

BIOMOLECOLE

Le sostanze che hanno un'importanza cruciale nei processi vitali sono principalmente:

- Carboidrati**
- Proteine**
- Grassi (Lipidi)**
- Acidi nucleici**

Ad esclusione dei grassi, gli altri materiali sono dei **polimeri**

- Carboidrati (monosaccaridi)**
- Proteine (amminoacidi)**
- Acidi nucleici (nucleotidi)**

Gli **acidi nucleici** contengono l'informazione genetica di ogni organismo, e controllano la sintesi delle proteine.

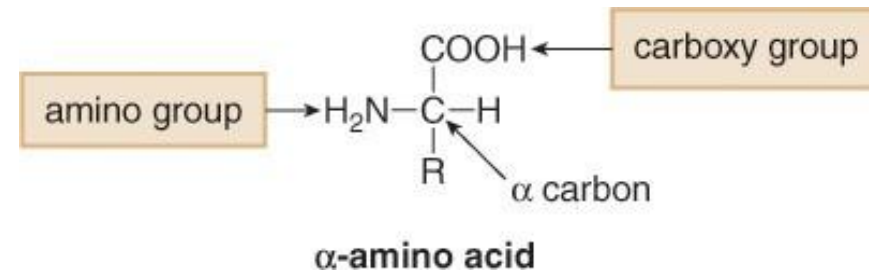
Le **proteine** hanno sia un ruolo strutturale (es. tessuto connettivo) e sia un ruolo funzionale (es. enzimi che catalizzano le reazioni biochimiche).

I **carboidrati** e i **lipidi**, oltre che avere un ruolo fondamentale nelle membrane, sono strettamente connessi con le proteine nei vitali processi di ricognizione e di trasporto.

PROTEINE

Amminoacidi....precursori di peptidi e proteine

- Gli amminoacidi contengono due gruppi funzionali: un gruppo amminico (NH_2) e un gruppo carbossilico (COOH).
- Gli amminoacidi sono i componenti base delle proteine.

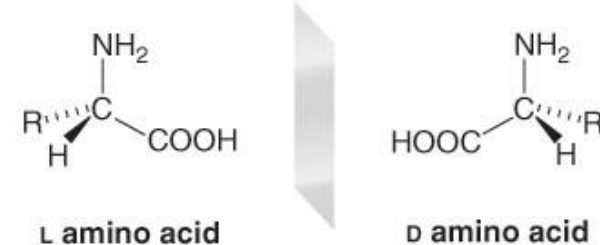


- L'amminoacido più semplice, la glicina, ha $\text{R} = \text{H}$. Quando il gruppo R è diverso da H , il carbonio α è un centro stereogenico.

Simplest amino acid, $\text{R} = \text{H}$



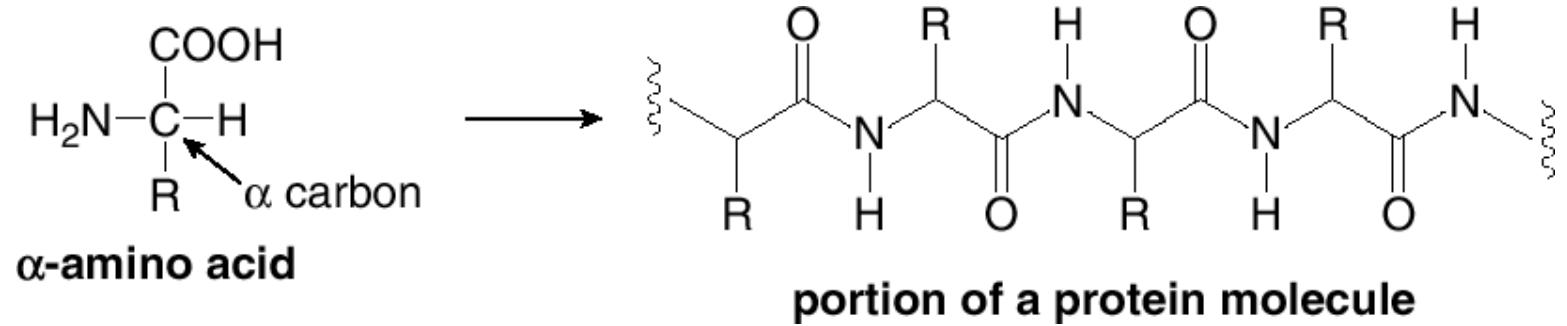
Two possible enantiomers when $\text{R} \neq \text{H}$



Only this isomer occurs in proteins.

Amminoacidi...precursori di peptidi e proteine

- Gli amminoacidi naturali hanno un gruppo amminico (NH_2) legato al carbonio α di un gruppo carbossilico (COOH), e per questo vengono chiamati α -amminoacidi.

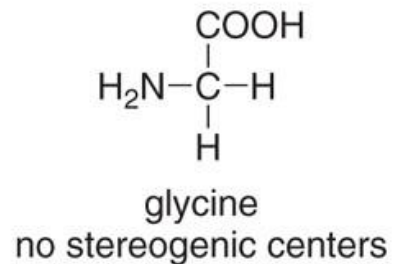


Caratteristiche generali degli α -amminoacidi

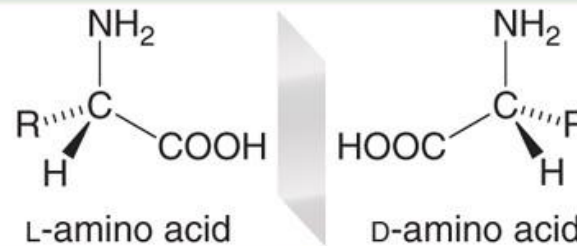
- I 20 amminoacidi naturali che sono presenti nelle proteine differiscono fra loro per la natura del gruppo R legato al carbonio α . Il gruppo R viene definito catena laterale dell'amminoacido.
- I prefissi D ed L vengono usati per attribuire la configurazione al centro stereogenico degli amminoacidi.

- **Gli amminoacidi naturali comuni vengono definiti L-amminoacidi. I loro enantiomeri, i D-amminoacidi, si trovano di raro in natura.**
- **Utilizzando la convenzione *R,S*, tutti gli L-amminoacidi hanno la configurazione *S* eccetto la cisteina.**
- **Tutti gli amminoacidi hanno nomi comuni. Questi nomi possono essere sostituiti con una abbreviazione a una lettera oppure a tre lettere.**

Simplest amino acid, R = H

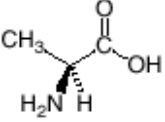
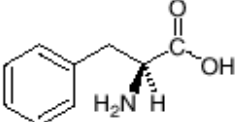
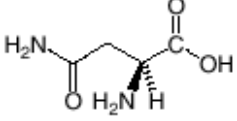
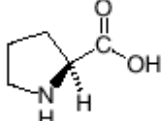
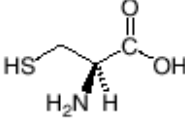
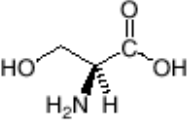
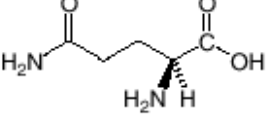
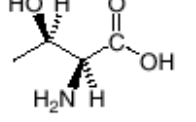
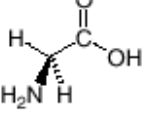
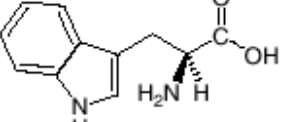
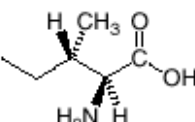
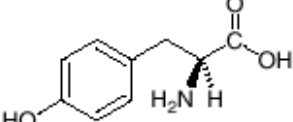
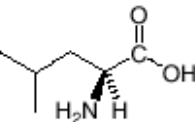
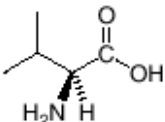
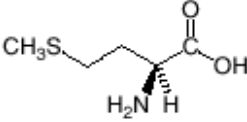


Two possible enantiomers when R ≠ H



Only this isomer occurs in proteins.

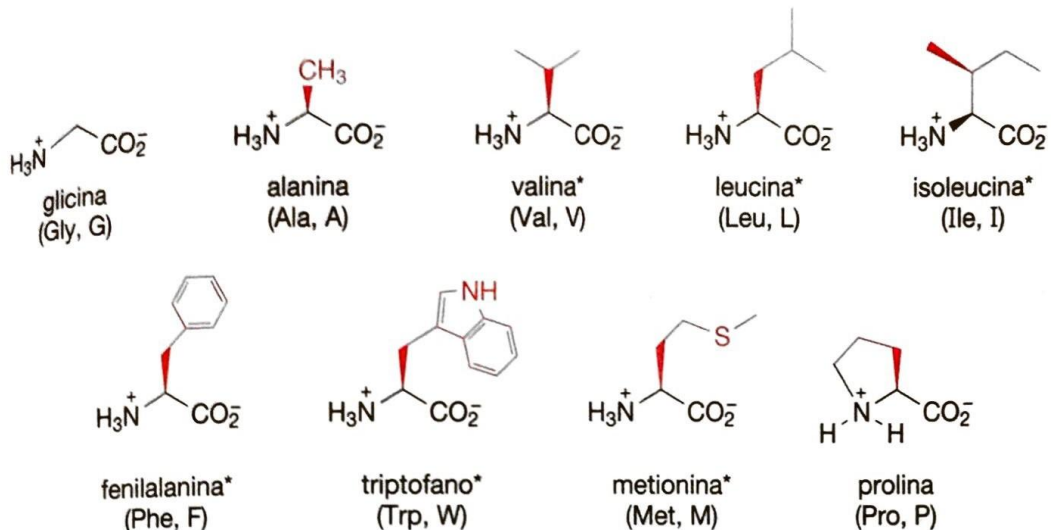
Neutral amino acids

Name	Structure	Abbreviations	Name	Structure	Abbreviations
Alanine		Ala A	Phenylalanine*		Phe F
Asparagine		Asn N	Proline		Pro P
Cysteine		Cys C	Serine		Ser S
Glutamine		Gln Q	Threonine*		Thr T
Glycine		Gly G	Tryptophan*		Trp W
Isoleucine*		Ile I	Tyrosine		Tyr Y
Leucine*		Leu L	Valine*		Val V
Methionine*		Met M			

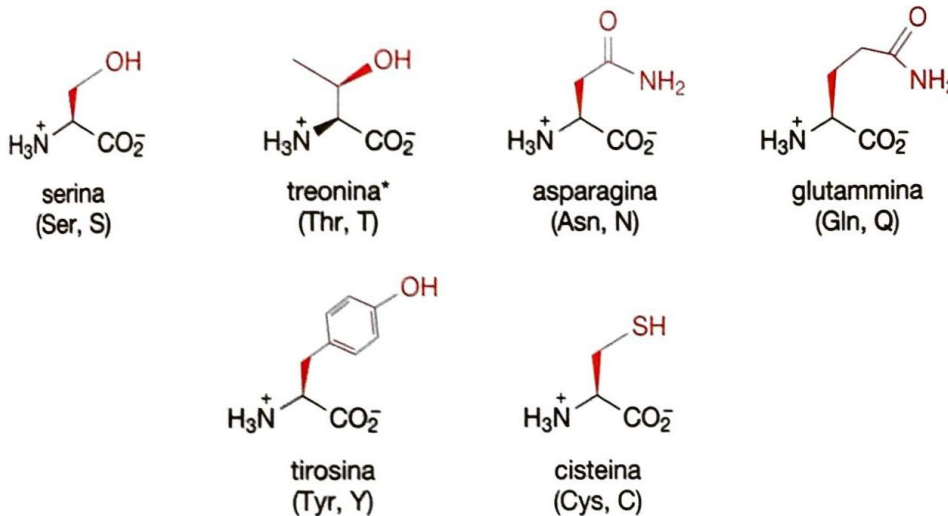
Gli aminoacidi sono classificati, sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche, in due gruppi principali: aminoacidi neutri e aminoacidi contenenti cariche.

AMMINOACIDI NEUTRI

Amminoacidi con residui neutri apolari

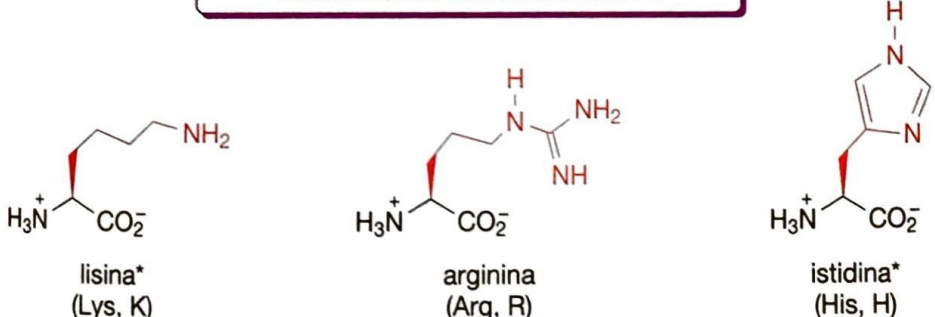


Amminoacidi con residui neutri polari

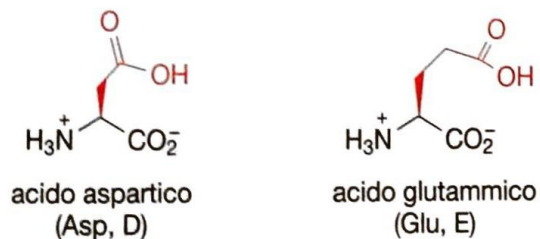


AMMINOACIDI CONTENENTI CARICHE

Amminoacidi con residui basici

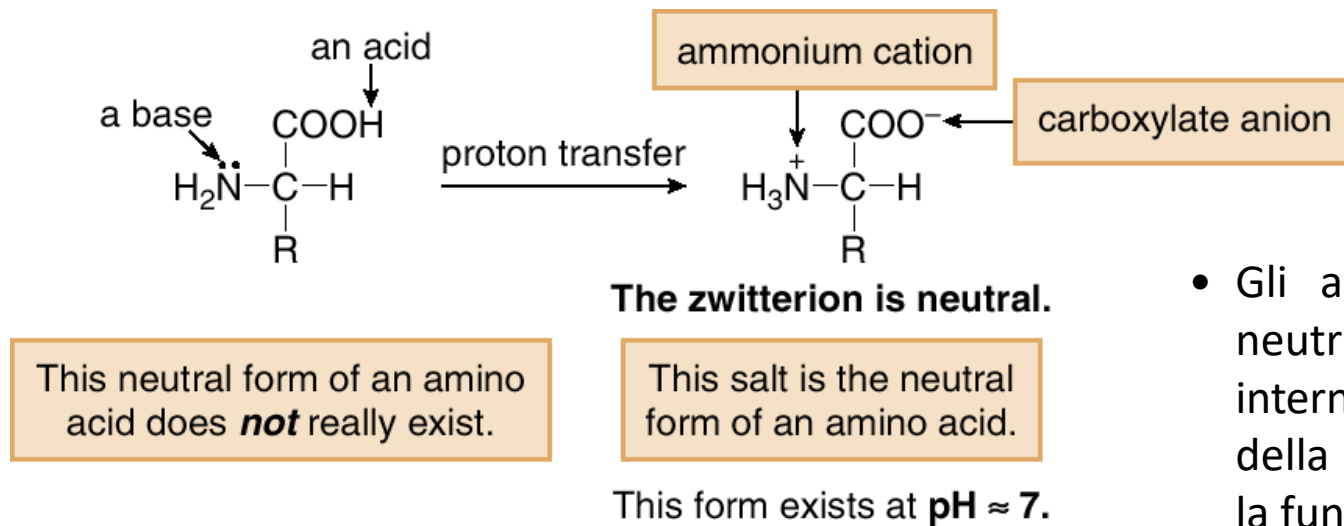


Amminoacidi con residui acidi



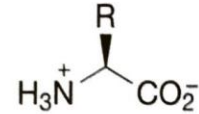
Comportamento acido-base

Poiché le funzioni carbossilica ed amminica hanno un opposto carattere acido-base, a un pH prossimo a 7 queste daranno luogo ad una struttura zwitterionica, nella quale la funzione carbossilica risulta deprotonata (e quindi carica negativamente), mentre quella amminica protonata (e quindi carica positivamente):

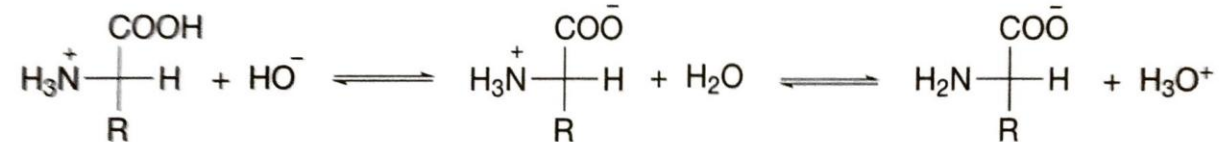


- Gli aminoacidi non sono mai composti neutri privi di carica. Esistono come sali interni o zwitterioni, come conseguenza della reazione acido-base intramolecolare tra la funzione carbossilica e quella amminica.

Allo stato solido, gli aminoacidi esistono nella struttura di ioni dipolari, caratterizzati dalla presenza di un **gruppo ammonico** (NH_3^+) e di un **gruppo carbossilato** (CO_2^-). Come tali, sono dei **sali interni** e possiedono molte delle proprietà fisiche dei sali. Hanno momenti dipolari elevati, sono generalmente solubili in acqua (a eccezione di quelli con catene laterali idrofobiche) e sono sostanze cristalline con alti punti di fusione.



In soluzione acquosa, la forma zwitterionica reagisce con l'acqua portando alla formazione della specie cationica e di quella anionica secondo i seguenti equilibri simultanei:

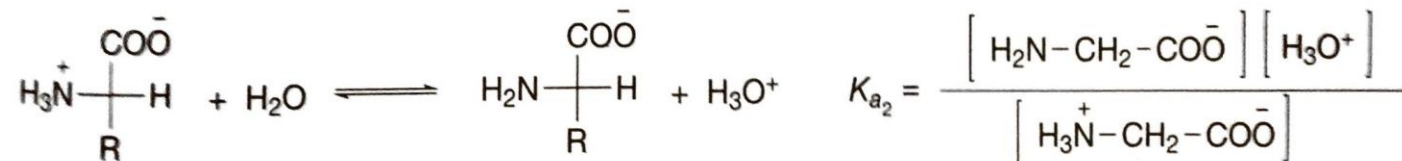
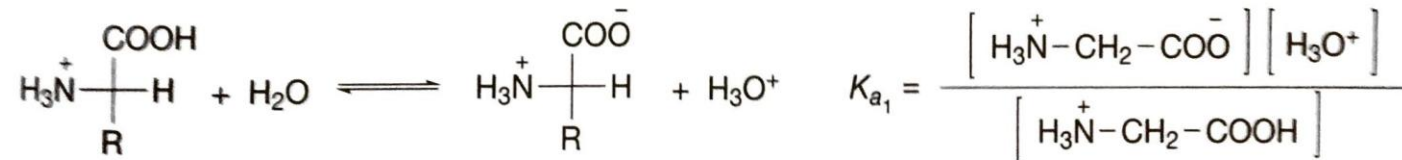


forma cationica

forma zwitterionica

forma anionica

Ciò è dovuto al fatto che ogni aminoacido possiede due siti acidi, caratterizzati da due costanti di dissociazione K_{a_1} e K_{a_2} (costante coniugata del gruppo amminico).



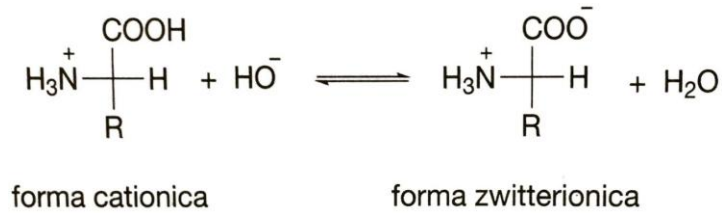
CURVA DI TOLAZIONE DELLA GLICINA

- pH=0, prevale la forma cationica della glicina:



- L'aggiunta di NaOH determina la reazione riportata di seguito, con conseguente formazione della soluzione tampone: $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}/^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$

Dopo aggiunta della metà degli equivalenti di NaOH, il valore del pH è uguale al pK_{a1} (2,34).



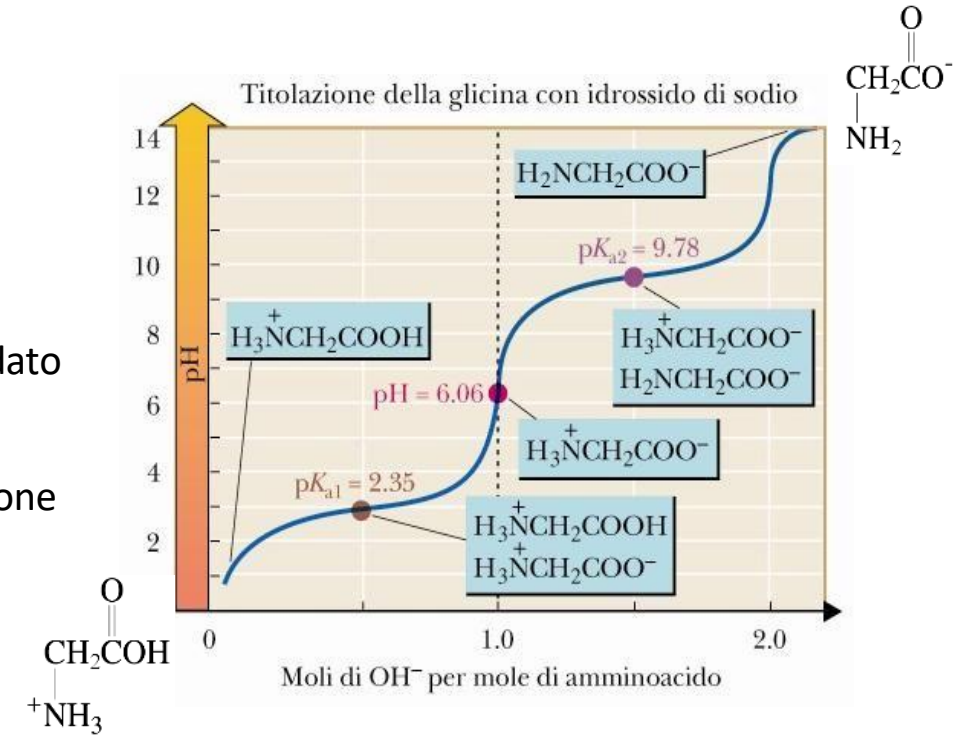
- All'equivalenza, tutto l'aminoacido si trova nella forma ionica dipolare: il pH è dato dalla formula $\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2}/2 = 5,97$

- L'ulteriore aggiunta di NaOH determina la formazione della seconda soluzione tampone: $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-/\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$

Dopo aggiunta di 1,5 equivalenti di NaOH, il valore del pH è uguale al pK_{a2} (9.60)



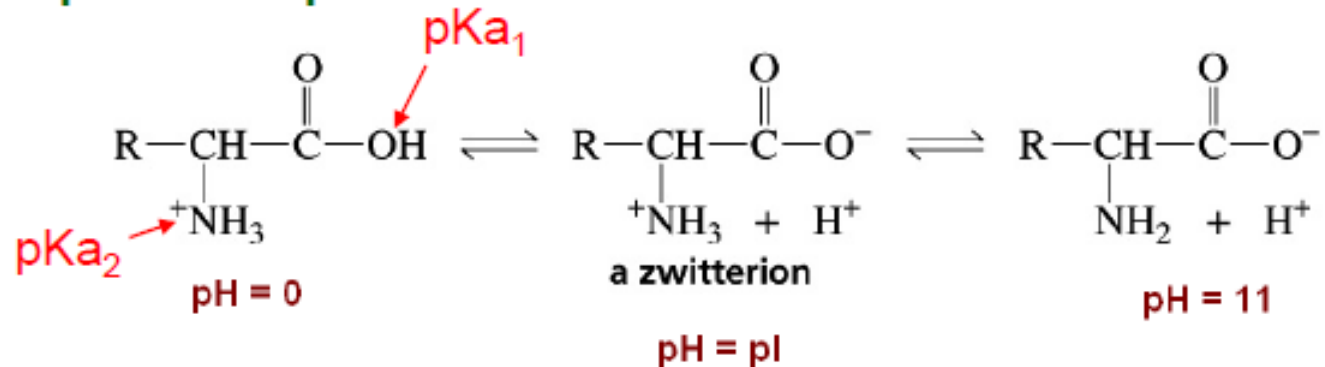
- A pH > 13 prevale la forma anionica della glicina: $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$



Punto isoelettrico

Poichè un amminoacido protonato ha almeno due protoni differenti rimuovibili, è riportato il valore di pK_a per ciascuno di questi protoni.

Lo stato di carica nel quale l'amminoacido si trova in acqua dipende dal pH:



Il pH che determina l'assenza di carica netta su un amminoacido è detto punto isoelettrico (pI) di quell'amminoacido. Questo può essere facilmente calcolato con la seguente equazione:

$$\text{pI} = (\text{pKa}_1 + \text{pKa}_2)/2$$

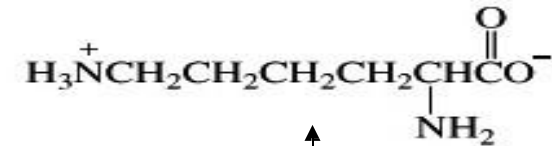
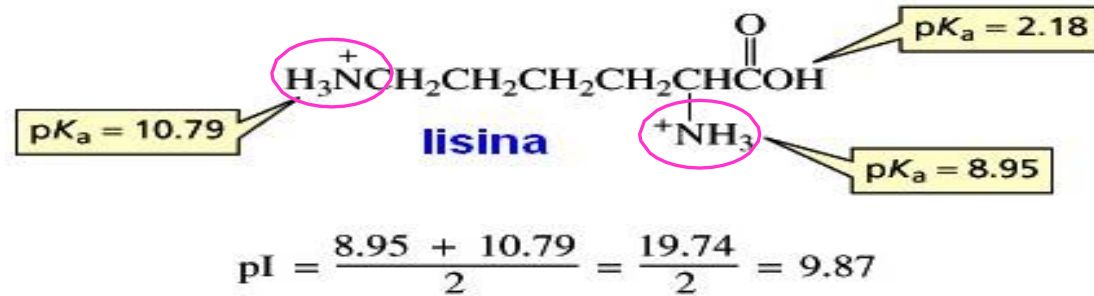
I valori dei pK_a per i gruppi ionizzabili degli amminoacidi

Amminoacido	pK_a di α -COOH	pK_a di α -NH ₃ ⁺	pK_a della catena laterale	Punto isolettrico (pI)
Acido aspartico	2.10	9.82	3.86	2.98
Acido glutammico	2.10	9.47	4.07	3.08
Alanina	2.35	9.87	–	6.11
Arginina	2.01	9.04	12.48	10.76
Asparagina	2.02	8.80	–	5.41
Cisteina	2.05	10.25	8.00	5.02
Fenilalanina	2.58	9.24	–	5.91
Glicina	2.35	9.78	–	6.06
Glutammina	2.17	9.13	–	5.65
Isoleucina	2.32	9.76	–	6.04
Istidina	1.77	9.18	6.10	7.64
Leucina	2.33	9.74	–	6.04
Lisina	2.18	8.95	10.53	9.74
Metionina	2.28	9.21	–	5.74
Prolina	2.00	10.60	–	6.30
Serina	2.21	9.15	–	5.68
Tirosina	2.20	9.11	10.07	5.63
Treonina	2.09	9.10	–	5.60
Triptofano	2.38	9.39	–	5.88
Valina	2.29	9.72	–	6.00

Il **pI** di un amminoacido che ha **gruppi ionizzabili sulla catena laterale** è ottenuto come **valore medio dei pKa dei due gruppi** che, **nella rispettiva forma protonata, sono entrambi o neutri o carichi positivamente**. Fa eccezione a questa regola il caso dell'amminoacido tirosina, per il quale il pI è calcolato come media dei pKa dei gruppi $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_3^+$

esempio

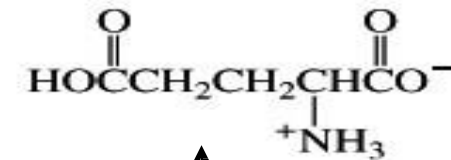
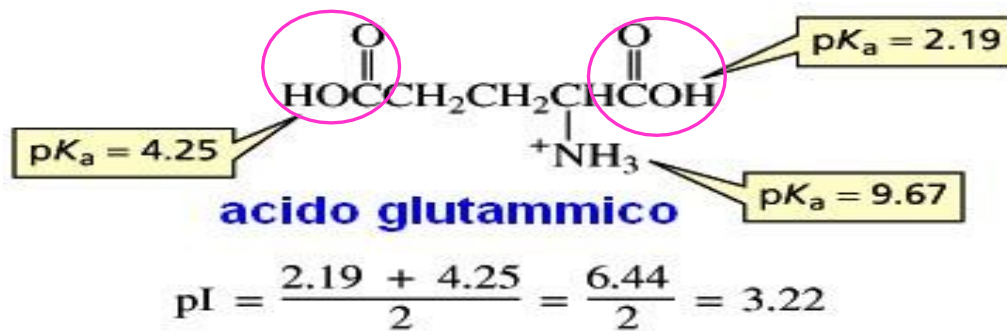
Gruppi da scegliere per la media dei **pKa**



al **pI**

pH = 9.87

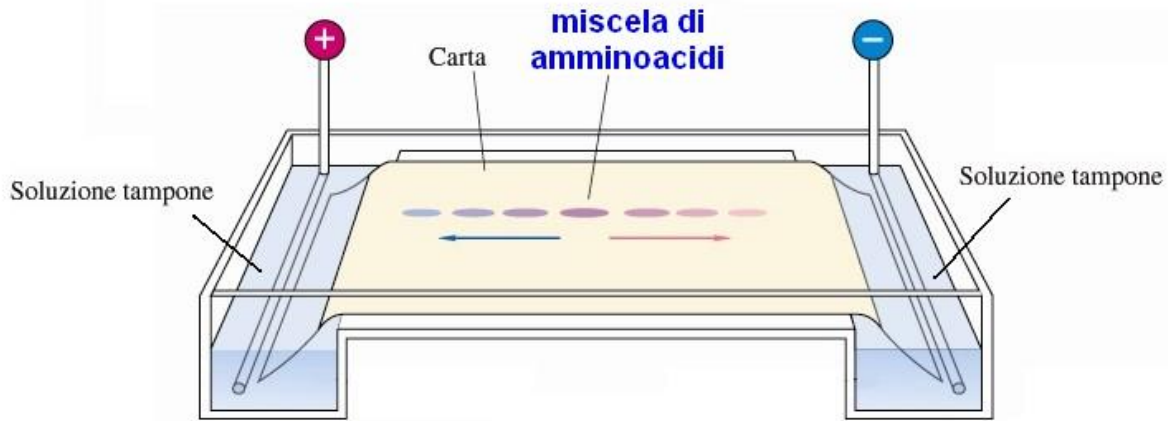
esempio



al **pI**

pH = 3.22

apparato per elettroforesi

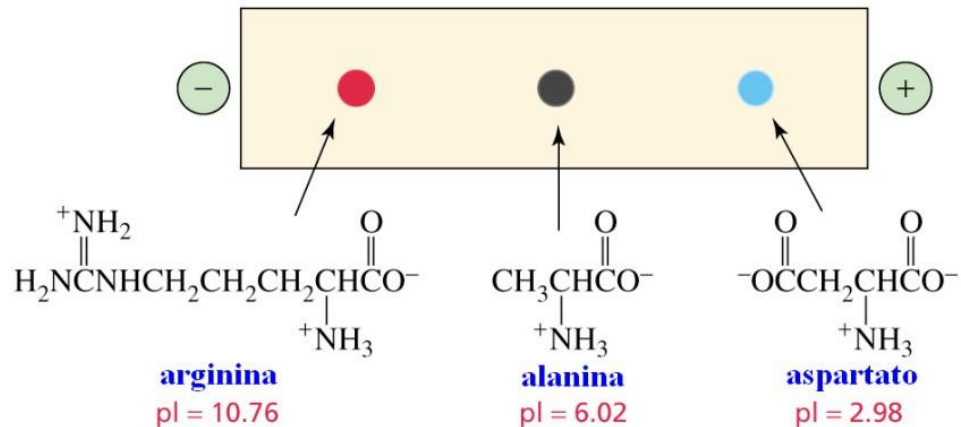


gli amminoacidi con carica negativa si muovono verso l'elettrodo positivo

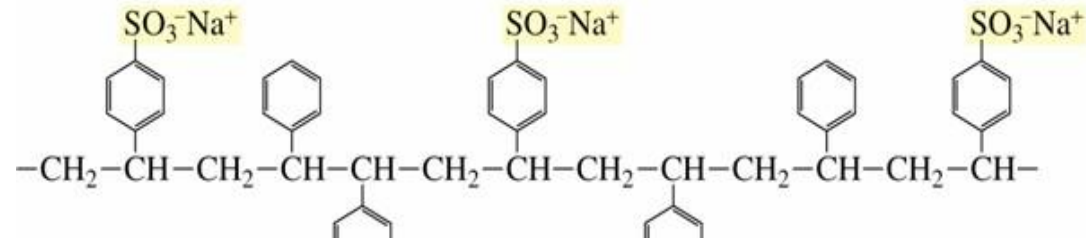
gli amminoacidi senza carica rimangono all'origine

gli amminoacidi con carica positiva si muovono verso l'elettrodo negativo

Il diverso stato di carica assunto dai vari amminoacidi ad un fissato pH può essere sfruttato per separarli, facendoli “migrare” sotto l’effetto di un campo elettrico. La tecnica basata su questo principio è nota col termine di **elettroforesi**



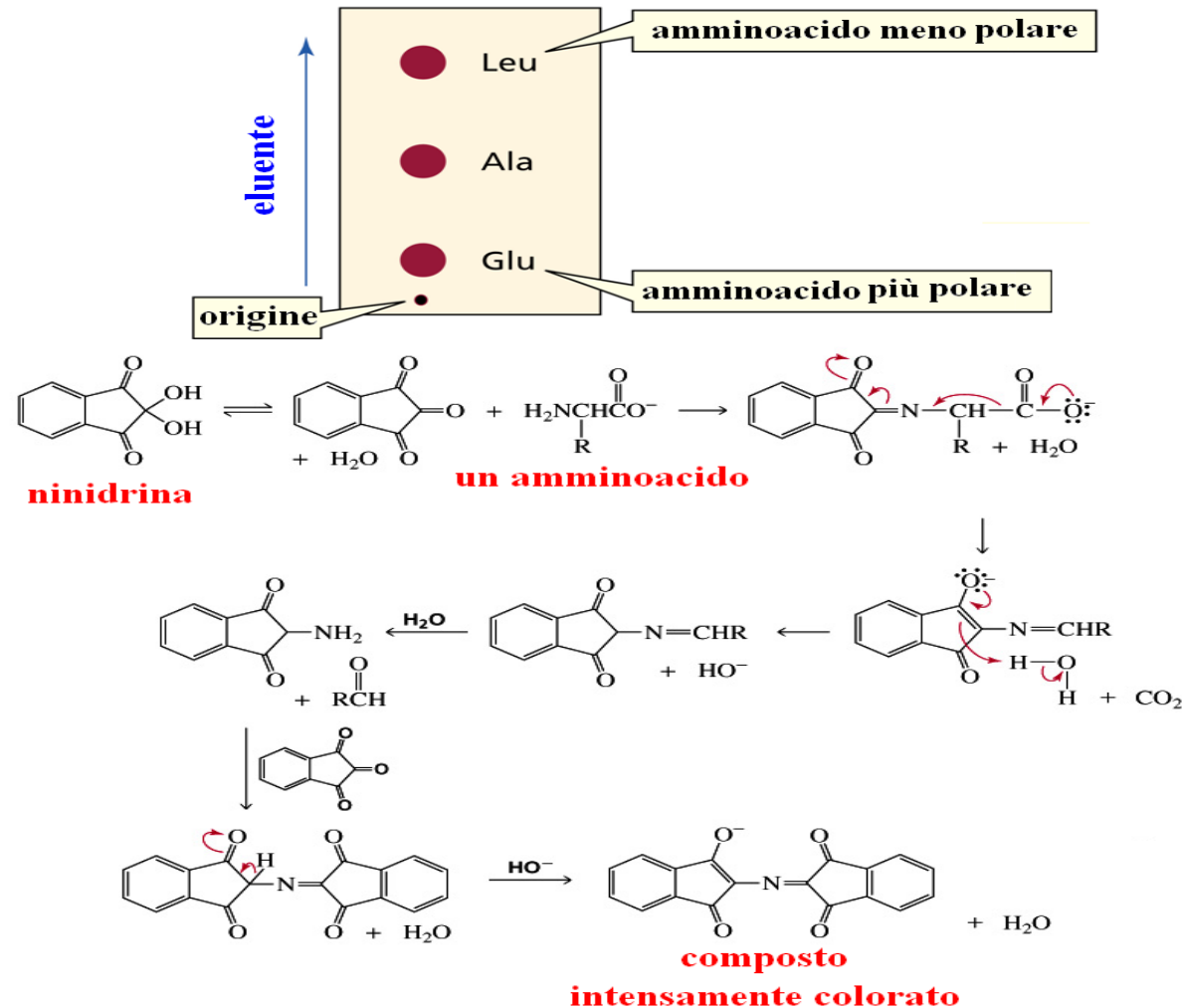
In alternativa la **separazione** può essere ottenuta con **tecniche cromatografiche che sfruttano l'uso di fasi stazionarie a scambio ionico** (anioniche, scambiatrici di cationi):



A pH molto basso (3,25) gli a.a. contenenti residui acidi sono poco trattenuti, quelli con residui privi di siti protonabili sono mediamente trattenuti, mentre quelli con residui basici sono fortemente trattenuti. L'ordine di eluizione può essere modulato agguistando opportunamente il pH dell'eluente

Cromatografia su strato sottile

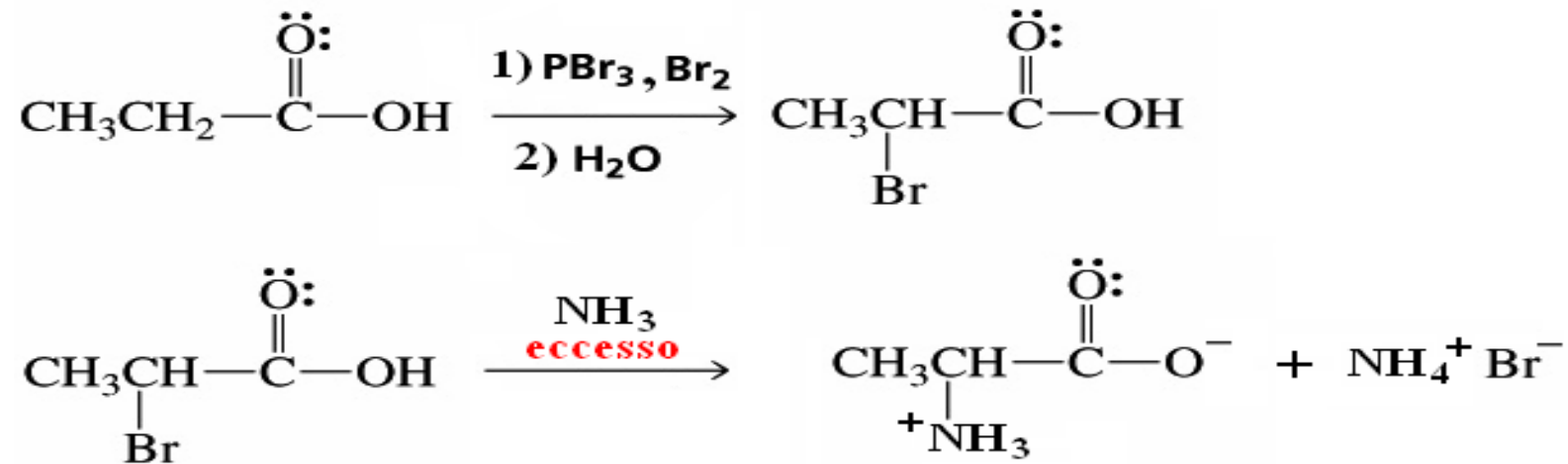
Gli amminoacidi non hanno colorazione. Per renderli visibili dopo la loro separazione su lastrina si utilizza la ninidrina, un reattivo che, reagendo con essi, forma un composto intensamente colorato:



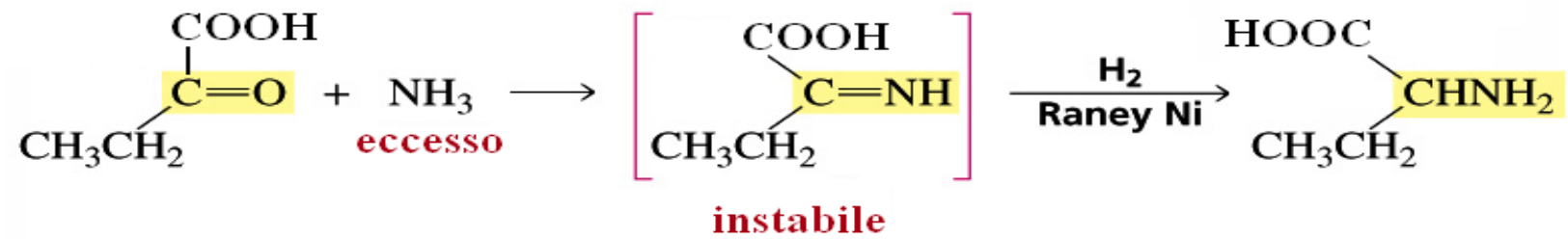
Sintesi di amminoacidi

Applicazione della reazione di **Hell-Volhard-Zelinski**

Gli amminoacidi possono essere preparati dagli acidi carbossilici attraverso la loro conversione negli α -*bromoacidi*, attraverso la **bromurazione** di Hell-Volhard-Zelinski, e la successiva reazione di **amminazione**.

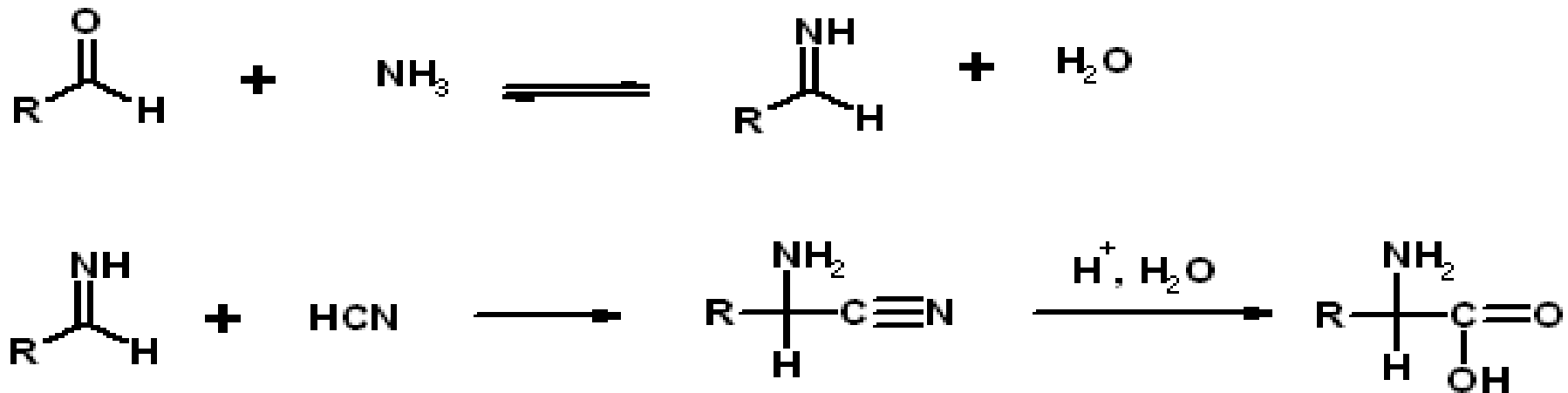


Amminazione riduttiva di α -chetoacidi



Sintesi di Strecker

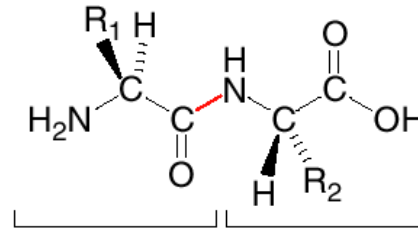
Una procedura di sintesi degli amminoacidi, che ha anche importanza storica, è la sintesi di **Stecker**. Il composto di partenza è un'aldeide, che viene fatta reagire contemporaneamente con *ammoniaca* e *acido cianidrico*. L'aldeide, in presenza di ammoniaca, è in equilibrio con la corrispondente immina, la quale aggiunge acido cianidrico in modo analogo ad aldeidi e chetoni. Il risultato è l'ottenimento di un α -amminonitrile che, per idrolisi acida, genera l' α -amminoacido in forma racemica.



I peptidi

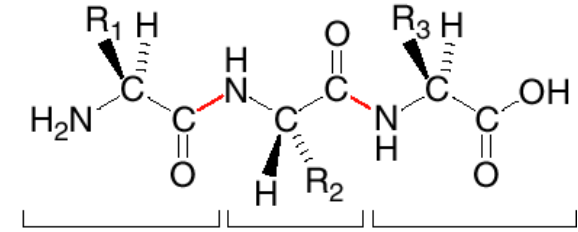
- Quando gli aminoacidi sono legati insieme con legami ammidici, formano molecole più grandi chiamate peptidi e proteine.
- Il termine proteina è di solito riservato per polimeri di più di 40 aminoacidi.

Dipeptide



Two amino acids joined together.

Tripeptide



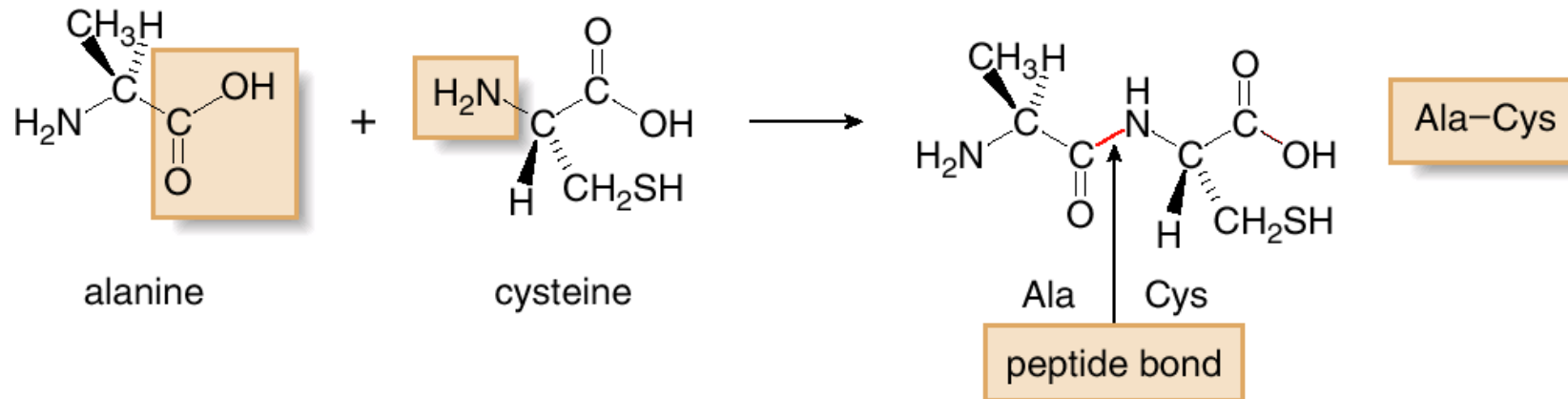
Three amino acids joined together.

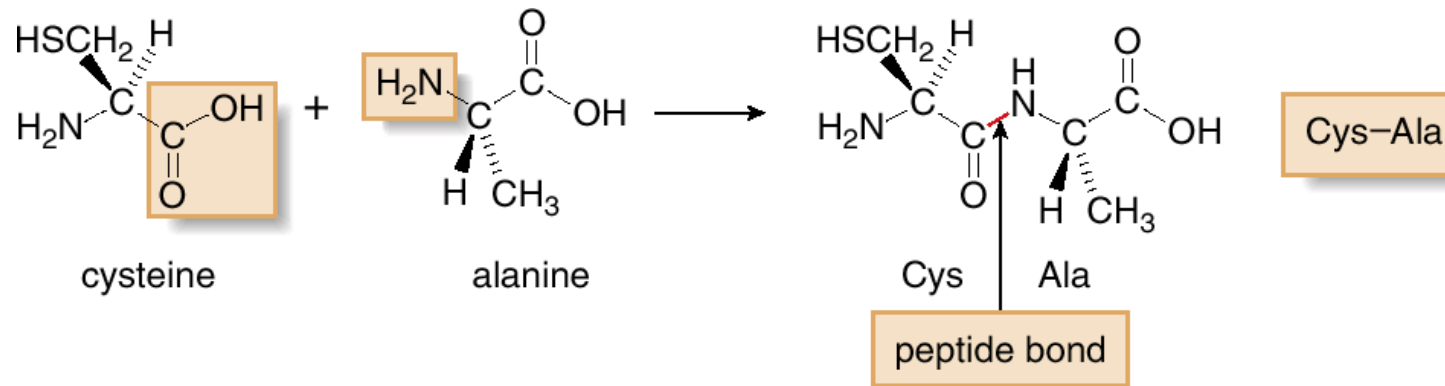
[Amide bonds are drawn in red.]

Peptidi semplici

- Per formare un dipeptide, il gruppo amminico di un aminoacido forma un legame ammidico con il gruppo carbossilico di un altro aminoacido. Poiché ciascun aminoacido ha sia un gruppo amminico che uno carbossilico, si possono formare due diversi peptidi.

Il gruppo COOH dell'alanina può reagire con il gruppo NH₂ della cisteina.



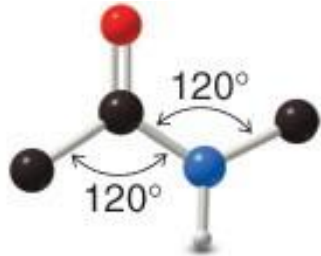


- The amino acid with the free amino group is called the *N-terminal amino acid*.
- The amino acid with the free carboxy group is called the *C-terminal amino acid*.

- **Notare che, per convenzione, l'amminoacido N-terminale viene sempre scritto all'estremità di sinistra della catena e l'amminoacido C-terminale all'estremità destra.**
- **Il peptide può essere abbreviato scrivendo i simboli ad una o tre lettere per gli amminoacidi della catena partendo dall'estremità N-terminale verso quella C-terminale.**

Il legame peptidico

Il carbonio carbonilico di un'amide è ibrido sp^2 e presenta una geometria trigonale planare. Le ammidi sono più stabilizzate per risonanza rispetto agli altri composti acilici, quindi la struttura di risonanza che contiene il legame C=N dà un contributo significativo all'ibrido.



These six atoms lie in a plane.

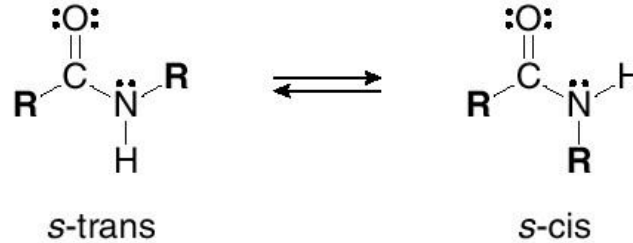


two resonance structures for the peptide bond

- conseguenza della stabilizzazione per risonanza è che tutti i sei atomi coinvolti nel legame peptidico giacciono sullo stesso piano.
- Tutti gli angoli sono $\sim 120^\circ$ ed i legami C=O e N—H sono orientati a 180° l'uno rispetto all'altro.

La stabilizzazione per risonanza ha conseguenze significative. La rotazione attorno al legame C—N è limitata a causa del suo parziale carattere di doppio legame. Di conseguenza, ci sono due possibili conformazioni.

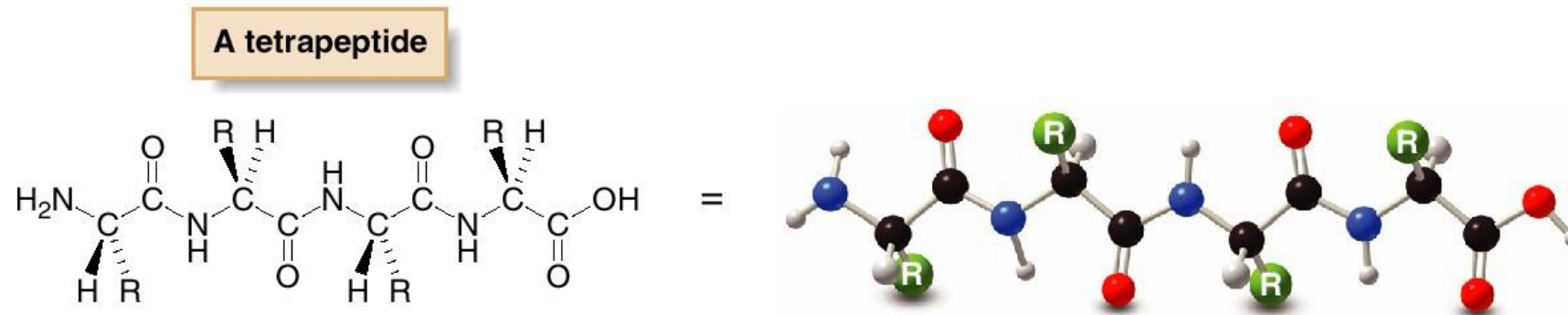
Two conformations of the peptide bond



- The *s-trans* conformation has the two R groups oriented on *opposite* sides of the C—N bond.
- The *s-cis* conformation has the two R groups oriented on the *same* side of the C—N bond.
- The *s-trans* conformation of a peptide bond is typically more stable than the *s-cis*, because the *s-trans* has the two bulky R groups located farther from each other.

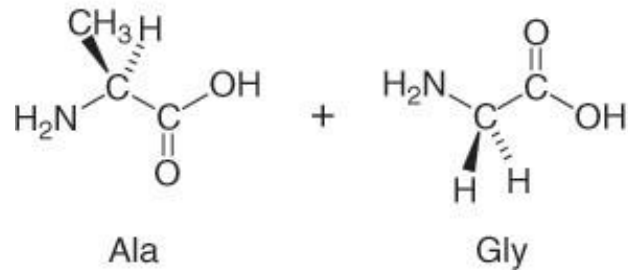
- **La struttura di un tetrapeptide illustra questi effetti in una lunga catena peptidica.**

- The s-trans arrangement makes a long chain with a zigzag arrangement.
- In each peptide bond, the N–H and C=O bonds lie parallel and at 180° with respect to each other.

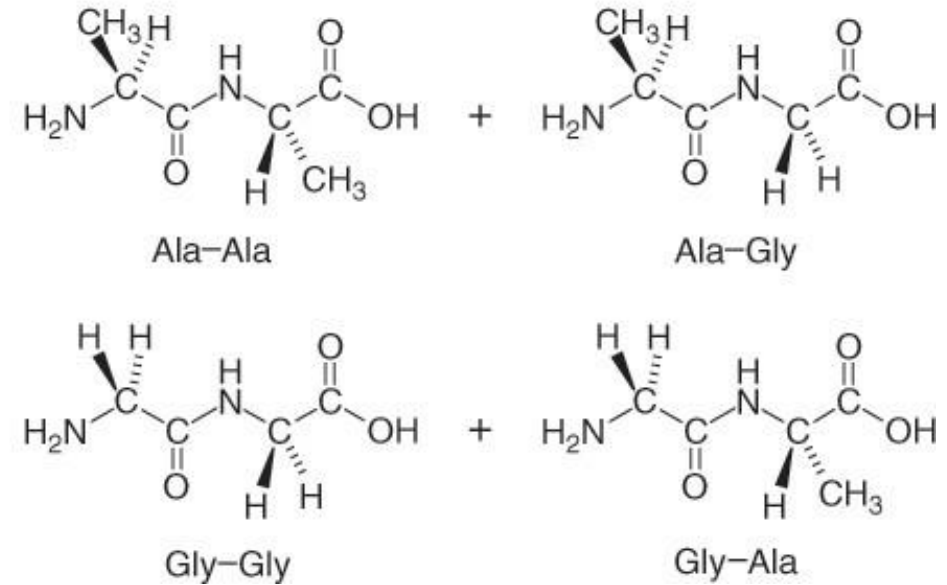


Sintesi dei peptidi

From two amino acids...



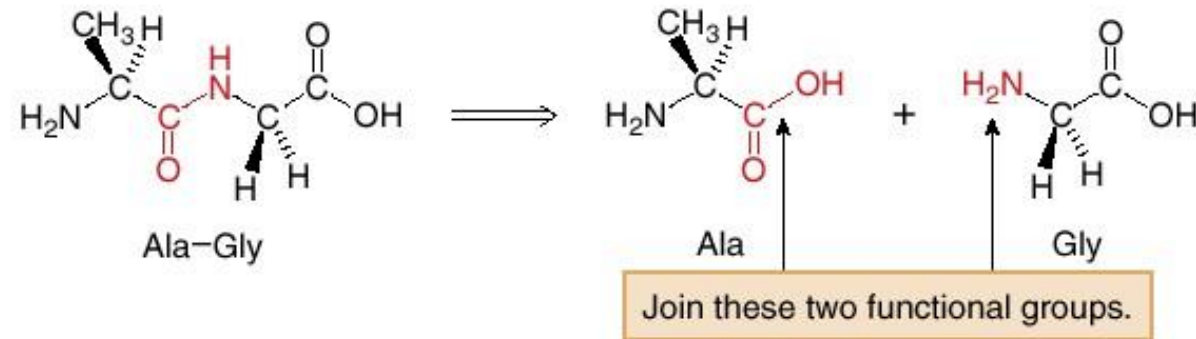
...there are four possible dipeptides.



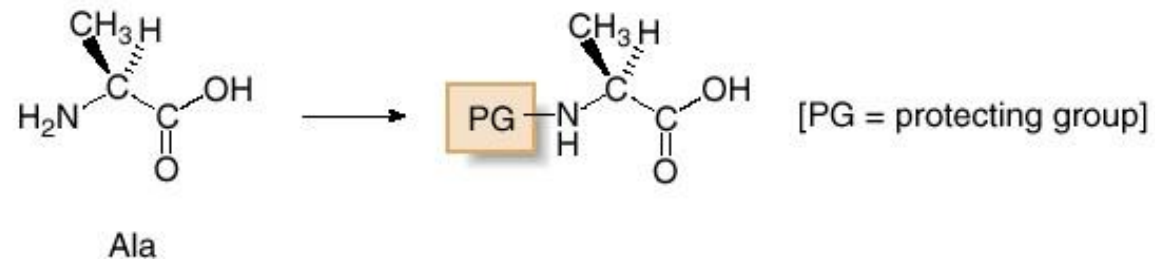
- La sintesi di un determinato dipeptide come Ala-Gly a partire da alanina e glicina è complicato dal fatto che entrambi gli amminoacidi hanno due gruppi funzionali. Di conseguenza, è possibile ottenere quattro prodotti—cioè, Ala-Ala, Ala-Gly, Gly-Gly e Gly-Ala.

- Per sintetizzare i peptidi, è importante proteggere i gruppi funzionali che non vogliamo che reagiscano, e poi formare il legame ammidico.

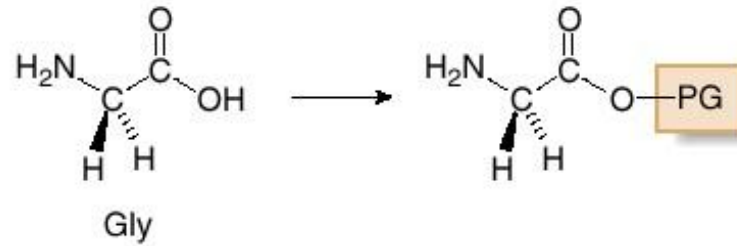
Example



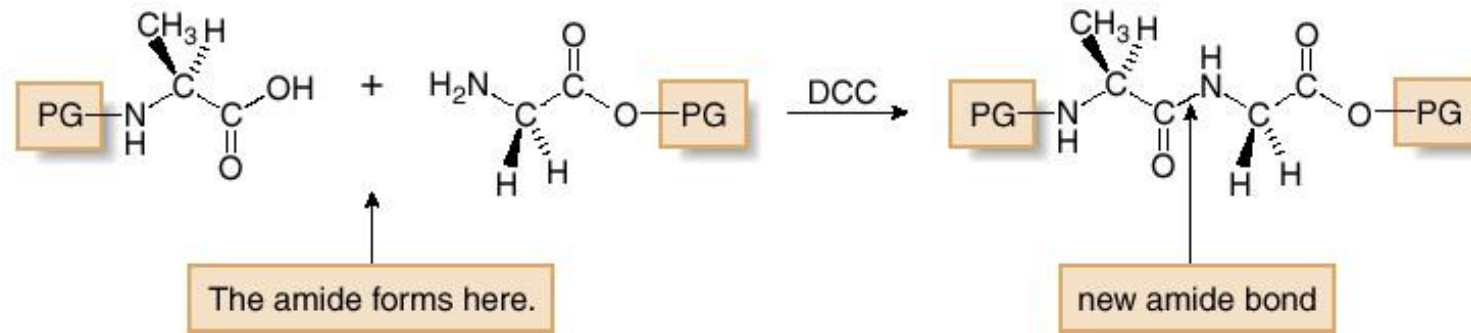
Step [1] Protect the NH_2 group of alanine.



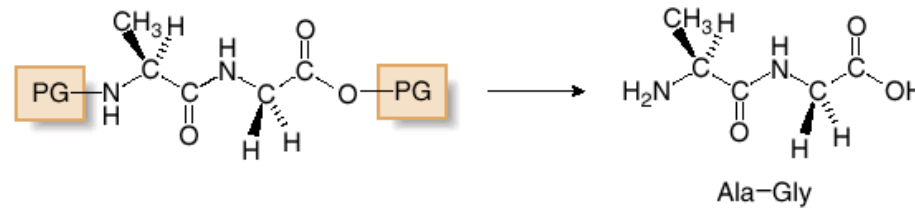
Step [2] Protect the COOH group of glycine.



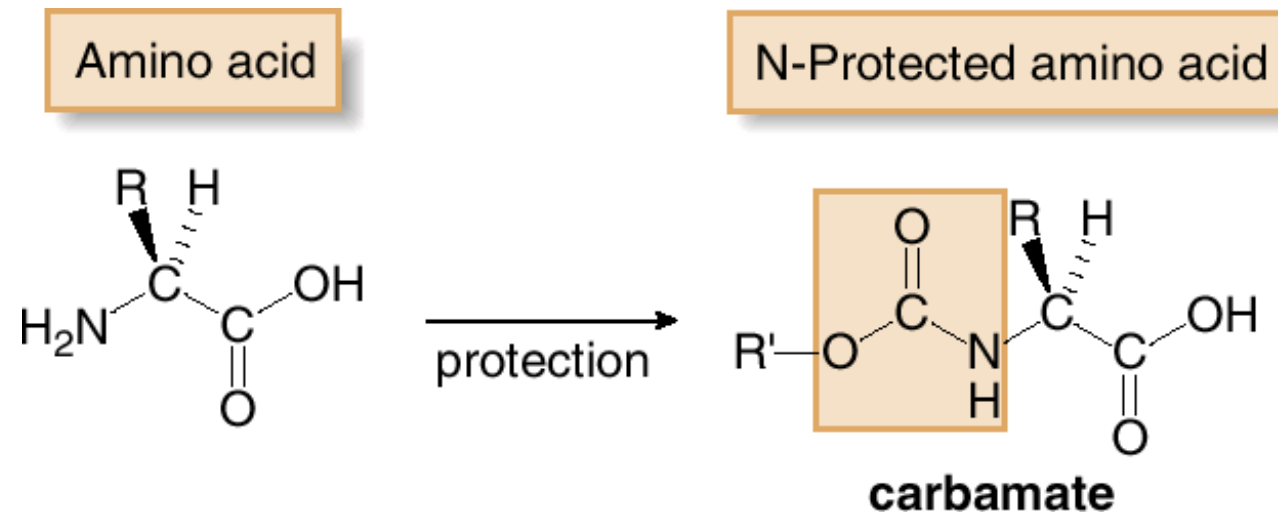
Step [3] Form the amide bond with DCC.



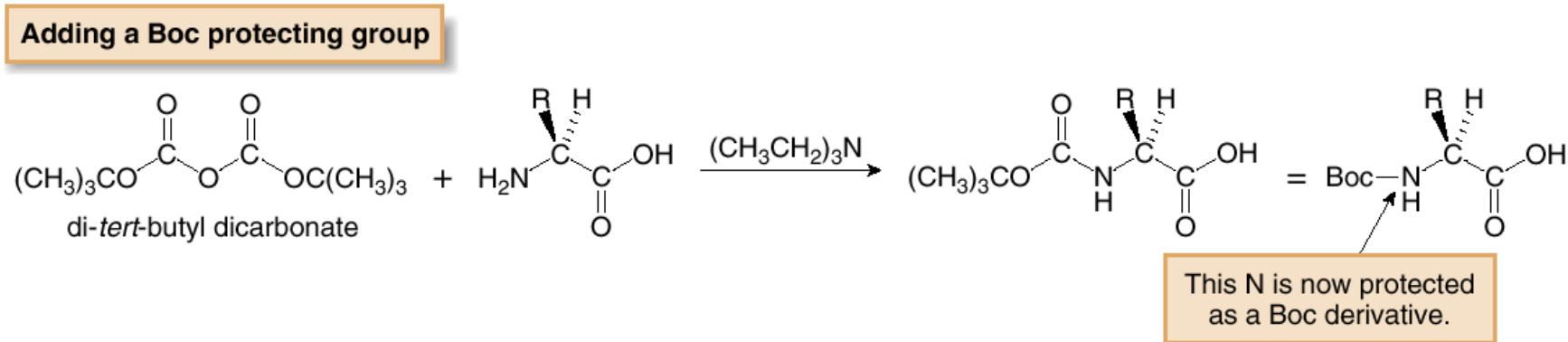
Step [4] Remove one or both protecting groups.



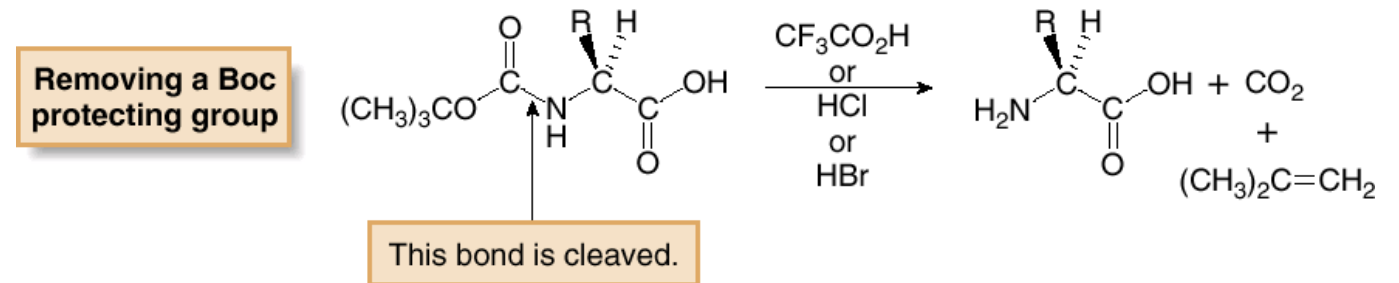
- Un gruppo protettore largamente usato è capace di convertire un'ammina in un carbammato, un gruppo funzionale che presenta un carbonile legato ad un atomo di ossigeno ed uno di azoto.
- Poiché l'atomo di N del carbammato è legato ad un gruppo carbonilico, l'ammino gruppo protetto non è più nucleofilo.



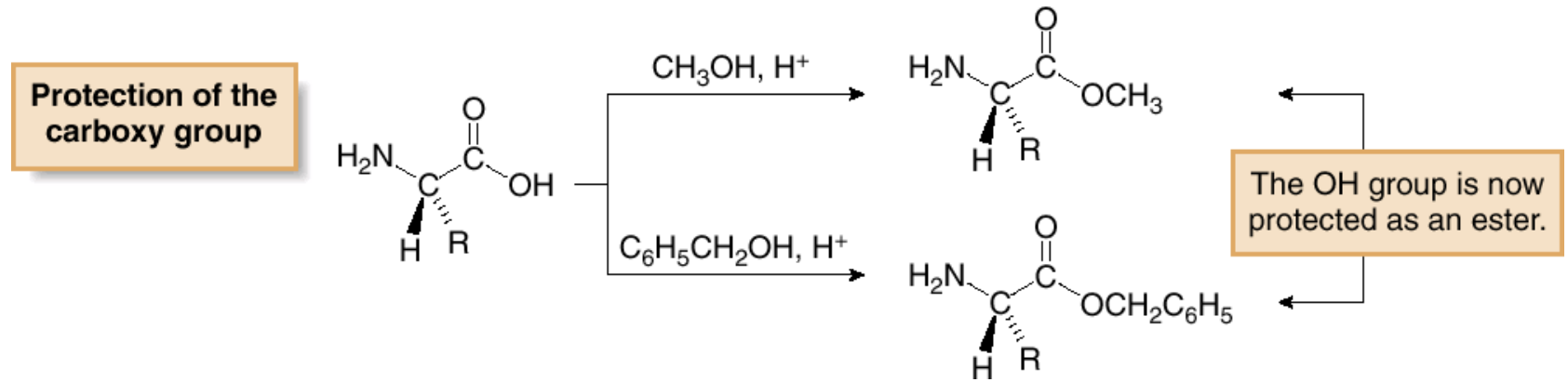
Esempio: il **gruppo protettore *t*-butossicarbonile**, abbreviato come **Boc**, si forma per reazione dell' amminoacido con di-*t*-butil dicarbonato mediante una reazione di sostituzione nucleofila acilica.



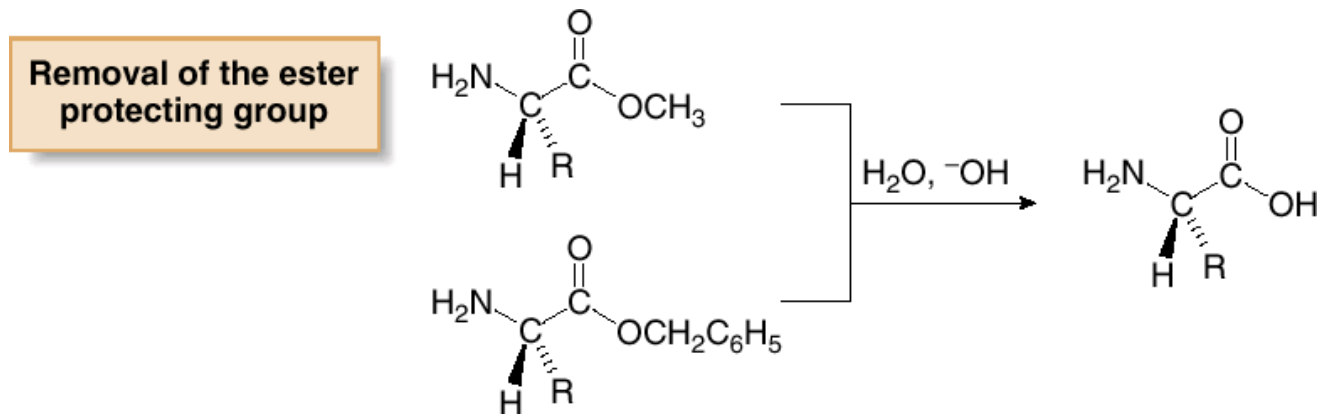
- Per essere un gruppo protettore utile, il gruppo **Boc** deve essere rimosso in condizioni che non disturbino gli altri gruppi funzionali della molecola. Può essere rimosso con un acido come l'acido trifluoroacetico, HCl o HBr.



- Il gruppo carbossilico viene generalmente protetto come estere metilico o benzilico per reazione con un alcol ed un acido.

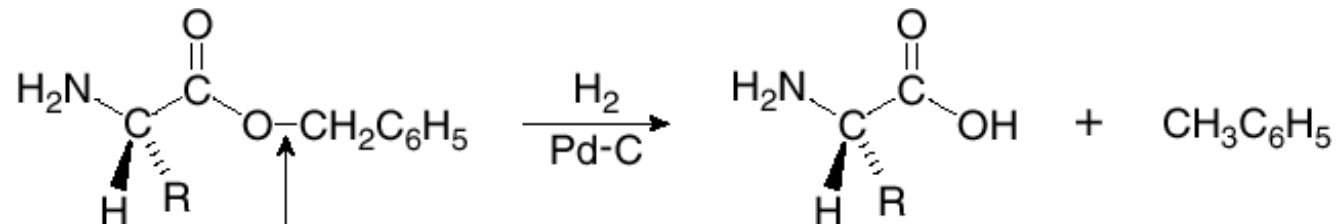


- Questi esteri sono di solito rimossi per idrolisi in basi acquose.



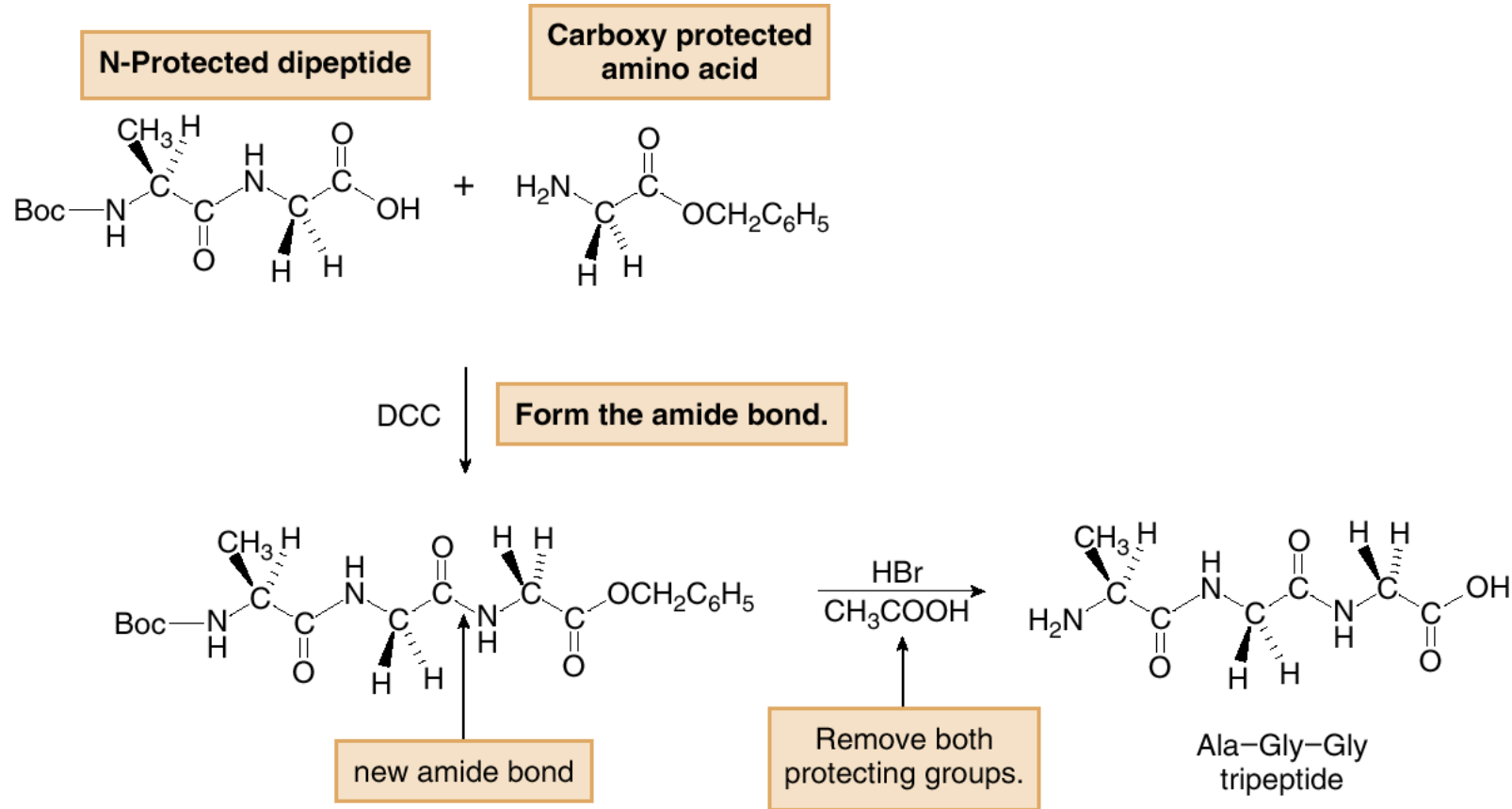
- Un vantaggio nell'utilizzo dell'estere benzilico nella protezione risiede nel fatto che può essere rimosso anche da H₂ in presenza di Pd come catalizzatore.
- Questo processo è chiamato idrogenolisi.
- Le condizioni di idrogenolisi sono particolarmente blande perché evitano l'uso di acidi e di basi.
- Gli esteri benzilici possono anche essere rimossi con HBr in acido acetico.

Hydrogenolysis of benzyl esters

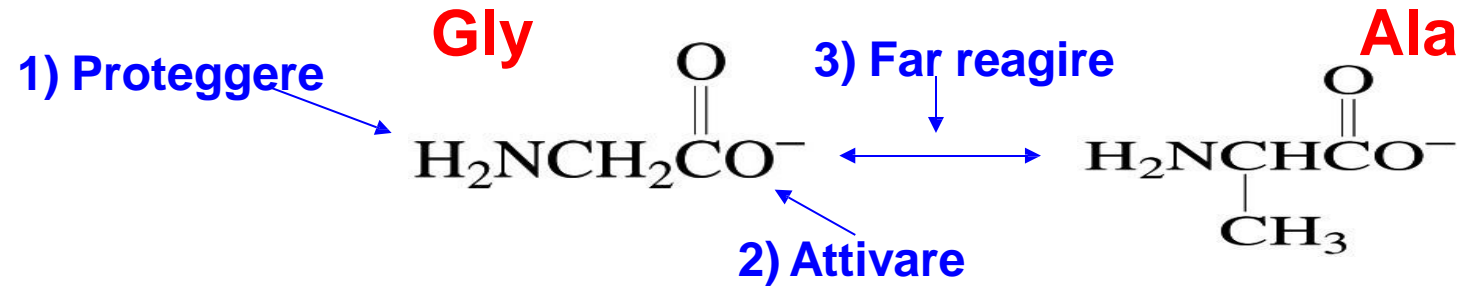


This bond is cleaved.

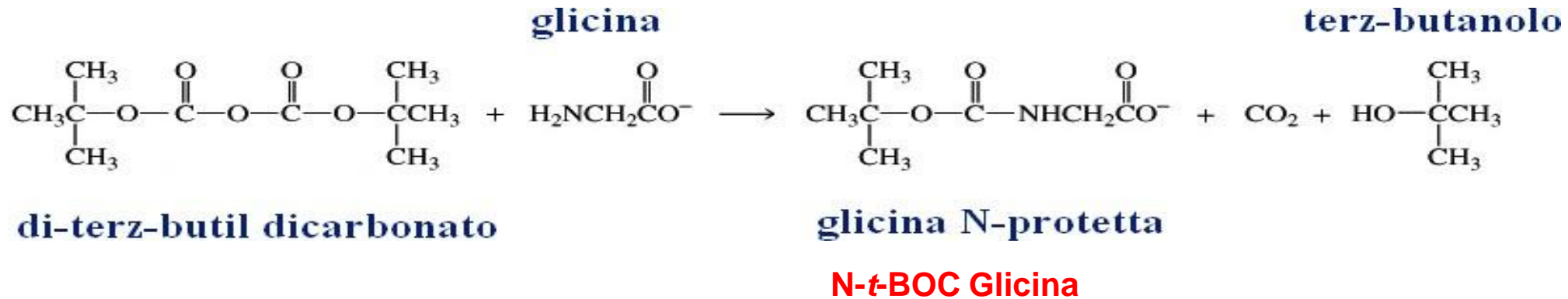
- Questo metodo può essere applicato alla sintesi di tripeptidi e anche di polipeptidi più grandi.



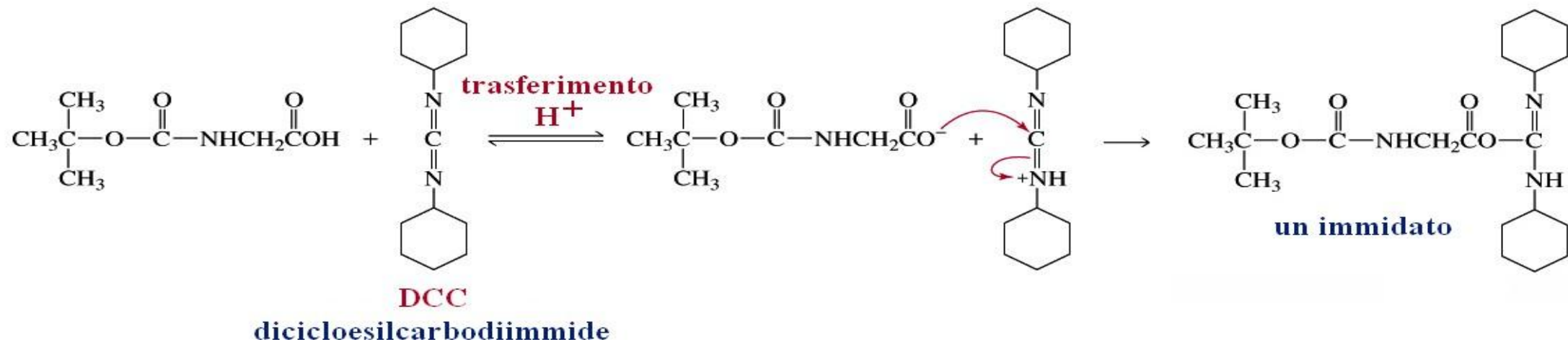
Volendo preparare la Gly-Ala dovremo:



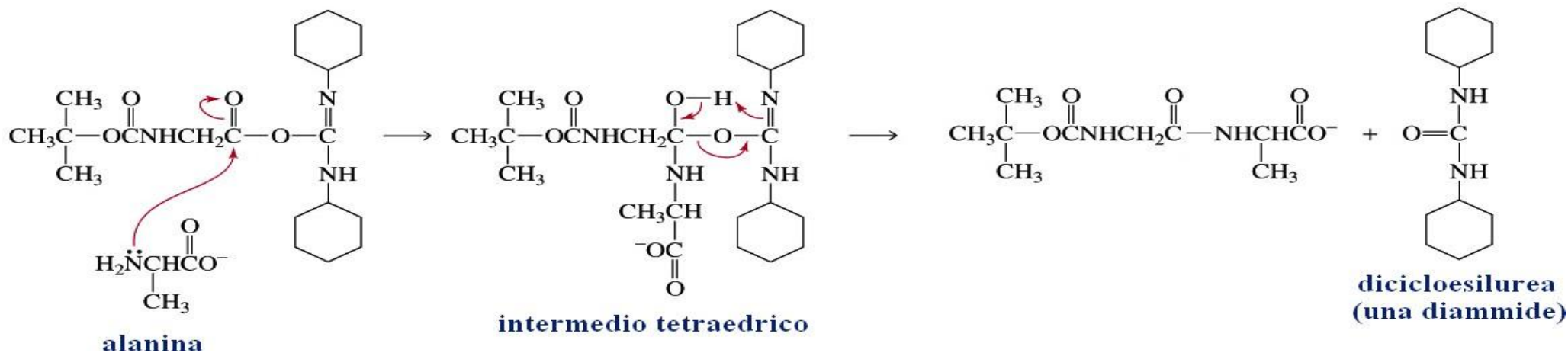
1) Proteggere il gruppo amminico della glicina



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)

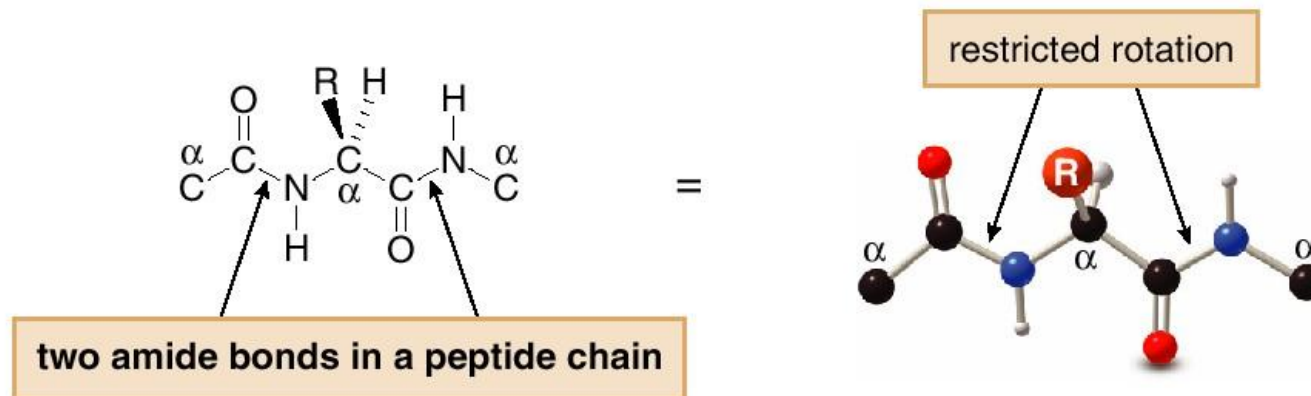


La struttura delle proteine

Struttura primaria

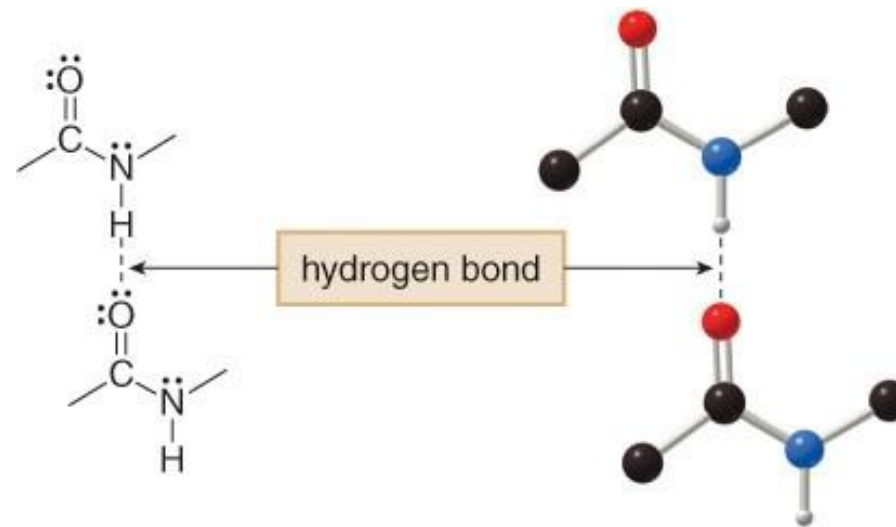
- La struttura primaria delle proteine è costituita dalla sequenza degli amminoacidi uniti insieme con legami peptidici. L'elemento più importante della struttura è il legame ammidico.

- Rotation around the amide C–N bond is *restricted* because of electron delocalization, and the *s-trans* conformation is the more stable arrangement.
- In each peptide bond, the N–H and C=O bonds are directed 180° from each other.



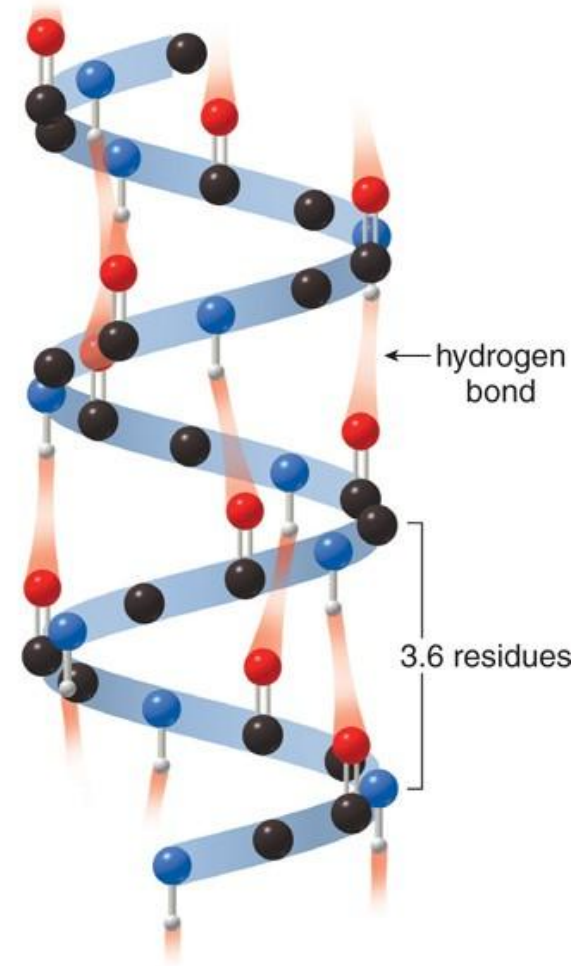
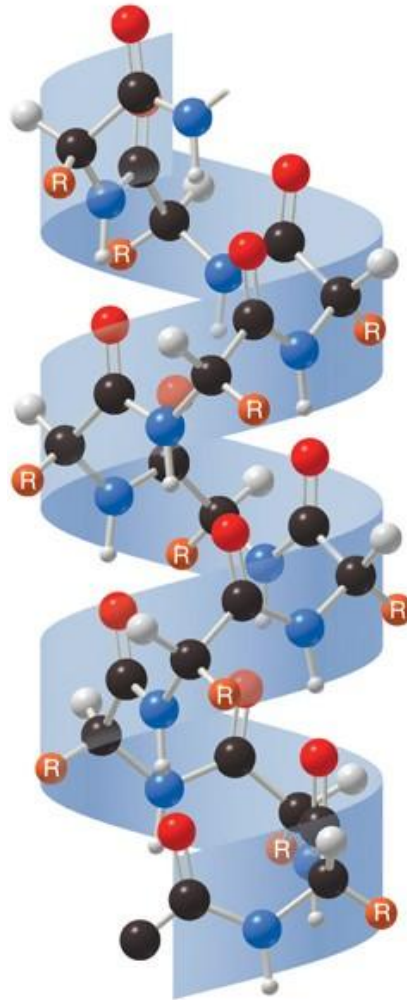
Struttura secondaria

- Le conformazioni tridimensionali di porzioni circoscritte di una proteina vengono chiamate le sue strutture secondarie. Queste regioni sono il risultato della formazione di legami ad idrogeno fra il protone del gruppo N—H di un'amide e l'ossigeno del gruppo C=O di un'altra.
- Due conformazioni sono particolarmente stabili—l' α -elica ed il foglietto β -pieghettato.

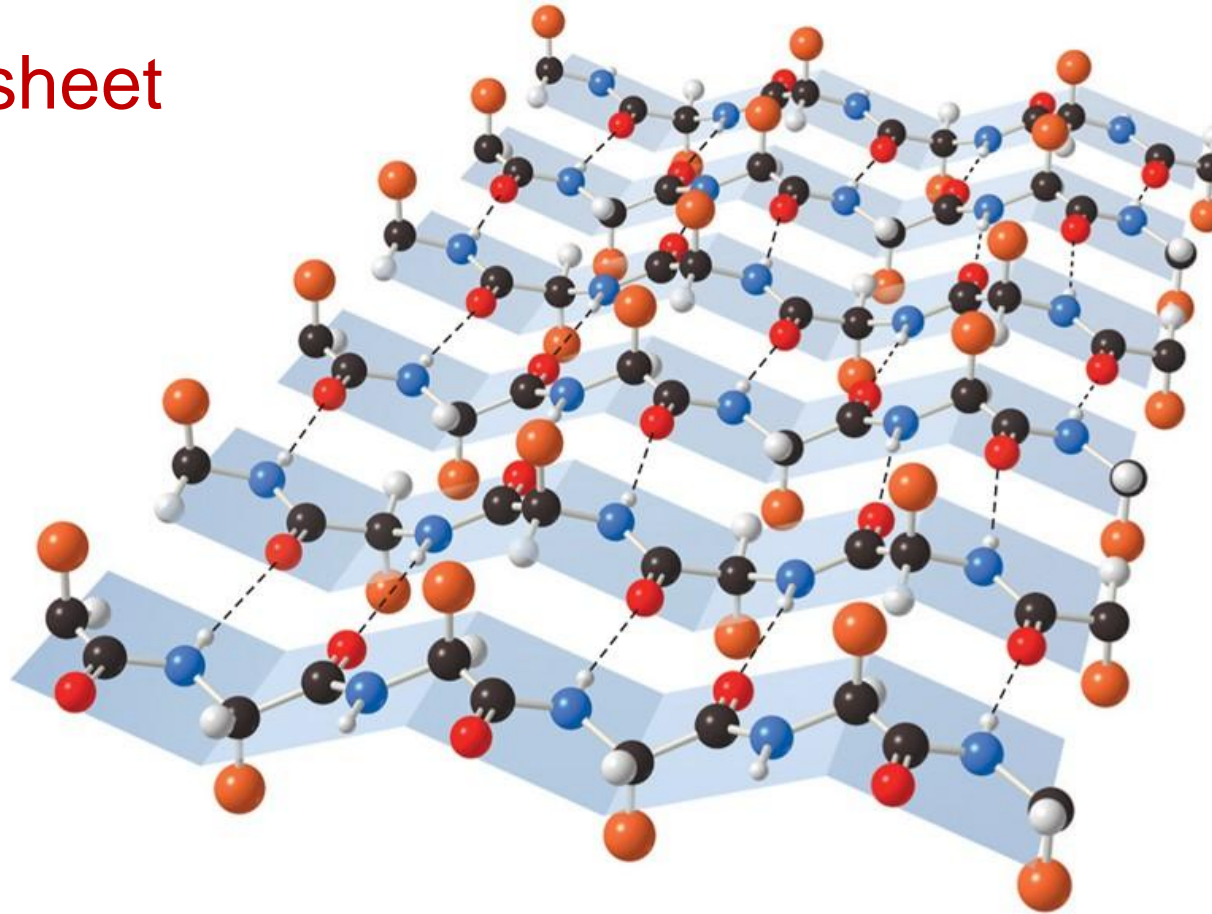


α -elica

- L' α -elica si forma quando una catena peptidica si attorciglia formando una spirale che va verso destra, in senso orario.



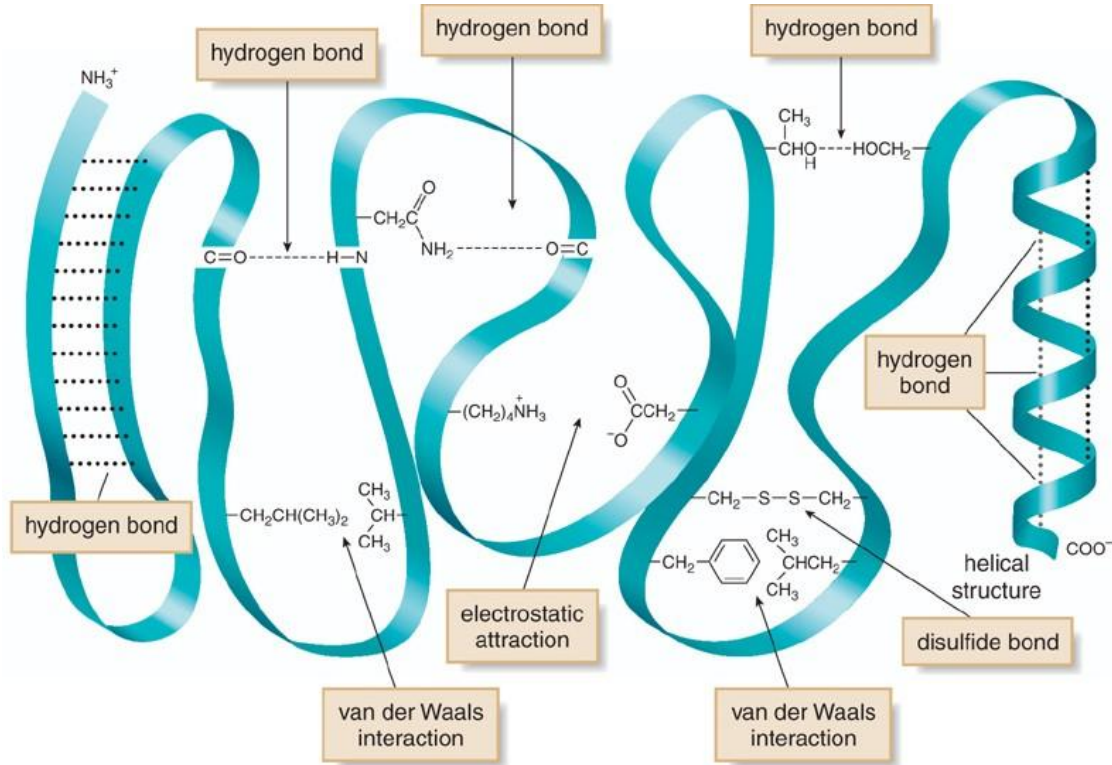
β -pleated sheet



- The β -pleated sheet consists of extended strands of the peptide chains held together by hydrogen bonding. The C=O and N-H bonds lie in the plane of the sheet, and the R groups (shown as orange balls) alternate above and below the plane.

Struttura terziaria e quaternaria

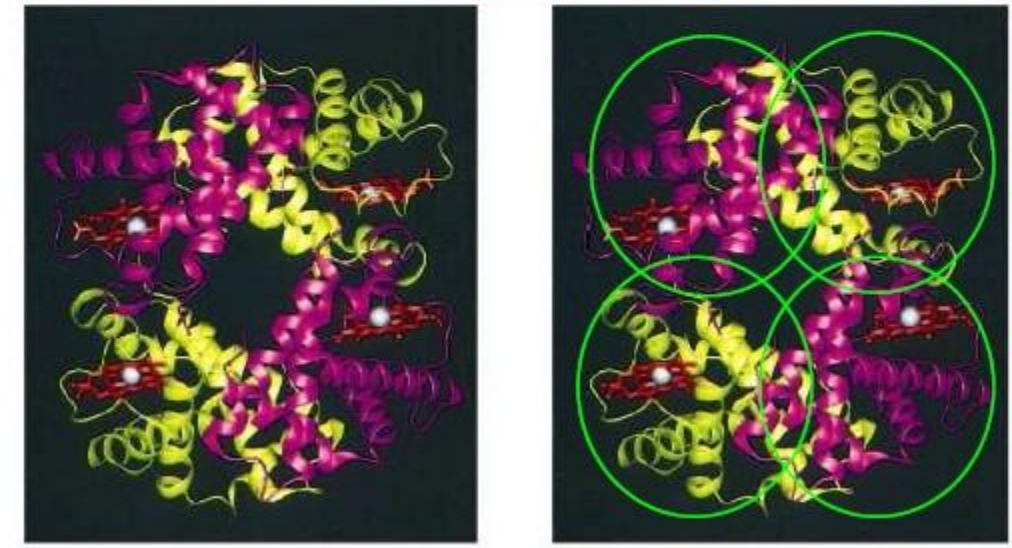
- 1 La forma tridimensionale assunta dall'intero peptide viene definita la sua struttura terziaria.
- 2 Le proteine generalmente assumono conformazioni che ne rendono massima la stabilità. Nell'ambiente acquoso delle cellule, spesso le proteine si ripiegano in modo tale da mettere il maggior numero possibile di gruppi apolari all'interno della proteina, dove le interazioni di van der Waals tra questi gruppi idrofobici aiutano a stabilizzare la molecola. In questa conformazione, un elevato numero di gruppi polari e carichi rimane sulla superficie per rendere massima la formazione di legami idrogeno con l'acqua.
- 3 I gruppi funzionali polari formano legami idrogeno fra loro (e non solo con l'acqua), e gli amminoacidi con catene laterali come COO^- e -NH_3^+ stabilizzano la struttura terziaria attraverso interazioni elettrostatiche.



Struttura quaternaria

Riguarda le proteine formate da più subunità (cioè più catene indipendenti come struttura primaria, secondaria e terziaria, ma vincolate le une alle altre per effetto di legami non covalenti). **Definisce la relazione spaziale esistente tra le diverse subunità.**

Emoglobina: 4 subunità



Le catene α sono porpora, le catene β sono gialle, i leganti dell'eme sono rossi e gli atomi di Fe sono sfere bianche.

The primary, secondary, tertiary, and quaternary structure of proteins

