

Regolazione dell'attività degli ENZIMI

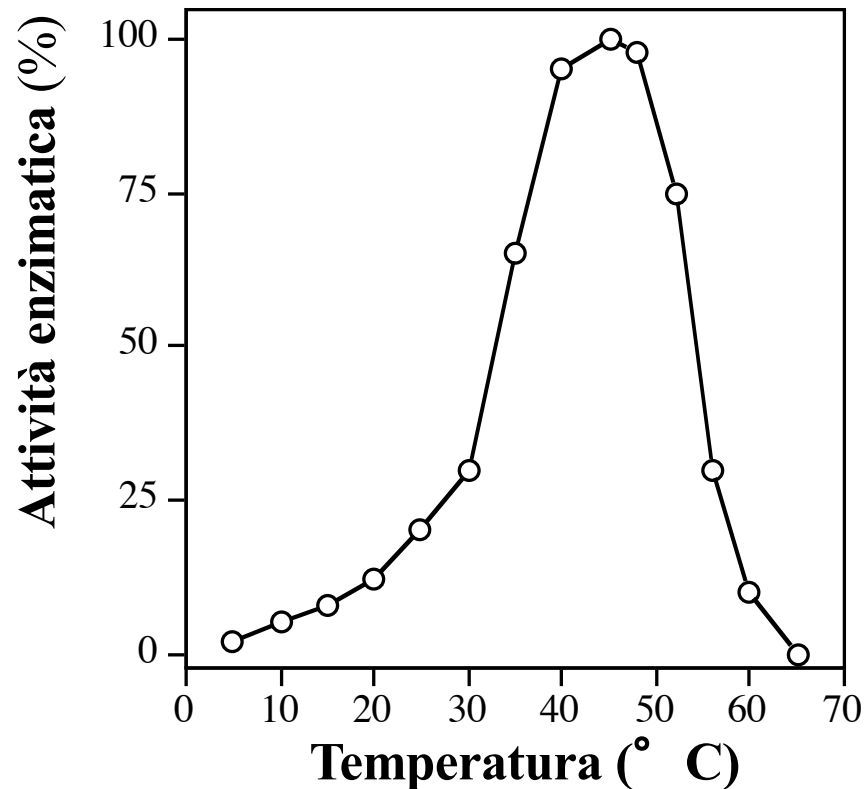
I fattori che influenzano l'attività di un enzima sono diversi.

- **Temperatura**
- **pH**
- **Forza ionica**
- **Modifiche covalenti**
- **Presenza di inibitori**
- **Presenza di attivatori**

Molto spesso l'azione combinata di più parametri è alla base della regolazione delle vie metaboliche

Effetto della temperatura

Un aumento della temperatura determina un aumento della attività di un enzima, come in tutte le reazioni. Tale effetto però si verifica solo nell'intervallo di temperatura in cui l'enzima è ancora stabile.

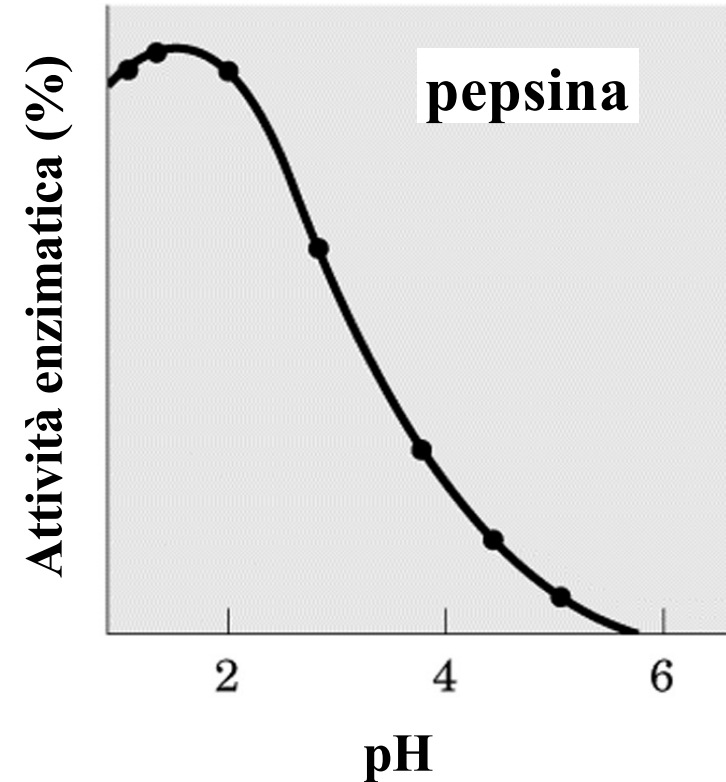
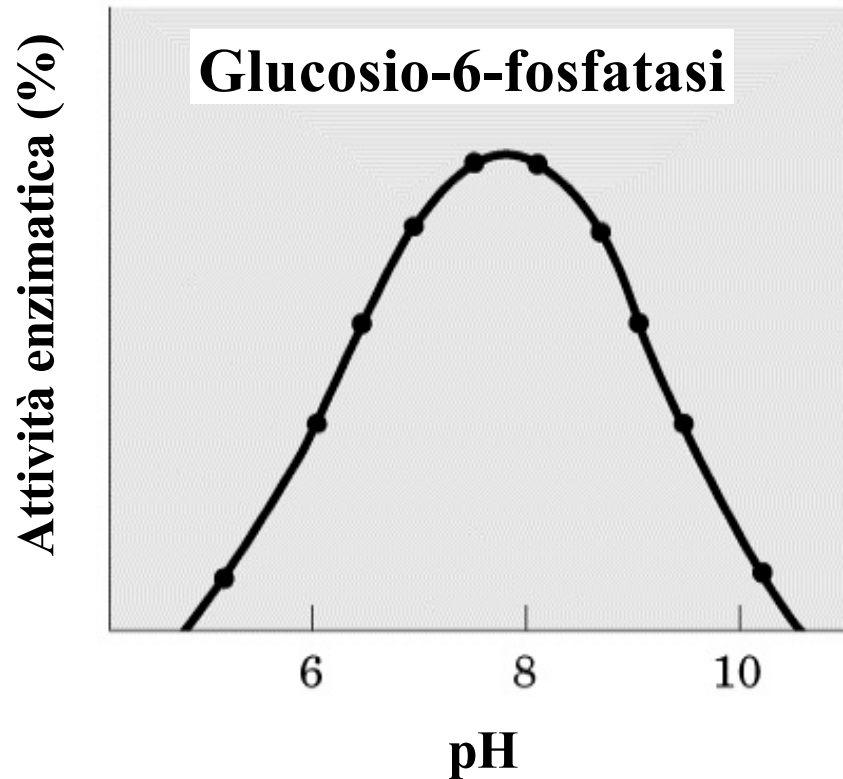


Nella parte ascendente, in genere c'è un raddoppio della velocità ogni aumento di 10 °C.

Nella parte discendente, alle temperature più alte, l'attività diminuisce perché si verifica l'inattivazione termica dell'enzima.

Effetto del pH

La maggior parte degli enzimi ha un valore di pH caratteristico a cui la loro attività è massima.



In questi casi, la variazione del pH può influenzare lo stato di ionizzazione di gruppi presenti nel sito attivo e che partecipano al meccanismo di catalisi.

Inibizione enzimatica

Molte sostanze (inibitori) riducono l'attività di un enzima legandosi reversibilmente ad esso. Possono influenzare l'affinità per il substrato e/o il numero di turnover.

Si possono avere diversi tipi di inibizione differenziati in base al meccanismo di inibizione.

- Competitiva**
- Incompetitiva**
- Mista**
- Inattivazione**

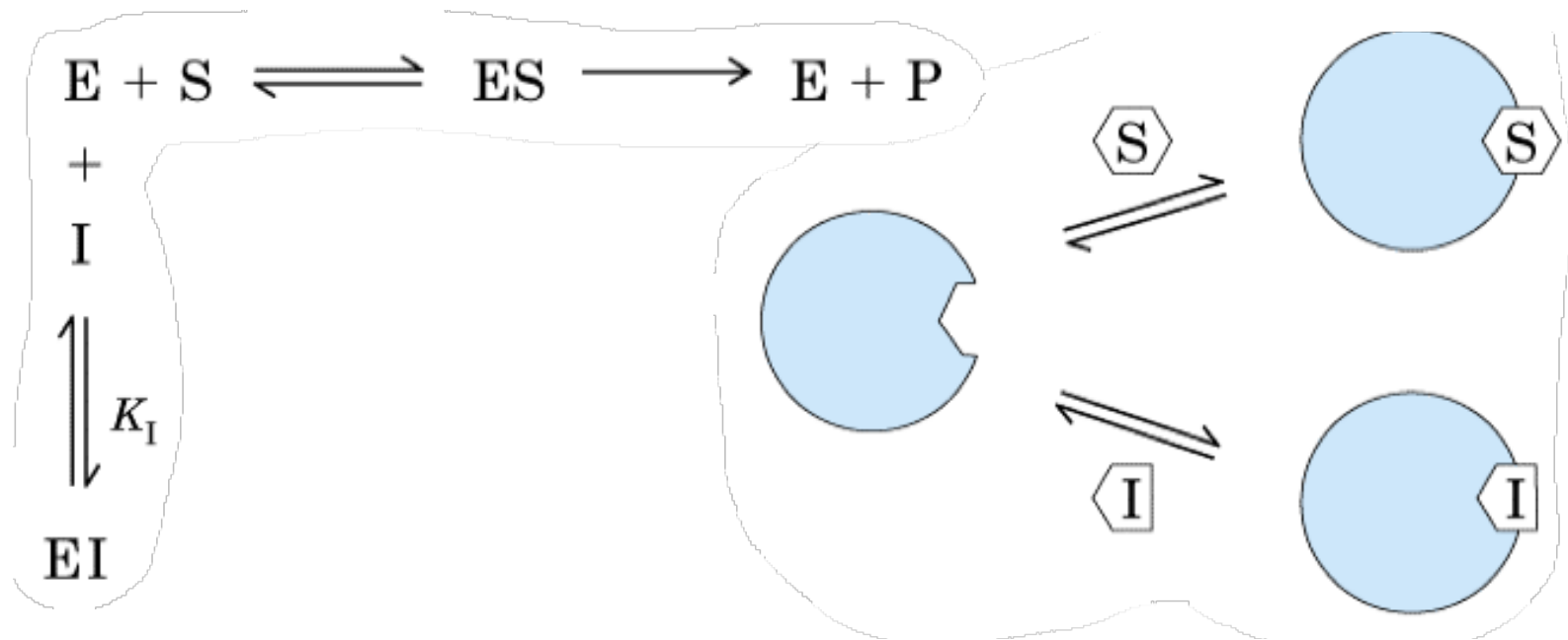
L'inibizione competitiva, incompetitiva e mista sono reversibili, mentre l'inattivazione è un processo irreversibile.

L'identificazione del tipo di inibizione può essere effettuata mediante l'analisi dei grafici dei doppi reciproci.

Inibizione competitiva (1)

5

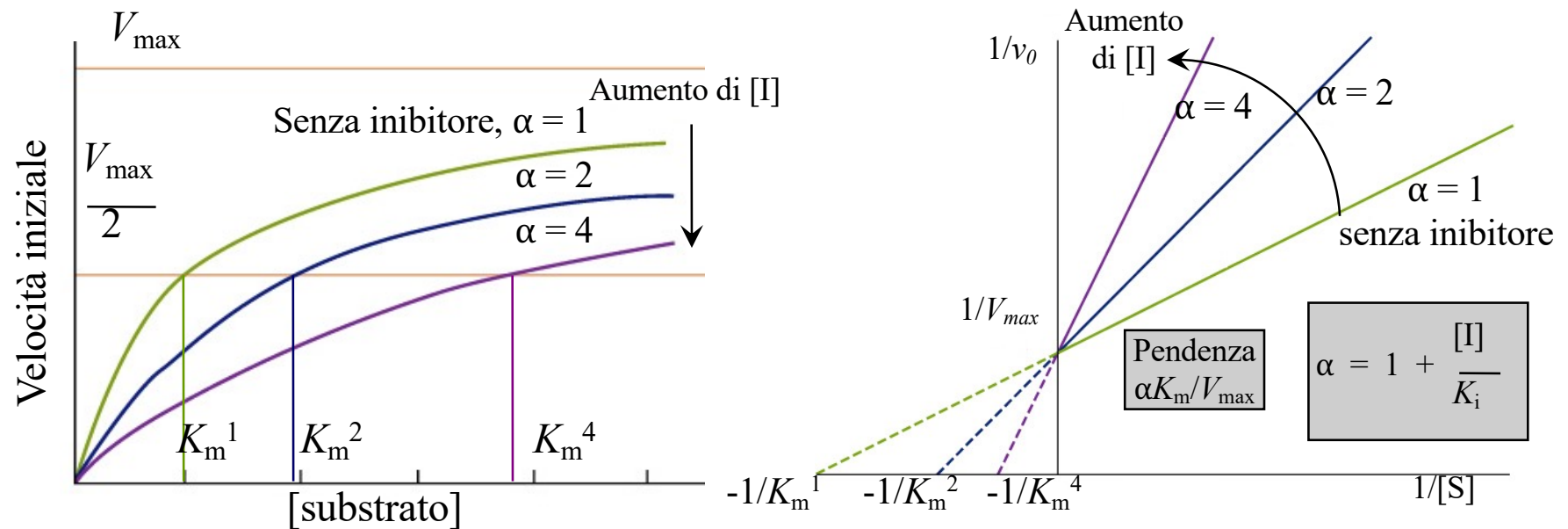
In questo tipo di inibizione, l'inibitore può legarsi al sito attivo dell'enzima libero in modo simile al substrato, senza essere poi modificato.



Presenza di due equilibri con un reagente in comune, l'enzima. Aumentando la concentrazione del substrato l'effetto scompare.

Per questo motivo la V_{\max} non cambia mentre K_m aumenta all'aumentare della concentrazione di inibitore.

Inibizione competitiva (2)



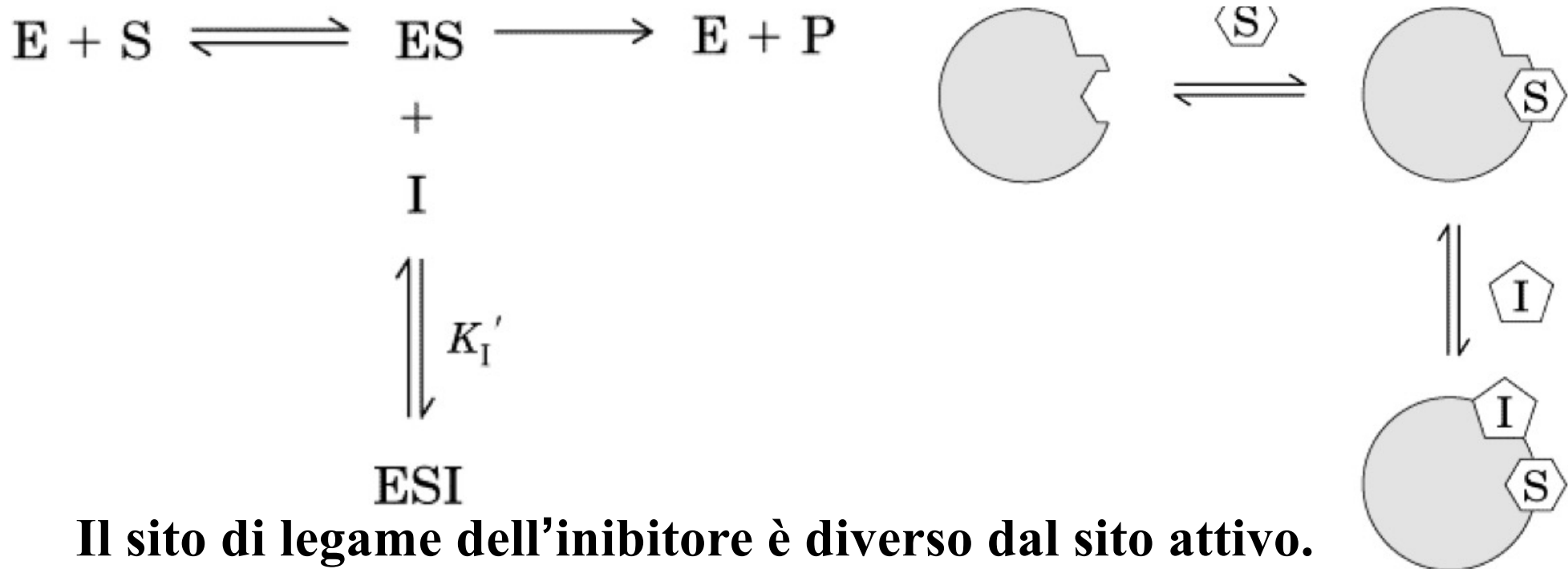
Il grafico dei doppi reciproci permette di identificare questo tipo di inibizione. Le rette si intersecano nello stesso punto sull'asse delle ordinate.

Dalla variazione della pendenza in presenza di una determinata concentrazione di inibitore (α) si può ricavare la costante di dissociazione del complesso enzima-inibitore (K_i).

Maggiore sarà la K_i minore sarà l'affinità dell'enzima per l'inibitore.

Inibizione incompetitiva (1)

In questo tipo di inibizione, l'inibitore si lega al complesso enzima-substrato e non interagisce con l'enzima libero.



Il sito di legame dell'inibitore è diverso dal sito attivo.

Il legame dell'inibitore provoca una distorsione del sito attivo che lo rende cataliticamente meno efficace.

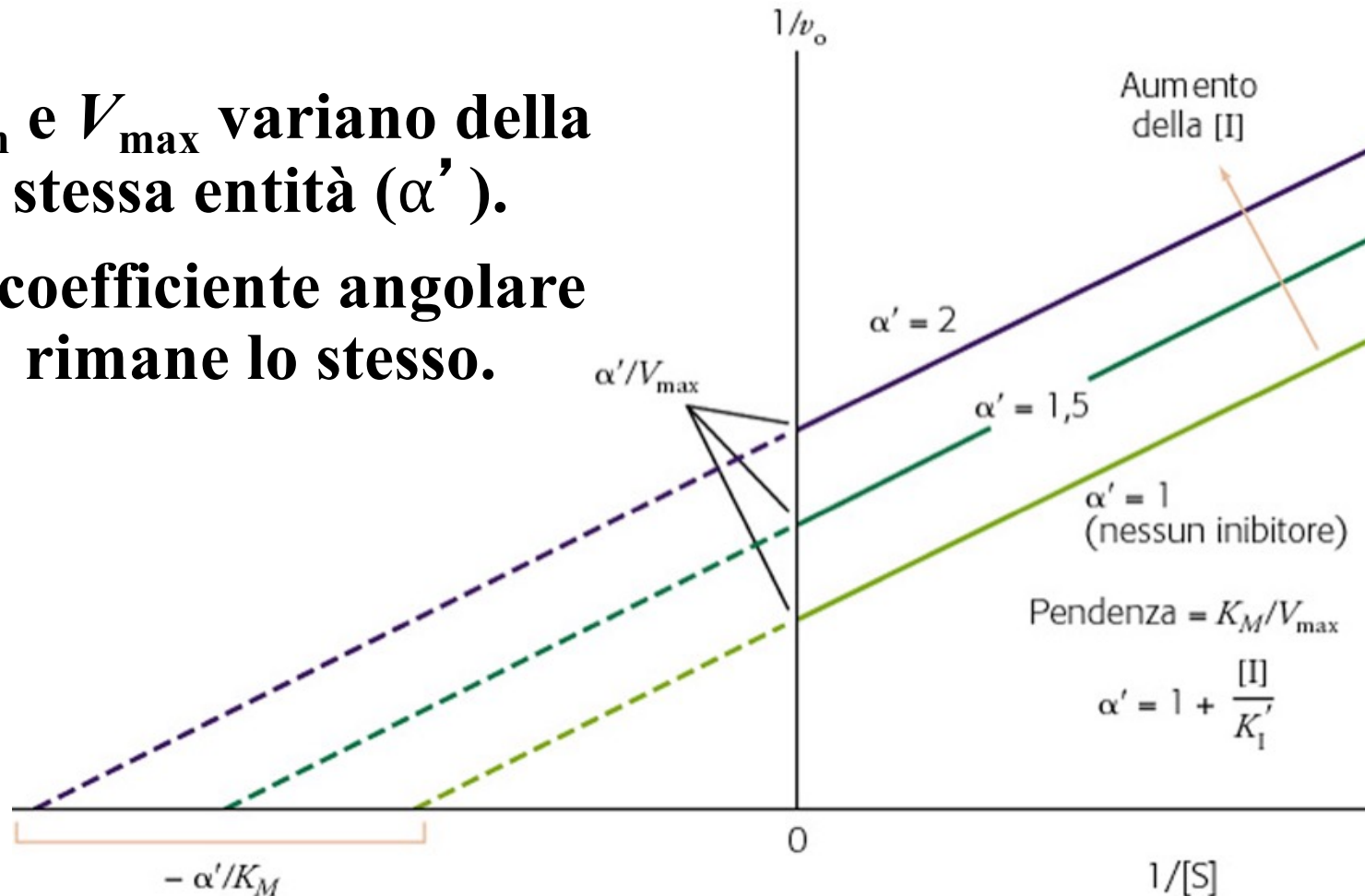
Diminuiscono sia l'affinità (aumenta K_m) sia V_{max} della stessa entità.

Inibizione incompetitiva (2)

Il grafico dei doppi reciproci permette di identificare anche questo tipo di inibizione. Le rette sono parallele.

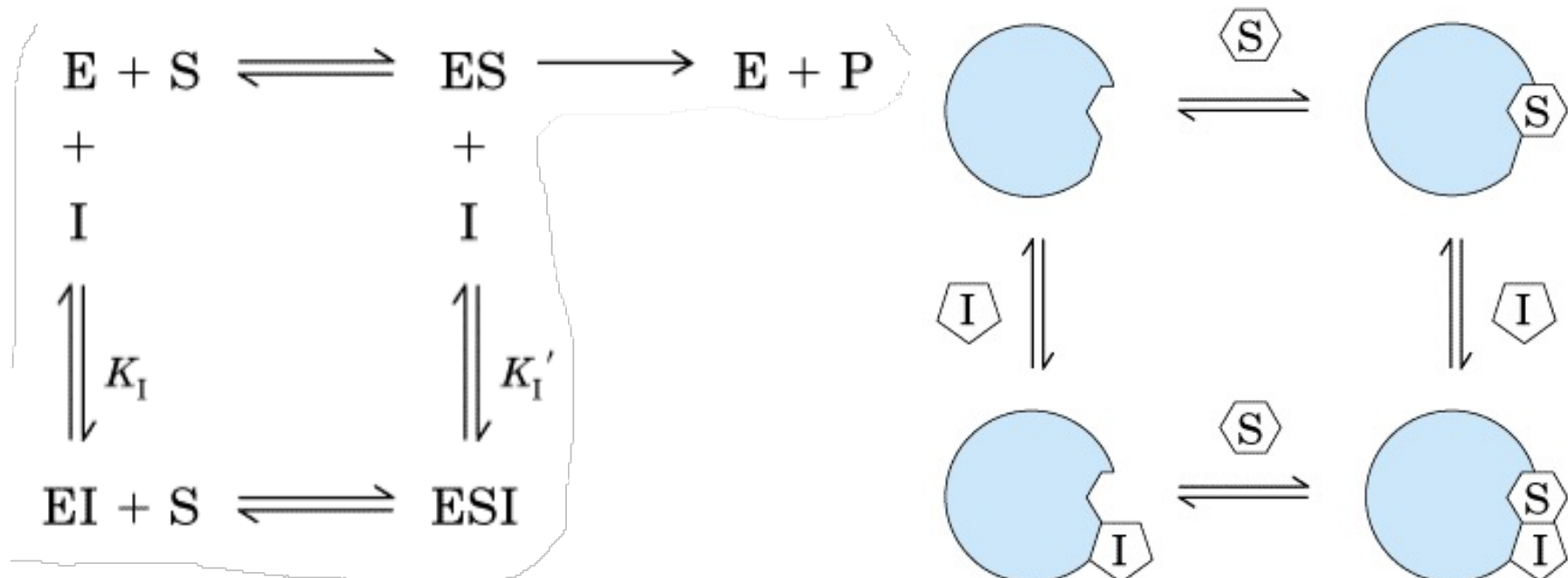
K_m e V_{max} variano della stessa entità (α').

Il coefficiente angolare rimane lo stesso.



Inibizione mista (1)

In questo tipo di inibizione, l'inibitore si lega sia al complesso enzima-substrato sia all'enzima libero.



In genere l'affinità dell'inibitore per l'enzima libero o complessato al substrato è diversa.

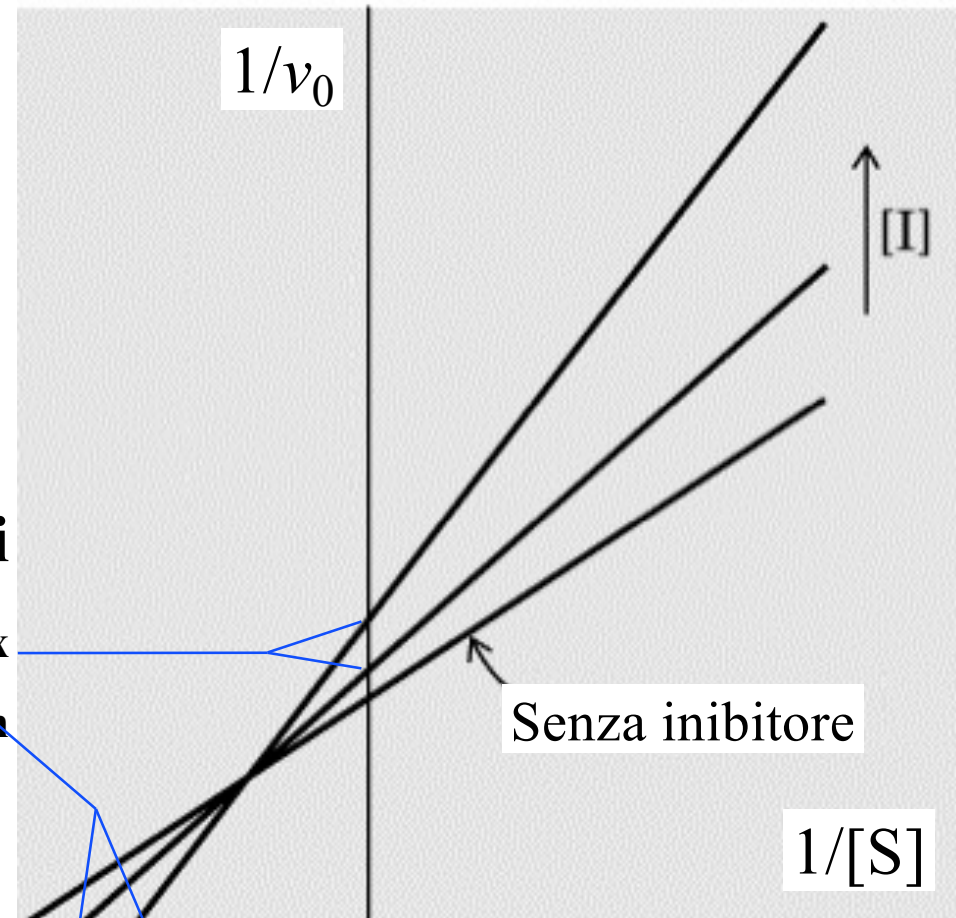
Diminuiscono sia l'affinità (aumenta K_m) che V_{max} ma di entità diverse.

Inibizione mista (2)

Il grafico dei doppi reciproci permette di identificare anche questo tipo di inibizione.

Le rette si intersecano nel quadrante negativo dell'asse delle ascisse con ordinata positiva.

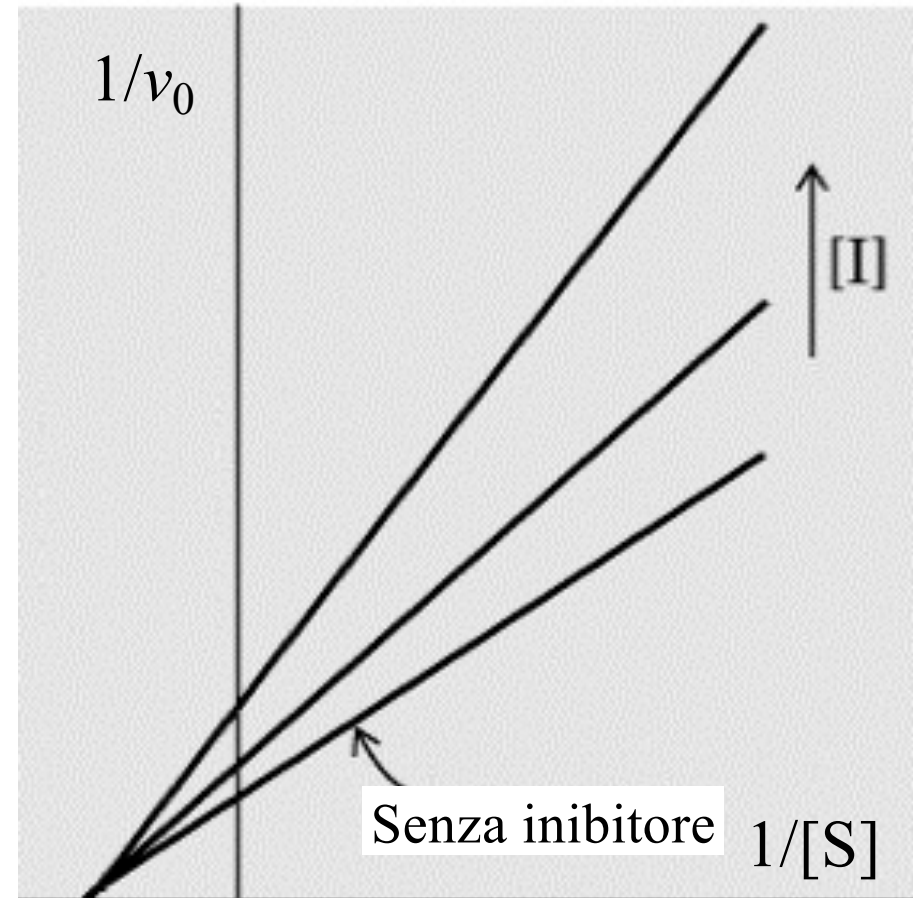
Fattori correttivi diversi per V_{\max} e per K_m



Inibizione mista (3)

Nel caso in cui l'affinità dell'enzima libero e di quello complessato per l'inibitore è identica, le rette intersecano l'asse delle ascisse nello stesso punto.

Non c'è quindi variazione della K_m . Questo tipo di inibizione mista particolare prende il nome di: ***inibizione non competitiva***.



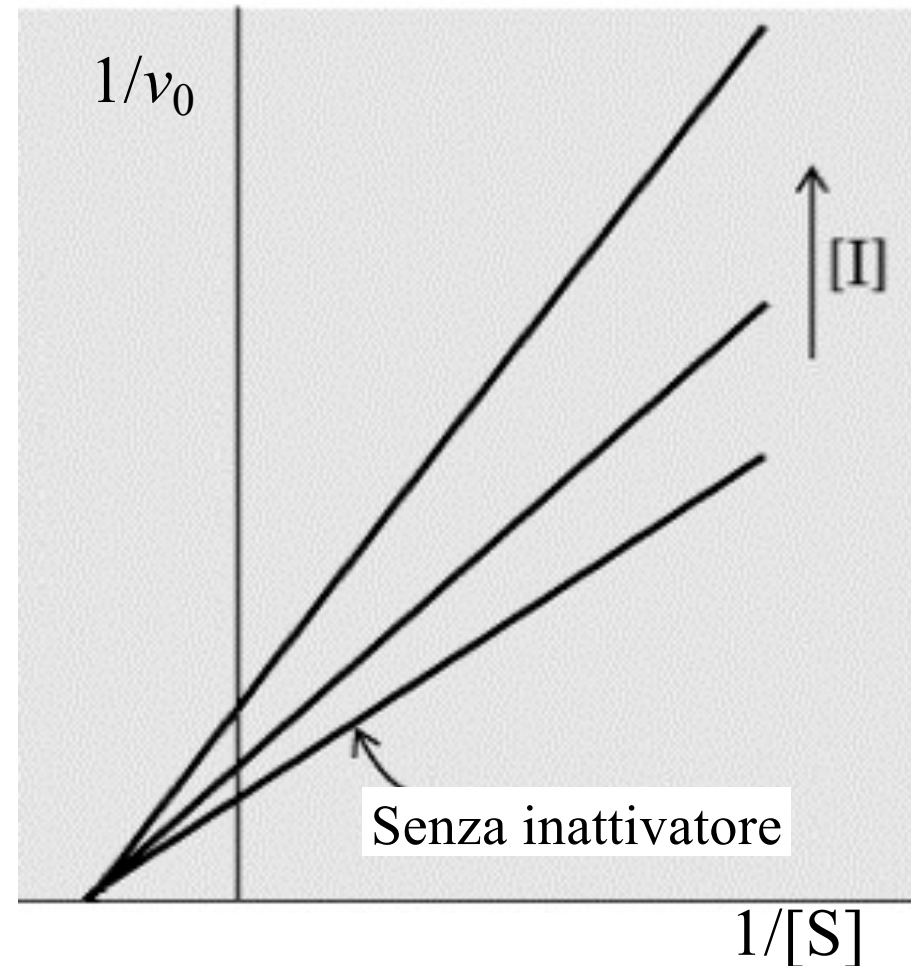
Inattivazione irreversibile (2)

L'inibitore si lega ad un enzima covalentemente, modificando gruppi funzionali essenziali per la loro attività, in maniera irreversibile (*inattivatore*).

L'inattivatore riduce la concentrazione totale dell'enzima cataliticamente attivo.

Le molecole di enzima non inattivate presentano la stessa affinità (K_m) per il substrato.

Il grafico dei doppi reciproci è identico a quello dell'inibizione non competitiva.



Meccanismi di regolazione

Esistono altri meccanismi di regolazione dell'attività enzimatica che le cellule di un organismo mettono in atto per poter coordinare tutti i numerosi processi metabolici.

1. Controllo dell'attività enzimatica

- *Meccanismi di inibizione retroattiva (a feedback)*
- *Utilizzo di regolatori allosterici (cooperatività)*
- *Modificazioni covalenti reversibili (ad es. fosforilazioni)*
- *Modificazioni per maturazione proteolitica da un precursore inattivo*

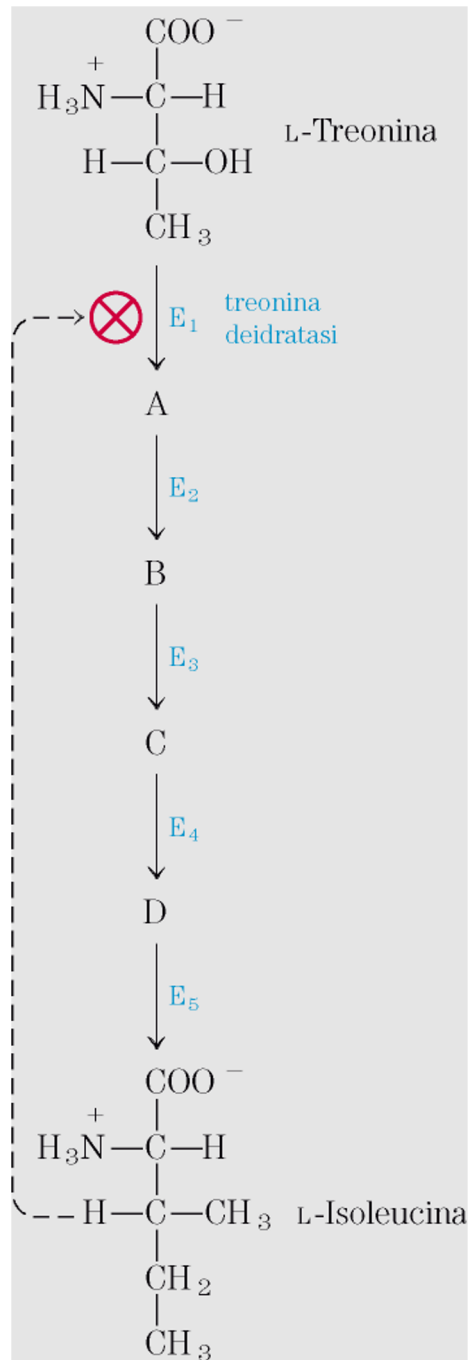
2. Controllo della disponibilità di un enzima (controllo trascrizionale e/o post-traduzionale)

- *Equilibrio tra velocità di sintesi e di degradazione*

Enzimi regolatori

Nel metabolismo cellulare, spesso gli enzimi agiscono in sequenza in una via definita metabolica.

Solitamente il primo enzima della via è un enzima regolatore, la cui attività aumenta o diminuisce in risposta ad alcuni segnali.



Inibizione retroattiva

L'aumento della concentrazione del prodotto terminale (L-isoleucina) rallenta la velocità dell'intero processo.

L'enzima E₁ (treonina idratasi) è inibito allostericamente dall'L-isoleucina

Regolazione allosterica (1)

Meccanismo di controllo dell'attività di un enzima eseguito da un modulatore.

Enzimi omotropici (il modulatore è la stessa molecola di substrato)

Enzimi eterotropici (il modulatore è un metabolita diverso dal substrato)

Il legame con il modulatore induce una variazione nell'attività enzimatica: aumento (attivatore allosterico) o diminuzione (inibitore allosterico)

Si osserva per enzimi con struttura quaternaria (più subunità) che occupano posizioni chiave delle vie metaboliche.

Si basa sulla cooperatività di legame.

Regolazione allosterica (2)

L'andamento della velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato non viene descritta dalla equazione di Michaelis-Menten.

Il legame della molecola regolatrice modifica l'affinità del substrato per la subunità catalitica, provocando su di essa modifiche conformazionali. In genere si lega in posizioni diverse dal sito attivo.

Si possono riscontrare subunità catalitiche e subunità regolatorie

Regolazione allosterica (3)

Un esempio: l'aspartato transcarbamilasi (ATCasi)

Questo enzima è coinvolto nella prima tappa nella via anabolica della biosintesi delle basi pirimidiniche, il cui prodotto finale è il CTP (citidina trifosfato).

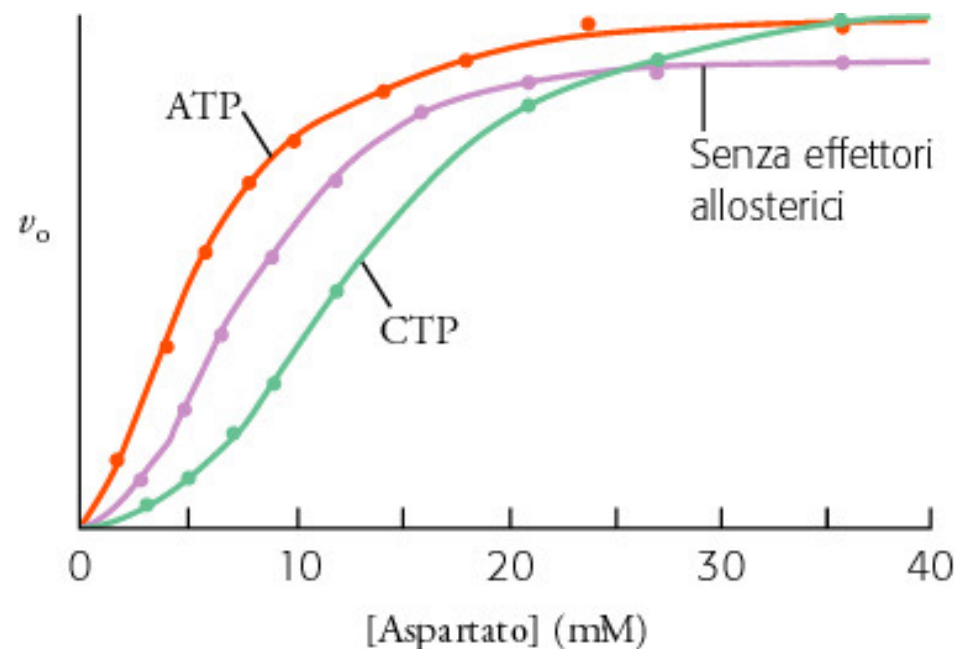
Catalizza la seguente reazione:

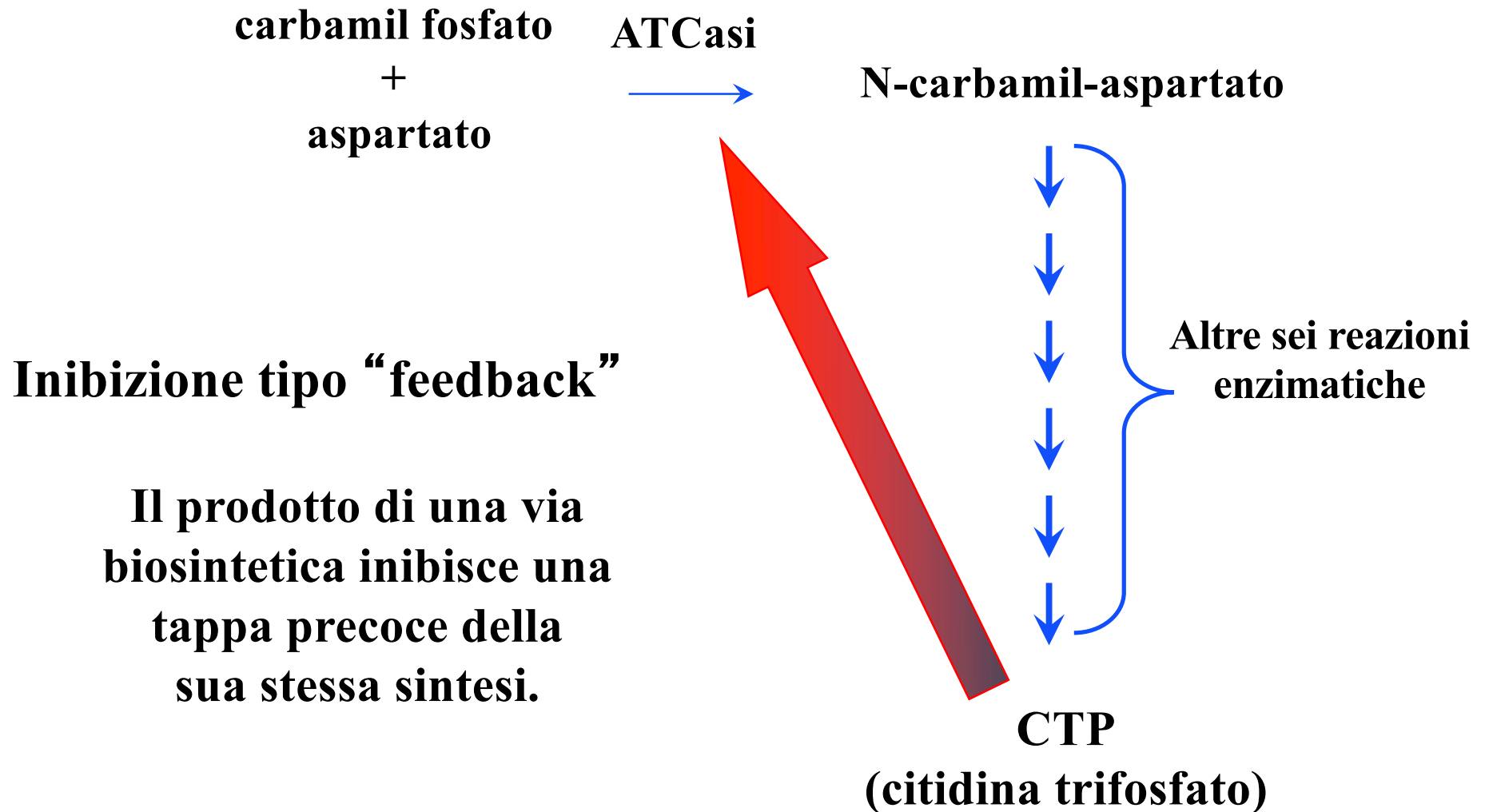


L'ATP è un attivatore allosterico

La CTP è un inibitore allosterico
(inibizione retroattiva)

Cinetica sigmoidale





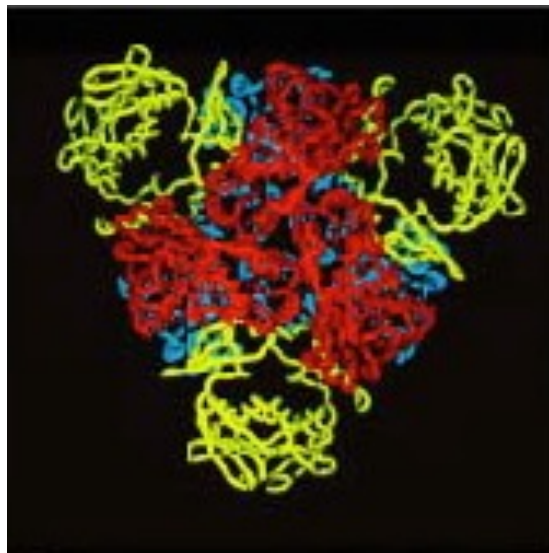
L' ATP è un attivatore in quanto mantiene le concentrazioni relative di purine e pirimidine intorno a valori costanti.

L'ATCasi un enzima costituito da 12 subunità, di cui sei cataliticamente attive e sei cataliticamente inattive ma che svolgono una azione regolatoria.

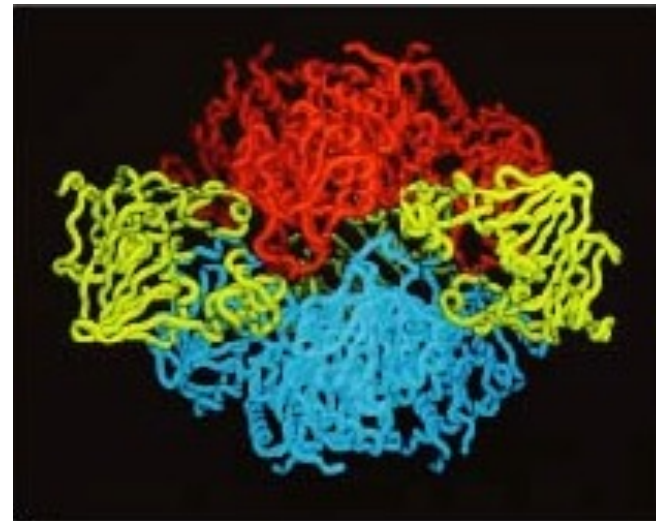
Le sei subunità catalitiche sono organizzate in due trimeri.

Le sei subunità regolatorie sono organizzate in tre dimeri.

I due trimeri catalitici (rosso e blu) sono tenuti insieme dai tre dimeri regolatori (giallo)



Visione dall'alto



Visione laterale

Le subunità catalitiche sono organizzate in due domini ognuno dei quali lega uno dei due substrati (CAF o Asp).

Ogni subunità catalitica esiste in due conformazioni diverse denominate forma R con alta affinità per i substrati e forma T con bassa affinità.

Il legame dei substrati alla forma R di una subunità provoca un cambio conformazionale sulle altre subunità catalitiche, che induce un aumento dell'affinità per il substrato di tutta l'ATCasi, in seguito alla trasformazione di queste dalla forma T a quella R.

Modello allosterico simmetrico.

Questo fenomeno non si verifica sui trimeri di subunità catalitiche isolati dai dimeri di subunità regolatorie.

I trimeri catalitici isolati seguono la cinetica di Michaelis-Menten.

I modulatori allosterici interagiscono con i dimeri regolatori.

L'attivatore allosterico ATP si lega alle subunità regolatorie quando l'ATCasi è nella forma R a più alta affinità per i substrati, provocandone una sua stabilizzazione.

L'inibitore allosterico CTP si lega alle subunità regolatorie quando l'ATCasi è nella forma T a più bassa affinità per i substrati, provocandone una sua stabilizzazione.

I modulatori allosterici quindi si legano alle subunità regolatorie ma inducono una stabilizzazione della forma appropriata dell'enzima.

Modifiche covalenti reversibili (1)

L'attività di alcuni enzimi regolatori è modulata mediante modifiche covalenti reversibili a carico dei gruppi R di uno o più residui amminioacidici.

I gruppi utilizzati per le modifiche covalenti sono:

gruppi fosforici, acetilici, adenilici, uridilici, metilici, ammidici, palmitoilici, etc.

La modifica comporta una variazione dell'attività dell'enzima che può sfavorire o favorire la reazione catalizzata.

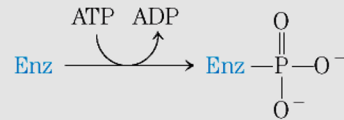
La fosforilazione è il tipo di modifica più importante ad opera di enzimi detti chinasi. Le fosfatasi sono enzimi che rimuovono i gruppi fosforici.

Modifiche covalenti reversibili (2)

Modificazione covalente
(residui bersaglio)

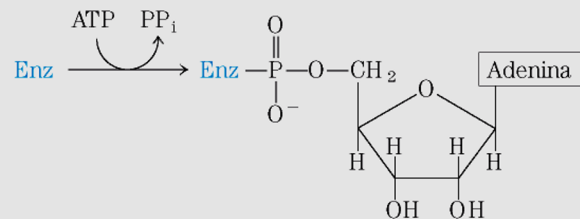
Fosforilazione

(Tyr, Ser, Thr, His)



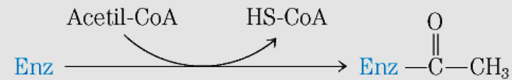
Adenilazione

(Tyr)



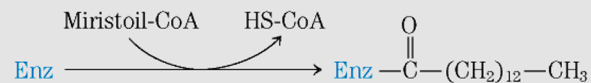
Acetilazione

(Lys, α-ammino gruppo [amminoterminale])



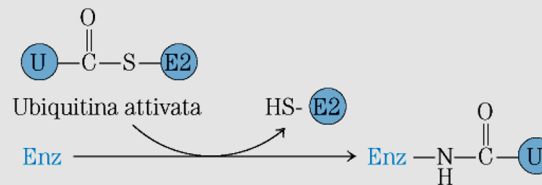
Miristoilazione

(α-ammino gruppo [amminoterminale])



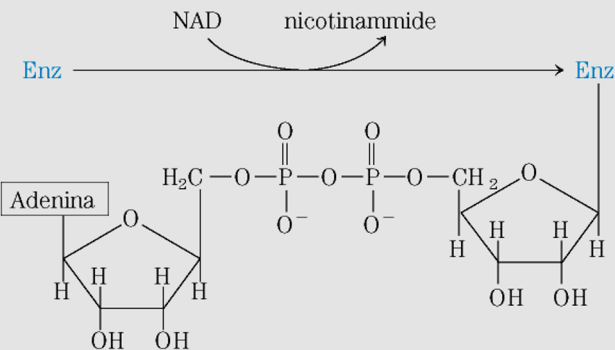
Ubiquitinazione

(Lys)



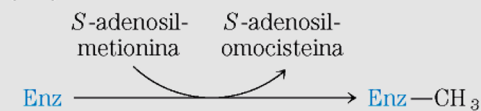
ADP-ribosilazione

(Arg, Gln, Cys, diftamide: una His modificata)

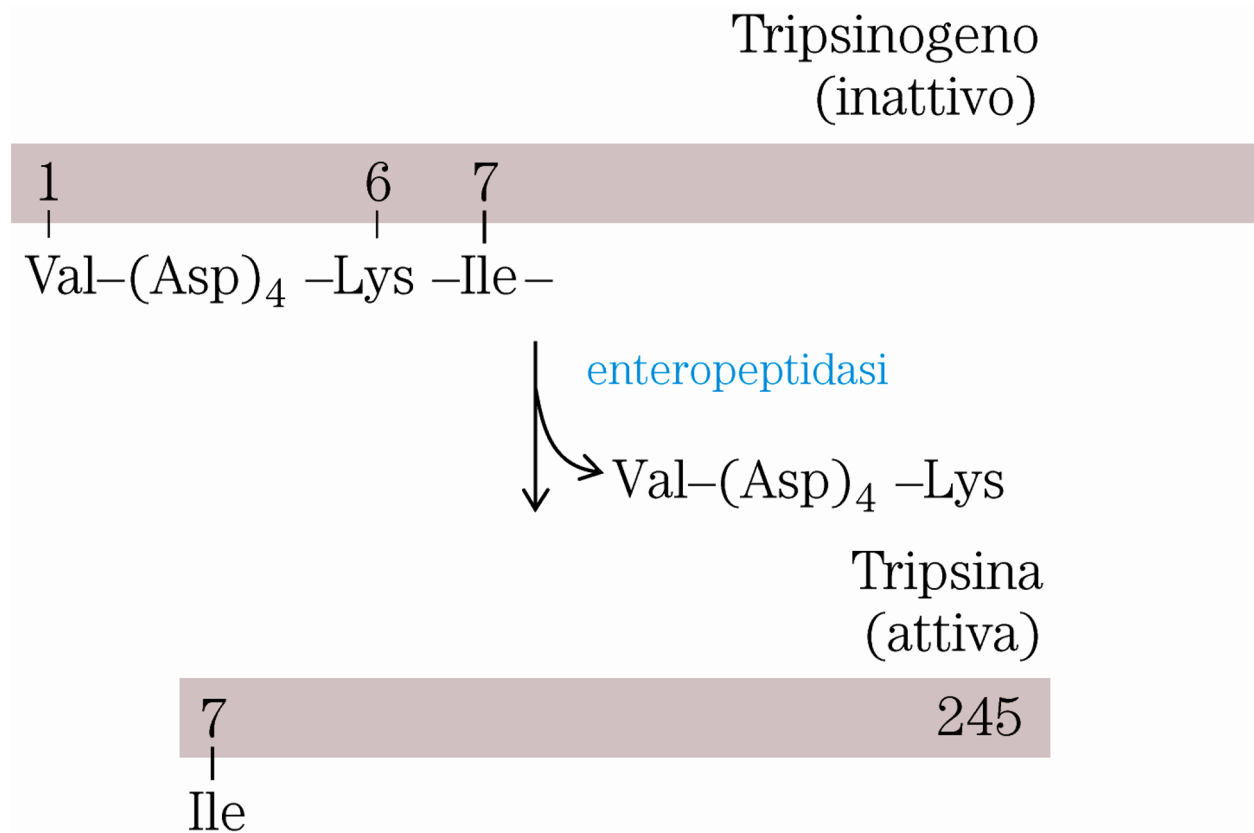


Metilazione

(Glu)



Attivazione proteolitica degli zimogeni (1)



Conversione irreversibile di un enzima dallo stato inattivo (zimogeno o proenzima) alla forma attiva mediante idrolisi di pochi o anche un solo legame peptidico

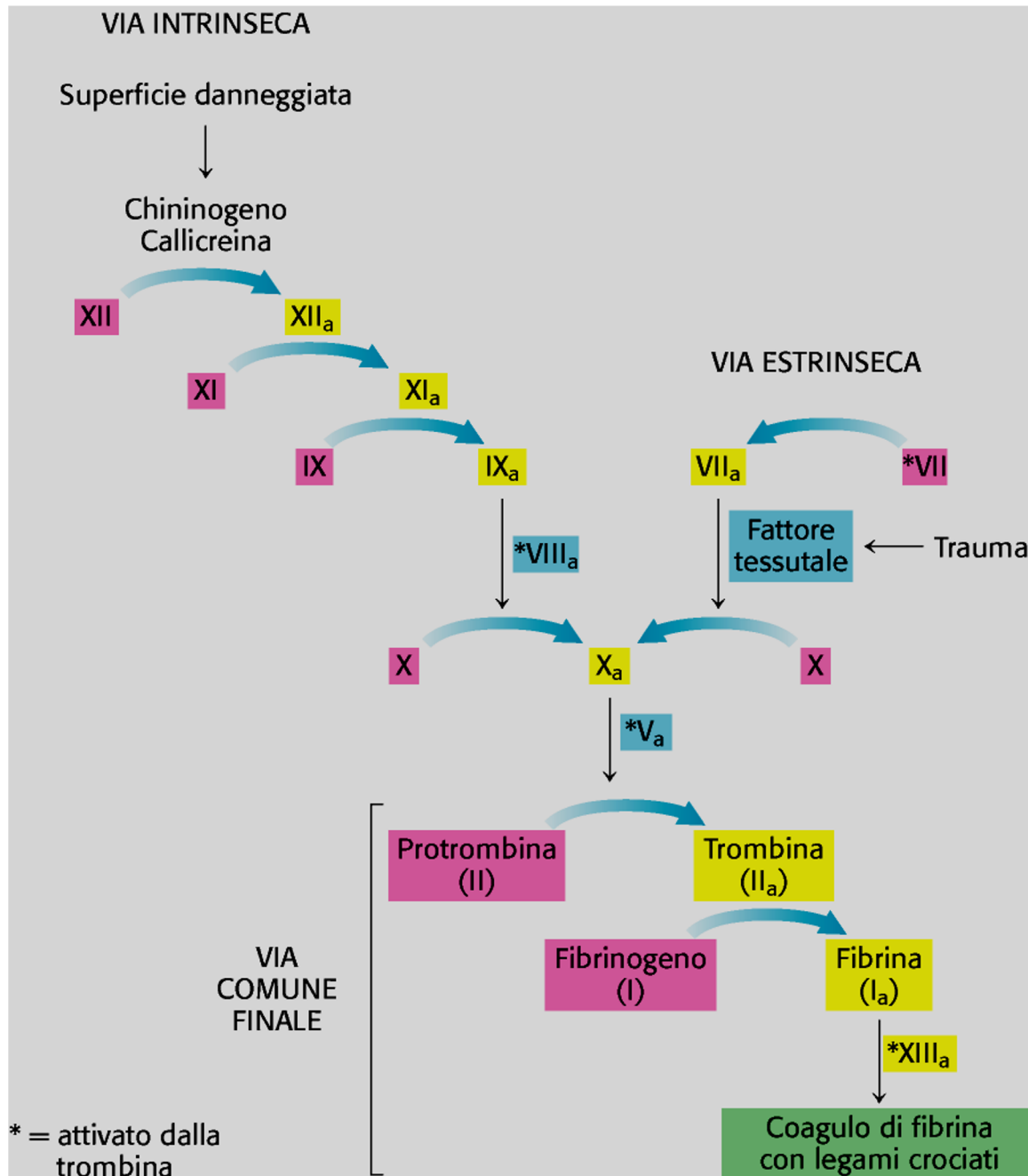
Attivazione proteolitica degli zimogeni (2)

Questo meccanismo di regolazione si verifica:

- negli enzimi digestivi (chimotripsina, tripsina, pepsina)**
- enzimi della coagulazione del sangue, risposta rapida in seguito ad un trauma o danno tissutale (cascata di attivazioni proteolitiche con attivazione della protrombina in trombina)**
- enzimi coinvolti nelle morte cellulare programmata o apoptosi (attivazione delle caspasi dalle procaspasi)**

Cascata della coagulazione del sangue

La fase finale del processo di coagulazione della cascata consiste nella conversione del fibrinogeno in fibrina catalizzata dalla trombina



Isoenzimi

- **Gli isoenzimi o isozimi sono forme multiple di un enzima, presenti nello stesso organismo.**
- **Sono proteine omologhe con diversa struttura primaria che catalizzano la stessa reazione ma possiedono valori diversi di K_m e V_{max} e proprietà regolatorie diverse.**
- **Spesso gli isoenzimi sono espressi in maniera tessuto specifica o in uno specifico organello o in uno stadio ben preciso dello sviluppo embrionale consentendo così la regolazione di un specifica reazione in distretti cellulari e/o tempi diversi.**