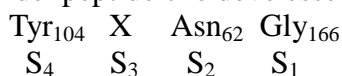
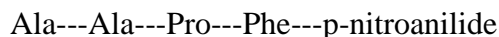


Problema 21 Substrate Specificity of Subtilisin

Nei quattro subsiti S_1 - S_4 della subtilisina si trovano i seguenti amminoacidi affacciati alle catene laterali dei primi quattro amminoacidi del peptide che deve essere tagliato:



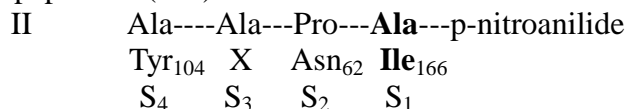
La sequenza ideale riconosciuta è:



a) Quale dei seguenti peptidi viene riconosciuto e tagliato più velocemente se si usa un enzima mutato che contiene Ile al posto di Gly_{166} ?

- I Ala-Ala-Pro-**Phe**-p-nitroanilide
- II Ala-Ala-Pro-**Ala**-p-nitroanilide
- III Ala-Ala-Pro-**Glu**-p-nitroanilide
- IV Ala-Ala-Pro-**Tyr**-p-nitroanilide

Visto che è stato mutato solo S_1 , concentriamo la nostra attenzione solo sul primo amminoacido, quello in neretto. La catena laterale di Ile (secbutile) è più ingombrante di quella di Gly (H), quindi I (Phe) e IV (Tyr) sono esclusi. Anche III (Glu) non è accettabile perchè ha una catena laterale ingombrante e acida. Resta il peptide II (Ala)



b) Si sono creati tre mutanti della subtilisina introducendo Asp in uno, due o tre dei subsiti:

- Mutante 1 Tyr₁₀₄ X Asn₆₂ **Asp**₁₆₆
- Mutante 2 Tyr₁₀₄ X **Asp**₆₂ **Asp**₁₆₆
- Mutante 3 **Asp**₁₀₄ X **Asp**₆₂ **Asp**₁₆₆

Quale dei seguenti peptidi viene idrolizzato più velocemente da ciascun mutante?

- I Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide X Phe-Gly-Lys-Arg-p-nitroanilide
- V Ala-Ala-Lys-Phe-p-nitroanilide XI Leu-Gly-Phe-Arg-p-nitroanilide
- VI Arg-Ala-Lys-Arg-p-nitroanilide XII Ala-Ala-Lys-Arg-p-nitroanilide
- VII Arg-Gly-Lys-Glu-p-nitroanilide XIII Arg-Gly-Ala-Arg-p-nitroanilide
- VIII Ala-Ala-Pro-Arg-p-nitroanilide XIV Arg-Gly-Lys-Phe-p-nitroanilide
- IX Ala-Gly-Glu-Arg-p-nitroanilide

L'interazione più forte si ha quando un amminoacido basico (Arg, Lys, His) si affaccia su uno acido (in questo caso Asp). I peptidi che vengono riconosciuti meglio sono quindi:

- Mutante 1 Tyr₁₀₄ X Asn₆₂ **Asp**₁₆₆
- VIII Ala---Ala---Pro---**Arg**---p-nitroanilide

- Mutante 2 Tyr₁₀₄ X **Asp**₆₂ **Asp**₁₆₆
- XII Ala---Ala---**Lys**---**Arg**---p-nitroanilide

- Mutante 3 **Asp**₁₀₄ X **Asp**₆₂ **Asp**₁₆₆
- VI **Arg**---Ala---**Lys**---**Arg**---p-nitroanilide

Soluzione proposta da
prof. Mauro Tonellato
ITI Marconi - Padova