

4 categorie principali di proteasi

Serina proteasi
Cisteina proteasi

} Formano legami
covalenti con il substrato

Aspartil-proteasi
Metallo-proteasi

} Non formano legami
covalenti

SERINA PROTEASI: meccanismo catalitico

Gruppo di enzimi proteolitici molto diffuso

Meccanismo catalitico comune: residuo di Ser particolarmente reattivo

Enzimi digestivi dei procarioti ed eucarioti:

Proteine coinvolte nella cascata di coagulazione del sangue

Proteine coinvolte nel processo di infiammazione, etc.

Proteine coinvolte nei processi di regolazione mediante attivazione/inattivazione da taglio proteolitico

es. enzimi digestivi

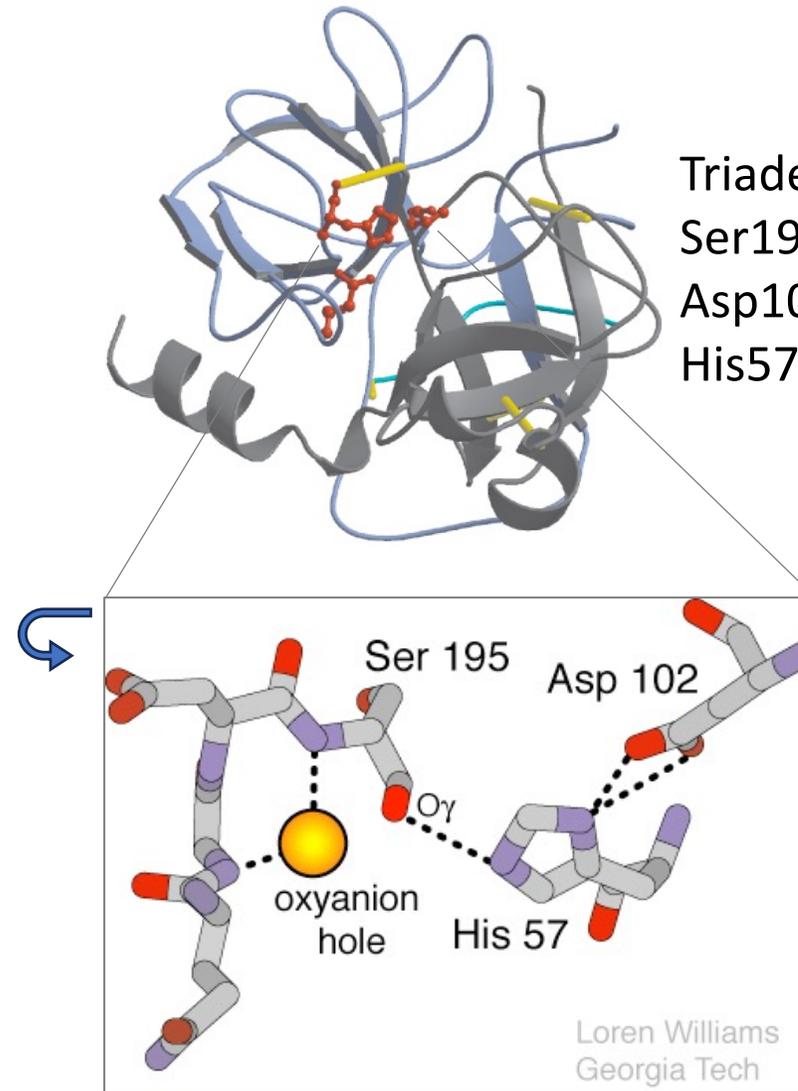
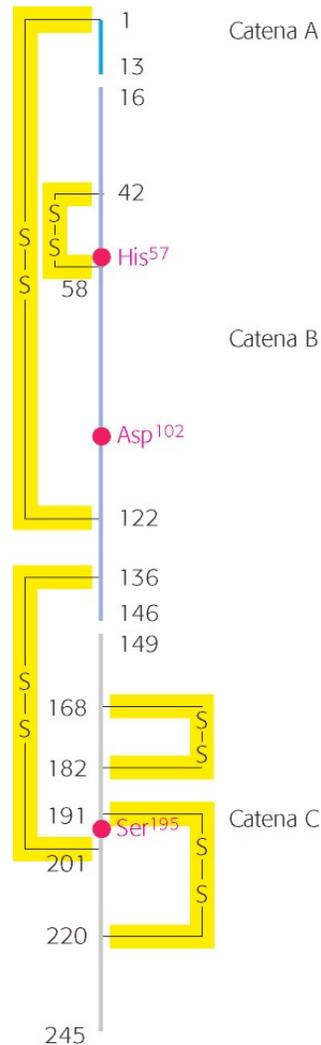
Chimotripsina (residui aromatici)

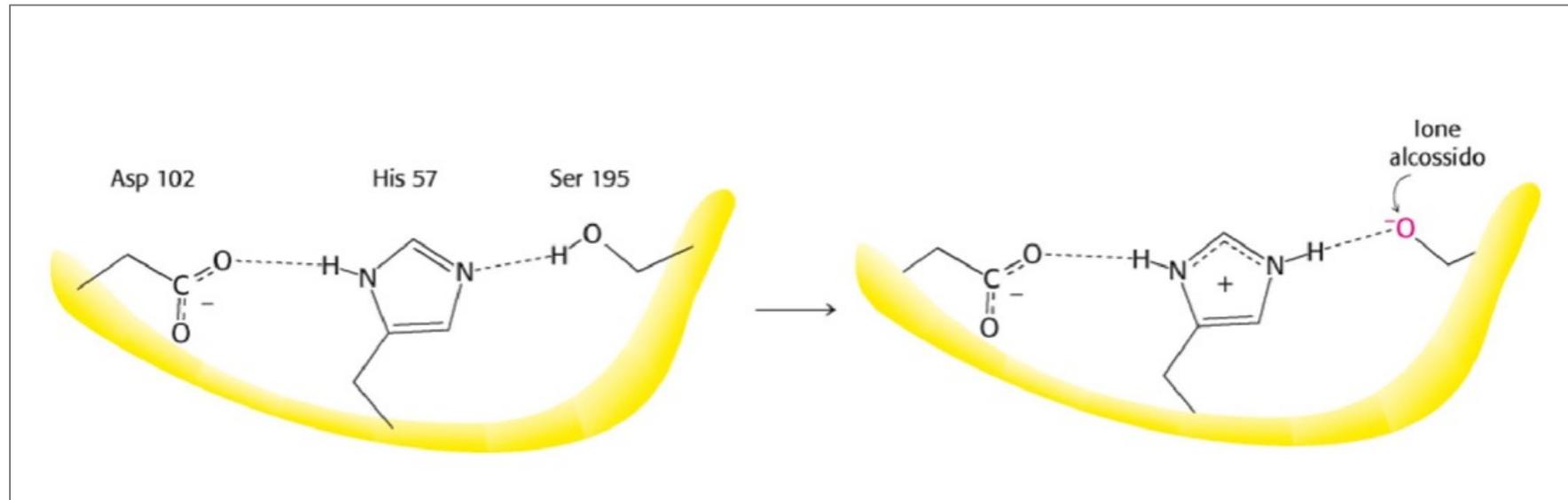
Tripsina (residui basici, arg e lys)

Elastasi (residui neutri)

CHIMOTRIPSINA

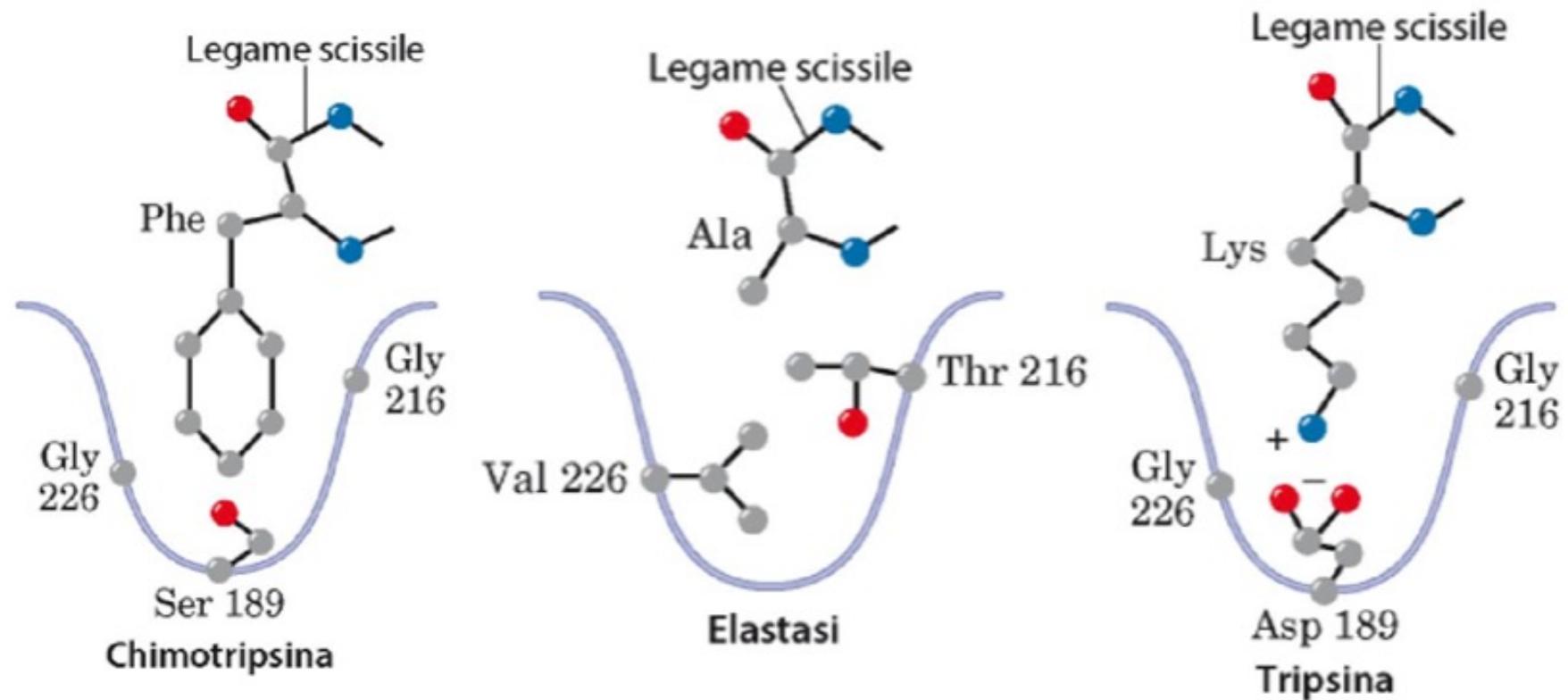
La **chimotripsina** idrolizza legami peptidici adiacenti a residui aromatici (Trp, Phe, Tyr): è un esempio di stabilizzazione dello stato di transizione e dell'utilizzo dei **meccanismi acido-base generale e covalente**.





Questa triade catalitica funziona in primo luogo con un meccanismo di catalisi acido-base. Questi tre amminoacidi sono infatti allineati in maniera tale da creare legami idrogeno; questa rete di legami idrogeno, che in particolare coinvolge il carbossile dell'aspartato, un idrogeno dell'istidina, un atomo di azoto dell'istidina ed un OH della serina, fa sì che ci sia una redistribuzione della nuvola elettronica che coinvolge questi tre amminoacidi.

Il gruppo ossidrilico della serina diventa in tal modo molto più acido di come è normalmente, tanto che perderà lo ione idrogeno (dell'OH) molto più facilmente; infatti la serina 195 formerà uno ione alcossido che presenterà una carica negativa, che permetterà di attaccare il legame peptidico da scindere.



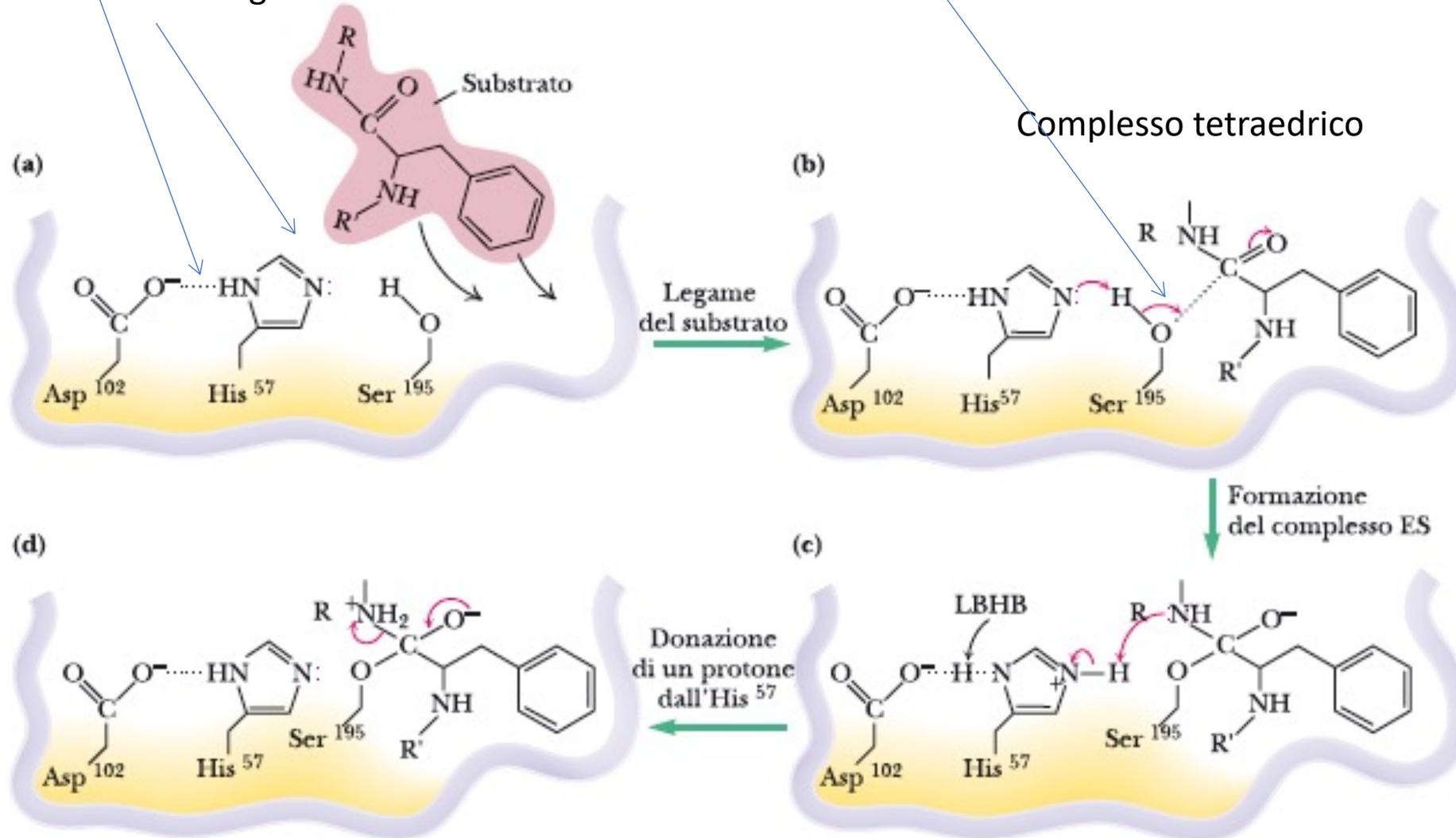
Chimotripsina, elastasi e tripsina sono serina proteasi digestive, che pur avendo stessa funzione (catalizzano cioè la stessa reazione, ovvero la scissione del legame peptidico) presentano una diversa specificità di substrato, che può cambiare semplicemente con variazioni della struttura terziaria del loro sito attivo. Questi tre enzimi presentano una tasca di legame molto simile; le uniche varianti sono date dal fatto che:

- nella chimotripsina la tasca di legame (che lega la catena laterale della molecola di substrato) è grande ed idrofobica
- nell'elastasi, a livello del sito attivo si trovano catene laterali più ingombranti (valina e treonina) quindi taglierà solo legami peptidici al cui lato si ha un residuo molto piccolo e non polare (glicina, alanina, valina)
- La tripsina presenta invece nel sito attivo un residuo polare di aspartato ulteriore, ionizzato a pH fisiologico, quindi sarà favorito il legame e taglio di amminoacidi a carica positiva (come lisina e arginina)

Asp102 stabilizza his57

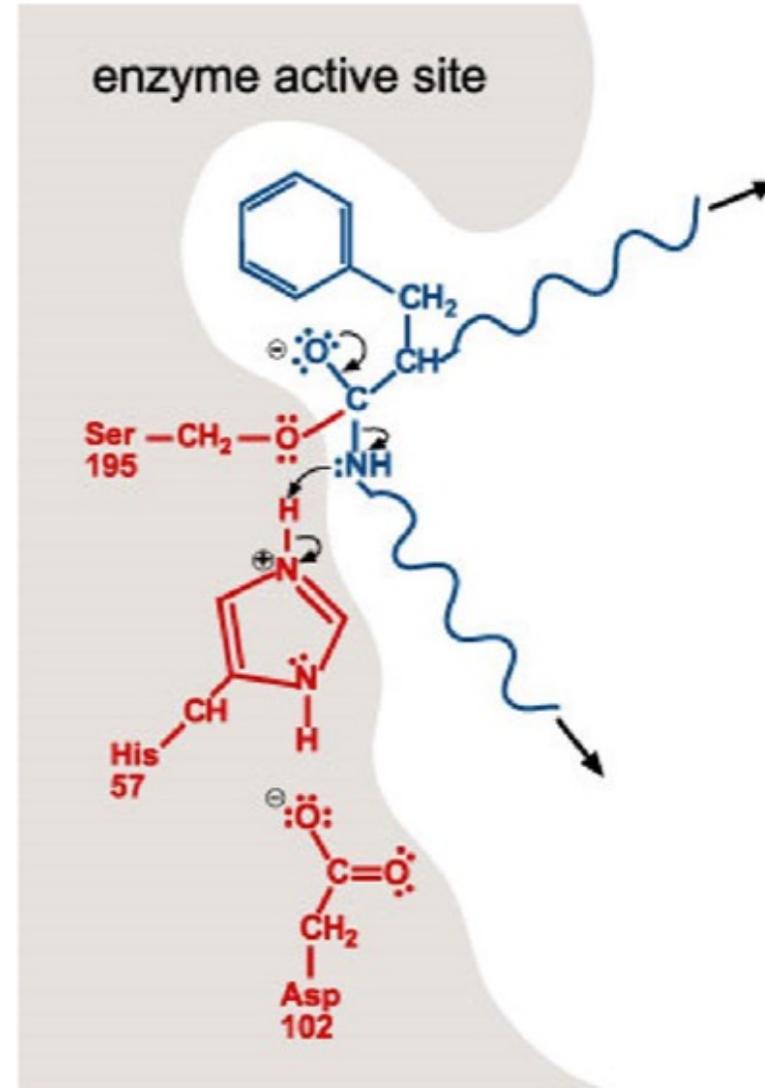
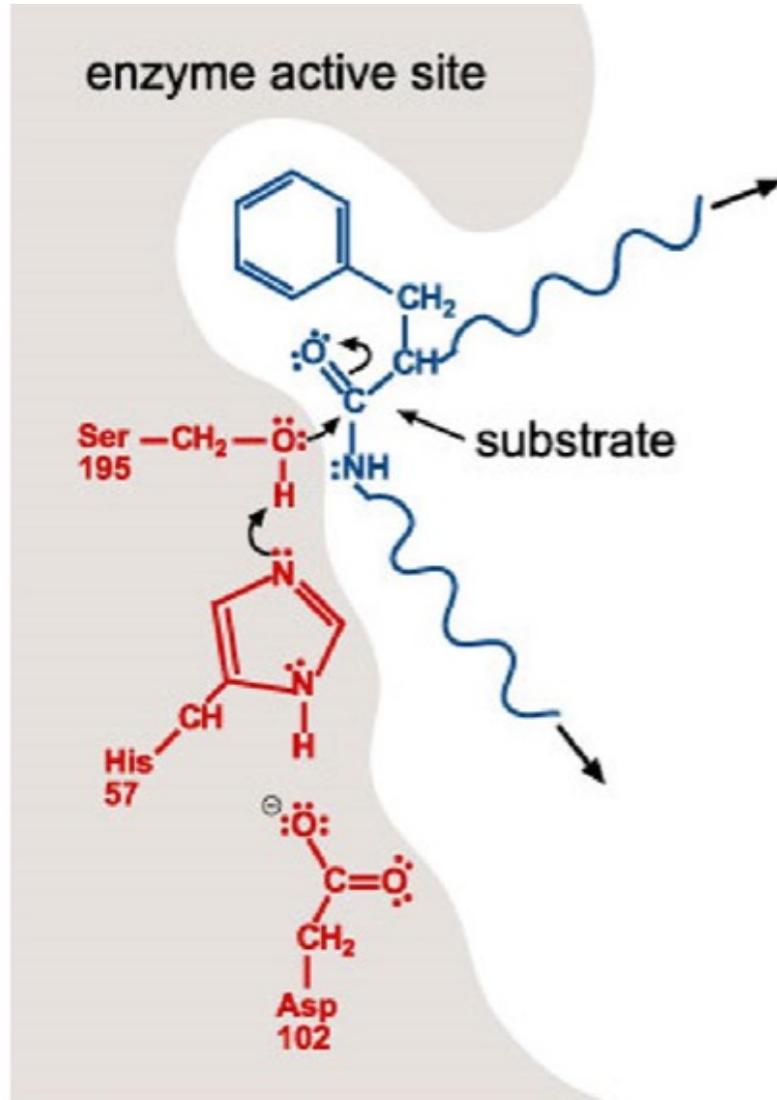
His57 agisce come base

Attacco nucleofilo ser195

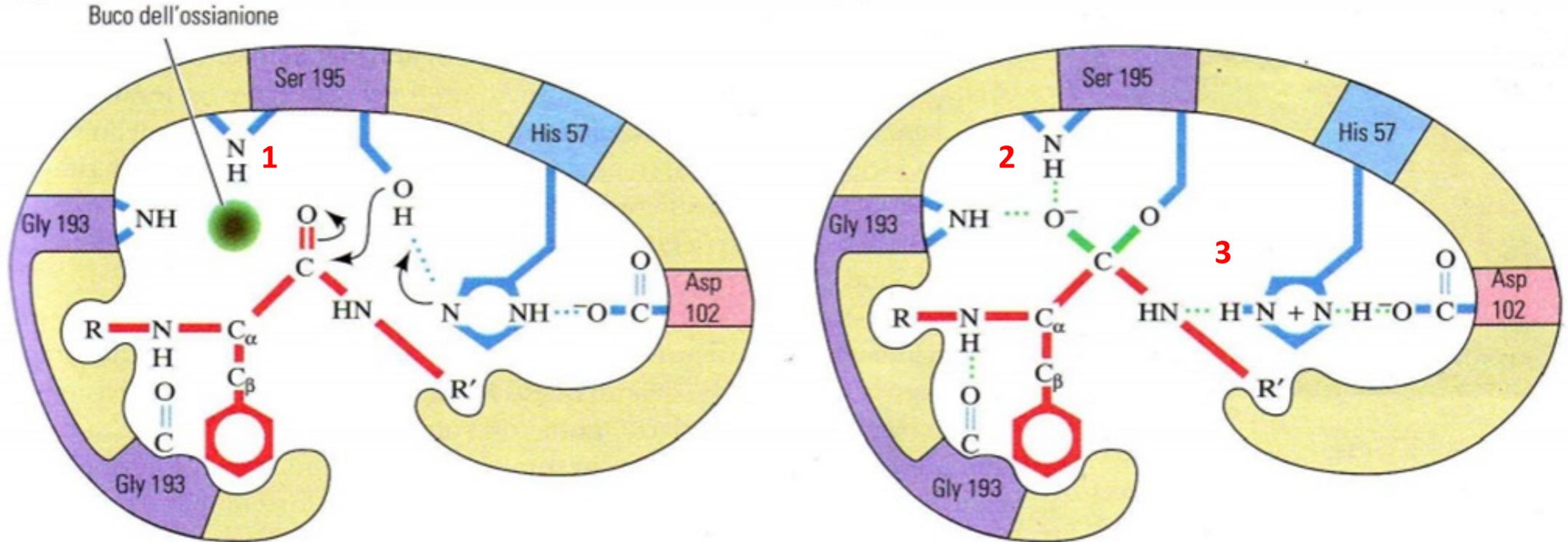


Legame a H favorito stabilizzante

Attacco nucleofilo e formazione di un legame covalente enzima-substrato: INTERMEDIO TETRAEDRICO



Stabilizzazione dello stato di transizione

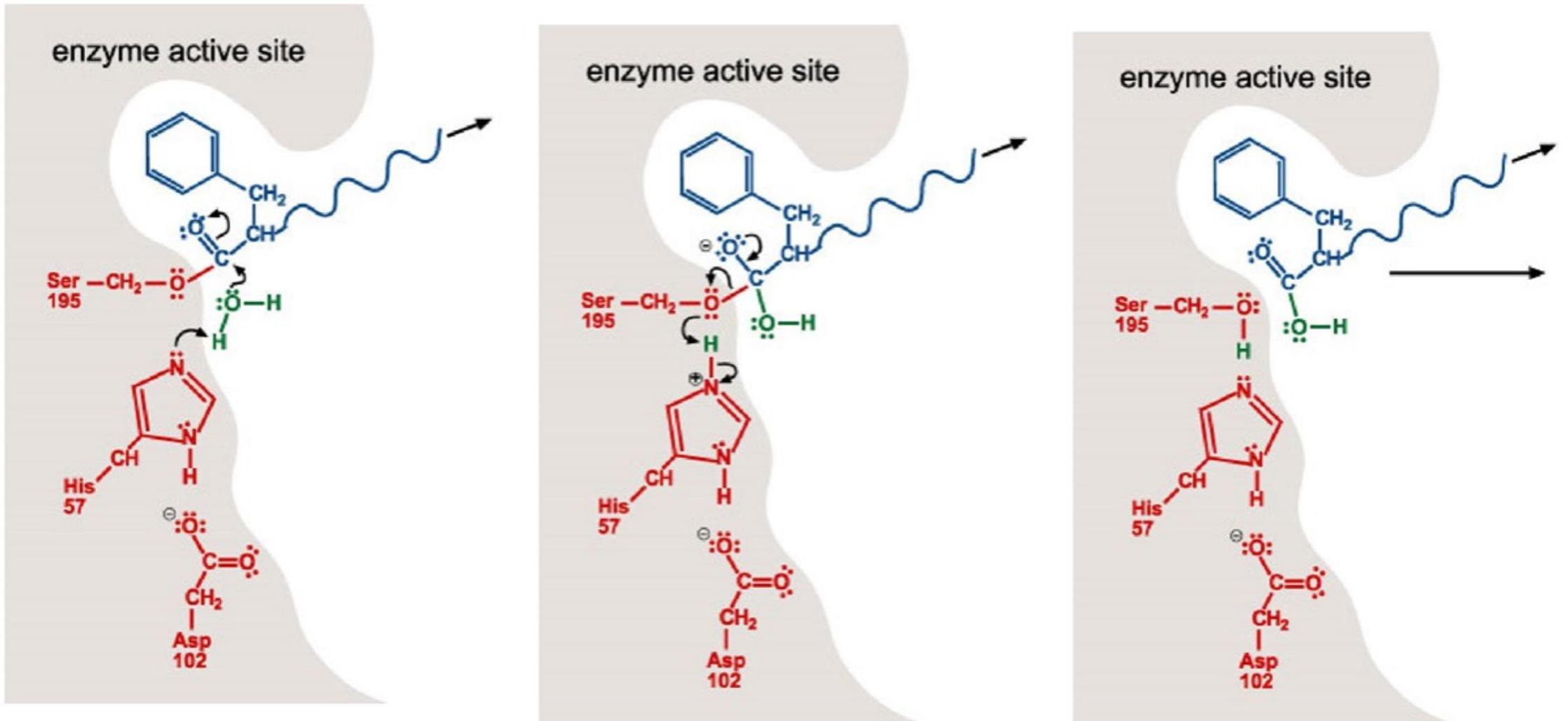


1-La formazione dell'intermedio tetraedrico provoca una distorsione conformazionale e provoca lo spostamento dell'ossigeno carbonilico (ora carico $-$) in una localizzazione piú profonda del sito attivo (prima vuota), chiamata **buco dell'ossianione**.

2-Si formano due legami H con l'enzima

3-Il complesso è stabilizzato da altro legame H tra l'enzima ed il gruppo $-NH$ del res che precede il legame peptidico suscettibile di scissione

Il ruolo dell'H2O: Attacco nucleofilo verso il legame covalente enzima-substrato

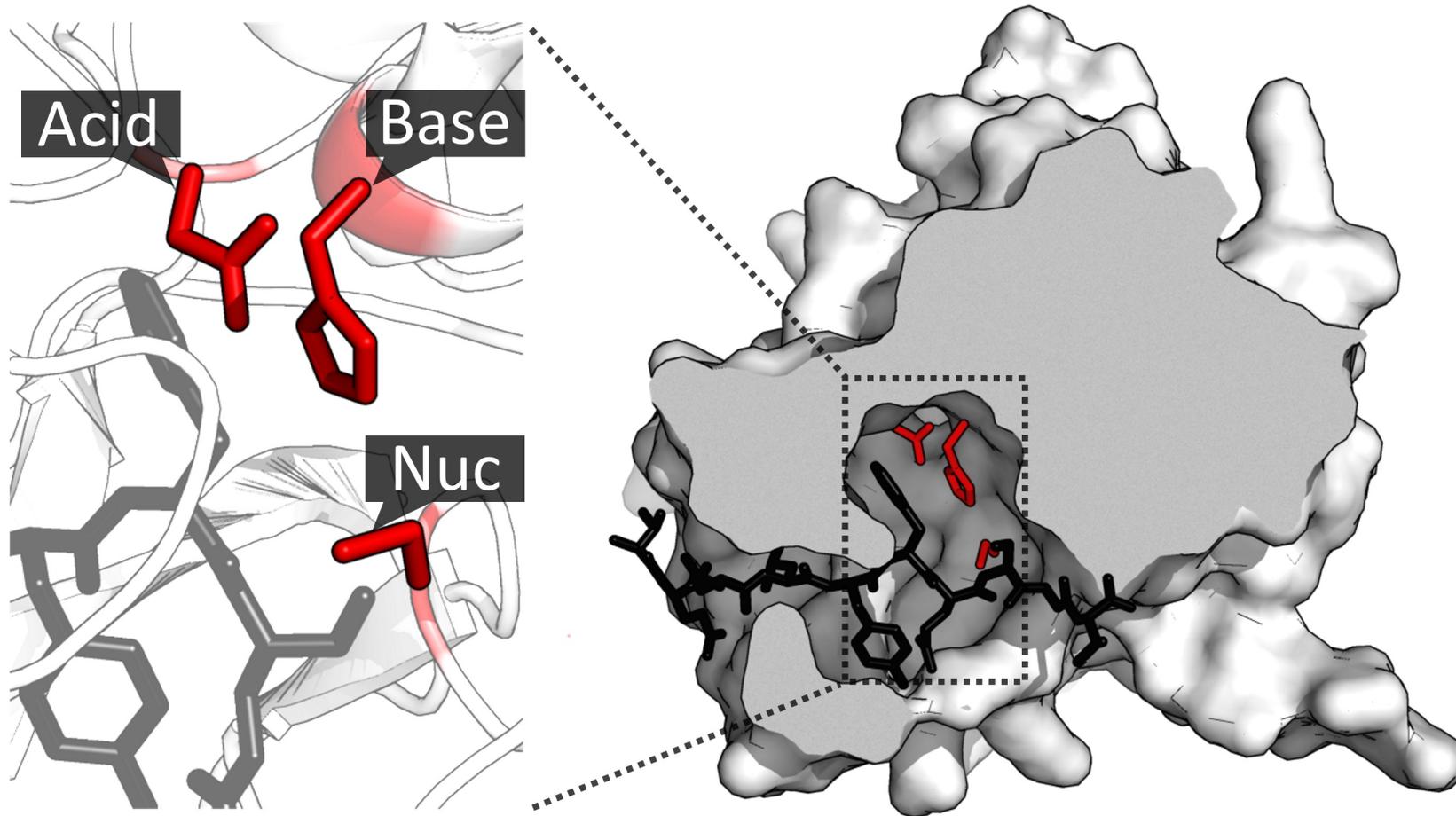


1. Analizziamo l'esempio della chimotripsina, (il meccanismo catalitico sarà lo stesso per le altre serina proteasi). Nella chimotripsina abbiamo inizialmente che la tasca di legame è legata all'amminoacido collocato lateralmente al legame peptidico da scindere. La serina del sito attivo si ionizza in quanto lo ione idrogeno viene sottratto dall'istidina; lo ione O- reagisce con il carbonio carbonilico del legame peptidico mediante attacco nucleofilo e questo porta alla formazione di un legame covalente enzima-substrato (siamo quindi nell'ambito della catalisi covalente). Il carbonio carbonilico che ha subito l'attacco della serina assume conformazione tetraedrica e il doppio legame si trasforma in un legame singolo (gli elettroni del doppio legame vengono condivisi con l'ossigeno serinico). Si forma di nuovo una carica negativa, ma questa volta sul [ossigeno del] carbonio carbonilico.

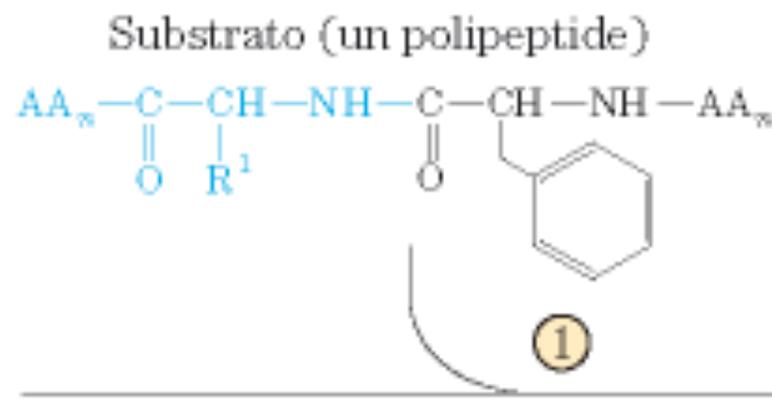
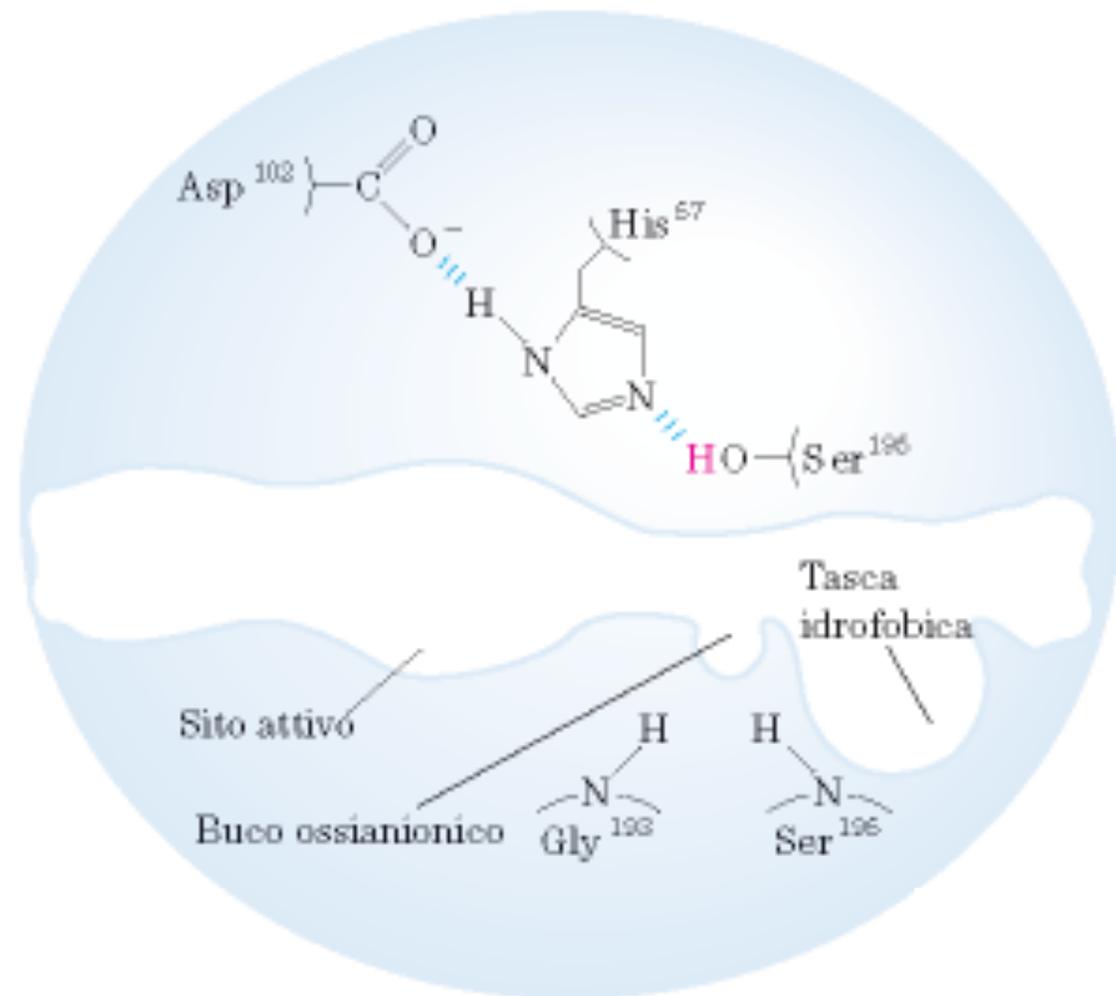
2. Qui interviene un successivo meccanismo catalitico, che determina una stabilizzazione dello stato di transizione. Lo stato di transizione, che presenta una carica negativa, viene stabilizzato da residui contenuti nel sito catalitico; questi residui sono gruppi NH, con cui lo stato di transizione forma legami idrogeno. Questo accade nella regione chiamata buco dell'ossianione del sito attivo, dove sono appunto disponibili questi gruppi amminici NH che fungono da donatori del legame idrogeno. Questi legami idrogeno stabilizzano lo stato di transizione e fanno sì che il gruppo NH del legame peptidico sia suscettibile all'attacco (catalisi acido-base) da parte dell'istidina della triade catalitica. Questa istidina può donare un elettrone all'azoto e far sì che il legame peptidico sia scisso. È quindi tutto un gioco di spostamento di elettroni da un legame all'altro che favorisce la formazione o la rottura di uno specifico legame; in questo modo un peptide tagliato fuoriesce dal sito attivo.

3. Abbiamo però un intermedio di reazione ancora legato; il legame tra questa molecola ed il sito attivo viene scisso mediante una molecola d'acqua. Di nuovo questa molecola di acqua viene resa più acida (come vedremo nel caso dello zinco) e quindi più capace di compiere un attacco nucleofilo verso il legame covalente enzima-substrato; in questo caso viene scisso il legame covalente della serina col carbonio del legame peptico, con formazione di un gruppo carbossilico libero. Questo prodotto viene rilasciato e la serina viene riconvertita nella serina iniziale, con il suo gruppo ossidrilico. Immediatamente questa serina ricostituirà la rete di legame idrogeno della triade catalitica: l'enzima torna allo stato iniziale e può iniziare un nuovo ciclo.

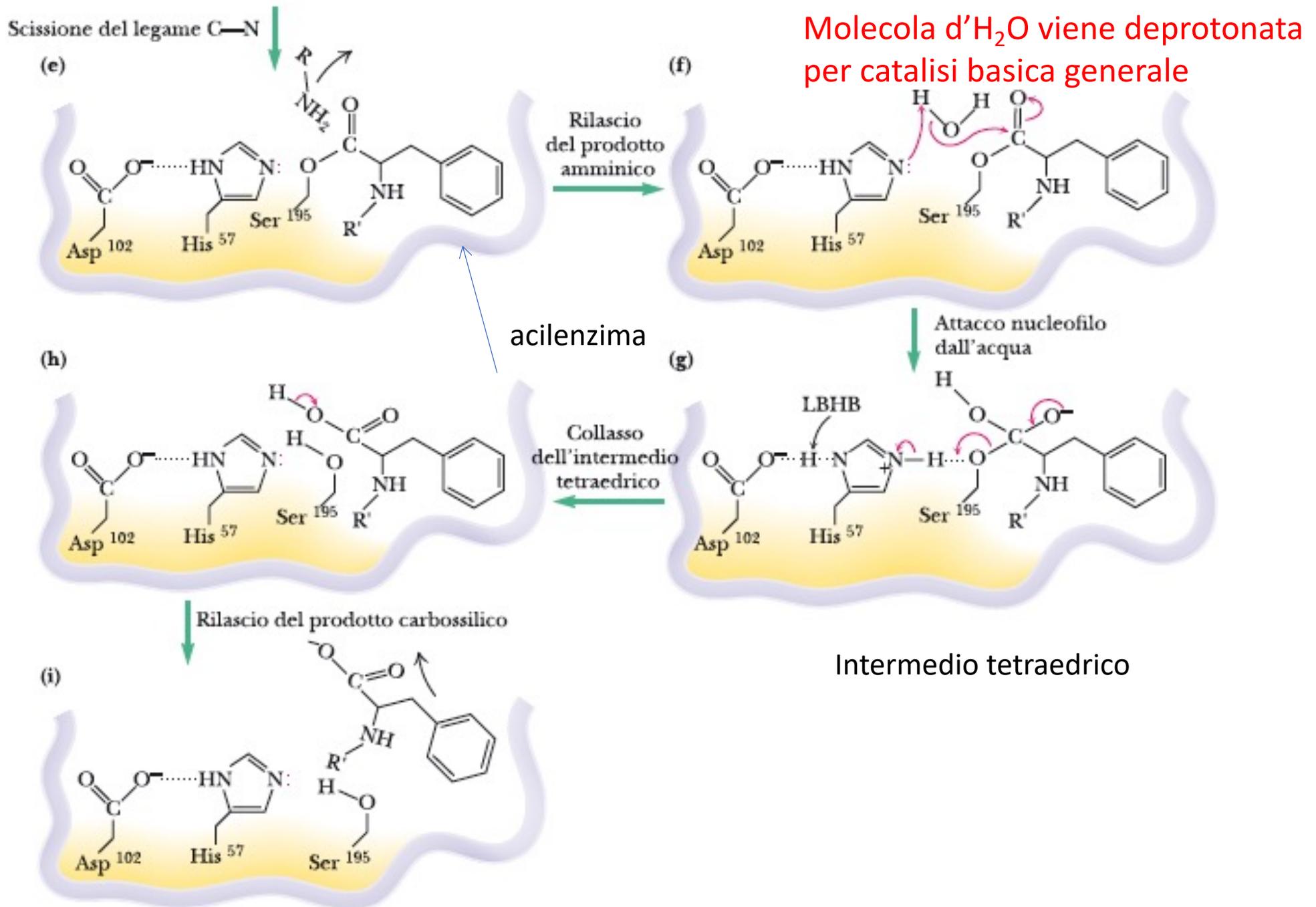
Da cosa deriva la funzionalità/capacità di catalizzare e quindi accelerare a reazione da parte delle serina proteasi? Questo legame preferenziale dello stato di transizione (o dell'intermedio tetraedrico) rispetto al legame del complesso enzima-substrato è responsabile della efficienza catalitica delle serina proteasi!



Chimotripsina (enzima libero)

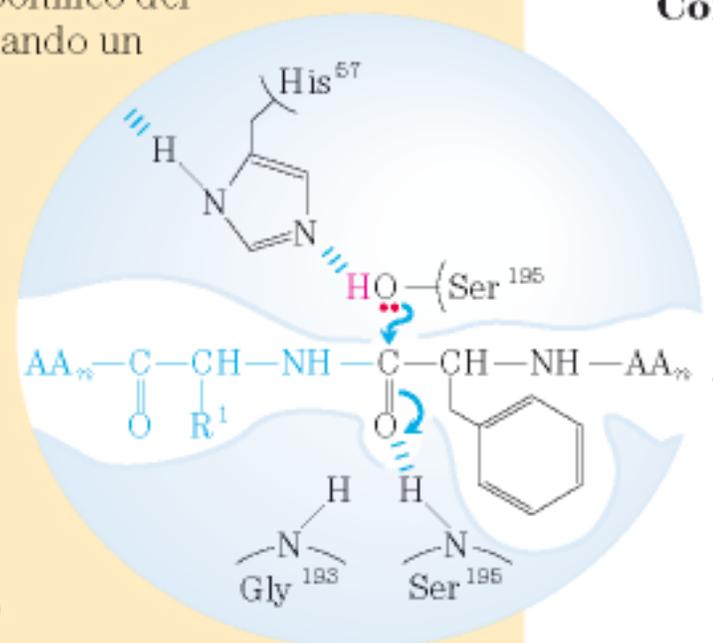


Quando il substrato si lega, la catena laterale del residuo adiacente al legame peptidico che verrà tagliato si inserisce in una tasca idrofobica dell'enzima, in modo da posizionare il legame in maniera corretta per l'attacco



L'interazione tra Ser¹⁹⁵ e His⁵⁷ genera uno ione alcossido sulla Ser¹⁹⁵ fortemente nucleofilo; lo ione attacca il gruppo carbonilico del peptide, formando un

intermedio tetraedrico acil-enzima. Si ha inoltre la formazione di una carica negativa a vita breve sull'ossigeno carbonilico del substrato, stabilizzata da legami idrogeno nel buco ossianionico



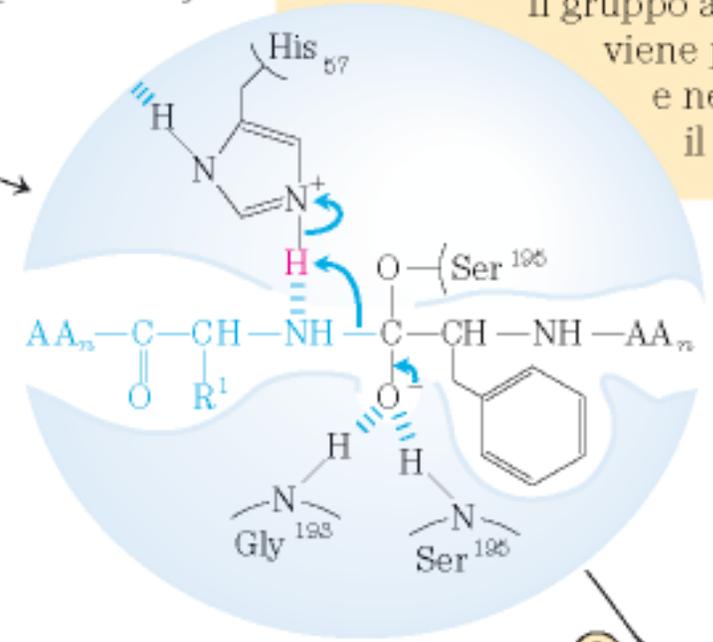
Complesso ES

Intermedio* a vita breve (acilazione)

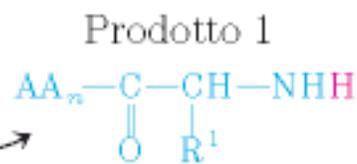
L'instabilità della carica negativa sull'ossigeno carbonilico del substrato porta al collasso dell'intermedio tetraedrico: la riformazione di un doppio legame con il carbonio rimuove il legame tra il carbonio e il gruppo amminico del legame peptidico causandone la rottura.

Il gruppo amminico uscente viene protonato dall'His⁵⁷ e ne viene facilitato il distacco

②

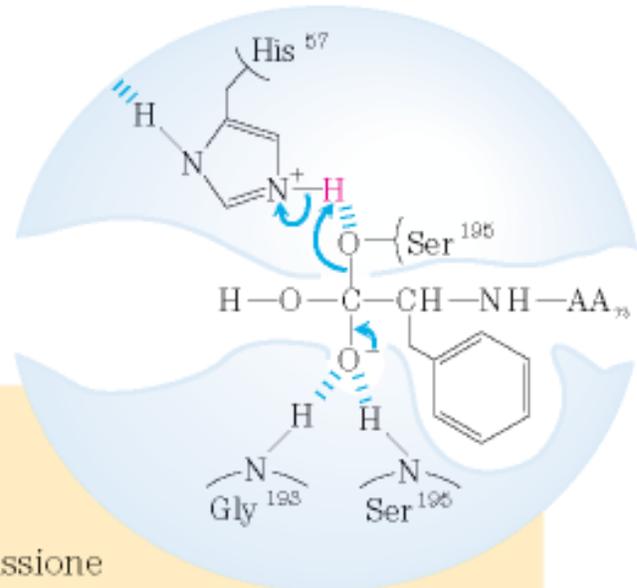


③



⑥

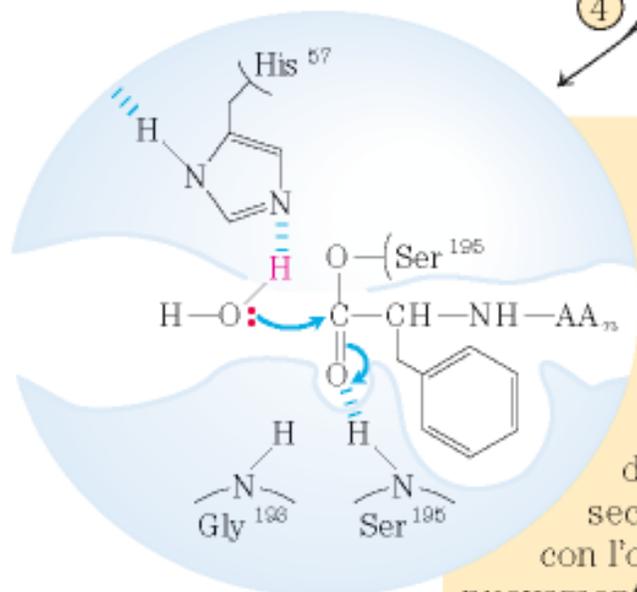
**Intermedio*
a vita breve
(deacilazione)**



La scissione dell'intermedio tetraedrico forma il secondo prodotto, un anione carbossilato, e produce il distacco della Ser¹⁹⁵

⑤

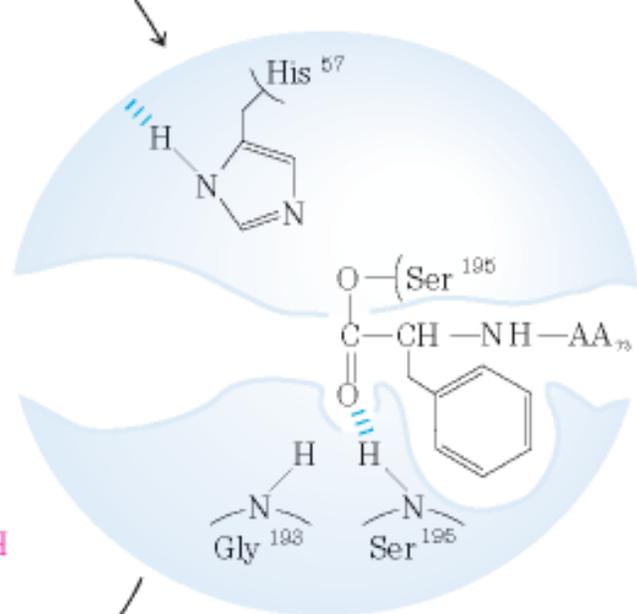
Intermedio acil-enzima



Una molecola di acqua entrante viene deprotonata per catalisi basica generale, formando uno ione ossidrile, fortemente nucleofilo. L'attacco dell'ossidrile sul legame estere dell'acil-enzima genera un secondo intermedio tetraedrico, con l'ossigeno che assume nuovamente una carica negativa nel buco ossianionico

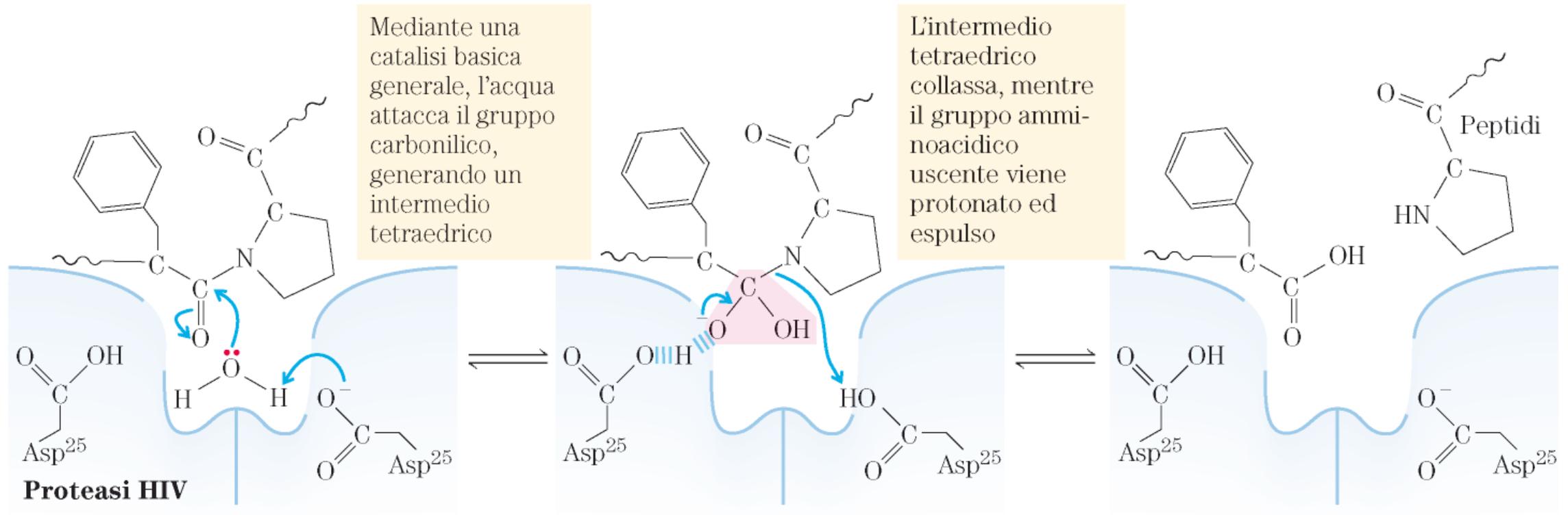
④

Intermedio acil-enzima



Aspartil-proteasi es. proteasi HIV (scinde il legame Pro-Phe)

Due residui di Asp nel sito catalitico facilitano l'attacco diretto di una molecola di H₂O sul gruppo carbonilico.

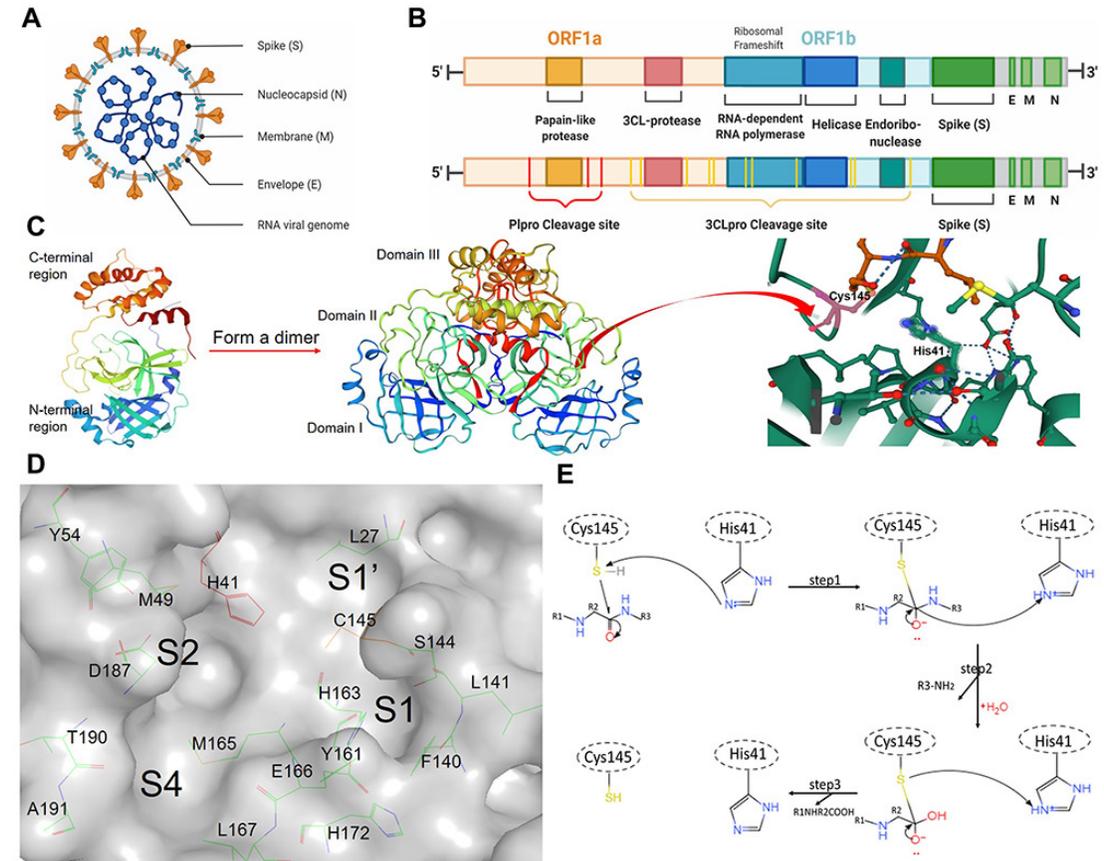
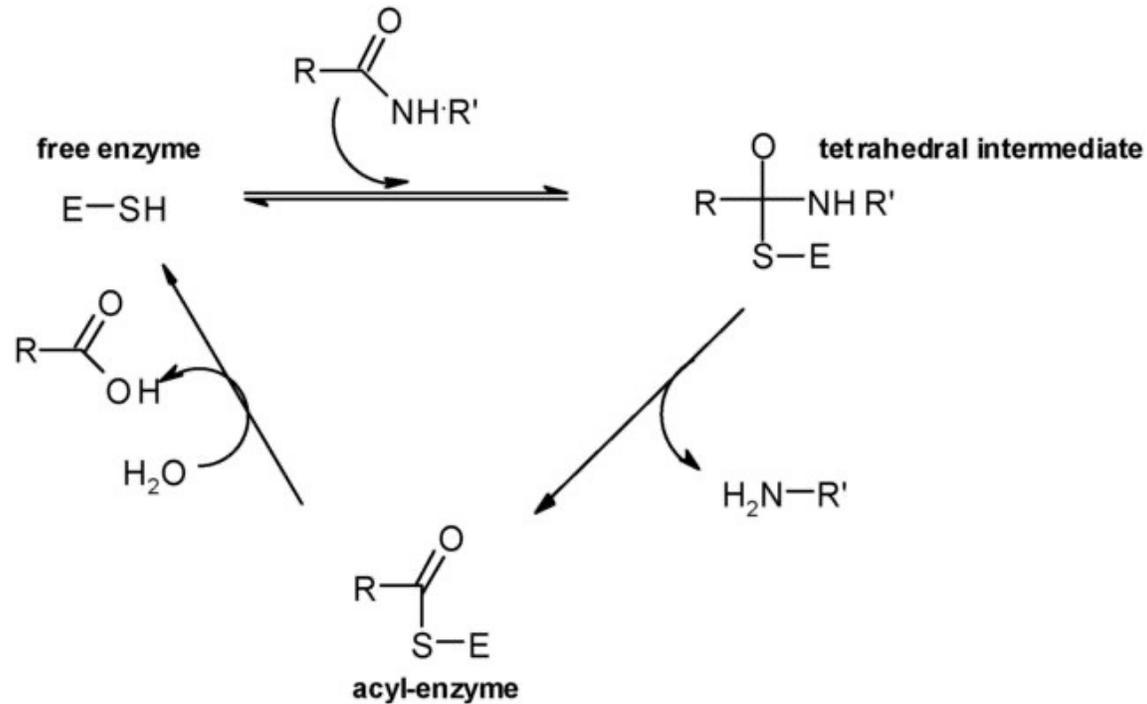


HIV-1 protease (PR) is a retroviral aspartyl protease (retropepsin)

Proteasi basate su Cys come nucleofilo: CISTEINA PROTEASI

Il residuo di Ser qui sostituito da una cisteina nel sito catalitico che media l'attacco diretto al Carbonio carbonilico.

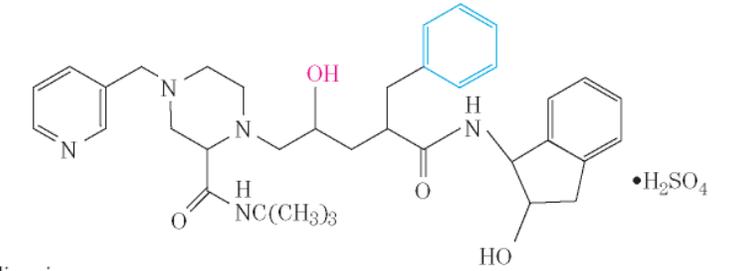
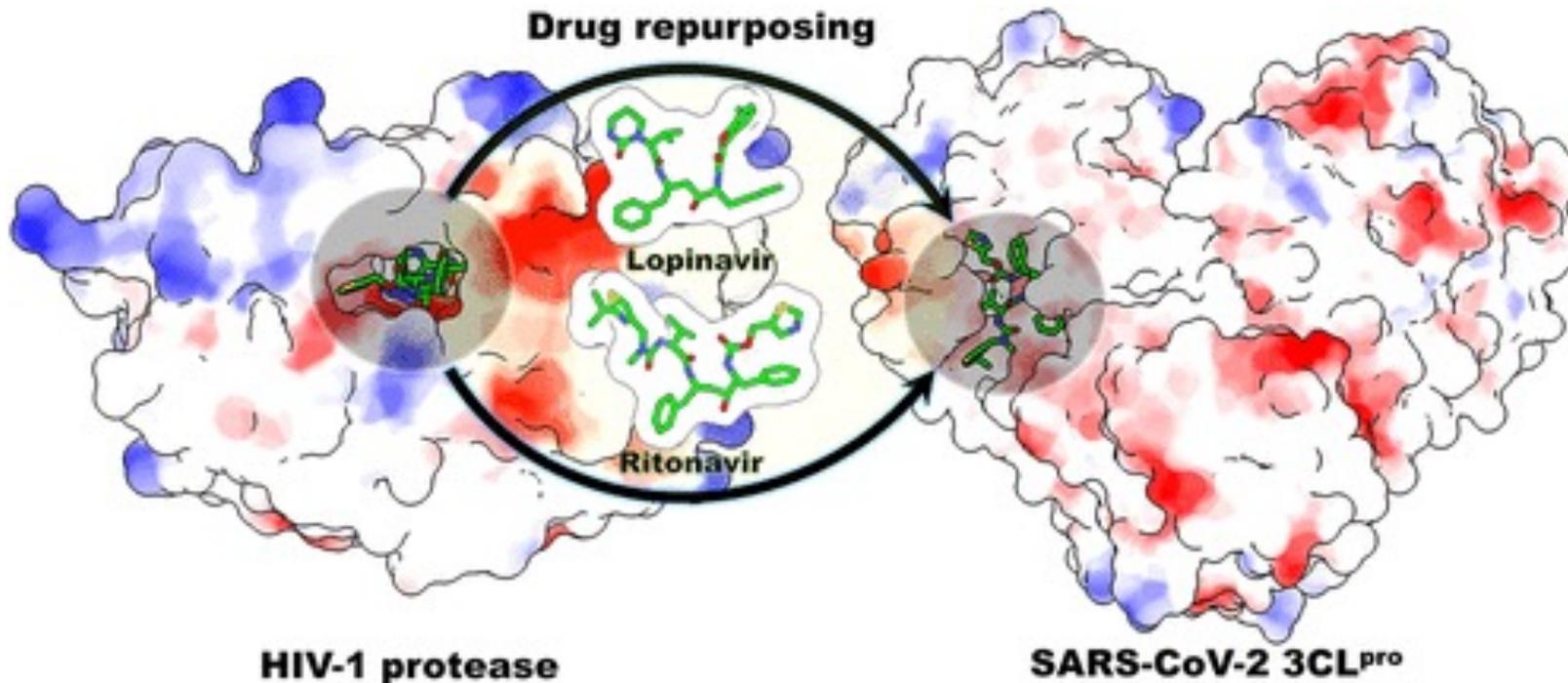
Un residuo di His facilita la stabilizzazione dell'intermedio tetraedrico e l'attacco diretto di una molecola di H₂O sul gruppo carbonilico.



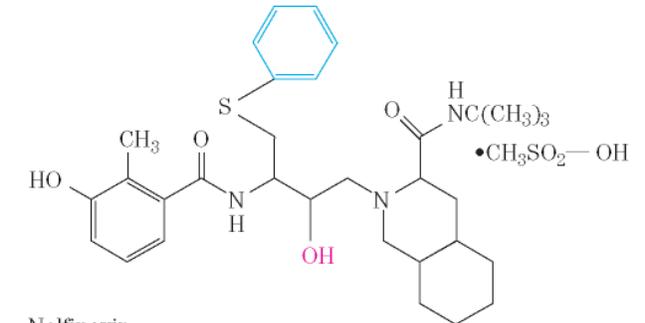
Main protease (Mpro) is a chymotrypsin-type cysteine protease

Farmaci che formano un **complesso stabile e reversibile** con l'enzima e lo inibiscono: inibitori della proteasi di HIV

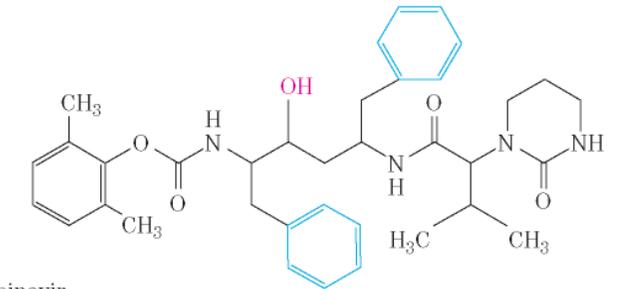
- **Gruppo benzilico** si lega alla tasca idrofobica di legame dei gruppi aromatici;
- **OH** imita l'ossigeno carico negativamente dell'intermedio tetraedrico che si genera nella reazione catalizzata.



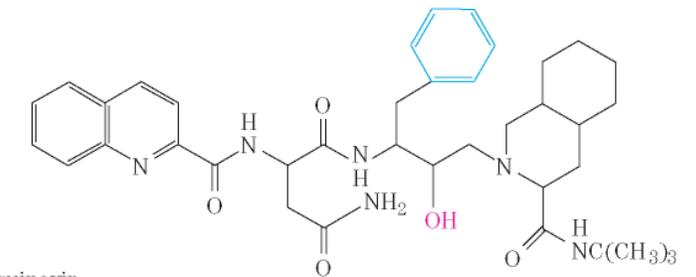
Indinavir



Nelfinavir

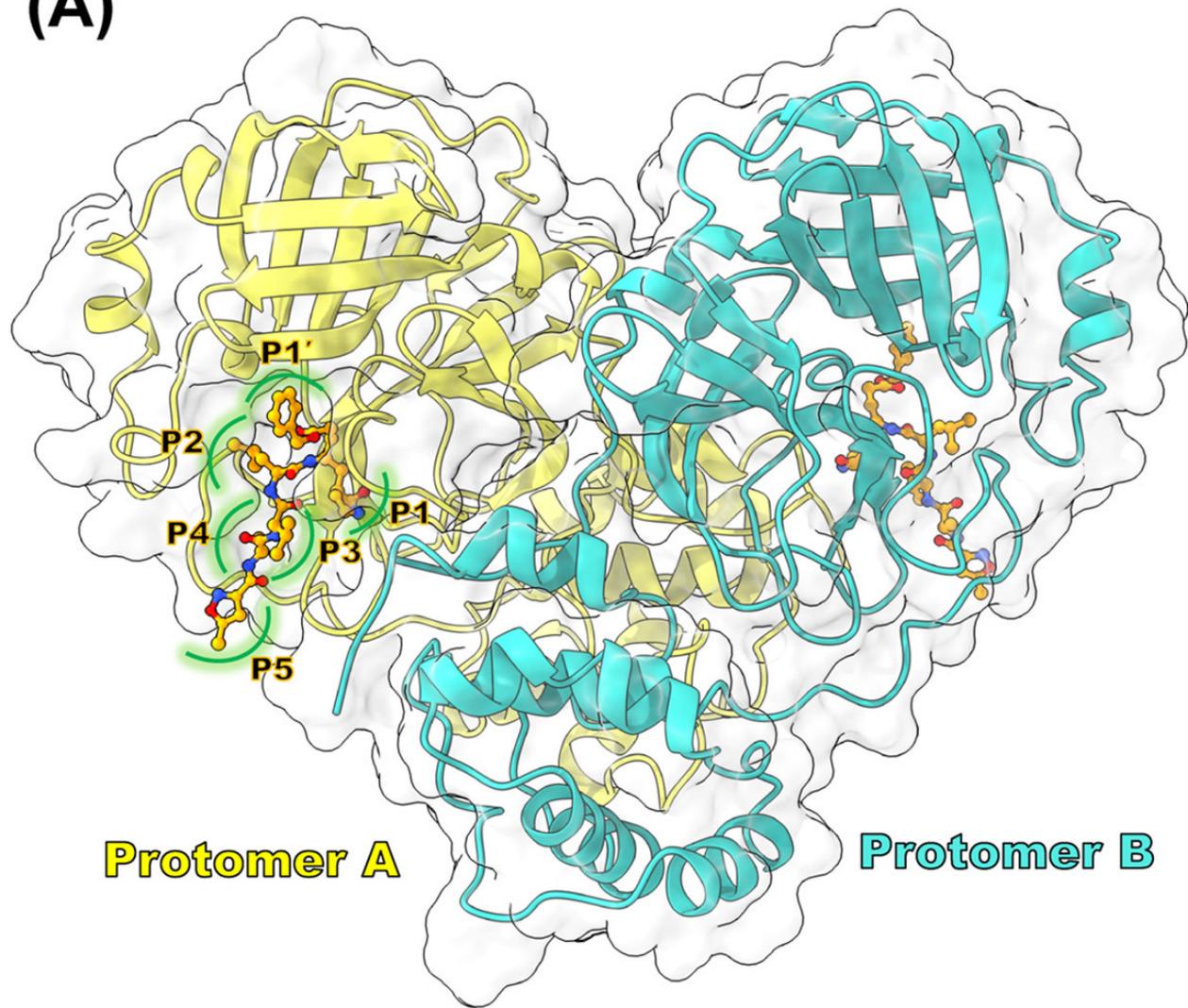


Lopinavir

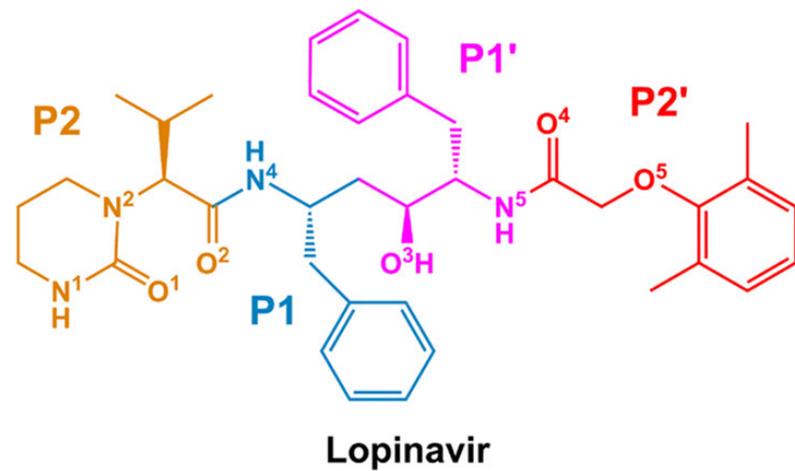


Saquinavir

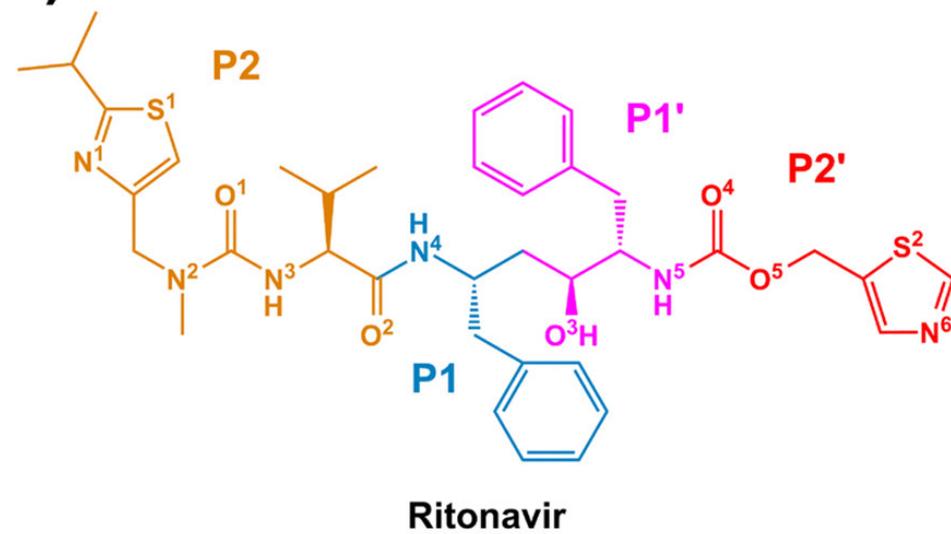
(A)



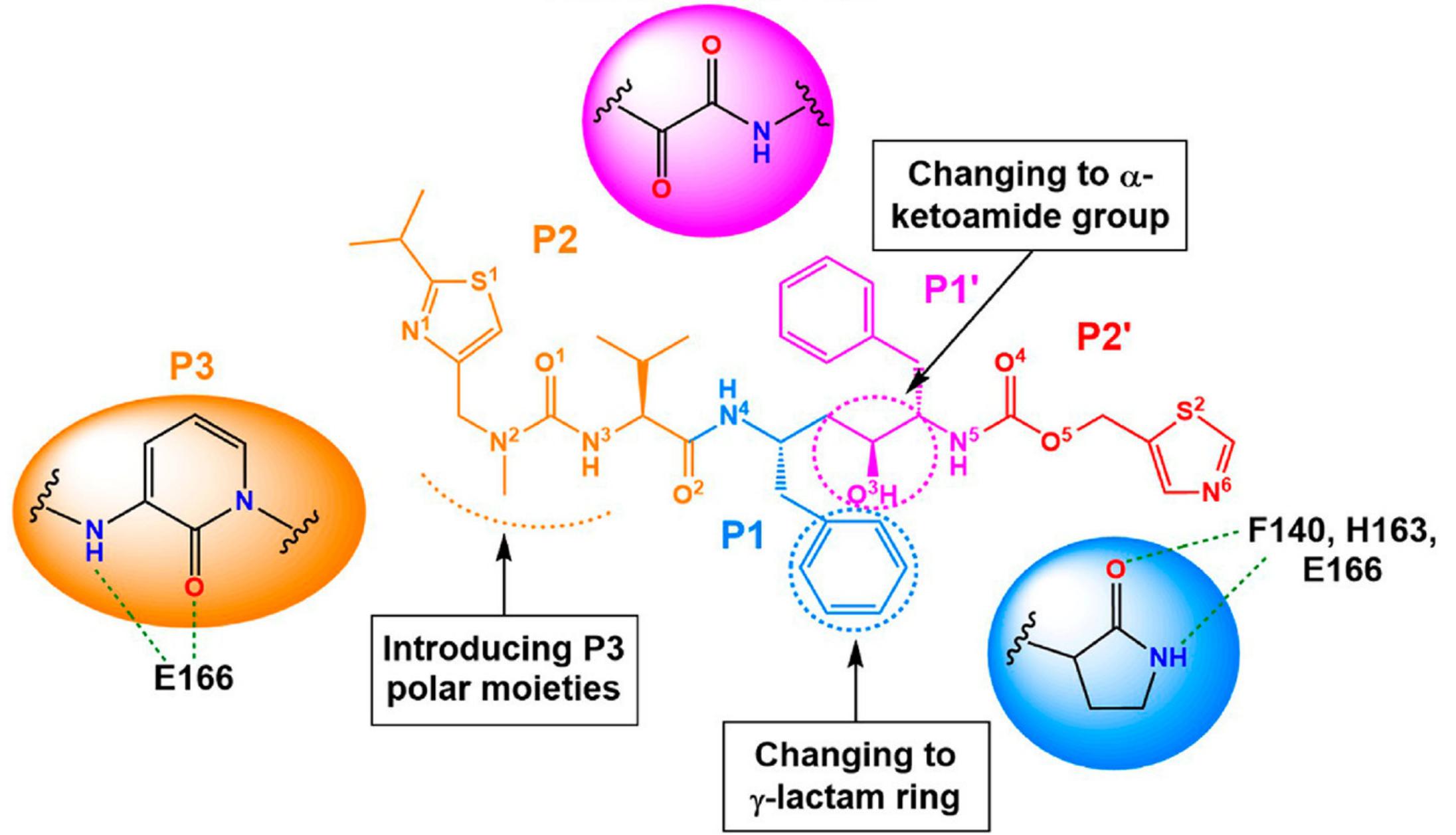
(B)



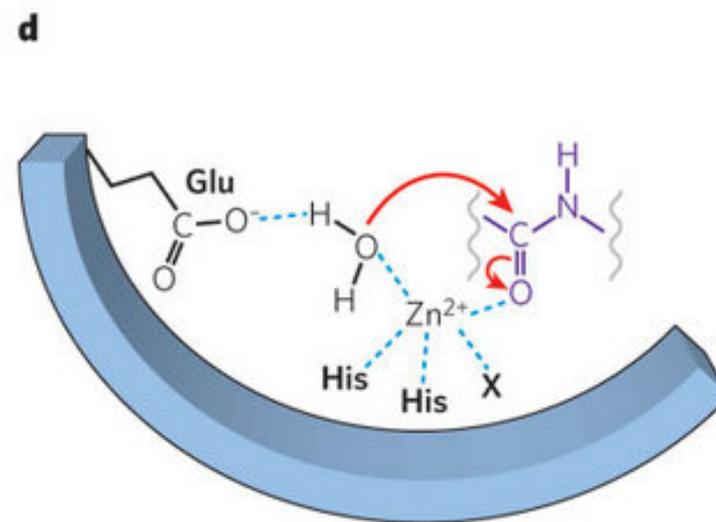
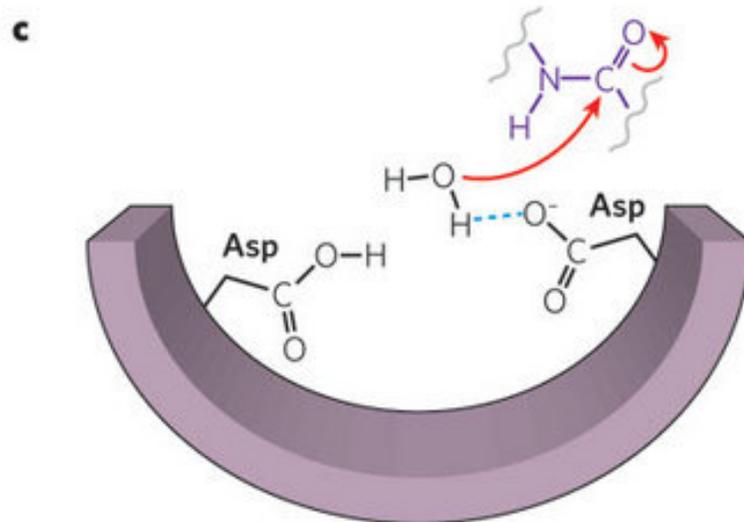
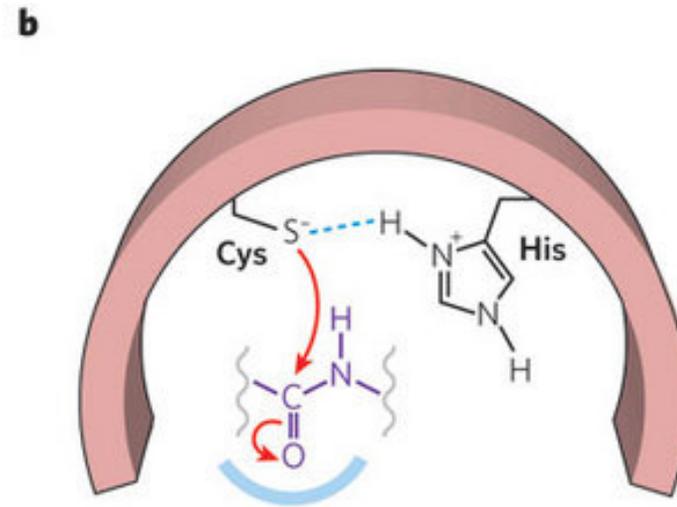
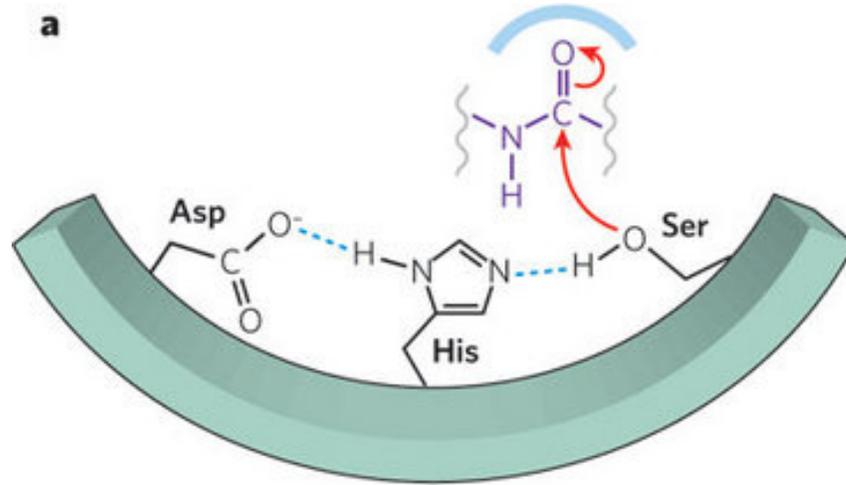
(C)



Covalent bond formation with C145



serine proteases (a); cysteine proteases (b); aspartyl proteases (c); and metalloproteases (d)



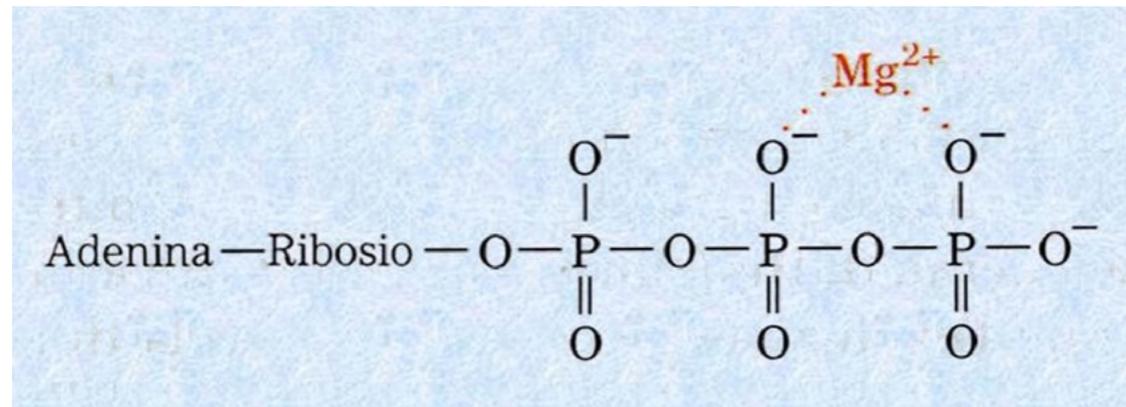
Catalisi mediata da ioni metallici

Abbiamo metalli che si legano in maniera stabile all'enzima con un legame di coordinazione, in maniera più o meno labile: nei casi in cui è molto labile (ad es. se la coordinazione non completamente assicurata da catene laterali di aa) si parla di enzima attivato da metallo (libero in soluzione e disponibile...)

Molti enzimi sono attivati dal fattore metallico e tra questi vi sono quelli che prendono parte alle reazioni di ossidoriduzione, basilari per il metabolismo.

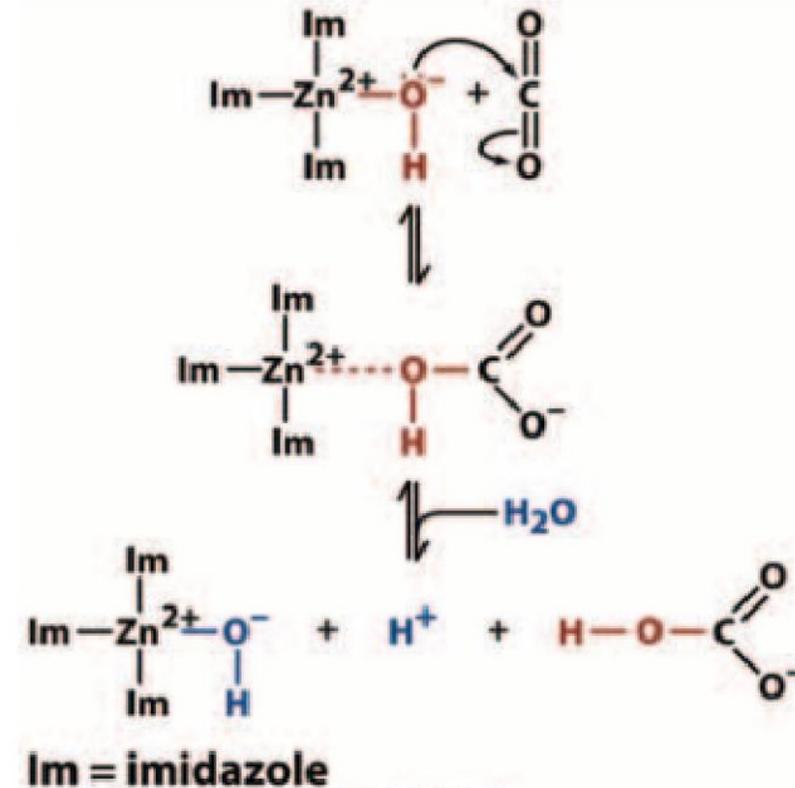
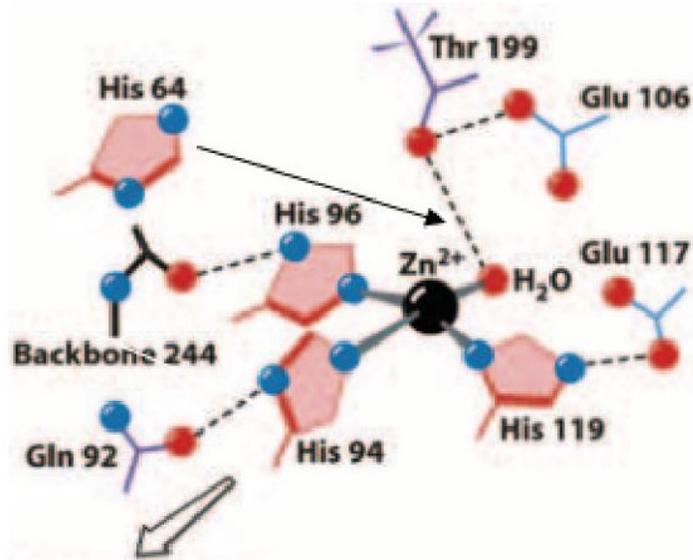
I meccanismi con cui agisce il metallo sono molteplici:

1. In primis vi può essere una stabilizzazione elettrostatica del substrato (esempio l'ATP)



2. Catalisi acido/base: attivazione dei substrati (esempio anidrase carbonica)

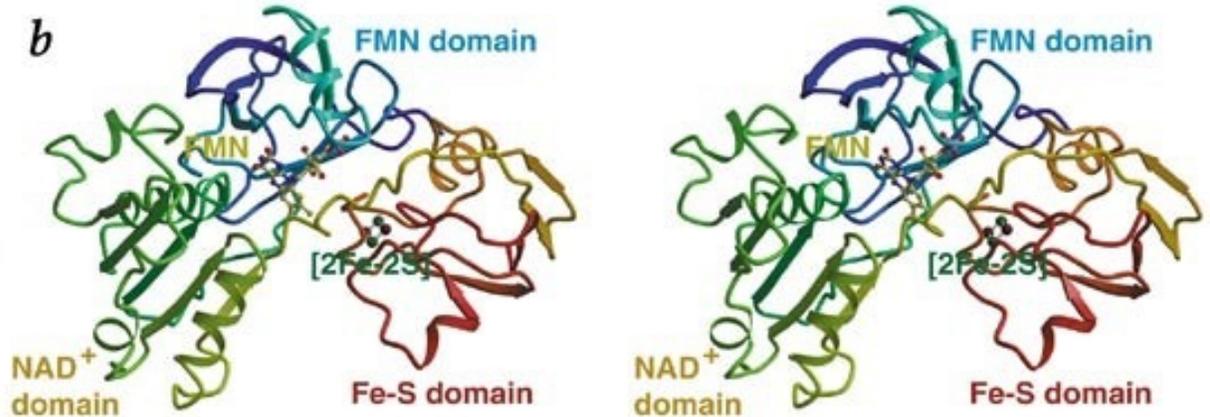
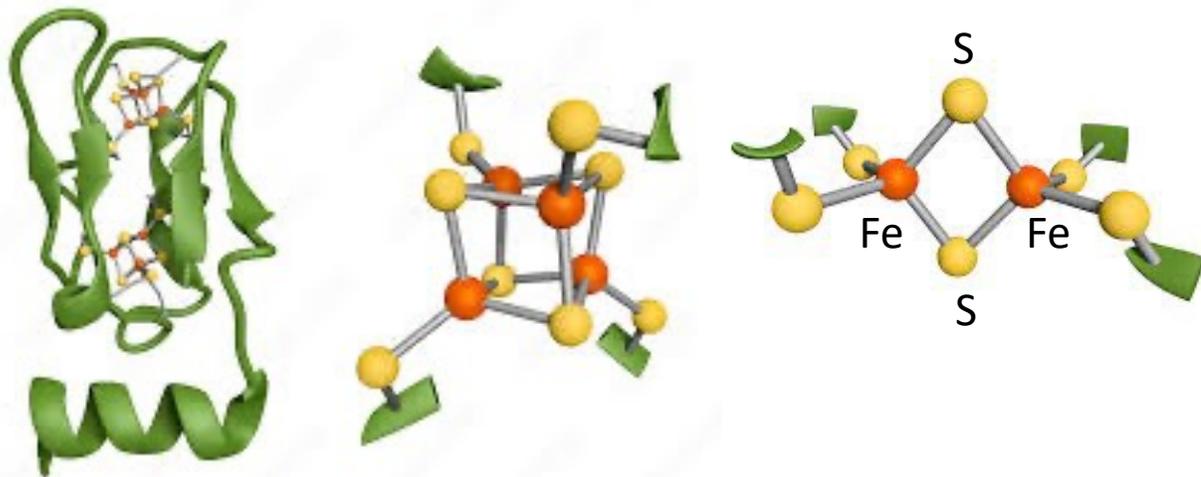
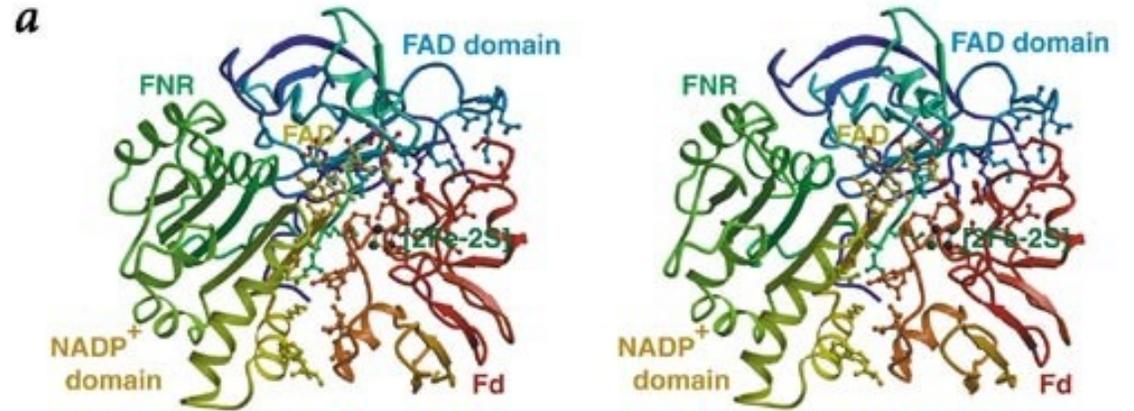
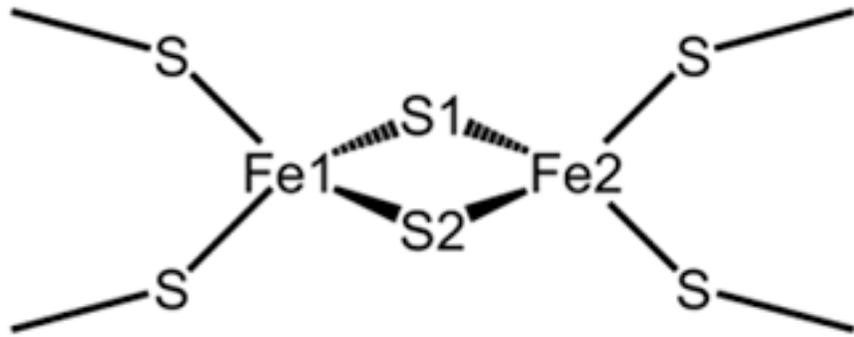
Anidrase carbonica



Lo ione zinco interagisce con una molecola d'acqua e la rende molto più acida di come è normalmente, in quanto crea un legame di coordinazione con l'ossigeno: ciò fa sì che questo ossigeno sia in grado di legare il carbonio della CO_2

3. Favoriscono/prendono parte alle ossidoriduzioni

Esistono diversi metalli di transizione, che hanno diversa configurazione elettronica e che possono favorire o meno la perdita dell'elettrone più esterno (della propria nube elettronica)



Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR)

Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR) is a ubiquitous flavin adenine dinucleotide (FAD)-binding enzyme encoded by a small nuclear gene family in higher plants. The chloroplast targeted FNR isoforms are known to be responsible for the final step of linear electron flow transferring electrons from ferredoxin to NADP⁺

