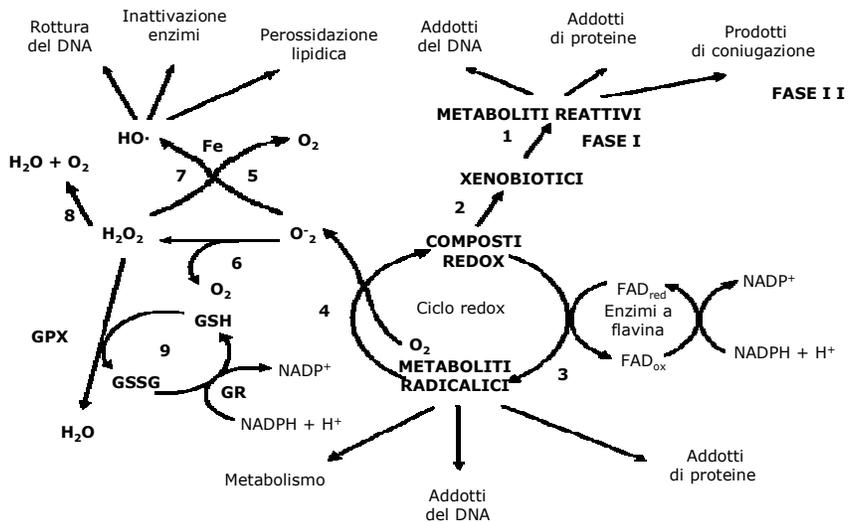




Misure con biomarcatori

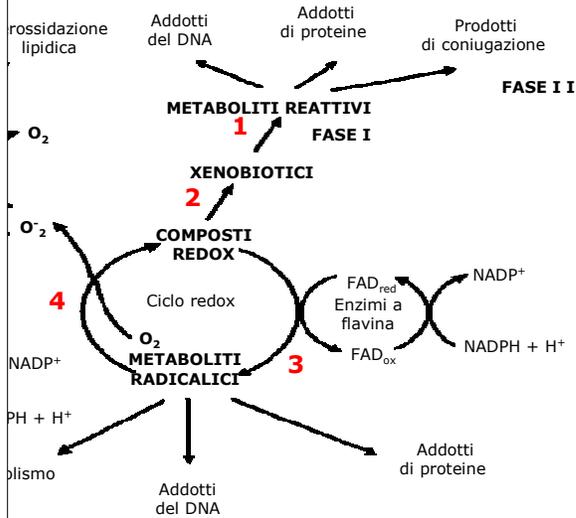
V. Markers enzimatici

Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno

1. Il metabolismo di fase I (incluso l'ossidazione lipidica da Citocromo P450) può formare metaboliti reattivi.
2. Il metabolismo di fase I può formare specie redox che possono subire un ciclo redox.
3. Ciclo redox che comprende flavoproteine.
4. Per completare il ciclo redox si forma l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) e si rigenera il composto di partenza.

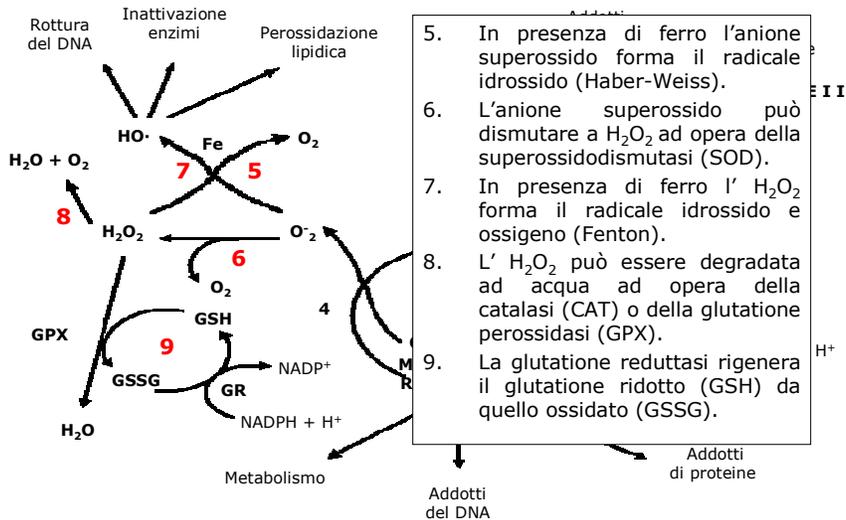


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

3

Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

4

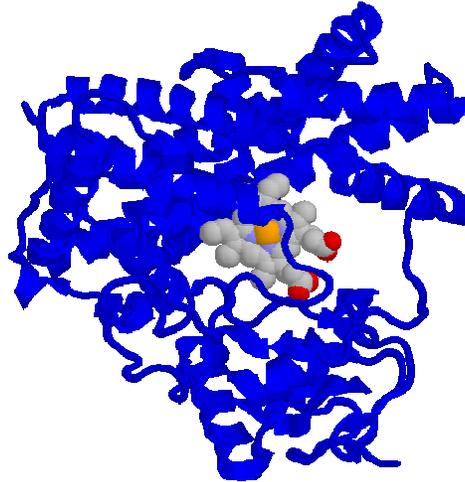
Citocromo P450 (CYP)

- Enzima microsomiale, il più versatile tra gli enzimi di fase I.
- Inducibile.
- Anche conosciuto come ossidasi a funzioni miste (MFO).
- Proteina che contiene un gruppo eme
 - Il complesso formato dal Fe^{2+} e CO ha uno spettro di assorbimento con massimo centrato a 450 nm (447-452) nm.

CYP

- Ossida gli xenobiotici usando il NADPH come cofattore e O_2
- La reazione procede come ciclo catalitico:
 $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \longrightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$
- Non è attivo contro tutti i contaminanti (specialmente gli alogeni)
- In alcuni casi genera prodotti tossici (epossidi)
- L'induzione delle MFO è un sistema di biomarcatura

Struttura del CYP (1PO5)

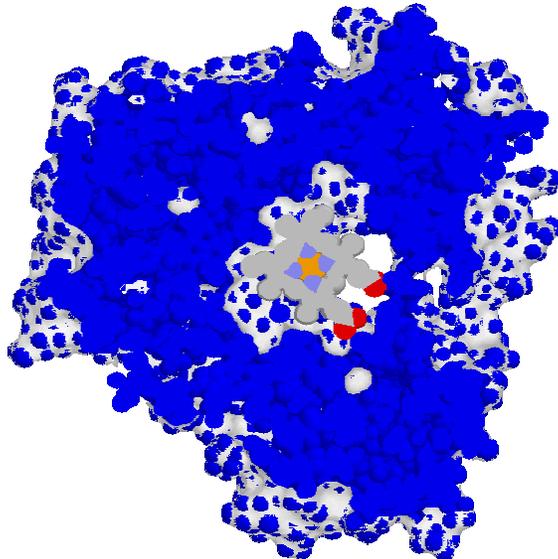


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

7

Struttura del CYP (1PO5)

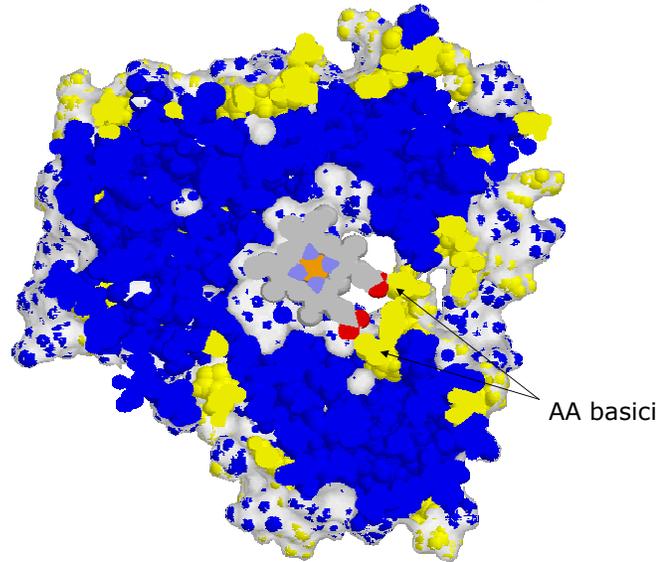


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

8

Struttura del CYP (1PO5)

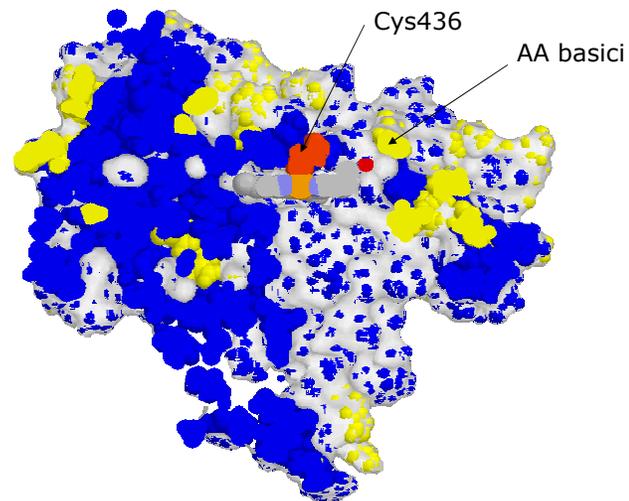


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

9

Struttura del CYP (1PO5)

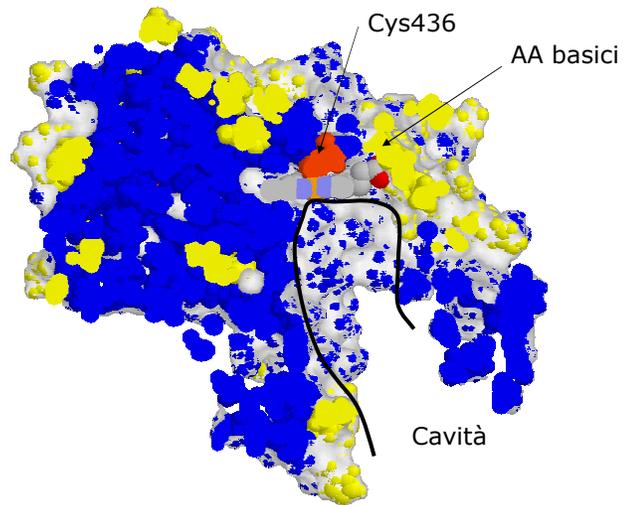


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

10

Struttura del CYP (1PO5)

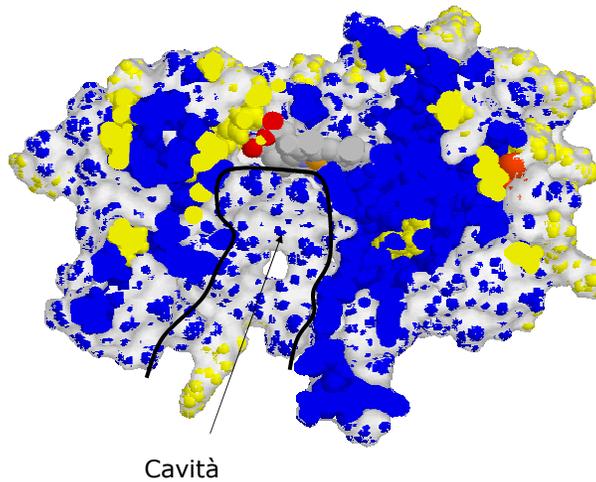


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

11

Struttura del CYP (1PO5)

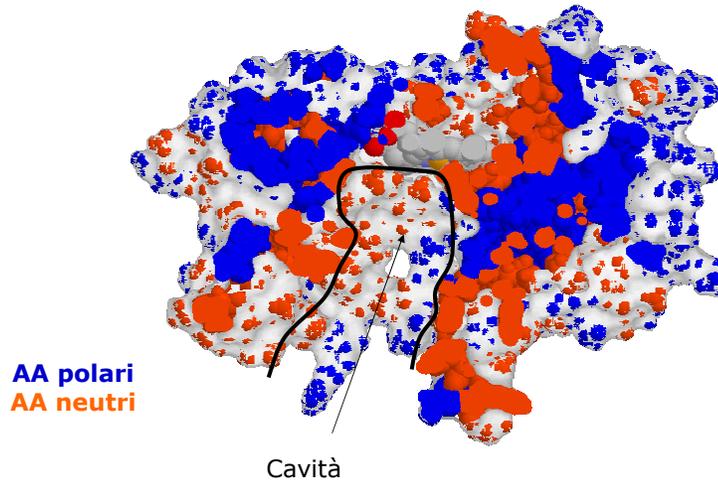


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

12

Struttura del CYP (1PO5)

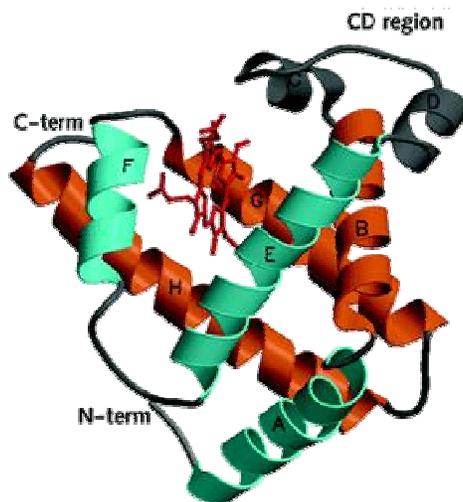


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

13

Struttura del CYP

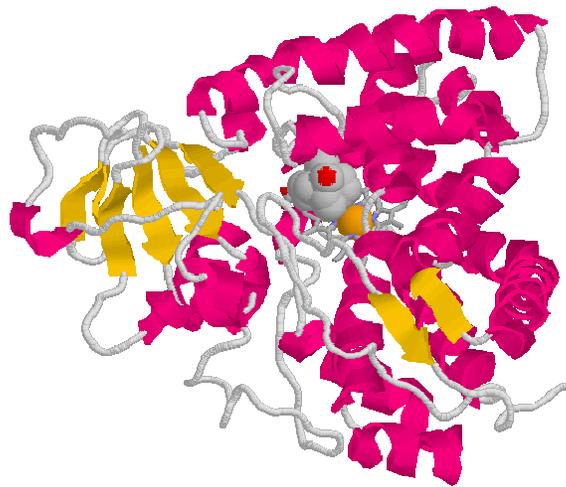


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

14

Struttura del CYP

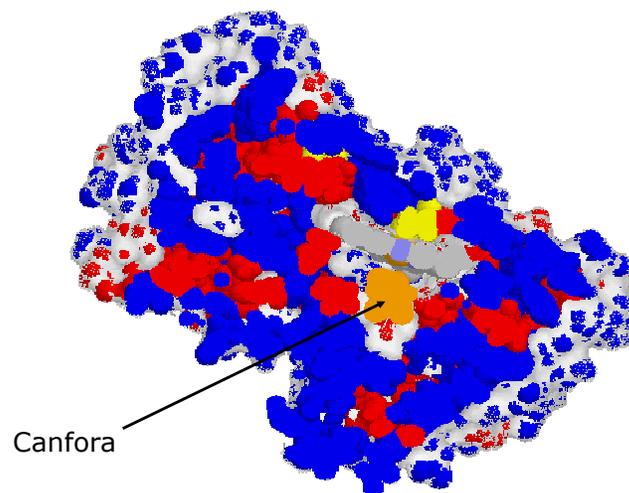


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

15

Struttura del CYP

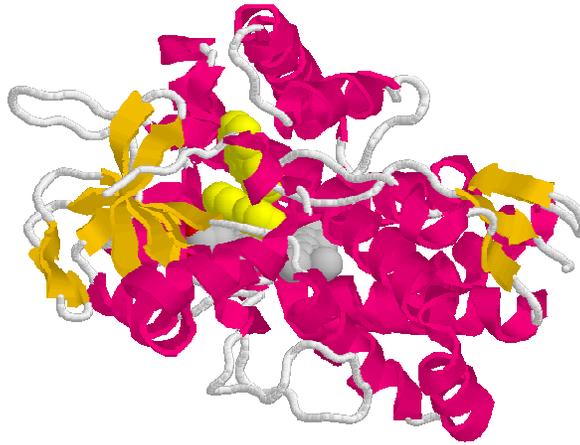


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

16

Struttura del CYP

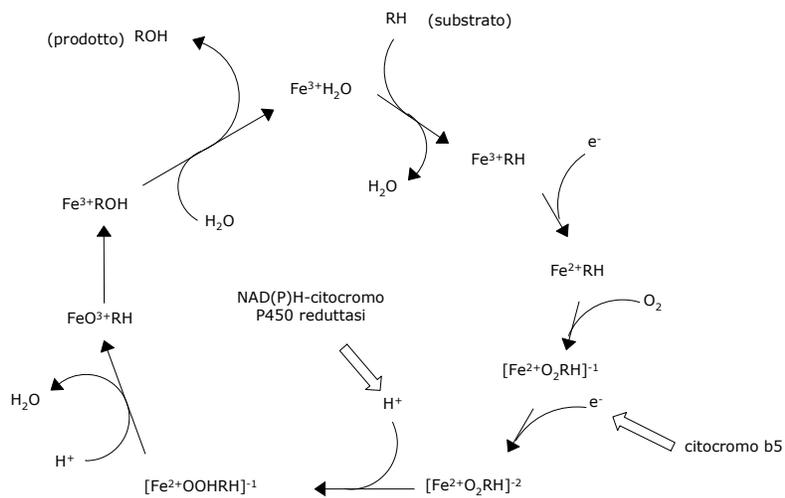


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

17

Ciclo del CYP



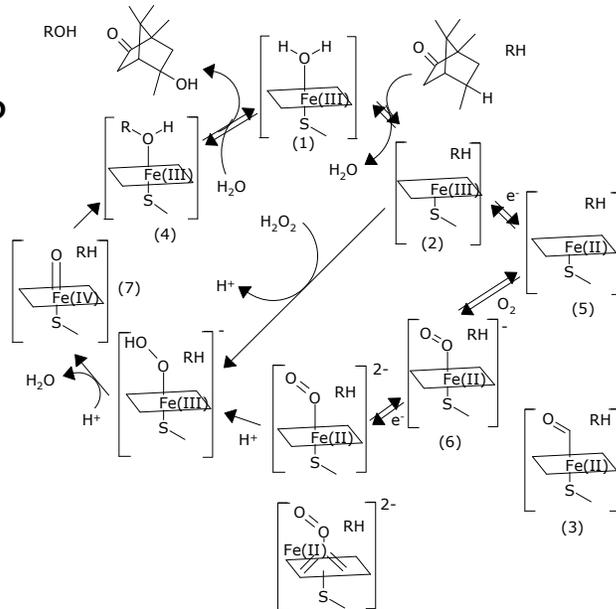
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

18

Meccanismo ciclico del CYP

1. P450 acquo Fe(III)
2. P450 canfora Fe(III)
3. P450 canfora CO Fe(III)
4. P450 prodotto Fe(III)
5. P450 canfora Fe(II)
6. P450 canfora O_2^- Fe(II)
7. P450 ossigeno attivato Fe(IV)



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

19

Meccanismo

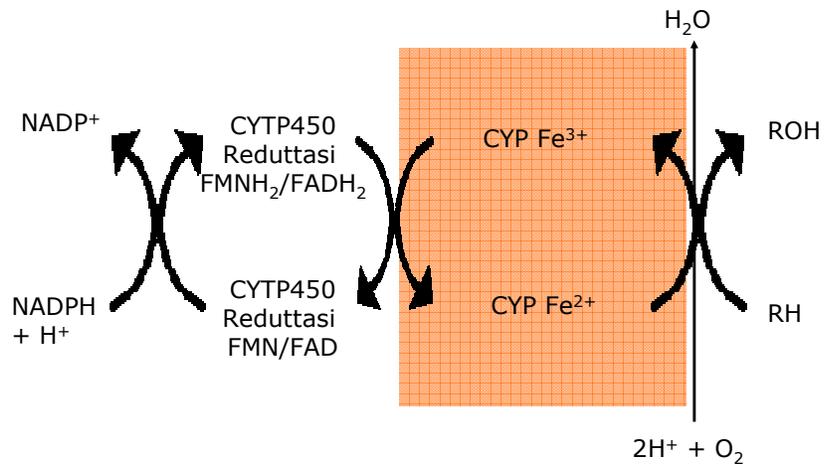
- L'ossigeno è legato non ad angolo retto.
- Il legame dell'ossigeno allontana il ligando (RH) solo dopo che i due atomi di ossigeno si sono ridotti il ligando si riavvicina. Ciò previene la formazione di ROS.
- Gli elettroni per la riduzione dell'ossigeno sono forniti da una proteina Fe-S (P450 batterica o mitocondriale) o da una NADPH-citocromo P450 ossidoreduttasi FAD/FMN dipendente (microsomi).

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

20

Meccanismo generale del CYP



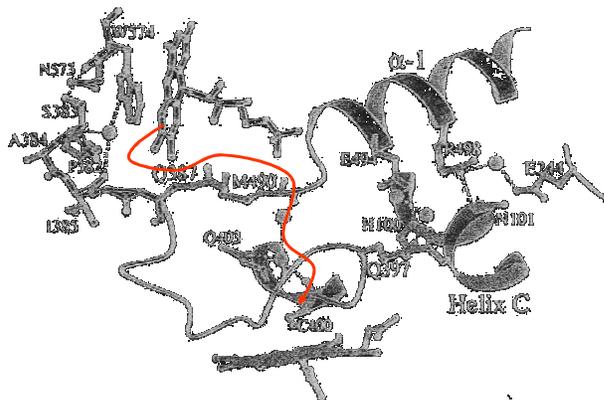
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

21

Meccanismo

- Nel complesso con la NADPH-citocromo P450 ossidoreduttasi l'elettrone si muove attraverso lo scheletro della proteina

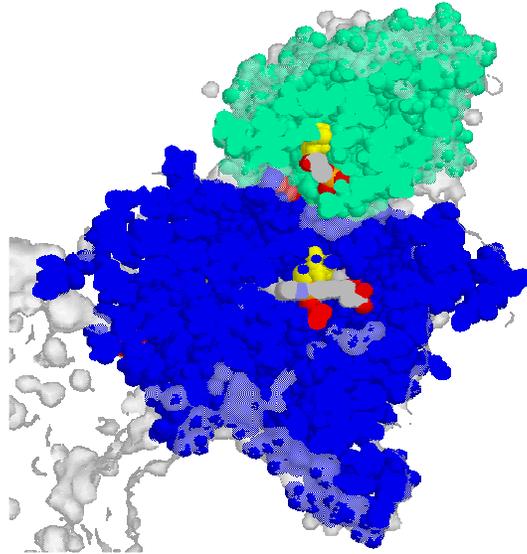


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

22

Struttura del CYP

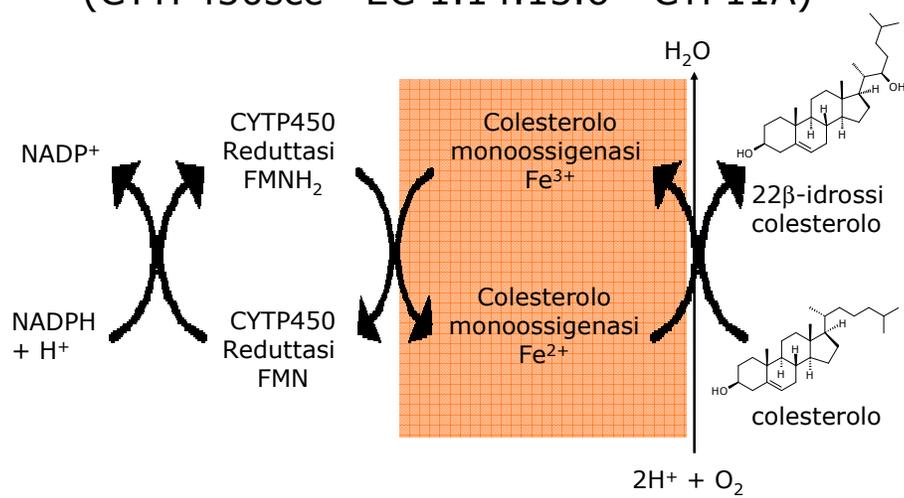


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

23

Colesterolo monoossigenasi (CYTP450scc - EC 1.14.15.6 - CYP11A)



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

24

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

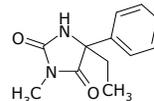
- Idrossilazione di aromatici
- Epossidazione di aromatici
- Idrossilazione di alifatici
- Epossidazione di alcheni
- N-dealchilazione
- O-dealchilazione
- S-sealchilazione
- N-ossidazione
- N-idrossilazione
- S-ossidazione
- Ossidazione di aldeidi
- Aromatizzazione di androgeni
- Ossidazione dell'alotano
- Riduzione dell'alotano
- Ossidazione dell'arginina
- Taglio della catena laterale del colesterolo
- Deidrogenazione
- Dealogenazione
- Azoriduzione
- Deaminazione
- Desolforazione
- Idrolisi di ammidi
- Idrolisi di esteri
- Perossidazione
- Denitrazione

Più almeno altre 20

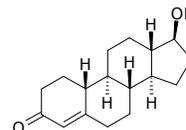
Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Idrossilazione di atomi di carbonio alifatici o aromatici

- Da (S)-mefentoina a 4'-idrossi-(S)-mefentoina (CYP2C19)

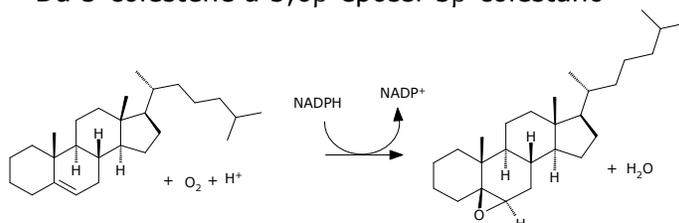


- Da testosterone a 6 α -idrossitestosterone (CYP3A4)



Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Epossidazione di doppi legami
 - Da 5-colestene a 5,6 β -epossi-5 β -colestano



- Ossigenazione di eteroatomi, *N*-idrossilazione
 - Da amine a idrossilamine
 - Da omeprazolo to solfone (CYP3A4)

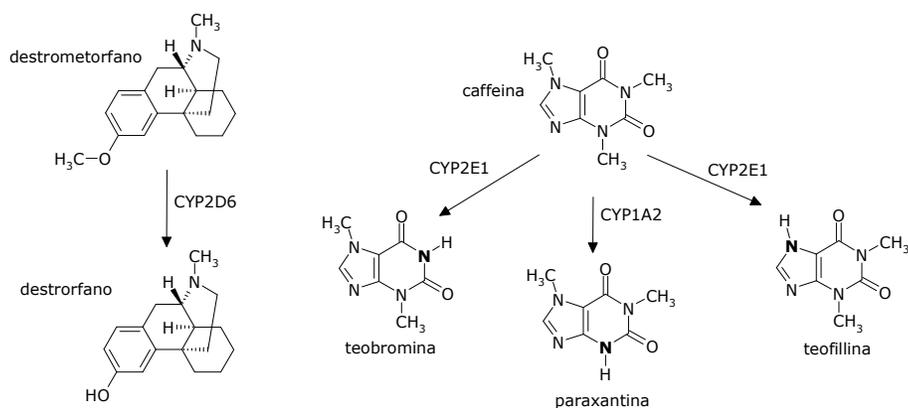
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

27

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione di eteroatomi
 - *O*-dealchilazione (da destrometorfano a destrorfano)
 - *N*-demetilazione della caffeina



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

28

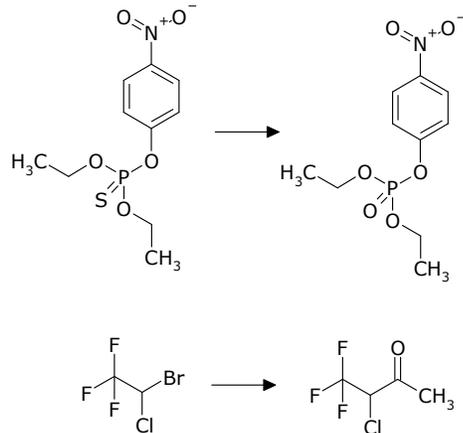
Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Trasferimento di gruppo per via ossidativa

– N, S, X

rimpiazzato con O

- Da parathion a paroxon (da S a O)
- Attivazione dell'alotano a trifluoroacetilcloruro



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

29

Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Scissione di esteri

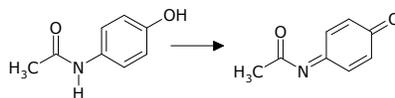
– Scissione del gruppo funzionale con O nel gruppo uscente

- Da loratadina a lorantadina desacetilata (CYP3A4, 2D6)

- Deidrogenazione

– Astrazione di due H con formazione di C=C

- Attivazione di acetaminofene al metabolita epatotossico *N*-acetilbenzochinoneimina



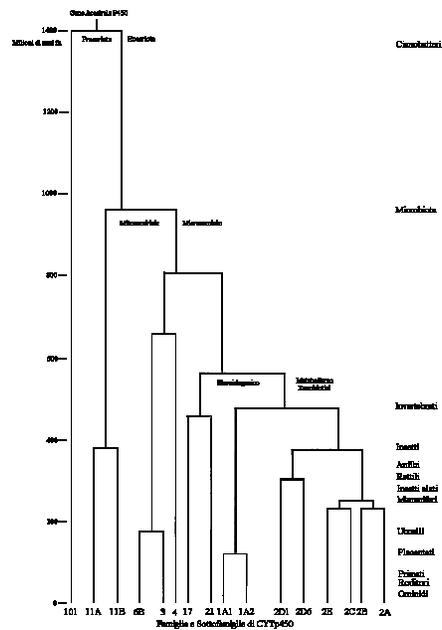
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

30

La famiglia del Citocromo P450

- Ha molti membri:
 - 450 nel riso, 57 nell'uomo, 84 nel topo, 10 nella Chlamodymonas
- Filogenesi



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

31

Induzione

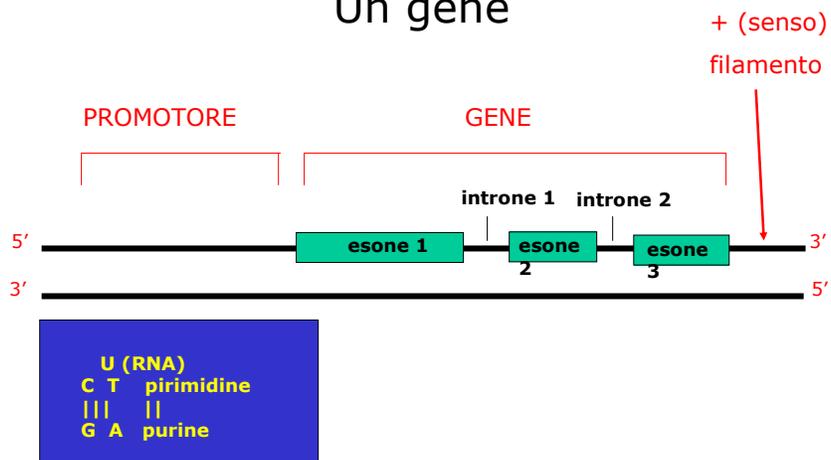
- Meccanismo attraverso il quale uno stimolo esterno alla cellula provoca come risposta la produzione di una o più proteine o, comunque, una attivazione della sintesi proteica:
 - CYP
 - HSP
 - Stress

gs © 2001-2006 ver 3.1

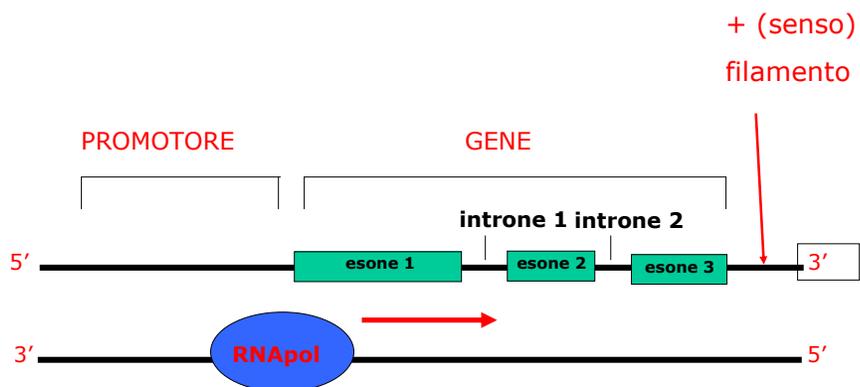
Misure con biomarcatori V

32

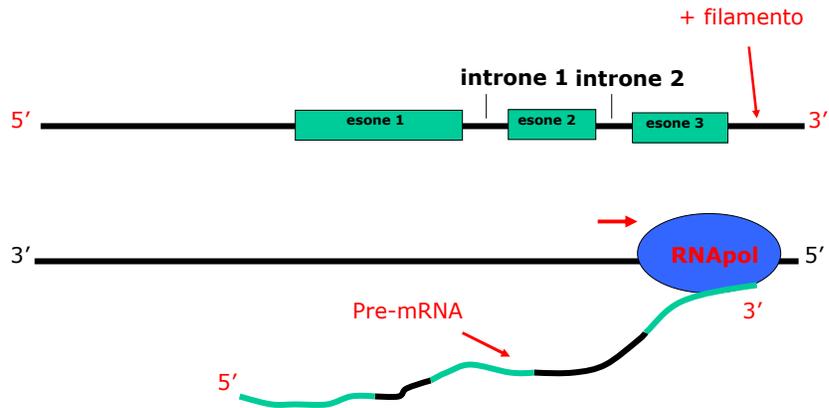
Un gene



Il DNA fa RNA che fa PROTEINA

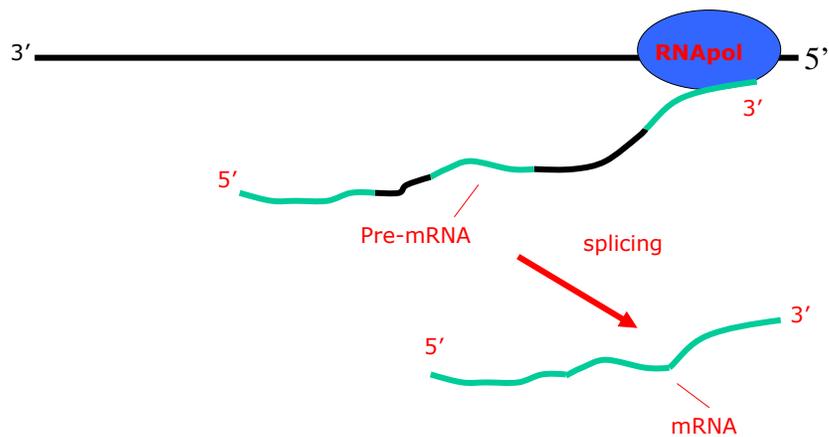


Trascrizione

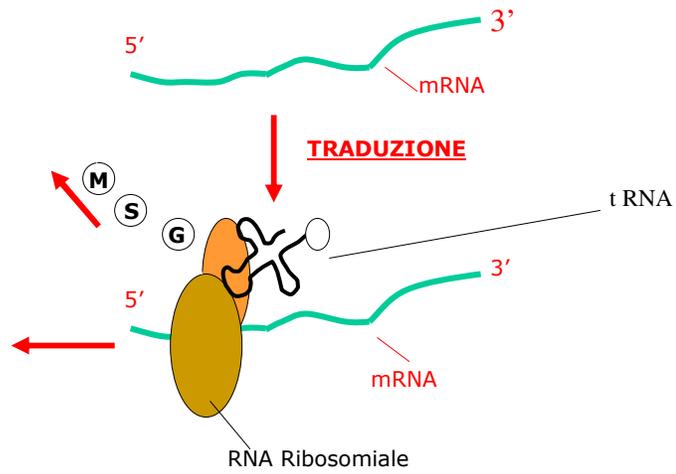


Il filamento complementare dà una COPIA del GENE.

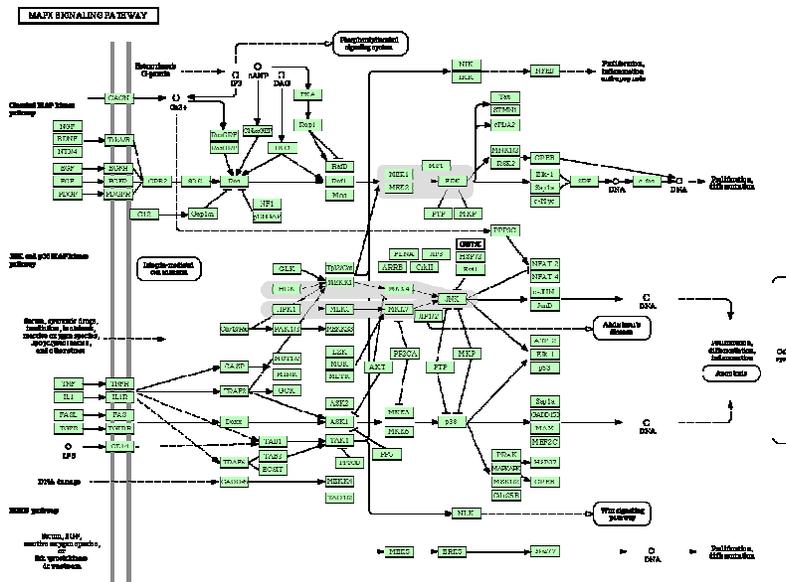
Splicing



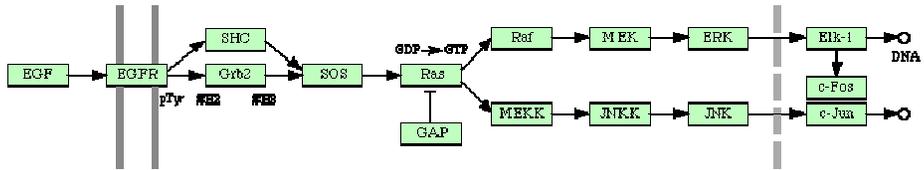
Traduzione



MAPK



MAPK

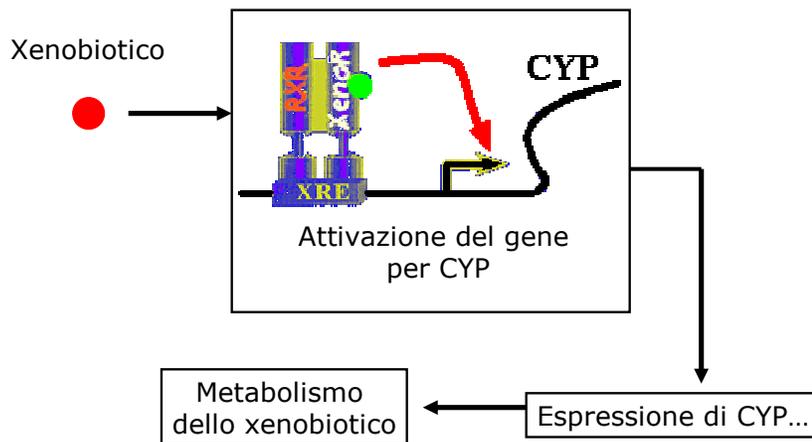


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

39

Il paradigma



gs © 2001-2006 ver 3.1

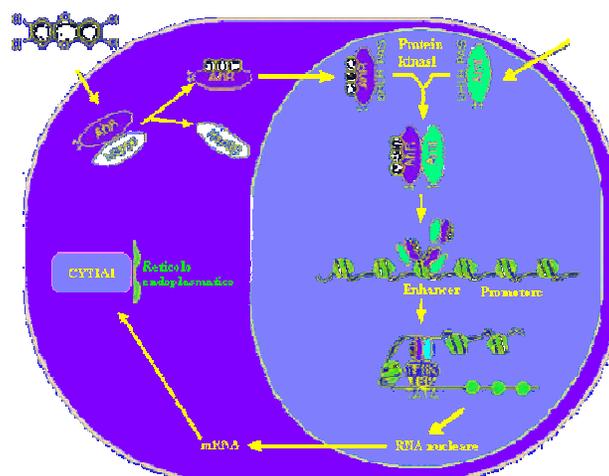
Misure con biomarcatori V

40

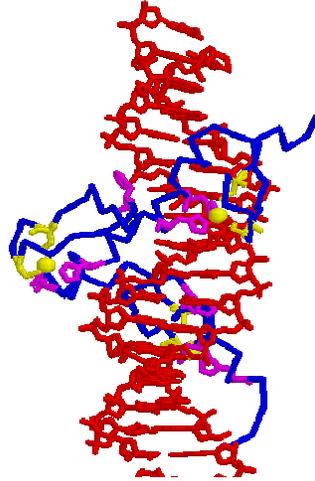
CYP1A1 e recettori per idrocarburi aromatici

- CYP1A1 non è espressa costitutivamente nel fegato di ratto.
- CYP1A1 è indotta da idrocarburi policiclici
 - Benzo(α)pirene, TCDD (diossine).
 - Farmaci (omeprazolo, inibitore delle pompe protoniche).
- Meccanismo – up-regulation trascrizionale.

Induzione CYP1



Dominio zinc-fingers

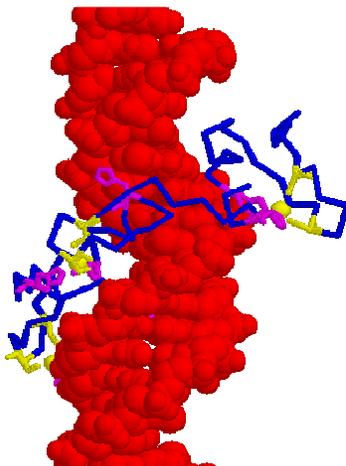


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

45

Dominio zinc-fingers



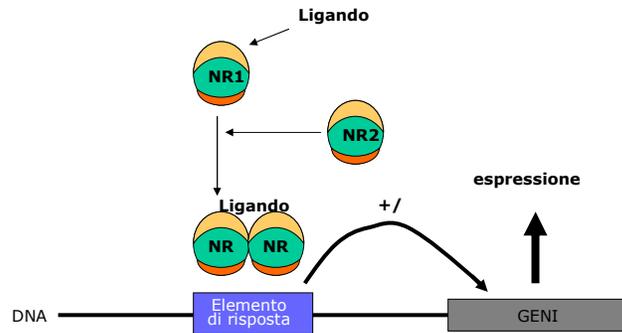
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

46

Recettori nucleari

I recettori nucleari sono fattori di trascrizione attivati dai ligandi



Recettori nucleari

- Recettori per gli steroidi
 - GR: recettore per i glucocorticoidi
 - MR: recettore per i mineralocorticoidi
 - AR: recettore per gli androgeni
 - ER: recettore per gli estrogeni
- Recettori per altri ligandi
 - RXR: recettore per X retinoide
 - RAR: recettore per l'acido retinoico
 - TR: recettore per l'ormone tiroideo
 - VDR: recettore per la vitamina D
- ?
 - PXR: recettore per X pregnano
 - CAR: recettore costitutivo attivato

Recettori nucleari

- I recettori nucleari si legano ad uno specifico elemento di risposta
- Generalmente 2 mezzi siti di legame correlati con AGGTCA
- Sono i recettori per gli ormoni steroidei (GR, MR ecc...)
- Si lega come omodimero
- Sequenza palindromica imperfetta
- Separati da 3bp

AGGACANNTGTACC

TCCTGTNNACATGG

Heat Shock Proteins

Classificazione delle HSP

Famiglia	Nome	Altri nomi	Localizzazione subcellulare	Livello di espressione	
				Normale	Stress
hsp 100	hsp 110		Nucleo/nucleolo	+	++
	hsp 104		citosol	+	+++
	grp 100		ER/Golgi	+	++
hsp 90	hsp 90	hsp 82, HtpG	Citosol/nucleo	++	+++
	grp 94	Erp90	ER	+	++
hsp 70	hsp 70	hsp 72, DnaK	Citosol/nucleo	-	+++
	hsc 70	hsp 73	Citosol/nucleo	++	?
	grp 78	BIP, Kar2p	ER	++	+++
	mtp 70	Ssc1p, grp 75	Mitocondrio	+	++
hsp 60	hsp60	GroEL, cpn60	Citosol	+	+
	hsp 58	HuChA 60	Mitocondrio	+	+
hsp 40	hsp 40	DnaJ, hdj-1	Citosol/nucleo	+	++
					++
hsp 30	hsp 32	eme-ossigenasi	Citosol	+	++
	hsp 35	G3PDH	Citosol	+	++
Piccole hsp	hsp 27	α -cristallino	Citosol/nucleo	+	?
	hsp42p			+	++
	hsp 10	GroES, cpn-10	Mitocondrio	+	++
Ubiquitina	Ubiquitina		Citosol	+	++

Ruolo costitutivo delle HSP

- Le HSP presenti costitutivamente nelle cellule hanno un ruolo fondamentale nei processi fisiologici di ripiegamento, trasferimento e degradazione delle proteine.

Ruolo citoprotettivo delle HSP

- Il ruolo delle HSP indotte in cellule sottoposte ad insulto è quello di minimizzare i danni arrecati ai processi di:
 - sintesi,
 - traslocazione
 - ripiegamento
- di proteine cellulari.

Risposta heat shock

- La risposta heat shock è un evento comune a tutti gli organismi, caratterizzato dall'aumentata sintesi di HSP in risposta ad un numero molto elevato di stimoli:
 - aumento di temperatura,
 - ipossia,
 - shock osmotico,
 - metalli pesanti, ischemia,
 - invecchiamento
 - ...

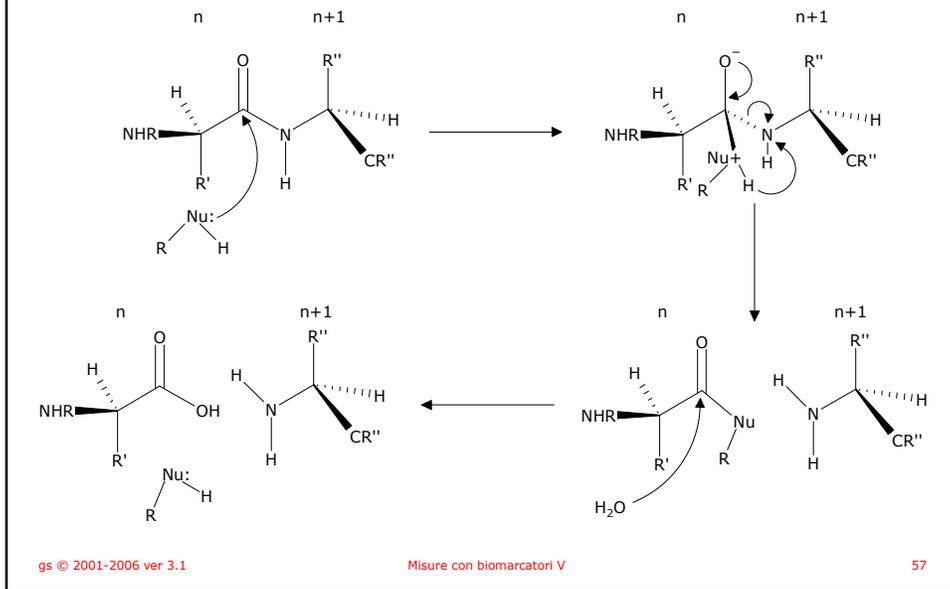
Turn-over delle proteine

- 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

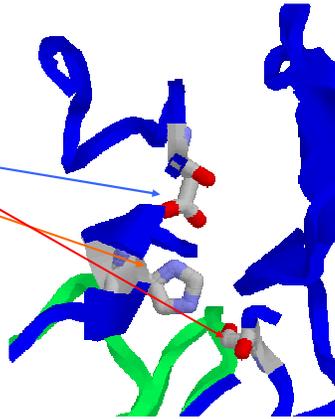


Enzimi proteolici

- **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.



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 H₂O 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.

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.

Enzimi proteolici: proteasi a cisteina

- Appartengono alla classe delle proteasi a Cisteine:
 - La papaina (della *Carica Papaya*).
 - Alcune proteasi lisosomiali (cathepsine).
 - 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.
 - Il 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

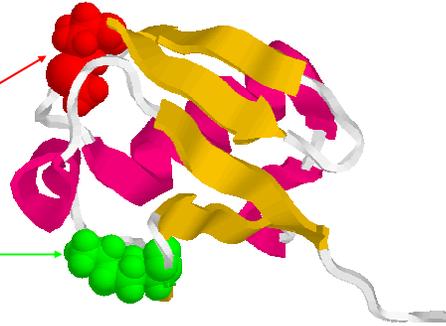
- Ubiquitina:
 - Le proteine sono marcate per la proteolisi selettiva dall'ubiquitina, una proteina ubiquitaria altamente conservata.
 - Si forma un legame isopeptidico tra il carbossiterminale dell'ubiquitina e un gruppo NH₂ di una lisina della proteina da degradare.
 - Il processo è ATP dipendente.
 - 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.



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

67

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.



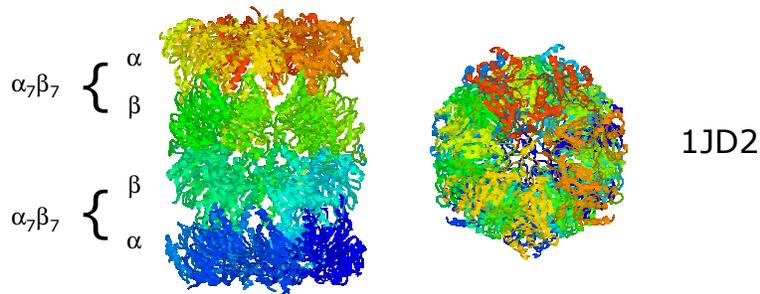
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

68

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.



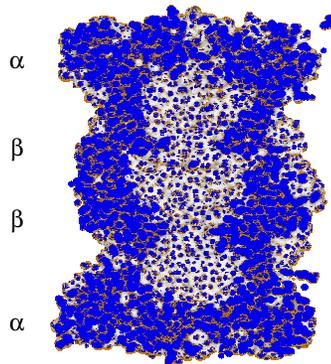
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

69

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.



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

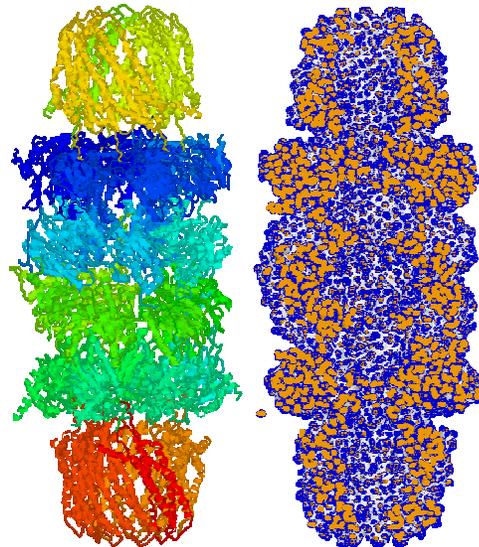
70

Sistema Ubiquitina-proteosoma

1. Una subunità β ha una attività simile alla chimotripsina 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.

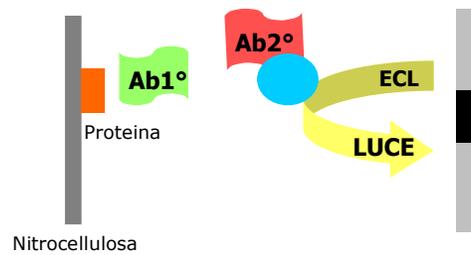
Sistema Ubiquitina-proteosoma

- 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.



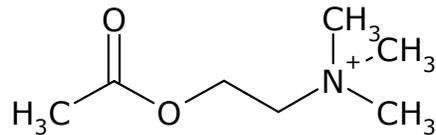
Determinazione

- Western blotting:
 - anticorpo specifico
 - sviluppo di chemiluminescenza



Acetilcolinesterasi

Acetilcolina

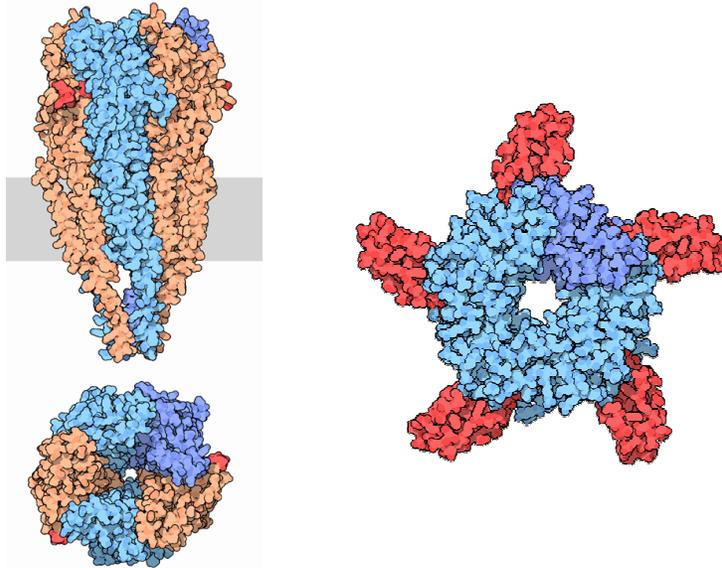


- È stato il primo neurotrasmettitore ad essere identificato
 - da Otto Loewi nel 1921, attraverso la stimolazione del nervo vago nelle rane che, era noto, causa il rallentamento del battito cardiaco.
 - Raccolse il fluido circostante il cuore stimolato e lo applicò ad un cuore non stimolato osservandone il rallentamento.
 - Attribuí l'effetto ad un prodotto chimico che in seguito identificò come acetilcolina.

Recettori per l'acetilcolina

- Due tipi:
- Recettori Nicotinici
 - Canali ionici,
 - Rispondono rapidamente ed hanno effetto eccitatorio
 - Bloccati dal curaro
- Recettori Muscarinici
 - Accoppiati alla proteina G
 - Rispondono lentamente
 - Possono essere sia eccitatori che inibitori
 - Bloccati da atropina e scopolamina.

Il recettore nicotinic per l'acetilcolina



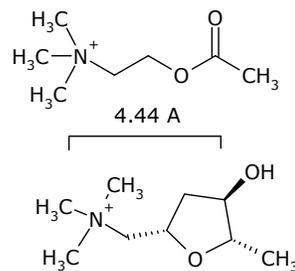
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

77

Recettori muscarinici

- Acetilcolina
- Muscarina



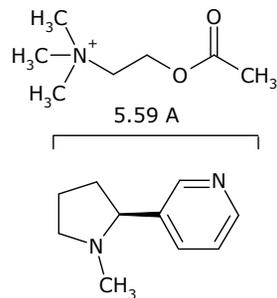
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

78

Recettori nicotinici

- Acetilcolina
- Nicotina

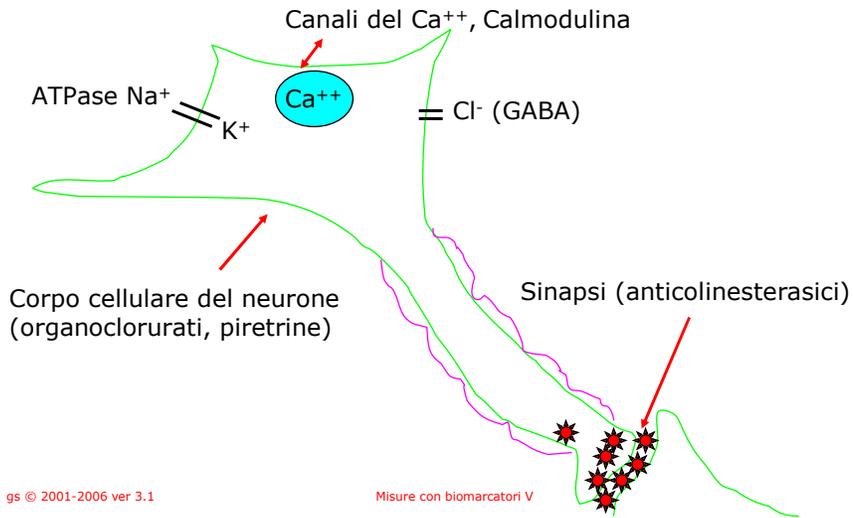


Acetilcolinesterasi (AChE) EC 3.1.1.7

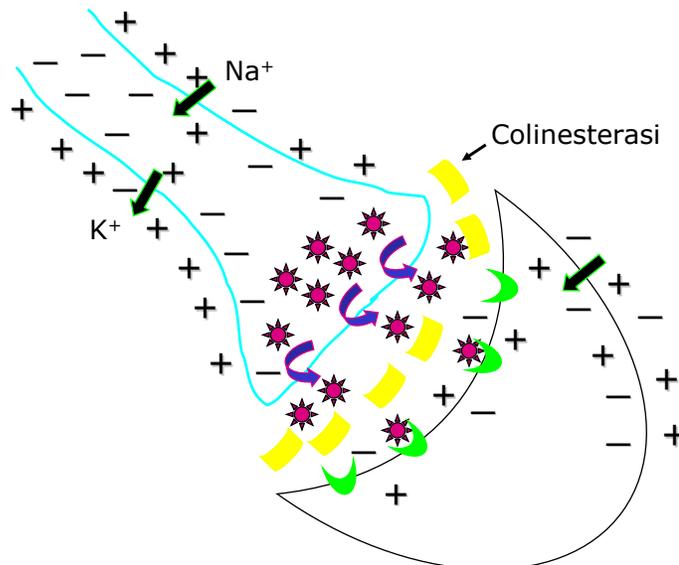
- È l'enzima che si occupa di degradare l'acetilcolina per evitare una sovrastimolazione.



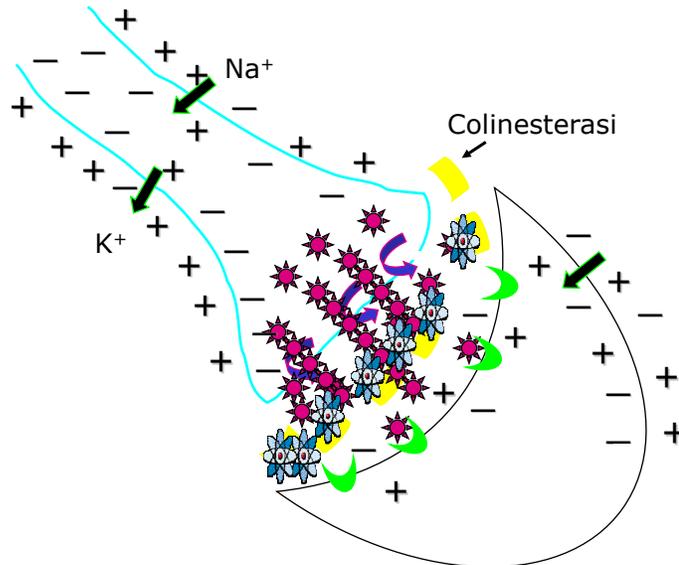
Siti di azione degli insetticidi neurotossici



Trasmissione del segnale nervoso



Trasmissione del segnale nervoso

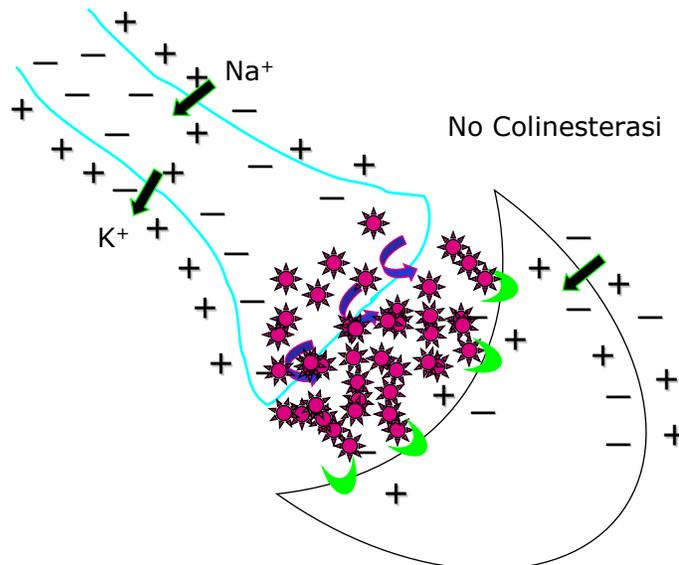


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

83

Trasmissione del segnale nervoso

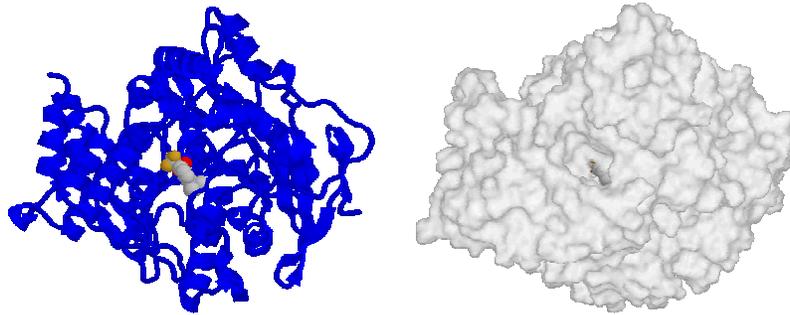


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

84

Acetilcolinesterasi

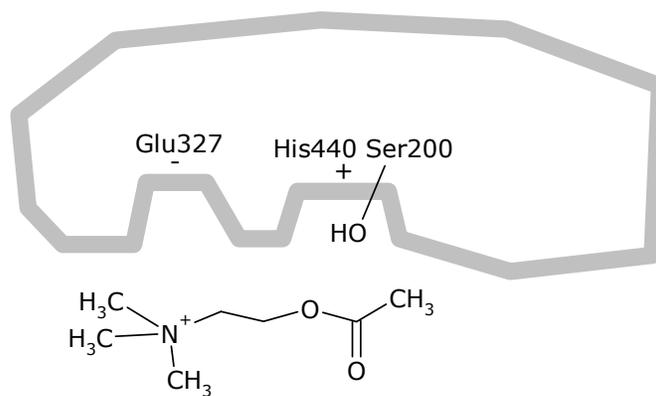


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

85

Acetilcolina e acetilcolinestrasi

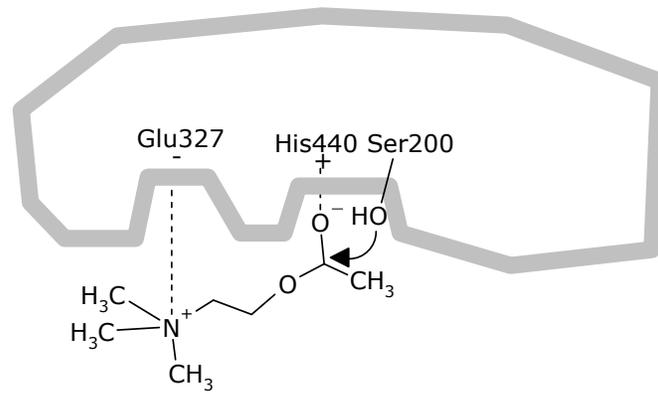


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

86

Acetilcolina e acetilcolinestrase

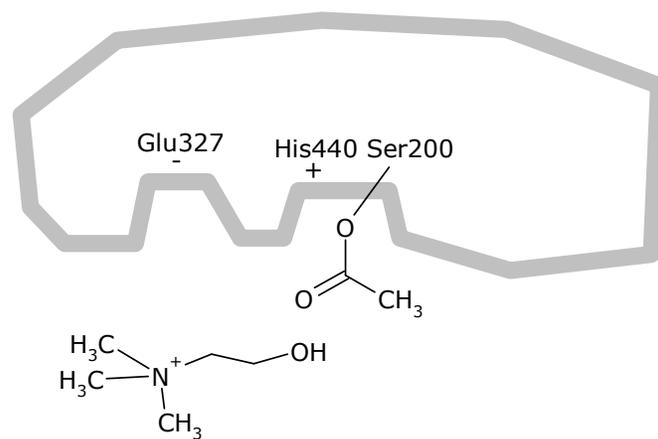


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

87

Colina e acetilcolinestrase acetilata

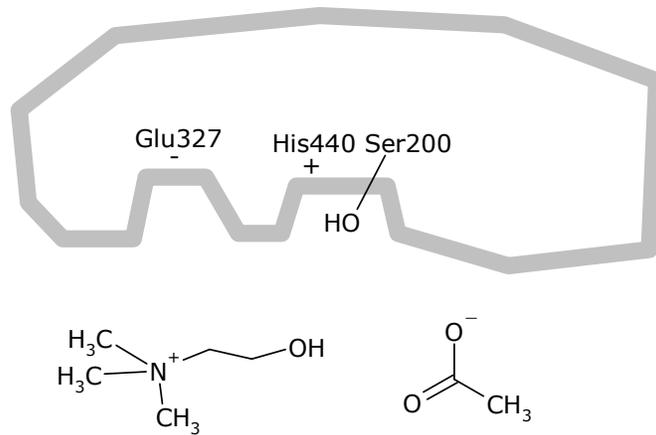


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

88

Colina e acetilcolinestrasi acetilata

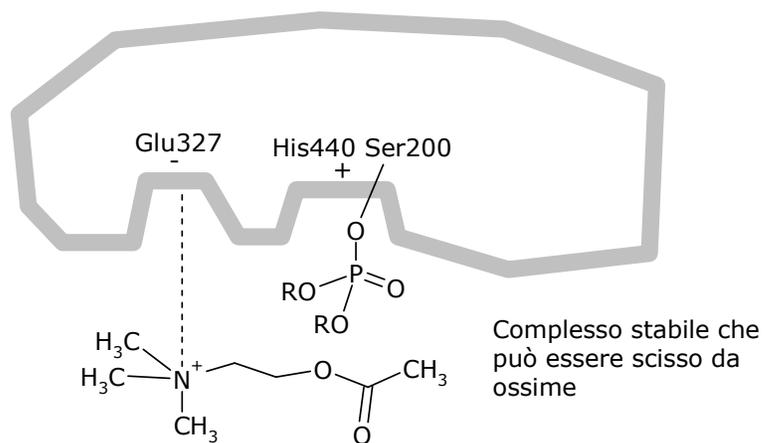


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

89

Acetilcolinestrasi fosforilata

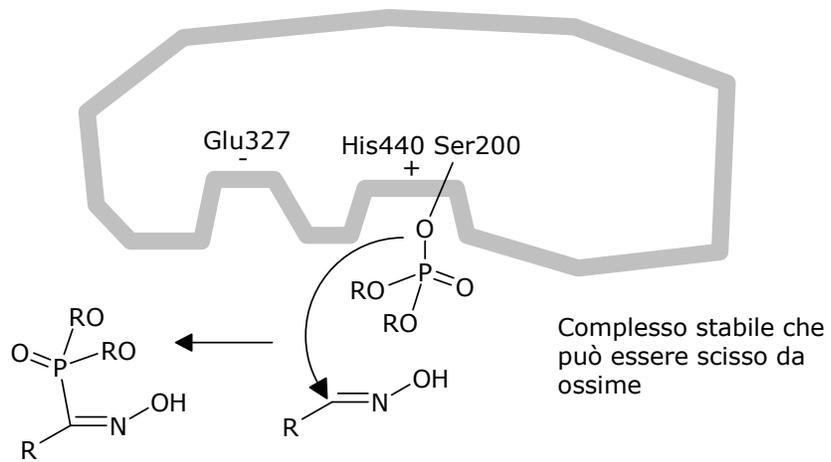


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

90

Acetilcolinestrasei fosforilata

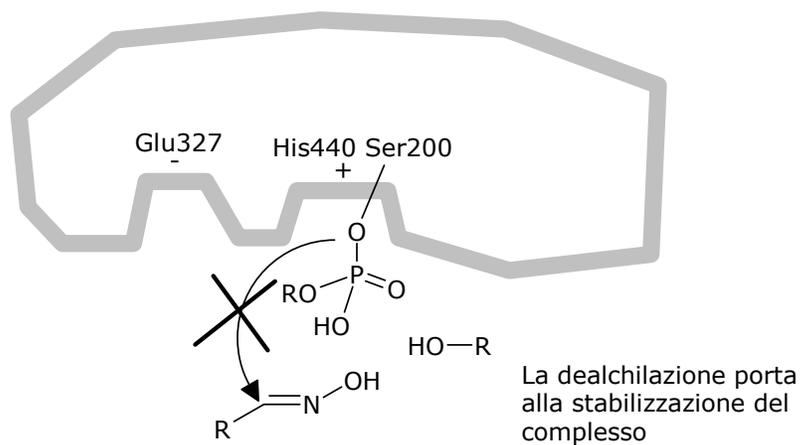


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

91

Acetilcolinestrasei fosforilata



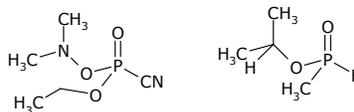
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

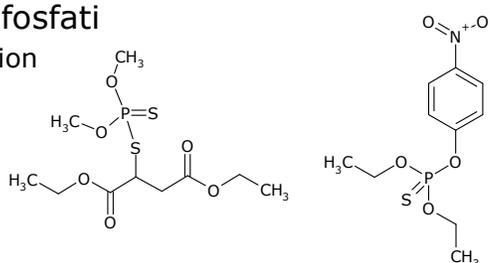
92

Agenti anticolinestrasici

- Inizialmente sviluppati come arma chimica
- Gas nervini
 - Tabun, Sarin



- Insetticidi organofosfati
 - Malathion, parathion

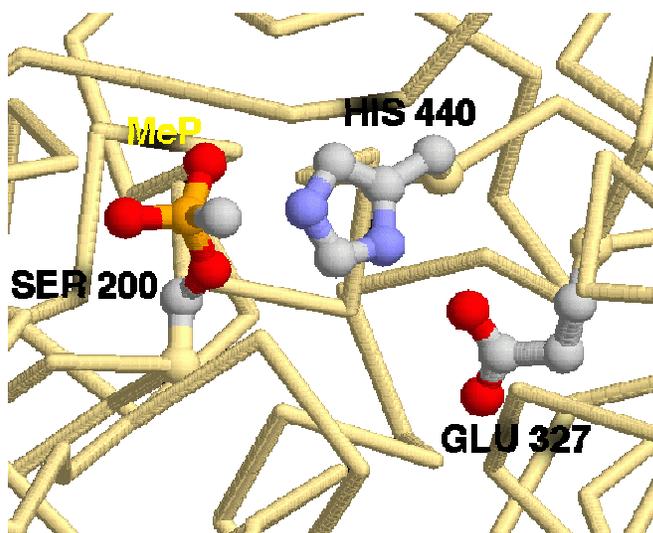


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

93

Acetilcolinesterasi e Sarin

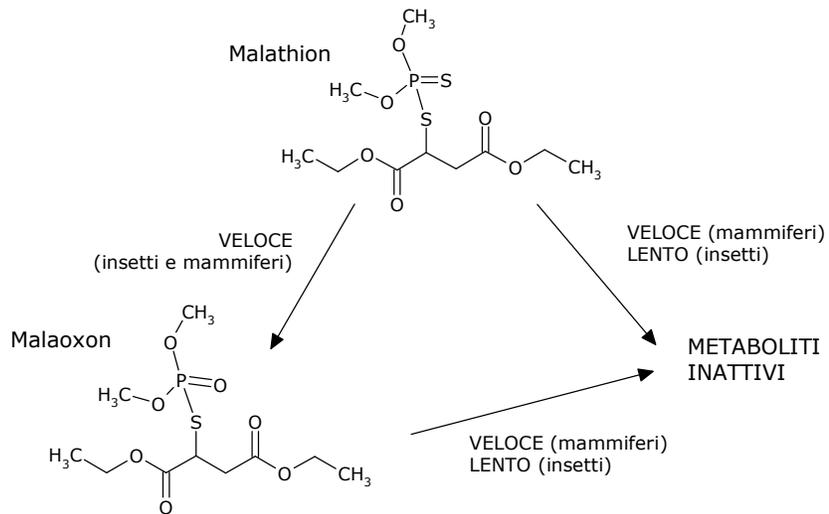


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

94

Tossicità selettiva

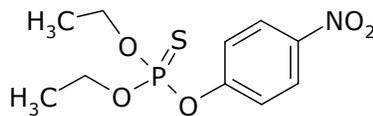
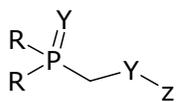


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

95

Inibitori dell'acetilcolinesterasi



Parathion

Struttura generale

- R = catena idrocarburica
- Z = gruppo organico
- Y = S o O

• Organofosfati

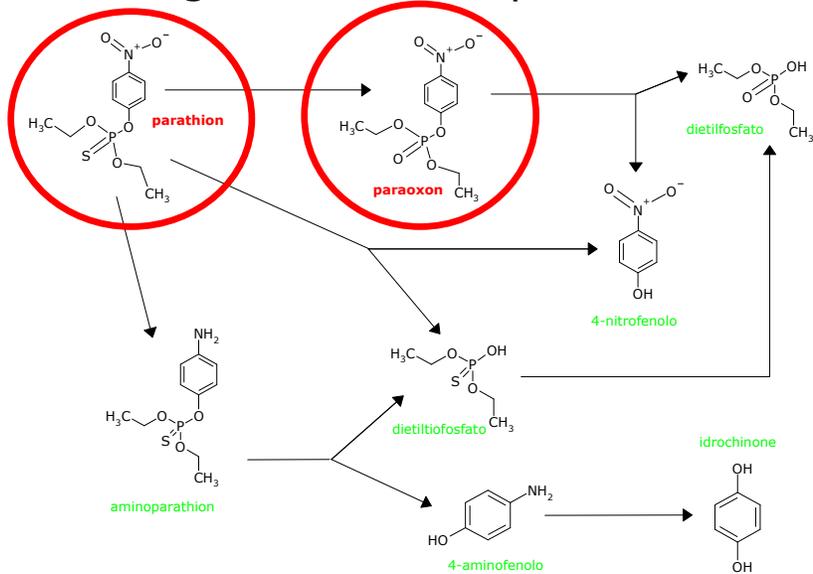
- Poco costosi e poco tossici verso le specie non bersaglio.
- Più solubili in acqua del DDT, più degradabili e meno persistenti.
- Veleno del SN.

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

96

Degradazione del parathion®



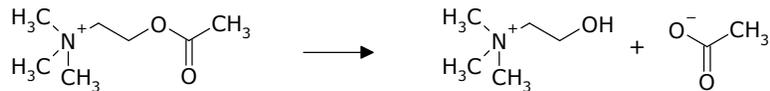
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

97

Determinazione

- L'enzima idrolizza l'acetilcolina in colina e acido acetico rimuovendola così dalle fessure sinaptiche



- Viene valutata l'idrolisi dell'acetil**ti**ocolina (metodo di ELLMAN)

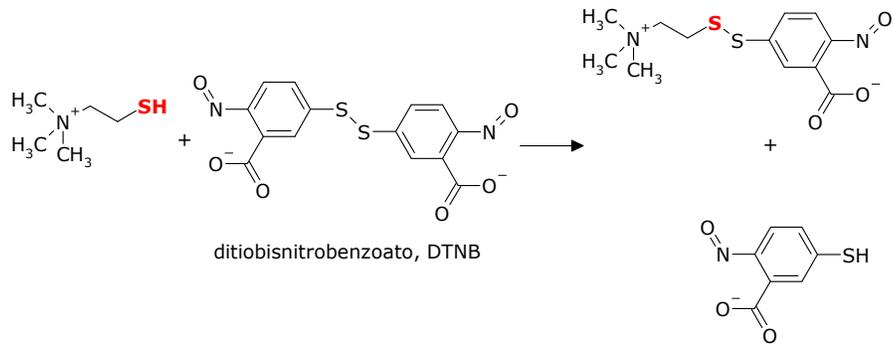


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

98

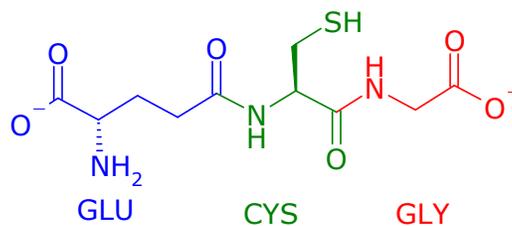
Reazione di ELLMAN



Assorbimento a 412 nm

GSH

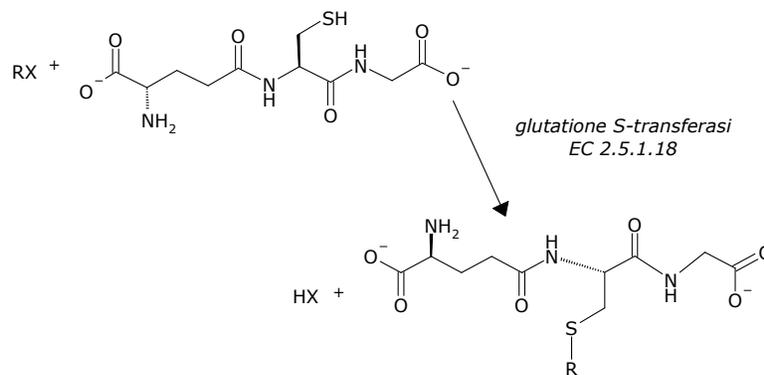
- Il glutathione è un tripeptide formato da glicina, cisteina, acido glutamico.



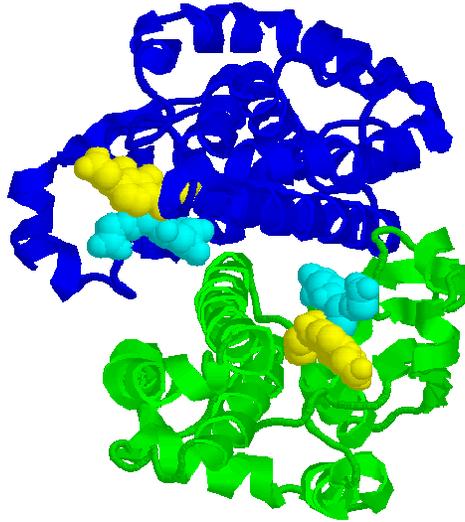
Coniugazione con il GSH

- Due tipi di reazione con il GSH
 - Spiazzamento di alogeni, solfati, solfonati, fosfati, nitrogruppi
 - Il glutatone viene addizionato a doppi legami attivati (epossidi) come nella sintesi delle prostaglandine.
- Substrati:
 - Idrofobici che contengono un elettrofilo
 - Possono reagire non enzimaticamente

Coniugazione



Glutathione S-transferasi – EC 2.5.1.18

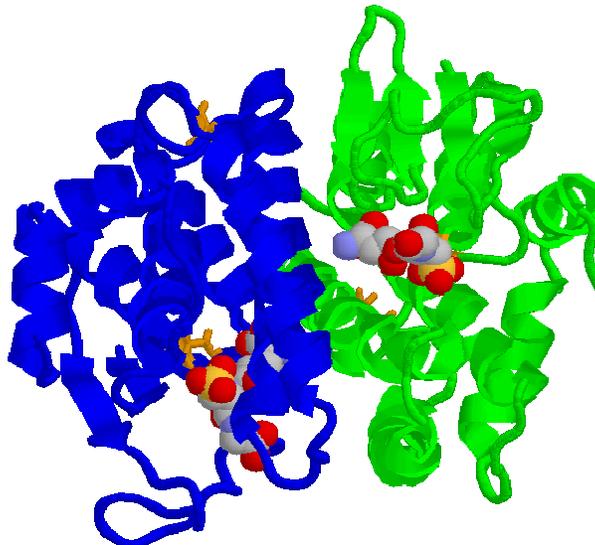


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

103

Glutathione S-transferasi EC 2.5.1.18 (*1A0F*)



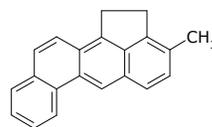
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

104

Glutazione S-transferasi

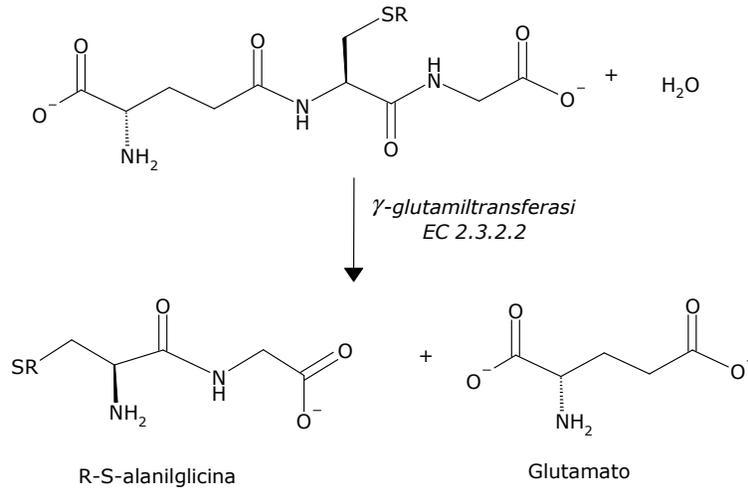
- Glutazione-S-transferasi microsomiale e citosolica
- Almeno quattro classi di glutazione-S-transferasi (α , β , γ , δ), diversi isoenzimi inducibili.
 - Induttori (3-metilcolantrene, fenobarbital, corticosteroidi, anti-ossidanti)
 - La sovraespressione porta a resistenza (insetti DDT resistenti, piante resistenti all'atrazina, cellule tumorali resistenti alla chemioterapia)



Eliminazione dei composti coniugati con il GSH

- Escrezione dei glutazione-coniugati:
 - Intatti nella bile
 - Convertiti in acido mercapturico nei reni ed escreti nelle urine
 - γ -glutamilttransferasi, aminopeptidasi M

γ -glutamyltransferasi



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

107

Metallotioneine

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

108

Metallotioneine

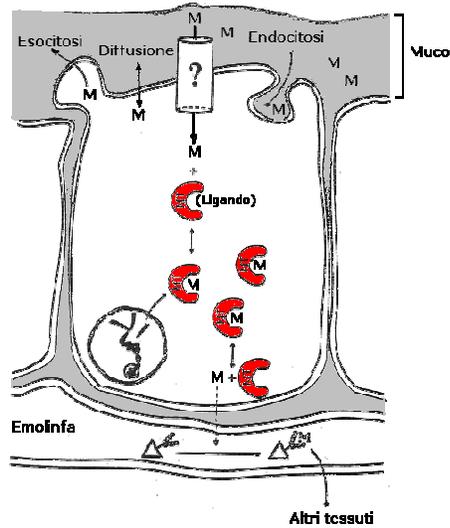
- Le metallotioneine (MT) sono peptidi e proteine ubiquitarie a basso peso molecolare ad alto contenuto in aminoacidi solforati e metalli.
- Si ipotizza che giochino un ruolo:
 - nella fissazione dei metalli in tracce (Zn^{++} , Cu^{++}),
 - nel controllare la concentrazione di questi ioni,
 - nella regolazione dei flussi degli ioni ai distretti cellulari,
 - nella neutralizzazione dei metalli tossici (Cd^{++} , Hg^{++}) e nella protezione dallo stress indotto dai metalli.

Distribuzione

- Le metallotioneine sono presenti in tutti gli organismi: animali, vegetali e microrganismi.
- Negli animali queste proteine posseggono polimorfismo genetico e sono abbondanti nei tessuti parenchimali (fegato, rene, pancreas e intestino).
- La loro concentrazione dipende da specie, tessuto, età, sesso ed altri fattori non ancora completamente identificati
- Nonostante che le metallotioneine siano proteine citoplasmatiche si sono trovate accumulate nei lisosomi e nel nucleo.

Trasporto di metallotioneine

- Schema ipotetico del trasporto di metalli pesanti attraverso l'epitelio branchiale di molluschi bivalvi.
 - M: metalli in traccia;
 - MT: metallotioneine.



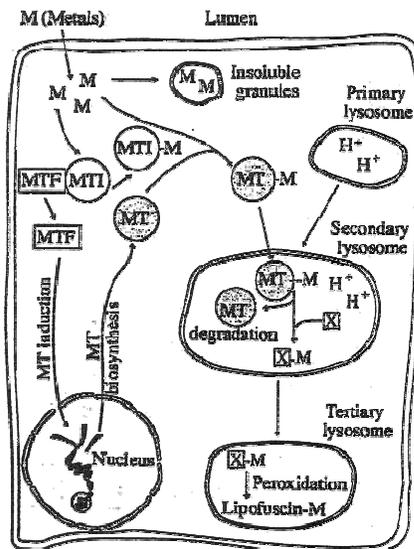
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

111

Turnover delle metallotioneine

- Schema del turnover di MT in cellule di molluschi bivalvi (*Isani et al., 2000*).
 - M: Metalli;
 - MTF: Fattori di Trascrizione;
 - MTI: Inibitori di Trascrizione.



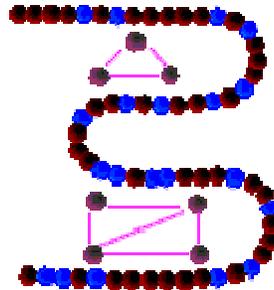
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

112

Classificazione

- Il nome deriva dal fatto che hanno un alto contenuto di zolfo e metalli. Tale contenuto varia a secondo del metallo (fino ad oltre il 20% in peso)
- Nei mammiferi sono caratterizzate da un peso molecolare di 6000-7000 Da, contengono da 60 ad 68 aminoacidi di cui 20 Cys che legano 7 equivalenti di ione metallico bivalente. Mancano di aminoacidi aromatici. Tutte le Cys sono in forma ridotta e sono coordinate con ioni metallici.



Classificazione – Le metalloioneine

- La superfamiglia delle metalloioneine è definita come quella che comprende i peptidi che assomigliano alla metalloioneina renale equina che ha le seguenti caratteristiche:
 - Basso peso molecolare
 - Composizione:
 - Alto contenuto in Cys, basso contenuto in aromatici.
 - Sequenza caratteristica.

Classificazione – Le famiglie

- Una famiglia di metallotioneine è caratterizzata da una particolare sequenza ed è legata ad una o più specie.
 - I membri di una determinata famiglia appartengono solo a quella e si pensa siano correlati da un punto di vista evolutivistico
 - Ogni famiglia è identificata da un numero e dalla specie.
 - *Per esempio*: Famiglia 1: vertebrati.

Classificazione

- Le sottofamiglie
 - Si definiscono sottofamiglie di metallotioneine quegli insiemi di proteine che oltre i caratteri propri delle famiglie condividono un insieme di caratteri più stringenti.
 - *Per esempio*: m1, m2...
- I sottogruppi
 - Un sottogruppo rappresenta un insieme di sequenza correlate filogeneticamente. In un albero filogenetico rappresentano un ramo.
 - *Per esempio*: m2U2 = MT-2 di ungulati, sottogruppo della sottofamiglia m2.
- Le isoforme
 - Sono i membri di sottogruppi, sottofamiglie e famiglie.
 - *Per esempio* MT-1E umana.

Classificazione – I clan

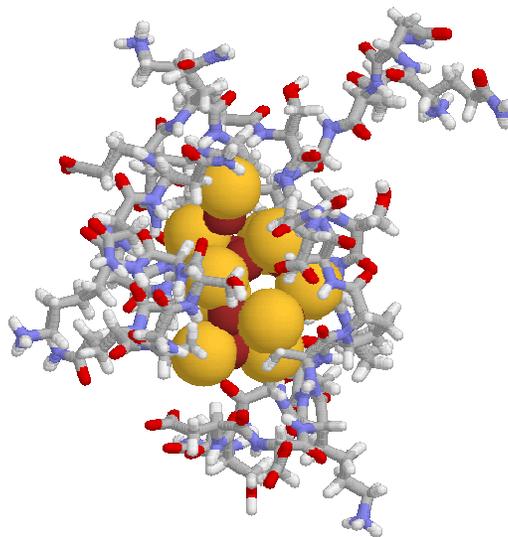
- Un clan è un insieme di proteine che dividono delle caratteristiche non già definite:
 - Struttura,
 - Proprietà termodinamiche,
 - Affinità per i metalli
 - Proprietà funzionali
 - ...

Sequenza	Famiglia	Caratteristiche	Sottofamiglie
K-x(1,2)-C-C-x-C-C-P-x(2)-C	1 vertebrati	Da 60 a 68 AA; 20 Cys (21 in un caso), 19 totalmente conservate; due domini strutturali, contenenti 9 e 11 Cys che legano 3 e 4 ioni bivalenti rispettivamente. Il gene è composto di 3 esoni, 2 introni	m1, m2, m3, m4, m, a, a1, a2, b, ba, t
C-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K	2 molluschi	Da 64 a 75 AA; da 18 a 23 Cys, minimo 13 totalmente conservate; due domini	mo1, mo2, mog, mo
P-[GD]-P-C-C-x(3,4)-C-x-C	3 crostacei	da 58 a 60 AA; esistono varianti con e senza Met N-terminale; 18 Cys totalmente conservate; due domini, ognuno con 9 Cys che legano 3 ioni bivalenti	c1, c2, c
P-D-x-K-C-[V,F]-C-C-x(5)-C-x-C-x(4)-C-C-x(4)-C-C-x(4,6)-C-C	4 echinodermi	Da 64 a 67 AA; 20 Cys ; due domini strutturali, contenenti 9 e 11 Cys che legano 3 e 4 ioni bivalenti rispettivamente	e1, e2
C-G-x(2)-C-x-C-x(2)-Q-x(5)-C-x-C-x(2)D-C-x-C	5 ditteri	Da 40 a 43 AA; 10 Cys conservate	d1, d2
K-C-C-x(3)-C-C	6 nematodi	62 e 74 AAs; 18 Cys, contiene una Tyr	n1, n2
una sequenza	7 ciliati	105 AA, 31 Cys, multiplo pattern CCC, una Tyr	ci
C-G-C-S-x(4)-C-x-C-x(3,4)-C-x-C-S-x-C	8 funghi I	Da 25 a 33 AA; 7 Cys	f1
C-X-K-C-x-C-x(2)-C-K-C	11 funghi IV	Da 55 a 56 AA; 9 Cys; un pattern CCC; contiene His e Phe	f4
K-C-A-C-x(2)-C-L-C	14 procarioti	Da 53 a 56 AAs; 9 Cys; una Tyr, una His; contiene residui non comuni	p
[YFH]-x(5,25)-C-[SKD]-C-[GA]-[SDPAT]-x(0,1)-C-x-[CYF]	15 piante	Da 45 a 84 AAs; due regioni ricche di Cys (dominio 1 e dominio 3) separate da una regione con poche Cys (dominio 2)	p1, p2, p2v, p3, pec, p21

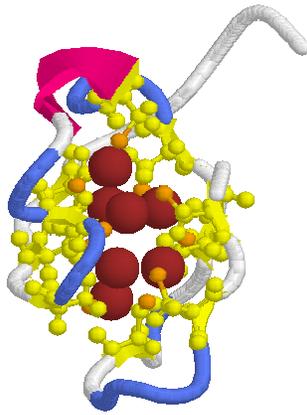
Struttura

- Nonostante che le sequenze aminoacidiche siano diverse hanno caratteristiche strutturali simili:
 - Forma a manubrio,
 - Due domini,
 - Diverse unità tetraedriche Me(II)-Cys,
 - Tutte le Cys coinvolte nel legame con lo ione metallico
 - Pressoché assente la struttura secondaria.

Cu-Metallotioneina da *Saccharomyces Cerevisiae* (1AQR)



Cu-Metallotioneina da *Saccharomyces Cerevisiae* (1AQR)

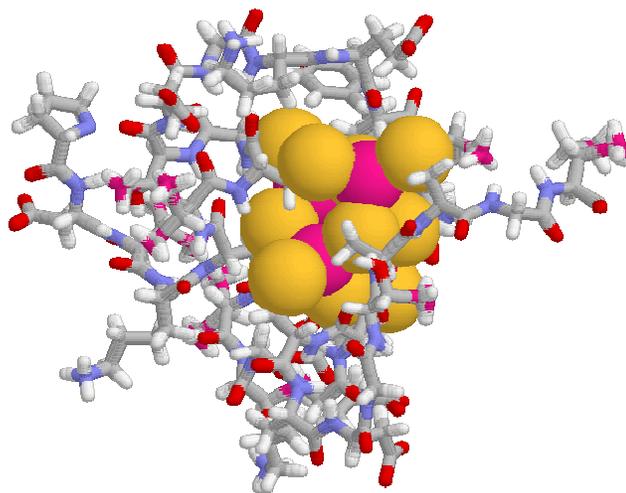


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

121

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare
Subunità α (1QJH)

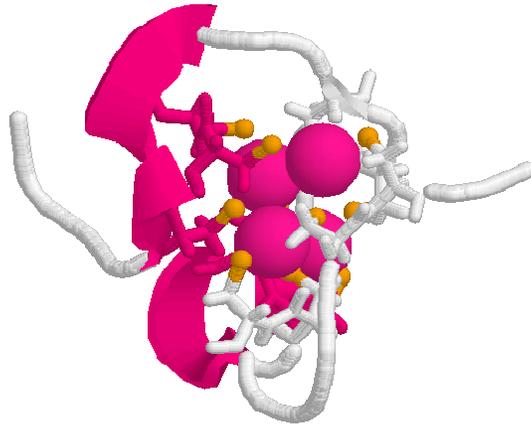


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

122

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare
Subunità α (1QJH)

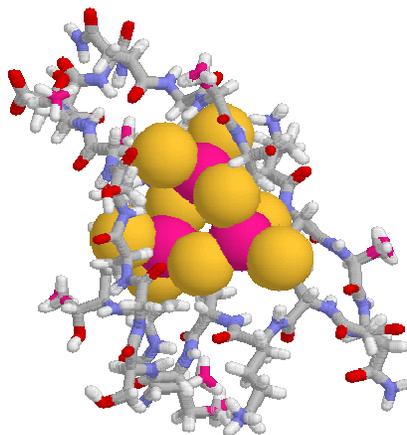


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

123

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare
Subunità β (1QJL)

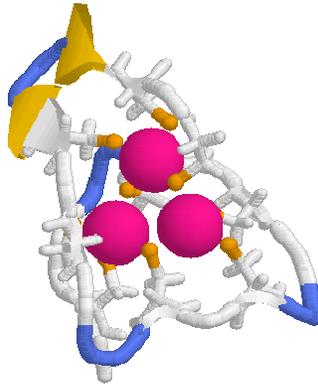


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

124

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare
Subunità β (1QJL)

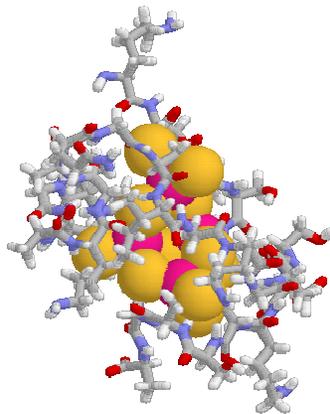


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

125

Cd-Metallotioneina umana (1MHU)

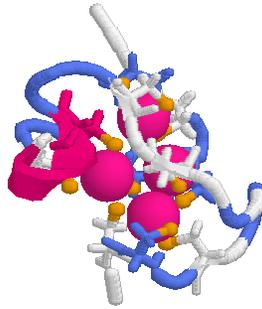


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

126

Cd-Metallotioneina umana (1MHU)

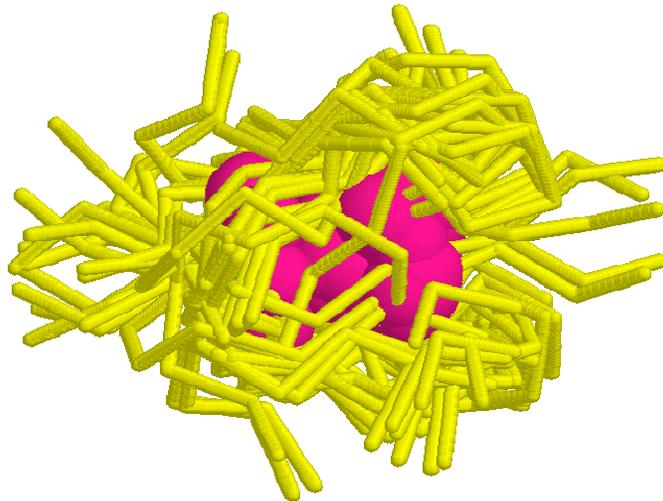


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

127

Cd-Metallotioneina di *Callinectes sapidus* (1DMF)

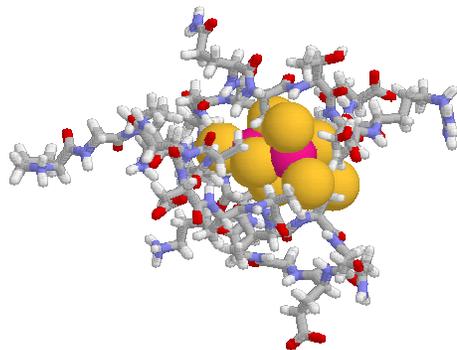


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

128

Cd-Metallotioneina di *Callinectes sapidus* (1DMF)

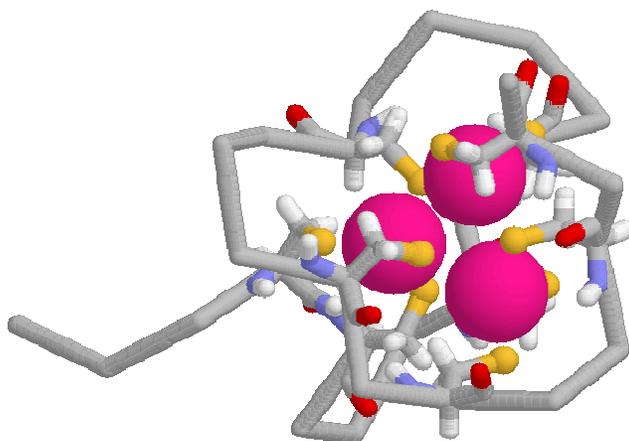


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

129

Cd-Metallotioneina di *Callinectes sapidus* (1DMF)

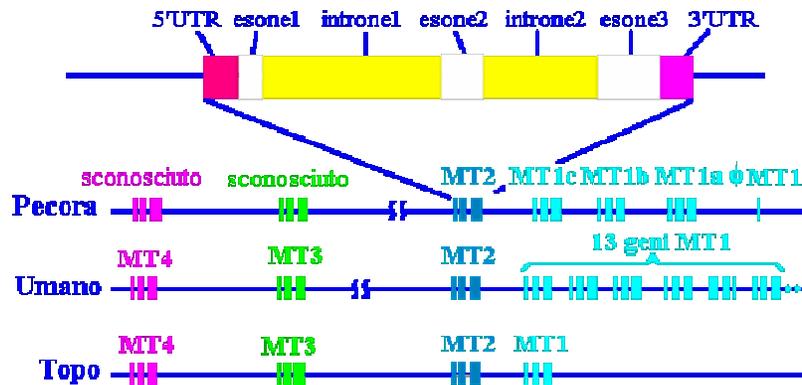


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

130

Struttura genica



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

131

Aspetti funzionali

- La più importante delle funzionalità delle metallothioneine è la loro inducibilità da una serie di agenti e condizioni:
 - Ioni metallici d^{10} (Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} , Tl^+ , Pb^{++} ...)
 - Ormoni
 - Citochine
 - Fattori di crescita
 - Promotori tumorali
 - Stress
- È dimostrato il loro aumento fisiologico durante la proliferazione cellulare:

$$MT-Zn^{++} + Apo-Zinc-fingers \rightarrow MT + Zn^{++} - Zinc-fingers$$

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

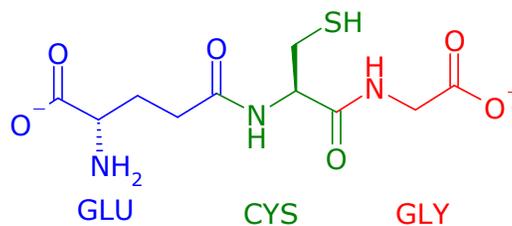
132

Determinazione

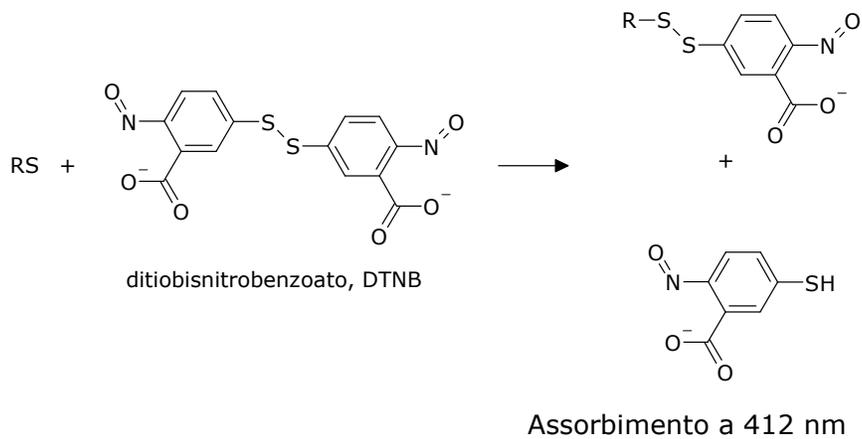
- Le MT sono proteine ricche in cisteina con affinità elevata per i metalli pesanti
- La concentrazione di MT è quantificata valutando il contenuto in Cys
- Reazione di ELLMAN (standard GSH)

GSH

- Il glutathione è un tripeptide formato da glicina, cisteina, acido glutamico.



Reazione di ELLMAN



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

135

Grazie a...

- ... Bruna Gravina, Irene Tamburin, Christian Asirelli, Federico Caselli, Francesco Ferretti, Giuseppe Giammanco che, nell'ambito delle loro tesi di laurea in Scienze Ambientali, hanno prodotto testi, immagini, figure e diapositive, utilizzate in questa presentazione.

Giorgio Sartor

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

136

Referenze sul WEB ...

- Vie metaboliche
 - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
 - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Hexpasy
 - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
 - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
 - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
 - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
 - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
 - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umh.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

...e naturalmente

- Questo ed altro materiale può essere trovato visitando il sito: <http://www1.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- 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
Corso di Laurea in Scienze Ambientali