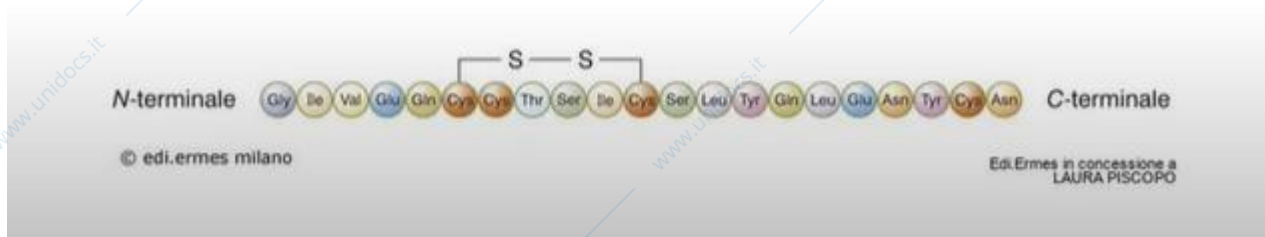


23 C:

Struttura delle proteine

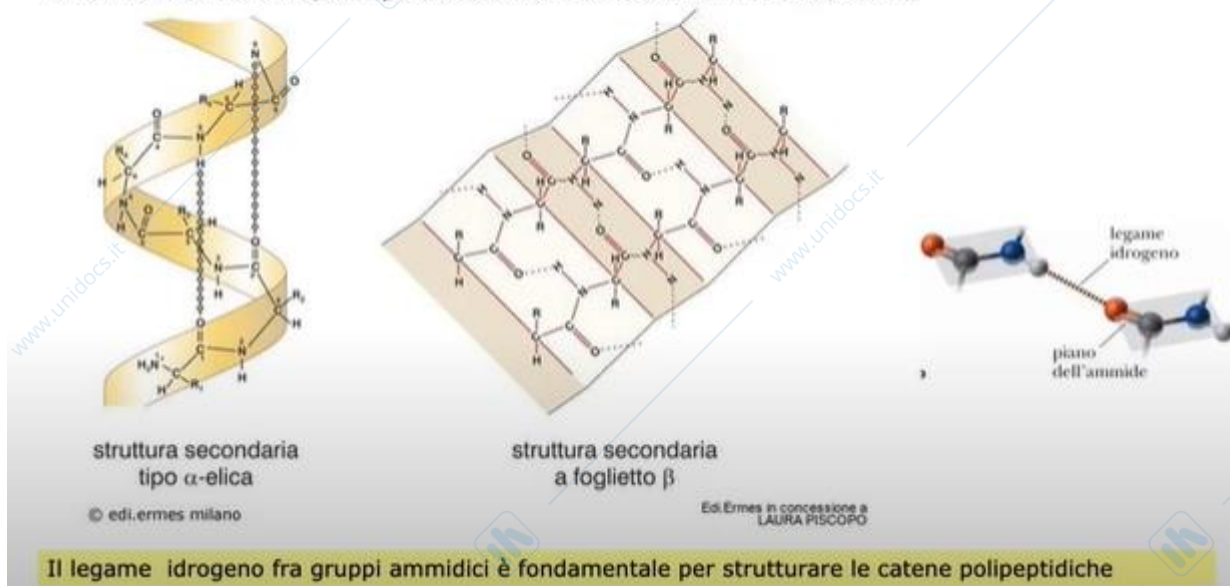
Le proteine sono costituite da lunghe catene di aa che possono assumere conformazioni diverse e ripiegarsi. Talvolta sono formate da più sub-unità. Questa complessità viene classificata con quattro livelli di struttura

Struttura primaria: sequenza degli aa nella catena



La struttura primaria è data dalla sequenza lineare degli aminoacidi e dalla localizzazione dei ponti di solfuro.

Struttura secondaria : è un ripiegamento della catena polipeptidica che si realizza grazie alla formazione di legami idrogeno tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico di 2 aa differenti. Le strutture secondarie più comuni sono α -elica e foglietto β e possono anche coesistere su una stessa proteina



Sono conformazioni ripetitive e ordinate adottate da segmenti di un peptide o di una proteina.

I fattori che determinano la struttura secondaria di un segmento peptidico sono 3:

-la planarità nella regione intorno al legame peptidico, che è conseguenza del parziale carattere di doppio legame del legame

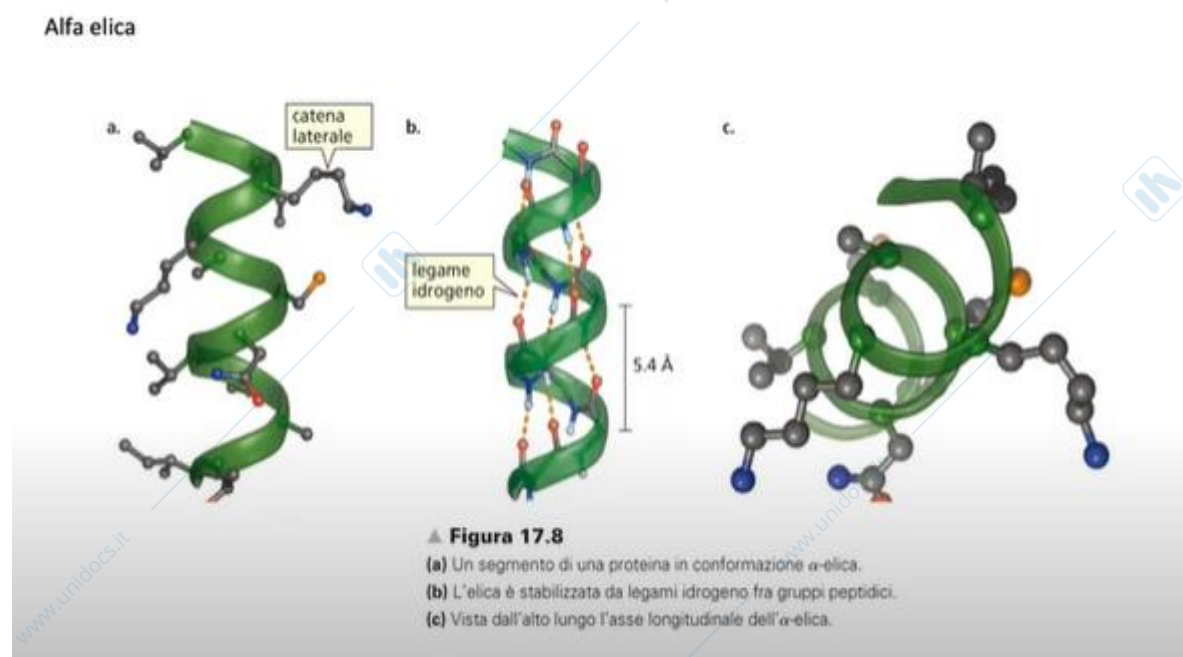
ammidico e questo limita le possibili conformazioni della catena peptidica.

-L'altro fattore è la formazione del numero maggiore possibile del legame a idrogeno tra i gruppi peptidici, i quali si possono formare tra l'ossigeno del gruppo carbonilico dell'aa e l'idrogeno amminico di un altro aa. Questo va a minimizzare l'energia della molecola.

-la necessità di una separazione tra i gruppi R vicini in modo da evitare repulsione sterica o repulsione tra cariche uguali.

Un tipo di struttura secondaria è l'alpha elica, in cui lo scheletro del polipeptide si avvolge lungo un asse maggiore della struttura elicoidale.

L'altra struttura secondaria possibile è a foglietto beta.



I sostituenti sul carbonio alpha degli aa in un alpha elica si protendono verso l'esterno dell'elica e in questo modo minimizzano l'ingombro sterico, inoltre l'elica può essere resa stabile dalla formazione dei legami a idrogeno.

Ogni idrogeno legato a un N ammidico può formare un legame a idrogeno con l'ossigeno del gruppo carbonilico di un amminoacido che si trova 4 posizioni + avanti.

Gli amminoacidi della categoria L formano delle alpha eliche destrose, cioè si avvolgono in senso orario e il giro d'elica contiene 3.6 residui di amminoacidi per giro.

Non tutti gli aa si accomodano bene in un alpha elica, un residuo di prolina può causare una distorsione dell'elica perché il legame tra N della prolina e il carbonio alpha non può ruotare, e quindi non può permettere alla prolina di adattarsi bene all'alpha elica.

Allo stesso modo due aa vicini con + di un sostituito sul carbonio beta, come ad esempio la isoleucina, treonina, non possono far parte dell'alpha elica perché hanno un grosso ingombro sterico tra i gruppi R.

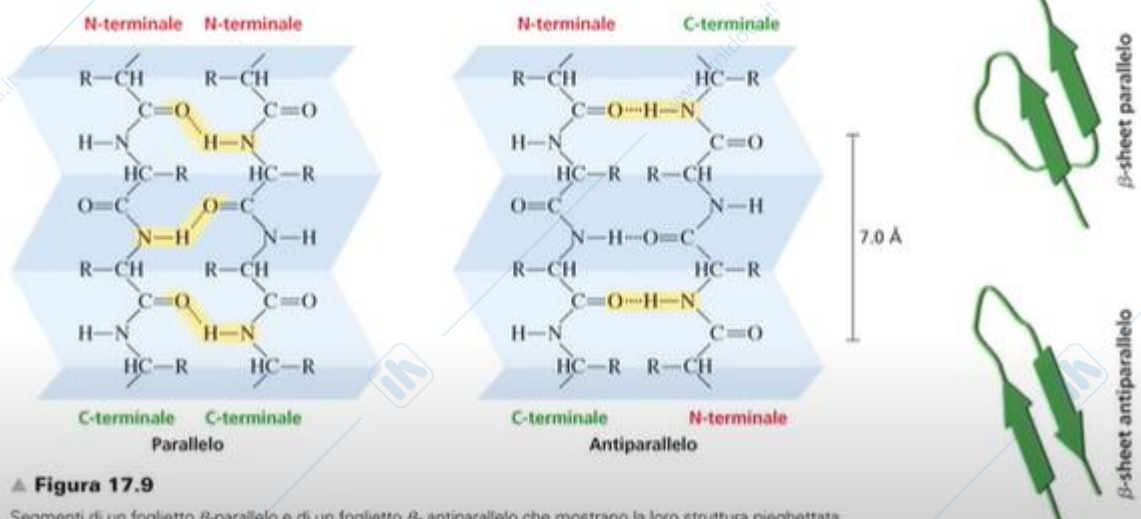
Ancora amminoacidi adiacenti con sostituenti con la stessa carica non sono adatti a formare un alpha elica a causa delle repulsioni elettrostatiche tra i gruppi R.

La percentuale di aa organizzati in un alpha elica varia da proteine a proteina.

Mediamente circa il 25% degli aa nella proteina globulare si trova sottoforma di alpha elica.

Ad esempio, nella lana o nelle proteine fibrose dei muscoli abbiamo quasi esclusivamente alpha eliciche come strutture secondarie, la conseguenza è che queste proteine possono essere sottoposte ad ulteriore allungamento.

Foglietto beta



▲ Figura 17.9

Segmenti di un foglietto β -parallelo e di un foglietto β -antiparallelo che mostrano la loro struttura pieghettata.

Il secondo tipo di struttura secondaria è il foglietto beta pieghettato. Il foglietto beta pieghettato e lo scheletro polipeptidico formano una struttura a zig zag che ricorda una serie di pieghettature.

I legami a idrogeno tra il foglietto beta si instaurano tra segmenti adiacenti della catena peptidica.

Un foglietto beta è quasi completamente esteso. Quindi la distanza media tra un residuo amminoacidico e quello che sta due residui + avanti è di \neq amstrong.

Un segmento di catena polipeptidica in un foglietto beta è rappresentato in genere da una freccia piatta che punta dall'azoto al carbonio terminale.

Questi segmenti possono essere paralleli o anti-paralleli. In un foglietto beta parallelo le catene peptidiche adiacenti si sviluppano tutte nella stessa direzione, mentre in un foglietto beta antiparallelo si sviluppano in direzioni opposte.

Per ottimizzare i legami a idrogeno le catene devono avvicinarsi e questa distanza è possibile solo se i sostituenti R presenti sul carbonio alpha degli aa sono poco ingombranti.

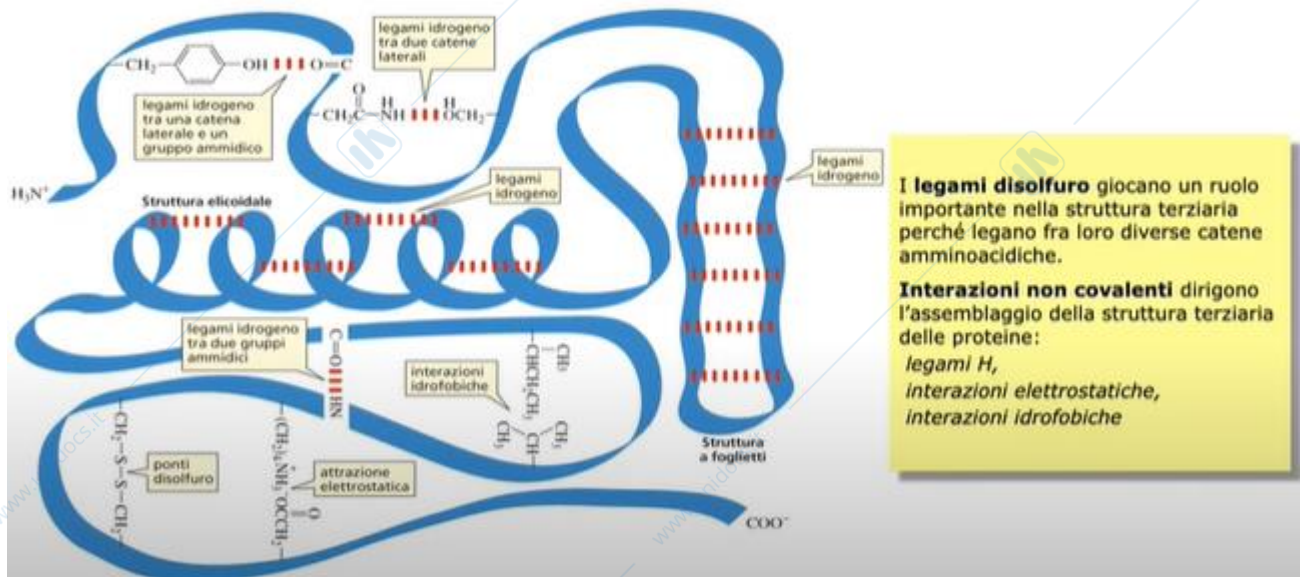
La feta è costituita da una proteina che ha un gran numero di aa con piccoli sostituenti (glicina e alanina) ed ha delle grosse regioni in conformazione a foglietto beta.

In una proteina globulare il numero di catene affiancate in un singolo foglietto beta va da 2/15.

La lunghezza media di una catena in un foglietto beta è di 6 residui amminoacidici.

Le proteine con struttura secondarie di tipo foglietto beta come la feta non possono subire ulteriori allungamenti, in quanto la struttura a foglietto beta è già quasi completamente estesa.

Struttura terziaria: costituita dai **ripiegamenti** che la proteina assume per generare la sua forma tridimensionale. È dovuta alle interazioni che si stabiliscono tra i gruppi laterali R dei diversi aa.



+ energia viene rilasciata e più è stabile la proteina.

La proteina tende a ripiegarsi per massimizzare il numero di interazioni stabilizzanti.

Le interazioni stabilizzanti in una proteina possono essere: ponti disolfuro, legami a idrogeno oppure interazioni elettrostatiche di tipo attrattivo tra cariche opposte.

Infine le interazioni idrofobiche.

Queste interazioni si stabiliscono tra gruppi peptidici o atomi dello scheletro polipeptidico, tra gruppi delle catene laterali o tra i gruppi peptidici delle catene laterali.

Poiché le catene laterali sono fondamentali per determinare il ripiegamento, la struttura terziaria di una proteina dipende da quella primaria.

I legami disolfuro sono gli unici legami covalenti che si possono formare quando una proteina si ripiega, le altre interazioni sono molto + deboli.

Tuttavia essendo molto + numerose, sono anche esse importanti nel determinare il ripiegamento della proteina.

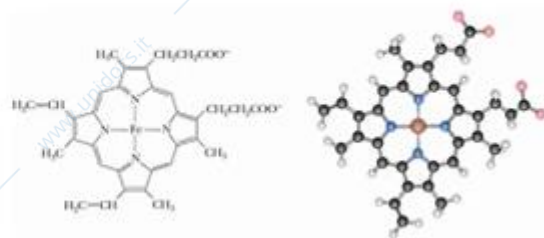
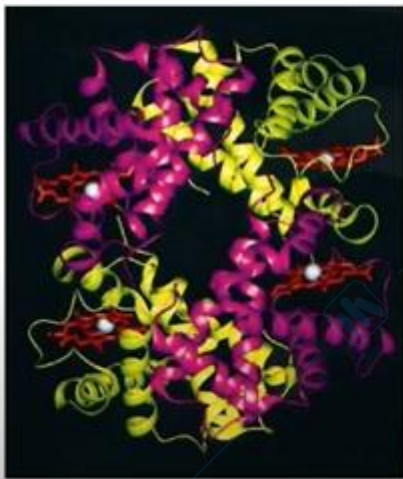
Molte proteine si trovano in ambienti acquosi, quindi queste tendono a ripiegarsi in modo da esporre il massimo numero di gruppi polari verso l'ambiente esterno e a rivolgere i gruppi non

polari verso l'interno della struttura proteica, quindi lontano dall'ambiente acquoso.

Due residui di cisteina in una proteina possono essere poi ossidati per formare un ponte disolfuro che sono l'unico tipo di legame covalente che lega gli amminoacidi e proteine.

Questo legame influenza la conformazione della proteina tenendo vicini i residui di cisteina collocati in punti diversi della catena polipeptidica.

Struttura quaternaria : aggregazione di varie subunità proteiche



La struttura quaternaria unisce fra loro diverse catene polipeptidiche che costituiscono le proteine di grandi dimensioni.

Le varie subunità interagiscono fra loro attraverso una combinazione di interazioni non covalenti (fra le quali l'effetto idrofobico gioca un ruolo fondamentale)

L'emoglobina è una proteina che consta di quattro catene polipeptidiche separate: due α di 141 AA ciascuna e due β di 146 AA.

Alcune proteine possono avere una struttura quaternaria, cioè essere formata da + catene polipeptidiche.

Ogni singola catena prende il nome di subunità e quindi proteine con + subunità possono formare dei dimeri o trimeri/tetrameri.

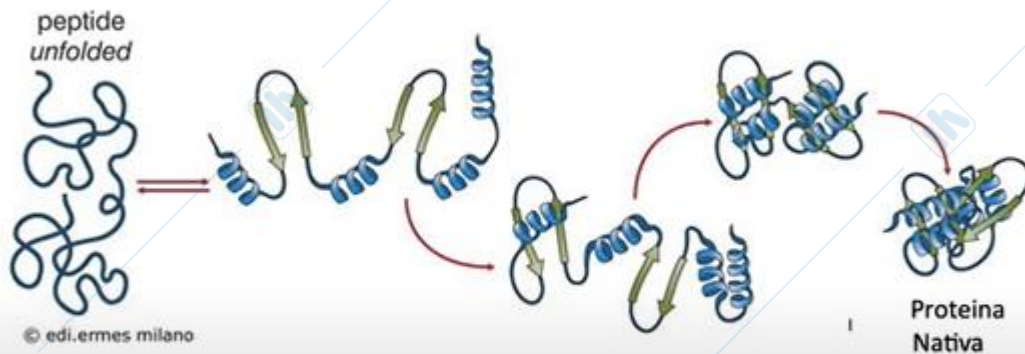
La struttura quaternaria descrive la disposizione reciproca delle subunità nello spazio.

Queste subunità possono essere uguali o diverse.

L'emoglobina ad esempio è un tetramero costituito da due diversi tipi di subunità, ogni molecola contiene due subunità di ogni tipo.

Le catene polipeptidiche sono tenute insieme dallo stesso tipo di interazioni che tengono insieme le catene proteiche nella struttura tridimensionali, quindi interazioni idrofobe, legami a idrogeno, legami elettrostatici.

Folding delle proteine



Per svolgere le loro funzioni le proteine sono ripiegate in una struttura definita detta **conformazione nativa**. Il processo per raggiungere la conformazione nativa si chiama **folding** e la sua descrizione è uno degli obiettivi più importanti della biologia moderna. La comprensione dei meccanismi di folding consentirebbe di prevedere la struttura tridimensionale partendo dalla sequenza aa. Diverse malattie neurodegenerative sono legate a un non corretto folding

Le proteine svolgono diverse funzioni biologiche.

L'attività della proteina dipende dalla sua struttura tridimensionale.

Perché una proteina funzioni deve ripiegarsi in una struttura definita come conformazione nativa.

La maggior parte delle proteine passa attraverso diverse forme intermedie prima di ripiegarsi nella struttura + stabile e biologicamente attiva.

Proteine che non hanno avuto un corretto ripiegamento possono avere anche effetti gravi nell'organismo.

Come la fibrosi cistica, il morbo di alzheimer, il parkinson ed altre malattie.

Le quattro interazioni deboli implicate nel folding di un polipeptide in ambiente acquoso

Legame ionico	≈10 kcal/mole
Legame H	3-7 kcal/mole
<i>fra catene laterali</i> <i>fra gruppi amidici</i>	
Interazione idrofobica	1-2 kcal/mole
Forze di van der Waals	< 1 kcal/mole

Le interazioni deboli di van der Waals si hanno tra i gruppi di catene laterali e la presenza di queste forze aumenta la stabilità della proteina ripiegata; invece, i legami a idrogeno e ionici dipendono dagli aa polari che vengono esposti sulla superficie della proteina.

Quindi i legami a idrogeno si possono formare con le molecole di acqua ma anche con le catene laterali degli aa polari.

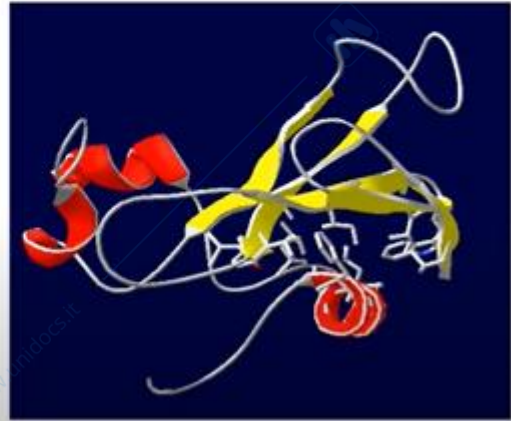
Gli amminoacidi carichi positivamente o negativamente sono presenti sull'esterno della proteina e vanno a formare legami ionici con altri amminoacidi vicini ma con una carica di segno opposto.

Oltre a queste interazioni deboli sono possibili i legami disolfuro (molto forti) che vanno a stabilizzare la proteina ripiegata bloccandola nella sua conformazione preferita.

Il corretto ripiegamento dipende anche dal pH, concentrazione salina, temperatura, qualsiasi situazione di condizioni fisico/chimiche in ambiente proteico va a influire sulle interazioni che tengono insieme la proteina e possono causare un errato ripiegamento della proteina stessa e di conseguenza possono portare alla perdita della funzione biologica della proteina → denaturazione della proteina.

Forze implicate nel *fold*ing della barnasi

La ribonucleasi batterica barnasi, un piccolo polipeptide di 110 aminoacidi e 12.4 kDa di massa molecolare, è un buon modello per descrivere il *fold*ing di un polipeptide

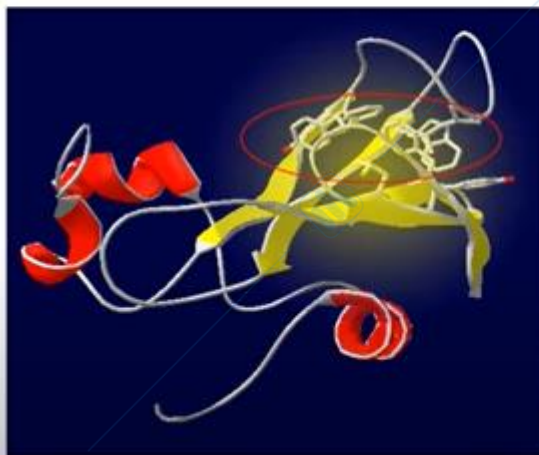


È stato studiato per vedere le forze implicate nel *fold*ing. Scelto per la sua semplicità e perché il suo *ripiegamento* è reversibile. Il percorso di *ripiegamento* della barnasi è sequenziale e con un ordine definito.

La formazione della struttura secondaria è guidata dalla sepoltura della porzione idrofoba locale all'interno della molecola e questo precede la formazione della maggior parte delle strutture terziarie.

Forze implicate nel *fold*ing della barnasi

Core idrofobico della barnasi



Aa con catena alifatica o aromatica non polare

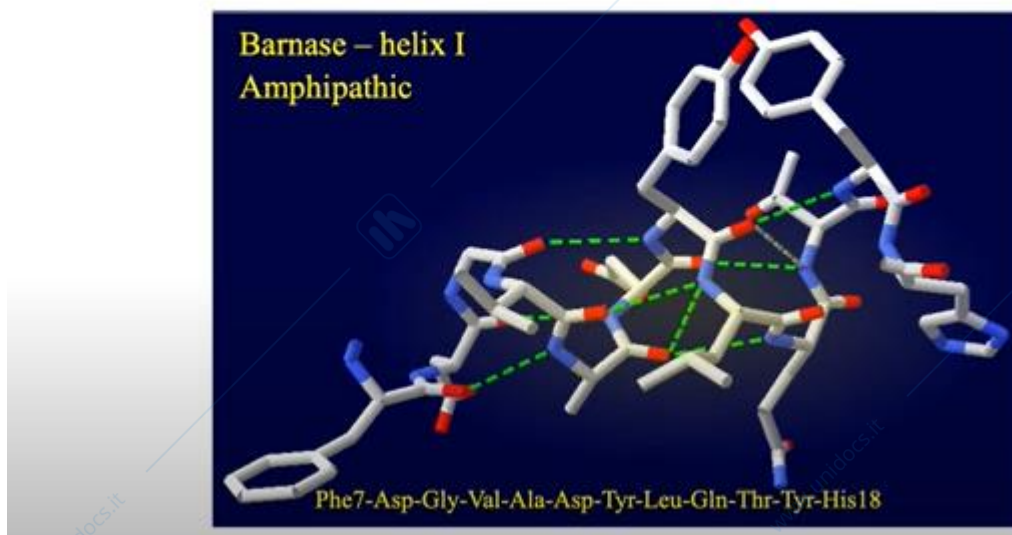
Phe56 Leu63
Trp71 Leu89
Tyr97 Tyr103
Phe106

Si forma quindi un core (cuore) interno idrofobico evidenziato, costituito da amminoacidi con catena alifatica/aromatica non polare.

Gli aa non polari sono quelli che vanno ad evitare le interazioni con l'acqua (quindi aa idrofobici) e quando una proteina viene ripiegata in un ambiente cellulare, le catene laterali degli amminoacidi idrofobici vanno ad essere sepolti nel nucleo della proteina (lontani dall'ambiente acquoso); viceversa le catene laterali degli aa idrofilici verranno esposti sulla superficie della proteina.

Forze implicate nel *fold*ing della barnasi

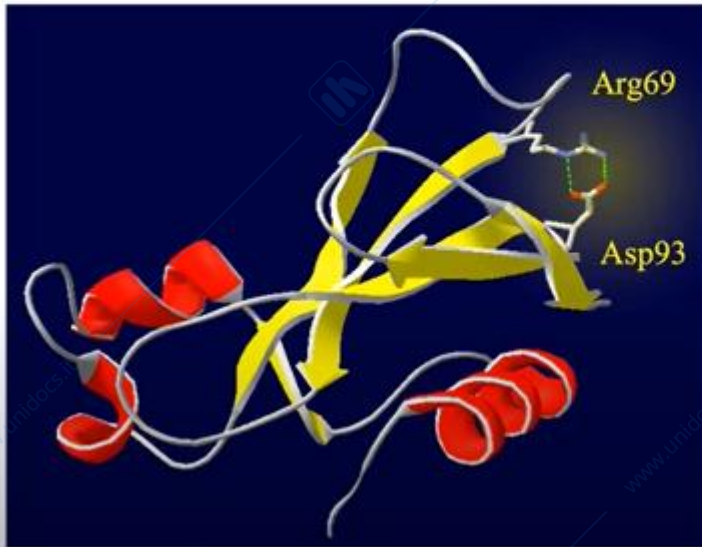
Legami idrogeno



Gli amminoacidi polari esposti sulla superficie della proteina sono liberi di formare legami a idrogeno sia con le molecole di acqua sia con le catene laterali di aa polari.

Qui si vede il legame a idrogeno in una porzione di alpha elica della barnasi.

Forze implicate nel *fold*ing della barnasi Interazioni elettrostatiche



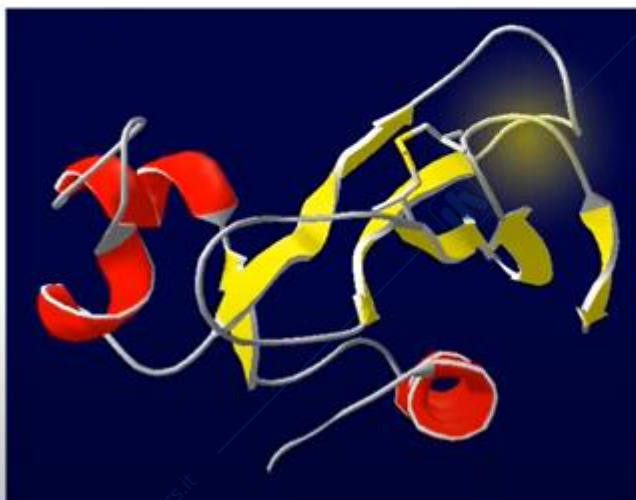
Rompendo questo legame ionico la proteina diventa *unfolded*

aa carichi + Arginina
aa carichi - Aspartato

Gli aa caricati +/- come arginina e aspartato presenti all'esterno della proteina formano legami a idrogeno gli uni con gli altri, quindi aa vicini carichi in modo opposto.

La proteina poi, attraverso variazione di pH, può andare incontro a denaturazione perché può modificare le cariche portate dalle catene laterali di arginina e aspartato alterando le interazioni elettrostatiche.

Forze implicate nel *fold*ing della barnasi Ponti disolfuro



Ser-Cys85
His-Cys102

Qui si vede il ponte disolfuro, si tratta di una proteina modificata perché nella barnasi naturale non sono possibili; questi avvengono tra due residui di cisteina in posizione 85 e 102.

Questa è un'interazione solida che rinforza il ripiegamento della proteina bloccandola nella sua conformazione tradizionale.

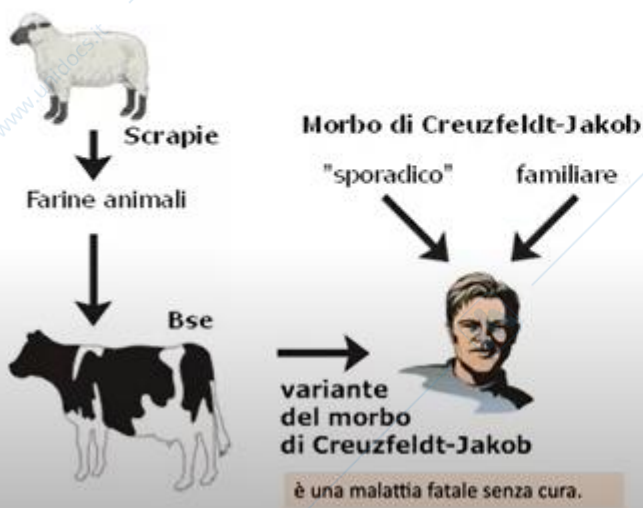
I prioni

Fino a poco tempo fa, si credeva che tutte le malattie contagiose fossero causate da agenti patogeni viventi, come virus, batteri o funghi. Per un piccolo numero di malattie contagiose, gli scienziati sono rimasti sconcertati dalla loro incapacità di identificare l'agente patogeno responsabile

Esempi includono la malattia di **Creutzfeldt-Jakob** nell'uomo e la **scrapie** nelle pecore. Entrambe le malattie sono simili, causando demenza e morte. Le autopsie delle vittime hanno rivelato placche di proteina amiloide circondate da tessuto simile a una spugna nel cervello, da cui il nome **encefalopatie spongiformi**.

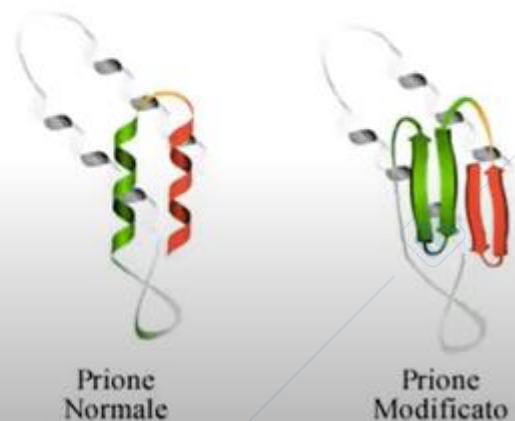
Negli anni ottanta Stanley Prusiner, un neurologo dell'Università della California a San Francisco, separò sistematicamente tutti i componenti del cervello di pecora infettato da scrapie. Egli trovò che l'agente infettivo era una particolare proteina. Quindi suggerì che la scrapie e altre malattie correlate erano causate da proteine infettive, che chiamò **prioni**.

Le malattie da prioni attirarono l'opinione pubblica negli anni '90, quando le mucche in Inghilterra, Canada e Stati Uniti furono colpite da una malattia chiamata encefalopatia spongiforme bovina. Questa malattia, comunemente chiamata malattia della **mucca pazza**, è stata presumibilmente causata dall'uso dei resti di pecore infettate da scrapie per nutrire le mucche.



I prioni

Sono formati solo da **proteine**, non possiedono **acidi nucleici** e costituiscono una forma spazialmente modificata di una proteina naturalmente presente nel sistema nervoso. Quando la proteina modificata viene a contatto con una normale, la modifica rendendola a sua volta patogena.



Sono proteine che si trovano in una conformazione modificata rispetto alla proteina nella sua conformazione naturale.

Quando il prione viene a contatto con una normale la modifica a sua volta rendendola patogena.

Il morbo della mucca passa è una malattia diversa perché non è causata da microrganismi ma è associata ad un prione che non si ripiega correttamente.

La variazione del prione induce un deterioramento che induce le cellule ad un aspetto spugnoso → funzione cerebrale perse.

Non è curabile ed è letale, non contagiosa.

Si pensa che fosse stata insorta nelle mucche perché nutrite con farina ed animali a base di ovini infetti da scrapide.

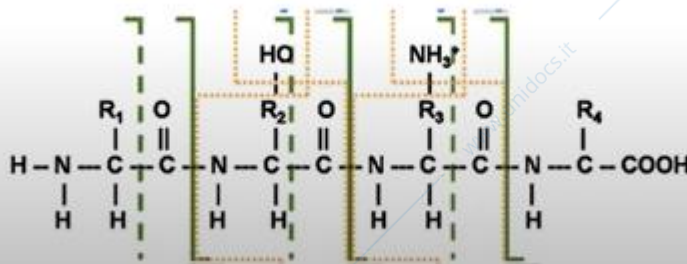
I sintomi della malattia compaiono anni dopo l'infezione e il discorso è rapido.

DETERMINAZIONE STRUTTURA PRIMARIA DI PEPTIDI E PROTEINE

La struttura primaria è la sequenza di amminoacidi che costituiscono la proteina

Idrolisi enzimatica: enzimi proteolitici come la tripsina scindono specifici legami peptidici.

Sequenziamento dei peptidi:



Per determinare la struttura primaria si procede attraverso step successivi. Idrolisi della proteina con liberazione degli aa che la costituiscono; separazione degli aa presenti nell'idrolizzato e poi quantificazione degli aa.

Essendo che normalmente le proteine hanno dimensioni maggiori dei 60 aa occorre romperlo in peptidi + piccoli e poi sequenziare i peptidi.

Questa procedura prevede la scissione dei legami peptidici in ponti specifici utilizzando o dei metodi chimici o enzimatici.

La scissione avviene in un punto specifico della proteina.

Degradazione di Edman: il trattamento di un polipeptide con fenil isotiocianato in ambiente acido scinde selettivamente l'amminoacido N-terminale sotto forma di una feniltioantoina sostituita che viene poi separata e identificata.



Carbossipeptidasi. Scinde selettivamente l'amminoacido C-terminale

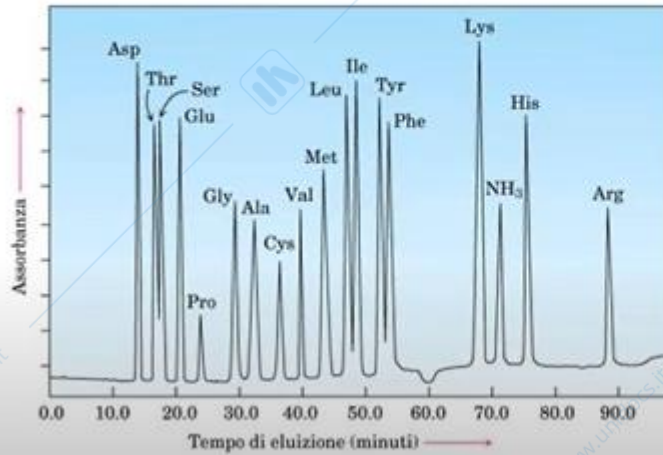


La struttura primaria delle proteine viene determinata utilizzando la degradazione di edman, che è una tecnica che permette di rimuovere ed identificare un aa alla volta partendo dall'estremità N-terminale del peptide.

Queste serie di reazioni viene eseguito automaticamente in apparecchi specifici che prendono il nome di sequenziatori automatici delle proteine e che possono arrivare ad identificare fino a 60 aa partendo dalla porzione N terminale della proteina.

Un aa C terminale può invece essere identificato trattando il polipeptide con una carbossipeptidasi, un enzima che catalizza l'idrolisi dei legami peptidici C-terminali staccando l'amminoacido C terminale.

Il peptide o la proteina, una volta scissi negli amminoacidi che li costituiscono possono essere analizzati attraverso tecniche cromatografiche.



La separazione e la quantificazione degli aa nell'idrolizzato avviene attraverso un'analisi cromatizzata.

Sintesi dei polipeptidi

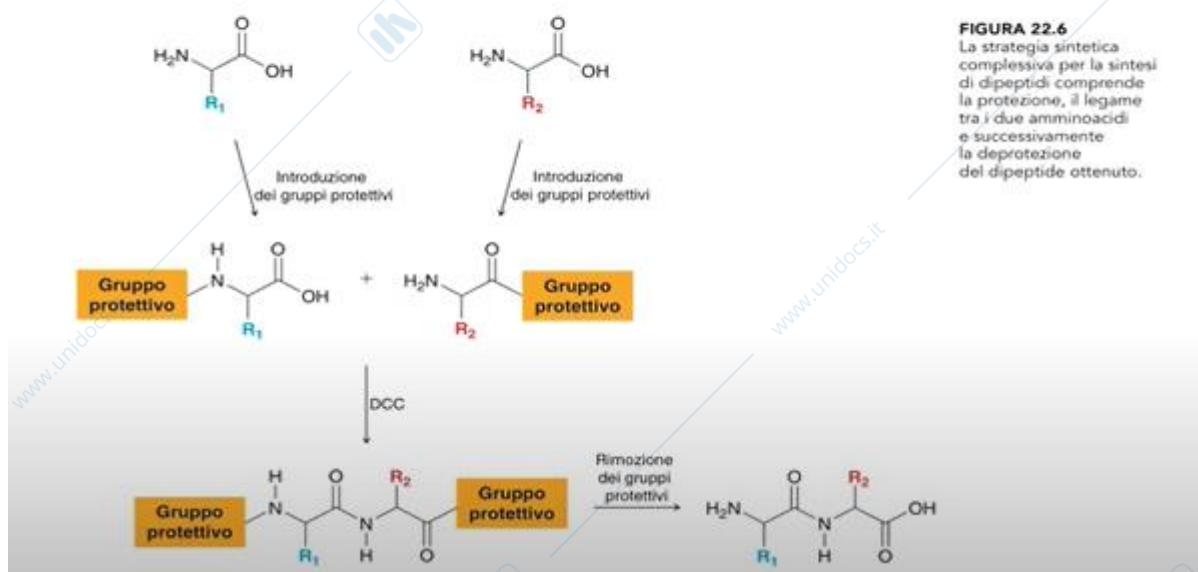


FIGURA 22.6
La strategia sintetica complessiva per la sintesi di dipeptidi comprende la protezione, il legame tra i due amminoacidi e successivamente la deprotezione del dipeptide ottenuto.

La strategia per la sintesi dei di-peptidi comprende la protezione, il legame tra i due aa e la successiva deprotezione del peptide ottenuto. La sintesi del legame peptidico è complicata perché un amminoacido ha due gruppi funzionali: il gruppo amminico dell'estremità N-terminale deve essere protetto in modo da non poter + formare un legame peptidico, così come deve essere protetto il gruppo carbossilico del secondo aa che deve essere legato.

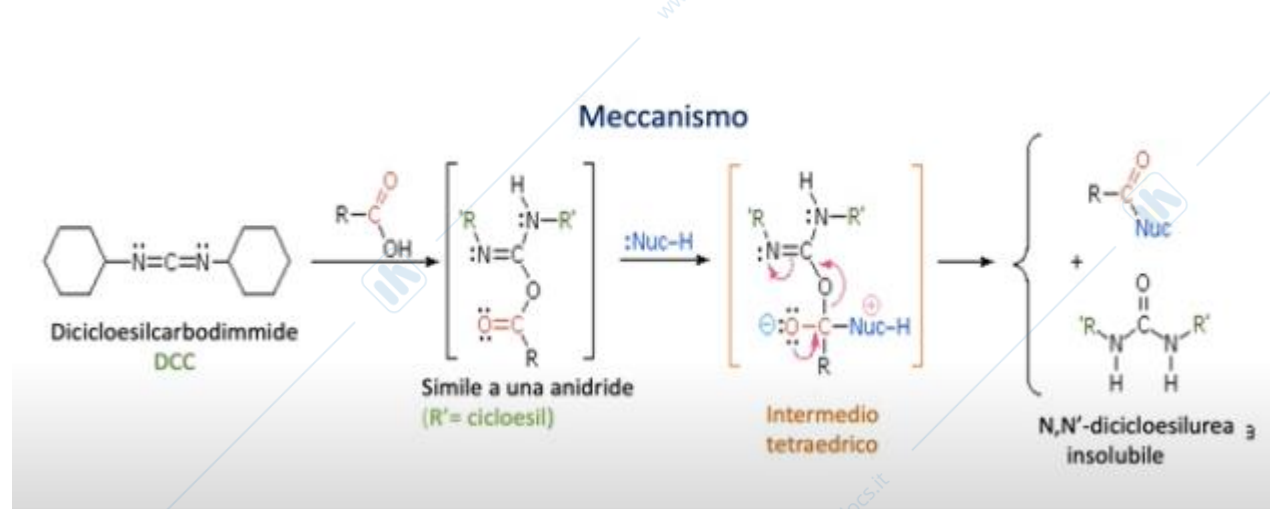
In questo modo abbiamo solo un gruppo carbossilico sull'aa di sinistra e un gruppo amminico sull'aa di destra che possono reagire insieme per formare il legame amminico.

Dobbiamo però considerare che il gruppo carbossilico per reagire con l'ammina e formare il legame amminico deve essere prima attivato e il reagente + utilizzato per attivare il gruppo carbossilico di un aa è la dicicloesilcarbodiimmide DCC.

La DCC attiva il gruppo carbossilico legando al carbonio carbonilico un buon gruppo uscente.

Una volta che si è formato il legame amidico si possono rimuovere i gruppi protettivi.

DCC attiva il carbonile verso la formazione dell'amide



La difficoltà nella formazione del legame amminico nasce dal fatto che gli acidi carbossilici e le ammine primarie e secondarie, se mescolate insieme non formano i legami amidici, ma generalmente reagiranno attraverso una reazione acido-base.

Dobbiamo quindi attivare la funzione carbossilica in modo che questa possa legarsi a l'unica ammina libera rimanente.

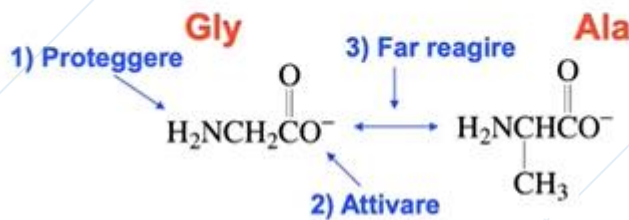
L'attivazione con la DCC porta ad un composto che ha la stessa reattività di un alogenuro acilico o di un'anidride.

Si vede che la molecola che si forma dall'azione della DCC con l'acido carbossilico è molto simile ad un'anidride.

A questo punto la molecola formata può reagire con l'ammina del secondo amminoacido per formare un intermedio tetraedrico che ha

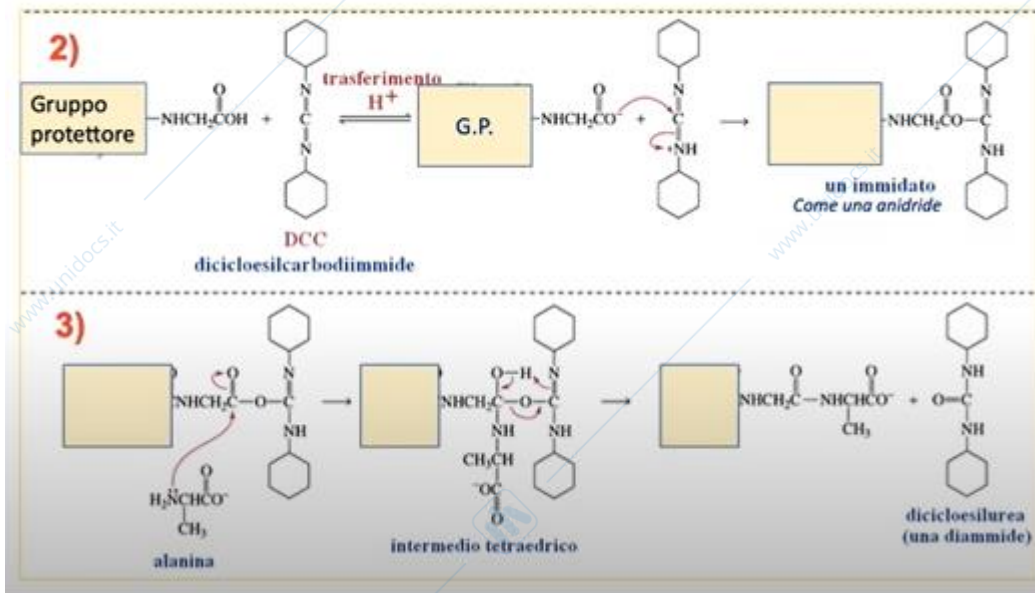
un buon gruppo uscente che rompendo il legame carbonio-ossigeno nell'intermedio e formando un doppio legame di un carbonile. Si forma quindi un legame carbonile nucleofilo dell'ammide e si libera N-N'-dicicloesilurea.

Volendo preparare la Gly-Ala bisognerà:



- 1) Proteggere il gruppo amminico della glicina
- 2) Attivare il gruppo carbossilico della glicina
- 3) Far reagire la glicina che ha il gruppo amminico protetto e la funzione carbossilica attivata con l'alanina (la sua funzione amminica)

Devo proteggere il gruppo amminico della glicina e farla reagire con l'alanina con il gruppo NH2.



Si aggiunge un gruppo protettore sull'azoto della glicina, lo faccio reagire con la dcc in modo da formare l'immidato che ha la stessa reattività di un amide, l'azoto dell'alanina funge da nucleofilo, si forma l'intermedio tetraedrico quindi il nuovo legame C-N esce il

gruppo uscente che è un buon gruppo uscente che è la dcc e quello che ottengo sarà il dimero (dipeptide).

