

Amminoacidi e proteine

Dagli amminoacidi come *building-blocks* alla struttura quaternaria

- Generalità
- Gli amminoacidi
- Il legame peptidico
- Proteine: struttura primaria, secondaria, terziaria, quaternaria
- Ripiegamento delle proteine *in vitro* e *in vivo*

- Glicoproteine
- Parete cellulare batterica: il peptidoglicano

Francesca Anna Scaramuzzo, PhD

Dipartimento di Scienze di Base e Applicate per l'Ingegneria - Centro di Nanotecnologie Applicate all'Ingegneria

francesca.scaramuzzo@uniroma1.it

Proteina: dal greco *próteios*, primario

Le Proteine:

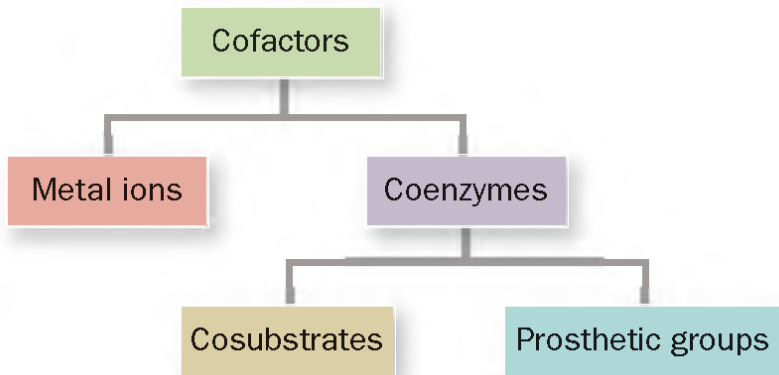
- Sono polimeri costituiti da unità dette *amminoacidi*
- Hanno varietà di struttura e funzione

Funzioni delle Proteine:

- Funzione strutturale nelle cellule
- Catalisi di processi metabolici
- Regolazione e monitoraggio delle condizioni intra- ed extra-cellulari

Metodi di funzionamento delle Proteine:

- Interazioni elettrostatiche
- Interazioni deboli e legami di coordinazione
- Meccanismi cooperativi
- Associazione con piccole molecole dette **cofattori**



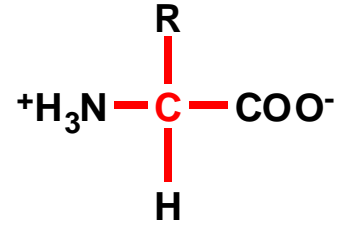
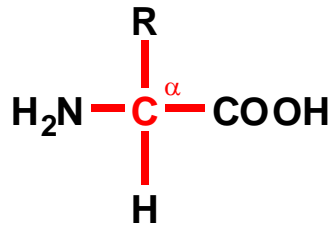
Ioni metallici (necessità tracce nella dieta, tossicità di alcuni metalli pesanti)

Cosubstrati (e.g. NAD⁺, associazione transitoria)

Gruppi prostetici (e.g. eme, associazione permanente)

Gli Amminoacidi

- Nelle proteine ci sono 20 amminoacidi (aa) *standard*
- Esistono amminoacidi non standard con ruoli biologici fondamentali
- α -amminoacidi: i sostituenti sono sullo stesso atomo di C (ad eccezione della Pro)
- Si presentano in forma zwitterionica (ioni dipolari)



DOMANDA: Perché gli amminoacidi si presentano in forma zwitterionica a pH fisiologico?

$$\text{pK}_1 \approx 2,2$$

$$\text{pK}_2 \approx 9,4$$

Gli Amminoacidi: proprietà acido-base

- Possiedono almeno due gruppi acido-base
- I due valori di pK sono molto diversi
- Vale l'equazione di Henderson-Hasselbach

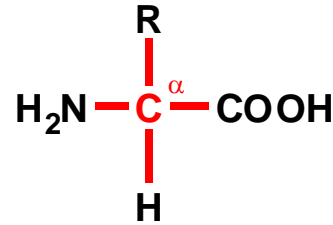
$$\text{pH} = \text{pK} + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$

Punto isoelettrico: pH a cui la molecola non presenta cariche nette

$$\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{pK}_i + \text{pK}_j)$$

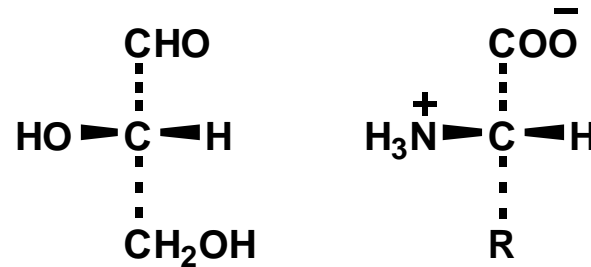
DOMANDA: Che andamento ha la curva di titolazione di un aa (senza catene laterali cariche)?

Gli Amminoacidi: Stereochimica

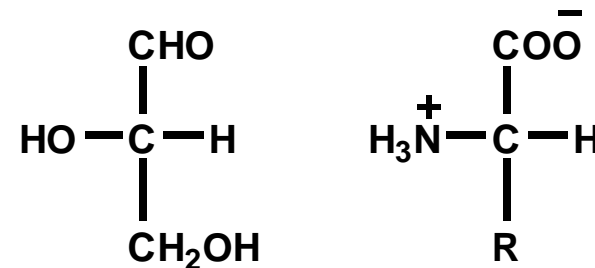


- Agli amminoacidi si applica la convenzione di Fisher per la configurazione dei centri asimmetrici

Formule geometriche



Proiezioni di Fisher

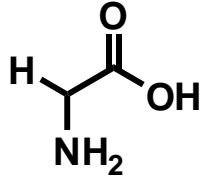


L-gliceraldeide

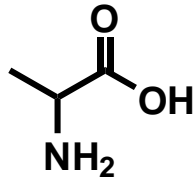
L- α -amminoacido

- Le proteine sono costituite da amminoacidi a configurazione L
- D-amminoacidi sono presenti in peptidi batterici e pareti cellulari batteriche

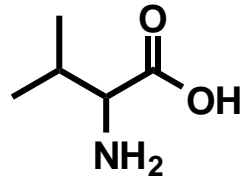
Gli Amminoacidi



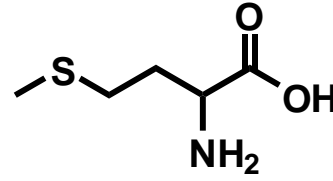
Glicina (Gly, G)



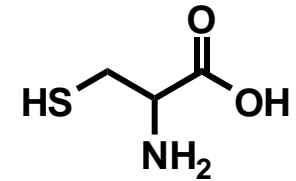
Alanina (Ala, A)



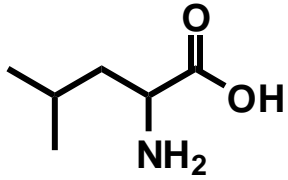
Valina (Val, V)



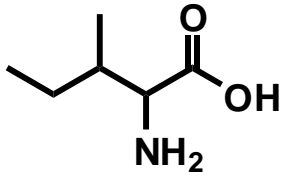
Metionina (Met, M)



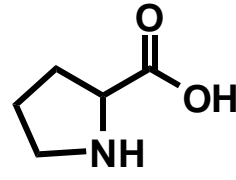
Cisteina (Cys, C)



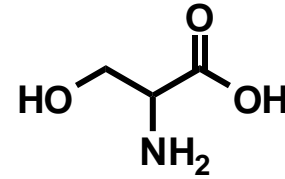
Leucina (Leu, L)



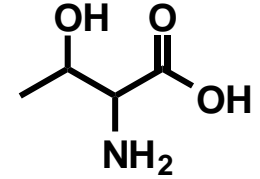
Isoleucina (Ile, I)



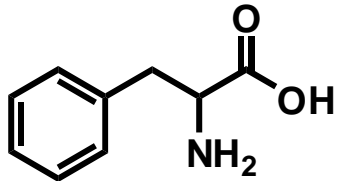
Prolina (Pro, P)



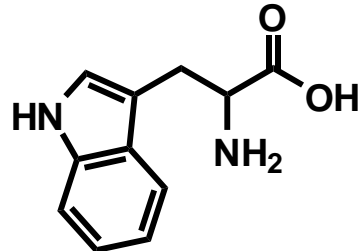
Serina (Ser, S)



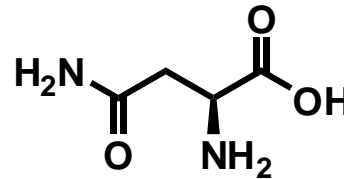
Treonina (Thr, T)



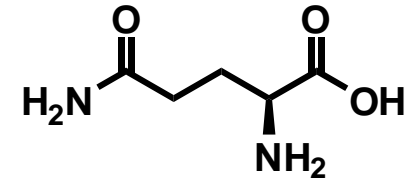
Fenilalanina (Phe, F)



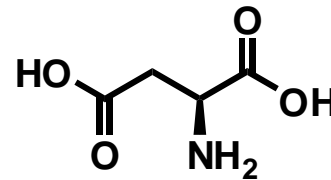
Triptofano (Trp, W)



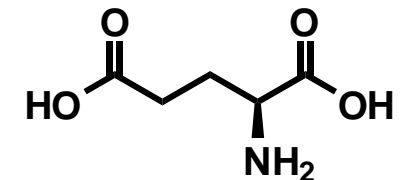
Asparagina (Asn, N)



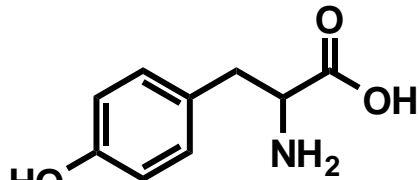
Glutammina (Gln, Q)



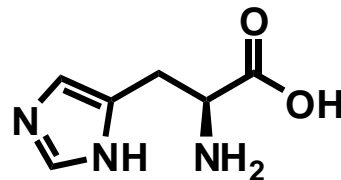
Acido Aspartico (Asp, D)



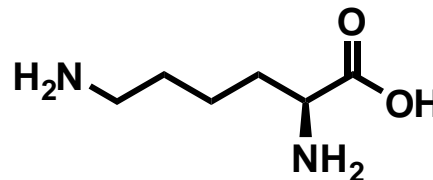
Acido Glutammico (Glu, E)



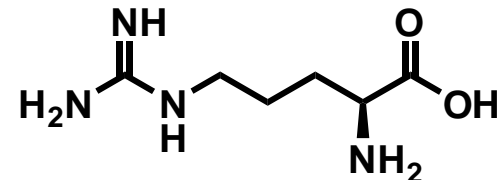
Tirosina (Tyr, Y)



Istidina (His, H)

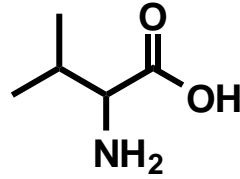


Lisina (Lys, K)

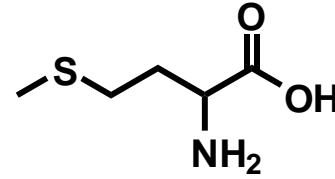


Arginina (Arg, R)

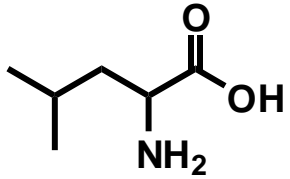
Gli Amminoacidi



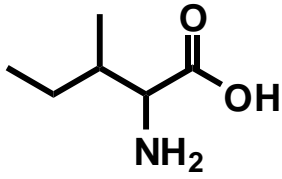
Valina (Val, V)



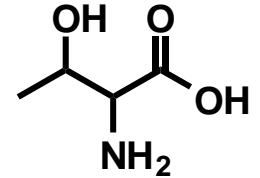
Metionina (Met, M)



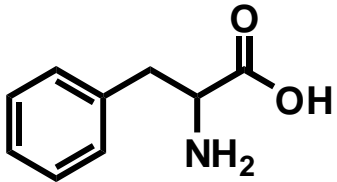
Leucina (Leu, L)



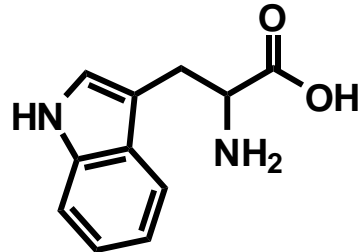
Isoleucina (Ile, I)



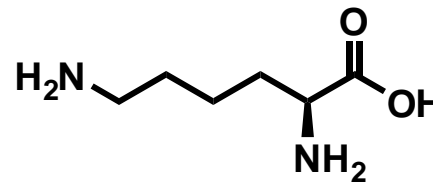
Treonina (Thr, T)



Fenilalanina (Phe, F)

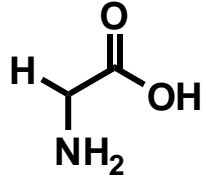


Triptofano (Trp, W)

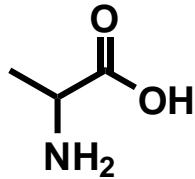


Lisina (Lys, K)

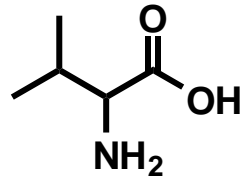
Gli Amminoacidi



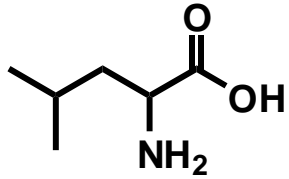
Glicina (Gly, G)



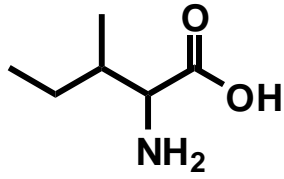
Alanina (Ala, A)



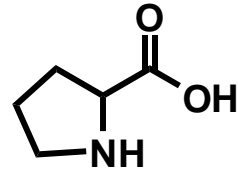
Valina (Val, V)



Leucina (Leu, L)



Isoleucina (Ile, I)

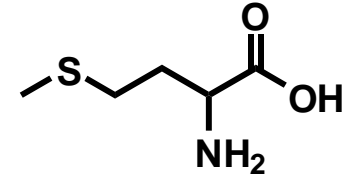
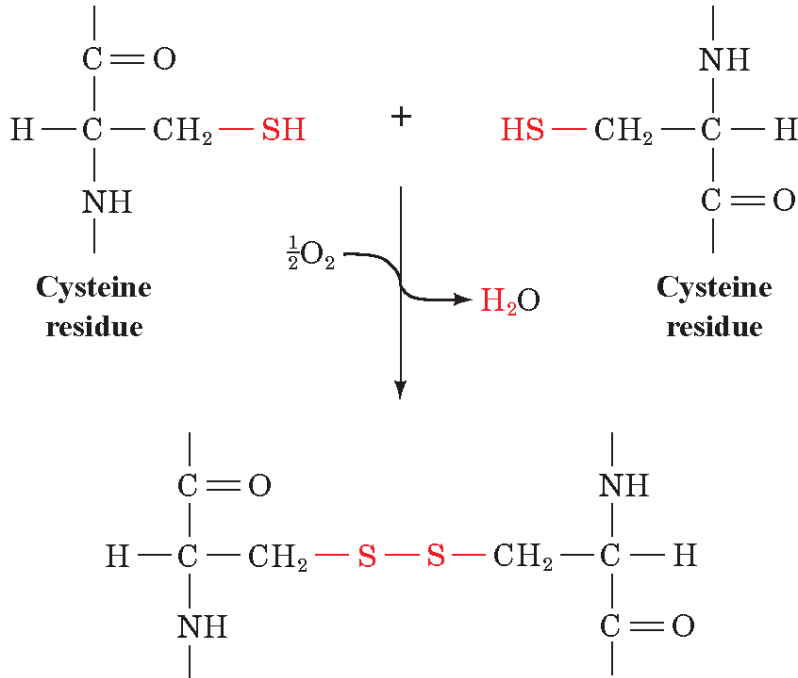


Prolina (Pro, P)

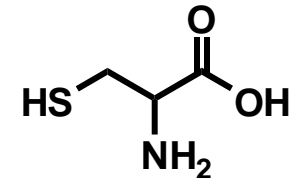
- Aa alifatici
- Catene laterali non polari
- Gly non chirale
- Pro contiene un gruppo amminico secondario

Gli Amminoacidi

- Contengono S in catena laterale
- Cys può formare ponti disolfuro (Cistina)

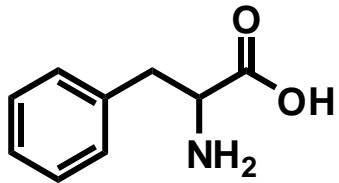


Metionina (Met, M)

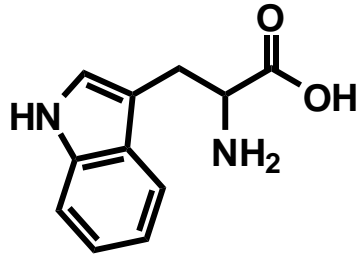


Cisteina (Cys, C)

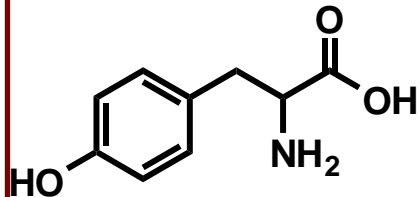
Gli Amminoacidi



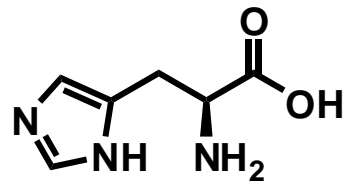
Fenilalanina (Phe, F)



Triptofano (Trp, W)



Tirosina (Tyr, Y)

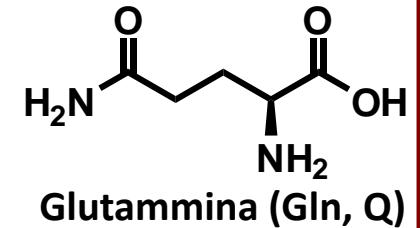
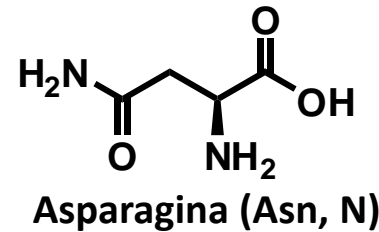
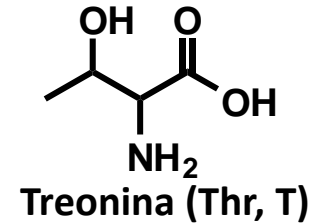
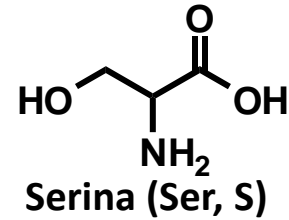


Istidina (His, H)

- Aa aromatici
- Phe non polare
- Tyr e Trp moderatamente polari
- His fortemente polare
- Assorbimento UV

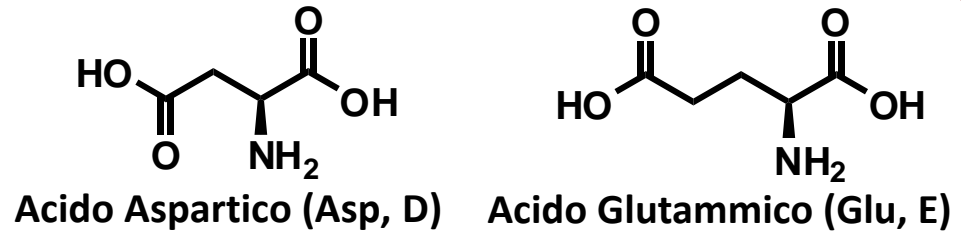
Gli Amminoacidi

- Aa neutri
- Ser e Thr hanno gruppo -OH
- Asn e Gln hanno gruppi carbamidici



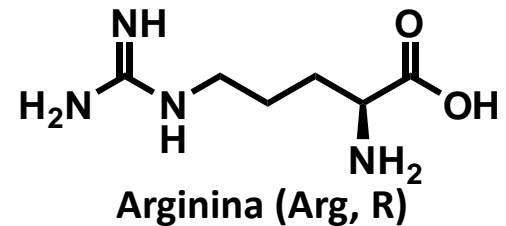
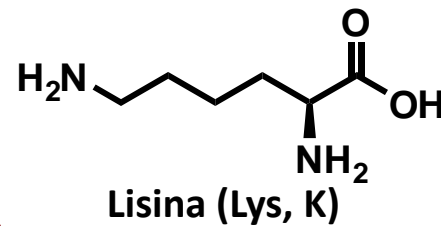
Gli Amminoacidi

- Aa acidi (completamente deprotonati a pH fisiologico)



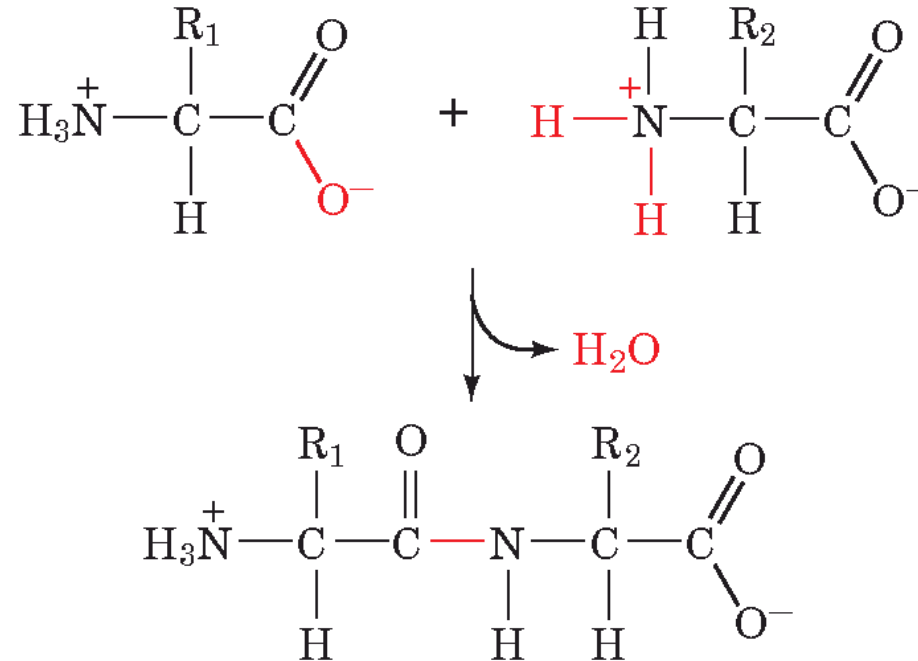
Gli Amminoacidi

- Aa basici (completamente protonati a pH fisiologico)



Il legame peptidico

Legame tra due amminoacidi



- Reazione di condensazione tra due aa con eliminazione di una molecola di acqua
- Legame ammidico
- In un polipeptide, tutti i residui amminoacidici sono impegnati in due legami peptidici, a parte gli aa N-terminale e C-terminale

Struttura Primaria

Sequenza amminoacidica della/delle sue catene polipeptidiche

DOMANDA: Dato che gli aa possibili sono 20, quante sequenze sono possibili per una proteina con n amminoacidi?

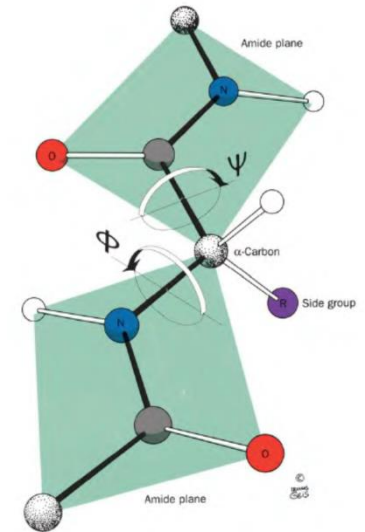
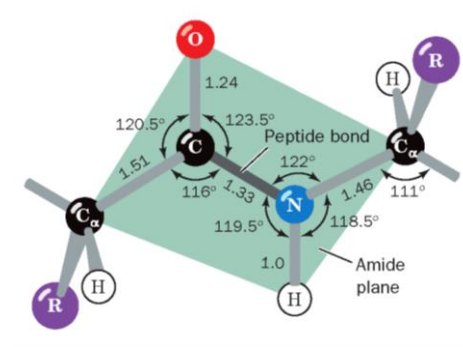
- In genere le proteine contengono almeno 40 residui
- Mediamente le proteine contengono tra i 100 e i 1000 aa
- I 20 aa standard non sono tutti presenti con la stessa frequenza nelle proteine
- Le caratteristiche delle proteine dipendono più dalla sequenza degli aa che della composizione amminoacidica in sé

– Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)

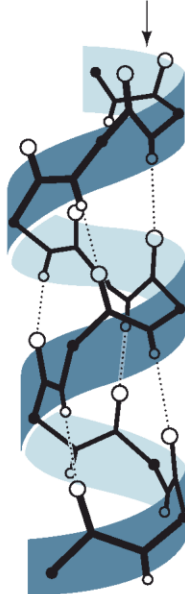
Struttura Secondaria

Disposizione spaziale degli atomi dello scheletro del polipeptide (senza considerare le catene laterali)

- La conformazione dello scheletro può essere descritta dagli angoli di torsione (angoli diedri) intorno ai legami di ogni residuo



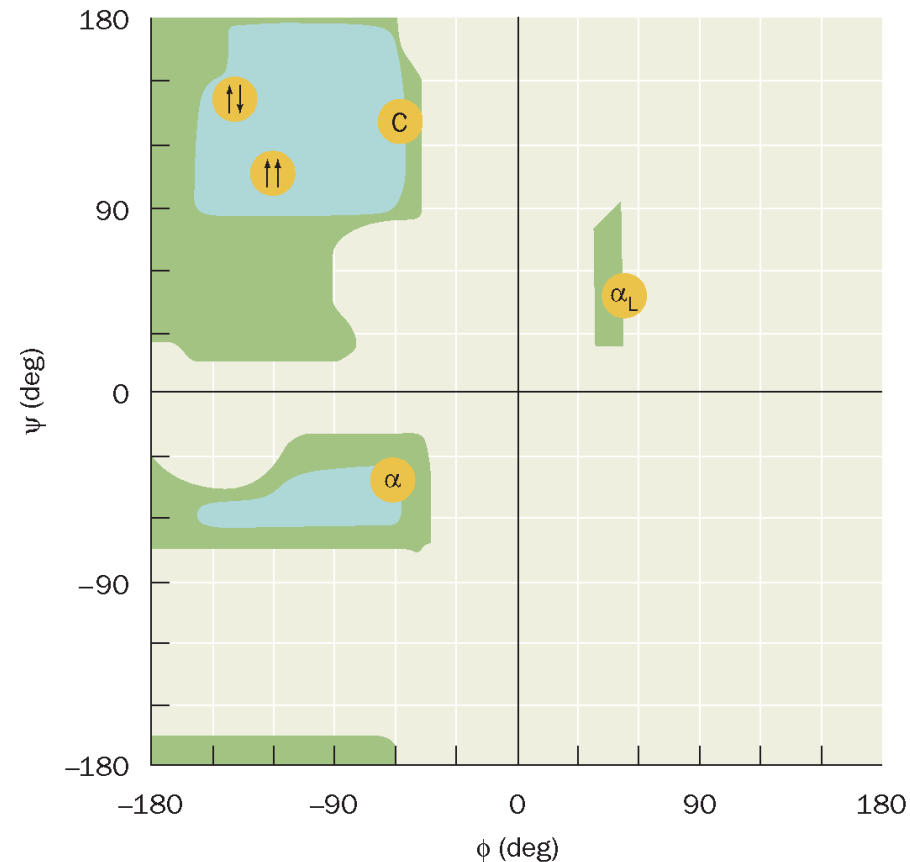
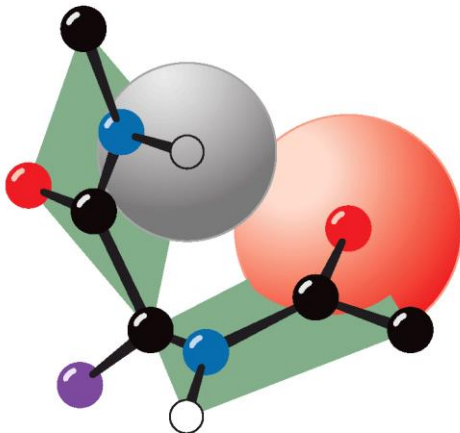
- Lys - Ala - His - Gly - Lys - Lys - Val - Leu - Gly - Ala -
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Struttura Secondaria

Disposizione spaziale degli atomi dello scheletro del polipeptide
(senza considerare le catene laterali)

- I valori degli angoli diedri si determinano sperimentalmente
- I valori degli angoli diedri devono essere tali per cui le distanze tra gli atomi devono essere maggiori della corrispondente distanza di Van der Waals
- I valori degli angoli diedri permessi sono raccolti nel *plot di Ramachandran*



Struttura Secondaria

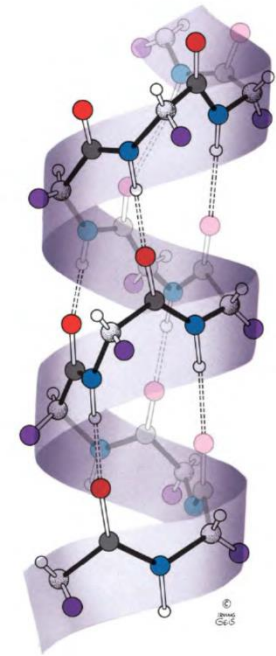
Disposizione spaziale degli atomi dello scheletro del polipeptide
(senza considerare le catene laterali)

Strutture secondarie regolari: hanno residui con valori di angoli diedri che si ripetono

α – elica
Foglietti β

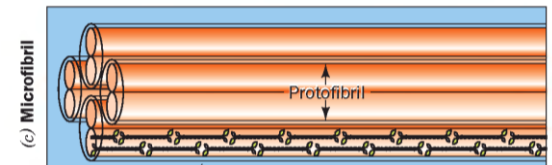
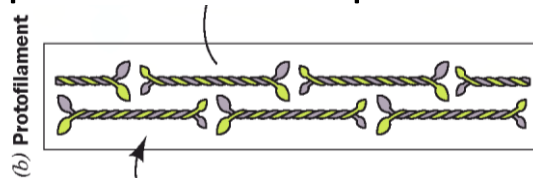
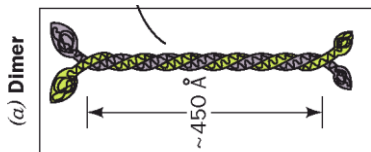
α -elica:

- Scoperta da Pauling nel 1951
- Destrorsa
- 3,6 residui per giro
- Passo (distanza tra due giri) di 5,4 Å
- Stabilizzata da un elevato numero di legami H intracatena



Esempio:

- α -cheratina: proteina componente strati epidermici cornei dei mammiferi



Struttura Secondaria

Disposizione spaziale degli atomi dello scheletro del polipeptide
(senza considerare le catene laterali)

Strutture secondarie regolari: hanno residui con valori di angoli diedri che si ripetono

α – elica
Foglietti β

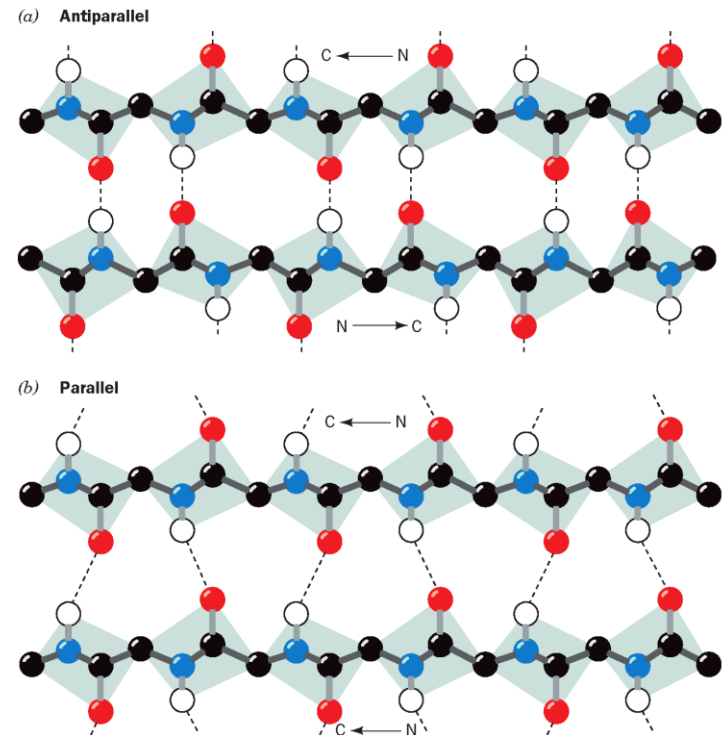
Foglietto β :

- Scoperto da Pauling e Corey nel 1951
- Stabilizzati da un elevato numero di legami H intercatena
- Antiparallelo: le catene affiancate corrono in direzioni opposte
- Parallelo: le catene affiancate corrono nella stessa direzione

Esempio:

- Fibroina della seta: proteina costituita da foglietti β antiparalleli

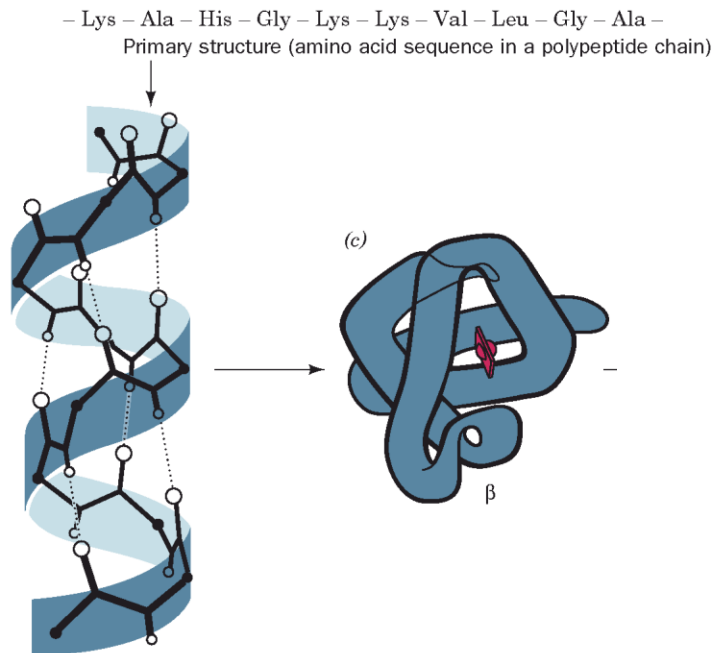
Gly-Ser-Gly-Ala- Gly- Ala



Struttura Terziaria

Struttura tridimensionale di un intero polipeptide

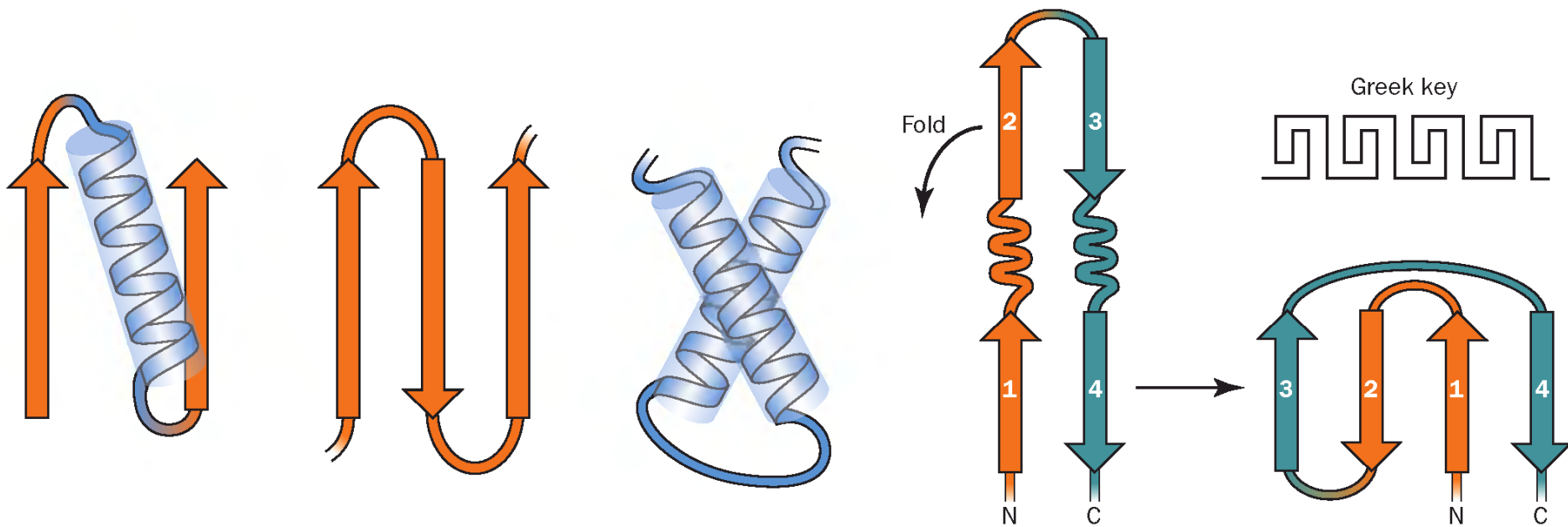
- Gli elementi della struttura secondaria possono ripiegarsi in diversi modi
- Si specifica la posizione di tutti gli atomi
- Tecniche utili: raggi-X, NMR
- Correlazione struttura terziaria/attività biologica



Struttura Terziaria

Struttura tridimensionale di un intero polipeptide

- Nelle proteine globulari, gli aa sono distribuiti nello spazio in base alla loro polarità
- Gli elementi di struttura secondaria possono combinarsi in vari modi (motivi)
- I motivi hanno funzione strutturale o funzionale

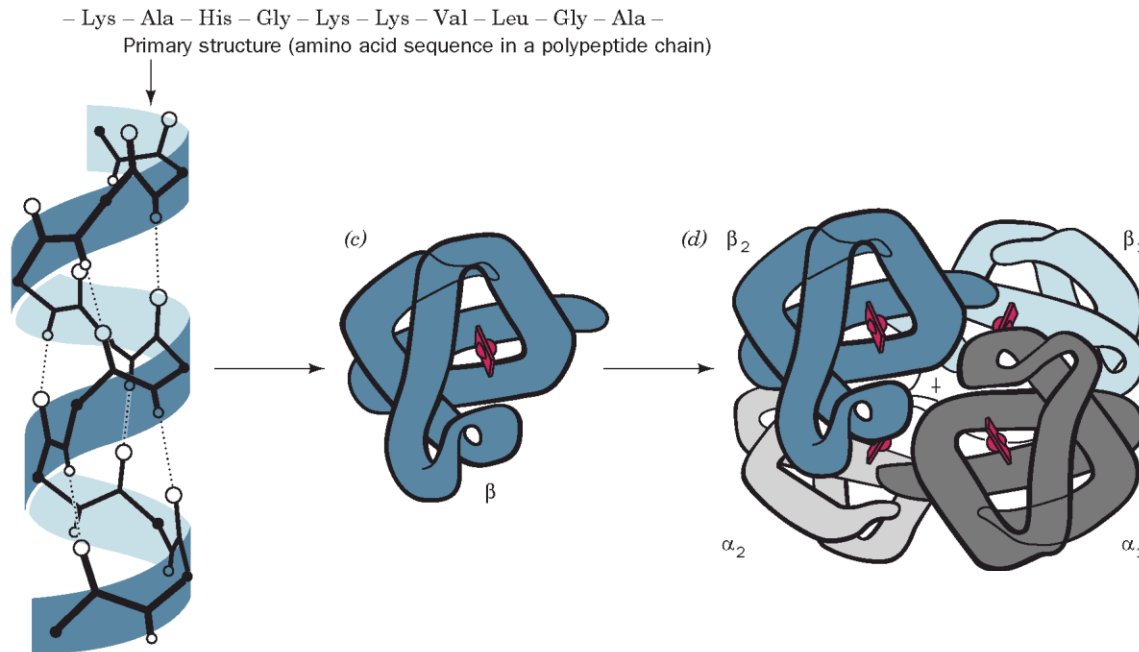


Struttura Quaternaria

Disposizione spaziale delle subunità

- Proteine molto grandi formate da diverse subunità
- Subunità associate in modo non-covalente
- Subunità disposte in modo simmetrico

DOMANDA: Quali sono i vantaggi di un enzima con molte subunità?



Ripiegamento delle Proteine

Le proteine sono stabilizzate da:

- Effetto idrofobico
- Interazioni elettrostatiche e legami H
- Legami chimici trasversali

Le proteine possono denaturarsi (perdere la loro conformazione nativa):

- Effetto T
- Variazione di pH
- Detergenti
- Agenti caotropici, solventi non acquosi

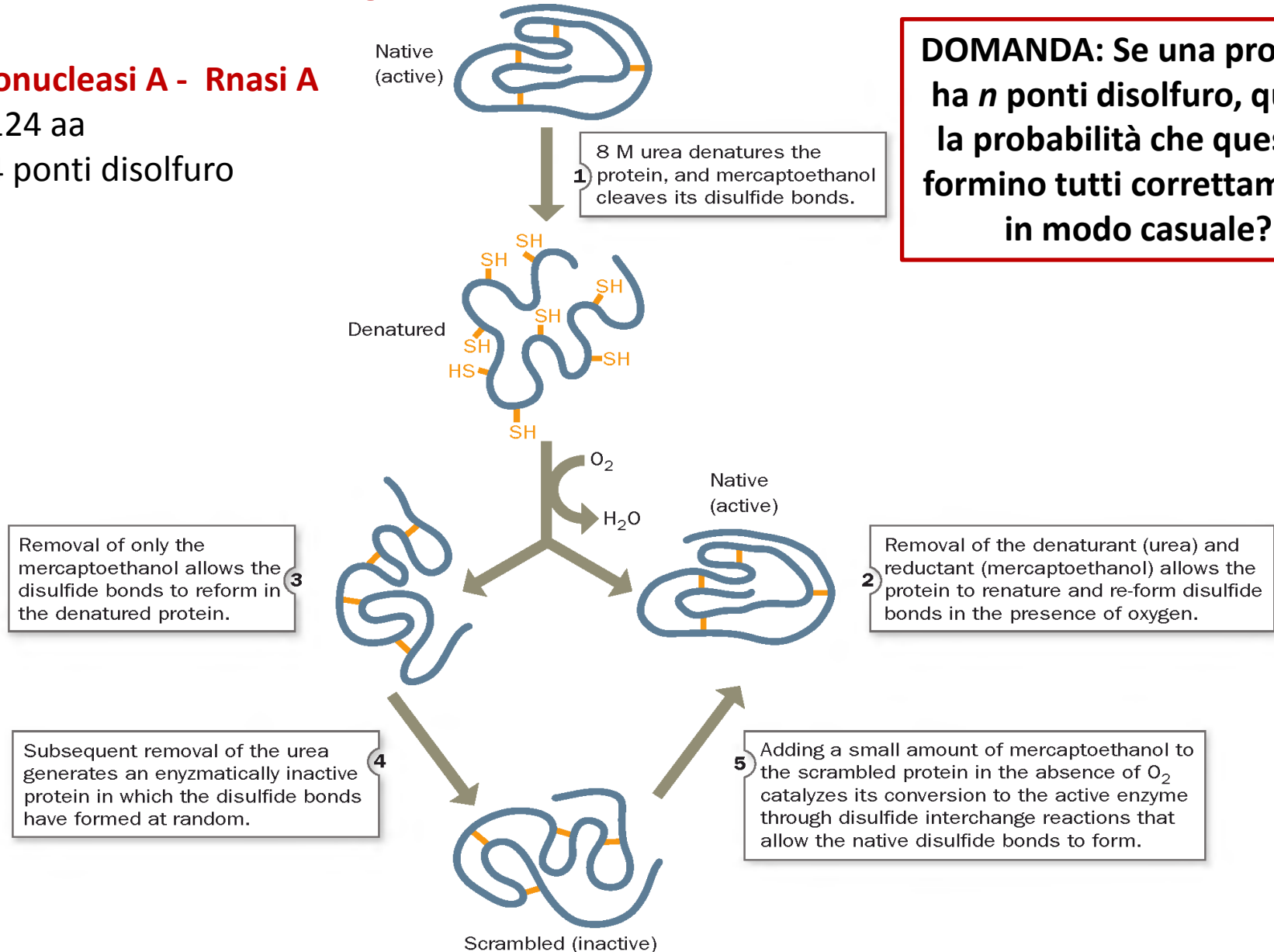
La denaturazione è reversibile

L'esperienza di Anfinsen

Ribonucleasi A - Rnasi A

- 124 aa
- 4 ponti disolfuro

DOMANDA: Se una proteina ha n ponti disolfuro, qual è la probabilità che questi si formino tutti correttamente in modo casuale?



La struttura primaria di una proteina è in grado di dirigere la costruzione dello stato nativo

Ripiegamento delle Proteine

La struttura primaria di una proteina è in grado di dirigere la costruzione dello stato nativo

Per una proteina di n residui, i valori degli angoli diedri sono 2^n . Se le conformazioni stabili sono 3 per ogni coppia di angoli, le conformazioni possibili sono $3^{2n} \approx 10^n$. Se la proteina esplora una conformazione ogni 10^{-13} s, il tempo totale è

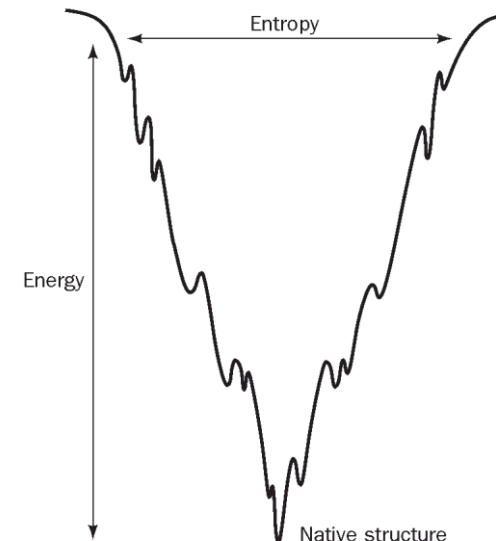
$$t = 10^n \cdot 10^{-13}$$

Ovviamente la proteina non esplora tutte le conformazioni possibili.

Le proteine si ripiegano in maniera gerarchica:

- Ripiegamento segmenti struttura secondaria
- Collasso idrofobico (molten globule)
- Formazione sottodomini
- Formazione domini

Processo cooperativo

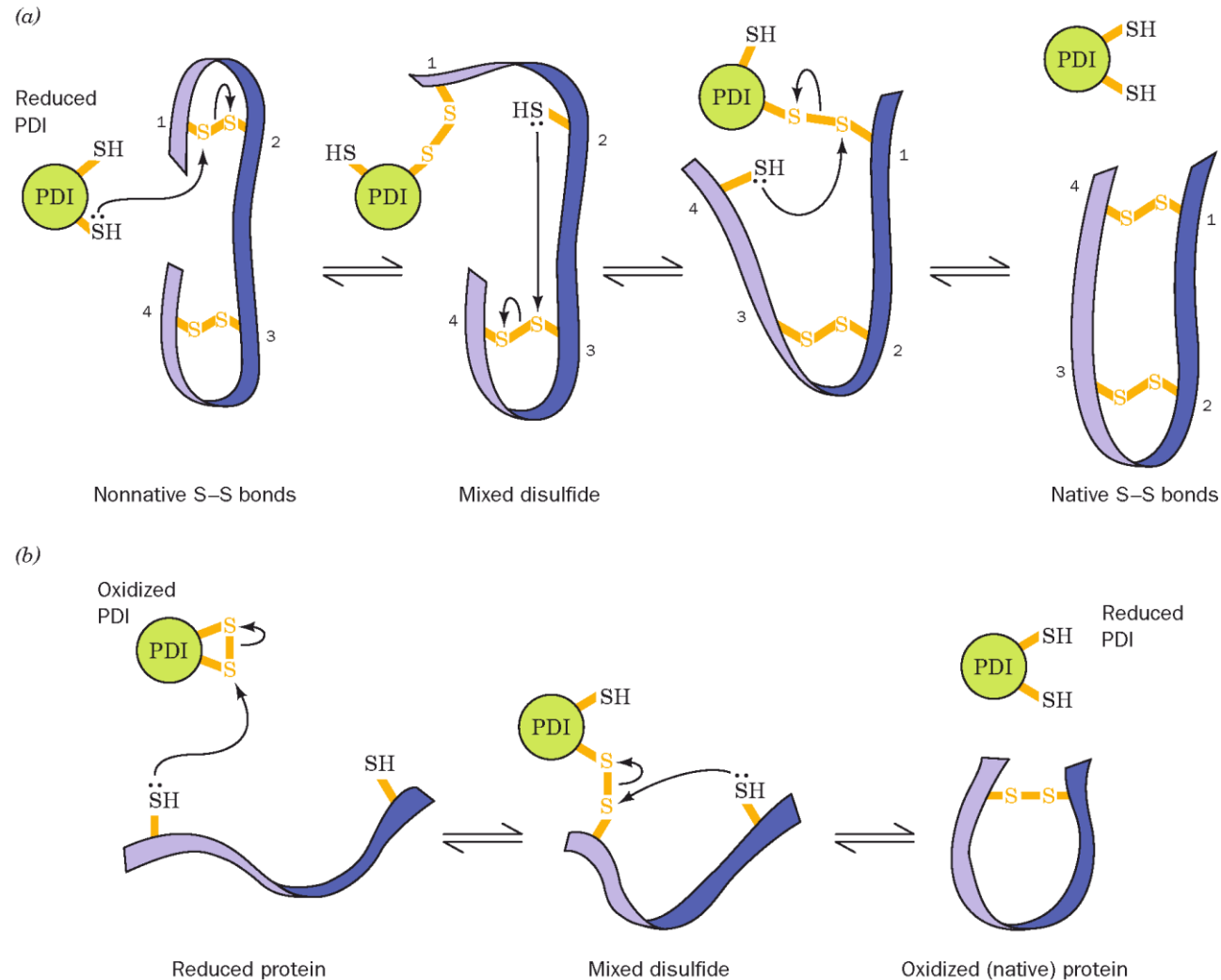


Ripiegamento delle proteine in vivo

In vivo le proteine si ripiegano più rapidamente che in vitro

Disolfuro isomerasi delle proteine

- Enzima che catalizza il processo di interscambio di ponti disolfuro
- Interagisce con proteine non ripiegate tramite interazioni idrofobiche



Ripiegamento delle proteine in vivo

In vivo le proteine si ripiegano più rapidamente che in vitro

- Le proteine iniziano il ripiegamento durante la loro sintesi

Chaperoni molecolari

- Proteine essenziali che si legano alle catene polipeptidiche totalmente o parzialmente ripiegate per impedire l'associazione non corretta di segmenti idrofobici
- Sono detti anche proteine da shock termico perché maggiormente presenti ad alte T

Hsp70

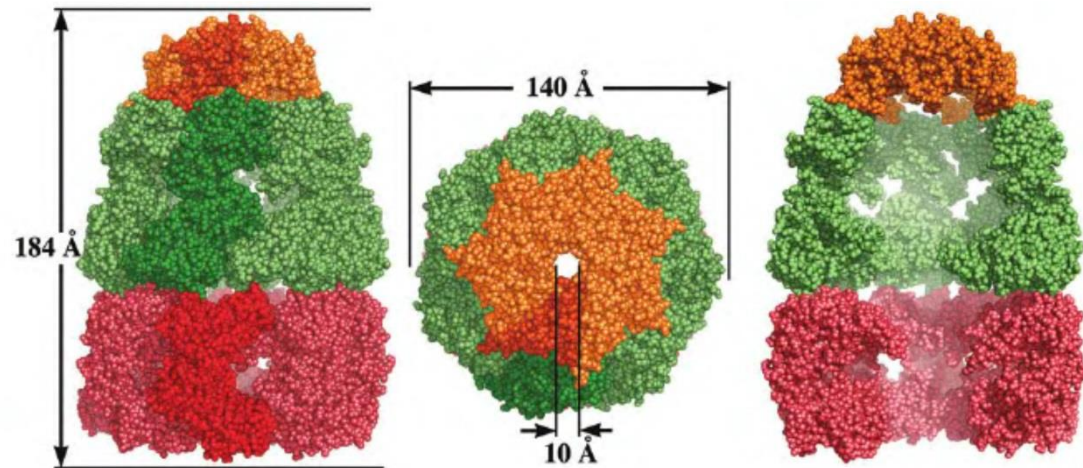
- 70kDa
- Impedisce il ripiegamento prematuro

Chaperonina Hsp60 (GroEL)

- 14 · 60kDa
- Si organizza in 2 cilindri sovrapposti di 7 subunità ciascuno

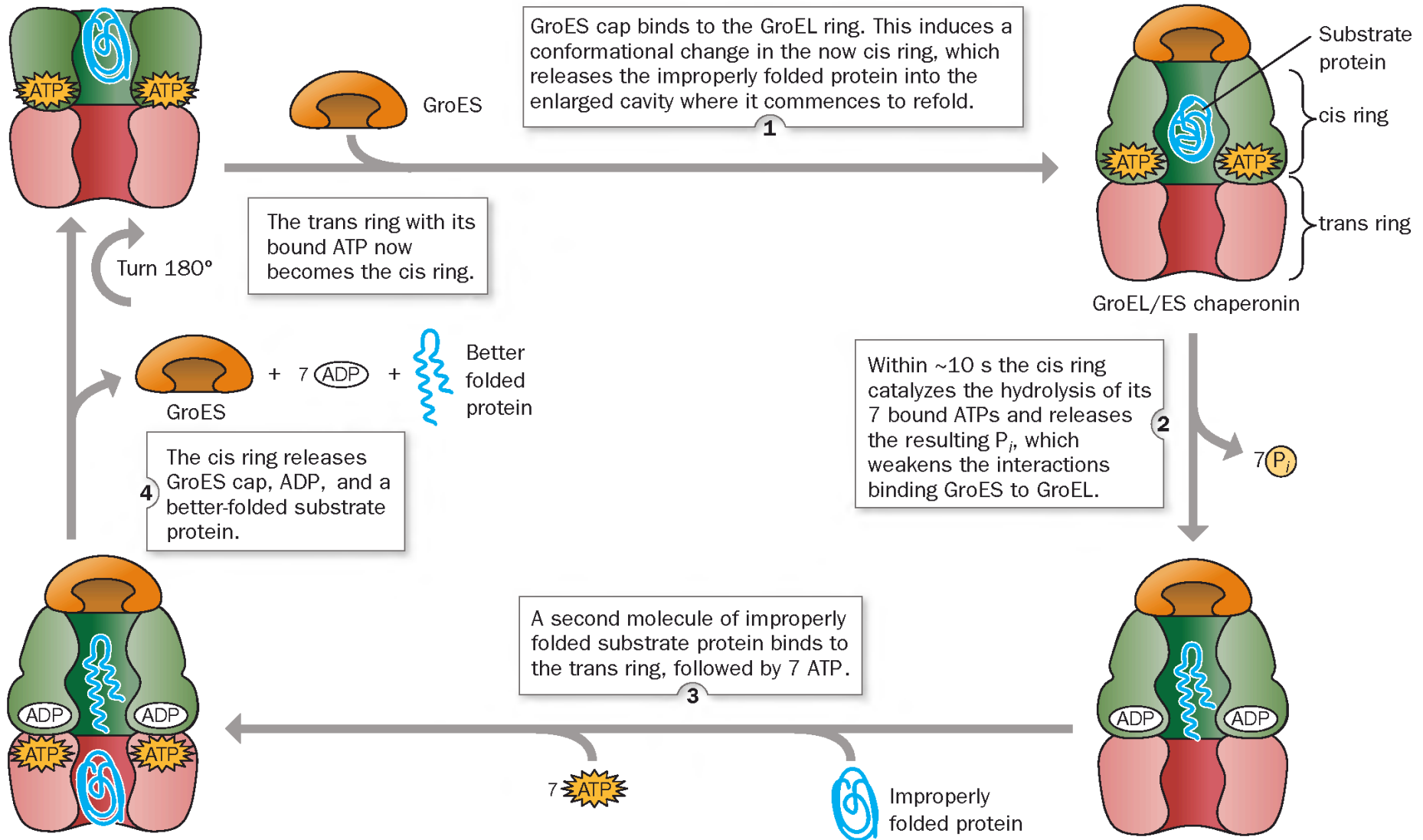
Chaperonina Hsp10 (GroES)

- 7 · 10kDa
- Si organizza in struttura a forma di cupola



GroEL e GroES formano un complesso il cui interno è un ambiente protetto per il ripiegamento delle proteine . Il complesso favorisce il ripiegamento per idrolisi di ATP

Ripiegamento delle proteine in vivo



Glicoproteine

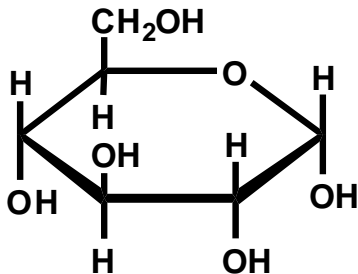
- La maggior parte delle proteine è glicosilata
- Le catene di carboidrati delle proteine sono sintetizzate per via enzimatica e poi legate covalentemente alla proteina
- Le glicoproteine hanno **microeterogeneità**

Particolari glicoproteine

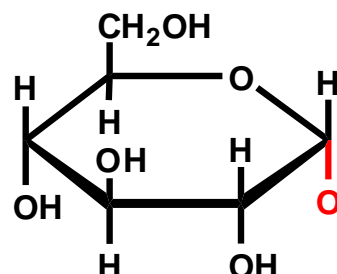
- Proteoglicani
- Proteine di membrana unite ad oligosaccaridi con legami *N*-glicosidici
- Proteine di membrana unite ad oligosaccaridi con legami *O*-glicosidici
- Peptidoglicani

Legame glicosidico: legame tra C anomero e O di un alcol

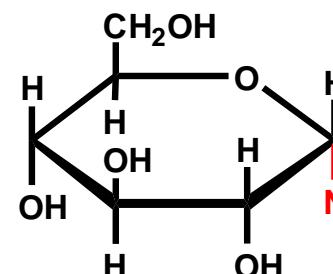
Legame *N*-glicosidico: legame tra C anomero e un gruppo amminico



α -D-glucosio



Legame
O-glicosidico



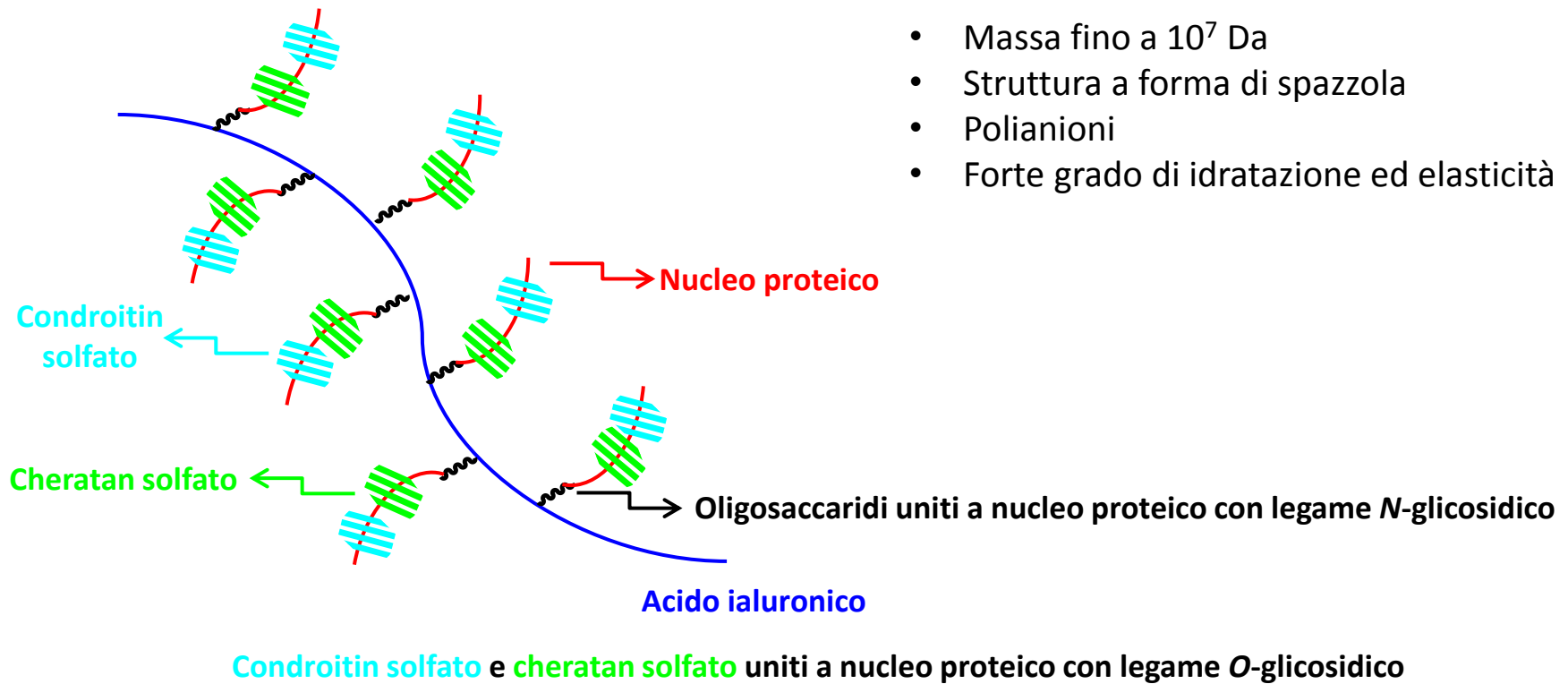
Legame
N-glicosidico

Glicoproteine

Particolari glicoproteine

- Proteoglicani
- Proteine di membrana unite ad oligosaccaridi con legami *N*-glicosidici
- Proteine di membrana unite ad oligosaccaridi con legami *O*-glicosidici
- Peptidoglicani

Macromolecole composte da proteine e glicosamminoglicani della matrice extracellulare (es. cartilagine)

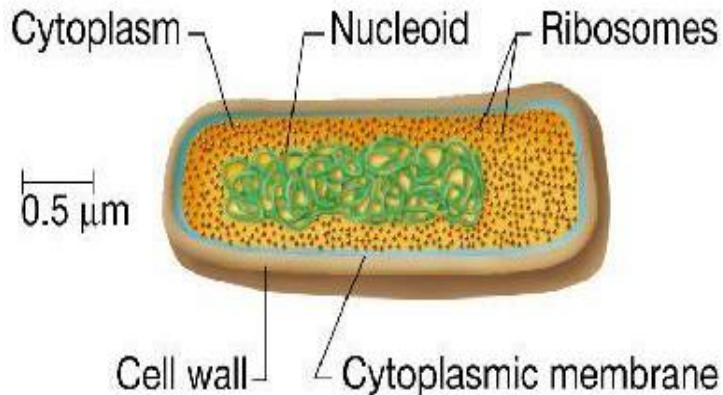


La parete cellulare batterica

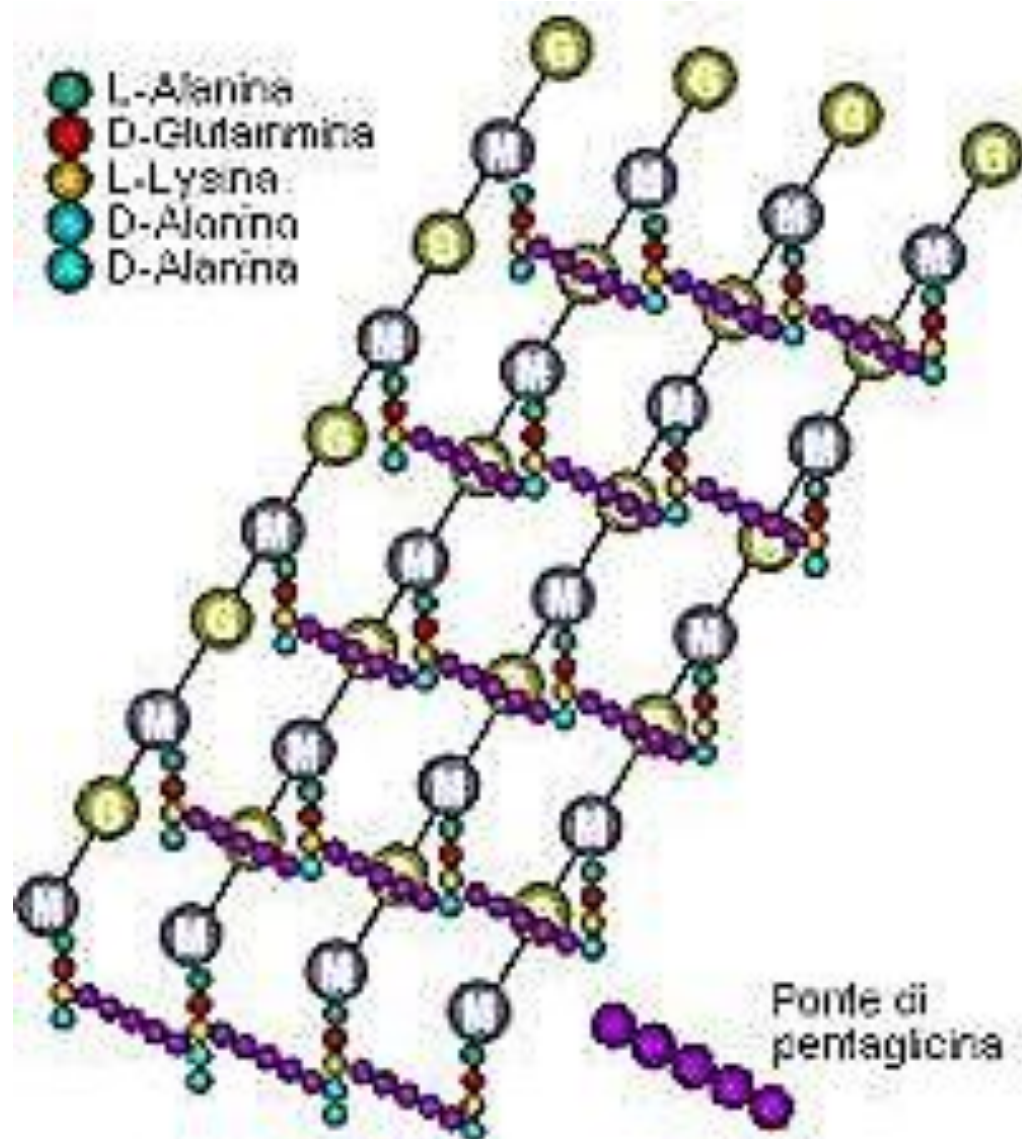
- Involucro polisaccaridico posto all'esterno della membrana citoplasmatica in quasi tutti i batteri
- Spessore variabile

Funzioni

- Protezione dai danni di tipo osmotico
- Mantiene la forma del batterio
- Protegge da offese meccaniche
- Funzione immunitaria

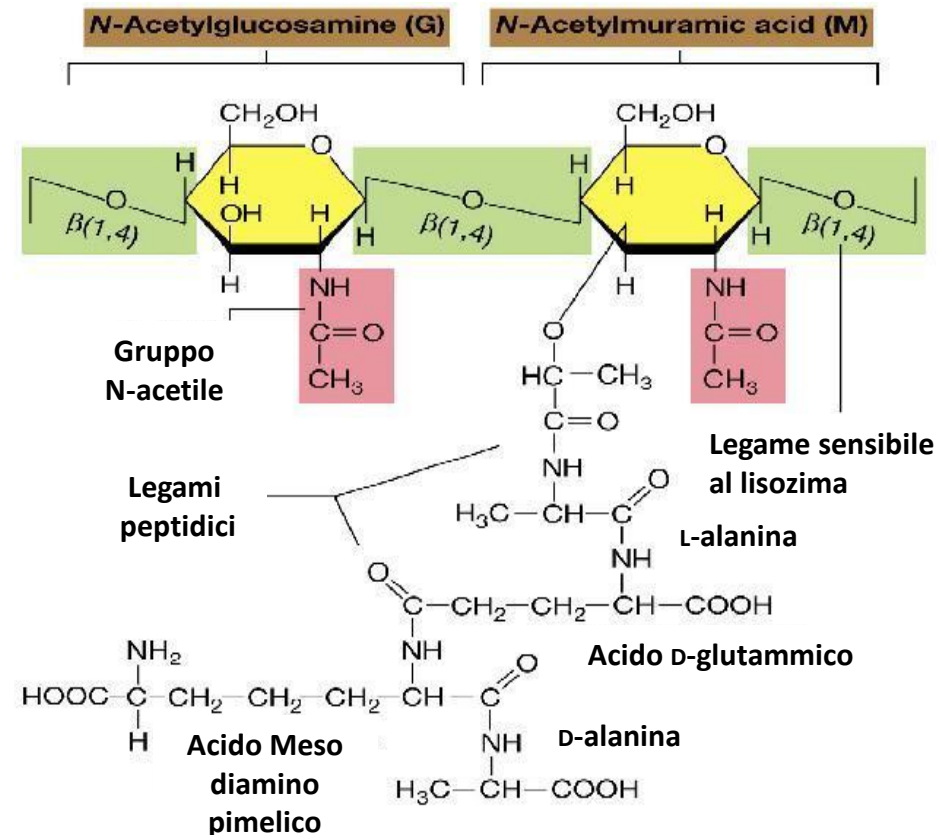
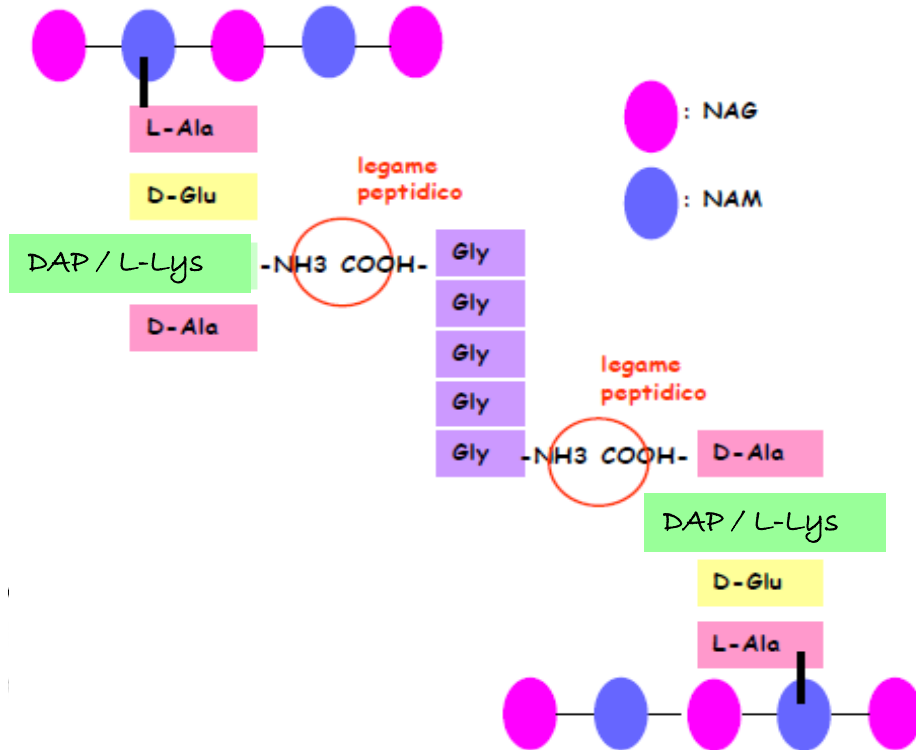


Il suo componente principale è il peptidoglicano (mureina)



Il peptidoglicano

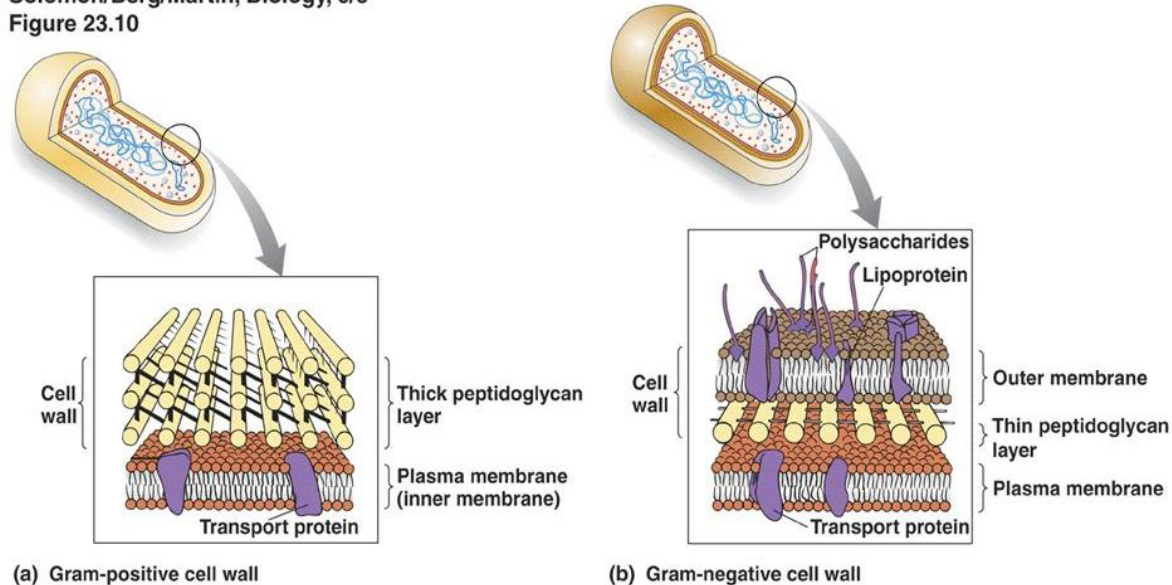
- Polimero
- Subunità: N-acetilglucosammina (G) + acido N-acetilmuramico (M) (amminozuccheri) uniti da legame β -1,4-glicosidico + catena peptidica
- Acido pimelico alternativo a lisina
- Alcuni aa hanno configurazione D
- Tetrapeptidi legati direttamente o tramite pentaglicina
- Altamente resistente (configurazione aa, legame β -1,4-glicosidico, alta direzionalità, legami H)



Batteri Gram+ e Gram-

- Due famiglie di batteri
- Differenze in parete esterna
- Diversa reazione con specifici coloranti
- Diversa resistenza ad antibiotici

Solomon/Berg/Martin, Biology, 6/e
Figure 23.10



Colorazione di Gram

- Cristalvioletto + KI: complesso liposolubile
- Lavaggio con alcol
- Gram +: la parete di peptidoglicano si disidrata, la porosità diminuisce e il complesso resta imprigionato
- Gram -: l'alcol scioglie i lipidi della membrana esterna aumentando la porosità delle pareti e permettendo l'estrazione del complesso

Resistenza ad antibiotici

- Gli antibiotici β -lattamici inibiscono la sintesi peptidoglicanica e bloccano la sintesi della parete batterica (letali per i batteri in fase di proliferazione)

Formola di struttura della Penicillina G

