

Modulo 5b

Gli enzimi – strategie catalitiche

2023-24

MECCANISMI di CATALISI

► Gli enzimi utilizzano relativamente pochi diversi meccanismi di catalisi

- le interazioni E/S **abbassano l'energia di attivazione** e **stabilizzano $S^\ddagger$** (intermedio di reaz.)
- impiegano uno o più meccanismi di catalisi (**strategie catalitiche**):
- **Catalisi covalente**: il sito attivo contiene un gruppo reattivo (es. potente nucleofilo) che forma un **legame covalente transitorio** al substrato
- **Catalisi acido-base**: H^+ o OH^- partecipano alla reazione; sono forniti da H_2O attivata o da gruppi presenti su AA catalitici che svolgono il ruolo di **donatore o accettore di protoni**.
- **Catalisi per distorsione/prossimità/orientamento (effetti sterici)**:
 - > in reazioni **unimolecolari** **distorcono $S \rightarrow S^\ddagger$**
 - > in reazioni **bimolecolari** **avvicinando** i substrati ed **orientandoli correttamente** per la reazione
- **Catalisi da metalli (cofattori): effetti elettrofilici** di diverso tipo
 - > facilitando la formazione di un nucleofilo
 - > ridistribuendo la densità di carica
 - > fungendo da ponte tra substrato e enzima
 - > promuovendo **reazioni redox**

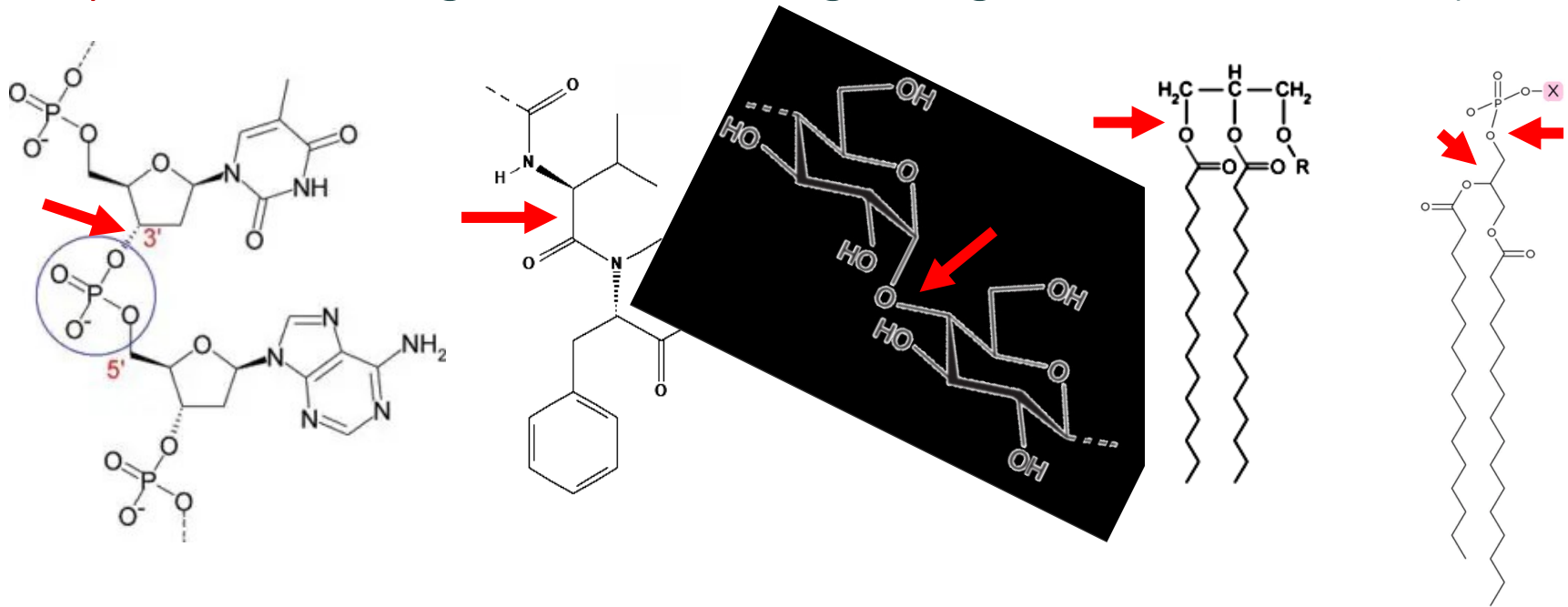


NB ossidazione = perdita di e^-
riduzione = guadagno di e^-

MECCANISMI di CATALISI: le idrolasi

► Le idrolasi catalizzano reazioni della Classe 3

- le **DNAsi** ed **RNAsi** idrolizzano il **legame fosfodiester** (EC 3.1)
- le **peptidasi** (proteasi) idrolizzano il **legame peptidico** (EC 3.4)
- le **glicosilasi** idrolizzano i **legami O-glicosidici** (in polisaccaridi o glicoproteine) (EC 3.2)
- le **lipasi** idrolizzano il **legami estere** fra **acidi grassi** e **glicerolo o fosfato** (EC 3.1)



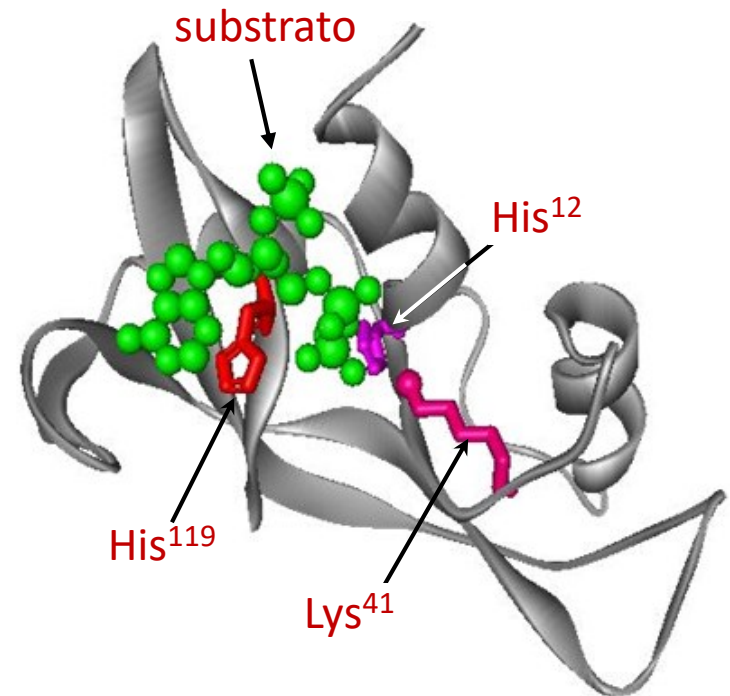
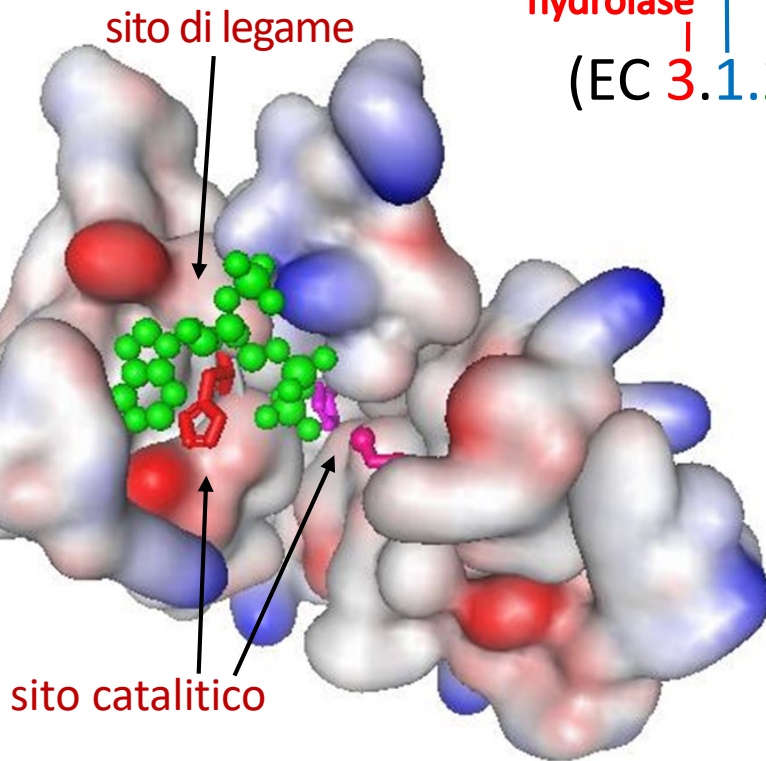
- Per le idrolasi che tagliano legami in macromolecole, sono **endo-** se **tagliano all'interno** della catena, ed **exo-** se **rimuovono residui dai terminali**

Strategie catalitiche: Ribonucleasi A

► La *Ribonucleasi A* (RNAsi) è una nucleasi (fosfodiesterasi)

- taglia il legame fosfodiesterico lasciando il fosfato sul 3' del ribosio
- enzima pancreatico digestivo (utilizzato da Anfinsen per studi di folding)

acting on ester bonds
hydrolase (EC 3.1.27.5) | endoribonucleases producing 3'-phosphomonoesters

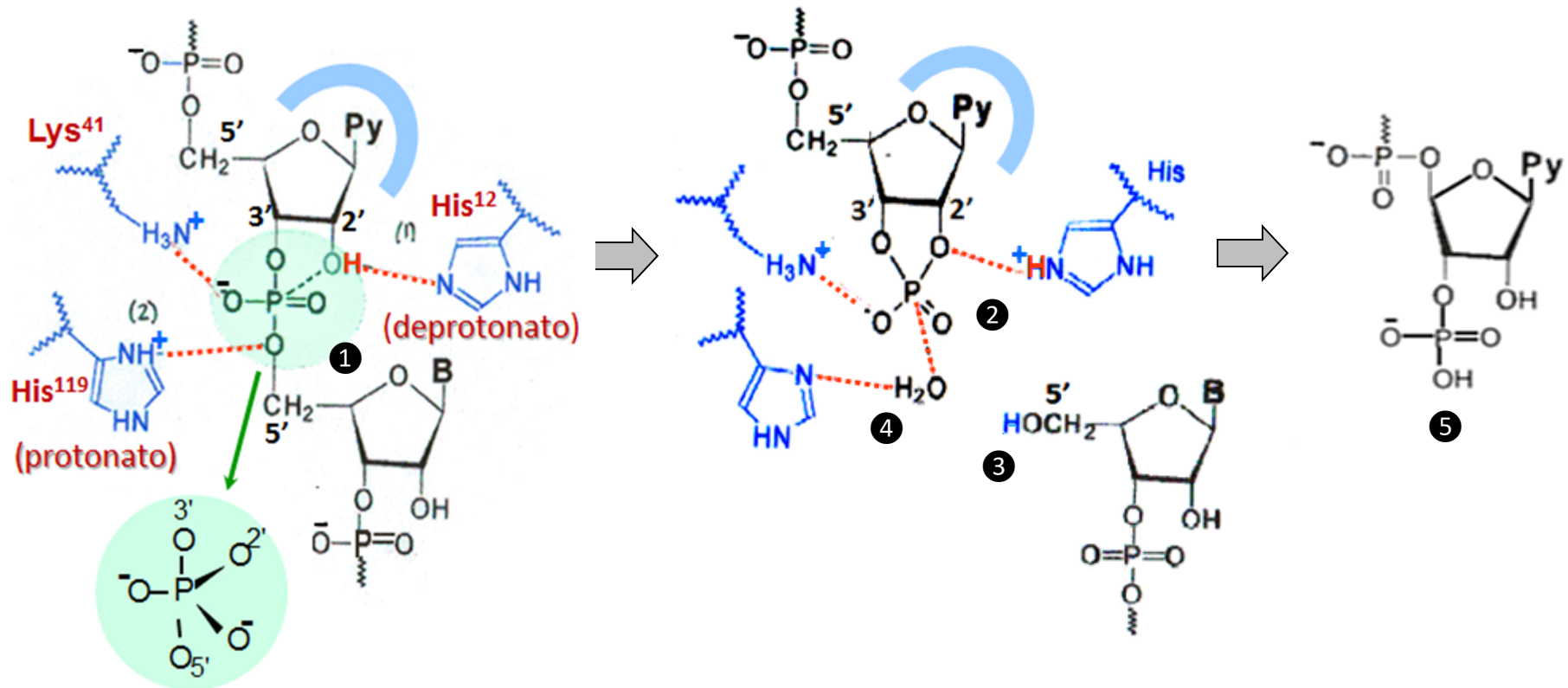


- **selettività:** taglia al 3' di basi pirimidiniche e NON idrolizza DNA
- agisce come *endo*- o *eso*-nucleasi

Meccanismo d'azione della Ribonucleasi A

► Il meccanismo coinvolge diversi passaggi prima della idrolisi

- 1) formazione di un fosfato pentavalente, 2) formazione di un fosfato ciclico (trasferimento 5'→2')
- 3) scissione del legame, 4) inserimento di -OH dalla molecola di H₂O, 5) il fosfato rimane sul C3'

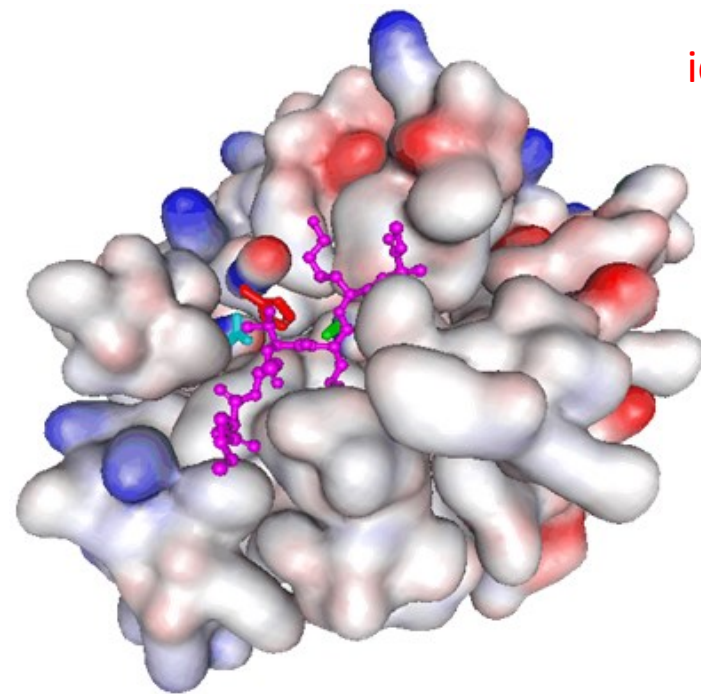


- l'assegnazione del numero EC è stata assai controversa, prima assegnando EC 2.7.7.16 (trasferasi), poi EC 3.1.27.5 (idrolasi), e per ultimo EC 4.6.1.18 (liasi) poiché la idrolisi viene dopo la rottura del legame (la rottura stessa è diversa dall'idrolisi)

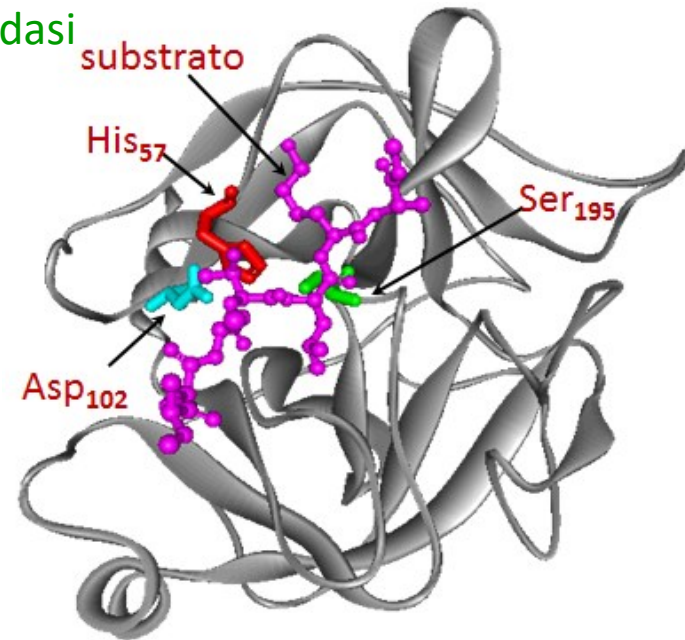
Strategie catalitiche: Serina proteasi

► La *Chimotripsina* è una proteasi digestiva prodotta dal pancreas

- è una *serina proteasi*, un'endopeptidasi che taglia selettivamente dopo **residui aromatici**
- il sito catalitico è formato da tre residui, Ser, His e Asp noti come **triade catalitica**

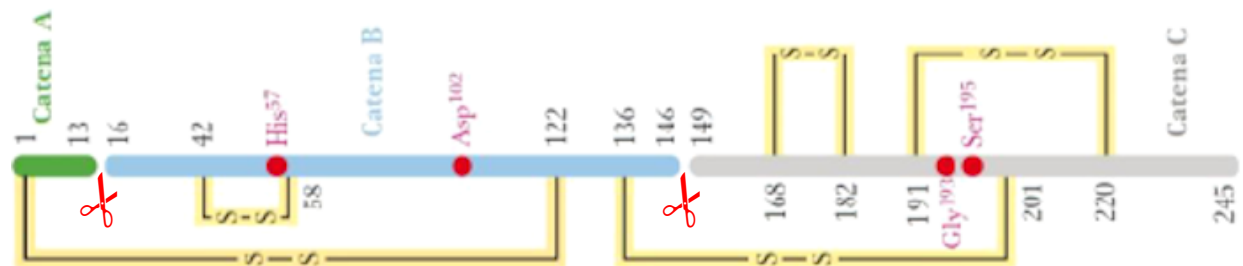


idrolasi | peptidasi
| |
| | serina endopeptidasi
(EC: 3.4.21.1)



► Viene espressa come «*zimogeno*» inattivo, ed attivata per taglio proteolitico

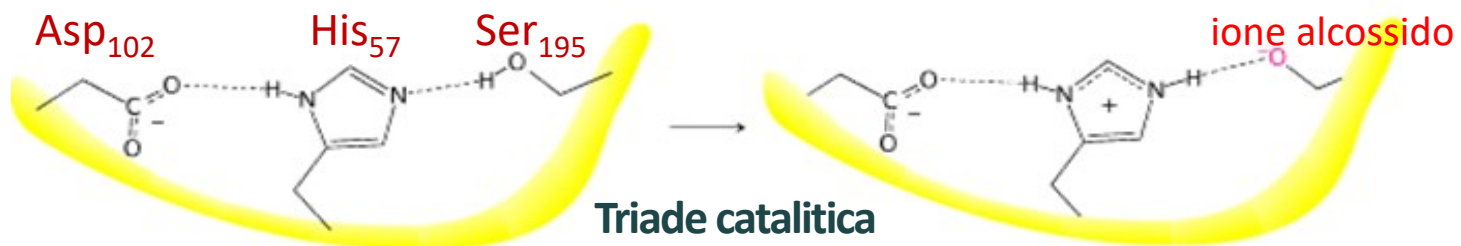
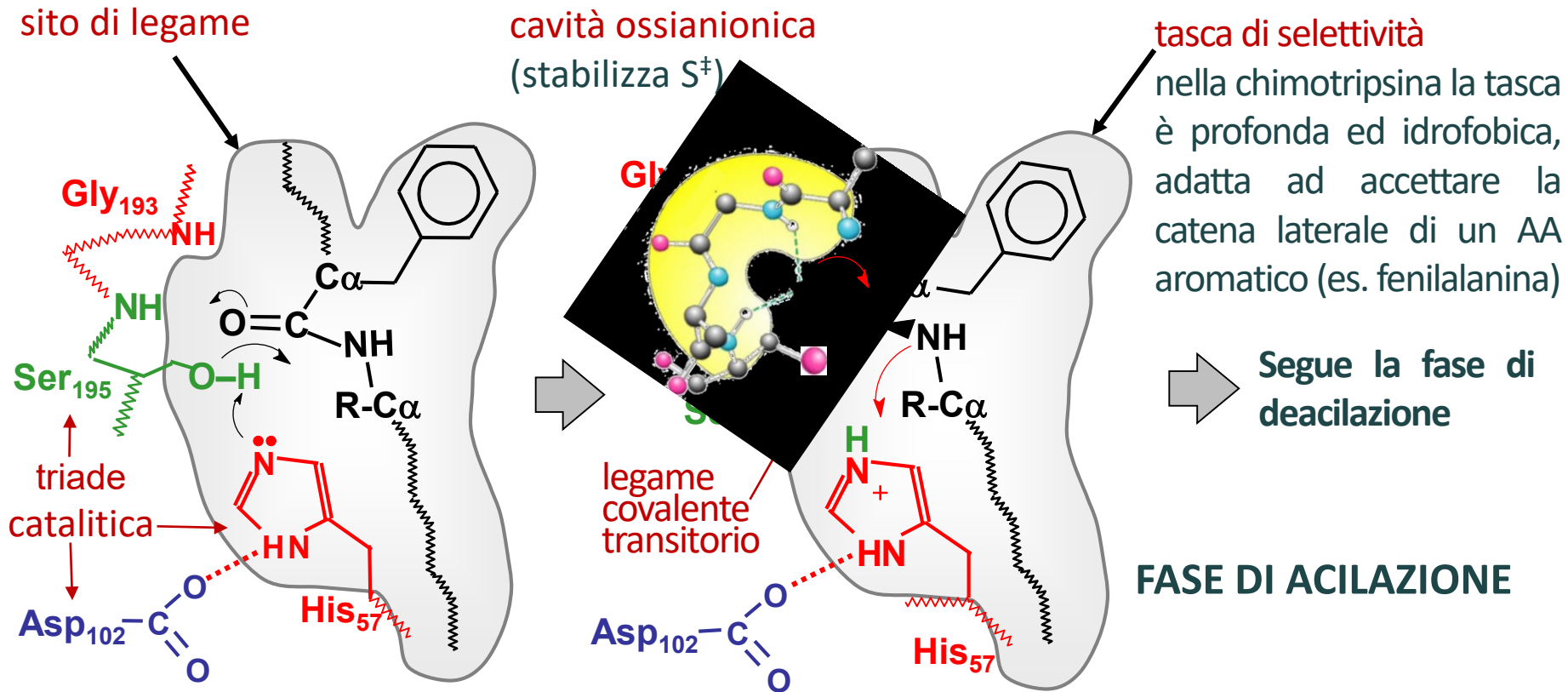
- attivazione covalente permanente



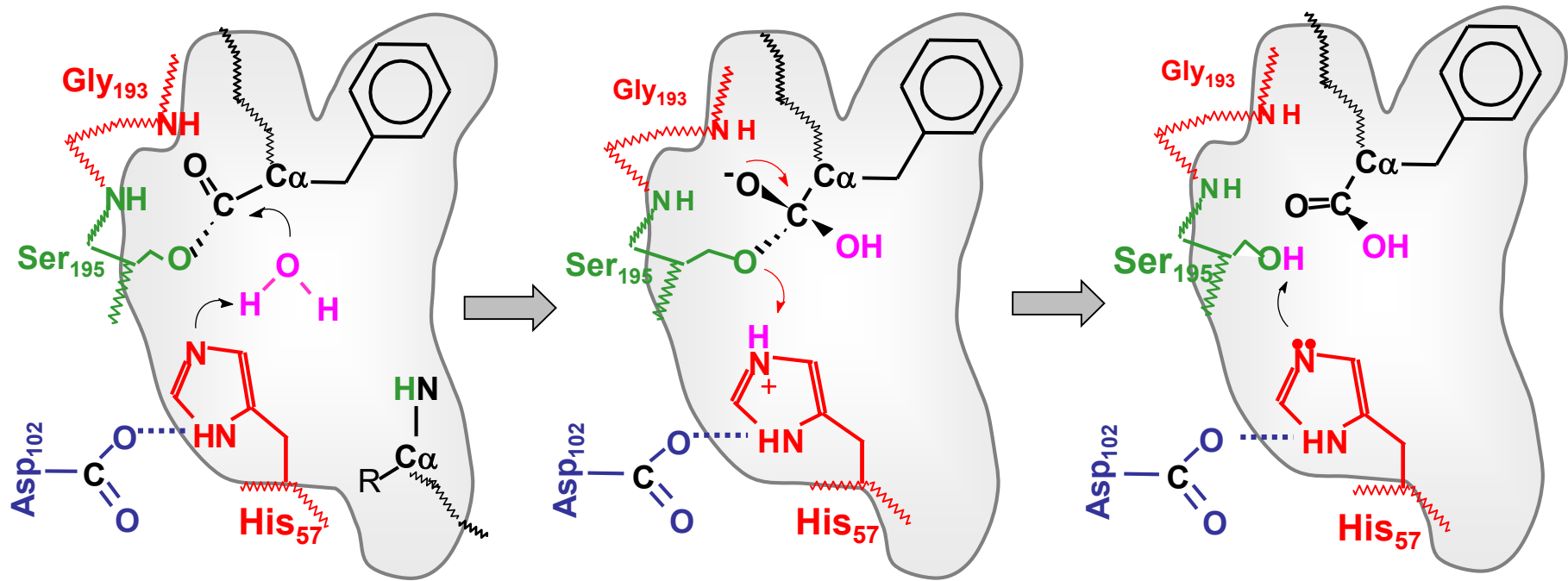
Meccanismo d'azione della chimotripsina

► Nelle serina proteasi la catalisi segue due fasi – acilazione e deacilazione

- nella **fase di acilazione** si forma un legame covalente transitorio

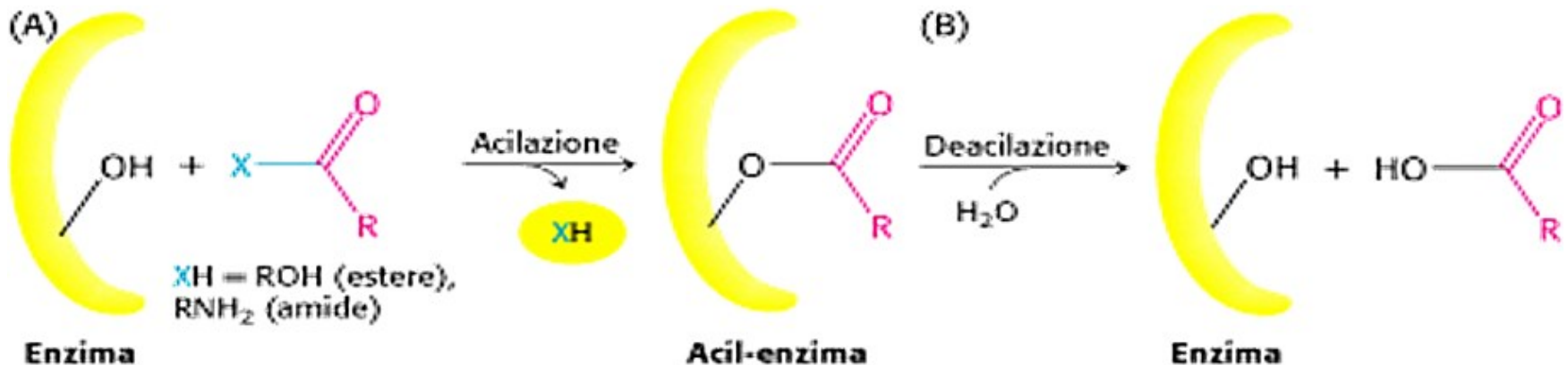


Meccanismo d'azione della chimotripsina (cont.)



FASE DI DEACILAZIONE

► Il meccanismo opera in diverse idrolasi che scindono legami ammidici ed estere



SELETTIVITÀ delle serina proteasi

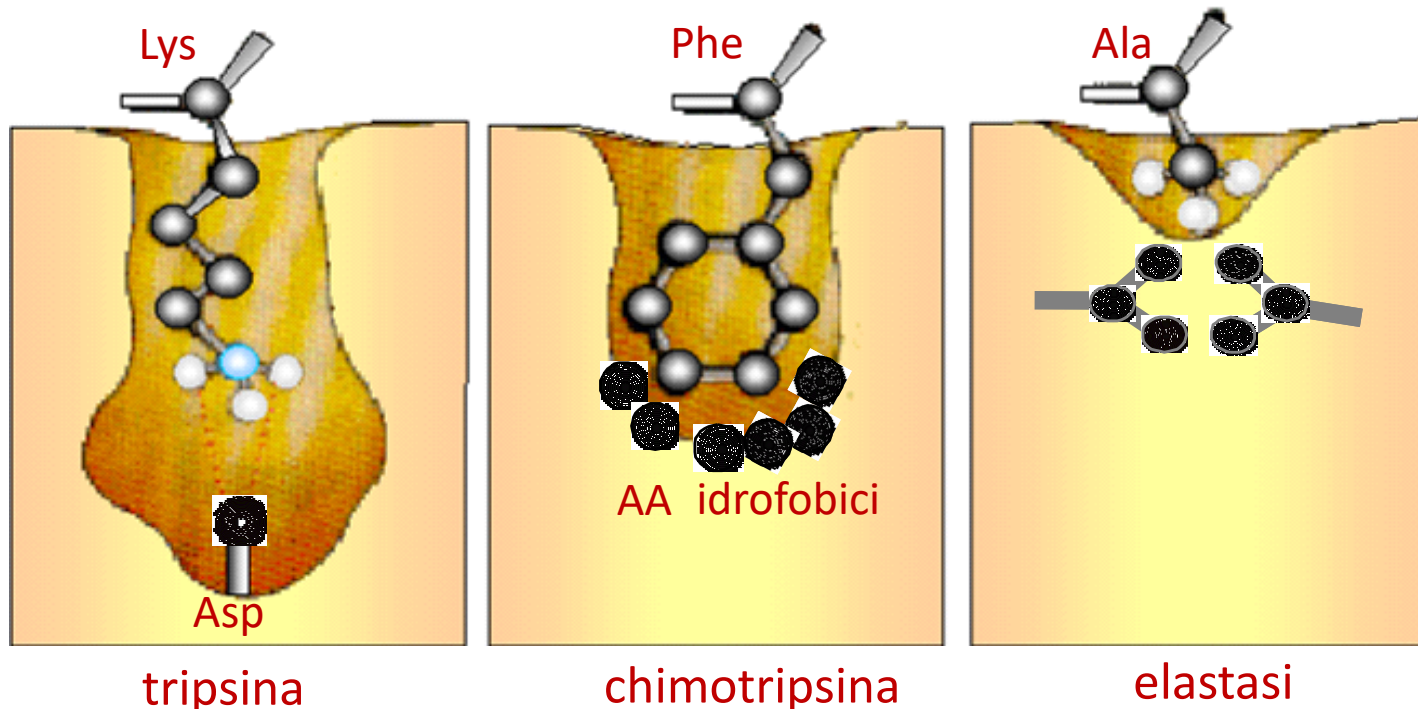
- ▶ Le serina proteasi tagliano il legame peptidico dopo specifici residui

Tripsina: —**Lys**— | —Xaa— — **Arg**— | —Xaa

Chimotripsina: —**Phe**— | —Xaa— (anche Trp, Tyr > Leu, Met)

Elastasi: —**Ala**— | —Xaa— (anche Val > Ile, Leu, Ser)

- questa specificità deriva dalle caratteristiche delle tasche per il riconoscimento specifico del substrato



EVOLUZIONE delle serina proteasi

► Le serina proteasi sono emerse per evoluzione divergente e convergente

- Chimotripsina, tripsina ed elastasi sono **omologhe**, espresse da geni **paraloghi**, emerse per duplicazione genica ed **evoluzione divergente**.
- La subtilisina è emersa per **evoluzione convergente**; la posizione della triade catalitica e sito di legame varia più nella struttura 1^a che 3^a

Chimotripsina

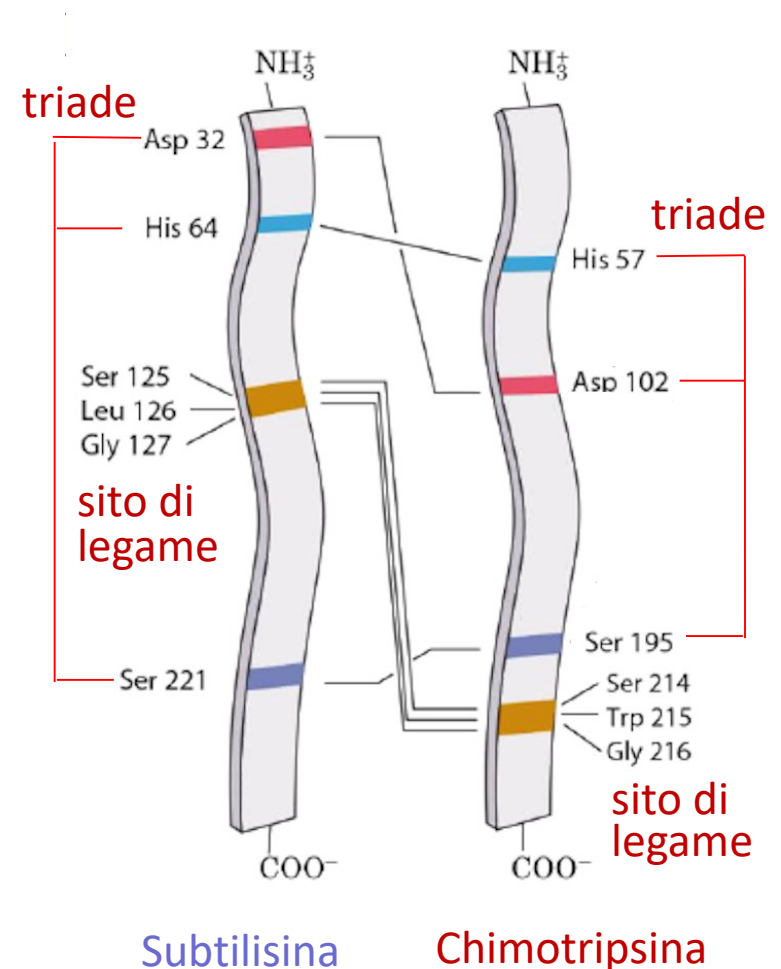
Elastasi

E. d.

Evoluzione
divergente



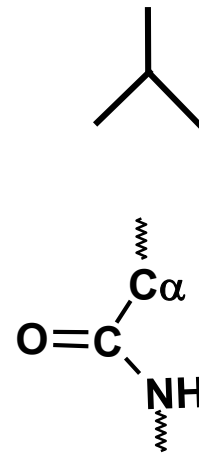
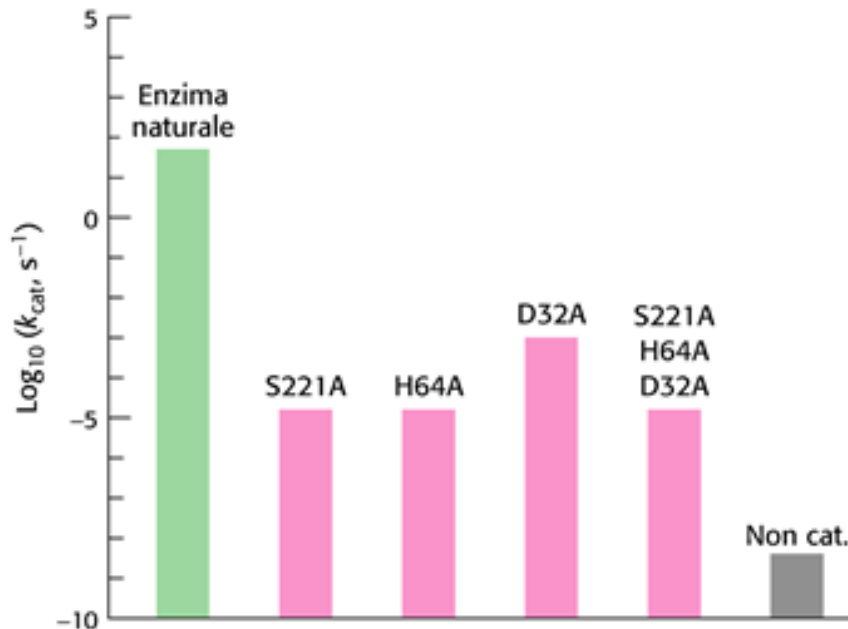
Tripsina



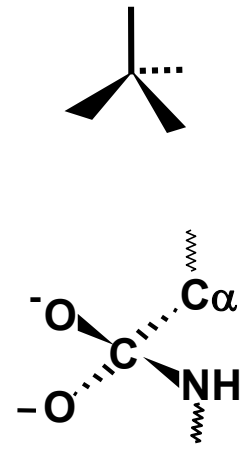
Metodi di studio delle serina proteasi

► La mutagenesi sito specifica conferma il ruolo della triade catalitica

- si possono mutare specifici residui nelle proteasi per determinare il loro ruolo nella catalisi
- Ser, His e Asp della triade catalitica nella subtilisina sono stati mutati singolarmente o tutti assieme a residui di Ala ($S \rightarrow A$, $H \rightarrow A$, $D \rightarrow A$)
- la mutazione di qualunque dei residui determina una netta diminuzione (10^6 volte) della capacità catalitica dell'enzima ($D < H = S$)
- ulteriori mutazioni non la diminuiscono ulteriormente, e rimane comunque un poco più elevata che in assenza di enzima (perché?)



legame
peptidico

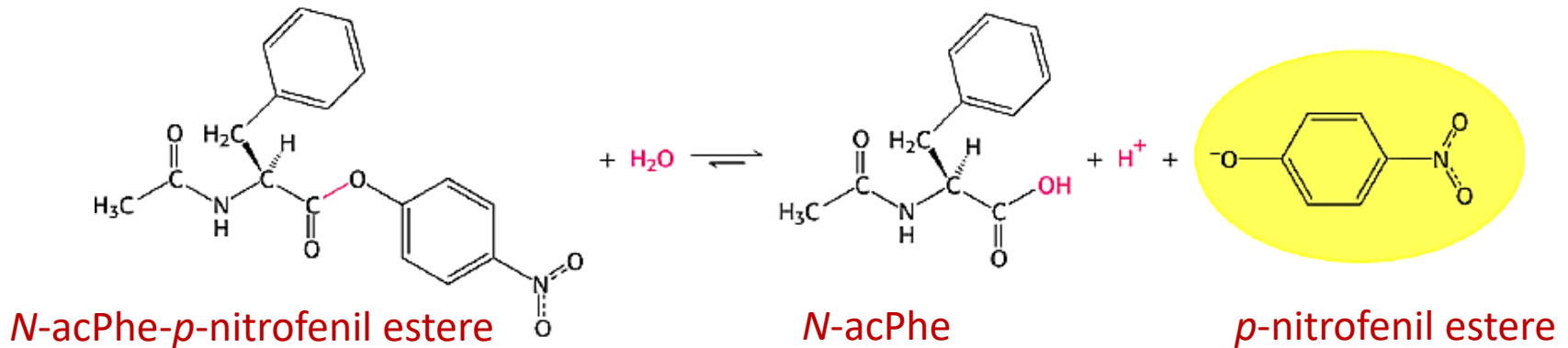


intermedio
di reazione

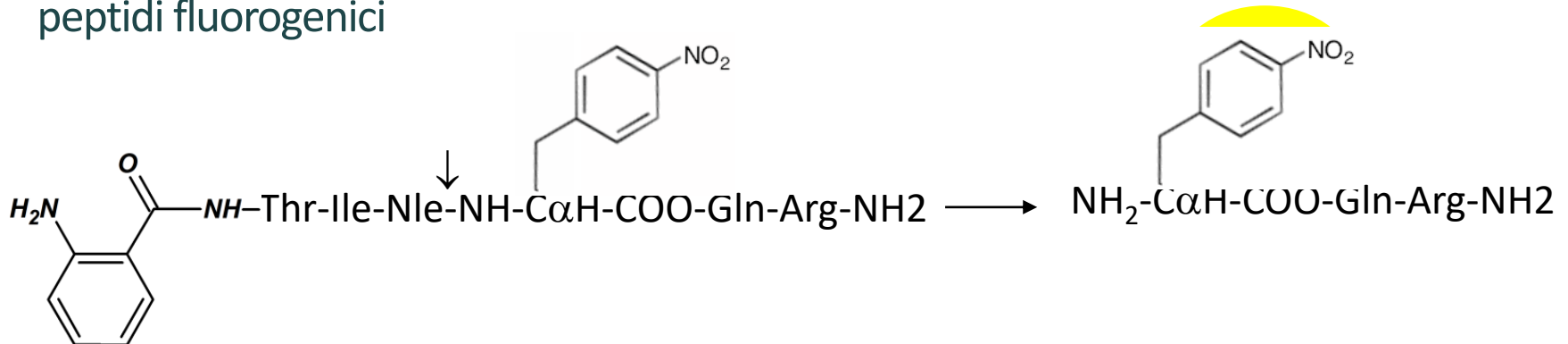
Metodi di studio delle serina proteasi

- ▶ La cinetica di catalisi può essere seguita con un substrati cromogenici o fluorogenici
- Molte proteasi idrolizzano anche gli esteri, e la cinetica può essere studiata usando un analogo cromogeno del substrato: es. *N*-acetil-fenilalanina *p*-nitrofenil estere

$$v \propto [p\text{-nitrofenil estere}] \propto A_{410} \quad (A = \epsilon cl)$$



- Alternativamente si può sfruttare l'effetto FRET (Förster resonance energy transfer) in peptidi fluorogenici



MECCANISMI SIMILI: Transpeptidasi batterica

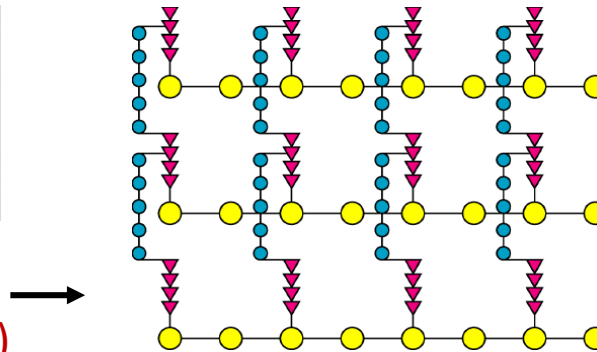
► Il peptidoglicano batterico richiede una *transpeptidasi* con Ser catalitico

- la *transpeptidasi* che forma il PG usa Ser in modo simile (acilazione/deacilazione)



membrana

peptidoglicano
(parete batterica)

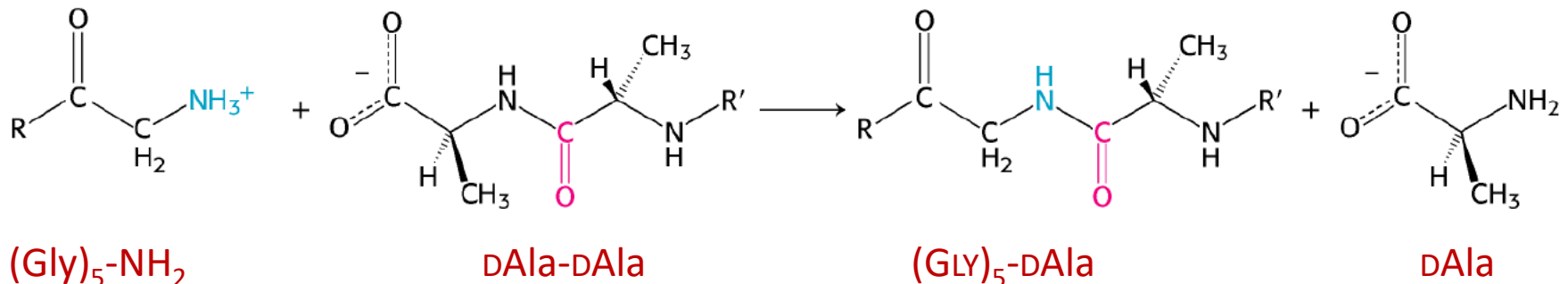


oligosaccaride

LAla-DGlu-LLys-DAla
tetrapeptide

ponte penta-Gly

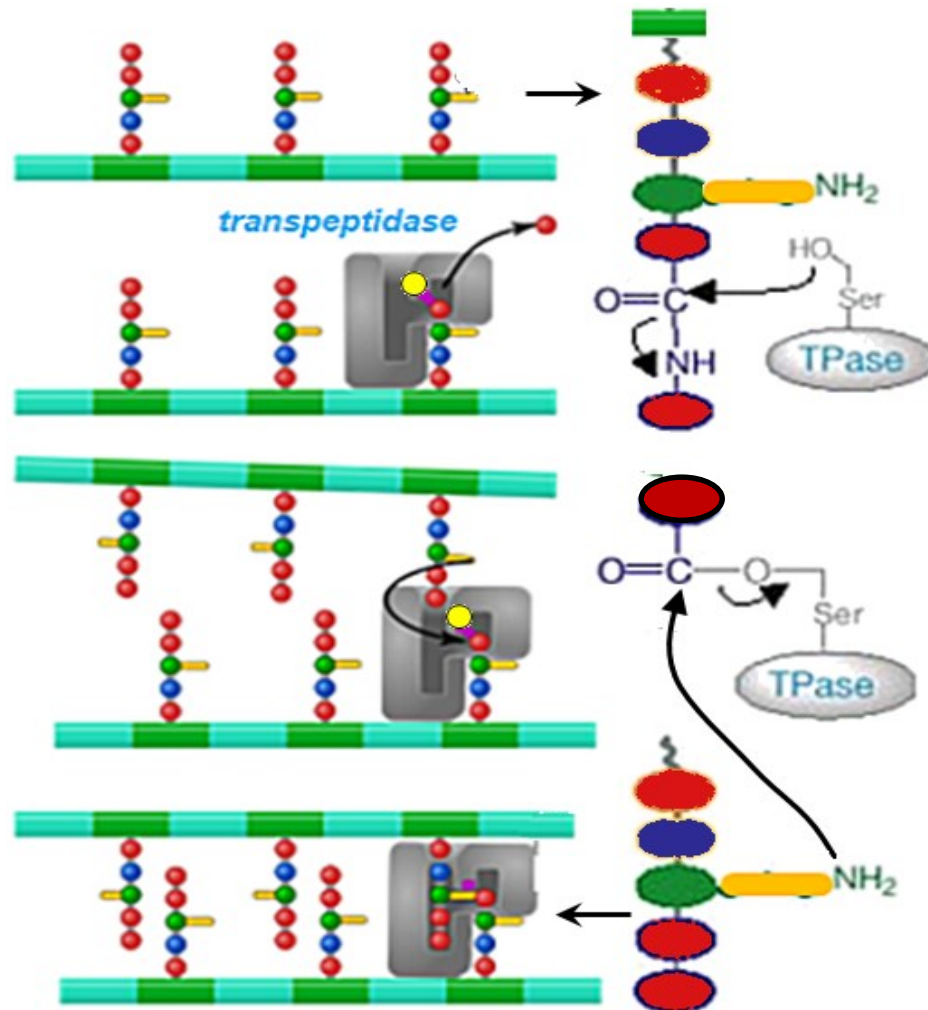
- il peptidoglicano è formato da oligosaccaridi legati covalentemente a tetrapeptidi, a loro volta connessi fra di loro da un pentapeptide (Gly)₅ che lega la catena laterale di LLys con il C-terminale di (Gly)₅ e il suo N-terminale con DAla in un altro tetrapeptide.
- il peptide inizialmente legato al oligosaccaride è LAla-DGlu-LLys-DAla-DAla, e l'enzima *glycopeptide transpeptidasi* trasferisce il gruppo -NH₂ terminale di (Gly)₅ per sostituire il legame fra DAla⁴ e DAla⁵



MECCANISMI SIMILI: Transpeptidasi batterica

► Meccanismo d'azione della *transpeptidasi*

- la *transpeptidasi* che forma il PG usa Ser in modo simile alle serina proteasi, con cicli di acilazione e deacilazione.

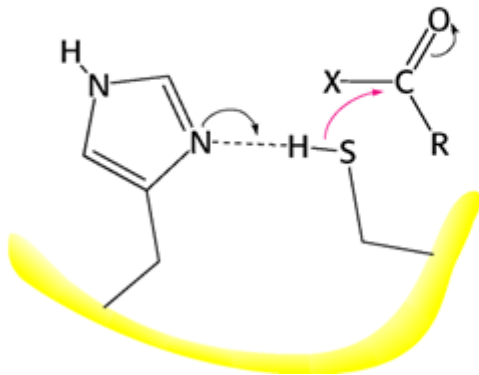


Questo meccanismo viene inibito dagli antibiotici β -lattamici (penicilline)

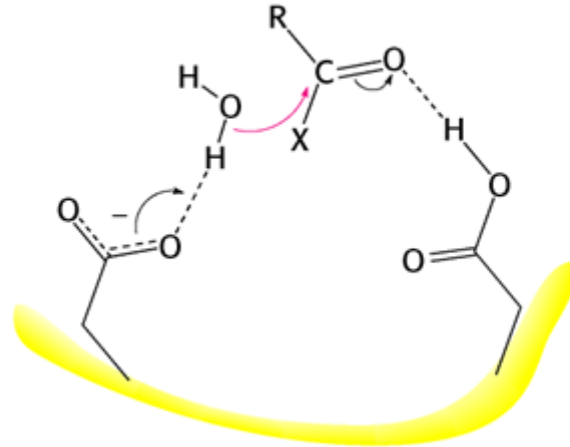
Meccanismi alternativi: Cys-, Asp- e metallo proteasi

- Altre proteasi utilizzano meccanismi alternativi ma con la stessa logica:
- generare un **forte nucleofilo** per attaccare il carbonile (C=O) del legame peptidico

(A) CISTEINA PROTEASI



(B) ASPARTIL PROTEASI



(C) METALLOPROTEASI



Cisteina proteasi: Cys svolge il ruolo di nucleofilo con meccanismo simile a quello di Ser nelle serin-proteasi, assistito da His. Forma un legame covalente con substrato con fase di acilazione e deacilazione. Es. *Papaina, Caspasi*.

Aspartil proteasi: due residui di Asp agiscono assieme per attivare una molecola di H₂O, deprotonandola. es. *Renina, Pepsina, Proteasi HIV*

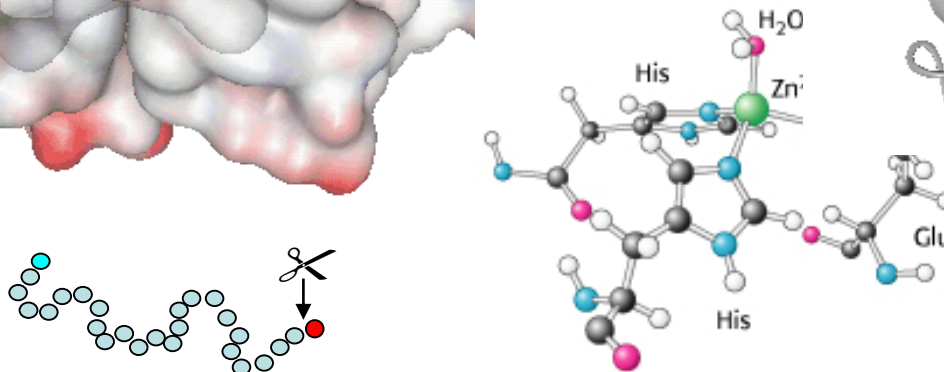
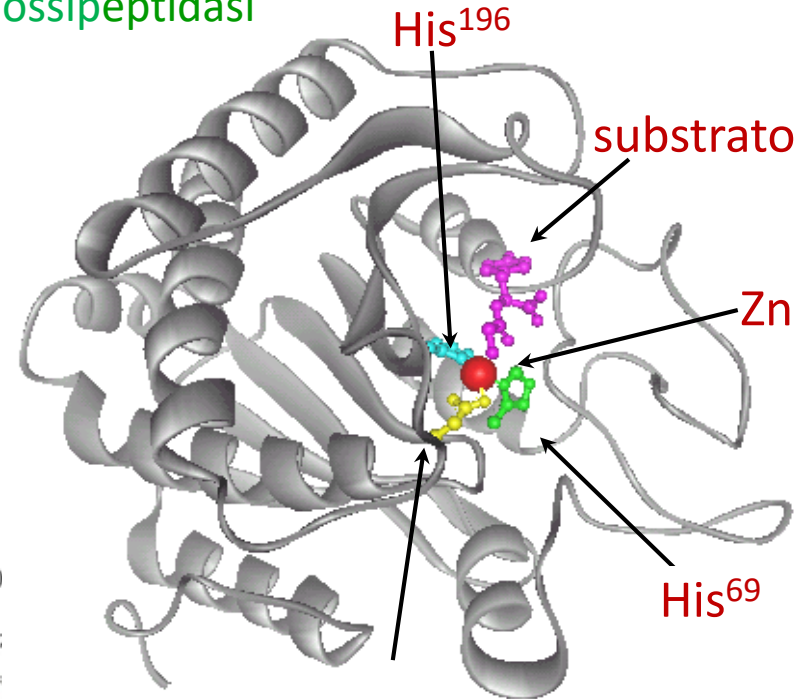
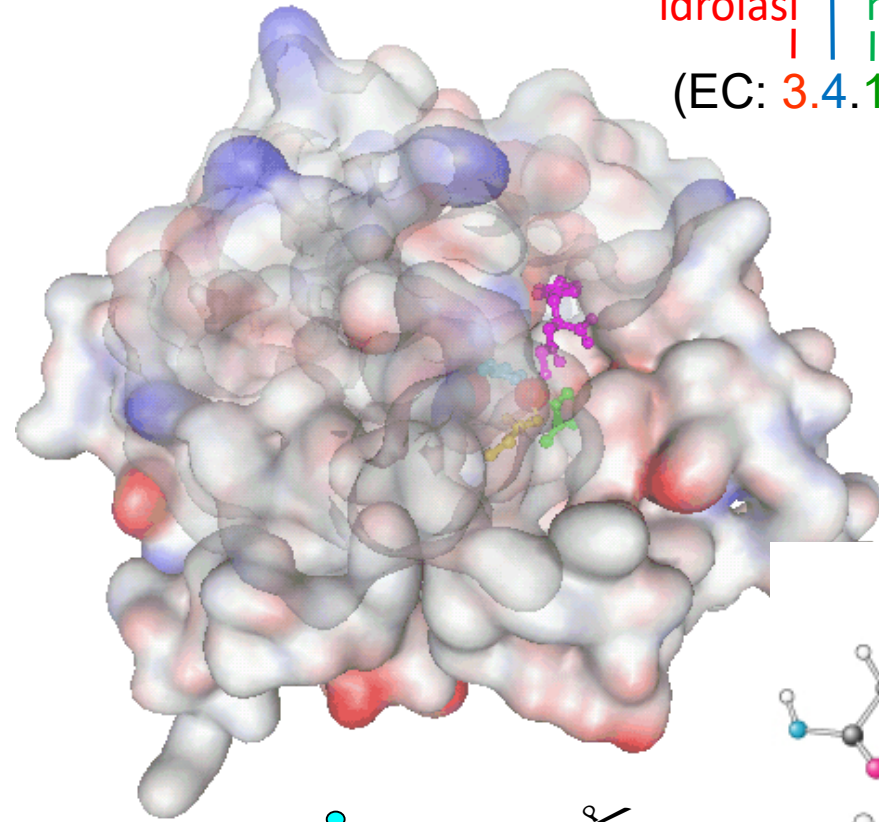
Metalloproteasi: Zn²⁺ attiva una H₂O che agisce da nucleofilo. es. *Carbossipeptidasi A*.

Questi due enzimi non formano legami covalenti con il substrato

Strategie catalitiche: Metallo proteasi

- ▶ La *carbossipeptidasi A* è una metallo proteasi (esopeptidasi, enzima digestivo)

idrolasi | peptidasi
| |
| metallocarbossipeptidasi
(EC: 3.4.17.1)



stacca il residuo C-terminale

- selettività: *carbossipeptidasi A*: Xaa-|-Phe-COOH
- carbossipeptidasi B*: Xaa-|-Lys-COOH

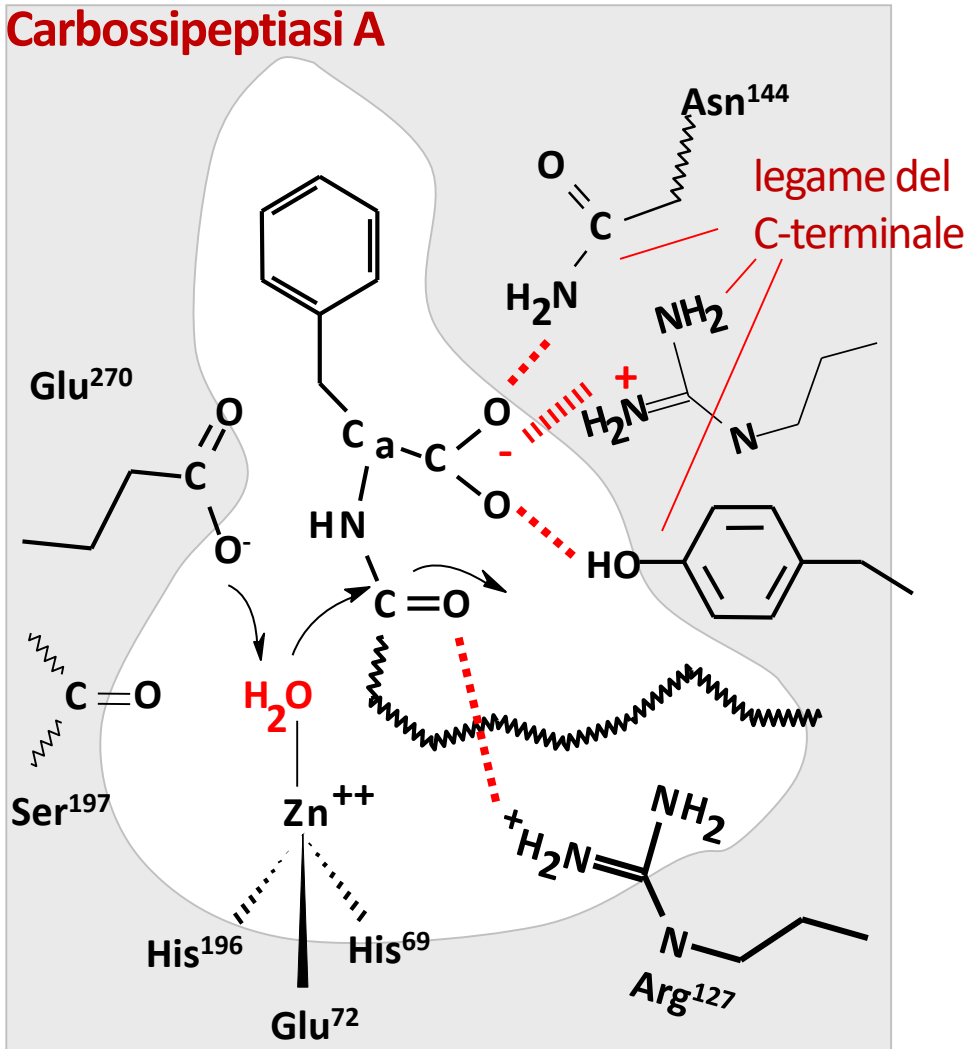
aromatico o alifatico grande
basico

Meccanismo d'azione della carbossipeptidasi

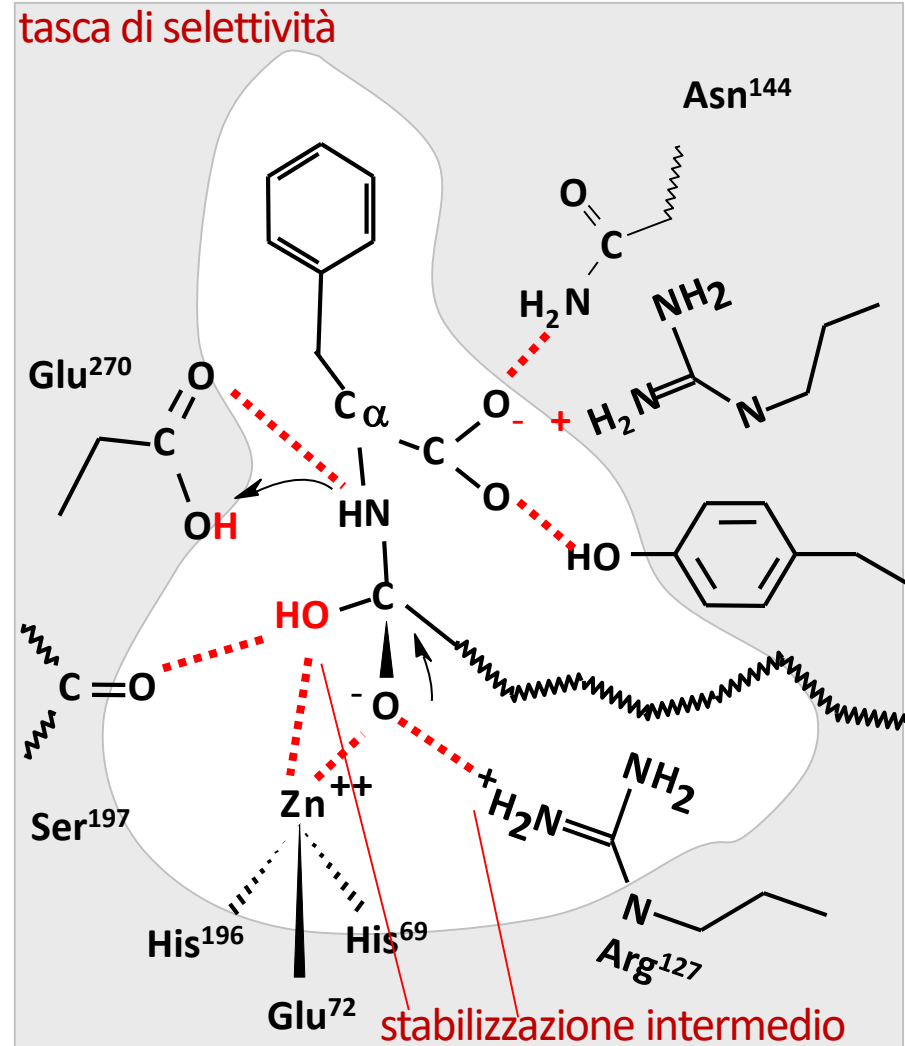
► Le carbossipeptidasi sono metallo (zinco) proteasi

- agiscono senza la formazione di un addotto covalente, attivando l' H_2O idrolitica

Carbossipeptasi A

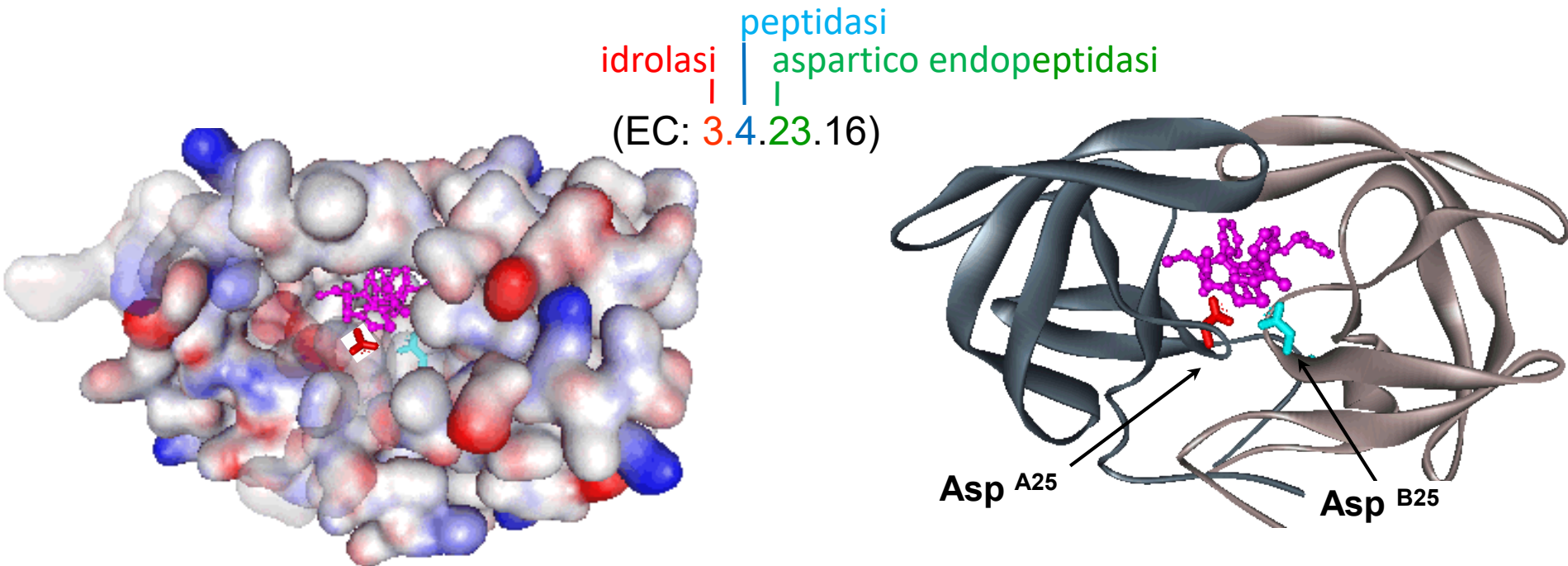


tasca di selettività



Strategie catalitiche: Aspartico proteasi

- La proteasi di HIV-1 è un esempio di una aspartico proteasi (endopeptidasi)
 - È una proteina **omodimerica** dove un residuo Asp per catena forma il sito catalitico



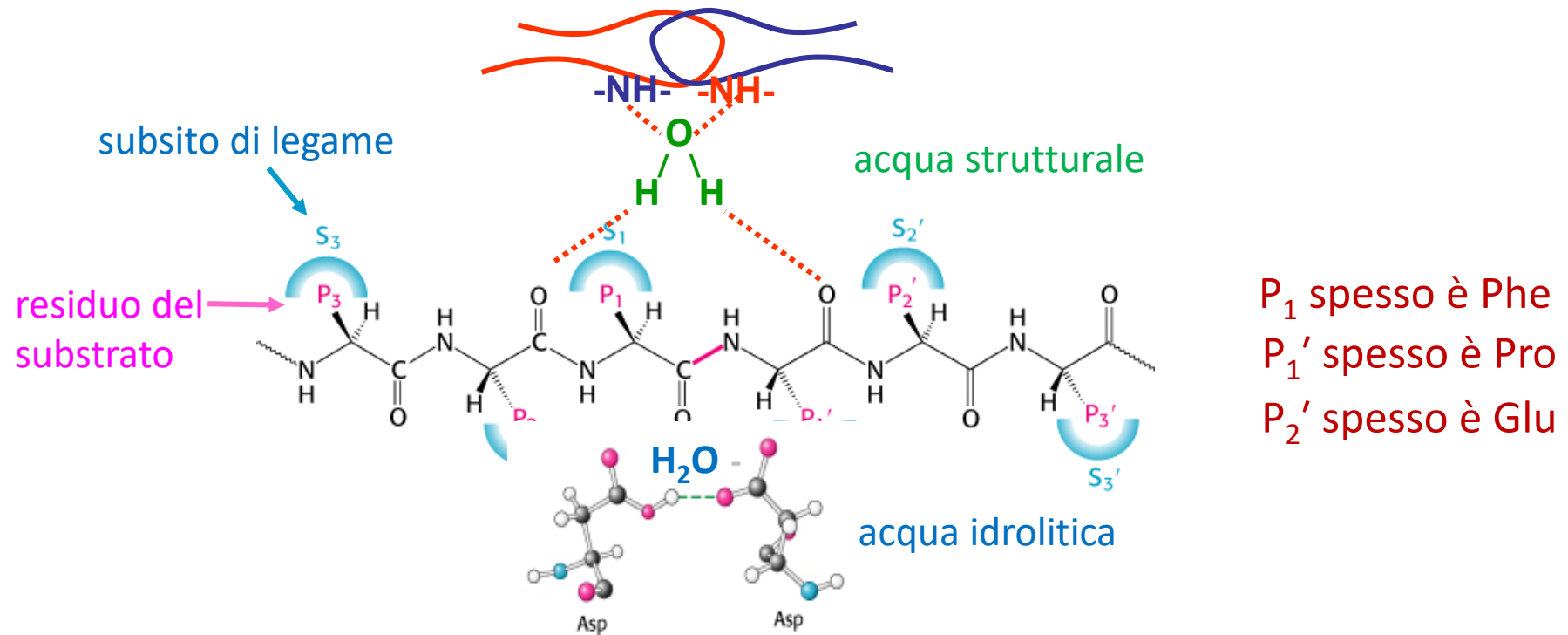
- ha un ruolo centrale nella genesi virale ed è quindi un importante bersaglio terapeutico



Meccanismo d'azione dell'aspartico proteasi

► L'idrolisi procede senza la formazione di un legame covalente transiente

- il polipeptide idrolizzato viene 'abbracciato' nel sito attivo dell'enzima

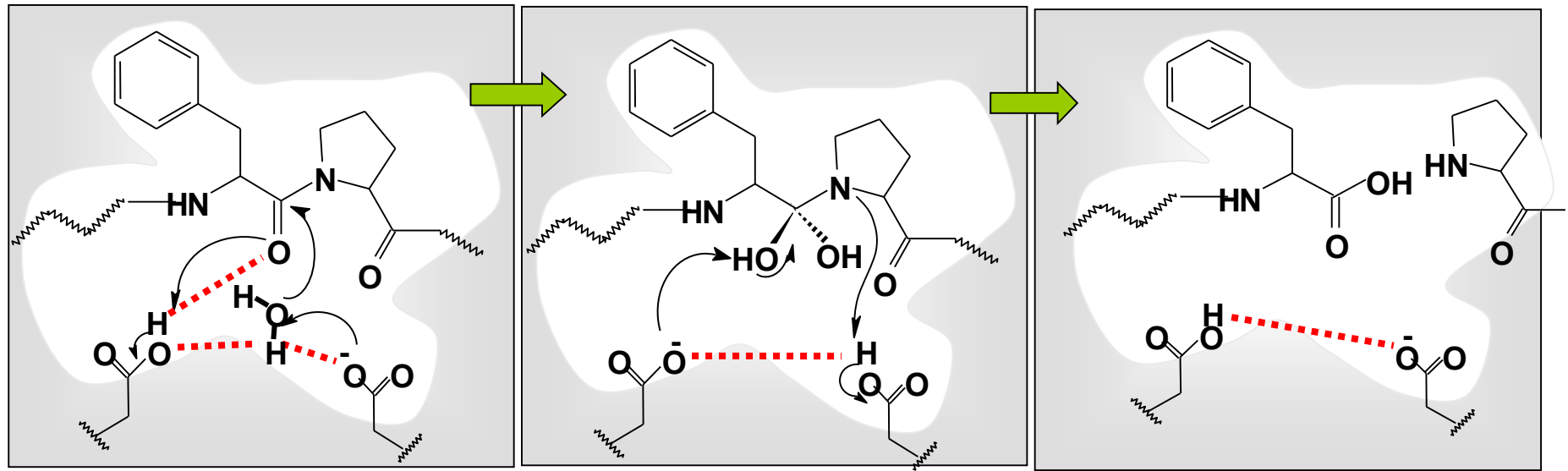


- due lembi (*flaps*) della proteina racchiudono il substrato formando legami-H mediati da una molecola d'acqua 'strutturale'.
- 6 residui trovano subsiti di legame, 3 a monte (P_1 - P_3) e 3 a valle (P_1' - P_3') del legame scisso

Meccanismi d'azione delle aspartico proteasi (cont.)

► Il meccanismo procede mediante l'attivazione dell'acqua idrolitica

- anche se l'enzima è un omodimero simmetrico, gli Asp catalitici non sono equivalenti
- un Asp è deprotonato (forte proton accettore) e l'altro è protonato (forte proton donatore)

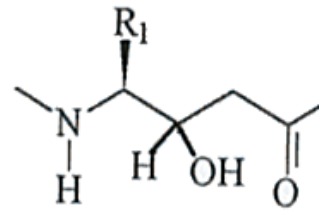


- uno attiva la molecola d'acqua per l'attacco nucleofilo sul carbonile, assistito dall'altro
- si forma un intermedio (stato di transizione) **gem diolo**
- per progettare inibitori di questo importante bersaglio terapeutico serve tener conto:
 - 1) delle **interazioni del sito di legame col substrato**,
 - 2) dello **stato di transizione**
 - 3) della **natura del sito catalitico**

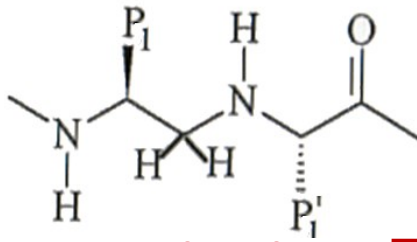
Inibitori come farmaci: inibizione dell'aspartico proteasi di HIV-1

► Gli inibitori di HIV-AP sono molecole peptidomimetiche, dove:

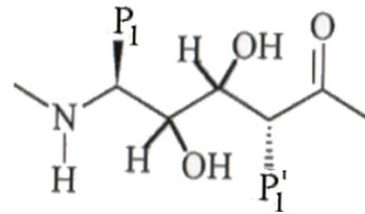
- 1) Il legame peptidico idrolizzabile viene sostituito con un *isostere* non idrolizzabile (Ψ)
- 2) Ψ assomigli il più possibile al gemdiolo e $P_n - P_n'$ interagiscono strettamente con $S_n - S_n'$
- 3) La dimensione dell'inibitore è ridotta al minimo, come anche la natura peptidica



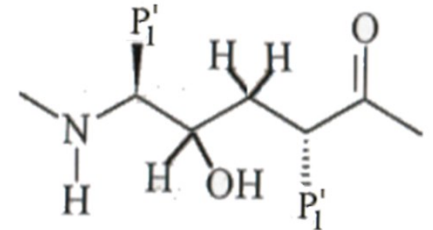
Statina ☒
(inibitore naturale)



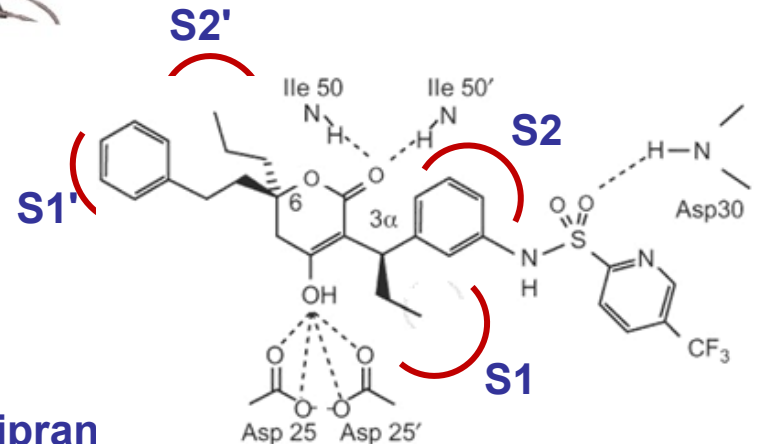
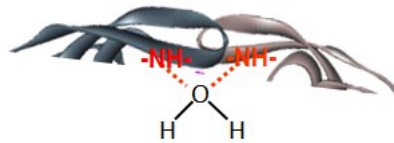
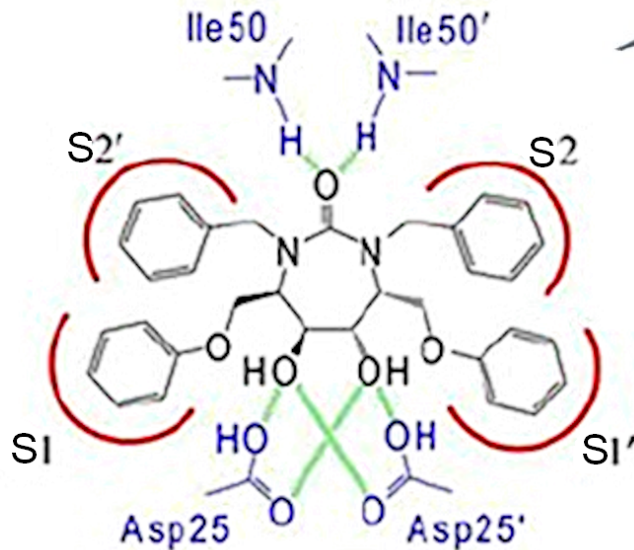
Ammide ridotto ☒
(punto di partenza)



Diidrossietilene ☑

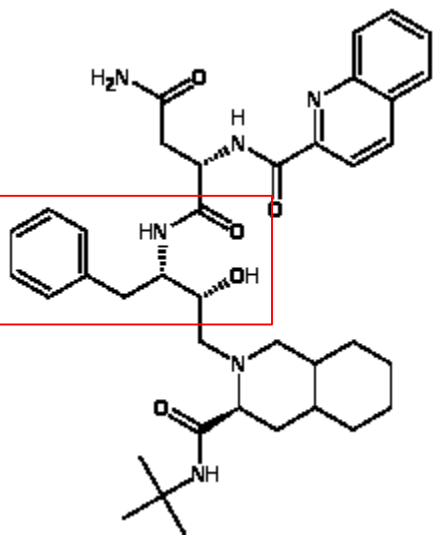


Monoidrossietilene ☑

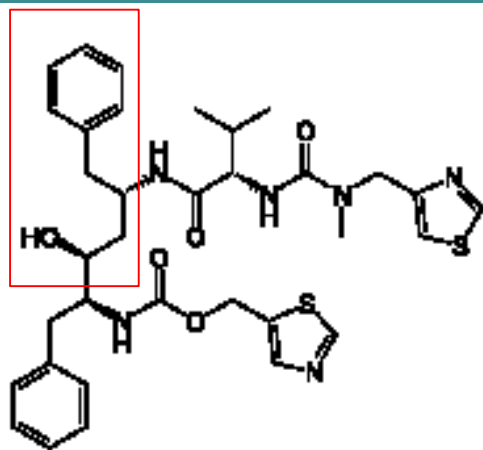


Tipran

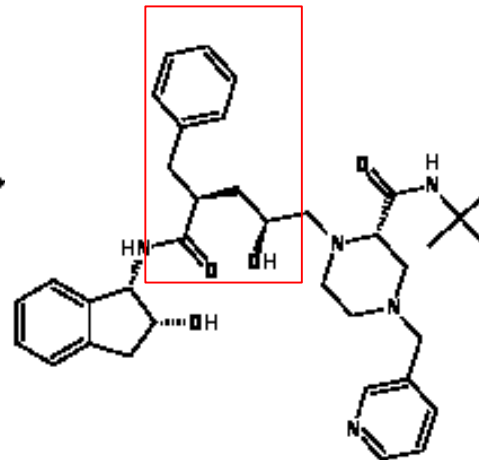
Esempi di inibitori di HIV-AP in uso clinico



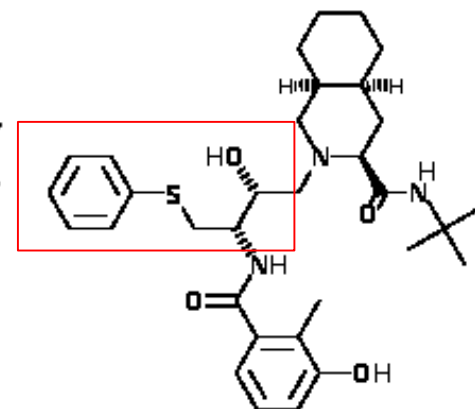
Saquinavir (1995)



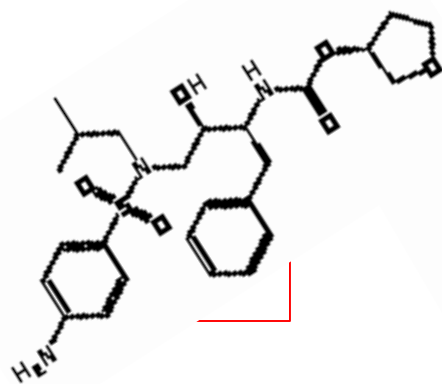
Ritonavir (1996)



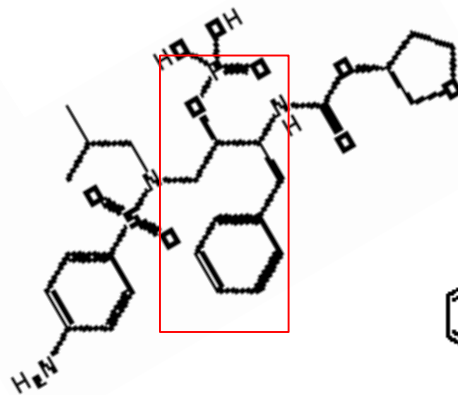
Indinavir (1996)



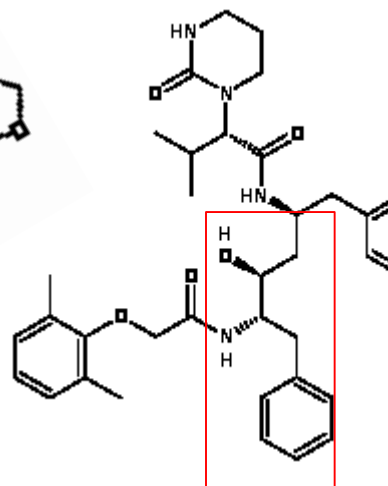
Nelfinavir (1997)



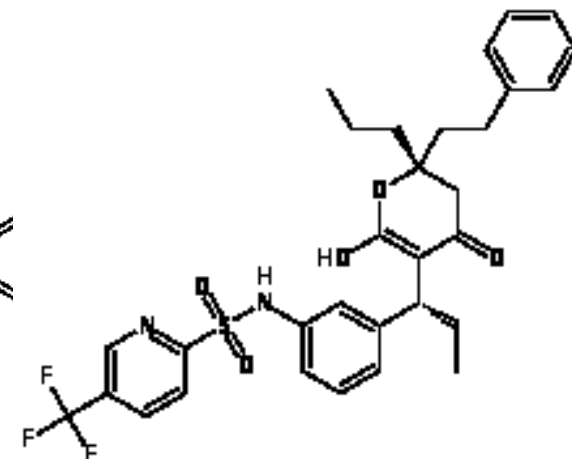
Amprenavir (1999)



Fosamprenavir (2003)



Lopinavir (ABT-378)



Tipranavir (2005)

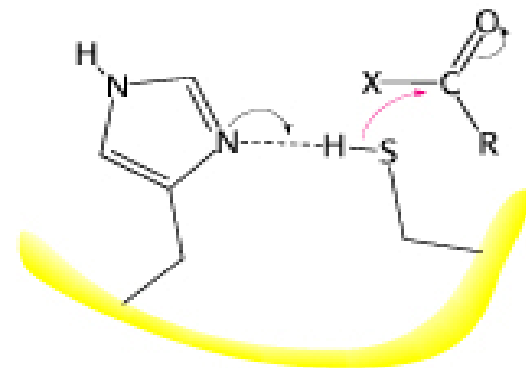
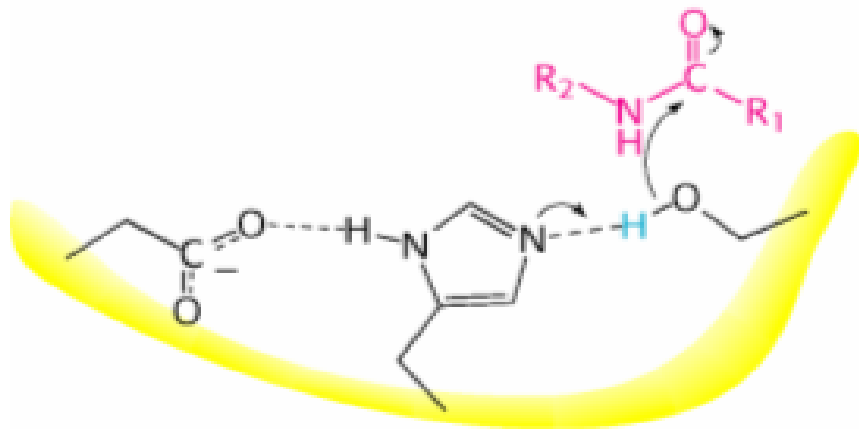
non peptidico

Riassunto: meccanismi d'azione delle proteasi a confronto

serina proteasi (*)

legame covalente

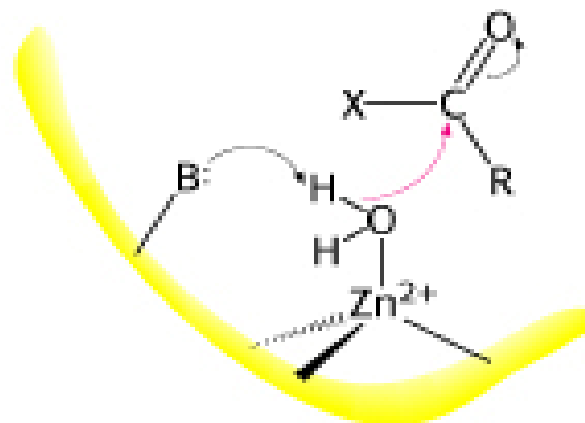
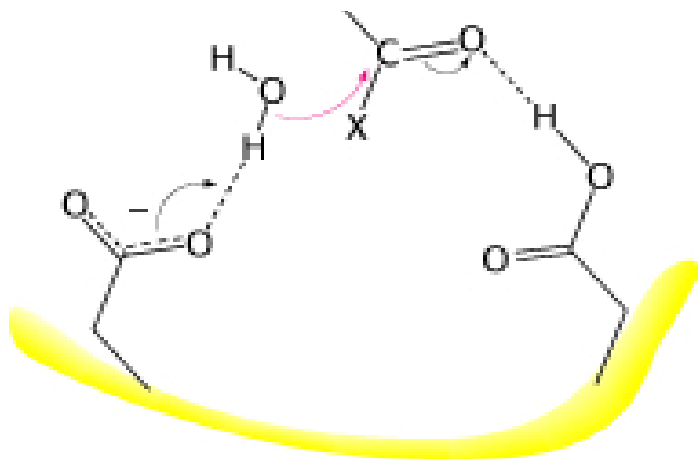
cisteina (*)



aspartico proteasi

attivazione H₂O

metallo proteasi

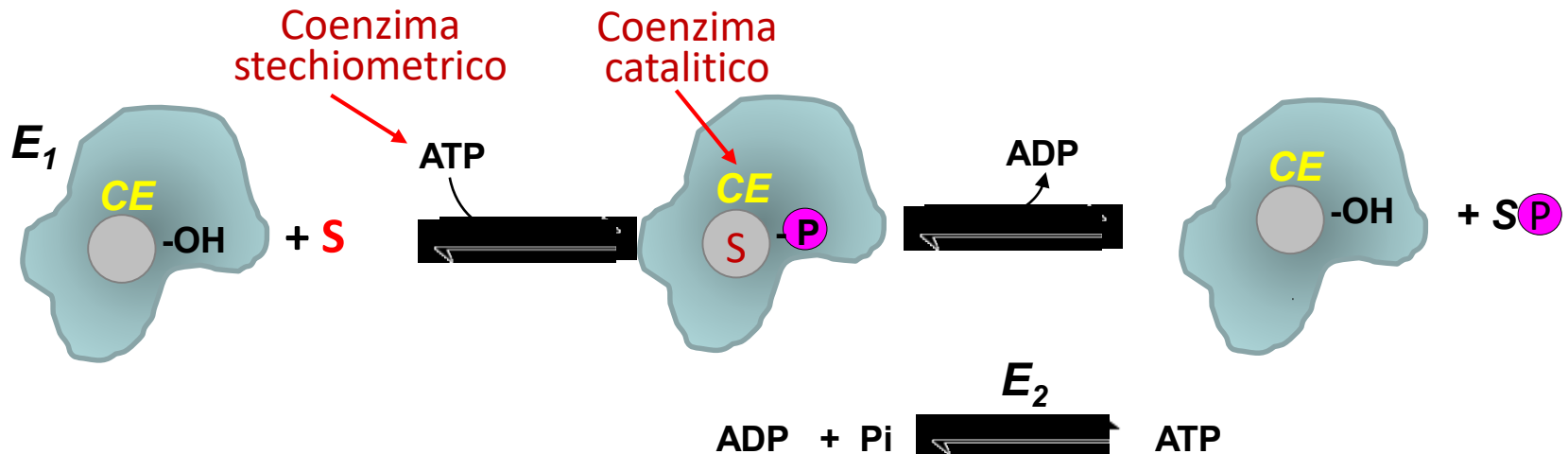


► I coenzimi sono molecole non amminoacidiche che partecipano nella catalisi

- Ce ne sono di due tipi:

coenzimi catalitici (co-catalizzatori che partecipano alla reazione ma non sono modificati)

coenzimi stechiometrici (co-substrati, modificati dalla reazione e ricostituiti altrove)



- i coenzimi catalitici sono presenti alla stessa concentrazione dell'enzima (molto meno di S)
- i coenzimi stechiometrici devono essere presenti almeno alla $[S]$
- In ogni caso sono derivati da vitamine

COENZIMI (cont.)

► I coenzimi derivano da vitamine.

- derivati da vitamine idrosolubili → trasferimento intramolecolare (catalitici ©) o intermolecolari (stechiometrici \$) di gruppi chimici o potenziale redox
- derivati da vitamine liposolubili → varie funzioni (ormoni, antiossidanti ecc.)

ATP

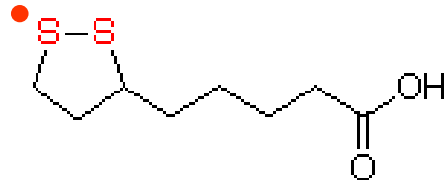
Vitamine idrosolubili

Vitamina	coenzima	tipo	gruppi trasportati	fonti
ALA (acido lipoico)	lipoammide	\$	acetili. intramol.	carne, spinaci, <i>endogena</i>
B ₁ (tiammina)	tiammina pirofosfato	\$	carbonili	carne, vegetali,
B ₂ (riboflavina)	FADH ₂ , FMNH ₂	\$	1 o 2 e ⁻ intramol.	latte, uova, verd., fegato
B ₃ (niacina)	NADH, NADPH	©	2e ⁻ (H ⁺) intermol.	carne, veg., uova, lattic.
B ₅ (acido pantotenico)	coenzima A (CoA)	©	acetili o acili intermol.	tutti i cibi naturali
B ₆ (piridossale)	piridossal fosfato	\$	amminici	carne, veg., uova, latticini
B ₇ (biotina)	biocitina	\$	CO ₂	legumi, cereali, latte, lievito
B ₁₂ (cobalamina)	adenosil-, OH-, Me-cbl	\$	CH ₃ , alchilici	carne, pesce, pollame, lattic.
B ₉ (folato)	tetraidrofolato	\$	unità monocarboniose	verdure, succhi, lenticchie
C	acido ascorbico	\$	e ⁻ per riduzione Fe ^{III}	verdura, frutta

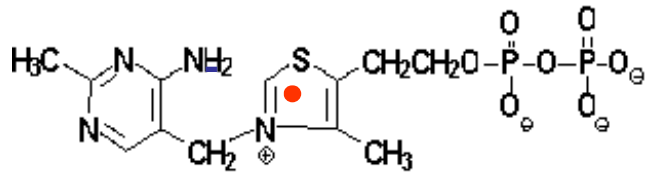
Vitamine liposolubili

Vitamina	forma attiva		funzione	fonti
A (retinolo)	<i>trans</i> -retinale	\$	visione, crescita	lipidi animali e vegetali
K (naftochinone)	fillo- e menachinone	\$	coagulazione	lipidi animali e vegetali
D (calciferolo)	ergo- e colecalciferolo	\$	pro-ormone	<i>produzione endogena</i>
E (tocoferolo)	α-tocoferolo	\$	antiossidante	lipidi animali e vegetali

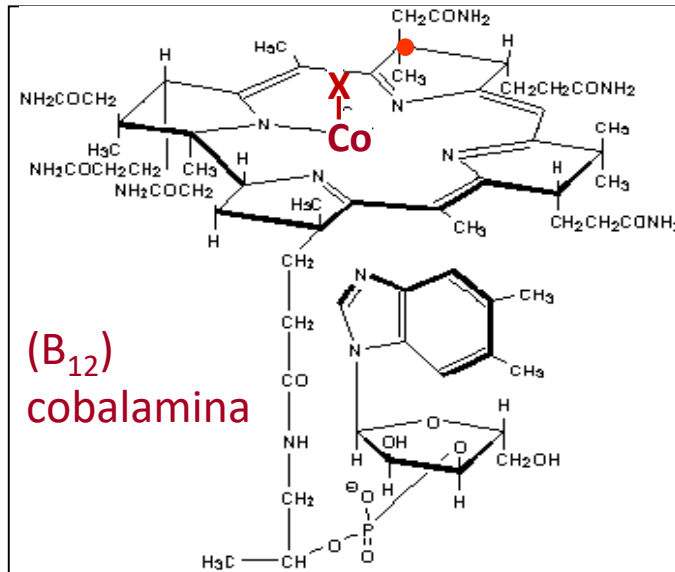
COENZIMI derivati da vitamine idrosolubili



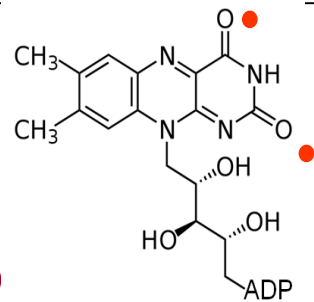
acido lipoico (ALA)



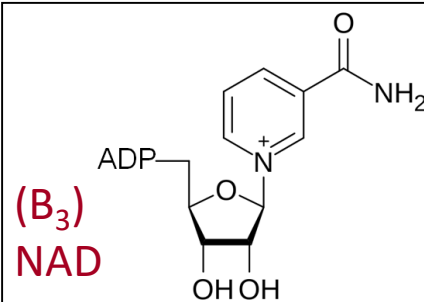
tiammina pirofosfato (B₁)



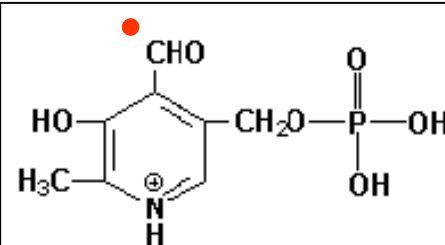
(B₁₂)
cobalamina



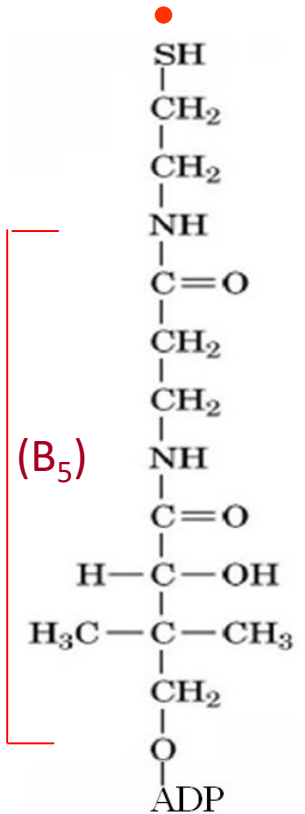
(B₂)
riboflavina



(B₃)
NAD

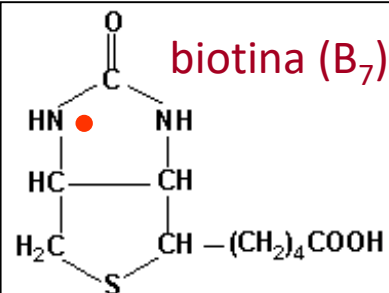


piridossalfosfato (B₆)

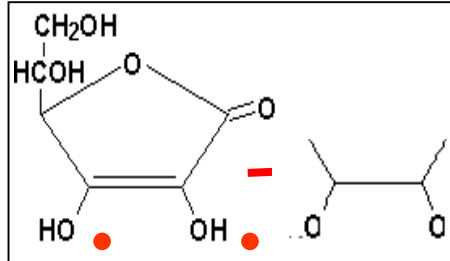


(B₅)

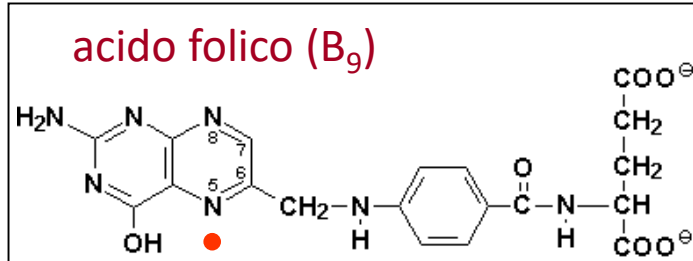
coenzima A



biotina (B₇)

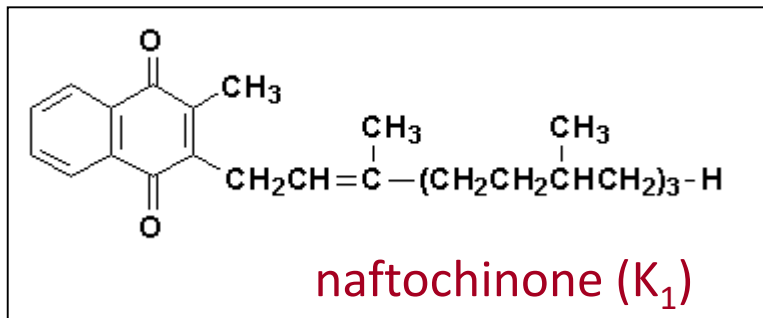
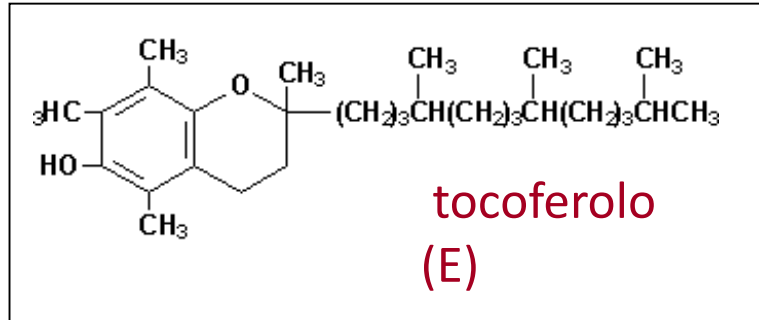
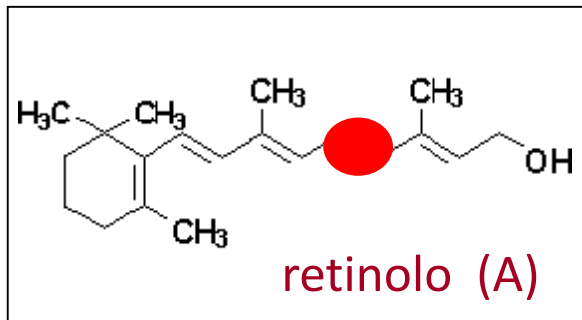
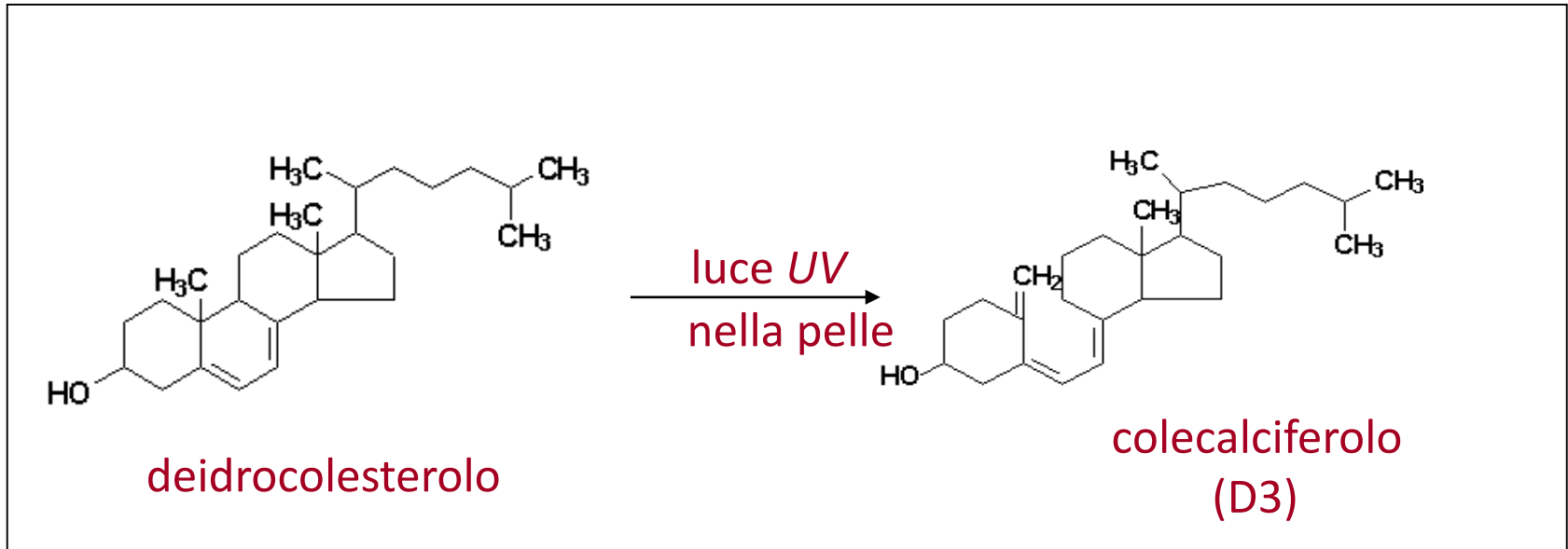


ascorbato (C)



acido folico (B₉)

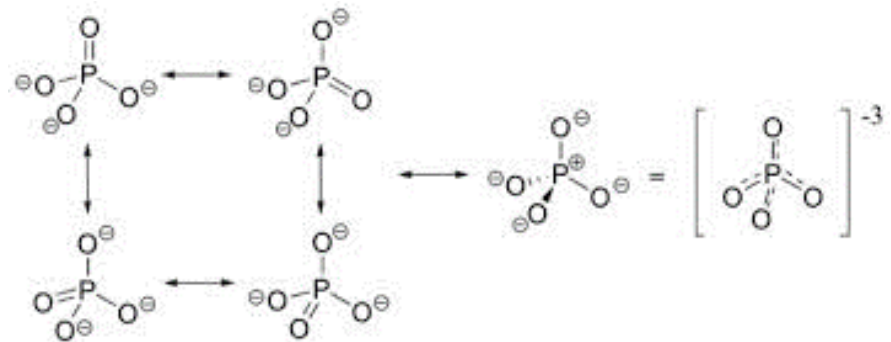
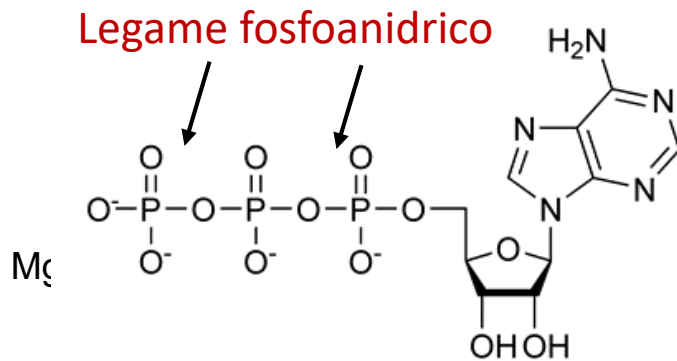
COENZIMI derivati da vitamine liposolubili



Ciascuna vitamina contiene una famiglia di molecole, i cosiddetti *vitameri*, che sono strutturalmente molto simili

► Il ciclo ATP-ADP-AMP è il modo fondamentale per lo scambio di energia nella cellula

- ATP è un **donatore immediato di energia** con un **elevato potenziale di trasferimento** di P_i o PP_i (separazione e delocalizzazione delle cariche)
- è la principale unità molecolare del **trasferimento di energia** intracellulare (anche GTP)
- Il trasferimento avviene **solo in reazioni catalizzate** da enzimi (*chinasi*)
- l'idrolisi di ATP rilascia energia libera ($\Delta G^\circ \sim 30$ e 45 kJ/mol per rilascio di P_i o PP_i)
- P_i è **intercambiabile** con altri nucleotidi (CTP, GTP, UTP)

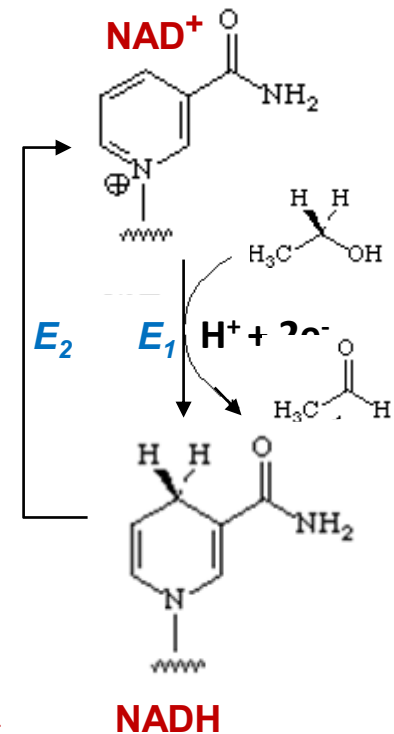
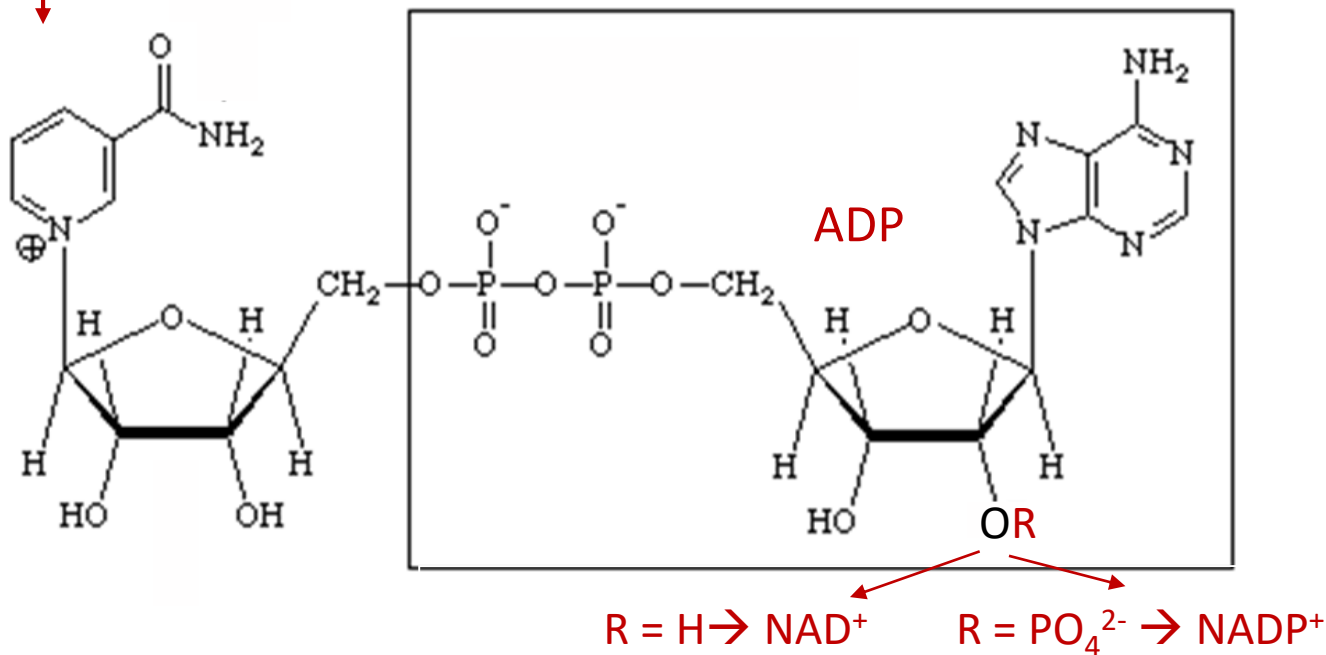


COENZIMI: NAD e NADP \$

► Nicotinammide adenin dinucleotide (NAD^+) e un accettore/donatore di elettroni

- partecipa in **reazioni di ossidoriduzione**: es. $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{H} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{H} + \text{NADH}$
- NADH trasporta **2 elettroni** in modo intermolecolare (navetta) \$, in **reazioni redox** utilizzate principalmente per scopi bioenergetici (NB. trasporta $\text{H}^+ + 2\text{e}^- \equiv \text{H}^-$ ione idruro)
- NAD P H trasporta **2e-** in reazioni di biosintesi riduttive. es. $\text{R}_2\text{C}=\text{O} + 2\text{NADPH} \rightarrow \text{R}_2\text{CH}_2$

nicotinammide (derivato dalla niacina, Vit. B₃)



trasferimento e⁻ catalizzato da **deidrogenasi**

► Flavin adenin dinucleotide (FAD) e Flavin mononucleotide (FMN)

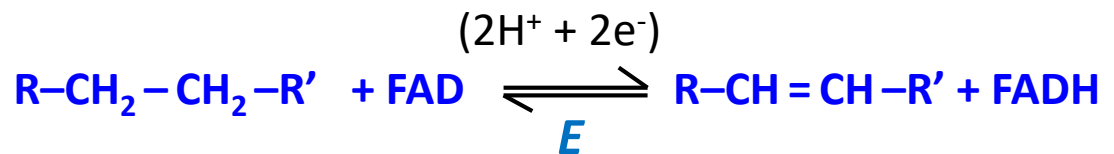
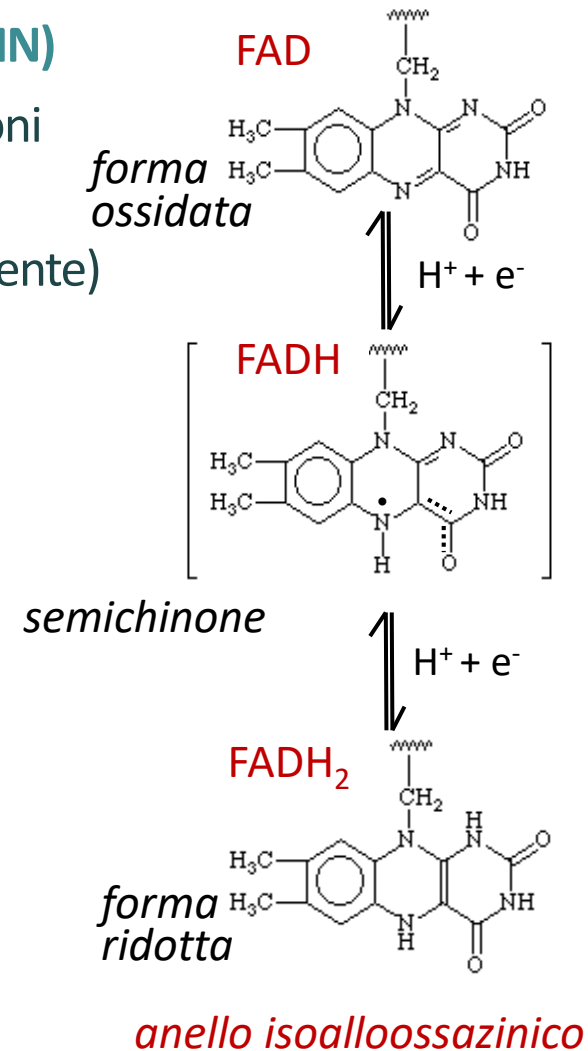
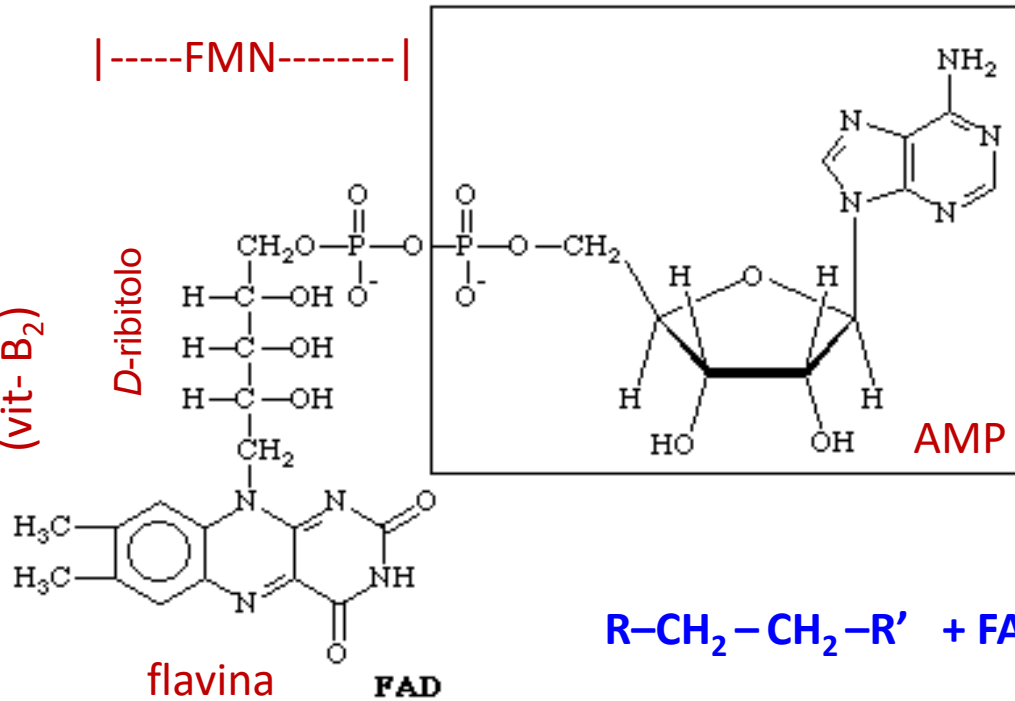
- Permettono il flusso di e^- in modo intramolecolare © in reazioni redox ($2H^+ + 2e^- \equiv H_2$)
- **legano strettamente** a *deidrogenasi* (FMN anche covalentemente) e **non sono navette**; non si staccano dall'enzima
- l'**anello isoalloossazinico** può accettare e trasmettere **1 o 2 e^-**

-----FAD-----

-----FMN-----

riboflavina
(vit- B₂)

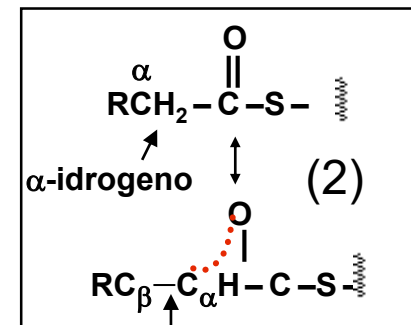
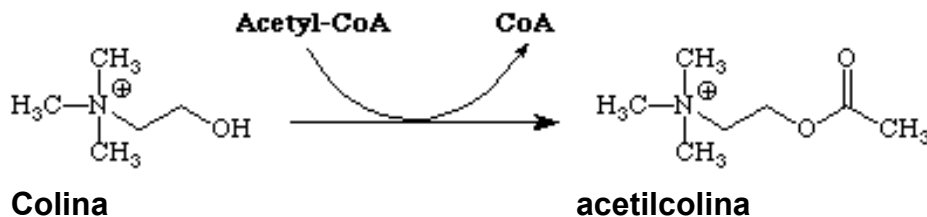
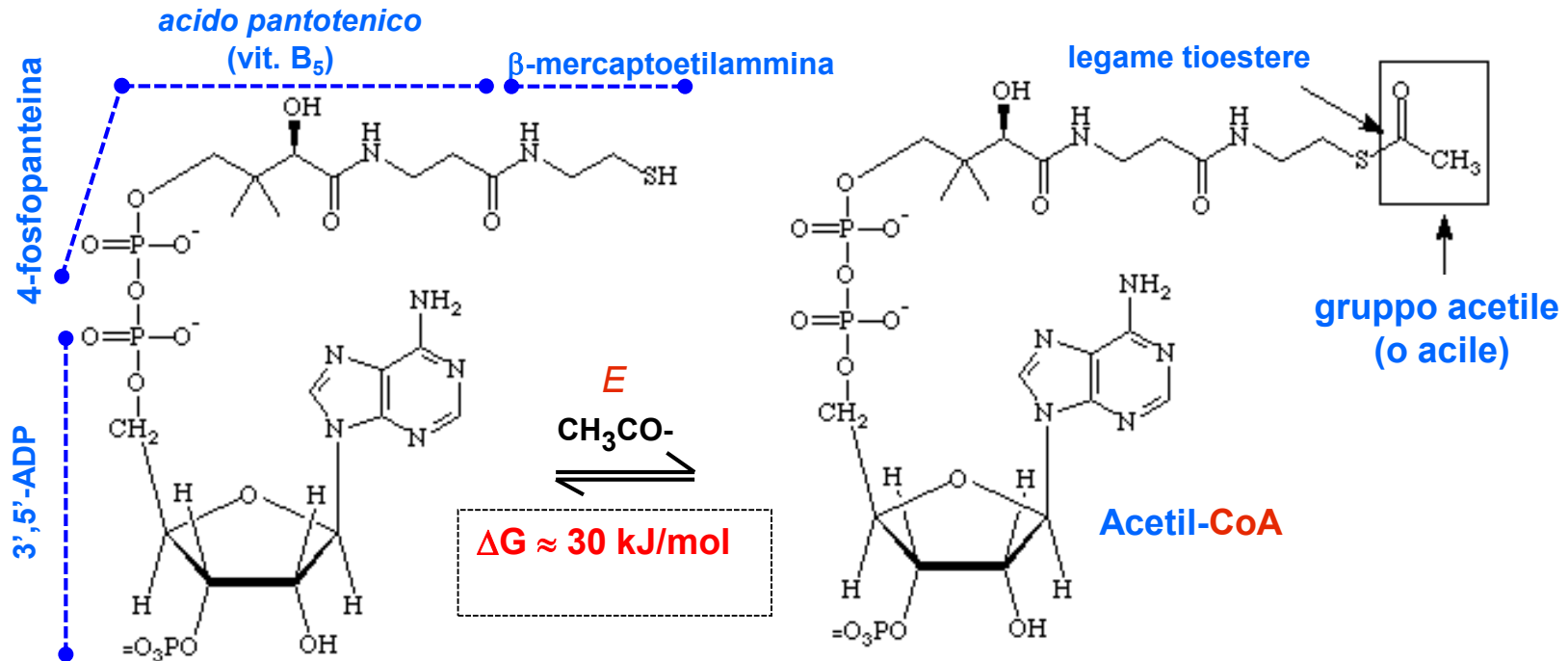
D-ribitolo



COENZIMI: CoA \$

► Coenzima A (CoA) trasportatore attivato di unità bicarboniose

- 1) acil-CoA ha un elevato potenziale per il **trasferimento di gruppi acile**
- 2) attiva C α per la rimozione dell' α -idrogeno, promuovendo la β -ossidazione



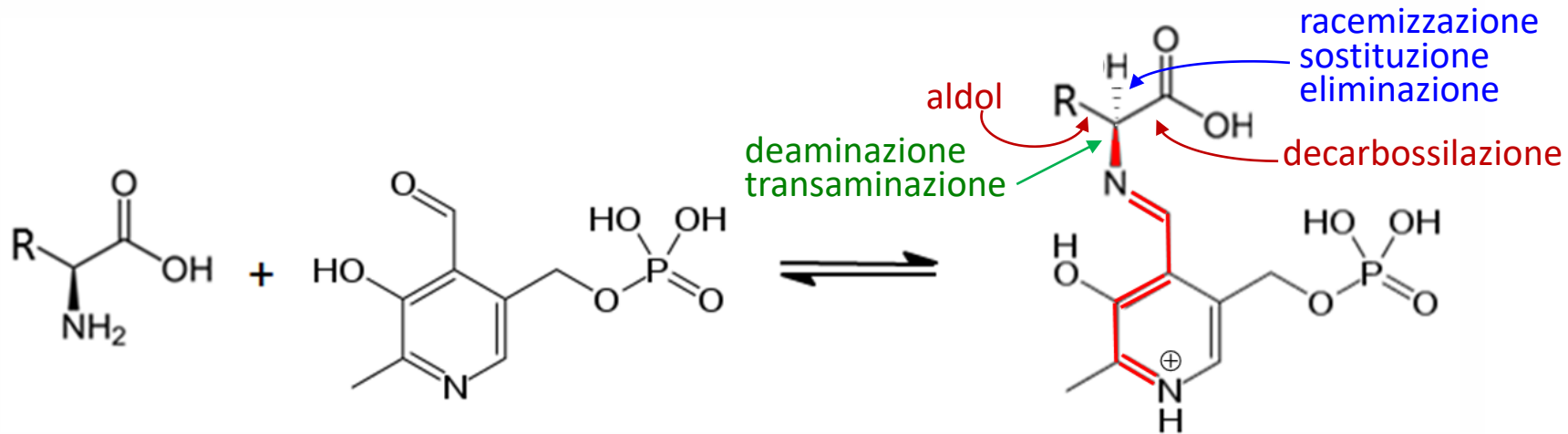
COENZIMI: Piridossal fosfato (PLP) ©

► Coenzima versatile - partecipa in diverse reazioni che spesso coinvolgono amino acidi:

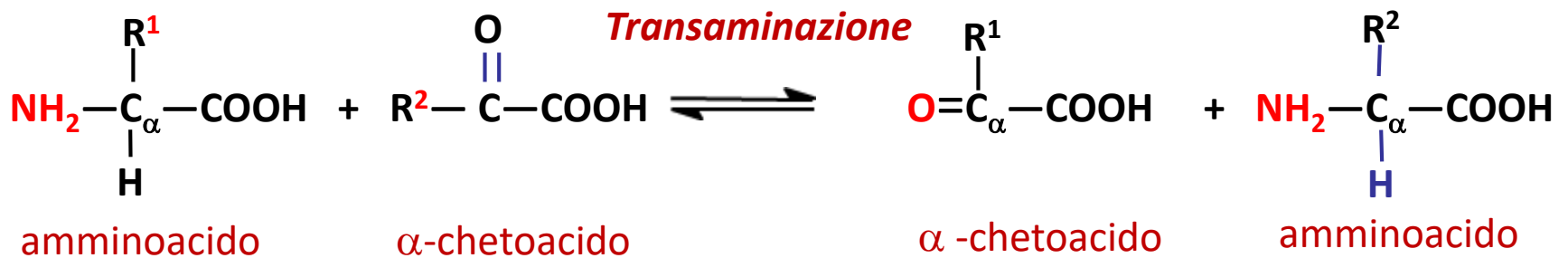
- la versatilità deriva dalla capacità di (1) **formare legami covalenti** col substrato e stabilizzare intermedi carboanionici, (2) agire come **trappola di elettroni**:

1) forma una **base di Schiff** (aldimina) stabile con il gruppo α -amminico

2) stabilizza l'intermedio (carbocatione C_α) intrappolando e^- nei legami delocalizzati

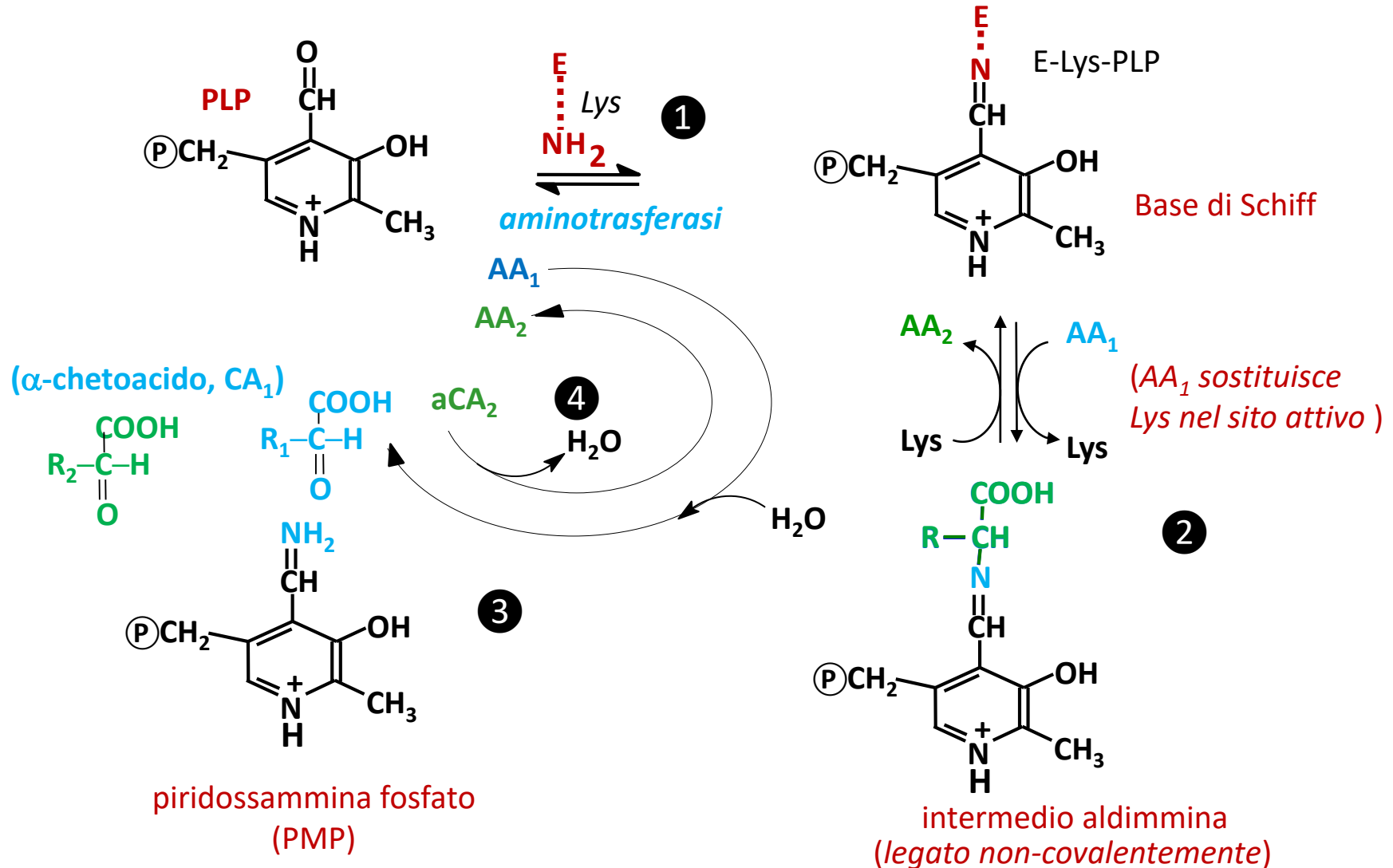


- Una delle principali reazioni che catalizza è la transaminazione di AA con α -chetoacidi



COENZIMI: Piridossal fosfato _ meccanismo d'azione

- **La transaminazione:** ① inizia con la formazione della base di Schiff con un residuo di Lys nel sito attivo dell'enzima; ② l'AA₁ entrante lo sostituisce ③ viene deaminato ad α-chetoacido ④ il gruppo amminico viene poi trasferito sull'α-chetoacido 2 per formare il nuovo AA₂



COENZIMI: Tiammina pirofosfato ©

► **TPP è un coenzima spesso coinvolto in reazioni del metabolismo dei carboidrati**

- vengono sintetizzati o **scissi legami con atomi di carbonio carbonilico** (aldeidi o chetoni)

