# Complessi multienzimatici

Complesso di enzimi caratterizzati da una precisa stechiometria e struttura che catalizza una serie di reazioni correlate  Alcuni esistono come un insieme di polipeptidi altri da un’unica catena proteica possono essere  presenti interazioni allosteriche  e accoppiamento di siti attivi

# Triptofano sintasi

## esempio di incanalamento di substrati

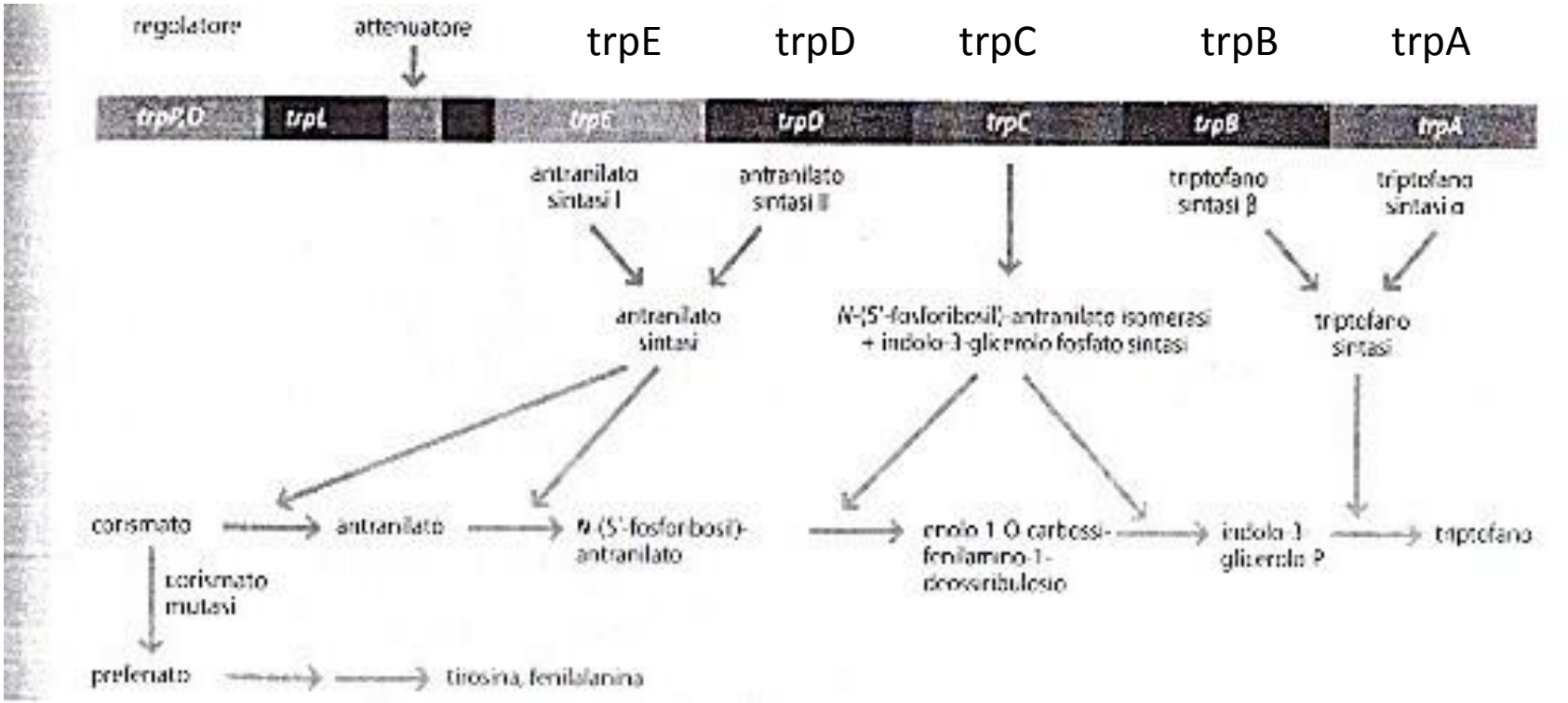
Tripofano sintasi : tetramero α2β2

trpB  subunità β : indol-3 glicerol P

trpA subunità  α: indolo + serina

Indolo composto reattivo e  tossico e biosinteticamente costoso

Ciascuna subunità  isolata è 100 volte meno attiva di quella coinvolta nel complesso

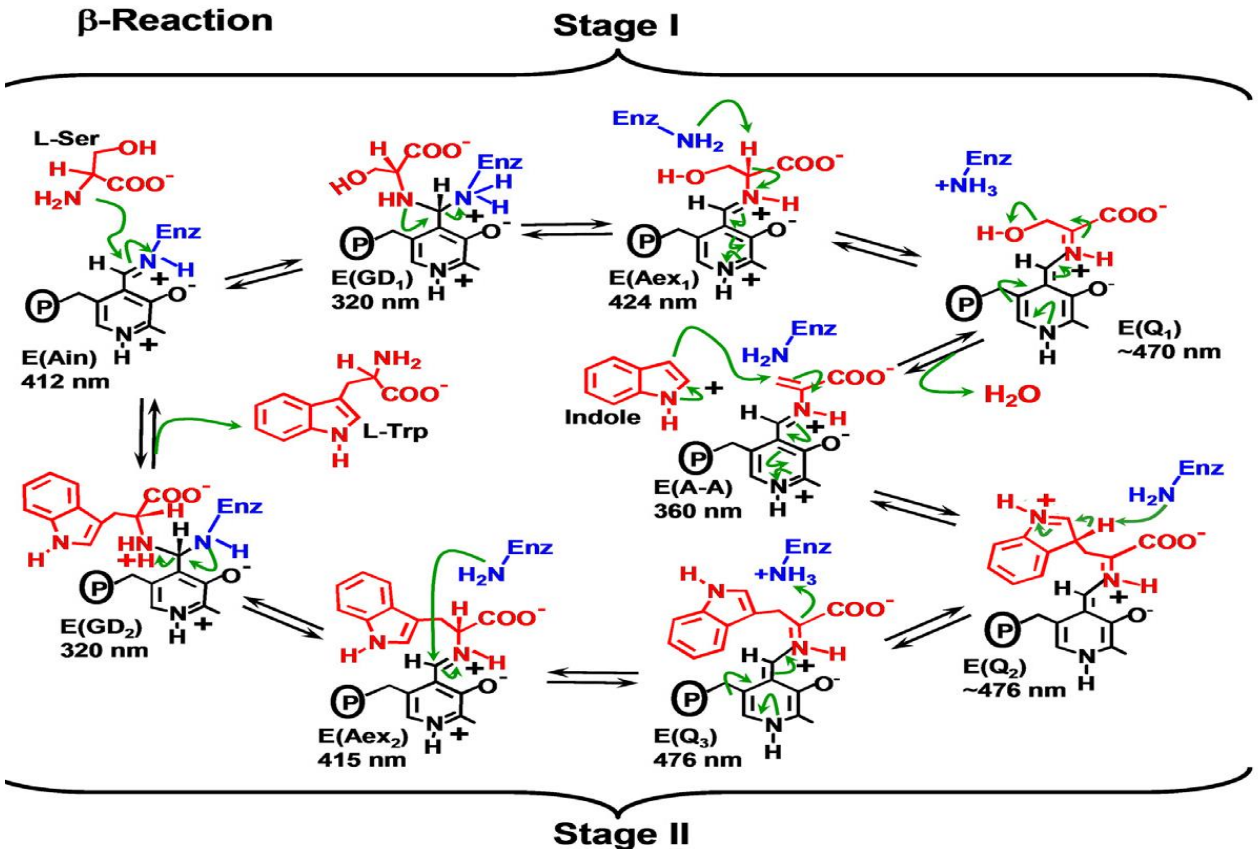


α-Reaction

IGP ⇌ Indole + G3P (eq. 1)

β-Reaction

Indole + L-Ser → L-Trp + $H_2O$ (eq. 2)



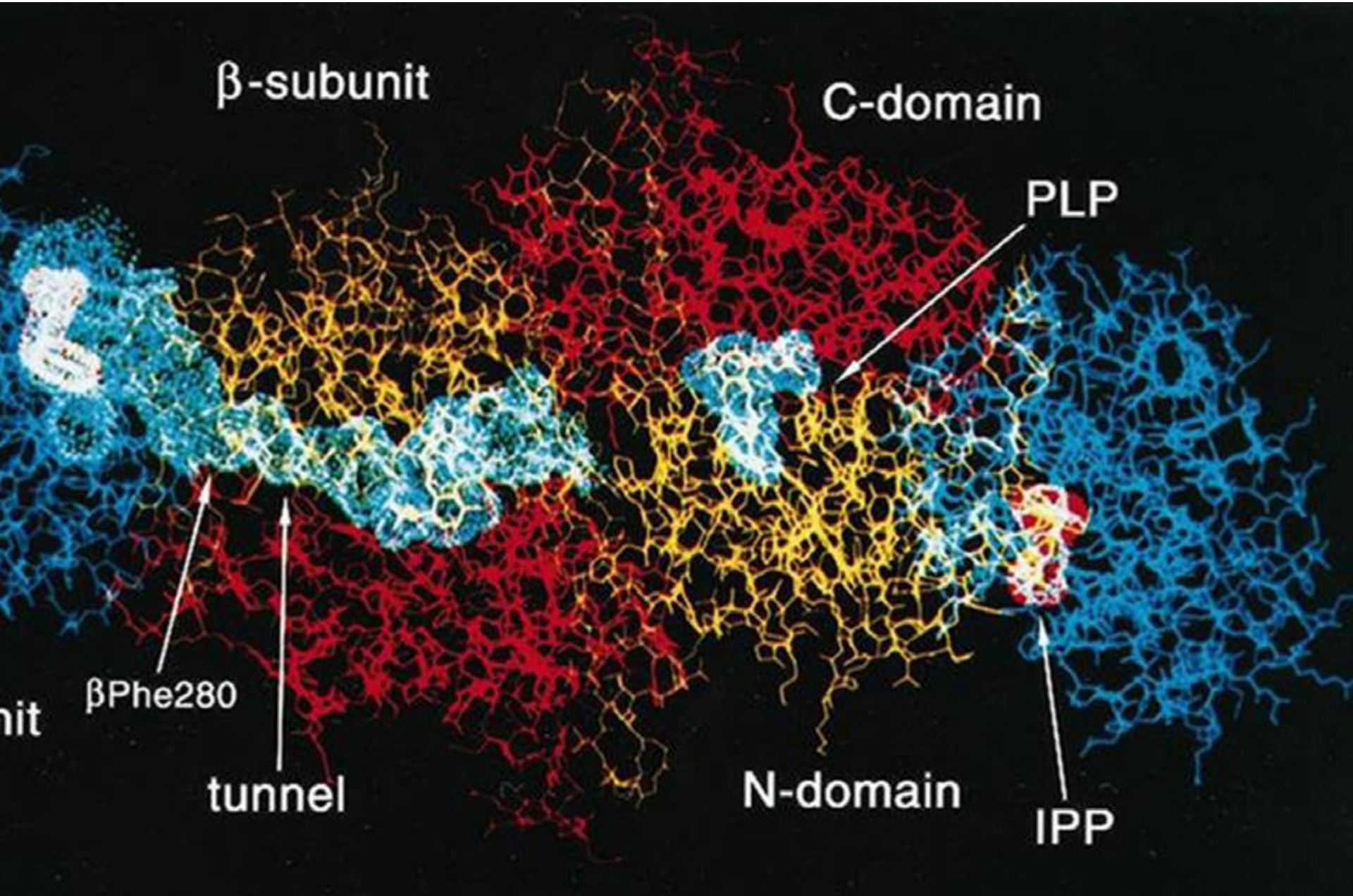
- # Evidenze per l'incanalamento del substrato

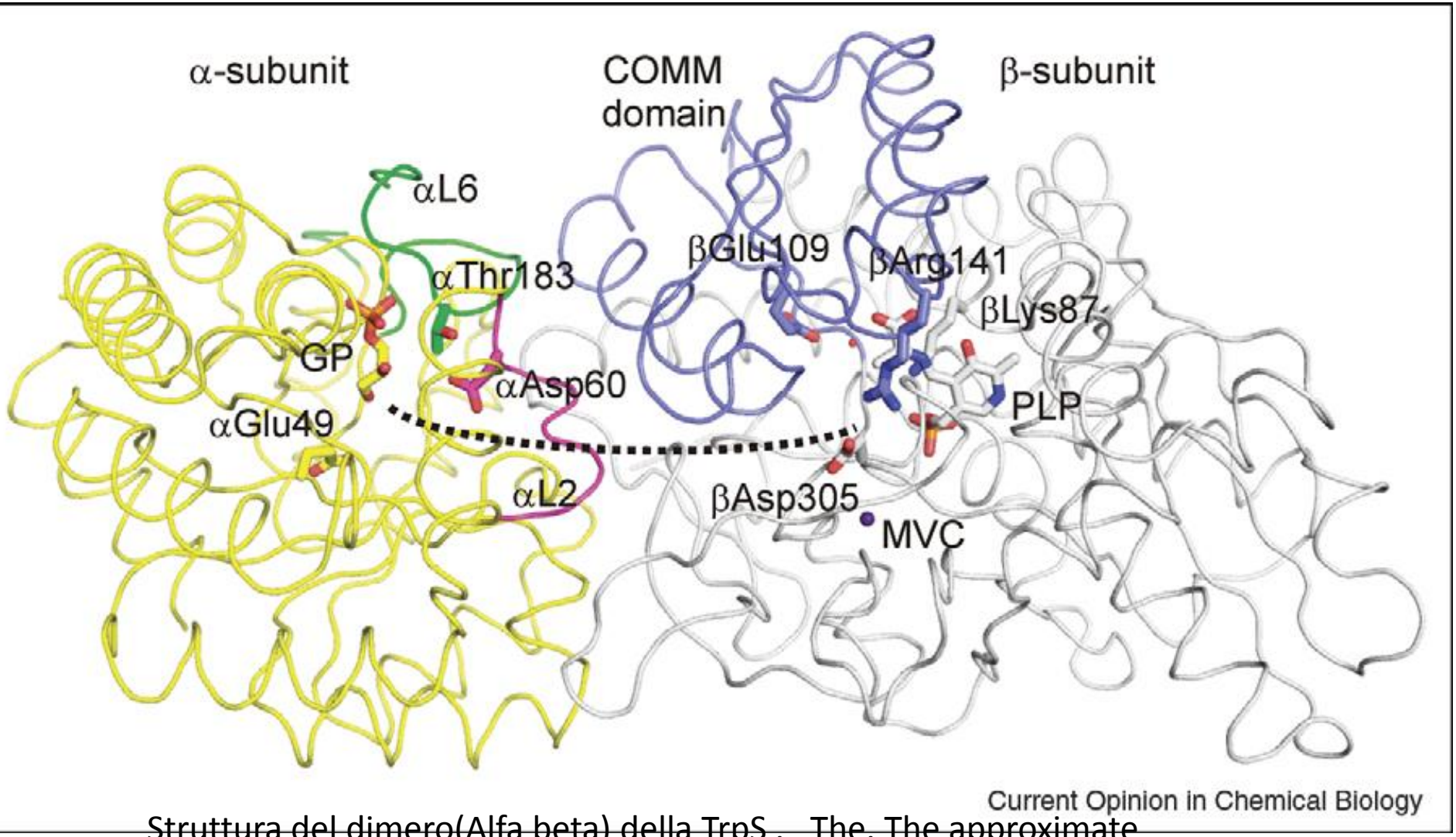
L'indolo non è rilasciato in soluzione

Struttura cristallografica 1988 della triptofano sintasi di Salmonella typhimurium con l'analogo del substrato IPP **indolo 3 propanolo fosfato** ha evidenziato un canale idrofobico

Studi di cinetica rapida con analoghi del substrato hanno evidenziato il cambiamento conformazionale della subunità alfa : il rilascio dell'indolo è rallentato dal legame on la subunità alfa

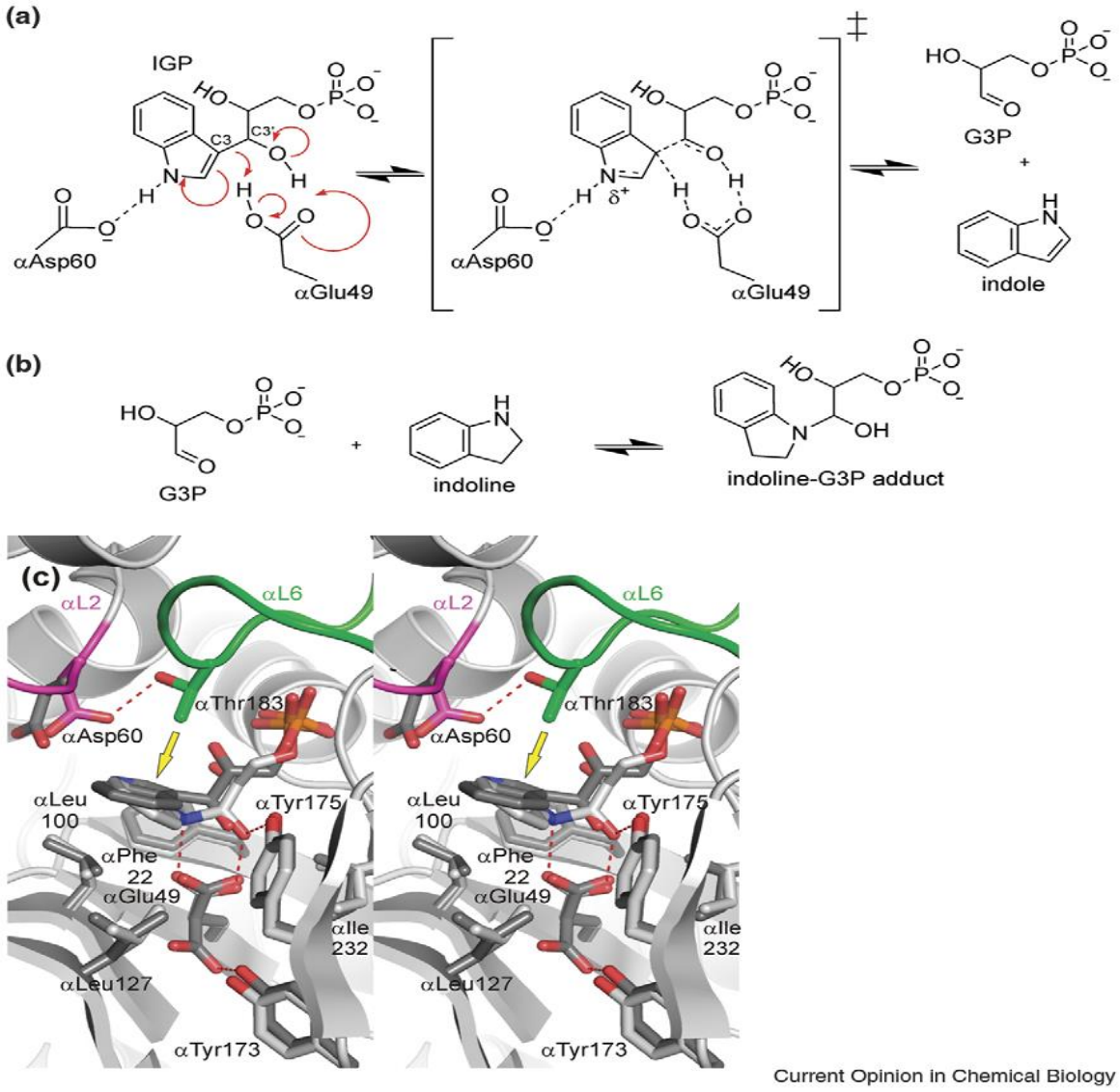
Struttura cristallografica di mutanti hanno evidenziato il cambiamento conformazionale : la conformazione aperta è caratterizzata dalla presenza di un loop L6 disordinato nella subunità alfa


β-subunit
C-domain
PLP
βPhe280
tunnel
N-domain
IPP




Struttura del dimero(Alfa beta) della TrpS . The. The approximate path of the tunnel connecting the a and b active sites is indicated by the dashed line. Molecular graphics were prepared using PyMol [47].

# Reazione della subunità alfa

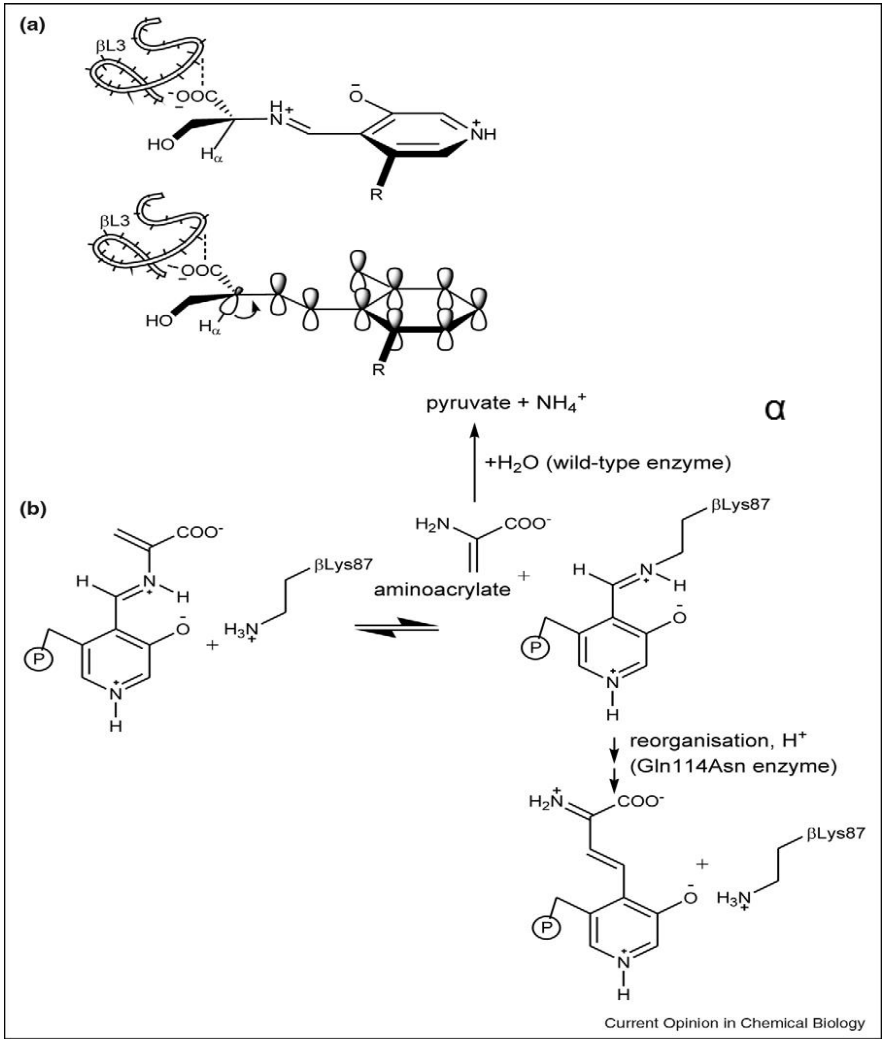



A Il Glu49 trasfersce un protone da C3'-OH a C3, mentre Asp60 stabilizza la carica che si forma sull'azoto.

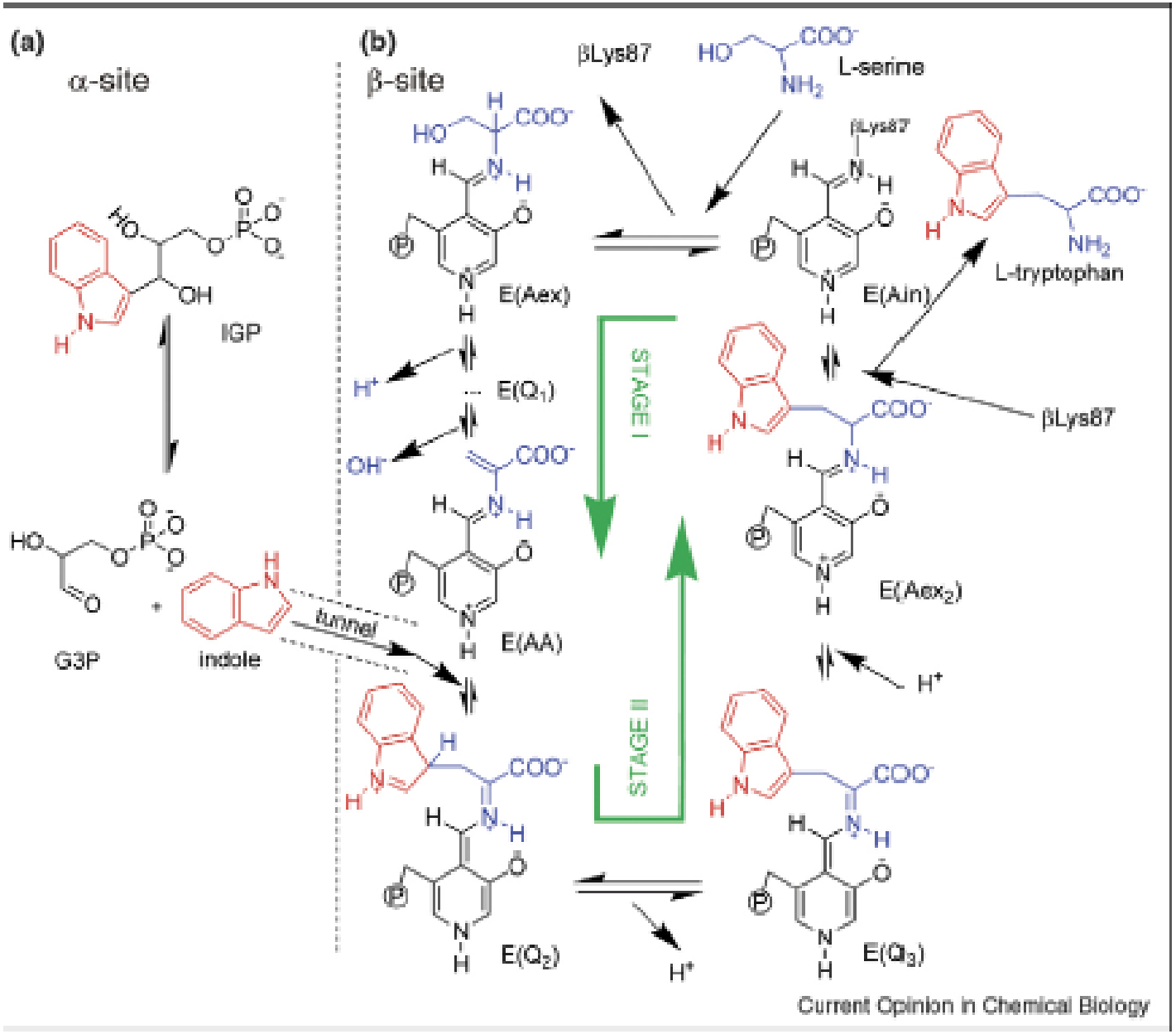
B reazione tra G3P e indolina per formare l'addotto indolina G3P che mima lo stato di transizione

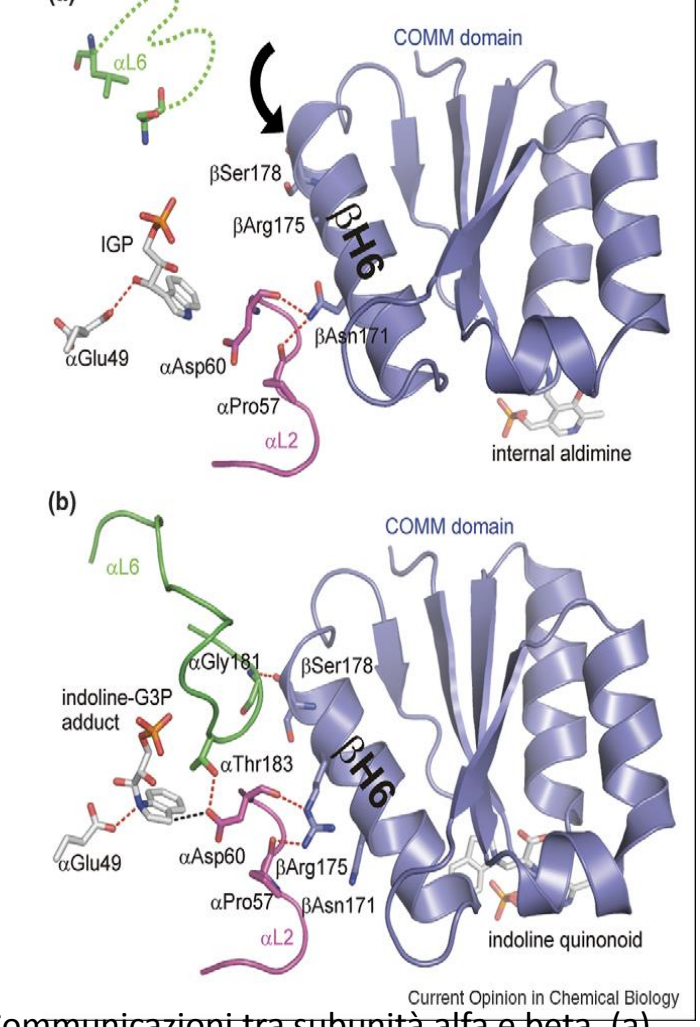
C struttura della sub alfain assenza e in presenza del substrato (cambiamento conformazionale

meccanismo di reazione della subunità beta formazione dell'aldimina esterna

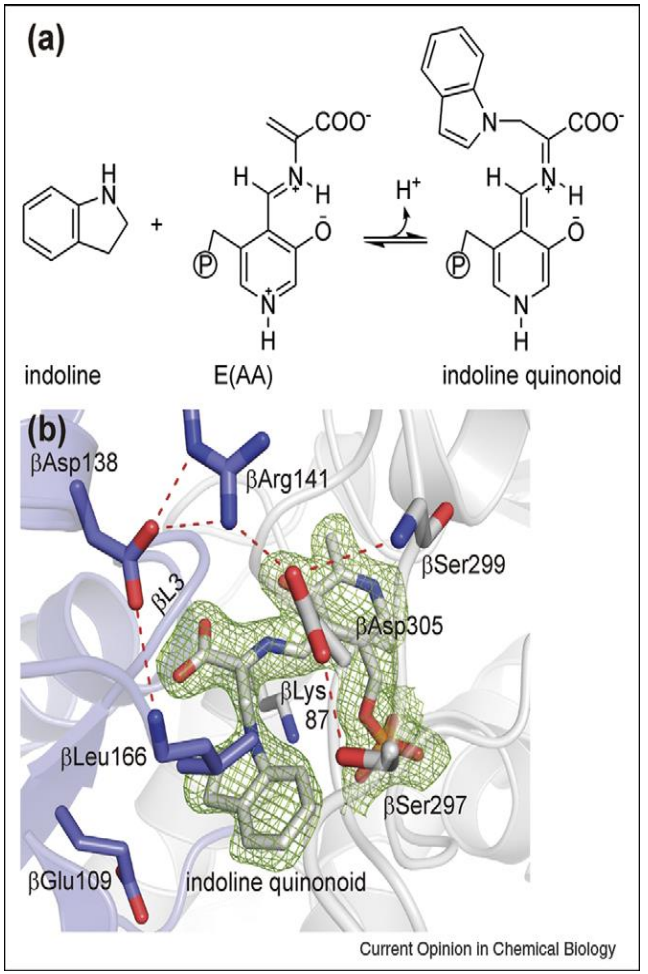



βL3 blocca la posizione del gruppo carbossilico del substrato perpendicolarmente al piano dei legami π PLP Quando viene rimosso il protone l'elettrone può essere delocalizzato e questo destabilizza il legame Cα–Hα.

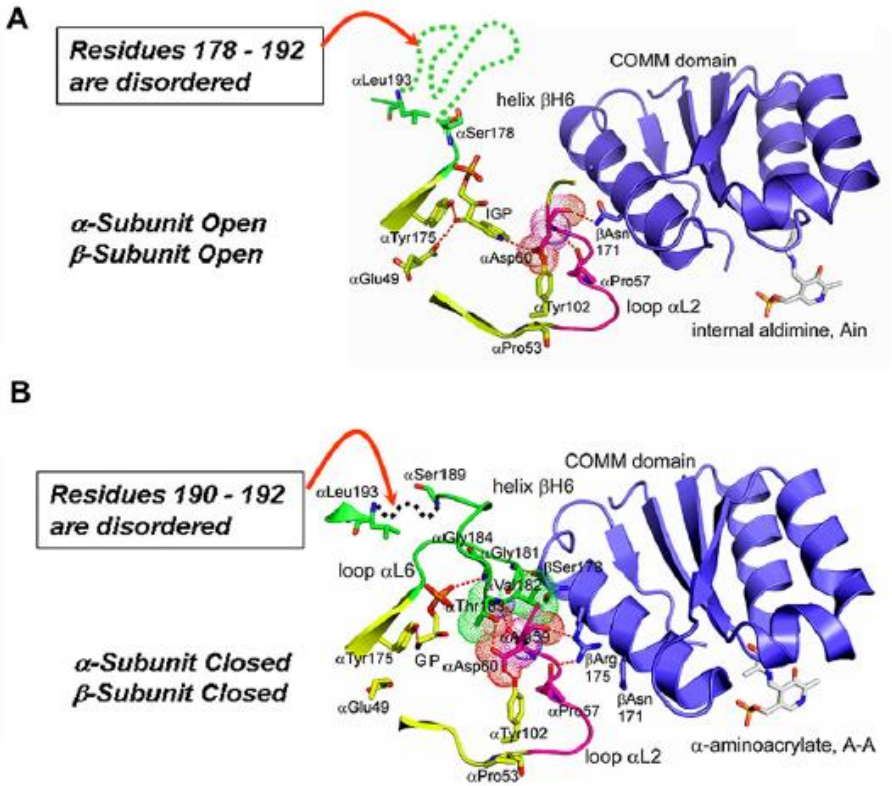

(a)
α-site
IGP
G3P
indole
tunnel
(b)
β-site
βLys87
L-serine
E(Aex)
E(Ain)
L-tryptophan
E(Q1)
E(AA)
E(Aex2)
STAGE I
STAGE II
E(Q2)
E(Q3)
Current Opinion in Chemical Biology



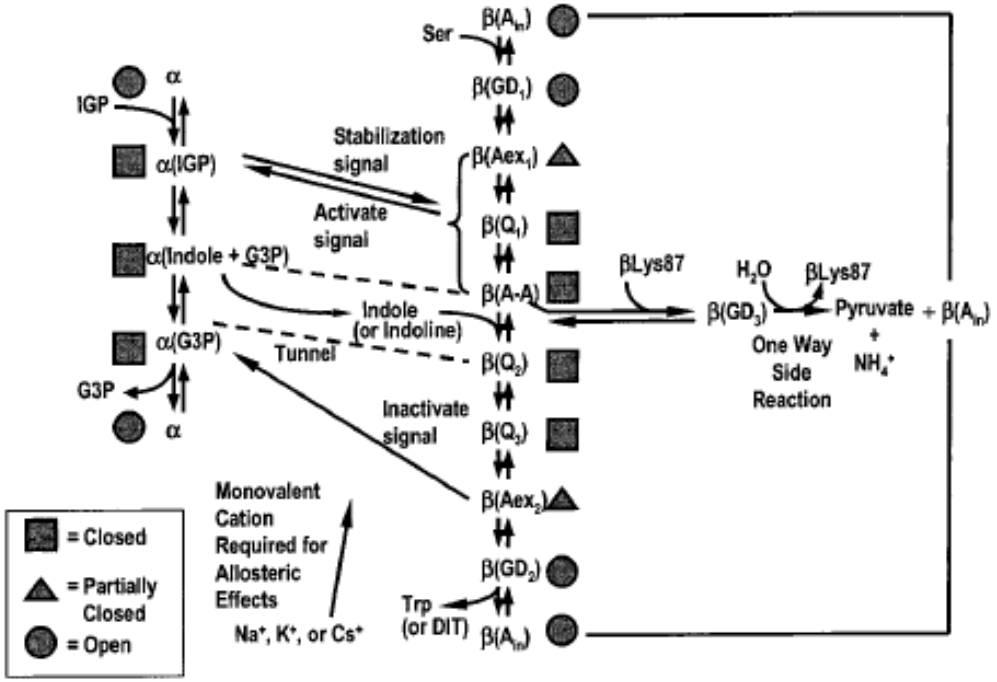

Communicazioni tra subunità alfa e beta. (a) subunità alfa e beta in conformazione aperta in assenza di . IGP del secondo substrato IGP è legato Glu49 il Loop L6 (verde) è disordinato il loop aL2 interagisce con l'elica beta 6
(b) Struttura in presenza dell'intermedio indoline-G3P alfa e beta site and b site in conformazione chiusa. Loop L6 è ordinato e anche loop alfa L2 è spostato vicino Arg175 della subunità beta



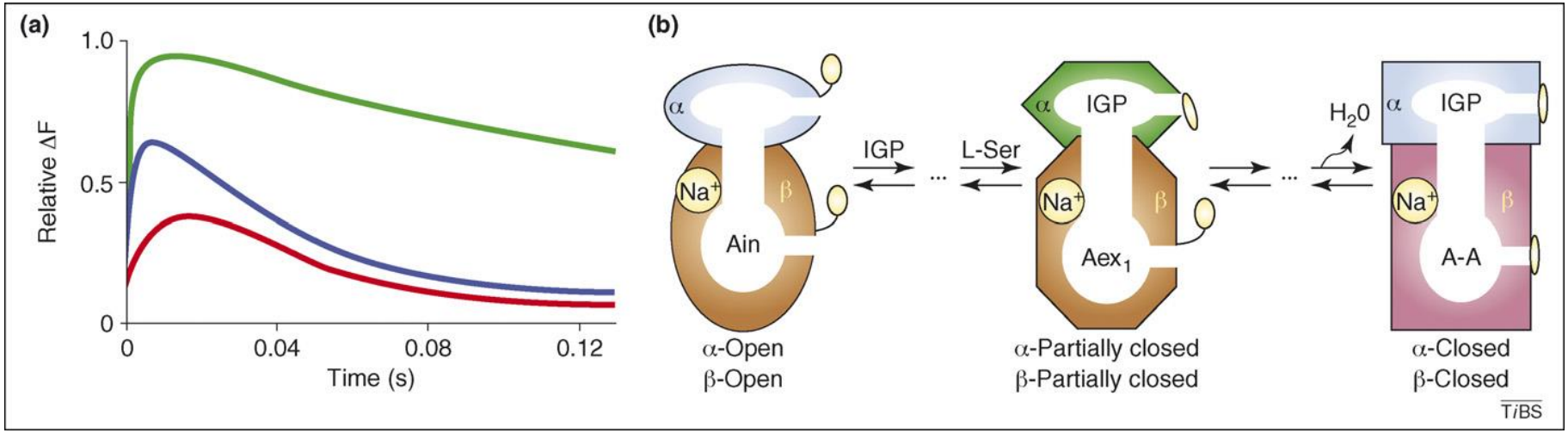

Sito attivo in presenza dell'indolina G3P


A
Residues 178 - 192
are disordered
α-Subunit Open
β-Subunit Open
COMM domain
helix βH6
αLeu193
αSer178
IGP
αTyr175
αGlu49
αAsp60
βAsn
171
αPro57
αTyr102
loop αL2
αPro53
internal aldimine, Ain
B
Residues 190 - 192
are disordered
α-Subunit Closed
β-Subunit Closed
COMM domain
helix βH6
αLeu193
αSer189
αGly184
αGly181
loop αL6
αTyr175
GP
αAsp60
βArg
175
αGlu49
αPro57
βAsn
171
αTyr102
loop αL2
αPro53
α-aminoacrylate, A-A
C
α
β
Na+
Ain
IGP
L-Ser
H2O
α
IGP
Na+
β
A-A
α-open
β-open
α-closed
β-closed

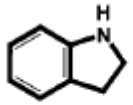
Scheme 2: Schematic Representation of the Allosteric Signals between the α- and β-Sites[a]



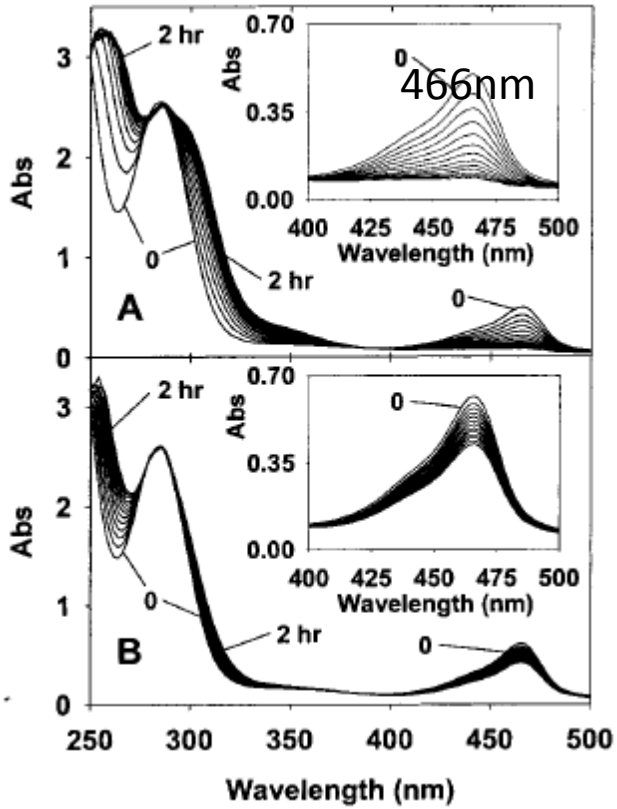

[a] When IGP binds to the α-site, the α-subunit converts to a closed conformation. The closed conformation of the α-site then stabilizes the L-Ser reaction at the β-site. When L-Ser reacts at the β-site, the conversion of E(Aex1) to E(A-A) switches the β-site to the closed conformation and sends an activation signal to the α-site. Once the α-site is activated, IGP is cleaved into G3P and indole; G3P remains bound to the α-site, and the indole is free to migrate along the tunnel to the β-site. Indole is trapped within the closed conformation of the bienzyme complex and can only react with the E(A-A) at the β-site. The reaction of indole with E(A-A) gives two quinonoid intermediates, the L-Trp external aldimine and the geminal diamine species, and then the enzyme is cycled back to E(Ain) with the release of L-Trp. During the transformation of the L-Trp quinonoid species to the external aldimine species, both the α- and the β-sites are converted from the closed to the open conformation releasing G3P, and an inactivation signal is sent to the α-site. The quasi-stable E(A-A) at the β-site can react with water through an irreversible side reaction to form pyruvate and ammonium ion and regenerate E(Ain), but this side reaction occurs at a much slower rate than the indole reaction. All of the allosteric communications between the α- and β-subunits require a monovalent cation bound to the β-subunit. If indoline is used instead of indole, DIT is produced instead of L-Trp.

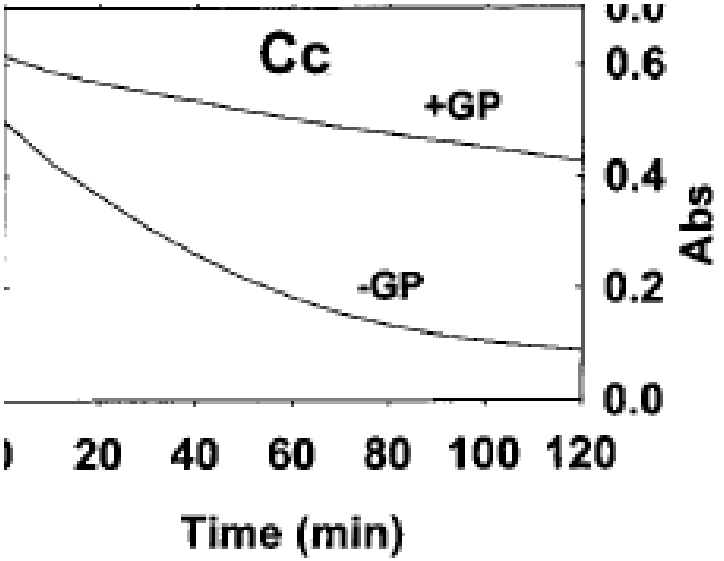

(a)
1.0
0.5
0
Relative ΔF
0
0.04
0.08
0.12
Time (s)
(b)
α
Na+
β
Ain
IGP
L-Ser
α
IGP
Na+
β
Aex1
H20
α
IGP
Na+
β
A-A
α-Open
β-Open
α-Partially closed
β-Partially closed
α-Closed
β-Closed
TiBS

Reazione tra serina e indolina in presenza (A) e assenza (B) di GP (glicerolofosfato)



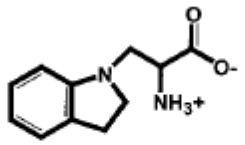

indoline




Serina e indolina reagiscono immediatamente per formare l'intermedio chinonoide( A 466nm) ma in presenza di GP l'intermedio decade lentamente a formare DIT

# Reazioni con DIT




dihydroiso-L-tryptophan

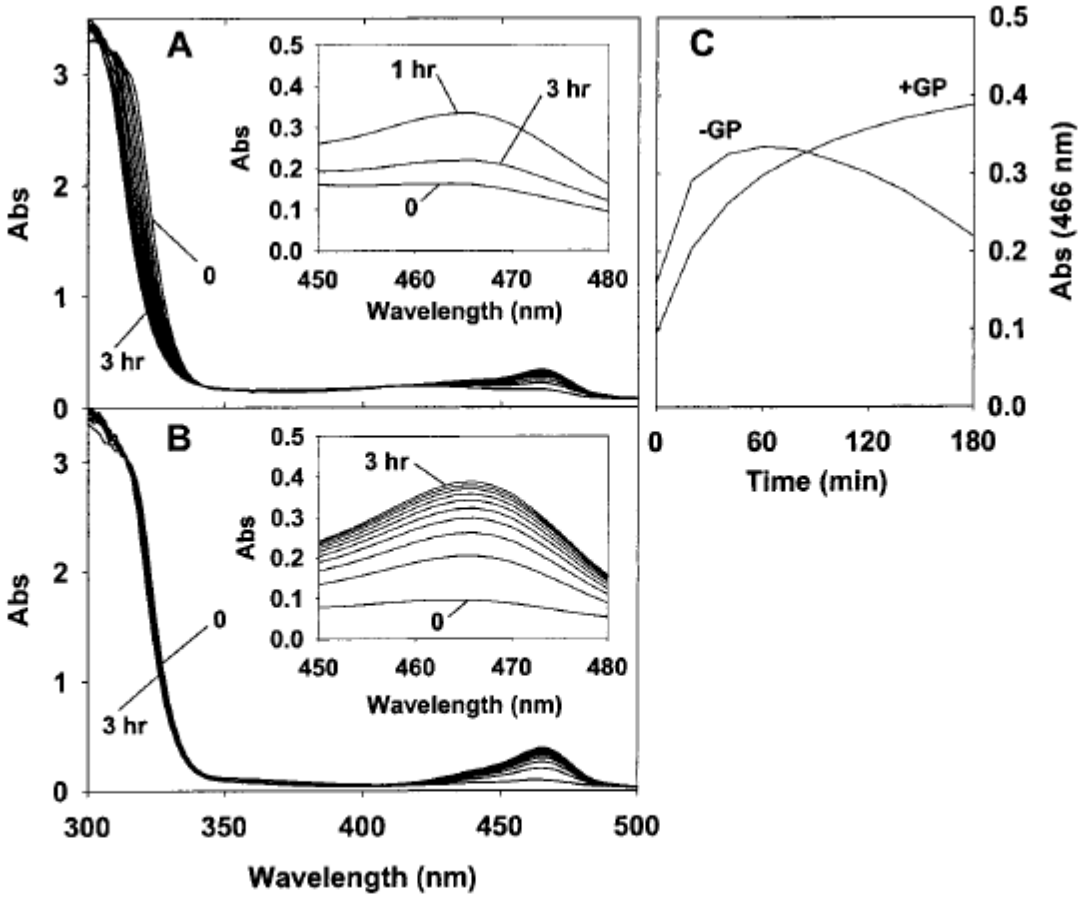
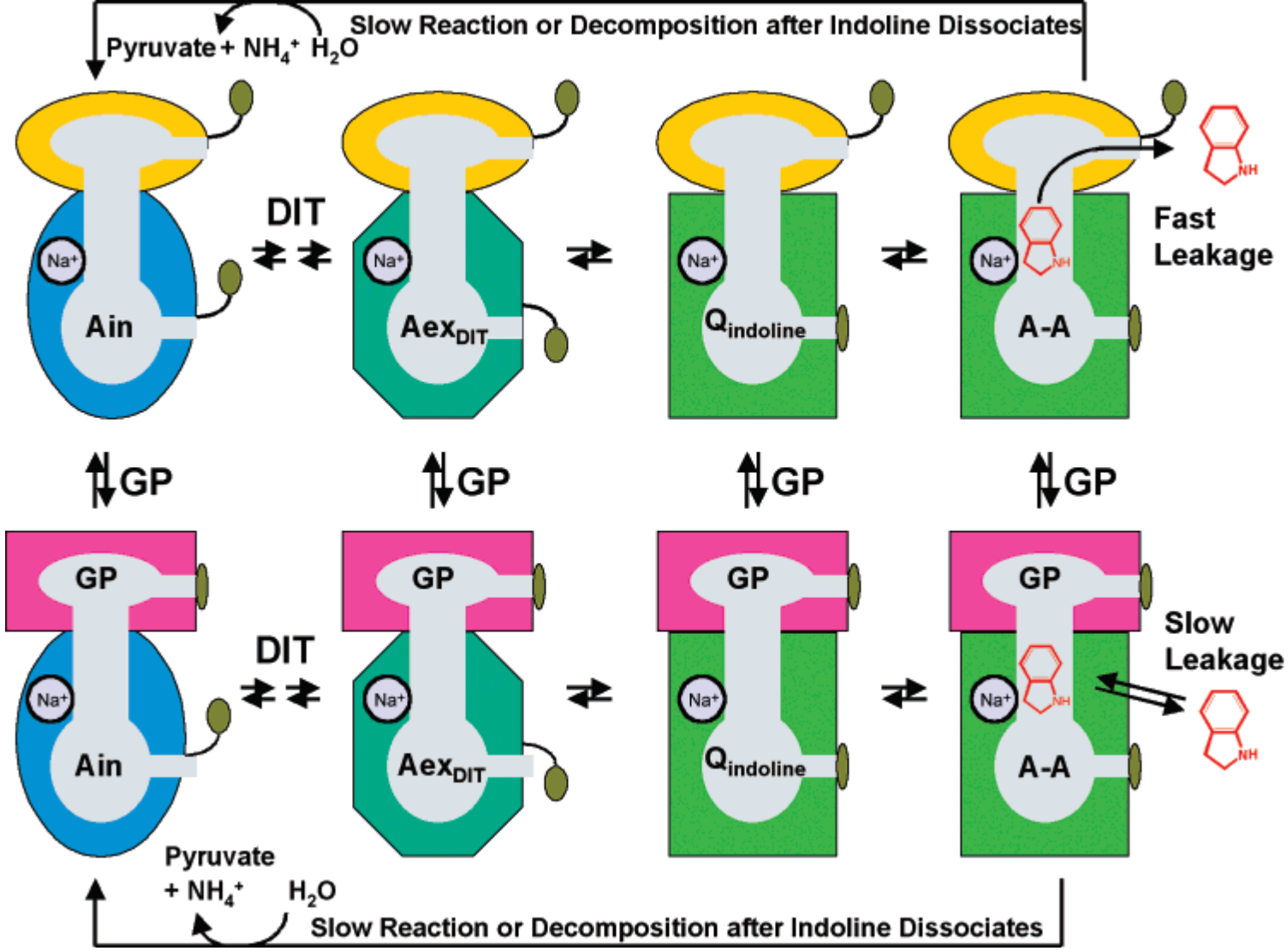
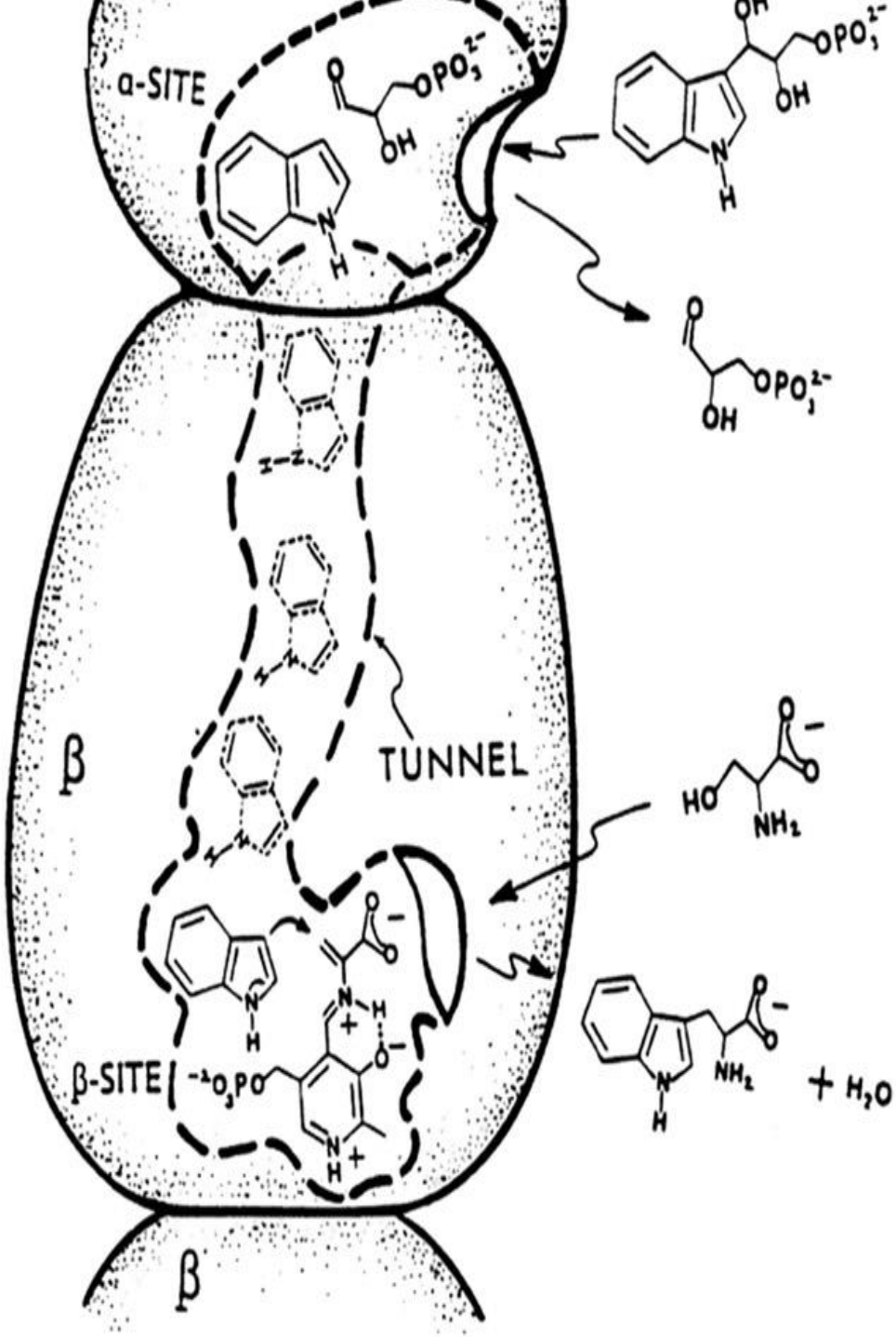
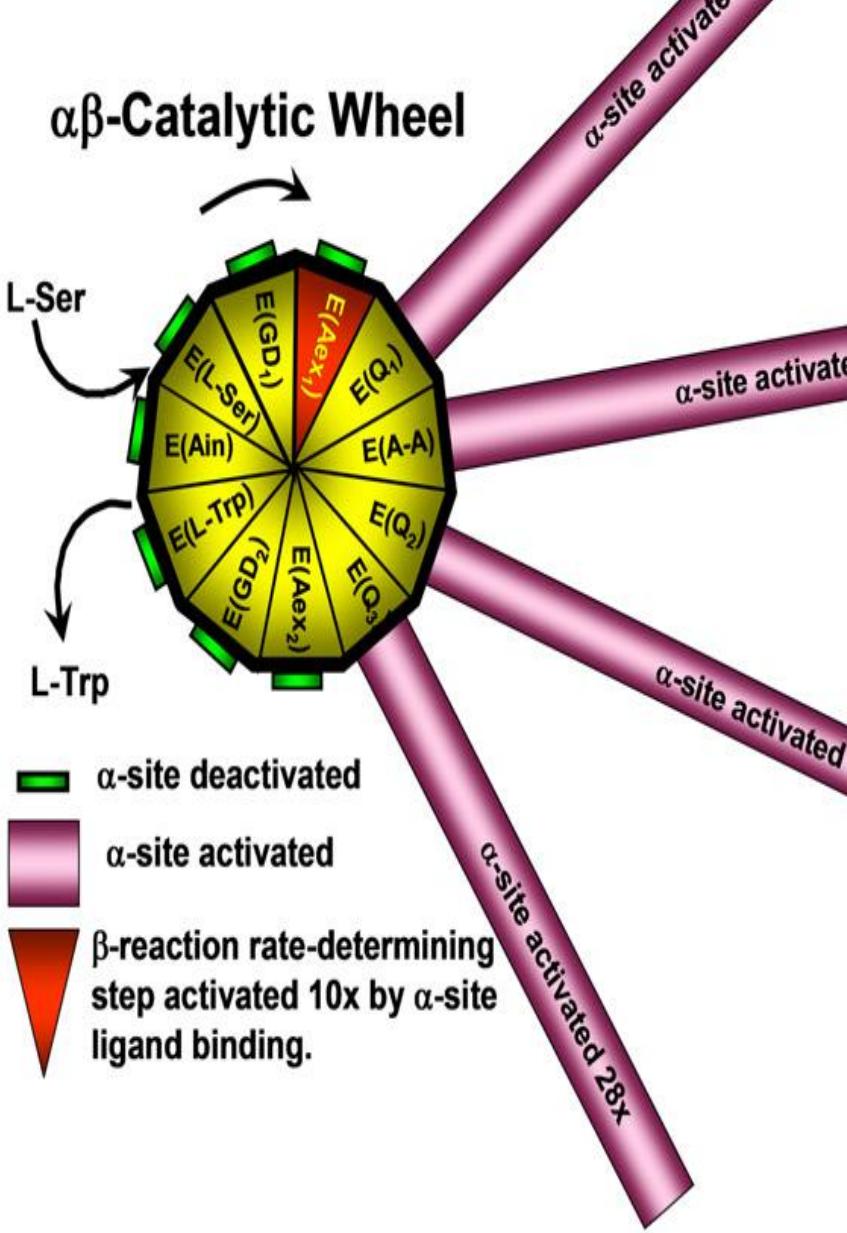



FIGURE 2: Time-resolved spectra for the reaction of $\alpha_2\beta_2$ with DIT without (A) and with GP (B). DIT slowly forms $E(Q)_{indoline}$ ($\lambda_{max}$ = 466 nm). Spectra were measured at 20 min intervals. Insets show expansions of the quinonoid region. Panel C shows the single wavelength time courses for the reactions at 466 nm for $E(Q)_{indoline}$. Concentrations: $[\alpha_2\beta_2]$ = 10 $\mu$M, $[Na^+]$ = 100 mM, [GP] = 50 mM, and [DIT] = 5 mM. The spectra designated time 0 were collected approximately 5−10 s after mixing.


Slow Reaction or Decomposition after Indoline Dissociates
Pyruvate + $NH_4^+$ $H_2O$
DIT
Na+
Ain
$Aex_{DIT}$
$Q_{indoline}$
A-A
NH
Fast
Leakage
GP
Slow
Leakage
Pyruvate
+ $NH_4^+$
$H_2O$
Slow Reaction or Decomposition after Indoline Dissociates


α-SITE
β
TUNNEL
β-SITE
β
+ H₂O

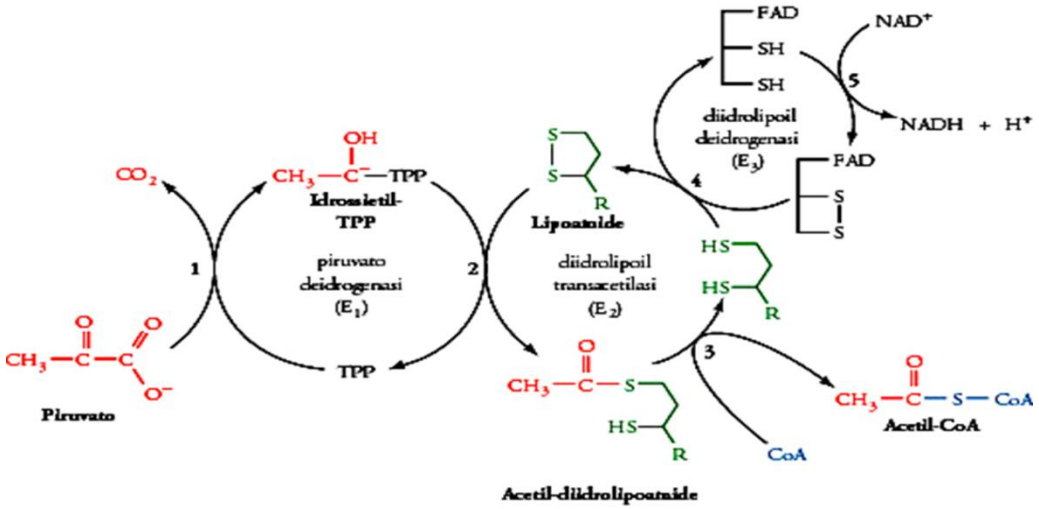

αβ-Catalytic Wheel
L-Ser
L-Trp
E(Aex1)
E(Q1)
E(A-A)
E(Q2)
E(Aex2)
E(Q3)
E(GD2)
E(L-Trp)
E(Ain)
E(L-Ser)
E(GD1)
α-site activate
α-site activate
α-site activated
α-site activated 28x
α-site deactivated
α-site activated
β-reaction rate-determining step activated 10x by α-site ligand binding.

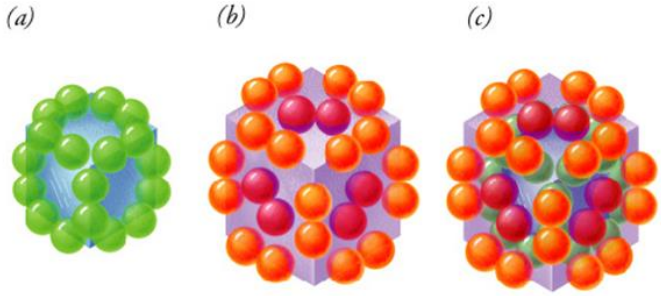
# COMPLESSO DELLA PIRUVATO DEIDROGENASI (PDH)

Alcuni complessi multienzimatici catalizzano una serie di reazioni complicate che richiedono coordinazione

gli enzimi sono vicini

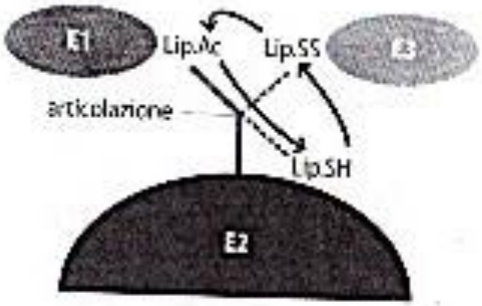
il substrato è legato covalentemente agli enzimi

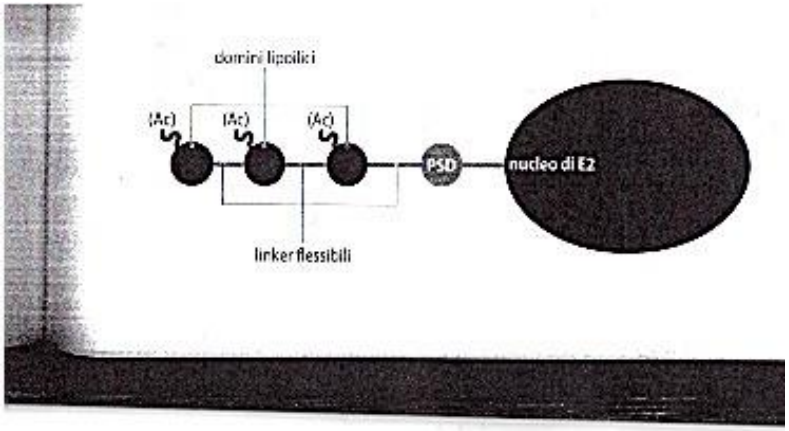


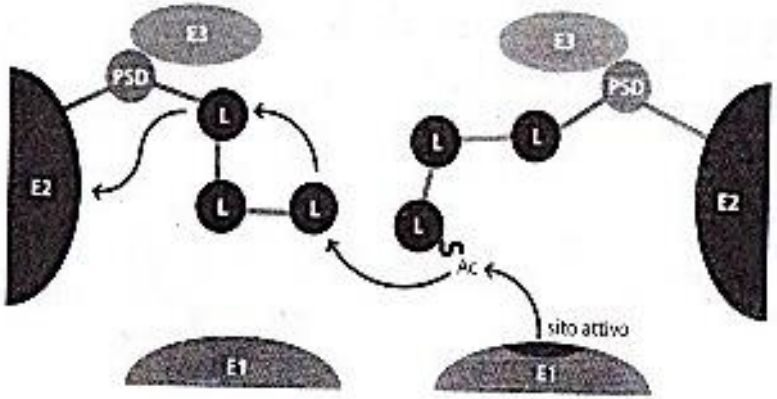




E2 costituisce il cuore dell'enzima che porta su una lisina il il braccio lipoico in E coli sono presenti tre domini lipoilici in tandem tenuti insieme da dei linker flessibili di prolina e alanina che conferiscono mobilità

La PDH  presenta un accoppiamento dei siti attivi tali che la rimozione del braccio lipoico  non determina un cambiamento significativo della velocità di reazione



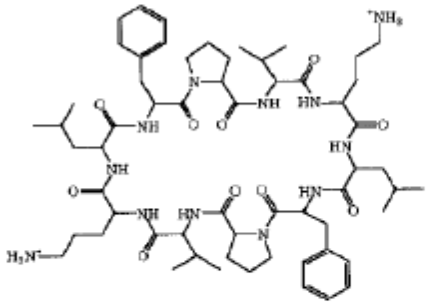



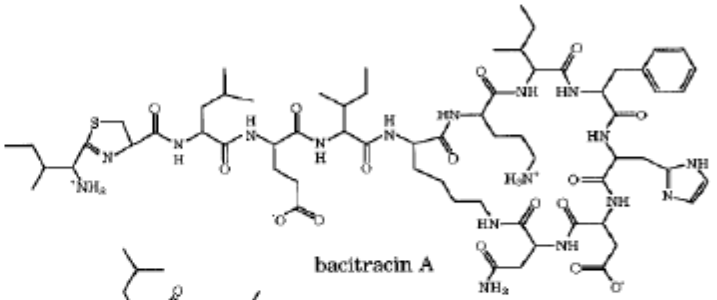
## Sintetasi peptidiche (NRPS)

- Le NRPS sono enzimi di grandi dimensioni multifunzionali
- Il meccanismo d'azione richiede gruppi SH
- Le NRPS hanno una struttura ripetitiva
- I geni coinvolti nella sintesi del peptide sono organizzati in cluster
- Informazioni ottenute sulla proteina unite all'identificazione dei geni che codificano per le NRPS hanno permesso di comprenderne il meccanismo d'azione

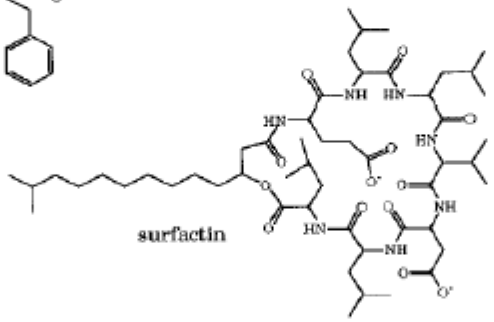
# Strutture di alcuni peptidi bioattivi prodotti da batteri e funghi



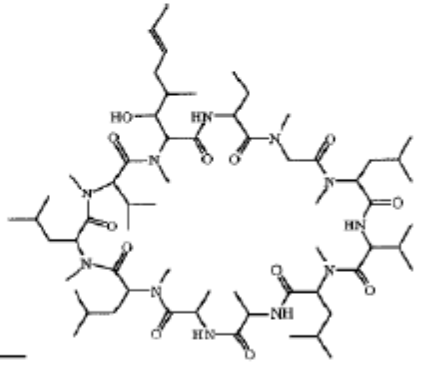
gramicidin S



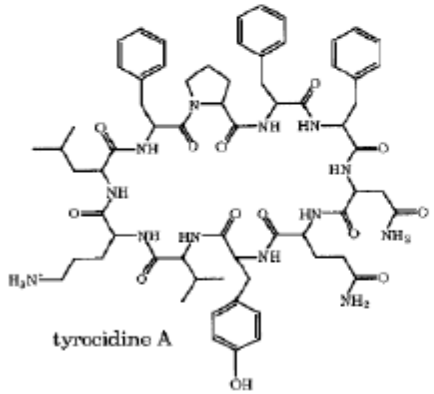
bacitracin A



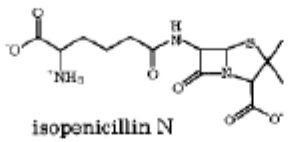
surfactin



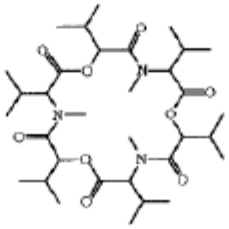
cyclosporin A



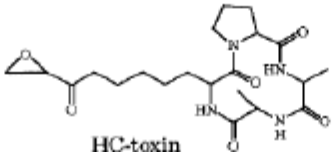
tyrocidine A



isopenicillin N



enniatin B



HC-toxin

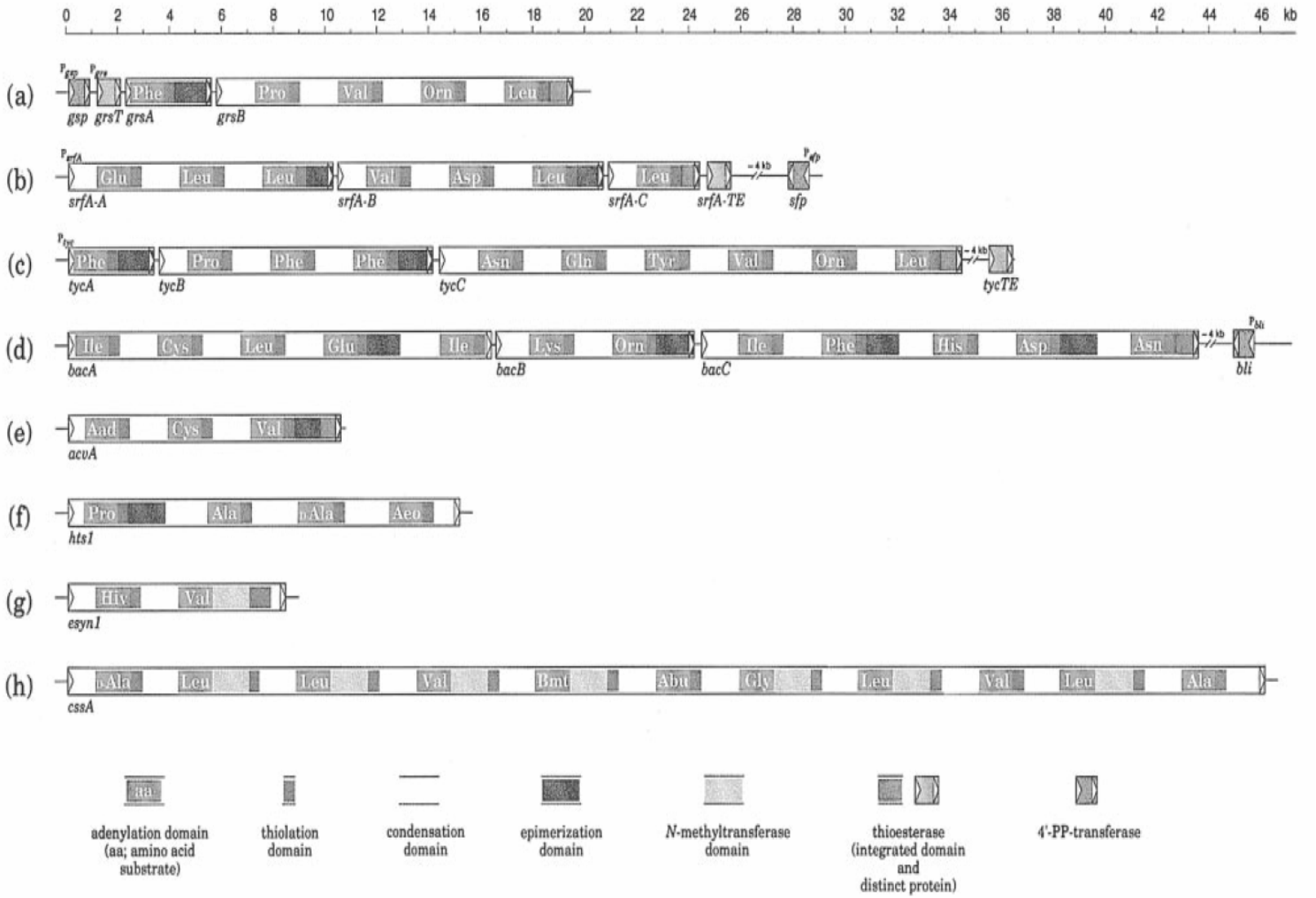
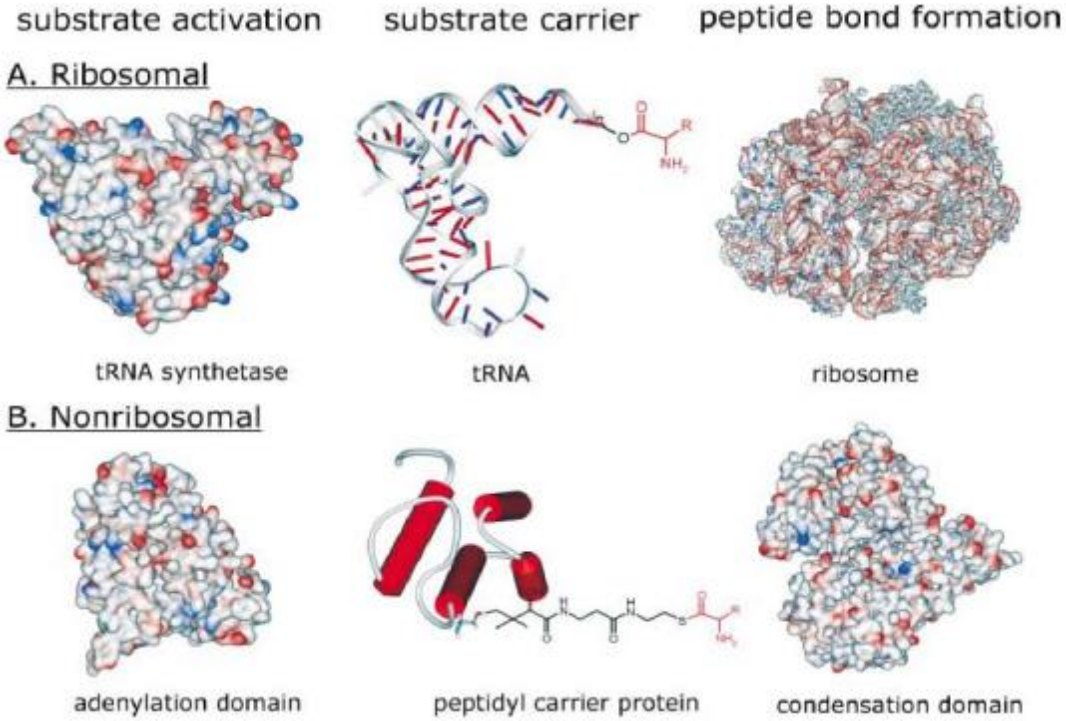


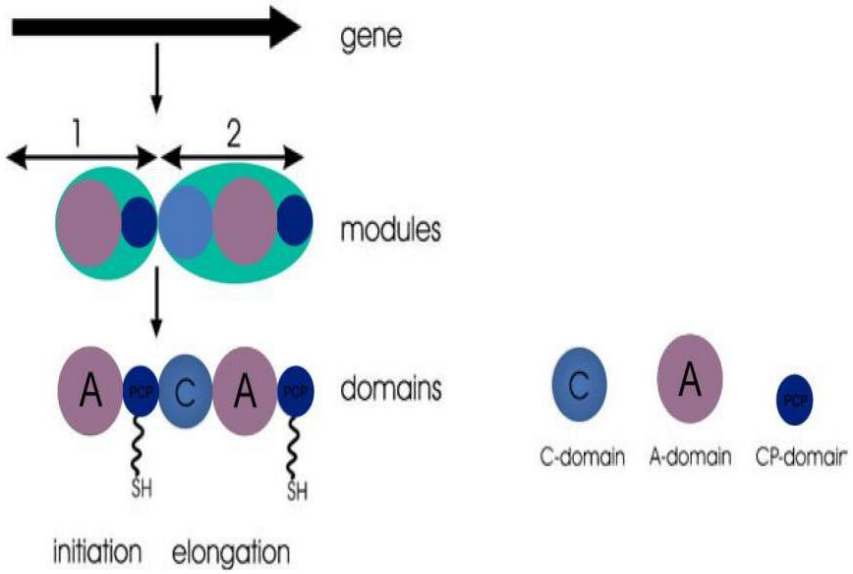

**Figure 3.** Schematic diagram showing the modular organization of peptide synthetases encoded by the bacterial operons *grs* (gramicidin S; row a), *srfA* (surfactin; row b), *tyc* (tyrocidine; row c) and *bac* (bacitracin; row d) as well as the fungal genes *acvA* (δ-(L-α-aminoadipyl)-L-Cys-D-Val; row e), *hts1* (HC-toxin; row f), *esyn1* (enniatin; row g) and

# Analogia tra NRPS e sintesi proteica

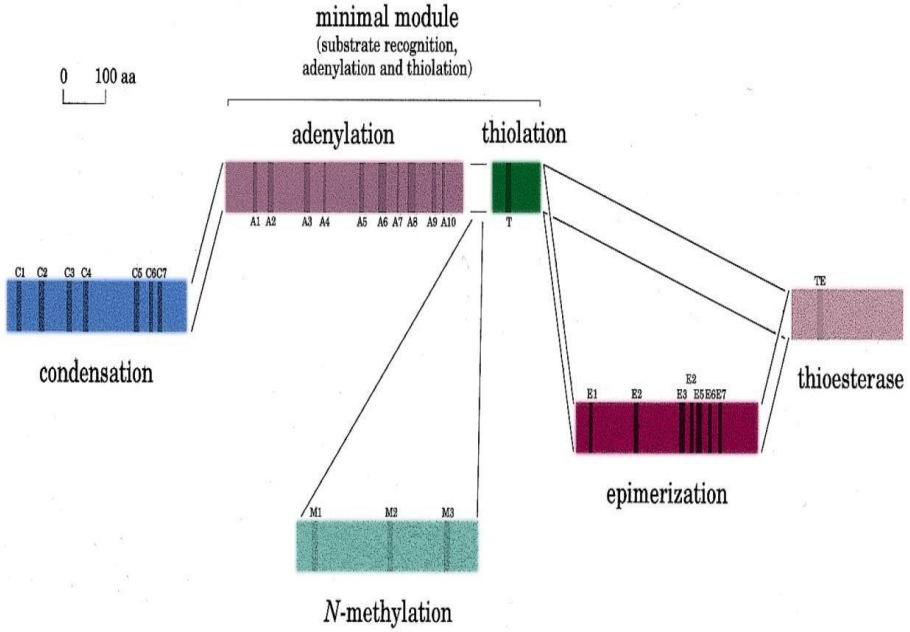


# Organizzazione modulare delle sintetasi peptidiche

La sequenza amminoacidica del metabolita è determinata dalla successione dei moduli nella struttura dell'enzima, a sua volta dettata dalla sequenza genica che codifica per i singoli modu
Esiste quindi una colinearità tra il prodotto del g
e quello dell'enzima.

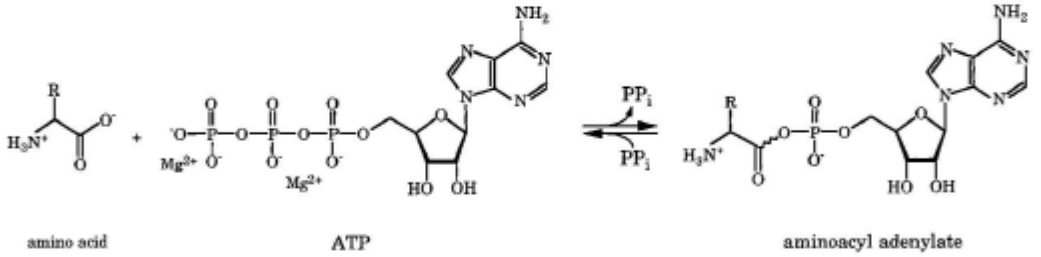



Ogni modulo è organizzato in domini e catalizza l'inserimento di un singolo amminoacido nel prodotto



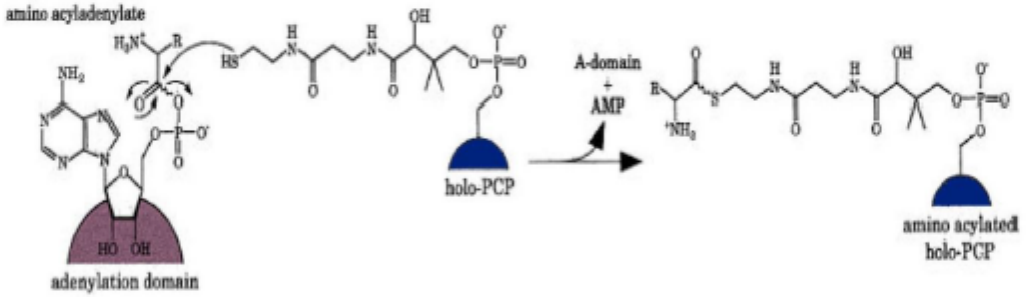
# Dominio di adenilazione (A)

Il dominio di adenilazione è formato da circa 550 amminoacidi ed è deputato al riconoscimento ed all' attivazione dell' amminoacido in una reazione di amminoacil-adenilazione con idrolisi dell' ATP e formazione di un amminoacil-AMP.



# Dominio di tiolazione (PCP)

Il dominio di tiolazione (T) o peptidyl carrier protein (PCP) è formato da circa 100 amminoacidi e lega covalentemente l' amminoacil-AMP alla 4' -fosfopanteteina (4' -PP) attraverso la formazione di un legame tioestere e la liberazione di AMP.



Il dominio di tiolazione deve essere attivato dalle fosfopanteteinil-trasferasi che utilizzano il Coenzima A come donatore di 4' -PP e catalizzano l' attacco del cofattore su un residuo di serina conservato.

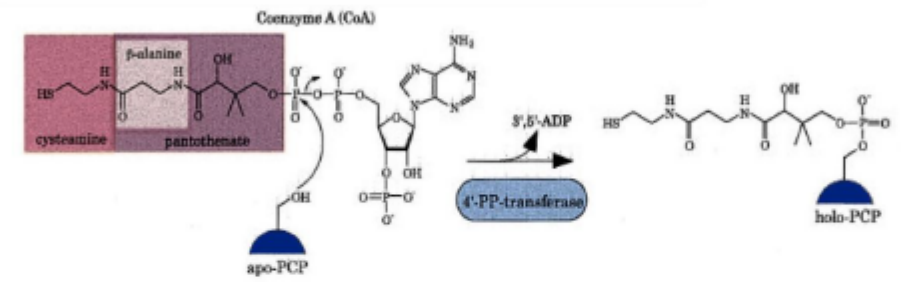


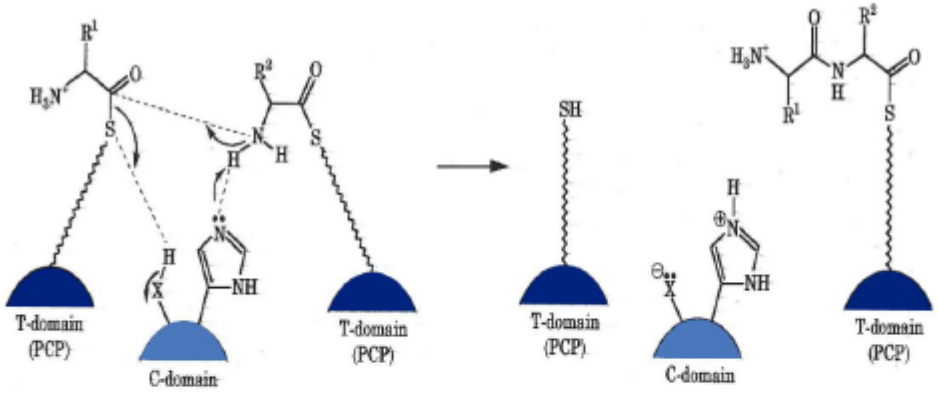

**Table 4. Enzyme Superfamily of Acyl/Peptidyl Carrier Proteins (ACPs/PCPs): Sequence Alignment around the Highly Conserved Cofactor 4'-PP Binding Site**

| Enzyme | Organism | Position (aa) | Sequence [a] |
|---|---|---|---|
| A) Peptide synthetases | | | |
| TycA | *Bacillus brevis* | 553 | D N F Y S L G G H **S** I Q A I Q V |
| GrsB | *Bacillus brevis* | 2033 | D N F F E L G G H **S** L R A M T M |
| SrfA-B | *Bacillus subtilis* | 990 | D N F F M I G G H **S** L K A M M M |
| AcvA | *Penicillium chrysogenum* | 3049 | D D L F K L G G D **S** I T S L H L |
| Hts1 | *Cochliobolus carbonum* | 2405 | S D F F S S G G N **S** M A A I A L |
| CssA | *Tolypocladium niveum* | 13645 | D N F F E L G G H **S** L L A T K L |
| B) Acyl carrier proteins | | | |
| Polyketide synthases | | | |
| Act-ACP | *Streptomyces coelicolor* | 33 | L R F E D I G Y D **S** L A L M E T |
| Gra-ACP | *Streptomyces violaceoruber* | 33 | I T F E E L G Y D **S** L A L M E S |
| Fatty acid synthases | | | |
| FAS-ACP | *Escherichia coli* | 28 | S F V E D L G A D **S** L D T V E L |
| FAS-ACP | *Saccharomyces cerevisiae* | 73 | Q F H K D L G L D **S** L D T V E L |
| | | consensus | L G x(HD)S L |

[a] Sequence data are derived from: TycA [54], GrsB [32], SrfA-B [33]; AcvA [29], CssA [35], Hts [36], Act-ACP [104], Gra-ACP [105], FAS-ACP from *E. coli* [102], FAS-ACP from yeast [102].

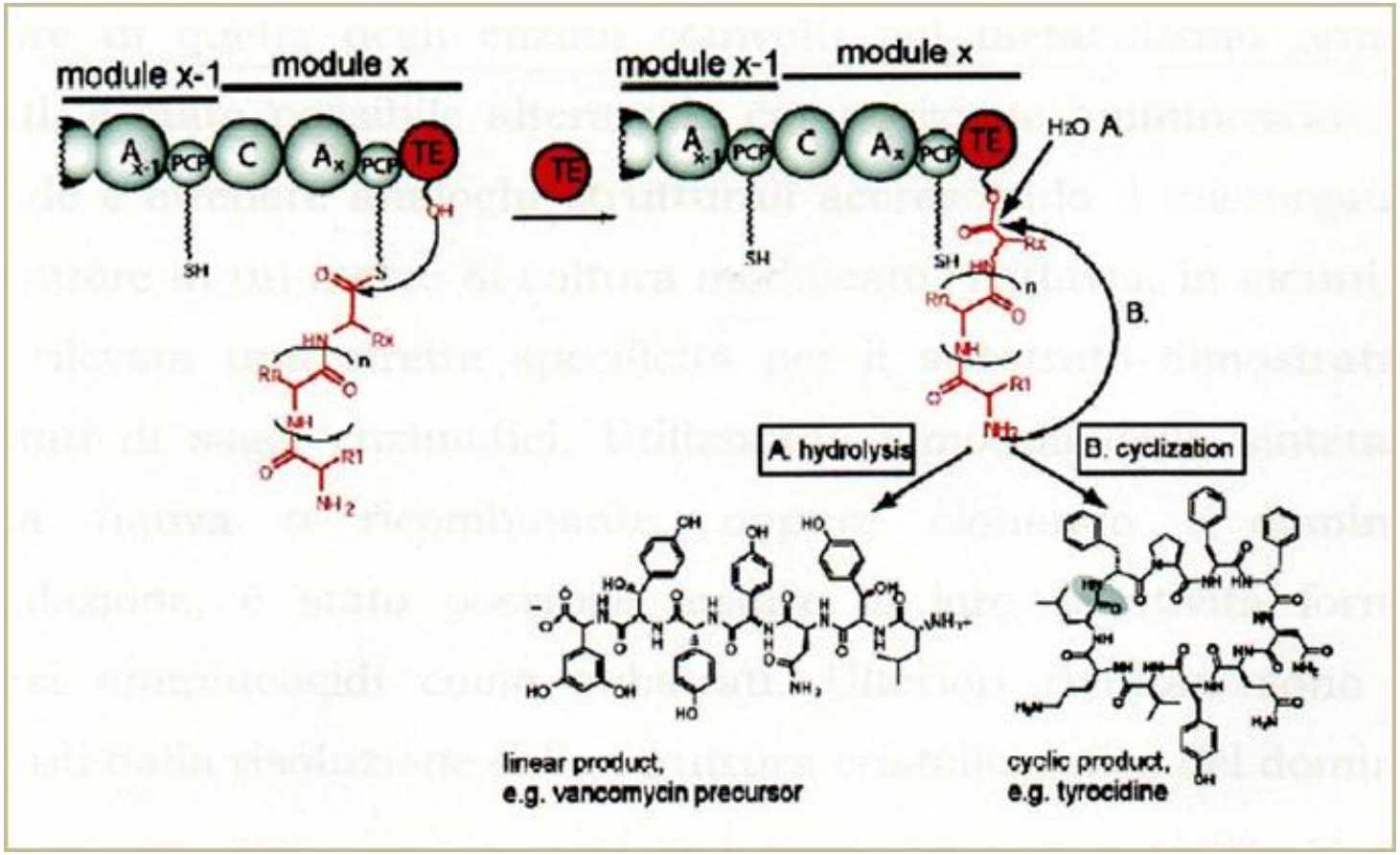
# Dominio di condensazione (C)

Il dominio di condensazione è costituito da circa 450 amminoacidi, è localizzato a monte del dominio di adenilazione e catalizza la formazione del legame peptidico tra gli amminoacidi legati a due domini di tiolazione adiacenti.

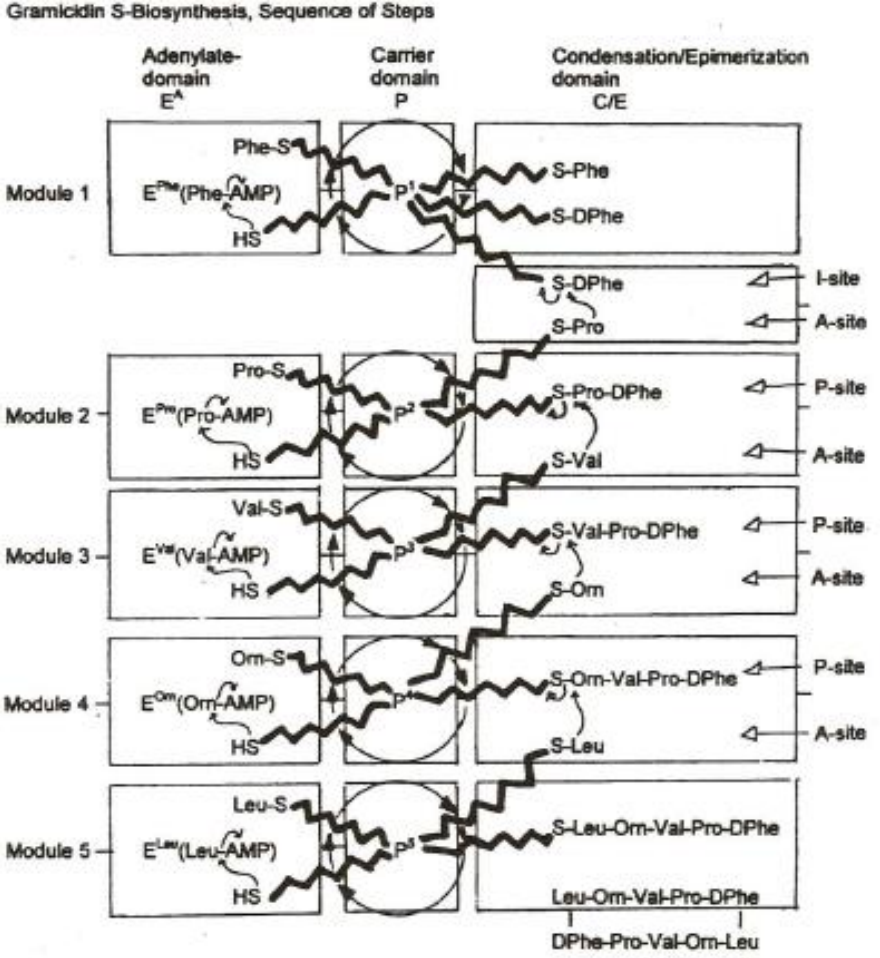


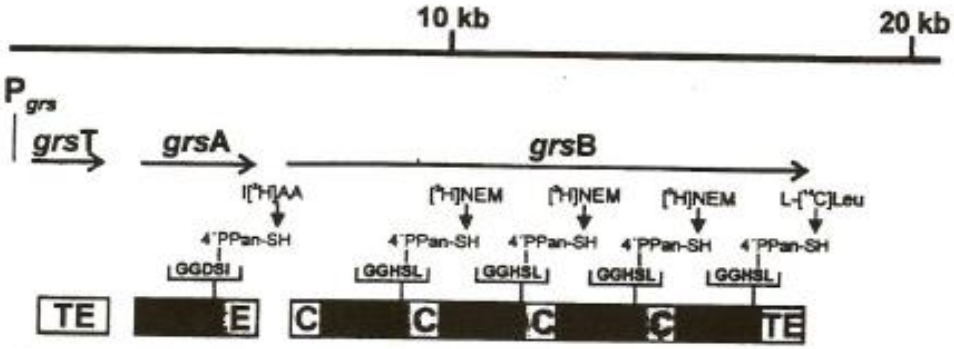
# Il domionio tioesterasico

di circa 250 amminoacidi presente alla fine dell'ultimo modulo.Il meccanismo di catalisi è simile a quello delle proteasi a serina e la reazione genera un intermedio acil-O-TE.Il rilascio del peptide avviene per attacco nucleofilo intramolecolare che genera un prodotto ciclico o per idrolisi nel caso di prodotti lineari

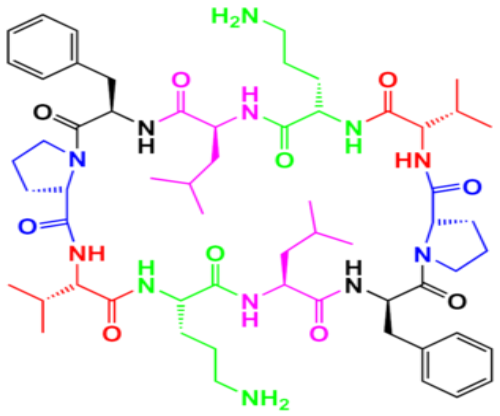


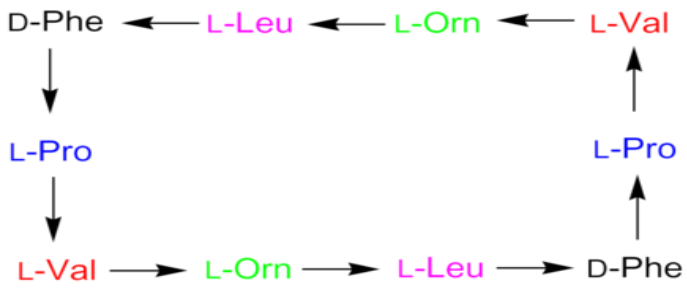
Modello del meccanismo d' azione delle NRPS: meccanismo tio-templato a trasportatore multiplo. I bracci di 4' -PP facilitano il trasporto del substrato e dei vari intermedi ai centri catalitici dei diversi domini.

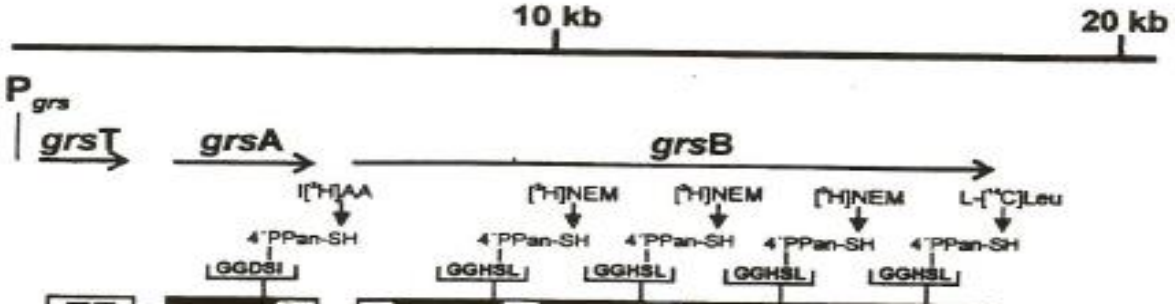


La gramicidina è uno ionoforo costituito da 10 aminoacidi  5 ripetuti testa coda
D)Phe-Pro-Val-Orn-Leu-(D)Phe-Pro-Val-Orn-Leu



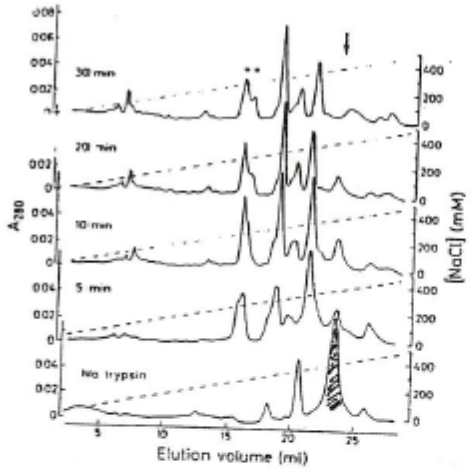


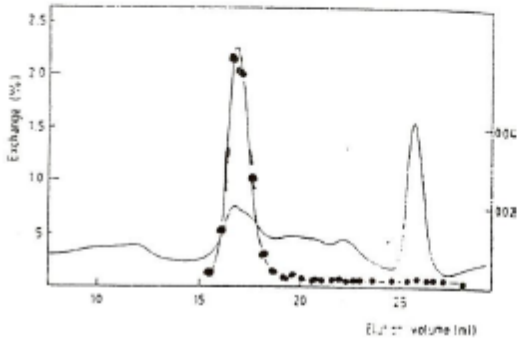
## Identificazione del sito attivo.

Le NRPS sono enzimi di grandi dimensioni quindi è necessario frammentarle mediante proteolisi limitata in condizioni native per ottenere i singoli moduli o domini che possono essere separati per cromatografia e ulteriormente caratterizzati.

È necessario un saggio di attività enzimatica per identificare le frazioni che contengono l' attività di interesse.




Proteolisi limitata della Grs2 con tripsina per isolare il dominio che lega prolina. Cromatografia a scambio ionico




Gel-filtrazione su Superose
•-• attività di scambio ATP/$PP_i$ prolina-dipendente

# Saggi di attivita' enzimatica delle sintetasi peptidiche

Attivazione degli amminoacidi

amminoacido + ATP ↔ amminoacido-AMP + $^{32}PP_i$

Il saggio è basato sullo scambio ATP-$^{32}PP_i$: si segue la formazione di ATP marcato con $^{32}P$ in presenza dell' enzima e di amminoacidi che esso riconosce come substrati.

L'enzima viene incubato con i substrati e successivamente viene aggiunto $^{32}PP_i$ in eccesso. L' ATP che si forma viene separato dalla miscela di reazione mediante adsorbimento su carbone attivo e quindi viene dosata la radioattività.

Formazione del metabolita peptidico

Legame covalente dell' amminoacido all' enzima

Vengono forniti gli amminoacidi precursori di cui almeno uno è marcato radioattivamente ($^{14}C$ oppure $^{3}H$) e si misura la radioattività incorporata nel peptide formato.

Il peptide viene separato dalla miscela di reazione mediante precipitazione con acido tricloroacetico (TCA). Il TCA è un precipitante delle proteine e di peptidi, quindi la radioattività associata ad amminoacidi liberi (non incorporati) non verrà precipitata.

# Evidenze sperimentali a favore del meccanismo tio-templato delle NRPS

- Sono coinvolti gruppi –SH
inibitori –SH bloccano l'attività
- Si forma un legame tioestere tra l'amminoacido e l'enzima
il tioestere è instabile nella degradazione di Edman
la marcatura viene persa
- Sequenze amminoacidiche del sito attivo indicano la presenza di cisteina o serina deidroalanina
- Sequenze nucleotidiche indicano la presenza di serine conservate

# Marcatura per affinita' del sito di legame per la valina sulla gramicidina S sintetasi 2

- Protezione del sito attivo con valina
- Blocco dei gruppi -SH con N-etil-maleimide (NEM)
- Gel-filtrazione per rimuovere il NEM in eccesso
- Riduzione con ditiotreitolo (DTT) e gel-filtrazione per rimuovere la valina
- Marcatura del sito attivo con [$^3$H] NEM
- Digestione con tripsina per ottenere frammenti proteici da analizzare
- Purificazione del peptide marcato con [$^3$H] e sequenziamento mediante degradazione di Edman
- Sequenza: LGGH $\Delta$A LR

  $\Delta$A: deidroalanina, può derivare da Cisteina o Serina
- Il NEM non è legato direttamente all' enzima altrimenti sarebbe stato identificabile nella sequenza poiché forma un legame stabile con i gruppi -SH

# Meccanismo tio-templato delle NRPS

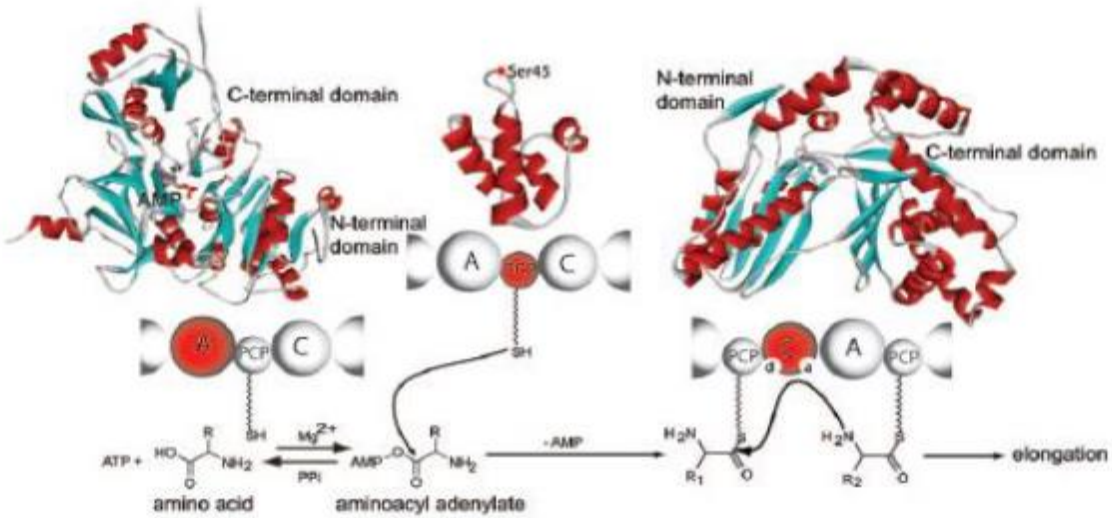



FIG. 4. Chemical principles of nonribosomal peptide synthesis. Domains in action are indicated in red and the respective crystal structures are shown above. First, the A-domain specifically recognizes a dedicated amino acid and catalyzes formation of the aminoacyl adenylate under consumption of ATP. Second, the activated aminoacyl adenylate is tethered to the free thiol group of the PCP-bound phosphopantetheine (ppan) cofactor. Third, the C-domain catalyzes peptide elongation. Here, the nucleophilic amine of the acceptor substrate nucleophilically attacks the electrophilic thioester of the donor substrate (a, acceptor site; d, donor site). The crystal structure of the A-domain is derived from the Phe-activating A-domain (PheA) of the first module of gramicidin S synthetase of *B. brevis* (22). The NMR-structure of the PCP is derived from the third module of the *B. brevis* tyrocidine synthetase (141), and the C-domain is derived from the crystal structure of VibH, a stand alone C-domain of the *V. cholerea* vibriobactin synthetase (60).

# La spettrometria di massa rivela la presenza di fosfopanteteina legata alla serina

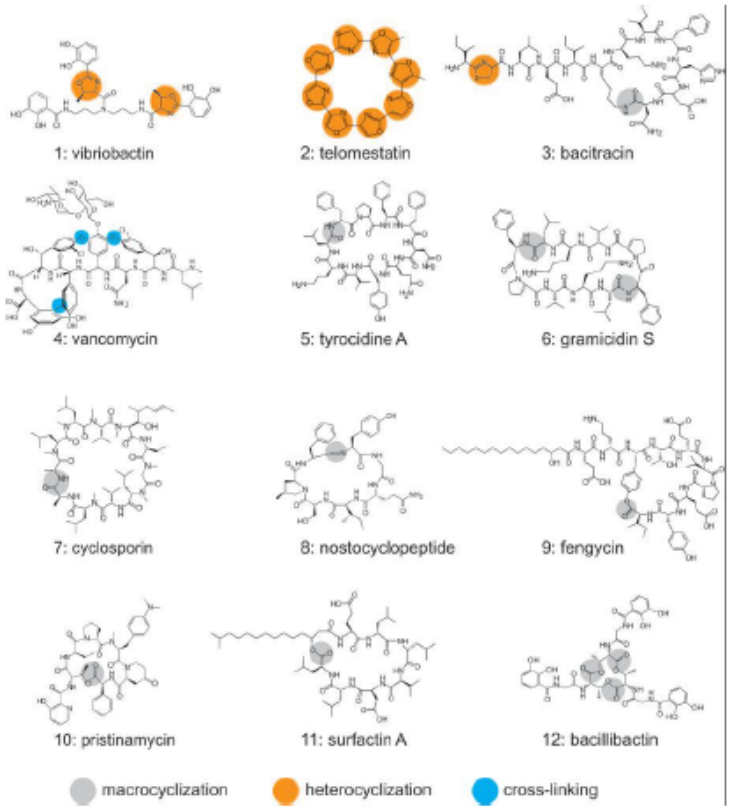
TABLE I

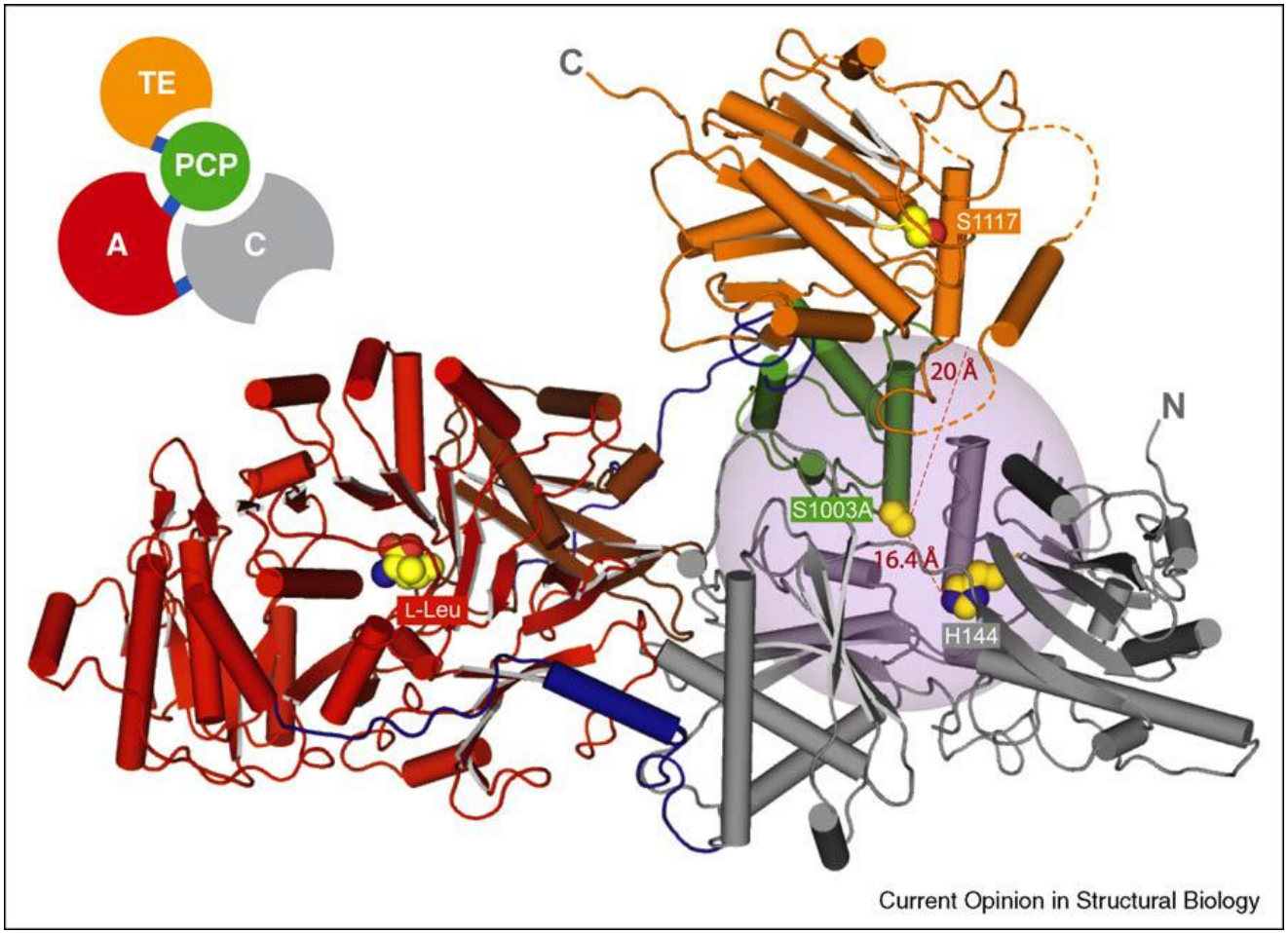
*Structure of the radiolabeled thiotemplate site peptide fragments of gramicidin S synthetase*

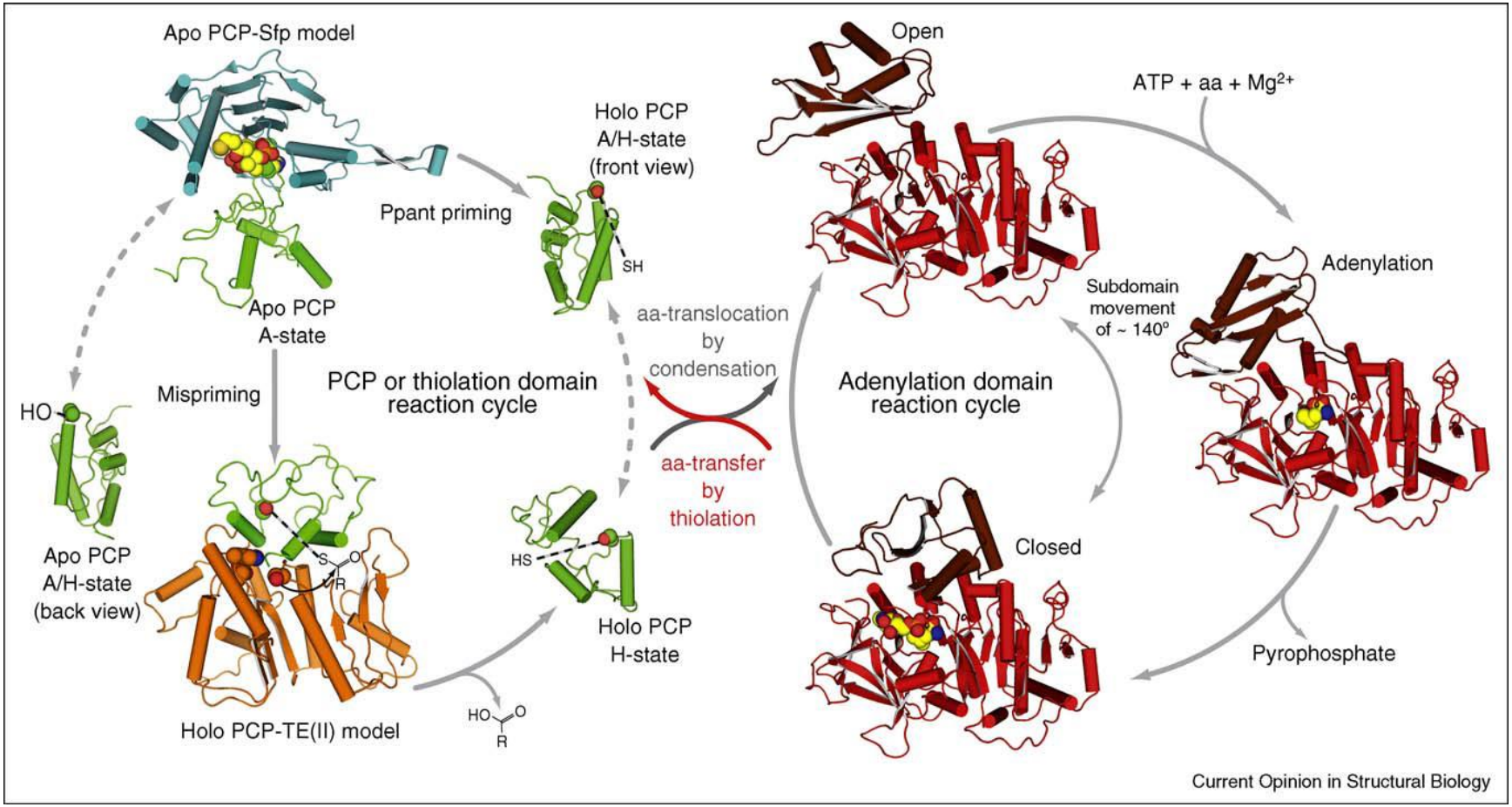
| Enzyme | Thio-template | Position of the fragment within the multienzyme | Thiotemplate site peptide fragments | Molecular mass (Dalt: Calculation from gene[a] | Molecular mass (Dalt: Calculation from Pan-adduct[b] | Molecular mass (Dalt: Resu ESI- |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GS1 | Phe | D 564 - K 575 | DNFYALGGDSIK<br>└Pan-[$^{3}$H]NES | 1299.4 | 1764.9 | 176 |
| GS2 | L-Pro | I 983 - K1008 | IWEEVLGISQIGIQDNFFSLGGHSLK<br>└Pan-[$^{3}$H]NES | 2888.4 | 3353.8 | 335 |
| | L-Val | I2029 - R2044 | IGVLDNFFELGGHSLR<br>└Pan-[$^{3}$H]NES | 1774.0 | 2239.5 | 223 |
| | L-Orn | V3075 - K3090 | VGIHDDFFTIGGHSLK<br>└Pan-[$^{3}$H]NES | 1742.9 | 2208.3 | 220 |
| | L-Leu | F4120 - L4132 | FELGGHSLKATLL<br>└Pan-[$^{14}$C]Leu | 1385.6 | 1848.9 | 184 |

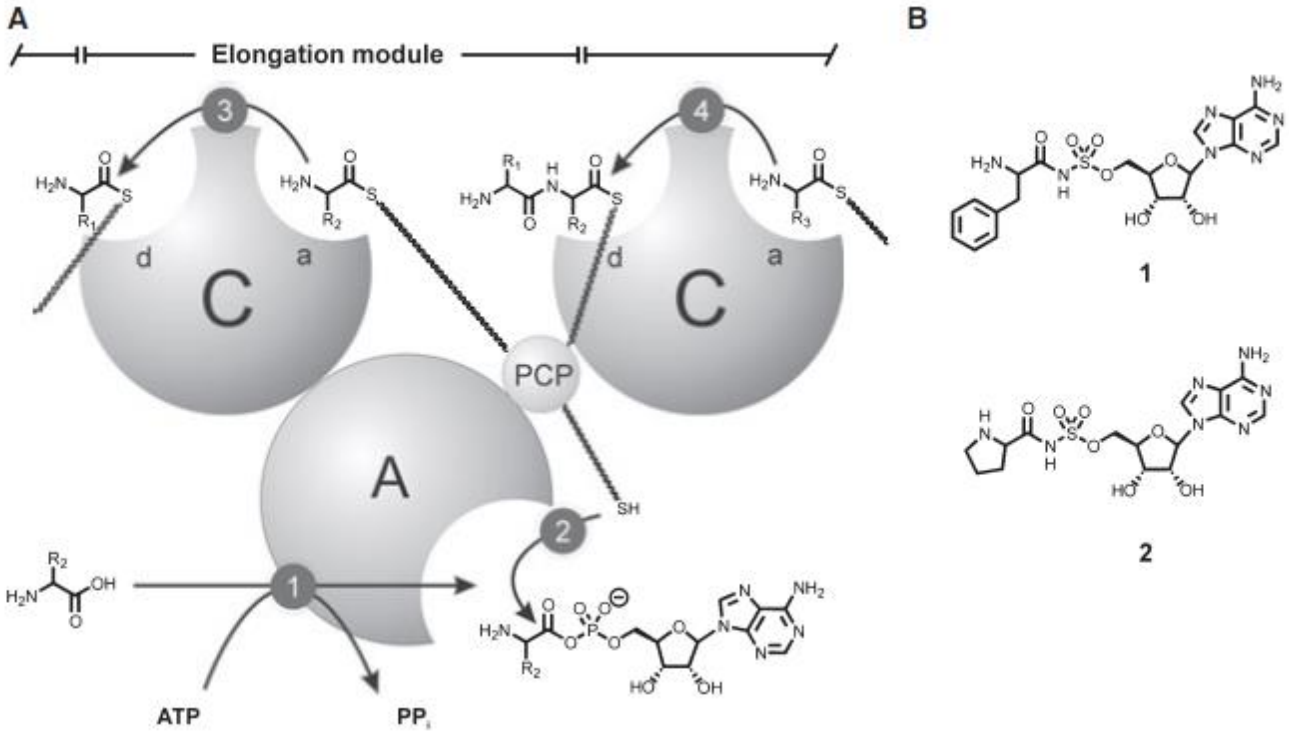
# Modificazioni del peptide

- N-metilazione
- Ossidazione
- Alogenazione
- Eterociclizzazione
- Epimerizzazione




TE
PCP
A
C
C
S1117
20 Å
N
S1003A
16.4 Å
L-Leu
H144
Current Opinion in Structural Biology


Apo PCP-Sfp model
Apo PCP
A-state
Ppant priming
Holo PCP
A/H-state
(front view)
SH
aa-translocation
by
condensation
aa-transfer
by
thiolation
PCP or thiolation domain
reaction cycle
Mispriming
HO
Apo PCP
A/H-state
(back view)
Holo PCP-TE(II) model
HS
Holo PCP
H-state
HO
O
R
Open
ATP + aa + Mg2+
Subdomain
movement
of ~ 140°
Adenylation
Adenylation domain
reaction cycle
Closed
Pyrophosphate
Current Opinion in Structural Biology


A
Elongation module
3
4
d
C
a
d
C
a
PCP
A
SH
2
1
ATP
PP$_i$
B
1
2