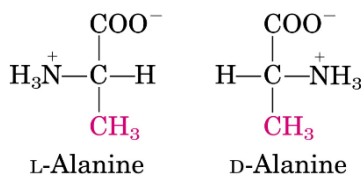
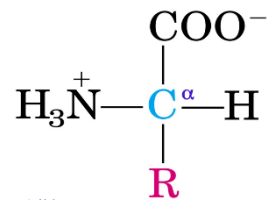


LEZIONE 2 (sbobinatori: Viviana Volpe ed Enrico De Rosa)

Argomenti: Gli amminoacidi e la struttura delle proteine

Gli amminoacidi sono i monomeri che costituiscono le proteine, nella loro struttura vediamo la presenza di:

- Carbonio α
- Gruppo carbossilico
- Gruppo amminico
- Un atomo di idrogeno
- Un gruppo R o catena laterale



Gli amminoacidi sono molecole chirali, ovvero enantiomeri non sovrapponibili.

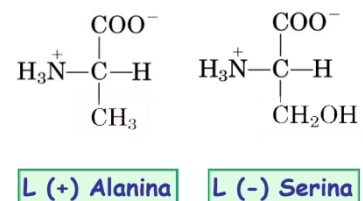
Per gli enzimi, due enantiomeri costituiscono due substrati diversi.

Nel nostro organismo viene utilizzato l'**enantiomero di tipo L**, il quale è classificato come tale grazie alla *posizione del gruppo amminico* rispetto alla proiezione di Fisher. Se è posizionato a destra sarà un enantiomero D, se è posizionato a sinistra sarà un enantiomero L. Questa considerazione è stata fatta a partire dalla molecola di L-Gliceraldeide, la quale è un aldeide tricarbossilica, dove l'enantiomero viene classificato come L a causa della posizione dell'OH in posizione 2.

Classificazione degli amminoacidi in base a diverse proprietà:

1. Capacità di deviare la luce polarizzata.

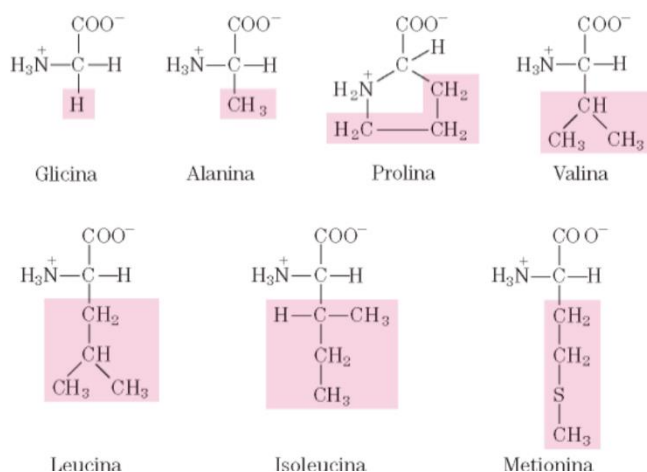
Questo non dipende dalla conformazione dell'enantiomero di tipo L o D, difatti l'alanina risulta essere L(+) Alanina, che ruota la luce verso destra, mentre la serina è di tipo L(-) Serina, che ruota la luce verso sinistra.



2. In base alla catena laterale R, che ne identifica particolari caratteristiche chimiche.

Classi di amminoacidi: polari e apolari.

Gli amminoacidi NON POLARI devono avere una catena laterale di tipo idrofoba:

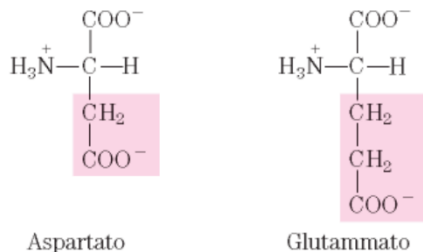


- La **Glicina** ($R = H$);
- L'**Alanina** ($R = CH_3$);
- La **Metionina**: caratterizzata dal fatto di avere nella sua catena laterale R un atomo di Zolfo (S), inoltre è il primo amminoacido che viene inserito in una proteina;
- La **Prolina**: è un amminoacido ciclico, quindi manca del gruppo NH_3 libero, questo rende la prolina un amminoacido che destabilizza le strutture secondarie delle proteine, in particolare l' α -elica;

insieme a questa, anche la Glicina destabilizza queste strutture perché è un amminoacido mobile;

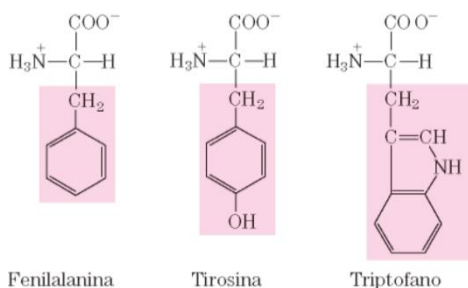
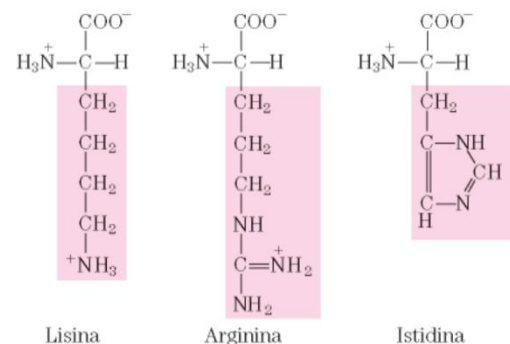
- La **Valina**, l'**Isoleucina** e la **Leucina**: tre amminoacidi ramificati che il nostro organismo utilizza in maniera importante durante i momenti di digiuno prolungato.

Gli amminoacidi POLARI possono essere carichi positivamente e negativamente.



- Amminoacidi polari carichi negativamente: **Aspartato** e **Glutammato**, due amminoacidi la cui catena laterale termina con un gruppo carbossilico e sono ricorrenti nel metabolismo che studieremo.

- Amminoacidi polari carichi positivamente: **Lisina**, **Istidina** e **Arginina**, caratterizzati da una carica positiva che per la Lisina è data dal gruppo amminico terminale della catena laterale R, per l'Arginina è data dalla presenza del *gruppo guanidinico* (ricorda: l'arginina è responsabile della sintesi dell'urea), per l'Istidina è data dal *gruppo ciclico imidazolico* (ricorda: il pKa dall'istidina è intorno alla neutralità, anche se tende ad essere un amminoacido basico).

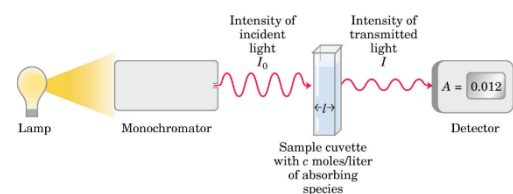


Gli amminoacidi AROMATICI:

- **Fenilalanina**, **Tirosina** e **Triptofano**: la caratteristica di questi amminoacidi è che sono in grado di assorbire ad una determinata lunghezza d'onda, ovvero assorbono luce a 280 nm. Questa loro caratteristica rende questi amminoacidi utili quando si vuole determinare se in una soluzione è presente una proteina (perché si ipotizza che

uno di questi residui sia presenti nella sequenza proteica) oppure per dosare la quantità di proteina che si ha all'interno di una soluzione.

Quando si ha una sostanza che è in grado di assorbire ad una determinata lunghezza d'onda, se si sottopone questa sostanza a varie lunghezze d'onda, quando si arriva al "picco di assorbimento" si misura l'**assorbanza**, la quale è una quantificazione della capacità della sostanza di assorbire luce. Questi saggi di assorbimenti della luce vengono effettuati mediante apparecchiature che prendono il nome di spettrofotometri, i quali sono caratterizzati da una *sorgente luminosa* che emette a tutte le lunghezze d'onda, un *monocromatore*, il quale filtra la lunghezza d'onda (seleziona lunghezza d'onda, se si vogliono studiare le proteine, allora la lunghezza d'onda selezionata sarà di 280 nm), questo fascio che emette a quella lunghezza d'onda colpisce il campione presente in una *cuvetta* (recipiente a forma di parallelepipedo).



Il raggio che fuoriesce dal monocromatore è chiamato *raggio di luce incidente* e colpisce la soluzione nella quale è la sostanza, se la sostanza è in grado di assorbire a quella lunghezza d'onda, si avrà un *raggio di luce trasmesso* diverso dal raggio di luce incidente che viene rilevato dal *detector*, quindi la macchina darà la misura dell'assorbanza, cioè quanta luce è stata assorbita dal campione.

Il semplice utilizzo dell'apparecchio a 280 nm dice se la sostanza assorbe o non assorbe, quindi se c'è o non c'è la proteina nel campione.

Sulla base di queste considerazioni e della legge di Lambert-Beer, è possibile misurare la concentrazione di qualsiasi sostanza che sia in grado di assorbire ad una determinata lunghezza d'onda. Difatti, il numero che dà il detector, l'assorbanza, è legato alla legge di Lambert-beer, la legge che permette di misurare la concentrazione di una sostanza che assorbe la luce all'interno del campione.

- **Legge di Lambert-Beer:**

La frazione di luce incidente che viene assorbita da una soluzione ad una data lunghezza d'onda è proporzionale al cammino ottico della soluzione e alla concentrazione della soluzione.

In termini matematici, la legge dice che il rapporto del logaritmo fra il raggio di luce incidente (I_0) fratto il raggio di luce trasmesso (I) è direttamente proporzionale ad ϵlc , dove:

$$\text{Log } \frac{I_0}{I} = \epsilon lc$$

I_0 intensità della luce incidente

I intensità della luce trasmessa

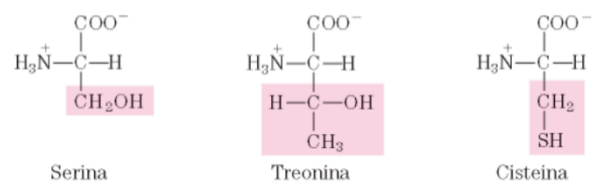
ϵ coefficiente di estinzione molare (litro/moli cm^{-1})

l lunghezza del cammino ottico (cm)

C concentrazione della specie che assorbe (moli/litro)

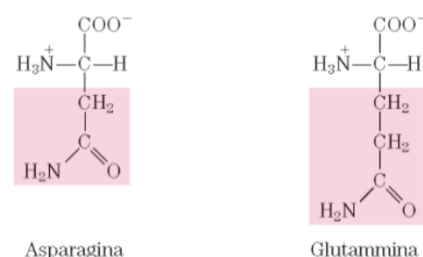
Il rapporto tra il raggio di luce incidente e il raggio di luce trasmesso è detto assorbanza, il valore che ci dà lo spettrofotometro, quindi il valore di assorbanza ottenuto è direttamente proporzionale ad ϵlc . Poiché ϵ è costante nella sostanza considerata, l'assorbanza diventerebbe proporzionale ad lc , ma la cuvetta (il recipiente) ha forma parallelepipedo a base quadrata con lunghezza standard di 1cm, ciò vuol dire che l'assorbanza diventa direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza.

Questa legge viene usata anche in dosaggi clinici enzimatici, perché i coenzimi come NADH sfruttando questo tipo di caratteristica, permettono il dosaggio enzimatico.



Gli amminoacidi POLARI NON CARICHI:

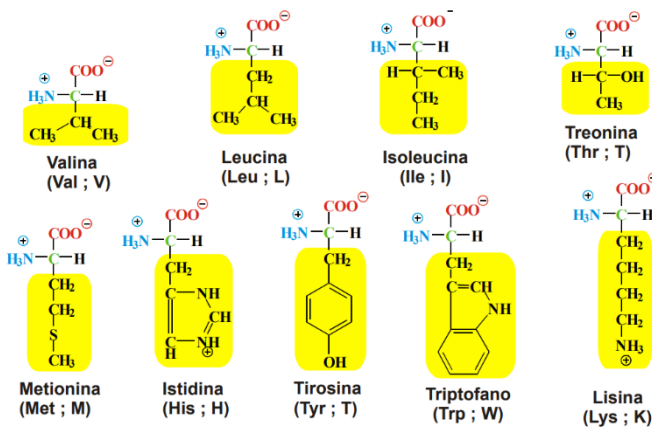
- Serina, Treonina, Cisteina, Asparagina e Glutammina. La **Cisteina** presenta atomi di Zolfo ma è diversa dalla Metionina perché ha una funzione di stabilizzazione delle strutture delle



proteine poiché, avendo nella sua catena laterale un gruppo –SH, può essere sottoposta a reazioni di riduzione e ossidazione (con SH ridotta, che se viene ossidata crea il ponte disolfuro con un'altra cisteina). Il ponte disolfuro è un legame covalente e conferisce stabilità nella configurazione tridimensionale, inoltre si può formare sia all'interno di una stessa catena proteica oppure tra due subunità diverse. L'esempio più classico è quello dell'insulina: dopo la maturazione dà luogo a due subunità separate A e B, nella catena A esiste un ponte disolfuro intracatena, mentre tra A e B c'è un legame di due ponti disolfuro.

Serina e **Treonina** hanno un gruppo ossidrilico terminale, sono quindi amminoacidi che possono legare gli zuccheri. Ci sono poi l'**Asparagina** e la **Glutamina**, che sono i corrispondenti ammidi dell'aspartato e glutammato.

3. Gli amminoacidi possono essere distinti in amminoacidi essenziali e amminoacidi non essenziali.



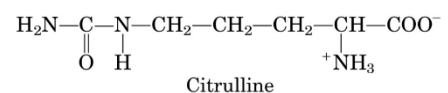
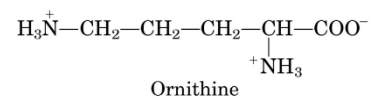
La caratteristica degli amminoacidi essenziali è che essi non vengono sintetizzati nel nostro organismo:

- Valina, Leucina, Isoleucina, Treonina, Metionina, Istidina, Tirosina, Triptofano e Lisina.

A questi si aggiunge, durante lo sviluppo dell'organismo, l'**Arginina**, la quale diventa non essenziale nell'organismo dell'adulto.

4. Oltre ai 20 amminoacidi canonici, ne esistono alcuni non canonici, di questi dobbiamo ricordare:

- L'**Ornitina** e la **Citrullina**, entrambi i quali sono necessari per la sintesi dell'urea.



Un'altra caratteristica degli amminoacidi è avere la cosiddetta

struttura zwitterionica. Gli zwitterioni sono acidi deboli e acidi diprotici, perché hanno due gruppi che possono agire sia da acido che da base, che sono il gruppo amminico e il gruppo carbossilico. Lo zwitterione ha carica netta pari a zero ed esso può sia agire da acido, liberando protoni e conferendo alla struttura una forma anionica, sia da base accettando protoni portando ad una forma cationica.

Essendo acidi deboli, sono in equilibrio con il protone e con la loro base coniugata e questo equilibrio ha una costante di equilibrio pari alla concentrazione dei prodotti (protone per la base coniugata) diviso la concentrazione dell'acido.

Mettendo in evidenza, in questa equazione, la concentrazione dei protoni, si ottiene K_a che moltiplica la concentrazione dell'acido fratto la base coniugata. La concentrazione dei protoni si esprime con -log [H⁺] il quale indica il pH.

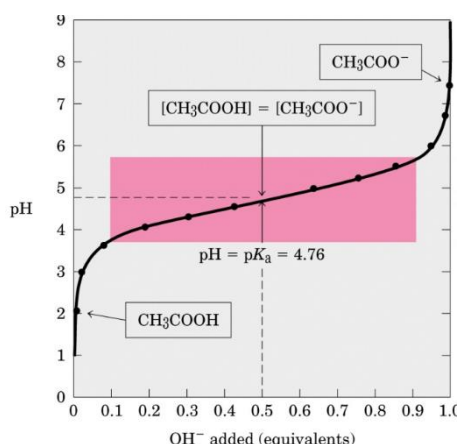


$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$[\text{H}^+] = K_a \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Essendo acidi deboli, è possibile titolare gli amminoacidi.

Quella che vediamo in esempio è la titolazione dell'acido acetico, ma come si effettua la titolazione?



La titolazione di un acido debole avviene in questo modo: Bisogna avere una soluzione di una base (come NaOH) e partendo da una certa concentrazione, aumentare con il tempo la concentrazione della base che aggiungiamo in soluzione. Man mano che si aggiunge la base, si va a misurare il pH della concentrazione che chiaramente deve contenere l'acido debole, si ha quindi la **curva di titolazione** dell'acido debole. Quello che ci interessa di questa curva di titolazione è l'andamento:

All'inizio si fanno piccole aggiunte di base e si nota un repentino innalzamento del pH, poi si ha una **regione di flesso** (in rosa), in cui, a importanti aggiunte di base, la variazione di pH è relativamente minore se confrontata alla regione precedente. Superata la regione di flesso, si ha lo stesso fenomeno iniziale, quindi a piccole aggiunte di base si ha un grande aumento di pH. Quindi la regione di flesso risulta essere la **regione tampone** (buffer) della soluzione, cioè se si tenta di variare il pH di una soluzione che abbia l'acido acetico a pH 4,76, le variazioni di pH vengono ammortizzate.

Questo meccanismo viene anche utilizzato dall'organismo per tamponare ad esempio il pH del sangue.

Nel punto di mezzo della curva di titolazione presa in esempio, il valore di pH corrisponde a quello di pKa, questo perché in questo punto di mezzo la concentrazione del donatore di protoni e dell'accettore di protoni sono uguali.

Per l'appunto, il pKa, uguale al pH, è il potere tampone della soluzione, chiaramente l'acido acetico a pH = 4,76 ha un potere tampone molto più forte rispetto ad altri valori. Questa deduzione che il pH è uguale al pKa nel punto di mezzo della regione di flesso, è stata dimostrata da Henderson e Hasselbalch. Ritornando alla derivazione che noi abbiamo fatto per la costante di dissociazione, difatti, cambiando di segno il logaritmo si ha l'equazione di Henderson e Hasselbalch. La base è di fatto l'accettore di protoni mentre HA è il donatore di protoni, quando l'accettore di protoni è uguale al donatore di protoni, il valore di questo logaritmo è zero, quindi pH = pKa, il potere tampone della sostanza.

$$-\log[H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

equazione di
Henderson-
Hasselbalch

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{accettore di protoni}]}{[\text{donatore di protoni}]}$$

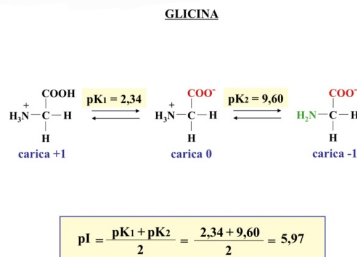
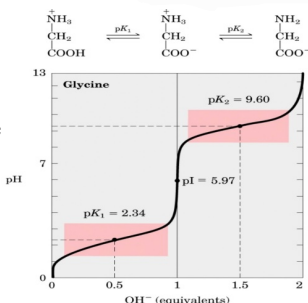
Come abbiamo visto gli amminoacidi posseggono un gruppo acido (-COOH) e un gruppo basico (-NH₃), quindi in base al pH della soluzione dell'amminoacido è possibile trovarlo o in una forma completamente protonata o in una completamente deprotonata (rispettivamente catione e anione). Esiste però un particolare pH delle soluzioni amminoacidiche in cui la molecola è presente in forma dipolare e acquista il nome di **ZWITTERIONE**. Questo valore caratteristico di pH prende il nome di punto **isoeletttrico**, ovvero quel valore del pH dove l'amminoacido ha carica netta pari a 0. Il calcolo del punto isoeletttrico avviene facendo la media tra i due PK dell'amminoacido.

$$pI = (pK_1 + pK_2) / 2 \quad \text{Dove } pI = \text{PUNTO ISOELETTTRICO}$$

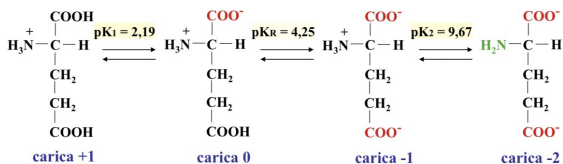
Gli amminoacidi hanno due gruppi che possono agire da acidi deboli: uno è il **gruppo carbossilico** e l'altro è il **gruppo amminico**. Quindi le regioni amminoacidiche che possono essere titolate sono ben due.

(partiamo dal

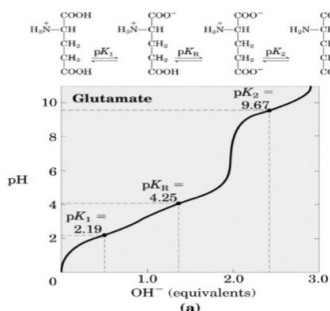
presupposto che il seguente ragionamento è fatto partendo dalla glicina che è l'amminoacido più semplice possedendo unicamente -NH₃ e -COOH come gruppi) Nel momento della titolazione l'amminoacido vedrà la dissociazione del gruppo carbossilico e sarà proprio la dissociazione del gruppo carbossilico a dare la prima regione di flesso e, quindi, il primo PK; questo corrisponde al punto in cui l'amminoacido ha carica netta +1. Dopodiché possiamo notare l'inizio della titolazione del gruppo amminico, si avrà quindi una regione di flesso in cui è presente un PK, il cui punto corrisponde al punto in cui l'amminoacido ha carica netta pari a -1. Guardando lo schema, notiamo dopo la regione di flesso di dissociazione del gruppo carbossilico un repentino innalzamento del pH, nei pressi del quale si troverà il PUNTO ISOELETTTRICO (pI); questo è al centro perfetto tra i due PK (si trova con la formula espressa prima) ed è, quindi, il luogo in cui l'amminoacido ha carica netta pari a 0 (ZWITTERIONE).



ACIDO GLUTAMMICO



$$pI = \frac{pK_1 + pK_R}{2} = \frac{2,19 + 4,25}{2} = 3,22$$



il “problema” sorge quando l’amminoacido possiede una catena R con carica positiva o negativa, anche questo gruppo andrà a dissociarsi. Prendiamo in considerazione il glutammato, esso, avendo due gruppi carbossilici e uno amminico, possiede già una carica netta +1. All’inizio della titolazione andrà a dissociarsi per primo il gruppo carbossilico della catena R, quindi formerà come il solito una regione di flesso e un punto pK; successivamente si dissocia il secondo gruppo carbossilico (quello tipico dell’amminoacido) e in fine quello amminico. Se si guardano le regioni di flesso (ripetiamo, visto che io lo

dimentico, che le regioni di flesso sono le regioni tampone), si passa da una carica netta +1, ad una 0, ad una -1, ad una -2. Il pI, in questo caso, si otterrà con la semisomma dei pK con carica +1 e -1: in questo caso specifico PK1 e PKR (il punto di flesso della catena R).

Per gli amminoacidi carichi positivamente anche quelli si devono dissociare secondo un ordine: Gruppo carbossilico, gruppo di R e infine gruppo amminico. Vanno, in questo caso, preso in considerazione, per la semisomma, i Pk con carica -1 e +1.

Struttura delle proteine

La struttura non è solo la conseguenza della disposizione degli amminoacidi, come sono legati fra di loro ma, naturalmente, anche del loro avvolgimento spaziale. Per ogni proteina abbiamo la struttura primaria, secondaria, terziaria e in alcuni casi quaternaria.

La struttura primaria, è costituita dalla successione degli amminoacidi. Per ottenere la struttura primaria si parte dal legame di due amminoacidi attraverso un legame detto **legame peptidico**, questi legami sono presenti lungo la sequenza polipeptidica e si formano tra il gruppo carbossilico e il gruppo amminico per condensazione (nella reazione si andrà a perdere una molecola d’acqua), questa reazione verrà catalizzata dall’enzima peptidiltransferasi. Per convenzione tutte le strutture primarie si scrivono a partire dall’amminoacido n-terminale fino a quello c-terminale, tutti gli amminoacidi sono in grado di formare questo legame tranne la prolina che non ha il gruppo n-terminale libero. La particolarità del legame peptidico sta nella capacità di formare un parziale doppio legame tra i due gruppi a causa delle loro cariche, ciò rende questo legame diverso da un semplice legame amminico, per esempio, gli atomi di carbonio e azoto, a causa del doppio legame, sono più vicini; questa rigidità di legame causa cosa? L’impossibilità di rotazione tra N e C, tuttavia gli amminoacidi ruotano per mezzo del legame tra il carbonio alfa e il carbonio carbossilico: ciò rende possibile ruotare i piani **PHI** e **PSI** (i due piani degli amminoacidi c-terminale e n-terminale).

La struttura secondaria è costituita proprio dalla rotazione di tali catene polipeptidiche, le quali, rotando, vanno a formare 2 tipi di struttura: foglietti beta o alfa eliche.

Le alfa eliche hanno una struttura regolare, ogni giro è formato da circa 3,6 residui di amminoacidi e ogni giro, a sua volta, va a formare un gradino dell’elica. Il legame è stabilizzato dai legami ad idrogeno che si instaurano tra un gruppo amminico di un gradino e il gruppo carbossilico del gradino successivo. Quest’elica può essere destrorsa o levogira, essere l’una piuttosto che l’altra è decretato dall’utilizzo della regola della mano destra. Le catene laterali degli amminoacidi sono poste all’esterno dell’elica per avere meno ingombro sterico possibile. Elementi che favoriscono o destabilizzano l’alfa elica:

- Repulsione o attrazione dei gruppi R carichi
- Dimensione dei gruppi R adiacenti, questi non devono essere troppo grandi o rischiano di distruggere l’elica

- Interazioni tra catene laterali spaziate da tre o quattro residui
- Presenza di Glicina e Prolina. La glicina è pericolosa a causa della presenza dell'idrogeno come gruppo R, ciò rende la molecola instabile e mobile; Prolina, che non ha il gruppo amminico libero, spesso la prolina si trova al termine dell'elica generando così il famoso alfa elica-braker.
- Interazioni tra amminoacidi alle estremità terminali dove sono presenti dei dipoli elettrici.

Foglietti beta, tipica delle strutture di sostegno, possiede tre catene polipeptidiche disposte a zig-zag e anche qui si formano legami ad idrogeno tra i filamenti, i quali vanno a stabilizzare le strutture. I foglietti beta possono essere paralleli o antiparalleli; la differenza si osserva anche nei legami ad idrogeno: nei foglietti beta paralleli i legami ad idrogeno sono obliqui, mentre in quelli antiparalleli sono perpendicolari. Le catene laterali sono disposte sopra o sotto il piano del foglio. Le proteine sono composte da più tipi di catene, infatti possono esservi alternanza di alfa eliche e foglietti beta, ma allo stesso tempo vi sono proteine che posseggono unicamente l'una o l'altra.

Struttura terziaria: La struttura terziaria è data dalla struttura tridimensionale assunta dalla proteina. Mentre la struttura secondaria è detta "a corto raggio" a causa delle interazioni tra amminoacidi vicini tra loro, la struttura terziaria è detta "a lungo raggio". Nella struttura terziaria teniamo conto delle caratteristiche degli amminoacidi intra catena che possono avere carica, possono essere polari, idrofobici e ovviamente tutto ciò determinerà conseguenza in termini strutturali perché se ci sono lungo la sequenza delle cariche negative queste tenderanno naturalmente ad attrarre verso sé porzioni di molecole che hanno cariche positive. A mantenere la struttura terziaria di una proteina, ovvero la sua capacità di essere operativa, ci sono i legami ad idrogeno o le forze di Van der Waals. Quindi quando parliamo di struttura terziaria prendiamo dalla struttura stabilizzata da una conformazione nata a causa delle interazioni dei gruppi laterali degli amminoacidi.

Struttura quaternaria è la struttura di una proteina che è un progetto complesso, costituito da più subunità proteiche (per esempio l'emoglobina). Per struttura quaternaria si intende la struttura della proteina costituita da due o più catene polipeptidiche che interagiscono tra loro sempre tramite legami deboli o anche covalenti, ad esempio i ponti disolfuro tra amminoacidi appartenenti a differenti catene.

DIFFERENZA MIOGLOBINA E EMOGLOBINA:

la prima è monomerica e il suo compito è quello di assorbire ossigeno dall'emoglobina e cederlo ai tessuti quando necessario; la seconda è tetramerica e se non avesse tutte e quattro le sue subunità non riuscirebbe ad adempiere al suo lavoro a differenza della Mioglobina.