

Proteasi della Matrice

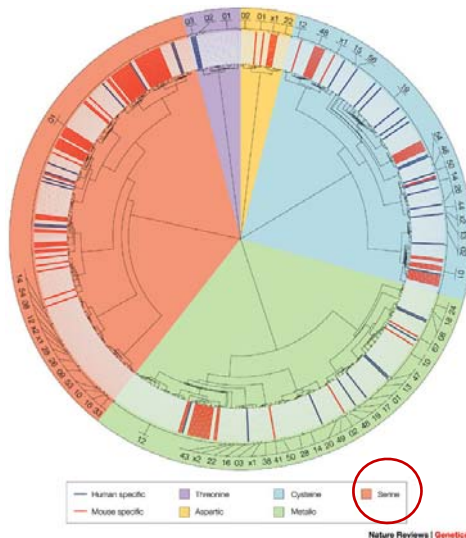
SERINA PROTEASI

http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_protease

Nature/Scitable: **Serina proteasi** – [a]

- ✚ Le serina proteasi sono coinvolte in un gran numero di processi biologici.
- ✚ Sono enzimi molto potenti che **digeriscono il cibo**, contribuiscono alla **formazione dei coaguli**, **combattono le infezioni** e collaborano alla **fecondazione**.
- ✚ Aiutano i batteri a digerire materiale (e.g. «mangiatori di carne») e i virus ad infettare le cellule (epatite C).
- ✚ Regolano lo sviluppo degli organismi e degradano la carne dopo il morso di un serpente.
- ✚ Nell'uomo sono prevalenti in molte funzioni fisiologiche, sia normali che correlate a malattie.

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/enzyme-catalysis-the-serine-proteases-14398894>

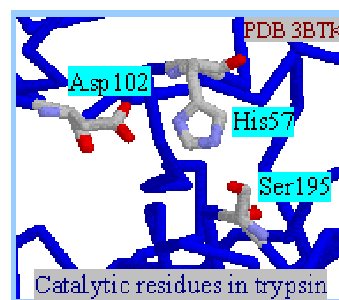
Nature/Scitable: **Serina proteasi** – [b]**The protease wheel**

Unrooted phylogenetic tree of human and mouse proteases. **Proteases are distributed in five catalytic classes and 63 different families.** The code number for each protease family is indicated in the outer ring. Protein sequences that correspond to the protease domain from each family were aligned using the ClustalX program. Phylogenetic trees were constructed for each family using the Protpars program. A global tree was generated using the protease domain from one member of each family, and individual family trees were added at the corresponding positions. The figure shows the non-redundant set of proteases. Orthologous proteases are shown in light grey, mouse-specific proteases are shown in red and human-specific proteases in blue. **Metalloproteases are the most abundant class of enzymes in both organisms, but most lineage-specific differences are in the serine protease class, making this sector wider.** The 01 family of serine proteases can be divided into 22 smaller subgroups on the basis of involvement in different physiological processes, to facilitate the interpretation of differences.

http://www.nature.com/scitable/resource?action=showFullImageForTopic&imgSrc=/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/14462436/f1_punte_nrg1111-f1.jpg

Aspetti strutturali comuni alle serina proteasi

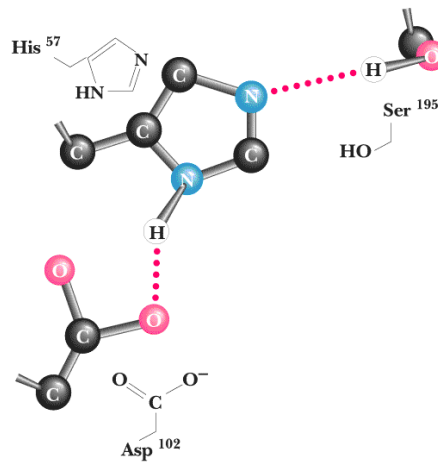
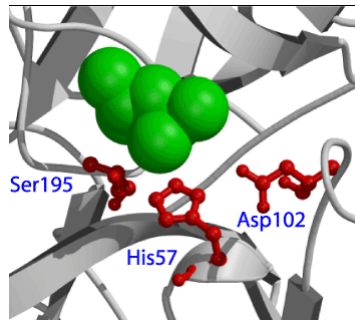
- Residui specifici di **acido aspartico, istidina e serina** (“**triade catalitica**”) in un allineamento special che permette un facile trasferimento di protoni verso o fuori dal sito attivo.
- Una sorta di “tasca” che stabilizza i passi intermediari del processo di rottura del legame peptidico (**buco ossianionico**; “oxyanion hole”).
- Una regione altamente variabile alla base della specificità dell’enzima.



<http://www.nature.com/scitable/topicpage/enzyme-catalysis-the-serine-proteases-14398894>

<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/protease.htm>

Triade catalitica delle serina proteasi



<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bio471/pages/Lecture3/Lecture3.html>

http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/ENZYMES/catalytic_triad.gif

Quali aspetti permettono alle serina proteasi di attaccare substrati diversi?

- ✚ La differenza sta nella **tasca di specificità**.
- ✚ Nella **chimotripsina** la tasca è rivestita da **aminoacidi idrofobici**, e quindi le proteine substrato con aminoacidi idrofobici quali la **leucina** o l'**isoleucina** si legano fortemente e nell'orientamento corretto perché la triade funzioni.
- ✚ Dall'altra parte, la tasca della **tripsina** ha un **acido aspartico carico negativamente** nella tasca e quindi i substrati che la tripsina decompone debbono avere nella posizione giusta un **aminoacido carico positivamente**, quali la **lisina** o l'**arginina**.
- ✚ Un altro esempio è l'**elastasi** in cui la **tasca è molto piccola e poco profonda** in cui solo le proteine con aminoacidi con catene laterali relativamente piccole, quali la **glicina** o l'**alanina**, possono essere degradate da quest'enzima.
- ✚ Questi sono **enzimi digerenti** in grado di rompere i legami peptidici in un'ampia gamma di proteine.
- ✚ Viceversa, in alcune vie, come nel **processo di coagulazione** del sangue o nel sistema immunitario, una **serina proteasi** può essere talmente **specifico** che può soltanto rompere **un singolo legame peptidico in una singola e specifica proteina substrato**.

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/enzyme-catalysis-the-serine-proteases-14398894>

SERINA PROTEASI – [1]

- ✚ Famiglia di enzimi che frammentano alcuni legami peptidici di altre proteine.
 - Questa attività dipende da un **insieme di residui aminoacidi nel sito attivo dell'enzima** – uno dei quali è sempre la **serina** (da cui il loro nome) che funge da agente nucleofilo.
- ✚ Nei Mammiferi le serina proteasi coordinano diverse funzioni fisiologiche importanti, specialmente nella:
 - **Digestione**
 - **Coagulazione** del sangue
 - Sistema del **complemento**
 - **Sistema delle chinine**

<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/tease.htm>

SERINA PROTEASI – [2]

- ✚ **ENZIMI DIGESTIVI**
 - Tre degli enzimi digestivi secreti dal **pancreas** sono delle serina proteasi:
 - Chimotripsina
 - Tripsina
 - Elastasi
- ✚ Questi tre enzimi condividono strutture molto simili (terziarie e non solo primarie).
 - Infatti, il loro residuo di serina attivo è nella stessa posizione (Ser-195) in tutti i tre.
- ✚ Tuttavia, nonostante queste somiglianze, hanno **diverse specificità di substrato**, ossia, **scindono legami peptidici diversi durante la digestione delle proteine**.

Seminario

Serina Proteasi digestive

Clan della chimotripsina – [1]

1. Clan della chimotripsina

- Sono caratterizzate da una struttura caratteristica che consiste in due domini a β -foglietto che convergono nel sito catalitico.
- I più noti sono la **chimotripsina**, **tripsina** ed **elastasi**.
- Questi tre enzimi, sintetizzati dalle cellule acinari del **pancreas** e secreti nell'intestino tenue, sono responsabili della catalisi dell'idrolisi dei legami peptidici.
- **Le differenze riguardano il legame peptidico che viene idrolizzato: legame scindibile.**
- I tre tipi, come la maggior parte degli enzimi, sono **altamente specifici nelle reazioni che catalizzano.**
- Ciascun tipo di queste serina-proteasi digestive ha come bersaglio **regioni diverse della catena polipeptidica**, individuabili dalle **catene laterali dei residui di aminoacidi che circondano il sito di scissione.**

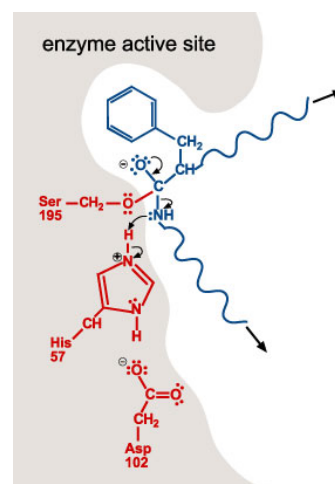
http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_protease

Seminario

Clan della chimotripsina – [2]

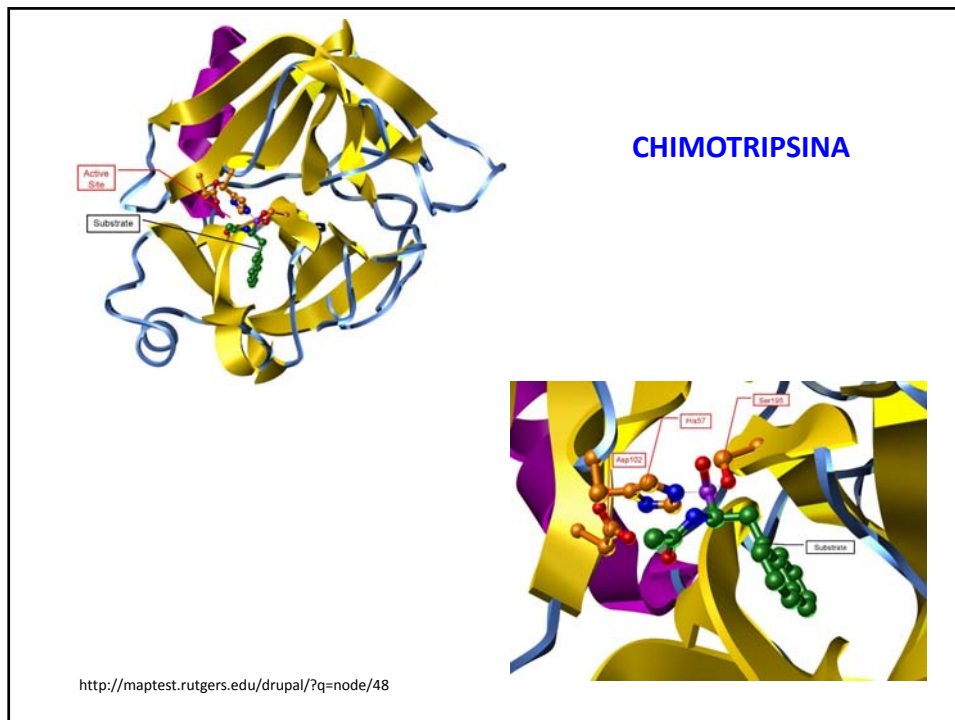
La **CHIMOTRIPSINA** è responsabile della **rottura** di legami peptidici che seguono un residuo aminoacidico **ingombrante e idrofobico**.

- I residui preferiti includono la **fenilalanina**, il **triptofano** e la **tirosina**, che si inseriscono bene nella tasca idrofobica dell'enzima.



http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_protease

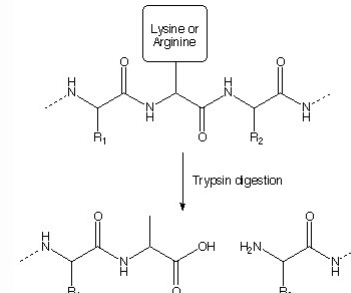
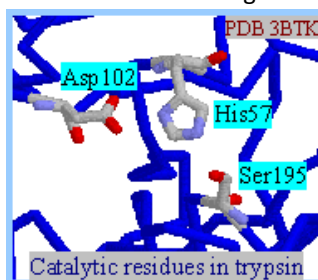
http://www.mpcfacylty.net/mark_bishop/chymotrypsin.htm



Seminario

Clan della chimotripsina - [3]

- ✦ La **TRIPSINA** è responsabile della **rottura di legami peptidici che seguono un residuo di aminoacidi carico positivamente** (es. **lisina** o **arginina**).
- Invece di avere una tasca idrofobica (come nel caso della chimotripsina), possiede un residuo di **acido aspartico** alla base della tasca.
- Questo residuo del sito attivo dell'enzima può interagire con **residui carichi positivamente** come l'arginina e la lisina nel peptide substrato da essere degradato.



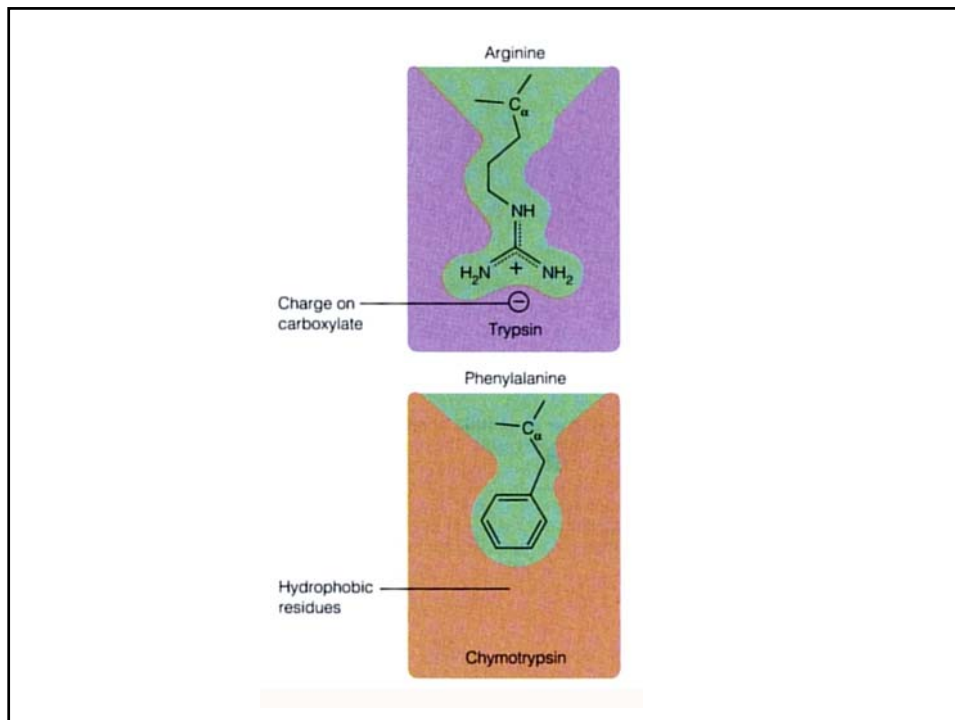
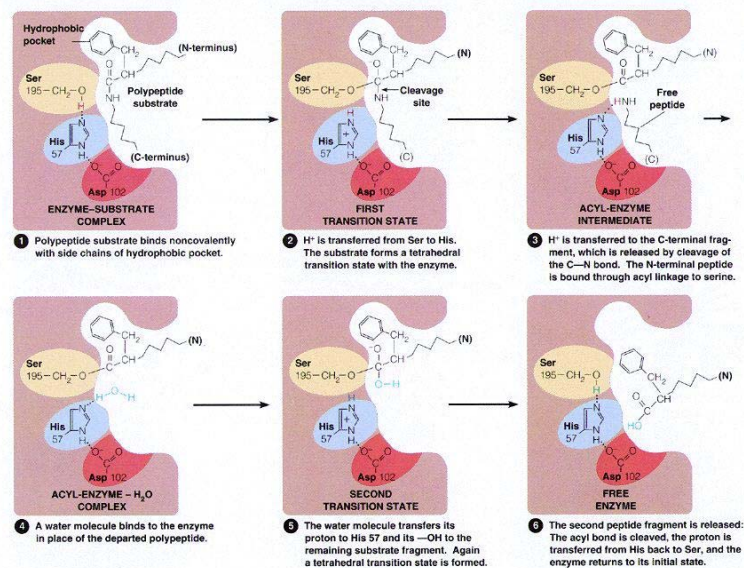


Figure 11.13 Catalysis of peptide bond hydrolysis by chymotrypsin



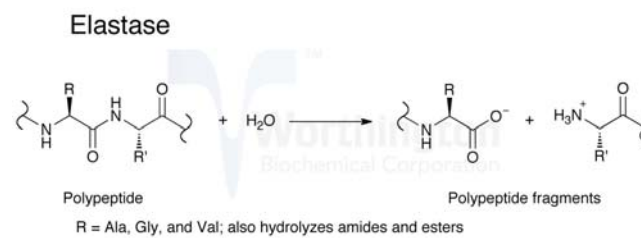
From Mathews and van Holde: *Biochemistry 2/e*. © The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.

Seminario

Clan della chimotripsina – [4]

✚ La **ELASTASI** è responsabile della **rottura di legami peptidici che seguono un piccolo residuo aminoacidico neutro**, quale l'alanina, la glicina e la valina (questi aminoacidi formano molto del tessuto connettivo della carne).

- Rispetto a quella della tripsina o della chimotripsina, la tasca in questo caso è **parzialmente riempita con valina e treonina**, rendendola una **depressione poco profonda**, che **può accomodare piccoli residui aminoacidici**.

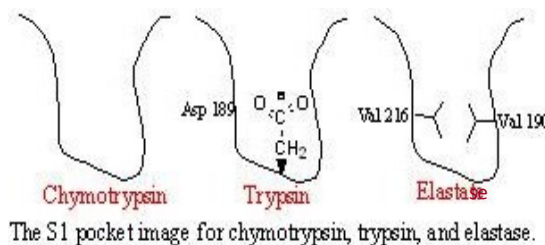


http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_proteases

Seminario

Clan della chimotripsina – [5]

✚ L'azione combinata di **tripsina**, **chimotripsina** ed **elastase** rende il team digestivo incredibilmente efficace, e fondamentale responsabile della digestione delle proteine.



http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Catalytic_Triad_and_S1_Pocket

2. Clan della Subtilisina

- ✚ La Subtilisina è una serina proteasi dei **Procarioti**.
 - Non ha una omologia evolutiva con il clan della chimotripsina, ma **condivide lo stesso meccanismo catalitico che usa una triade catalitica per creare una serina nucleofila**.
 - Questo è un classico esempio di evoluzione convergente, dato che lo stesso meccanismo è evoluto due volte indipendentemente durante l'evoluzione.

http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_proteases

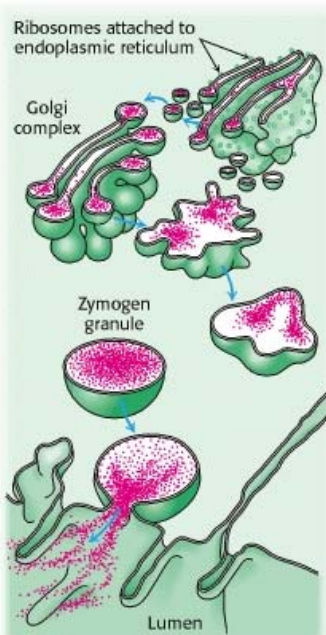
Importanza degli inibitori

- ✚ Ci sono **alcuni inibitori che somigliano all'intermediario tetraedrico che si forma durante la reazione catalitica** e che quindi **riempiono il sito attivo, impedendo l'enzima di lavorare adeguatamente**.
 - La tripsina, un potente enzima digerente, è generata nel pancreas.
 - Il rischio di autodigestione del pancreas stesso richiede degli inibitori di questi enzimi.

Zimogeni delle serina proteasi – [1]

- ✚ Gli **ZIMOGENI** sono i **precursori inattivi di un enzima**.
- ✚ Se gli enzimi digerenti fossero attivi quando sintetizzati, essi inizierebbero immediatamente a digerire gli organi e tessuti che li hanno sintetizzati.
 - La **PANCREATITE ACUTA** è una di queste condizioni in cui vi è una attivazione prematura degli enzimi digestivi del pancreas che provoca la auto-digestione (autolisi).

http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_proteases



Secrezione di zimogeni da una cellula acinare del pancreas

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22589/figure/A1387/>

Zimogeni delle serina proteasi – [2]

- ✚ Gli **zimogeni** sono strutture di grandi dimensioni, inattive, che hanno la capacità di rompersi o modificarsi dando origine agli enzimi attivati di minori dimensioni.
- ✚ La differenza fra **zimogeno** ed **enzima attivo** sta nel fatto che **negli zimogeni il sito attivo di catalisi è distorto**.
 - Quindi, il peptide substrato non riesce a legarsi in modo efficace e la proteolisi non può avere luogo.
- ✚ Solo dopo l'**attivazione**, durante la quale **la conformazione e la struttura dello zimogeno vengono modificati e il sito attivo si apre**, può avere luogo la proteolisi.

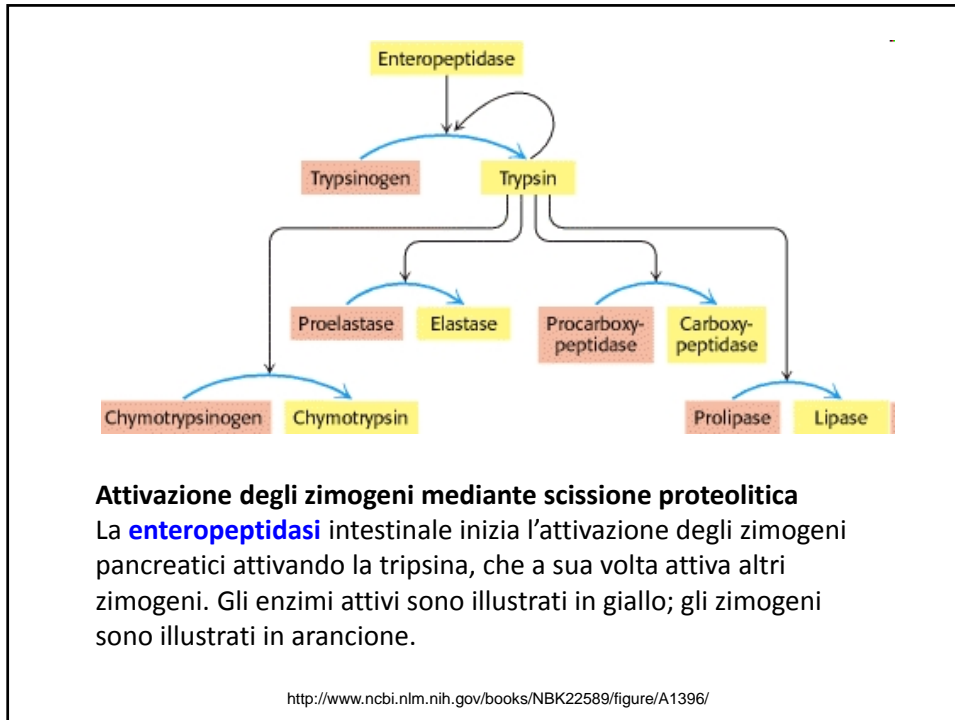
http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_proteases

Seminario

Zimogeni delle serina proteasi – [3]

- ✚ *L'**attivazione del tripsinogeno a tripsina è essenziale, perchè attiva la sua stessa attività catalitica ed anche quella della chimotripsina e della elastasi.***
- ✚ E' perciò essenziale che questa attivazione non abbia luogo prematuramente.
- ✚ Ci sono diverse **misure protettive** che l'organismo adopera per impedire l'autodigestione:
 - L'**attivazione** del tripsinogeno mediante la tripsina è relativamente **lenta**.
 - Gli zimogeni sono **immagazzinati in granuli di zimogeno**, vescicole che hanno pareti che si ritiene siano resistenti alla proteolisi.

http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_proteases



What does Serpins stand for?
 Serine Protease Inhibitors

SERPINE

http://s.allacronyms.com/banners/1398192_1.jpg

SERPINE

✚ Le **Serpine** sono **inibitori** delle **Serine Proteasi**

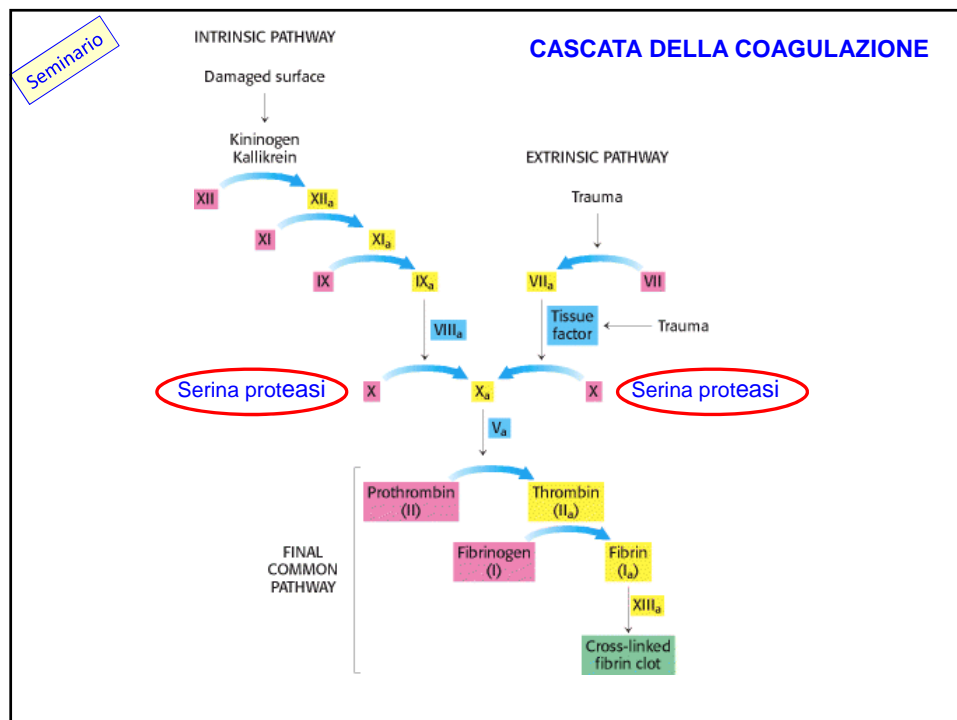
Serine Protease	Serpin
Chymotrypsin	alpha-1-antichymotrypsin
Complement factor C1s	C1 Inhibitor (C1INH)
Elastase (secreted by neutrophils)	alpha-1-antitrypsin
Clotting factor 10 (X)	antithrombin III
Thrombin	antithrombin III
Plasmin	alpha-2-antiplasmin
Trypsin	pancreatic trypsin inhibitor

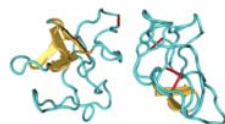
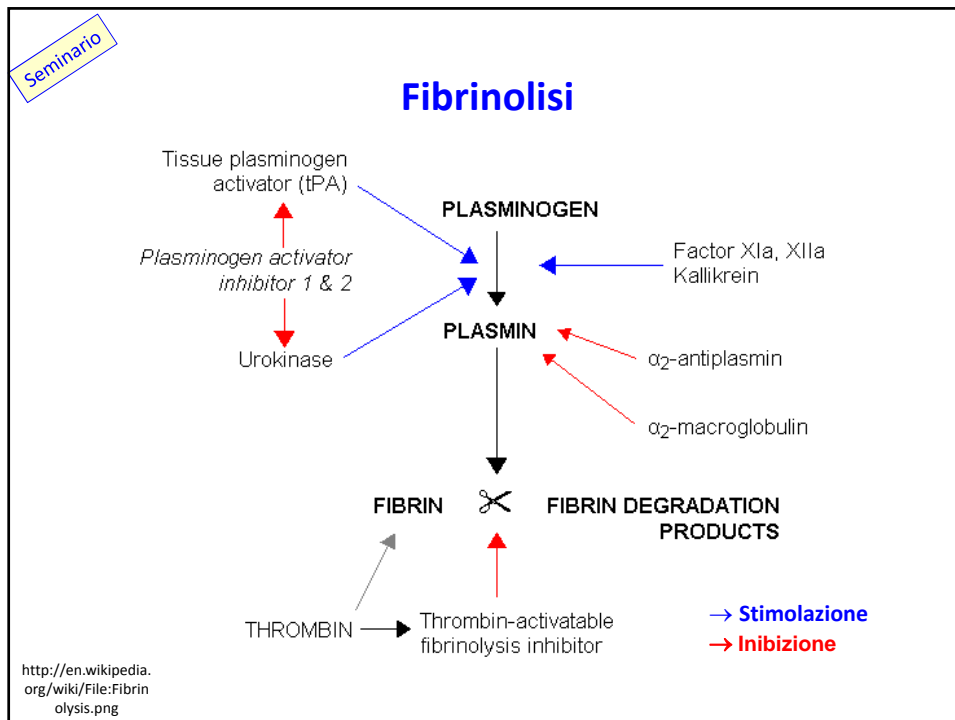
COME FUNZIONANO LE SERPINE?

- ✚ Inibiscono l'azione delle rispettive serina proteasi **simulando la struttura tridimensionale del normale substrato delle proteasi.**
- ✚ Ma la serpina ha un ulteriore "trucco" da giocare:
 - La **proteasi fanno un taglio nella serpina** che porta a:
 - **Formazione di un legame covalente fra le due molecole.**
 - **Un'alterazione allosterica massiccia nella struttura della serpina che sposta la proteasi legata verso un sito dove possa essere distrutta.**

IMPORTANZA DELLA SERPINE

- ✚ Circa il 20% delle proteine che si trovano nel **plasma sanguigno** sono serpine.
- ✚ La loro abbondanza riflette la loro importanza: **fermare l'attività proteolitica** quando è necessario che si concluda.
- ✚ Questo è specialmente importante per i sistemi di:
 - coagulazione
 - complemento
- ✚ ... che sono processi in cui un piccolo evento iniziale porta ad una cascata di attività in rapida amplificazione.



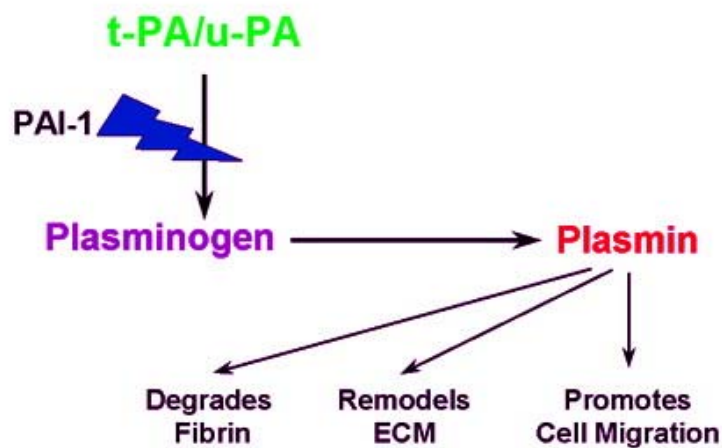


Plasmina - 1

- ✚ La **Plasmina** è un importante enzima (EC 3.4.21.7) presente nel sangue che degrada molte proteine plasmatiche, in particolare i coaguli di fibrina. La degradazione della fibrina viene chiamata **fibrinolisi**.
- ✚ È una **serina proteasi** che viene rilasciata nella circolazione sotto forma di precursore inattivo, il **plasminogeno**
- ✚ È **attivata**:
 - dall'**attivatore del plasminogeno tissutale** (tPA);
 - dall'**attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi** (uPA);
 - dalla trombina;
 - dalla fibrina;
 - dal fattore XII (fattore di Hageman) della coagulazione
- ✚ È **inattivata**:
 - dalla alfa-2-antiplasmina, un inibitore delle serina proteasi (**serpina**)

Plasmina - 2

- ✚ Oltre ad essere coinvolta nella fibrinolisi, la plasmina proteolizza proteine di diversi altri sistemi:
 - **Attiva le collagenasi**, alcuni mediatori del sistema del complemento ed indebolisce la parete del follicolo di Graaf (provocando l'ovulazione).
 - **Degrada la fibrina**, la **fibronectina**, la **trombospondina**, la **laminina**, e il **fattore di von Willebrand** della coagulazione.
- ✚ **Un deficit di plasmina può portare alla trombosi, perchè i coaguli non vengono degradati come si deve.**



Brown NJ, et al. *Adv Intern Med.* 2000;45:419-429.

FAMIGLIA DEGLI ATTIVATORI DEL PLASMINOGENO-1

- ✚ Gli **attivatori del plasminogeno** (PAs) sono **serina-proteasi** che convertono il **plasminogeno inattivo** in **plasmina attiva**, un enzima simile alla tripsina che degrada una grande varietà di proteine, quali la fibrina, la fibronectina, il collagene di tipo IV, la vetronectina e la laminina.
- ✚ Il PA esiste sotto forma di:
 - **attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (tPA)**
 - **attivatore del plasminogeno di tipo urochinasasi (uPA).**

Attivatori del plasminogeno e matrice extracellulare – [1]

- ✚ Il Sistema di **Attivazione del Plasminogeno** (PA) è un meccanismo estesamente impiegato per **generare attività proteolitica** nella MEC, dove contribuisce al rimodellamento dei tessuti in un'ampia gamma di processi fisiopatologici.
- ✚ L'attivazione dello **zimogeno plasminogeno** alla **serina proteasi attiva plasmina** è un processo altamente regolato.
- ✚ Ci sono due distinti attivatori del plasminogeno (PAs):
 - tPA: «tissue-type plasminogen activator»
 - uPA: «urokinase-type plasminogen activator»
- ✚ Recettori specifici (uPAR/CD8 per uPA; α -enolasi per il plasminogeno; annexina-II per tPA) contribuiscono a localizzare le attività dei PA e della plasmina nella zona pericellulare.

Suelves M, Vidal B, Ruiz V, Baeza-Raja B, Diaz-Ramos A, Cuartas I, Lluís F, Parra M, Jordi M, Lopez-Aleman R, Serrano AL, Munoz-Canoves P. The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1). Front Biosci. 2005 Sep 1;10:2978-85.

The Plasminogen Activation System

Suelves M, Vidal B, Ruiz V, Baeza-Raja B, Diaz-Ramos A, Cuartas I, Lluís F, Parra M, Jordi M, Lopez-Aleman R, Serrano AL, Munoz-Canoves P. **The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1).** Front Biosci. 2005 Sep 1;10:2978-85.

- La plasmina attiva (Plm) viene generata a partire dal suo zimogeno, il plasminogeno (Plg), mediante l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPA) che, a sua volta, può essere inibito dall'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1).
- Il uPA si lega al suo recettore specifico uPAR.
- Il Plg si può associare con il recettore α-enolasi sulla superficie cellulare.
- Oltre alla fibrinolisi, le attività dell'uPA e della plasmina inducono diversi processi cellulari, incluso migrazione, proliferazione e degradazione della MEC.

<https://lauragarrison.wordpress.com/tag/fibrin/>

coaguli di fibrina

Medscape
Hemostasis Inflammation

Migration and proliferation Maturation

● Macrophage ● Platelet ● Fibrin clot
● Mast cell ● Lymphocyte ● Neutrophil ● Macrophage
● Fibroblast ● Epithelial cell ● Keratinocyte
● Granulation tissue ● Late granulation tissue

Source: Nanomedicine © 2013 Future Medicine Ltd

<http://img.medscape.com/article/782/469/782469-fig2.jpg>

Attivatori del plasminogeno e matrice extracellulare – [2]

- ✚ La **plasmina** è il principale enzima responsabile per la **degradazione della fibrina** sia in siti intravascolari che extravascolari.
- ✚ Inoltre il uPA e la plasmina sono coinvolti in numerosi altri **processi non-fibrinolitici** che portano alla degradazione della matrice extracellulare (MEC) sia direttamente mediante **scissione proteolitica** di componenti della **MEC** quali la fibronectina o la laminina, o indirettamente mediante **attivazione di metalloproteinasi latenti** della matrice (MMPs).
- ✚ Inoltre, *in vitro*, la uPA, la plasmina e alcune MMPs **attivano diversi fattori di crescita latenti** (es. Transforming Growth Factor- β , Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, basic Fibroblast Growth Factor), attività fondamentali per la migrazione cellulare e il rimodellamento dei tessuti *in vivo*.

Suelves M, Vidal B, Ruiz V, Baeza-Raja B, Diaz-Ramos A, Cuartas I, Lluís F, Parra M, Jordi M, Lopez-Aleman R, Serrano AL, Munoz-Canoves P. The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1). Front Biosci. 2005 Sep 1;10:2978-85.

Attivatori del plasminogeno e matrice extracellulare – [3]

- ✚ Dato che la generazione incontrollata di attività proteolitica può essere pericolosa per le cellule, l'**attività** della plasmina è strettamente **controllata** a livello degli PAs mediante **inibitori degli attivatori** (PAI-1 e PAI-2), e a livello della plasmina mediante la α 2-antiplasmina.
- ✚ Il PAI-1 è il principale inibitore fisiologico di uPA. Regola l'attività di uPA:
 - direttamente mediante la sua attività di serina proteasi
 - Indirettamente, regolando i livelli del complesso uPA-uPAR mediante promozione della sua endocitosi.
- ✚ Il uPAR e il PAI-1 sono stati implicati anche in processi non proteolitici che inducono anche segnalamento:
 - In presenza di uPA, uPAR promuove direttamente l'adesione cellulare alla vitronectina (VN) promossa da integrine
 - Mediante la sua forte interazione con la VN, il PAI-1 può inibire l'adesione cellulare alla VN e la migrazione

Suelves M, Vidal B, Ruiz V, Baeza-Raja B, Diaz-Ramos A, Cuartas I, Lluís F, Parra M, Jordi M, Lopez-Aleman R, Serrano AL, Munoz-Canoves P. The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1). Front Biosci. 2005 Sep 1;10:2978-85.

Complemento

CLASSICAL PATHWAY
antibody binding
C1
C2
C4

LECTIN PATHWAY
mannan-binding lectin
MBL
MASP
C2
C4

ALTERNATIVE PATHWAY
pathogen surfaces
B
D

CLEAVAGE OF C3

COATING OF MICROBES AND INDUCTION OF PHAGOCYTOSIS

RECRUITMENT OF INFLAMMATORY CELLS

CELL LYSIS
C5
C6
C7
C8
C9

C1s: Serina proteasi

Figure 25-41. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Tutte tre le vie generano un'attività enzimatica cruciale che, a sua volta, genera molecole effettrici del complemento. Le tre principali conseguenze dell'attivazione del complemento sono **l'opsonizzazione dei patogeni**, il **richiamo di cellule infiammatorie** e **l'uccisione diretta dei patogeni**.

Sistema delle chinine - 1

Hageman factor (XII)

Collagen or other activators

XIIa

Coagulation cascade

Prekallikrein activator

Prekallikrein

Kallikrein **Serina proteasi**

Kininogen

Bradykinin

Vasodilation
Vascular permeability
Pain

Figure 6-10 The plasma kinin cascade.

Rote & Huether: Inflammation • In: Understanding Pathophysiology (Huether & McCance, eds.) Mosby, 3^e ed