

REGOLAZIONE ENZIMATICA

Cambio conformazionale

- In molte molecole proteiche, cambiamenti strutturali possono determinare profondi cambiamenti nella funzione o nell'attività.
- Il cambio conformazionale può avvenire in risposta ad interazioni con altre molecole quali:
 - *Substrato, analoghi del substrato, prodotti finali di vie metaboliche*
 - *Modulatori allosterici*
 - *Legame covalente di gruppi*
 - *Subunità regolative o proteine accessorie*
 - *Enzimi proteolitici*

Regolazione dell'attività enzimatica

INIBIZIONE

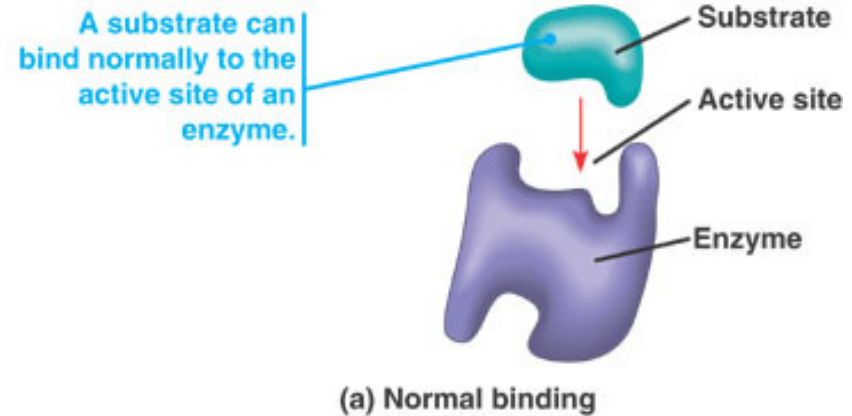
1. Irreversibile
2. Reversibile
 - A. Competitiva
 - B. Non-competitiva
 - C. Acompetitiva

REGOLAZIONE COVALENTE

- Fosforilazione/defosforilazione
- Proteolisi (zimogeni)

REGOLAZIONE ALLOSTERICA

- inibizione
- attivazione
- cooperatività



REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI PROTEINE MEDIANTE MODIFICAZIONE COVALENTE REVERSIBILE

| Covalent modification | Amino acid residues known to accept covalent modification |
|---|---|
| <p>Phosphorylation</p> <p> $\text{Enz} \xrightarrow{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}} \text{Enz}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2$ </p> | Tyr, Ser, Thr, His |
| <p>Adenylylation</p> <p> $\text{Enz} \xrightarrow{\text{ATP} \rightarrow \text{PP}_i} \text{Enz}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{ribose}-\text{adenine}$ </p> | Tyr |
| <p>Uridylylation</p> <p> $\text{Enz} \xrightarrow{\text{UTP} \rightarrow \text{PP}_i} \text{Enz}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{ribose}-\text{uridine}$ </p> | Tyr |
| <p>ADP-ribosylation</p> <p> $\text{Enz} \xrightarrow{\text{NAD} \rightarrow \text{nicotinamide}} \text{Enz}-\text{ribose}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{ribose}-\text{adenine}$ </p> | Arg, Gln, Cys, diphthamide (a modified His) |
| <p>Methylation</p> <p> $\text{Enz} \xrightarrow{\text{S-adenosyl-methionine} \rightarrow \text{S-adenosyl-homocysteine}} \text{Enz}-\text{CH}_3$ </p> | Glu |

Conseguenze funzionali delle modifiche post-traduzionali

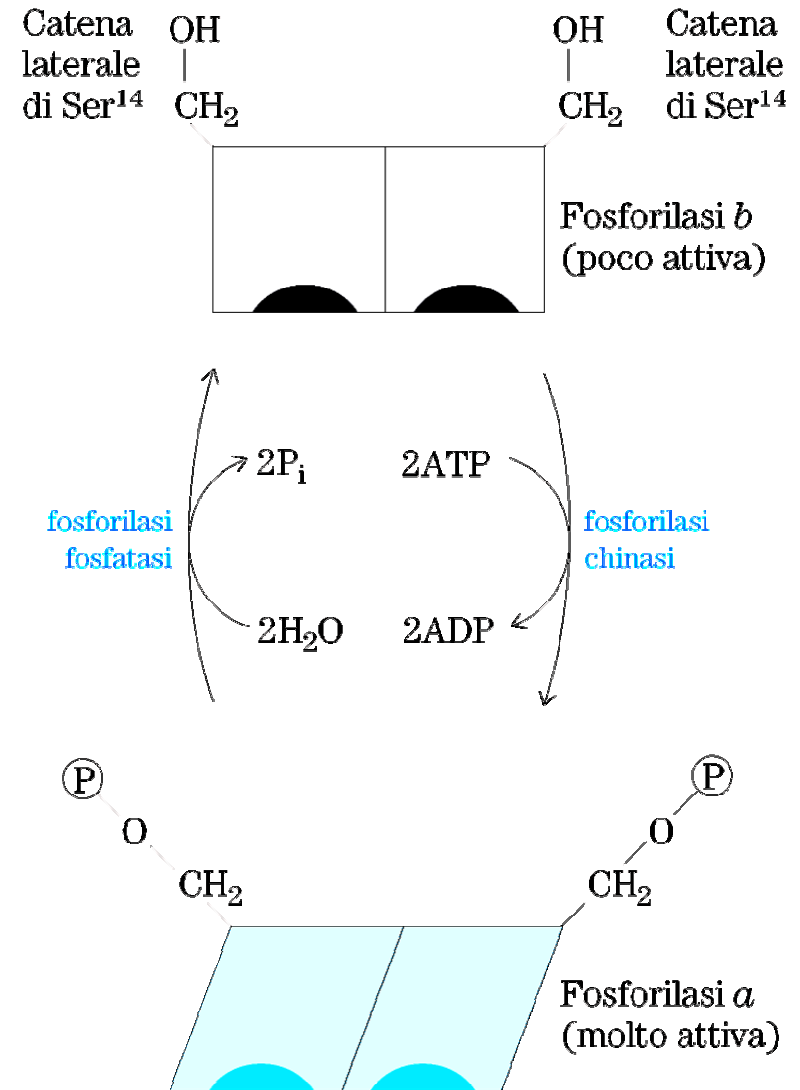
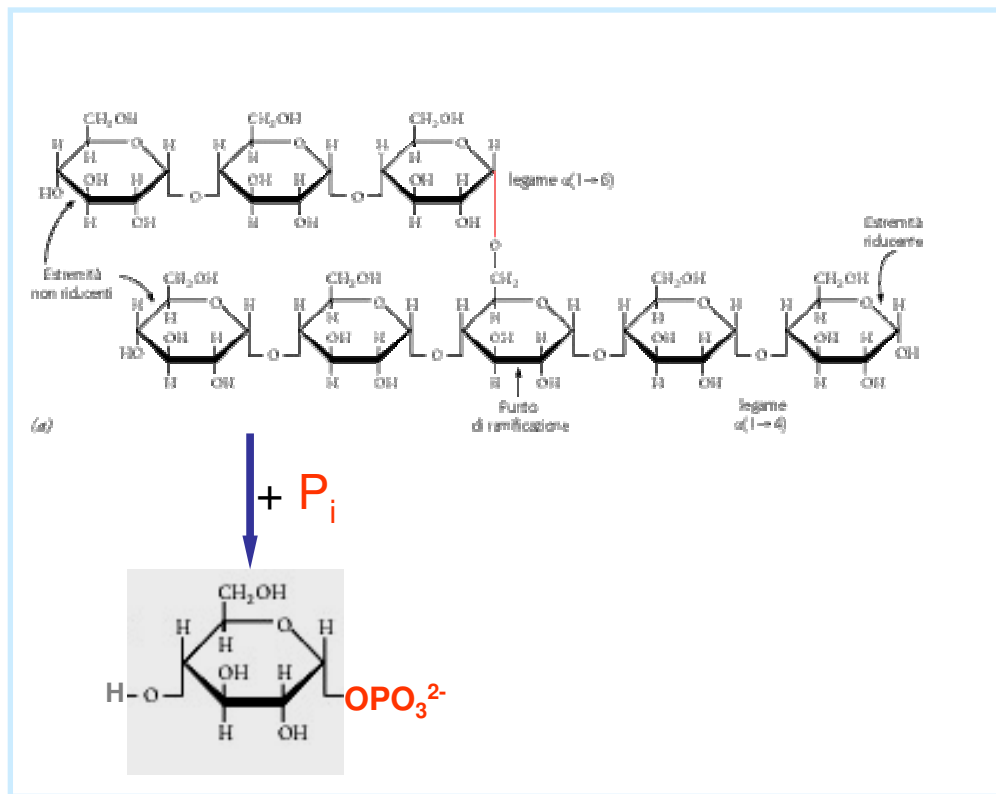
- Attivazione/inibizione
- Localizzazione
- Acquisizione di una nuova funzione
- Aumento della stabilità meccanica
- Degradazione proteolitica

Es: **La fosforilazione** è un importante meccanismo di regolazione delle vie metaboliche

Enzimi che catalizzano la reazione di fosforilazione: CHINASI

Enzimi che rimuovono il gruppo fosfato: FOSFATASI

Esempio: Regolazione dell'attività della glicogeno fosforilasi



REGOLAZIONE ENZIMATICA

Attivazione degli zimogeni

Precursore inattivo (zimogeno o proenzima)

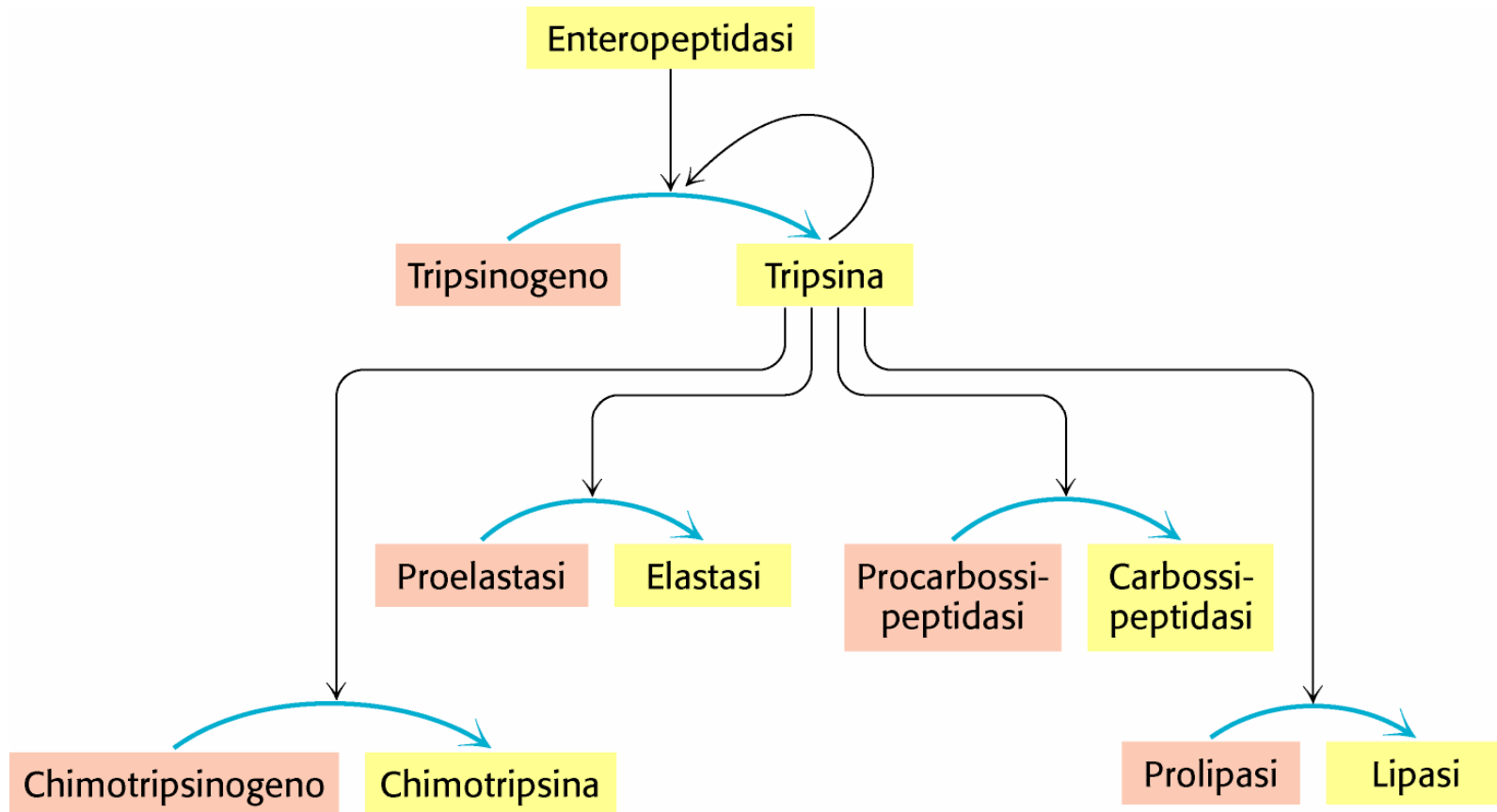


Taglio proteolitico

Enzima attivo

ATTIVAZIONE IRREVERSIBILE!

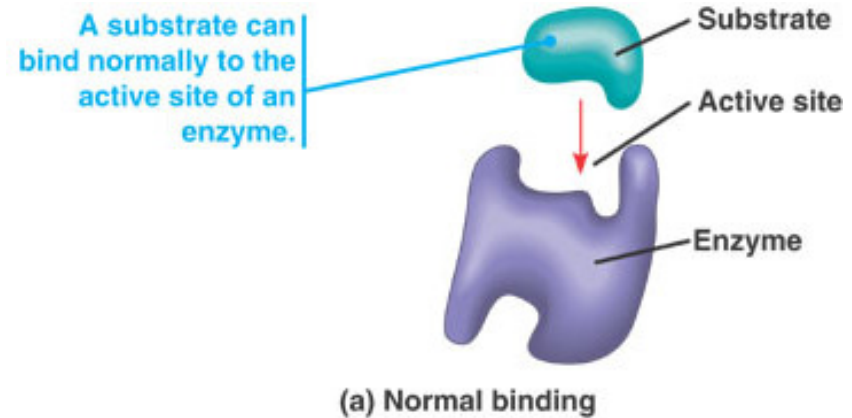
ATTIVAZIONE DEGLI ZIMOGENI



Regolazione dell'attività enzimatica

INIBIZIONE

1. Irreversibile
2. Reversibile
 - A. Competitiva
 - B. Non-competitiva
 - C. Acompetitiva



REGOLAZIONE COVALENTE

- Fosforilazione/defosforilazione
- Proteolisi (zimogeni)

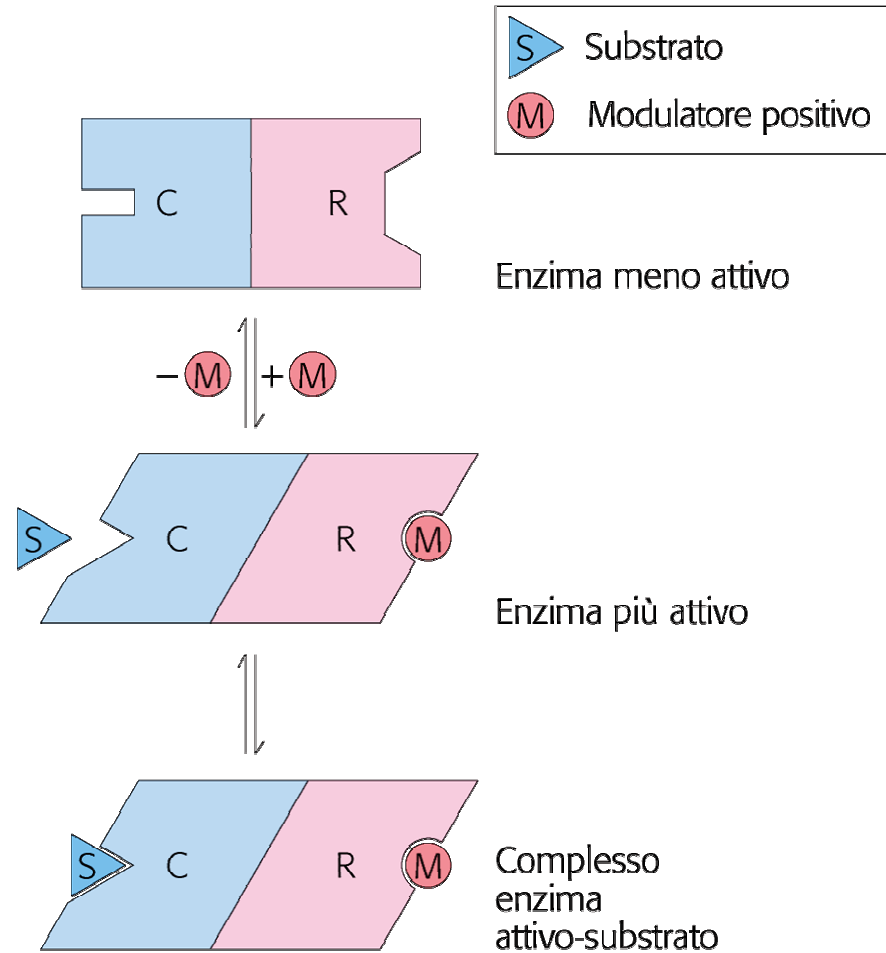
REGOLAZIONE ALLOSTERICA

- inibizione
- attivazione
- cooperatività

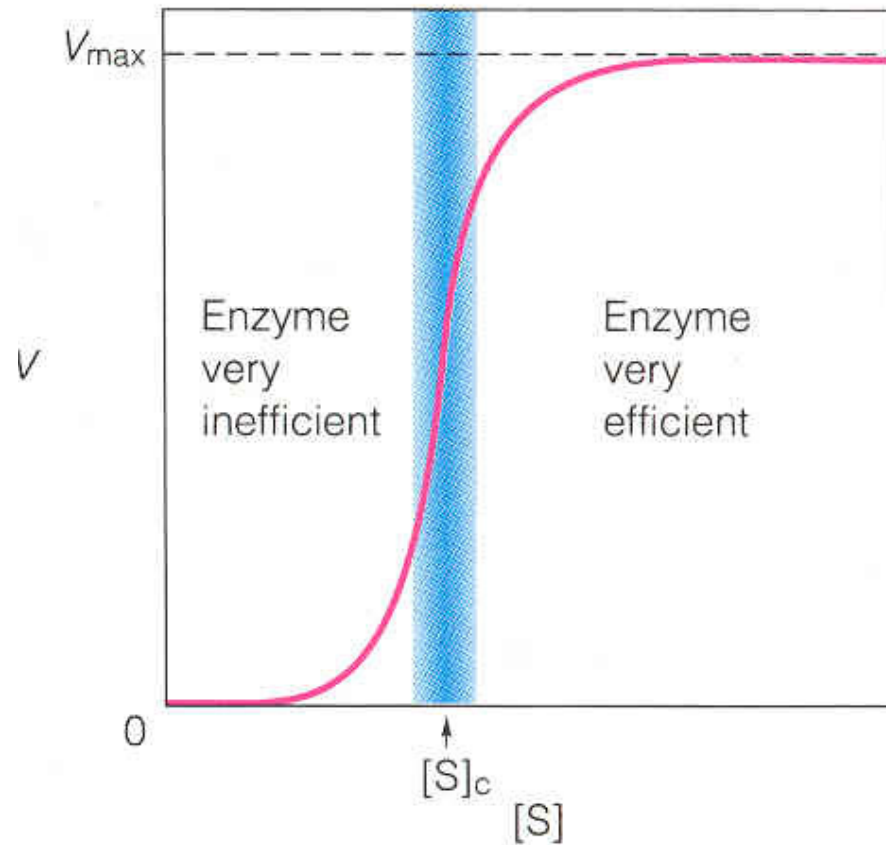
Gli ENZIMI ALLOSTERICI

- enzimi la cui attività è influenzata da cambiamenti conformazionali mediati dall'interazione con piccole molecole (effettori o modulatori)
- effettori o modulatori si legano ad **un sito diverso** dal sito attivo
 - effettori **negativi**: riducono l'attività dell'enzima
 - effettori **positivi**: fanno aumentare l'attività dell'enzima
- sono costituiti da più subunità

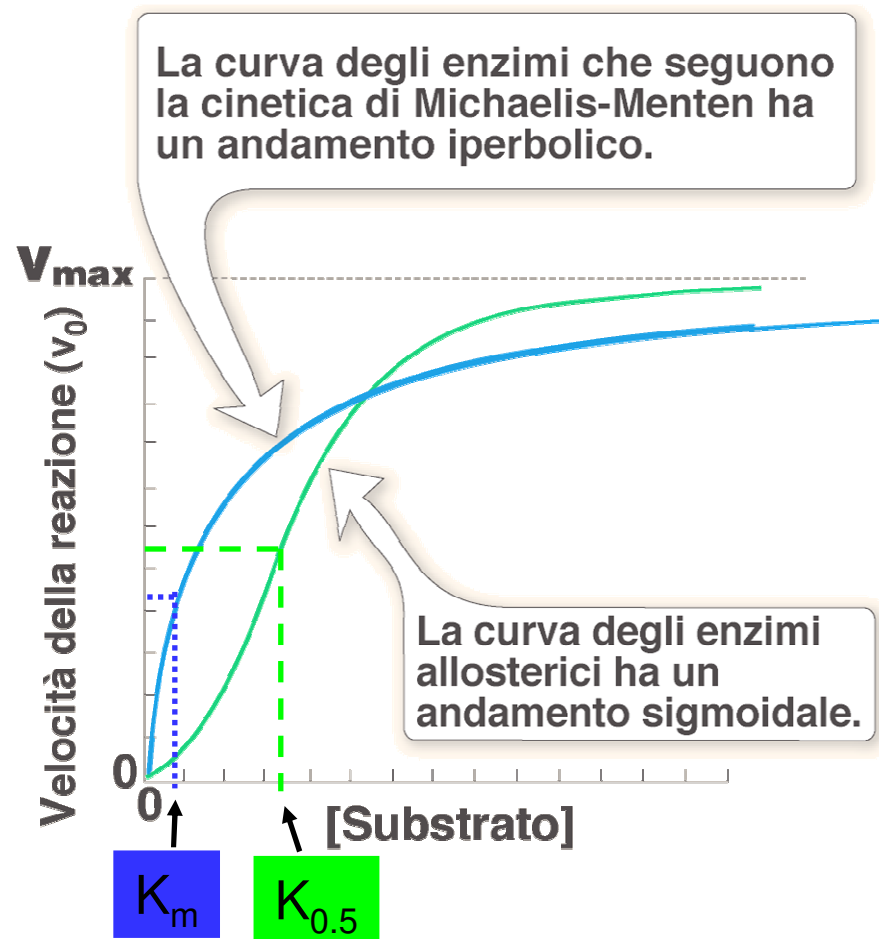
...sito catalitico e sito del modulatore su subunità diverse...



Il controllo allosterico ottimizza l'efficienza di un enzima



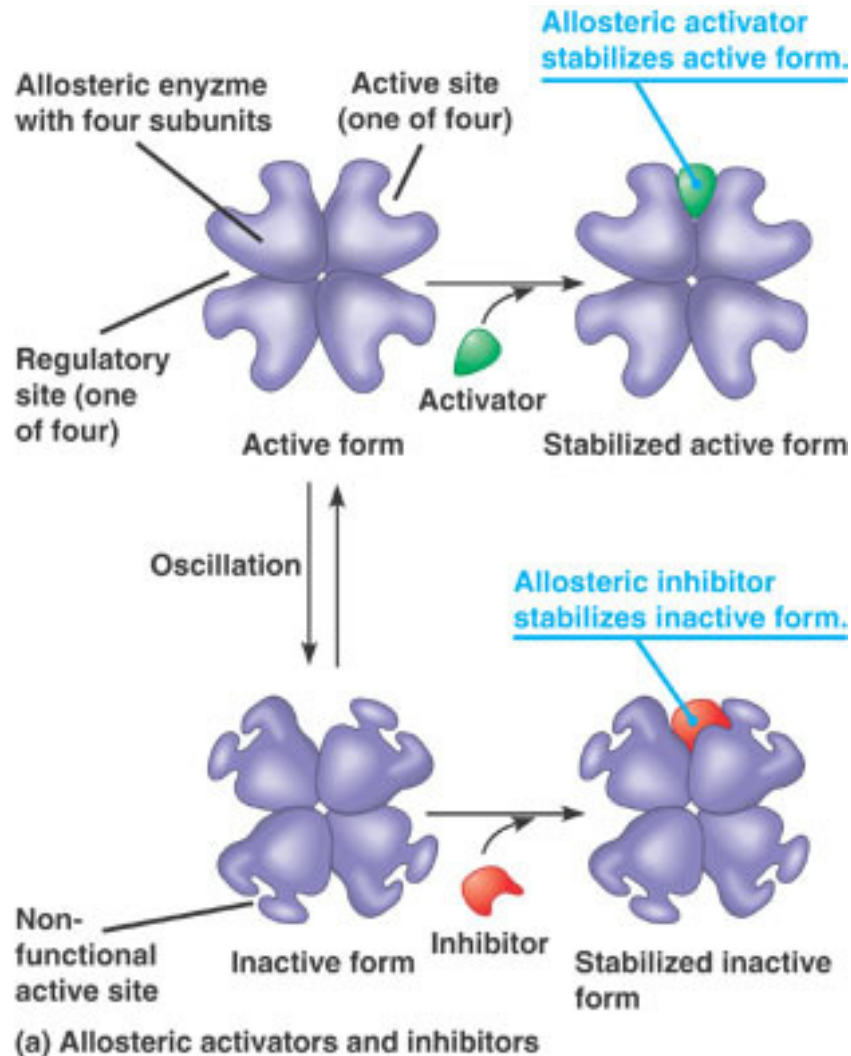
Il legame di una molecola di ligando influenza l'attività al secondo sito



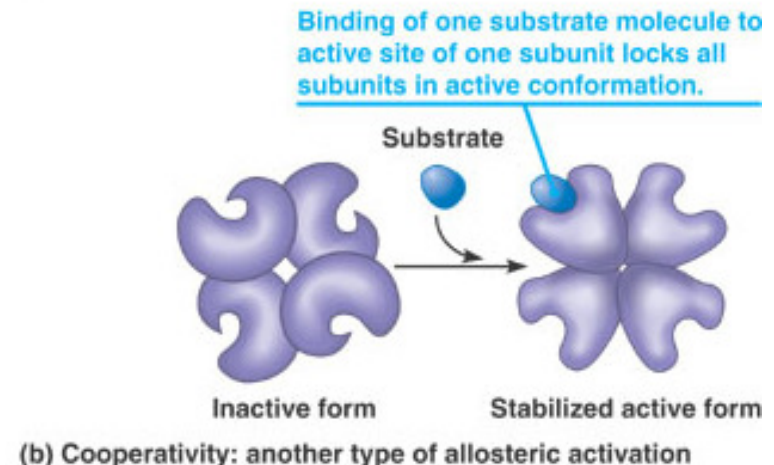
Negli enzimi allosterici la curva della velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato ha un andamento sigmoidale

REGOLAZIONE ALLOSTERICA

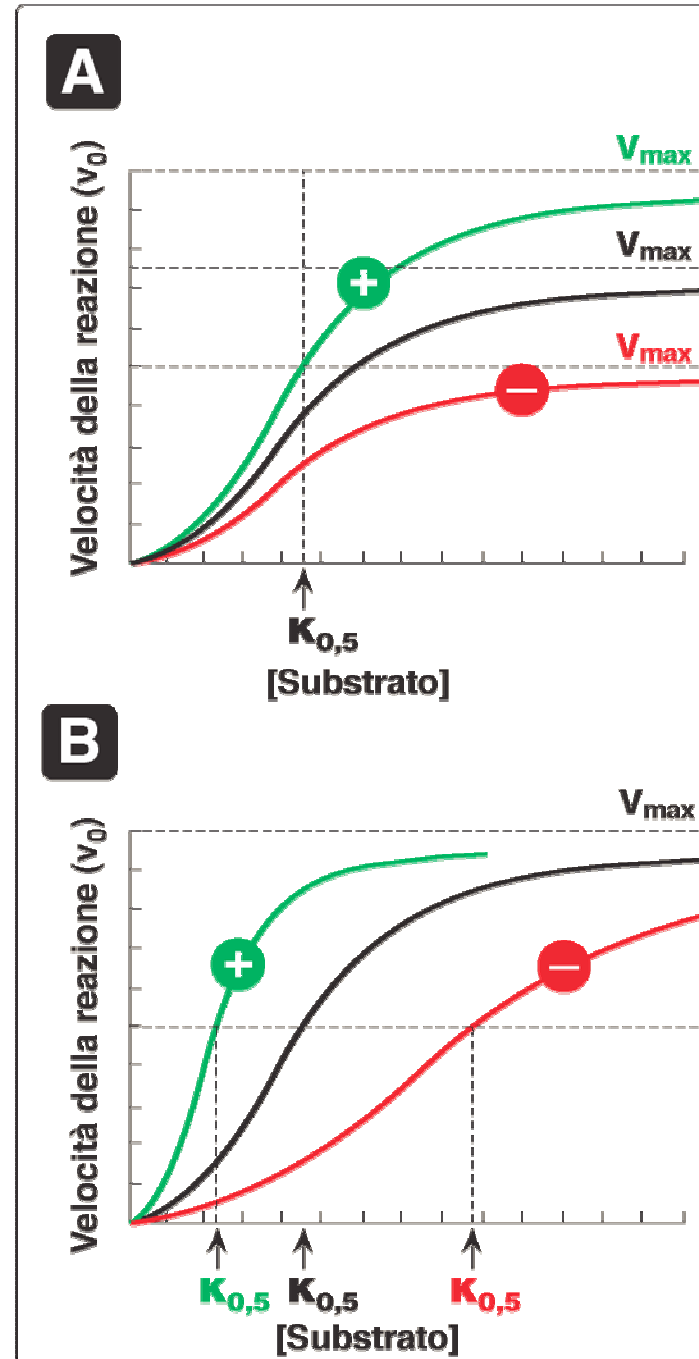
- L'attività dell'enzima può essere regolata da sostanze che si legano a domini di regolazione (subunità) differenti dal sito attivo degli enzimi.
- Gli effettori allosterici possono essere **INIBITORI** o **ATTIVATORI**



COOPERATIVITÀ



Un effettore allosterico può modificare l'affinità dell'enzima per il substrato ($K_{0,5}$) o la velocità catalitica massima (V_{max}) o entrambi i parametri



ALLOSTERIA

Effetto omotropico: *il substrato stesso funge da effettore*

Cooperatività positiva: interazioni omotropiche positive tra siti catalitici

Cooperatività negativa interazioni omotropiche negative tra siti catalitici

Effetto eterotropico: *l'effettore è un composto diverso dal substrato*

Interazioni eterotropiche positive tra siti catalitici e di regolazione

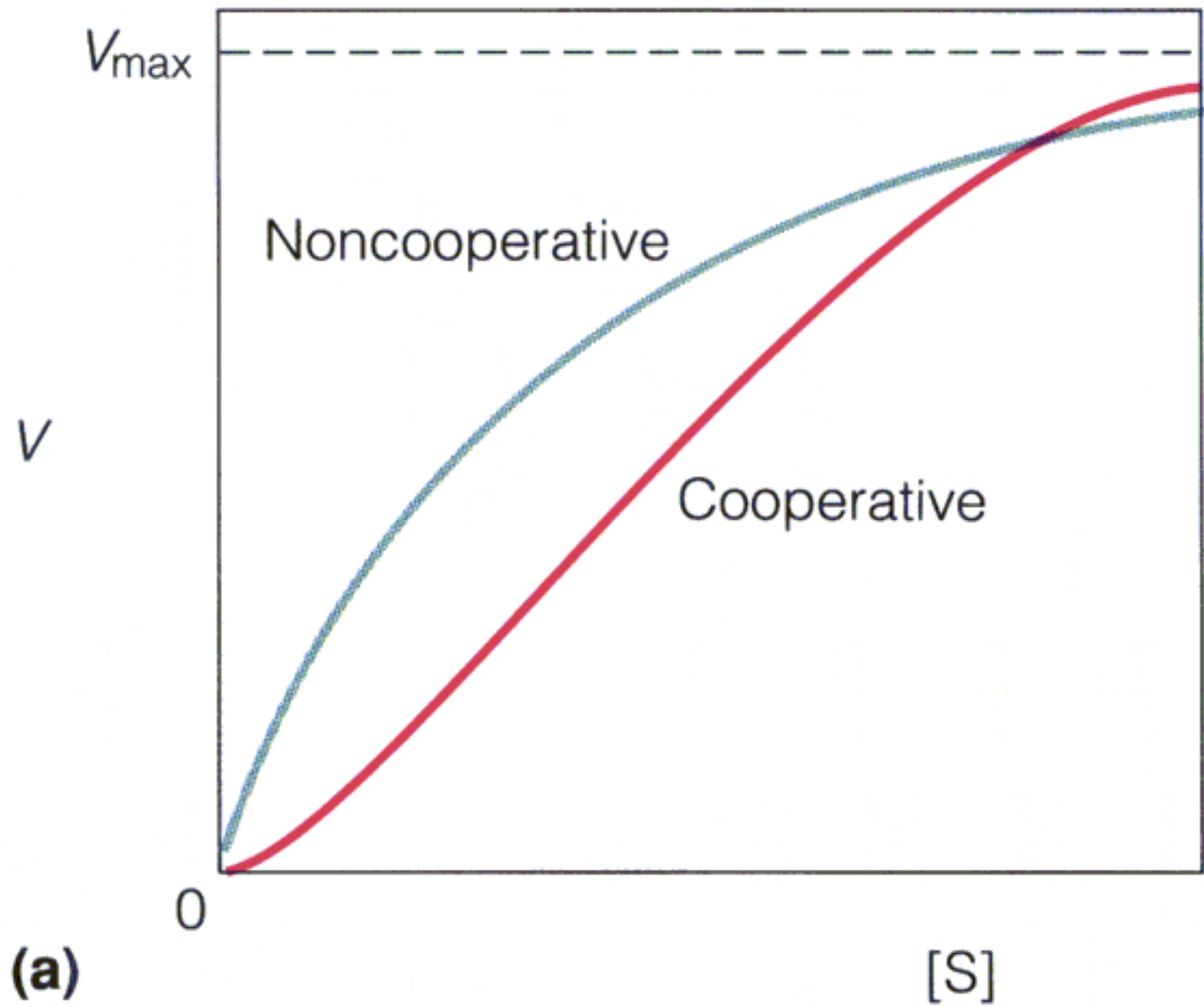
Interazioni eterotropiche negative tra siti catalitici e di regolazione

....**Esistono poi**....

Interazioni omotropiche positive tra siti di regolazione per il legame di un effettore positivo

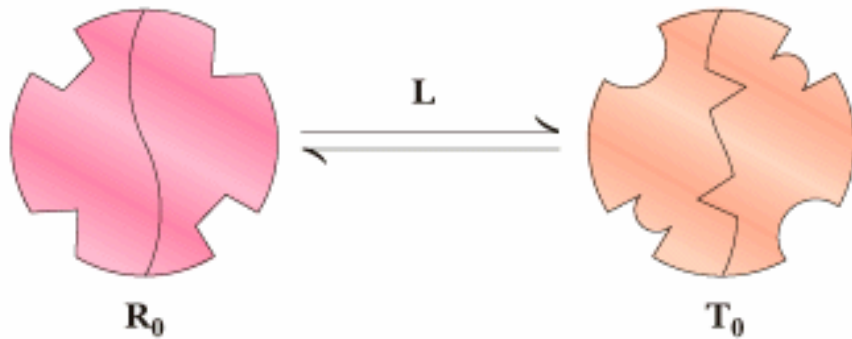
Interazioni omotropiche negative tra siti di regolazione per il legame di un effettore negativo

Cooperatività



Cooperatività positiva

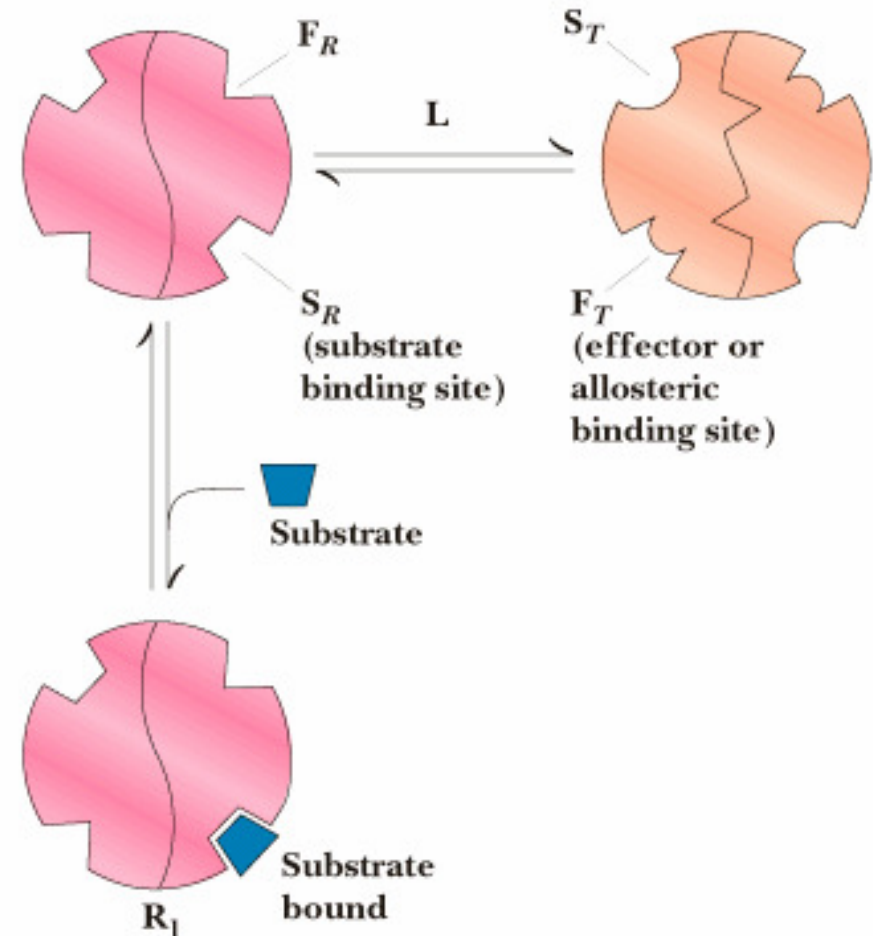
(a) A dimeric protein can exist in either of two conformational states at equilibrium.



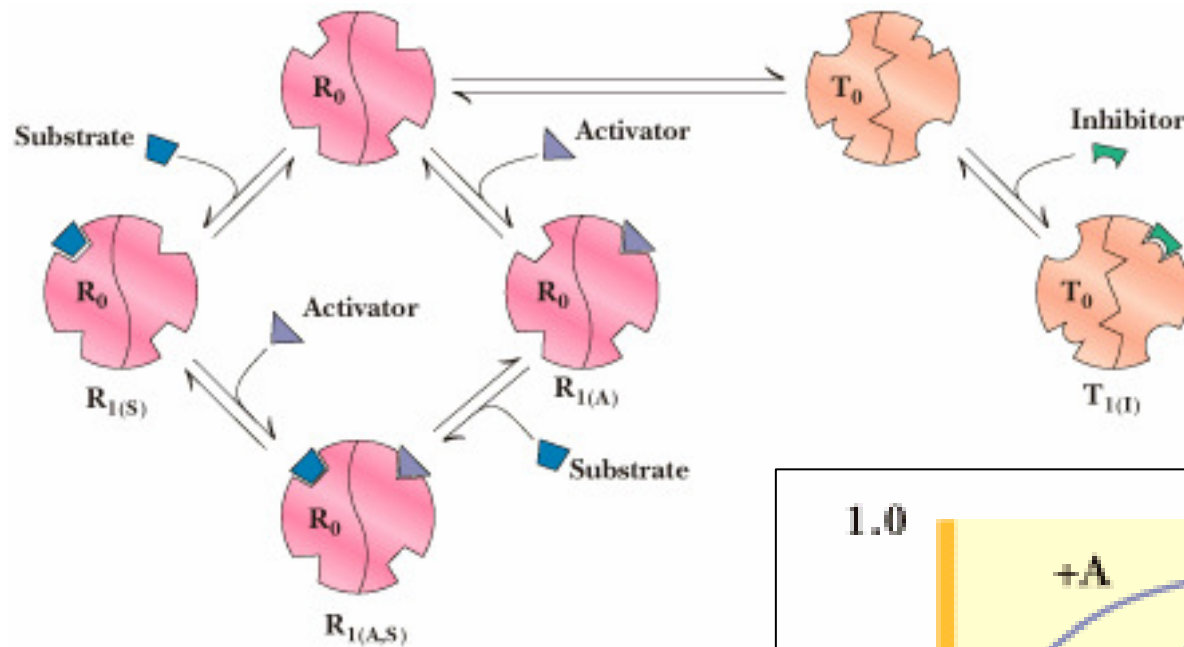
$$L = \frac{T_0}{R_0} \quad L \text{ is large. } (T_0 \gg R_0)$$

Il legame del substrato può stabilizzare lo stato R e quindi spostare l'equilibrio verso lo stato R.

(b) Substrate binding shifts equilibrium in favor of R.

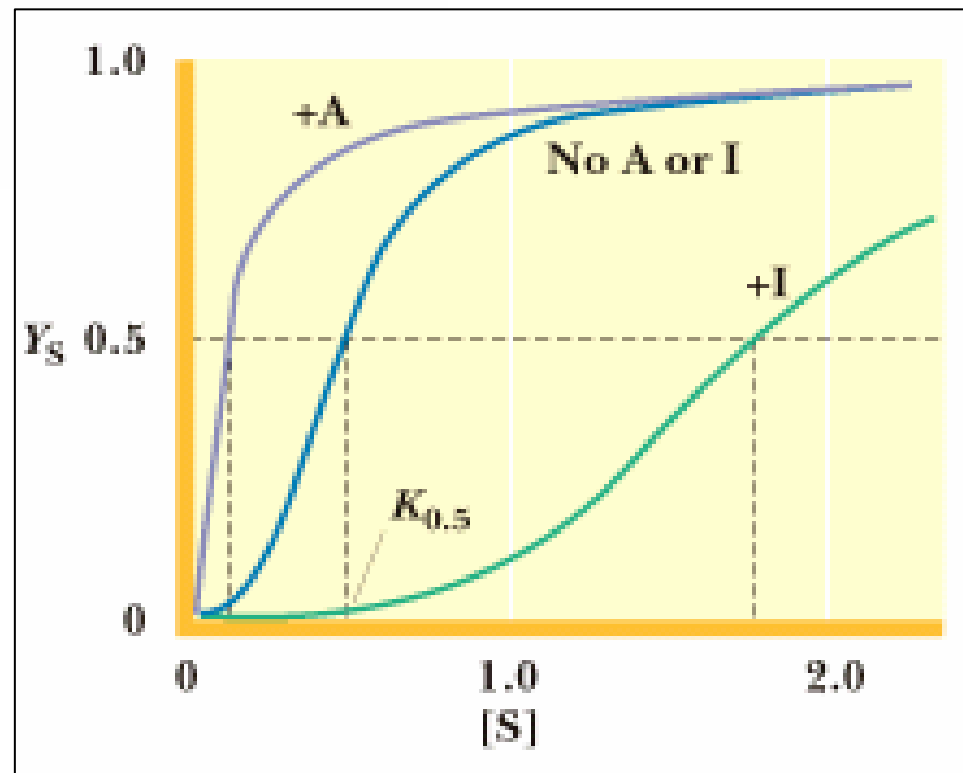


Effettore eterotropico



Un inibitore stabilizza lo stato T: enzima meno attivo

Un attivatore stabilizza lo stato R: enzima più attivo.



Understanding Protein Allostery

Protein allostery has been investigated from a kinetic perspective. Models were created to explain kinetic findings.

1904 - Cooperativity discovered in Hemoglobin.

- C. Bohr observed a sigmoid binding curve for O₂

1913 - Hill Plot

- Measure cooperative binding of Hemoglobin.

1913 - Michaelis-Menten Kinetics

- Describe the rate of enzyme mediate reactions.

1965 - MWC Model

- Concerted Model: Jacques Monod, Jeffries Wyman, and Jean-Pierre Changeux

1966 - KNF Model

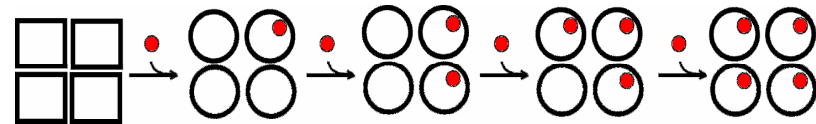
- Sequential Model: Daniel Koshland, George Nemethy, and David Filmer

Modelli classici per spiegare l'allosteria

Modello MWC (1965)

- Modello concertato.
- I cambiamenti allosterici si verificano all'unisono

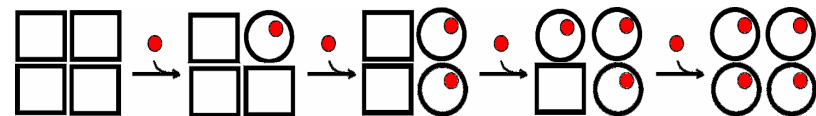
JMB, 12: 88-118



Modello KNF(1966)

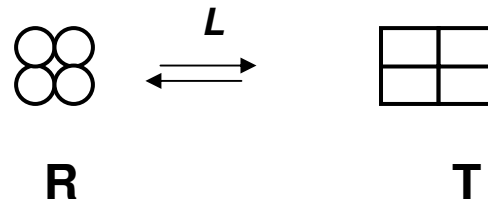
- Modello sequenziale
- I cambiamenti allosterici si verificano in sequenza.

Biochemistry, 5: 365-385

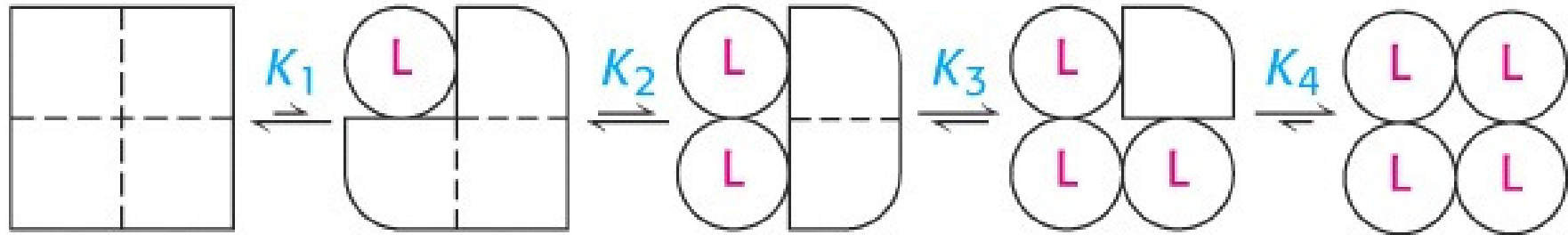


Modelli allosterici (concertato)

- L'oligomero presenta un asse di simmetria
- Il modello concertato assume che l'enzima abbia due stati: T (teso) ed R (rilassato). I substrati e gli attivatori si legano meglio alla forma R, gli inibitori meglio alla forma T.
- Il primo effettore che si lega cambia la conformazione di tutte le subunità contemporaneamente.
- La simmetria è conservata

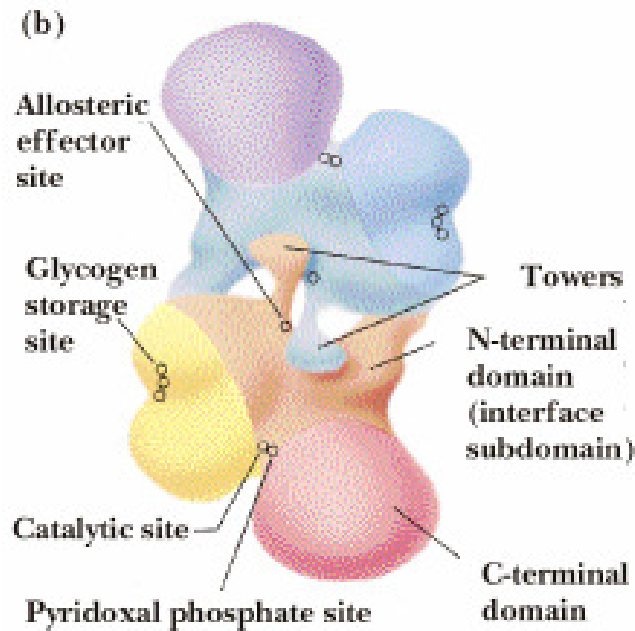


Modelli allosterici (sequenziale)



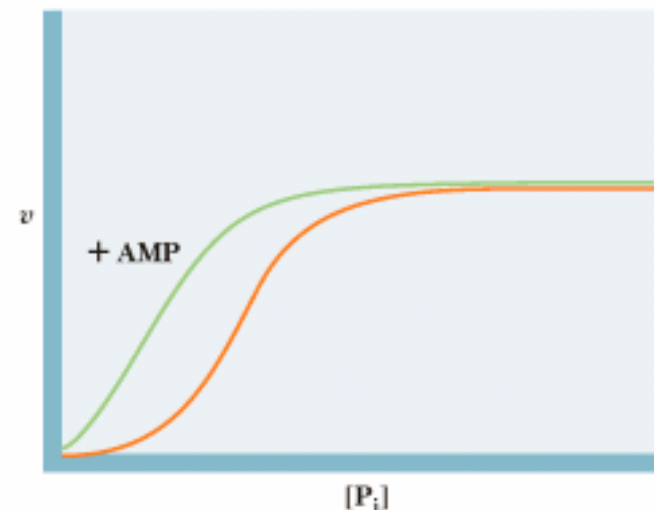
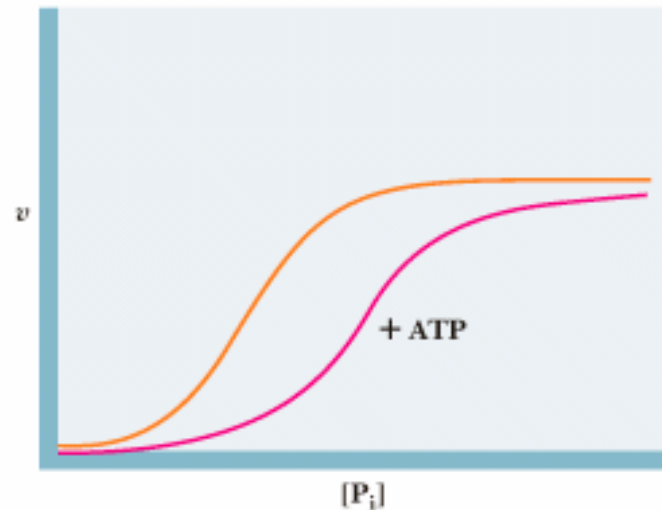
- In assenza di ligando l'enzima esiste in un solo stato conformazionale.
- In questo modello, ciascun protomero può essere sia nella forma T che nella forma R indipendentemente dalle altre subunità.
- Il legame della prima molecola di ligando determina un cambio conformazionale che è comunicato alle altre subunità in maniera sequenziale.
- In termini di costanti di legame: $K_1 > K_2 > K_3 > K_4$.
- L'ipotesi sequenziale accetta la possibilità che possano trovarsi enzimi misti, contenenti cioè entrambe le subunità. Ancora si avrebbe un equilibrio di cui le forme pure R e T rappresentano gli estremi di questo equilibrio.
- Il modello sequenziale spiega meglio la cooperatività negativa, dove il legame del primo ligando riduce l'affinità per i ligandi successivi.
- Nell'elaborazione del modello si determina Y considerando i differenti equilibri e le loro costanti di dissociazione

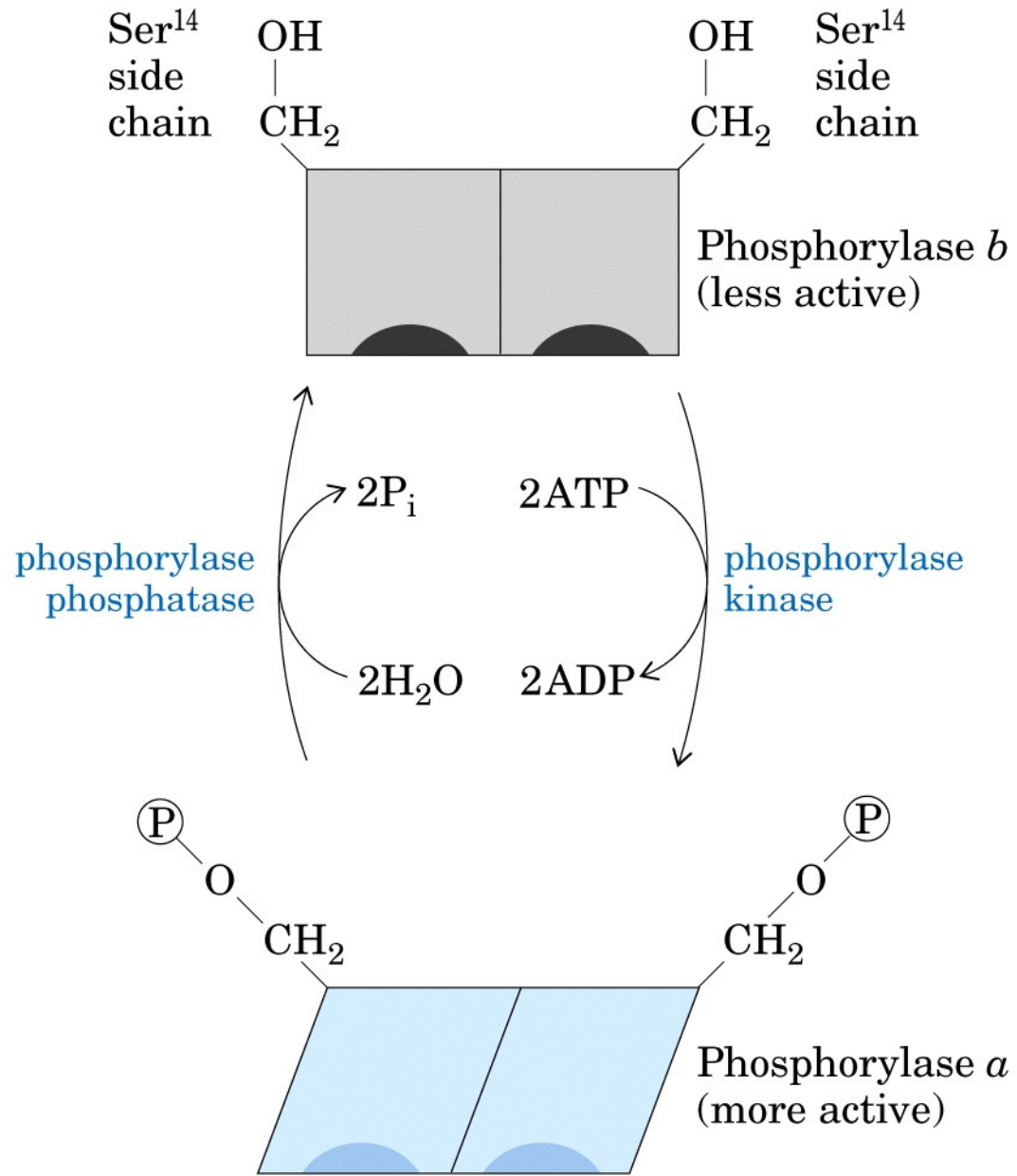
Esempio di regolazione allosterica



La glicogeno fosforilasi utilizza il fosfato per idrolizzare il glicogeno.

Esiste come dimero e risponde allostericamente al fosfato. ATP e AMP sono effettori allosterici. L'ATP è un inibitore, l'AMP un attivatore.



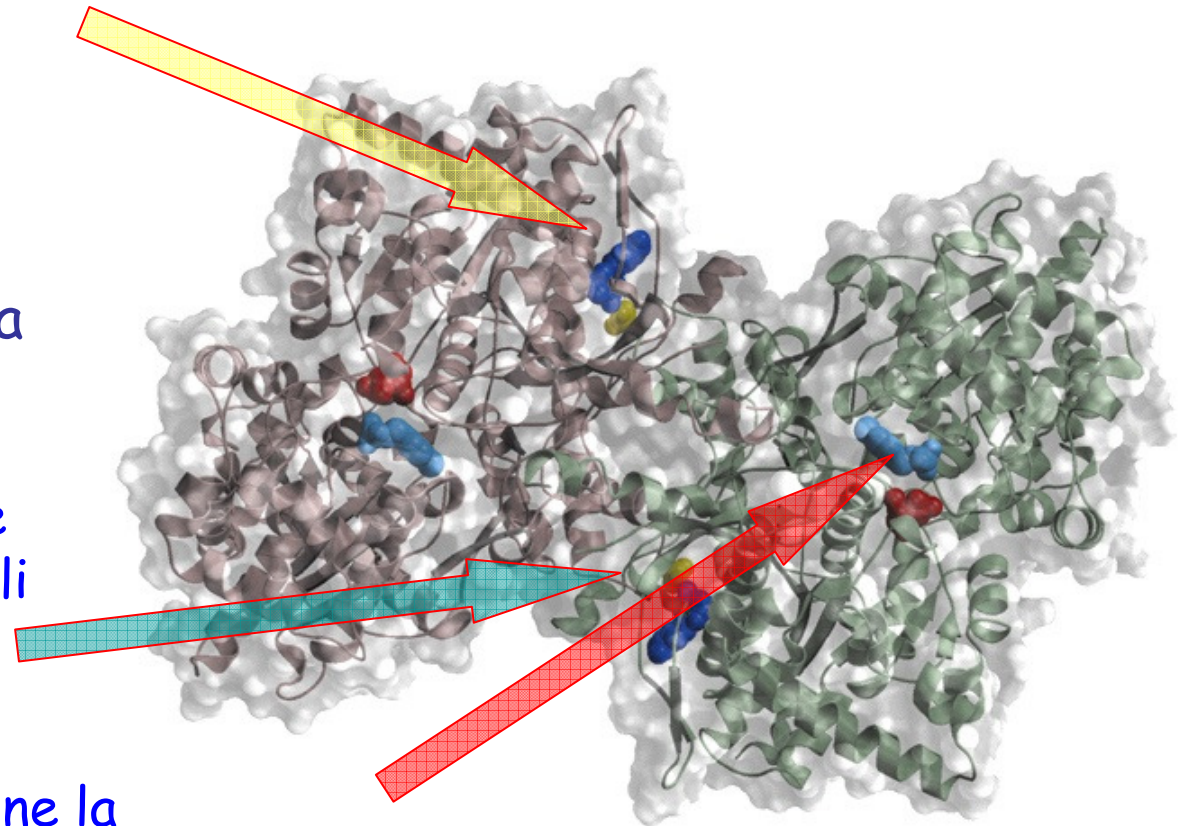


GLICOGENO FOSFORILASI (forma a)

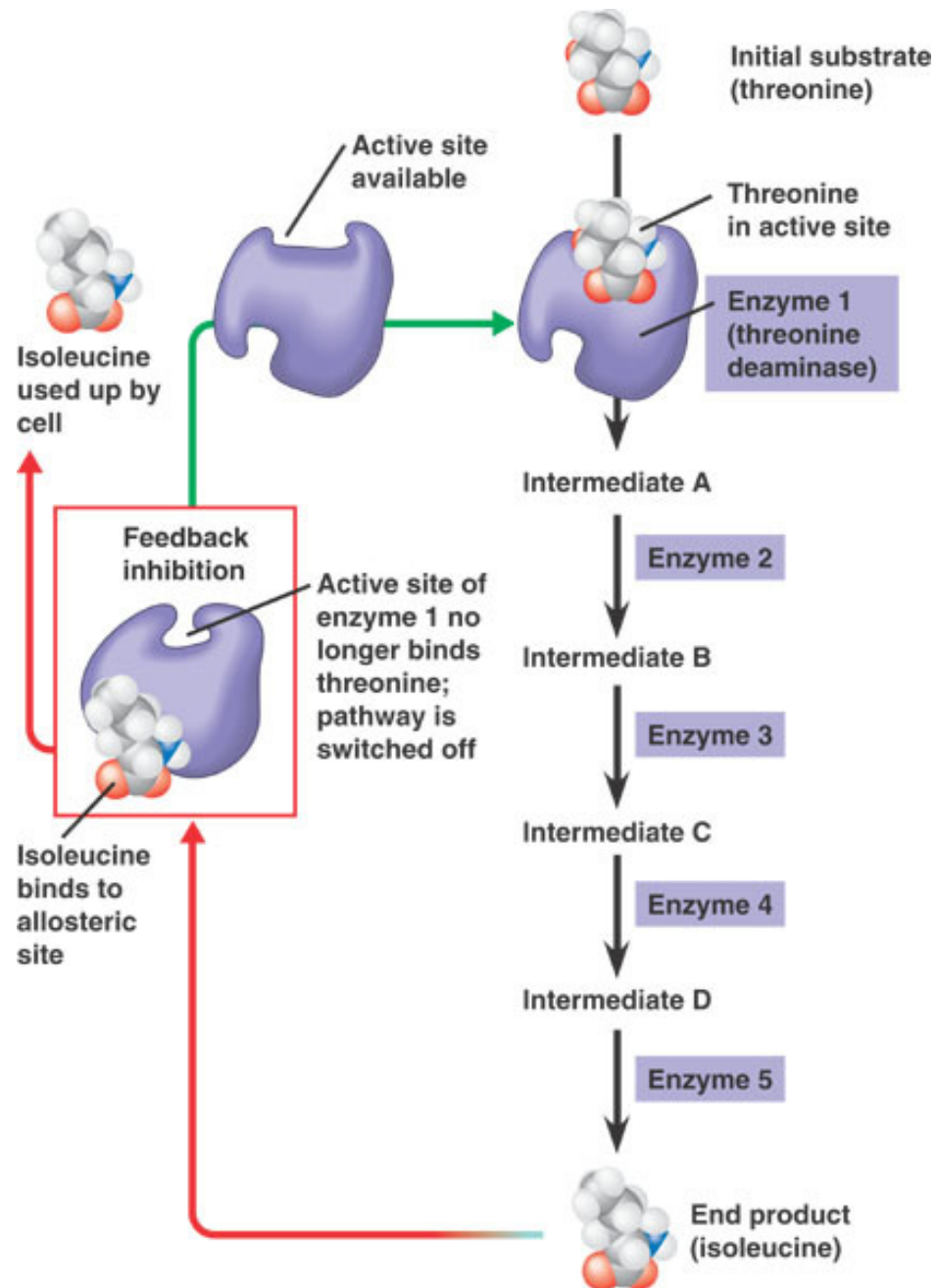
La fosforilazione della Ser¹⁴ in risposta all'epinefrina (muscolo)/glucagone (fegato), destabilizza l'N-terminale dell'enzima (forma attiva *a*)

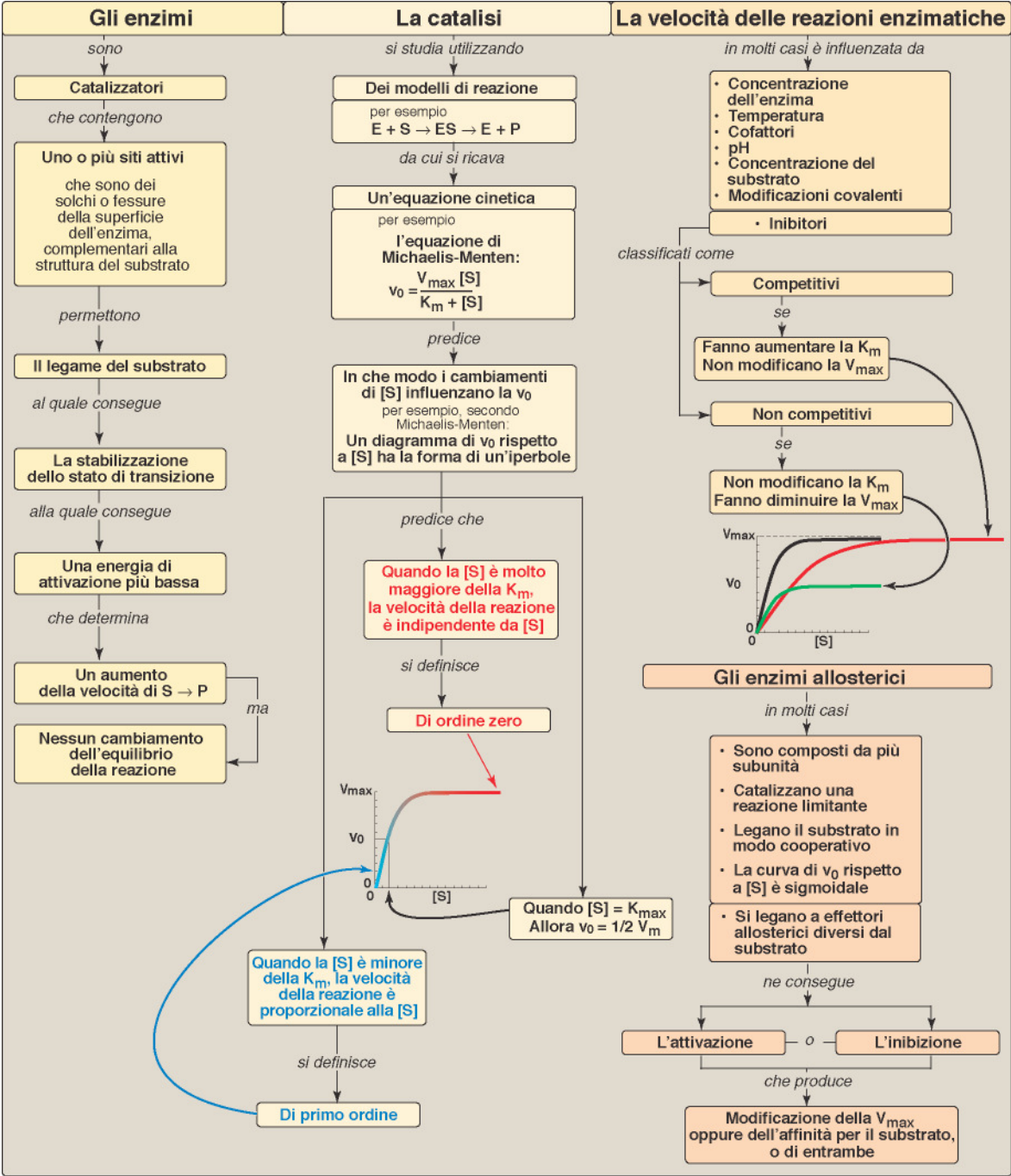
E' attivato allostericamente dall'AMP (cioè quando i livelli di ATP sono bassi)

La presenza di glucosio espone la Ser¹⁴-P all'azione della fosfatasi, convertendo l'enzima nella forma *b* non attiva.



REGOLAZIONE DA FEEDBACK





REGOLAZIONE ENZIMATICA

Necessaria per la COORDINAZIONE dei processi metabolici e per il mantenimento dell' OMEOSTASI

Può essere PASSIVA o ATTIVA

Regolazione Passiva

- # Molti enzimi si trovano normalmente in una situazione tale per cui $[S]=K_M$.
- # Una singola reazione chimica può regolare un'intera via metabolica (**feedback**)
- # **Compartimentazione** (enzimi coinvolti nello stesso processo formano complessi multiproteici e/o enzimi coinvolti in vie metaboliche diverse operano in compartimenti diversi della cellula)
- # **Isozimi**

Regolazione attiva

REGOLAZIONE DELLA QUANTITA' DI UN ENZIMA

Regolazione dell'espressione genica (trascrizionale e post-trascrizionale)

(quantità diverse di enzima prodotte in risposta a stimoli specifici)

Regolazione della velocità di sintesi e degradazione degli enzimi

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' CATALITICA

- ***Inibitori reversibili*** (piccole molecole che interferiscono con la catalisi- inibizione reversibile/irreversibile)
- ***Modificazioni covalenti reversibili*** (modificazioni post-traduzionali reversibili. Molti enzimi del metabolismo regolati per fosforilazione/defosforilazione)
- ***Attivazione proteolitica*** (conversione di un precursore inattivo in un enzima attivo mediante taglio proteolitico)
- ***Controllo allosterico*** (effettori positivi e negativi; cooperatività; effetti omotropici e eterotropici)
- ***Stimolazione o inibizione da parte di proteine di controllo*** (calmodulina)