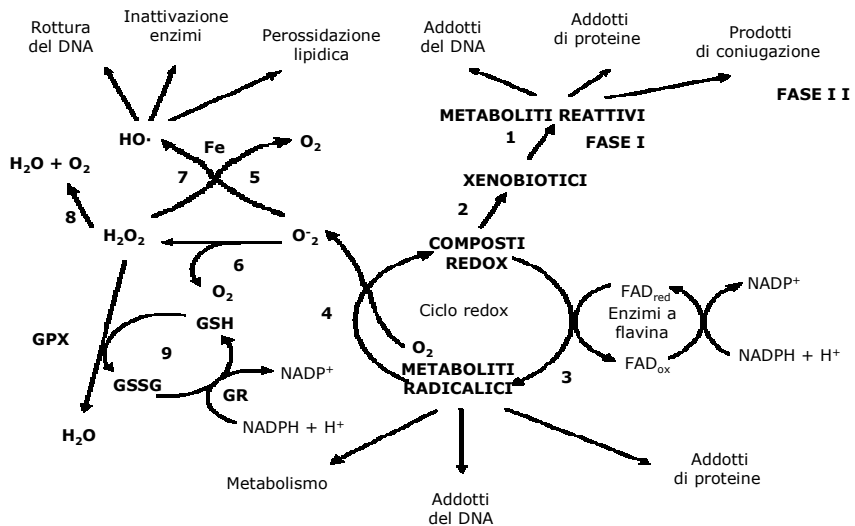




# Misure con biomarcatori

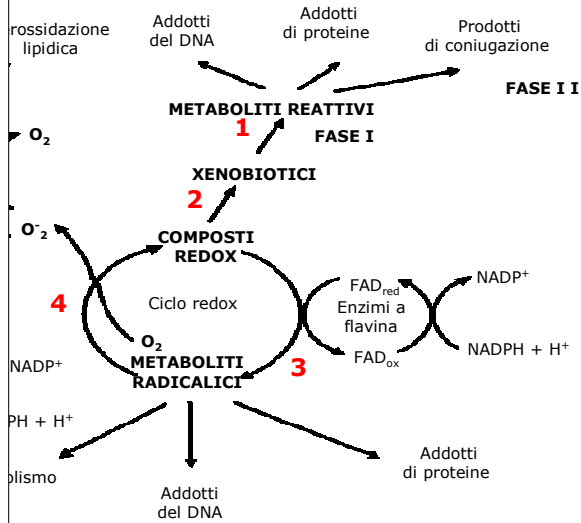
## V. Markers enzimatici

### Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



## Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno

1. Il metabolismo di fase I (incluso l'ossidazione lipidica da Citocromo P450) può formare metaboliti reattivi.
2. Il metabolismo di fase I può formare specie redox che possono subire un ciclo redox.
3. Ciclo redox che comprende flavoproteine.
4. Per completare il ciclo redox si forma l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e si rigenera il composto di partenza.

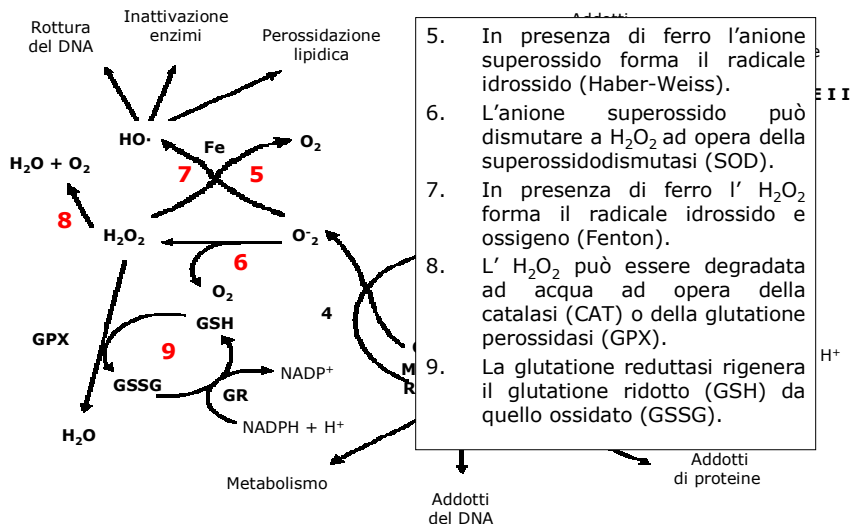


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

3

## Vie metaboliche e radicali dell'ossigeno



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

4

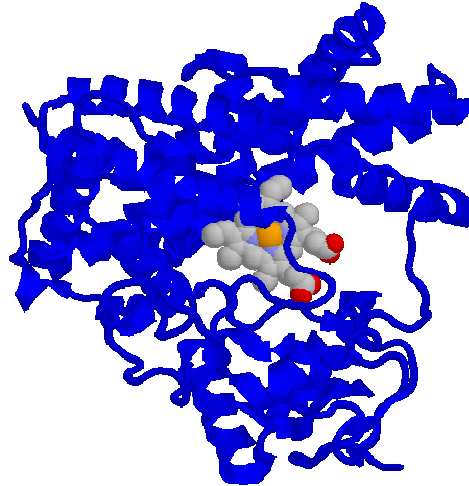
## Citocromo P450 (CYP)

- Enzima microsomiale, il più versatile tra gli enzimi di fase I.
- Inducibile.
- Anche conosciuto come ossidasi a funzioni miste (MFO).
- Proteina che contiene un gruppo eme
  - Il complesso formato dal  $\text{Fe}^{2+}$  e CO ha uno spettro di assorbimento con massimo centrato a 450 nm (447-452) nm.

## CYP

- Ossidazione di xenobiotici usando il NADPH come cofattore e  $\text{O}_2$
- La reazione procede come ciclo catalitico:  
 $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \longrightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$
- Non è attivo contro tutti i contaminanti (specialmente gli alogeni)
- In alcuni casi genera prodotti tossici (epossidi)
- L'induzione delle MFO è un sistema di biomarcatura

## Struttura del CYP (1PO5)

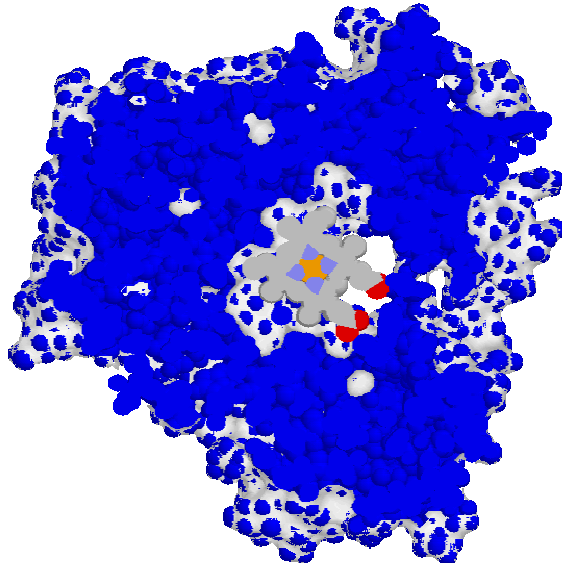


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

7

## Struttura del CYP (1PO5)

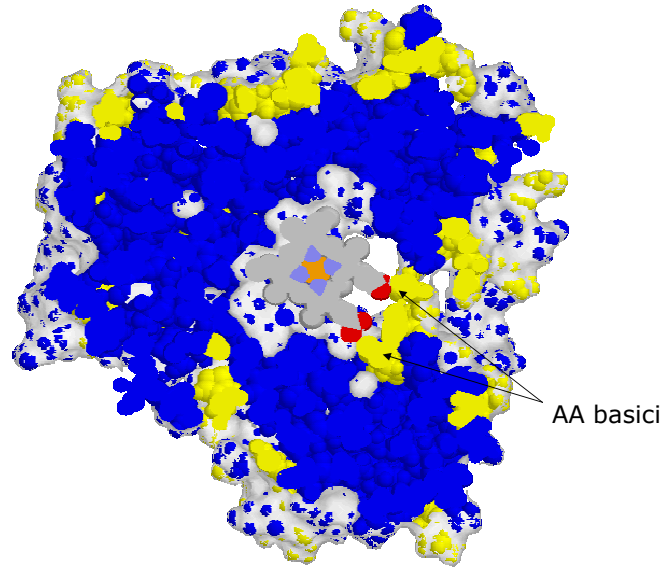


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

8

## Struttura del CYP (1PO5)

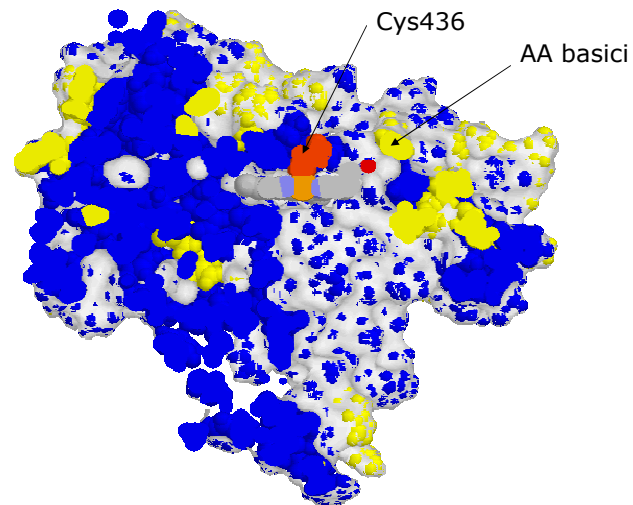


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

9

## Struttura del CYP (1PO5)

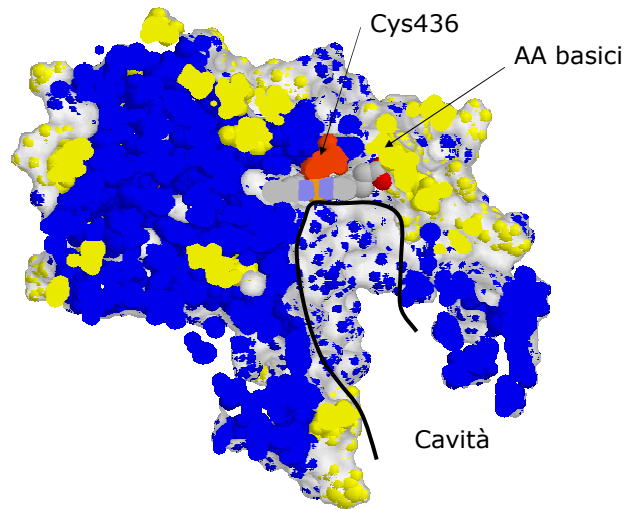


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

10

## Struttura del CYP (1PO5)

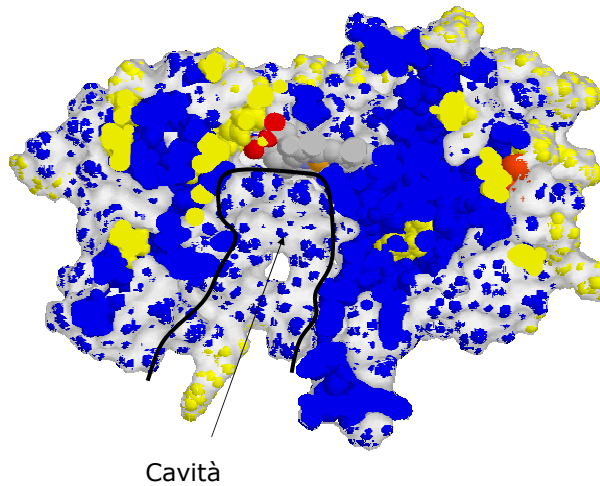


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

11

## Struttura del CYP (1PO5)

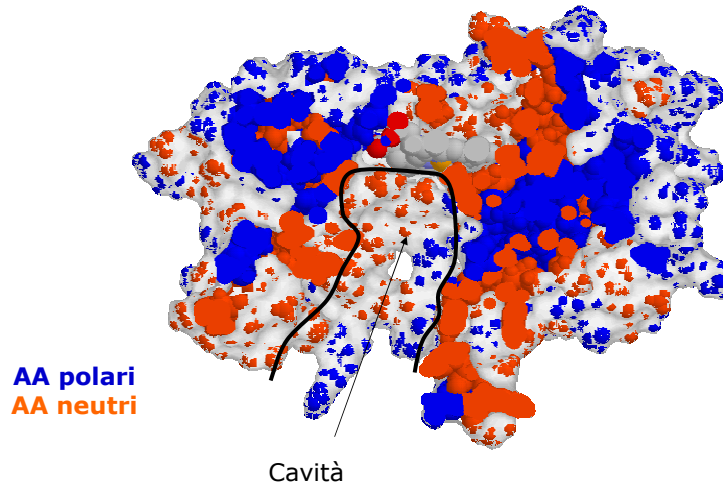


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

12

## Struttura del CYP (1PO5)

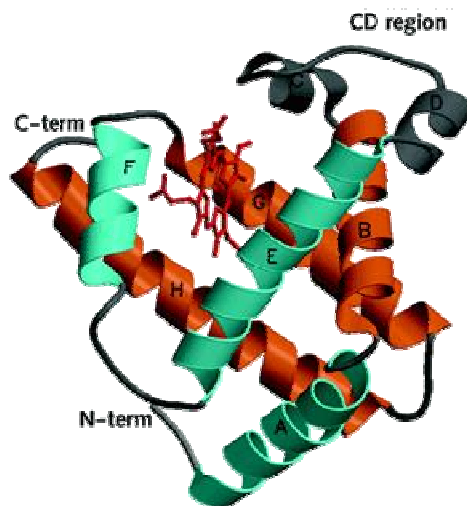


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

13

## Struttura del CYP

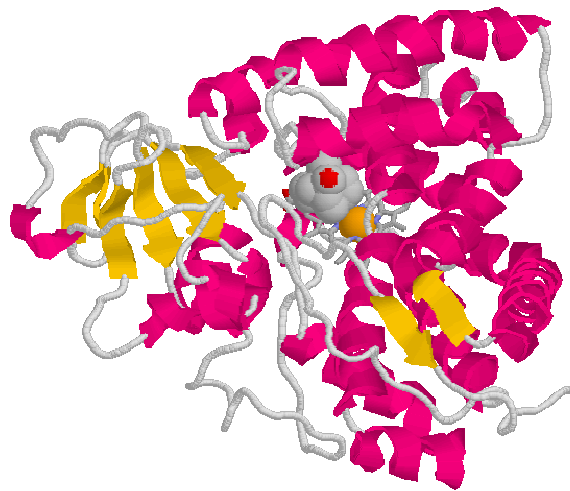


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

14

## Struttura del CYP

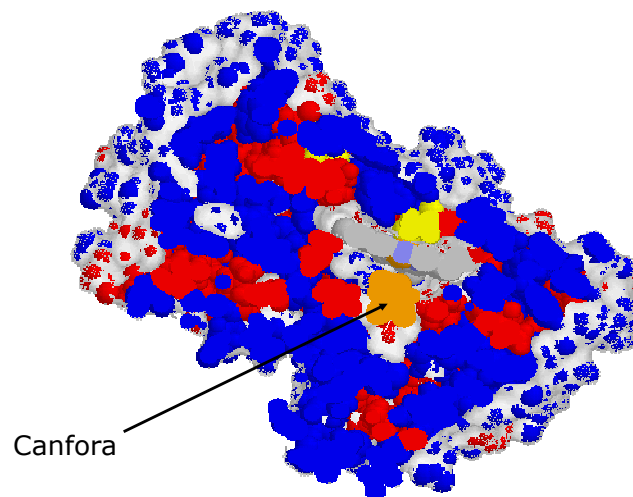


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

15

## Struttura del CYP



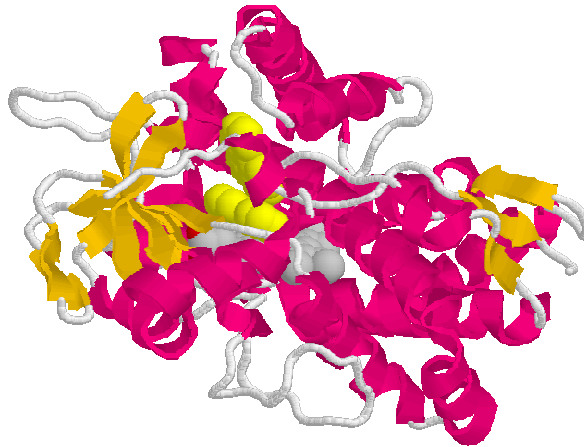
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

16



## Struttura del CYP

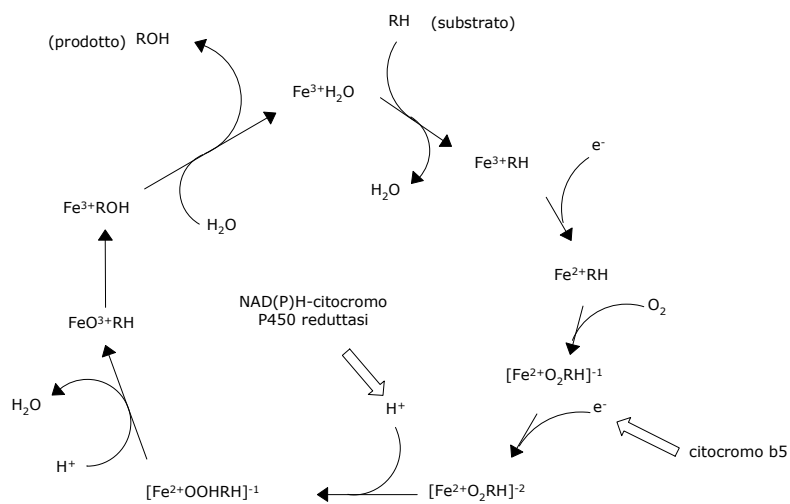


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

17

## Ciclo del CYP



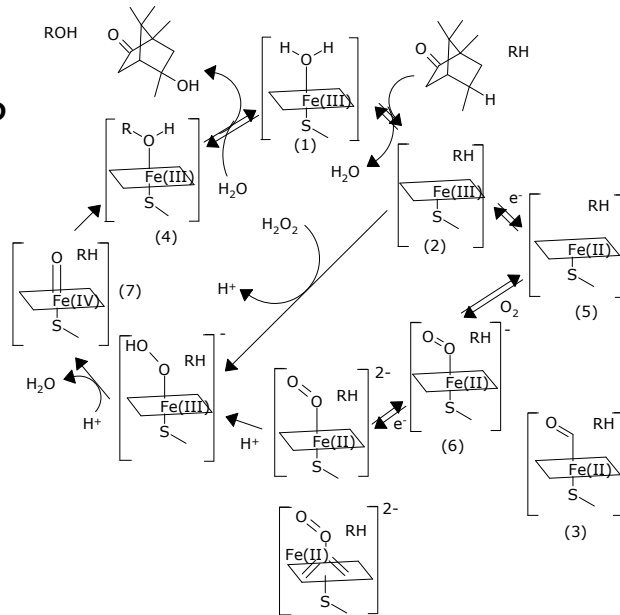
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

18

## Meccanismo ciclico del CYP

1. P450 acquo Fe(III)
2. P450 canfora Fe(III)
3. P450 canfora CO Fe(III)
4. P450 prodotto Fe(III)
5. P450 canfora Fe(II)
6. P450 canfora  $O_2^-$  Fe(II)
7. P450 ossigeno attivato Fe(IV)



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

19

## Meccanismo

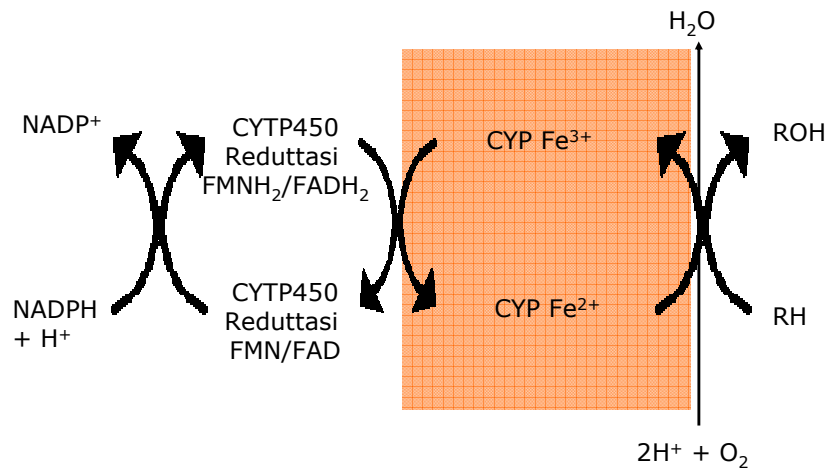
- L'ossigeno è legato non ad angolo retto.
- Il legame dell'ossigeno allontana il ligando (RH) solo dopo che i due atomi di ossigeno si sono ridotti il ligando si riavvicina. Ciò previene la formazione di ROS.
- Gli elettroni per la riduzione dell'ossigeno sono forniti da una proteina Fe-S (P450 batterica o mitocondriale) o da una NADPH-citocromo P450 ossidoreduttasi FAD/FMN dipendente (microsomi).

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

20

## Meccanismo generale del CYP



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

21

## Meccanismo

- Nel complesso con la NADPH-citocromo P450 ossidoreduttasi l'elettrone si muove attraverso lo scheletro della proteina

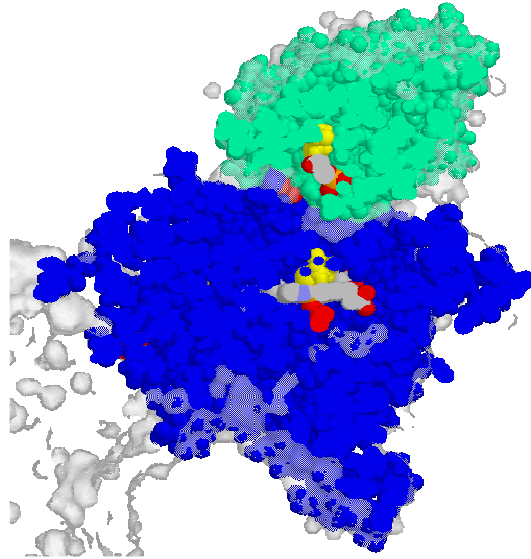


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

22

## Struttura del CYP

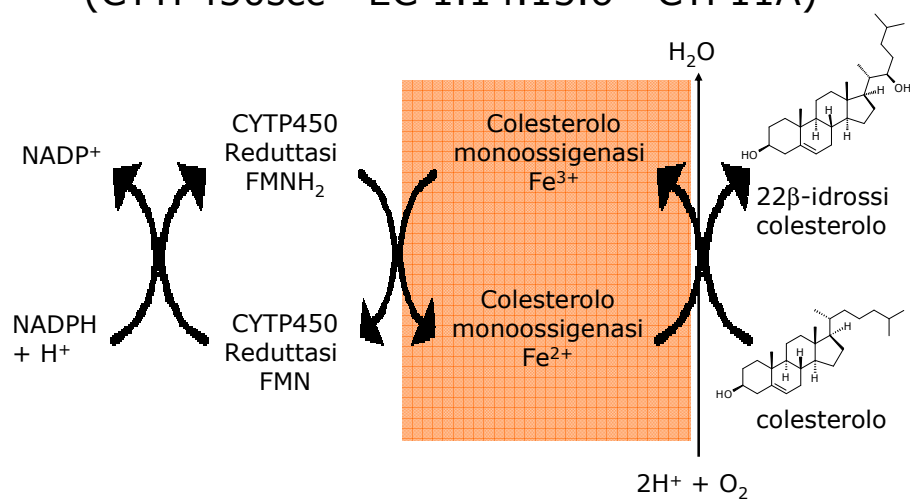


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

23

## Colesterolo monoossigenasi (CYTP450scc - EC 1.14.15.6 - CYP11A)



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

24

## Reazioni catalizzate dal citocromo P450

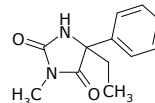
- Idrossilazione di aromatici
- Epossidazione di aromatici
- Idrossilazione di alifatici
- Epossidazione di alcheni
- N-dealchilazione
- O-dealchilazione
- S-sealchilazione
- N-ossidazione
- N-idrossilazione
- S-ossidazione
- Ossidazione di aldeidi
- Aromatizzazione di androgeni
- Ossidazione dell'alotano
- Riduzione dell'alotano
- Ossidazione dell'arginina
- Taglio della catena laterale del colesterolo
- Deidrogenazione
- Dealogenazione
- Azoriduzione
- Deaminazione
- Desolforazione
- Idrolisi di ammidi
- Idrolisi di esteri
- Perossidazione
- Denitrazione

Più almeno altre 20

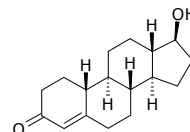
## Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Idrossilazione di atomi di carbonio alifatici o aromatici

- Da (S)-mefentoina a 4'-idrossi-(S)-mefentoina (CYP2C19)

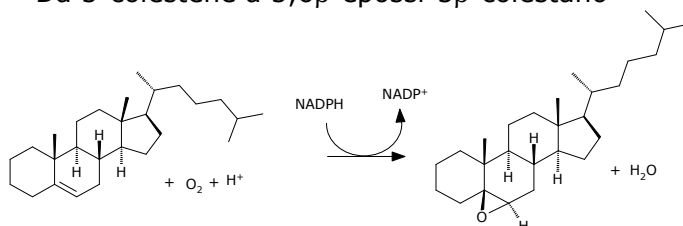


- Da testosterone a 6 $\alpha$ -idrossitestosterone (CYP3A4)



## Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Epossidazione di doppi legami
  - Da 5-colestene a 5,6 $\beta$ -epossi-5 $\beta$ -colestano



- Ossigenazione di eteroatomi, *N*-idrossilazione
  - Da amine a idrossilamine
  - Da omeprazolo to solfone (CYP3A4)

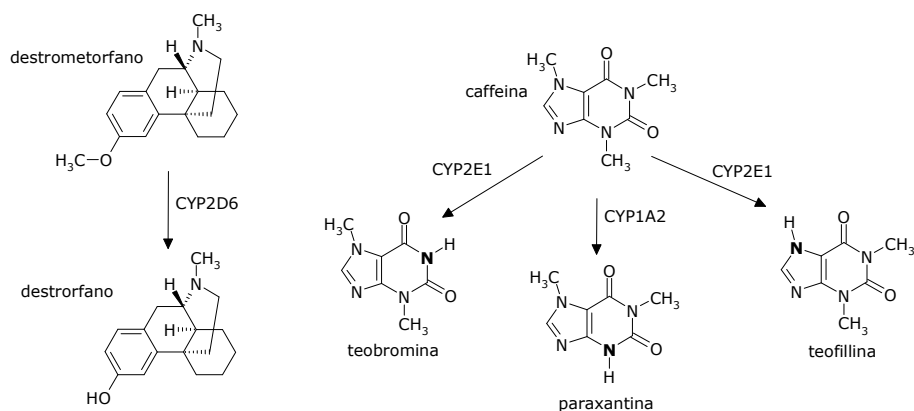
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

27

## Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Dealchilazione di eteroatomi
  - *O*-dealchilazione (da destrometorfano a destrorfano)
  - *N*-demetilazione della caffeina



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

28

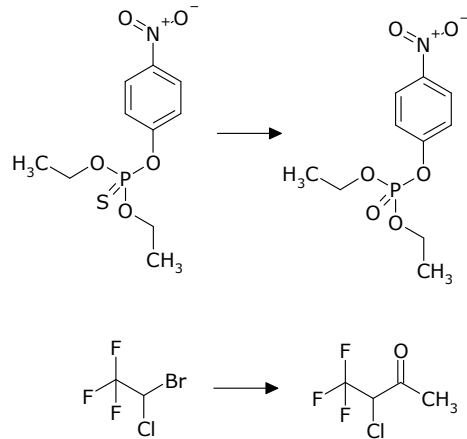
## Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Trasferimento di gruppo per via ossidativa

– N, S, X

rimpiazzato con O

- Da parathion a paroxon (da S a O)
- Attivazione dell'alotano a trifluoroacetilcloruro



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

29

## Reazioni catalizzate dal citocromo P450

- Scissione di esteri

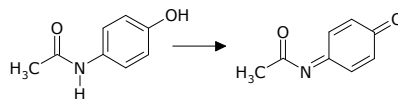
– Scissione del gruppo funzionale con O nel gruppo uscente

- Da loratadina a lorantadina desacetilata (CYP3A4, 2D6)

- Deidrogenazione

– Astrazione di due H con formazione di C=C

- Attivazione di acetaminofene al metabolita epatotossico *N*-acetilbenzochinoneimina



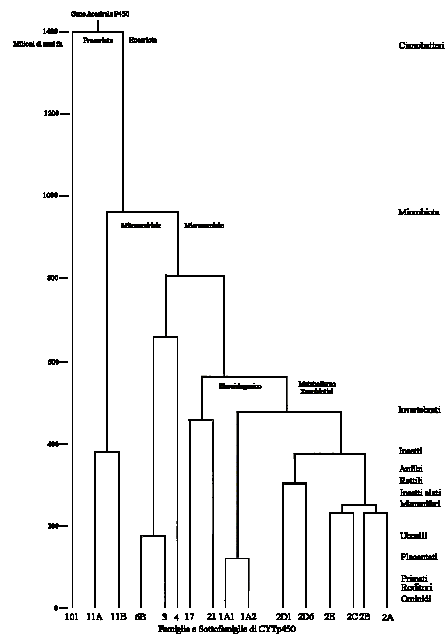
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

30

## La famiglia del Citocromo P450

- Ha molti membri:
  - 450 nel riso, 57 nell'uomo, 84 nel topo, 10 nella Chlamodymonas
- Filogenesi



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

31

## Induzione

- Meccanismo attraverso il quale uno stimolo esterno alla cellula provoca come risposta la produzione di una o più proteine o, comunque, una attivazione della sintesi proteica:
  - CYP
  - HSP
  - Stress

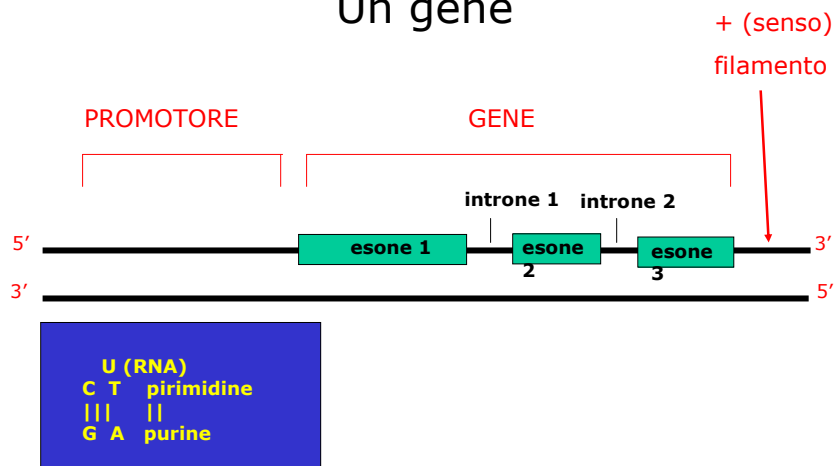
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

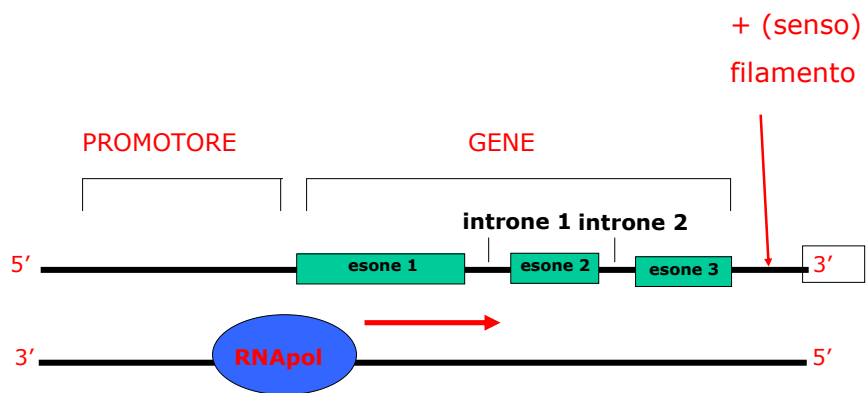
32



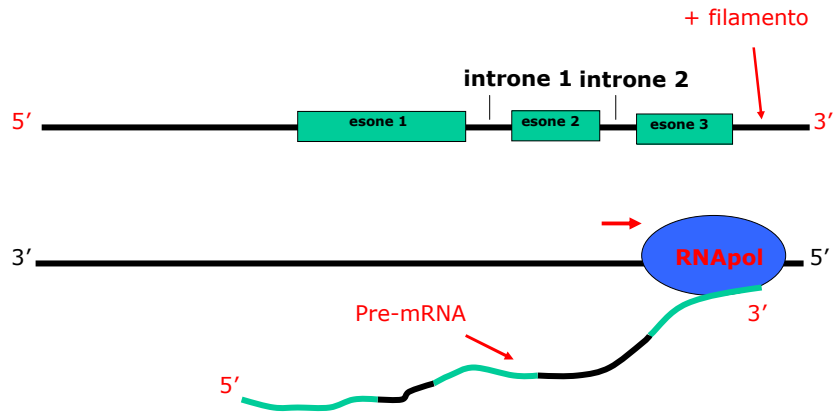
# Un gene



# Il DNA fa RNA che fa PROTEINA

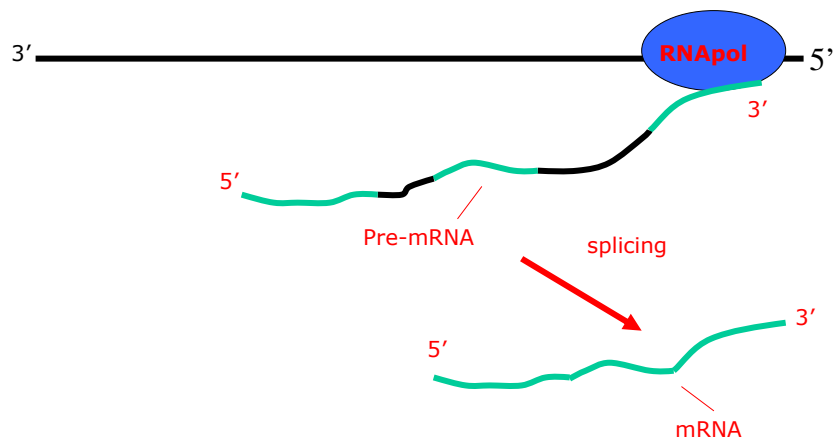


# Trascrizione

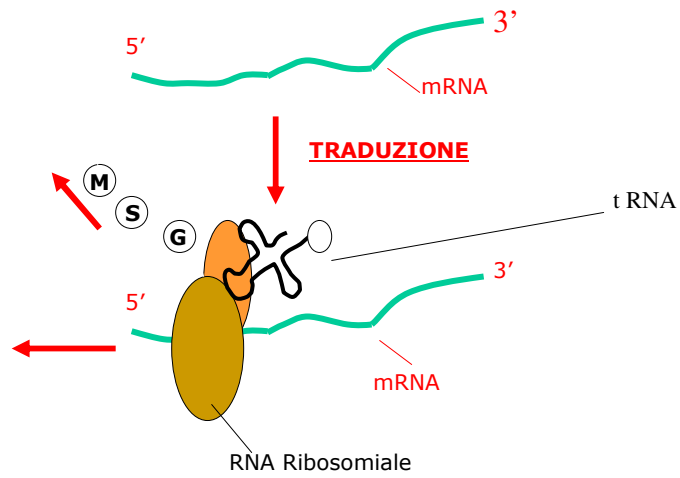


Il filamento complementare dà una COPIA del GENE.

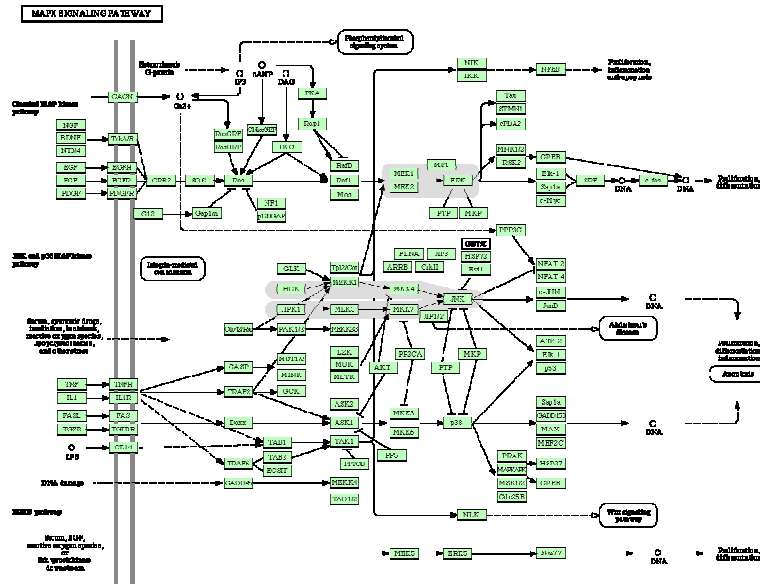
# Splicing



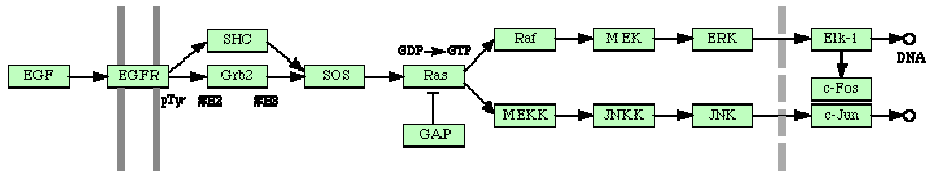
# Traduzione



# MAPK



## MAPK

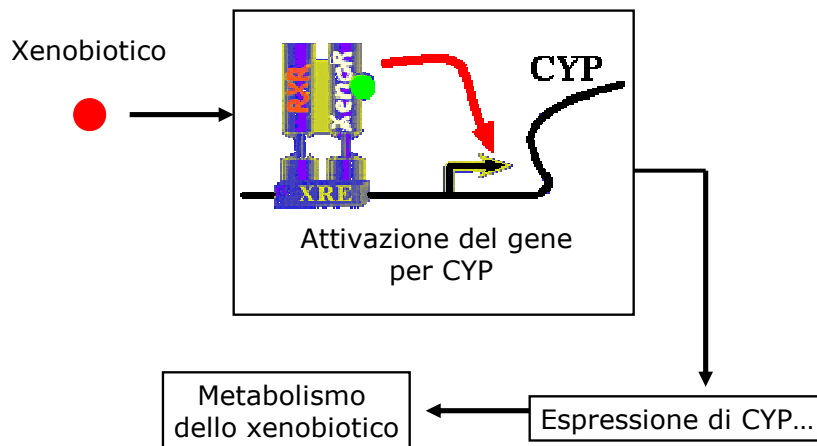


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

39

## Il paradigma



gs © 2001-2006 ver 3.1

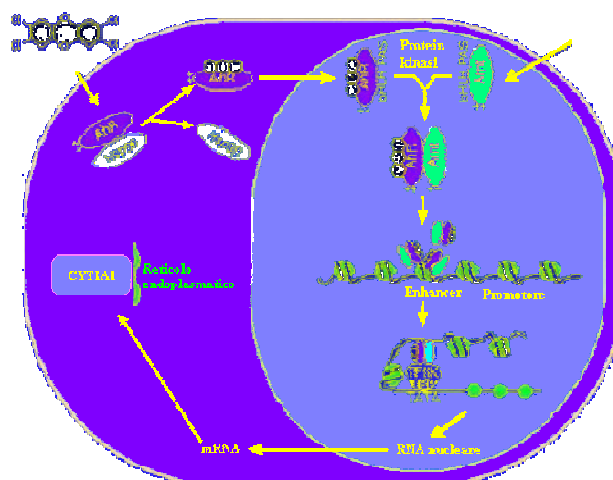
Misure con biomarcatori V

40

## CYP1A1 e recettori per idrocarburi aromatici

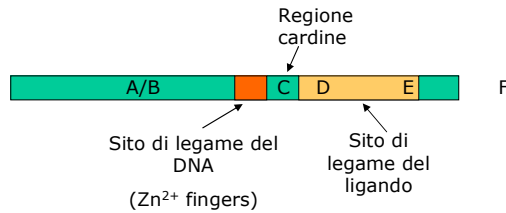
- CYP1A1 non è espressa costitutivamente nel fegato di ratto.
- CYP1A1 è indotta da idrocarburi policiclici
  - Benzo( $\alpha$ )pirene, TCDD (diossine).
  - Farmaci (omeprazolo, inibitore delle pompe protoniche).
- Meccanismo - up-regulation trascrizionale.

## Induzione CYP1

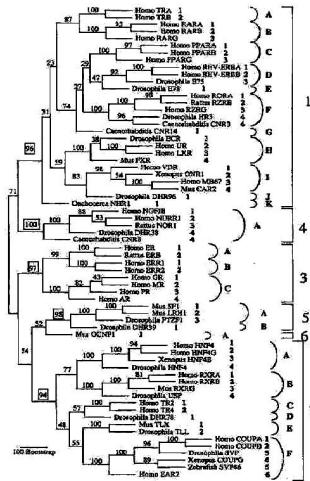


# Induzione CYP2-4 (e 7)

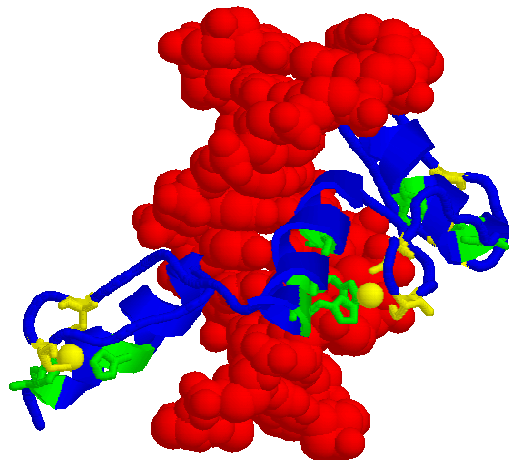
Regolata da recettori nucleari



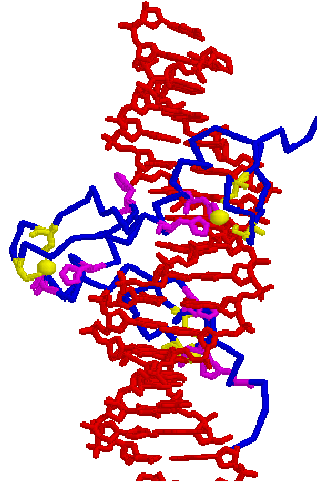
I recettori nucleari sono una superfamiglia di proteine



# Dominio zinc-fingers



## Dominio zinc-fingers

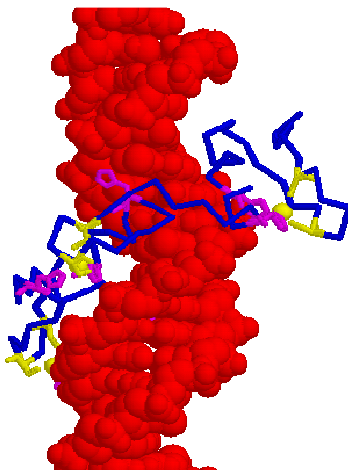


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

45

## Dominio zinc-fingers



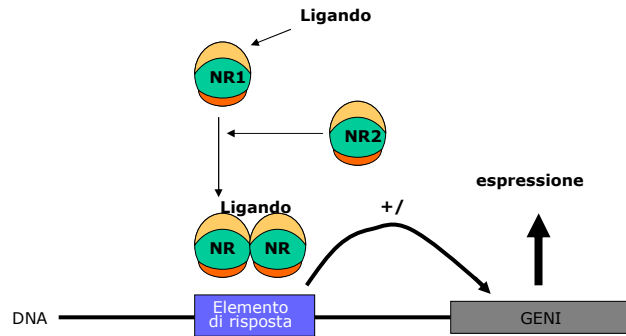
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

46

# Recettori nucleari

**I recettori nucleari sono fattori di trascrizione attivati dai ligandi**



# Recettori nucleari

- Recettori per gli steroidi
  - GR: recettore per i glucocorticoidi
  - MR: recettore per i mineralocorticoidi
  - AR: recettore per gli androgeni
  - ER: recettore per gli estrogeni
- Recettori per altri ligandi
  - RXR: recettore per X retinoide
  - RAR: recettore per l'acido retinoico
  - TR: recettore per l'ormone tiroideo
  - VDR: recettore per la vitamina D
- ?
  - PXR: recettore per X pregnano
  - CAR: recettore costitutivo attivato



## Recettori nucleari

- I recettori nucleari si legano ad uno specifico elemento di risposta
- Generalmente 2 mezzi siti di legame correlati con AGGTCA
- Sono i recettori per gli ormoni steroidei (GR, MR ecc...)
- Si lega come omodimero
- Sequenza palindromica imperfetta
- Separati da 3bp

AGGACANNTGTACC

TCCTGTNNACATGG

## Heat Shock Proteins

## Classificazione delle HSP

Famiglia	Nome	Altri nomi	Localizzazione subcellulare	Livello di espressione	
				Normale	Stress
hsp 100	hsp 110		Nucleo/nucleolo	+	++
	hsp 104		citosol	+	+++
	grp 100		ER/Golgi	+	++
hsp 90	hsp 90	hsp 82, HtpG	Citosol/nucleo	++	+++
	grp 94	Erp90	ER	+	++
hsp 70	hsp 70	hsp 72, DnaK	Citosol/nucleo	-	+++
	hsc 70	hsp 73	Citosol/nucleo	++	?
	grp 78	BIP, Kar2p	ER	++	+++
	mtp 70	Ssc1p, grp 75	Mitocondrio	+	++
hsp 60	hsp60	GroEL, cpn60	Citosol	+	+
	hsp 58	HuChA 60	Mitocondrio	+	+
hsp 40	hsp 40	DnaJ, hdj-1	Citosol/nucleo	+	++
					++
hsp 30	hsp 32	eme-ossigenasi	Citosol	+	++
	hsp 35	G3PDH	Citosol	+	++
Piccole hsp	hsp 27	$\alpha$ -cristallino	Citosol/nucleo	+	?
	hsp42p			+	++
	hsp 10	GroES, cpn-10	Mitocondrio	+	++
Ubiquitina	Ubiquitina		Citosol	+	++

## Ruolo costitutivo delle HSP

- Le HSP presenti costitutivamente nelle cellule hanno un ruolo fondamentale nei processi fisiologici di ripiegamento, trasferimento e degradazione delle proteine.

## Ruolo citoprotettivo delle HSP

- Il ruolo delle HSP indotte in cellule sottoposte ad insulto è quello di minimizzare i danni arrecati ai processi di:
  - sintesi,
  - traslocazione
  - ripiegamento
- di proteine cellulari.

## Risposta heat shock

- La risposta heat shock è un evento comune a tutti gli organismi, caratterizzato dall'aumentata sintesi di HSP in risposta ad un numero molto elevato di stimoli:
  - aumento di temperatura,
  - ipossia,
  - shock osmotico,
  - metalli pesanti, ischemia,
  - invecchiamento
  - ...

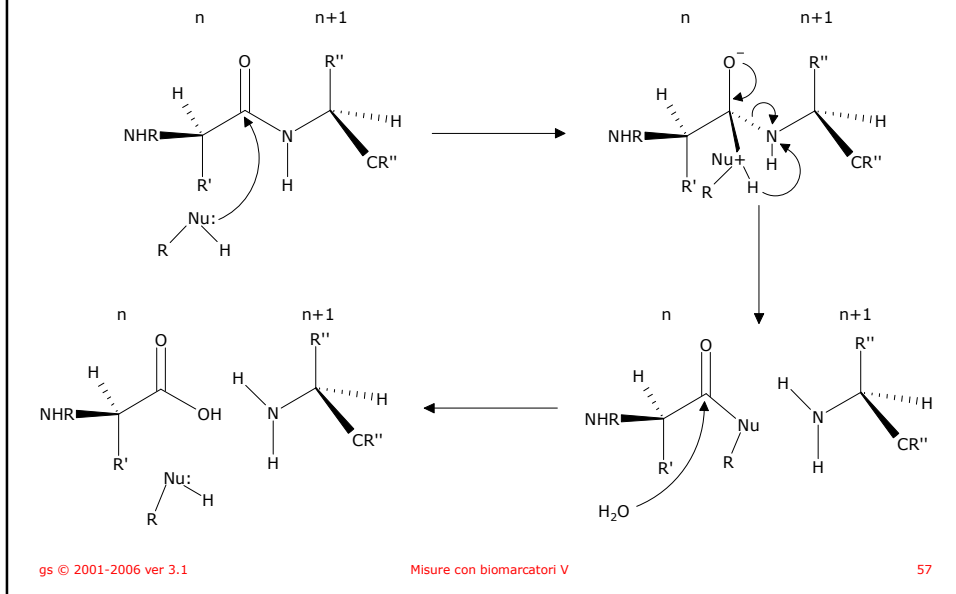
## Turn-over delle proteine

- Le proteine cellulari vengono regolarmente degradate e risintetizzate.
- Il tempo di semi-vita di un enzima nel fegato di ratto varia da 10 minuti a una settimana.
- In media il tempo di semi-vita di una proteina è correlato con il residuo N-terminale:
  - Proteine con N-terminale come Met, Ser, Ala, Thr, Val, o Gly hanno un tempo di semi-vita maggiore di 20 ore.
  - Proteine con N-terminale Phe, Leu, Asp, Lys, o Arg hanno un tempo di semi-vita di 3 minuti o meno.

## Turn-over delle proteine

- È stato dimostrato che le proteine ricche in Pro (P), Glu (E), Ser (S) and Thr (T), chiamate proteine PEST, sono degradate più rapidamente che le altre proteine.
- La degradazione di specifiche proteine può essere regolata:
  - Negli eucarioti il ciclo cellulare è controllato, alcuni enzimi regolatori del ciclo sono degradati in fasi particolari del ciclo cellulare in risposta a segnali intra o extra-cellulari.

## Proteolisi: meccanismo generale

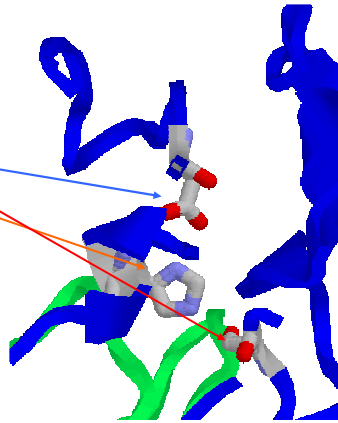


## Enzimi proteolici

- **Classi di enzimi proteolitici:**
  - Proteasi a serina: enzimi digestivi come tripsina, chimotripsina, elastasi...
  - Differiscono nella specificità del substrato:
    - Chimotripsina: privilegia il taglio del legame peptidico nel quale l'AA che impegna il  $C=O$  ha una catena laterale.
    - Tripsina: preferisce un AA carico positivamente (Lys o Arg) nella stessa posizione.

## Enzimi proteolici: proteasi a serina

- Il sito attivo (tripsina bovina 3BTK) è fatto da un residuo di serina (**Ser195**), uno di istidina (**His57**) e uno di aspartato (**Asp102**).
- Durante la catalisi vi è un attacco nucleofilo del OH della serina sul carbonio del carbonile del legame peptidico che deve essere tagliato.
- Durante la reazione un  $H^+$  è trasferito dalla serina all'anello imidazolico dell'istidina, l'aspartato forma un legame H con l'istidina.



## Enzimi proteolici: proteasi a aspartato

- Le proteasi ad aspartato comprendono:
  - La pepsina (enzima digestivo).
  - Alcune proteasi lisosomiali.
  - L'enzima renale renina.
  - Le proteasi dell'HIV.
- Due residui di aspartato sembra partecipino alla catalisi acido/base nel sito attivo.
- Un aspartato accetta  $H^+$  da una molecola di  $H_2O$  nel sito attivo che attacca il carbonio carbonilico del legame peptidico.
- Simultaneamente l'altro aspartato cede l' $H^+$  all'ossigeno del carbonile del legame peptidico.

## Enzimi proteolici: metallo proteasi

- Appartengono alla classe delle proteasi a Zinco (metalloproteasi):
  - La carbossipeptidasi (enzima digestivo).
  - Le metalloproteasi della matrice (collagenasi), coinvolte nella degradazione della matrice extra cellulare durante la crescita dei tessuti.
  - Una proteasi lisosomiale.
- Nel sito attivo è presente uno *zinc binding motif*, con due residui di istidina il cui imidazolo complessa lo ione  $Zn^{++}$ .
- Nella catalisi lo  $Zn^{++}$  interagisce con l'ossigeno del  $C=O$  promuovendo l'attacco nucleofilo dell'ossigeno di una molecola di acqua nel sito attivo al carbonio del  $C=O$ .
- Nella carbossipeptidasi un residuo di glutamato facilita la reazione estraendo un  $H^+$  dall'acqua.

## Enzimi proteolici: proteasi a cisteina

- Appartengono alla classe delle proteasi a Cisteine:
  - La papaina (della *Carica Papaya*).
  - Alcune proteasi lisosomiali (cathepsine).
  - Le caspasi che si occupano della degradazione delle proteine dell'apoptosi (morte cellulare programmata).
- Le proteasi lisosomiali a cisteina sono omologhe alla papaina. Sono una famiglia molto grande con svariata specificità di substrato.
- Le caspasi tagliano il lato carbossilico di un aspartato.
- Il meccanismo delle proteasi a cisteina si pensa che coinvolga la deprotonazione del SH di una cisteina da parte di un residuo vicino di istidina seguito da un attacco nucleofilo dello zolfo al carbonio carbonilico.

## Attivazione delle proteasi

- Attivazione delle proteasi:
- La maggior parte delle proteasi sono sintetizzate come proenzimi di maggiori dimensioni.
- L'attivazione consiste nella rimozione di un segmento inibitorio nel proenzima.
- L'attivazione può avvenire dopo che la proteasi è stata secreta nell'apposito compartimento cellulare o nella matrice extracellulare.
- In alcuni casi (attivazione dell'apoptosi) l'attivazione può essere a cascata e portare all'attivazione di proteasi specifiche.

## Degradazione delle proteine

- Ci sono tre principali sistemi di degradazione delle proteine (nel muscolo):
  - Ubiquitina-proteosoma
    - Le proteine sono marcate per la degradazione da unità di ubiquitina.
    - Il proteosoma 20S inattivo viene attivato da una proteina regolatrice diventando proteosoma 26S
    - Il proteosoma 26S rompe la proteina in peptidi
      - I peptidi sono scissi in aminoacidi liberi da altri processi nella cellula
  - Lisosomi
    - Le proteine entrano nei lisosomi via endocitosi
      - La catepsina e le proteinasi degradano i legami peptidici.
  - Calpaina
    - Proteasi attivate da calcio nel citosol della cellula
      - I differenti isomeri sono attivati da differenti concentrazioni di calcio.



## Sistema Ubiquitina-proteosoma

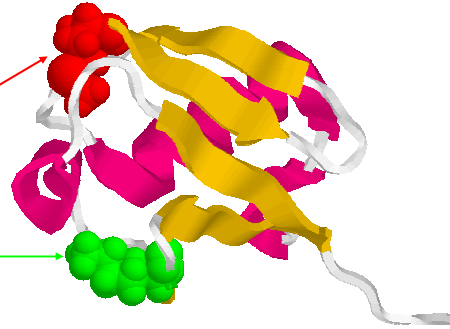
- Ubiquitina:
  - Le proteine sono marcate per la proteolisi selettiva dall'ubiquitina, una proteina ubiquitaria altamente conservata.
  - Si forma un legame isopeptidico tra il carbossiterminale dell'ubiquitina e un gruppo NH<sub>2</sub> di una lisina della proteina da degradare.
    - Il processo è ATP dipendente.
    - Sono coinvolti tre enzimi (E1, E2 e E3).

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Inizialmente il carbossiterminale dell'ubiquitina è legato con un legame tioestere al *Ubiquitin-Activating Enzyme* (E1) attraverso una reazione ATP dipendente
- L'ubiquitina viene quindi trasferita ad un gruppo sulfidrilico del *Ubiquitin-Conjugating Enzyme* (E2).
- Una *Ubiquitin-Protein Ligase* (E3) trasferisce l'ubiquitina attivata al gruppo ε-amino di una lisina formando un legame isopeptidico.
- Ci sono diverse ligasi dell'ubiquitina che differiscono per la specificità.

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Più ubiquitine sono legate per formare una catena.
- Il **carbossiterminale** forma un legame con il gruppo  $\epsilon$ -amino della **Lys48** di una catena adiacente di ubiquitina.



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

67

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Alcune proteine (per esempio le cicline, coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare) presentano una sequenza chiamata *destruction box*, riconosciuta da un dominio del corrispondente **E3**.
- L'interazione dell'ubiquitina ligasi con il suo bersaglio è regolata, in alcuni casi, dalla fosforilazione della proteina bersaglio e può coinvolgere altre proteine adattatrici.



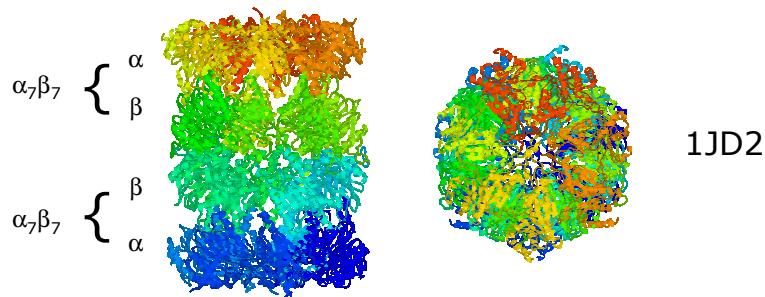
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

68

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- La degradazione selettiva di una proteina avviene nel proteosoma. Un complesso proteico presente nella cellula.
- Il *core complex* del proteosoma, ha un coefficiente di sedimentazione di 20S ed è costituito di 14 subunità di due tipi ( $\alpha_7\beta_7$ ).
  - Le sette subunità  $\alpha$  formano un anello a struttura cilindrica.
  - Le sette subunità  $\beta$  formano l'anello centrale.



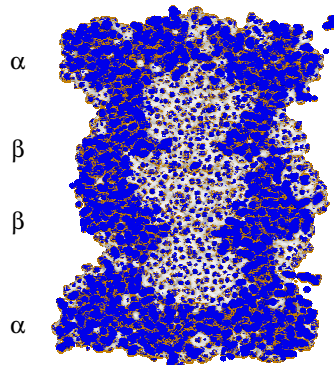
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

69

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Il *core complex* del proteosoma racchiude una cavità fatta di tre compartimenti collegati da uno stretto passaggio.
- L'attività proteasica è associata a tre delle subunità  $\beta$  ognuna con differente specificità per il substrato.



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

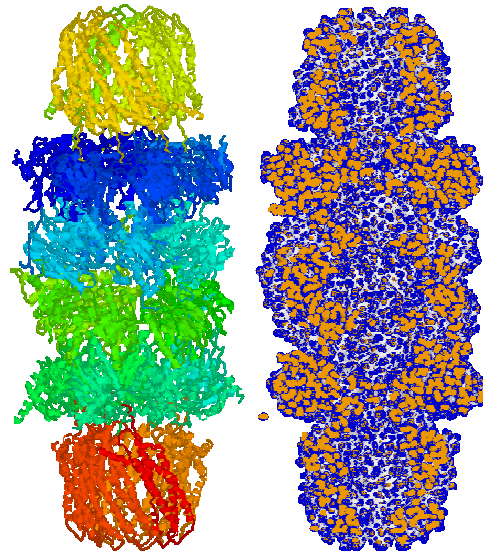
70

## Sistema Ubiquitina-proteosoma

1. Una subunità  $\beta$  ha una attività simile alla chimotripsina con preferenza per Tyr o Phe come AA al carbonile del legame peptidico.
2. Una subunità  $\beta$  ha una attività simile alla tripsina con preferenza per Arg o Lys al carbonile del legame peptidico.
3. Una subunità  $\beta$  ha una attività post-glutamil con preferenza per glutamato o altro residuo acido.
  - Non sono coinvolti residui di cisteina o serina.
  - L'attività idrolasica del proteosoma costituisce una famiglia di proteasi a treonina.

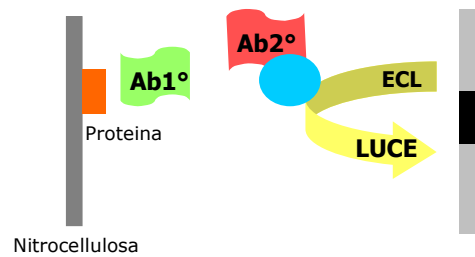
## Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Nella struttura del *core complex* del proteosoma non ci sono apparenti aperture verso l'esterno.
- Si è postulata l'interazione con un *cap complex* che apra il passaggio verso l'esterno.
- È stato cristallizzato il *core complex* 20S del proteosoma con il *cap complex* 11S.
- L'interazione del *cap complex* 11S altera la conformazione del dominio N-terminale delle subunità  $\alpha$  del *core complex* permettendo l'accesso dall'esterno.



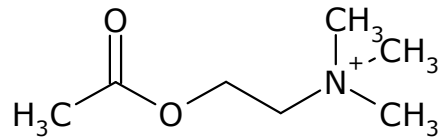
## Determinazione

- Western blotting:
  - anticorpo specifico
  - sviluppo di chemiluminescenza



## Acetilcolinesterasi

## Acetilcolina

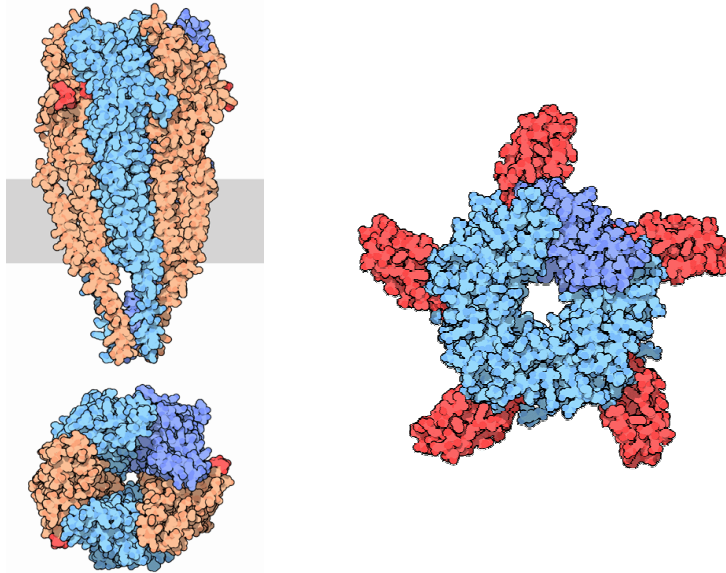


- È stato il primo neurotrasmettitore ad essere identificato
  - da Otto Loewi nel 1921, attraverso la stimolazione del nervo vago nelle rane che, era noto, causa il rallentamento del battito cardiaco.
  - Raccolse il fluido circostante il cuore stimolato e lo applicò ad un cuore non stimolato osservandone il rallentamento.
  - Attribuí l'effetto ad un prodotto chimico che in seguito identificò come acetilcolina.

## Recettori per l'acetilcolina

- Due tipi:
- Recettori Nicotinici
  - Canali ionici,
  - Rispondono rapidamente ed hanno effetto eccitatorio
  - Bloccati dal curaro
- Recettori Muscarinici
  - Accoppiati alla proteina G
  - Rispondono lentamente
  - Possono essere sia eccitatori che inibitori
  - Bloccati da atropina e scopolamina.

## Il recettore nicotinic per l'acetilcolina



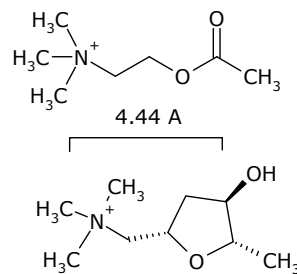
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

77

## Recettori muscarinici

- Acetilcolina
- Muscarina



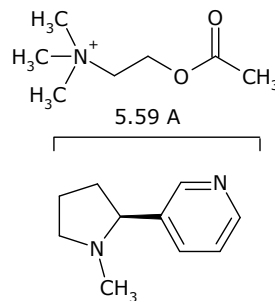
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

78

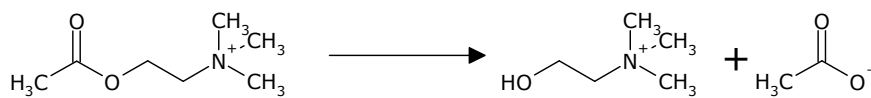
## Recettori nicotinici

- Acetilcolina
- Nicotina



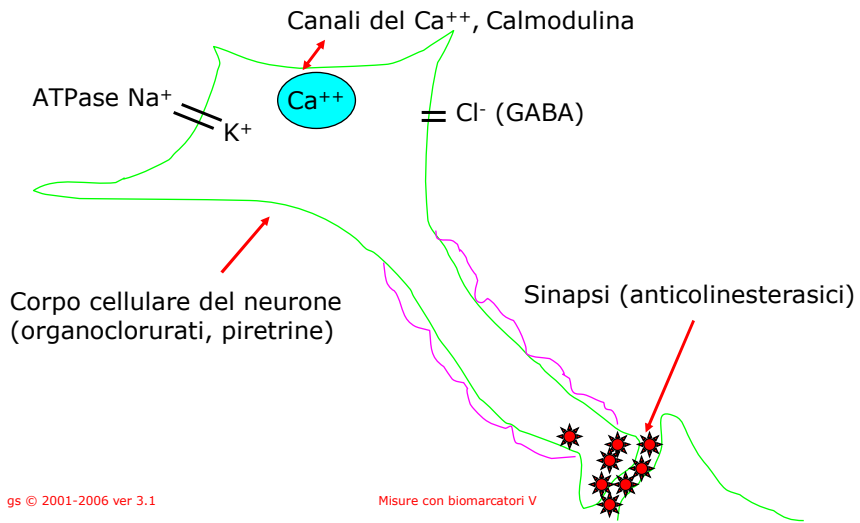
## Acetilcolinesterasi (AChE) EC 3.1.1.7

- È l'enzima che si occupa di degradare l'acetilcolina per evitare una sovrastimolazione.

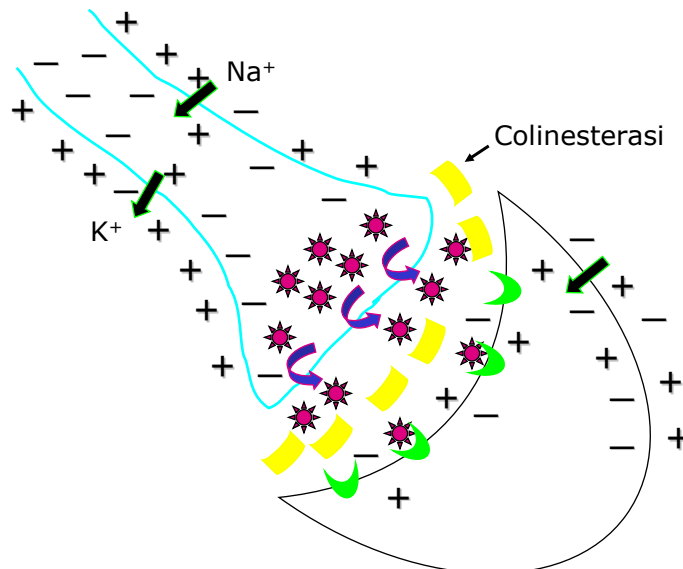




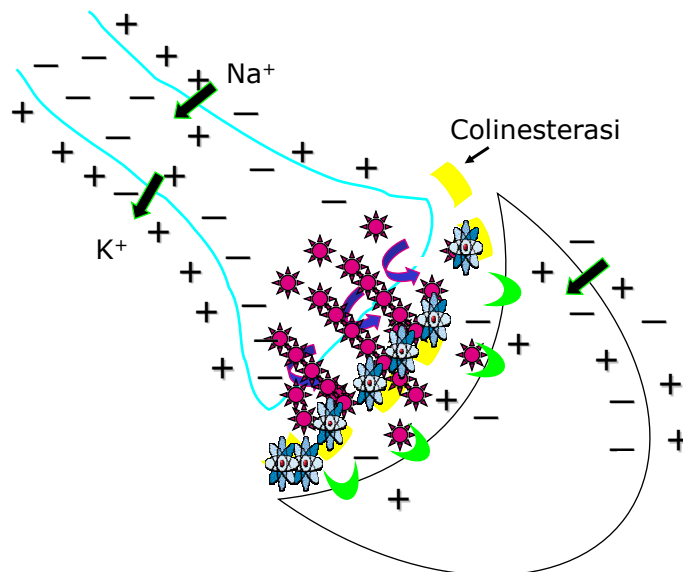
## Siti di azione degli insetticidi neurotossici



## Trasmissione del segnale nervoso



## Trasmissione del segnale nervoso

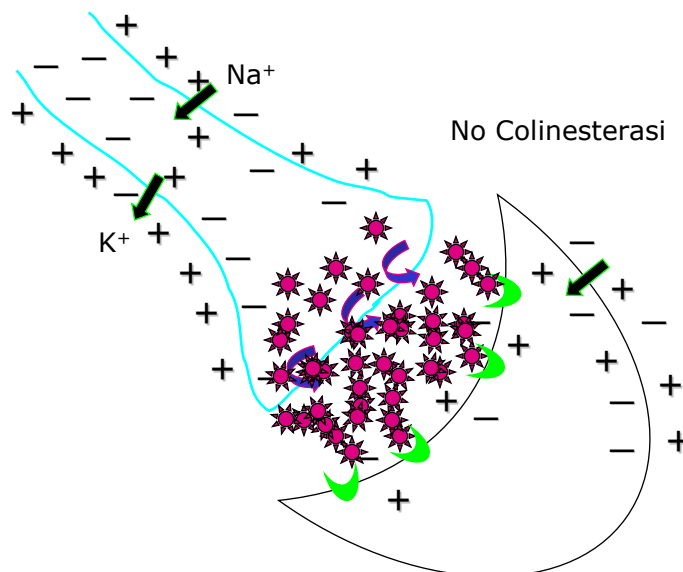


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

83

## Trasmissione del segnale nervoso

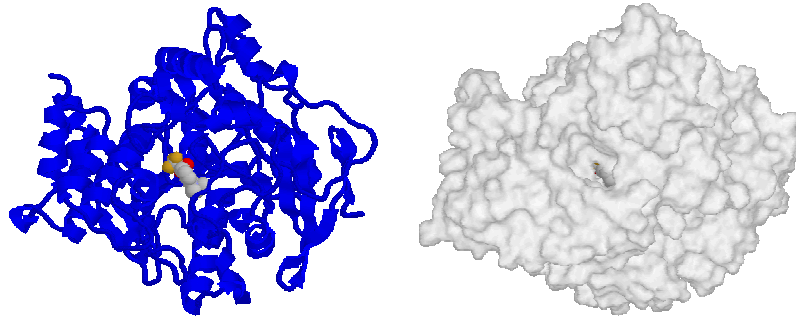


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

84

## Acetilcolinesterasi

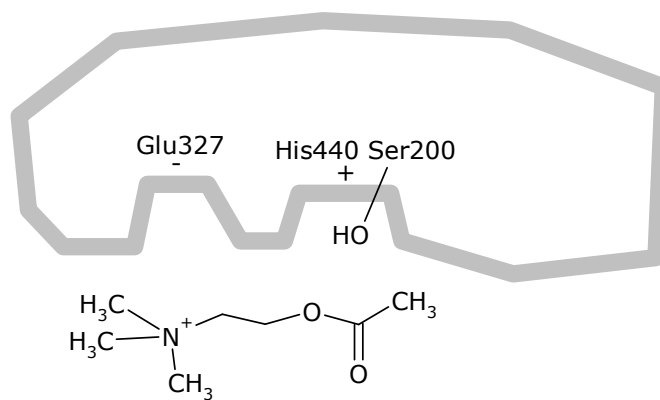


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

85

## Acetilcolina e acetilcolinestrasi

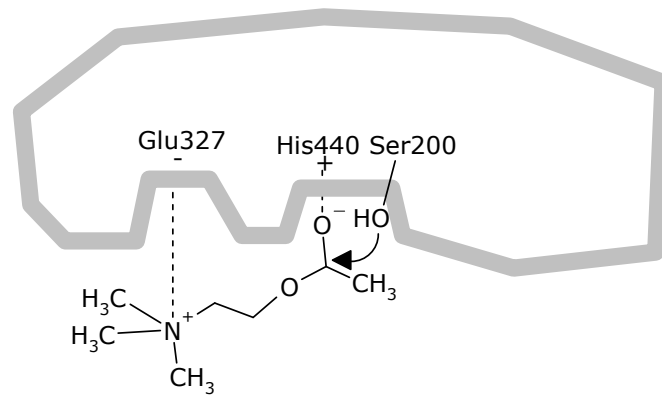


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

86

## Acetilcolina e acetilcolinestrasi

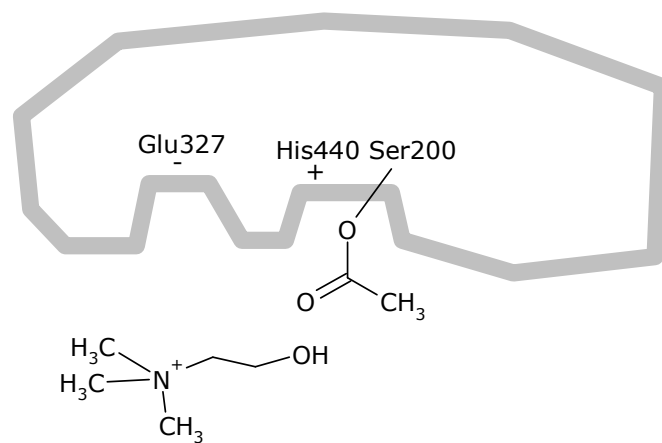


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

87

## Colina e acetilcolinestrasi acetilata

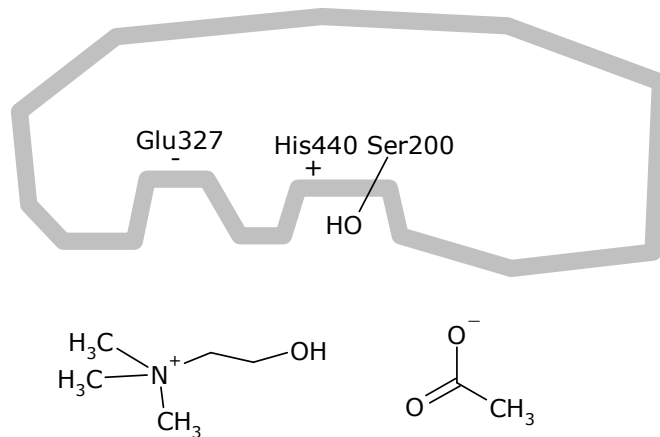


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

88

## Colina e acetilcolinestrasi acetilata

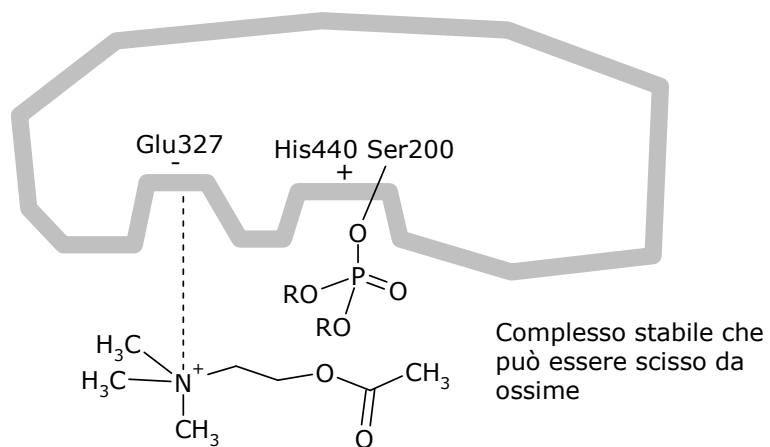


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

89

## Acetilcolinestrasi fosforilata

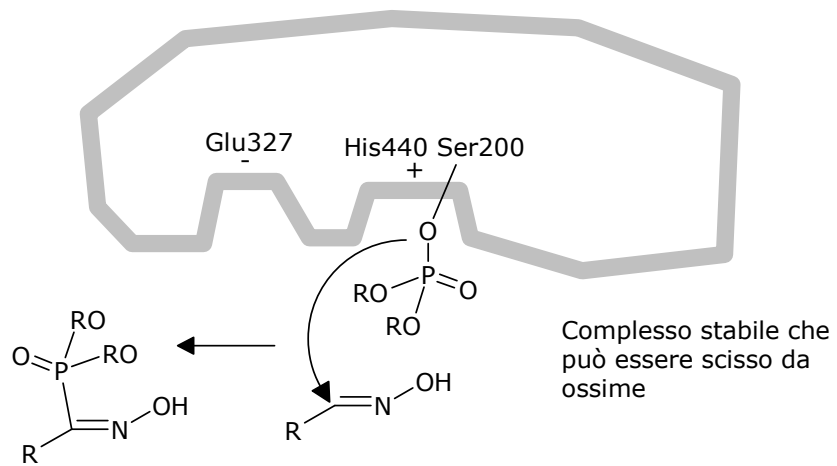


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

90

## Acetilcolinestrasei fosforilata

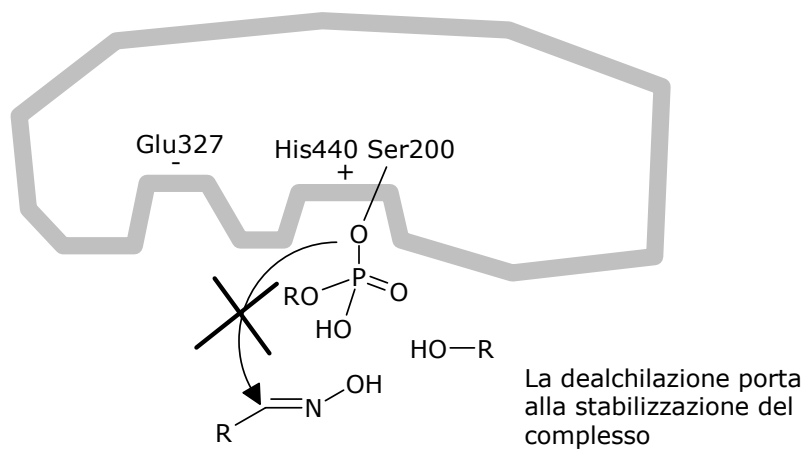


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

91

## Acetilcolinestrasei fosforilata



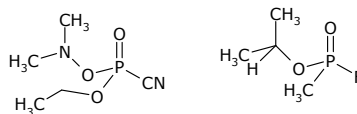
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

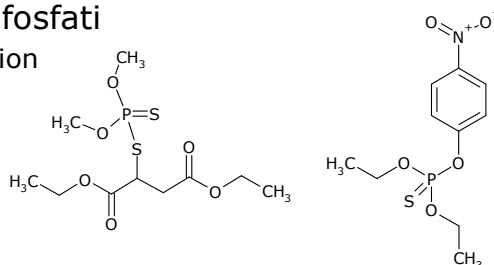
92

## Agenti anticolinestrasici

- Inizialmente sviluppati come arma chimica
- Gas nervini
  - Tabun, Sarin



- Insetticidi organofosfati
  - Malathion, parathion

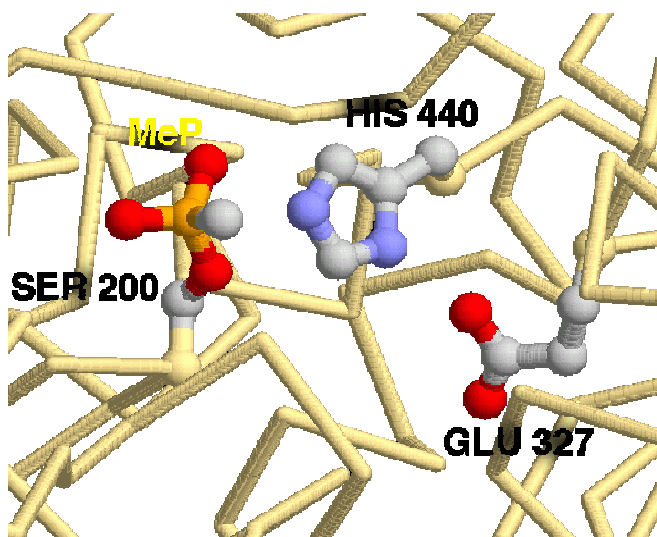


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

93

## Acetilcolinesterasi e Sarin

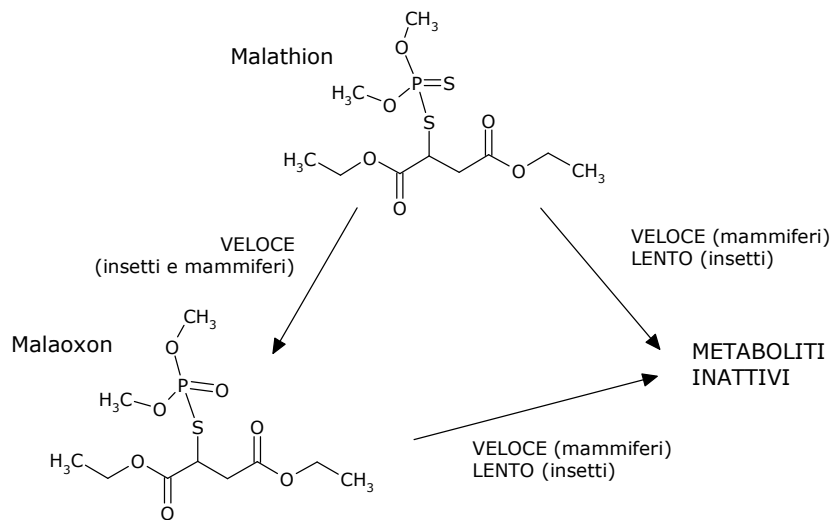


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

94

## Tossicità selettiva

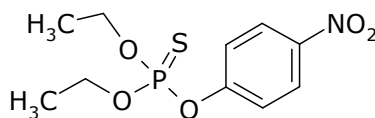
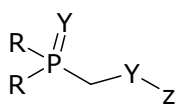


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

95

## Inibitori dell'acetilcolinesterasi



Parathion

Struttura generale

- R = catena idrocarburica
- Z = gruppo organico
- Y = S o O

### • Organofosfati

- Poco costosi e poco tossici verso le specie non bersaglio.
- Più solubili in acqua del DDT, più degradabili e meno persistenti.
- Veleno del SN.

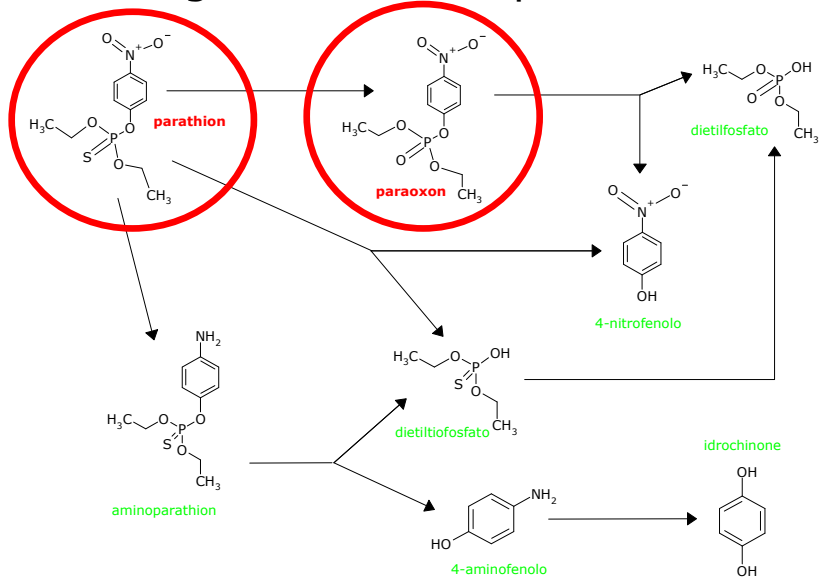
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

96



## Degradazione del parathion®



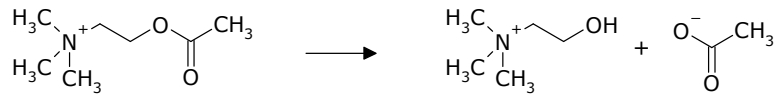
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

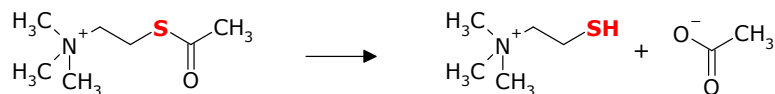
97

## Determinazione

- L'enzima idrolizza l'acetilcolina in colina e acido acetico rimuovendola così dalle fessure sinaptiche



- Viene valutata l'idrolisi dell'acetil**ti**ocolina (metodo di ELLMAN)

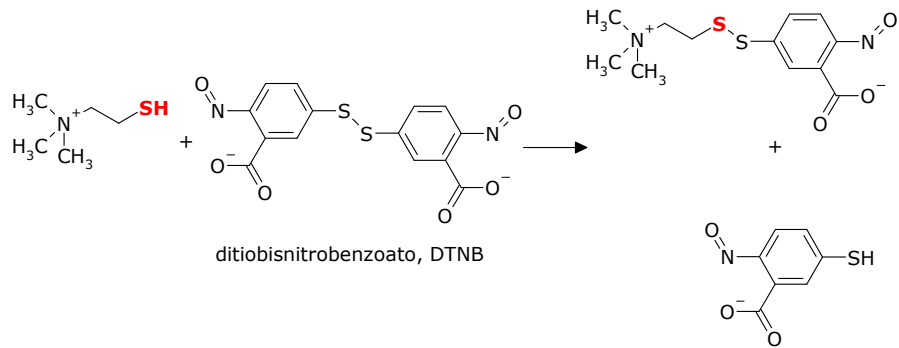


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

98

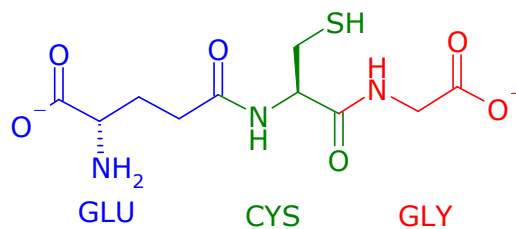
## Reazione di ELLMAN



Assorbimento a 412 nm

## GSH

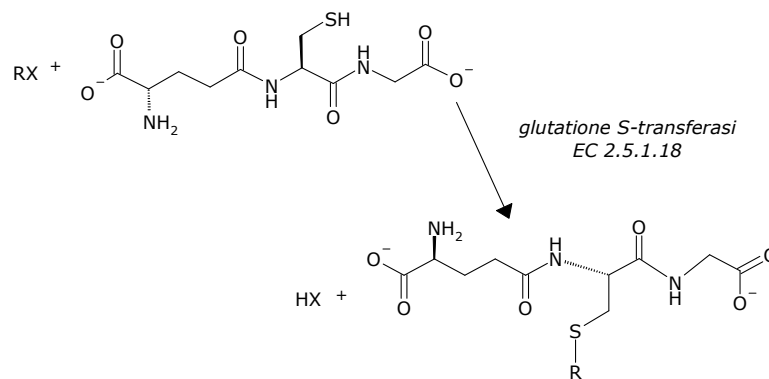
- Il glutathione è un tripeptide formato da glicina, cisteina, acido glutamico.



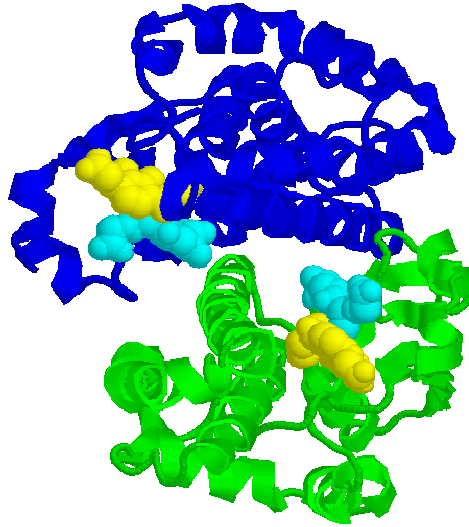
## Coniugazione con il GSH

- Due tipi di reazione con il GSH
  - Spiazzamento di alogeni, solfati, solfonati, fosfati, nitrogruppi
  - Il glutatione viene addizionato a doppi legami attivati (epossidi) come nella sintesi delle prostaglandine.
- Substrati:
  - Idrofobici che contengono un elettrofilo
  - Possono reagire non enzimaticamente

## Coniugazione



## Glutathione S-transferasi – EC 2.5.1.18

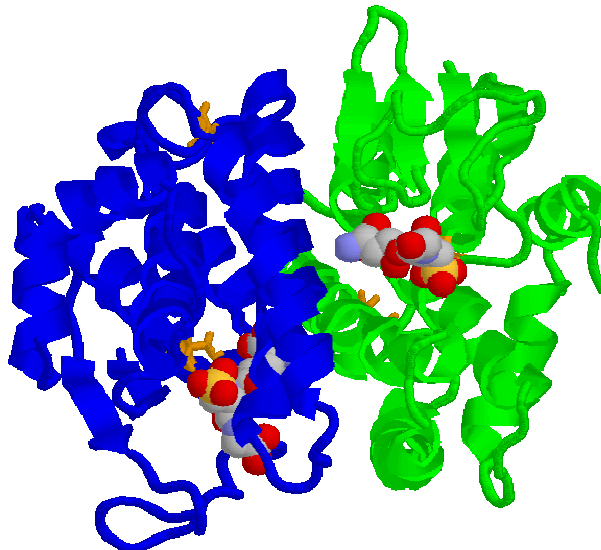


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

103

## Glutathione S-transferasi EC 2.5.1.18 (*1A0F*)



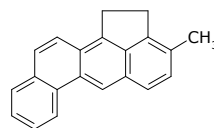
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

104

## Glutazione S-transferasi

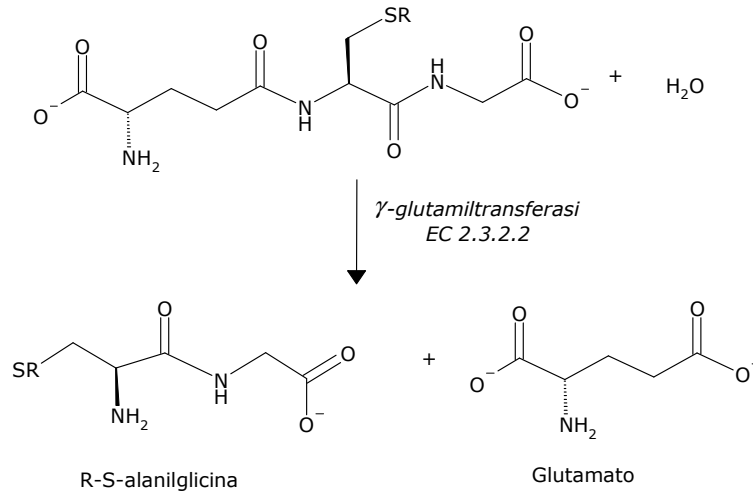
- Glutazione-S-transferasi microsomiale e citosolica
- Almeno quattro classi di glutazione-S-transferasi ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), diversi isoenzimi inducibili.
  - Induttori (3-metilcolantrene, fenobarbital, corticosteroidi, anti-ossidanti)
  - La sovraespressione porta a resistenza (insetti DDT resistenti, piante resistenti all'atrazina, cellule tumorali resistenti alla chemioterapia)



## Eliminazione dei composti coniugati con il GSH

- Escrezione dei glutazione-coniugati:
  - Intatti nella bile
  - Convertiti in acido mercapturico nei reni ed escreti nelle urine
    - $\gamma$ -glutamilttransferasi, aminopeptidasi M

## $\gamma$ -glutamyltransferasi



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

107

## Metallotioneine

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

108

## Metallotioneine

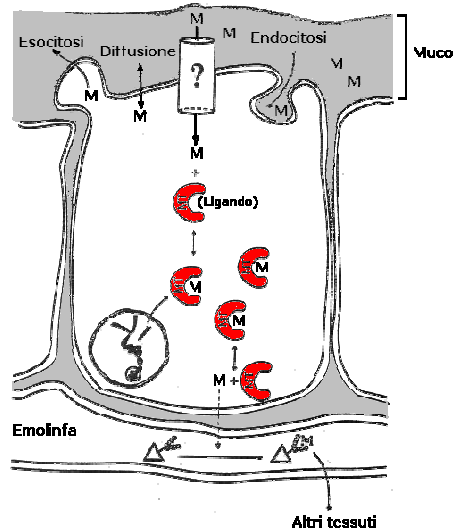
- Le metallotioneine (MT) sono peptidi e proteine ubiquitarie a basso peso molecolare ad alto contenuto in aminoacidi solforati e metalli.
- Si ipotizza che giochino un ruolo:
  - nella fissazione dei metalli in tracce ( $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ),
  - nel controllare la concentrazione di questi ioni,
  - nella regolazione dei flussi degli ioni ai distretti cellulari,
  - nella neutralizzazione dei metalli tossici ( $Cd^{++}$ ,  $Hg^{++}$ ) e nella protezione dallo stress indotto dai metalli.

## Distribuzione

- Le metallotioneine sono presenti in tutti gli organismi: animali, vegetali e microrganismi.
- Negli animali queste proteine posseggono polimorfismo genetico e sono abbondanti nei tessuti parenchimali (fegato, rene, pancreas e intestino).
- La loro concentrazione dipende da specie, tessuto, età, sesso ed altri fattori non ancora completamente identificati
- Nonostante che le metallotioneine siano proteine citoplasmatiche si sono trovate accumulate nei lisosomi e nel nucleo.

## Trasporto di metallotioneine

- Schema ipotetico del trasporto di metalli pesanti attraverso l'epitelio branchiale di molluschi bivalvi.
  - M: metalli in traccia;
  - MT: metallotioneine.



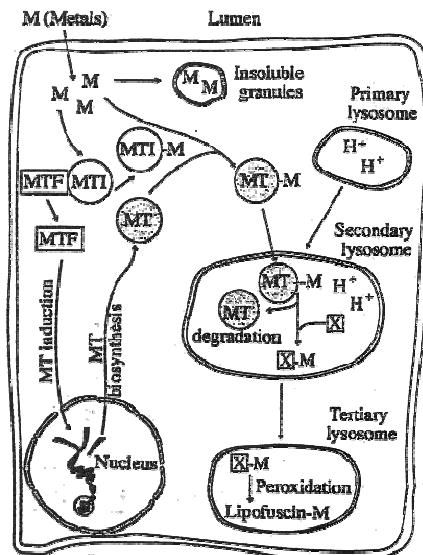
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

111

## Turnover delle metallotioneine

- Schema del turnover di MT in cellule di molluschi bivalvi (*Isani et al., 2000*).
  - M: Metalli;
  - MTF: Fattori di Trascrizione;
  - MTI: Inibitori di Trascrizione.



gs © 2001-2006 ver 3.1

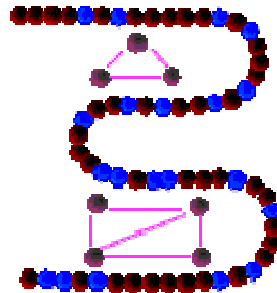
Misure con biomarcatori V

112



## Classificazione

- Il nome deriva dal fatto che hanno un alto contenuto di zolfo e metalli. Tale contenuto varia a secondo del metallo (fino ad oltre il 20% in peso)
- Nei mammiferi sono caratterizzate da un peso molecolare di 6000-7000 Da, contengono da 60 ad 68 aminoacidi di cui 20 Cys che legano 7 equivalenti di ione metallico bivalente. Mancano di aminoacidi aromatici. Tutte le Cys sono in forma ridotta e sono coordinate con ioni metallici.



## Classificazione – Le metalloioneine

- La superfamiglia delle metalloioneine è definita come quella che comprende i peptidi che assomigliano alla metalloioneina renale equina che ha le seguenti caratteristiche:
  - Basso peso molecolare
  - Composizione:
    - Alto contenuto in Cys, basso contenuto in aromatici.
    - Sequenza caratteristica.

## Classificazione – Le famiglie

- Una famiglia di metallotioneine è caratterizzata da una particolare sequenza ed è legata ad una o più specie.
  - I membri di una determinata famiglia appartengono solo a quella e si pensa siano correlati da un punto di vista evolutivistico
  - Ogni famiglia è identificata da un numero e dalla specie.
  - *Per esempio*: Famiglia 1: vertebrati.

## Classificazione

- Le sottofamiglie
  - Si definiscono sottofamiglie di metallotioneine quegli insiemi di proteine che oltre i caratteri propri delle famiglie condividono un insieme di caratteri più stringenti.
  - *Per esempio*: m1, m2...
- I sottogruppi
  - Un sottogruppo rappresenta un insieme di sequenza correlate filogeneticamente. In un albero filogenetico rappresentano un ramo.
  - *Per esempio*: m2U2 = MT-2 di ungulati, sottogruppo della sottofamiglia m2.
- Le isoforme
  - Sono i membri di sottogruppi, sottofamiglie e famiglie.
  - *Per esempio* MT-1E umana.

## Classificazione – I clan

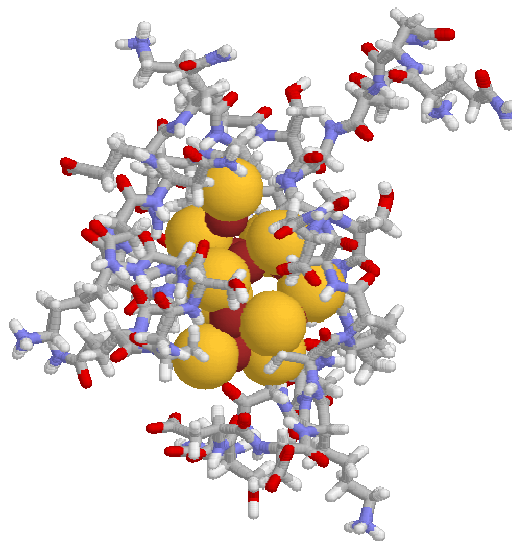
- Un clan è un insieme di proteine che dividono delle caratteristiche non già definite:
  - Struttura,
  - Proprietà termodinamiche,
  - Affinità per i metalli
  - Proprietà funzionali
  - ...

Sequenza	Famiglia	Caratteristiche	Sottofamiglie
K-x(1,2)-C-C-x-C-C-P-x(2)-C	1 vertebrati	Da 60 a 68 AA; 20 Cys (21 in un caso), 19 totalmente conservate; due domini strutturali, contenenti 9 e 11 Cys che legano 3 e 4 ioni bivalenti rispettivamente. Il gene è composto di 3 esoni, 2 introni	m1, m2, m3, m4, m, a, a1, a2, b, ba, t
C-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K	2 molluschi	Da 64 a 75 AA; da 18 a 23 Cys, minimo 13 totalmente conservate; due domini	mo1, mo2, mog, mo
P-[GD]-P-C-C-x(3,4)-C-x-C	3 crostacei	da 58 a 60 AA; esistono varianti con e senza Met N-terminale; 18 Cys totalmente conservate; due domini, ognuno con 9 Cys che legano 3 ioni bivalenti	c1, c2, c
P-D-x-K-C-[V,F]-C-C-x(5)-C-x-C-x(4)-C-C-x(4)-C-C-x(4,6)-C-C	4 echinodermi	Da 64 a 67 AA; 20 Cys ; due domini strutturali, contenenti 9 e 11 Cys che legano 3 e 4 ioni bivalenti rispettivamente	e1, e2
C-G-x(2)-C-x-C-x(2)-Q-x(5)-C-x-C-x(2)D-C-x-C	5 ditteri	Da 40 a 43 AA; 10 Cys conservate	d1, d2
K-C-C-x(3)-C-C	6 nematodi	62 e 74 AAs; 18 Cys, contiene una Tyr	n1, n2
una sequenza	7 ciliati	105 AA, 31 Cys, multiplo pattern CCC, una Tyr	ci
C-G-C-S-x(4)-C-x-C-x(3,4)-C-x-C-S-x-C	8 funghi I	Da 25 a 33 AA; 7 Cys	f1
C-X-K-C-x-C-x(2)-C-K-C	11 funghi IV	Da 55 a 56 AA; 9 Cys; un pattern CCC; contiene His e Phe	f4
K-C-A-C-x(2)-C-L-C	14 procarioti	Da 53 a 56 AAs; 9 Cys; una Tyr, una His; contiene residui non comuni	p
[YFH]-x(5,25)-C-[SKD]-C-[GA]-[SDPAT]-x(0,1)-C-x-[CYF]	15 piante	Da 45 a 84 AAs; due regioni ricche di Cys (dominio 1 e dominio 3) separate da una regione con poche Cys (dominio 2)	p1, p2, p2v, p3, pec, p21

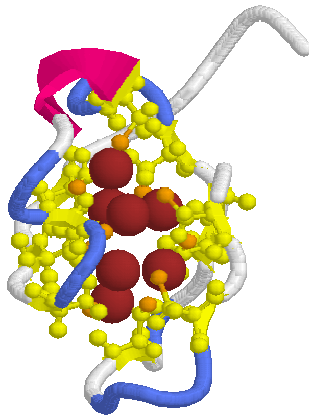
## Struttura

- Nonostante che le sequenze aminoacidiche siano diverse hanno caratteristiche strutturali simili:
  - Forma a manubrio,
  - Due domini,
  - Diverse unità tetraedriche Me(II)-Cys,
  - Tutte le Cys coinvolte nel legame con lo ione metallico
  - Pressoché assente la struttura secondaria.

## Cu-Metallotioneina da *Saccharomyces Cerevisiae* (1AQR)



Cu-Metallotioneina da *Saccharomyces Cerevisiae* (1AQR)

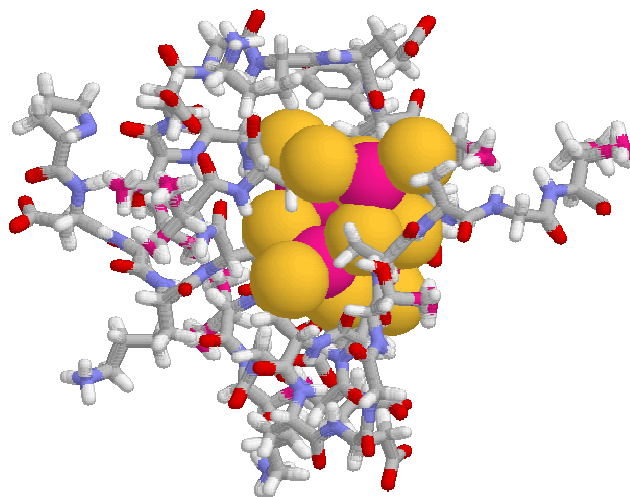


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

121

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare  
*Subunità  $\alpha$*  (1QJH)

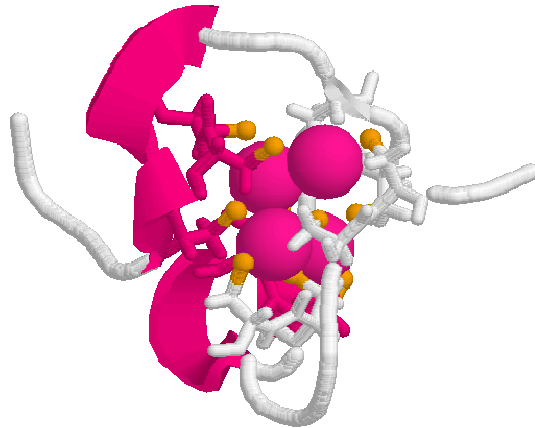


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

122

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare  
*Subunità  $\alpha$*  (1QJH)

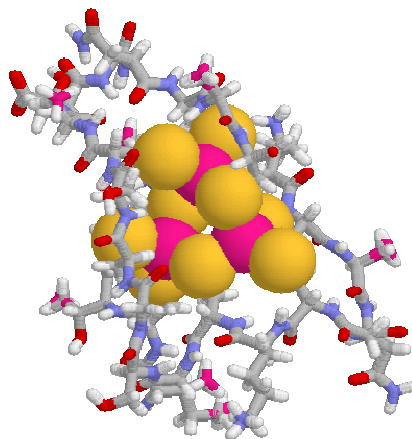


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

123

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare  
*Subunità  $\beta$*  (1QJL)

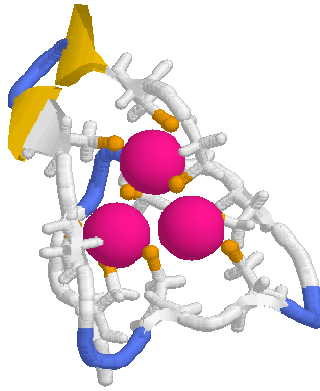


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

124

Cd-Metallotioneina da Riccio di mare  
*Subunità  $\beta$*  (1QJL)

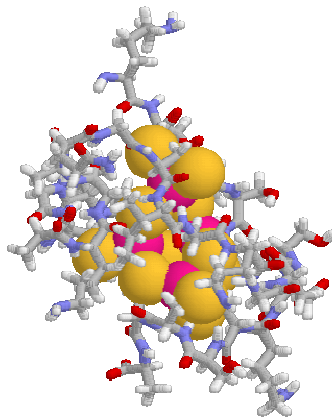


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

125

Cd-Metallotioneina umana (1MHU)

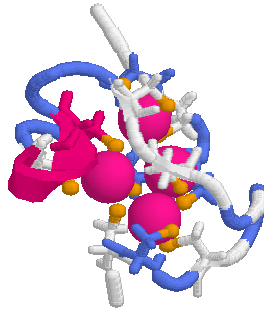


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

126

### Cd-Metallotioneina umana (1MHU)

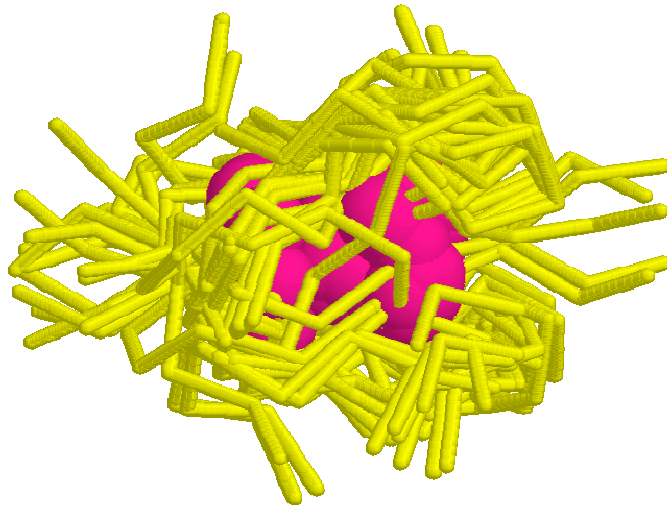


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

127

### Cd-Metallotioneina di *Callinectes sapidus* (1DMF)



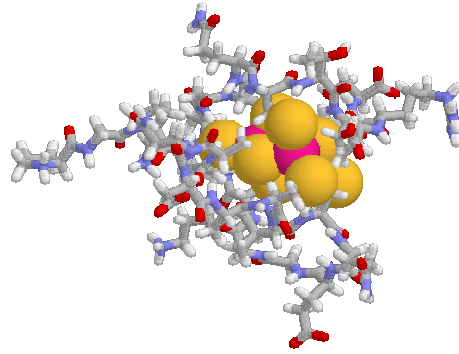
gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

128



Cd-Metallotioneina di *Callinectes sapidus* (1DMF)

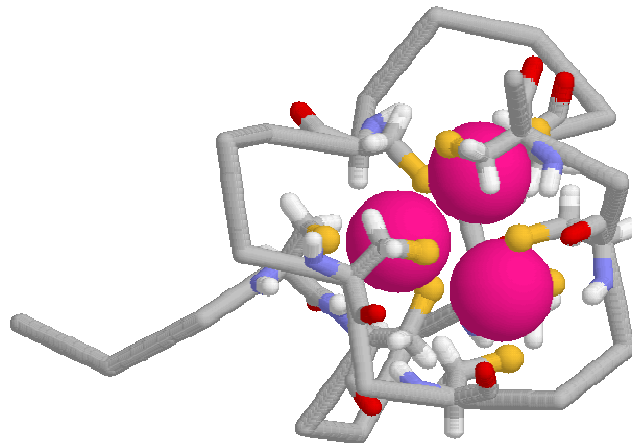


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

129

Cd-Metallotioneina di *Callinectes sapidus* (1DMF)

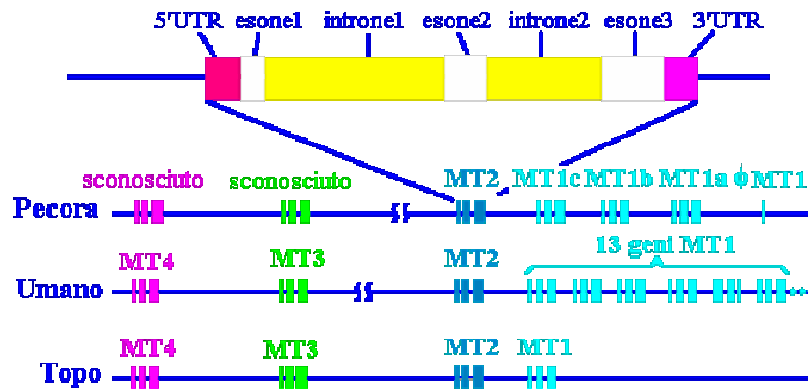


gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

130

## Struttura genica



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

131

## Aspetti funzionali

- La più importante delle funzionalità delle metallothioneine è la loro inducibilità da una serie di agenti e condizioni:
  - Ioni metallici  $d^{10}$  ( $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Tl^+$ ,  $Pb^{++}$ ...)
  - Ormoni
  - Citochine
  - Fattori di crescita
  - Promotori tumorali
  - Stress
- È dimostrato il loro aumento fisiologico durante la proliferazione cellulare:
 
$$MT-Zn^{++} + Apo-Zinc-fingers \rightarrow MT + Zn^{++} - Zinc-fingers$$

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

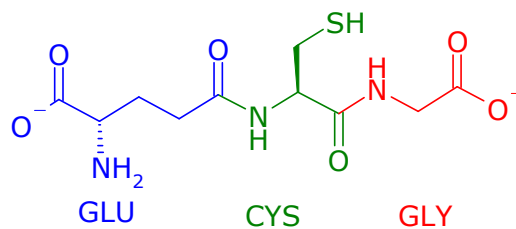
132

## Determinazione

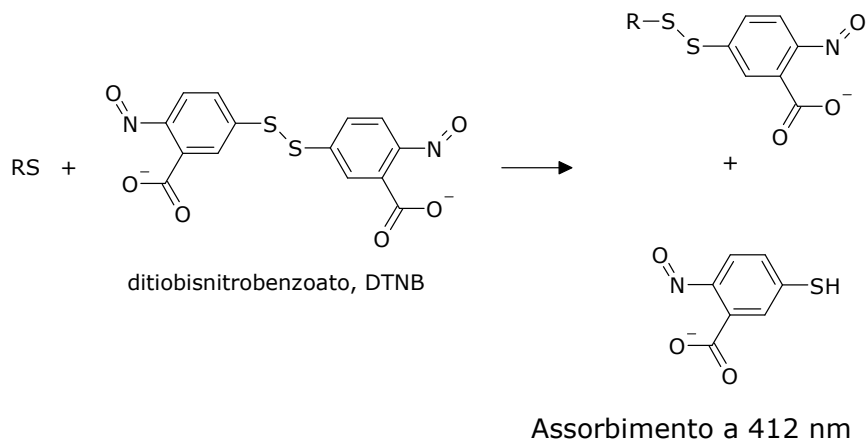
- Le MT sono proteine ricche in cisteina con affinità elevata per i metalli pesanti
- La concentrazione di MT è quantificata valutando il contenuto in Cys
- Reazione di ELLMAN (standard GSH)

## GSH

- Il glutathione è un tripeptide formato da glicina, cisteina, acido glutamico.



## Reazione di ELLMAN



gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

135

## Grazie a...

- ... Bruna Gravina, Irene Tamburin, Christian Asirelli, Federico Caselli, Francesco Ferretti, Giuseppe Giammanco che, nell'ambito delle loro tesi di laurea in Scienze Ambientali, hanno prodotto testi, immagini, figure e diapositive, utilizzate in questa presentazione.

Giorgio Sartor

gs © 2001-2006 ver 3.1

Misure con biomarcatori V

136

## Referenze sul WEB ...

- Vie metaboliche
  - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
    - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
  - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
  - Hexpasy
    - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
    - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
    - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
  - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
  - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
  - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
  - Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umh.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

## ...e naturalmente

- Questo ed altro materiale può essere trovato visitando il sito: <http://www1.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:
- **Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**  
Università di Bologna a Ravenna  
Corso di Laurea in Scienze Ambientali