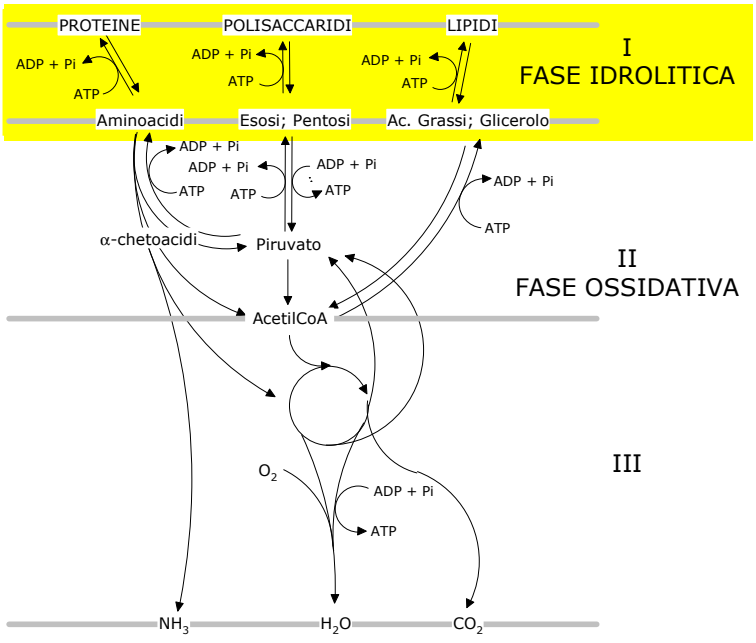
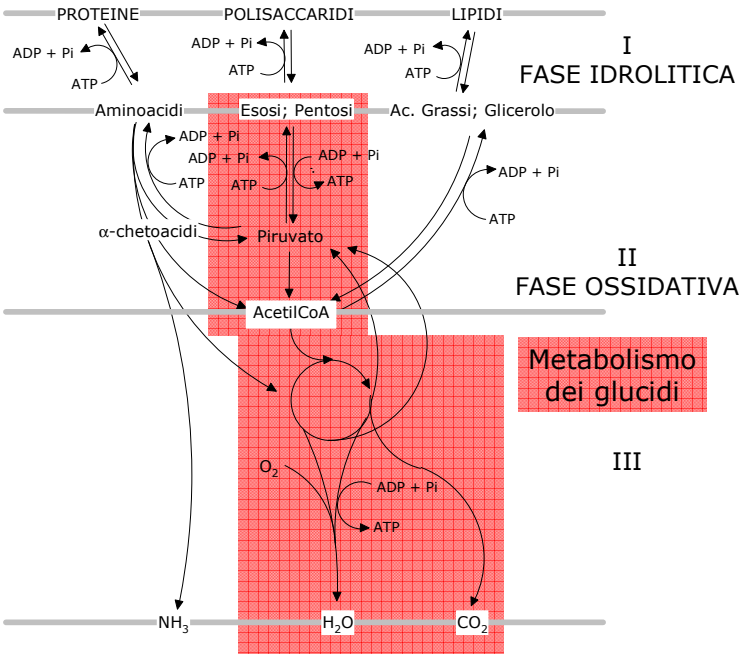
Prof. Giorgio Sartor

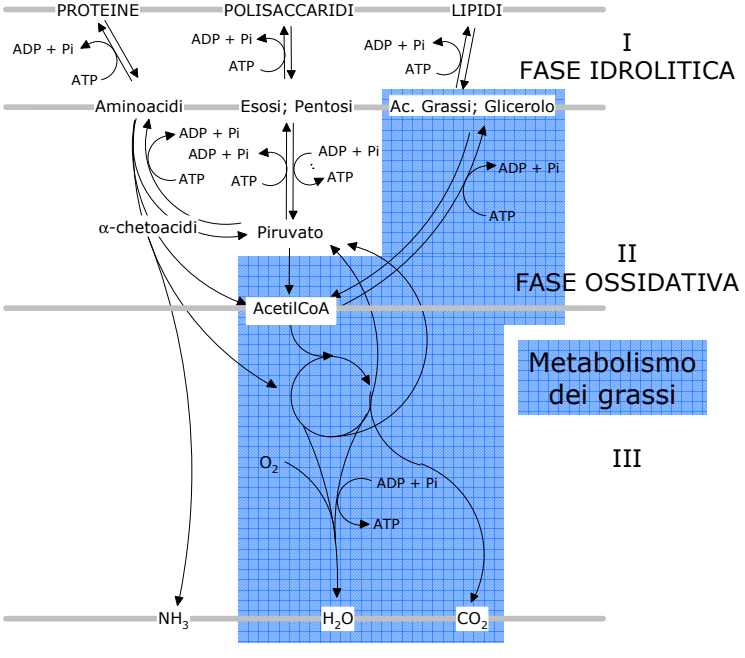
Le proteine

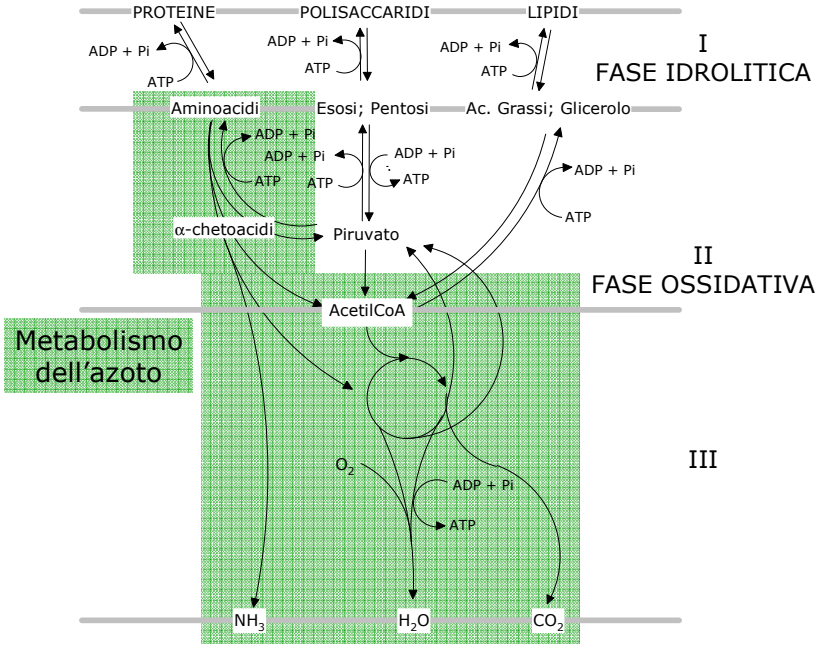
Copyright © 2001-2008 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

L02 - Versione 1.2.1 – nov 2008




PROTEINE
POLISACCARIDI
LIPIDI
ADP + Pi
ATP
I
FASE IDROLITICA
Aminoacidi
Esosi; Pentosi
Ac. Grassi; Glicerolo
α-chetoacidi
Piruvato
II
FASE OSSIDATIVA
AcetilCoA
Metabolismo dei glucidi
III
O_2
NH_3
H_2O
CO_2


PROTEINE
POLISACCARIDI
LIPIDI
ADP + Pi
ATP
I
FASE IDROLITICA
Aminoacidi
Esosi; Pentosi
Ac. Grassi; Glicerolo
α-chetoacidi
Piruvato
II
FASE OSSIDATIVA
AcetilCoA
Metabolismo dei grassi
III
O_2
NH_3
H_2O
CO_2



Fase idrolitica

- Proteasi
  - Scissione del legame peptidico
- Lipasi
  - Scissione del legame estereo nei trigliceridi e nei lipidi
- Glicosidasi
  - Scissione del legame etereo nei polisaccaridi

Proteasi

- Enzimi che scindono il legame peptidico
  - Rimozione della metionina N-terminale nella sintesi proteica.
  - Rimozione del peptide segnale dopo il loro trasporto attraverso la membrana.
  - Separazione di proteine virali tradotte da mRNA policistronico.
  - Digestione di proteine da cibo come sorgente di AA.
  - Conversione di pro-proteine (proenzimi, zimogeno, preormoni) enlle loro strutture finali.
  - Degradazione delle cicline nei differenti stadi del ciclo cellulare.
  - Gestione del turnover delle proteine.

Proteasi

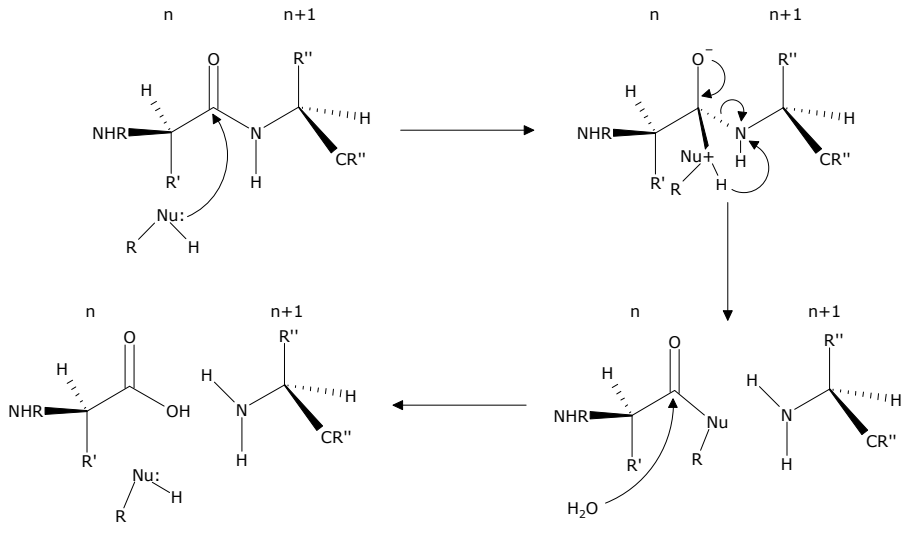
- Enzimi che scindono il legame peptidico
  - Rimozione della metionina N-terminale nella sintesi proteica.
  - Rimozione del peptide segnale dopo il loro trasporto attraverso la membrana.
  - Separazione di proteine virali tradotte da mRNA policistronico.
  - Digestione di proteine da cibo come sorgente di AA.
  - Conversio
    preormoni
  - Degradazi
    cellulare.
  - Gestione d

- Proteasi a serina
  - Tripsina
  - Chimotripsina
- Metallo-proteasi
  - Aminopeptidasi
  - Carbossipeptidasi
- Proteasi ad aspartato
  - Pepsina

Proteasi

- Proteasi a serina
  - Tripsina
  - Chimotripsina
- Proteasi ad aspartato
  - Pepsina
- Metallo-proteasi
  - Aminopeptidasi
  - Carbossipeptidasi

Proteolisi: meccanismo generale



Attivazione delle proteasi

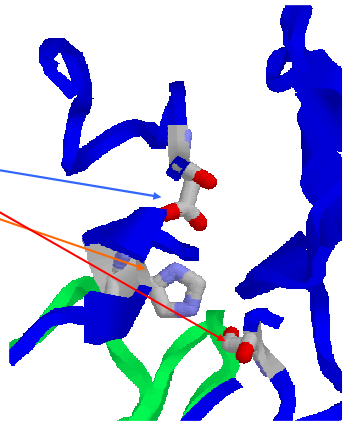
- Attivazione delle proteasi:
- La maggior parte delle protesi sono sintetizzate come proenzimi di maggiori dimensioni.
- L'attivazione consiste nella rimozione di un segmento inibitorio nel proenzima.
- L'attivazione può avvenire dopo che la proteasi è stata secreta nell'apposito compartimento cellulare o nella matrice extracellulare.
- In alcuni casi (attivazione dell'apoptosi) l'attivazione può essere a cascata e portare all'attivazione di proteasi specifiche.

Enzimi proteolici

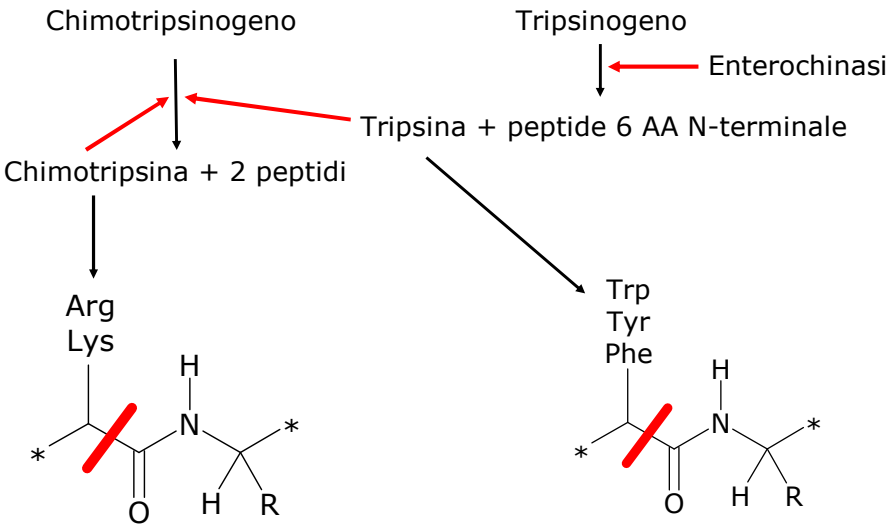
- Classi di enzimi proteolitici:
  - Proteasi a serina: enzimi digestivi come tripsina, chimotripsina, elastasi...
  - Differiscono nella specificità del substrato:
    - Chimotripsina: privilegia il taglio del legame peptidico nel quale l'AA che impegna il C=O ha una catena laterale.
    - Tripsina: preferisce un AA carico positivamente (Lys o Arg) nella stessa posizione.

Enzimi proteolici: proteasi a serina

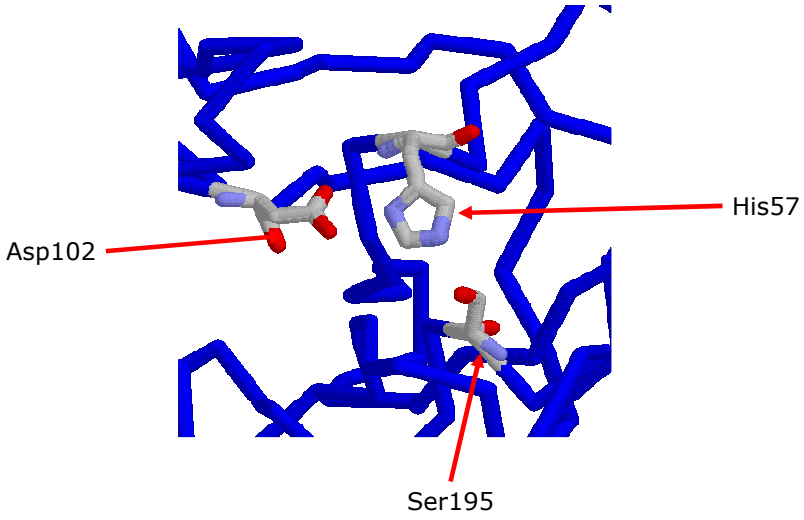
- Il sito attivo (tripsina bovina 3BTK) è fatto da un residuo di serina (Ser195), uno di istidina (His57) e uno di aspartato (Asp102).
- Durante la catalisi vi è un attacco nucleofilo del OH della serina sul carbonio del carbonile del legame peptidico che deve essere tagliato.
- Durante la reazione un H^+ è trasferito dalla serina all'anello imidazolico dell'istidina, l'aspartato forma un legame H con l'istidina.



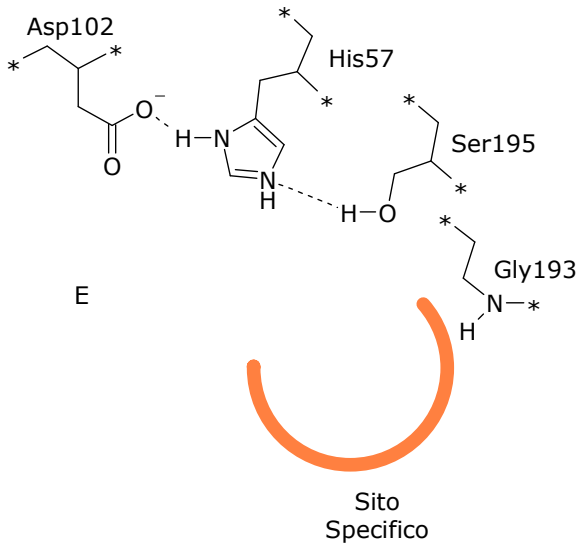
Chimotripsina e tripsina



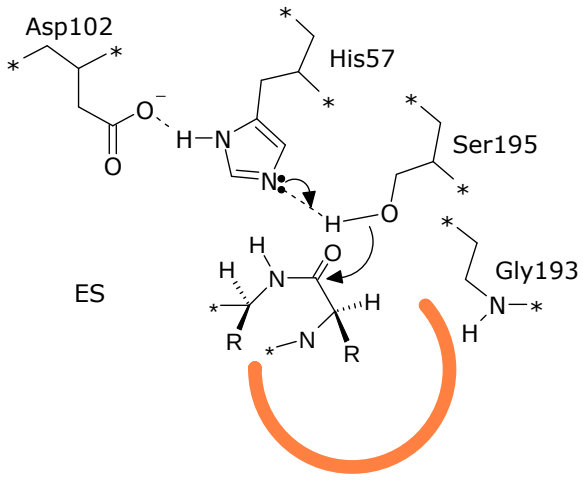
Centro catalitico



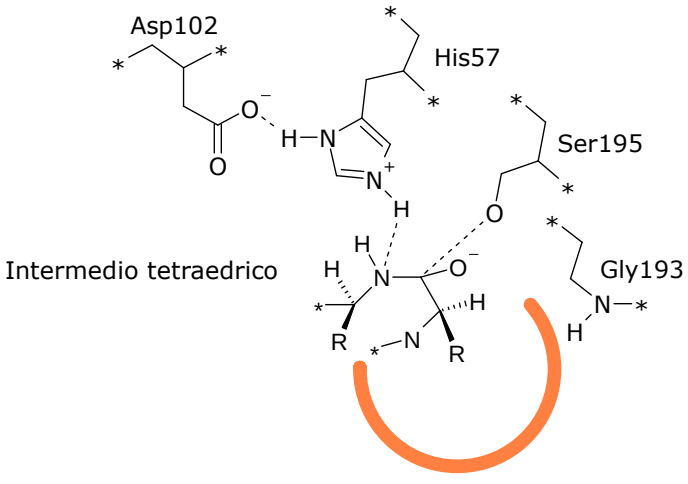
Meccanismo delle proteasi a serina



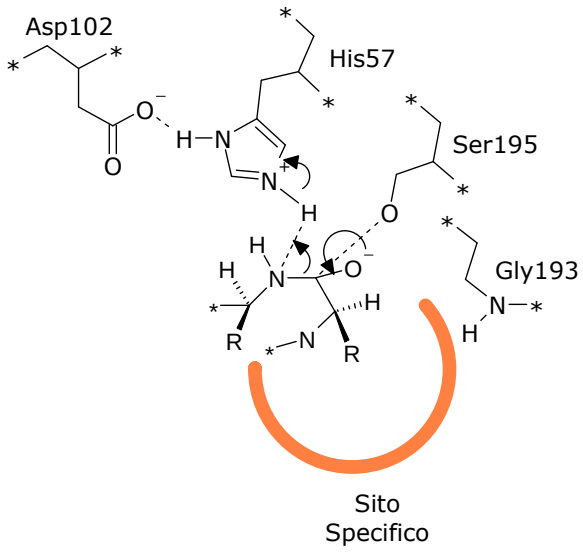
Meccanismo delle proteasi a serina



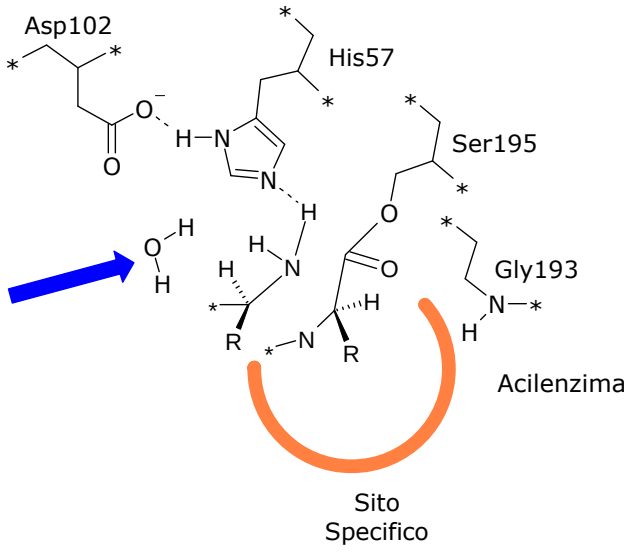
Meccanismo delle proteasi a serina



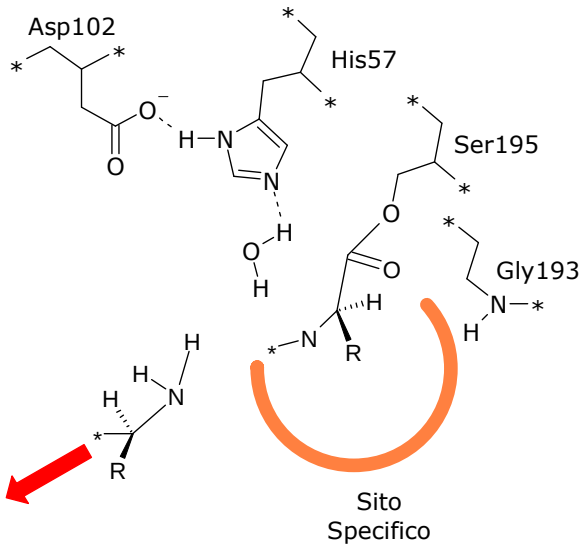
Meccanismo delle proteasi a serina



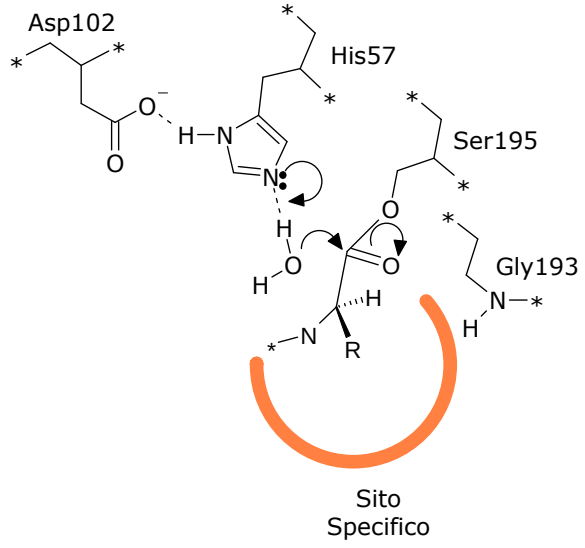
Meccanismo delle proteasi a serina



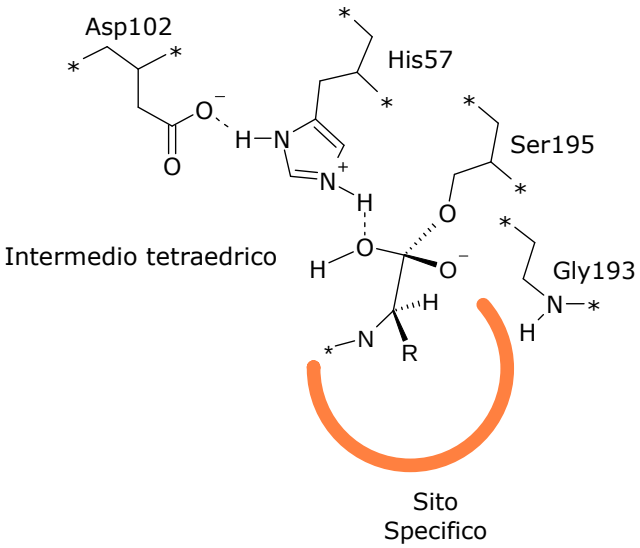
Meccanismo delle proteasi a serina



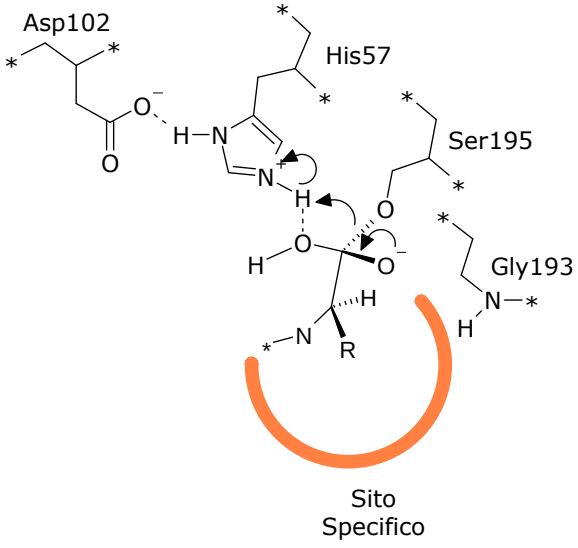
Meccanismo delle proteasi a serina



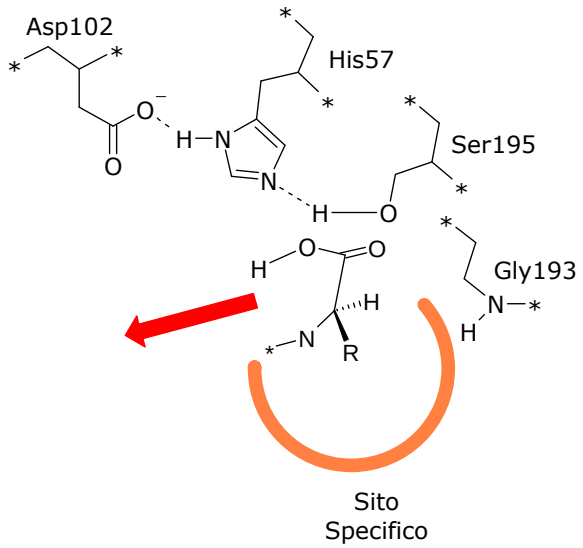
Meccanismo delle proteasi a serina



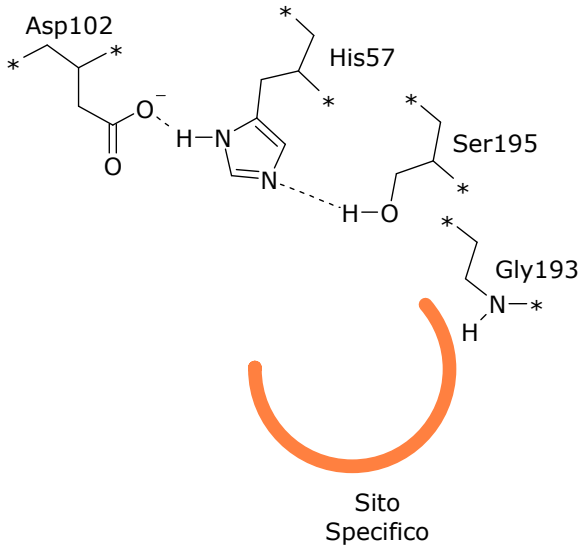
Meccanismo delle proteasi a serina



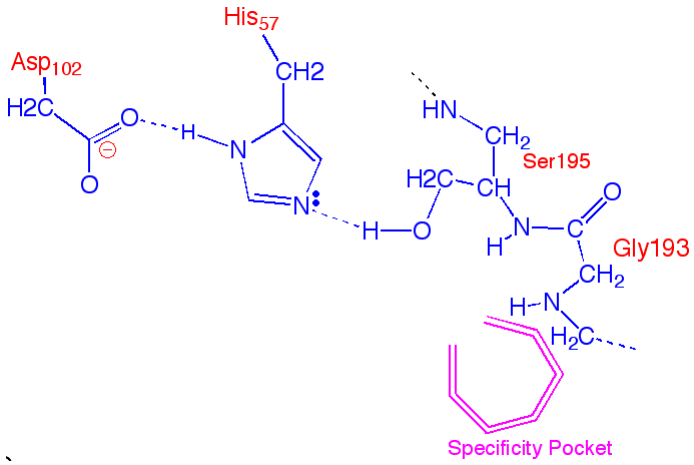
Meccanismo delle proteasi a serina



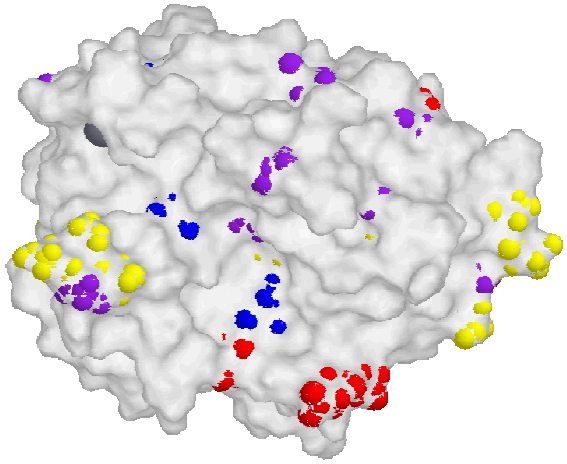
Meccanismo delle proteasi a serina



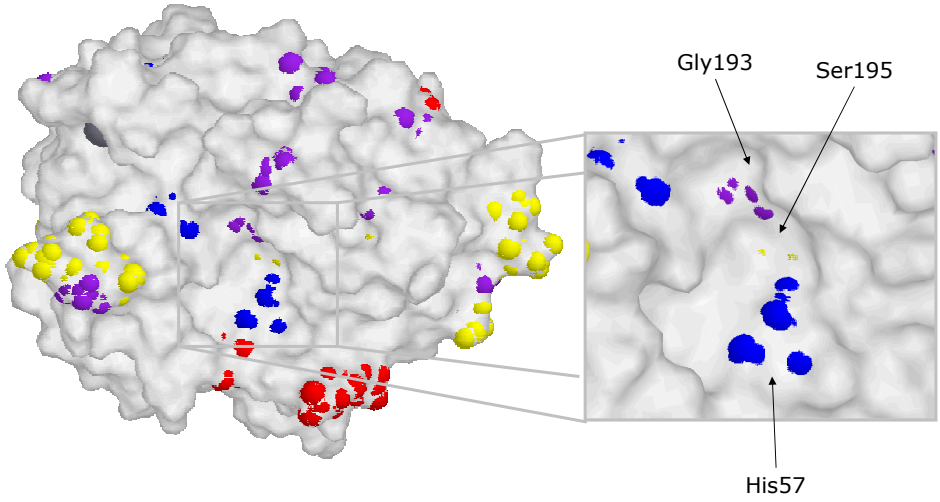
Meccanismo delle proteasi a serina



Proteasi a serina (1HAX)



Proteasi a serina (1HAX)



Proteasi a serina

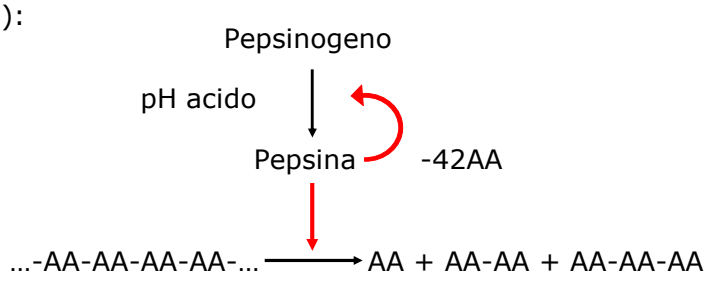
- Enzimi digestivi come tripsina, chimotripsina, elastasi...
  - Differiscono nella specificità del substrato:
    - Chimotripsina: privilegia il taglio del legame peptidico nel quale l'AA che impegna il C=O ha una catena laterale.
    - Tripsina: preferisce un AA carico positivamente (Lys o Arg) nella stessa posizione.

Enzimi proteolici: proteasi a aspartato

- Le proteasi ad aspartato comprendono:
  - La pepsina (enzima digestivo).
  - Alcune proteasi lisosomiali.
  - L'enzima renale renina.
  - Le proteasi dell'HIV.
- Due residui di aspartato sembra partecipino alla catalisi acido/base nel sito attivo.
- Un aspartato accetta H^+ da una molecola di H_2O nel sito attivo che attacca il carbonio carbonilico del legame peptidico.
- Simultaneamente l'altro aspartato cede l'H^+ all'ossigeno del carbonile del legame peptidico.

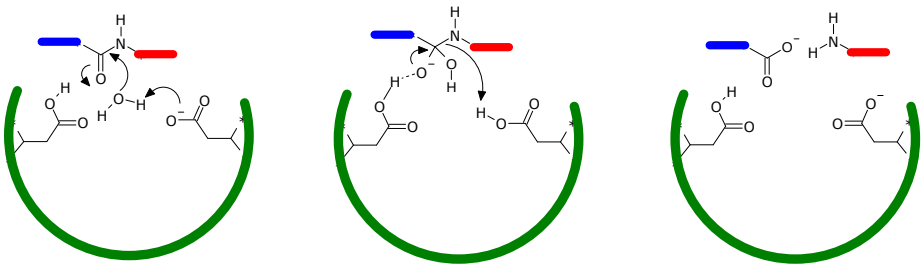
Pepsina

- Secreta dalle cellule della mucosa gastrica (che secernono anche HCl) come pepsinogeno inattivo (40 kD):



- Taglia con maggior frequenza legami tra aminoacidi aromatici, Met, Leu e produce peptidi e pochi aminoacidi liberi.

Meccanismo delle proteasi ad aspartato



Peptidasi intestinali

Procarbossipeptidasi A e B

Carbossipeptidasi

A

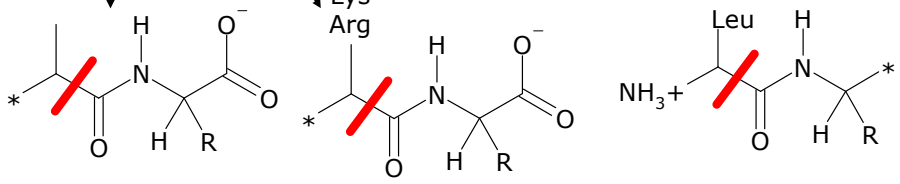
B

Lys

Arg

Leucina aminopetidasi

Leu

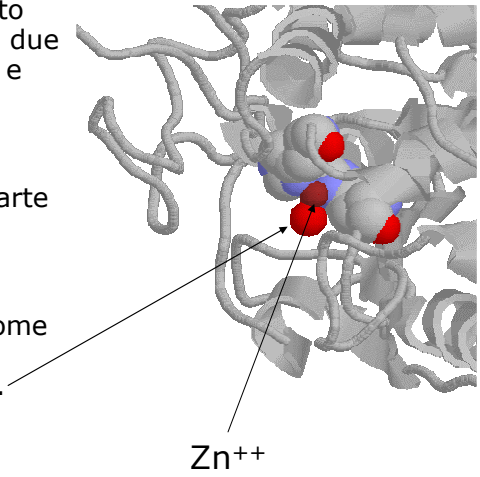


Enzimi proteolici: metallo proteasi

- Appartengono alla classe delle proteasi a Zinco (metalloproteasi):
  - La carbossipeptidasi (enzima digestivo).
  - Le metalloproteasi della matrice (collagenasi), coinvolte nella degradazione della matrice extra cellulare durante la crescita dei tessuti.
  - Una proteasi lisosomiale.
- Nel sito attivo è presente uno *zinc binding motif*, con due residui di istidina il cui imidazolo complessa lo ione Zn^{++}.
- Nella catalisi lo Zn^{++} interagisce con l'ossigeno del C=O promuovendo l'attacco nucleofilo dell'ossigeno di una molecola di acqua nel sito attivo al carbonio del C=O.
- Nella carbossipeptidasi un residuo di glutamato facilita la reazione estraendo un H^+ dall'acqua.

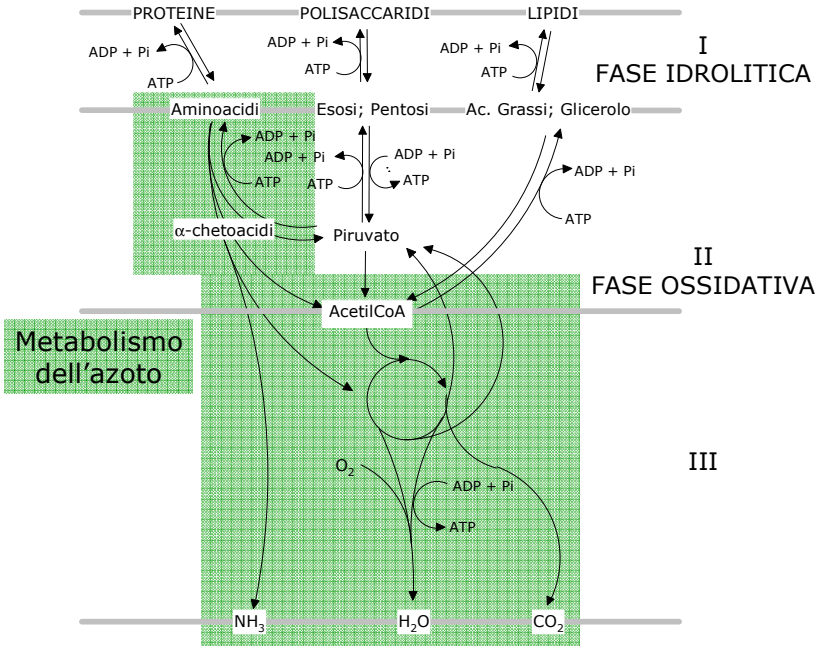
Metallo (zinco) proteasi

- Uno ione Zn^{++} è coordinato con due atomi di azoto di due His, il carbonile di un Glu e H_2O
- Lo ione Zn^{++} promuove l'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico da parte dell'atomo di ossigeno dell'acqua legata nel sito attivo
- Il residuo di Glu agisce come base facilita la reazione estraendo un H^+ dall'H_2O.



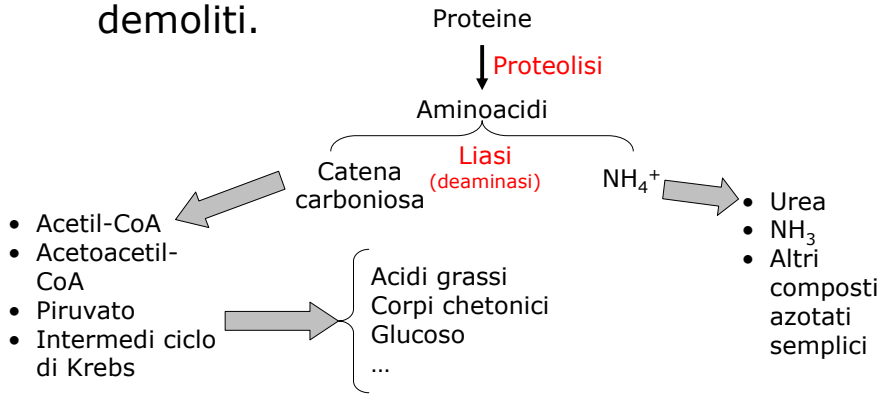
Enzimi proteolici: proteasi a cisteina

- Appartengono alla classe delle proteasi a Cisteine:
  - La papaina (della *Carica Papaya).*
  - Alcune protesi lisosomiali (catepsine).
  - Le caspasi che si occupano della degradazione delle proteine dell'apoptosi (morte cellulare programmata).
- Le proteasi lisosomiali a cisteina sono omologhe alla papaina. Sono una famiglia molto grande con svariata specificità di substrato.
- Le caspasi tagliano il lato carbossilico di un aspartato.
- Il meccanismo delle proteasi a cisteina si pensa che coinvolga la deprotonazione del SH di una cisteina da parte di un residuo vicino di istidina seguito da un attacco nucleofilo dello zolfo al carbonio carbonilico.



Degradazione degli aminoacidi

- Gli aminoacidi in eccesso non possono né essere immagazzinati in macromolecole di deposito né essere escreti come tali, vengono quindi demoliti.

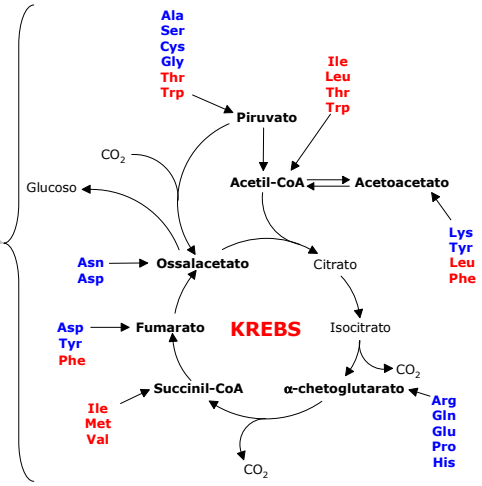


Aminoacidi

- Aminoacidi essenziali
  - Vengono forniti dall'esterno (cibo, simbiosi),
  - Non possono essere sintetizzati:
    - Fenilalanina, valina, treonina, triptofano, isoleucina, metionina, leucina e lisina
- Aminoacidi non essenziali
  - Derivano da α-chetoacidi o dal metabolismo di altri aminoacidi.

Ossidazione degli aminoacidi

- La degradazione degli aminoacidi è un processo complesso che coinvolge un numero molto grande di intermedi:
- Catena Carboniosa
- Azoto ammoniacale:
  - Urea
  - NH_3
- Azoto basi azotate:
  - Acido urico
  - Urea
  - NH_3

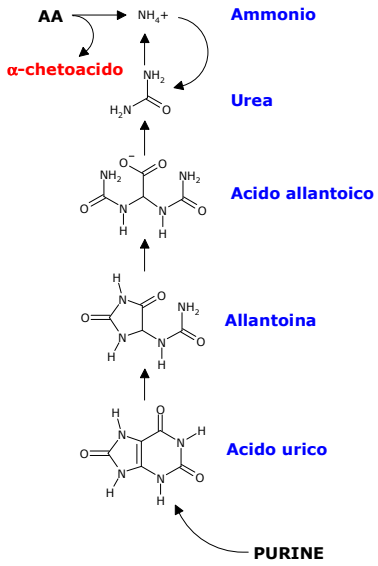


AMMONIO

$$NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$$

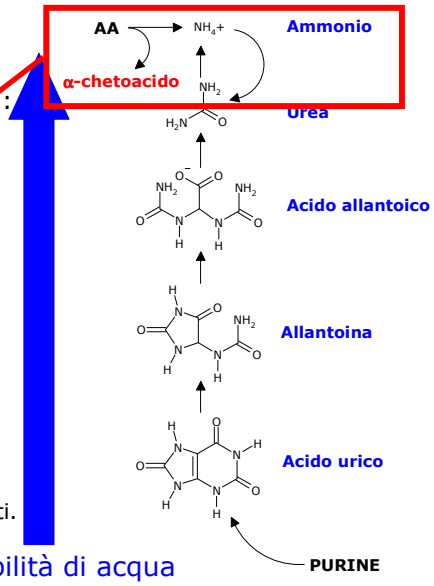
Eliminazione dell'azoto

- La forma molecolare con la quale viene eliminato da un organismo dipende dalla disponibilità di acqua:
- Ammonio: Ammoniotelici
  - Invertebrati acquatici
- Urea: Ureotelici
  - Pesci, anfibi, bivalvi di acqua dolce
- Acido allantoico
  - Alcuni teleostei
- Allantoina
  - Molluschi, insetti, mammferi (non primati)
- Acido Urico: Uricotelici
  - Insetti, vermi, rettili, uccelli, primati.



Eliminazione dell'azoto

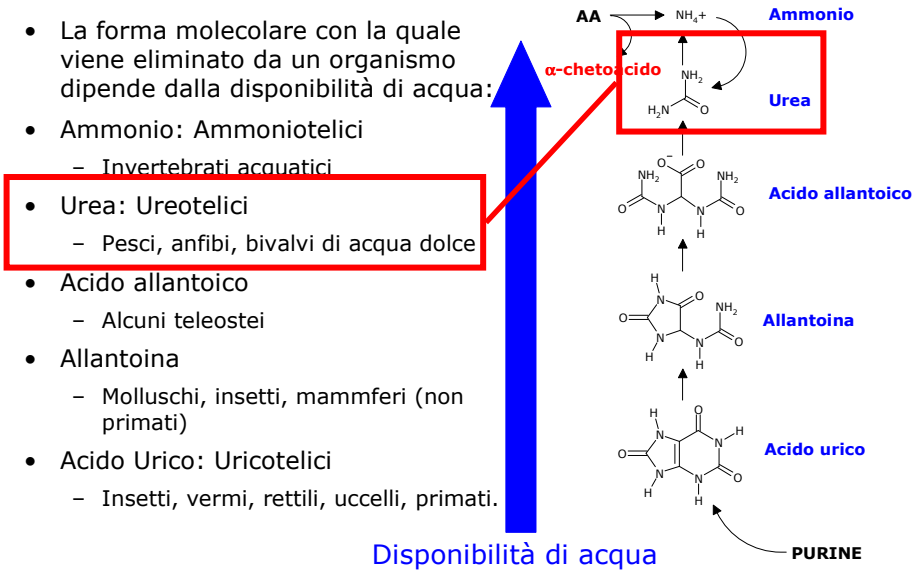
- La forma molecolare con la quale viene eliminato da un organismo dipende dalla disponibilità di acqua:
- Ammonio: Ammoniotelici
  - Invertebrati acquatici
- Urea: Ureotelici
  - Pesci, anfibi, bivalvi di acqua dolce
- Acido allantoico
  - Alcuni teleostei
- Allantoina
  - Molluschi, insetti, mammferi (non primati)
- Acido Urico: Uricotelici
  - Insetti, vermi, rettili, uccelli, primati.

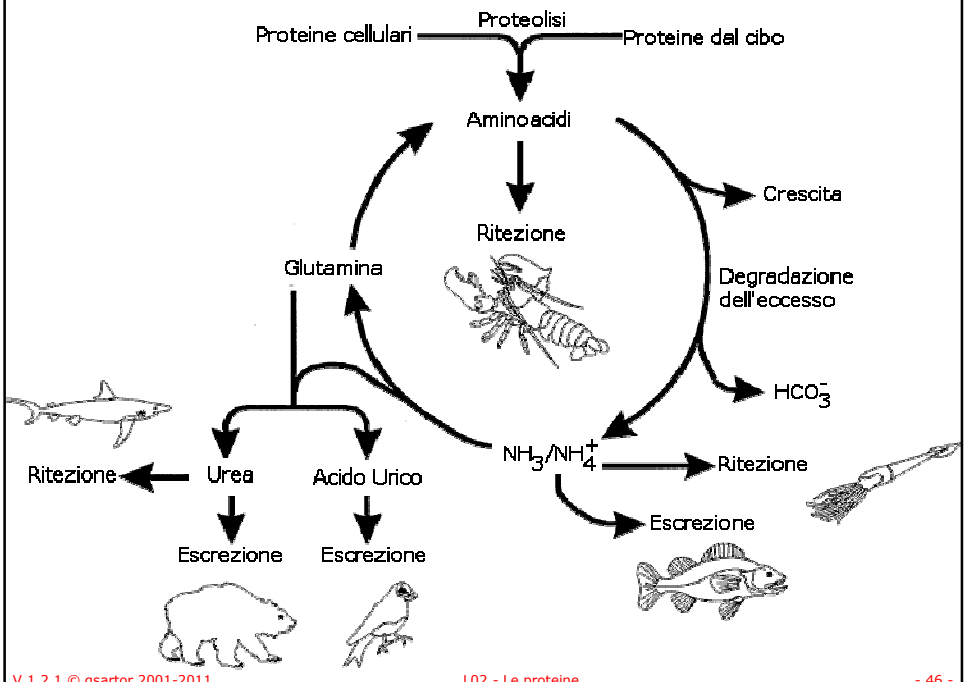


Disponibilità di acqua

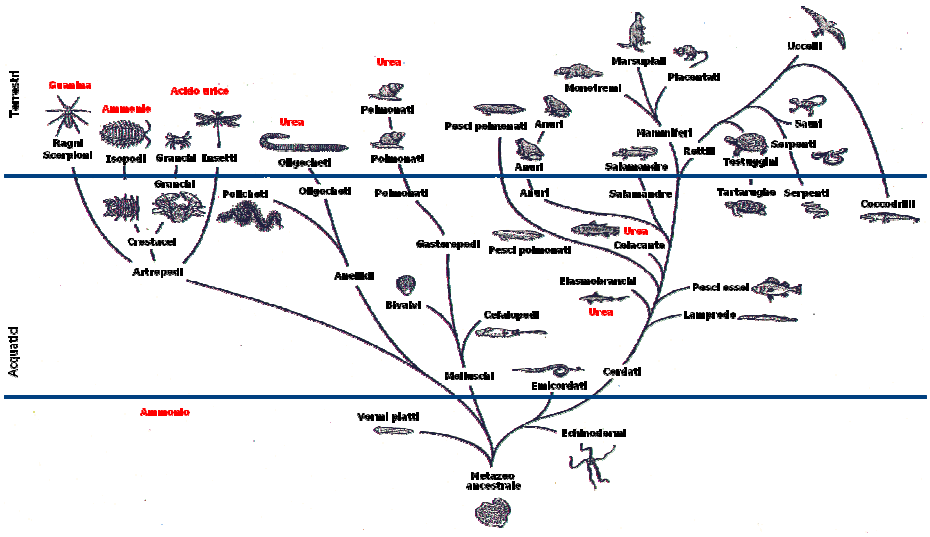
Eliminazione dell'azoto

- La forma molecolare con la quale viene eliminato da un organismo dipende dalla disponibilità di acqua:
- Ammonio: Ammoniotelici
  - Invertebrati acquatici
- Urea: Ureotelici
  - Pesci, anfibi, bivalvi di acqua dolce
- Acido allantoico
  - Alcuni teleostei
- Allantoina
  - Molluschi, insetti, mammferi (non primati)
- Acido Urico: Uricotelici
  - Insetti, vermi, rettili, uccelli, primati.

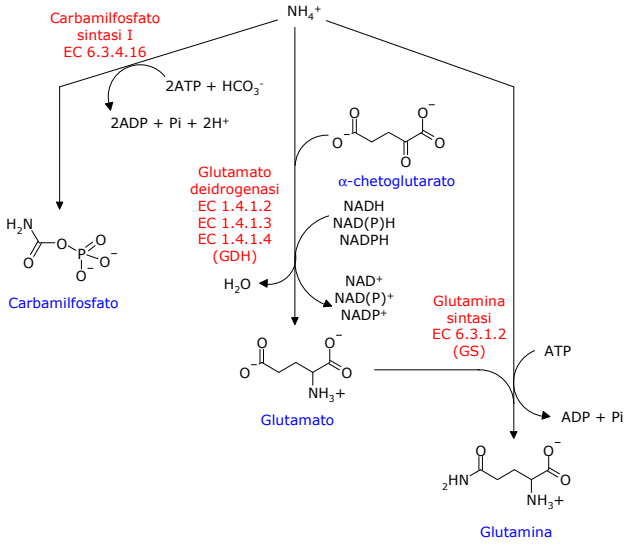




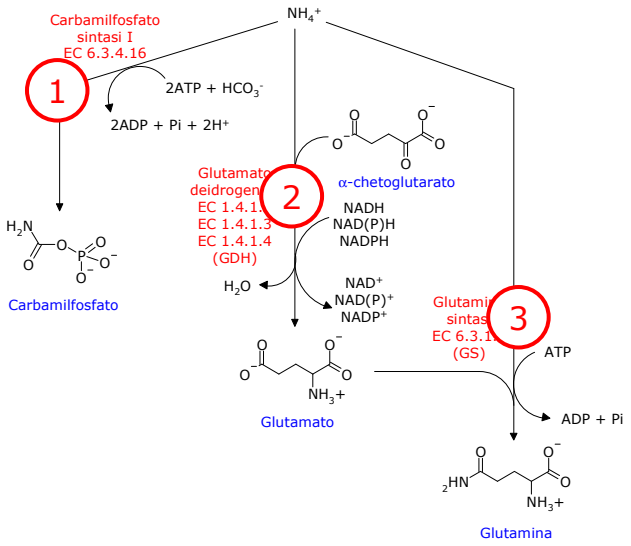
Eliminazione dell'azoto



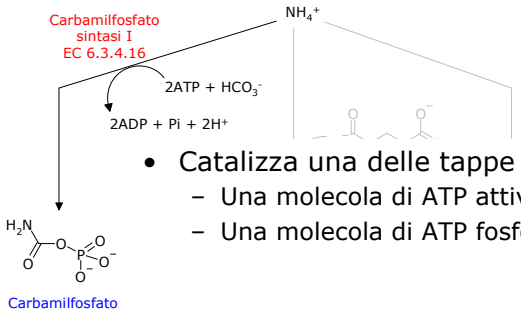
Destino di NH_4^+



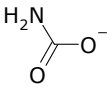
Tre enzimi



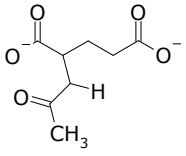
Carbamilfosfato sintasi I (EC 6.3.4.16)



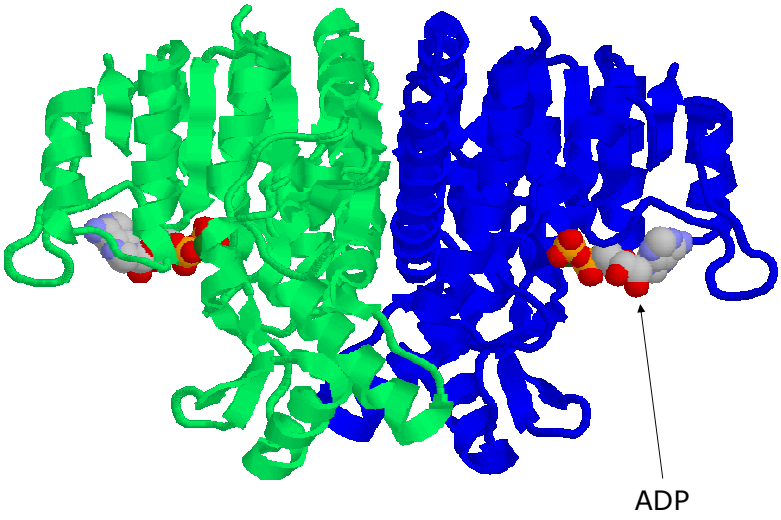
- Catalizza una delle tappe del ciclo dell'urea
  - Una molecola di ATP attiva il bicarbonato
  - Una molecola di ATP fosforila il carbammato



- N-acetiglutamato è un attivatore allosterico essenziale

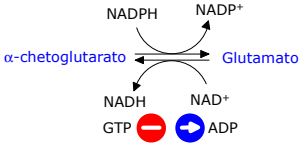


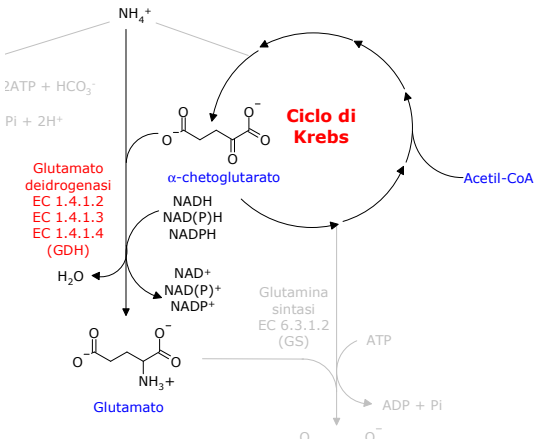
Carbamilfosfato sintasi I (EC 6.3.4.16)



Glutamato deidrogenasi (GDH) (EC 1.4.1.X)

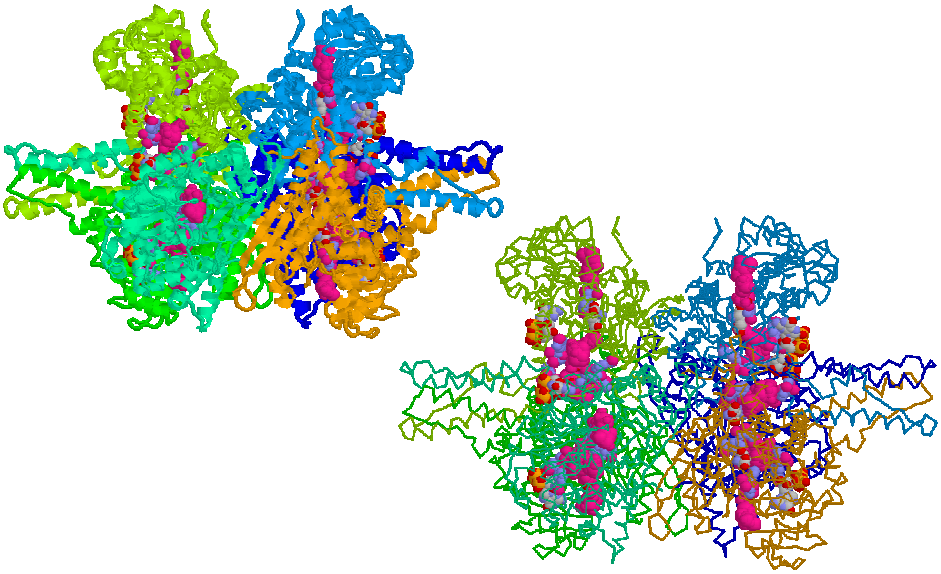
- È un esamero
- Tre diversi enzimi che usano NADH o NADPH o uno dei due.
  - EC 1.4.1.2 → NADH
  - EC 1.4.1.3 → NAD(P)H
  - EC 1.4.1.4 → NADPH
- Può operare sia nella via biosintetica che degradativa.





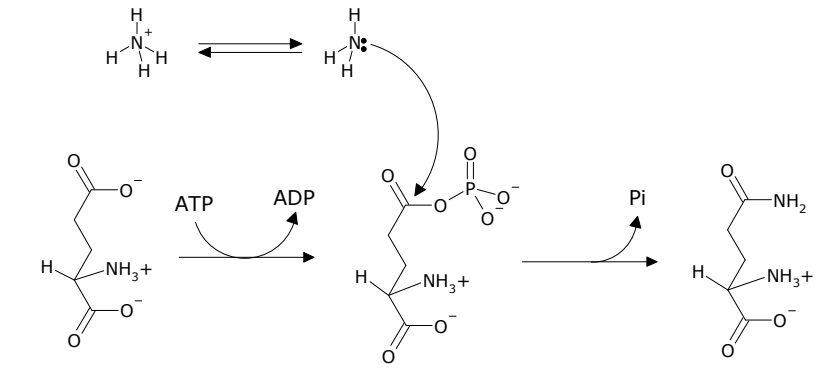
- Nel secondo caso è attivata allostericamente da ADP e inibita da GTP.

Glutamato deidrogenasi (GDH) (EC 1.4.1.X)



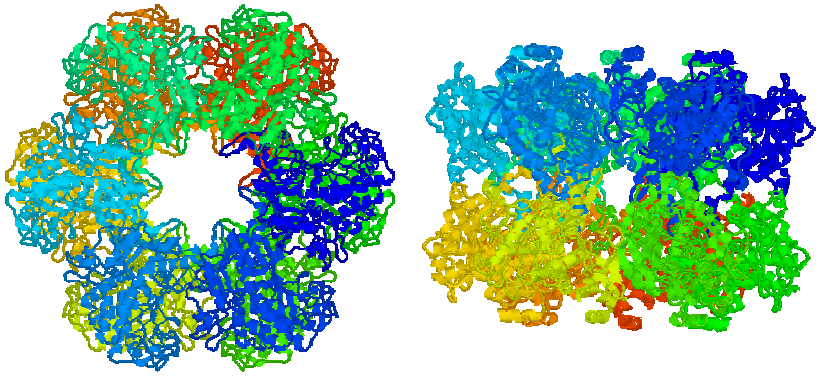
Glutamina sintasi (GS) (EC 6.3.1.2)

- Dodecamero
- Meccanismo:



Glutamato Glutamina

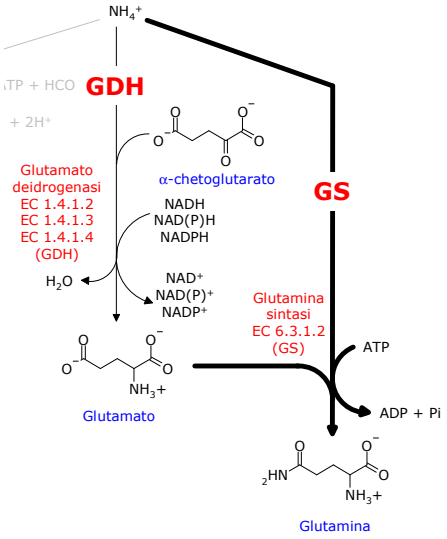
Glutamina sintasi (GS) (EC 6.3.1.2)



Correlazione e competizione tra GDH e GS

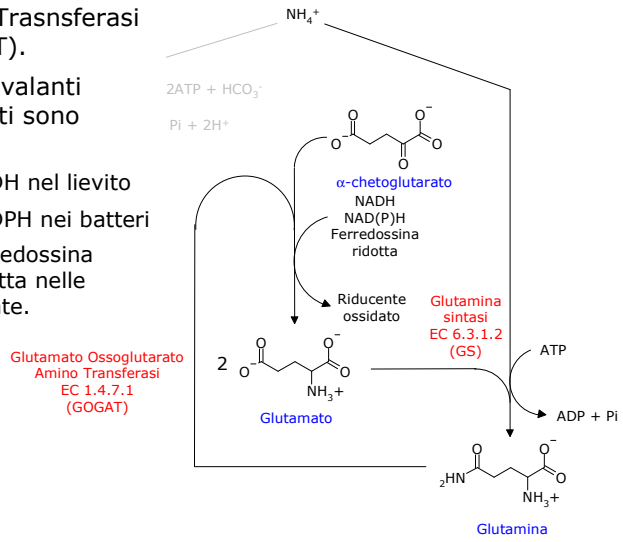
- La K_m per lo ione ammonio è diversa:

  K_m (GDH) > K_m (GS)
- la conseguenza è che ci si trova in carenza di glutamato che viene consumato più in fretta di quanto la GDH riesca a produrlo.
- Vi è un sistema di ripristino del glutamato a spese dell'α-chetoglutarato e della glutamina.

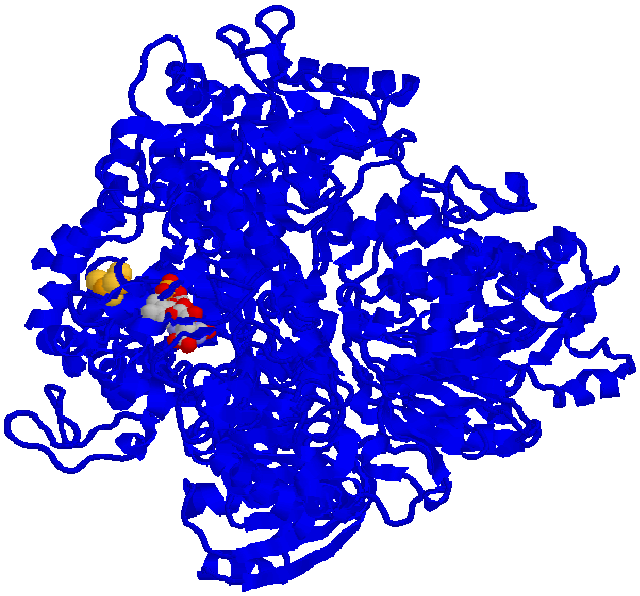


GOGAT

- L'enzima coinvolto è la Glutamato Ossoglutarato Amino Trasnsferasi (GOGAT).
- Gli equivalanti riducenti sono diversi:
  - NADH nel lievito
  - NADPH nei batteri
  - Ferredossina ridotta nelle piante.



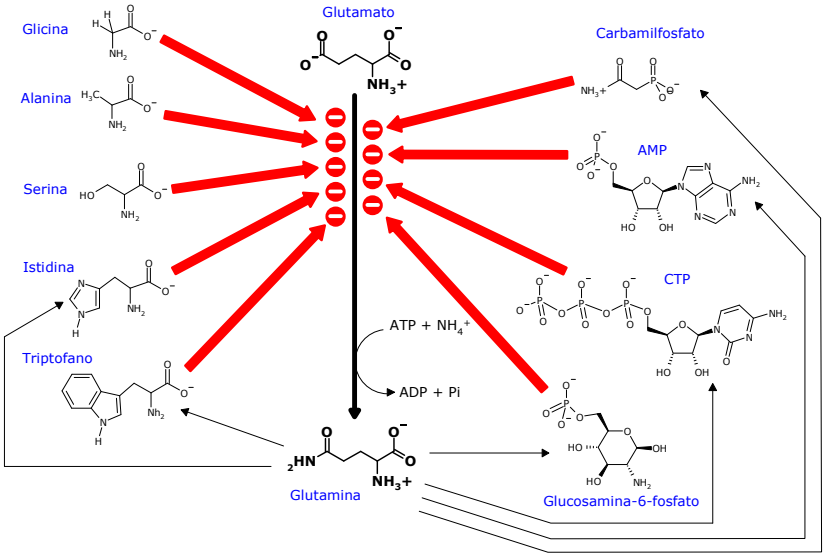
GOGAT



Regolazione allosterica della GS

- La glutamina è un componente centrale nella biosintesi degli aminoacidi e dei nucleotidi,
- La sua sintesi è estremamente regolata:
  - In modo allosterico, da prodotti che provengono dalla glutamina,
  - In modo covalente,
  - Attraverso la regolazione genica.
- L'inibizione allosterica, da prodotti, è cumulativa,
  - mediamente ogni inibitore presente a concentrazione saturante satura l'11% dell'attività.

Regolazione allosterica della GS

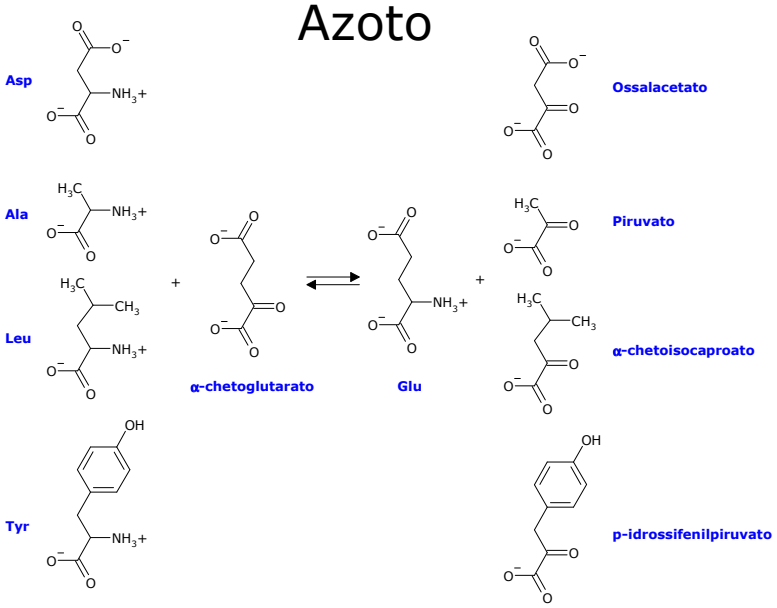


Azoto

- Il primo stadio della degradazione degli aminoacidi è la rimozione del gruppo amminico attraverso le aminotransferasi:

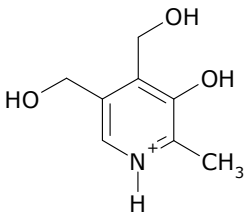
$$AA_1 + \alpha\text{-chetoacido}_2 \rightarrow \alpha\text{-chetoacido}_1 + AA_2$$

Azoto

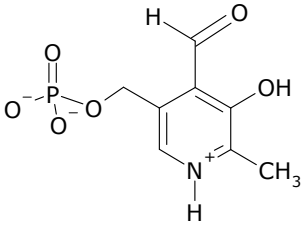


Transaminazione

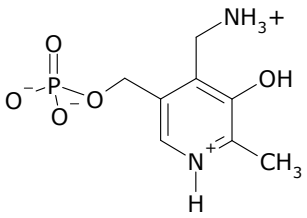
- Le reazione di transaminazione usano come coenzima il piridossal fosfato.
- Il piridossal fosfato forma una base di Shiff con un residuo di Lys della transaminasi (EC 2.6.1.X, uno per ogni aminoacido e oltre).



Piridossina
(Vit B_6)

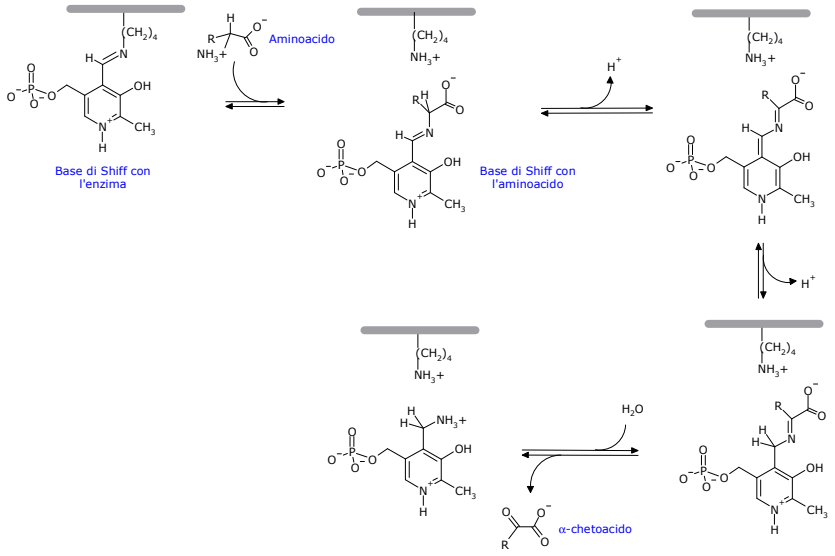


Piridossal fosfato
(PLP)

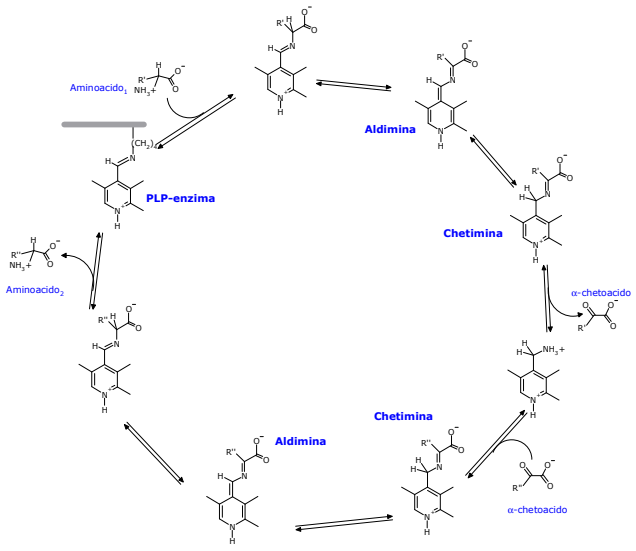


Piridossamina fosfato
(PMP)

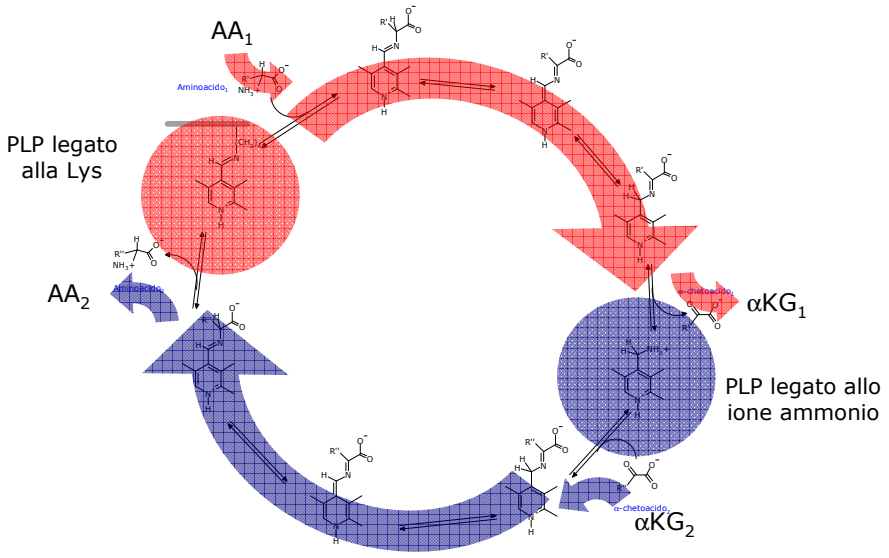
Meccanismo della transaminazione



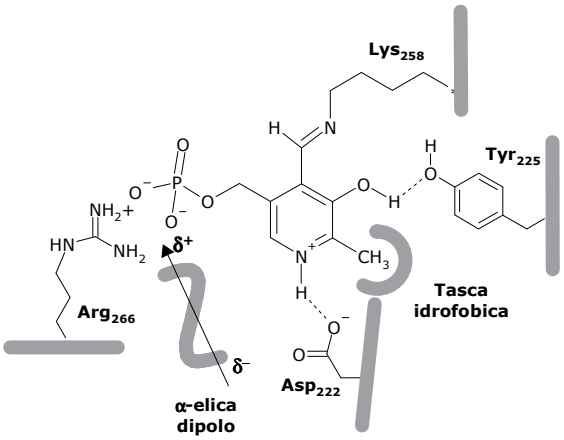
Meccanismo della transaminazione



Meccanismo della transaminazione

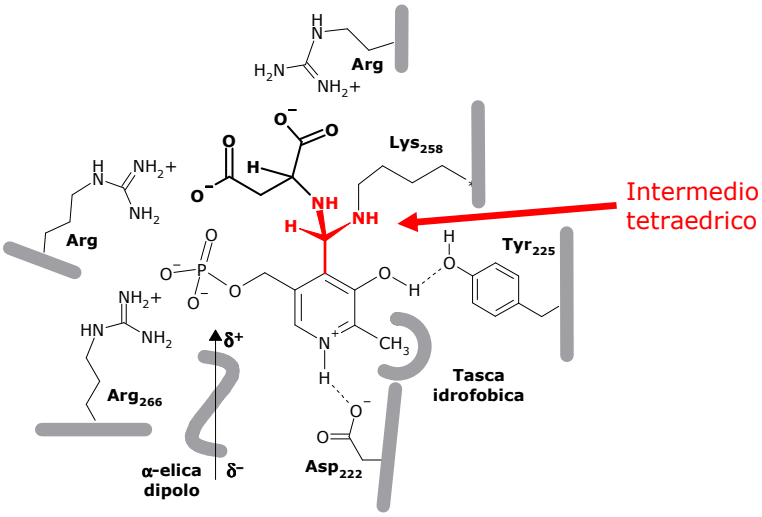


Meccanismo della transaminazione



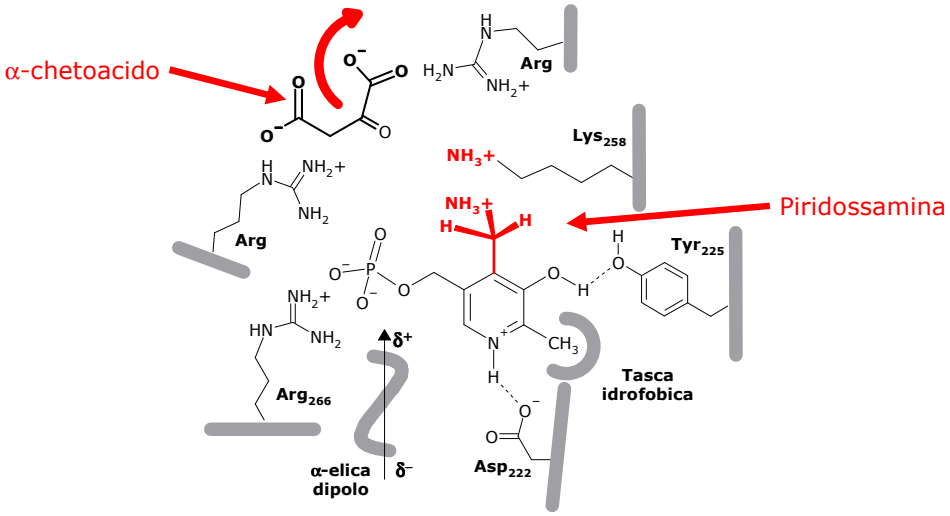
- Il PLP è legato alla Lys come base di Shiff

Meccanismo della transaminazione



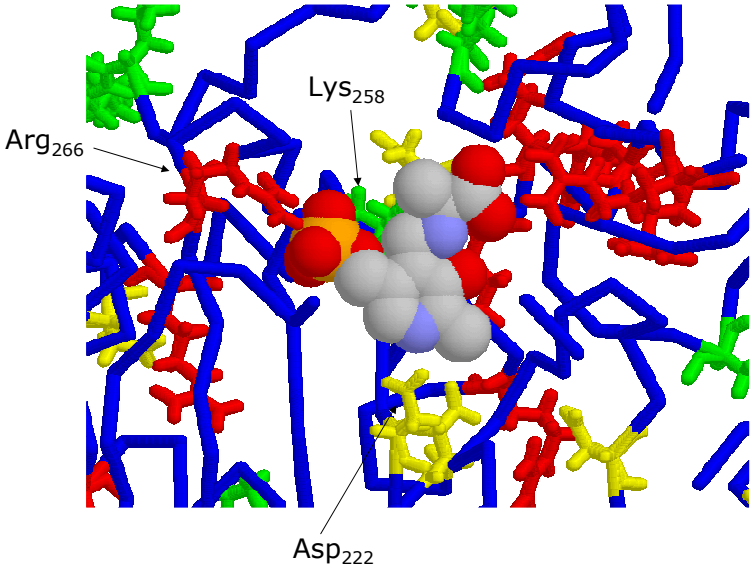
- Si lega l'AA, la molecola è tenuta in sede da due Arg che danno la specificità

Meccanismo della transaminazione



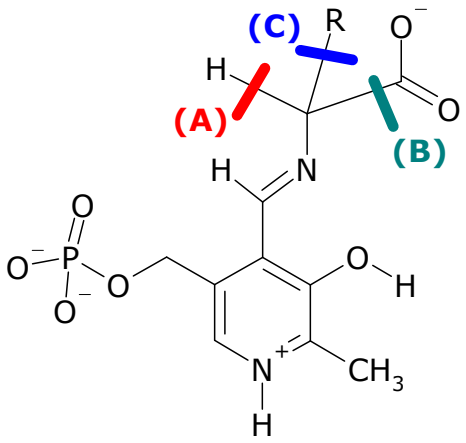
- Si forma l'α-chetoacido e la piridossamina.

Meccanismo della transaminazione



PLP

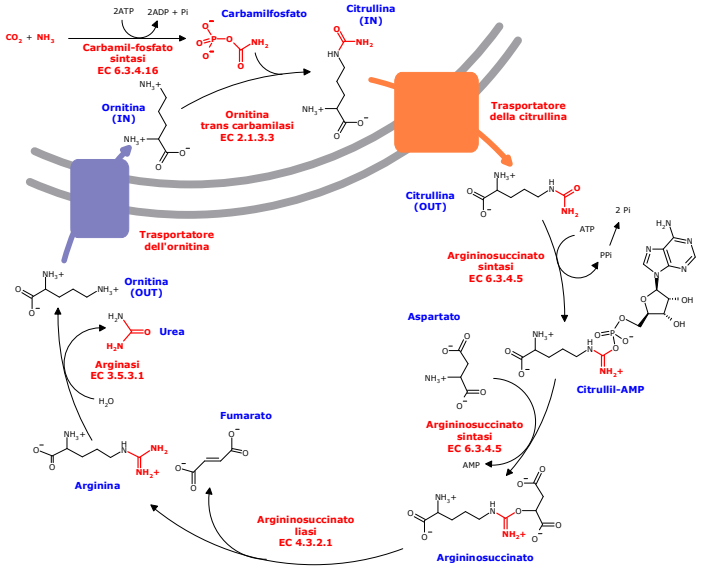
- Il PLP è un sistema molto versatile per trasformare aminoacidi:
  - Il legame C-H **(A)** è reso più labile nelle transaminasi
  - Il legame C-COO^- **(B)** è reso più labile nelle decarbossilasi
  - Il legame C-R **(C)** è reso più labile nelle aldolasi
  - Gli enzimi con PLP catalizzano anche reazioni al Cβ e Cγ.



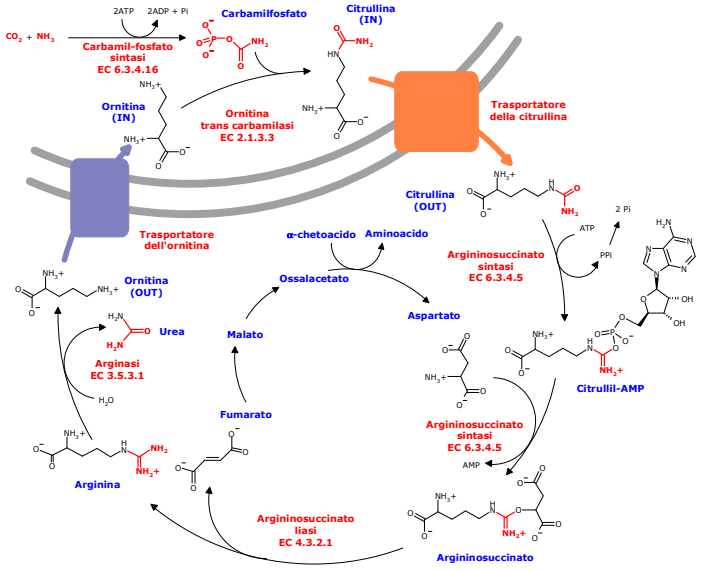
Metabolismo dell'azoto

Ciclo dell'urea

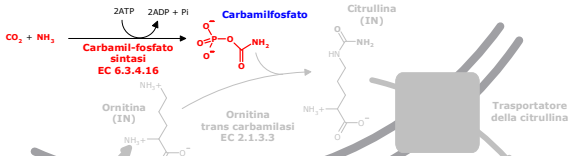
Ciclo dell'urea



Ciclo dell'urea

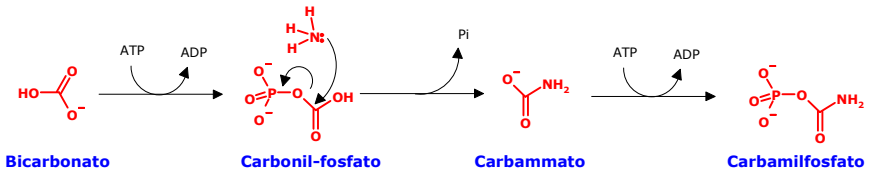


Ciclo dell'urea



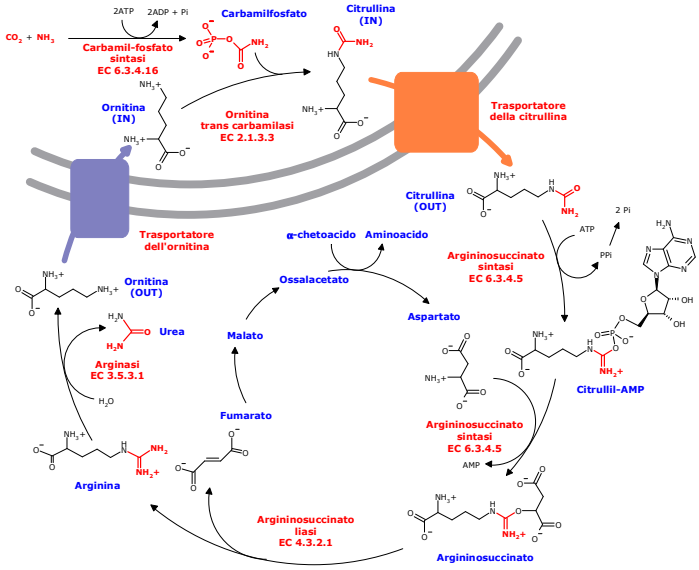
- La carbamil-fosfato sintasi catalizza la reazione di formazione di carbamil-fosfato da CO_2 e NH_3.
- Intervengono due molecole di ATP,
- L'enzima deve essere attivato da un effettore allosterico, il N-Acetilglutamato.
- Questo derivato proviene da acetil-CoA e glutamato quando la concentrazione dei quest'ultimo è alta, segnale di un eccesso di aminoacidi liberi.

Ciclo dell'urea

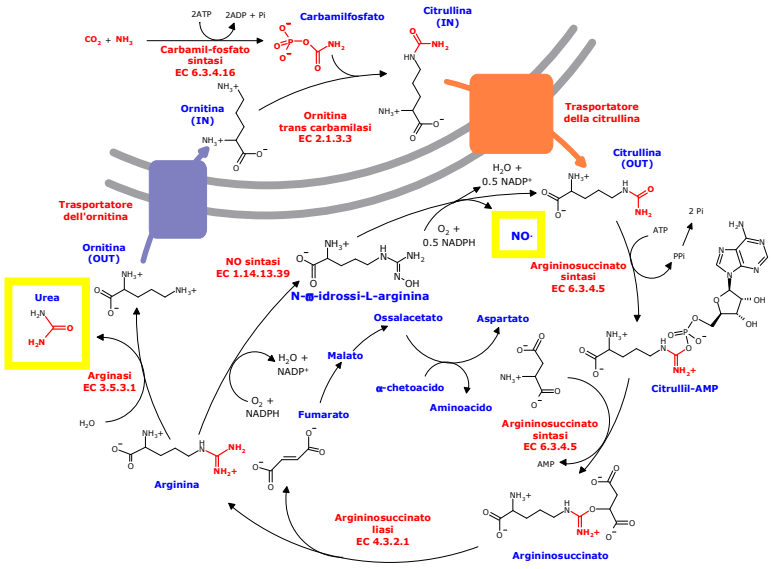


- Le due molecole di ATP operano in questo modo:
  - la prima attiva in carbonato (CO_2) per formare il carbonil-fosfato,
  - L'ammoniaca si lega e forma il carbammato liberando il fosfato,
  - La seconda molecola di ATP lega il carbammato attivandolo.

Ciclo dell'urea



Ciclo dell'urea e NO



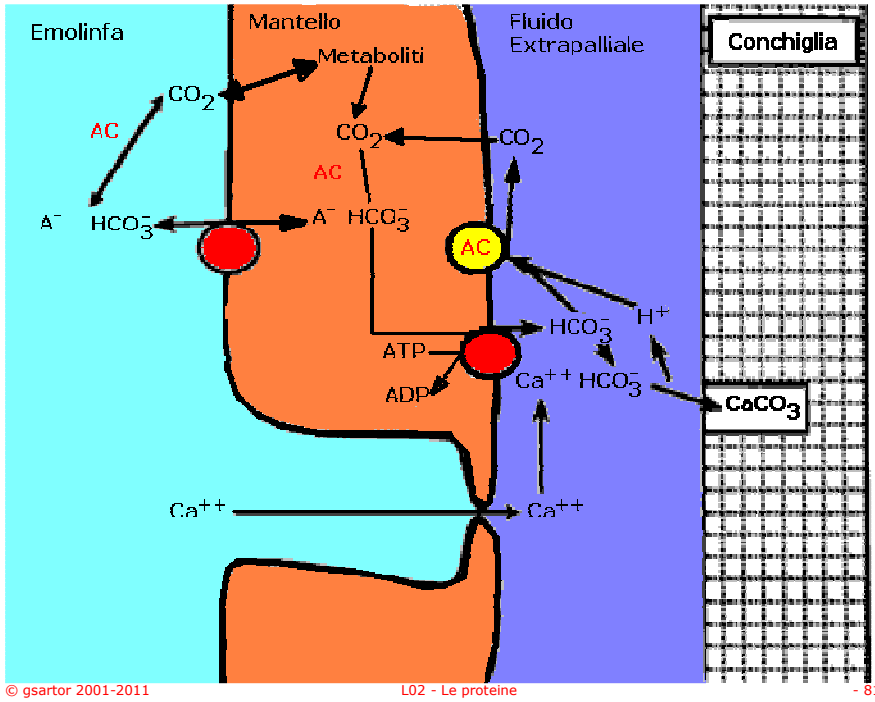
Come riutilizzare gli avanzi

CO_2, NH_3 e Urea

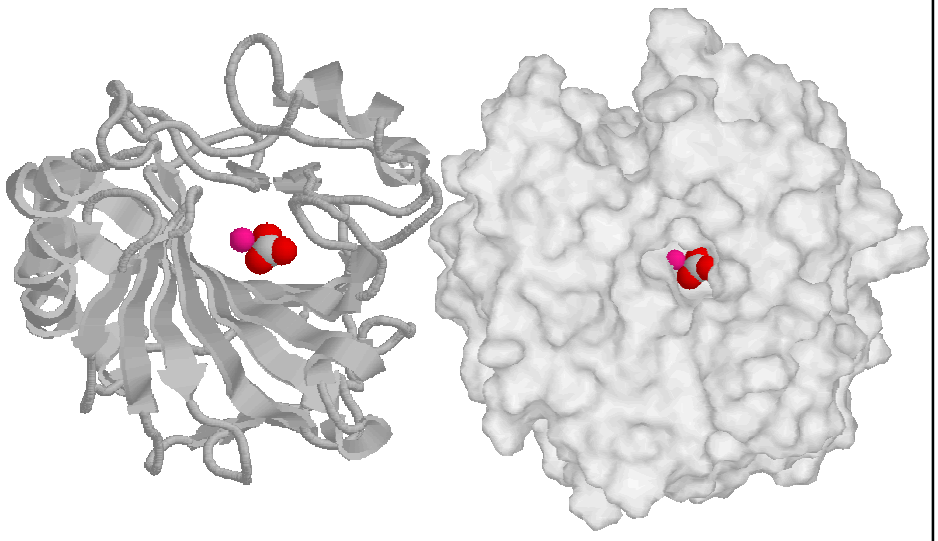
Urea, CO_2 e NH_3

- La CO_2 può essere utilizzata per formare il $CaCO_3$ con Ca^{2+} disciolto nell'ambiente.
- Il $CaCO_3$ si forma dal HCO_3^- e dal Ca^{++}
- Lo ione HCO_3^- si forma spontaneamente da CO_2 e H_2O per azione dell'Anidrasi Carbonica (EC 4.2.1.1)

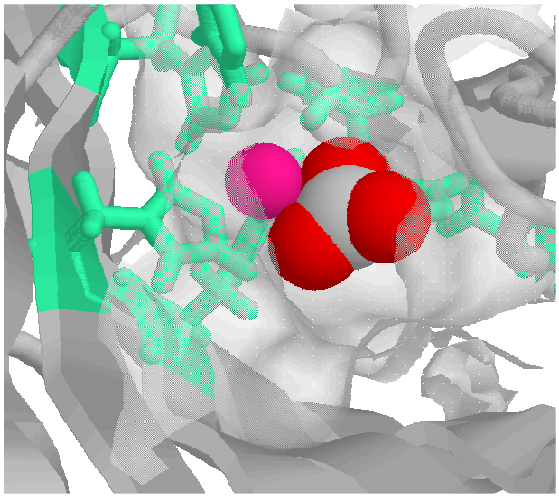
- L'ambiente basico dovuto alla presenza di NH_3 favorisce la precipitazione del carbonato.
- La NH_3 proviene dalla scissione dell'urea catalizzata dall'ureasi (EC 3.5.1.5)



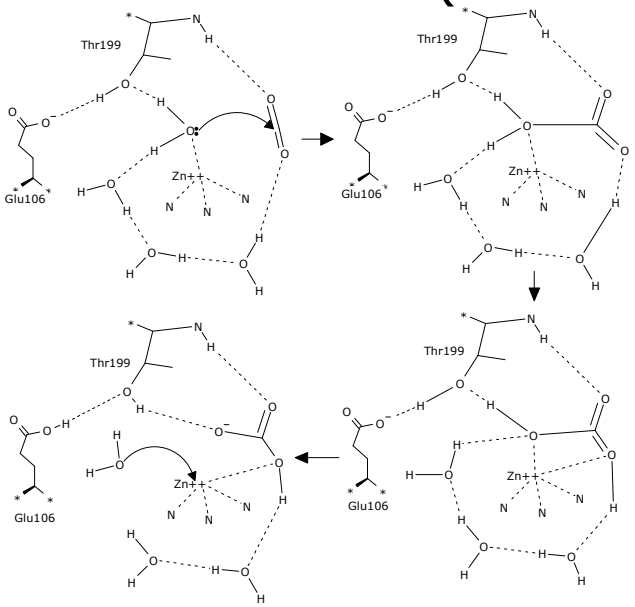
Anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1)



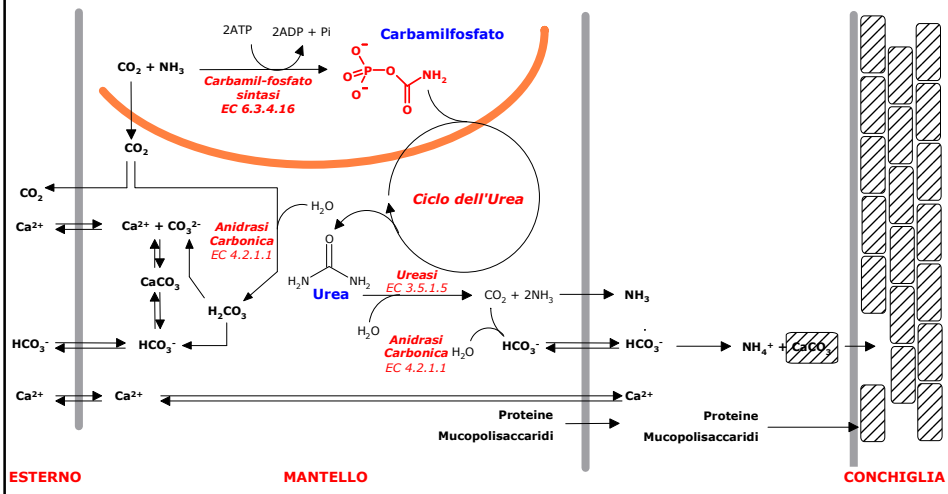
Anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1)



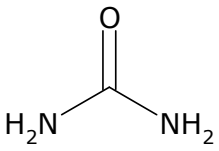
Anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1)



Urea, CO_2 e NH_3



Urea ed ammonica



urea

Ureasi
EC 3.5.1.5
1EF2 1EJW

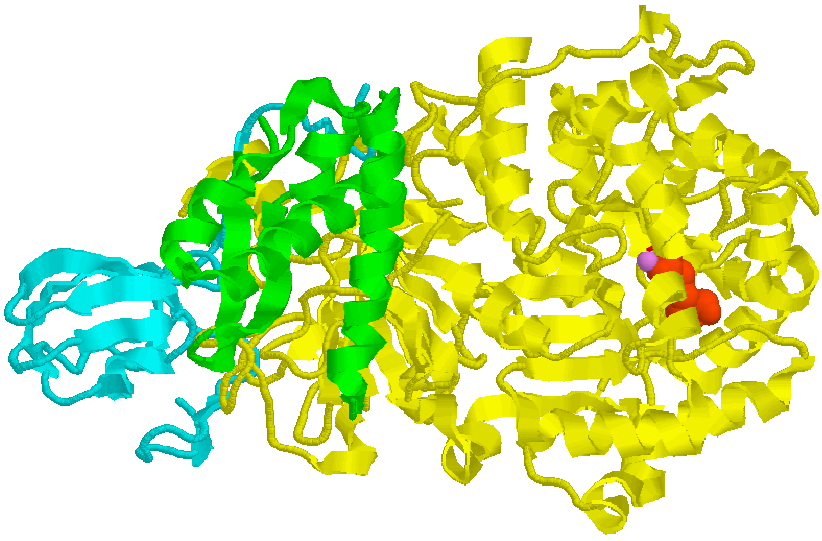
$$+ H_2O \longrightarrow CO_2 + 2NH_3$$

Ureasi *EC 3.5.1.15*

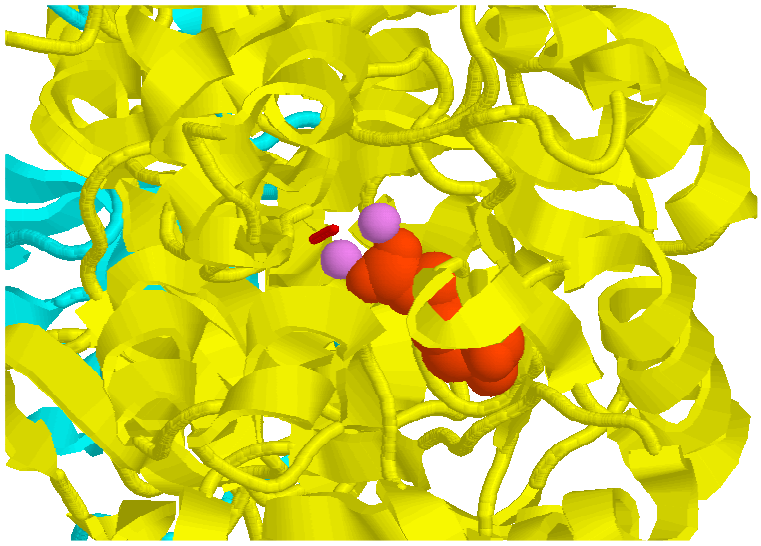
Organismo	Subunità
Ureaplasma urealyticum	?
Glycine max	?
Brevibacterium	?
Canavalia ensiformis	?
Helicobacter pylori	?
Mycobacterium	?
Klebsiella aerogenes	10
Morus alba	2
Staphylococcus	12
Ureaplasma urealyticum	6
Spirulina maxima	6
Methylophilus	6
Helicobacter pylori	6
bacterium strain SL100	6
Ureaplasma urealyticum	5
Bacillus pasteurii	4
Brevibacterium	3

Organismo	Peso Molecolare (Kda)
Helicobacter pylori	600
Helicobacter pylori	484
Helicobacter mustelae	484
Helicobacter	484
Helicobacter felis	484
Glycine max	480
Staphylococcus	420
Staphylococcus xylosus	410
Ureaplasma urealyticum	380
Lactobacillus animalis	350
Glycine max	280
Arthrobacter oxydans	242
Spirulina maxima	232
Bacillus pasteurii	230
Klebsiella aerogenes	224
Lactobacillus fermentum	220
Lactobacillus reuteri	220
Brevibacterium	215
Streptococcus mitior	200
Methylophilus	190
Rhodobacter capsulatus	185
Mycobacterium	185
Rhodobacter capsulatus	180
Morus alba	175
Lactobacillus ruminis	150
Streptococcus salivarius	140
Bos taurus	135
Bos taurus	130
Bos taurus	125

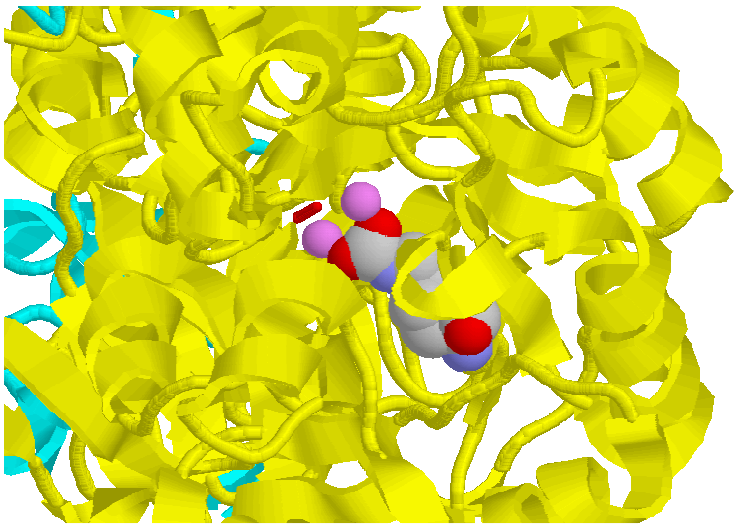
Ureasi *EC 3.5.1.15 (1EF2)*



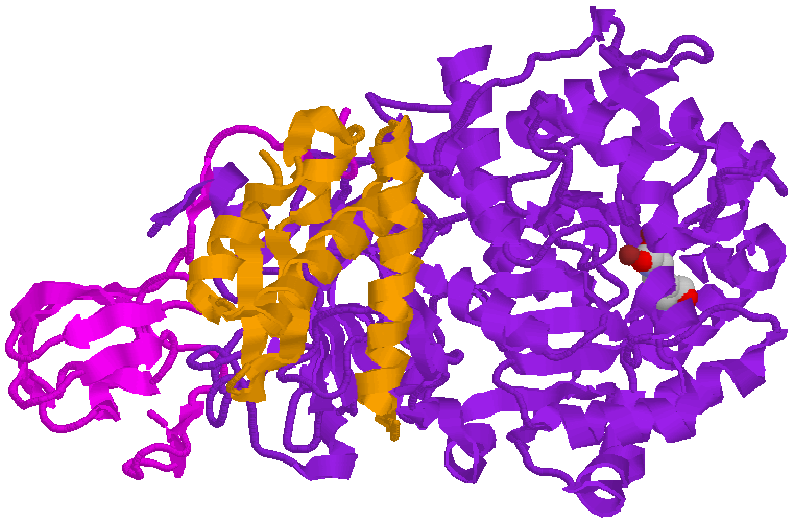
Ureasi *EC 3.5.1.15 (1EF2)*



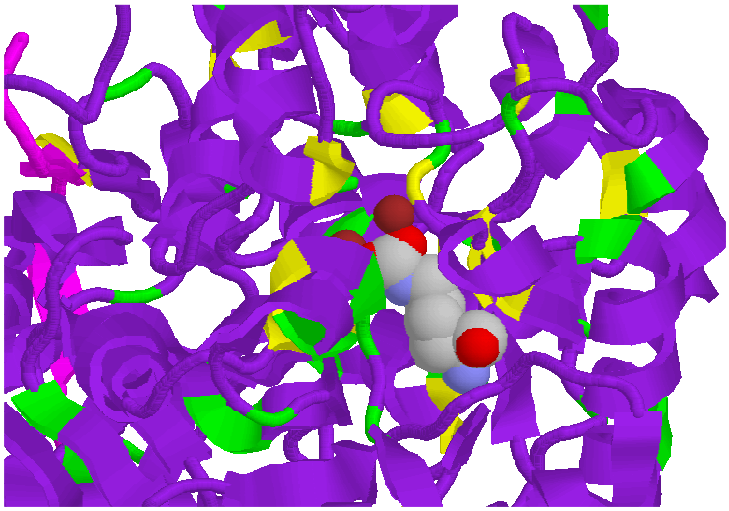
Ureasi *EC 3.5.1.15 (1EF2)*



Ureasi *EC 3.5.1.15 (1EJW)*



Ureasi *(EC 3.5.1.15 1EJW)*



Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
  - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] – Zanichelli
  - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
  - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
  - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli

- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
  - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes http://www.genome.ad.jp/kegg/
  - Brenda: http://www.brenda.uni-koeln.de/
  - Protein Data Bank: http://www.rcsb.org/pdb/
  - Rensselaer Polytechnic Institute: http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:
http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/ oppure da **http://www. gsartor.org/**

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:
Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna a Ravenna
Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it