

AVVERTENZA

Il presente materiale didattico è messo a disposizione degli studenti per facilitare la comprensione degli argomenti trattati nel corso delle lezioni e lo studio individuale

Non sostituisce il libro di testo che rappresenta lo strumento fondamentale per lo studio della **Biochimica generale e molecolare**

Le immagini utilizzate sono tratte dal libro di testo consigliato e da quelli da consultare indicati nelle diapositive 3-7 del file
INTRODUZIONE

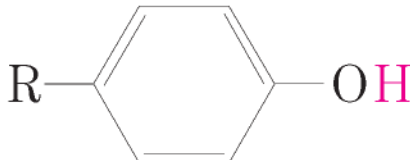

Strategie catalitiche

Dopo che il substrato si è legato all'enzima la catalisi può avvenire con diverse modalità sfruttando i gruppi funzionali opportunamente disposti nel sito attivo

catalisi acido-base

catalisi covalente

catalisi da metalli

Residui amminoacidici	Forma acida generale (donatore di protoni)	Forma basica generale (accettore di protoni)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}(H)_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$ \begin{array}{c} R-C=CH \\ \diagdown \quad \diagup \\ HN \quad N^+H \\ \diagup \quad \diagdown \\ C \\ \\ H \end{array} $	$ \begin{array}{c} R-C=CH \\ \diagdown \quad \diagup \\ HN \quad N: \\ \diagup \quad \diagdown \\ C \\ \\ H \end{array} $
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr		

Catalisi con ioni metallici

- Gli ioni metallici più comuni sono Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}
 Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}
- Partecipano al processo catalitico:
 - 1) In reazioni redox in cui il metallo interviene cambiando il suo stato di ossidazione
 - 2) Orientando i substrati in modo corretto
 - 3) Stabilizzando possibili cariche negative che si possono formare durante la reazione

Dati molecolari di alcune proteine

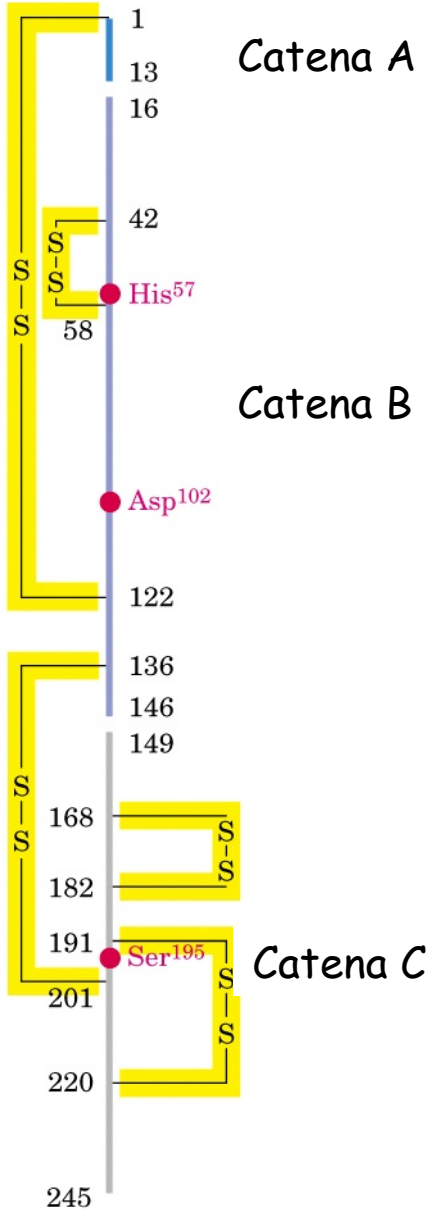
	Peso molecolare	Numeri di residui	Numero di catene polipeptidiche
Citocromo C (umano)	13,000	104	1
Ribonucleasi A (pancreas di bue)	13,700	124	1
Lisozima (bianco dell'uovo)	13,930	129	1
Mioglobina (cuore di cavallo)	16,890	153	1
Chimotripsina (pancreas di bue)	21,600	241	3
Chimotripsinogeno (bovino)	22,000	245	1
Emoglobina (umana)	64,500	574	4
Albumina del siero (umana)	68,500	609	1
Esochinasi (lievito)	102,000	972	2
RNA polimerasi (<i>E.Coli</i>)	450,000	4,158	5
Apolipoproteina B (umana)	513,000	4,536	1
Glutammina sintetasi (<i>E. Coli</i>)	619,000	5,628	12
Titina (umana)	2,993,000	26,926	1

Proteine globulari

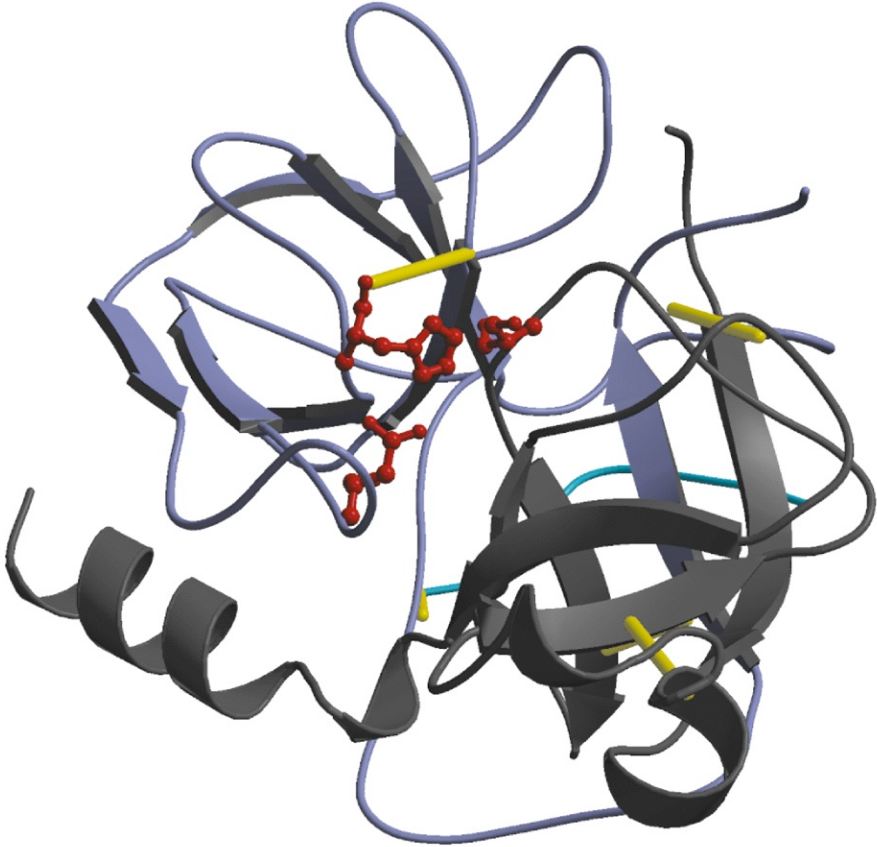
	NUMERO DI AA	α -ELICA %	β -STRUTTURA %
Mioglobina	153	78	0
Citocromo C	104	39	0
Lisozima	129	40	12
Ribonucleasi	124	26	35
Chimotripsina	241	14	45

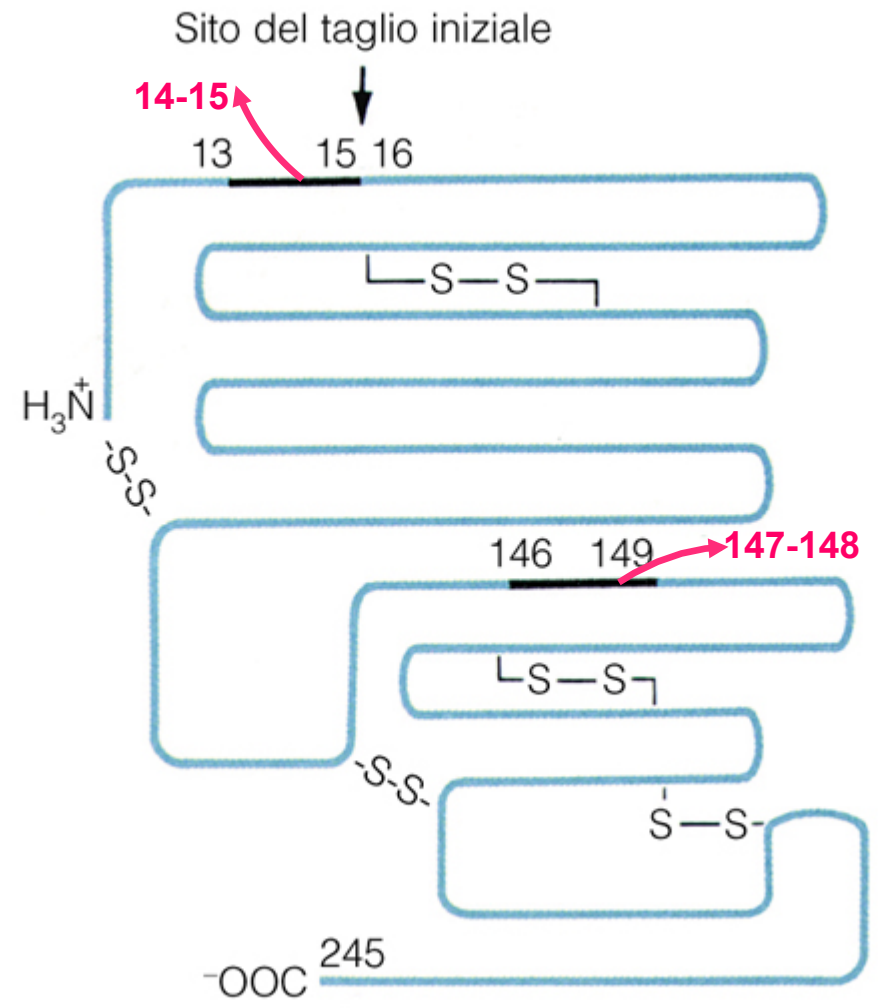
Le proteine globulari hanno strutture terziarie diverse e con differenti % di strutture secondarie

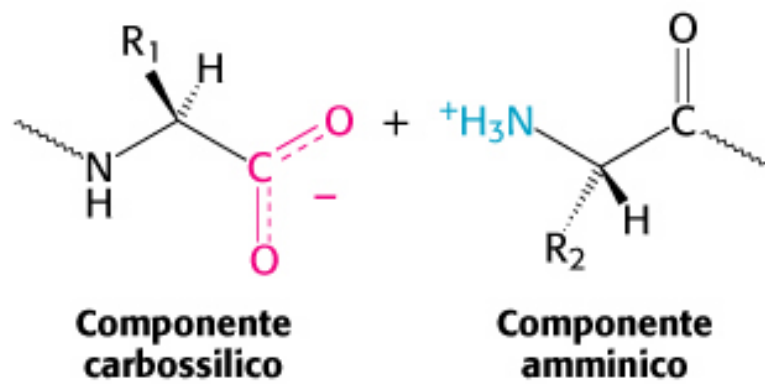
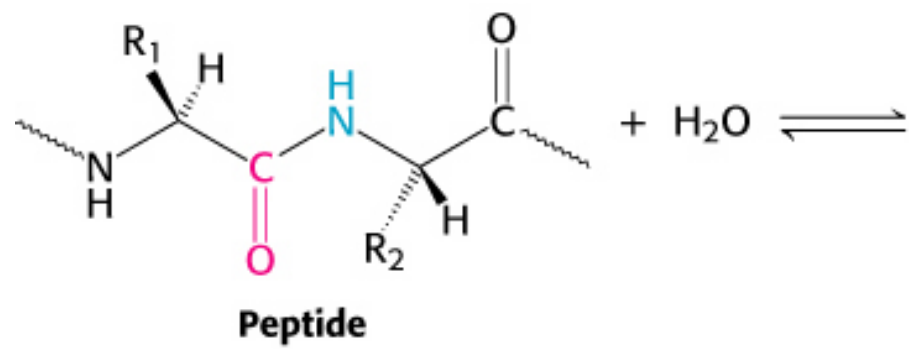
Proteasi serinica



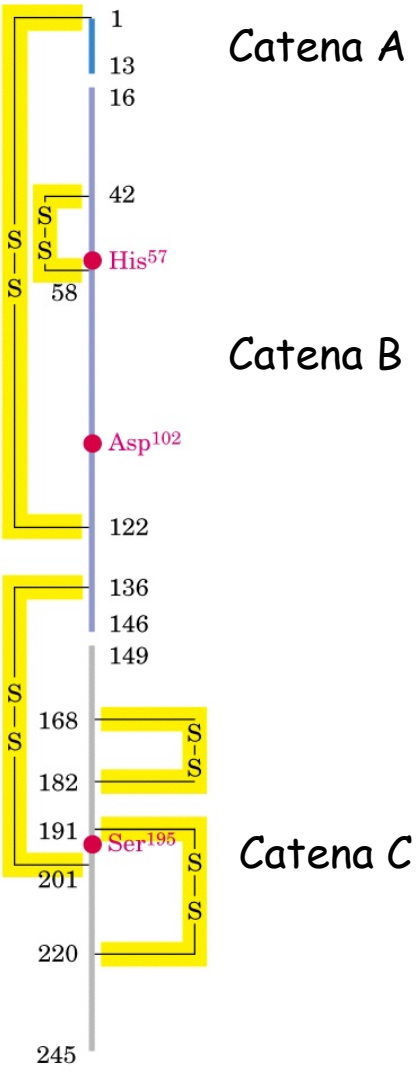
Chimotripsina





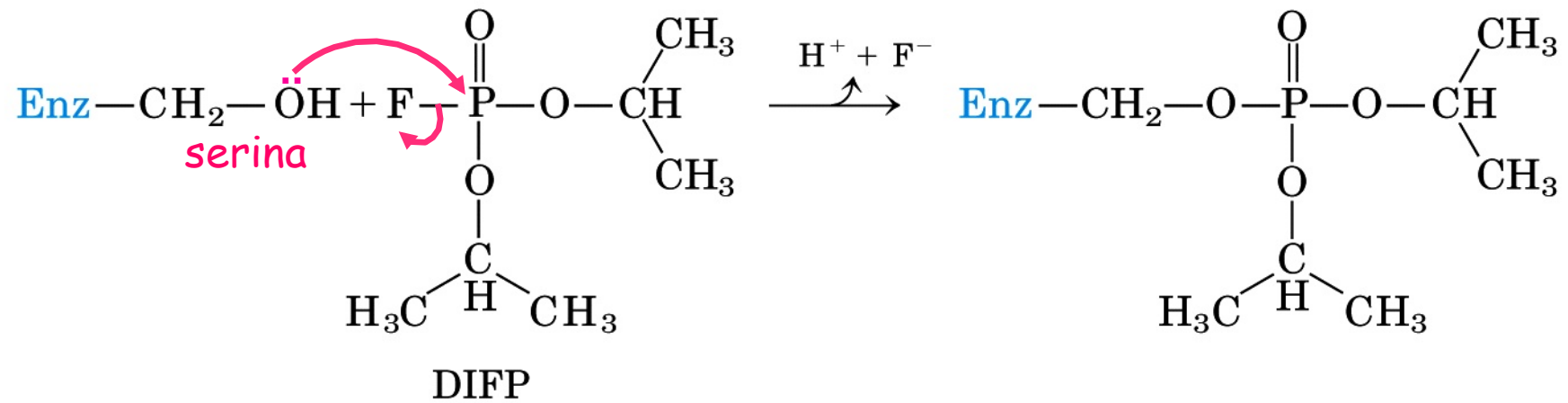


Triade catalitica: Ser¹⁹⁵, His⁵⁷, Asp¹⁰²

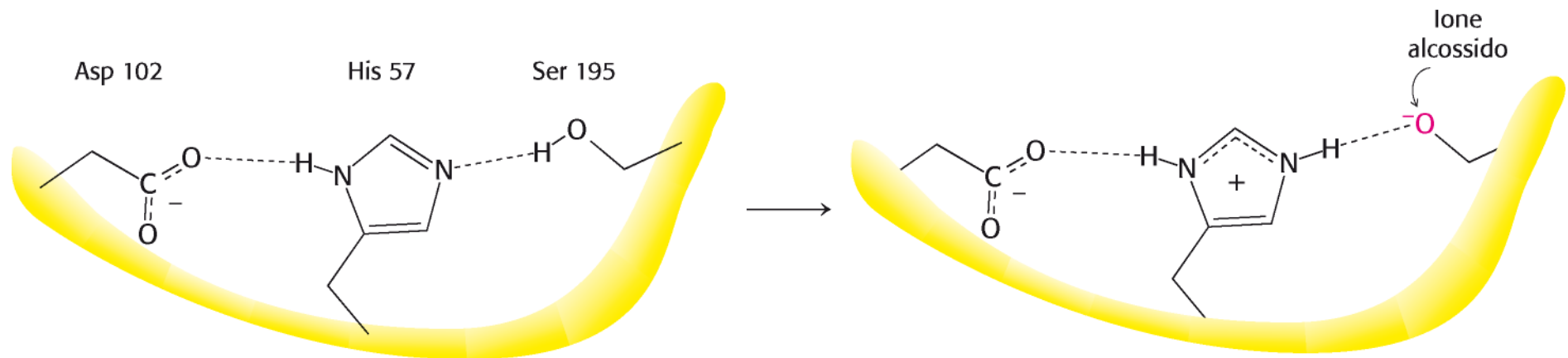


Chimotripsina

Inibizione irreversibile



- His 57 polarizza il gruppo alcolico della serina facilitandone la deprotonazione che avviene in presenza del substrato
- Asp 102 contribuisce a ben orientare l'His 57 e ad essere un migliore accettore di protoni

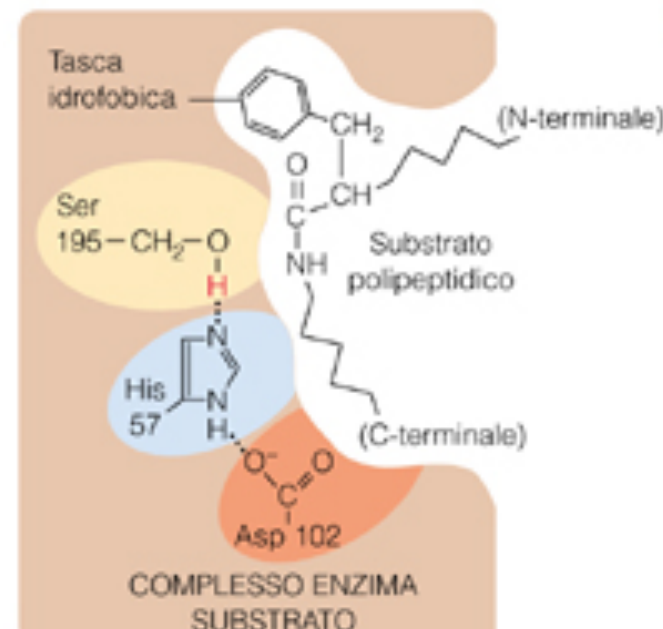
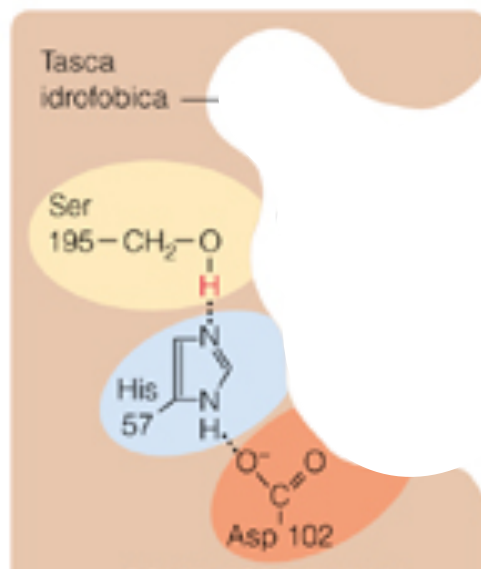


La triade catalitica facilita la conversione della serina 195 in un potente nucleofilo

Meccanismo catalitico della chimotripsina

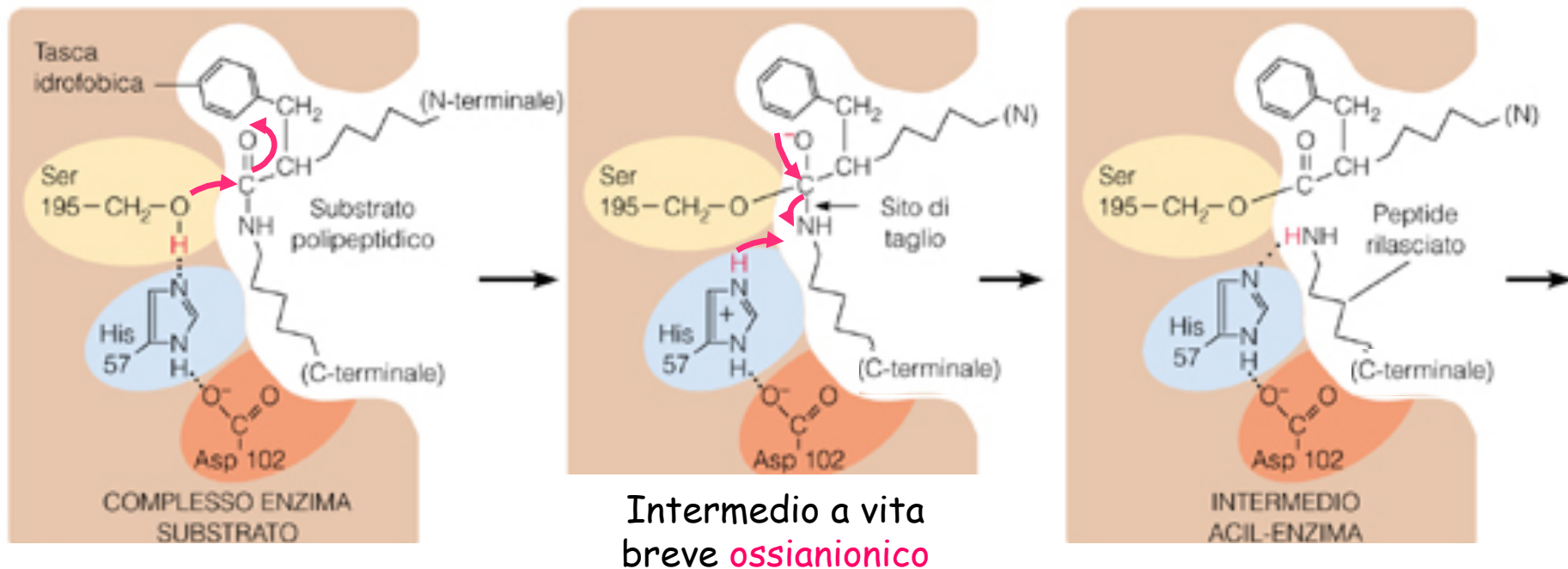
fase di acilazione
fase di deacilazione

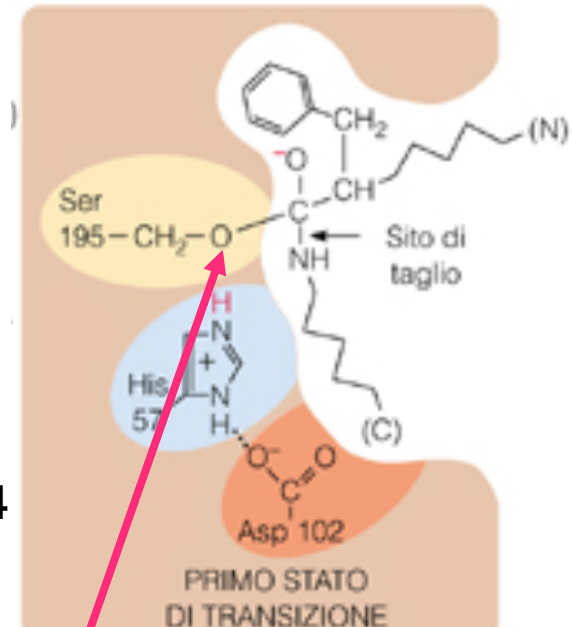
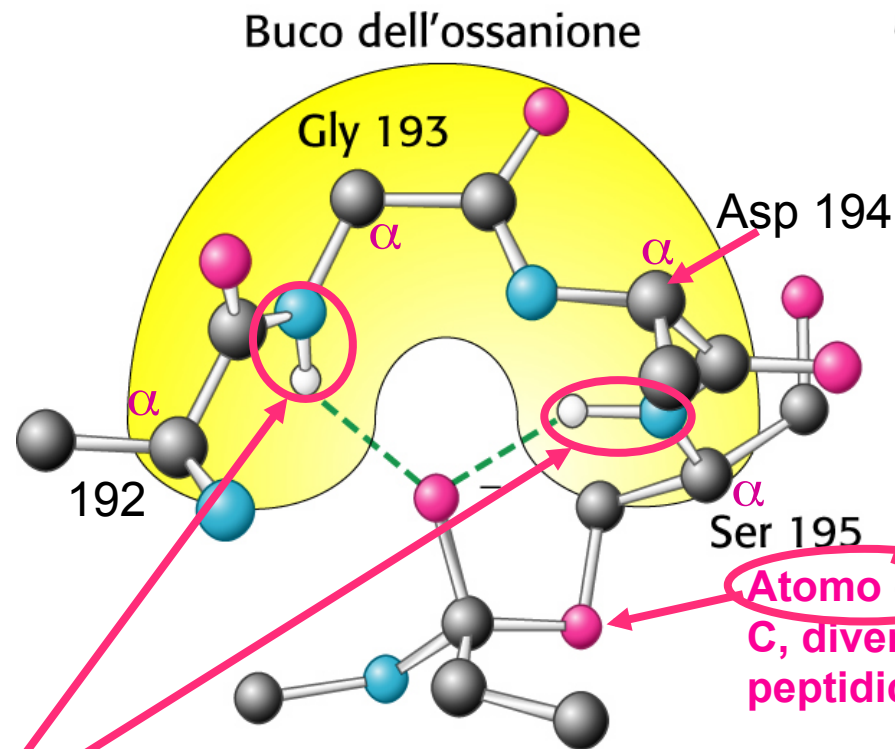
Triade catalitica: Ser¹⁹⁵, His⁵⁷, Asp¹⁰²



Meccanismo catalitico della chimotripsina

fase di acilazione



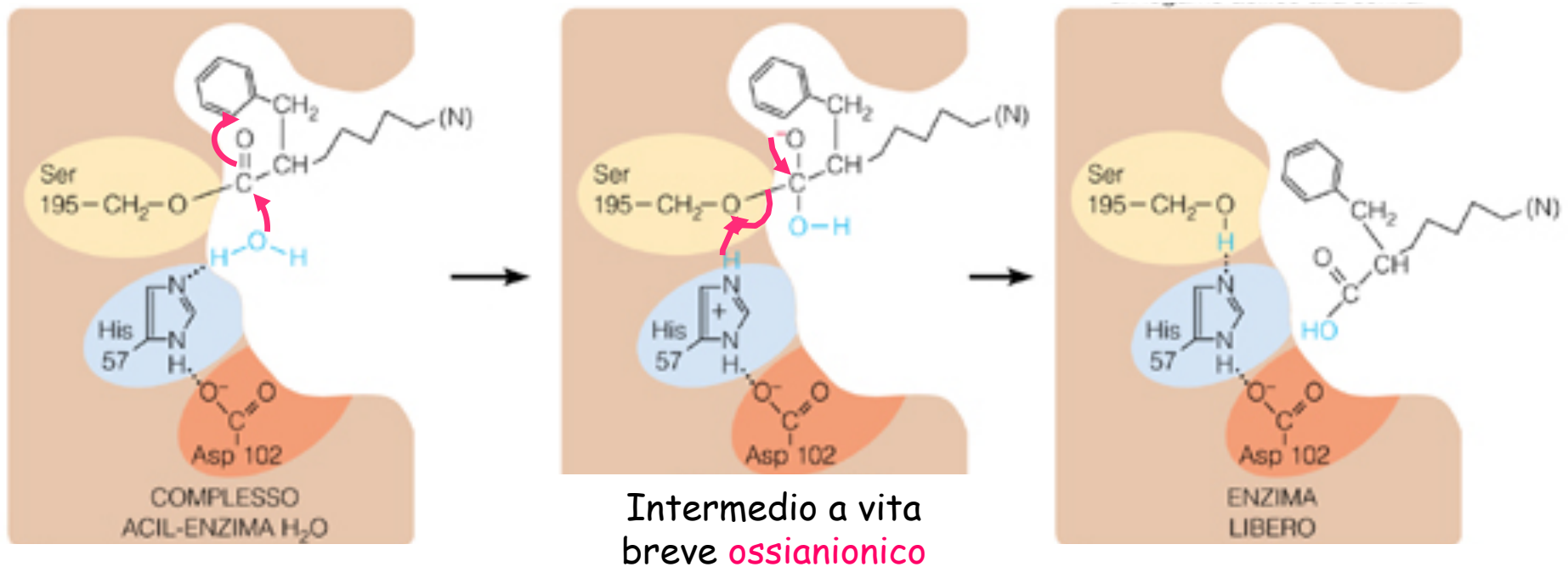


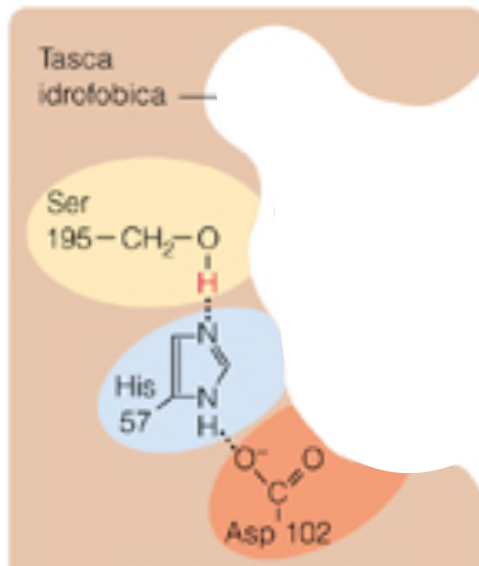
Atomo di O della Ser 195 legato al C, diventato sp³, del legame peptidico della proteina-substrato

I gruppi NH dei legami peptidici stabilizzano la carica negativa dell'ossianione mediante legami idrogeno

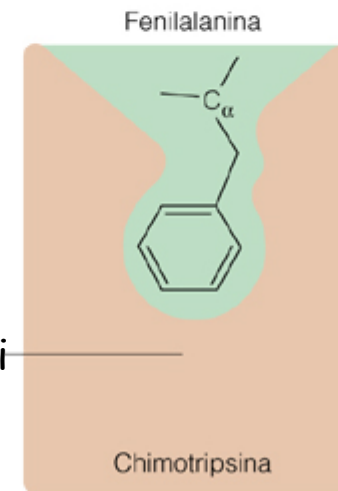
Meccanismo catalitico della chimotripsina

fase di deacilazione

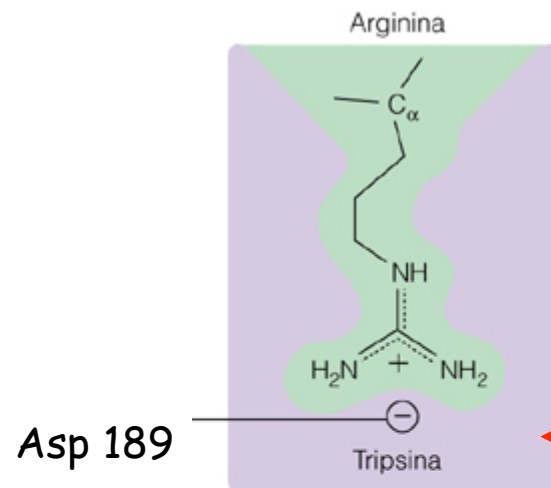




residui idrofobici

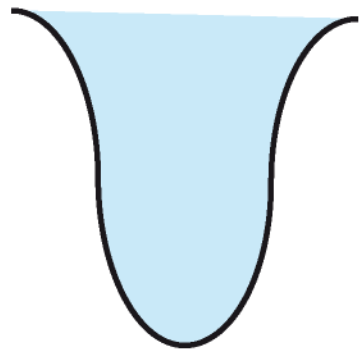
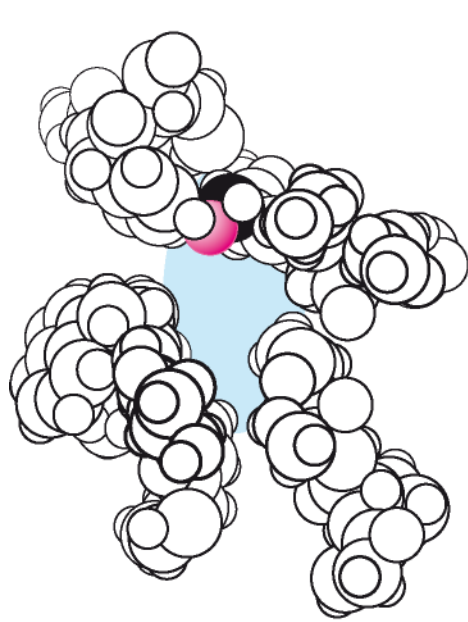


Tasca idrofobica nel sito attivo della chimotripsina

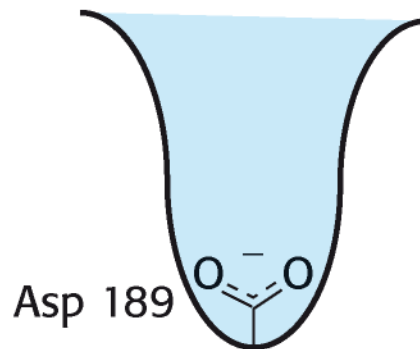
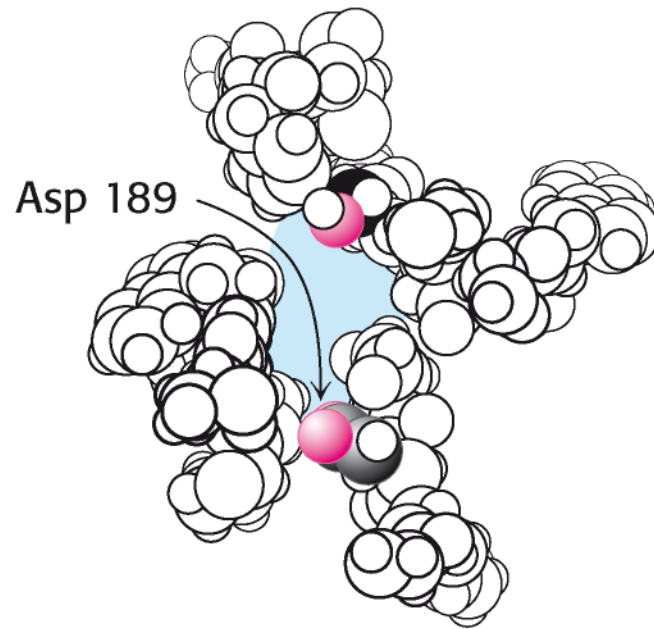


Tasca polare nel sito attivo della tripsina

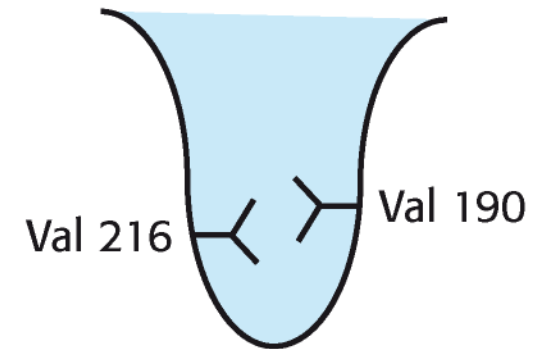
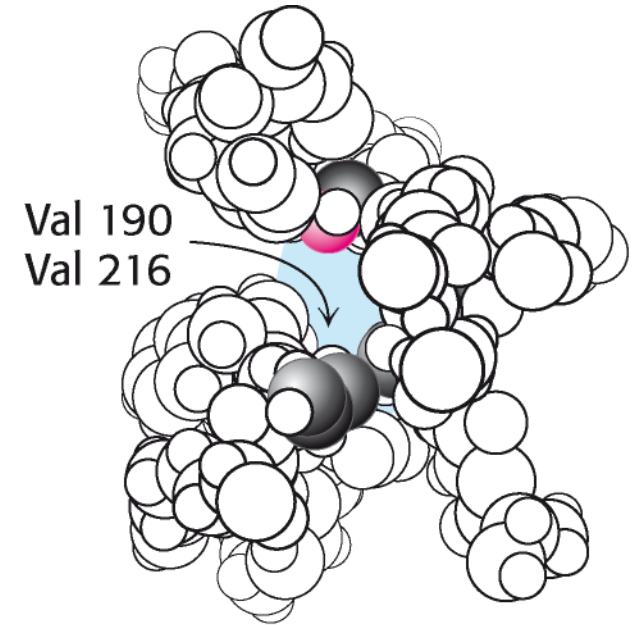
SERENA PROTEASI



Chimotripsina



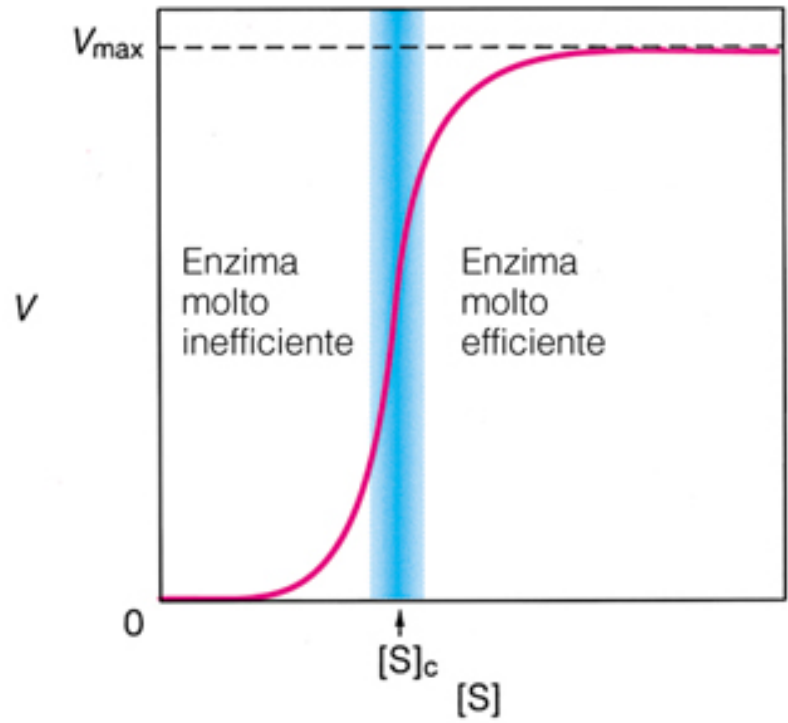
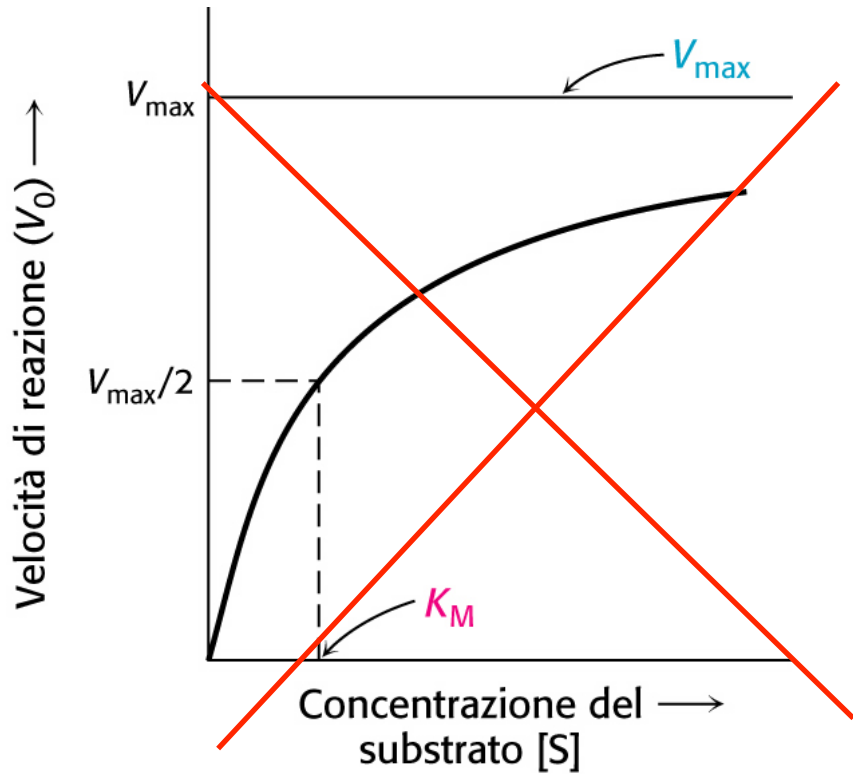
Tripsina



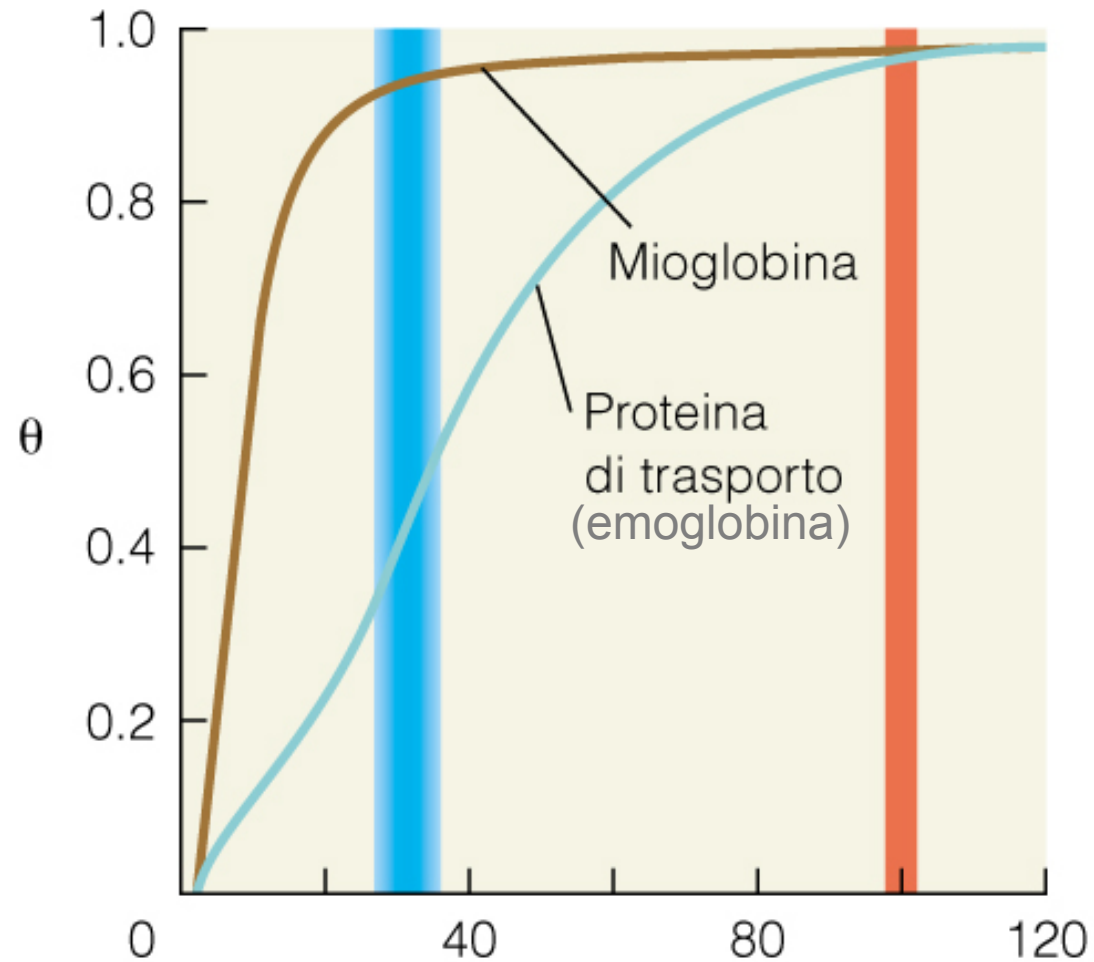
Elastasi

40% di identità di sequenza e stesse relazioni spaziali

Enzimi allosterici



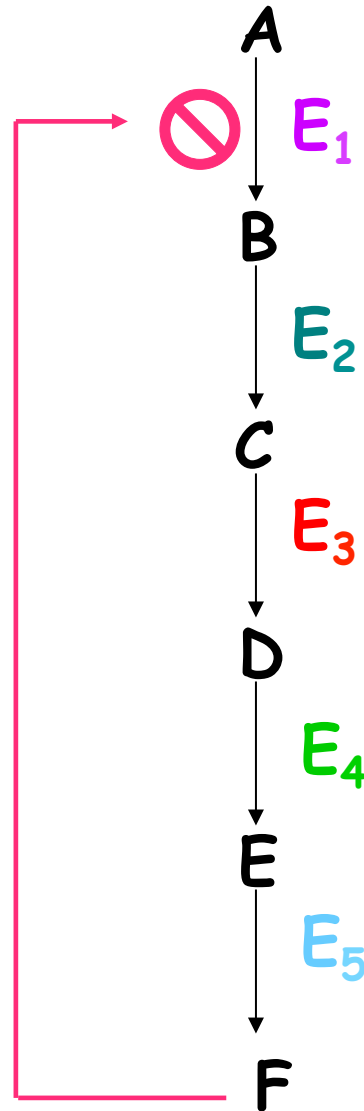
.....come le proteine che legano l'ossigeno:
mioglobina ed emoglobina



(c) Proteina di trasporto efficiente sia nel legame sia nel rilascio

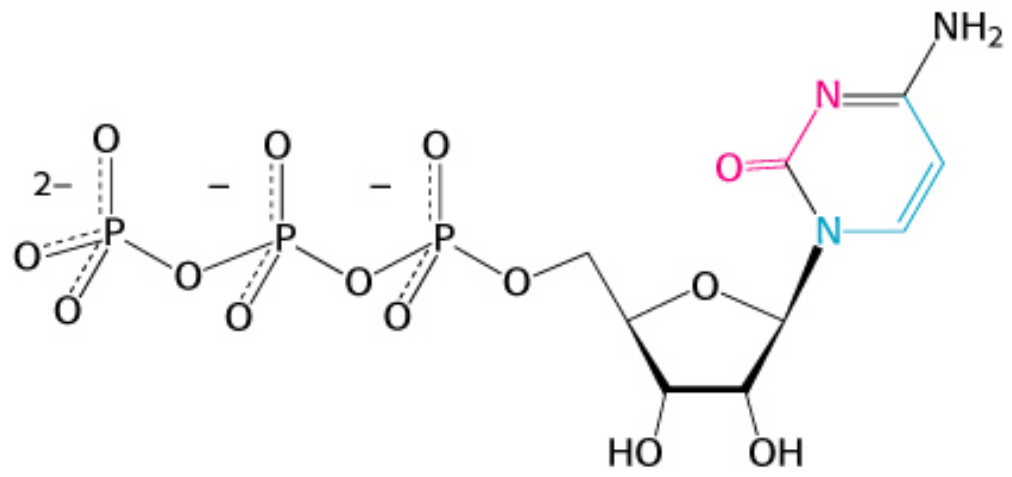
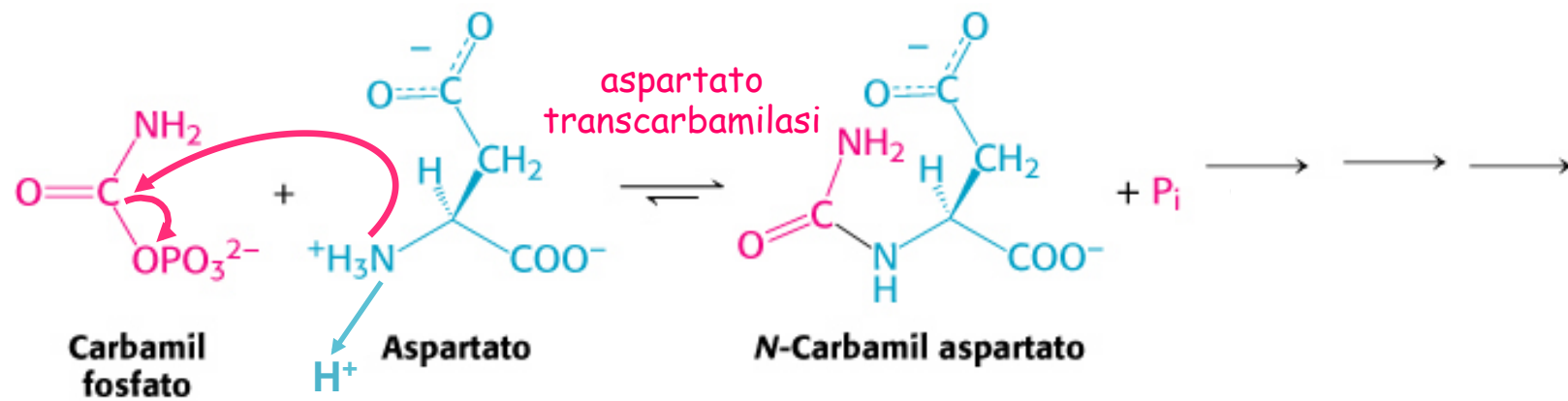
Enzimi allosterici

- Il comportamento cinetico degli enzimi allosterici non segue l'equazione di Michaelis-Menten
- Sempre enzimi multisubunità
- Non si determina una K_m ma una $K_{0.5}$
- Gli enzimi allosterici presentano cooperatività: il legame di un regolatore ad una subunità determina cambiamenti conformazionali e quindi funzionali anche delle altre subunità (transizione T \rightarrow R)
- Il regolatore è in genere una molecole diversa dal substrato (regolazione eterotropica)
- In certi casi il substrato stesso può essere anche il regolatore e sito attivo e sito regolatore coincidono (regolazione omotropica).

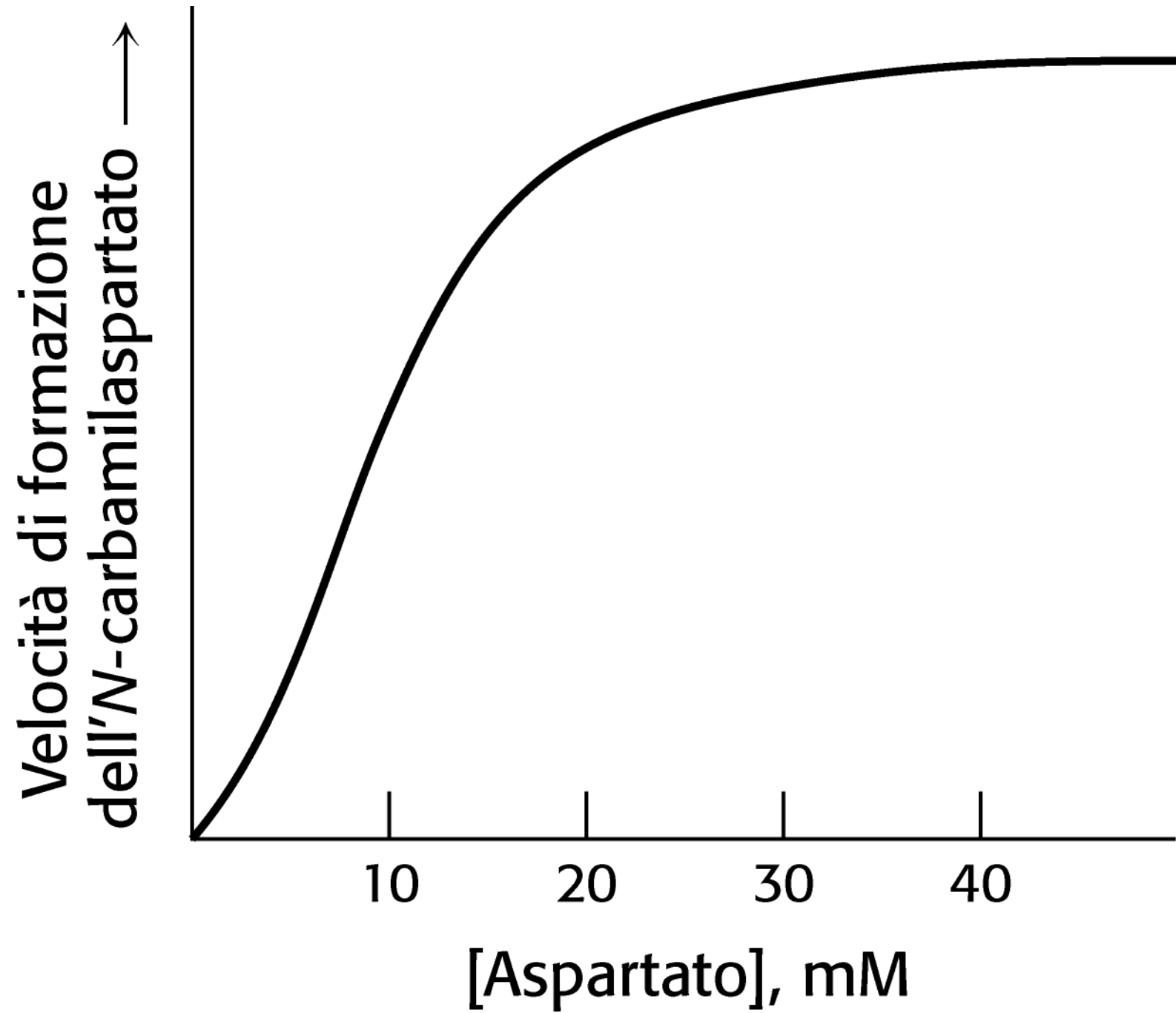


Alcuni enzimi **regolatori** sono soggetti al controllo della propria attività catalitica regolando la velocità complessiva della sequenza di reazioni (flusso Metabolico)

Inibizione a feedback

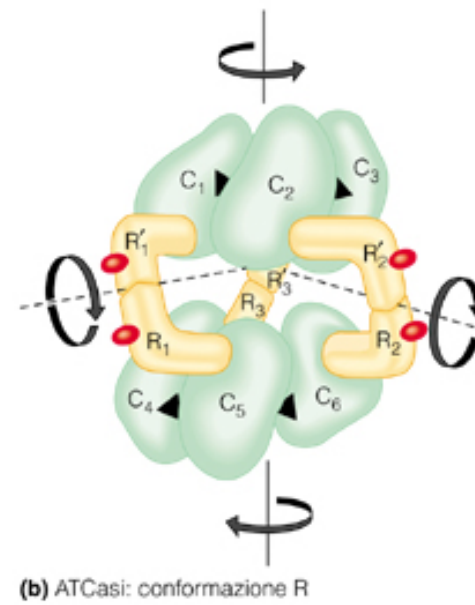
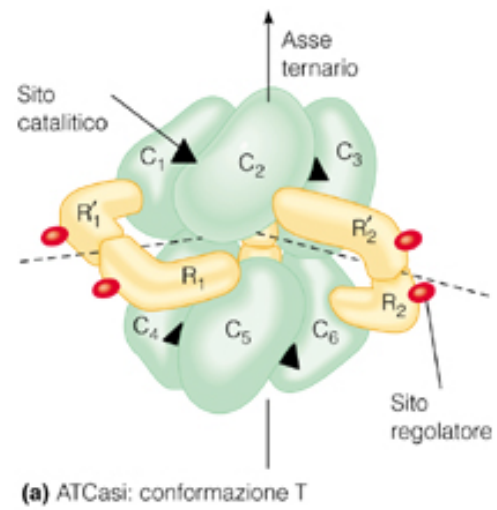


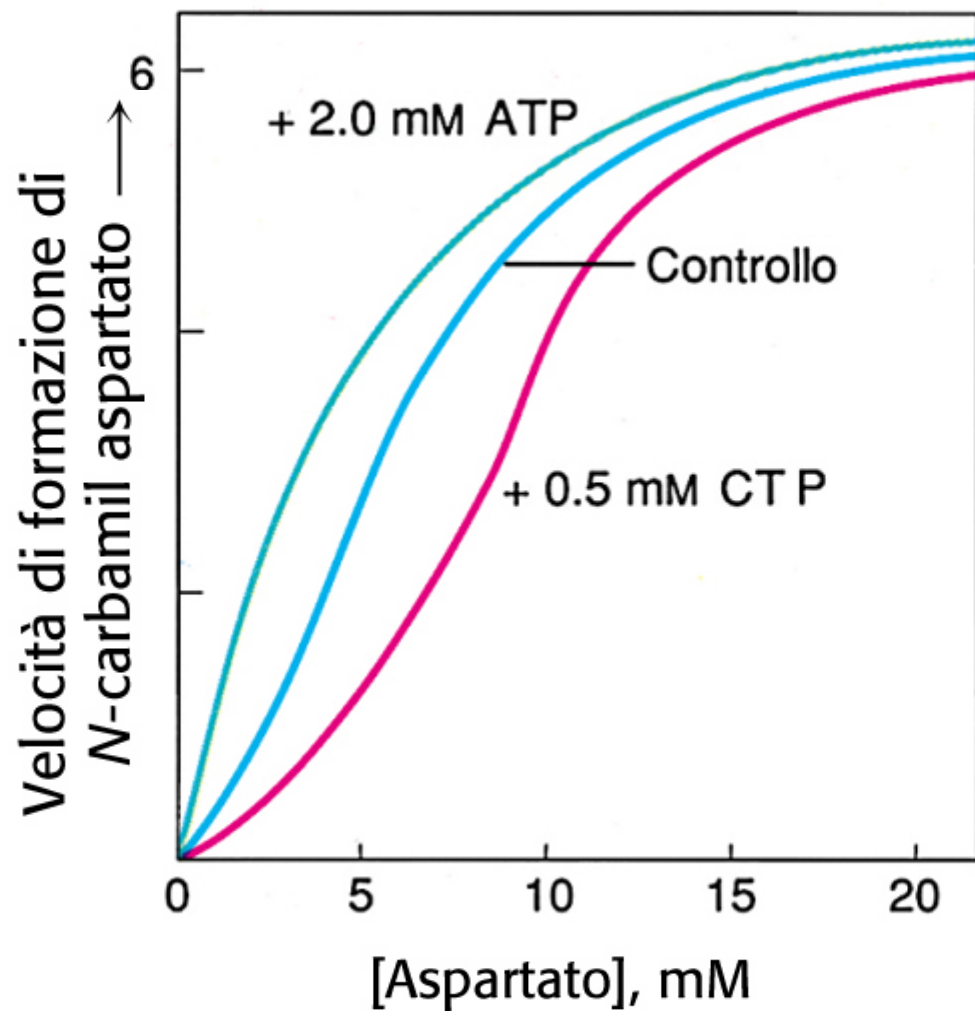
Citidina trifosfato (CTP)

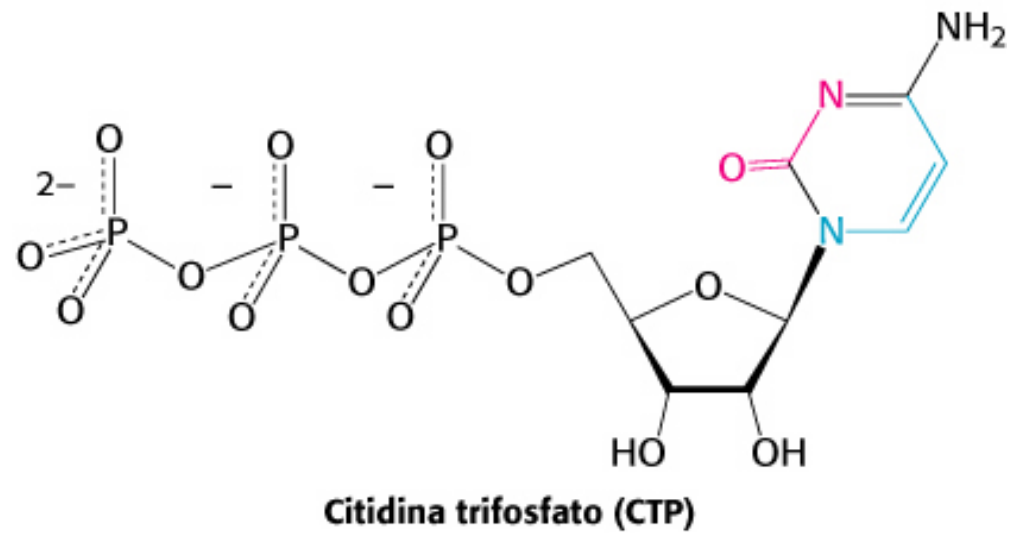
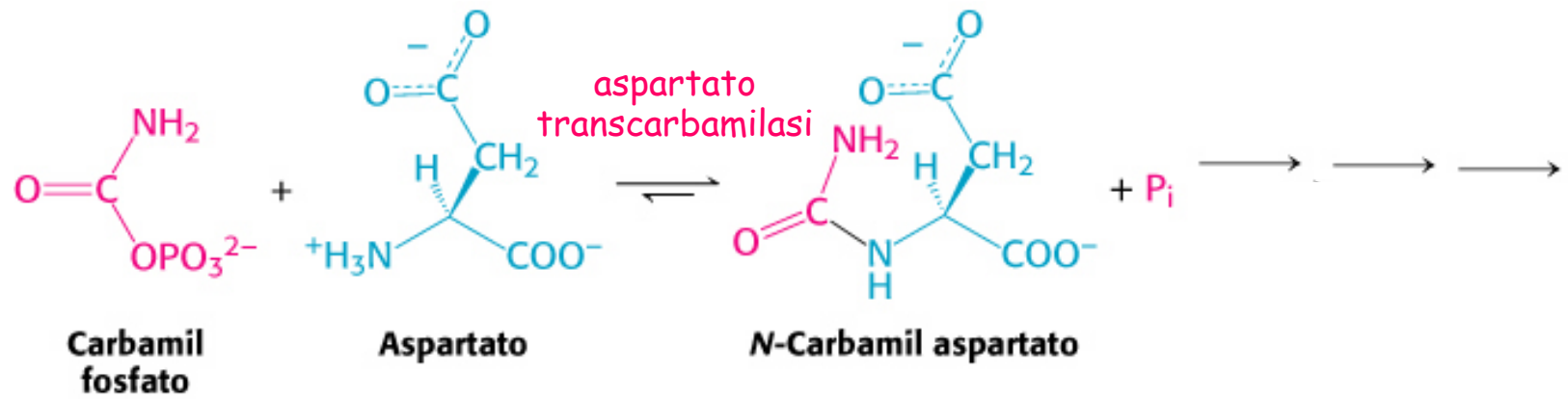


C = subunità catalitica

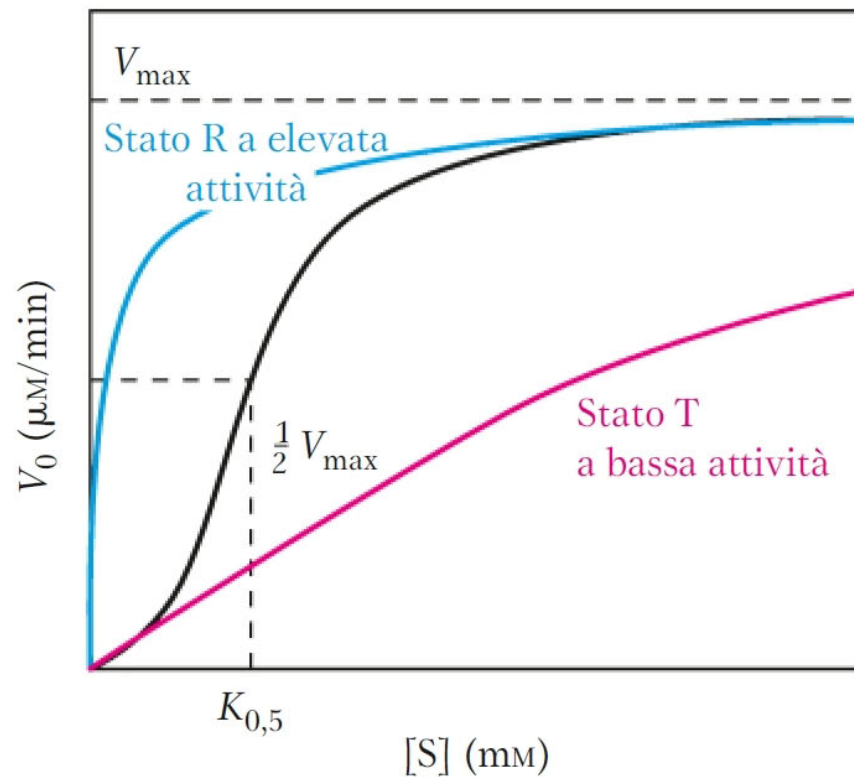
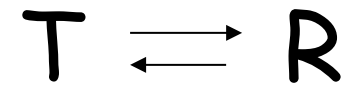
R = subunità regolatrice

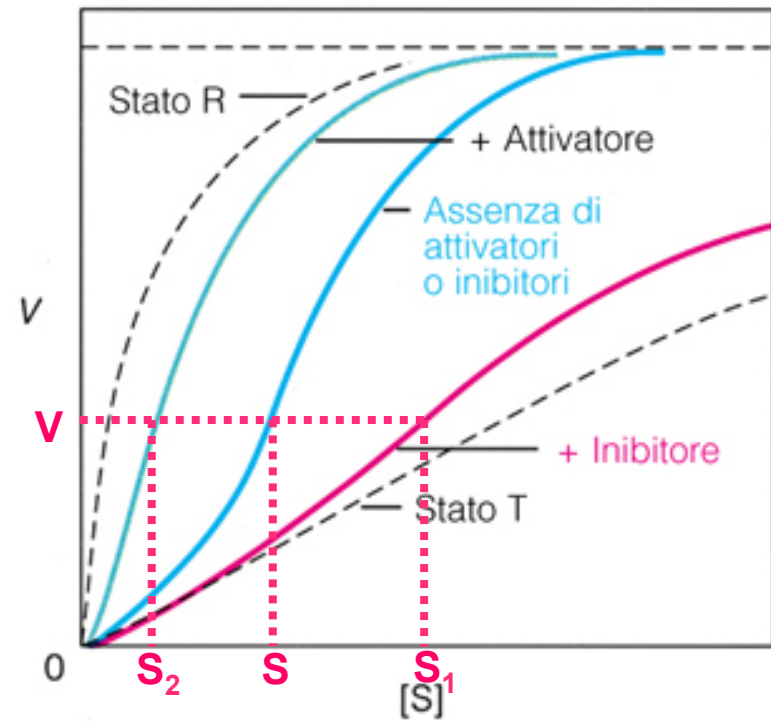
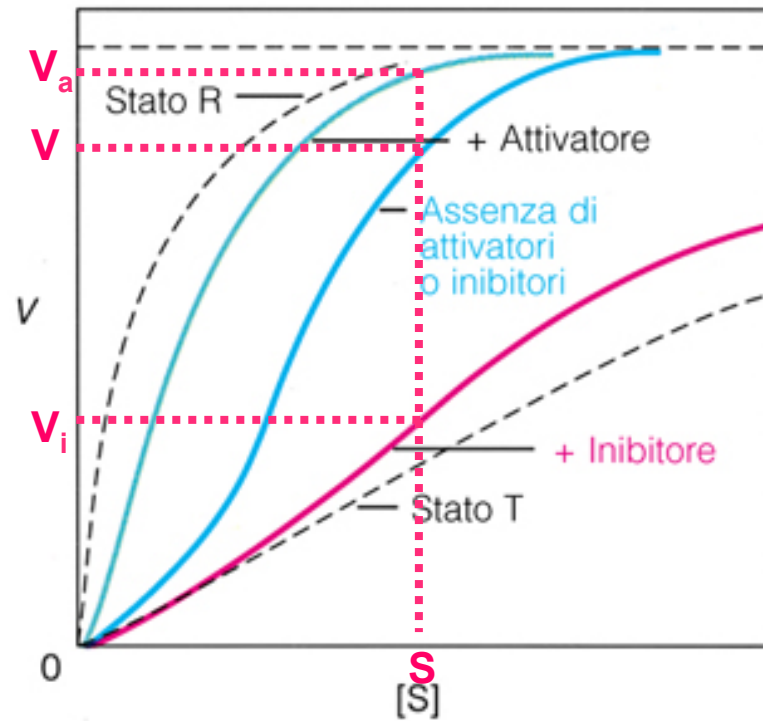




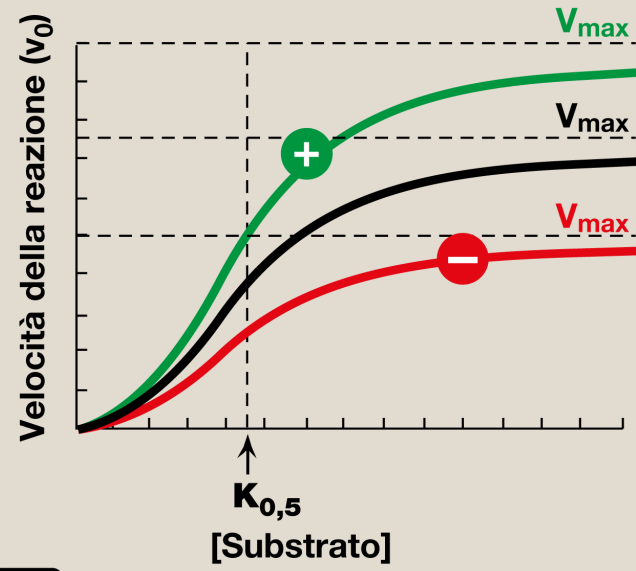
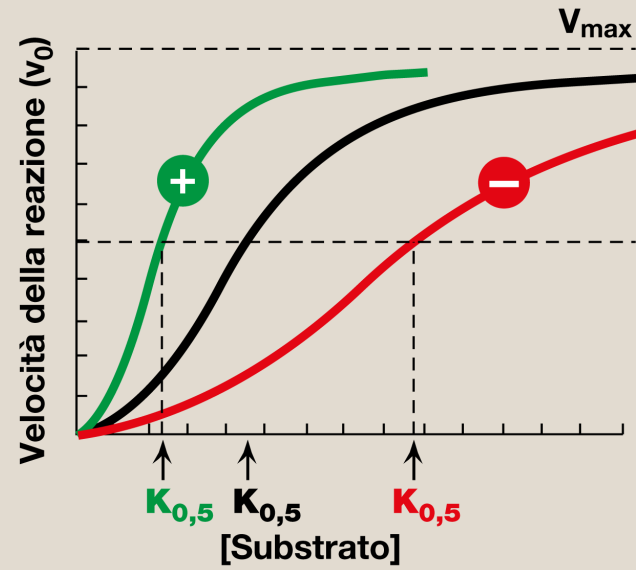


- Il legame del substrato causa variazioni conformazionali che si riflettono sull'attività di altri siti
- Generalmente il cambiamento conformazionale converte una conformazione relativamente inattiva (**stato T**) in una conformazione più attiva (**stato R**)





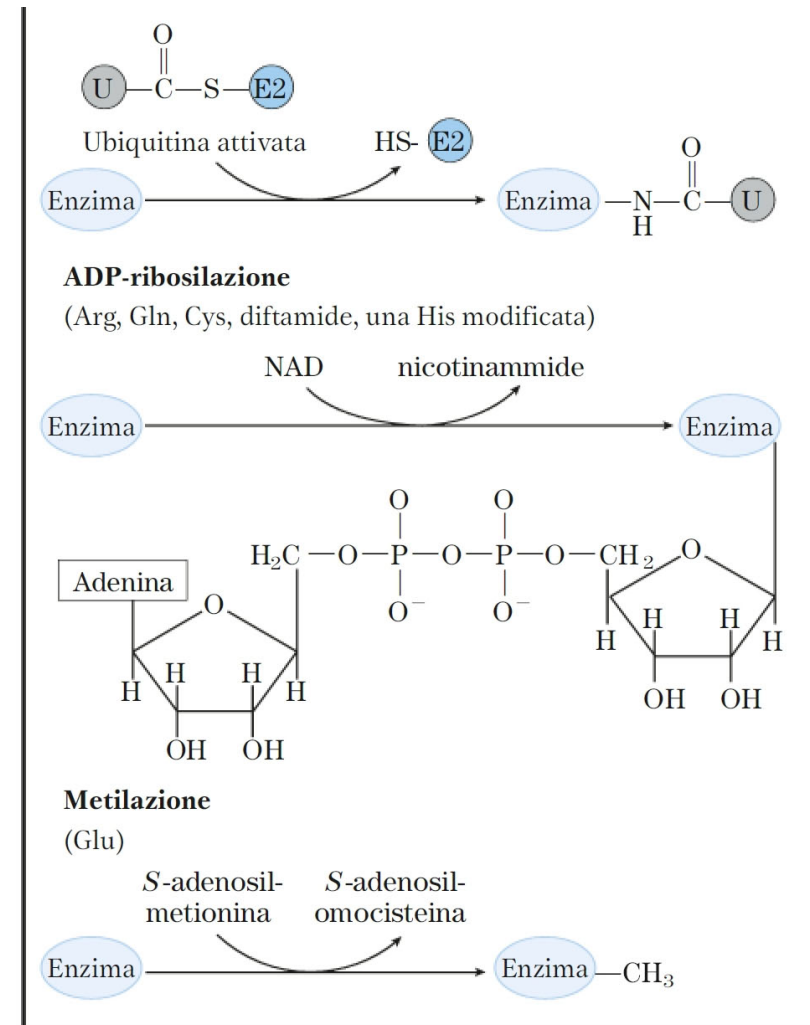
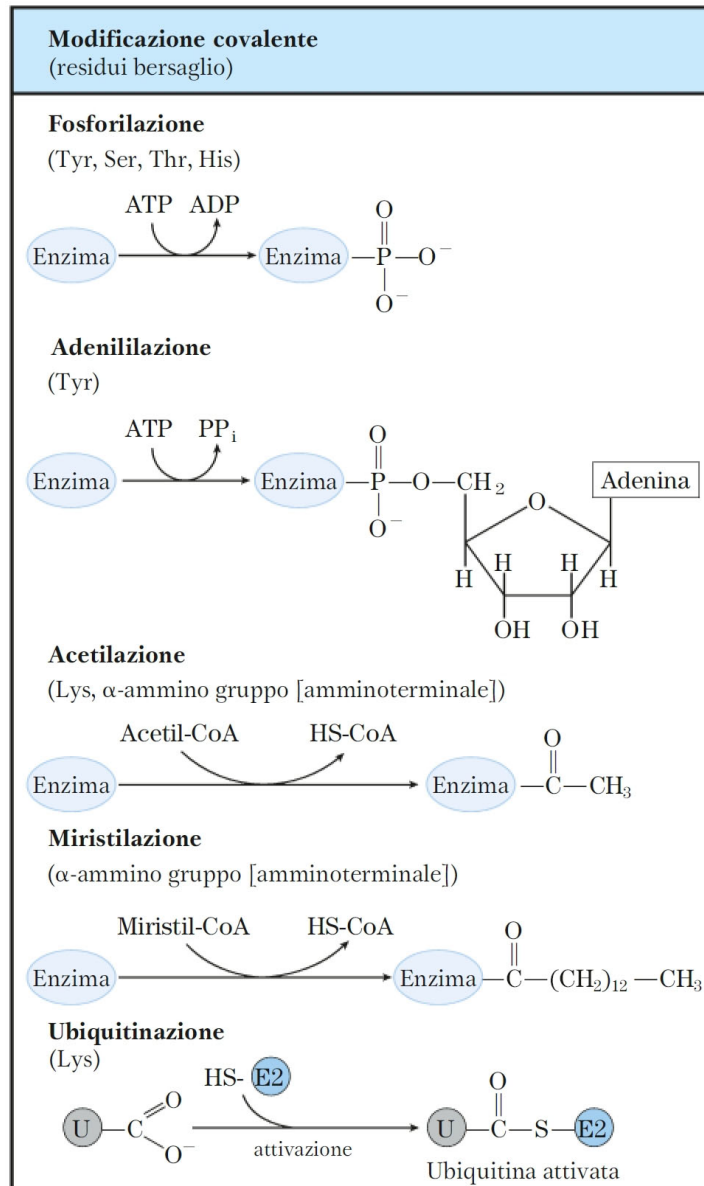
- I modulatori allosterici **non** si devono confondere con gli inibitori reversibili acompetitivi e non competitivi

A**B**

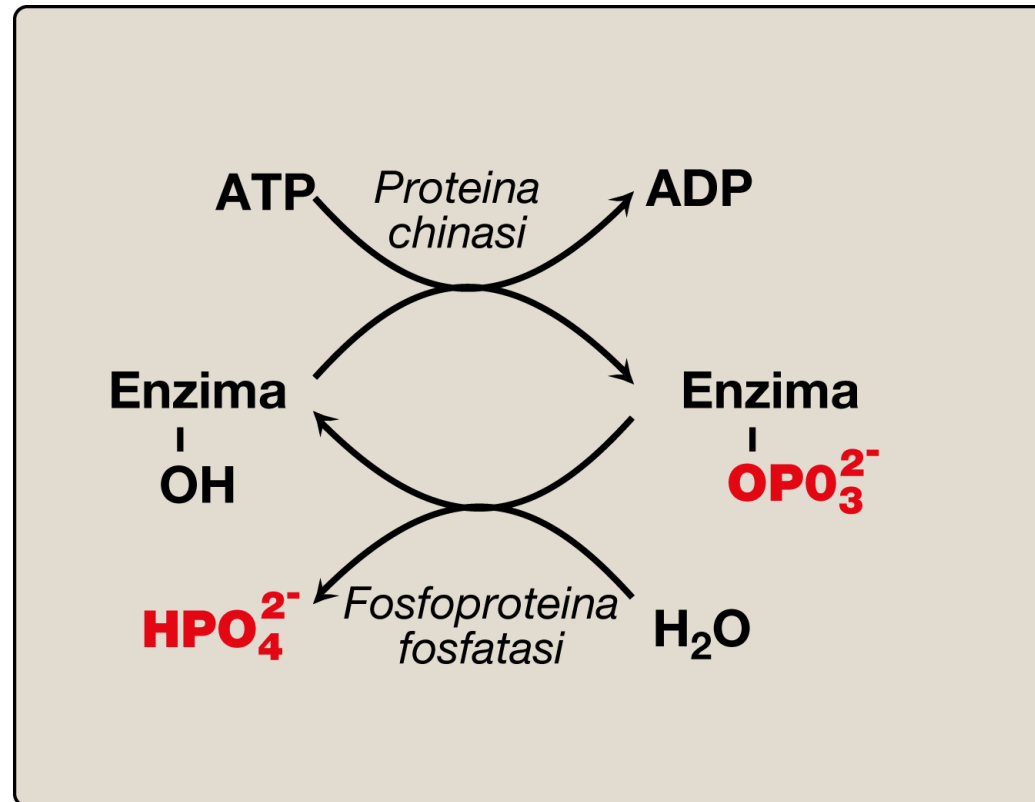
Regolazione dell'attività enzimatica

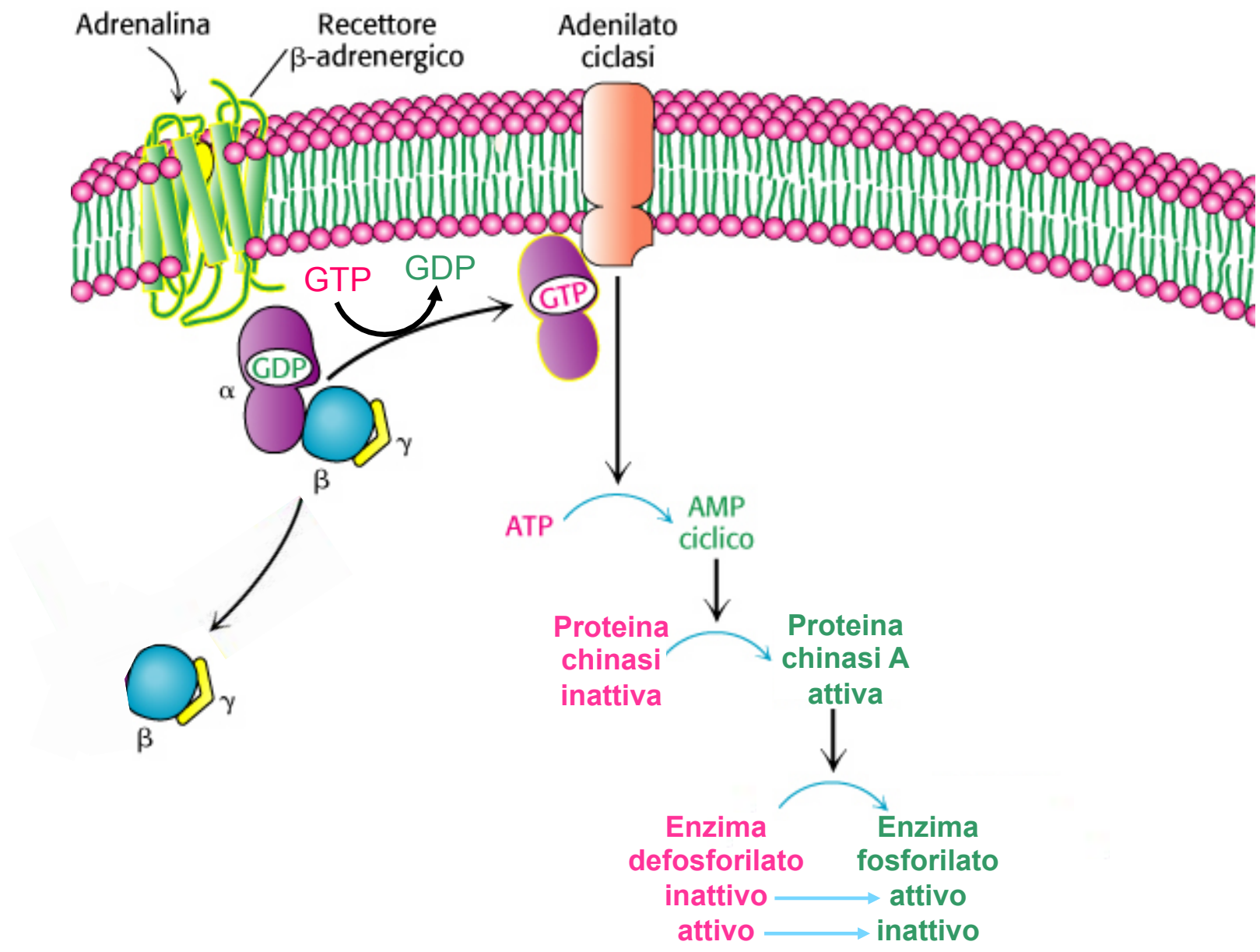
- Regolazione allosterica
- Regolazione covalente:
 - reversibile
 - irreversibile: mediante proteolisi
- Sintesi e degradazione dell'enzima

Regolazione covalente reversibile dell'attività enzimatica



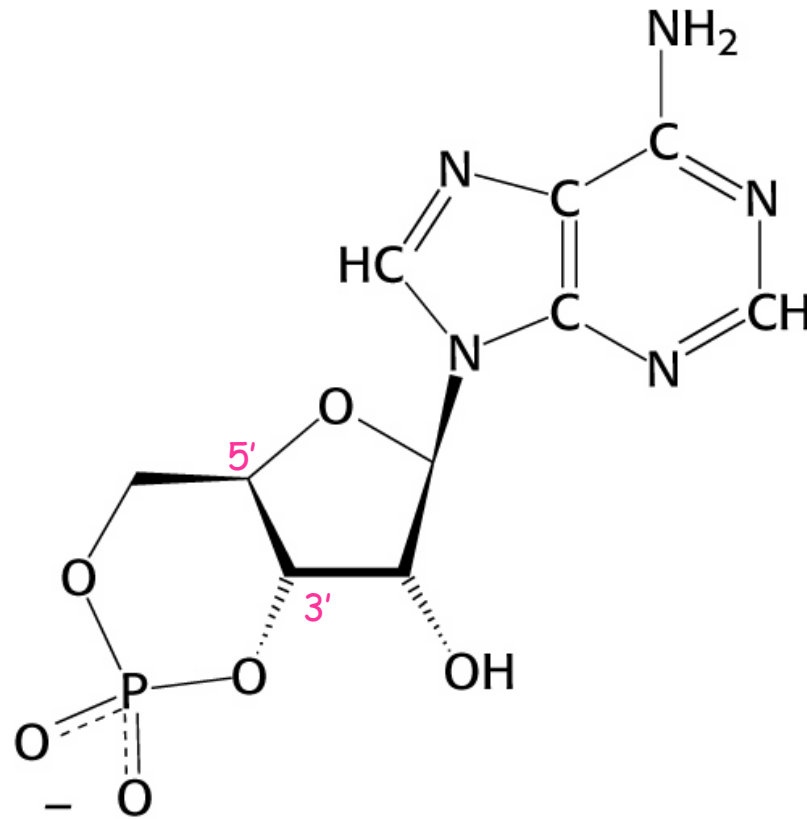
Regolazione covalente reversibile mediante fosforilazione





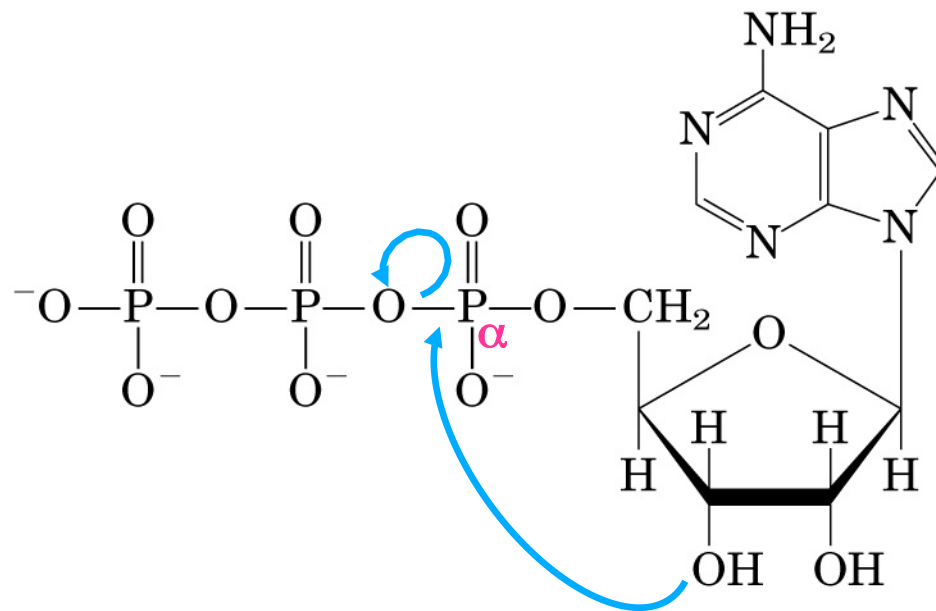
Regolazione covalente reversibile

Le proteine chinasi A sono attivate dall' **cAMP**

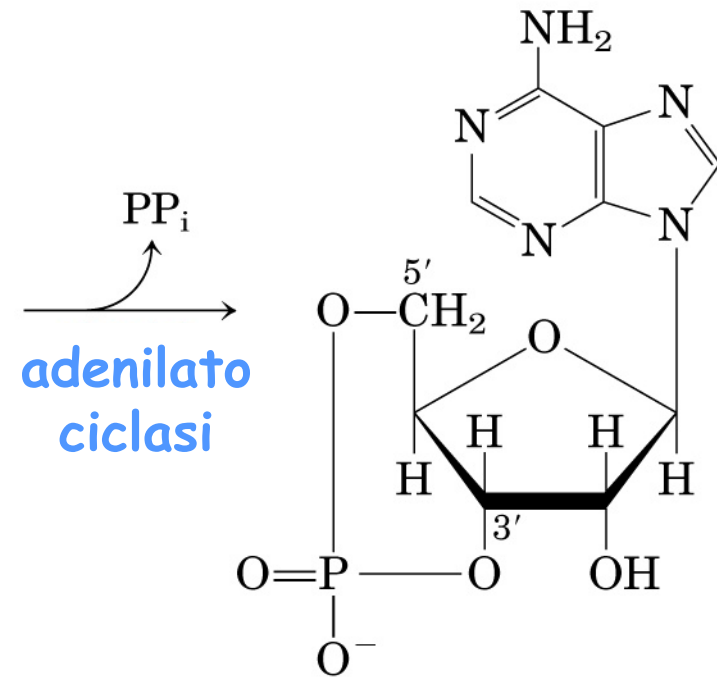


**Adenosina monofosfato ciclico
(cAMP)**

Regolazione covalente reversibile

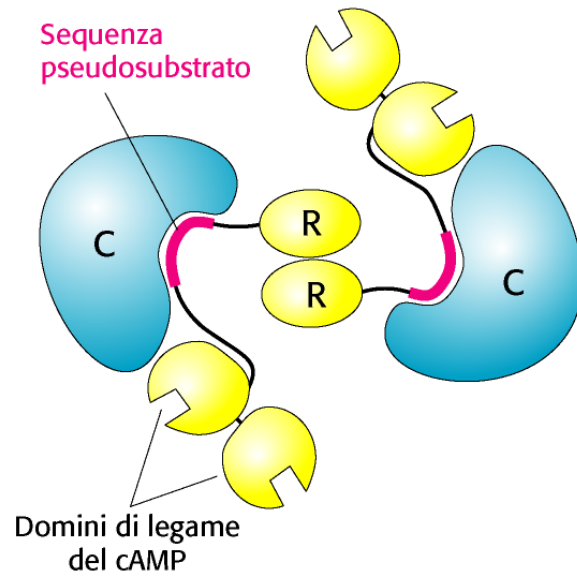


ATP



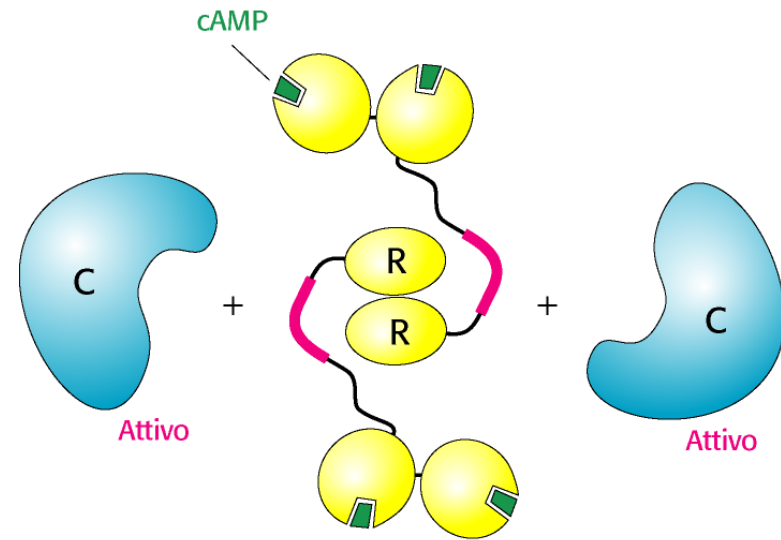
Adenosina
3',5'-monofosfato
ciclico
(cAMP)

Regolazione covalente reversibile



Proteina chinasi A inattiva

+ 4 cAMP



Proteina chinasi attiva

Regolazione covalente reversibile

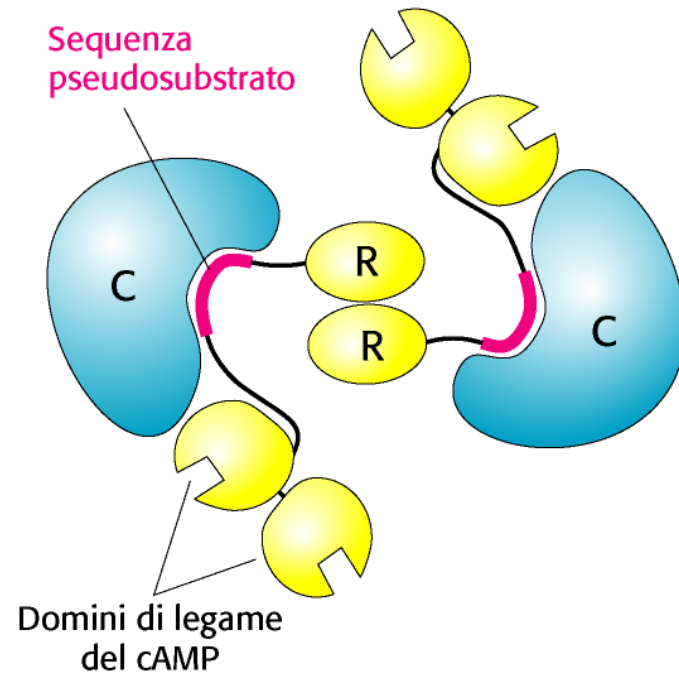
Le proteine chinasi riconoscono nella proteina-substrato determinate sequenze amminoacidiche dette **sequenze consenso** del tipo:

- Arg-Arg-X-**Ser**-Z
- Arg-Arg-X-**Thr**-Z

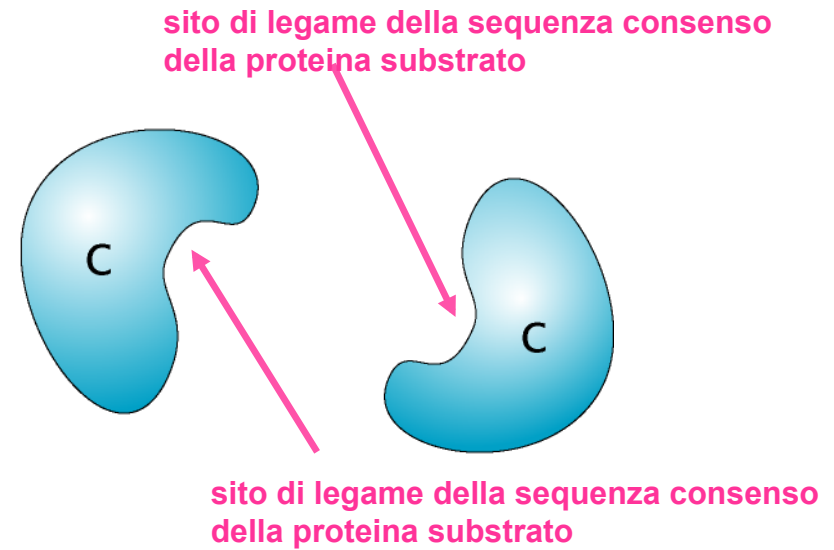
sequenza pseudosubstrato sulle subunità regolatrici:

Arg-Arg-Gly-**Ala**-Ile

Regolazione covalente reversibile

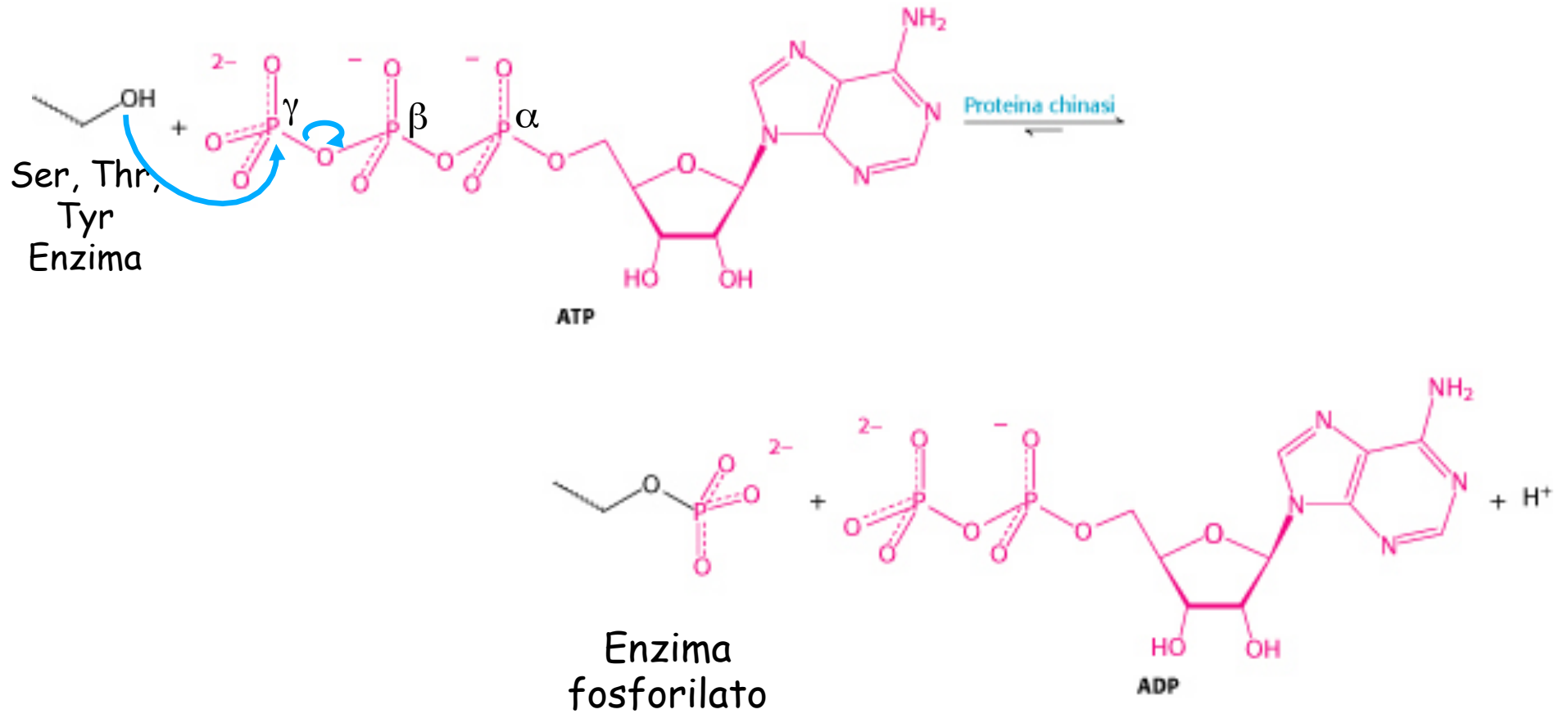


Proteina chinasi A
inattiva



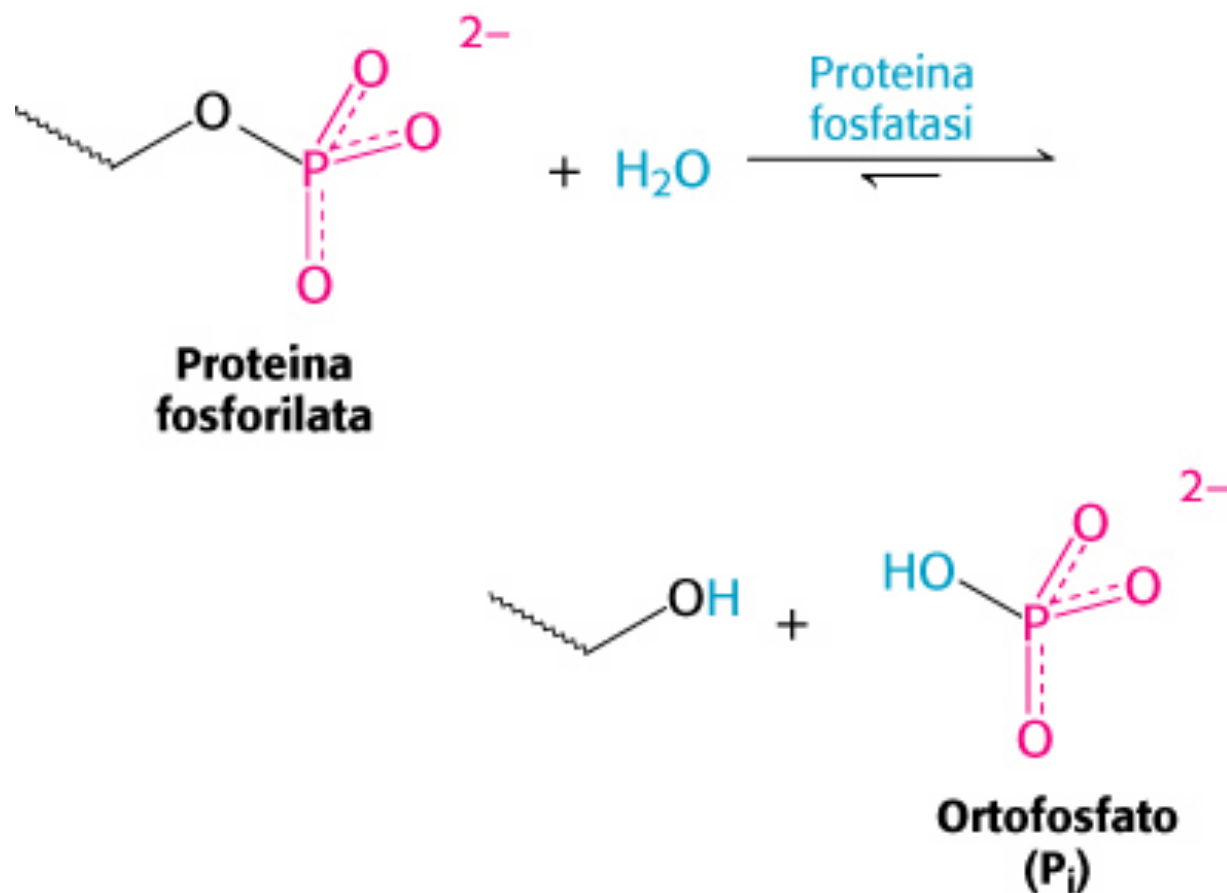
Proteina chinasi A
attiva

Regolazione covalente reversibile



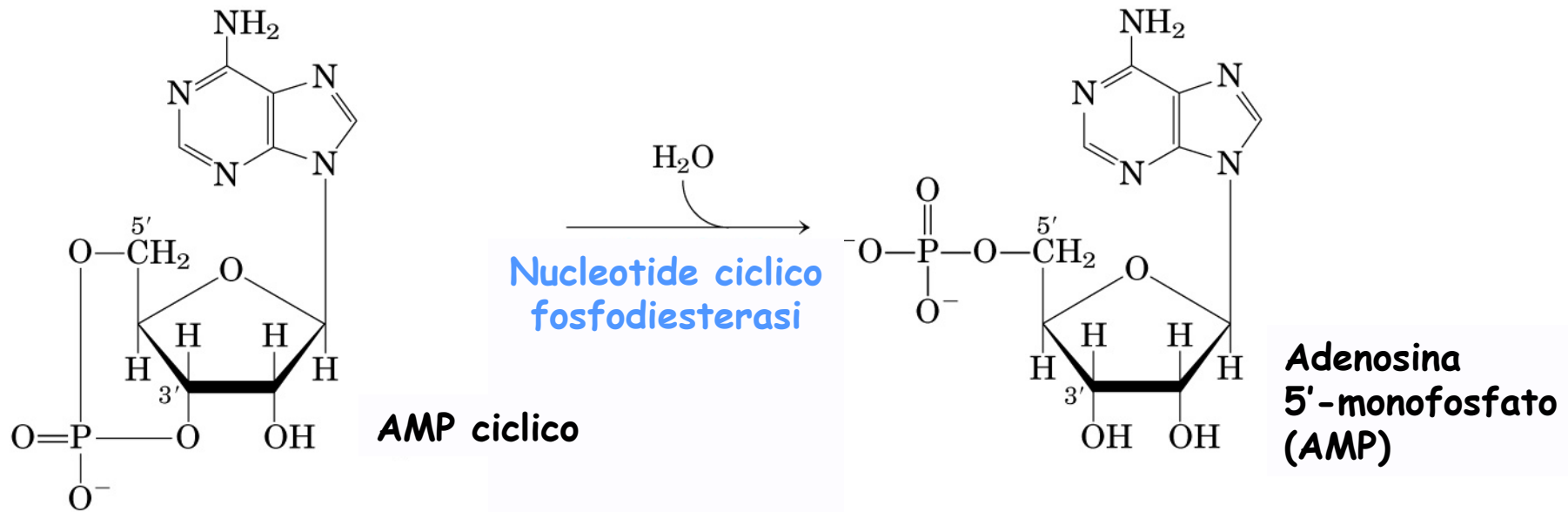
Regolazione covalente reversibile

Defosforilazione della proteina

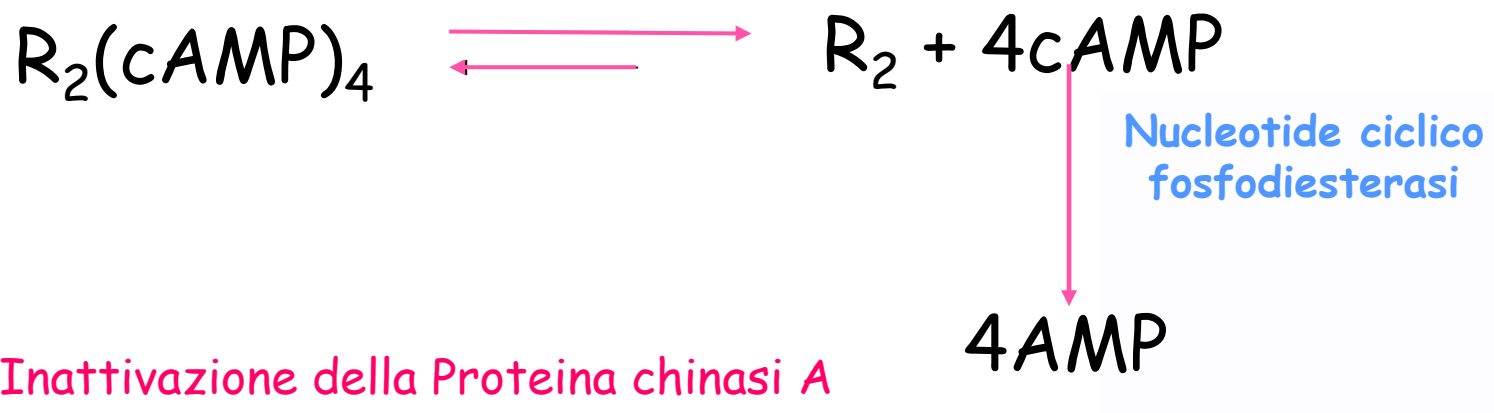
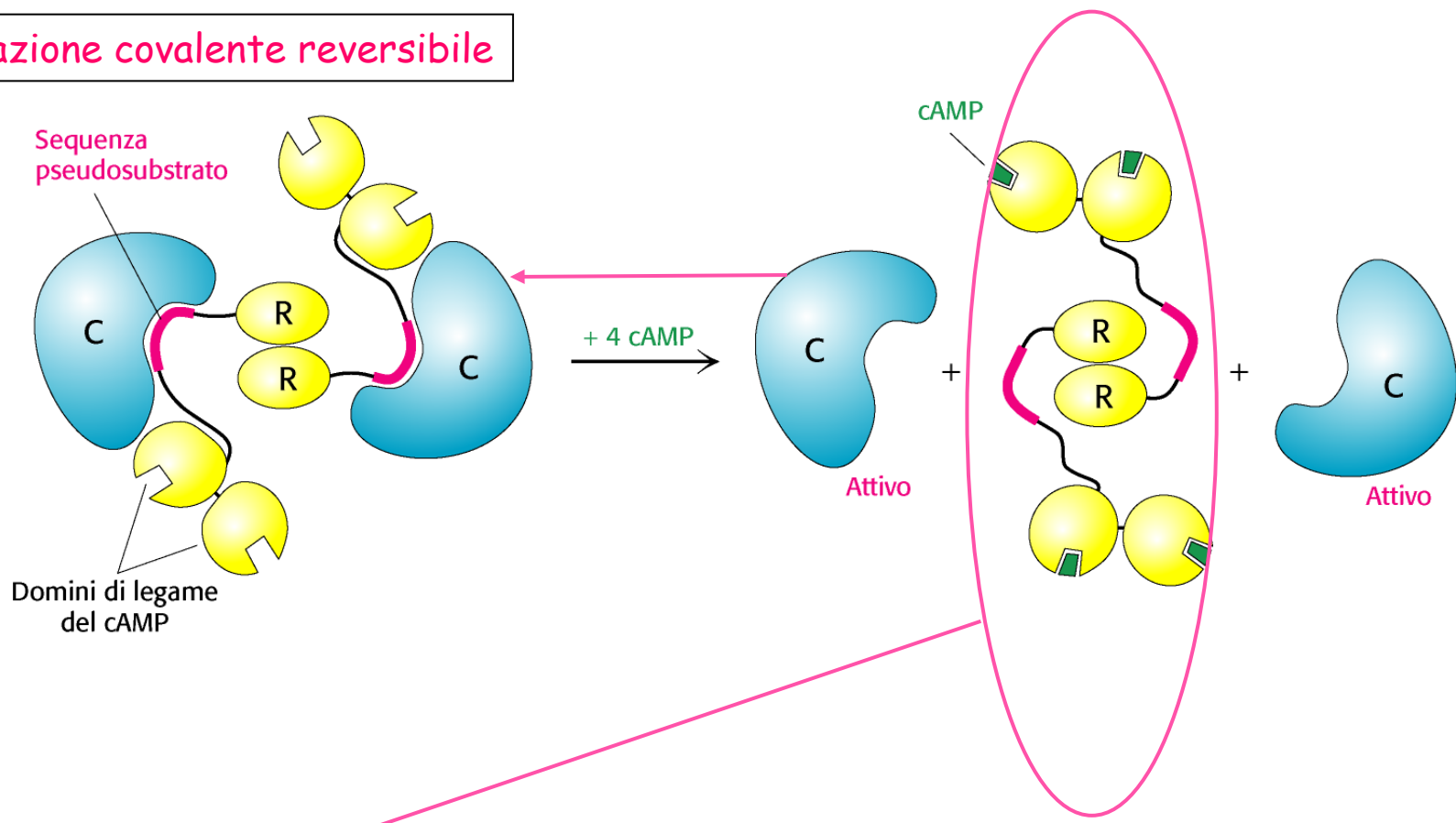


Regolazione covalente reversibile

Degradazione dell'AMP ciclico

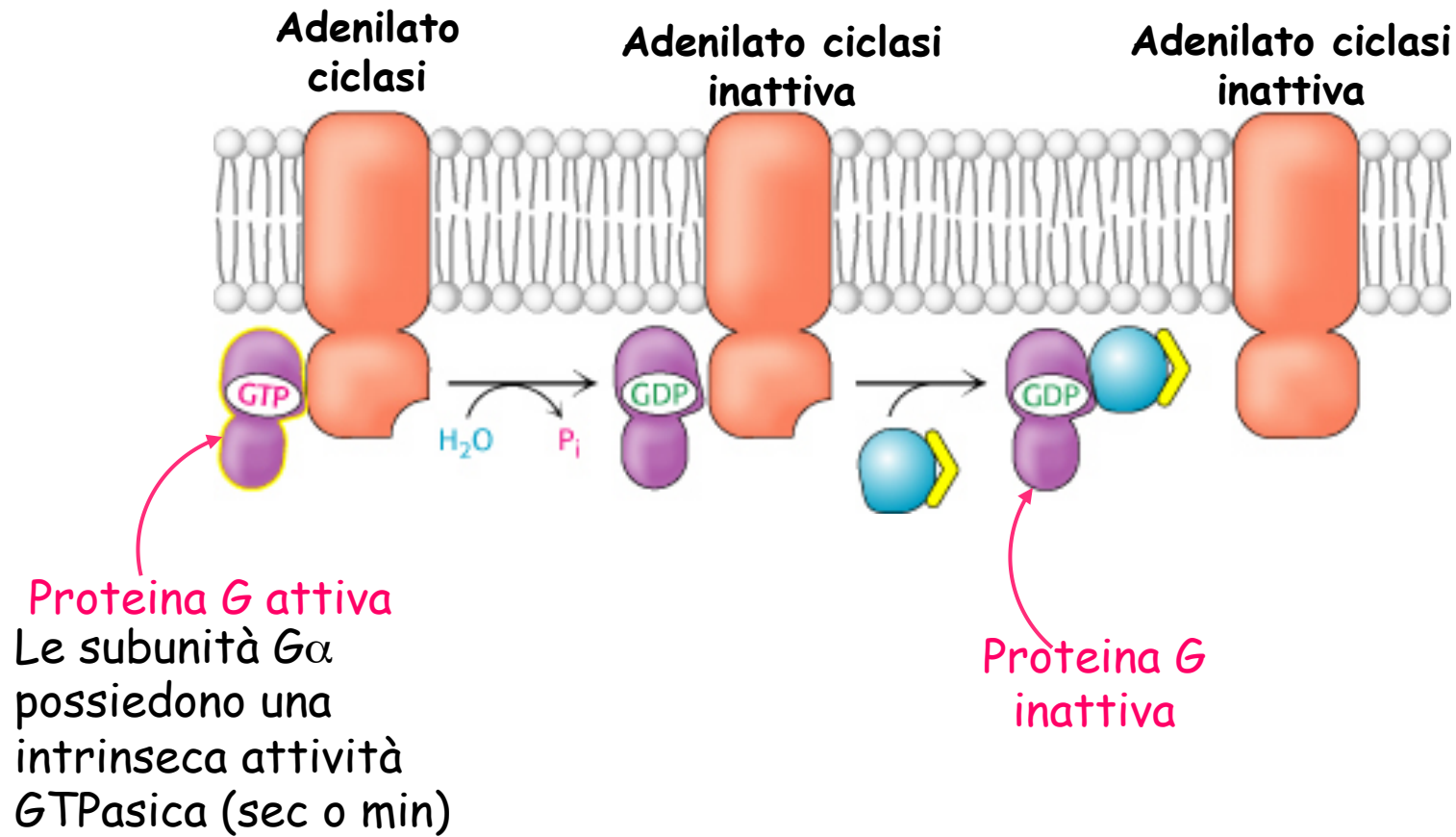


Regolazione covalente reversibile



Regolazione covalente reversibile

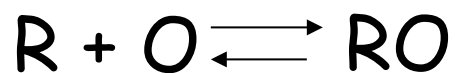
Inattivazione dell'adenilato ciclasi



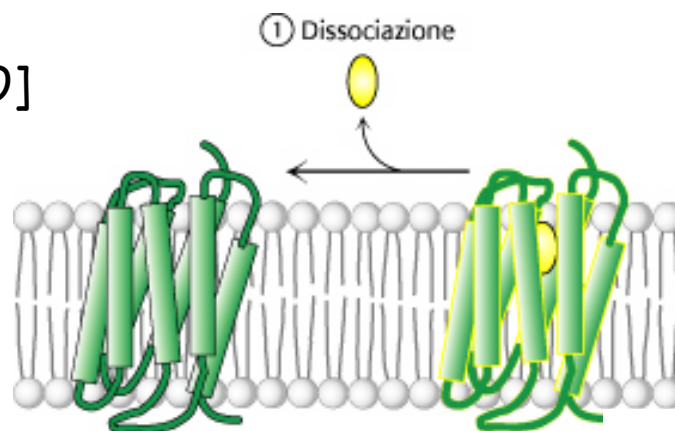
Regolazione covalente reversibile

Inattivazione del recettore

Equilibrio si sposta verso sinistra

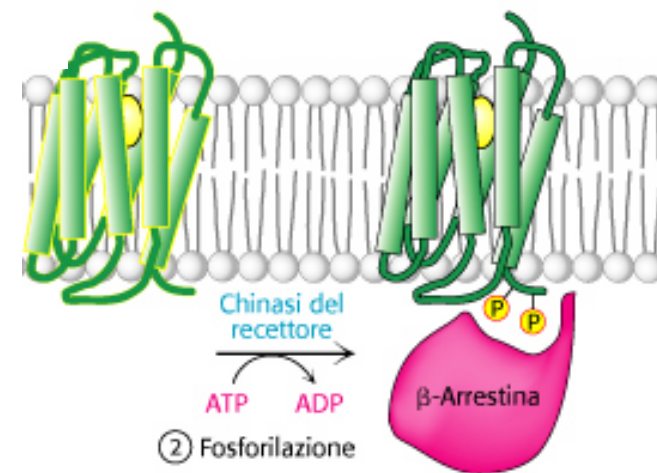
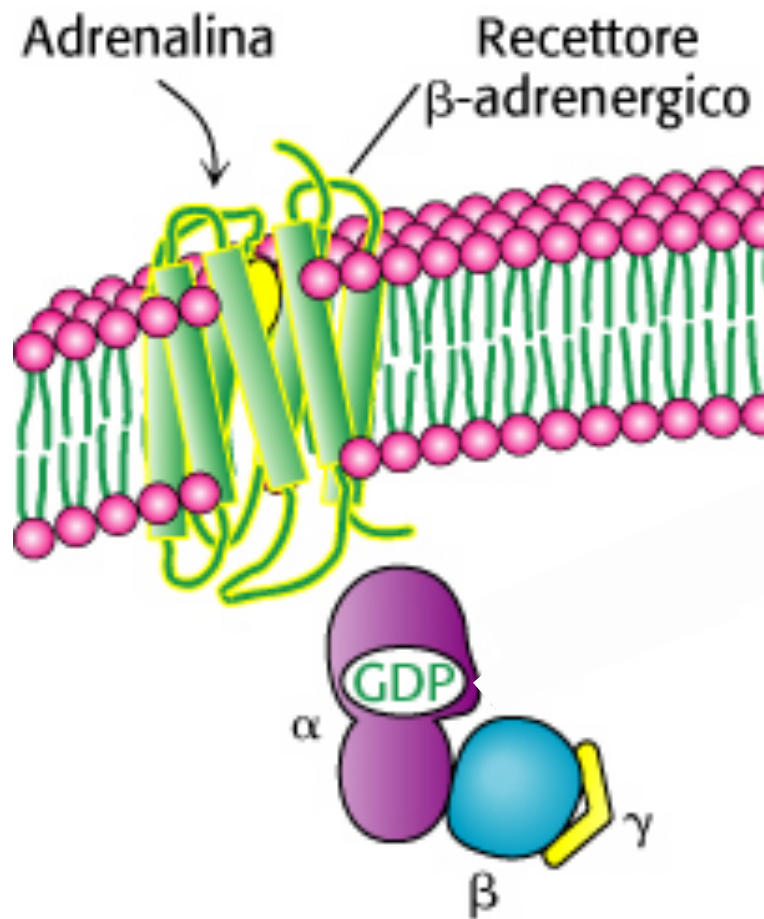


↓
Calo della [O]



Regolazione covalente reversibile

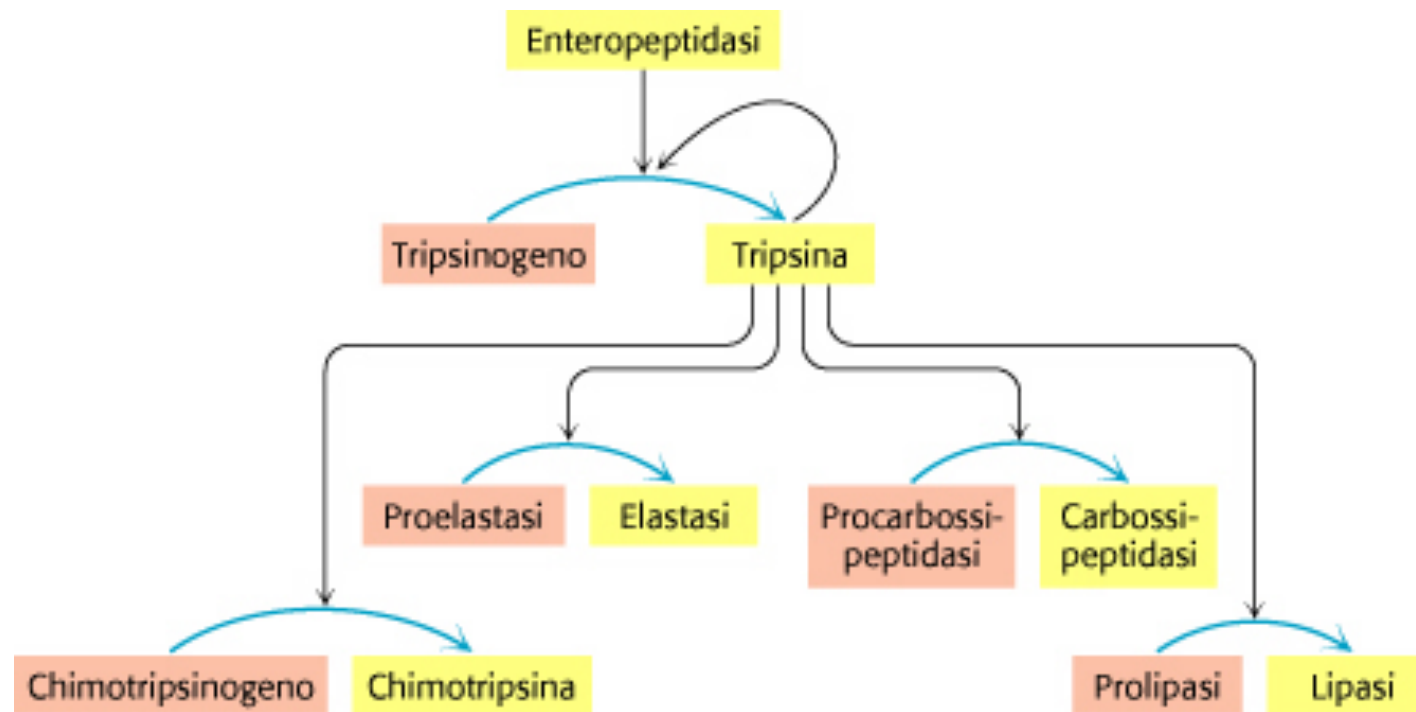
Inattivazione del recettore



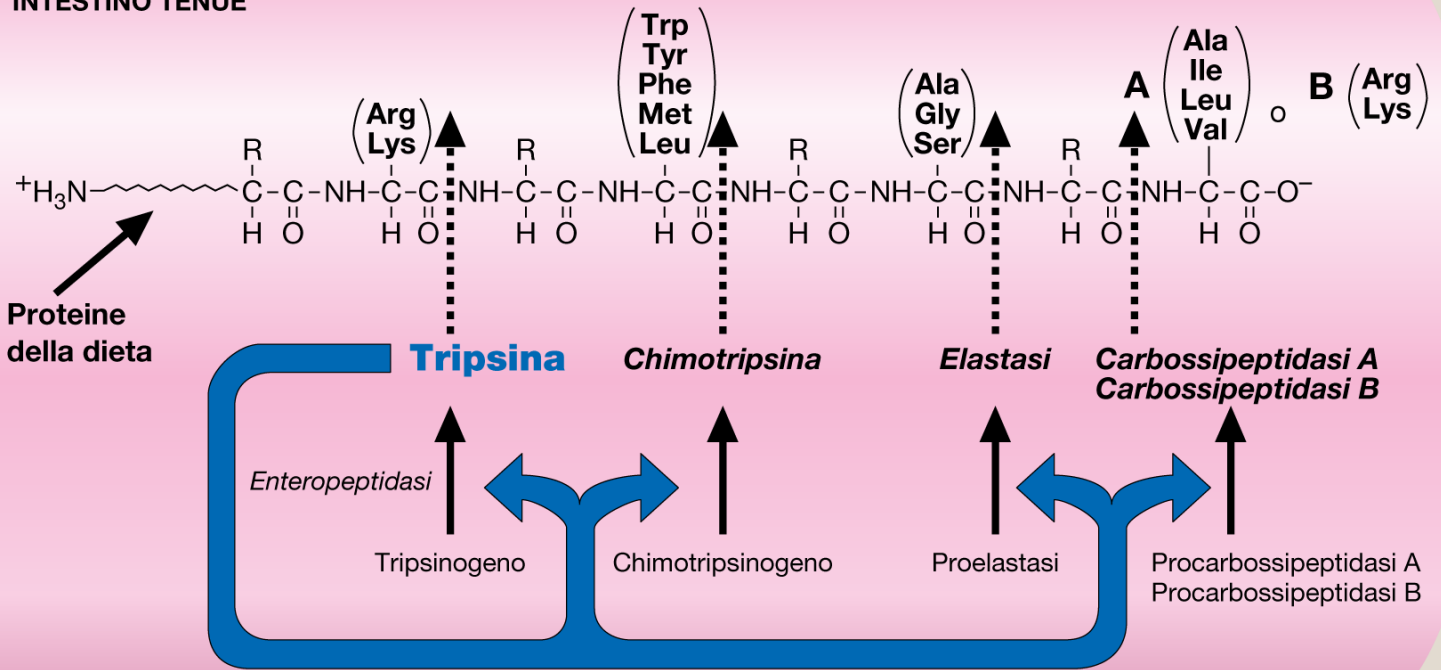
Regolazione dell'attività enzimatica

- Regolazione allosterica
- Regolazione covalente:
 - reversibile
 - irreversibile: mediante proteolisi
- Sintesi e degradazione dell'enzima

Regolazione mediante proteolisi



INTESTINO TENUE



Proteine della dieta

Enteropeptidasi

Tripsinogeno

Tripsina

Chimotripsina

Chimotripsinogeno

Elastasi

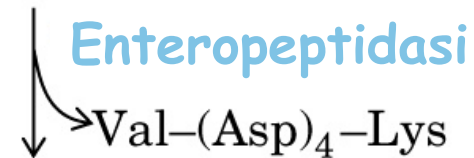
Proelastasi

Carbossipeptidasi A
Carbossipeptidasi B

Procarbossipeptidasi A
Procarbossipeptidasi B

Regolazione mediante proteolisi

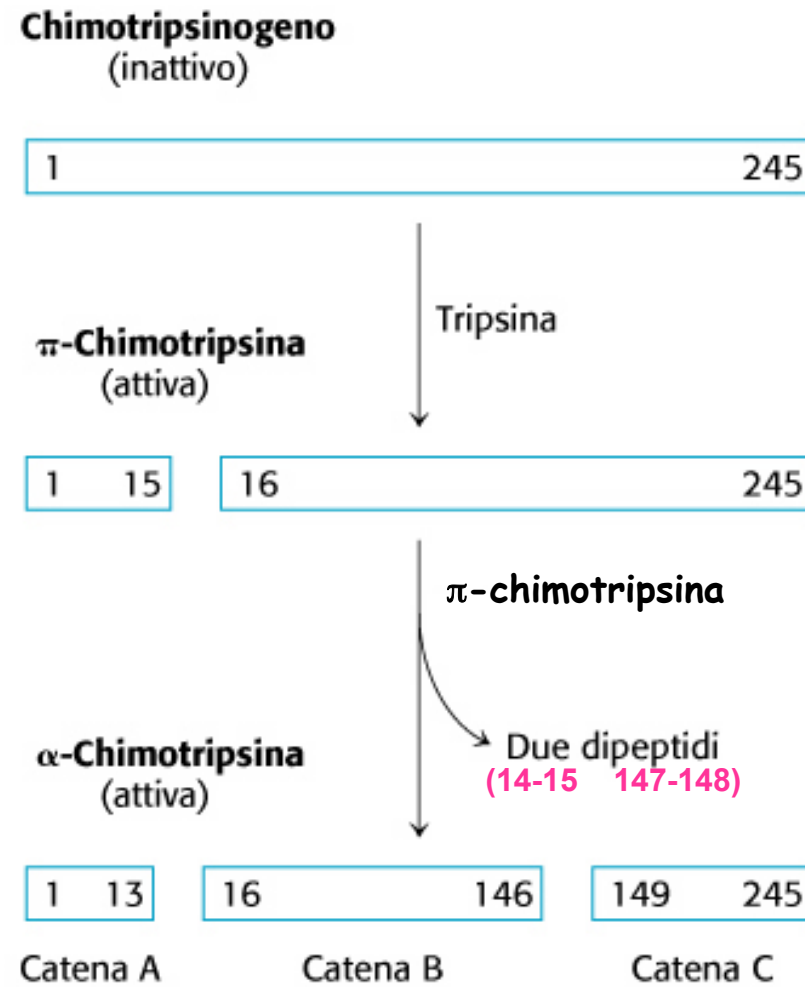
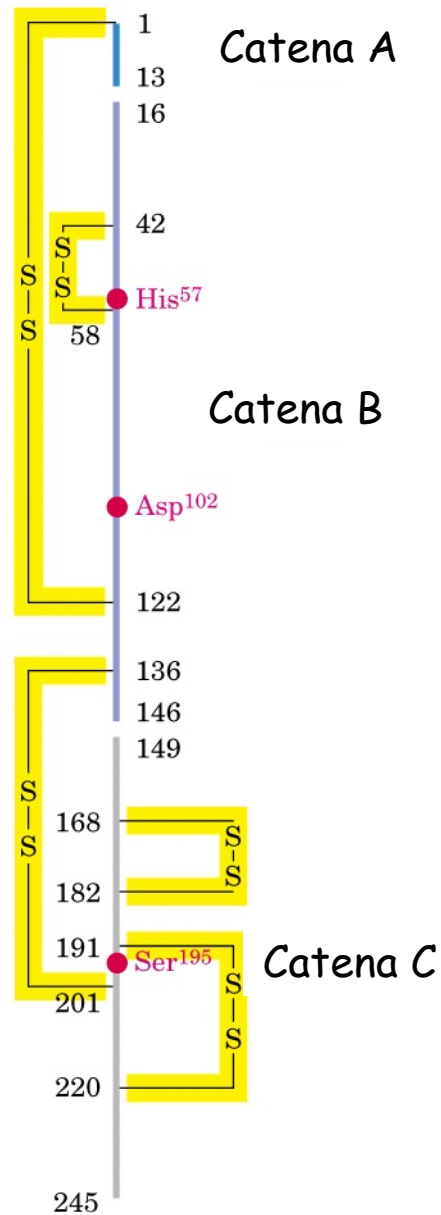
Tripsinogeno



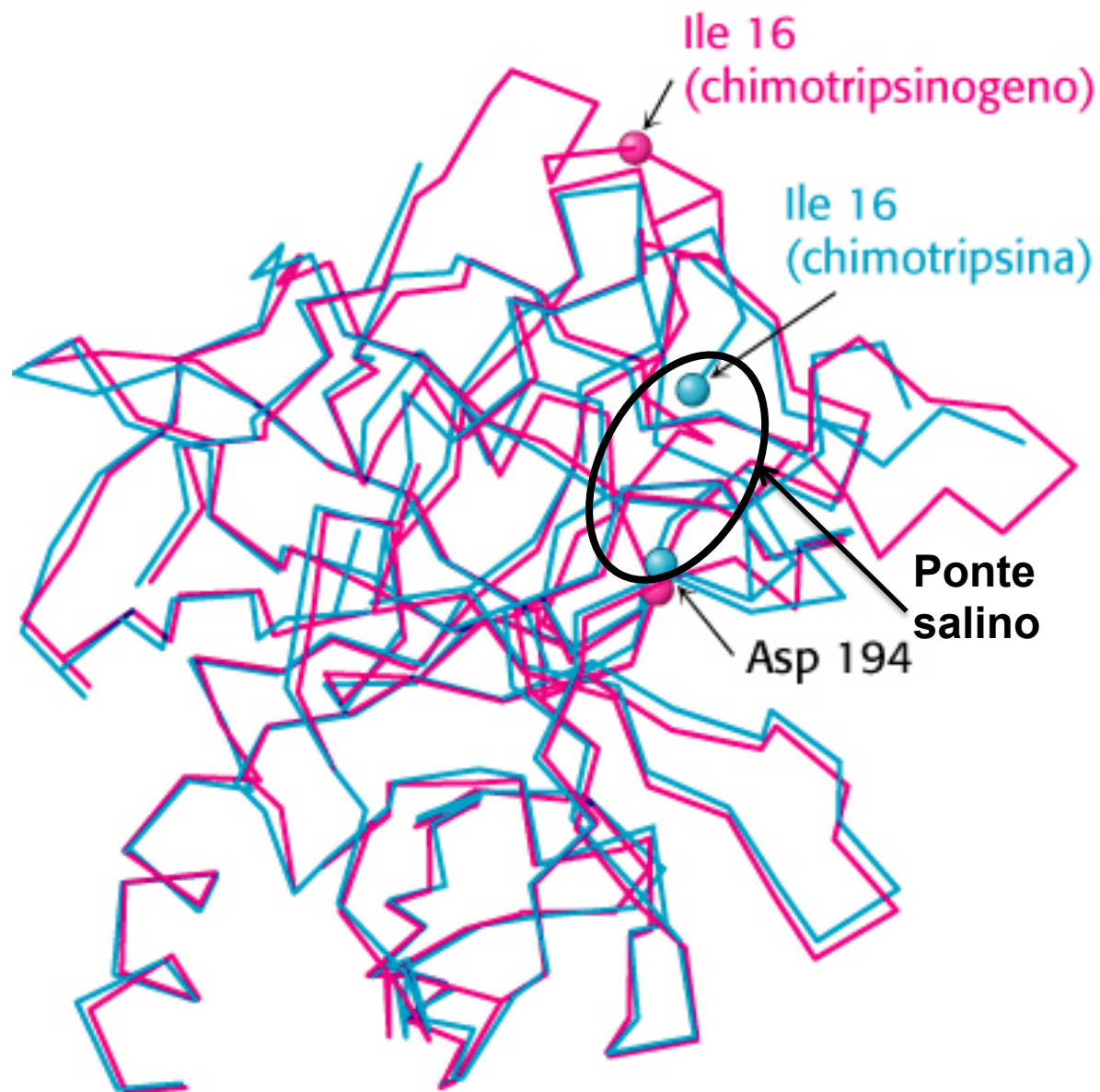
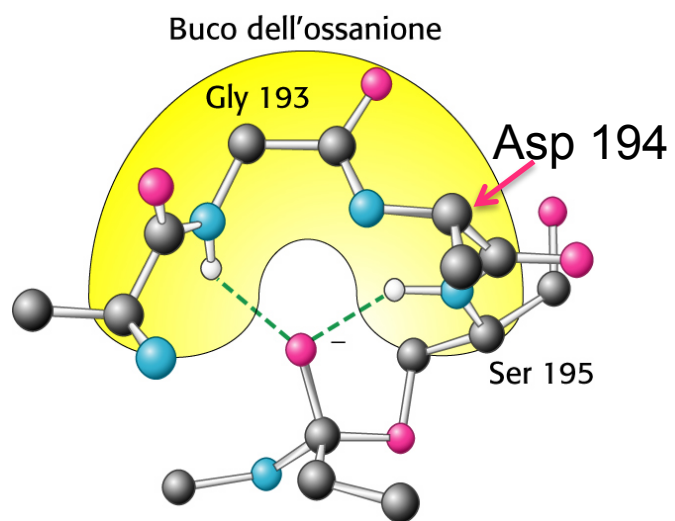
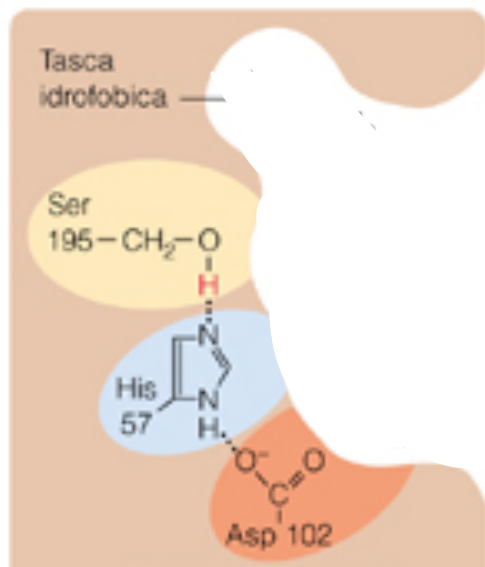
Tripsina



Regolazione mediante proteolisi

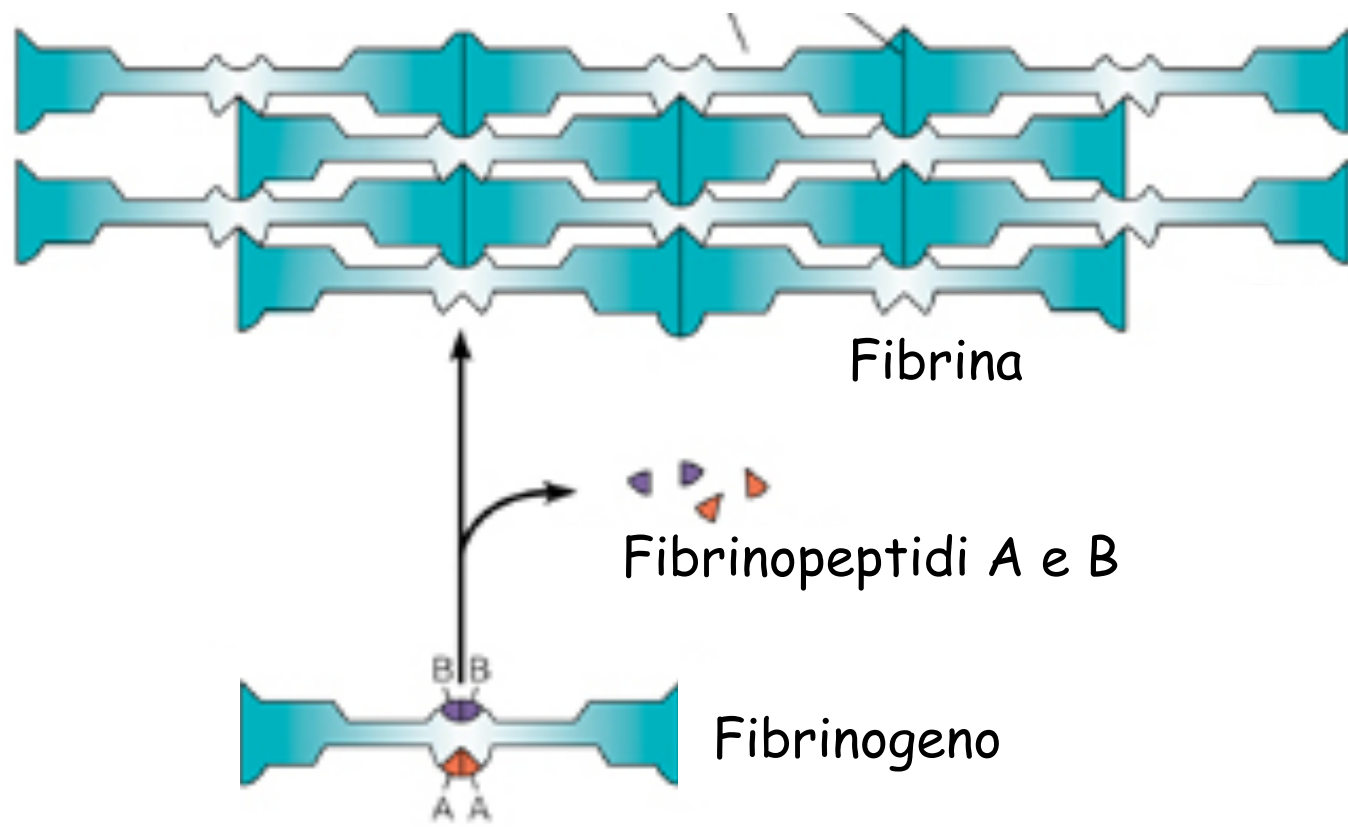


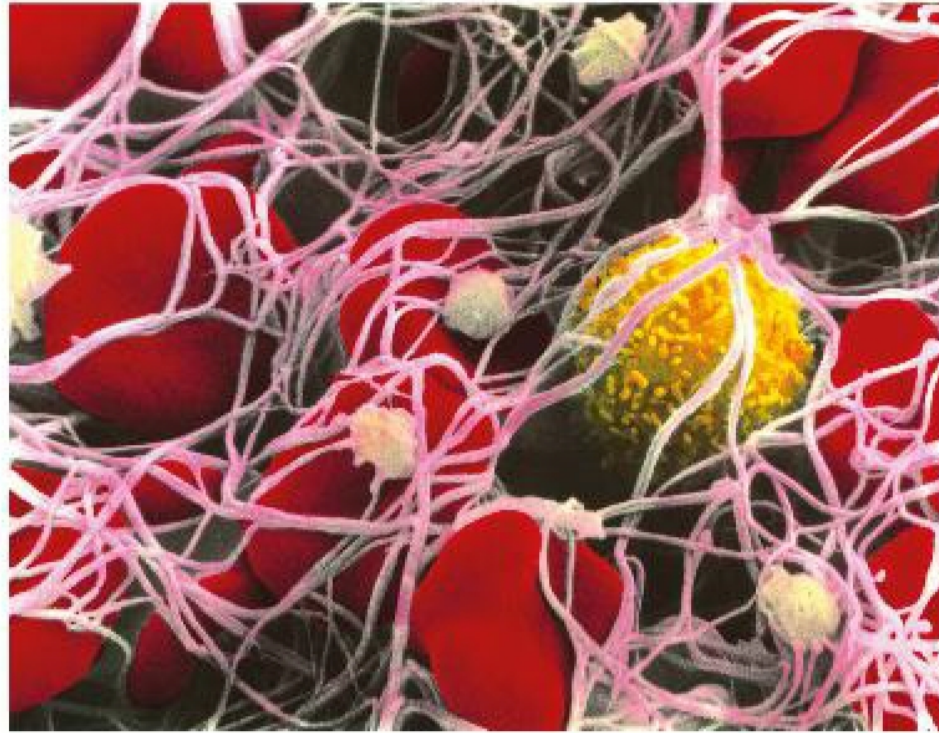
Regolazione mediante proteolisi



Regolazione mediante proteolisi di altri enzimi e proteine non enzimatiche

- Enzimi digestivi
- Fattori della coagulazione del sangue
- Ormoni proteici
- Proteine strutturali
- Proteine dell' apoptosi

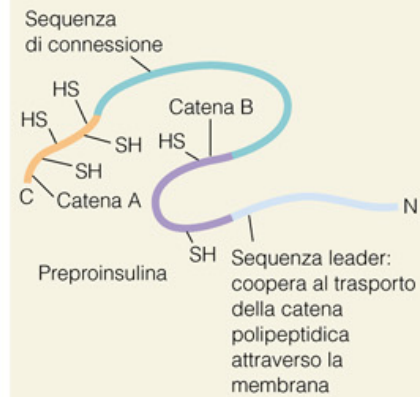




Un coagulo di sangue

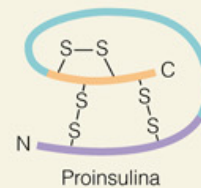
Attivazione per proteolisi dell'insulina

1 La preproinsulina viene sintetizzata come catena ad avvolgimento casuale su ribosomi associati a membrana

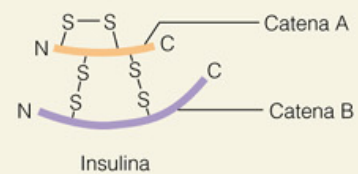


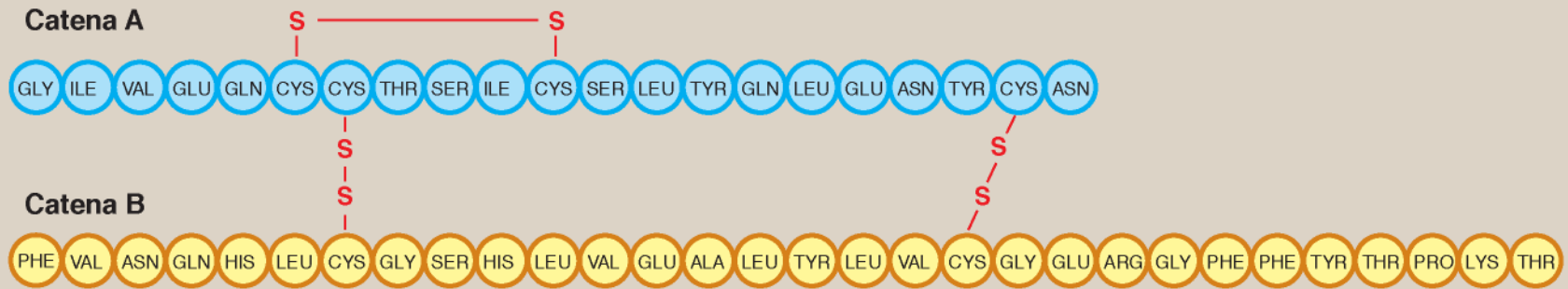
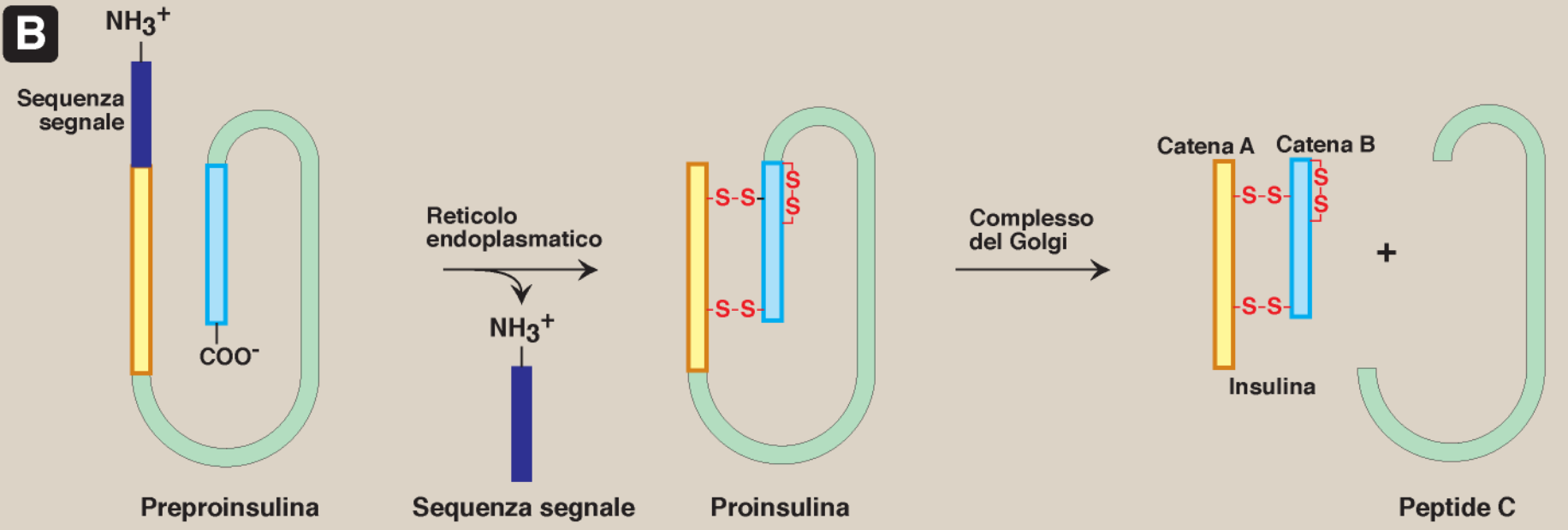
2 La sequenza leader viene scissa e la proinsulina così formata si piega in una conformazione stabile

3 Si formano i ponti disolfuro

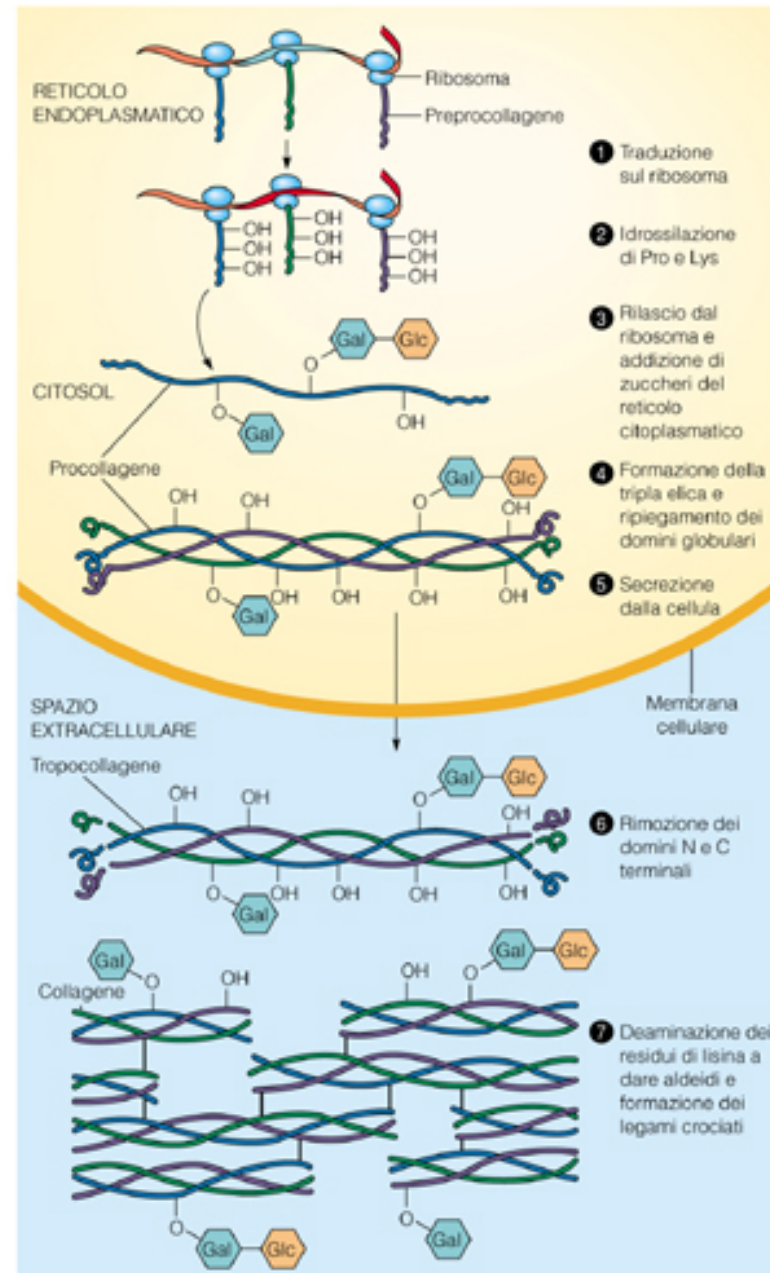


4 La sequenza di connessione viene rimossa e si forma la molecola di insulina matura



A**B**

Maturazione per proteolisi del collagene



Regolazione dell'attività degli enzimi

Evento regolatore	Effettore tipico	Effetto	Tempo necessario per la modificazione
Disponibilità del substrato	Substrato	Modificazione della velocità (v_o)	Immediata
Inibizione da parte del prodotto	Prodotto della reazione	Modificazione della V_{max} e/o della K_m	Immediata
Controllo allosterico	Prodotto finale della via	Modificazione della V_{max} e/o della $K_{0,5}$	Immediata
Modificazione covalente	Un altro enzima	Modificazione della V_{max} e/o K_m	Immediata in pochi minuti
Sintesi o degradazione dell'enzima	Ormone o metabolita	Modificazione della quantità di enzima	Ore o giorni

Regolazione dell'attività enzimatica

- Regolazione allosterica
- Regolazione covalente:
 - reversibile
 - irreversibile: mediante proteolisi
- Sintesi e degradazione dell'enzima
- Legame a proteine regolatrici
- Segregazione in un organello

Fattori che controllano la quantità e l'attività di un enzima

