

!!! SE SEI IN POSSESSO DEL FORMATO DIGITALE IN PDF DEL FILE PUOI CLICCARE SULLE VOCI DEL SOMMARIO PER RAGGIUNGERE IL CAPITOLO DESIDERATO !!!

Sommario

1 LE PROTEINE.....	6
1.1 Amminoacidi.....	6
1.1.1 Struttura generale	6
1.1.2 Amminoacidi idrofobici	7
1.1.3 Amminoacidi polari.....	8
1.1.4 Amminoacidi carichi positivamente o basici.....	9
1.1.5 Amminoacidi carichi negativamente o acidi	9
1.2 Struttura Primaria.....	9
1.3 Struttura secondaria.....	12
1.3.1 α -elica.....	12
1.3.2 Foglietto β	13
1.4 Struttura terziaria	14
1.5 Struttura quaternaria.....	15
1.6 Esperimento di Anfisen.....	15
1.7 Proteine e proteoma	17
1.7.1 Metodologie di purificazione del campione.....	17
1.7.2 Metodologie di indagine della struttura primaria	17
1.7.3 Tecnologia del DNA ricombinante	18
1.7.4 Studio delle proteine	18
2 EMOGLOBINA E MIOGLOBINA.....	19
2.1 La Mioglobina	19
2.1.1 Il gruppo EME.....	19
2.2 L'Emoglobina	20
2.2.1 Emoglobina: un trasportatore efficiente.....	21
3 ENZIMI.....	24
3.1 Il sito attivo.....	24
3.2 Classificazione	25
3.3 Proprietà cinetiche	25
3.4 Enzimi allosterici.....	26
3.5 Fattori che influiscono sull'attività enzimatica	26
3.6 Saggio enzimatico.....	28
3.7 Inibitori	28
3.7.1 Inibitori reversibili.....	28
3.8 Strategie catalitiche	29
3.8.1 Le proteasi	29

3.8.2	Le endonucleasi di restrizione.....	33
3.8.3	Le Miosine.....	34
3.9	Strategie regolative	35
3.9.1	Controllo allosterico	36
3.9.2	Isoenzimi e compartimentalizzazione.....	36
3.9.3	Modificazioni covalenti reversibili	36
3.9.4	Controllo per inibizione	37
3.9.5	Modificazioni covalenti irreversibili	38
4	I LIPIDI	42
4.1	Lipidi di riserva	42
4.1.1	Gli acidi grassi.....	42
4.1.2	Triacilgliceroli.....	43
4.1.3	Cere	44
4.2	Lipidi come segnali, cofattori e pigmenti.....	45
4.2.1	Gli eicosanoidi	45
4.2.2	Ormoni steroidei.....	45
4.2.3	Vitamine	45
4.2.4	Altri esempi	46
4.2.5	Analisi dei lipidi	46
5	LE MEMBRANE BIOLOGICHE.....	47
5.1	I lipidi di membrana.....	47
5.1.1	Fosfolipidi	48
5.1.2	Glicolipidi.....	49
5.1.3	Colesterolo	49
5.1.4	Caratteristiche dei lipidi di membrana	49
5.2	Proteine di membrana	51
5.2.1	Proteine ed interazioni con la membrana	51
5.3	Fluidità della Membrana	53
5.3.1	Diffusione laterale.....	53
5.3.2	Diffusione trasversale.....	54
5.3.3	Modello a mosaico fluido.....	54
5.3.4	Asimmetria delle membrane	55
5.4	Trasporto di soluti attraverso le membrane.....	55
5.4.1	Diffusione semplice – Trasporto Passivo.....	56
5.4.2	Diffusione facilitata – Trasporto Passivo	56
5.4.3	Trasporto attivo primario	57
5.4.4	Trasporto attivo secondario.....	59

6 I CARBOIDRATI	61
6.1 I monosaccaridi	61
6.1.1 Enantiomeri, diastereoisomeri ed epimeri.....	62
6.1.2 Principali monosaccaridi	63
6.1.3 Forme cicliche.....	64
6.1.4 Zuccheri modificati.....	66
6.1.5 Zuccheri riducenti	66
6.2 Oligosaccaridi	66
6.2.1 Disaccaridi	67
6.2.2 Polisaccaridi.....	67
6.3 Glicoconiugati	69
6.3.1 Glicoproteine.....	69
6.3.2 Proteoglicani.....	70
6.3.3 Mucine.....	70
6.4 La Glicomica	71
7 NUCLEOTIDI E ACIDI NUCLEICI	72
7.1 Nucleotidi	72
7.1.1 Basi azotate	72
7.1.2 Nucleotidi e Nucleosidi	73
7.1.3 Caratteristiche acide.....	73
7.1.4 Funzioni	74
7.2 Acidi Nucleici	75
7.2.1 Il DNA	75
7.2.2 L'RNA.....	78

1 LE PROTEINE

Le proteine sono polimeri lineari costituiti da una catena di unità monometriche, gli amminoacidi. Le proteine contengono molti gruppi funzionali e possono interagire fra di loro e con altre molecole biologiche per formare complessi funzionali (es. DROSHA, APE1). Alcune proteine sono rigide, mentre altre sono relativamente flessibili. Le unità rigide possono funzionare come elementi strutturali del citoscheletro o del tessuto connettivo.

Funzione biologica delle proteine: catalizzare reazioni, trasportare (emoglobina) o conservare (mioglobina) altre molecole, fornire un supporto meccanico o una protezione immunitaria, generare un movimento, trasmettere impulsi nervosi e controllare la crescita e il differenziamento delle cellule.

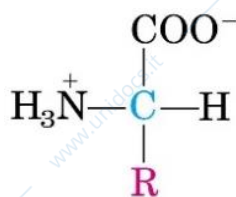
1.1 Amminoacidi

L'analisi di una vasta serie di molecole proteiche provenienti da quasi tutte le fonti disponibili hanno evidenziato che tutte le proteine sono composte da 20 amminoacidi; ovviamente, non tutte le proteine li contengono tutti.

Gli amminoacidi comuni sono noti come α -amminoacidi, poiché possiedono un gruppo amminico primario $-NH_2$ in qualità di sostituito dell'atomo di carbonio α , cioè l'atomo di carbonio adiacente al gruppo carbossilico.

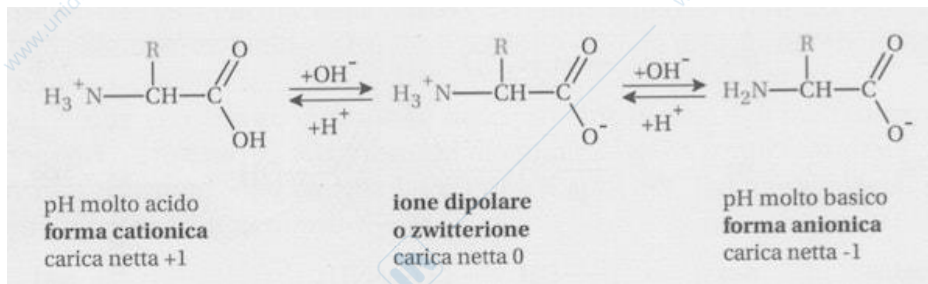
1.1.1 Struttura generale

I 20 amminoacidi sono tutti composti da un carbonio a cui sono legati un idrogeno, un gruppo amminico, un gruppo carbossilico e una catena o un gruppo funzionale R, detto anche **catena laterale**. La diversità tra i 20 amminoacidi deriva proprio dalla struttura di questa catena, la varietà di forme che si possono avere come catena R spiega la grande quantità di funzioni biologiche in grado di essere svolte dalle proteine. Data la disposizione a tetraedro dei quattro gruppi diversi intorno ad esso, gli α -amminoacidi sono molecole chirali. Le due forme, sono dette isomero D (rotazione oraria) e isomero L (rotazione antioraria). Soltanto gli L-amminoacidi formano le proteine.



Come abbiamo già detto, tutti gli amminoacidi abbiano un gruppo amminico ed uno carbossilico, questa caratteristica sancisce le caratteristiche generali degli amminoacidi, soprattutto a livello di pH. Se immerso in una soluzione a pH neutro, l'amminoacido si trova sotto forma di ione dipolare detto anche **struttura zwitteronica** (struttura delineata in precedenza).

Se, da questa condizione neutra, alziamo il pH avremo un abbassamento della presenza di protoni e dunque i due gruppi saranno entrambi deprotonati, avremo la **forma cationica**; mentre se, sempre dalla condizione di neutralità, abbassiamo il pH allora avremo una maggior presenza di protoni ed i due gruppi saranno entrambi protonati, avremo **la forma anionica**.



Tramite questo equilibrio è possibile ricavare la pK dei due gruppi funzionali.

I 20 amminoacidi studiati sono quelli adibiti alla proteinogenesi, ossia alla formazione di proteine. L'uomo può sintetizzare autonomamente solo 10 di questi, gli altri devono essere assunti con la dieta e sono chiamati amminoacidi essenziali.

Negli adulti questi sono: Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano e Valina. Nei bambini, a questi, si aggiungono anche Istidina e Arginina.

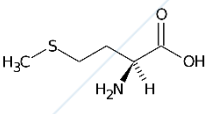
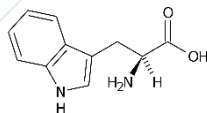
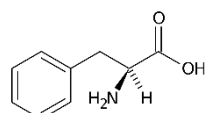
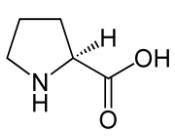
Classificazione degli amminoacidi, avviene tramite le diverse caratteristiche chimiche date dai diversi gruppi R:

- Amminoacidi idrofobici
- Amminoacidi polari
- Amminoacidi carichi positivamente
- Amminoacidi carichi negativamente

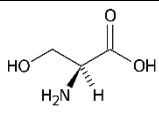
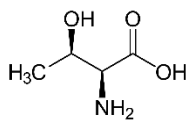
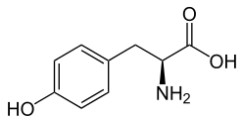
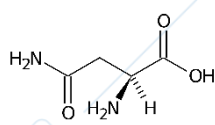
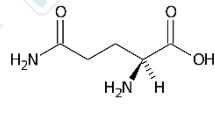
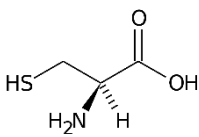
1.1.2 Amminoacidi idrofobici

Le grosse catene laterali alifatiche sono idrofobiche, cioè tendono a raggrupparsi, evitando così il contatto con l'acqua. La struttura tridimensionale delle proteine solubili in acqua viene stabilizzata dalla tendenza delle catene idrofobiche a raggrupparsi, detta **effetto idrofobico**.

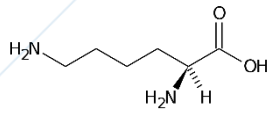
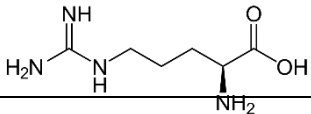
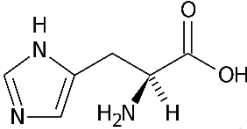
GLICINA – Gly, G		È l'unico amminoacido achirale in quanto ha due gruppi H
ALANINA – Ala, A		
VALINA – Val, V		Tra gli amminoacidi idrofobici, sono quelli che hanno le catene laterali più grandi.
LEUCINA – Leu, L		
ISOLEUCINA – Ile, I		Isomero della Leucina

METIONINA – Met, M		Catena con gruppo tioetere e carattere alifatico
TRIPTOFANO – Trp, W		Presenza di una catena aromatica
FENILALANINA – Phe, F		Presenza di una catena aromatica
PROLINA – Pro, P		La sua catena laterale è legata sia all'atomo di azoto che a quello di carbonio, per questo, sebbene sia considerata amminoacido dovrebbe essere, più accuratamente chiamata imminoacido in quanto possiede un gruppo imminico e non amminico.

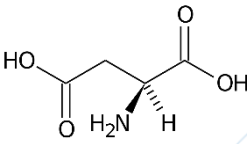
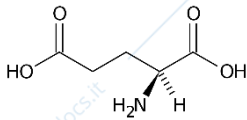
1.1.3 Amminoacidi polari

SERINA – Ser, S		Possiedono un gruppo ossidrilico alifatico nella catena laterale, sono perciò molto idrofilici e molto reattivi. Simili rispettivamente a Ala, Val, Phe.
TREONINA – Thr, T		
TIROSINA – Tyr, Y		
ASPARAGINA – Asn, N		Presenza di un gruppo -CONH2. Anch'essi molto idrofilici.
GLUTAMINA – Gln, Q		
CISTEINA – Cys, C		Presenza di un gruppo solfidrilico o tionilico -SH, molto più reattivo di quello ossidrilico. Molto idrofilico, simile a Ser

1.1.4 Amminoacidi carichi positivamente o basici

LISINA – Lys, K		Termina con un gruppo amminico primario, carico positivamente a Ph neutro.
ARGININA – Arg, R		Termina con un gruppo guanidico, che è carico positivamente a Ph neutro.
ISTIDINA – His, H		Termina con un gruppo imidazolico, che può essere scarico o carico a pH neutro perché ha $pK_a \approx 6$. Spesso si trova nel sito attivo degli enzimi, dove l'anello imidazolico può legare o rilasciare protoni nel corso della reazione catalizzata.

1.1.5 Amminoacidi carichi negativamente o acidi

ACIDO ASPARTICO – Asp, D	
ACIDO GLUTAMMICO – Glu, E	

Sono chiamati anche aspartato e glutammato, per sottolineare che a pH fisiologico le loro catene laterali sono generalmente deprotonate. Tuttavia in alcune proteine le catene laterali di questi due amminoacidi possono accettare protoni, una proprietà importante per la funzione del polipeptide.

1.2 Struttura Primaria

Le proteine sono formate dall'unione del gruppo α -carbossilico di un amminoacido e il gruppo α -amminico di un altro, tramite un tipo di legame detto legame peptidico o legame carbamminico. La formazione di un dipeptide è accompagnata dalla perdita di una molecola d'acqua.

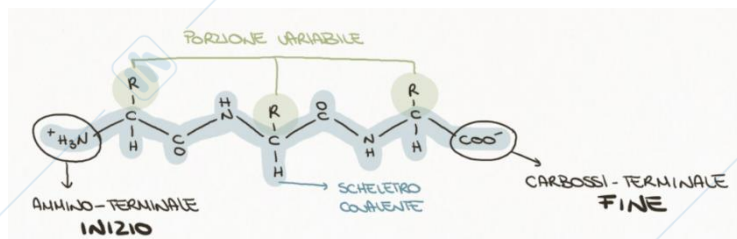
200412

L'equilibrio chimico della reazione è spostato verso l'idrolisi, piuttosto che verso la sintesi, perciò nella cellula la biosintesi dei legami peptidici richiede l'apporto di energia libera.

Tutti gli amminoacidi, avendo tutti gruppi $-NH_3^+$ e $-COO^-$ possono legarsi tra loro formando una **catena polipeptidica**, nella quale ogni unità amminoacidica è detta **residuo**. Questa catena ha due estremità differenti, che la rendono polare, l'**estremità ammino-terminale**, data da un gruppo amminico non ulteriormente legato, e l'**estremità carbossi-terminale**, data da un gruppo

carbossilico non ulteriormente legato. In generale, per convenzione, l'estremità amminica segna l'inizio della catena e l'estremità carbossilica la fine.

Una catena polipeptidica è caratterizzata da una serie di unità regolari ripetute, detta **catena principale** o **scheletro covalente**, che consiste nelle parti di struttura comuni a tutti gli amminoacidi, e da una **porzione variabile**, che comprende le catene laterali R.



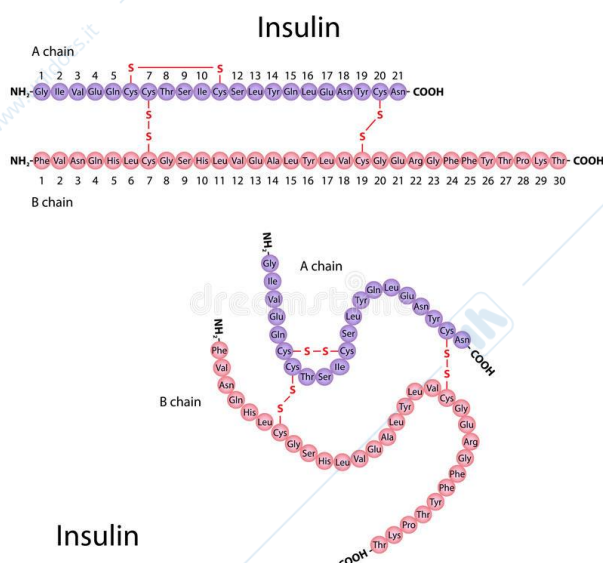
Lo scheletro covalente è ricco di potenziali accettori o donatori di legami idrogeno (gruppo C=O donatore, gruppo -NH- della prolina buon accettore) che possono formare legami.

La maggior parte dei peptidi naturali contiene da 50 a 2000 residui amminoacidici e vengono chiamati **proteine**. I peptidi formati da un numero limitato di residui vengono detti **oligopeptidi** o, semplicemente, peptidi e possono essere sintetizzati artificialmente con facilità.

Nel 1953 Friederick Sanger determinò la sequenza degli amminoacidi dell'insulina. Il suo lavoro è stato una pietra miliare nello sviluppo della biochimica perché ha dimostrato per la prima volta che le proteine hanno sequenze amminoacidiche definite con grande precisione. Ciascuno dei 20 amminoacidi è codificato da una o più sequenze specifiche tra i nucleotidi.

La sequenza amminoacidica di una proteina viene chiamata **struttura primaria**. Dunque, le proteine hanno strutture primarie uniche specificate dai geni presenti nel DNA. Una volta sintetizzata la catena polipeptidica, questa viene sottoposta a diverse modificazioni post-traduzionali. Ad esempio, tutte le proteine quando vengono sintetizzate hanno come amminoacido iniziale la Metionina che, talvolta, viene lisata dopo la completa traduzione dell'intera proteina.

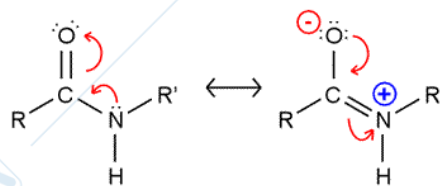
Conoscere la sequenza amminoacidica delle proteine è essenziale per capirne il meccanismo d'azione in quanto la struttura tridimensionale delle proteine, da cui deriva la funzione, dipende da questa sequenza.



L'insulina è composta da due catene legate tra loro tramite legami disolfuro. Viene sintetizzata inizialmente come un'unica catena, si ha solo successivamente la divisione di questa in due catene separate (con perdita di alcuni residui amminoacidici). Solo a questo punto si ha la formazione dei ponti disolfuro (legami covalenti, molto forti).

Il legame peptidico è un legame essenzialmente planare che vede posti sullo stesso piano l'atomo di carbonio α e il gruppo -CO- di un amminoacido e l'atomo di carbonio α e il gruppo -NH- di quello successivo. Si è inoltre visto come questo tipo di legame abbia una lunghezza intermedia tra un le-

game singolo ed uno doppio (legame peptidico = 1,32Å, legame singolo C-N = 1,49Å, legame doppio



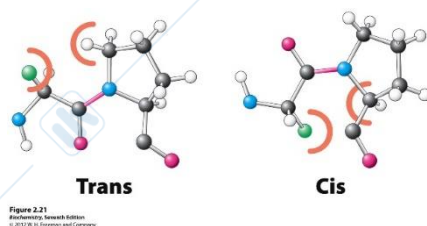
C=N = 1,27Å) assumendo carattere di doppio legame, caratteristica che impedisce la rotazione.

Il legame peptidico planare può assumere due conformazioni:

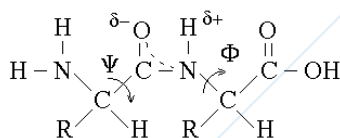
- **Conformazione trans**
I due atomi di carbonio α si trovano in posizione opposta rispetto al doppio legame.
- **Conformazione cis**
I due atomi di carbonio α si trovano sullo stesso lato.

Quasi tutti i legami peptidici delle proteine sono nella forma trans. Questa preferenza è dovuta agli ingombri sterici tra i gruppi legati agli atomi di carbonio α , che ostacolano la forma cis e sono assenti in quella trans.

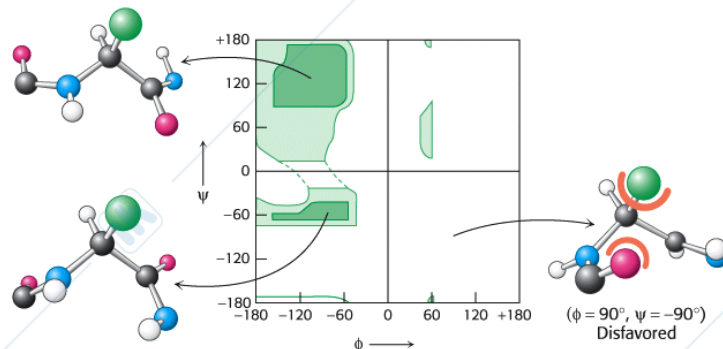
I più comuni legami peptidici in forma cis sono i legami X-Pro. Questi legami hanno una minor preferenza per la configurazione trans, in quanto l'atomo di azoto della prolina è legato a due atomi di carbonio tetraedrici, che limitano le differenze steriche tra le due forme trans e cis.



Al contrario del legame peptidico il legame tra carbonio e gruppo -NH e tra carbonio e gruppo -CO possono ruotare. La libertà di rotazione di ciascun amminoacido intorno a questi due legami permette alle proteine di ripiegarsi in modi diversi. La rotazione è definita dagli angoli di torsione. L'angolo di rotazione intorno al legame C-N è detto ϕ (fi), mentre quello intorno al legame C-CO è detto ψ (psi).



La catena può ripiegarsi in molti modi diversi, consideriamo che teoricamente si può avere una qualunque combinazione tra tutti gli angoli di torsione possibili sui due legami, tuttavia Gopalasamudram Ramachandran ha osservato che molte di queste combinazioni non sono permesse, a causa di interferenze steriche tra gli atomi. I valori permessi possono essere riportati in un grafico a due dimensioni chiamato **Ramachandran Plot**. L'esclusione per impedimenti sterici, cioè il fatto che due atomi non possono occupare la stessa posizione nello stesso momento, è un importante principio che regola l'organizzazione delle strutture chimiche.



Consideriamo che, i polimeri molto flessibili, con un gran numero di possibili conformazioni favorevoli non è detto si ripieghino in un'unica struttura. Tuttavia, la rigidità del legame peptidico, e il ristretto numero di angoli di torsione permessi, limitano il numero delle strutture non ripiegate possibili e favoriscono il ripiegamento della proteina in un'unica struttura corretta.

1.3 Struttura secondaria

Ci sono delle caratteristiche dettate da vincoli di legame e dalle caratteristiche di una certa struttura molecolare, che rendono una certa struttura secondaria favorevole o meno per la proteina:

- Le catene polipeptidiche sfruttano la libertà conformazionale per strutturarsi
- Le interazioni idrofobiche favoriscono la formazione di una struttura secondaria più compatta perché le molecole apolari si ammassano per rendere minima la superficie a contatto con il solvente (H_2O)
- Nella struttura finale si forma il minimo numero possibile di legami a ponte idrogeno
- La struttura è favorita se si ha il contributo di legami elettrostatici e forze di Van der Waals
- La struttura finale è quella termodinamicamente più stabile

Nel 1951, Linus Pauling e Robert Cprey proposero due strutture periodiche e regolari, basate sulla considerazione dell'ingombro sterico e sulla capacità di formare legami a ponte idrogeno. Queste strutture sono:

- **α -elica**
- **Foglietto β**

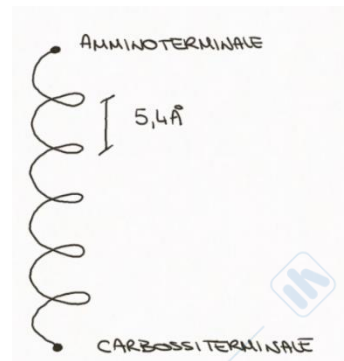
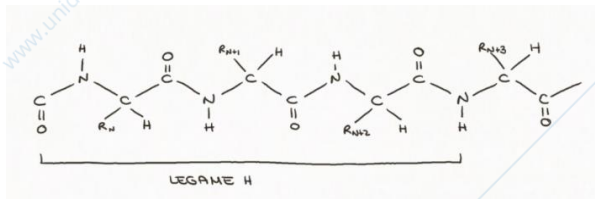
Successivamente sono state individuate altre due strutture che pur non essendo periodiche contribuiscono a determinare la struttura finale delle proteine: ripiegamento β e l'ansa omega (Ω).

Le α -eliche, i foglietti β e i ripiegamenti vengono stabilizzati da serie di legami idrogeno che si formano tra i gruppi N-H e C=O dei legami peptidici tra amminoacidi.

1.3.1 α -elica

In questa struttura lo scheletro covalente è strettamente avvolto e forma una spirale (elica) da cui sporgono le catene laterali degli amminoacidi.

Il gruppo C=O di ogni amminoacido forma un legame idrogeno con il gruppo NH dell'amminoacido posizionato 4 residui più avanti nella sequenza. Quindi, tutti i gruppi CO e NH sono impegnati in legami idrogeno, eccetto quelli degli amminoacidi alle estremità dell' α -elica. Ogni residuo è spostato rispetto al precedente di 1,5Å lungo l'asse dell'elica. Quindi ogni giro dell'elica comprende 3,6 amminoacidi.



Le α -eliche possono essere sinistre (senso antiorario) o destrorse (senso orario). L'elica destrorsa è però energeticamente favorita per ingombro sterico tra le catene laterali e la catena principale, dunque, in natura tutte α -eliche delle proteine sono destrorse.

Non tutti gli amminoacidi possono comporre un' α -elica:

- Valina (Val), Treosina (Thr) e Isoleucina (Ile) destabilizzano l'elica per ingombro sterico dovuto alla presenza di ramificazioni a livello dell'atomo di carbonio β
- Serina (Ser), Acido aspartico (Asp) e Asparagina (Asn) tendono a destabilizzare l'elica perché le loro catene laterali contengono donatori o accettori di legami idrogeno che competono con i gruppi CO e NH
- Prolina (Pro) destabilizza l'elica per assenza di un gruppo -NH

1.3.2 Foglietto β

È composto da due o più catene polipeptidiche, dette catene β che si associano tra loro tramite legami ad idrogeno. Le catene sono quasi completamente estese invece che avvolte su se stesse; infatti, la distanza tra amminoacidi adiacenti è di circa $3,5\text{\AA}$ (nell' α -elica era di $1,5\text{\AA}$).

Le catene dei foglietti possono associarsi in modo:

Antiparallelo	Parallelo
<p>Le catene adiacenti sono disposte in direzioni opposte. Il gruppo NH e CO di ciascun amminoacido formano legami ad idrogeno rispettivamente con il gruppo CO e NH dell'amminoacido corrispondente sull'altra catena.</p>	<p>Le catene adiacenti sono disposte nella stessa direzione. Il gruppo NH e CO di ciascun amminoacido formano legami ad idrogeno rispettivamente con il gruppo NH e CO dell'amminoacido corrispondente sull'altra catena.</p>

Possono formarsi foglietti completamente antiparalleli, completamente paralleli o misti.

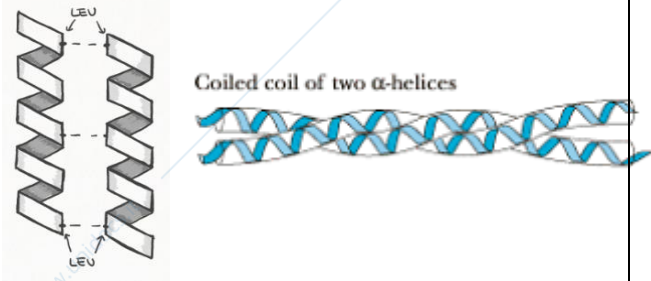
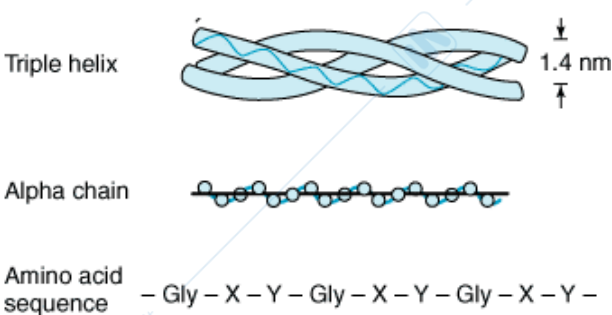
Nelle rappresentazioni schematiche, le catene β vengono raffigurate tramite larghe frecce, che puntano all'estremità C-terminale, in modo da indicare anche se la struttura è antiparallela o parallela.

La maggior parte delle proteine, inoltre, assume una forma globulare dette ripiegamenti β tramite formazione di legami ad idrogeno tra gruppi NH e CO terminali sulla catene; in questo modo si possono avere foglietti misti con forme diverse come, ad esempio:

- Foglietto β - distorto
- Foglietto β - barile

Oltre ai ripiegamenti (turn) la catena può congiungersi attraverso strutture disordinate (loop) che uniscono foglietti β tra loro, α -eliche tra loro e foglietti β con α -eliche.

Strutture secondarie particolari:

<p>α-cheratina</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Composta da due eliche destrorse che formano una superelica sinistrorsa chiamata avvolgimento avvolto di α-eliche • Lunga 100 nm • Le eliche interagiscono tra loro tramite forze di Van der Waals, legami ionici e ponti disolfuro tra residui di cisteina posti vicini • Ogni 7 residui amminoacidici è presente l'amminoacido leucina che reagisce con la leucina posta sull'altra elica • Le eliche sono estensibili ed elastiche, se allungate tornano alla posizione iniziale.
<p>collageno</p>  <p>Triple helix</p> <p>Alpha chain</p> <p>Amino acid sequence - Gly - X - Y - Gly - X - Y - Gly - X - Y -</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Formato da 3 catene polipeptidiche da 1000 residui ciascuna • Presenza frequente di alcuni tipi di amminoacidi: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Glicina (Gly) ogni 3 residui amminoacidici ▪ Prolina (Pro) ▪ Idrossiprolina (Hip), modifica post-trasduzionale della prolina. È presente un gruppo ossidrilico al posto di uno degli atomi di idrogeno nell'anello • Struttura stabilizzata da repulsioni steriche tra gli anelli pirrolidinici di Idrossiprolina (Hip) e Prolina (Pro) e da legami ad idrogeno tra il gruppo -NH della Glicina (Gly) e il gruppo -CO di Prolina o Istidina • La struttura è una treccia formata da 3 eliche dove la glicina è l'unico residuo amminoacidico che può essere presente all'interno della catena.

1.4 Struttura terziaria

Le proteine possono ripiegarsi nello spazio a formare una struttura ripiegata grazie ad interazioni tra le strutture secondarie. Questa disposizione spaziale delle proteine prende nome di **struttura terziaria**. La maggioranza delle strutture terziarie delle proteine è complessa e priva di simmetria, ma ci sono delle caratteristiche più o meno generali:

- In ambiente acquoso le proteine si ripiegano in modo da avere quasi esclusivamente all'interno residui non polari ed all'esterno residui carichi. Quindi, il ripiegamento è guidato dalla forte tendenza dei residui idrofobici a non avere contatti con l'acqua, questo perché termodinamicamente un sistema è tanto più stabile quanto i suoi gruppi idrofobici sono raggruppati tra loro e non liberi nell'ambiente acquoso circostante.
- Le proteine di membrana hanno struttura invertita: i residui amminoacidici idrofili si trovano all'interno mentre quelli idrofili si trovano all'esterno. Le membrane sono formate principalmente da catene idrocarburiche idrofobiche, quindi le porine presentano al loro esterno essenzialmente residui idrofobici, che reagiscono con le catene idrocarburiche dell'ambiente circostante. La parte centrale contiene molti residui amminoacidici polari, che??????
- Alcune combinazioni di strutture secondarie sono presenti in molte proteine, e frequentemente esse hanno anche funzioni simili. Queste combinazioni sono chiamate **motivi** o **strutture supersecondarie**.
Ad es. successione strutture elica-ripiiegamento-elica
- Alcune catene polipeptidiche si ripiegano formando due o più regioni compatte, connesse tra loro da un segmento flessibile della catena polipeptidica. Queste unità globulari connesse tra loro vengono chiamate **domini** e sono composte da 30 a 400 residui amminoacidici. Sono elementi delle proteine in grado di svolgere una determinata funzione ed, in questo, sono indispensabili l'uno all'altro.

1.5 Struttura quaternaria

Consideriamo ora le proteine che contengono più di una catena polipeptidica. Tali proteine possiedono un quarto livello di struttura e ciascuna catena polipeptidica viene chiamata **subunità**. La struttura quaternaria prende in considerazione la disposizione spaziale delle subunità e la natura delle loro interazioni; in pratica è l'unione delle strutture terziarie di proteine. La struttura quaternaria più semplice è quella di un **dimero**, ossia una proteina formata da due subunità identiche; proteine aventi strutture quaternarie più complesse sono dette **oligomeri**.

Come abbiamo già detto, la struttura quaternaria non è propria di tutte le proteine e, in effetti, l'unica struttura che è propria di tutte le proteine è quella primaria. Proteine che possiedono la sola struttura primaria sono dette **nativamente disordinate**.

Agglomerati di strutture quaternarie in grado di interagire con complessi proteici sono detti **strutture supramolecolari** e possono essere:

- **Aperte**
Ossia variabili, possono
- **Chiuse**
Ossia costanti, possono

1.6 Esperimento di Anfisen

Nel 1950, Christian Anfisen verificò che anche se la struttura secondaria di una proteina viene distrutta (tramite rottura di ponti di-solfuro, legami ad idrogeno e forze di Van der Waals) questa è capace di ripristinare la sua struttura tridimensionale. Dunque, rivelò la relazione tra la sequenza degli amminoacidi di una proteina e a sua conformazione. Agenti chimici come l'urea e la guanidina dicloruro provocano la rottura dei legami non covalenti delle proteine. La maggior parte delle proteine prive dei ponti disolfuro assumono in soluzioni di questi due agenti una **conformazione casuale** o **gomitolo casuale**. Anfisen descrisse come la ribonucleasi (enzima contenente 4 ponti disolfuro) trattata con β -mercaptoetanolo e urea assume una conformazione ad avvolgimento casuale completamente ridotta e diventa incapace della sua normale capacità enzimatica.

Quando una proteina assume una momentanea conformazione casuale priva della sua naturale attività, viene a trovarsi in una forma detta **denaturata**; mentre se perde la sua forma e la sua funzione definitivamente la proteina viene detta **degradata**.

Anfisen osservò che se l'agente denaturante viene tolto...

- **Gradualmente**
Allora la proteina è in grado di riformare la sua struttura iniziale e ritornare attiva
- **Bruscamente**
Allora la proteina forma dei legami diversi da quelli nativi e si crea una struttura tridimensionale diversa da quella precedente che la rende inattiva alla sua funzione

Nell'esperimento di Anfisen, in particolare, ci sono 105 modi diversi di accoppiare le 8 cisteine della ribonucleasi a formare i quattro ponti disolfuro; solo una di queste combinazioni rende la proteina funzionalmente attiva. Le altre 104 conformazioni vengono dette ribonucleasi "rimescolate".

L'esperimento dimostrò uno dei principi della biochimica: la sequenza determina anche la conformazione. Dunque le informazioni per la struttura attiva della proteina sono contenute nella struttura primaria e se una proteina viene denaturata è in grado di riacquisire la sua struttura tridimensionale (non altrettanto se viene degradata)

Il ripiegamento delle proteine è un **processo cooperativo**:

Per molte proteine l'andamento della denaturazione in funzione della concentrazione dell'agente denaturante mostra una transizione relativamente rapida dallo stato ripiegato (nativo) allo stato srotolato (denaturato). Questa osservazione suggerisce che solo questi due stati siano presenti in quantità significative e quindi vi sia una rapida transizione tra i due che non lascia posto a stadi intermedi di denaturazione. Il processo di ripiegamento e denaturazione è un processo del tipo "tutto o niente". Infatti, basta che si degradi una sola porzione della proteina per modificare tutta la sua struttura. In realtà, devono comunque esistere tra lo stato nativo e quello degradato delle strutture intermedie, instabili e transitorie.

Le proteine, per ripiegarsi in una struttura corretta non possono "provare" ad assumere tutte le possibili conformazioni, perché sono numericamente troppe ed anche una piccola proteina impiegherebbe troppo tempo per provarle tutte. È probabile che le proteine seguano un processo di ripiegamento in parte predefinito, passando tramite forme intermedie la cui conformazione sta tra la proteina nativa e quella denaturata.

1.7 Proteine e proteoma

Vediamo gli strumenti ed i metodi per studiare le proteine ed il proteoma.

Le proteine si differenziano per:

- Dimensioni
- Polarità
- Struttura

Prima di studiare il quantitativo e il qualitativo delle proteine in un certo campione devo purificare il campione da tutto ciò che non è proteico.

1.7.1 Metodologie di purificazione del campione

- **Centrifugazione differenziale**

Centrifugando il campione tre volte ottengo le seguenti frazioni:

1. Frazione nucleare
2. Frazione mitocondriale
3. Frazione microsomiale

- **Dialisi**

Passaggio da miscela eterogenea a miscela omogenea usando un filtro che trattiene solo le proteine

- **Cromatografia per gel-filtrazione**

Le molecole più piccole rimangono incastrate nel gel che poi viene separato dal restante campione

- **Cromatografia a scambio ionico**

Si utilizza una resina carica elettricamente. Le proteine a carica positiva si legano a molecole di resina negativa e le proteine a carica negativa si legano a molecole di resina positiva.

- **Cromatografia di affinità**

Alcune proteine si legano a specifiche molecole, ad esempio il glucosio, che possono essere usate per separarle dal campione.

- **Elettroforesi su gel**

Le proteine cariche positivamente migrano verso il polo positivo alla fine del gel mentre le proteine cariche negativamente migrano verso il polo negativo alla fine del gel.

1.7.2 Metodologie di indagine della struttura primaria

Per conoscere la sequenza amminoacidica o altri dati rilevanti alla struttura primaria posso usare le seguenti metodologie:

- **Degradazione di Edman**

Individua uno specifico amminoacido (se voglio conoscerne di più devo rifarla più volte). Il metodo diventa più efficace e veloce se lavoro su pezzi piuttosto che sulla proteina intera.

Avviene in due fasi:

1. Marcatura
Unione dell'amminoacido con fenil-isotiocionato
2. Rilascio
Distacco del gruppo amminoacido e fenil-isotiocionato dal resto della proteina

- **Indagine sul DNA**

Identifico uno degli amminoacidi della proteina conoscendo una sequenza di tre basi azotate sulla molecola di DNA

1.7.3 Tecnologia del DNA ricombinante

Posso produrre proteine tramite la tecnologia del DNA ricombinante, per farlo ho bisogno di:

- Un segmento di DNA da inserire nell'organismo ospite per la produzione della proteina
- Che avvenga la combinazione tra gene ospitato e gene ospitante

Uso sistemi viventi come bioreattori per produrre la proteina, questa tecnologia costituisce una nuova via di produzione di farmaci. Posso ingegnerizzare i farmaci modificando "ad arte" sul DNA le sequenze amminoacidiche prodotte dalla cellula.

1.7.4 Studio delle proteine

Problema: mentre il genoma è sempre lo stesso il trascrittoma e il proteoma cambiano da tessuto a tessuto (il risultato è la differenziazione cellulare) e da una fase vitale all'altra.

Metodologie per lo studio delle proteine

Le principali metodologie per lo studio delle proteine sono:

- **Elettroforesi bidimensionale**
Separazione delle proteine in due dimensioni in base a punto isoelettrico e peso molecolare (2 assi)
- **Analisi differenziale**
Studio del proteoma per sapere la differenza proteica tra cellule sane e cellule malate. Esempio: confronto tra proteine di cellule "normali" e proteine di cellule tumorali
- **Spettrometria di massa Maldi-Tof**
Identifica il peso molecolare di una proteina in base al rapporto massa/carica
- **Spettrometria di massa Tandem**
Frammentazione della proteina in peptidi tramite bombardamento con ioni inerti. Dopo si può procedere con l'analisi dei singoli peptidi.

La struttura tridimensionale delle proteine può essere determinata tramite:

- **Cristallografia a raggi X**
Determina struttura tridimensionale della proteina a livello atomico fornendo un'analisi molto dettagliata
- **Spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (NMR)**
Permette di ricavare la struttura di molecole in soluzione e ottenere così immagini più dettagliate rispetto a quelle ottenute con la cristallografia a raggi X

dell'apoproteina, in una posizione specifica: con i gruppi propriolici (unici con carattere idrofilico) verso l'esterno e con i rastanti gruppi (idrofobici) più verso l'interno della proteina.

L'atomo di ferro è localizzato al centro della protoporfirina ed è legato ai quattro atomi di azoto degli anelli pirrolici. Nonostante il ferro legato al gruppo eme possa avere numero di ossidazione +2 o +3, solo nel primo caso la mioglobina è in grado di legare l'ossigeno. La mioglobina avente ferro con numero di ossidazione +3 non è in grado di legare l'ossigeno ed è chiamata **metamioglobina**.

Nella mioglobina, vicino al gruppo eme sono presenti due residui di istidina. L'istidina è capace di legare il gruppo eme covalentemente. L'istidina che si lega al gruppo eme viene detta **prossimale**, l'istidina che non lega il gruppo eme ma comunque interagisce con esso è detta **distale**. L'ossigeno si deve legare al ferro con una geometria particolare che non lo faccia passare dallo stato +2 allo stato +3, altrimenti l'ossigeno verrebbe rilasciato. L'istidina distale modula l'interazione tra i due elementi in modo tale da far legare l'ossigeno a 120° con il ferro e non ossidarlo per ingombro sterico.

Oltre all'ossigeno, ci sono altri gas che si legano al gruppo eme, come, ad esempio, il monossido di carbonio. Questo gas è molto pericoloso perché ha un'affinità al gruppo eme 25 000 volte maggiore rispetto all'ossigeno ed un'affinità alla proteina circa 200 volte maggiore. In condizioni ambientali normali circa l'1% della mioglobina è legata al monossido di carbonio e il 91% della mioglobina è legata all'ossigeno. In condizioni ambientali anormali, con un'alta concentrazione di monossido di carbonio, l'alta affinità di questo alla mioglobina diventa un pericolo mortale.

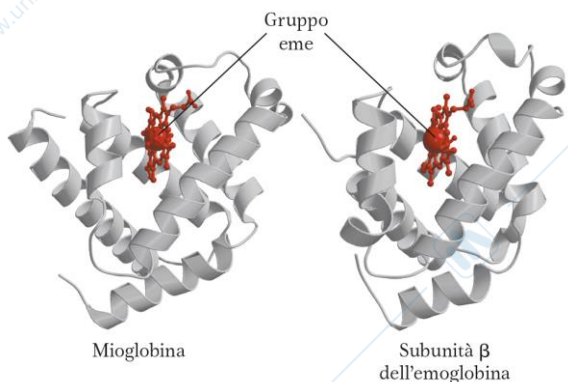
2.2 L'Emoglobina

Tutte le emoglobine di diverse specie studiate nel corso degli anni hanno una struttura comune: possiedono 4 catene polipeptidiche identiche a due a due, queste catene vengono chiamate **subunità** ed, in particolare, **catene α** e **catene β**. Ciascuna subunità comprende una serie di α-eliche disposte in modo simile a quelle della mioglobina. La struttura ricorrente è denominata **ripiegamento globinico**. I residui essenziali per la funzione, come l'istidina prossimale e l'istidina distale, sono conservati in tutte le catene. Quindi le catene dell'emoglobina sono correlate tra loro e con la mioglobina mediante un'evoluzione divergente.

Il tetramero dell'emoglobina, indicato in genere con il nome di **emoglobina A (HbA)**, è meglio descritto come una coppia di due dimeri αβ identici che si associano tra loro.

Somiglianze tra emoglobina e mioglobina:

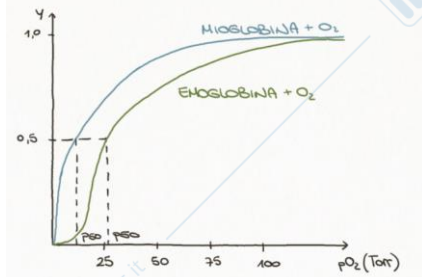
La struttura tridimensionale delle subunità dell'emoglobina assomigliano a quella della mioglobina poiché sequenze aminoacidiche diverse possono specificare strutture tridimensionali simili.



	Mb	Hba	Hbb	Mb	Hba	Hbb
NM1	W	W	W	K	A	A
	T	T	H	K	H	H
	S	S	T	K	V	L
A1	S	S	T	SG	D	D
	E	D	E	H	D	SN
	G	A	E	H	M	L
	E	A	E	E	P	K
	W	K	K	E	N	G
	Q	E	E	E	A	T
	L	N	A	L	N	F
	V	K	V	K	S	A
	L	K	T	K	S	A
	H	A	A	L	L	E
	V	A	A	A	S	S
	W	W	W	Q	D	E
	K	K	K	S	L	S
	K	K	K	K	K	K
	K	K	K	K	K	K
A16	E	G	V	T	D	D
	A	S	V	A	A	C
	A	S	V	T	D	D
B1	SD	SD	N	H	K	K
	V	A	AV	L	L	L
	A	G	D	K	R	H
	G	E	E	L	V	V
	H	V	V	D	D	D
	G	G	G	I	P	100P
	Q	A	G	K	V	E
	D	E	E	Y	N	N
	L	L	L	L	F	R
	L	L	L	F	104L	L
	I	E	G	I	L	L
	F	F	L	S	S	G
	L	M	L	E	H	N
	F	F	L	A	C	V
	K	L	V	I	L	L
	L	L	L	I	L	V
B16	S	S	V	H	V	C
C1	H	F	V	V	T	V
	E	T	W	L	L	L
	T	T	F	H	A	H
	E	T	Q	R	H	H
	E	T	QR	E	H	H
C7	K	Y	F	L	L	L
	F	F	F	100P	P	G
	D	P	P	G	A	104K
	R	H	S	D	F	E
	R	H	S	R	F	E
	K	-	G	H	T	T
	H	D	D	A	F	P
	L	L	D	D	100K	P
	K	S	S	A	V	A
	T	H	T	Q	H	Q
D1	E	-	P	G	A	A
	A	-	H	A	S	A
	E	-	A	M	L	Y
	M	-	V	S	D	Q
	K	-	M	K	K	K
I0	A	G	G	A	F	V
E3	S	S	N	L	L	V
	E	A	N	E	A	A
	SD	Q	K	L	S	G
	L	V	AV	F	V	V
	K	K	K	R	S	A
	K	G	A	100K	T	N
Hb 127	H	H	H	D	V	100A
	G	G	G	I	L	L
	Y	AK	K	A	T	A
	T	K	K	A	S	H
	T	K	K	K	K	K
	L	A	L	K	100Y	102Y
	T	A	G	K	100Y	102Y
	A	A	A	K	100Y	102Y
	L	L	F	K	100Y	102Y
	G	T	S	K	100Y	102Y
	A	N	D	Y		
	L	A	G	Y		
E39	L	V	L	100G		

2.2.1 Emoglobina: un trasportatore efficiente

Facciamo un confronto tra curva di legame dell'ossigeno della **mioglobina** e quella dell'**emoglobina**: la curva di legame dell'ossigeno è un grafico in cui la saturazione frazionale viene riportata in funzione della concentrazione dell'ossigeno. La saturazione frazionale, Y , è definita come la frazione dei possibili siti di legame a cui effettivamente è legato l'ossigeno e perciò può variare da 0 (tutti i siti sono vuoti) a 1 (tutti i siti sono occupati). La concentrazione dell'ossigeno è più correttamente riportata sotto forma di pressione parziale pO_2 .

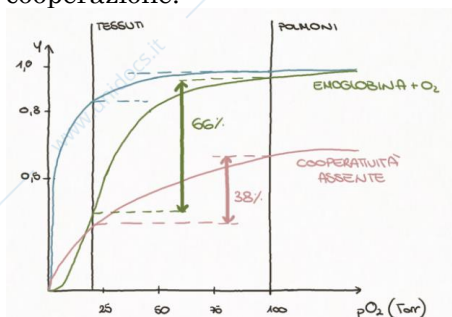


p_{50} : valore della p a cui il 50% dei siti sono saturati (legati ad O_2)

Osserviamo che:

- **La curva per la mioglobina** ha un andamento iperbolico, tipico di un semplice equilibrio chimico. La curva aumenta rapidamente all'aumentare di pO_2 , fino a livellarsi su un valore pressoché costante, tendente a $Y=1,0$. Il valore di pO_2 a cui la metà dei siti sono occupati (p_{50}) è di appena 2 Torr.
- **La curva per l'emoglobina** ha un andamento ad S ossia ha un andamento sigmoide e la curva prende il nome di curva sigmoidea. Curve di questo tipo, in biologia, indicano un comportamento peculiare: una cooperazione. Infatti ci suggerisce che una volta che l'ossigeno si lega a uno dei quattro possibili siti di legame, la probabilità che un'altra molecola di ossigeno si leghi ad un altro sito di legame aumenta. Analogamente, il distacco dell'ossigeno da un sito promuove il distacco delle molecole d'ossigeno dagli altri tre. Le reazioni di legame dell'ossigeno al sito attivo non sono tra loro indipendenti, ecco perché il meccanismo viene detto cooperativo.

Confrontiamo ora i due grafici precedenti con una curva ipotetica per l'emoglobina dove non c'è cooperazione.



Consideriamo l'efficienza dei tre trasportatori, ossia la differenza tra la percentuale di saturazione nei polmoni (ossia praticamente la saturazione massima) e la percentuale di saturazione a livello dei tessuti (dove l'ossigeno viene scaricato):

L'emoglobina è effettivamente un trasportatore efficiente poiché scarica il 66% dell'ossigeno legato. La mioglobina non è altrettanto efficiente come trasportatore perché scarica solo il 7%. L'ipotetico trasportatore senza cooperatività non è efficiente quanto l'emoglobina avente cooperazione in quanto scarica solo il 38%.

Ossigenazione e variazioni nella struttura quaternaria

Abbiamo visto come il comportamento di cooperazione attuato dai quattro siti di legame comporta che il legame dell'ossigeno a uno di essi influenzi anche gli altri. Tuttavia, non è possibile un'interazione diretta tra i siti, perché essi si trovano troppo distanti all'interno della molecola di emoglobina. Ne consegue che l'interazione dev'essere mediata da meccanismi indiretti, correlati con la struttura quaternaria.

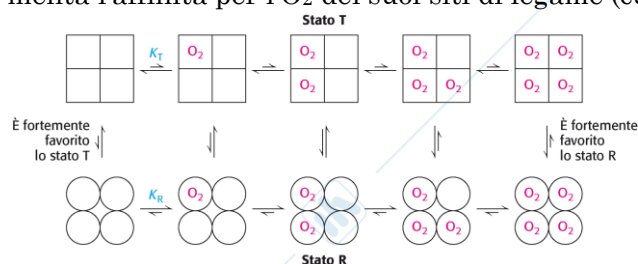
Effettivamente, durante l'ossigenazione l'emoglobina va incontro ad imponenti cambiamenti della struttura quaternaria: i dimeri $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, ruotano di circa 15° l'uno rispetto all'altro e sono più liberi di muoversi l'uno rispetto all'altro. Dunque, avremo due strutture quaternarie per l'emoglobina: la deossiemoglobina avrà una **struttura T** (tense) con le quattro subunità unite saldamente insieme; mentre la ossiemoglobina avrà una **struttura R** (relaxed) dove le strutture sono "più libere".

Riassumendo: il legame dell'ossigeno a uno dei quattro siti induce una modificazione conformazionale dell'emoglobina dallo stato T allo stato R che a sua volta aumenta l'affinità per l'ossigeno degli altri siti.

Sono stati elaborati due modelli limite per spiegare questo processo:

1. Modello concentrato o modello MWC

La proteina multimerica può essere presente in due stati conformazionali, T ed R. Il legame del ligando sposta l'equilibrio fra i due stati. Quando una molecola assume la forma R aumenta l'affinità per l'O₂ dei suoi siti di legame (curva sigmoide).



2. Modello sequenziale

Il legame di un ligando aumenta l'affinità di legame dei siti vicini senza indurre la conversione completa della molecola.



Qual è il modello che descrive meglio il meccanismo?

Nessuno dei due, è necessario ricorrere ad un modello combinato. Il comportamento dell'emoglobina non segue fedelmente il modello concentrato poiché, sebbene la struttura quaternaria con tre siti occupati sia ben descritta dal modello, l'affinità per l'ossigeno di questa molecola monossigenata è tre volte superiore a quella dell'emoglobina deossigenata, concretamente con il modello sequenziale.

Il legame dell'ossigeno comporta lo spostamento di ciascun atomo di Fe dell'emoglobina all'interno del piano della porfirina. Quando l'atomo di ferro si muove, insieme a esso si muove anche il residuo di istidina prossimale facente parte di un' α -elica, che quindi si muoverà a sua volta. La modificazione strutturale a livello dello ione ferro in una subunità viene direttamente trasmessa alle altre per modificazione consequenziale di tutta la molecola.

Ci sono altre molecole che possono modificare l'affinità dell'emoglobina con l'ossigeno:

- **2,3-bifosfoglicerato**

Senza questa molecole l'efficacia dell'emoglobina come trasportatore sarebbe dell'8% e non del 66%.

070518

Affinchè l'emoglobina possa trasferire efficacemente l'ossigeno ai tessuti è necessario che la forma T rimanga stabile, fino a che il legame dell'ossigeno la converte in forma R. Tuttavia lo stato T non è affatto stabile (l'emoglobina tende a stare in forma R per interazioni tra le molecole) e non permette il rilascio dell'ossigeno in condizioni fisiologiche. Si è visto come l'emoglobina purificata lega l'ossigeno molto più drasticamente rispetto all'emoglobina degli eritrociti; questo perché negli eritrociti è presente il 2,3-bisfosfoglicerato. Una singola molecola si lega al centro del tetramero, in una tasca presente solo nella forma T dell'emoglobina. A seguito della transizione da T ad R la tasca si contrae e la molecola viene rilasciata. Si parla di **controllo allosterico** (la molecola, cambiando la sua forma, lega con meno o più facilità determinate molecole).

Il 2,3-bisfosfoglicerato dà interazioni con i residui che sporgono in questa tasca: His2, Lys82, Hys143 della subunità β ; interazioni che stabilizzano la struttura T fino a che non viene raggiunta una concentrazione di ossigeno più elevata.

Emoglobina fetale:

Il gene per l'emoglobina espresso da un feto umano differisce da quello espresso dall'adulto; il tetramero dell'emoglobina fetale è formato da due catene α e due catene γ . Una differenza importante tra catene β e γ è la presenza di un residuo di Ser in posizione 143, al posto di un'istidina della catena β . Poichè quest'istidina fa parte del sito di legame del 2,3-bisfosfoglicerato, questo ha affinità ridotta per l'emoglobina. Dunque, l'affinità per l'ossigeno fetale è più alta di quella materna rendendo possibile il trasferimento dell'ossigeno dagli eritrociti materni a quelli fetali.

- H^+ , CO_2

3 ENZIMI

Gli enzimi sono un gruppo di proteine che catalizzano le reazioni chimiche dei sistemi biologici senza consumarsi, dunque, sono molto importanti a livello del metabolismo cellulare.

A differenza dei catalizzatori inorganici, agiscono a bassissime concentrazioni, in determinate condizioni e manifestando una specificità nei confronti delle molecole da trasformare.

Caratteristiche:

- Potere catalitico

Catalizzano le reazioni chimiche aumentando la velocità di reazione di circa 10^6 volte

- Mediano la conversione di energia tra una forma e l'altra
- Circa un quarto dei geni appartenenti al genoma umano codifica per enzimi
- Quasi tutti gli enzimi sono proteine

La scoperta di molecole di RNA cataliticamente attive suggerisce che, durante l'evoluzione, l'RNA sia stato il primo biocatalizzatore.

- Specificità

Hanno un potere catalitico altamente specifico sia per la reazione catalizzata, sia per la scelta dei reagenti, chiamati **substrati**. La **specificità relativa** è riferita al fatto che l'enzima può agire anche su substrati chimicamente diversi, mentre nel caso della **specificità assoluta**, l'enzima riconosce solo determinati substrati e catalizza solo quella reazione.

- Non vengono modificati dalla reazione che catalizzano e non ne modificano l'equilibrio
- Possono accoppiare reazioni energeticamente sfavorevoli con la sintesi di ATP, rendendole possibili
- Agiscono in un arco ristretto di condizioni quali pH, temperatura, ecc...

Come viene catalizzata la reazione?

Gli enzimi legano i substrati al **sito attivo** con un orientamento ottimale, dal quale dipende la formazione o la rottura di legami chimici. Essi catalizzano le reazioni anche stabilizzando gli stati di transizione. Stabilizzando uno specifico stato di transizione, gli enzimi determinano quale reazione avrà luogo tra le molte possibili.

Molti enzimi richiedono l'intervento di piccole molecole, chiamate **cofattori**. In genere, i cofattori partecipano a reazioni chimiche che non possono avvenire se sono presenti solo le catene laterali dei 20 amminoacidi standard. Un enzima senza il suo fattore è detto **apoenzima**; l'enzima completo, cataliticamente attivo è detto **oloenzima**. Quindi:

Apoenzima + cofattore = oloenzima

I cofattori possono essere divisi in due gruppi:

1. Metalli
2. Coenzimi, piccole molecole organiche.

Spesso i coenzimi sono derivati di vitamine e possono essere fortemente o blandamente legati agli enzimi. I coenzimi fortemente legati prendono il nome di **gruppi prostetici**.

Gli enzimi che utilizzano lo stesso coenzima utilizzano spesso meccanismi simili.

3.1 Il sito attivo

Il sito attivo è la regione a cui si lega il substrato e i cofattori (se ci sono).

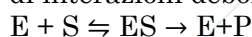
Caratteristiche:

- Costituito da una tasca (o fenditura) tridimensionale

- Occupa una parte relativamente piccola della superficie dell'enzima
- È un "ambiente unico", particolare, dove l'acqua non è esclusa
- L'interazione con il substrato è debole
- Parte colorata immagine → se vediamo dove si posizionano questi residui componenti il sito attivo sulla struttura primaria, questi non sono vicini => sono vicini solo grazie al ripiegamento della proteina.
- La specificità del legame dipende dalla disposizione degli atomi nel sito attivo.

L'adattamento indotto è un modello più appropriato rispetto a "chiave-serratura" perché il sito attivo non è rigidamente complementare al substrato ma vi si adatta.

Come ottengono gli enzimi l'energia necessaria per abbassare l'energia di attivazione? Per aumento di interazioni deboli E-S, questo causa un abbassamento della ΔG .



3.2 Classificazione

La classificazione si basa sulle reazioni che vengono catalizzate:

- 1. Ossidoriduttasi**
Enzimi che catalizzano reazioni redox => O, H, o e⁻
- 2. Transferasi**
Enzimi in grado di promuovere, accelerare, il trasferimento di un gruppo chimico da una molecola all'altra (intermolecolarmente)
- 3. Idrolasi**
Catalizzano reazioni di idrolisi (scissione di un legame)
- 4. Liasi/sintasi**
Catalizzano reazioni di addizione o rimozione non idrolitica di un gruppo (rottura non idrolitica di legami)
- 5. Isomerasi**
Catalizzano reazioni che causano riarrangiamento intramolecolari come formazione di isomeri
- 6. Ligasi**
Catalizzano reazioni che promuovono la formazione di legami, reazioni che necessitano di ATP

Siglatura:

Tripsina EC 3.4.21.4

3 → tipo di enzima --- idrolasi

4 → tipo di legame su cui agisce – peptidico

21 → famiglia --- serin endopeptidasi

4 → enzima specifico – tripsina

3.3 Proprietà cinetiche

070501

La velocità di reazione è strettamente collegata alla concentrazione di substrato ed è rappresentata dal grafico:

070502

La curva è un ramo d'iperbole e rappresenta un andamento simile all'interazione tra mioglobina e O₂; in K_M, la concentrazione di substrato è tale per avere una velocità di reazione pari alla metà di quella massima quindi

$v = \frac{1}{2} v_{MAX}$. K_M varia in base al tipo di substrato e alle condizioni di pH, T e forza ionica. Due enzimi con diverso K_M possono reagire con lo stesso substrato, ma danno prodotti diversi.

La relazione tra velocità di reazione e concentrazione di substrato è descritta dall'equazione di **Michaelis-Menten**:

$$V = V_{max} * \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

La dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione di substrato è

- **Alta** quando [S] è molto bassa;
- **Bassa** quando [S] è molto alta.

La relazione tra velocità di reazione e concentrazione del substrato a quantità di enzima costante può essere descritta anche dal grafico di **Lineweaver-Burk**, in cui avremo sull'asse delle ordinate il reciproco della velocità e sull'asse delle ascisse il reciproco della concentrazione di substrato.

090501

Il grafico è una retta descritta dall'equazione:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{MAX}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{MAX}}$$

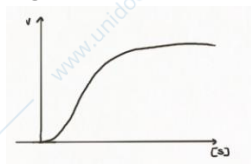
Dove $\frac{1}{v} = y$; $\frac{1}{[S]} = x$; $\frac{K_M}{v_{MAX}} = m$ e $\frac{1}{v_{MAX}} = q$

Il punto di intersezione della retta con l'asse delle ascisse è il punto $(-\frac{1}{K_M}; 0)$ mentre il punto di intersezione della retta con l'asse delle ordinate è $(0; \frac{1}{v_{MAX}})$ e, perciò, ci sono d'aiuto se vogliamo conoscere questi due parametri.

Il **numero di turnover** corrisponde al numero di molecole di substrato che vengono convertite in prodotto da una molecola di enzima in una unità di tempo.

3.4 Enzimi allosterici

Gli **enzimi allosterici** sono enzimi che non seguono la cinetica descritta dall'equazione di Michaelis-Menten poiché hanno più subunità che agiscono cooperativamente e perciò hanno una curva sigmoide.



Avendo una cooperazione tra le subunità, anche in questo caso possiamo distinguere una forma tesa con minor affinità per il substrato e una forma rilassata con maggior affinità per il substrato ed anche in questo caso il meccanismo viene spiegato da due diversi modelli: **modello simmetrico (MWC)** e modello **sequenziale (KNF)**.

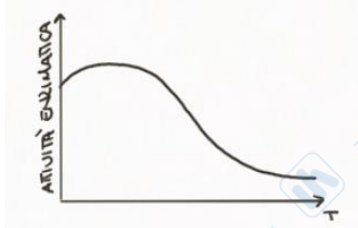
3.5 Fattori che influiscono sull'attività enzimatica

I fattori che influiscono sull'attività enzimatica sono:

- **Temperatura**

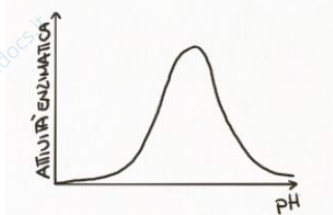
L'attività enzimatica aumenta all'aumentare della temperatura perché si ha un aumento dell'energia cinetica delle particelle e quindi anche un aumento della probabilità di interazioni tra le particelle. Ovviamente, questo aumento di temperatura può arrivare fino ad un certo punto (56°) perché a temperature troppo alte gli enzimi si denaturano (si ha la rottura

dei legami secondari che stabilizzano la conformazione della proteina). Al di sotto dei 0°C gli enzimi rallentano la loro attività e sono poco reattivi.



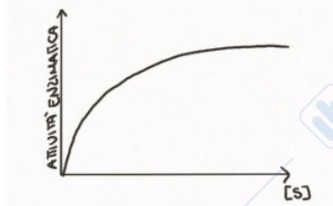
• **pH**

Ogni enzima ha un suo pH ottimale, a cui corrisponde la sua attività massima. I pH troppo acidi o basici provocano una variazione elettrica dei gruppi funzionali, con conseguente alterazione anche del sito catalitico, per cui le reazioni potrebbero non aver luogo per variazione di carica di residui implicati nell'azione catalitica o variazioni di disponibilità di formazione di legami ad idrogeno.

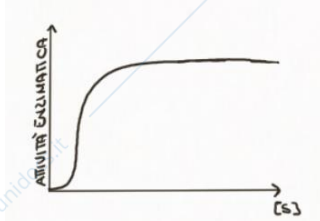


• **Concentrazione del substrato [S]**

Enzimi seguenti l'equazione MM:



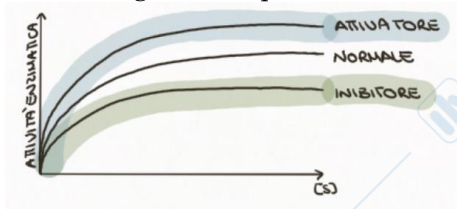
Enzimi allosterici:



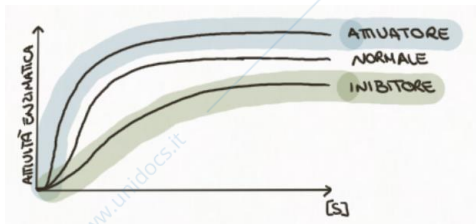
• **Inibitori/attivatori**

Sono molecole che, legandosi all'enzima, possono cambiare l'affinità enzima-substrato

Enzimi seguenti l'equazione MM:



Enzimi allosterici:

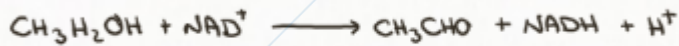


- **Concentrazione dell'enzima [E]**

All'aumentare della quantità di enzima aumenta l'attività enzimatica
080508/

3.6 Saggio enzimatico

I valori di un enzima, velocità e concentrazione di substrato, possono essere determinati sperimentalmente. Da questi dati si possono poi ricavare tutti gli altri riguardanti la cinetica dell'enzima. Es. analizzo la reazione dell'etanolo che viene convertito da alcoldeidrogenasi in acetaldeide



Per determinare i valori di un enzima, allestiamo un certo numero di provette con diverse quantità di substrato, una quantità fissa di enzima e misuriamo (dopo un certo intervallo di tempo) la quantità di prodotto che si è formata. Come faccio a misurare la quantità di prodotto nella miscela? NADH avrà una certa lunghezza d'onda, dunque possiamo analizzare il campione spettrofotometricamente e conoscerne la quantità di NADH. Questa quantità, per stechiometria della reazione è uguale alla quantità di acetaldeide. Ora posso ricavare la quantità di prodotto formatasi in un'unità di tempo e dunque anche la velocità a cui avviene la reazione.

3.7 Inibitori

Gli inibitori si distinguono in:

- **Inibitori irreversibili**

Sono molecole che si legano all'enzima e si dissociano da esso molto lentamente (legame inibitore-enzima molto forte o covalente).

Es. la Pennicillina è un inibitore che blocca un enzima che sintetizza la produzione della parete batterica. L'Aspirina blocca la cicloossigenasi nel processo di infiammazione. I gas nervini bloccano l'acetilcolinesterasi nel processo di trasmissione dell'impulso nervoso.

- **Inibitori reversibili**

Sono molecole che interagiscono con l'enzima e si dissociano rapidamente. Sono molto frequenti dal punto di vista biologico, il tipo di regolazione è più tenue.

3.7.1 Inibitori reversibili

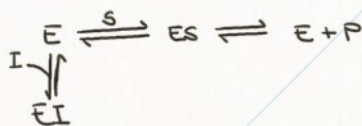
Esistono diversi tipi di inibitori reversibili:

- **Inibitore competitivo**

L'inibitore lega l'enzima competendo con il substrato per il legame nel sito attivo (imita il substrato per occupare il sito).

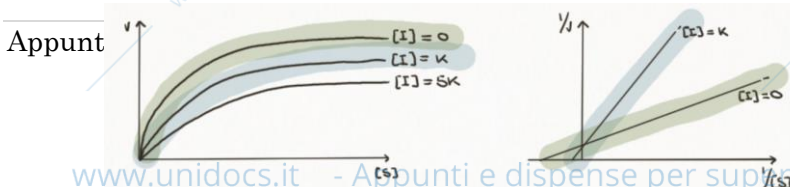


La reazione che avviene può essere schematizzata come segue:



Una certa quantità di enzima viene "portata via" perché una molecola di enzima o si lega al substrato o l'inibitore tuttavia l'efficienza della catalisi non cambia (sta solo più tempo ad essere effettuata) perché l'inibizione può essere limitata aumentando [S].

Avremo dei grafici del tipo:



Dal secondo si può vedere come K_M aumenta in presenza di inibitore rispetto a quando è assente, mentre V_{MAX} rimane uguale.

- **Inibitore incompetitivo**

L'inibitore si lega all'enzima quando questo è complessato con il substrato. L'inibitore può legarsi solamente quando il substrato si lega all'enzima.

090506/

La reazione che avviene può essere schematizzata come segue:

090507/

L'inibitore non può legarsi all'enzima privo di substrato e l'inibizione non può essere limitata aumentando $[S]$.

Avremo dei grafici del tipo:

090508/

Dal secondo si può vedere come K_M e V_{MAX} in presenza di inibitore rispetto a quando è assente.

Inibitore non competitivo

L'inibitore si lega all'enzima, non nel sito attivo, modificandone la struttura e diminuisce la sua affinità verso il substrato.

090509/

La reazione che avviene può essere schematizzata come segue:

090510/

L'enzima può legarsi anche quando non c'è substrato e l'inibizione non può essere limitata aumentando $[S]$.

Avremo dei grafici del tipo:

090511/

Dal secondo si può vedere come K_M rimane uguale, mentre V_{MAX} aumenta in presenza di inibitore rispetto a quando è assente.

3.8 Strategie catalitiche

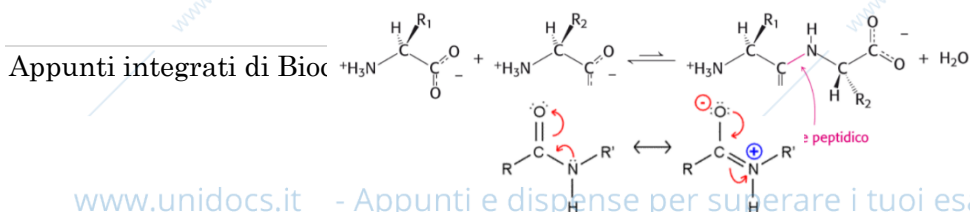
Per catalizzare reazioni specifiche gli enzimi impiegano una o più delle seguenti strategie:

- Catalisi covalente
- Generalmente, gli enzimi che sfruttano questa strategia hanno un gruppo reattivo (di solito nucleofilo) nel sito attivo, capace di legarsi covalentemente ad una regione del substrato.
- Catalisi generale acido-base
- Nella catalisi generale acido-base una molecola (diversa dall' H_2O) funge da donatore o accettore di elettroni
- Catalisi per prossimità
- In molte reazioni partecipano due substrati distinti; in questi casi la reazione viene catalizzata ponendo i due substrati uno vicino all'altro.
- Catalisi da ioni metallici
- Gli ioni metallici possono aiutare la catalisi delle reazioni in due modi: possono facilitare la formazione di un nucleofilo oppure possono fungere da agenti elettrofili, stabilizzando una carica negativa di un intermedio della reazione.

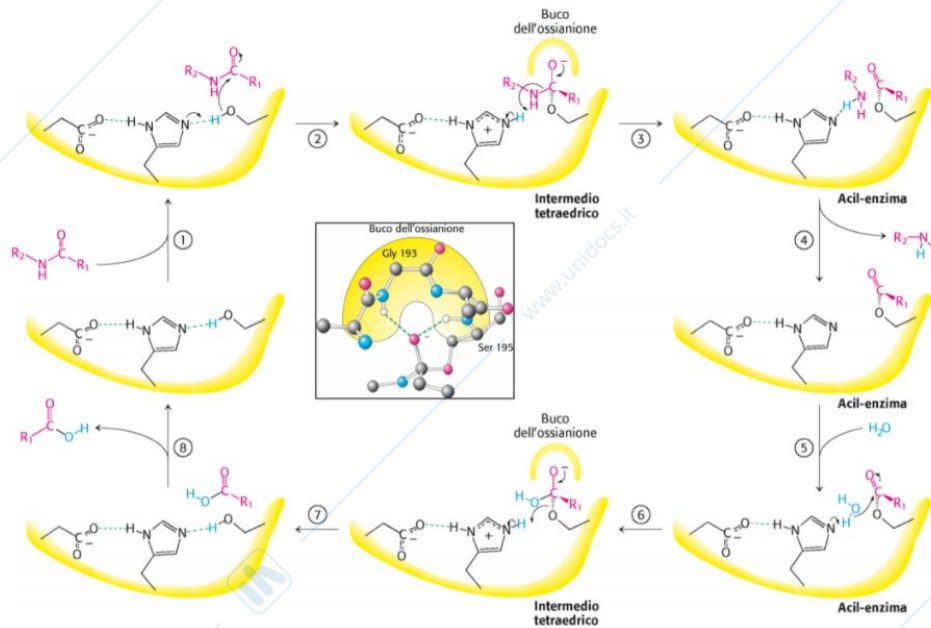
Vedremo in seguito alcune famiglie di enzimi usanti queste strategie catalitiche.

3.8.1 Le proteasi

Le proteasi sono enzimi che legano le proteine ed aiutano il processo di degradazione utile per la digestione, il turnover (le proteine che hanno svolto il loro compito vengono demolite per il riciclo degli amminoacidi) ed altri meccanismi utili. Le proteasi scindono le proteine con un meccanismo idrolitico, che consiste nell'aggiunta di una molecola d'acqua al legame peptidico. Termodinamicamente è favorita l'idrolisi, quindi questo processo dovrebbe essere spontaneo, tuttavia, la reazione non avviene con facilità e per questo dev'essere catalizzata.

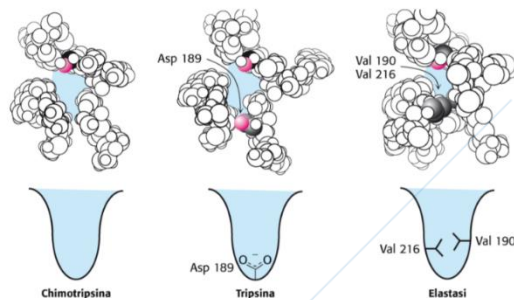


- Una molecola d'acqua va a prendere il posto prima occupato dalla componente amminica del substrato ed il gruppo estere dell'acil enzima viene idrolizzato con un processo che riprende le fasi da 2 a 4.
- Agendo con un meccanismo di catalisi acida generale, l'istidina 57 stacca un protone dall'acqua. Lo ione OH^- così formato attacca l'atomo carbonilico del gruppo acilico formando un intermedio tetraedrico.
- Questa struttura collassa, per formare un acido carbossilico come prodotto finale
- Infine, il rilascio dell'acido carbossilico rende l'enzima disponibile per un altro ciclo di reazioni.



Triade catalitica in altri enzimi

Sono state trovate molte altre proteine contenenti una triade catalitica. Alcune di esse, come la **tripsina** e l'**elastasi**, sono evidenti omologhi della chimotripsina.



In cosa consiste la differenza tra tripsina, chimotripsina ed elastasi?

Nelle differenti specificità di substrato dovute a piccole differenze strutturali. Infatti, la chimotripsina scinde legami peptidici che si trovano immediatamente dopo residui con catene laterali aromatiche, o lunghe catene non polari. La tripsina idrolizza i legami peptidici che si trovano immediatamente dopo residui con lunghe catene laterali cariche positivamente, come quelle dell'arginina e della lisina. L'elastasi idrolizza i legami peptidici che seguono residui con catene laterali piccole, come quelle dell'alanina e della serina. Nella tripsina, un residuo di aspartato (Asp189) è presente in fondo alla tasca, al posto del residuo di serina della chimotripsina. Il residuo di aspartato attrae e stabilizza i residui di arginina o di lisina carichi positivamente, presenti nel substrato. Nell'elastasi, all'inizio della tasca, sono presenti due residui di valina (Val190 e Val216)

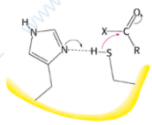
che chiudono l'entrata della tasca, in modo da permettere l'ingresso solo a catene laterali di piccole dimensioni.

Altre famiglie di proteasi

Non tutte le proteasi utilizzano strategie basate sull'attivazione di residui di serina. Sono state scoperte classi di proteine che per idrolizzare il legame peptidico utilizzano meccanismi alternativi. Comunque, la strategia è sempre la stessa: generare un forte nucleofilo per attaccare il carbonio carbonilico del legame peptidico.

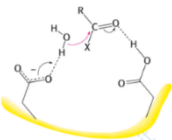
Cistein proteasi

In questo gruppo di enzimi un residuo di cisteina, attivato da un residuo di istidina, svolge il ruolo di nucleofilo, che attacca il legame peptidico con un meccanismo del tutto simile a quello del residuo di serina nelle serin proteasi. Essendo però l'atomo di zolfo della cisteina un nucleofilo migliore dell'atomo di ossigeno della serina, sembra che le cistein proteasi richiedano solo questo residuo di istidina oltre alla cisteina e non l'intera triade catalitica. Esempi di cistein proteasi sono la papaina (papaia), le catepsine (sistema immunitario) e le caspasi (apoptosi).



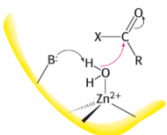
Aspartil proteasi

La caratteristica principale dei loro diti attivi è la presenza di due residui di acido aspartico, che agiscono insieme, per permettere a una molecola di acqua di attaccare il legame peptidico. Un residuo di acido aspartico (nella sua forma deprotonata) attiva la molecola di acqua che interverrà nella catalisi, prepalandola ad essere deprotonata. L'altro residuo di acido aspartico (nella sua forma protonata), polarizza il gruppo carbonilico del legame peptidico, per renderlo più suscettibile all'attacco nucleofilo. Esempi di aspartil proteasi sono la renina (pressione sanguigna), la pepsina (stomaco) e le proteasi HIV.



Metalloproteasi

Il sito attivo delle metalloproteasi contiene uno ione metallico legato, quasi sempre uno ione zinco, che attiva una molecola di acqua per attivarla nella forma di un nucleofilo capace di attaccare un gruppo carbonilico del peptide. Esempi di metalloproteasi sono la termolisina (batterico), le carbosipeptidasi A (digestione), la metalloproteasi della matrice.



Inibitori delle proteasi

Alcuni importanti farmaci sono inibitori delle proteasi. Per esempio, il **captopril**, usato nella regolazione della pressione sanguigna, è un inibitore di una metalloproteasi. L'indivavir, il retrovir e almeno altri 20 composti usati nel trattamento dell'AIDS sono inibitori della proteasi dell'HIV, una aspartil proteasi.

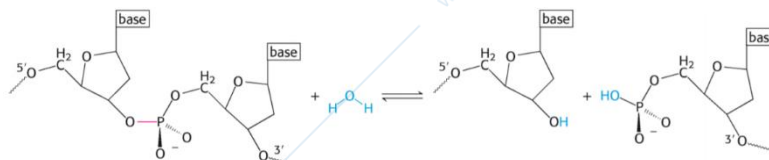
3.8.2 Le endonucleasi di restrizione

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi che degradano il DNA tramite idrolisi. Sono enzimi prodotti da batteri ed archeobatteri e costituiscono un sistema di difesa contro le infezioni virali: quando il virus infetta la cellula batterica inietta in essa il suo DNA, gli enzimi di restrizione degradano il DNA virale iniettato limitando le possibilità di infezione da parte dei virus. Le endonucleasi di restrizione devono mostrare un elevato grado di specificità a due livelli: non devono degradare il DNA genomico che contenga sequenze simili a quelle di restrizione e devono tagliare solo le molecole di DNA che contengono le sequenze di riconoscimento.

Le endonucleasi di restrizione sono di grande importanza scientifica poiché hanno permesso l'elaborazione della tecnologia del DNA ricombinante. Le classi di enzimi di restrizione meglio studiate comprendono gli enzimi di restrizione di tipo II, che scindono il DNA all'interno delle loro sequenze di riconoscimento. Altri tipi di enzimi di restrizione tagliano il DNA in posizioni alquanto distanti da tali siti.

Meccanismo: azione delle endonucleasi

Le endonucleasi di restrizione catalizzano l'idrolisi del legame fosfodiesterico del DNA. Più specificamente, viene scisso il legame tra l'atomo di ossigeno in 3' e l'atomo di fosforo.



Possiamo ipotizzare due meccanismi di idrolisi:

1. **Taglio del DNA con formazione di un intermedio covalente**, tramite un potente nucleofilo, meccanismo simile all'azione della chimotripsina.
2. **Taglio del DNA tramite idrolisi diretta**, meccanismo simile all'azione delle aspartil proteasi (molecola d'acqua resa particolarmente reattiva).

Secondo dati sperimentali il secondo meccanismo è più verosimile, perché?

I due meccanismi differiscono per il numero di sostituzioni nucleofile a livello dell'atomo di fosforo. Nel meccanismo di tipo 1, un nucleofilo appartenente all'enzima attacca il gruppo fosforico, per formare un intermedio covalente. Nella seconda fase, l'intermedio viene idrolizzato per generare i prodotti finali. Quindi si hanno due reazioni di sostituzione nucleofila. Di conseguenza, la configurazione dell'atomo di fosforo viene invertita due volte quindi è equivalente a quella iniziale. Nel meccanismo di tipo 2, una molecola d'acqua attivata attacca direttamente l'atomo di fosforo. Questo meccanismo comporta una singola reazione di sostituzione nucleofila e quindi la configurazione dell'atomo di fosforo si trova invertita.

I risultati sperimentali hanno rivelato che la configurazione stereochimica dell'atomo di fosforo alla fine della reazione è invertita, quindi sperimentalmente è più verosimile il meccanismo di tipo 2.

Molti enzimi che agiscono su substrati che contengono il gruppo fosforico richiedono la presenza di ioni metallici (spesso Mg^{2+}) che si legano all'enzima per azione di due residui di Asp. Il ruolo di questi ioni metallici è ancora soggetto ad indagine ma sappiamo che uno o più ioni Mg^{2+} o altri cationi equivalenti sono essenziali per la catalisi delle endonucleasi di restrizione.

Le sequenze riconosciute dalla maggior parte degli enzimi di restrizione sono palindromi e quindi possono essere riconosciute su entrambi i filamenti. Essendo la sequenza riconosciuta simmetrica possiamo intuire che anche gli enzimi abbiano struttura simmetrica. Infatti, gli enzimi di restrizione sono dimeri, in cui le due subunità sono correlate da un asse di simmetria.

Ulteriori studi sugli enzimi di restrizione hanno sottolineato come questi si leghino a tutte le sequenze di DNA, coniugate o non coniugate, approssimativamente con la stessa affinità ma riconoscono quelle corrette tramite un gruppo di interazioni specifiche che si formano tra l'enzima e le basi della sequenza corretta. Queste interazioni non solo fungono da riconoscimento ma rendono

no possibile la distorsione della struttura del DNA da parte dell'enzima e quindi la sua azione. L'enzima distorce la struttura del DNA portando il gruppo fosfato vicino ad Asp del sito attivo, questo spostamento rende possibile il legame con Mg^{2+} che comporta il taglio. Quando l'enzima si lega a sequenze di DNA non specifiche non le piega e quindi non può tagliarle.

Il DNA batterico non viene digerito dagli enzimi di restrizione, perchè?

Il DNA viene metilato da enzimi detti **metilasi** a livello di specifiche basi di adenina poste all'interno delle sequenze di riconoscimento. Una endonucleasi non potrà tagliare il DNA

Esempio di endonucleasi: *ECORV*

ECORV è un'endonucleasi prodotta dal batterio *Escherichia coli* che riconosce e taglia la sequenza 5'-GATATC-3' nelle molecole di DNA virali a doppia elica. Supponiamo che una sequenza di riconoscimento sia lunga come quella di *ECORV*. Poiché esistono 4^6 , o 4096, sequenze con sei coppie di basi, la concentrazione dei siti che non devono essere tagliati sarà approssimativamente 4000 volte maggiore dei siti che devono essere tagliati. Quindi, per evitare che la cellula batterica venga danneggiata gli enzimi di restrizione devono avere un'elevatissima specificità.



3.8.3 Le Miosine

Le miosine catalizzano l'idrolisi di ATP per formare ADP e fosfato inorganico e usare l'energia associata a questa reazione per guidare il movimento di molecole nelle cellule. Quindi si ha una trasformazione di energia chimica in energia meccanica. Le miosine sono presenti in tutte le cellule eucariotiche, nel genoma umano sono presenti 40 forme diverse appartenenti a questa famiglia di enzimi. Hanno una struttura allungata con due domini globulari che sono centro dell'attività ATPasica.



Domini globulari ATPasici

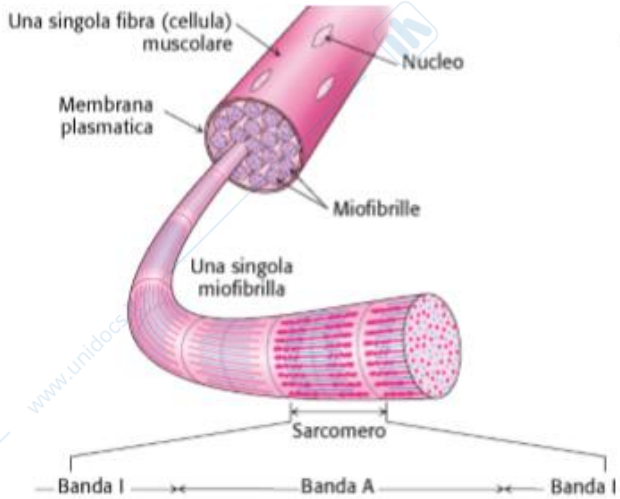
La struttura cristallografica del dominio ATPasico in assenza di nucleotidi ha mostrato la presenza di un singolo dominio globulare di circa 750 amminoacidi. Verso il centro è presente una tasca contenente acqua che può rappresentare il sito di legame per il nucleotide. La struttura ha evidenziato la presenza di ATP legato al sito attivo, non accompagnata da significativi mutamenti nella struttura globulare, né da idrolisi. L'ATP è anche legato ad uno ione di Mg^{2+} . Questi enzimi sono inattivi in assenza di metalli bivalenti ma acquistano la loro attività in aggiunta di questi ioni, tuttavia il metallo non fa parte del sito attivo. Sono i nucleotidi come l'ATP che legano questi ioni metallici formando complessi che costituiscono i veri substrati di questi enzimi.

L'attacco nucleofilo da parte di una molecola d'acqua sul gruppo fosforico gamma e sul gruppo ossidrilico dell'amminoacido Ser236 richiede un meccanismo di attivazione della molecola d'acqua, azione che può essere attuata da un residuo basico o uno ione metallico. Tuttavia, lo ione presente nel complesso è troppo distante dal gruppo fosforico per essere coinvolto in questo ruolo e non ci sono residui basici vicini che possano ricoprirlo. Quindi l'enzima non si trova nella conformazione idonea per catalizzare la reazione, ne consegue che questo dominio deve cambiare conformazione per catalizzare la reazione di idrolisi dell'ATP. Ciò avviene, l'ATP viene idrolizzato non dallo ione ma dalla SER236 e si nota una modificazione conformazionale di una regione di circa 60 residui

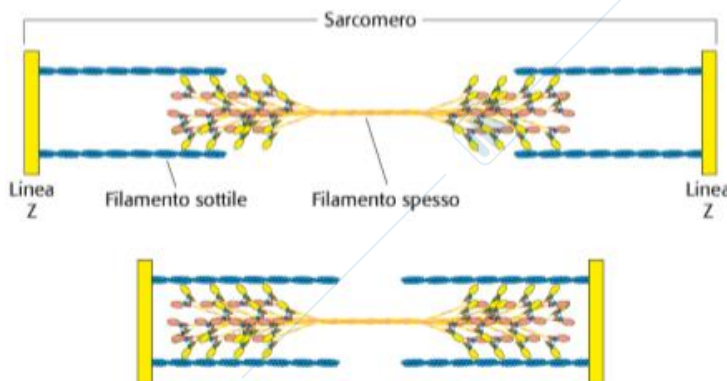
amminoacidici nella regione carbossiterminale del dominio. Il dominio carbossiterminale è connesso ad altre strutture della regione allungata della molecola.

Miosina e contrazione muscolare

Abbiamo detto che la miosina è costituita da due domini globulari e una struttura allungata. I domini globulari presentano il sito attivo e sono indipendenti tra di loro.



Le miosine sono note soprattutto per il loro coinvolgimento nella contrazione muscolare: esse sono contenute nei **sarcomeri**, unità che compongono una singola miofibrilla all'interno di una fibra muscolare. I sarcomeri sono divisi l'uno dall'altro da strie proteiche dette **linee Z** e sono costituiti da bande chiare e scure: le bande chiare, dette anche **bande I**, sono costituite da filamenti sottili di actina, tropomiosina e tropomiosina e si trovano ai lati delle linee Z; le bande scure, dette anche **bande A**, invece si trovano nella parte centrale del sarcomero, circondate dalle bande chiare: sono costituite da filamenti spessi di miosina.



Quando le fibre muscolari vengono stimulate, i filamenti spessi di miosina, che rimangono immobili durante la contrazione muscolare, "attirano" a sé i filamenti sottili di actina formando dei ponti trasversali in modo da far sorreggere i 2 filamenti sottili uno verso l'altro; quando i 2 filamenti sono stati "trascinati" verso l'interno, i ponti trasversali vengono rotti e se ne creano degli altri per continuare il processo di contrazione.

3.9 Strategie regolative

L'attività degli enzimi deve essere regolata in modo che essi siano attivi solo quando è necessario e nella giusta localizzazione. Ci sono diversi meccanismi per regolare l'azione degli enzimi:

1. **Controllo allosterico**
2. **Isoenzimi e compartimentalizzazione**
3. **Modificazioni covalenti reversibili**
4. **Controllo per inibizione dell'enzima**
Con inibitori specifici che bloccano il sito attivo (vedi parte Inibitori)
5. **Modificazioni covalenti irreversibili**
6. **Controllo della concentrazione dell'enzima**

Un meccanismo per regolare l'attività è regolare la quantità di enzima. Al variare della concentrazione dell'enzima varia anche la velocità della reazione. Avviene primariamente per meccanismi di controllo sulla produzione dell'enzima, ossia su trascrizione e traduzione dai geni.

Si possono usare diversi di questi meccanismi su un solo enzima. Sono caratterizzati da diversi tempi di azione.

3.9.1 Controllo allosterico

È un meccanismo di regolazione molto rapido, parliamo infatti di intervalli di tempo in millisecondi. Le proteine allosteriche contengono siti regolatori distinti e molti siti attivi. Il legame di piccole molecole di segnale comporta un cambiamento di forma dell'enzima (per questo usiamo il termine allosterico) e quindi ne inibiscono l'azione. Inoltre, le proteine allosteriche presentano una proprietà caratteristica, nota come **cooperatività**: l'attività di un sito funzionale influenza l'attività degli altri siti.

Esempio - Aspartato transcarbamilasi (ATCasi)

L'aspartato transcarbamilasi catalizza la prima tappa della biosintesi delle pirimidine, il cui prodotto finale è la citidina trifosfato (CTP). Come viene regolato questo enzima in modo che venga prodotta solo la quantità di CTP necessaria alla cellula? L'ATPasi è inibita dalla CTP: la via biosintetica rimane attiva fino a che non si accumula una quantità sufficiente di CTP. L'inibizione dell'ATPasi da parte della CTP è un esempio di **inibizione a feedback** (o **retroattiva** o **da prodotto finale**), cioè l'inibizione di un enzima da parte del prodotto finale della via biosintetica di cui fa parte. È un sistema di autoregolazione. La CTP ha, però, una struttura differente da quella dei substrati della reazione. Quindi questo nucleotide si deve legare ad un sito diverso da quello a cui si legano i substrati. Questi siti sono chiamati **siti allosterici** o **regolatori**. La CTP è un esempio di inibitore allosterico.

3.9.2 Isoenzimi e compartimentalizzazione

Gli isoenzimi costituiscono un mezzo per variare la regolazione di una specifica reazione in distretti o in tempi diversi incontrando alle specifiche esigenze fisiologiche dei vari tessuti. Gli isoenzimi sono proteine omologhe presenti nello stesso organismo che catalizzano la stessa reazione; essi differiscono nella struttura primaria, possiedono valori diversi di K_M e V_{max} e diverse proprietà di regolazione. L'esistenza degli isoenzimi permette di regolare il metabolismo in base al fabbisogno dei singoli tessuti o del loro stadio di sviluppo.

Esempio - Lattato deidrogenasi (LDH)

La lattato deidrogenasi (LDH) è un enzima che fa parte sia della glicolisi anaerobica, sia della sintesi di glucosio. Gli esseri umani possiedono due isoforme di questo enzima: l'**isoenzima H**, espresso soprattutto nel muscolo cardiaco e l'**isoenzima M**, espresso soprattutto nel muscolo scheletrico. L'enzima è un tetramero che può essere costituito da un diverso rapporto delle due forme.

In che modo differiscono i due isoenzimi? L'isoenzima H_4 , che si trova nel cuore, ha maggiore affinità per i substrati rispetto all'isoenzima M_4 . Le due forme differiscono anche per il fatto che alti livelli di piruvato inibiscono allostericamente l'isoenzima H_4 , ma non la forma M_4 . Inoltre, l'isoenzima M_4 funziona meglio in un ambiente avente scarsa concentrazione di O_2 , mentre l'isoenzima H_4 funziona meglio in ambienti ricchi di O_2 .

A fini diagnostici, un aumento dei livelli serici dell'isoenzima H_4 rispetto all'isoenzima H_3M , suggerisce un avvenuto infarto miocardico.

3.9.3 Modificazioni covalenti reversibili

È un meccanismo di regolazione che agisce nell'arco di alcuni secondi. Le proprietà catalitiche di molti enzimi possono essere notevolmente alterate mediante l'attacco covalente di un gruppo chimico, nella maggior parte dei casi un gruppo fosforico.

Esempio - Fosforilazione

La fosforilazione e la defosforilazione sono i sistemi più comuni di modificazione covalente ma non sono i soli: un altro tipo è l'attacco o la rimozione di gruppi acetilici, ad esempio. La fosforilazione viene usata come un importante meccanismo di regolazione nelle cellule eucariotiche, in effetti, circa il 30% delle proteine eucariotiche sono fosforilate.

Gli enzimi che catalizzano le reazioni di fosforilazione sono detti **proteina chinasi**. La molteplicità delle chinasi (ce ne sono più di 500 tipi nell'uomo) permette di modulare la regolazione in base al tessuto, al tempo e al substrato.



La fosforilazione è un sistema efficiente per controllare l'attività della proteina bersaglio in quanto:

- 1) L'energia libera di fosforilazione è elevata
- 2) Il gruppo fosforico aggiunge due cariche negative
- 3) Il gruppo fosforico può formare tre o più legami idrogeno
- 4) Fosforilazione e defosforilazione sono modificazioni veloci (sec) o meno (ora)
- 5) La fosforilazione produce effetti amplificati

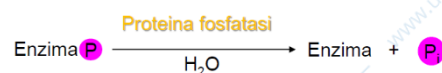
L'ATP è il donatore del gruppo fosforico più utilizzato. Negli eucarioti l'accettore del gruppo fosforico è generalmente uno dei tre amminoacidi contenenti un ossidrile nella catena laterale.

Possiamo classificare le chinasi in base ai residui amminoacidici su cui operano:

- **Serin/treonin chinasi**
Trasferisce il gruppo fosforico a residui di serina e treonina.
- **Tirosin chinasi**
Trasferisce il gruppo fosforico a residui di tirosina

Le proteina chinasi hanno diversi gradi di specificità. Quelle monofunzionali fosforilano una sola proteina o poche proteine strutturalmente correlate, quelle multifunzionali modificano molti bersagli diversi; esse hanno un ampio spettro d'azione e possono coordinare diversi processi biologici.

La sequenza di consenso riconosciuta dalla **proteina chinasi A (PKA)** è Arg-Arg-X-Ser-Z oppure Arg-Arg-X-Thr-Z, in cui X è un residuo di piccole dimensioni e Z un residuo di grandi dimensioni.



Ser e Thr sono i siti di fosforilazione.

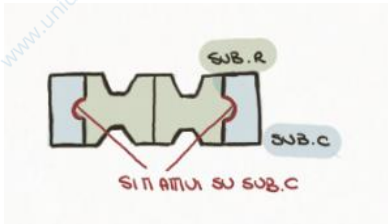
Il determinante primario della specificità è la sequenza amminoacidica che circonda il sito di fosforilazione della serina e della treonina.

3.9.4 Controllo per inibizione

Abbiamo già visto in particolare come funziona il controllo per inibizione. Vediamo ora un esempio specifico.

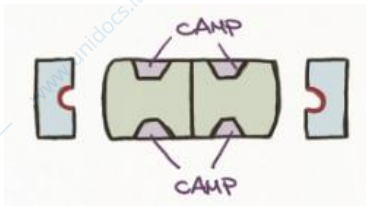
Esempio – cAMP e PKA

La PKA aiuta gli animali ad affrontare situazioni stressanti. L'ormone adrenalina rilasciato in queste situazioni determina la sintesi di AMP ciclico, un messaggero intracellulare che si forma dalla ciclizzazione dell'ATP. Il cAMP attiva un enzima chiave (visto nella fosforilazione): la proteina chinasi A. La PKA è formata da due diverse unità: una subunità regolatoria R e una subunità catalitica C. In assenza di cAMP, le subunità formano un complesso R₂C₂, enzimaticamente inattivo.



Il legame di due molecole di cAMP ad ogni subunità regolatoria provoca la dissociazione della proteina in due subunità R e due subunità C ora attive. Quindi, il legame di cAMP alla subunità regolatoria rimuove l'inibizione esercitata dalla subunità regolatoria stessa sulle subunità catalitiche. Come funziona l'inibizione?

Ciascuna catena R contiene la sequenza Arg-Arg-Gly-Ala-Ile, che costituisce una sequenza pseudosubstrato in quanto uguale alla sequenza del substrato riconosciuto ma con Ala al posto di Ser. Nel complesso RC, la pseudosequenza occupa il sito catalitico, non rendendo l'enzima capace di alcuna catalizzazione. Il legame di cAMP alla catena R provoca un cambiamento morfologico di questa subunità che quindi si stacca dal complesso, lasciando libere le subunità catalitiche attive.



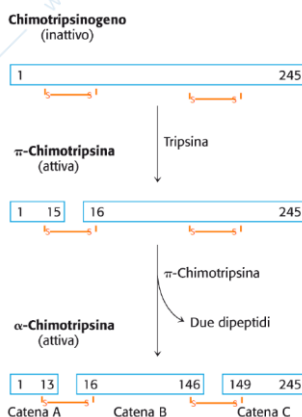
3.9.5 Modificazioni covalenti irreversibili

È un meccanismo di regolazione permanente. Gli enzimi controllati da questo meccanismo irreversibilmente dallo stato inattivo a quello attivo.

Vengono svolte da proteasi che alterano permanentemente gli enzimi rendendoli attivi. Ad esempio:

- Enzimi digestivi (gli zimosogeni digestivi sono le versioni inattive)
- Enzimi per la coagulazione del sangue
- Enzimi per i processi di sviluppo
- Enzimi per l'apoptosi
- Ormoni proteici (come l'insulina)
- Collagene

Esempio – Enzimi digestivi



Reazione: Chimotripsinogeno + Tripsina → Chimotripsina

La catena del chimotripsinogeno viene tagliata in tre peptidi che rimangono legati tramite ponti disolfuro. Il primo taglio rende l'enzima attivo perché si verificano dei cambiamenti conformazionali che definiscono la struttura del sito attivo. Dunque, il **chimotripsinogeno** viene attivato dall'idrolisi di un singolo legame peptidico.

Il chimotripsinogeno viene prodotto nel Pancreas, insieme ad altri enzimi digestivi. Se fossero prodotti già come enzimi attivi digerirebbero tutte le cellule incontrate sul loro percorso dal Pancreas allo Stomaco, anche le stesse cellule che li hanno prodotti.

La stessa tripsina è un enzima prodotto sottoforma inattiva, come **tripsinogeno** e viene attivata tramite l'intervento dell'enteropepsidasi (prodotta nel duodeno). La tripsina viene regolata dall'**inibitore pancreatico della tripsina** che agisce da analogo del substrato, subisce la "rea-

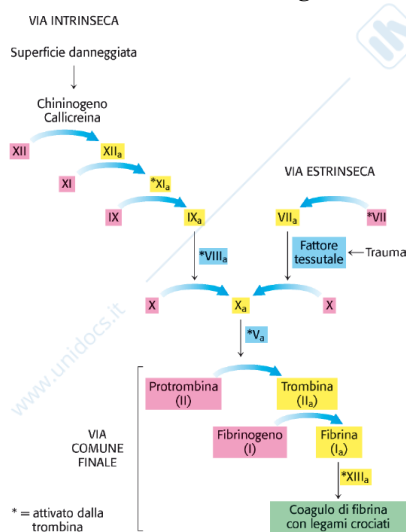
zione di taglio” ma questa impiega molto tempo ad essere effettuata e quindi inibisce l’enzima. Regolando l’azione della tripsina si regolano anche tutti gli enzimi che essa attiva apportando un notevole risparmio di energia nel processo di regolazione.

Alcuni enzimi proteolitici hanno inibitori specifici, come l’ α_1 -antitripsina. Questo inibitore è presente nel plasma e protegge i tessuti dalla digestione da parte dell’elastasi che viene secreta dai neutrofili (leucociti che fagocitano i batteri) in seguito ad esempio, ad un’infezione batterica. L’ α_1 -antitripsina blocca l’azione dell’elastasi, legandosi quasi irreversibilmente al sito attivo. I disordini genetici che portano ad una carenza dell’inibitore dimostrano che ha un importante ruolo fisiologico. La sostituzione di una lisina al posto di un glutammato in posizione 54 (mutante di tipo Z) rallenta la secrezione di α_1 -antitripsina da parte delle cellule epatiche. L’eccesso di elastasi attiva così ottenuto distrugge le pareti degli alveoli polmonari, digerendo le fibre elastiche, e altre proteine del tessuto connettivo. La condizione clinica che ne deriva è chiamata **enfisema polmonare** (o malattia polmonare distruttiva).

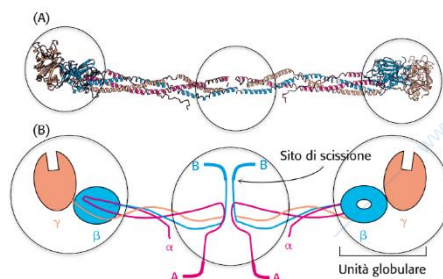
Esempio – Coagulazione del sangue

La coagulazione del sangue è una cascata enzimatica (processo usato in molti altre risposte rapide). Le cascate enzimatiche prendono origine da un segnale iniziale che innesca una serie di tappe successive, ciascuna delle quali è catalizzata da un enzima specifico. Il segnale viene così amplificato a livello di ogni tappa. I coaguli enzimatici si formano tramite una cascata di attivazione di zimogeni. **La forma attiva di un fattore di coagulazione catalizza l’attivazione di quello successivo.**

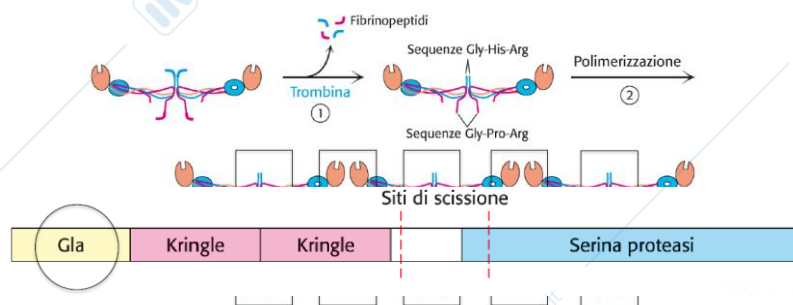
La coagulazione del sangue può essere descritta tramite due processi: la **via intrinseca** e la **via estrinseca**. Entrambe convergono in una via comune ossia nell’attivazione della trombina che porta alla formazione del coagulo di fibrina tramite attivazione del fibrinogeno.



La parte meglio caratterizzata del processo di coagulazione del sangue è, appunto, questa via comune finale. Il **fibrinogeno** è costituito da tre unità globulari (di quella centrale non è stata determinata la struttura) connesse da due regioni a bastoncino. Le regioni a bastoncino sono avvolgenti avvolti ad α -elica a triplo filamento. Questa proteina è formata da sei catene: due catene A α , due catene B β e due catene γ . La **trombina**, un enzima proteolitico, rompe quattro legami peptidici arginina-glicina nella parte centrale della molecola e vengono rilasciati i cosiddetti **fibrinopeptidi**: due peptidi A (dalle catene A α) e due peptidi B (dalle catene B β).



Una molecola di fibrinogeno priva di questi peptidi è detta **monomero di fibrina**. I monomeri di fibrina si organizzano in strutture fibrose ordinate chiamate **fibrina**. Come si formano queste strutture? Le sequenze di aminoacidi esposte dopo i tagli derivati dalla trombina (chiamate generalmente **nodi**) sulle subunità α si legano a dei "buchi" sulle subunità globulari γ che riconoscono tali sequenze. La protofibrilla così formata si estende se i nodi delle subunità β si adattano nei buchi di subunità β di altre protofibrille.



La trombina viene sintetizzata sotto forma di zimogeno, noto come **protrombina**. La molecola inattiva comprende quattro domini maggiori (**dominio gla** + due **domini kringle**) e il dominio contenente l'attività serin proteasica. L'attivazione ha inizio con la scissione proteolitica del legame tra arginina 274 e treonina 275, in modo da rilasciare un frammento contenente i primi tre domini. La successiva scissione del legame tra arginina 323 e isoleucina 324 produce la trombina attiva.

Il dominio Gla è ricco di γ -carbossigluttammato, un forte chelante del Ca^{2+} e complesso **vitamina K-dipendente**. La reazione di carbossilazione vitamina k-dipendente converte il glutammato, chelante debole del Ca^{2+} , in γ -carbossigluttammato. La protrombina diventa quindi in grado di legare il Ca^{2+} , legame che consente l'ancoraggio dello zimogeno alle membrane fosfolipidiche derivate dalle piastrine dopo un trauma. Le piastrine richiamano il calcio sul sito del trauma che a sua volta richiama nello stesso posto la protrombina che a questo punto si trova in prossimità di due proteine che ne catalizzano la conversione in trombina. Il dominio di legame del calcio viene rimosso durante l'attivazione, la trombina viene rilasciata dalla membrana e può scindere il fibrinogeno e altre proteine bersaglio.

La **vitamina K** è essenziale per la sintesi della protrombina e di molti altri fattori della coagulazione del sangue, la sua assenza determina una coagulazione difettosa. Analoghi della vitamina K come il **dicumarolo** e la **warfarina** causano la sintesi di una protrombina anomala, non contenente γ -carbossigluttammato.

La coagulazione è un processo che dev'essere finemente regolato. Un eccesso di coagulazione può portare a trombosi (blocchi di materiale che limitano il passaggio di sangue nei vasi) ed un suo difetto porta ad emorragie, con conseguenze anche gravi. Dunque, il coagulo di sangue deve essere limitato alla zona lesionata. Come viene regolato questo processo? Tramite:

- **Labilità dei fattori di coagulazione**

I fattori attivati durante la coagulazione hanno un'emivita breve, in quanto vengono diluiti dal flusso sanguigno, sono rimossi dal fegato e degradati da altre proteasi. Ad esempio, i fattori V_a e VIII_a vengono idrolizzati dalla **proteina C**, una delle proteasi attivate dalla trombina. Quindi la trombina ha una duplice funzione: catalizza la formazione della fibrina e dà inizio alla deattivazione della cascata di coagulazione.

- **Inibitori specifici dei fattori di coagulazione**

Ad esempio, l'**antitrombina III**, una proteina plasmatica che inattiva la trombina formando con essa un complesso irreversibile e inibisce anche altre serin proteasi come i fattori XII_a , XI_a , X_a e IX_a . L'azione inibitoria dell'antitrombina III è favorita dall'**eparina**, un anticoagulante che aumenta la velocità di formazione dei complessi creati dall'antitrombina III stessa.

I coaguli, inoltre, non sono strutture permanenti, ma sono destinati a dissolversi quando viene ripristinata l'integrità strutturale delle aree danneggiate. La fibrina viene distrutta dalla **plasmina**, una serina proteasi il cui precursore è il **plasminogeno** che ha elevata affinità per i coaguli di fibrina. La conversione viene favorita dall'**attivatore tissutale del plasminogeno (TPA)**. Il TPA è simile alla protrombina ma il dominio gla è sostituito nel TPA da un dominio che riconosce i coaguli di fibrina. Il TPA legato alla fibrina attiva rapidamente il plasminogeno che vi aderisce; il plasminogeno libero (non legato alla fibrina) viene attivato molto lentamente.

L'**emofilia classica**, o **emofilia A**, è il difetto di coagulazione meglio conosciuto. La malattia è legata ad un carattere recessivo legato al sesso pertanto colpisce soltanto i maschi, mentre le femmine sono portatrici sane. In questa malattia il fattore VIII della via estrinseca è assente o molto ridotto. Oggi, il fattore viene prodotto tramite inserimento del gene isolato in cellule cresciute in coltura. In passato, venivano effettuate delle trasfusioni di plasma sanguigno ma questo portava il rischio di infezione con altre malattie quali l'epatite e l'AIDS.

4 I LIPIDI

I lipidi sono un gruppo di composti aventi la caratteristica di essere insolubili in acqua. Svolgono numerose funzioni biologiche quali:

- **Riserva di energia**
- In piccole quantità sono presenti come **cofattori enzimatici, trasportatori di elettroni, pigmenti**, ecc...
- Sono componenti delle **membrane biologiche**

4.1 Lipidi di riserva

I grassi e gli oli, utilizzati come forma di riserva energetica sono composti derivati dagli **acidi grassi** che a loro volta sono derivati dagli idrocarburi. L'ossidazione degli acidi grassi (come quella degli idrocarburi) è un processo che genera molta energia.

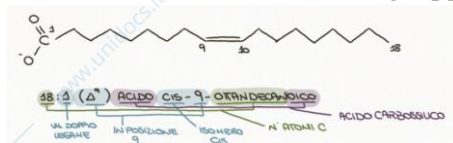
4.1.1 Gli acidi grassi

Gli **acidi grassi** sono acidi carbossilici aventi una catena idrocarburica contenente da 4 a 36 atomi di carbonio (ma sempre in numero pari per il modo in cui sono sintetizzati. I più comuni hanno da 12 a 24 C). In alcuni la catena è completamente satura ossia composta da soli legami singoli, tali composti prenderanno il nome di **acidi grassi saturi**; in altri la catena può contenere uno o più doppi legami (quasi sempre in cis), tali composti prendono il nome di **acidi grassi insaturi**.

La famiglia degli **acidi grassi poliinsaturi (PUFA)** ha una notevole importanza nella nutrizione umana. L'uomo ha bisogno di acido α -linoleico (ALA), un PUFA omega 3 ma deve ottenerlo dalla dieta. A partire dall'ALA può sintetizzare altri 2 PUFA omega 3: l'acido eicosapentaenoico e il docosaenoico. Uno squilibrio fra gli omega 3 e gli omega 6 aumenta il rischio di malattie cardiovascolari. Il loro rapporto ottimale è fra 1:1 e 4:1. La dieta mediterranea garantisce tale rapporto, per questo è molto importante.

Nomenclatura degli acidi grassi

Il carbonio 1 è il carbonio del gruppo ossidrilico. Se ci sono doppi legami vanno indicati come segue:

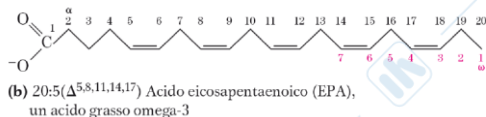


Nella maggior parte dei composti, oltre al nome sistematico si ha nome comune.

Carbon skeleton	Structure*	Systematic name ¹	Common name (derivation)	Melting point (°C)	Solubility at 30 °C (mg/g solvent)	
					Water	Benzene
12:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	n-Dodecanoic acid	Lauric acid (Latin laurus, "laurel plant")	44.2	0.063	2,600
14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	n-Tetradecanoic acid	Myristic acid (Latin Myristica, nutmeg genus)	53.9	0.024	874
16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	n-Hexadecanoic acid	Palmitic acid (Latin palma, "palm tree")	63.1	0.0083	348
18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	n-Octadecanoic acid	Stearic acid (Greek stear, "hard fat")	69.6	0.0034	124
20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	n-Eicosanoic acid	Arachidic acid (Latin Arachis, legume genus)	76.5		
24:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	n-Tetracosanoic acid	Lignoceric acid (Latin lignum, "wood" + cera, "wax")	86.0		
18:1(Δ ⁷)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	cis-9-Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid	1-0.5		
18:1(Δ ⁷)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	cis-9-Octadecenoic acid	Oleic acid (Latin oleum, "oil")	13.4		
18:2(Δ ^{7,11})	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	cis,cis-9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid (Greek linon, "flax")	1-5		
18:3(Δ ^{7,11,15})	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic acid	α -Linolenic acid	-11		
20:4(Δ ^{6,9,12,15})	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	Docosahexaenoic acid	Arachidonic acid	-49.5		

Cosa vuol dire omega 3 e omega 6?

I PUFA hanno una nomenclatura particolare: il carbonio più lontano dal gruppo carbossile è indicato come carbonio $\omega 1$. Gli acidi grassi $\omega 3$ sono PUFA aventi il primo doppio legame presente sul carbonio $\omega 3$ mentre gli acidi grassi $\omega 6$ sono PUFA aventi il primo doppio legame presente sul carbonio $\omega 6$.

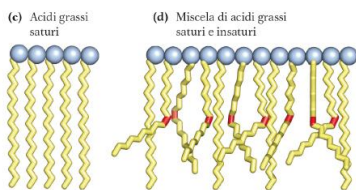


Proprietà fisiche degli acidi grassi

Come si può apprezzare dalla tabella posta precedentemente (paragrafo “Nomenclatura degli acidi grassi”), man mano che la catena si allunga, la temperatura di melting aumenta e la solubilità in acqua diminuisce. Mentre a parità di lunghezza, se un acido grasso è più insaturo si avrà una minore temperatura di melting e una maggiore solubilità. Perché?

Un acido grasso è formato da una testa idrofilica ed una coda idrofobica in quanto è una catena idrocarburica. Se allunghiamo la catena aumentiamo anche la porzione idrofobica della molecola e, dunque, avremo una solubilità più bassa.

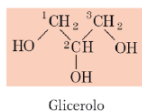
Gli acidi grassi, inoltre, tendono ad impilarsi creando degli impacchettamenti. Come si può vedere dall'immagine, acidi grassi saturi formano pacchetti più compatti rispetto ad acidi grassi insaturi. Nei pacchetti compatti le forze di Wan Der Waals che si formano tra gli acidi grassi sono più forti. Questo spiega perché acidi grassi saturi siano più idrofobici rispetto ad acidi grassi insaturi.



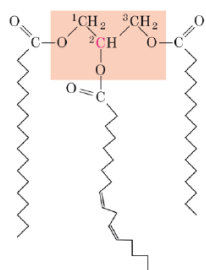
Le forze di Wan Der Waals che si formano nei pacchetti influenzano anche la temperatura di melting: più queste forze sono forti più energia dovremmo impiegare per romperle. Quindi avremo una maggiore temperatura di melting per acidi grassi saturi ed una minore temperatura di melting per acidi grassi insaturi.

4.1.2 Triacilgliceroli

I lipidi più semplici sono i **triacilgliceroli** (o **trigliceridi**, **grassi** o **grassi neutri**) sono composti da 3 molecole di acidi grassi legati estericamente attraverso i gruppi carbossilici ai gruppi ossidrilici di una molecola di **glicerolo**.



Se gli acidi grassi sono tutti e tre uguali allora parliamo di **triacilgliceroli semplici** che prendono il nome dall'acido che contengono tuttavia, la maggior parte dei triacilgliceroli sono **misti**.

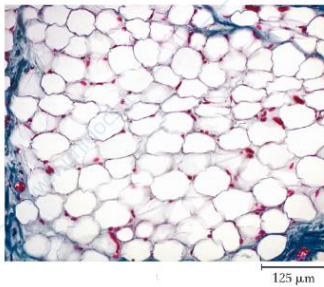


1-Stearil,2-linoleil,3-palmitil glicerolo, un triacilglicerolo misto

Nella maggior parte delle cellule eucariotiche i triacilgliceroli sono presenti come microscopiche gocce oleose presenti nel citosol acquoso. Nei vertebrati gli **adipociti** sono cellule in grado di conservare grandi quantità di triacilgliceroli sotto forma di gocce di grasso; questo fenomeno è presente anche nei semi di alcune piante. Il resto delle componenti cellulari sono ridotte e schiacciate verso l'estremità della cellula. Le cellule contengono degli enzimi, le **lipasi**, che idrolizzano i trigliceridi rilasciando liberando gli acidi grassi che vengono trasportati nei siti dove c'è bisogno di energia. I triacilgliceroli sono più efficienti rispetto ad amido e glicogeno come deposito energetico perché:

- 1) a pari quantità possono liberare il doppio dell'energia rispetto ad amido e glicogeno
- 2) non sono idratati (non trattengono acqua) e quindi pesano di meno

In alcuni animali i depositi di triacilgliceroli servono anche come isolamento dal freddo poiché gli adipociti creano dei veri e propri strati isolanti di grasso.



La maggior parte dei grassi naturali è una miscela di triacilgliceroli semplici e misti. Se lasciati troppo all'ossigeno dell'aria i doppi legami si ossidano e si formano aldeidi e acidi carbossilici a catena corta che hanno la caratteristica di puzzare molto; i trigliceridi possono diventare rancidi. Per evitare che questo avvenimento accada presto, nella grande distribuzione gli oli commerciali vengono sottoposti ad idrogenazione, un processo che trasforma i doppi legami cis in legami semplici e rende i grassi solidi a temperatura ambiente (la margarina, ad esempio, è un grasso idrogenato). Tuttavia, come sottoprodotto dell'idrogenazione si ha la conversione dei doppi legami in cis in doppi legami in trans, questa conversione, se assunta regolarmente, comporta un aumento del rischio di incorrere in malattie coronariche ed un aumento della risposta infiammatoria. I grassi aventi legami in trans vengono usati per friggere i cibi, soprattutto nei fast food.

4.1.3 Cere

Le cere sono esteri di acidi grassi saturi ed insaturi a catena lunga (contenente dai 14 ai 36 atomi di carbonio) con alcoli a catena lunga (contenente dai 16 ai 30 atomi di carbonio). Hanno un punto di fusione molto alto (tra i 60° e i 100°) e, avendo catene così lunghe, hanno un'ottima idrofobicità (sono impermeabili). Queste caratteristiche idrorepellenti sono importanti per alcuni organismi quali uccelli acquatici, piante (le foglie soprattutto), ecc. inoltre, negli organismi planctonici sono utilizzati come fonte principale di conservazione dell'energia metabolica. Sono usati molto anche nell'industria cosmetica e farmaceutica.



4.2 Lipidi come segnali, cofattori e pigmenti

I trigliceridi ed i lipidi di membrana sono molto abbondanti ma svolgono un ruolo passivo; altri lipidi presenti in piccole quantità svolgono un ruolo attivo nell'organismo, ad esempio, nel traffico metabolico, come messaggeri, come segnali, ecc.

4.2.1 Gli eicosanoidi

Gli **eicosanoidi** sono **ormoni paracrini**, ossia rilasciati da una cellula e agenti su cellule vicine alla secernente. Sono coinvolti in vari processi (funzione riproduttiva, infiammazione, rialzo termico, dolore, ecc.). Sono derivati dagli acidi grassi, in particolare dall'acido arachidonico e sono suddivisi in tre classi:

1. Prostaglandine

Hanno una struttura ciclica a 5 atomi di carbonio

Stimolano la contrazione uterina, regolano la temperatura corporea, causano infiammazione e dolore

2. Trombossani

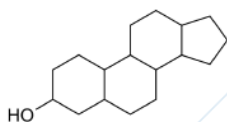
Hanno una struttura ciclica a 6 atomi di carbonio e sono prodotti dalle piastrine. Aiutano la formazione del coagulo e la riduzione del flusso sanguigno nella zona lesionata

3. Leucotrieni

Fungono da contribuenti nei processi infiammatori e nell'attività del sistema immunitario, la loro sovrapproduzione può dare malattie quali asma e bronchite. Infatti, gli antagonisti di questi composti sono usati per la cura di queste patologie.

4.2.2 Ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei sono derivati degli steroli, ossia composti policiclici formati da quattro anelli condensati (tre a sei atomi di carbonio e uno a cinque atomi di carbonio).



Vengono trasportati nel sangue, entrano nei tessuti bersaglio e, tramite dei recettori, il loro segnale arriva nel nucleo cellulare dove opera come regolatore dell'espressione genica. Esempi di tali composti sono gli ormoni sessuali maschili e femminili quali il testosterone e l'estradiolo, gli ormoni prodotti dalla corteccia surrenale quali cortisolo e aldosterone. Altri esempi quali prednisone e prednisolone sono usati come farmaci con attività antinfiammatoria.

4.2.3 Vitamine

Le vitamine sono classificate come **idrosolubili** e **liposolubili**, al secondo caso appartengono vitamina **A**, **D**, **E** e **K**. In particolare, le vitamine A e D sono precursori ormonali.

Vitamina D

La classe "vitamina D" comprende diversi composti, tra questi la **vitamina D3**, detta anche **calciferolo**, si forma nella pelle attraverso una reazione fotochimica tra raggi UV e il **7-deidrocolesterolo**. Successivamente viene convertita in un ormone che regola il trasporto del calcio nell'intestino e i livelli di calcio nei reni e nelle ossa; inoltre, come gli ormoni steroidei, funge da regolatrice per l'espressione genica. Una mancanza di vitamina D causa rachitismo e difetti nella formazione delle ossa, patologie che possono essere curate con una somministrazione esogena di tale vitamina.

Vitamina A

La Vitamina A, detta anche retinolo, si comporta come ormone ma funge anche da pigmento essenziale per la visione nei vertebrati (supporta il corretto funzionamento di coni e bastoncelli). Viene isolata dall'olio di fegato dei pesci ma si può trovare anche in cibi come uova, latte e burro. In particolare, il beta carotene presente nelle carote può essere convertito in vitamina A. La carenza di tale vitamina porta a sintomi quali secchezza della pelle, ritardo nello sviluppo e nella crescita, cecità notturna, ecc.

Vitamina E

Con Vitamina E si intende il nome collettivo di un gruppo di lipidi simili ai **tocoferoli**; hanno un anello aromatico e una lunga catena isoprenoide. Tali lipidi fungono da antiossidanti biologici, proteggono i lipidi di membrana dall'ossidazione distruggendo le forme più reattive dei radicali dell'ossigeno e impediscono, dunque, che la membrana cellulare sia troppo fragile.

Vitamina K

La vitamina K è importante nella coagulazione del sangue.

4.2.4 Altri esempi

Altri esempi di questi "lipidi funzionali" sono:

- **Ubichinone e plastochinone**

Fungono da importanti trasportatori di elettroni nelle reazioni redox che portano alla sintesi dell'ATP

- **Polichetidi**

Sono metaboliti secondari, svolgono cioè funzioni di supporto nel metabolismo. Ad esempio, l'eritromicina funge da antibiotico, l'anfotericina B da antifungino e la lovastatina è un importante inibitore della sintesi del colesterolo

4.2.5 Analisi dei lipidi

Partendo dal tessuto in oggetto di studio bisogna separare le cellule e mettere in soluzione le relative molecole. Il solvente utilizzato sarà composto da acqua, metanolo e cloroformio poiché nell'acqua e nel metanolo si solubilizzano le molecole idrofiliche mentre nel cloroformio si solubilizzano le molecole idrofobiche (come i lipidi). Separando le fasi si può analizzare la soluzione di cloroformio tramite spettrometria di massa o tramite tecniche cromatografiche per avere informazioni sui lipidi contenuti e sulla loro quantità.

5 LE MEMBRANE BIOLOGICHE

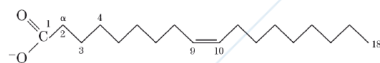
Le cellule sono delimitate da membrane biologiche, le barriere che separano l'interno e l'esterno delle cellule. Le membrane biologiche sono strutture dinamiche in quanto la loro conformazione può cambiare nel tempo e da tessuto a tessuto; possono essere considerate barriere alla permeabilità in quanto impediscono alle molecole utili di passare all'esterno e a molecole indesiderate di passare all'interno. Le membrane biologiche contengono sistemi di trasporto, che conferiscono una permeabilità selettiva (cioè a determinate molecole utili).

Oltre alla membrana cellulare esterna, detta membrana plasmatica, le cellule eucariotiche possiedono anche membrane endocellulari, che delimitano i confini di organelli come mitocondri, cloroplasti, perossisomi e lisosomi. Le membrane biologiche partecipano anche ad altre funzioni indispensabili per la vita, come l'immagazzinamento dell'energia e la trasduzione dell'informazione, meccanismi che dipendono dalle proteine di membrana

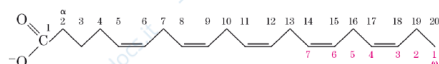
5.1 I lipidi di membrana

Le componenti principali dei lipidi sono gli acidi grassi, che ne garantiscono l'idrofobicità. Gli acidi grassi sono catene idrocarburiche che hanno una lunghezza e un grado di saturazione variabile (lunghezza tra i 14 e i 24 atomi di carbonio). Terminano con un gruppo carbossilico.

Il nome sistematico di un acido grasso deriva da quello dell'idrocarburo da cui deriva, sostituendo la desinenza -oico alla desinenza -ano. Ad esempio, l'acido grasso saturo C18 è detto *acido ottadecanoico*. L'acido grasso C18 con un legame doppio viene detto *acido ottadecenoico*, con due doppi legami *acido ottadecadienoico*, con tre *acido ottadecatrienoico*. Valgono sempre le notazioni numeriche, ad esempio 18:0 dove il primo numero indica il numero di atomi di carbonio della catena, mentre il secondo indica il numero di legami doppi presenti. Gli atomi di carbonio vengono numerati dal carbonio del gruppo carbossilico, oppure dal carbonio ω opposto a quello del gruppo. (vedi capitolo 4.1.1 – nomenclatura degli acidi grassi)



(a) 18:1(Δ^9) Acido cis-9-ottadecanoico



(b) 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$) Acido eicosapentaenoico (EPA), un acido grasso omega-3

Le proprietà degli acidi grassi influenzano anche le proprietà della membrana stessa, in particolare la sua fluidità. Più la **fluidità di membrana** è maggiore più la membrana è permeabile. Una membrana volutamente fluida è di solito composta da acidi grassi insaturi con catena corta. (vedi capitolo 4.1.1 – proprietà degli acidi grassi).

Se un batterio è sottoposto ad alte temperature la fluidità della sua membrana aumenta, mettendolo a rischio. Per questo può regolare la sua membrana allungando la catena e saturando i legami π dei lipidi di membrana.

I lipidi di membrana sono di tre diversi tipi:

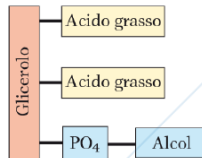
1. **Fosfolipidi**
2. **Glicolipidi**
3. **Colesterolo**

5.1.1 Fosfolipidi

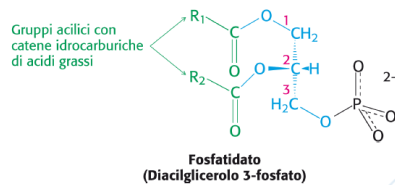
I fosfolipidi sono abbondanti in tutte le membrane biologiche. Essi sono costituiti da quattro componenti: uno o più acidi grassi, un gruppo fosforico ed un alcol ad esso legato. La struttura portante può essere formata da:

- **Glicerolo**

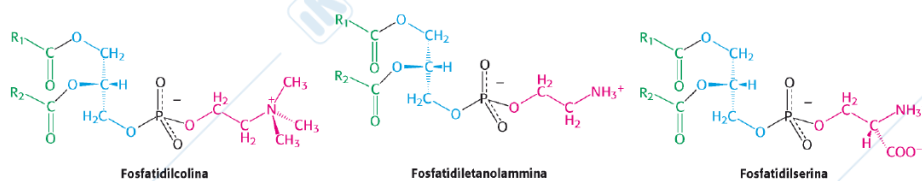
Un alcol a tre atomi di carbonio. I fosfolipidi aventi glicerolo come struttura portante prendono il nome di **glicerofosfolipidi** o **fosfogliceridi**.



Nei glicerofosfolipidi i gruppi ossidrilici nelle posizioni C1 e C2 del glicerolo sono esterificati con i gruppi carbossilici delle due catene di acido grasso. Il gruppo ossidrilico nella posizione C3 dello scheletro del glicerolo è esterificato con un acido fosforico. Il composto così ottenuto prende il nome di **fosfatidato**, il glicerofosfolipide più semplice, non molto importante per la presenza nelle membrane biologiche (in quanto è ridotta) ma per la sua funzione di precursore nella biosintesi degli altri glicerofosfolipidi.



Esempi di glicerofosfolipidi:

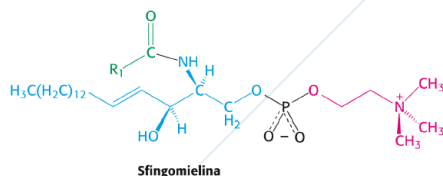


- **Sfingosina**

Un aminoalcol che contiene una lunga catena idrocarburica insatura, che perciò lega un solo acido grasso. I fosfolipidi aventi sfingosina come struttura portante prendono il nome di **sfingolipidi**.

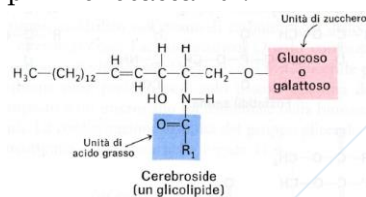


Il legame si svolge tra l'acido grasso ed il gruppo amminico (-NH) della sfingosina, perciò è un legame amminico. Inoltre, il gruppo ossidrilico primario della sfingosina è esterificato con un residuo di colina fosforilata. La **sfingomielina** è un esempio di sfingolipide.



5.1.2 Glicolipidi

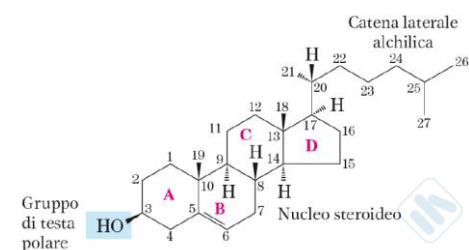
I glicolipidi sono **lipidi contenenti zuccheri** e nelle cellule animali derivano dalla sfingosina. Il gruppo amminico dello scheletro della sfingosina è acilato da un acido grasso, tuttavia, a differenza degli sfingolipidi, l'unità legata al gruppo ossidrilico primario della sfingosina è costituita da uno o più monosaccaridi.



I glicolipidi sono orientati in modo asimmetrico nelle membrane, in quanto i residui saccaridici sono sempre rivolti verso l'esterno della cellula, cioè sono disposti sul lato extracellulare della membrana.

5.1.3 Colesterolo

Il colesterolo è uno steroide formato da 4 anelli idrocarburici fusi fra loro. A un'estremità dello steroide è legata una catena lineare idrocarburica, mentre all'estremità opposta è presente un gruppo ossidrilico.



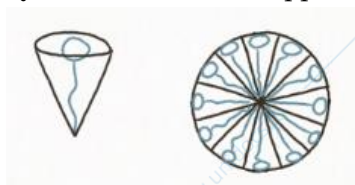
Il colesterolo non è sempre presente nelle membrane biologiche. In alcuni tipi di cellule nervose costituisce quasi il 25% dei lipidi di membrana, ma è praticamente assente nelle membrane intracellulari.

5.1.4 Caratteristiche dei lipidi di membrana

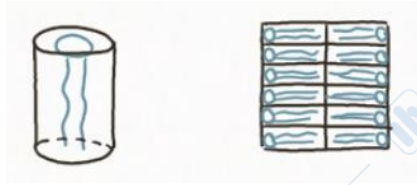
I lipidi di membrana sono molto diversificati ma hanno una caratteristica comune: sono **molecole anfipatiche**. Ossia, un lipide di membrana contiene una porzione idrofila ed una porzione idrofoba. Questa caratteristica è molto importante perché la formazione delle membrane è la conseguenza della natura anfipatica di queste molecole. Le loro teste polari tendono a interagire con l'acqua mentre le code idrocarburiche tendono a interagire tra loro, escludendo l'acqua. Le molecole possono disporsi nel mezzo acquoso formando **micelle** o **foglietti bimolecolari**.



Nella **micella**, le teste polari si trovano all'esterno della struttura circolare, in contatto con le molecole d'acqua, mentre le code idrofobiche interagiscono fra loro e vengono sequestrate all'interno. Questa struttura è rappresentata meglio da lipidi aventi una sola coda.



Il **foglietto bimolecolare** è chiamato anche **doppio strato lipidico** in quanto composto da due strati di molecole paralleli che si dispongono con le code idrofobiche all'interno e le teste polari all'esterno, interagenti con il mezzo acquoso su entrambi i lati del doppio strato. Questa struttura è rappresentata meglio da lipidi aventi due code, in particolare da fosfolipidi e glicolipidi.

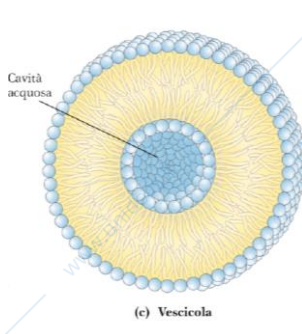


Il doppio strato si forma spontaneamente, con un processo di autostrutturazione. In altre parole, la struttura del doppio strato lipidico è insita nella struttura dei costituenti delle molecole fosfolipidiche. Le interazioni idrofobiche costituiscono la forza trainante per la formazione del foglietto. Le forze attrattive di Van Der Waals che si generano tra le catene idrocarburiche favoriscono uno stretto impacchettamento. Inoltre, tra le teste polari e le molecole d'acqua si esercitano attrazioni elettrostatiche e si formano legami a idrogeno. Quindi, i doppi strati lipidici vengono stabilizzati dall'intera gamma di forze deboli.

Le strutture viste possono essere considerate come organizzazioni cooperative stabilizzate da numerose interazioni non covalenti. Le interazioni idrofobiche hanno tre importanti conseguenze:

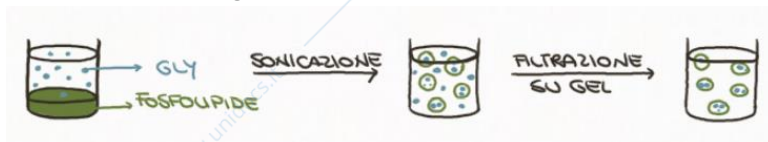
1. I doppi strati lipidici tendono ad **estendersi**
2. I doppi strati lipidici tendono a formare **strutture chiuse**, in modo che non vi siano estremità idrocarburiche esposte
3. I doppi strati lipidici sono **autosigillanti**, in quanto la formazione di un foro è un processo energeticamente sfavorito.

I **liposomi** sono vescicole lipidiche che si formano per chiusura del foglietto bimolecolare (proprietà 2 e 3) e tendono a fondersi con la membrana plasmatica (proprietà 1). Per questa loro caratteristica sono molto usati per studiare la permeabilità delle membrane e per veicolare molecole (DNA, RNA, farmaci...) nelle cellule.



Studio della permeabilità delle membrane

Si possono formare liposomi esponendo un appropriato lipide a un mezzo acquoso e **sonicando** (agitando la sospensione mediante onde sonore ad alta frequenza); si ottiene così una dispersione di vescicole chiuse di grandezza abbastanza uniforme. Si possono preparare vescicole più grandi facendo evaporare lentamente il solvente organico da una sospensione di fosfolipidi dispersa in un sistema costituito da una miscela di solventi. Durante il processo di formazione dei liposomi diventa quindi possibile intrappolare ioni e molecole all'interno dei loro compartimenti acquosi. Ad esempio molecole come la glicina.



Un altro metodo di studio è l'utilizzo della membrana planare a doppio strato. Questa struttura si può realizzare intingendo un pennellino sottile in una soluzione lipidica e passandolo su un foro di 1 mm di diametro presente nel setto centrale del dispositivo. Sul foro si forma spontaneamente un singolo doppio strato fosfolipidico. Anche in questo caso possiamo inserire una molecola o ione in uno dei due compartimenti e constatare se passa nell'altro e, in caso, quanto tempo impiega per passare. Altrimenti, si possono studiare le proprietà di conduttanza elettrica della membrana inserendo due elettrodi, uno per compartimento. Per esempio, la permeabilità agli ioni può essere determinata misurando l'intensità di corrente attraverso la membrana, in funzione del voltaggio applicato.

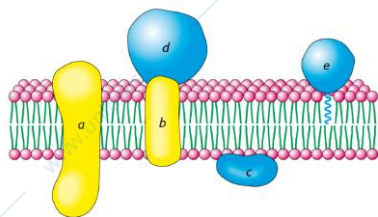


5.2 Proteine di membrana

I lipidi di membrana formano una barriera alla permeabilità, quindi determinano la formazione di compartimenti, mentre le proteine specifiche mediano quasi tutte le altre funzioni delle membrane. In particolare, le proteine trasportano sostanze chimiche e informazioni, mentre i lipidi creano l'ambiente appropriato per l'azione di queste proteine. Le membrane differiscono per il loro corredo proteico, infatti, le membrane plasmatiche contengono molte pompe, canali, recettori ed enzimi ed il loro contenuto proteico si aggira intorno al 50%. Le membrane interne dei mitocondri e dei cloroplasti hanno un contenuto di proteine che si aggira intorno al 75% poiché le membrane sono utili alla trasduzione dell'energia. Altre membrane ancora, tipo la guaina mielinica, hanno un basso contenuto proteico, circa il 18%. In genere **le membrane che svolgono funzioni diverse contengono un diverso repertorio di proteine.**

5.2.1 Proteine ed interazioni con la membrana

Le proteine di membrana possono essere classificate come **periferiche** o **integrali** sulla base della loro dissociazione dalle membrane. Alcune possono essere solubilizzate con trattamenti relativamente blandi, altre sono legate più saldamente e possono essere estratte solo usando un detergente o un solvente organico.

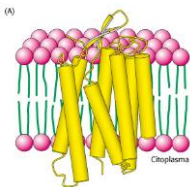


Le **proteine integrali di membrana** interagiscono mediante interazioni non polari con l'intero doppio strato della membrana, cioè attraversano tutta la membrana. Le **proteine periferiche di membrana** si legano alle membrane principalmente per mezzo di interazioni elettrostatiche e di legami idrogeno con le teste polari dei lipidi. Queste interazioni polari possono essere rotte aumentando la concentrazione salina o variando il pH. Altre proteine sono ancorate al doppio strato lipidico per mezzo di una catena idrofobica, come quella di un acido grasso. Vedremo ora le diverse modalità di interazione delle proteine con le membrane tramite alcuni esempi.

Interazione tramite α -eliche: la Batteriorodopsina

La **batteriorodopsina** è una proteina archeale che utilizza l'energia della luce per trasportare i protoni dall'interno all'esterno della cellula, generando così un gradiente protonico, che verrà poi utilizzato per sintetizzare ATP. La batteriorodopsina è formata da **7 α -eliche**, disposte quasi perpendicolarmente al piano della membrana cellulare e che attraversano il doppio strato lipidico per tutta la sua lunghezza.

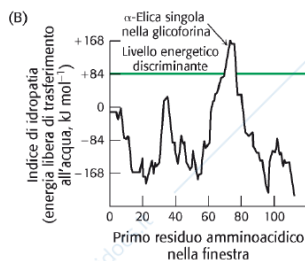
La maggior parte degli amminoacidi delle α -eliche che attraversano la membrana **non sono polari e solo alcuni sono carichi**. Tale disposizione risponde ad una logica molecolare, in quanto questi amminoacidi devono interagire con la porzione idrofobica dei lipidi oppure con un altro residuo non polare. Le α -eliche che attraversano interamente la membrana sono i motivi strutturali più comuni delle proteine di membrana.



Localizzazione dell'elica nella membrana: la glicoforina

Un modo per identificare le possibili sequenze trans-membrana è quello di chiederci se un determinato segmento ad α -elica in teoria è più stabile in un ambiente idrofobico, oppure in acqua. Per ottenere questa informazione basta determinare la **variazione di energia libera** necessaria per il trasferimento di un tratto ad α -elica dall'interno di una membrana all'acqua. Scegliamo una **finestra**, ossia un intervallo di residui (di solito 20) e consideriamo la variazione di energia libera per ciascuna finestra riportandola in un grafico in funzione della posizione del primo amminoacido della finestra stessa. Si ottiene così il grafico dell'idropatia della proteina. Anche se il sistema è relativamente empirico, un picco di +84 kJ/mol o più nel grafico, indica che quel segmento polipeptidico potrebbe essere un' α -elica che attraversa la membrana. Teniamo presente che questo è solo un indizio e non una prova schiacciante. Alcune proteine di membrana contengono elementi che attraversano la membrana che sfuggono all'identificazione con l'uso di questi grafici di idropatia.

Es. La **glicoforina**, una proteina di membrana degli eritrociti, possiede un' α -elica trans-membrana.



Interazione tramite β -foglietti a barile: la Porina

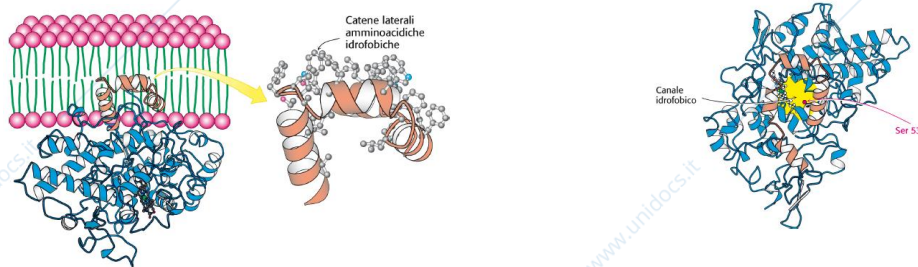
La **porina** è una proteina di membrana che si trova principalmente sulla membrana plasmatica dei batteri fa parte di una classe di proteine di membrana formate essenzialmente da β -foglietti, senza α -eliche. La disposizione dei foglietti β è molto semplice: ciascuna catena β è legata a quella adiacente tramite legami idrogeno in modo antiparallelo, formando in tal modo un foglietto β . Il foglietto β si avvolge su sé stesso formando un cilindro cavo, cioè un poro o canale, che attraversa la membrana. La superficie esterna della porina è di natura non polare e può così interagire con la parte idrocarburica della membrana. Invece l'interno del canale è prevalentemente idrofilico e può riempirsi di acqua. Questa disposizione di superfici polari e non polari è resa possibile dall'alternanza di residui idrofobici e idrofilici lungo ciascuna catena β .



Interazione tramite una piccola porzione: la Prostaglandina H2 sintasi-1

La **prostaglandina H2 sintasi-1** è un enzima che si trova sulla membrana del reticolo endoplasmatico e sintetizza la prostaglandina H2 dall'acido arachidonico. È un omodimero costituito principalmente da α -eliche. Questa proteina non attraversa completamente la membrana, ma per la maggior parte giace al di fuori di essa, con una piccola porzione legata alla membrana per mezzo di α -eliche, i cui residui idrofobici interagiscono con le catene idrocarburiche dei lipidi di membrana. Questo tipo di legame è talmente forte, che solo intervenendo con detergenti è possibile staccare la proteina dalla membrana. Per questo l'enzima può essere considerato come una proteina integrale di membrana, anche se non attraversa per intero la membrana.

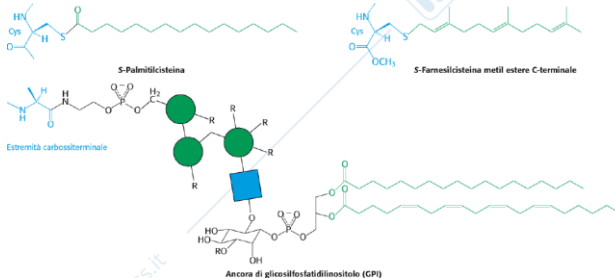
La prostaglandina H2 promuove l'infiammazione e modula la secrezione gastrica di acido cloridrico.



co. Farmaci quali l'aspirina (acido acetilsalicilico) e l'ibuprofene bloccano il canale della prostaglandina H2 sintasi-1 impedendo la sintesi della prostaglandina H2 ed agendo così da antinfiammatori.

Interazione tramite gruppi idrofobici

Alcune proteine, non dotate delle strutture prima considerate, si associano alla membrana per mezzo di gruppi idrofobici aggiunti alle stesse proteine tramite modificazioni post-traduzionali.



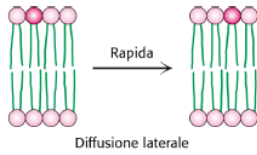
5.3 Fluidità della Membrana

La membrana cellulare non dev'essere pensata come un elemento fisso e statico ma piuttosto come un elemento **fluido** e **dinamico**. Infatti, le sue componenti possono non solo cambiare in quantità e qualità ma anche spostarsi attraverso la membrana stessa. Si hanno due tipi di diffusione dei lipidi e delle proteine nella membrana: la **diffusione laterale** e la **diffusione trasversale**.

5.3.1 Diffusione laterale

La diffusione laterale è la fluttuazione di lipidi e proteine che avviene sullo stesso strato della membrana. Il rapido movimento laterale delle proteine di membrana è stato visualizzato per mezzo della microscopia a fluorescenza, per mezzo della tecnica del **recupero della fluorescenza in seguito a fotosbiancamento (FRAP)**. Dapprima un componente della superficie cellulare viene marcato specificamente con un cromatoforo fluorescente. Una piccola regione della superficie cellulare viene tenuta sotto osservazione con un microscopio a fluorescenza. Le molecole fluorescenti in questa regione vengono distrutte (sbiancate) con un impulso molto forte di luce laser. La fluorescenza, sempre nella stessa regione, viene poi monitorata nel tempo. Se il componente marcato è

mobile, le molecole sbiancate lasciano la regione, in scambio con molecole non sbiancate, con un conseguente aumento dell'intensità della fluorescenza. La velocità del recupero della fluorescenza dipende dalla velocità di diffusione laterale del componente fluorescente.



Si può calcolare la velocità di diffusione laterali per i componenti, che può essere espressa come **coefficiente di diffusione D**.

$$S=(4Dt)^{1/2}$$

S = distanza media

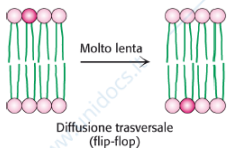
t = intervallo di tempo

D = coefficiente di diffusione

Una molecola di fosfolipide percorre una distanza media di $2\mu\text{m}$ in 1 secondo. Questi valori di coefficiente di diffusione stabiliscono che la viscosità delle membrane è circa 100 volte superiore a quella dell'acqua (vicina all'olio d'oliva). Al contrario dei lipidi, le proteine mostrano una velocità di diffusione molto varia. Alcune proteine si muovono quasi con la stessa velocità dei lipidi, mentre altre sono quasi immobili.

5.3.2 Diffusione trasversale

La diffusione laterale, o diffusione flip-flop consiste nel trasferimento di una molecola da uno strato all'altro del foglietto bimolecolare. Il flip-flop delle molecole fosfolipidiche è stato misurato direttamente con tecniche di risonanza di spin elettronico. Queste misure hanno dimostrato che una molecola fosfolipidica impiega diverse ore per spostarsi da una parte all'altra della membrana. La barriera energetica per il movimento di flip-flop è ancora più elevata per le proteine, che hanno regioni polari più estese dei lipidi. Infatti l'asimmetria di membrana si mantiene inalterata per tempi molto lunghi.



5.3.3 Modello a mosaico fluido

Sulla base delle caratteristiche di mobilità delle proteine di membrana, nel 1972 S.Jonathan Singer e Garth Nicolson hanno proposto un modello a mosaico fluido. Il modello si basa sul concetto che le membrane sono soluzioni bidimensionali di lipidi orientati e di proteine globulari. Il doppio strato lipidico ha un duplice ruolo: agisce sia da solvente per le proteine integrali di membrana, sia da barriera alla permeabilità.

Fattori che influenzano la fluidità della membrana

Molti processi di membrana dipendono dalla fluidità dei lipidi di membrana, caratteristica che viene controllata dalla composizione in acidi grassi e dalla presenza di colesterolo. La transizione dallo stato rigido allo stato fluido e viceversa si può avere quando una cellula è sottoposta a diverse temperature e può essere una transizione molto brusca quando, ad esempio, la temperatura a cui è esposta la cellula supera quella di melting. La temperatura di fusione dipende dalla lunghezza degli acidi grassi e dal loro grado di insaturazione. La presenza di alcuni residui di acidi grassi saturi favorisce lo stato rigido, in quanto le catene idrocarburiche lineari interagiscono molto favorevolmente.

mente l'una con l'altra. Invece, la presenza di un doppio legame cis genera un angolo nella catena idrocarburica. Questo ripiegamento impedisce l'impacchettamento ordinato delle catene di acido grasso, e quindi il valore della temperatura di melting diminuisce. Anche la lunghezza delle catene di acidi grassi influenza tale temperatura, poiché le catene lunghe interagiscono molto meglio tra loro rispetto a quelle corte.

I batteri regolano la fluidità delle loro membrane variando il numero di doppi legami e la lunghezza delle loro catene di acidi grassi. La diminuzione della quantità relativa dei residui saturi impedisce alla membrana di diventare troppo rigida all'abbassarsi della temperatura.

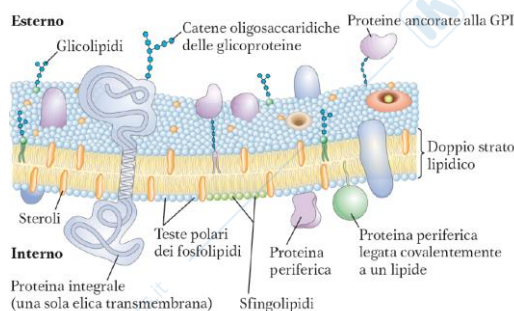
Negli animali il colesterolo è il principale regolatore della fluidità della membrana, poiché contiene un nucleo steroideo voluminoso e la sua presenza tra i lipidi altera la regolare interazione tra le catene degli acidi grassi.

5.3.4 Asimmetria delle membrane

Le membrane sono strutturalmente e funzionalmente asimmetriche. La superficie interna ed esterna di tutte le membrane conosciute hanno componenti e attività enzimatiche differenti. Le proteine di membrana hanno un preciso orientamento, in quanto, dopo essere state sintetizzate, vengono inserite nelle membrane in modo asimmetrico. La particolare disposizione asimmetrica viene mantenuta, in quanto le proteine non possono ribaltarsi all'interno della membrana. Le membrane mantengono questa proprietà in quanto sono sempre sintetizzate facendo crescere membrane preesistenti.

Es. pompa sodio-potassio: è orientata in modo tale da pompare ioni Na^+ fuori dalla cellula e ioni K^+ all'interno della cellula.

Anche i lipidi possono dare asimmetria nella membrana; infatti, la sfingomieline e la fosfatidilcolina sono preferenzialmente localizzate sul foglietto esterno del doppio strato, mentre la fosfatidiletanolamina e la fosfatidilserina sono localizzate principalmente sul foglietto interno.



5.4 Trasporto di soluti attraverso le membrane

Le cellule devono ottenere dall'ambiente circostante le molecole per la biosintesi e per la produzione di energia inoltre devono rilasciare le sostanze di rifiuto derivate dal metabolismo. Abbiamo visto che ci sono molecole che non sono in grado di diffondere tramite la membrana plasmatica, solo pochi composti non polari riescono a passare autonomamente il doppio strato lipidico. Le altre sostanze possono passare la membrana tramite l'uso di proteine di membrana quali le pompe, i trasportatori e i canali ed il trasporto di queste sostanze può avvenire tramite due tipi di trasporto:

- **Trasporto passivo**

La molecola riesce a passare la membrana senza utilizzo di energia ma tramite gradiente elettro-chimico. Può avvenire come **diffusione semplice** o **diffusione facilitata**

- **Trasporto attivo**

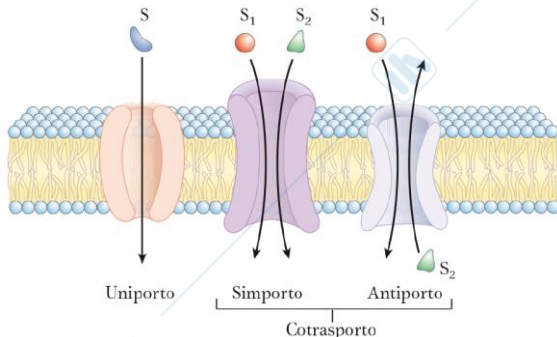
Per trasportare la molecola deve essere utilizzata una certa quota di energia. Si divide in **trasporto attivo primario** e **trasporto attivo secondario**.

Inoltre le proteine canale possono essere classificate come:

- **Uniporto**

Trasporta una molecola in una direzione

- **Simporto**
Cotrasporta due molecole in una direzione
- **Antiporto**
Cotrasporta due molecole in direzioni opposte.



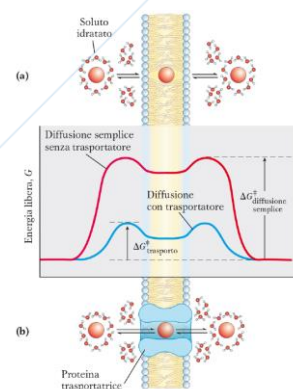
Questa classificazione non tiene conto del fatto che il trasporto sia attivo o passivo ma è una classificazione generale di tali proteine

5.4.1 Diffusione semplice – Trasporto Passivo

La molecola riesce a diffondersi passando direttamente tramite i lipidi di membrana. Avviene per molecole quali i gas, le molecole idrofobiche e le piccole molecole polari, non può avvenire per grosse molecole polari o per le molecole cariche.

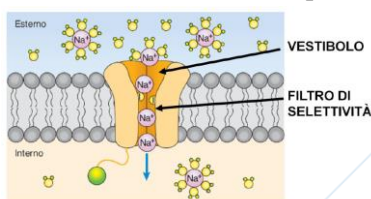
5.4.2 Diffusione facilitata – Trasporto Passivo

La molecola non riesce a diffondersi tramite i lipidi e c'è bisogno di una proteina integrale di membrana che crei un passaggio nella membrana. Per passare attraverso il doppio strato lipidico un soluto polare o carico deve perdere le sue molecole di idratazione e poi riacquistarle. La tappa intermedia è uno stato altamente energetico (\approx energia di transizione reazione chimica). Le proteine di membrana abbassano l'energia di attivazione (ΔG^*) per il trasporto di composti polari e ioni perciò creano una diffusione facilitata. La variazione di energia libera che si ha in seguito all'interazione fra la proteina ed il soluto compensa quella persa dalla perdita dell' H_2O di idratazione. In questo modo il processo risulta molto più veloce. La diffusione facilitata può avvenire tramite **canali** o tramite **trasportatori** (o **carriers**).



Proteine Canale

I canali sono proteine trans membrana che delimitano uno spazio interno per il passaggio delle molecole. In genere sono poco specifici e non sono saturabili, caratteristica che rende il movimento più veloce. Le molecole che passano attraverso queste proteine sono ioni e piccole molecole cariche.



La selettività dei canali è strettamente determinata dal tipo di cariche (positive o negative) che formano le pareti del foro di permeazione. Si hanno canali con un'**alta selettività** come ad esempio i canali del **sodio**, del **potassio**, del **calcio** e del **cloro** e canali con una **selettività intermedia** come i canali **sodio-potassio** e i canali **sodio-potassio-calcio**.

Si hanno anche diverse modalità di attivazione di queste proteine:

1. Canali voltaggio dipendenti

La probabilità di apertura dipende strettamente dal potenziale elettrico della membrana

2. Canali attivati dai ligandi

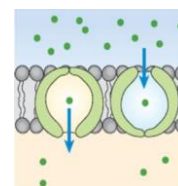
La probabilità di apertura e chiusura è determinata dall'azione di particolari molecole messaggere

3. Canali attivati da secondi messaggeri

La probabilità di apertura è condizionata dalla presenza nel liquido intracellulare di ioni e molecole comunemente indicati come secondi messaggeri intracellulari (Ca^{2+} , ATP, cAMP, cGMP, IP_3)

Proteine Carriers

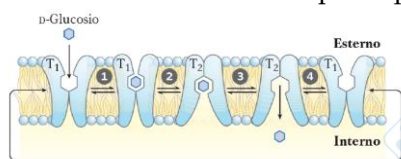
Le proteine carriers legano i substrati con alta stereospecificità e sono saturabili (come gli enzimi, infatti sono chiamati anche permeasi) tuttavia, la diffusione avviene in tempi più lunghi rispetto alle proteine canale.



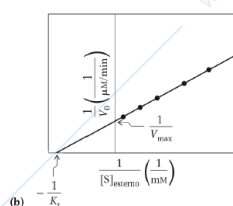
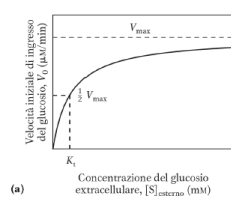
Carrier

Trasportatore del Glucosio (GLUT1)

Il glucosio, indispensabile per il metabolismo degli eritrociti, entra nella cellula per diffusione facilitata grazie ad uno specifico trasportatore chiamato GLUT1. Tale proteina è composta da 12 segmenti idrofobici trans-membrana e da residui idrofilici capaci di legare il glucosio. GLUT1 possiede le 3 caratteristiche principali: alta velocità, saturabilità e specificità.



Nonostante sia un tipo di trasporto molto veloce si ha comunque una velocità massima di esecuzione dovuta dal fatto che i carriers sono saturabili (possono portare una sola molecola per volta ed avrà un tot di carrier sulla membrana => possono essere tutti occupati e non si ha passaggio, devo aspettare che si "liberino"). D'altronde possiamo anche definire la concentrazione extracellulare per avere la velocità di reazione uguale alla metà della velocità massima (ossia una sottospecie di K_M enzimatica ma per i carriers), chiameremo questo valore K_T . A questo punto possiamo tracciare la cinetica di trasporto del glucosio nell'eritrocita.



5.4.3 Trasporto attivo primario

Il trasporto attivo primario consiste nel trasporto di una molecola contro gradiente tramite proteine di membrana ATP-dipendenti. Dunque, il trasporto della molecola è accoppiato ad una reazione esoergonica come la conversione di ATP in ADP

Le ATPasi

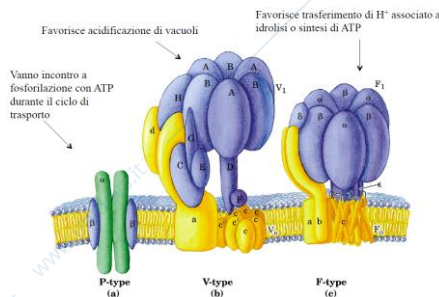
Il funzionamento di questi trasportatori, che prendono il nome di pompe, si basa in genere su un cambiamento della conformazione tridimensionale della molecola: l'attacco della molecola al suo sito modifica la conformazione della pompa proteica, il che favorisce l'attacco di una molecola di

ATP all'altro sito; l'ATP fornisce l'energia necessaria all'apertura del canale e al rilascio della molecola dall'altra parte della membrana.

Grazie a questi meccanismi, le cellule possono mantenere differenti concentrazioni rispetto all'ambiente esterno, proprietà su cui si basano numerosi fenomeni biologici:

- la **contrazione muscolare** è regolata dal trasporto di Ca^{++} verso l'interno delle fibre muscolari;
- la **formazione dell'impulso nervoso** dipende dalla momentanea variazione del potenziale elettrico della membrana plasmatica, operata mediante trasporto attivo di ioni.

Le ATPasi sono classificate in quattro diverse classi:



1. ATPasi di tipo P

Sono trasportatori attivi di cationi, che vengono reversibilmente fosforilati dall'ATP. Sono comunemente presenti negli eucarioti ma anche nei batteri; nel genoma umano si hanno geni per produrre circa 70 ATPasi di tipo P.

2. ATPasi di tipo V

Sono pompe protoniche che si trovano sulla membrana dei vacuoli e dei lisosomi

3. ATPasi di tipo F

Sono pompe protoniche che si trovano a livello della membrana mitocondriale. Sono fattori di accoppiamento energetico e possono anche sintetizzare ATP (ATP sintasi)

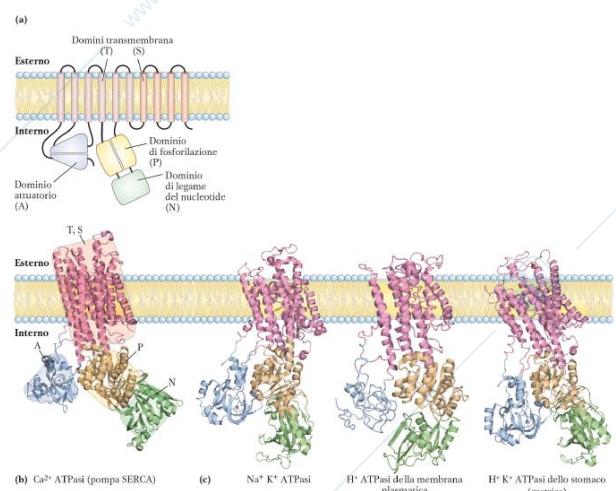
4. Trasportatori ABC

Pompano aminoacidi, peptidi, ioni metallici ed altri composti all'esterno della cellula, contro gradiente.

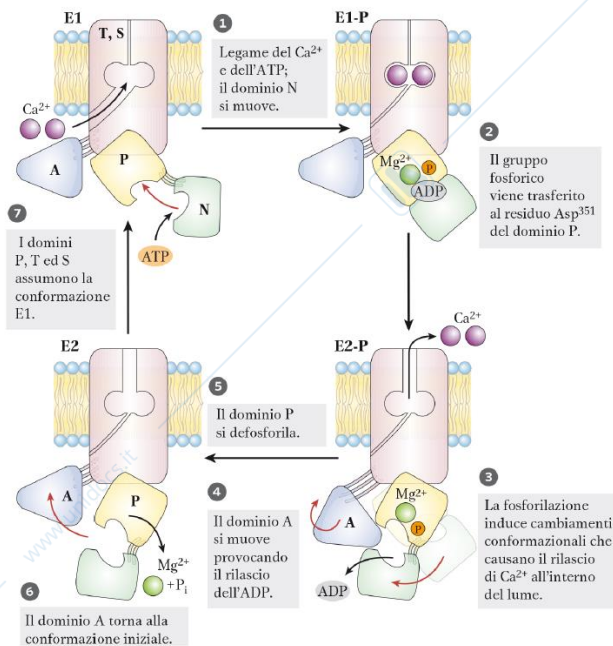
ATPasi P-type: la pompa SERCA

L'enzima **SERCA** rappresenta circa l'80% delle proteine di membrana del reticolo sarcoplasmatico, svolge un ruolo importante nella contrazione muscolare, indotta da un brusco aumento della concentrazione citosolica del calcio. Il rilassamento muscolare dipende dalla rapida rimozione di Ca^{2+} dal citosol e dal suo trasferimento nel reticolo sarcoplasmatico (ad opera di SERCA).

La proteina è composta da un singolo polipeptide avente due domini trans-membrana: il **dominio T (dominio di trasporto)**, contiene la struttura di trasporto dello ione) ed il **dominio S (dominio di supporto)** costituiti da 10 α -eliche che contengono i siti di legame per due ioni calcio. Ciascuno ione calcio è coordinato da sette atomi di ossigeno, che derivano dalle catene laterali di vari aminoacidi. Un'ampia regione della proteina sporge nel citoplasma e consiste in tre domini distinti, con distinte funzioni. Il **dominio N** (con attività kinasica) lega il **nucleotide ATP**; il **dominio P** accetta il **gruppo fosforico** su un residuo di aspartato essenziale (viene fosforilato); il **dominio A** agisce da **adattatore**, traferendo le variazioni strutturali dei domini N e P alla regione trans-membrana dell'enzima.

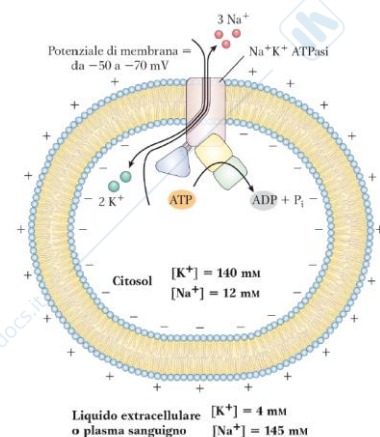


Meccanismo della pompa SERCA:



ATPasi P-type: la pompa sodio-potassio

Fisiologicamente, le cellule devono mantenere più alta la concentrazione di K^+ all'interno della cellula e più bassa la concentrazione di Na^+ rispetto all'ambiente extracellulare. Poiché per il suo funzionamento trasporta 3 ioni sodio all'esterno della cellula e due ioni potassio all'interno della cellula in un unico "movimento". Questi gradienti ionici sono generati e mantenuti da un sistema di trasporto specifico, costituito da un enzima denominato pompa sodio-potassio oppure $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasi. Più di un terzo dell'ATP consumato da un animale a riposo viene utilizzato per pompare questi ioni. Nelle cellule animali il gradiente sodio-potassio controlla il volume cellulare, rende i neuroni e le cellule muscolari elettricamente eccitabili, e favorisce il trasporto degli zuccheri e degli amminoacidi.



Trasportatori ABC: MDR1

La **MDR1** o **glicoproteina P** è responsabile della resistenza di certi tumori ai farmaci (adriamicina, doxorubicina, ecc). È una proteina integrale di membrana composta da due dimeri, ciascuno con 6 eliche trans-membrana e 2 domini che legano ATP. Nella membrana placentare e nella barriera ematoencefalica MDR1 fa in modo che i composti tossici non entrino nella cellula.

Trasportatori ABC: BtuCD

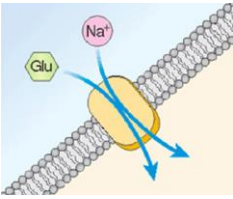
trasporta all'interno fattori essenziali come la vitamina B2. Quella di E. coli omodimero 10 eliche transmembrana e 2 domini che legano nucleotidi.

5.4.4 Trasporto attivo secondario

Il trasporto attivo secondario consiste nel trasporto di una molecola contro gradiente tramite spostamento di un'altra molecola per gradiente. Dunque, il trasporto della molecola è accoppiato ad un flusso esoergonico di un soluto diverso che era stato precedentemente accumulato.

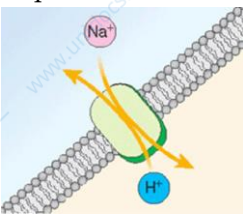
Pompa Na^+ -D-glucosio

Determina l'assorbimento intestinale ed il riassorbimento renale del glucosio. È un simporto, ossia trasporta le due molecole nello stesso verso.



Pompa Na^+ - H^+

È un antiporto (quindi trasporta le due molecole in senso opposto) gioca un ruolo determinante nel controllo del pH a livello di tutte le cellule poiché permette l'acidificazione delle urine e l'espulsione di protoni a livello renale.



6 I CARBOIDRATI

I carboidrati sono molecole cruciali per lo sviluppo e il funzionamento corretto di tutti gli organismi, ma anche come molecole ricche di informazioni. I carboidrati, le proteine contenenti carboidrati e proteine che legano specifici carboidrati sono composti richiesti per le interazioni che consentono alle cellule di formare tessuti, determinano i gruppi sanguigni umani e sono usati da una vasta gamma di agenti patogeni per ottenere l'accesso nelle cellule ospiti. Infatti i carboidrati, con la loro **estrema diversità strutturale**, sono adatti a fungere da mediatori delle interazioni cellulare. In generale sono molecole organiche contenenti molti **gruppi ossidrilici**; la formula empirica di molti di essi è $(\text{CH}_2\text{O})_n$, da cui origina il nome di "idrati di carbonio".

L'importanza dei carboidrati in tutti questi aspetti della biochimica ha generato una nuova area di studio detta **glicobiologia**, che studia la sintesi e la struttura dei carboidrati e come queste molecole sono legate e riconosciute da altre molecole. Si viene così ad aggiungere alla genomica e alla proteomica anche la **glicomica**, che studia il **glicoma**. Il glicoma non è statico e può cambiare in base alle condizioni cellulari ed ambientali, come il proteoma.

6.1 I monosaccaridi

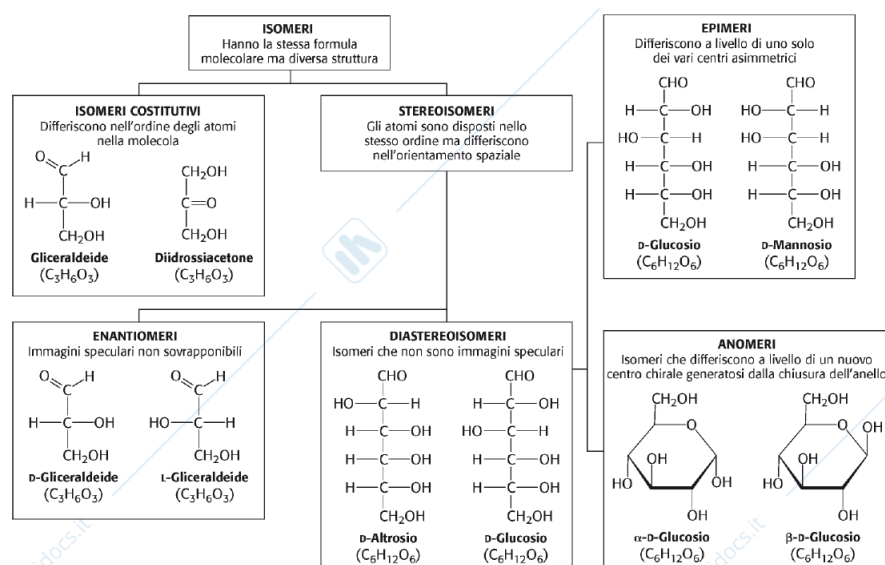
I carboidrati sono costituiti da **monosaccaridi** (i monosaccaridi sono detti anche **carboidrati semplici**), piccole molecole di aldeidi o chetoni che contengono da tre a nove atomi di carbonio legati a gruppi ossidrilici e diverse tra loro per dimensione e configurazione stereochimica a livello di uno o più atomi di carbonio chirali.

Possiamo classificare i monosaccaridi in due classi generali:

- **Monosaccaridi aldosi**
Contengono un gruppo aldeidico, ossia un gruppo carbonilico legato al carbonio primario.
- **Monosaccaridi chetosi**
Contengono un gruppo chetonico, ossia un atomo di ossigeno legato con un legame doppio ad un atomo di carbonio secondario.

Inoltre possono essere classificati come **triosi**, **tetrosi**, **pentosi**, **eptosi**, ecc. in base al numero di atomi di carbonio che li compongono.

Come abbiamo già detto in precedenza, particolarità dei carboidrati è la loro diversità strutturale data soprattutto dalla grande varietà di forme isomeriche:



Il numero dei possibili stereoisomeri è 2^n dove n indica il numero dei carboni asimmetrici.

6.1.1 Enantiomeri, diastereoisomeri ed epimeri

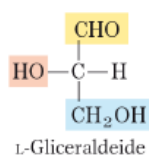
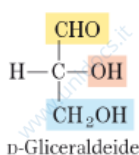
I monosaccaridi da più di tre atomi di carbonio hanno uno o più carboni asimmetrici, quindi formano **diastereoisomeri** ossia forme molecolari che non sono l'immagine speculare l'una dell'altra. I monosaccaridi possono anche essere **enantiomeri**, ossia forme speculari non sovrapponibili e per questo sono classificati come monosaccaridi in **configurazione D** o **configurazione L**, metodologia di classificazione che fa riferimento alla **gliceraldeide**, uno dei monosaccaridi più semplici. In generale:

- **Configurazione D**

L'atomo di carbonio asimmetrico più lontano dal gruppo funzionale ha **gruppo ossidrilico a destra**,

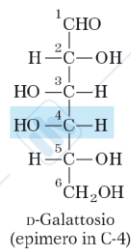
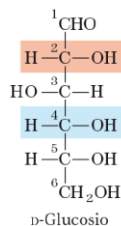
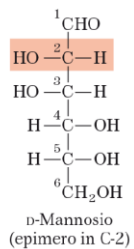
- **Configurazione L**

L'atomo di carbonio asimmetrico più lontano dal gruppo funzionale ha **gruppo ossidrilico a sinistra**.



La maggior parte dei carboidrati si trova in configurazione D.

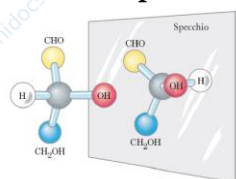
Gli epimeri sono monosaccaridi che differiscono per un solo centro asimmetrico.



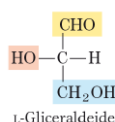
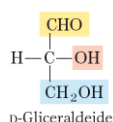
Rappresentazione Enantiomeri

Ho tre tipi possibili di rappresentazione per quanto riguarda i monosaccaridi:

1. Modelli a palle e bastoncini

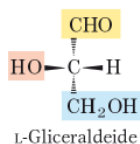
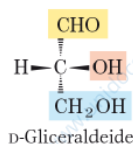


2. Formule proiettive di Fischer



Attenzione! La posizione a destra o a sinistra dei componenti non è equivalente in caso di carbonio chirale.

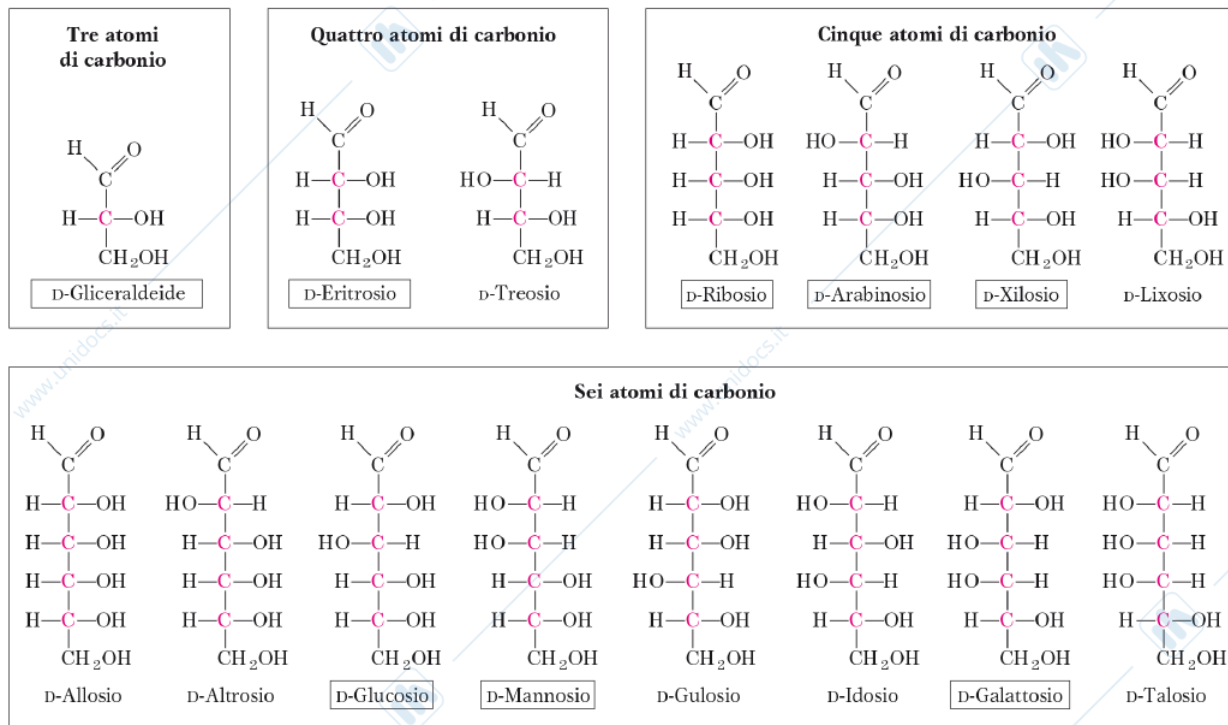
3. Formule prospettiche



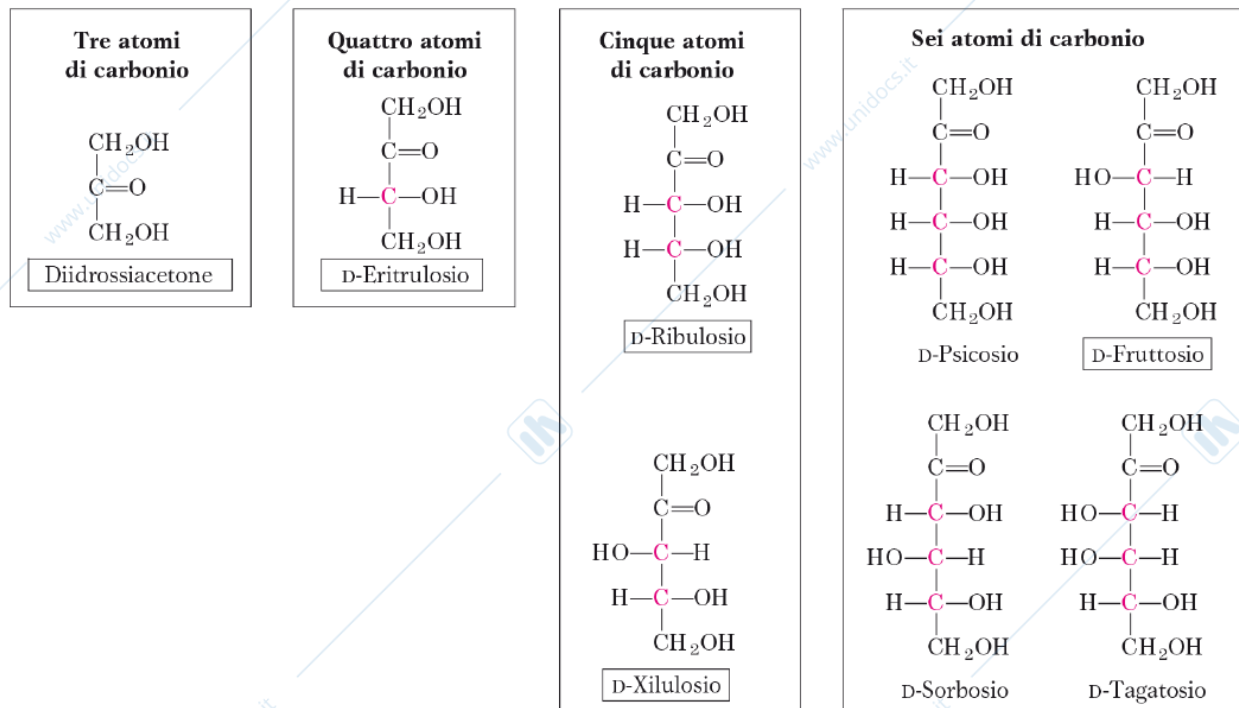
6.1.2 Principali monosaccaridi

Vediamo ora i principali monosaccaridi aldosi o chetosi in configurazione D, teniamo presente che è sempre possibile la configurazione L.

Principali monosaccaridi aldosi



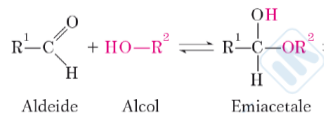
Principali monosaccaridi chetosi



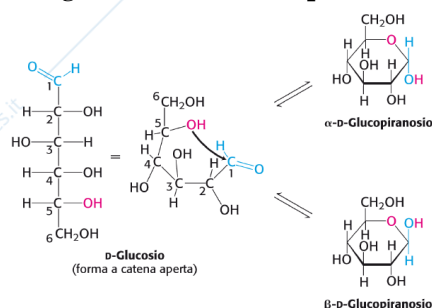
6.1.3 Forme cicliche

Nella maggior parte degli zucche (ad esempio ribosio, glucosio e fruttosio) le forme aperte ciclizzano, generando anelli energeticamente più stabili. La base molecolare per la formazione degli anelli sta nelle reazioni:

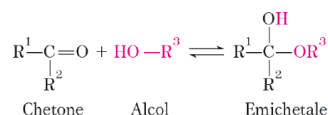
- Gruppo aldeidico ed alcol danno formazione di un **emiacetale**



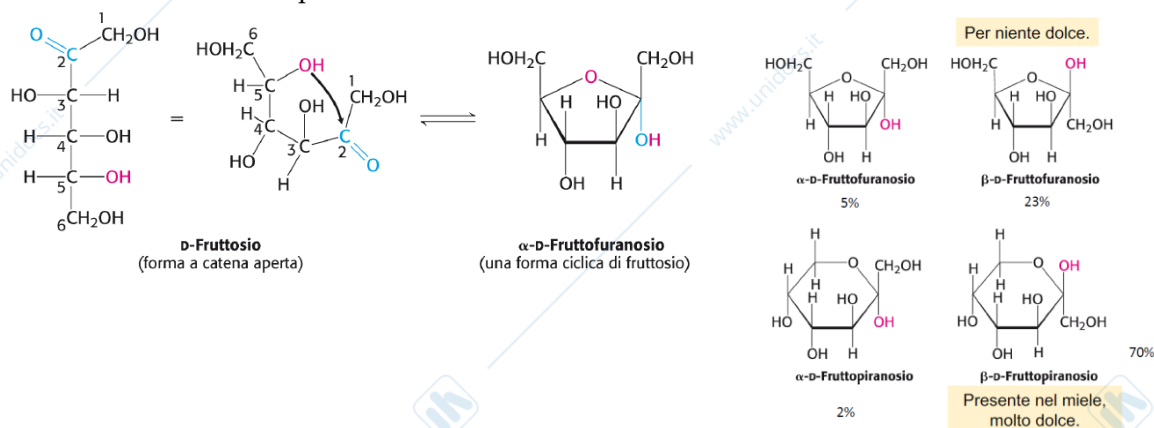
Per un aldoso, come il glucosio, il gruppo aldeidico in C1 della forma aperta reagisce con il gruppo ossidrilico in C5 formando un **emiacetale intramolecolare**. L'anello a sei termini che si genera è chiamato **piranosio** perché simile al pirano.



- Gruppo chetonico ed alcol danno formazione di **emichetale**



Per un chetoso, come il fruttosio, il gruppo aldeidico in C2 della forma aperta reagisce con un gruppo ossidrilico della stessa molecola formando un **emichetale intramolecolare**. Il gruppo chetoni in C2 può reagire sia con l'ossidrile legato al C6, formando un anello a sei termini, sia con l'ossidrile in C5, formando un anello a sei termini. L'anello a cinque termini è chiamato **furanosio** perché simile al furano.



Come si può vedere dalle immagini, la ciclizzazione dà come prodotto due possibili forme dette anomeri:

- anomero α**

Il gruppo ossidrilico legato al C1 (ciclo a 6C) o al C2 (ciclo a 5C) si trova dalla parte opposta rispetto al C6.

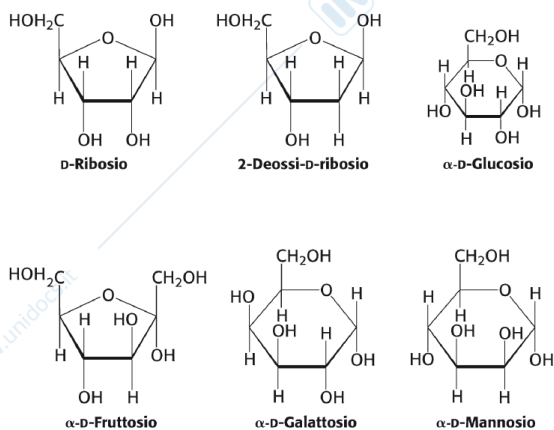
- anomero β**

Il gruppo ossidrilico legato al C1 (ciclo a 6C) o al C2 (ciclo a 5C) si trova dalla stessa parte parte rispetto al C6.

Il carboni C1 (nel ciclo a 6C) e C2 (nel ciclo a 5C) prendono il nome di **carboni anomeric**.

Le rappresentazioni usate precedentemente per i carboidrati ciclici prendono il nome di **proiezioni di Haworth**. In tali proiezioni gli atomi di carbonio dell'anello non vengono mostrati esplicitamente. Il piano approssimativo dell'anello è perpendicolare al piano del foglio, con la linea in grassetto dell'anello rivolta verso il lettore.

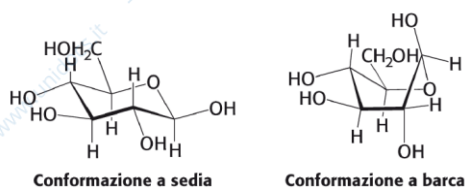
Zuccheri comuni in forma ciclica



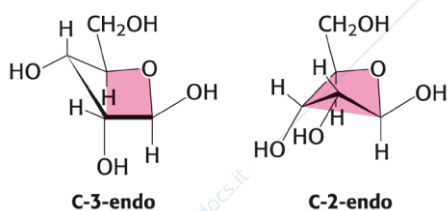
Conformazioni degli anelli

L'anello piranosico a sei termini e l'anello piranosico a cinque termini non possono essere planari perché gli atomi di C hanno geometria tetraedrica.

Gli anelli piranosici possono esistere in due conformazioni diverse: **conformazione a sedia** e **conformazione a barca**. Nelle conformazioni i sostituenti sugli atomi di carbonio possono avere due orientamenti: **assiale** o **equatoriale**. I legami assiali sono quasi perpendicolari al piano medio dell'anello mentre quelli equatoriali sono quasi paralleli a questo piano. I sostituenti assiali tendono ad ostacolarsi l'un l'altro, invece i sostituenti equatoriali hanno più spazio a disposizione. La conformazione a sedia del β -D-glucopiranosio è predominante, in quanto tutte le posizioni assiali sono occupate da atomi di idrogeno, mentre le posizioni equatoriali presentano i gruppi più ingombranti.

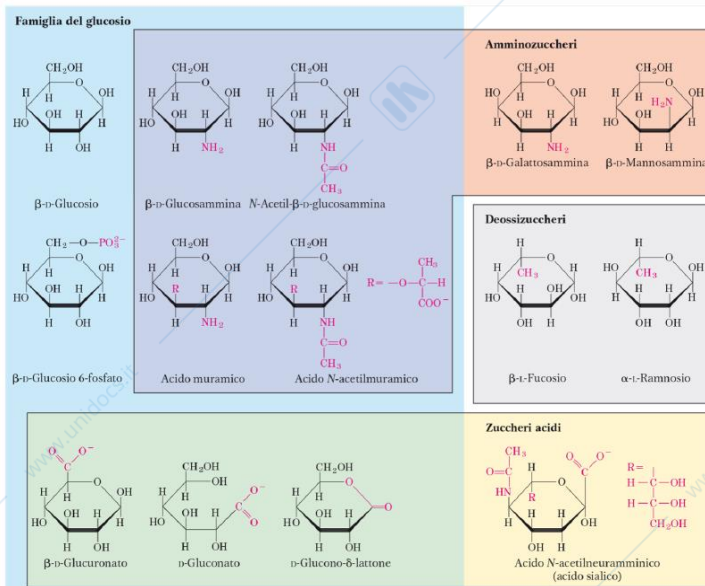


Negli anelli furanosici, la tetraedricità dei carboni causa la fuoriuscita dal piano medio della molecola di un solo atomo di carbonio. Questa conformazione è chiamata **conformazione a busta**. Nella maggioranza delle biomolecole che lo contengono, il residuo di ribosio presenta il C2 o il C3 fuori dal piano, sullo stesso lato del C5. Queste conformazioni sono chiamate rispettivamente **C2-endo** e **C3-endo**.



6.1.4 Zuccheri modificati

Gli zuccheri (monosaccaridi) possono andare incontro a modificazioni post-sintesi. In generale, reagiscono con tre tipi di molecole: alcoli, ammine e gruppi fosforici. Tali molecole possono legarsi agli zuccheri tramite legami O-glicosidici oppure N-glicosidici



Più importanti: **glucosio 6-fosfato**, glucosammina, N-acetilglucosammina.

Legame glicosidico

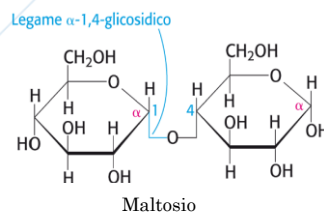
Il legame glicosidico è il legame covalente che unisce il gruppo emiacetalico di uno zucchero con un atomo, di solito nucleofilo, di un'altra molecola. Possiamo trovare legami O-glicosidici se l'altro atomo è un ossigeno, N-glicosidici se l'altro atomo è un azoto o S-glicosidici se l'altro atomo è uno zolfo.

6.1.5 Zuccheri riducenti

Poiché gli isomeri α e β del glucosio sono in un equilibrio che passa attraverso la forma a catena aperta, il glucosio presenta alcune proprietà chimiche tipiche delle aldeidi libere, come la capacità di reagire con agenti ossidanti. Ogni carboidrato che reagendo con un agente ossidante forma un acido aldolico è classificato come **zucchero riducente**.

6.2 Oligosaccaridi

Poiché gli zuccheri contengono molti gruppi ossidrilici, i legami glicosidici possono unire un monosaccaride ad un altro. Gli oligosaccaridi sono carboidrati formati da due o più unità monosaccaridiche legate da uno o più legami O-glicosidici. Gli oligosaccaridi hanno una direzionalità determinata dalle estremità riducenti e non riducenti.

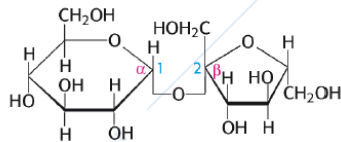


6.2.1 Disaccaridi

Gli oligosaccaridi più semplici sono composti da due sole unità monosaccaridiche e prendono il nome di **disaccaridi**. I disaccaridi più comuni sono **Saccarosio**, **Lattosio** e **Maltosio**.

Saccarosio

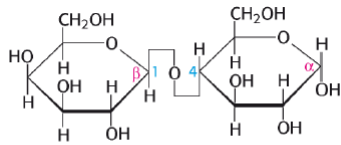
Il saccarosio è una forma di trasporto degli zuccheri nelle piante e si ottiene commercialmente per estrazione dalla canna da zucchero o dalla barbabietola. In questo disaccaride il legame glicosidico unisce i due atomi di carbonio anomerici delle unità di glucosio e di fruttosio; la configurazione del legame glicosidico è **α per il glucosio** e **β per il fruttosio**. Il saccarosio può essere scisso nei due componenti monosaccaridici dall'enzima **saccarasi**.



Saccarosio
 α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruttofuranosio

Lattosio

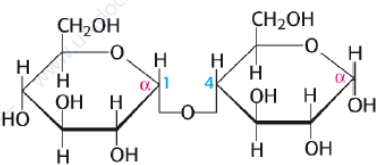
Il lattosio è il disaccaride del latte, è formato da β galattosio e α glucosio. Il lattosio viene idrolizzato dalla lattasi nell'uomo e dalla β -galattosidasi nei batteri.



Lattosio
 β -D-Galattopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopiranosio

Maltosio

Nel maltosio, due unità di glucosio sono unite da un legame α -1,4-glicosidico. Il maltosio viene prodotto dall'idrolisi di lunghi polimeri saccaridici come l'amido e il glicogeno e viene a sua volta idrolizzato in glucosio dalla maltasi.



Maltosio
 α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopiranosio

6.2.2 Polisaccaridi

Gli oligosaccaridi prendono il nome di **polisaccaridi** o **glicani** quando le loro dimensioni superano i 20 000 Da. Inoltre, i polisaccaridi possono essere **omopolisaccaridi** se composti da un solo tipo di monosaccaride oppure **eteropolisaccaridi** se sono formati da due o più tipi di monosaccaridi. Inoltre, possiamo avere anche **polisaccaridi ramificati** o **polisaccaridi lineari** a seconda del tipo di catena (ramificata o lineare).

Glicogeno e amido

Il glucosio è un'importante fonte energetica ma non può essere immagazzinato come tale perché elevate concentrazioni di glucosio altererebbero l'equilibrio osmotico cellulare con conseguente rottura e morte della cellula. La soluzione è stata ottenuta immagazzinando il glucosio sotto forma di polimero. Nelle cellule animali, il **glicogeno** (omopolimero del glucosio) è di gran lunga il polisaccaride più abbondante, in particolar modo per quanto riguarda le cellule muscolari e le cellule del fegato. Il glicogeno è un polimero molto grande e ramificato in cui la maggior parte dei residui di glucosio sono uniti da legami α -1,4 glicosidici e le ramificazioni sono date da legami α -1,6-glicosidici. Nelle piante la riserva del glucosio è costituita dall'**amido**, di cui esistono due forme. L'**amilosio**, la forma non ramificata, è costituito da residui di glucosio uniti da legami α -1,4. L'**amilopectina**, la forma ramificata, presenta un legame α -1,6 ogni 30 legami α -1,4. Il glicogeno, l'amilosio e l'amilopectina vengono idrolizzati dall' α -amilasi, un enzima secreto dalle ghiandole salivari e dal pancreas. Le strutture create da questi tre polisaccaridi sono eliche cave, particolarmente adatte a formare riserve di zucchero facilmente utilizzabili.

Cellulosa

La **cellulosa** è un importante polisaccaride presente nelle piante che ha una funzione strutturale anziché nutrizionale ed è uno dei più importanti composti organici della biosfera. La cellulosa è un polimero non ramificato di residui di glucosio legati da legami β -1,4. Questa piccola diversità stereochimica tra la cellulosa e i 3 polimeri visti in precedenza genera due molecole sostanzialmente diverse per proprietà e funzioni biologiche. La configurazione β permette alla cellulosa di formare catene lineari molto lunghe. Le fibrille sono formate da catene parallele, che interagiscono tra loro per mezzo di legami idrogeno che generano una struttura rigida idonea a funzioni di supporto.

La cellulosa non è digeribile dall'essere umano poiché non si hanno enzimi. Le fibre insolubili come la cellulosa sono comunque utili nella dieta perché aumentano la velocità con la quale i prodotti della digestione passano attraverso l'intestino crasso, minimizzando in tal modo il tempo di esposizione alle tossine presenti nella dieta.

Chitina

La chitina è un omopolisaccaride formato da residui di N-acetil glucosammina legati con legame β -1,4. È il principale componente dell'esoscheletro degli artropodi e perciò è probabilmente il secondo polisaccaride più abbondante in natura, dopo la cellulosa.

Agar e agarosio

L'**Agar** è una miscela di eteropolisaccaridi solforati composti da D-galattosio e alcuni derivati dell'L-galattosio. Questi monosaccaridi sono uniti tra loro da legami etere tra il C-3 ed il C-6. È tipicamente presente nella parete di alcune alghe rosse marine. L'Agarosio è il componente dell'agar con meno gruppi carichi. Forma facilmente un gel ossia una matrice tridimensionale che incorpora acqua, per questa caratteristica viene utilizzato in laboratorio per analisi elettroforetiche di DNA e RNA.

Polisaccaridi della matrice extracellulare

Lo spazio tra le cellule è riempito da una **matrice extracellulare (ECM)**, un materiale gelatinoso in cui sono presenti polisaccaridi (in particolare eteropolisaccaridi) e diversi tipi di proteine (collagene, elastine, ecc.). Gli eteropolisaccaridi che si trovano nella ECM sono glicosaminoglicani, polimeri lineari composti da unità disaccaridiche che si ripetono e che assumono forma estesa a bastoncino (presenti negli animali e nei batteri ma non nelle piante). Ci sono diversi eteropolisaccaridi compresi nella ECM, la loro quantità e qualità differenzia le ECM dei vari tessuti.

Vediamo alcuni esempi:

- **Ialuronano**
Composto da ripetizioni di **acido Glucuronico** e **N-acetilglucosammina**. Presente nel liquido sinoviale delle articolazioni, nell'umor vitreo dell'occhio dei vertebrati, nella cartilagine e nei tendini.
- **Condroitin solfato**
Composto da ripetizioni di **acido Glucuronico** e **N-acetilgalattosammina-4-solfato**. Presente nel tessuto cartilagineo.
- **Cheratan solfati**
Composti da ripetizioni di **Galattosio** e **N-acetilglucosammina-6-solfato**. Presenti nelle cartilagini, nelle ossa e nelle strutture cornee di cellule morte (corni, unghie, artigli, ecc.).
- **Eparan solfati**
Composti da ripetizioni di **acido iduronico-2-solfato** e **glucosammina-2-3-6-solfato**. Hanno un'altissima carica negativa, interagiscono con fattori coagulazione ed altri fattori. In parte costituiscono l'eparina.

6.3 Glicoconiugati

I carboidrati si possono trovare associati covalentemente ad altre molecole come proteine e lipidi. Avremo quattro classi principali di **glicoconiugati**:

1. **Glicoproteine**
2. **Proteoglicani**
3. **Mucine o mucoproteine**
4. **Glicosfingolipidi**

6.3.1 Glicoproteine

Nelle glicoproteine la parte proteica è la principale componente in peso. Gli zuccheri delle glicoproteine si legano all'atomo di azoto delle catene laterali dei residui di asparagina (legame N-glicosidico) oppure all'atomo di ossigeno delle catene laterali di residui di serina e treonina (legame O-glicosidico). Il residuo di asparagina può accettare un oligosaccaride solo se inserito in un determinato **consensus**, ossia se fa parte della sequenza Asn-X-Ser o Asn-X-Thr dove X può essere qualunque altro residuo amminoacidico, eccetto la prolina. Questa particolarità è data dal fatto che queste modificazioni sono date da particolari enzimi presenti nel reticolo endoplasmatico. Quindi, nelle sequenze amminoacidiche possono essere presenti potenziali siti di glicosilazione, ma non è detto che vengano utilizzati. La glicosilazione dipende anche da altri aspetti della struttura proteica e dal tipo di cellula in cui la proteina viene espressa.

L'Eritroproteina

L'ormone glicoproteico **eritroproteina (EPO)** viene secreto dal rene e stimola la produzione di globuli rossi. L'eritroproteina è composta da 165 amminoacidi ed è N-glicosilata a livello di tre residui di asparagina e O-glicosilata su un residuo di serina. L'EPO matura contiene circa il 40% in peso di carboidrati e la glicosilazione aumenta la sua stabilità nel sangue. La proteina non glicosilata può produrre solo circa il 10% di attività rispetto ad EPO glicosilata. La disponibilità dell'eritroproteina umana ricombinante ha fortemente migliorato il trattamento delle anemie. Però gli atleti coinvolti in competizioni di lunga durata usano l'EPO umana ricombinante per aumentare il numero di globuli rossi e quindi migliorare la capacità di trasporto dell'ossigeno.

Gruppi sanguigni

I gruppi sanguigni sono determinati da tre tipi di glicoproteine presenti sulla superficie dei globuli rossi. Le tre strutture hanno in comune una porzione oligosaccaridica ma gli antigeni A e B si for-

mano per presenza di un altro monosaccaride in aggiunta a questa regione. In particolare N-acetilgalattosammina per l'antigene A e galattosio per l'antigene B. Dunque, possiamo dire che il gruppo sanguigno deriva dalla presenza, nel genoma, di geni codificanti per enzimi che possano operare queste modificazioni. L'assenza del monosaccaride in più sulla regione oligosaccaridica rappresenta il gruppo 0.

6.3.2 Proteoglicani

Le cellule di mammifero producono 40 tipi di **proteoglicani**. Sono organizzatori tissutali, influenzano diverse attività cellulari (adesione intercellulare, attivazione fattori di crescita, ecc..) e sono anche presenti come proteine di membrana. La componente proteica dei proteoglicani è coniugata ad un particolare tipo di polisaccaride detto **glicosamminoglicano**. I carboidrati costituiscono una percentuale molto più elevata nei proteoglicani piuttosto che nelle glicoproteine. I polisaccaridi glicosamminoglicani sono legati covalentemente ad un **nucleo proteico** mediante ponte tetrasaccaridico con la serina della sequenza (Ser-Gly-X-Gly).

Proteoglicani sulla membrana

Sulle membrane biologiche sono presenti due famiglie di proteoglicani contenenti nella struttura catene di eparan solfato:

- **Sindecani**
Sono proteine integrali di membrana aventi un dominio extracellulare con 3-5 catene di eparan solfato
- **Glipicani**
Sono proteine legate alla membrana tramite una porzione lipidica che funge da ancora. Possono essere rilasciati della ECM tramite tagli effettuati da proteasi e fosfolipasi.

Aggrecano e collagene

Il proteoglicano aggrecano e il proteoglicano collagene sono componenti chiave del tessuto cartilagineo. La tripla elica del collagene ha funzioni strutturali ed è responsabile della resistenza alla trazione, mentre l'aggrecano è responsabile dell'assorbimento degli urti.

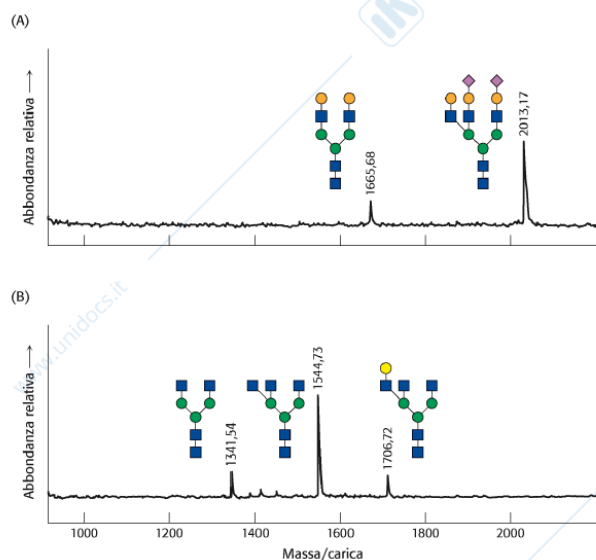
La componente proteica dell'aggrecano è composta 2397 amminoacidi ed è organizzata in tre domini globulari chiamati G1, G2 e G3. In una regione che si estende tra G2 e G3 sono presenti dei residui di serina in sequenze ripetute a cui si legano tramite un ponte trisaccaridico diverse molecole di **cheratan solfato** e **condrotin solfato**. Molte molecole di aggrecano sono a loro volta legate non covalentemente attraverso il primo dominio globulare a un filamento molto lungo formato da un insieme di molecole di **ialuronano**. L'acqua si lega ai glicosamminoglicani, attratta dalle numerose cariche negative. L'aggrecano attutisce gli urti, in quanto l'acqua assorbita gli permette di riassumere la forma originale, dopo essere stato deformato. L'**osteoartrite** deriva dalla degradazione dell'aggrecano e del collagene della cartilagine.

6.3.3 Mucine

Nelle mucine la componente proteica è glicosilata con N-acetilgalattosammina a livello di residui di serina o treonina. Le mucine sono in grado di formare grandi strutture polimeriche e sono normalmente presenti nelle secrezioni di muco, agiscono da lubrificanti per diverse parti corporee come i tratti tracheobronchiali e gastrointestinali e sono presenti nella saliva. Agisce anche come barriera protettiva aderendo alle cellule epiteliali. La caratteristica strutturale è una regione della catena proteica chiamata **regione dal numero variabile di unità ripetute in fila (VNTR, variable number of tandem repeats)**, ricca di residui di serina e treonina O-glicosilati. Infatti, i carboidrati possono rappresentare fino al 80% in peso della molecola.

6.4 La Glicomica

La **glicomica** è la caratterizzazione sistematica della componente saccaridica di una cellula o di un tessuto. Di solito gli oligosaccaridi vengono sequenziati mediante **spettrometria di massa**. Si utilizzano specifici enzimi per isolare la componente oligosaccaridica dagli altri elementi componenti il determinato tessuto da studiare ed altri enzimi per frammentare ulteriormente gli oligosaccaridi ottenuti.



Specifici oligosaccaridi contengono informazioni sulla destinazione intracellulare delle proteine, interazioni cellula-cellula, differenziazione cellulare, ecc. Per la loro importanza in questo settore è nato un nuovo ramo della biologia, chiamato glicobiologia che si occupa dello studio della struttura e funzione dei glicocongiugati.

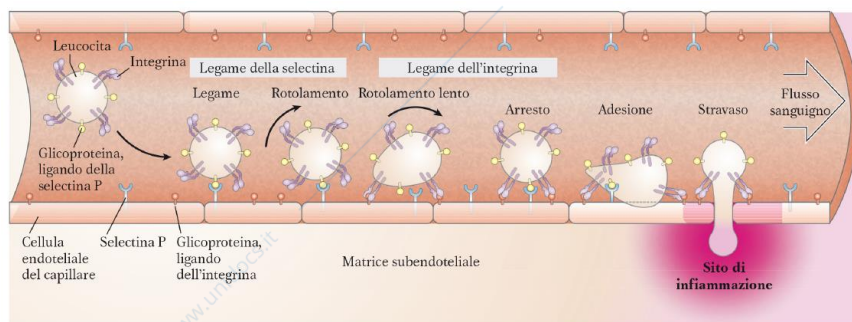
Diversi monosaccaridi possono legarsi assieme generando strutture ramificate, con diversi legami ed un'elevata complessità. Ci sono proteine in grado di riconoscere queste strutture complesse. Ne vedremo alcuni esempi.

Le lectine

Le lectine sono proteine che legano i glicani riconoscendo 2 o più unità saccaridiche. La loro principale funzione è facilitare il contatto cellula-cellula. Ci sono diverse classi di lectine, ad esempio le lectine di tipo C possiedono un dominio di 120 residui aa responsabile del legame ai carboidrati ed il loro funzionamento richiede calcio.

Le Selectine

Le **selectine** appartengono alle **lectine di tipo C** e sono proteine coinvolte nella mediazione del riconoscimento ed adesione cellulare. Ad es. legano le cellule del sistema immunitario ai siti danneggiati durante la risposta immunitaria.



7 NUCLEOTIDI E ACIDI NUCLEICI

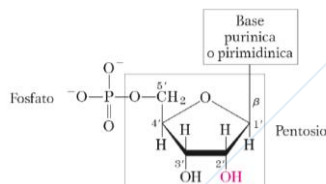
Il DNA e l'RNA sono lunghi polimeri lineari, chiamati acidi nucleici, che trasportano l'informazione in una forma che può essere trasferita da una generazione a quella successiva. Queste macromolecole sono formate da un gran numero di nucleotidi legati un all'altro. I nucleotidi e gli acidi nucleici sono molecole aventi come principali componenti basi azotate eterocicliche; la sequenza di basi lungo una catena di un acido nucleico contiene e conserva l'informazione genetica.

Riassumendo, gli acidi nucleici:

- Sono i vettori dell'eredità e agenti del trasferimento dell'informazione genetica
- Sono polimeri lineari costituiti da nucleotidi
- Sono costituiti principalmente da basi azotate, un tipo di zucchero a 5 atomi di carbonio e acido fosforico (elementi che si possono ottenere tramite idrolisi dei due acidi nucleici)
- Sono di 2 tipi:
 - **Acido desossiribonucleico (DNA)**
Lo zucchero che lo compone è il 2-desossiribosio
 - **Acido ribonucleico (RNA)**
Lo zucchero che lo compone è il ribosio

7.1 Nucleotidi

I nucleotidi sono composti formati da una **base azotata** legata ad uno **zucchero** (ribosio o desossiribosio) tramite un legame N-glicosidico e contengono un **acido fosforico** legato al C5. Il legame N-glicosidico lega il C1 anomero dello zucchero all'azoto della base purinica o pirimidinica; questo legame è sempre in forma β .

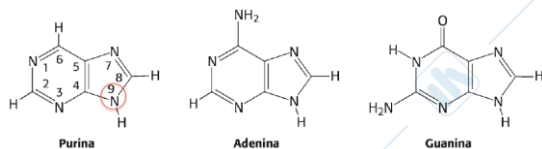


7.1.1 Basi azotate

Le basi azotate che compongono i nucleotidi sono di 5 tipi e sono classificate in 2 tipologie:

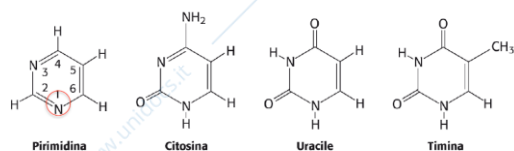
- **Purine**

Composte da due eterocicli aromatici condensati contenenti azoto, uno a sei termini e l'altro a cinque termini. Sono Adenina e Guanina. Il carbonio che forma il legame N-glicosidico è l'N9



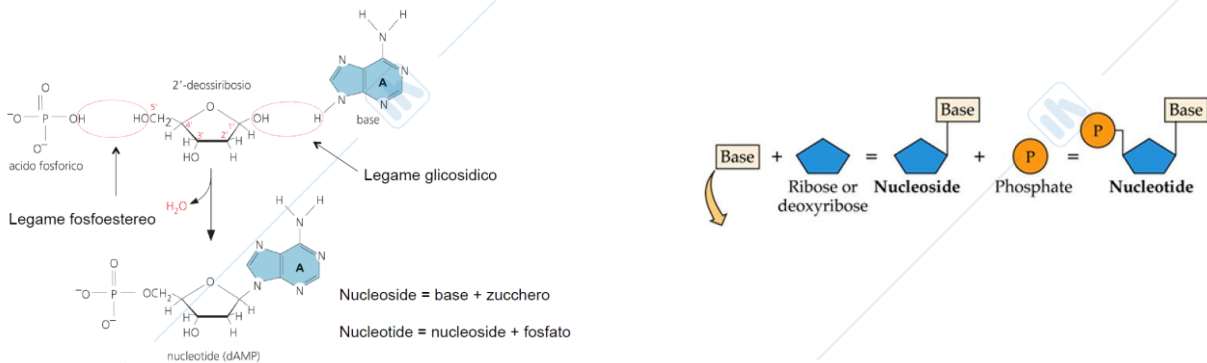
- **Pirimidine**

Composte da un eterociclo aromatico a sei termini contenete due atomi di azoto. Sono Citosina, Uracile e Timina. Il carbonio che forma il legame N-glicosidico è l'N1

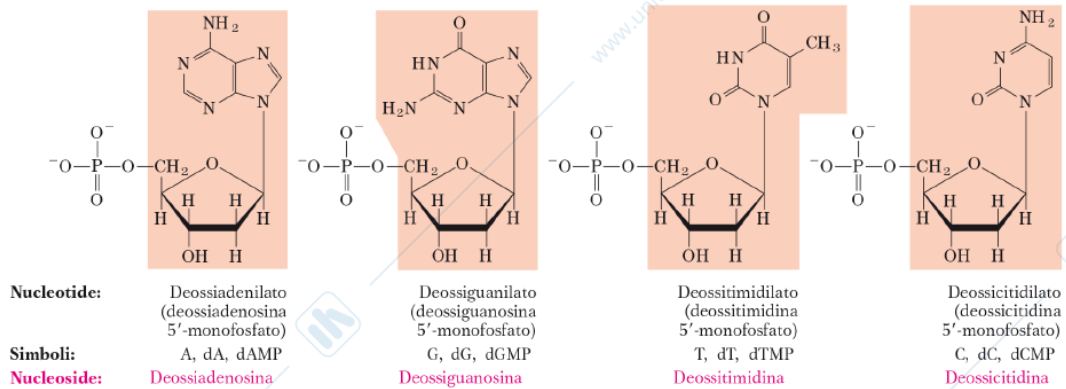


7.1.2 Nucleotidi e Nucleosidi

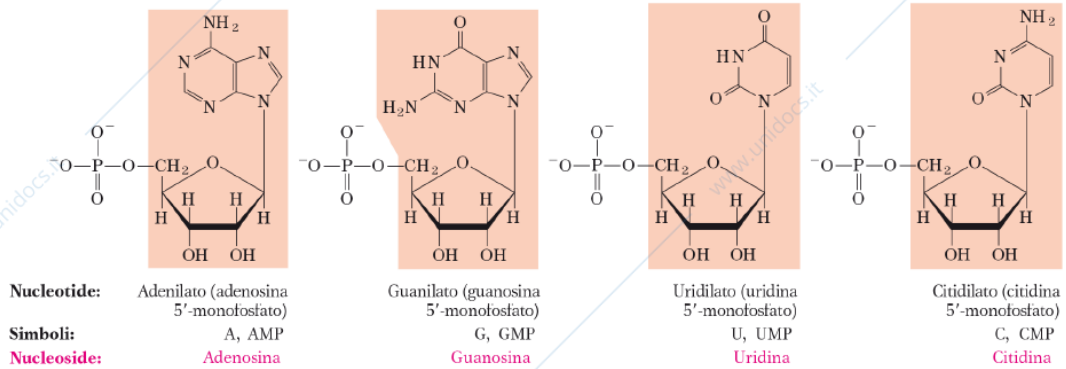
Facciamo chiarezza: nucleotidi e nucleosidi sono strutture diverse. Un'unità molecolare formata da una base azotata e uno zucchero è detta **nucleoside**. Il **nucleotide** è un estere fosforico di un nucleoside.



Vediamo ora i vari nucleotidi e nucleosidi composti da desossiribosio e ribosio:



(a) Deossiribonucleotidi



(b) Ribonucleotidi

7.1.3 Caratteristiche acide

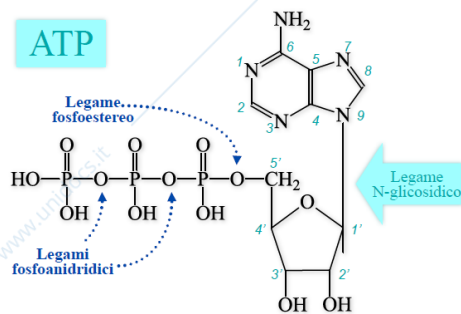
Perché il valore di pKa, per la prima dissociazione di un protone dalla parte dell'acido fosforico è 1.0 o meno, i nucleotidi hanno proprietà acide. Il valore della pKa per la seconda dissociazione è circa 6.0, per cui ad un pH neutro o superiore, la carica netta di un nucleoside monofosfato è -2. Gli acidi nucleici, che sono polimeri di nucleosidi monofosfati, traggono il loro nome dall'acidità di questi gruppi fosfato.

7.1.4 Funzioni

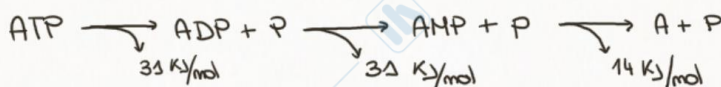
I nucleotidi non svolgono solo funzione di unità costruttive degli acidi nucleici ma svolgono anche una serie di importanti funzioni all'interno della cellula, ad esempio:

- Sono trasportatori di energia chimica
- Sono cofattori enzimatici
- Agiscono come molecole regolatrici.

Nucleotidi come trasportatori di energia chimica



I nucleotidi che agiscono come trasportatori di energia chimica sono **nucleosidi 5' trifosfati** (il più importante in assoluto è l'ATP) e sono elementi indispensabili per il metabolismo. Infatti, grazie al legame fosfoanidridico sono la prima sorgente di energia per il lavoro biologico. Tutte le reazioni chimiche che li riguardano prevedono il trasferimento di gruppi fosfato o pirofosfati. Vengono riconosciuti tramite la base azotata che però non partecipa direttamente al legame che si forma.



Nucleotidi come cofattori

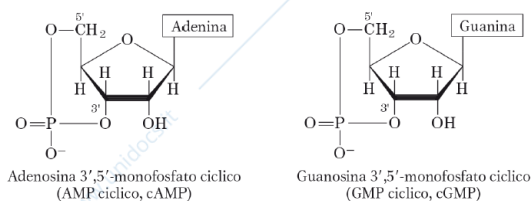
I più importanti nucleotidi con funzione di cofattori sono:

- **CoA**
Il cofattore A agisce nelle reazioni di trasferimento dei gruppi acilici che si legano a CoA tramite legame tioestere.
- **NAD⁺ e NADH**
Di cui NAD⁺ è la forma ossidata e NADH è la forma ridotta
- **FAD**
Usato per il trasferimento di elettroni, è la forma attiva della vitamina B₂

Nucleotidi come regolatori

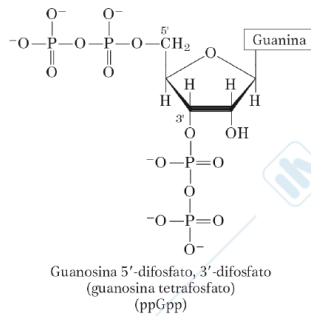
I più importanti nucleotidi con funzione regolatrice sono:

- **cAMP e cGMP**
Sono secondi messaggeri in tutte le cellule animali; hanno un anello saccaridico avente 2 legami con gruppi fosfato



- **ppGpp**

Agisce come rallentatore per la sintesi proteica; viene prodotto dai batteri

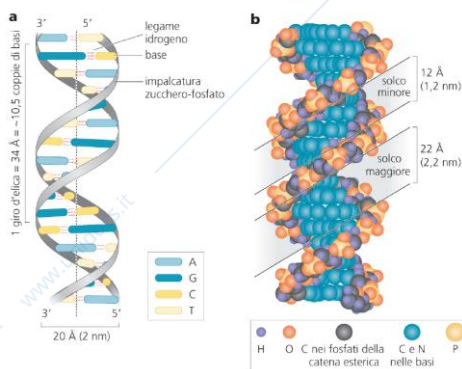


7.2 Acidi Nucleici

Gli acidi nucleici sono polimeri lineari costituiti da nucleotidi legati tramite ponti fosfodiesteri tra le molecole di zucchero. Il gruppo 3'-ossidrilico (3'-OH) di uno zucchero forma un legame estere con un gruppo fosforico che è unito a sua volta al gruppo 5'-ossidrilico dello zucchero adiacente. La catena di zuccheri legata da ponti fosfodiesteri viene chiamata scheletro covalente degli acidi nucleici. È come se la catena si costruisse aggiungendo nucleotidi 5' trifosfato al gruppo 3'-OH, dunque, il polimero ha una direzionalità: 5' → 3'. Scrivendo una sequenza di basi azotate la leggerò sempre da 5' (destra) a 3' (sinistra), altrimenti indico il verso.

7.2.1 Il DNA

Il DNA è costituito da una coppia di polimeri lineari di nucleotidi associati. I due filamenti sono **antiparalleli**, ossia disposti con direzionalità opposta e sono **avvolti in senso destrorso** attorno ad un asse comune. Un giro dell'elica ha lunghezza di circa 34Å (3,4nm) ossia circa 10,5 coppie di basi azotate. Nella struttura si trova un'alternanza di **solchi maggiori** e **solchi minori**, ossia ci sono diverse distanze con cui avviene l'avvolgimento (ne parleremo più avanti).



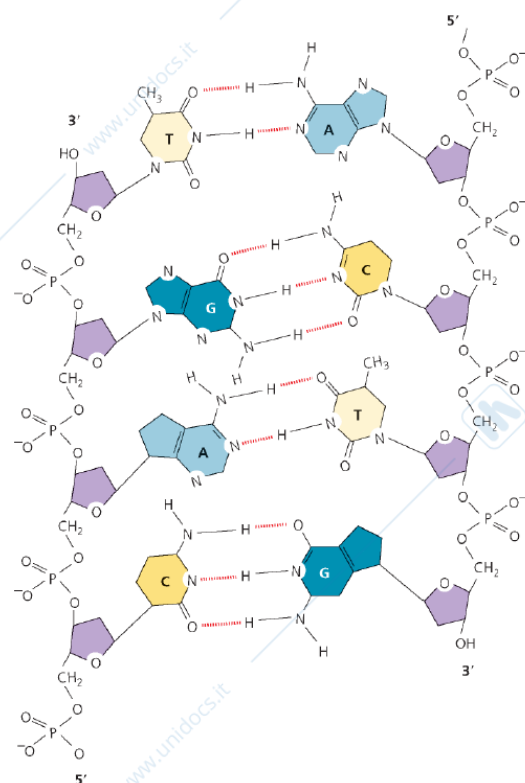
Il DNA e le basi azotate

Le basi si legano tra i due filamenti formando sempre le coppie:

T-A

G-C

Questi accoppiamenti garantiscono sempre lo stesso ingombro sterico tra i due filamenti e quindi una struttura regolare, senza distorsioni. Inoltre, questo tipo di appaiamento permette l'impilamento (o stacking) delle base. Questo contatto stretto così formato comporta la presenza di legami quali forze di Van Der Waals e legami ad idrogeno. Forze che permettono l'esistenza della molecola stessa (la "tengono in piedi").

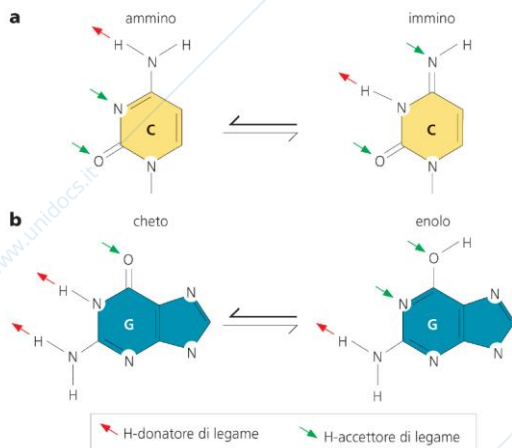


Per quanto riguarda i legami ad idrogeno gli appaiamenti T-A e G-C sono ancora una volta funzionali perché, con tali coppie, c'è uno stretto rapporto tra legami ad idrogeno che una base può accettare e legami ad idrogeno che una base può formare.

Regola di Chargaff: nella molecola di DNA avremo $[A]=[T]$ e $[G]=[C]$ (su entrambi i filamenti)

Basi e legami ad idrogeno: tautomeria

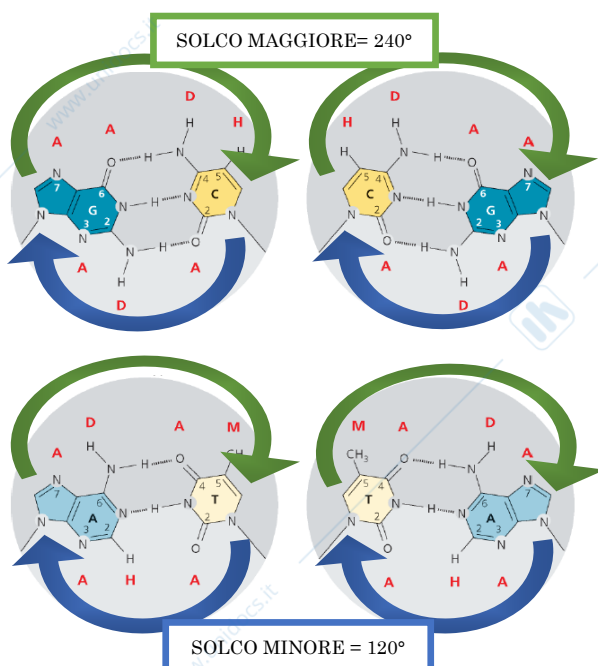
Come anticipato precedentemente, c'è uno stretto rapporto tra legami ad idrogeno che una base può accettare e legami ad idrogeno che una base può formare



Le basi possono anche andare incontro a tautomeria, cioè lo spostamento di atomi o gruppi all'interno della molecola. L'appaiamento secondo Watson-Crick richiede tuttavia la corretta forma tautomerica delle basi poiché questa garantisce il corretto numero e la corretta posizione degli accettori e dei donatori tra le coppie di basi.

Solchi maggiori e solchi minori

Nella struttura si trova un'alternanza di **solchi maggiori** e **solchi minori**, ossia ci sono diverse distanze con cui avviene l'avvolgimento, una maggiore pari a 22Å e una minore pari a 12Å. I solchi sono creati dagli appaiamenti tra le basi:



Questa caratteristica è importante perché i solchi maggiori costituiscono il punto di attacco per molecole esterne in grado di interagire con il DNA.

Il solco maggiore, in particolare, è molto importante perché costituisce un sito di accesso per le proteine capaci di interagire con la molecola di DNA. È un sito d'accesso non solo perché fisicamente c'è più spazio ma anche perché presenta più gruppi esposti riconoscibili da tali proteine. Infatti, le regioni delle basi che si affacciano nel solco maggiore ed in quello minore creano un sistema di donatori ed accettori di idrogeno e superfici di Van Der Waals.

A: accettore legame H
D: donatore legame H
M: gruppo metilico
H: idrogeno non polare

Conformazioni della doppia elica

Tramite la cristallografia a raggi X si è notato come la doppia elica possa trovarsi in diverse conformazioni:

- **Conformazione B**

Conformazione classica, quanto il DNA è meno concentrato ed ha un giro d'elica di circa 10 paia di basi ed un ampio solco maggiore.

- **Conformazione A**

Il DNA è più concentrato ed il solco maggiore è meno ampio.

- **Conformazione Z**

Il DNA presenta un'elica sinistrorsa con purine e pirimidine alternate. Il legame tra le purine è in *sin* mentre tra le pirimidine è in *anti* (normalmente si forma solamente in *anti*). L'alternamento dei legami *sin* e *anti* conferisce alla molecola una forma a zig-zag.

	Forma A	Forma B	Forma Z
Senso dell'elica	Destrorsa	Destrorsa	Sinistrorsa
Diametro	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Coppie di basi per ogni giro di elica	11	10,5	12
Distanza tra base e base	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Piegamento normale delle basi all'asse dell'elica	20°	6°	7°
Conformazione raggrinzita dello zucchero	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo per le pirimidine; C-3' endo per le purine
Conformazione del legame glicosilico	<i>Anti</i>	<i>Anti</i>	<i>Anti</i> per le pirimidine; <i>sin</i> per le purine

Denaturazione del DNA

Se il DNA viene riscaldato (fino a 100°) o posto a pH elevato si può **denaturare**. Se si ritorna **lentamente** alle condizioni di partenza il DNA può rinaturarsi; tuttavia, c'è la possibilità di formazione delle molecole ibride (ibridazione del DNA). Ossia, nel momento in cui vengono denaturate più molecole di DNA contemporaneamente ottengo da ognuna due filamenti singoli di DNA (filamento 1a e filamento 1b dalla molecola 1 e filamento 2a e filamento 2b dalla seconda), al momento della rinaturazione i filamenti si possono riassociare in modo misto (filamento 1a con filamento 2b, ecc.)

La denaturazione può avvenire ad opera di:

- **Fattori intrinseci**

- Composizione in basi

Se un segmento a più appaiamenti C-G avrà più legami ad idrogeno e sarà meno facile da denaturare

- Peso molecolare

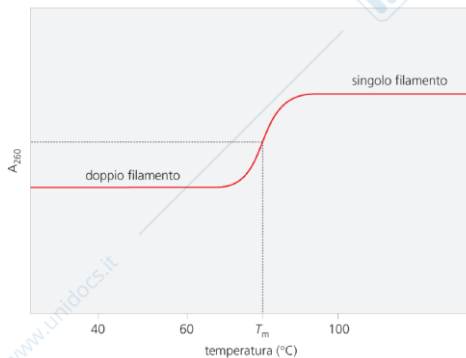
Un segmento più lungo è più difficile da denaturare (ha più interazioni di VDW)

- **Fattori estrinseci**

- Temperatura
- pH
- Cosoluti caotropi
- Forza ionica

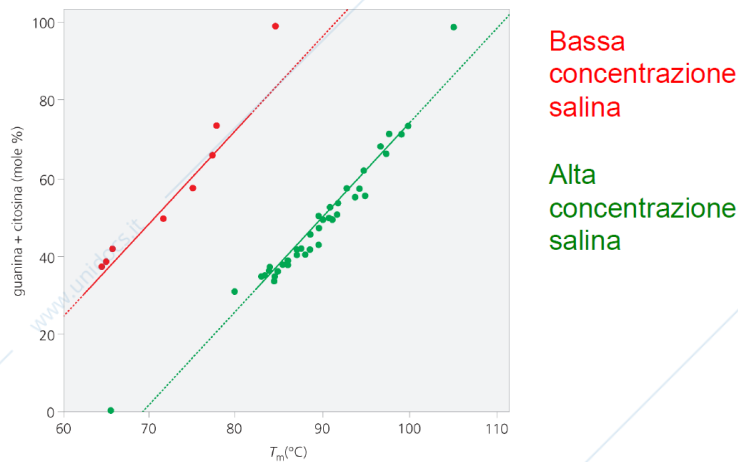
Le basi del DNA assorbono la luce UV tra 300 e 230 nm (con massimo di assorbimento attorno a 260 nm). Tuttavia l'entità dell'assorbimento a parità di concentrazione è maggiore di quasi il 50% per il DNA denaturato rispetto al DNA "nativo", cioè a doppia elica. Pertanto misure di assorbimento UV a 260 nm, facilmente ottenibili con uno spettrofotometro, si sono rivelate particolarmente comode nello studio della denaturazione (e della rinaturazione) del DNA.

Curva di denaturazione del DNA:



Il punto in cui il DNA è al 50% denaturato e al 50% ancora a doppio filamento ci indica la temperatura di melting di questo tipo di molecole.

Ci sono alcuni fattori che influenzano la denaturazione del DNA come ad esempio la forza ionica e la composizione dell'ambiente circostante. Se la sequenza ha una percentuale maggiore di appaiamenti C-G avrà un maggior numero di legami ad idrogeno e quindi la denaturazione del DNA sarà più difficile (aumenta T_m) mentre la presenza di sale influenza la presenza le cariche negative (gruppi fosfato dissociati) presenti sul DNA, i due filamenti sono così stabilizzati e non si respingono.



7.2.2 L'RNA

L'RNA differisce dal DNA per 4 caratteristiche fondamentali:

1. Lo zucchero che lo compone è il ribosio, non il 2'-desossiribosio
2. La base azotata Uracile sostituisce la Timina
3. È costituito da una singola catena polinucleotidica (tranne alcune eccezioni)
4. Non è un materiale genetico che viene duplicato da sé stesso

L'RNA ricopre una vasta gamma di funzioni, le sue funzioni più importanti sono:

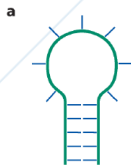
- Funzione di intermediario -mRNA

- Funzione di raccordo – tRNA
- Funzione strutturale – rRNA
- Funzione di regolazione – miRNA
- Funzione catalitica – ribozimi

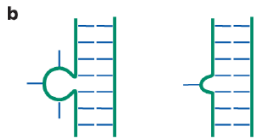
Inoltre, un'altra caratteristica importante dell'RNA è il fatto che, essendo a singolo filamento, può strutturarsi in maniera più complessa del DNA ripiegandosi e formando strutture terziarie:

- Se due tratti della catena hanno sequenze complementari (o quasi, alcune basi possono essere escluse dall'appaiamento) possono accoppiarsi formando strutture quali:

- **Forcine**



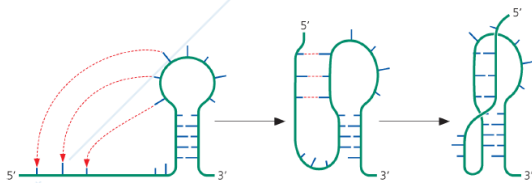
- **Gemme**



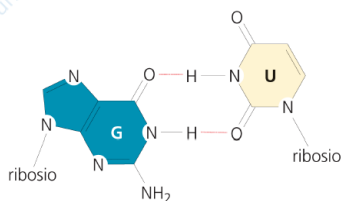
- **Anse**



- L'appaiamento di basi può avvenire anche fra regioni non contigue della catena



- Ha una propensione a formare strutture a doppia elica con appaiamenti



- Sono possibili legami tra tre basi contemporaneamente

