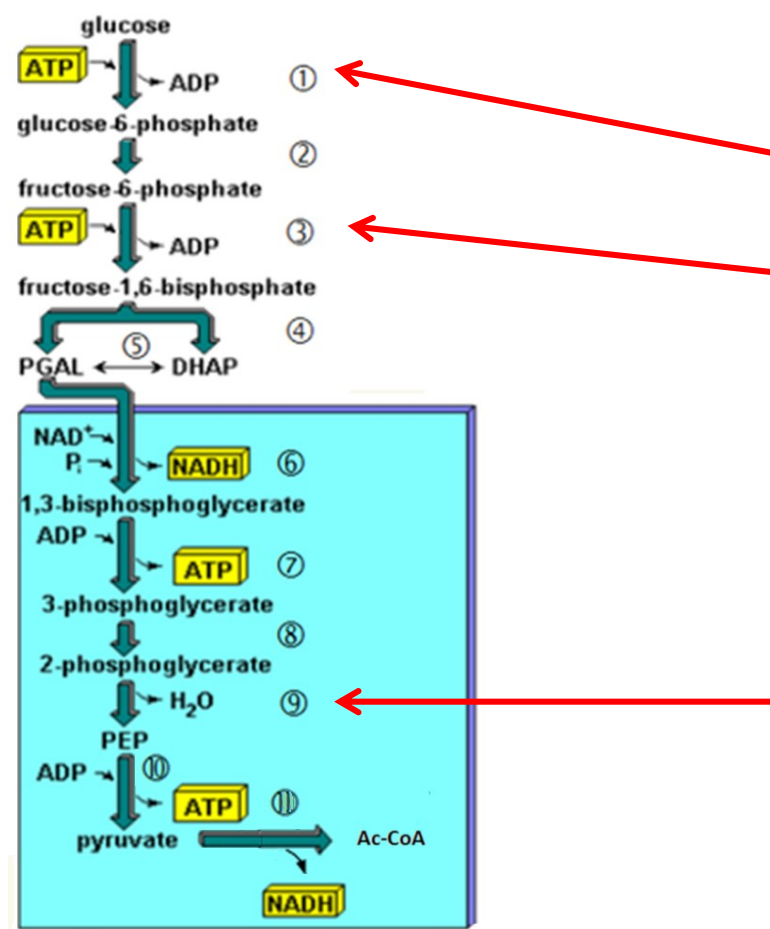
- L'introduzione di un gruppo fosfato al sito di fosforilazione di un enzima causa una **variazione conformazionale** ne che **altera attività** o l'**accessibilità** del sito attivo



Regolazione della Glicolisi

► La regolazione avviene a livello delle tre reazioni irreversibili (ΔG negativo)

- ① le **Esochinasi** sono sotto controllo da **substrato, genico, allosterico** e/o **sequestro**
- ③ la **Fosfofruttochinasi I** è sotto controllo **allosterico** e solo indirettamente per **fosforilazione**
- ⑨ la **Piruvato chinasi** è sotto controllo **allosterico**, e per **fosforilazione nel fegato** ma **NON nel muscolo**



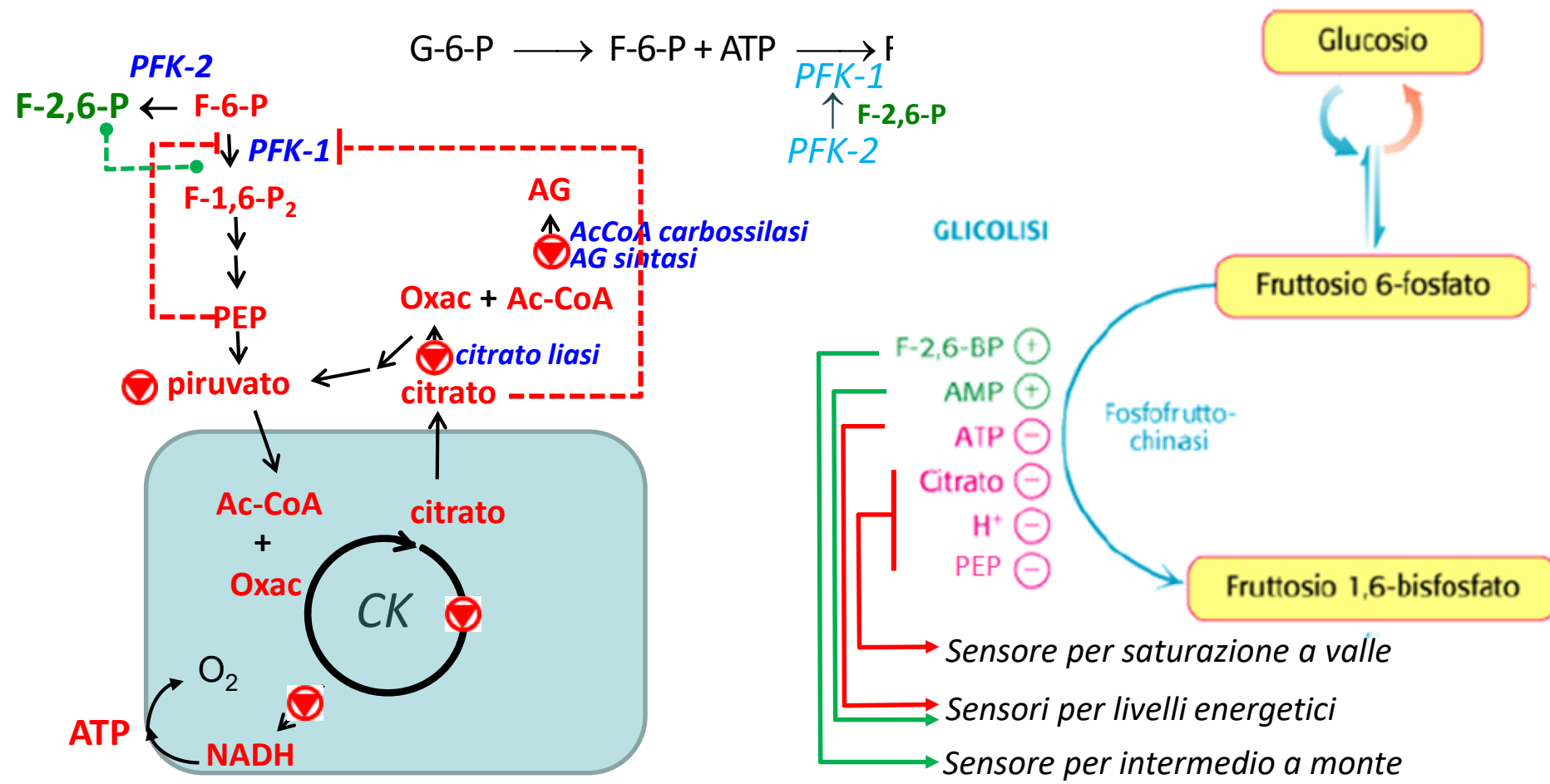
ENZIMA	ΔG (kJmol ⁻¹)
① ESOCHINASI	-33.5
② FOSFOGLUCOISOMERASI	-2.5
③ FOSFOFRUTTOCHINASI	-22.2
④ ALDOLASI	-1.3
⑤ TRIOSO FOSFATO ISOMERASI	+2.5
⑥ GLICERALDEIDE-3P DEIDROGENASI	-1.7
⑦ FOSFOGLICERATO CHINASI	-1.8
⑧ FOSFOGLICERATO MUTASI	0.8
⑨ ENOLASI	-3.3
⑩ PIRUVATO CHINASI	-16.7



Regolazione per fosforilazione: esempi nel metabolismo del glucosio

► La **fosfofruttochinasi 1 (PFK 1)** è regolata allostericamente, indirettamente per fosforilazione

- A differenza di **G-6-P** e **F-6-P**, che sono intermedi anche di altre vie metaboliche, il fruttosio 1-6-bisfosfato (**F-1,6-P₂**) è un **intermedio SOLO della glicolisi**.
- La reazione impegna lo zucchero ad entrare nella **Glicolisi** poiché è reversibile solo mediante un'altro enzima la **fruttosio-1,6-bifosfatasi (F16BPase)** della *Gluconeogenesi*



Regolazione delle *Fosfofruttochinasi* (cont.)

► Il fruttosio-2,6-bisfosfato (**F-2,6-P₂**) è il più potente attivatore allosterico di **PFK1**

- prodotto dallo stesso substrato, F-6-P, ma da un'altra chinasi, la **PFK-2**

- diminuisce K_M di **PFK-1** per **F-6-P**, efficiente anche a basse concentrazioni

- riduce l'effetto inibente di **ATP** (glicolisi procede anche se ATP ↑)

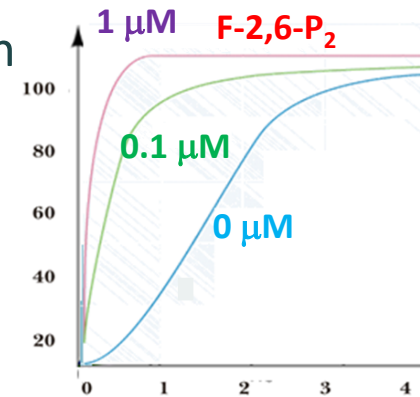
- In questo caso:

Gluc → **piruvato** → **Ac-CoA** → **citrato**

↗ (mitocondrio) → **ATP**

↓

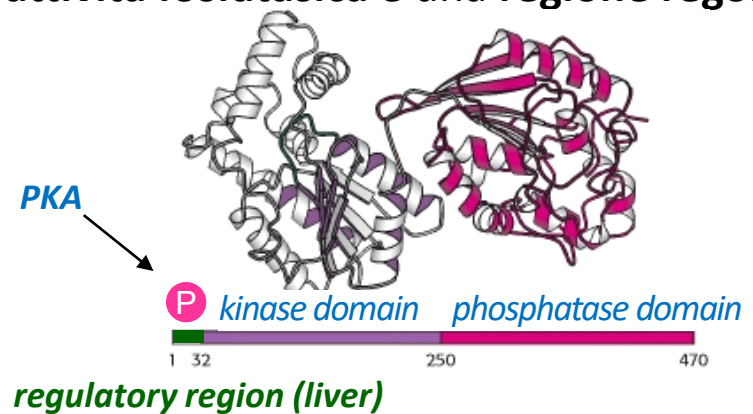
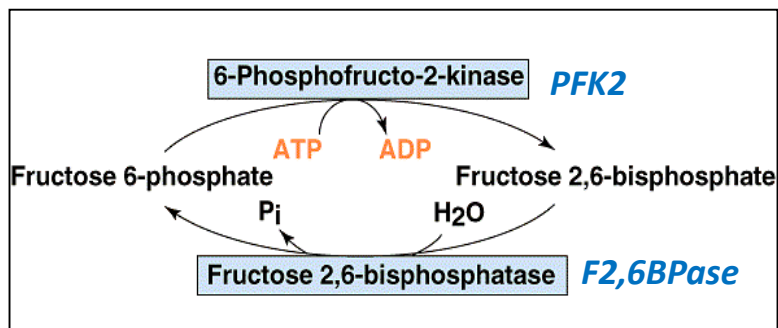
↘ (citoplasma) → **AG**



- **F-2,6-P₂** invece inibisce la **fruttosio-1,6-bisfosfatasi** (**F1,6BPase**) nella GLUCONEOGENESI, che catalizza la reazione inversa **F-1,6-P₂** → **F-6-P**

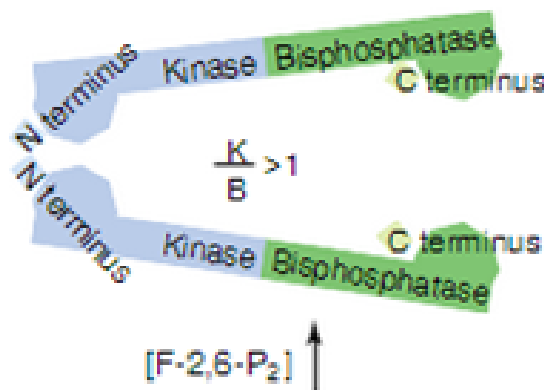
► **F-2,6-P₂** è prodotta e smantellata da un enzima bifunzionale **PFK2/F2,6BPase**

- un dominio ad attività chinasica, un dominio ad attività fosfatase e una regione regolatoria



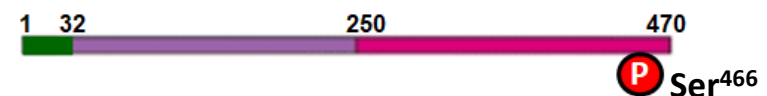
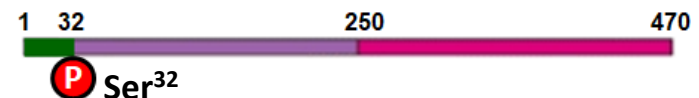
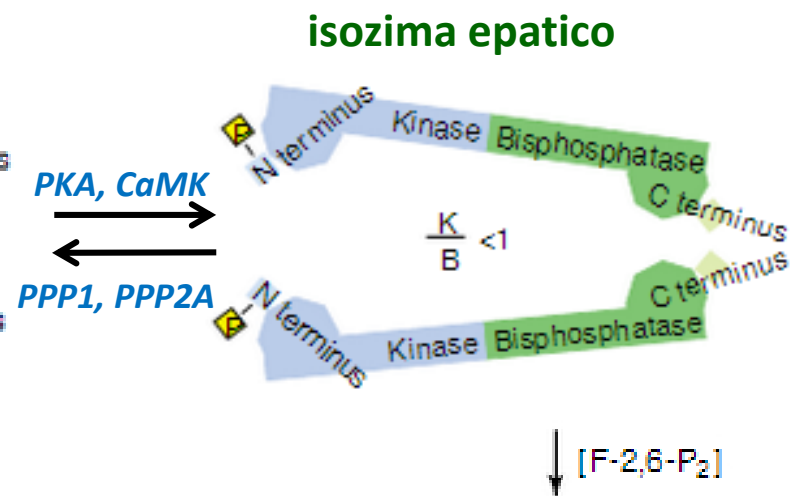
Regolazione delle *Fosfofruttochinasi* (cont.)

- **Muscolo e fegato esprimono isozeri della PFK-2/F2,6BPase regolati diversamente**
- **PFK-2/F2,6BPase** ha un ruolo importante nel controllo differenziale della glicolisi nel fegato e muscolo
 - enzima omodimerico, con disposizione parallela delle catene
 - **ISOZIMA L** (fegato) fosforilazione (**PKA** ← cAMP ← glucagone/adrenalina) o **CaM-K** (Ca^{2+}) **disattiva PFK-2** e **attiva F2,6BPase**, defosforilazione (**PPP1** ← **insulina**) **disattiva F2,6BPase** e **attiva PFK-2**
 - **ISOZIMA M** (muscolo) fosforilazione (**PKA** ← cAMP ← glucagone/adrenalina) o **CaM-K** (Ca^{2+}) **attiva PFK-2** e **disattiva F2,6BPase**, defosforilazione (**PPP1** ← **insulina**) **disattiva PFK-2** e **attiva F2,6BPase**
- adrenalina → **fegato**: **F-2,6-P₂** ↓ glicolisi ↓ gluconeogenesi ↑
- adrenalina → **muscolo**: **F-2,6-P₂** ↑ glicolisi ↑



ISOZIMA L

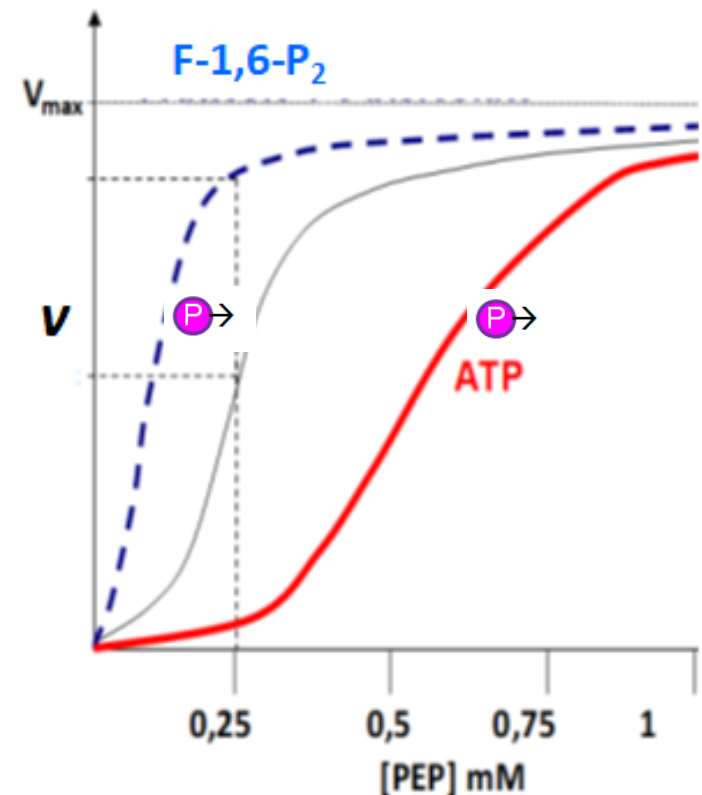
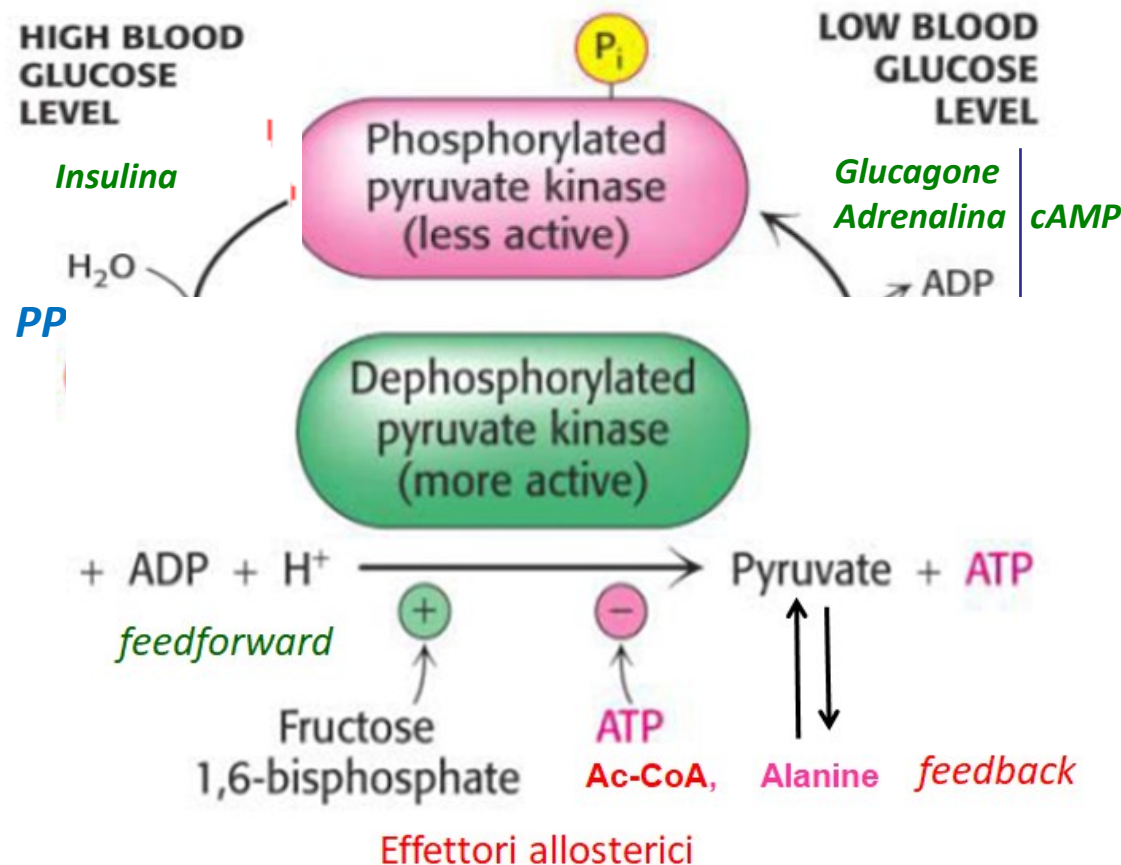
ISOZIMA M (cardiaco)



Regolazione della *Piruvato chinasi*

- ▶ La *Piruvato chinasi (PK)* epatica è regolata allostericamente e anche per fosforilazione
- regolazione allosterica e regolazione per fosforilazione sono spesso associate
- la *Piruvato chinasi* nel muscolo **NON** è regolata per fosforilazione

PK fosforilata ha maggiore affinità per l'ATP e minore affinità per F-1,6-P₂

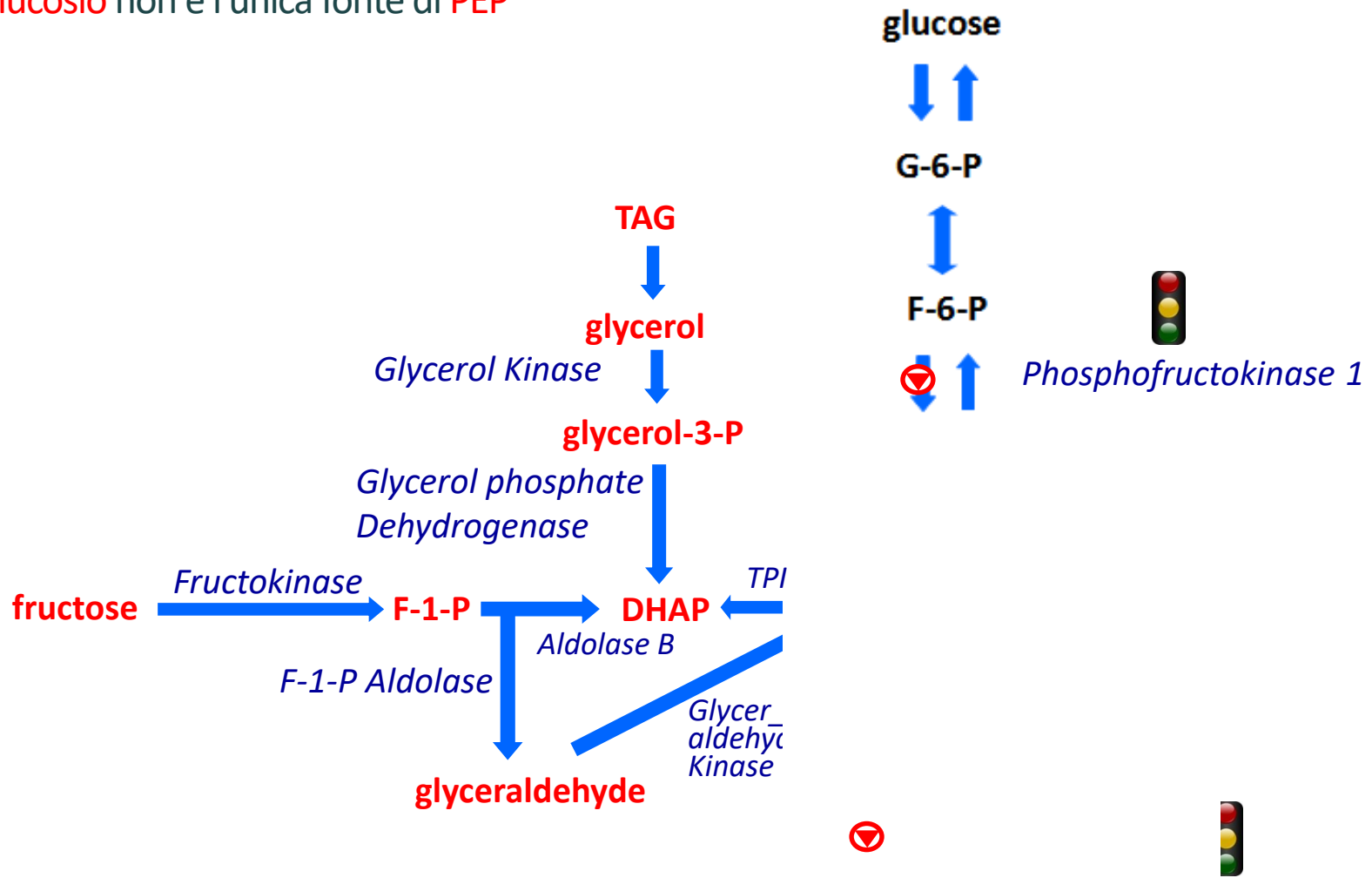


PK non fosforilata ha maggiore affinità per F-1,6-P₂ (feed-forward), è attivata a [F-1,6-P] minori

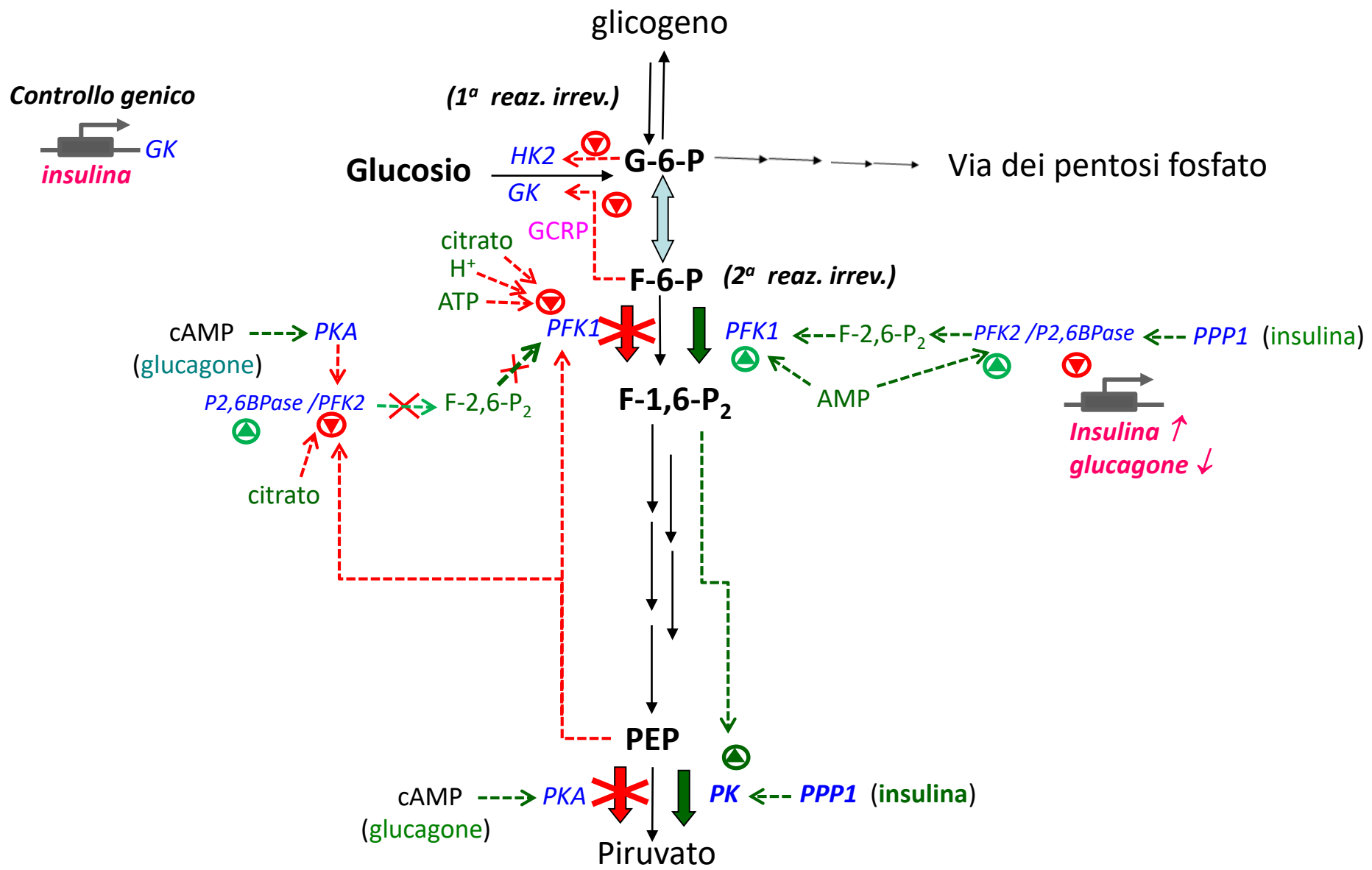
Regolazione della Piruvato chinasi (cont.)

► Logica della regolazione della Piruvato chinasi

- perché inibire la reazione $\text{PEP} \rightarrow \text{piruvato}$ se è già stata inibita la reazione $\text{F-6-P} \rightarrow \text{F-1,6-P}_2$?
- se $[\text{F-1,6-P}_2]$ è bassa, dovrebbe essere bassa anche $[\text{PEP}]$, quindi non basterebbe inibire la **PFK-1** ?
- NO, perché il **glucosio** non è l'unica fonte di **PEP**

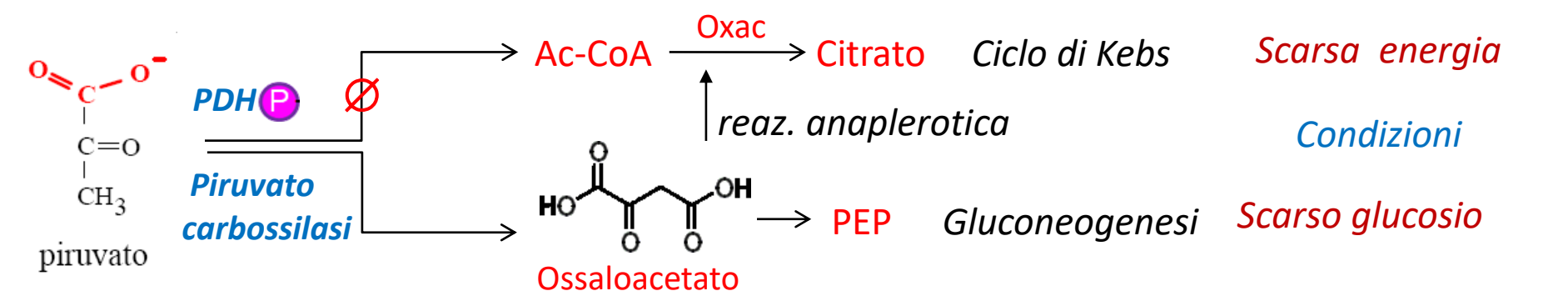
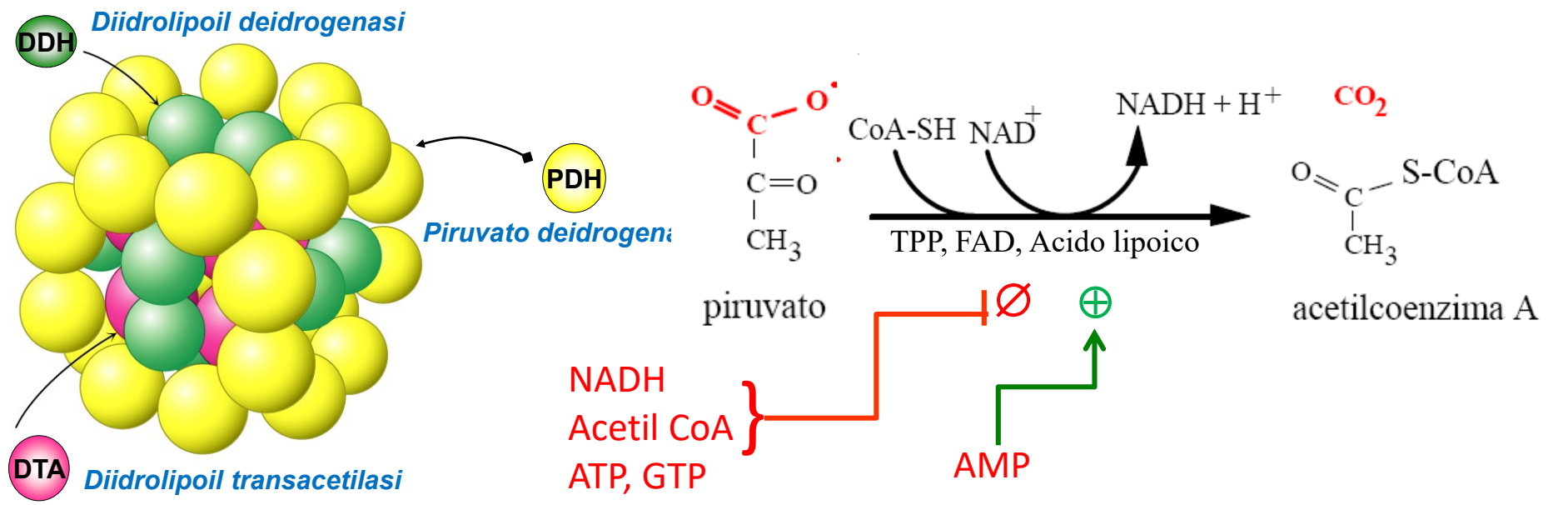


Regolazione della Glicolisi epatica – schema globale



Regolazione della Piruvato deidrogenasi (PDH)

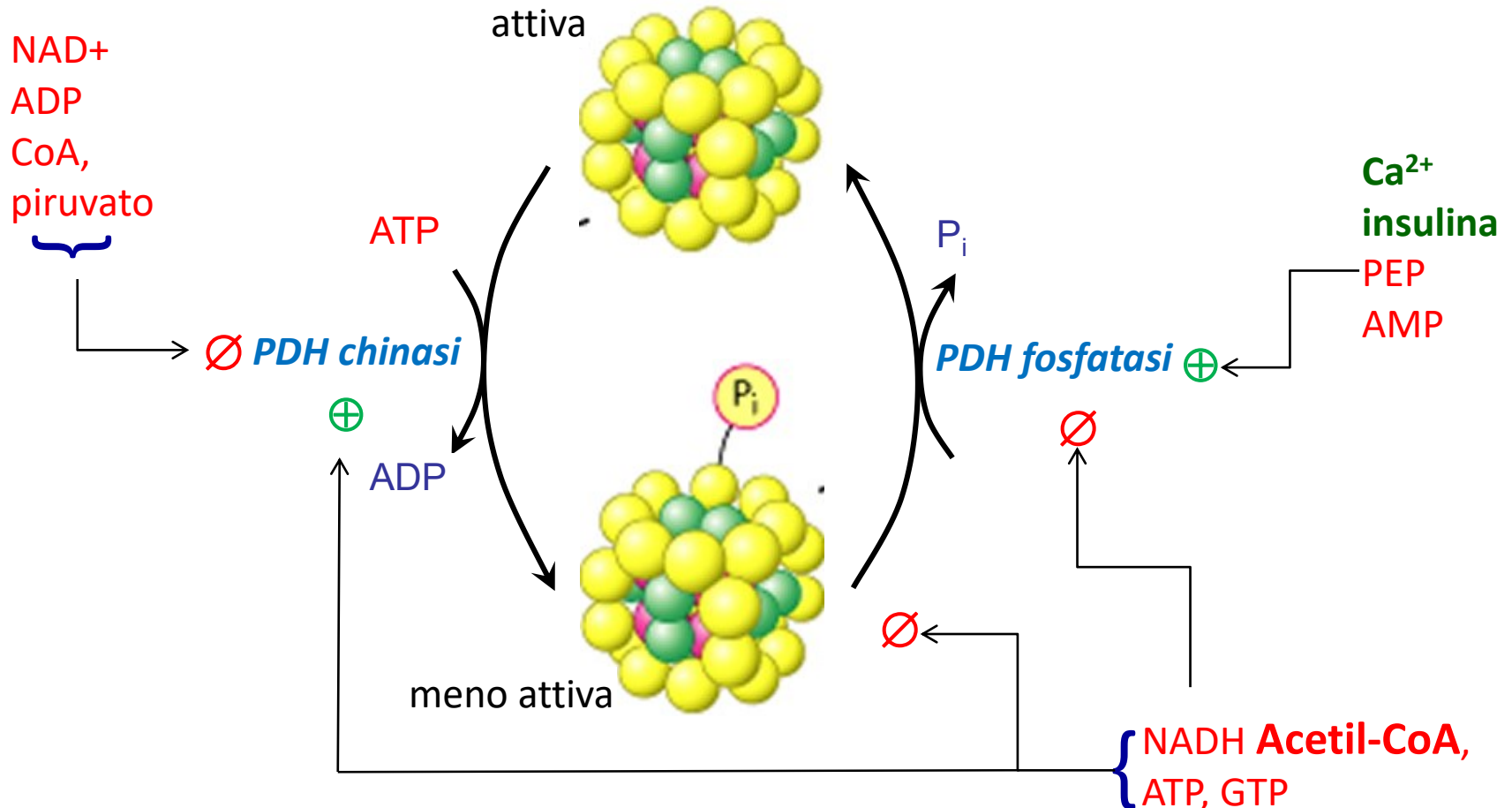
- La **PDH**, enzima mitocondriale, è sotto controllo allosterico e controllo per fosforilazione
 - il **controllo allosterico** è soprattutto da **indicatori della carica energetica** e dal suo prodotto stesso, **Ac-CoA** (controllo a feedback; elevato se è attiva la β -ossidazione degli AG)
 - Il **controllo per fosforilazione** è da parte di **chinasi** e **fosfatasi** dedicate



Regolazione della *Piruvato deidrogenasi (PDH)* (cont.)

► Allosterismo e fosforilazione permettono una regolazione articolata

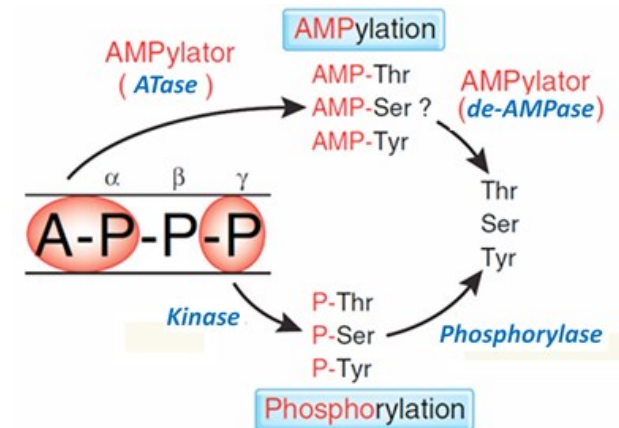
- l'enzima non fosforilato non è controllato allostericamente da **NADH**, **ATP** o **Acetil-CoA**: piruvato ossidativamente decarbossilato anche se la carica energetica è elevata
- la regolazione allosterica di **PDHK** e di **PDHP** permette più livelli di controllo
- esistono diversi isozimi di **PDHK** e di **PDHP** con diversa efficienza e regolazione nei diversi tessuti



5b) Altre forme di modificazioni covalenti reversibili

► **Ampilazione:** legame fosfodiester di **AMP** o **UMP** con la catena laterale di AA idrossilati (Tyr o Ser.)

- reazione mediata da **AMPilatori**: 2 domini di **Adeniltrasferasi (ATasi)** + **deadenilasi (de-AMPasi)**



► **Metilazione e acetilazione:**

- aggiunta di **gruppi metile** o **gruppi acetile** ai gruppi amminici (Arg, Lys, N-ter) in proteine come gli istoni; modificazione coinvolta in eventi epigenetici (anche su basi del DNA)



► **Ubiquitinazione (ubiquitilazione, ubiquitinilazione)**

- aggiunta di una o più **ubiquitine (Ub)** a residui di Lys, Cy, Ser, Thr o N-term di proteine

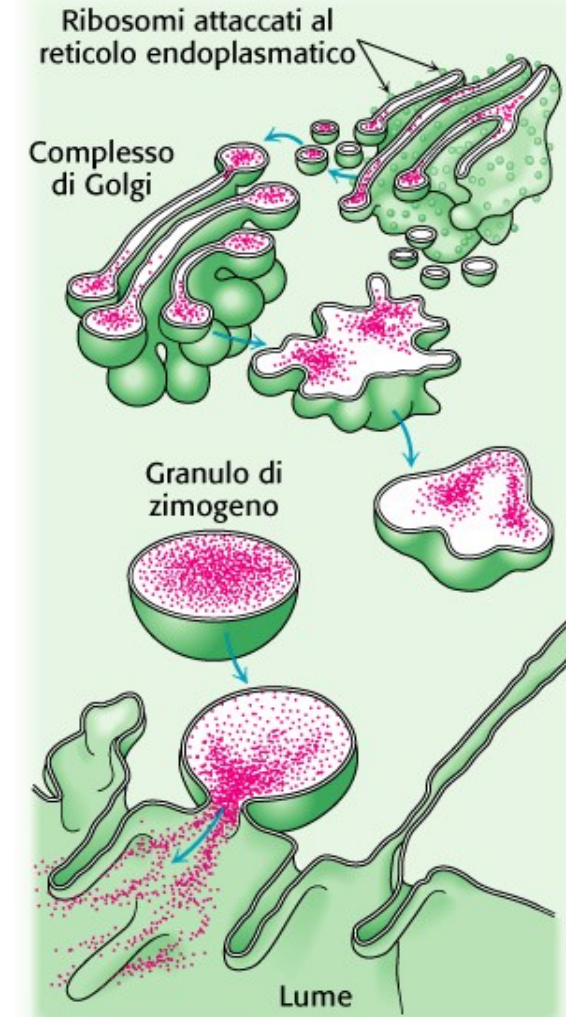
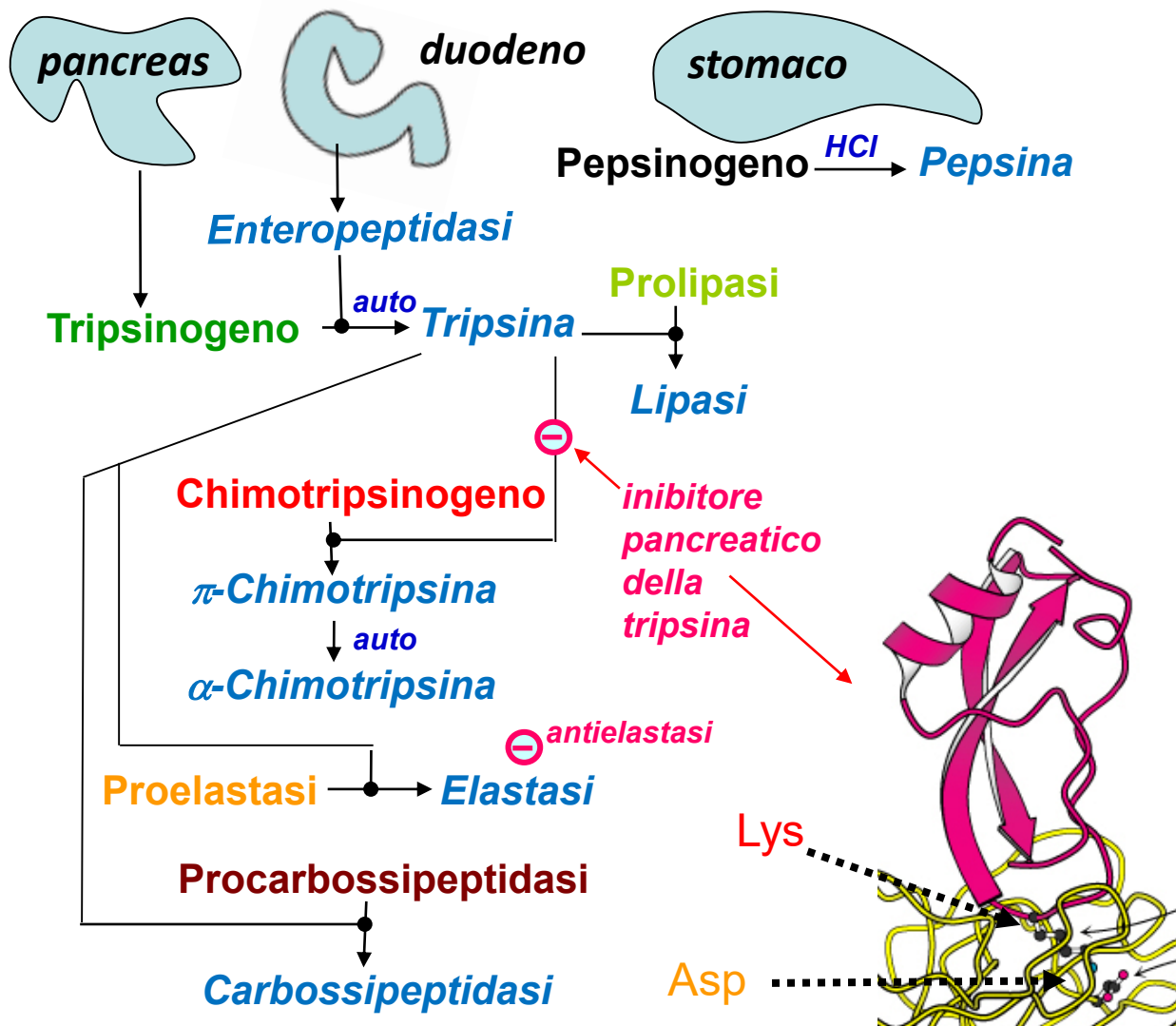
- marca molte proteine **per degradazione** da parte del **proteasoma**

- altera la posizione cellulare di proteine, influenza la loro attività o ne impedisce le interazioni

6) Modificazioni covalenti irreversibili – esempio nella digestione

► Gli zimogeni sono proforme inattive di enzimi

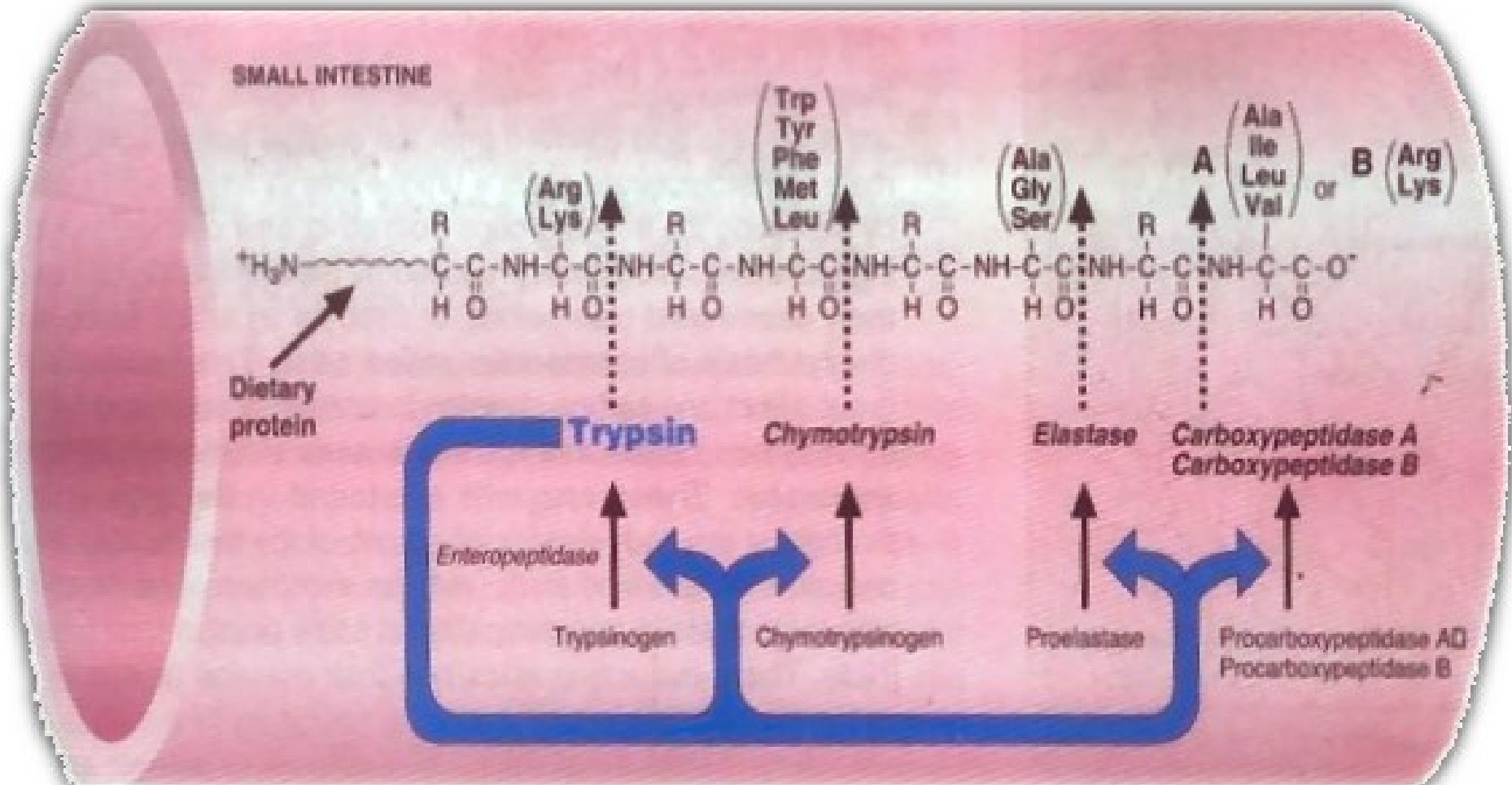
- gli enzimi digestivi sono attivati a **cascata** da zimogeni; la reazione è **irreversibile** – devono poi essere inattivati per inibizione



6) Modificazioni covalenti irreversibili – digestione (cont.)

► Enzimi digestivi:

- *Serina proteasi* e *Carbossipeptidasi* (*metalloproteasi*) con diverse selettività di taglio
- *Lipasi pancreatica* (richiede gli acidi biliari per agire sui TAG, assieme alla **Co-lipasi**)

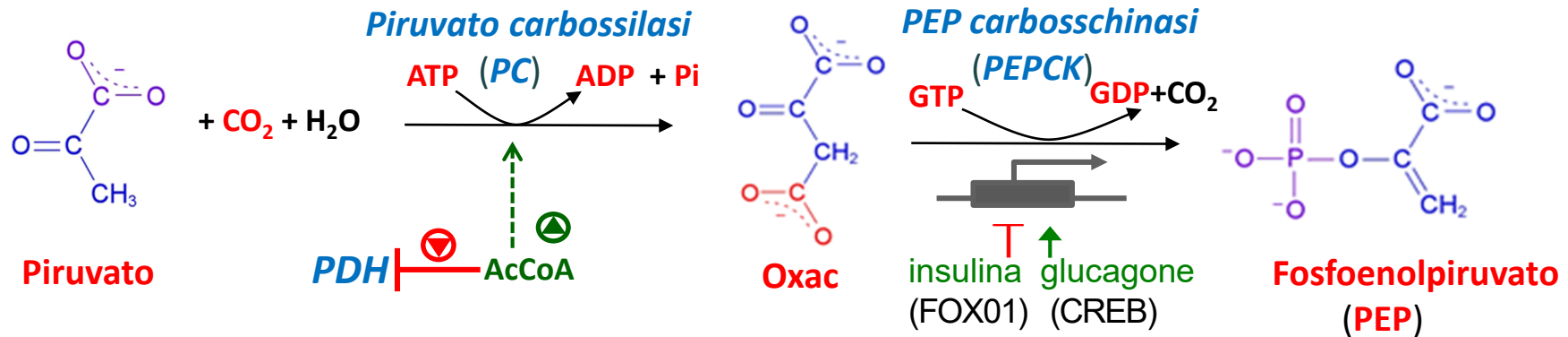


6) Compartimentazione e isozimi

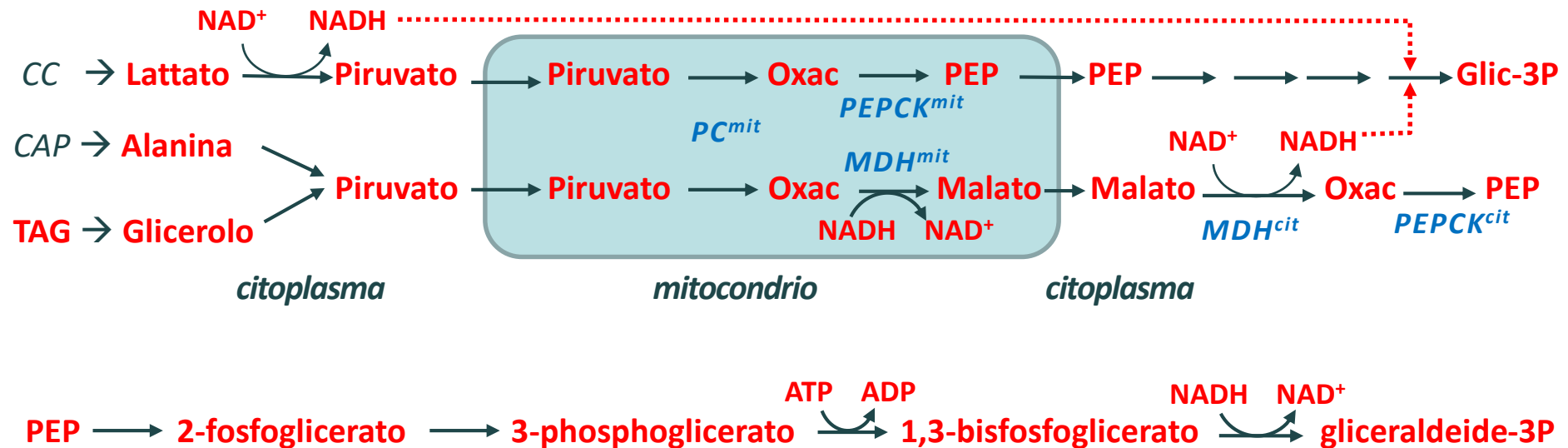
- ▶ **Enzimi che differiscono nella precisa sequenza AA ma catalizzano la stessa reazione**
 - spesso hanno diversi parametri cinetici (es. K_M) o sono regolati diversamente (es. ***L*PFK-2** e ***M*PFK-2**)
 - permettono di integrare il metabolismo alle particolari esigenze di un dato tessuto o stadio di sviluppo
 - sono spesso codificati da geni omologhi risultati da duplicazione genica, che si sono differenziati nel tempo
- ▶ **Esempio di isozimi nello stesso compartimento**
 - la ***Glucochinasi*** e l'***Esochinasi*** della glicolisi – diversi K_M e controllo allosterico
- ▶ **Esempi di isozimi in diversi compartimenti (Ciclo di Krebs e navetta citrato/malato)**
 - ***Citrato isomerasi*** e ***α -Chetogluttammato deidrogenasi***
 - mitocondriali** il citrato è usato nel **CK** per produrre NADH a scopo bioenergetico
 - citoplasmatici** il citrato esce nel citoplasma con la navetta → Ac-CoA e NADPH per sintesi AG
 - ***PEP carbossichinasi*** e ***Malato deidrogenasi*** mitocondriali o citoplasmatiche usate secondo livelli NADH
- ▶ **Esempi di isozimi in diversi tessuti**
 - la ***PFK-2*** epatica (L) è disattivata per fosforilazione mentre e la ***PFK-2*** muscolare (M) è attivata
- ▶ **Esempi di isozimi in diverse fasi dello sviluppo**
 - le ***DNA metiltrasferasi*** (***DNMT***) sono presenti in diverse isoforme che regolano lo sviluppo fetale mediante l'instaurarsi, mantenimento e dinamica della metilazione del DNA

Compartimentalizzazione – Isozimi della *PEP carbossichinasi*

- La gluconeogenesi inizia con la conversione di piruvato in ossalacetato e poi PEP
- Carbossilazione del piruvato seguita da decarbossilazione/fosforilazione



- Isozimi della *PEP carbossichinasi* e *Malato deidrogenasi* agiscono secondo i livelli di NADH



Regolazione reciproca di *Glicolisi* e *Gluconeogenesi* (nel fegato)

► La regolazione avviene a livello di enzimi che catalizzano reazioni con ΔG negativo

