

# Inibizione dell'attività enzimatica

Gli **inibitori** enzimatici sono molecole in grado di *interferire* o *bloccare* la catalisi di un enzima e possono operare in modo **reversibile** oppure **irreversibile**

## Inibizione irreversibile

Gli inibitori irreversibili sono inattivatori.

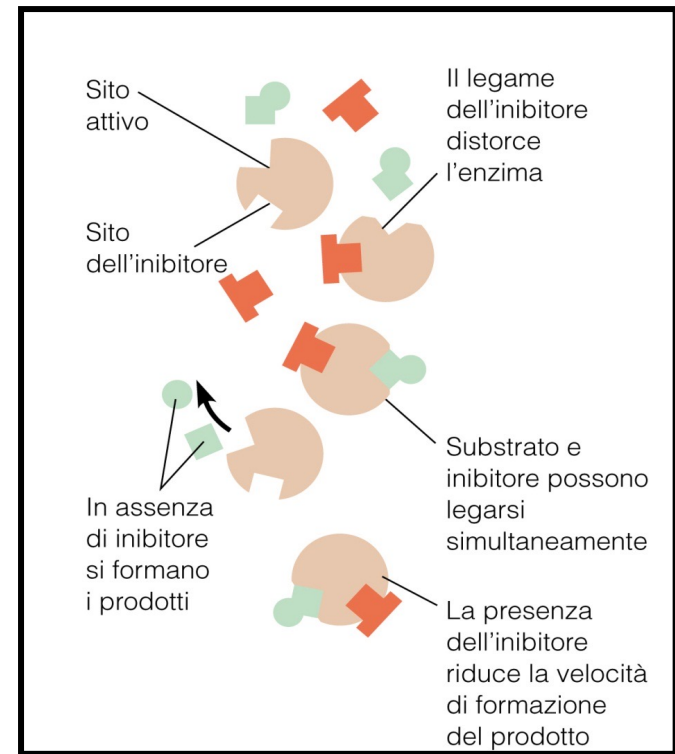
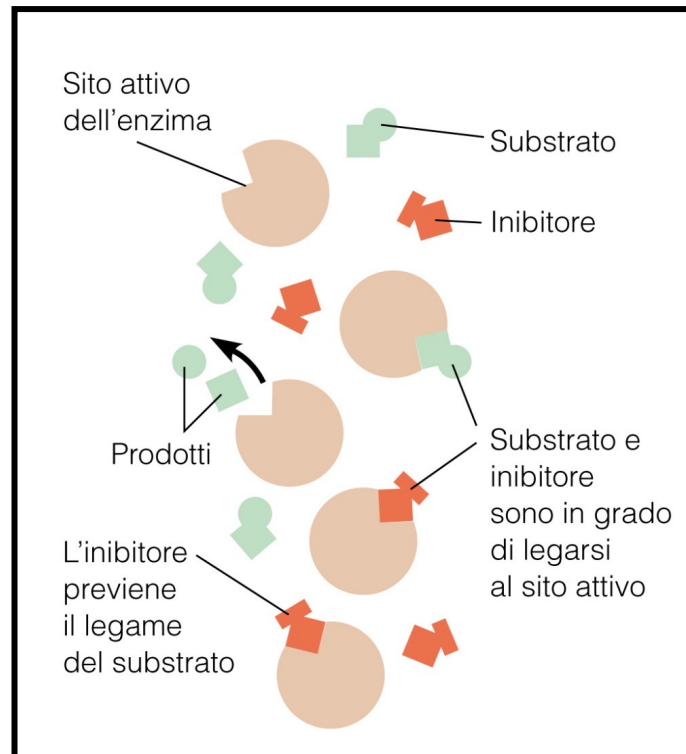
Si legano covalentemente e modificano gruppi funzionali essenziali all'attività dell'enzima o formano un complesso stabile.

**Riducono** il livello di  $E_t$  e quindi la  $V_{max}$  a qualsiasi valore di  $[S]$  senza modificare la  $K_m$

## Inibizione reversibile

Gli inibitori reversibili si legano non covalentemente all'enzima e possono agire in modo competitivo o meno con il substrato. Possono perciò agire alterando  $V_{max}$ ,  $K_m$ , oppure anche entrambe.

Possibili meccanismi di inibizione:



L'inibizione reversibile può essere di diverso tipo:

**competitiva**: l'inibitore si lega al sito attivo dell'enzima competendo con il substrato; l'aumento della [S] rimuove l'inibizione

**incompetitiva** : l'inibitore si lega solo al complesso ES in un sito diverso da quello catalitico dell'enzima, impedendo la catalisi

**Mista (in alcuni casi non competitiva)**: l'inibitore si lega ad un sito dell'enzima diverso dal sito attivo, ma può legarsi sia a E libero e che al complesso ES, bloccando la catalisi

Se un enzima ha più substrati, un inibitore può agire in modo differente a seconda del substrato, poiché il sito attivo contiene diversi siti di legame, uno per ciascun substrato: un inibitore può competere con il substrato A per il primo sito di legame, ma essere un inibitore non competitivo per il substrato B nel secondo sito di legame.

## Inibizione dell'attività enzimatica

Gli **inibitori** enzimatici sono molecole in grado di *interferire o bloccare* la catalisi di un enzima e possono operare in modo **reversibile** oppure **irreversibile**

Un **inibitore reversibile** che può legare E e/o ES è caratterizzato dalle due costanti di dissociazione:  $K_i$  (relativa a E) e  $K_i'$  (relativa al complesso ES).

$$K_i = ([E][I])/[EI]$$

$$K_i' = ([ES][I])/[ESI]$$

L'analisi *quantitativa* utilizza un'equazione di Michaelis–Menten modificata, dove  $\alpha$  e  $\alpha'$  sono definiti dalla *concentrazione* dell'inibitore  $[I]$  e dalle due *costanti di dissociazione*

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$$

$$= \frac{(1/\alpha') V_{\max} [S]}{(\alpha/\alpha') K_m + [S]}$$

$$\alpha = 1 + [I]/K_i$$

$$\alpha' = 1 + [I]/K_i'$$

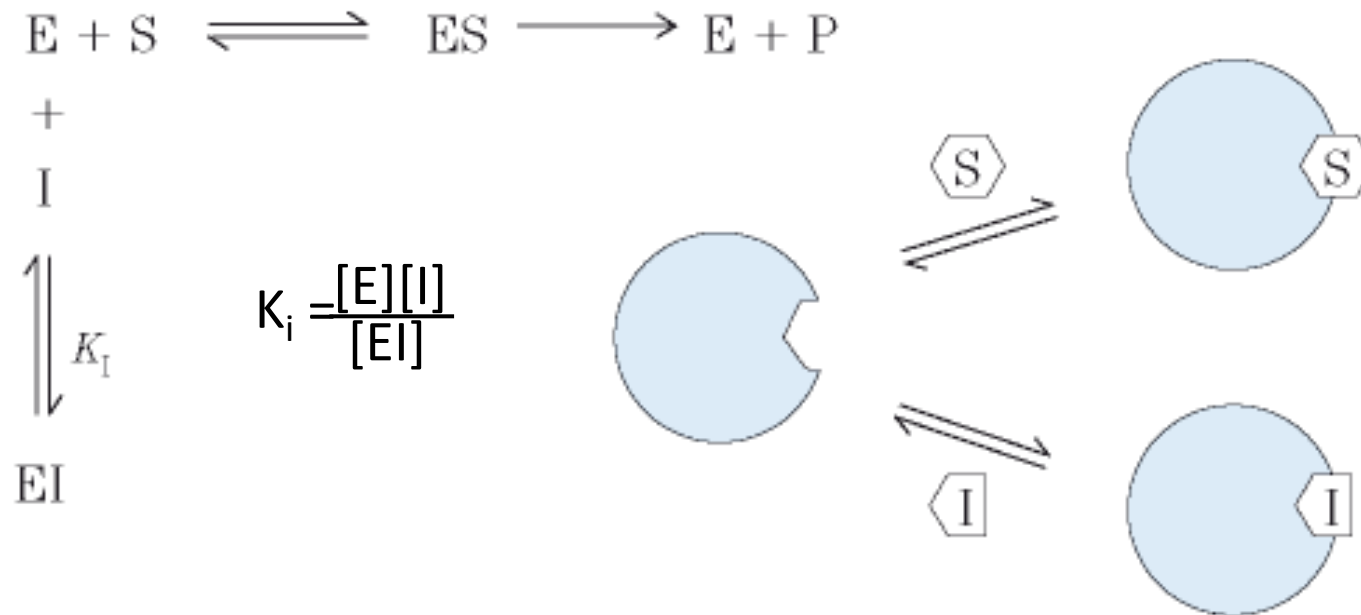
(si ricava tenendo conto che:

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI])$$



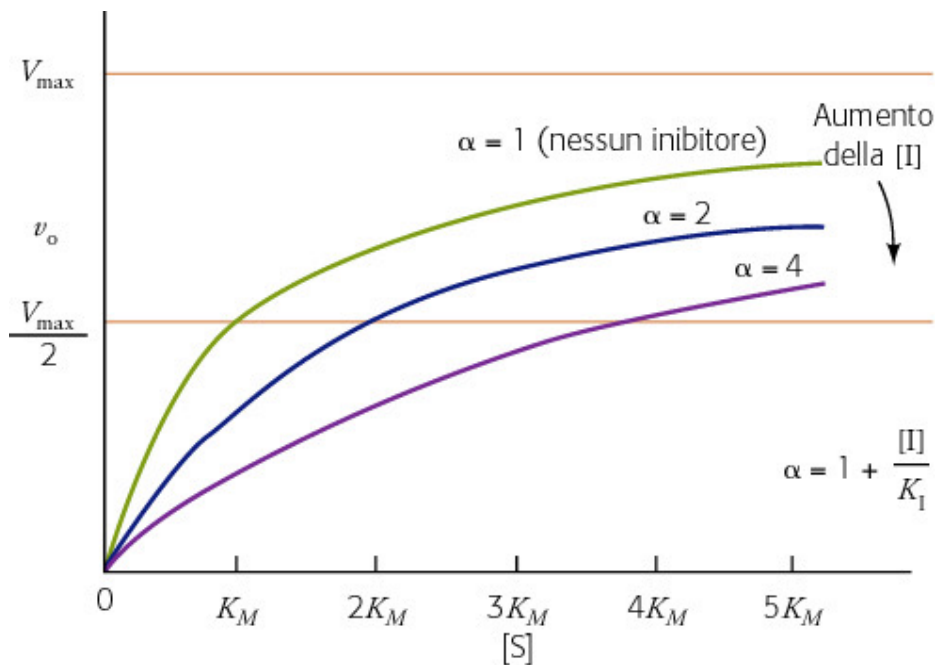
# Inibizione competitiva

Molti inibitori competitivi sono strutturalmente simili al substrato; l'inibitore si lega al sito attivo dell'enzima competendo con il substrato; l'aumento della [S] rimuove l'inibizione



Gli inibitori **competitivi** si possono legare a E, ma non a ES. L'inibizione competitiva **aumenta la  $K_m$**  (l'inibitore interferisce con il legame del substrato), **ma non influisce su  $V_{max}$**  (l'inibitore non ostacola la catalisi in ES perché non vi si può legare).

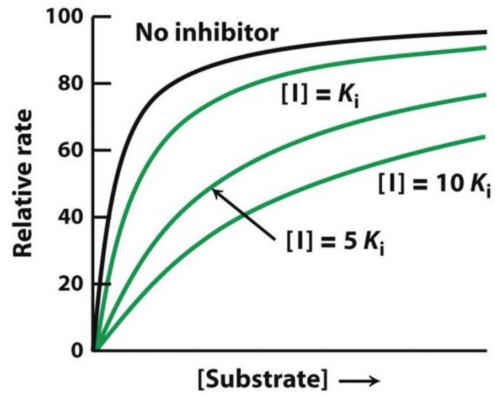
## Inibizione competitiva



$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + [S]}$$

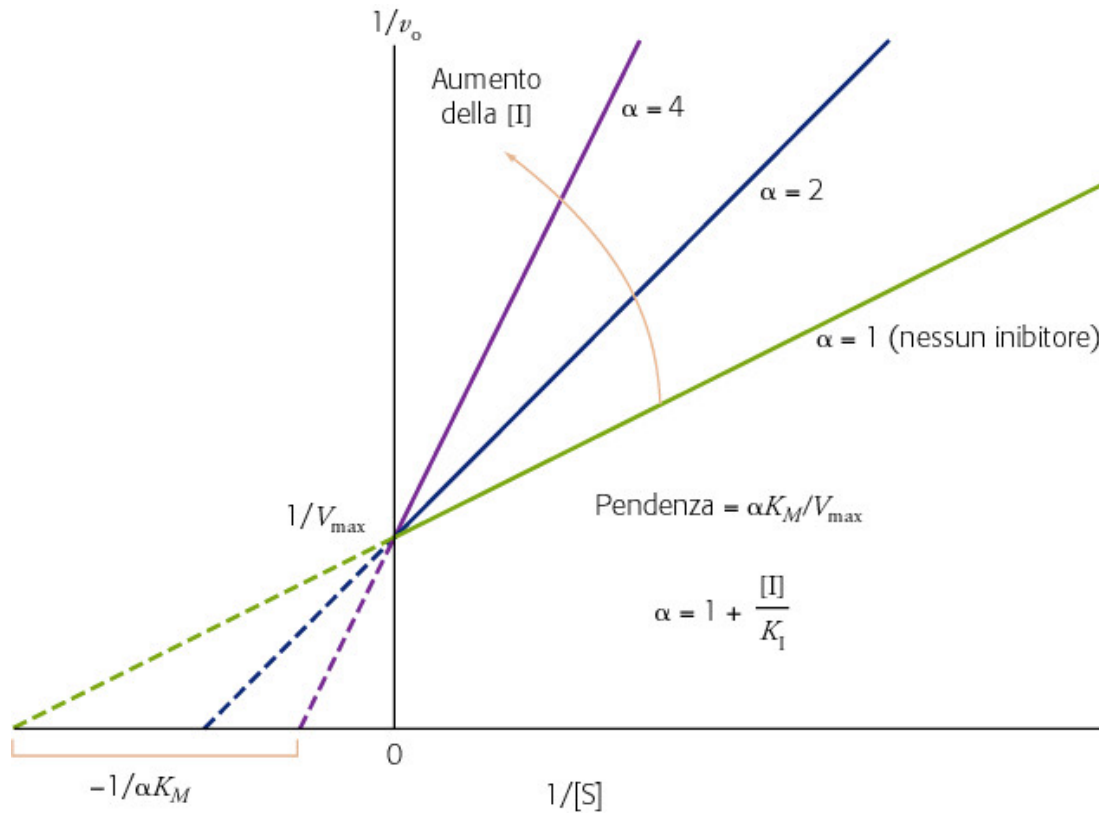
**$V_{max}$  rimane inalterata  
Aumenta la  $K_m$**

Quando  $[S]$  é molto grande, questa inibizione può essere superata,  $V$  si avvicina al valore di  $V_{max}$  proprio come in assenza di inibitore. Se le misure di  $K_m$  (apparente) vengono eseguite a diverse  $[I]$  si può determinare la  $K_I$ .



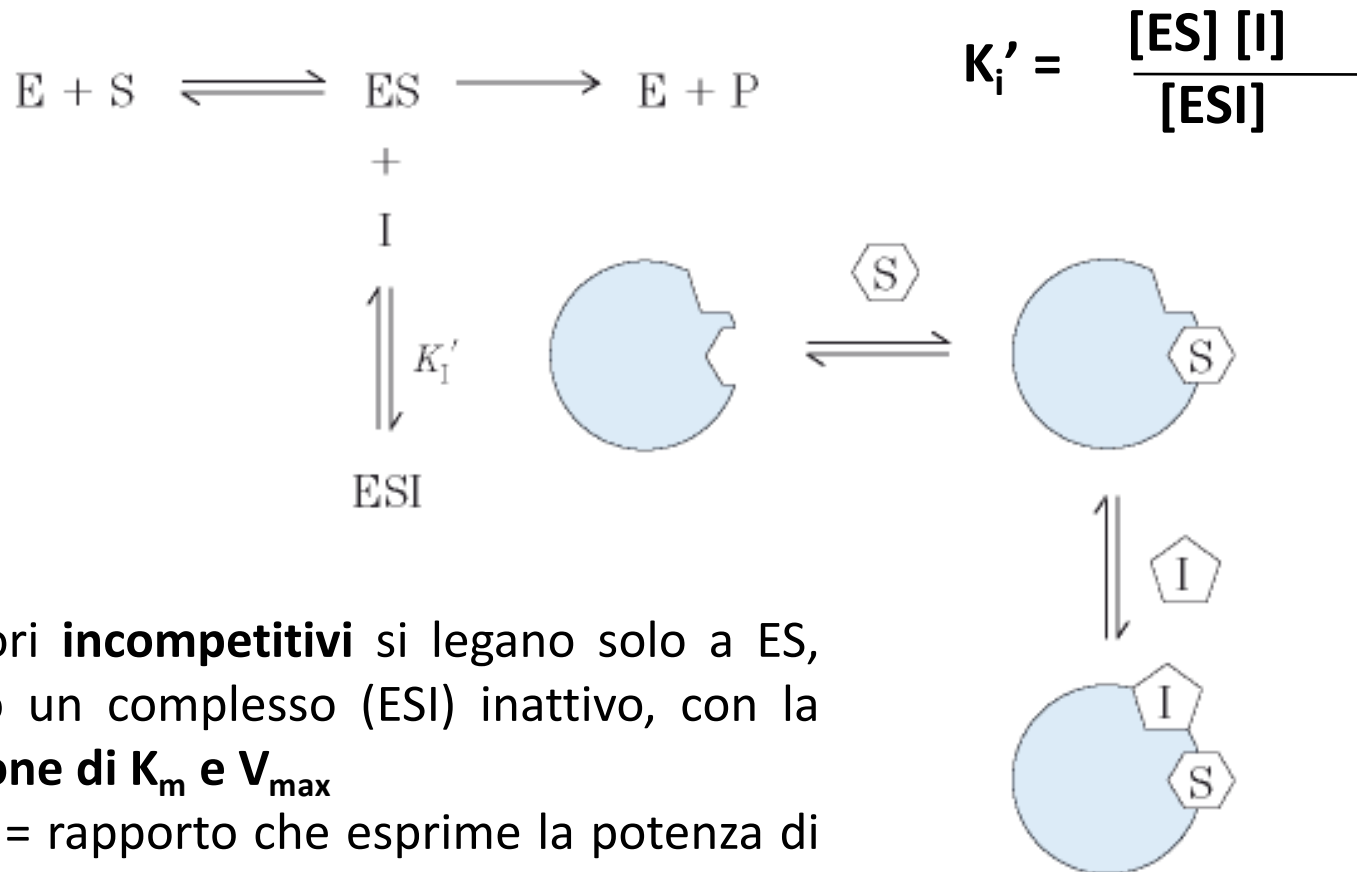
$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

**V<sub>max</sub> rimane inalterata**  
**Aumenta la K<sub>m</sub>**



## Inibizione incompetitiva

L'inibitore si lega direttamente al complesso ES (ma non all'enzima libero) in un sito diverso da quello catalitico dell'enzima, impedendo la catalisi

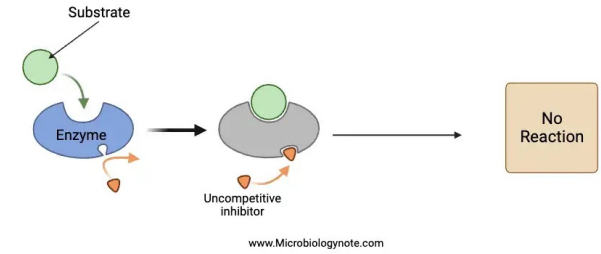


Gli inibitori **incompetitivi** si legano solo a ES, formando un complesso (ESI) inattivo, con la **diminuzione di  $K_m$  e  $V_{max}$**

$[ESI]/[ES]$  = rapporto che esprime la potenza di un inibitore (affinità verso il complesso ES)

# Inibizione incompetitiva

## Uncompetitive inhibition

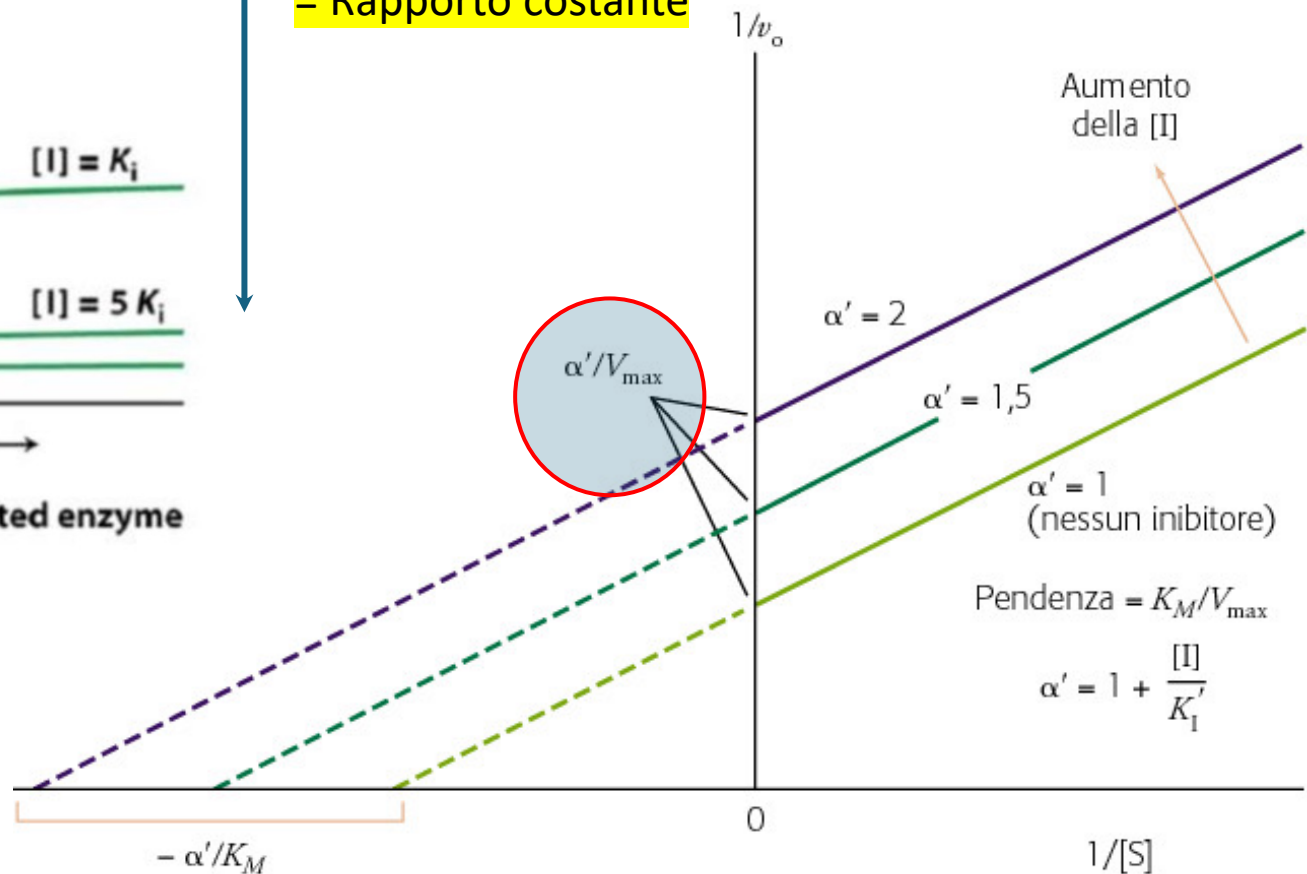
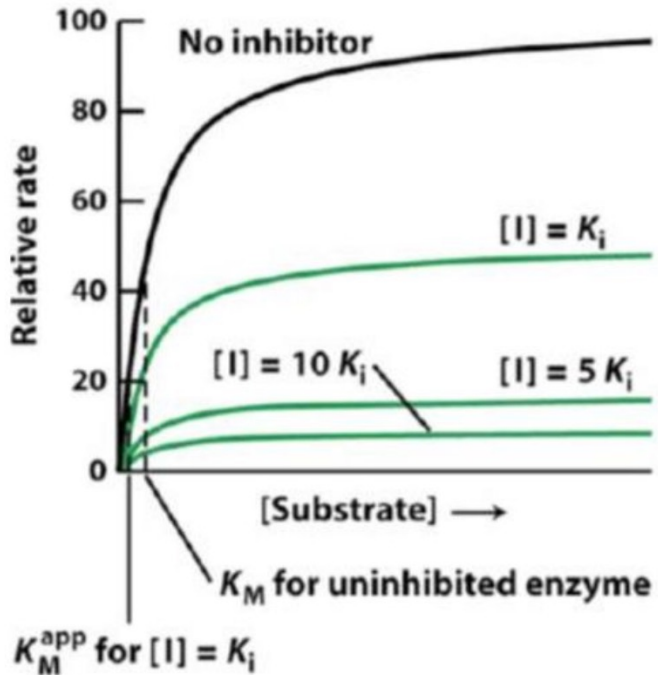


$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

Diminuiscono sia  $K_m$  che  $V_{\max}$

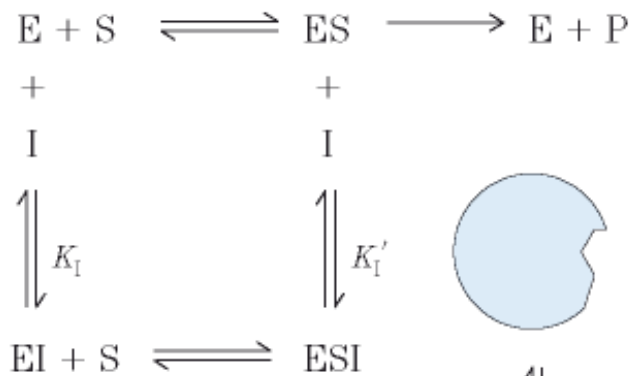
= Rapporto costante



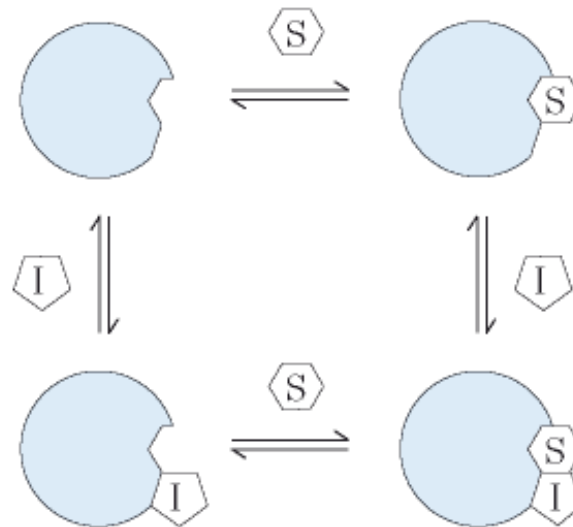
# Inibizione mista

L'inibitore si lega ad un sito dell'enzima libero E e del complesso ES, bloccando la catalisi

*Può verificarsi il caso che un inibitore misto si lega a siti dell'enzima che partecipano sia al legame con il substrato sia alla catalisi*



L'inibizione mista **diminuisce** la  $V_{max}$  e **modifica** la  $K_m$



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

# Inibizione mista

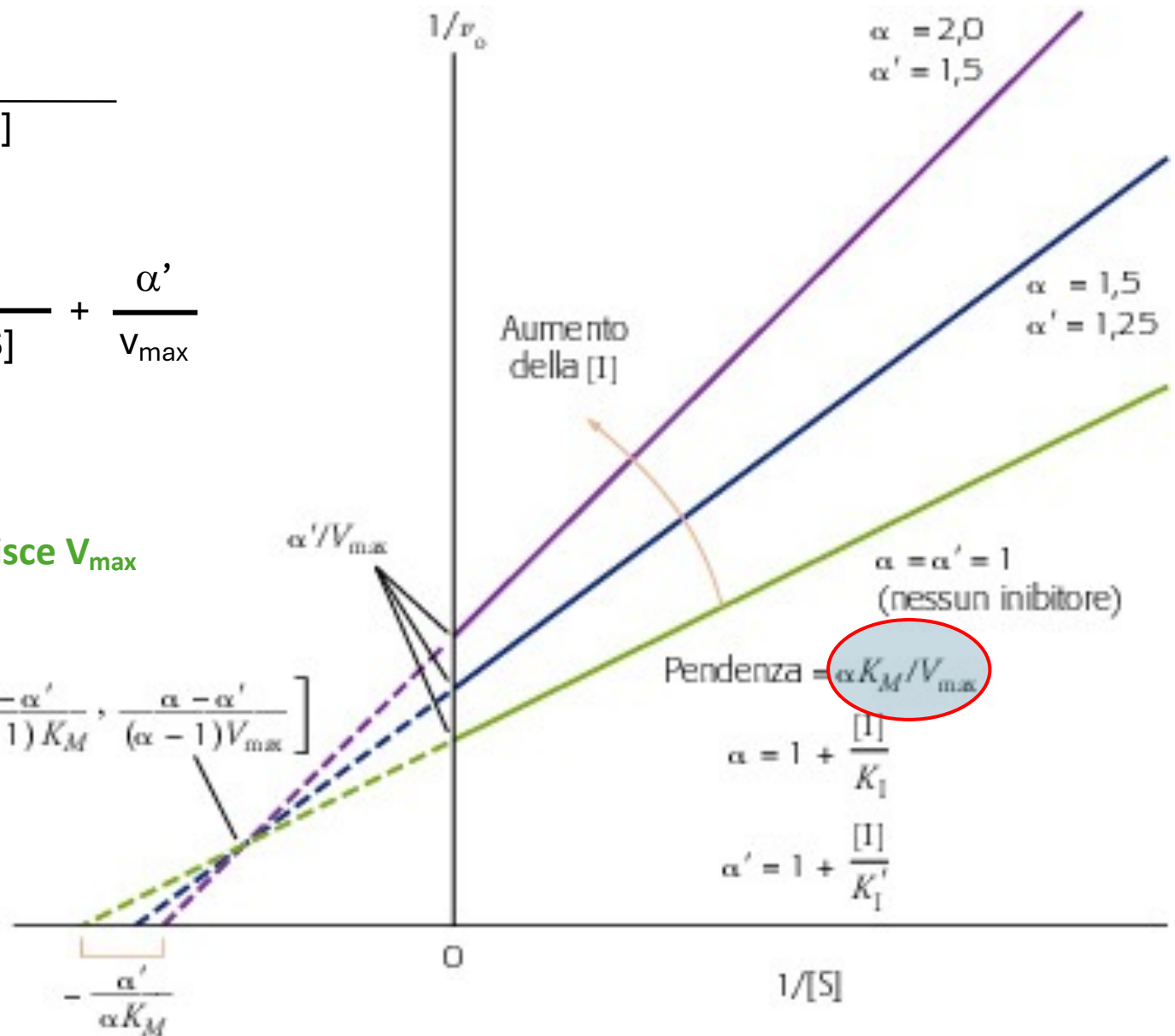
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

Diminuisce  $V_{\max}$

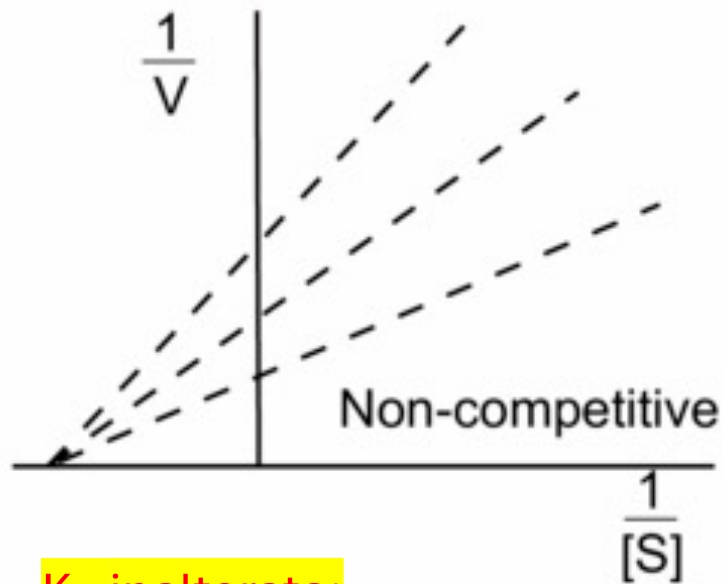
La  $K_m$  può aumentare o diminuire

$$\left[ \frac{1 - \alpha'}{(\alpha - 1) K_M}, \frac{\alpha - \alpha'}{(\alpha - 1) V_{\max}} \right]$$



**Nel caso particolare:**

in cui  $K_1=K_1'$  e cioè  $\alpha=\alpha'$ : diminuisce solo  $V_{\max}$  e la definiamo inibizione non competitiva!



$K_m$  inalterata;  
 $V_{max}$  diminuisce

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]} \quad \alpha/\alpha' = 1$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

For the case of non-competitive inhibitors, Campbell assumes that  $\alpha = \alpha'$ , or that the binding of the inhibitor to [E] is the same as to [ES]. Consequently there is no observed change in  $K_m$  ( $\alpha/\alpha' = 1$ ). This almost never occurs in real enzymes: both changes in  $V_{max}$  and  $K_m$  occur for non-competitive inhibitors.



...nel caso particolare in cui  $K_1=K_1'$  e cioè  $\alpha=\alpha'$

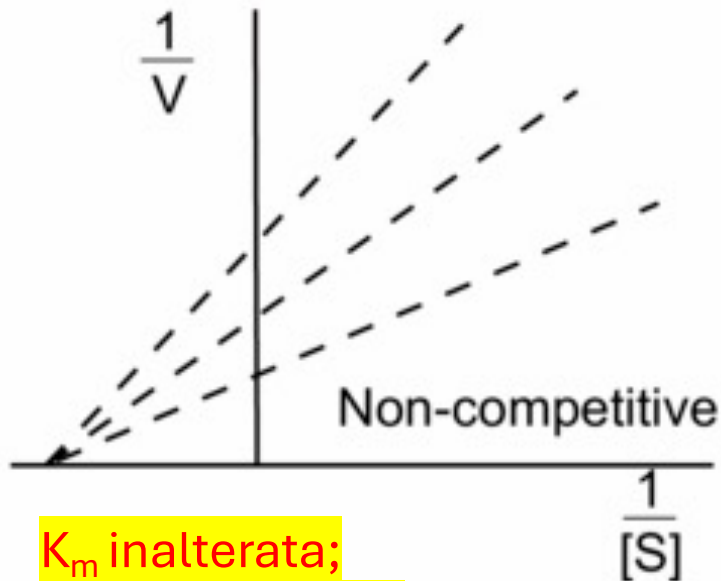
## Inibizione non competitiva

Le diverse rette intersecano sull'asse  $x=1/[S]$

**Conseguenza:** L'inibizione non competitiva **non modifica**  $K_m$  (non influisce sul legame col substrato) ma **diminuisce**  $V_{max}$  (il legame dell'inibitore ostacola la catalisi).

Questo tipo di **inibizione** viene chiamata **NON COMPETITIVA**.

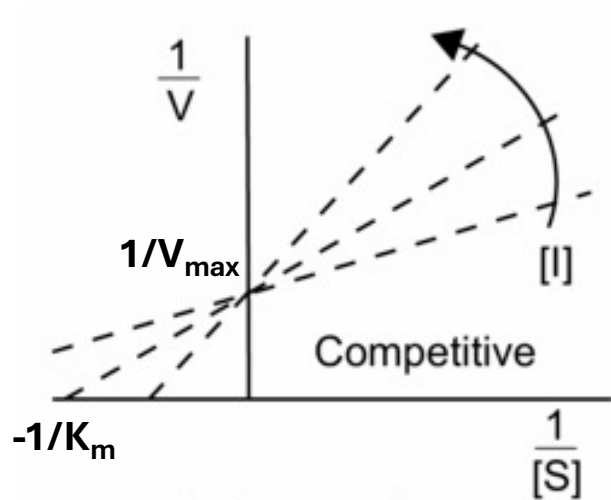
Gli inibitori che hanno *uguale* affinità per E ed ES ( $K_i = K_i'$ ) si chiamano **non competitivi**.



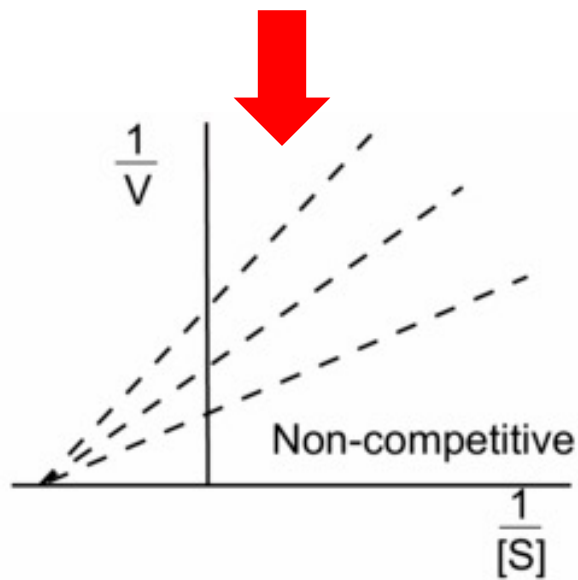
$K_m$  inalterata;  
 $V_{max}$  diminuisce

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]} \quad \alpha/\alpha'=1$$
$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

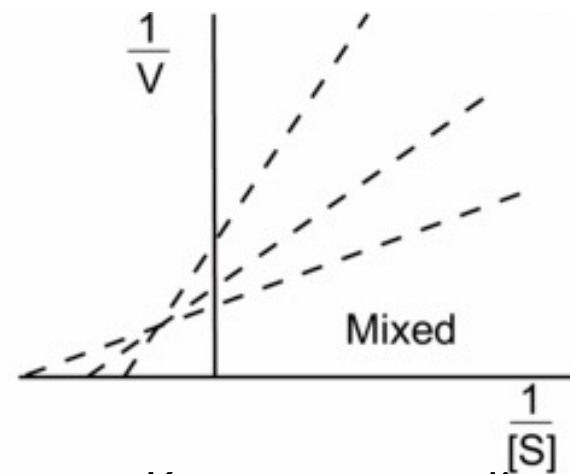
For the case of non-competitive inhibitors, Campbell assumes that  $\alpha=\alpha'$ , or that the binding of the inhibitor to [E] is the same as to [ES]. Consequently there is no observed change in  $K_m$  ( $\alpha/\alpha'=1$ ). This almost never occurs in real enzymes: both changes in  $V_{max}$  and  $K_m$  occur for non-competitive inhibitors.



$K_m$  aumenta;  
 $V_{\max}$  inalterata



$K_m$  inalterata;  
 $V_{\max}$  diminuisce



$K_m$  aumenta o dim;  
 $V_{\max}$  diminuisce

In presenza dell'inibitore, il legame enzima-substrato raggiunge un *equilibrio* dove le effettive  $K_m$  e  $V_{max}$  divengono rispettivamente  $(\alpha/\alpha')K_m$  e  $(1/\alpha')V_{max}$ .

- **Competitiva (solo legame EI):  $K_i$**

$K_m$  aumenta (diventa  $\alpha K_m$ ),  $V_{max}$  non varia

- **Incompetitiva (solo legame ESI):  $K_i'$**

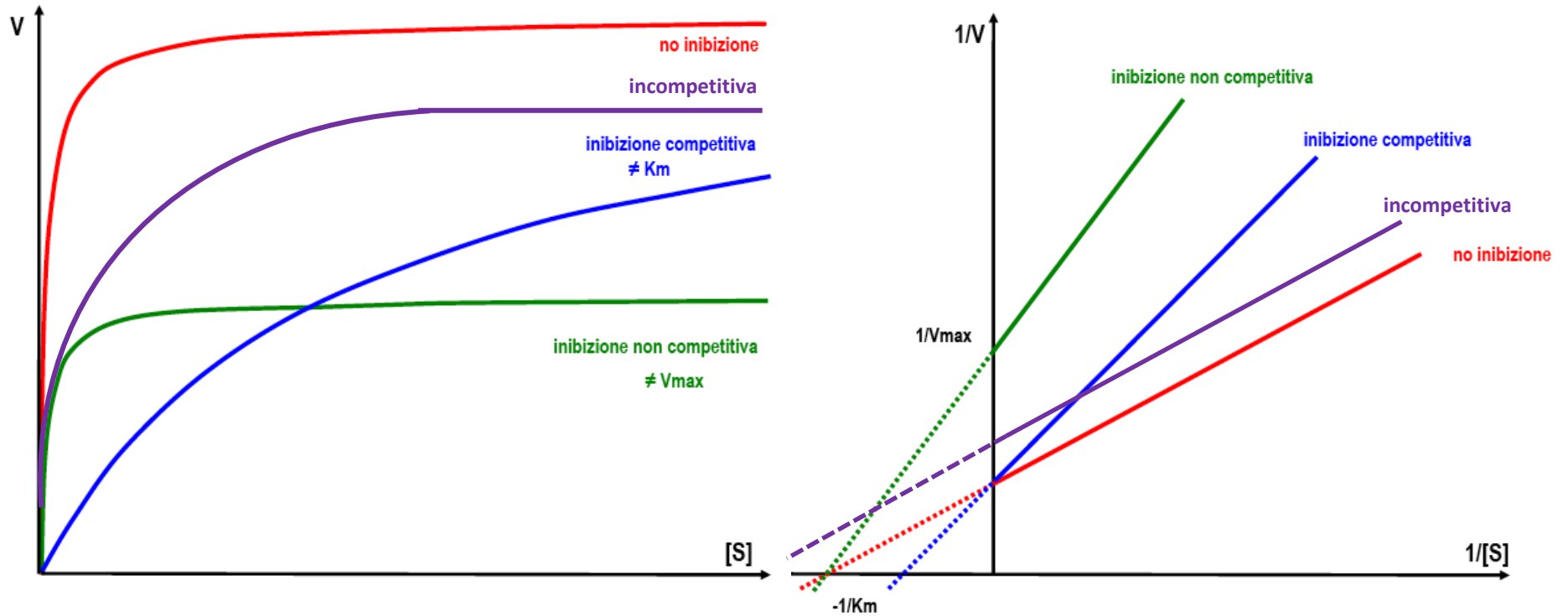
$V_{max}$  diminuisce (diventa  $(1/\alpha')V_{max}$ ), anche  $K_m$  diminuisce perché la  $[S]$  per raggiungere  $V_{max}/2$  diminuisce del fattore  $\alpha'$  ( $V_{max}$  dipende da  $[E]$ , ma  $I$  si lega a  $ES$ )

- **Mista (entrambi i legami EI e ESI,  $K_i \neq K_i'$ ,  $\alpha \neq \alpha'$ ):**

$K_m$  e  $V_{max}$  ( $I$  riduce  $[E]$  attiva) variano entrambe

(caso specifico: Inibizione **Non competitiva** quando **entrambi i legami EI e ESI,  $K_i = K_i'$ ,  $\alpha = \alpha'$** )

Gli effetti dell'inibizione possono essere visualizzati mediante i grafici di Michaelis–Menten e di Lineweaver–Burk



# **Regolazione dell'attività enzimatica**

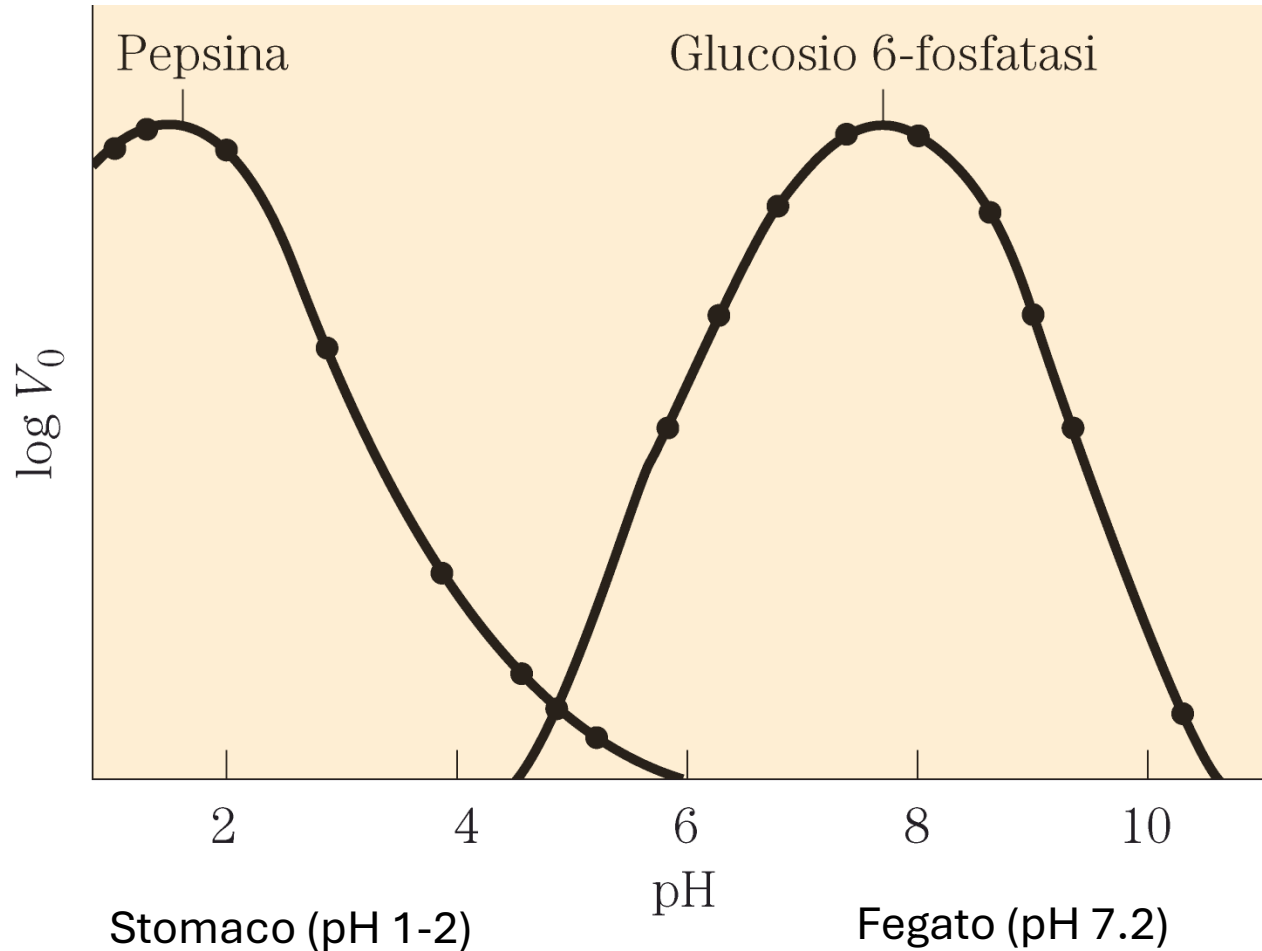
# L'attività enzimatica è regolabile

Fattori fisici che influenzano l'attività enzimatica alterando la struttura tridimensionale del sito catalitico

- forza ionica
- pH
- Temperatura\*

\*=perché aumenta la cinetica delle molecole e pertanto la probabilità di “incontro”

## Effetto del pH: gli enzimi presentano un valore di pH ottimale per la loro attività catalitica



Essendo proteine, anche per gli enzimi lo stato di *protonazione* delle catene laterali di particolari residui può influenzare la **struttura terziaria** e la conformazione 3D; inoltre, questo può modificare la **capacità catalitica acido-base** di un enzima

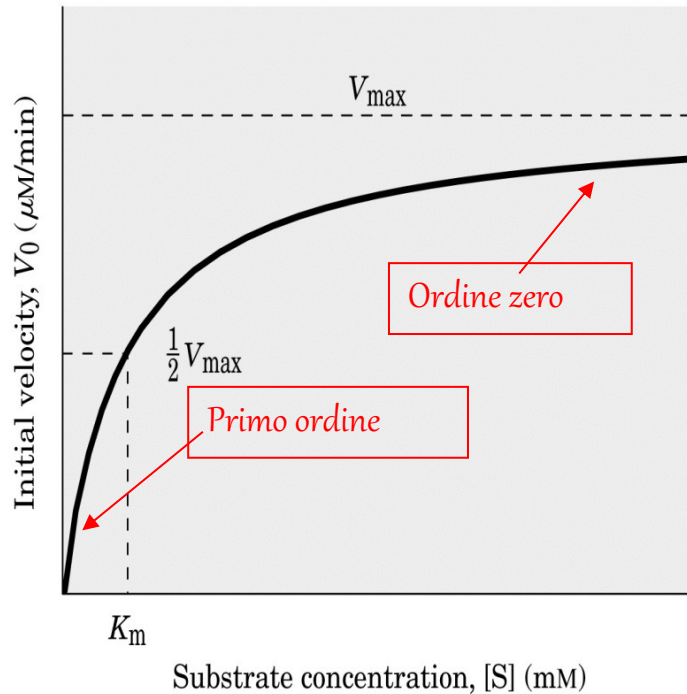
# L'attività enzimatica è regolabile

## Tipologie di Regolazione fisiologica:

- **Variazione della concentrazione del substrato (enzimi "Michaeliani")**
- **Variazione della concentrazione dell'enzima**
- **Variazione delle proprietà dell'enzima**
  - **Allosterismo**
  - **Modificazioni covalenti ed equilibri di associazione/dissociazione**



# Variazione della concentrazione del substrato



$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}[\text{Et}][S]}{K_m + [S]}$$

Spesso la concentrazione fisiologica di un substrato è vicina o inferiore al valore di  $K_m$  dell'enzima che lo metabolizza

Questo è un fatto molto importante in quanto, essendo la velocità della reazione enzimatica lineare solo attorno al valore di  $K_m$ ,

Piccole variazioni nella concentrazione di un substrato si riflettono in importanti variazioni della velocità del suo metabolismo!!

Ci possono essere **enzimi** che catalizzano una **stessa reazione** ma che hanno una **diversa  $K_m$**  e che quindi **entreranno in funzione in condizioni cellulari diverse** (differenti fasi metaboliche e/o cellulari).

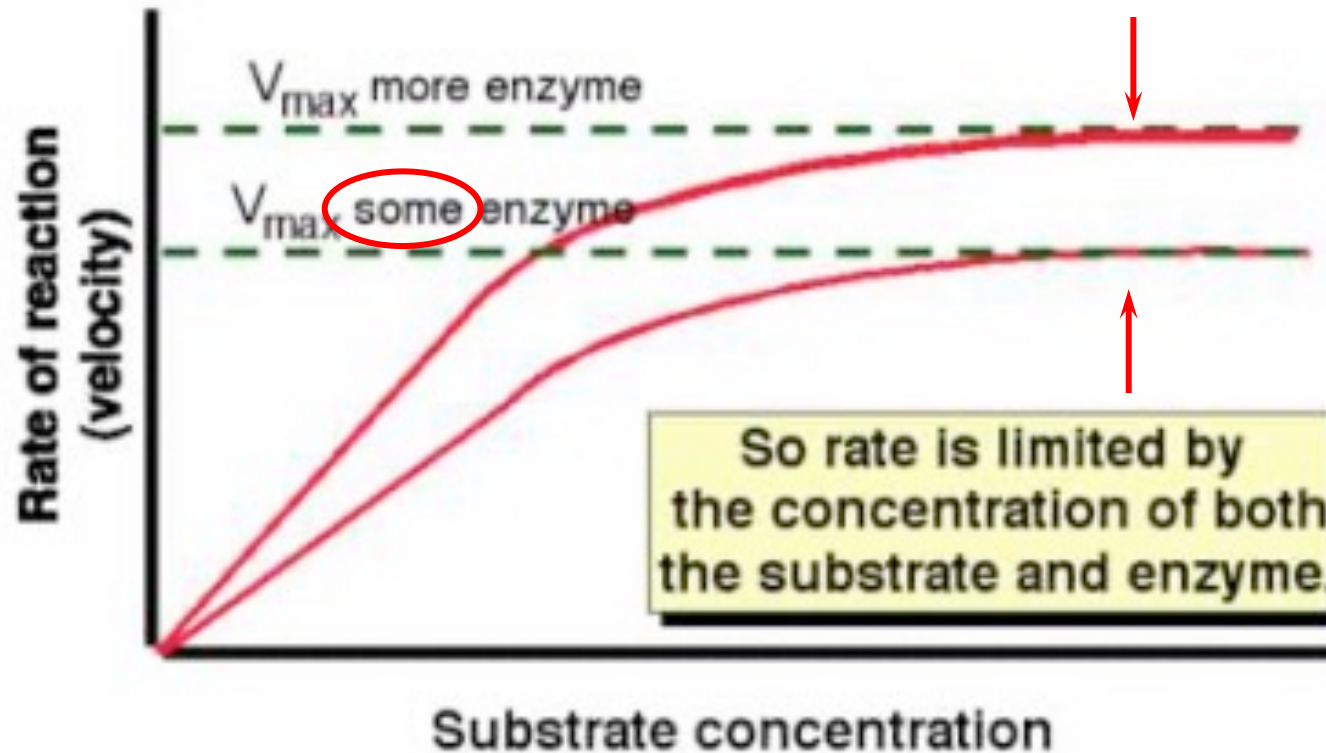
# Variazione della concentrazione dell'enzima

Controllo **quantitativo** di una specifica attività enzimatica:

- Regolazione dell'**espressione genica** (*sintesi delle proteine enzimatiche*)
- Regolazione della **degradazione proteolitica** delle proteine enzimatiche
- Taglio proteolitico di un **pro-enzima**, che produce un enzima attivo

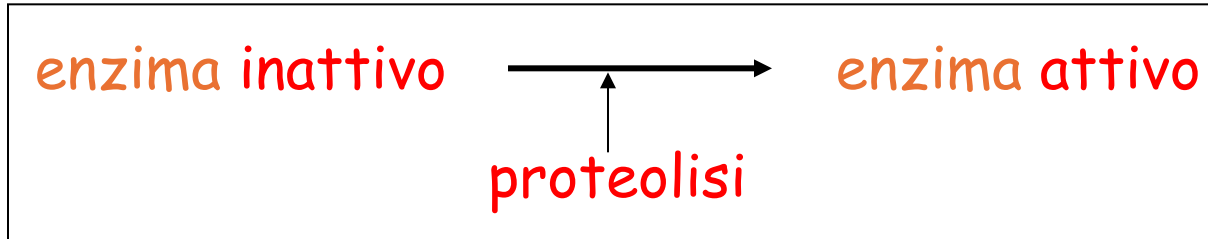
Il *bilancio* tra **sintesi e degradazione** delle proteine è un meccanismo di controllo dell'attività enzimatica che agisce in modo *lento* (ore/giorni); il taglio proteolitico di un **precursore inattivo** di un enzima è un processo più *rapido* ma è un meccanismo *irreversibile*.

## Impatto della variazione della concentrazione dell'enzima

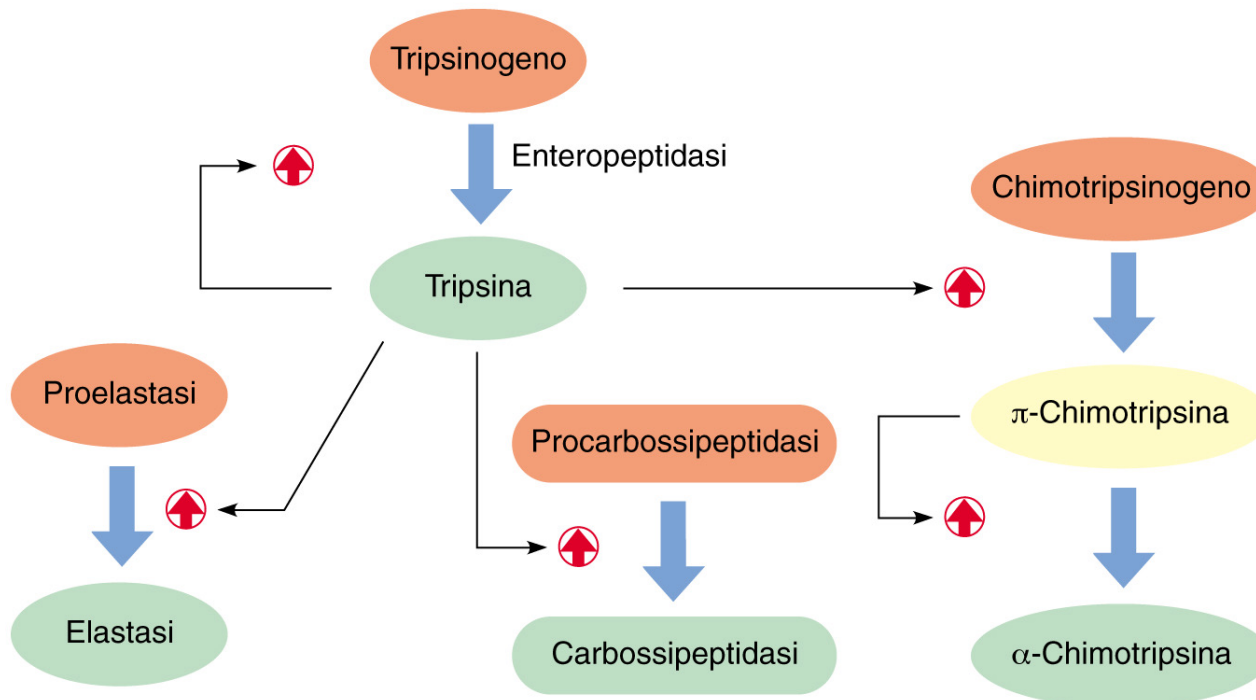


Es. enzimi inducibili

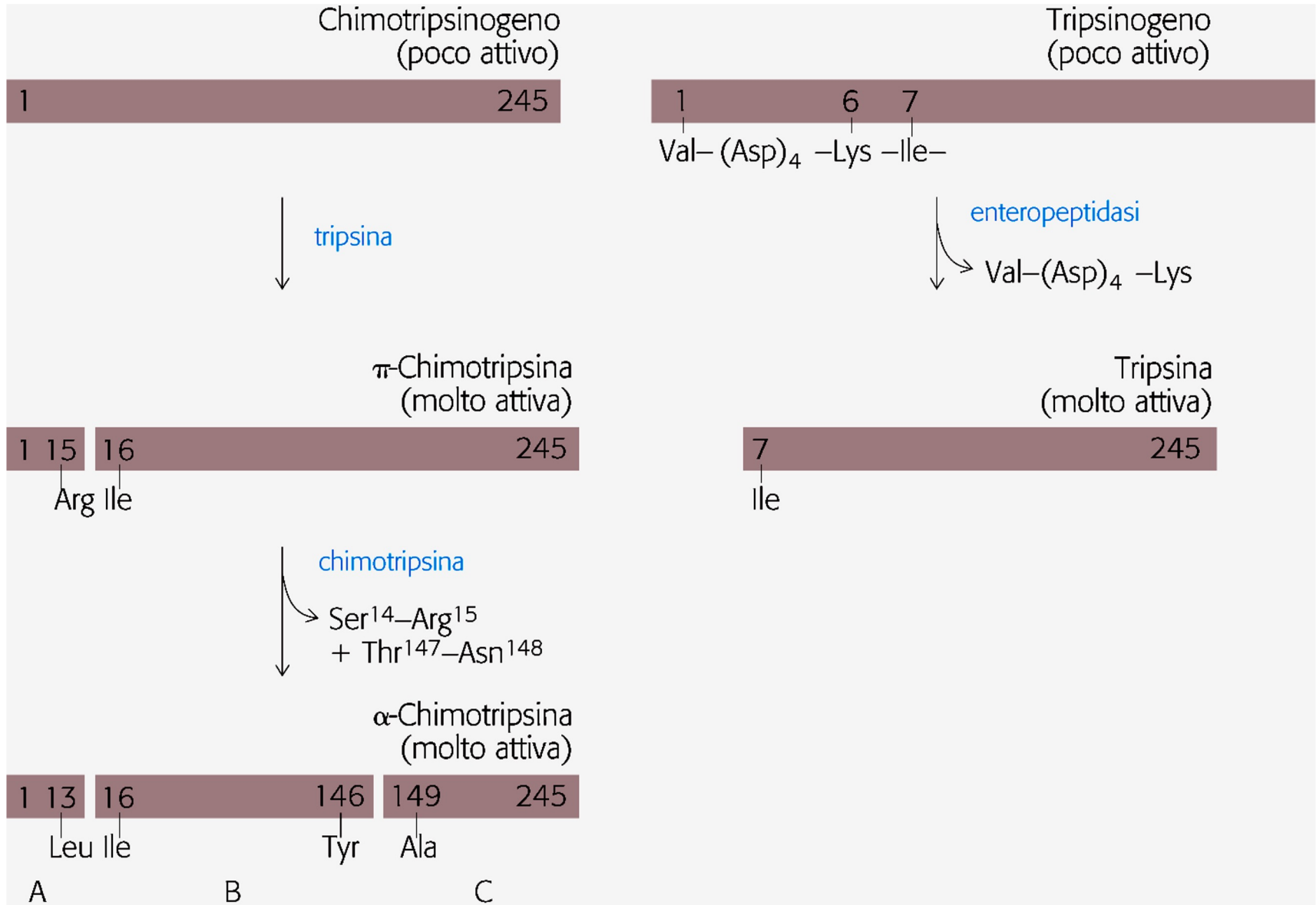
La proteolisi può essere a carico delle forme immature (inattive, dette zimogeni) degli enzimi, che quindi diventano attivi



E' questo sempre il caso degli enzimi digestivi



# Esempio: tripsina e chimotripsina



Chymotrypsinogen(inactive)



Cleavage at Arg15  
by trypsin

$\pi$ -Chymotrypsin(active)



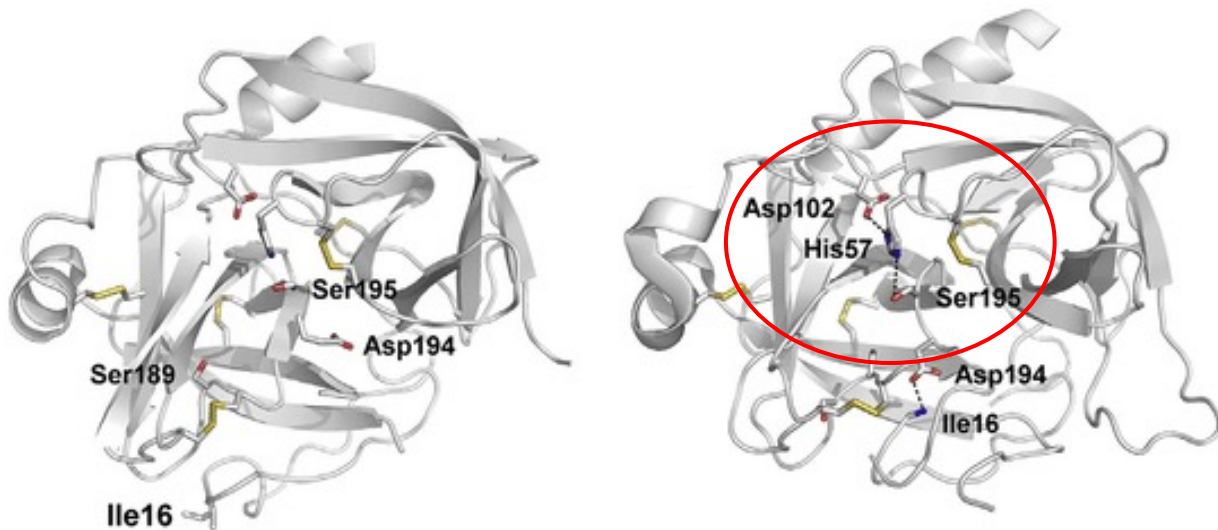
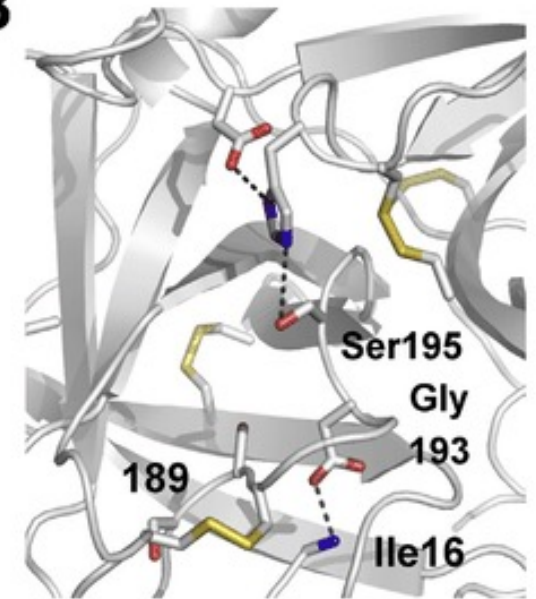
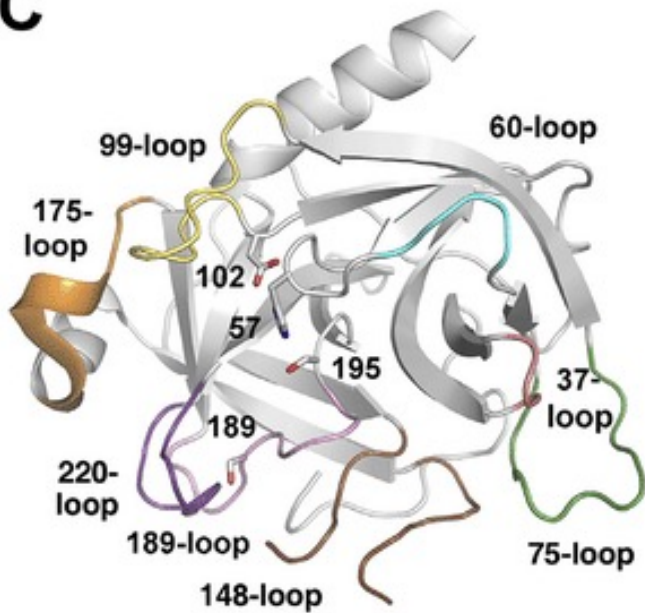
Self-digestion at Leu13,  
Tyr146 & Asn148  
by  $\pi$ -chymotrypsin



$\alpha$ -Chymotrypsin(active)

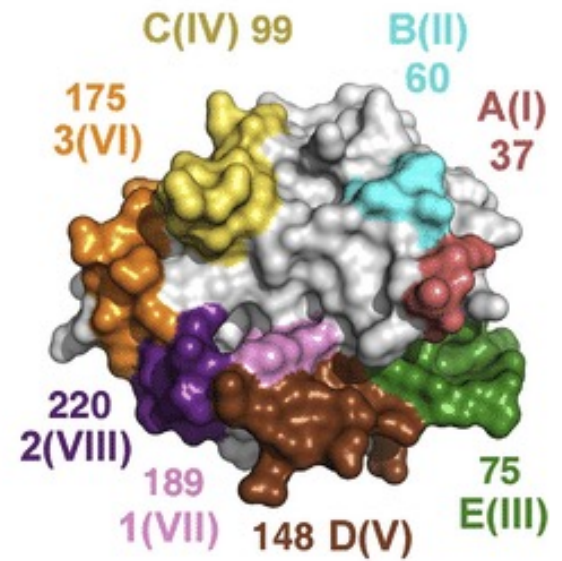




**A****B****C**

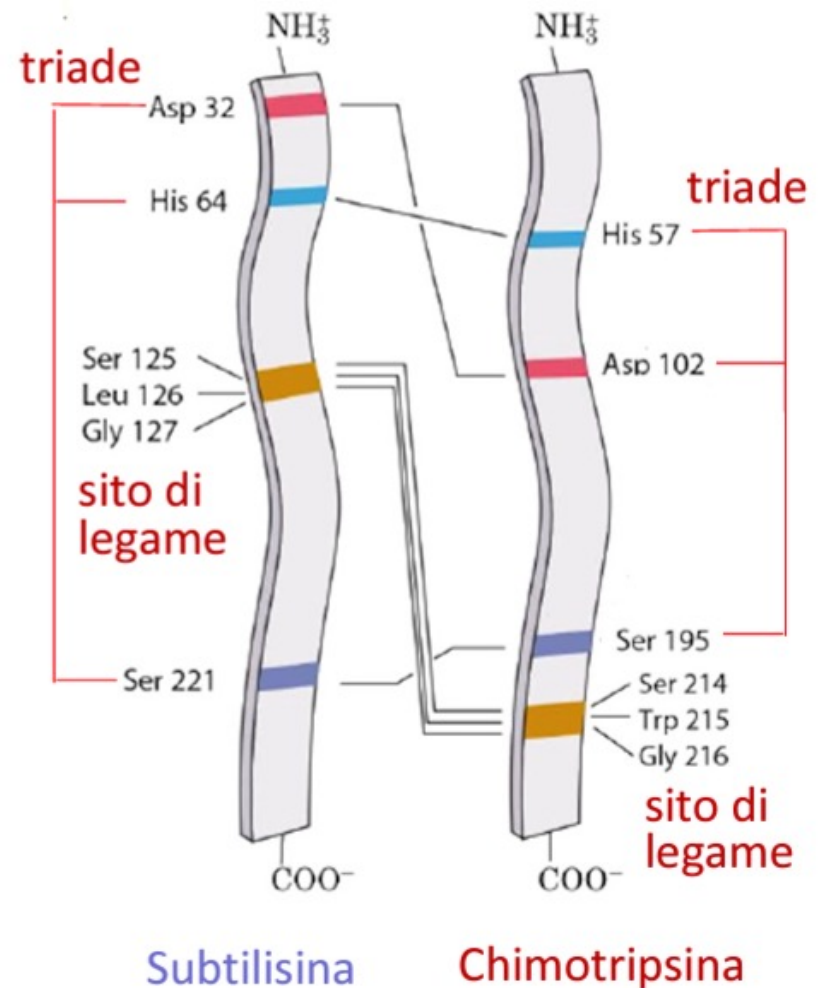
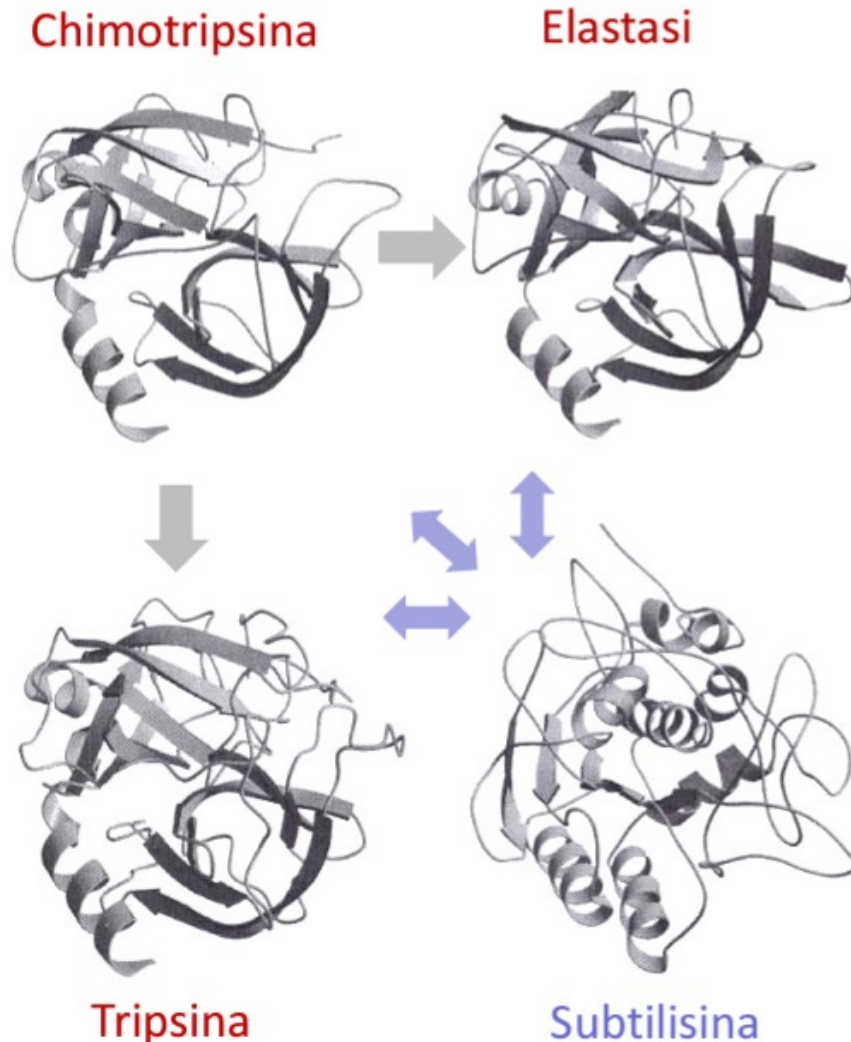
Attivazione della chimotripsina:

In figura sono evidenziati i residui parte della triade catalitica **Ser195**, **His57**, e **Asp102** ed altri che subiscono i maggiori riarrangiamenti a seguito del taglio proteolitico x attivazione.

**D**

## ► Le serina proteasi sono emerse per evoluzione divergente e convergente

- Chimotripsina, tripsina ed elastasi sono **omologhe**, espresse da geni **paraloghi**, emerse per duplicazione genica ed **evoluzione divergente**. La subtilisina è emersa per **evoluzione convergente**; la posizione della triade catalitica e sito di legame varia più nella struttura 1<sup>a</sup> che 3<sup>a</sup>

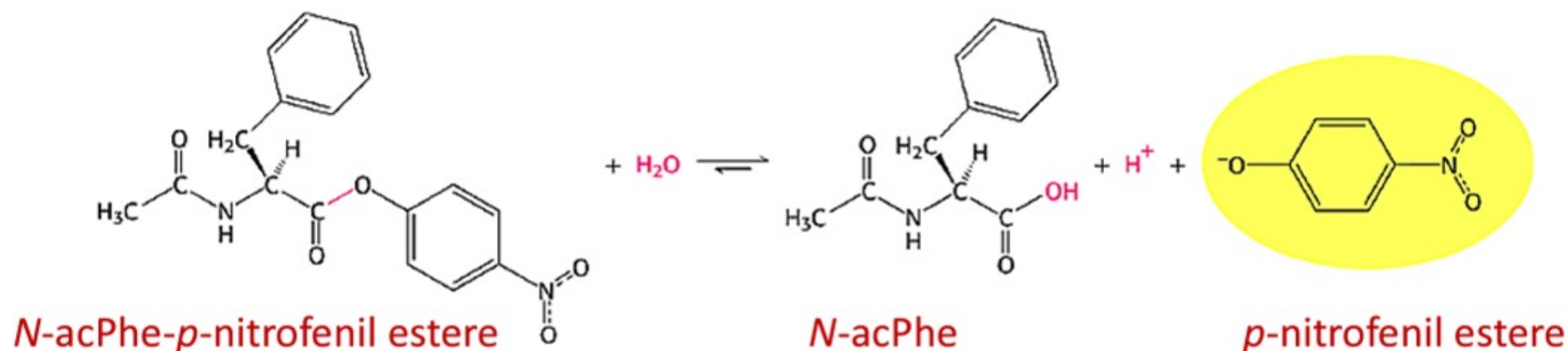




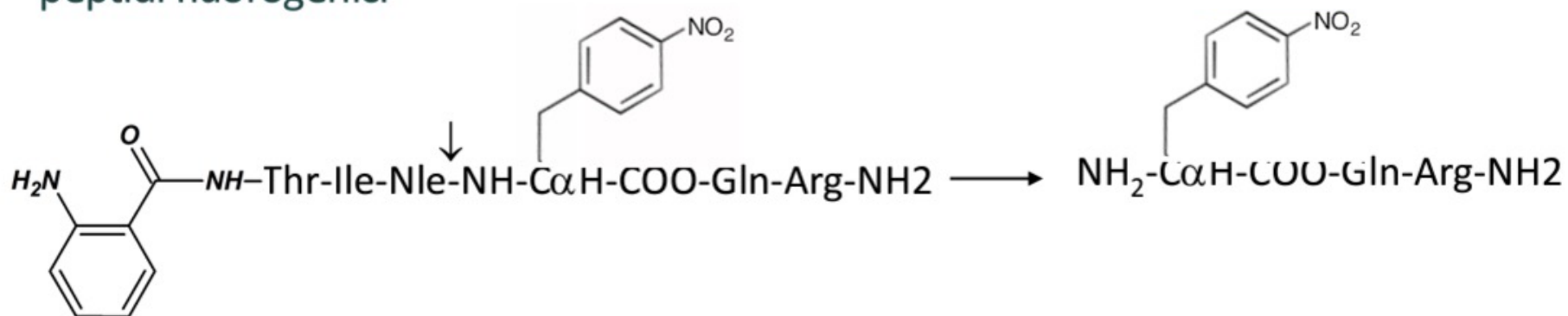
► La cinetica di catalisi può essere seguita con un substrati cromogenico o fluorogeni

- Molte proteasi idrolizzano anche gli esteri, e la cinetica può essere studiata usando un analogo cromogeno del substrato: es. *N*-acetil-fenilalanina *p*-nitrofenil estere

$$v \propto [\textit{p}\text{-nitrofenil estere}] \propto A_{410}$$



- Alternativamente si può sfruttare l'effetto FRET (Förster resonance energy transfer) in peptidi fluorogenici



# Regolazione dell'attività enzimatica

Un ulteriore meccanismo di regolazione è il *sequestro* di un enzima in un compartimento specifico, dove l'accesso ai substrati è limitato (**compartimentazione**)

## *Compartimentazione cellulare*

es1: gli *acidi grassi*, sintetizzati nel citoplasma, e degradati a scopo energetico nei mitocondri; es2: gli *enzimi lisosomiali*

## *Compartimentazione tissutale*

Espressione di isoforme enzimatiche con diversa affinità per il substrato o di enzimi che catalizzano la stessa reazione ma con diversa specificità di substrato. Es. esochinasi e glucochinasi (muscolo, cervello, fegato...)

# Regolazione dell'attività enzimatica

*Controllo di una specifica attività enzimatica:*

- Regolazione mediante **modificazione covalente reversibile** dell'enzima
- **Regolazione allosterica** (mediato dai *modulatori o effettori allosterici*)

# Modificazione covalente

Usata in molte vie metaboliche e tipi cellulari

vengono attaccati gruppi particolari  
a **residui specifici** dell'enzima in questione

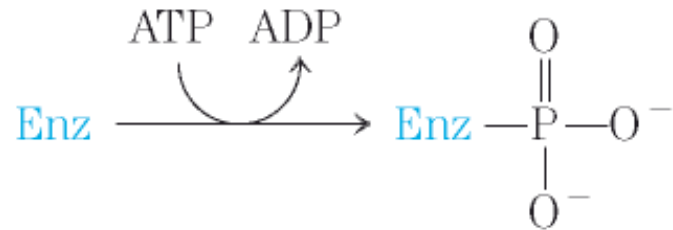
Trattandosi di **legami covalenti**, c'è il  
**necessario intervento di enzimi**  
(sia per attaccare sia per staccare questi gruppi)



*«reversibile»*

## Fosforilazione

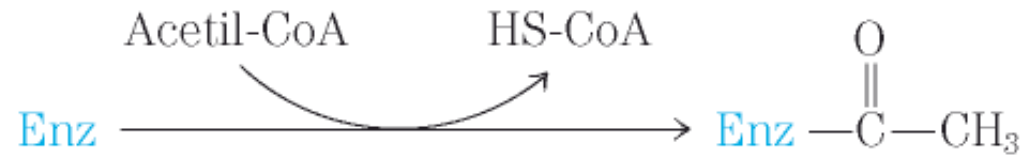
(Tyr, Ser, Thr, His)



**Chinasi e fosfatasi**

## Acetilazione

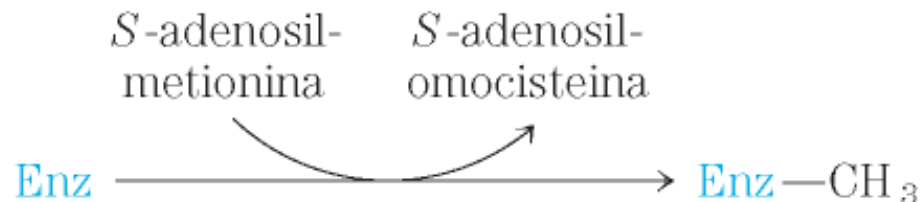
(Lys,  $\alpha$ -ammino gruppo [amminoterminale])



**Acetilasi e deacetilasi**

## Metilazione

(Glu)

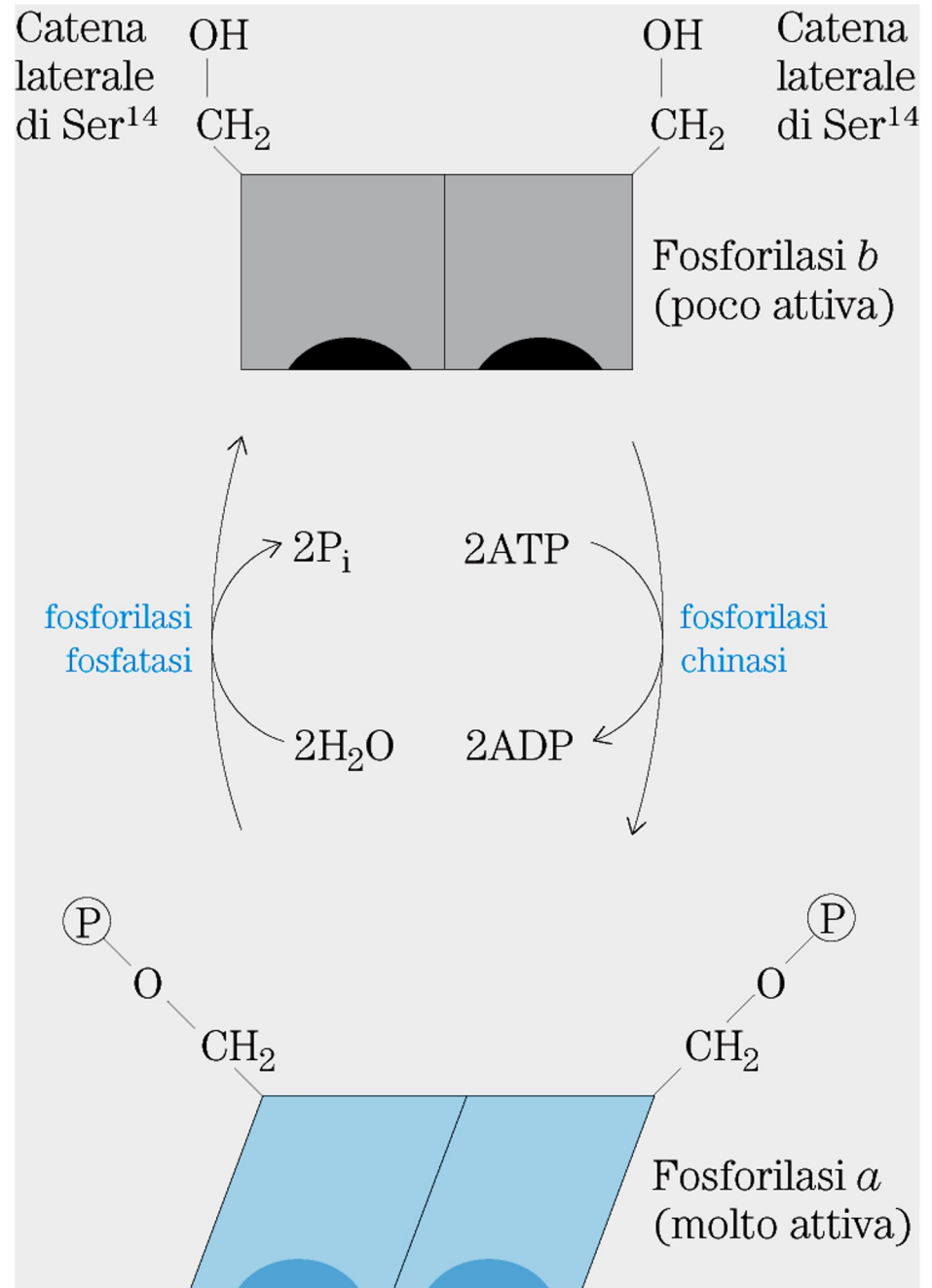


**Metilasi e demetilasi**

La **glicogeno fosforilasi** (enzima coinvolto nella degradazione del glicogeno) viene regolata mediante *fosforilazione*

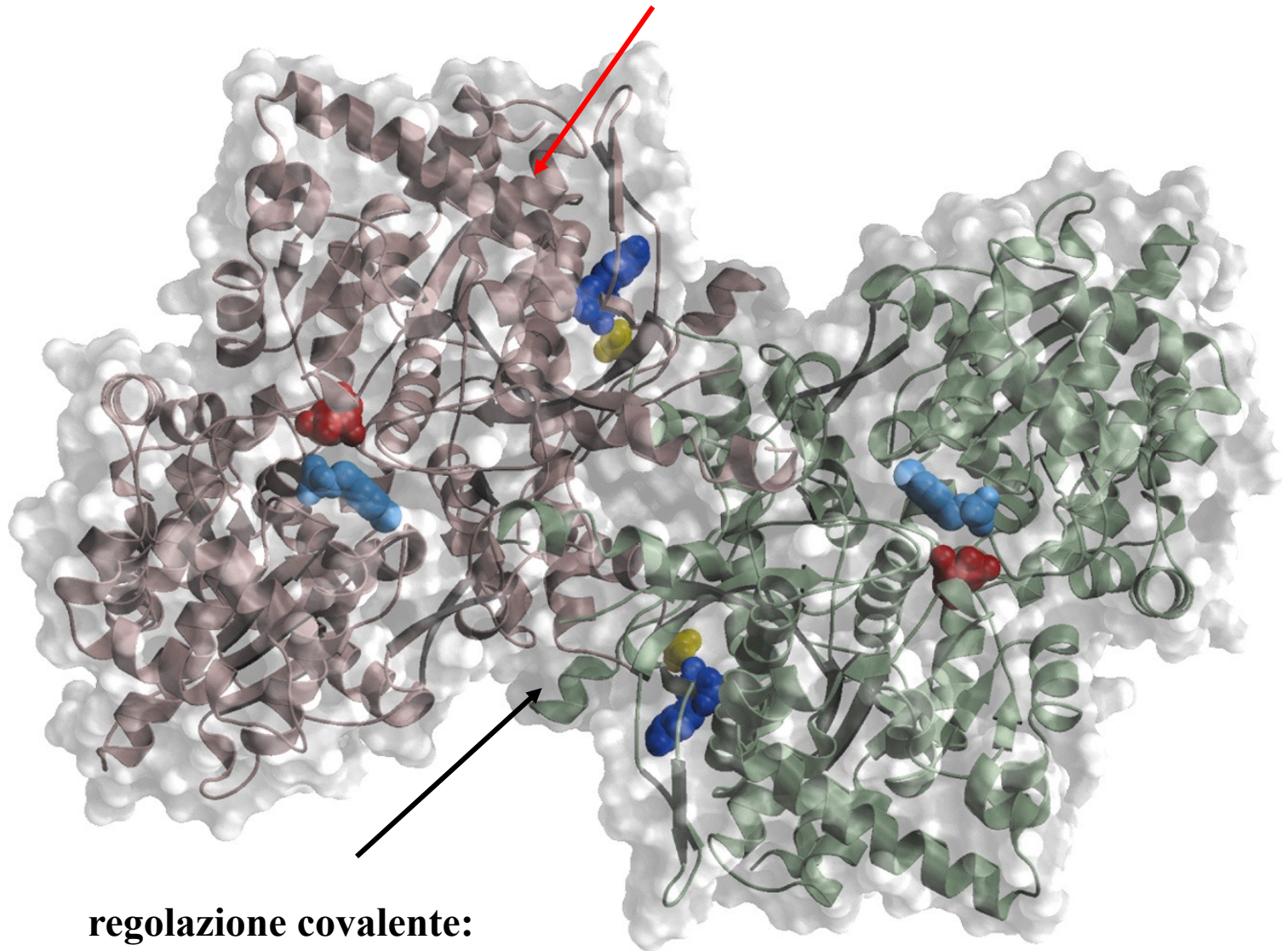
La serina è l'amminoacido bersaglio

la **fosforilasi chinasi** attiva l'enzima (forma *a*), mentre la **fosforilasi fosfatasi** rimuove i gruppi fosfato convertendo l'enzima in una forma poco attiva (*b*)



regolazione allosterica da parte di AMP: VEDI DOPO SPIEGAZIONE

Spesso, come  
nel caso della  
Glicogeno  
fosforilasi,  
un enzima può  
subire  
una **doppia**  
**regolazione**:  
covalente  
ed allosterica  
(-P; AMP)



**regolazione covalente:**  
**fosforilazione Serina 14**



# Allosterismo

**Cambiamento conformazionale** dell'enzima  
a seguito dell'interazione di un effettore (positivo o negativo)  
con un sito diverso da quello catalitico  
(sito allosterico, allos=altro)

- ✓ Gli enzimi allosterici hanno **generalmente struttura IV**
- ✓ Gli effettori allosterici hanno natura diversificata e possono essere sintetizzati da una via metabolica o a seguito di uno stimolo ormonale
- ✓ La modifica conformazionale dell'enzima si riflette sempre in un **cambiamento conformazionale** del sito attivo (e pertanto in un cambiamento delle caratteristiche cinetiche dell'enzima)



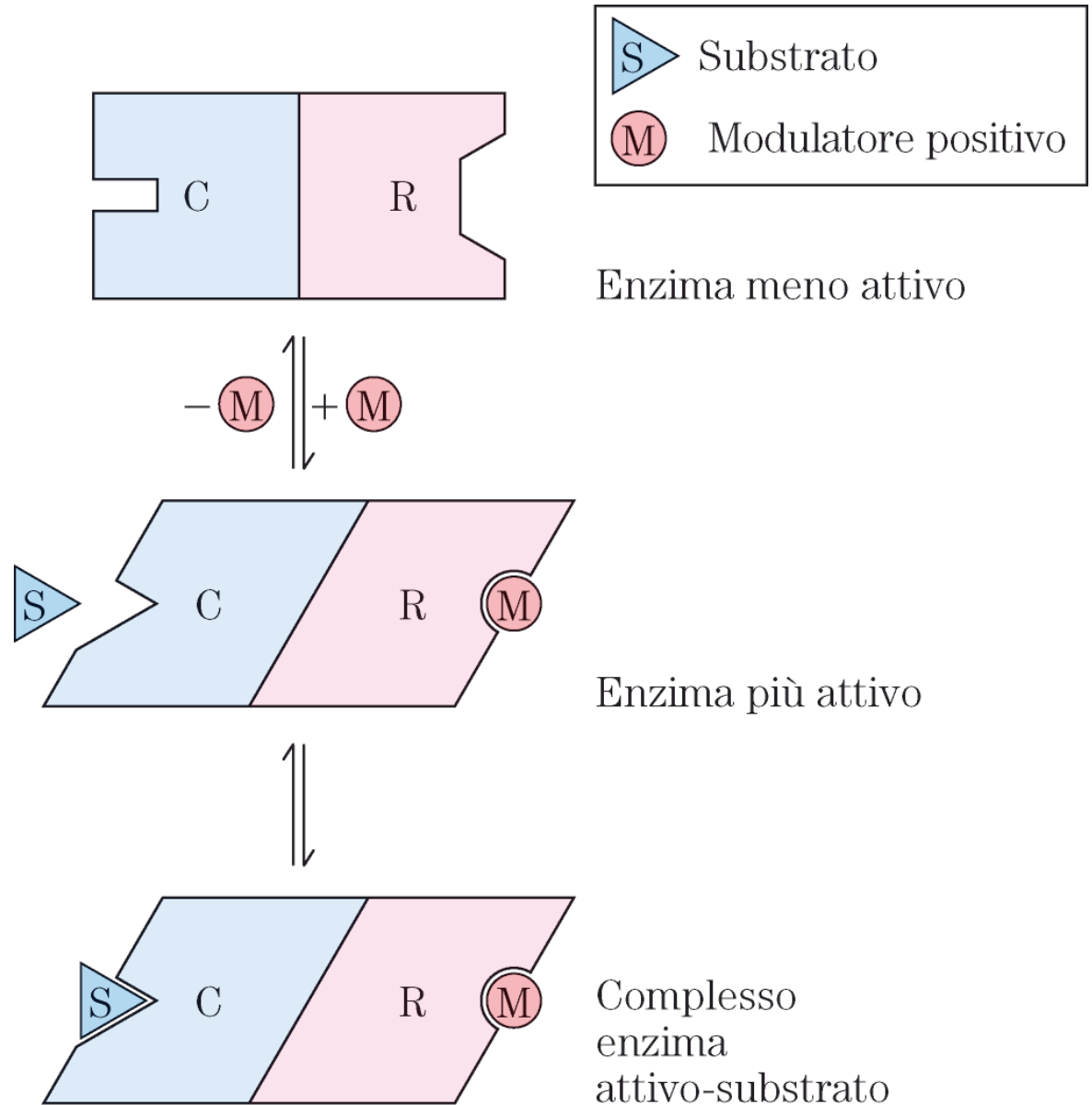
In generale, gli **effettori allosterici** sono capaci di *alterare le proprietà catalitiche* di un enzima attraverso la **modificazione conformazionale del sito attivo**, che viene indotta dal loro legame *non covalente* ad uno specifico *sito regolatorio*.

Gli **effettori positivi** producono un **aumento di attività** enzimatica, quelli **negativi** invece la **riducono**.

Quando il **substrato** agisce da modulatore allosterico, l'enzima si definisce **omotropico** (es. l'emoglobina è una proteina allosterica omotropica, ma non un enzima); quando l'effettore è una molecola *diversa* dal substrato, l'enzima si definisce **eterotropico**.

La maggior parte degli enzimi allosterici sono **oligo-** o **multimerici** e catalizzano principalmente le reazioni poste all'*inizio* di una cascata metabolica o nei punti di potenziali *diramazioni* delle vie metaboliche.

In molti enzimi allosterici, il sito catalitico e quello regolatorio si trovano su subunità diverse: il legame del modulatore induce una variazione conformazionale trasmessa a tutta la molecola



Il cambiamento conformazionale indotto nella molecola enzimatica dall'effettore allosterico causa una variazione di affinità dell'enzima per il substrato e questa alterazione modifica la cinetica della reazione.

Gli enzimi allosterici, infatti, non sono caratterizzati dalla tipica cinetica descritta da *Michaelis-Menten*, ma esprimono una risposta del tipo sigmoidale, secondo l'equazione:

$$v = \frac{V_{MAX} [S]^n}{k_M + [S]^n}$$

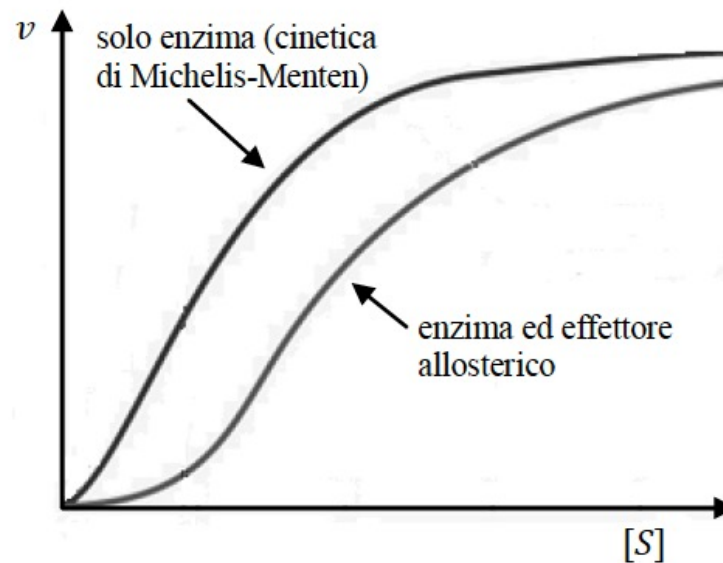
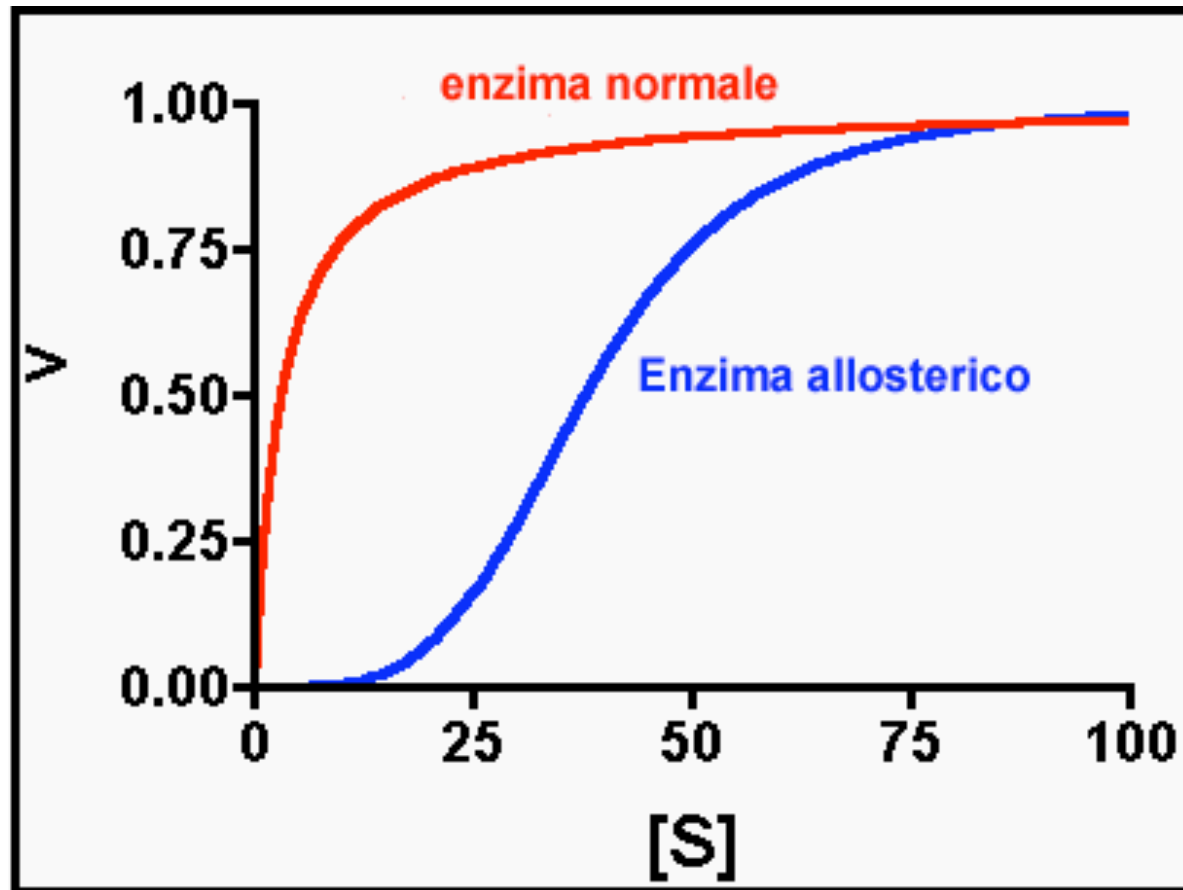


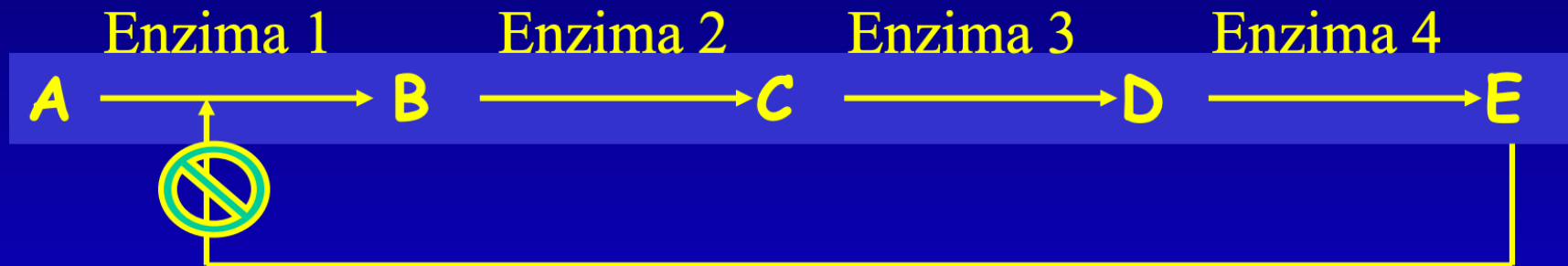
Fig. 15 - Modificazione allosterica, si osserva la risposta sigmoidale

Gli enzimi allosterici non seguono la cinetica iperbolica di Michaelis-Menten, ma l'andamento della velocità delle reazioni da essi catalizzate è di tipo **sigmoidale**, riflettendo la natura **cooperativa** delle interazioni tra le subunità dell'enzima e del legame dell'effettore sull'attività catalitica.



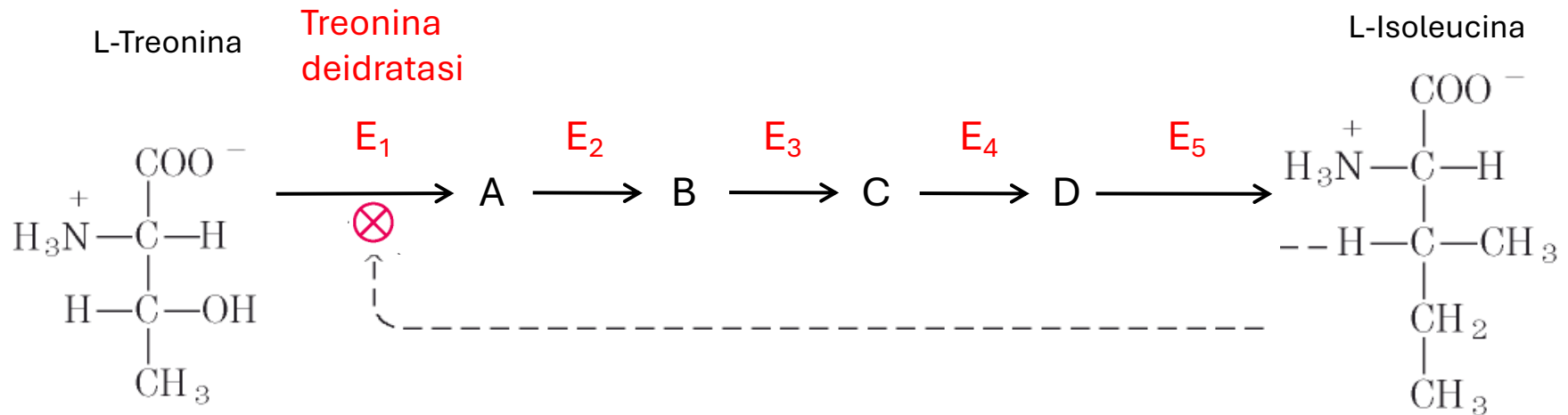
# La regolazione a feedback

La cellula può controllare la formazione del prodotto finale tramite attivazione o inibizione di un passaggio della via metabolica. Il sistema più efficiente è quello di agire sul primo passaggio.



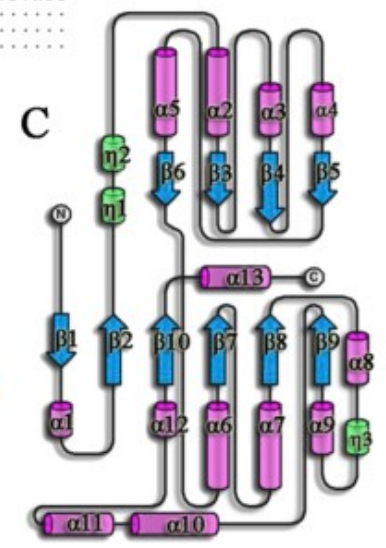
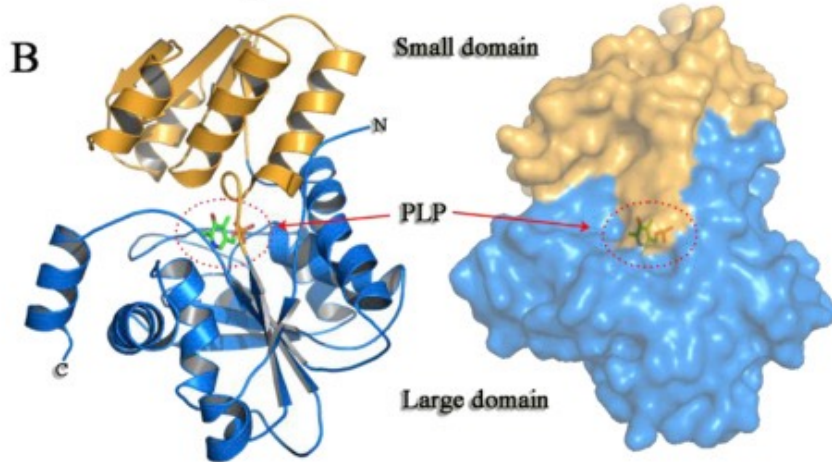
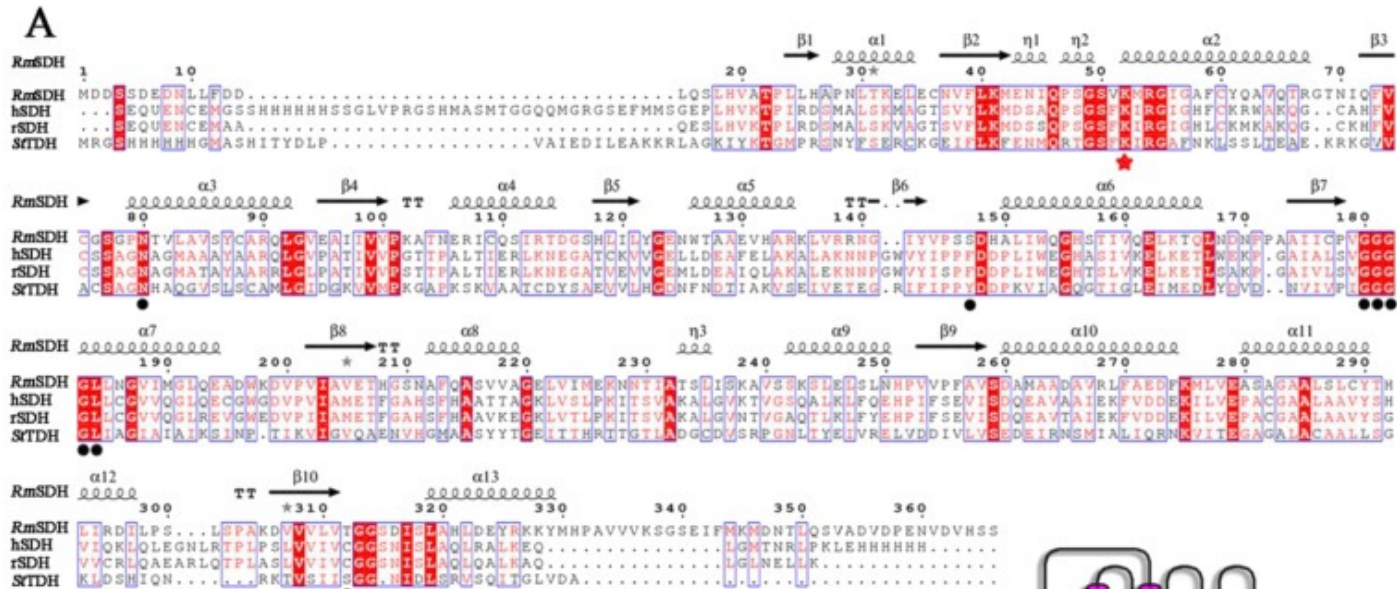
La trasformazione di A in B viene quindi controllata da E: questo processo è chiamato feedback o, più precisamente feedback negativo, in quanto un aumento della concentrazione di E ha come conseguenza una diminuzione della sua velocità di formazione.

La maggior parte degli enzimi allosterici sono **oligo-** o **multimerici** e catalizzano principalmente le reazioni poste all'*inizio* di una cascata metabolica o nei punti di potenziali *diramazioni* delle vie metaboliche.

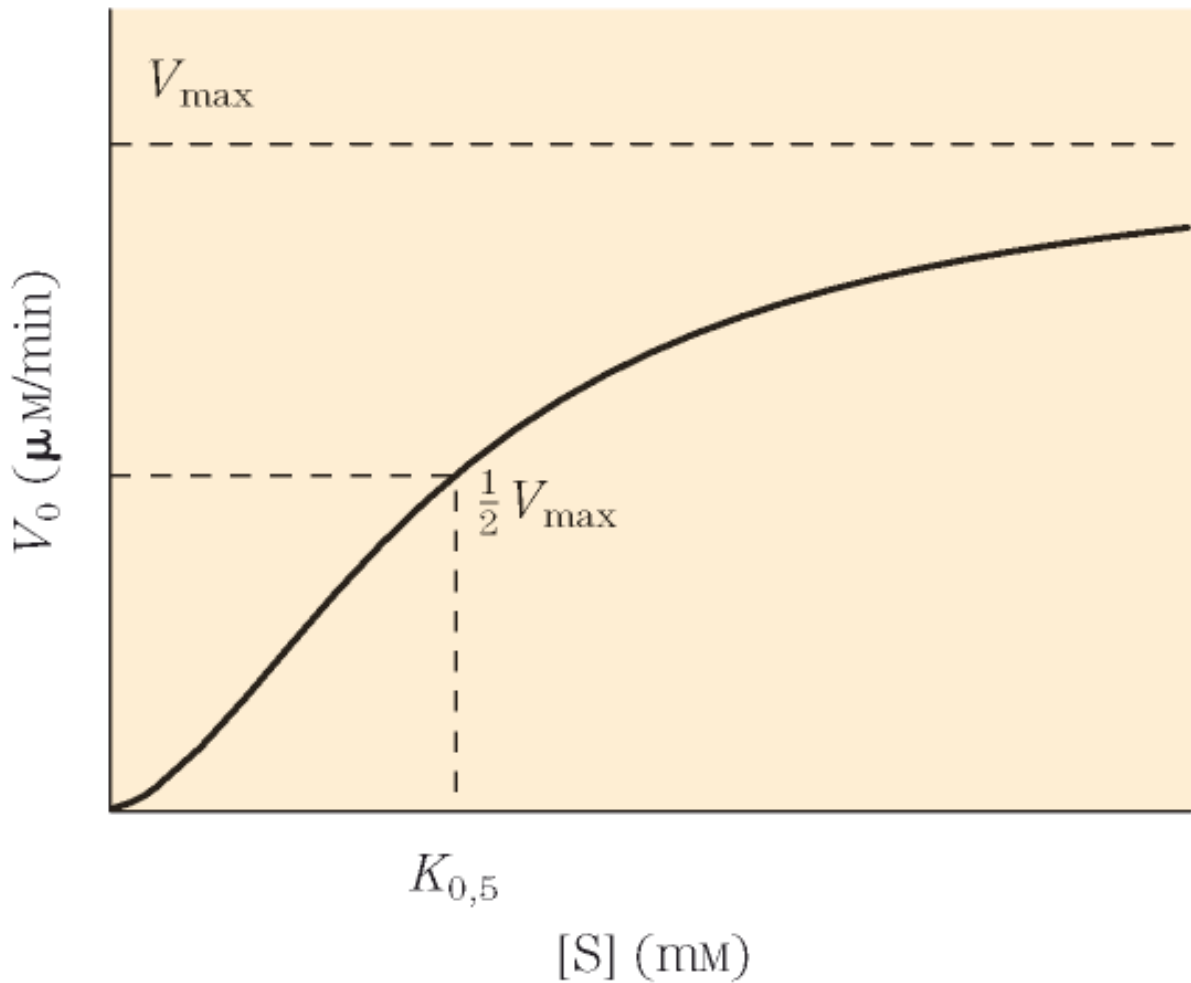


I prodotti finali di una cascata metabolica sono spesso inibitori allosterici dei primi enzimi della stessa via metabolica, regolando così l'intero flusso della cascata. Un tale meccanismo di regolazione è definito a **feedback negativo (o retro-inibizione)**, perché la quantità di prodotto generato dipende dalla sua stessa concentrazione.

La deaminazione degli aminoacidi, principalmente serina e treonina, è catalizzata dalla serina deidratasi o dalla treonina deidratasi (questi enzimi possono essere indicati anche come ser o thr deaminasi, ser o thr deidratasi, o ser o thr ammoniaca liasi). Queste reazioni non sono ossidative. Il coenzima di questi enzimi è il piridossal fosfato (PLP).



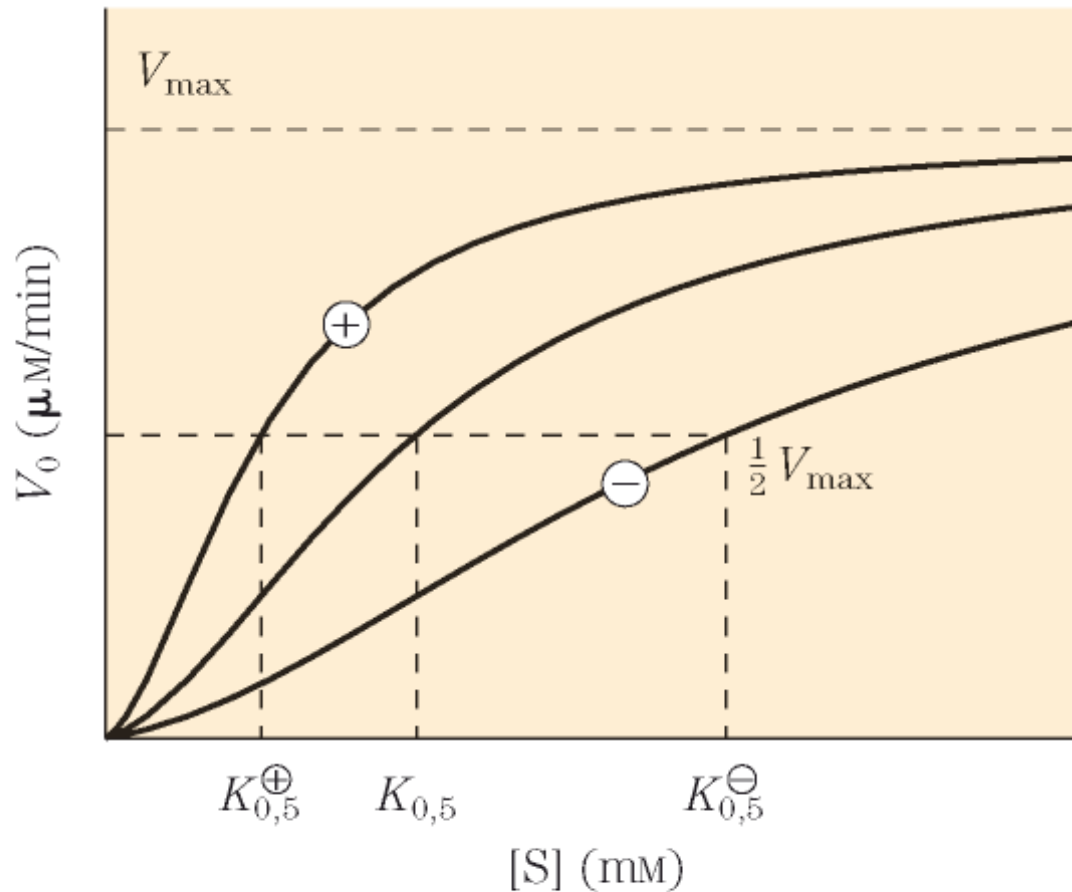
Per gli enzimi allosterici, si definisce la  $K_{0,5}$ , con lo stesso significato biochimico della  $K_m$





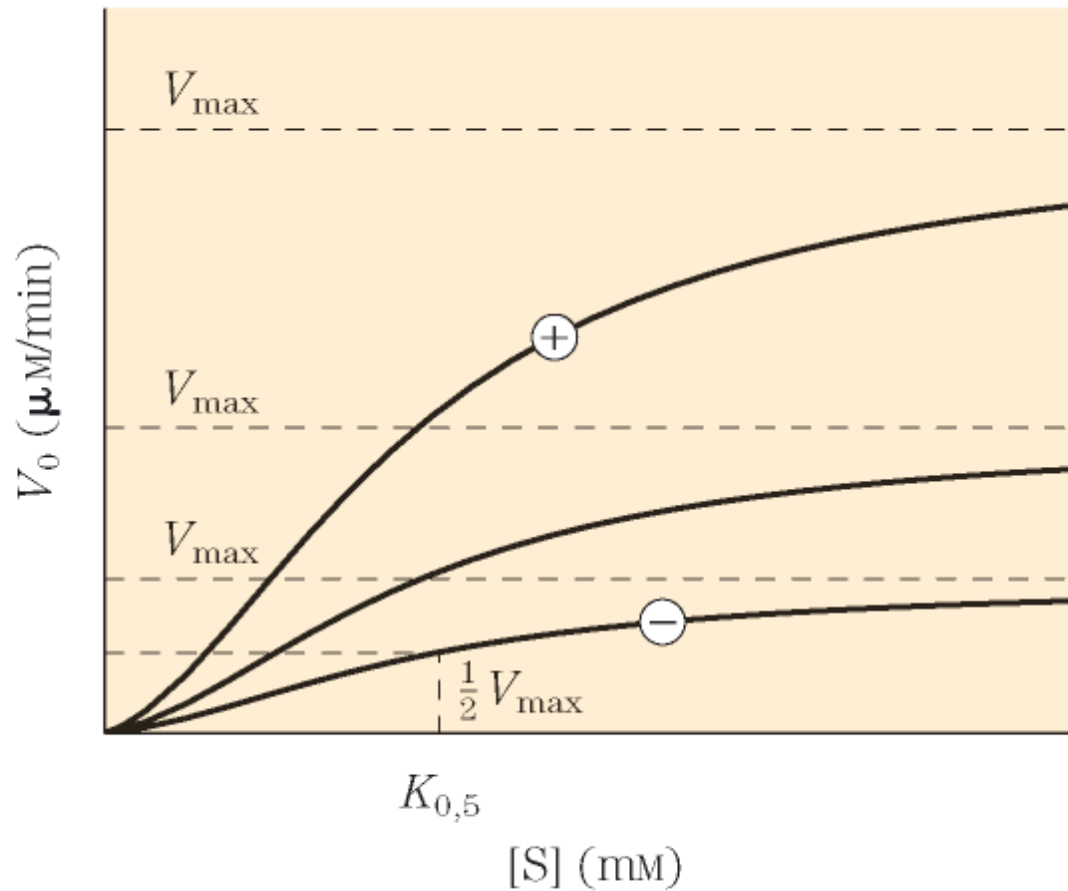
# Variazione di $K_{0.5}$

Un effettore positivo può abbassare  $K_{0.5}$  (un effettore negativo la innalza), senza variazioni di  $V_{\max}$



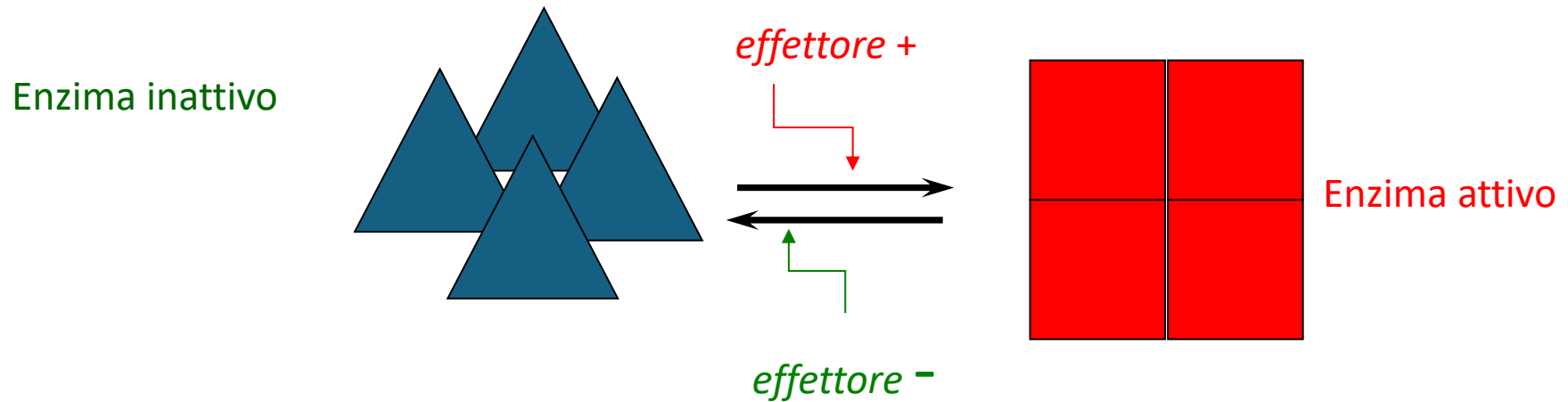
# Variazione di $V_{\max}$

Un effettore positivo può aumentare  $V_{\max}$  (l'effettore negativo la abbassa), senza variazioni di  $K_{0.5}$



## Associazione - Dissociazione

A seguito del legame con l'effettore,  
l'enzima cambia drasticamente l'organizzazione strutturale perché  
cambia il numero (e la configurazione) delle sue subunità



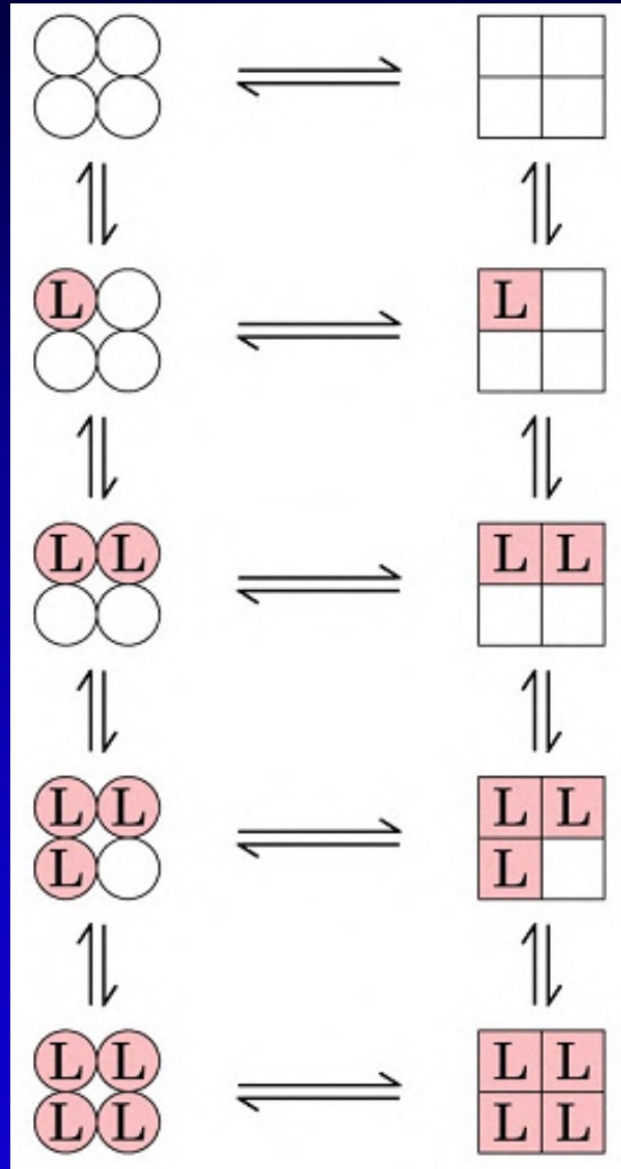
Generalmente (ma non sempre) l'enzima diventa attivo  
nello stato oligomerico

E' facilmente intuibile come ciò sia vero se, come in alcuni enzimi,  
alla corretta struttura del sito catalitico contribuiscano più subunità

# Il modello simmetrico MWC (1965)

Protomeri  
nello stato T

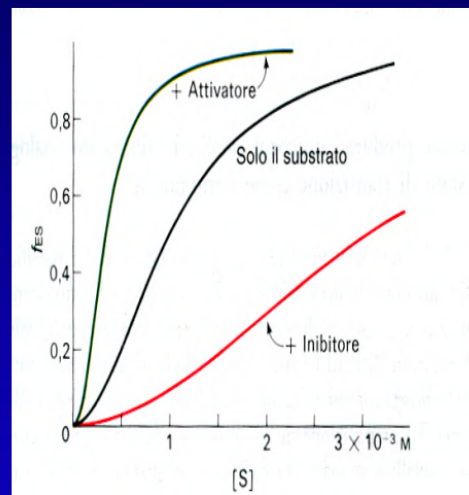
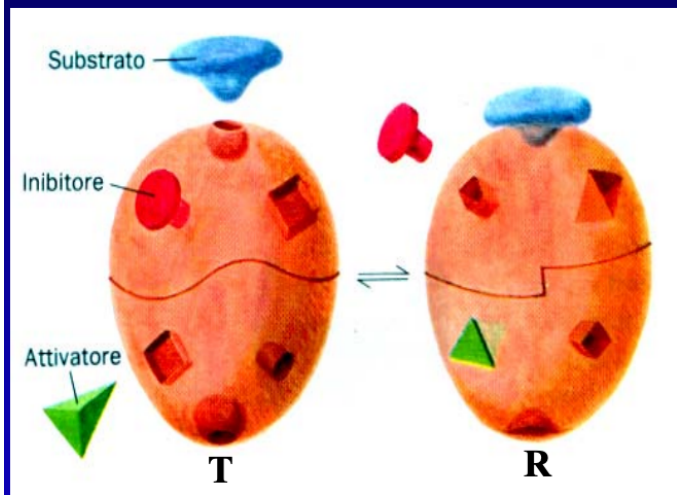
Protomeri  
nello stato R



- Una proteina allosterica è un oligomero costituito da protomeri (subunità) simmetricamente correlati;
- ogni protomero può esistere in due stati conformazionali, chiamati T (tensed) e R (relaxed) in equilibrio tra loro;
- il legame del ligando induce un cambiamento conformazionale concertato dalla forma T alla forma R senza formazione di specie intermedie e mantenendo la simmetria della proteina.

# Il modello simmetrico MWC (1965)

Nel modello simmetrico dell'allosterismo (MWC), gli effettori omotropici (substrato) ed eterotropici (attivatori) positivi si legano preferenzialmente alla forma R stabilizzandola, mentre gli effettori eterotropici negativi (inibitori) si legano allo stato T rendendolo più stabile.



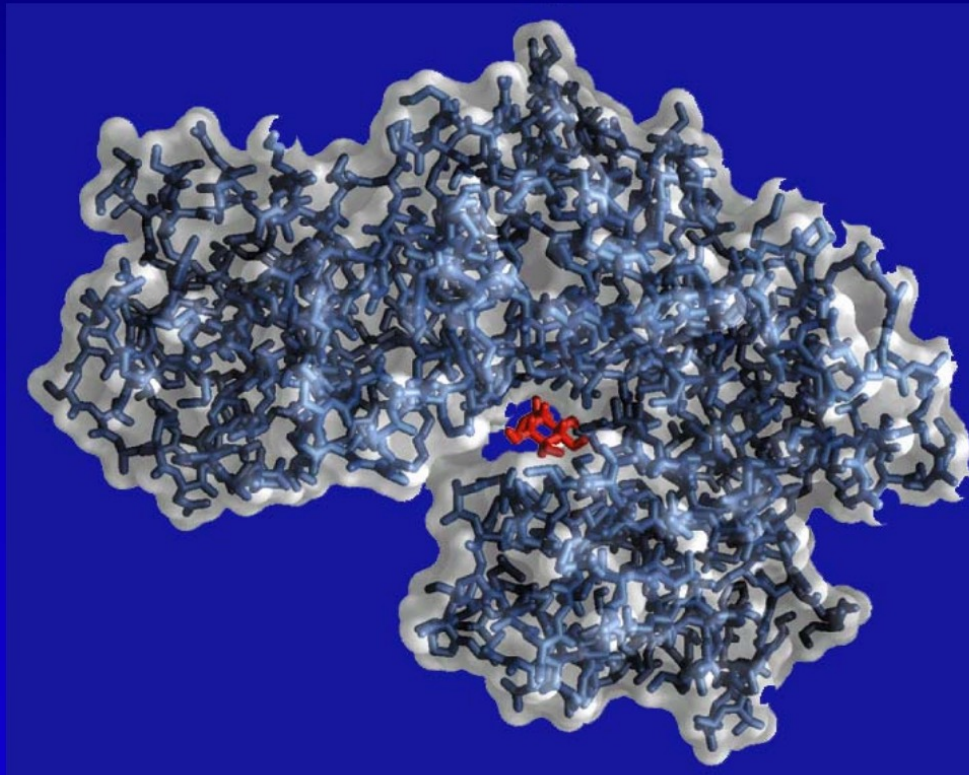
Il modello simmetrico (MWC) fornisce una plausibile razionalizzazione delle proprietà di legame del ligando in parecchie proteine ed enzimi. Tuttavia vi sono diverse valide obiezioni a questo modello:

é difficile credere che la simmetria sia invariabilmente conservata in tutte le proteine oligomeriche a seguito del legame del ligando;



## Il modello sequenziale KNF (1966)

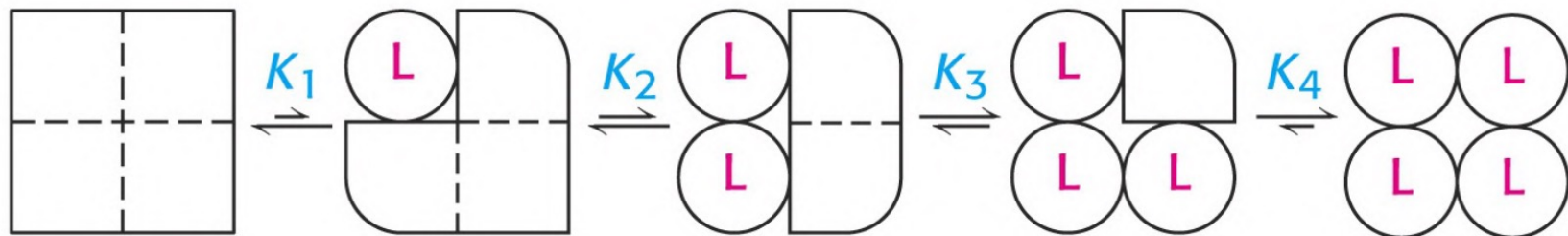
Il modello simmetrico (MWC) implicitamente assume il modello di Fischer a "chiave serratura" per il legame dei ligandi. In questo modello i siti di legame vengono considerati rigidi e complementari come forma al loro ligando. Nell'ipotesi dell'adattamento indotto (sequenziale), più sofisticata, si postula invece che un'interazione flessibile tra substrato ed enzima induca una modificazione conformazionale dell'enzima stesso (trasmessa attraverso l'interfaccia tra le subunità) che porta ad un aumento della sua affinità per il substrato.



## Il modello sequenziale KNF (1966)

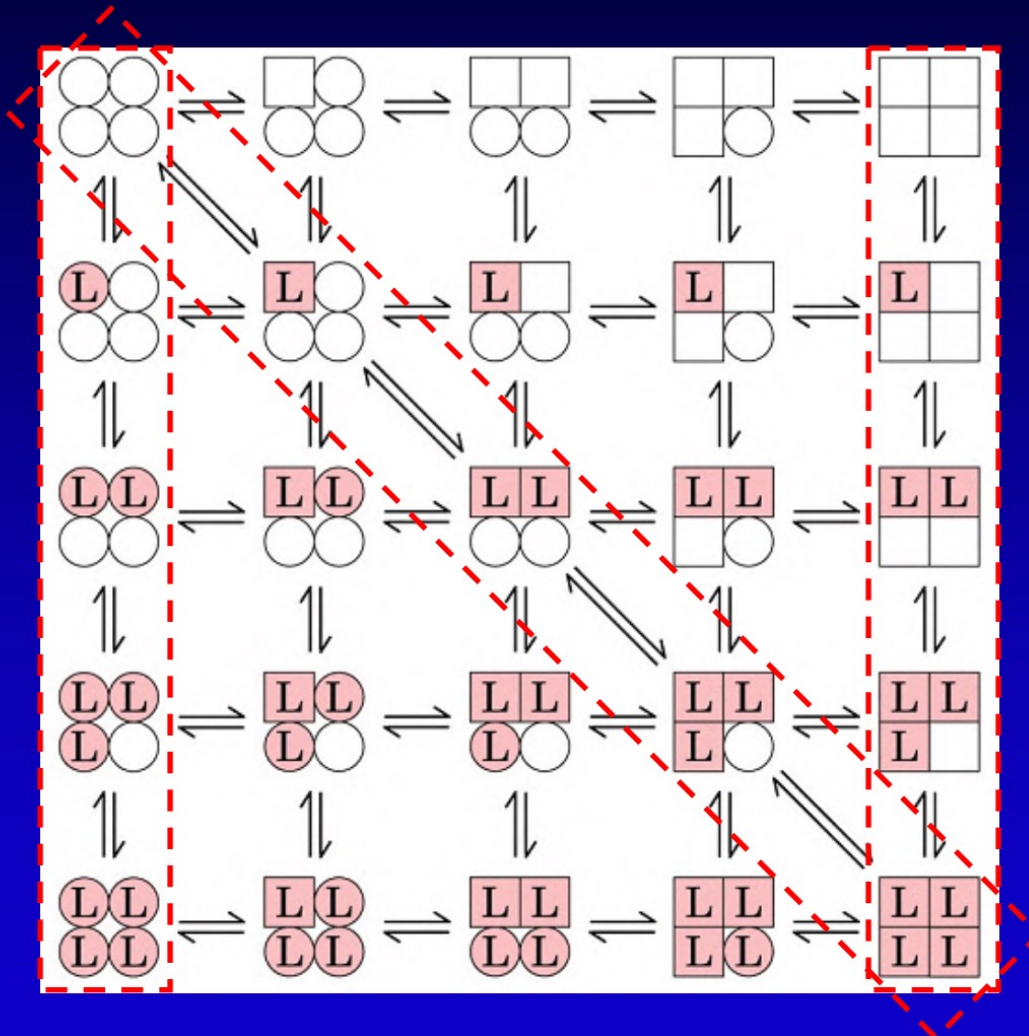
Koshland, Nemethy e Filmer nel 1966 proposero un modello confermato in molti enzimi mediante analisi ai raggi X.

Nel modello sequenziale, il legame del ligando induce una modificazione conformazionale in un protomero (subunità); le interazioni cooperative derivano dagli effetti che queste variazioni conformazionali hanno sulle subunità vicine. L'affinità della proteina per il legame del ligando varia con il numero di molecole di ligando legate, passando attraverso una serie di forme intermedie.





# Il modello generale di interazioni allosteriche

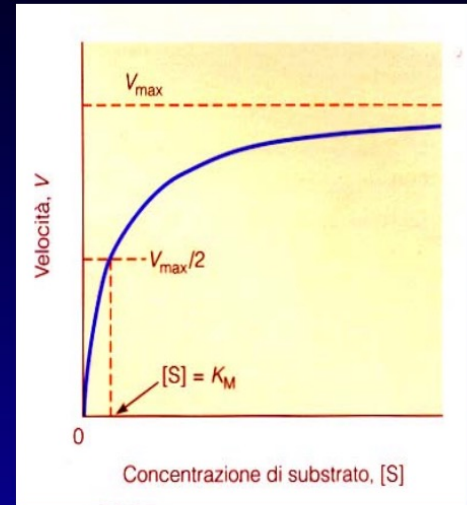




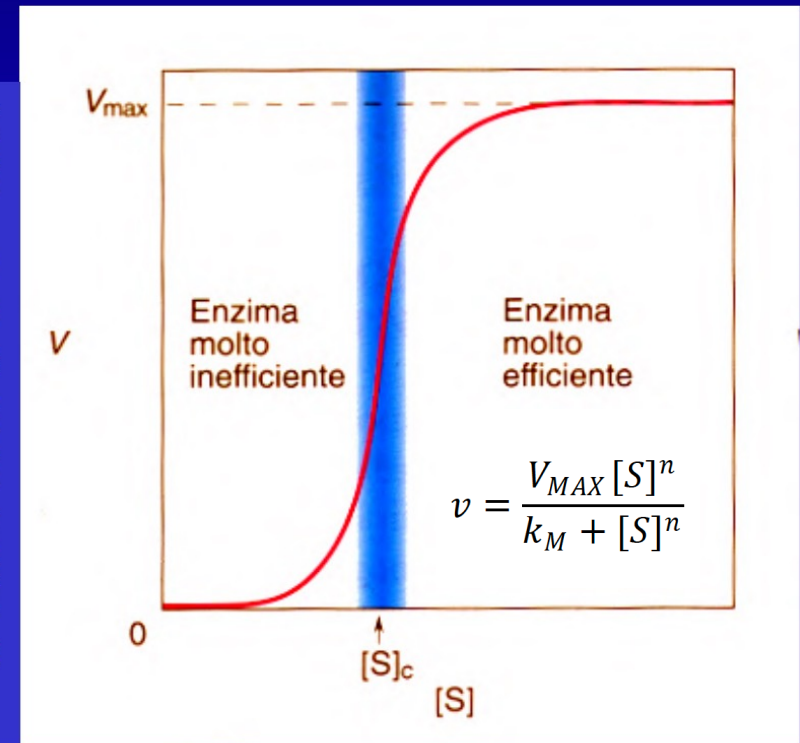
# Gli enzimi allosterici

**Gli enzimi non allosterici hanno un andamento iperbolico delle curve di V in funzione di [S] descritto dall'equazione di Michaelis Menten:**

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$



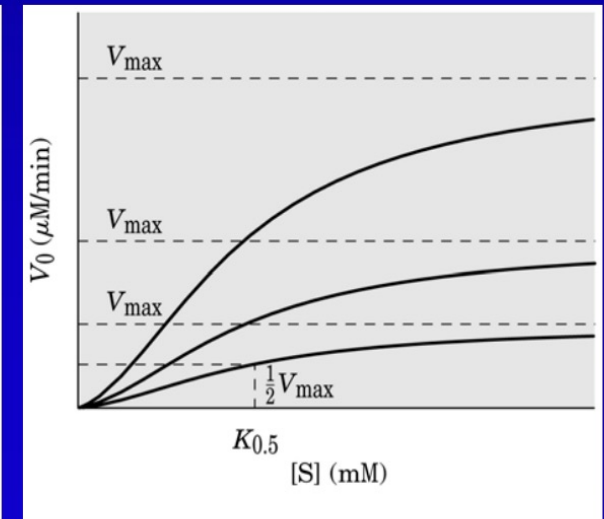
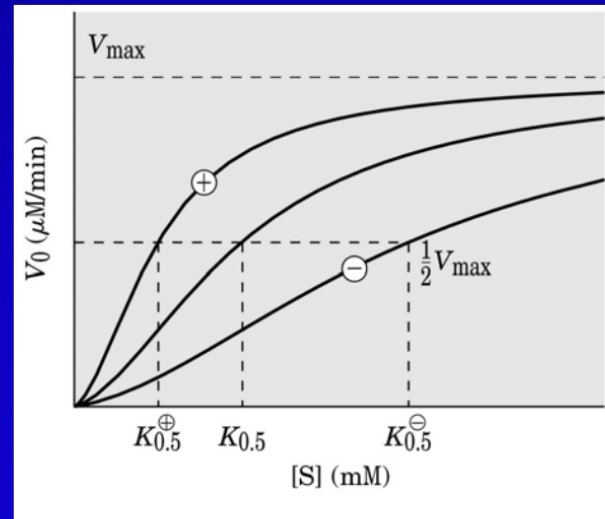
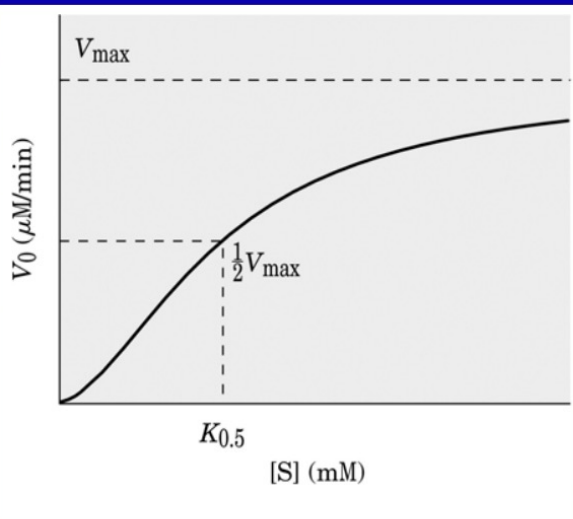
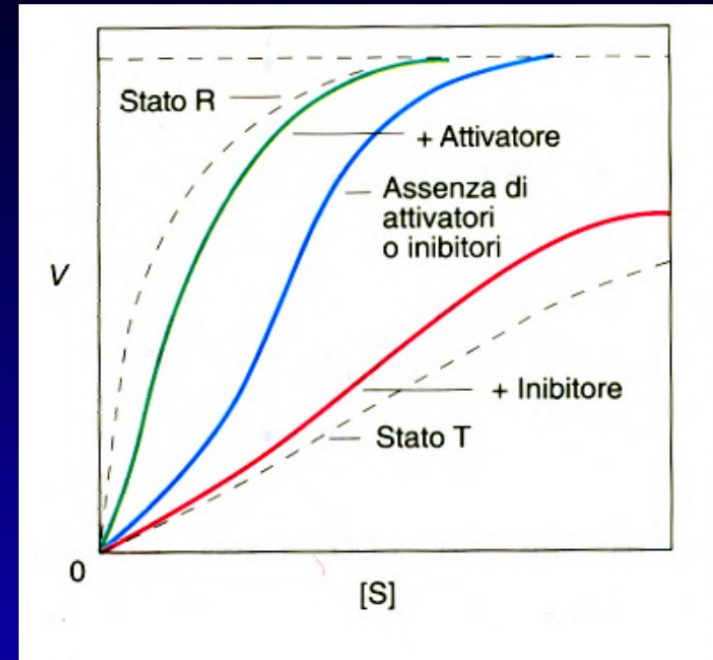
**Le proprietà cinetiche degli enzimi allosterici non seguono le cinetiche di Michaelis-Menten. Gli enzimi allosterici, che legano il substrato in modo cooperativo, danno curve di tipo sigmoide. A basse concentrazioni di [S] l'enzima si comporta come se avesse una debole capacità di legame ( $K_{0.5}$  elevata), all'aumentare di [S] viene indotto un aumento di quantità di substrato legato e quindi di efficienza catalitica dell'enzima.**



# La regolazione allosterica

Oltre ad essere regolati omotropicamente, gli enzimi allosterici possono avere effettori eterotropici positivi (attivatori) o negativi (inibitori).

Il valore di concentrazione di substrato a cui si ha una velocità pari a metà della  $V_{max}$  viene definito  $[S]_{0.5}$  o  $K_{0.5}$ .

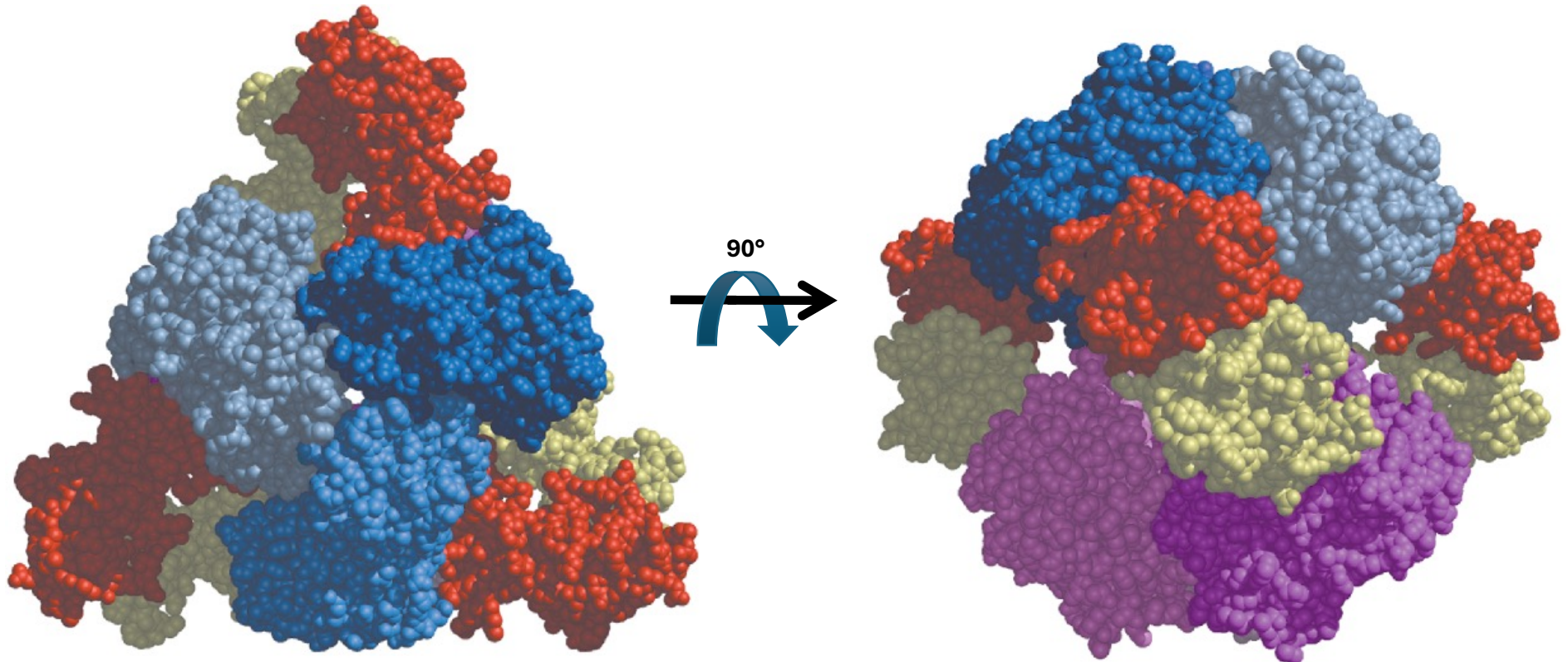
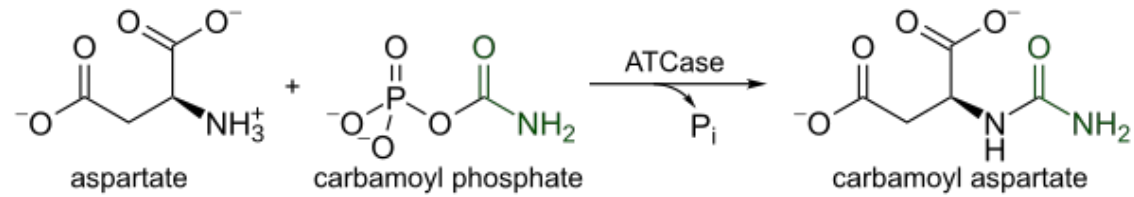




## Aspartato transcarbamilasi: carbamilazione dell'acido aspartico

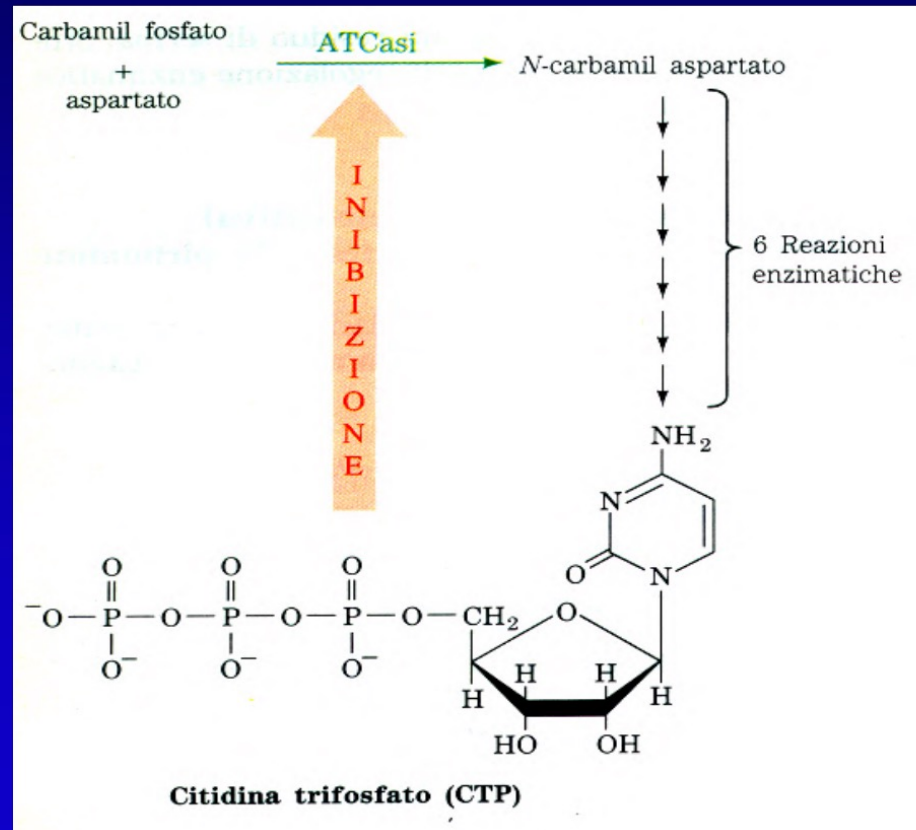
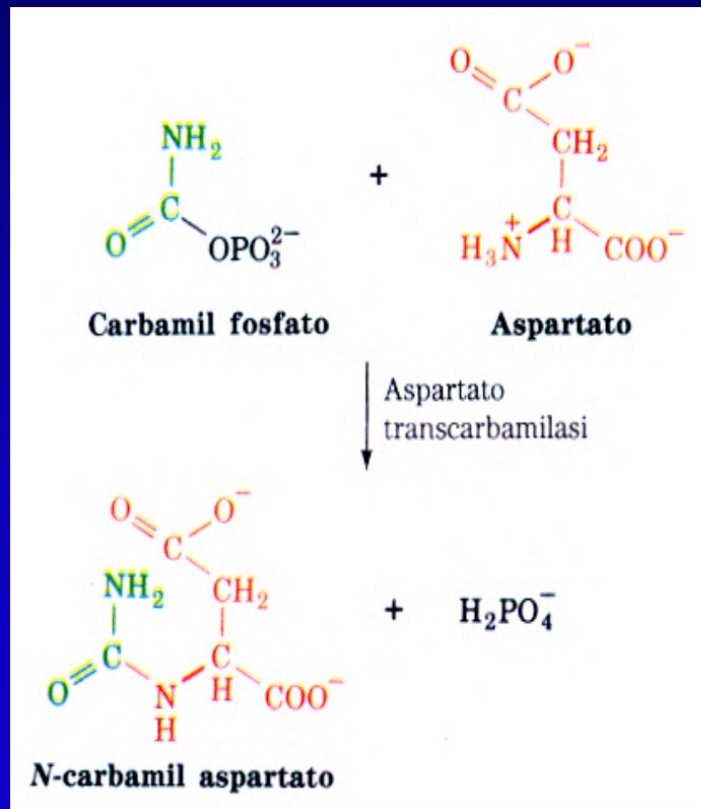
2 gruppi catalitici (3 + 3 subunità, blu/viola)

3 gruppi regolatori (2 subunità ciascuno, beige/rosso)



# L'aspartato transcarbamilasi (ATCasi)

Un esempio di regolazione allosterica dell'attività enzimatica è dato dall'enzima aspartato transcarbamilasi (ATCasi). Esso catalizza la prima tappa della biosintesi delle pirimidine ed è un enzima che presenta una inibizione a feedback negativo.

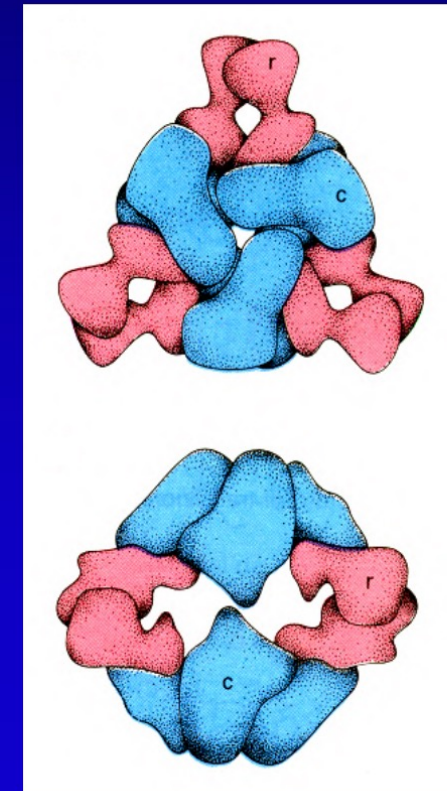
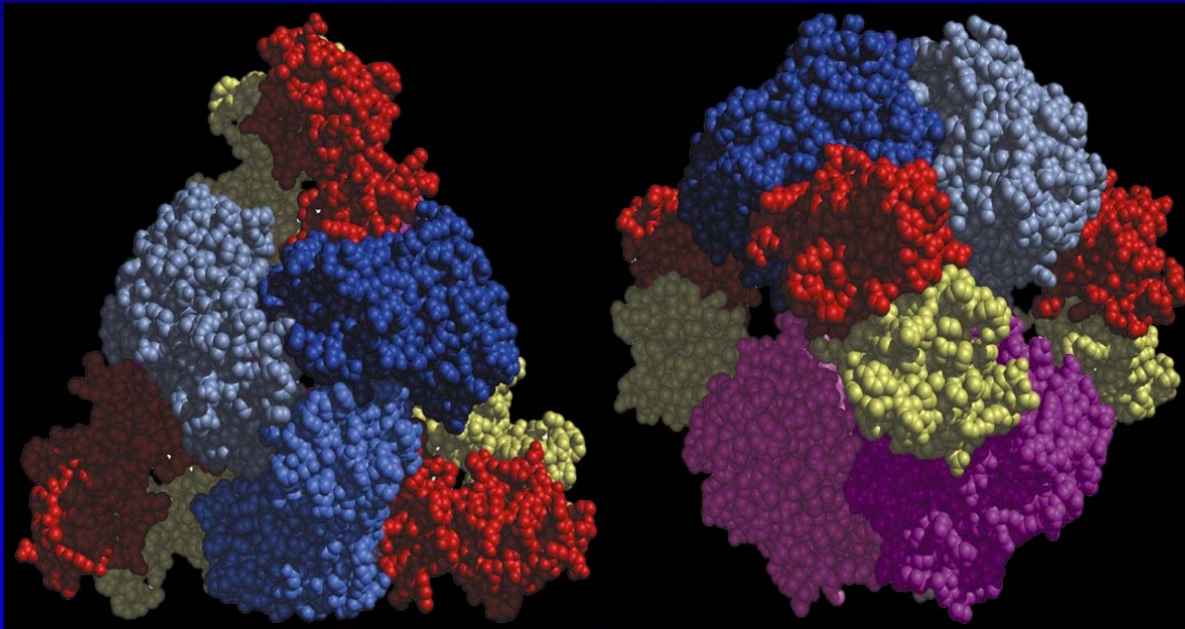




## La struttura quaternaria dell'ATCasi

L'ATCasi di *E.coli* ha una composizione in subunità di tipo  $C_6R_6$  dove C ed R sono rispettivamente le subunità catalitiche e regolatrici.

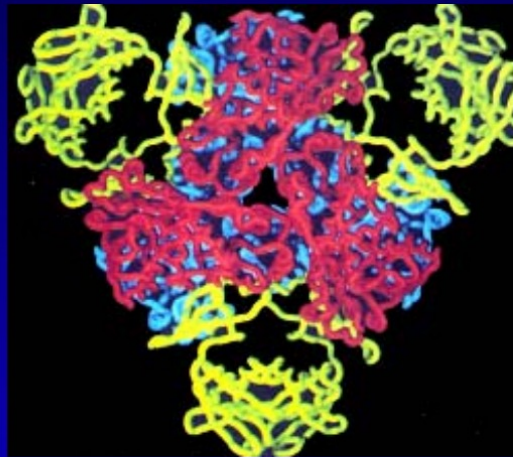
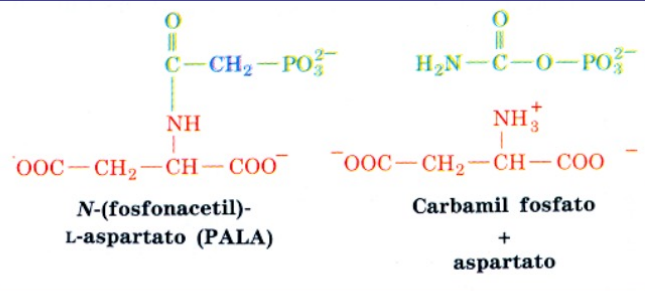
Le subunità catalitiche sono organizzate in due trimeri ( $C_3$ ) e dissociate mantengono l'attività, ma presentano curve di saturazione da substrato iperboliche non cooperative. Pertanto, solo nell'enzima in forma nativa si manifesta l'attività allosterica e le subunità regolatrici modulano l'attività delle subunità catalitiche.



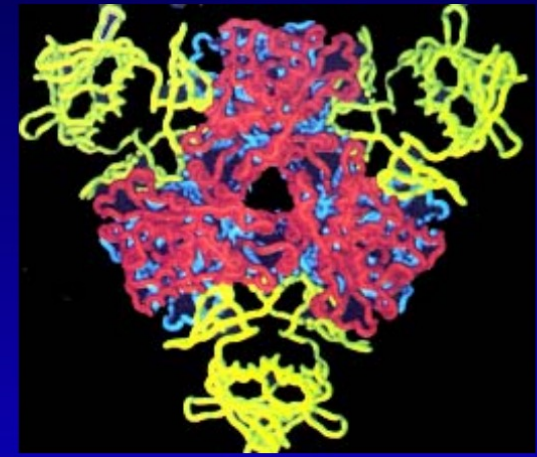


# II PALA

Utilizzando l'analogo di substrato (PALA) non reattivo che si lega saldamente all'ATCasi bloccandola nella conformazione R, è stato possibile studiare la struttura ai raggi X della proteina nei due stati e conoscere le differenze conformazionali responsabili della modulazione allosterica.

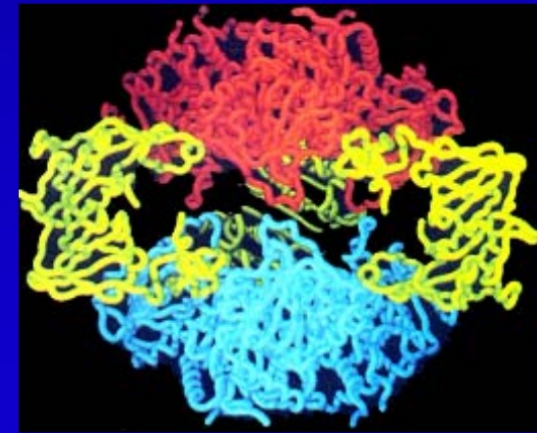
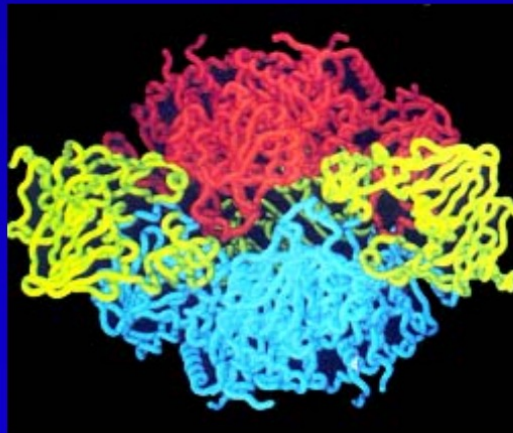


stato T



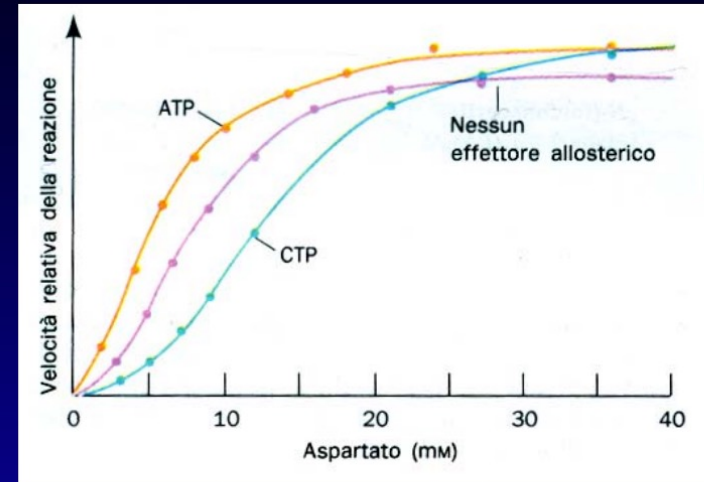
stato R

A causa della sua carica netta negativa, il PALA si lega elettrostaticamente a quattro Arg e una Lys del sito attivo.



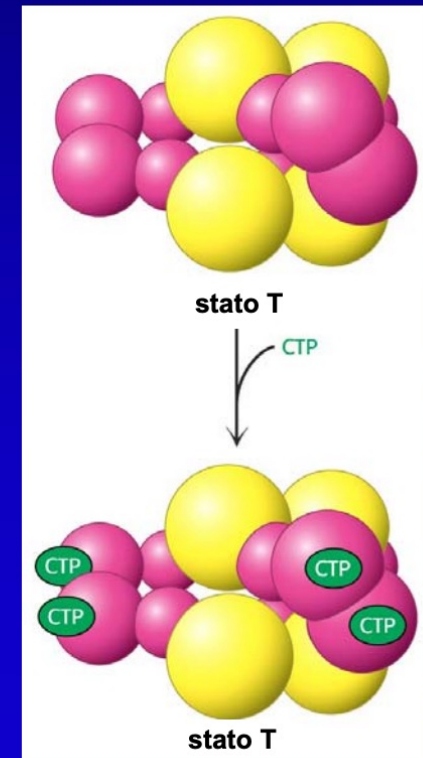
# La regolazione allosterica dell'ATCasi

Questo enzima possiede un legame omotropico di tipo cooperativo positivo per entrambi i suoi substrati (aspartato e carbamil fosfato). Inoltre, l'ATCasi viene inibita eterotropicamente dalla citidina trifosfato (CTP), un nucleotide pirimidinico, mentre viene attivata eterotropicamente dall'ATP.

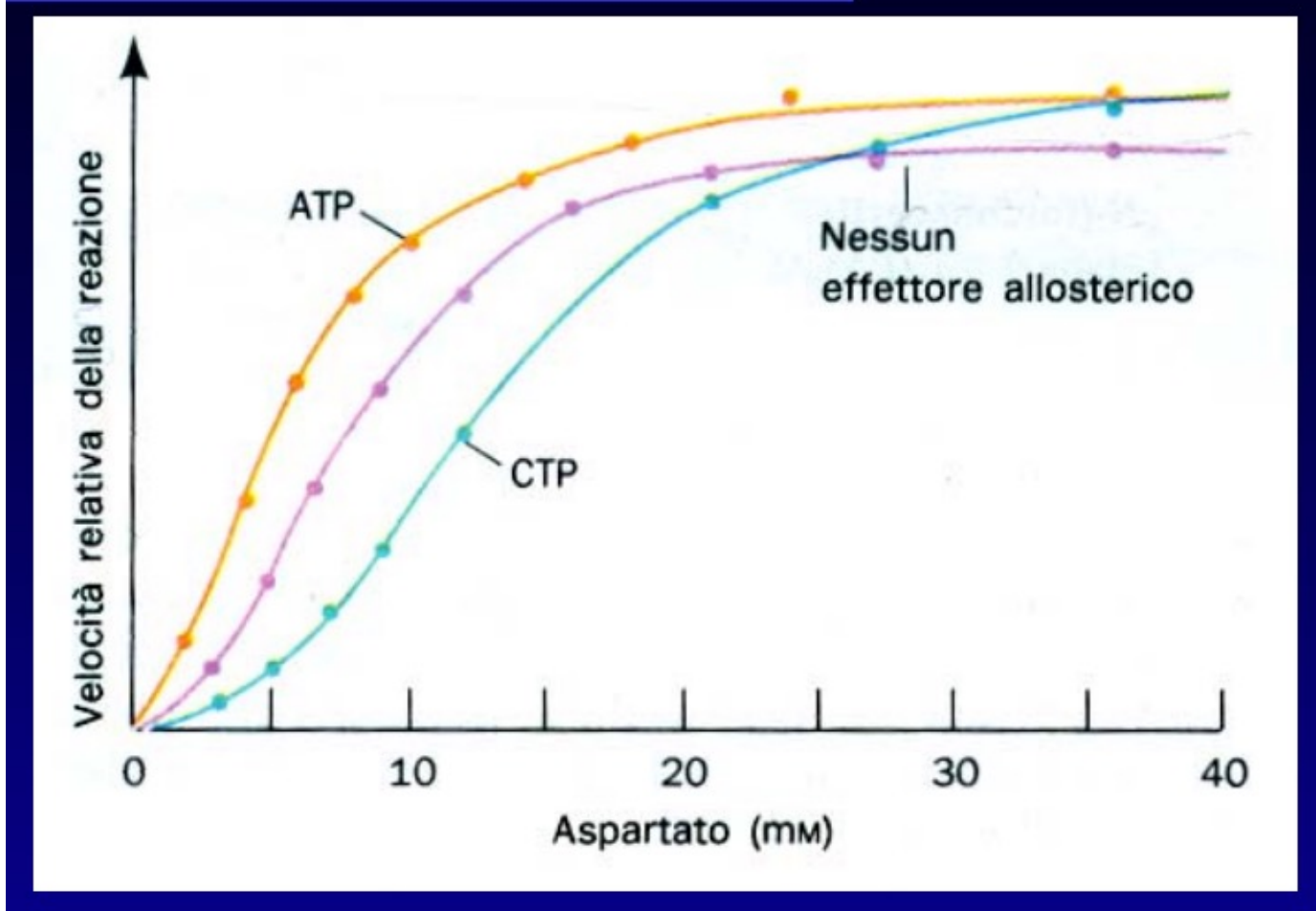


Pertanto, come predetto dalla teoria dell'allosterismo, l'attivatore ATP si lega preferenzialmente alla ATCase attiva (stato R), mentre l'inibitore CTP si lega alla forma meno attiva dell'enzima (stato T).

Ognuno dei sei siti attivi è posto all'interfaccia tra le subunità catalitiche, ogni subunità regolatrice possiede un sito a cui possono legarsi il CTP o l'ATP.









## La regolazione allosterica dell'ATCasi

Elevati livelli di CTP segnalano che non sono necessarie altre pirimidine. Alte concentrazioni di ATP sono sintomo sia di una situazione intracellulare di elevata disponibilità di energia, che è necessaria per attivare le biosintesi dell'RNA e del DNA, sia di un elevato livello di purine e pertanto di una necessità di pirimidine.

