

Prof. Giorgio Sartor

Sintesi e degradazione delle proteine

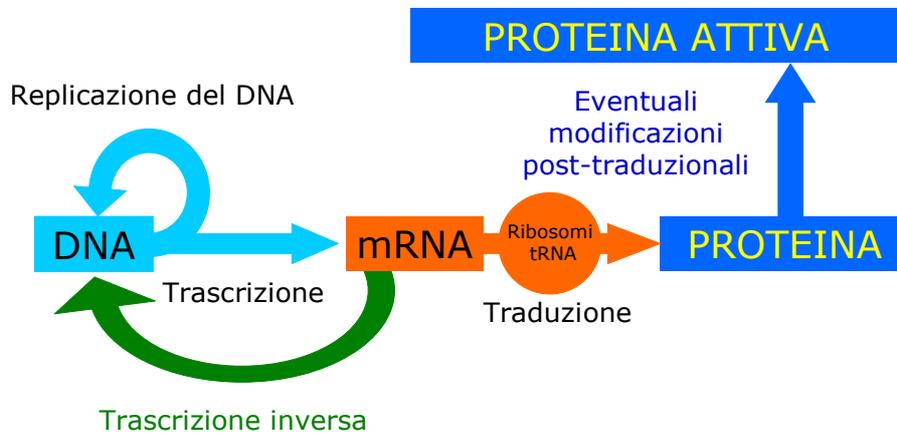
Copyright © 2001-2011 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

B15 - Versione 1.4.1 - may 2011

Trasmissione dell'informazione

- L'informazione è contenuta nel DNA ed è trasferita al RNA e quindi espressa nella struttura delle proteine
 - Processo a due stadi:
 - **Trascrizione** – L'informazione è trascritta dal DNA in mRNA
 - **Traduzione** – L'informazione nel mRNA è tradotta nella struttura primaria delle proteine
 - Modificazioni postraduzionali
 - Le proteine subiscono delle trasformazioni che le rendono funzionanti.

Flusso dell'informazione genica

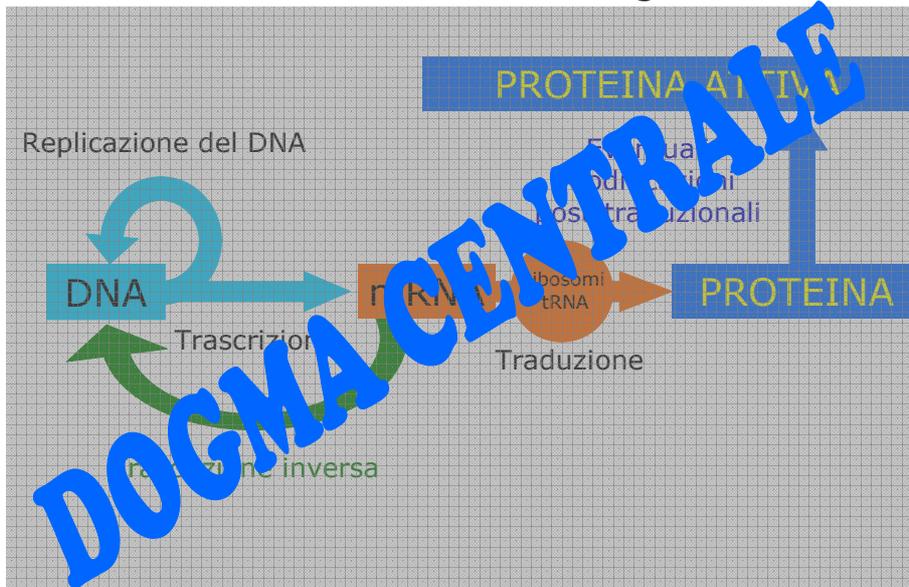


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 3 -

Flusso dell'informazione genica

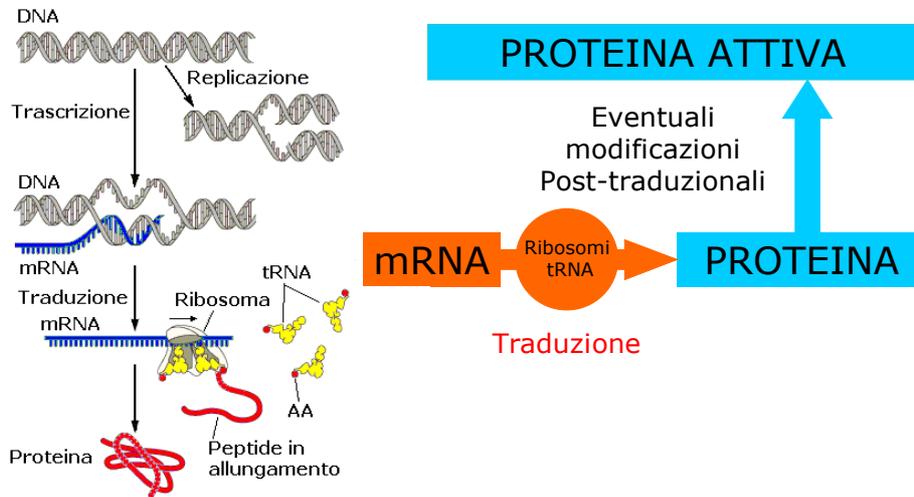


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 4 -

Flusso dell'informazione genica



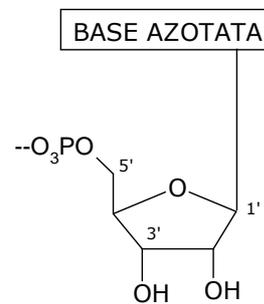
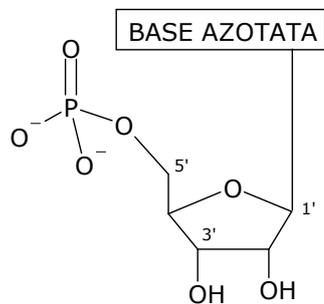
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 5 -

RNA

- Polimero di nucleotidi
 - I nucleotidi sono formati di una base azotata,
 - Un pentoso (riboso)
 - Un fosfato

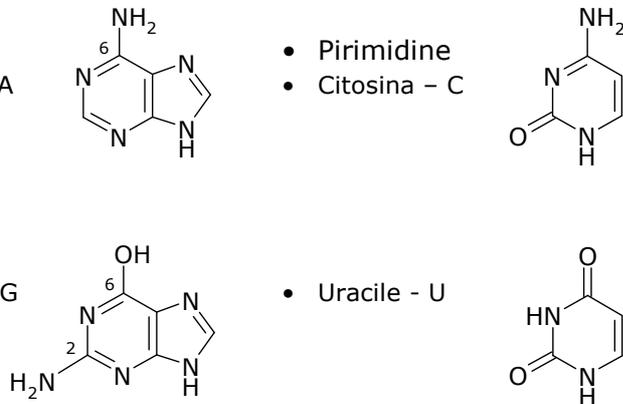


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 6 -

Le basi azotate

- Purine
 - Adenina - A
 - Pirimidine
 - Citosina - C
 - Guanina - G
 - Uracile - U
- 
- Chemical structures of the four nitrogenous bases:
- Adenine (A): Purine base with an amino group (NH_2) at position 6.
 - Cytosine (C): Pyrimidine base with an amino group (NH_2) at position 4 and a carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) at position 2.
 - Guanine (G): Purine base with a carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) at position 6 and an amino group (H_2N) at position 2.
 - Uracil (U): Pyrimidine base with carbonyl groups ($\text{C}=\text{O}$) at positions 2 and 4.

RNA

- Quattro tipi di RNA:
 - RNA messaggero (**mRNA**) – trasporta l'informazione genetica dal DNA nel nucleo al citoplasma dove le proteine sono sintetizzate
 - RNA transfer (**tRNA**) – trasporta gli amino acidi dal pool degli amino acidi al mRNA
 - RNA ribosomale (**rRNA**) – insieme alle proteine ribosomali forma i ribosomi dove gli aminoacidi sono uniti per formare la struttura primaria delle proteine.
 - Small nuclear RNA (**snRNA**) – associato a proteine nucleari forma le "small nuclear ribonucleoprotein particles" (**snRNPs**) che elidono gli introni dal pre-mRNA.

Dal mRNA alla sintesi delle proteine

- L'ordine con il quale gli aminoacidi si legano tra loro è specificato dal codon nel mRNA.
- Il transfer RNA (tRNA) agisce come un adattatore.
- Vi è un tRNA per ogni aminoacido (tRNA^{Phe}).
- Attraverso l'interazione codon-anticodon il tRNA porta l'aminoacido codificato dal codon nel mRNA.
- L'enzima **aminoacil-tRNA sintetasi**, una famiglia di enzimi attivatori, lega lo specifico aminoacido all'appropriato tRNA, si forma tRNA carico.

Traduzione

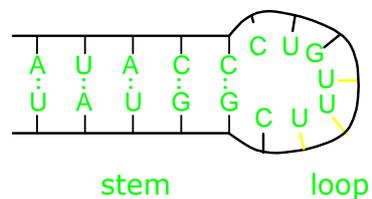
- **Procarioti**: la traduzione inizia prima che la sintesi del mRNA (trascrizione) sia completata
- **Eucarioti**: la trascrizione avviene nel nucleo mentre la traduzione avviene nel citoplasma
- La traduzione richiede quattro componenti:
 - ribosomi,
 - tRNA,
 - Enzimi attivatori e
 - mRNA

Traduzione

- La traduzione ha tre fasi :
 - **Attivazione** del tRNA,
 - **Iniziazione** della traduzione,
 - **Allungamento** del polipetide,
 - **Terminazione** della traduzione.

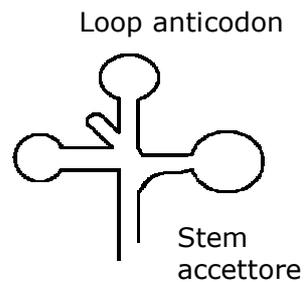
Struttura del RNA

- Molti RNA hanno struttura secondaria che consiste in domini (stem e loop)
- Gli **stems** a doppia elica derivano dall'accoppiamento di basi tra regioni complementari dello stesso strand.
- I **loops** sono presenti dove vi è mancanza di complementarità o dove vi sia la presenza di modificazioni delle basi che ne prevengano l'accoppiamento.



Struttura del RNA

- Il modello a trifoglio della struttura secondaria del tRNA enfatizza i due maggiori tipi di domini: **stem e loop**.
 - Il tRNA include molte basi modificate, in particolare nei domini dei loops.
 - La struttura terziaria dipende dalle interazioni tra basi a maggiore distanza. Molte di queste interazioni sono dovute ad appaiamenti e possono coinvolgere tre o più basi.
 - Normalmente il **tRNA** si ripiega per formare una struttura a forma di **L**.



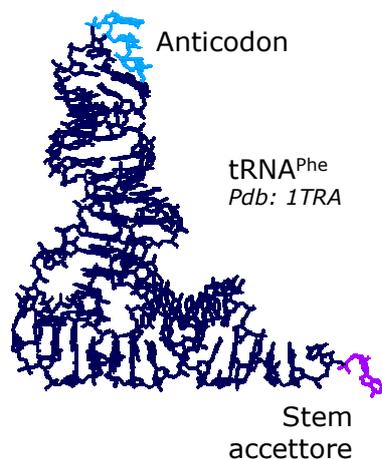
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 13 -

Struttura del tRNA

- Il terminale 3' del tRNA che si estende al di fuori dello stem accettore ha la sequenza CCA.
- L'aminoacido si attacca al ribosio al terminale 3' (in rosso)
- Il loop anticodon è all'estremità opposta della struttura a L.
- Alcuni RNA, inclusi quelli virali e segmenti del rRNA si ripiegano in pseudonodi, strutture terziarie che mimano la struttura 3D del tRNA.
- Gli pseudonodi sono stabilizzati da legami idrogeno non standard



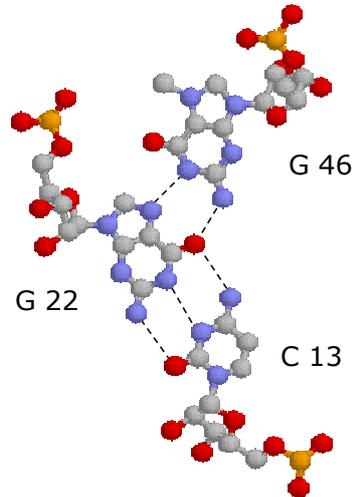
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 14 -

Struttura del tRNA

- L'accoppiamento non-standard tra basi è dovuto alla formazione di legami idrogeno ed aiuta la stabilizzazione della struttura a forma di L. (17N2)

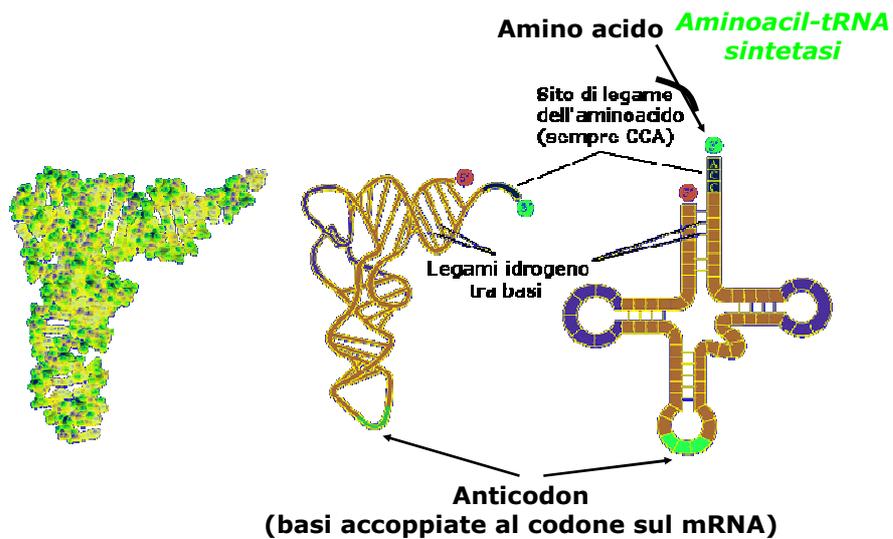


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 15 -

Il tRNA

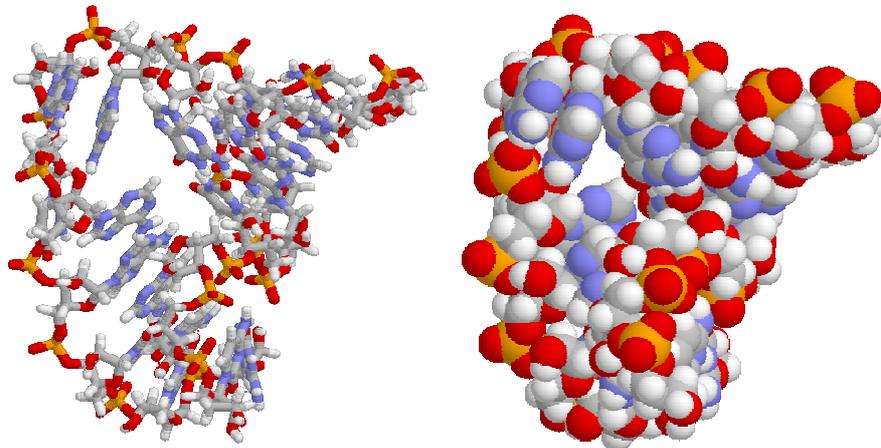


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 16 -

tRNA



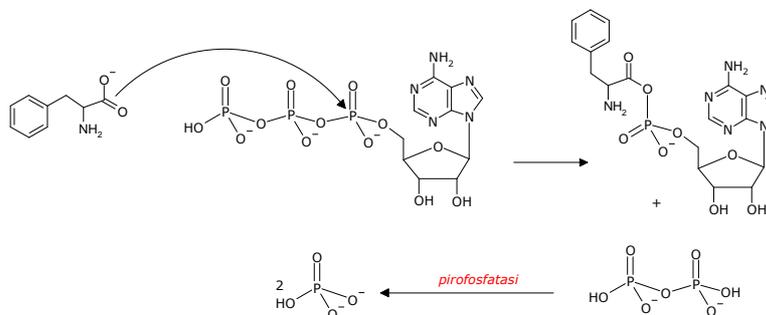
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 17 -

Attivazione - Come si carica il tRNA

- L'enzima Aminoacil-tRNA Sintetasi catalizza il legame tra l'appropriato aminoacido ed ogni tRNA. La reazione avviene in due stadi.
- Nel primo stadio un atomo di ossigeno del gruppo α -carbossilico di un aminoacido attacca l'atomo di fosforo dell' ATP.

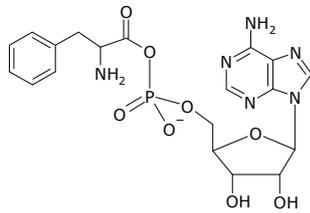


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

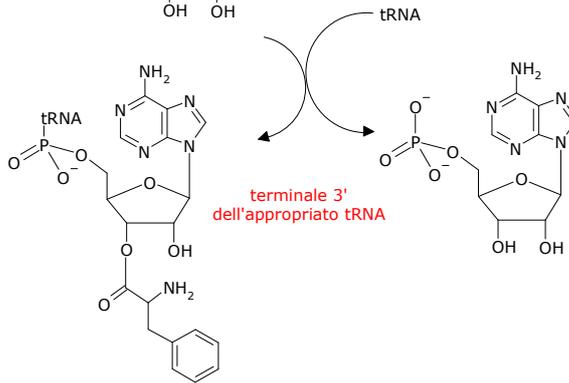
Sintesi e degradazione delle proteine

- 18 -

Attivazione - Come si carica il tRNA



- Nel secondo stadio il gruppo OH in 2' o 3' dell'adenosina terminale del tRNA attacca l'aminoacido al carbonio carbonilico.



Aminoacil-tRNA Sintetasi

Sommario della reazione

1. **amino acido** + **ATP** → **aminoacil-AMP** + **PP_i**
2. **aminoacil-AMP** + **tRNA** → **aminoacil-tRNA** + **AMP**

La reazione è globalmente spontanea a causa della concentrazione del **PP_i** mantenuta bassa a causa della sua idrolisi, catalizzata dalla pirofosfatasi.

Aminoacil-tRNA Sintetasi

- Ci sono differenti **Aminoacil-tRNA Sintetasi (aaRS)**, una per ogni aminoacido
- Ogni aaRS riconosce il suo particolare AA e il tRNA codifica per quel AA.
- La traduzione accurata del codice genetico dipende dal legame di ogni AA all'appropriato tRNA.
- I domini di tRNA che riconosciuti da un aaRS sono chiamati elementi di identità.
- I maggiori elementi di identità sono l'**acceptor stem** e l'**anticodon loop**.

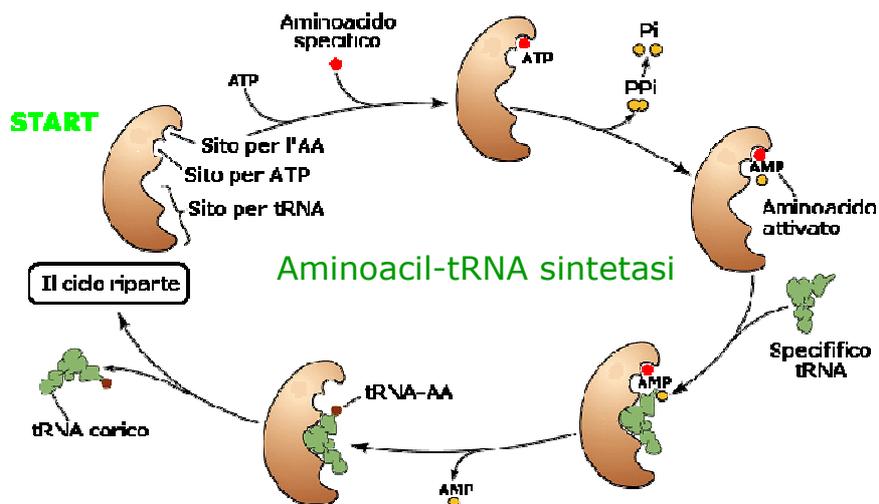
Aminoacil-tRNA Sintetasi: Classe I e Classe II

- Due differenti proteine ancestrali si sono evolute nelle due classi di aaRS che differiscono nella topologia del dominio del sito attivo.
- Le due classi si legano da parti opposte dell'acceptor stem del tRNA, ciò provoca una aminoacilazione a differenti posizioni dell'anello ribosidico (2' o 3').

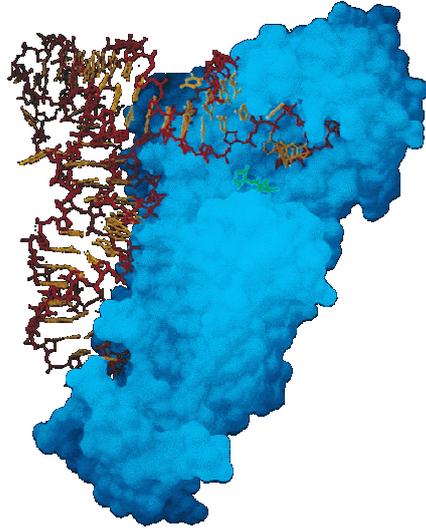
Aminoacil-tRNA Sintetasi: Classe I e Classe II

- Classe I:
 - Gli elementi di identità includono i residui del anticodon loop e dell'acceptor stem.
 - L'aminoacilazione avviene al **2'-OH** dell'adenosina al terminale 3'.
- Classe II:
 - Gli elementi di identità per alcuni enzimi di Classe II non includono il dominio anticodon.
 - Tendono ad aminoacilare il **3'-OH** dell'adenosina al terminale 3'.

Attivazione - Come si carica il tRNA



Aminoacil-tRNA sintetasi

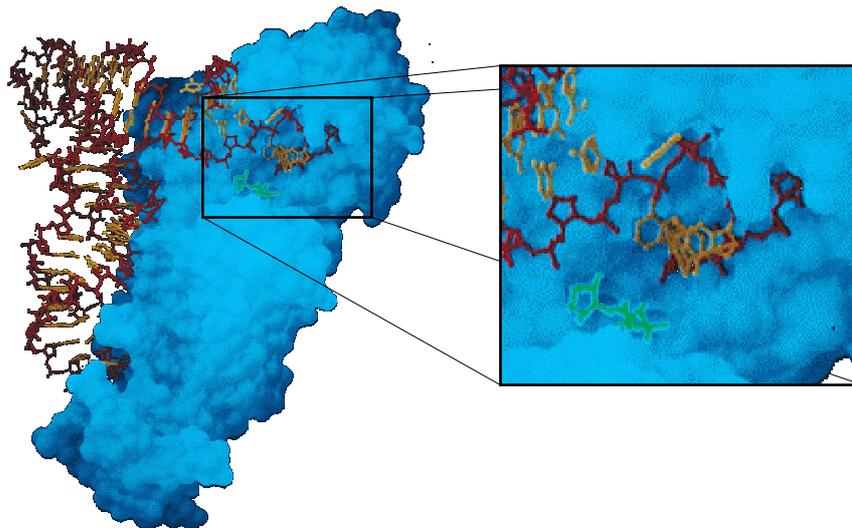


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 25 -

Aminoacil-tRNA sintetasi

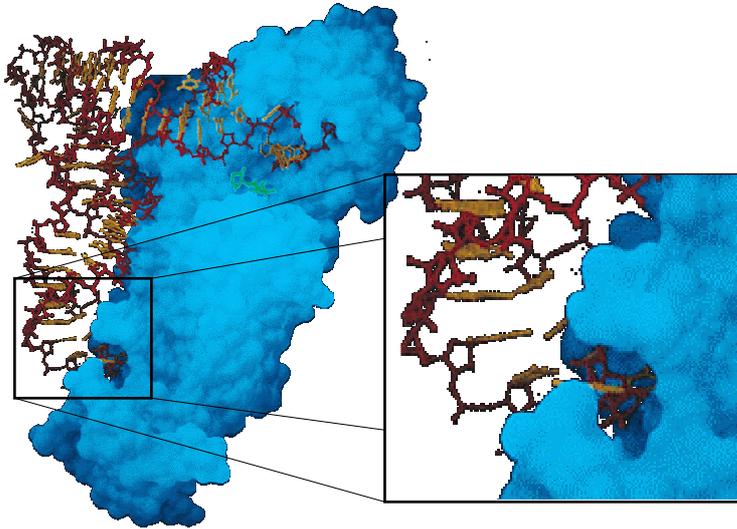


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 26 -

Aminoacil-tRNA sintetasi

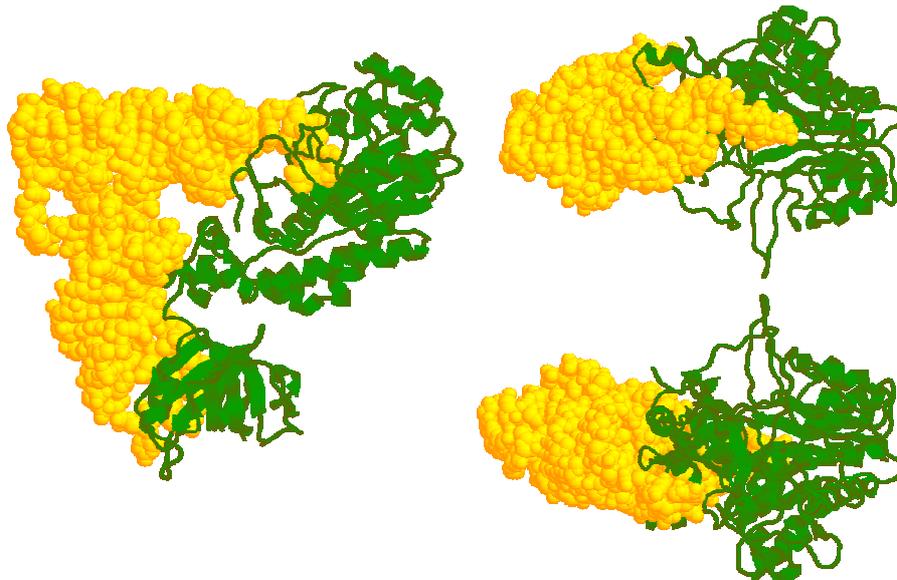


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 27 -

Aminoacil-tRNA sintetasi



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

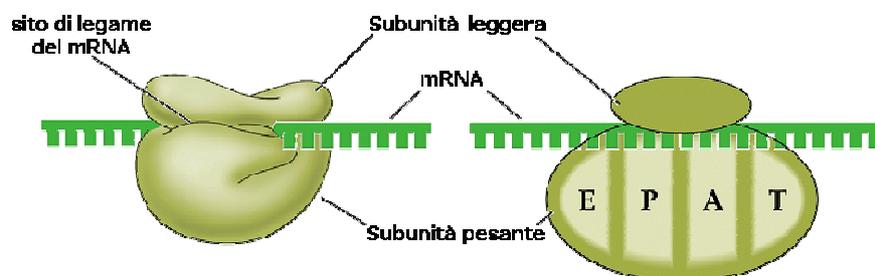
Sintesi e degradazione delle proteine

- 28 -

Sintesi proteica

Il ribosoma

- Il mRNA incontra il tRNA carico nei ribosomi
- Il ribosoma è composto di due subunità: leggera e pesante
- Il ribosoma ha quattro siti: E, P, A, T



Codice genetico

- Il codice genetico è basato su una sequenza di basi in un acido nucleico.
- Ogni **codon**, una sequenza di **tre basi** nel mRNA, codificano per un particolare aminoacido, o per una terminazione.
- Alcuni aminoacidi sono codificati da due o più codons.
 - **Sinonimi** (codons multipli per lo stesso aminoacido) in molti casi differiscono solo nella 3^a base.
 - Ci sono **61 codons** per **20 aminoacidi**.
 - Codons simili tendono a codificare per AA simili.
 - Effetti di mutazioni sono minimizzati.

1 ^a base	2 ^a base				3 ^a base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met*	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

1 ^a base	2 ^a base				3 ^a base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met*	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 33 -

1 ^a base	2 ^a base				3 ^a base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met*	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

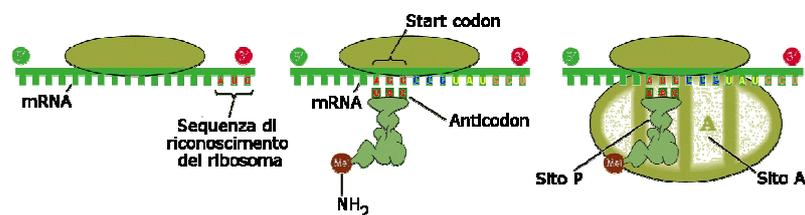
Sintesi e degradazione delle proteine

- 34 -

Traduzione

- La traduzione ha tre fasi:
 - **Iniziazione**
 - **Allungamento**
 - **Terminazione**
- **Iniziazione:**
 - Si forma un complesso di iniziazione, che consiste nel legame tra un tRNA iniziatore caricato con metionina e la subunità leggera del ribosoma legato al mRNA fa partire la sintesi proteica.

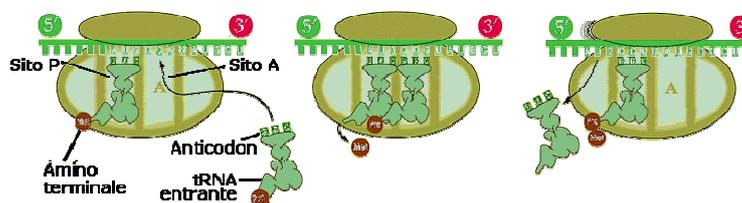
Traduzione - Iniziazione



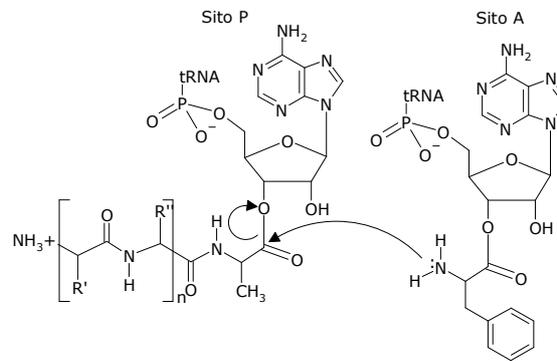
Traduzione - Allungamento

- Il ribosoma si muove lungo il mRNA un codon alla volta in direzione $5' \rightarrow 3'$
- I polipeptidi crescono dal **N terminale verso il C terminale**
- I tRNA carichi portano gli aminoacidi al ribosoma sequenzialmente
- La specificità è data da:
 - L'interazione **anticodon** (tRNA) -**codon** (mRNA)
 - L'accuratezza dell'**aminoacil-tRNA sintetasi**

Traduzione - Allungamento



Traduzione - Allungamento

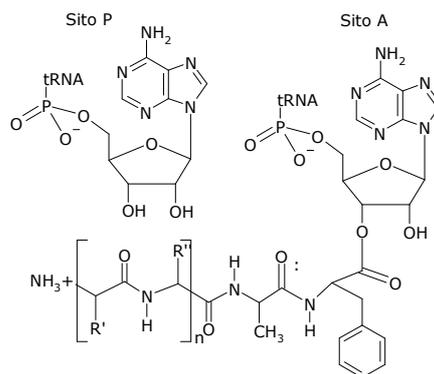


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 39 -

Traduzione - Allungamento

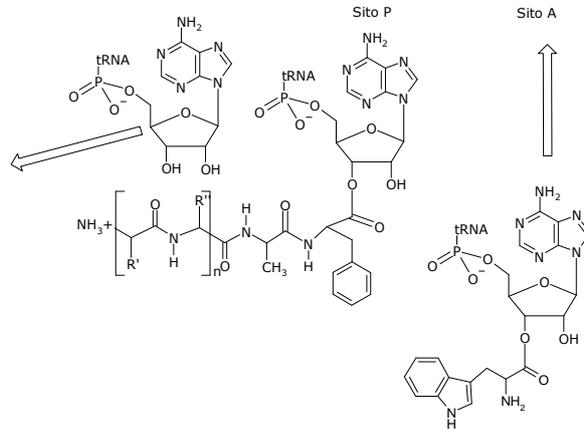


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

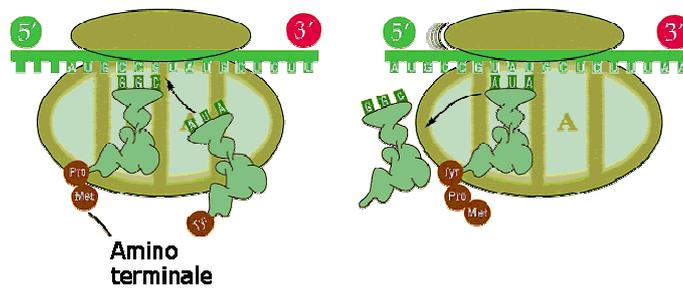
Sintesi e degradazione delle proteine

- 40 -

Traduzione - Allungamento

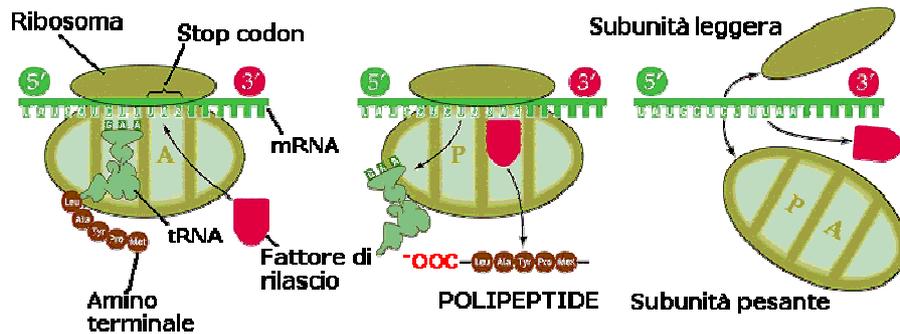


Traduzione - Allungamento



Traduzione - Terminazione

- La presenza di uno **stop codon** nel sito A del ribosoma causa la fine della traduzione.
- La proteina completa è rilasciata.

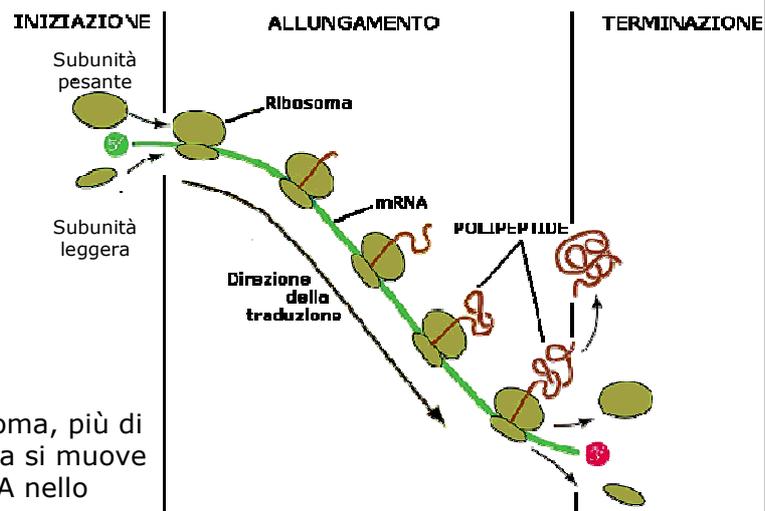


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 43 -

Traduzione



- In un polisoma, più di un ribosoma si muove lungo mRNA nello stesso tempo.

B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 44 -



The Nobel Prize in Chemistry 2009

"for studies of the structure and function of the ribosome"



Photo: MRC Laboratory of Molecular Biology

Venkatraman Ramakrishnan

🕒 1/3 of the prize

United Kingdom

MRC Laboratory of Molecular Biology
Cambridge, United Kingdom



Credits: Michael Marsland/Yale University

Thomas A. Steitz

🕒 1/3 of the prize

USA

Yale University
New Haven, CT, USA;
Howard Hughes Medical Institute



Credits: Micheline Pelletier/Corbis

Ada E. Yonath

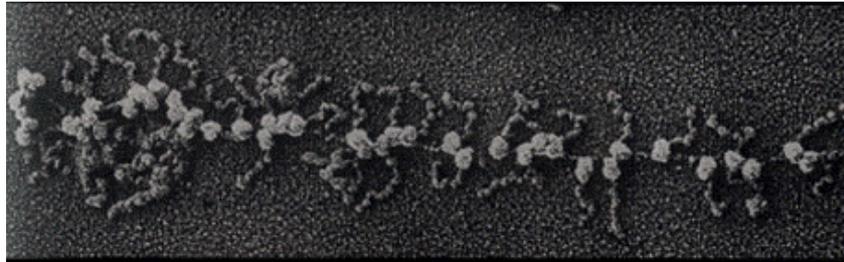
🕒 1/3 of the prize

Israel

Weizmann Institute of Science
Rehovot, Israel

Ribosome in action

Polisomi

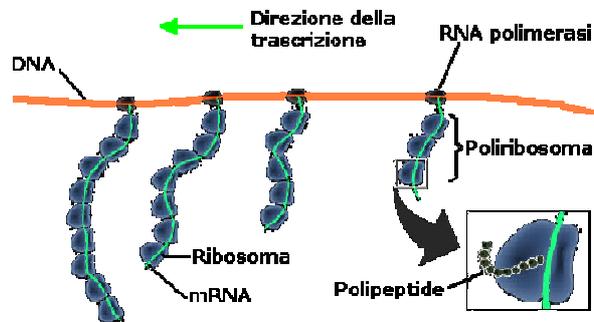
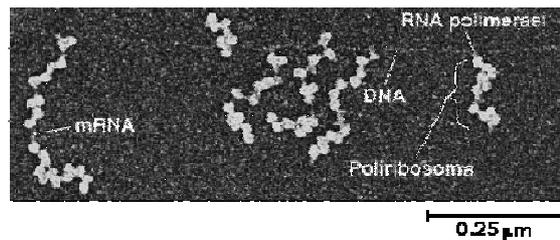


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 47 -

Polisomi nei batteri



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 48 -

Correzione di bozze e controllo di qualità

- Alcune Aminoacil-tRNA Sintetasi hanno siti catalici separati che rilasciano per idrolisi un aminoacido non corretto che viene attivato e trasferito al tRNA.
- Per esempio l'aminoacil-tRNA Sintetasi per isoleucina (IleRS) in una piccola percentuale delle volte attiva l'aminoacido (simile) valina a valina-AMP.
- Dopo che la valina viene trasferita al tRNA^{Ile}, si forma valina-tRNA^{Ile} che viene quindi rimossa per idrolisi ad un sito catalitico separato di IleRS che accoglie la valina ma non la più grande isoleucina.

Modificazione di aminoacidi

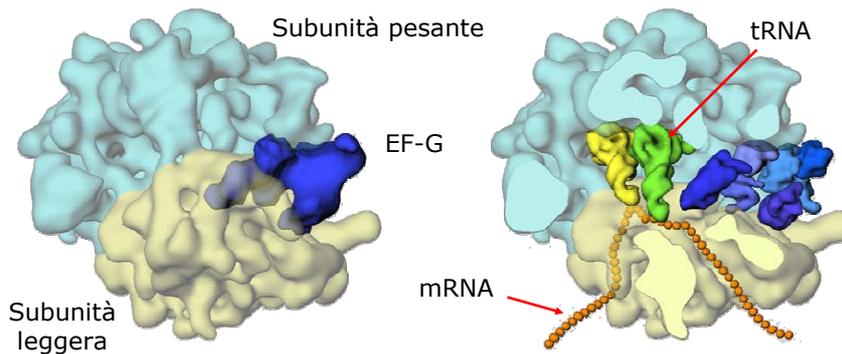
- Alcuni aminoacidi sono modificati dopo essere legati al tRNA.
- Per esempio: **tRNA^{fMet}** viene prima caricata con metionina
- L'enzima Metionil-tRNA Formiltransferasi catalizza la formilazione della metionina usando tetraidrofolato come donatore di formili per ottenere formilmetionina-tRNA^{fMet}.

Struttura dei ribosomi

Ribosoma da:	Ribosoma intero	Subunità leggera	Subunità pesante
<i>E. coli</i>	70S	30S 16S RNA 21 proteine	50S 23S e 5S RNAs 31 proteine
Citoplasma di ratto	80S	40S 18S RNA 33 proteine	60S 28S, 5.8S, e5S RNA 49 proteine

I ribosomi degli eucarioti sono più grandi e complessi di quelli dei procarioti. I ribosomi dei mitocondri e dei cloroplasti sono ancora diversi.

Struttura del ribosoma di *E. coli*

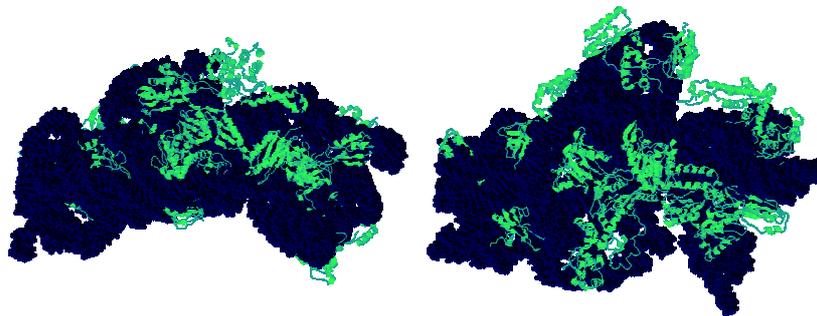


La sezione a destra mostra la posizione del tRNA (siti P, E) e del mRNA.

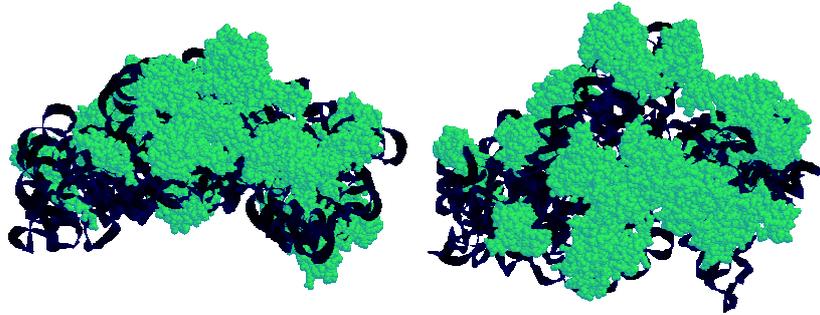
Ribosoma: Subunità leggera

- Nel complesso con il ribosoma il mRNA sfila attraverso un tunnel nella subunità leggera.
- Il sito di legame del tRNA è in una piega della subunità leggera.
- La terminazione 3' del rRNA 16s batterico è coinvolto nel legame del mRNA.
- La subunità leggera è relativamente flessibile e può assumere differenti conformazioni.
 - La subunità 30S del ribosoma batterico subisce un cambiamento conformazionale quando interagisce con il fattore di iniziazione.

Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)



Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)

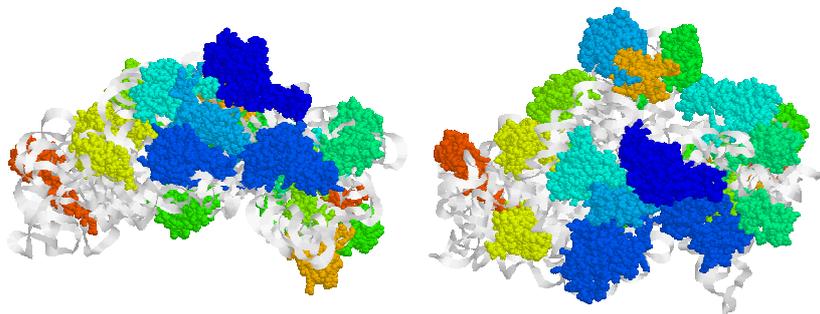


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 55 -

Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)

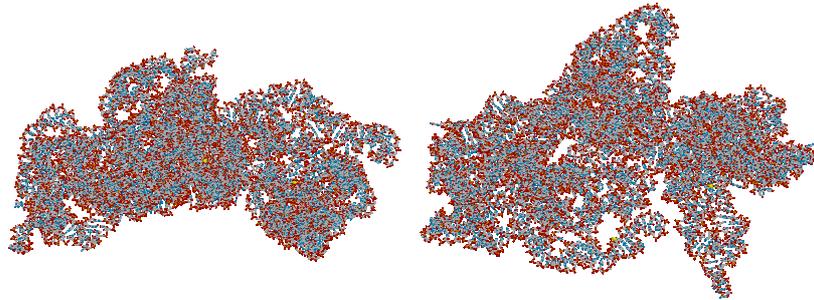


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 56 -

Ribosoma: Subunità leggera (*1J5E*)



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 57 -

Ribosoma: Subunità leggera

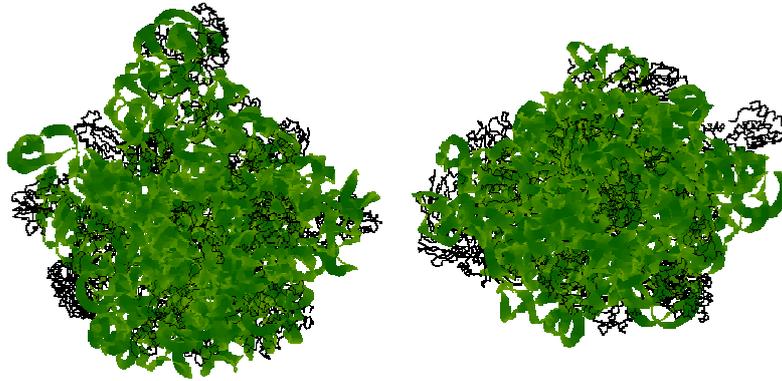
- La forma della subunità 30S è determinata dal rRNA
- Il rRNA è formato da doppie eliche connesse da loop a singolo filamento.
- Le proteine hanno domini globulari ed interagiscono, stabilizzandolo, con il rRNA.

B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 58 -

Ribosoma: Subunità pesante (*1FFK*)

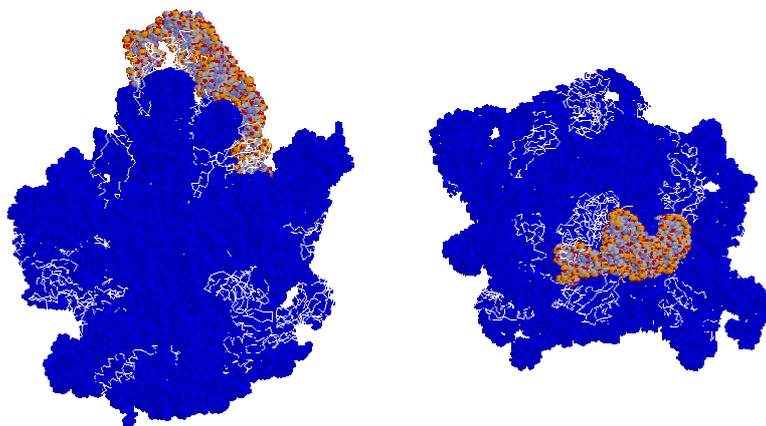


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 59 -

Ribosoma: Subunità pesante (*1FFK*)

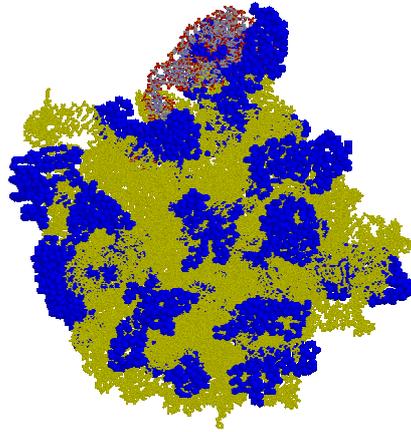


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 60 -

Ribosoma: Subunità pesante (1FFK)



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 61 -

Ribosoma: Subunità pesante

- L'interno della subunità pesante è fatto principalmente di RNA (23s)
- Le proteine sono distribuite nella superficie.
- Alcune proteine hanno una lunga coda che entra nell'interno del complesso.
- Queste code che interagiscono con il RNA, (carico negativamente) sono basiche.
- Il sito attivo per il legame peptidico è formato essenzialmente da proteine.
- L'attività peptidil transferasica è attribuita al rRNA 23s, (ribozima).
- Una adenosina universalmente conservata serve come aggancio per la formazione del legame peptidico.

B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

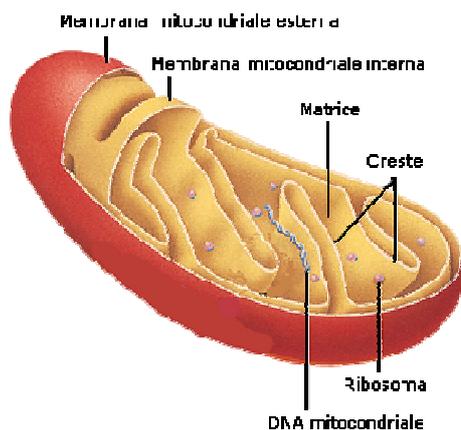
- 62 -

Sintesi proteica

- La sintesi proteica avviene nella cavità all'interno del ribosoma.
- Il polipeptide emerge dal tunnel nella subunità pesante.
- Alcune proteine neosintetizzate passano attraverso un canale nel lume del reticolo endoplasmatico o attraverso la membrana citoplasmatica all'esterno della cellula procariota.

Sintesi proteica mitocondriale

- I mitocondri contengono un proprio DNA e il sistema di sintesi proteica
- Il codice genetico mitocondriale è leggermente differente:
 - L'interazione codon-anticodon è semplificata
 - Lavora con solo 22 tRNA diversi
- Vengono sintetizzate solo un piccolo numero di proteine
 - La maggior parte delle proteine mitocondriali è codificato nel nucleo e trasportato nei mitocondri.



Adattato da: Tortora, GJ & Grabowski SR (2000)
Principles of Anatomy and Physiology (9th Ed).
New York: John Wiley & Sons. P84.

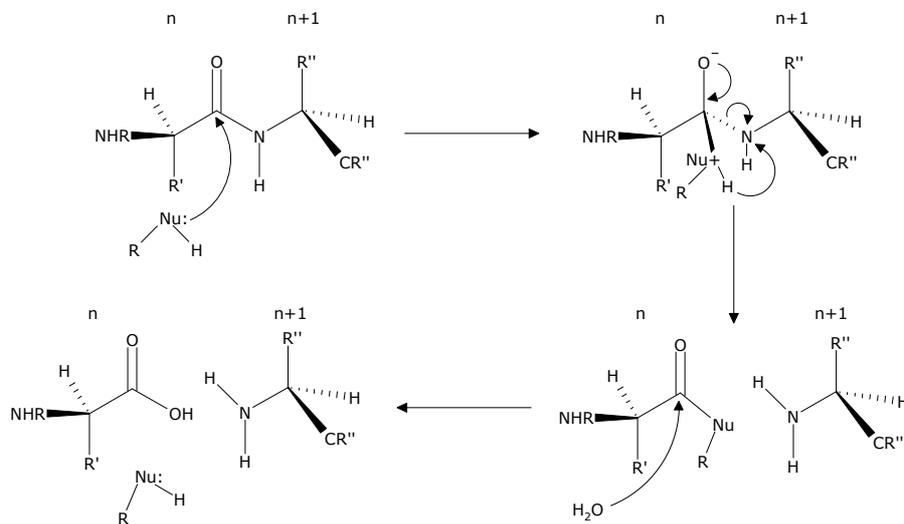
Turn-over delle proteine

- Le proteine cellulari vengono regolarmente degradate e risintetizzate.
- Il tempo di semi-vita di un enzima nel fegato di ratto varia da 10 minuti a una settimana.
- In media il tempo di semi-vita di una proteina è correlato con il residuo N-terminale:
 - Proteine con N-terminale come Met, Ser, Ala, Thr, Val, o Gly hanno un tempo di semi-vita maggiore di 20 ore.
 - Proteine con N-terminale Phe, Leu, Asp, Lys, o Arg hanno un tempo di semi-vita di 3 minuti o meno.

Turn-over delle proteine

- È stato dimostrato che le proteine ricche in Pro (P), Glu (E), Ser (S) and Thr (T), chiamate proteine PEST, sono degradate più rapidamente che le altre proteine.
- La degradazione di specifiche proteine può essere regolata:
 - Negli eucarioti il ciclo cellulare è controllato, alcuni enzimi regolatori del ciclo sono degradati in fasi particolari del ciclo cellulare in risposta a segnali intra o extra-cellulari.

Proteolisi: meccanismo generale



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 67 -

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.

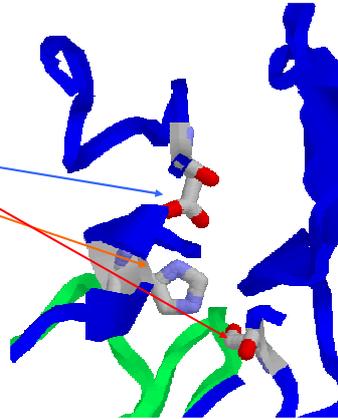
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 68 -

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.

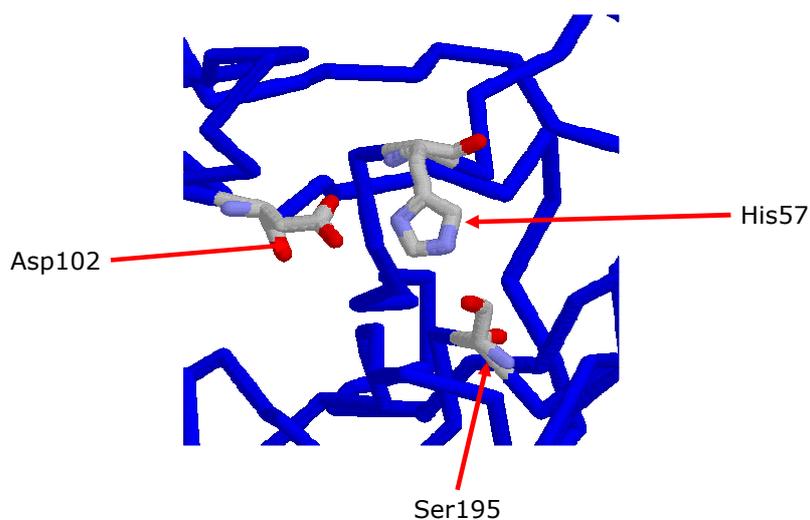


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 69 -

Centro catalitico

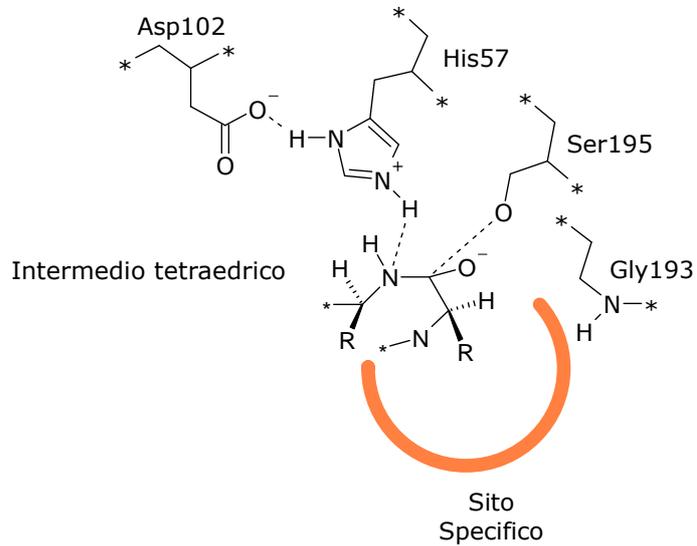


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 70 -

Meccanismo delle proteasi a serina

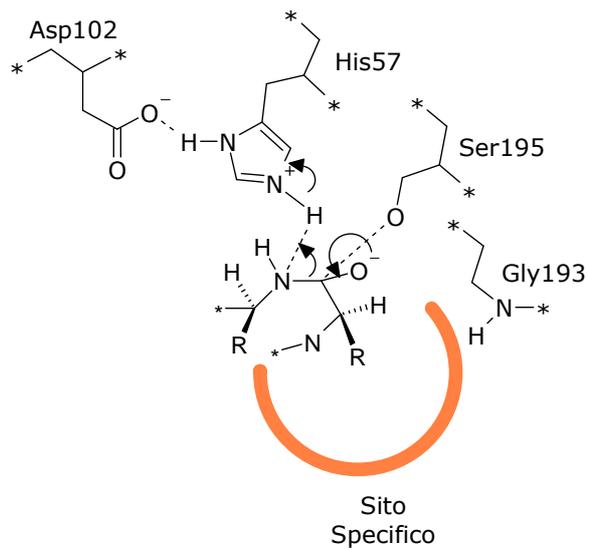


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 73 -

Meccanismo delle proteasi a serina

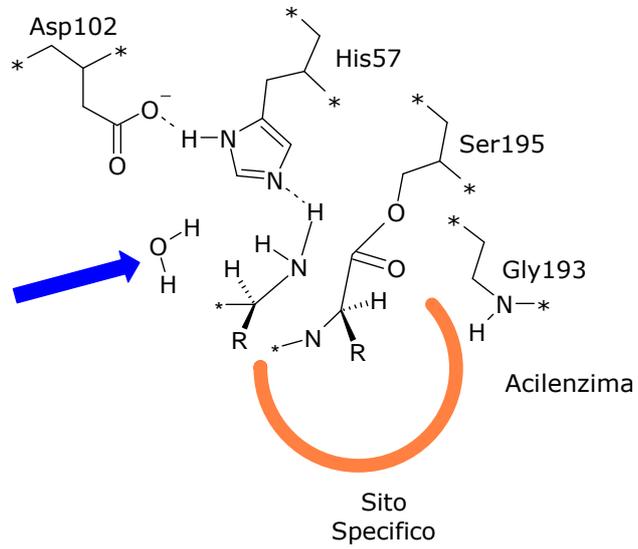


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 74 -

Meccanismo delle proteasi a serina

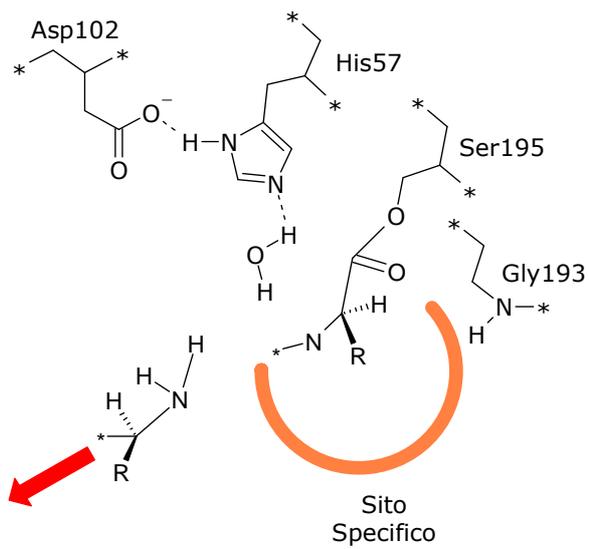


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 75 -

Meccanismo delle proteasi a serina

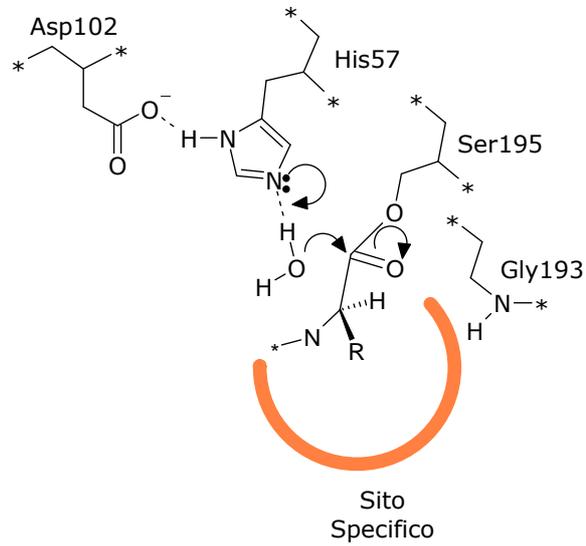


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 76 -

Meccanismo delle proteasi a serina

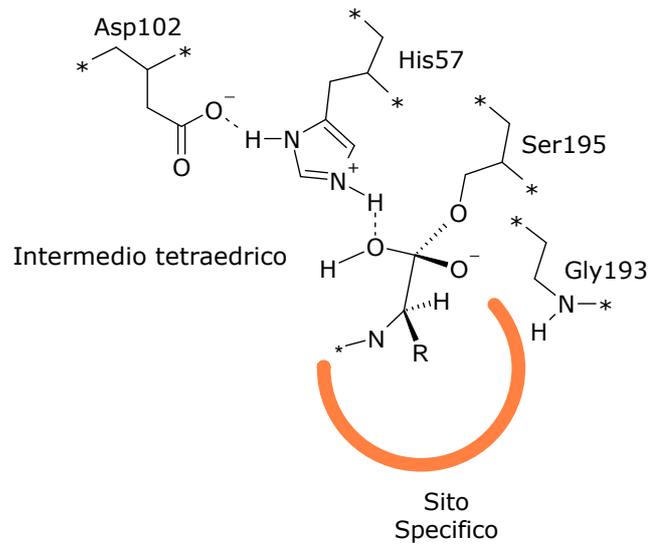


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 77 -

Meccanismo delle proteasi a serina

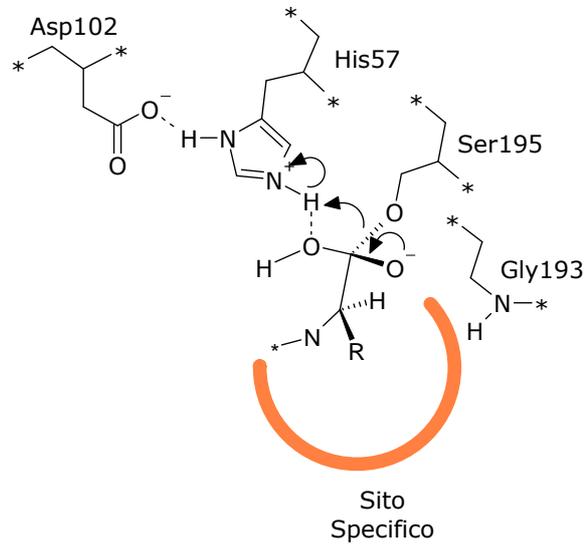


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 78 -

Meccanismo delle proteasi a serina

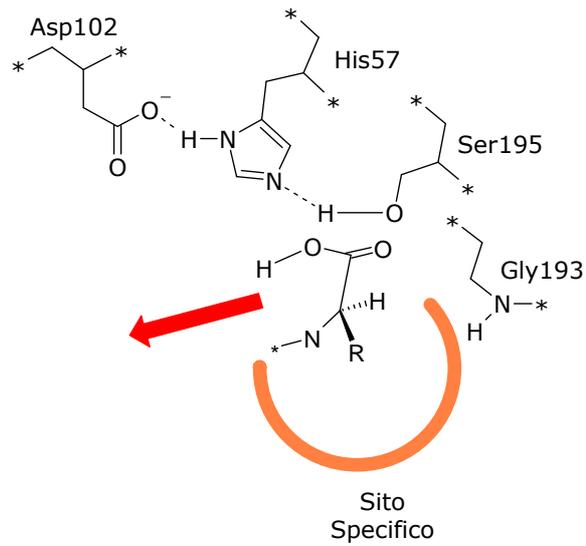


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 79 -

Meccanismo delle proteasi a serina

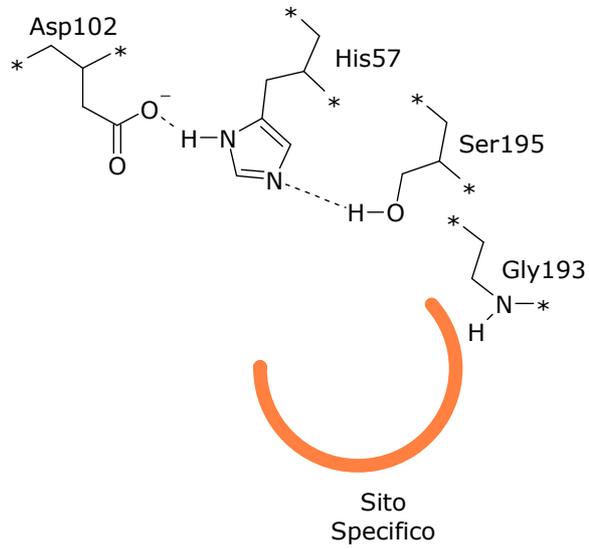


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 80 -

Meccanismo delle proteasi a serina

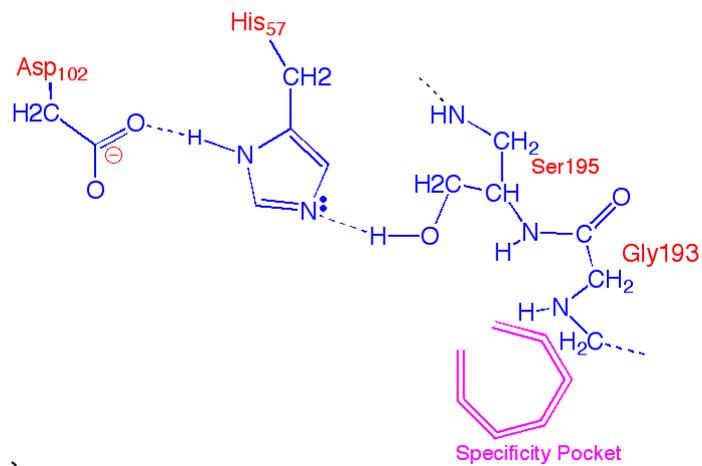


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 81 -

Meccanismo delle proteasi a serina

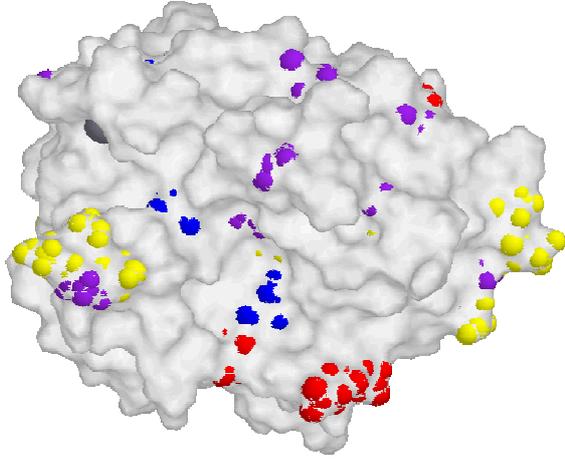


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 82 -

Proteasi a serina (1HAX)

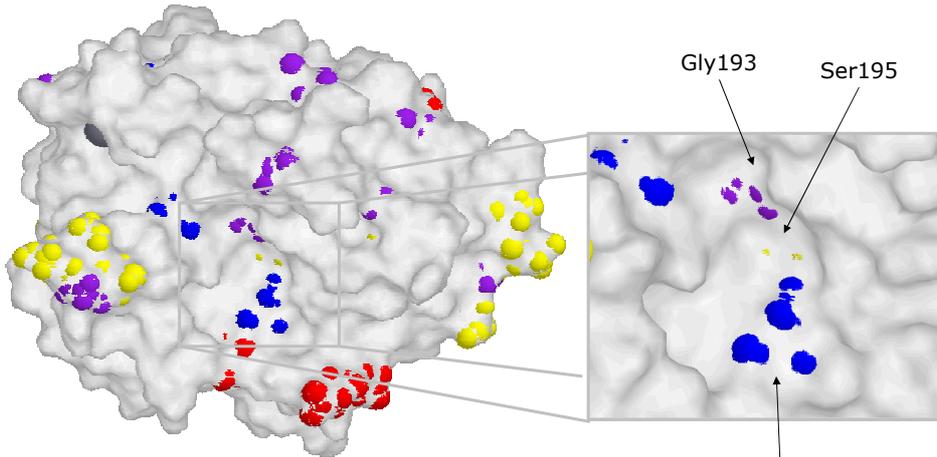


B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 83 -

Proteasi a serina (1HAX)



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

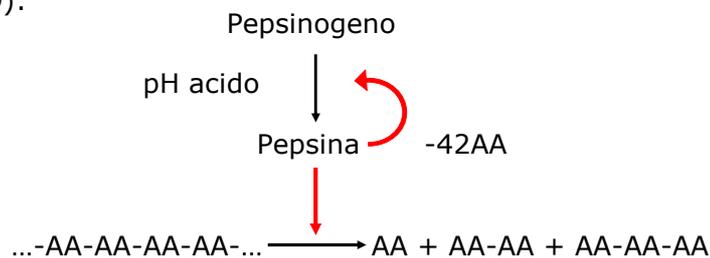
- 84 -

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.

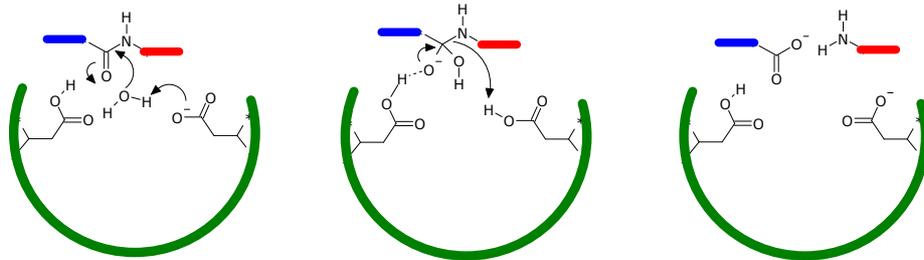
Pepsina

- 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



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

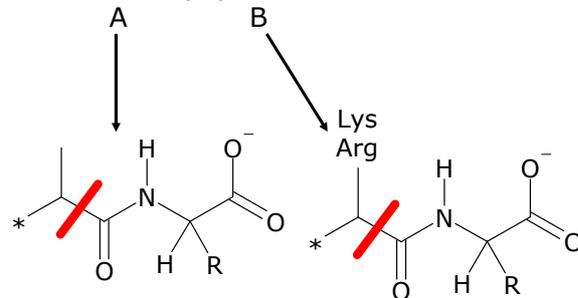
Sintesi e degradazione delle proteine

- 87 -

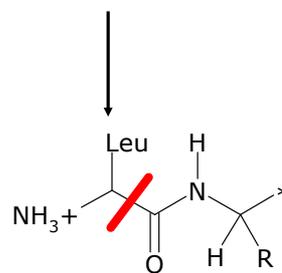
Peptidasi intestinali

Procarbossipeptidasi A e B

Carbossipeptidasi



Leucina aminopetidasi



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

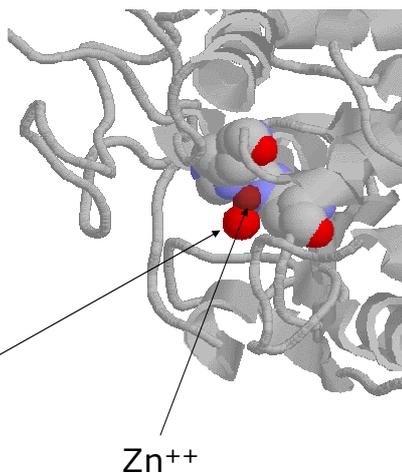
- 88 -

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 proteasi 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.

Attivazione delle proteasi

- Attivazione delle proteasi:
- La maggior parte delle proteasi 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.

Degradazione delle proteine

- Ci sono tre principali sistemi di degradazione delle proteine (nel muscolo):
 - Ubiquitina-proteosoma
 - Le proteine sono marcate per la degradazione da unità di ubiquitina.
 - I proteosoma 20S inattivo viene attivato da una proteina regolatrice diventando proteosoma 26S
 - Il proteosoma 26S rompe la proteina in peptidi
 - I peptidi sono scissi in aminoacidi liberi da altri processi nella cellula
 - Lisosomi
 - Le proteine entrano nei lisosomi via endocitosi
 - La catepsina e le proteinasi degradano i legami peptidici.
 - Calpaina
 - Proteasi attivate da calcio nel citosol della cellula
 - I differenti isomeri sono attivati da differenti concentrazioni di calcio.

Sistema Ubiquitina-proteosoma

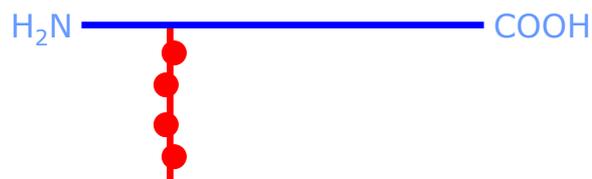
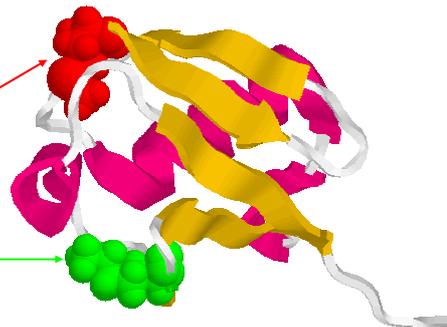
- Ubiquitina:
 - Le proteine sono marcate per la proteolisi selettiva dall'ubiquitina, una proteina ubiquitaria altamente conservata.
 - Si forma un legame isopeptidico tra il carbossiterminale dell'ubiquitina e un gruppo NH_2 di una lisina della proteina da degradare.
 - Il processo è ATP dipendente.
 - Sono coinvolti tre enzimi (E1, E2 e E3).

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Inizialmente il carbossiterminale dell'ubiquitina è legato con un legame tioestere al *Ubiquitin-Activating Enzyme* (E1) attraverso una reazione ATP dipendente
- L'ubiquitina viene quindi trasferita ad un gruppo sulfidrilico del *Ubiquitin-Conjugating Enzyme* (E2).
- Una *Ubiquitin-Protein Ligase* (E3) trasferisce l'ubiquitina attivata al gruppo ϵ -amino di una lisina formando un legame isopeptidico.
- Ci sono diverse ligasi dell'ubiquitina che differiscono per la specificità.

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Più ubiquitine sono legate per formare una catena.
- Il **carbossiterminale** forma un legame con il gruppo ϵ -amino della **Lys48** di una catena adiacente di ubiquitina.



Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Alcune proteine (per esempio le cicline, coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare) presentano una sequenza chiamata *destruction box*, riconosciuta da un dominio del corrispondente E3.
- L'interazione dell'ubiquitina ligasi con il suo bersaglio è regolata, in alcuni casi, dalla fosforilazione della proteina bersaglio e può coinvolgere altre proteine adattatrici.



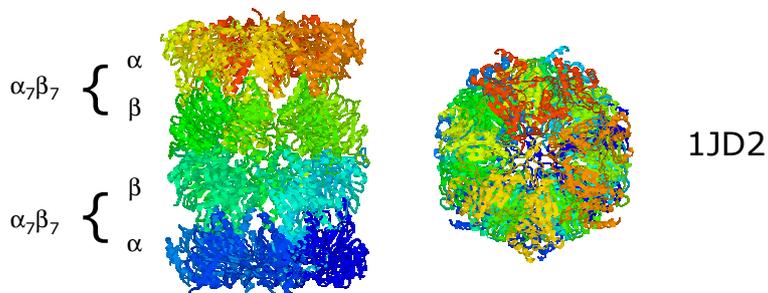
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 97 -

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- La degradazione selettiva di una proteina avviene nel proteosoma. Un complesso proteico presente nella cellula.
- Il *core complex* del proteosoma, ha un coefficiente di sedimentazione di 20S ed è costituito di 14 subunità di due tipi ($\alpha_7\beta_7$).
 - Le sette subunità α formano un anello a struttura cilindrica.
 - Le sette subunità β formano l'anello centrale.



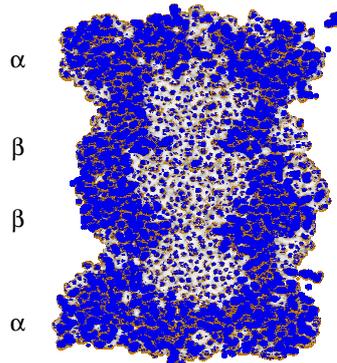
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 98 -

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Il *core complex* del proteosoma racchiude una cavità fatta di tre compartimenti collegati da uno stretto passaggio.
- L'attività proteasica è associata a tre delle subunità β ognuna con differente specificità per il substrato.



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 99 -

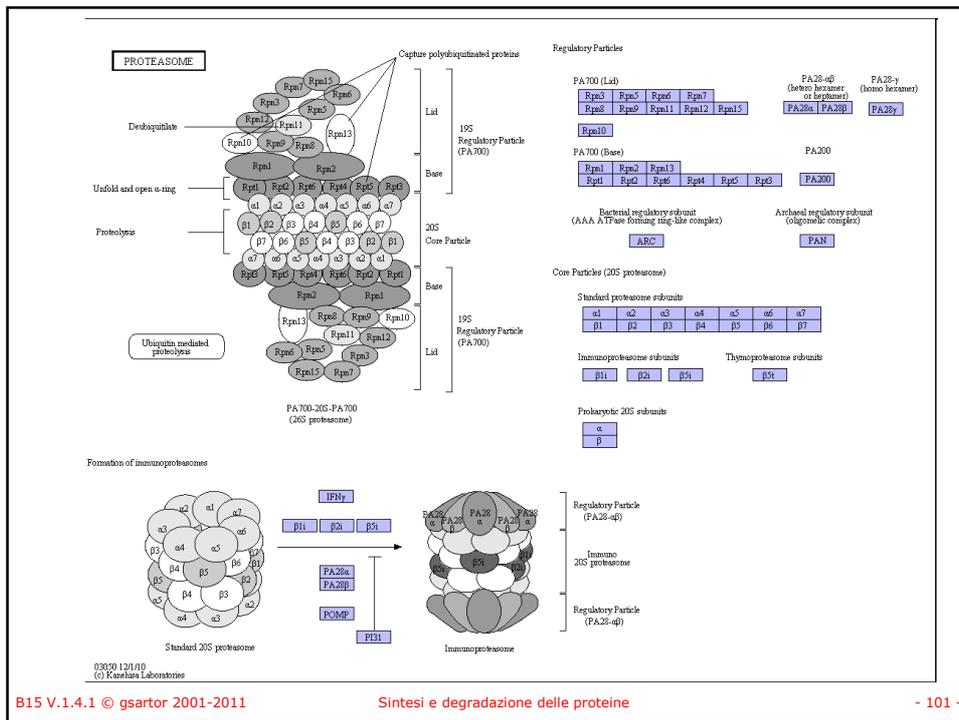
Sistema Ubiquitina-proteosoma

1. Una subunità β ha una attività simile alla chiotripsina con preferenza per Tyr o Phe come AA al carbonile del legame peptidico.
2. Una subunità β ha una attività simile alla tripsina con preferenza per Arg o Lys al carbonile del legame peptidico.
3. Una subunità β ha una attività post-glutamil con preferenza per glutamato o altro residuo acido.
 - Non sono coinvolti residui di cisteina o serina.
 - L'attività idrolasica del proteosoma costituisce una famiglia di proteasi a treonina.

B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 100 -



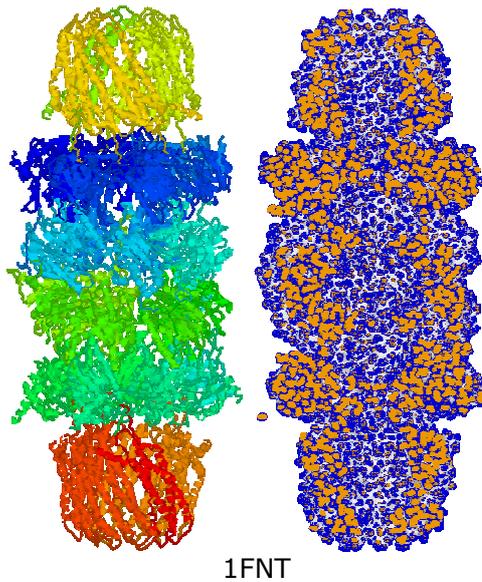
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 101 -

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Nella struttura del *core complex* del proteosoma non ci sono apparenti aperture verso l'esterno.
- Si è postulata l'interazione con un *cap complex* che apra il passaggio verso l'esterno.
- È stato cristallizzato il *core complex* 20S del proteosoma con il *cap complex* 11S.
- L'interazione del *cap complex* 11S altera la conformazione del dominio N-terminale delle subunità α del *core complex* permettendo l'accesso dall'esterno.



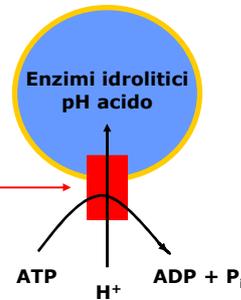
B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 102 -

Lisosomi

- I lisosomi contengono enzimi idrolitici che degradano le proteine e altre sostanze catturate per endocitosi.
- I lisosomi hanno un valore di pH interno basso (acido a causa di un trasporto di protoni pilotato da una **ATPasi**.
- Tutti gli enzimi idrolitici lisosomali hanno un optimum a pH acido.
- Le catepsine (proteasi a cisteina) sono attivate dalla scissione di proenzimi che può essere catalizzata da altri enzimi lisosomali o dall'ambiente acido

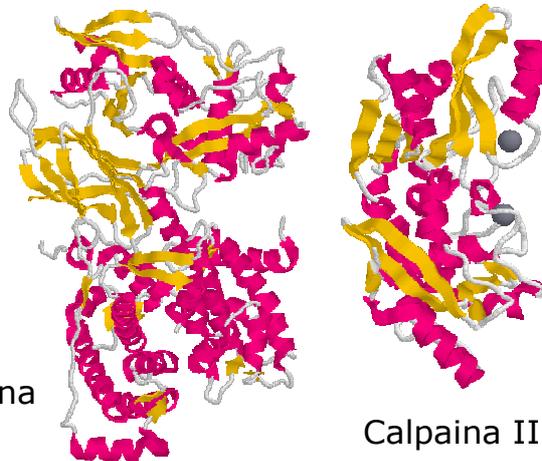


Lisosomi: sistemi di protezione

- Le cistatine inibiscono le catepsine lisosomali. Sono presenti nel citosol e nello spazio extracellulare.
- Le cistatine si legano al sito attivo delle catepsine competendo con il substrato e proteggono la cellula dalle catepsine eventualmente uscite dai lisosomi.
- Autofagia: se una porzione del citoplasma viene incapsulata dai lisosomi si ha la degradazione delle proteine.
- Questo meccanismo non è il meccanismo di elezione per la degradazione selettiva delle proteine.

Calpaine

- Proteasi attivate da calcio nel citosol della cellula
 - I differenti isomeri sono attivati da differenti concentrazioni di calcio.



B15 V.1.4.1 © gsartor 2001-2011

Sintesi e degradazione delle proteine

- 105 -

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>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

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