PROTEINE

Lo studio delle proteine è il settore più importante in Chimica Bioorganica. Infatti:

A) Gli enzimi sono proteine

Conoscere il funzionamento di un'enzima può servire a progettare e realizzare farmaci che lo inibiscano (*inibitori enzimatici*),

ma anche ad utilizzare gli enzimi in sintesi organica o per la trasformazione di sostanze naturali

B) Anche altri importanti "target biologici" sono proteine

I recettori ed i canali ionici sono macromolecole di tipo proteico che svolgono ruoli importantissimi nei processi biologici.

Anche in questo caso la conoscenza della loro struttura e del loro modo di azione è importante nella progettazione di nuovi farmaci

C) Proteine relativamente "piccole" svolgono il ruolo di molecole segnale

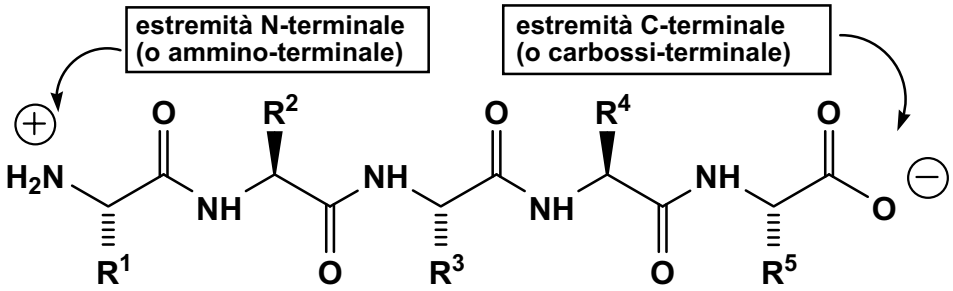
D) Molti processi biologici sono mediati da complesse interazioni proteina-proteina

Se il DNA è il depositario del codice genetico, sono le proteine a realizzare in pratica tutti i fenomeni biologici

STRUTTURA DELLE PROTEINE

Come sono fatte le proteine?

STRUTTURA PRIMARIA



La struttura primaria dipende dalla sequenza specifica degli amminoacidi nella proteina e discende direttamente dal gene che ne codifica la sintesi

DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA

Prima di determinare la struttura primaria vengono sempre rotti i ponti disolfuro, responsabili della struttura terziaria

Si può innanzitutto determinare quali amminoacidi sono presenti ed in quale percentuale relativa:

- **Si esegue una idrolisi di tutti i legami ammidici in condizioni drastiche (ad es. HCl 6 N). <u>Attenzione</u>: in queste condizioni l'asparagina si trasforma in acido aspartico e la glutammina in acido glutammico.**

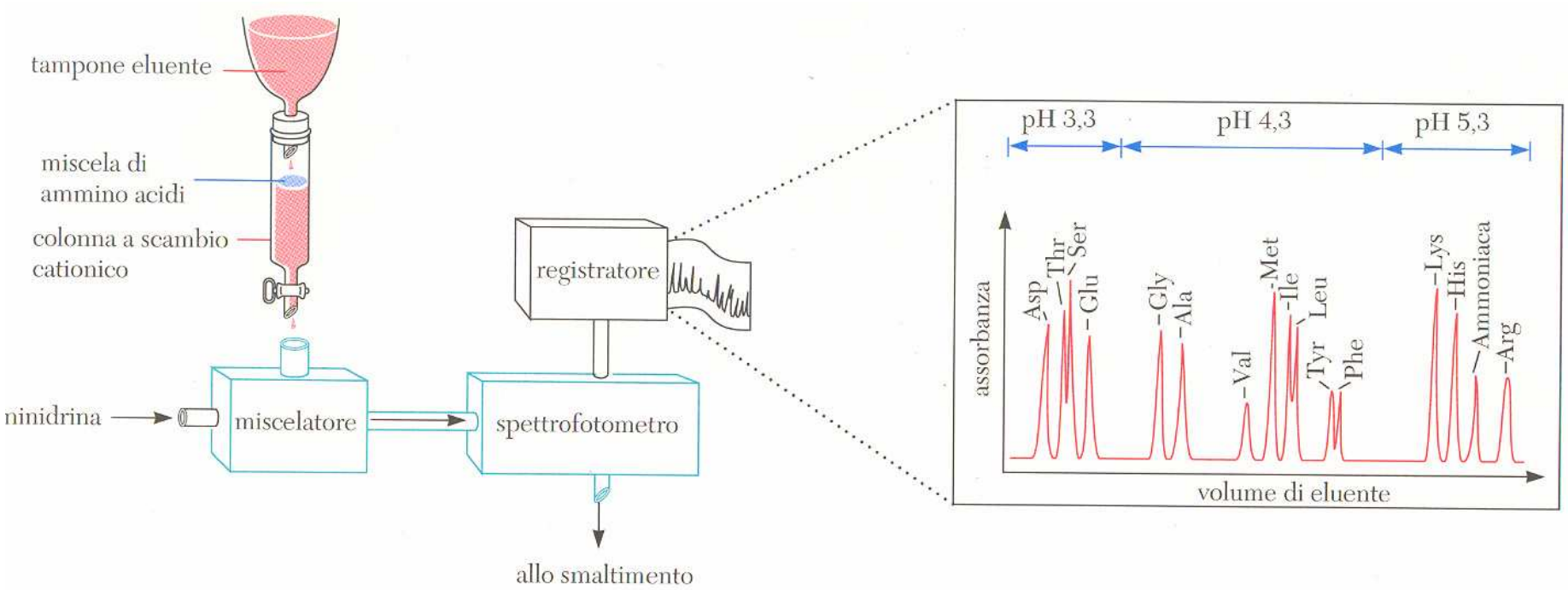
- **Si analizzano <u>quantitativamente</u> gli amminoacidi mediante cromatografia a scambio ionico**

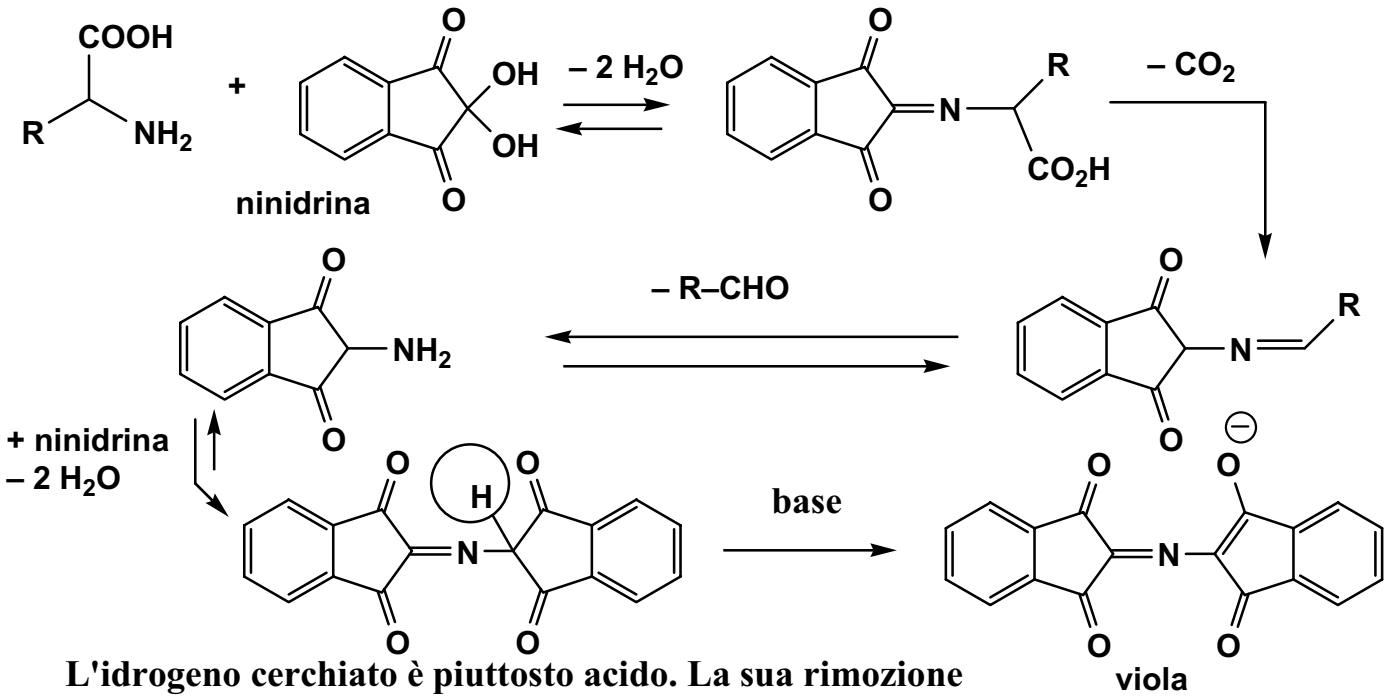
- **Questa analisi non ci dà informazioni sulla sequenza e serve soprattutto a decidere la strategia migliore da impiegare con i metodi descritti successivamente**

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Viene eseguita con solventi acquosi come fase mobile, usando come fase stazionaria una resina con legati gruppi cationici (ad es. ioni ammonio) o anionici (ad es. solfonati o carbossilati).

- **Se la resina ha legati gruppi <u>anionici</u>, la cromatografia è detta <u>a scambio cationico</u>.**
- **Viceversa se ha legati gruppi <u>cationici</u>, è detta <u>s scambio anionico</u>.**
- **Gli analizzatori di amminoacidi usano resine a scambio cationico.**
- **La parte cationica dell'amminoacido si lega alla resina con un legame ionico**
- **La fase mobile contiene a sua volta cationi che possono scambiare con i cationi degli amminoacidi attraverso reazioni di equilibrio.**
- **L'equilibrio dipende dalla struttura dell'aminoacido e dal pH e quindi amminoacidi differenti eluiscono con velocità differenti**
- **All'uscita della colonna gli amminoacidi vengono mescolati con ninidrina ed il complesso risultante viene analizzato con un rivelatore UV-VIS**



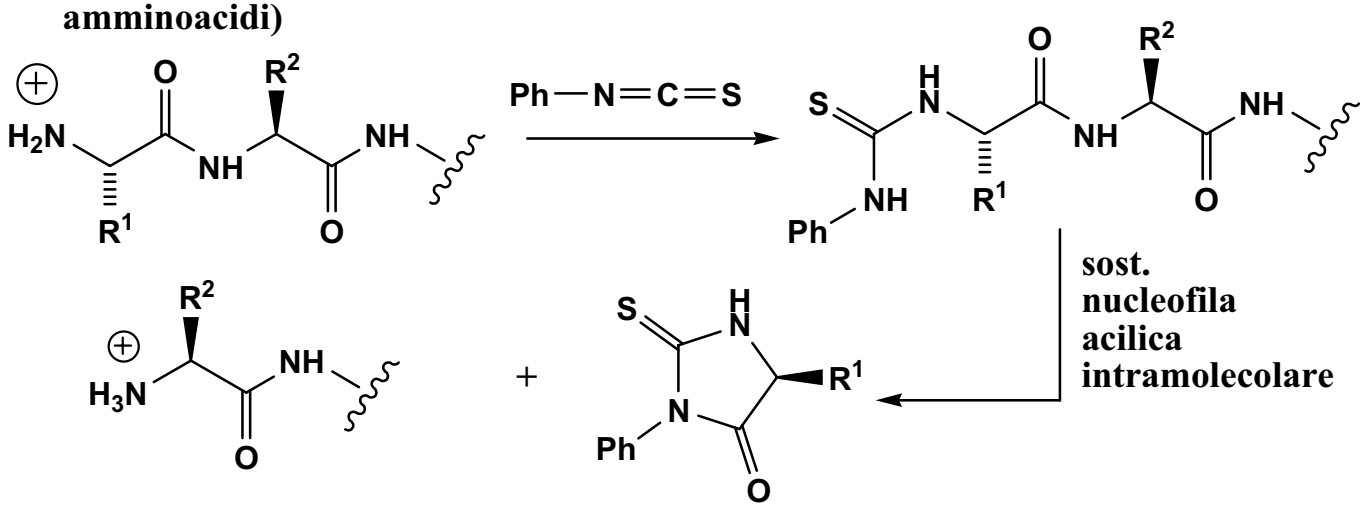


L'idrogeno cerchiato è piuttosto acido. La sua rimozione sposta l'equilibrio complessivo

DETERMINAZIONE DELLA SEQUENZA

Metodo di Edman

Serve per determinare la sequenza di "piccole" unità peptidiche (fino a 30 amminoacidi)



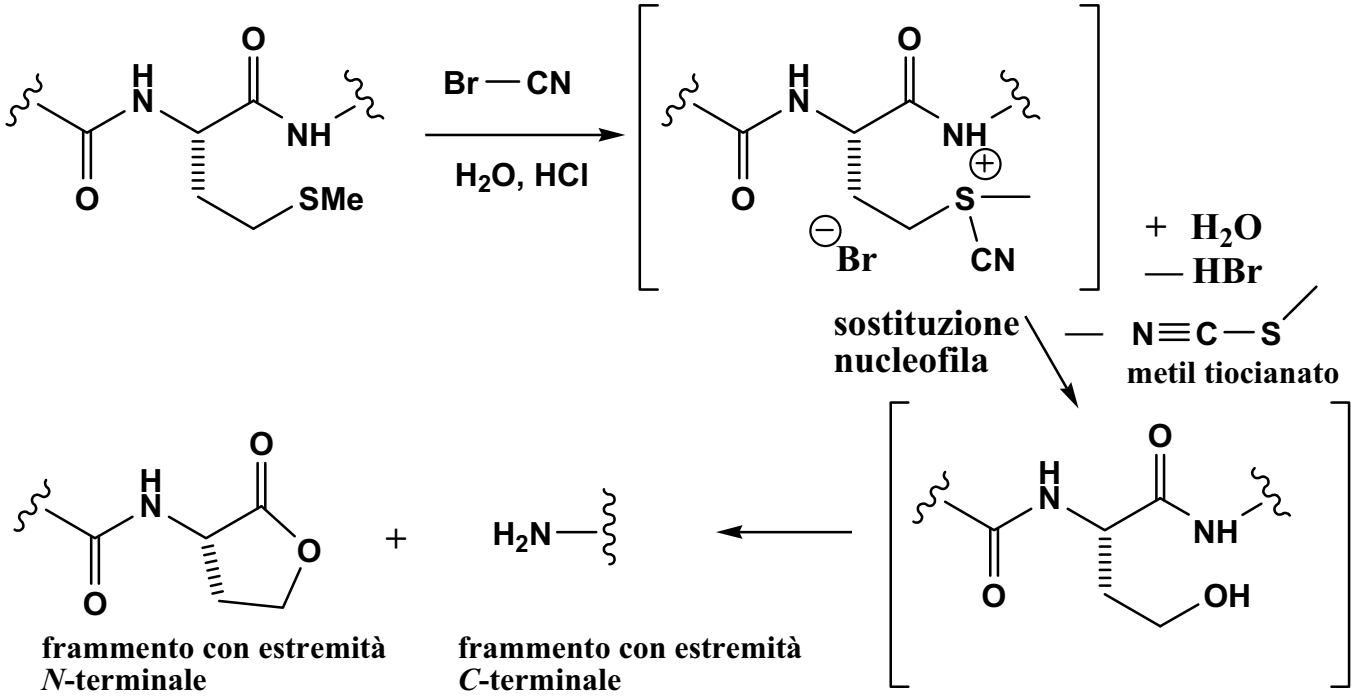
In questo modo viene staccato, sotto forma di tioidantoina, solo l'amminoacido *N*-terminale, che può essere identificato. Il processo viene ripetuto fino ad analizzare tutta la sequenza dell'oligopeptide.

Frammentazione di un peptide più grosso in frammenti più piccoli

Può essere fatto in vari modi, sia chimici che enzimatici

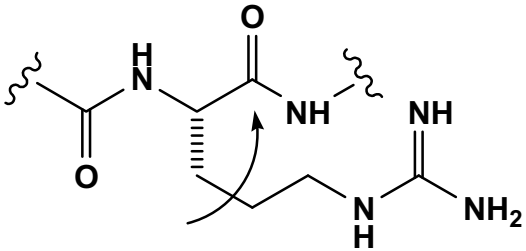
Bromuro di cianogeno

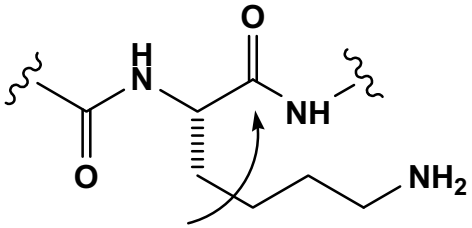
Scinde selettivamente i peptidi in corrispondenza di una metionina



TRIPSINA

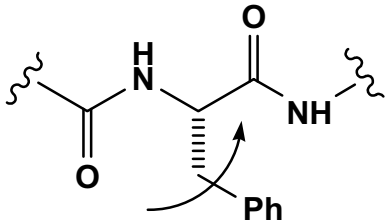
Scinde selettivamente i legami peptidici coinvolgenti i carbossili di Arginina e Lisina

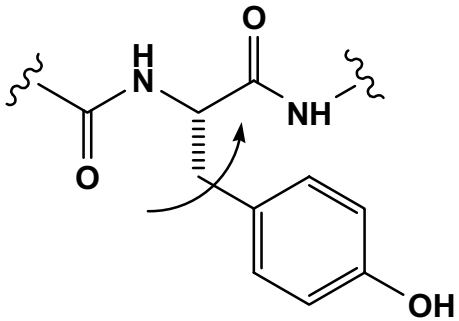


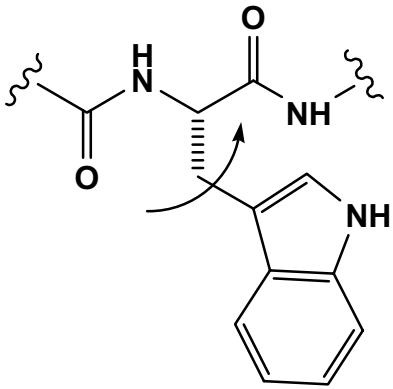


CHIMOTRIPSINA

Scinde selettivamente i legami peptidici coinvolgenti i carbossili di Fenilalanina, Tirosina e Triptofano

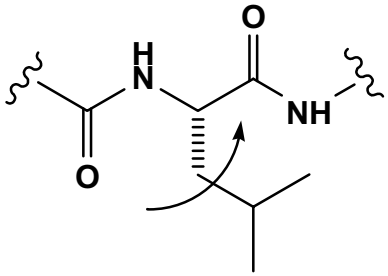


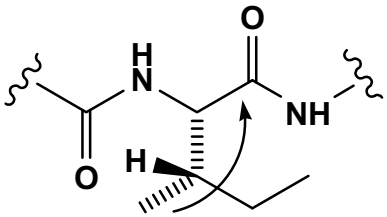


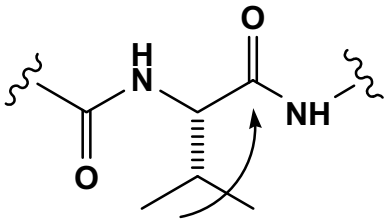


TERMOLISINA

Scinde selettivamente i legami peptidici coinvolgenti i carbossili di Leucina, Isoleucina e Valina







ANALISI DI UN PEPTIDE INCOGNITO

***Scissione con bromuro di cianogeno*:**

Gly-Met + un altro frammento

Scissione con Tripsina

Trp-Gly-Leu-Ser-Ala **Gly-Met-Val-Arg**

Phe-Asp-Gly-Ala-Lys

Scissione con Chimotripsina

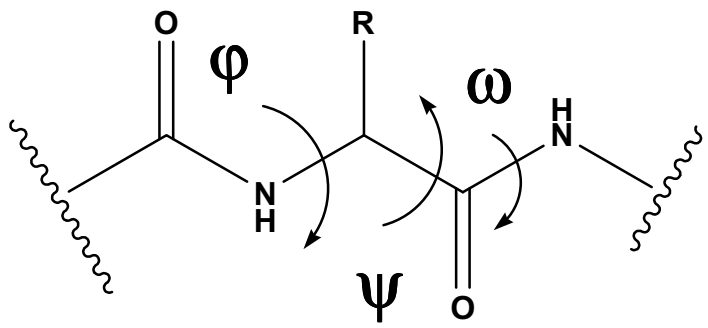
Gly-Leu-Ser-Ala **Asp-Gly-Ala-Lys-Trp** **Gly-Met-Val-Arg-Phe**

Scissione con Termolisina

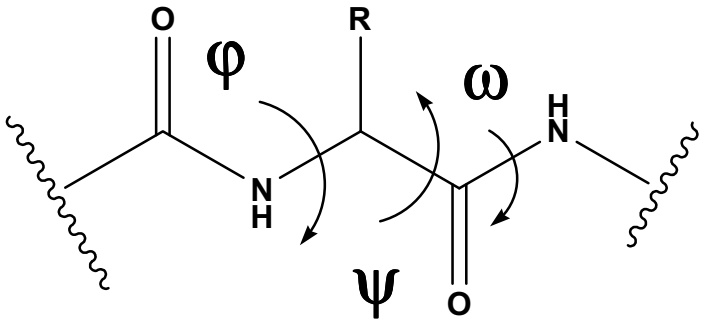
Arg-Phe-Asp-Gly-Ala-Lys-Trp-Gly-Leu **Gly-Met-Val** **Ser-Ala**

STRUTTURA SECONDARIA DELLE PROTEINE

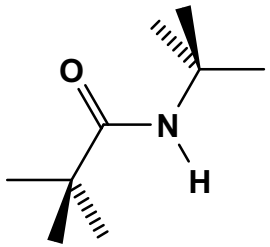
Essendoci libera rotazione intorno ai legami semplici, un peptide può assumere in principio tantissime conformazioni. Tuttavia i dati sperimentali mostrano come spesso le proteine abbiano una geometria ben precisa. Questa geometria, derivante dalla conformazione favorita, è detta <u>struttura secondaria dei peptidi</u>.



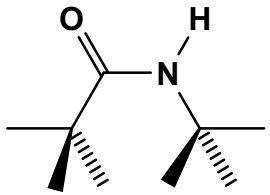
La struttura secondaria può essere definita in modo esatto dai valori di tre angoli diedri per ciascuna unità amminoacidica.



Tuttavia i legami ammidici hanno forte tendenza ad essere planari. Quindi ω può valere 0° o 180°.
In realtà nei peptidi, ω assume quasi sempre un valore pari a 180°. La conformazione dell'ammide è quindi di tipo *transoide*



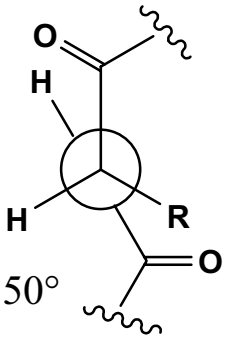
conformazione transoide **conformazione cisoide**



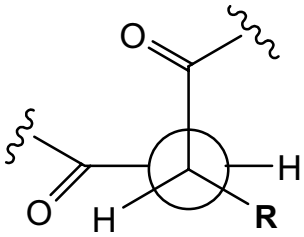
Quindi per definire la struttura secondaria, basta definire φ e ψ

Come si misurano gli angoli φ e ψ ?

φ



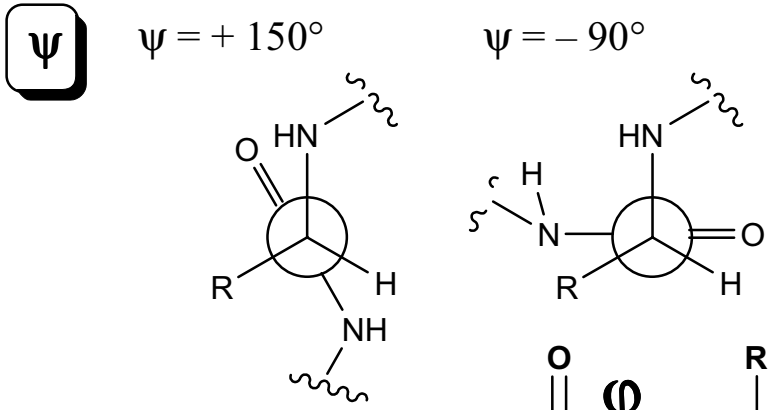
φ = + 150°



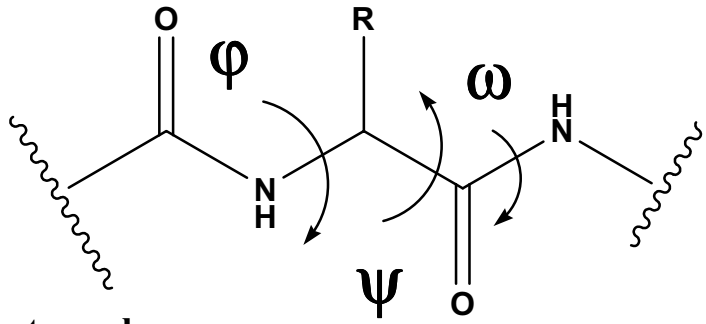
φ = – 90°

Si traguarda il legame (non importa da che direzione) e si guarda la rotazione che deve compiere il carbonile in primo piano per eclissare quello in secondo piano. Rotazioni orarie sono positive, antiorarie negative. Il valore assoluto massimo è 180°.

Come si misurano gli angoli φ e ψ ?



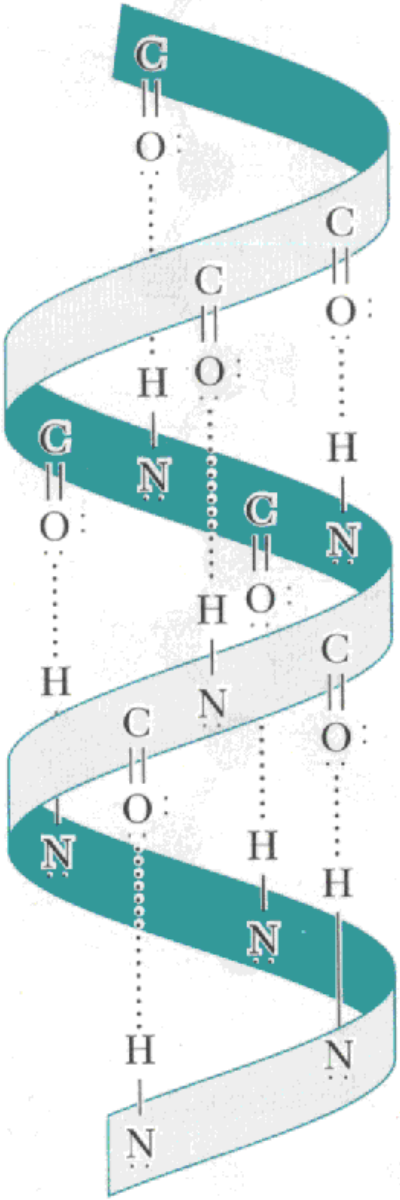
Si traguarda il legame (non importa da che direzione) e si guarda la rotazione che deve compiere l'azoto in primo piano per eclissare quello in secondo piano. Rotazioni orarie sono positive, antiorarie negative. Il valore assoluto massimo è 180°.

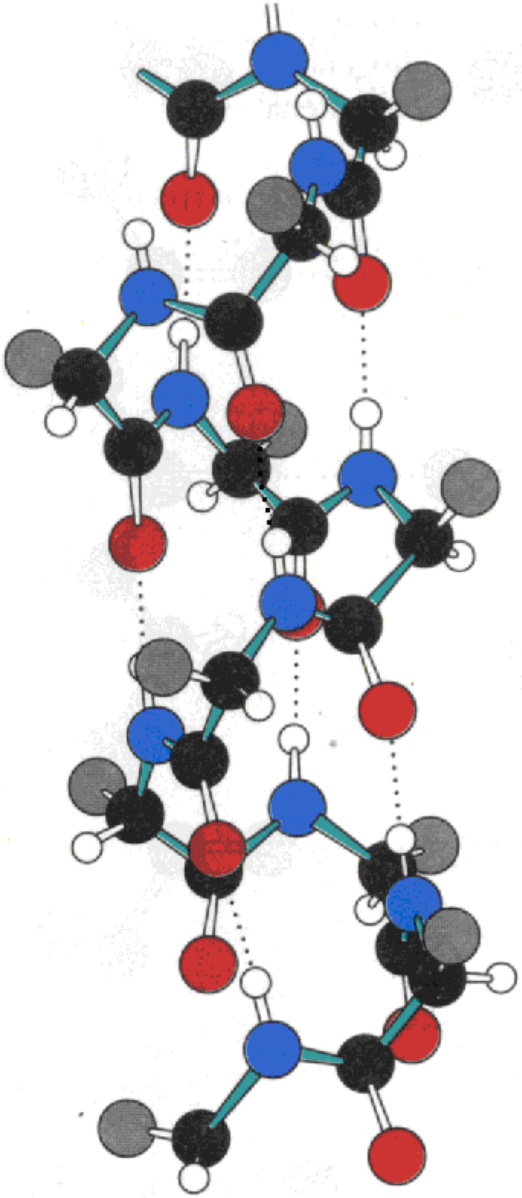


Il fattore più importante nel determinare la struttura secondaria di un peptide sono i legami ad idrogeno tra l'NH ammidico ed il carbonile ammidico. Il peptide assumerà una conformazione che permetta di avere un alto numero di questi legami ad idrogeno

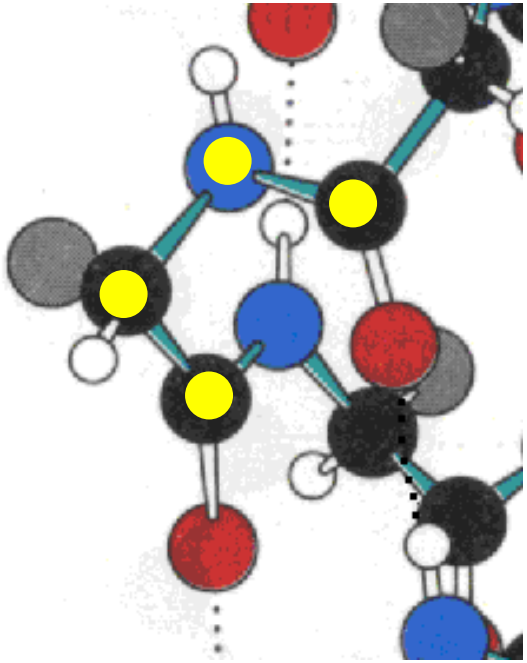
Una possibilità è l'α-elica, delucidata dal premio Nobel Linus Pauling nel 1951

nell'α-elica, sia φ che ψ sono negativi (circa – 90° e – 70° rispettivamente). L'elica è destrorsa. Un'elica destrorsa "scende" in senso orario.

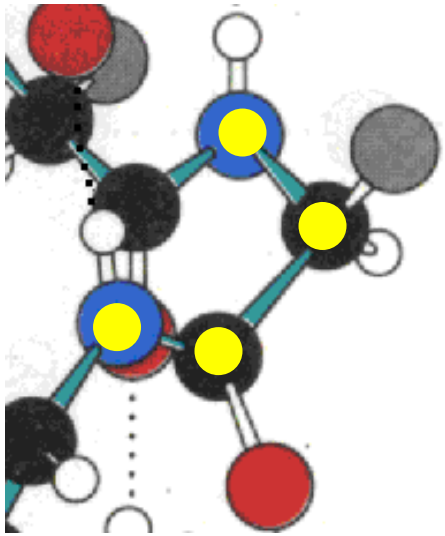




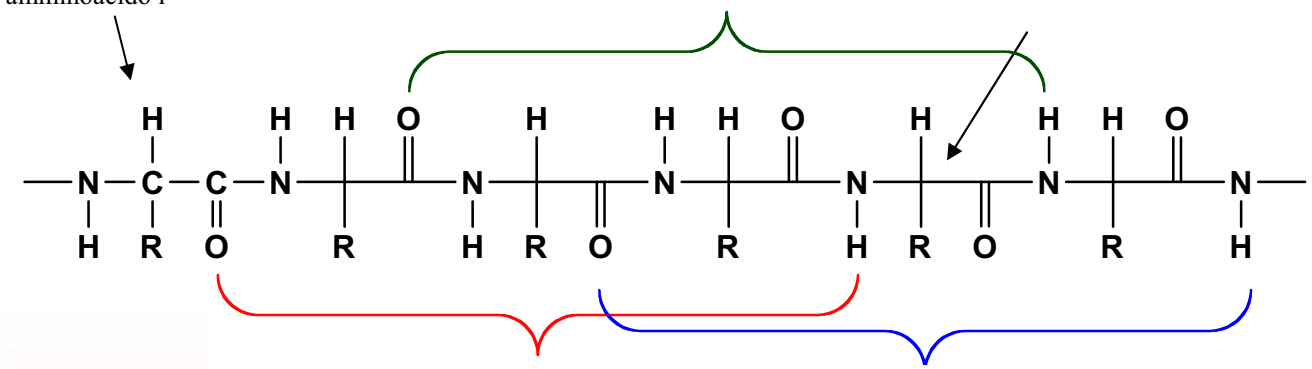
φ

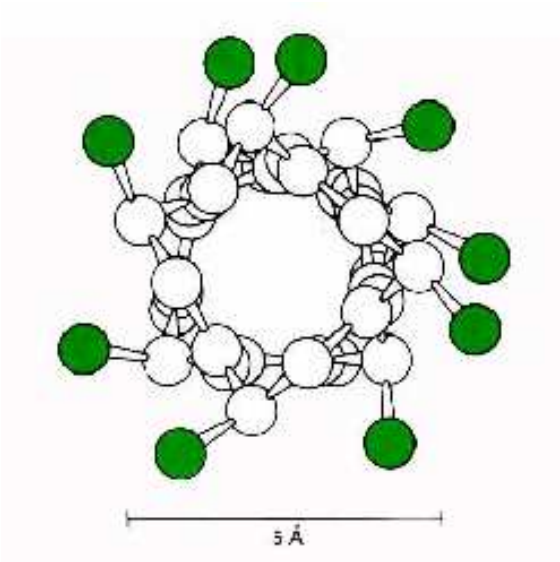


ψ



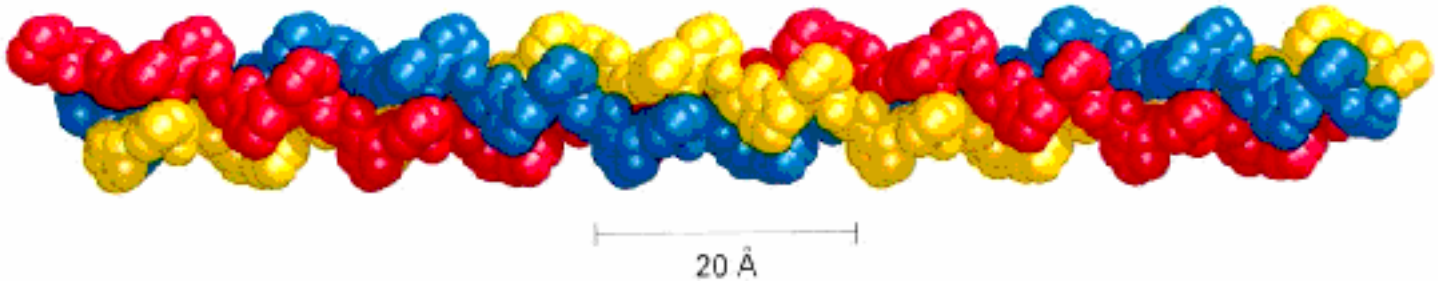
α- ELICA





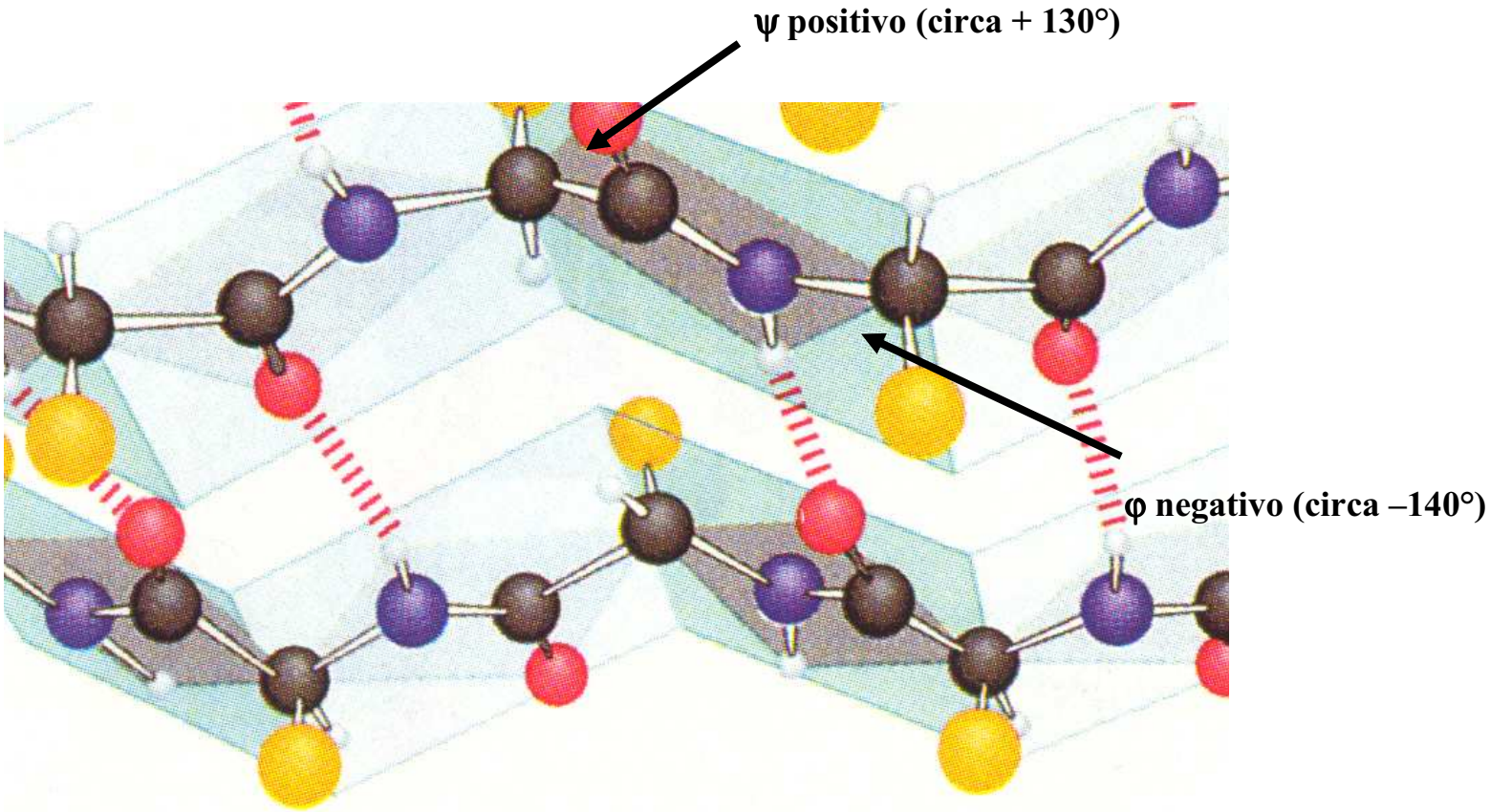
La struttura si ripete ogni 5.4 Å lungo l'asse dell'elica. Si dice che l'elica ha un passo di 5.4 Å. Per ogni giro ci sono 3,6 unità amminoacidiche. Ogni C=O della catena principale forma un legame ad idrogeno con un NH posto 4 residui oltre. I piani dei legami ammidici sono circa paralleli all'asse dell'elica. Inoltre tutti i C=O puntano nella stessa direzione e tutti gli N–H nella direzione opposta. Le catene laterali puntano verso l'esterno. Al centro non c'è praticamente posto per nulla.

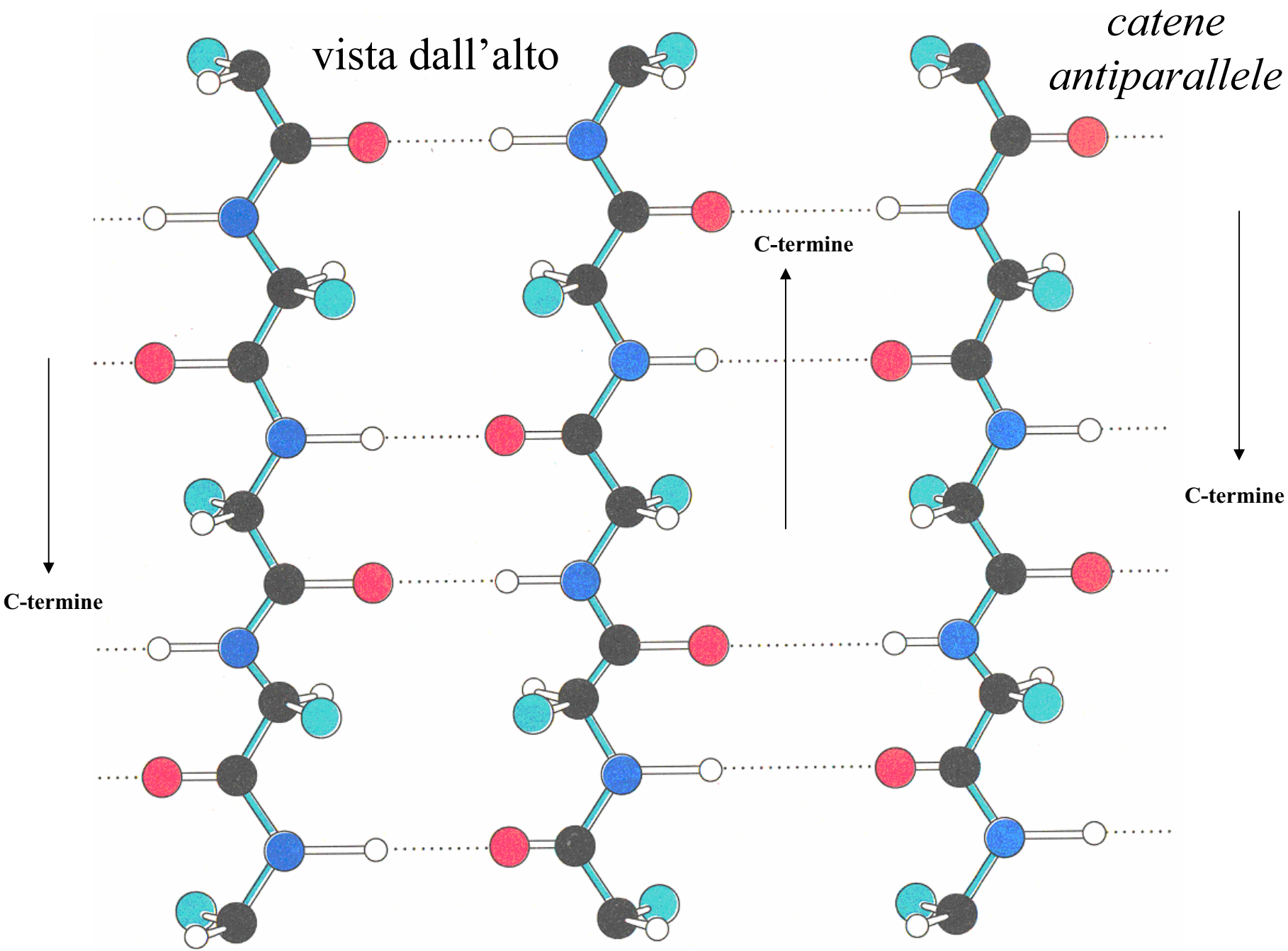
Le α-eliche sono particolarmente comuni in proteine con funzione strutturale (cheratina dei capelli e della lana) dove sono presenti in genere tre catene intrecciate



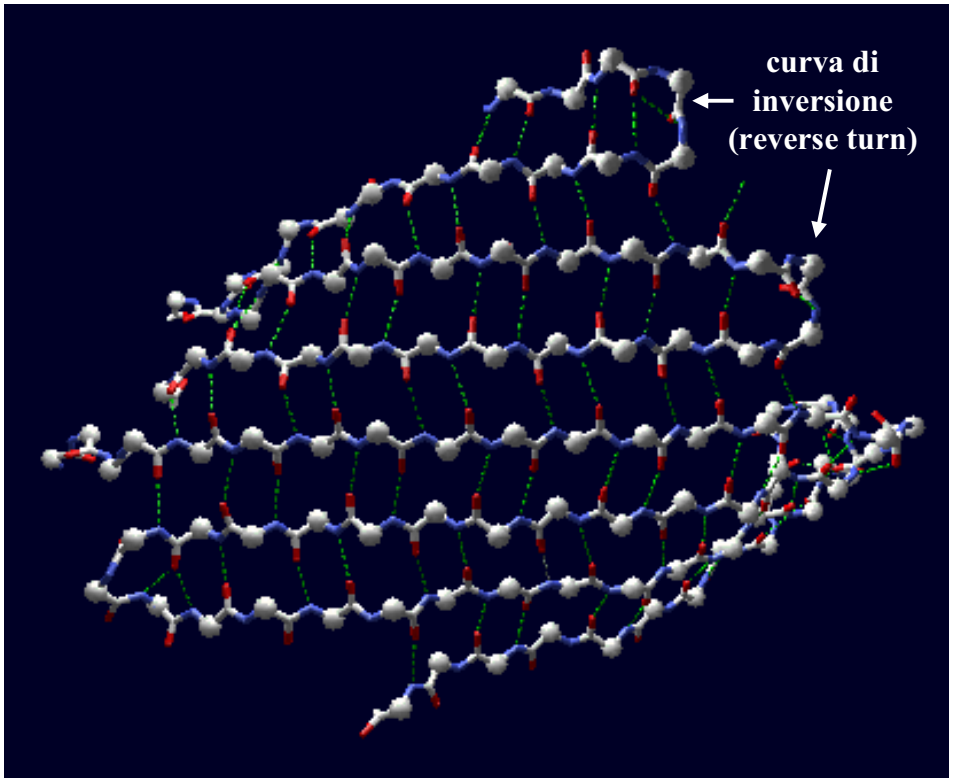
FOGLIETTI BETA

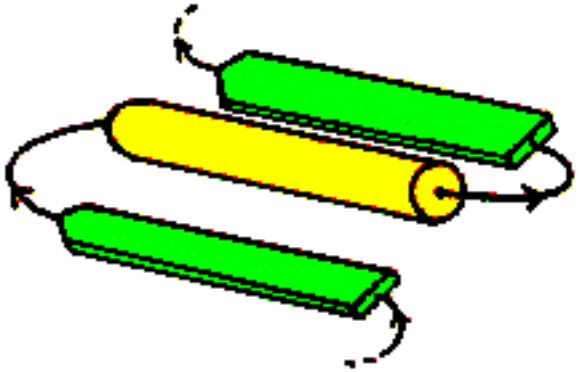
Un altro modo per poter avere diversi legami ad idrogeno all'interno del peptide è costituito dai foglietti beta, in cui due catene sono tenute unite da legami ad idrogeno inter-catena.
Nei foglietti beta φ è negativo (intorno a –140°), mentre ψ è positivo (intorno a + 130°). I residui R sono alternativamente sopra e sotto il piano mediano del foglietto. La distanza assiale tra amminoacidi adiacenti è pari a 3,5 Å, contro gli 1,5 nell'α-elica. Quindi i foglietti β occupano più distanza longitudinale.
Le fibre date da α-eliche sono più elastiche (ad es. lana), mentre fibre date da foglietti β sono più rigide. (ad es. seta)




vista dall'alto
catene antiparallele
C-termine
C-termine
C-termine

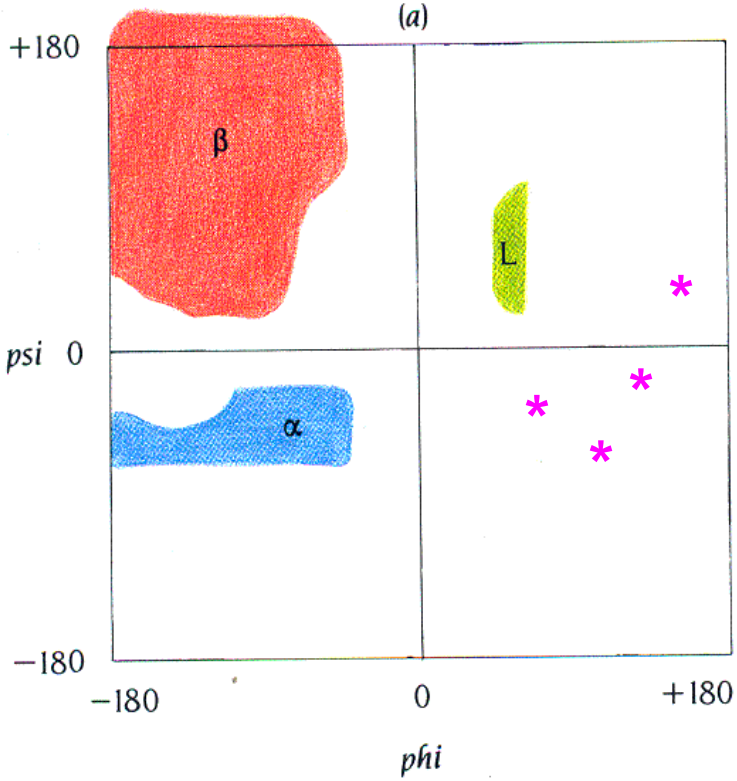
I foglietti β possono contenere fino a 6 catene. Le catene possono essere parallele o anti-parallele. Se le catene sono antiparallele possono essere connesse da curve di inversione



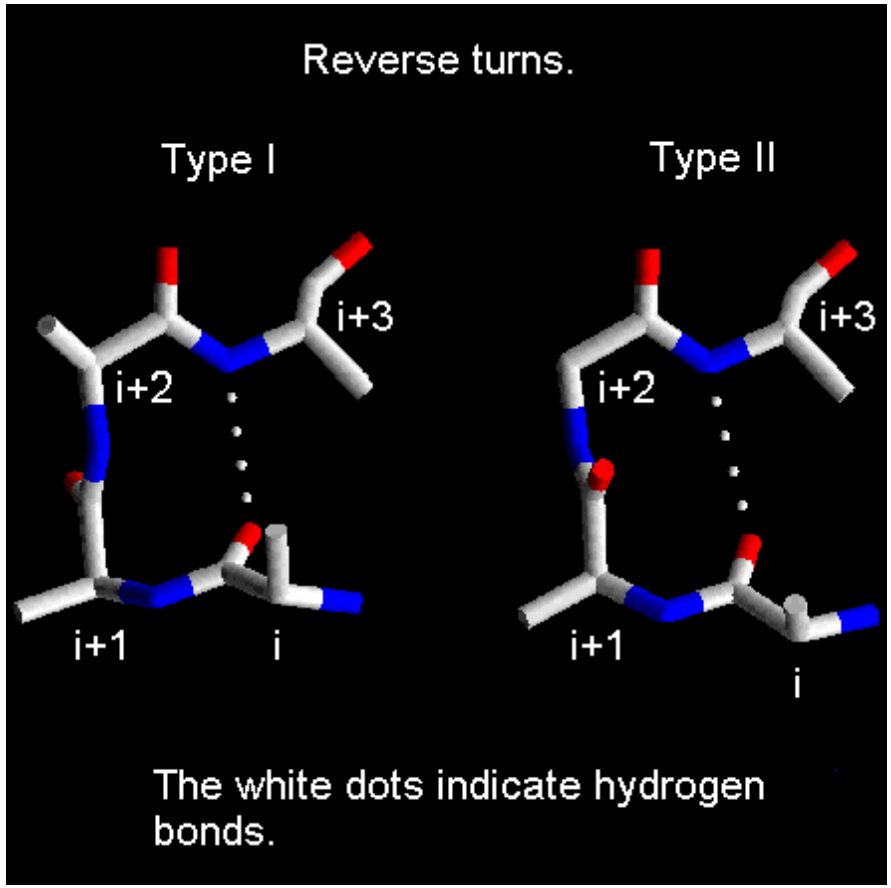


Se le catene sono parallele, sono connesse da lunghe catene, che spesso sono α-eliche

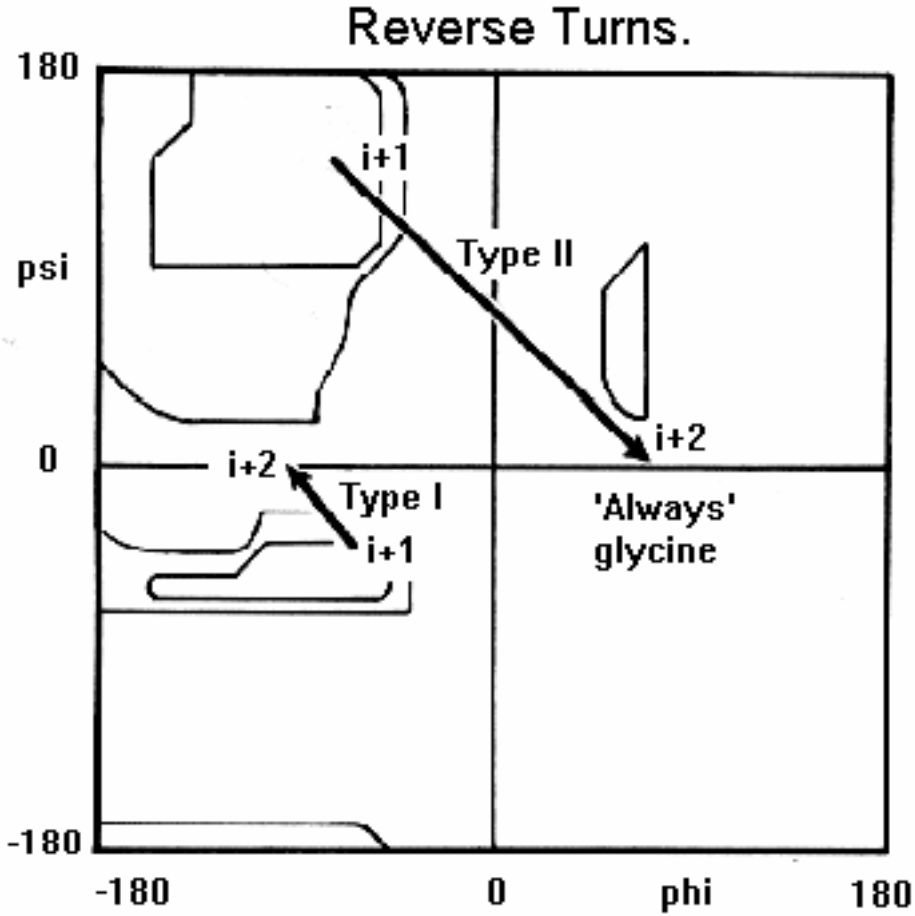
DIAGRAMMA DI RAMACHANDRAN



le aree colorate indicano le regioni "stericamente permesse" relative alle coppie di angoli diedri Φ e Ψ. In particolare la regione colorata in blu corrisponde ai valori di angoli osservati nelle a eliche destrogire, quella colorata in verde ai valori di angoli osservati nelle a eliche levogire e quella arancione ai valori di angoli osservati nelle strutture costituite da filamenti β. Gli amminoacidi di un peptide ricadono quasi tutti in queste regioni. L'unica eccezione sono le glicine (asterischi viola) che occasionalmente possono cadere fuori dalle zone permesse



Curve di inversione si possono avere anche per catene che non corrispondono alle due strutture secondarie principali. Esse possono essere di vari tipi a seconda degli angoli φ e ψ dei residui (i+1) e (i+2). I tipi più comuni sono detti I e II.



La combinazione degli angoli φ e ψ del residuo (i+2) nella curva di tipo II cade fuori dalle zone consentite. Questo amminoacido è perciò sempre la glicina. Se ci fosse un sostituente, questo interagirebbe in modo sfavorevole con il carbonile del residuo (i+1).

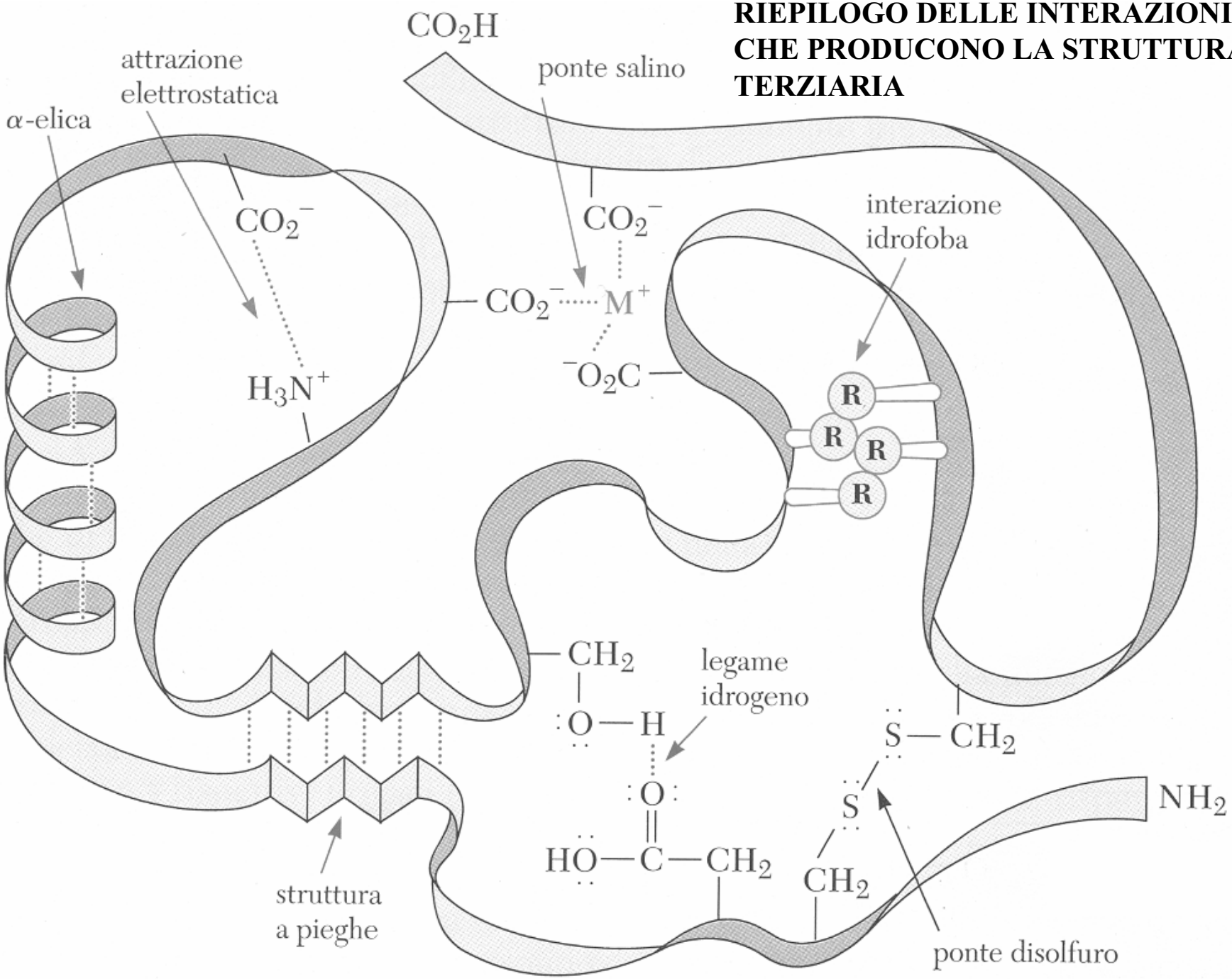
STRUTTURA TERZIARIA

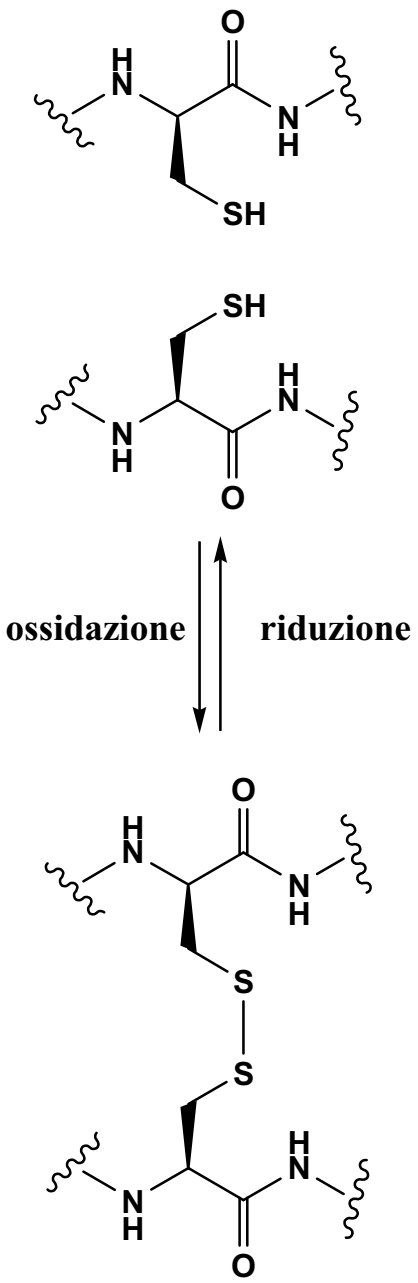
Un determinato peptide può contenere varie zone con differente struttura secondaria. Oltre alle α-eliche ed ai foglietti β, vi sono zone in cui il peptide forma catene singole non riconducibili a queste due strutture secondarie, chiamate anse. Tutte queste parti della catena assumono una forma tridimensionale globale, che viene chiamata struttura terziaria.

A determinare la struttura terziaria contribuiscono vari fattori:

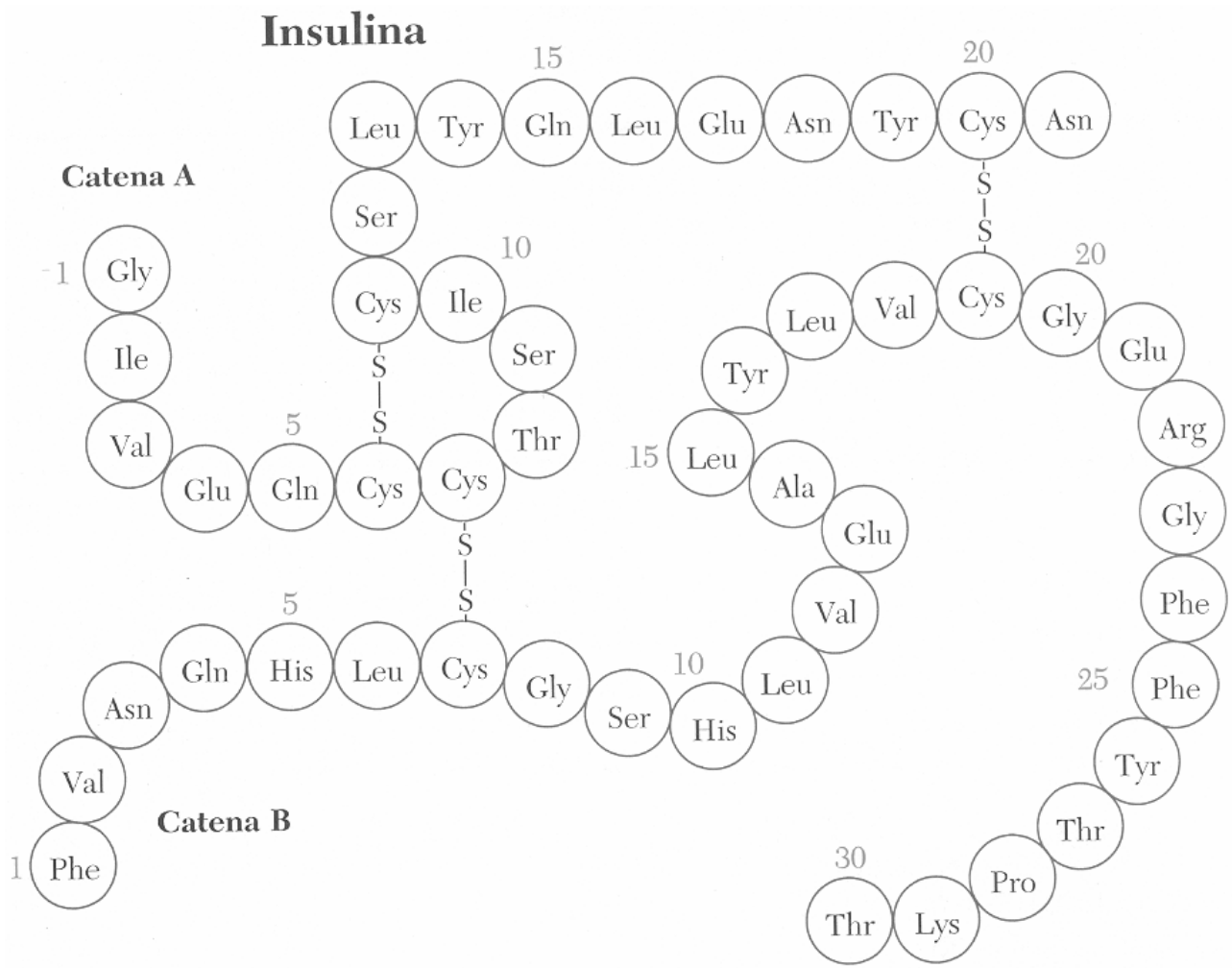
- **Il peptide può ripiegarsi per permettere alle catene laterali idrofobe di disporsi in modo da non dover interagire con l'acqua.**
- **Al contrario, il peptide può ripiegarsi in modo che le catene idrofile si trovino verso la superficie esterna della proteina**
- **Vi possono essere forze attrattive elettrostatiche tra ioni positivi (lisina, istidina, arginina) ed ioni negativi (ac. aspartico, ac. glutammico)**
- **Ci possono essere "ponti salini" dati da un catione metallico coordinato da due o più carbossilati**
- **Ci possono essere legami ad idrogeno tra amminoacidi distanti oltre a quelli presenti nelle strutture di α-elica e di foglietto β**
- **Ci possono essere ponti disolfuro tra residui cisteinici**

RIEPILOGO DELLE INTERAZIONI CHE PRODUCONO LA STRUTTURA TERZIARIA

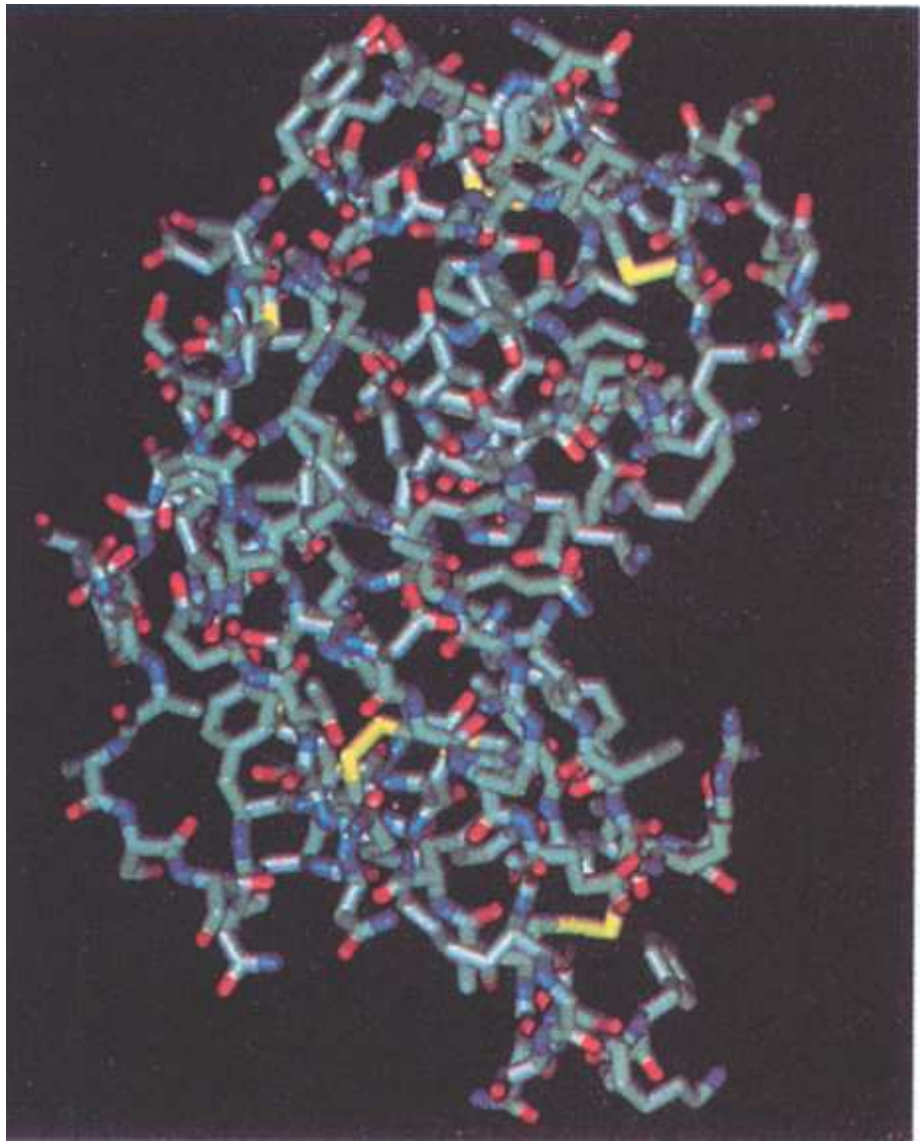


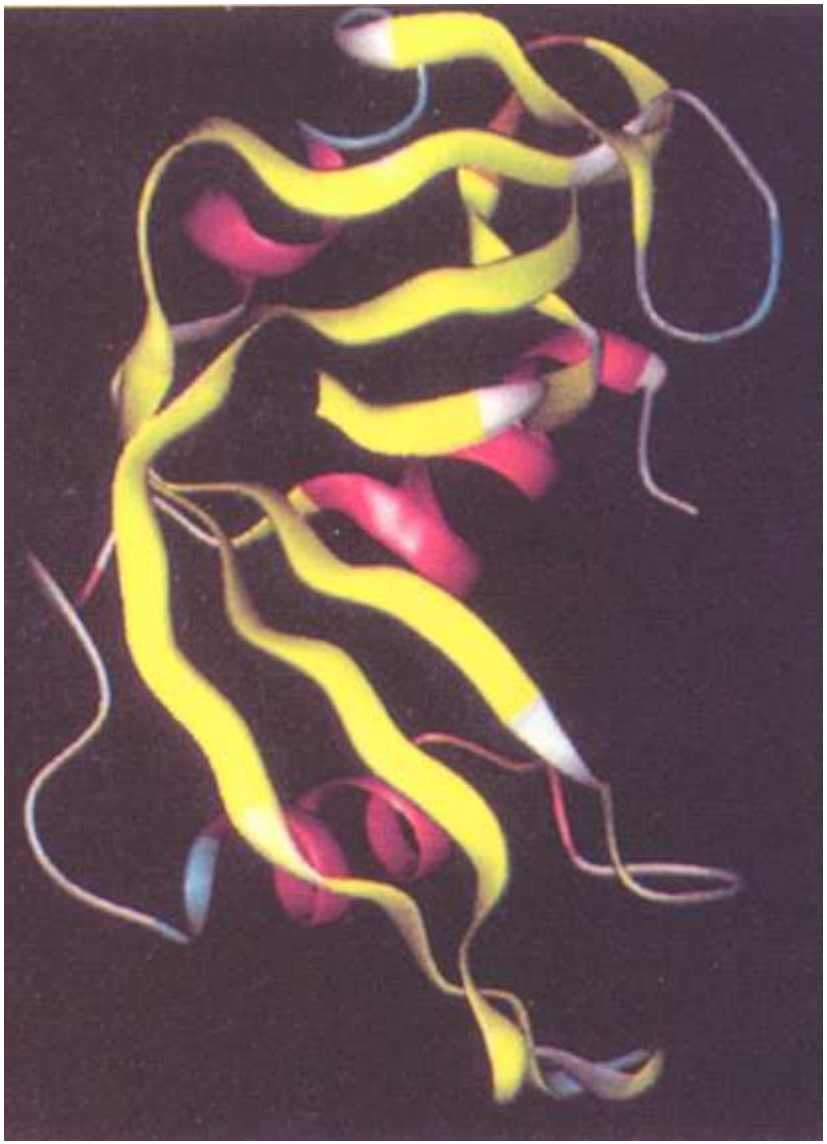


I ponti disolfuro possono servire anche a tenere insieme diverse catene peptidiche, come nel caso dell'insulina umana, mostrata qui sotto.

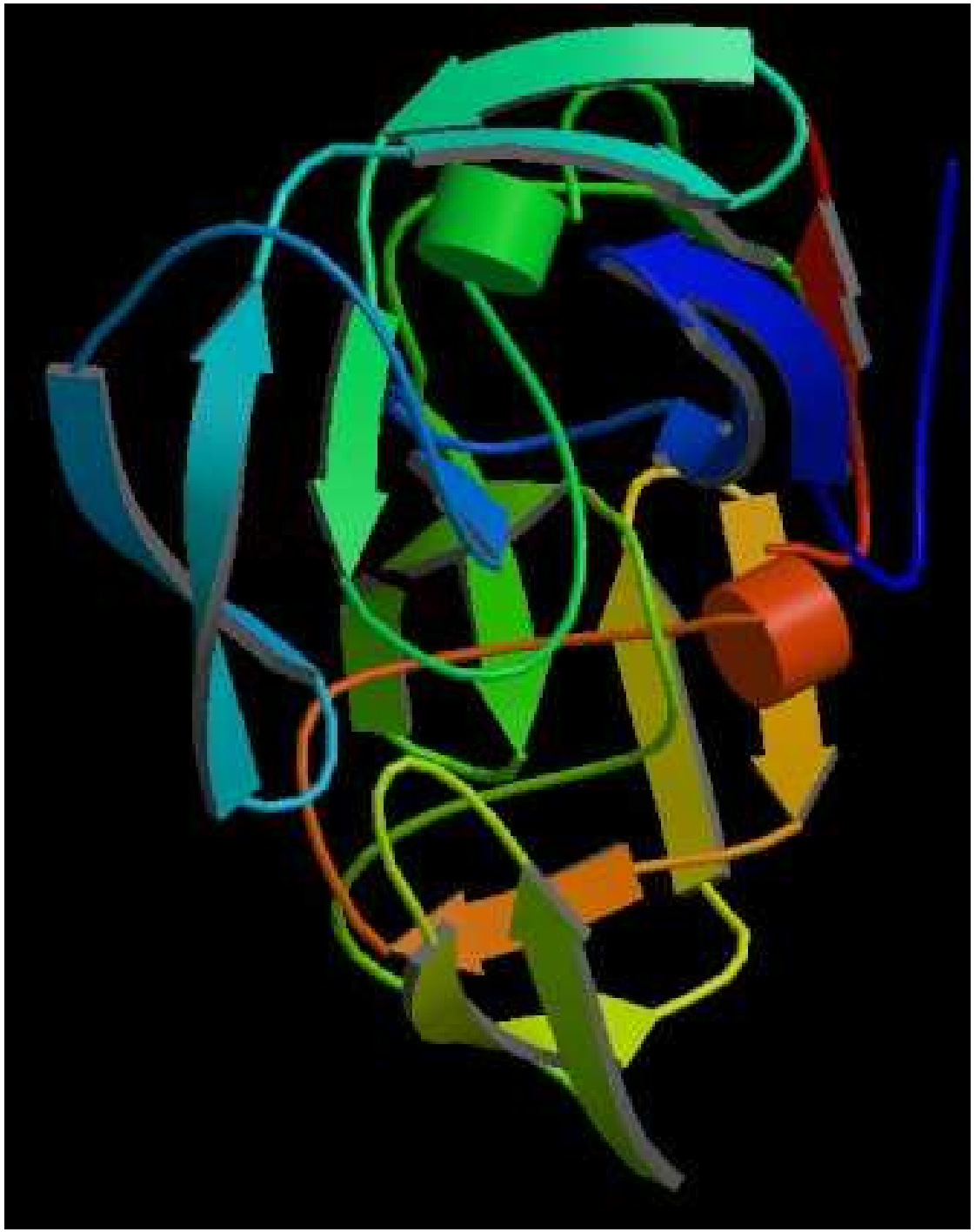


Spesso le proteine sono rappresentati in un modo schematico, che mette in evidenza i vari tipi di struttura secondaria.





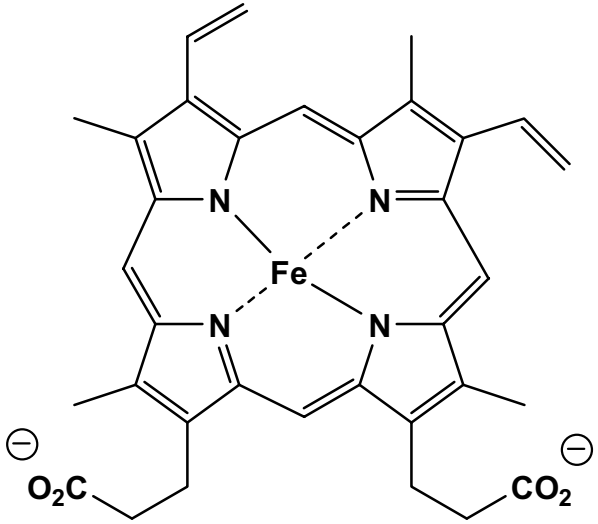
Ribonucleasi A. Immagini tratte dal Brown



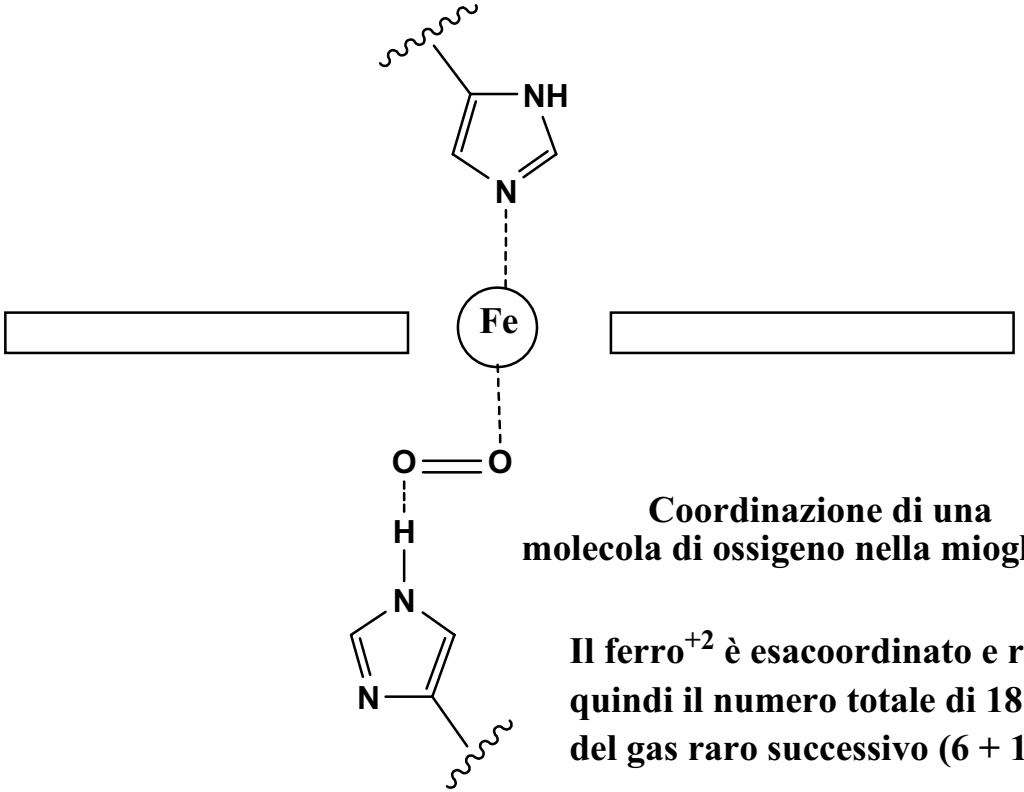
HIV Proteasi

STRUTTURA QUATERNARIA

Molte proteine grandi consistono di due o più catene polipeptidiche legate fra di loro in modo non covalente. Inoltre le proteine possono essere legate in modo non covalente con sottostrutture di natura non proteica (gruppi prostetici). Un esempio è dato dalla mioglobina, che permette di accumulare ossigeno nei muscoli.



EME
(una porfirina)



Coordinazione di una molecola di ossigeno nella mioglobina

Il ferro^{+2} è esacoordinato e raggiunge quindi il numero totale di 18 elettroni del gas raro successivo (6 + 12 e)

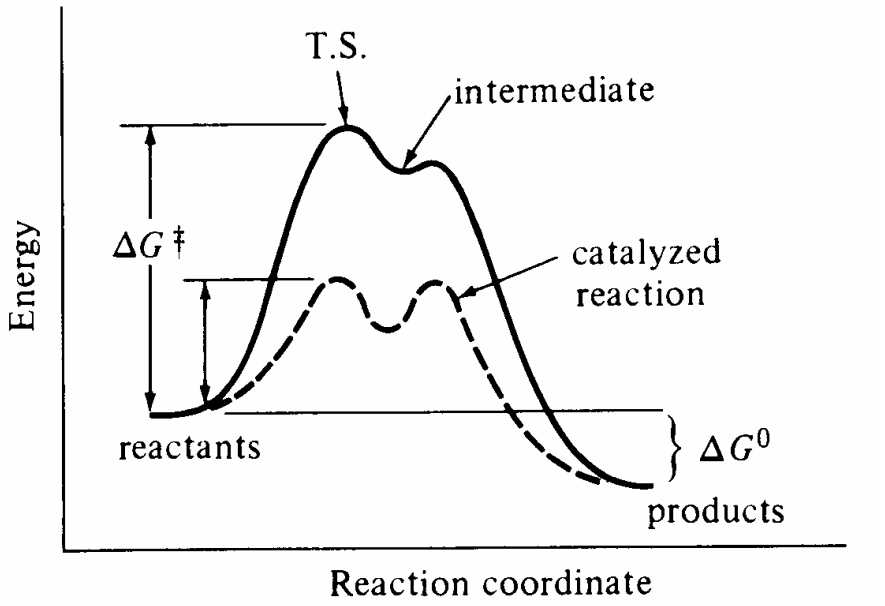
Un altro esempio è dato dall'emoglobina, che è formata da 4 unità proteiche globulari e da 4 unità di eme

GLI ENZIMI SONO CATALIZZATORI ESTREMAMENTE EFFICIENTI

Cos'è un catalizzatore?

Nel caso di una reazione omogenea, un catalizzatore è una sostanza la cui concentrazione appare nell'espressione della velocità con una potenza superiore del suo contributo alla stechiometria della reazione.

In genere il catalizzatore non compare per nulla nella stechiometria della reazione. In questo caso particolare, un catalizzatore è una sostanza che fa aumentare la velocità di una determinata reazione, senza subire cambiamenti permanenti. La catalisi enzimatica ricade in questo caso.
Quindi, in questa ipotesi, un catalizzatore rimane intatto alla fine di ogni ciclo catalitico e può essere utilizzato in quantità sub-stechiometriche.
Perché un catalizzatore possa svolgere la sua funzione deve essere coinvolto nello stato di transizione e far sì che lo stato di transizione abbia energia inferiore a quello della reazione non catalizzata.
Un catalizzatore può interagire con il substrato unicamente a livello di stato di transizione, oppure legarsi ad esso con un legame covalente a livello di un intermedio. In quest'ultimo caso si parla di *catalisi covalente*.
Infine un catalizzatore può essere *omogeneo* o *eterogeneo*.



TIPI DI CATALISI

- **Catalisi acida specifica**
- **Catalisi basica specifica**
- **Catalisi acida generale**
- **Catalisi basica generale**
- **Catalisi nucleofilica**
- **Catalisi elettrofilica**

CINETICA DELLE REAZIONI ENZIMATICHE

$$S \xrightarrow{Enz} P$$

In generale, una reazione enzimatica irreversibile, consiste di almeno 3 stadi

$$S + Enz \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} EP \xrightarrow{k_3} P + Enz$$

Spesso l'ultimo stadio non influenza la velocità della reazione. Allora si può scrivere

$$S + Enz \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + Enz$$

Trascurando eventuali altri reattivi stechiometrici coinvolti nel passaggio da ES ad EP (ad esempio H_2O) che di solito sono in largo eccesso, sarà:

$$v = k_2 [ES]$$

E' difficile però valutare [ES]

Nel 1913, Michaelis e Menten hanno proposto una trattazione matematica semplificata, facendo un'importante supposizione

Leonor Michaelis (1875-1949) Maud Menten (1879-1960)

La concentrazione dell'intermedio non cambia nel tempo (approssimazione dello stato stazionario)

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN (BRIGGS-HALDANE)

$$S + Enz \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + Enz \qquad v = k_2\,[ES]$$

La concentrazione dell'intermedio cambia in modo trascurabile nel tempo

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \Longrightarrow k_{-1}[ES] + k_2[ES] = k_1[E][S]$$

[E] rappresenta la concentrazione istantanea dell'enzima libero. E' difficile conoscerla, così come [ES], ma noi sappiamo che:

$[E]_t = [E] + [ES]$ dove $[E]_t$ è la concentrazione totale di enzima (libero o legato), che corrisponde all'enzima posto a reagire inizialmente. Allora:

$$[E] = [E]_t - [ES]$$

Quindi

$$(k_{-1} + k_2)\,[ES] = k_1[S]([E]_t - [ES]) \Longrightarrow (k_{-1} + k_2)\,[ES] = k_1[S][E]_t - k_1[S][ES] \Longrightarrow$$

$$(k_{-1} + k_2)\,[ES] + k_1[S][ES] = k_1[S][E]_t \Longrightarrow (k_{-1} + k_2 + k_1[S])\,[ES] = k_1[S][E]_t$$

dividi sopra e sotto per k_1

$$\Downarrow$$

$$[ES] = [E]_t[S] \bullet \frac{k_1}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} = \frac{[E]_t[S]}{\dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

$$\text{Definendo } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \Longrightarrow [ES] = \frac{[E]_t[S]}{K_m + [S]} \Longrightarrow$$

$$\Longrightarrow v = k_2 \frac{[E]_t[S]}{K_m + [S]} \xrightarrow{\text{definendo } V_{max} = k_2[E]_t} \boxed{v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_M + [S]}}$$

Eq. Michaelis-Menten

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

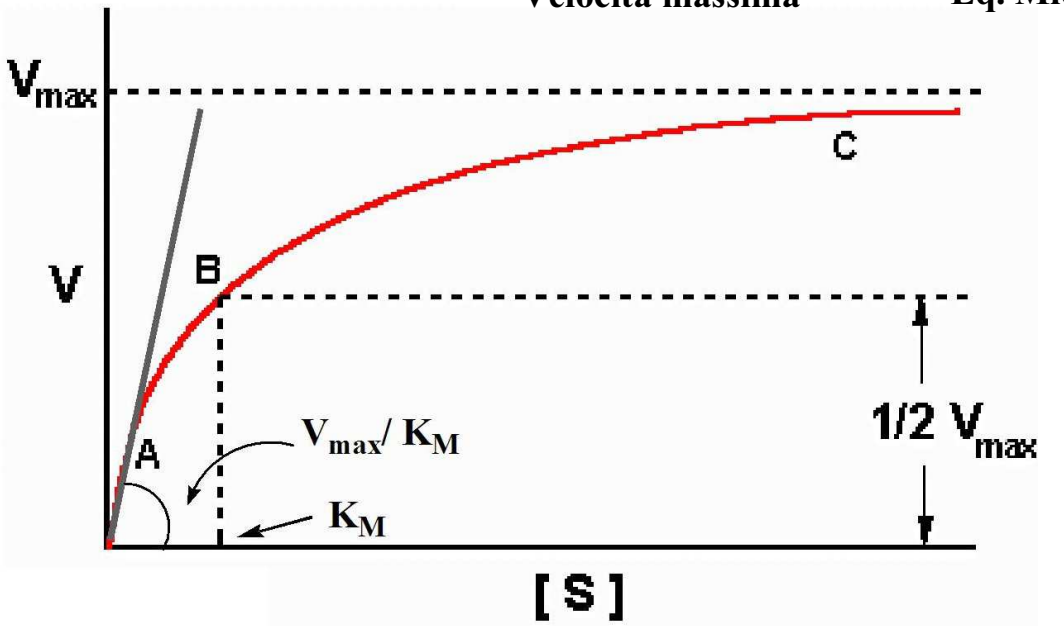
Costante di MM

$$V_{max} = k_2[E]_t$$

Velocità massima

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

Eq. Michaelis-Menten



Velocità misurata
nelle fasi inziali
(quando [S] può essere ritenuto
costante)

Significato di V_{max}

All'aumentare della concentrazione del substrato, si arriva ad avere, per [S] >> K_M che:

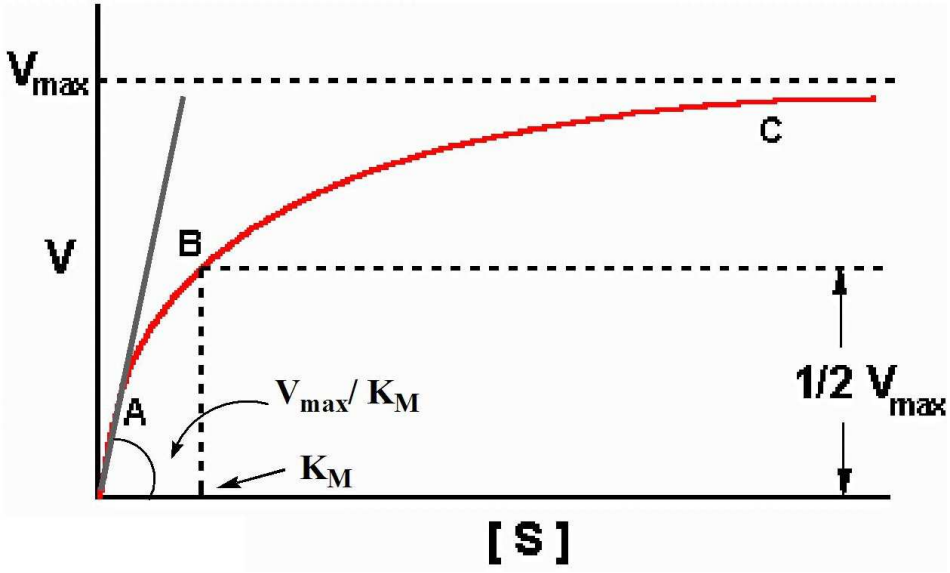
$v = V_{max}$ *questa è la massima velocità realizzabile!*

Significato di K_M

K_M è uguale alla concentrazione di substrato per cui $v = V_{max}/2$

K_M non è una costante di equilibrio: infatti ingloba anche un termine cinetico (k_2). Tuttavia quando il preequilibrio è molto più veloce della successiva reazione, e cioé

$k_2 << k_{-1}$, l'equazione diventa $K_M = k_{-1} / k_1 = K_D$ (costante di dissociazione)



Velocità misurata nelle fasi inziali (quando [S] può essere ritenuto costante)

$$K_D = \frac{[E]\,[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Infatti all'eq.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1\,[E][S] - k_{-1}\,[ES] = 0$$

Tanto maggiore è K_D tanto meno forte il complesso enzima-substrato
Tanto minore è K_D tanto più forte il complesso enzima-substrato

A basse concentrazioni di substrato, l'eq. di Michaelis-Menten diventa:

$$v = \frac{V_{max}}{K_M}\,[S] = \frac{k_2}{K_M}\,[E]\,[S]$$

Ciò avviene quando $[S] << K_M$

Questo è quello che di solito avviene in reazioni condotte in laboratorio, che seguono quindi una cinetica del primo ordine.

DETERMINAZIONE SPERIMENTALE DI K_M E V_{MAX}

L'equazione di Michaelis-Menten non è lineare e quindi non è facile determinare i due parametri riportando in grafico la velocità in funzione della concentrazione di substrato.

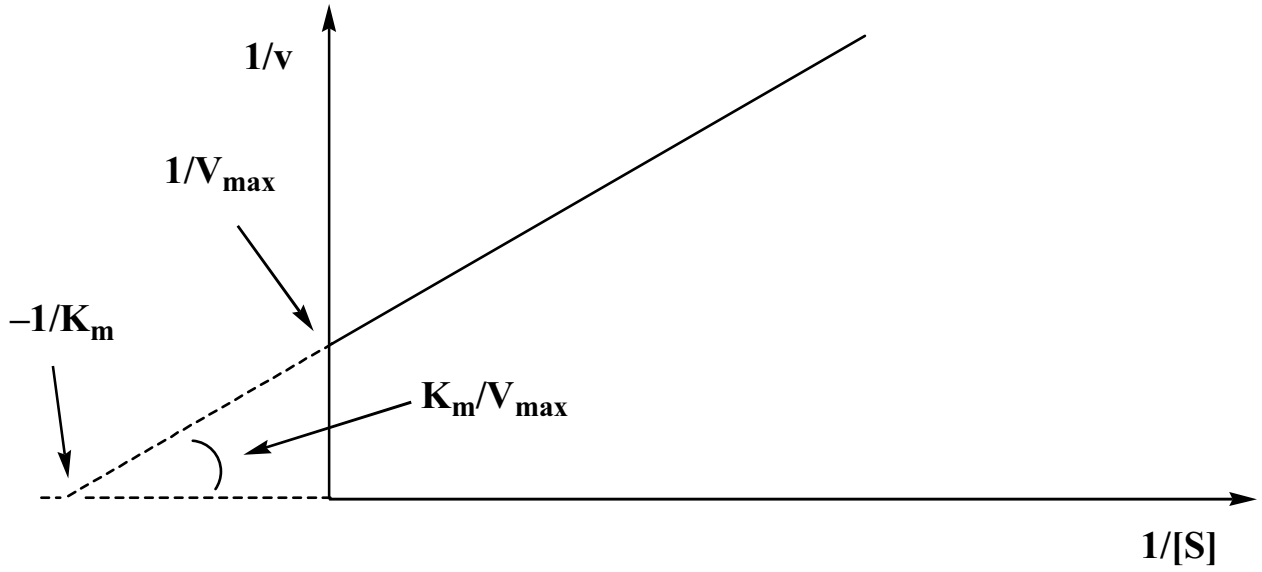
Se però si usano i reciproci di queste grandezze, si ottiene una retta:

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}\,[S]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}\,[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

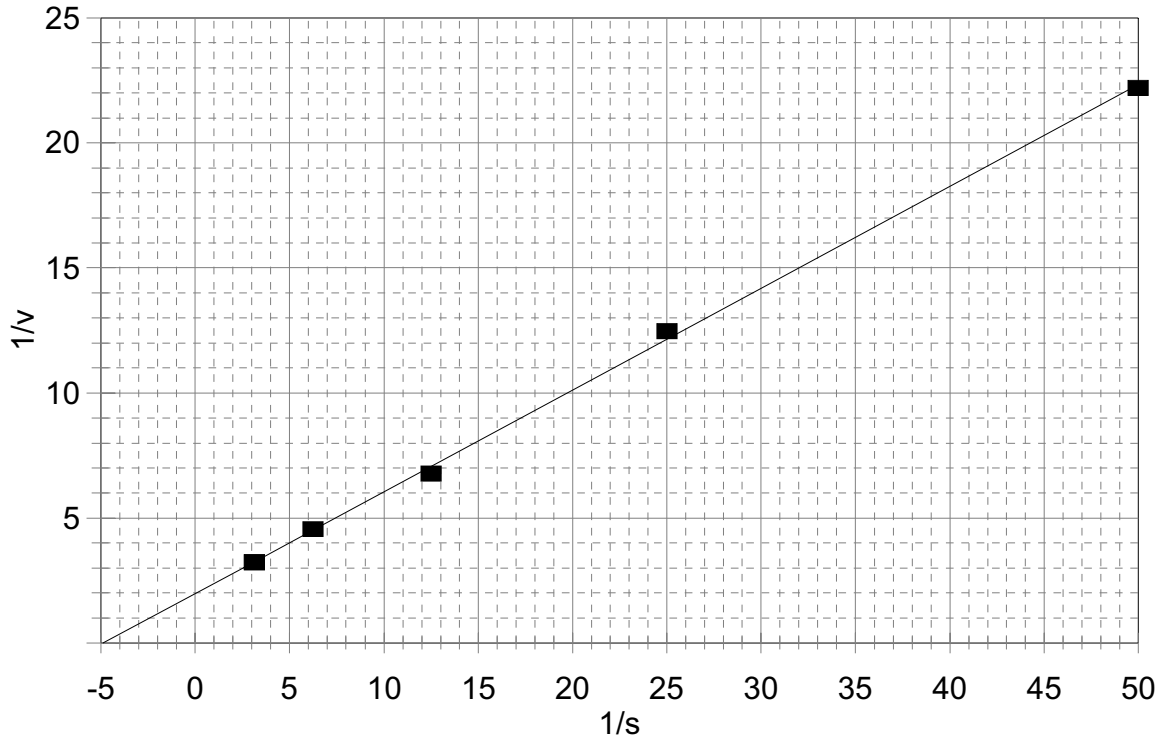
Eq. Michaelis-Menten

Abbiamo così ottenuto una retta in cui l'intercetta è $1/V_{max}$ e la pendenza è K_m / V_{max}

Il grafico corrispondente è detto di Lineweaver-Burk e consente la facile determinazione di K_m e V_{max}



Esempio di grafico di Lineweaver-Burke



pendenza = 0.407

intercetta sulle Y = 1.982

v_{max} = 0.505 mM/min

K_M = 0.205 mM

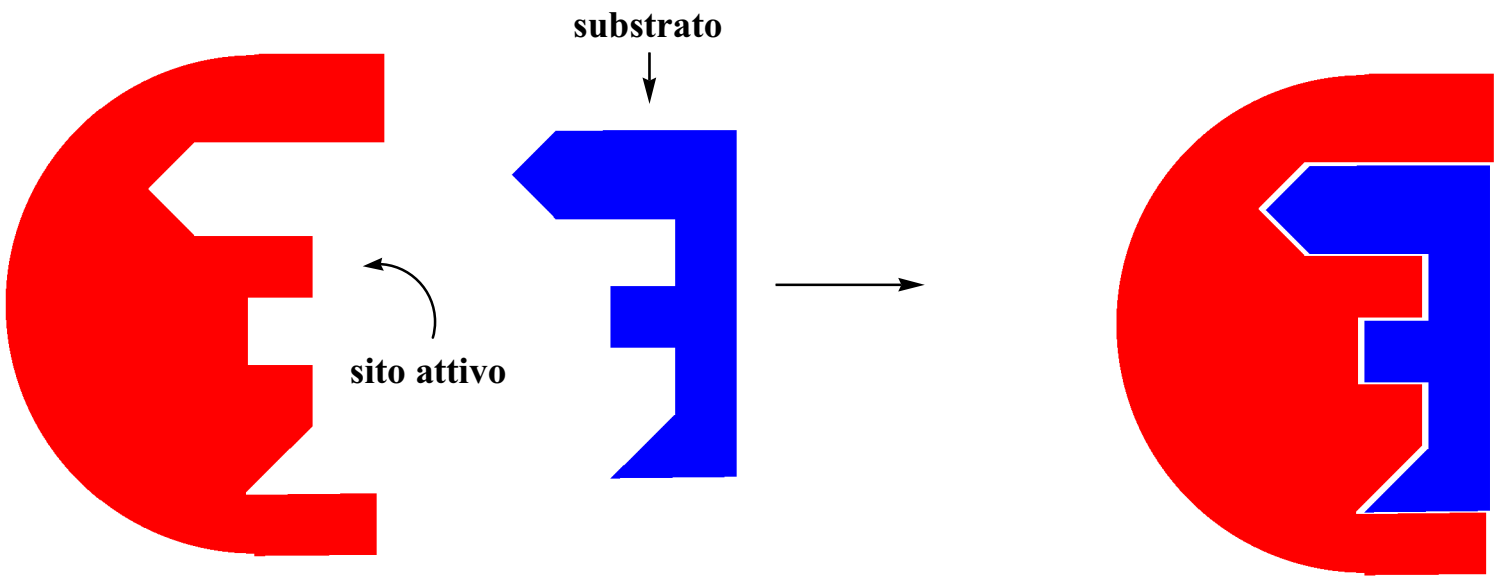
s è espressa in mmoli/l (mM)

GLI ENZIMI SONO CATALIZZATORI ESTREMAMENTE EFFICIENTI

Il rapporto tra le vel,ocità della reazione catalizzata e di quella non catalizzata è in genere molto alto (da 10^{10} fino a 10^{14})! Ad esempio l'idrolisi di un peptide con l'enzima *Tripsina* a 37°C e a pH 5 è più veloce della stessa idrolisi a 110°C in soluzione di HCl 6N in assenza dell'enzima!!!

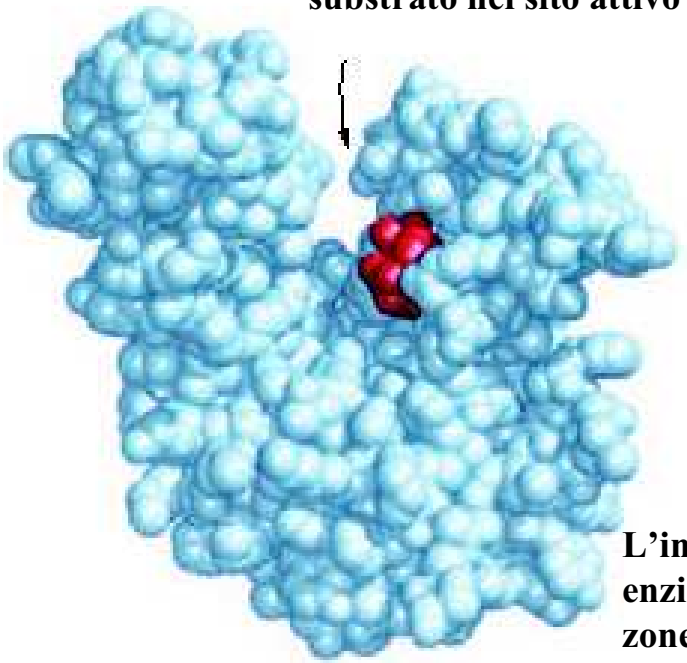
Ma quali sono le ragioni chimiche di questa elevata selettività?

Già nel 1894, il grande Emil Fischer propose un meccanismo semplificato per spiegare l'azione degli enzimi. Per la prima volta suppose che gli enzimi fossero caratterizzati da un "SITO ATTIVO" e che il substrato vi si adattasse come una chiave con la serratura.



Questa ipotesi affermava già un'importante verità:
Solo una piccola parte dell'enzima prende effettivamente parte alla reazione. Il concetto di sito attivo è tuttora del tutto valido! **Ad esempio, solo tre amminoacidi della Chimotripsina (250 amminoacidi in tutto) sono implicati nella reazione**

Tuttavia l'ipotesi di Fischer è troppo semplicistica e non riesce a spiegare molti fatti sperimentali.



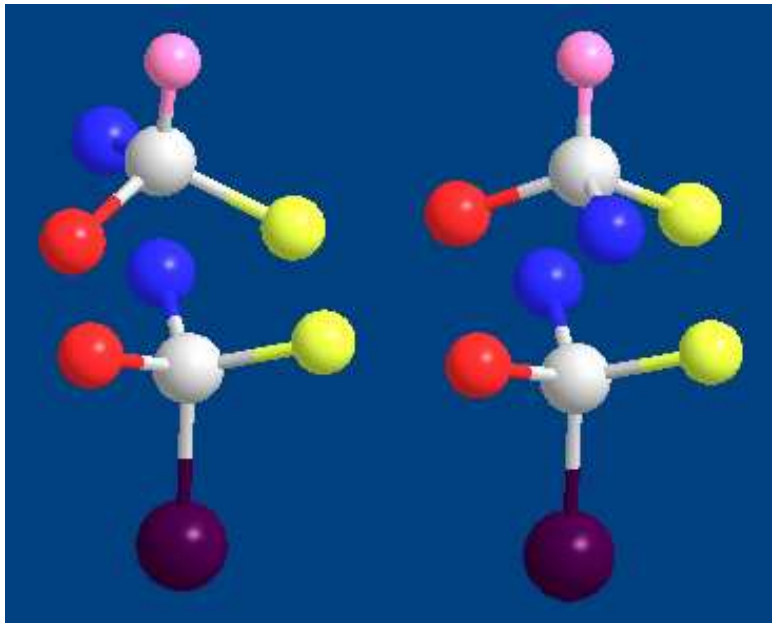
Per esempio dal modello di Fischer non si capisce perché molecole più piccole del substrato naturale non possano entrare nella "serratura".

Evidentemente non è solo un problema di dimensioni, ma di interazioni specifiche di non-legame tra il substrato e l'enzima.

Queste interazioni possono essere di varia natura: a) interazioni elettrostatiche; b) legami ad idrogeno; c) interazioni idrofobiche; d) legami π; e) interazioni dipolari, etc.

L'intervento di queste interazioni spiega bene anche l'enantioselettività degli enzimi. Un utile modello è quello cosiddetto dei "tre punti": supponendo tre zone del sito attivo in grado di dare interazioni di tipo A, B e C, solo uno di due enantiomeri sarà in grado di fornire tutte e 3 le interazioni:

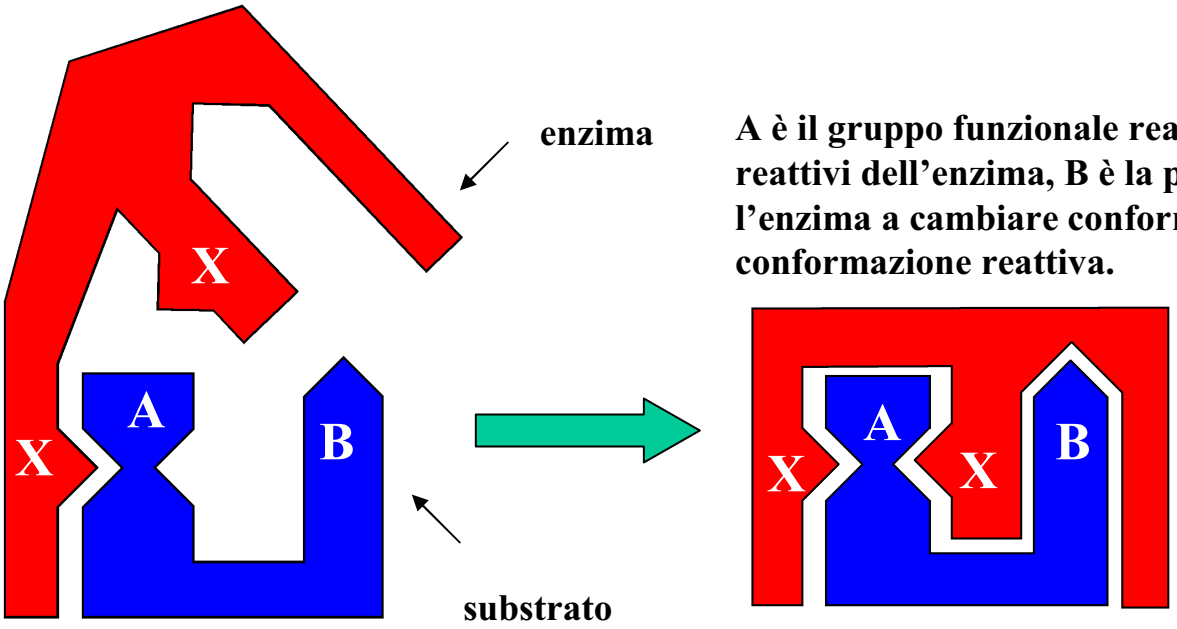
Complessazione favorita (tre interazioni)



Complessazione sfavorita (solo 2 interazioni)

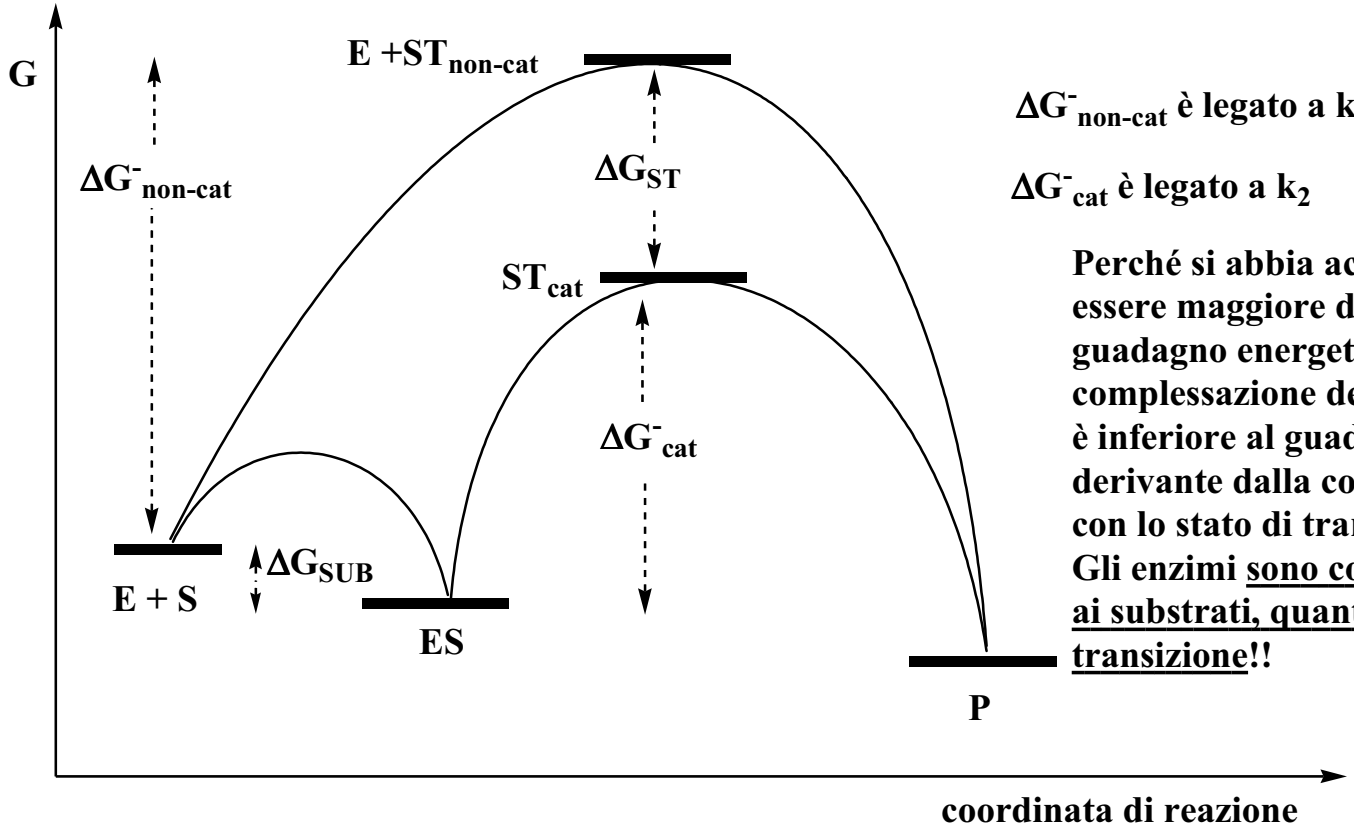
Inoltre non si spiega come fanno alcuni enzimi (ad es. le lipasi) ad accettare numerosi substrati differenti.

Un modello che tiene conto di questo fatto è il modello "Induced-fit" di Koshland Jr., proposto alla fine degli anni '60. Secondo questo modello l'enzima non è "rigido" come proposto da Fischer, ma si adatta al substrato, cambiando la sua conformazione in modo da avvolgersi attorno al suo "ospite"



A è il gruppo funzionale reattivo del substrato, X sono i gruppi reattivi dell'enzima, B è la parte del substrato che forza l'enzima a cambiare conformazione, assumendo così la conformazione reattiva.

Ma se tutte queste ipotesi possono spiegare la selettività degli enzimi, ancora non spiegano la loro efficacia catalitica !



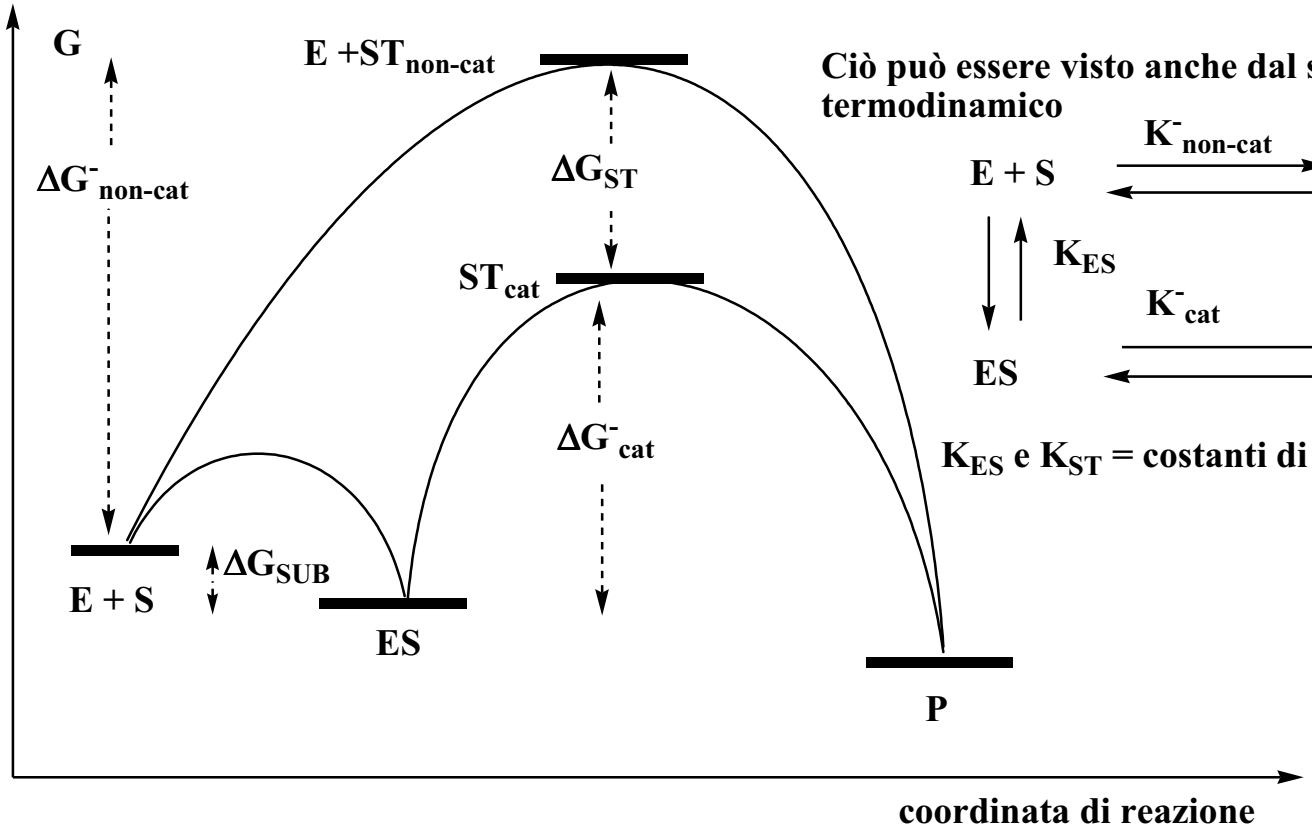
$\Delta G^{-}_{non\text{-}cat}$ è legato a $k_{non\text{-}cat}$

ΔG^{-}_{cat} è legato a k_2

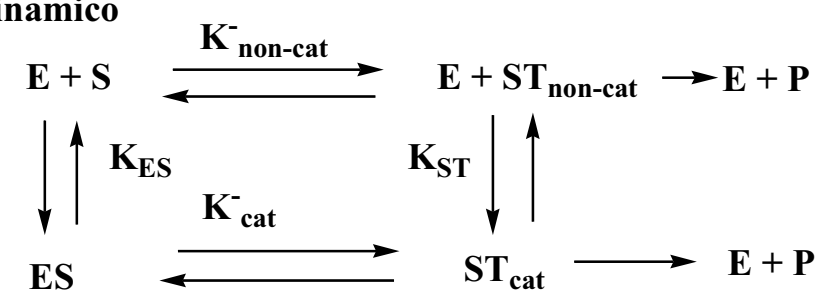
Perché si abbia accelerazione, ΔG_{ST} deve essere maggiore di ΔG_{SUB}. Quindi il guadagno energetico derivante dalla complessazione dell'enzima con il substrato è inferiore al guadagno energetico derivante dalla complessazione dell'enzima con lo stato di transizione.
Gli enzimi <u>sono complementari non tanto ai substrati, quanto agli stati di transizione</u>!!

Linus Pauling

The active site of an enzyme is complementary to the transition state of the reaction it catalyzes (1948)



Ciò può essere visto anche dal seguente ciclo termodinamico



K_{ES} e K_{ST} = costanti di <u>dissociazione</u> di ES e di ST_{cat}

sarà allora:

$$\frac{K^-_{cat}}{K^-_{non\text{-}cat}} = \frac{k_2}{k_{non\text{-}cat}}$$ (teoria dello stato di transiz.)

$$\frac{K^-_{cat}}{K^-_{non\text{-}cat}} = \frac{K_{ES}}{K_{ST}}$$ (ciclo termodinamico)

In conclusione:

$$\frac{k_2}{k_{non\text{-}cat}} = \frac{K_{ES}}{K_{ST}}$$

K_{ST} e K_{ST} = costanti di <u>dissociazione</u> di ES e di ST_{cat}

Perciò:

$K_{ES} >> K_{ST}$ ⇨ ST si complessa con E molto meglio di S

FATTORI CHE STABILIZZANO LO S.d.T.

FATTORI ENTALPICI

1) Interazioni di non legame:

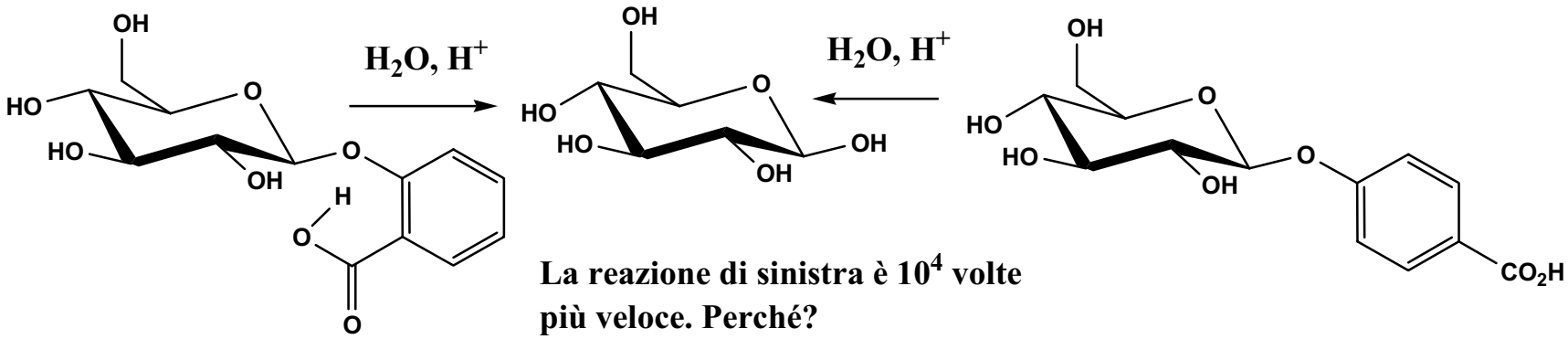
Le interazioni già citate tra il sito attivo dell'enzima ed il substrato, sono ancora più favorevoli nello S.d.T. (*per esempio lo S.d.T. può dare un legame ad idrogeno più forte*)
Oppure una certa interazione può avvenire solo nello S.d.T. (*ad esempio un'interazione elettrostatica con uno S.d.T. carico positivamente o negativamente*)

2) Desolvatazione: se il substrato occupa precisamente il sito attivo, non c'è più posto per molecole di acqua. Quindi il substrato si trova in uno stato di "desolvatazione". I gruppi funzionali sono più "nudi" e quindi più reattivi.

FATTORI ENTROPICI

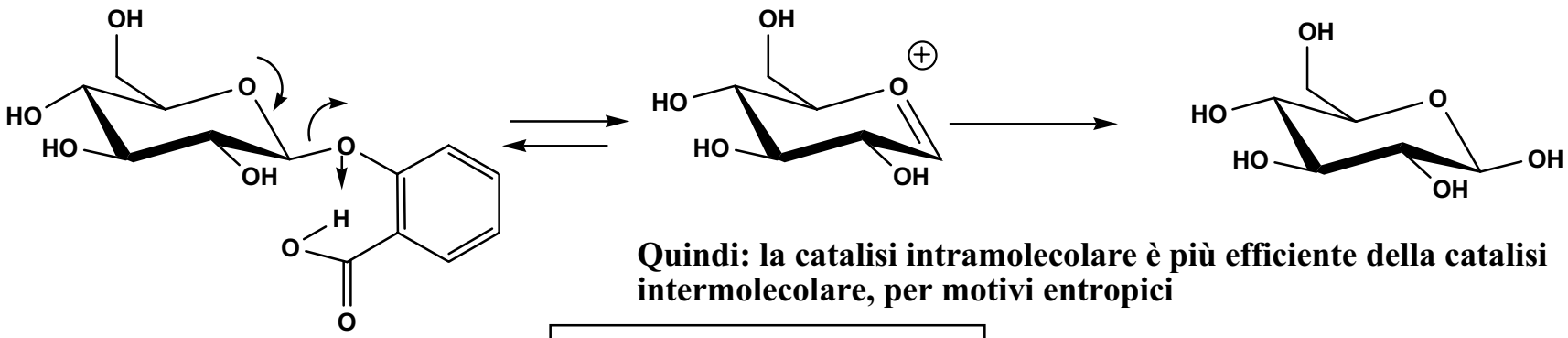
Per comprendere l'importanza dei fattori entropici, può essere utile fare degli esempi riguardanti reazioni non-enzimatiche.

CATALISI INTRAMOLECOLARE



La reazione di sinistra è 10^4 volte più veloce. Perché?

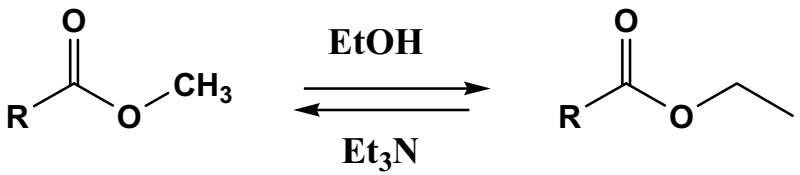
La reazione è facilitata da una catalisi acida generale intramolecolare



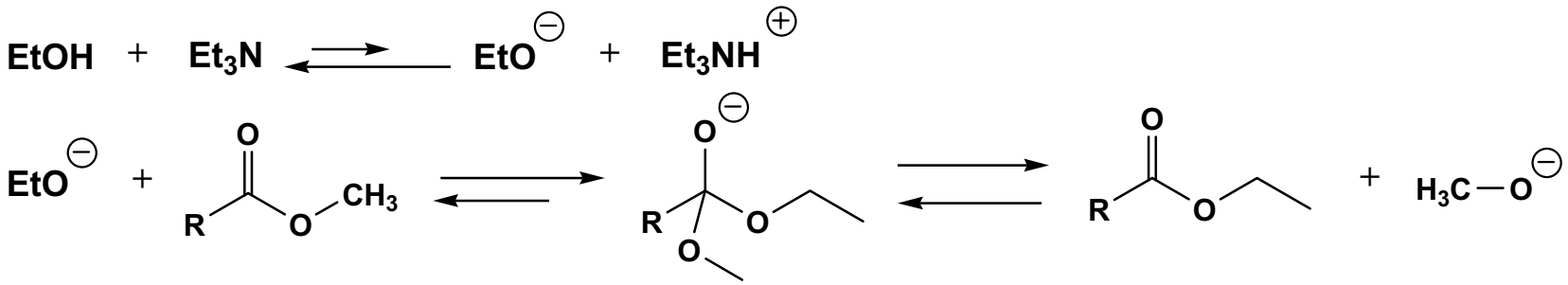
Quindi: la catalisi intramolecolare è più efficiente della catalisi intermolecolare, per motivi entropici

CATALISI MULTIPLA

La reazione di transesterificazione base-catalizzata può sembrare una reazione semplice, ma in realtà è complicata da reazioni di trasferimento protonico

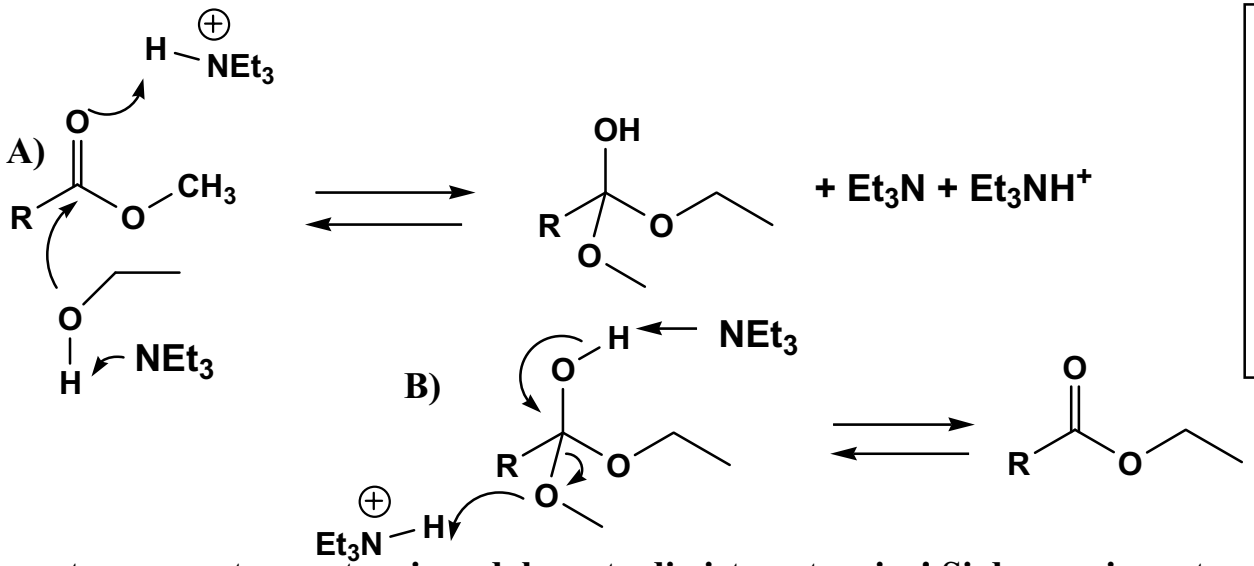


Un possibile meccanismo è il seguente:



Secondo questo meccanismo, la trietilammina è un catalizzatore basico specifico. Questo meccanismo prevede però l'intervento di specie intermedie cariche (alcolati) abbastanza basiche.

Il seguente meccanismo sarebbe molto vantaggioso dal punto di vista entalpico:

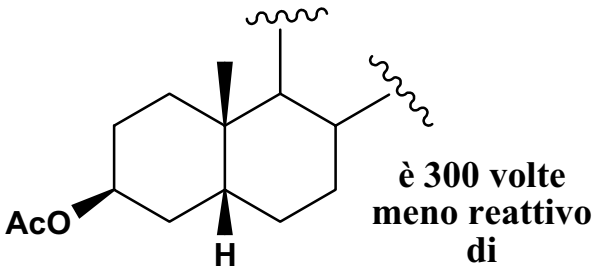


Questo meccanismo sfrutta contemporaneamente una catalisi acida ed una catalisi basica.

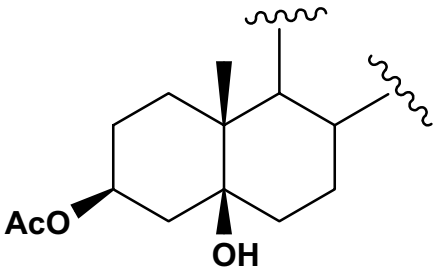
Si tratta di una catalisi "multipla"

ma estremamente svantaggioso dal punto di vista entropico! Si devono incontrare ben 4 molecole diverse!

Pertanto questo meccanismo è in generale più lento dell'altro. Tuttavia, se la struttura del reagente permette di superare, almeno in parte, lo svantaggio entropico, questo meccanismo concertato può divenire prevalente

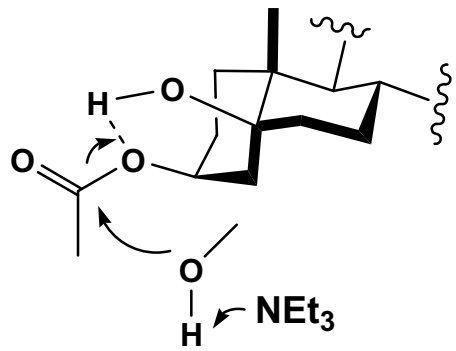


è 300 volte meno reattivo di



nella velocità di solvolisi con MeOH/Et_3N

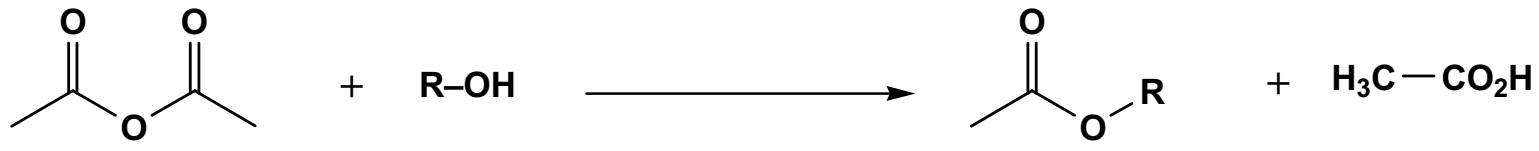
In questo esempio la catalisi multipla è anche (in parte) intramolecolare



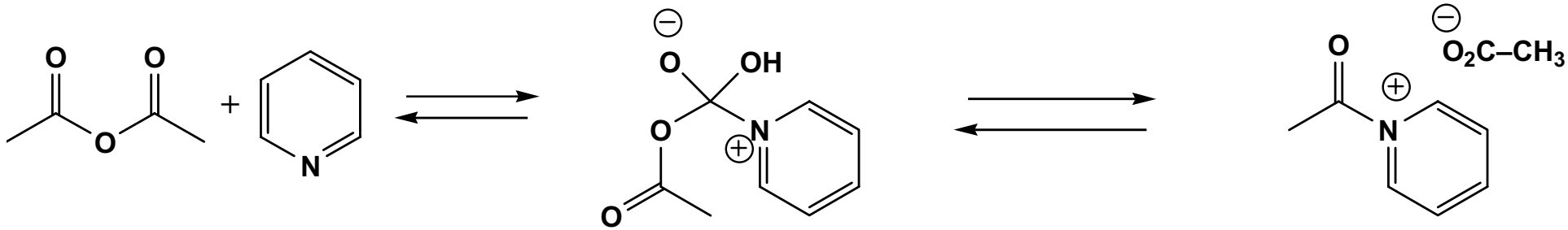
La rigidità degli steroidi fa si che l'OH sia nella posizione ideale per fornire assistenza intramolecolare

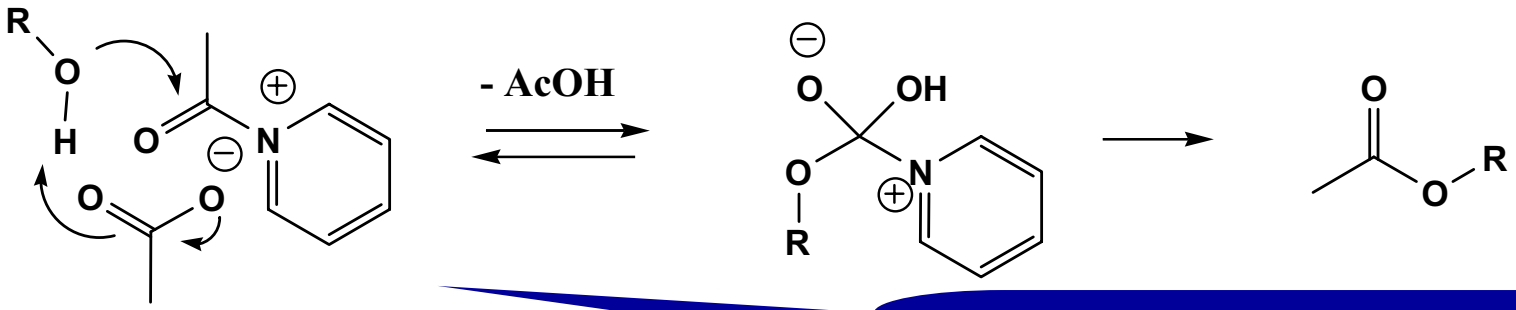
vediamo altri esempi

CATALISI NUCLEOFILICA



è ben noto che questa reazione può essere catalizzata da piridina. Si tratta di una *catalisi nucleofilica*

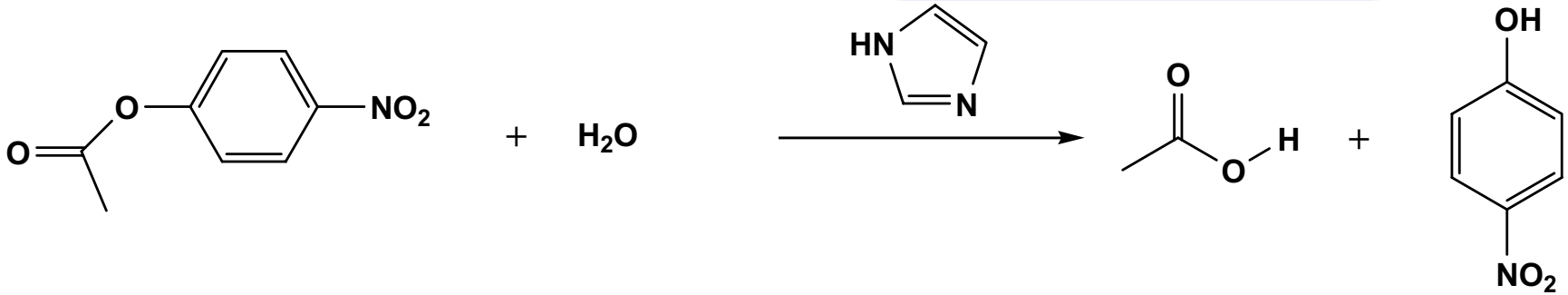


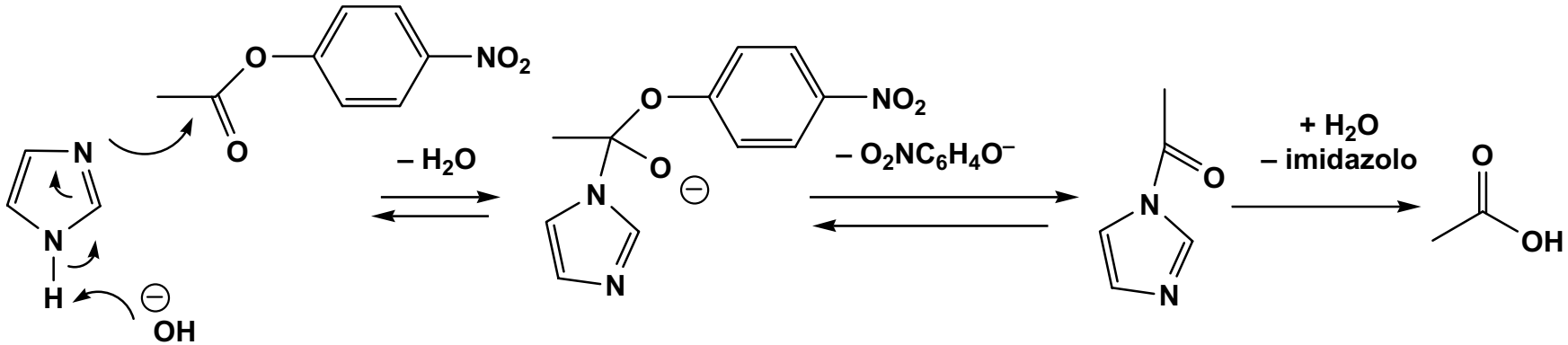


catalisi basica intramolecolare

Questo spiega perché l'anidride acetica è più reattiva del cloruro di acetile

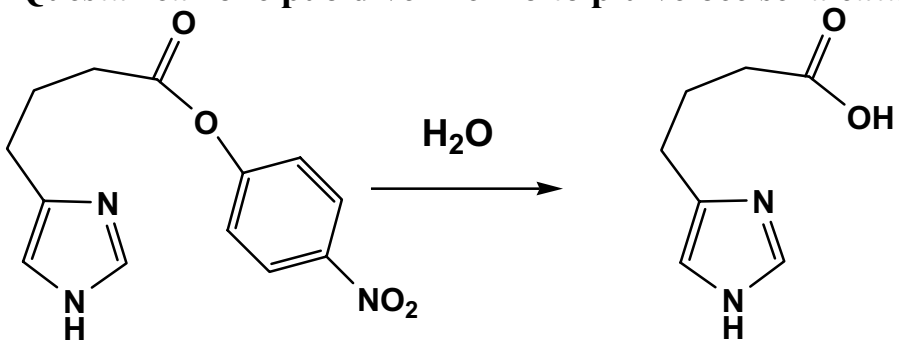
Una reazione simile è la seguente:





In questo caso nel rate-limiting step, oltre alla *catalisi nucleofilica*, c'è una *catalisi basica generale*. Quindi siamo in presenza di una catalisi *multipla*.

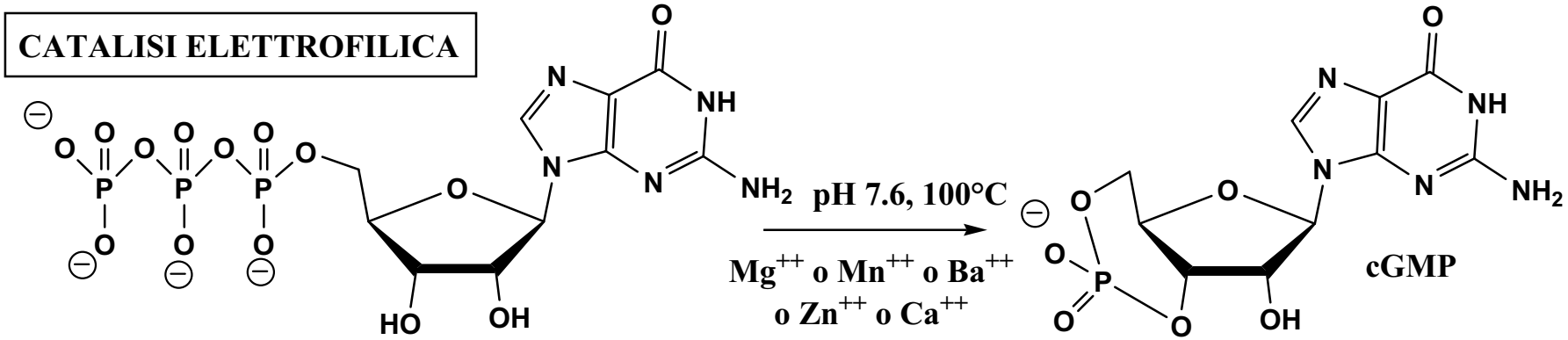
Questa reazione può divenire molto più veloce se la catalisi multipla diventa in parte intramolecolare

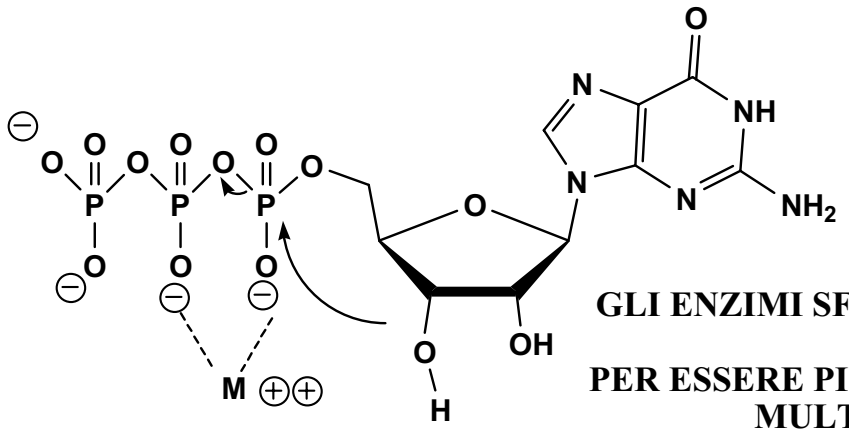


La reazione avviene addirittura a pH = 7 !!

Altro esempio **La trasformazione chimica della guanosina trifosfato a dare il cGMP è fortemente accelerata da ioni metallici bivalenti. Si tratta di una *catalisi elettrofilica***

CATALISI ELETTROFILICA





La reazione è favorita dalla catalisi elettrofila e dal fatto che si tratta di una reazione intramolecolare

GLI ENZIMI SFRUTTANO A SECONDA I CASI TUTTI QUESTI TIPI DI CATALISI.
PER ESSERE PIU' EFFICIENTI UTILIZZANO PERO' CATALISI MULTIPLA (DUE O PIU' TIPI DI CATALISI CONTEMPORANEAMENTE) ED AL TEMPO STESSO CATALISI INTRAMOLECOLARE

I vantaggi dell'intramolecolarità

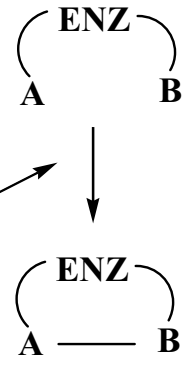
***E' evidente che, grazie ad una minor perdita (o ad un guadagno) di entropia*:**
- Le reazioni intramolecolari sono più veloci delle reazioni intermolecolari.
- Le reazioni in cui la catalisi è intramolecolare sono più veloci delle reazioni in cui la catalisi è intermolecolare

Entrambi i vantaggi sono sfruttati dagli enzimi:
a) L'enzima lega a se sia il substrato che il reagente. Quindi anche una reazione che sarebbe intermolecolare può diventare intramolecolare

A + B ⟶ A–B

reazione non enzimatica: intermolecolare (da 2 molecole ad 1: sfavorita entropicamente)

A + B + ENZ ⇌



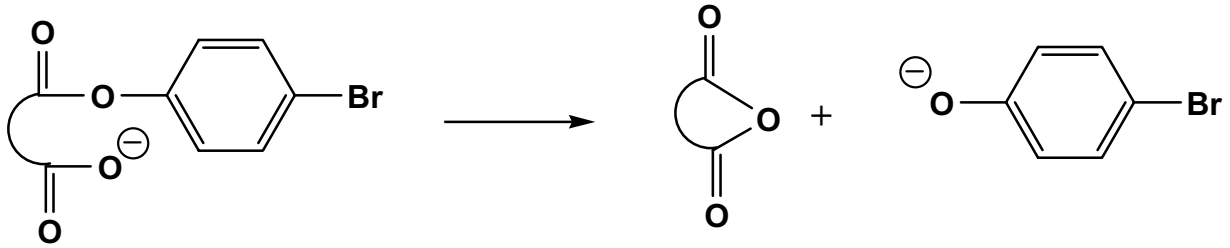
la complessazione dei substrati con l'enzima è sfavorita entropicamente, ma l'affinità del sito attivo con i substrati (interazioni di non legame favorevoli) compensa la perdita di entropia

reazione enzimatica: intramolecolare (da 1 molecola a 1: non sfavorita entropicamente)

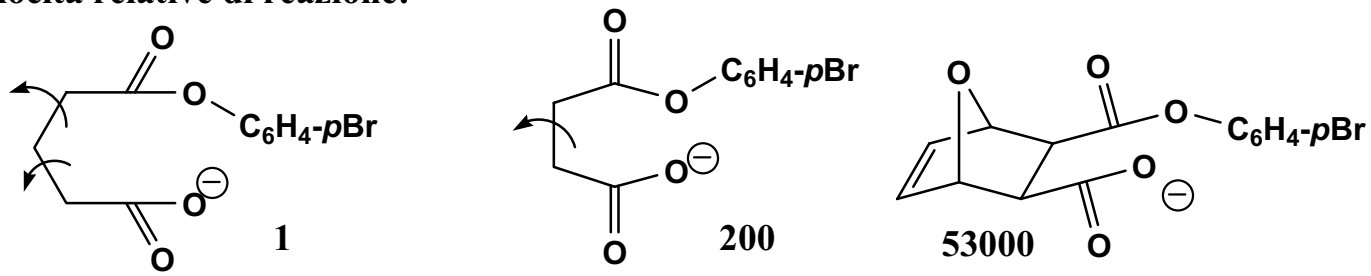
b) Ma oltre a ciò, gli enzimi sfruttano anche una <u>catalisi multipla intramolecolare</u>.

Finora abbiamo preso in considerazione il fatto che reazioni intramolecolari e catalisi intramolecolari sono favorite rispetto agli analoghi processi intermolecolari.
Ma c'è di più:
una reazione enzimatica può essere favorita anche da un guadagno entropico di tipo conformazionale!

Vediamo ancora una volta degli esempi di tipo "chimico":



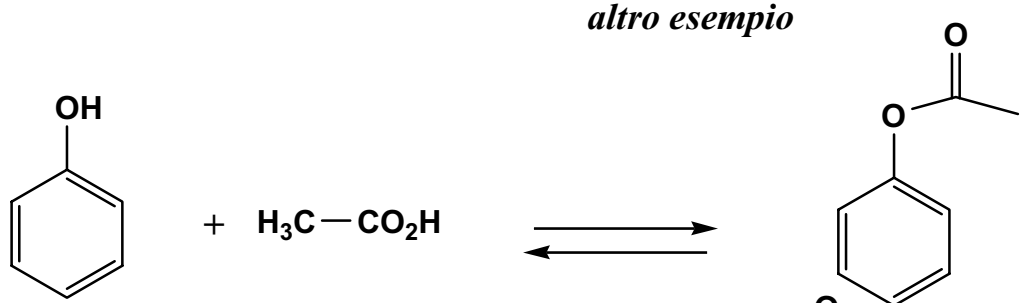
Velocità relative di reazione:



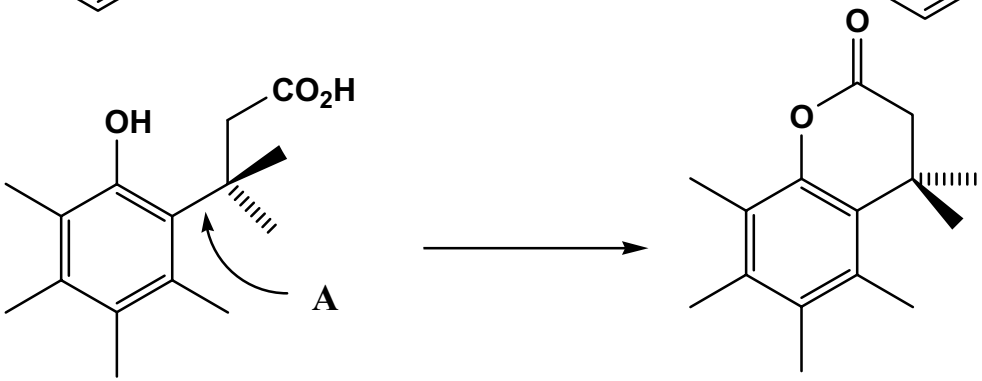
La diminuzione di gradi di libertà conformazionale porta ad un aumento della velocità di reazione

All'interno del sito attivo di un enzima avviene una sorta di "congelamento" conformazionale che comporta un enorme guadagno in termini di entropia rotazionale.

altro esempio



questa reazione avviene con velocità irrisoria, in assenza di catalisi acida (ed è anche sfavorita termodinamicamente)

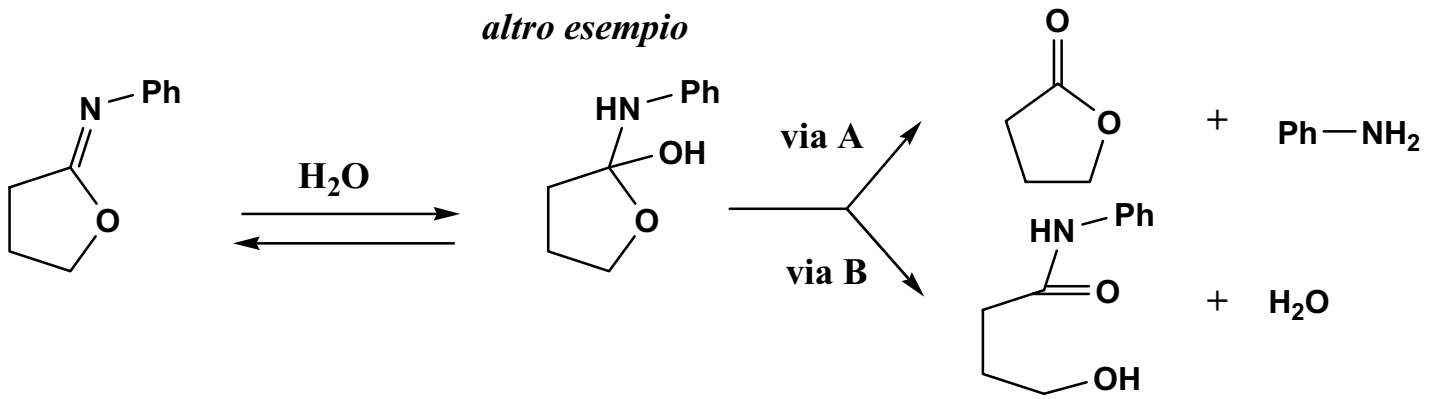


questa reazione avviene spontaneamente a temperatura ambiente, addirittura a pH basici!

E' stato misurato un rapporto di velocità (allo stesso pH) pari a 10^{15}

Questo enorme aumento di velocità è dovuto ad una combinazione di fattori entropici ed entalpici:
a) La reazione è intramolecolare anziché intermolecolare (fattore entropico)
b) La conformazione è "congelata": la rotazione intorno al legame A è impedita dalle interazioni tra i metili dell'anello e della catena (fattore entropico)
c) La "tensione sterica" è maggiore nel substrato che nel prodotto (fattore entalpico)

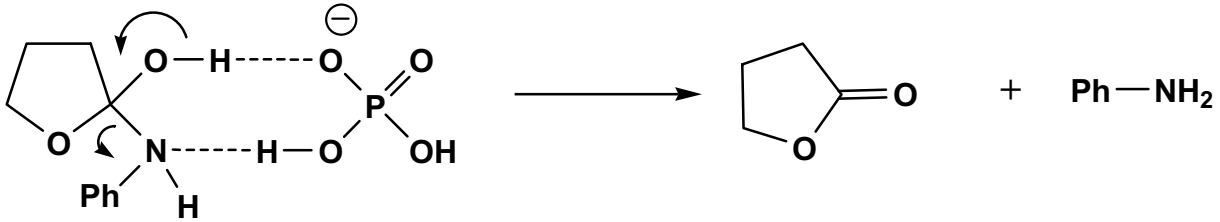
altro esempio



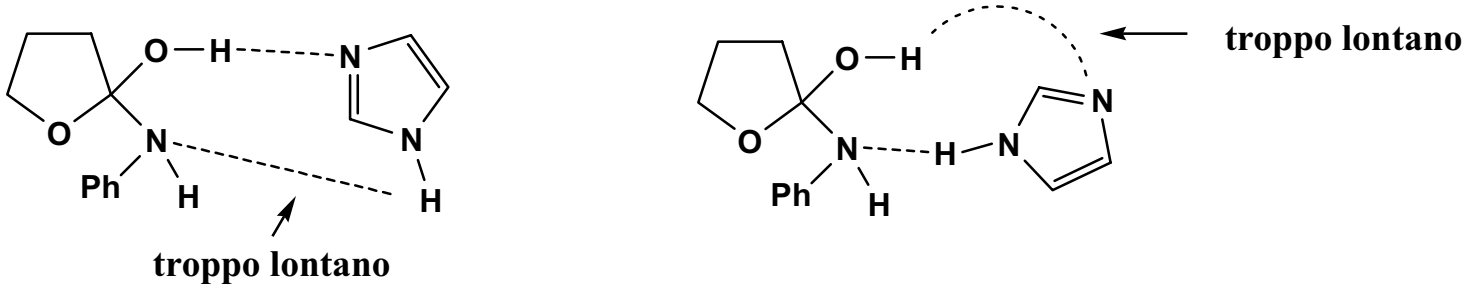
A pH basico la via B prevale (se non si protona, il gruppo PhNH- è un pessimo gruppo uscente).
A pH neutro, in presenza di un tampone, la via A diviene competitiva grazie ad una catalisi multipla acido-base.

Ma il fatto curioso è che <u>il rapporto tra i due prodotti dipende, a parità di pH, dalla natura del tampone!</u>

Con un tampone fosfato prevale il lattone:



Ma, con un tampone imidazolico, questa catalisi multipla intramolecolare non è possibile e prevale l'ammide



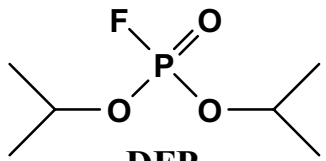
MORALE DELLA FAVOLA: non basta avere intramolecolarità. Bisogna anche che i gruppi funzionali implicati siano nella posizione giusta. In ciò gli enzimi sono abilissimi.

CONCLUDENDO

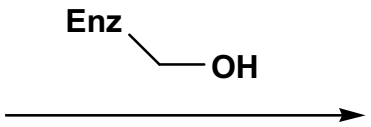
- **La complessazione dell'enzima con il substrato (o i substrati) comporta una notevole perdita di entropia dovuta al fatto che da più molecole se ne ottiene solo una e dalla riduzione dei gradi di libertà conformazionali.**
- **Questa perdita di entropia è compensata dalle interazioni di non legame (favorevoli) del sub strato (o dei substrati) con il sito attivo, grazie alla struttura semirigida e "su misura" di quest'ultimo.**
- **A sua volta la struttura semirigida del sito attivo, che comporta perdita di entropia, è compensata dalle numerose interazioni di non legame distribuite su tutto l'enzima. Anche per questo gli enzimi devono essere molto più grandi del sito attivo.**
- **La reazione vera e propria, che segue la complessazione, è molto più veloce di quella non catalizzata per la sommatoria di una serie di fattori favorevoli:**
  - **Le interazioni di non legame sono ancora più favorevoli a livello di stato di transizione che a livello di substrato/i (vantaggio entalpico)**
  - **Il sito attivo è in una situazione locale di desolvatazione, rendendo più reattivi i gruppi funzionali (vantaggio entalpico)**
  - **Si tratta sempre di reazioni intramolecolari, in quanto i vari substrati sono tutti pre-legati all'enzima (vantaggio entropico)**
  - **I substrati sono "congelati" nella disposizione spaziale ideale perchè avvenga la reazione (vantaggio di entropia traslazionale e rotazionale)**
  - **Parti del sito attivo sono coinvolte in una catalisi multipla e intramolecolare (basica, acida, nucleofilica, elettrofilica). La catalisi è particolarmente efficiente perchè le unità catalitiche sono anch'esse "congelate" nella disposizione ideale (vantaggio entropico)**

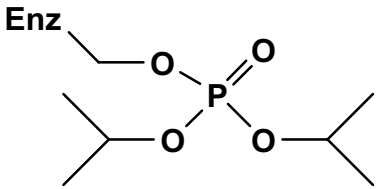
α-CHIMOTRIPSINA

- E' una proteasi, cioé un enzima adibito all'idrolisi delle proteine.
- E' formato da 241 amminoacidi
- Viene ricavata dal pancreas di bovini
- E' uno degli enzimi più studiati in quanto può essere ottenuto in forma molto pura per cristallizzazione
- E' una endopeptidasi (idrolizza cioé le proteine in corrispondenza di amminoacidi "interni"). E' selettiva per legami peptidici coinvolgenti (come componente carbossilico) la fenilalanina, la tirosina, il triptofano.
- Il pH ideale di attività è 7.8. Per l'idrolisi di esteri si preferisce usare pH intorno a 5-6, in quanto l'enzima è più stabile a questi pH. La chimotripsina è stabile in forma cristallina, ma si "autodigerisce" in soluzione a pH 6-9.
- E' una proteasi "serinica", in quanto il suo meccanismo d'azione è basato sull'intervento di una unità serinica. (<u>attenzione</u>: proteasi serinica (serine protease) = proteasi il cui meccanismo è basato su una serina; proteasi fenilalanilica (phenylalanyl proteasi) = proteasi che idrolizza ammidi della fenilalanina)
- Viene sintetizzata nel pancreas in una forma inattiva (chiamata chimotripsinogeno) che ha 4 amminoacidi in più ed un'unica catena. Questo precursore è a sua volta trasformato nell'α-chimotripsina ad opera di altre proteasi (inclusa la tripsina) che rompono la catena in vari punti per formare tre catene unite con ponti disolfuro.
- Lo studio del sito attivo è stato compiuto anche con studi cristallografici in presenza di un inibitore tipico delle proteasi seriniche.

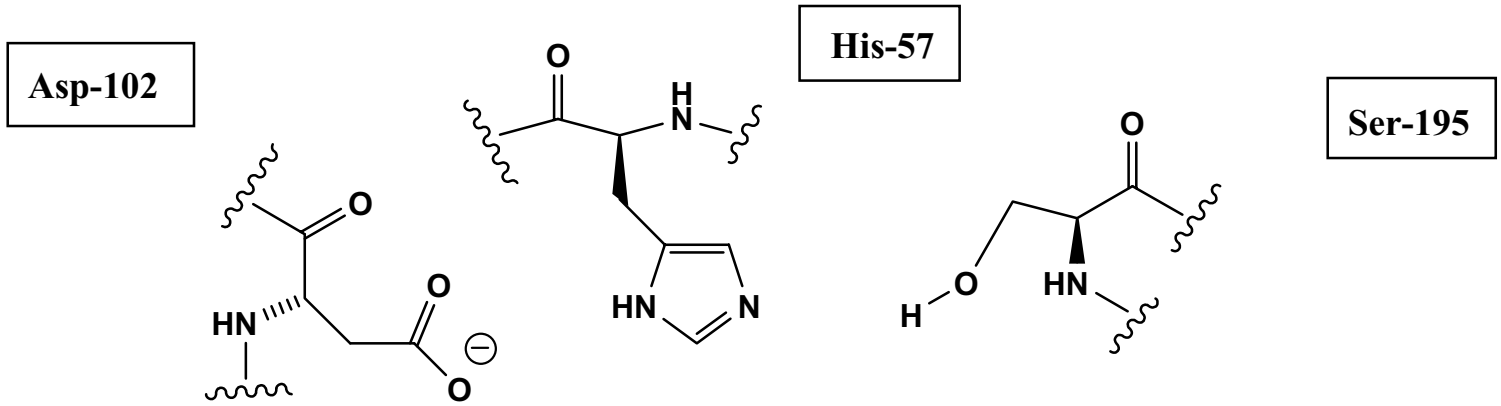


DFP
(diisopropil fosforofluoridato)

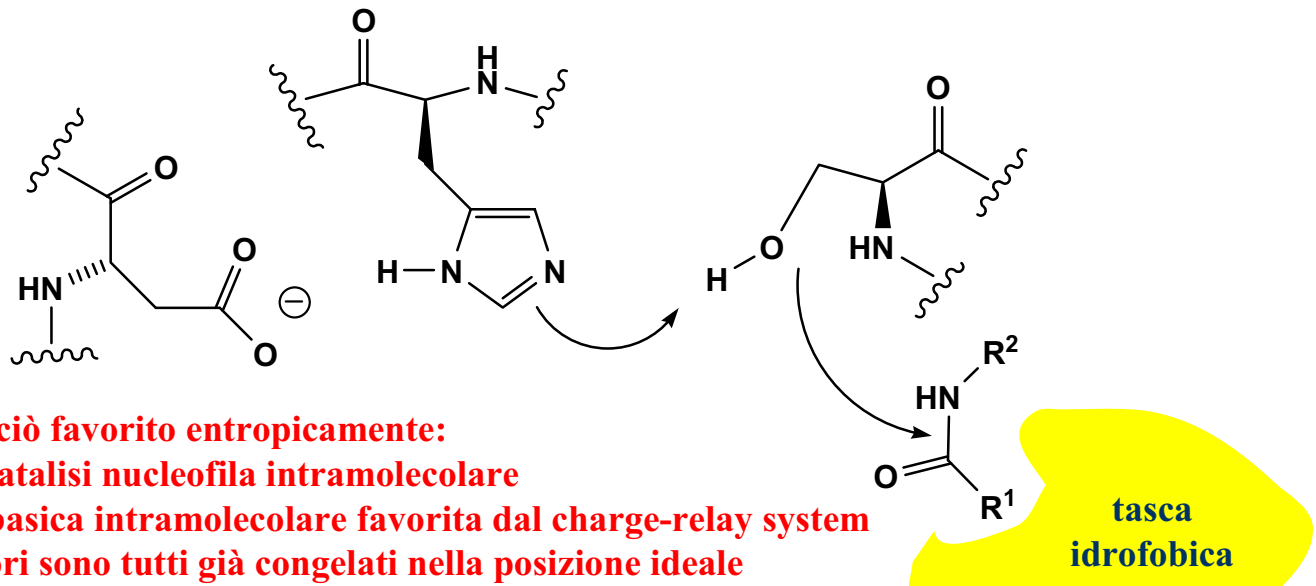




Questi studi hanno mostrato tre amminoacidi coinvolti nel sito attivo:

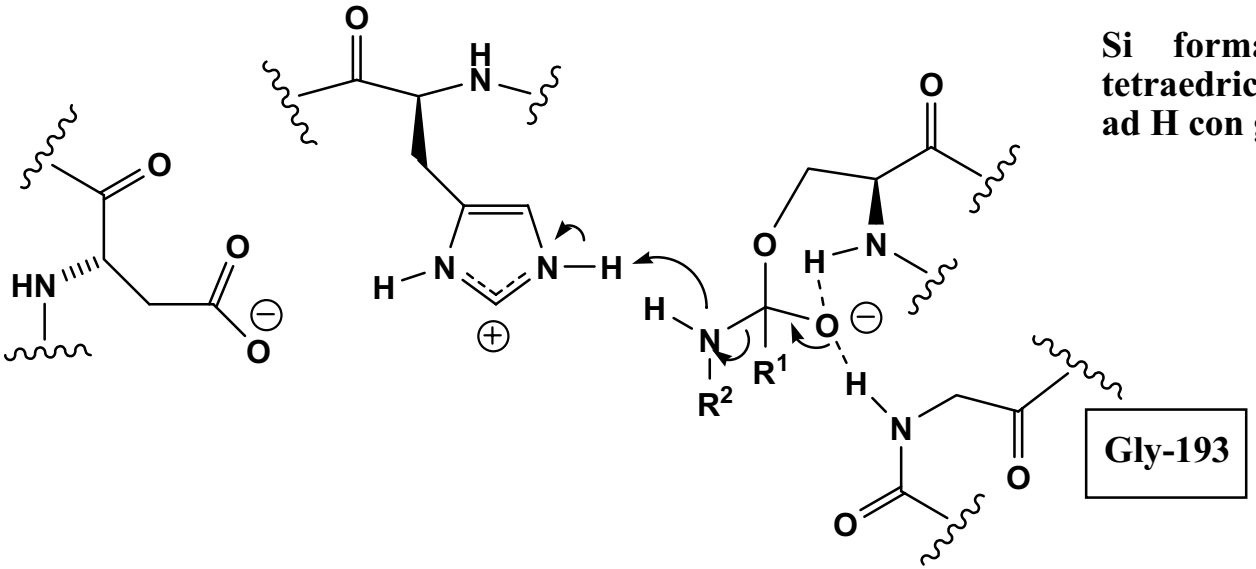


I residui laterali di questi tre amminoacidi sono allineati nel modo ideale per dare luogo ad una catalisi basica generale che attiva l'ossidrile serinico. La naturale basicità moderata dell'azoto di tipo piridinico dell'imidazolo è esaltata dalla polarizzazione del sistema imidazolico fornita dal carbossilato dell'acido aspartico (*charge-relay system*)



Questo primo stadio è perciò favorito entropicamente:
a) poiché si tratta di una catalisi nucleofila intramolecolare
b) c'è inoltre una catalisi basica intramolecolare favorita dal charge-relay system
c) i reattivi ed i catalizzatori sono tutti già congelati nella posizione ideale

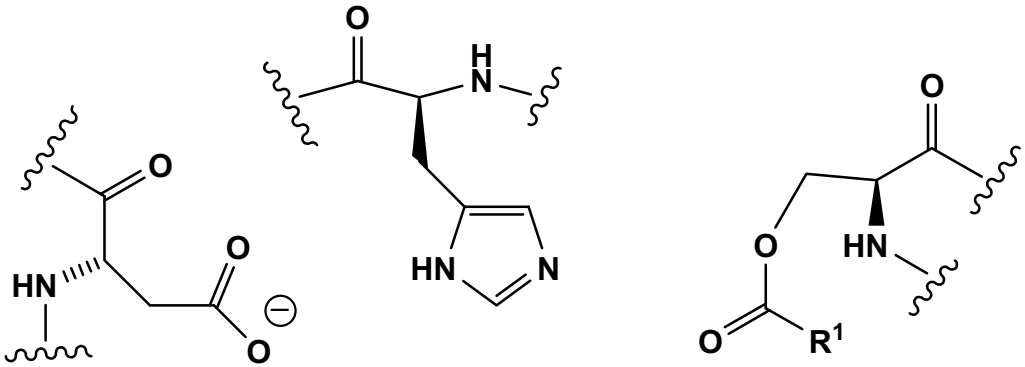
Il substrato si lega <u>selettivamente</u> nella posizione ideale del sito attivo grazie alle interazioni di non-legame tra il gruppo aromatico ed una tasca idrofobica



Si forma così questo intermedio tetraedrico, che è stabilizzato da legami ad H con gli NH di Ser-195 e Gly-193

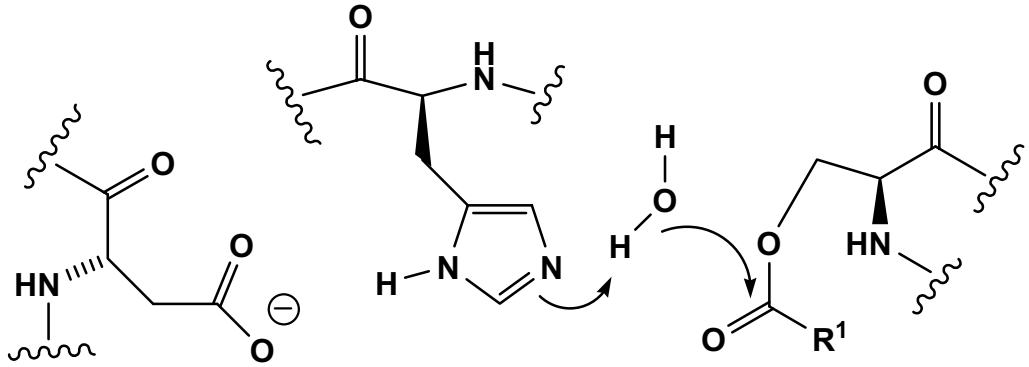
La presenza di Gly-193 nella corretta posizione è <u>fondamentale</u> e rappresenta la differenza principale tra chimotripsina e chimotripsinogeno!

Il charge-relay system funziona ora da catalizzatore acido intramolecolare facilitando l'espulsione dell'ammina e portando alla formazione di un acil-enzima



acil-enzima

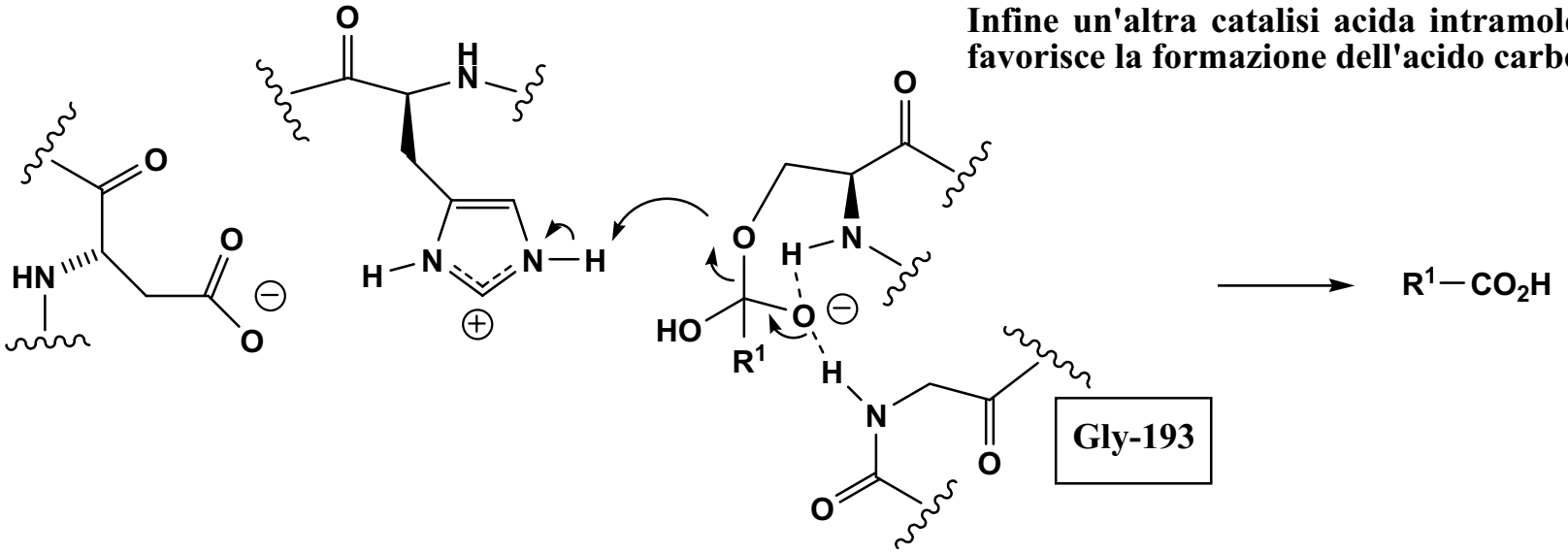
A questo punto entra di nuovo in azione il charge-relay system, nuovamente per favorire una catalisi basica intramolecolare

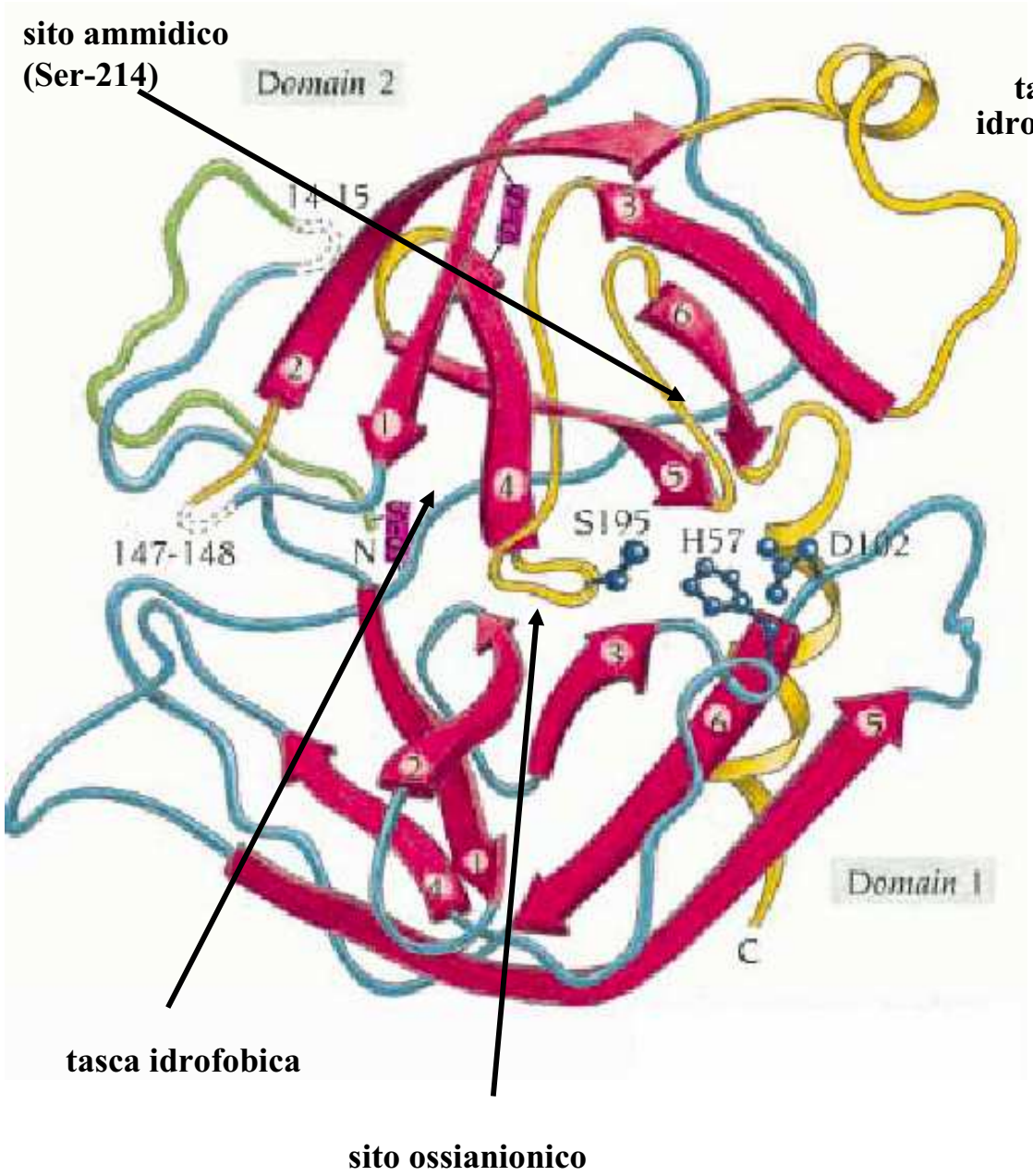


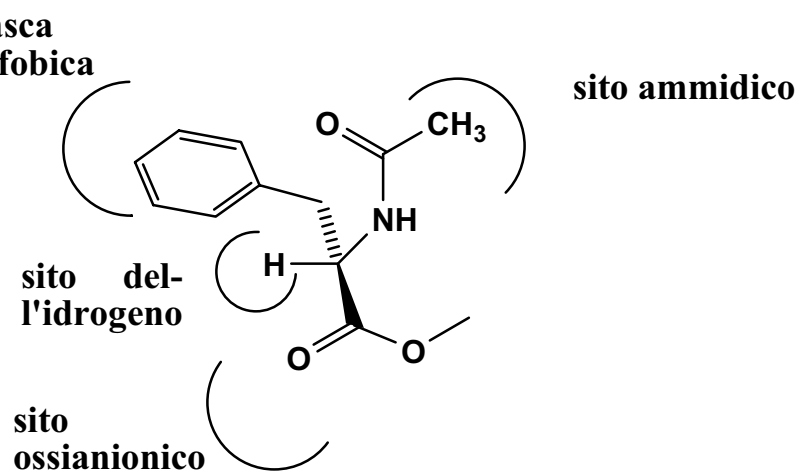
acil-enzima

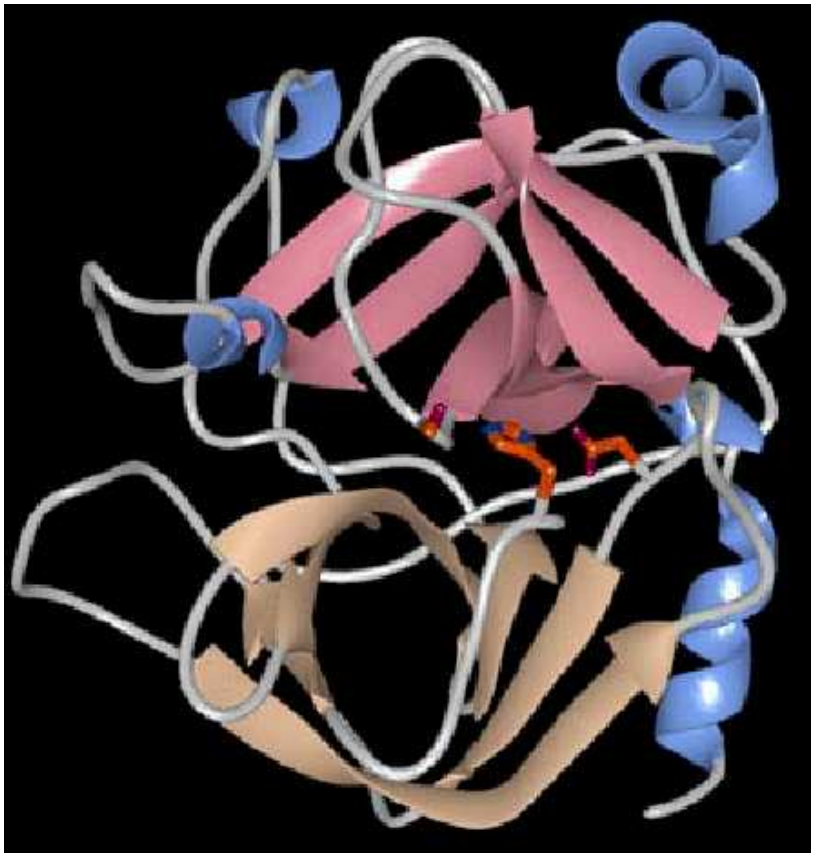
Si ha un secondo intermedio tetraedrico, ancora stabilizzato da Gly-193

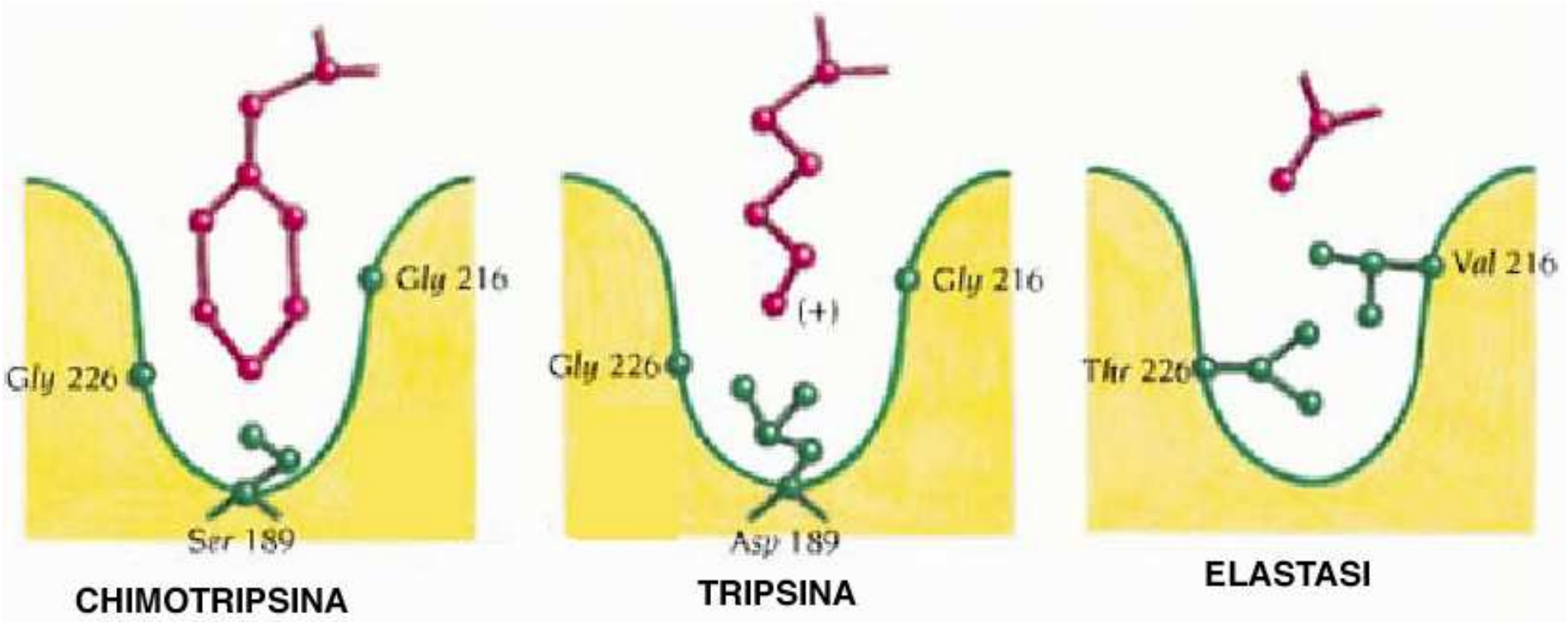
Infine un'altra catalisi acida intramolecolare favorisce la formazione dell'acido carbossilico




sito ammidico
(Ser-214)
Domain 2
14 15
147-148
N
S195
H57
D102
Domain 1
C
tasca idrofobica
sito ossianionico


tasca
idrofobica
sito ammidico
O
CH3
NH
H
sito del-
l'idrogeno
O
O
sito
ossianionico





Questi tre enzimi sono tutti e tre proteasi seriniche e hanno una triade catalitica del tutto simile. Sono però differenziati dalla cosiddetta "tasca di specificità".

- **Nella Chimotripsina la tasca è di natura idrofobica e predilige gruppi aromatici**
- **Nella Tripsina c'è un gruppo anionico e sono quindi preferiti amminoacidi scissili con residui cationici (arginina, lisina)**
- **Nella Elastasi la tasca è idrofobica, ma piccola. Sono quindi preferiti amminoacidi scissili con residui idrofobici piccoli (ad es. alanina)**

COFATTORI

Finora abbiamo sempre considerato, per semplicità, reazioni enzimatiche del tipo (A = substrato; P = prodotto)

$$A \xrightarrow{\textit{enzima}}$$

che procedono così :

$$A + E \longrightarrow AE \longrightarrow PE \longrightarrow P$$

In realtà, a parte qualche reazione particolare (trasposizioni, ciclizzazioni), non è mai così. Più spesso è

$$A + B \xrightarrow{\textit{enzima}} P$$

oppure

$$A + B \xrightarrow{\textit{enzima}} P + C$$

$$A + B \xrightarrow[D]{\textit{enzima}} P + C$$

oppure

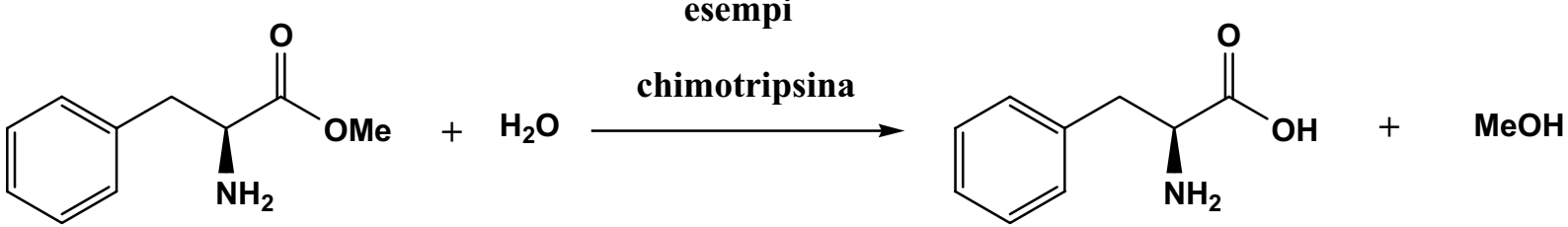
$$A + B + C \xrightarrow{\textit{enzima}} P + D$$

dove A + B si uniscono a dare P e C si trasforma in D

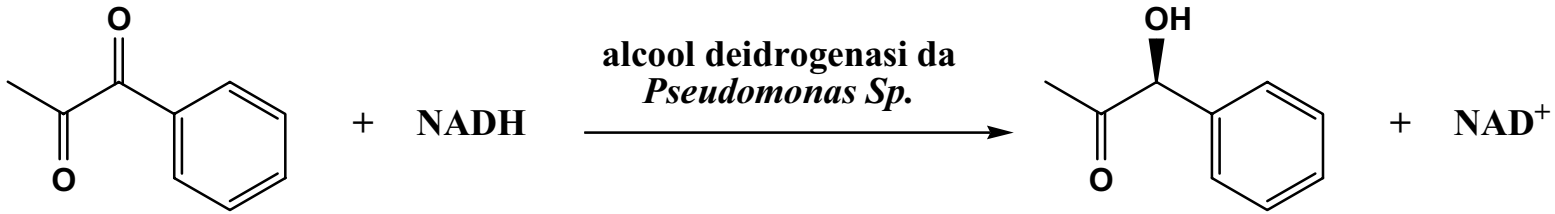
Quindi perché la reazione avvenga, oltre al substrato A e all'enzima, devono essere presenti altre sostanze

QUESTE SOSTANZE SONO DETTE COFATTORI

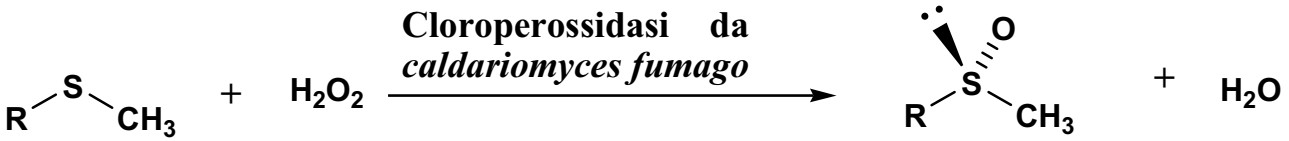
esempi



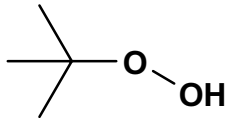
in questo caso il cofattore sarebbe l'acqua. Normalmente però l'acqua non è considerata un cofattore, così come l'ossigeno. Queste sostanze sono infatti sempre presenti



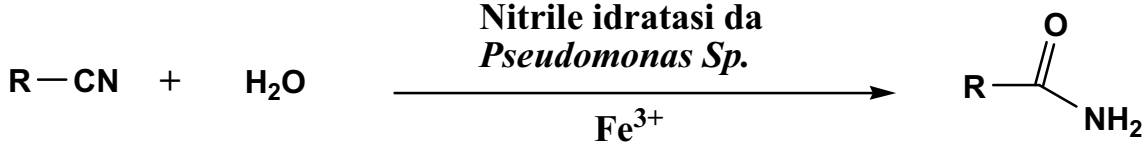
I cofattori possono essere sostanze organiche o inorganiche



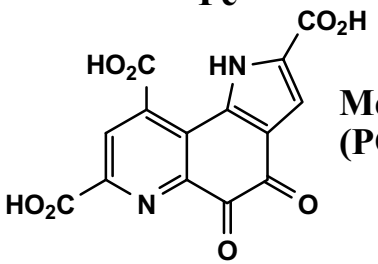
Al posto di H_2O_2 si può usare anche



I cofattori possono essere reattivi stechiometrici o catalitici



sia lo ione ferrico che la Metoxatina sono essenziali per il funzionamento dell'enzima, ma non si consumano nel corso della reazione, la cui stechiometria prevede l'intervento della sola acqua



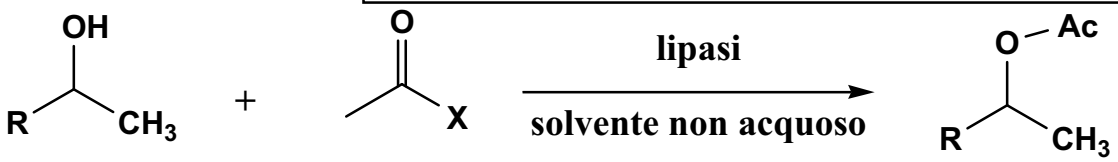
Metoxatina (PQQ)

Quando una sostanza organica non-peptidica è legata all'enzima con legame covalente è detta *gruppo prostetico* e non cofattore

I cofattori possono essere già legati all'enzima, quando esso viene isolato

Ciò vale soprattutto per i cofattori che non si consumano. Ad esempio la nitrile idratasi, quando viene isolata, è già legata allo ione ferrico ed al PQQ. Lo stesso avviene in genere per i *metalloenzimi*, in cui il metallo indispensabile per la catalisi rimane sempre legato all'enzima.

Alcuni enzimi accettano diversi cofattori, altri no



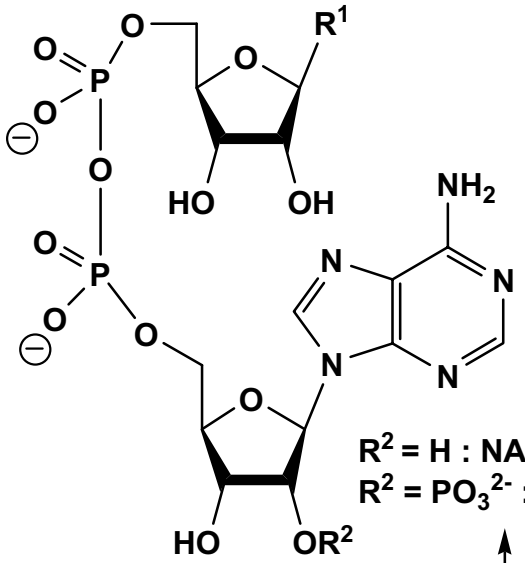
X = OH, OCH_3, OCH_2CF_3, $OCH{=}CH_2$, etc.

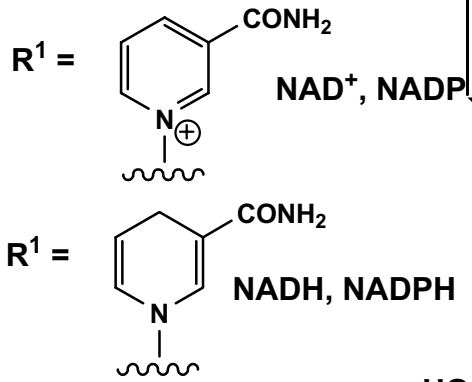
Invece le ossido-reduttasi accettano solo un ben preciso cofattore

Quando i cofattori sono molecole organiche di una certa complessità sono detti COENZIMI

Molti coenzimi sono vitamine o loro derivati

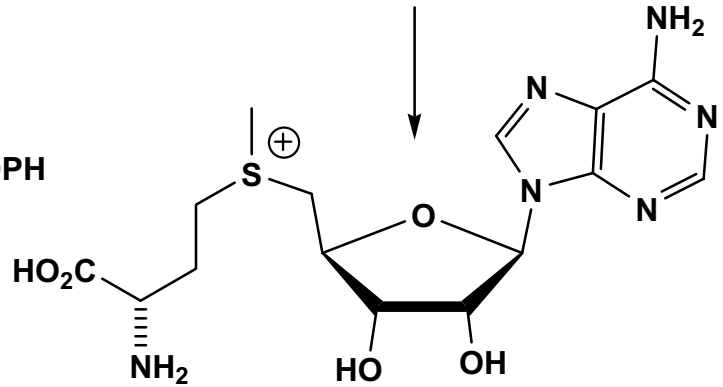
Esempi di coenzimi:



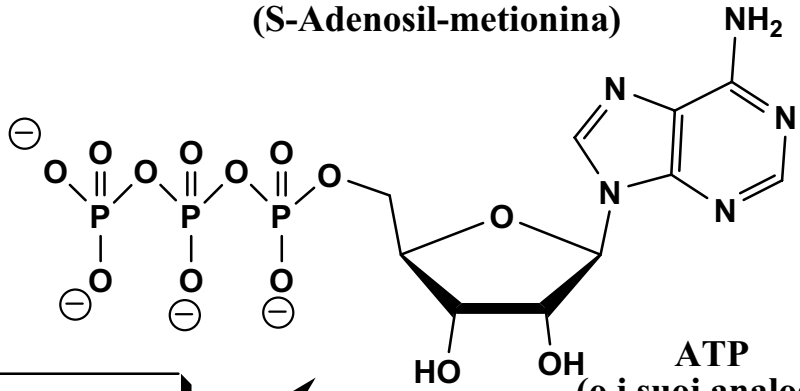


- Derivati della vitamina PP (nicotinammide)
- Implicati in processi redox
- Si consumano nella reazione
- Costosi (necessitano riciclo)(fattibile)

- Implicato in processi di trasferimento di metile
- Si consuma nella reazione
- Costoso (necessita riciclo)(problematico)

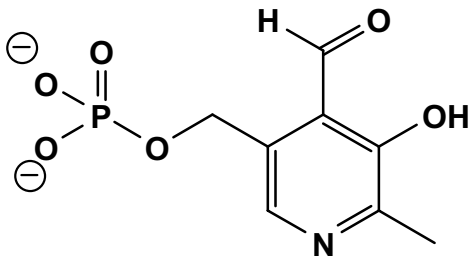


SAM
(S-Adenosil-metionina)



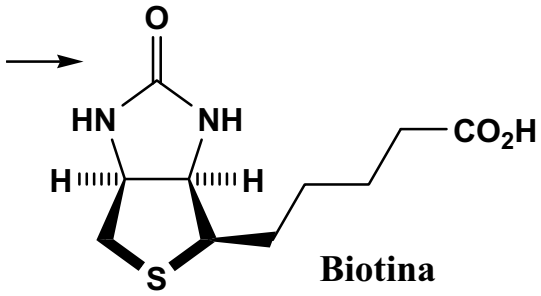
ATP
(o i suoi analoghi UTP, GTP etc.)

- Implicati in fosforilazioni, formazioni legami C-C, trasferimento di glicosili, svariati processi che richiedono energia
- Si consumano nella reazione
- Costosi (necessitano riciclo)(fattibile)



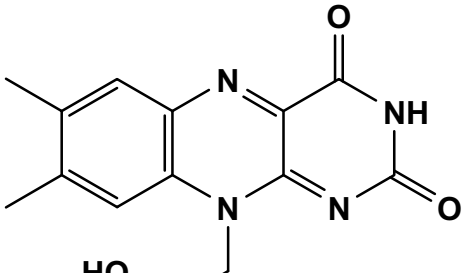
piridossal fosfato

- è la vitamina H
- è implicato in reazioni di carbossilazione (incorporazione di CO_2) e decarbossilazione
- non si consuma (consuma ATP)

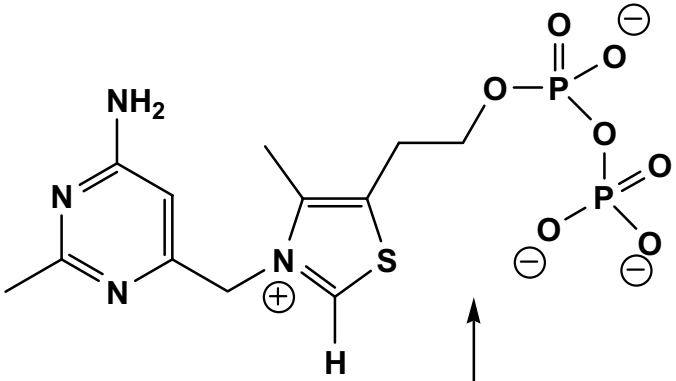


Biotina

- è un derivato della vitamina B_6 (piridossina)
- è implicato in transamminazioni, ma anche in formazioni di legami C-C
- non si consuma

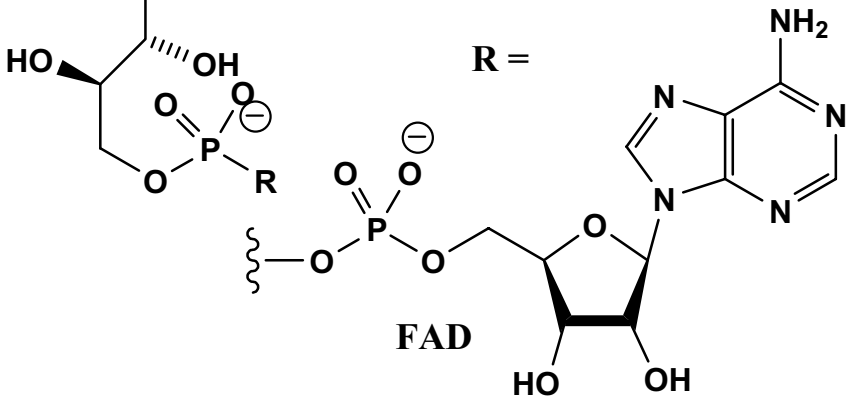


R = OH: FMN



Tiamina pirofosfato

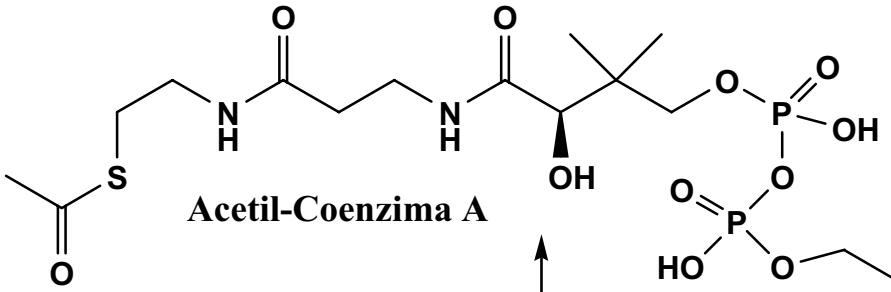
R =



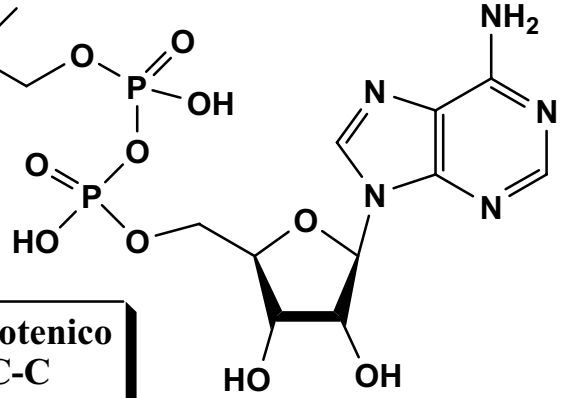
FAD

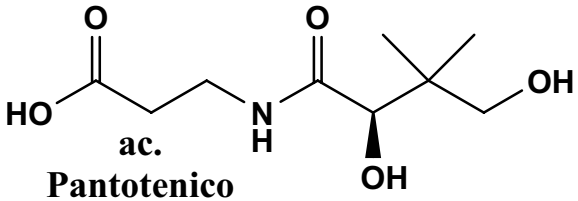
- è un derivato della vitamina B_1 (tiamina)
- è implicato in formazioni di legami C-C
- non si consuma

- sono derivati della vitamina B_2 (riboflavina)
- sono implicati in reazioni redox
- si consumano riducendosi, ma in genere sono riossidati da NAD/NADP o da O_2



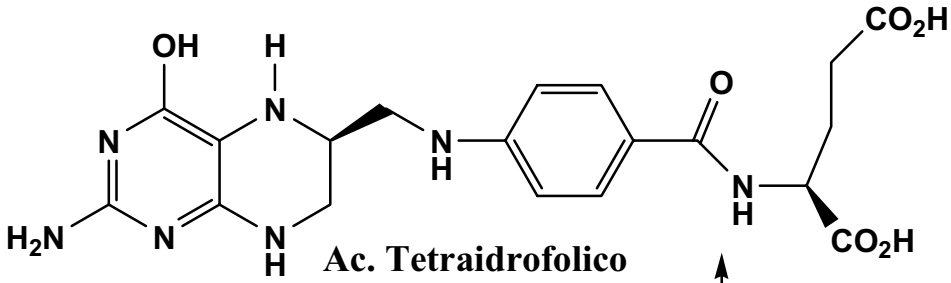
Acetil-Coenzima A





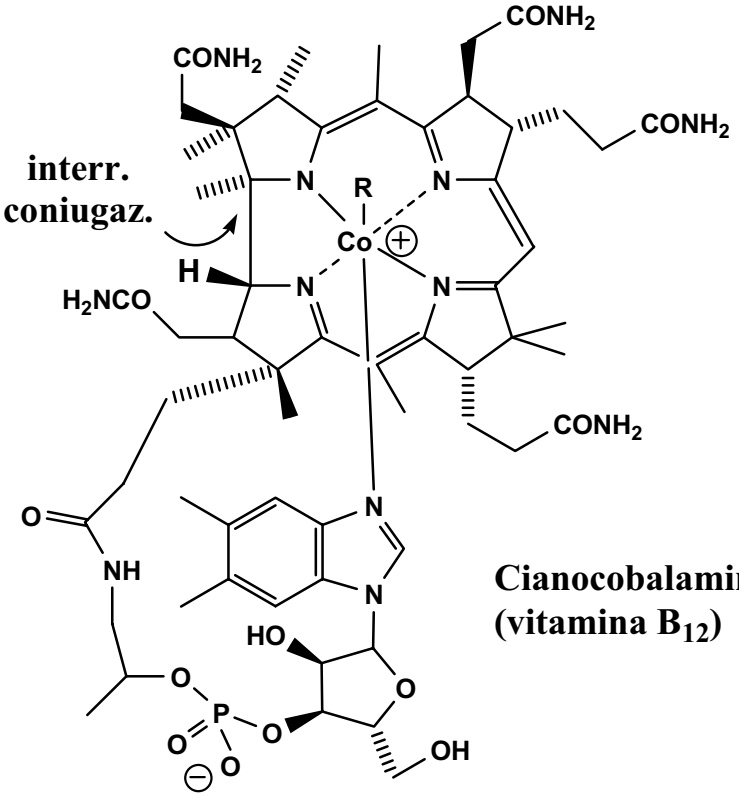
ac. Pantotenico

- è un derivato della vitamina ac. Pantotenico
- è implicato in formazioni di legame C-C
- si consuma
- costoso (necessita riciclo)(fattibile)



Ac. Tetraidrofolico

- è un derivato della vitamina ac. Folico
- è implicato in trasporto di unità CHO, CH_2OH, CH_3
- non si consuma

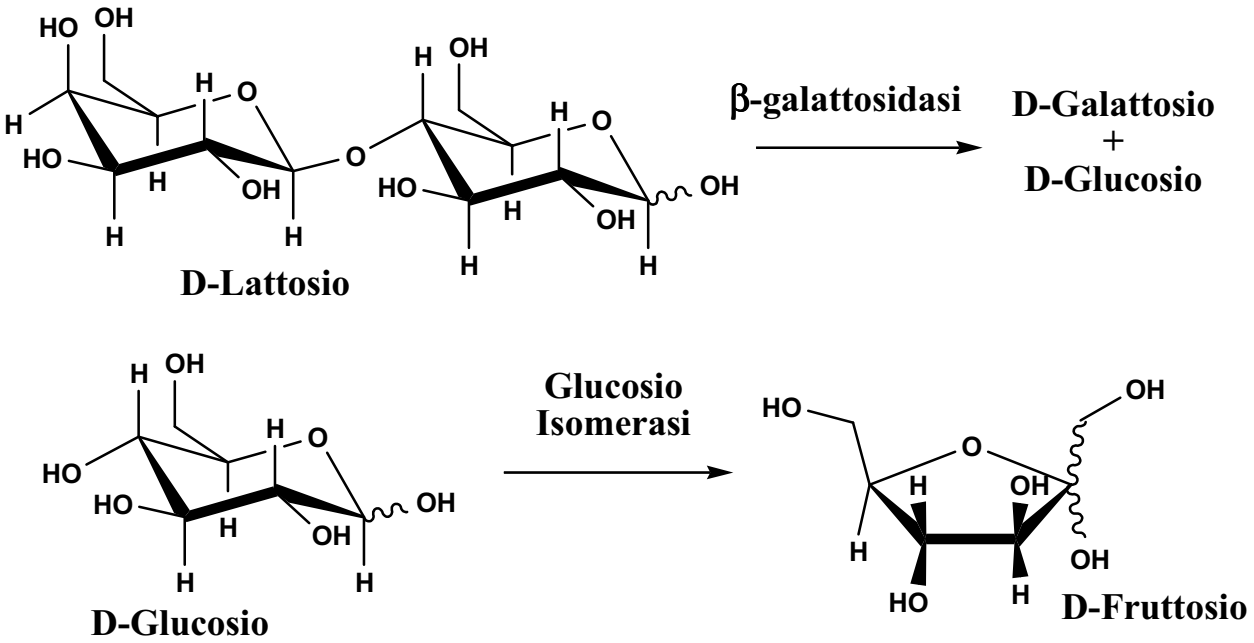


Cianocobalamina (vitamina B_{12})

- è un derivato della vitamina B_{12}
- è implicato in reazioni di metilazione elettrofila e di isomerizzazione
- non si consuma

GLI ENZIMI POSSONO ESSERE SFRUTTATI DALL'UOMO IN VARI MODI

- **Per sintetizzare selettivamente e/o in condizioni blande e/o rispettose dell'ambiente intermedi chimici o prodotti finali**
- **Nell'industria alimentare per migliorare la qualità degli alimenti *(predigerire il cibo per bambini (tripsina), rendere più tenera la carne (papaina), precipitare la caseina nel formaggio (Rennina), idrolizzare le proteine, transesterificazioni di trigliceridi con lipasi (ad es. lipasi da Rhizopus Niveus) per ottenere grassi con caratteristiche organolettiche differenti (burro cacao), idrolisi di trigliceridi con lipasi per mutare il sapore del formaggio) oppure:***



- **Nei detergenti per favorire la rimozione dello sporco *(lipasi o proteasi (ad es. subtilisina))***
- **Nella chimica ambientale per la biodegradazione di inquinanti**

PREGIUDIZI COMUNI CONTRO L'USO DEGLI ENZIMI IN SINTESI

a) ***Gli enzimi sono poco stabili e più sensibili dei comuni reattivi organici***

E' in parte vero: gli enzimi si denaturano a caldo o in presenza di reattivi energici. D'altra parte sono attivi in condizioni molto blande. Inoltre posso essere stabilizzati per supportazione su matrici solide. Recentemente sono stati isolati ed impiegati enzimi derivanti da organismi *estremofili* che sono stabili anche a temperature di 100°C o ad elevate pressioni.

b) ***Gli enzimi sono costosi***

Grazie alle tecniche di ingegneria genetica ora molti enzimi sono accessibili da microorganismi a costi contenuti. Inoltre se ne usa sempre una piccola quantità

c) ***Gli enzimi agiscono solo sui substrati "naturali"***

Questo è stato più volte smentito. Molti enzimi accettano anche numerosi substrati "non naturali". Anche se l'efficacia catalitica può diminuire un po' rispetto ai substrati naturali, l'elevata efficienza degli enzimi li rende comunque sufficientemente attivi.

d) ***Gli enzimi funzionano solo in acqua***

Anche questo fatto è stato più volte smentito. In molti casi è possibile utilizzare enzimi anche in solventi organici puri o in acqua contenente cosolventi.

Classificazione degli Enzimi

La classificazione segue le regole della "Enzyme Commission" (E.C.). Gli enzimi sono classificati con 4 numeri A,B,C,D (quindi E.C.A.B.C.D) dove i 4 numeri denotano:
A: Il tipo principale di reazione
B: Il sottotipo, indicando il tipo di substrato o il tipo di molecola trasferita
C: La natura del co-substrato
D: il tipo individuale di enzima

PDB = Protein Data Bank, dove sono depositate le strutture degli enzimi

Classe	Descrizione	N. PDB	% uso in sintesi	utilità
E.C.1: Ossidoreduttasi	Riduzioni, ossidazioni	1733	25%	+++
E.C.2: Transferasi	Trasferimento di gruppi: aldeidici, chetonici, acilici, zuccherini, fosforilici, metilici	2261	5%	+
E.C.3: Idrolasi	Idrolisi-formazione di esteri, ammidi, glicosidi, fosfati etc.	4637	60%	++++
E.C.4: Liasi	Addizione eliminazione di piccole molecole a doppi legami C=C, C=N, C=O	796	5%	++
E.C.5: Isomerasi	Isomerizzazioni: ad es. racemizzazioni, epimerizzazioni, trasf. aldosi in chetosi etc.	497	<5%	–
E.C.6: Ligasi	Formazione-rottura di legami C–C, C–O, C–S, C–N con concomitante idrolisi di trifosfati	284	<5%	–

Si riportano qui i principali tipi di enzimi appartenenti a ciascuna classe. Tra parentesi il numero di strutture PDB

Ossidoreduttasi

- **Alcool deidrogenasi (E.C.1.1)(397): ossidazione di alcooli-riduzione di chetoni-aldeidi. In genere NADH/NAD o NADPH/NADP dipendenti**
- **Aldeide deidrogenasi (E.C.1.2)(83): ossidazione di aldeidi ad acidi carbossilici. In genere NAD o NADP dipendenti**
- **Alchene deidrogenasi (E.C.1.3)(81): idrogenazione di doppi legami C=C. NADH/NAD o NADPH/NADP dipendenti**
- **Perossidasi (E.C.1.11)(203): utilizzano H_2O_2 come ossidante**
- **Mono-ossigenasi e di-ossigenasi (E.C.1.13 ed E.C.1.14)(311): utilizzano O_2 come ossidante**
- **Superossido dismutasi (E.C.1.15)(98): utilizzano superossido come ossidante**

Transferasi

- **Transferasi di un'unità C-1 (E.C.2.1)(271): trasferimento di gruppi con 1 atomo di C: ad es. metil transferasi dipendenti da SAM; idrossimetil transferasi dipendenti da ac. folico.**
- **Trans-chetolasi (E.C.2.2)(18): trasferimento di gruppi aldeidici o chetonici**
- **Acil transferasi (E.C.2.3)(152): trasferimento di gruppi acilici: ad es. le acetil transferasi CoA dipendenti.**
- **Glicosil transferasi (E.C.2.4)(343): trasferimento di gruppi glicosidici e quindi sintesi di glicosidi**
- **Chinasi (E.C.2.7)(1138): trasferimento di gruppi fosforati.**

Idrolasi

- **Idrolasi di esteri carbossilici (E.C.3.1.1)(245): idrolisi di esteri carbossilici. A loro volta si dividono in esterasi vere e proprie, lipasi, fosfolipasi, acetil esterasi, acetilcolina esterasi etc.**
- **Fosfatasi (E.C.3.1.3)(235): idrolisi di fosfati**
- **Glicosilasi (E.C.3.2)(1465): idrolisi di legami glicosidici**
- **Epossido idrolasi (E.C.3.3.2)(16): idrolisi di epossidi**
- **Proteasi (E.C.3.4)(1582): idrolisi dei legami ammidici nei peptidi. Chiamate anche peptidasi (endo-peptidasi o eso-peptidasi a seconda che idrolizzino il peptide al centro o partendo dai legami terminali).**
- **Idrolasi che agiscono su legami C-N non peptidici (E.C.3.5)(306): Comprendono le acilasi (idrolisi di ammidi non peptidiche), le lattamasi (idrolisi di lattami), le idantoinasi (idrolisi di idantoine), le nitrilasi (idrolisi di nitrili ad acidi), le nitrile idratasi (idratazione di nitrili ad ammidi) etc.**

Liasi

- **Liasi di legami C-C (E.C.4.1)(277): rottura o sintesi di legami C-C: comprendono aldolasi e sintetasi**
- **Liasi di legami C-O(E.C.4.2)(425): rottura o sintesi di legami C-O: ad esempio le fumarasi che sommano acqua all'acido fumarico a dare acido malico**
- **Liasi di legami C-N (E.C.4.3)(152): rottura o sintesi di legami C-N: ad esempio le ammoniaca liasi, che sommano NH_3 a doppi legami.**

Isomerasi

- **Racemasi ed Epimerasi (E.C.5.1.)(76): racemizzazioni ed epimerizzazioni**
- **Cis-Trans Isomerasi (E.C.5.2)(93): isomerizzazioni di doppi legami**

Ligasi

- **Ligasi che formano legami C-O (E.C.6.1.)(116): ad es. le amminoacil *t*-RNA sintetasi**
- **Ligasi che formano legami C-N (E.C.6.3)(144): ad es. la L-glutammina sintetasi**

USO DI ENZIMI ISOLATI NELLA SINTESI ORGANICA

Fonti degli enzimi isolati

- **Scarti della macellazione o organi di basso costo di animali di allevamento: ad es. fegato, pancreas, reni di bovini, ovini, equini, etc.**
- **Da colture di microorganismi (funghi o batteri), spesso modificati geneticamente per aumentare la resa nell'enzima voluto.**

Gli enzimi sono ottenuti dai grezzi mediante una serie di separazioni che sfruttano estrazioni, precipitazioni, cromatografie (su Sephadex) ed in alcuni casi, cristallizzazione.
Gli enzimi non sono quasi mai isolati in forma pura. Spesso, anzi, l'enzima rappresenta in peso solo una piccola parte del totale. Inoltre talvolta, un certo preparato contiene più enzimi con caratteristiche simili (isoenzimi), che possono presentare differenze di selettività.
Gli enzimi vengono venduti come solidi cristallini, polveri derivanti da liofilizzazione o dispersioni in tamponi acquosi.

Visto che gli enzimi non sono puri e spesso non se ne conosce nemmeno il peso molecolare, come si fa a dosarli?

Gli enzimi vengono misurati con le UNITA'

Un'unità è la quantità di enzima che permette la trasformazione di 1 micromole di substrato in 1 minuto.

- **Per poter misurare le unità bisogna definire il substrato (in genere quello più tipico in natura) e le condizioni di reazione (inclusa la concentrazione del substrato quando la reazione è di ordine 1).**
- **La velocità di reazione deve essere misurata nelle fasi iniziali, in modo che la concentrazione del substrato sia costante**

Su ogni confezione di enzima ci sono scritte le U/g o U/mg e le condizioni per la determinazione dell'attività

L'attività di un enzima può variare da preparazione a preparazione ed anche nel tempo

Ciò è dovuto alla *denaturazione* dell'enzima.
Le cause della denaturazione possono essere:

- **<u>Eccessiva anidrificazione</u>:un enzima liofilizzato contiene ancora il 5-10% in peso di acqua. Quest'acqua è evidentemente fortemente legata all'enzima ed è detta "acqua strutturale". Se si anidrifica ulteriormente (ad esempio con P_2O_5), la rimozione dell'acqua strutturale porta ad una variazione della struttura secondaria e terziaria con conseguente perdita di attività.**
- **<u>Riscaldamento</u>. quasi tutti gli enzimi si denaturano reversibilmente a temperature sopra i 40-50°C. Salendo ulteriormente la denaturazione diviene irreversibile (si hanno idrolisi delle unità di glutammina e asparagina a dare ac. glutammico e aspartico). Esistono però enzimi (derivanti da organismi termofili) che sopportano anche temperature fino a 100°C!**
- **<u>Interscambio di ponti disolfuri</u>**
- **<u>Reazioni di ossidazione</u> (specialmente di residui cisteinici)**
- **<u>Reazioni con agenti chimici</u>.**
- **<u>Complessazione con solventi organici</u>**
- **<u>Perdita di cofattori</u> (ad esempio metalli legati all'enzima)**

Alcuni enzimi sono meno stabili di altri e vanno quindi conservati in frigorifero o addirittura in freezer. Molti enzimi sono instabili in soluzione.
Gli enzimi possono essere resi più stabili per immobilizzazione su supporti solidi o per microincapsulamento

Quando è vantaggioso usare un enzima al posto delle procedure tradizionali chimiche

- **Quando il prodotto che si vuole sintetizzare è per uso umano**
- **Per evitare reattivi/solventi costosi o inquinanti**
- **Quando è richiesta una selettività non raggiungibile con metodiche tradizionali**
  - # ***Chemioselettività***
  - # ***Regioselettività***
  - # ***Selettività di substrato***
  - # ***Diastereoselettività***
  - # ***Enantioselettività***

USO DI IDROLASI NELLA SINTESI

Gli enzimi che idrolizzano legami esterei o ammidici sono senza dubbio i più impiegati nella sintesi organica.

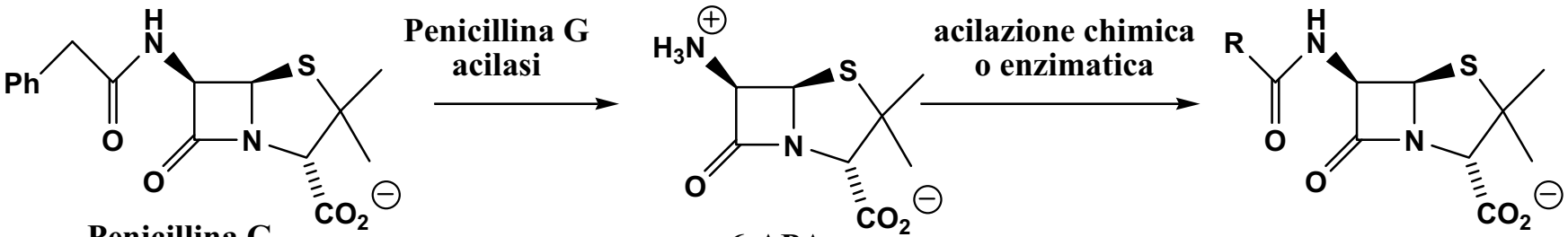
Vantaggi

- Numerosi enzimi di questa classe sono accessibili a basso costo
- Non richiedono cofattori (solo acqua!)
- Tollerano bene solventi organici
- Sono spesso impiegabili sia per reazioni di idrolisi che per le reazioni inverse di condensazione
- Molti di essi hanno una attività a largo spettro

Svantaggi

- Le reazioni che danno sono in genere realizzabili facilmente anche per via chimica tradizionale
- Apparentemente le reazioni non comportano la generazione di nuovi centri stereogenici

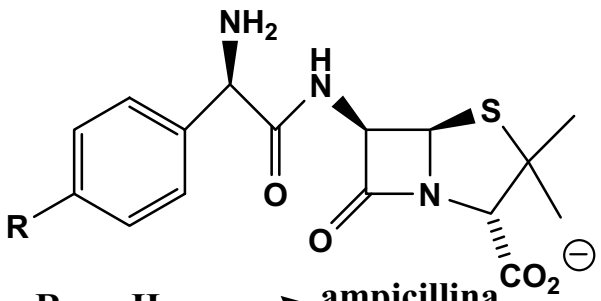
Il motivo più importante che giustifica il loro utilizzo è la selettività!



Penicillina G
(da fermentazione)

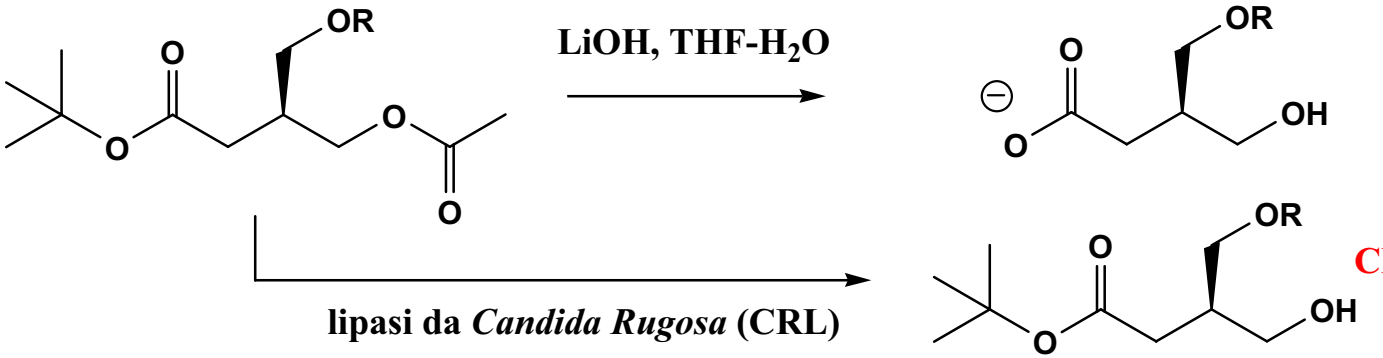
6-APA
(6-amminopenicillanic acid)

Reazione CHEMIOSELETTIVA

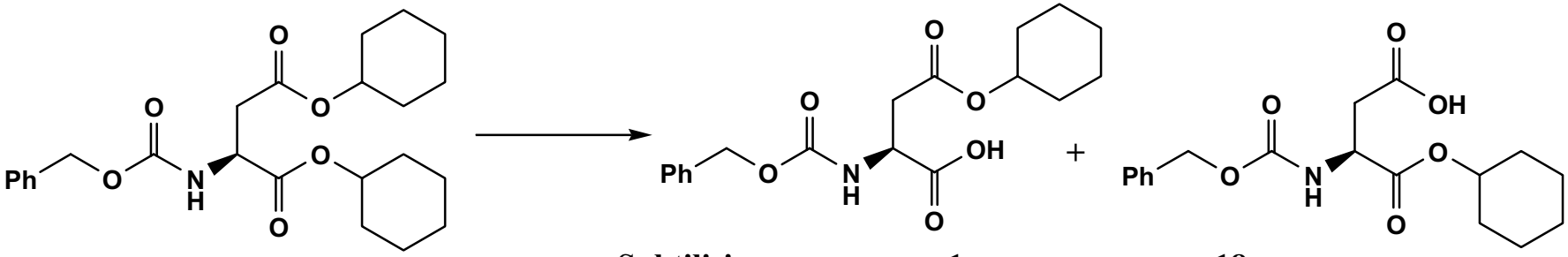


R = H → ampicillina
R = OH → amossicillina

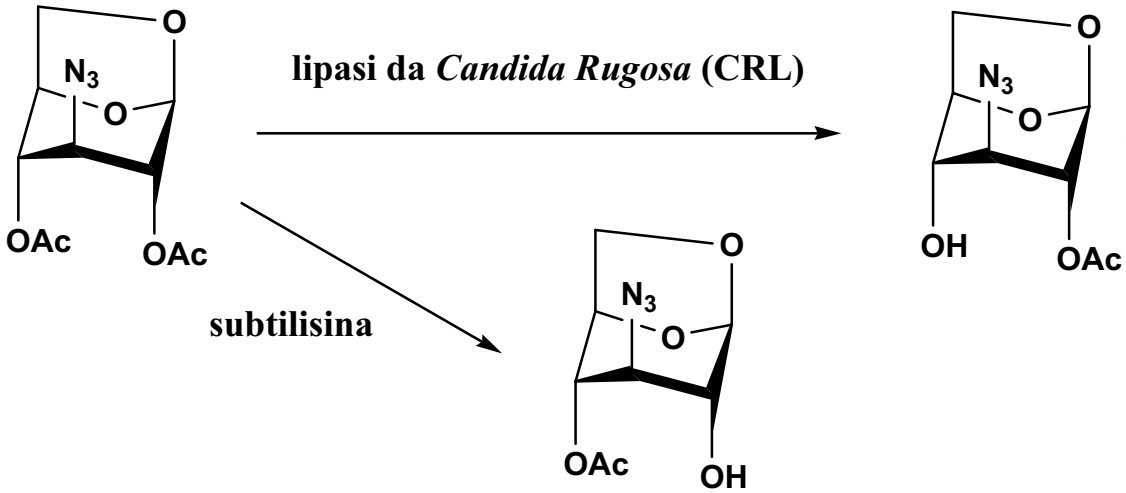
Più di 5000 t/anno di penicillina G sono idrolizzate in questo modo. La corrispondente reazione chimica è difficile da realizzare in quanto il β-lattame è più reattivo all'idrolisi della fenilacetammide



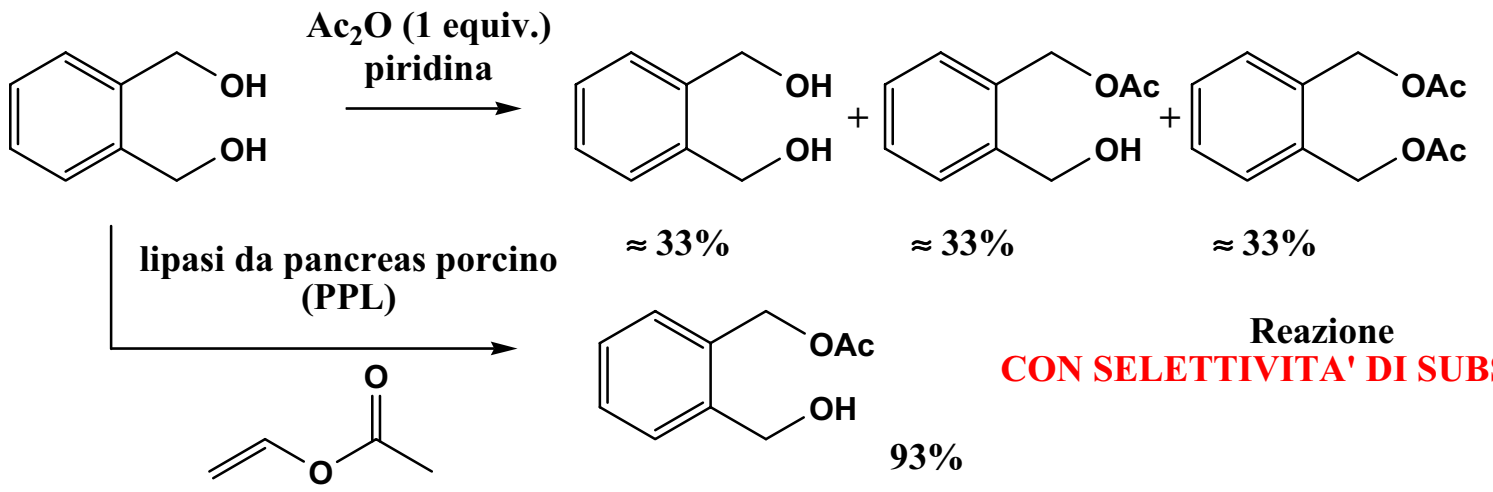
Reazione
CHEMIOSELETTIVA



Subtilisina	1	:	18
α-Chimotripsina	10	:	1



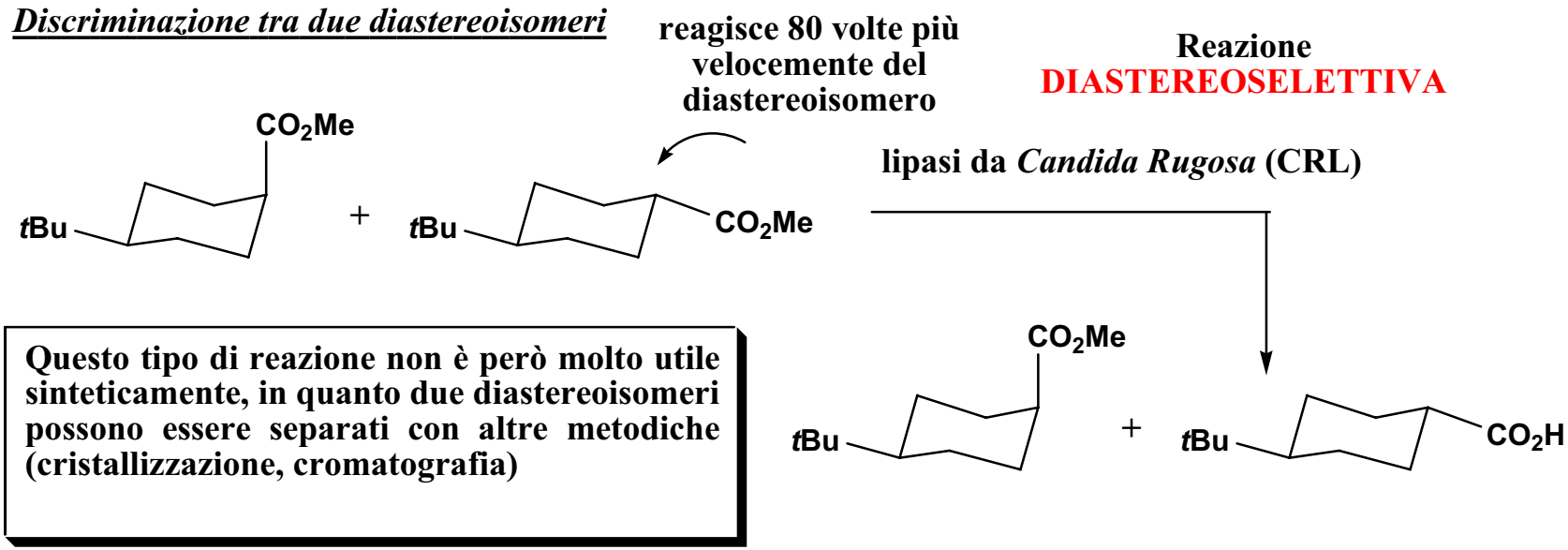
Reazioni
REGIOSELETTIVE



Reazione
CON SELETTIVITA' DI SUBSTRATO

Per quanto riguarda le reazioni <u>stereoselettive</u> in prima analisi sembrerebbe che una reazione di idrolisi non possa dar luogo a reazioni stereoselettive, in quanto non viene generato un nuovo centro asimmetrico. Tuttavia può realizzarsi una sorta di stereoselettività di substrato. Cioé l'enzima può far reagire selettivamente un determinato stereoisomero, se si parte da una miscela.

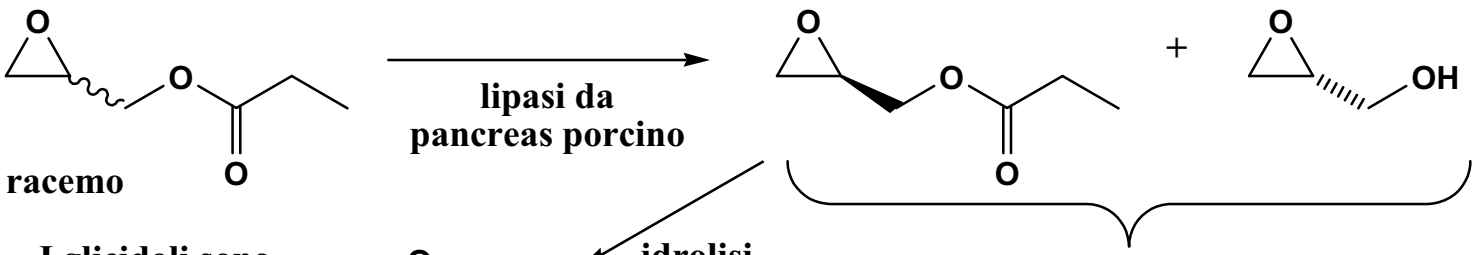
<u>Discriminazione tra due diastereoisomeri</u>



Reazione
DIASTEREOSELETTIVA

Questo tipo di reazione non è però molto utile sinteticamente, in quanto due diastereoisomeri possono essere separati con altre metodiche (cristallizzazione, cromatografia)

Discriminazione tra due enantiomeri



I glicidoli sono importanti intermedi per la sintesi di diverse sostanze chirali di importanza farmaceutica. Questa reazione viene effettuata su scala industriale.

(*S*) glicidolo

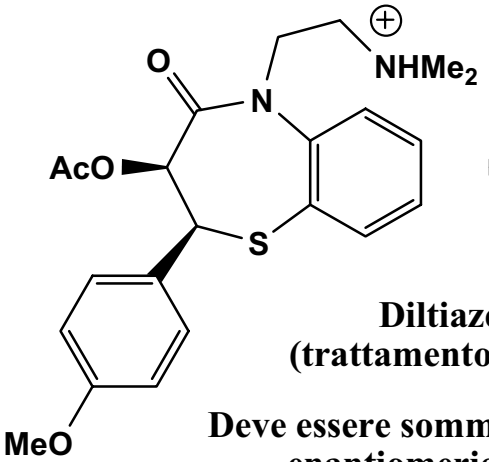
idrolisi chimica o enzimatica

facilmente separabili per distillazione

Reazione **ENANTIOSELETTIVA**

> Questo tipo di reazione (risoluzione cinetica) è molto utile sinteticamente. Rappresenta oggi, quando applicabile, probabilmente il metodo più pratico per la risoluzione di enantiomeri

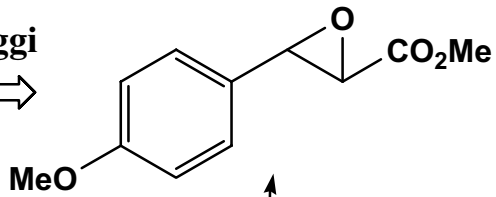
Altro esempio di applicazione industriale



Diltiazem
(trattamento angina)

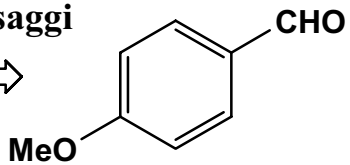
Deve essere somministrato in forma enantiomericamente pura

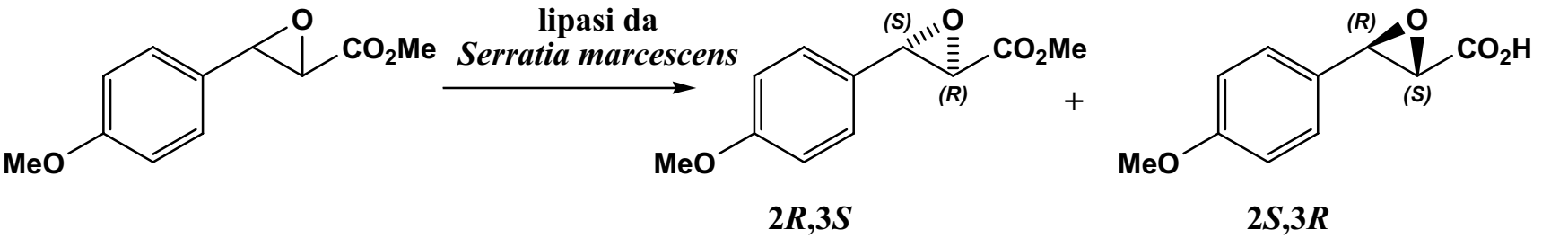
3 passaggi



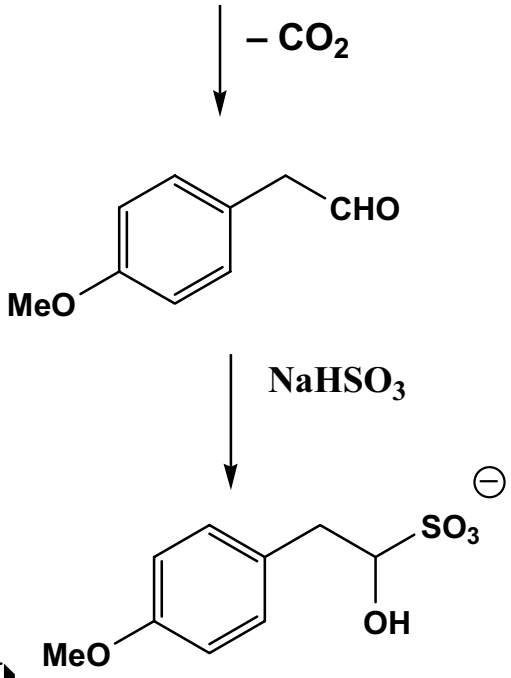
bisogna risolvere questo epossido nei due enantiomeri

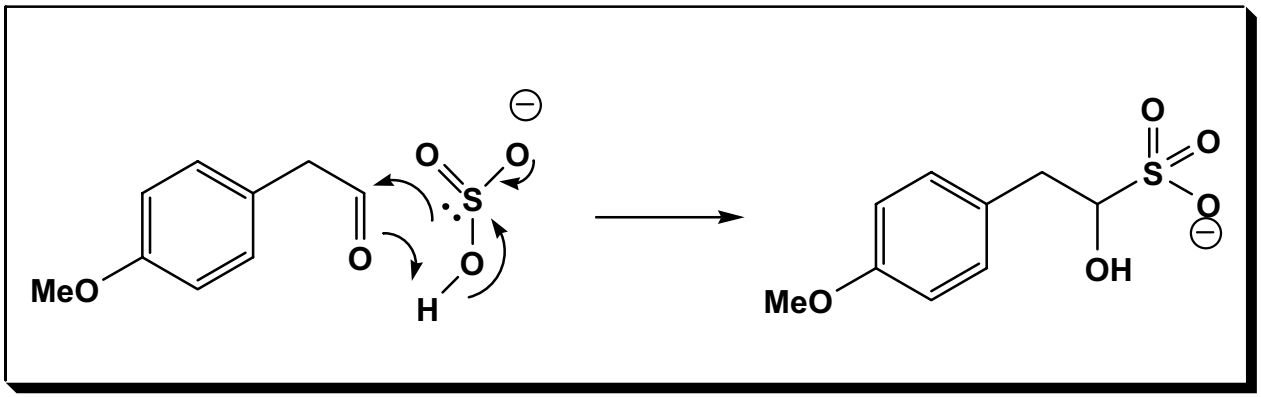
2 passaggi





La reazione viene condotta in un reattore a membrana.
Ci sono due fasi (toluene e H_2O) separate dalla membrana.
L'enzima è supportato sulla membrana.
La fase acquosa contiene $NaHSO_3$
L'aldeide, che si forma per decarbossilazione spontanea dell'epossiacido, passa in fase acquosa, dove dà l'addotto bisolfitico (addotto di Bertagnini), solubile in acqua.
L'epossiestere enantiomericamente puro ha un p.f. più alto del racemo e cristallizza da toluene in forma 100% pura.
La resa è del 43%!!





LIPASI ED ESTERASI

Le esterasi (E.C.3.1.1.x) sono enzimi che idrolizzano gli esteri carbossilici. Le lipasi (E.C.3.1.1.3) sono un caso particolare di esterasi, preposte all'idrolisi dei trigliceridi. Dal punto di vista del meccanismo di azione sono molto simili. Di norma le lipasi prediligono substrati insolubili in acqua, mentre le esterasi idrolizzano anche esteri solubili.
In entrambi i casi tratta di *esterasi seriniche*. La modalità di azione è molto simile a quella della Chimotripsina. Curiosamente il sito attivo è quasi l'immagine speculare di quello della Chimotripsina.
Un fatto interessante nelle lipasi ed in molte esterasi è la presenza di una sorta di "tappo". La struttura ai raggi X delle lipasi mostra infatti un segmento ad α-elica che blocca il sito attivo (tappo). Quando però la lipasi viene in contatto con un'interfaccia idrofobica (una gocciolina di lipide o di solvente immiscibile in acqua), il tappo si apre, consentendo l'accesso al sito attivo.
Le lipasi ed esterasi possono essere ricavate:
a) da scarti di macelleria o da organi di basso costo di animali di allevamento (reni, fegato, pancreas etc.)
b) da colture di microorganismi (batteri e funghi) sia di tipo nativo che geneticamente modificati

In genere le lipasi sono più esigenti nei confronti dei componenti carbossilici degli esteri: lavorano bene con esteri di acidi lineari, anche a lunga catena. Le esterasi sono più esigenti nei confronti dei componenti alcolici: prediligono esteri di alcoli piccoli quali metanolo, etanolo.

L'idrolisi di esteri può essere realizzata anche con alcune proteasi. Esistono 4 tipi di proteasi: proteasi seriniche, proteasi cisteiniche, metallo-proteasi, proteasi aspartiche. Le più utili in sintesi appartengono alle prime tre famiglie.

Questi enzimi sono di solito venduti ed usati come grezzi in cui l'enzima costituisce solo una piccola parte. Ciò per 2 motivi: a) le tecniche per la purificazione cromatografica sono costose; b) le "impurezze" spesso stabilizzano l'enzima.

Enzimi più comuni impiegati nella idrolisi di esteri

Sigla	Fonte	Nome Commerc.	PM (KDa)	% in peso	purezza	note
			Lipasi			
PPL	pancreas porcino	PPL	50	8-20	*	contiene altre idrolasi
PCL	*Pseudomonas cepacia* (batterio)	Amano P/PS, Altus CHIROCLEC-PL, Boheringer Chirazyme L-1, Fluka SAM-II	33	1-25	***	Amano PS è supportata su celite
CRL	*Candida Rugosa* (*Candida cylindracea*) (fungo)	Amano AY, Boheringer Chirazyme L-3, Altus CHIROCLEC-CR, Meito Sangyo MY	63	2-11	**	Contiene isoenzimi
RML	*Rhizomucor miehei* (fungo) (ricomb. in *Aspergillus*)	Amano MAP, Boehringer Chirazyme L-9, Novo Lypozyme	33	25-27	****	
CAL	*Candida Antarctica* (fungo) (ricomb. in *Aspergillus*)	Novo Novozyme, Boehringer Chirazyme L-2	33	16-51	****	
			Esterasi			
PLE	fegato porcino	PLE	58-61	–	**	Venduta come sospensione acquosa. Miscela di 3 isoenzimi
AChE	murena	Acetilcolina esterasi	68	-	***	Nel sito attivo ha Glu invece di Asp
			Ammidasi			
α-CT	pancreas bovino	α-Chimotripsina	25	>80	*****	proteasi serinica
-	*Bacillus thermoproteolyticus*	Termolisina				metallo proteasi
-	*Bacillus Sp.*	subtilisine				proteasi serinica
PGA	*Escherichia Coli*	penicillina G acilasi				
-	papaya	Papaina				proteasi cisteinica

Alcune lipasi o proteasi trovano impieghi industriali diversi dalla sintesi organica:

Nell'industria dei detergenti si utilizzano vari tipi di ***subtilisine***, che sono state ottimizzate ed ingegnerizzate in modo da resistere ad alte temperature (50-60°C), alti pH (fino ad 11), presenza di ipoclorito etc. Si usano anche lipasi microbiche, quali la ***lipasi da Humicola lanuginosa***.

Nell'industria casearia si utilizzano vari tipi di ***lipasi***, che permettono di determinare il tipo di sapore. Il sapore del formaggio è spesso provocato dall'idrolisi dei trigliceridi, che forma acidi a catena media (C-4/C-8) che poi subiscono ulteriori trasformazioni a dare gli aromi. Talvolta il formaggio è trattato con microorganismi che producono lipasi particolari. E' il caso della ***lipasi da Penicillium Roqueforti***, responsabile del sapore del Roquefort, del Blue Cheese e del Gorgonzola.

Nell'industria alimentare si usa la ***tripsina*** per predigerire cibi per neonati o la ***papaina*** per ammorbidire la carne.

Nell'industria degli oli alimentari si usano varie ***lipasi*** per idrolizzare i trigliceridi a monogliceridi, oppure per acilare la glicerina a monogliceridi. Questi sono i principali emulsionanti negli alimenti e nei cosmetici. Inoltre reazioni di transesterificazione sono usate per tramutare trigliceridi a basso costo (ad es. olio di palma) in trigliceridi più pregiati (burro di cacao)

Nell'industria dei polimeri si usano varie ***lipasi*** per catalizzare la polimerizzazione a dare poliesteri da: a) diacidi + dioli; d) diesteri + dioli; b) idrossiacidi; c) idrossiesteri; e) lattoni

chiaramente gli enzimi impiegati in questi processi, hanno costi molto bassi e sono perciò particolarmente vantaggiosi nella sintesi organica (ad es. le subtilisine e vari tipi di lipasi)

Lipasi, esterasi e proteasi sono impiegate nell'idrolisi di esteri. Il mezzo di reazione è comunemente una soluzione acquosa tamponata al pH opportuno.

Spesso però viene aggiunto un cosolvente organico (sia solubile in acqua che insolubile), per le seguenti ragioni:

- **Se il substrato è un solido o un oilio denso insolubile in acqua, la reazione potrebbe non avvenire. Le proteasi e le esterasi lavorano in fase acquosa. Le lipasi lavorano all'interfaccia con una fase lipofila sufficientemente fluida**
- **L'aggiunta di un cosolvente può migliorare la selettività**

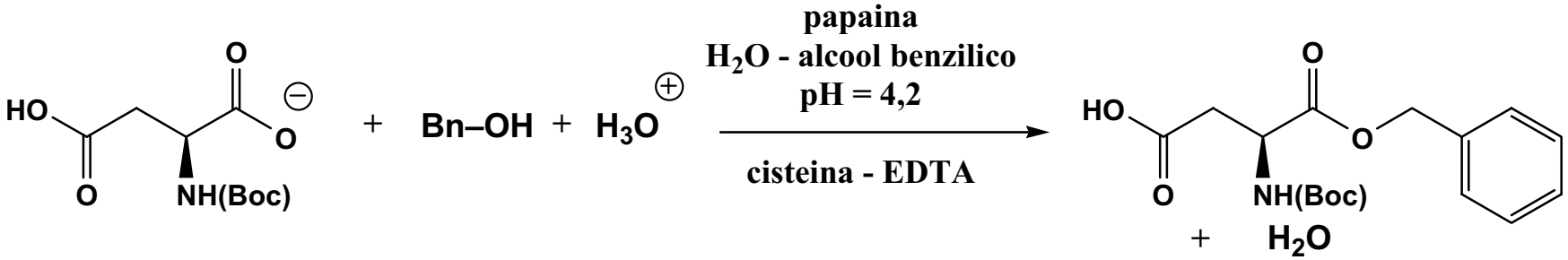
Con esterasi e proteasi si impiegano in genere solventi idrosolubili (DMSO, DMF, acetone, *t*-BuOH etc.) in % non maggiori al 10-20%. Con lipasi si possono usare solventi di tutti i tipi, anche in % maggiori.

Le lipasi possono essere usate non solo in reazioni di idrolisi, ma anche in reazioni di esterificazione.

In linea di principio un catalizzatore può essere impiegato anche per accelerare la reazione inversa.

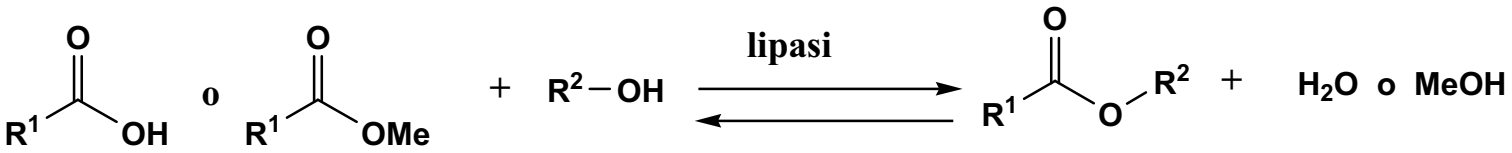
E' però necessario che la reazione sia favorita termodinamicamente!!

In <u>casi molto particolari</u> si riesce a spostare l'equilibrio anche in ambiente acquoso:



ma, in generale, per poter realizzare esterificazioni, è indispensabile lavorare in ambiente <u>anidro</u>. In queste condizioni, le esterasi e le proteasi non funzionano. Funzionano invece molto bene le lipasi:

Si può allora condurre l'acilazione di un alcool con un acido o un estere in ambiente anidro:

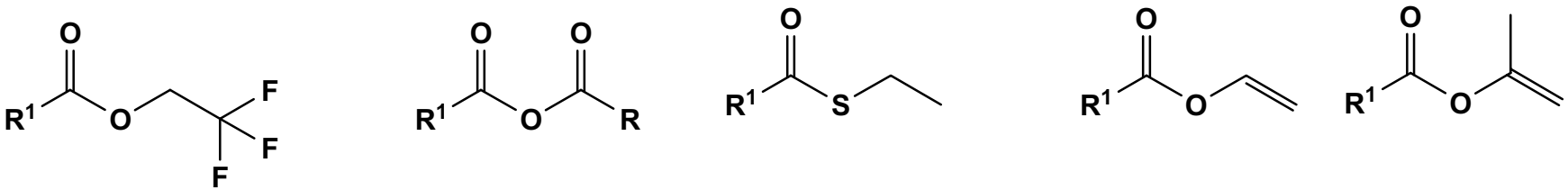


Questo tipo di reazione presenta però alcuni svantaggi:

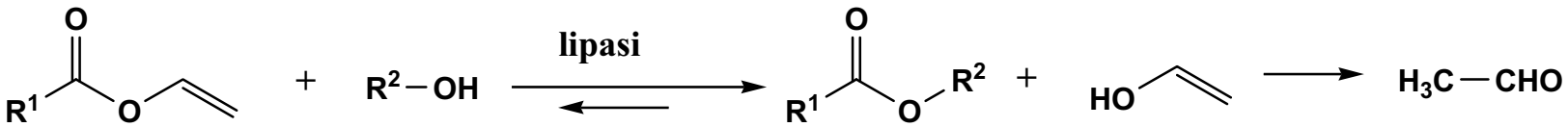
- **Si tratta in genere di reazioni lente.**
- **E' necessario usare un largo eccesso di acido**
- **E' difficile portare la reazione a completezza.**
- **La reazione è reversibile: si può instaurare un controllo termodinamico (cosa assolutamente da evitare per reazioni enantioselettive!)**

Quindi questo metodo è impiegato solo quando la enantioselettività e la conversione completa non sono importanti ed il basso costo di acidi ed esteri risulta decisivo (ad esempio nella transesterificazione dei trigliceridi)

Si preferisce quindi far uso di agenti acilanti che diano reazioni più veloci e, soprattutto, irreversibili. Ad esempio:



Tra questi gli enol esteri sono senza dubbio i più utilizzati. Dopo l'acilazione, l'enolo che si forma si trasforma nel corrispondente composto carbonilico, spostando così l'equilibrio.



Allo stesso modo gli isopropenil esteri forniscono acetone

WATER ACTIVITY

Quanto anidre devono essere le condizioni di reazione nelle acilazioni enzimatiche?

Non troppo!

E' stato visto che un'eccessiva anidrificazione del solvente porta ad una diminuzione della velocità, in quanto il solvente tende a "strappare" dall'enzima l'acqua ad esso necessaria per mantenere la corretta struttura secondaria.

Solventi polari (più idroscopici) hanno maggior tendenza a "strappare" l'acqua all'enzima. Quindi la quantità di acqua ottimale è maggiore in solventi polari che in solventi polari.

Generalmente i solventi polari devono contenere l'1-3% di acqua; quelli apolari lo 0,05-1%.

Un parametro termodinamico appropriato per stabilire le condizioni ottimale è la

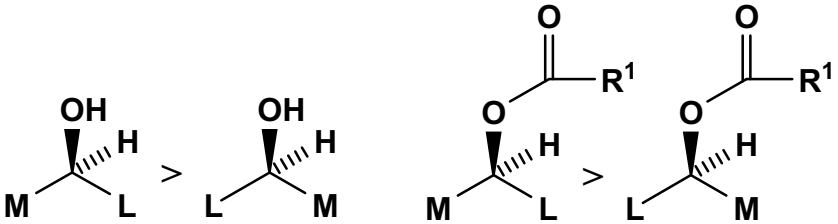
WATER ACTIVITY (a_w). Se si mettono diversi solventi (o soluzioni acquose saline) in equilibrio (in un essicatore) dopo un po' avranno tutte la stessa a_w (ma non la stessa quantità di acqua % sciolta!). Chiaramente, a parità di a_w, i solventi igroscopici conterranno più acqua e quelli idrofobi molto meno. Ogni lipasi presenta una a_w ideale per le reazioni di acilazione in solvente organico.

Un buon metodo (in laboratorio) per avere un solvente con una certa a_w è quello di equilibrarlo con una soluzione acquosa salina satura avente quella particolare a_w desiderata.

Per la risoluzione di alcoli secondari l'acilazione è spesso più utilizzata dell'idrolisi degli esteri. Infatti il work-up della reazione è più semplice (basta una filtrazione).

Risoluzione cinetica di alcoli secondari

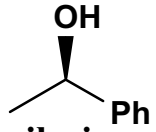
Esiste una regola empirica <u>generale</u> per prevedere quale dei due enantiomeri di un alcool secondario (o di un suo estere) reagirà più velocemente con una generica lipasi.



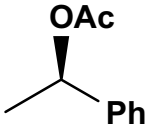
Questa regola è basata solo sulle dimensioni steriche dei due gruppi M ed L. E' una regola approssimativa in quanto non tiene conto di fattori elettronici, spesso importanti. Gruppi insaturi tendono infatti ad andare in posizione L.

si noti comunque che l'enantiomero che reagisce più velocemente nella acilazione è lo stesso che reagisce più velocemente nella idrolisi.

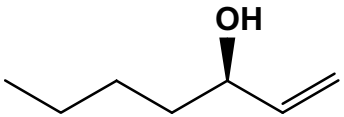
Le lipasi CAL-B, PPL, PCL e RML rispettano di più la regola. Le reazioni di CRL non sono invece prevedibili con essa. La subtilisina dà induzione opposta (ma spesso con bassa selettività). Le lipasi di gran lunga più usate sono PCL (più selettiva) e CAL-B (più reattiva). CRL sembra più adatta a substrati voluminosi (ha un sito attivo più grosso)
Ecco alcuni esempi (viene mostrato l'enantiomero più reattivo del substrato):



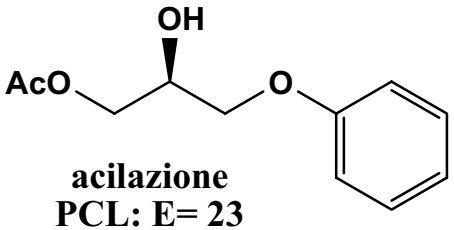
acilazione
PCL: E>100
CAL-B: E=35



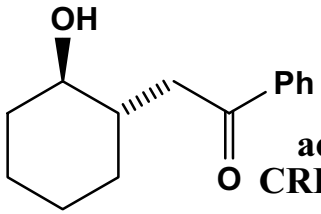
idrolisi
PCL: E>100



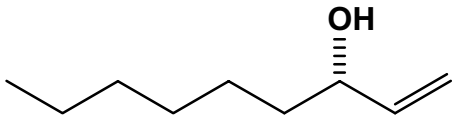
acilazione
PCL: E= 16



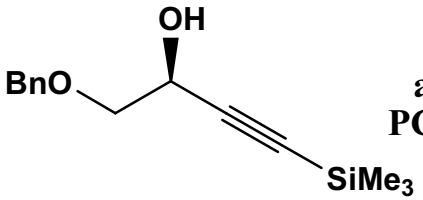
acilazione
PCL: E= 23



acilazione
CRL: E=36-76

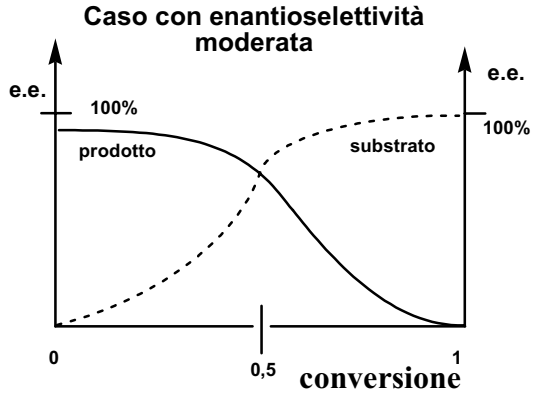


acilazione
CAL: E= >150

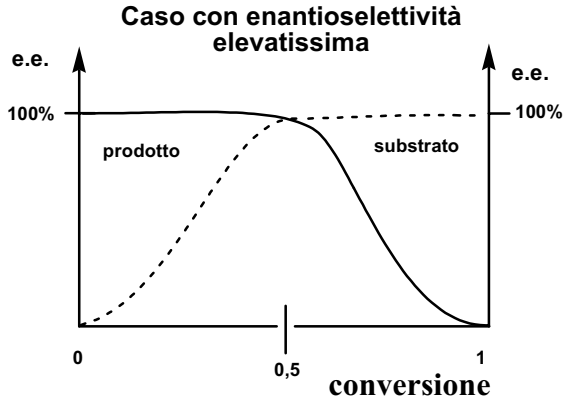


acilazione
PCL: E> 100

IMPORTANZA DELLA CONVERSIONE



sia che l'enzima sia poco o molto enantioselettivo gli e.e. dipendono fortemente dalla conversione della reazione



$$c = \text{conversione} = \frac{[P]}{[S]_0} = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0}$$

è cioè la frazione di substrato iniziale che si è trasformata nel prodotto

Per valutare l'efficienza di una reazione di risoluzione cinetica non basta quindi riportare l'e.e. del prodotto (o del substrato); bisogna anche riportare la conversione. Sarebbe però comodo poter ricavare un parametro caratteristico di una data reazione che sia indipendente dalla conversione, che dia un'idea dell'efficienza della reazione e che permetta di <u>prevedere teoricamente</u> gli e.e. di substrato e prodotto ad un determinato grado dei conversione. Questo parametro esiste ed è detto "fattore di enantioselettività" (E)

Supponiamo di avere una miscela racemica e di condurre una reazione enzimatica irreversibile. In genere in queste condizioni $[S] << K_M$, per cui le velocità di reazione dei due enantiomeri sono date da:

$$v_R = \frac{V_{max\,(R)}}{K_{M\,(R)}}\,[S_R] \qquad v_S = \frac{V_{max\,(S)}}{K_{M\,(S)}}\,[S_S]$$

Il fattore di selettività E è definito come il rapporto iniziale tra queste due velocità.
Quindi, essendo all'inizio $[S_R] = [S_S]$, sarà, <u>se l'enantiomero R è quello che reagisce più velocemente</u>:

$$E = \left(\frac{V_R}{V_S}\right)_{iniz} = \frac{V_{max\,(R)}}{K_{M\,(R)}} \Big/ \frac{V_{max\,(S)}}{K_{M\,(S)}}$$

Se definito in questo modo, E è perciò una costante per una data reazione ed un dato set di condizioni sperimentali (solvente, pH, temp., concentrazione, additivi etc.).

Ma come si determina E ?
Dall'equazione vista prima è evidente che E può essere determinato nelle primissime fasi della reazione, quando è

$$E = \left(\frac{V_R}{V_S}\right)$$

In questa ipotesi E sarà uguale al rapporto enantionerico dei due prodotti:

$$E = \frac{[P_R]}{[P_S]} \quad \text{dato che e.e.}_P = \frac{[P_R] - [P_S]}{[P_R] + [P_S]} \Rightarrow [P_R]\ (1 - ee_p) = [P_S]\ (1 + ee_p)$$

$$\Rightarrow \quad E = \frac{(1 + ee_p)}{(1 - ee_p)}$$

Ad esempio, se ee_p è = a 0,80 (80%), vuol dire che avrò il 90% di P_R ed il 10% di P_S. E sarà uguale a 9.

In realtà non è pratico determinare E in questo modo. Si preferisce quindi utilizzare equazioni più generali. che permettano di ricavare E a qualunque valore di conversione. Oltretutto queste equazioni ci consentono anche di prevedere gli eccessi enantiomerici a qualunque conversione conoscendo E e la conversione stessa.

In qualunque momento è

$$v_R = -\frac{d\,[S_R]}{d\,t} = \frac{V_{max\,(R)}}{K_{M\,(R)}}\,[S_R] \Rightarrow -\frac{d\,[S_R]}{[S_R]} = \frac{V_{max\,(R)}}{K_{M\,(R)}}\,d\,t$$

integrando da t=0 a t=t, si ha:

$$\frac{V_{max\,(R)}}{K_{M\,(R)}}\,t = -\ln[S_R] + cost \xrightarrow[\text{lo si vede ponendo t=0}]{cost = \ln [S_R]_0} \frac{V_{max\,(R)}}{K_{M\,(R)}} = -\frac{1}{t}\ln\frac{[S_R]}{[S_R]_0} \Rightarrow \frac{V_{max\,(S)}}{K_{M\,(S)}} = -\frac{1}{t}\ln\frac{[S_S]}{[S_S]_0}$$

facendo il rapporto:

$$E = \ln\frac{[S_R]}{[S_R]_0} \Big/ \ln\frac{[S_S]}{[S_S]_0}$$

Se si parte dalla miscela racemica,
$[S_R]_0 = [S_S]_0 = 1/2\ [S]_0$

$$\Longrightarrow E = \ln\frac{2[S_R]}{[S]_0} \Big/ \ln\frac{2[S_S]}{[S]_0}$$

$$E = \ln \frac{2[S_R]}{[S]_0} \Big/ \ln \frac{2[S_S]}{[S]_0}$$

Però, quando realizziamo in pratica una reazione, noi non determiniamo mai la quantità di $[S_R]$ e di $[S_S]$!! Le grandezze che possiamo ricavare con metodi analitici sono:

$$c = \frac{[P_R] + [P_S]}{[S]_0}$$

$$ee_S = \frac{[S_S] - [S_R]}{[S_S] + [S_R]}$$

$$ee_p = \frac{[P_R] - [P_S]}{[P_R] + [P_S]}$$

Sappiamo inoltre che:

$$[S_R] + [P_R] = [S_S] + [P_S] = 1/2\,[S]_0 \qquad \text{e che} \qquad [S_R] + [P_R] + [S_S] + [P_S] = [S]_0$$

Da questo sistema di equazioni si può ricavare E conoscendo solo due delle tre grandezze determinabili sperimentalmente:

conoscendo c ed ee_s ⇒

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_s)]}{\ln [(1-c)(1+ee_s)]}$$

conoscendo c ed ee_p ⇒

$$E = \frac{\ln [1 - c\,(1 + ee_p)]}{\ln [1 - c\,(1 - ee_p)]}$$

conoscendo ee_p ed ee_p ⇒

$$E = \ln \frac{(1-ee_s)\,(ee_p)}{ee_s + ee_p} \Big/ \ln \frac{(1+ee_s)\,(ee_p)}{ee_s + ee_p}$$

Come si ricava la prima equazione:

$$ee_S = \frac{[S_S] - [S_R]}{[S_S] + [S_R]} \Rightarrow ([S_R] + [S_S])\, ee_S = [S_S] - [S_R] \Rightarrow ([S_R] + [S_S])\, ee_S = 2\,[S_S] - ([S_S] + [S_R])$$

aggiungiamo e togliamo $[S_S]$ a destra

$$\Downarrow$$

$$([S_R] + [S_S])\,(1+ee_S) = 2\,[S_S]$$

$$\Downarrow$$

$$c = \frac{[S]_0 - ([S_R] + [S_S])}{[S]_0} \Rightarrow [S_R] + [S_S] = (1-c)\,[S]_0$$

$$[S_S] = \frac{(1-c)\,(1+ee_s)\,[S]_0}{2}$$

aggiungiamo e togliamo $[S_R]$ a destra

$$([S_R] + [S_S])\, ee_S = [S_S] - [S_R] \Rightarrow ([S_R] + [S_S])\, ee_S = -2\,[S_R] + ([S_S] + [S_R])$$

$$\Downarrow$$

$$([S_R] + [S_S])(ee_S - 1) = -2\,[S_R]$$

$$\Downarrow$$

$$[S_R] + [S_S] = (1-c)\,[S]_0$$

$$\Downarrow$$

$$([S_R] + [S_S])(1-ee_S) = 2\,[S_R]$$

$$\Downarrow$$

$$[S_R] = \frac{(1-c)\,(1-ee_s)\,[S]_0}{2}$$

$$[S_R] = \frac{(1-c)\,(1-ee_s)\,[S]_0}{2}$$

e

$$[S_S] = \frac{(1-c)\,(1+ee_s)\,[S]_0}{2}$$

$$\Downarrow$$

$$E = \ln \frac{2[S_R]}{[S]_0} \Big/ \ln \frac{2[S_S]}{[S]_0}$$

$$E = \frac{\ln\,[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln\,[(1-c)(1+ee_s)]}$$

Come si ricava la seconda equazione:

$$[S]_0 = 2([S_R] + [P_R]) = 2([S_S] + [P_S])$$

pertanto

$$E = \ln \frac{2[S_R]}{[S]_0} \Big/ \ln \frac{2[S_S]}{[S]_0} \Longrightarrow \ln\left(1 - \frac{2\,[P_R]}{[S]_0}\right) \Big/ \ln\left(1 - \frac{2\,[P_S]}{[S]_0}\right)$$

ma $\boxed{c = \dfrac{[P_R] + [P_S]}{[S]_0}}$ ***e*** $\boxed{ee_p = \dfrac{[P_R] - [P_S]}{[P_R] + [P_S]}}$ ***se l'enantiomero R reagisce più velocemente, nel prodotto prevarrà l'enantiomero R***

$$\Downarrow \qquad\qquad \Downarrow$$

$$[P_R] + [P_S] = c\,[S]_0 \qquad [P_R] - [P_S] = ([P_R] + [P_S])\,ee_p$$

da cui si ricava (come nelle precedenti diapositive) che

$$[P_R] = \frac{(c)\,(1+ee_p)\,[S]_0}{2} \qquad [P_S] = \frac{(c)\,(1-ee_p)\,[S]_0}{2}$$

$$\Downarrow$$

$$\boxed{E = \frac{\ln\,[1 - c\,(1 + ee_p)]}{\ln\,[1 - c\,(1 - ee_p)]}}$$

Come si può ricavare la terza equazione:

sapendo che:

$$[S_R] = \frac{(1-c)\,(1-ee_s)\,[S]_0}{2}$$

e

$$[S_S] = \frac{(1-c)\,(1+ee_s)\,[S]_0}{2}$$

$$[S_S] + [P_S] = [S_R] + [P_R]$$

$$[P_R] = \frac{(c)\,(1+ee_p)\,[S]_0}{2}$$

$$[P_S] = \frac{(c)\,(1-ee_s)\,[S]_0}{2}$$

$$\frac{(1-c)\,(1+ee_s)\,[S]_0}{2} + \frac{(c)\,(1-ee_p)\,[S]_0}{2} = \frac{(1-c)\,(1-ee_s)\,[S]_0}{2} + \frac{(c)\,(1+ee_p)\,[S]_0}{2}$$

$$(1-c)(ee_s) = c\,(ee_p)$$

$$ee_s - c\,(ee_s) = c\,(ee_p)$$

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

$$1 - c = 1 - \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

$$1 - c = \frac{ee_s + ee_p - ee_s}{ee_s + ee_p}$$

$$1 - c = \frac{ee_p}{ee_s + ee_p}$$

$$E = \frac{\ln\,[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln\,[(1-c)(1+ee_s)]}$$

$$E = \ln \frac{(1-ee_s)\,(ee_p)}{ee_s + ee_p} \Big/ \ln \frac{(1+ee_s)\,(ee_p)}{ee_s + ee_p}$$

Facciamo un esempio:

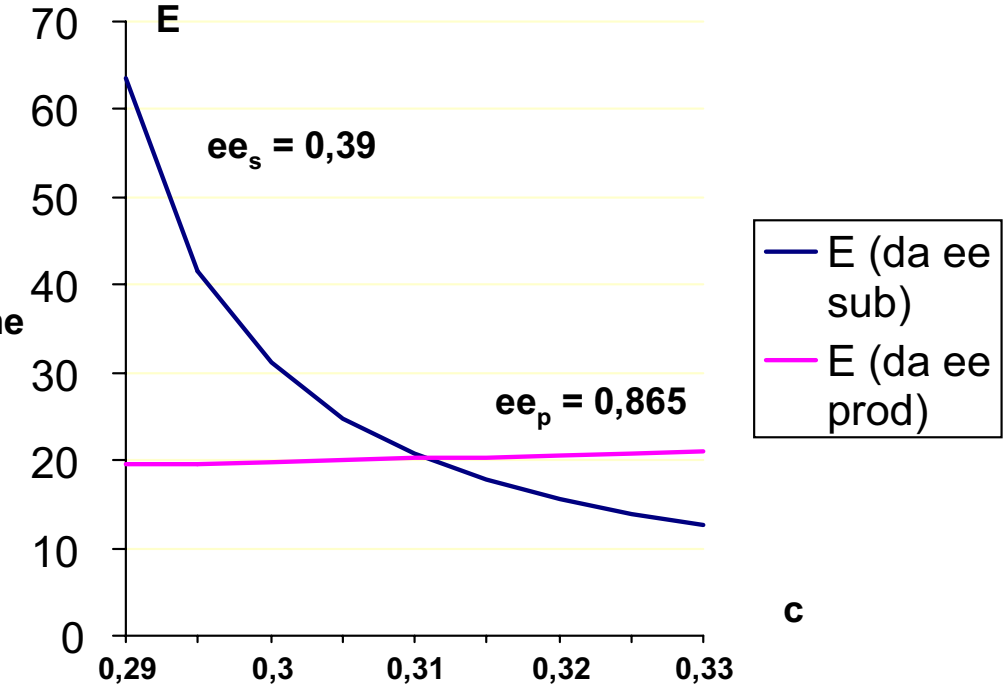
c = 31,1 ee_s = 0,39 ee_p = 0,865

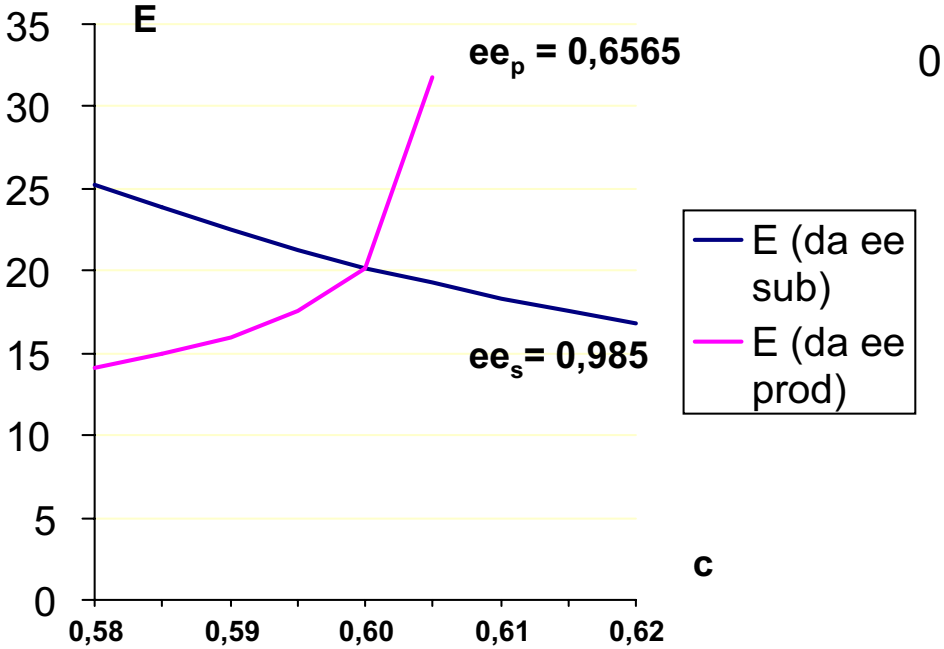
c = 0,60 ee_s = 0,985 ee_p = 0,6565

da tutte e 3 le equazioni → E = 20,22

ma, in pratica, quale equazione conviene usare ?

A conversioni basse <u>non</u> conviene usare l'equazione che prevede, come variabili, ee_s e c. Infatti piccoli errori nella determinazione di c si ripercuotono fortemente sul calcolo di E. Invece se si usano eep e c, gli errori nella determinazione di c incidono poco sul valore di E.



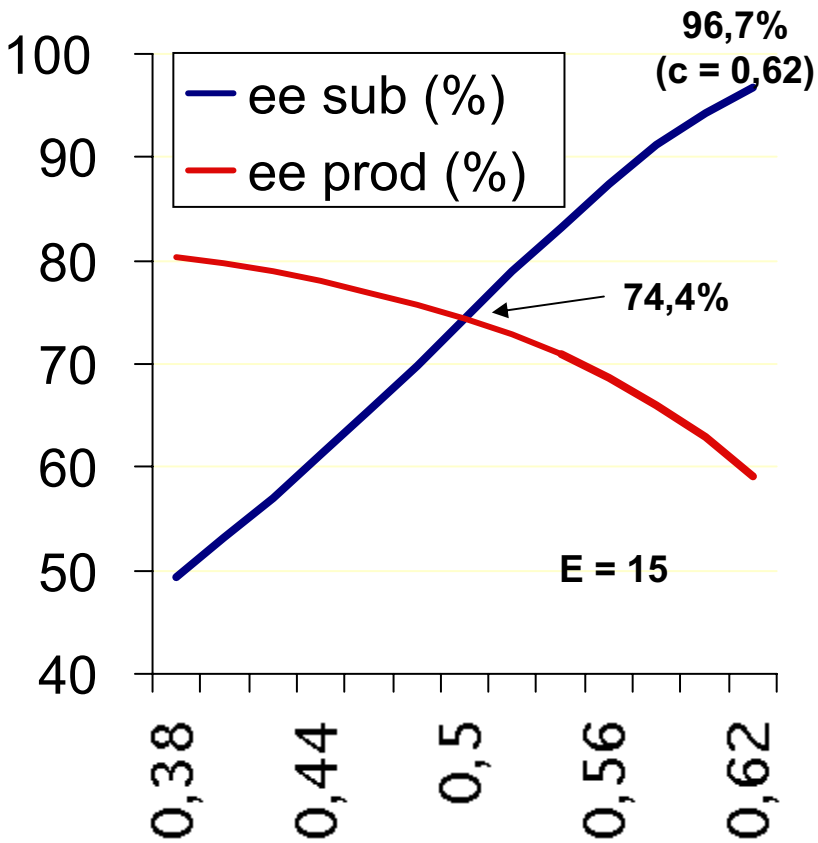


Se invece andiamo a conversioni > 50%, <u>non</u> conviene usare l'equazione basata su ee_p e c. Infatti l'errore sulla determinazione della conversione porta ad un grande errore su E e addirittura si può ottenere un logaritmo di un numero negativo. Per c = 0,61, (1 - c(1+eep)) diviene = (1-1,01)!

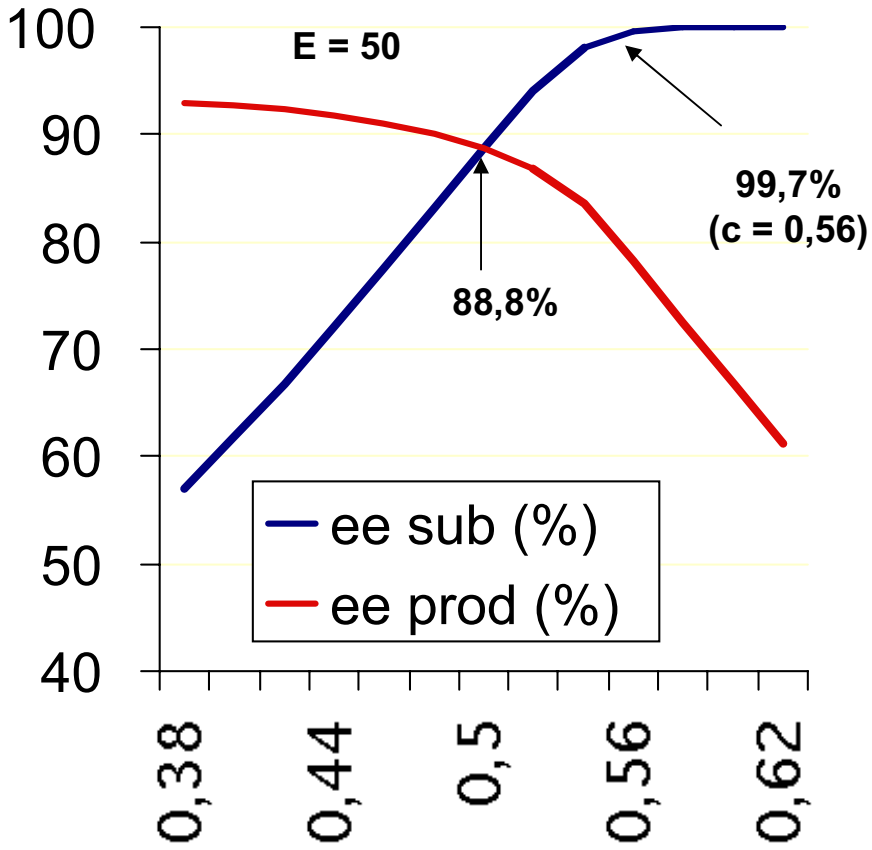
L'equazione basata su ee_p ed ee_s va bene sempre

Se mettiamo in grafico gli ee di substrato e prodotto in funzione della conversione, otteniamo due curve non simmetriche. Anche con valori di E moderati è possibile ottenere il substrato con eccellente ee, mentre per ottenere il prodotto con ee elevato (> 95%) è necessario avere E>50 e lavorare a conversioni piuttosto basse.

ee prodotto < 86%anche a basse c

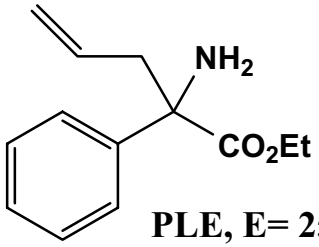


ee prodotto < 96%anche a basse c

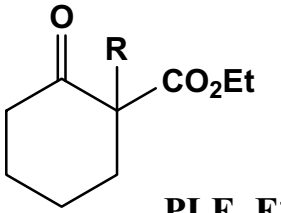


Gli enzimi idrolitici possono essere utilizzati anche per la risoluzione cinetica di esteri con un centro chirale in posizione α o β. In genere si impiegano esteri metilici (meglio) o etilici

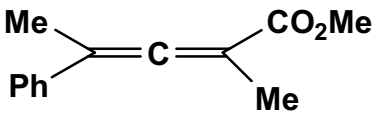
In questo caso gli enzimi più usati sono la esterasi da fegato di maiale (PLE) e la lipasi da *Candida Rugosa* (CRL). In casi particolari possono risultare utili anche alcune proteasi ed ammidasi, quali la Chimotripsina, le Subtilisine o la Penicillina G acilasi. Su scala industriale le subtilisine (poco costose) sono da preferirsi alla PLE (più costosa), che però ha una portata più generale



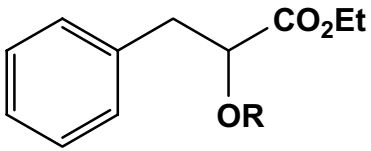
PLE, E= 25



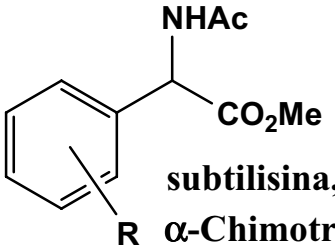
PLE, E> 100



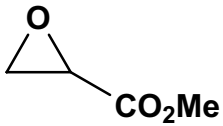
PLE, E= 35



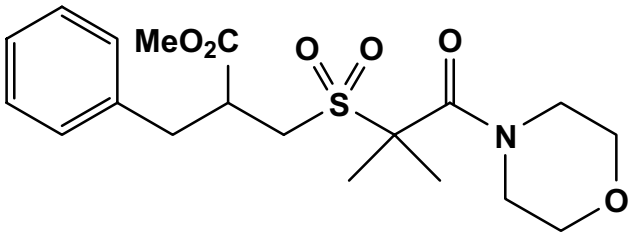
α-Chimotripsina, E>100



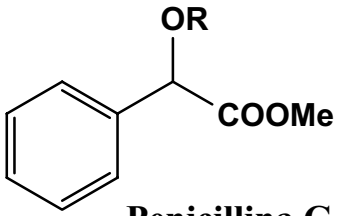
subtilisina, E>100
α-Chimotripsina, E>100



CRL, E=100

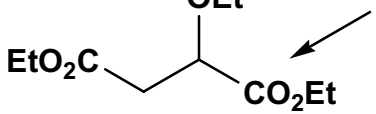


subtilisina, E elevato
Risolto industrialmente su scala di Kg
(intermedio per la sintesi di inibitori della Renina)



Penicillina G acilasi
E elevato

reazione regioselettiva

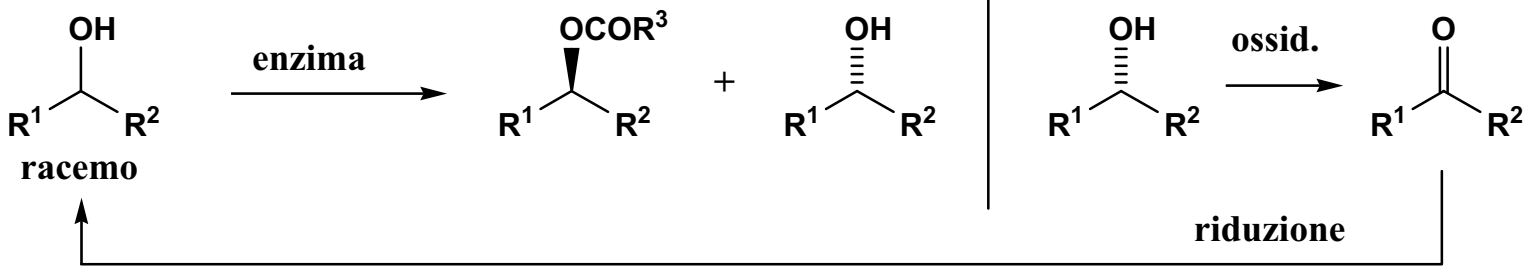


CRL, E=75

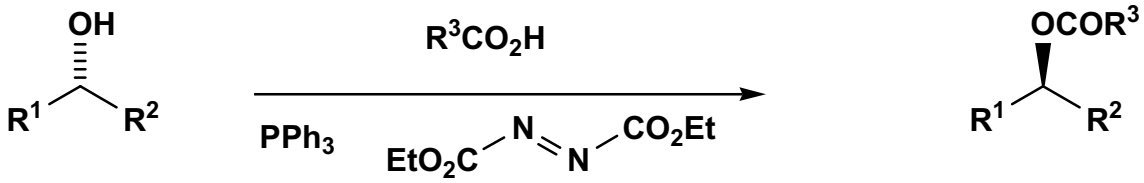
Un problema connesso con le reazioni di risoluzione è che la resa massima teorica in uno dei due enantiomeri è del 50%.

Quando entrambi gli enantiomeri hanno interesse commerciale, la cosa non è grave. Lo è però se interessa solo uno dei due enantiomeri. Come fare allora?

STRATEGIA 1: riciclo per racemizzazione



STRATEGIA 2: inversione stereospecifica della configurazione



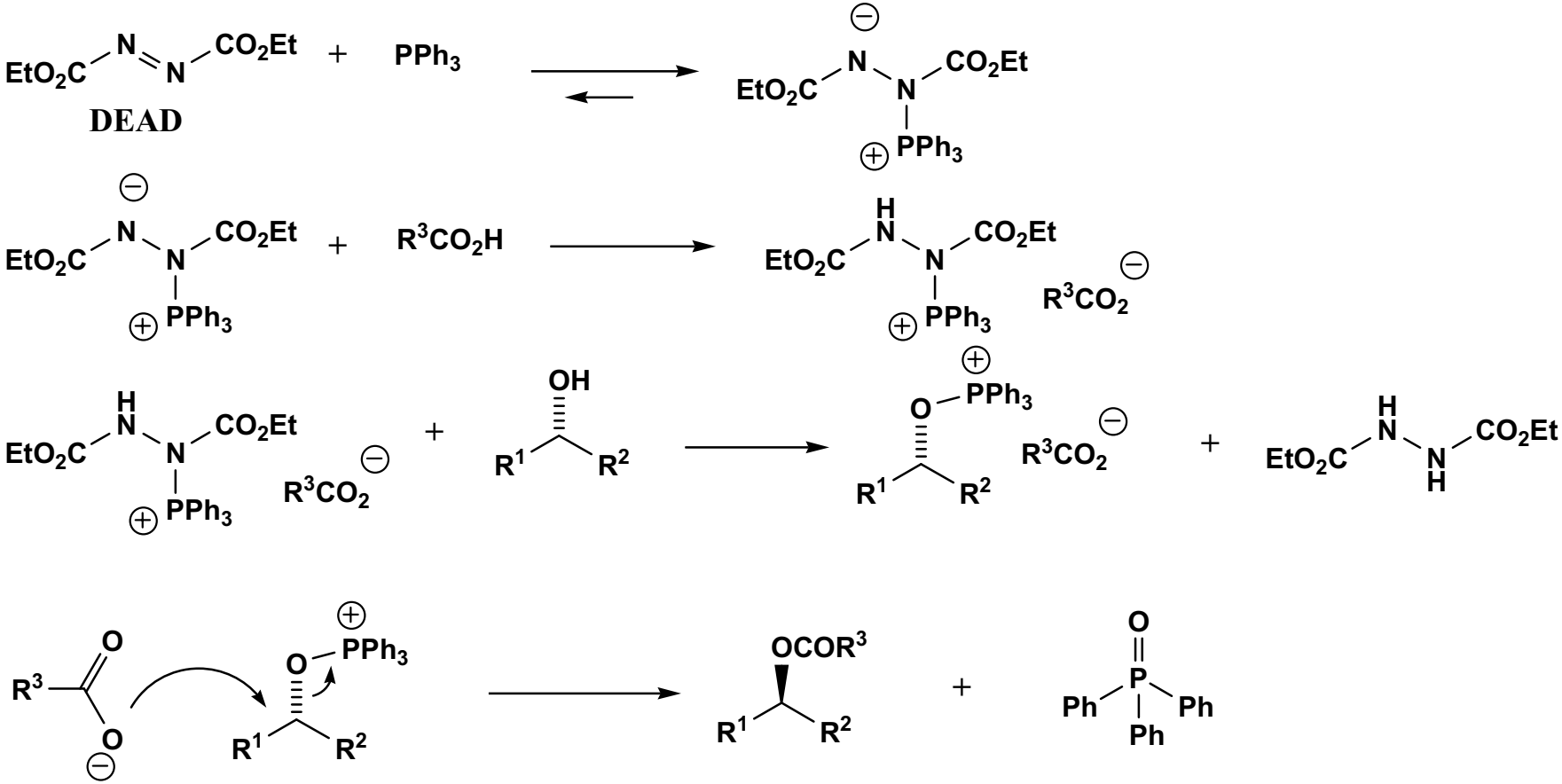
reazione di Mitsunobu

la reazione è stereospecifica (è una S_N2 e procede con inversione di configurazione)

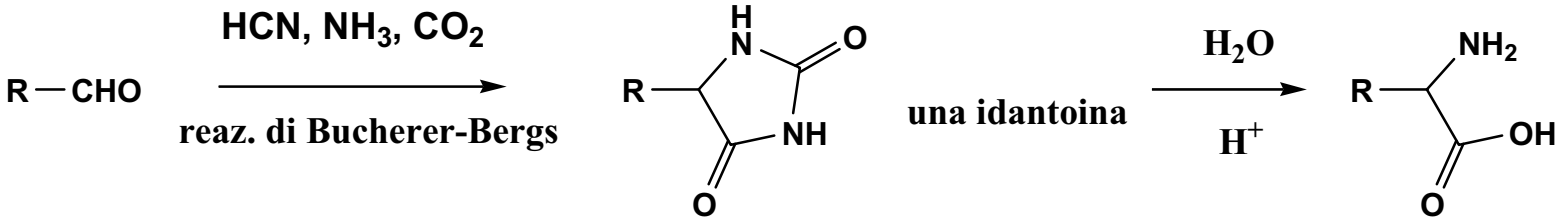
In questo modo si può convertire <u>tutto</u> l'alcool racemo in un solo enantiomero.

STRATEGIA 3: risoluzione cinetica dinamica: la reazione enzimatica viene condotta in condizioni in cui il substrato subisce veloce racemizzazione (ma il prodotto no!). L'enantiomero più reattivo viene così "estratto" selettivamente dalla miscela degli antipodi in equilibrio.
In questo modo la resa teorica di un singolo enantiomero può arrivare al 100%.

Meccanismo della reazione di Mitsunobu

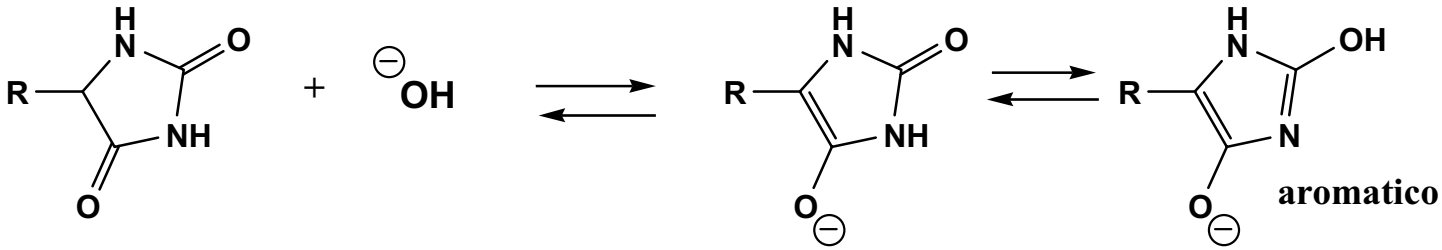


Risoluzione Cinetica Dinamica

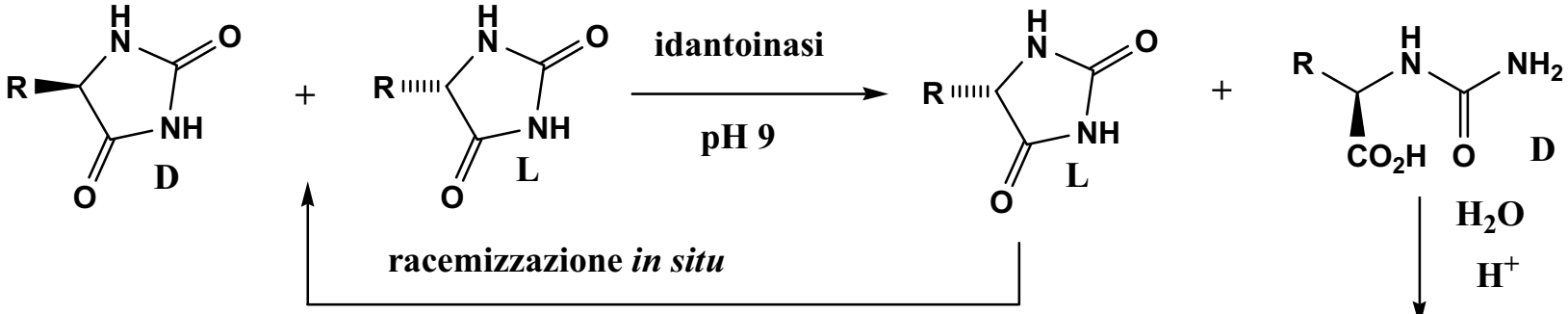


La reazione di Bucherer-Bergs è una variante della reazione di Strecker e rappresenta un metodo molto comodo per preparare α-amminoacidi <u>racemi</u>

Le idantoine hanno forte tendenza a racemizzare, già a pH >8



C'è un enzima, la *Idantoinasi*, che idrolizza selettivamente le idantoine D

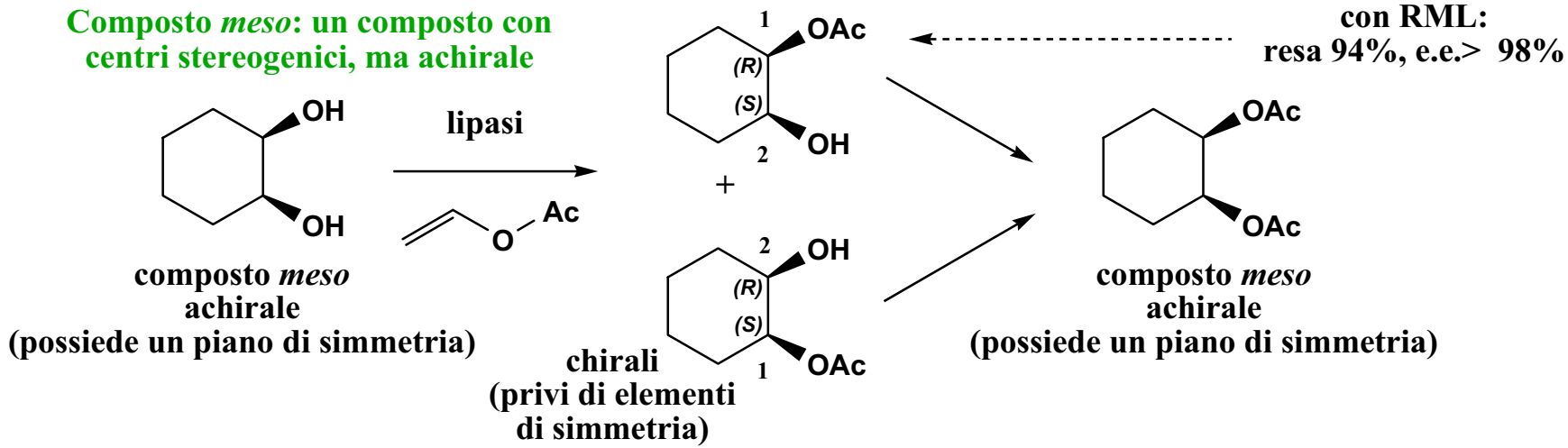


Questo processo è usato industrialmente (Kanegafuchi, DEBI) per preparare amminoacidi D, in particolare le D-fenilglicine usate per i derivati della penicillina (amossicillina, ampicillina)

ASIMMETRIZZAZIONE DI SUBSTRATI MESO O PROCHIRALI

Un altro metodo di grande utilità per poter avere una resa massima teorica del 100% in un solo enantiomero, è quello che prevede la ASIMMETRIZZAZIONE di un substrato meso o prochirale

Composto *meso*: un composto con centri stereogenici, ma achirale



composto *meso*
achirale
(possiede un piano di simmetria)

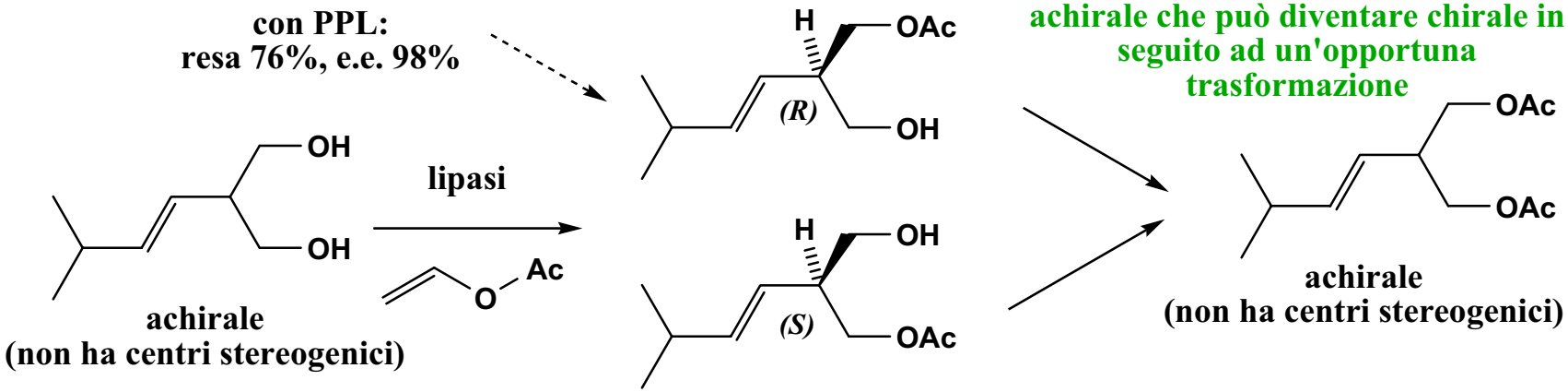
chirali
(privi di elementi
di simmetria)

composto *meso*
achirale
(possiede un piano di simmetria)

La prima reazione non è una risoluzione cinetica, ma una reazione asimmetrica vera e propria. Il caso ideale è quello con massima selettività di substrato (cioé la seconda reazione non avviene) e massima enantioselettività della prima reazione. In questo caso si può ottenere un singolo enantiomero con resa del 100%.

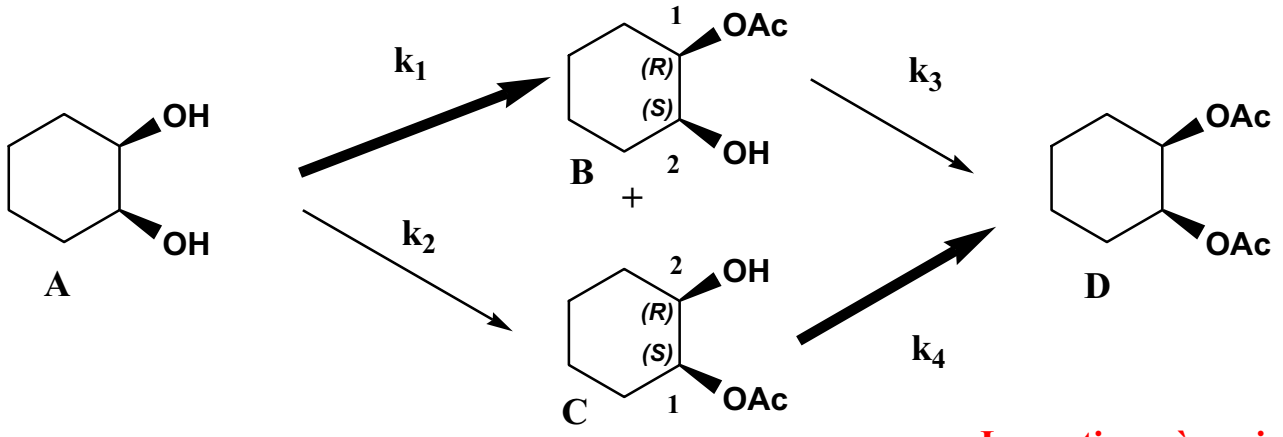
La stessa cosa si può verificare con un substrato *prochirale*:

composto *prochirale*: un composto achirale che può diventare chirale in seguito ad un'opportuna trasformazione



achirale
(non ha centri stereogenici)

achirale
(non ha centri stereogenici)



La conversione qui è in genere definita in modo differente

$$c = \frac{(B + C)/2 + D}{A_0}$$

per c = 1, la reazione è completa a dare tutto D.
per c = 0,5, A = D

In pratica c è pari al rapporto tra gli OH acetilati e gli OH iniziali

La situazione è più complessa che nel caso della semplice risoluzione cinetica. Si ha una sequenza di: a) una reazione asimmetrica, governata dalle costanti cinetiche del 1° ordine k_1 e k_2 e b) una risoluzione cinetica (che però parte da una miscela non racemica), governata dalle costanti cinetiche del 1° ordine k_3 e k_4

CASO SEMPLIFICATO

Supponiamo che avvenga solo la prima reazione. Ciò è vero quando la selettività di substrato è molto elevata o quando ci si ferma a basse conversioni

Allora $\frac{B}{C} = \frac{k_1}{k_2} = E$ ed è costante per qualunque conversione

ne consegue che $ee = \frac{B - C}{B + C} = \frac{EC - C}{EC + C} = \frac{E - 1}{E + 1}$

per esempio, se E = 50

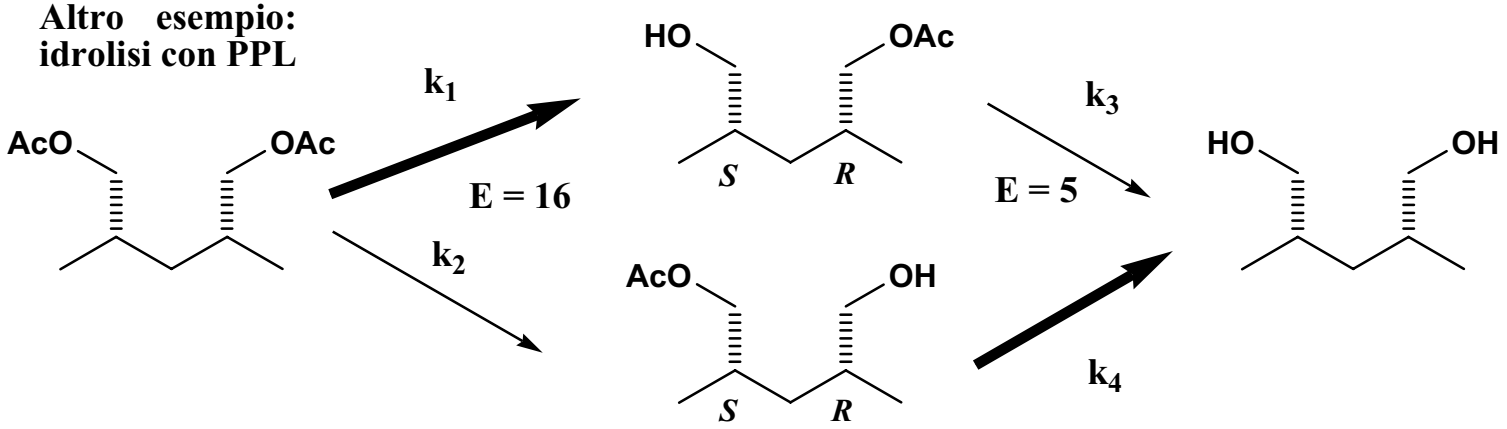
⇩

ee = 96%

CASO GENERALE

Di solito però si procede fino a conversioni vicine al 50%, per massimizzare la resa nel prodotto monoacilato. Allora l'ee è condizionato anche dalla successiva risoluzione cinetica. L'enantiomero che si forma più lentamente (C) è anche quello che reagisce più velocemente. Pertanto la risoluzione cinetica arricchisce ulteriormente la miscela in B. Perciò, a conversioni > 50%, l'ee aumenta.

Altro esempio: idrolisi con PPL

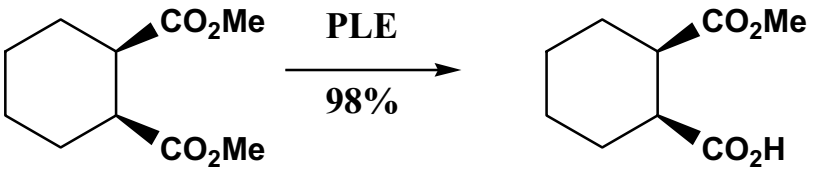


A basse conversioni, ee = 88%, come calcolato dall'equazione precedente.
Ad una conversione del 65% (quando si hanno il 70% di monoacetato ed il 30% di diolo), l'e.e. del monoacetato è salito al 97%.

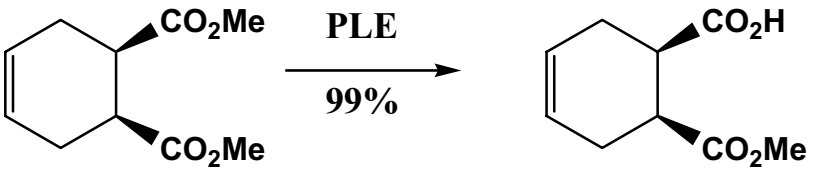
Si noti che l'aumento dell'ee si verifica anche quando E della risoluzione cinetica è inferiore ad E della sintesi asimmetrica, come in questo caso. L'aumento di ee è ovviamente accompagnato da una perdita nella resa in monoacetato, che è massima quando c=0,50

Un tipo di asimmetrizzazione molto utile sinteticamente è l'idrolisi di diesteri meso o prochirali promossa daesterasi, quali la PLE.

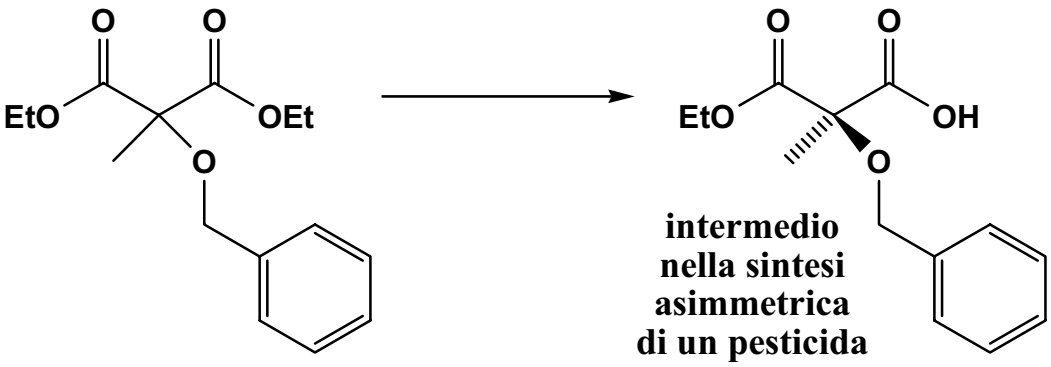
In questi casi si verifica un'eccellente selettività di substrato e la reazione si ferma al primo stadio.
L'inconveniente è che non si può sfruttare la risoluzione cinetica per aumentare l'e.e.



E = 8, ee = 78%



E = 100, ee = 99%



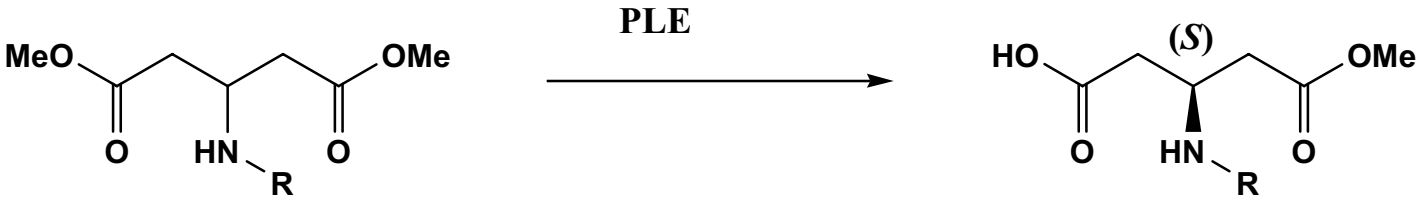
intermedio nella sintesi asimmetrica di un pesticida

enzima	cosolvente	ee
PLE	–	53%
HLAP	–	89%
HLAP	*i*Pr_2O (10%)	96%

HLAP = Horse Liver Acetone Powder (un'esterasi grezza)

L'efficacia di una reazione enzimatica può essere aumentata in vari modi:
a) Provando diversi enzimi commerciali
b) Cambiando le condizioni di reazione (solvente, cosolvente, pH, temperatura, conc. etc.)
c) Mediante modificazioni strutturali
d) creando nuovi enzimi "artificiali"

Un altro esempio di miglioramento della enantioselettività tramite modificazione strutturale è mostrato qui sotto:

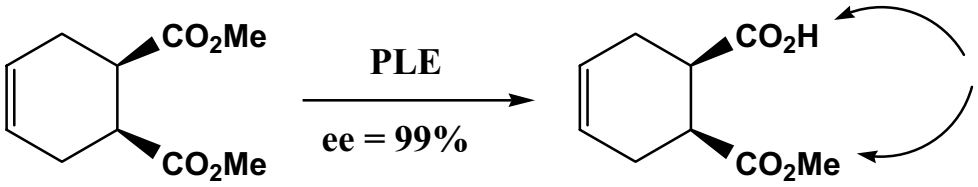


R = CH_3CO	ee = 93% (*R*)
R = H	ee = 41% (*R*)
R = *t*BuCO	ee = 93% (*S*)

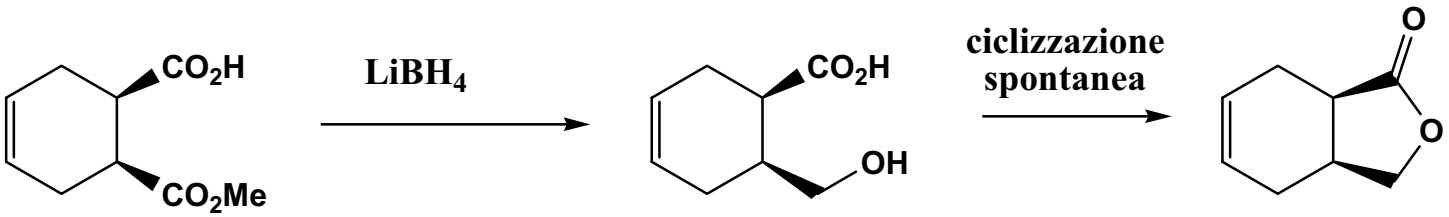
In conclusione il grande vantaggio delle reazioni di asimmetrizzazione rispetto alle reazioni di risoluzione risiede nel fatto che in principio tutto il substrato può essere convertito in un unico enantiomero del prodotto.

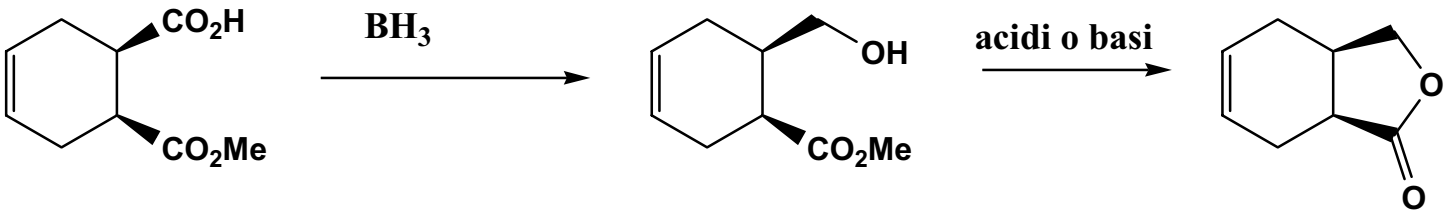
STEREODIVERGENZA

Tuttavia c'è anche un secondo vantaggio. I due gruppi del substrato meso o prochirale sono *sinteticamente equivalenti*. Ciò permette di ottenere entrambi gli enantiomeri di un certo prodotto a partire da un unico enantiomero ottenuto dalla reazione enzimatica. Si parla di *stereodivergenza*



Questi due gruppi funzionali sono diversi, ma *sinteticamente equivalenti*. Ad esempio, possono essere entrambi ridotti a dare un alcool primario

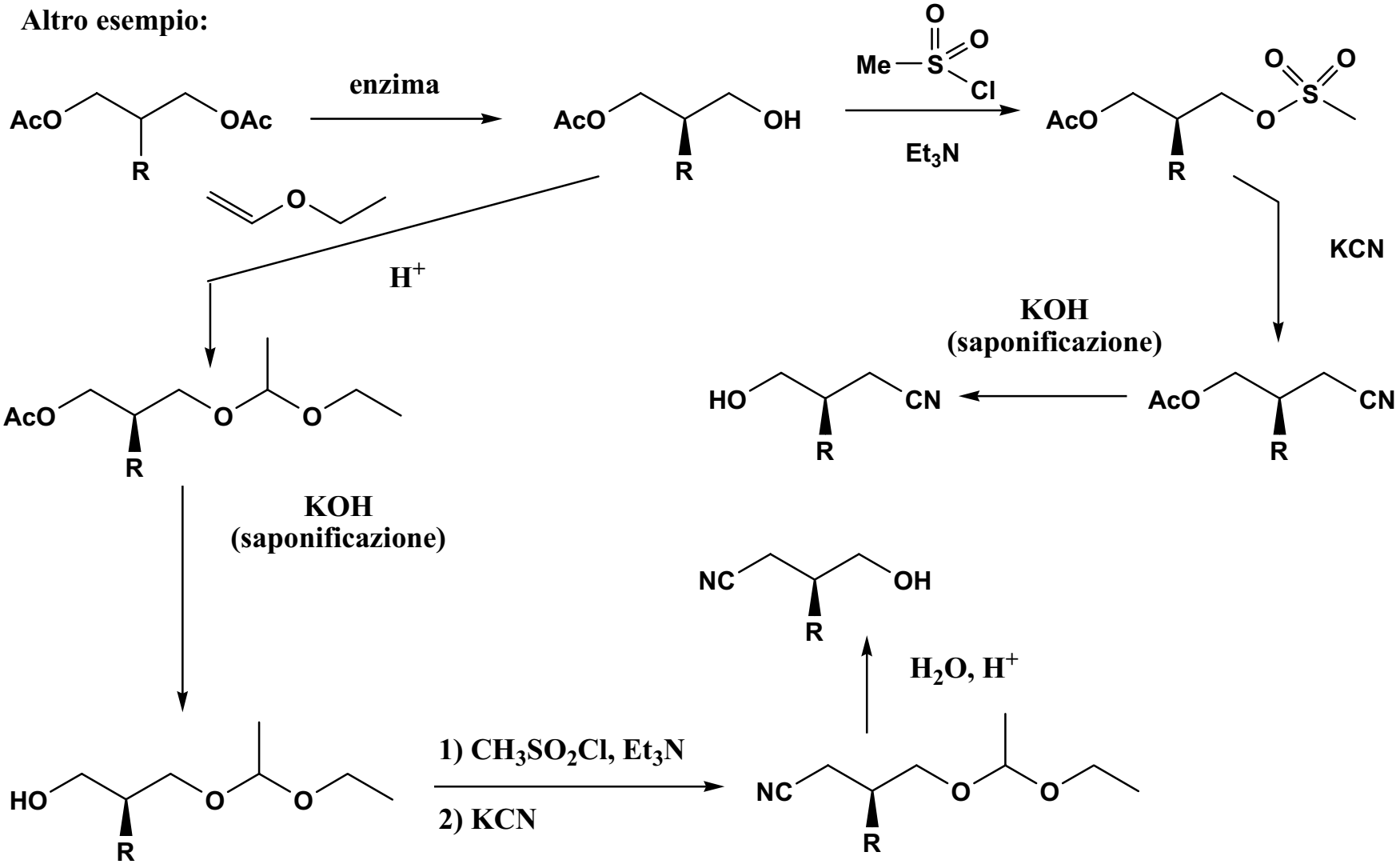




Si possono preparare entrambi gli enantiomeri del lattone semplicemente usando riducenti selettivi verso l'uno o l'altro gruppo funzionale

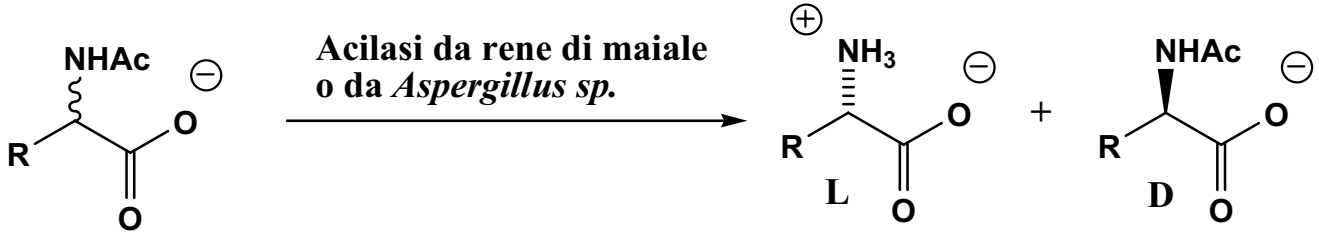
STEREODIVERGENZA

Altro esempio:

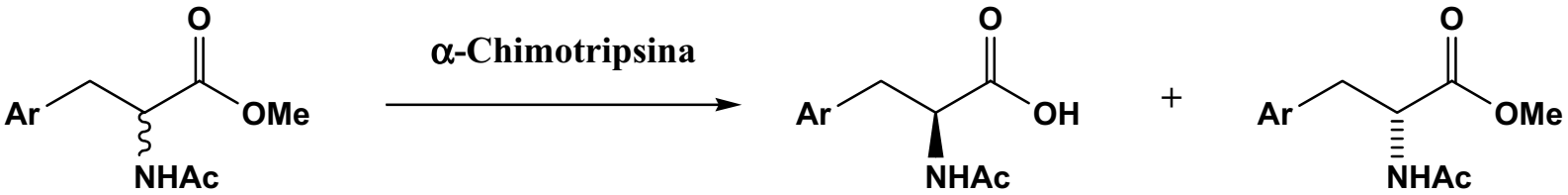


IDROLISI DI AMMIDI CON PROTEASI E AMMIDASI

L'idrolisi enzimatica di ammidi può servire per risolvere ammine chirali o acidi carbossilici chirali. Queste risoluzioni sono meno usate di quelle tramite idrolisi di esteri e sono molto sfruttate nella preparazione di amminoacidi enantiomericamente puri



Per risolvere acidi chirali si preferisce però idrolizzare esteri, anziché ammidi



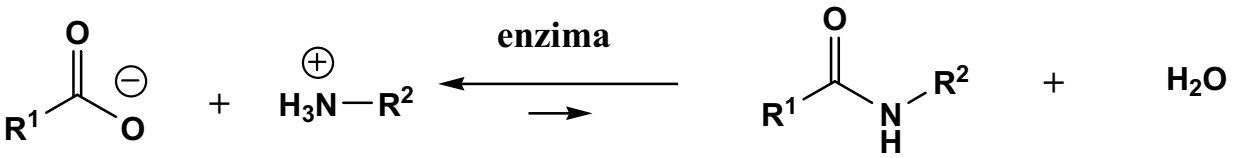
SINTESI DI AMMIDI CON PROTEASI E AMMIDASI

L'uso di enzimi per la sintesi di ammidi, in particolare di piccoli peptidi, può essere vantaggioso rispetto ai metodi chimici tradizionali per vari motivi:

a) Non è necessario attivare il carbossile
b) Assenza di racemizzazione
c) Selettività (non sono richiesti gruppi protettori)
d) Elevata biocompatibilità (assenza di residui potenzialmente tossici in prodotti per uso umano)

Tuttavia l'utilizzo di proteasi ed ammidasi per questo scopo non è ovvio

Un catalizzatore accelera una reazione in entrambi i versi, ma.....

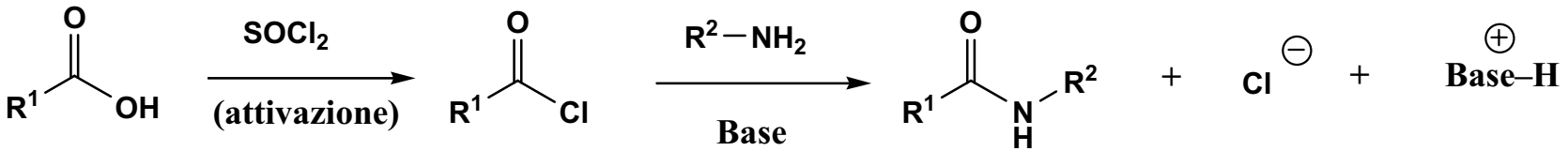


$\Delta G \approx 2{,}2$ Kcal/mole

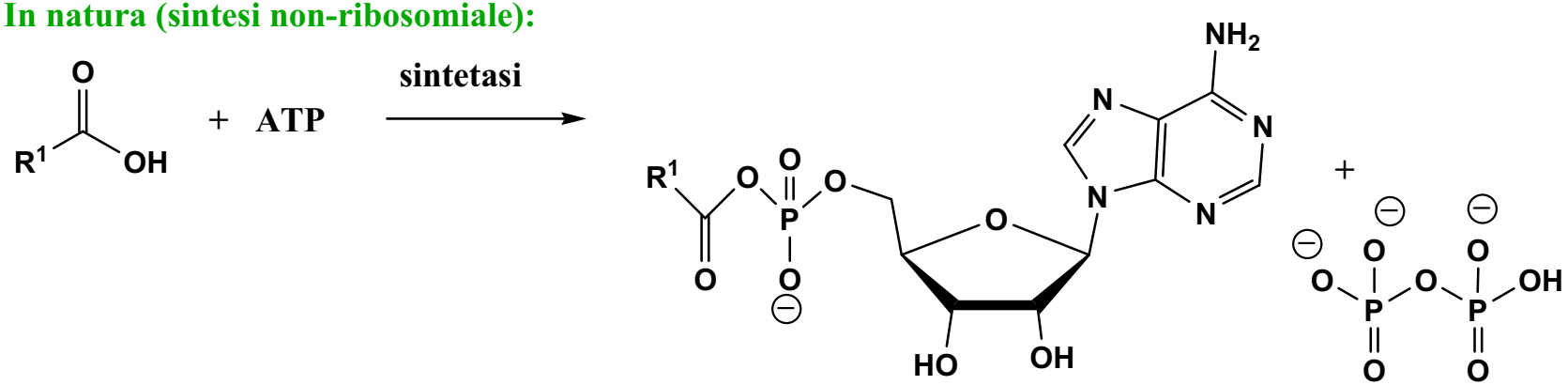
.....in questo caso l'equilibrio è sfavorito

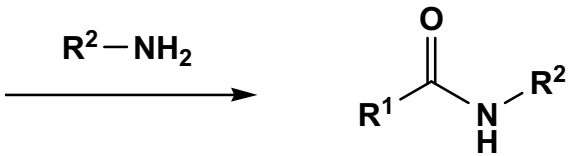
Infatti le proteine non vengono sintetizzate in natura ad opera di proteasi o ammidasi. Proteasi ed ammidasi sono impiegate solo in reazioni di idrolisi.
Per la sintesi di proteine, la natura usa un sistema simile alla sintesi di laboratorio delle ammidi:

In laboratorio:



In natura (sintesi non-ribosomiale):



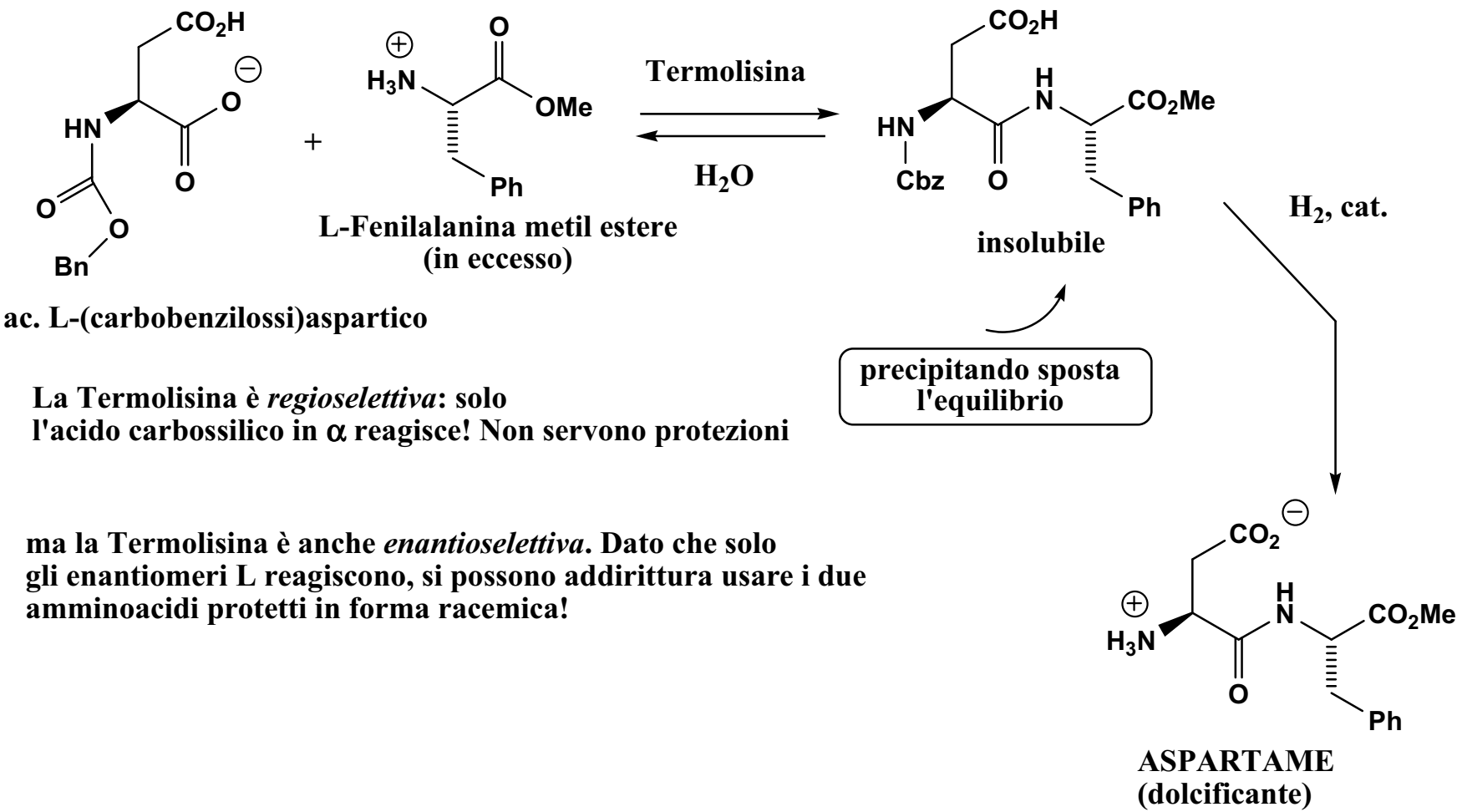


Per poter impiegare le proteasi o le ammidasi esistono due approcci.

Approccio con Controllo Termodinamico

Utilizza dei trucchi per spostare l'equilibrio. Qualunque proteasi o ammidasi è in principio impiegabile.

Un esempio eccellente è la sintesi industriale dell'Aspartame (migliaia di tonnellate /anno):



ac. L-(carbobenzilossi)aspartico

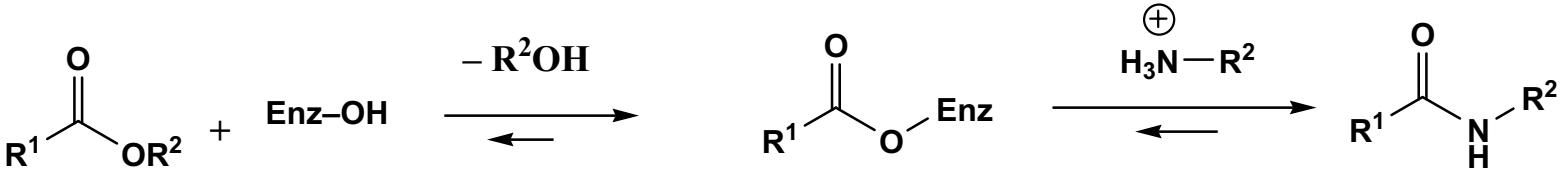
La Termolisina è *regioselettiva*: solo l'acido carbossilico in α reagisce! Non servono protezioni

ma la Termolisina è anche *enantioselettiva*. Dato che solo gli enantiomeri L reagiscono, si possono addirittura usare i due amminoacidi protetti in forma racemica!

Approccio con Controllo Cinetico

Si utilizza, anziché un acido, un estere, che è più reattivo. La reazione è così favorita termodinamicamente e non è necessario utilizzare trucchi per spostare l'equilibrio.

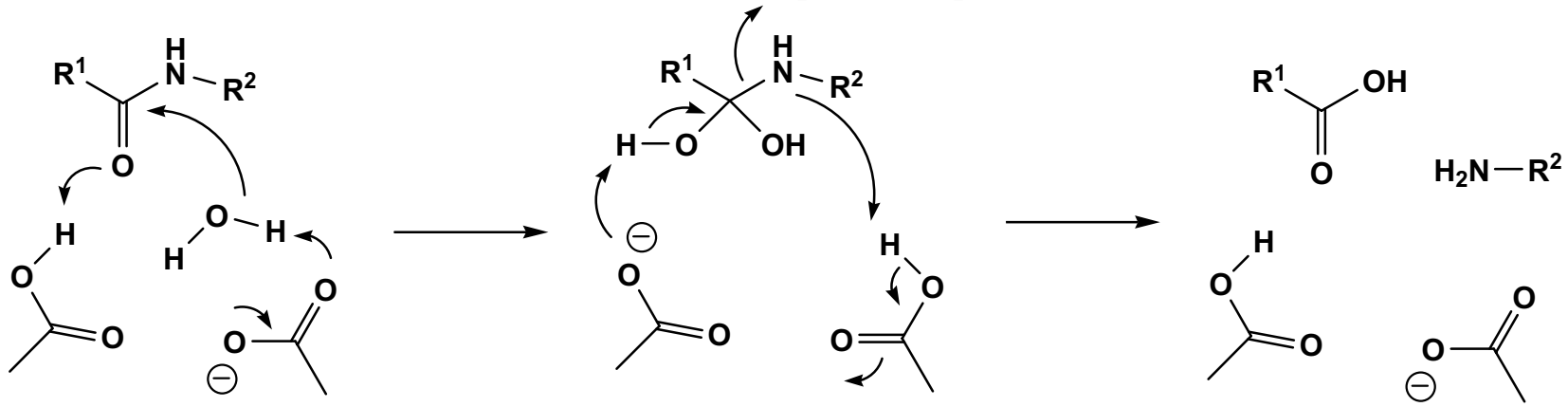
Questo metodo è impiegabile solo con enzimi il cui meccanismo passa attraverso un acil-enzima, come le proteasi seriniche o cisteiniche



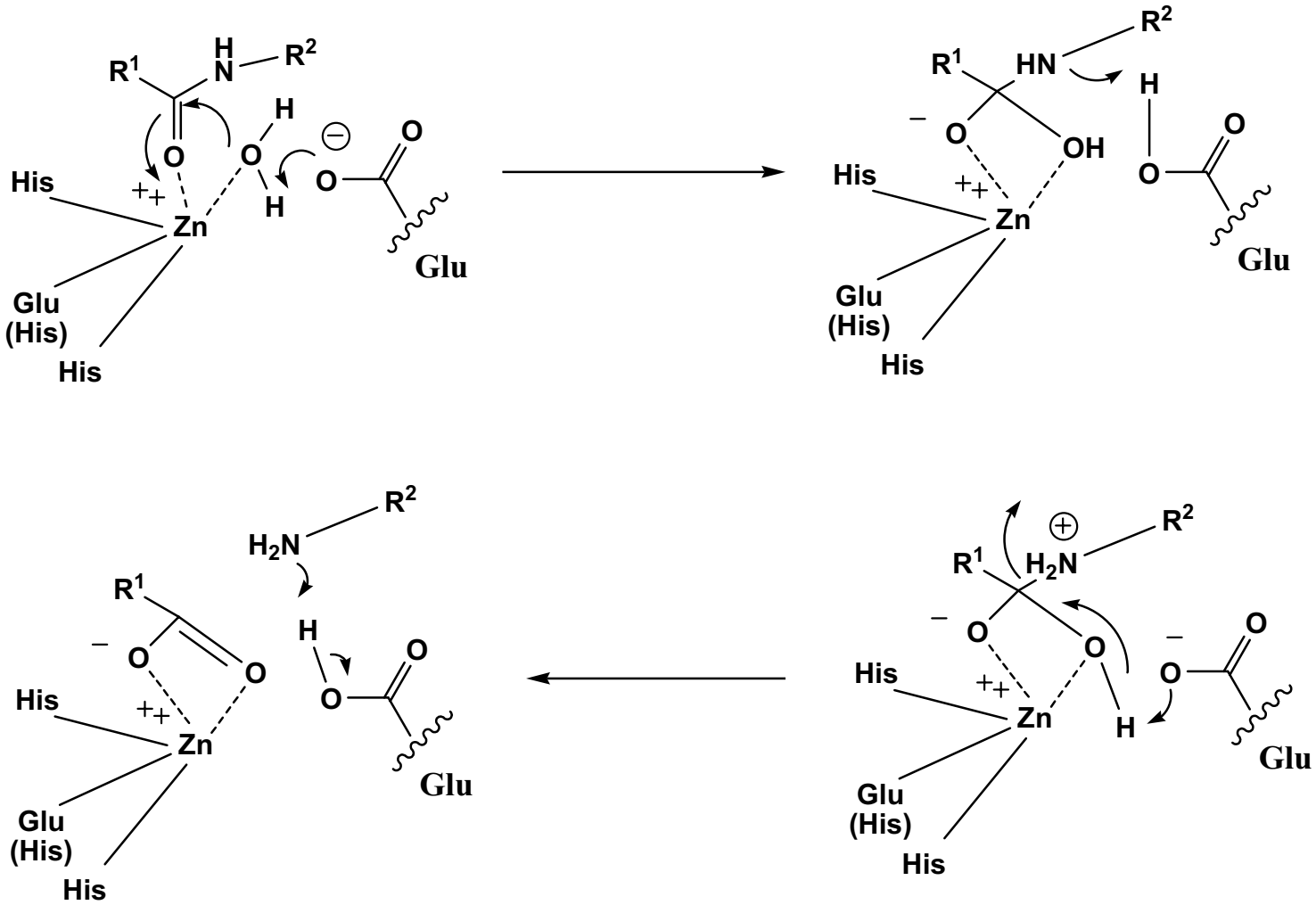
esistono 4 tipi di proteasi:

a) Seriniche (ad es. Chimotripsina)
b) Cisteiniche: hanno un meccanismo molto simile alle seriniche, ma c'è un SH al posto di OH
c) Aspartiche. ad es. HIV proteasi
d) Metalloproteasi: ad es. Acilasi, Termolisina

Meccanismo delle proteasi aspartiche



Meccanismo delle metallo-proteasi

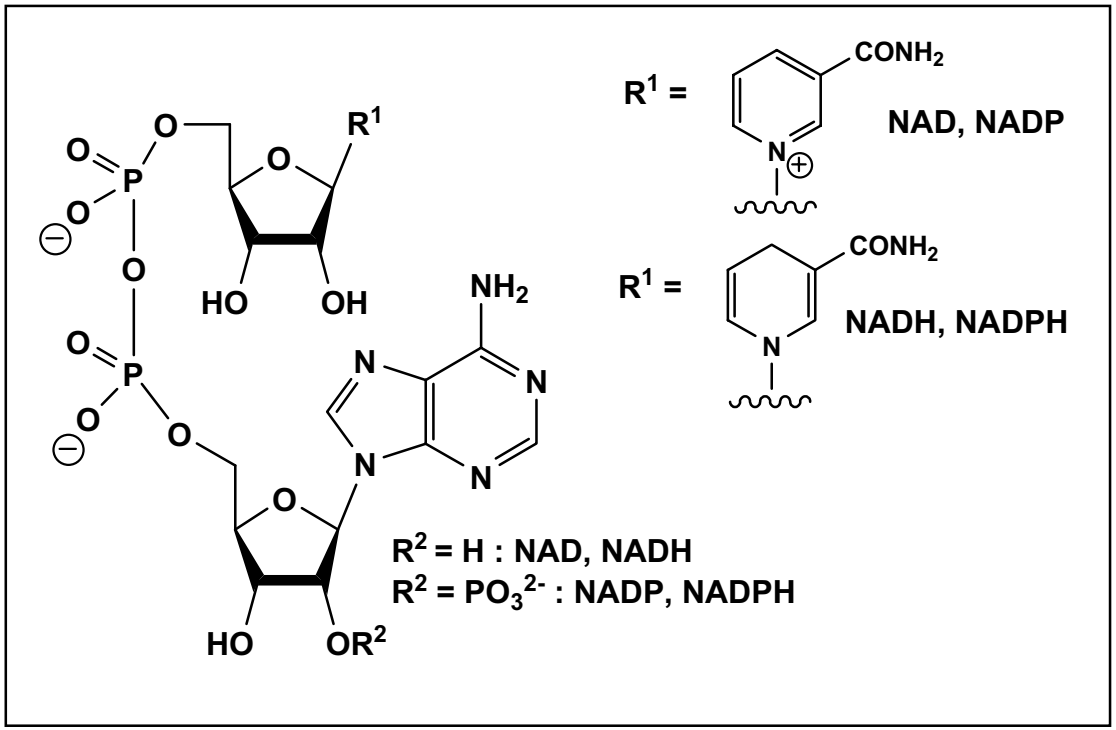


- **Le metalloproteasi più comuni utilizzano uno ione Zinco bivalente**
- **Lo zinco è tenuto legato all'enzima da ben tre gruppi donatori (3 gruppi imidazolici o 2 gruppi imidazolici ed un carbossilato)**
- **Lo zinco (acido di Lewis) attiva il carbossile all'attacco di una molecola di acqua.**
- **Nel sito attivo un ruolo determinante è svolto da un acido glutammico, che funge da catalizzatore basico o acido generale**

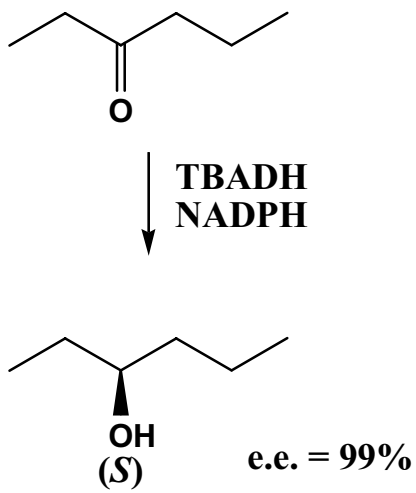
OSSIDO-REDUTTASI

- **Alcool deidrogenasi (E.C.1.1)(397): ossidazione di alcooli-riduzione di chetoni-aldeidi. NADH/NAD o NADPH/NADP dipendenti**
- **Alchene deidrogenasi (E.C.1.3)(81): idrogenazione di doppi legami C=C. NADH/NAD o NADPH/NADP dipendenti**
- **Perossidasi (E.C.1.11)(203): utilizzano H_2O_2 come ossidante**
- **Mono-ossigenasi e di-ossigenasi (E.C.1.13 ed E.C.1.14)(311): utilizzano O_2 come ossidante**
- **Superossido dismutasi (E.C.1.15)(98): utilizzano superossido come ossidante**

Il gruppo più importante di ossido-reduttasi (dal punto di vista sintetico) è costituito dalle alcol deidrogenasi, le quali sono quasi sempre NADH/NAD o NADPH/NADP dipendenti

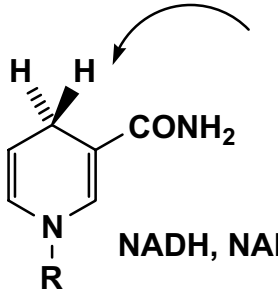


La principale utilità delle alcool deidrogenasi risiede nella loro stereoselettività. Ad esempio



TBADH = *Thermoanaerobium brockii alcohol dehydrogenase*

L'enantioselettività deriva dalla selettività tipica degli enzimi, ma anche dal fatto che il NADH/NADPH trasferisce selettivamente solo uno dei due possibili idrogeni



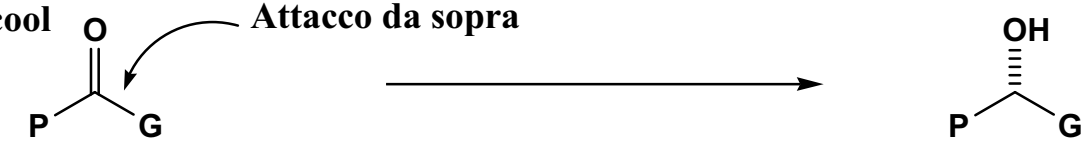
idrogeno *pro*-R: viene trasferito selettivamente dalle principali alcool deidrogenasi, tra cui quelle da lievito (NADH dipendente), da fegato di cavallo (HLADH)(NADH dipendente) o da *Thermoanaerobium brockii* (NADPH dipendente)

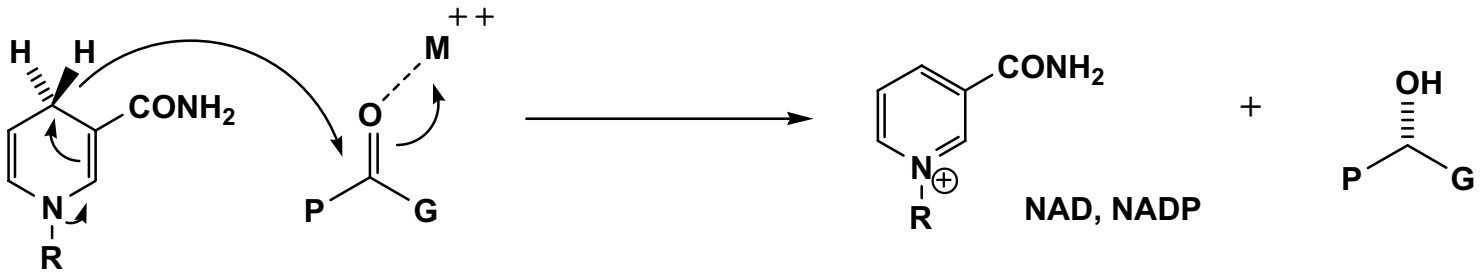
REGOLA DI PRELOG

P = piccolo
G = grande

Vale per tutte le alcool deidrogenasi che trasferiscono l'idrogeno *pro*-R

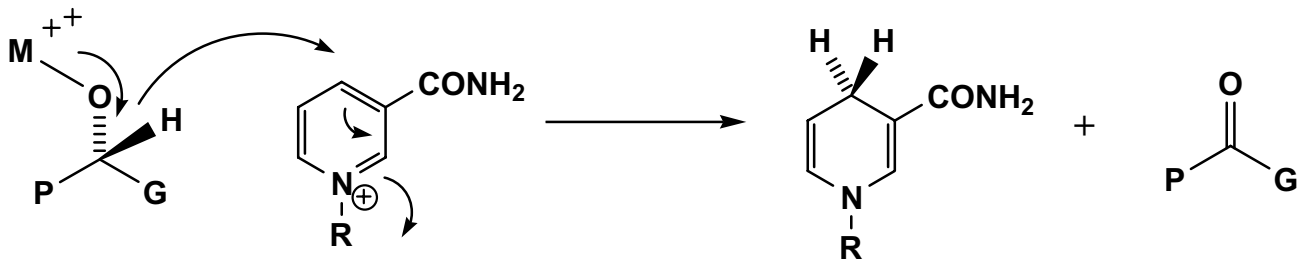
Attacco da sopra



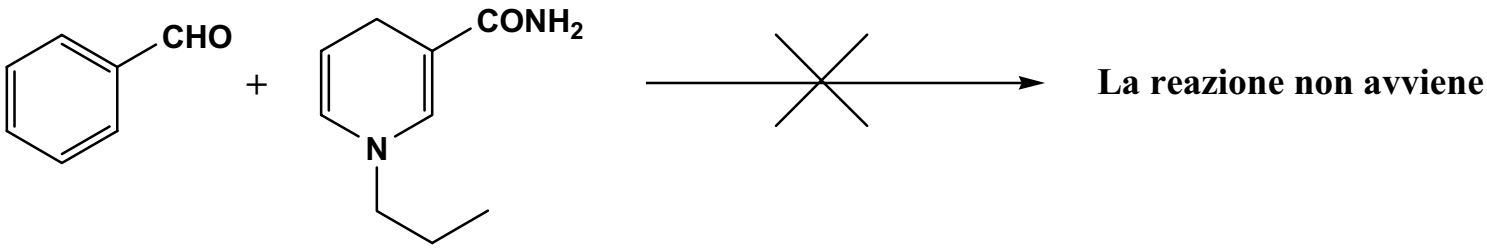


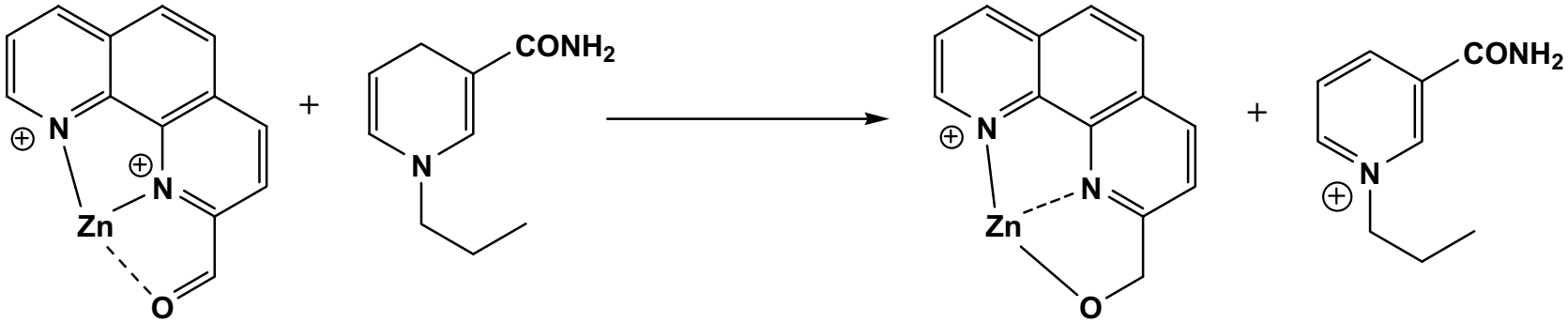
Oltre che di NADH, NADPH, le alcool deidrogenasi necessitano di un metallo divalente come cofattore (di solito zinco o magnesio)

Le deidrogenasi possono catalizzare anche la reazione opposta



L'attivazione ad opera dello ione metallico e la catalisi enzimatica sono essenziali affinché la reazione avvenga:





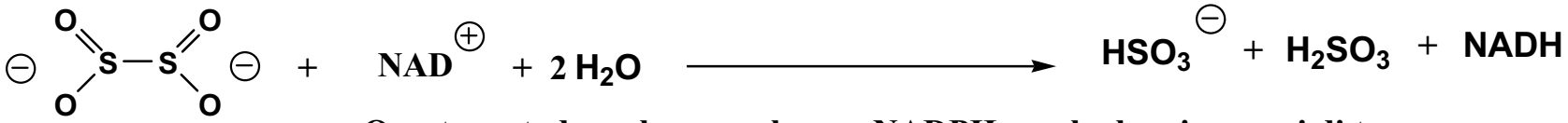
Come al solito, la catalisi intramolecolare fa la differenza!

RICICLO DEL COENZIMA

Sia NAD/NADP che NADH/NADPH sono estremamente costosi e non molto stabili. Reazioni che ne facciano uso in quantità stechiometrica non sono perciò utili sinteticamente.
Per fortuna sono stati messi a punto metodi efficienti per il riciclo.

Riciclo del NADH

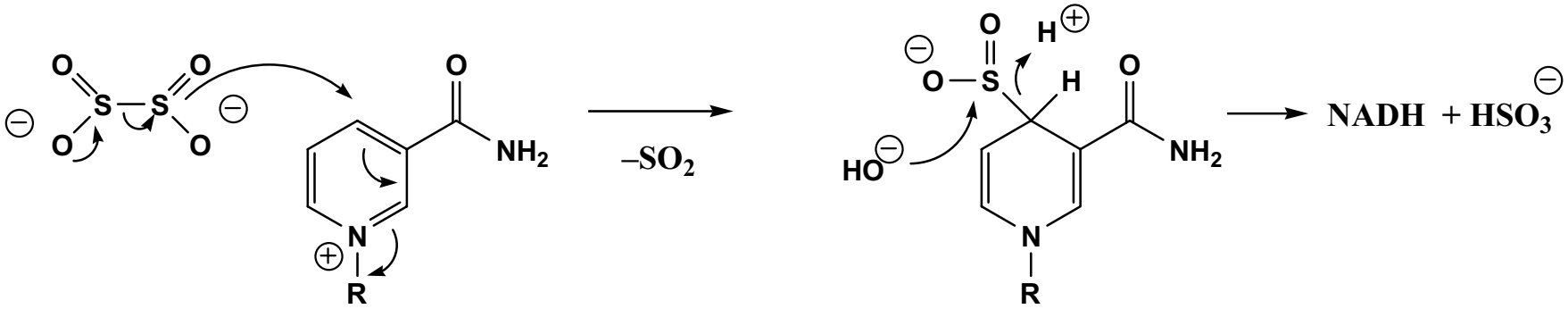
Una possibilità è quella di usare un riducente chimico che reagisce irreversibilmente con NAD^+



ditionito

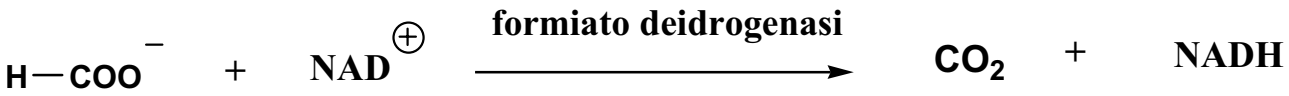
Questo metodo va bene anche per NADPH, ma ha bassi numeri di turnover

Il metodo sfrutta la tendenza dei sali di piridinio a subire attacco nucleofilo in posizione 4:



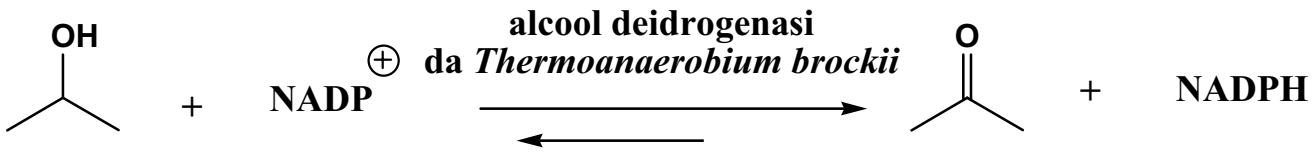
Funzionano meglio metodologie di riciclo di tipo enzimatico

A) Uso di due enzimi e due substrati:



questo metodo va bene per NAD, ma non per NADP

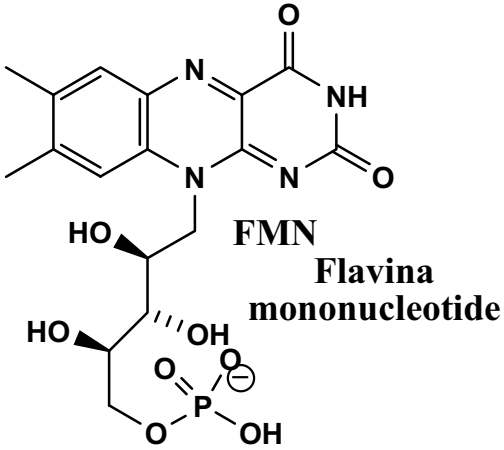
B) Uso di un enzima e due substrati



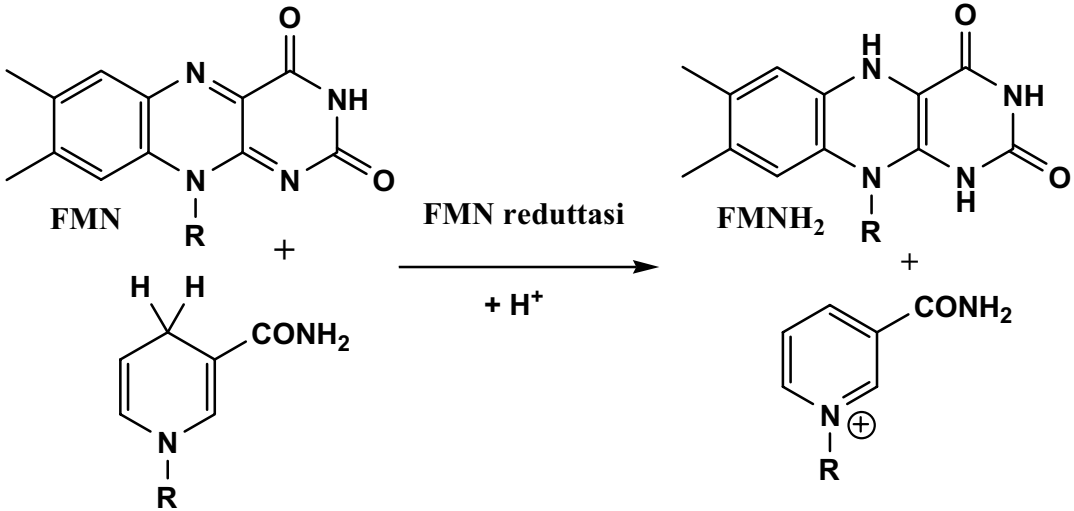
L'equilibrio è spostato a destra dall'uso di un largo eccesso di isopropanolo, che è impiegato come cosolvente.

In pratica, nelle reazioni con TBADH, si usa semplicemente una quantità catalitica di $NADP^+$, in presenza di un eccesso di isopropanolo.

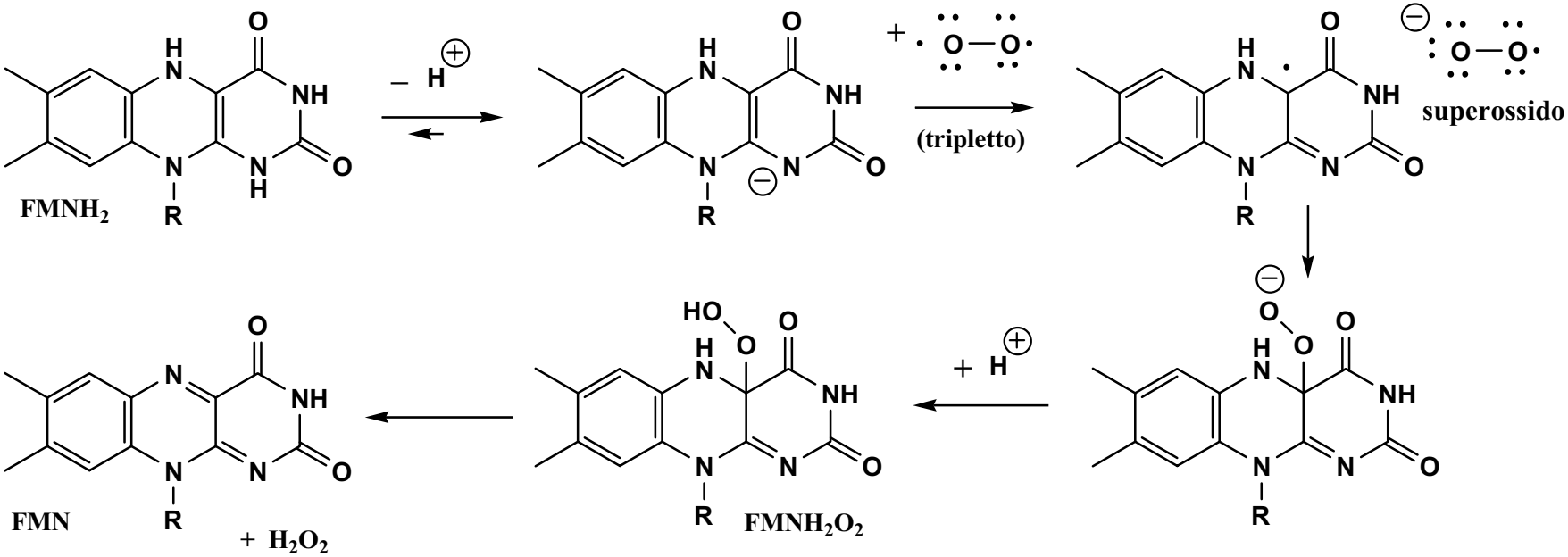
Riciclo del NAD$^+$



Un metodo interessante e tra i più usati sfrutta un altro coenzima, la FMN:



L'interesse in questo metodo è che il $FMNH_2$, a differenza del NADH, può essere ossidato direttamente dall'ossigeno:



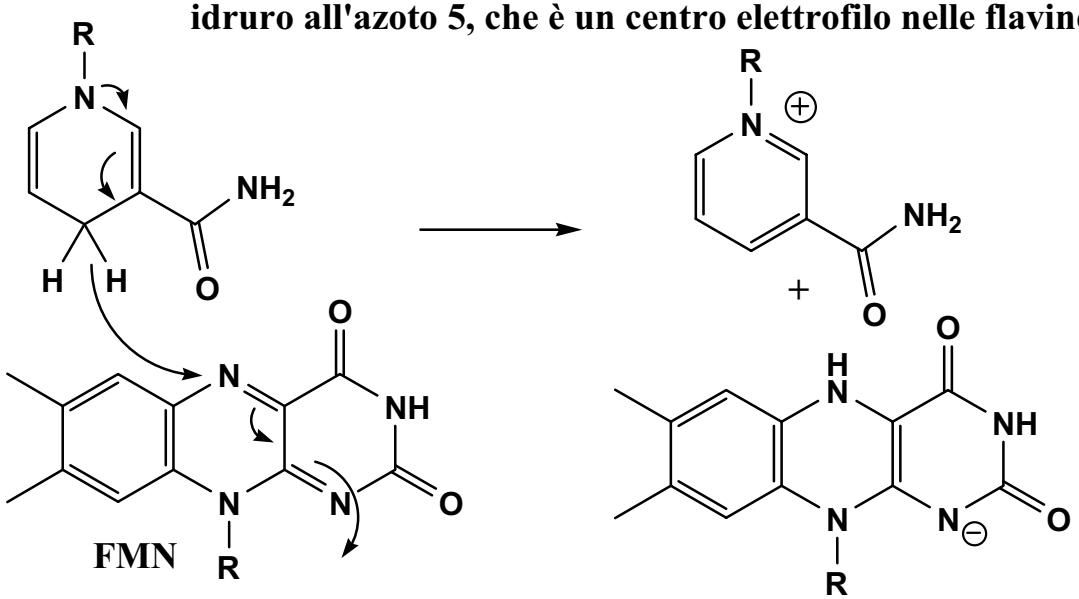
Questo metodo accetta sia NAD che NADP

Di solito si aggiunge anche un enzima (la catalasi) che distrugge la H_2O_2, secondo la reazione:

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

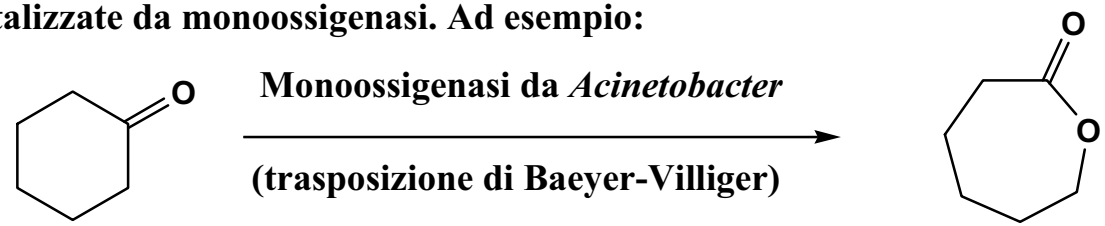
Quindi si usano insieme: ADH, FMN-reduttasi, catalasi, NADH o NADPH (cat.), FMN (cat.)

La reazione delle flavine con il NADH prevede la cessione di un idruro all'azoto 5, che è un centro elettrofilo nelle flavine



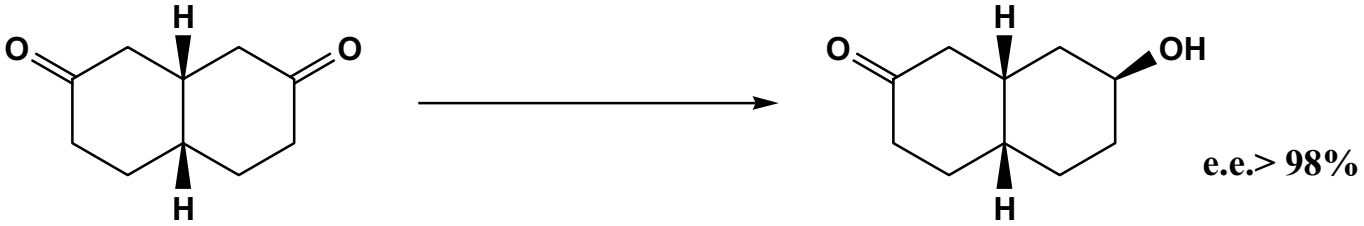
Questo anione è stabilizzato per risonanza

Il $FMNH_2O_2$ ed il $FADH_2O_2$ sono essi stessi importanti coenzimi per reazioni in cui viene ceduto un atomo di ossigeno, catalizzate da monoossigenasi. Ad esempio:



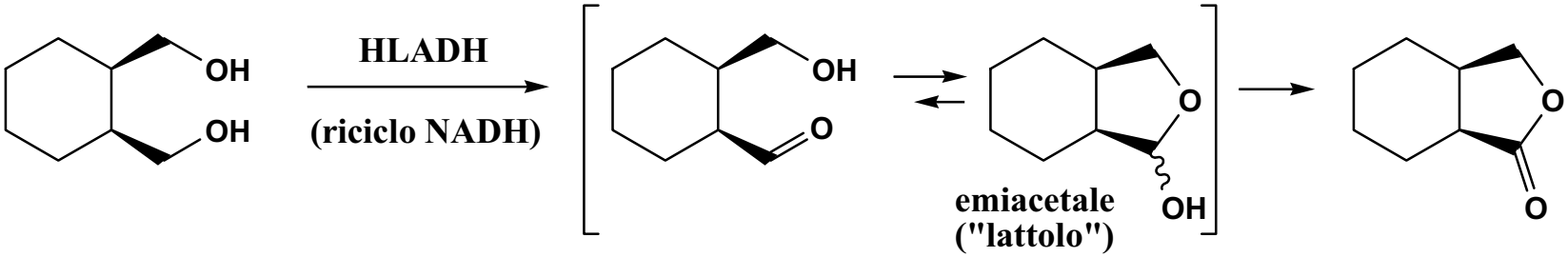
In realtà ci vogliono, come coenzimi sia FAD (catalitico) che NADPH (stechiometrico). Infatti NADPH serve per ridurre FAD a $FADH_2$. L'ossigeno ha un potenziale ossidante di 4 e^-. 2 vengono presi dal cicloesanone e 2 dal NADPH. Il NADPH deve quindi essere riciclato da NADP.

Le alcool deidrogenasi possono essere impiegate anche in reazioni di asimmetrizzazione:

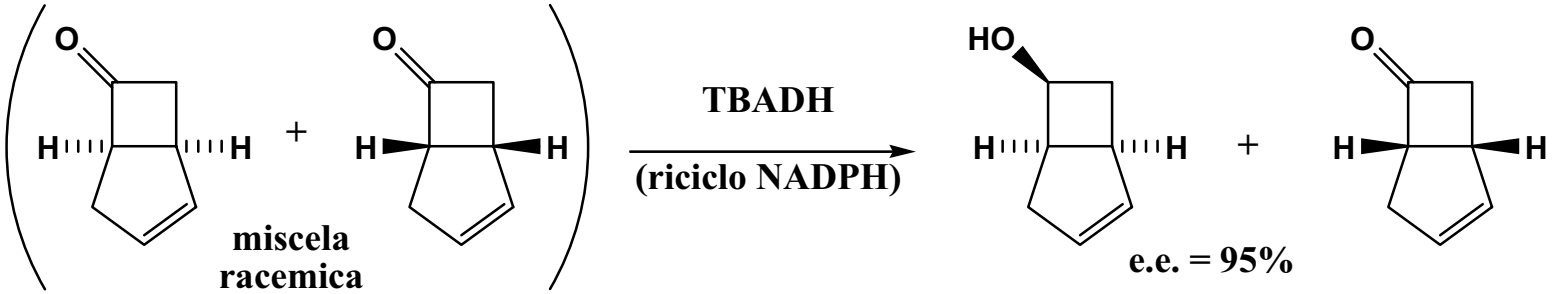


e.e.> 98%

Non solo la reazione è diastereoselettiva, ma è anche enantioselettiva, distinguendo tra i due gruppi carbonili prochirali (enantiotopici)



In questo caso la reazione è solo enantioselettiva. La HLADH è un enzima ad ampia specificità e quindi reagisce anche con i lattoli, ossidandoli a lattoni.

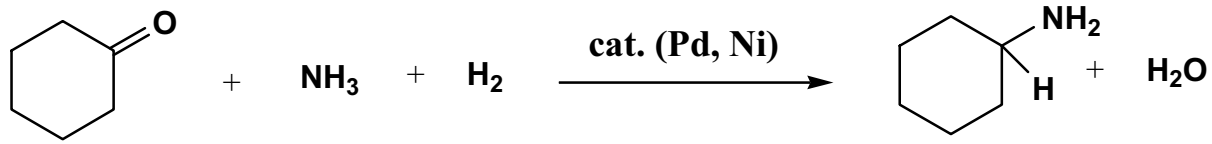


e.e. = 95%

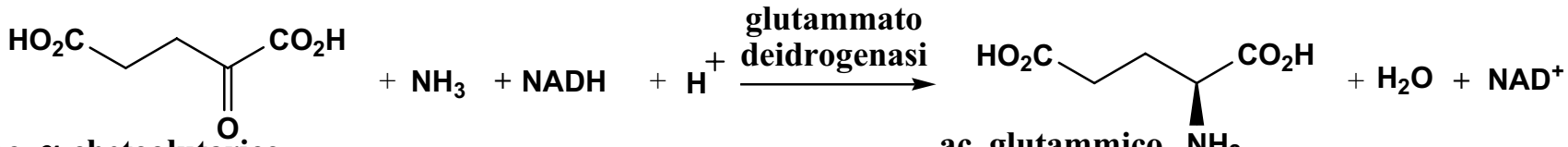
La reazione è sia diastereoselettiva che enantioselettiva. L'enzima non solo produce unicamente un alcool diastereoisomerico, ma reagisce unicamente con uno dei due chetoni enantiomerici

AMMINAZIONE RIDUTTIVA

In laboratorio l'amminazione riduttiva può essere condotta per idrogenazione

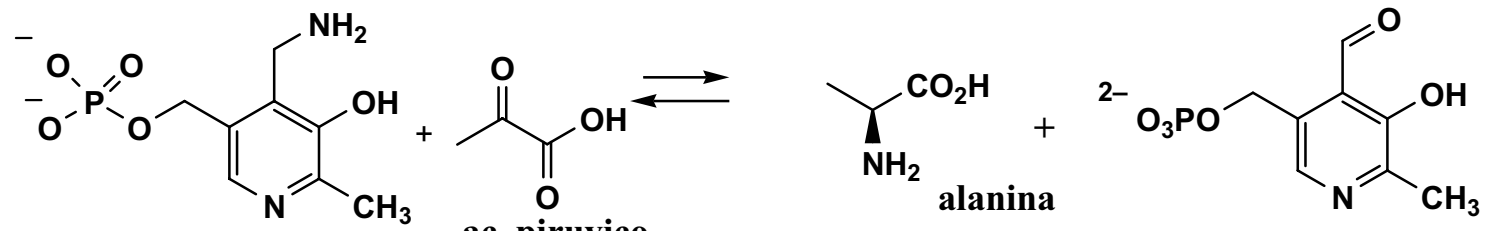


In vivo la stessa cosa può essere fatta, ma ovviamente non con l'idrogeno!

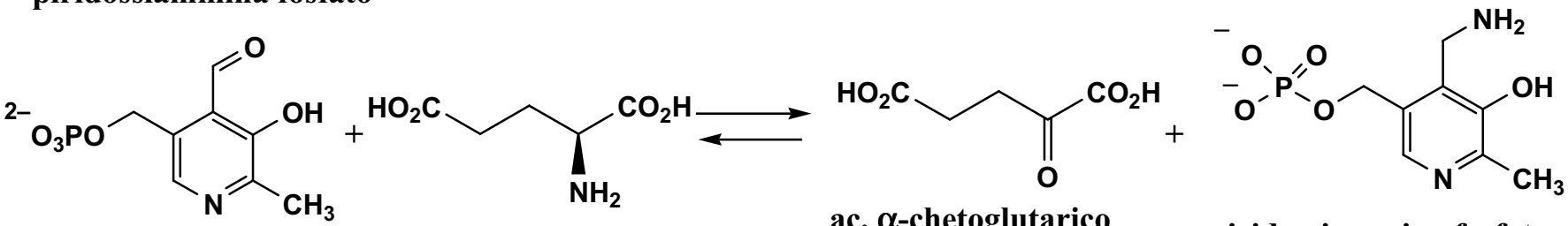


ac. α-chetoglutarico **ac. glutammico**

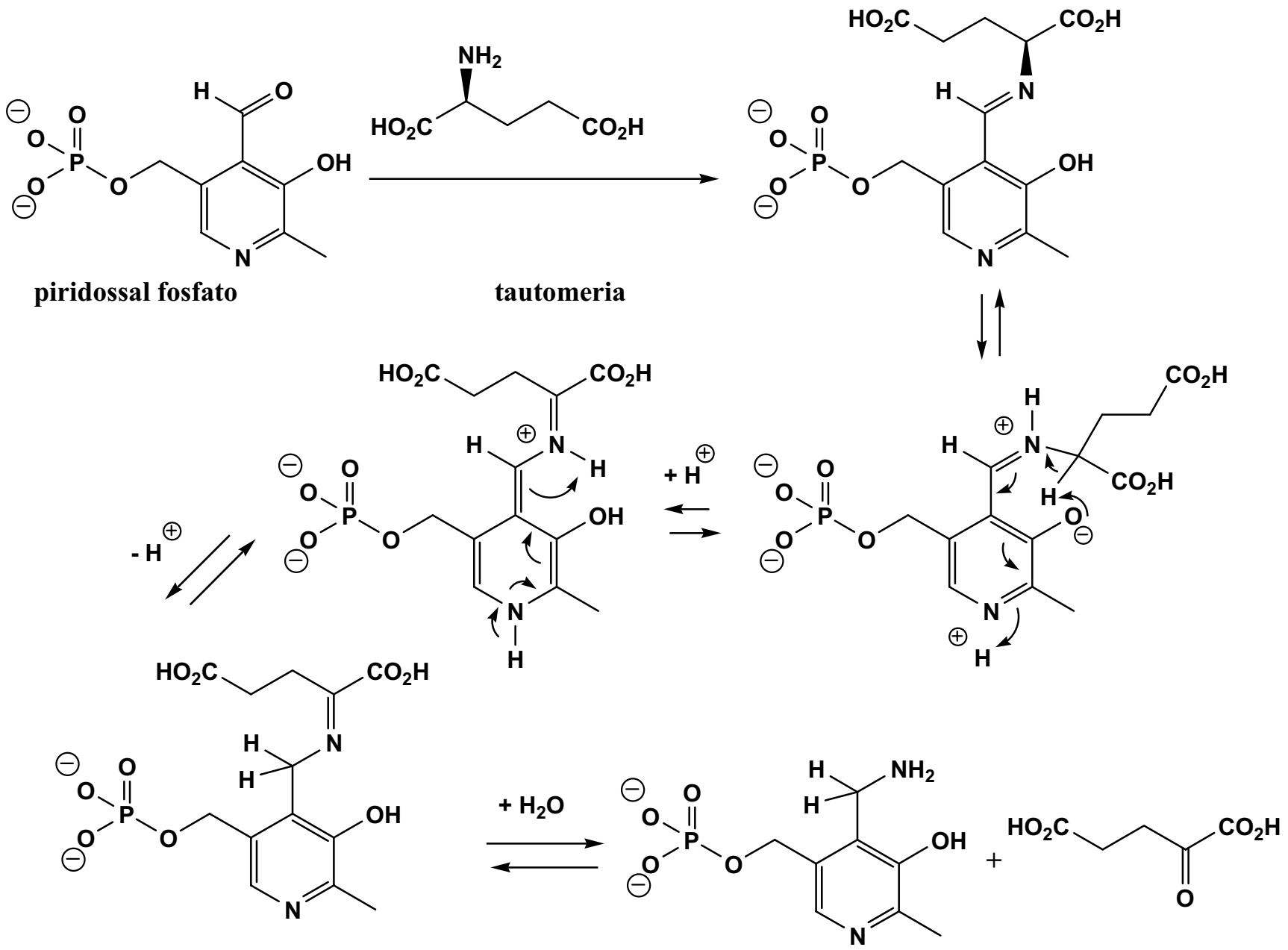
In realtà solo nel caso dell'acido glutammico l'amminazione riduttiva è condotta a spese di NADH
Nel caso dell'acido aspartico, alanina, serina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, istidina, si ha una reazione di transamminazione. Ad es.:



piridossiammina fosfato **ac. piruvico** **piridossale fosfato**



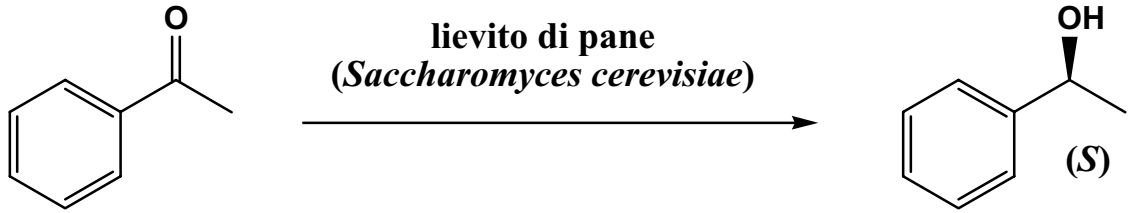
piridossale fosfato **ac. α-chetoglutarico** **piridossiammina fosfato**



bioorg_07_4_9

ESISTE PERO' UN ALTRO METODO PER ESEGUIRE QUESTE RIDUZIONI

Usare celle intere di un microorganismo (ad es. un lievito)



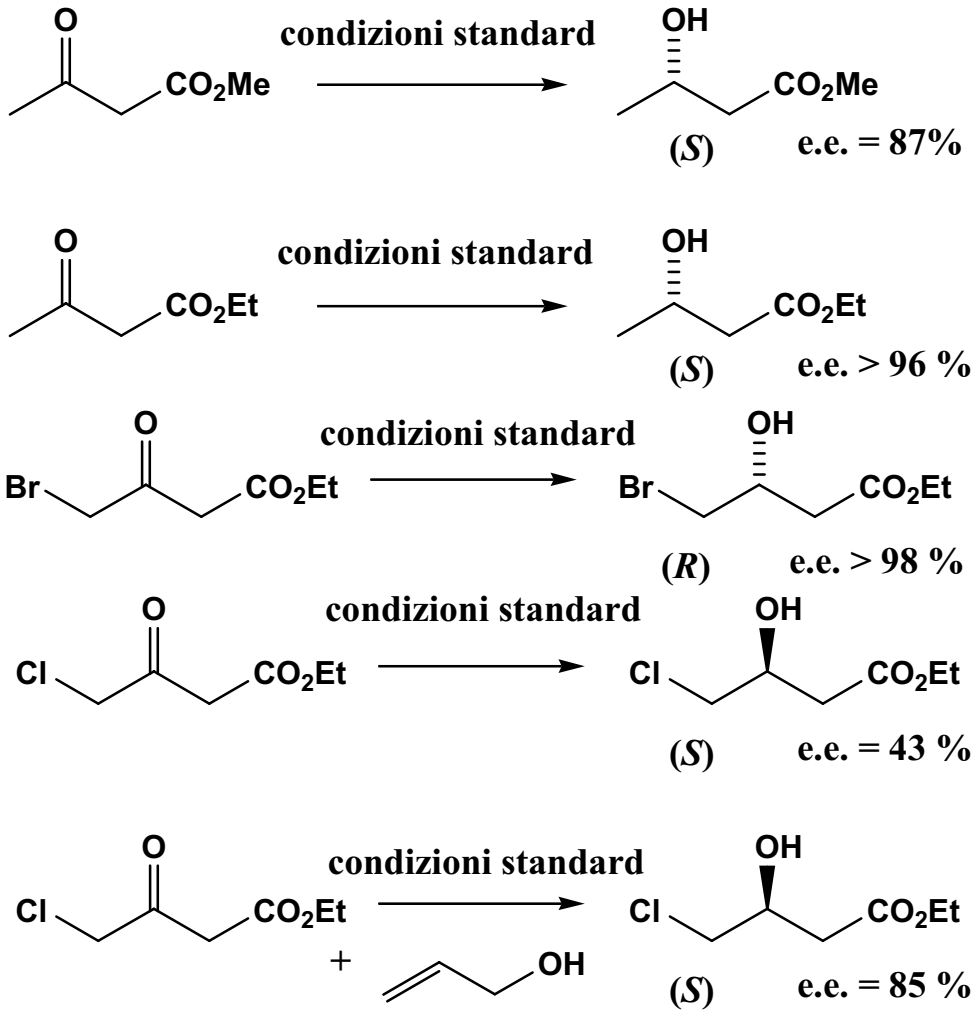
e.e. = 89%

Come si esegue in pratica la reazione:
si sospende il lievito in acqua e si aggiunge del glucosio o del saccarosio. Si agita in condizioni anaerobiche. Dopo un po' si nota riscaldamento e sviluppo di CO_2: il lievito "fermenta".
A questo punto si aggiunge il chetone, eventualmente sciolto in poco etanolo. Dopo un certo tempo (in genere da alcune ore ad alcuni giorni), si filtra su celite lavando con Et_2O. Si separano le fasi (emulsioni!). La fase organica, viene evaporata e distillata a dare il prodotto.

Vantaggi del metodo:
- **Non bisogna isolare l'enzima**
- **Non bisogna aggiungere cofattori**
- **L'unico "reattivo" da aggiungere è lo zucchero, molto economico (si possono addirittura usare melasse, cioé scarti di lavorazione dello zucchero)**
- **Il lievito è un microorganismo "facile" da usare e di basso costo.**

Svantaggi:
- **La reazione richiede volumi di solvente maggiori che le reazioni con enzimi isolati**
- **La lavorazione è un po' più difficoltosa**
- **Il prodotto è meno puro (è contaminato da altri metaboliti)**
- **La presenza di molti altri enzimi (ad es. idrolasi) porta a reazioni collaterali indesiderate**
- **Ci sono meno variabili sperimentali modificabili per ottimizzare rese ed e.e.**

Si può comunque giocare sulla struttura del substrato per migliorare gli e.e.:



Nel lievito di pane sono presenti due deidrogenasi, con selettività opposte. Variazioni strutturali del substrato possono renderlo più o meno affine ad una di queste due deidrogenasi, con conseguente aumento (o diminuzione) dell' e.e., o addirittura con inversione di configurazione.

la deidrogenasi selettiva per l'alcool L preferisce il bromo; quella selettiva per l'alcool D "preferisce" il cloro

L'alcool allilico è in grado di inibire la deidrogenasi L-selettiva, aumentando l'e.e. del prodotto D

Altri due modi per ottimizzare rese e/o e.e. sono:
- utilizzare differenti ceppi di lievito o differenti microorganismi
- modificare geneticamente il microorganismo in modo che produca una deidrogenasi particolarmente efficiente per il processo desiderato

Ma perché il lievito funge da riducente?

E cos'è una fermentazione ?

Nelle piante l'energia viene fornita dalle radiazioni solari.
Negli animali e nei microorganismi, l'energia viene fornita da processi di demolizione che prendono il nome di *respirazione* o *fermentazione*.

La *respirazione* è è il processo che porta alla produzione di energia mediante demolizione ossidativa di carboidrati (o, in misura minore, di altre sostanze), <u>in presenza di ossigeno</u>.

La *fermentazione* è il processo che porta alla produzione di energia mediante demolizione di carboidrati (o, in misura minore, di altre sostanze), <u>in assenza di ossigeno</u>.

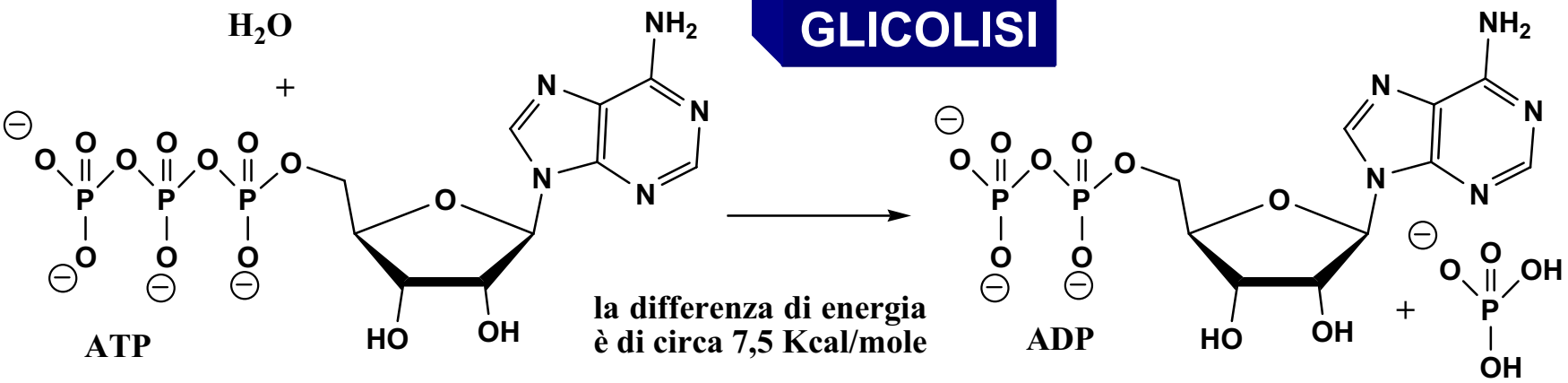
Nella respirazione, l'intervento dell'ossigeno avviene solo negli ultimi stadi. Pertanto gran parte del processo demolitivo (che nel caso degli zuccheri è detto *glicolisi*) è comune ai due processi della respirazione e della fermentazione.

Alcuni microorganismi, detti *anaerobi obbligati* possono solo utilizzare la fermentazione come fonte di energia (per loro l'ossigeno è veleno).
Altri, detti *anaerobi facoltativi* (tra cui i lieviti) possono svilupparsi sia in assenza che in presenza di ossigeno e possono quindi sfruttare sia la respirazione che la fermentazione.

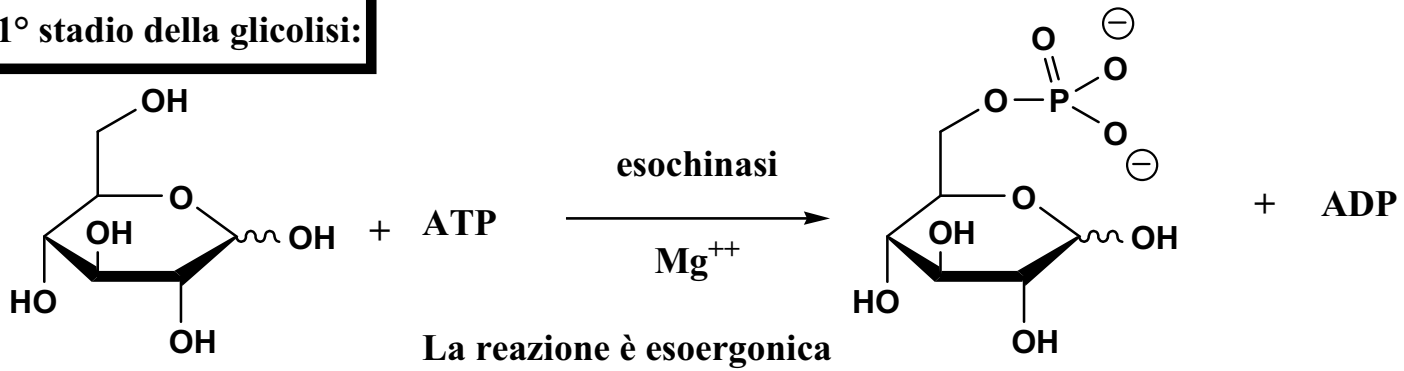
La fermentazione è molto meno efficiente (circa il 5%) della respirazione nel produrre energia. Quindi i microorganismi che possono sfruttare solo la fermentazione (gli anaerobi obbligati o gli anaerobi facoltativi se posti in condizioni anaerobiche) devono trasformare grosse quantità di materiale zuccherino. Quindi producono grosse quantità dei prodotti finali della fermentazione. Ciò li rende utili industrialmente per la produzione di "fine chemicals".

In entrambi i processi, l'energia viene in parte rilasciata come calore ed in parte immagazzinata come energia chimica nell' ATP

GLICOLISI

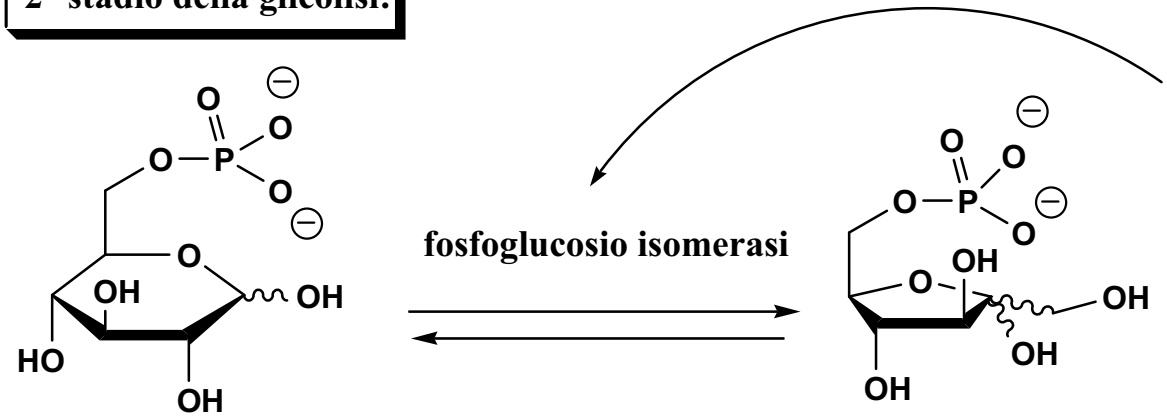


1° stadio della glicolisi:



La reazione è esoergonica

2° stadio della glicolisi:



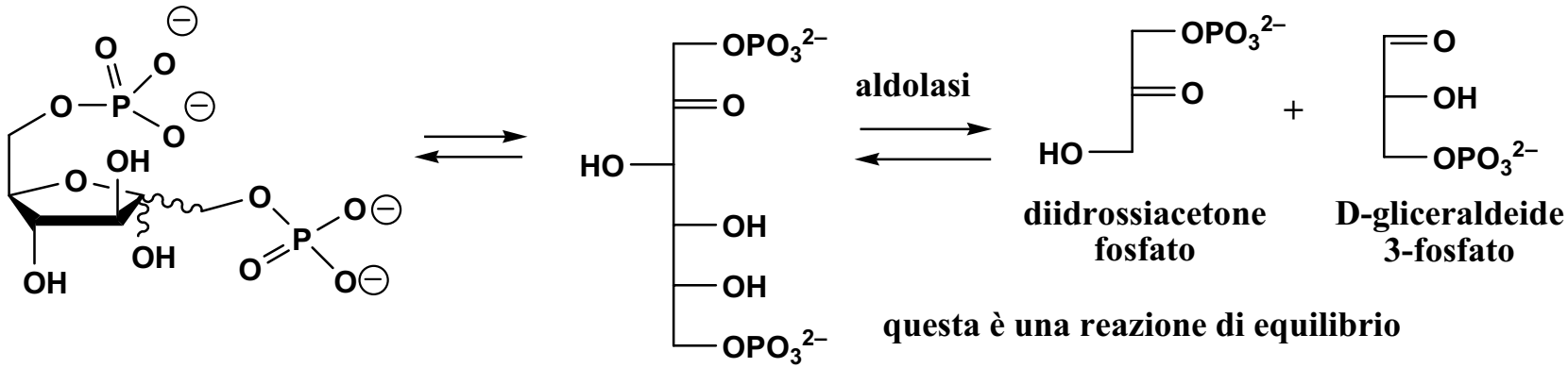
il meccanismo di questa reazione è analogo a quello della ben nota reazione di Lobry De Bruyn - Alberda van Ekenstein (danza degli zuccheri)

questa è una reazione di equilibrio

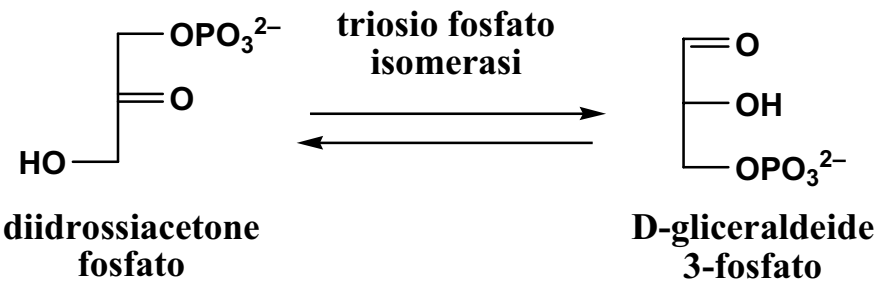
3° stadio della glicolisi:

La reazione è esoergonica
Questo è il "rate limiting step" della glicolisi

4° stadio della glicolisi:



questa è una reazione di equilibrio



questa è una reazione di equilibrio spostata a sinistra. Ma le successive reazioni, che avvengono sulla gliceraldeide, spostano l'equilibrio

Fruttosio 1,6-Difosfato Aldolasi (FDA) (E.C.4.1.2.13)

- **Questa aldolasi è uno degli enzimi più utili anche per la sintesi di legami C-C.**
- **E' una liasi (E.C.4.): a questa classe appartengono enzimi che sommano molecole a doppi legami C=C, C=O, C=N (o che danno la reazione inversa). In questo caso si tratta di un'addizione al doppio legame C=O della gliceraldeide.**
- **Il secondo numero si riferisce al tipo di legame che si forma o si rompe. In questo caso si ha formazione/rottura di un legame C–C (E.C.4.1)**

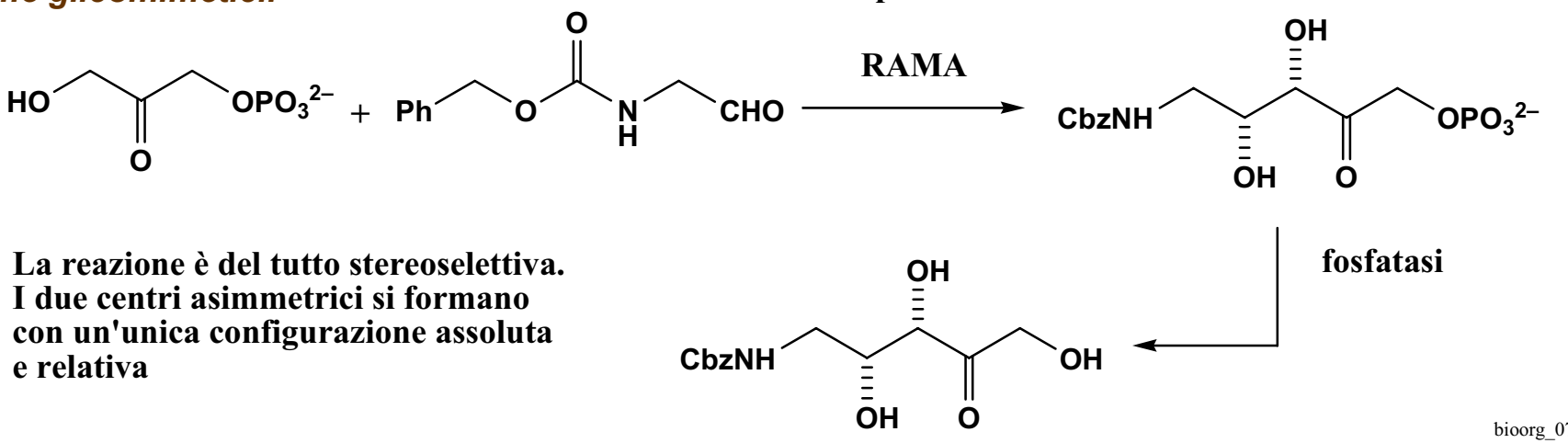
Esistono due famiglie di queste aldolasi. Negli animali e nelle piante superiori vi sono le aldolasi di tipo I, che non richiedono cofattori metallici. Nei microorganismi vi sono le aldolasi di tipo II che richiedono Zn^{++} come cofattore.

L'aldolasi più usata sinteticamente è la RAMA (rabbit muscle aldolase). Ovviamente sinteticamente viene usata per effettuare formazioni di legame C–C e non rotture di legame C–C!

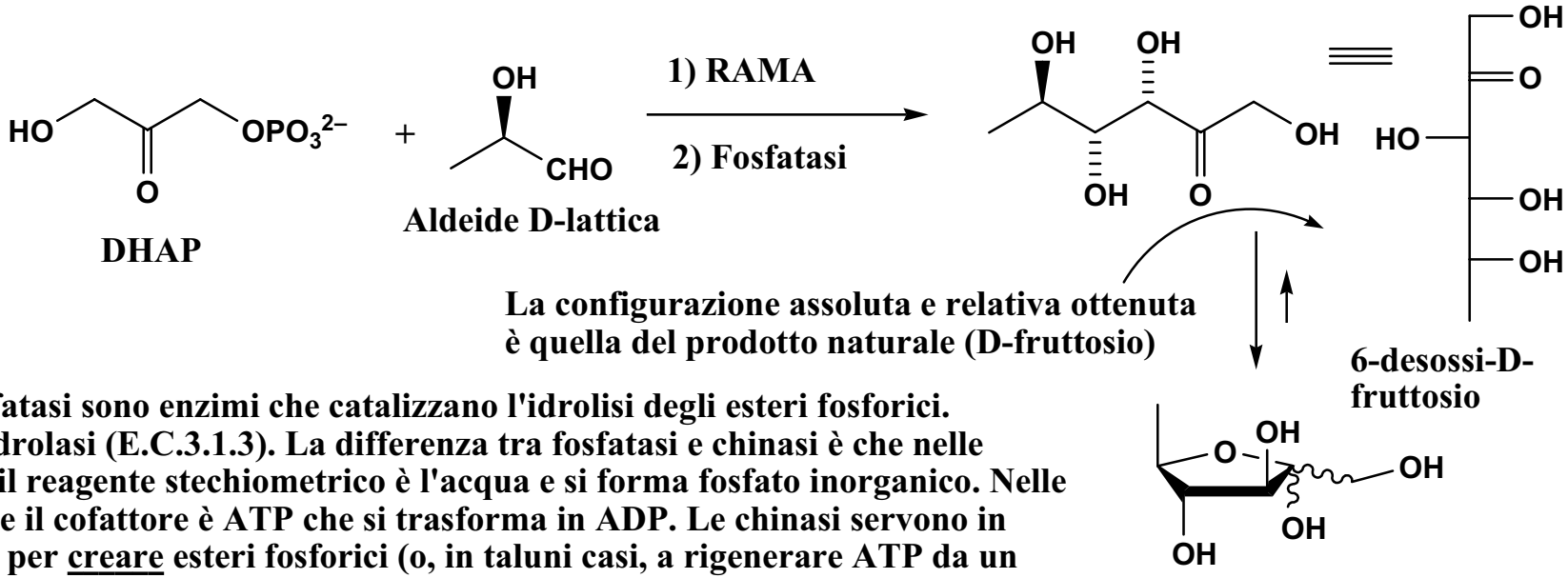
Le FDA sono del tutto specifiche per il diidrossiacetone fosfato, ma possono accettare anche aldeidi diverse dalla gliceraldeide (anche aldeidi non fosforilate). Si tratta però in genere di aldeidi alifatiche con sostituenti ossidrilati o azotati.

Questo metodo consente la sintesi di composti simili agli zuccheri, che possono trovare impiego come glicomimetici.

Ad esempio:

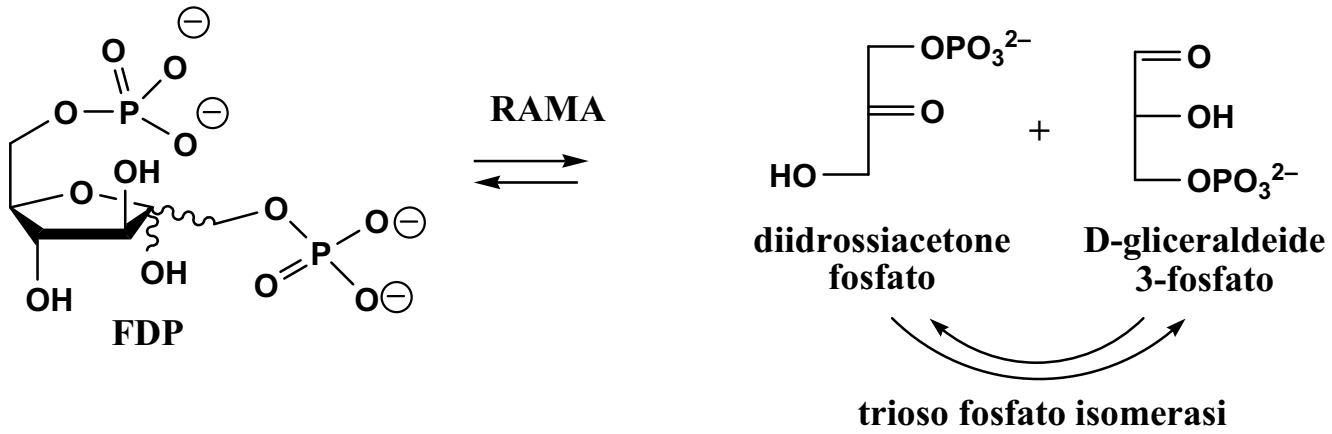


La reazione è del tutto stereoselettiva. I due centri asimmetrici si formano con un'unica configurazione assoluta e relativa

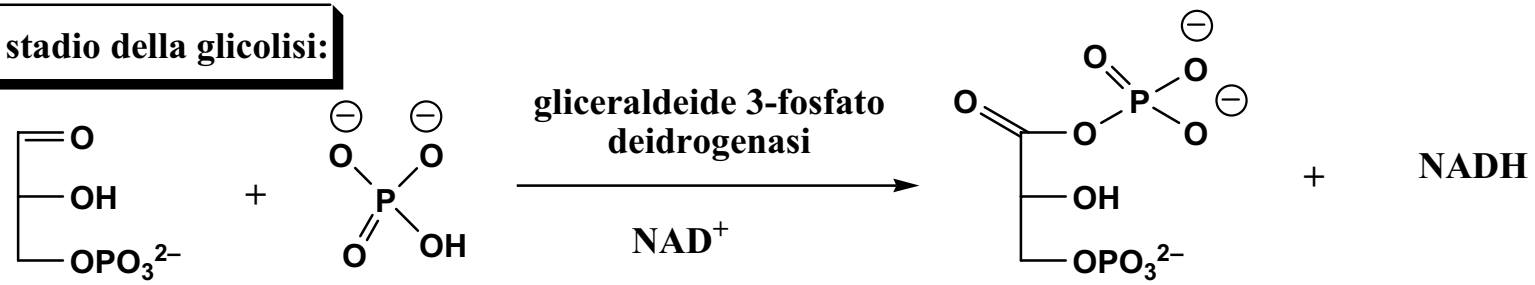


Le fosfatasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi degli esteri fosforici. Sono idrolasi (E.C.3.1.3). La differenza tra fosfatasi e chinasi è che nelle prime il reagente stechiometrico è l'acqua e si forma fosfato inorganico. Nelle seconde il cofattore è ATP che si trasforma in ADP. Le chinasi servono in genere per <u>creare</u> esteri fosforici (o, in taluni casi, a rigenerare ATP da un fosfato e ADP). Le fosfatasi per <u>idrolizzarli</u>.
Le fosfatasi sono di due tipi: acide e alcaline, a seconda del pH ottimale di utilizzo

il DHAP è molto costoso e poco stabile. al contrario il fruttosio difosfato è commercialmente disponibile ad un prezzo ragionevole. Pertanto si usa un eccesso di FDP (per spostare l'equilibrio) in presenza di trioso fosfato isomerasi



5° stadio della glicolisi:

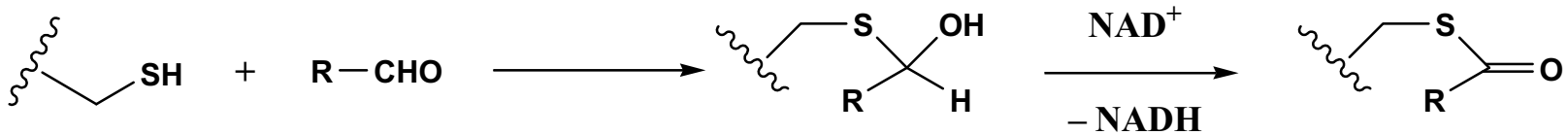


D-gliceraldeide 3-fosfato **Pi**

La reazione è irreversibile

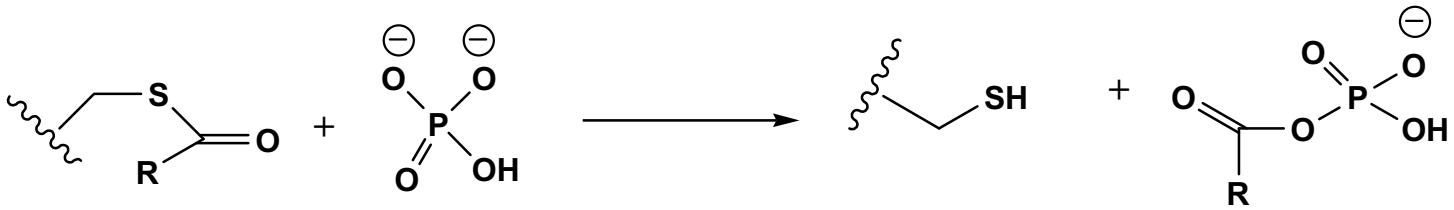
Questo è per certi versi lo stadio più importante. Infatti l'ossidazione è tanto favorita termodinamicamente che non solo è endoergonica, ma permette l'immagazzinamento di energia mediante formazione di un'anidride mista fosforica.

Questa è una aldeide deidrogenasi (E.C.1.2). Il meccanismo di reazione è analogo a quello delle alcool deidrogenasi, ma la reazione di ossidazione avviene a livello di un emitioacetale:



residuo cisteinico dell'enzima

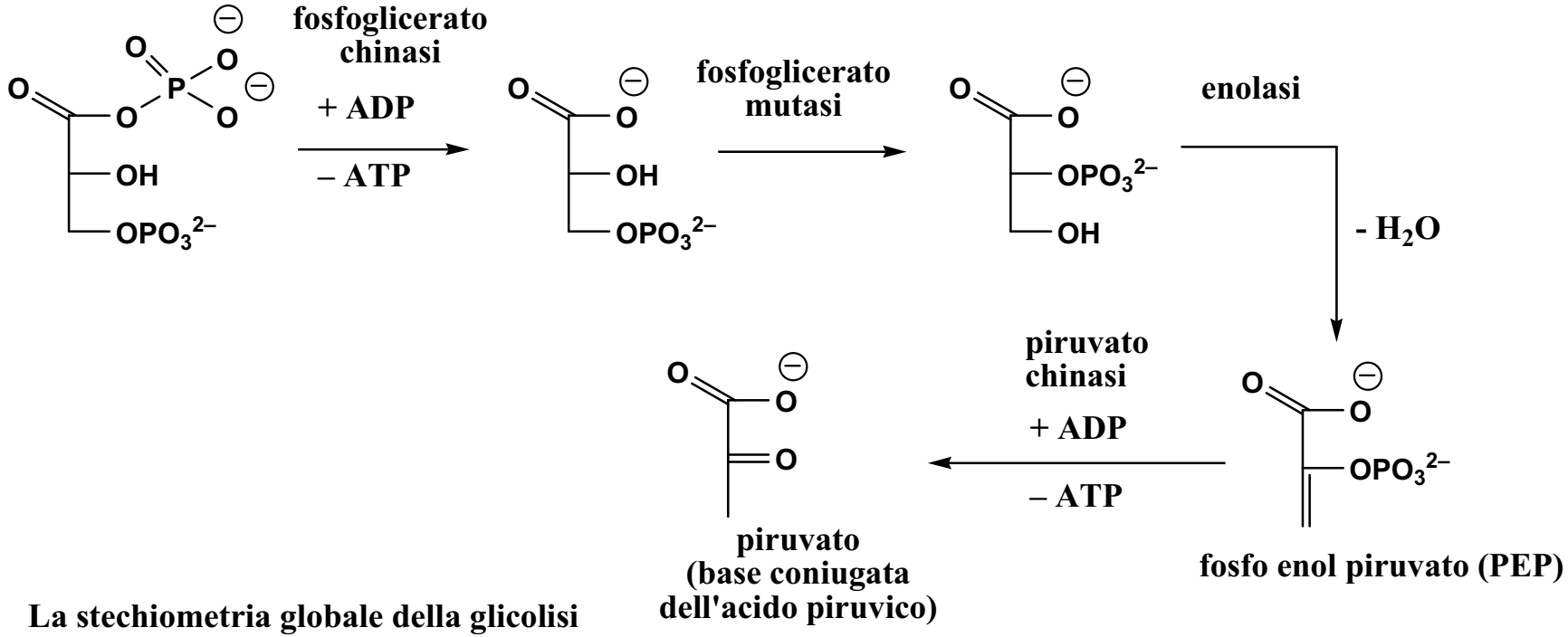
l'ossidazione fornisce un tioestere. I tioesteri sono esteri <u>attivati</u>



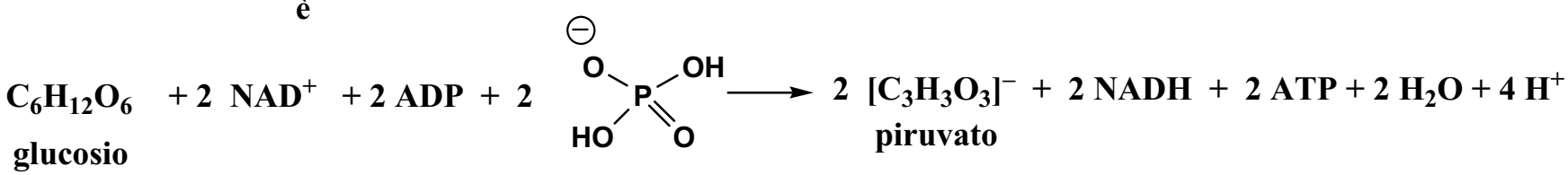
Il tioestere, essendo attivato, subisce sostituzione nucleofila acilica dal fosfato

Stadi finali della glicolisi:

Avviene una serie di isomerizzazioni /transfer di gruppi fosfato che porta alla produzione di due molecole di ATP per ogni gliceraldeide (quindi 4 ATP per ogni glucosio)



La stechiometria globale della glicolisi è



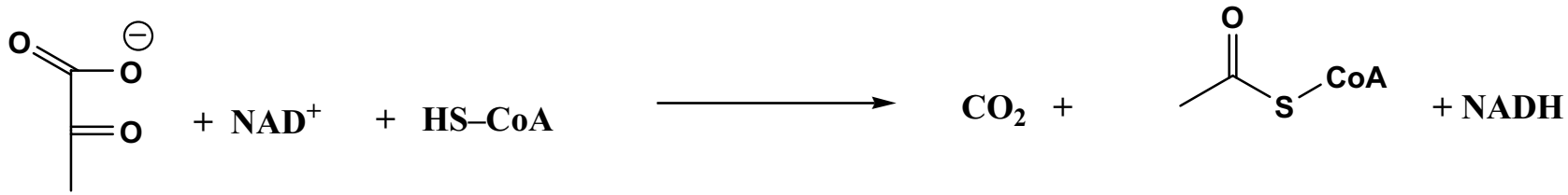
La glicolisi produce quindi 2 moli di ATP per mole di glucosio, ma consuma 2 moli di NAD^+, che deve essere in qualche modo rigenerato.

Rigenerazione di NAD^+ in organismi aerobici

Tramite una catena di reazioni [che include anche derivati flavinici (FMN), chinoni e citocromi (che contengono anelli porfirinici e ioni ferrosi/ferrici) come "trasportatori di elettroni"], il NADH viene in ultima analisi ossidato dall'ossigeno atmosferico. Questo processo produce energia (3 ATP per ogni NADH):

$$2\ NADH + O_2 \longrightarrow 2\ NAD^+ + 6\ ATP$$

In aggiunta a ciò il piruvato viene ulteriormente ossidato a acetil-CoA e CO_2.

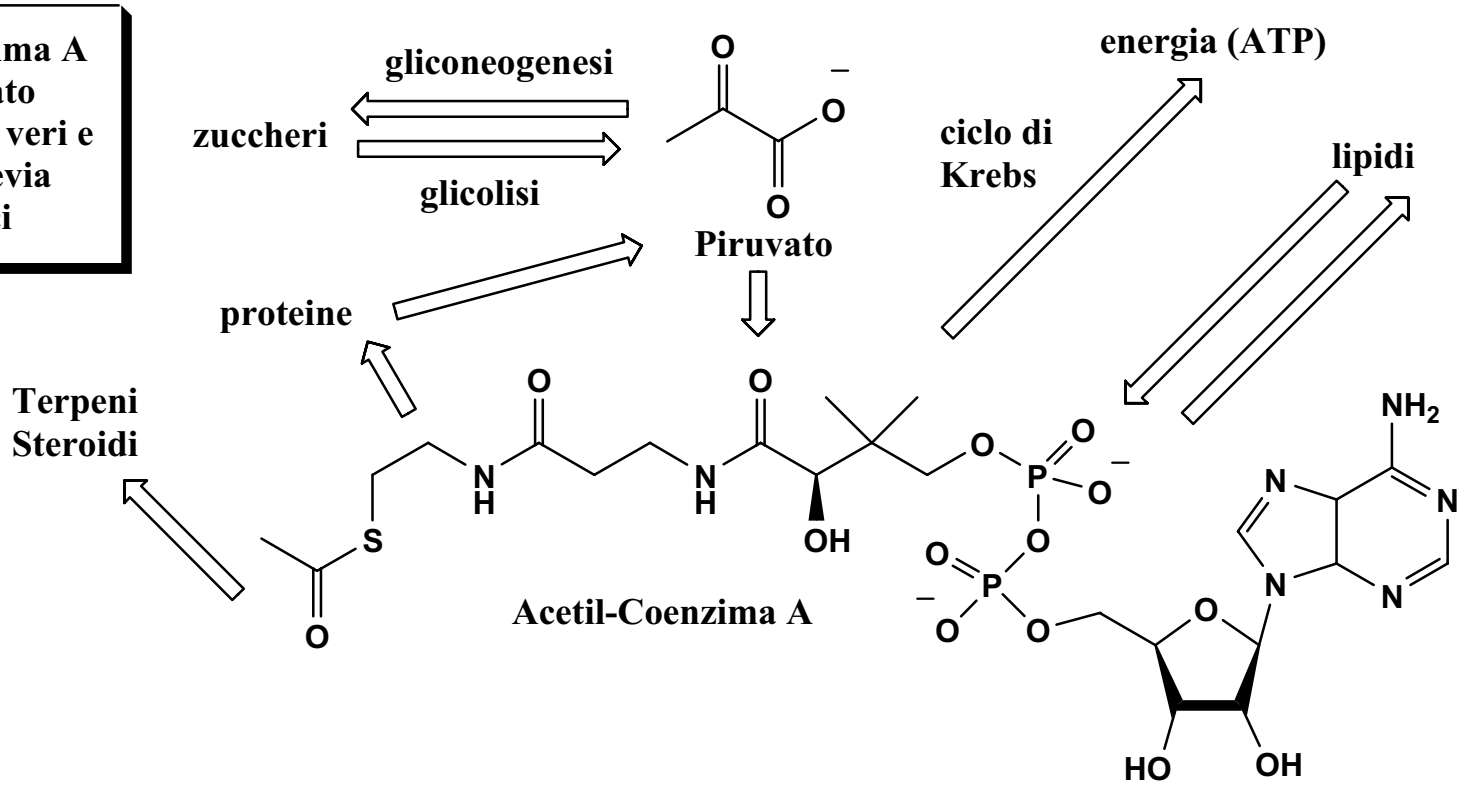


Acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs, ossidandosi a CO_2 e producendo altro NADH, $FADH_2$ e ATP. IL $FADH_2$ viene riossidato da O_2 producendo energia sufficiente a produrre 2 ATP per molecola di $FADH_2$

In totale, da una molecola di glucosio, si producono ben 38 molecole di ATP!

	ATP	NADH	$FADH_2$	ATP da NADH/$FADH_2$	ATP tot
Glicolisi	2	2	0	6	8
Piruvato → AcetilCoA	0	2	0	6	6
ciclo di Krebs	2	6	2	22	24
Totale	4	10	2	34	38

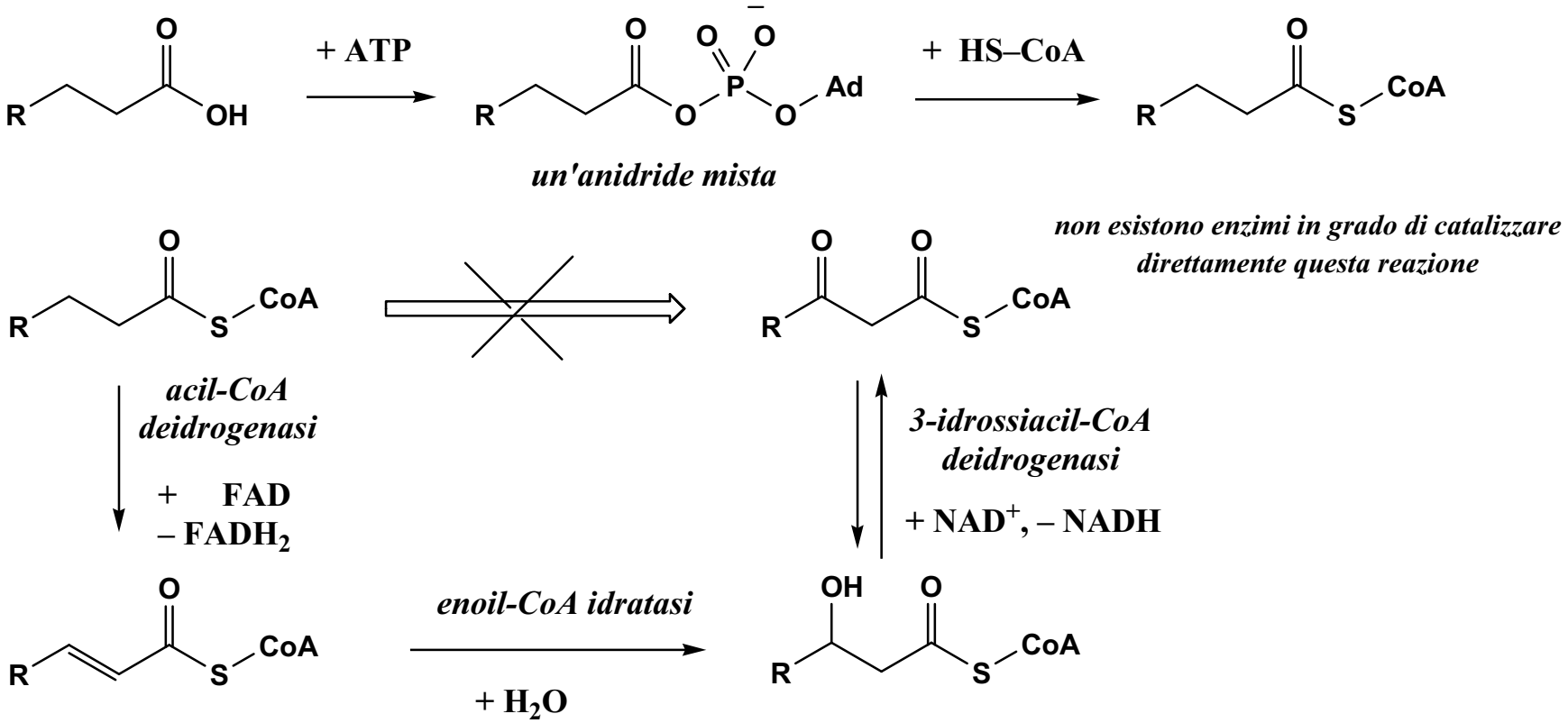
L'acetil-coenzima A ed il piruvato rappresentano veri e propri crocevia metabolici



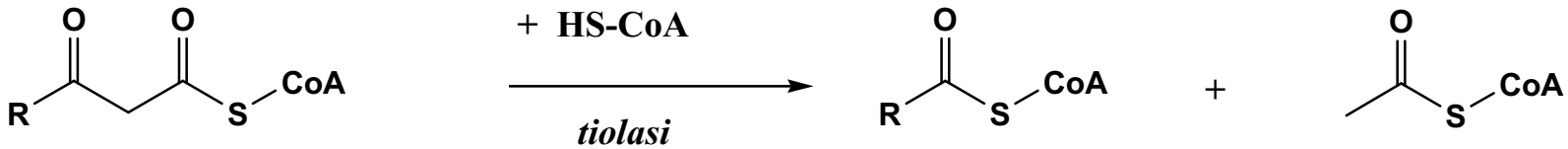
- Il glucosio è la fonte primaria di energia. Viene immagazzinato come glicogeno e degradato mediante la glicolisi ad acetil-CoA
- Se c'è più glucosio del necessario, l'acetil-CoA viene trasformato in lipidi, che sono una forma di immagazzinamento più efficiente e più a lungo termine del glicogeno
- Se c'è carenza di glucosio, l'acetil-CoA è prodotto dalle scorte lipidiche. Esso è quindi usato per produrre energia
- I lipidi non sono invece convertiti in glucosio. La gliconeogenesi, che è in un certo senso l'inverso della glicolisi, anche se segue un cammino sintetico leggermente differente, parte da acido piruvico, prodotto per degradazione delle proteine.
- Normalmente le proteine vengono metabolizzate ed usate per produrre altre proteine. In assenza di meglio possono essere anch'esse degradata ad acido piruvico
- Alcuni amminoacidi non essenziali possono essere prodotti a partire da acetil-CoA attraverso il 2-chetoglutarato (ciclo di Krebs) e l'amminazione riduttiva

DEGRADAZIONE DEI LIPIDI: β-OSSIDAZIONE

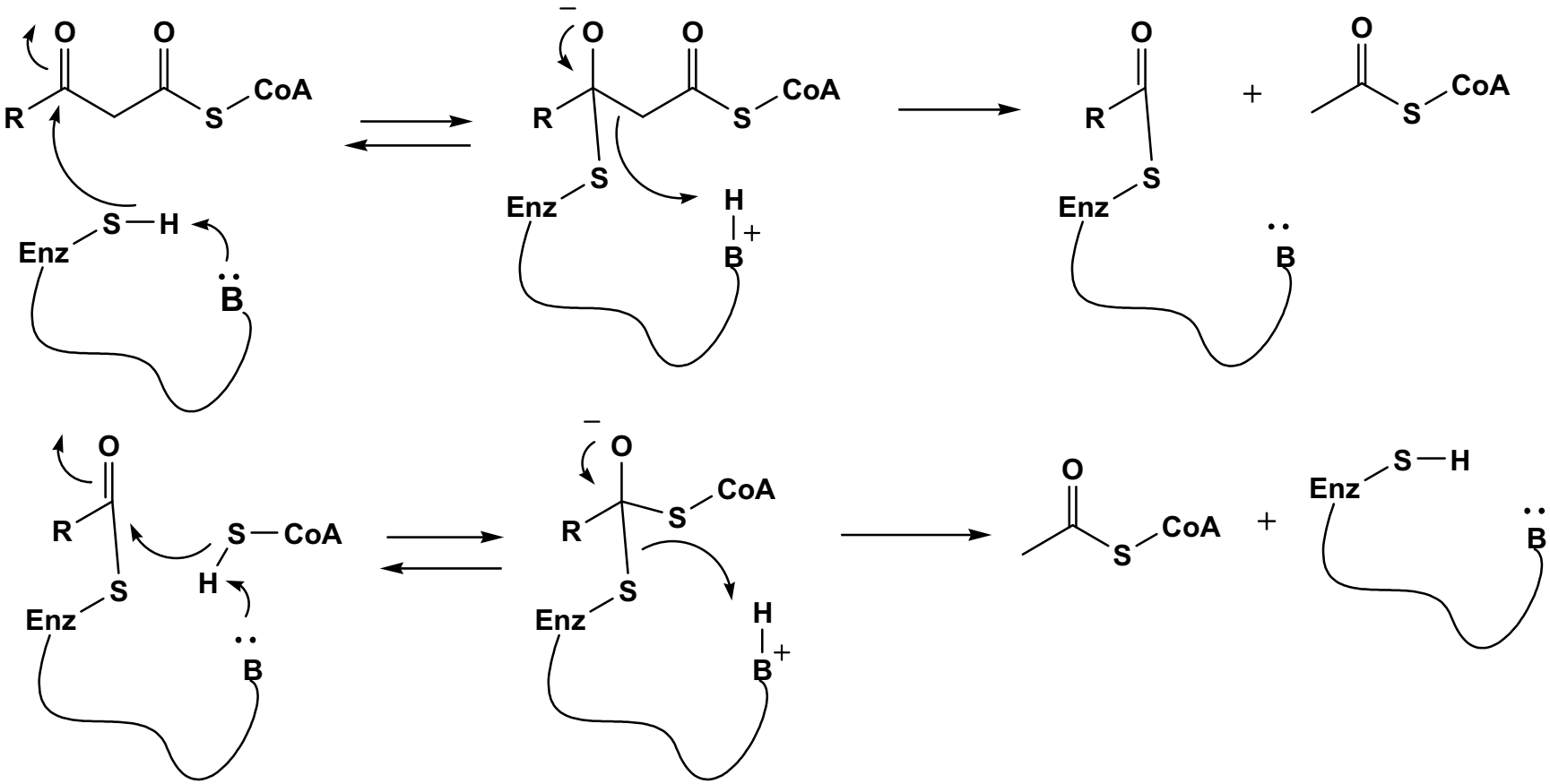
I trigliceridi sono prima idrolizzati ad acidi grassi dalle lipasi e quindi trasformati nei corrispondenti tioesteri, mediante una reazione che consuma ATP



Il passaggio chiave della degradazione è quindi una reazione di retro-Claisen:

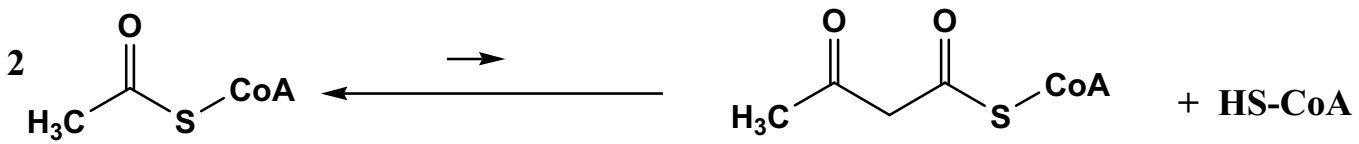


La tiolasi agisce tramite un residuo cisteinico, che partecipa alla reazione



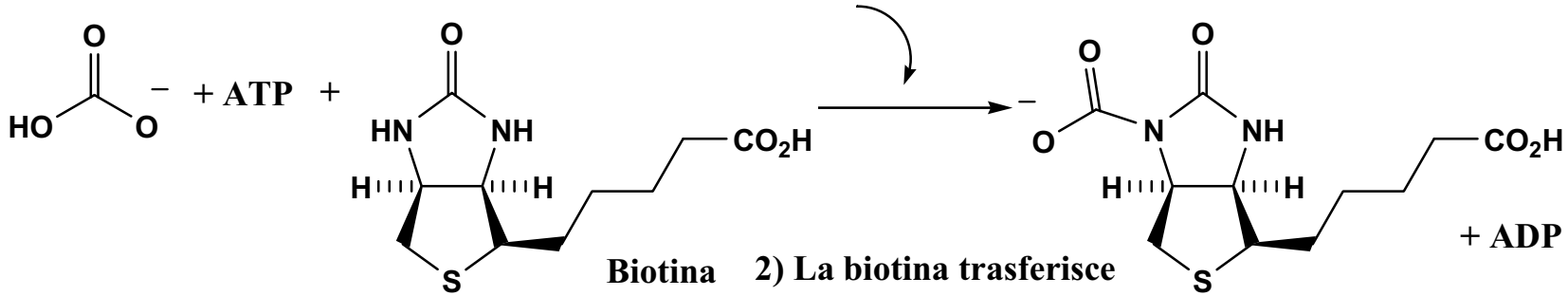
LIPIGENESI

Il processo inverso (la sintesi di acidi grassi da acetil-CoA) è detto lipigenesi. Nella lipigenesi l'acetoacetil-CoA è un intermedio, ma.....
Esso non può essere semplicemente preparato tramite la reazione di Claisen inversa a quella qui mostrata (equilibrio sfavorevole)

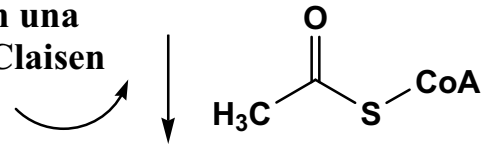


Questo processo sarebbe endoergonico. E' necessario fornire energia chimica e, ovviamente, il meccanismo deve essere diverso. E' in effetti un meccanismo a stadi

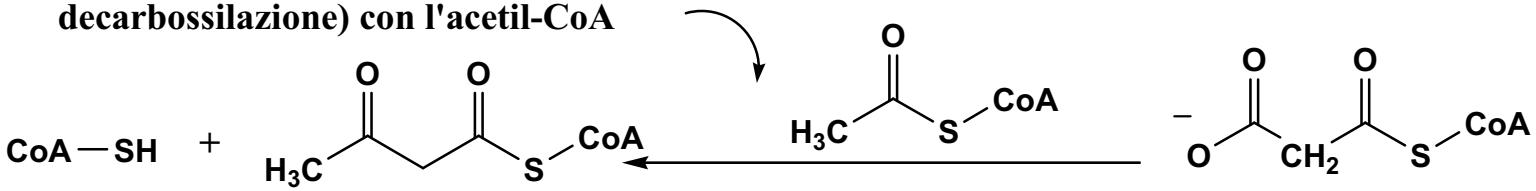
1) Il bicarbonato viene trasformato in un agente carbossilante reattivo



2) La biotina trasferisce CO_2 all'acetil-CoA in una sorta di reazione di Claisen



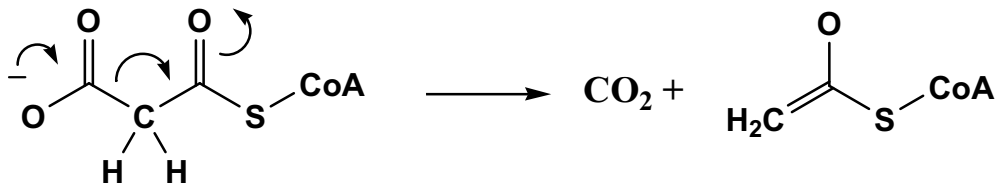
3) Il malonil-CoA dà una reazione di Claisen (con simultanea decarbossilazione) con l'acetil-CoA



malonil-CoA

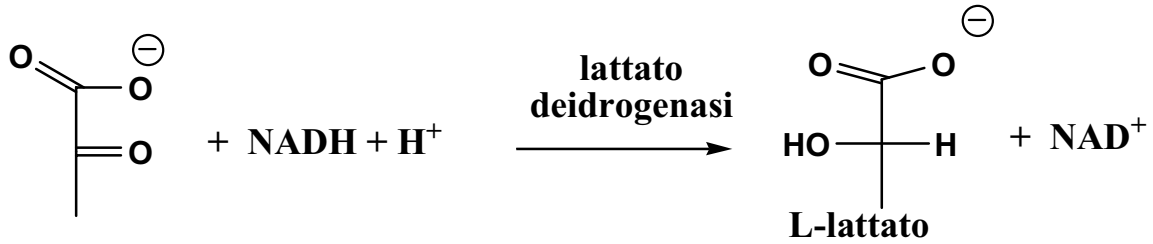
I primi 2 stadi sono catalizzati dallo stesso enzima, l'acetil-CoA carbossilasi. Il terzo è catalizzato da un altro enzima. Nei mammiferi è detto "acidi grassi sintasi": è un polienzima che catalizza anche l'inverso della beta-ossidazione

La "driving force" è la decarbossilazione spontanea

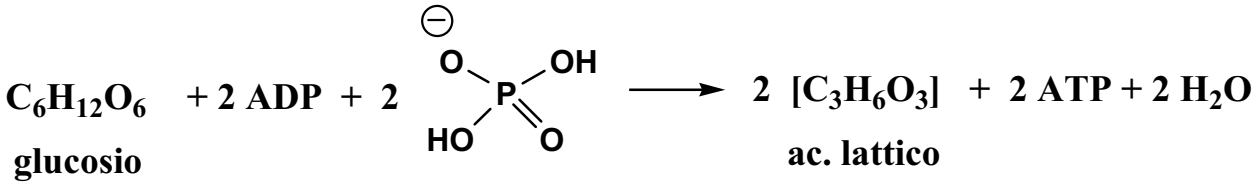


Rigenerazione di NAD^+ in organismi anaerobici

In questo caso non c'è ossigeno. Quindi non si può impiegarlo per rigenerare il NAD^+. La cellula deve trovare un sistema alternativo. Per esempio la *fermentazione lattica*, che avviene nei muscoli in carenza di ossigeno, o in alcuni microorganismi (*Lactobacillus bulgaricus*)

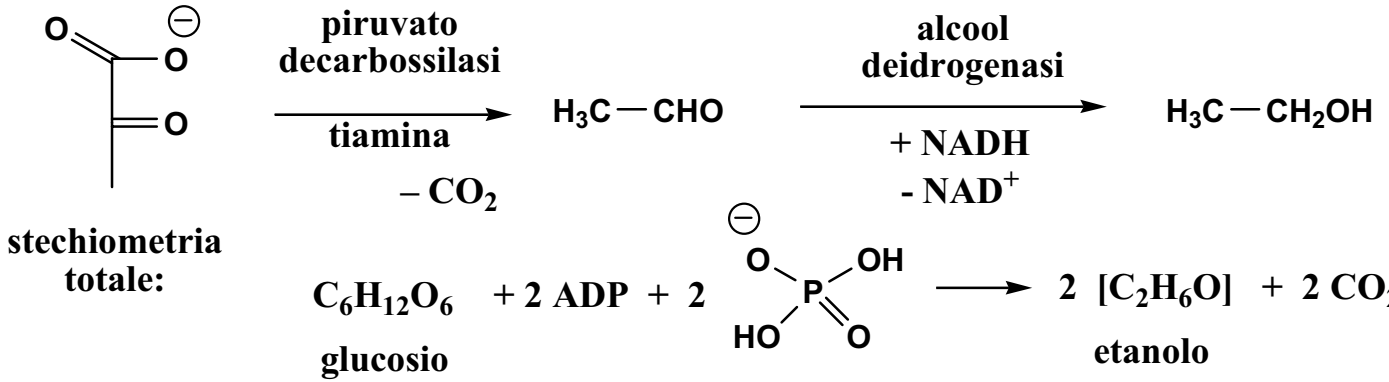


Quindi il NADH che, negli organismi aerobi, è una ricca fonte di ATP, viene ritrasformato in NAD^+ senza produzione di ATP. La stechiometria finale è:

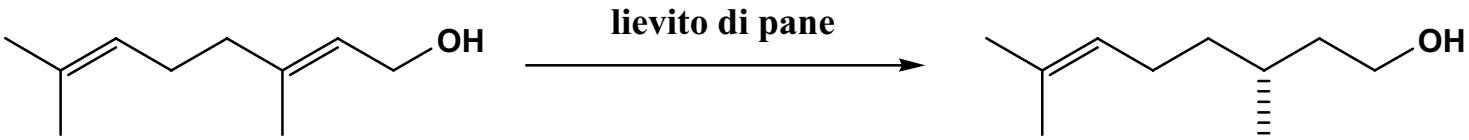


Il bilancio totale è quindi di soli 2 ATP da 1 glucosio (il 5.3% dell'ATP prodotto in aerobiosi)

Oppure la *fermentazione alcolica*:



oltre che per la riduzione di chetoni, i lieviti sono utili anche nella riduzione di doppi legami C=C. Anche in questo caso l'utilità, rispetto a metodi "chimici" (idrogenazione catalitica) risiede nella selettività:

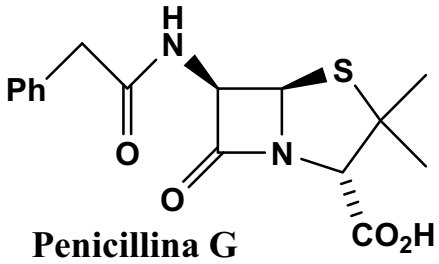


geraniolo **(*R*)- citronellolo**

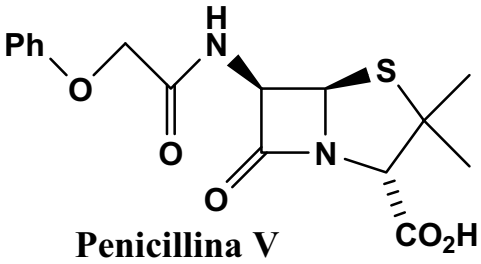
la reazione è regio- ed enantioselettiva!

Oltre ai prodotti più comuni della fermentazione (ac. lattico, etanolo, ac. acetico, ac. citrico), molti microorganismi producono prodotti, anche complessi, specifici per una data specie.

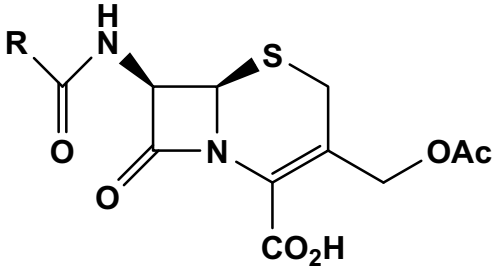
Molte sostanze naturali sono state isolate da colture di microorganismi, identificate e sottoposte a test di attività biologica. Questo è stato in passato uno dei metodi più importanti per trovare nuovi farmaci ed è tuttora un metodo di grande utilità.
Una volta accertata l'utilità pratica di una certa sostanza, la sua produzione per via microbiologica è spesso la via più efficiente da un punto di vista economico. In particolare molti antibiotici sono prodotti per fermentazione:



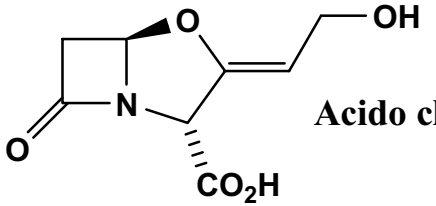
Penicillina G



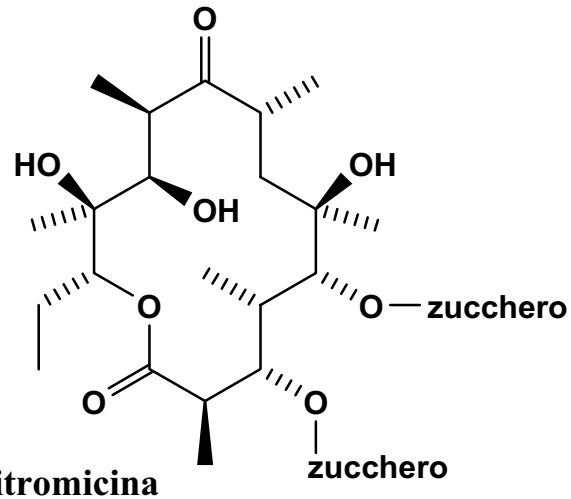
Penicillina V



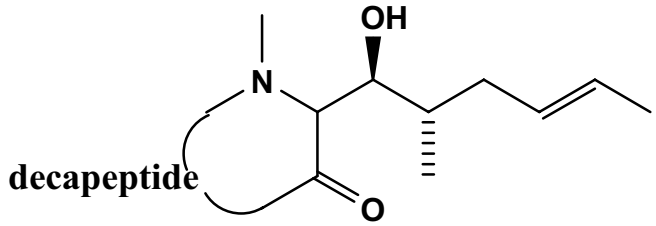
Cefalosporine



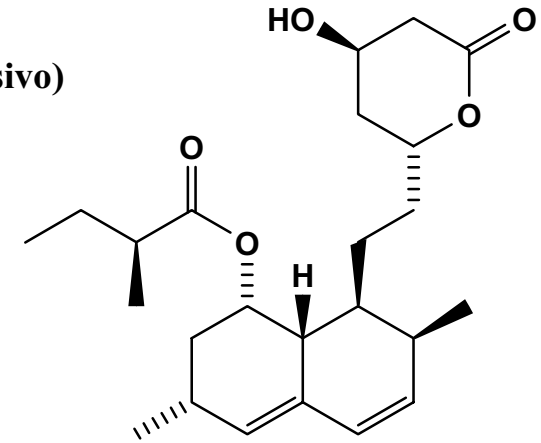
Acido clavulanico



Eritromicina
(antibiotico macrolidico)



Ciclosporina
(agente immunosoppressivo)

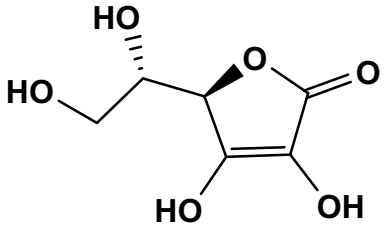


Lovastatina (mevinolina)
(inibitore HMGCoA reduttasi)
(anti iper-colesterolemia)

Tutte sostanze di grande interesse farmaceutico, prodotte in grossa quantità per fermentazione

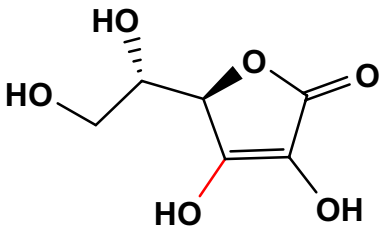
Ma i microorganismi vengono usati anche per realizzare reazioni di ossidazione selettiva. Ovviamente non saranno microorganismi anaeriobici!

Vediamo un esempio storico. Il *Gluconobacter suboxidans*, in condizioni aerobiche (addirittura con aria arricchita in ossigeno e sotto 2-3 atm di pressione), ossida selettivamente alcoli secondari a chetoni. Questo microorganismo è stato impiegato, già nel 1934 in una brillante sintesi industriale dell'acido ascorbico (vitamina C).

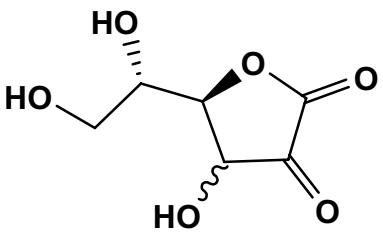


acido L-ascorbico

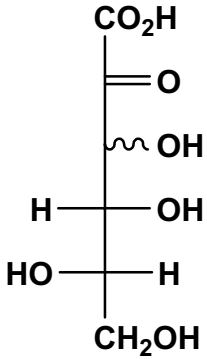
Esaminiamo un po' la struttura dell'acido ascorbico:



è la forma enolica di

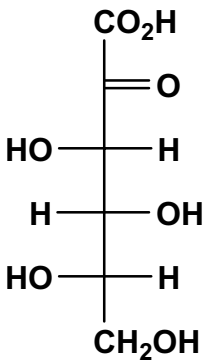


che è la forma ciclica di

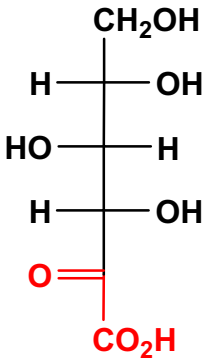


un acido uronico della serie L

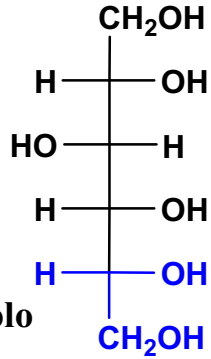
Gli zuccheri della serie L non sono accessibili a basso prezzo in natura.
Il trucco è allora quello di usare uno zucchero della serie D ed invertire gli estremi. Ad esempio:



≡

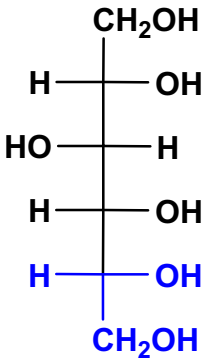


questo può in linea di principio derivare da ossidazione del D-glucitolo, prodotto di basso costo (da riduzione del D-glucosio con H_2/catalizzatori)

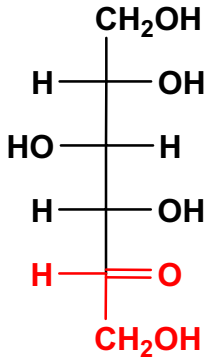


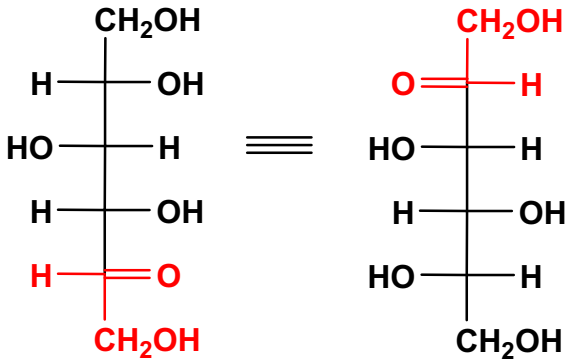
D-glucitolo

Il problema era: come ossidare selettivamente i carboni 5 e 6? Il problema è stato risolto combinando un'ossidazione microbiologica con un'ossidazione chimica



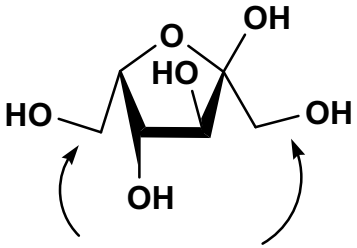
Acetobacter suboxidans →





L-Sorbosio

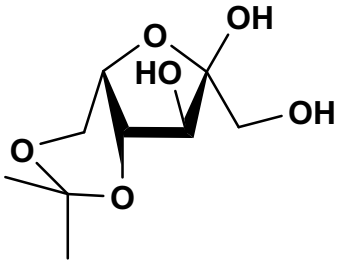
anomero favorito



ho due alcoli primari difficili da distinguere direttamente

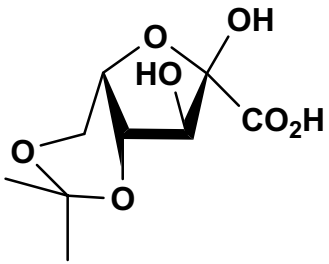
acetone

H^+



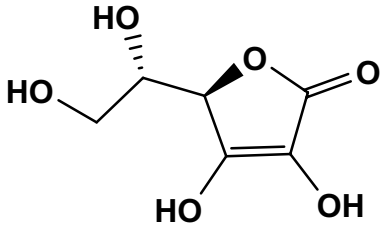
per motivi sterici solo uno dei due alcoli primari può formare l'acetale

$KMnO_4$, oppure O_2, Pd, NaOH



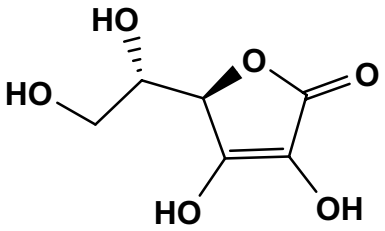
MeOH

H^+

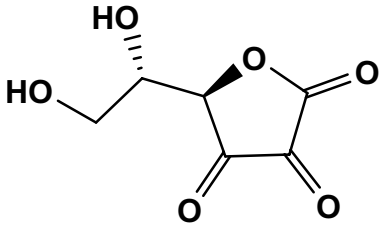


La resa dei vari passaggi è tra l' 85% ed il 95% !!

L'acido ascorbico è un antiossidante. E' in grado di catturare radicali ed ossidarsi



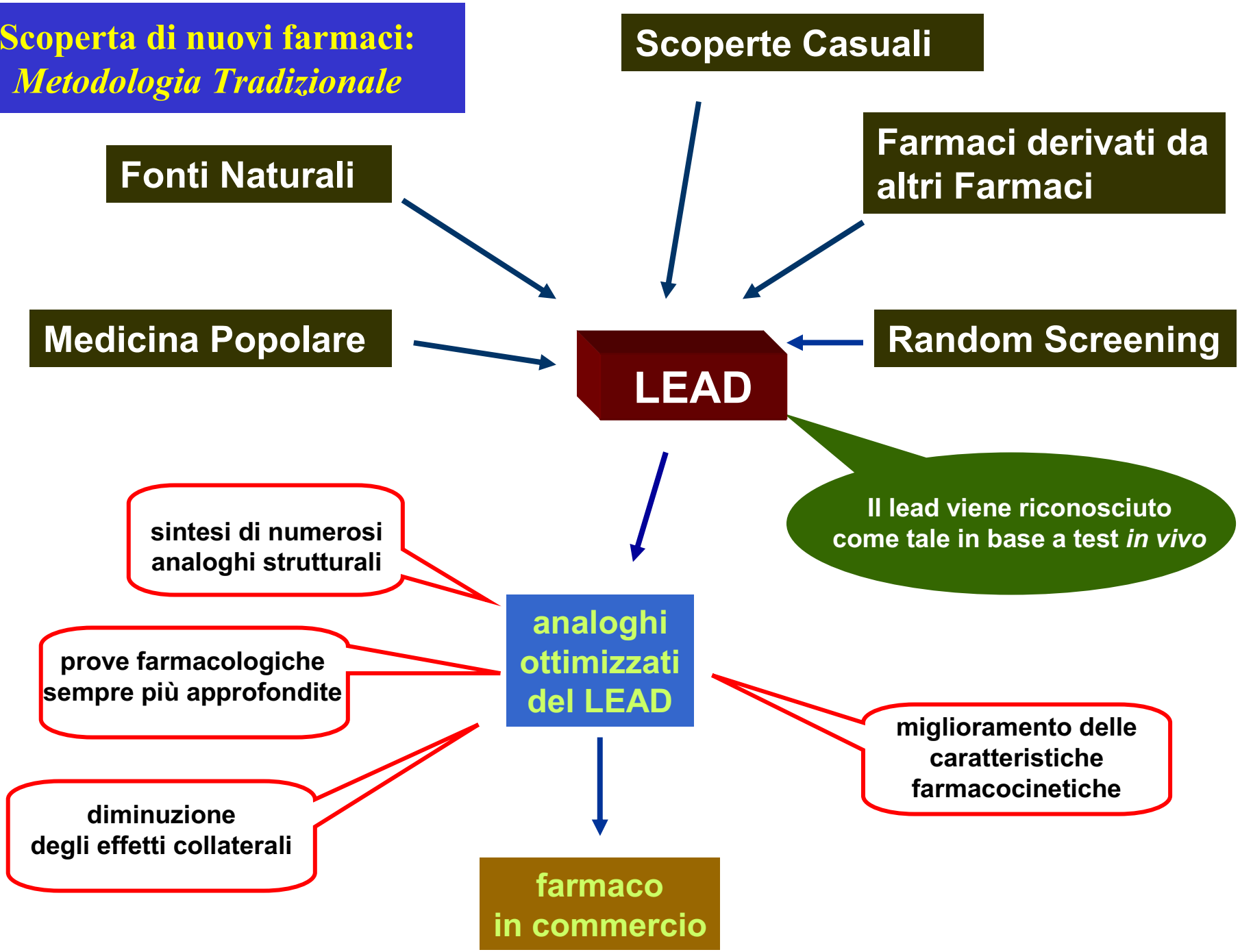
[ox]



ac. deidroascorbico

(non è un acido!)

Scoperta di nuovi farmaci: *Metodologia Tradizionale*



Farmaci che derivano da prodotti naturali

Rappresentano ancora oggi una larga fetta delle medicine in uso corrente.

- **Inizialmente si partiva principalmente dalle tradizioni della medicina popolare, isolando i principi attivi specialmente da erbe officinali.**
- **In seguito la ricerca di sostanze naturali di possibile attività farmacologica, ha seguito strade dettate da ragionamenti più razionali.**

  ***Ad esempio*: I batteri patogeni non sopravvivono a lungo nel terreno. Come mai? Evidentemente sono distrutti da altri batteri che popolano il terreno. Eseguendo un approfondito esame dei metaboliti secondari prodotti da batteri di vari terreni sono stati trovati importanti antibiotici come il Cloramfenicolo, la Streptomicina, l'Eritromicina e le Tetracicline.**

  ***Ad esempio:* i veleni naturali agiscono provocando effetti su determinati processi biologici. Usati in piccoli dosaggi possono produrre effetti positivi. Così, ad esempio, studiando il veleno delle rane sono stati trovati potenti antidolorifici.**

- **Infine, più recentemente, vengono eseguiti dei test preliminari a tappeto (random screening) su ogni nuova sostanza naturale isolata. L'enorme biodiversità del mondo non è ancora stata esplorata del tutto. Nuovi organismi (specialmente microorganismi) vengono continuamente trovati nelle profondità del mare, in giungle inesplorate, in grotte e vulcani etc.**

Farmaci che derivano da "random screening"

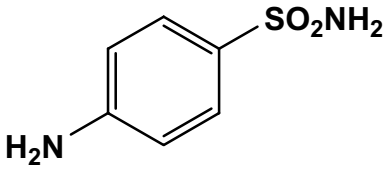
- **Oltre che sulle nuove sostanze naturali, il "random screening" viene applicato anche a sostanze non naturali preparate in laboratorio, anche in ricerche non finalizzate a questo scopo.**

  ***Un esempio classico* è rappresentato dalla scoperta dei sulfammidici (1931, Gerhard Domagk), che deriva da uno screening di coloranti azoici per saggiarne l'attività antibatterica.**

Scoperte casuali

- **L'esempio senz'altro più famoso è la scoperta della Penicillina**

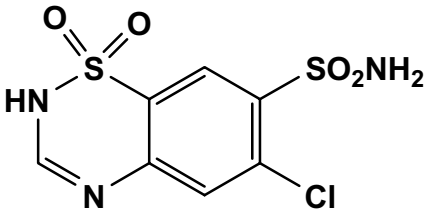
Farmaci che derivano da altri farmaci



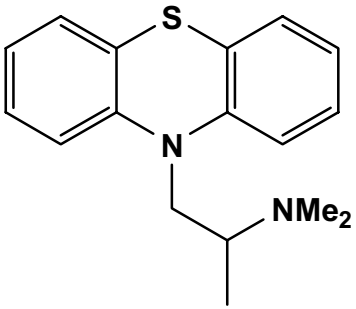
Solfanilammide (un solfammidico)

I solfammidici sono dei farmaci antibatterici molto usati prima dell'avvento dei beta-lattamici. Venne osservato che il trattamento con la Solfanilammide provocava diuresi nei pazienti

I chimici della Sharp & Dohme sintetizzarono allora molti derivati della solfanilammide, fino a trovare la Clorotiazide, il LEAD di un'ampia famiglia di tiazidi usati come farmaci diuretici.

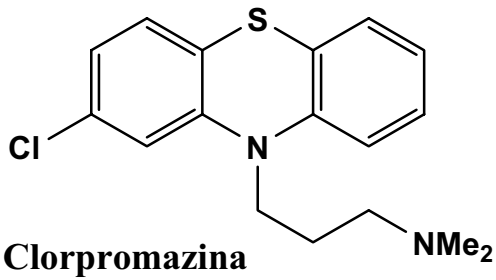


Clorotiazide



Prometazina

Negli anni '40, gli antiistaminici, tra cui la Prometazina, venivano studiati in pazienti operati per prevenire lo shock anafilattico chirurgico. Un medico della Marina Francese notò però che i pazienti erano particolarmente tranquilli!



Clorpromazina

Da questa osservazione derivò uno studio su analoghi che portò in breve (1952) a trovare la Clorpromazina, un vero LEAD nel campo dei tranquillanti, che ha rivoluzionato il trattamento clinico della schizofrenia.

TEST PRELIMINARI PER RICONOSCERE L'EFFICACIA DI UN FARMACO

Possiamo grossolanamente dividere i farmaci in due grosse categorie:

- **Farmaci antibiotici (anti-microbici, anti-protozoi, antifungini, antivirali, antitumorali etc.)**
- **Farmaci contro le malattie metaboliche**

Nel primo caso la funzione del farmaco è quella di "uccidere" l'organismo patogeno, risparmiando l'ospite. In pratica il farmaco è un veleno selettivo. I test preliminari possono essere facilmente fatti sul microorganismo stesso (o sulla linea cellulare nel caso di tumori).

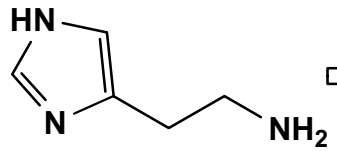
Nel secondo caso dobbiamo in qualche modo controllare/alterare un certo metabolismo. I test preliminari venivano tipicamente condotti su animali di laboratorio in cui la malattia veniva in qualche modo indotta.

In entrambi i casi, le tecniche "tradizionali" permettevano di conoscere l'effetto macroscopico del farmaco, ma non il suo meccanismo d'azione a livello molecolare.

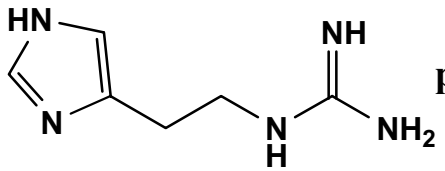
OTTIMIZZAZIONE DEL LEAD

Una volta trovato un buon LEAD, le case farmaceutiche sintetizzavano tantissime sostanze correlate strutturalmente ad esso allo scopo di:

- **Trovare nuovi analoghi dotati di prestazioni migliori**
- **Trovare analoghi con prestazioni paragonabili al LEAD, in modo da poter entrare nel mercato in concorrenza con l'azienda detentrice del brevetto sul LEAD.** ***Questi farmaci vengono solitamente detti "Me-Too". Anche se le proprietà sembrano all'inizio simili, può darsi che il farmaco "Me-Too" finisca per soppiantare il LEAD, se nell'uso clinico su larga scala si rivela migliore.***



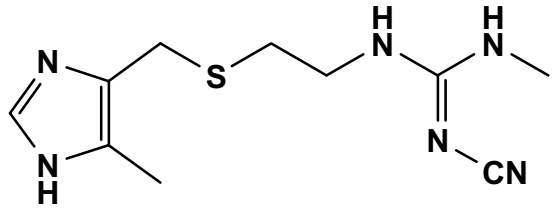
Istamina



Guanil Istamina

LEAD

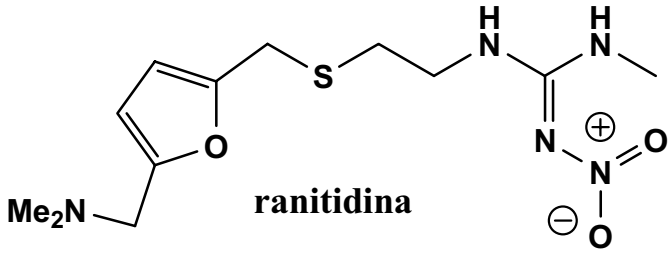
miglioramento delle prestazioni



Cimetidina (Tagamet)

PRIMO FARMACO

Farmaco "Me-Too"

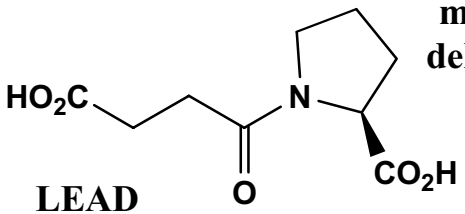


ranitidina

FARMACO PIU' IN USO ORA

Evoluzione dei farmaci anti-ulcera basati sull'antagonismo del recettore H-2

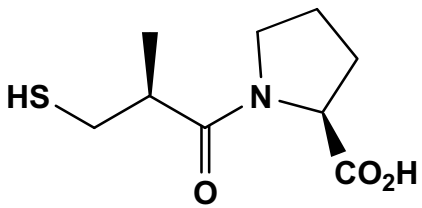
Evoluzione dei farmaci anti-ipertensivi basati sull'inibizione dell'ACE



LEAD

IC_{50} = 630 μM

enorme miglioramento delle prestazioni

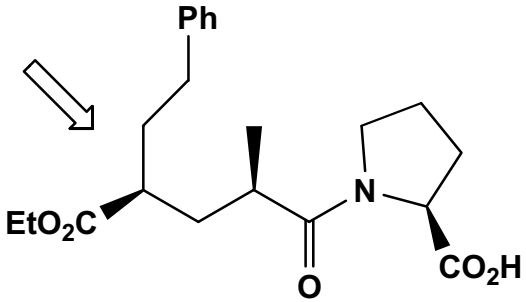


Captopril

IC_{50} = 23 nM

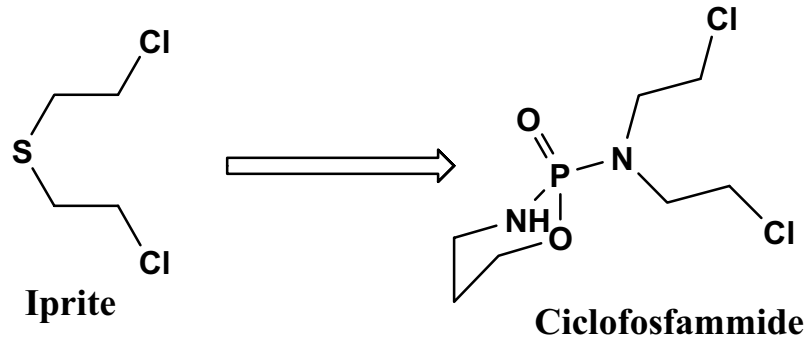
Primo farmaco di questo tipo

Farmaco "Me-Too"



Enalapril

FARMACO PIU' IN USO ORA



Iprite

(LEAD)

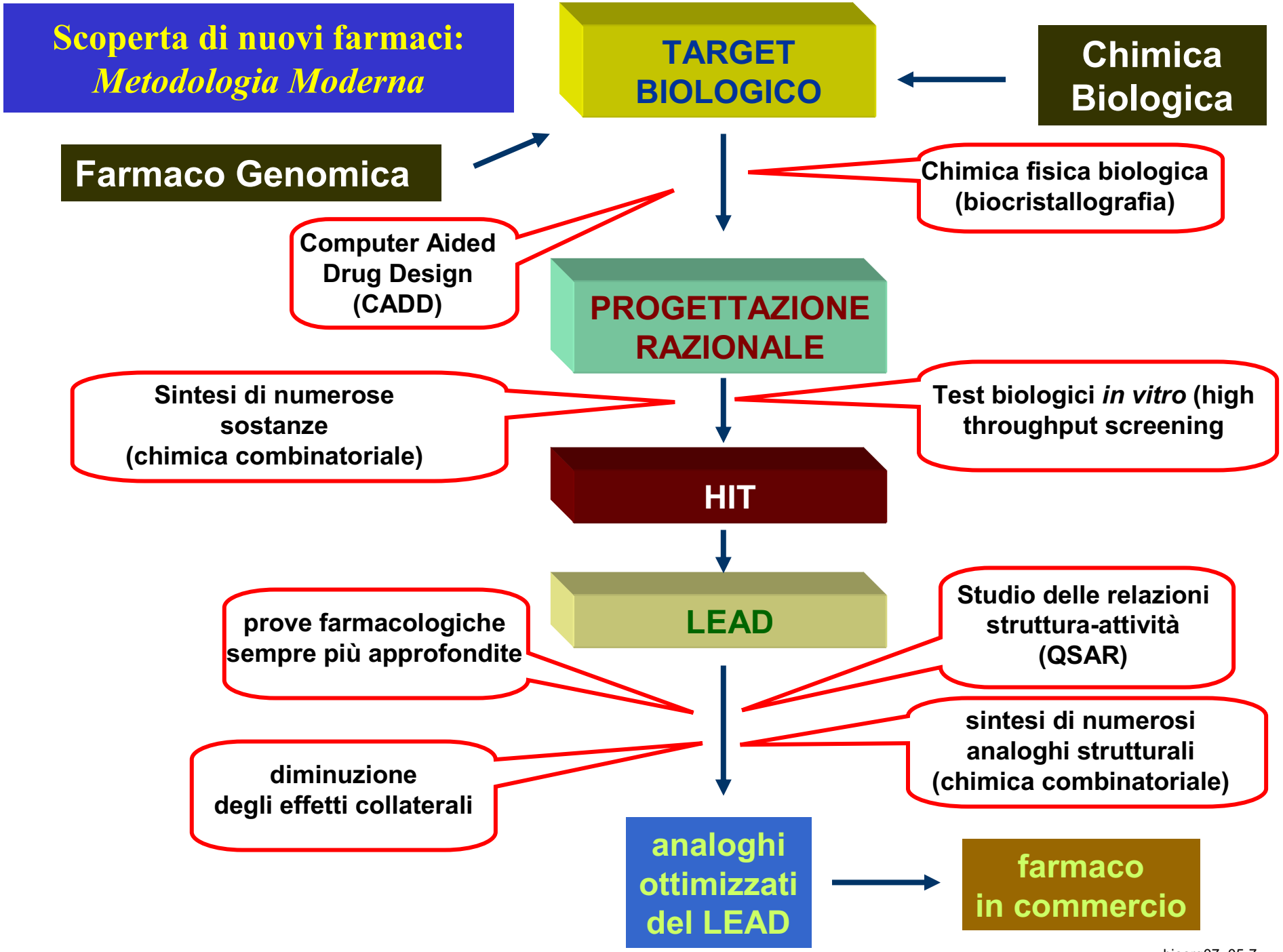
Ciclofosfammide

L'iprite è un potente vescicante, purtroppo usato come arma chimica nella prima guerra mondiale. Non tutto il male vien per nuocere. Dal suo sviluppo, 50 anni dopo, è stata sviluppata la ciclofosfammide, un potente antitumorale, in uso clinico anche oggi.

Affinché un lead promettente possa diventare un vero farmaco occorre superare una serie di ottimizzazioni, legate a:

- **Selettività: il farmaco deve agire possibilmente solo ove desiderato, minimizzando gli effetti collaterali**
- **Formulazione: devono essere risolte problematiche legate alla instabilità, o alla eccessiva insolubilità in acqua.**
- **Aspetti farmacocinetici: quando un prodotto estraneo entra nel nostro organismo, segue un determinato percorso metabolico. Ciò influisce grandemente sull'attività in vivo. Se il farmaco viene degradato subito, o se non entra nelle cellule dove deve arrivare, etc., non funziona**

Quindi, in conclusione, il passaggio da un lead, magari attivo in vitro, ad un farmaco efficiente, richiedeva e richiede un lungo processo di ottimizzazione, che comporta anche la preparazione di migliaia di analoghi.


Scoperta di nuovi farmaci:
Metodologia Moderna
TARGET BIOLOGICO
Chimica Biologica
Farmaco Genomica
Chimica fisica biologica (biocristallografia)
Computer Aided Drug Design (CADD)
PROGETTAZIONE RAZIONALE
Sintesi di numerose sostanze (chimica combinatoriale)
Test biologici in vitro (high throughput screening
HIT
LEAD
prove farmacologiche sempre più approfondite
Studio delle relazioni struttura-attività (QSAR)
sintesi di numerosi analoghi strutturali (chimica combinatoriale)
diminuzione degli effetti collaterali
analoghi ottimizzati del LEAD
farmaco in commercio

TARGET BIOLOGICI

I più importanti target biologici sono:

1. **Enzimi: praticamente tutti i processi metabolici che avvengono in un organismo sono controllati da enzimi. Inibire l'attività di uno di essi può modificare tali processi.**

2. **Recettori: i vari processi biologici sono coordinati tra di loro da un complesso sistema di comunicazione che utilizza molecole come messaggeri. Questi messaggeri chimici trasmettono la loro informazione legandosi a macromolecole biologiche (proteine od acidi nucleici), dette recettori. Inibire o esaltare l'attività di uno di essi può modificare tali processi. Gli antagonisti inibiscono l'attività, gli agonisti la esaltano.**

3. **Acidi nucleici: attaccare il DNA/RNA può portare alla morte della cellula o impedire la replicazione.**

4. **Canali ionici o pompe ioniche: sono proteine di membrana che permettono il passaggio di ioni inorganici (ad es. di Na, K, Ca) tra l'ambiente extracellulare ed il citoplasma. Rivestono grande importanza in numerosi processi metabolici (ad es. il battito cardiaco, la trasmissione degli stimoli nervosi). Si può controllarli tramite "blockers" o "openers".**

Ricordiamo che si possono dividere i farmaci in due grosse categorie:

- **Farmaci antibiotici (anti-microbici, anti-protozoi, antifungini, antivirali, antitumorali etc.)**
- **Farmaci contro le malattie metaboliche**

I target biologici 1, 3 e 4 sono più usati per farmaci del primo tipo. I target 1, 2 e 4 sono i più usati per farmaci del secondo tipo. L'enfasi sarà però diversa. Negli antibiotici mireremo a distruggere l'organismo/cellula/virus nocivo. Nei farmaci contro le malattie metaboliche cercheremo di ottenere una regolazione del metabolismo.

I VANTAGGI DI MIRARE AI TARGET BIOLOGICI

1. **Si può scegliere razionalmente il target biologico più promettente.**
2. **Il farmaco non è più ricercato puntando all'effetto macroscopico finale, ma piuttosto al suo effetto a livello molecolare. Quindi è più facile ottenere farmaci selettivi e prevedere a priori eventuali effetti collaterali.**
3. **I test biologici preliminari per selezionare il LEAD possono essere eseguiti direttamente sul target, senza bisogno di impiegare animali da laboratorio. I test sono quindi veloci, economici e richiedono quantità esigue (high throughput screening)**
4. **Se si conosce bene la struttura del target è possibile impiegare un approccio razionale, in particolare con l'aiuto del computer aided drug design(CADD).**
5. **Dato che per ogni patologia si possono individuare diversi target, è possibile sviluppare farmaci "ortogonali" che curino la stessa malattia, ma agendo su diversi target. In questo modo si può contrastare la resistenza acquisita o evitare incompatibilità con altre patologie del paziente.**

Prima di utilizzare un determinato target per la ricerca di un farmaco, il target deve essere "validato"

I 13 FARMACI PIU' VENDUTI

Principio Attivo	Trade Name	Tipo di Target	Target	Uso	Fatturato (mil. di $)
Atorvastatina	Lipitor	Enzima	HMGCoA reduttasi	Anti-colesterolo	11.300
Simvastatina	Zocor	Enzima	HMGCoA reduttasi	Anti-colesterolo	9.600
Lansoprazolo	Takepron	Canale ionico	Pompe ioniche	Anti- Ulcera	4.900
Olanzapina	Zyprexa	Recettore	Rec. Dopamina ed altri	Schizofrenia	4.400
Amlodipina	Norvasc	Canale ionico	Canali calcio L	Angina	4.200
Rofecoxib	Vioxx	Enzima	COX-2	Anti-infiammatorio	3.800
Celecoxib	Cerebrex	Enzima	COX-2	Anti-infiammatorio	3.400
Paroxetina	Seroxat	Recettore	Rec. Serotonina	Anti-depressivo	3.400
Losartan	Cozaar	Recettore	Rec. Angiotensina	Anti-Ipertensione	2.800
Sertralina	Zoloft	Recettore	Rec. Serotonina	Anti-depressivo	2.700
Ac. Clavulanico / Ampicillina	Augmentin	Enzima	beta-lattamasi	Antibiotico	2.600
Pravastatina	Pravacol	Enzima	HMGCoA reduttasi	Anti-colesterolo	2.600
Omeprazolo	Losec	Canale Ionico	Pompe ioniche	Anti-Ulcera	2.600

Stime fatte nel 2002 per il 2004
Fonte: *Natur. Rev. Drug Discovery*, 176 (2002)

EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN (o di BRIGGS-HALDANE)

In generale, una reazione enzimatica irreversibile, consiste di almeno 3 stadi

$$S + Enz \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} EP \xrightarrow{k_3} P + Enz$$

Dato che l'ultimo stadio non influenza la velocità della reazione, si può scrivere

$$S + Enz \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + Enz$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

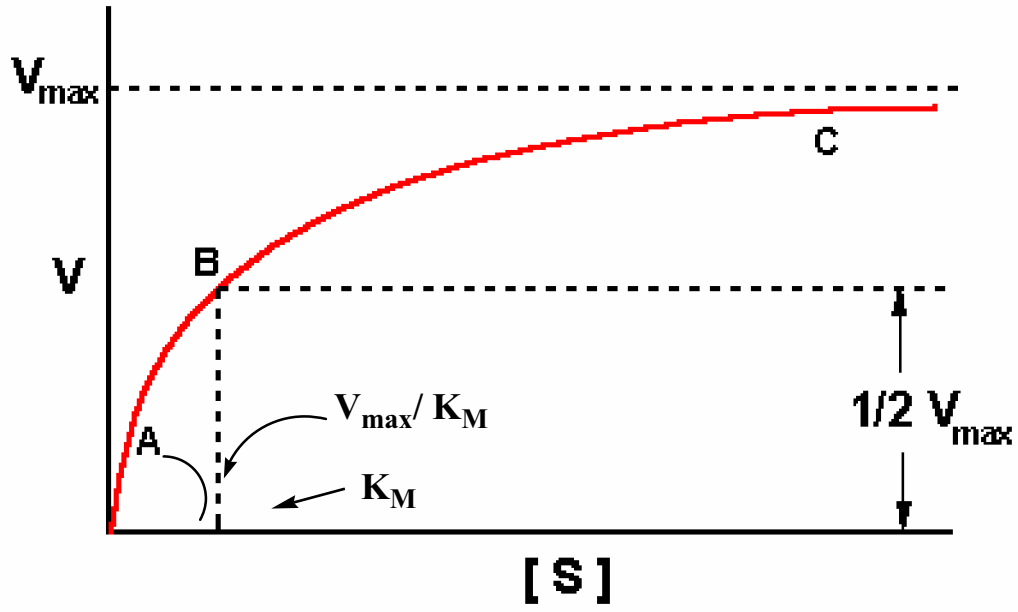
Costante di MM

$$V_{max} = k_2[Enz]$$

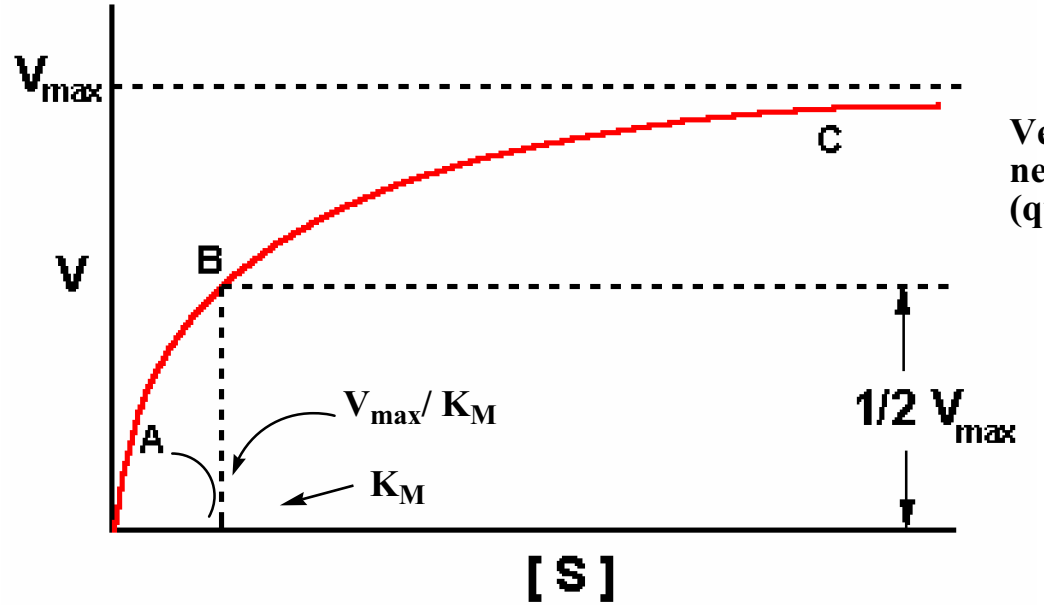
Velocità massima

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

Eq. Michaelis-Menten



Velocità misurata nelle fasi inziali (quando [S] può essere ritenuto costante)



Velocità misurata nelle fasi inziali (quando [S] può essere ritenuto costante)

$$v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

Eq. Michaelis-Menten

Significato di V_{max}

All'aumentare della concentrazione del substrato, si arriva ad avere, per [S] >> K_M che:

$v = V_{max}$ ***questa è la massima velocità realizzabile!***

Significato di K_M

K_M è uguale alla concentrazione di substrato per cui $v = V_{max}/2$

K_M non è una costante di equilibrio: infatti ingloba anche un termine cinetico (k_2). Tuttavia quando il preequilibrio è molto più veloce della successiva reazione, e cioé

$k_2 << k_{-1}$, l'equazione diventa $K_M = k_{-1} / k_1 = K_D$ **(costante di dissociazione)**

$$K_D = \frac{[E]\,[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Infatti all'eq.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1\,[E][S] - k_{-1}\,[ES] = 0$$

DETERMINAZIONE SPERIMENTALE DI K_M E V_{MAX}

L'equazione di Michaelis-Menten non è lineare e quindi non è facile determinare i due parametri riportando in grafico la velocità in funzione della concentrazione di substrato.

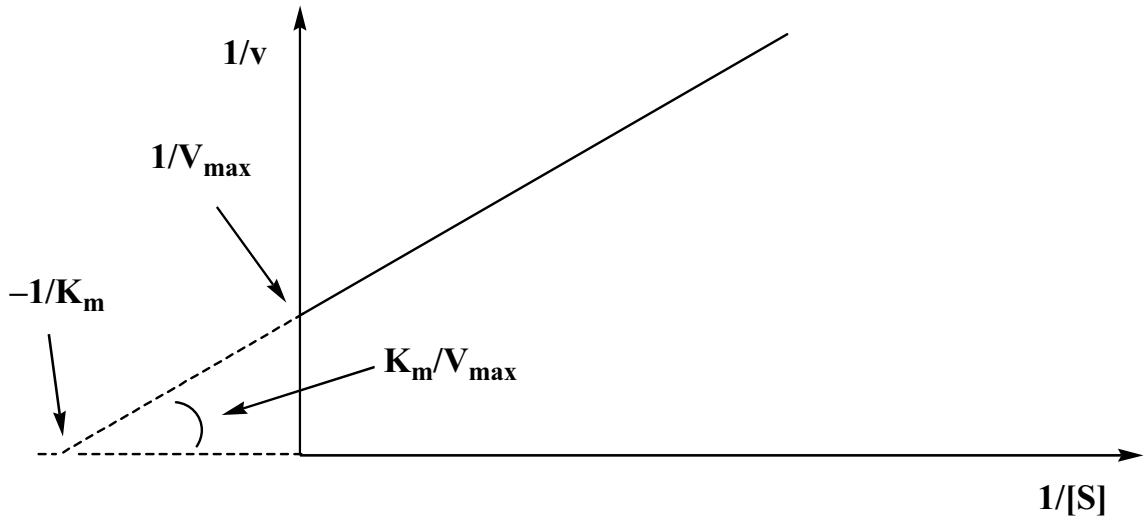
Se però si usano i reciproci di queste grandezze, si ottiene una retta:

$$\boxed{v = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}\,[S]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}\,[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

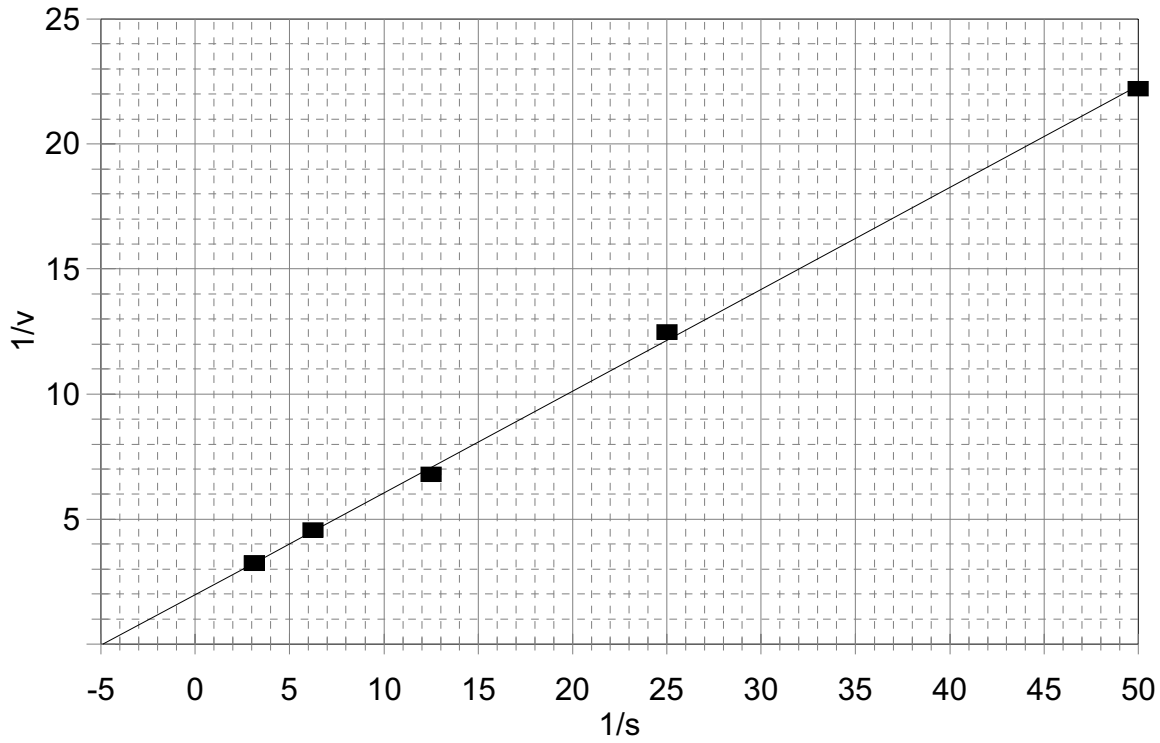
Eq. Michaelis-Menten

Abbiamo così ottenuto una retta in cui l'intercetta è $1/V_{max}$ e la pendenza è K_m / V_{max}

Il grafico corrispondente è detto di Lineweaver-Burk e consente la facile determinazione di K_m e V_{max}



Esempio di grafico di Lineweaver-Burke



pendenza = 0.407

intercetta sulle Y = 1.982

v_{max} = 0.505 mM/min

K_M = 0.205 mM

s è espressa in mmoli/l (mM)

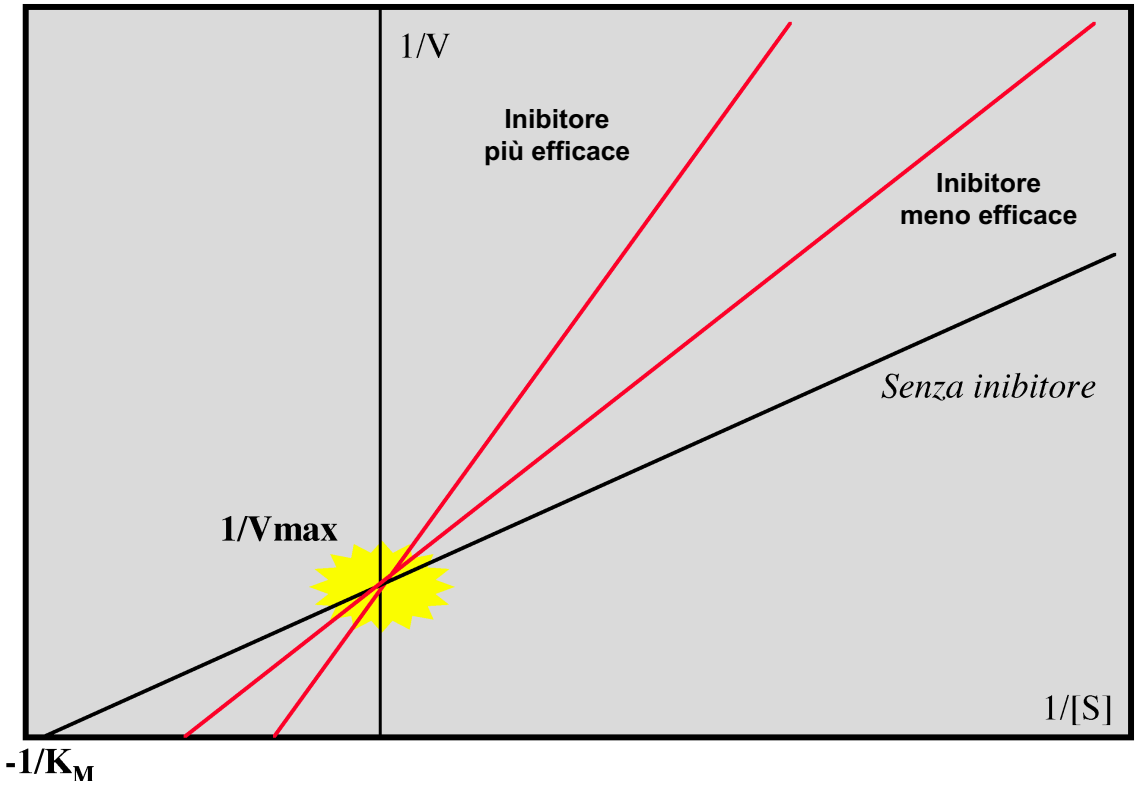
INIBITORI ENZIMATICI

Inibitori reversibili competitivi

Gli inibitori reversibili "competitivi" competono con il substrato naturale per il sito catalitico. A differenza del substrato naturale, l'inibitore non subisce però reazione, ma rimane inalterato.
Gli inibitori reversibili competitivi possono essere progettati razionalmente partendo dalla struttura del substrato naturale.

$$E + I \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EI \qquad k_i = \frac{[E]\,[I]}{[EI]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

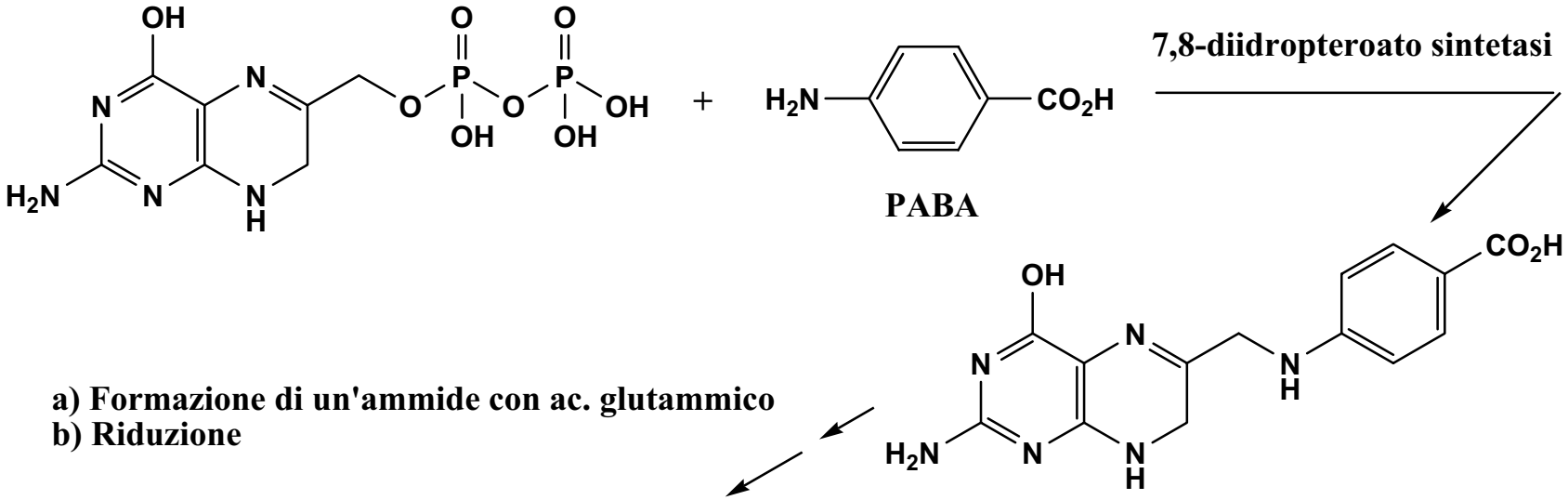
k_i è una costante di dissociazione.
Tanto minore è k_i, tanto migliore è l'inibitore enzimatico



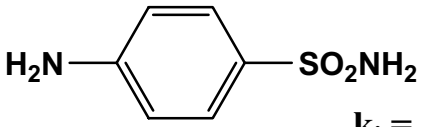
Un inibitore competitivo è facilmente riconoscibile utilizzando il diagramma di Lineweaver-Burke. L'intercetta sull'asse delle x si sposta verso l'origine. Quindi la costante di Michaelis-Menten aumenta e la velocità ad una data concentrazione di substrato diminuisce. All'aumentare della conc. di substrato, però, la velocità si avvicina a quella dell'enzima non inibito.

Un accumulo di substrato può rendere l'inibizione inefficace.

Gli inibitori reversibili competitivi hanno struttura simile al substrato. Fino a pochi anni fa gli inibitori più studiati erano di questo tipo. Ad esempio



La solfanilammide, capostipite dei sulfamidici, è un inibitore competitivo, analogo strutturale del substrato naturale PABA

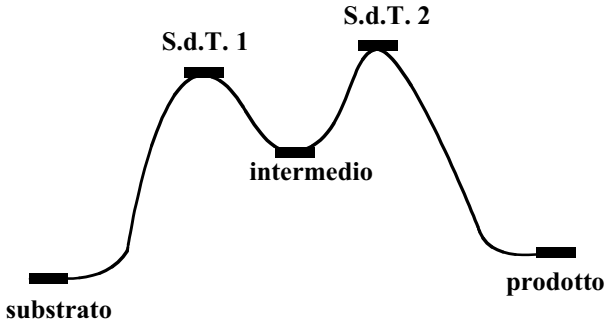


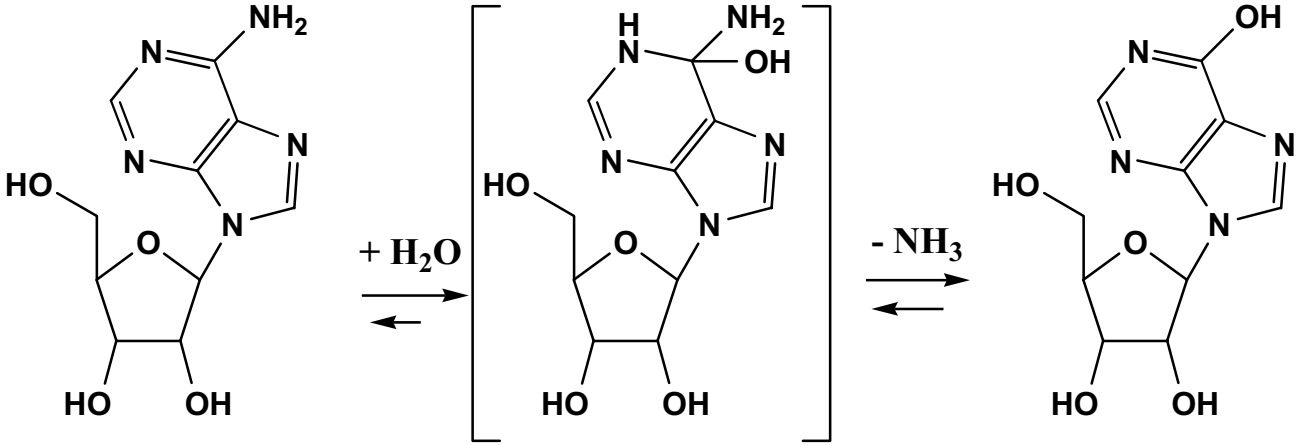
Solfanilammide $k_i = 10^{-9}$

Inibitori basati sullo stato di transizione

The active site of an enzyme is complementary to the transition state of the reaction it catalyzes (1948)

Gli enzimi stabilizzano lo stato di transizione più di quanto stabilizzino il substrato (principio di Pauling).



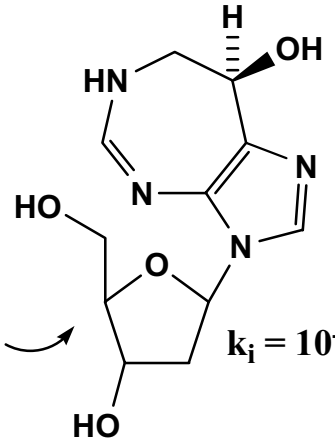


Adenosina

Intermedio

Inosina

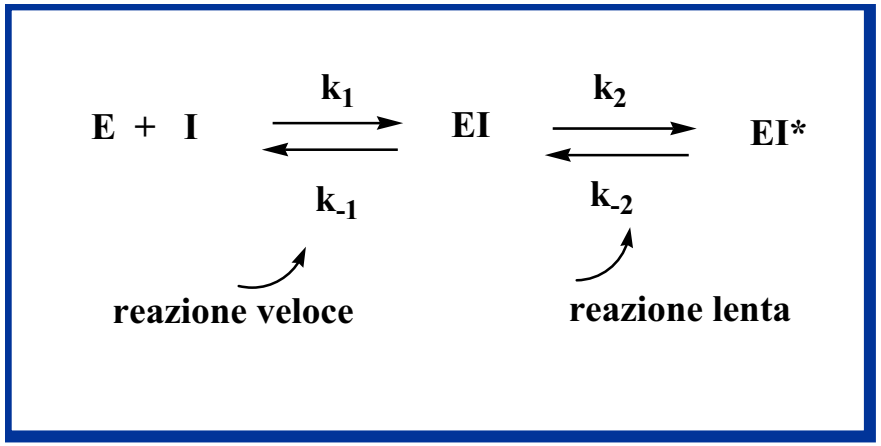
Adenosina Deamminasi



Inibitore basato sullo stato di transizione

$k_i = 10^{-12}$

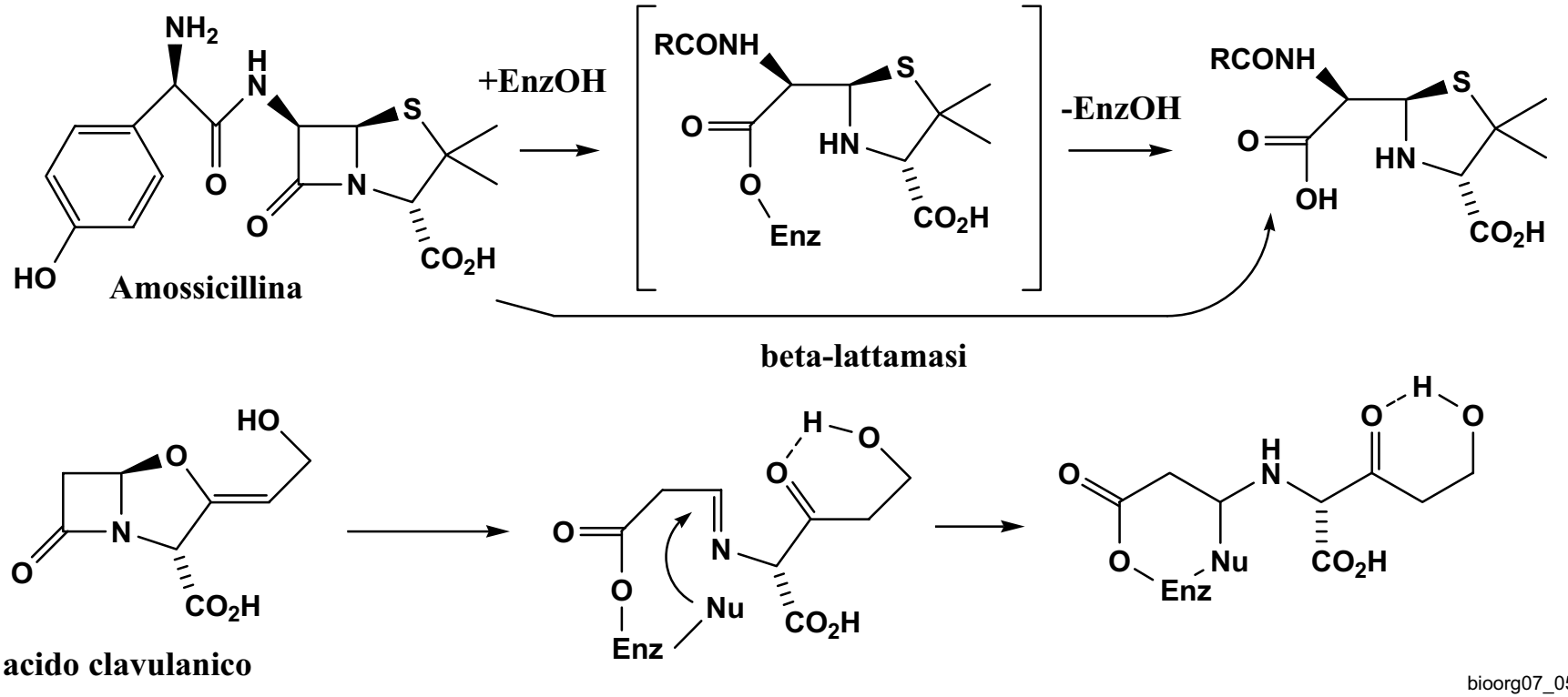
2-Desossi-coformicina



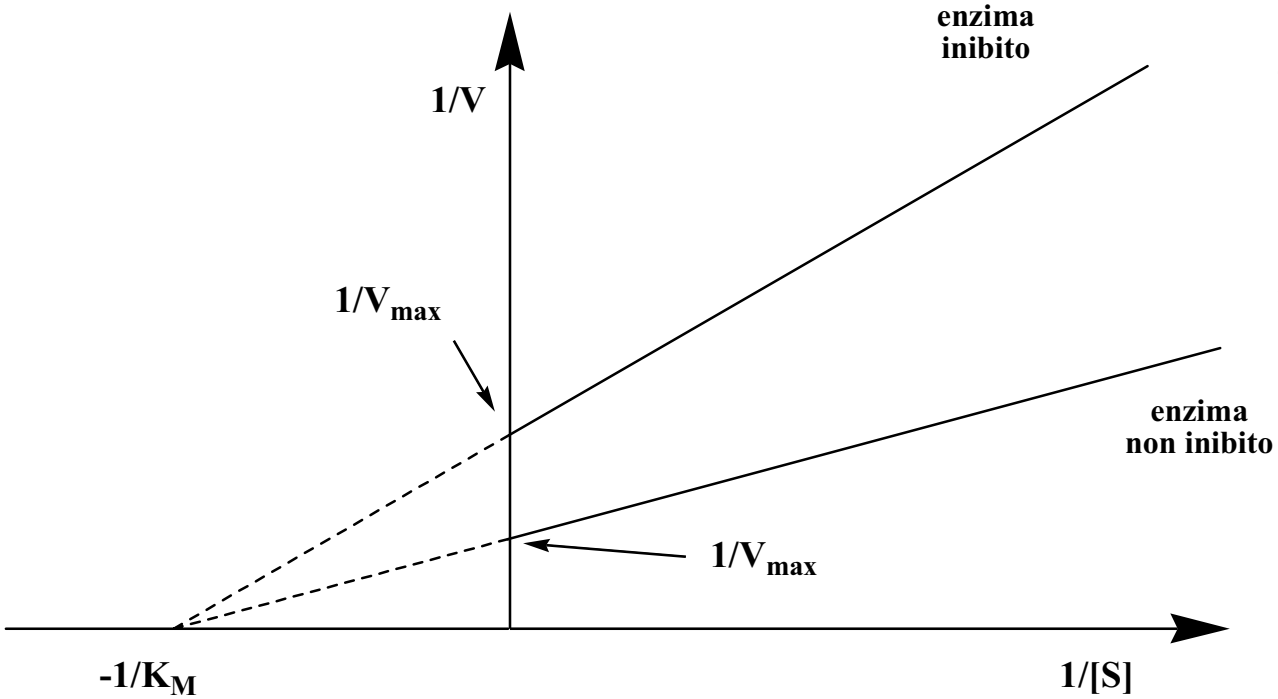
Probabilmente il complesso iniziale (che si forma velocemente) viene trasformato, in seguito ad un riarrangiamento conformazionale (che può richiedere secondi o addirittura minuti) in un complesso EI*, particolarmente stabile. Quando k_{-2} è molto minore di k_2 , l'inibitore si comporta come un inibitore irreversibile.

Inibitori irreversibili

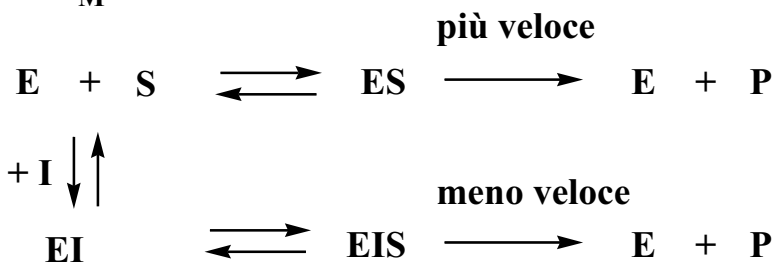
Per definizione, un enzima è inibito irreversibilmente quando non riacquista la sua attività nemmeno dopo dialisi. Ad esempio.



Inibitori reversibili non competitivi



L'inibitore si lega all'enzima, ma non in corrispondenza del sito attivo. Non compete quindi con il substrato per il sito attivo. Legandosi però in un altro sito, modifica la conformazione dell'enzima, rendendolo meno efficace come catalizzatore



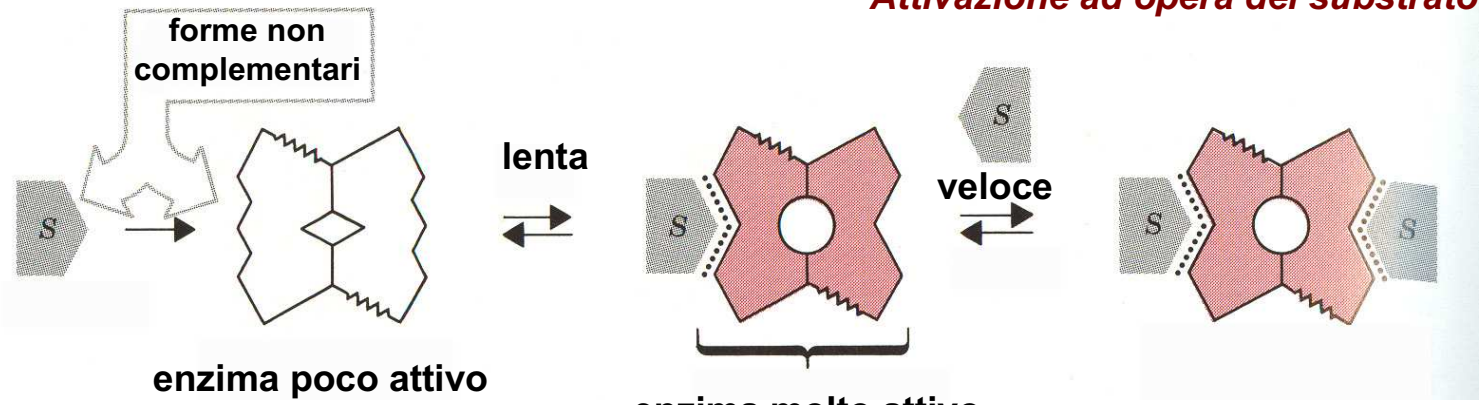
In questo caso K_M non cambia. Cambia invece V_{max} e quindi K_{cat}. L'efficienza dell'inibitore non è diminuita dall'accumulo del substrato.

Inibitori di questo tipo non sono molto comuni. La loro progettazione razionale è molto difficile. Pertanto i LEADS di questo tipo sono quasi sempre sostanze naturali o sostanze trovate mediante "random screening".

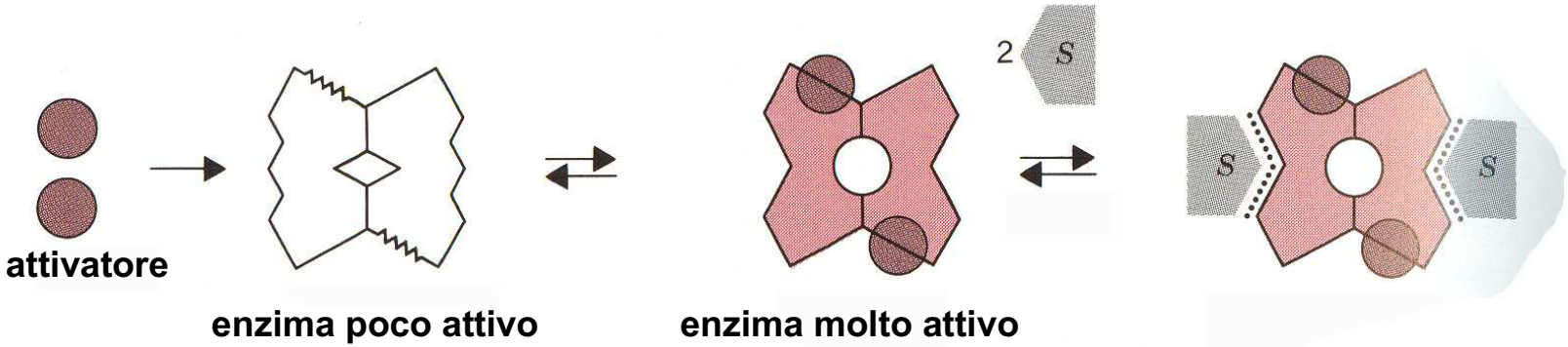
Attivatori Allosterici

Una sostanza che si lega al sito attivo può avere solo un effetto inibitorio.
Invece una sostanza che si lega allostericamente (cioé in un altro sito) può modificare la conformazione dell'enzima in modo da renderlo più attivo.
Queste sostanze sono dette "attivatori allosterici". Sostanze di questo tipo non sono utilizzabili in genere come farmaci, ma sono usate dalla natura per regolare l'attività degli enzimi.
L'attivazione allosterica può avvenire ad opera del substrato stesso, oppure di un'altra molecola non implicata nella reazione.

Attivazione ad opera del substrato



Attivazione ad opera di un'altra sostanza



RIASSUMENDO:

Inibitori reversibili competitivi → **Facili da progettare razionalmente. In principio selettivi. Soggetti a diminuzione di efficacia per accumulo di substrato.**

Inibitori reversibili non competitivi → **Difficili da progettare razionalmente. Possono essere selettivi. Non soggetti a diminuzione di efficacia per accumulo di substrato.**

Inibitori irreversibili → **Facili da progettare razionalmente. Difficile renderli selettivi. Non soggetti a diminuzione di efficacia per accumulo di substrato.**

Inibitori basati sullo stato di transizione → **Facili da progettare razionalmente. In principio selettivi. Non soggetti a diminuzione di efficacia per accumulo di substrato.**

ESEMPI DI INIBITORI ENZIMATICI DI IMPORTANZA FARMACEUTICA

R (ANGIOTENSINA II) = Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

L'angiotensina II è un messaggero primario, che riveste un'importanza chiave nel controllo della pressione arteriosa dei mammiferi. E' un oligopeptide formato da 8 residui amminoacidici.

FEGATO

↓

R-His-Leu-Val-Ile-His

Angiotensinogeno

RENE

la pressione a livello renale controlla la produzione di renina

Renina (una proteasi aspartica)

↓

R-His-Leu

Angiotensina I

Angiotensin Converting Enzyme (ACE) (una metalloproteasi) →

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

Angiotensina II

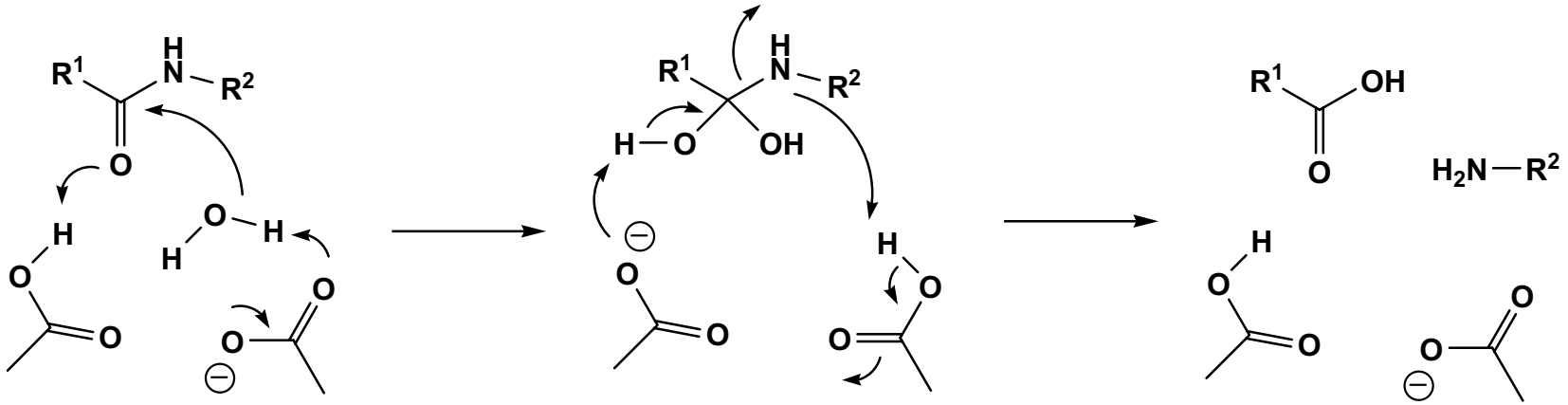
↓ **Recettore dell'angiotensina II**

Vasocostrizione e ritenzione idrica → **AUMENTO DELLA PRESSIONE SANGUIGNA**

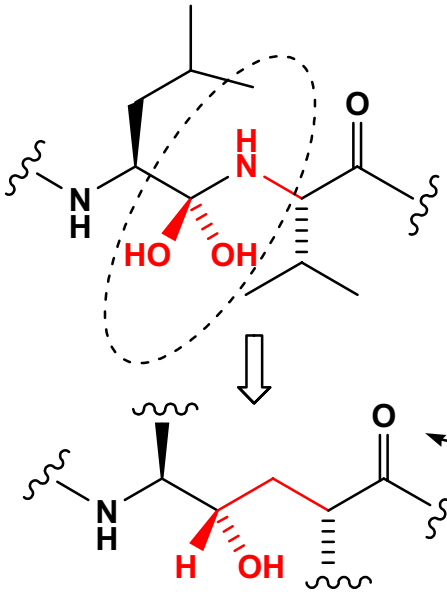
Si possono quindi individuare tre possibili target biologici: 2 enzimi (renina e ACE) ed un recettore. In linea di principio la renina è un target migliore dell'ACE perché: a) la reazione da essa catalizzata è il passaggio lento; b) è un enzima specifico per l'angiotensinogeno.

INIBITORI DELLA RENINA

Meccanismo delle proteasi aspartiche

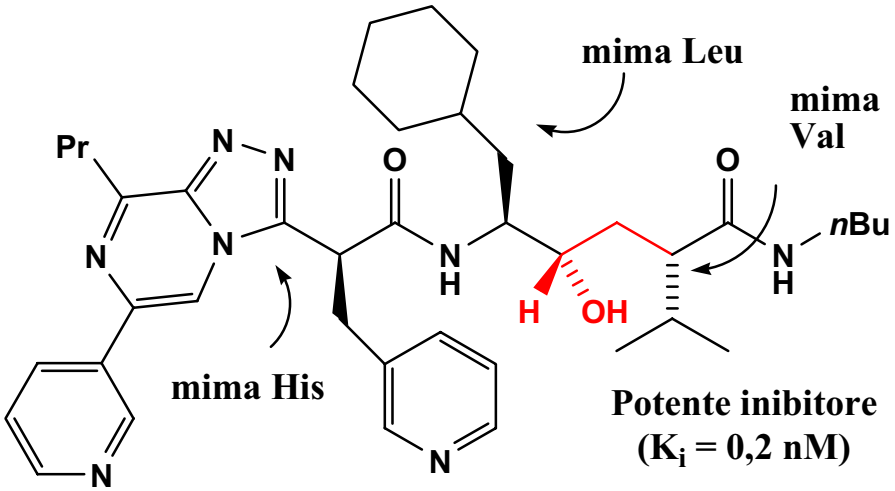


I risultati migliori sono stati finora realizzati mirando ad inibitori basati sullo stato di transizione. Come nell'esempio precedente, lo stato di transizione assomiglierà all'intermedio tetraedrico. Il modello sarà quindi:



Ovviamente non si potrà usare la funzione cerchiata (non stabile) ma bisognerà progettare una funzione stabile di struttura simile (isostere)

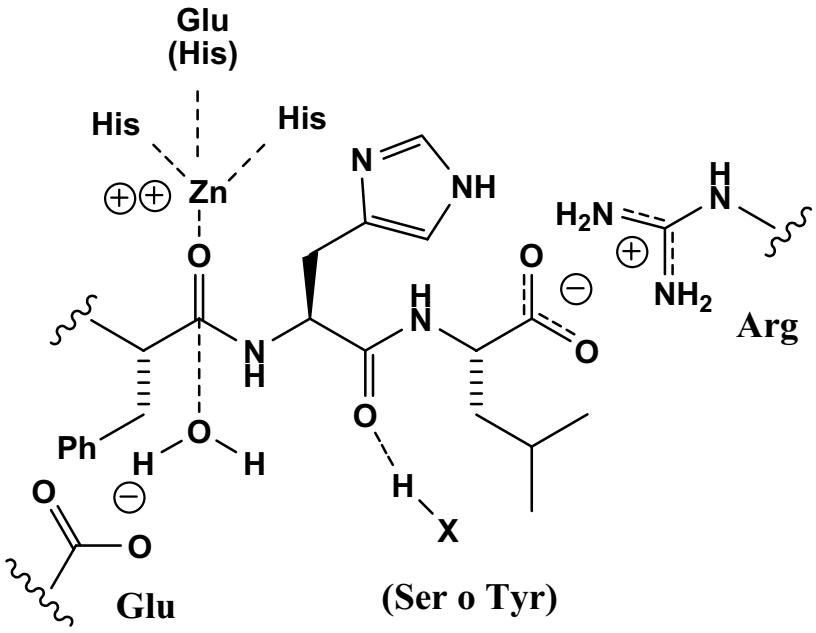
idrossietilene isostere (molto usato negli inibitori delle proteasi aspartiche)



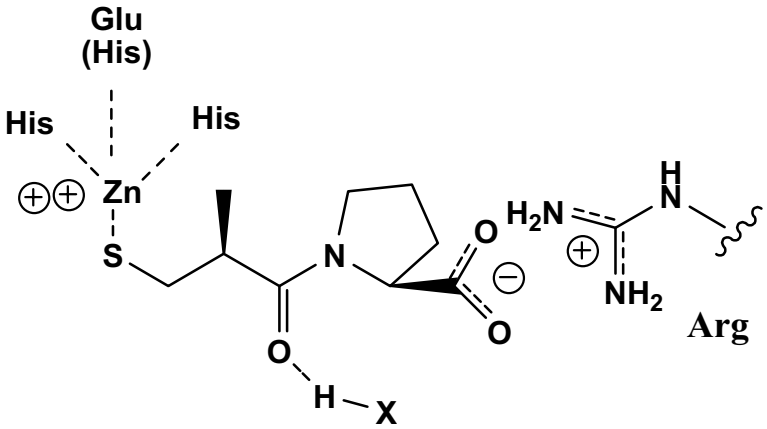
Potente inibitore (K_i = 0,2 nM)

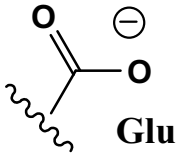
INIBITORI DELL'ACE

La struttura ed il meccanismo di azione dell'ACE non erano noti. Erano ben noti però per un enzima simile, la carbossipeptidasi A. L'approccio razionale per la ricerca di un inibitore (basato sul substrato) è partito perciò dalla carbossipeptidasi A. Questo è un enzima che idrolizza i peptidi partendo dal termine carbossilico. E' quindi una eso-peptidasi, come l'ACE. Come esso taglia al peptide 2 amminoacidi.



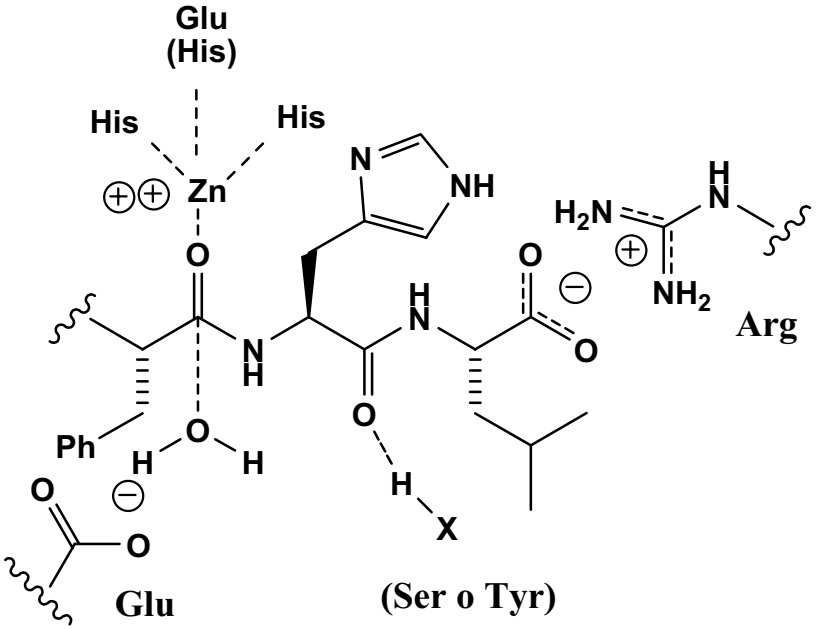
Sito attivo dell'ACE (basato sulla similitudine con la carbossipeptidasi A)

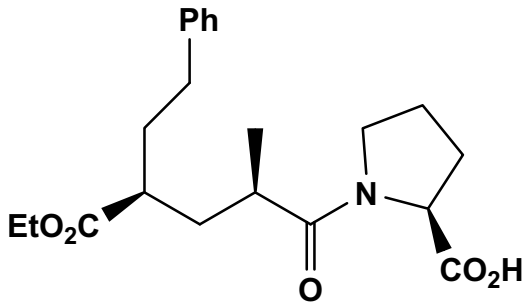




***posizionamento nel sito attivo del LEAD (captopril)*. Sono presenti: a) una funzione che complessa lo zinco meglio di un carbonile; b) un carbossilato che dà interazione elettrostatica con l'arginina; c) un carbonile ammidico in posizione corrispondente al carbonile del secondo amminoacido.**

INIBITORI DELL'ACE





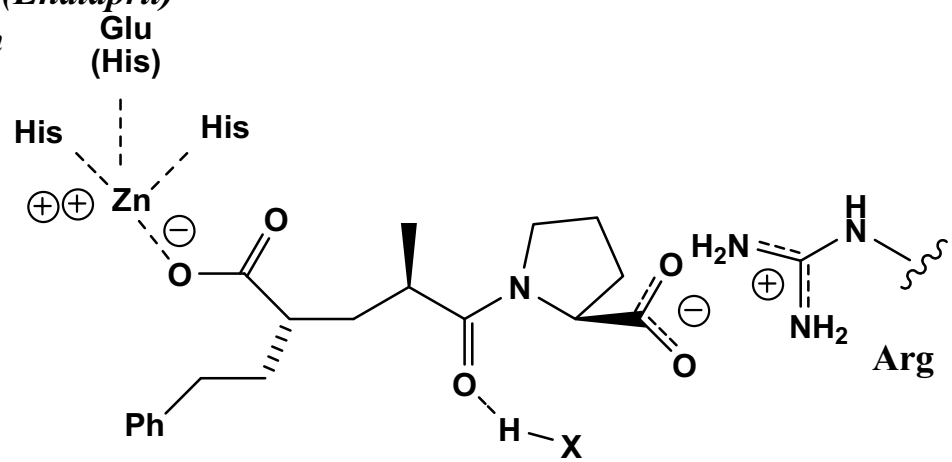
Enalapril

L'Enalapril è un profarmaco. Di per sé non è attivo, ma in vivo l'estere etilico si idrolizza facilmente a dare il farmaco vero e proprio.

Sito attivo dell'ACE (basato sulla similitudine con la carbossipeptidasi A)

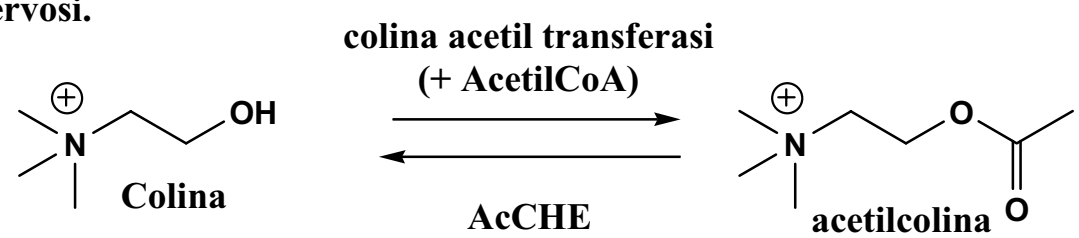
posizionamento nel sito attivo del farmaco più usato (Enalapril)

Nel caso dell'enalapril, il tiolato è sostituito da un carbossilato. E' inoltre presente una catena che mima la fenilalanina dell'angiotensina I.



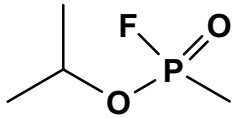
INIBITORI DELL'ACETILCOLINA ESTERASI

L'acetilcolina esterasi è una esterasi serinica, che riveste un ruolo fondamentale nella trasmissione di impulsi nervosi.



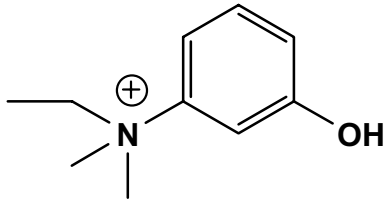
L'acetilcolina è un messaggero primario; più precisamente un neurotrasmettitore

In seguito ad un impulso nervoso, la sinapsi libera acetilcolina, che passa all'altro terminale nervoso legandosi ad un recettore colinergico post-sinaptico. Subito dopo l'acetilcolina deve essere idrolizzata immediatamente, altrimenti l'impulso nervoso non si arresta. I gas nervini sono potenti inibitori (non specifici) di tutte le proteasi o esterasi seriniche. Bloccano irreversibilmente il residuo serinico formando un estere fosforico. L'effetto più letale è proprio quello di inibizione della Acetilcolina esterasi.

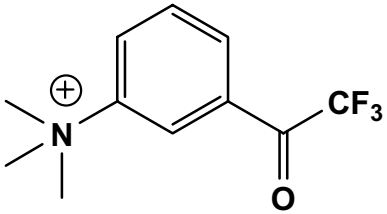


isopropil metilfosfonofluoridato (SARIN)

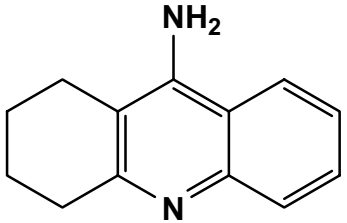
Al di là dei gas nervini, gli inibitori della AcCHE trovano impiego come insetticidi, ma anche come farmaci per alcune malattie neurologiche quali la miastenia grave ed il morbo di Alzheimer.



Edrofonio
(inibitore basato sul substrato)
(impiegato per la Miastenia)

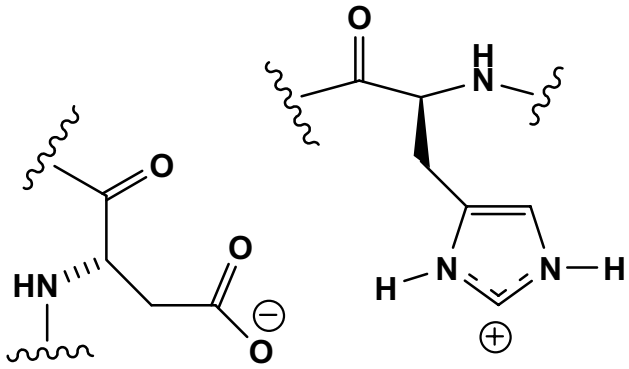


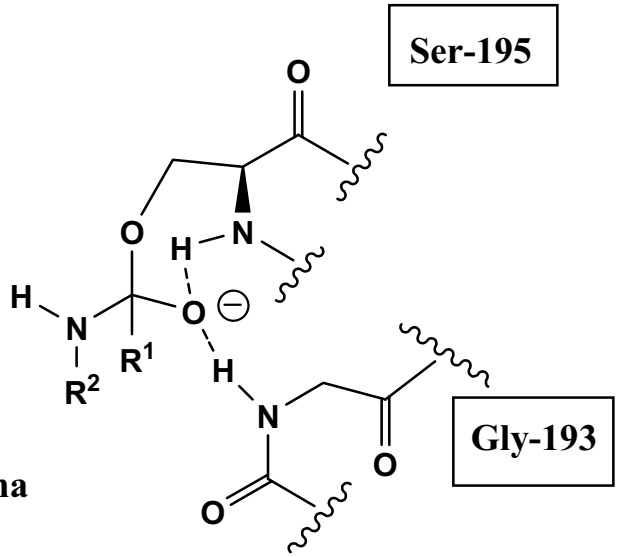
TFK
Inibitore basato sullo stato di transizione
(non impiegato)



Tacrina
Inibitore non competitivo
(scoperto non razionalmente)
(impiegato per l'Alzheimer)

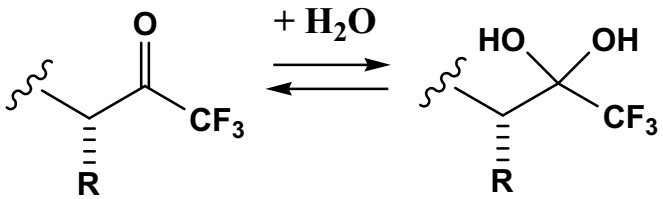
GRUPPI FUNZIONALI USATI PER REALIZZARE INIBITORI DI PROTEASI O ESTERASI SERINICHE BASATI SULLO STATO DI TRANSIZIONE





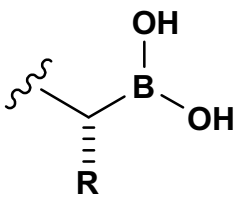
Questo è l'intermedio già visto per le reazioni catalizzate da Chimotripsina. Lo stato di transizione assomiglierà ad esso

un inibitore può essere un carbonile che si trasforma facilmente in un addotto tetraedrico e che quindi forma facilmente la forma idrata per addizione di acqua.

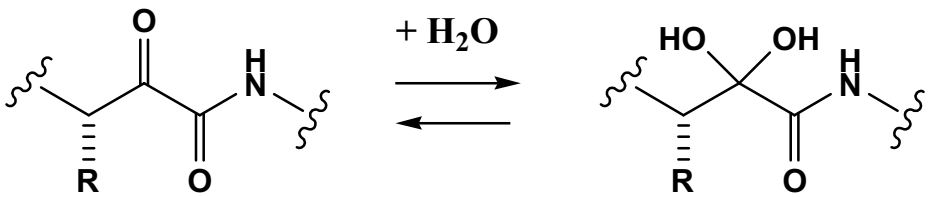


trifluorometil chetoni

oppure l'inibitore può possedere un gruppo funzionale che assomigli all'intermedio tetraedrico



Acidi boronici



α-Chetoammidi

Il vantaggio delle α-chetoammidi è quello di poter giocare sui sostituenti su entrambi i lati del carbonile

IL CASO DEI FARMACI ANTI-HIV

Nel 1984, anno della scoperta dell'AIDS, non si conoscevano farmaci antivirali specifici. Il successo ottenuto in questi 20 anni nella cura dell'AIDS è stato possibile grazie ad un'attenta scelta dei target biololgici ed alla progettazione razionale dei farmaci relativi.

Ma vediamo innanzitutto cos'è un virus e, in particolare, cos'è un retrovirus.

E' difficile dare una definizione univoca di virus, in quanto essi appartengono a varie classi caratterizzate da diverse modalità per la replicazione.
Comunque si può dire che i virus sono ELEMENTI GENETICI MOBILI.
I VIRUS:

 # Non sono cellule e non sono in grado di vivere da soli in un'opportuna coltura.

 # Sono formati da un elemento genetico (formato da DNA o RNA) e da un rivestimento proteico, chiamato capside.

 # Si moltiplicano all'interno di una cellula ospite sfruttando sia l'energia che gran parte dei complessi macchinari enzimatici della cellula ospite.

 # Spesso la loro moltiplicazione porta a danni o a morte della cellula ospite.

 # I virus, grazie al capside, sono in grado di uscire dalla cellula ospite e di entrare in una nuova cellula, infettandola.

Il modo in cui i virus si replicano e codificano la sintesi delle proteine necessarie al loro ciclo vitale varia a seconda della famiglia di virus.

	REPLICAZIONE	CODIFICA DELLE PROTEINE
Virus a DNA a doppio filamento (lineare o circolare)	DNA polimerasi (della cellula)	Come per il DNA cellulare (il codice viene trascritto in mRNA, usando entrambe le catene complementari)
Virus a DNA a singolo filamento (circolare)	Il genoma viene trasformato in un DNA a doppio filamento dalle DNA polimerasi dell'ospite e poi replicato come sopra	Come sopra
Virus a RNA a doppio filamento	RNA polimerasi (replicasi) (del virus)	Viene sintetizzato un mRNA, usando come stampo l'RNA genomico, usando una RNA polimerasi del virus
Virus a RNA a singolo filamento (positivo)	RNA polimerasi (replicasi) (del virus)	Il genoma del virus può già fungere da mRNA
Virus a RNA a singolo filamento (negativo)	RNA polimerasi (replicasi) (del virus)	Una RNA polimerasi presente nel capside sintetizza la catena complementare, che funge da mRNA
Virus a RNA a singolo filamento (retrovirus)	l'RNA viene trascritto in un DNA a doppia elica, che viene integrato nel genoma dell'ospite per poi produrre molte copie del genoma virale	Il genoma del virus può già fungere da mRNA

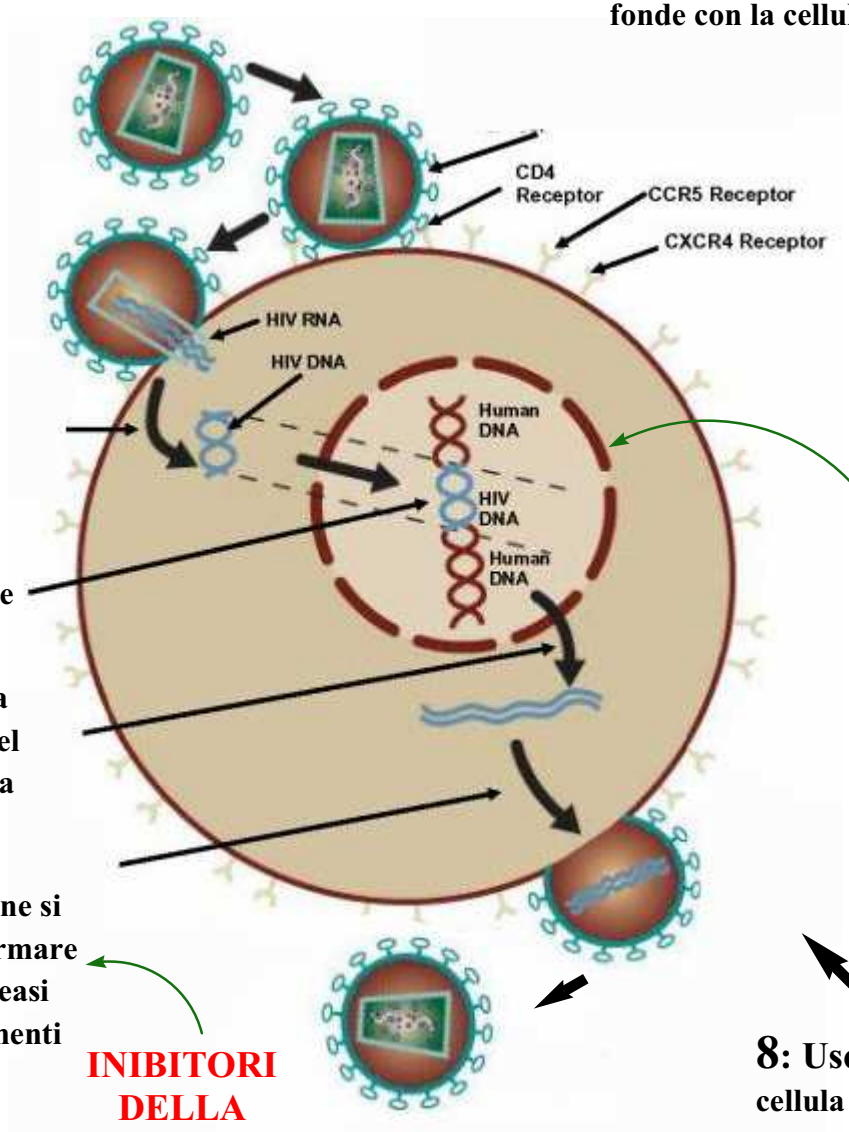
CICLO VITALE DELL'HIV

INIBITORI DELLA TRASCRITTASI INVERSA

1: Virus libero

2: Fusione: Il virus si lega ad un recettore CD4 e ad un corecettore (CCR5 o CXCR4). Quindi il virus si fonde con la cellula

3: Infezione: Il virus scarica nella cellula il genoma (2 molecole di RNA) ed un rivestimento che contiene proteine essenziali



INIBITORI DELLA FUSIONE

4: Trascrizione Inversa: l'RNA è copiato a dare un DNA a doppio filamento

5: Integrazione: il DNA è integrato nel cromosoma dell'ospite

INIBITORI DELLA INTEGRASI

6: Trascrizione: il DNA è letto a dare mRNA (identico al genoma del virus) che produce proteine a lunga catena

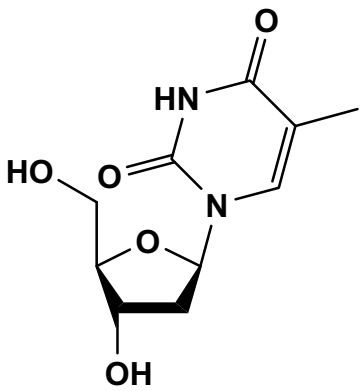
7: Montaggio: Le poliproteine si uniscono all'RNA virale a riformare varie copie del virus. Una proteasi scinde le poliproteine in frammenti più piccoli

INIBITORI DELLA PROTEASI

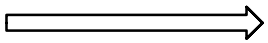
8: Uscita: Il virus esce dalla cellula per infettarne altre

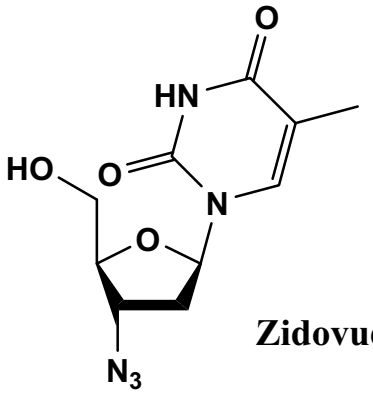
1° TARGET BIOLOGICO: TRASCRITTASI INVERSA

Inibitori basati sul substrato:



2-desossitimidina
(un nucleoside)



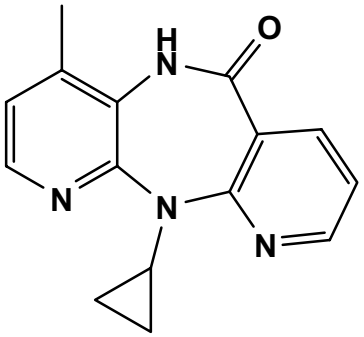


Il primo farmaco anti-HIV in uso clinico

Zidovudine (AZT)

In realtà è un pro-farmaco: in vivo viene fosforilato al corrispondente nucleotide, che blocca l'accrescimento della catena oligonucleotidica.

Inibitori non competitivi: **si legano all'enzima in un sito differente dal sito attivo e lo rendono meno attivo**



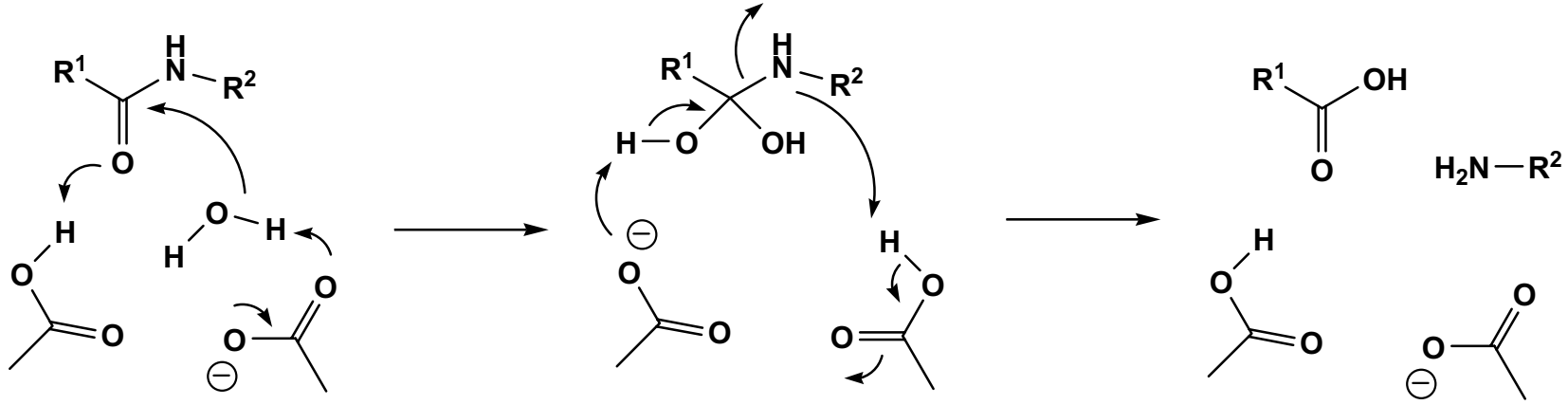
Nevirapina

Sono i farmaci anti-AIDS più economici.
Molto usati nel terzo mondo

2° TARGET BIOLOGICO: HIV PROTEASI

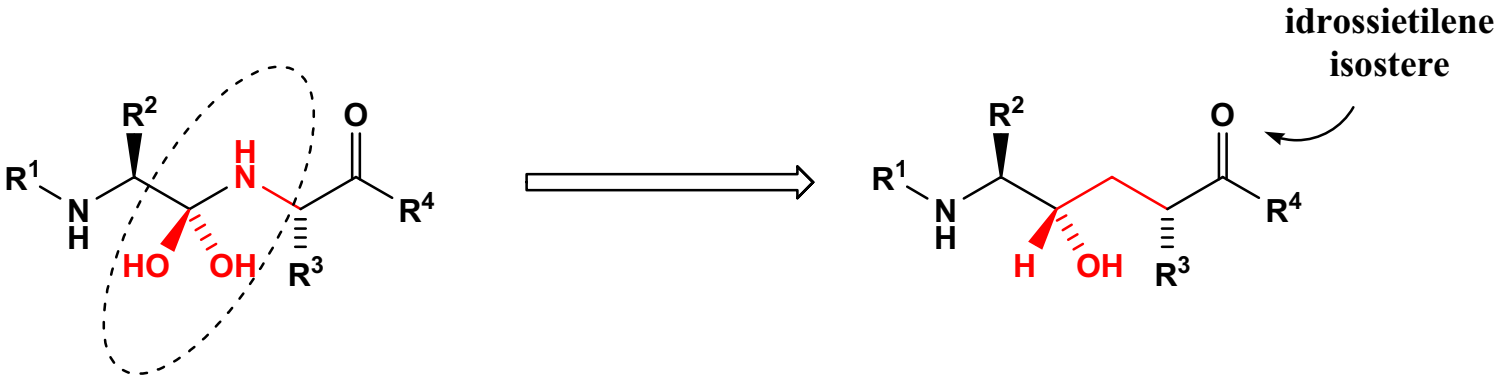
E' un target ideale perché specifico dell'HIV e cambia molto poco in funzione delle mutazioni genetiche o della famiglia di HIV. E' una proteasi aspartica.

Meccanismo delle proteasi aspartiche



La progettazione razionale ha sfruttato l'esperienza precedente relativa agli inibitori della Renina.
i punti chiave sono:

A) UTILIZZARE UN ISOSTERE DELLO STATO DI TRANSIZIONE
B) SELEZIONARE I GRUPPI R IN MODO DA MASSIMIZZARE LA COMPLESSAZIONE CON L'ENZIMA ED OTTENERE LA MASSIMA SELETTIVITA'



2° TARGET BIOLOGICO: HIV PROTEASI

Come punto di partenza per lo sviluppo di un inibitore, si osserva sempre la struttura del substrato.
In questo caso, la proteasi agisce però su ben 9 sequenze diverse!
In tre casi su nove la sequenza è

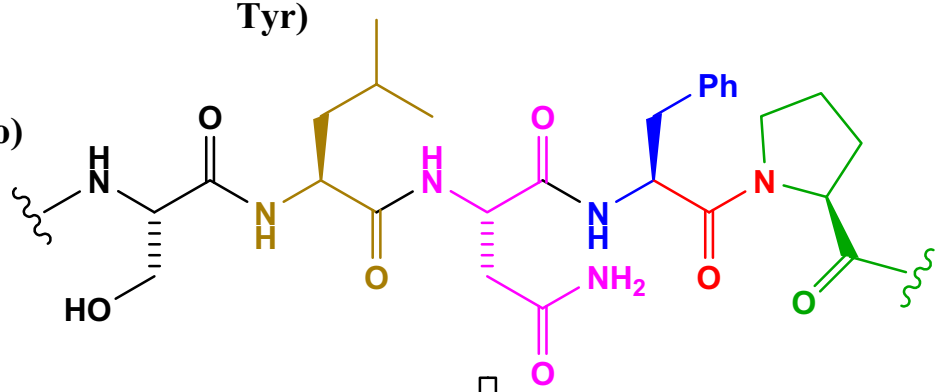
Nelle proteasi di mammiferi, la rottura di un legame peptidico coinvolgente la prolina come N-termine, è rara. Pertanto mirare a una di queste sequenze sembrava promettente ai fini della selettività

Legame che viene scisso

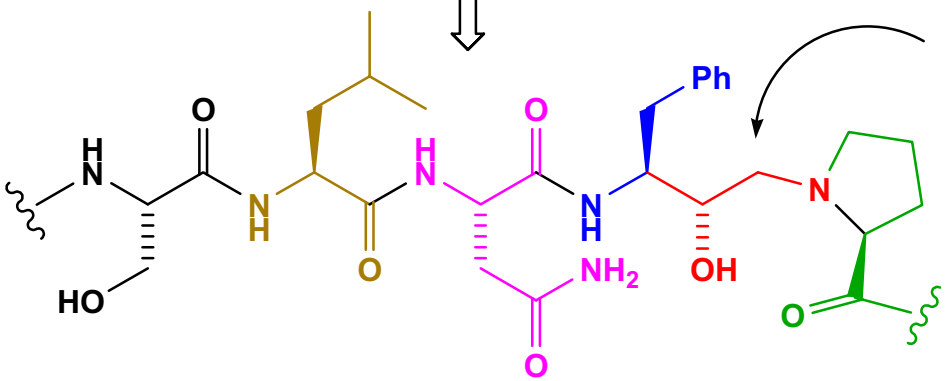
Ser — X — Y — Phe — Pro

(oppure Thr) **(oppure Tyr)**

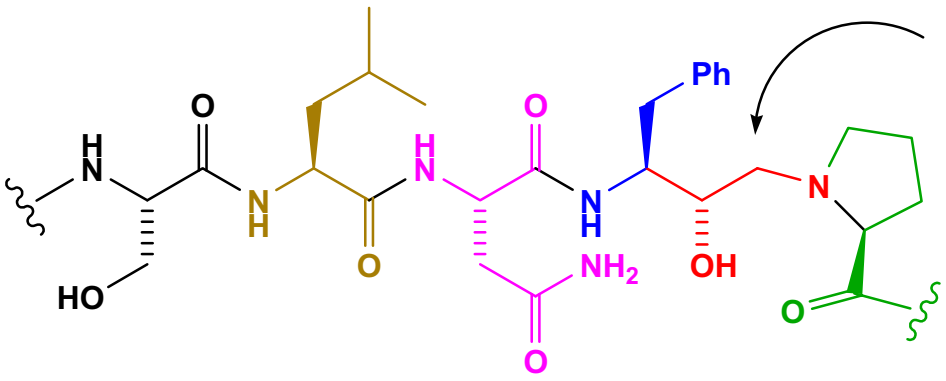
Sequenza target (Ser-Leu-Asn-Phe-Pro)



IC_{50} = 3,4 nM



idrossietilammina isostere

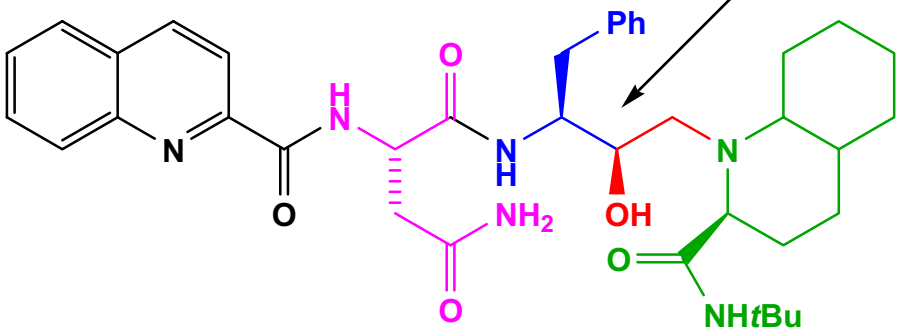


idrossietilammina isostere

IC_{50} = 3,4 nM

Sintesi di migliaia di analoghi !

in questo caso è più attivo l'R !!



FARMACO: saquinavir

IC_{50} < 0,4 nM

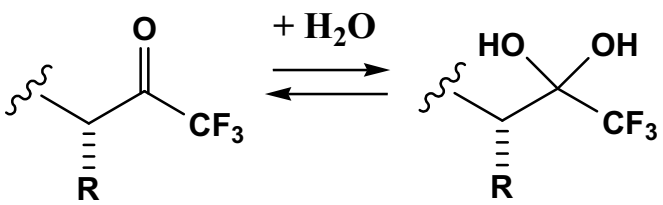
La presenza di una proteasi essenziale per il ciclo vitale è comune a molti altri virus, non necessariamente retro-virus.

Ad esempio, una proteasi del virus dell'epatite C (una delle malattie virali più dannose in assoluto) è stata identificata come promettente target biologico per trovare una cura farmacologica per la malattia.

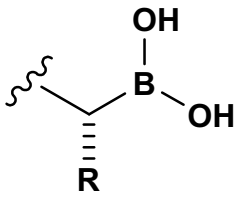
Pochi mesi fa sono stati annunciati studi clinici molto promettenti di un inibitore di questa proteasi serinica.

Allo stesso tempo si stanno esaminando inibitori di un'altra proteasi serinica, quella del Cytomegalovirus, un virus a DNA (doppio filamento) responsabile della più grave malattia dei neonati.

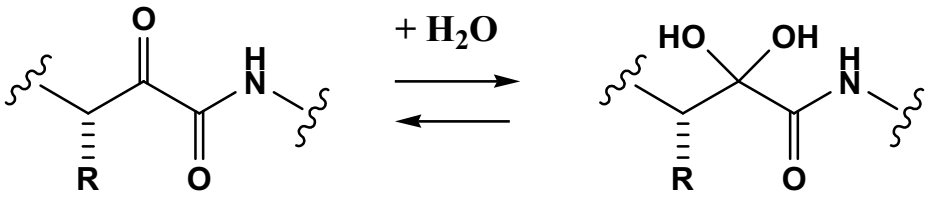
Le strategie adottate sono comuni a quelle di altre proteasi seriniche.



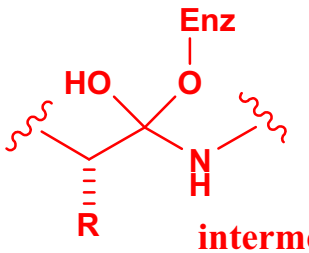
trifluorometil chetoni



Acidi boronici



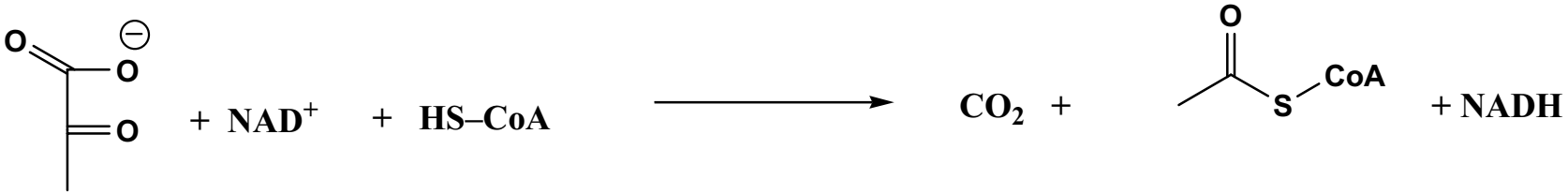
α-Chetoammidi

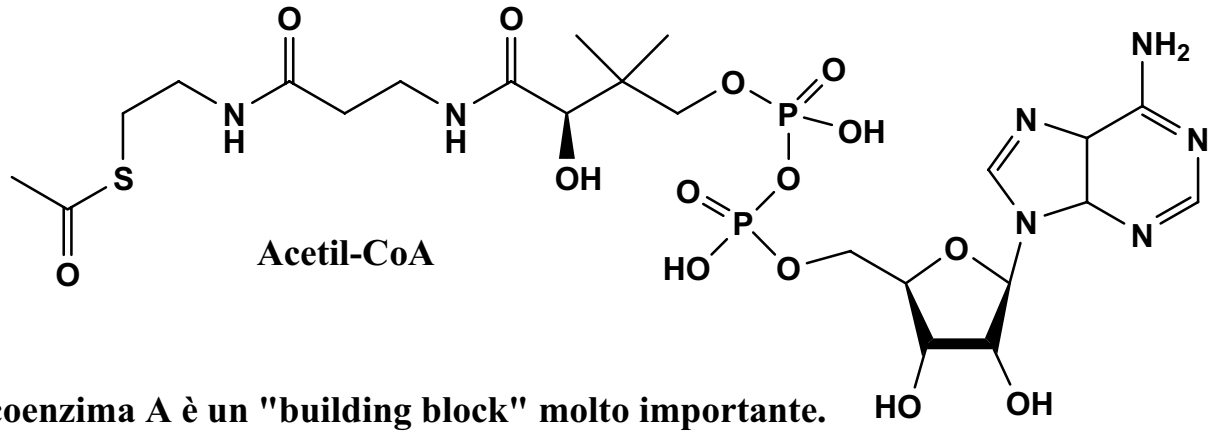


intermedio

COME CONTROLLARE IL TASSO DI COLESTEROLO

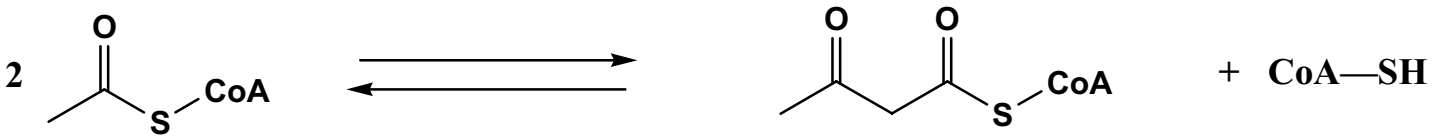
Avevamo visto, che negli organismi aerobici, l'acido piruvico derivante dalla glicolisi, viene ossidato con rigenerazione del NAD^+:



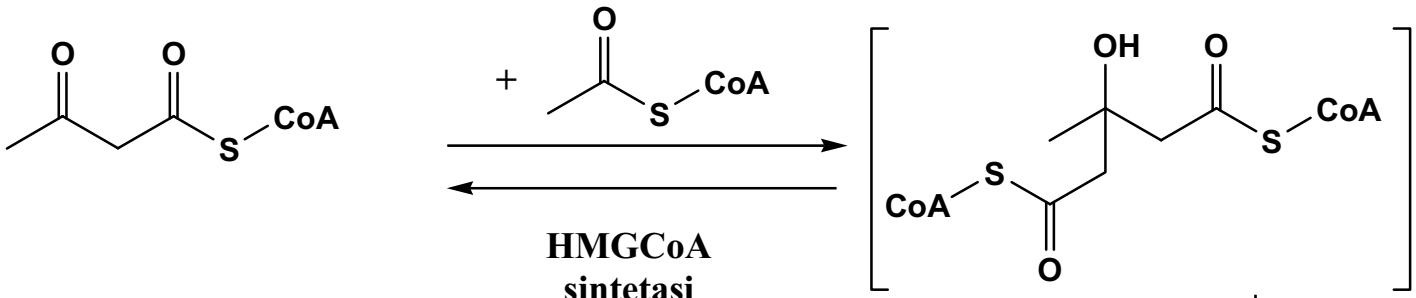


L'acetil coenzima A è un "building block" molto importante.
Esso serve:
1) Nel ciclo di Krebs per generare energia
2) Per sintetizzare gli acidi grassi e quindi i trigliceridi ed i fosfolipidi
3) Per sintetizzare il colesterolo e gli altri steroidi.

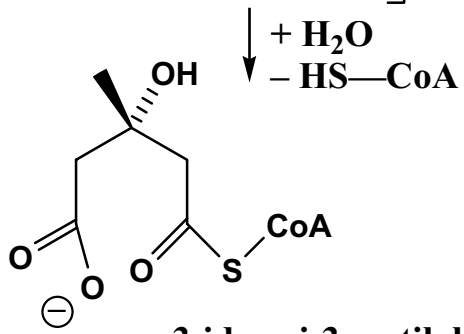
La sintesi del colesterolo ha luogo nel fegato ed è modulata dal colesterolo stesso



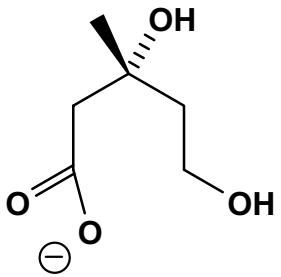
Abbiamo già visto come l'acetil-CoA può essere trasformato nell'acetoacetil-CoA per condensazione di Claisen



Si tratta di una condensazione aldolica. Nel corso della reazione avviene anche l'idrolisi del tioestere, che è estremamente enantioselettiva (è l'idrolisi enzimatica di un diestere prochirale)



3-idrossi-3-metilglutaril-CoA



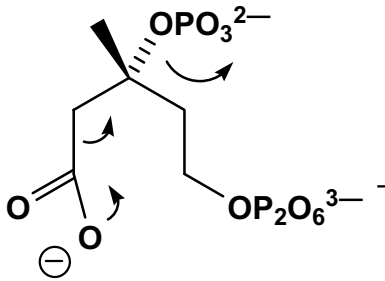
anione dell'acido mevalonico

HMGCoA reduttasi

+ 2 NADPH, — 2 $NADP^+$
— HS—CoA, — H_2O

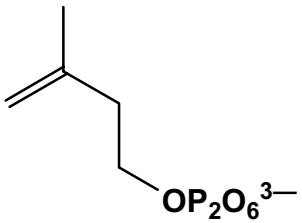
+ 3 ATP
— 3 ADP

La biosintesi del Colesterolo comprende 26 passaggi. Ognuno di essi può servire in principio da target. Tuttavia questo è il passaggio lento di tutta la sequenza. Il controllo biologico del tasso di colesterolo si basa sulla sua inibizione (viene prodotto meno enzima)

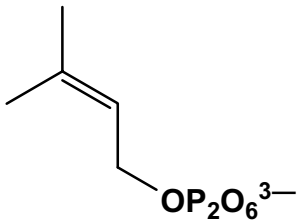


β-Eliminazione

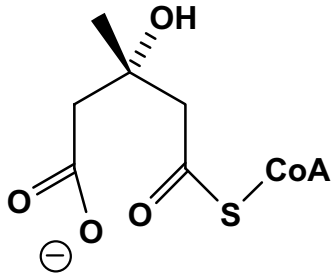
— CO_2, — PO_4^{3-}



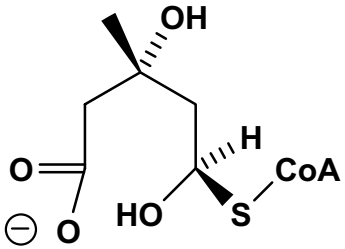
isopentenil pirofosfato

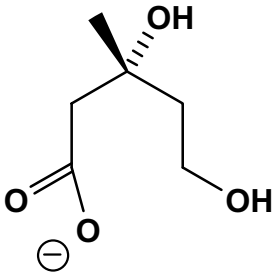


metallil pirofosfato



3-idrossi-3-metilglutaril-CoA

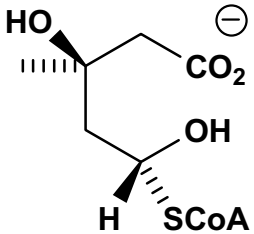


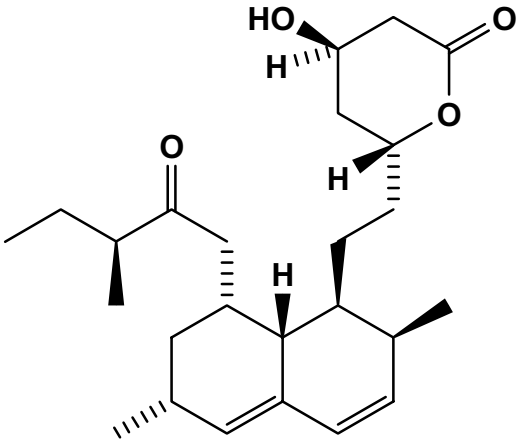


Mevalonato

intermedio

Lo S.d.T. è simile a questo intermedio

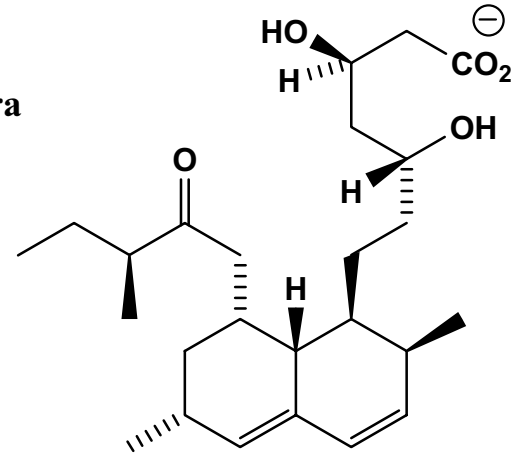




Mevinolina

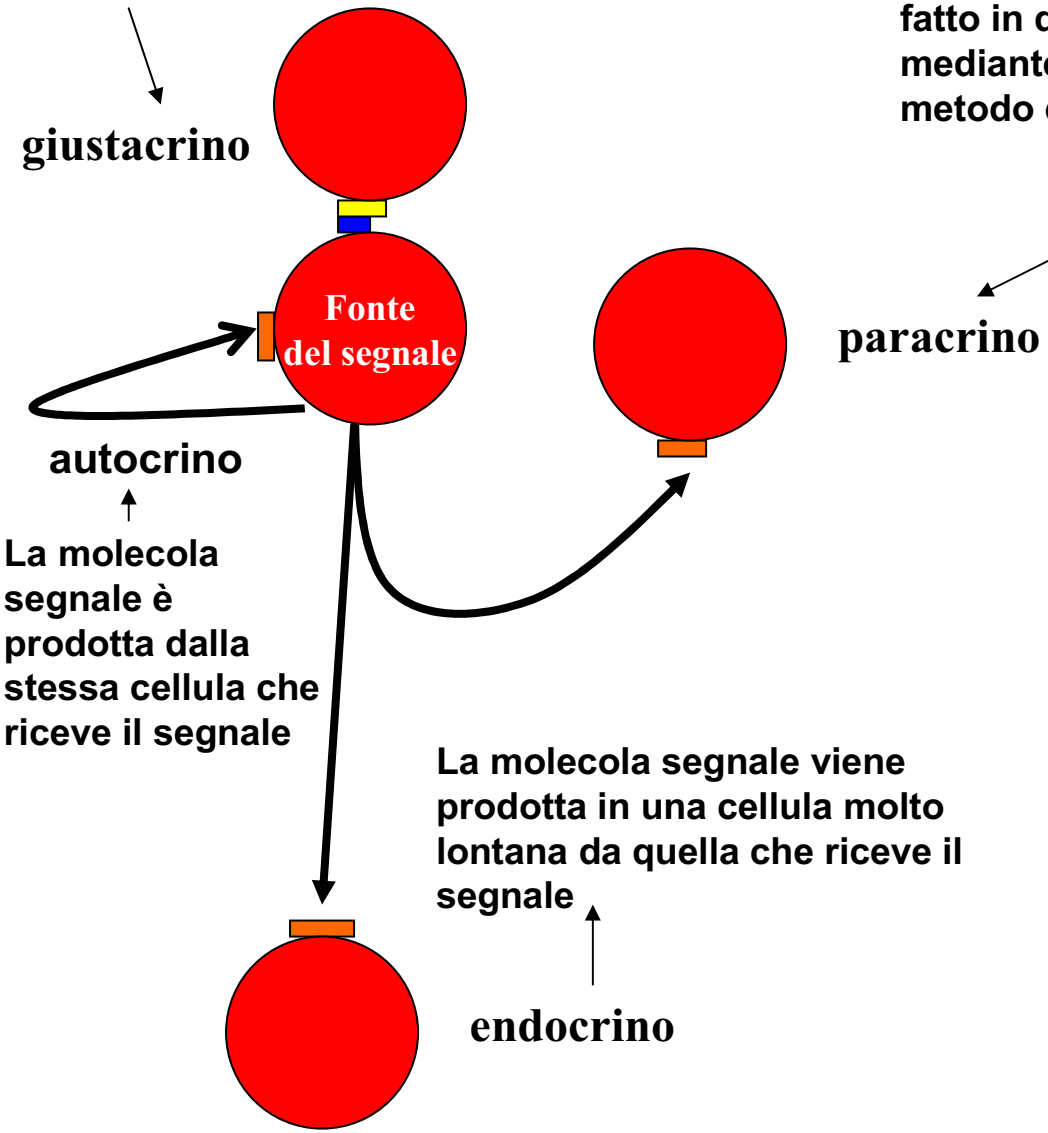
La Mevinolina (Lovastatina) è una sostanza naturale, estratta da una coltura di *Aspergillus*.
E' un potente inibitore della HMGCoA reduttasi (K_i = 0,64 nM). La parte superiore (una volta aperto il lattone) mima lo stato di transizione, mentre il resto della molecola aiuta nella complessazione.
La Mevinolina è stato il LEAD di importanti farmaci anti-colesterolo

in vivo



RECETTORI E MOLECOLE SEGNALE (MESSAGGERI)

La molecola segnale rimane legata alla cellula che la produce



In un organismo pluricellulare, le cellule hanno bisogno di scambiarsi dei messaggi. Ciò viene fatto in due modi: mediante impulsi elettrici o mediante "messaggeri chimici". Il secondo metodo è di gran lunga il più usato.

La molecola segnale viene prodotta in una cellula vicina quella che riceve il segnale

La molecola segnale è prodotta dalla stessa cellula che riceve il segnale

La molecola segnale viene prodotta in una cellula molto lontana da quella che riceve il segnale

Le MOLECOLE SEGNALE sono di solito sostanze chimiche semplici, ma possono essere anche oligopeptidi. Essi esercitano la loro funzione legandosi ad un opportuno RECETTORE selettivo.
In seguito all'interazione con il recettore, la molecola segnale non subisce variazioni chimiche. Il recettore però provoca una RISPOSTA BIOLOGICA.
Le MOLECOLE SEGNALE possono essere dette anche MESSAGGERI PRIMARI o LIGANDI dei recettori.

I recettori sono macromolecole biologiche coinvolte nello scambio di segnali tra cellule. Un recettore è specifico per un determinato ligando. Al contrario spesso un dato messaggero primario può interagire con diversi recettori.
Un recettore deve necessariamente possedere nella sua struttura due siti:

- **Un sito di RICONOSCIMENTO, che si lega selettivamente al messaggero.**
- **Un sito che provoca la RISPOSTA BIOLOGICA**

Spesso questi due siti sono posti l'uno all'esterno della cellula (quello di riconoscimento) e l'altro all'interno (quello che provoca la risposta biologica). In questi casi il recettore è TRANS-MEMBRANA (TM). Inoltre, in questi casi, il messaggero deve poi essere rimosso.

I recettori sono di natura peptidica. Possono però essere legati a strutture di altra natura (per esempio carboidrati o acidi nucleici). L'interazione ligando-recettore non prevede legami covalenti, ma interazioni di non legame. La specificità è per certi versi simile a quella enzima-substrato, ma in questo caso non hanno luogo reazioni.

Tipi di messaggeri primari

Ormoni: sono messaggeri secreti da cellule specializzate, site anche molto lontano dalla cellula destinataria del messaggio (meccanismo endocrino). Hanno quasi sempre una funzione univoca. Spesso sono sostanze lipofile, che vengono trasportate nel sangue mediante proteine di trasporto.

Mediatori Chimici Locali: sono messaggeri che agiscono su cellule bersaglio situate nell'immediata vicinanza della cellula che li ha prodotti (meccanismo paracrino).

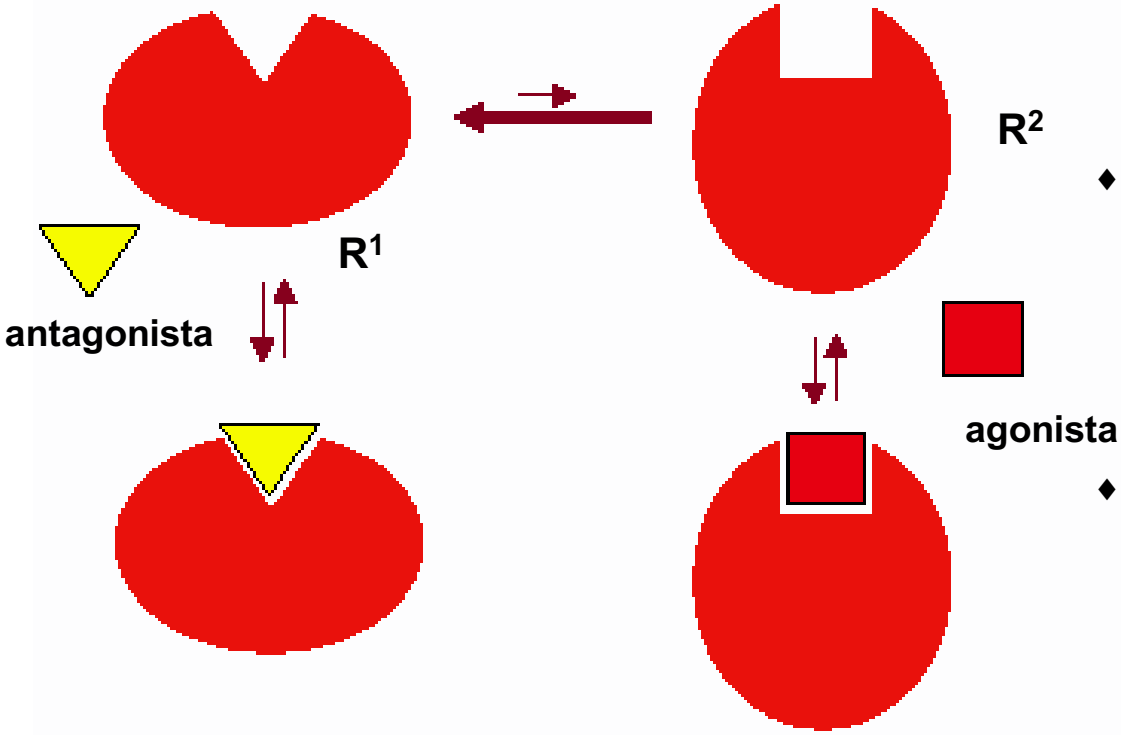
Fattori di crescita: sono messaggeri (in genere proteine) che provocano la proliferazione e/o la differenziazione delle cellule. Agiscono generalmente in modo paracrino o endocrino

Citochine: sono simili ai fattori di crescita, ma riguardano le cellule del sistema immunitario. Sono infatti generalmente secrete dai leucociti. Possono funzionare con meccanismo autocrino, paracrino o endocrino.

Neurotrasmettitori: sono preposti alla comunicazione tra neuroni. Hanno un meccanismo di tipo paracrino.

MODELLO A DUE STATI PER IL FUNZIONAMENTO DI UN RECETTORE

Vi sono due conformazioni del recettore in equilibrio, di cui una attiva (R^2) ed una inattiva (R^1). A riposo prevale nettamente all'equilibrio la conformazione inattiva, per cui la risposta biologica avviene in modo trascurabile.

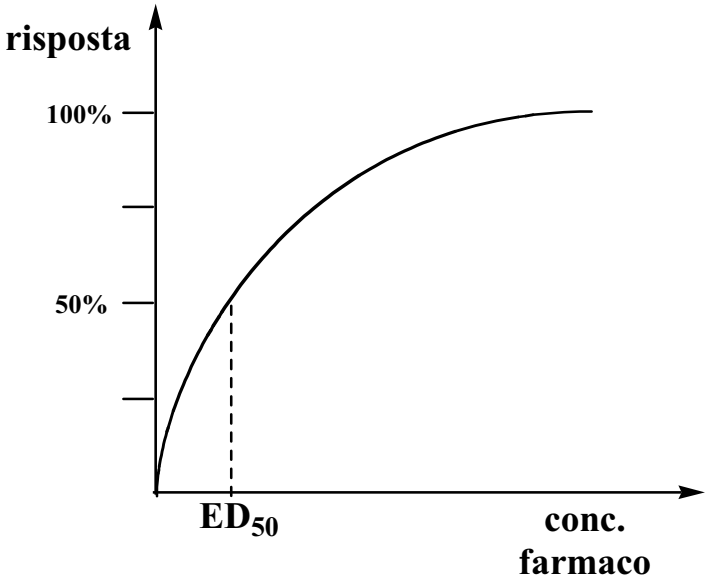


- **Un AGONISTA ha una spiccata preferenza per la conformazione R^2 e, legandosi ad essa, sposta l'equilibrio verso destra.**
- **Un ANTAGONISTA non distingue tra le due conformazioni, legandosi indifferentemente ad entrambe. Se occupa tutti i siti recettoriali, congela l'equilibrio nella situazione (sfavorevole) di riposo.**
- **Un AGONISTA PARZIALE ha maggiore affinità per R^2, ma non in modo così spiccato come l'agonista. Sposta quindi l'equilibrio, ma non completamente (la risposta è inferiore alla massima raggiungibile)**
- **Un AGONISTA INVERSO ha maggiore affinità verso la forma R^1 e sposta l'equilibrio a sinistra. Dato che l'equilibrio è comunque spostato a sinistra, è difficile distinguere tra un antagonista ed un agonista inverso.**

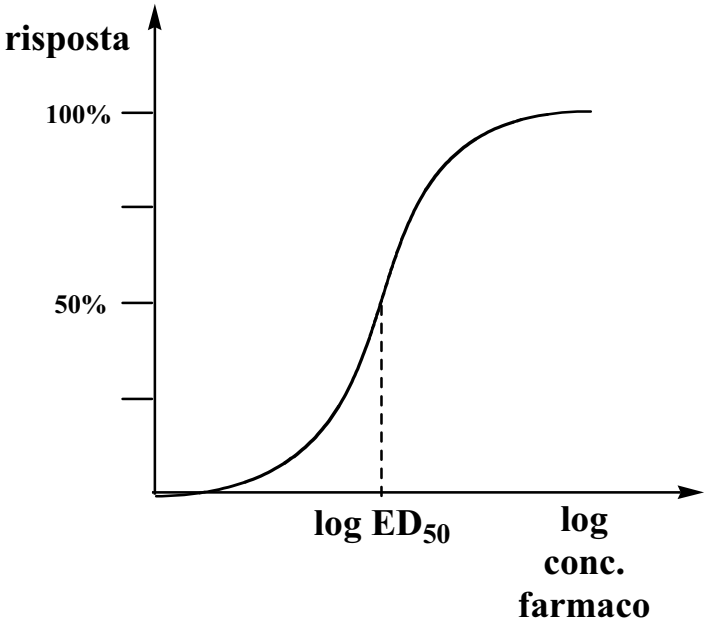
AGONISTA: sostanza che, legandosi al recettore, provoca la risposta biologica. Può essere il legando naturale o un'altra sostanza esogena.

L'efficacia di un agonista può essere misurata mediante le curve "dose-risposta"

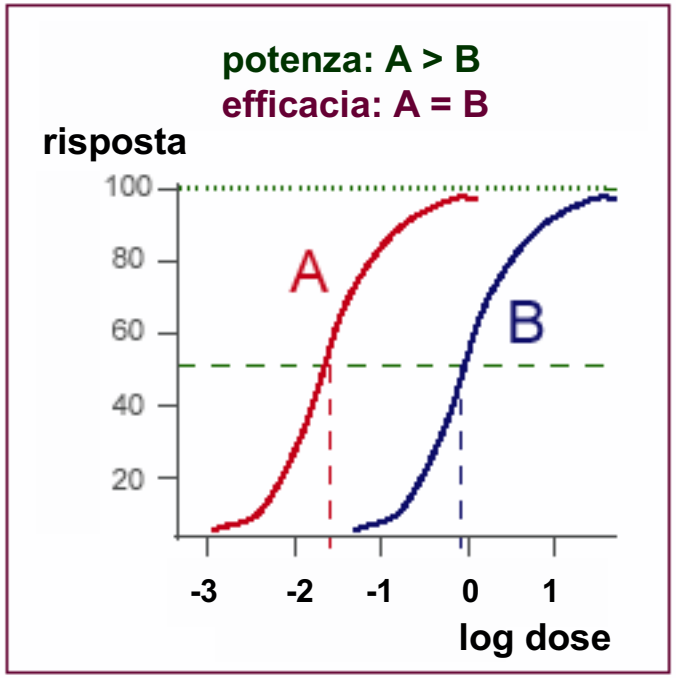
La risposta è una quantificazione dell'effetto biologico provocato dal recettore. La curva arriva ad un massimo non ulteriormente superabile. La **potenza** di un farmaco è data dalla concentrazione a cui si realizza metà della risposta massima. L'**efficacia** è invece la risposta massima realizzabile

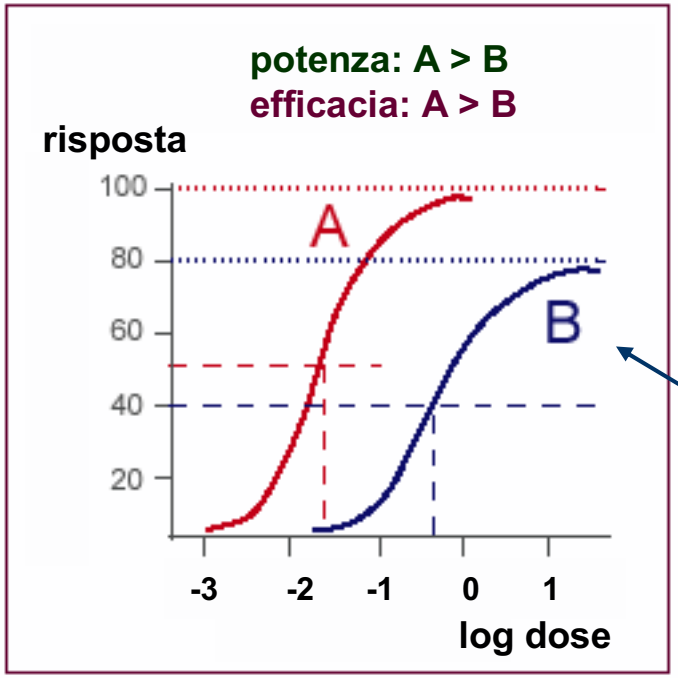


curva dose / risposta (normale)



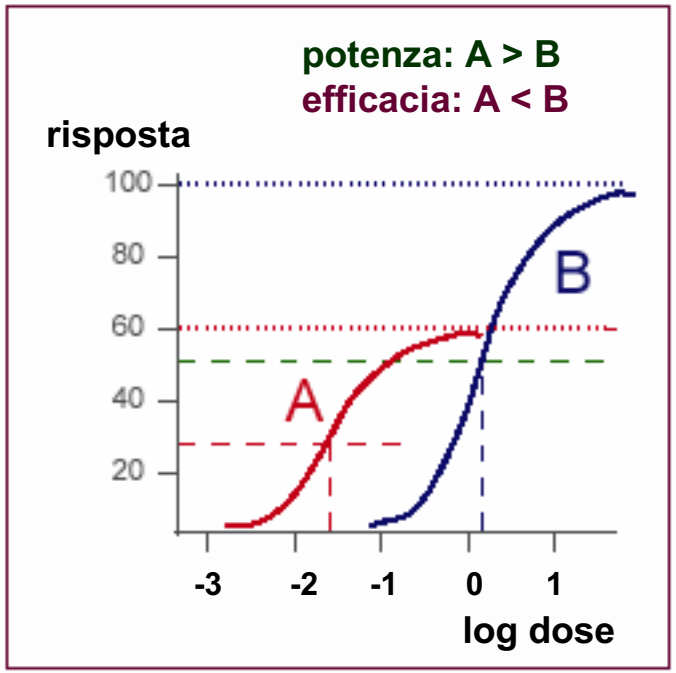
curva dose / risposta (logaritmica)

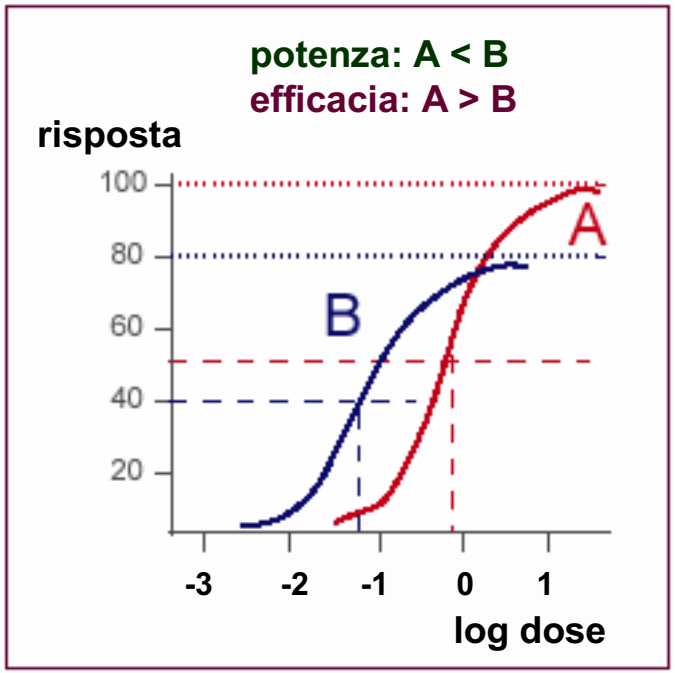




ED_{50} è determinato in relazione all'effetto massimo di quel dato farmaco

Se A è il ligando naturale o un agonista totale, B sarà un agonista parziale

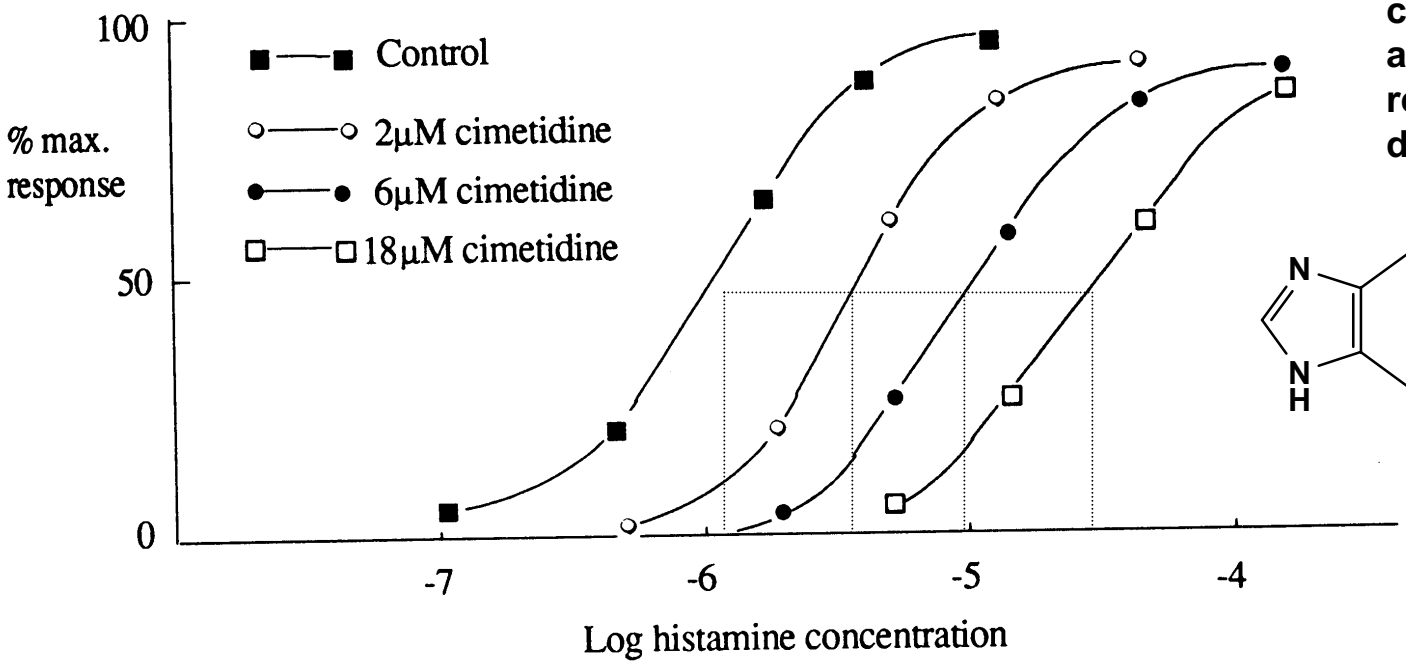




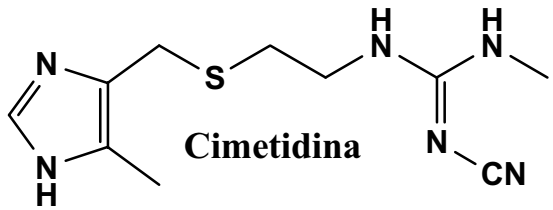
Per indicare la potenza di un agonista ci si riferisce in genere all' ED_{50}

La potenza di un agonista dipende dalla sua affinità con il recettore.

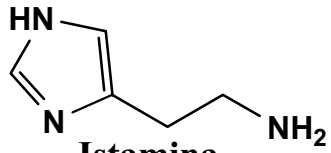
QUANTIFICAZIONE DELL'EFFETTO DI UN ANTAGONISTA



effetto della cimetidina, un antagonista dei recettori H_2 dell'istamina.



Cimetidina



Istamina

Per misurare l'effetto di un antagonista, esso deve essere utilizzato in congiunzione con un agonista. Se è presente l'antagonista, occorrerà una maggiore concentrazione di agonista per ottenere la stessa risposta biologica. Se per esempio [Ag] è la concentrazione dell'agonista che dà il 50% di risposta e [Ag]' è la concentrazione che darà ancora il 50% di risposta in presenza dell'antagonista (Ant), avrò:

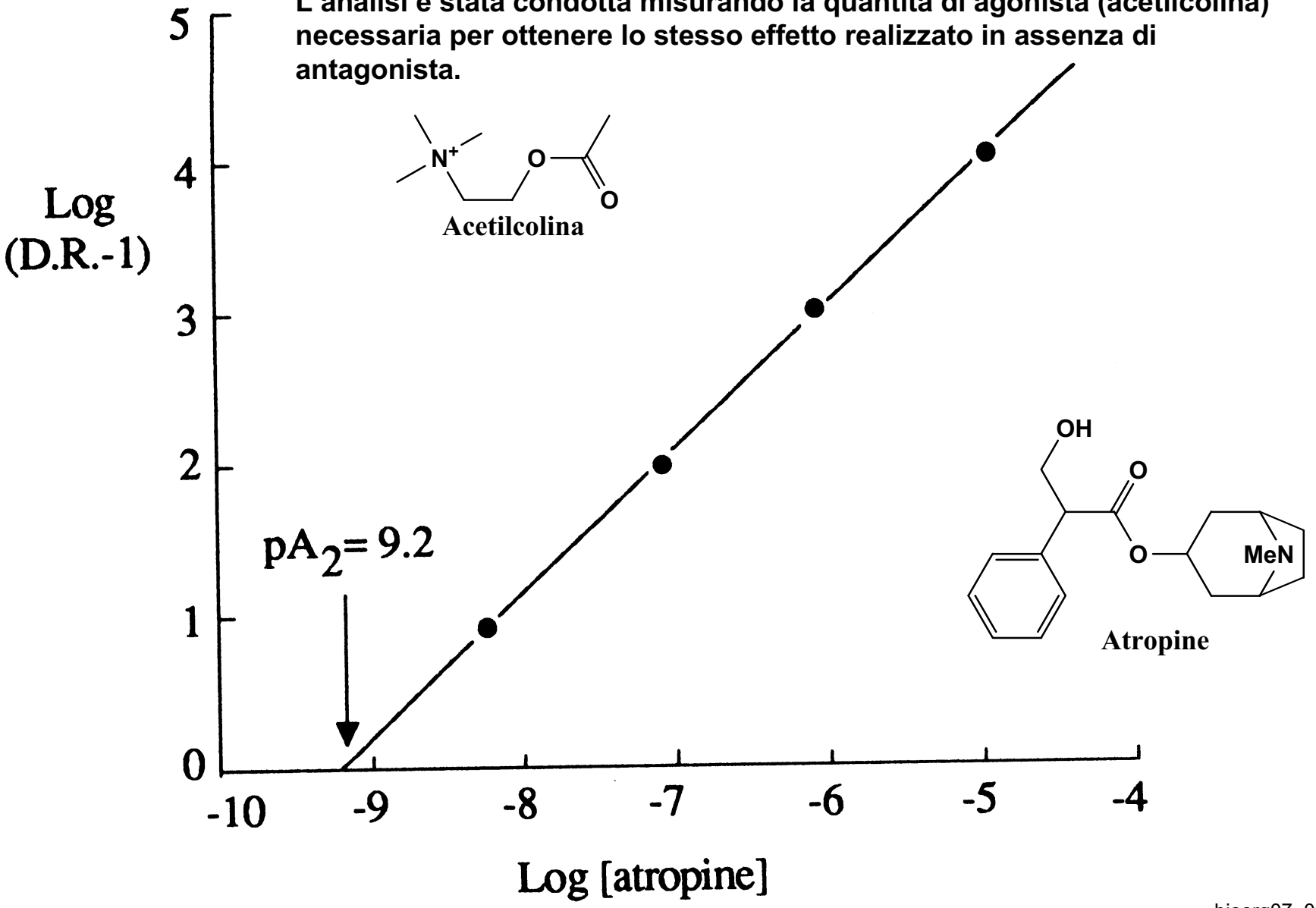
$$\frac{[Ag]'}{[Ag]} = \text{rapporto delle dosi (D.R.)}$$

Di solito si usa come grandezza: log (D.R.– 1) (pA)

pA_2 è il valore di [Ant] per cui pA = 0. ovvero per cui (D.R. – 1) = 1 e D.R. = 2
Questa è quindi la concentrazione a cui l'antagonista dimezza l'effetto dell'agonista

Si mette quindi in grafico pA [= log (D.R.-1)] in funzione di log [Ant]. L'intercetta con l'asse delle X corrisponde a pA_2

Effetto dell'atropina, un antagonista dei recettori muscarinici dell'acetilcolina.
L'analisi è stata condotta misurando la quantità di agonista (acetilcolina) necessaria per ottenere lo stesso effetto realizzato in assenza di antagonista.



I recettori possono essere interni alla cellula o trans-membrana

I messaggeri primari idrofilici non possono superare il doppio strato lipidico della membrana cellulare (per lo meno in assenza di un meccanismo di trasporto opportuno). In questo caso il sito di riconoscimento del recettore è posto all'esterno della membrana, mentre il sito della risposta biologica è situato all'interno.

I messaggeri primari lipofilici (ad es. gli ormoni steroidei) attraversano facilmente la membrana cellulare. Quindi i loro recettori sono situati dentro alla cellula.

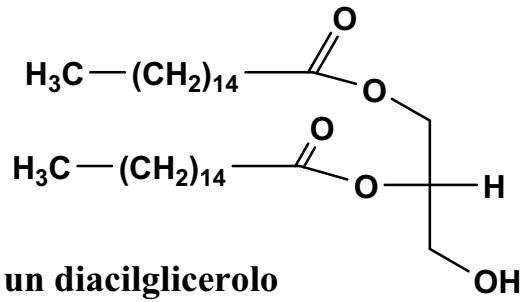
Ci sono più recettori che messaggeri primari

Diversi messaggeri primari sono attivi su più di un recettore. Questo è soprattutto vero per messaggeri che operano con meccanismo paracrino (neurotrasmettitori e mediatori chimici locali), mentre ormoni e fattori di crescita sono di solito più specifici.

COME SONO FATTE LE MEMBRANE CELLULARI?

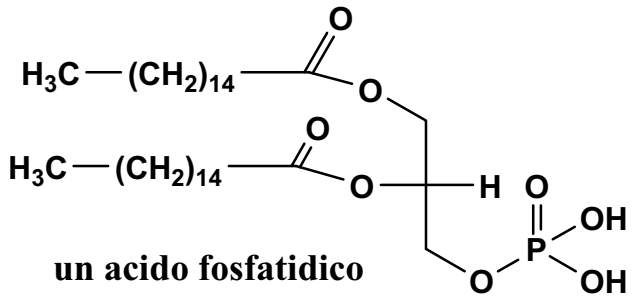
FOSFOLIPIDI

I fosfolipidi sono i lipidi più abbondanti in natura, dopo i trigliceridi. Sono derivati degli acidi fosfatidici



un diacilglicerolo

1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerolo



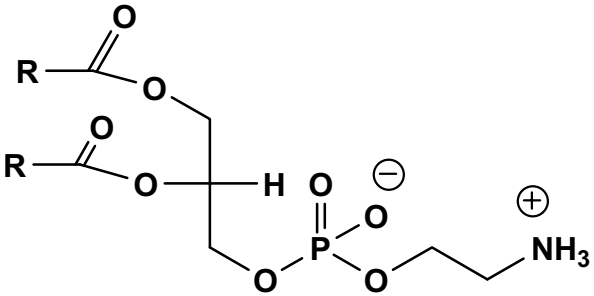
un acido fosfatidico

acido 1,2-dipalmitoil-3-*sn*-fosfatidico

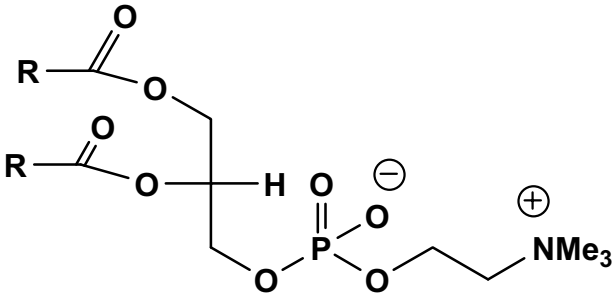
Gli acidi grassi più comuni negli acidi fosfatidici (e quindi nei fosfolipidi) sono gli acidi palmitico e stearico e l'acido oleico.

<u>Notazione di configurazione nei derivati del glicerolo:</u>
si scrive sempre la molecola in modo che l'ossidrile secondario (eventualmente esterificato) sia a sinistra e si numerano opportunamente i sostituenti dall'alto. L'uso di questa convenzione è indicato dal prefisso *sn*.

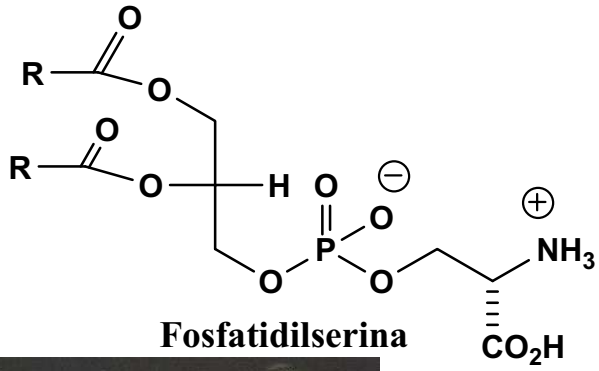
PRINCIPALI FOSFOLIPIDI



Fosfatidiletanolammina (Cefalina)

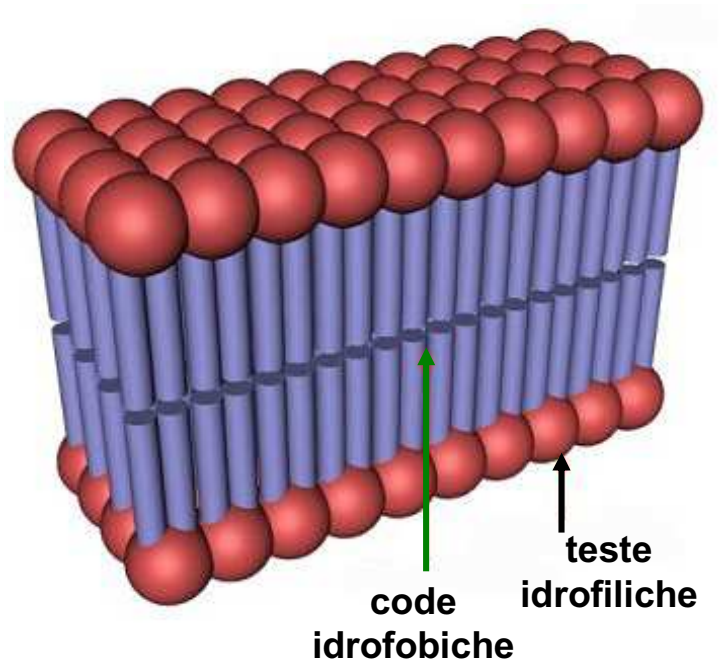


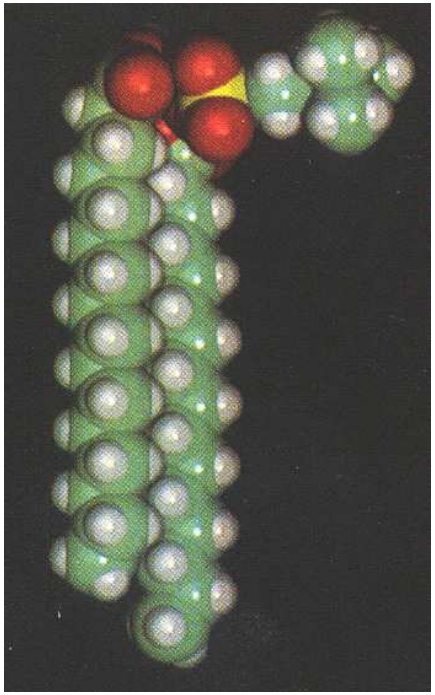
Fosfatidilcolina (Lecitina)



Fosfatidilserina

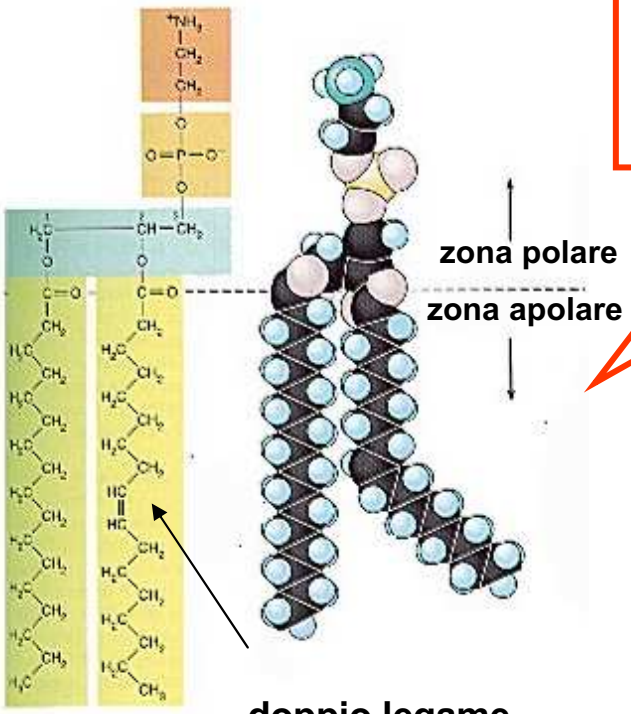
I fosfolipidi sono quindi costituiti da una testa polare ionica e da una lunga coda idrofobica.
Tendono perciò ad organizzarsi spontaneamente in un doppio strato lipidico che pone le catene idrofobiche all'interno e le teste polari all'esterno



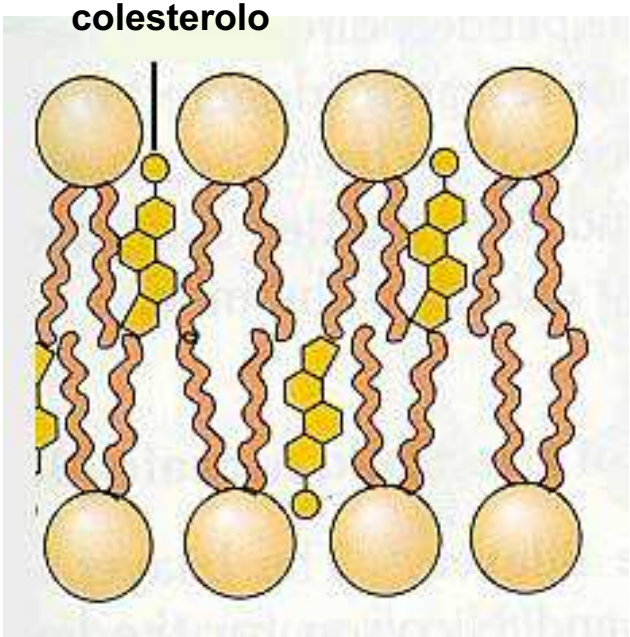


Lecitina

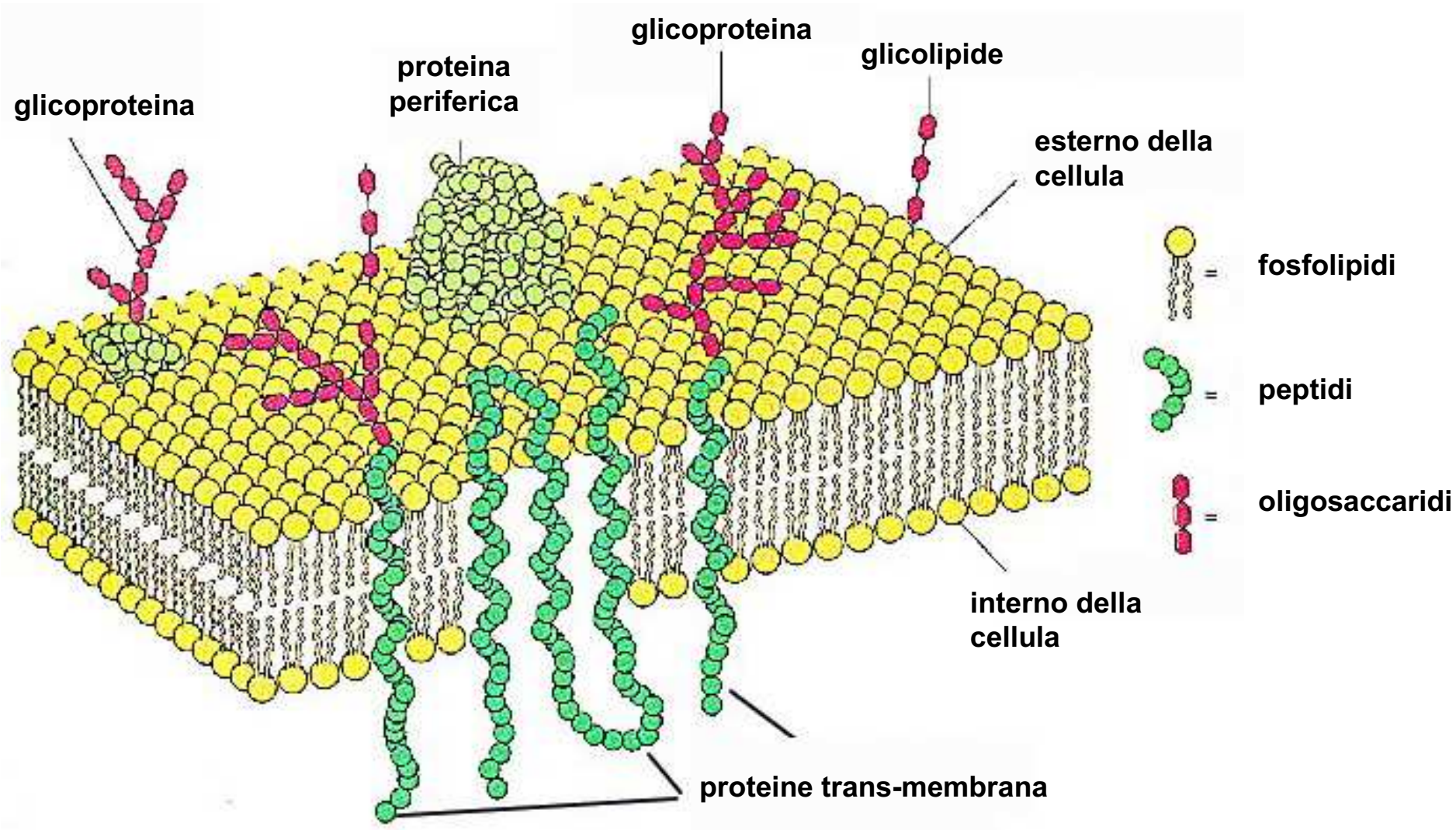
Quando è presente acido oleico la struttura del doppio strato risulta meno rigida.
Anche un aumento della temperatura rende il doppio strato più fluido.



colesterolo



In molte membrane è presente anche del colesterolo. Esso rende la membrana più impermeabile a piccole molecole polari. Le membrane cellulari dei batteri non hanno colesterolo, ma sono protette dalla parete cellulare



Le proteine transmembrana possono fungere da recettori o da canali ionici/molecolari. Il sito di riconoscimento extracellulare può essere di natura peptidica o carboidratica.
Le proteine trans-membrana possono attraversare la membrana solo una volta ("a singolo passo") o più volte ("a passo multiplo"). Le proteine trans-membrana sono dette anche "proteine integrali".

CANALI IONICI

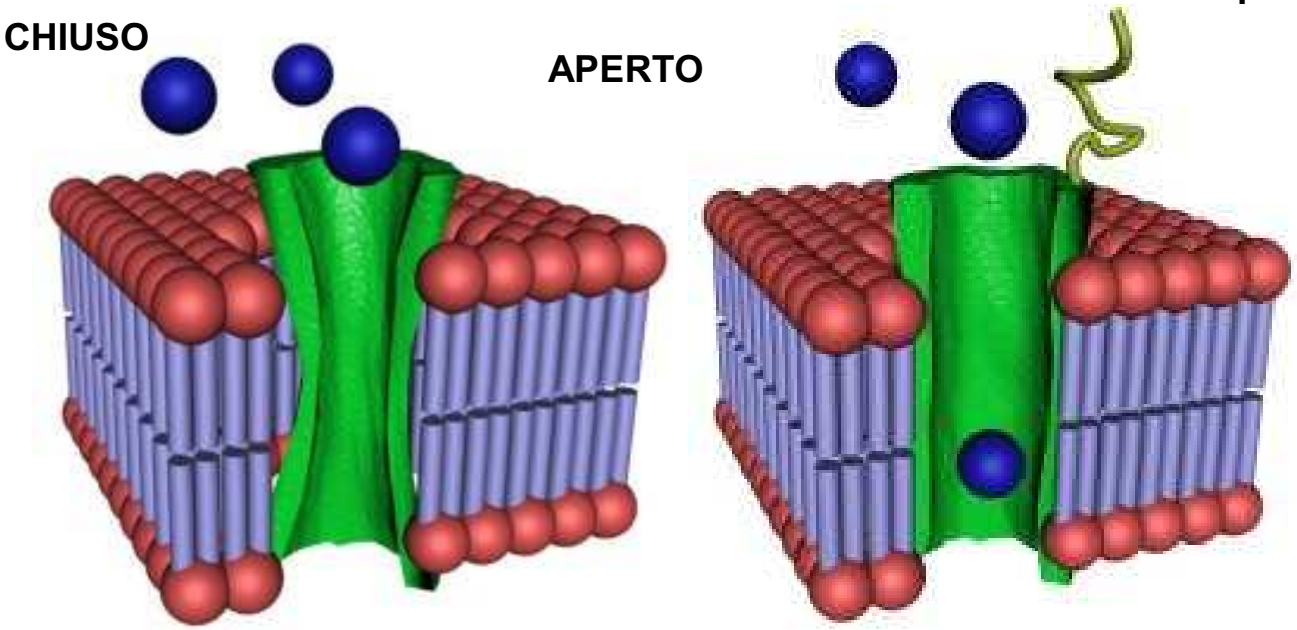
Le membrane cellulari sono impermeabili agli ioni ed alle sostanze idrosolubili in genere. Essi non passano quindi liberamente dentro e fuori.

Conc. tipiche di alcuni ioni (mmoli/l)		
Ione	Plasma	Cellule
Na^+	136 - 145	10
K^+	3,5 - 5,0	125

Se gli ioni potessero passare liberamente, non potrebbero esistere queste differenze!

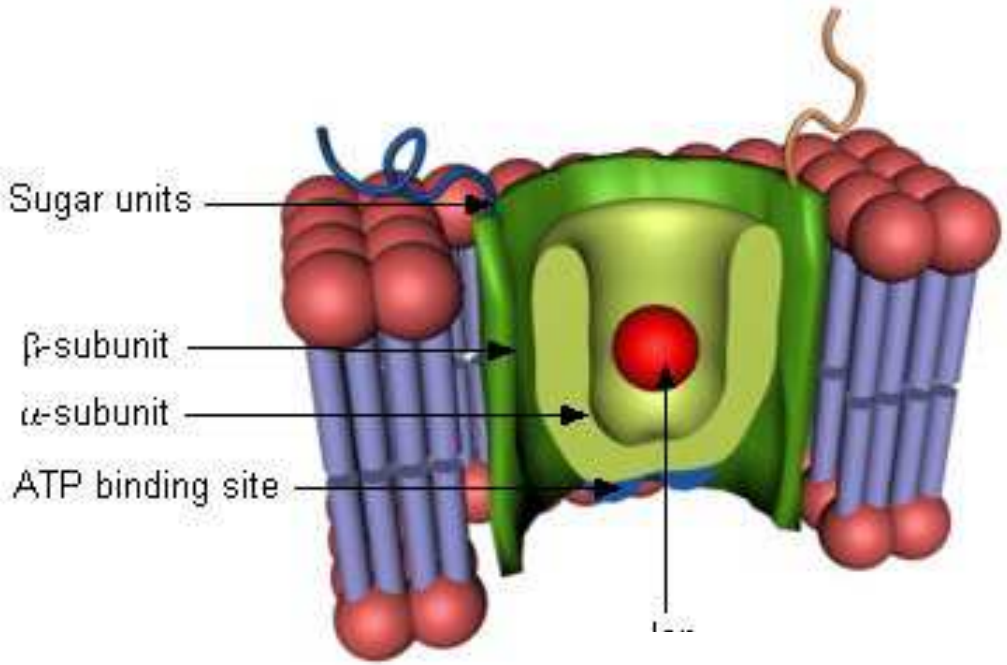
Il controllo del passaggio degli ioni è esercitato da particolari proteine trans-membrana, dette CANALI IONICI.

I CANALI IONICI possono essere di due tipi. Il primo tipo si apre e chiude facilitando così la diffusione spontanea degli ioni:

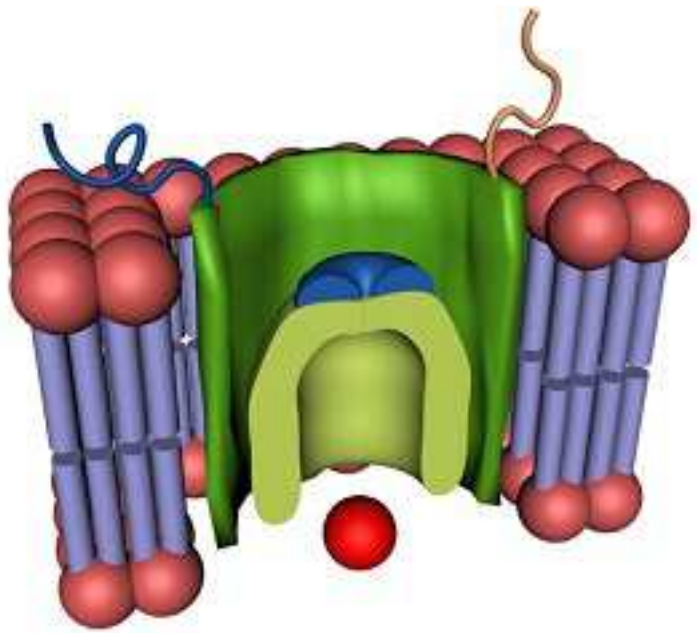


L'apertura/chiusura può essere mediata da una molecola segnale (ligand-gated) o da una variazione di potenziale elettrico (voltage-gated).

Il secondo tipo consente invece un trasporto "attivo" contro al gradiente. Questi canali ionici sono detti anche "pompe ioniche". Il trasporto attivo richiede energia e quindi è implicato l'ATP.



La pompa cattura lo ione all'esterno....

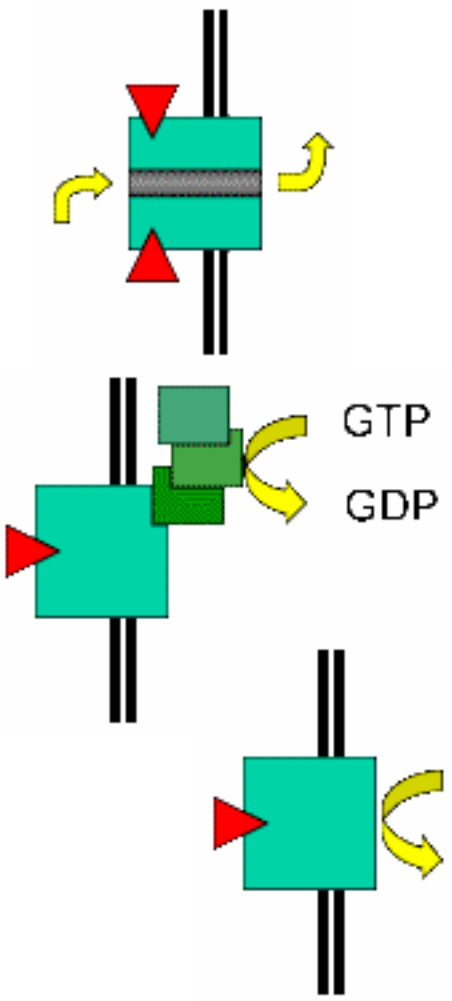


e lo rilascia all'interno.....

TORNANDO AI RECETTORI.....

In che modo la complessazione con il ligando (agonista) produce una risposta biologica (ovvero una modificazione delle funzioni cellulari)?

Possiamo classificare i recettori in 4 grandi famiglie a seconda del meccanismo generale seguito per produrre la risposta biologica. I 4 meccanismi si differenziano anche per la velocità della risposta.



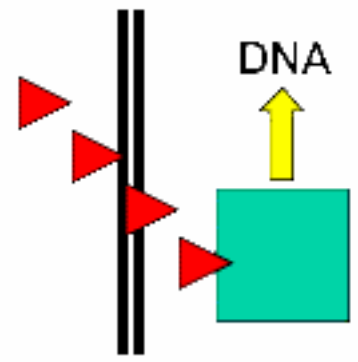
1) **Il recettore apre o chiude un canale ionico.** **Si tratta di recettori trans-membrana. La risposta è <u>molto</u> veloce (dell'ordine dei millisecondi)**

2) **Il recettore induce l'attività di una proteina (proteina G) legata ad esso. La proteina G in genere aumenta o diminuisce la produzione di un "messaggero secondario"** **che agisce all'interno della cellula. Si tratta di recettori trans-membrana. La risposta è veloce (dell'ordine dei secondi).**

3) **Il recettore induce l'attività di un particolare enzima (Tirosina chinasi o Guanilato ciclasi) legata al recettore stesso.** **Si tratta di recettori trans-membrana. La risposta è lenta (dell'ordine dei minuti).**

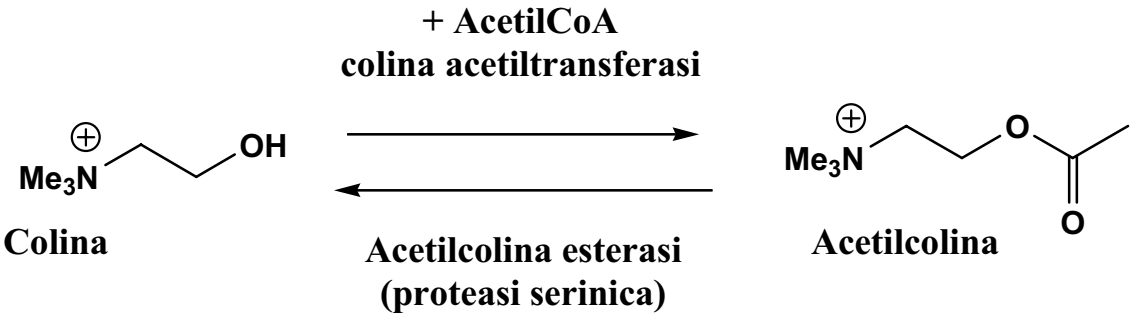
4) Il recettore induce l'attività di un particolare gene.

Si tratta di recettori interni alla cellula. Il sito della risposta biologica porta legato un frammento di DNA che, in seguito ad esposizione, attiva un gene del DNA cellulare. La risposta è molto lenta (ore o giorni).

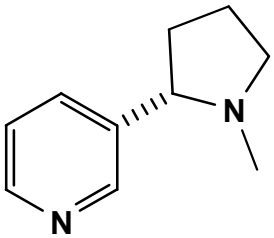


RECETTORI DI TIPO 1

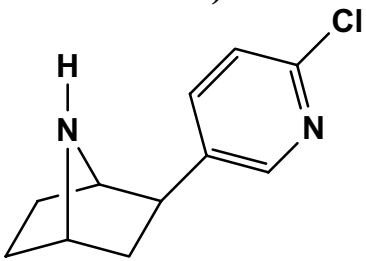
Un esempio tipico è dato dai recettori "nicotinici" della acetilcolina. L'acetilcolina è un importante NEUROTRASMETTITORE.



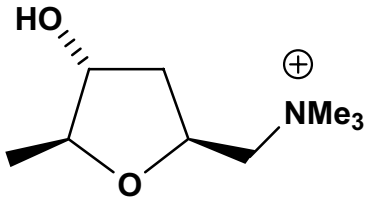
Sia la sintesi che l'idrolisi dell'acetilcolina sono processi molto veloci (soprattutto l'idrolisi)



Nicotina (un agonista dei recettori nicotinici)



Epibatidina (un potente agonista dei recettori nicotinici)



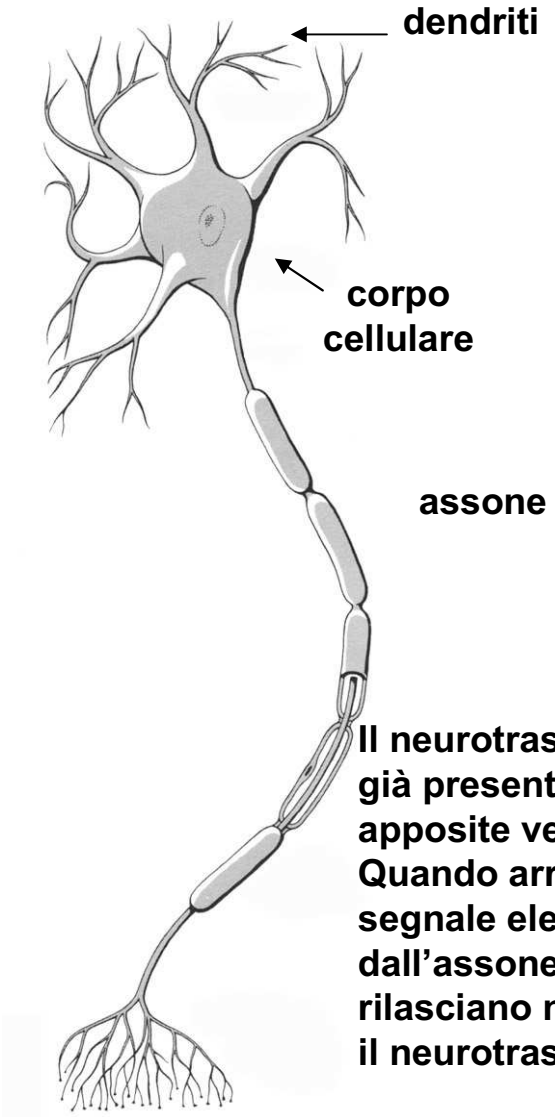
Muscarina (antagonista dei recettori muscarinici)

Amanita Muscaria

La funzione dei neurotrasmettitori è in genere quella di "passare" un messaggio da un neurone all'altro.

I recettori di tipo "nicotinico" sono presenti nei neuroni responsabili della contrazione muscolare, ma anche in neuroni del cervello.

NEURONE

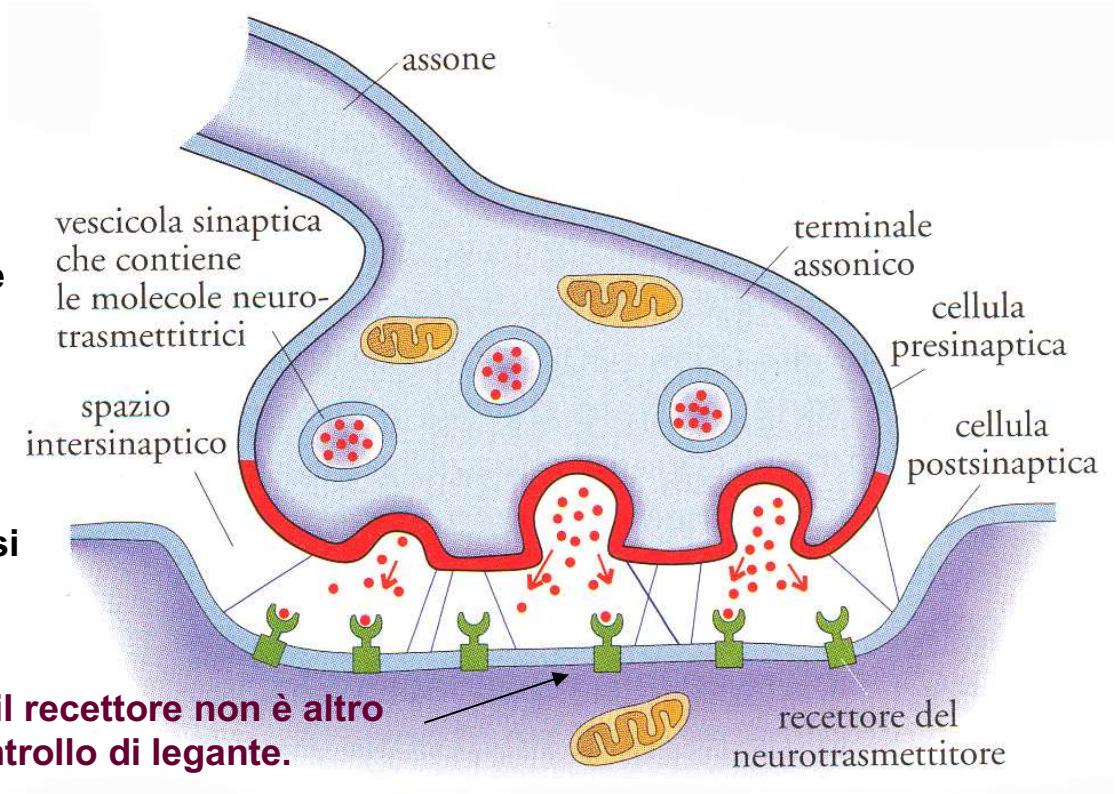


Un determinato segnale deve essere trasmesso da un neurone all'altro. Quindi il segnale deve: a) muoversi da un capo all'altro di un dato neurone; b) essere trasmesso dal terminale assonico di un neurone alla testa dendritica dell'altro.

Nel primo caso il segnale è di tipo "elettrico". Nel secondo caso è di tipo "chimico".

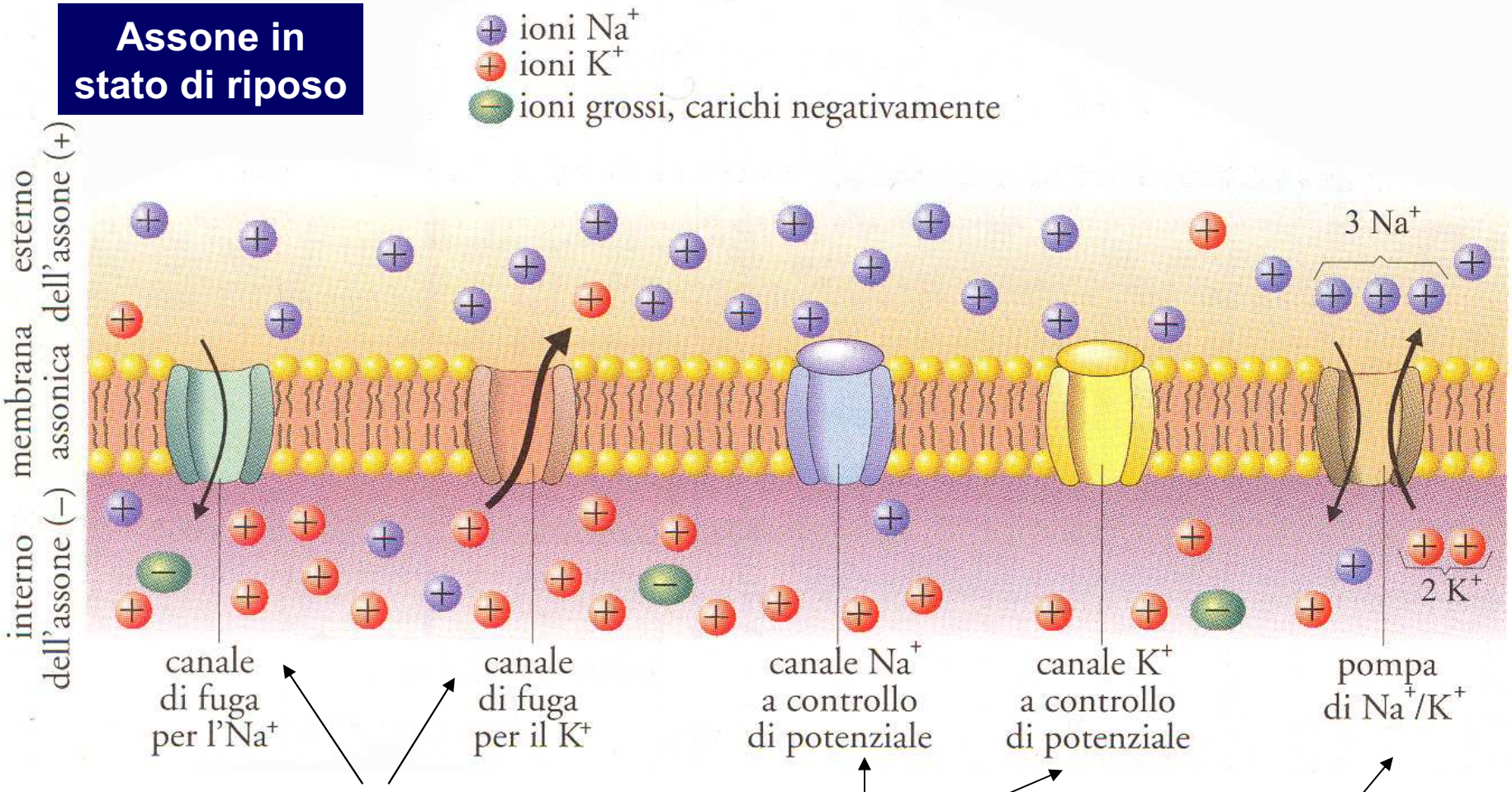
La trasmissione del segnale chimico sfrutta i neurotrasmettitori ed ha luogo in un piccolo spazio vuoto compreso tra i due neuroni. Questo spazio è detto SINAPSI. La cellula che manda il segnale è detta "pre-sinaptica". Quella che lo riceve "post-sinaptica".

Il neurotrasmettitore è già presente in apposite vescicole. Quando arriva il segnale elettrico dall'assone, queste rilasciano nella sinapsi il neurotrasmettitore



Nel caso dell'acetilcolina, il recettore non è altro che un canale ionico a controllo di legante.

Assone in stato di riposo



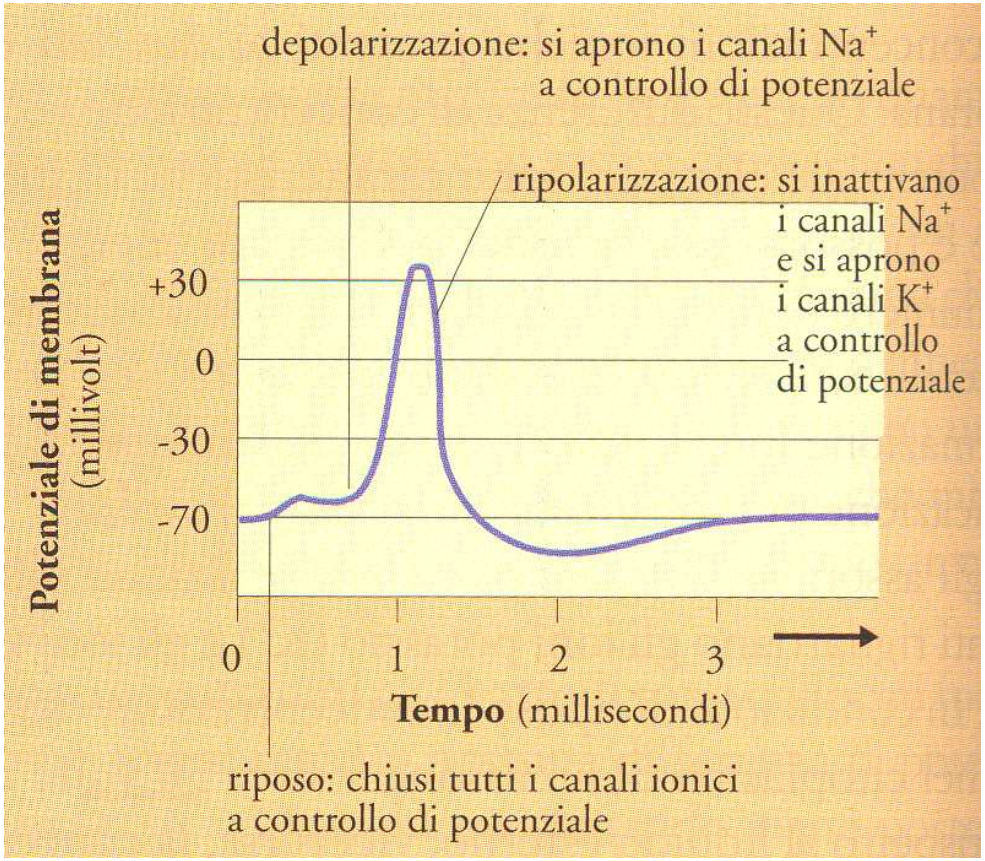
Questi canali consentono l'entrata di pochi ioni Na^+ e l'uscita di pochi ioni K^+, secondo il normale gradiente. Queste uscite ed entrate sono compensate dalla pompa ionica. Si ha pertanto una situazione di equilibrio

questi canali sono chiusi

La pompa ionica funziona in continuo. il 30-40%dell'energia consumata dal sistema nervoso è dovuta a questa pompa ionica

In condizioni di riposo il potenziale è negativo (circa - 70 mV)

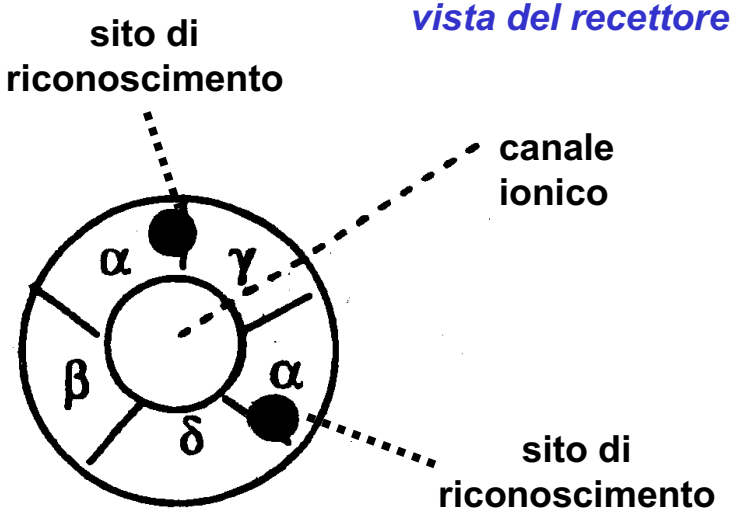
Il canale ionico a controllo di legante posto in testa alla cellula post-sinaptica si apre e fa entrare ioni Na^+ nella cellula. Questi si muovono lungo tutta la lunghezza del neurone, attratti dal potenziale negativo dell'assone. Ciò provoca una depolarizzazione che a sua volta induce l'apertura dei canali ionici del sodio a controllo di potenziale. In pratica si ha un'amplificazione del fenomeno. Il fenomeno dura però pochissimo. Non appena il potenziale diviene positivo i canali del sodio si chiudono e si aprono quelli del potassio. Grazie anche alla pompa ionica, in breve tempo si ripristina la situazione precedente.

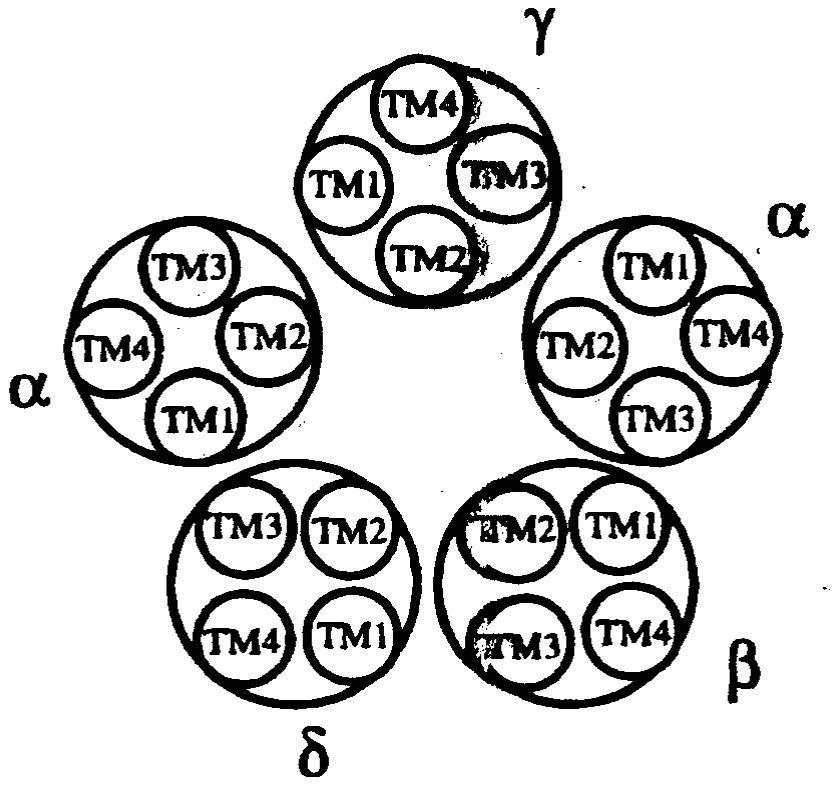


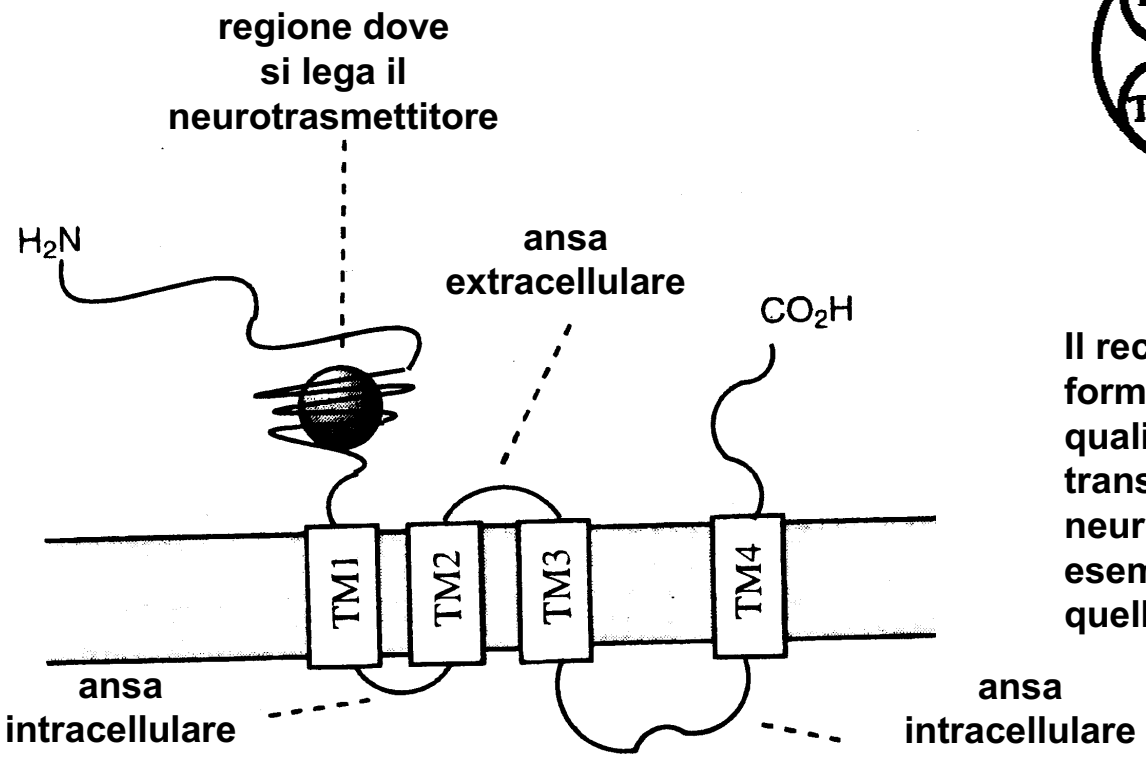
Nei terminali assonici ci sono molti canali ionici del calcio a controllo di potenziale. All'arrivo del segnale, si aprono, facendo entrare Ca^{++} nel terminale assonico. Ciò provoca la fusione delle vescicole con la membrana e la fuoriuscita del neurotrasmettitore.

I recettori nicotinici sono di tipo ECCITATORIO.
Il segnale chimico quindi eccita la cellula post-sinaptica a trasmettere a sua volta il segnale.
Esistono però recettori di neurotrasmettitori che sono di tipo INIBITORIO. In questo caso la cellula post-sinaptica non cambia polarità.
Ogni neurone del cervello (più di 10^9) è in contatto con $0,5\text{-}1*10^5$ neuroni. Può quindi trasmettere ad ognuno di essi segnali inibitori o eccitatori. Il tutto funziona come un computer.

vista del recettore dall'alto



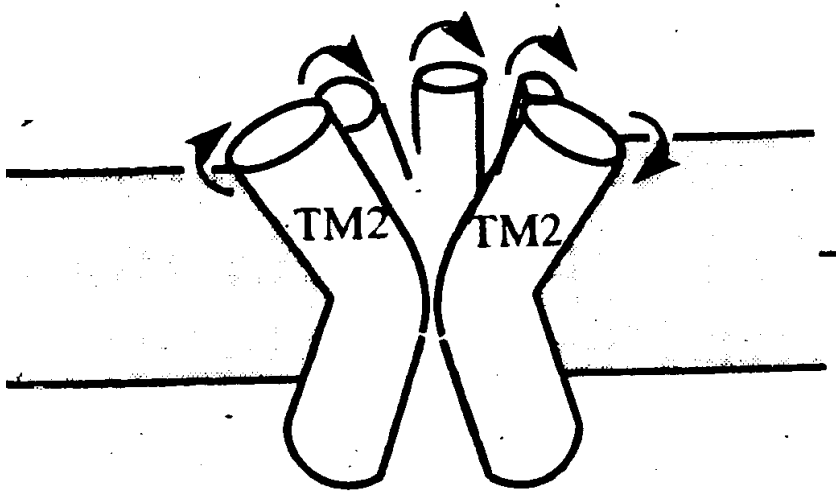


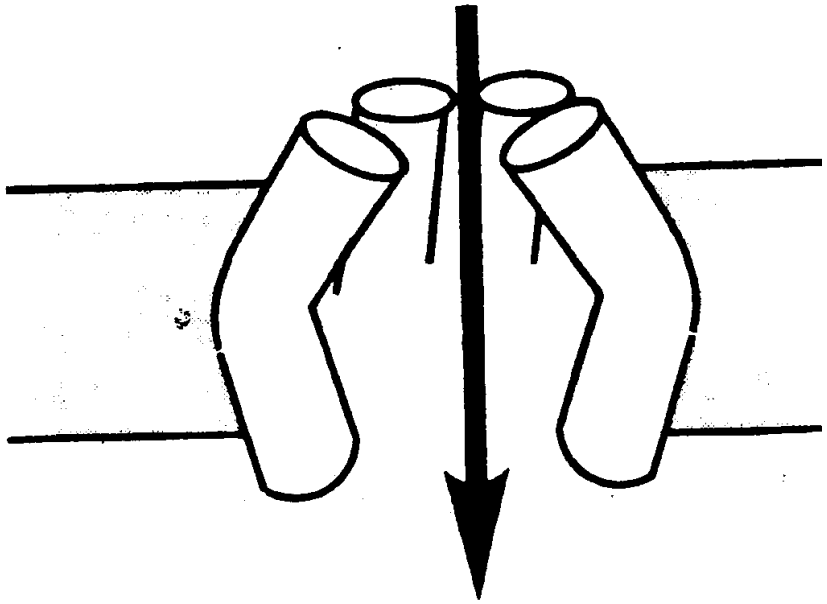


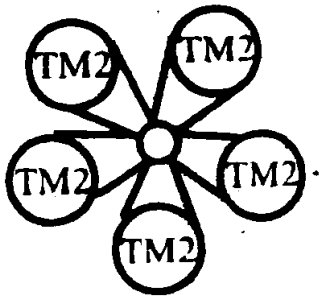
Il recettore nicotinico è del tipo 4-TM: è formato da cinque proteine, ciascuna delle quali è a sua volta formato da 4 domini trans-membrana. Molti recettori di neurotrasmettitori sono fatti così: ad esempio quelli della serotonina ($5HT_3$) e quello del GABA ($GABA_A$).

Le pareti del canale sono 5 alfa-eliche ognuna delle quali deriva da una proteina diversa delle 5 che compongono il canale.

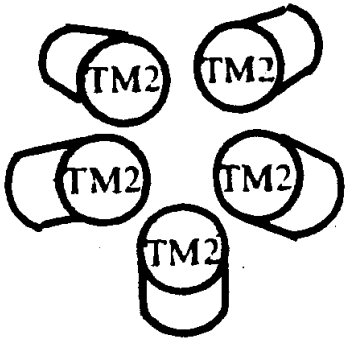
FLUSSO IONICO





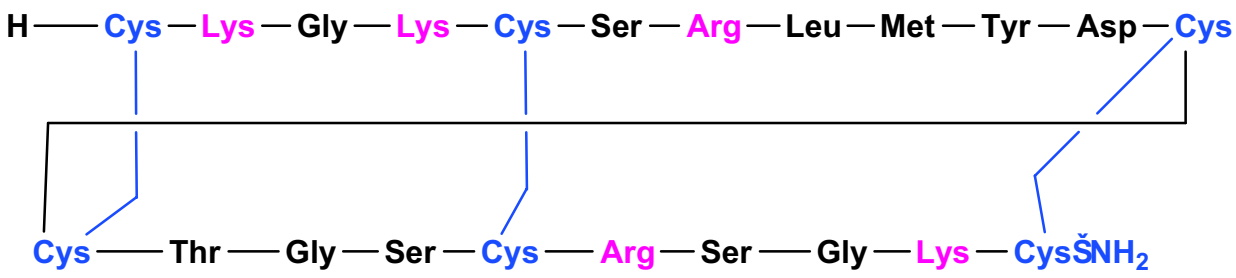


CANALE CHIUSO

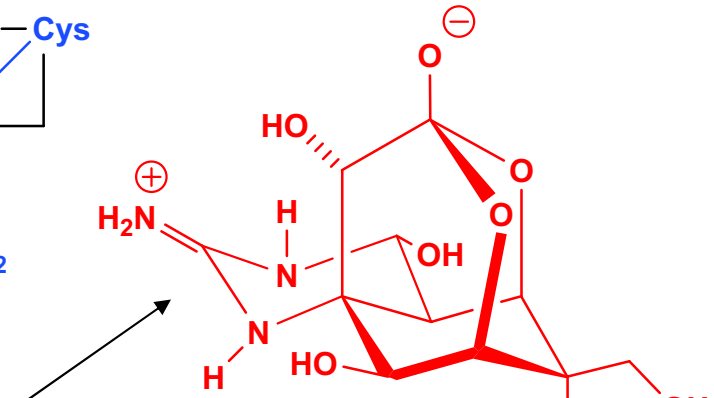


CANALE APERTO

Una volta trasmesso il segnale, è necessario che il neurotrasmettitore venga subito DISTRUTTO o RIASSORBITO. Altrimenti il segnale continuerà all'infinito!
Nel caso dell'acetilcolina, questo compito è svolto dall' Acetilcolina esterasi (proteasi serinica). La colina che si forma rientra nel terminale sinaptico.
Ci sono potenti veleni naturali che fungono da antagonisti dei recettori nicotinici dei muscoli.
Un esempio sono le conotossine (oligopeptidi)



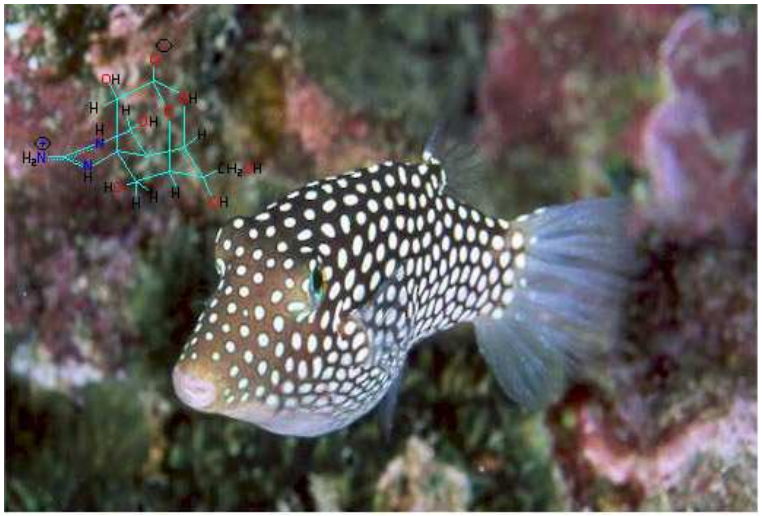
ZICONOTIDE (una CONOTOSSINA)



Tetrodotossina

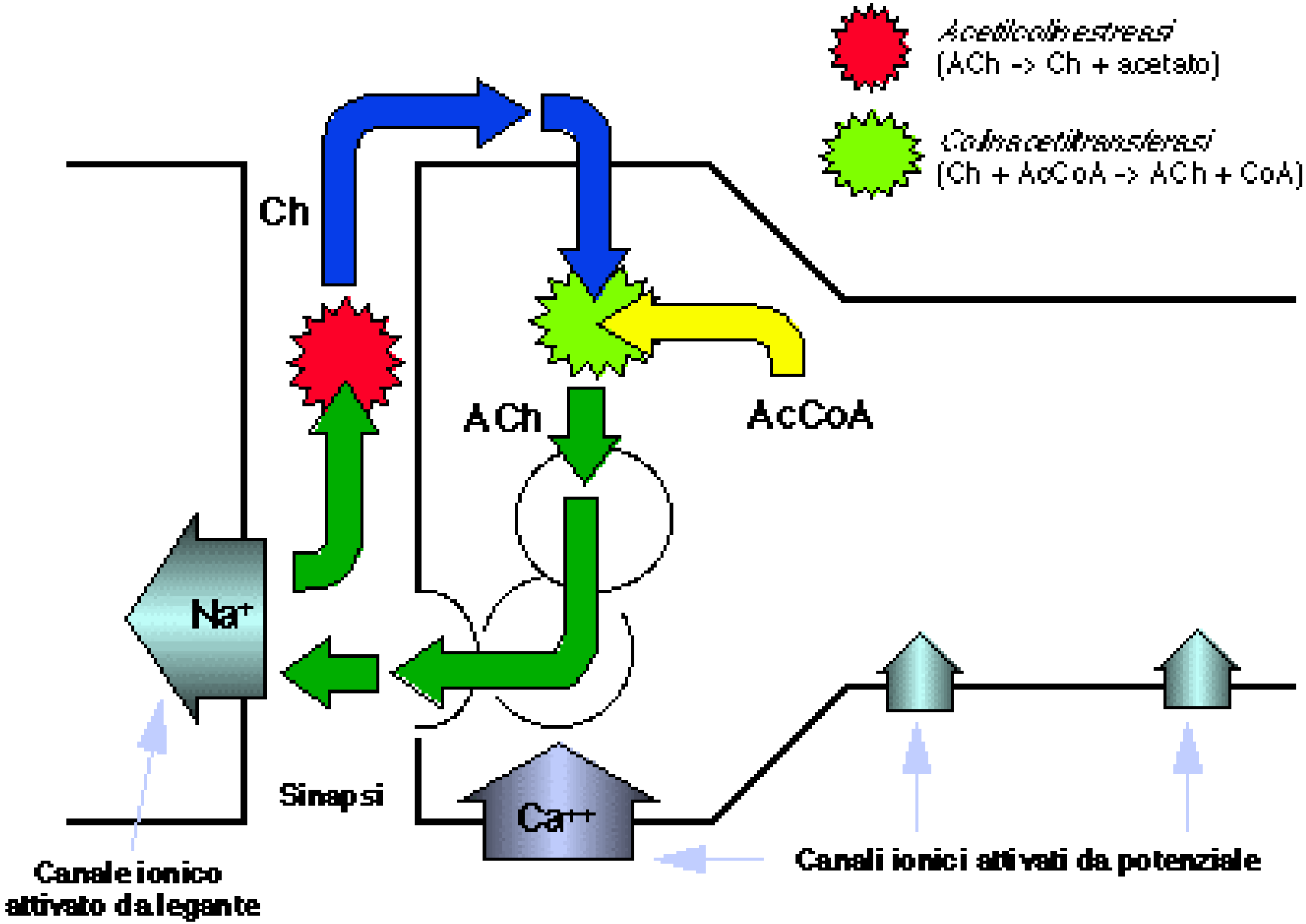
CONUS STRIATUS

La tetrodotossina, invece, blocca i canali del sodio voltaggio-dipendenti dei neuroni. Meno di 1 mg può uccidere un adulto!



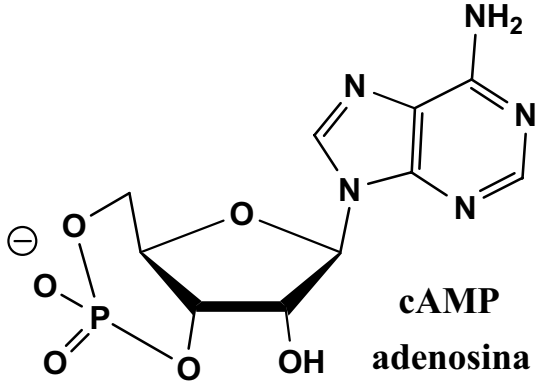
Pesce Palla

Riassumendo, questo schema riporta in modo schematico il funzionamento dei recettori nicotinici

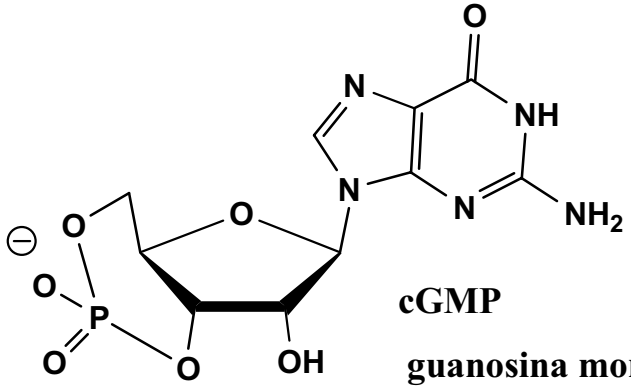


RECETTORI ACCOPPIATI CON PROTEINA G

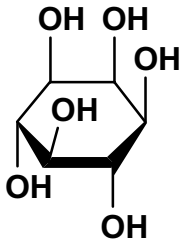
E' la classe di recettori più importante. Molti neurotrasmettitori e mediatori chimici locali agiscono su recettori di questo tipo. I recettori del gusto, dell'olfatto e della vista sono fatti così. Anche diversi ormoni peptidici attivano recettori di questa famiglia.
L'interazione con il messaggero primario porta all'attivazione di un complesso proteinico (detto "G"), che può svolgere diverse funzioni.
In alcuni casi, la funzione della proteina G è quella di portare alla produzione (all'interno della cellula) di un MESSAGGERO SECONDARIO, che a sua volta inizia una cascata di eventi biochimici che conducono alla risposta finale. Oppure, la proteina G può inibire la produzione del messaggero secondario o causarne la sua distruzione.
A differenza dei messaggeri primari, che sono molti, i messaggeri secondari sono pochissimi, anzi in pratica solo 4! Inoltre, i messaggeri secondari agiscono solo all'interno della cellula. Per questo possono essere pochi. La loro funzione specifica varia da cellula a cellula!
In questi recettori si osserva sempre un effetto di AMPLIFICAZIONE: per ogni messaggero primario che attiva il recettore, vengono prodotti molti messaggeri secondari.



cAMP
adenosina monofosfato ciclico



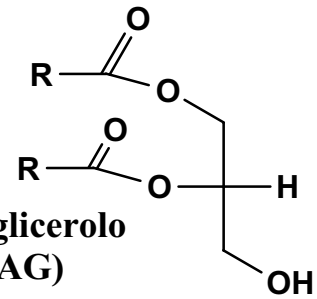
cGMP
guanosina monofosfato ciclico



Inositolo

(un ciclitolo o carbazucchero)

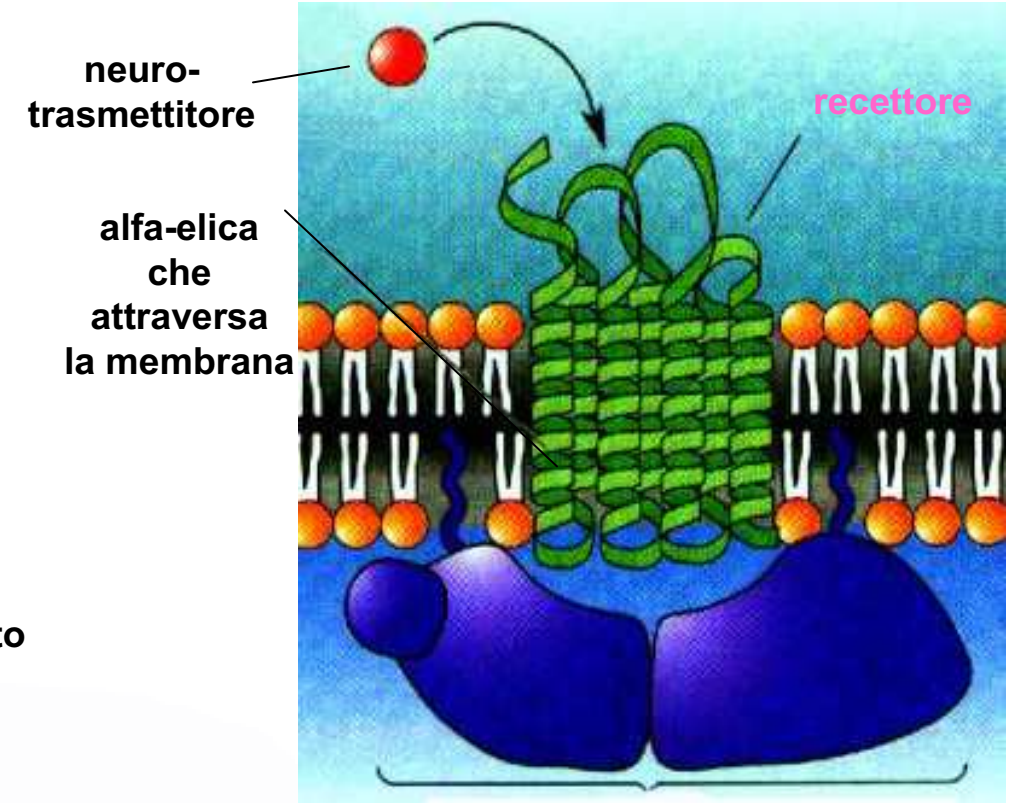
RCO_2H = acido grasso



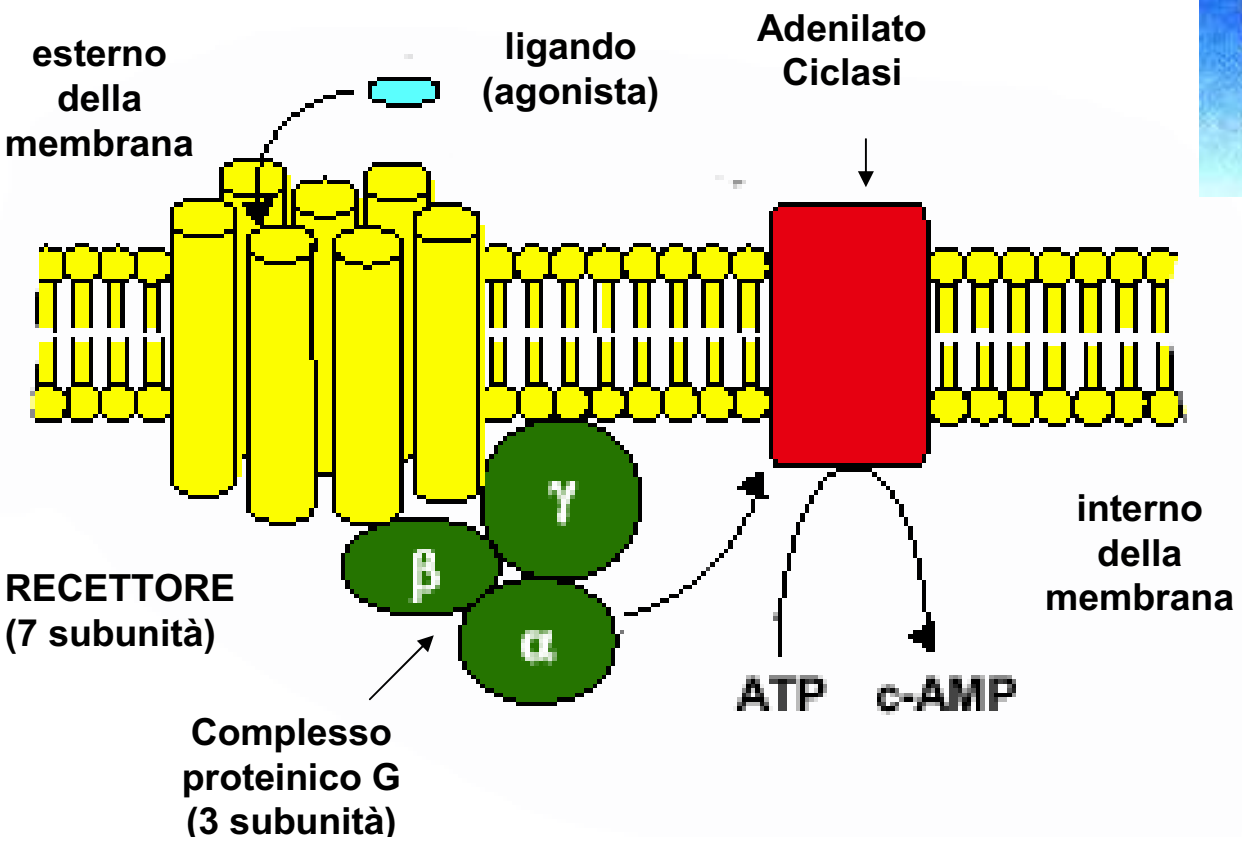
diacil glicerolo (DAG)

I recettori di questa famiglia hanno tutti alcune caratteristiche comuni:

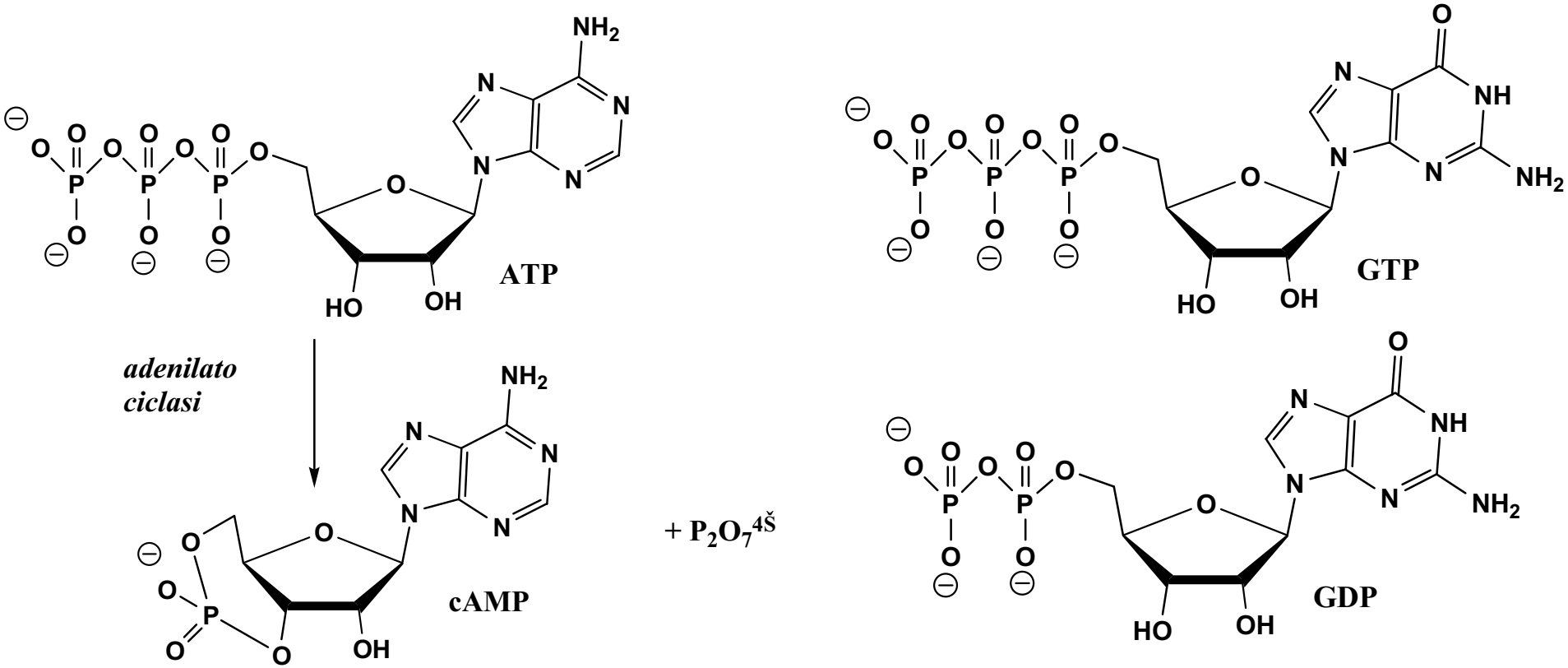
- ☺ Sono recettori trans-membrana a passo multiplo, formati da 7 subunità.
- ☺ La parte interna alla cellula è in grado di legarsi (ma solo quando c'è il ligando) ad un complesso proteinico, detto "G", formato da tre subunità.
- ☺ La subunità α è legata alla coppia GDP-GTP ed è responsabile dell'ulteriore trasmissione del segnale

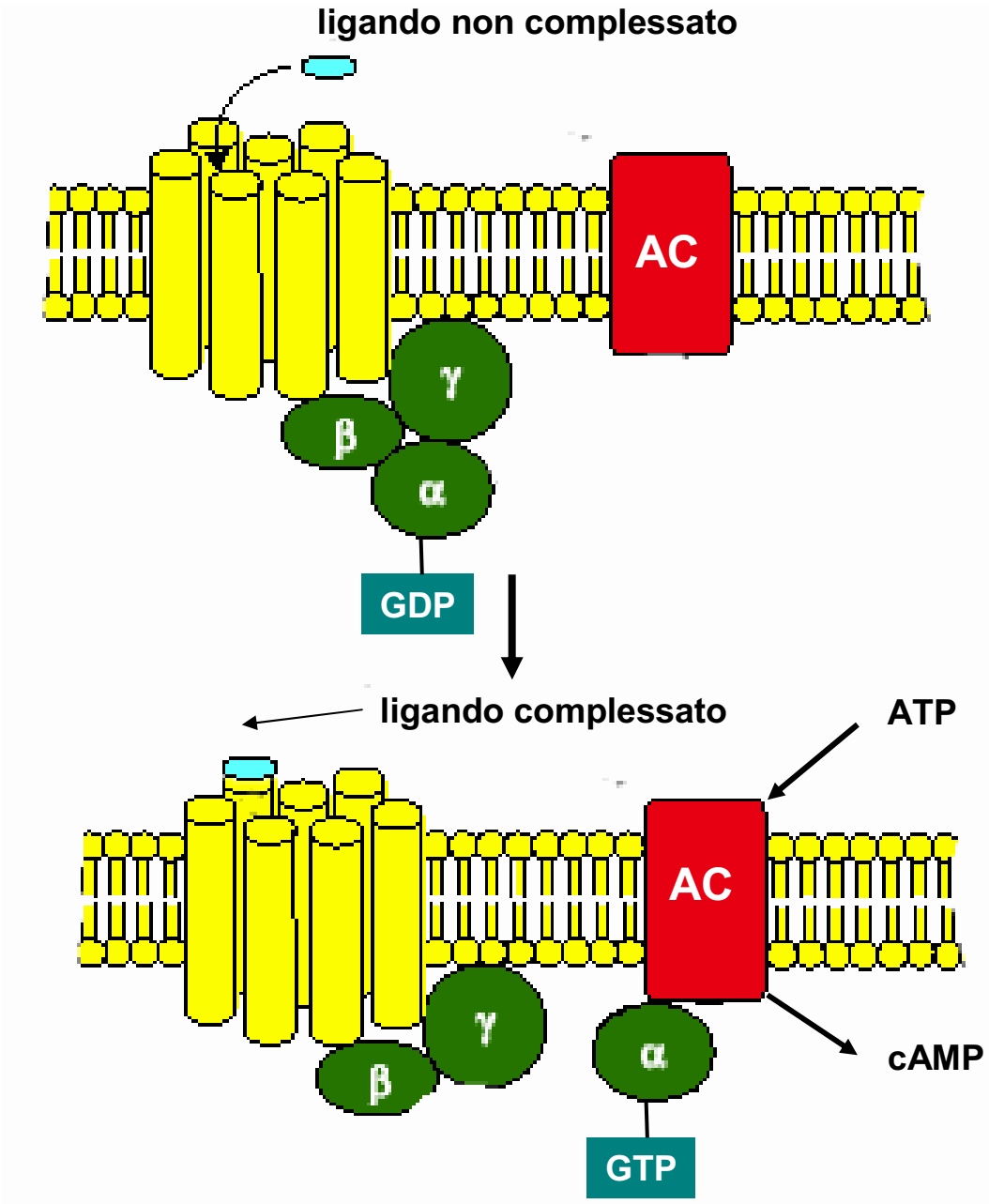


RECETTORI ACCOPPIATI CON PROTEINA G_s



In molti casi la subunità α porta alla produzione di c-AMP come messaggero secondario.
In questo caso l'enzima che viene attivato è anch'esso trans-membrana e si chiama *adenilato ciclasi*.


ATP
GTP
adenilato
ciclasi
cAMP
+ $P_2O_7^{4Š}$
GDP



Nella situazione di riposo (inattiva), la subunità α è fortemente legata al dimero β–γ ed è inattiva. Essa è inoltre legata a GDP.

Quando il ligando si posiziona, la proteina G si lega al recettore. Ciò provoca un cambiamento conformazionale che comporta una variazione dell'affinità della subunità α nei confronti di GDP e GTP. La subunità rilascia GDP e si lega a GTP (preso dalla cellula)

Il cambiamento del legando da GDP a GTP provoca una diminuzione dell'affinità verso β–γ ed il distacco dell'unità α. Anche il dimero β-γ si distacca.

L'unità α si lega alla adenilato ciclasi provocandone l'attivazione.

Questa attivazione è di breve durata. L'unità α è infatti attiva come GTPasi: in breve idrolizza essa stessa GTP a GDP ed il processo torna indietro. Se il ligando continua ad essere legato al recettore il processo di attivazione continua, altrimenti si arresta.

La adenilato ciclasi, una volta attivata, trasforma ATP in cAMP.

La cellula ripristina poi ATP e GTP consumati mediante i normali processi di immagazzinamento di energia.

La proteina G vista prima è del tipo **stimolatore**. Esistono però recettori che si legano a proteine G_i. In questi casi, la proteina G agisce come **inibitore**, rallentando, invece di accelerare, la produzione di c-AMP.
La forma dell'unità α (detta α_i) complessata con GTP inibisce, invece di attivare, la adenilato ciclasi.
Quindi, bisogna notare che la produzione di cAMP c'è sempre. I recettori la regolano, aumentandola o diminuendola. Non sono quindi <u>interruttori</u> ma <u>variatori</u>

A titolo di esempio si riportano alcuni tipi di recettori del tipo stimolatore ed inibitore

STIMOLATORI
recettore (ligando)
β-adrenergico (norepinefrina)
H_2 (istamina)
D_1 (dopamina)
V_2 (vasopressina)

INIBITORI
recettore (ligando)
α_2-adrenergico (norepinefrina)
M_2 muscarinico (acetilcolina)
D_2 (dopamina)
AT_1 (angiotensina)

La proteina G non è un buon target biologico! Infatti nei mammiferi esistono ben 6 tipi di adenilato ciclasi e molti più tipi di proteine G!

Ma cosa fa poi l'AMP ciclico che viene prodotto in questo modo?

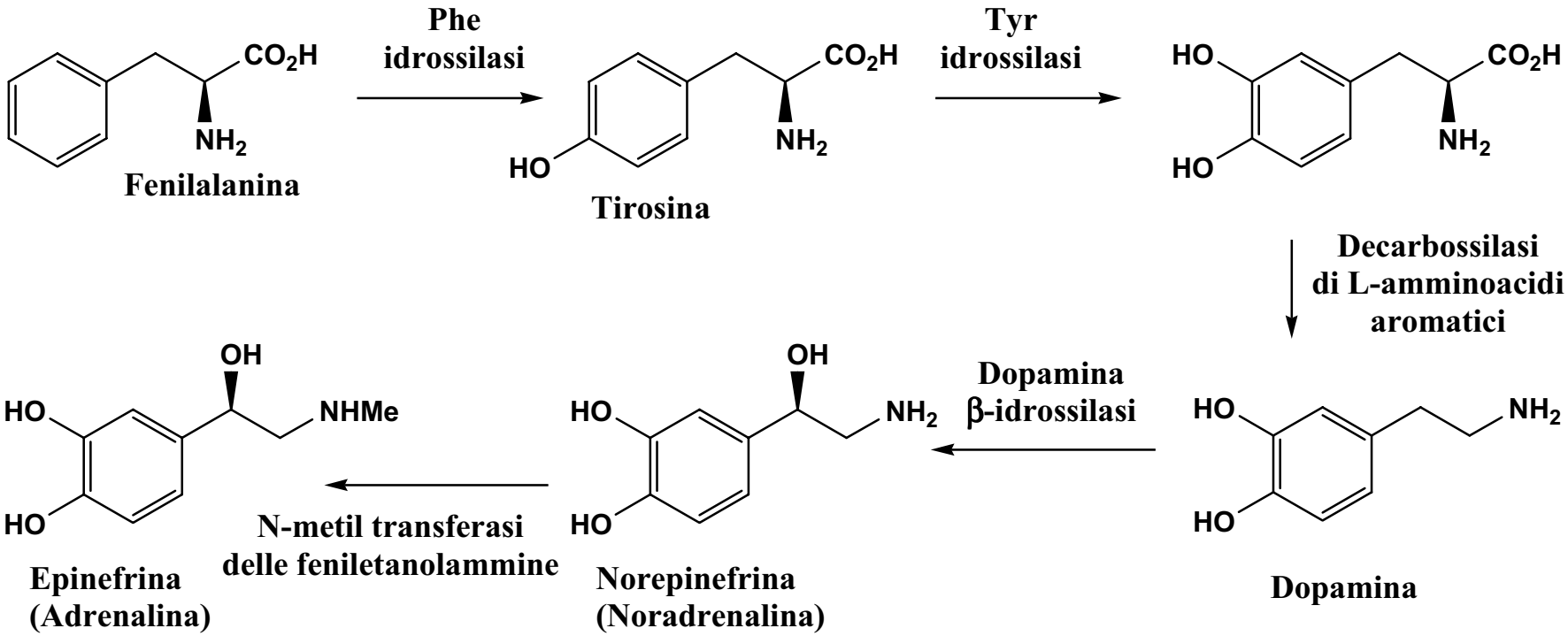
Esistono diversi cammini metabolici
Vediamo alcuni esempi

NOREPINEFRINA (NORADRENALINA) ED EPINEFRINA (ADRENALINA)

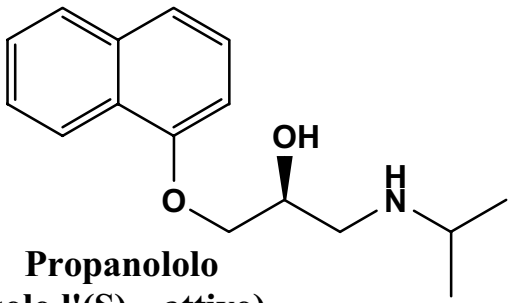
La Dopamina, la Norepinefrina e la Epinefrina sono tre importanti neurotrasmettitori appartenenti alla classe delle catecolammine. L'epinefrina e la norepinefrina hanno attività similare ed agiscono sui recettori adrenergici.
La Norepinefrina e la Epinefrina sono però anche ormoni.

Biosintesi delle catecolammine endogene

La biosintesi avviene nel surrene o nel cervello



La norepinefrina è attiva verso diversi recettori, tutti basati su una proteina G.
Per esempio, i recettori adrenergici β_1 sono presenti nel cuore ed implicati nella regolazione della pressione sanguigna. Antagonisti di questi recettori (i cosiddetti beta-blockers) trovano uso come anti-ipertensivi (ad es. il propanololo) o anti-angina



Propanololo
(solo l'(S) , attivo)

Nei recettori β_1-adrenergici l'AMP ciclico ha la funzione di aprire un canale ionico (del potassio).

Epinefrina/norepinefrina sono però implicate anche nella **regolazione del glucosio**. Infatti attivano l'idrolisi del glicogeno, specialmente nei muscoli. Sono quindi due degli ormoni implicati in questa complessa regolazione. L'attivazione dell'idrolisi del glicogeno nel fegato avviene in questo modo:

A Il cAMP attiva delle particolari chinasi, dette cAMP dipendenti o, più semplicemente, chinasi A. Si tratta di chinasi che fosforilano i gruppi ossidrilici di serina e treonina di altri polipeptidi e che funzionano solo in presenza di cAMP

$$\text{cAMP} + \text{CHINASI A (inattiva)} \longrightarrow \text{CHINASI A (attiva)}$$

B La chinasi A catalizza la fosforilazione di altre chinasi (in questo modo attivandole), fino ad arrivare alla fosforilazione del glicogeno

$$\text{Fosforilasi B inattiva} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{CHINASI A (attiva)}} \text{Fosforilasi B–P (attiva)} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicogeno Fosforilasi (GP) inattiva} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Fosforilasi B–P}} \text{Glicogeno fosforilasi (attiva)} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicogeno} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glicogeno fosforilasi (attiva)}} \text{Glicogeno fosforilato} \xrightarrow{\text{idrolisi}} \text{Glucosio 1-fosfato}$$

C Ma la chinasi A al tempo stesso fosforila un altro enzima, la Glicogeno Sintetasi (GP), questa volta rendendola inattiva

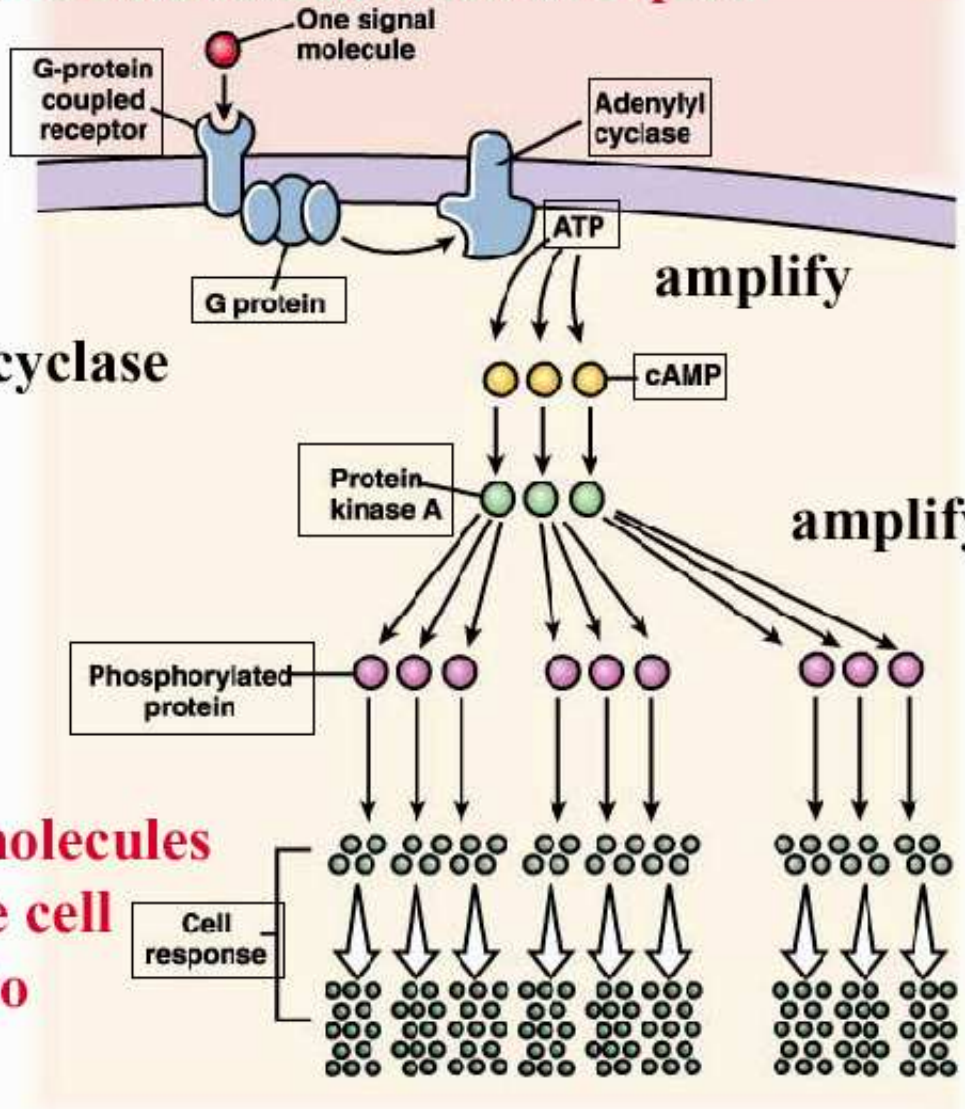
$$\text{Glicogeno Sintetasi (attiva)} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{CHINASI A (attiva)}} \text{Glicogeno Sintetasi fosforilata (inattiva)} + \text{ADP}$$

D Infine, la chinasi A fosforila una sostanza peptidica (detta PI, phosphatase inhibitor), che inibisce la fosfatasi preposta alla defosforilazione del glicogeno.

In conclusione la chinasi A interviene in più punti sul complesso meccanismo di regolazione della produzione di glucosio dal glicogeno.

Amplification in adenylate cyclase-cAMP system

One epinephrine mol. binds to one receptor



ECS

Liver Cell

Receptor-
G protein-
Adenylate cyclase

amplify

cytosol

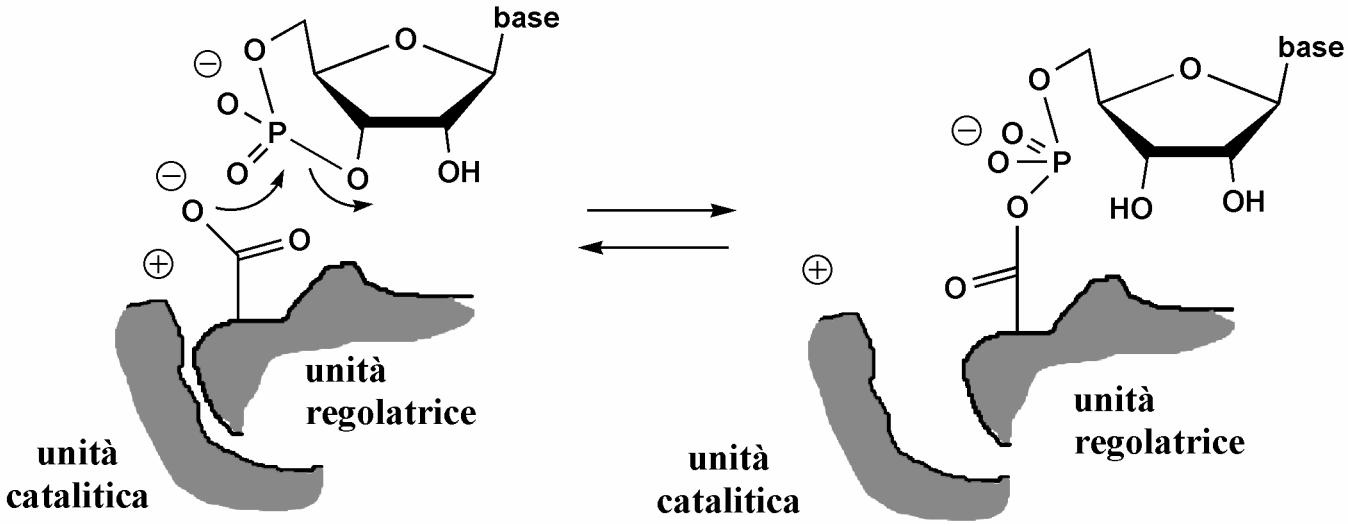
amplify

amplify

amplify

Many glucose molecules produced by the cell and released into the blood

Attivazione della chinasi A da parte di cAMP

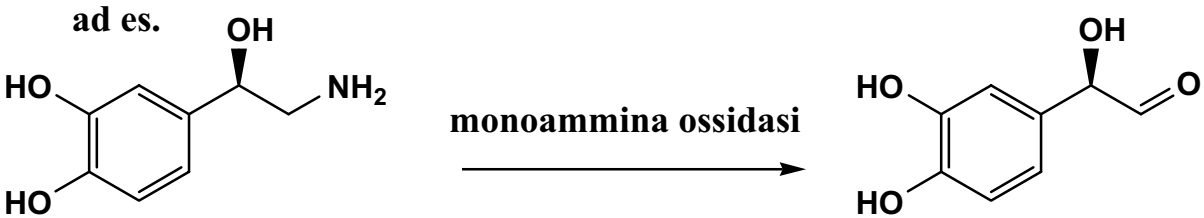


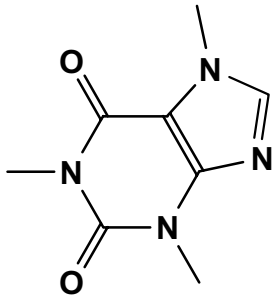
MECCANISMI DI FINE SEGNALE

E' essenziale che il segnale venga terminato dopo che ha assolto al suo compito. Ciò viene fatto in vari modi

1) Il ligando viene eliminato per riassorbimento o metabolizzato

ad es.



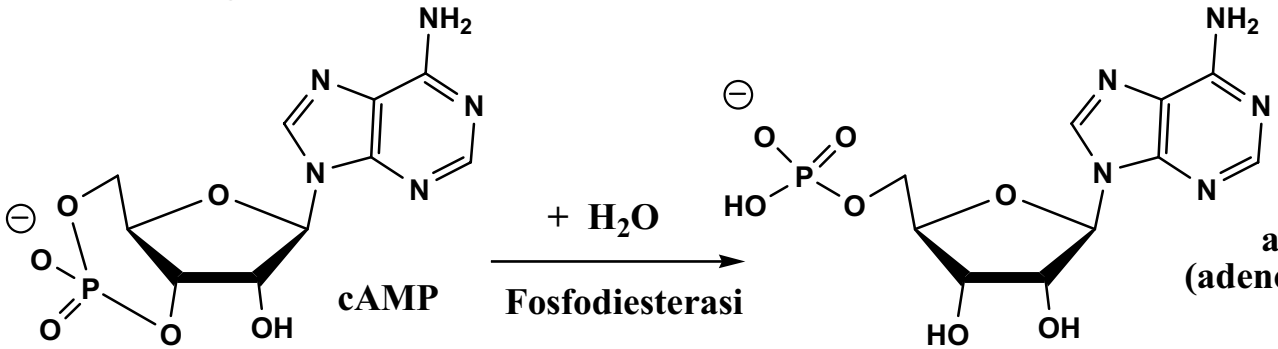


caffeina

(inibitore fosfodiesterasi)

2) Il GTP legato all'unità α viene idrolizzato dall'attività GTPasi della subunità stessa.

3) Il cAMP viene degradato da un enzima chiamato Fosfodiesterasi

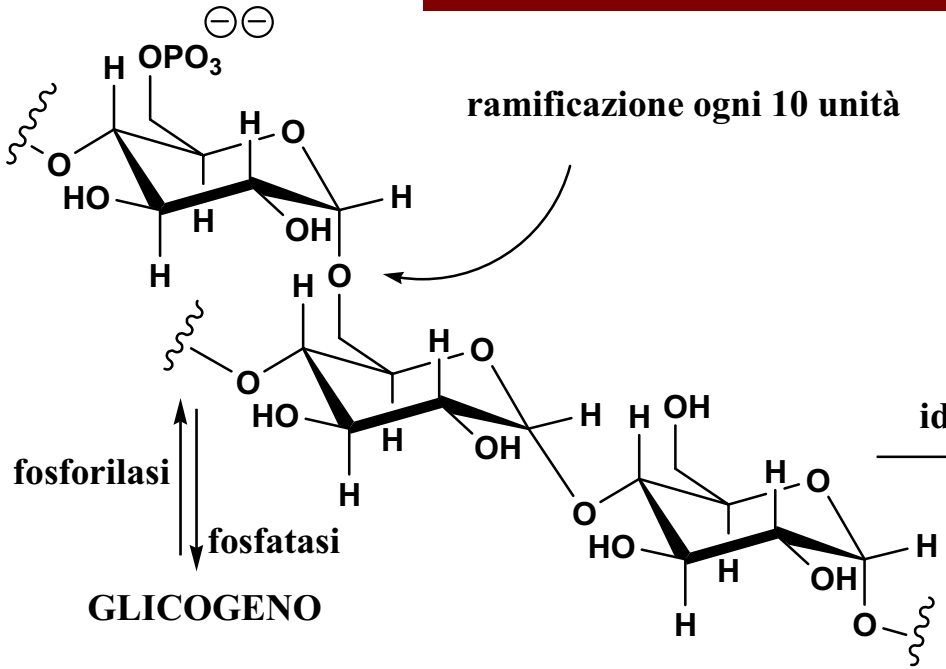


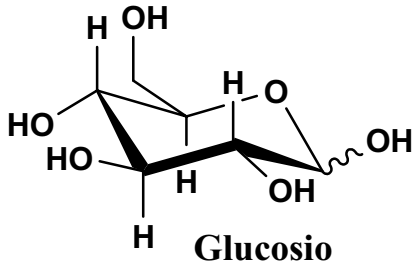
acido adenilico (adenosina monofosfato) (ADP)

4) Gli enzimi attivati per fosforilazione vengono defosforilati ad opera delle Fosfoproteine Fosfatasi

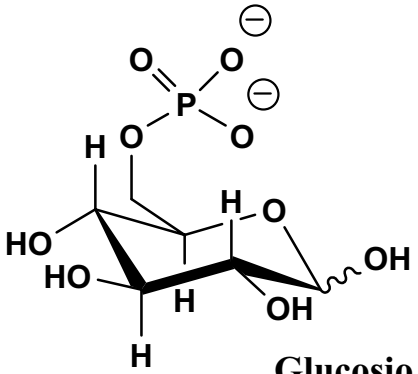
METABOLISMO DI GLUCOSIO E GLICOGENO

Il glicogeno viene fosforilato ad un ossigeno 6 di fine catena e quindi l'unità di glucosio fosforilata staccata a dare glucosio 6-fosfato. La ramificazione permette un'idrolisi più veloce.

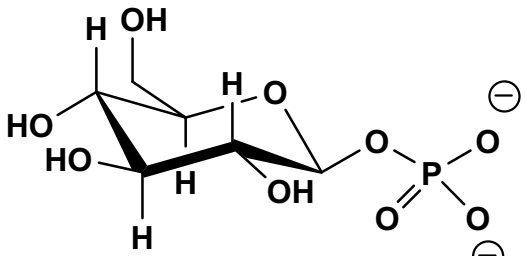




idrolisi



fosfoglucomutasi



Fosfatasi

GLICOLISI

TRASPORTO NEL SANGUE

glicogeno sintetasi

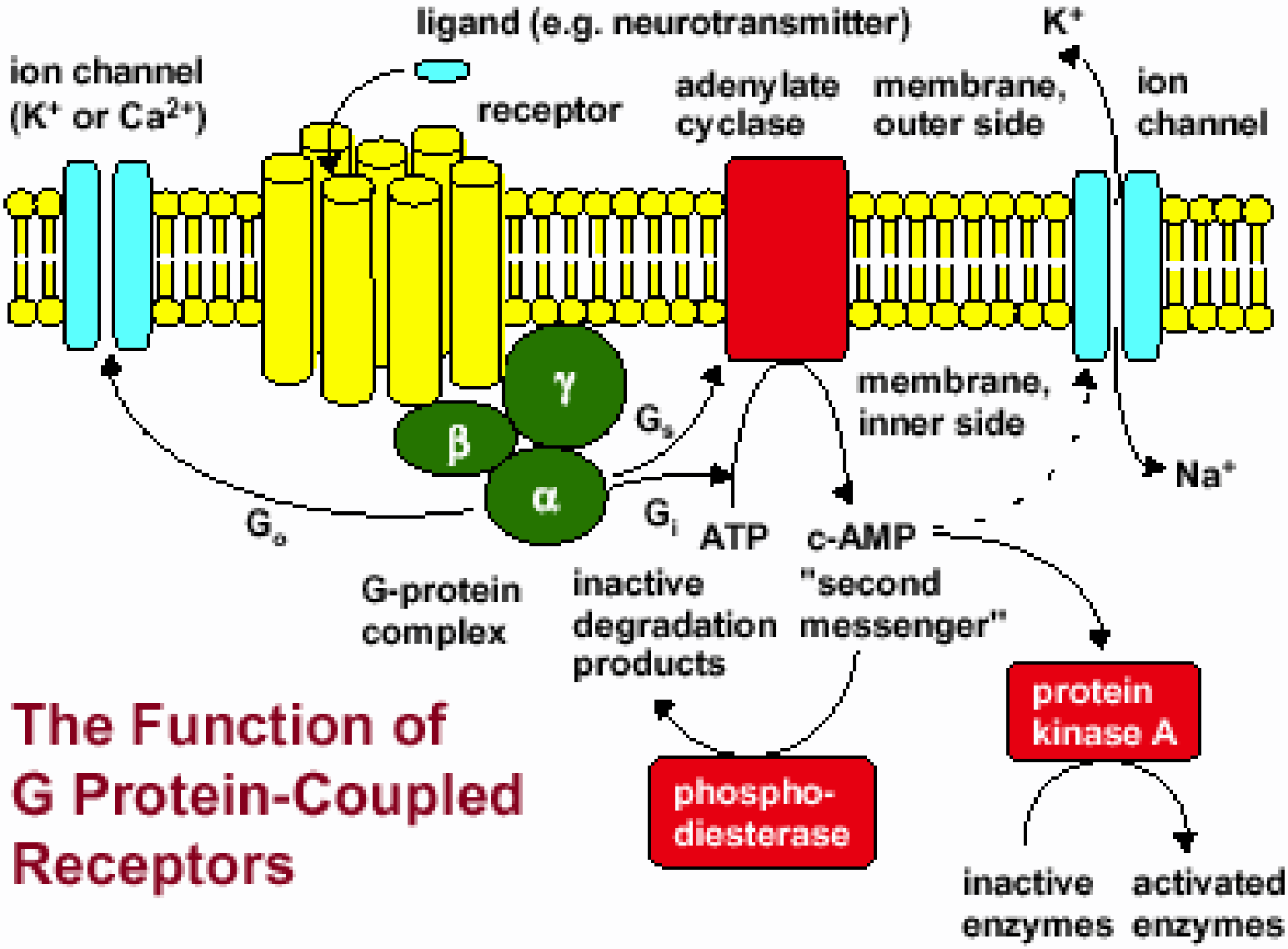
SINTESI GLICOGENO

- **Il glucosio è presente nel sangue come tale, in concentrazione regolata (circa 650-950 mg/l).**
- **Il glucosio può entrare nelle cellule tramite appositi canali, ma viene trattenuto all'interno solo se fosforilato.**
- **Quando c'è glucosio in eccesso, viene trasformato in riserve di energia: i grassi (riserva a più lungo termine) sono preparati dopo la glicolisi, dall'acetilCoA. Il glicogeno (riserva a breve termine) è preparato diretamente dal glucosio, nel fegato o nelle cellule muscolari.**
- **La glicogeno sintetasi del fegato (GS) è attivata dal glucosio stesso e quindi entra in azione quando c'è abbondanza di glucosio. E' invece inattivata dalla chinasi A (per fosforilazione).**
- **Il fegato contiene circa 70-110 g di glicogeno. I muscoli, globalmente, 170-250 g.**
- **Il cervello ha bisogno di continuo afflusso di glucosio (ne consuma 120 g al giorno!)**
- **Il fegato è in grado di rifornire rapidamente il sangue di glucosio. Ciò avviene se il glucacone (carenza di glucosio nel sangue) o l'epinefrina (situazioni di pericolo o stress) stimolano il fegato a fare ciò.**
- **La cascata di eventi che segue il legame dell'epinefrina con il recettore β_2 adrenergico porta il fegato ad idrolizzare il glicogeno. 1 sola molecola di epinefrina porta alla produzione di 30.000 molecole di glucosio!**

ALTRI ORMONI IMPLICATI NEL CONTROLLO DEL GLUCOSIO:

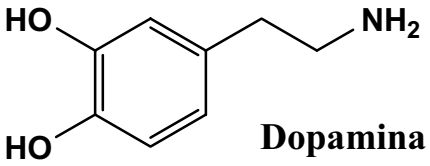
Glucacone (prodotto nel pancreas): ¸ un peptide. Agisce come l'epinefrina, ma ¸ prodotto in risposta ad un basso livello di glucosio nel sangue.

Insulina (prodotta nel pancreas): ¸ un peptide. Ha effetto opposto (ipoglicemico): induce assorbimento del glucosio (tramite esochinasi) nelle cellule dei muscoli e del tessuto adiposo.



The Function of G Protein-Coupled Receptors

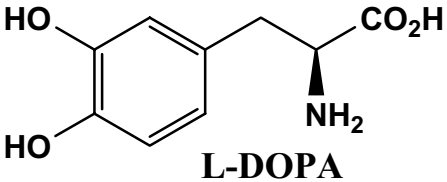
DOPAMINA



Dopamina

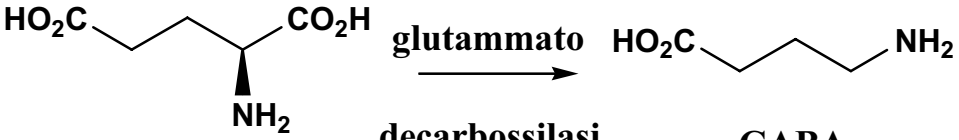
Per molti anni la dopamina era stata considerata solo un intermedio della biosintesi della norepinefrina. Invece è anch'essa un importante neurotrasmettitore. I suoi recettori (detti dopaminergici) sono soprattutto localizzati nel cervello, nella zona responsabile del controllo dei muscoli volontari. Il <u>morbo di Parkinson</u> è associato ad una carenza di dopamina.

La dopamina come tale non è usabile come farmaco perché non riesce a raggiungere il cervello.
Si usa allora la L-DOPA, che, nel cervello, è decarbossilata a dopamina



L-DOPA

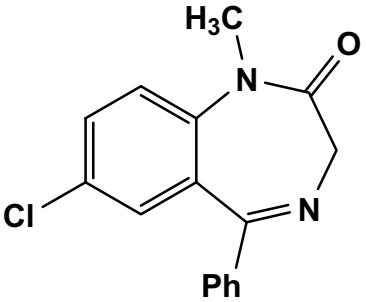
GABA



Ac. glutammico

GABA

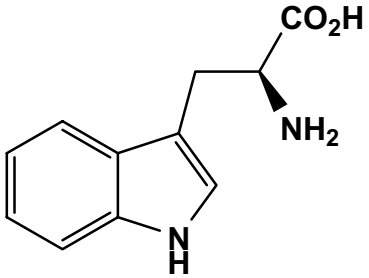
Il GABA è un altro neurotrasmettitore.
I recettori $GABA_A$ sono canali ionici attivati da legante. Sono canali ionici per lo ione Cl^- ed hanno effetto <u>inibitorio</u>. Il GABA ha quindi un effetto calmante, come la serotonina.



Diazepam
(Valium)

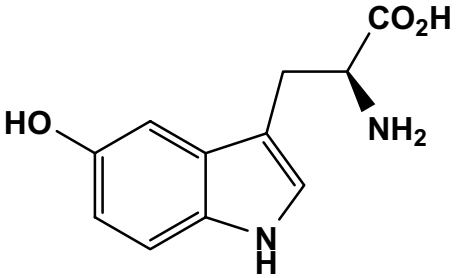
è uno dei più importanti ansiolitici. E' un agonista del GABA.

SEROTONINA



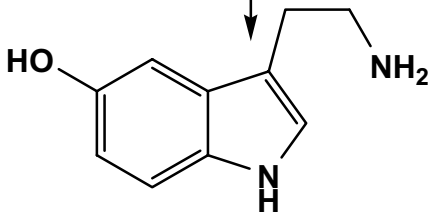
Triptofano

Triptofano idrossilasi



5-Idrossitriptofano

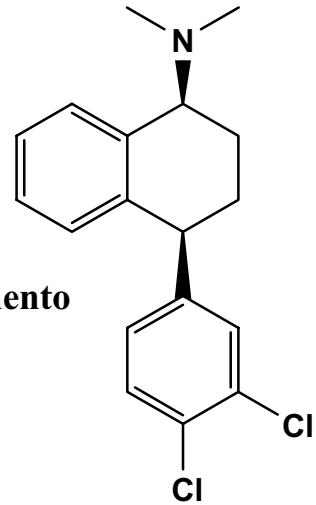
Decarbossilasi di amminoacidi L-aromatici



5-Idrossitriptamina (Serotonina)

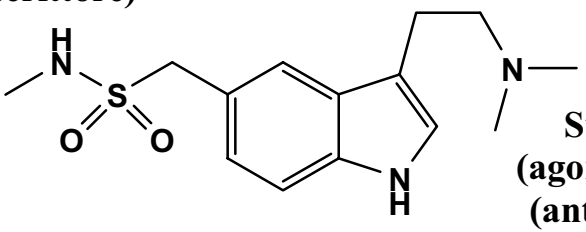
La serotonina è un neurotrasmettitore molto importante nel sistema nervoso centrale.
Ci sono ben 12 recettori diversi!
Il suo effetto è, a grandi linee, opposto a quello di norepinefrina ed epinefrina.
Mentre esse sono "eccitanti", la serotonina ha un effetto "calmante" e tende a far diminuire gli stati di stress. Quindi agonisti della serotonina sono in principio utilizzabili come anti-panico, anti-stress, anti-depressione.

Un modo per aumentare gli effetti della serotonina è tramite l'inibizione del riassorbimento nei neuroni.



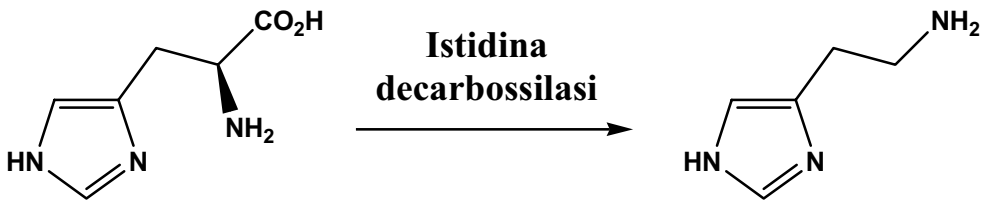
Sertralina (inibitore del riassorbimento della serotonina)

I recettori 5-HT_{1D} sono accoppiati con proteina G_i: quindi inibiscono la produzione di cAMP.
Agonisti del recettore contrastano l'emicrania (hanno effetto vasocoscrittore)



Sumatripan (agonista 5-HT_{1D}) (anti-emicrania)

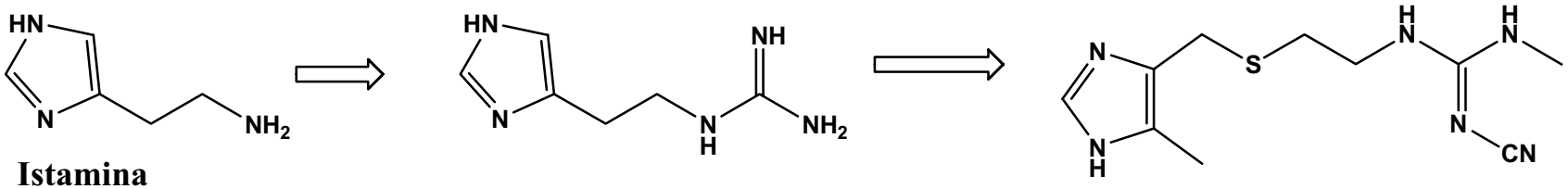
ISTAMINA



Istidina (His) — Istamina

L'istamina è un'altra importante "ammina biogenica". E' attiva su due classi di recettori: gli H1 e gli H2.

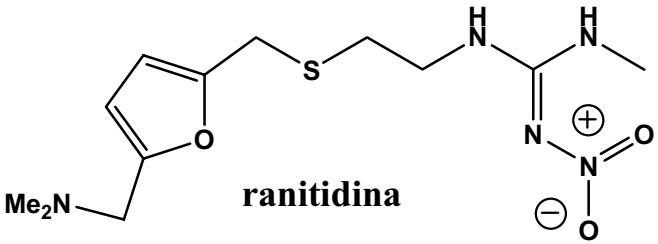
I recettori H2 sono recettori presenti nello stomaco. Sono attivanti e basati su proteina G / adenilato ciclasi. L'AMP ciclico porta all'attivazione di una pompa ionica che pompa ioni H^+ nello stomaco e ioni K^+ all'esterno.



Istamina — **Guanil Istamina LEAD** — **Cimetidina (Tagamet)** **PRIMO FARMACO**

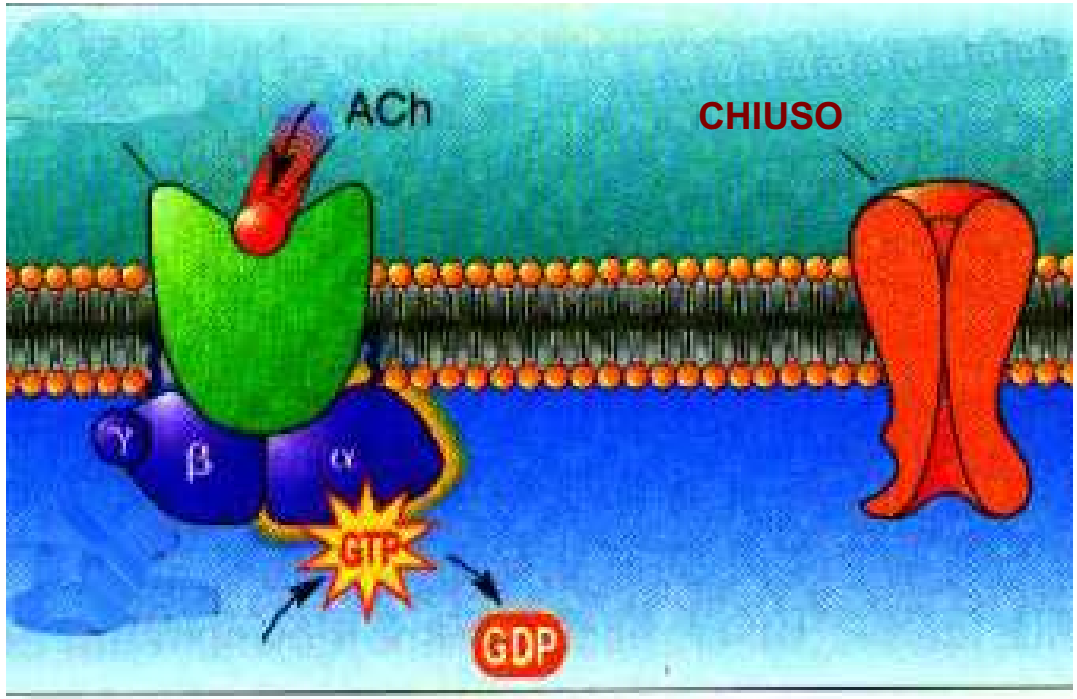
Evoluzione dei farmaci anti-ulcera basati sull'antagonismo del recettore H-2

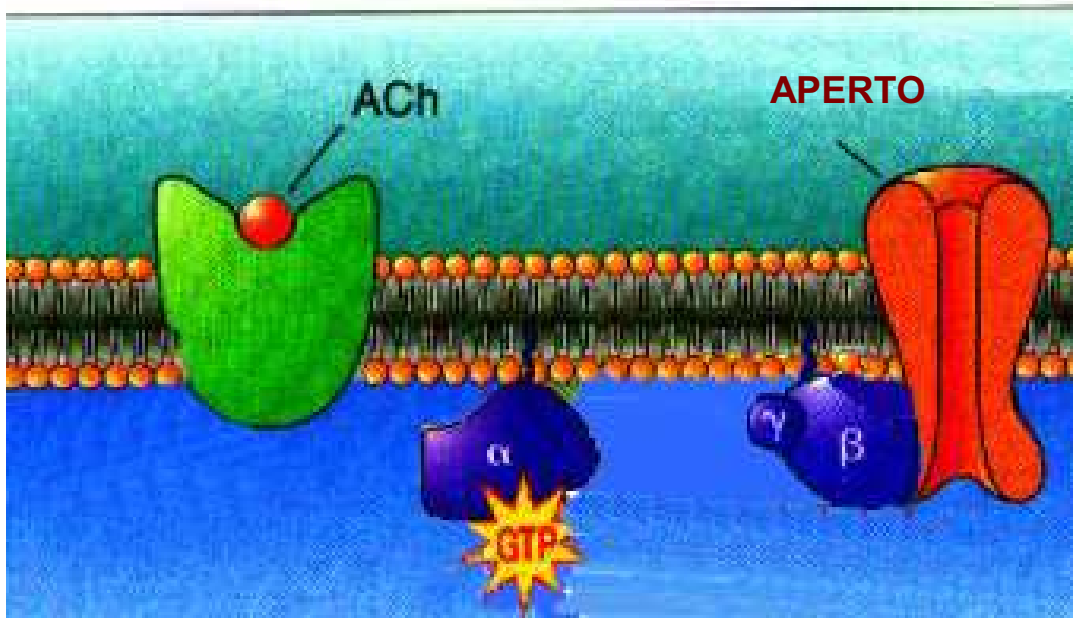
Questi farmaci sono selettivi per i recettori H-2 e fungono da antagonisti



ranitidina

FARMACO PIU' IN USO ORA





Alcuni recettori "muscarinici" dell'acetilcolina (gli M_2) funzionano in modo ancora diverso.

In questo caso le subunità β–γ vanno direttamente ad attivare un canale ionico (del potassio). L'unità α invece inibisce la produzione di c-AMP.

In altri recettori, l'unità β–γ va a chiudere un canale ionico. Ad esempio, i recettori α_2 adrenergici, oltre ad inibire la produzione di cAMP, chiudono un canale del calcio.

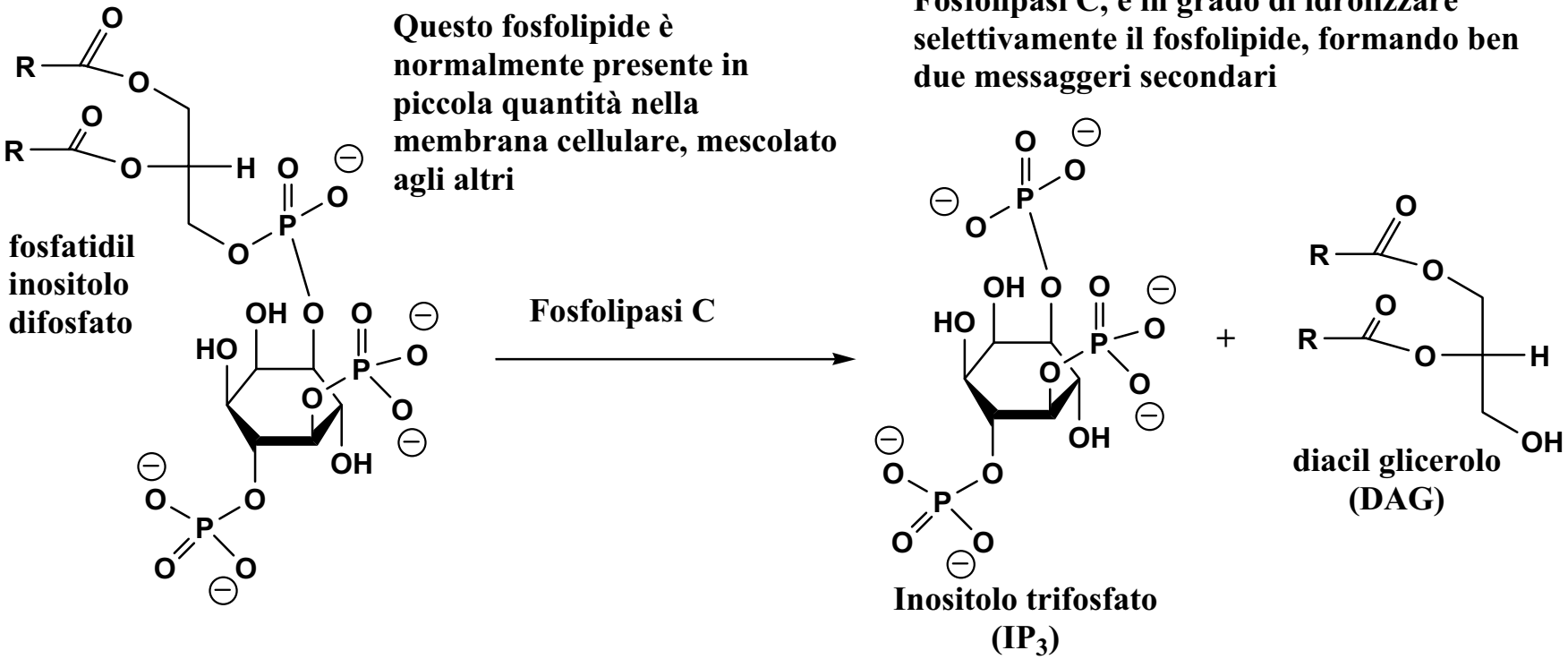
INOSITOLO E DAG COME MESSAGGERI SECONDARI

Abbiamo visto due modi con cui la proteina G trasmette il segnale: produzione di cAMP ed apertura diretta di un canale ionico. Infine c'è una terza via, che comporta la generazione dei due messaggeri secondari INOSITOLO e DIACILGLICEROLO (DAG)

RCO_2H = acido grasso

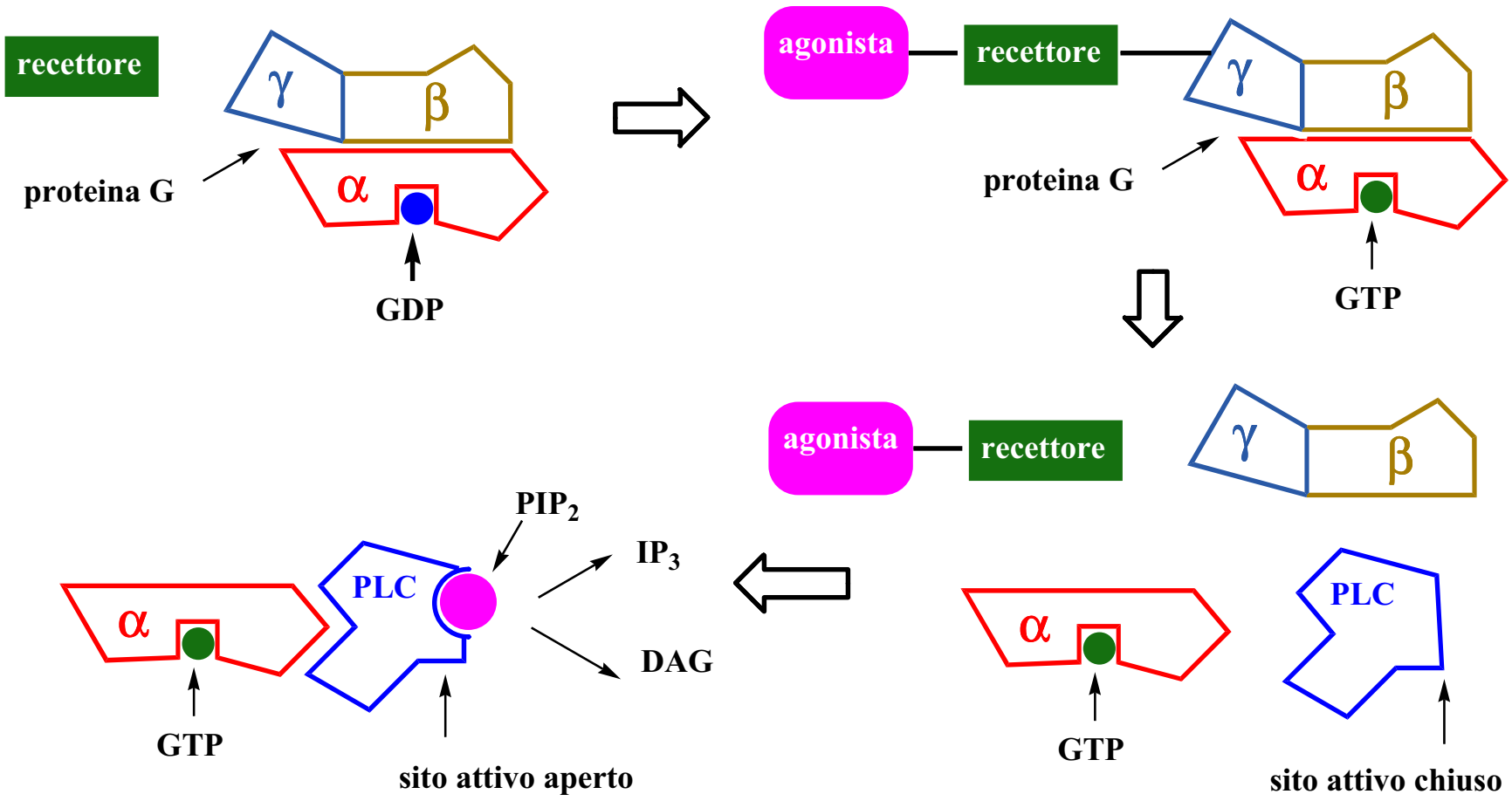
Questo fosfolipide è normalmente presente in piccola quantità nella membrana cellulare, mescolato agli altri

Una particolare FOSFATASI, detta Fosfolipasi C, è in grado di idrolizzare selettivamente il fosfolipide, formando ben due messaggeri secondari



La fosfolipasi C è normalmente inattiva, ma è attivata dal complesso proteinico G di opportuni recettori.

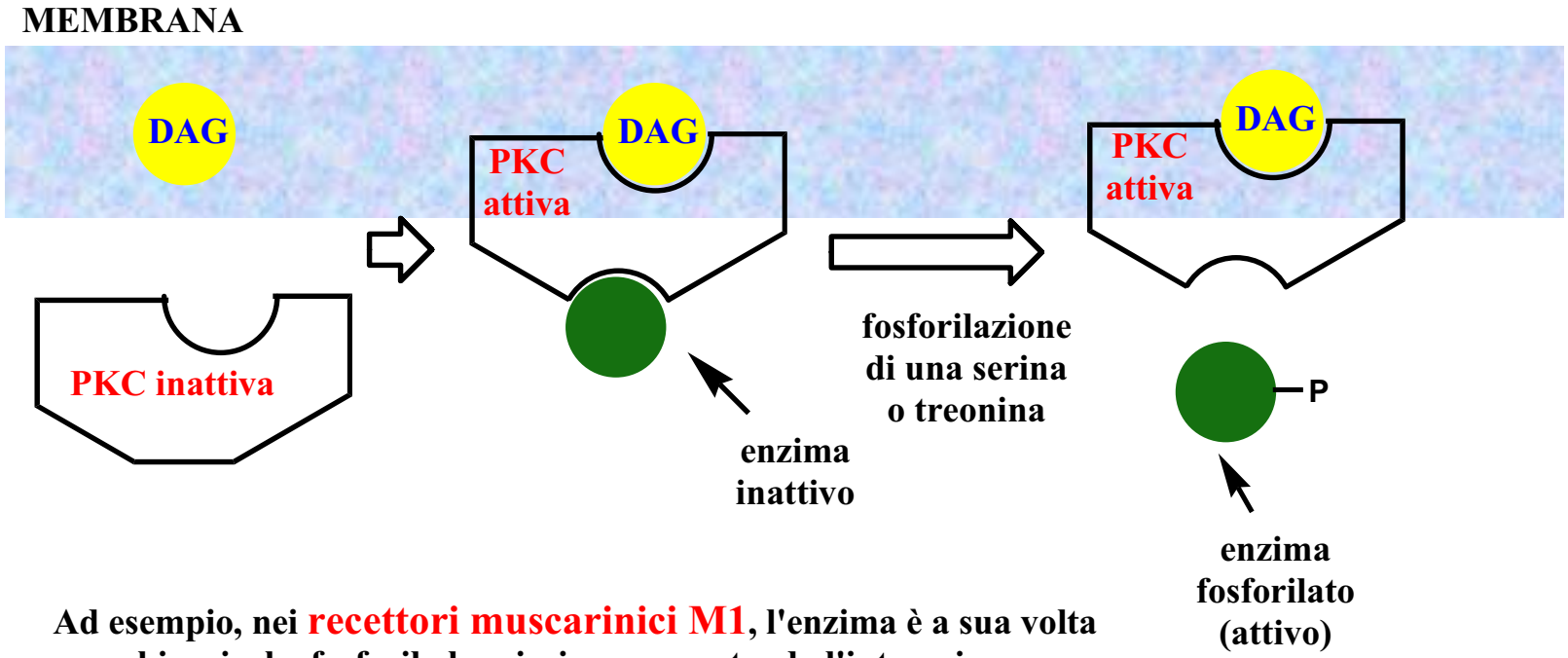
Il meccanismo è simile: stavolta però la proteina G, anziché G_i o G_s, è chiamata G_q, e la sua unità α, chiamata α_q, anziché attivare la guanidilato ciclasi, attiva la fosfolipasi C.



Anche la Fosfolipasi C, come l'adenilato Ciclasi, è un enzima legato alla membrana. Esempi di recettori di questo tipo sono i recettori α_1 adrenergici, i recettori M_1 muscarinici ed i recettori H_1 istaminici (quelli coinvolti in fenomeni allergici). Ma anche diversi fattori di crescita e citochine agiscono su recettori di questo tipo.

Con questi recettori PAGHI 1 E PRENDI DUE. Vengono infatti generati ben 2 messaggeri secondari: DAG e IP_3

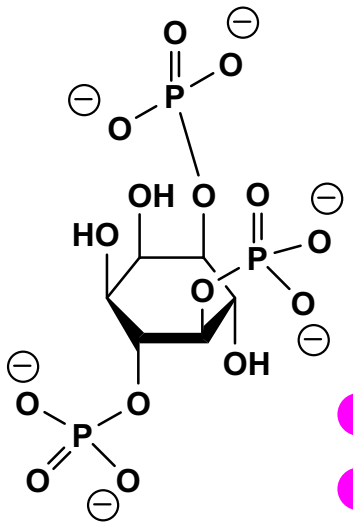
Il diacilglicerolo (DAG) é apolare. Rimane quindi nella membrana cellulare. Lì viene in contatto con una proteina chinasi, la CHINASI C (PKC), attivandola.



Ad esempio, nei recettori muscarinici M1, l'enzima è a sua volta una chinasi, che fosforila la miosina, consentendo l'interazione con l'actina.

Nelle cellule del sistema immunitario, l'enzima attiva fattori di trascrizione che portano alla duplicazione cellulare. Questi eventi sono attivati dalle citochine (fattori di crescita tipici del sistema immunitario) in risposta ad antigeni. Nelle malattie autoimmuni, questo processo è dannoso. Pertanto inibitori della Proteina Chinasi C sono esplorati come farmaci per malattie quali l'artrite reumatoide o la sclerosi multipla.

cosa fa invece l'inositolo trifosfato ?



Inositolo trifosfato (IP_3)

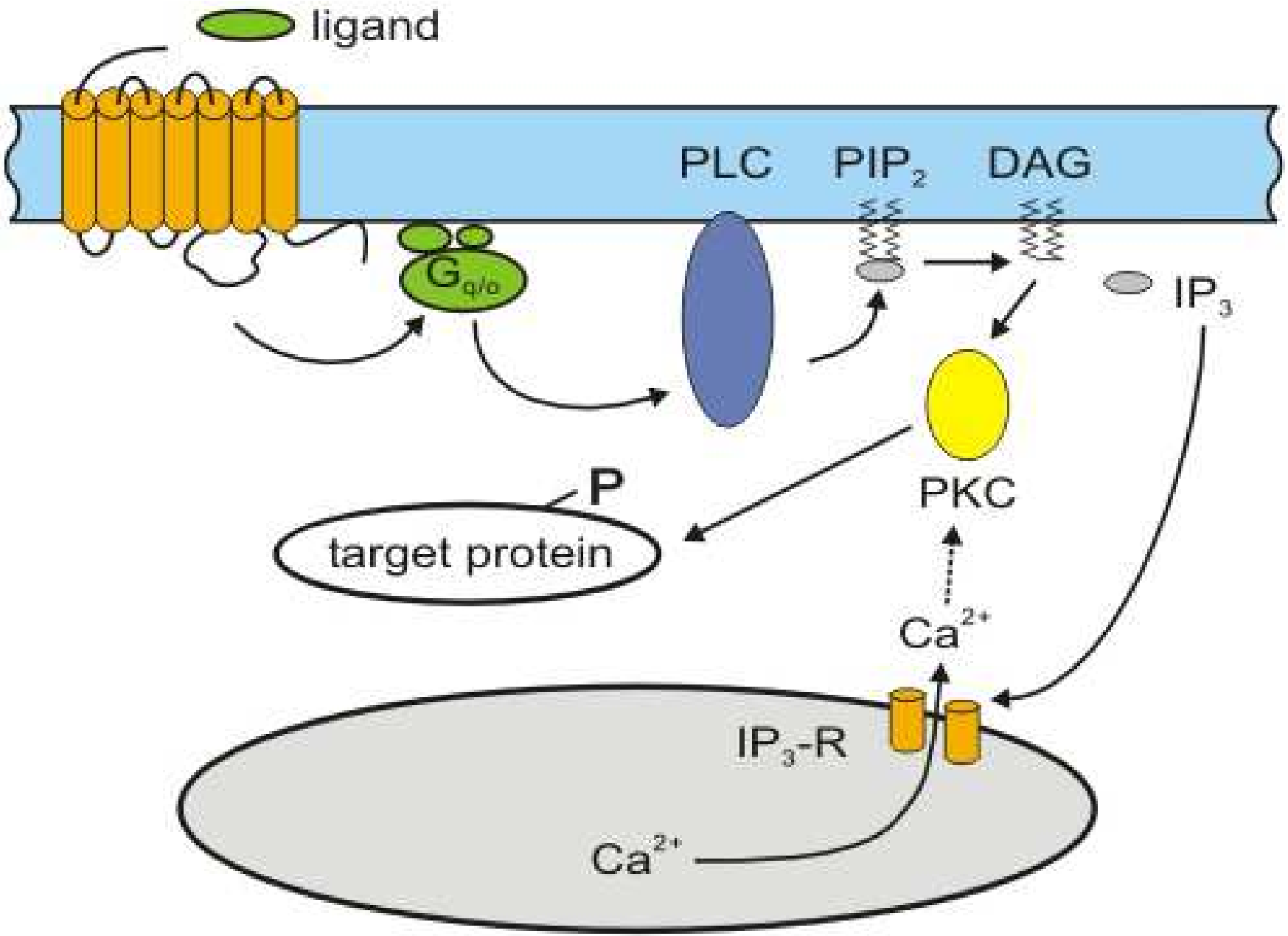
Questo messaggero secondario agisce a sua volta su un canale ionico dipendente da ligando, <u>interno alla cellula</u>. Questo canale collega all'esterno particolari reticoli endoplasmatici che costituiscono delle riserve di ioni Ca^{++}.

Lo ione Ca^{++} così rilasciato nella cellula può essere definito un <u>MESSAGGERO TERZIARIO</u>.

- **Nello spazio extra-cellulare lo ione Ca^{++} ha una concentrazione di circa 1mM**
- **All'interno della cellula, lo ione Ca^{++} ha una concentrazione di circa 0,01-0,1 μM**
- **Varie funzioni cellulari sono attivate solo quando la concentrazione sale a 1 μM. Tra di esse la contrazione dei muscoli. Lo ione calcio espone nella actina il sito di legame con la miosina.**
- **Un'altra proteina attivata dal calcio è la CALMODULINA, che è estremamente geneticamente conservata. E' uguale in tutte le specie, dal paramecio all'uomo! La Calmodulina, quando il calcio raggiunge la concentrazione di 1 μM, si lega ad esso e diviene attiva, attivando a sua volta altri enzimi.**

Terminazione del segnale

l' IP_3 viene defosforilato da una fosfatasi a dare inositolo.
Il DAG viene fosforilato dalla DAG chinasi, a dare acido fosfatidico.
La concentrazione di Ca^{++} è ridotta grazie ad una pompa ionica che lo reintroduce nelle vescicole del reticolo endoplasmatico

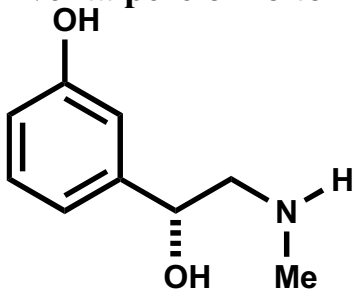

ligand
PLC
PIP2
DAG
Gq/o
IP3
PKC
P
target protein
Ca2+
IP3-R
Ca2+

L'effetto di potenziali farmaci che agiscono come agonisti o antagonisti di recettori non è facile da prevedere. Infatti:

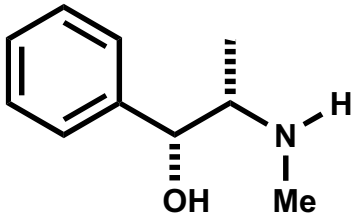
- **Un messaggero primario può agire su diverse famiglie di recettori. Ad esempio l'acetilcolina agisce sui recettori nicotinici e muscarinici, a loro volta suddivisi in 2 famiglie ciascuno; l'adrenalina (epinefrina) e la noradrenalina (norepinefrina) agiscono su due famiglie di recettori α e su tre famiglie di recettori β.**

- **Inoltre una stessa famiglia di recettori può essere presente in diversi tessuti, con effetti diversi.**

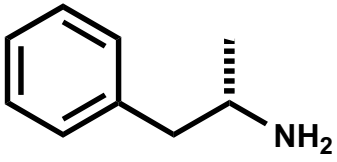
Diventa perciò molto importante la farmacocinetica dei potenziali farmaci.



Fenilefrina (agonista di recettori α-adrenergici)



Efedrina



Amfetamina

- **La fenilefrina è piuttosto polare e quindi ha effetti sul sistema periferico (non penetra facilmente nel cervello). Essendo agonista di recettori α_1 ha effetto vasocostrittore ed è usata contro la congestione nasale.**

- **L'efedrina è meno polare ed ha effetti sia periferici che sul sistema nervoso centrale. Se usata per la congestione nasale, provoca insonnia.**

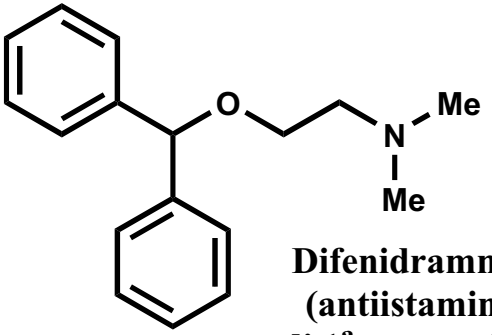
- **L'amfetamina è ancora meno polare e penetra bene nel cervello. Il suo effetto è primariamente sul sistema nervoso centrale dove genera effetti quali: diminuito senso di fatica, insonnia etc. E' quindi una droga senza utilità farmaceutica.**

FARMACI CONTRO L'ASMA

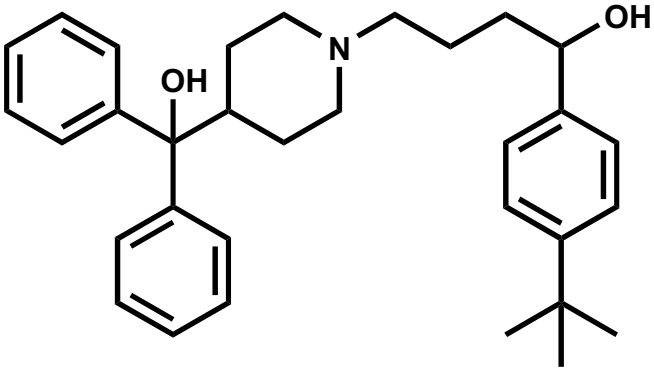
La stimolazione dei recettori istaminici H_1 nei polmoni porta ad una broncocostrizione, che è alla base dell'asma allergica. Sulla pelle si ha invece l'effetto dell'orticaria.

I farmaci anti-istaminici sono antagonisti dei recettori istaminici H_1.

Il problema di molti di essi è che hanno effetti indesiderati sul sistema nervoso centrale (l'istamina è un neurotrasmettitore anche nel sistema nervoso centrale). Anche in questo caso il trucco è stato di rendere meno lipofilo il farmaco, in modo da non farlo penetrare nel cervello.

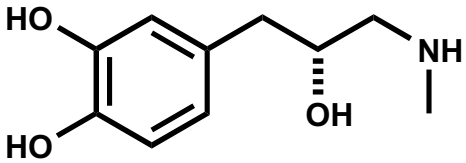


Difenidrammina (antiistaminico di 1ª generazione)

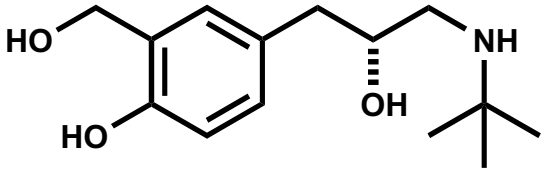


Terfenidina (antiistaminico di 2ª generazione)

Altri farmaci sono invece agonisti dei recettori β_2 adrenergici, che, nei bronchi, hanno effetto broncodilatatore. La stessa epinefrina è usata per contrastare reazioni allergiche mortali, come lo shock anafilattico.



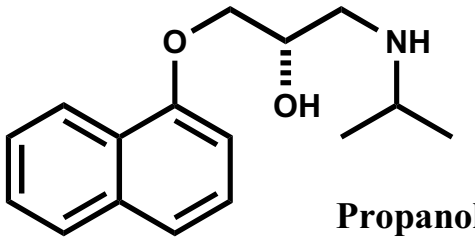
Epinefrina



Levalbuterolo

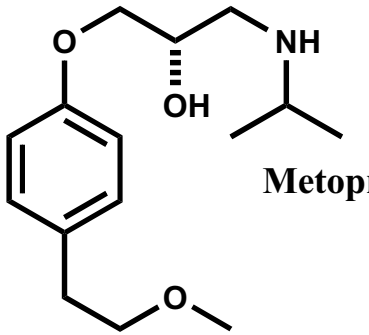
BETA BLOCCANTI

Invece antagonisti dei recettori β_1 sono usati come anti-ipertensivi (beta-blockers)



Propanololo

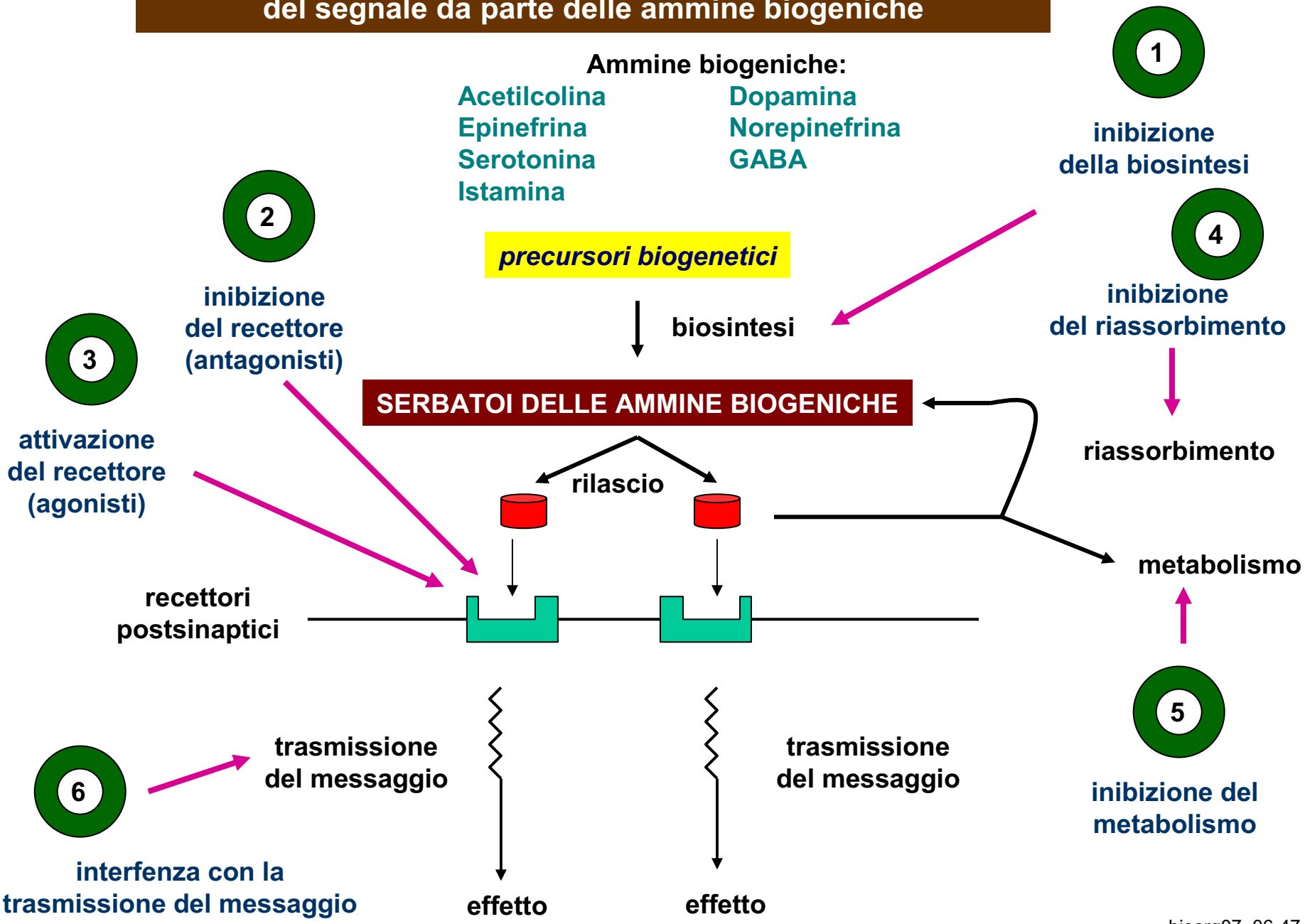
blocca sia i β_1 che i β_2: non adatto a chi soffre di asma



Metoprololo

Selettivo per i β_1

I molti modi in cui un farmaco può modificare la trasmissione del segnale da parte delle ammine biogeniche

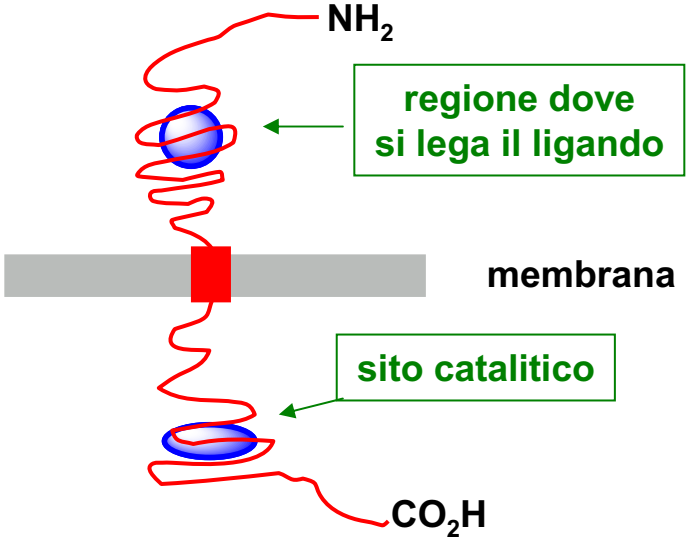


RECETTORI DI TIPO 3

Sono detti "RECETTORI UNITI A CHINASI" (Kinase-linked receptors) oppure RECETTORI (1-TM)

Infatti il recettore attraversa la membrana solo una volta (1-TM). La regione extracellulare è costituita dal terminale amminico. La regione intracellulare dal terminale carbossilico.
Questi recettori SONO ANCHE DEGLI ENZIMI: infatti la regione intracellulare contiene un sito catalitico. Nella maggior parte dei casi la reazione catalizzata é la fosforilazione di un OH della tirosina. Si tratta quindi di RECETTORI UNITI A TIROSINA CHINASI.

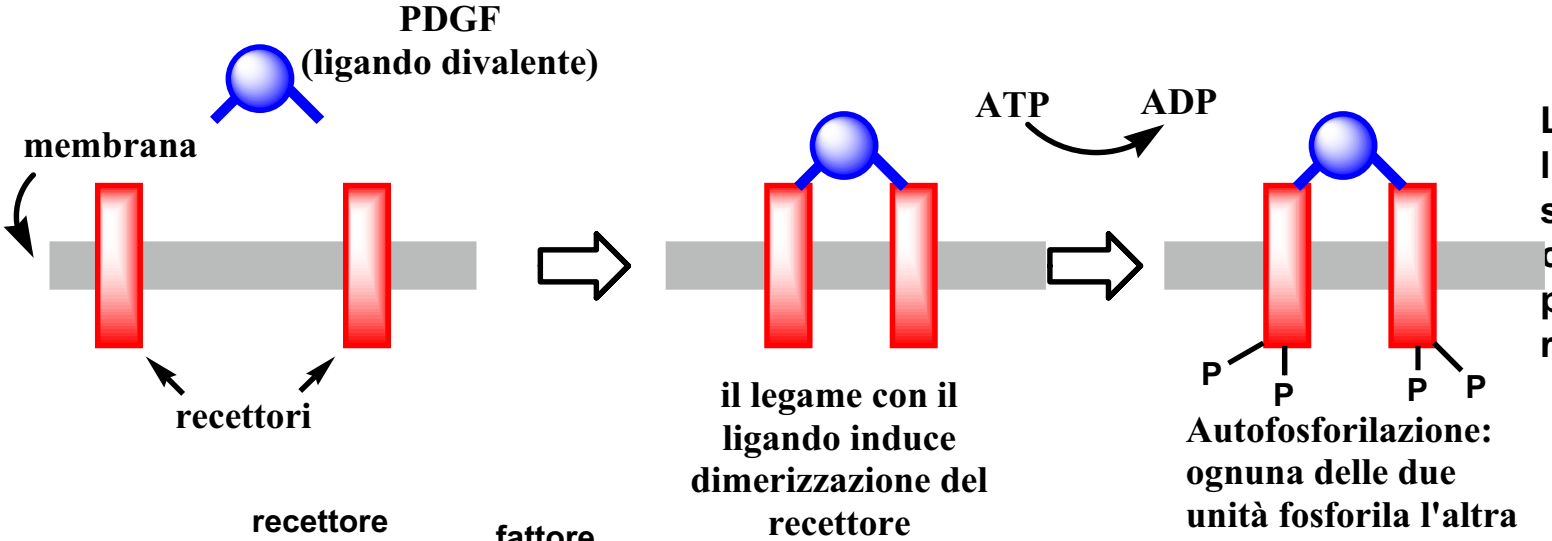
Di solito recettori di questo tipo sono implicati nella trasmissione di segnali da parte di ormoni (ad es. insulina), fattori di crescita e citochine.



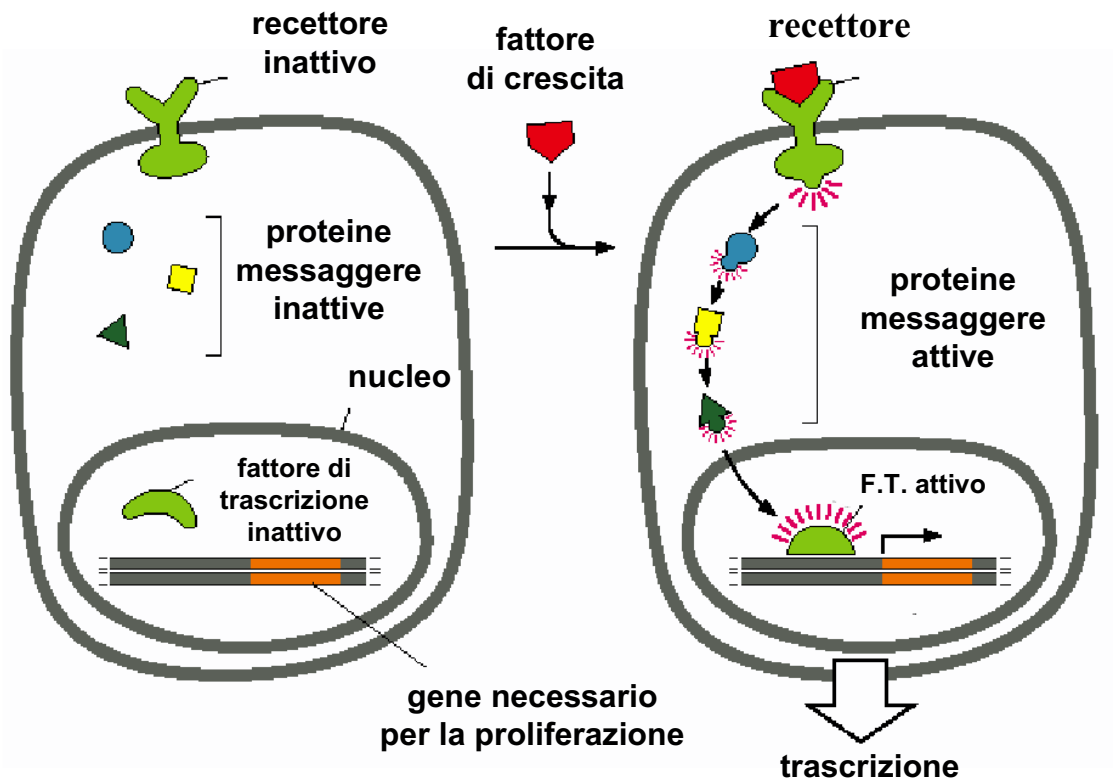
Quando è assente il ligando, l'enzima é inattivo.
Quando il ligando si complessa con la parte extracellulare del recettore, la chinasi entra in funzione e fosforila residui tirosinici in varie proteine.

Ma come avviene l'attivazione dell'enzima? Ci sono vari meccanismi!

esempio 1: recettori del fattore di crescita piastrinico (platelet derived growth factor) (PDGF).



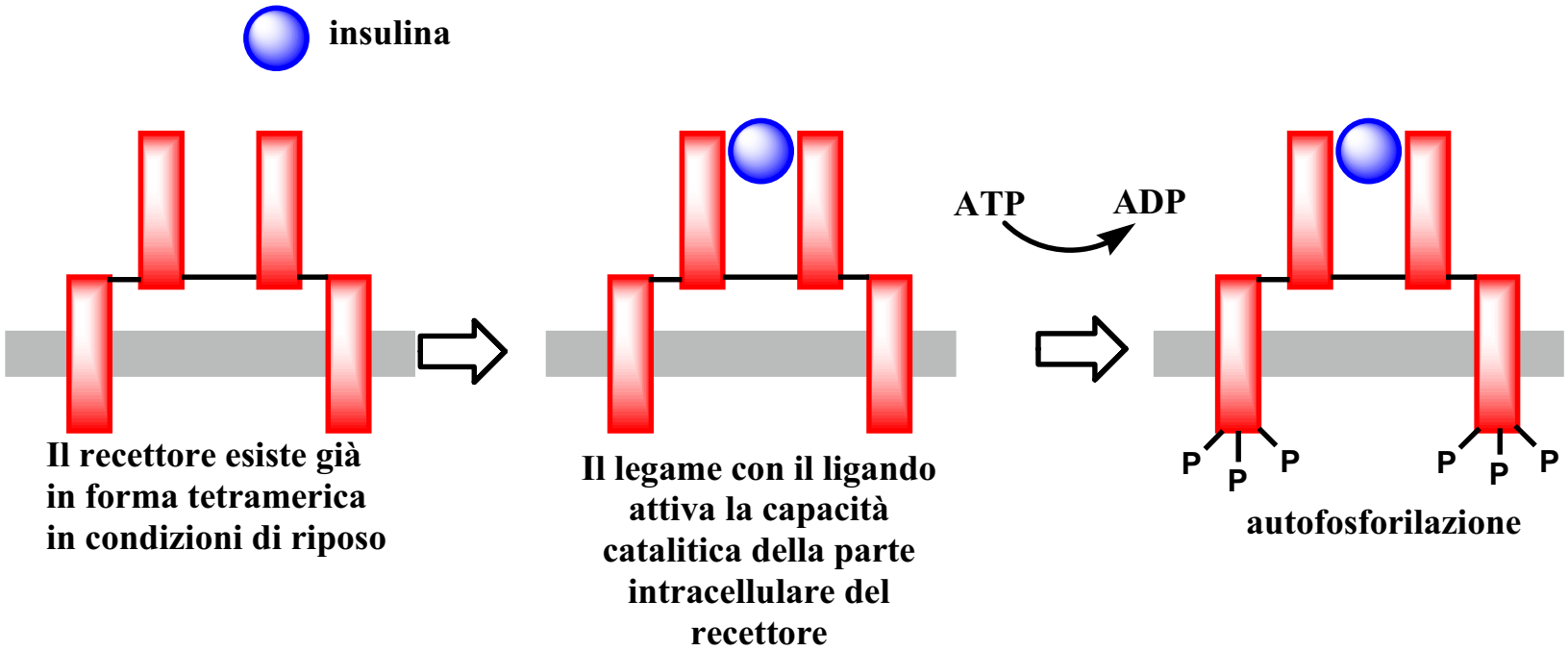
La dimerizzazione e l'autofosforilazione sono avvenimenti comuni a gran parte di questi recettori.



Una volta fosforilato, il recettore acquista capacità enzimatica e catalizza la fosforilazione di residui tirosinici di altre proteine che poi trasmettono il segnale. Per esempio queste proteine (messaggeri secondari) entrano nel nucleo dove attivano le proteine regolatrici di geni (fattori di trascrizione), che inducono la trascrizione e la proliferazione cellulare.

Un altro importante fattore di crescita è l'EGF (fattore di crescita epidermico). In questo caso, il ligando è monovalente, ma si ha comunque un processo simile. 2 ligandi si legano a due recettori, inducendo la dimerizzazione.

esempio 2: recettore dell'insulina



Un'altra famiglia di recettori 1-TM attiva ha una funzione catalitica differente. Si comporta da GUANILATO CICLASI e trasforma il GTP in GMP ciclico. Il GMP ciclico è un messaggero secondario, analogo al c-AMP.

POLISACCARIDI

Riassumiamo qui i principali polisaccaridi

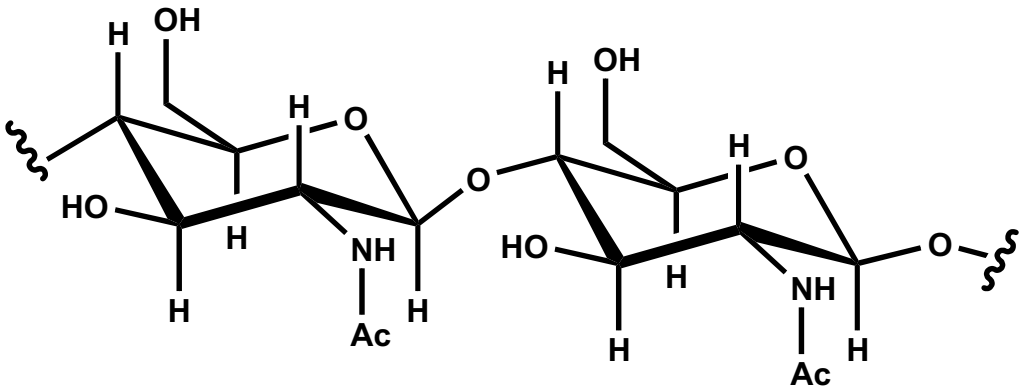
Cellulosa: polimero del D-glucosio, lineare, con legami 1,4-β

Amilosio: polimero del D-glucosio, lineare, con legami 1,4-α

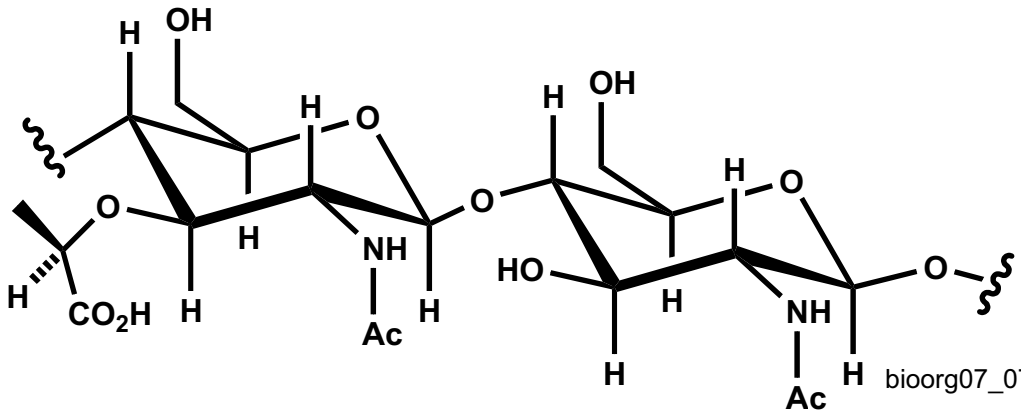
Amilopectina: polimero del D-glucosio con legami 1,4-α; presenta ramificazioni 1,6-α ogni 24-30 residui

Glicogeno: polimero del D-glucosio con legami 1,4-α; presenta ramificazioni 1,6-α ogni 8-12 residui

Chitina: polimero lineare della D-*N*-acetilglucosammina con legami 1,4-β.



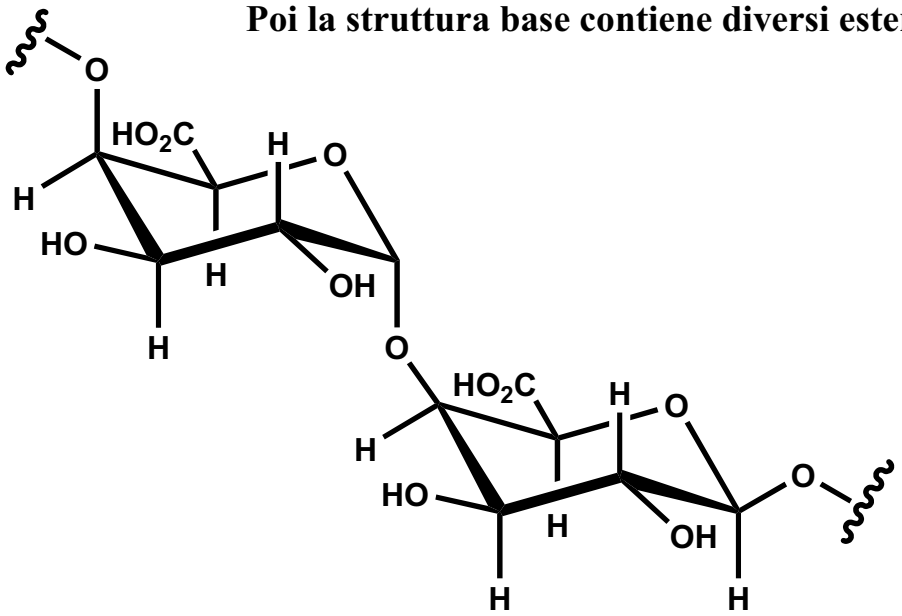
Mureina: simile alla chitina, ma un monomero ogni 2 ha un gruppo D-lattico all'O-3



bioorg07_07-1

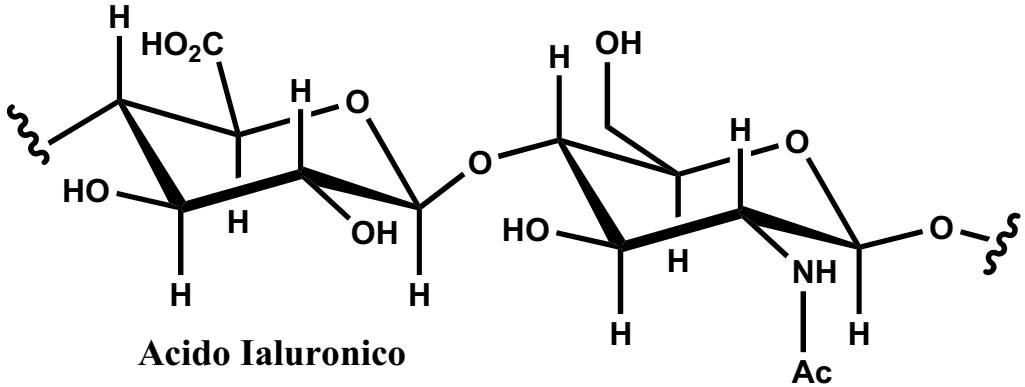
Pectine: la struttura base è costituita da un polimero 1,4-α dell'acido D-galatturonico

Poi la struttura base contiene diversi esteri metilici o ossidrili acetilati.



Destrani: la struttura base è costituita da un polimero 1,6-α del D-glucosio. Vi sono poi delle ramificazioni.

Mucopolisaccaridi (Glicosamminoglicani): sono la sostanza gelatinosa che (assieme al collageno e alle elastine) costituisce lo spazio extracellulare, in particolare in corrispondenza con i tessuti connettivi (cartilagini, tendini, pareti dei vasi sanguigni). Un esempio è dato dall'acido ialuronico, un polimero dell'acido glucuronico e della *N*-acetil glucosammina.



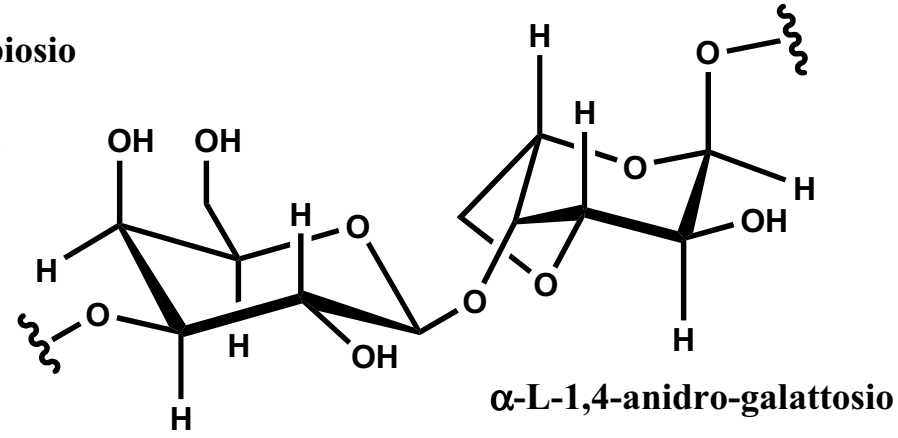
Acido Ialuronico

i mucopolisaccaridi si aggregano con le proteine a dare delle macromolecole dette **Proteoglicani**.

Agarosio: polimero lineare del disaccaride agarobiosio

Estratto ad un'alga marina

β-D-galattosio



α-L-1,4-anidro-galattosio

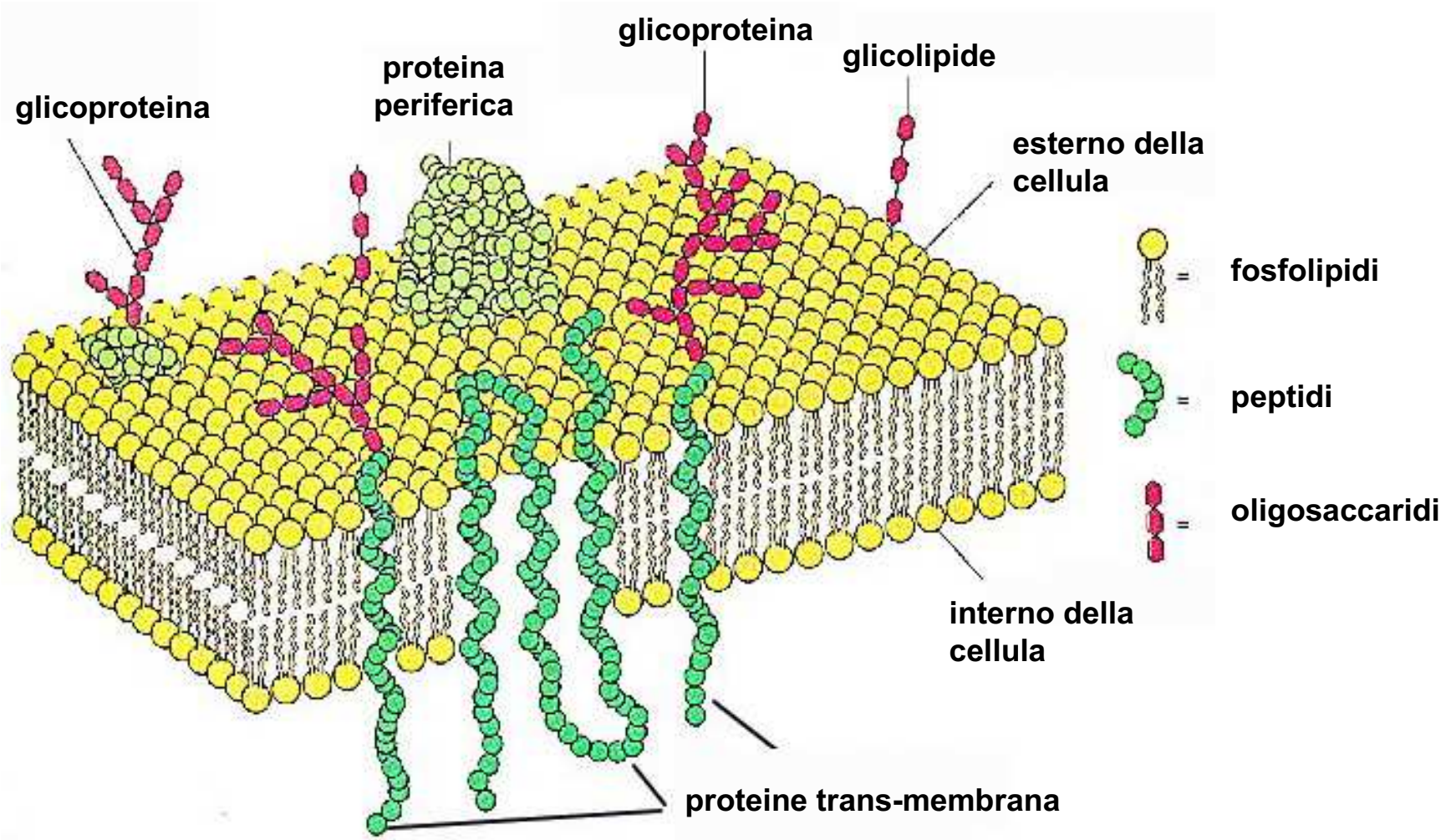
GLICOCONIUGATI

GLICOPROTEINE: Molto spesso le proteine sono glicosilate. Sono cioè legate, con un legame glicosidico, a mono- o ad oligosaccaridi. Questi ultimi possono arrivare fino a 20 unità di monosaccaride.

GLICOLIPIDI: Altre importanti biomolecole sono formate dall'unione di un oligosaccaride con un lipide.

Anche se alcuni gliconiugati sono idrosolubili e come tali sono riscontrabili nel sangue o all'interno della cellula, i glicoconiugati più importanti sono quelli di membrana. Essi sono implicati in fenomeni di riconoscimento cellulare da parte di:

- Altre cellule (ad es. i linfociti T)
- Anticorpi
- Lectine
- Microorganismi o virus

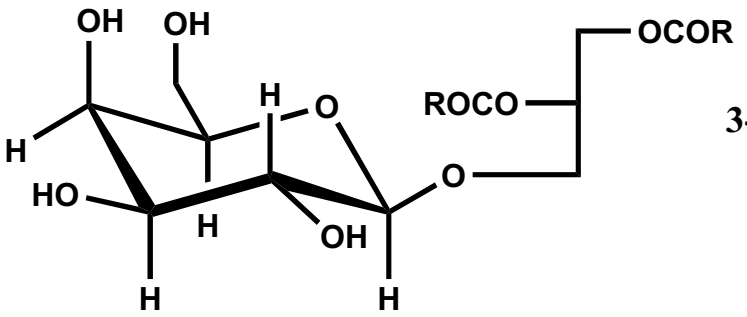


Varietà teorica degli oligosaccaridi

A differenza dei nucleotidi e degli amminoacidi, che possono unirsi l'uno all'altro solo in un modo, due monosaccaridi possono unirsi in vari modi. Se abbiamo 2 aldoesosi uguali possono unirsi con legami glicosidici di tipo 1,2 - 1,3 - 1,4 - 1,5 - 1,6. Inoltre il legame glicosidico può essere α o β. Abbiamo perciò 10 possibili omodimeri, contro 1 soltanto nel caso di amminoacidi e nucleotidi.
Utilizzando n monosaccaridi diversi, le possibilità di combinazione sono numerosissime, anche limitandoci a oligosaccaridi formati da solo 3-4 unità.

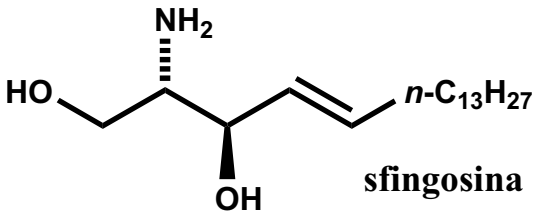
GLICOLIPIDI

Alcuni glicolipidi sono formati da un diacilglicerolo glicosilato. Ad esempio



3-β-galattosil-1,2-diacil-*sn*-glicerolo

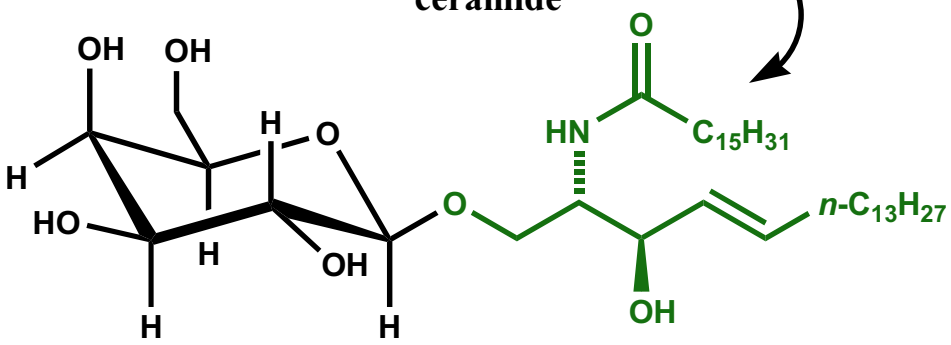
Ma i glicolipidi più importanti sono i glicosfingolipidi, formati dall'unione di un mono o oligosaccaride con una SFINGOSINA N-acilata (detta ceramide)



sfingosina

Quando l'unione coinvolge un monosaccaride o un disaccaride, i glicosfingolipidi sono detti cerebrosidi

questa parte verde (aglicone) è detta ceramide



un β-galattosil cerebroside

I galattosil cerebrosidi sono molto diffusi nelle membrane delle cellule neuronali

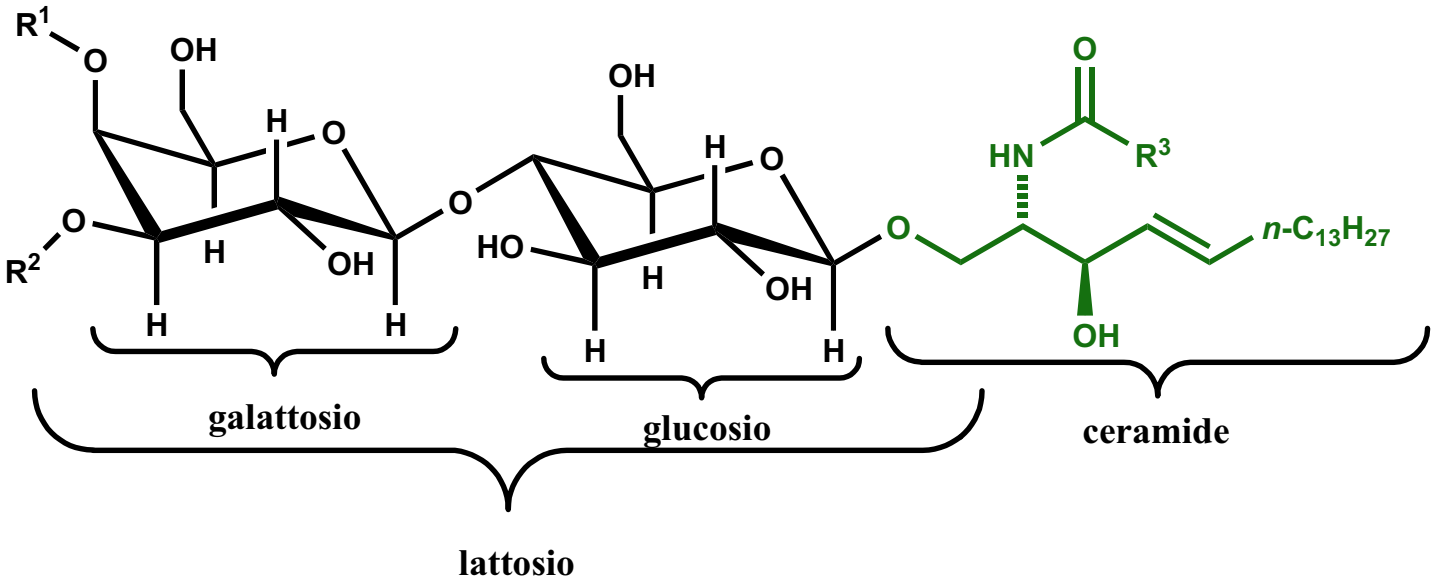
I **gangliosidi** sono una particolare famiglia di glicosfingolipidi in cui la ceramide è legata ad un oligosaccaride. La differenziazione tra i vari gangliosidi è data dalla catena idrofobica legata alla sfingosina ma, soprattutto, dalla natura dell'oligosaccaride. Esistono però delle caratteristiche comuni.

A) La ceramide è sempre legata ad un'unità di lattosio mediante un legame β-glicosidico

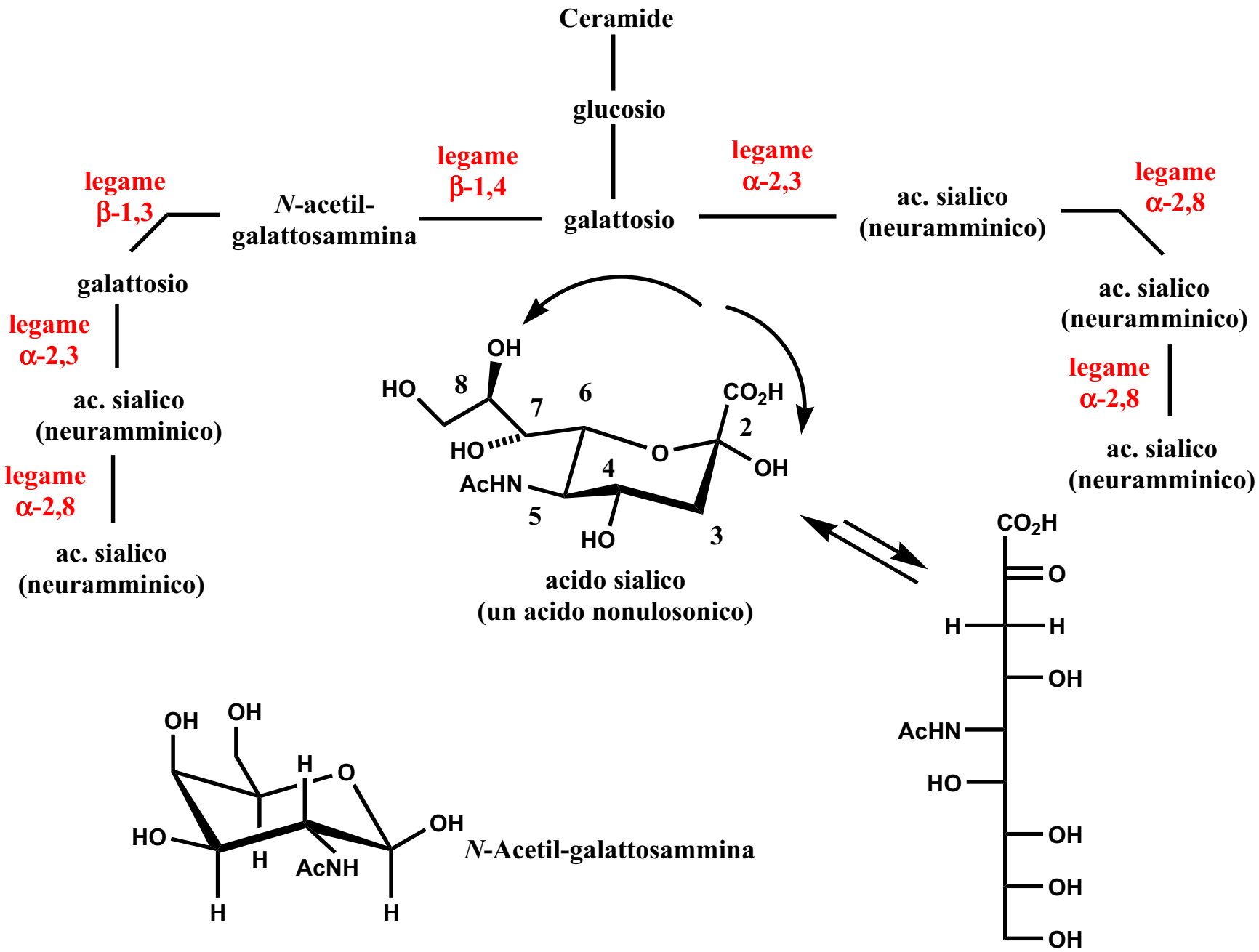
B) All'unità di lattosio sono uniti altre unità monosaccaridiche (da un minimo di 1 ad un massimo di 7).

C) Le unità addizionali sono legate all'ossidrile 4 del galattosio (da 0 a 4 unità) e/o all'ossidrile 3 del galattosio (da 0 a 3 unità)

D) Le unità che compongono le due catene (legate all'OH 4 o 3 del galattosio) sono sempre le stesse. Ciò che differenzia i vari gangliosidi non è il tipo di monosaccaride legato ma la lunghezza delle due catene

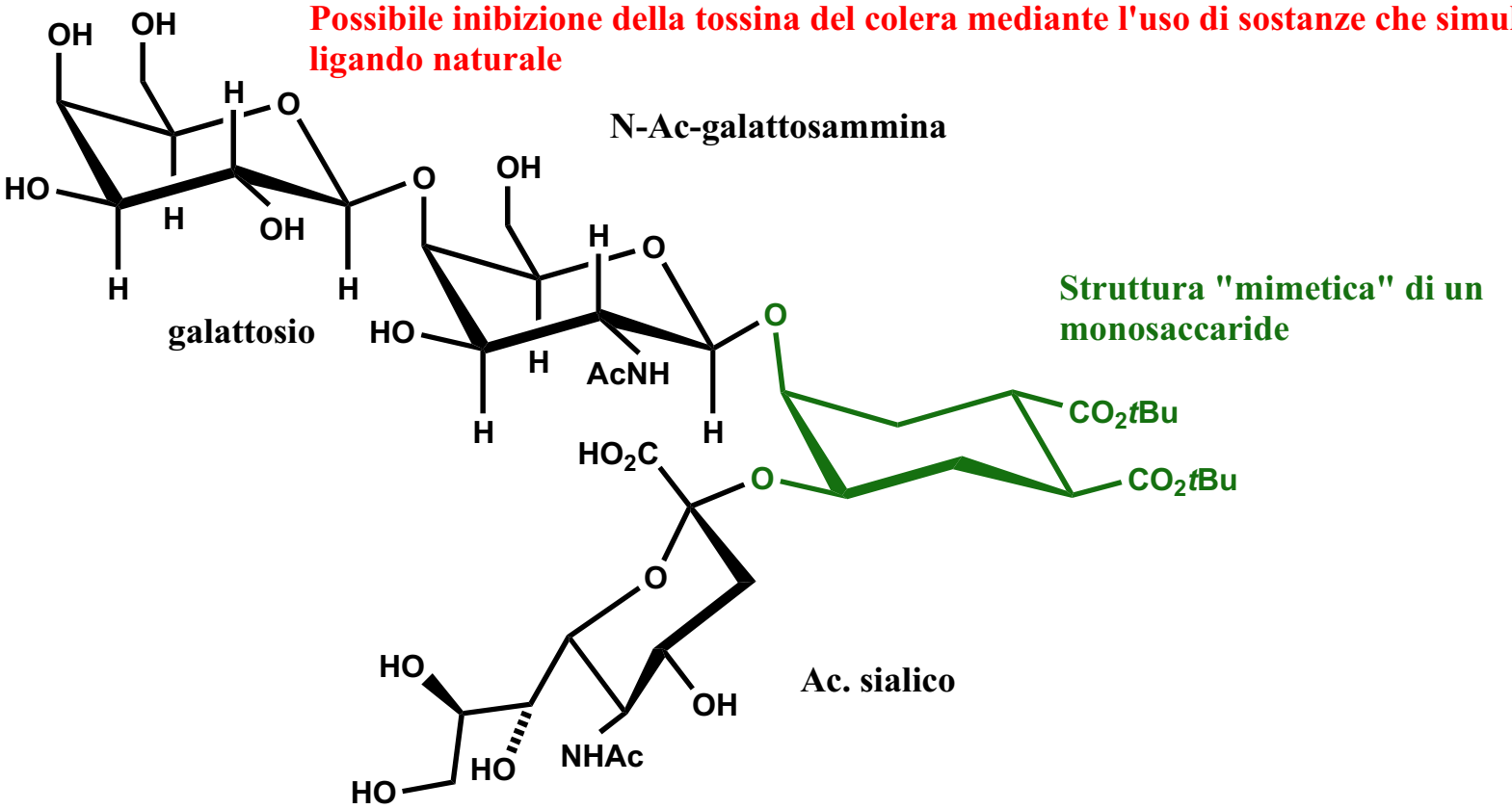


Dato che la catena R^1 può avere da 0 a 4 monosaccaridi e la catena R^2 può averne da 0 a 3, esistono 20 differenti possibilità. Tuttavia il composto in cui R^1 e R^2 sono entrambi = H non è considerato un ganglioside, ma un lattosil cerebroside. Pertanto, per ogni R^3 abbiamo 19 diversi gangliosidi.



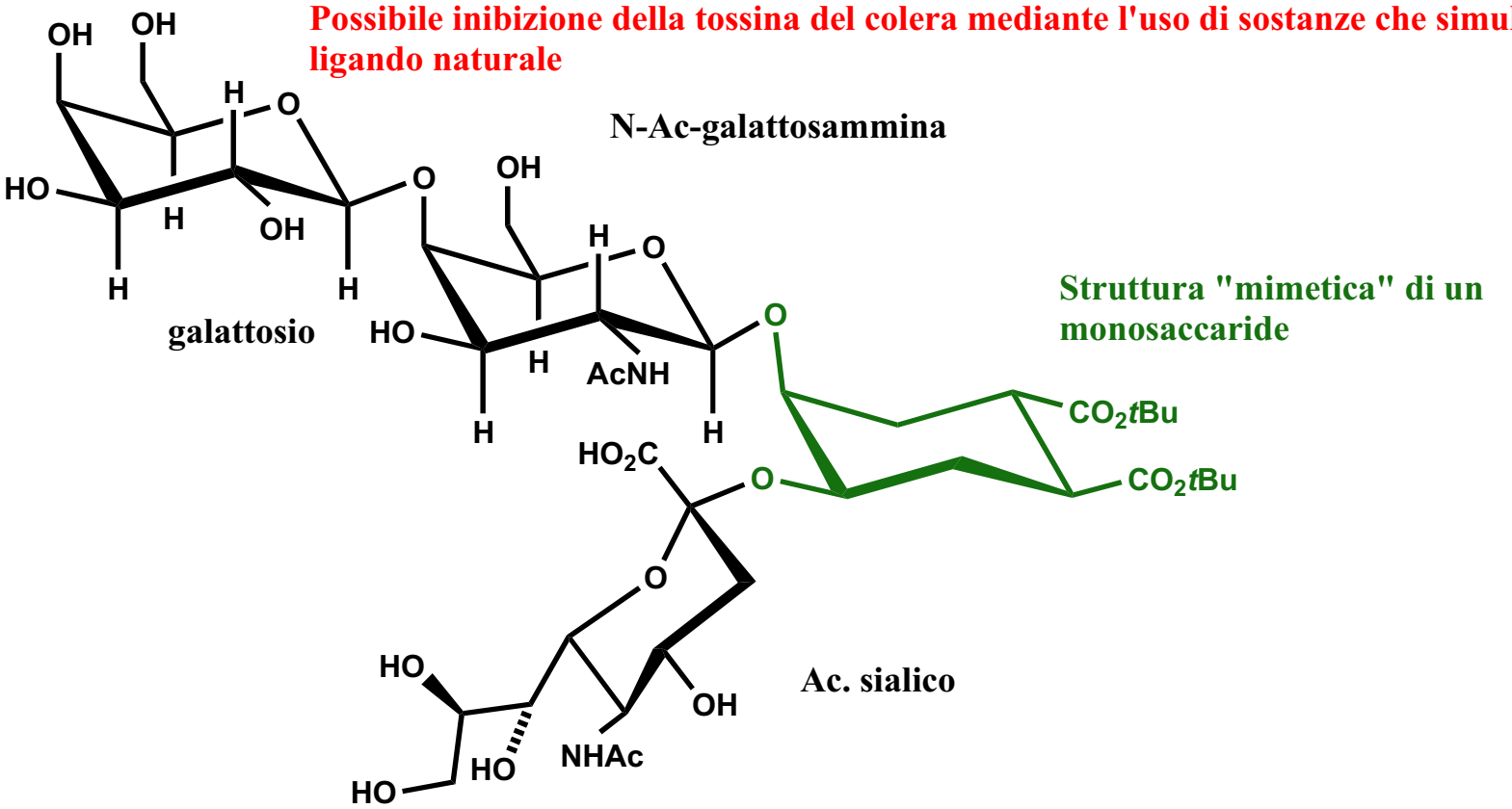
bioorg07_07-7

Possibile inibizione della tossina del colera mediante l'uso di sostanze che simulino il ligando naturale



La tossina del colera è un caso di LECTINA, cioé un peptide che si lega in modo non covalente ad un oligosaccaride. Le Lectine sono in pratica dei recettori. Quindi una sostanza che imiti il ligando può fungere da antagonista per tali recettori limitandone l'attività

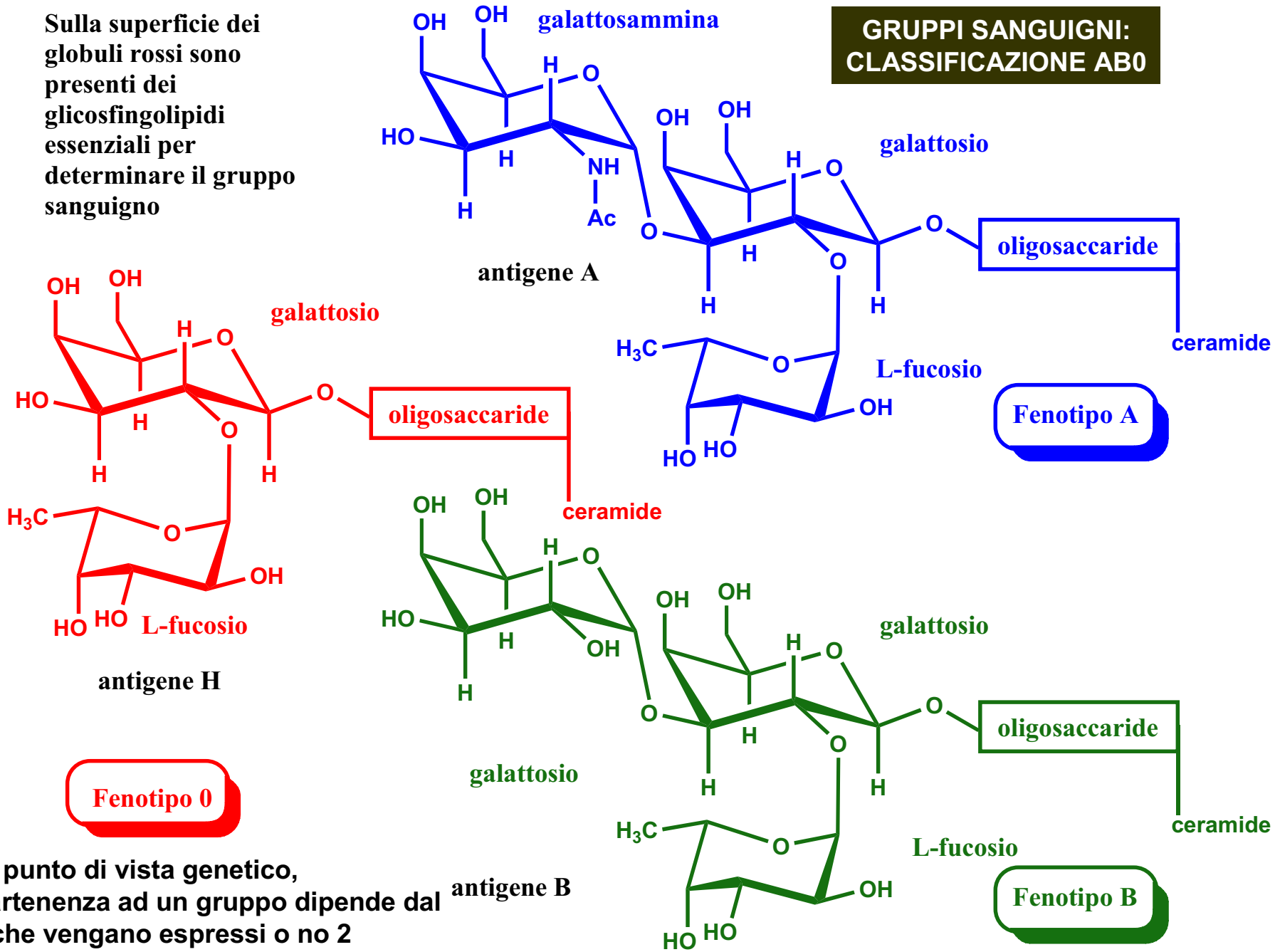
Possibile inibizione della tossina del colera mediante l'uso di sostanze che simulino il ligando naturale



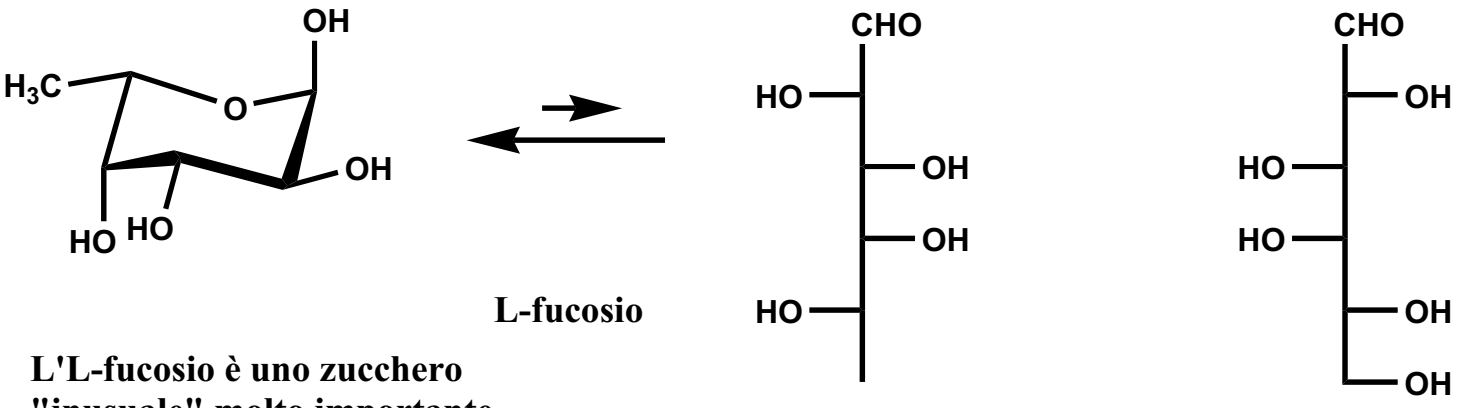
La tossina del colera è un caso di LECTINA, cioé un peptide che si lega in modo non covalente ad un oligosaccaride. Le Lectine sono in pratica dei recettori. Quindi una sostanza che imiti il ligando può fungere da antagonista per tali recettori limitandone l'attività

GRUPPI SANGUIGNI: CLASSIFICAZIONE AB0

Sulla superficie dei globuli rossi sono presenti dei glicosfingolipidi essenziali per determinare il gruppo sanguigno



da un punto di vista genetico, l'appartenenza ad un gruppo dipende dal fatto che vengano espressi o no 2 enzimi: alfa-1,3-galattosil-transferasi e alfa-1,3-NAcGal-transferasi



L-fucosio

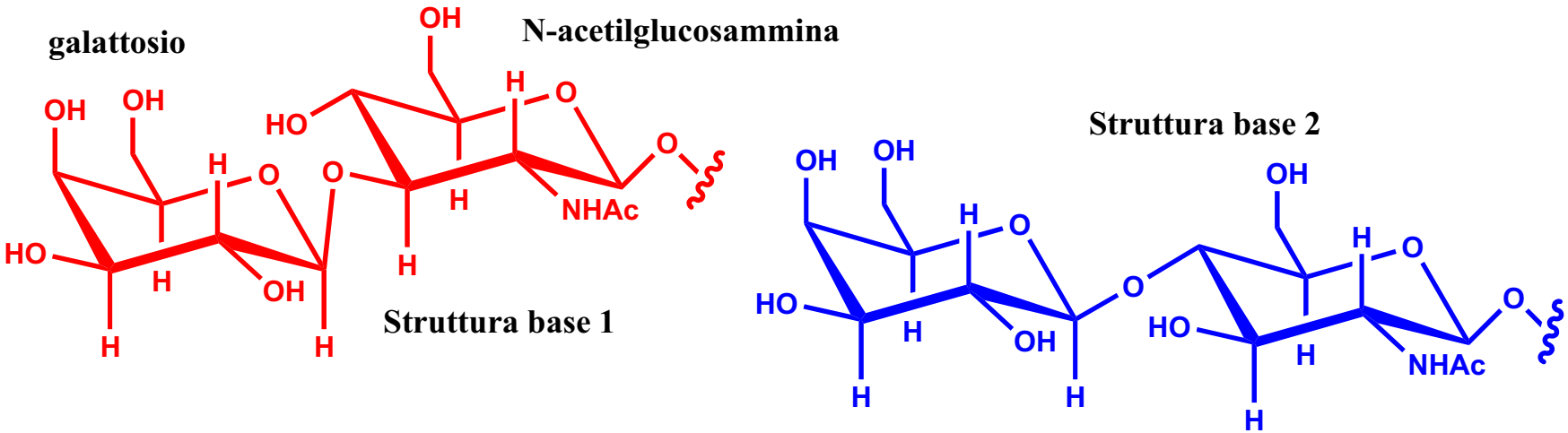
6-desossi-L-galattosio

D-galattosio

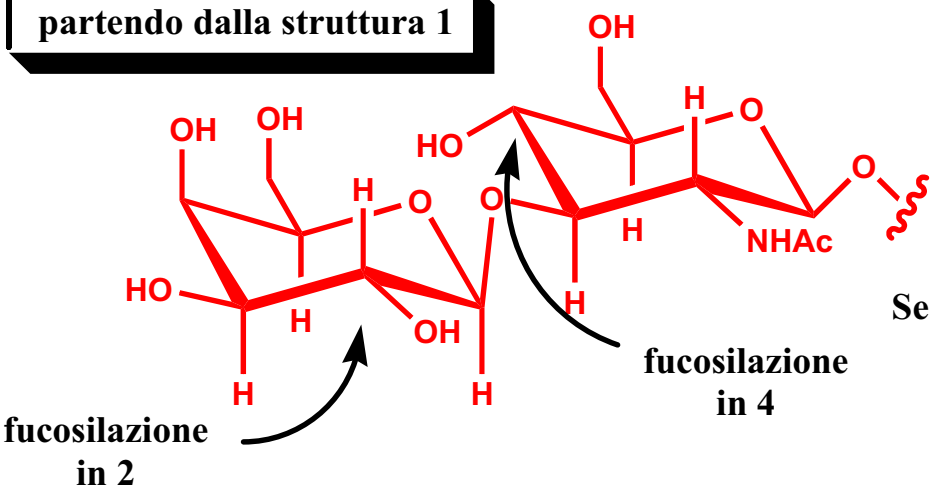
L'L-fucosio è uno zucchero "inusuale" molto importante in chimica bioorganica

ULTERIORE CLASSIFICAZIONE DI LEWIS DEI GRUPPI SANGUIGNI

Un'ulteriore suddivisione dipende dalla presenza o meno di altri due enzimi: si tratta stavolta di fucosil-transferasi. Sono la FUT-2 (1,2-fucosil transferasi) e la FUT-3 (1,3 o 1,4-fucosil transferasi). Questi enzimi agiscono su due diverse strutture-base e possono quindi produrre opportuni antigeni che, posti sulla superficie delle cellule, fungono da ulteriori elementi di riconoscimento.

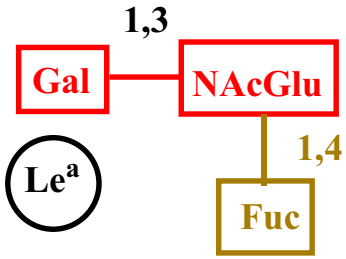


partendo dalla struttura 1

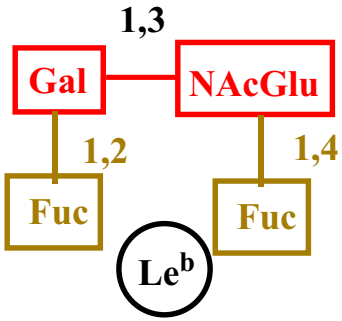


Se è presente solo FUT-2

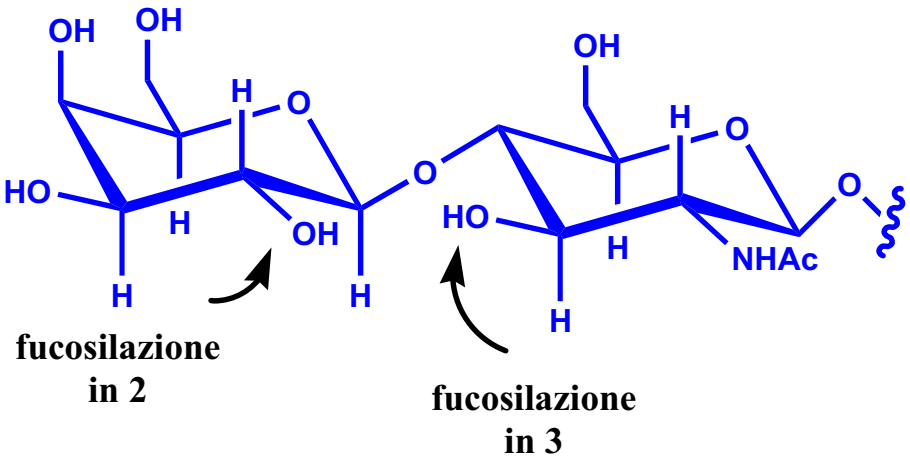
Se è presente solo FUT-3



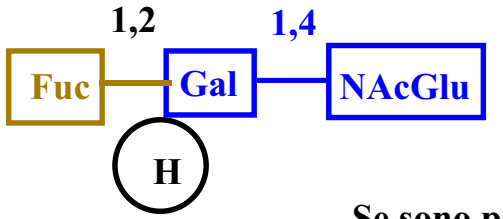
Se sono presenti
FUT-2 e FUT-3



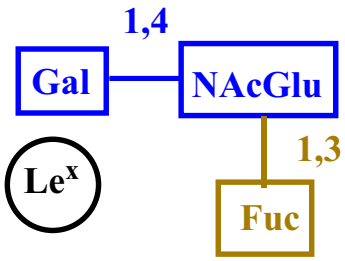
partendo dalla struttura 2



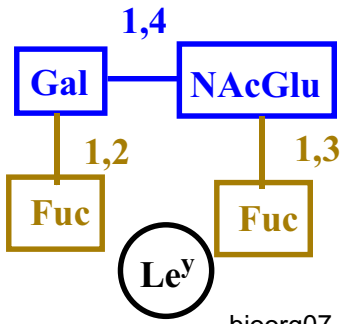
Se è presente solo FUT-2



Se è presente solo FUT-3

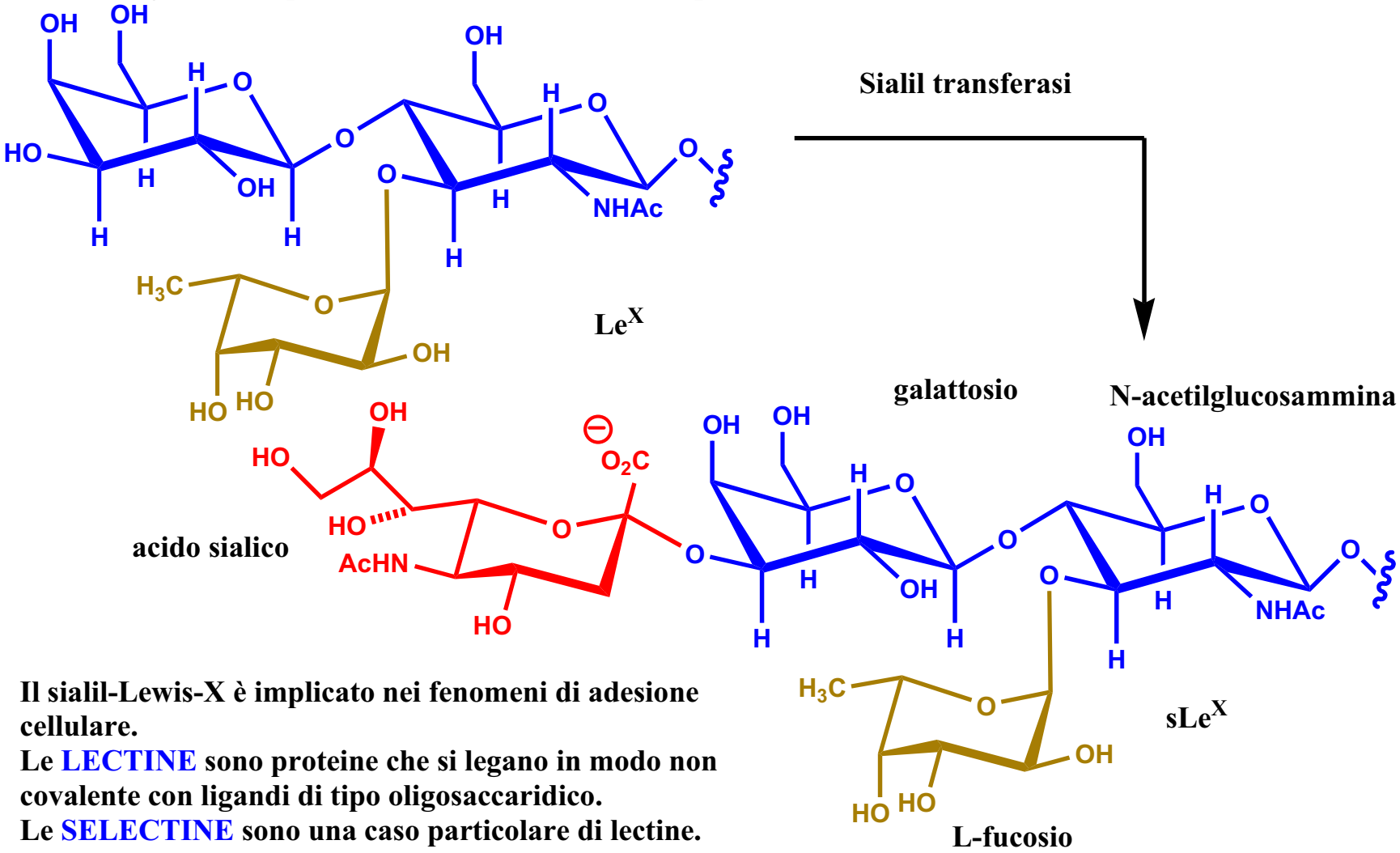


Se sono presenti
FUT-2 e FUT-3

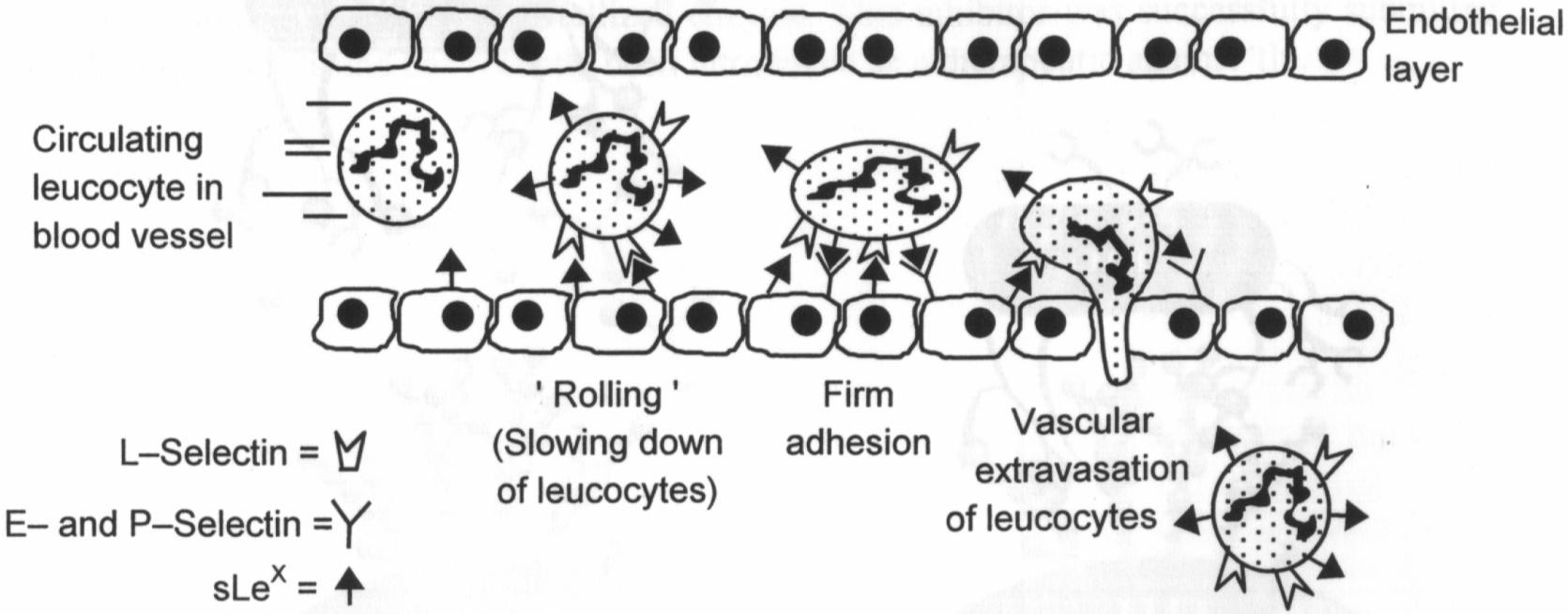


Nota: FUT-3 agisce solo sulla glicosammina
FUT-2 agisce solo sul galattosio (ovviamente)

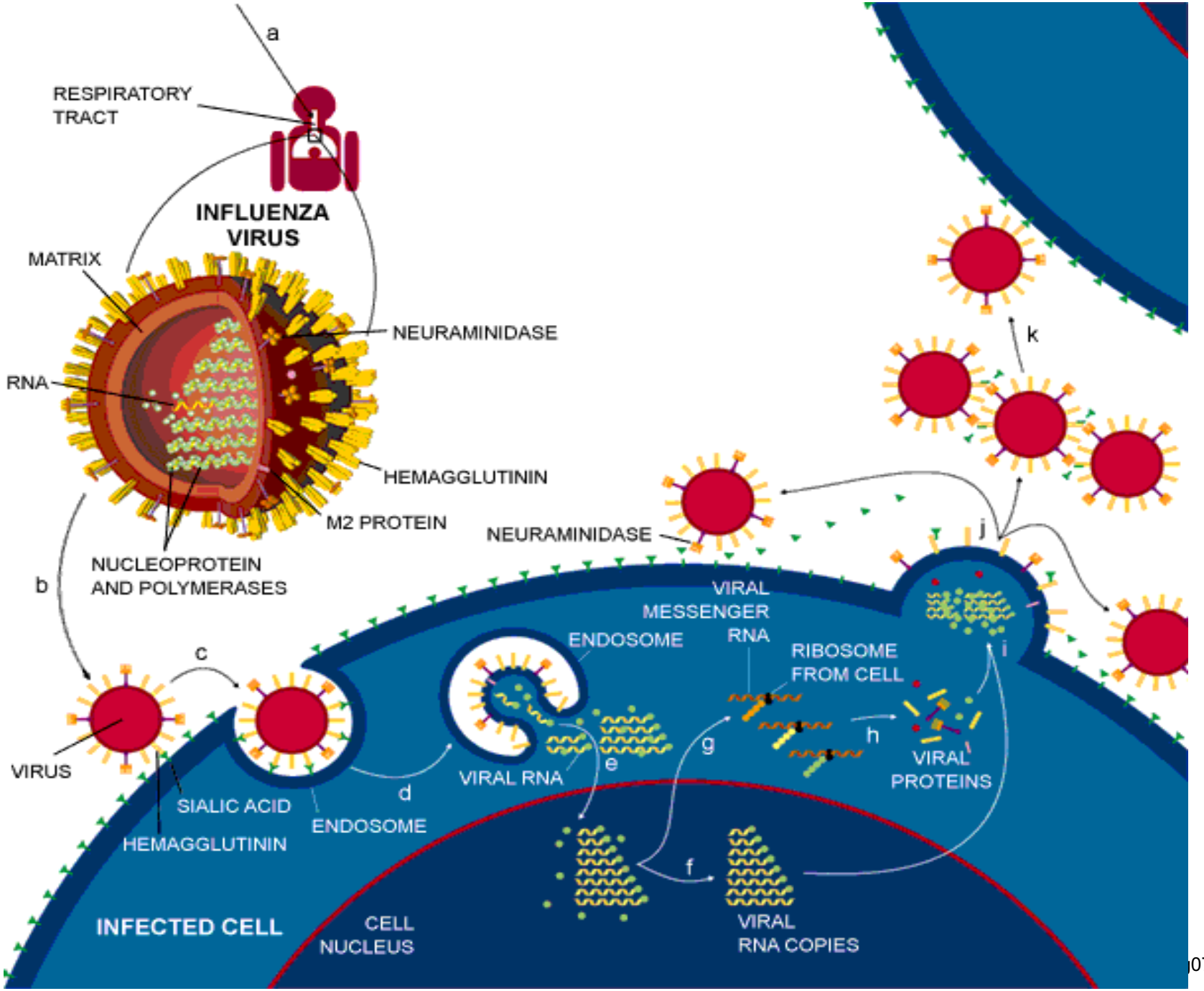
Questi antigeni sono spesso ulteriormente sialilati. Di particolare rilevanza è il sialil-Lewis-X (sLe^X)



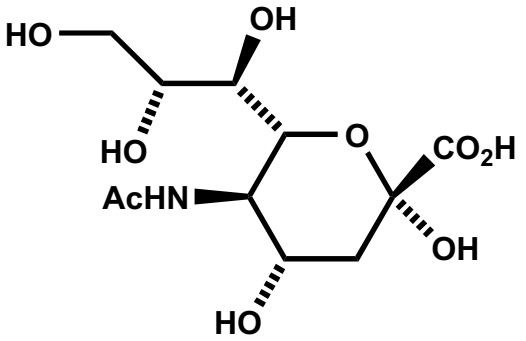
Il sialil-Lewis-X è implicato nei fenomeni di adesione cellulare.
Le LECTINE sono proteine che si legano in modo non covalente con ligandi di tipo oligosaccaridico.
Le SELECTINE sono una caso particolare di lectine. Esse sono recettori di membrana espresse sui leucociti e sulle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Anche il sLe^X si trova in entrambi i tipi di cellule. Il legame tra ligando (sLe^X) e selectine porta all'adesione dei leucociti con le pareti dei vasi, che è il primo processo per la fuoriuscita vascolare dei leucociti



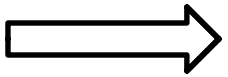
Anche i batteri ed i virus usano delle loro personali lectine per interagire con i carboidrati posti all'esterno delle cellule. La presenza di lectine specifiche è essenziale perché il microorganismo o il batterio sia patogenico. Per questo spesso i virus sono molto specifici per il tipo di animale e per il tipo di cellula.
I glicomimetici potranno forse in futuro servire ad ostacolare questi tipi di adesione.
Un importante esempio recente è dato dai primi farmaci contro il virus dell'influenza.
Il virus dell'influenza esprime due proteine essenziali: a) Una lectina (hemaglutinina) che serve a mediare l'adesione a residui di acido sialico presenti sulla superficie cellulare; b) Una sialidasi (neuramminidasi) che scinde un legame glicosidico e serve a facilitare la fuoriuscita del virus.
Sono entrambi possibili target biologici.
Finora sono stati messi in uso inibitori della sialidasi (una proteina molto conservata in seguito a mutazioni). Si stanno però studiando antagonisti della hemaglutinina.

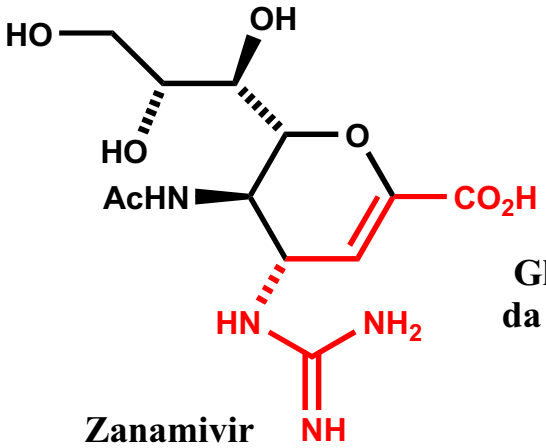

a
RESPIRATORY TRACT
INFLUENZA VIRUS
MATRIX
NEURAMINIDASE
RNA
HEMAGGLUTININ
M2 PROTEIN
NUCLEOPROTEIN AND POLYMERASES
b
c
VIRUS
SIALIC ACID
HEMAGGLUTININ
ENDOSOME
d
VIRAL RNA
e
f
g
h
i
j
k
NEURAMINIDASE
VIRAL MESSENGER RNA
RIBOSOME FROM CELL
VIRAL PROTEINS
VIRAL RNA COPIES
INFECTED CELL
CELL NUCLEUS

07_07-15



Acido sialico





Zanamivir

Gli inibitori della sialidasi da virus dell'influenza sono strutturalmente simili all'acido sialico

GLICOPROTEINE

Le glicoproteine sono principalmente di due tipi a seconda di come l'oligosaccaride è legato alla proteina:

a) N-Glicani: la proteina è legata con un legame N-glicosidico. Questo legame coinvolge sempre il gruppo NH_2 della catena laterale di una asparagina.

b) O-Glicani: la proteina è legata con un legame O-glicosidico. Il legame coinvolge un ossidrile della serina o della treonina.

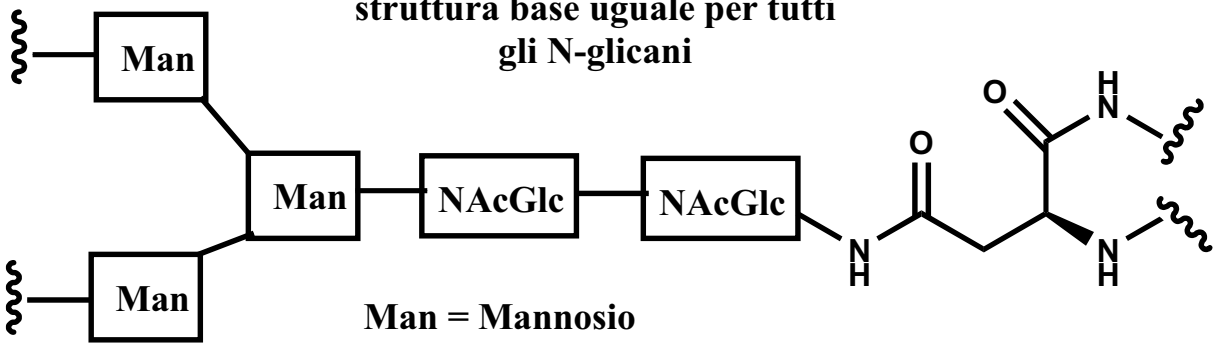
Come per i gangliosidi, esiste una struttura comune a tutti, a cui si aggiungono poi ulteriori monosaccaridi. Come per i gangliosidi, la differenziazione non sta tanto nel tipo di oligosaccaride aggiunto, ma nella lunghezza delle catene.

Ad esempio, per gli N-glicani:

NAcGlc = N-acetil glucosammina

A seconda dei tipi di *N*-glicani, si possono avere varie unità di mannosio, NAcGlc, o acido sialico

struttura base uguale per tutti gli N-glicani



Man = Mannosio

SINTESI DI OLIGOSACCARIDI

La sintesi di oligosaccaridi è senza dubbio più complessa della sintesi di oligopeptidi. E' necessario proteggere tutti i gruppi OH non implicati nel legame glicosidico e utilizzare metodi di glicosidazione stereoselettivi. I chimici organici hanno realizzato negli anni svariate metodologie per realizzare l'uno e l'altro obiettivo.

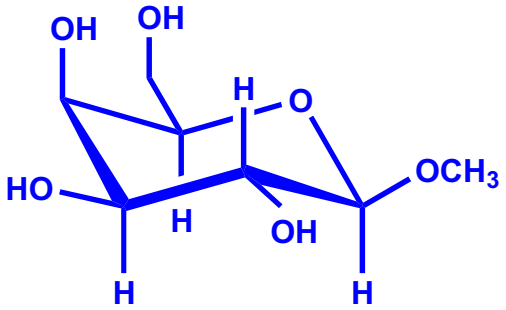
Tuttavia un'alternativa che sta prendendo sempre più piede è la sintesi enzimatica di glicosidi.

Esistono due classi di enzimi che possono in principio essere impiegati a tale scopo:

A) Le glicosidasi (E.C.3.2...): sono delle idrolasi (non richiedono cofattore)

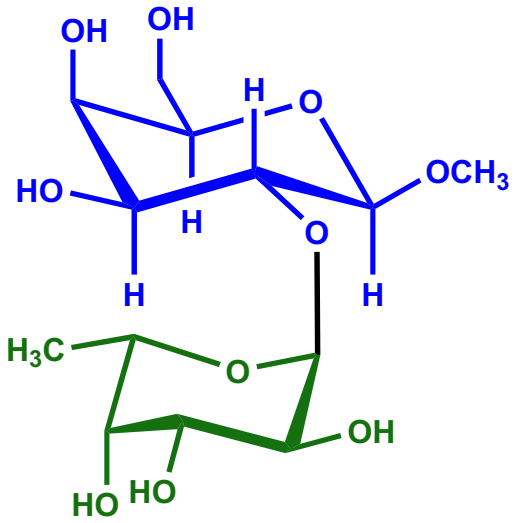
B) Le glicosil transferasi (E.C.2.4..): sono delle transferasi (richiedono UTP o analoghi)

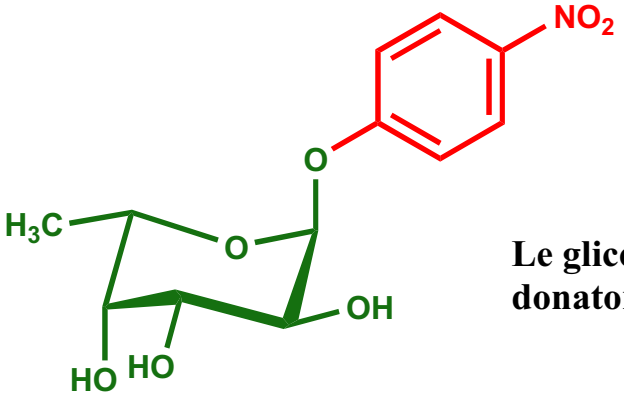
Le glicosidasi sono più facili da usare (non prevedono cofattore), ma l'equilibrio è spostato a favore dell'idrolisi. Per spostare l'equilibrio si possono usare opportuni glicosil donatori attivati



β-D-*O*-metil galattopiranoside

α-L-fucosidasi

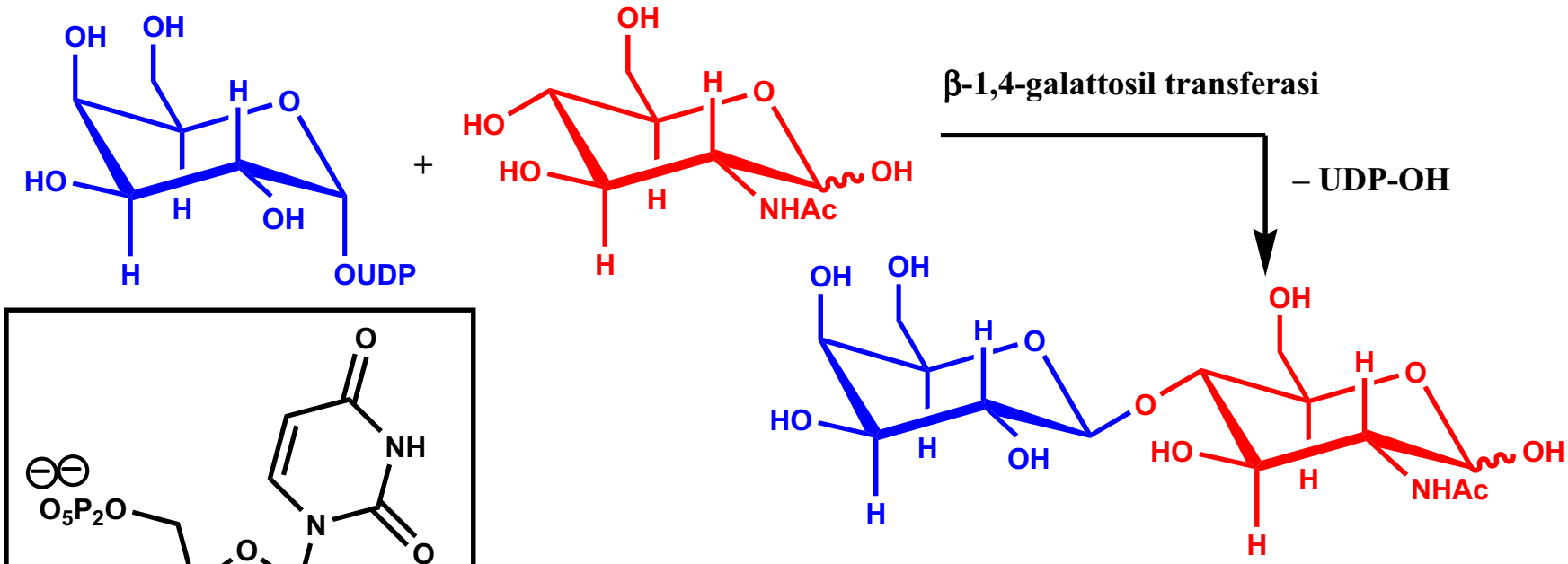
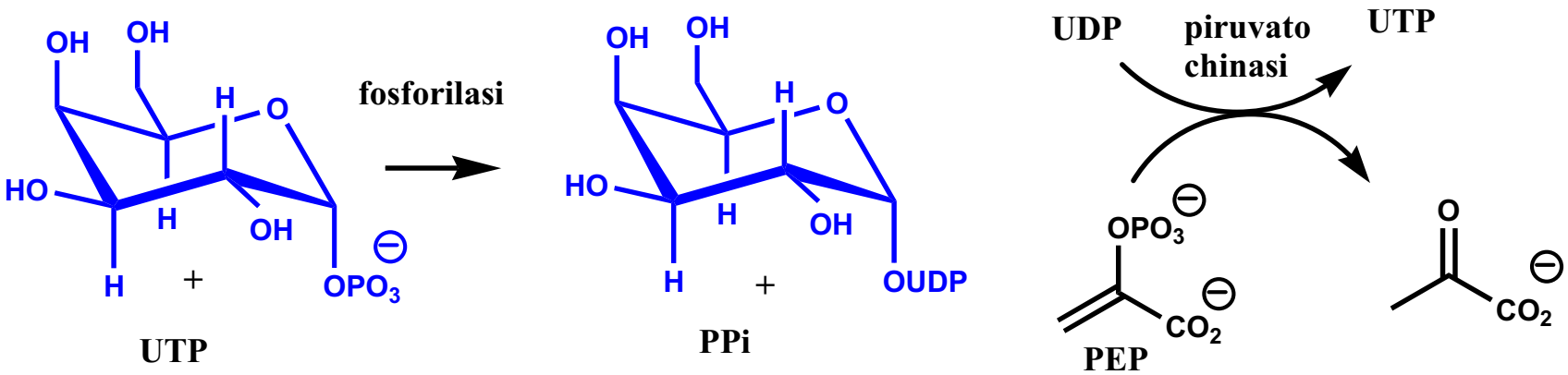




α-L-*O*-*p*-nitrofenil fucoside

Le glicosidasi sono meno selettive delle glicosil transferasi (accettano anche donatori glicosidici innaturali come i *p*-nitrofenil derivati)

Le glicosil transferasi utilizzano come donatori glicosidici, dei derivati attivati come difosfato (UDP)



I nucleotidi zuccherini sono costosi. E' perciò bene generarli in situ da UTP. A sua volta UTP è costoso. Quindi viene continuamente rigenerato da UDP mediante una reazione enzimatica a partire da PEP (molto più economico)