

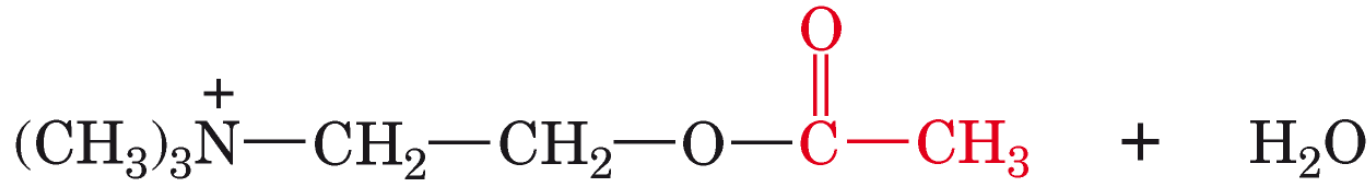
Inibizione e regolazione enzimatica

L'inibizione enzimatica

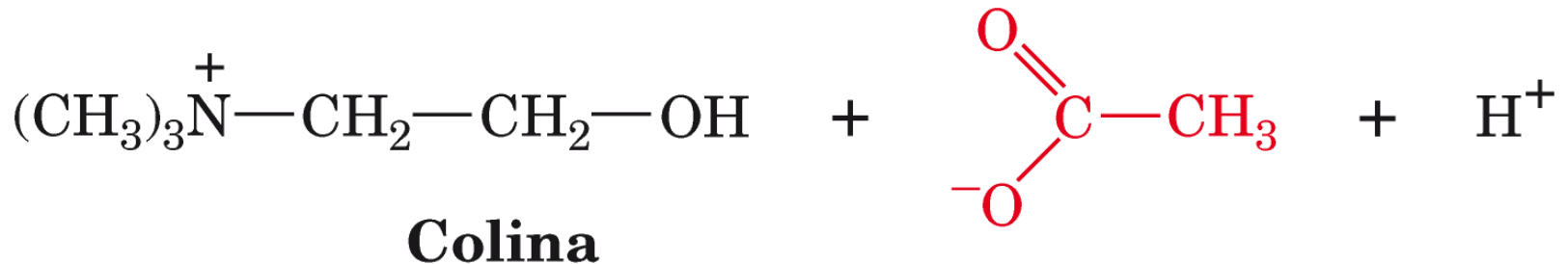
Concetti chiave

- Gli inibitori enzimatici interagiscono reversibilmente o irreversibilmente con un enzima alterandone i valori di K_M e/o di V_{max}
- Un **inibitore enzimatico irreversibile**, o inattivatore, interagisce in modo stabile e specifico (spesso legandosi covalentemente) con l'enzima, interferendo con i suoi meccanismi catalitici in modo da inattivarlo completamente
- Un **inibitore competitivo** si lega al sito attivo dell'enzima, competendo con il substrato, e facendo aumentare il valore apparente di K_M della reazione, ma lasciando inalterato il valore di V_{max}

Inibizione irreversibile: i veleni per il sistema nervoso



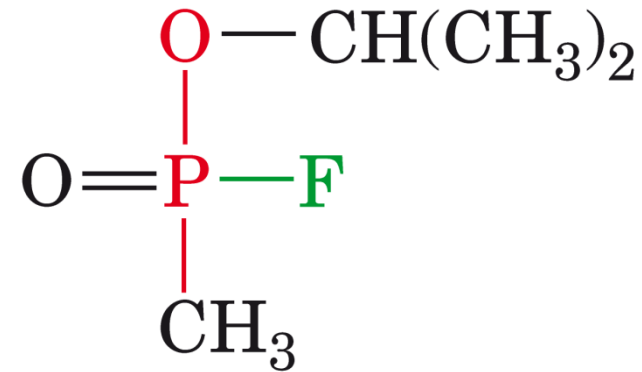
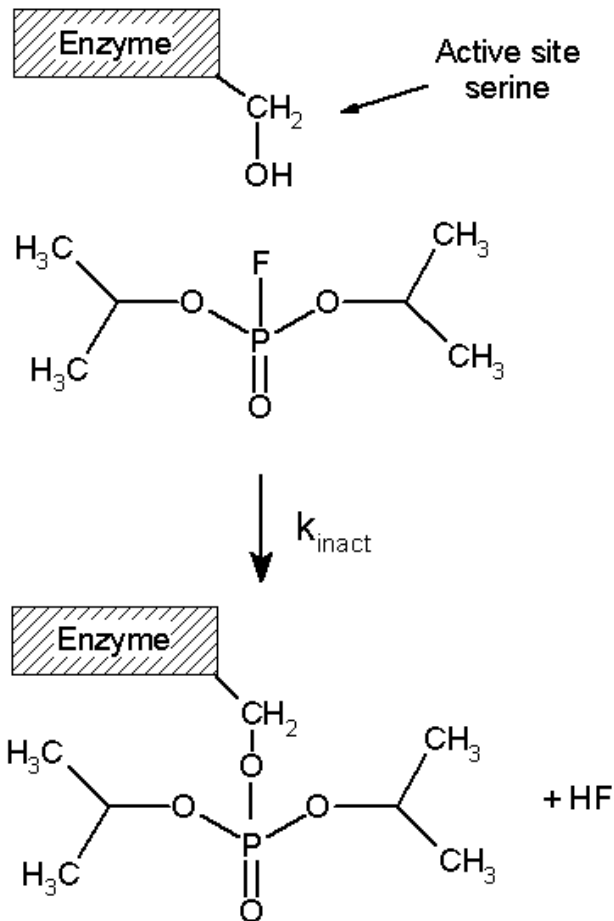
Acetilcolina



L'acetilcolina è il neurotrasmettitore delle giunzioni neuromuscolari. L'acetilcolina esterasi è un'idrolasi presente nella membrana postsinaptica della giunzione e scinde l'acetilcolina rilasciata nella sinapsi in colina e acetato.

Gas nervini: organofosfati

diisopropilfluorofosfato (DFP)

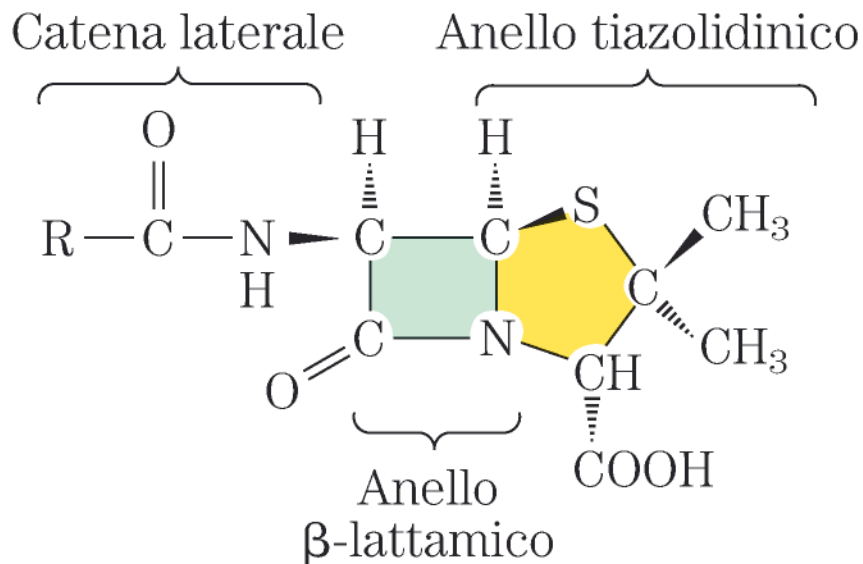


Sarin

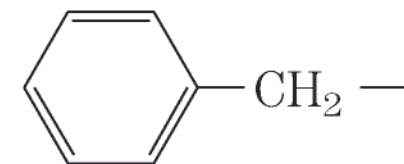
Target: enzimi con serina attivata

Target vitale: acetilcolinesterasi

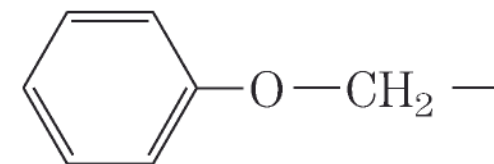
Inibizione irreversibile: gli antibiotici



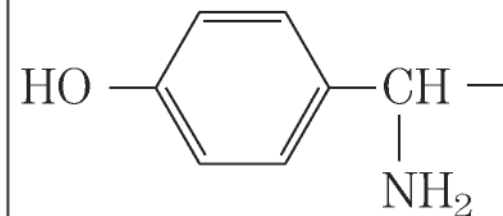
Gruppi R



Penicillina G
(benzilpenicillina)



Penicillina V



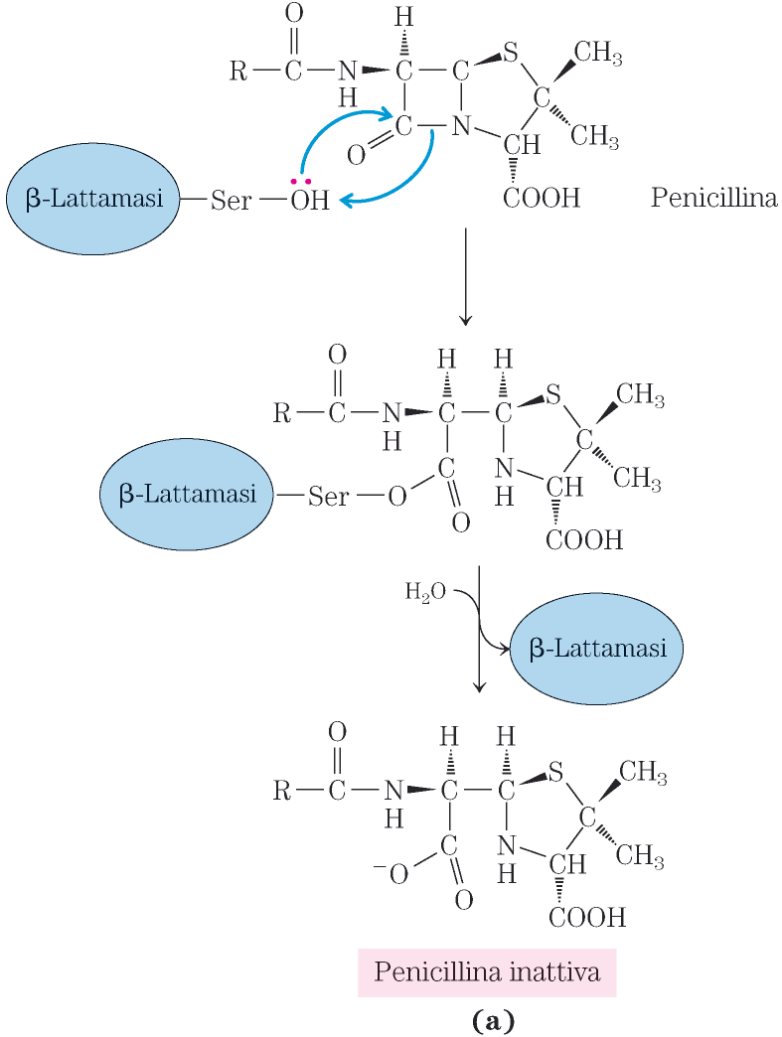
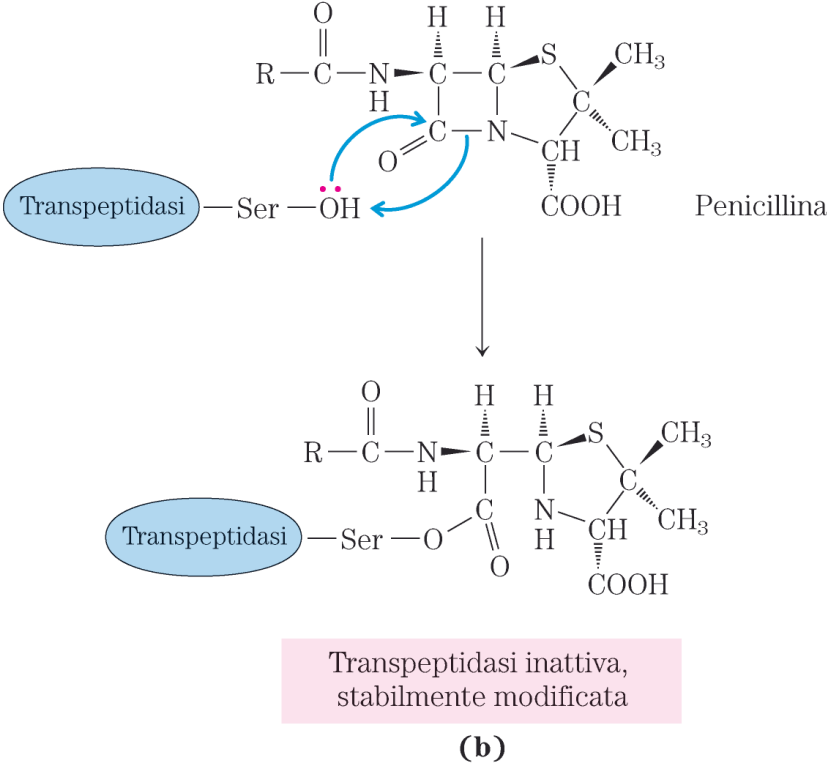
Amoxicillina

Struttura generale delle penicilline

(a)

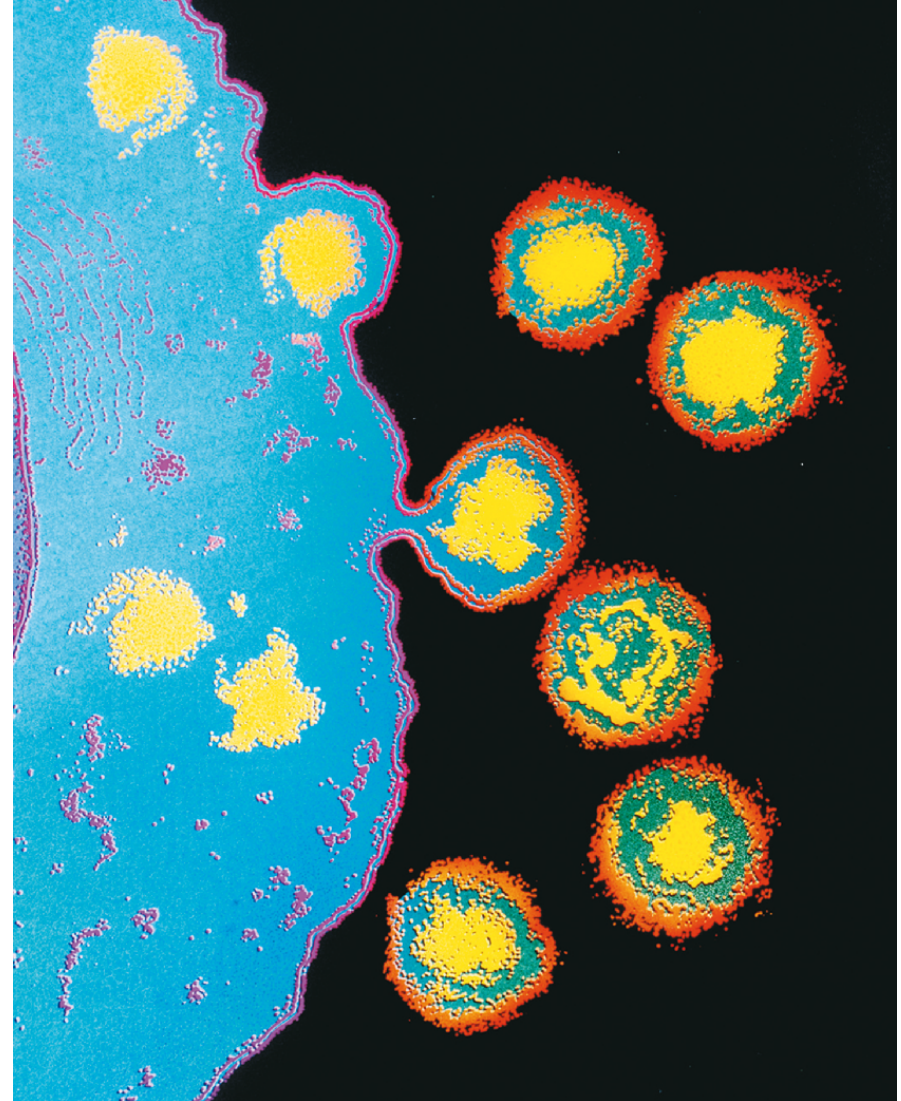
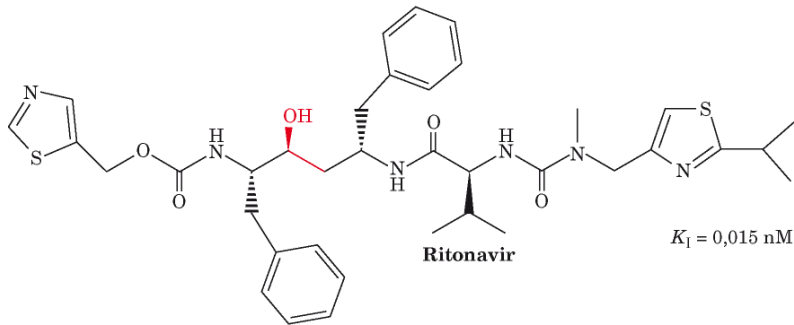
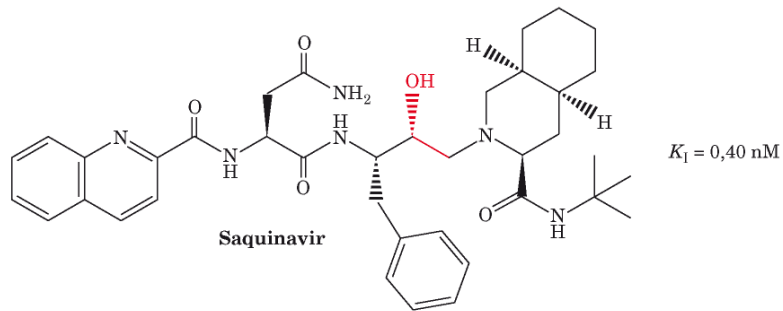
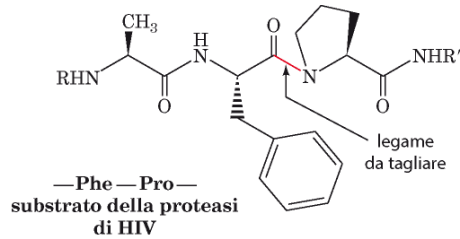
Meccanismo per la resistenza alla penicillina

Meccanismo di azione della penicillina

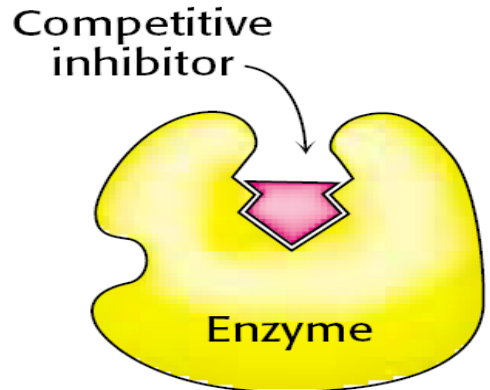
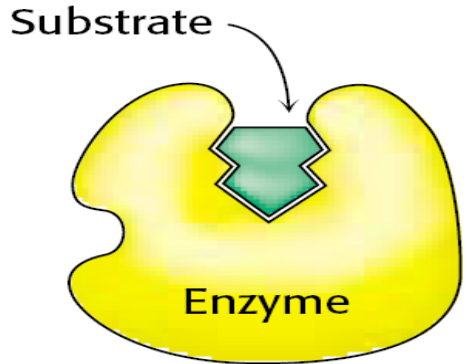
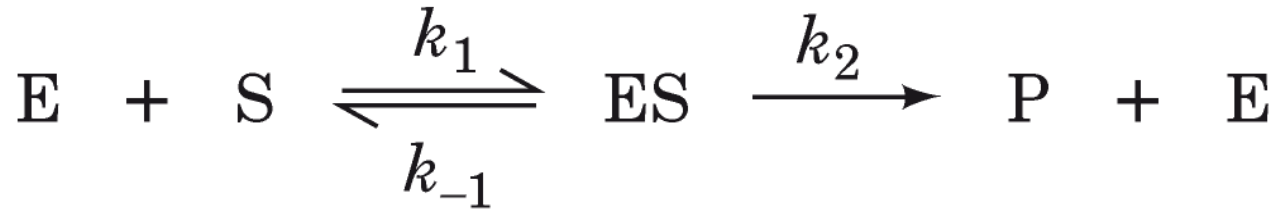


Gli inibitori enzimatici dell'HIV

inibitori della trascrittasi inversa;
inibitori della proteasi (inibizione reversibile);
inibitori della fusione;
inibitori dell'integrasi;
inibitori del co-recettore.



Inibizione enzimatica competitiva

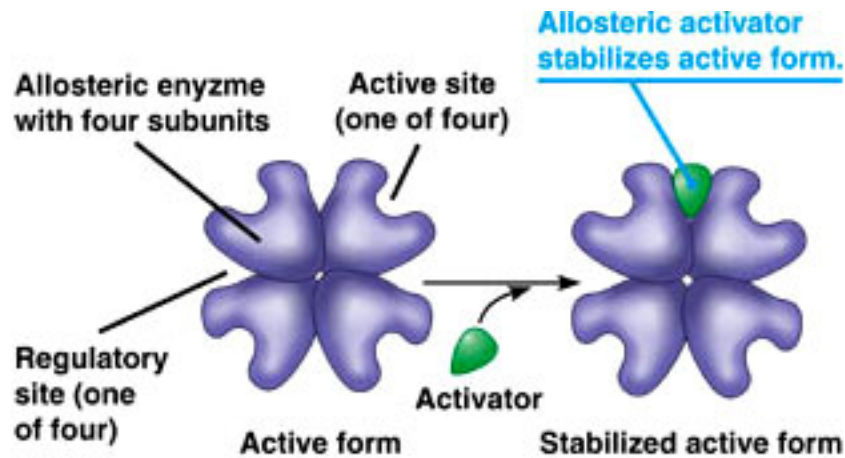


Il controllo dell'attività enzimatica

Concetti chiave

- Gli effettori allosterici (inibitori o attivatori) si legano reversibilmente agli enzimi costituiti da diverse subunità, quali la aspartato transcarbamilasi, inducendo cambiamenti conformazionali cooperativi che alterano l'attività catalitica dell'enzima, spostandone l'equilibrio tra la conformazione più attiva (forma R) e quella meno attiva (forma T).
- La fosforilazione e la defosforilazione di specifici residui (serina, treonina, tirosina) di un enzima sono **modificazioni covalenti reversibili** operate da enzimi specializzati, detti chinasi e fosfatasi. Il pattern di fosforilazione di un enzima, come la glicogeno fosforilasi, ne modifica la conformazione e quindi l'attività.
- Il taglio proteolitico controllato è un altro meccanismo covalente (irreversibile) per regolare l'attività di certi enzimi (zimogeni) prodotti in forma inattiva.

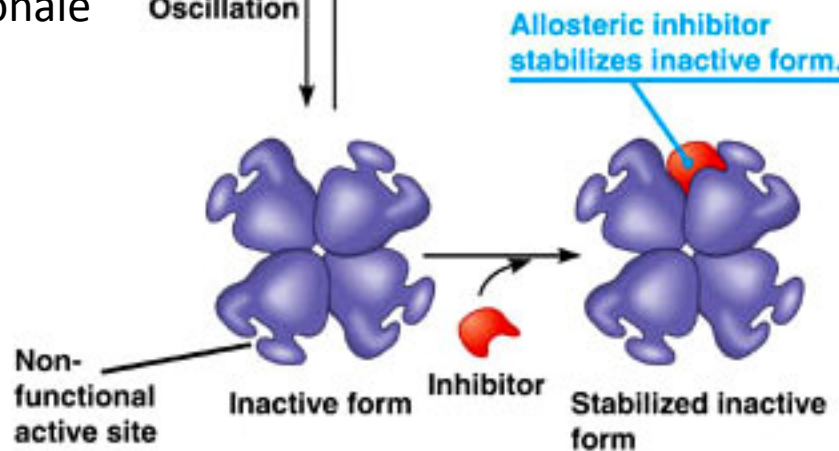
Il controllo allosterico



Forma R o attiva

Equilibrio conformazionale

Oscillation

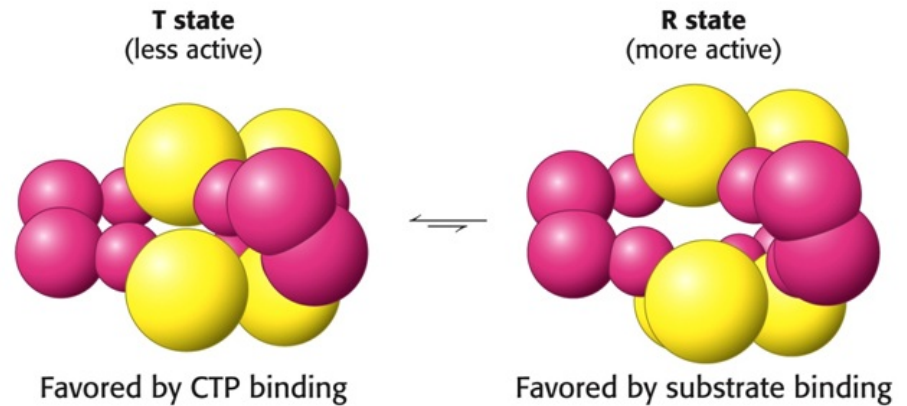
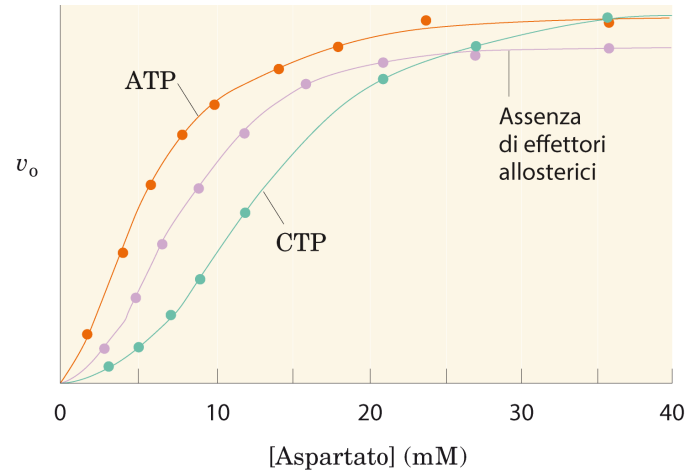
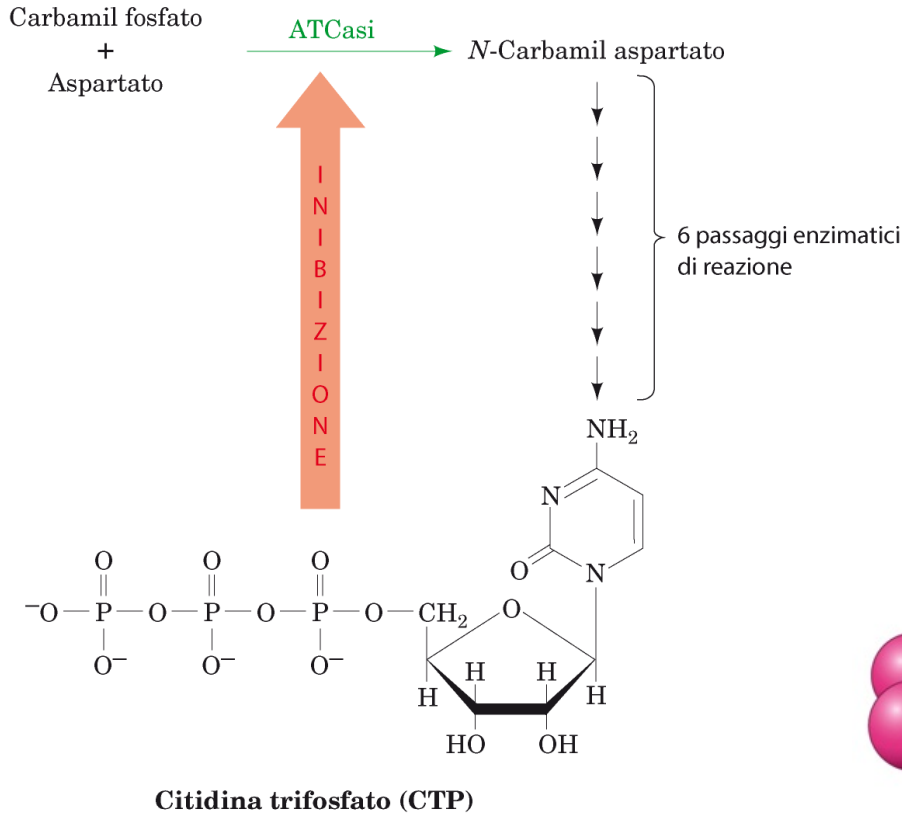


Forma T o inattiva

(a) Allosteric activators and inhibitors

L'enzima allosterico possiede una struttura quaternaria che oscilla tra due stati conformazionali definiti con diversa attività catalitica: T ed R (Teso, corrispondente alla forma inattiva, e Rilassato, a quella più attiva), in equilibrio tra di loro. Il legame di un ligando (effettore allosterico) modifica l'equilibrio spostandolo verso la forma R o T, chiamandosi così, rispettivamente, attivatore o inibitore allosterico.

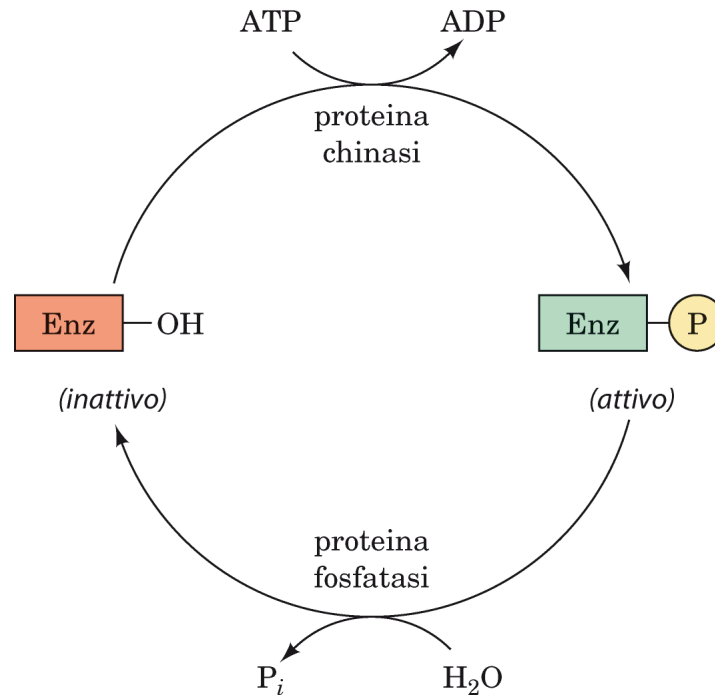
La via di biosintesi delle pirimidine: l'inibizione retroattiva dell'aspartato transcarbamilasi (ATCasi)



CTP: inibitore allosterico ATP: attivatore allosterico

La curva della velocità iniziale di reazione in funzione della concentrazione del substrato per gli enzimi allosterici ha un andamento sigmoide. Tale curva si sposta verso destra o verso sinistra a seconda che siano presenti molecole di un inibitore o di un attivatore allosterico, rispettivamente.

Il controllo per modificazione covalente: la fosforilazione



La fosforilazione del gruppo alcolico di specifici residui (serina, treonina, tirosina) di una proteina da parte di enzimi specializzati, detti proteina **chinasi** (o, più brevemente, **chinasi**), è un esempio di modificazione post-traduzionale che altera la conformazione della proteina e ne cambia così l'attività. Questi enzimi trasferiscono il gruppo fosforico dall'ATP a uno specifico residuo dell'enzima bersaglio. In questo caso, la fosforilazione dell'enzima lo stimola ad attivarsi. Questa modificazione covalente è reversibile in quanto il legame fosfo-estere che lega il residuo di fosfato (P) all'enzima può essere idrolizzato da parte di enzimi specializzati, dette proteina fosfatasi (o, più brevemente, **fosfatasi**). Il pattern di fosforilazione di un enzima ne influenza in modo unico l'attività e può essere anche molto complesso, essendo determinato in ogni istante dal particolare assortimento di chinasi e fosfatasi attivo nella cellula.

Le diverse proteina chinasi riconoscono specifiche sequenze consenso per la fosforilazione di specifiche proteine bersaglio

TABLE 6-10 Consensus Sequences for Protein Kinases

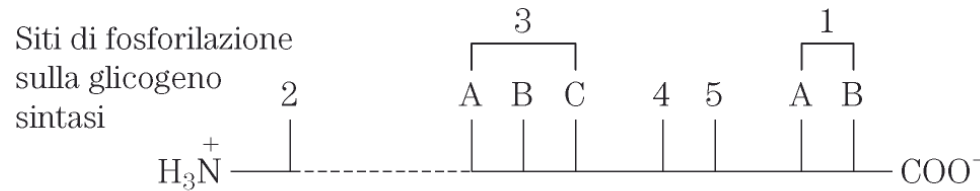
| Protein kinase | Consensus sequence and phosphorylated residue* | Symbol | Meaning |
|---|---|--------|---------------|
| Protein kinase A | -x-R-[RK]-x-[ST]-B- | | |
| Protein kinase G | -x-R-[RK]-x-[ST]-x- | | |
| Protein kinase C | -[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)- | A | Alanine |
| Protein kinase B | -x-R-x-[ST]-x-K- | C | Cysteine |
| Ca ²⁺ /calmodulin kinase I | -B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B- | D | Aspartic Acid |
| Ca ²⁺ /calmodulin kinase II | -B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)- | E | Glutamic Acid |
| Myosin light chain kinase (smooth muscle) | -K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)- | F | Phenylalanine |
| Phosphorylase b kinase | -K-R-K-Q-I-S-V-R- | G | Glycine |
| Extracellular signal-regulated kinase (ERK) | -P-x-[ST]-P(2)- | H | Histidine |
| Cyclin-dependent protein kinase (cdc2) | -x-[ST]-P-x-[KR]- | I | Isoleucine |
| Casein kinase I | -[SpTp]-x(2)-[ST]-B [†] | K | Lysine |
| Casein kinase II | -x-[ST]-x(2)-[ED]-x- | L | Leucine |
| β-Adrenergic receptor kinase | -[DE](n)-[ST]-x(3) | M | Methionine |
| Rhodopsin kinase | -x(2)-[ST]-E(n)- | N | Asparagine |
| Insulin receptor kinase | -x-E(3)-Y-M(4)-K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D- | P | Proline |
| Epidermal growth factor (EGF) receptor kinase | -E(4)-Y-F-E-L-V- | Q | Glutamine |
| | | R | Arginine |
| | | S | Serine |
| | | T | Threonine |
| | | V | Valine |
| | | W | Tryptophan |
| | | Y | Tyrosine |

Sources: Pinna, L.A. & Ruzzene, M.H. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191-225; Kemp, B.E. & Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342-346; Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15,555-15,558.

*Shown here are deduced consensus sequences (in roman type) and actual sequences from known substrates (italic). The Ser (S), Thr (T), or Tyr (Y) residue that undergoes phosphorylation is in red; all amino acid residues are shown as their one-letter abbreviations (see Table 3-1). x represents any amino acid. B, any hydrophobic amino acid. Sp, Tp, and Yp are Ser, Thr, and Tyr residues that must already be phosphorylated for the kinase to recognize the site.

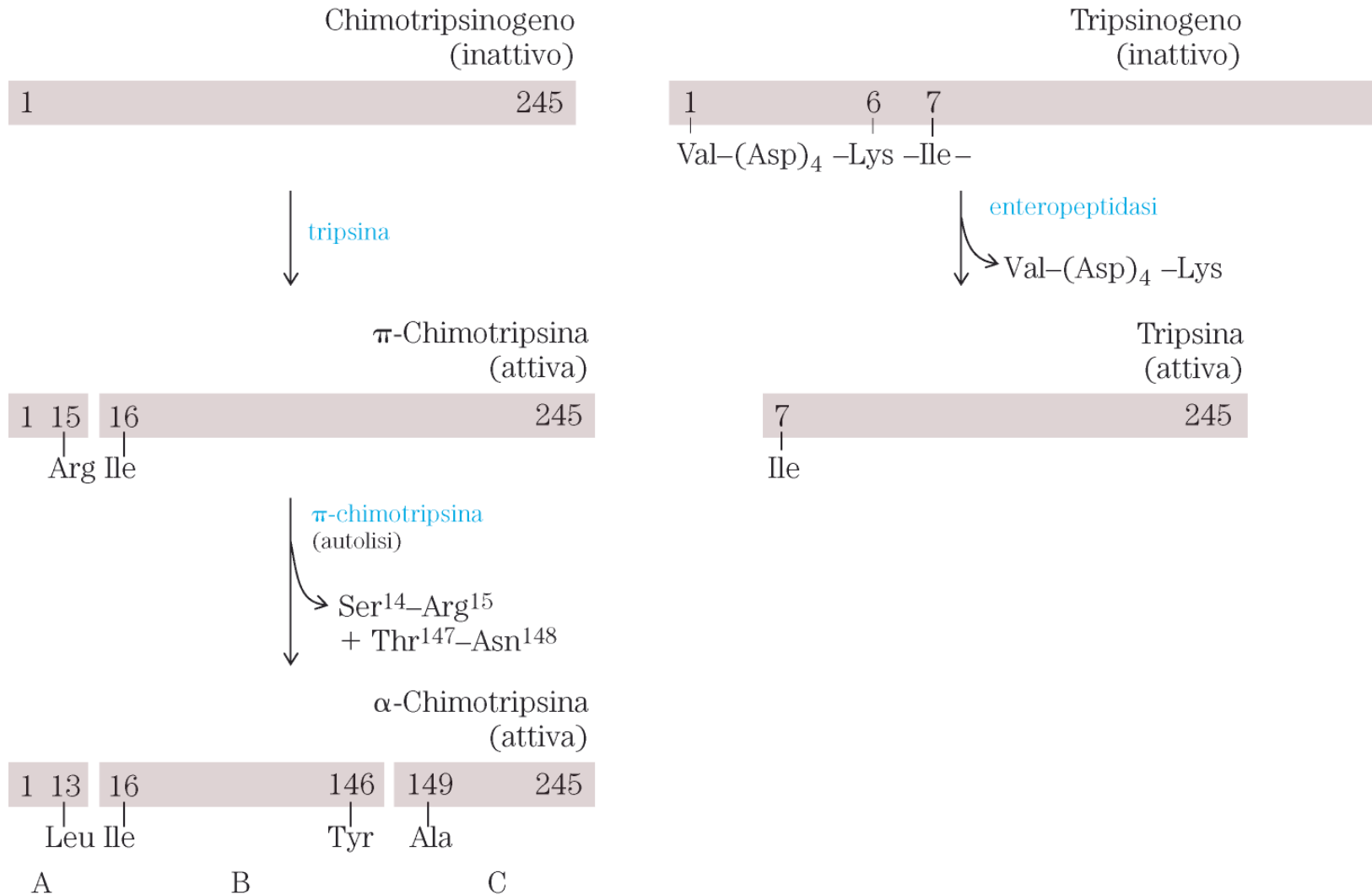
[†]The best target site has two amino acid residues separating the phosphorylated and target Ser/Thr residues; target sites with one or three intervening residues function at a reduced level.

La regolazione mediante fosforilazioni multiple ad opera di diverse proteina chinasi permette un controllo molto accurato dell'attività enzimatica

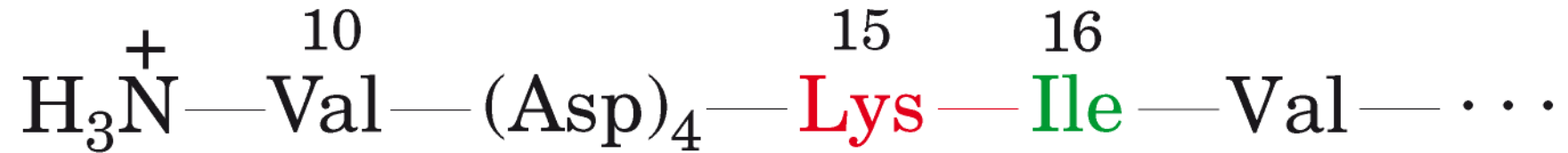


| Proteina chinasi | Siti di fosforilazione | Grado di inattivazione della sintasi |
|--|------------------------|--------------------------------------|
| Proteina chinasi A | 1A, 1B, 2, 4 | + |
| Proteina chinasi G | 1A, 1B, 2 | + |
| Proteina chinasi C | 1A | + |
| Proteina chinasi calcio/ calmodulina-dipendente | 1B, 2 | + |
| Fosforilasi chinasi <i>b</i> | 2 | + |
| Caseina chinasi I | Almeno 9 siti | + + + + |
| Caseina chinasi II | 5 | 0 |
| Glicogeno sintasi chinasi 3 | 3A, 3B, 3C | + + + |
| Glicogeno sintasi chinasi 4 | 2 | + |

Alcuni enzimi ed altre proteine sono regolati per scissione proteolitica di un precursore enzimatico (detto zimogeno o proenzima nel caso degli enzimi)



Attivazione del tripsinogeno a tripsina



Tripsinogeno



enteropeptidasi
o tripsina



Tripsina

| Sito di sintesi | Zimogeno | Forma attiva |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Stomaco | pepsinogeno | pepsina |
| Pancreas | tripsinogeno | tripsina |
| Pancreas | chimotripsinogeno | chimotripsina |
| Pancreas | proelastasi | elastasi |
| Pancreas | procarbossipeptidasi | carbossipeptidasi |

La cascata della coagulazione del sangue

