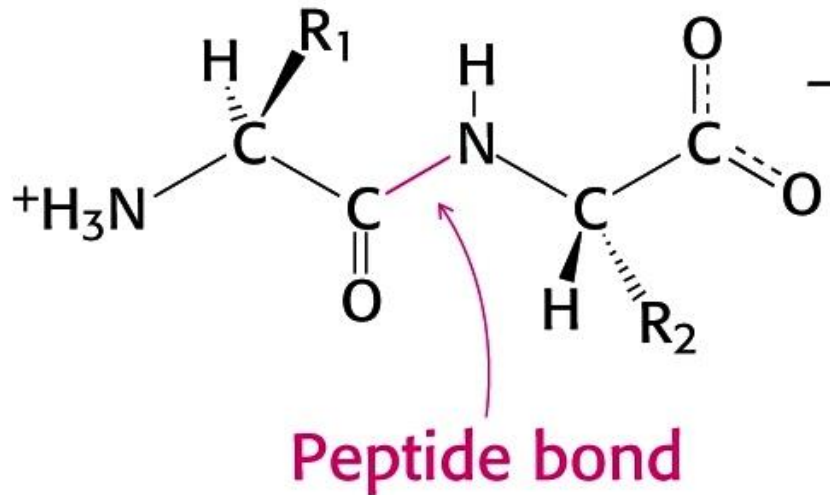


Proteasi

Serina proteasi

**Serina proteasi-Coagulazione del
sangue**

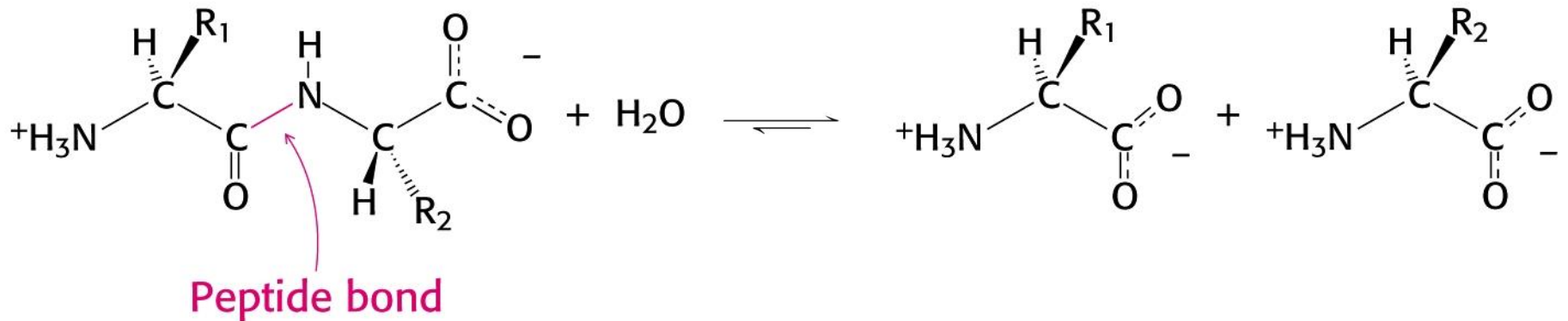
PROTEASI



Le proteasi catalizzano la scissione idrolitica di un legame peptidico

Peptide bond

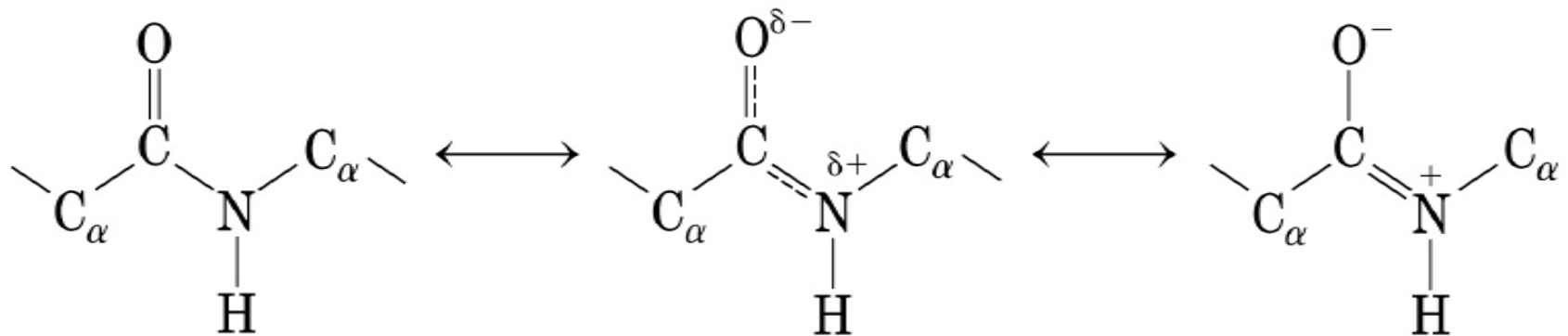
α -carboxyl group & α -amino group



La reazione di idrolisi e' termodinamicamente favorita
La biosintesi del legame richiede un apporto di energia

IL LEGAME PEPTIDICO

Il legame peptidico, come conseguenza delle interazioni di **risonanza**, è rigido e planare con caratteristiche di parziale doppio legame: **e' un legame particolarmente stabile**



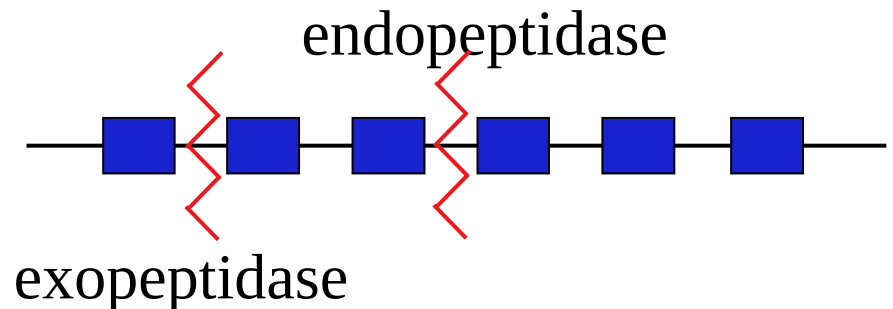
Strategia comune delle proteasi:
creare un potente nucleofilo che attacchi il carbonio carbonilico del legame peptidico

PROTEASI

4 famiglie in base al gruppo funzionale

- Serina-proteasi
- Metallo-proteasi
- Cisteina-proteasi
- Aspartico-proteasi

Due tipi di scissione



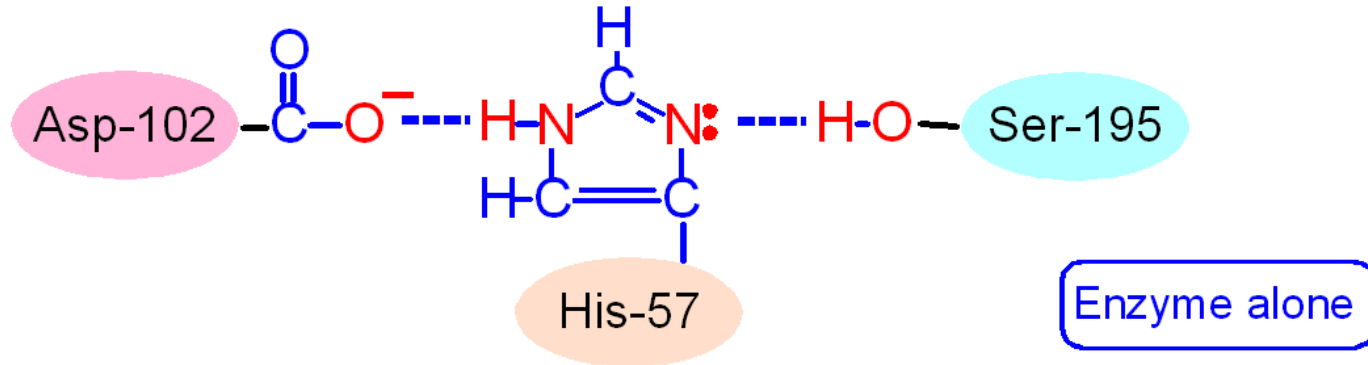
SERINA PROTEASI

Nei Mammiferi le serina proteasi coordinano diverse funzioni fisiologiche importanti, quali:

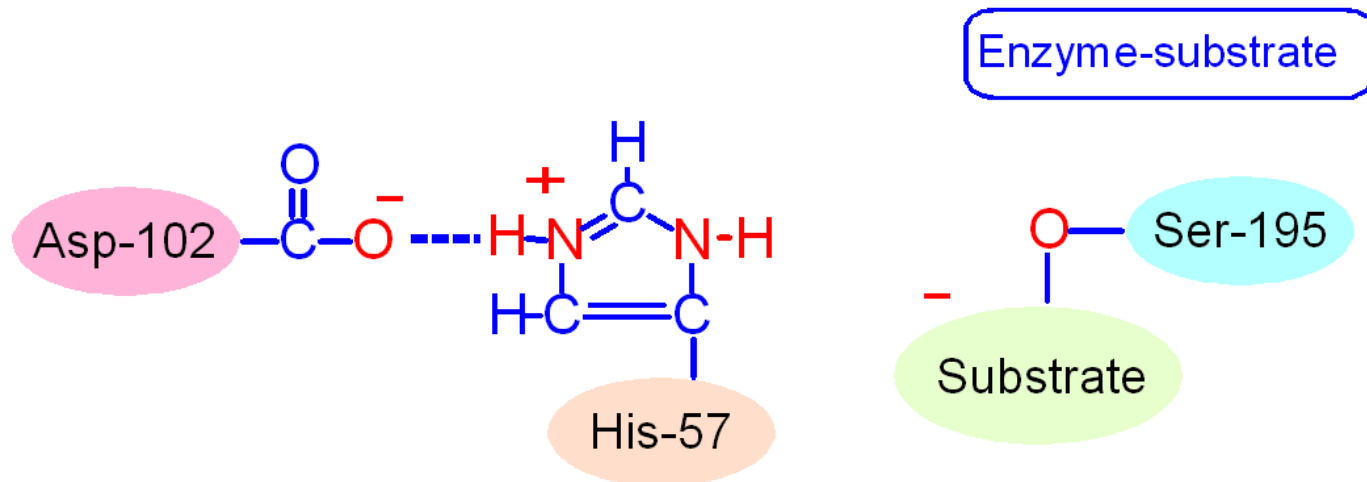
- Digestione delle proteine alimentari
- Coagulazione del sangue
- Fibrinolisi
- Sistema del complemento
- Attivazione ormonale
- Attivazione di fattori di crescita
- Fecondazione

Serina-proteasi

Triade catalitica



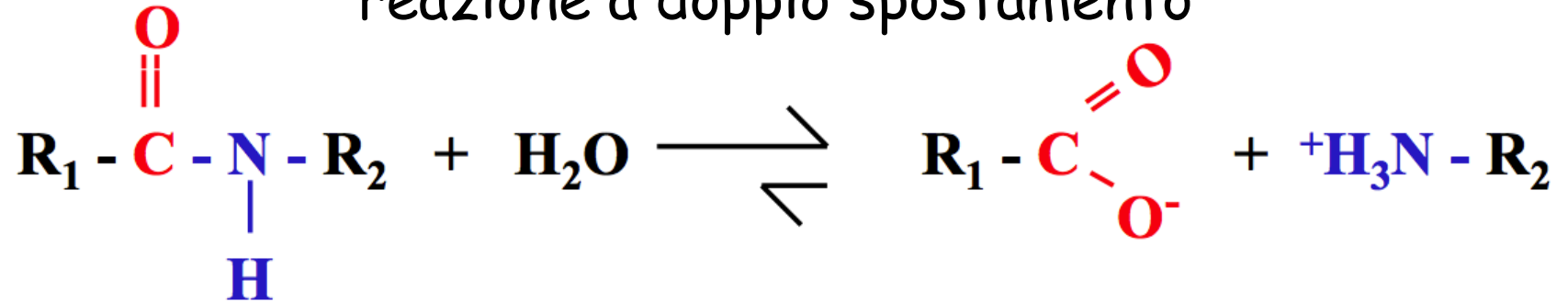
A charge relay complex activates Ser-195



Serina Proteasi

Catalisi covalente

reazione a doppio spostamento



2 FASI:

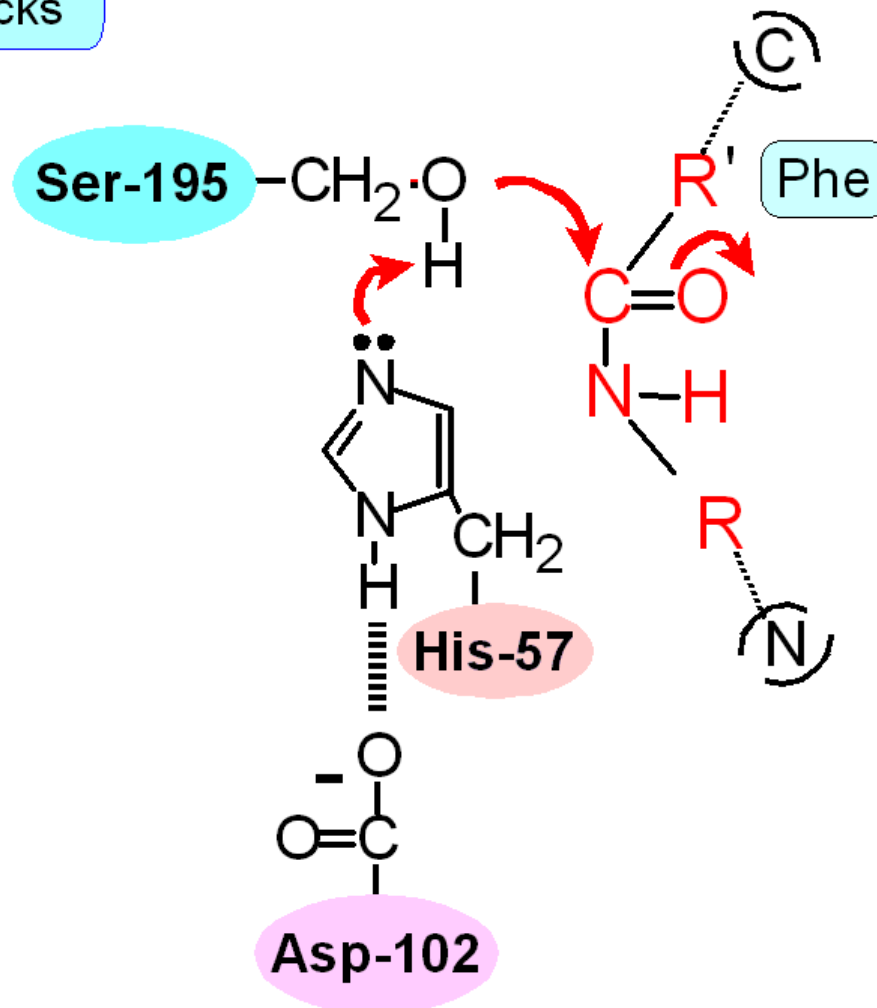
I. $\text{PROTEINA} + \text{E} \rightarrow \text{PEPTIDE 1} + \text{E-PEPTIDE 2}$

II. $\text{E-PEPTIDE 2} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{E} + \text{PEPTIDE 2}$



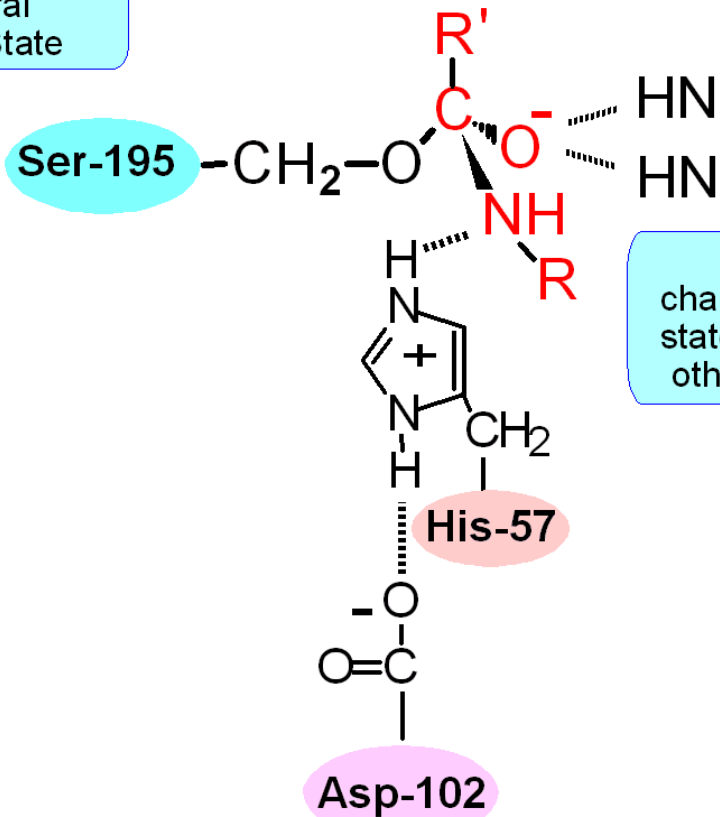
Catalytic Mechanism of Chymotrypsin

A Nucleophilic Serine Attacks

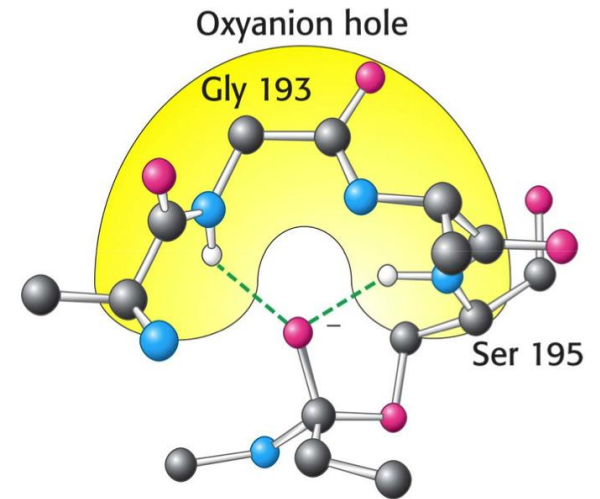


Substrate peptide

Tetrahedral
Transition State

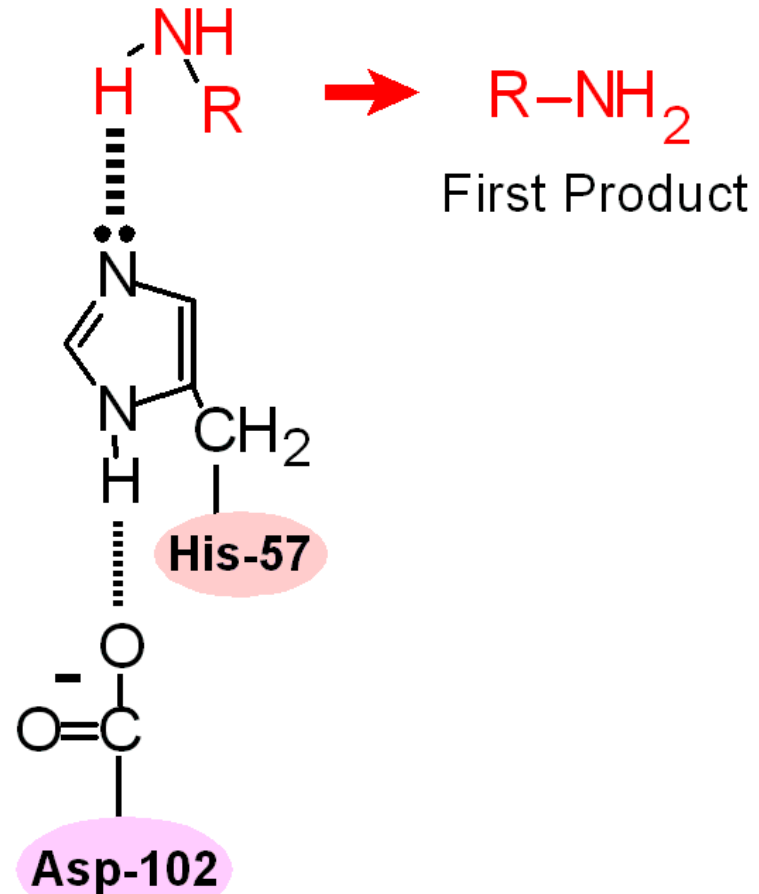


Negatively
charged transition
state stabilized by
other sidechains

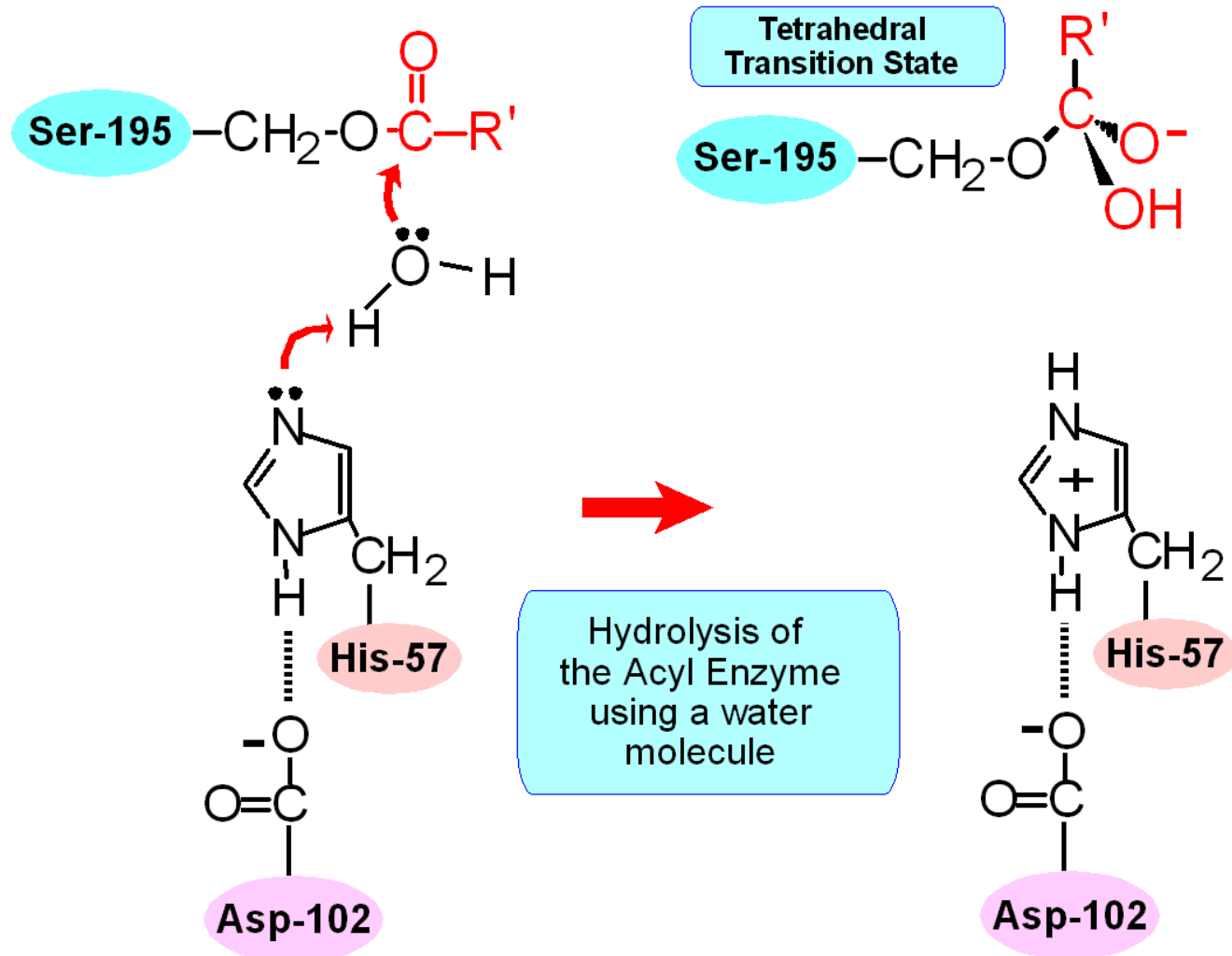




Acyl Enzyme
Formation
Release of
Product 1

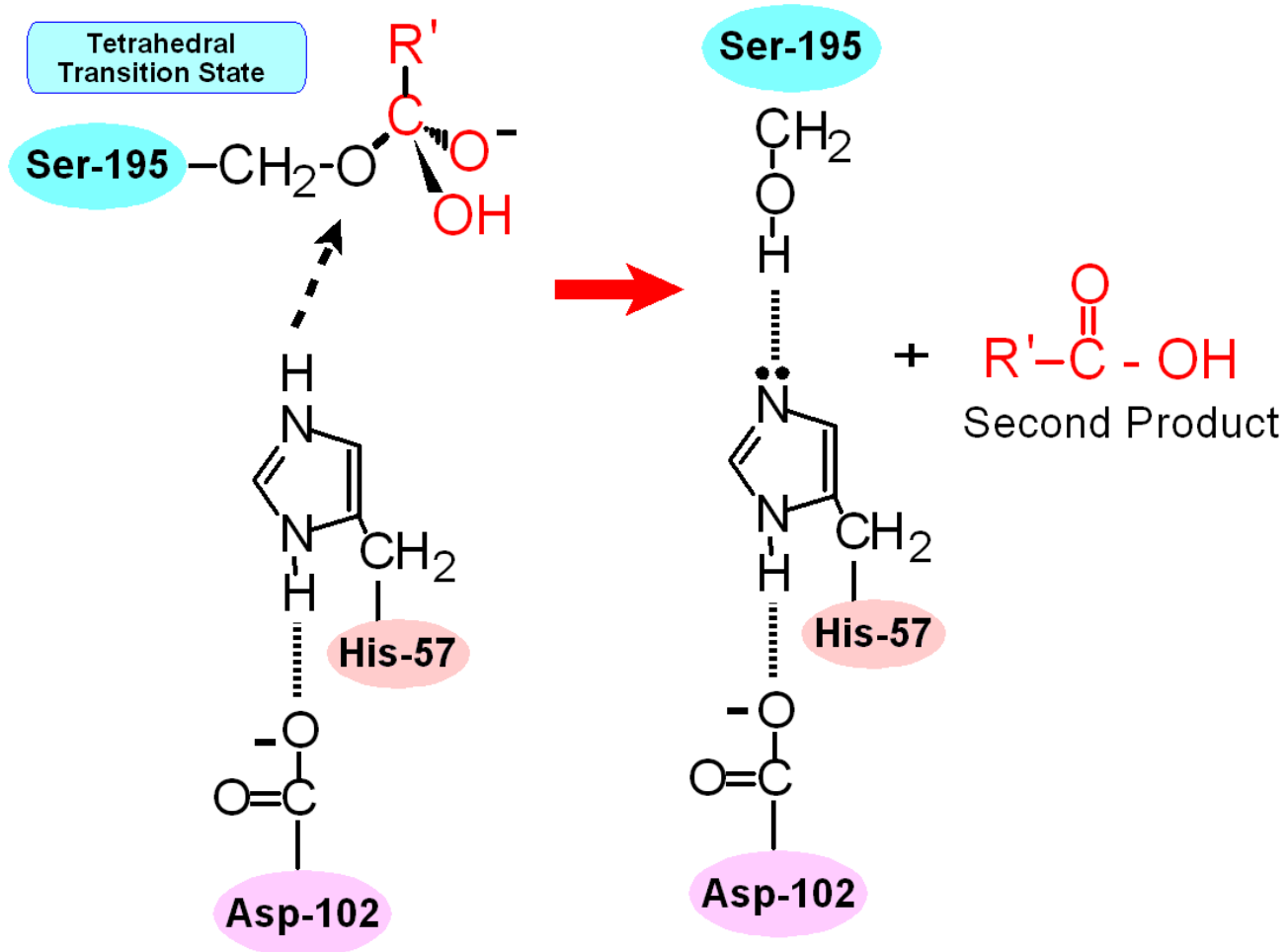


II Fase: deacilazione



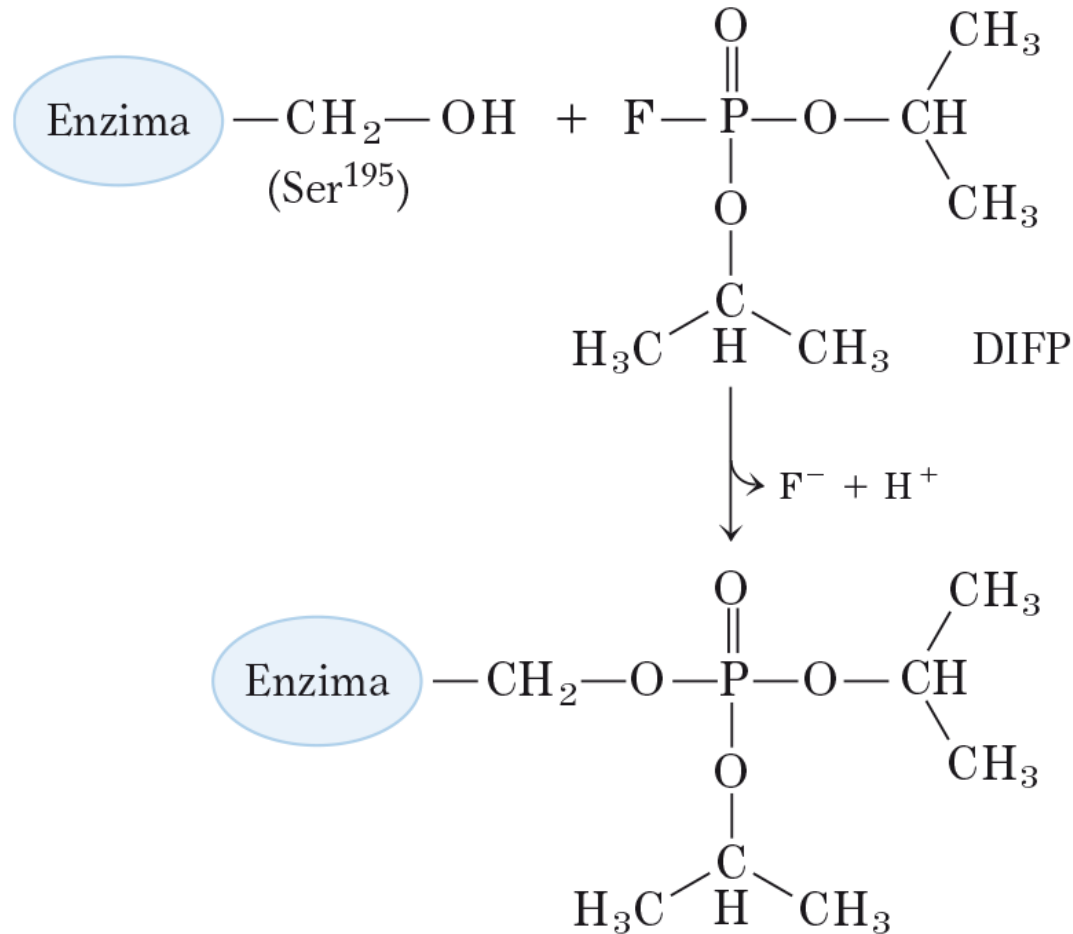
II Fase: deacilazione
E-PEPTIDE 2 + H₂O

E + PEPTIDE 2



Ruolo della serina del sito attivo

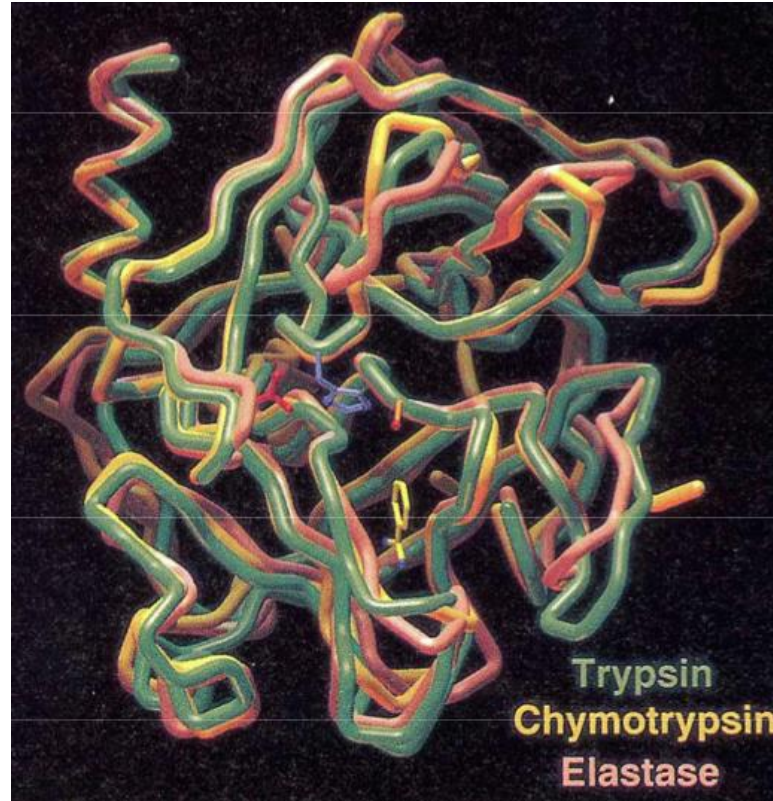
Solo la **serina 195** della chimotripsina e' **cataliticamente reattiva**.
Solo la serina del sito attivo reagisce con il DIPF.



esempio di:
inibizione
irreversibile

DIPF=diisopropilfluorofosfato

Le serina-proteasi hanno relazioni struttura-funzione simili

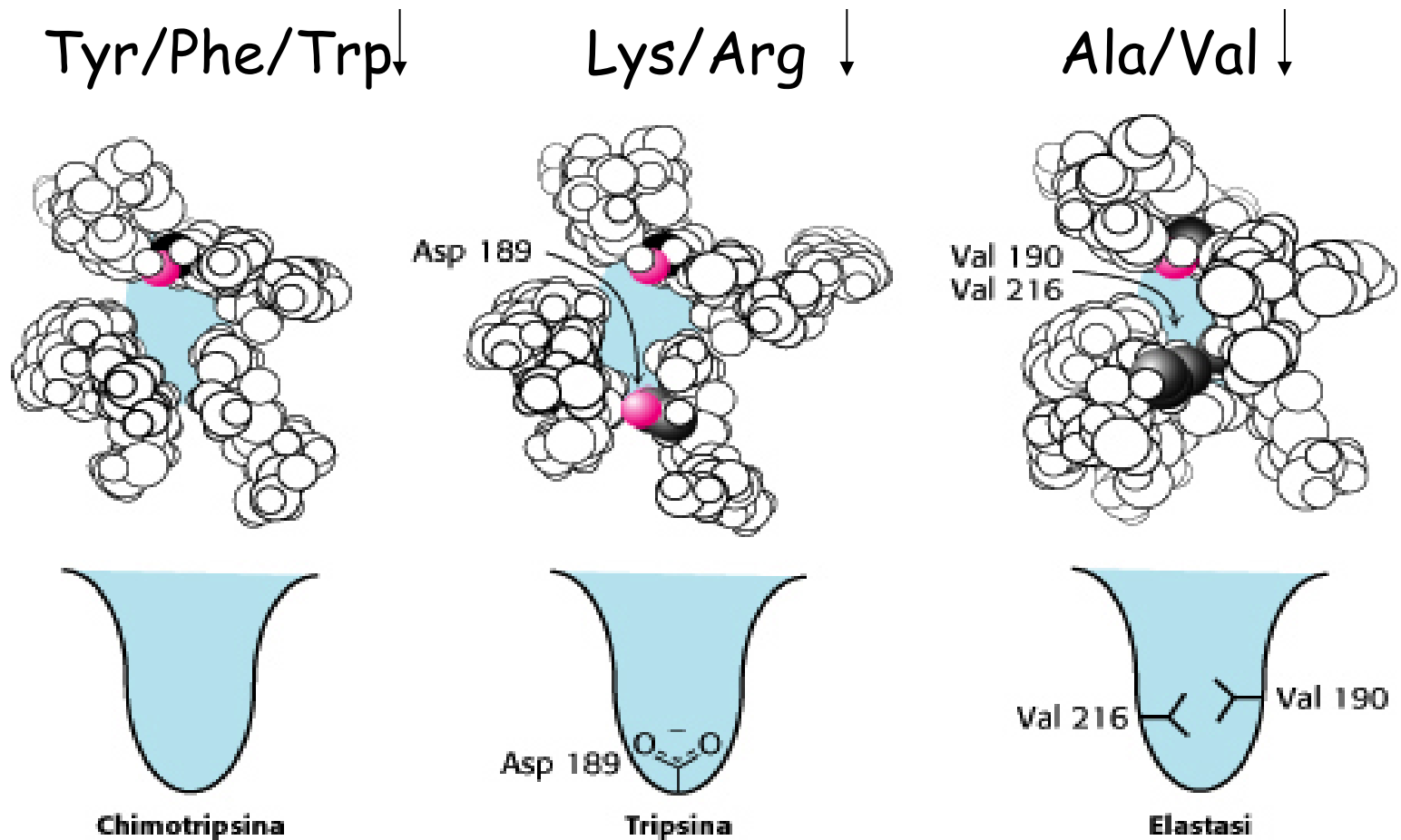


Le sequenze amminoacidiche della tripsina, chimotripsina ed elastasi sono identiche per circa il 40% e le loro strutture sono molto simili.

Agiscono attraverso un **meccanismo catalitico uguale**

Specificità delle serina-proteasi

Studi ai raggi X hanno chiarito che la **diversa specificità** è dovuta a **piccole differenze nella struttura del sito di legame del substrato**

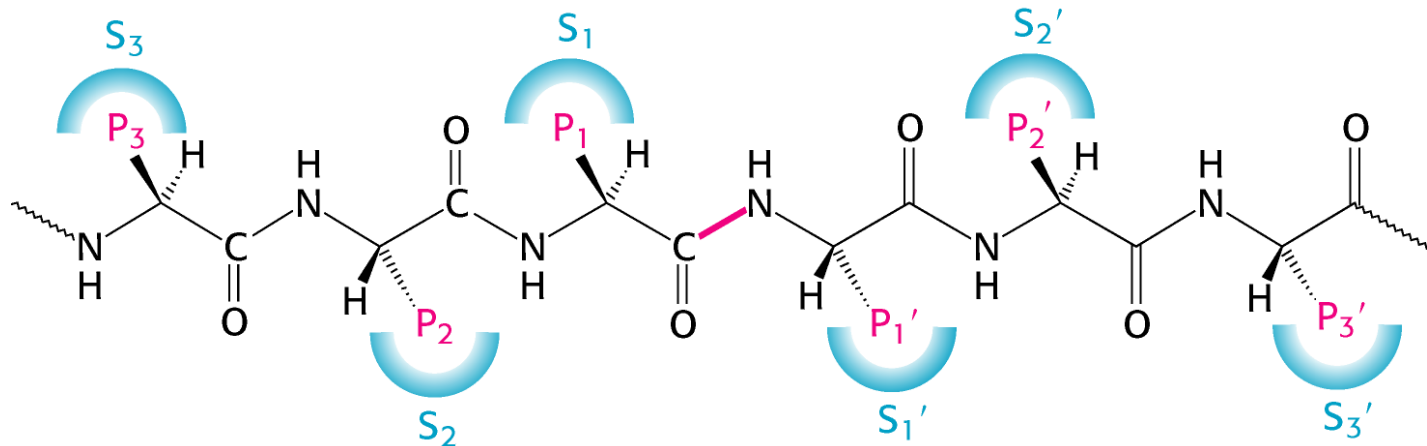


La tasca di specificità

Specificità delle serina-proteasi

Interazione primaria **S1-P1**

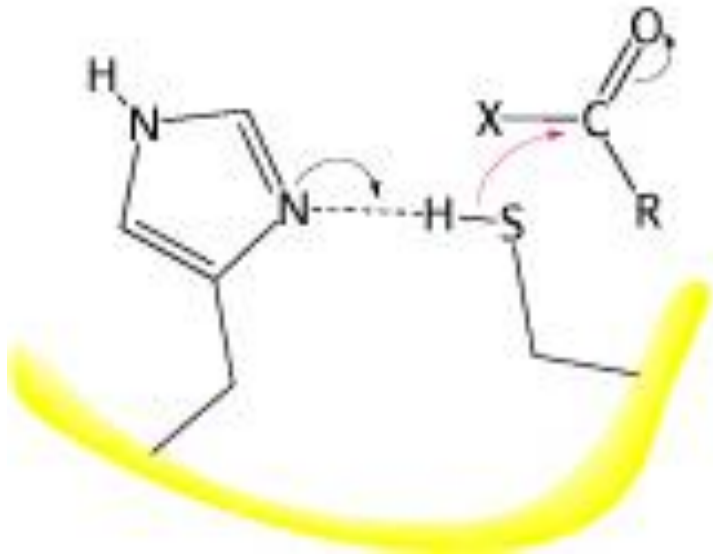
Interazioni secondarie



I siti potenziali di interazione del **substrato** con l'enzima sono indicati come **P** e i siti di legame corrispondenti sull'**enzima** sono indicati con le **S**.

ALTRE STRATEGIE PER IDROLIZZARE IL LEGAME PEPTIDICO

CISTEINA PROTEASI

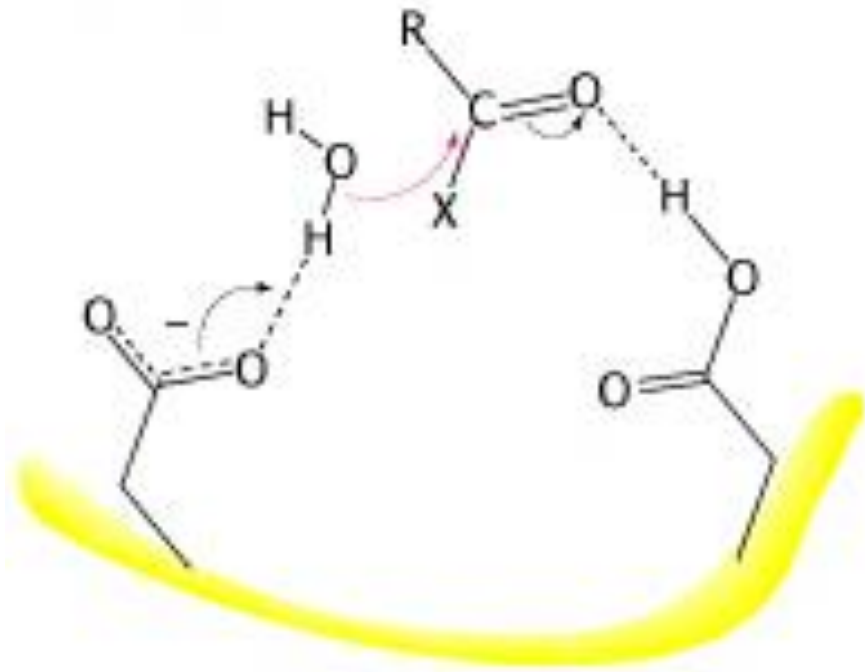


Catepsine: enzimi lisosomiali, degradano proteine cellulari, ruolo importante nel sistema immunitario

Caspasi: ruolo nell'apoptosi

Papaina, bromelina

ASPARTATO PROTEASI

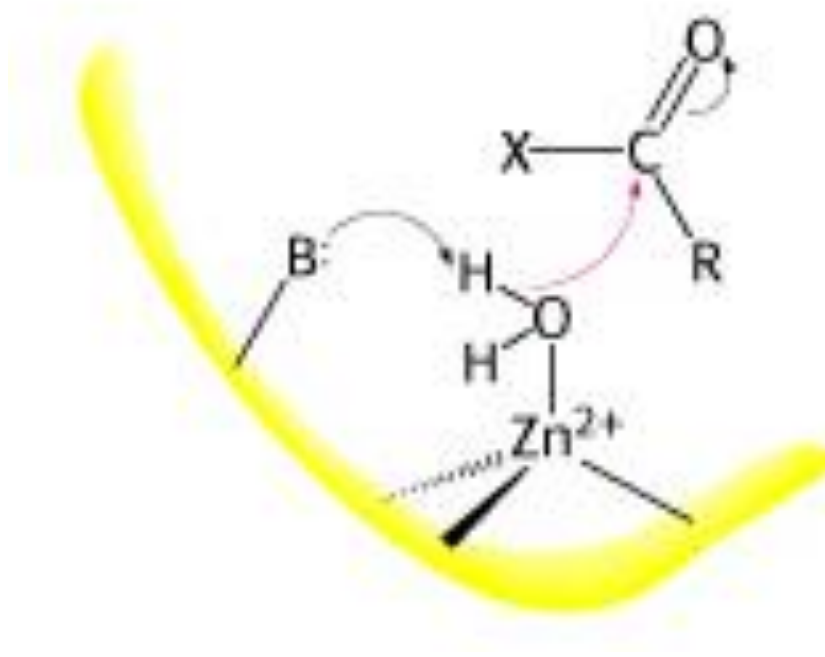


Pepsina: degrada le proteine alimentari che giungono nello stomaco

Renina: partecipa alla regolazione della pressione del sangue

Proteinasi di HIV: taglia le proteine multidominio del virus producendo le forme virali attive

METALLO PROTEASI



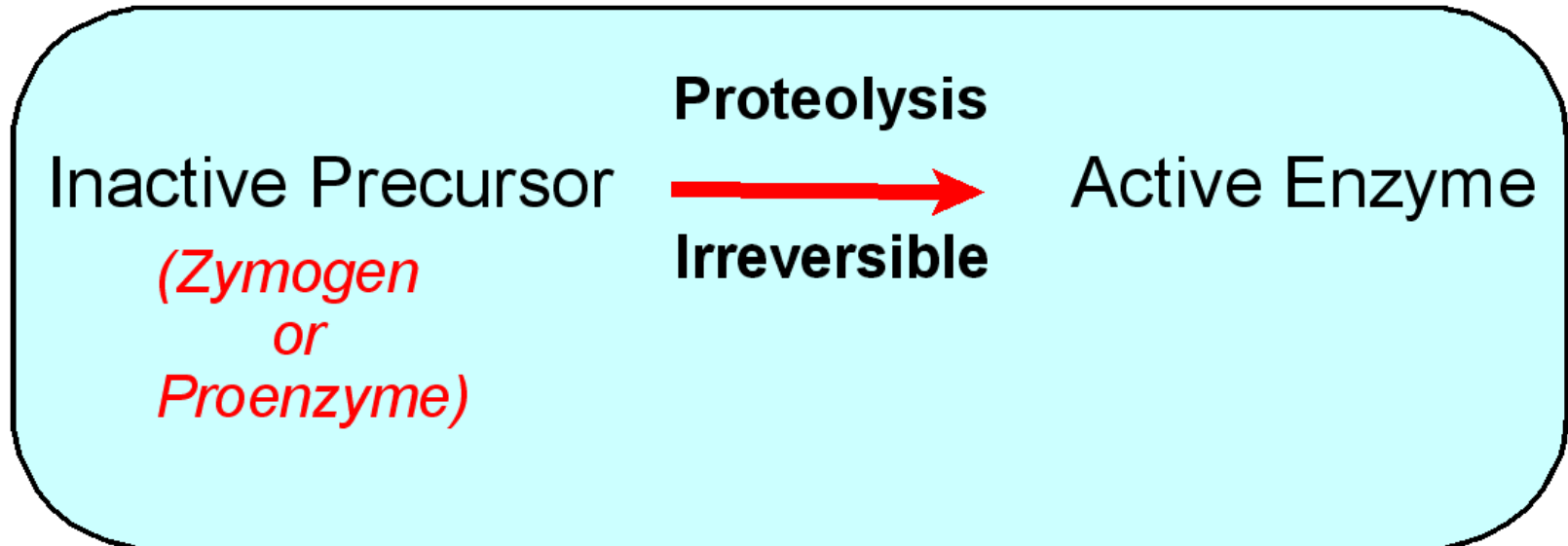
Collagenasi: metallo-proteasi della matrice extracellulare

Carbossipeptidasi: enzimi digestivi

ATTIVAZIONE SERINA PROTEASI

Mediante modificazione
posttraduzionale irreversibile
proteolisi

Regulation of Enzymic Activity Partial Proteolysis: Activation of Zymogens



L'attivazione mediante proteolisi, a differenza del controllo allosterico e delle modificazioni covalenti reversibili, **avviene una volta sola nella vita di un enzima**

Zimogeni

- Gli **zimogeni** sono strutture di **grandi dimensioni**, inattive.
- La differenza fra **zimogeno** ed **enzima attivo** sta nel fatto che **negli zimogeni il sito attivo di catalisi è distorto**, il peptide substrato non riesce a legarsi in modo efficace e la proteolisi non può avere luogo.
- La proteolisi limitata a carico dello zimogeno → **cambi strutturali e conformazionali** (tasca per il substrato, sito attivo, incavo dell'ossianione) → attività dell'enzima

La proteolisi specifica è una modalità comune di attivazione di enzimi o di altre proteine

Alcuni enzimi vengono attivati irreversibilmente per proteolisi limitata specifica (attivazione degli zimogeni):

- ENZIMI DIGESTIVI (es Chimotripsina)
- ENZIMI COINVOLTI NEL RIMODELLAMENTO DEI TESSUTI (es Collagenasi)
- ENZIMI DELLA COAGULAZIONE DEL SANGUE (es Trombina)
- ENZIMI COINVOLTI NELL'APOPTOSI (es.Caspasi)

Anche altre **proteine non enzimatiche** possono essere attivate irreversibilmente per proteolisi limitata:

- proteina strutturale: PROCOLLAGENO → COLLAGENO
- ormone: PROINSULINA → INSULINA

Proteasi ed inibitori

- **Necessità dell'organismo di controllare le proteasi** → sviluppo di **inibitori**.

L'incapacità di controllare le proteasi, che può essere causata da un **deficit di un loro specifico inibitore**, può portare a conseguenze "deleterie" per l'organismo.

- **Serpine** : **inibitori delle serina proteasi**

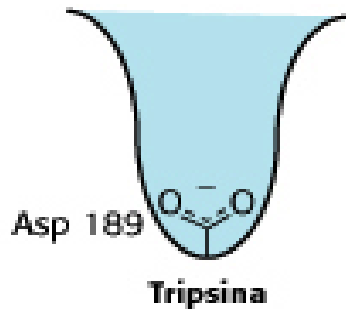
Circa il 20% delle proteine che si trovano nel **plasma sanguigno** sono serpine.

La loro abbondanza riflette la loro importanza: **fermare l'attività proteolitica** quando è necessario che si concluda.

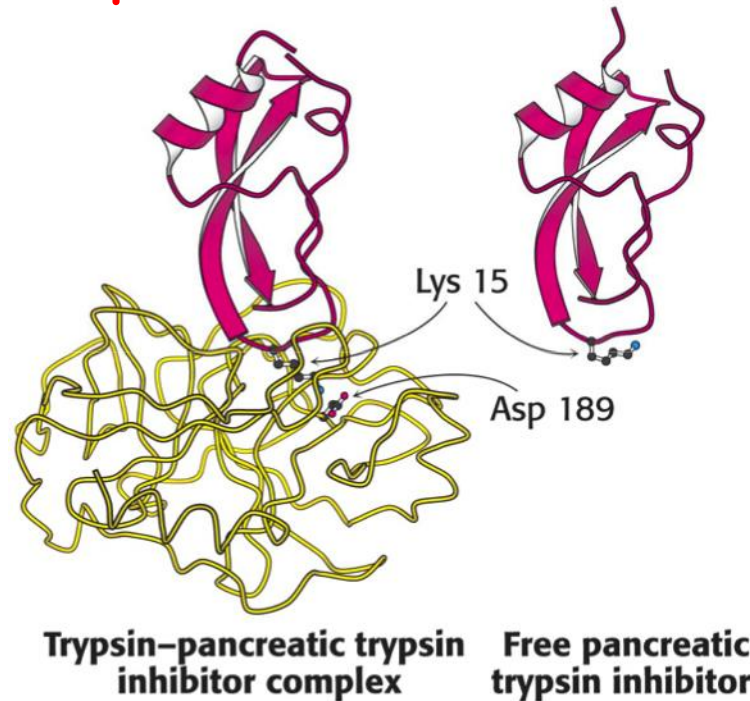
Questo è specialmente importante per i sistemi della coagulazione e del complemento, cascate enzimatiche in rapida amplificazione.

Proteasi ed Inibitori

Esempio: **Inibitore pancreatico della tripsina**



La tasca di specificità



Analogo del substrato

L'inibitore pancreatico della tripsina impedisce che anche piccolissime quantità di tripsina possano essere attivate già nel pancreas o nei dotti biliari con conseguente gravissimo danno tissutale (pancreatite acuta)

Proteasi ed Inibitori

L' **α 1-antitripsina** (**α 1-antiproteasi**) e' un **inibitore** della **elastasi** (secreta dai neutrofili).

Difetti genetici (es omozigosi lys53-Glu, allele Z) che portano a **deficit di questo inibitore** si associano a danni degli alveoli polmonari per aumentata degradazione delle fibre elastiche ad opera dell'elastasi (**enfisema polmonare**).

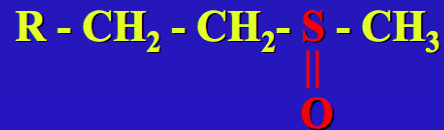
Il **fumo** di sigaretta aumenta la probabilità che anche un **eterozigote** sviluppi l'**enfisema**

Il fumo di sigaretta ossida il residuo metionina 358 dell' α_1 -antitripsina, un inibitore dell'elastasi, aumentando il rischio di enfisema.



Metionina 358

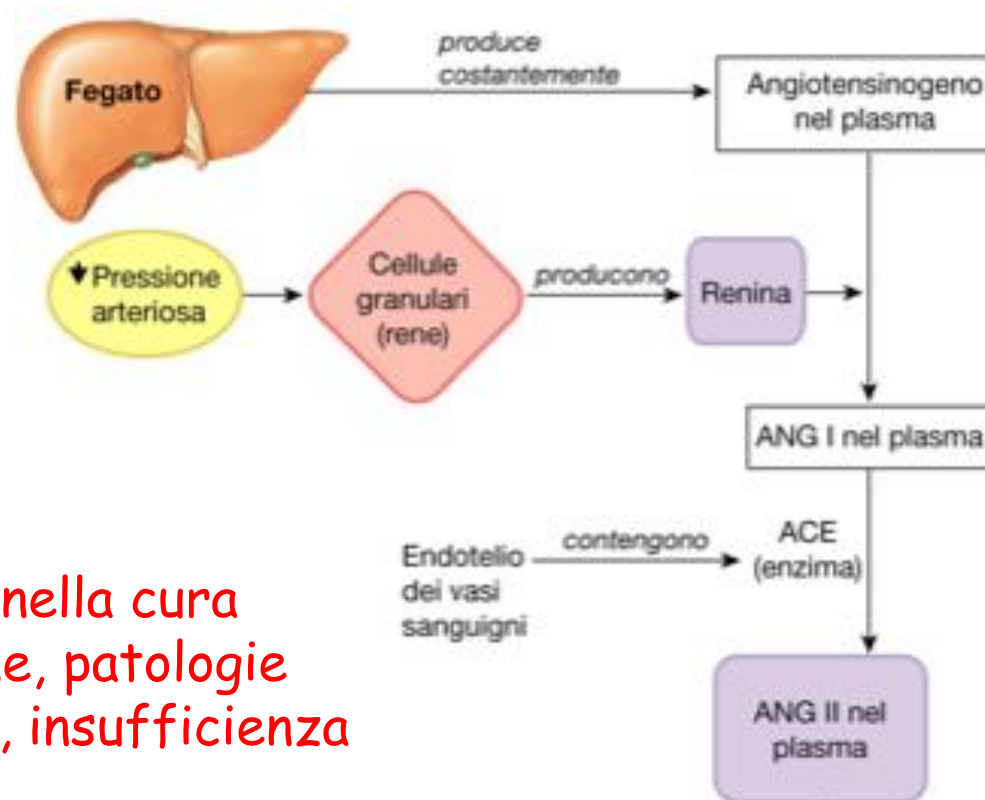
Ossidazione



Derivato sulfossido

ALCUNI FARMACI SONO INIBITORI SPECIFICI DI PROTEASI

Gli ACE inibitori (es *captopril*) inibiscono l'Enzima che converte l'angiotensina (ACE), una metalloproteasi.



Sono utilizzati nella cura dell'ipertensione, patologie cardiovascolari, insufficienza renale.

ACE inibitori

ALCUNI FARMACI SONO INIBITORI SPECIFICI DI PROTEASI

L' *indinavir* e il retrovir sono **inibitori** della proteasi dell'HIV, una aspartico proteasi (cura dell'AIDS).

Questa proteasi taglia le proteine virali multidominio producendo proteine virali mature, indispensabili per la forma infettiva del virus.

L'inibitore mima lo stato di transizione tetraedrico.

Proteasi digestive

Le proteine ingerite con **la dieta** vengono degradate nello stomaco e nell'intestino tenue da parte di proteasi.

La maggior parte delle proteasi digestive vengono prodotte come **zimogeni**.

GLI ENZIMI DIGESTIVI CHE IDROLIZZANO LE PROTEINE,
INTRODOTTE CON LA DIETA, SONO SINTETIZZATI COME
ZIMOGENI

Site of synthesis	Zymogen	Active enzyme
Stomach	Pepsinogen	Pepsin
Pancreas	Chymotrypsinogen	Chymotrypsin
Pancreas	Trypsinogen	Trypsin
Pancreas	Procarboxypeptidase	Carboxypeptidase
Pancreas	Proelastase	Elastase

Digestione delle proteine

Ingresso di una proteina **nello stomaco**

↓
gastrina (ormone)

↓
HCL

↓
pepsinogeno

↓
pepsina

Ingresso peptidi nel **duodeno**

↓ **(pH acido)**

↓
secretina (ormoni) colecistochinina

↓ **pancreas**

HCO₃⁻ (pH neutro)

↓ **pancreas**

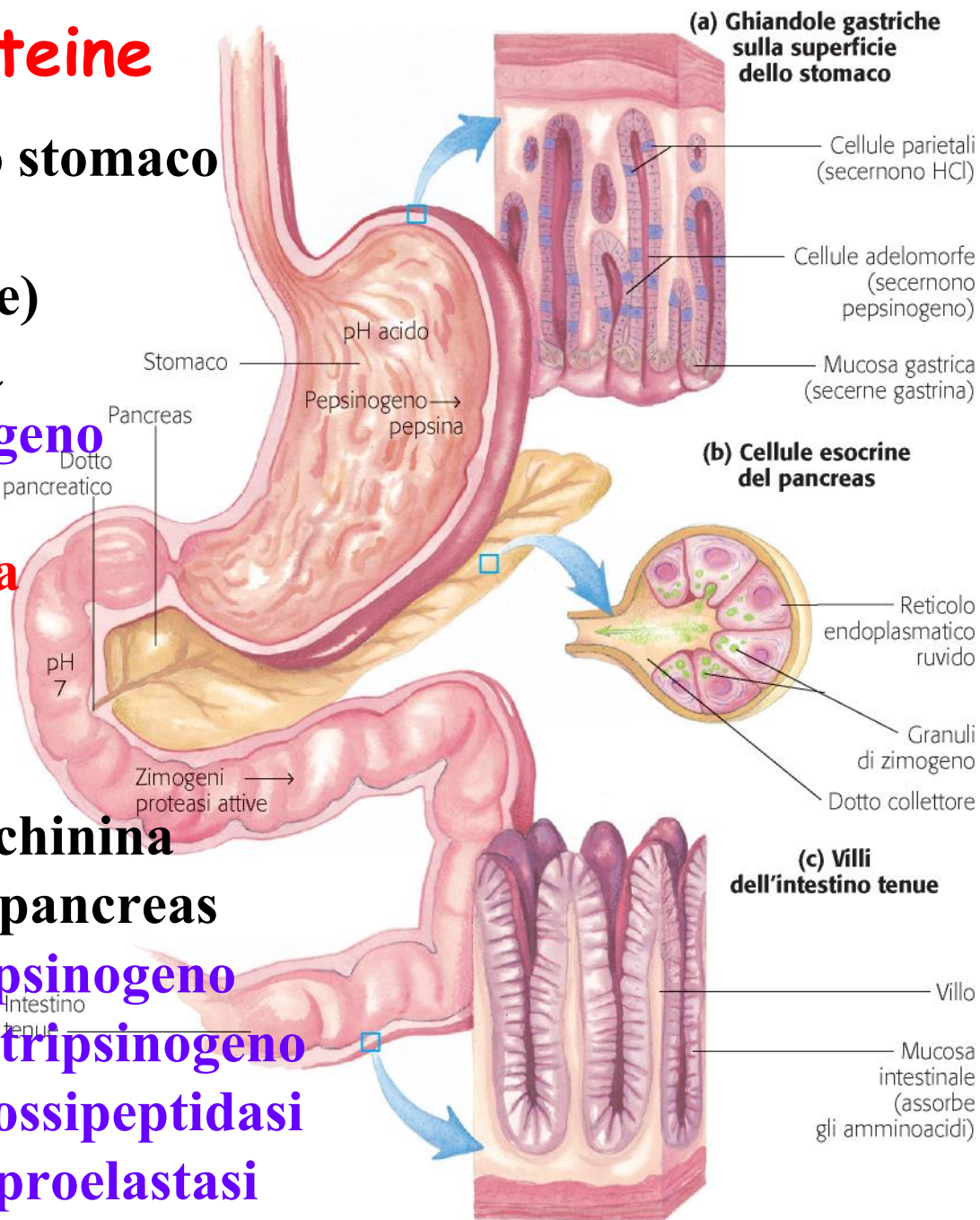
trypsinogeno

chymotrypsinogeno

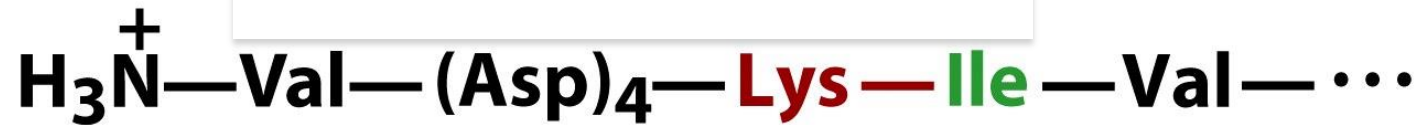
procarbossipeptidasi

proelastasi

zimogeni



ATTIVAZIONE DEL TRIPSINOGENO



Trypsinogen

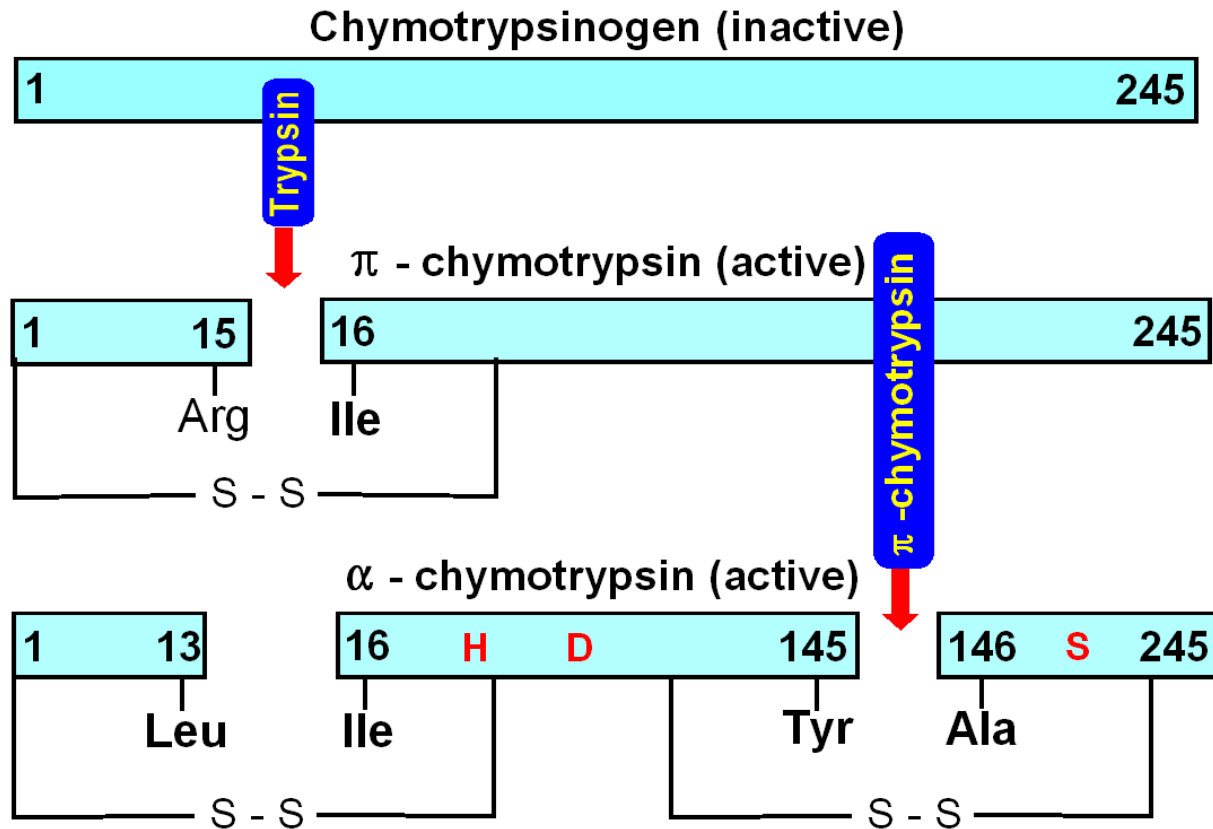
↓ enteropeptidase or
trypsin



Trypsin

ATTIVAZIONE DEL CHIMOTRIPSINOGENO

Activation of Chymotrypsin - Partial Proteolysis



Secrezione pancreatica

- **Componente proteica**
 - **Enzimi proteolitici**
 - Endopeptidasi (Tripsina, Chimotripsina, Elastasi)
 - Esopeptidasi (Carbossipeptidasi A e B)
 - **Enzimi glicolitici**
 - Alfa amilasi
 - **Enzimi lipolitici**
 - Lipasi pancreatica
- **Tutti gli enzimi vengono secreti come proenzimi e vengono attivati nel lume intestinale**

La tripsina è l'attivatore comune di molti zimogeni

