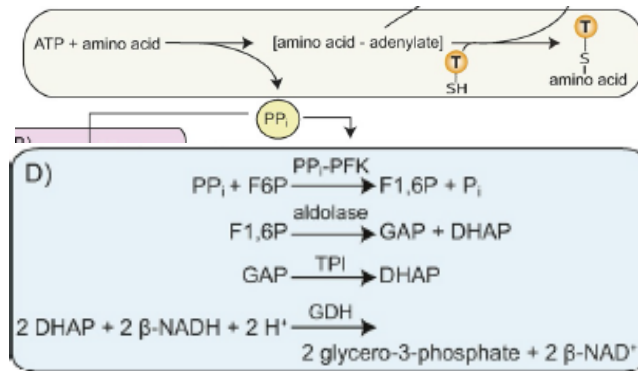


Esercizi NRPS



Schema del saggio accoppiato continuo NADH/PPi

Lo schema rappresenta la sequenza di reazioni che permettono di determinare l'attività ATP-dipendente dei domini di adenilazione (A-domain) attraverso il consumo di NADH. Si misura spettrofotometricamente la variazione di assorbanza a 340 nm dovuta al consumo di NADH e la velocità di reazione viene calcolata secondo la legge di Lambert-Beer mediante l'equazione

$$v = (\Delta A_{340}/\text{min}) / [\epsilon_{340}(\text{NADH}) \times l \times 2]$$

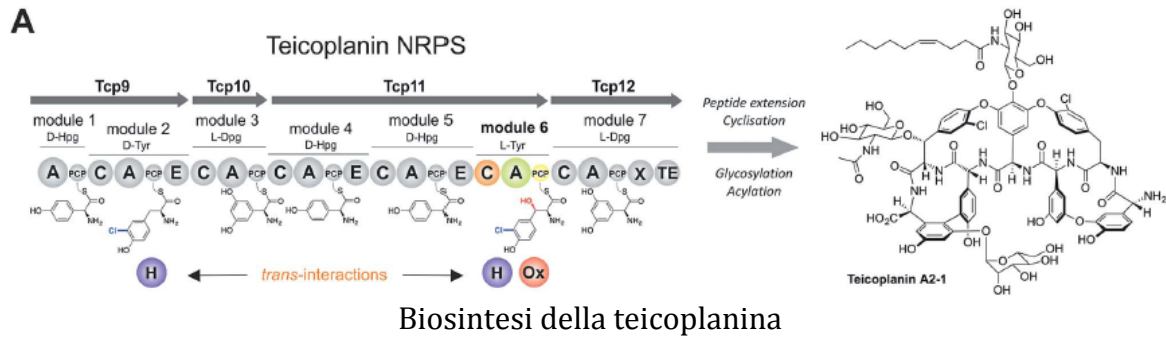
dove l è il cammino ottico della cuvetta.

- spiegare perchè è necessario dividere per 2 per ottenere la velocità di reazione di A-domain

La reazione viene iniziata con l'aggiunta dell'amminoacido substrato dell'A-domain alla mix

- indicare quali dei seguenti componenti NON devono essere presenti nella mix iniziale
- | | | | | | |
|----------|---------|----------|-----|------|------|
| ATP | F6P | F1,6P | GAP | DHAP | NADH |
| A-domain | PPi-PFK | aldolase | TPI | GDH | |

- che cosa succede se non è presente TPI nella mix?



L'antibiotico teicoplanina contiene l'amminoacido modificato cloro-β-idrossi-tirosina (Cl-Bht) in posizione 6. Nella biosintesi della teicoplanina il modulo 6 attiva la tirosina che viene modificata da una alogenasi (H) e una monossigenasi (Ox) che introducono l'atomo di cloro e il gruppo ossidrilico, rispettivamente, prima che avvenga l'incorporazione nel peptide.

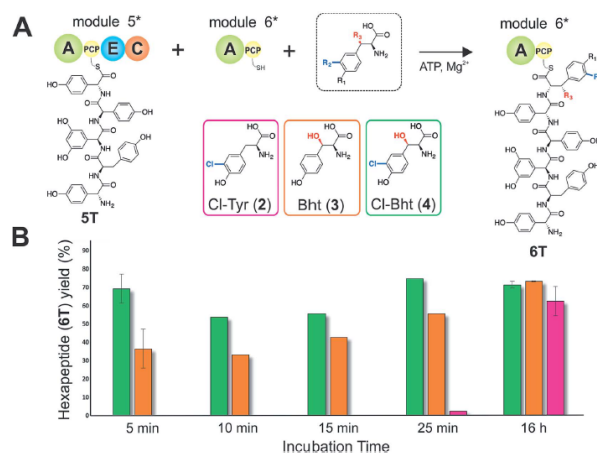


Fig. 6 The rate of pentapeptide extension by teicoplanin module 6 using differently modified tyrosine residues as substrates (A). Hexapeptide biosynthesis reconstituted using ATP, pentapeptide (5T)-loaded M5, plus Cl-Tyr (2), Bht (3) and Cl-Bht (4) as M6 substrates, analysed by LCMS analysis (ESI, positive mode) at various time intervals (B). 5 min and 16 h experiments were performed in triplicate with the standard deviation indicated; other time points are the result of single experiments. A – adenylation domain, C – condensation domain, PCP – peptidyl carrier protein domain, E – epimerisation domain, Cl-Tyr – 3-chlorotyrosine (2), Bht – β-hydroxytyrosine (3), Cl-Bht – 3-chloro-β-hydroxytyrosine (4).

La figura rappresenta l'estensione catalizzata da M5/6-C del pentapeptide caricato su M5 utilizzando diversi analoghi della tirosina per caricare M6-A *in vitro*. Il grafico B riporta la resa di esapeptide prodotto e dimostra che l'ordine di preferenza dei substrati di M6-A da parte di M5/6-C è Cl-Bht > Bht > Cl-Tyr.

- *In vivo* quale enzima (H oppure Ox) deve agire per primo su M6-PCP-Tyr per ottenere il derivato corretto Cl-Bht nell'antibiotico? Perché?