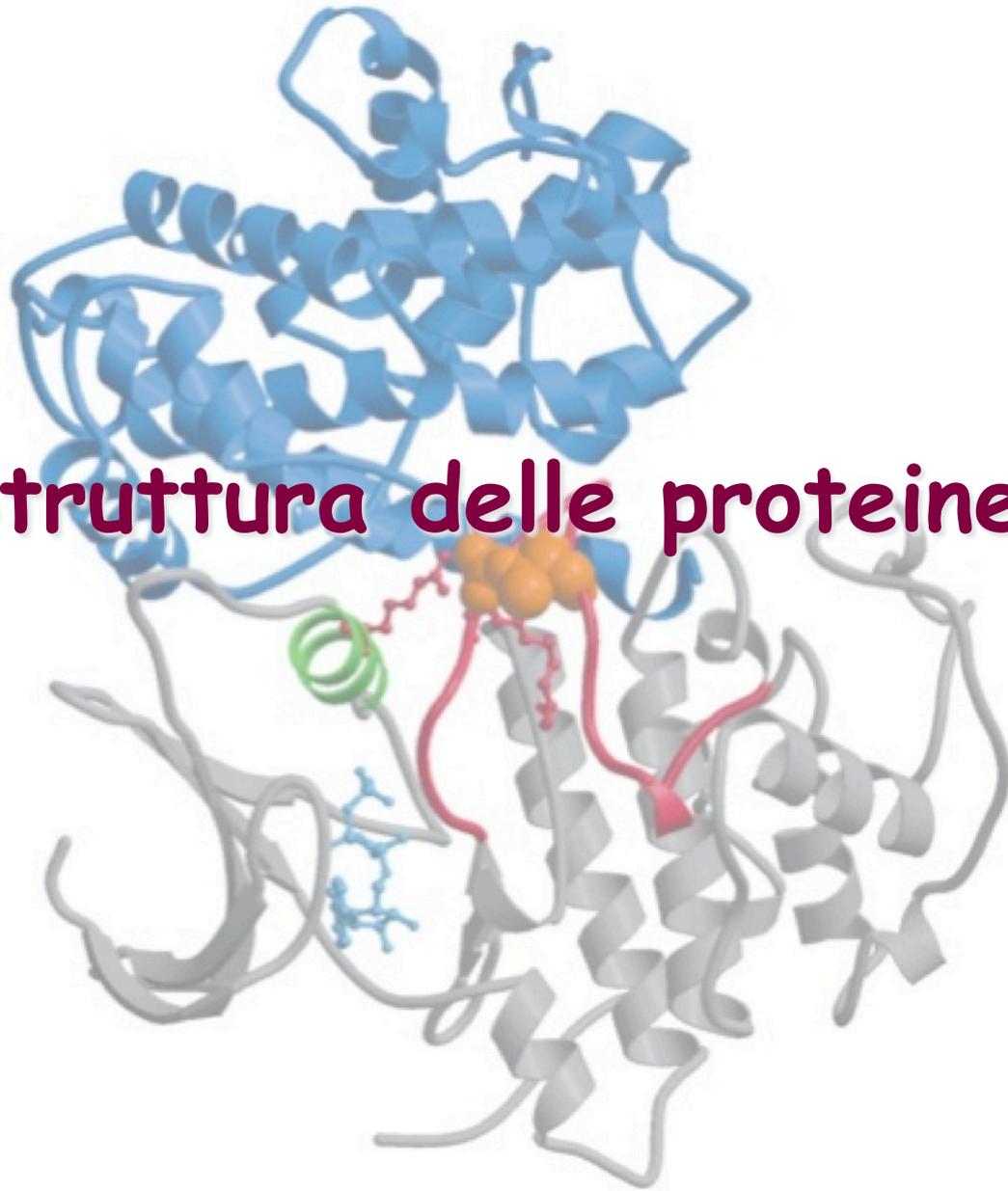


# Struttura delle proteine



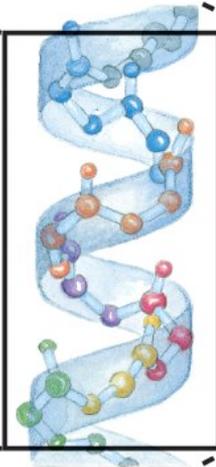
# Nelle proteine vi sono quattro livelli di organizzazione strutturale

**Primary structure**



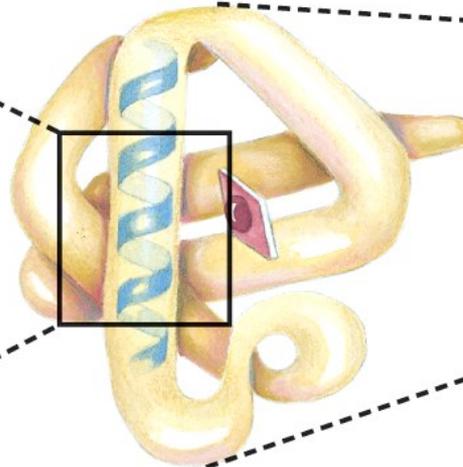
**Amino acid residues**

**Secondary structure**



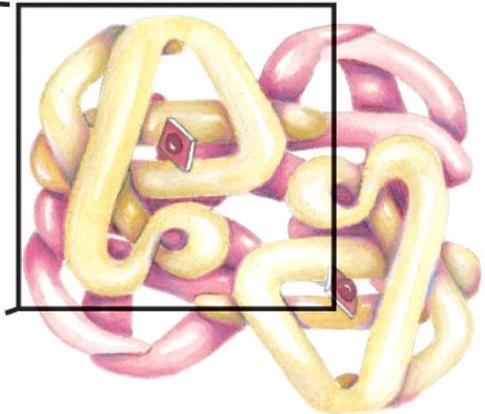
**$\alpha$  Helix**

**Tertiary structure**



**Polypeptide chain**

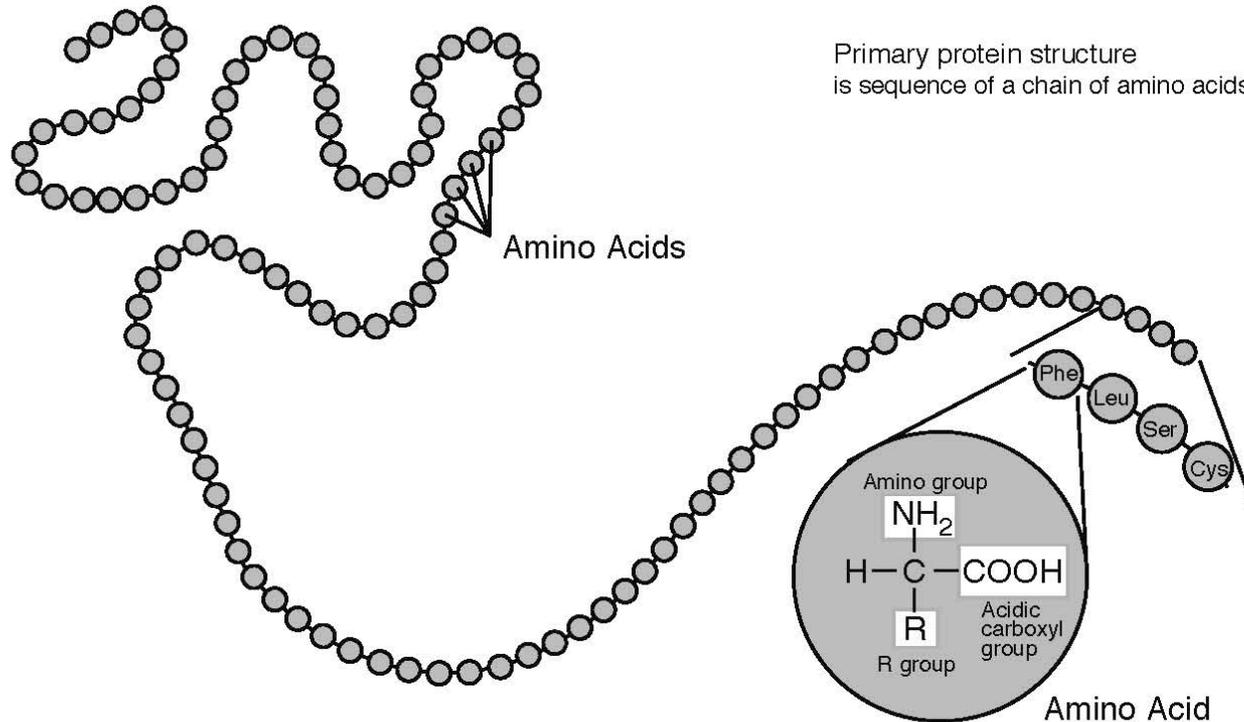
**Quaternary structure**



**Assembled subunits**

## Struttura Primaria:

sequenza di aminoacidi legati tra loro da legami peptidici



Tutte le proteine esistenti derivano da combinazioni diverse dei 20 aminoacidi naturali

## Perché è estremamente importante conoscere la struttura primaria di una proteina:

- La sequenza amminoacidica è l'anello che congiunge il messaggio genetico sul DNA e la struttura tridimensionale direttamente correlata alla funzione biologica di una proteina

**Quindi la funzione di una proteina dipende dalla struttura primaria**

- Per comprendere il meccanismo di azione

- Possibilità di costruire in laboratorio peptidi e proteine difficilmente estraibili da materiali biologici

- Alterazioni della sequenza primaria possono produrre anomalie di funzione e malattie

- Per studiare le correlazioni evolutive tra le diverse specie

# Variazioni della struttura primaria di una proteina possono provocare stati patologici

Es. Anemia falciforme

L'emoglobina è costituita da 4 catene:

2 catene  $\alpha$  di 141 AA

2 catene  $\beta$  di 146 AA

Nei malati di anemia falciforme un residuo di **acido glutammico** (polare) nella catena  $\beta$  è sostituito da un residuo di **valina** (apolare) a causa di un errore genetico

Emoglobina normale

....Val-His-Leu-Thr-Pro-**Glu**-Gly-Lys....

Emoglobina anormale

....Val-His-Leu-Thr-Pro-**Val**-Gly-Lys....

tratto di catena  $\beta$  dell'emoglobina

# Piccole differenze nella struttura primaria implicano funzioni biologiche completamente diverse

Es.: ossitocina e vasopressina sono due oligopeptidi con struttura molto simile e funzioni biologiche ed usi molto differenti

## OSSITOCINA



Causa la contrazione dell' utero

Causa la produzione del latte dalle ghiandole mammarie

Viene somministrato per indurre il parto

## VASOPRESSINA



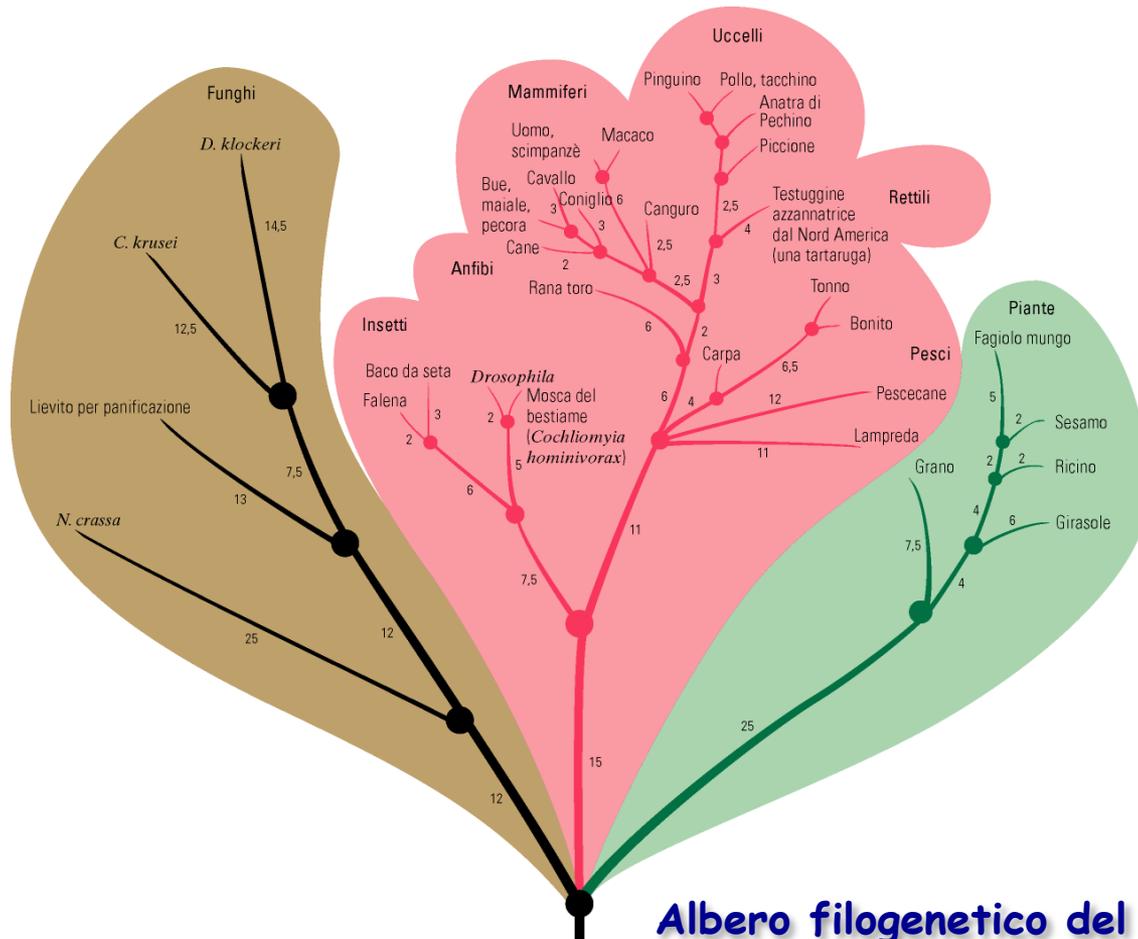
Regola il riassorbimento di acqua dalle urine

Viene somministrato nel trattamento del diabete insipido (eccesso di produzione di urine)

L'evoluzione degli organismi è legata a mutazioni spontanee che avvengono nei loro geni.

Le differenze nella struttura primaria sono la "memoria" dei cambiamenti avvenuti a livello genetico nel corso dell'evoluzione.

In specie legate da notevole affinità le strutture primarie delle proteine comuni sono simili.



Il Citocromo C è una buona proteina per studi evolutivi comparati perché si trova nella catena respiratoria di tutti gli organismi.

Quando le linee evolutive divergono aumenta il numero di differenze tra le sequenze.

Albero filogenetico del Citocromo C

## La duplicazione genica e le famiglie di proteine

Proteine con funzioni analoghe presentano sequenze simili

E' molto probabile che queste sequenze siano evolute a partire da un progenitore comune

Duplicazione genica: evento di ricombinazione genetica in cui un cromosoma acquisisce entrambe le copie del gene primordiale.

Modalità evolutiva particolarmente efficiente poiché una copia del gene sviluppa una nuova funzione, mentre la sua controparte continua a dirigere la sintesi della proteina originale

# Famiglia delle globine: esempio di evoluzione mediante duplicazione genica

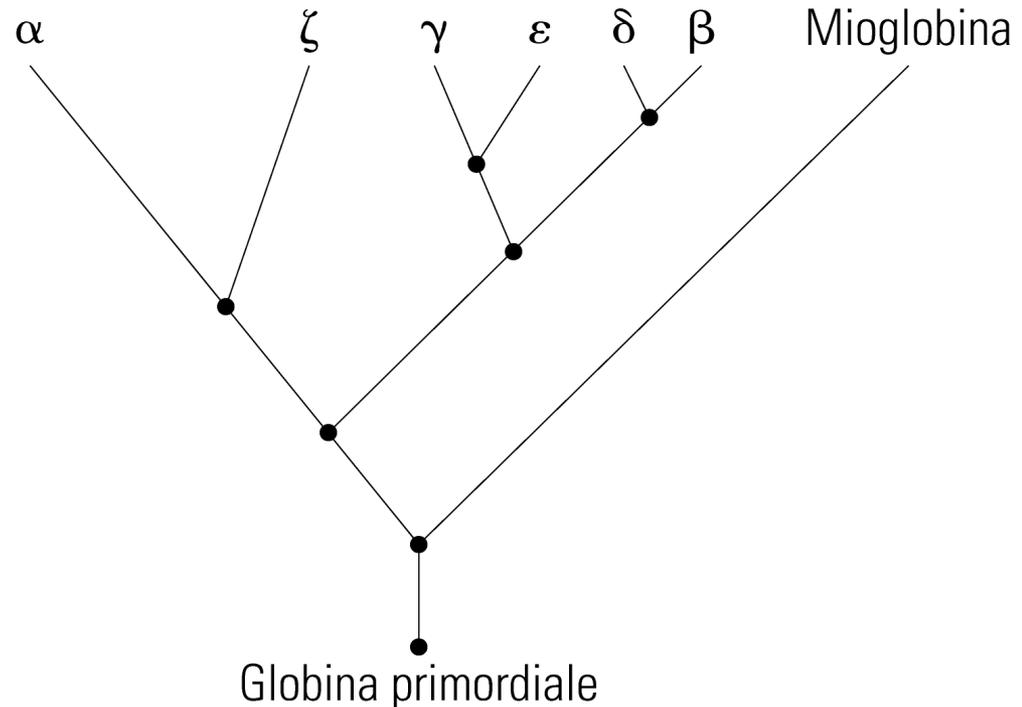
Emoglobina: tetramero  $\alpha_2\beta_2$ ; trasporta ossigeno dai polmoni ai tessuti

Mioglobina: monomero; consente la diffusione dell'ossigeno nel tessuto muscolare

Emoglobina fetale: tetramero  $\alpha_2\gamma_2$

Emoglobina  $\epsilon_2\zeta_2$  : prodotta nelle prime fasi dell'embriogenesi

Emoglobina  $\alpha_2\delta_2$  : nei primati; rappresenta l'1% dell'emoglobina totale dell'adulto



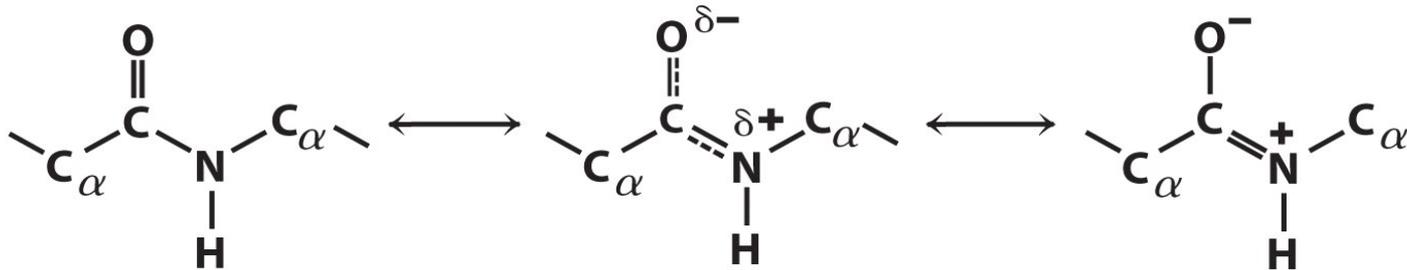
# STRUTTURA SECONDARIA

La catena polipeptidica può assumere nello spazio strutture che hanno carattere di regolarità.

Il carattere periodico e regolare dipende dal ripetersi nella catena della parte comune a tutti gli amminoacidi e che, impegnata nel legame peptidico, dà origine allo scheletro peptidico



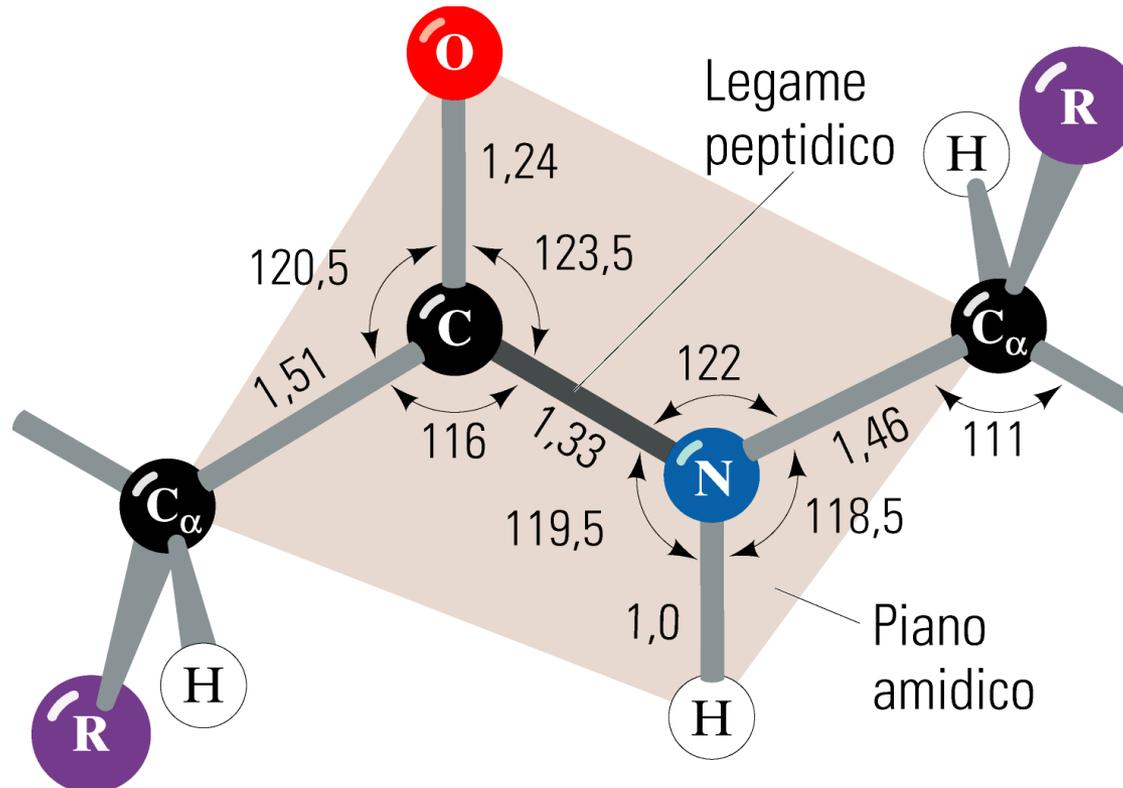
Il legame peptidico è **POLARE**, **PLANARE** e **STABILIZZATO** per **RISONANZA**



Nella situazione intermedia gli elettroni sono coinvolti tra O carbonilico, C carbossilico e N ammidico

La differenza di elettronegatività tra O e N conferisce polarità al legame peptidico; ciò rende possibile, la formazione di legami a H sia a livello di O che a livello di N

Il carattere di doppio legame parziale del legame peptidico impedisce, alle temperature fisiologiche, la rotazione del legame C-N, mentre è possibile la rotazione dei legami  $C_{\alpha 1}-C$  e  $C_{\alpha 2}-N$

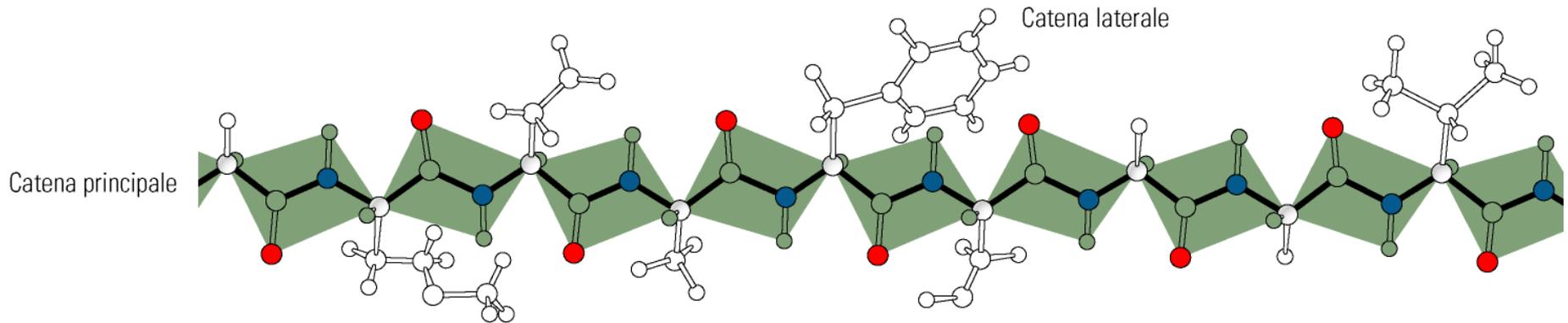


Data la NON possibilità di rotazione intorno al legame CO-N si ha possibilità di isomeria cis trans

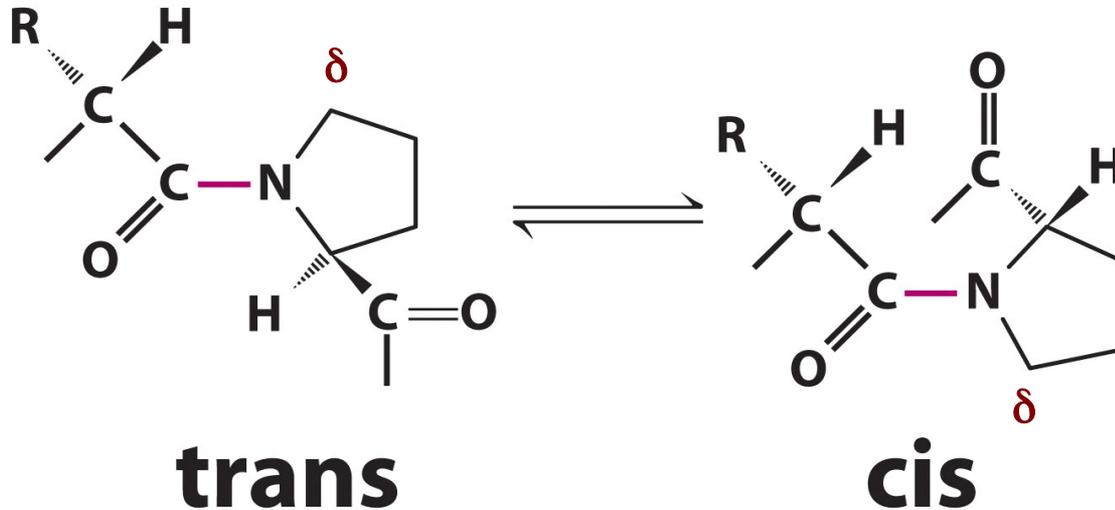
Delle due configurazioni possibili, la *trans* è quella favorita dal punto di vista energetico (minima repulsione sterica)

Oltre il 99% dei legami peptidici delle proteine naturali hanno configurazione *trans*

Fanno eccezione alcuni legami amidici in cui è coinvolto l'N imidico della prolina



# Proline isomers



Le due configurazioni hanno contenuto energetico simile

La configurazione *trans* è destabilizzata dalla repulsione sterica tra il carbonio  $\delta$  dell'anello pirrolidinico e la catena laterale del residuo aa adiacente

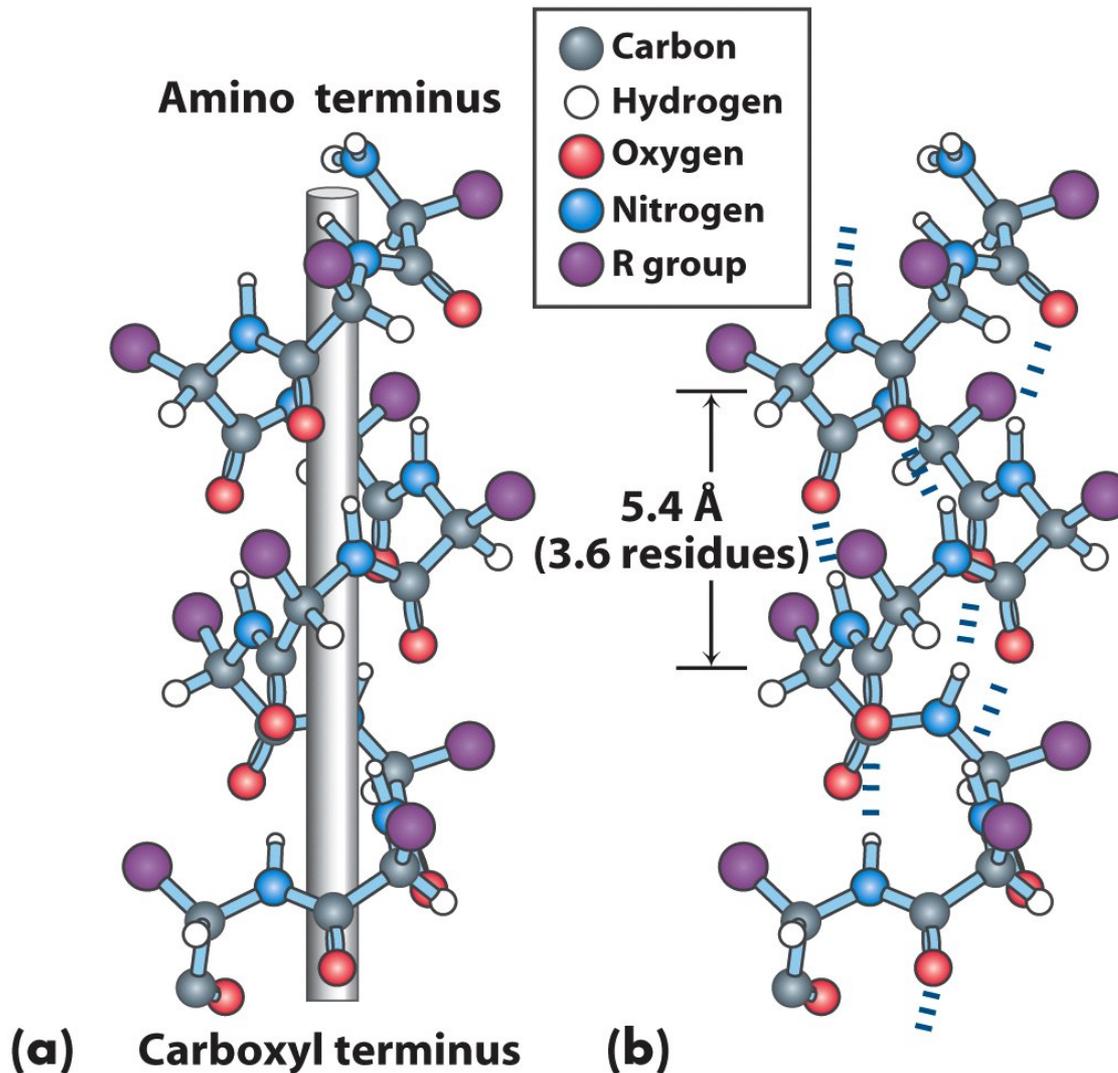
Nei solventi acquosi, e quindi anche nell'ambiente cellulare, la catena polipeptidica assume strutture regolari e ripetitive (**strutture elicoidali, strutture a pieghe**) che comportano massima stabilità derivante da uno stato di minima energia interna della molecola; per il raggiungimento di questa condizione le strutture sono tali da consentire:

1. Minima repulsione sterica tra i gruppi delle catene laterali

2. Massima possibilità di formazione di legami a H

# $\alpha$ -ELICA

- può essere teoricamente destrorsa o sinistrorsa, ma sempre composta da L-aa
- la sinistrorsa è meno stabile per motivi di ingombro sterico
- l' $\alpha$ -elica destrorsa è quella più frequente nelle proteine naturali



**PASSO:** distanza tra due posizioni equivalenti (una spira dell'elica) = 0,54 nm; contiene 3,6 residui

- ogni residuo prolunga l'elica di 0,15 nm rispetto all'asse longitudinale

- ogni O carbonilico nello scheletro polipeptidico è unito mediante legame H con un H ammidico dell'AA che si trova, lungo la catena polipeptidica, a 3 residui AA di distanza

# RESIDUI AA PIU' FREQUENTI NELLE $\alpha$ -ELICHE

ALANINA

LEUCINA

FENILALANINA



piccoli o elettricamente neutri

# RESIDUI AA POCO FREQUENTI NELLE $\alpha$ -ELICHE

ARGININA

A. GLUTAMMICO

SERINA

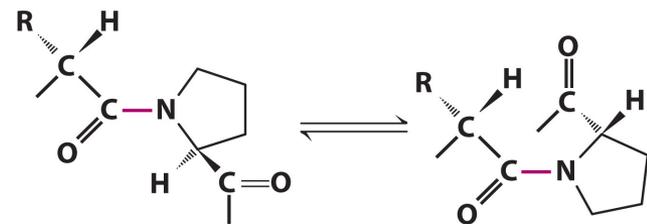
LISINA



polari a pH fisiologico  
destabilizzano l'elica

La PROLINA interrompe l'elica perché la sua struttura non può assumere la conformazione richiesta

## Proline isomers



trans

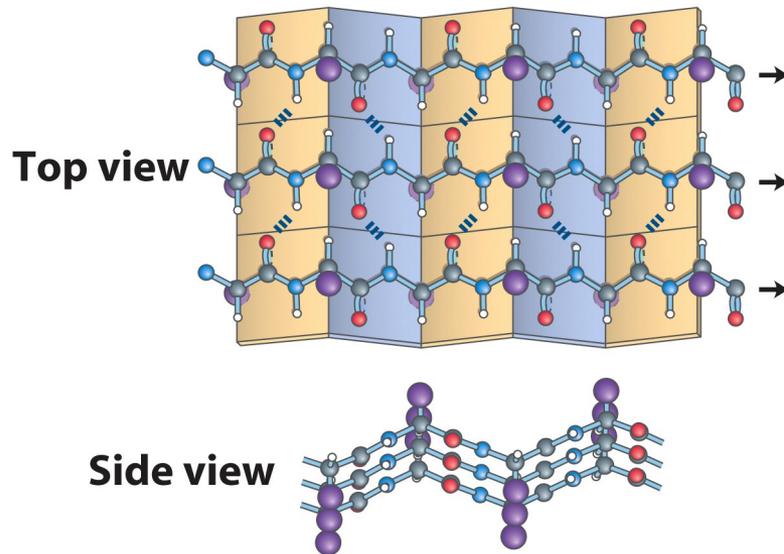
cis

Alcune molecole proteiche sono interamente organizzate come  $\alpha$ -elica  
Es.: le  $\alpha$ -cheratine, costituenti principali della pelle e dei suoi annessi

# STRUTTURA $\beta$ A FOGLIETTO PIEGHETTATO

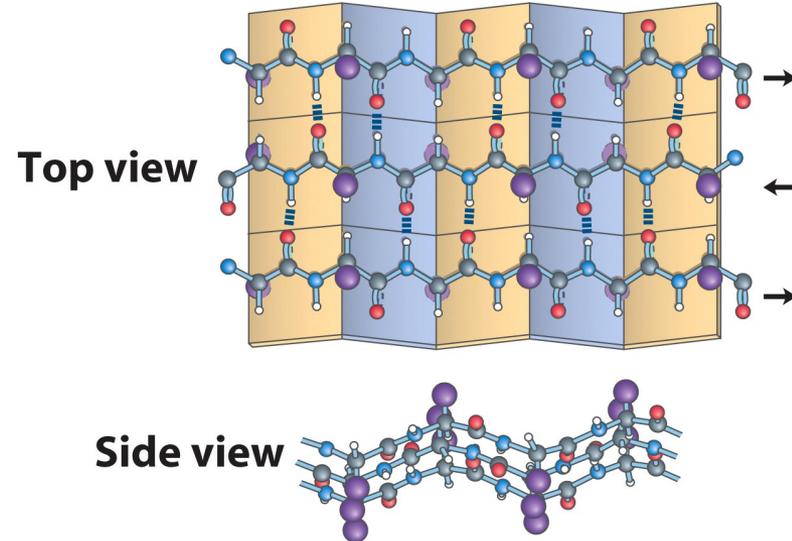
- le catene polipeptidiche non sono avvolte a elica ma sono quasi completamente distese
- la struttura è pieghettata a causa degli angoli di legame
- O carbonilico e H ammidico sporgono quasi ad angolo retto rispetto all'asse longitudinale della catena distesa
- tra O carbonilico e H ammidico di due o più catene adiacenti si instaurano legami H che stabilizzano la struttura
- le catene laterali dei vari residui amminoacidici sporgono alternativamente sopra e sotto il piano del foglietto pieghettato in modo che le catene laterali di residui adiacenti si trovino, rispetto al foglietto, su lati opposti

**(b) Parallel**



il legame tra  $-NH$  e  $-C=O$  decorre nella stessa direzione

**(a) Antiparallel**



il legame tra  $-NH$  e  $-C=O$  decorre in direzioni opposte

## RESIDUI AA PRESENTI NELLE STRUTTURE $\beta$ :

- Predominano piccoli residui non polari (METIONINA, VALINA ISOLEUCINA)

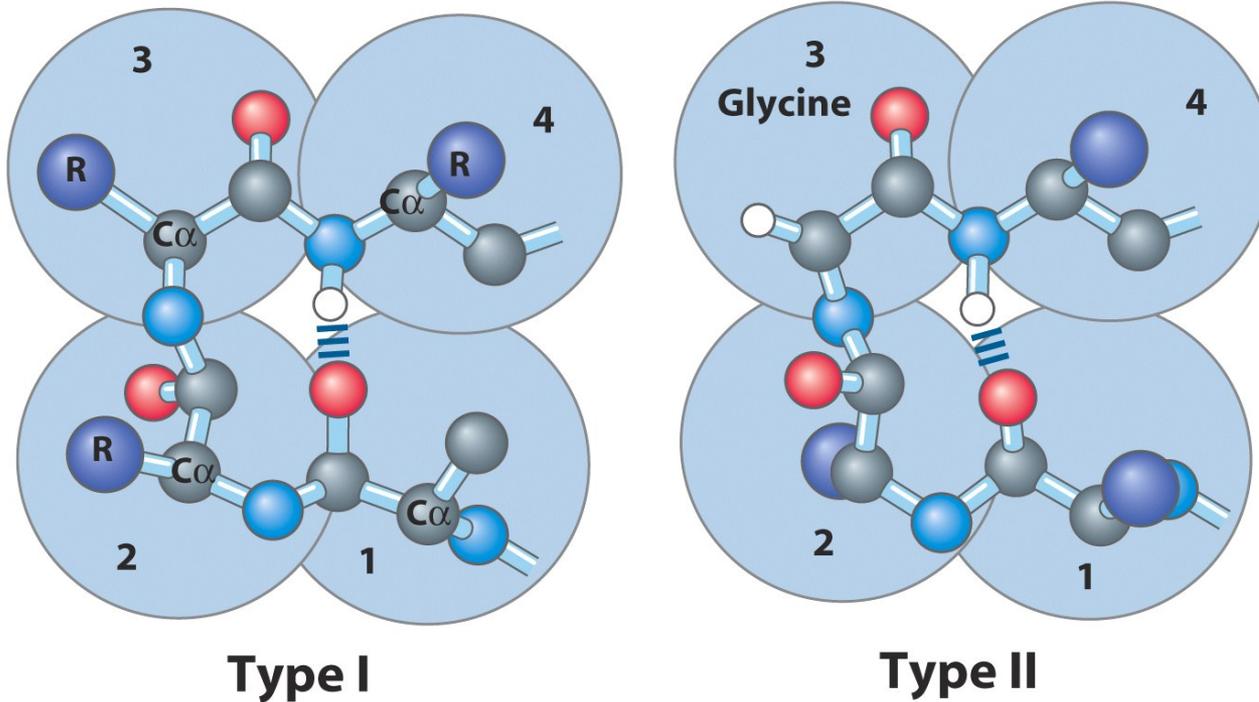
- sono meno frequenti gli AA con catene laterali polari o ingombranti

- la PROLINA è talvolta presente ma tende a interrompere l'andamento regolare della struttura producendo gomiti e inversioni di direzione

# Ripiegamenti o anse:

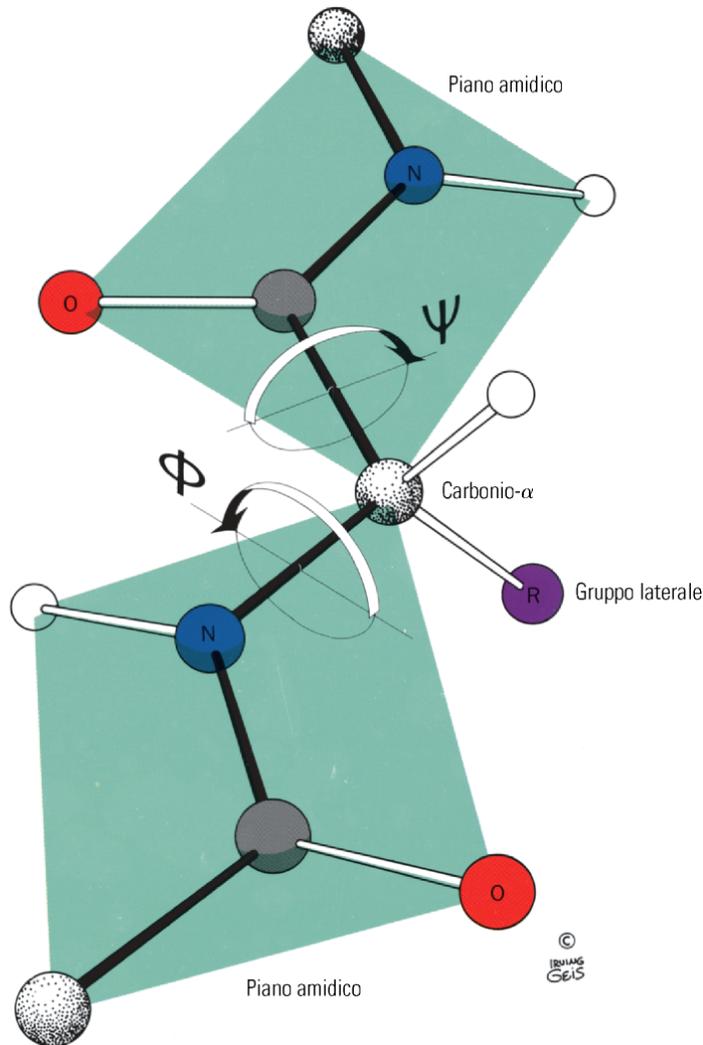
Presenti principalmente nelle proteine globulari. Provocano una inversione della direzione della catena polipeptidica. I ripiegamenti  $\beta$  uniscono segmenti consecutivi di un foglietto  $\beta$  antiparallelo.

## (a) $\beta$ Turns



Il tipo II ha sempre un residuo di Gly nella terza posizione.  
La struttura è stabilizzata dal legame H tra il residuo 1 e il residuo 4

Considerando un singolo residuo AA,  $C\alpha$  funziona da perno unendo due piani ammidici adiacenti. L'angolo di rotazione  $C\alpha-C=O$  è indicato con  $\Psi$  (psi), quello  $C\alpha-NH$  con  $\Phi$  (phi). Gli angoli sono calcolati rispetto ad un piano di riferimento che contiene entrambi i legami ammidici ( $\Psi$  e  $\Phi = 0^\circ$ )



conformazioni ideali (in cui non vi sono interazioni tra catene laterali)

$\alpha$ -elica:

$$\Phi = -57^\circ$$

$$\Psi = -47^\circ$$

$\beta$ -parallelo:

$$\Phi = -119^\circ$$

$$\Psi = +113^\circ$$

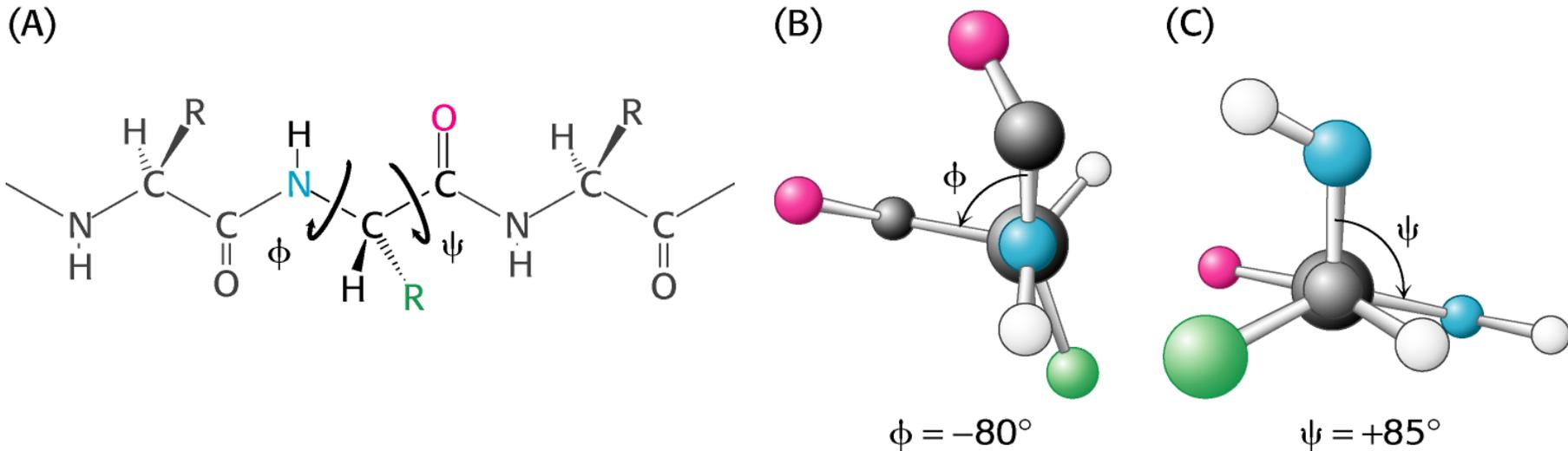
$\beta$ -antiparallelo:

$$\Phi = -139^\circ$$

$$\Psi = +135^\circ$$

Oltre alla  $\alpha$ -elica e alla struttura  $\beta$ , la flessibilità della catena rende possibili altre strutture meno regolari.

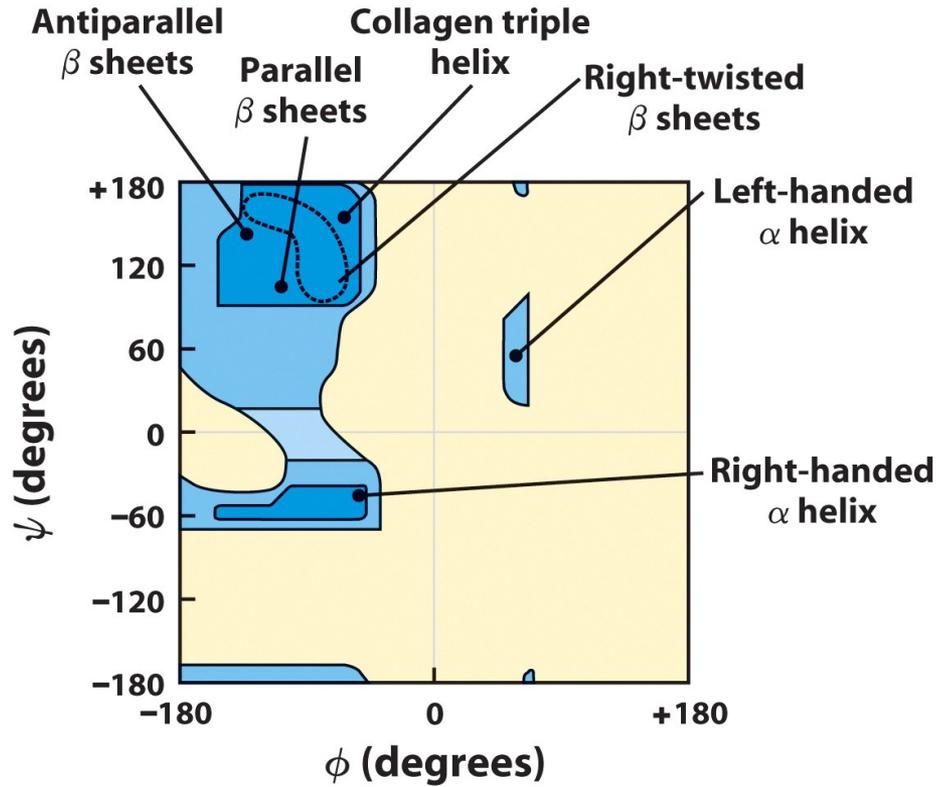
La conformazione della catena polipeptidica in corrispondenza di un dato residuo è determinata dalla posizione reciproca assunta dai gruppi liberi di muoversi e da molte interazioni non covalenti.



In conformazioni diverse, c'è un limite al numero delle combinazioni possibili dei due angoli di rotazione, perché alcune hanno effetti destabilizzanti a causa delle forze di repulsione tra gli O. Vi sono quindi conformazioni più stabili di altre perché favorite da un punto di vista energetico. Conformazioni proibite sono anche quelle in cui si svilupperebbe una forte repulsione tra le catene laterali

**Delle moltissime conformazioni teoricamente possibili per un residuo AA in una catena polipeptidica solo alcune sono stabili**

# Grafico di Ramachandran



# STRUTTURA TERZIARIA

Si origina dal ripiegamento nello spazio della catena polipeptidica, che assume una struttura tridimensionale

Il ripiegamento avviene dopo che la catena ha già stabilite le sue strutture primaria e secondaria

La struttura tridimensionale di una proteina appare come un groviglio casuale della catena, ma in realtà è **predeterminata e dipende dalla struttura primaria**

**La struttura terziaria di una proteina è quella che, tra le numerosissime possibili, ha il minor contenuto energetico che corrisponde alla massima stabilità della proteina**

Un 'importante caratteristica della struttura terziaria è il **ripiegamento a distanza**, in conseguenza del quale residui AA molto distanti nella struttura primaria vengono a trovarsi vicini

La proprietà di ripiegamento permette alla molecola proteica di avere uno o più siti a livello dei quali può legarsi con altre molecole

Stretta correlazione con la funzione biologica

Possibilità di modificare la conformazione per modificare la funzione

La struttura terziaria è stabilizzata da legami tra catene laterali di residui AA che si trovano spazialmente vicini

**LEGAME IONICO:** tra gruppi che portano una carica netta positiva (residui ionizzati di lisina, arginina, istidina e gruppo NH<sub>2</sub> terminale) e gruppi che portano una carica netta negativa (residui ionizzati di a.glutammico, a.aspartico, e gruppo COOH terminale)

L'energia del legame dipende fortemente dalla distanza tra il gruppo + e il gruppo - che di solito è 2-3 Angstrom.

Poiché l'acqua ha una fortissima tendenza a rompere i legami ionici e quelli H la loro esistenza dipende in larga misura dall'esclusione di contatti con il solvente acquoso.

**LEGAME H:** tra gruppi donatori di H e gruppi accettori di H presenti nelle catene laterali.

La capacità di formare legami H può dipendere dallo stato di ionizzazione del gruppo e quindi dal pH

**LEGAME IDROFOBICO:** tendenza delle catene laterali non polari ad unirsi tra loro in modo da offrire la minore superficie al solvente acquoso.

Es.: catene laterali di alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina

**PONTE S-S:** legame covalente. Importante nella stabilizzazione della struttura terziaria. Si forma quando, dopo che la proteina ha assunto la struttura terziaria, due gruppi -SH vengono a trovarsi spazialmente vicini e si ossidano.

La quantità di ponti S-S che si possono formare in una proteina dipende dal numero di residui di cisteina presenti e dalla loro disposizione spaziale.

**LEGAMI CON IONI METALLICI:** in alcune proteine contenenti ioni metallici come  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{++}$ , i legami coordinativi che questi ioni formano con catene laterali di AA possono avere un ruolo importante nel mantenimento della struttura terziaria

Sulla base dei diversi livelli strutturali assunti, le proteine sono classificate in

## **FIBROSE e GLOBULARI**

Differenze strutturali e funzionali

Differenti caratteristiche di idrosolubilità

# PROTEINE FIBROSE

La struttura secondaria è prevalente rispetto a livelli di organizzazione superiore

Sono costituite da lunghe catene polipeptidiche disposte in lunghi fasci o foglietti

Struttura estremamente ordinata

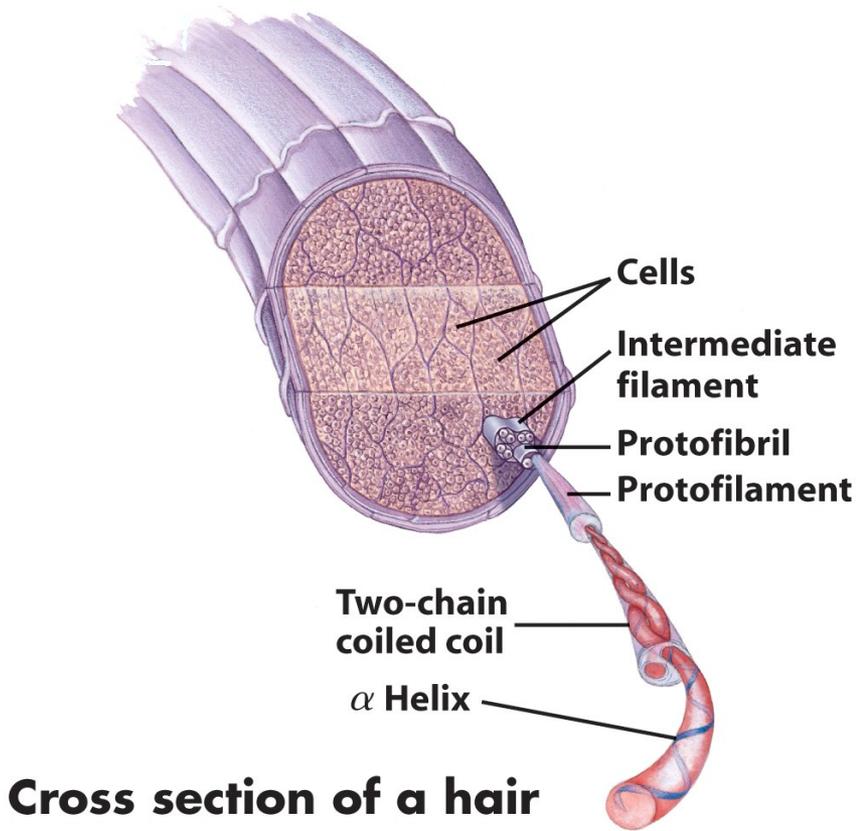
Funzione di **protezione e sostegno**

Rappresentano fino a 1/3 del peso in proteine dei vertebrati

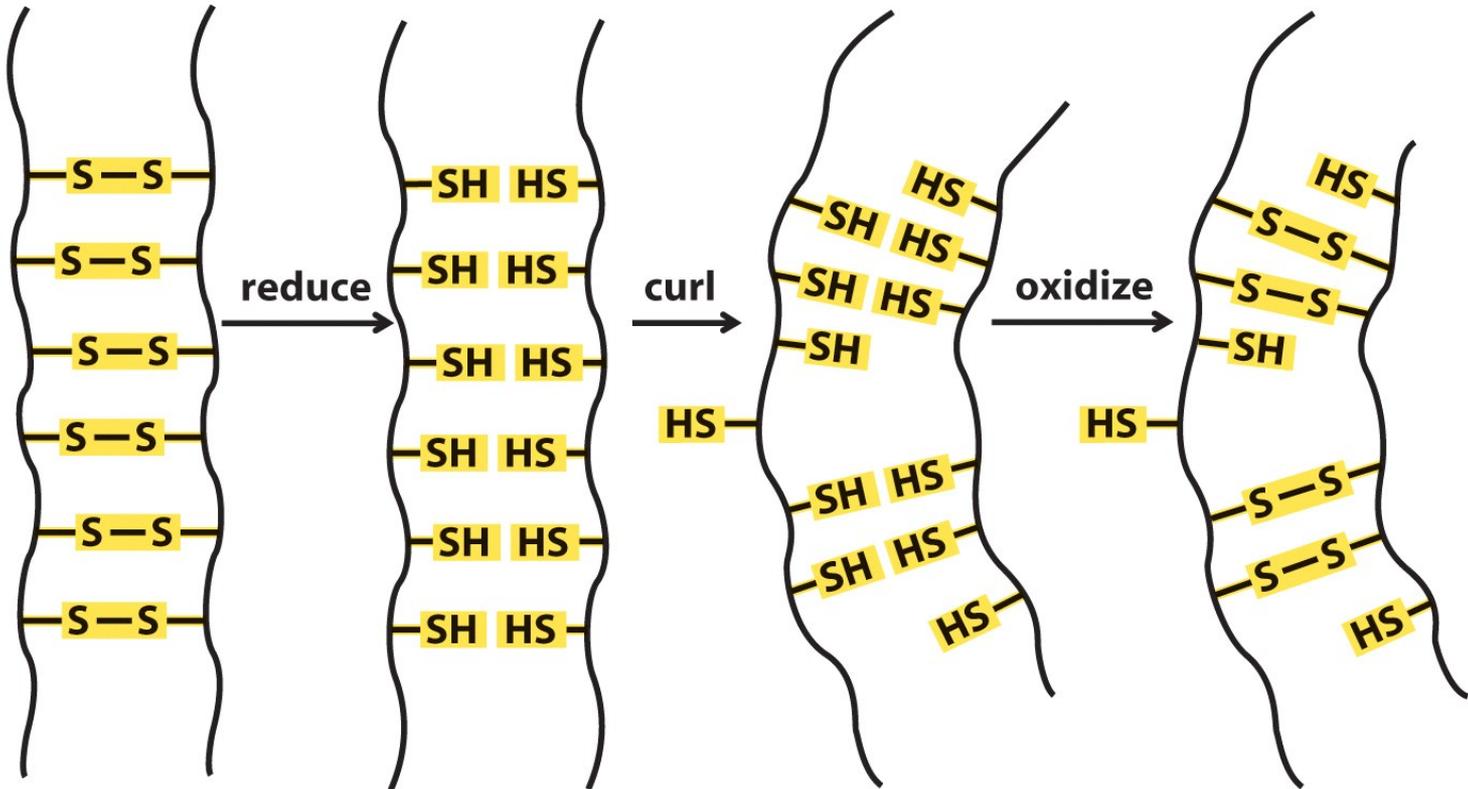
Sono costituiti prevalentemente da proteine fibrose:



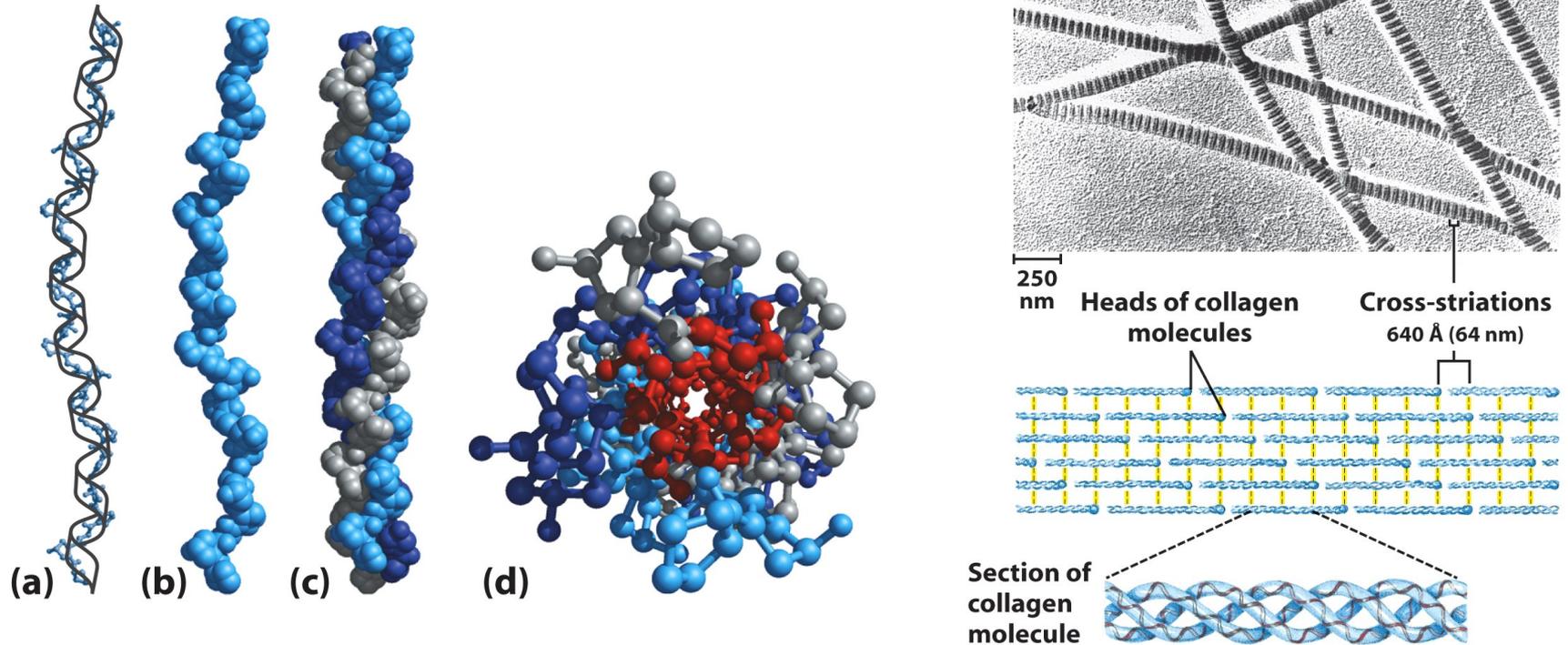
**Insolubili in acqua** perché costituite prevalentemente da AA con radicali idrofobici che sporgono verso l'esterno della struttura



La “permanente” è il risultato di una serie di reazioni chimiche



# Struttura del collageno

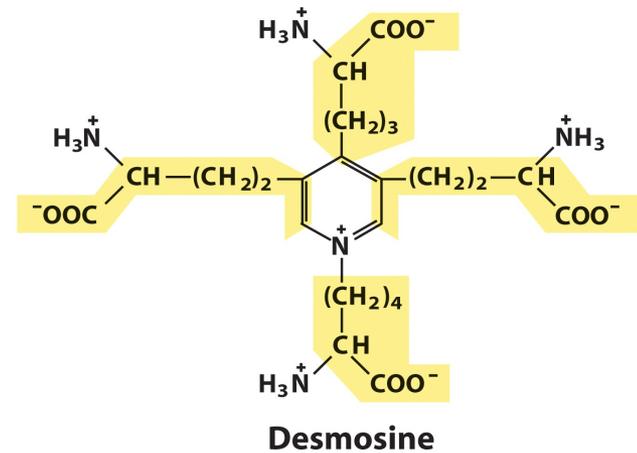
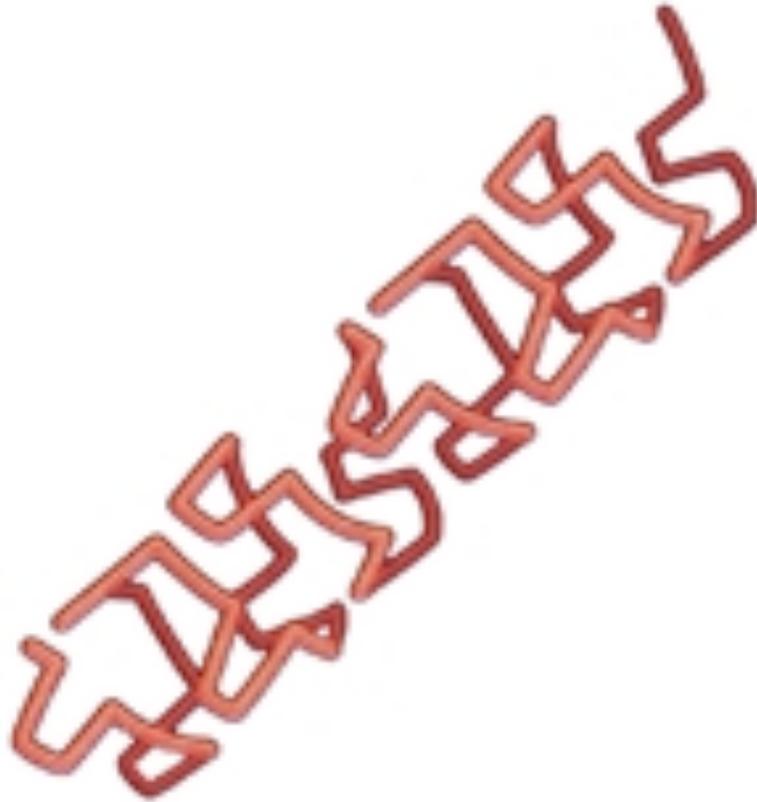


Componente principale del tessuto connettivo (ossa, tendini, legamenti e vasi sanguigni).

Ciascun filamento forma una conformazione elicoidale (sinistrorsa) e tre filamenti si avvolgono l'uno intorno all'altro (legami intercatena idrofobici e legami H).

L'effetto è la creazione di una proteina fibrosa di grande resistenza alla rottura, ma capacità di allungamento nulla

# Elastina



Principale costituente dei tendini

Simile per composizione al collagene, ma possiede elasticità grazie alla presenza della DESMOSINA, presente solo in questo tipo di struttura  
La molecola della desmosina funziona da fulcro sul quale si innestano le catene di elastina

# FIBROINA

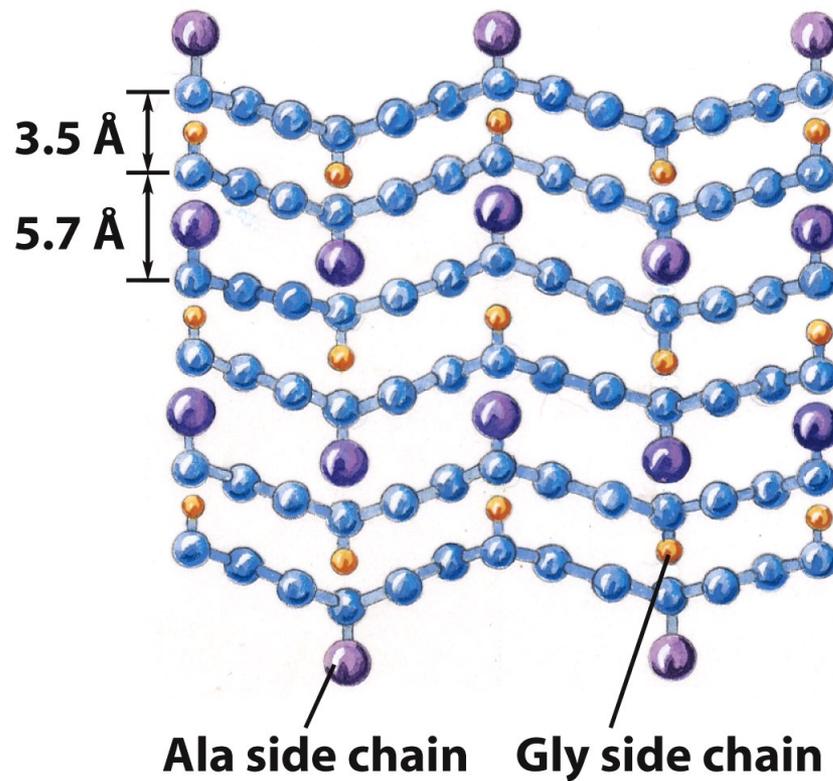
Costituente principale della seta e della tela di ragno  
Organizzata esclusivamente come struttura  $\beta$   
I foglietti sono impilati in maniera estremamente ordinata

La Fibroina è:

**FLESSIBILE** perché le lamine sovrapposte sono unite tra loro da interazioni di Van der Waals fra le catene laterali

**RESISTENTE** a causa dei legami H fra le catene adiacenti di ogni lamina e per l'effetto globale delle forze di Van der Waals tra catene sovrapposte

Le catene sono ricche di Ala e Gly. Le piccole catene laterali di questi due residui consentono un ammassamento perfetto degli strati di foglietti



## **PROTEINE GLOBULARI**

**Assumono struttura terziaria e qualche volta quaternaria  
Sono macromolecole compatte di forma più o meno sferica  
Struttura meno ordinata delle fibrose con necessità di variare  
conformazione**

**Funzione di  
trasporto  
catalisi  
tutte le proteine che intervengono nella regolazione delle attività  
della cellula**

**Sono proteine globulari:**

**Enzimi**

**Trasportatori di ossigeno e lipidi nel sangue**

**Alcuni ormoni**

**Recettori di membrana**

**Anticorpi**

**Sono proteine solubili nel citosol e nella fase lipidica delle membrane biologiche (la struttura tridimensionale può variare al variare dell'ambiente in cui si trova)**

**La struttura è caratterizzata da brevi tratti di  $\alpha$ -elica e struttura  $\beta$ , collegate da tratti non organizzati in struttura secondaria**

**TABLE 4-2** Approximate Amounts of  $\alpha$  Helix and  $\beta$  Conformation in Some Single-Chain Proteins

<i>Protein (total residues)</i>	<i>Residues (%)*</i>	
	$\alpha$ Helix	$\beta$ Conformation
Chymotrypsin (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxypeptidase (307)	38	17
Cytochrome c (104)	39	0
Lysozyme (129)	40	12
Myoglobin (153)	78	0

Source: Data from Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W. H. Freeman and Company, New York.

\*Portions of the polypeptide chains that are not accounted for by  $\alpha$  helix or  $\beta$  conformation consist of bends and irregularly coiled or extended stretches. Segments of  $\alpha$  helix and  $\beta$  conformation sometimes deviate slightly from their normal dimensions and geometry.

---

**$\beta$  Conformation**  
 **$2,000 \times 5 \text{ \AA}$**

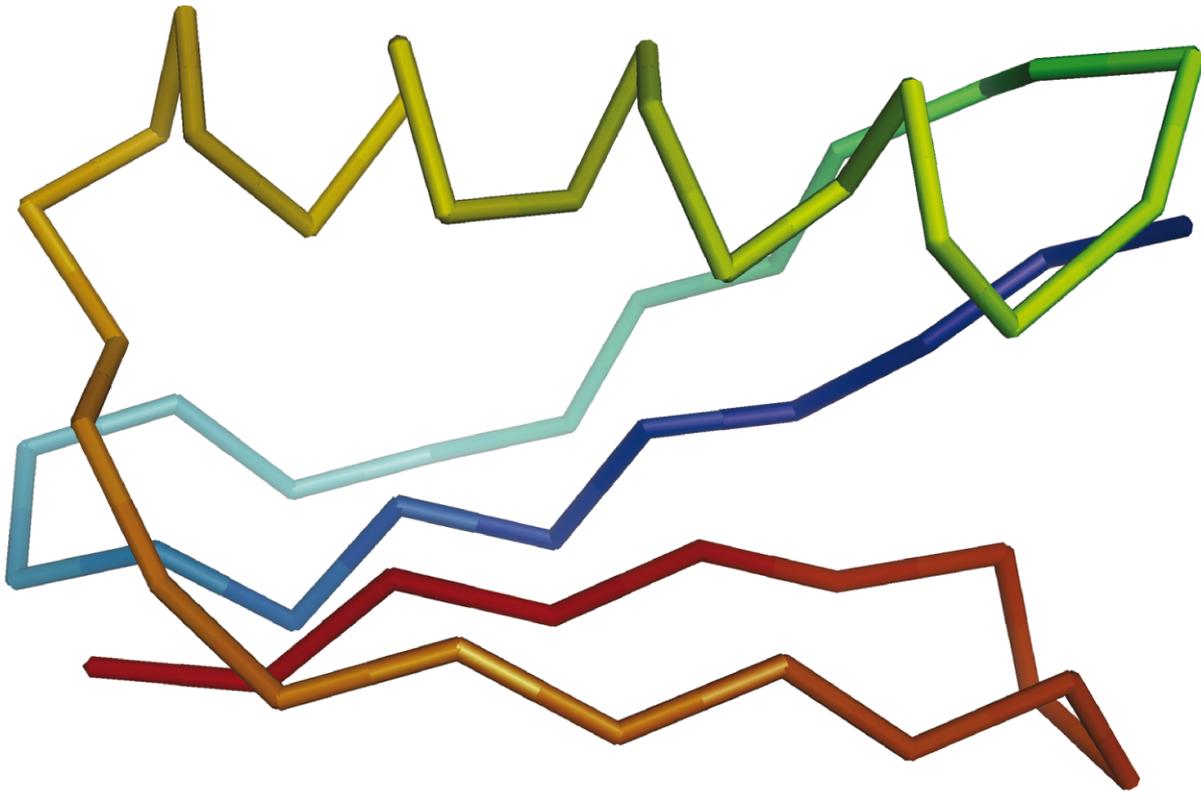
---

**$\alpha$  Helix**  
 **$900 \times 11 \text{ \AA}$**

  
**Native globular form**  
 **$100 \times 60 \text{ \AA}$**

**Albumina del siero umano**  
**PM 64500**  
**585 AA**

**La struttura terziaria  
di una proteina può  
essere rappresentata  
in maniera diversa**



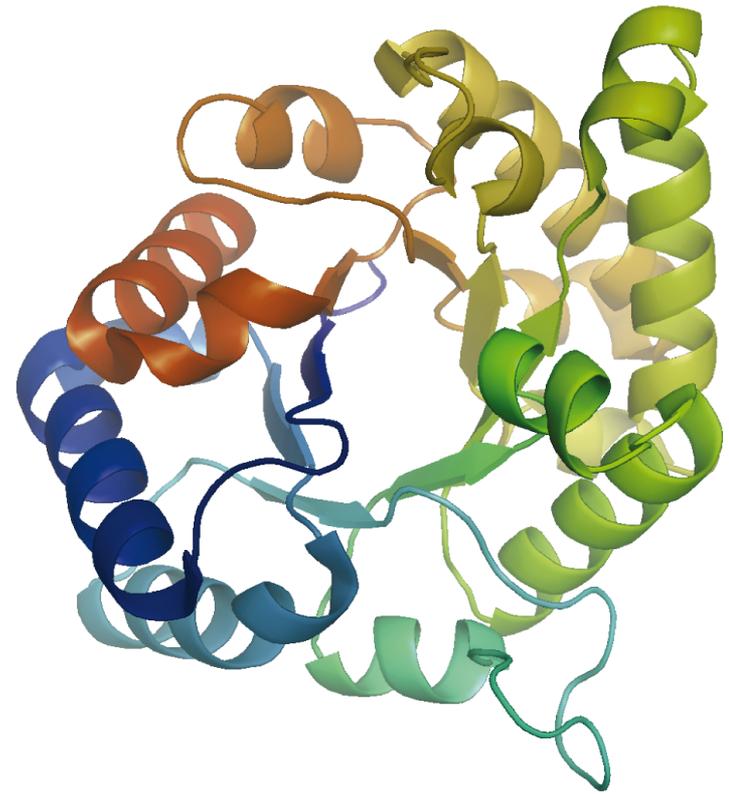
**Proteina G di Stafilococco**

**Blu= N-terminale**

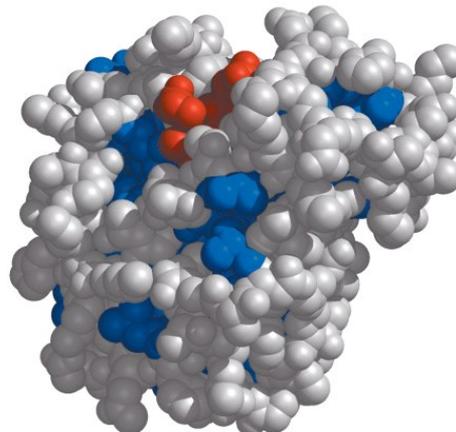
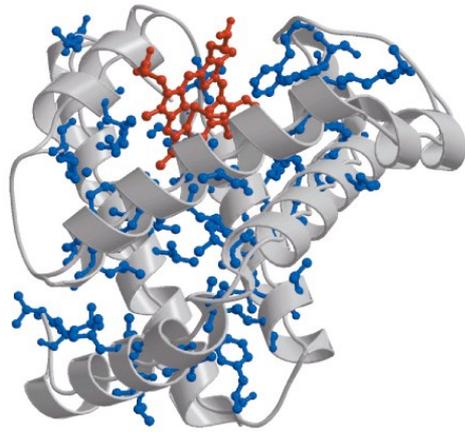
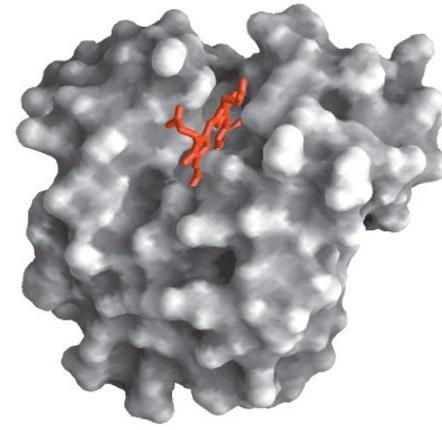
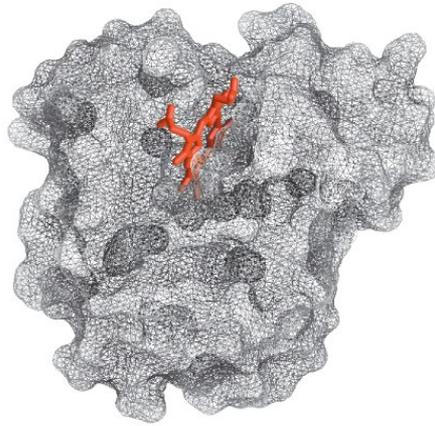
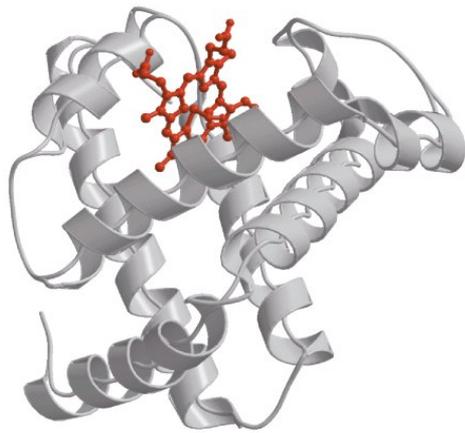
**Rosso = C-terminale**



**AraC**



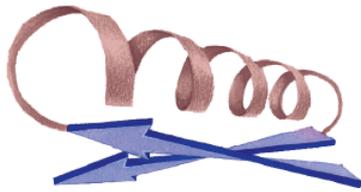
**Trioso fosfato isomerasi**



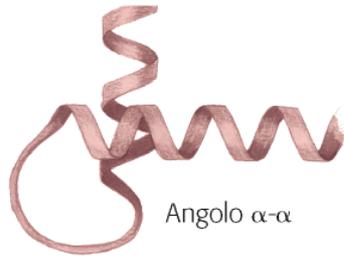
**Struttura terziaria della mioglobina di capodoglio**

# STRUTTURE SUPERSECONDARIE (motivi, ripiegamenti)

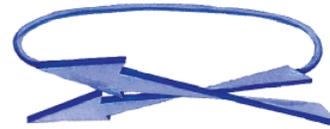
Livello strutturale intermedio tra la struttura secondaria e la terziaria  
Presenti nelle proteine globulari. Organizzazioni particolarmente stabili,  
correlate con la funzione



(a) Coppio  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$



Angolo  $\alpha$ - $\alpha$



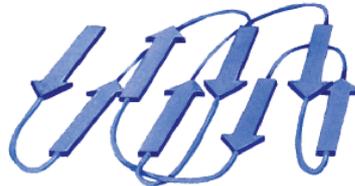
(c) Connessione destrorsa  
tra due catene  $\beta$



Connessione sinistrorsa  
tra due catene  $\beta$   
(molto rare)



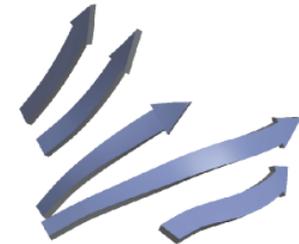
(b) Connessioni tipiche  
in un motivo tutto  $\beta$



Connessioni incrociate  
(non osservate)



(d) Barile  $\beta$



Foglietto  $\beta$  avvolto

# STRUTTURA QUATERNARIA

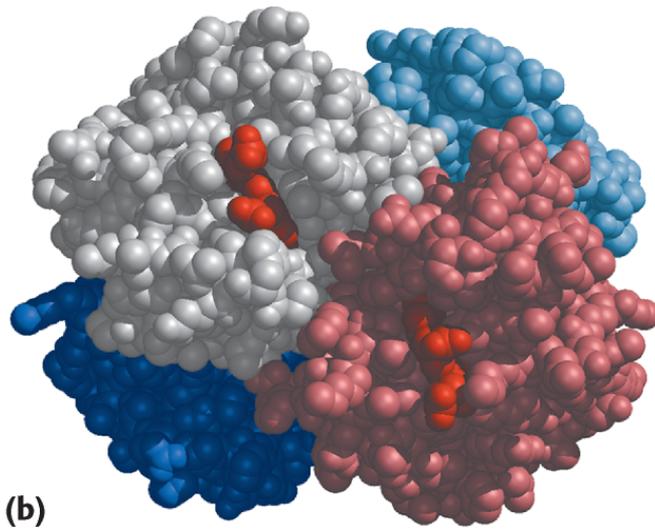
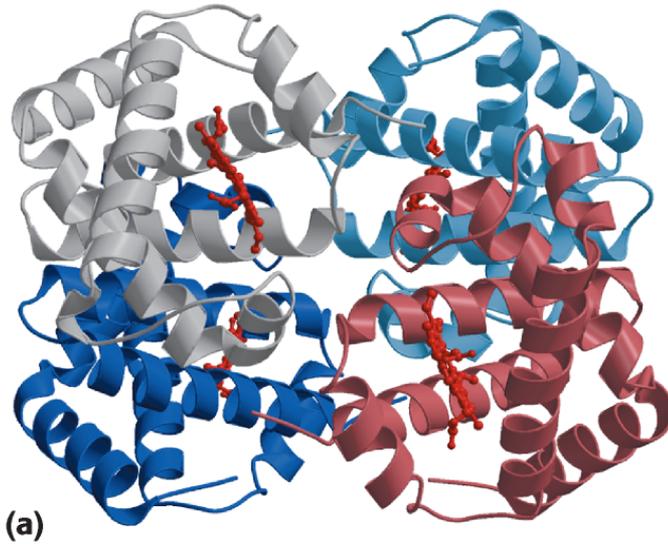
Stabilisce il modo in cui due o più catene polipeptidiche si associano tramite interazioni non covalenti.

La struttura che ne risulta è spesso detta OLIGOMERO e le catene polipeptidiche costituenti sono dette MONOMERI o PROTOMERI o SUBUNITA' .

I monomeri di una proteina oligomerica possono avere struttura primaria, secondaria e terziaria identiche o completamente diverse

# CARATTERISTICHE:

- il numero e il tipo di catene è programmato e definito
- le subunità sono unite mediante legami H, ionici, idrofobici
- i rapporti spaziali tra le subunità sono fissi
- la geometria della molecola intera è definita
- l'unione delle subunità può permettere l'insorgere di proprietà non possedute dai singoli monomeri
- l'unione o la separazione delle subunità può mediare la regolazione di alcuni processi cellulari



**Struttura quaternaria della deossiemo globina**

La perdita della struttura di una proteina determina la perdita della sua funzione → **DENATURAZIONE**

La maggior parte delle proteine può essere denaturata con il **calore**, che altera i legami deboli, in particolare i legami H.

La perdita della struttura avviene in maniera brusca ed in un intervallo molto ristretto di temperatura (ipotesi di **meccanismo cooperativo**). Il valore  $T_m$  è caratteristico di ogni proteina.

**Altri agenti denaturanti:**

**valori di pH estremi:** alterazioni dello stato di ionizzazione delle catene laterali, alterazioni della carica netta della proteina, che determinano repulsioni elettrostatiche e rottura di legami H

**solventi organici (alcol o acetone)**

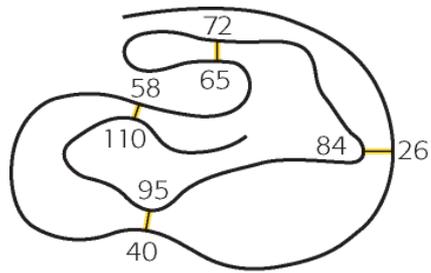
**urea**

**idrocloreuro di guanidina,**

**detergenti**

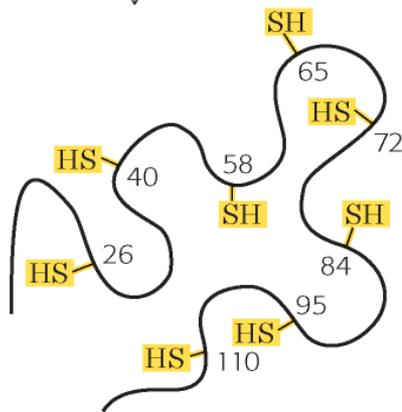
alterazioni delle interazioni idrofobiche che stabilizzano il nucleo interno delle proteine globulari

Lo stato denaturato cambia a seconda del denaturante usato e della proteina



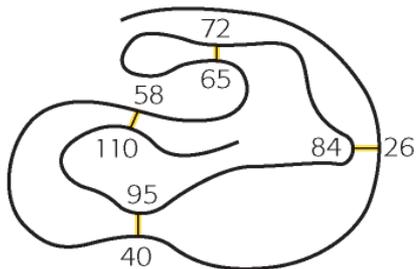
Stato nativo,  
cataliticamente attivo

aggiunta  
di urea  
e di  
mercapto-etanolo



Stato srotolato, inattivo.  
I ponti disolfuro sono  
stati ridotti a residui  
di Cys

allontanamento  
dell'urea  
e del  
mercapto-etanolo



Stato nativo,  
cataliticamente attivo.  
I ponti disolfuro dei  
quattro residui di  
cistina si sono riformati  
correttamente

## LA DENATURAZIONE E' UN PROCESSO REVERSIBILE

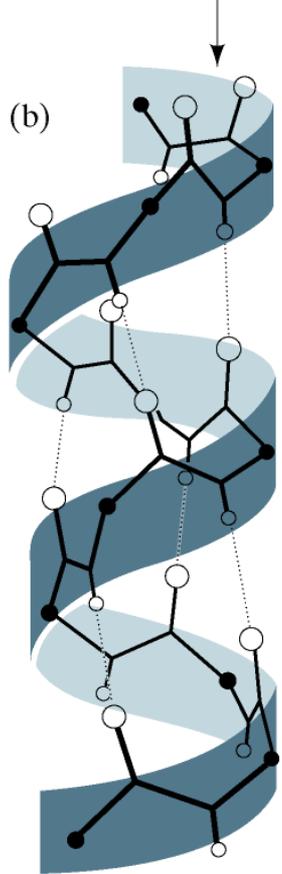
Le proteine globulari, una volta denaturate, possono riacquistare la loro struttura nativa e la loro attività biologica se vengono riportate nelle condizioni in cui la conformazione attiva è stabile

## RINATURAZIONE

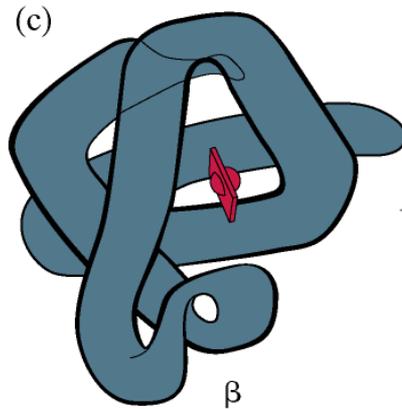
E' la prova più importante a supporto del concetto che la struttura terziaria di una proteina globulare è determinata dalla sua sequenza aminoacidica

### Rinaturazione della Ribonucleasi

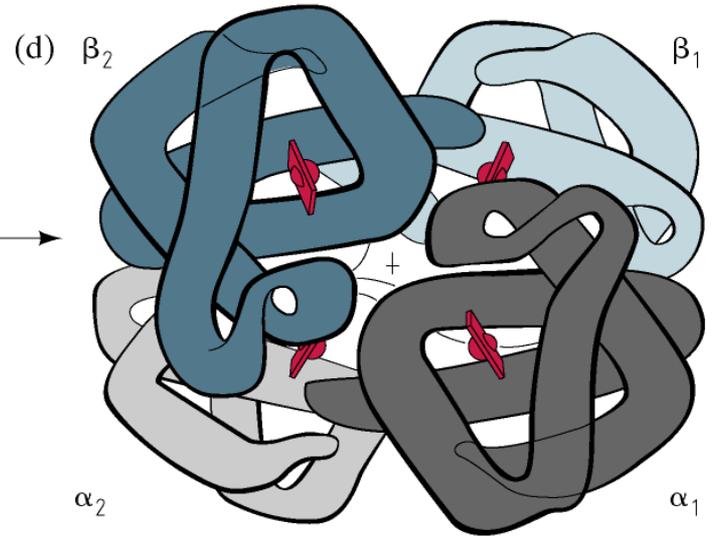
(a) - Lys - Ala - His - Gly - Lys - Lys - Val - Leu - Gly - Ala -  
Struttura primaria (sequenza degli amminoacidi di una catena polipeptidica)



Struttura secondaria (elica)



Struttura terziaria :  
una catena proteica completa  
(catena β dell'emoglobina)



Struttura quaternaria:  
le quattro catene separate  
dell'emoglobina assemblate  
in un'unica proteina oligomerica