

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 come un'unica catena proteica possono essere presenti interazioni allosteriche e accoppiamento di siti attivi.

vantaggi complessi multienzimatici

- evoluzione verso una maggior efficienza catalitica:

- (a) minimizzazione delle distanze percorse dai substrati per raggiungere i vari siti attivi \Rightarrow aumento della velocità di reazione
 - (b) riduzione di reazioni fra intermedi metabolici di reazioni successive con altre molecole (minimizzazione reazioni collaterali)
 - (c) le reazioni possono essere controllate in modo coordinato
-

Triptofano sintasi esempio di incanalamento di substrati

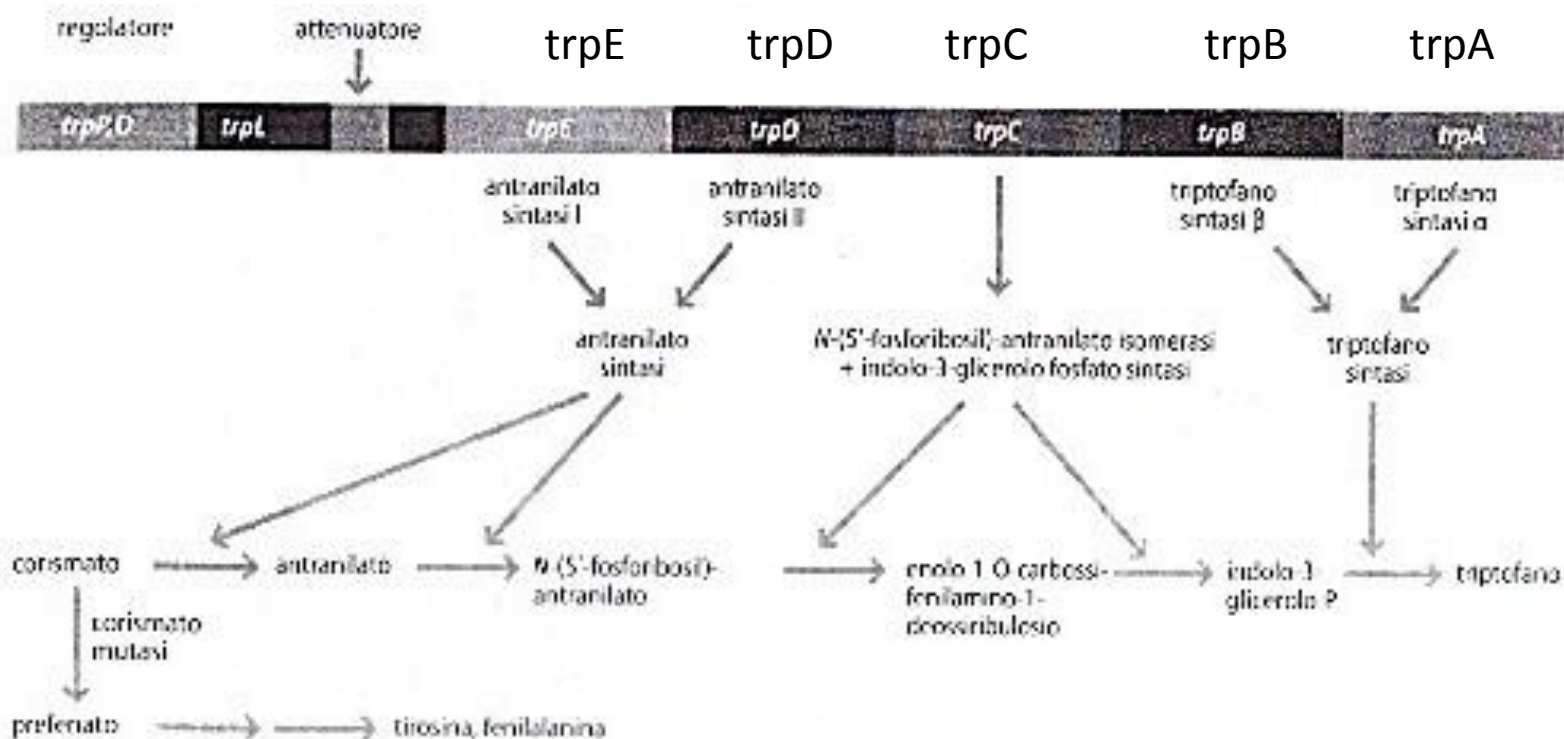
Triptofano sintasi : tetramero $\alpha_2\beta_2$

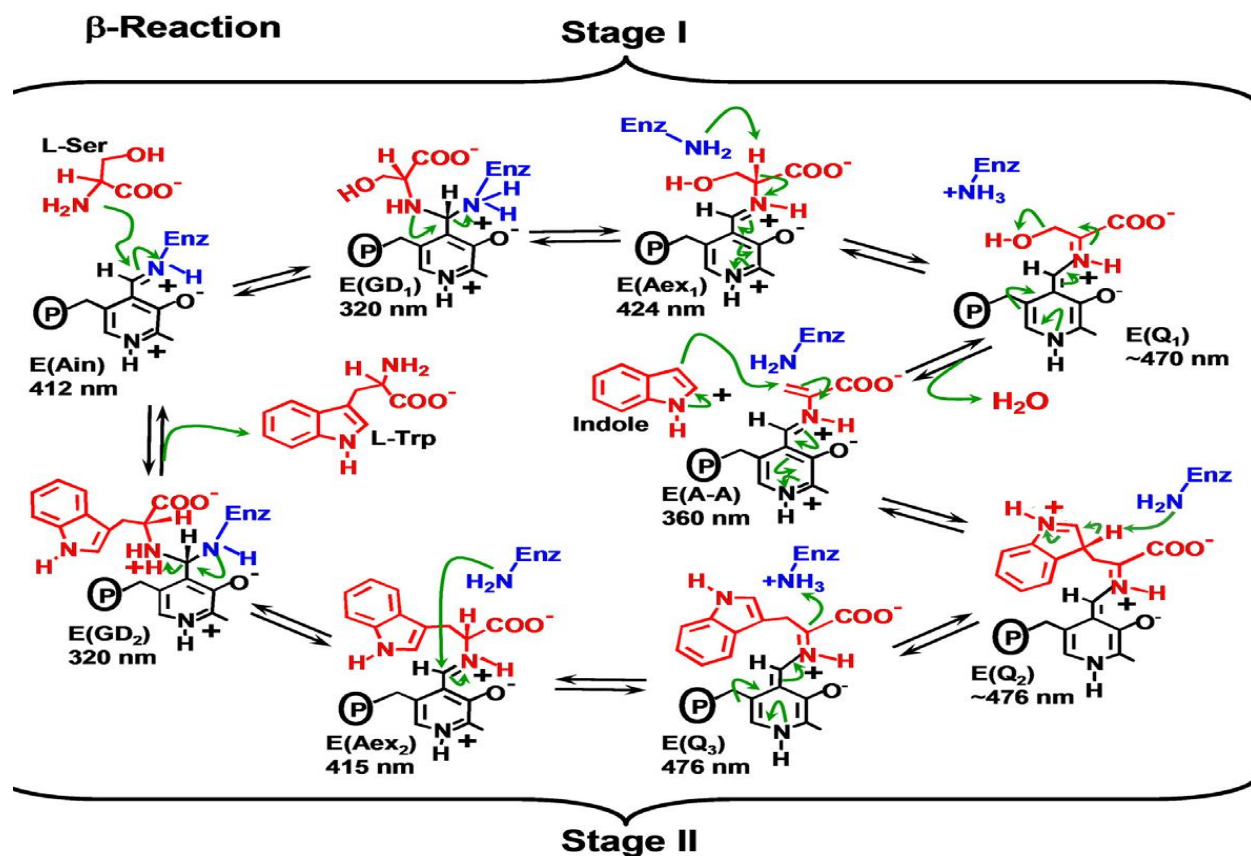
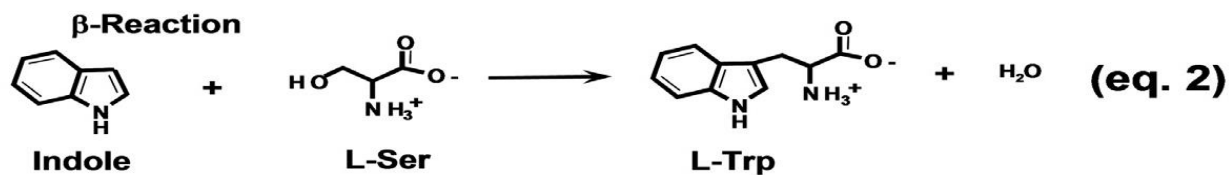
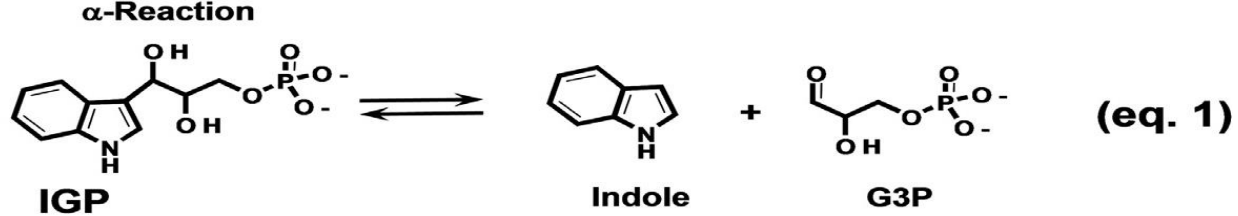
trpB subunità β : indol-3 glicerol P

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





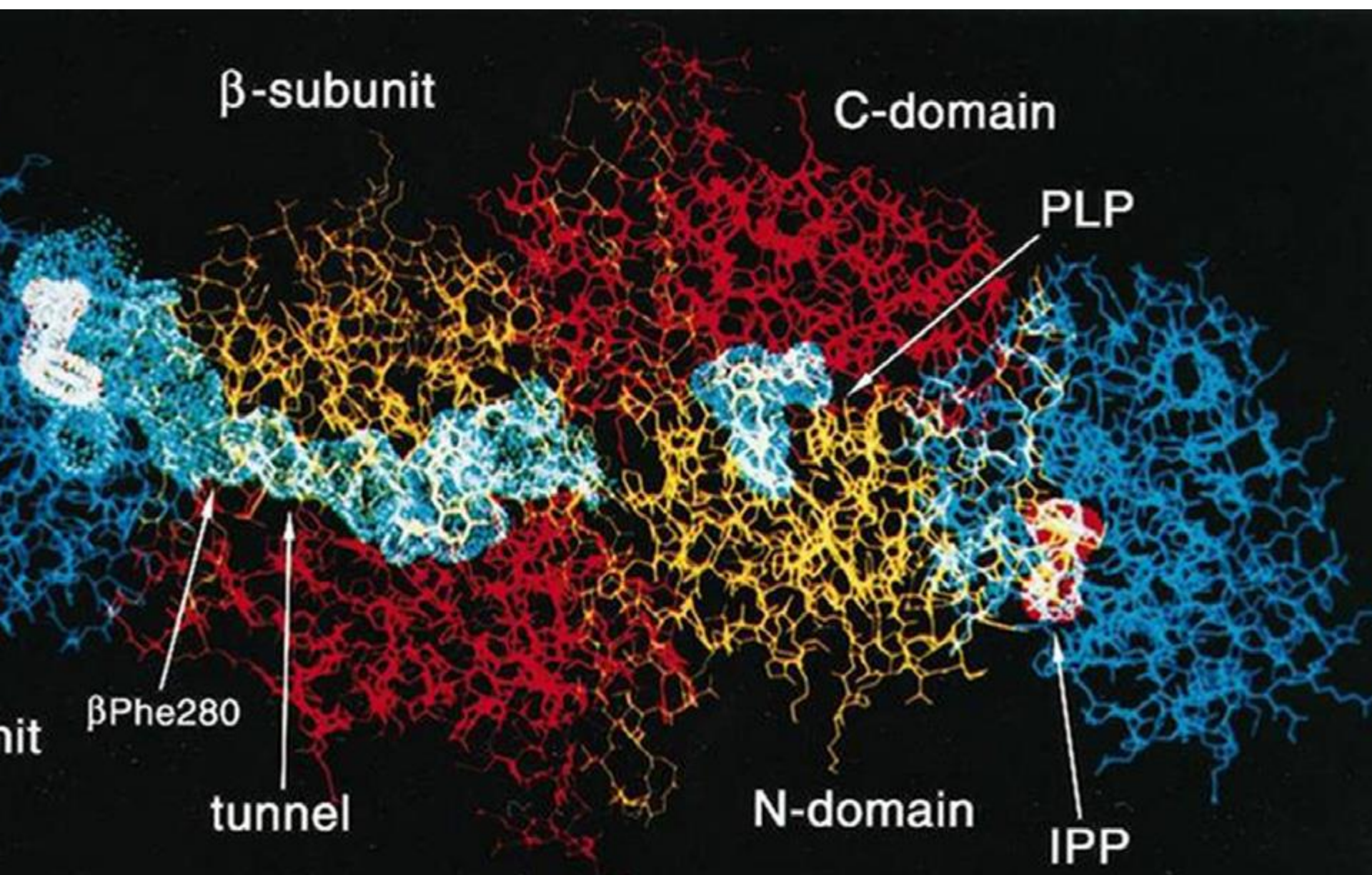
- **Evidenze per l'incanalamento del substrato**

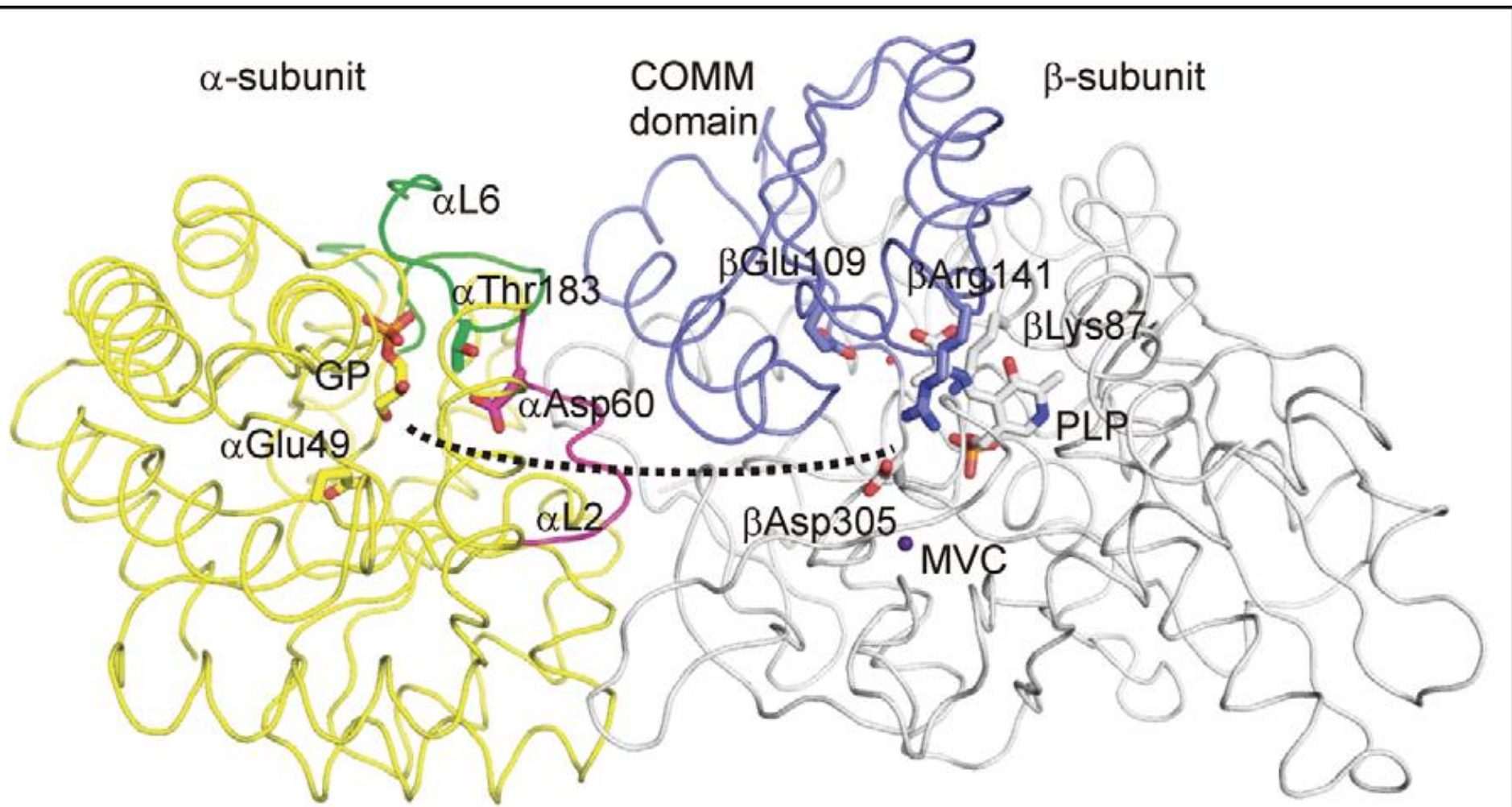
L'indolo non è rilasciato in soluzione

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 con la subunità alfa

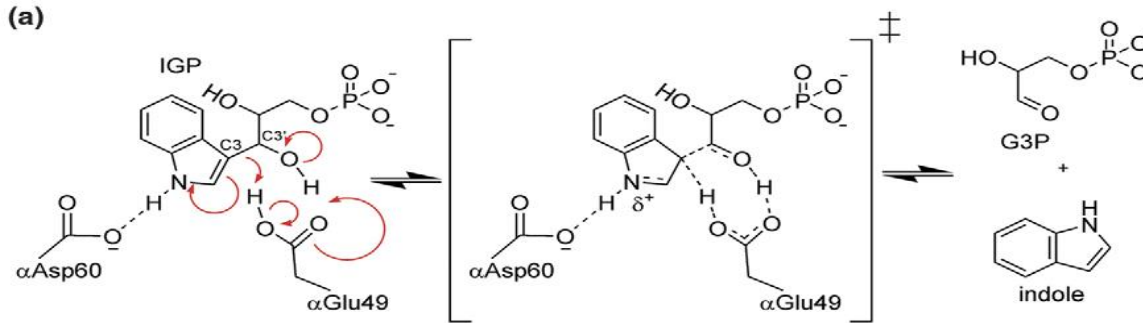
Strutture cristallografiche di mutanti hanno evidenziato il cambiamento conformazionale : la conformazione aperta è caratterizzata dalla presenza di un loop L6 disordinato nella subunità alfa



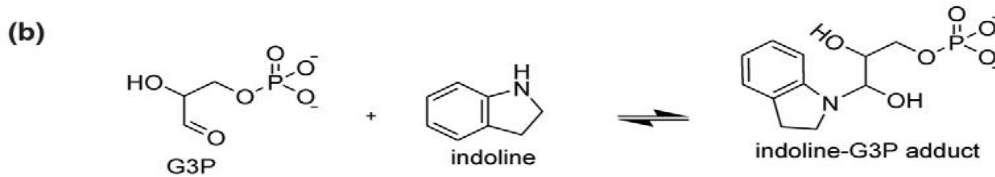


Struttura del dimero(Alfa beta) della TrpS . The. The approximate path of the tunnel connecting the a and b active sites is indicated by the dashed line. Molecular graphics were prepared using PyMol [47].

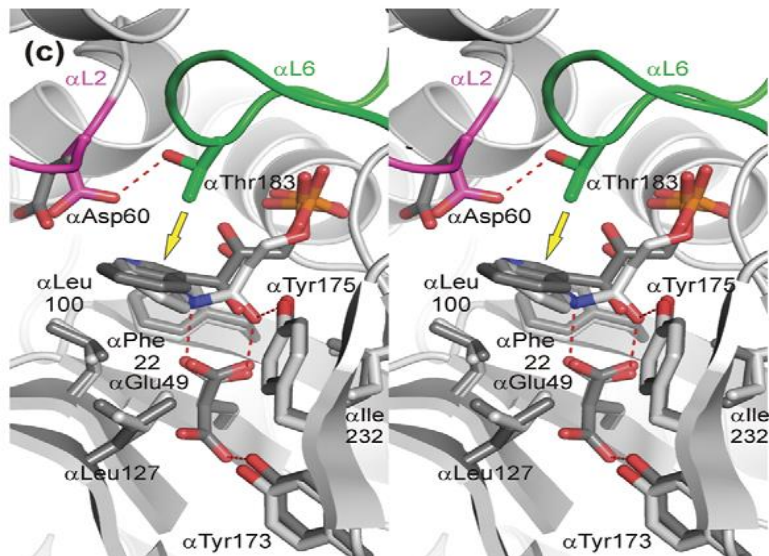
Reazione della subunità alfa



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

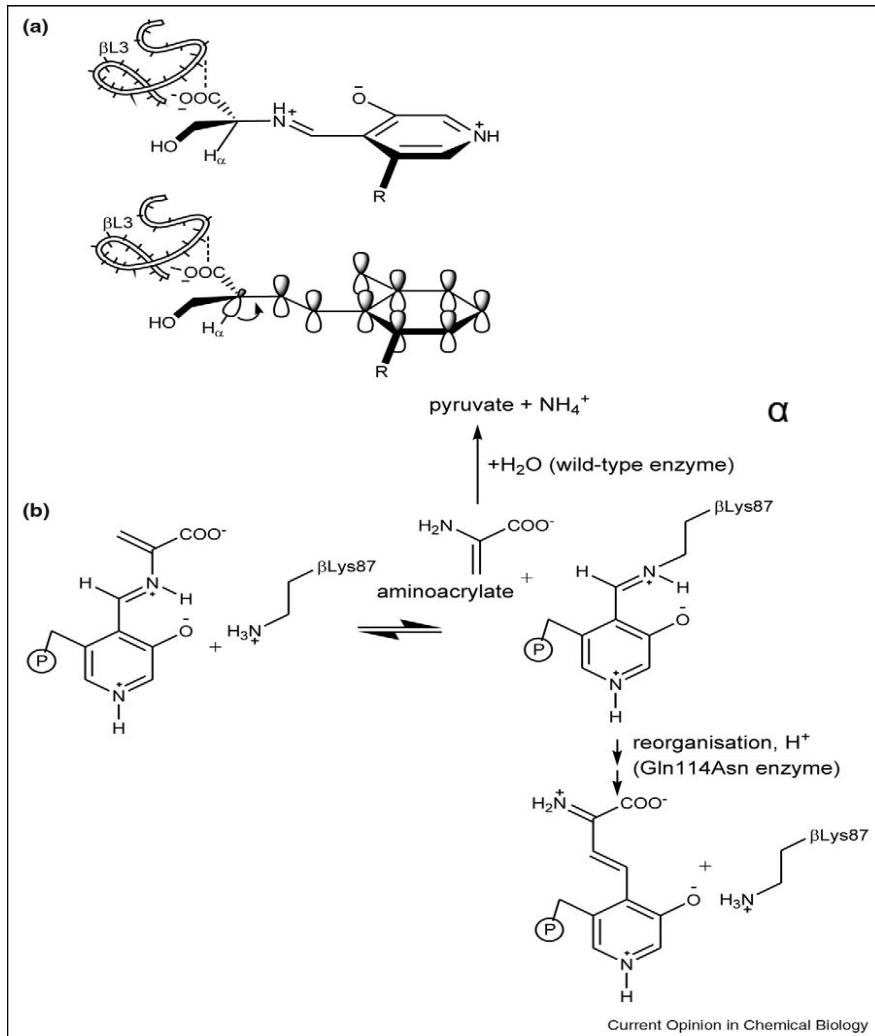


B reazione tra G3P e indolina per formare l'addotto indolina G3P che mima lo stato di transizione

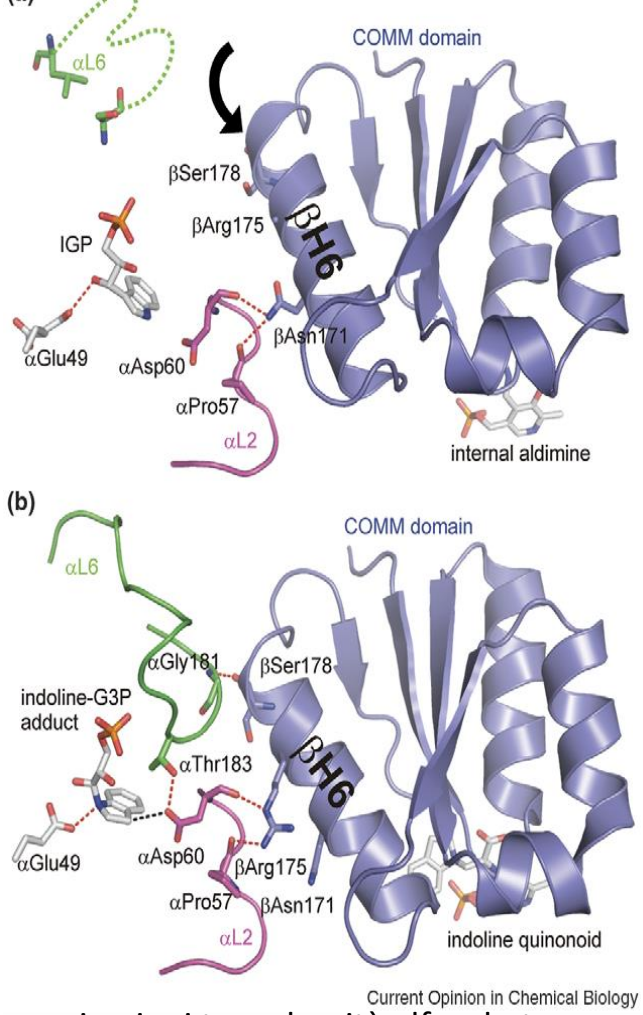


C struttura della sub alfa in assenza e in presenza del substrato (cambiamento conformazionale)

meccanismo di reazione della subunità beta formazione dell'aldimina esterna



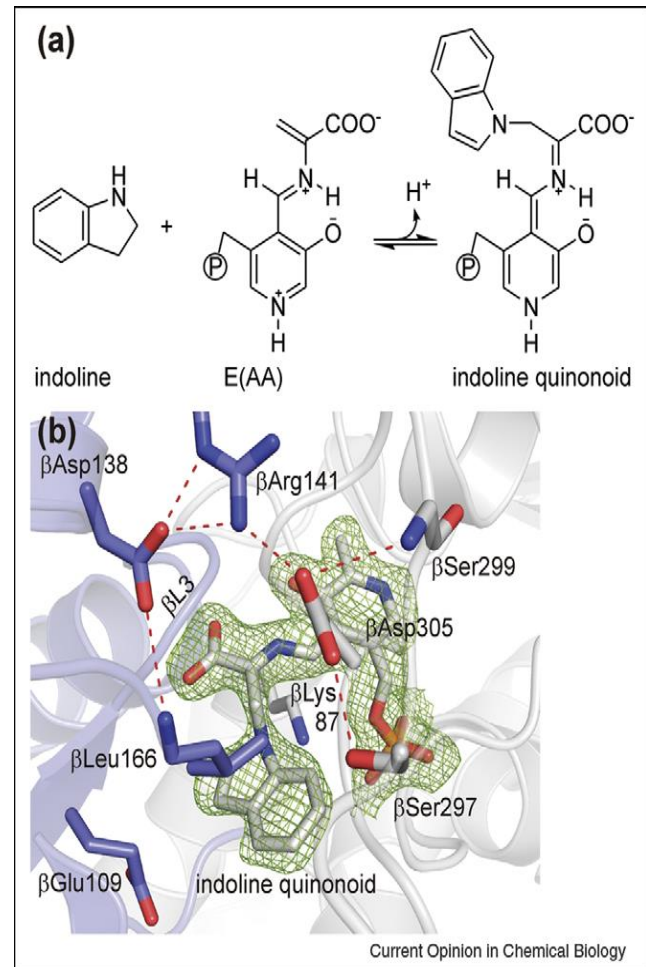
βL3 blocca la posizione del gruppo carbossilico del substrato perpendicolarmente al piano dei legami π PLP. Quando viene rimosso il protone, l'elettrone può essere delocalizzato e questo destabilizza il legame Cα-Hα.



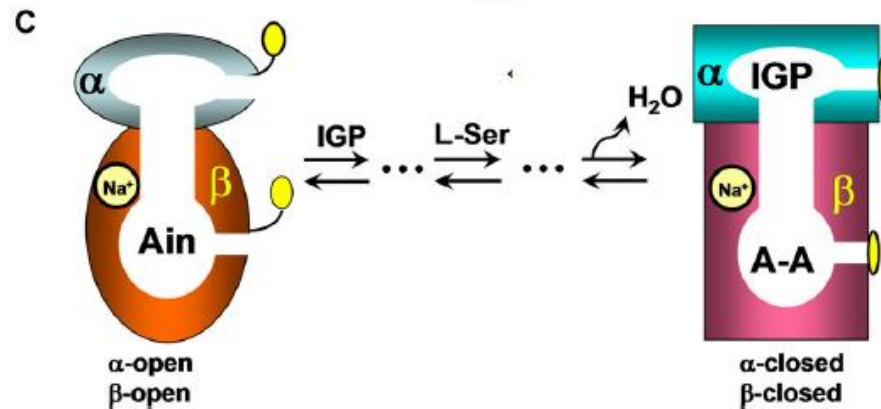
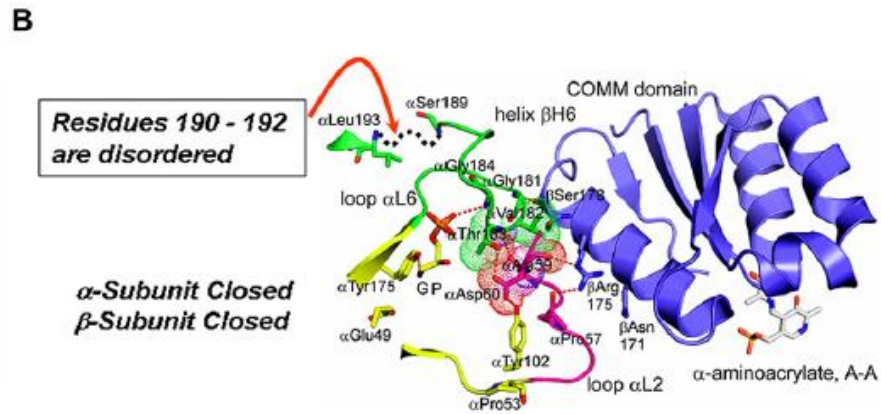
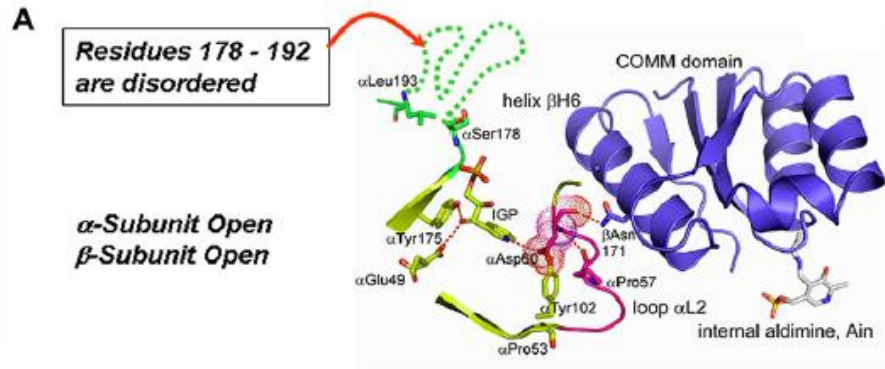
Comunicazioni tra subunità alfa e beta.

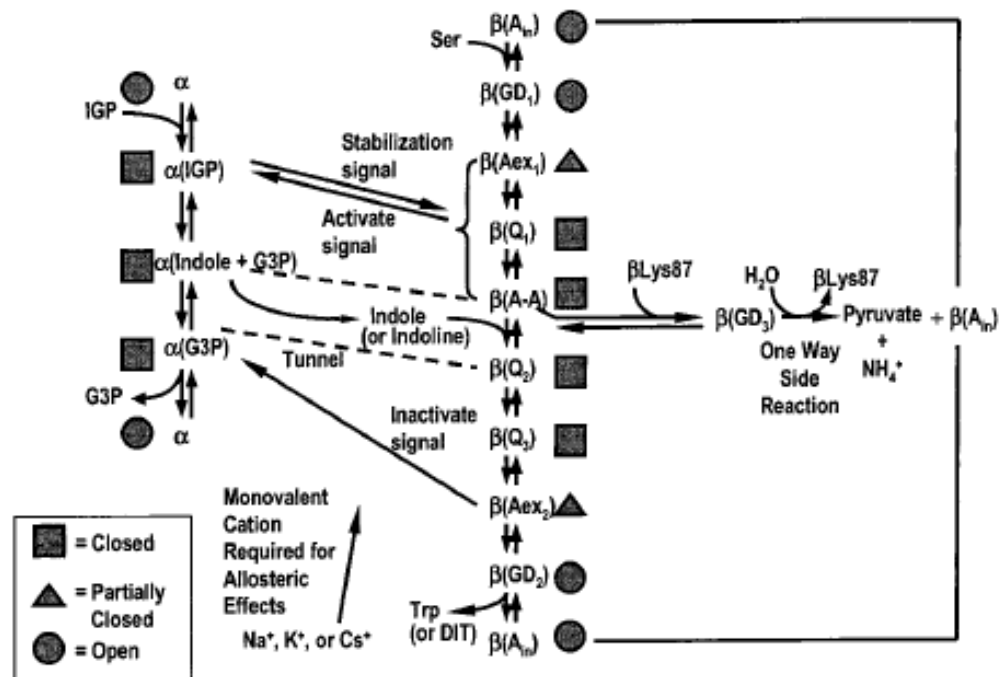
(a) subunità alfa e beta in conformazione aperta in assenza di IGP secondo substrato IGP è legato Glu49 il Loop L6 (verde) è disordinato il loop α L2 interagisce con l'elica β H6

(b) Struttura in presenza dell'intermedio indolina G3P alfa e beta subunità in conformazione chiusa. Loop L6 è ordinato e anche loop α L2 è spostato vicino Arg175 dell'elica β H6

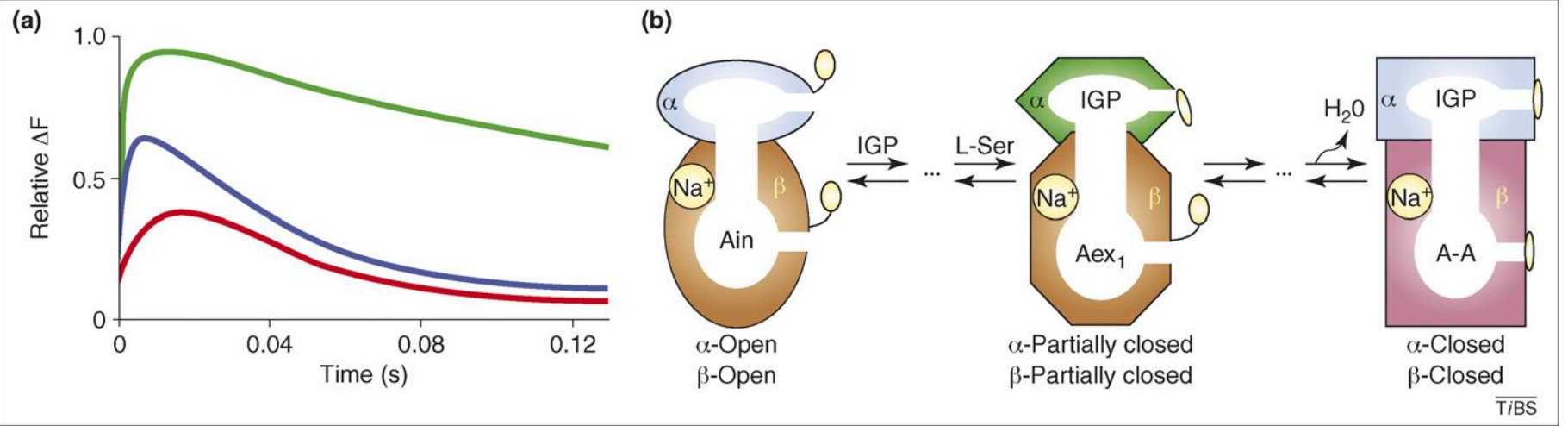


Sito attivo in presenza dell'indolina G3P

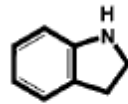


Scheme 2: Schematic Representation of the Allosteric Signals between the α - and β -Sites^a

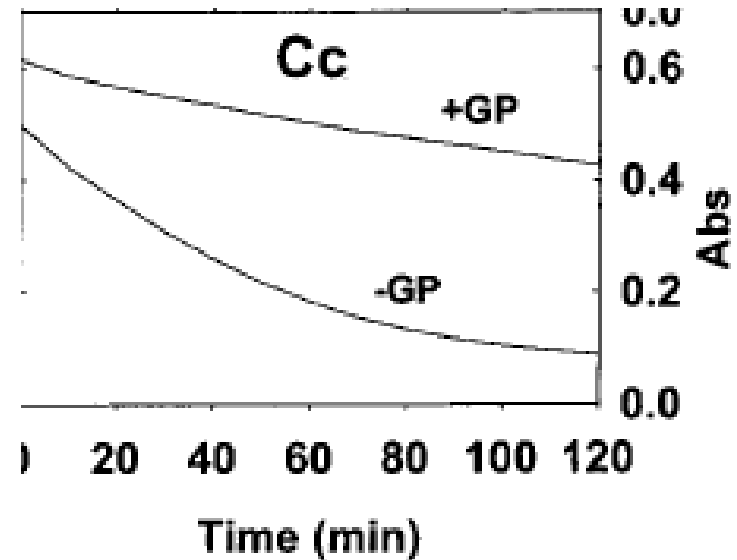
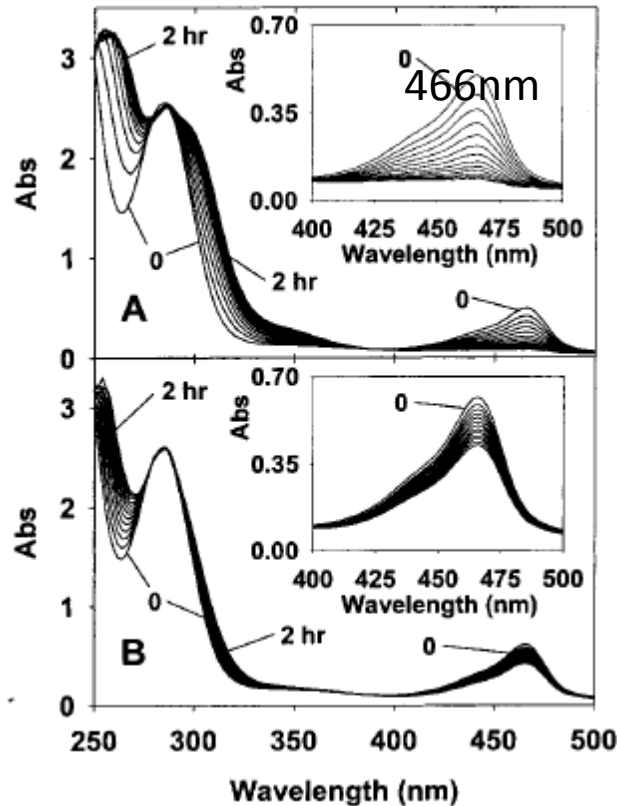
^a When IGP binds to the α -site, the α -subunit converts to a closed conformation. The closed conformation of the α -site then stabilizes the L-Ser reaction at the β -site. When L-Ser reacts at the β -site, the conversion of E(Aex₁) to E(A-A) switches the β -site to the closed conformation and sends 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.



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

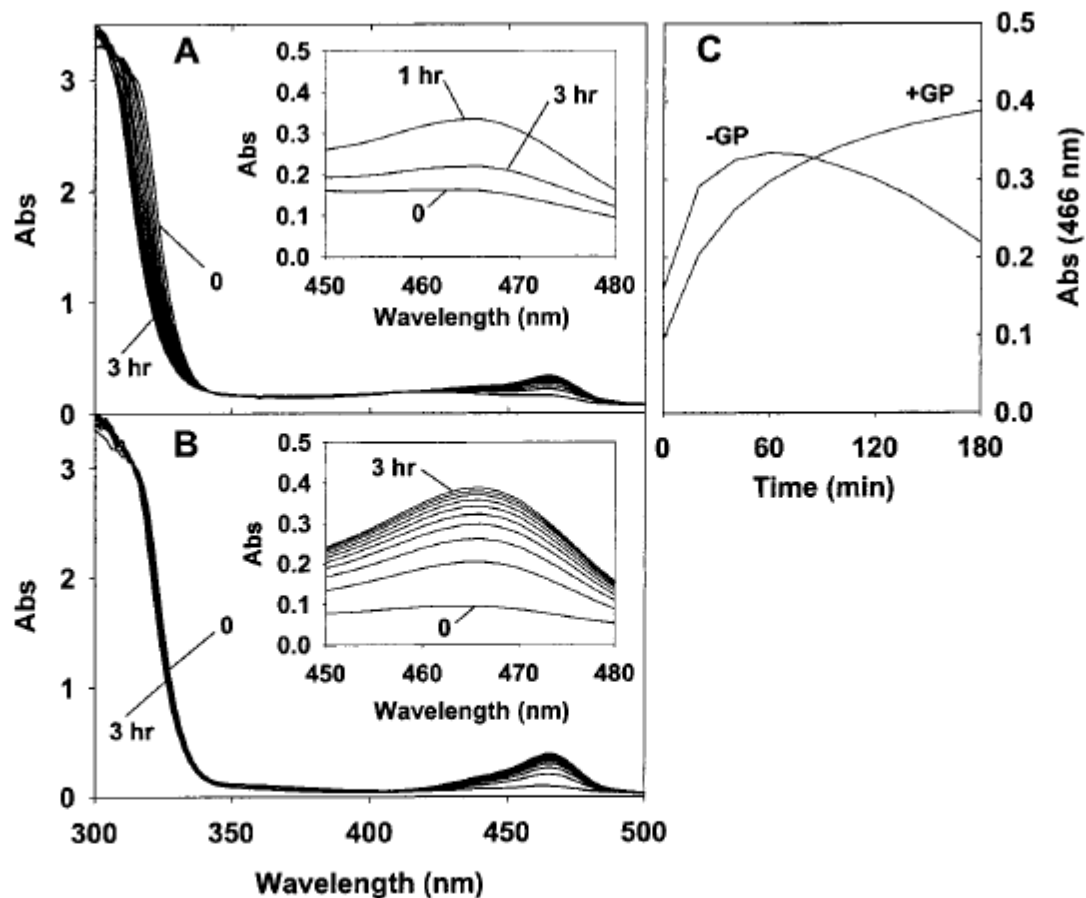
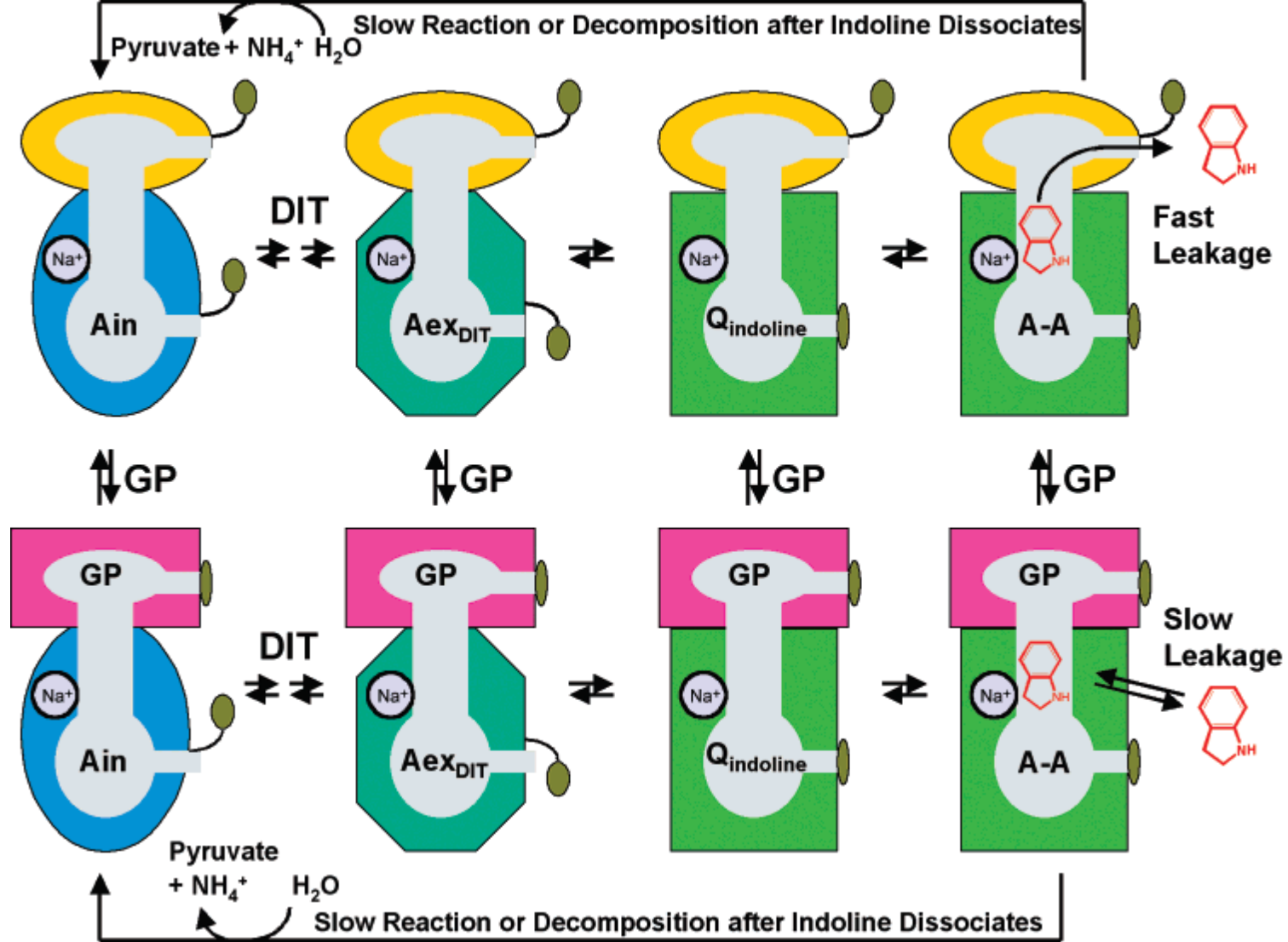
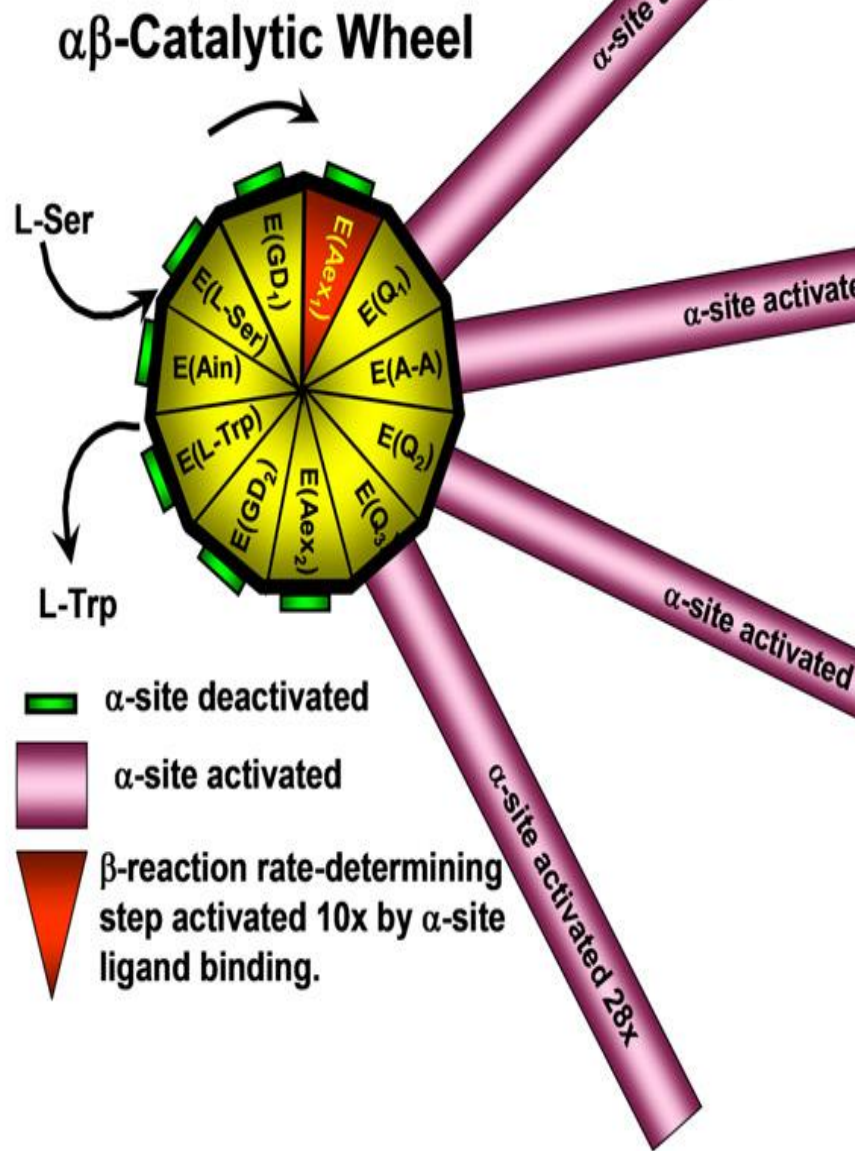
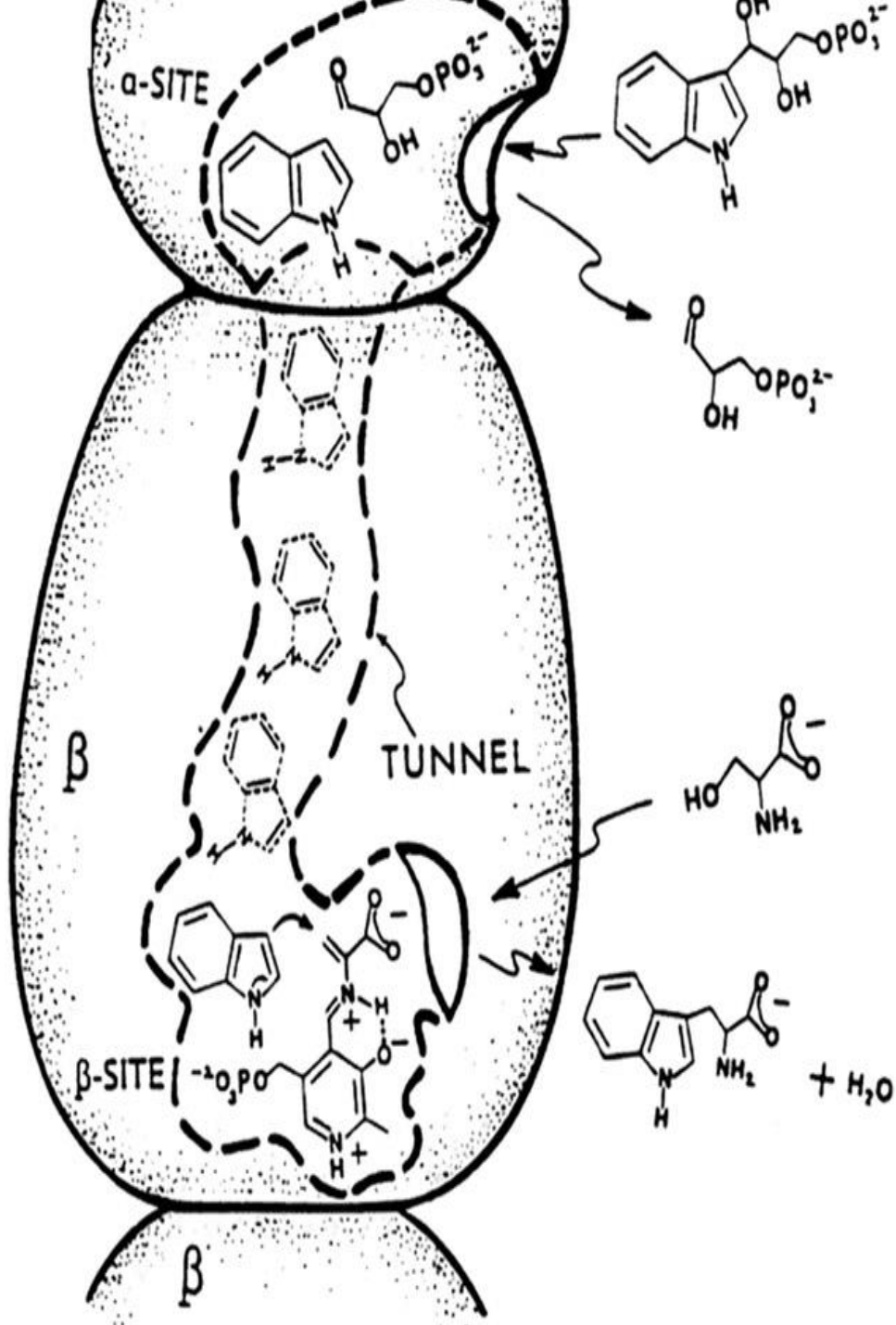


FIGURE 2: Time-resolved spectra for the reaction of $\alpha_2\beta_2$ with DIT without (A) and with GP (B). DIT slowly forms E(Q)_{indoline} ($\lambda_{\max} = 466$ nm). Spectra were measured at 20 min intervals. Insets show expansions of the quinonoid region. Panel C shows the single wavelength time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



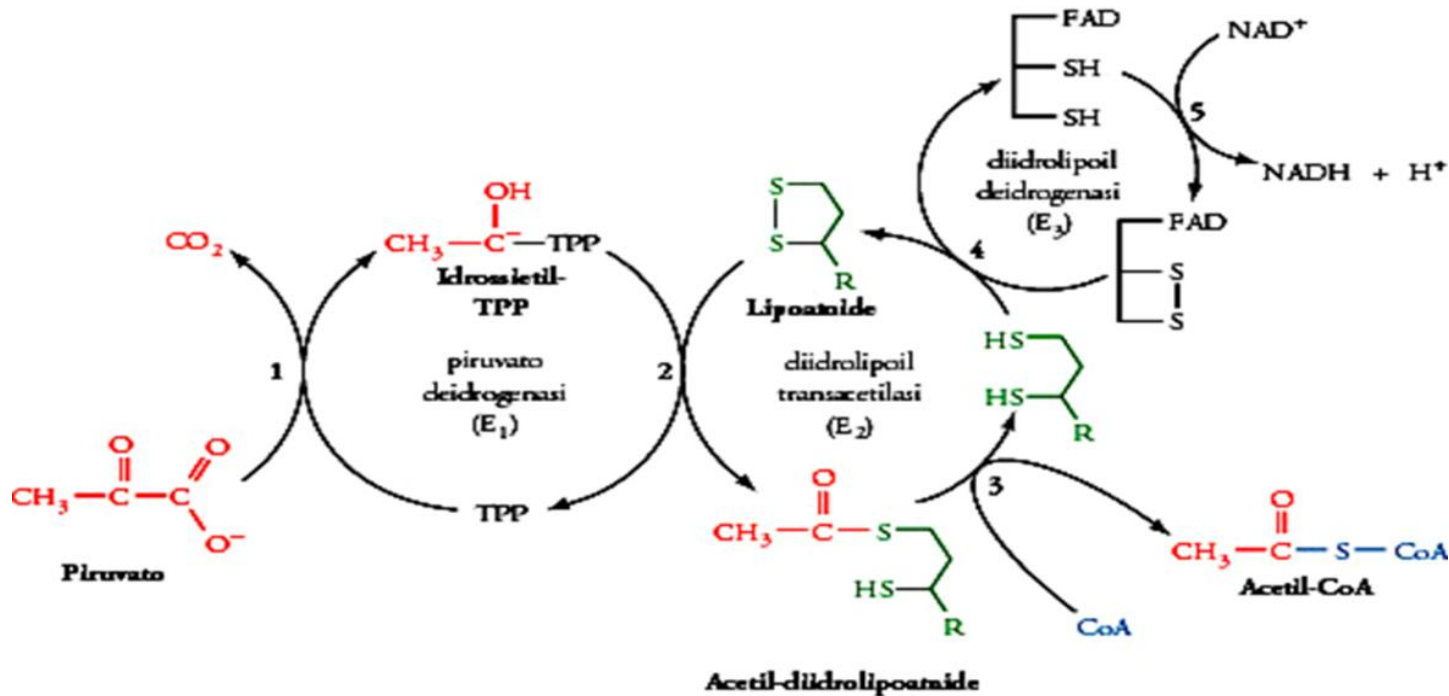


COMPLESSO DELLA PIRUVATO DEIDROGENASI (PDH)

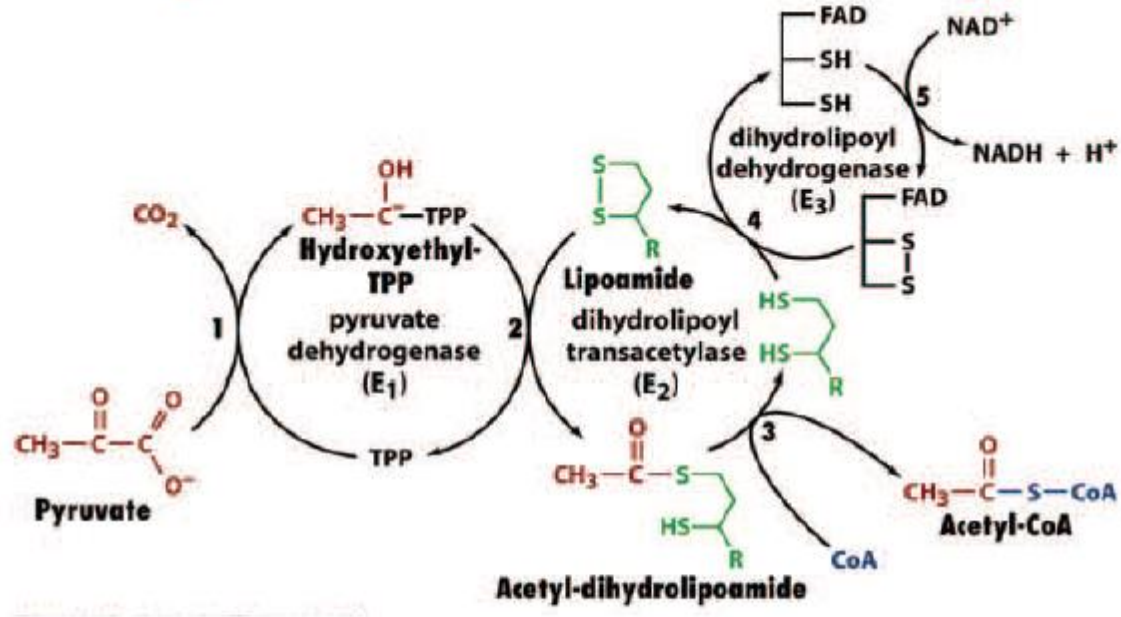
Alcuni complessi multienzimatici catalizzano una serie di reazioni complicate sequenziali e spesso cicliche che richiedono coordinazione

Ciascun enzima svolge una funzione specifica e

il substrato è legato covalentemente ad un dominio che ha la funzione di trasportare il substrato tra i siti attivi degli enzimi



Complesso della Piruvato deidrogenasi



- il **gruppo idrossietile** legato alla TPP viene trasferito alla lipoamide ossidata riducendola a diidrolipoamide
- l'idrossietile (aldeide) viene contemporaneamente **ossidato** ad **acetile**
- quando l'acetile è trasferito al CoA, due elettroni restano sulla diidrolipoamide

Complesso della Piruvato deidrogenasi

- complesso multienzimatico contenente **3 enzimi** in copie multiple

E1 \Rightarrow piruvato deidrogenasi

E2 \Rightarrow diidrolipoil transacetilasi

E3 \Rightarrow diidrolipoil deidrogenasi

E.coli: 60 subunità totali (~ 4600 kD, diametro ~ 300 Å)

24 proteine E2 (associate in trimeri agli angoli di un cubo)

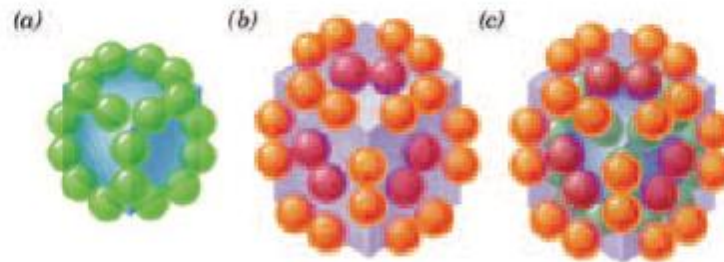
24 proteine E1 (associate in dimeri lungo i 12 lati del cubo)

12 proteine E3 (associate in dimeri sulle 6 facce del cubo)

palline verdi

palline arancioni

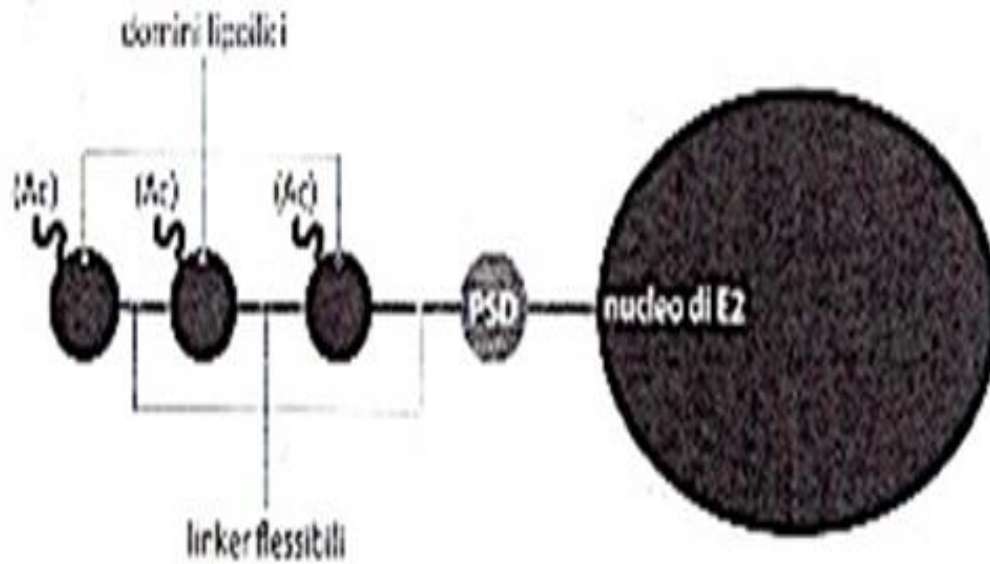
palline viola



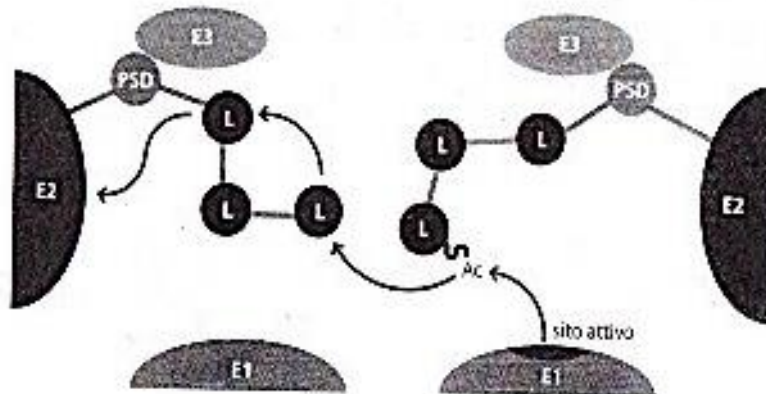
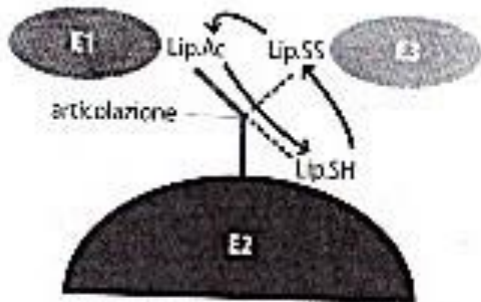
- il complesso di mitocondrio di mammifero ha dimensioni doppie di quelle del complesso di *E. coli* e contiene anche subunità regolatorie

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

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



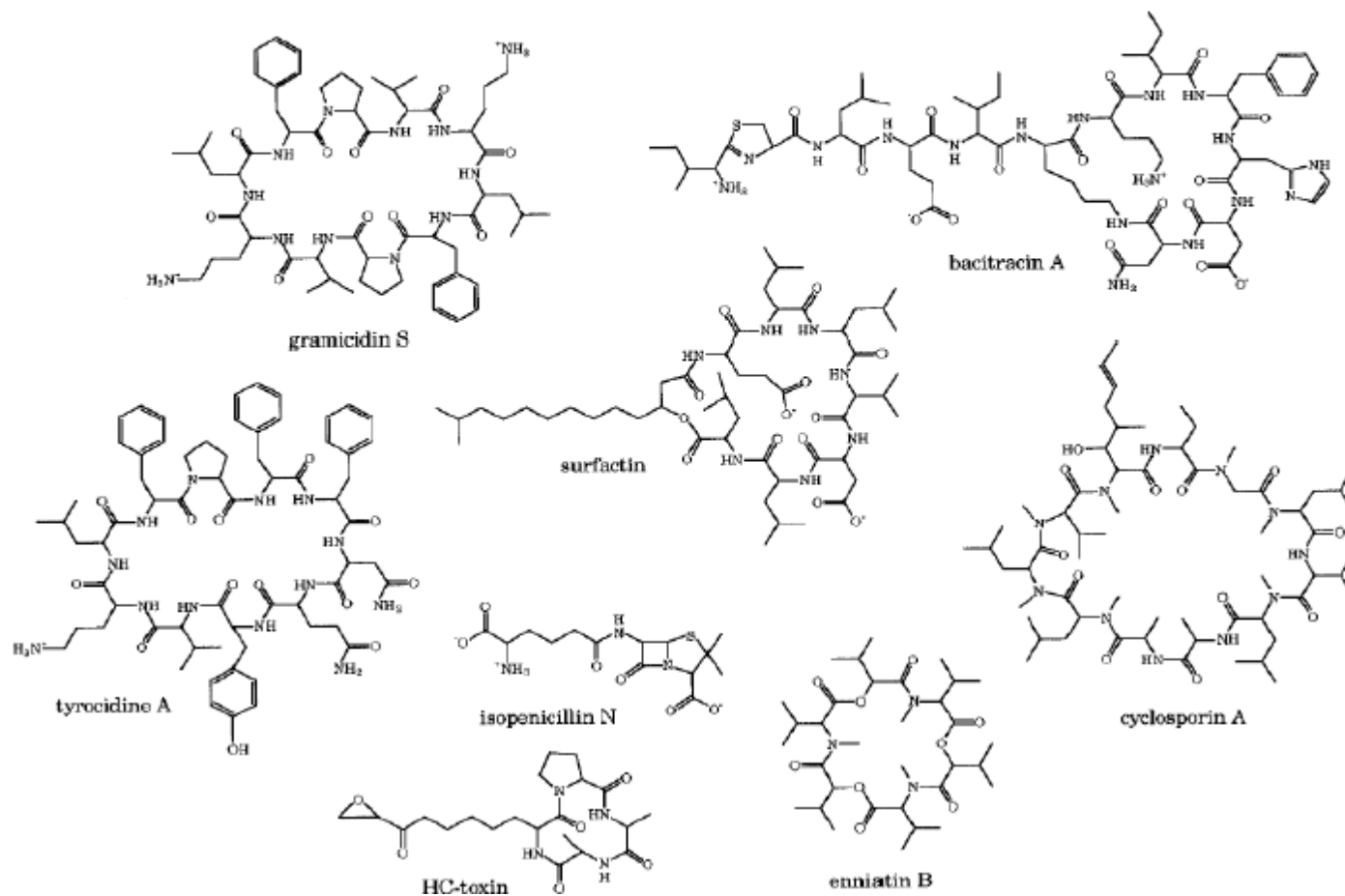
Il complesso della piruvato decarbossilasi presenta un accoppiamento dei siti attivi tali che la rimozione del braccio lipoico non determina un cambiamento significativo della velocità di reazione



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



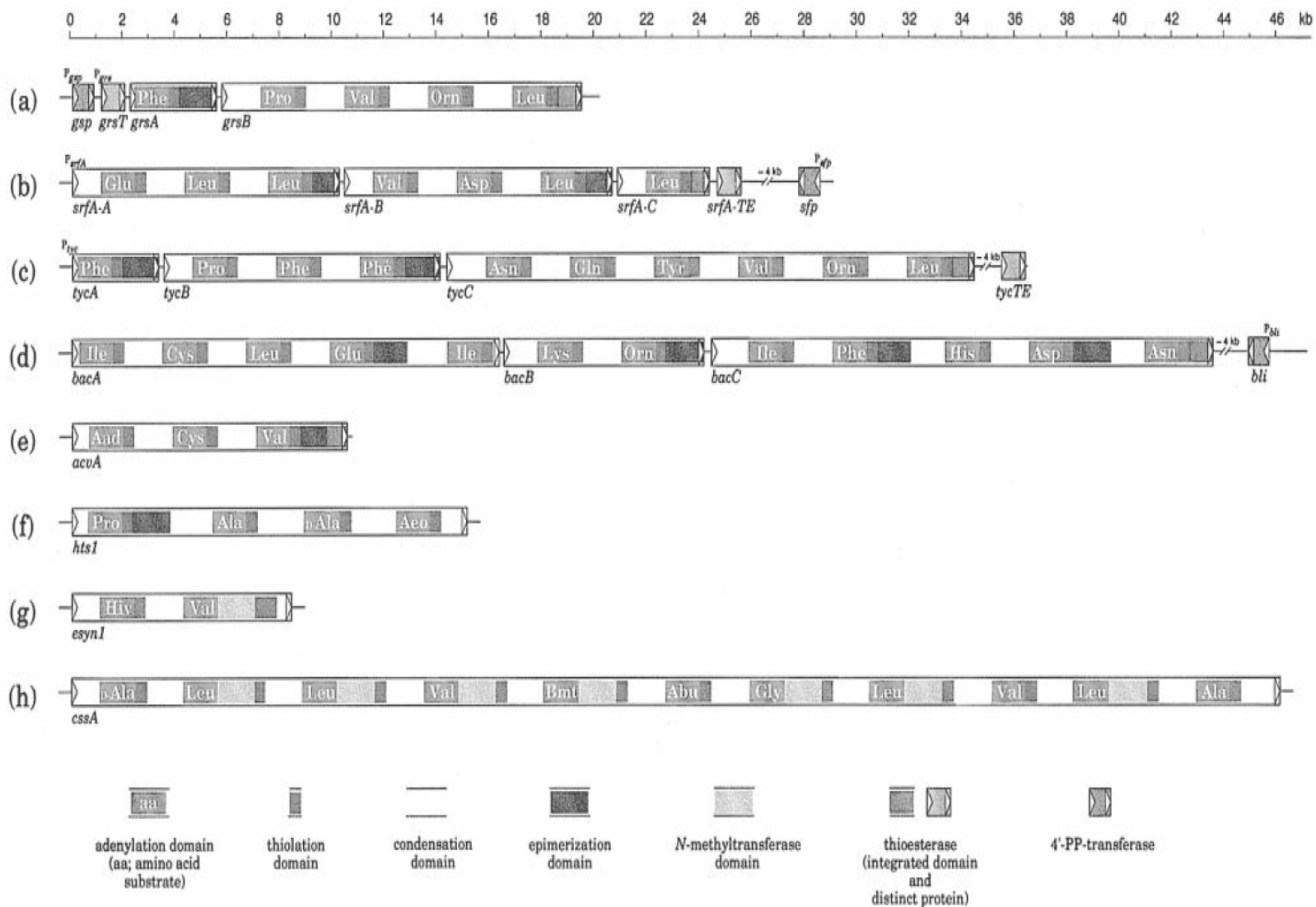


Figure 3. Schematic diagram showing the modular organization of peptide synthetases encoded by the bacterial operons *grs* (gramicidin S; row a), *srfA* (surfactin; row b), *tyc* (tyrocidin; row c) and *bac* (bacitracin; row d) as well as the fungal genes *acvA* (δ -(*L*- α -aminoadipyl)-*L*-Cys-*D*-Val;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

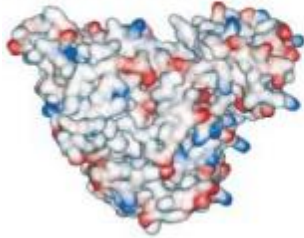
Analogia tra NRPS e sintesi proteica

substrate activation

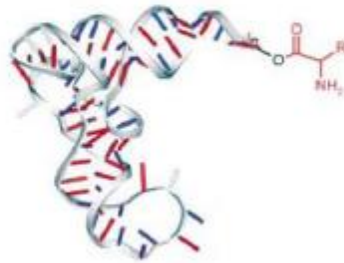
substrate carrier

peptide bond formation

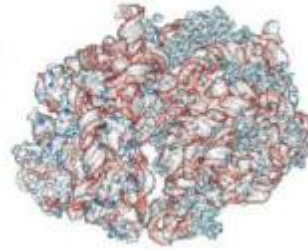
A. Ribosomal



tRNA synthetase

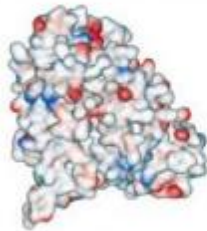


tRNA

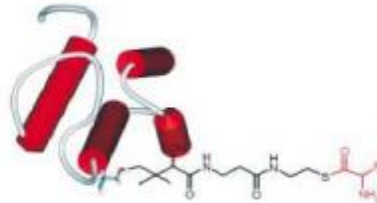


ribosome

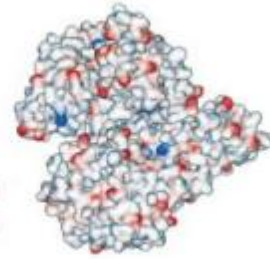
B. Nonribosomal



adenylation domain



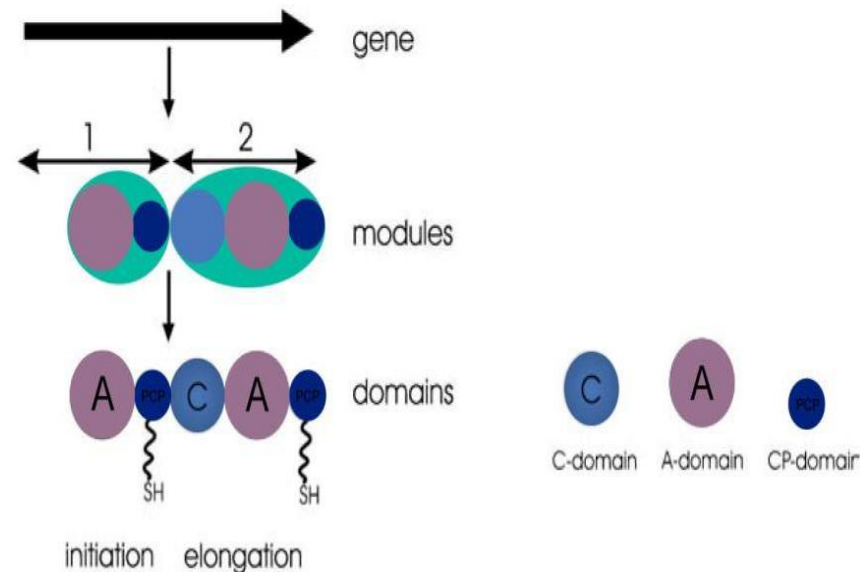
peptidyl carrier protein



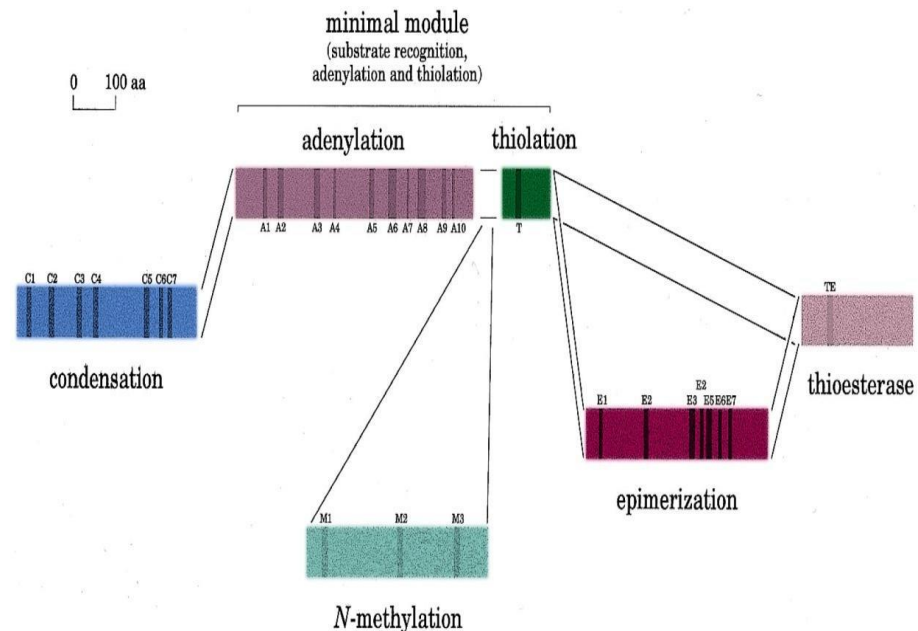
condensation domain

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 moduli. Esiste quindi una colinearità tra il prodotto del gene e quello dell'enzima.

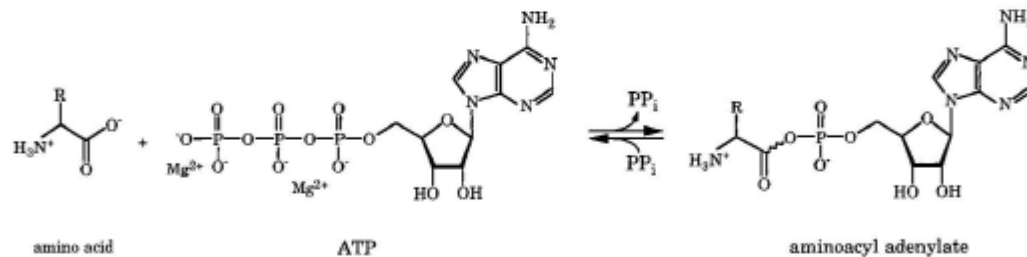


Ogni modulo è organizzato in domini e catalizza l'inserimento di un singolo amminoacido nel prodotto



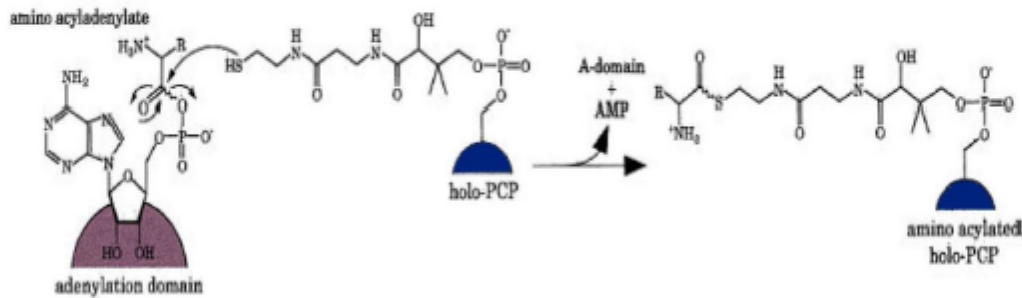
Dominio di adenilazione (A)

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 aminoacidi 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.

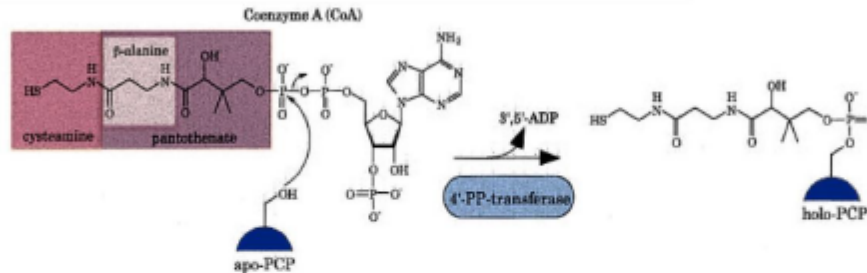


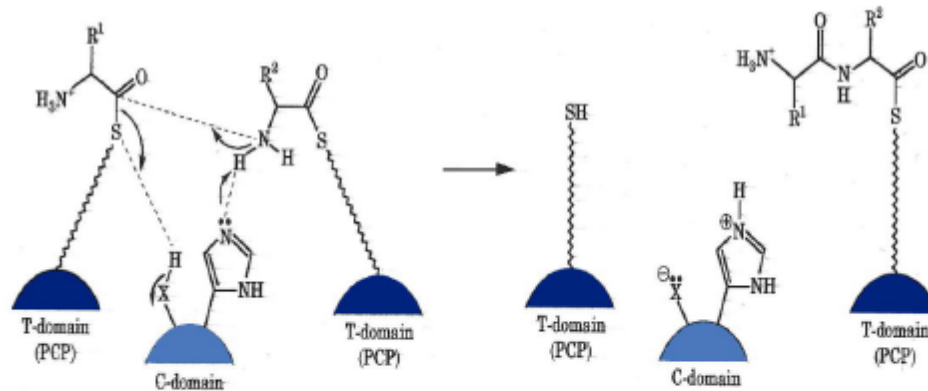
Table 4. Enzyme Superfamily of Acyl/Peptidyl Carrier Proteins (ACPs/PCPs): Sequence Alignment around the Highly Conserved Cofactor 4'-PP Binding Site

Enzyme	Organism	Position (aa)	Sequence ^a
A) Peptide synthetases			
TycA	<i>Bacillus brevis</i>	563	D N F Y S L G G H S I Q A I Q V
GraB	<i>Bacillus brevis</i>	2033	D N F F E L G G H S L R A M T M
SrfA-B	<i>Bacillus subtilis</i>	990	D N F F M I G G H S L K A M M M
AcvA	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3049	D D L F K L G G D S I T S L H L
Hts1	<i>Cochliobolus carbonum</i>	2405	S D F F S S G G N S M A A I A L
CssA	<i>Tolypocladium nivatum</i>	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	<i>Streptomyces coslicolor</i>	33	L R F E D I G Y D S L A L M E T
Gra-ACP	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	33	I T F E E L G Y D S L A L M E S
Fatty acid synthases			
FAS-ACP ^b	<i>Escherichia coli</i>	28	S F V E D L G A D S L D T V E L
FAS-ACP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	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: TycA⁵⁴, GraB³⁰, SrfA-B³⁰, AcvA²⁹, CssA³⁶, Hts³⁶, Act-ACP¹⁰⁴, Gra-ACP¹⁰⁵, FAS-ACP from *E. coli*¹⁰³, FAS-ACP from yeast¹⁰².

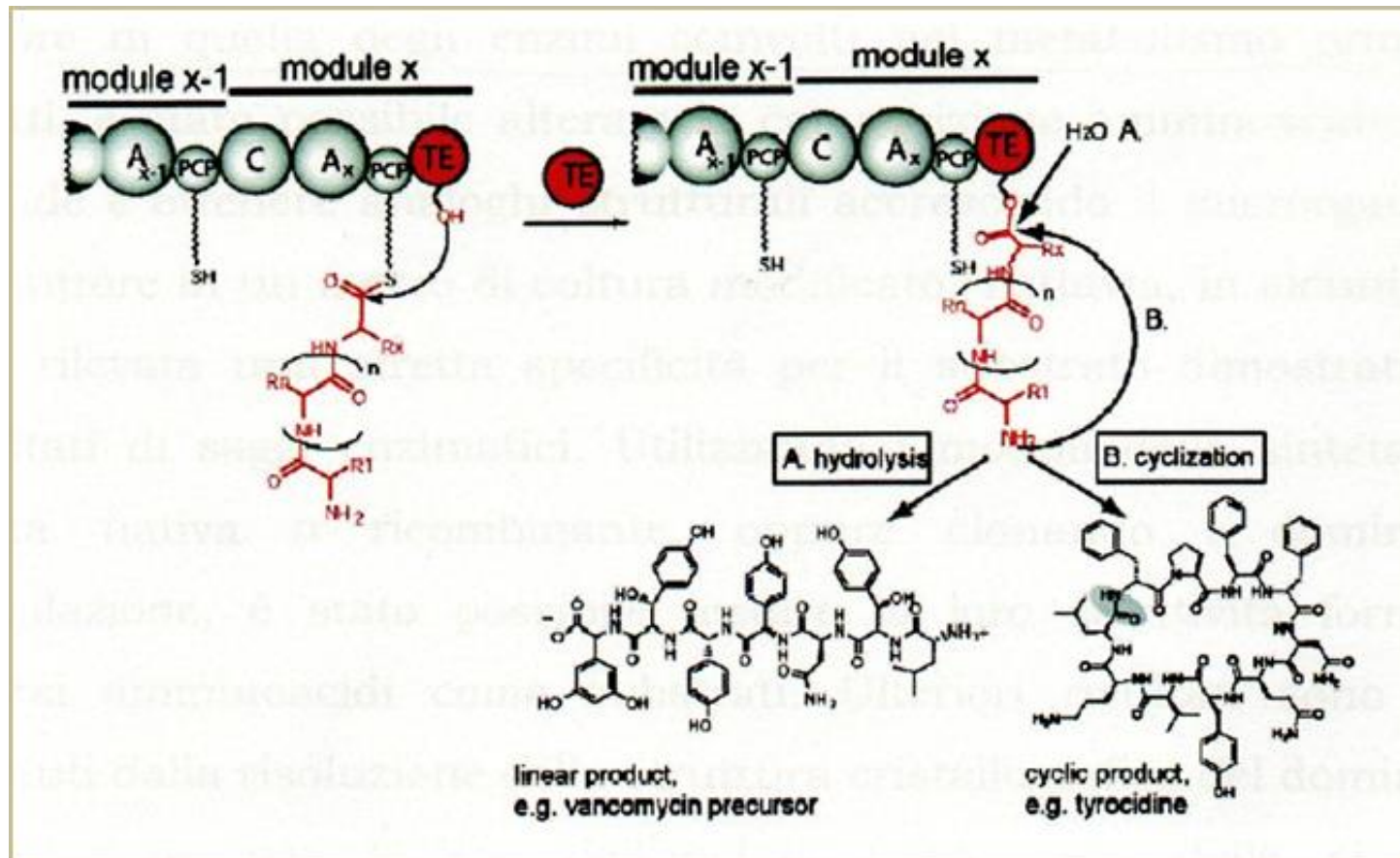
Dominio di condensazione (C)

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.

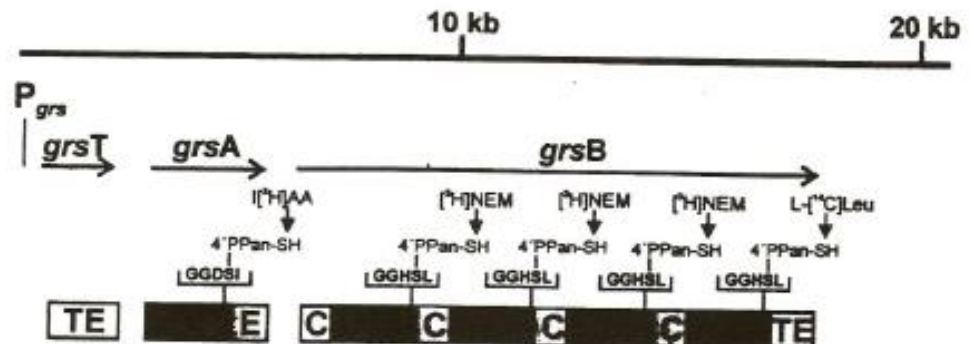
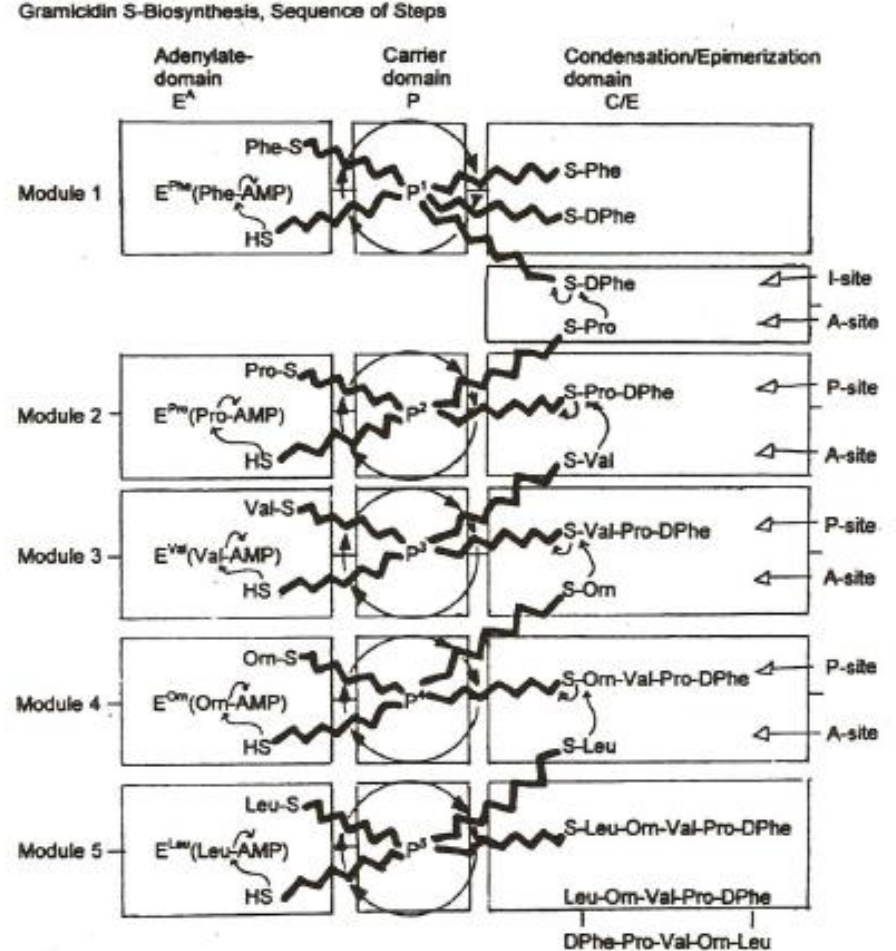


Il dominio tioesterasico

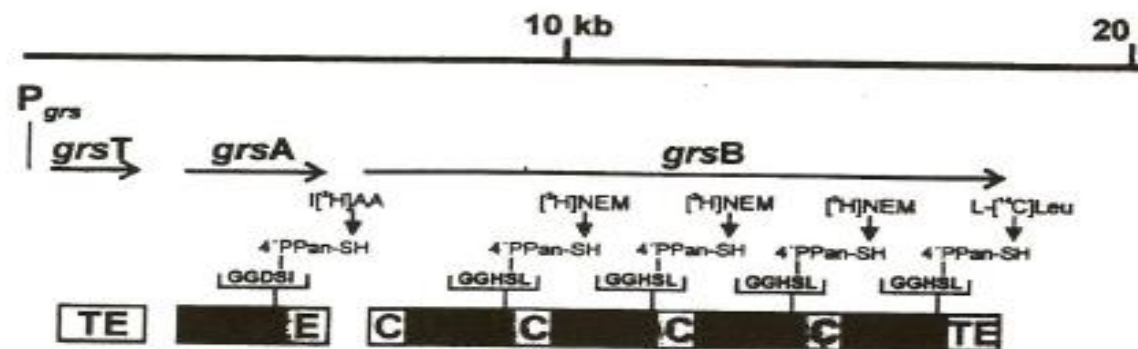
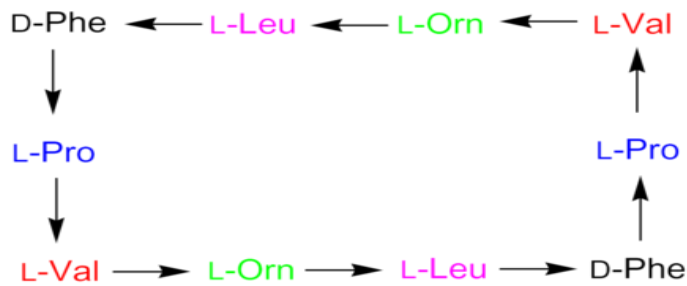
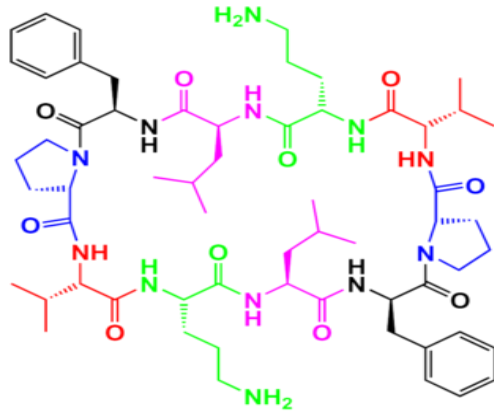
di circa 250 amminoacidi presente alla fine dell'ultimo modulo. Il meccanismo di catalisi è simile a quello delle proteasi a serina e la reazione genera un intermedio acil-O-TE. Il rilascio del peptide avviene per attacco nucleofilo intramolecolare che genera un prodotto ciclico o per idrolisi nel caso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



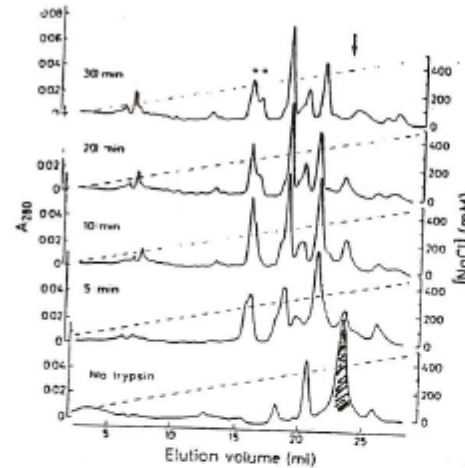
La gramicidina è uno ionoforo costituito da 10 aminoacidi 5 ripetuti testa coda
 D)Phe-Pro-Val-Orn-Leu-(D)Phe-Pro-Val-Orn-Leu



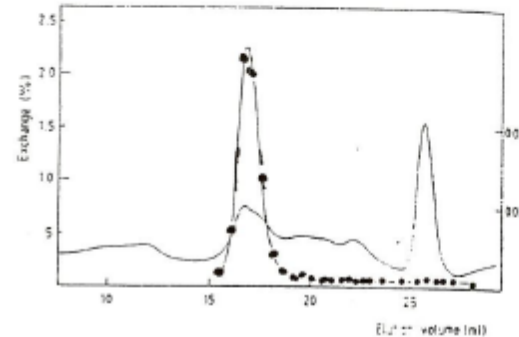
Identificazione del sito attivo.

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



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

L'enzima viene incubato con i substrati e successivamente viene aggiunto ${}^{32}\text{PP}_i$ 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 (${}^{14}\text{C}$ oppure ${}^3\text{H}$) 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 affinità' 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 ditionitrito (DTT) e gel-filtrazione per rimuovere la valina
- Marcatura del sito attivo con [³H] NEM
- Digestione con tripsina per ottenere frammenti proteici da analizzare
- Purificazione del peptide marcato con [³H] e sequenziamento mediante degradazione di Edman
- Sequenza: LGGH Δ A LR
- Δ 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

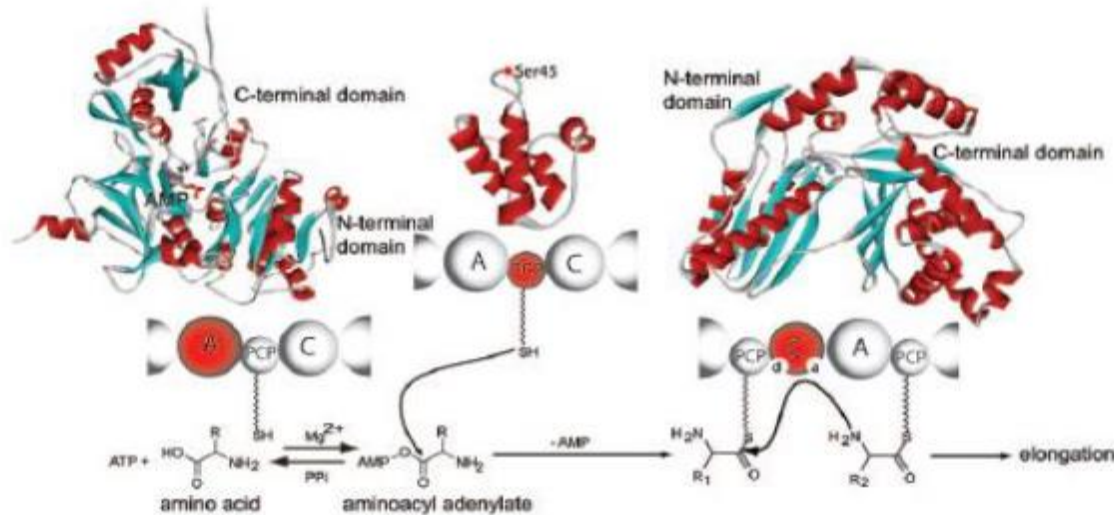


FIG. 4. Chemical principles of nonribosomal peptide synthesis. Domains in action are indicated in red and the respective crystal structures are shown above. First, the A-domain specifically recognizes a dedicated amino acid and catalyzes formation of the aminoacyl adenylate under consumption of ATP. 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. cholerae* 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 (Dalton)		Residue ESI-
				Calculation from gene ^a	Pan-adduct ^b	
GS1	Phe	D 564 - K 575	DNFYALGGDSIK └ Pan- ³ H]NES	1299.4	1764.9	176
GS2	L-Pro	I 983 - K1008	IWEEVLGISQIGIQDNFFSLGGHSLK └ Pan- ³ H]NES	2888.4	3353.8	335
	L-Val	I2029 - R2044	IGVLDNFFELGGHSLR └ Pan- ³ H]NES	1774.0	2239.5	223
	L-Orn	V3075 - K3090	VGIHDDFFTIGGHSLK └ Pan- ³ H]NES	1742.9	2208.3	220
	L-Leu	F4120 - L4132	FELGGHSLKATLL └ Pan- ¹⁴ C]Leu	1385.6	1848.9	184

Modificazioni del peptide

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

