

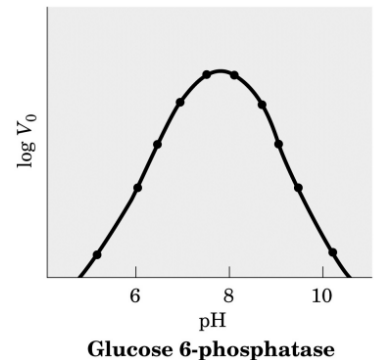
## LEZIONE 7 (sbobinatori: Alessia Mannarino, Carlo Luciani)

**Argomenti: Dipendenza della velocità di una reazione dal Ph, enzimi regolati e regolatori, regolazione enzimatica (allosterica, covalente reversibile, tramite proteina inibitrice e proteolitica),**

Anche il Ph influisce sulla velocità di una reazione.

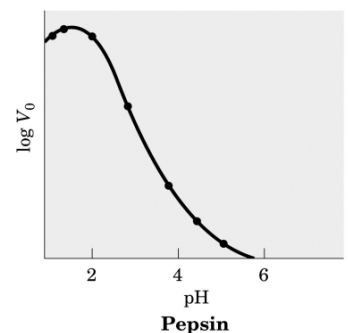
Nel primo grafico sono messi in relazione il logaritmo della velocità iniziale e la variazione di Ph durante una catalisi enzimatica. Ciò che possiamo osservare è un andamento a campana gaussiana, in cui l'enzima raggiunge il suo optimum ad un pH tra 6,5/7.

L'enzima preso in considerazione, la glucosio-6-fosfatasi, agisce a livello del reticolo endoplasmatico, la dove il pH cellulare è più o meno intorno alla neutralità, dunque intorno al suo optimum.



Nel secondo grafico osserviamo la velocità in funzione del pH prendendo in considerazione la pepsina, uno dei più importanti enzimi digestivi presenti nello stomaco, che ha pH estremamente acido. Notiamo, infatti, che il suo optimum di pH è di circa 2 (il pH dello stomaco).

Ricordiamo che questo enzima degrada le proteine, quindi una sua eventuale attivazione in un ambiente non proprio provocherebbe seri danni. Anche per questo motivo la pepsina è inattiva al di fuori del suo range di estrema acidità (è addirittura inattiva già a pH6).



Quando inizieremo a studiare nel dettaglio i metabolismi, incontreremo una serie di enzimi.

Ad esempio, uno dei primi metabolismi che vedremo, quello del glucosio, porterà, attraverso una serie di tappe enzimatiche, alla produzione di un ultimo substrato.

Ogni tappa enzimatica del metabolismo è caratterizzata dalla presenza di un particolare enzima.

Gli enzimi che caratterizzano la glicolisi o qualunque altro metabolismo che prenderemo in considerazione non sono tutti uguali tra di loro. Infatti è importante distinguerli in due grandi categorie:

- Enzimi regolatori;
- Enzimi regolati.

La maggior parte degli enzimi che costituiscono una via metabolica sono enzimi regolati, ma in ogni via metabolica ci sarà almeno un enzima regolatorio. Quest'ultimo determinerà la velocità finale del metabolismo considerato; dunque sarà "l'enzima più importante", detto anche "enzima chiave" di quel metabolismo.

In linea di massima, tutti i metabolismi portano un dispendio energetico, almeno inizialmente, anche se sono metabolismi che produrranno energia. Gli enzimi regolatori, cioè gli enzimi che più strettamente regoleranno il metabolismo, sono proprio quelli delle prime reazioni enzimatiche.

La **differenza cinetica** sostanziale tra gli enzimi regolati e gli enzimi regolatori è che gli enzimi regolati seguono una cinetica di Michaelis-Menten, dunque una cinetica di tipo iperbolico; mentre gli enzimi regolatori hanno una cinetica sigmoidale.

Quando abbiamo parlato di emoglobina e mioglobina, abbiamo detto che la cinetica di queste due proteine corrisponde alla cinetica dei due tipi di enzimi che andremo a trattare.

Quindi, gli enzimi regolati seguono una cinetica uguale a quella della mioglobina, mentre gli enzimi regolatori seguono una cinetica di tipo sigmoidale, come quella che abbiamo visto per l'emoglobina.

Per enzimi regolatori, che hanno una cinetica di tipo sigmoidale, invece di identificare una  $K_m$  per definire l'affinità per il substrato, si identificherà il cosiddetto  $K_{0.5}$ . Quest'ultimo corrisponde comunque a quella concentrazione di substrato che permette di raggiungere la metà della velocità massima di reazione ( $V_{max}$ ).

L'equazione cinetica di un enzima di tipo regolatorio sarà uguale alla cinetica di Michaelis-Menten, ma si deve tener presente il fattore  $n$ , che identifica la cooperatività all'interno della proteina.

Ricordiamo, infatti, che gli enzimi regolatori, per seguire questa cinetica di tipo sigmoidale, sono chiaramente costituiti da più subunità proteiche.

Su gli enzimi regolatori possiamo avere una serie di regolazioni enzimatiche di vario tipo:

1. Regolazione allosterica (chiaramente reversibile)
2. Regolazione covalente reversibile
3. Regolazione tramite legame con proteina inibitrice
4. Proteolisi irreversibile (l'unica di tipo irreversibile)

Per i primi 3 tipi di regolazione (allosterica, covalente e con proteina inibitrice), la regolazione è considerata di tipo **fine**: non avviene una regolazione di tipo "tutto o nulla" (cioè l'enzima o funziona o non funziona), ma tutte queste regolazioni aumentano o diminuiscono l'attività enzimatica.

L'unica regolazione di tipo "**tutto o nulla**" è quella data dagli enzimi che vengono attivati mediante proteolisi.

Il più classico **esempio** degli enzimi attivati tramite regolazione del tipo "tutto o nulla", tramite proteolisi, è dato dal complesso di enzimi che digeriscono le proteine alimentari.

Sappiamo che le proteine alimentari, per essere utilizzate nel nostro organismo, devono essere scisse nei loro componenti principali: gli amminoacidi.

Per compiere questa degradazione proteica, vengono sintetizzate una serie di proteasi (enzimi in grado di rompere il legame peptidico) a livello dell'intestino, dello stomaco e del pancreas sotto forma di enzimi nativi, che prendono il nome di zimogeni.

**Zimogeno** (o proenzima): precursore inattivo di un enzima. Esso richiede la rottura di uno o più legami peptidici specifici per divenire un enzima attivo.

Tutte le proteasi vengono sintetizzate sotto forma di zimogeni.

Esistono vari tipi di proteasi, ognuna ha una specifica sequenza amminoacidica, ma hanno tutte questa caratteristica: sono tutte sintetizzati in maniera inattiva.

La loro attivazione viene effettuata tramite la rimozione di una porzione della proteina. In genere viene allontanato l'N-terminale della proteina e l'enzima diventa attivo.

Una volta che viene allonata una porzione dalla proteina, non è più possibile legare questa porzione alla proteina, perciò l'enzima resta attivo.

Questa è una regolazione di tipo tutto o nulla: o l'enzima è completamente inattivo (zimogeno) o l'enzima viene attivato.

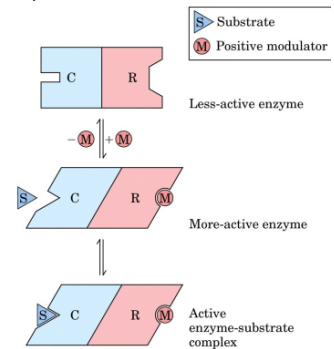
Gli altri 3 tipi di regolazione sono di tipo fine, cioè possono aumentare o diminuire la velocità di reazione, ma non determinano una completa assenza o presenza dell'attività enzimatica.

Le **regolazioni di tipo allosterico** si hanno quando un substrato viene legato all'enzima. Possiamo avere due tipi di regolazione allosterica:

- Positivo, in cui il legame con il substrato aumenta l'attività dell'enzima;
- Negativo, in cui il legame con il substrato diminuisce l'attività enzimatica.

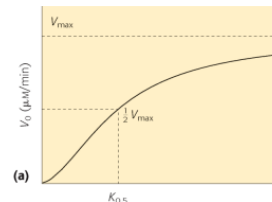
Nell'immagine a destra è mostrata una regolazione allosterica di tipo positivo, in cui il modulatore, legandosi al suo sito, determina un cambio conformazionale che rende il substrato più adatto al suo sito attivo.

Generalmente, mentre i modulatori si legano nella regione di regolazione dell'enzima (in rosa), il substrato si lega nella regione catalitica dello stesso (in azzurro), cioè dove avverrà la reazione enzimatica.

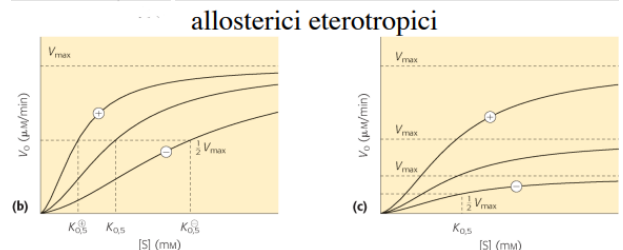


Nella regolazione allosterica si possono trovare substrati omotropici ed eterotropici:

- Nei substrati omotropici, l'effettore corrisponde al substrato. Un esempio di substrato omotropico è nell'emoglobina. Quando l'ossigeno, legandosi al sito, favorisce il legame per l'ossigeno stesso nelle altre subunità.
- Nei substrati eterotropici, l'effettore è un composto diverso dal substrato. In questo caso, le regolazioni allosteriche possono dar luogo sia a variazione di  $K_m$ , sia a variazioni di velocità, che possono essere entrambe sia diminuite che aumentate.



allosterici omotropici



allosterici eterotropici

Le **regolazioni di tipo covalente** (quelle che vedremo noi) sono fondamentalmente di due tipi: fosforilazione e defosforilazione degli enzimi.

Questo tipo di regolazione è diretta sostanzialmente da due ormoni: insulina e glucagone.

Questi due ormoni avranno un effetto opposto sul metabolismo: l'insulina (come ultimo passaggio della sua cascata enzimatica) porterà a defosforilazione degli enzimi, mentre il glucagone (sempre come ultimo passaggio della sua cascata enzimatica) porterà a fosforilazione degli enzimi.

Ciò NON significa che tutti gli enzimi fosforilati sono attivi, oppure inattivi; ma ciò dipende dal metabolismo che stiamo considerando.

Se il metabolismo è sotto controllo positivo dell'insulina, allora i suoi enzimi sono attivi quando sono defosforilati e inattivi da fosforilati.

Viceversa, se il metabolismo è sotto il controllo del glucagone, saranno attivi se fosforilati e inattivi se defosforilati.

Prendiamo in esempio la glicogeno-fosforilasi, uno degli enzimi che incontreremo nella degradazione del glicogeno: questo enzima è inattivo quando viene defosforilato e attivo se fosforilato perché è sotto il controllo della cascata enzimatica del glucagone.

Ciò che vedremo costantemente nel metabolismo basale è il controllo dell'omeostasi.

Focalizzeremo il nostro sguardo prevalentemente sul ciclo digiuno/alimentazione.

Il nostro organismo tende a mantenere costante i livelli di tutti i substrati (proteine, lipidi, glucosio...); questo è possibile alternando fasi di digiuno a fasi di alimentazione.

Banalmente, dall'ultimo pasto che si fa la sera, fino alla colazione del mattino seguente, il metabolismo è variato. Nel momento in cui si va ad alimentare di nuovo, il metabolismo varia nuovamente.

Sostanzialmente questo ciclo digiuno/alimentazione è sotto il controllo di questi due ormoni: insulina e glucagone.

Il principale obiettivo dell'organismo a livello metabolico è quello di mantenere costante la concentrazione di glucosio nel sangue.

La costanza della concentrazione di glucosio nel sangue dipende:

- dall'assorbimento che avviene nel tratto gastrointestinale, dunque con i nutrienti provenienti dall'esterno;
- dall'utilizzo che i vari tessuti fanno del glucosio (perché non è uguale per tutti i tessuti);
- dalla produzione endogena del glucosio, dal momento che il nostro organismo è in grado di sintetizzare il glucosio ex novo.

Sostanzialmente al controllo dell'omeostasi (del glucosio e non solo) contribuiscono: insulina (detto ormone anabolizzante), alcuni fattori di crescita insulino-simili e ormoni catabolizzanti, quali glucagone, cortisolo e catecolamine.

Noi focalizzeremo il nostro sguardo sull'azione esattamente opposta di insulina e glucagone.

Domanda: Quando si definisce una sostanza anabolizzante? Che cosa s'intende per "anabolizzante"?

Una sostanza si dice anabolizzante quando porta alla sintesi di alcuni prodotti; dunque l'insulina, essendo un ormone anabolizzante, in linea di massima\* favorisce le sintesi.

Al contrario, il glucagone, essendo un ormone catabolizzante, in linea di massima\* favorisce le degradazioni.

\*S'insiste con questo "in linea di massima" poiché l'insulina e il glucagone, rispetto a questo concetto base, hanno un'eccezione: l'insulina promuove la degradazione del glucosio e di tutte le sintesi, mentre il glucagone promuove la sintesi del glucosio e di tutte le degradazioni.

L'insulina viene secreta in generale dopo un pasto, quindi promuove l'accumulo dei metaboliti; mentre il glucagone viene secreto durante il periodo di digiuno, promuovendo la degradazione delle sostanze quali lipidi e, in ultima analisi, anche proteine.

L'insulina viene secreta dalle cellule beta del pancreas e viene riversata, tramite la vena porta, al fegato.

Il fegato è difatti l'organo che controlla l'omeostasi generale di tutto il corpo a livello metabolico. Il fegato è il primo organo che deve rispondere alle variazioni metaboliche.

L'insulina è sintetizzata da un singolo polipeptide, che prende il nome di pre-proinsulina, che subisce un processo di maturazione.

In questo processo di maturazione si ha prima l'allontanamento di un peptide leader (di 23/24 amminoacidi). Questo allontanamento genera la proinsulina.

Successivamente si ha la formazione delle catene a e b, che costituiscono la proteina, e del peptide c, che viene allontanato.

L'insulina matura è costituita dalle catene a e b, legate tra di loro da ponti disolfuro e di cisteina. La forma precedente dell'insulina ha il peptide c, che è l'ultimo segmento che viene allontanato.

I tre diversi stadi di maturazione dell'insulina (pre-proinsulina, proinsulina ed insulina) hanno diverse proprietà.

L'insulina non ha un'emivita molto lunga, vive all'incirca 3/5 ore; mentre la proinsulina ha un'emivita più lunga.

La proinsulina, rispetto all'insulina, ha un'attività pari al 5%, dunque è praticamente inattiva.

Il peptide c permette di distinguere, all'interno di un organismo, l'insulina che è stata sintetizzata dall'organismo e l'insulina somministrata per via esogena.

Ciò accade poiché l'insulina somministrata per via esogena è insulina matura; mentre nell'insulina che è stata sintetizzata dal nostro organismo è presente anche il peptide c.

La presenza di proinsulina e di peptide c nel sangue sono spesso indice di un tumore a livello pancreatico.

Il rilascio dell'insulina a livello del circolo sanguigno è sotto il controllo del metabolismo.

Esistono una serie di fattori che contribuiscono al rilascio dell'insulina nel sangue:

- il rapporto dell'ATP con l'ADP, cioè la quantità di ATP presente in cellula;
- la chiusura e l'apertura delle proteine canale del calcio e delle proteine canale del potassio ATP-dipendenti
- vari agenti farmacologici (es. sulfonilurea)

Viceversa, fattori ormonali, quali alcuni agonisti alfa adrenergici inibiscono il rilascio dell'insulina.

Quando ci alimentiamo, abbiamo un innalzamento del glucosio nel sangue. Questo è il primo stimolo per il rilascio di insulina nel sangue dal nostro organismo.

Dunque, quando siamo in condizioni di bassa concentrazione di glucosio (in uno stato di digiuno), il rapporto tra ATP e ADP è a favore dell'ADP, dal momento che in digiuno la produzione di ATP è inferiore.

Questo determina l'apertura dei canali del potassio e la chiusura dei canali del calcio.

Quindi, l'insulina resta depositata all'interno della cellula sotto forma di granuli.

Quando il metabolismo s' inverte, quindi si ha un'aumento della sintesi dell'ATP, l'elevata sintesi di ATP determina una chiusura dei canali del potassio che a sua volta determina una depolarizzazione a livello della membrana e permette l'apertura dei canali del calcio.

Il calcio stimola il rilascio dell'insulina da parte delle cellule  $\beta$  del pancreas.

I canali del potassio sono costituiti da proteine ABC transporter, cioè sono dei trasportatori che idrolizzano ATP, dunque sono sensibili alla variazione di concentrazione di ATP.

Una delle subunità dei canali del calcio è sensibile alla sulfonilurea, il farmaco che viene utilizzato per il rilascio dell'insulina.

Le **proteine ABC** sono dei trasportatori trans membrana che, sfruttando l'energia ricavata dall'idrolisi dell'ATP (trasporto attivo primario), mediano il passaggio attraverso il doppio strato lipidico della cellula di una vasta gamma di substrati

Fra gli altri fattori che contribuiscono al rilascio dell'insulina, vi è la leucina, che stimola il ciclo di Krebs attraverso la sintesi di alfa chetoglutarato, uno degli intermedi del ciclo di Krebs.

Dunque, in maniera indiretta, la leucina aumenta la sintesi di ATP e il rilascio di insulina.

L'insulina non ha bisogno di trasportatori per essere rilasciata, ha un'emivita di circa 3/5 minuti, (quando è nel sangue), e viene captata e metabolizzata innanzi tutto dal fegato e successivamente dal rene e dalla placenta.

Sia insulina che glucagone determinano la cosiddetta cascata enzimatica, cioè una serie di reazioni enzimatiche, che comportano ad un'ultima azione.

Per avere questa cascata enzimatica, l'insulina, che è esterna rispetto alla cellula, si deve legare a un suo recettore di membrana.

Questo recettore di membrana è una proteina tetrimerica formata da due subunità  $\alpha$  e due subunità  $\beta$ .

Le subunità  $\alpha$  sono altamente glicosilate e sono situate a livello extracellulare, dunque sporgono fuori dal citoplasma.

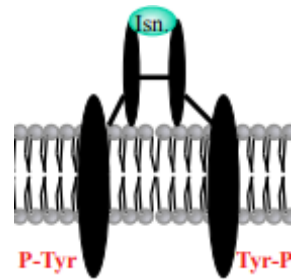
Le subunità  $\alpha$  sono unite tra di loro da ponti di solfuro e determinano il legame con l'insulina.

Le catene  $\beta$  sono proteine transmembrana presenti a livello delle membrane plasmatiche, anch'esse altamente glicosilate e anch'esse unite da ponti di solfuro.

La loro particolare caratteristica è il dominio tirosino-chinasico.

Queste subunità, quando l'insulina si lega al recettore, sono capaci di autofosforilarsi, quindi subiscono un processo di autofosforilazione, che determina la trasduzione del segnale.

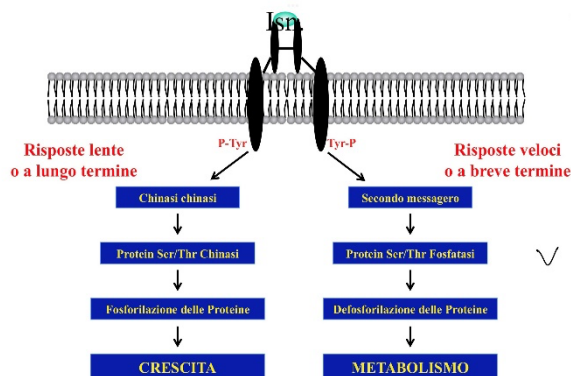
Quindi, un recettore dell'insulina è formato da due catene  $\alpha$ , che sporgono verso la matrice cellulare, e due catene  $\beta$  rivolte verso il citoplasma. Queste 4 catene sono in grado di autofosforilarsi: questo processo avviene quando l'insulina si lega al suo recettore: non appena vengono fosforilate le subunità  $\beta$  si attiva la trasduzione del segnale, andando ad attivare una famiglia proteica, le Insulin Receptor Substrate, che a loro volta vanno ad attivare una serie di enzimi.



L'insulina può attivare due tipi di risposta:

-la risposta a breve termine, che agisce direttamente sul metabolismo, quindi permette una sintesi di glucosio immediata

-la risposta a lungo termine, che agisce sulla proliferazione cellulare.



Questi tipi di risposte avvengono grazie all'attivazione di due cascate: la prima cascata, quella che induce le risposte veloci, grazie all'ausilio di secondi messaggeri, porta all'attivazione di una proteina ad azione fosfatase (cioè in grado di fosforilare gli enzimi), che agirà direttamente sul metabolismo; la seconda cascata, quella che induce le risposte lente, induce l'attivazione di una serie di proteine chinasi che vanno a regolare tutti quei meccanismi cellulari lenti (ad esempio il ciclo cellulare o la trascrizione degli enzimi).

Gli effetti dell'insulina sul metabolismo sono: aumento del trasportatore del glucosio sulla membrana degli adipociti e delle fibre muscolari, diminuzione della glicemia (l'effetto più importante dal punto di vista medico), diminuzione della lipolisi (degradazione dei lipidi), aumento della sintesi delle proteine nelle cellule e aumento della frequenza della replicazione cellulare.

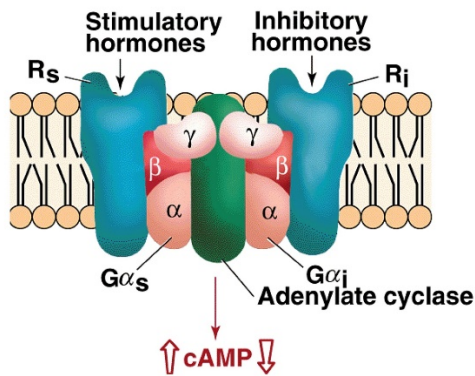
L'insulina nel nostro organismo agisce controllando numerosi enzimi e proteine, determinando l'espressione di oltre un centinaio di differenti mRNA.

Dal punto di vista clinico, l'insulina è il principale responsabile dell'insorgenza di alcune patologie, tra le quali il diabete, che può essere di due tipi: giovanile o senile. Il diabete giovanile è caratterizzato da una grave insufficienza di insulina, dovuta al fatto che le cellule del pancreas adibite alla produzione di quest'ormone non vengono riconosciute dal sistema immunitario, e quindi vengono attaccate non riuscendo a produrre adeguate quantità di insulina. (per questo il diabete giovanile viene chiamato anche insulino-dipendente). Nel diabete senile, che si manifesta in età avanzata, l'insulina che viene prodotta non viene adeguatamente utilizzata per la degradazione del glucosio nel sangue (per questo il diabete senile viene chiamato anche non-insulino dipendente).

Un altro tipo di ormone importante nel metabolismo è il glucagone, che ha effetto opposto all'insulina, cioè è un ormone che promuove la sintesi del glucosio e la degradazione di tutto il resto. Anche il glucagone agisce attraverso una cascata enzimatica: esso si va a legare a un

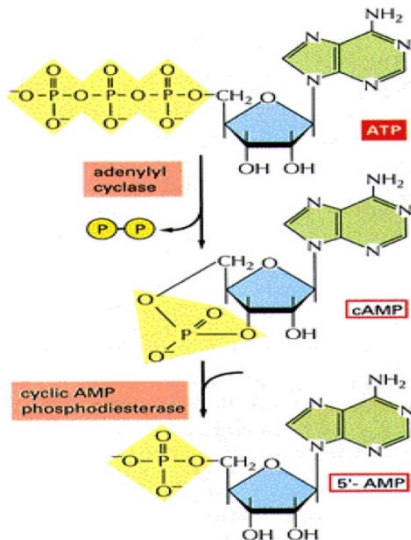
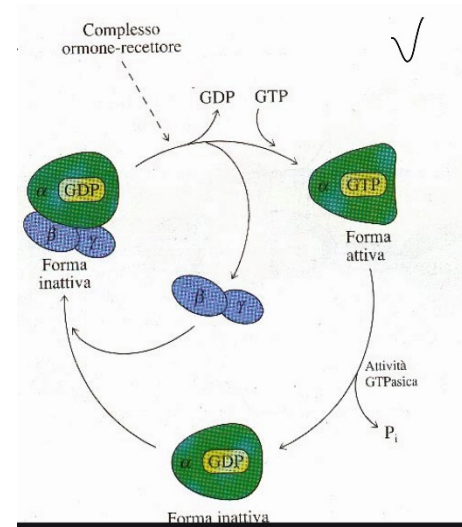


recettore di membrana, andando ad attivare la cosiddetta proteina G; questa proteina, a sua volta, attiva l'adenilato ciclasi, che sintetizza AMP ciclico, il quale andrà ad attivare la proteina chinasi A che agisce sul metabolismo fosforilando gli enzimi. Questo meccanismo possiede dei punti di controllo, che sono in grado di interrompere il processo.



Il primo punto di controllo si ha sulla proteina G. Le proteine G sono costituite da 3 subunità proteiche:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , in cui sulla subunità  $\alpha$  è legata una molecola di GDP quando essa è inattiva (guanidina difosfato). Quando arriva lo stimolo (legame recettore-glucagone), la subunità  $\alpha$  si dissocia dalle altre 2 e su di essa si lega una molecola di GTP, attivando la subunità.

Quando si deve interrompere il processo, GTP si idrolizza, la subunità  $\alpha$  riavrà la molecola di GDP e si andrà di nuovo a legare alle altre due subunità, rendendo la proteina G di nuovo inattiva.



Il secondo punto di regolazione è la produzione dell'AMP ciclico. L'AMP ciclico viene sintetizzato dall'adenilato ciclasi tramite fuoriuscita di un gruppo pirofosfato e ciclizzazione della molecola di AMP in posizione 3'-5'. Nel nostro organismo esiste un enzima, detto fosfodiesterasi, che rompe il ciclo trasformando l'AMP ciclico in 5' AMP, andando a interrompere il meccanismo. L'AMP ciclico va ad attivare in particolare la pKA, o proteina chinasi A, una proteina composta da 4 subunità, 2 catalitiche e 2 regolatorie. Quando l'AMP ciclico si lega alle subunità regolatorie, le 2 subunità catalitiche si dissociano e diventano attive.

L'ultimo effetto della cascata regolatoria del glucagone è quello di fosforilare gli enzimi, rendendoli attivi o inattivi a seconda del metabolismo. L'ultimo tipo di regolazione che possono subire gli enzimi regolatori è quella da parte di proteina inibitrice, cioè una proteina che, andandosi a legare agli enzimi, va ad inibirli.

Un enzima può subire quindi una cosiddetta regolazione "multipla", che può essere: allosterica, covalente e tramite proteina inibitrice. Un esempio è dato dalla glicogeno fosforilasi, una proteina i cui effetti dei tre processi regolativi si vanno a sommare andando a determinare la funzione vera e propria del nostro enzima.

Le vie metaboliche sono regolate a vari livelli. I più semplici meccanismi di regolazione sono quelli che vanno a controllare i primi step delle vie di regolazione di un processo metabolico qualsiasi. Si può avere, come nel caso della glicolisi, una regolazione da prodotto, cioè il substrato inibisce i primi enzimi della sintesi stessa, oppure si può avere una attivazione da prodotto, in cui un eccesso di glucosio andrà a promuovere la glicolisi. Si possono avere anche le cosiddette azioni compensatorie, ovvero quando due vie metaboliche finiscono entrambe nello stesso substrato e tendono quindi ad andare alla stessa velocità.

Un altro tipo di regolazione si può osservare nelle cosiddette vie ramificate, ovvero delle vie regolatorie che portano a due substrati diversi, ma che hanno origine comune, ed è classico ad

esempio nel caso delle sintesi delle basi azotate che compongono il DNA (puriniche e pirimidiniche). I substrati però, nonostante siano diversi, andranno poi a cooperare per raggiungere un'azione comune, operando in maniera singola o cooperativa.