

Riepilogo 2^a lezione

DOMINI

- Si definisce **dominio strutturale** (o **dominio** o **modulo**) di una proteina: un'unità globulare o fibrosa formata da catene polipeptidiche ripiegate in più *regioni compatte le quali costituiscono divisioni della struttura terziaria*. Sono zone distinguibili della proteina ma unite da segmenti flessibili di catene polipeptidiche. I domini sono strutture supersecondarie complesse delle proteine.
- *Si distinguono in:*
 - Dominio tutto α (paralleli o antiparalleli): formati da **alfa elica**.
 - Dominio tutto β : formati da **foglietti beta**.
 - Dominio misti (o domini $\alpha+\beta$): formati da entrambe le strutture secondarie
- *Spesso domini diversi hanno diverse funzioni. Per piccole proteine a volte il dominio corrisponde all'intera proteina.*

Struttura terziaria (*i domini*)

- Le catene polipeptidiche formate da più di 200 amminoacidi in genere comprendono 2 o più piccole unità compatte: i *domini*.
- I *domini* sono le unità strutturali e funzionali di una proteina.
- Ciascun *dominio* è una regione compatta, che si forma per la combinazione di più elementi strutturali secondari (α -eliche, foglietti β , sequenze non ripetitive).
- Strutturalmente, ciascun dominio è indipendente da altri domini della stessa catena polipeptidica.
- La struttura terziaria riguarda sia il ripiegamento di ciascun dominio sia la disposizione reciproca finale dei domini di un polipeptide.

**Le proteine oligomeriche
presentano un ulteriore livello di
organizzazione strutturale la
struttura quaternaria**

**LA STRUTTURA QUATERNARIA
descrive il modo in cui le singole
catene polipeptidiche sono disposte
l'una rispetto all'altra.**

LEGAMI RESPONSABILI DELLA STRUTTURA QUATERNARIA

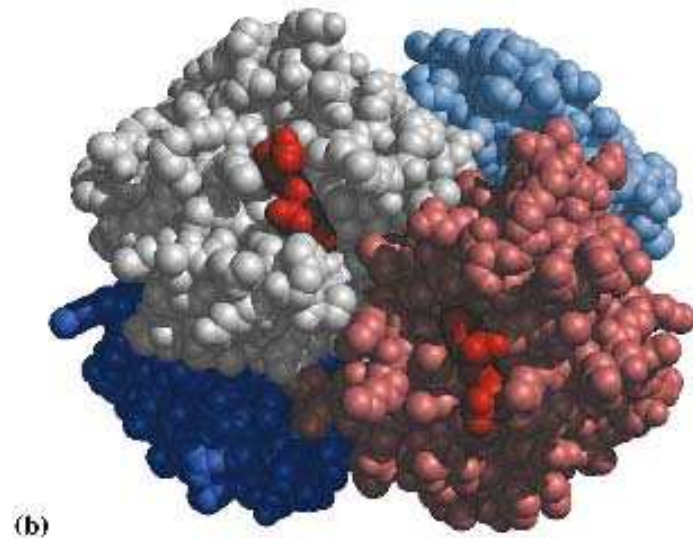
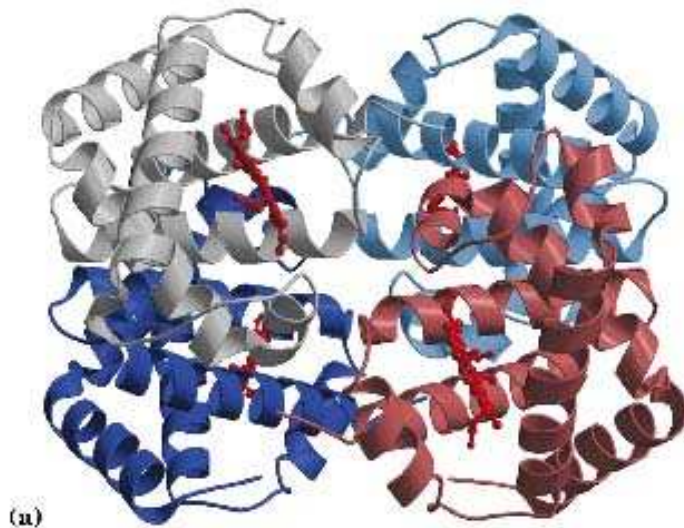
-FORZE DI VAN DER WAALS

-LEGAMI A H

-LEGAMI IONICI

La struttura quaternaria delle proteine

La struttura quaternaria riguarda proteine costituite da 2 o più catene polipeptidiche o da più domini strutturali (es. proteine regolatrici). E' possibile classificare le proteine in due gruppi: Proteine fibrose con catene disposte in lunghi fasci o foglietti e Proteine globulari con catene polipeptidiche ripiegate a formare forme globulari o sferiche



Esempio: la emoglobina

Le interazioni tra le subunita consentono grandi variazioni nell'attività catalitica



Per la sintesi di una catena polipeptidica di 4000 residui aminoacidici è necessario un gene che contenga almeno $4000 \times 3 = 12.000$ basi azotate.

Per la sintesi di 20 copie di una stessa catena polipeptidica di 200 residui è sufficiente un gene che contenga solo $200 \times 3 = 600$ basi



**Le proteine con peso
molecolare superiore a
50.000 sono**

OLIGOMERICHE

**Sono costituite cioè da più
catene polipeptidiche**

PROTOMERI O SUBUNITÀ

Vantaggi della struttura quaternaria

Risparmio di DNA

Minimizzazione degli errori casuali durante la biosintesi proteica

Presenza di interazioni allosteriche

La Ferritina ha un peso molecolare di circa 480.000 daltons. Non è costituita da una sola catena polipeptidica di 400 a.a. ma di 20 catene identiche di circa 200 residui ciascuna.

**LA GLICERALDEIDE-3-FOSFATO
DEIDROGENASI È COSTITUITA
DA 4 SUBUNITÀ IDENTICHE DI
330 RESIDUI ($330 \times 4 = 1320$
NUCLEOTIDI)**

**SE LA PROTEINA CONSISTESSE IN
1 CATENA DI (330×4) 1320
RESIDUI OCCORREREBBE UN
GENOMA DI $3 \times 1320 = 3960$
NUCLEOTIDI.**

MINIMIZZAZIONE DEGLI ERRORI

*Biosintesi di una proteina di
100.000 aminoacidi*

**A) SINGOLA CATENA DI 100.000
RESIDUI**

**B) 100 CATENE DI 1000 RESIDUI
CIASCUNA**

*Biosintesi di una proteina di
100.000 aminoacidi*

**A) SINGOLA CATENA DI 100.000
RESIDUI**

**B) 100 CATENE DI 1000 RESIDUI
CIASCUNA**

**Consideriamo che nella
biosintesi proteica esiste un
incidenza di errore pari a
1/100.000**

**A) Tutte le proteine
conterranno un errore**

**B) Solo 1 Subunità su 100
conterrà un errore.**

Generalmente nella formazione delle proteine oligomeriche le subunità difettose sono scartate.

Nelle cellule le proteine si sintetizzano ad una velocità molto elevata.

Le cellule di *E.Coli* producono una molecola proteica biologicamente attiva contenente 100 residui aminoacidici in 5 sec a 37°.

***COME FANNO LE PROTEINE AD
AVVOLGERSI NEL TEMPO DI POCHI
SECONDI?***

❖ Supponiamo che ciascuno dei 2 angoli di torsione, ϕ ψ , di una proteina con n residui possa assumere 3 conformazioni stabili, le conformazioni possibili per questa proteina saranno 3^{2n} circa 100^n

❖ Se la proteina può esplorare una conformazione ogni 10^{-13} secondi

Il tempo in sec necessario per esplorare tutte le conformazioni possibili sarà

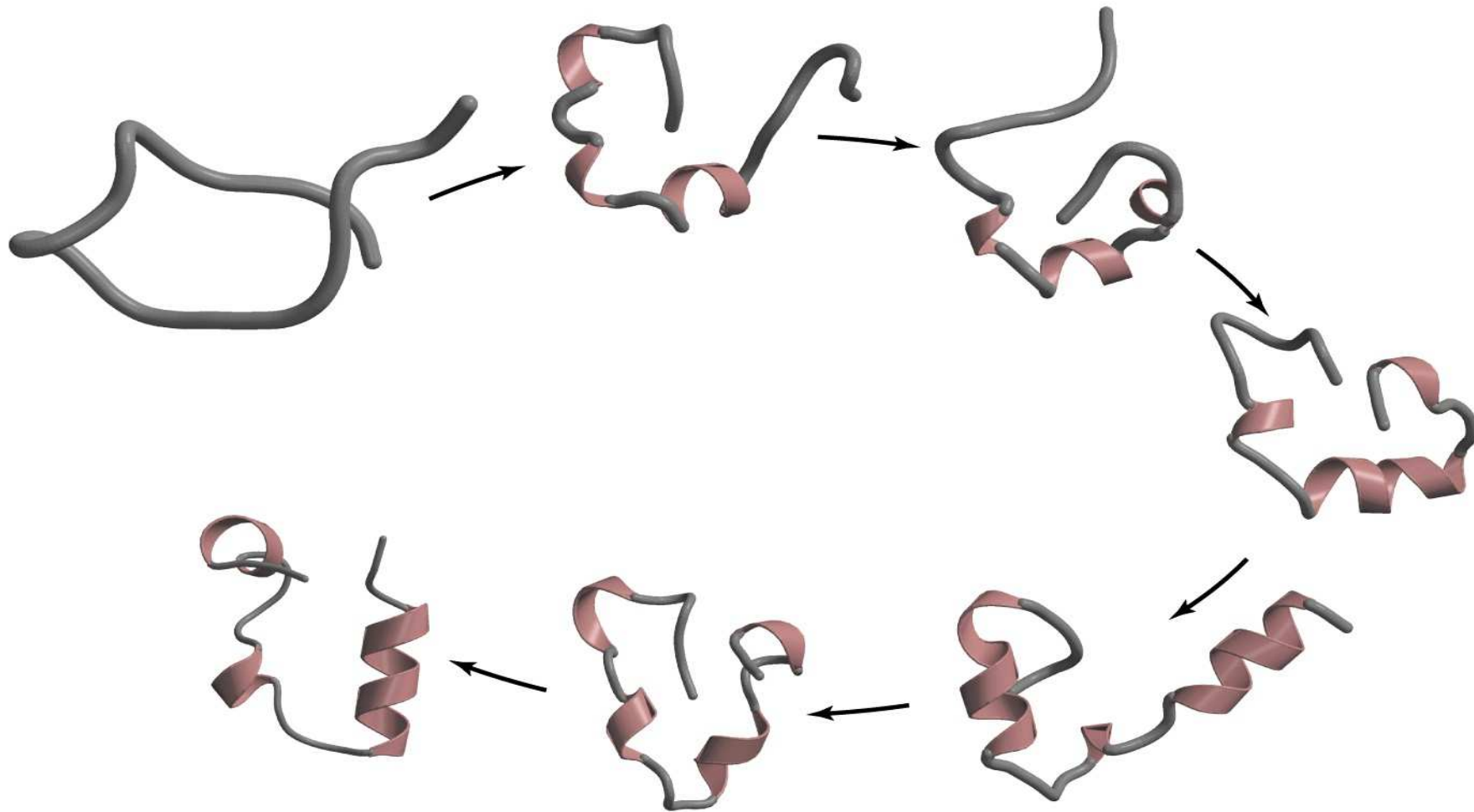
$$t = 10^n / 10^{13}$$

Per $n=100$ $t = 10^{87}$ (20 miliardi di anni!)

Le proteine

- ▶ **non ricercano casualmente la conformazione nativa fra le molte possibili**
- ▶ **si ripiegano seguendo vie dirette**

*PICCOLI TRATTI DI STRUTTURA
SECONDARIA SERVONO DA
MEDIATORI DEL PROCESSO DI
AVVOLGIMENTO.*



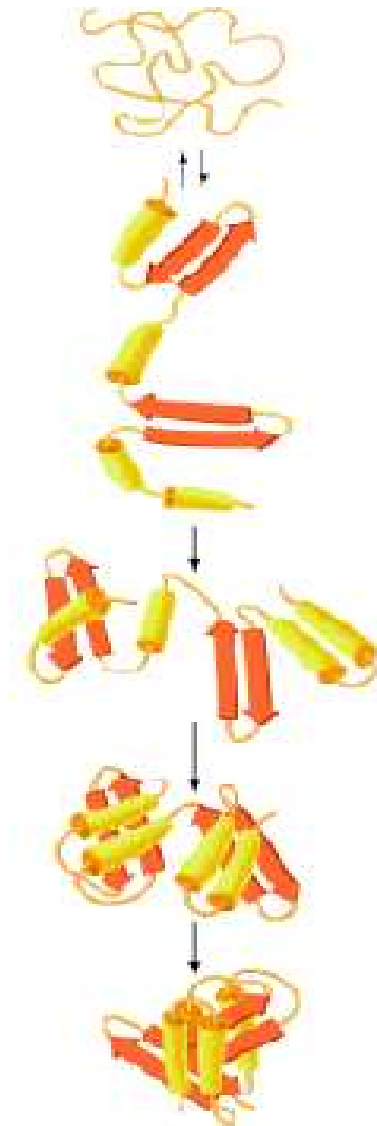
*LA FORMAZIONE DI CORTI SEGMENTI
DI STRUTTURA SECONDARIA È MOLTO
VELOCE.*

Questi piccoli tratti (circa 15 residui) si stabilizzano formando dei complessi (es 2α , 2β , $\alpha\beta$) che si chiamano

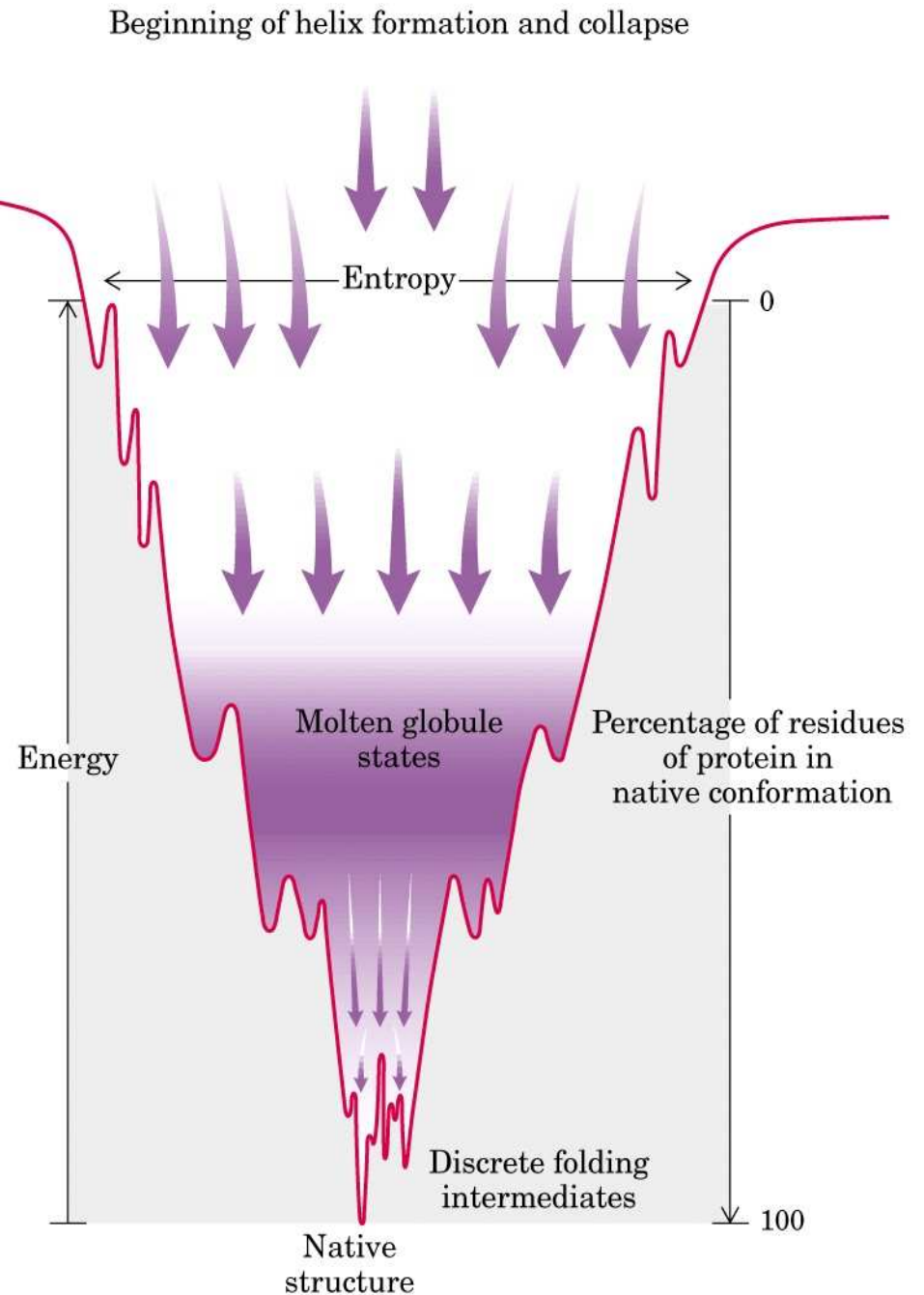
unità di avvolgimento.

Intorno a questi centri si stabilizzano poi altri tratti di struttura secondaria

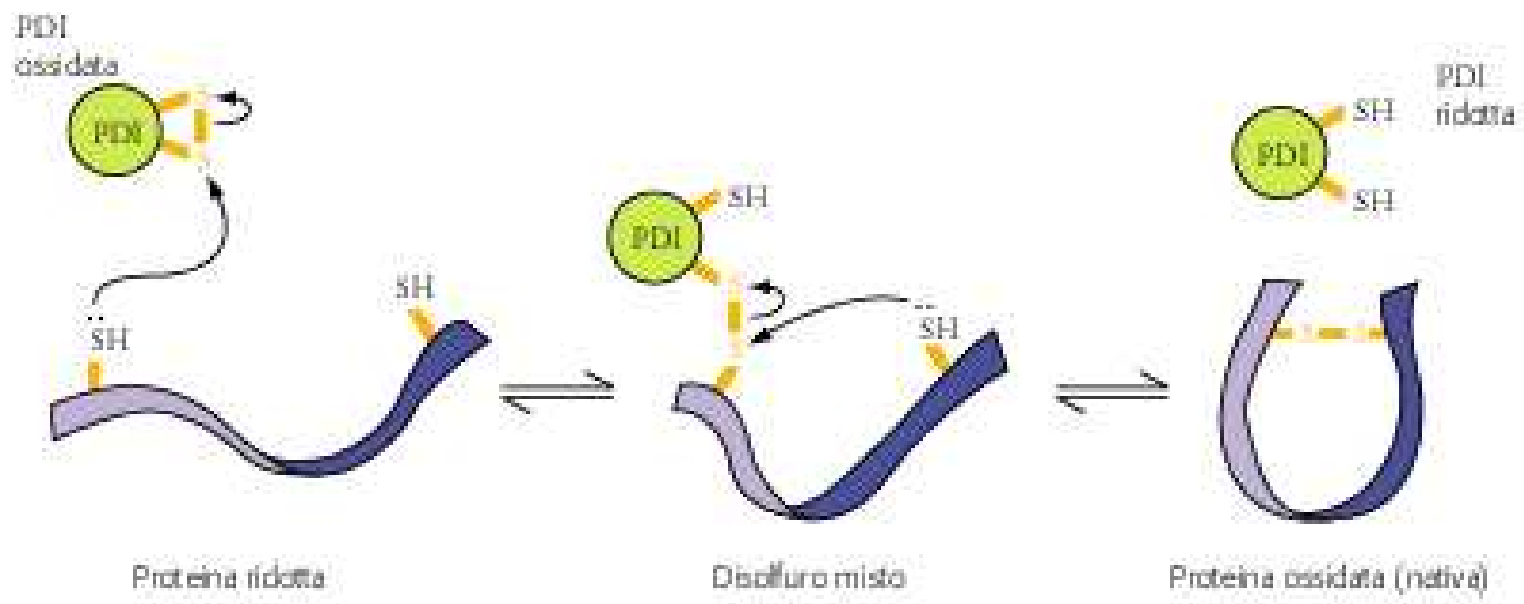
L'avvolgimento spontaneo delle catene polipeptidiche nella loro corretta struttura terziaria è un processo altamente *cooperativo*, in cui la formazione di piccoli elementi accelera la produzione di altri più grandi



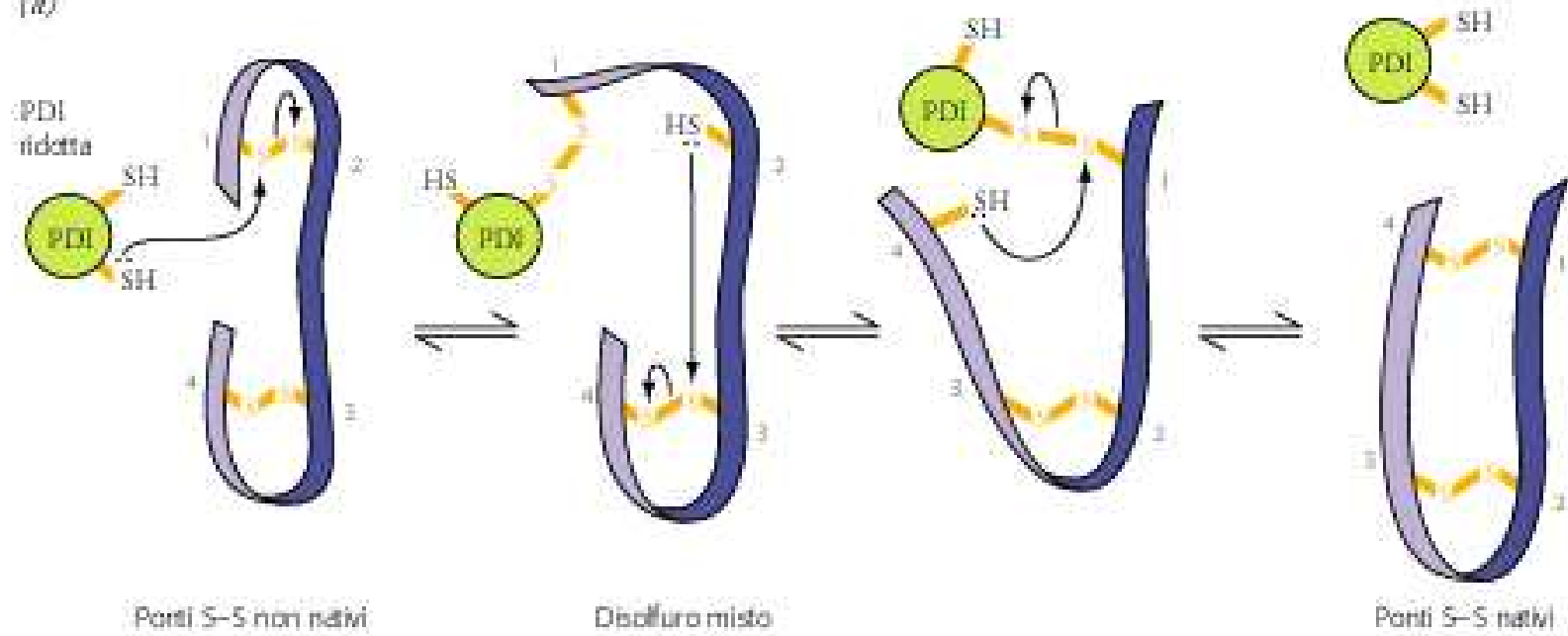
Il processo di ripiegamento di una proteina procede da uno stato ad alta energia ed alta entropia ad uno a bassa energia e bassa entropia



**IL processo di avvolgimento delle
proteine può essere accelerato
dall'enzima “ proteina disolfuro
isomerasi”**



(a)



Per alcune proteine a tale processo partecipano gli *chaperoni molecolari* che :

- ▣ contribuiscono al corretto avvolgimento di una proteina nascente

- ▣ consentono alle proteine ripiegate in modo non corretto di raggiungere la conformazione nativa

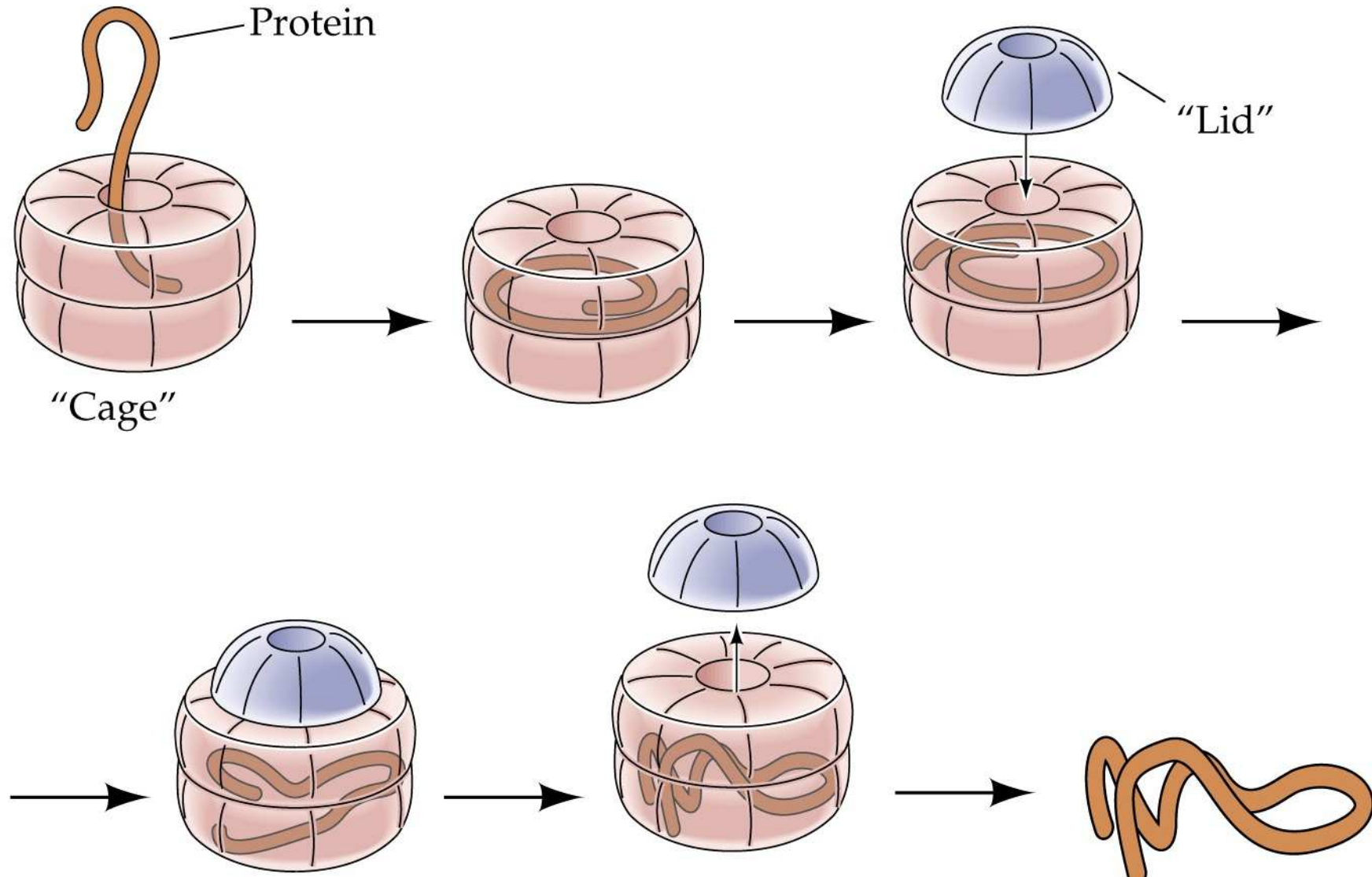
Esistono due classi di **chaperoni molecolari** : la famiglia **Hsp70** e le **chaperonine** (Hps60 o GroEL ed o Hsp10 GroES)

Le chaperonine sono costituite da due tipi di proteine HP60 (GroEL) e HP10 (GroES)

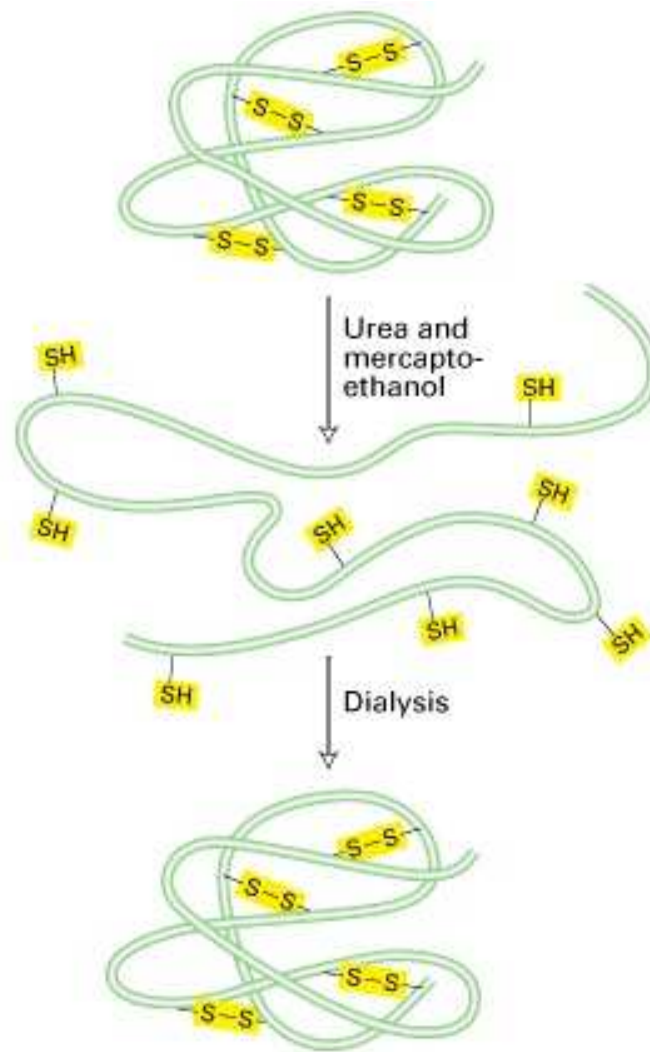
GroEL 14 subunità identiche (549 aa) disposte in due anelli sovrapposti (7+7)

GroES 7 subunità identiche (97aa) formano un anello eptamerico

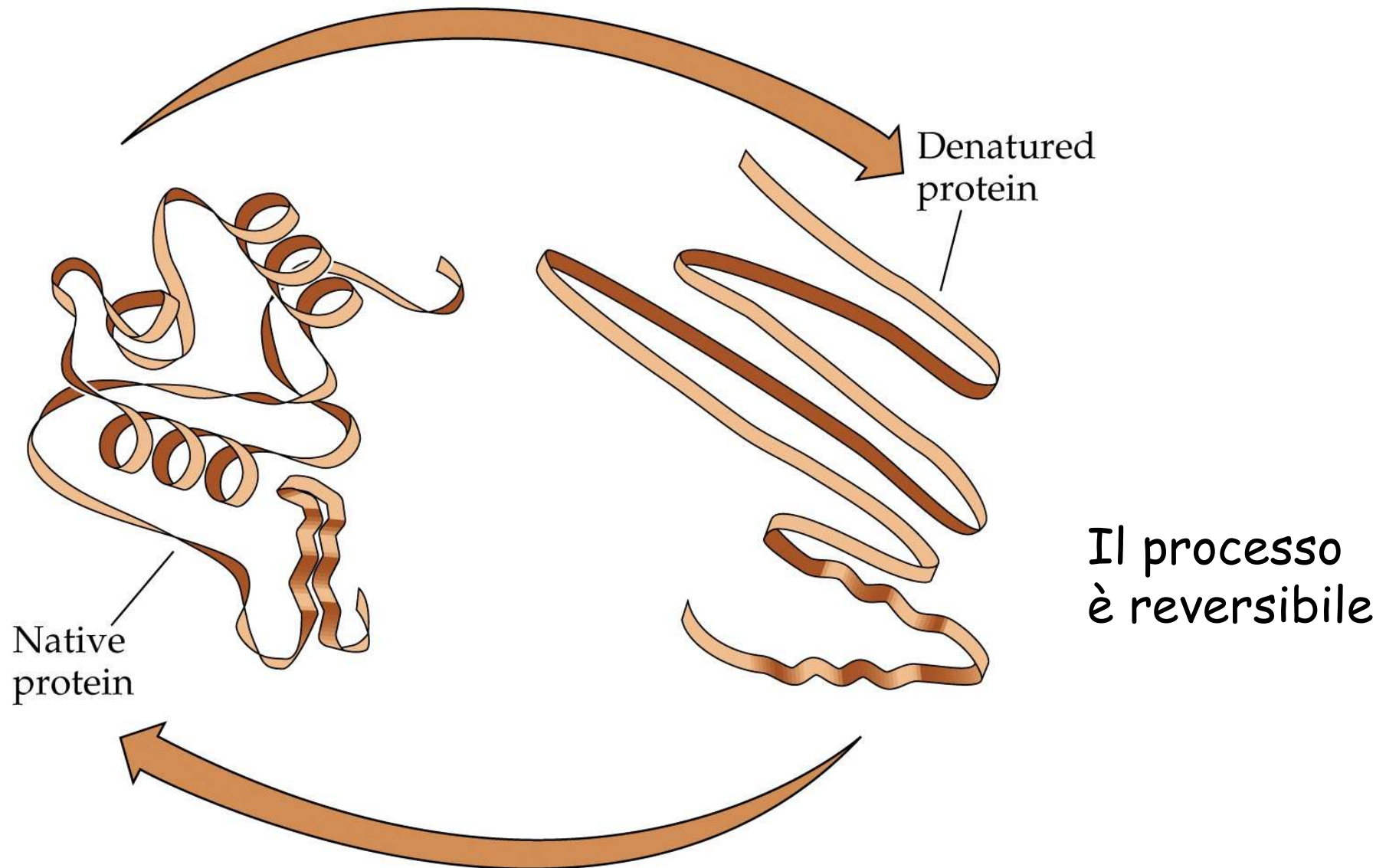
Le chaperonine assistono le proteine nella fase di folding, prevenendo il legame con ligandi inappropriati.

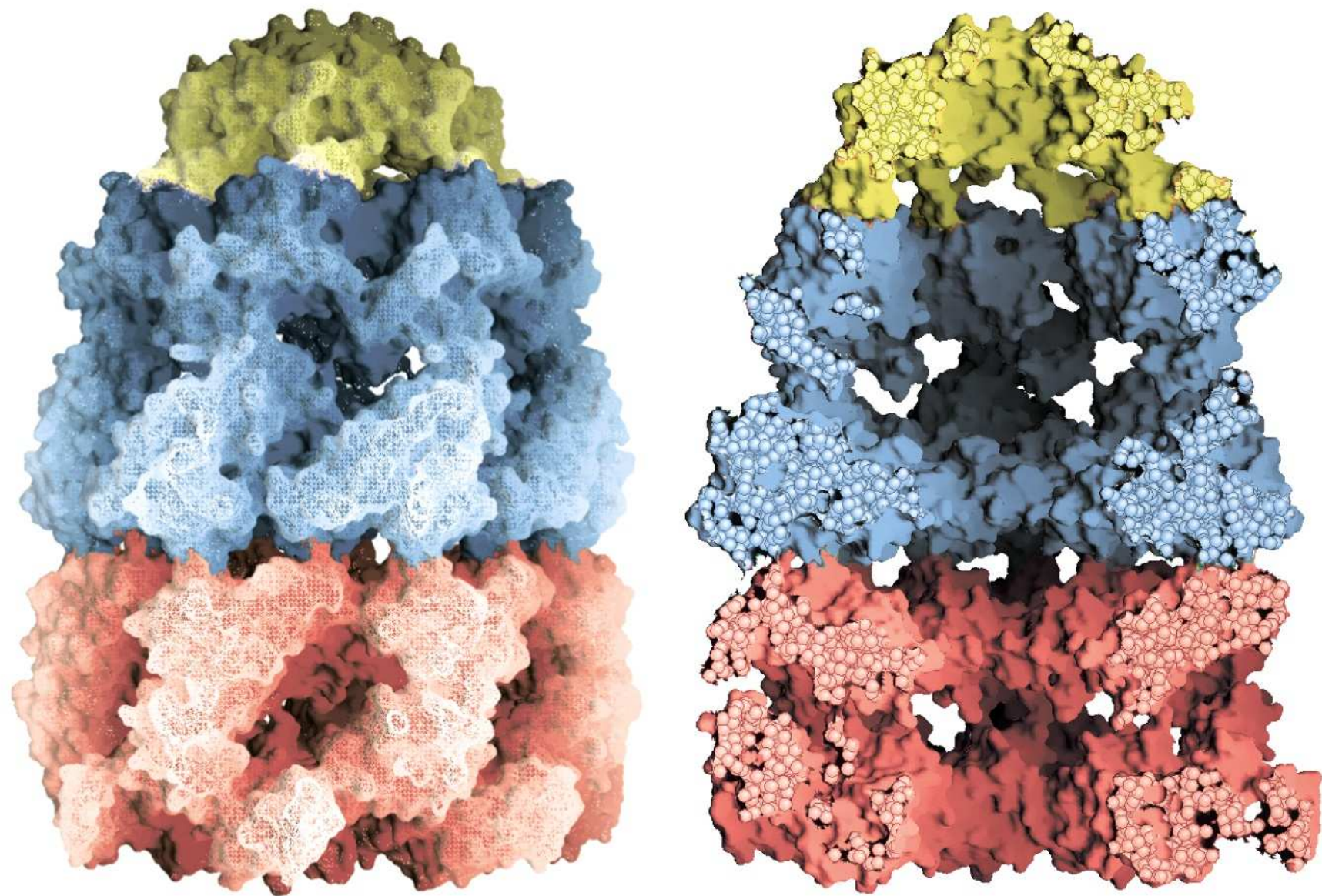


L'informazione per il "folding" della proteina è contenuta nella sequenza



Proteine denaturare al calore, con acidi, o chimici perdono la struttura terziaria e secondaria e la funzione biologica.

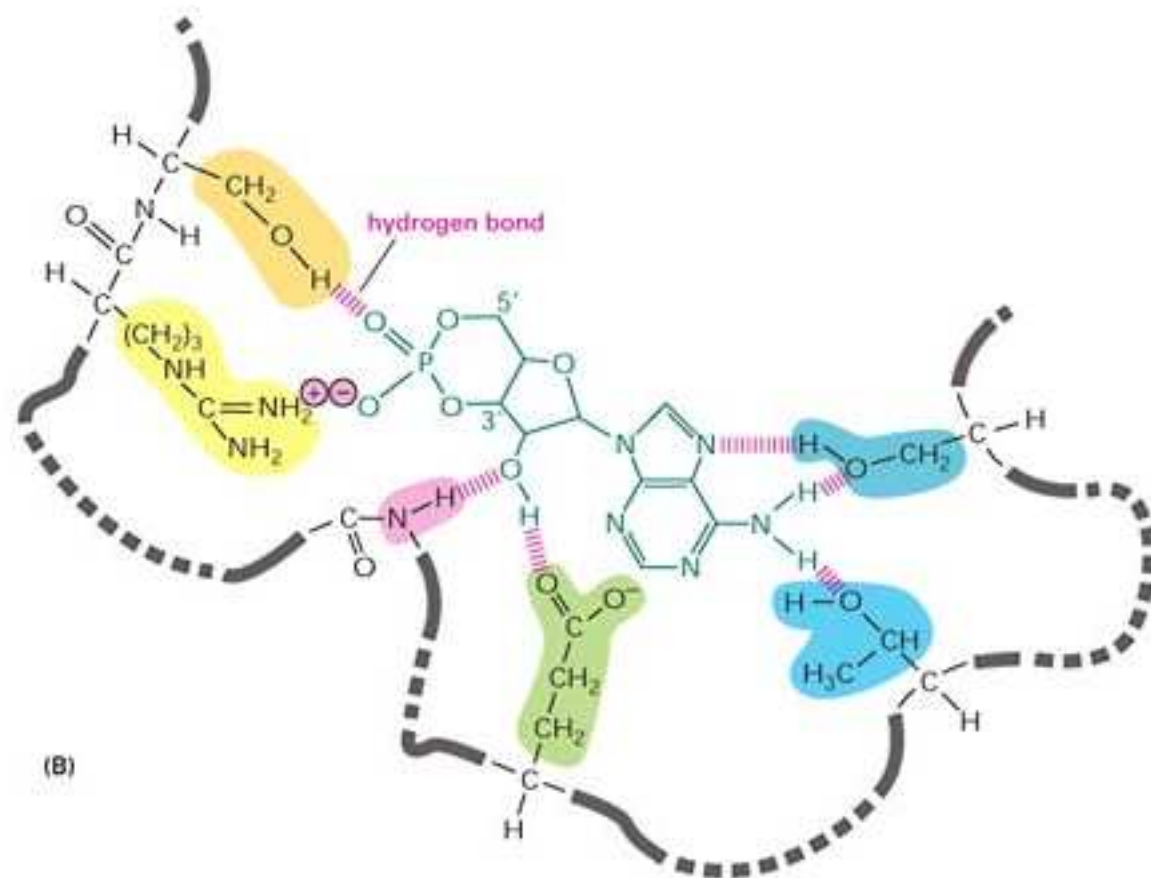
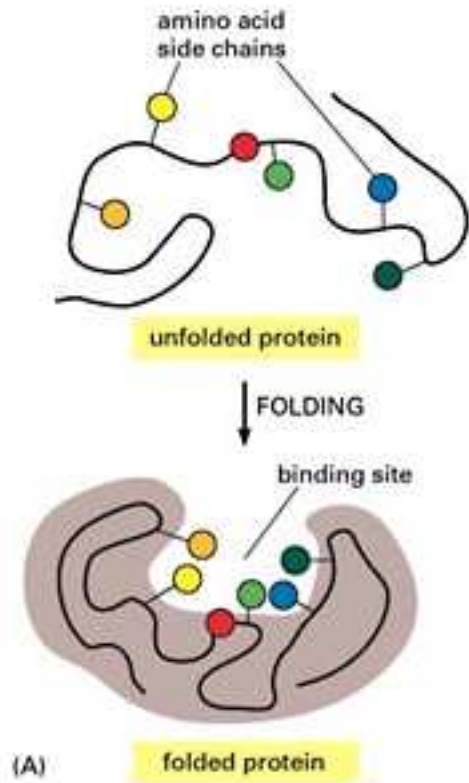




(b)

Conformazione, modificazione e degradazione delle proteine

- Una catena polipeptidica appena sintetizzata deve conformarsi e spesso subire modificazioni chimiche per generare la proteina finale
- Tutti i polipeptidi con la stessa sequenza amminoacidica assumono, in condizioni standard, la stessa conformazione (lo stato nativo), che è la più stabile conformazione che la molecola può assumere.



Molte malattie sono dovute al difettoso ripiegamento di una proteina

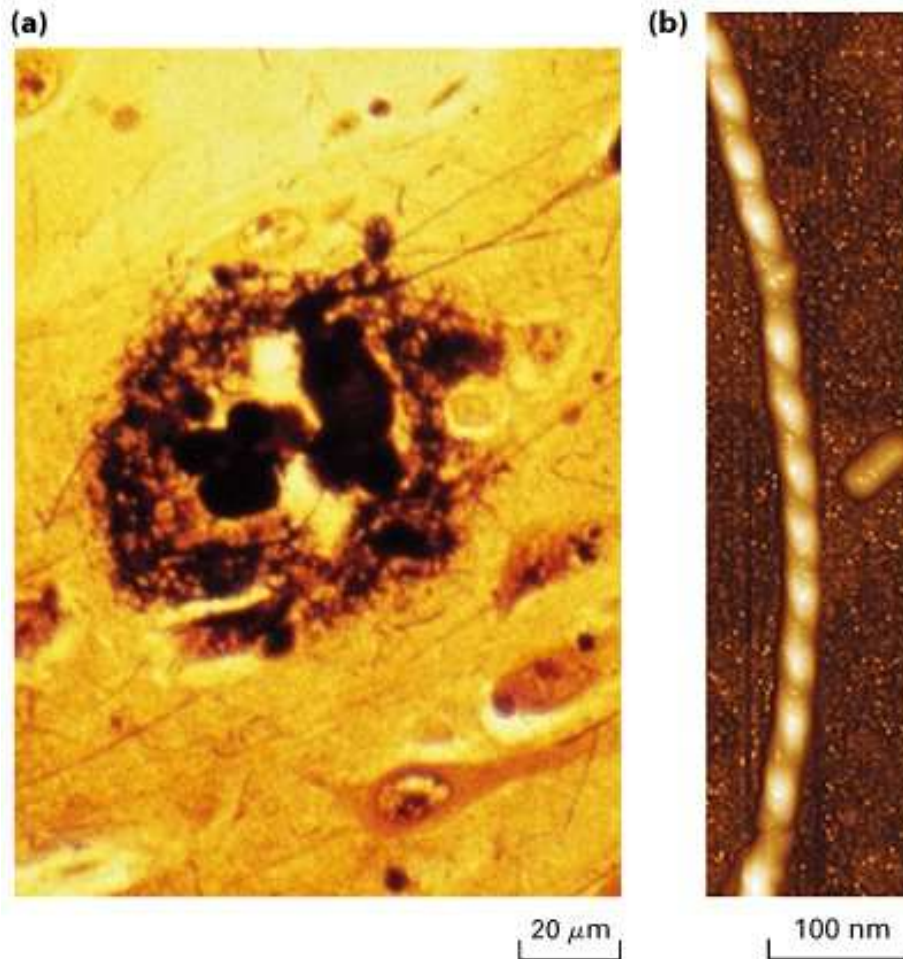
Alcune patologie derivano da proteine che non sono in grado di raggiungere la loro struttura funzionale e che tendono a formare grossi aggregati (fibrille o forme amiloidi): Alzheimer, Parkinson, encefalopatia spongiforme, diabete di tipo II.

In altri casi mutazioni puntiformi generano proteine che non raggiungono la loro locazione finale o che non sono più in grado di svolgere la loro funzione perché incapaci di legare i loro substrati.

La fibrosi cistica è un difetto nella proteina transmembrana che agisce come un canale degli ioni cloro nelle cellule epiteliali (CFTR: 1480 amminoacidi). La mutazione più comune è la delezione di un amminoacido (Phe 508) e la proteina mutata non si avvolge correttamente.

Proteine conformate in modo aberrante sono implicate nello sviluppo di patologie

Una placca amiloide nella malattia di Alzheimer è un agglomerato di filamenti proteici



Comparazione sequenze

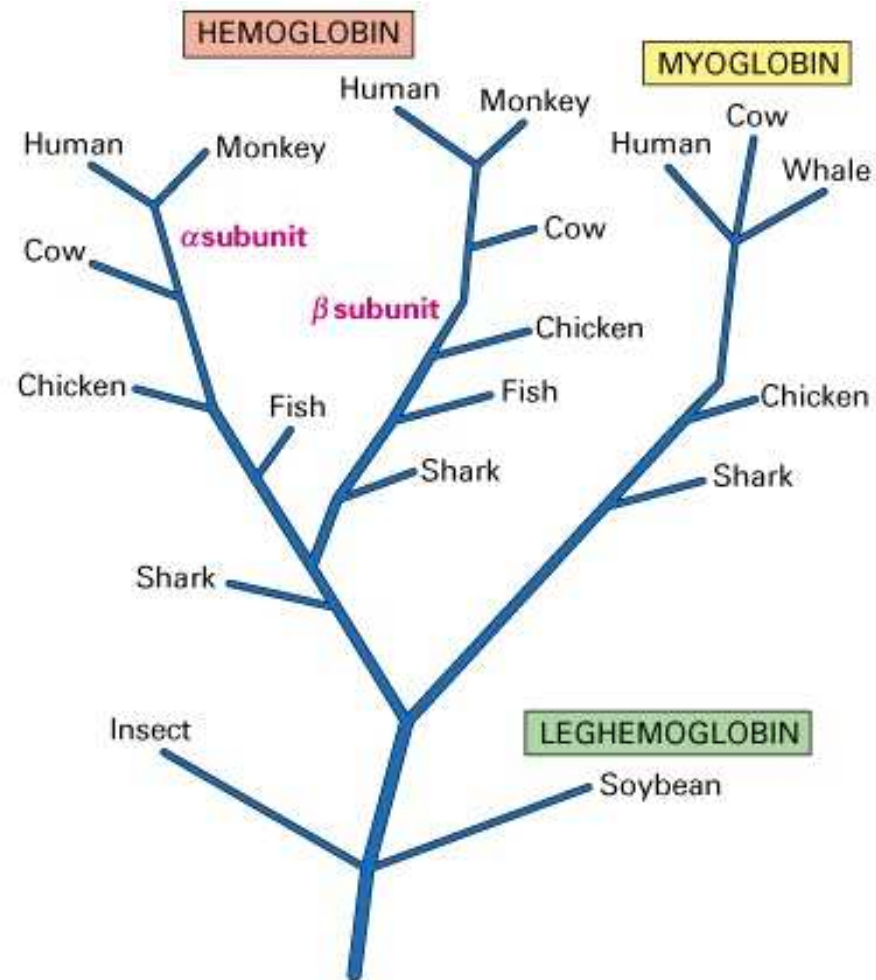
Hum α globina: mvlspadktn vkaawgkvga hageygaeal
Bovis: mvlsaadkgn vkaawgkvgg haeygaeal
Pig: vlsaadkan vkaawgkvgg qagahgaeal

ermflsfptt ktyfphfdls hgsaqvkghg **kkvadaltna** vahvddmpna
ermflsfptt ktyfphfdls hgsaqvkghg **akvaaltka** vehlddlpga
ermflgfptt ktyfphfnls hgsdqvkahg kvadaltka vghlddlpga

lsalsdlhah klrvidpvnfk llshcllvtl **aahlpaeftp** avhasldkfl
lsealsdlhah klrvidpvnfk llshsllvtl **ashlpdftp** avhasldkfl
lsalsdlhah klrvidpvnfk llshcllvtl **aahhpddfnp** svhasldkfl

asvstvltsk yr
anvstvltsk yr
anvstvltsk yr

L'omologia delle sequenze suggerisce relazioni funzionali ed evolutive tra le proteine



Emoglobina e mioglobina

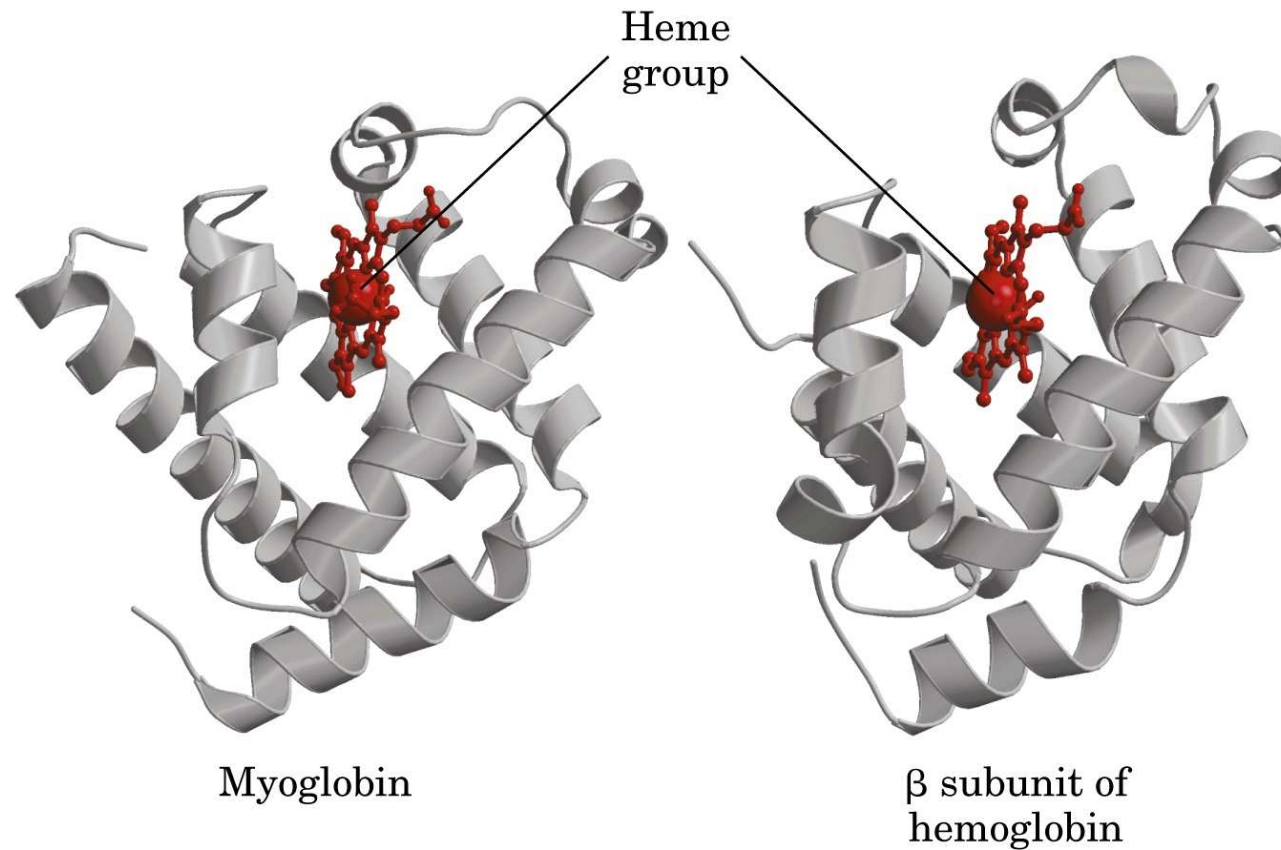
Per poter parlare in modo comprensibile dell'*emoglobina (Hb)*, è utile occuparsi prima della *mioglobina (Mb)* che è molto simile all'emoglobina ma è molto più semplice. Tra emoglobina e mioglobina ci sono stringenti relazioni di parentela: entrambe sono proteine coniugate ed il loro gruppo prostetico (parte non proteica) è il gruppo *eme*.

La mioglobina è una proteina globulare costituita da una singola catena di circa centocinquanta amminoacidi (dipende dall'organismo) ed il suo peso molecolare è di circa 18 Kd.

E' dotata di un gruppo eme che è inserito in una porzione idrofobica (o lipofila) della proteina, costituita da ripiegamenti riconducibili alle strutture α -elica delle proteine fibrose.

La mioglobina è composta principalmente da segmenti di α -eliche, presenti in numero di **otto** e consiste, quasi esclusivamente, di residui non polari (leucina, valina, metionina e fenilalanina) mentre sono praticamente assenti i residui polari (acido aspartico, acido glutammico, lisina e arginina); gli unici residui polari sono due istidine, che svolgono un ruolo fondamentale per l'attacco dell'ossigeno al gruppo eme.

Il gruppo eme è un gruppo cromoforo (assorbe nel visibile) ed è il gruppo funzionale della mioglobina.



Mioglobina

La Mioglobina è proteina che trasporta ossigeno nei muscoli dei mammiferi.

E' formata da 150 amminoacidi ed é la prima proteina la cui struttura tridimensionale é stata determinata con cristallografia a raggi X.

Un po' di chimica

L'**eme** è un anello tetrapirrolico (protoporfirina) presenta:

- quattro anelli pirrolici tenuti insieme da gruppi metilenici (-CH=);
- due gruppi vinilici (CH₂=CH),
- quattro gruppi metilici (-CH₃) e
- due propionici (-CH₂-CH₂-COO-).

Il legame tra protoporfirina e ferro è un legame tipico dei composti detti di coordinazione che sono composti chimici in cui un atomo (o ione) centrale, forma dei legami con altre specie chimiche in numero superiore al suo numero di ossidazione (carica elettrica).

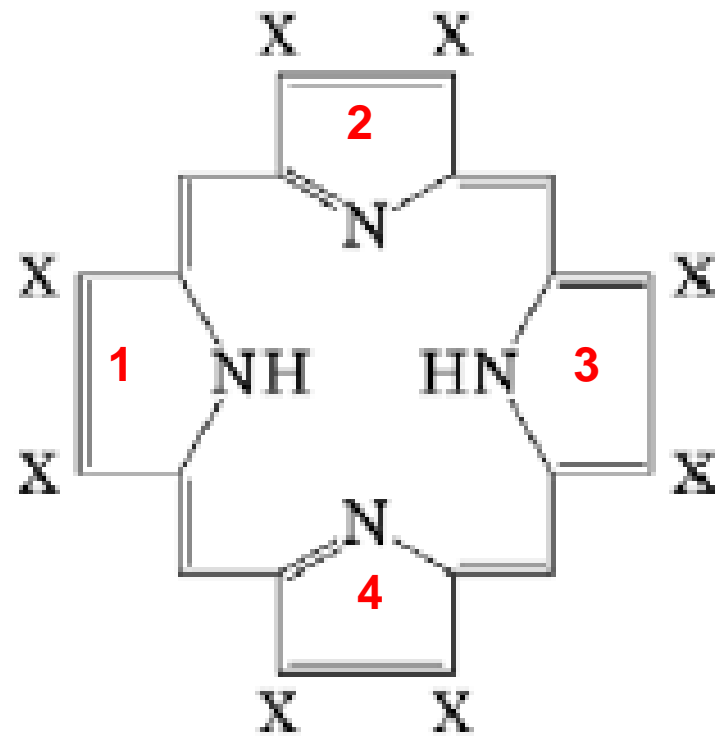
Nel caso dell'eme, tali legami sono reversibili e deboli.

Il numero di coordinazione (numero di legami di coordinazione) del ferro è sei:

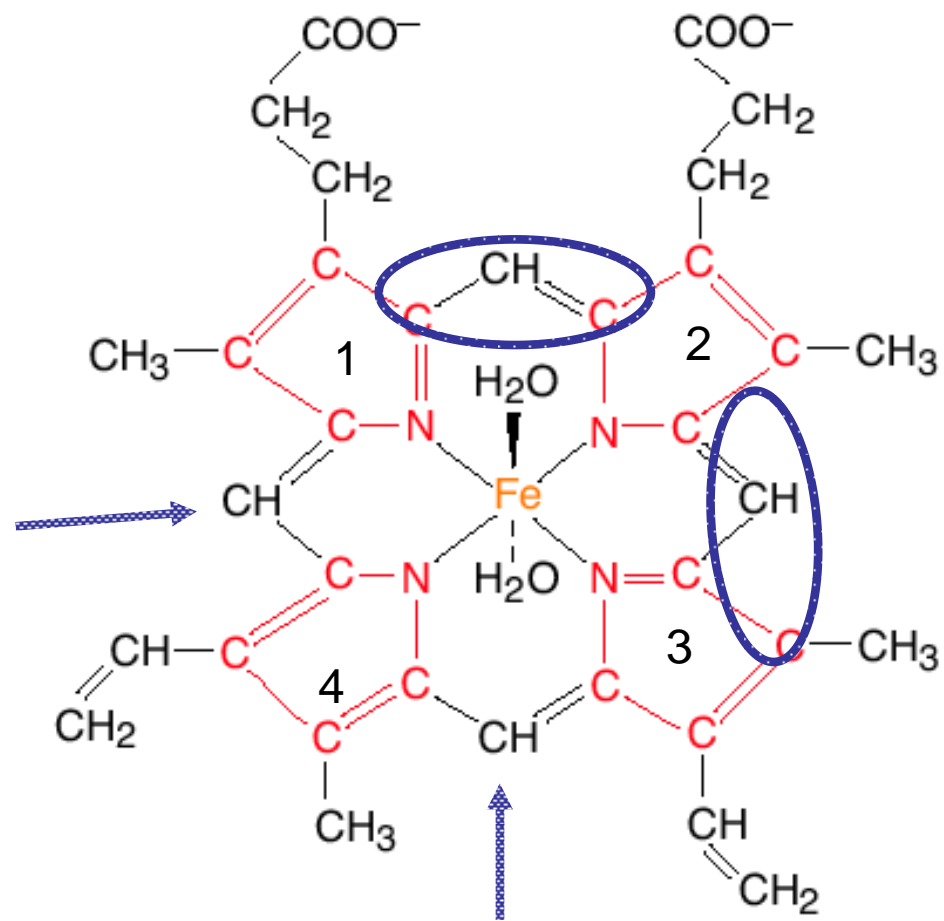
ci possono essere sei molecole attorno al ferro che mettono in condivisione gli elettroni di legame.

Per formare un composto di coordinazione, ci vogliono due orbitali con orientamento corretto: uno in grado di "acquistare" elettroni e l'altro in grado di donarli

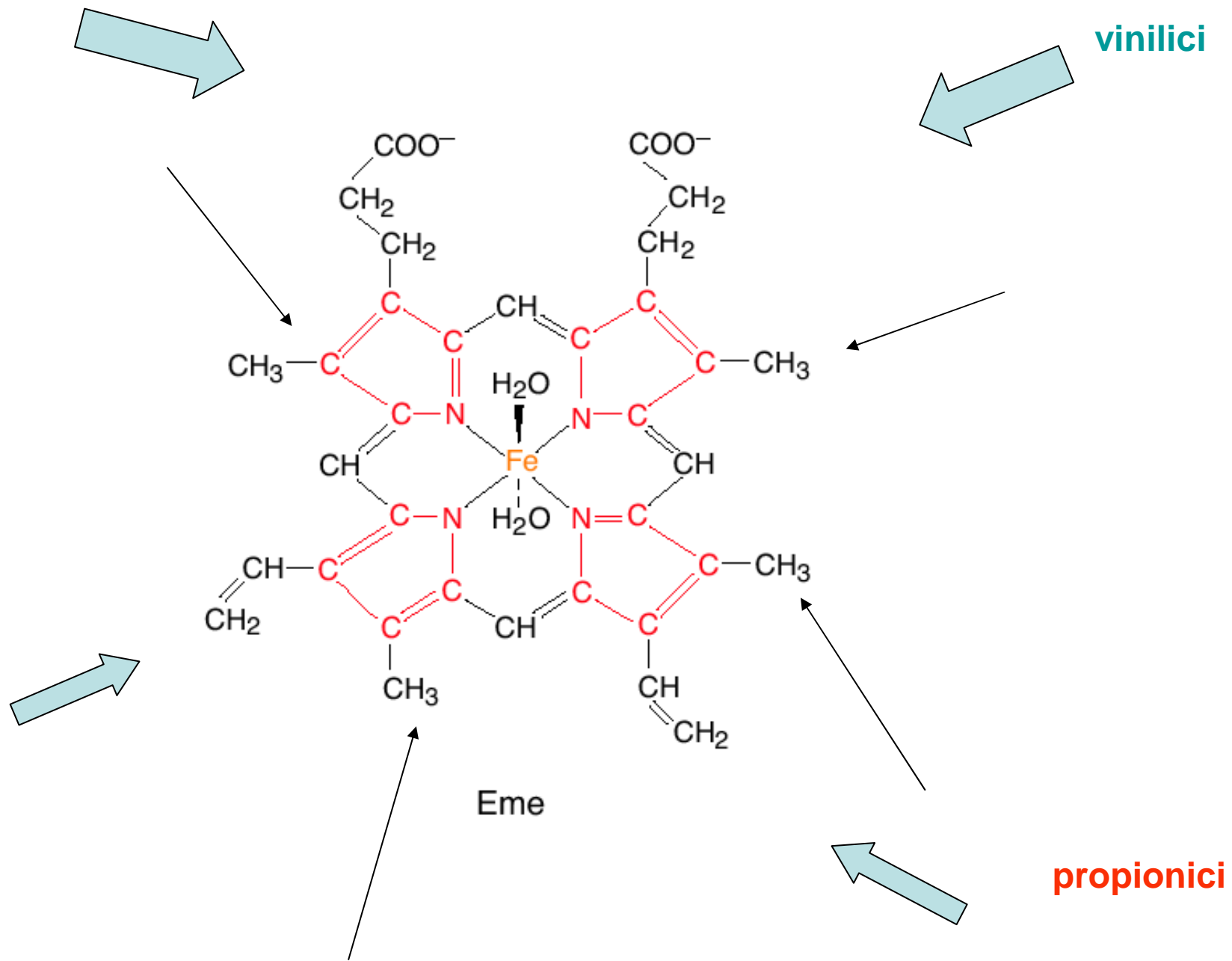
Protoporfirina



Quattro anelli pirrolici uniti da ponti metinici



Eme



Il ferro nell'eme

Nell'eme, il ferro forma:

- quattro legami planari con i quattro atomi di azoto che si trovano al centro dell'anello della proto-porfirina ed
- un quinto legame con un azoto dell'istidina prossimale;

il ferro ha il sesto legame di coordinazione libero e può legarsi all'ossigeno.

Quando il ferro è sottoforma di ione libero:

i suoi orbitali di tipo d hanno tutti la stessa energia;

nella mioglobina, lo ione ferro è legato alla protoporfirina e all'istidina che perturbano magneticamente gli orbitali d del ferro;

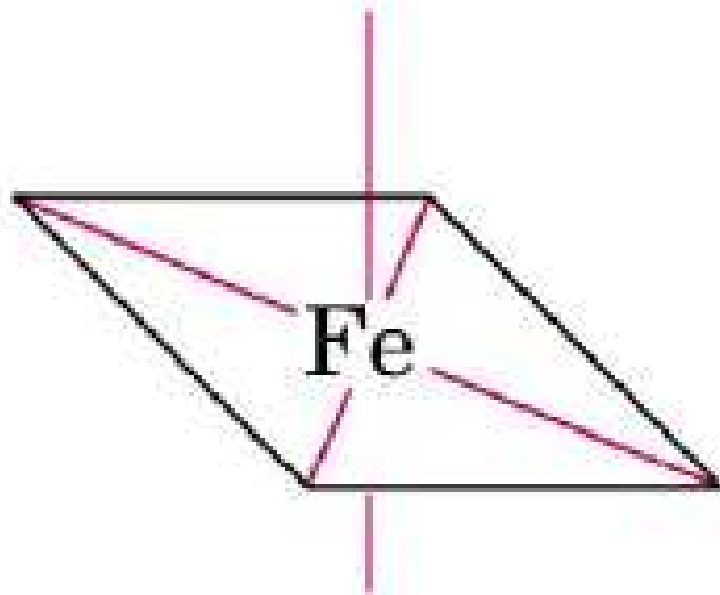
l'entità della perturbazione sarà diversa per i vari orbitali d a seconda del loro orientamento spaziale e di quella delle specie perturbanti.

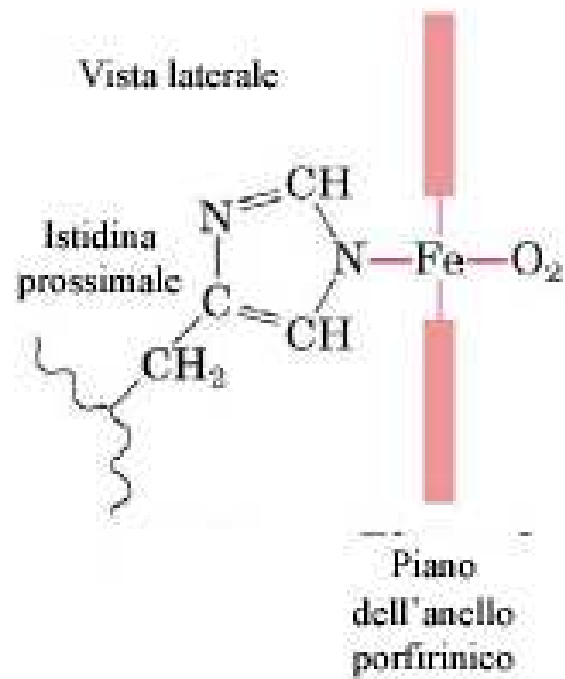
Dato che:

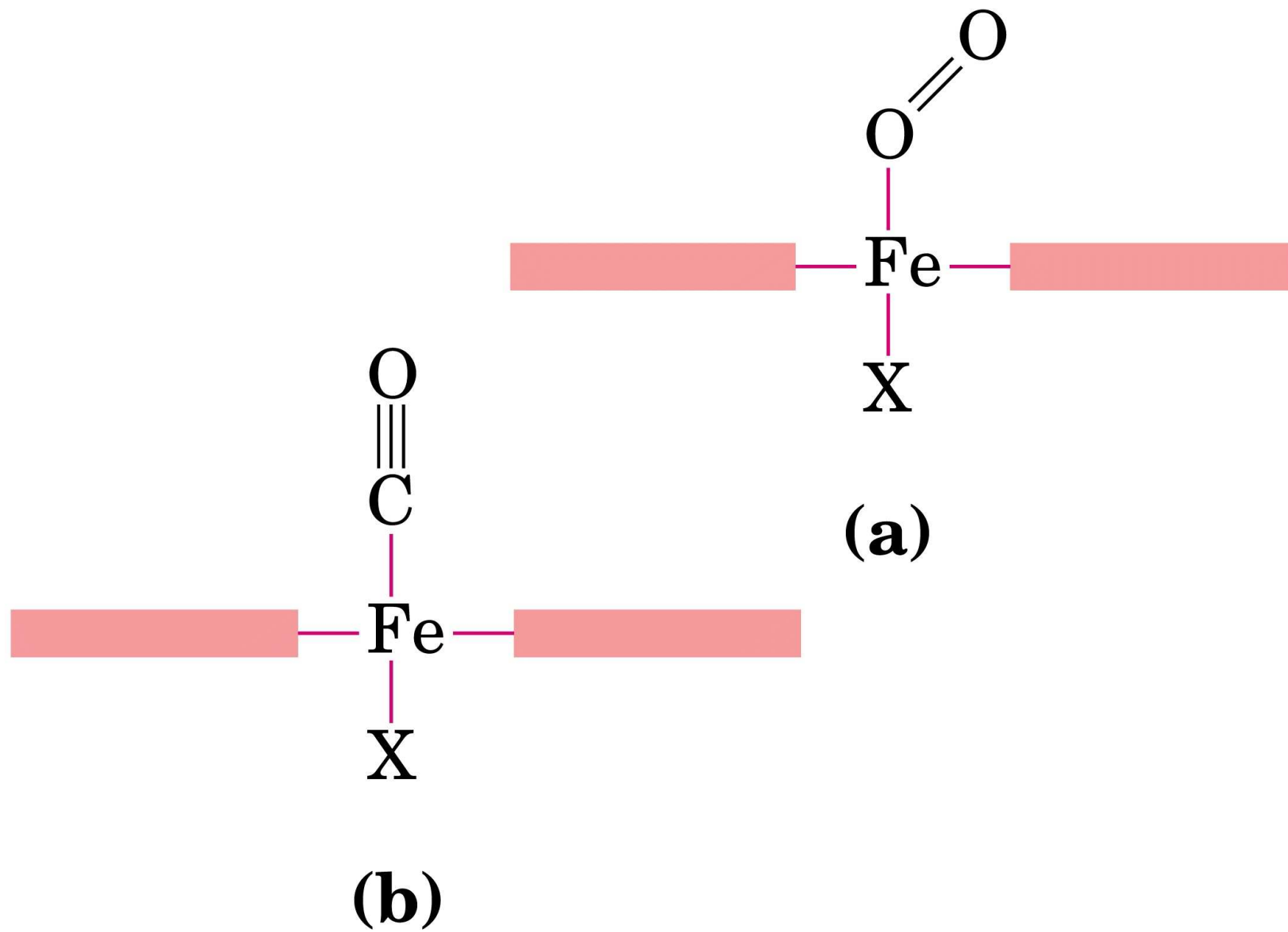
l'energia totale degli orbitali deve rimanere costante, la perturbazione causa una separazione energetica tra i vari orbitali: l'energia acquisita da alcuni orbitali, equivale all'energia persa dagli altri.

A rendere più o meno rossa la carne è il contenuto di emoproteine (è l'eme che rende rossa la carne).

Legami di coordinazione del ferro



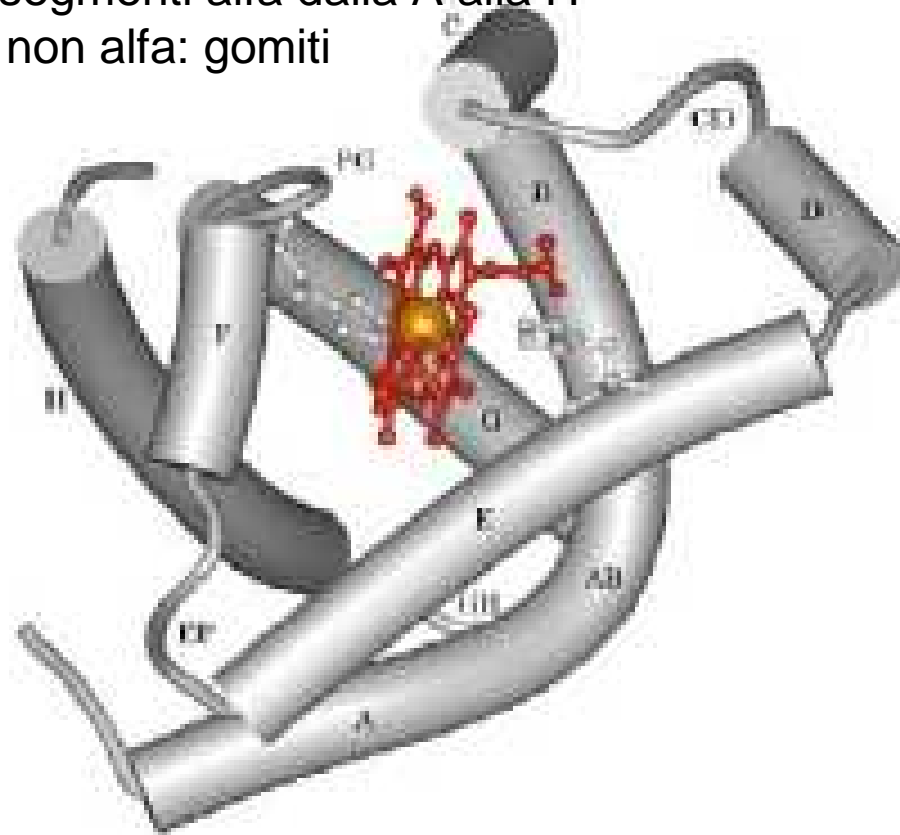




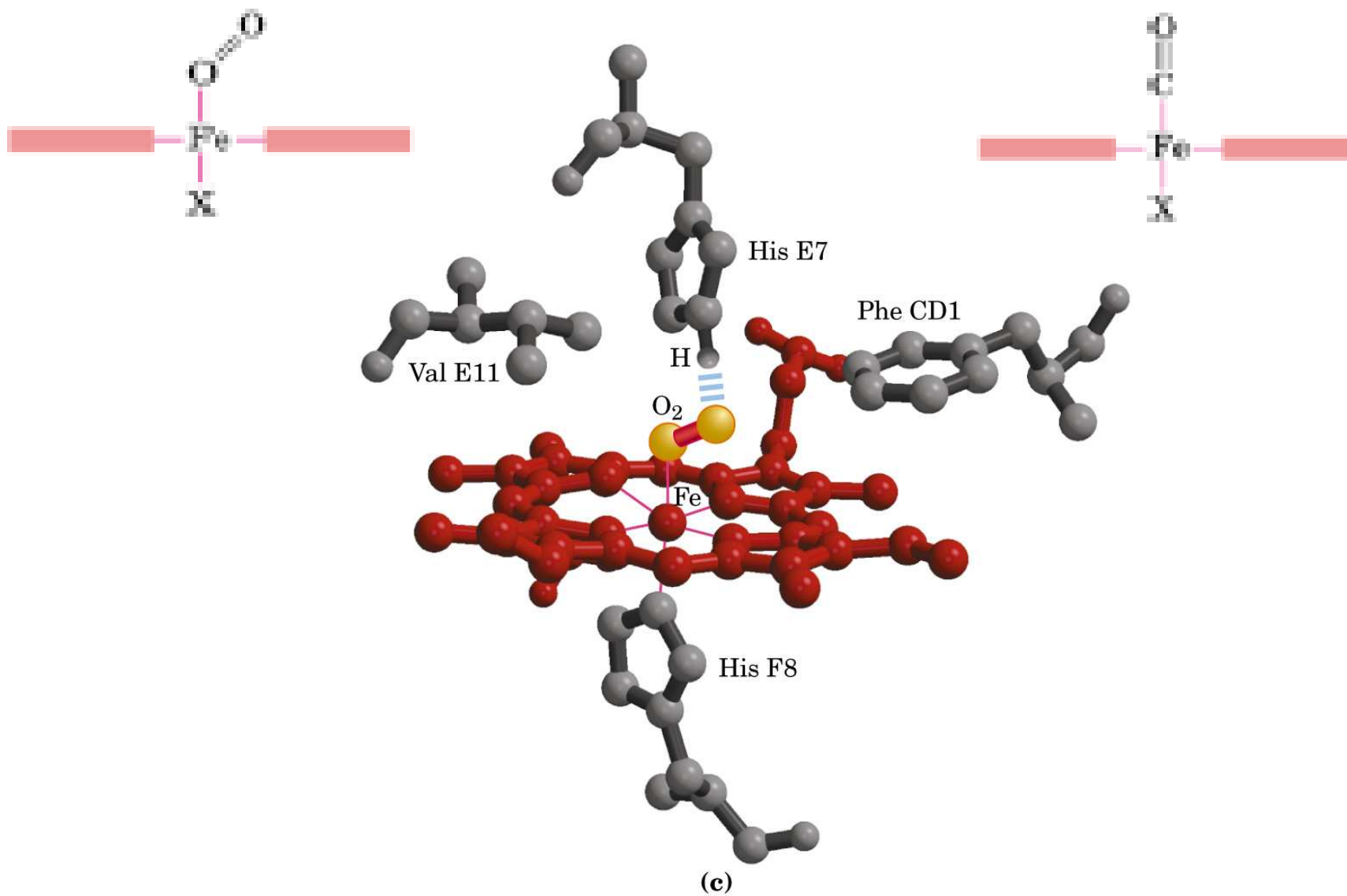
Struttura della mioglobina e della emoglobina

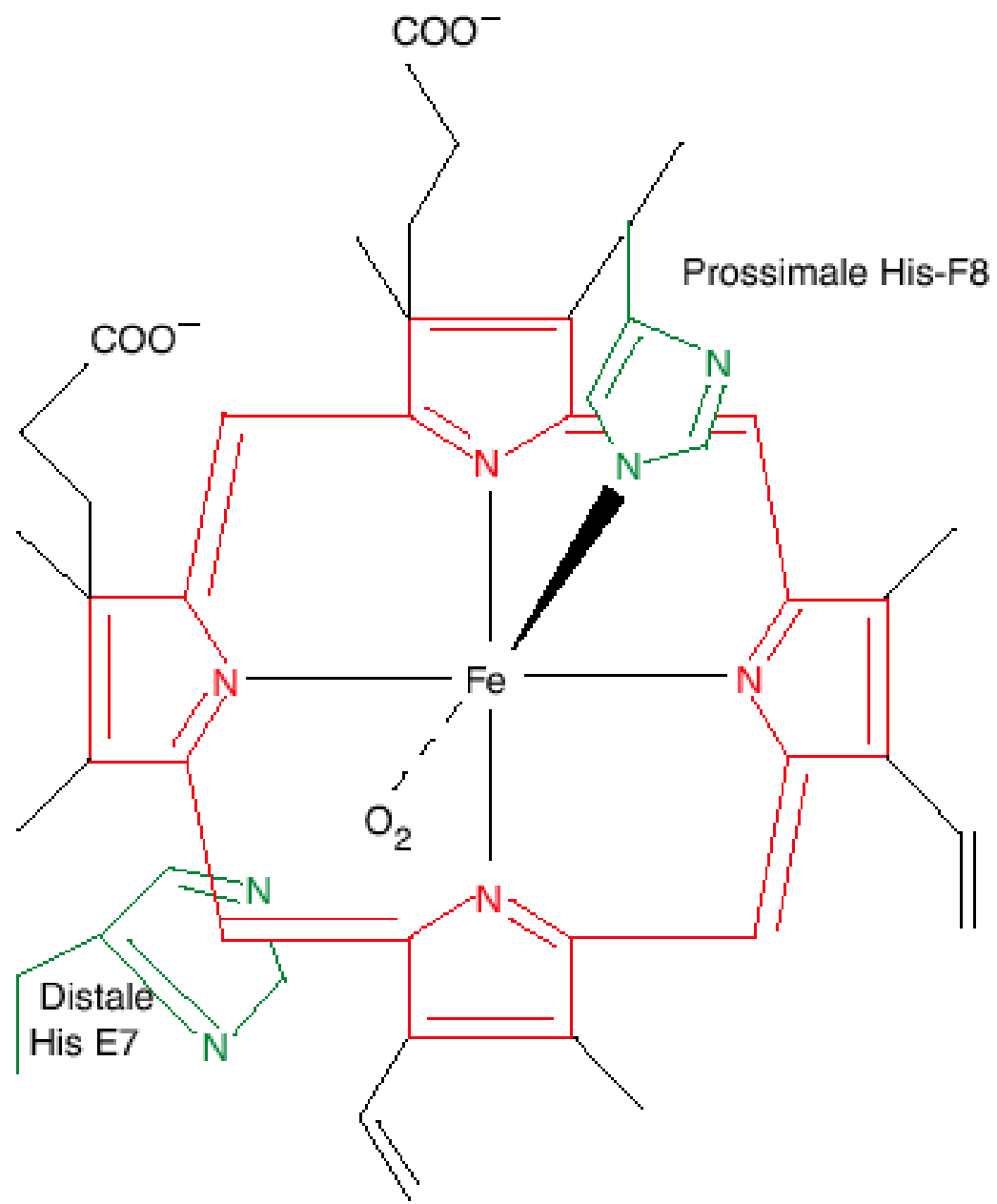
Struttura a 8 segmenti alfa dalla A alla H

Con raccordi non alfa: gomiti

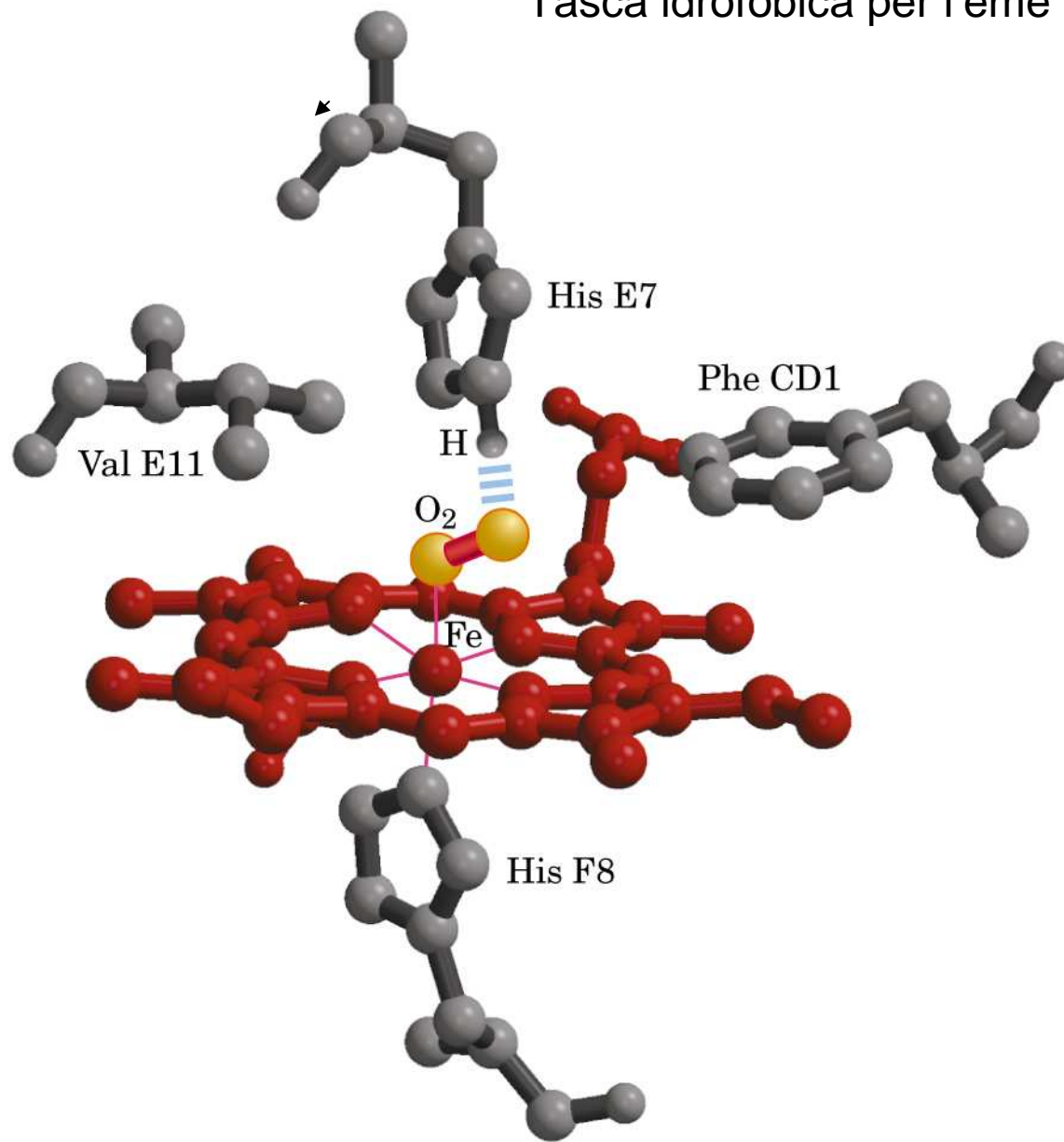


Effetti sterici sul legame di ligandi all'eme della mioglobina



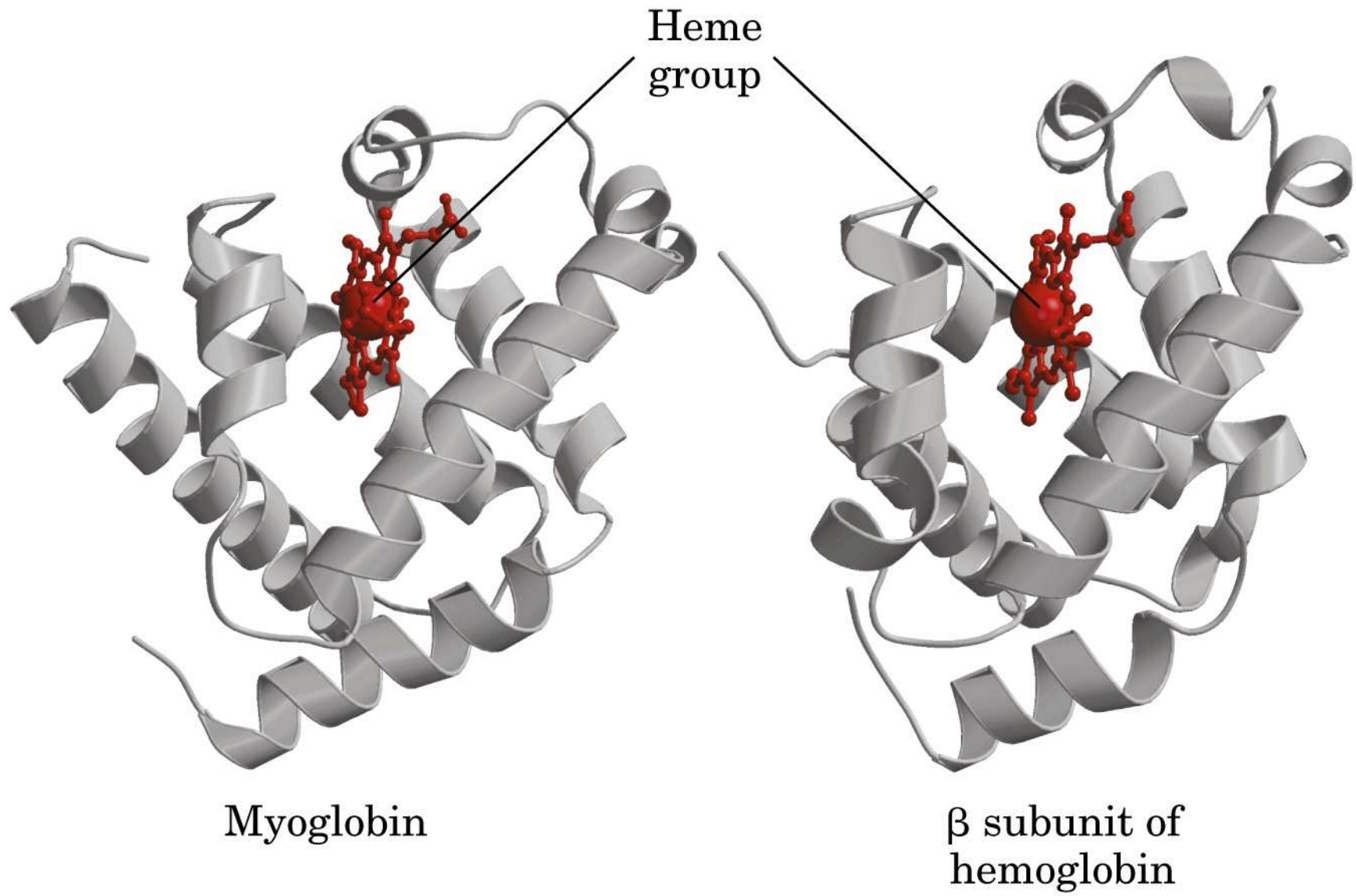


Tasca idrofobica per l'eme



(c)

- **La mioglobina è una proteina tipica dei muscoli** (ma non si trova solo nei muscoli).
La mioglobina si estrae dal capodoglio in cui è presente in gran quantità e poi viene purificata.
- **La mioglobina** lega in maniera reversibile l'ossigeno ed è presente nei tessuti periferici in percentuale tanto maggiore quanto più quel tessuto è abituato a lavorare con approvvigionamenti di ossigeno distanti nel tempo.



- L'**emoglobina** ha molte analogie strutturali con la mioglobina ed è in grado di legare l'ossigeno molecolare in modo reversibile; ma, mentre la mioglobina è confinata nei muscoli e nei tessuti periferici in generale, l'emoglobina si trova negli eritrociti o globuli rossi (sono pseudo cellule cioè non sono cellule vere e proprie) che costituiscono il 40 % del sangue.
- Contrariamente alla mioglobina il lavoro dell'emoglobina è quello di prelevare ossigeno nei polmoni, rilasciarlo nelle cellule ove ce ne sia bisogno, prelevare anidride carbonica e rilasciarla nei polmoni dove il ciclo ricomincia.

Eritrociti di individuo normale



2 μ m

Emoglobina

- L'Hb contenuta nei globuli rossi incrementa da 5 ml a 250 ml (50 volte) la capacità di trasporto dell'O₂ in un litro di sangue.
- In presenza di O₂ si estrae 18 volte più Energia che in sua assenza.
- La mioglobina serve da riserva di O₂ permette il movimento dell'O₂ dalla superficie della cellula al mitocondrio.
- Se l'O₂ fosse trasportato alle cellule per semplice diffusione, la dimensione massima di un organismo aerobio sarebbe di 1 mm.

	ml di O ₂ consumato/min	
	riposo	lavoro
muscoli scheletrici	260	6000
cuore	9	347

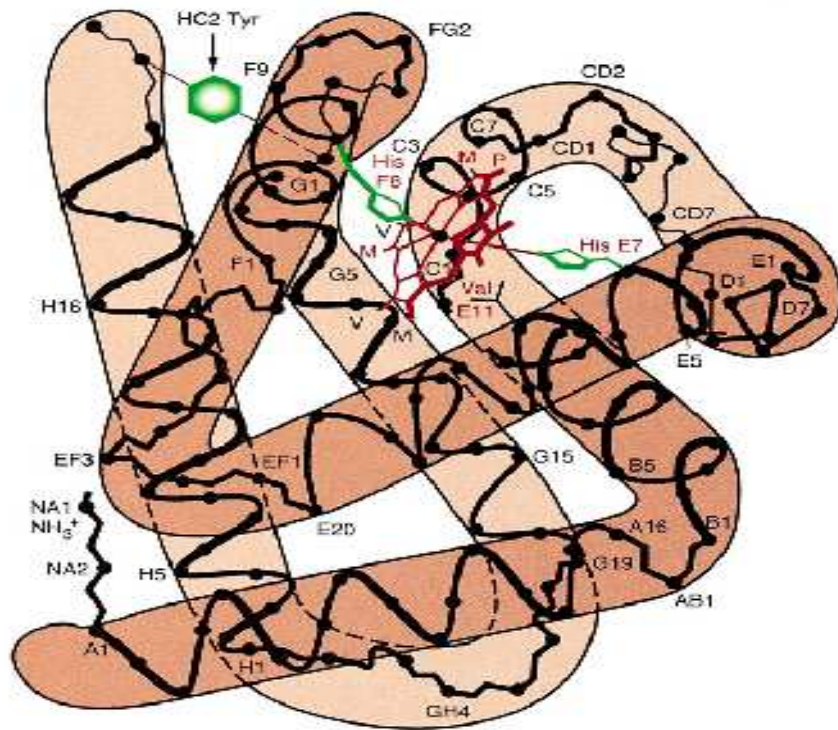


Fig. 3.33. Struttura secondaria e terziaria di una catena polipeptidica dell'emoglobina.

EMOGLOBINA

E' La 1^a proteina di cui è stato determinato il PM con accuratezza;

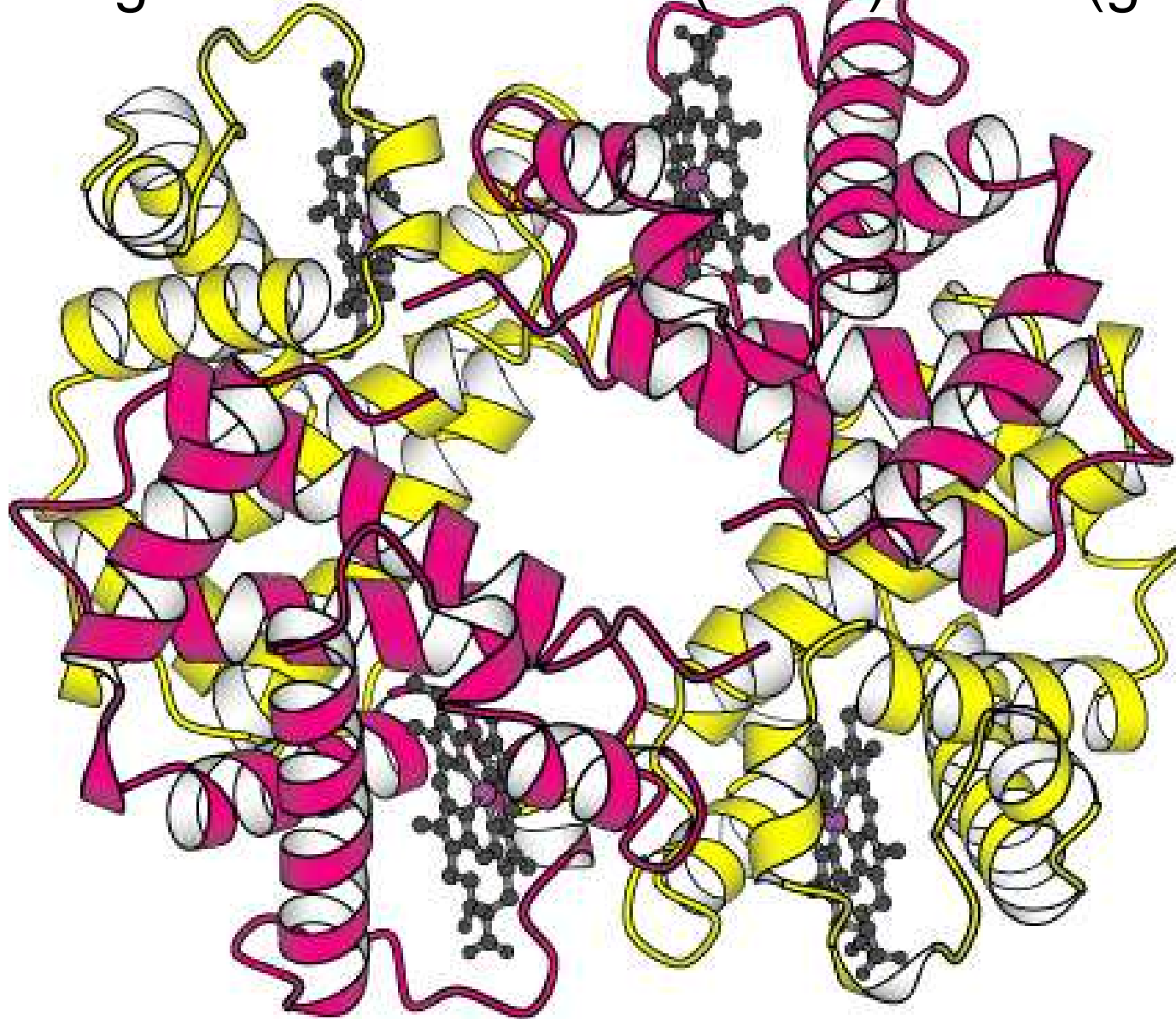
- è un tetramero, 4 sub. 2-alfa e 2-beta (141 e 146 aa rispettivamente).

- in cui è stata identificata una patologia molecolare;

- la 1^a in cui è stata definita la struttura utilizzando la diffrazione ai raggi X.

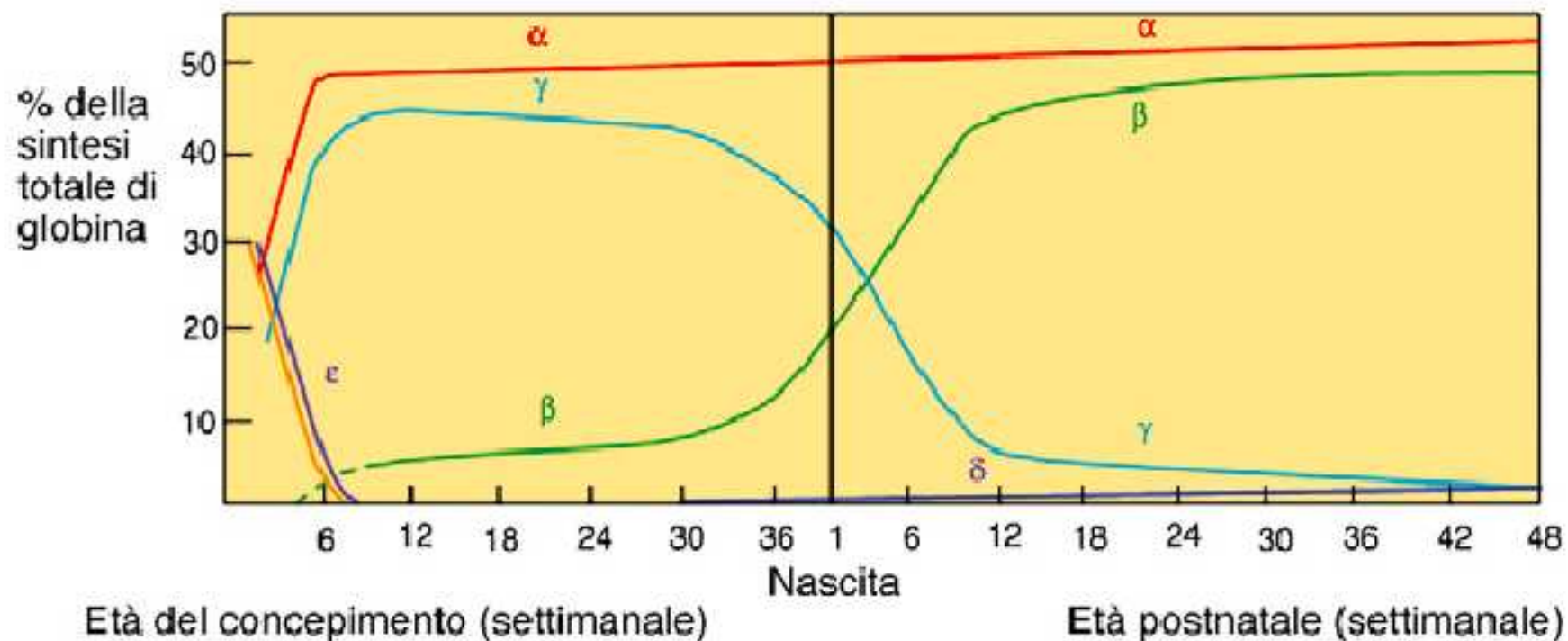
La cooperatività del suo legame all'O₂ ha fornito un modello per la comprensione di molte regolazioni enzimatiche

Emoglobina umana alfa2(rosso) beta2 (giallo)



- Nello sviluppo di un essere umano vi sono dei **geni** che vengono espressi **solo per un determinato periodo di tempo**; per tale motivo si hanno emoglobine diverse:
fetali, embrionali, dell'uomo adulto.
- Le **catene** che costituiscono queste **diverse emoglobine**, hanno delle **strutture differenti**, ma con delle similitudini, infatti la funzione che svolgono è più o meno la **stessa**.

<i>Fonte principale</i>	<i>Simbolo</i>	<i>Subunità</i>
Adulto	Hb A ₁	$\alpha_2\beta_2$
Adulto	HB A ₂	$\alpha_2\delta_2$
Fetale	Hb F	$\alpha_2\gamma_2$
Embrionale (stato fetale precoce)	Hb Gower-2	$\alpha_2\varepsilon_2$



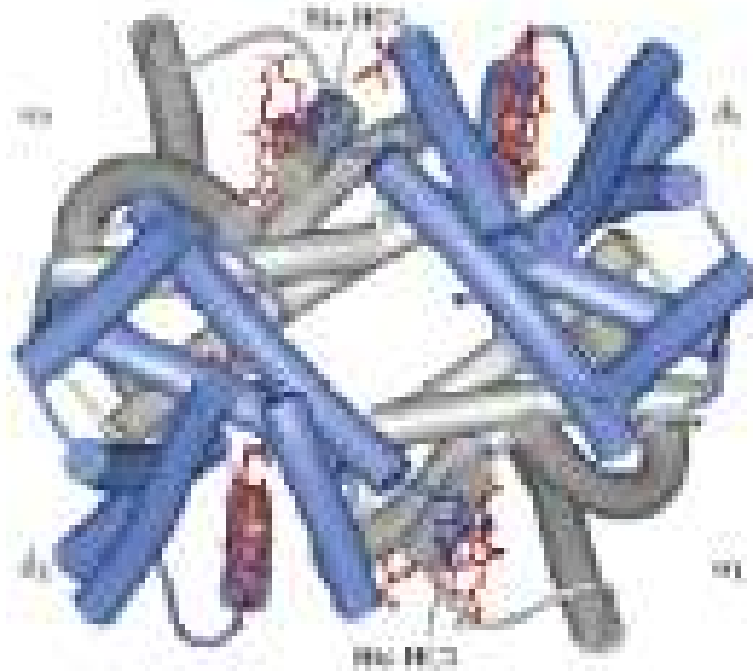
Legame cooperativo

- Quando una proteina è funzionalmente attiva, può mutare la sua forma senza indurre cambi conformazionali nelle proteine vicine; (mioglobina ossigenata non influenza le mioglobine vicine).
- Invece in proteine associate come l'emoglobina: quando una catena si ossigena e cambia la sua forma tale modificazione si ripercuote sulle altre catene del tetrametro.
- le altre catene del tetrametro assumono un "atteggiamento meno ostile" nei riguardi dell'ossigeno: la difficoltà con cui una catena si ossigena diminuisce man mano che le catene ad essa vicine si ossigenano a loro volta. Lo stesso discorso è valido per la deossigenazione.

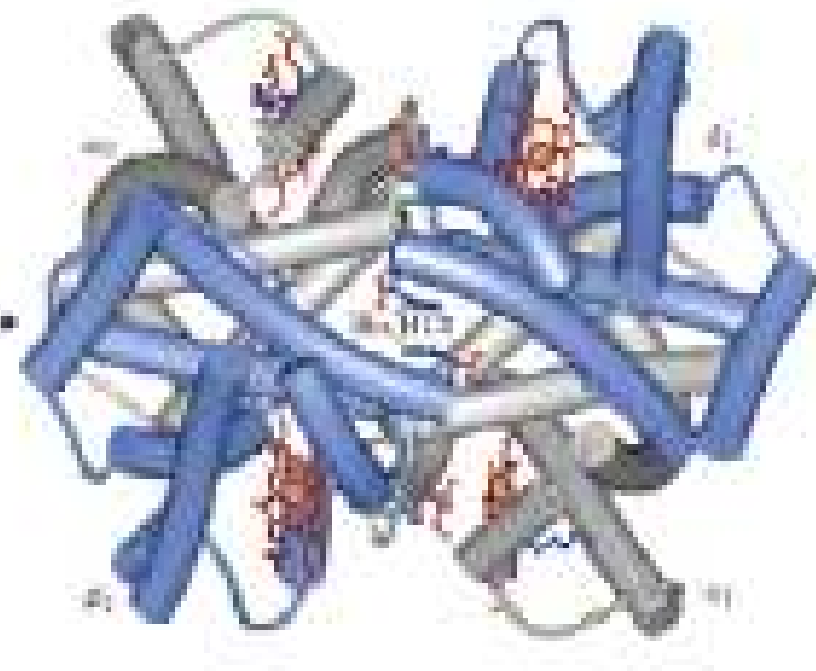
La struttura quaternaria della deossiemoglobina prende il nome di :

- **forma T (tesa)**
- mentre quella della ossiemoglobina viene chiamata forma **R (rilasciata)**;
- nello stato teso vi sono una serie di **interazioni elettrostatiche piuttosto forti tra amminoacidi acidi e amminoacidi basici che portano ad una struttura rigida della deossiemoglobina (ecco il perché del "forma tesa")**,
- mentre quando si lega l'ossigeno, l'entità di queste interazioni diminuisce (ecco il perché della "forma rilasciata").
- Inoltre, in assenza di ossigeno, la carica dell'istidina (vedi struttura) viene stabilizzata dalla carica opposta dell'acido aspartico mentre,
- in presenza di ossigeno, c'è la tendenza da parte della proteina, a perdere un protone;
- tutto ciò comporta che l'emoglobina ossigenata sia un acido più forte dell'emoglobina deossigenata: *effetto bohr*

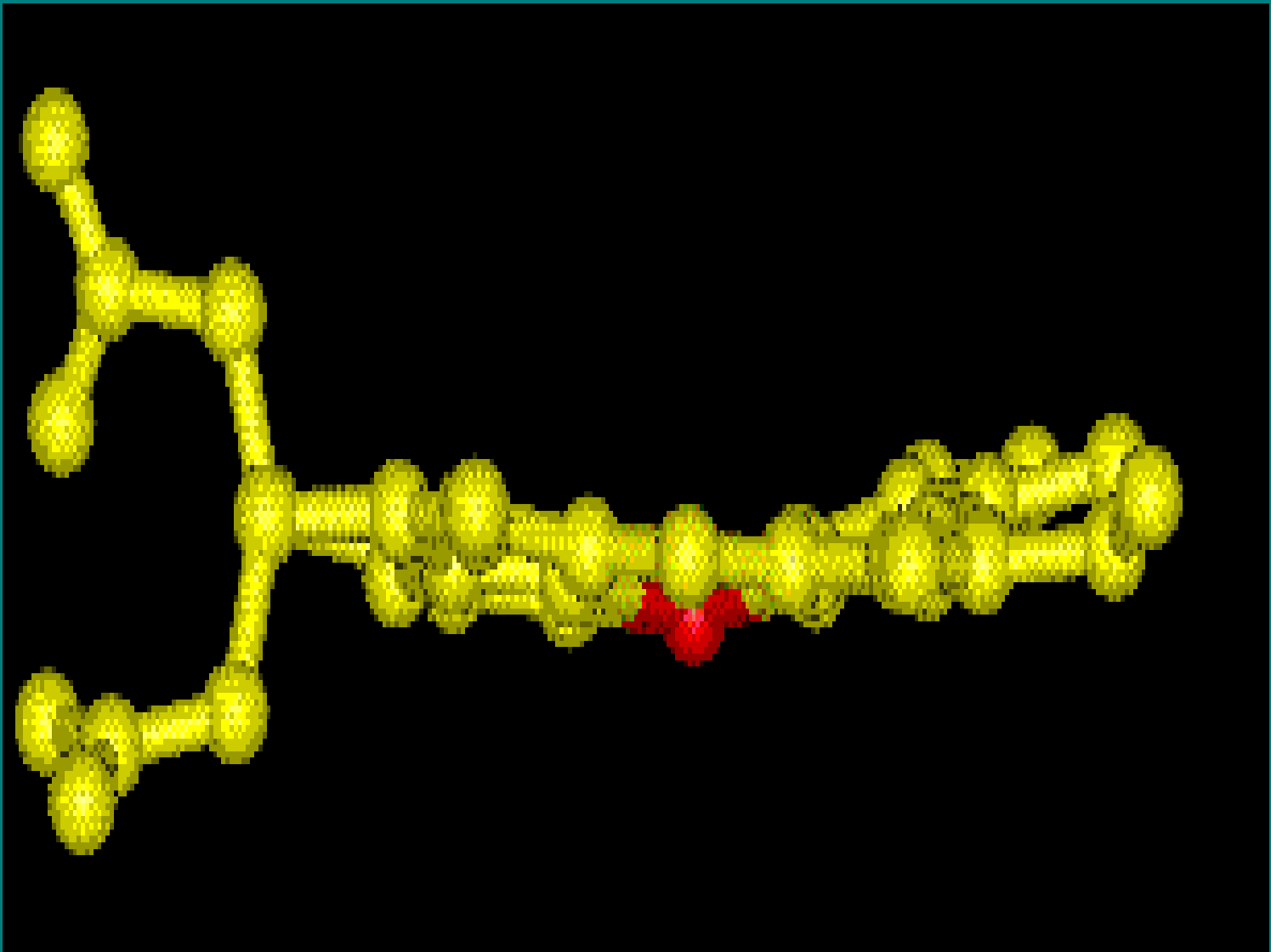
Transizione T \rightarrow R



Stato T



Stato R



Modificazioni della conformazione vicino al gruppo eme in seguito al legame dell'ossigeno

