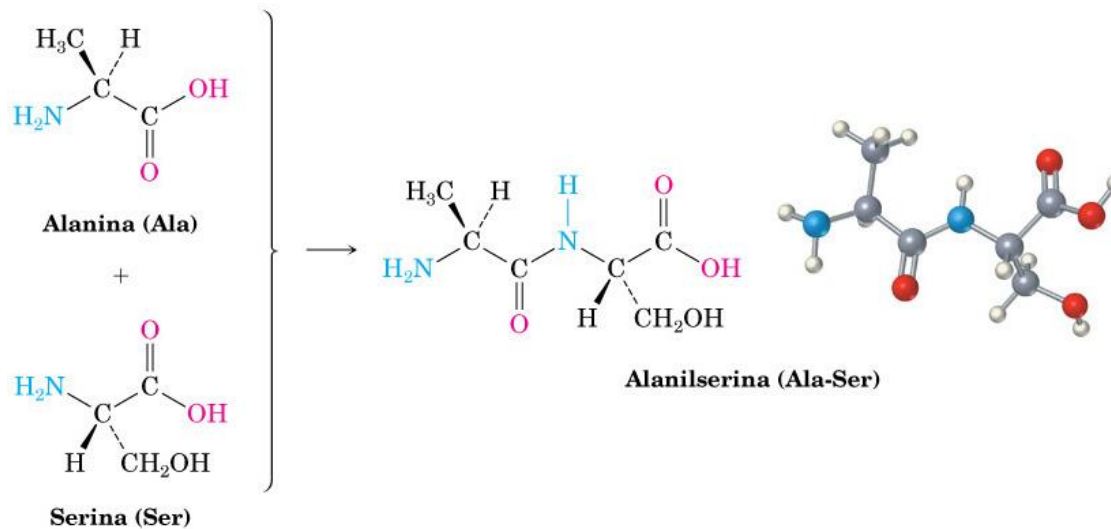


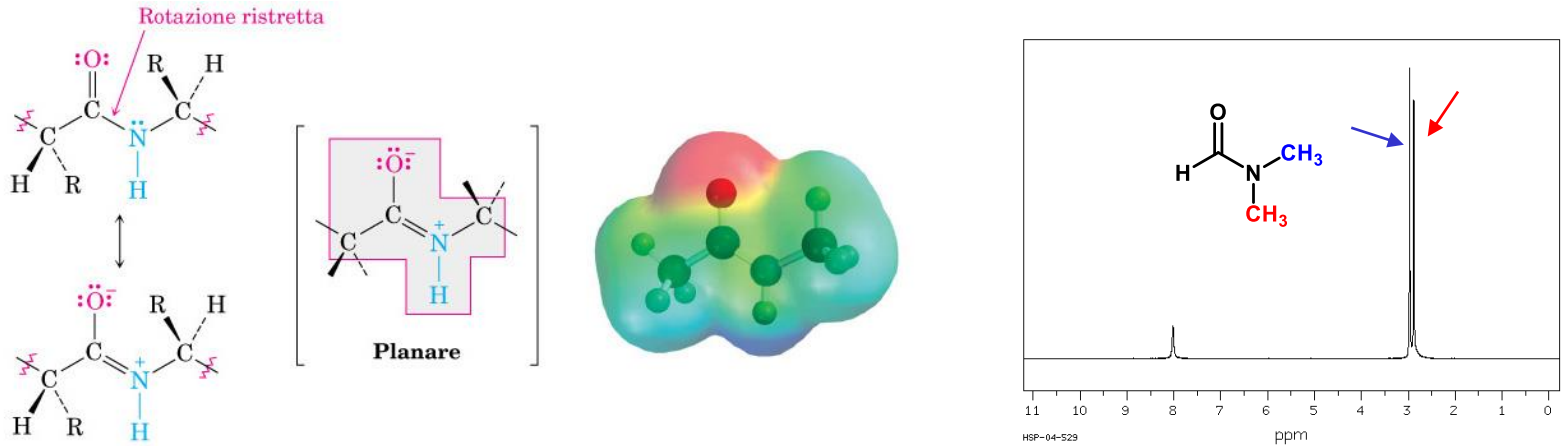
# Peptidi

Polimeri costituiti da amminoacidi legati tra loro da legami ammidici (legame peptidico). Si definiscono come di, tri, tetra....oligo....proteine (con PM >10000). Convenzionalmente vengono scritti con l'amminoacido *N*-terminale a sinistra.

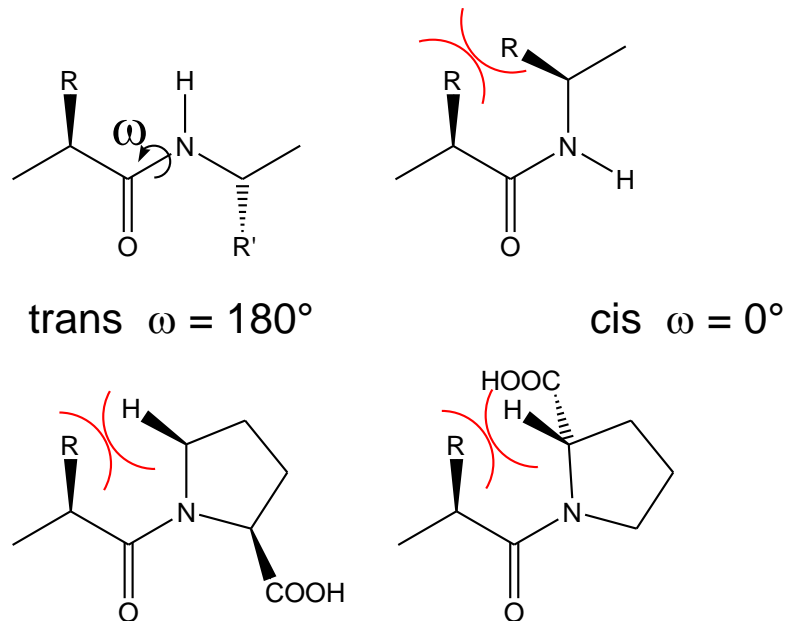


# Peptidi

Il legame ammidico è planare con una rotazione parzialmente ristretta attorno al legame CO-N.

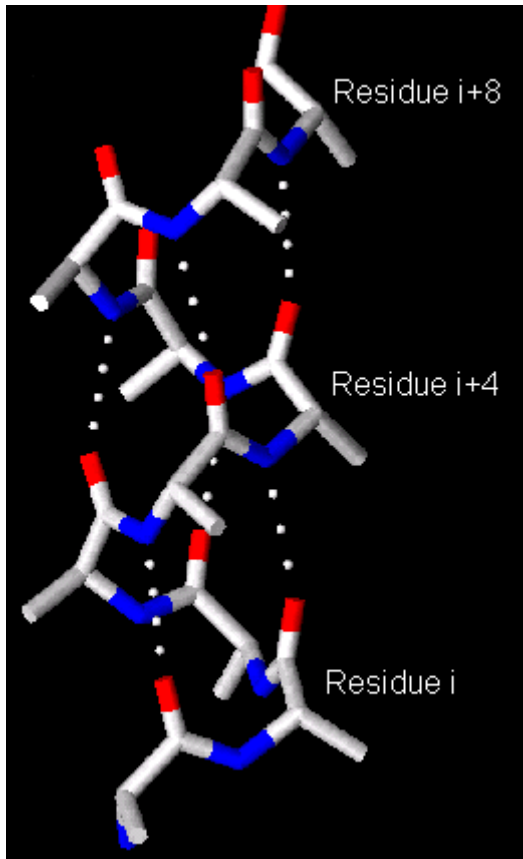


Normalmente nei peptidi il legame ammidico ha conformazione trans. Fa eccezione la prolina in cui le due conformazioni hanno energia paragonabile e può essere presente anche in conformazione cis.



# Peptidi

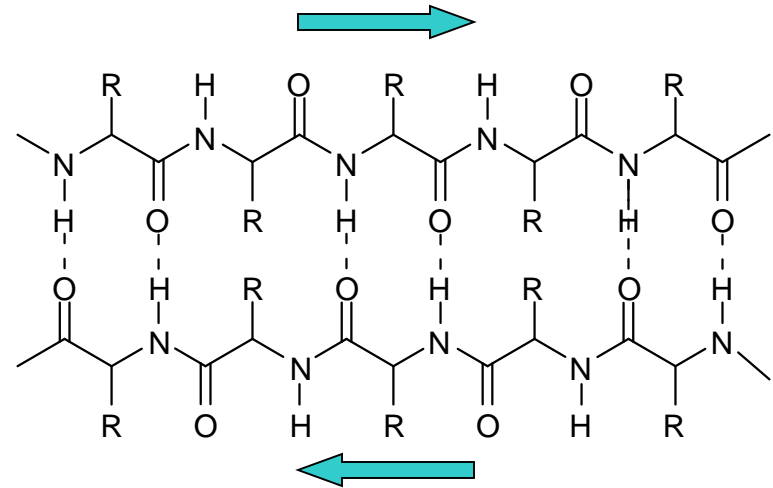
## $\alpha$ -elica



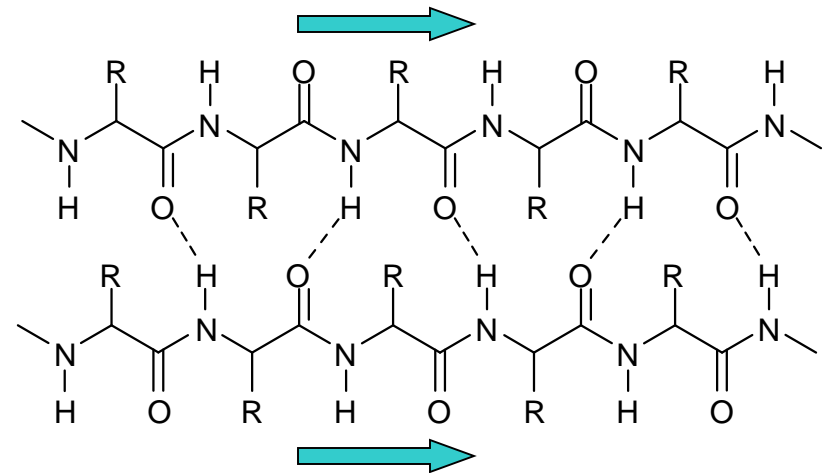
Passo 3,6 residui

## $\beta$ -foglietto

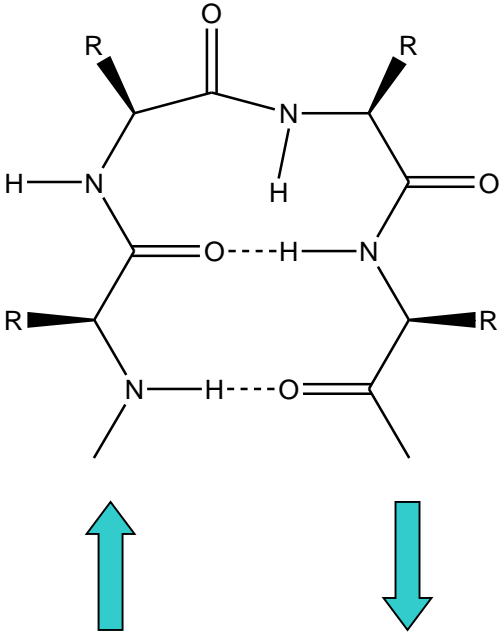
antiparallelo



parallelo

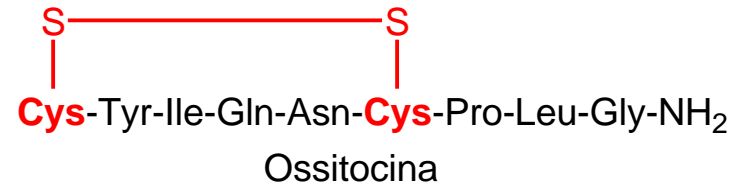
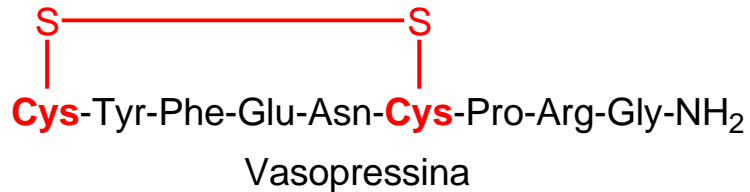


## $\beta$ -turn

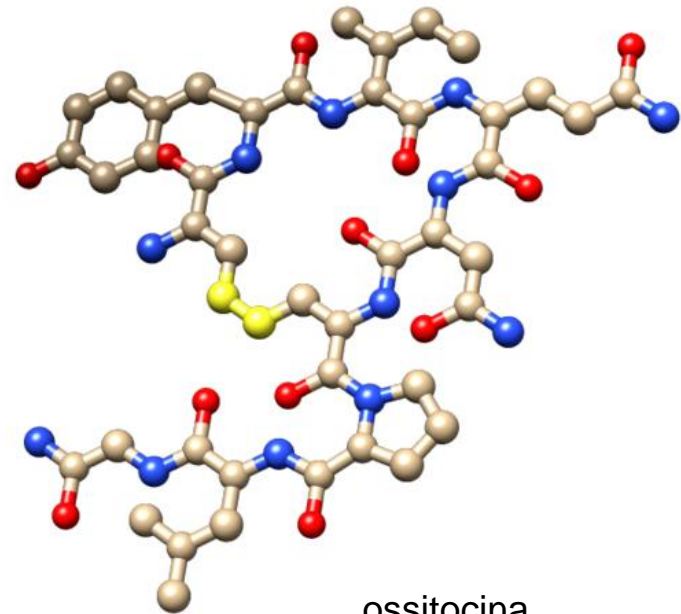


# Peptidi

Nei peptidi si trova un altro legame covalente che è il **ponte disolfuro** che si forma tra due cisteine spesso in posizioni remote lungo la sequenza primaria del peptide. Il ponte disolfuro stabilizza determinate conformazioni sia in piccoli peptidi che in proteine.



L'ossitocina e la vasopressina sono ormoni coinvolti rispettivamente nel controllo delle contrazioni muscolari e come antidiuretico. Furono tra i primi ormoni sintetici sintetizzati nel 1953 da Vincent du Vigneaud, premio Nobel nel 1955.



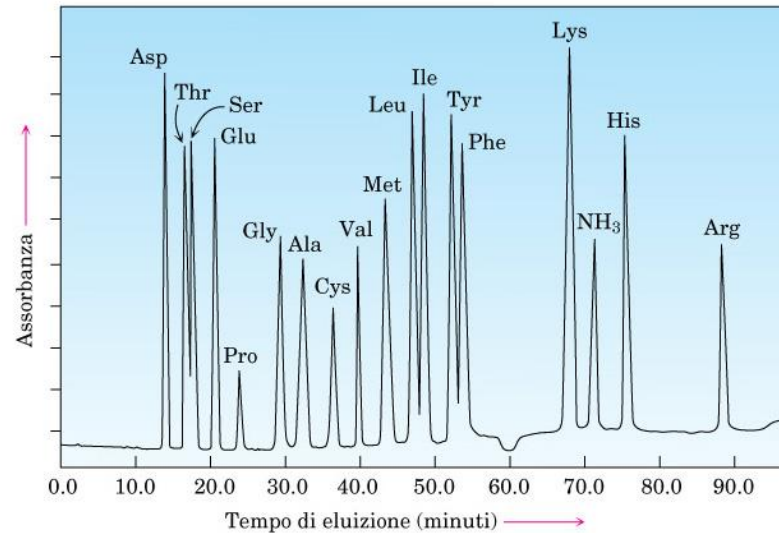
# Peptidi: determinazione della sequenza primaria

---

1. **Analisi degli amminoacidi:** determina quali amminoacidi sono presenti e i loro rapporti molari.
2. **Idrolisi Parziale dei Peptidi:** rompe il peptide in frammenti più piccoli e determina la composizione in amminoacidi di questi frammenti più piccoli.
3. **C- e N-Terminus?:** identifica l'N-terminus e il C-terminus nel peptide originario e in ciascun frammento.
4. **Analisi della Sequenza:** organizza l'informazione in modo tale che i piccoli frammenti possano sovrapporsi per rivelare la sequenza completa.

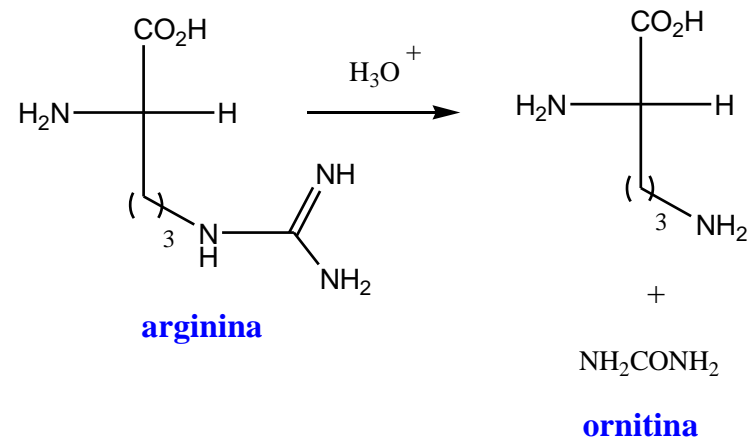
# Peptidi: determinazione della sequenza primaria

**Analisi degli amminoacidi:** il peptide viene idrolizzato completamente con HCl (6N, 24 h, 110 °C) e la miscela di amminoacidi viene separata per cromatografia a scambio ionico. Gli amminoacidi vengono rilevati dopo reazione con ninidrina.



**FIGURA 26.3** Analisi degli amminoacidi di una miscela equimolare di 17  $\alpha$ -amminoacidi.

Nel processo di idrolisi alcuni amminoacidi vengono degradati: il triptofano, per la presenza del nucleo indolico, sensibile all'ambiente acido, si decompone; l'arginina, per la presenza del nucleo guanidinico, perde urea e si trasforma in ornitina, asparagina e glutammina subiscono l'idrolisi del gruppo ammidico.

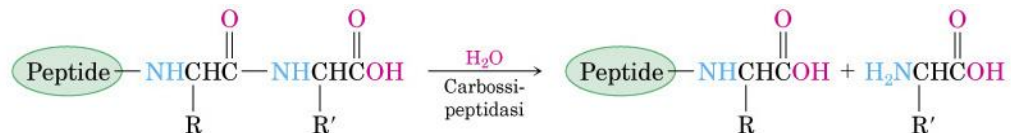


# Peptidi: determinazione della sequenza primaria

**Idrolisi parziale:** il peptide viene idrolizzato in frammenti più piccoli che sono poi analizzati separatamente. Normalmente si utilizzano enzimi capaci di idrolizzare il peptide in siti specifici. Due tra quelli utilizzati comunemente sono la **tripsina** che idrolizza selettivamente il legame peptidico al gruppo carbossilico della lisina o dell'arginina e la **chimotripsina** che rompe selettivamente il legame peptidico del gruppo carbossilico degli amminoacidi con catena laterale aromatica.



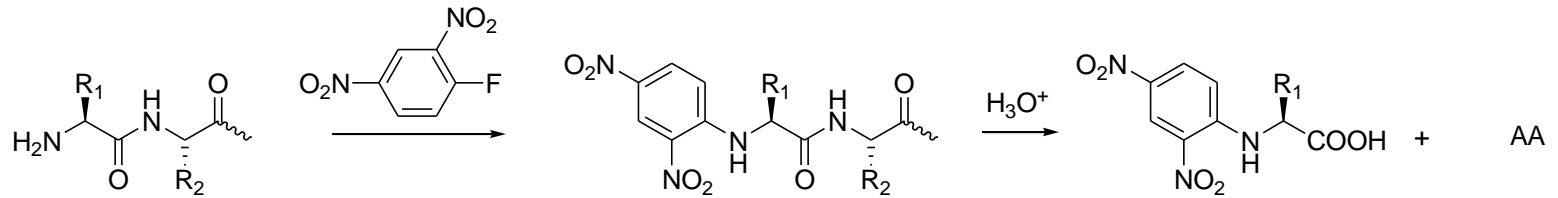
**C-terminale:** per la determinazione dell'amminoacido C-terminale esistono metodi chimici che però sono poco usati. Si preferisce utilizzare enzimi che rimuovono selettivamente l'amminoacido C-terminale. Un esempio è la *carbossipeptidasi*.





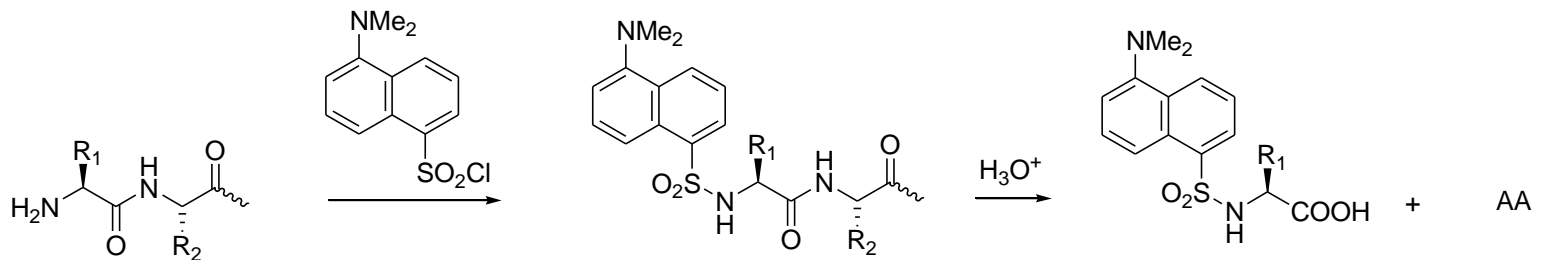
# Peptidi: determinazione della sequenza primaria

## N-terminale: metodo di Sanger



**2,4-DNP-a.a.**

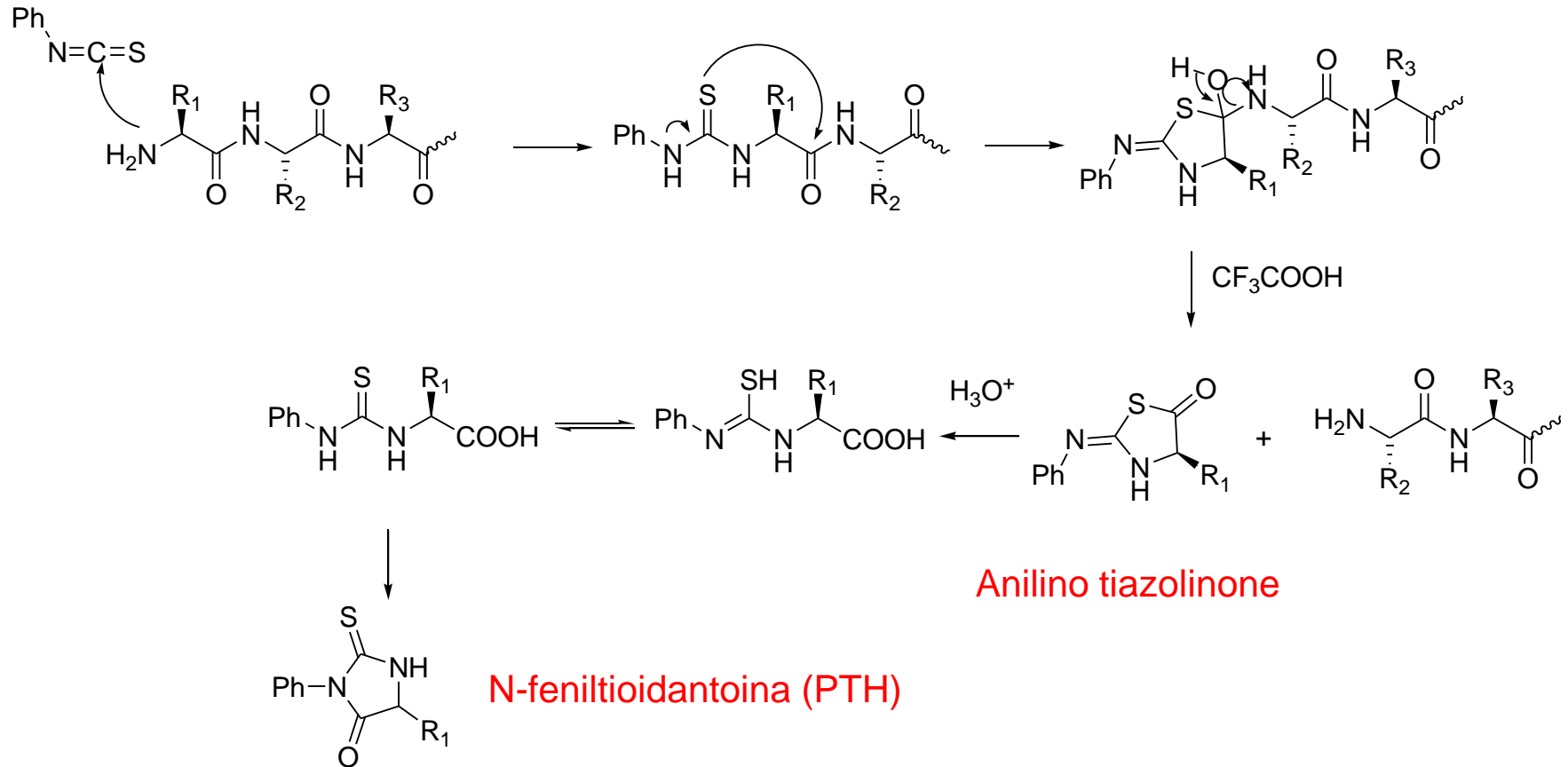
**TLC, HPLC**



**dansyl-a.a.**

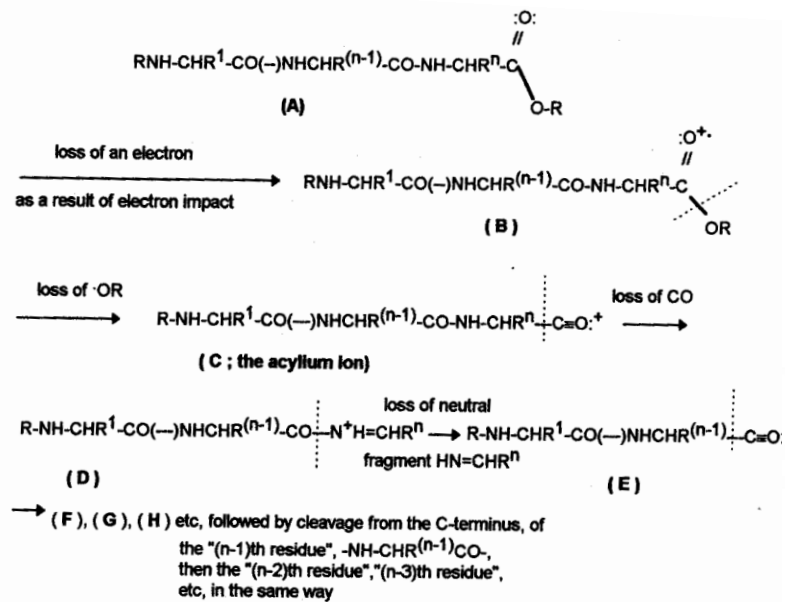
# Peptidi: determinazione della sequenza primaria

**N-terminale:** metodo di Edman (reattivo isotiocianato di fenile)



Il metodo è stato automatizzato e si riesce a determinare la sequenza di peptidi fino a 50 aa con solo 1-5 picomoli di campione (ca. 0.1  $\mu$ g). Oggi tuttavia sono molto utilizzate le tecniche di spettrometria di massa per determinare la sequenza dei peptidi.

# Spettrometria di massa



Scheme 4.1. Fragmentation of a peptide after electron impact.

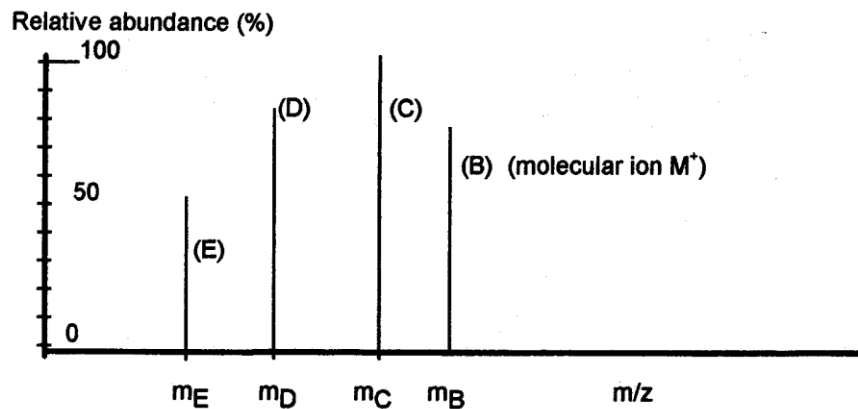
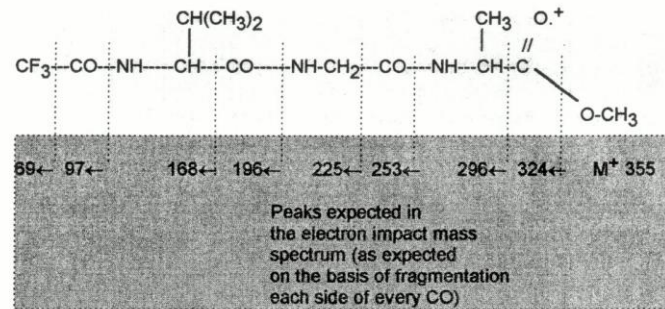


Figure 4.3. A partial mass spectrum.

- (a) the carboxy-terminus,  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CHR}^n-\text{CO}_2\text{R}$ , of the derivatised peptide  $\text{R}-\text{NH}-\text{CHR}^1-\text{CO}(\dots)\text{NHCHR}^{(n-1)}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CHR}^n-\text{CO}_2\text{R}$  (A) suffers ionisation as a result of electron impact and is stripped of one electron from the C-terminal carboxy group, giving the molecular ion  $\text{M}^+$  (B), which then loses the radical  $\cdot\text{OR}$ , to become  $\text{R}-\text{NH}-\text{CHR}^1-\text{CO}(\dots)\text{NHCHR}^{(n-1)}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CHR}^n-\text{C}\equiv\text{O}^+$  (C); and
- (b) (C) loses CO by fragmenting to  $\text{R}-\text{NH}-\text{CHR}^1-\text{CO}(\dots)\text{NHCHR}^{(n-1)}-\text{CO}-\text{N}^+\text{H}=\text{CHR}^n$  (D), which then loses  $\text{HN}=\text{CHR}^n$  to give  $\text{R}-\text{NH}-\text{CHR}^1-\text{CO}(\dots)\text{NHCHR}^{(n-1)}-\text{C}\equiv\text{O}^+$  (E).

# Spettrometria di massa



169  
small  
peak

226

Peaks actually present in the mass spectrum, one mass unit larger than expected due to H abstraction from NH by collision with fragment ions

278 337

Peaks seen in the mass spectrum, due to loss of H<sub>2</sub>O from ions 18 mass units larger than 278 and 337 (favoured by glycine, and aromatic and heteroaromatic amino acids)

313

Loss of propene (CH<sub>3</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, mass 42) from the parent ion of valine-containing peptides (McLafferty rearrangement)

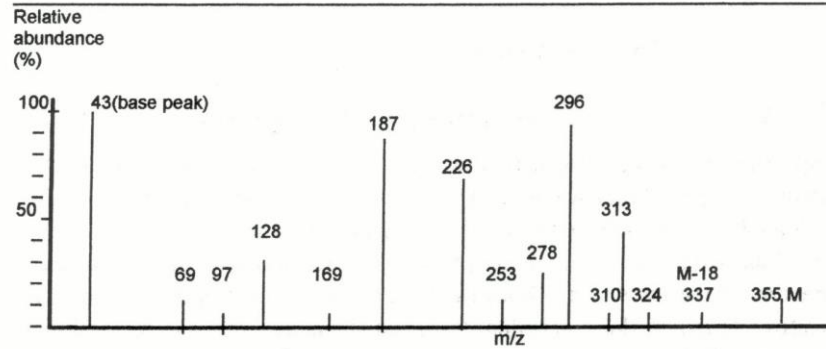
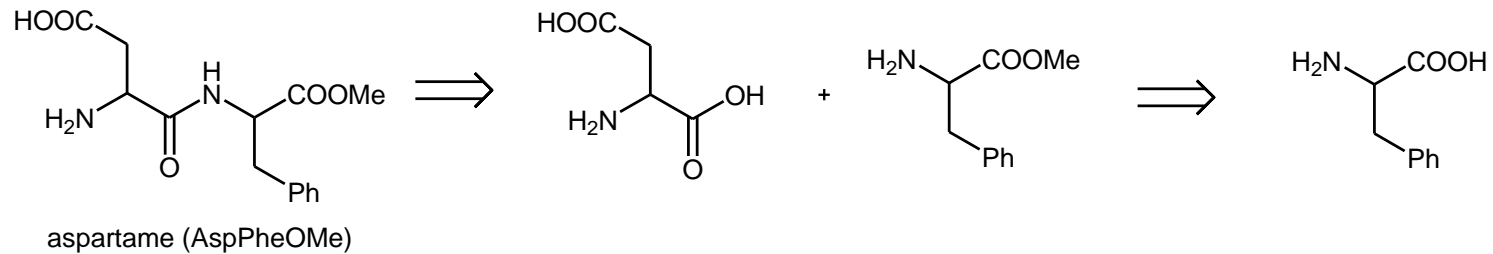


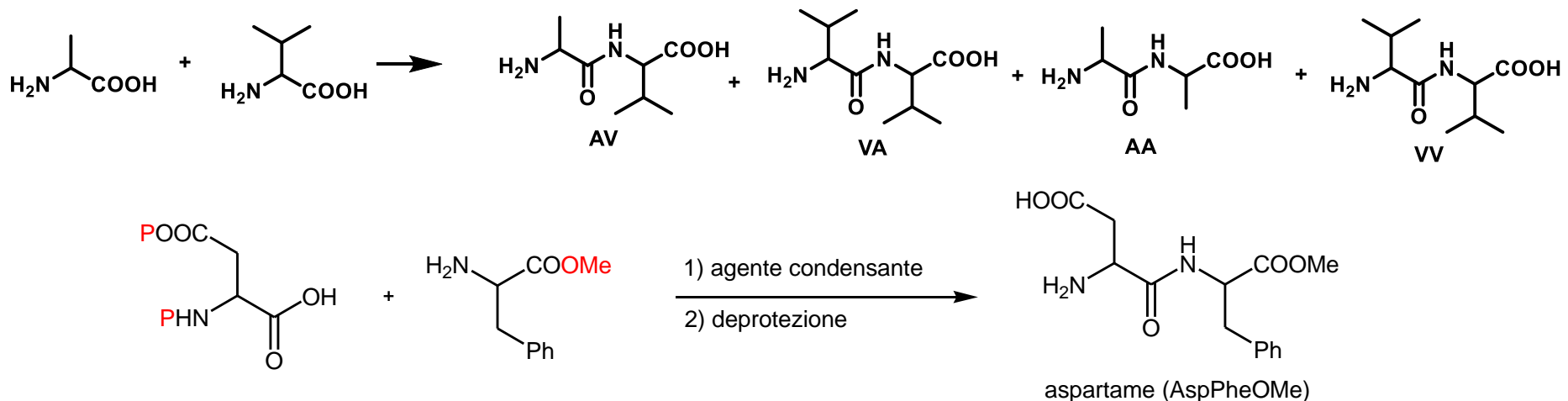
Figure 4.5. Peaks expected and found in the mass spectrum.

# Sintesi peptidica



Non si può ottenere direttamente dai due amminoacidi per due motivi principali:

- si otterrebbe una miscela di prodotti: è necessario proteggere le funzioni che non devono reagire;
- per ottenere il legame ammidico bisogna attivare il gruppo carbossilico;



Caratteristiche generali dei gruppi protettori:

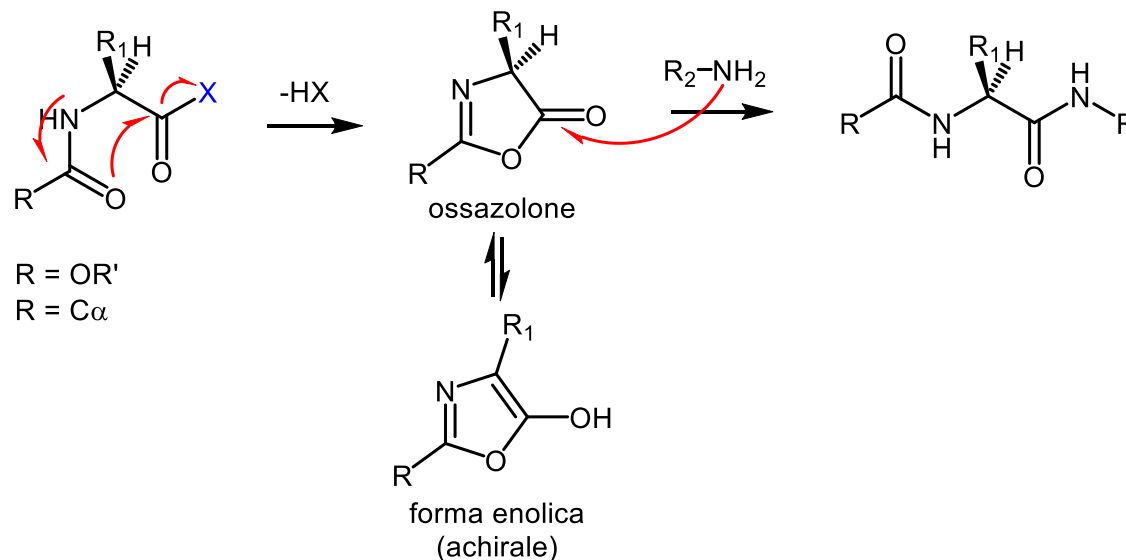
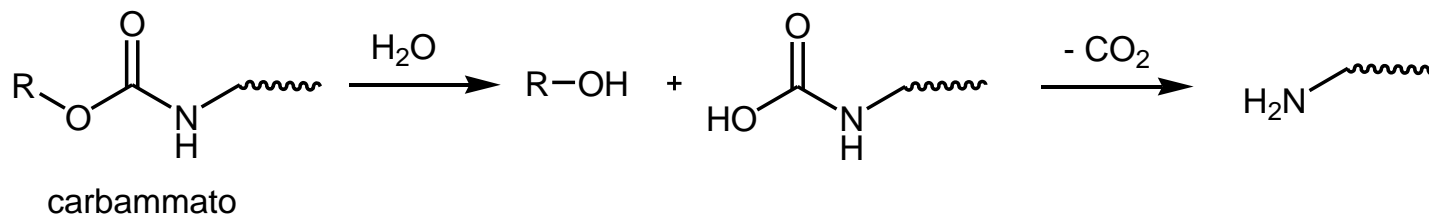
- devono potere essere introdotti facilmente e con buone rese;
- devono essere stabili nelle condizioni di reazione utilizzate;
- deve essere rimossi facilmente, con buone rese e selettivamente (ortogonalità);

# Protezione del gruppo amminico

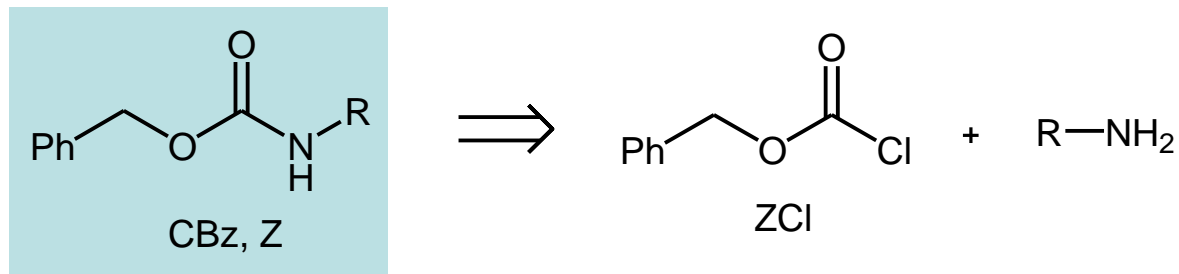
L'ammina è basica e nucleofila e può essere protetta trasformandola in ammido. Tuttavia una semplice ammido (acetammido, per esempio) richiede condizioni di deprotezione troppo drastiche.

I gruppi protettori più comunemente utilizzati sono i **carbammati**, formalmente derivati asimmetrici dell'acido carbonico. Hanno due vantaggi principali:

- Vengono rimossi facilmente perché l'idrolisi interessa la parte esterea e il prodotto che si ottiene decarbossila facilmente;
- Tendono a deprimere la formazione dell'ossazolone che è acilante ma può causare racemizzazione.

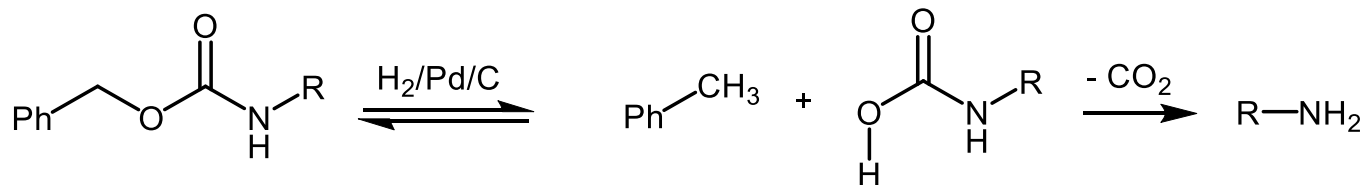
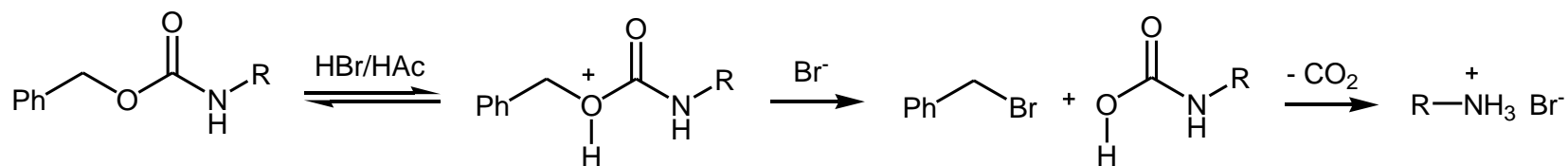


# Carbobenzilossi (Cbz, Z)

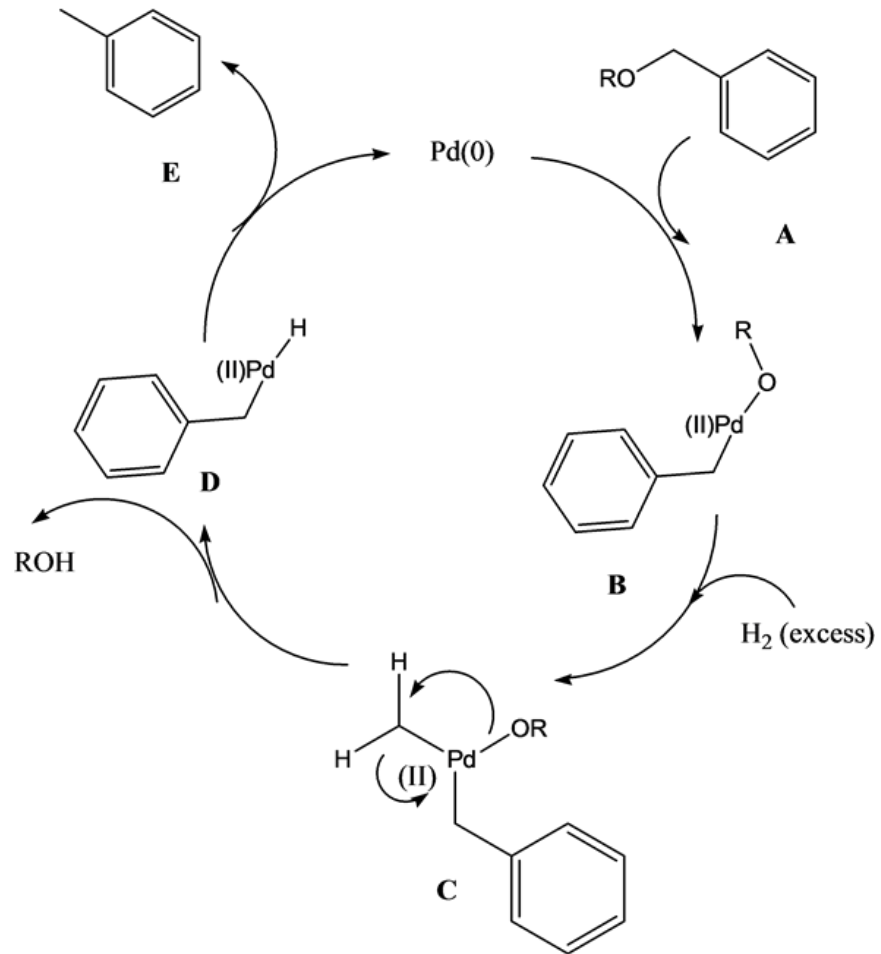


Stabile in ambiente neutro e basico. Stabile anche con acidi deboli.

Rimozione: acidi forti (HBr/AcOH) o idrogenazione catalitica (H<sub>2</sub>/Pd/C).

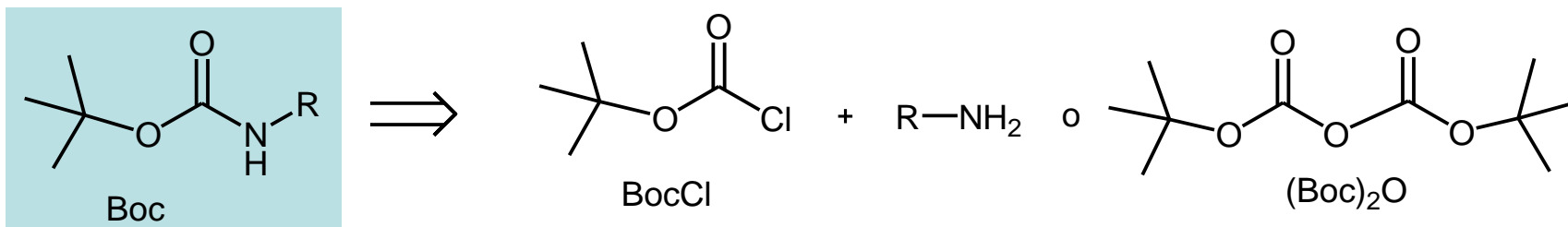


# Carbobenzilossi (Cbz, Z)



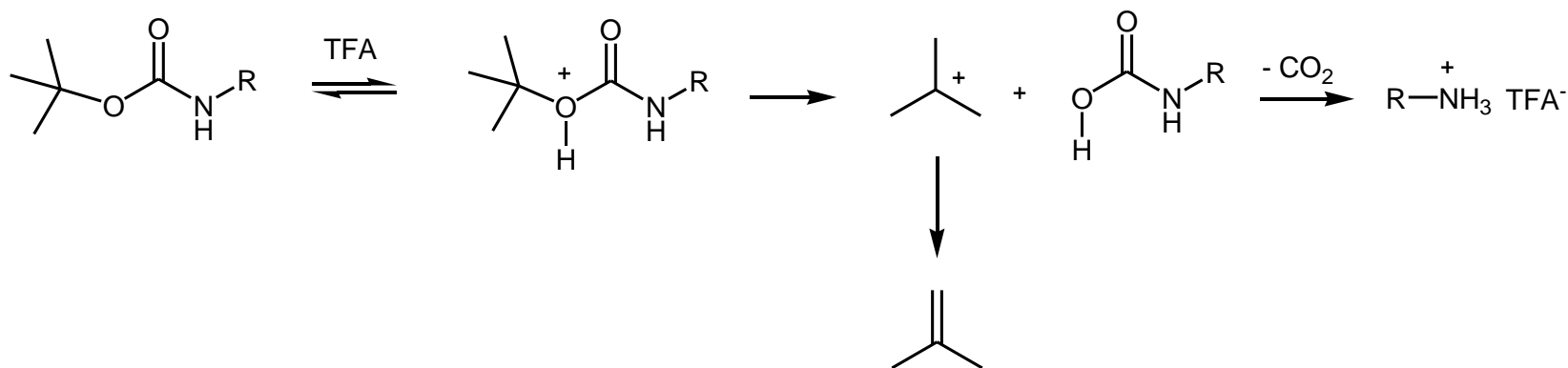


# t-butossicarbonil (Boc)

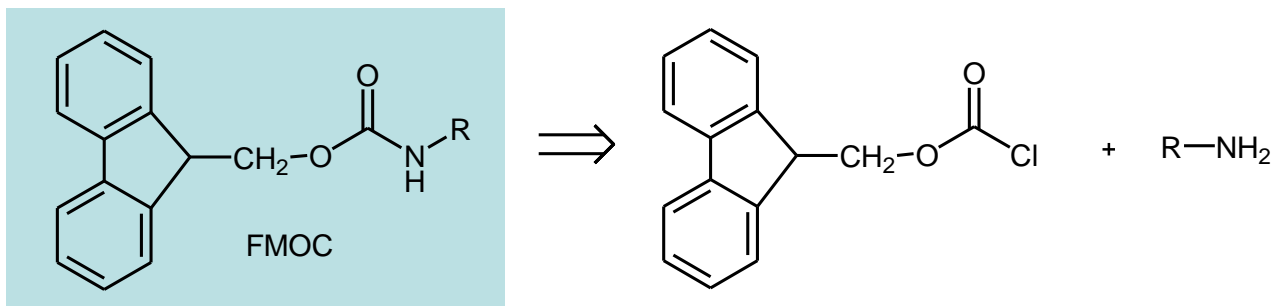


Stabile in ambiente neutro e basico. Stabile anche all'idrogenazione catalitica.

Rimozione: acidi deboli (TFA) e forti (HBr/AcOH).

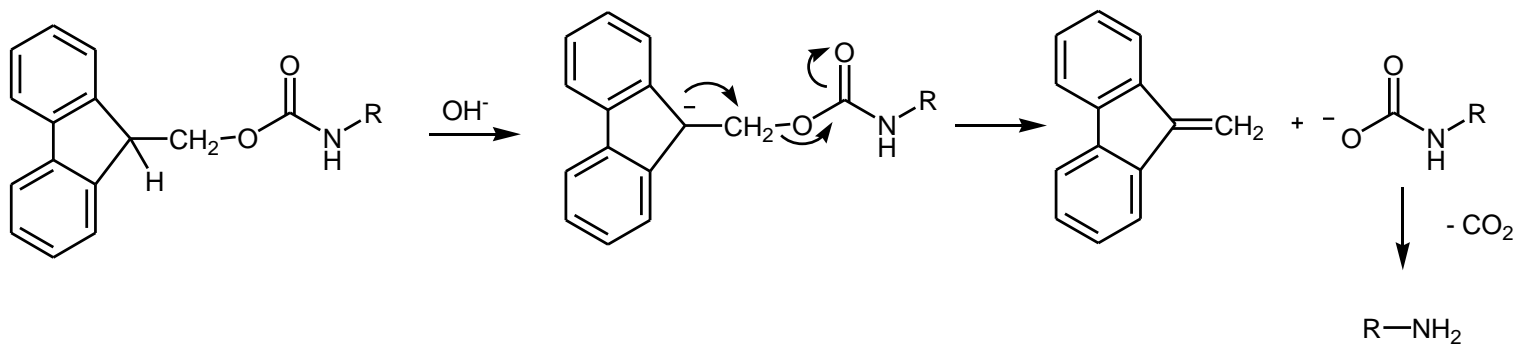


# 9-fluorenilmetossicarbonil, Fmoc



Stabile in ambiente neutro e acido. Stabile anche all'idrogenazione catalitica.

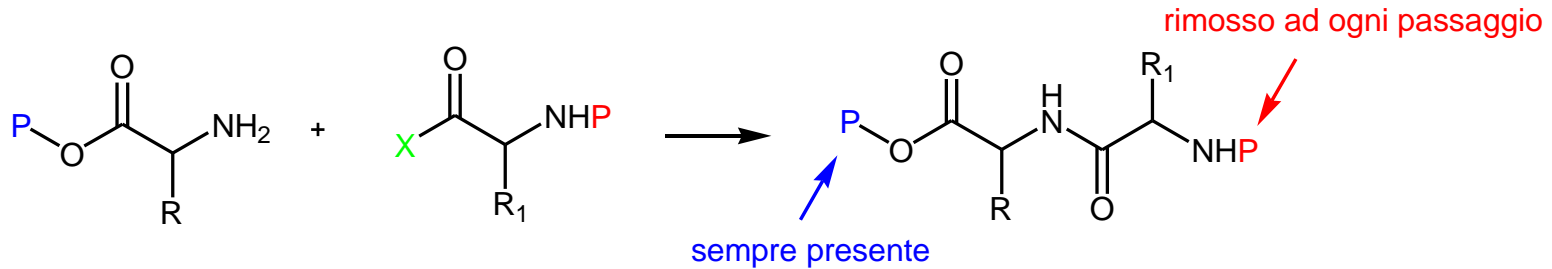
Rimozione: basi deboli



	stabile	deprotezione
Cbz	H <sup>+</sup> debole, OH <sup>-</sup>	H <sup>+</sup> forte, H <sub>2</sub> /Pd
Boc	OH <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> /Pd	H <sup>+</sup>
Fmoc	H <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> /Pd	OH <sup>-</sup>

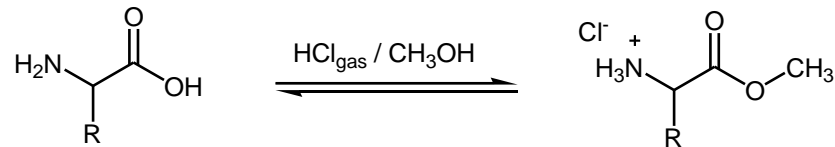
# Protezione del gruppo carbossilico

Nella sintesi peptidica solitamente si fa crescere il peptide dal C-terminale al N-terminale. Si protegge quindi il gruppo carbossilico del C-terminale con una protezione che rimane fino al termine della sintesi e quelli in catena laterale.

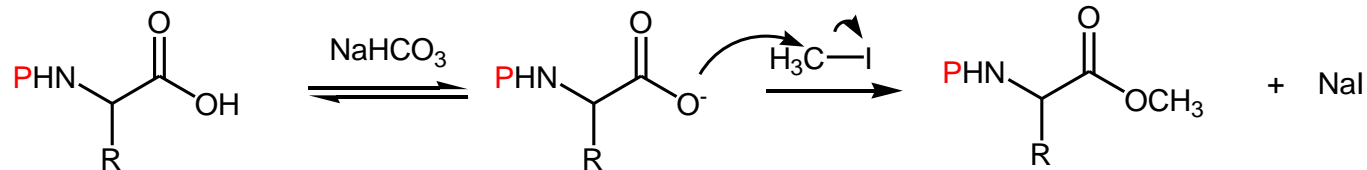


a) Estere metilico.

i) esterificazione di Fischer

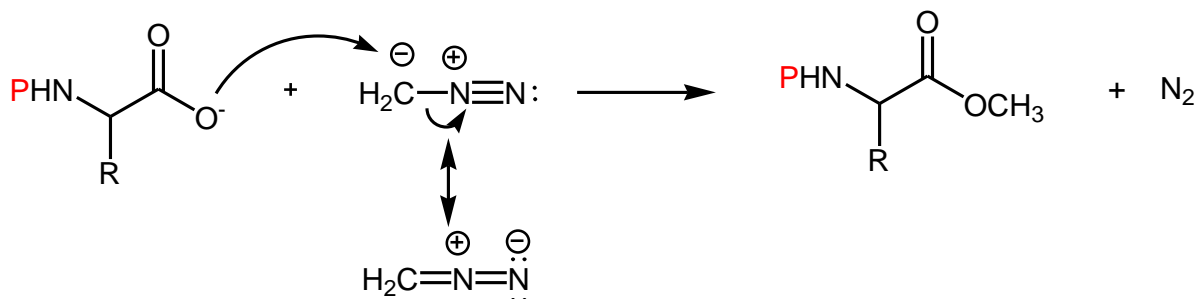


ii) sostituzione nucleofila

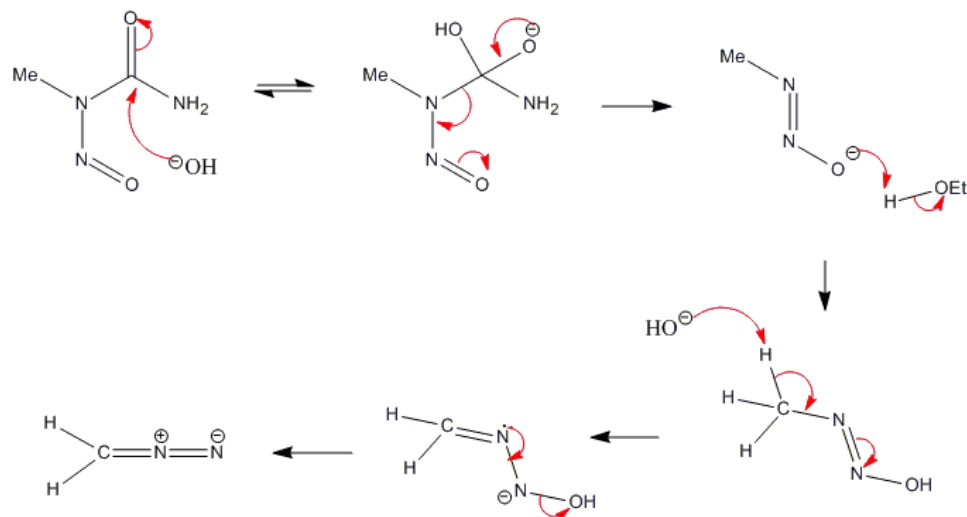
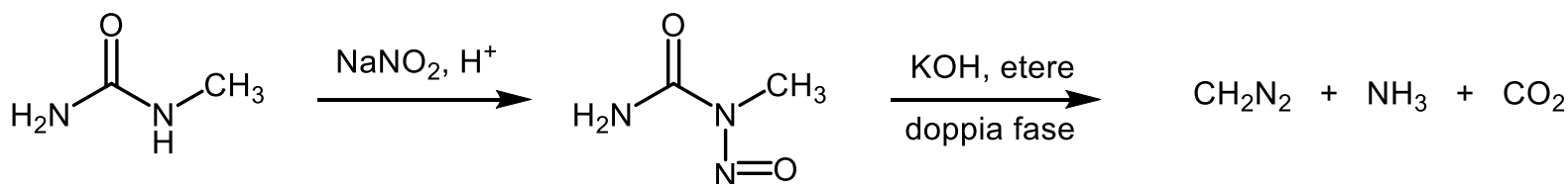


# Protezione del gruppo carbossilico

i) Reazione con il diazometano



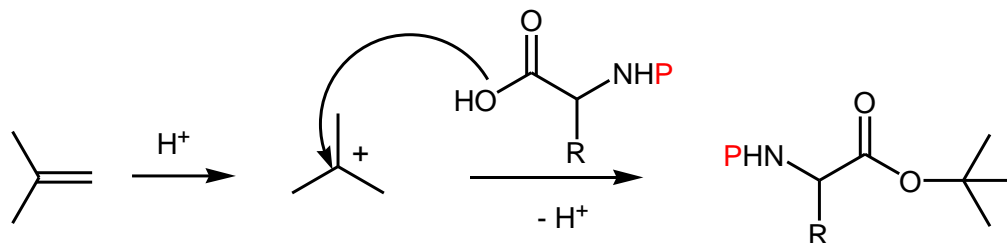
Il diazometano è un forte agente alchilante. Può essere considerato come un sale di diazonio alifatico. E' molto reattivo ma decompone facilmente in modo esplosivo. Viene preparato in bassa concentrazione e utilizzato direttamente.



# Protezione del gruppo carbossilico

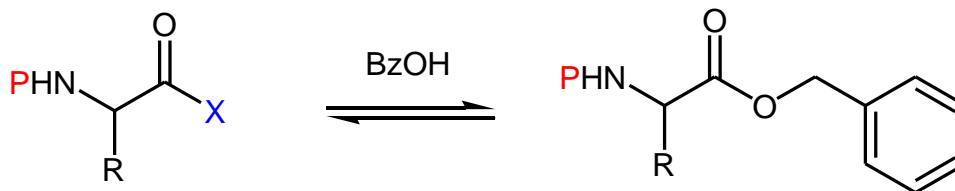
b) Estere *t*-butilico.

Può essere introdotto con metodi tradizionali (Fischer) ma si preferisce la reazione con l'isobutene.



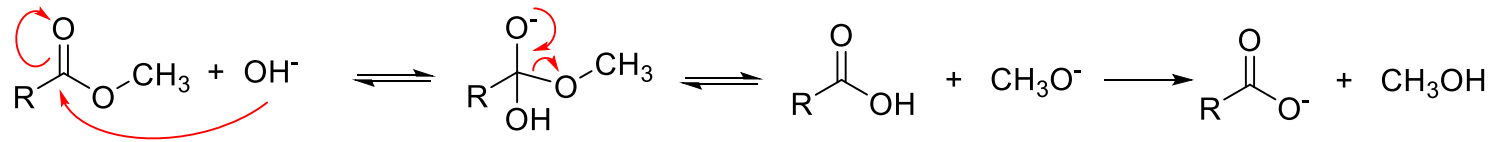
c) Estere benzilico.

Viene introdotto utilizzando alcol benzilico su derivati attivati dell'acido carbossilico.

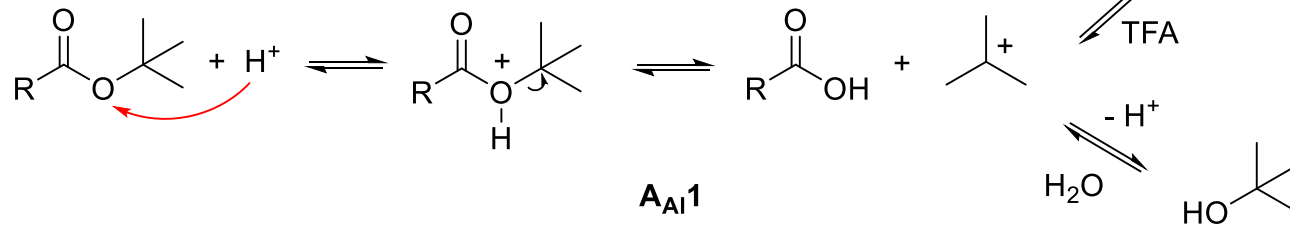
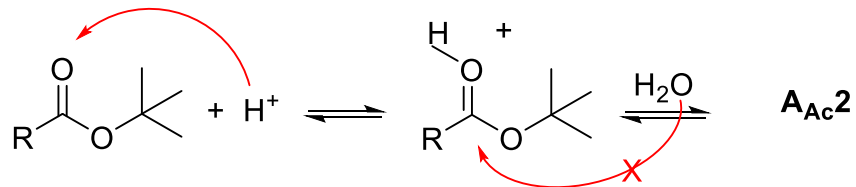
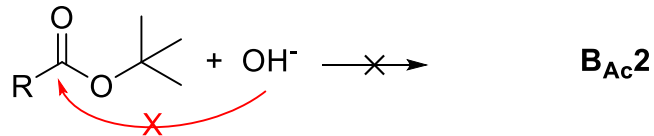


	stabile	deprotezione
-COOMe	$H^+$ , $OH^-$ debole, $H_2/Pd$	NaOH
-COO <sup>t</sup> Bu	$OH^-$ , $H_2/Pd$	$H^+$ debole
-COOBz	$H^+$ e $OH^-$ debole	$H^+$ forte, $H_2/Pd$

# Protezione del gruppo carbossilico



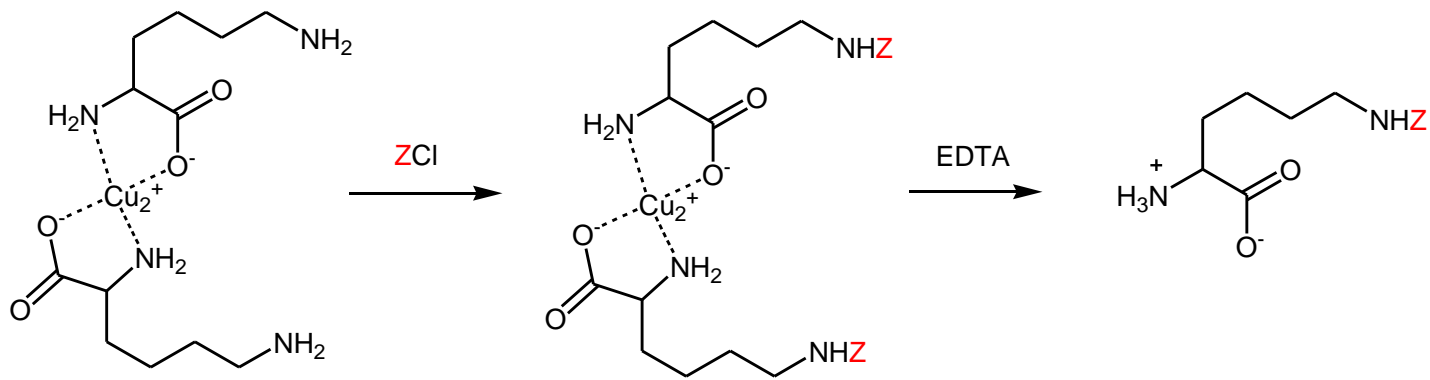
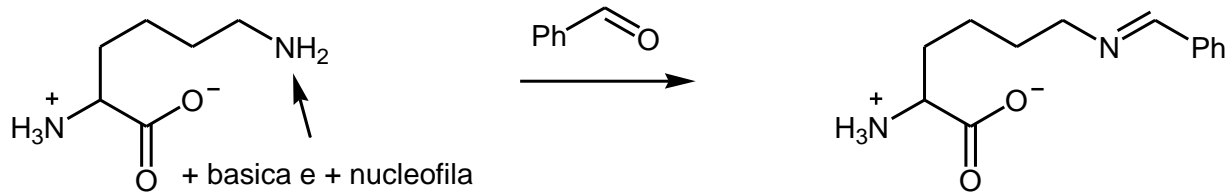
saponificazione **B<sub>Ac</sub>2**



# Protezione dei gruppi in catena laterale

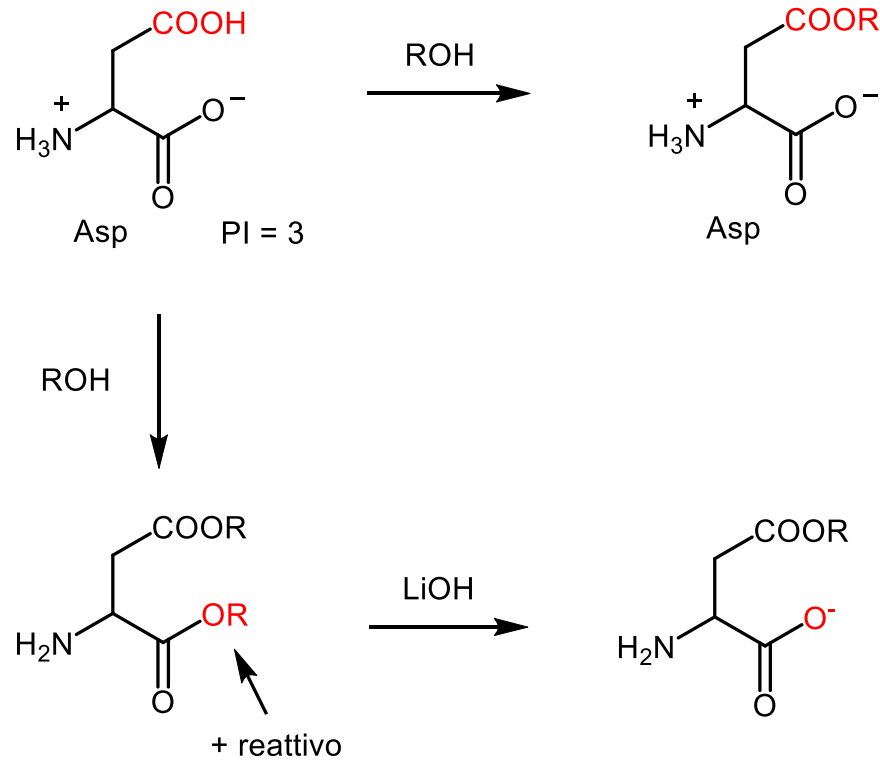
Gruppi reattivi in catena laterale interferiscono con la sintesi peptidica e devono essere protetti in modo ortogonale rispetto ai gruppi amminico/carbossilico della catena principale.

Per proteggere i gruppi in catena laterale si sfruttano la diversa reattività o proprietà particolari come la capacità degli aminoacidi di formare complessi con ioni metallici che coinvolgono solo i gruppi in amminico e carbossilico in  $\alpha$ .



# Protezione dei gruppi in catena laterale

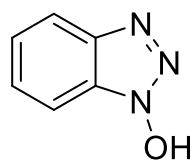
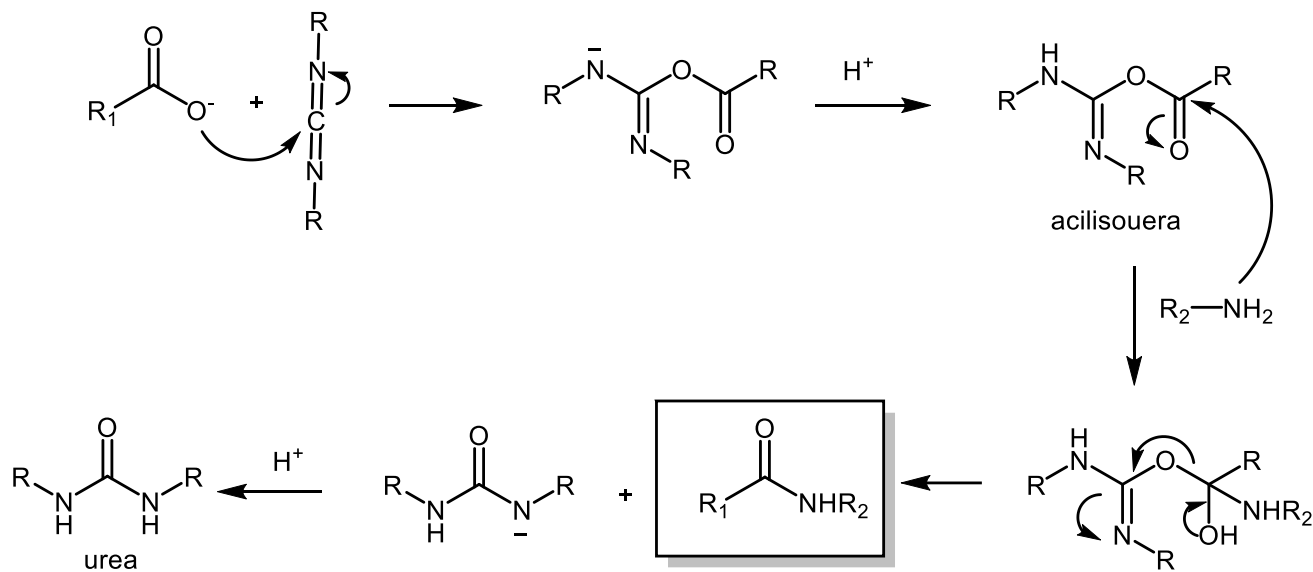
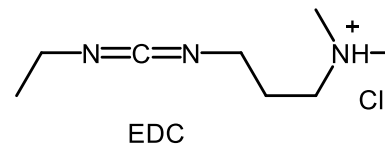
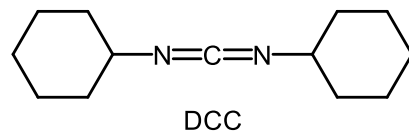
Nel caso dell'acido aspartico a seconda della carica dell'amminoacido il gruppo carbossilico in catena laterale è più o meno reattivo di quello in alfa.



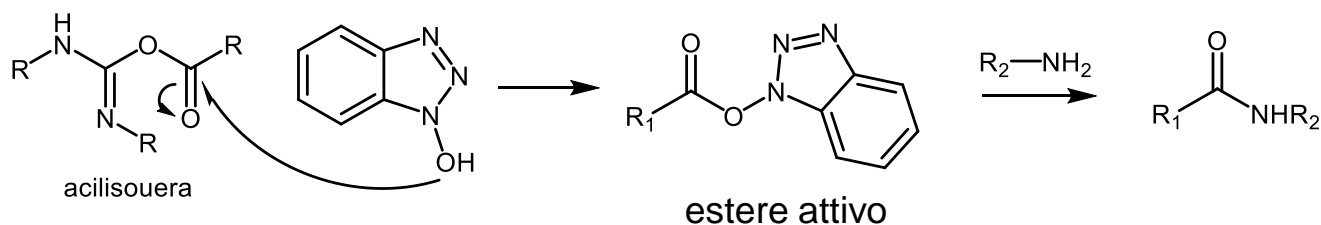


# Formazione del legame peptidico

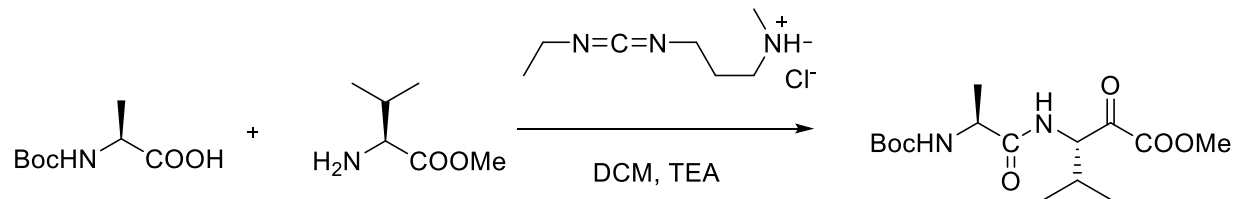
La formazione del legame peptidico richiede l'attivazione della funzione carbossilica. Questa può essere ottenuta in diversi modi: acilcloruri, anidridi simmetriche o non, esteri attivati. Il metodo più comunemente utilizzato sfrutta invece la reattività delle **carbodiimidi**, dette anche agenti condensanti.



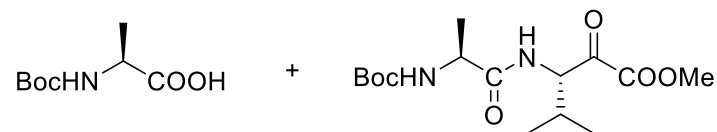
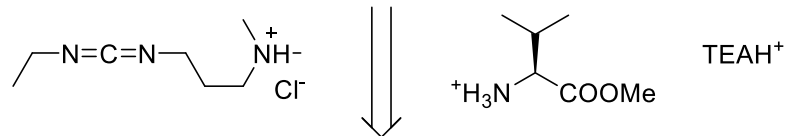
Hydroxybenzotriazole (HOBT)



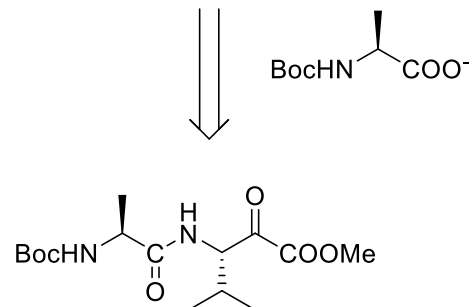
# Formazione del legame peptidico



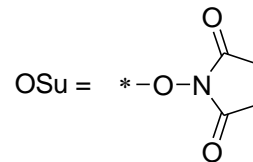
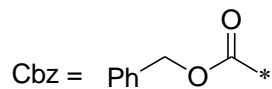
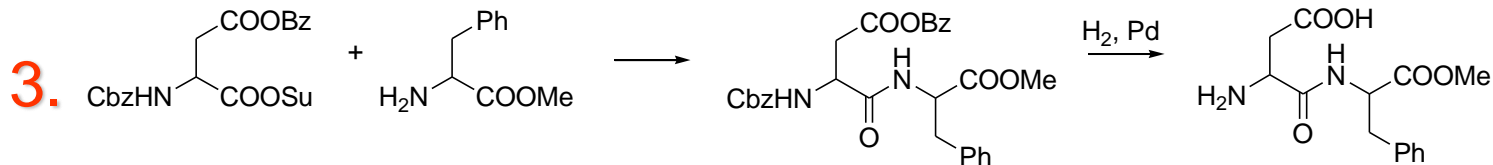
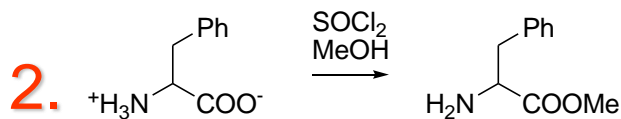
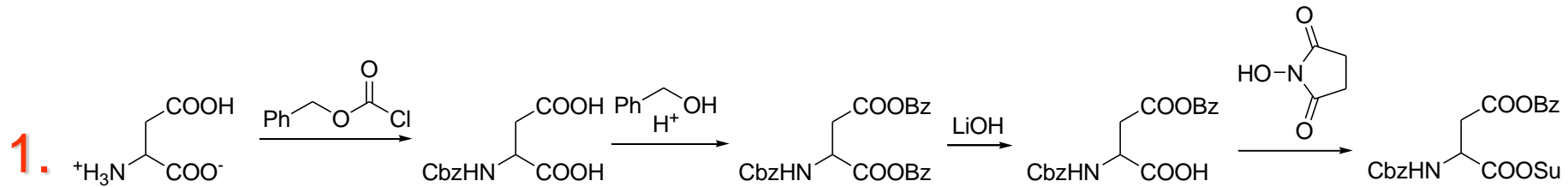
lavaggi acidi (acido citrico)



lavaggi basici ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )



# Sintesi industriale dell'aspartame



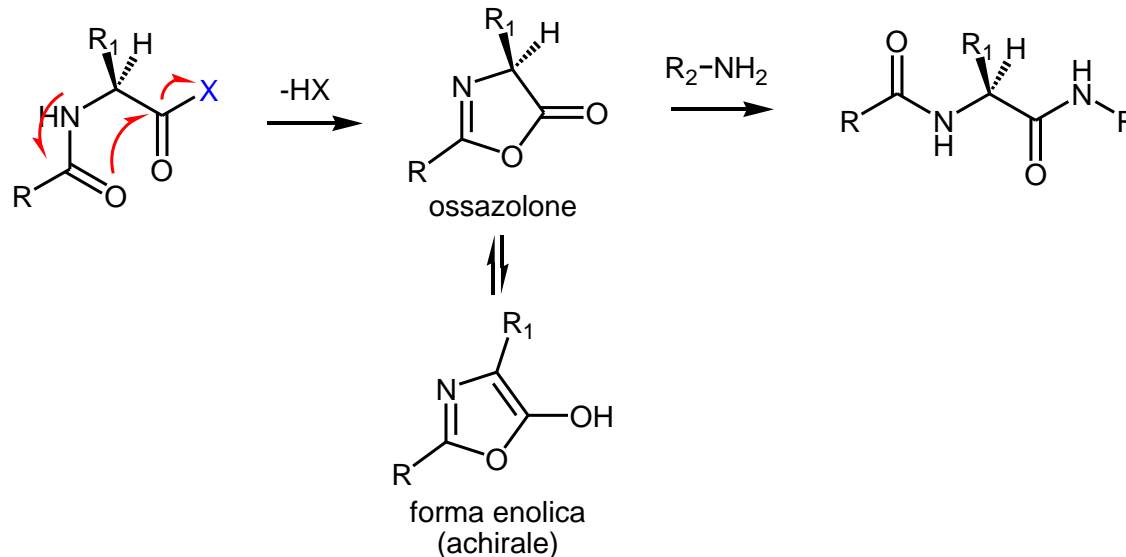
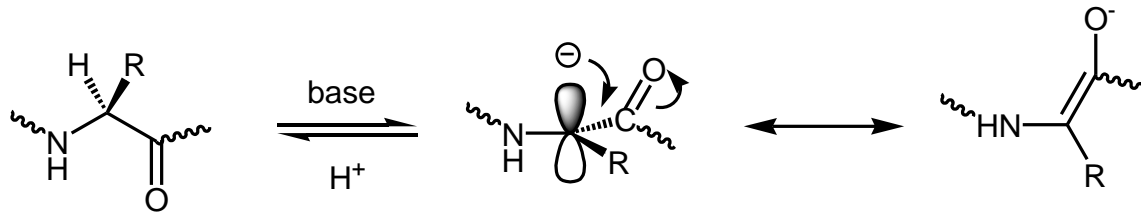
Per fare un solo legame sono necessari 7 passaggi.

# Sintesi peptidica

La sintesi peptidica richiede una sequenza di steps di protezione/coupling/deprotezione che si ripetono.

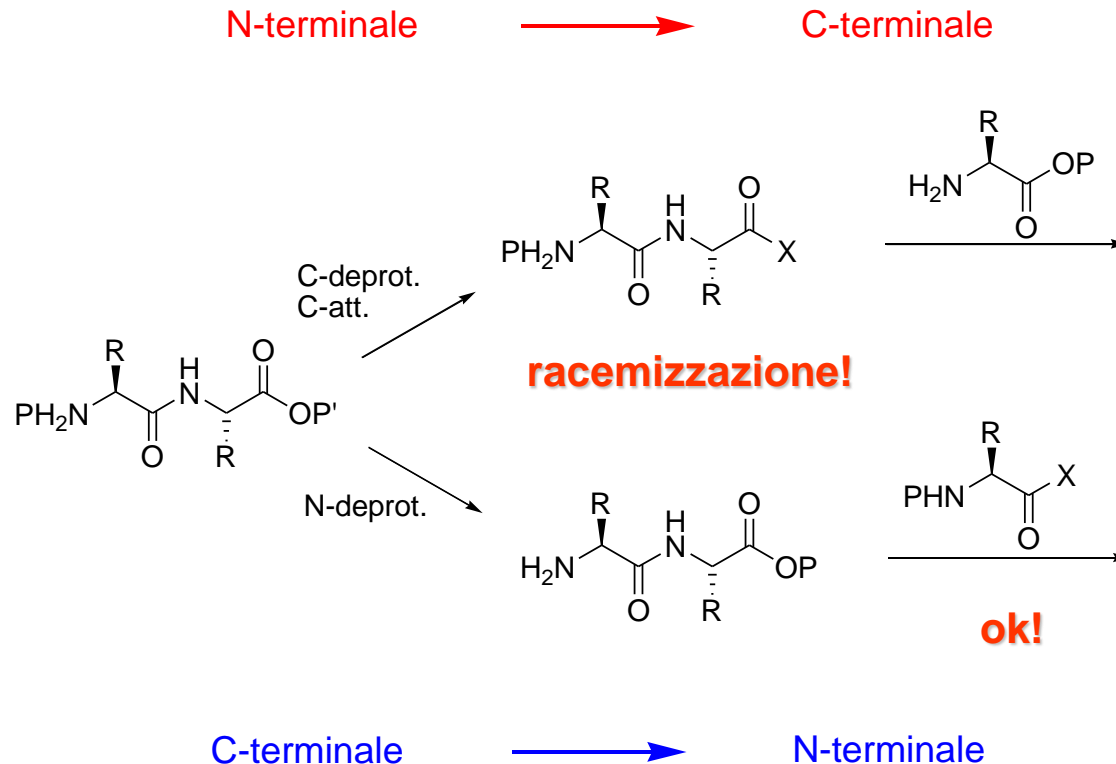
Problemi che si incontrano sono:

- 1) Solubilità del peptide che diminuisce mano a mano che le sue dimensioni crescono.
- 2) Racemizzazione che può essere dovuta all'azione diretta di basi sul protone in alfa o alla formazione dell'ossazolone. Per minimizzare questi rischi si evitano condizioni basiche forti e si procede alla sintesi dal C-terminale verso il N-terminale.



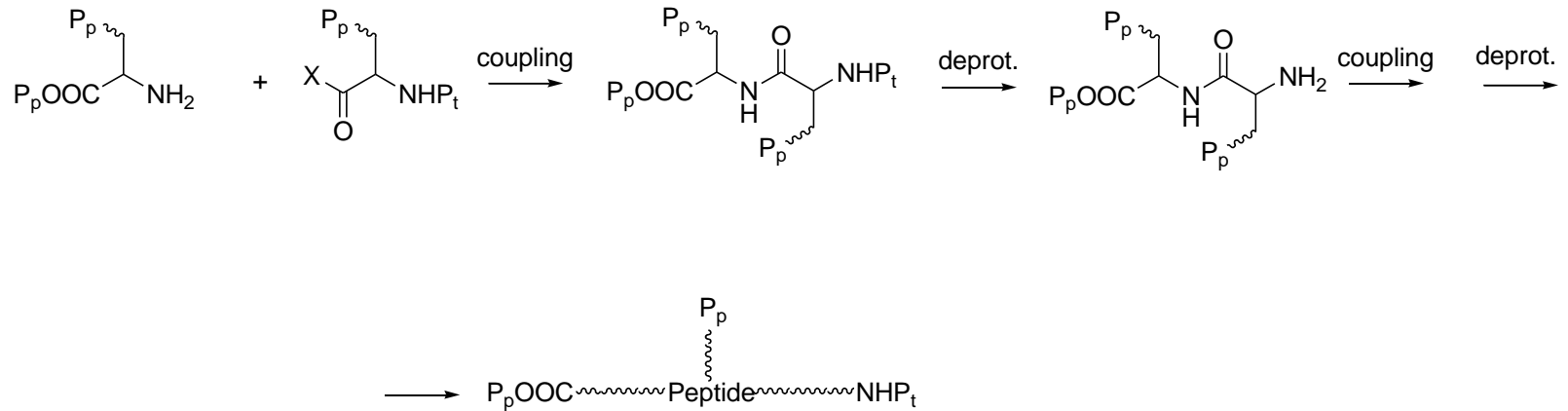
# Sintesi peptidica

La via di sintesi che allunga il peptide facendo il coupling sull'amminoacido C-terminale (da N-terminale a C-terminale) genera un carbossile attivato in posizione n+1 rispetto ad un altro amminoacido favorendo la formazione dell'ossazolone.



# Sintesi peptidica

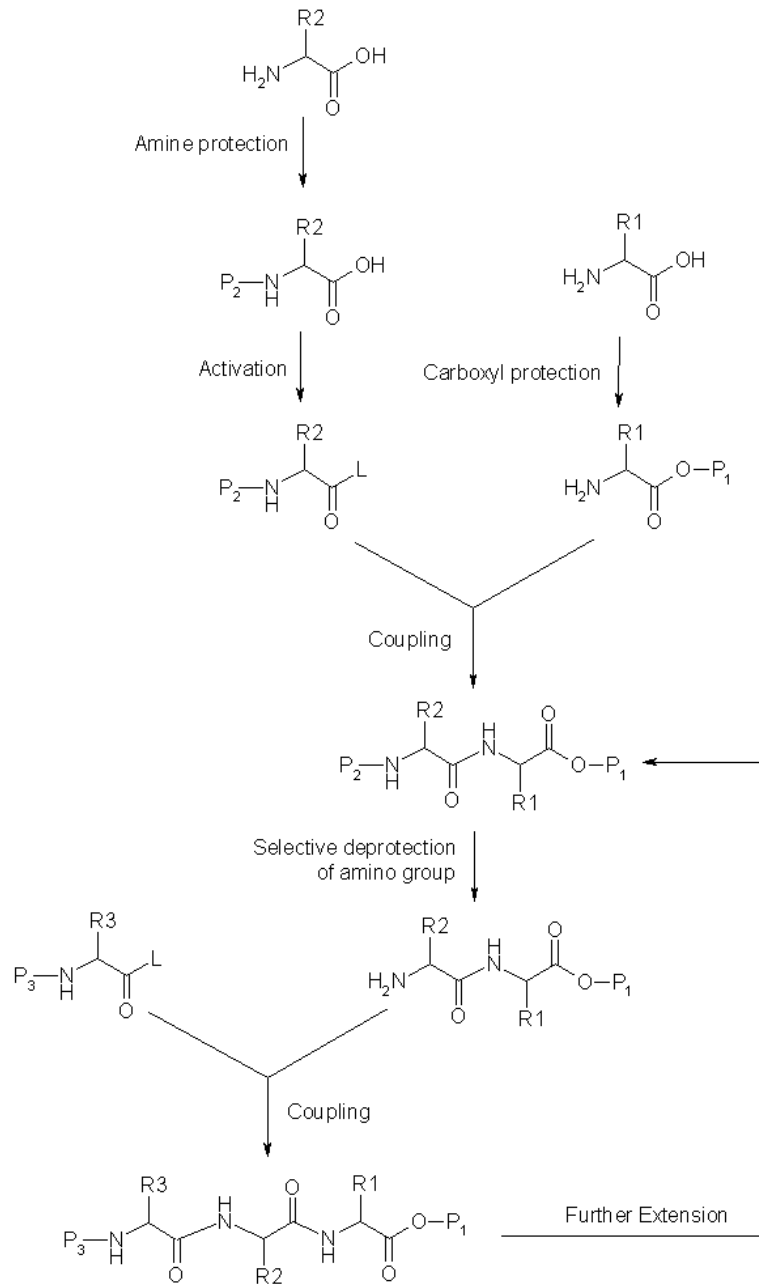
3) Bisogna scegliere protezioni ortogonali dei gruppi in catena laterale e del carbossilato C-terminale.



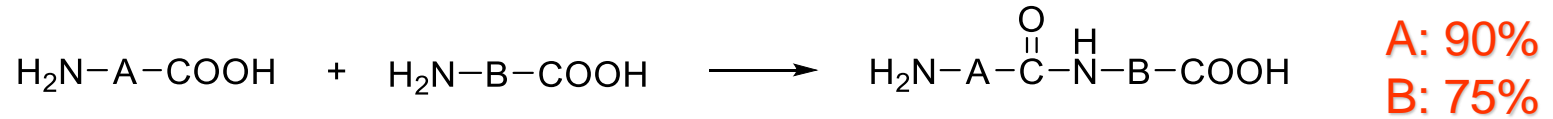
	<b>A</b>		<b>B</b>		<b>C</b>	
<b><math>P_t</math></b>	Cbz	$H_2$	Boc	$H^+$	Fmoc	Base
<b><math>P_p</math></b>	Boc	$H^+$	Cbz	$H_2$	Boc	$H^+$
	OtBu		Bz		OtBu	

Normalmente si preferiscono le strategie B e C per evitare di dover rimuovere il gruppo Z mediante idrogenazione ad ogni step di allungamento di catena.

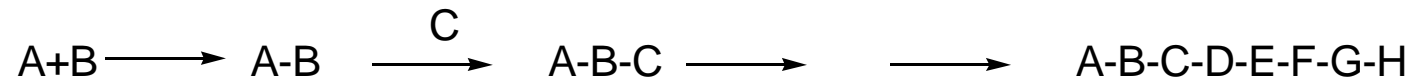
# Sintesi peptidica



# Sintesi lineare e convergente



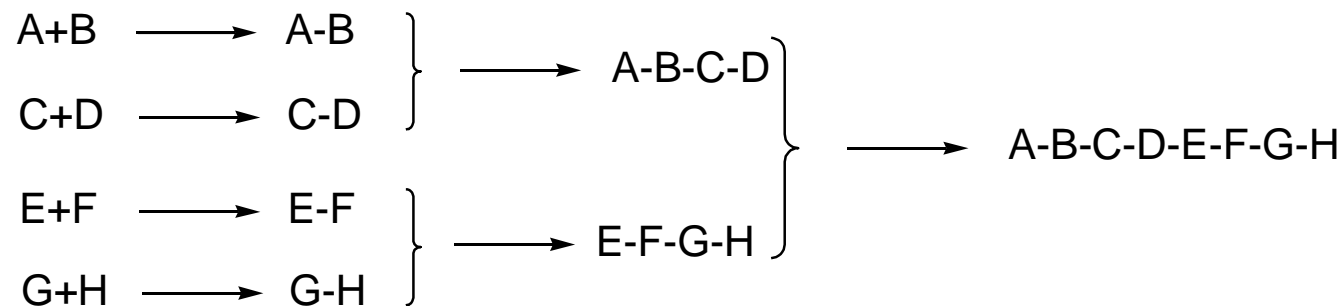
Lineare:



A:  $0.9^7 = 48\%$

B:  $0.75^7 = 13\%$

Convergente:



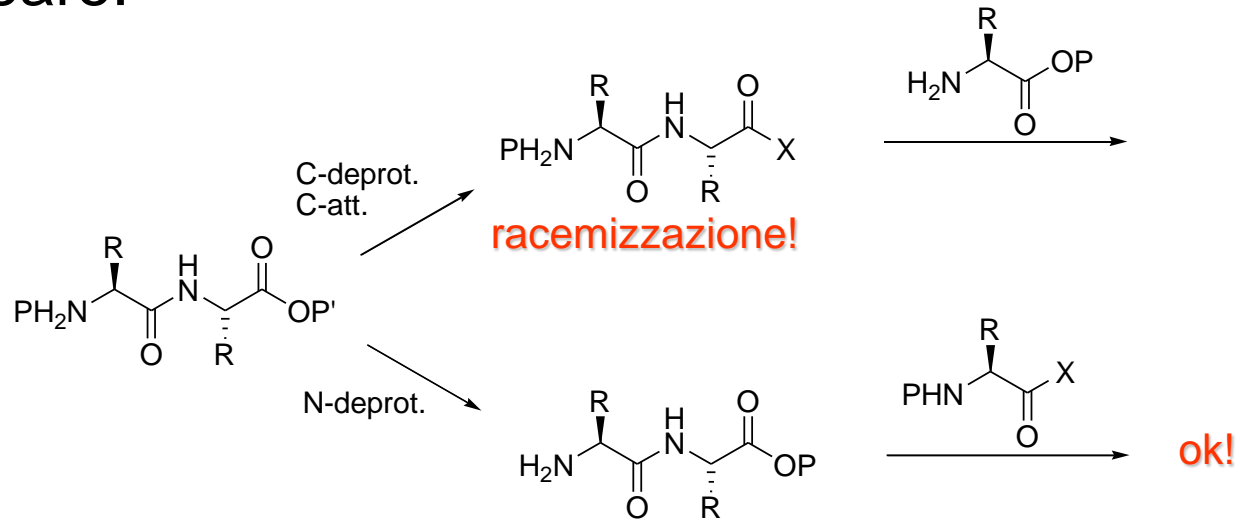
A:  $0.9^3 = 72\%$

B:  $0.75^3 = 42\%$

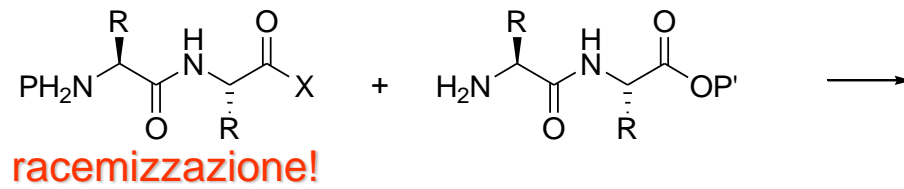


# Sintesi lineare e convergente

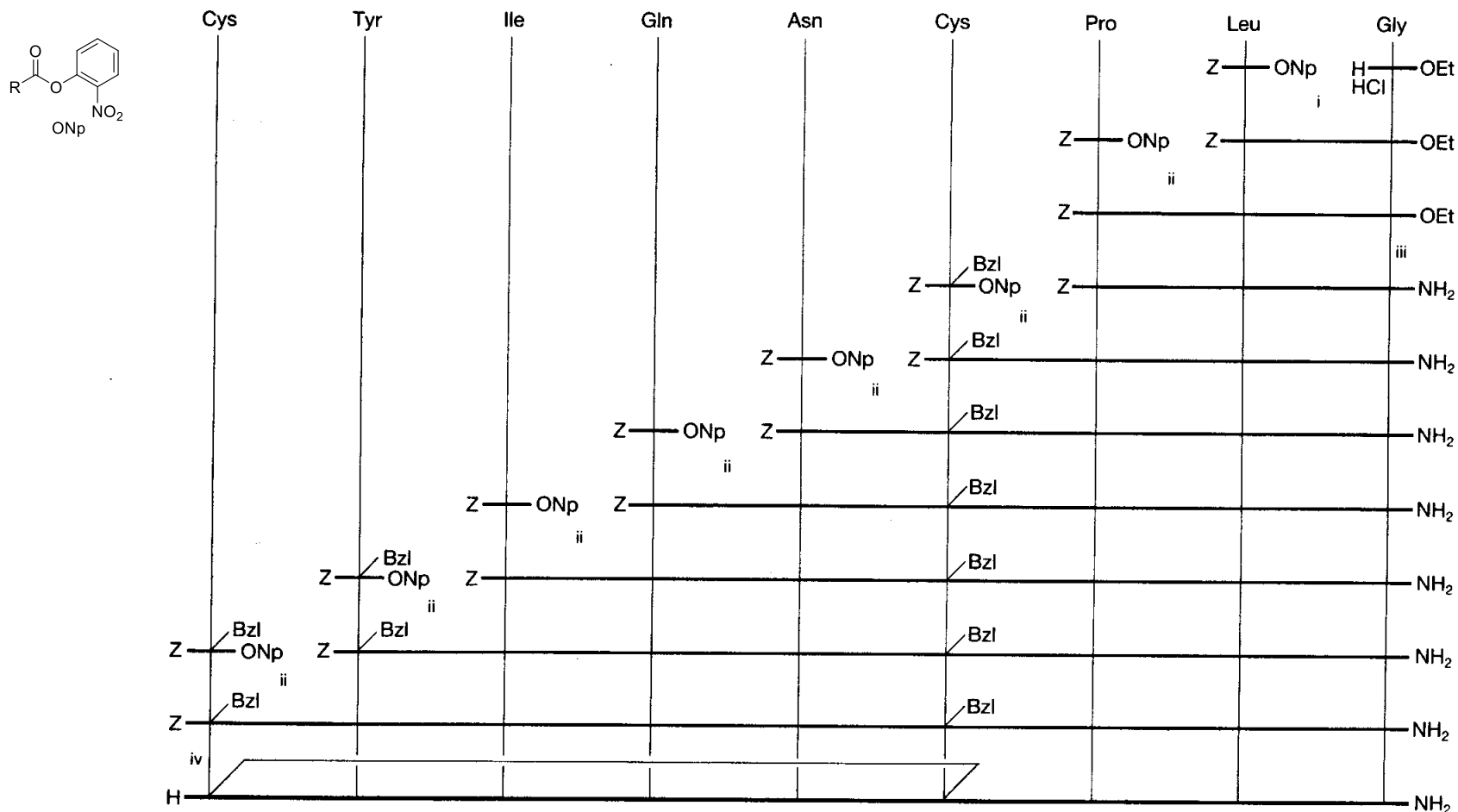
Lineare:



Convergente:

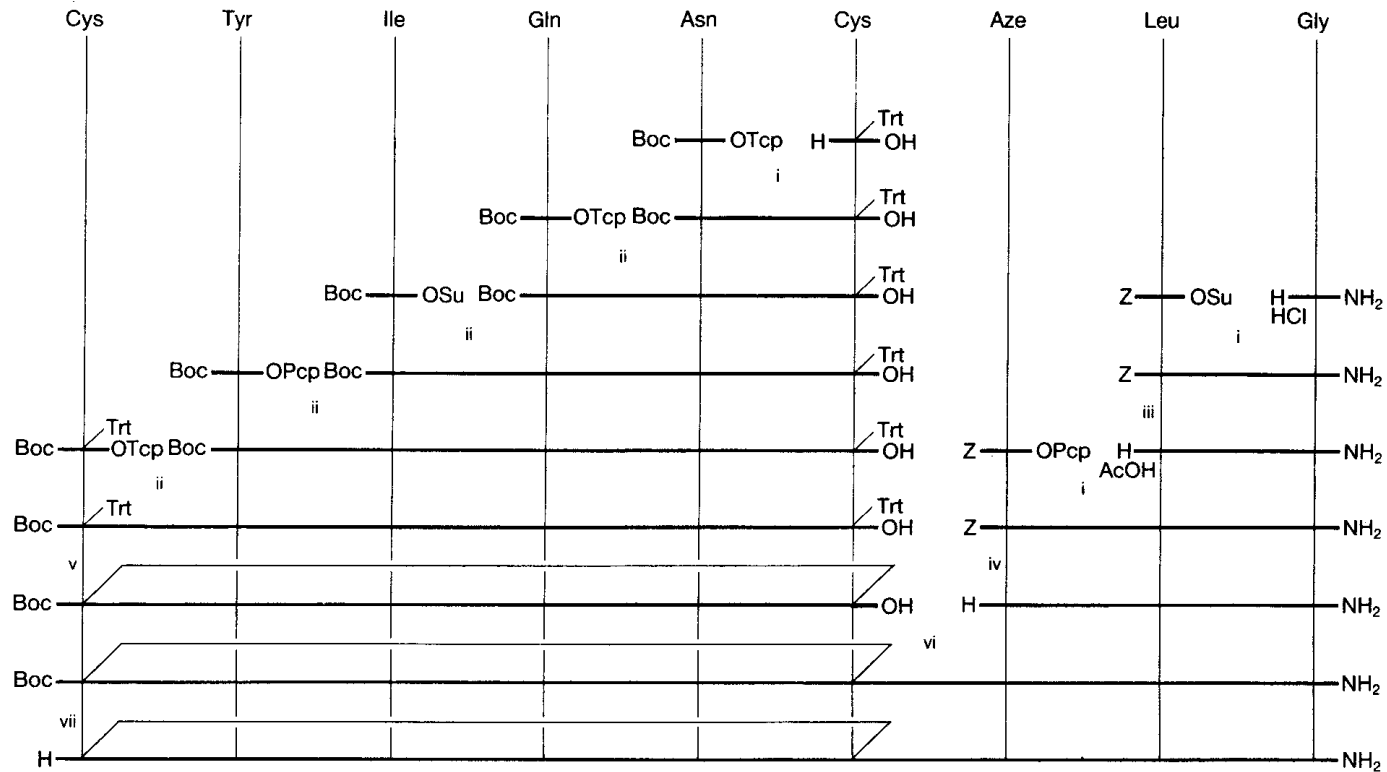


# Sintesi dell'ossitocina

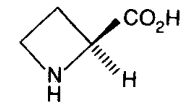


**Scheme 8.1.** Conditions: i,  $\text{Et}_3\text{N}/\text{CHCl}_3$ ; ii,  $\text{HBr}/\text{AcOH}$  on the protected amino component, then conversion to the free base form, either before or during reaction with active ester in  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{EtOAc}$  or  $\text{DMF}$ ; iii,  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ ; iv,  $\text{Na}/\text{NH}_3(\text{l})$ , then  $\text{O}_2$ , followed by countercurrent distribution purification.

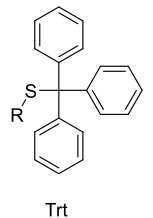
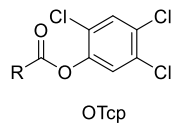
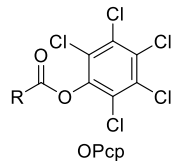
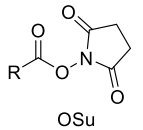
# Sintesi di un analogo dell'ossitocina



**Scheme 8.2.** Conditions: i,  $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMF}$ ; ii, TFA (with added TrtOH to suppress *S*-detritylation), then active ester/  $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMF}$ ; iii,  $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})/\text{AcOH}$ ; iv,  $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{C})/\text{aq. MeOH}$ ; v,  $\text{I}_2/\text{AcOH}$ ; vi,  $\text{DCCI}/\text{HOBt}/\text{DMF}$ ; vii, 90% aq. TFA, then purification by gel permeation chromatography.

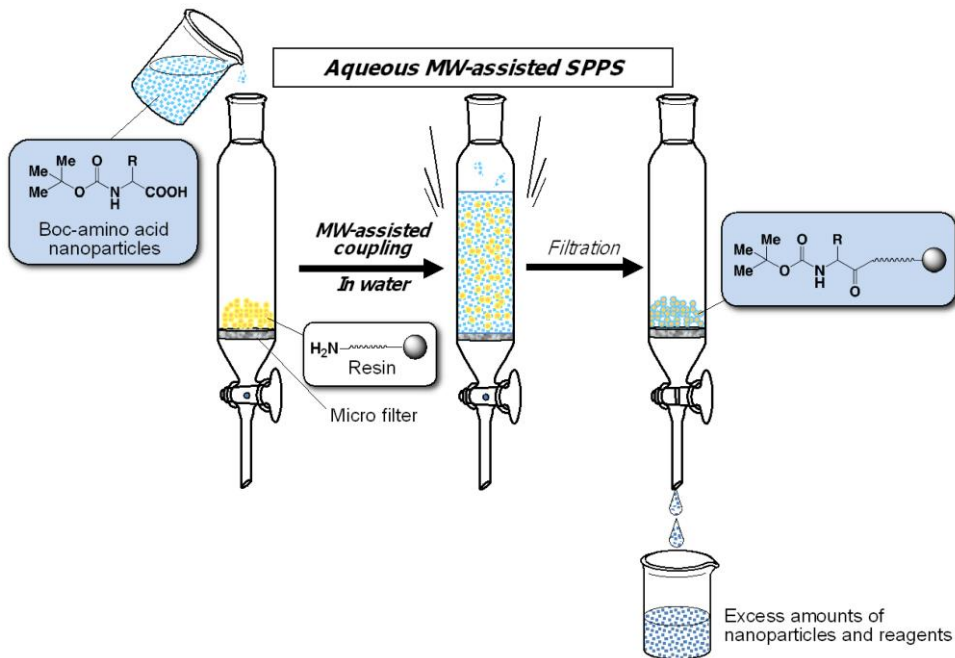


Azetidine-2-carboxylic

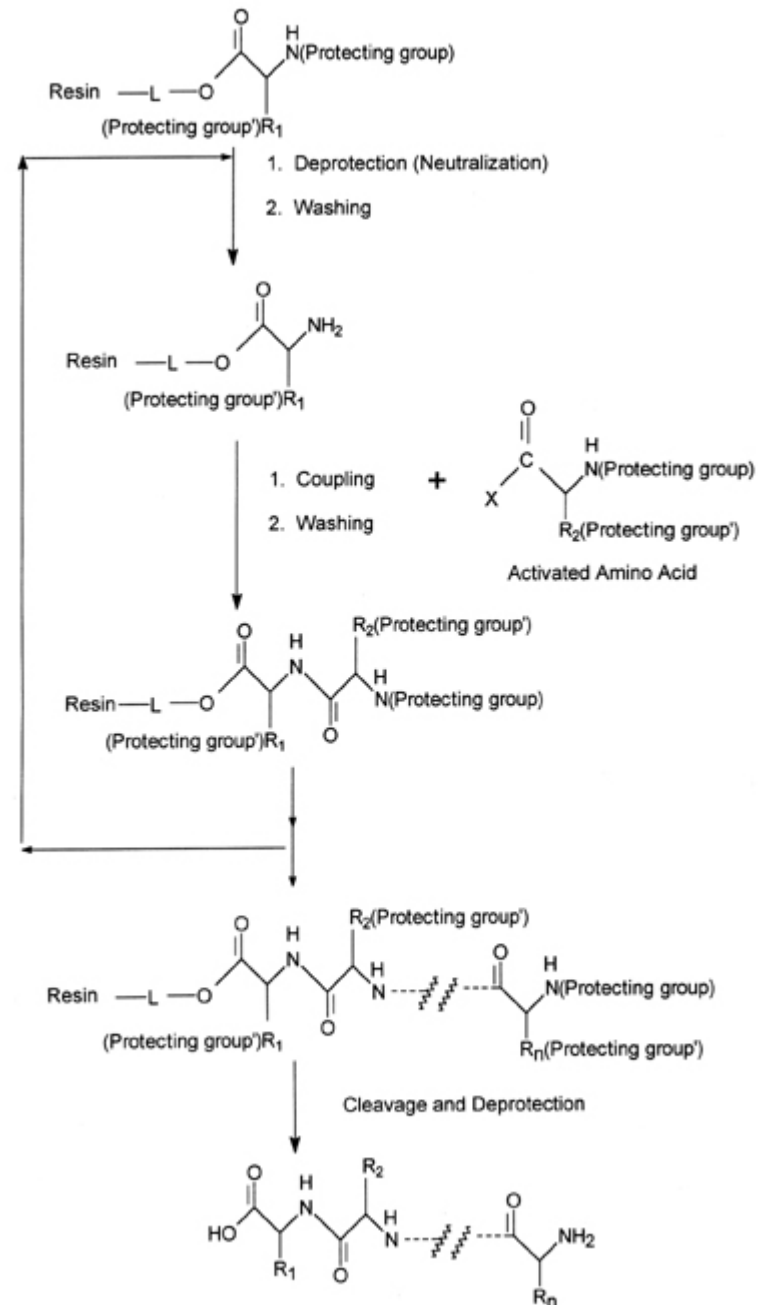


# Sintesi peptidica in fase solida (SPS)

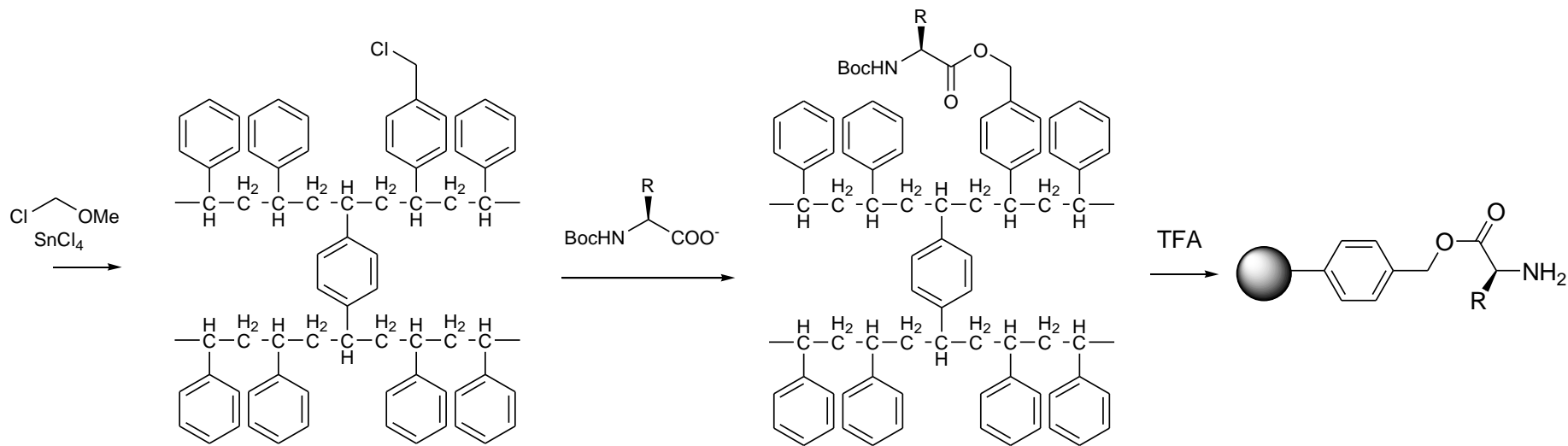
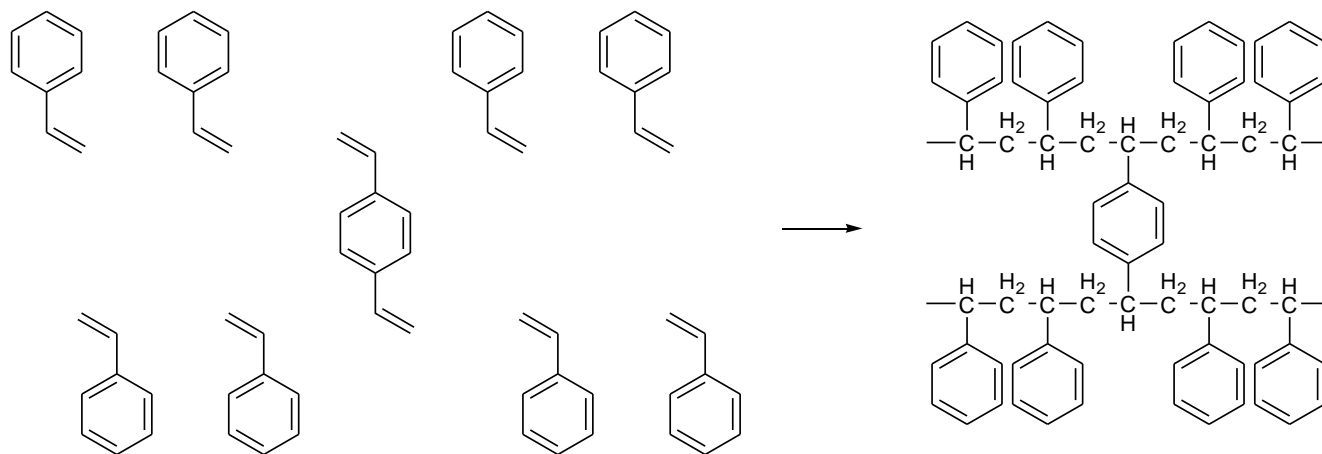
E' stata introdotta negli anni 70 da R. B. Merrifield (premio Nobel nel 1984). Avviene all'interfaccia di un supporto polimerico insolubile rigonfiato con il solvente. Su di esso viene ancorato l'amminacido C-terminale. Le reazioni utilizzate per la sintesi peptidica sono le stesse di quelle utilizzate in soluzione. Il grosso vantaggio è che la purificazione viene effettuata semplicemente per filtrazione e lavaggi della resina. Inoltre è stata automatizzata.



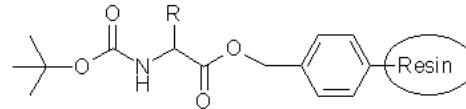
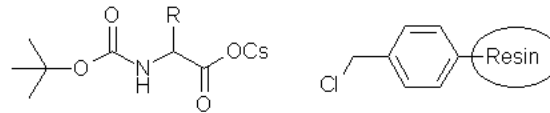
## General Protocol for Solid Phase Peptide Synthesis



# SPS resina di Merrefield



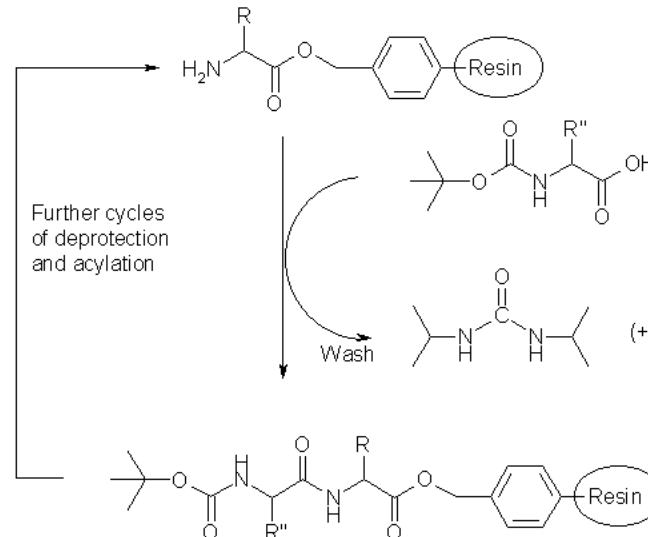
# SPS resina di Merrefield



Gruppo protettore temporaneo: BOC  
Gruppo protettore permanente: Z

1.  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$
  2.  $\text{NR}'_3$
- 
1.  $\text{CO}_2 + (\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}_2$
  2.  $\text{CF}_3\text{CO}_2^- \cdot \text{R}'_3\text{NH}^+$

Deprotection

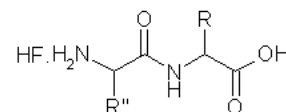


Further cycles  
of deprotection  
and acylation

Wash

Acylation

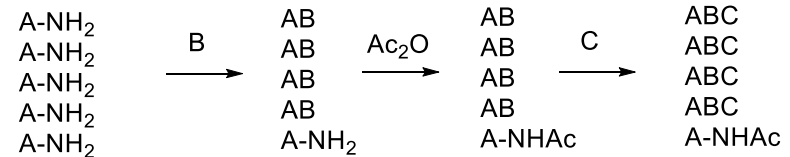
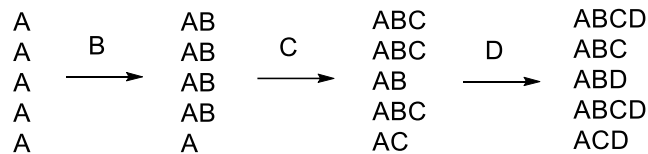
(+ Excess reagents)



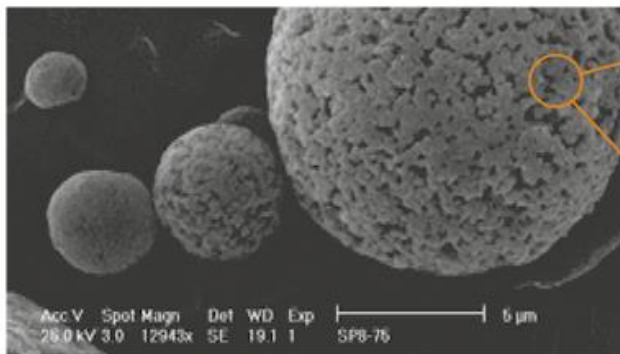
# SPS resina di Merrefield

## Problemi della sintesi in fase solida:

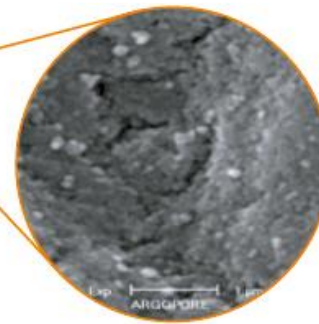
- 1) La resa deve essere prossima al 100% in ogni passaggio. Infatti la purificazione del peptide si effettua solo al termine della sintesi. Ad esempio se la resa di ogni step nella sintesi di un decapeptide è del 99 % la resa finale sarà del 90% (36% nel caso di un peptide da 100 residui). Il rimanente sono peptidi più corti difficili da separare. Per ovviare si usano eccessi di reagenti e si ripetono i passaggi più critici. Si può anche utilizzare un reagente di capping (anidride acetica) per bloccare i gruppi amminici liberi.



- 2) La resina presenta un limitato spazio interno e questo può rendere difficile la crescita del peptide.



Electron micrograph of MD-TMT resin particle



- Insoluble, cross-linked polystyrene
- Spherical 50–1000 μm diameter
- Formal pore structure
- Excellent diffusion and mass transport properties

# SPS resina di Merrifield

---

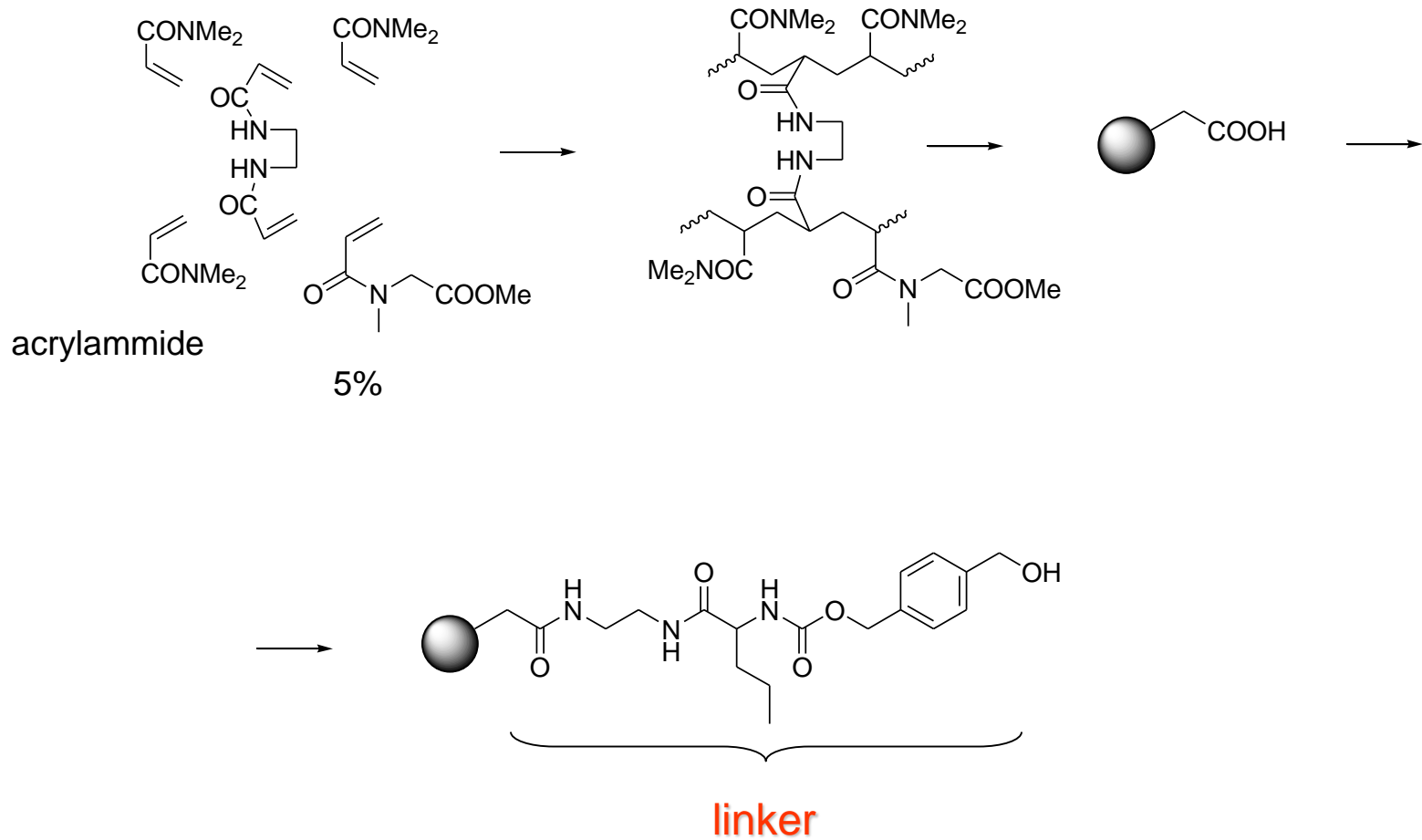
## Problemi della sintesi in fase solida:

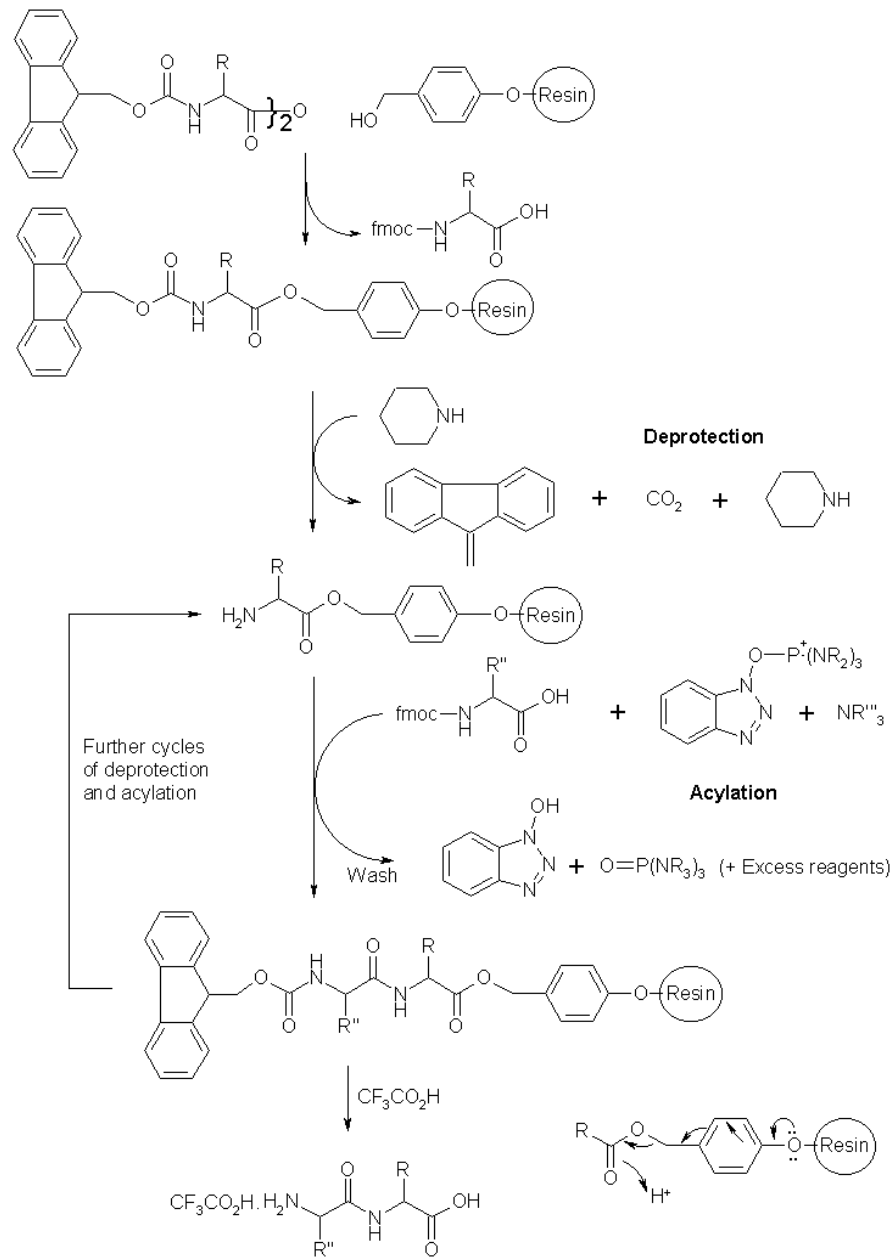
- 3) Quando il peptide cresce tende a strutturarsi e questo limita l'accessibilità del gruppo N-terminale. Questo è ancora più importante quando si usano solventi apolari come il  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  che si usa per la resina di Merrifield. Per ovviare a questo sono state introdotte altre resine come la resina di Sheppard a base di poliacrylamide con le quali si usa DMF.
- 4) I gruppi BOC/Z non sono perfettamente ortogonali. Oggi si utilizza di più FMOC/BOC.
- 5) Si possono sintetizzare quantità limitate di peptide.

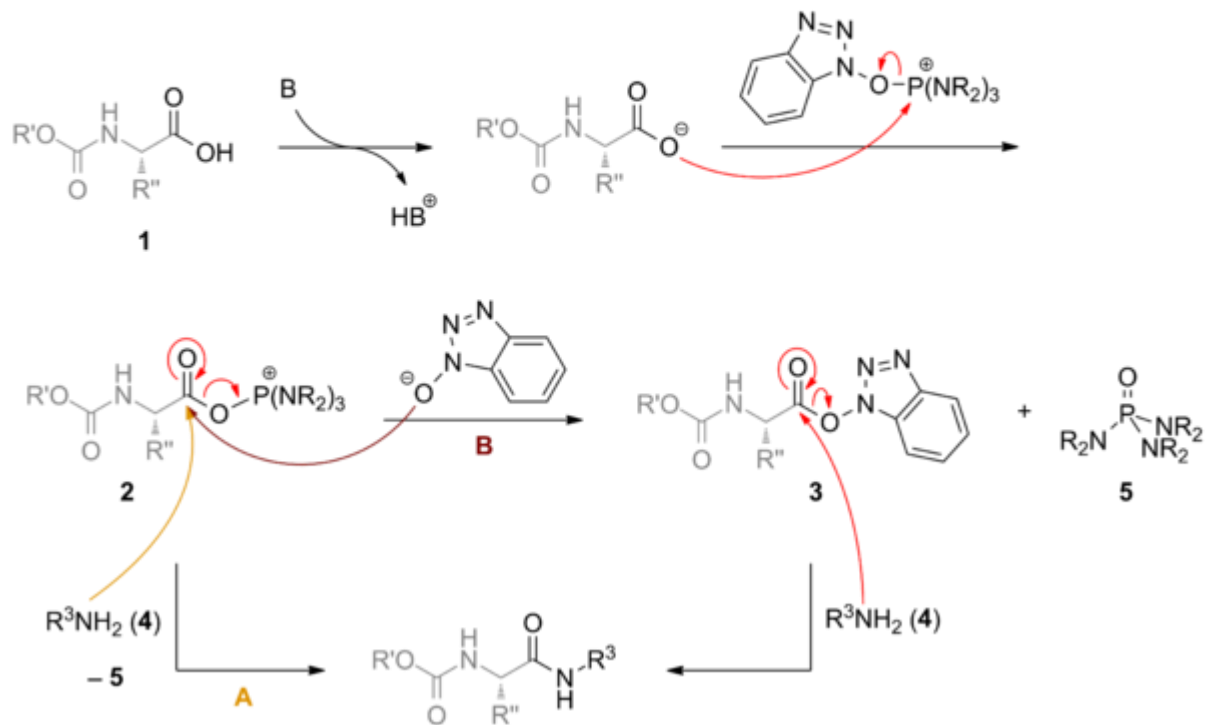
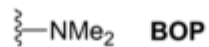
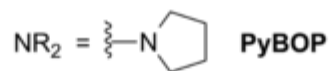
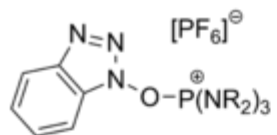
**Il vantaggio principale è la rapidità.** Si possono ottenere peptidi di 40 AA in un giorno! Inoltre si presta ad un approccio combinatoriale.



# Resina ammidica (Sheppard)







# Proteine

---

Le proteine sono biopolimeri con caratteristiche poliammidiche dove l'unità monomerica è l' $\alpha$ -amminoacido della serie L.

Possono essere classificate in vari modi:

**Proteine fibrose:** insolubili in acqua e in soluzione diluita di sali; sono solide. Sono costituite da catene polipeptidiche disposte linearmente una a fianco dell'altra a formare fibre. Sono utilizzate in natura come materiali strutturali. Esempio è il collagene.

**Proteine globulari:** solubili in acqua e in soluzioni diluite di sali; sono formate da catene polipeptidiche, avvolte in forme compatte; sono approssimativamente sferiche. Appartengono a questa classe la maggior parte degli enzimi.

**Proteine semplici:** per idrolisi danno solo  $\alpha$ -amminoacidi.

**Proteine coniugate:** il polipeptide è coordinato con una parte non amminoacidica (gruppo prostetico); sono esempi le lipoproteine, le glicoproteine, le metalloproteine etc.

La loro struttura viene identificata in 4 livelli:

**Struttura primaria:** la sequenza amminoacidica.

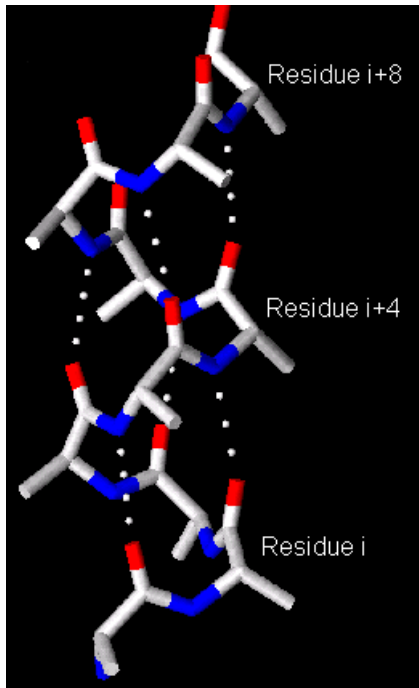
**Struttura secondaria:** identifica la struttura tridimensionale di segmenti della catena peptidica

**Struttura terziaria:** indica la struttura tridimensionale di tutta la proteina.

**Struttura quaternaria:** definisce l'organizzazione di più proteine in un'unica struttura.

# Proteine: struttura secondaria

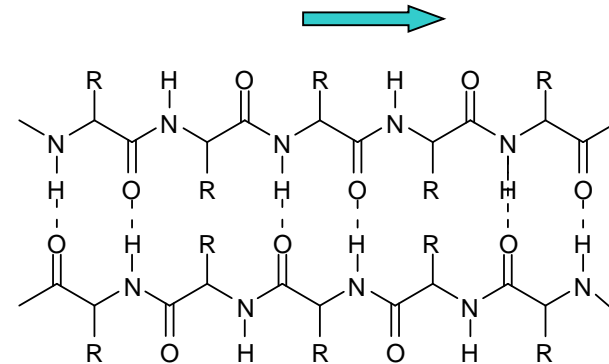
## $\alpha$ -elica



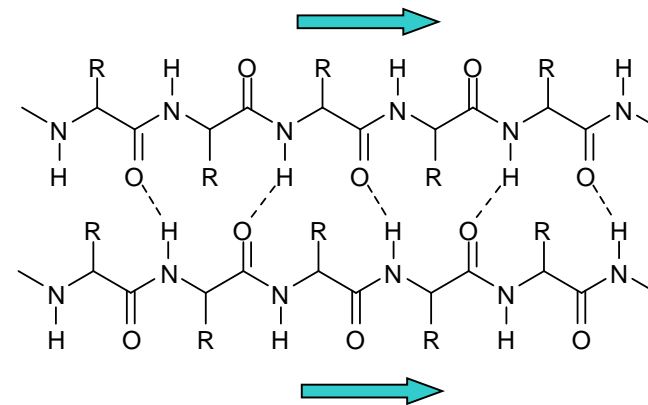
Passo 3,6 residui

## $\beta$ -foglietto

antiparallelo



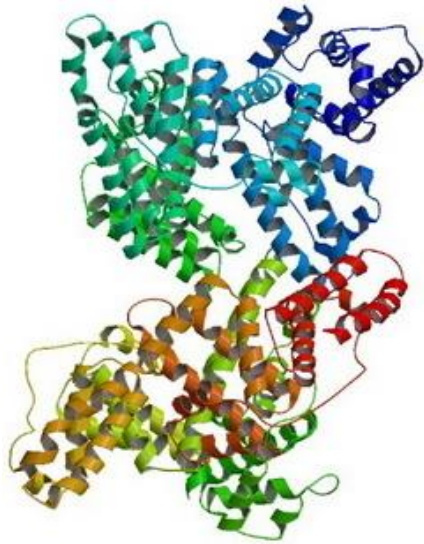
parallelo



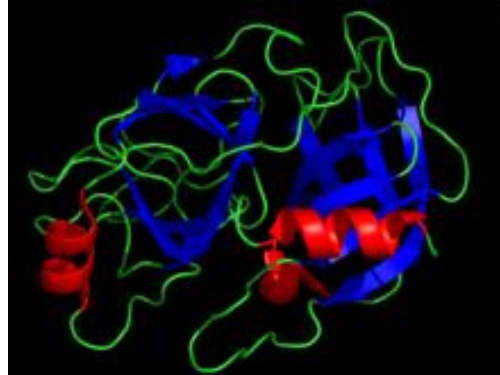
Nelle proteine la struttura secondaria è determinata dalle preferenze conformazionali degli AA costituenti e viene stabilizzata da interazioni non covalenti come i legami ad idrogeno o covalenti come i ponti disolfuro

# Proteine: struttura terziaria

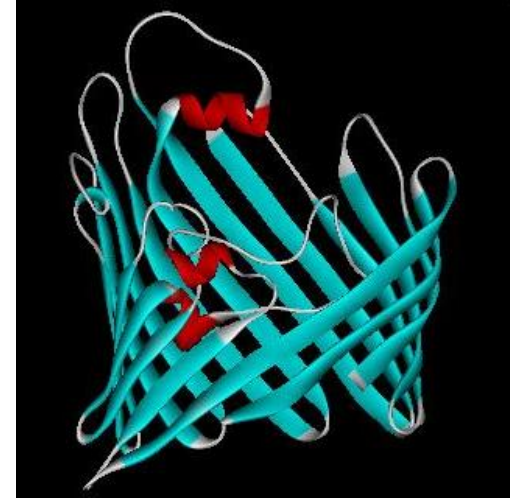
---



albumina



tripsina

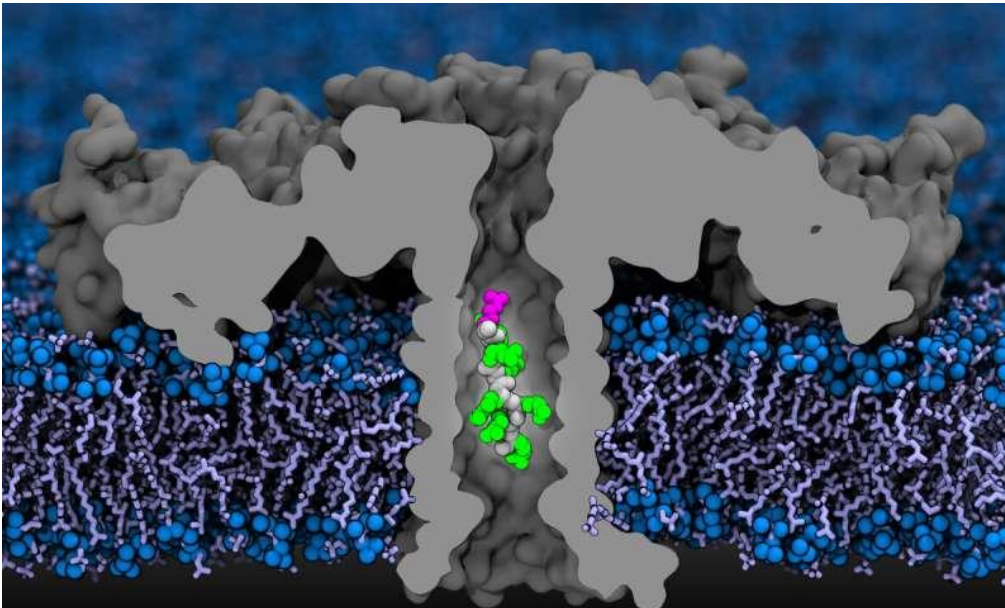
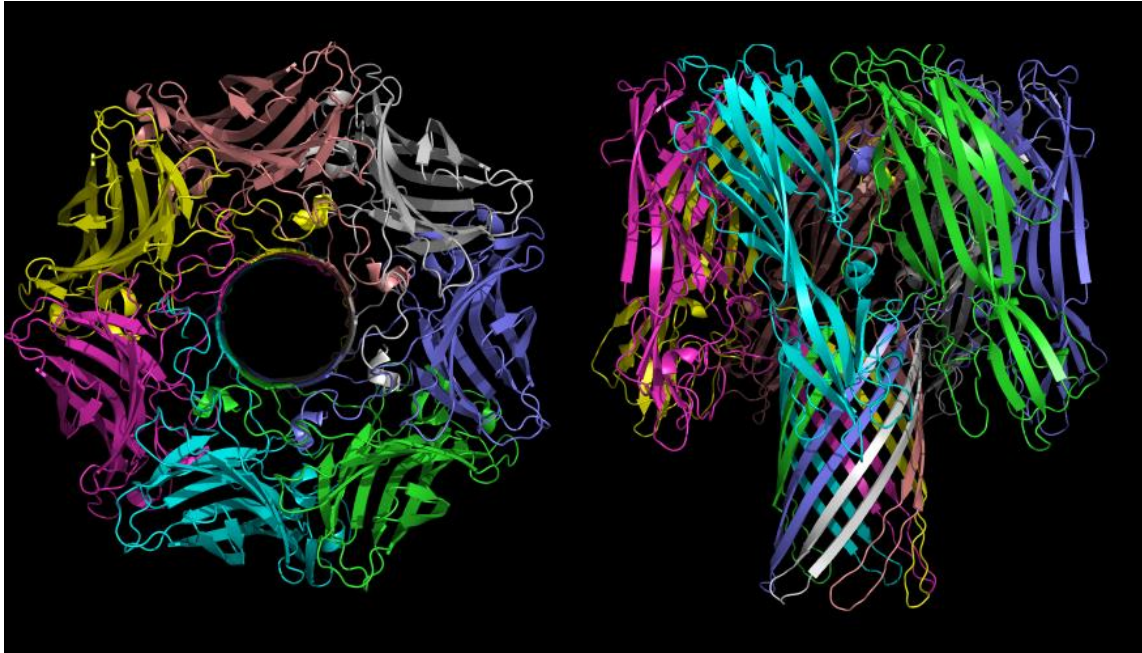


porina

La struttura terziaria della catena polipeptidica è determinata da interazioni di non legame (forze di v.d.W. e legami idrogeno) e di legame (ponte disolfuro tra due residui cisteinici), come pure da attrazioni di tipo coulombiano tra gruppi portanti carica di segno opposto (gruppo ammonico e anione carbossilato). Molto importanti sono le interazioni idrofobiche che tendono a concentrare sulla superficie i residui polari e all'interno della struttura globulare i residui idrofobici

Il processo di perdita della struttura terziaria va sotto il nome di denaturazione e può essere reversibile (solventi organici, forza ionica) o irreversibile (temperatura elevata, acidi forti).

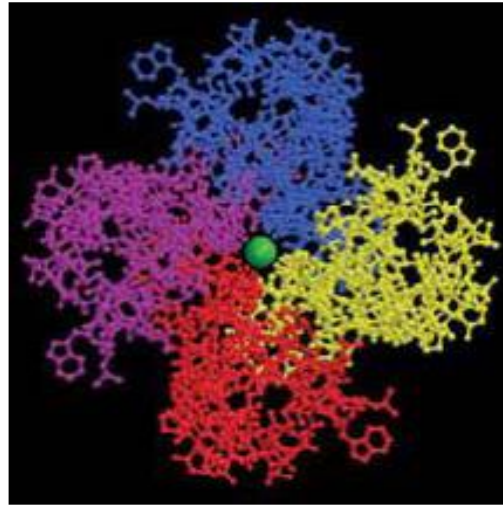
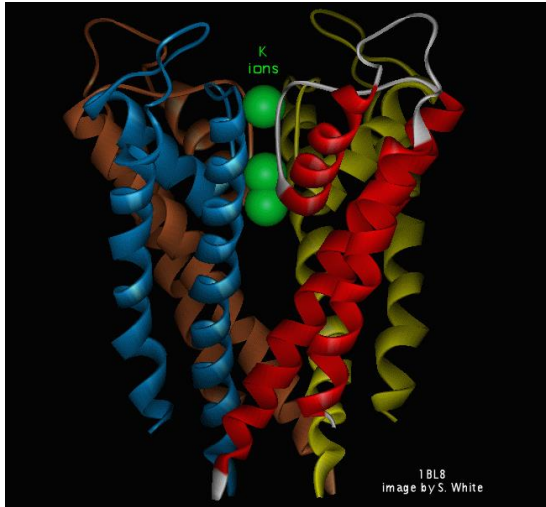
## Proteine: struttura quaternaria



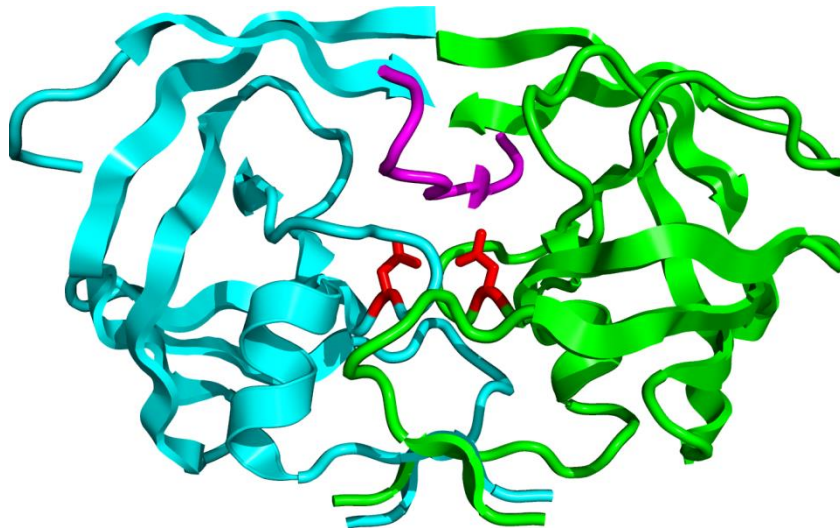
*Aeromonas hydrophila* is a bacterium that causes diarrheal diseases. These complications arise due to pore formation in sensitive cells by the protein toxin aerolysin. Aerolysin monomers associate to form a heptameric transmembrane pore. Each monomer in this aggregate contributes three  $\beta$ -strands to the  $\beta$ -barrel pore. Each of these  $\beta$ -strands (residues 277 to 287, 290 to 302, and 410 to 422) consists of alternating hydrophobic and polar residues, so that the pore once again places polar residues toward the water-filled channel and nonpolar residues facing the lipid bilayer.

# Proteine: struttura quaternaria

---



Canale del potassio

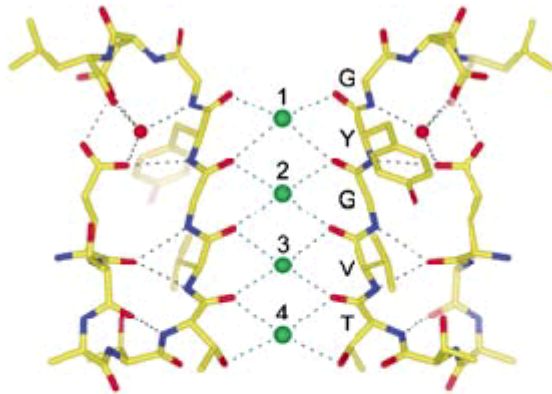


HIV-1 proteasi

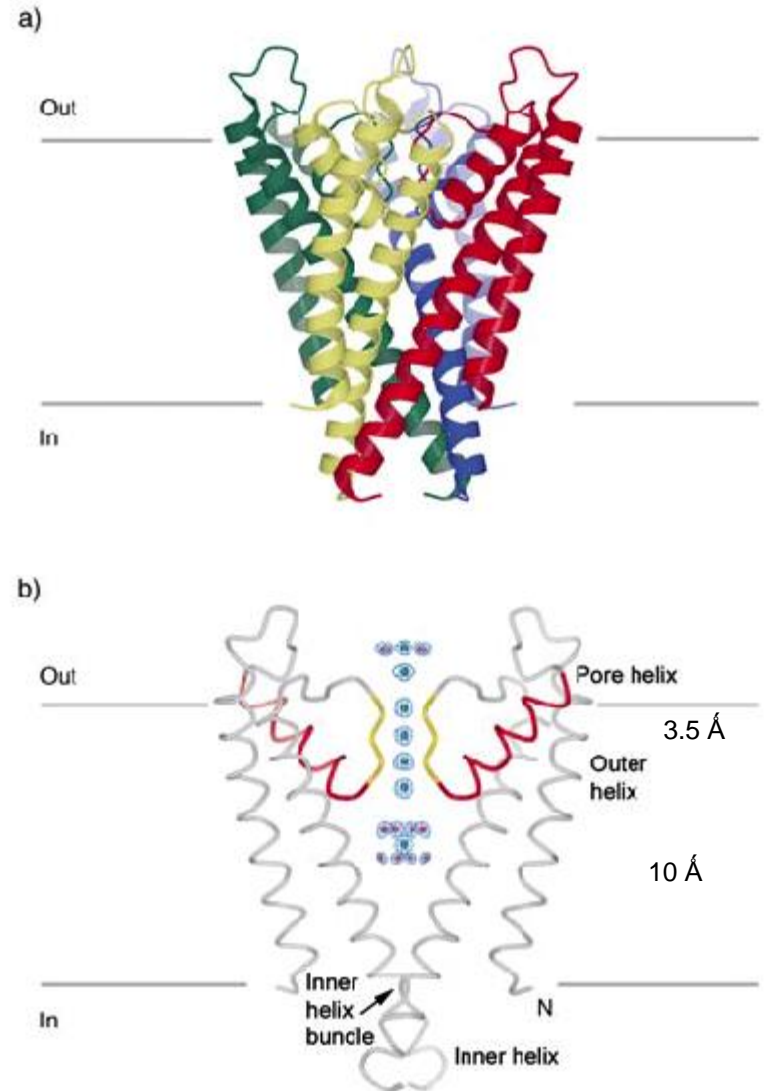


# KcsA K<sup>+</sup> Channel

Bacterial K<sup>+</sup> from *Streptomyces lividans*.



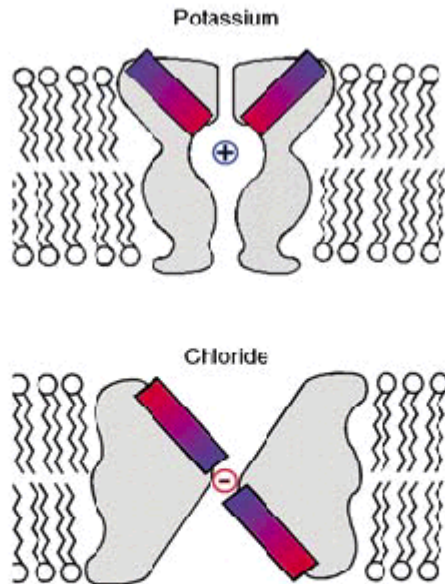
**Figure 6.** Detailed structure of the K<sup>+</sup>-selectivity filter (two subunits). Oxygen atoms (red) coordinate K<sup>+</sup> ions (green spheres) at positions 1 to 4 from the extracellular side. Single letter amino acid code identifies select amino acids of the signature sequence (yellow: carbon, blue: nitrogen, and red: oxygen). Green and gray dashed lines show O...K<sup>+</sup> and hydrogen-bonding interactions, respectively.



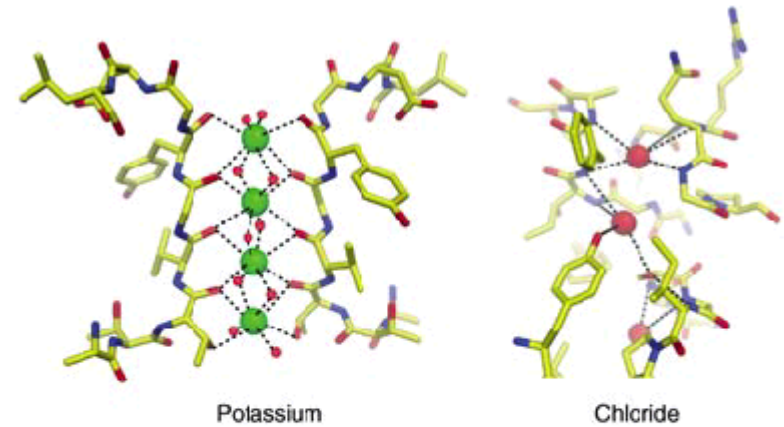
**Figure 5.** a) A ribbon representation of the KcsA K<sup>+</sup> channel with its four subunits colored differently. The channel is oriented with the extracellular solution on top. b) The KcsA K<sup>+</sup> channel with front and back subunits removed. The pore helices are shown in red and selectivity filter in yellow; the electron density along the ion pathway is shown in a blue mesh. The outer and inner helices correspond to S5 and S6 in Figure 2.

# ECIC Cl<sup>-</sup> Channel

Bacterial Cl<sup>-</sup> from *Escherichia coli*

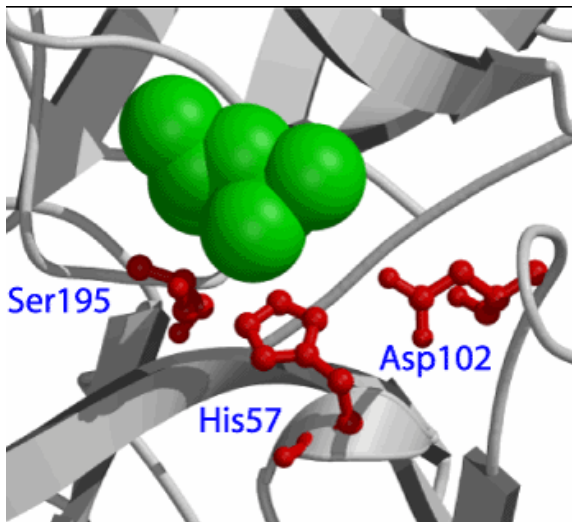
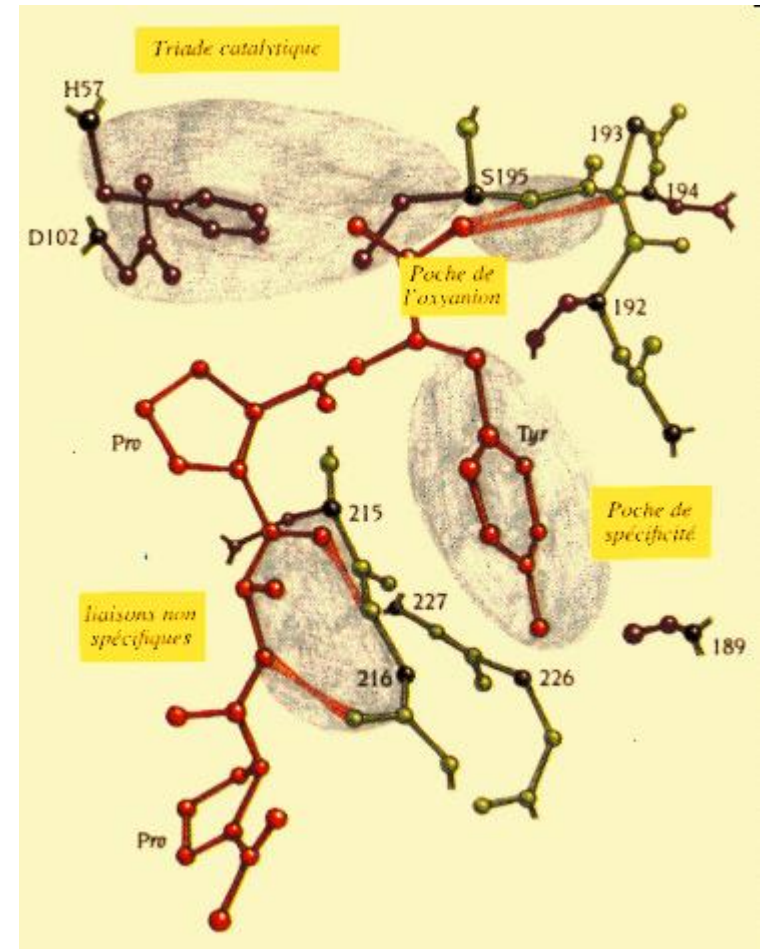
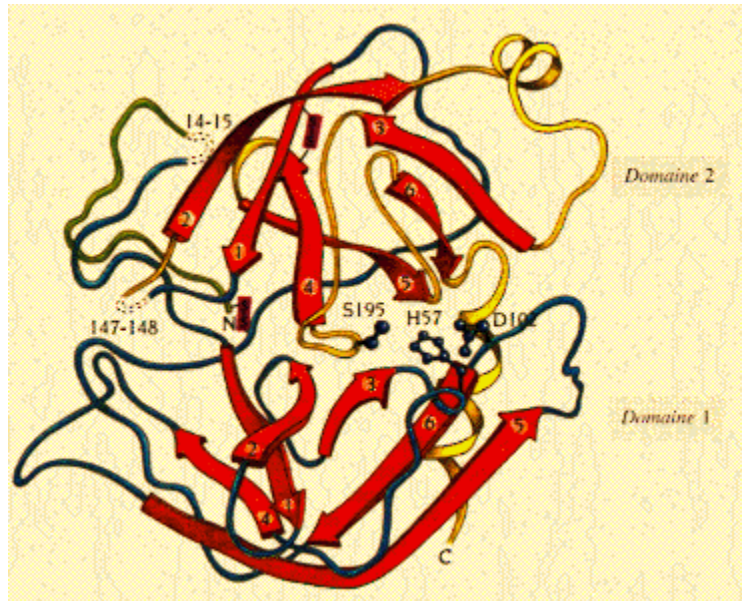


**Figure 11.** The overall architecture of K<sup>+</sup> channels and ClC Cl<sup>-</sup>-transport proteins is very different, but certain general features are similar. One similarity shown here is the direction of  $\alpha$ -helix end charges toward the ion pathway. The negative C-terminal end charge (red) points to the K<sup>+</sup> ion. The positive N-terminal end charge (blue) points to the Cl<sup>-</sup> ion.



**Figure 12.** K<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-selectivity filters make use of main-chain atoms to coordinate ions: carbonyl oxygen atoms for K<sup>+</sup> ions (green) and amide nitrogen atoms for Cl<sup>-</sup> ions (red). Both filters contain multiple close-spaced ion-binding sites. The Cl<sup>-</sup>-selectivity filter is that of a mutant ClC in which a glutamate amino acid was changed to glutamine.[64]

# Enzimi: chimotripsina



La chimotripsina è un enzima proteolitico che idrolizza il legame ammidico preferenzialmente in corrispondenza di amminoacidi aromatici (fenilalanina, triptofano e tirosina). Si forma da un precursore di 245 aa per idrolisi del legame 14-15 e 147-148. Le tre catene peptidiche sono tenute insieme da ponti disolfuro.

# Enzimi: chimotripsina

