

BIOCHIMICA

Fondamenti di biochimica

Modulo 1. Fondamenti di biologia cellulare:

Circa 14 miliardi di anni fa l'universo ebbe origine con un'emissione di calore di particelle subatomiche; mentre 4 miliardi di anni fa comparve la vita.

Gli organismi viventi hanno delle caratteristiche importanti:

1. hanno un altro grado di complessità chimica di organizzazione microscopico
2. hanno sistemi capaci di estrarre trasformare ed utilizzare l'energia dell'ambiente
3. hanno funzioni specifiche di ogni componente cellulare
4. meccanismi per percepire e rispondere ad alterazioni dell'ambiente
5. capacità di autoriprodursi
6. capacità di cambiare nel tempo attraverso un'evoluzione generale

Capitolo 1. Cellule unità strutturali

Tutti i tipi di cellule hanno alcune caratteristiche strutturali comuni. La membrana plasmatica separa il contenuto della cellula dall'esterno. Il contenuto cellulare è racchiuso all'interno della membrana. Il citoplasma è composto da una soluzione acquosa, il citosol e da varie particelle in sospensione. Questi componenti particolari sedimentano quando il citoplasma viene centrifugato. Ciò che rimane come soprannatante è il citosol.

Le particelle in sospensione sono strutture sopramolecolari come i ribosomi e proteasomi, mentre il citosol è formato da una soluzione di enzimi e molecole di RNA oltre ai componenti con cui queste molecole vengono sintetizzate, piccole molecole detti metaboliti e coenzimi. Tutte le cellule hanno un nucleo in cui viene replicato il genoma, mentre il nucleo degli eucarioti è racchiuso da una doppia membrana, i microrganismi sono sprovvisti di nucleo e venivano un tempo raggruppati in un unico gruppo detto procarioti.

Capitolo 2. Diffusione e dimensioni cellulari

La maggior parte delle cellule è microscopica ed invisibile ad occhio nudo. Il limite superiore della dimensione della cellula è legato alla velocità di diffusione delle molecole di soluto nei sistemi acquosi. Poiché il rapporto tra la sua area superficiale ed il volume è grande ogni parte del citoplasma è raggiungibile dall'ossigeno che diffonde dall'esterno all'interno della cellula stessa. All'aumentare della dimensione di una cellula il rapporto superficie volume diminuisce.

Il metabolismo che richiede ossigeno diventa impossibile quando la cellula si ingrandisce oltre una certa misura, ponendo un limite teorico alla dimensione della cellula.

Capitolo 3. I tre domini

Tutti gli organismi viventi ricadono in uno dei tre grandi gruppi: i domini. Tre rami dell'albero evolutivo della vita che prende origine da un antenato comune. Due di questi gruppi sono formati da organismi unicellulari e sono i batteri o archea o archeobatteri. I batteri vivono nel terreno, sulla superficie dell'acqua e nei tessuti di altri organismi viventi o in decomposizione. Molti archea vivono in condizioni estreme, per esempio acque saline sorgenti calde, paludi molto acide e nella profondità dell'oceano.

Tutti gli organismi eucarioti raggruppati nel terzo dominio, si sono voluti dallo stesso ramo da cui deriva archea. Negli habitat aerobici alcuni organismi ottengono l'energia dal trasferimento degli

BIOCHIMICA

elettroni, dalle molecole combustibili all'ossigeno in una cellula; in quelli anaerobici (privi di ossigeno) i microrganismi sono adattati ed ottengono energia dal trasferimento di elettroni al nitrato, al solfato e all'anidride carbonica.

Capitolo 4. Fonti di energia

Esistono due categorie basate sulle fonti di energia i fototrofi che assorbono la luce solare e i chemioautotrofi che traggono l'energia dall'ossidazione dei combustibili chimici. Alcuni chemioautotrofi, ossidano combustibili inorganici come il solfuro in zolfo. I fototrofi possono essere suddivisi in autotrofi, che ottengono tutto il carbonio di cui hanno bisogno dall'anidride carbonica o eterotrofi, che ottengono il carbonio dei nutrienti organici.

Capitolo 5. Similarità e differenze tra i batteri e gli archea

Il batterio più studiato *Escherichia coli* è un ospite non patogeno del tratto intestinale dell'uomo e possiede una membrana esterna protettiva e una membrana interna che racchiude il citoplasma e i nucleotidi in nucleoidi. La membrana plasmatica e gli strati più esterni costituiscono l'involucro cellulare. Le membrane plasmatiche dei batteri sono formate da un doppio strato lipidico, in cui si trovano delle proteine, alcuni batteri gram + vengono chiamati così perché vengono colorati dalla soluzione di Gram ed hanno uno spesso strato di peptidoglicano all'esterno della membrana plasmatica ma non hanno una membrana esterna. I gram negativi hanno una membrana esterna formata da un doppio strato, dove sono inseriti lipopolisaccaridi complessi. Il citoplasma dell'*Escherichia coli* contiene 15000 ribosomi, il nucleotide contiene una singola molecola circolare di DNA ed il citoplasma contiene uno o più segmenti circolari di DNA di piccole dimensioni in plasmidi. I cianobatteri hanno un sistema di membrane interne specializzate per catturare l'energia della luce.

Capitolo 6. Cellule eucariotiche

Le tipiche cellule eucariotiche sono molto più grandi delle cellule batteriche, il loro diametro è compreso tra i 5 e i 100 micrometri. I caratteri distintivi sono il nucleo e vari organelli. Questi organelli comprendono, i mitocondri, il reticolo endoplasmatico, il complesso di Golgi, i perossisomi, i lisosomi, i vacuoli ed i cloroplasti.

Capitolo 7. Citoscheletro

Una rete tridimensionale di interconnessioni di filamenti proteici è il citoscheletro.

Le eucarioti hanno tre tipi principali di filamenti citoplasmatici, ovvero i filamenti di actina, i microtubuli ed i filamenti intermedi.

Ogni tipo di componente del citoscheletro è formato da subunità proteiche semplici. I filamenti si disaggregano e si riassociano in altri siti della cellula. Il sistema di endomembrane separa specifici processi metabolici e genera le superfici su cui avvengono le reazioni catalizzate da enzimi. L'escitosi, l'endocitosi ed i meccanismi di trasporto costituiscono le vie di comunicazione tra il citoplasma ed il mezzo circostante.

Le subunità monomeriche delle proteine degli acidi nucleici e dei polisaccaridi sono unite da legami covalenti. Nelle strutture sopramolecolari le macromolecole sono però tenute insieme da interazioni non covalenti tutte molto più deboli di legami covalenti.

Capitolo 8. Studi in vitro

BIOCHIMICA

Uno degli approcci sperimentali rivolti a chiarire i meccanismi dei processi biologici è quello di purificare le singole biomolecole in vitro, in modo da eliminare le interferenze esercitate dalle altre molecole. Esperimenti in vitro con gli enzimi purificati vengono condotti ad una concentrazione molto bassa; nella cellula invece, un enzima si trova immerso nel citosol è una specie di gel e alcuni di questi enzimi fanno parte dei complessi multienzimatici nei quali i reagenti passano da un'enzima all'altro. Quindi il citosol è molto affollato e la diffusione rallentata dall'evoluzione delle macromolecole. In poche parole ogni molecola probabilmente si comporta in modo diverso nelle cellule rispetto al comportamento in vitro

Modulo 2 Fondamenti di chimica

Capitolo 1. Gli elementi degli organismi viventi

I 4 elementi più abbondanti negli organismi viventi sono idrogeno ossigeno azoto e carbonio, e formano più del 99% della massa della maggior parte delle cellule. Gli elementi presenti in tracce rappresentano una minuscola frazione del peso del corpo umano.

Capitolo 2. Il carbonio: la base strutturale

Nella biologia di grande significato è la capacità del carbonio di legare in modo stabile fino a 4 atomi di carbonio nessun altro elemento chimico può formare una varietà così ampia di molecole diverse per grandezza forma e composizione. Le biomolecole possono essere considerate come derivati degli idrocarburi, in cui gli atomi di idrogeno sono sostituiti da una serie di gruppi funzionali che conferiscono proprietà caratteristiche alle molecole, formando diverse famiglie di composti organici. Esempi tipici sono i gruppi funzionali degli alcoli, delle ammine e degli acidi. Queste biomolecole sono polifunzionali perché contengono due o più gruppi funzionali.

Capitolo 3. Le piccole molecole

La fase acquosa di tutte le cellule contiene un migliaio di piccole molecole organiche diverse. L'insieme delle piccole molecole presenti in una data cellula in condizioni specifiche è definito metaboloma. La metabolomica è la caratterizzazione sistematica del metaboloma.

Capitolo 4. Le macromolecole

Molte biomolecole sono macromolecole cioè polimeri con peso molecolare superiore a 500 a 5000. I polimeri più corti sono detti oligomeri, le proteine, gli acidi nucleici e polisaccaridi sono macromolecole composte da monomeri con un peso molecolare pari o inferiore a 500. L'insieme di tutte le proteine funzionanti in una cellula è detto proteoma. La proteomica è la caratterizzazione sistematica della serie completa delle proteine presenti in determinate condizioni. Gli acidi nucleici sono polimeri di nucleotidi. Il genoma è l'intera sequenza di DNA nella cellula, mentre la genomica è la caratterizzazione comparativa della struttura dell'evoluzione e della funzione della mappatura del genoma.

I polisaccaridi, polimeri di zuccheri semplici, come il glucosio hanno funzione di riserva, componente strutturale o di elementi extracellulari. Il glicoma è costituito da tutte l'insieme delle sue molecole che contengono carboidrati. I lipidi hanno funzione di componenti strutturali di riserve di energie e di pigmenti. L'insieme delle molecole che contengono lipidi costituiscono il lipoma. Poiché la sequenza

BIOCHIMICA

di elementi costitutivi sono ricche di informazioni, le proteine e gli acidi nucleici sono detti anche macromolecole informative.

Capitolo 3. Struttura tridimensionale

Un composto contenente carbonio si trova comunemente sotto forma di stereoisomeri, molecole con gli stessi legami chimici ma diversa stereochimica, cioè diversa configurazione. La configurazione è determinata dalla presenza di doppio legame attorno ai quali non vi è libertà di rotazione. Un atomo di carbonio con 4 sostituenti diversi viene detto asimmetrico, viene chiamato centro chirale. Una molecola con un solo atomo di carbonio chirale può avere solo due stereoisomeri ma quando i centri chirali sono due o più, possono esserci 2^n . Alcuni stereoisomeri sono chiamati enantiomeri, le coppie di stereoisomeri che non sono l'immagine speculare l'uno dell'altra sono chiamati diastereoisomeri. Per composti con più centri chirali, il sistema di nomenclatura più utilizzato è il sistema RS. Ogni gruppo legato ad un carbonio chirale è assegnata una priorità.

La conformazione molecolare è diversa dalla configurazione e rappresenta la disposizione spaziale che gruppi funzionali sono liberi di assumere senza rompere alcuni legami grazie alla libertà di rotazione intorno ai legami singoli.

Capitolo 4. Le interazioni tra le biomolecole sono stereospecifiche

Lo studio della stereochimica biomolecolare che utilizza sofisticati metodi fisici è una parte importante della moderna ricerca sulla struttura delle cellule e sulle funzioni biochimiche. La stereospecificità, cioè la capacità di distinguere tra gli stereoisomeri è una proprietà degli enzimi di altre proteine ed è una caratteristica peculiare delle interazioni biochimiche.

Modulo 3. Fondamenti di fisica:

Uno degli obiettivi della biochimica è comprendere in termini quantitativi e chimici i meccanismi deputati all'estrazione di incanalamento e al consumo di energia nelle cellule viventi.

Capitolo 1. Stato stazionario dinamico

Anche se la composizione caratteristica di ogni organismo cambia poco nel tempo, la popolazione delle molecole che lo compongono non è affatto statica. Le piccole molecole, le macromolecole ed i complessi sopramolecolari vengono continuamente sintetizzati e demoliti in reazioni che richiedono un flusso costante di energia attraverso il sistema.

Capitolo 2. Energia e materia

Per una reazione che viene una soluzione possiamo definire come sistema l'insieme dei reagenti e dei prodotti compreso il solvente, mentre il sistema e l'ambiente circostante costituiscono l'universo. Se il sistema non cambia né energia né materia con il suo ambiente circostante è definito isolato. Se scambia energia ma non materia è chiuso. Se scambia materia è aperto.

Il primo principio della termodinamica la legge di conservazione dell'energia, stabilisce che in ogni processo chimico fisico, la quantità totale di energia dell'universo rimane costante anche se le forme in cui si presenta l'energia possono cambiare.

Capitolo 3. Flusso di elettroni

BIOCHIMICA

Tutte le reazioni che comportano un flusso di elettroni, sono reazioni di ossidoriduzione. Un reagente si ossida mentre un altro si riduce.

Capitolo 4. Lavoro ed energia

Il DNA, l'RNA e le proteine sono macromolecole informazionali. La sequenza delle loro unità costitutive contiene l'informazione proprio come le lettere che compongono questa frase.

Convinzione importante: la casualità o disordine dei componenti di un sistema chimico viene espressa come entropia. Gibbs ha sviluppato una teoria sulle variazioni di energia dimostrando che il contenuto di energia libera G di un sistema chiuso può essere definito in termini di 3 quantità: l'entalpia H , la temperatura assoluta ed il numero e il tipo di legami. Quindi G è uguale ad $H-TS$.

La variazione di energia libera è la variazione di entalpia che riguarda il tipo ed il numero di legami chimici. Un processo tende ad avvenire spontaneamente, solo se la variazione di energia libera è negativa. Cioè se viene rilasciata energia durante il processo.

Capitolo 5. Accoppiamento energetico

La quantità di energia disponibile per produrre un lavoro è la variazione di energia libera ΔG , questa sarà come sempre inferiore alla quantità teorica di energia rilasciata, in quanto una parte viene dissipata come calore. La variazione di energia che si ha quando il sistema passa dallo stato iniziale a quello di equilibrio è data dalla variazione di energia libera di Gibbs. Il valore di ΔG dipende dalla natura della reazione chimiche e da quanto il sistema allo stato iniziale si trova lontano dalla condizione di equilibrio.

Nelle reazioni che avvengono spontaneamente i prodotti possiedono meno energia libera rispetto ai reagenti.

Capitolo 6. Costante equivalente ed il ΔG e misura della tendenza di spontaneità.

La misura della tendenza di una reazione ad andare a compimento, è determinata dalla costante di equilibrio che per calcolare bisogna utilizzare la concentrazione molare. Un valore elevato della costante di equilibrio significa che la reazione procede fino a che i reagenti sono trasformati tutti in prodotti.

Gibbs dimostrò che il valore della variazione di energia libera per ogni reazione chimica è una funzione della variazione di energia libera standard ΔG standard, che è una costante di ogni specifica reazione. ΔG standard è semplicemente un secondo modo di indicare la forza trainante di una reazione. Le costanti termodinamiche come ΔG standard indicano come procede una reazione per raggiungere il suo equilibrio, ma non ci dicono niente sul tempo necessario per raggiungerlo. L'accoppiamento di reazioni esoergoniche ed endoergoniche tra reazioni che hanno un intermedio comune è importante per gli scambi energetici dei sistemi viventi.

Capitolo 7 enzimi e reazioni chimiche

Tutte le macromolecole sono termodinamicamente molto meno stabili rispetto alle subunità monomeriche, ma sono cineticamente stabili. La loro demolizione in assenza di catalisi avviene così lontanamente che in una scala temporale, queste molecole risultano stabili. Praticamente ogni reazione

BIOCHIMICA

chimica in una cellula avviene ad una velocità significativa solo in presenza di enzimi. La rottura dei legami esistenti e la formazione di nuovi richiede per prima cosa, la distorsione di legami e la creazione di uno stato di transizione, con un'energia libera più elevata rispetto a quella dei reagenti e dei prodotti. Le migliaia di reazioni catalizzate da enzimi nelle cellule sono organizzate in molte sequenze di reazioni consecutive dette vie metaboliche, in cui il prodotto di una reazione diventa il reagente di quella successiva. Queste reazioni nel loro insieme liberano energia e sono definite catabolismo. Altre vie iniziano in piccole molecole che sono convertite in molecole più grandi, tali vie sintetiche richiedono un apporto di energia e sono definite anabolismo.

Capitolo 8. Metabolismo per massima economia

Considerando una via anabolica che porta alla sintesi dell'isoleucina che comprende cinque tappe, se la cellula comincia a produrre più isoleucina di quanto è necessario, per la sintesi delle proteine, la parte non utilizzata si accumula e l'aumento della concentrazione dell'aminoacido inibisce l'attività catalitica del primo enzima della via. Questo processo viene detto inibizione retroattiva o a feedback.

Se la concentrazione di un metabolita cambia hanno inizio tutta una serie di effetti a cascata che influenzano il flusso di altre vie metaboliche. Tuttavia i nuovi approcci teorici e sperimentali che vanno sotto il nome di biologia dei sistemi e che saranno trattati nel capitolo 5, hanno già dato interessanti informazioni sulla regolazione dell'intero meccanismo.

Modulo 4: Fondamenti di genetica:

Tra le scoperte fondamentali in campo biologico nel ventesimo secolo vi è sicuramente la definizione della natura chimica e della struttura tridimensionale del materiale genetico, il DNA. Per la perpetuazione di una specie biologica è necessario che la sua informazione genetica sia mantenuta in una forma stabile e sia espressa accuratamente nella forma di prodotti genetici e se riprodotta per il minimo di errori.

Capitolo 1. Molecola di DNA

Il DNA è una singola molecola di 4.64 milioni di coppie di nucleotidi nelle *Escherichia coli*. Questa singola molecola deve essere perfettamente replicata in ogni dettaglio perché una cellula possa dare origine ad una progenie identica mediante la divisione cellulare. Uno spermatozoo umano fornisce all'uomo che feconda una sola molecola di DNA per ognuno di 23 diversi cromosomi, che si combina con una sola molecola di DNA di ogni cromosoma corrispondente dell'uovo. Il risultato è un embrione con tutti i suoi 20000 geni costituiti da 3 miliardi di coppie di nucleotidi intatti.

Capitolo 2. Struttura di DNA

La capacità delle cellule viventi di preservare il proprio materiale genetico e duplicarlo per generazioni successive è risultato della complementarità strutturale tra due della molecola di DNA. L'unità di base del DNA è un polimero lineare di quattro diverse subunità monomeriche (deossiribonucleotidi) organizzate in una specifica sequenza lineare che contiene l'informazione genetica. Due di questi filamenti sono avvolti a spirale a formare la doppia elica tipica del DNA. Prima che la cellula si divide, i due filamenti si separano ed ogni catena serve da stampo per la sintesi di un nuovo.

BIOCHIMICA

Capitolo 3. Sequenza di DNA e proteine

Anche se la forma finale della proteina è dettata dalla sequenza di amminoacidi, il processo di ripiegamento è aiutato dai chaperoni molecolari. La struttura tridimensionale o conformazione nativa della proteina è cruciale per la sua funzione. Il raggiungimento di questa conformazione e del corretto ripiegamento richiede delle condizioni ambientali specifiche di pH, forza ionica e concentrazione di ioni metallici e così via.

Modulo 5. Fondamenti di biologia dell'evoluzione:

Capitolo 1. Variazioni istruzioni ereditarie

Nonostante la fedeltà della replicazione genetica, vengono commessi errori che provocano variazioni della sequenza del DNA generando mutazioni genetiche e modificazioni nelle istruzioni. Le mutazioni possono provocare la sintesi di un enzima difettoso, non più in grado di catalizzare una reazione metabolica. Se una cellula venisse a trovarsi in un ambiente dove quel composto è la sola fonte di nutrimento, la cellula avrebbe un vantaggio nei confronti delle cellule non mutate di quella popolazione. Alcuni miliardi di anni di selezione hanno perfezionato i sistemi cellulari per ottenere il massimo vantaggio dalle proprietà chimiche e fisiche del materiale grezzo presente nell'ambiente.

Capitolo 2. Biologia e biomolecole per evoluzione chimica

Non abbiamo fin qui preso in considerazione quello che potremmo considerare la storia dell'evoluzione, ovvero la comparsa della prima cellula vivente. Secondo l'ipotesi i primi organismi si sono formati per l'effetto di potenti forze atmosferiche, radiazioni ultraviolette e scariche elettriche ed eruzioni vulcaniche. Questa è stata l'ipotesi di Stanley Miller sottopose delle miscele gassose simili a quelle presenti nella terra contenenti NH_3 , CH_4 , acqua e H_2 a scariche elettriche, prodotte da una coppia di elettroni per una settimana e analizzò il contenuto. La fase gassosa della miscela risultante contiene anidride carbonica e monossido di carbonio. Questo esperimento dimostra la possibilità di produzione abiotica di molecole di biomolecole in tempi brevi e in condizioni blande.

Capitolo 3. Molecole di RNA e precursori

Gli enzimi hanno la capacità di catalizzare la replicazione e la riparazione degli acidi nucleici. Chi viene prima il DNA o le proteine? la risposta più probabile è che essi siano apparsi nello stesso momento ma che le RNA abbia preceduto entrambi. La molecola di RNA possono essere i catalizzatori delle reazioni coinvolte nelle formazioni suggerisce che l'RNA possa essere sotto stato il primo gene e al tempo stesso il primo catalizzatore.

Qualche tempo dopo la prima evoluzione di questo primitivo sistema di sintesi delle proteine vi fu uno sviluppo, ovvero le molecole di DNA con la sequenza complementare a quella delle molecole di RNA autoreplicanti aggiunsero la funzione di conservare l'informazione genetica e quelle di RNA assunsero la funzione di sintesi delle proteine.

Da dove provengono i nucleotidi necessari per formare la prima molecola di RNA? una teoria ha ipotizzato che prima del mondo a RNA si siano evolute alcune specie semplici vie metaboliche, forse a livello dei camini vulcanici caldi. I precursori potrebbero essere stati quindi prodotti da un insieme di reazioni chimiche.

BIOCHIMICA

Capitolo 4. Evoluzione biologica

La terra si formò circa 4.6 miliardi di anni fa e le prime forme di vita risalgono a 3.5 miliardi di anni fa. Alcuni ricercatori in Groenlandia trovarono l'evidenze chimiche di una vita risalente a 3.8 miliardi di anni fa ed individuarono forme di carbonio all'interno di una roccia che sembrava una chiara origine biologica. Da qualche parte sulla terra durante il primo miliardo di anni comparve il primo semplice organismo capace di auto replicare la propria struttura usando uno stampo, cioè il primo materiale genetico.

Capitolo 5. La genomica funzionale

Una volta determinata la sequenza di un genoma i genetisti possono raggruppare i geni in funzione dei processi molecolari e si può individuare quale frazione del genoma è associata a ciascuna delle attività cellulari. Più complesso è l'organismo maggiore è la proporzione del suo genoma contenente i geni coinvolti nella regolazione delle risposte cellulari i cosiddetti geni costitutivi o housekeeping sono espressi in qualsiasi condizione.

Capitolo 6. Confronto tra genomi

I genomi dello scimpanzé e dell'uomo sono identici per il 99.9 % eppure le differenze sono notevoli. Le poche differenze potrebbero spiegare il processo di linguaggio, l'atleticità dello scimpanzé e molte altre cose. Numerosi studi fondamentali in cui è stata determinata la sequenza dell'intero genoma di centinaia di migliaia di persone affette da cancro, diabete di tipo 2, schizofrenia ed altre malattie hanno permesso di identificare molti geni in cui le mutazioni sono correlate con le situazioni cliniche. Ciascuno di questi geni codifica una proteina e può diventare il bersaglio di farmaci per il trattamento di quella patologia.

Acqua

Modulo 1. Interazioni deboli

Capitolo 1. I legami idrogeno

I legami a idrogeno sono deboli e nell'acqua allo stato liquido hanno un'energia di dissociazione di circa 23 kilojoule per Mole. L'espressione flickering clusters (ammassi instabili) è stata conosciuta proprio per descrivere gruppi di molecole di acqua unite da legami idrogeno con una vita media breve.

Il gran numero di legami idrogeno che si forma tra le molecole conferisce all'acqua allo stato liquido una grande coesione interna, però nell'acqua allo stato liquido le molecole sono in uno stato disordinato e in movimento, così che ogni molecola forma in media sul 3.4 legame idrogeno. Nel ghiaccio invece ogni molecola di acqua è bloccata nello spazio e forma 4 legami idrogeno con molecole vicine. A temperatura ambiente sia la fusione del ghiaccio sia l'evaporazione avvengono spontaneamente. La struttura a reticolo cristallino rende il ghiaccio meno denso dell'acqua allo stato liquido, per questo il ghiaccio galleggia sull'acqua.

Capitolo 2. L'acqua e legami a idrogeno con i soluti polari

Gli atomi di idrogeno legati covalentemente ad atomi di carbonio, non partecipano alla formazione dei legami idrogeno quindi il legame è debolmente polare. I legami ad idrogeno sono più forti quando le molecole legate sono orientate in modo da rendere massima l'interazione elettrostatica e questo

BIOCHIMICA

avviene quando gli atomi di idrogeno e di altri due atomi che partecipano al legame, sono in una linea retta.

Capitolo 3. Interazioni elettrostatiche

L'acqua è particolarmente efficace nel rompere le interazioni elettrostatiche tra gli ioni sciolti perché la sua costante dielettrica è particolarmente elevata.

Capitolo 4 Sostanze cristalline

L'aumento dell'entropia del sistema è il principale responsabile della facilità con cui i sali come il cloruro di sodio si sciolgono in acqua.

Capitolo 5. I gas non polari.

I gas biologicamente importanti anidride carbonica ossigeno ed azoto non sono polari. La natura non polare di questi gas e la diminuzione di entropia quando passano in soluzione riducono molto la loro solubilità in acqua.

Le molecole d'acqua nelle immediate vicinanze di un soluto non polare, sono costrette ad assumere un orientamento preciso.

I composti anfipatici contengono nella loro molecola regioni polari e regioni non polari. I composti anfipatici in acqua assumono delle strutture stabili chiamate micelle che possono contenere centinaia o migliaia di molecole, I legami che tengono unite le regioni non polari delle molecole sono detti interazioni idrofobiche Molte biomolecole sono anfipatiche: le proteine, i pigmenti, le vitamine, gli steroli, i fosfolipidi di membrana ecc ecc.

Capitolo 6. Le interazioni di van der Waals.

Quando due atomi privi di carica vengono portati molto vicini l'uno all'altro, le loro nuvole elettroniche si influenzano vicendevolmente. Le variazioni casuali della posizione degli elettroni induce la formazione di un altro dipolo elettrico transitorio opposto all'altro atomo. Nel punto in cui l'attrazione è massima si dice che i nuclei sono in contatto di van der Waals.

Ogni atomo ha una sua caratteristico raggio di van der Waals che è una misura di quanto l'atomo permette ad un altro di avvicinarsi.

Capitolo 7. Interazioni deboli = struttura e funzione di macromolecola.

riferimento: the nature Of The Chemical Bond

La grande dimensione degli enzimi e dei recettori rispetto al loro substrato rigenera superfici che offrono molte opportunità per la formazione di interazioni deboli a livello molecolare. La complementarità tra biomolecole che interagiscono tra loro riflette la complementarità e le interazioni deboli tra gruppi polari carichi idrofobici.

Capitolo 8. I sali influenzano le proprietà colligative delle soluzioni acquose.

Tutti gli i tipi di soluti alterano alcune proprietà fisiche dell'acqua: la tensione di vapore, il punto di ebollizione, il punto di fusione, la pressione osmotica. Queste proprietà sono chiamate proprietà colligative perché l'effetto dei soluti sulle quattro proprietà ha lo stesso fondamento: la concentrazione dell'acqua in soluzione è più bassa rispetto a quella dell'acqua pura.

BIOCHIMICA

Nel loro ambiente naturale le cellule contengono in genere concentrazioni di biomolecole e di ioni, più elevate dell'ambiente circostante. L'ingresso dell'acqua nelle cellule distenderebbe la membrana plasmatica fino a causarne la rottura e quindi la disgregazione della cellula (lisi osmotica).

Per evitare che questo accada si sono evoluti diversi meccanismi. Nei batteri e nelle piante la membrana plasmatica è circondata da una parete cellulare non espandibile. Negli animali pluricellulari il plasma sanguigno e i liquidi interstiziali sono mantenuti a un'osmolarità simile a quella del citosol.

Poiché l'effetto di soluti dipende dal numero delle particelle disciolte, le macromolecole hanno un effetto inferiore sull'osmolarità. Quindi conservare il combustibile sotto forma di polisaccaridi piuttosto che sotto forma di glucosio o di altri zuccheri semplici impedisce che la pressione osmotica aumenti all'interno della cellula.

Modulo 2. Ionizzazione dell'acqua degli acidi deboli e delle basi deboli.

Capitolo 1. L'acqua pura è poco ionizzata

Le molecole di acqua hanno una piccola tendenza a ionizzarsi in modo reversibile per formare idrogeno e uno ione ossidrile. Anche se spesso indichiamo lo ione con H^+ come prodotto di dissociazione, i protoni liberi non si trovano in soluzione ma si trova lo ione idronio H_3O^+ .

Il movimento degli ioni idronio e ossidrile in campo elettrico è molto più rapido rispetto agli altri ioni. Questa elevata mobilità ionica deriva da salti protonici. Nessun protone percorre singolarmente lunghe distanze nella soluzione ma attraversa una serie di salti protonici tra molecole di acqua legate da legame idrogeno. Si genera così un movimento protonico netto su lunghe distanze in tempi brevissimi. La posizione dell'equilibrio in una qualsiasi reazione chimica è espressa dalla costante di equilibrio. Nella formula, invece che di concentrazione dovremmo parlare per ogni specie molecolare di attività, cioè la concentrazione effettiva in soluzione non ideali. La costante di equilibrio è caratteristica per ogni reazione chimica a una specifica temperatura. Essa definisce la composizione della miscela finale all'equilibrio delle reazioni chimica indipendentemente dalla quantità di reagenti e di prodotti.

Capitolo 2. Ionizzazione dell'acqua espressa da una costante di equilibrio.

La costante di equilibrio della reazione irreversibile della ionizzazione dell'acqua 25° dell'acqua pura è 55.5 molare. Risolvendo l'equazione della costante di equilibrio, si otterrà il prodotto ionico dell'acqua, che è uguale a $(55,5M) \times K_{eq}$ a $25^\circ C$. Sostituendo il valore della K_{eq} a $25^\circ C$, si ottiene $1,0 \times 10^{-14} M$.

Capitolo 3. La scala del ph.

Le soluzioni che hanno un valore di ph superiore a 7 sono alcaline e le concentrazioni degli OH^- è maggiore di quella degli H^+ . Le soluzioni con ph minore di 7 sono acide.

Il ph di una soluzione può essere misurato facendo uso di alcuni coloranti indicatori, come il tornasole, la fenolftaleina e il rosso fenolo. Il ph influenza la struttura è l'attività delle macromolecole biologiche per esempio l'attività catalitica degli enzimi dipende dal ph .

- ❖ Determinazione del pH delle urine e del sangue vengono effettuati di routine per formulare diagnosi mediche.

BIOCHIMICA

Capitolo 4. Gli acidi e le basi deboli hanno costanti di dissociazione caratteristiche.

Gli acidi cloridrico, solforico e nitrico comunemente chiamati acidi forti sono completamente ionizzati in soluzione acquose diluite. Nei sistemi biologici gli acidi e le basi deboli svolgono ruoli importanti nel metabolismo e nella sua regolazione.

Gli acidi possono essere definiti donatori di protoni e le basi accettore di protoni.

Quando un donatore di protone come l'acido acetico perde un protone diventa il corrispondente accettore di protone. Il donatore di protone ed il suo corrispondente accettore, formano una coppia acido base coniugata.

Le costanti di equilibrio delle reazioni di ionizzazione sono in genere chiamate costanti di ionizzazione o di dissociazione acida.

Capitolo 5. Dalle curve di titolazione di acidi deboli al pka.

La titolazione viene usata per determinare la quantità di acido in una soluzione. In questa tecnica un volume noto di una soluzione di un acido viene titolato con una soluzione di una base forte, di solito idrossido di sodio a concentrazione nota. La soluzione di idrossido di sodio viene aggiunta in piccole quantità fino a che tutto l'acido viene consumato. Il punto esatto di neutralità viene determinato utilizzando un indicatore oppure un piaccametro un equivalente definito come la quantità di una sostanza che può reagire con una mole di ioni idrogeno in una reazione acido-base.

Mettendo in grafico la variazione del pH in funzione della quantità di idrossido di sodio aggiunto si può identificare il valore di pH dell'acido debole. Al punto di mezzo della titolazione si verifica un'importante relazione: il pH delle soluzioni equimolari di acido acetico e acetato è esattamente uguale al valore di pka dell'acido acetico.

L'acido acetico è il più forte dei tre perde il suo protone più facilmente e quindi il suo valore di K_a è il maggiore dei tre ovvero il valore di pK_a è il più basso.

Modulo 3: Sistemi tampone contro le variazioni di pH nei sistemi biologici

Capitolo 1. I tamponi.

I tamponi sono sistemi acquosi che tendono ad opporsi alle variazioni di pH quando vengono aggiunte piccole quantità di un acido o di una base. Per esempio una miscela di uguali concentrazioni di acido acetico e ione acetato è un sistema tampone.

Si noti che la curva di titolazione dell'acido acetico ha una zona piatta che si estende per oltre una unità di pH da entrambi i lati del punto di mezzo della titolazione, in questa zona di pH una certa quantità di ioni idrogeno e ioni ossidrile aggiunto al sistema ha un effetto minore sul pH rispetto ad una quantità equivalente aggiunta a valore di pH diversi. Questa è la regione tamponante della miscela acido acetico-acetato.

Se si aggiungono ioni H^+ o OH^- si osserva una piccola variazione del rapporto tra le concentrazioni relative dell'acido e del suo ione e quindi solo una piccola variazione di pH.

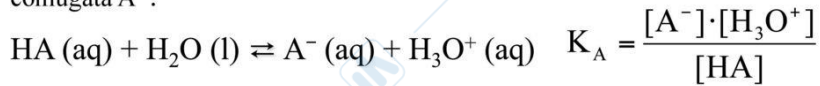
Capitolo 2 Equazione di henderson-hasselbach

L'andamento della curva di titolazione di ogni acido debole è descritta dall'equazione di henderson-hasselbach particolarmente importante per comprendere l'azione tamponante e il bilancio acido-base nel sangue e nei tessuti dei vertebrati. Per la dissociazione di un acido debole, l'equazione di henderson-hasselbach può essere ricavata come segue:

BIOCHIMICA

L'equazione di Henderson-Hasselbalch

In una soluzione tampone che contenga un acido debole HA e la sua base coniugata A⁻:



$$[\text{H}_3\text{O}^+] = K_A \cdot \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} = K_A \cdot \frac{[\text{acido}]}{[\text{base coniugata}]}$$

Estraiamo il logaritmo negativo decimale di questa espressione:

$$\begin{aligned} -\log_{10}[\text{H}_3\text{O}^+] &= -\log_{10} K_A - \log_{10} \frac{[\text{acido}]}{[\text{base coniugata}]} \\ &= -\log_{10} K_A + \log_{10} \frac{[\text{base coniugata}]}{[\text{acido}]} \end{aligned}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_A + \log_{10} \frac{[\text{base coniugata}]}{[\text{acido}]}$$

20

Capitolo 3 Gli acidi e le basi deboli si oppongono nelle cellule e nei tessuti alle variazioni di pH.

I due sistemi tampone biologici più importanti sono il sistema fosfato e quello del bicarbonato. Il sistema tampone fosfato che agisce nel citoplasma di tutte le cellule è costituito dal donatore di protoni H₂PO₄⁻ e dall'accettore di protoni (HPO₄)₂⁻.

Il sistema fosfato è attivo ha un pH intorno al suo valore di pK_a di 6,86 e quindi si oppone a variazioni del pH nella regione compresa tra 5,9 e 7,9. Questo sistema è particolarmente efficace nel tamponare il pH dei fluidi intracellulari nei mammiferi. Per esempio i fluidi extracellulari e molti comportamenti citoplasmatici hanno un pH tra 6,9-7,4. Quando è presente una quantità maggiore di base coniugata rispetto all'acido, la titolazione procede per più del 50% e quindi il valore del pH è superiore a quello del pK_a (6,86).

Il plasma sanguigno è tamponato in parte dal sistema bicarbonato costituito da acido carbonico come donatore di protoni e da bicarbonato come accettore. Questo sistema è più complesso di altre coppie coniugate acido base. L'acido carbonico si forma dalla anidride carbonica disciolta in acqua. Il pH del sistema tampone bicarbonato dipende dalla concentrazione di acido carbonico e bicarbonato, rispettivamente accettore e donatore di protoni. Ma la concentrazione di bicarbonato a sua volta dipende dalla concentrazione della anidride carbonica disciolta, che in equilibrio con l'anidride carbonica presente in fase gassosa o pressione parziale dell'anidride carbonica indicata come pCO₂.

- ❖ La CO₂ liberata viene quindi espirata.
- ❖ L'iperventilazione, ovvero il respiro corto causato dallo stress o ansia rovescia il normale equilibrio di ossigeno inspirato e anidride carbonica espirata a favore di un'eccessiva emissione di anidride carbonica. Innalzando il pH del sangue questa alcalosi può causare capogiri, mal di testa, debolezza, perdita di coscienza. Un semplice rimedio per una debole alcalosi è quella di

BIOCHIMICA

respirare velocemente in un sacchetto di carta. L'aria contenuta nel sacchetto si arricchisce di anidride carbonica e inalare quest'aria incrementa la concentrazione di anidride carbonica nel corpo.

❖ *.Il diabete non trattato provoca grave acidosi.*

Ogni enzima ha un'attività catalitica massima ad un pH caratteristico detto pH ottimale. Allontanandosi dal pH ottimale l'attività catalitica diminuisce rapidamente. Nei soggetti diabetici affetti da diabete mellito non trattato, la mancanza di insulina o l'insensibilità all'insulina impedisce l'apporto di glucosio ai tessuti e costringe i tessuti ad usare le riserve di acidi grassi come combustibile primario. Questa dipendenza dagli acidi grassi provoca accumulo di due acidi carbossilici: l'acido B-idrossibutirrico e l'acido acetico. La dissociazione di questi acidi abbassa il pH del plasma a valori inferiori a 7.35 causando acidosi e se l'acidosi grave insorgono mal di testa stanchezza nausea vomito e diarrea seguiti da stordimento coma e convulsioni. Quando un paziente presenta una glicemia elevata bassi valori di pH ed elevati livelli di acido B-idrossibutirrico e di acido acetico nel sangue e nelle urine, la diagnosi più probabile è di diabete.

Anche altre condizioni possono produrre acidosi: il digiuno, un esercizio fisico strenuo e l'insufficienza renale, le malattie polmonari ecc.

L'acidosi viene trattata curando la malattia che l'ha prodotta cioè somministrando insulina a soggetti diabetici oppure steroidi antibiotici a soggetti affetti da malattie polmonari.

Modulo 4. L'acqua come reagente

L'acqua non è solo il solvente in cui avvengono tutte le reazioni, spesso partecipa alle reazioni. Per esempio la formazione di ATP da ADP e fosfato è una reazione di condensazione, la reazione inversa è detta idrolisi. La reazione di idrolisi catalizzata da enzimi chiamati idrolasi sono quasi sempre esoergoniche. Queste molecole producono infatti due molecole a partire da una. La formazione di polimeri tramite reazioni di condensazione è un processo endoergonico, quindi non spontaneo.

Modulo 5. L'ambiente acquoso è adatto alla vita

Tutti gli organismi viventi si sono ben adattati all'ambiente acquoso. L'elevato calore specifico dell'acqua è utile alla cellula e agli organismi, in quanto consente all'acqua di agire come tampone termico mantenendo la temperatura di un organismo costante.

Amminoacidi peptidi e proteine

Modulo 1. Gli amminoacidi

Le proteine sono polimeri di amminoacidi in cui ogni residuo amminoacidico è unito a quello vicino da un specifico tipo di legame covalente.

Capitolo 1. Amminoacidi e proprietà strutturali comuni

Tutti i 20 amminoacidi presenti nelle proteine sono alfaamminoacidi. Ad ogni amminoacido presente nelle proteine è stata assegnata un'abbreviazione a tre lettere, il codice a una lettera fu introdotto da Margaret Oakley Dayoff, considerata dai più come il fondatore della bioinformatica.

In tutti i comuni amminoacidi ad eccezione della glicina il carbonio alfa è legato a quattro gruppi differenti. Si tratta dunque di un centro chirale.

BIOCHIMICA

I quattro gruppi differenti possono disporsi nello spazio in due modi diversi, quindi sono possibili per ogni amminoacido due stereoisomeri. Essendo immagini speculari le due forme rappresentano una classe di stereoisomeri detta enantiomeri.

Tutte le molecole con un centro chirale sono anche otticamente attive.

È stato sviluppato uno speciale sistema di nomenclatura per specificare la configurazione assoluta dei quattro sostituenti degli atomi di carbonio asimmetrici. Viene stabilita con il sistema D,L. Per tutti i composti chirali gli stereoisomeri che hanno configurazioni correlate alla D-gliceraldeide sono disegnati con la lettera D.

Nella convenzione di Fischer L e D si riferiscono soltanto alla configurazione assoluta dei quattro sostituenti attorno ad un carbonio chirale e non ha le proprietà ottiche della molecola.

Un altro sistema usato è il sistema RS.

Capitolo 2. I residui amminoacidici delle proteine sono tutti stereoisomeri L

È degno di nota che praticamente tutti i residui amminoacidici delle proteine abbiano la configurazione assoluta L.

Capitolo 3. Classificazione degli amminoacidi

1) Gruppi R alifatici non polari:

Alanina Valina leucina isoleucina tendono a raggrupparsi all'interno delle proteine stabilizzando la struttura con interazioni idrofobiche. La glicina ha la struttura più semplice e anche se è collocabile nel gruppo degli amminoacidi non polari, la sua catena laterale non contribuisce alla formazione di interazioni idrofobiche. La metionina, uno dei due amminoacidi contenenti zolfo. Ha un gruppo tioetere non polare nella sua catena laterale. La prolina ha una catena laterale alifatica con una caratteristica struttura ciclica.

2) Gruppi R aromatici:

I 3 amminoacidi fenilalanina tirosina triptofano sono non polari.

Tutti e tre possono intervenire nelle interazioni idrofobiche. La tirosina e il triptofano sono sensibilmente più popolari della fenilalanina.

3) Gruppi R polari non carichi:

Questa classe comprende la Serina, la treonina, la cisteina e l'asparagina e la glutammina. La polarità della serina e della treonina è dovuta al gruppo ossidrilico; la cisteina è particolare perché la sua polarità è modesta ed è dovuta al gruppo sulfidrilico che forma legami a idrogeno deboli con l'acqua. L'asparagina e la glutammina sono ammidi di altri due amminoacidi presenti nelle proteine. La cisteina è facilmente ossidabile con legame covalente formando cistina.

4) Gruppi R carichi positivamente:

I gruppi idrofilici sono quelli che contengono cariche nette positive e negative. La lisina ha un secondo gruppo amminico primario, l'arginina un gruppo guanidinico carico positivamente, l'istidina contiene un gruppo imidazolico aromatico.

5) Gruppi R carichi negativamente:

BIOCHIMICA

I due gruppi amminoacidi che hanno gruppi R con una carica negativa netta sono l'aspartato ed il glutammato.

❖ *Assorbimento della luce da parte delle molecole*

La misura dell'assorbimento della luce con uno spettrofotometro è utilizzata per indicare le molecole e valutare la loro concentrazione in soluzione. Queste due relazioni sono combinate nella legge di Lambert Beer.

Capitolo 4. Gli amminoacidi non comuni

Tra questi vi sono la 4-idrossiprolina e la 5-idrossilisina.

La prima si trova nelle proteine della parete cellulare delle cellule vegetali ed entrambe nel collagene. La 6-N-metilisina si trova nella miosina e il gamma-carbossiglutammina è presente nella protrombina, una proteina che partecipa alla coagulazione del sangue.

Nelle cellule sono stati identificati 300 amminoacidi che hanno varie funzioni ma non sono costituenti delle proteine. L'ornitina e la citrullina meritano attenzione perché sono intermedi nella biosintesi dell'arginina.

Capitolo 5. Amminoacidi Acidi e Basi

Quando un amminoacido si trova in soluzione sotto forma di ione dipolare o zwitterione, può comportarsi come acido o come base. I composti che hanno questa doppia natura sono detti anfoterici e possono essere chiamati anfoterici.

Capitolo 6. Amminoacidi e curve di titolazione.

La figura mostra la curva di titolazione della forma diprotica della glicina. I due gruppi ionizzabili vengono titolati con una base forte come la NaOH.

Nella prima fase della titolazione il gruppo COOH- perde il suo protone. Nel punto di mezzo di questa fase si hanno delle concentrazioni equimolari delle due forme protonata e non protonata.

Per la glicina il pH al punto di mezzo è 2.34, quindi il suo gruppo -COOH ha un pKa di 2.34. Il pKa può anche essere considerato come una misura della tendenza di un gruppo a cedere il protone così può serbare un altro punto di flesso ovvero il punto in cui la glicina si trova nella sua forma dipolare. $+H_3N-CH_2-COOH$.

La seconda fase della titolazione corrisponde alla rimozione del gruppo $-NH_3^+$.

Il pH al punto di mezzo di questa fase è di 9.60 e corrisponde al pKa.

Il valore più basso del pKa della glicina è dovuta alla repulsione tra il protone uscente e la vicina carica positiva del gruppo amminico. Il pKa di un gruppo funzionale è fortemente influenzato dal suo ambiente chimico che lo circonda. Osservando la curva di titolazione della glicina si può dedurre che questo amminoacido a due regioni con potere tamponante.

Capitolo 6. Dalla curva di titolazione alla carica elettrica.

BIOCHIMICA

Un'altra importante informazione che è possibile ottenere dalla curva di titolazione di un amminoacido è la relazione tra la sua carica netta di il PH della soluzione. A pH 5.97 il punto di flesso tra le due fasi della curva di titolazione, la glicina è presente come forma dipolare ma con carica netta pari a zero. Il pH caratteristico al quale la carica Netta è zero si chiama punto isoelettrico o ph isoelettrico.

Capitolo 7. Proprietà acido base degli amminoacidi

Il glutammato ha un pI più basso di quello della glicina. Ciò dipende dalla presenza di due gruppi carbossilici, che al loro punto medio dei loro valori di pKa (3,22) contribuiscono con una carica netta negativa di -1 che controbilancia la carica netta positiva di +1 del gruppo amminico.

Il pI dell'istidina, che ha due gruppi carichi positivamente quando sono protonati è di 7,59.

Come già puntualizzato in precedenza in condizioni di completa esposizione all' ambiente acquoso l'istidina è il solo amminoacido che ha un gruppo R con pKa di 6,0 e può così comportarsi da tampone ad un pH vicino alla neutralità.

Modulo 2. I peptidi e le proteine

Capitolo 1. I peptidi sono catene di amminoacidi

Due molecole di amminoacidi possono unirsi mediante un legame ammidico chiamato legame peptidico. Questo tipo di legame si genera per eliminazione di una molecola d'acqua.

Tre aminoacidi possono essere uniti tra loro mediante due legami peptidici e formano un tripeptide; quattro aminoacidi generano un tetrapeptide. Quando il numero degli aminoacidi è piccolo la struttura viene detta oligopeptide; se gli aminoacidi sono tanti il prodotto viene detto polipeptide. Le molecole chiamate polipeptidi hanno masse molecolari inferiori a 10000.

In un peptide il residuo amminoacidico con cui termina la catena il residuo Aminotermineale ha il gruppo Alfa amminico libero: il residui all'altra estremità ha un gruppo Alfa carbossilico libero ed è il residuo carbossi terminale (c-terminale).

- ❖ Quando viene mostrata la sequenza di un peptide la estremità ammino terminale viene posta a sinistra e quella carbossiterminale a destra.

I legami peptidici delle proteine sono abbastanza stabili ed hanno una vita media che è di circa 7 anni.

Capitolo 2. I peptidi biologicamente attivi hanno dimensioni e composizioni variabili

Alcune proteine sono costituite da una singola catena polipeptidica, altre chiamate multisubunità hanno due o più polipeptidi associati in modo non covalente.

Le catene polipeptidiche presenti in una proteina multisubunità possono essere identiche tra loro o diverse. Se almeno due sono identiche la proteina viene detta oligomerica e le unità identiche sono chiamate protomeri.

Solo un numero limitato di proteine contiene due o più catene polipeptidiche unite da legami covalenti per esempio le due catene dell'insulina sono unite da ponti disolfuro. In questi casi i singoli polipeptidi non sono più considerati subunità ma sono semplicemente indicati come catene polipeptidiche.

BIOCHIMICA

Capitolo 3 Proteine e gruppi chimici diversi dagli aminoacidi

Molte proteine sono costituite soltanto da aminoacidi altre presentano altri gruppi chimici associati e sono chiamate proteine coniugate. La parte non aminoacidica della proteina viene detta gruppo prostetico.

Queste sono classificate in base alla natura del gruppo prostetico. Per esempio le lipoproteine contengono lipidi, le glicoproteine gruppi saccaridici e le metalloproteine un metallo.

Modulo 3. Lavorare con le proteine

Capitolo 1 Separazione e purificazione delle proteine.

Negli ultimi decenni sono stati integrati metodi classici da tecniche che includono il clonaggio di DNA. Questi nuovi metodi più efficienti hanno come svantaggio la perdita dell'attività biologica della proteina purificata. La fonte della proteina è un tessuto o una cultura di cellule batteriche.

Il primo passaggio consiste nella rottura della cellula che provoca il rilascio delle proteine in una soluzione e si chiama *estratto grezzo*.

Si utilizza la centrifugazione frazionata per preparare frazioni e isolare specifici organelli. L'estratto grezzo viene sottoposto a trattamenti che hanno lo scopo di separare le diverse proteine in frazioni sfruttando proprietà come grandezza carica mediante il frazionamento. L'aggiunta di certi sali nella giusta quantità può far precipitare selettivamente solo alcune proteine. Il solfato di ammonio è adatto allo scopo e viene usato per far precipitare le proteine.

La dialisi è una tecnica che separa le proteine dalle piccole molecole in soluzione sfruttando le maggiori dimensioni delle proteine.

Il metodo più adatto alla separazione della proteina è la cromatografia su colonna che sfrutta differenze di carica, grandezza, affinità di legame ed altre proprietà.

Un tubo di vetro viene riempito con materiale solido poroso dotato di proprietà chimiche opportune che sarebbe la fase stazionaria ed una soluzione tampone che sarebbe la fase mobile. Questa viene fatta percolare all'interno della colonna. La frazione proteica disciolta nella stessa soluzione tamponata che è stata utilizzata precedentemente per la fase mobile viene stratificata sulla sommità della colonna e fatta percolare attraverso la matrice solida.

Le singole proteine migrano più o meno velocemente in base alle proprietà.

La cromatografia a scambio ionico sfrutta la differenza del tipo dell'intensità della carica. La matrice della colonna è un polimero sintetico che contiene i gruppi carichi. Le resine con gruppi carichi negativamente sono gli scambiatori di cationi quelle con gruppi carichi positivi gli scambiatori di anioni. L'affinità della proteina per gruppi carichi della colonna dipende dal pH.

Nella cromatografia a scambio cationico la matrice solida ha gruppi carichi negativamente nella fase mobile. Le proteine con una carica netta positiva migrano attraverso la matrice più lentamente di quelle con carica netta negativa. In quanto la migrazione viene ritardata dall'interazione con la fase stazionaria.

La cromatografia per esclusione molecolare detta anche gel filtrazione, separa le proteine secondo le loro dimensioni.

La cromatografia per affinità si basa sulla formazione di legami specifici quando si aggiunge alla colonna una miscela di proteine, ogni specie proteica che ha affinità per il ligando si lega ai granuli quindi la sua migrazione attraverso la matrice viene rallentata.

BIOCHIMICA

La risoluzione delle metodiche cromatografiche può essere incrementata dalla HPLC o cromatografia liquida ad alta pressione che utilizza pompe ad alta pressione per aumentare la velocità delle molecole proteiche attraverso la colonna.

Capitolo 2. Elettroforesi

Un'altra tecnica per la separazione delle proteine si basa sulla migrazione delle proteine cariche in un campo elettrico in un processo detto elettroforesi. Un metodo elettroforetico usata comunemente per valutare la purezza e la massa molecolare delle proteine comprende l'uso del detergente sodio dodecil solfato. Dopo aver effettuato l'elettroforesi le proteine possono essere visualizzate mediante il trattamento con un colorante.

Modulo 4. Struttura delle proteine

Capitolo 1. La struttura primaria

la definizione di tutti i legami covalenti che legano tra loro i vari aminoacidi in una catena polipeptidica costituisce la struttura primaria. L'elemento principale della struttura primaria di una proteina è la sequenza degli aminoacidi che la compongono.

Capitolo 2. La funzione della proteine dipende dalla struttura primaria

Il batterio *Escherichia coli* sintetizza più di 3000 proteine differenti, si può quindi concludere che se si altera la struttura primaria di una proteina, si altera la sua funzione.

Alcune semplici osservazioni: proteine che svolgono funzioni diverse hanno sequenze diverse, migliaia di malattie genetiche sono dovute alla produzione di proteine difettose.

Ma la sequenza amminoacidica di un particolare proteina è veramente sempre la stessa cioè invariante? Si può affermare che dal 20 al 30% delle proteine umane sono *polimorfiche* cioè mostrano piccole variazioni all'interno della popolazione umana molte di queste non producono alcun effetto sulla funzione della proteina. In alcune regioni la sequenza amminoacidica può variare senza influenzare la funzione biologica ma la maggior parte delle proteine contiene regioni essenziali per la loro funzione la cui sequenza devono essere quindi conservate.

La sequenza dei nucleotidi di DNA e degli aminoacidi delle proteine sono correlate.

Capitolo 3. Tecniche di sequenziamento dei polipeptidi

Nella metodica tradizionale per il sequenziamento delle proteine di grandi dimensioni la prima tappa prevede la marcatura del residuo amminoacidico aminoterminale seguita dalla sua identificazione. Il gruppo Alfa amminico aminoterminale può essere marcato con il reagente 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB).

Il sequenziamento chimico è basato su un processo detto a due tappe detto la Degradazione di Edman. Questo metodo marca e rimuove solo il residuo aminoterminale del peptide, lasciando intatti tutti gli altri. Il peptide viene fatto reagire in condizioni alcaline con il fenilisotiocianato, che converte l'amminoacido terminale in un addotto feniltiocarbammilico (PTC). Il legame peptidico più vicino alla Dotto che converte l'amminoacido aminoterminale in un addotto il legame peptidico più vicino all'addotto PTC viene scisso dalla acido trifluoroacetico in ambiente acido con rimozione dell'amminoacido aminoterminale che viene liberato come derivato anilinoiazolinonico.

BIOCHIMICA

Il derivato viene estratto con solventi organici e convertito nella forma più stabile feniltioidantoinica.

Nella figura sono mostrate due diverse tecniche per scindere i ponti disolfuro.

Gli enzimi detti proteasi catalizzano l'idrolisi dei legami peptidici, alcuni rompono soltanto legami peptidici adiacenti a specifici residui, frammentando il polipeptide in modo riproducibile, prevedibile. Tra le proteasi l'enzima digestivo tripsina catalizza l'idrolisi soltanto di quei legami peptidici il cui gruppo carbonilico è fornito da un residuo di lisina o di arginina indipendentemente dalla lunghezza o dalla sequenza della catena polipeptidica.

Nel metodo classico una proteina di grandi dimensioni dovrebbe essere tagliata per due volte in frammenti più piccoli utilizzando due diverse proteasi o due reagenti idrolitici per ogni ciclo di taglio.

Capitolo 4. Spettrofotometria e Spettrometria di massa

I moderni adattamenti della spettrometria di massa forniscono un'importante alternativa e metodi di sequenziamento descritti in precedenza.

Le molecole che devono essere analizzate dette anche analiti sono prima ionizzate nel vuoto. Quando le nuove molecole cariche vengono introdotte in un campo elettrico il percorso che compiono diventa funzione del loro rapporto massa/carica m/z .

Nel 1988 sono state sviluppate due nuove tecniche per superare il problema perché la misura di m/z venivano effettuate su molecole in fase gassosa e quindi la spettrometria non poteva essere applicata alle macromolecole come proteine e acidi nucleici.

Questo processo noto come il matrix-assisted laser desorption/ionization; Mass spectrometry (MALDI MS) è stato usato con successo per misurare la massa di una grande varietà di macromolecole. In un secondo metodo molto efficace invece le macromolecole sono forzate a passare dal liquido alla fase gassosa, il solvente. Quindi la soluzione di analiti passa attraverso un ago carico mantenuto ad un alto potenziale elettrico e viene dispersa sotto forma di una miscela di microgocce cariche. Il solvente sulle gocce evapora relativamente e gli ioni delle macromolecole passano senza danni alla fase gassosa. La tecnica è detta electrospray ionization Mass spectrometry o ESI MS.

La spettrometria di massa può essere utilizzata anche per sequenziare frammenti piuttosto brevi di un polipeptide che è un'applicazione che sta diventando insostituibile per la rapida identificazione di proteine sconosciute. Le informazioni sulla frequenza sono ottenute mediante una tecnica detta MS tandem o M/S.

I diversi metodi per ottenere le informazioni sulla sequenza della proteina si completano l'un l'altro.

La procedura conosciuta come degradazione di Edman a volte è utile se si desidera ottenere informazioni sulla sequenza di una proteina o di un peptide. Tale procedimento è lento e richiede anche una quantità maggiore di campione rispetto alla spettrometria di massa.

La spettrometria di massa può essere utilizzata nei casi in cui vi sia poco campione a disposizione. Questa tecnica fornisce informazioni sulle sequenze ma il processo di frammentazione può lasciare dei buchi nella sequenza non prevedibili.

La spettrometria di massa costituisce il metodo di elezione per l'identificazione di proteine presenti in quantità più piccole.

Capitolo 4. Dalle sequenze alle informazioni biochimiche

La conoscenza della sequenza di una proteina offre molte informazioni sulla struttura tridimensionale, funzione e sulla localizzazione ed evoluzione di una proteina.

BIOCHIMICA

Sulla base della somiglianza fra le sequenze aminoacidiche si possono identificare famiglie di proteine che hanno in comune caratteristiche strutturali e funzionali. Le singole proteine sono assegnate ad una famiglia in base al grado di somiglianza della sequenza aminoacidica. I membri di una famiglia proteica generalmente hanno il 25% o più di omologhi e spesso hanno in comune alcune caratteristiche strutturali e funzionali. Alcune famiglie però sono identificabili solo sulla base di pochi residui cruciali per una certa funzione.

Un certo numero di substrutture simili o domini si trovano in molte proteine con funzioni diversificate. Speciali sequenze segnale vengono usate per etichettare alcune proteine che devono essere esportate fuori dalla cellula. Molte informazioni funzionali che si possono trarre dalle sequenze proteiche derivano dalle sequenze consenso. Quando si comparano sequenze di acidi nucleici o di proteine, una sequenza consenso viene definita come quella che rispecchia le basi e gli aminoacidi più comuni. In ciascuna posizione le sequenze consenso possono essere rappresentate in diversi modi.

In un tipo di rappresentazione ciascuna posizione è separata dall'altra da un trattino, le ambiguità sono indicate ponendo i possibili aminoacidi tra parentesi quadre. Per esempio W tra parentesi quadre significa che tutti gli aminoacidi sono possibili tranne il triptofano.

La glicina viene considerata come aminoacido polare.

La rappresentazione logo rende chiaro quali sono gli aminoacidi prevalenti in una data posizione. Dunque l'analisi di tutte le informazioni disponibili ha generato un nuovo campo di indagine chiamato bioinformatica.

Questa disciplina fornisce programmi computerizzati molto accessibili su internet a disposizione di ricercatori e studenti. Inoltre le sequenze proteiche possono fornire anche informazioni su come le proteine si sono evolute e quindi su come si è sviluppata la vita sul nostro pianeta.

Per una data proteina, i residui aminoacidi essenziali per l'attività sono rimasti gli stessi durante tutta l'evoluzione, invece i residui meno importanti possono variare nel tempo. Sono questi residui variabili che possono fornire informazioni sulla evoluzione. Un altro fattore che complica lo studio della storia dell'evoluzione il trasferimento di un gene o di un gruppo di geni da un organismo all'altro. Questo processo è detto *trasferimento genico orizzontale*.

Una proteina chiamata fattore di allungamento è coinvolta nella sintesi di proteine di tutti gli eucarioti. I membri di famiglie proteiche sono chiamate *proteine omologhe* o omologhi.

Se due proteine di una famiglia cioè due omologhi sono presenti nella stessa specie vengono dette paraloghi proteine omologhe di specie diverse vengono dette ortologhi.

Attraverso i programmi computerizzati è possibile selezionare l'allineamento col punteggio massimo cioè con un maggior numero possibile di residui e con il minor numero di interazione.

Per un acido nucleico costituito da solo quattro residui differenti l'allineamento casuale di sequenze non omologhe produrrà una sovrapposizione di 25% .

Analizzando le divergenze di sequenza all'interno di famiglie proteiche selezionate è possibile suddividere gli organismi in classi sulla base delle loro relazioni evolutive. Queste sequenze possono essere utilizzate come sequenze di identificazione per il gruppo in cui esse si trovano.

Le sequenze di identificazione sono state utilizzate per stabilire relazioni evolutive tra gruppi di organismi diversi.

Considerando la sequenza di una proteina, ricercatori possono ora costituire alberi evolutivi.

BIOCHIMICA

Nella figura i punti terminali liberi delle diverse linee chiamate i nodi esterni rappresentano le specie attuali indicate. I punti dove due linee si incontrano i nodi interni, rappresentano specie ancestrali progenitrici estinte.

Nella maggior parte delle rappresentazioni la lunghezza delle linee che uniscono i nodi è proporzionale al numero delle sostituzioni che separano una specie dall'altra.

La ricerca è rivolta a creare un albero dettagliato degli esseri viventi in grado di descrivere l'evoluzione e le relazioni evolutive di ogni organismo sulla terra si tratta ovviamente di una ricerca ancora in corso.