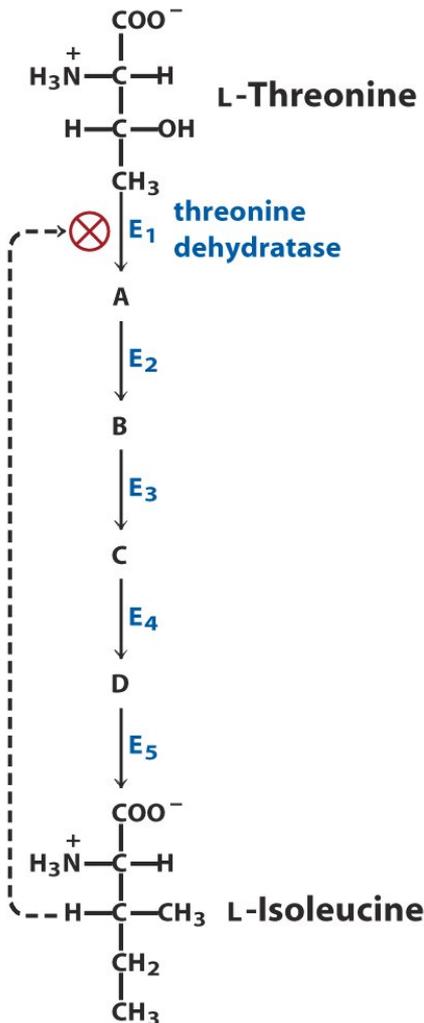




Regolazione enzimatica
Isoenzimi

Gli enzimi regolatori



nel metabolismo gruppi di enzimi lavorano insieme per produrre una via metabolica in cui il prodotto del primo enzima diventa il substrato del secondo e così via l'enzima che catalizza la reazione più lenta determina la velocità complessiva ed è un

ENZIMA REGOLATORE = enzima regolato in risposta a determinati segnali

gli altri enzimi della sequenza portano avanti la reazione non appena il substrato è reso disponibile dalla reazione precedente

la velocità di ogni sequenza metabolica si adegua alla domanda cellulare di energia e di biomolecole

Nella maggior parte dei casi l'enzima regolatore è quello che catalizza la prima reazione.

enzimi regolatori

enzimi allosterici

regolazione mediata da un legame reversibile con uno o più modulatori allosterici o effettori (metaboliti o piccoli cofattori)
permette una regolazione fine delle vie metaboliche in risposta alle necessità della cellula

enzimi regolati mediante modificazioni covalenti

reversibili

o irreversibili (enzimi attivati tramite scissione proteolitica)

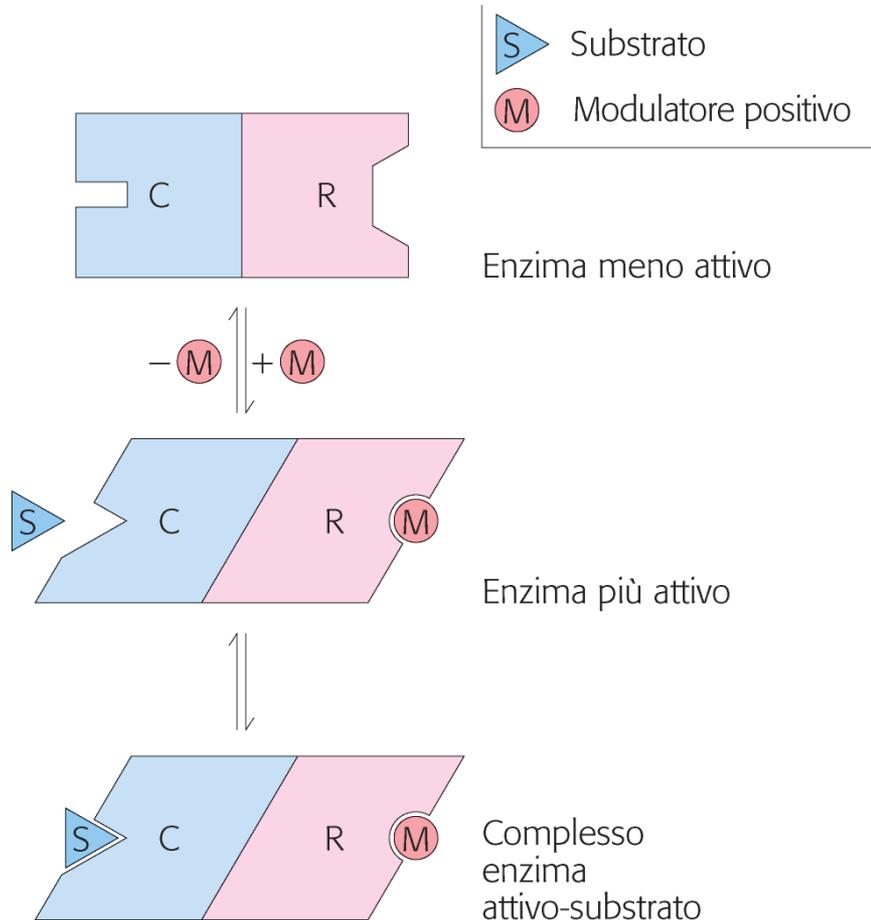
tende ad agire mediante la regola del tutto o niente

enzimi regolati tramite associazione e/o dissociazione con proteine regolatrici specifiche

non vi sono regole precise che stabiliscono quale tipo di regolazione viene applicata ad un dato sistema

in genere la regolazione risulta da più contributi diversi

proprietà degli enzimi allosterici



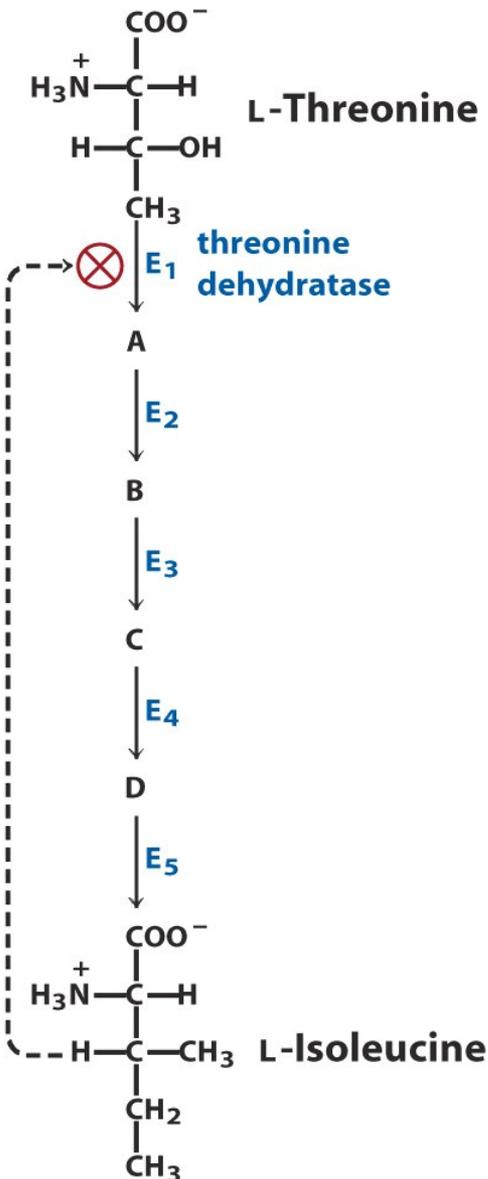
- Sono in genere più grandi e più complessi degli enzimi non regolatori. La maggior parte possiede due o più subunità

- Oltre ai siti attivi o catalitici, possiedono uno o più siti regolatori, o allosterici, specifici per il legame con il modulatore

- Il legame con il modulatore produce una modificazione conformazionale che converte l'enzima in una forma differentemente attiva

i modulatori degli enzimi allosterici

- possono essere sia inibitori che stimolatori
- il substrato stesso dell'enzima può essere un attivatore (**ENZIMI OMOTROPICI**). Il sito attivo funziona anche da sito regolatore
- il modulatore è una molecola diversa dal substrato (**ENZIMI ETEROTROPICI**)
- alcuni enzimi possiedono due o più modulatori



Inibizione retroattiva o inibizione a feedback

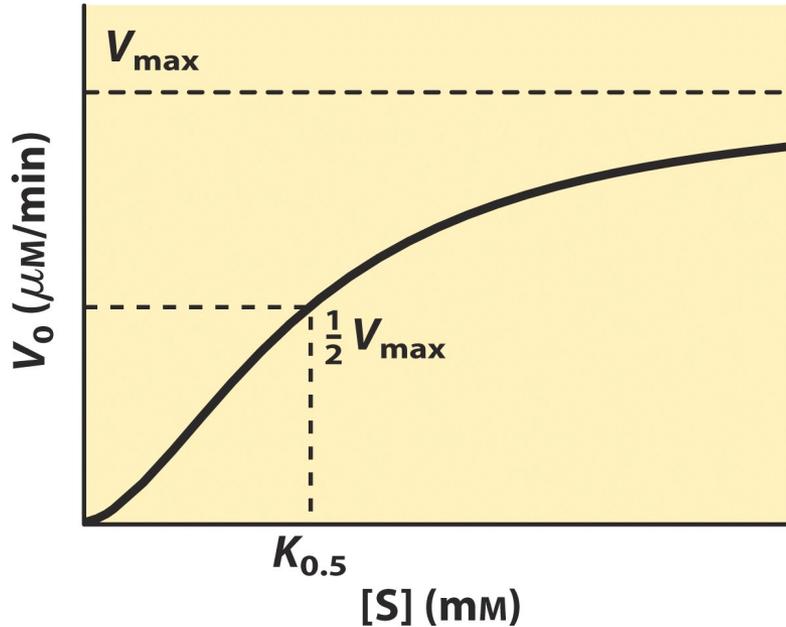
E₁ viene inibito allostericamente e in modo specifico da L-isoleucina

L'enzima regolatore viene inibito in maniera specifica dal prodotto finale della via metabolica

L'attività dell'enzima regolatore (la velocità di produzione del prodotto finale) risponde rapidamente e reversibilmente alle fluttuazioni della concentrazione intracellulare del prodotto finale sulla base delle necessità cellulari

cinetica degli enzimi allosterici

gli enzimi allosterici non seguono la cinetica di Michaelis-Menten

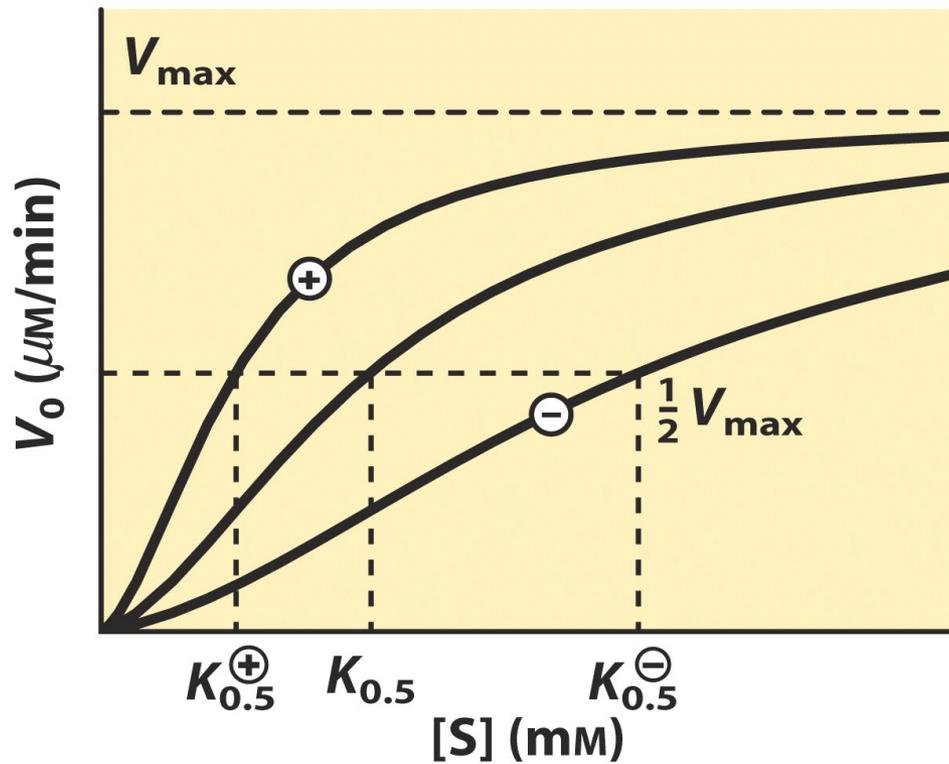


Curva sigmoide di un enzima omotropico

L'andamento sigmoide della cinetica indica la presenza di interazioni cooperative tra le diverse subunità della proteina

poiché l'enzima non segue la cinetica di M-M non si può parlare di K_m

per rappresentare la $[S]$ che determina $\frac{1}{2} V_{\text{max}}$ si usa $[S]_{0,5}$ o $K_{0,5}$



Effetto di un modulatore
positivo (+) e negativo (-) su
un enzima allosterico

Effetto su $K_{0,5}$ ma non su
 V_{max}

Regolazione enzimatica tramite modificazione covalente reversibile

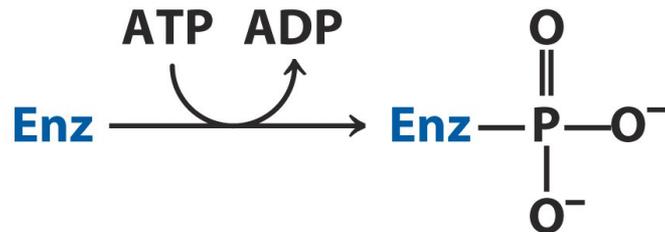
Le modificazioni reversibili vengono rimosse sempre per via enzimatica (idrolasi)

Fosforilazione

Covalent modification (target residues)

Phosphorylation

(Tyr, Ser, Thr, His)



coinvolto in un gran numero di meccanismi di regolazione (quasi la metà delle proteine cellulari si trova nello stato fosforilato)

TABLE 6-10 Consensus Sequences for Protein Kinases

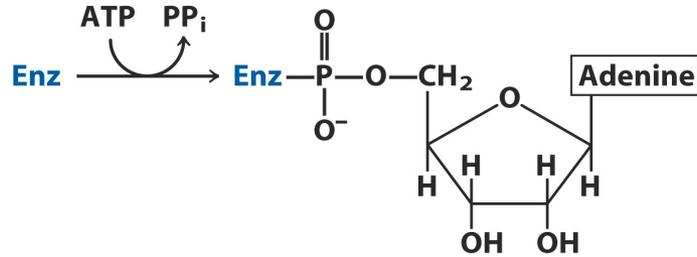
<i>Protein kinase</i>	<i>Consensus sequence and phosphorylated residue*</i>
Protein kinase A	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-B-
Protein kinase G	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-X-
Protein kinase C	-(R/K)-(R/K)-X-(S/T)-B-(R/K)-(R/K)-
Protein kinase B	-X-R-X-(S/T)-X-K-
Ca ²⁺ /calmodulin kinase I	-B-X-R-X-X-(S/T)-X-X-X-B-
Ca ²⁺ /calmodulin kinase II	-B-X-(R/K)-X-X-(S/T)-X-X-
Myosin light chain kinase (smooth muscle)	-K-K-R-X-X-S-X-B-B-
Phosphorylase <i>b</i> kinase	-K-R-K-Q-I-S-V-R-
Extracellular signal-regulated kinase (ERK)	-P-X-(S/T)-P-P-
Cyclin-dependent protein kinase (cdc2)	-X-(S/T)-P-X-(K/R)-
Casein kinase I	-(Sp/Tp)-X-X(X)-(S/T)-B
Casein kinase II	-X-(S/T)-X-X-(E/D/Sp/Yp)-X-
β -Adrenergic receptor kinase	-(D/E) _n -(S/T)-X-X-X-
Rhodopsin kinase	-X-X-(S/T)-(E) _n -
Insulin receptor kinase	-X-E-E-E-Y-M-M-M-M-K-K-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K-K-K- L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-
Epidermal growth factor (EGF) receptor kinase	-E-E-E-E-Y-F-E-L-V-

I residui S, T e Y sono localizzati in motivi strutturali comuni (*sequenze consenso*) riconosciuti da protein chinasi specifiche

La sequenza primaria non è il solo fattore importante per la fosforilazione: la struttura tridimensionale determina l'accessibilità o meno delle sequenze target

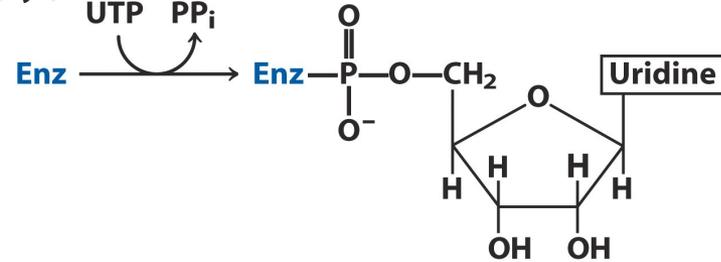
Covalent modification (target residues)

Adenylylation (Tyr)



Covalent modification (target residues)

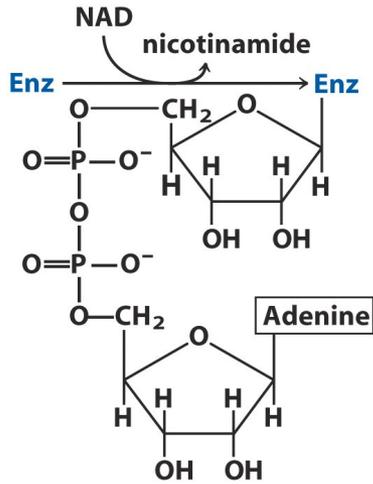
Uridylylation (Tyr)



Covalent modification (target residues)

ADP-ribosylation

(Arg, Gln, Cys, diphthamide—a modified His)



Covalent modification (target residues)

Methylation

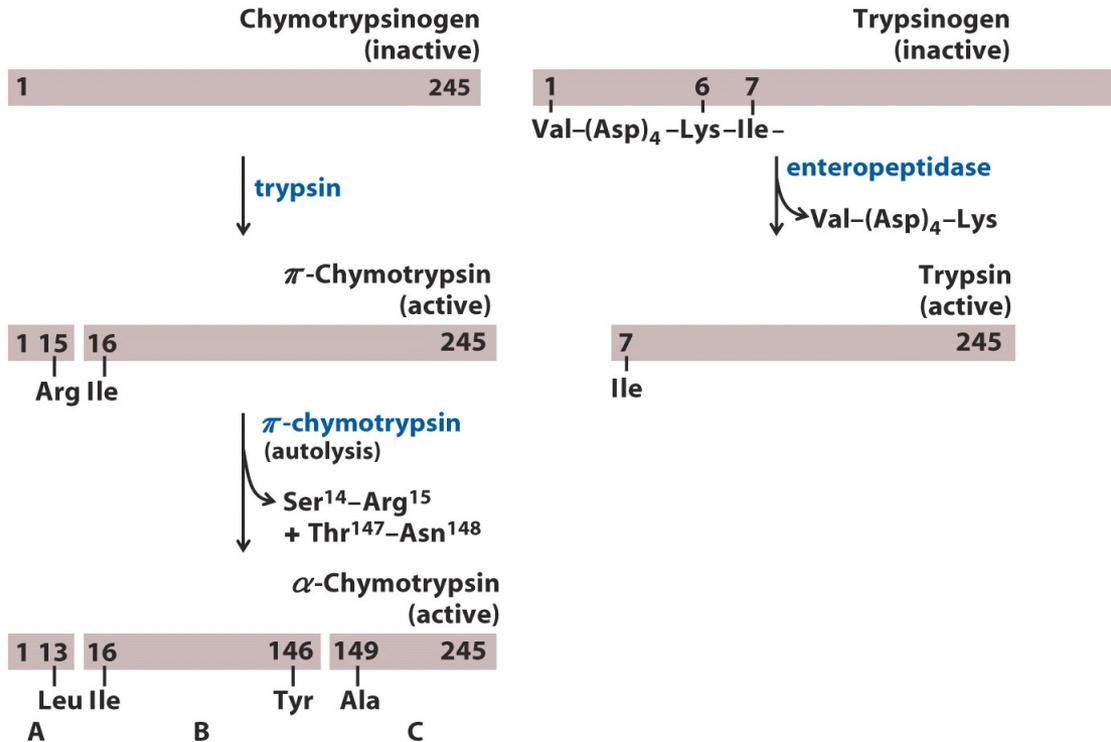
(Glu)

S-adenosyl-methionine → *S*-adenosyl-homocysteine



Attivazione mediante proteolisi

un precursore inattivo dell'enzima (**ZIMOGENO**)
viene scisso in modo da generare la forma attiva



Meccanismo di attivazione tipico delle proteasi. L' inattivazione è mediata da proteine inibitrici che si legano al sito attivo.

Gli isoenzimi

- proteine diverse in grado di catalizzare la stessa reazione
- differiscono in genere per le **proprietà cinetiche o regolatorie** o nella loro **distribuzione subcellulare**
- hanno sequenze AA simili ma non identiche (sono codificate da geni diversi)
- spesso hanno diversa struttura quaternaria

Altre volte le frazioni isoenzimatiche possono originarsi da:

- alterazioni strutturali dell'enzima fondamentale (es. anidrasi carbonica)**
- per l'intervento di enzimi proteolitici sulla molecola dell'enzima fondamentale (es. isoenzimi dell'esochinasi)**
- per la combinazione in rapporti differenti di materiale proteico o non proteico nella molecola dell'enzima (es. isoenzimi delle fosfatasi a diverso contenuto di acido sialico)**
- da diverse modificazioni posttraduzionali**
- da processi di splicing alternativo**

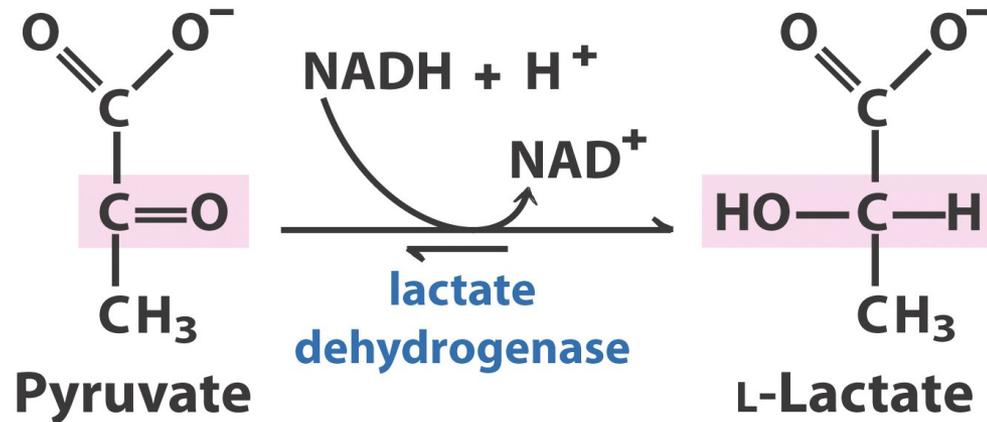
Per esempio:

- La **lattico deidrogenasi** (LDH) esiste in 5 forme isoenzimatiche. Sono tutte dei tetrameri di uguale PM (33500) ma di diversa composizione e sequenza amminoacidica.

Alla formazione delle diverse isoforme concorrono due differenti tipi di monomeri, codificati da geni diversi: H (da Heart, o A) e M (da Muscle, o B).

LDH1 (H4) LDH2 (H3M)	miocardio, eritrociti, rene e polmone
LDH3 (H2M2)	milza, pancreas, tiroide e linfonodi
LDH4 (HM3) LDH5 (M4)	fegato, muscolo scheletrico

Le diverse forme isoenzimatiche hanno valori di V_{max} e K_m diversi, particolarmente per il piruvato



$$\Delta G'^{\circ} = - 25.1 \text{ kJ/mol}$$

- nel muscolo scheletrico è favorita la rapida riduzione di piruvato a lattato
- nel muscolo cardiaco è favorita la rapida ossidazione di lattato a piruvato

La distribuzione delle forme isoenzimatiche di un enzima riflette quattro regole:

1. diverse utilizzazioni metaboliche in organi diversi

2. diversa localizzazione e ruoli metabolici di un dato enzima in un certo tipo di cellula

3. differenziazione e sviluppo di tessuti adulti dalle forme embrionali e fetali

4. fine controllo delle velocità metaboliche mediate dalle risposte diverse di isoenzimi a modulatori allosterici diversi