

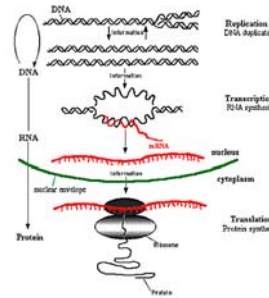
Proteine

Continuazione

Dogma Centrale della Biologia (parere classico)

(Francis Crick, 1958)

in biologia molecolare il flusso dell'informazione genetica è monodirezionale



✚ L'informazione "scorrerebbe" dal DNA al RNA e dal RNA alle proteine, ma non in senso contrario (Francis Crick)

ossia

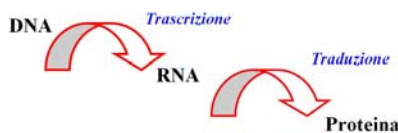
✚ I **geni (genotipo)** codificano per **messaggeri** che vengono tradotti in **proteine**, gli effettori, che costituiscono il **fenotipo** (insieme dei caratteri fisici di un individuo)

The Central Dogma of Molecular Biology

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MACourse/Modules/MolBioReview/central_dogma.html

✚ I geni vengono espressi mediante un processo di trascrizione seguito da traduzione

- **Trascrizione ("transcription")**: sintesi del RNA sotto la direzione del DNA
- **Traduzione ("translation")**: sintesi delle proteine sotto la direzione del RNA
- Un gene nel filamento stampo ("template") viene usato per la trascrizione, dando origine ad un trascritto complementare al filamento stampo del DNA.



Vantaggio di avere un intermediario tra il DNA e le proteine che codifica

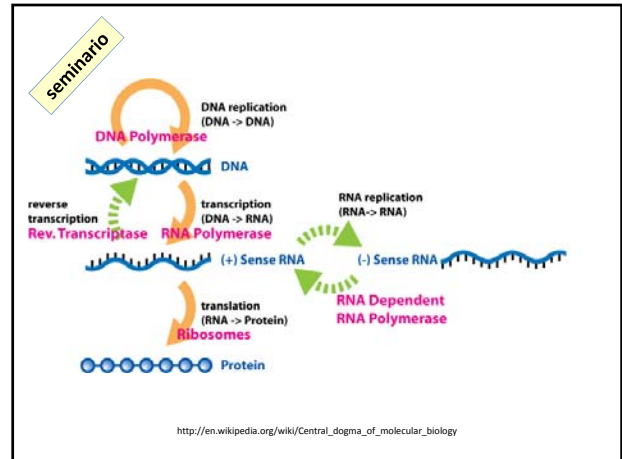
- ✚ Il **DNA** può rimanere incontaminato e protetto, lontano dai processi chimici che si svolgono nel citoplasma.
- ✚ L'informazione genetica può essere amplificata mediante molteplici copie di un RNA ottenute da una singola copia di DNA.
- ✚ La regolazione dell'espressione genica può essere influenzata da punti di controllo specifici ad ogni componente della via fra il DNA e le proteine. Quanti più elementi ci sono nella via tante più opportunità ci sono di controllarli in diverse circostanze.

MIT, sito non più attivo

Nuove scoperte ed eccezioni alla regola
(risultato da recenti studi genomici)

- Molto del DNA che **non** codifica per **proteine** codifica per diversi tipi di **RNA funzionali**.
- I **retrovirus** non ubidiscono al "dogma centrale" in quanto il loro RNA codifica per il DNA – trascrizione inversa («reverse transcription»).
- I **prioni** sono proteine capaci di replicarsi influenzando la struttura di altre proteine dello stesso tipo, senza prendere in considerazione alcun tipo di informazione genetica.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MIAcourse/Modules/MolBioReview/central_dogma.html



Human Immunodeficiency Virus (HIV) Anatomy

Capsid, Glycoprotein, Identical RNA Strands, Reverse Transcriptase Enzyme, Viral Envelope.

Trascrizione inversa

Reverse Transcription

Using its reverse transcriptase enzyme and host materials (nucleotides, sugars, etc.), the HIV virion **transcribes its RNA into DNA**.

Cell Cytoplasm, HIV RNA, Reverse Transcriptase, HIV DNA.

http://www.columbia.edu/~bo8/undergraduate_research/projects/manal_alam_project/what_character.HTML

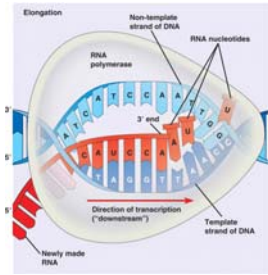
SINTESI PROTEICA

- DNA in nucleus serves as a template.
- mRNA is processed before leaving the nucleus.
- When mRNA is formed it has codons.
- mRNA moves into cytoplasm and becomes associated with ribosomes.
- tRNA with anticodon carries amino acid to mRNA.
- Peptide chain is transferred from resident tRNA to incoming tRNA.
- tRNA departs and will soon pick up another amino acid.
- Anticodon-codon complementary base pairing occurs.

<http://www.proteinsynthesis.org/wp-content/uploads/2013/02/process-of-protein-synthesis.jpg>

SINTESI PROTEICA: 1a fase: **TRASCRIZIONE** («Transcription»)

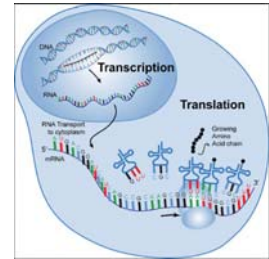
Prima che la sintesi della proteina inizi, la corrispondente molecola di RNA è prodotta mediante il processo di **trascrizione del RNA**. Uno dei filamenti della doppia elica del DNA viene utilizzato come **stampo** («template») dall'enzima RNA polimerasi per sintetizzare un **RNA messaggero (mRNA)**. Questo mRNA migra dal nucleo nel citoplasma. Durante questo passo, il mRNA subisce diversi tipi di passi di **maturazione**, incluso uno detto di «**splicing**» in cui le **sequenze non codificanti** vengono eliminate. La **sequenza di mRNA codificante** può essere descritta come una **unità di tre nucleotidi** chiamata un **codone**.



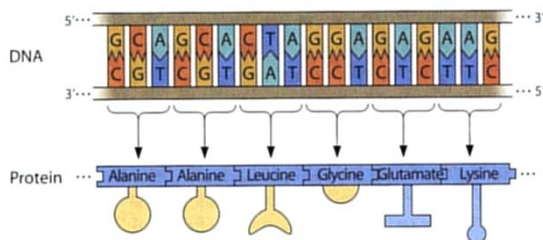
<http://dna-ma.net/2011/08/24/ma-transcription/>

SINTESI PROTEICA: 2a fase: **TRADUZIONE** («Translation»)

Il ribosoma si lega al mRNA nel **codone iniziale (AUG)** che viene riconosciuto dal **tRNA iniziatore**. Il ribosoma procede allora alla **fase di allungamento** della sintesi proteica. In questo stadio, i complessi, composti da un amminoacido legato al tRNA, si legano in modo sequenziale al codone appropriato del mRNA, formando coppie di basi complementari con l'anticodone del tRNA. Il ribosoma si muove da codone a codone lungo il mRNA. Gli amminoacidi vengono aggiunti uno ad uno, tradotti in sequenze polipeptidiche dettate dal DNA e rappresentate dal mRNA. Alla fine, un fattore di rilascio si lega al **codone finale**, terminando la traduzione e rilasciando il **polipeptide** completo dal ribosoma.



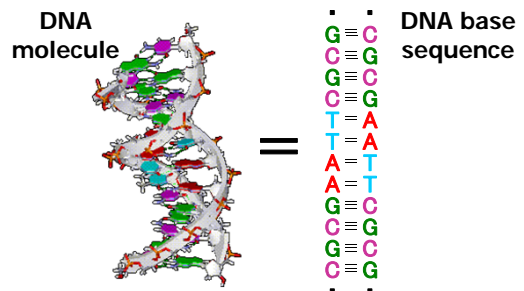
<http://dna-ma.net/2011/08/28/translation-of-ma/>

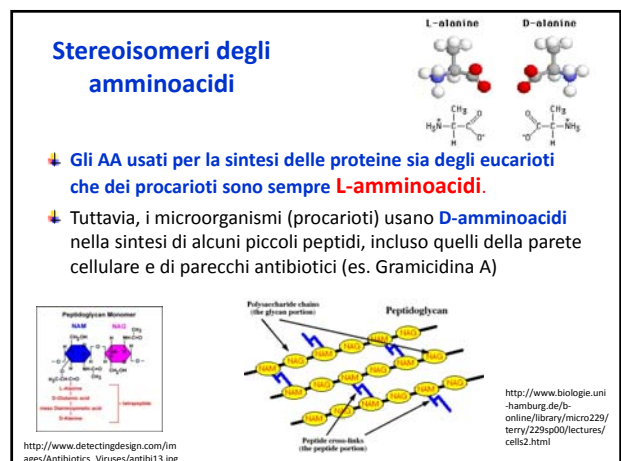
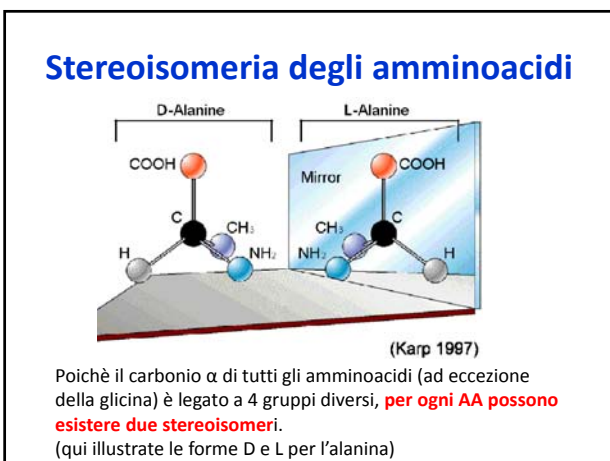
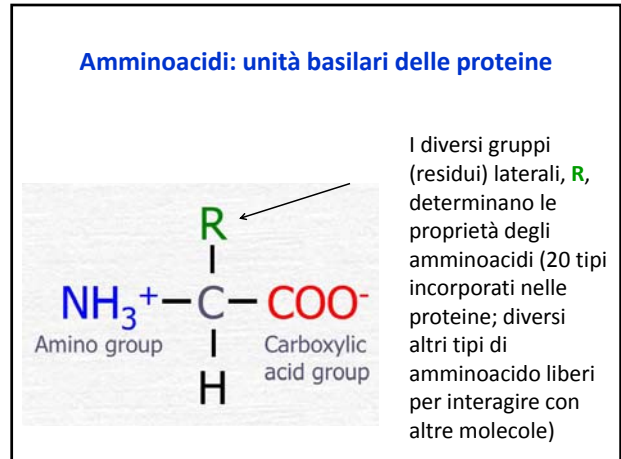
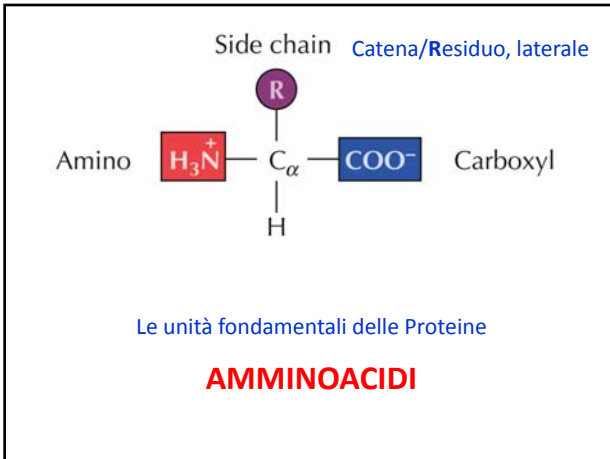


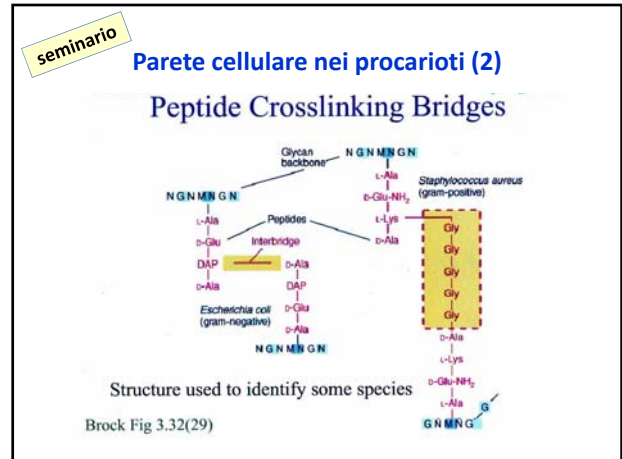
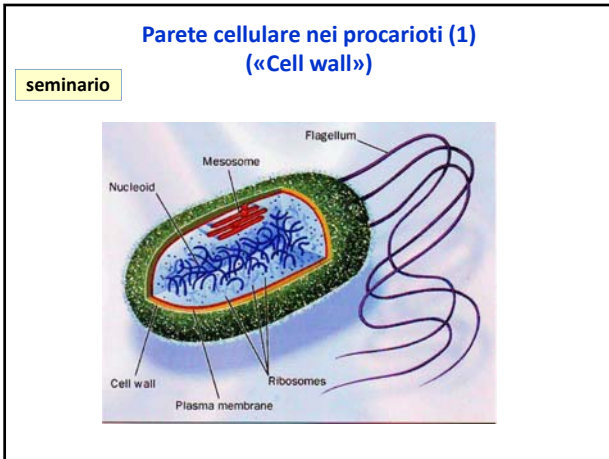
La **sequenza di basi del DNA** determina la **sequenza di amminoacidi delle proteine**.

(H. Kreuzer & A. Massey: *Biology and Biotechnology: Science, Applications and Issues* ASM Press, Washington, D.C., 2005)

La **sequenza di amminoacidi** è codificata dalla **sequenza di basi del DNA in un gene**







Gramicidina

seminario

- Polipeptide con L- e D- amminoacidi alternati, composti con la formula generale: formil-L-X-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Y-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-etanolamina.
- E' attiva contro batteri Gram-positivi, tranne che per bacilli Gram-positivi, e contro organismi selezionati Gram-negativi, quali i batteri Neisseria.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Gramicidin>

amminoacidi

CATEGORIE

Amino acids with electrically charged side chains				
Positive			Negative	
Arginine	Histidine	Lysine	Aspartic acid	Glutamic acid
Amino acids with polar but uncharged side chains				
Serine	Threonine	Glutamine	Asparagine	
Special cases				
Cysteine	Glycine	Proline		
Amino acids with hydrophobic side chains				
Alanine	Isoleucine	Methionine	Tryptophan	Phenylalanine
Valine	Leucine	Tyrosine		

Ionizzazione degli AA polari provvisti di carica

A pH fisiologico (pH ~7.0) praticamente tutti i residui di **ac. glutammico** sono carichi negativamente

A pH fisiologico praticamente tutti i residui di **lisina** sono carichi positivamente

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Polari carichi (1)

Amino acids with electrically charged side chains

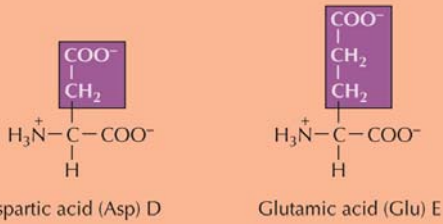
Amminoacidi polari carichi basici (al pH tipico dei liquido biologici, ~7)

Basic amino acids

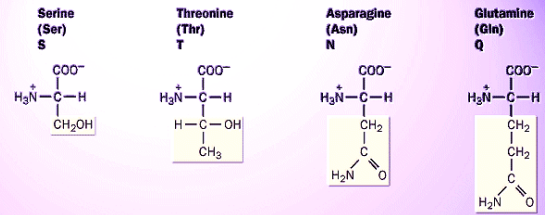
Lysine (Lys) K Arginine (Arg) R Histidine (His) H

Amminoacidi polari carichi acidi (al pH tipico dei liquido biologici, ~7)

Acidic amino acids

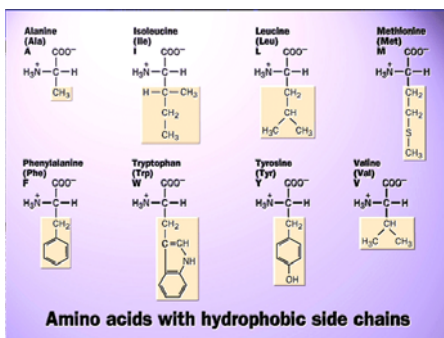


Polari ma privi di carica



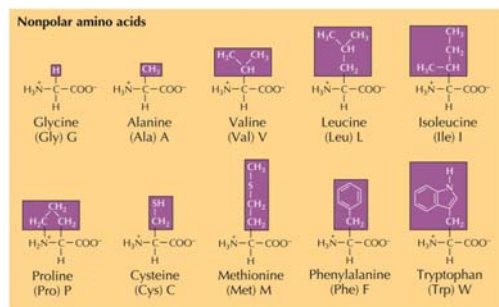
Amino acids with polar but uncharged side chains

Non Polari (Idrofobici) (1)



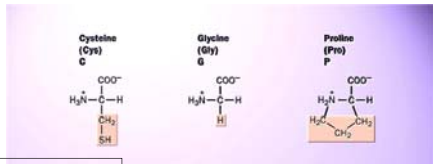
Quanto maggiori sono le dimensioni dei gruppi laterali tanto più idrofobico sarà l'amminoacido

Non Polari (Idrofobici) (2)



THE CELL, Fourth Edition, Figure 3.14 (Part 1) © 2008 Sinauer Associates, Inc.

Catene laterali con proprietà particolari

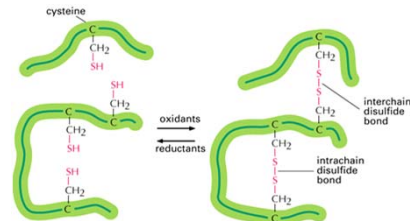


CISTEINA: Sebbene la catena laterale abbia un carattere polare non carico, ha la particolarità di **costituire un legame covalente con un'altra cisteina**, per formare ponti disolfuro (S-S), che irrigidiscono la catena.

GLICINA: la catena laterale è formata solo da un atomo di H e **può adattarsi sia ad un ambiente idrofilo che idrofobico**. Spesso si trova in siti dove due polipeptidi sono a stretto contatto

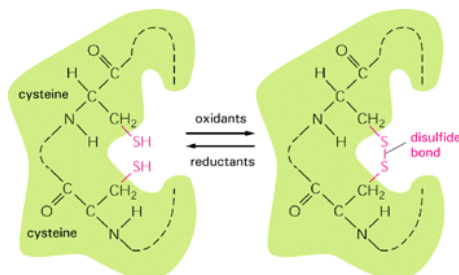
PROLINA: Sebbene la catena laterale abbia un carattere polare non carico, ha la particolarità di creare **snodi** nelle catene polipeptidiche ed interrompere la struttura secondaria ordinata

Ponti disolfuro (S-S) tra residui di cisteina



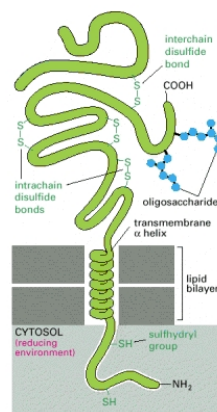
Questi legami incrociati possono collegare sia due parti della stessa catena polipeptidica che due catene polipeptidiche diverse. Poiché l'energia necessaria per rompere un legame covalente è molto superiore all'energia necessaria per rompere persino un intero insieme di legami non-covalenti, **un legame disolfuro può avere un effetto stabilizzante notevole in una proteina.**

FORMAZIONE DI PONTI S-S NELLE PROTEINE



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/figure/A437/>

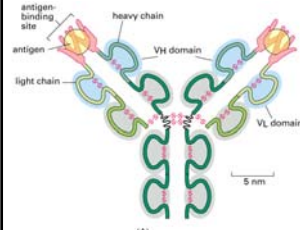
Tipica proteina con diversi legami S-S (1)



Tipica proteina transmembrana a passaggio singolo ("single-pass"). Si noti che la catena lipidica attraversa il doppio strato lipidico come α -elica destrorsa e che le catene oligosaccaridiche e i legami disolfuro sono tutti sulla superficie non citosolica della membrana. I legami disolfuro non si formano fra i gruppi sulfidrilici nel dominio citoplasmatico della proteina, perché l'ambiente riducente del citosol mantiene questi gruppi nella loro forma ridotta (-SH).

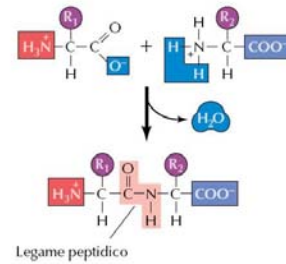
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28291/figure/A2474/>

Tipica proteina con diversi legami S-S (2)



Una molecola di anticorpo. (A) Una tipica molecola di anticorpo ha la forma a Y e ha due siti di legame identici per il suo antigene, uno in ciascuna delle braccia della Y. La proteina è composta da quattro catene polipeptidiche (due catene pesanti identiche e due catene leggere identiche e più piccole) tenute insieme da legami disolfuro. Ogni catena è fatta da diversi domini di tipo immunoglobulina, qui ombreggiati sia in azzurro che in grigio. Il sito di legame con l'antigene si forma laddove un dominio variabile della catena pesante (V_H) e un dominio variabile della catena leggera (V_L) vengono a contatto. Questi sono i domini che differiscono di più in sequenza e struttura nei diversi anticorpi.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26911/figure/A421/report-objectonly>

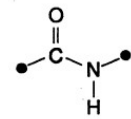
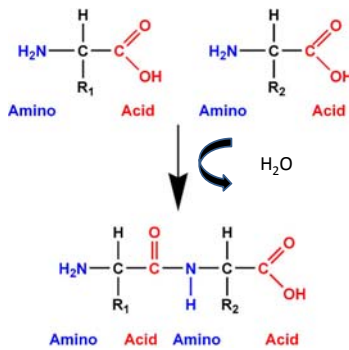


Legame peptidico

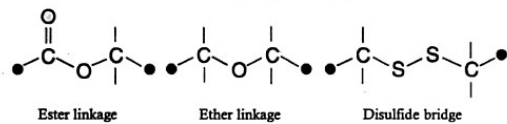
Aminoacidi

LEGAME PEPTIDICO

Formazione del legame peptidico (1)



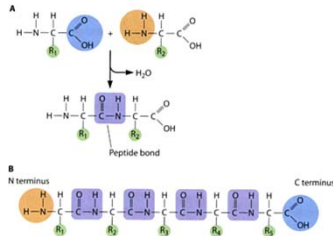
Amide linkage (Peptide linkage)



Ester linkage Ether linkage Disulfide bridge

Structure of various Functional Groups present in Biomolecules.

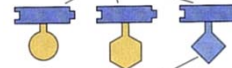
Formazione del legame peptidico (2)



- (A) I **legami peptidici** si formano fra il gruppo NH_2 di un aminoacido e il gruppo $COOH$ di un altro, con la formazione e perdita di una molecola di acqua. R_n , catena laterale dell'aminoacido.
- (B) Una proteina ha un'impalcatura polipeptidica con diversi gruppi laterali degli aminoacidi

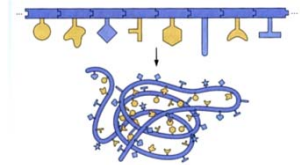
H. Kreuzer & A. Massey: *Biology and Biotechnology: Science, Applications and Issues* ASM Press, Washington, D.C., 2005.

Hydrophilic backbone



Side chains can be hydrophobic or hydrophilic

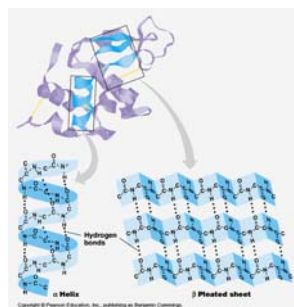
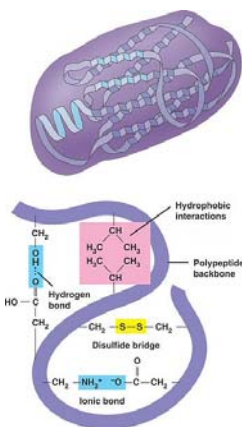
Gli **amminoacidi** hanno un'impalcatura idrofila che può formare catene e uno fra i 20 diversi tipi di catene laterali, che possono essere idrofiliche o idrofobiche.



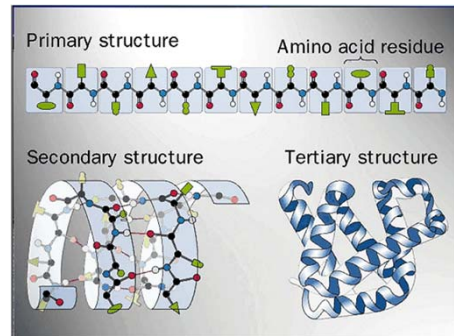
Una **proteina** è una catena di aminoacidi che si piega in una conformazione tridimensionale specifica.

H. Kreuzer & A. Massey: *Biology and Biotechnology: Science, Applications and Issues* ASM Press, Washington, D.C., 2005.

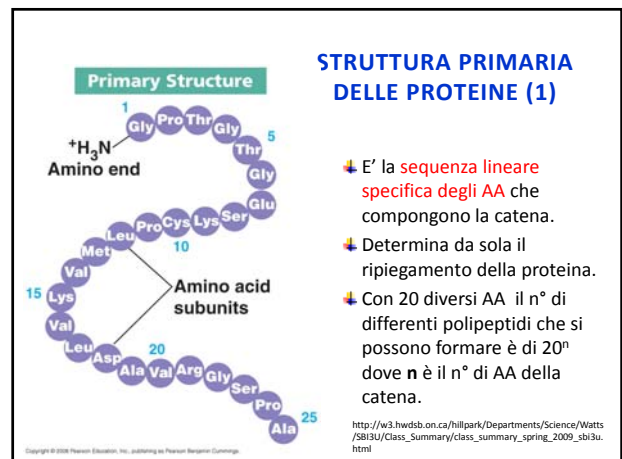
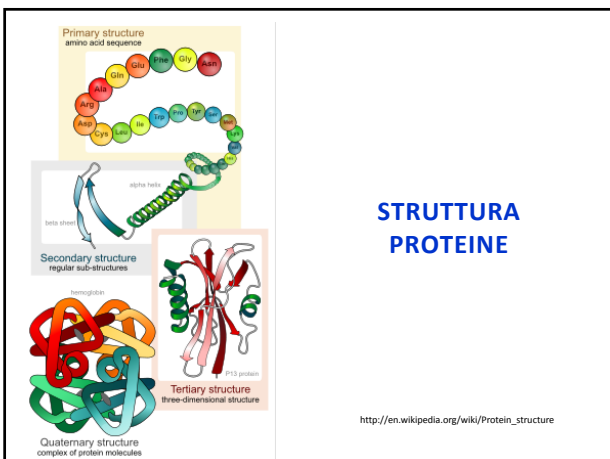
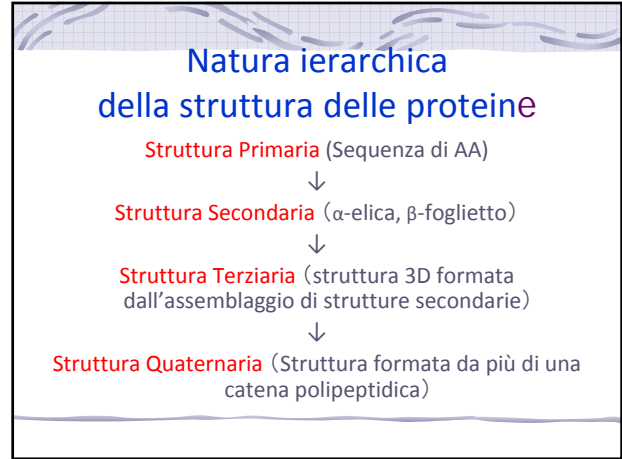
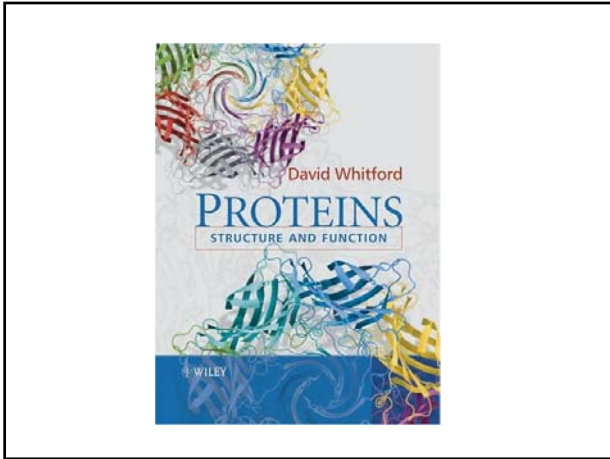
STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DELLE PROTEINE




STRUTTURA PROTEINE (1)



Cooper: *the Cell, a Molecular Approach*, 2nd ed.





Anemia falciforme (1)

(«Sickle cell anemia»)

⚡ Questa grave malattia ereditaria deriva da **un singolo cambiamento nella sequenza amminoacidica** della molecola di emoglobina: nella proteina mutata una **VALINA** (AA **non polare**) si trova al posto di un **ACIDO GLUTAMICO** (AA **polare carico**).

CC(C)C(N)C(=O)O

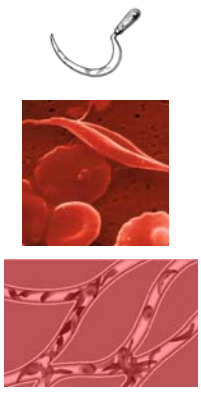
VALINA

CCCC(N)C(=O)O

Ac. GLUTAMICO

<http://thesecretoftheblood.blogspot.com/>

Anemia falciforme (2)



- ⚡ Le persone con anemia falciforme ("sickle cell anemia") producono una forma di emoglobina A diversa, detta emoglobina S (S sta per "sickle").
- ⚡ Gli eritrociti che contengono soprattutto l'emoglobina S non hanno un tempo di vita così lungo quanto i globuli rossi normali (che di solito è di 16 giorni).
- ⚡ Inoltre diventano **più rigidi, distorti** in forma e **hanno difficoltà a passare attraverso i vasi sanguigni più sottili** (capillari).
- ⚡ Quando un eritrocito falciforme blocca un vaso sanguigno sottile, la quantità di sangue che raggiunge quella parte del corpo è inferiore. Il tessuto che non riceve un normale flusso sanguigno finisce per diventare danneggiato.
- ⚡ Ci sono diverse forme di anemia falciforme. Le più comuni sono: Sickle Cell Anemia (SS), Sickle-Hemoglobin C Disease (SC), la "Sickle Beta-Plus Thalassemia" e la "Sickle Beta-Zero Thalassemia".

seminario

Struttura secondaria α-elica & foglietto β

- ⚡ La struttura secondaria rappresenta la **conformazione ordinata** che **alcuni tratti di proteina possono assumere, sulla base della struttura primaria**, cioè della sequenza amminoacidica.
- ⚡ La struttura secondaria è caratterizzata dalla **presenza di ponti idrogeno fra i gruppi del legame peptidico di residui non adiacenti**, mentre **non sono direttamente coinvolte le catene laterali degli amminoacidi**.
- ⚡ All'interno della stessa proteina, diversi tratti possono assumere la medesima struttura secondaria o strutture secondarie differenti. Le principali forme di strutture secondarie presenti nelle proteine sono l'**α-elica** e le strutture **β foglietto**.

<http://www.unisr.it/biotechbook/view.asp?id=250>

Struttura secondaria α-elica & foglietto β

- ⚡ La struttura secondaria rappresenta la **conformazione ordinata** che **alcuni tratti di proteina possono assumere, sulla base della struttura primaria**, cioè della sequenza amminoacidica.
- ⚡ La struttura secondaria è caratterizzata dalla **presenza di ponti idrogeno fra gli atomi del legame peptidico tra residui non adiacenti**, mentre **non sono direttamente coinvolte le catene laterali degli amminoacidi**.
- ⚡ All'interno della stessa proteina, diversi tratti possono assumere la medesima struttura secondaria oppure strutture secondarie differenti. Le principali forme di strutture secondarie presenti nelle proteine sono l'**α-elica** e le strutture **β foglietto**.

<http://www.unisr.it/biotechbook/view.asp?id=250>

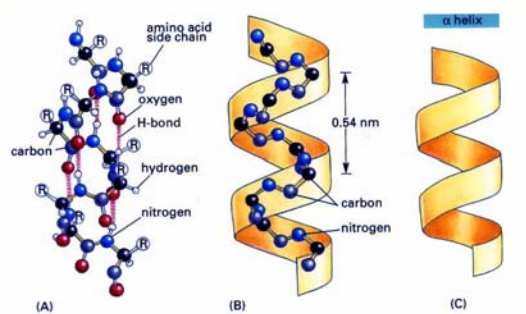


Primary structure
Secondary structure
 beta pleated sheet
 alpha helix
Tertiary structure
Quaternary structure

IMPORTANZA DEI PONTI DI IDROGENO PER LA FORMAZIONE DI UN'ELICA E DI ALTRE STRUTTURE ORDINATE

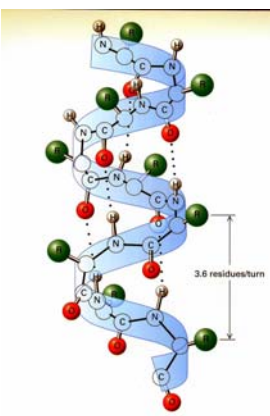
Una elica si forma quando una serie di subunità si legano una all'altra in modo regolare

α-elica (1)



(A) (B) (C)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/figure/A402/?report=objectonly>

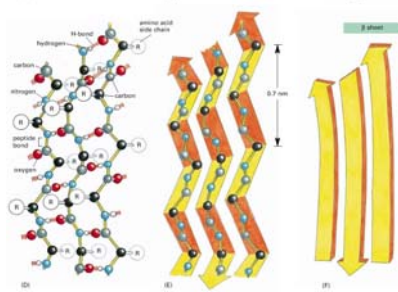


α-elica (2)

3.6 residues/turn

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21581/figure/A529/>

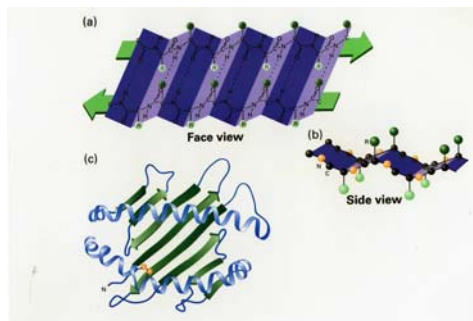
β-foglietto (1)



(A) (B) (C)

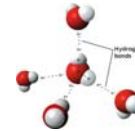
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/figure/A402/?report=objectonly>

β-foglietto (2)



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21581/figure/A532/?report=objectonly>

Note sul ripiegamento delle proteine (1)



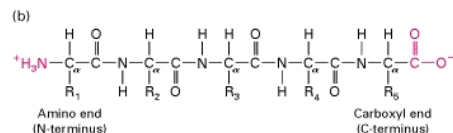
- ⚡ L'acqua contiene due legami polari ossigeno-idrogeno ed è una molecola estremamente polare.
- ⚡ Perciò si associa "confortevolmente" con altre molecole polari o cariche elettricamente.
- ⚡ Per questa ragione, le molecole che sono elettrostaticamente cariche o polari sono **IDROFILICHE**.
- ⚡ Poiché le molecole non polari non si associano "confortevolmente" con l'acqua, esse sono **IDROFOBICHE**.
- ⚡ **Le catene laterali idrofobiche (non polari) degli aminoacidi non si associano stabilmente con il fluido intracellulare (o extracellulare).**

Note sul ripiegamento delle proteine (2)

- ⚡ Viceversa, **le catene laterali idrofiliche degli aminoacidi** (cariche o polari) **si possono associare stabilmente con il fluido** perchè le loro cariche, o cariche parziali possono essere neutralizzate dalle cariche parziali complementari delle molecole polari dell'acqua.
- ⚡ Una regola basilare che determina la **struttura delle proteine in ambiente acquoso** è, per quanto possibile, il **ripiegamento dei gruppi laterali idrofobici concentrandoli all'interno della proteina**, così creando un ambiente idrofobico privo di acqua.
- ⚡ Le catene laterali idrofiliche sono invece stabili quando esposte al citoplasma sulla superficie della proteina.

Note sul ripiegamento delle proteine (3)

- ⚡ Si dice perciò che una proteina in un ambiente acquoso contiene una **zona centrale** ("core"; nocciolo) **idrofobica e stabile**.
- ⚡ La struttura tridimensionale di ogni singola proteina (**STRUTTURA TERZIARIA**) può essere vista come la migliore soluzione al problema di creare la zona centrale idrofobica per ogni struttura primaria.
- ⚡ Questo presenta un ulteriore problema: l'**impalcatura/asse comune** (**sequenza di legami peptidici**) contiene un gran numero di **legami NH e CO**, che sono altamente **polari**.

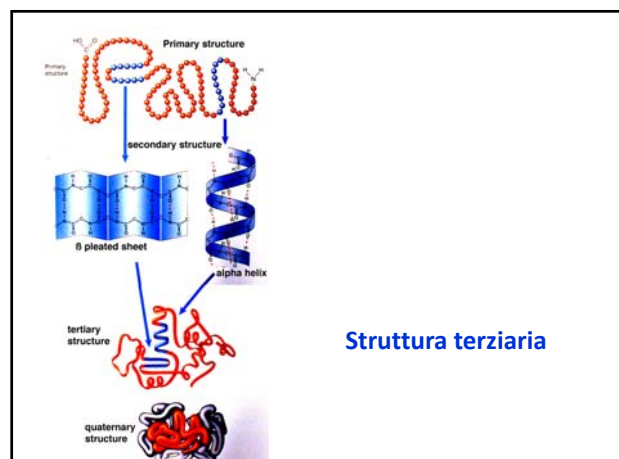
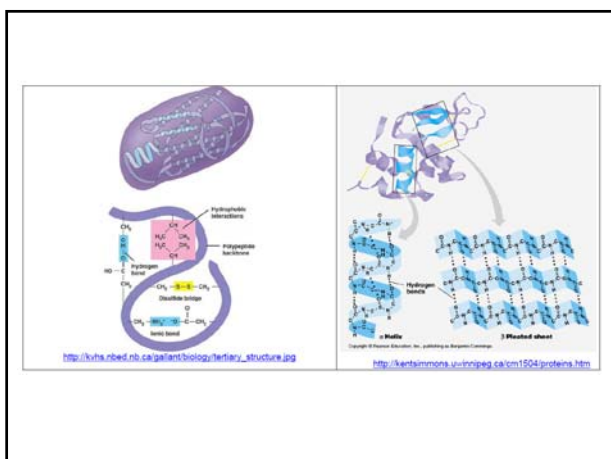


Note sul ripiegamento delle proteine (4)

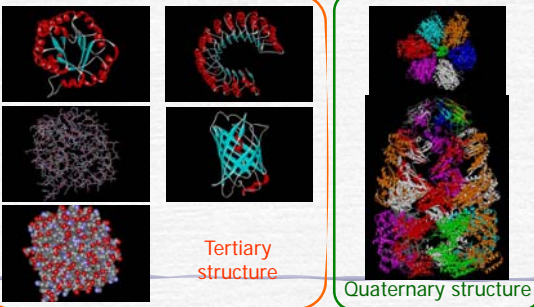
- ⚡ Alla superficie della proteina questi legami parzialmente carichi possono essere prontamente neutralizzati mediante **legami di idrogeno con l'acqua**.
- ⚡ Tuttavia, perchè una struttura proteica sia stabile **le cariche parziali dell'impalcatura polipeptidica debbono essere neutralizzate anche all'interno della proteina, dove l'acqua non è presente**.

Note sul ripiegamento delle proteine (5)

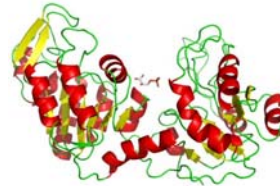
- ⚡ La soluzione di questo problema è un fattore di importanza fondamentale che determina la struttura della proteina:
 - **L'asse della proteina deve neutralizzare le sue stesse cariche parziali.**
 - **I gruppi NH possono formare legami d'idrogeno con i gruppi CO, neutralizzandosi a vicenda.**
 - Per costrizioni geometriche, i gruppi CO e NH dello stesso amminoacido non sono in posizione tale da poter formare ponti d'idrogeno l'uno con l'altro.
 - **Viceversa, l'asse polipeptidico deve essere disposto accuratamente in posizione tale che gruppi NH e CO lungo l'asse siano in posizione da potere formare ponti d'idrogeno con gruppi complementari in altre posizioni lungo l'asse.**
 - L' α -elica e il foglietto β (**STRUTTURE SECONDARIE**) sono le due disposizioni più comunemente riscontrate nelle proteine che permettono la formazione dei legami d'idrogeno.



Three-dimensional structure of proteins



Struttura terziaria



Fosfoglicerato chinasi

<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Proteins8.html>

- ✚ Gli elementi strutturali (spirali e tornanti, eliche, filamenti e stratti) si combinano a formare «**motivi**».
- ✚ I motivi a loro volta si combinano a formare «**domini**». Le proteine di piccole dimensioni possono formare un solo dominio.
- ✚ Le proteine di maggiori dimensioni sono combinazione di domini. La struttura prodotta dall'organizzazione di elementi strutturali in domini nella struttura globale viene chiamata **struttura terziaria della proteina**.
- ✚ In genere i domini si comportano come se potessero avere esistenza e stabilità indipendenti.

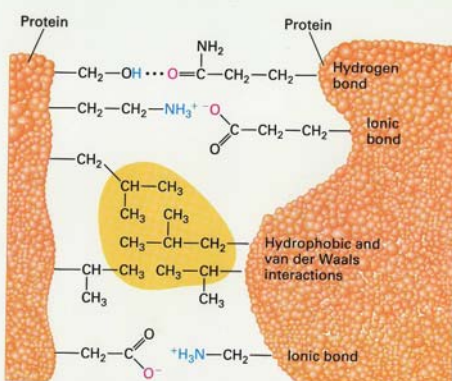


Figure 2-17
Lodish et al. MOLECULAR CELL BIOLOGY, Fourth Edition
Copyright © by W. H. Freeman and Company

Struttura quaternaria (1)

- ✚ Molte proteine contengono più di una catena polipeptidica.
- ✚ L'interazione tra queste catene sta alla base della struttura quaternaria.
- ✚ Le interazioni sono esattamente le stesse che determinano la struttura terziaria (**ponti S-S, ponti di idrogeno, interazioni ioniche e interazioni idrofobiche**) solo con l'eccezione che hanno luogo fra una o più catene polipeptidiche, dette «subunità».

D. Whitford: «Proteins: Structure and Function». Wiley, 2005.

Struttura quaternaria (2)

- ✚ Può essere basata su **subunità identiche** o **subunità diverse**:
 - **Omodimeri**: es. trifosfato isomerasi (enzima coinvolto nella glicolisi), HIV proteasi, molti fattori di trascrizione.
 - **Trimeri**: es. proteina MS2 del capsido virale
 - **Tetramero**: es. emoglobina, con due diverse subunità: 2 subunità α e 2 subunità β .

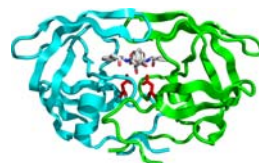
Struttura quaternaria (3)

- ✚ La **corretta attività funzionale** della proteine richiede la formazione della struttura quaternaria e la **specificità associazione della subunità**.
- ✚ Nonostante singolarmente le **forze** siano **deboli**, esse sono **numerose** e portano **all'assemblaggio delle subunità** ed ad aumentata **stabilità**.
- ✚ La struttura quaternaria permette la formazione di **siti di catalisi o di legame nell'interfaccia fra le unità**; tali siti sono impossibili da trovare nelle proteine monomeriche.

Struttura quaternaria (4)

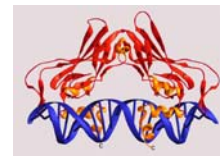
- ✚ Ulteriori vantaggi derivano dal fatto che **il legame con il substrato della reazione catalitica o con il ligando provoca alterazioni conformazionali** all'interno di tutto il complesso e offre la **possibilità di regolazione dell'attività biologica** – BASE PER LA **REGOLAZIONE ALLOSTERICA DELLE PROTEINE**.
- ✚ Permette quindi una grande **versatilità** di funzioni.

HIV proteasi



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/1/1d/HIV_protease_1EBV.png

Complesso fra fattore di trascrizione T-box /DNA



seminario

<http://www.embl-grenoble.fr/groups/dna/t.gif>

