



Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino

Appunti universitari

Tesi di laurea

Cartoleria e cancelleria

Stampa file e fotocopie

Print on demand

Rilegature

NUMERO: 1246

DATA: 27/10/2014

A P P U N T I

STUDENTE: Russo

MATERIA: Bioingegneria Chimica

Prof. Ciardelli

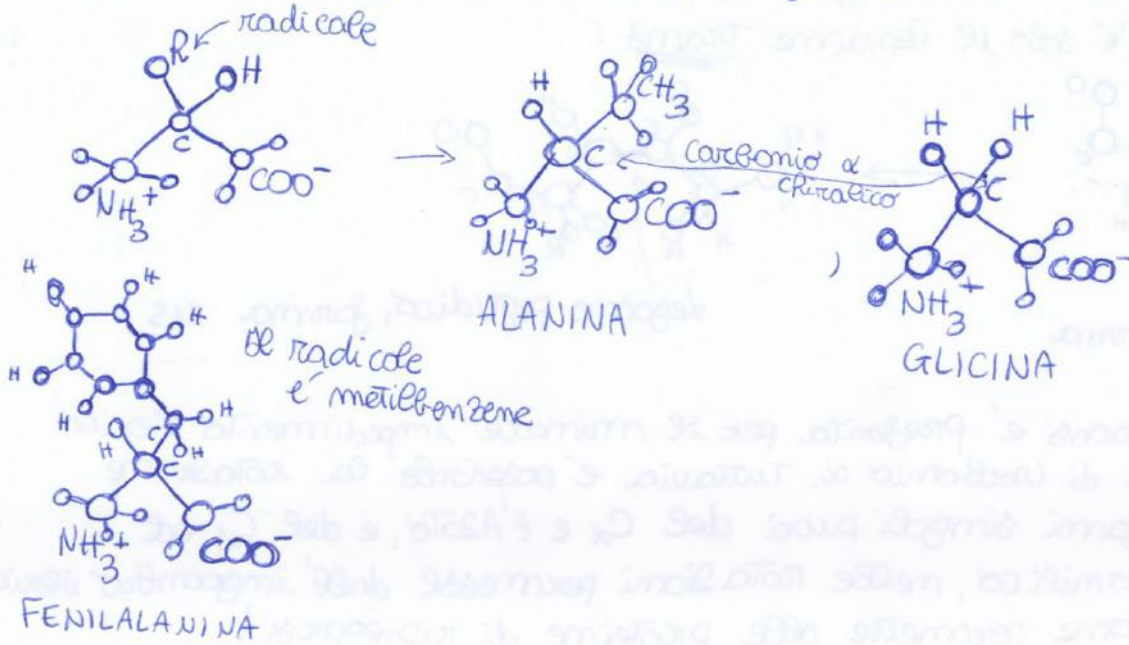
Il presente lavoro nasce dall'impegno dell'autore ed è distribuito in accordo con il Centro Appunti.

Tutti i diritti sono riservati. È vietata qualsiasi riproduzione, copia totale o parziale, dei contenuti inseriti nel presente volume, ivi inclusa la memorizzazione, rielaborazione, diffusione o distribuzione dei contenuti stessi mediante qualunque supporto magnetico o cartaceo, piattaforma tecnologica o rete telematica, senza previa autorizzazione scritta dell'autore.

**ATTENZIONE: QUESTI APPUNTI SONO FATTI DA STUDENTIE NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE.
IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.**

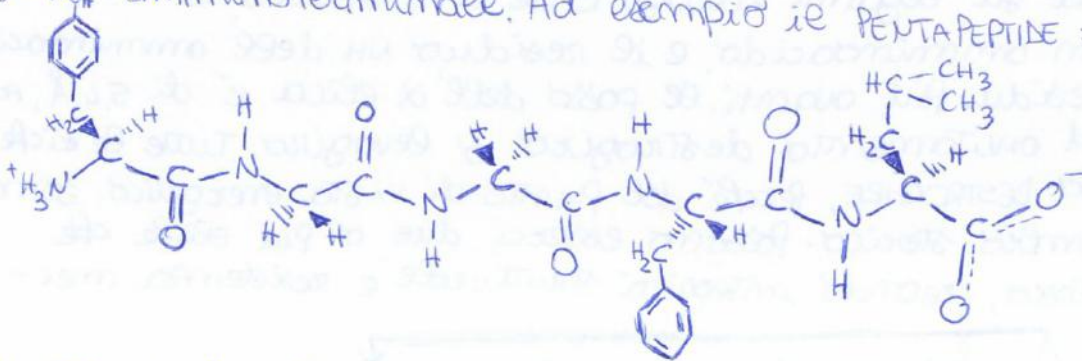
PROTEINE

Sono formate da 20 amminoacidi fondamentali:

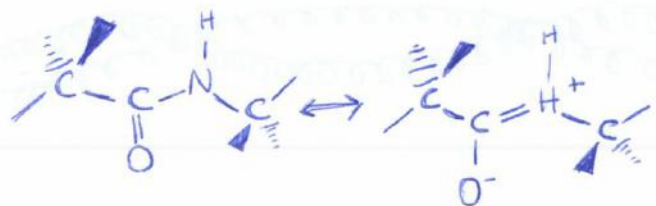
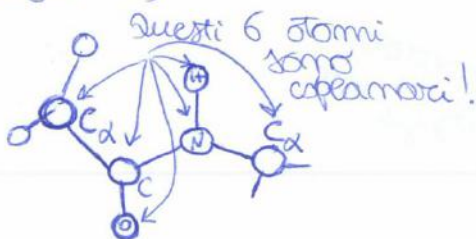


Struttura primaria delle proteine:

Sono polimeri lineari dove un residuo α -carbossilico si lega ad uno α -amminico, si chiama LEGAME PEPTIDICO; in una catena così formata ogni amminoacido si chiama "residuo", ad una estremità vi è sempre un gruppo α -amminico, all'altra un gruppo α -carbossilico; per convenzione si nomina la catena a partire dal gruppo amminoterminale. Ad esempio il PENTAPEPTIDE: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu:

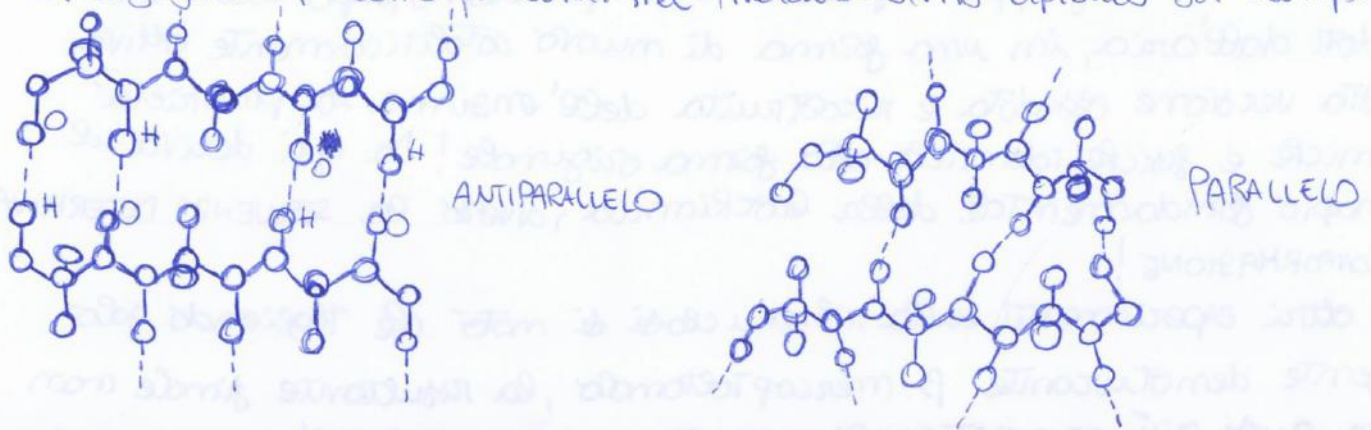


La sequenza degli amminoacidi in una catena è detta STRUTTURA PRIMARIA. I legami peptidici tendono ad essere planari, poiché fanno parte del sistema di doppi legami e riducono la possibile disposizione dello scheletro covalente del peptide (impossibilità di ruotare intorno al legame).



Possibili strutture di risonanza

β FOGLIETTO \rightarrow In una catena β , un singolo foglietto è formato da due o più catene unite da legami idrogeno. Queste catene possono avere stessa direzione uguale (β parallelo) o opposta (β antiparallelo). I foglietti β sono presenti nel metabolismo lipidico ad esempio.



RIPIEGAMENTI E ANSE \rightarrow Nelle proteine si verifica spesso inversione della catena principale, tramite ANSE α o RIPIEGAMENTI β . Queste modificazioni della struttura non formano periodicità regolare.

Struttura Terziaria delle proteine

Riguarda la disposizione nello spazio della catena polipeptidica. ~~La~~ Della distribuzione di proteine come la mioglobina si ritiene che l'interno della catena ha prevalentemente residui non polari (leucina, valina, metionina, fenilalanina), i residui polari sono quasi assenti. Da questo deriva che in ambiente acquoso il ripiegamento è guidato dalla tendenza ad isolare dall'acqua i residui idrofobici. Il sistema dal punto di vista termodinamico è più stabile quando i residui sono ADDENSATI invece che liberi nell'ambiente acquoso. Naturalmente i residui polari saranno sulla superficie della proteina (molte α eliche e β foglietto sono anfipatiche). Inoltre dallo stretto contatto dei residui addensati, si ottiene una notevole forza di interazione tramite legami di Van der Waals, che formano bisogno di vicinanza tra le molecole.

Una eccezione è data dalle proteine che attraversano le membrane biologiche, dove le catene amminoacidiche polari si trovano all'interno della proteina, così possono reagire con altre catene idrocarbiche mediante residui idrofobici presenti sulla superficie.

Struttura quaternaria delle proteine

In proteine con più di una catena polipeptidica, ogni catena viene detta SUBUNITÀ; la disposizione di queste subunità e le interazioni tra di esse si chiama STRUTTURA QUATERNARIA. Ad esempio l'emoglobina umana è un tetramero con due subunità α e due subunità β .

Processo dei ripiegamenti

Come si arriva da tutte le possibili conformazioni a quella motiva termodinamicamente favorevole? È possibile che vengano visitate tutte le possibili configurazioni, ma questo implicherebbe un tempo dell'ordine di 10^{27} anni, o fronte del poco tempo realmente necessario (paradossò di Levinthal). Questa differenza si spiega col fatto che vengono CONSERVATI GLI INTERMEDI CORRETTI, ovvero ogni residuo esatto ^{formisce} ~~formisce~~ un contributo energetico al totale necessario per raggiungere lo stato stabile. Si creano quindi delle PORZIONI della struttura finale, stabili.

L'enzima DISOLFURO ISOMERASI aiuta a rimediare questi errori di folding, può catalizzare l'apertura e richiusura dei ponti S-S del legame di zolfo.

ESPLORAZIONE DELLE PROTEINE!

Genoma e l'insieme delle sequenze delle basi nel DNA, proteoma e l'insieme delle informazioni funzionali delle proteine di un organismo. Per coprire il proteoma bisogna SEPARARE e catalogare le proteine. Devono quindi essere separate dal resto delle biomolecole (devono essere PURE). Per prima cosa, la proteina deve essere separata dalle cellule, ovvero ottenere componenti di cellule ricche di proteina. Si prepara prima un OMOGENATO rompendo le membrane cellulari; quindi la miscela viene centrifugata, nella provetta ci sarà una parte depositata (materiali pesanti e insolubili) e una supernatante detta soprarnatante (leggera, fase acquosa). Il soprarnatante verrà ulteriormente centrifugato per raccogliere altri elementi corpuscolati. Si ottengono quindi varie FRAZIONI (centrifugazione differenziale) nelle quali verrà dosata l'attività della proteina da purificare (quella più ricca sarà usata come fonte di materiale).

Le successive tecniche di purificazione sfruttano le caratteristiche della proteina come carica, affinità di legame con molecole specifiche, solubilità e dimensione.

Salting out

Si basa sulla diminuzione della solubilità di una proteina in presenza di SALI; con una debita concentrazione di sale (ad esempio solfato di ammonio), la proteina precipita sul fondo della provetta.

Dialisi

Separa le proteine da molecole più grandi mediante una membrana semipermeabile; i sali e le piccole molecole escono dal sacchetto per dialisi, le molecole più grosse rimangono dentro e non passano in soluzione (poco utile però per separare diverse proteine).

Viene anche aggiunto mercaptoetanololo per ridurre i legami disolfuro d'SDS su lega alla catena principale di ogni proteina, in rapporto 1 molecola SDS ogni 2 amminozacidi; il complesso SDS-proteina denaturata assume così carica netta negativa \propto proporzionale alla massa della proteina (\gg carica della proteina nativa). Questi complessi vengono ora sottoposti all'elettroforesi e visualizzate con tecniche di colorazione. Il risultato finale è che le proteine più piccole si muovono velocemente nel gel, mentre quelle più grandi restano vicine al punto dove è stata applicata la miscela. Questo perché all'incirca la velocità delle proteine è proporzionale al logaritmo della massa, si vedranno con la colorazione varie bande di proteine, ed aumentare della purificazione resterà solo la banda corrispondente alla proteina desiderata.

PUNTO ISOELETTRICO

È un altro metodo di elettroforesi basato sul contenuto di residui acidi e basici. Il PUNTO ISOELETTRICO della proteina è il pH al quale essa ha carica netta uguale a zero. La mobilità nell'elettroforesi sarà quindi nulla (non risente di E). Se si pone la miscela di proteine in un gel (SENZA SDS) con gradiente di pH, ogni proteina si muoverà fino alla zona dove il pH è uguale al punto isoelettrico (lì si ferma). È un metodo molto preciso per ~~le~~ classificare le proteine in base al loro punto isoelettrico! (Anche se differisce di poco da quello di un'altra proteina).

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

Combinando le due tecniche precedenti per ottenere un altro grado di risoluzione, consiste nell'eseguire prima la focalizzazione isoelettrica, poi porre la lastra su un gel con SDS, e infine viene eseguita elettroforesi verticale, ottenendo una distribuzione di macchie ORIZZONTALI (in base al punto isoelettrico) e VERTICALI (in base alla massa). Dalle dimensioni delle macchie si possono quantificare le proteine presenti, e mettere in evidenza l'aumento o diminuzione delle proteine in risposta a stimoli fisiologici. Per conoscere anche quali proteine ci sono oltre alla quantità, bisogna ricorrere alla spettrometria di massa.

Voluzione schematica della purificazione

Si possono valutare le seguenti caratteristiche della soluzione ottenuta dopo l'SDS-PAGE:

PROTEINA TOTALE \rightarrow concentrazione molare od ogni tappa della purificazione

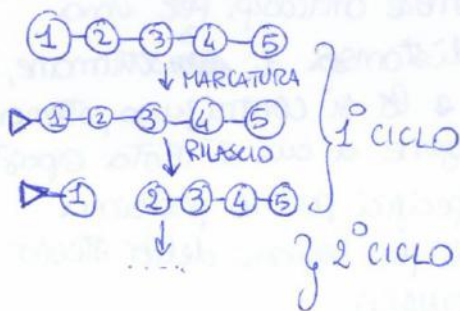
ATTIVITÀ SPECIFICA \rightarrow ad ogni tappa misura dell'attività enzimatica della proteina.

Degradazione di Edman

Dopo la purificazione e la determinazione della massa, bisogna determinare la sequenza amminiacidica (struttura primaria).
Come si determina quali amminiacidi compongono le peptide?
I legami peptidici vengono idrolizzati in HCl a 110°C , e quindi identificati con cromatografia a scambio ionico su colonna di polistirene. Una volta misurato il volume di eluzione, si quantifica ogni amminiacido mediante colorazione (ogni a.a. assorbe diversamente la luce). Confrontando il profilo cromatografico con uno standard, si determina le specie presenti, ad esempio: (Ala, Arg, Asp, Gly, Phe) SOLO COMPOSIZIONE, NON SEQUENZA

Successivamente si marca il residuo amminoterminale con un composto che si lega covalentemente ad esso (oggi cloruro di dansile, altamente fluorescente), formando un dansil-peptide. Questo elemento viene poi idrolizzato, dando un dansil amminiacido, che viene identificato dalla colorazione. Ma questo funziona solo per determinare un residuo! Infatti tutto il peptide viene degradato durante l'idrolisi, perdendo l'informazione.

Per non degradare tutto il peptide viene usata la DEGRADAZIONE DI EDMAN, rimuove un residuo alla volta dall'estremità amminoterminale. Si basa sul fenil isotiocinato che reagisce col gruppo amminoterminale, formando un derivato ciclico dell'amminiacido terminale in soluzione debolmente acida. Il resto del peptide resta intatto! (accorciato di un amminiacido). Il composto ciclico staccato dalla catena può essere identificato con cromatografia. Questa procedura è molto sensibile e permette di analizzare la sequenza di una proteina eluita da una banda di gel di poliacrilamide con SDS.



Tuttavia la deg. di Edman perde precisione all'aumentare dei cicli (peptidi > 50 residui), diventa inutilizzabile! Per risolvere questo problema si può rompere la catena in segmenti da 50 residui ciascuno. Per rompere la catena si usano composti specifici (ad esempio Bromuro di cianogeno che spezza in corrispondenza dei residui di metionina). Dopo aver identificato tutti gli amminiacidi dei singoli segmenti, bisogna ricomporre i vari segmenti, tramite la sovrapposizione dei peptidi. Per fare ciò si spezza la catena con un secondo enzima che rompe in corrispondenza di legami specifici (ad esempio Chimosina, che toglie sul lato carbossilico di residui aromatici). Questi peptidi così ottenuti permettono la determinazione di sequenza con due o più peptidi del primo

ELISA INDIRETTO → ricerca la presenza di anticorpi (ad es. ricerca dell'HIV).
 Le proteine del rivestimento del virus (antigeni) vengono fissate in fondo ad un pozzetto. Successivamente viene inserito il campione di anticorpi del paziente per permettere l'interazione. Infine viene inserito un secondo anticorpo con enzima che riconosce gli anticorpi umani, facendo via gli anticorpi in eccesso non legati. Si aggiunge infine il substrato incolore, e se l'enzima lo colora formando un complesso significa che il paziente possiede gli anticorpi per l'antigene virale.

ELISA SANDWICH → permette identificazione e quantificazione; rispetto al caso indiretto, viene fissato sul fondo del pozzetto un ~~antigene~~ antigene diretto contro un certo antigene, si aggiunge quindi l'antigene (sangue o urina) e poi l'anticorpo secondario con enzima. L'esito è lo stesso del caso indiretto, la reazione sarà direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente.



PROTEINE FIBROSE!

Sono molecole allungate la cui forma è determinata da un unico tipo di struttura secondaria; non assumono struttura terziaria sferica, svolgono funzione PROTETTIVA o di SUPPORTO. Ad esempio:

- Keratine (α -eliche con doppio avvolgimento) in capelli e unghie
- Fibroina (β -foglietti), fibre della seta
- Collagene (triplo α -elico), tendini, tessuto connettivo, matrice ossea.

α -Keratina

Formata da 2 α -eliche avvolte, sono importanti i legami tra residui idrofobici. È ricca di CISTEINA che forma ponti disolfuro tra catene adiacenti.

STRUTTURA PRIMARIA → costituita da 21a amminoacidi, sette residui ripetuti periodicamente (a, b, c, d, e, f, g con "a" e "d" non polari e idrofili). Contiene 7,5 residui per giro dell'elica.



Fibroina della seta

Contiene foglietti β -antiparalleli, con sequenze ripetute del tipo -gly-ser-gly-Ala-gly-Ala-. L'eteronomia della glicina (e Alanina) permette l'impaccamento rigido.

Beta amiloide

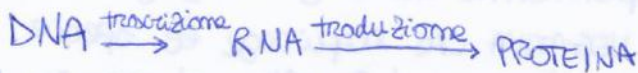
sono aggregati insolubili con maggioranza β -foglietto, il principale è il peptide beta-amiloide, originato dalla proteina APP (Amyloid Precursor Protein) in un processo a due stadi.

GLI ACIDI NUCLEICI

DNA e RNA sono polimeri lineari detti acidi nucleici, contengono l'informazione genetica da trasmettere. Contengono un gran numero di NUCLEOTIDI, ognuno costituito da uno zucchero, un gruppo fosforico e una base.

si legano a formare lo scheletro covalente

Le basi si legano in coppie con legami idrogeno, formando la struttura a doppia elica (due filamenti); nella sequenza di coppie di basi è contenuta l'informazione genetica, che può essere trasferita in una nuova catena polinucleotidica. Il RNA invece è lo stampo per la SINTESI PROTEICA; a partire dalle informazioni su una catena di DNA, l'enzima RNA polimerasi sintetizza tutte le molecole di RNA cellulare:

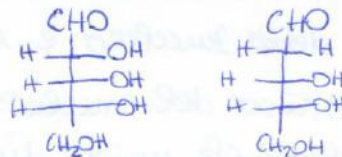
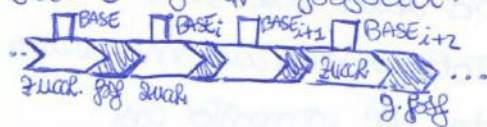


C'è una stretta relazione tra sequenza di basi del DNA e sequenza di amminoacidi nelle proteine! Infatti una sequenza di 3 basi (codon) specifica un amminoacido! Questi codon vengono copiati sul mRNA e poi letti dal tRNA che funge da adattatore; quindi la sintesi proteica avviene nei RIBOSOMI, formati da rRNA (RNA ribosomiale).

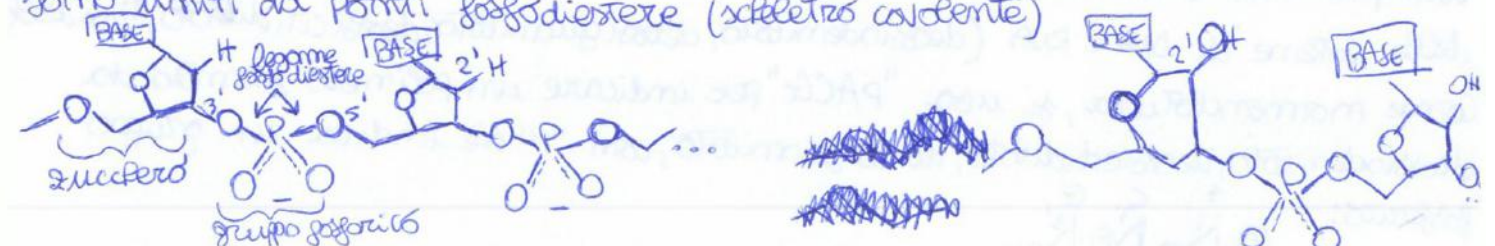
Struttura di un acido nucleico

DNA e RNA sono entrambi formati da una sequenza lineare di zuccheri,

basi e gruppi fosforici:



Nel DNA lo zucchero è il DEOSSIRIBOSIO (sull'atomo di carbonio 2' manca un atomo di ossigeno), mentre nell'RNA c'è il RIBOSIO. Questi zuccheri sono uniti da ponti fosfodiesterici (scheletro covalente)



DNA

sono uniti da legami fosfodiesterici 3' → 5'

RNA

Si nota la polarità della catena (da un lato si ha gruppo 5'-OH libero, e dall'altro 3'-OH libero), per convenzione la catena si scrive in direzione 5' → 3'!
Ne consegue che ACG e GCA hanno polarità diverse perché i gruppi terminali liberi sono agli opposti della catena, e indicano due composti diversi.

Struttura della doppia elica

La struttura a doppia elica del DNA facilita la replicazione, da ¹acido nucleico ~~una molecola~~ si possono generare due copie. Le principali caratteristiche della doppia elica scoperte da Watson e Crick furono:

- 1) Due catene polinucleotidiche sono avvolte a elica attorno ad un'asse comune con direzionalità opposta.
- 2) Lo scheletro si trova all'ESTERNO, mentre le coppie di basi all'INTERNO.
- 3) Ogni 34 Å l'elica si ripete, ci sono quindi 10 residui per giro dell'elica.
- 4) Il diametro dell'elica è ~ 20 Å.

Per formare questa elica così regolare, il modello prevede che la Guanina debba appaiarsi con la citosina, e l'Adenina con la Timina, per mezzo di legami idrogeno. Dalle fotografie a diffrazione si nota che le basi accoppiate parallele distano 3,4 Å, e questo "impilarsi" delle coppie di basi conferisce stabilità alla doppia elica per via del gran numero di interazioni di Van der Waals e dell'effetto idrofobico (infatti la superficie dell'elica è maggiormente polare). Ricorda la struttura terziaria delle proteine!

Replicazione del DNA

Una doppia elica che si separa in due catene può replicarsi, ogni catena fa da stampo per una catena complementare.

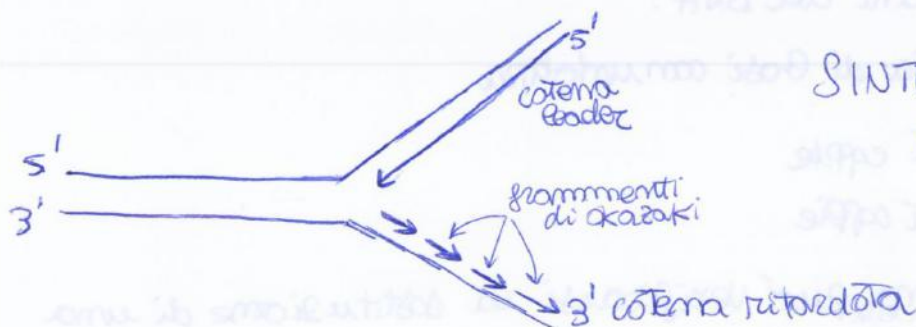
- 1) Per separare facilmente le due catene dell'elica è necessaria energia, che proviene dall'idrolisi dell'ATP utilizzata dall'enzima ELICASI, separa la doppia elica in un punto specifico.
- 2) Per separare le due catene è anche necessario SPOTOLARE, mediante enzimi detti TOPISOMERASI, i sovraavvolgimenti in senso opposto all'elica per ridurre la tensione.
- 3) Serve una capacità di coesione sulla doppia elica appena sintetizzata.
- 4) Velocità nella replicazione
- 5) Gli enzimi DNA polimerasi sintetizzano nucleotidi nella direzione 5' → 3'.
- 6) Una volta sintetizzato, il DNA deve essere riparato da eventuali danni dovuti ad agenti esterni.

Okazaki scopri che una buona parte del nuovo DNA esiste come frammenti (frammenti di Okazaki), lunghi un migliaio di nucleotidi vicini alla forcella di replicazione, che verranno uniti più avanti grazie ad una DNA ligasi (formando a seconda delle due catene figlie).

L'altra catena è sintetizzata in maniera CONTINUA (catena leader), questa è detta catena ritardata. Complessivamente, la sintesi dei frammenti avviene nella direzione $5' \rightarrow 3'$ ad opera delle polimerasi, ma la catena ritardata complessivamente ~~si~~ cresce in direzione $3' \rightarrow 5'$!!

Unione dei frammenti ad opera della DNA ligasi.

L'unione dei frammenti di Okazaki necessita di un enzima che unisca le due estremità dei frammenti. Questo enzima (DNA ligasi) catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico tra il $3'-OH$ di un'estremità e il gruppo fosforico $5' (P-5')$ dell'estremità dell'altra catena. Questa reazione richiede energia (ATP negli eucarioti). Come opera questo enzima? Esso non è in grado di legare due singole catene di DNA, ma può RICHIUDERE le aperture nelle molecole di DNA a doppia catena.



SINTESI DELLE DUE NUOVE CATENE (SEMIDISCONTINUA)

Funzione delle Polimerasi

Vari enzimi sono coinvolti nella precisa e rapida replicazione.

DNA POLIMERASI III \rightarrow responsabile della replicazione, ha elevate capacità catalitiche, fedeltà di replicazione, processività (capacità di catalizzare molte reazioni in serie senza rilasciare il substrato). Questo enzima quindi mantiene legato lo stampo fino a quando non è stato completamente replicato (migliaia di legami fosfodiesterici in contemporanea). Inoltre può sintetizzare loro nucleotidi al secondo, senza sacrificare precisione. Questo enzima è formato da varie subunità, la più importante è la β_2 con forma di anello strettato, che fa scorrere al suo interno il DNA sintetizzato e lo stampo, legandoli insieme.

Coordinazione tra catena leader e catena ritardata

In corrispondenza della forcella di replicazione l'enzima sintetizza entrambe le catene. La DNA polimerasi III inizia la sintesi della catena leader sul primer di RNA della Primasi, come detto non rilascia lo stampo fino alla fine della replicazione.

- Sistemi osmotici (AGENTI INTERCALANTI), si inseriscono tra due copie di basi adiacenti, provocando immissione o delezione di una o più copie di basi. Questo porta ad errori nella TRADUZIONE, durante la sintesi proteica.

Riparazioni

Sono principalmente 3 meccanismi:

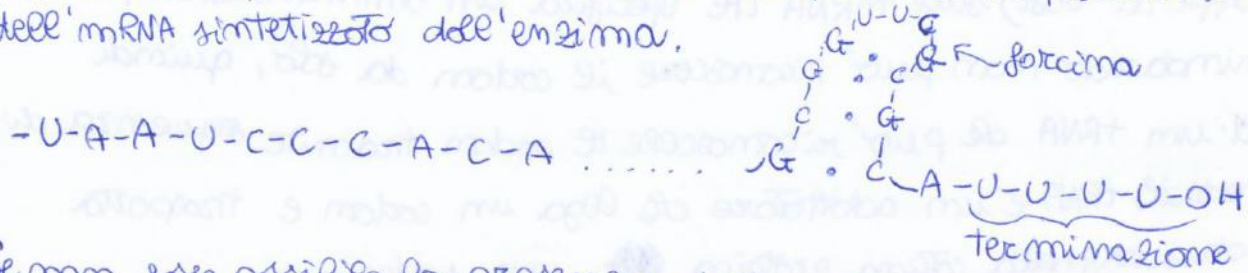
- 1) RIPARAZIONE DIRETTA, rimozione fotochimica dei dimeri di pirimidina; quasi tutte le cellule contengono un enzima fotoriattivante (DNA fotoliasi), detto DNA fotoliasi, che si lega alle regioni distorte e le taglia separando le due basi originali, tramite l'energia dell'ultravioletta luce.
- 2) RIPARAZIONE PER RIMOZIONE DI BASI, effettuata dall'enzima ALKA, allontanando le basi modificate fuori della doppia elica, agisce come una glicolasi rompendo il legame glicosidico. Rimane quindi un sito APURINICO o APYRIMIDINICO (manca una base); questo viene corretto da una AP endonucleasi e dalla DNA polimerasi I che inserisce un nucleotide corretto, e la catena viene quindi chiusa dalla DNA ligasi.
- 3) RIPARAZIONE PER ESCISSIONE DI NUCLEOTIDI, è l'eliminazione di un dimeri di pirimidina, coinvolge 3 attività enzimatiche. Dopprima le proteine dei geni UVABC rimuovono la deformazione causata dal dimeri, poi l'enzima UVABC taglia la catena di DNA danneggiato in due punti, 8 nucleotidi prima e 4 dopo il dimeri, quindi questo segmento di 12 nucleotidi si allontana per diffusione; a questo punto la DNA polimerasi I crea il pezzo mancante usando l'altra parte dell'elica intatta, e il tutto viene chiuso dalla ligasi.

Questi sistemi di riparazione sono anche il motivo per cui nel DNA c'è la TIMINA e nell'RNA c'è l'URACILE; infatti in presenza del controllo di un enzima (meccanismo DNA glicosilasi) l'uracile viene staccato dal desossiribosio idrolizzando il legame glicosidico, mentre la timina non viene attaccata! Invece nell'RNA questo controllo non è presente. La Timina è un messaggero genetico più fedele dell'uracile, ma più costoso in termini energetici!

Traduzione e Trascrizione del DNA in mRNA

I geni codificati nel DNA vengono espressi trascrivendo la sequenza di DNA in mRNA e traducendo quest'ultimo in sequenze amminoacidiche delle corrispondenti proteine. L'mRNA viene tradotto in proteine nei ribosomi grazie al tRNA. La sintesi iniziale dell'RNA avviene ad opera della RNA polimerasi, cercando dei siti detti "siti di inizio", o "promotori", e stabilendo una parte dell'elica; viene liberata una singola catena che funge da stampo, dalla quale riceve istruzioni. L'enzima procede lungo la catena in un'unica direzione, catalizzando la formazione di legami fosfodiesterici con il ribonucleoside.

Uracile che determinano la fine. Questo tratto a forci ma rende instabile l'appaiamento RNA-catena stampo e rende possibile il distacco dell'mRNA sintetizzato dall'enzima.



Se non fosse possibile la presenza della forci ma + uracile per terminare la trascrizione, è disponibile un secondo fattore, la proteina P₀. Essa idrolizza ATP in presenza di RNA a catena singola, ma non di DNA o RNA a catena doppia! Essa si lega alla catena singola in presenza di sequenze ricche di citosina e polvere di guanina, e scorre lungo essa fino a raggiungere la bolla di RNA polimerasi, dove svolge la funzione di DNA-RNA elicasi.

Si nota quindi una caratteristica di terminazione comune, il segnale si trova sulla catena di RNA di nuova sintesi, e non sul DNA!

Successive modificazioni dell'RNA N.B. la trascrizione può essere inibita da farmaci (risformicina) interferiscono con la RNA Polim.

Dopo la sintesi, l'mRNA non subisce più modificazioni, invece le molecole di tRNA e rRNA sono prodotte tramite rottura delle catene di RNA di nuova sintesi. Queste manipolazioni (tagli e aggiunte) avvengono ad opera degli enzimi RIBONUCLEASI.

Ad esempio il precursore di tRNA deve essere manipolato in modo da rimuovere un introne di 14 nucleotidi, una sequenza leader all'inizio, e la sostituzione di una sequenza U-U con C-C-A.

Il prodotto più modificato è l'mRNA, prima di diventare la forma finale.

Sintesi proteica

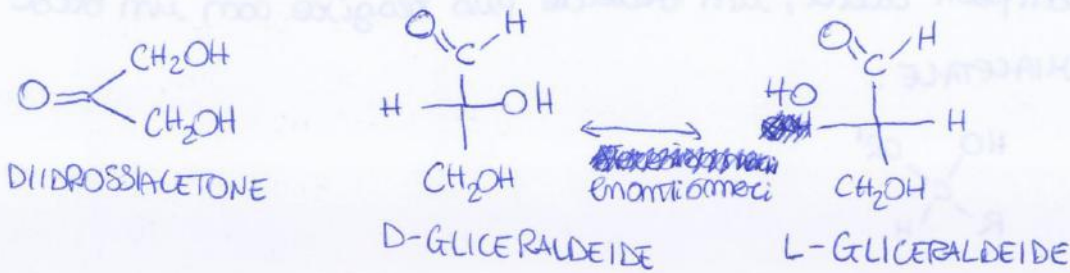
Avviene nei RIBOSOMI, e vede la partecipazione di molecole di tRNA, un mRNA e altre proteine. L'unione tra gli amminocidi risultanti e gli acidi nucleici è dovuta dall'enzima amminocid-tRNA sintetasi, associa un particolare amminocido a un tRNA.

La sintesi avviene a partire dal residuo amminoterminale verso quello carbossiterminale, tramite aggiunta sequenziale di amminocidi. All'inizio i nuovi residui vengono inseriti nel polipeptide nella forma attiva di amminocid-tRNA (molecole di tRNA unite al gruppo carbossilico di un amminocido).

CARBOIDRATI

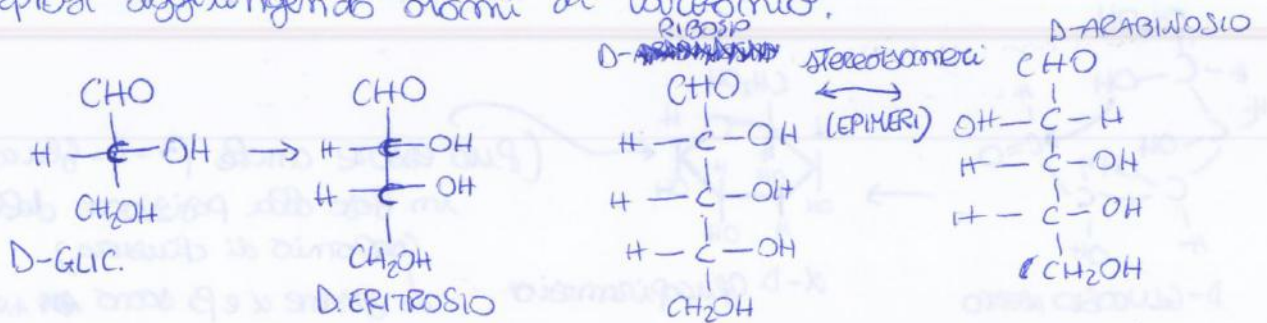
Monosaccaridi

Carboidrati più semplici, aldeidici o chetonici con due o più gruppi OH.
 Formula generica $(C-H_2O)_n$. I più piccoli ($n=3$) sono il diidrossiacetone e la D- e L-gliceraldeide (detti TRIOSI), in proiezioni di Fischer:

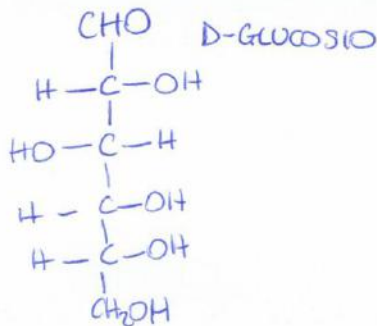


Il diidrossiacetone è un chetoso (gruppo chetonico), le altre due sono aldosi (gruppo aldeidico). Dalla gliceraldeide possono derivare tetrosi, pentosi, esosi ed eptosi aggiungendo atomi di carbonio.

ALDOSI

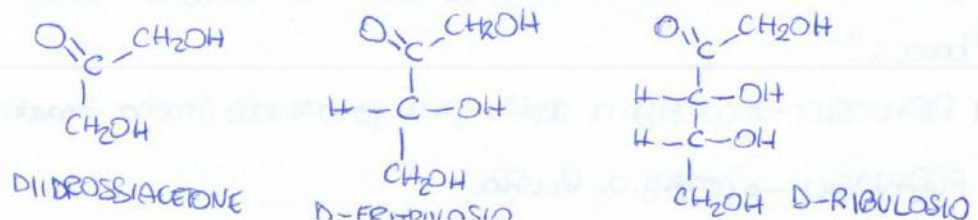


Si formano diverse forme in base alla posizione degli H e OH, ci sono molti stereoisomeri! Gli zuccheri che differiscono solo per la configurazione di un centro asimmetrico si dicono EPIMERI.



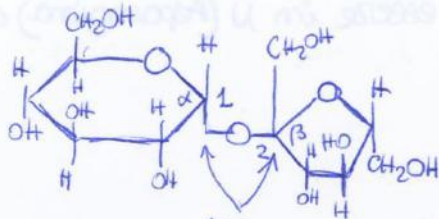
CHETOSI

Il più semplice come detto è il diidrossiacetone, anche loro formano stereoisomeri.



Disaccaridi

Sono due monosaccaridi uniti da un legame O-GLICOSIDICO; si tratta di un legame tra un atomo di carbonio di un anello piranosico e il carbonio di un altro anello mediante ossigeno. I disaccaridi principali sono il LATTOSIO, MALTOSIO, SACCAROSIO.



SACCAROSIO $1 \rightarrow 2$ legame O-glicosidico

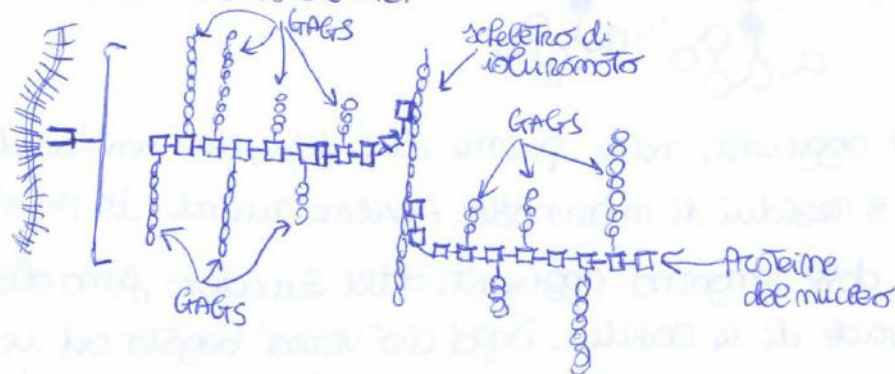
(Glucopiranosil - (1 \rightarrow 2) - β -D-Fruktofuranosil)

Polisaccaridi

Grandi oligosaccaridi polimerici, formati da piú monosaccaridi hanno il ruolo di riserva energetica e di integrità strutturale dell'organismo. I polimeri formati da tanti monosaccaridi identici sono detti OMOPOLIMERI, il piú comune è il GLICOGENO (tanti residui di glucosio legati da legami glicosidici).

Glicosaminoglicani (GAG) e Proteoglicani

Sono costituiti da unità disaccaridiche ripetitive contenenti un derivato di un amminozucchero. Sulla superficie cellulare sono legati a proteine per formare PROTEOGLICANI, importanti componenti strutturali del tessuto connettivo, fungono da lubrificanti, mediando l'adesione della cellula alla matrice extracellulare. Sono composti da lunghe catene di IALURONATO a cui sono legate in modo non covalente, numerose proteine; ogni proteina lega a sua volta piccole molecole di GAG in modo covalente.



STRUTTURA DEL PROTEOGLICANO

Alcuni GAG nei proteoglicani tendono a accumulare molta carica negativa, per minimizzare la repulsione tra cariche, le molecole assumono la forma estesa del proteoglicano, conferendo elevata VISCOSITÀ.

Controllo della qualità delle glicoproteine

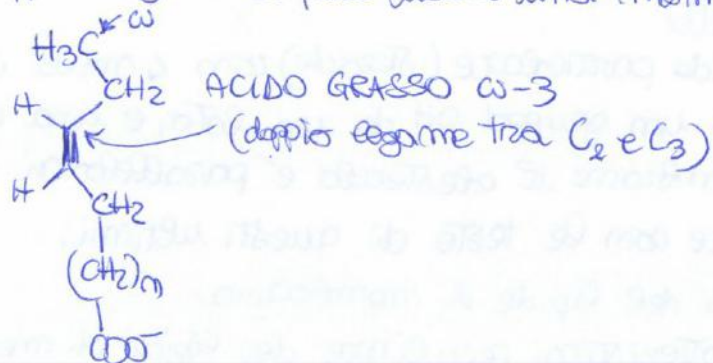
Dopo la glicosilazione, la glicoproteina deve entrare nel complesso del Golgi per subire altre modifiche, e questo passaggio rappresenta un controllo del processo appena subito. Infatti, prima di uscire dal lume del RE, l'oligosaccaride legato sulla proteina perde i 3 residui di glucosio, ma se la proteina non è sufficientemente ripiegata verrà riattaccato uno di questi residui; su questo glucosio verrà a sua volta legata una proteina (CALNESSINA o CALRETICULINA) che impedisce alla glicoproteina non sufficientemente ripiegata di uscire dal RE, in modo da avere il tempo di ripiegarsi. Se il ripiegamento procede correttamente, il residuo di glucosio verrà rimosso e la proteina proseguirà verso l'apparato di Golgi, altrimenti il processo si ripete. Questo sistema di controllo si dice che i carboidrati portano INFORMAZIONI!

LIPIDI E MEMBRANE

I lipidi sono i principali costituenti delle membrane cellulari (insieme alle proteine per il trasporto), dove formano un doppio strato (foglietti bimolecolari o bistrati) che fanno da barriera per le molecole polari, e sono POLARIZZATE.

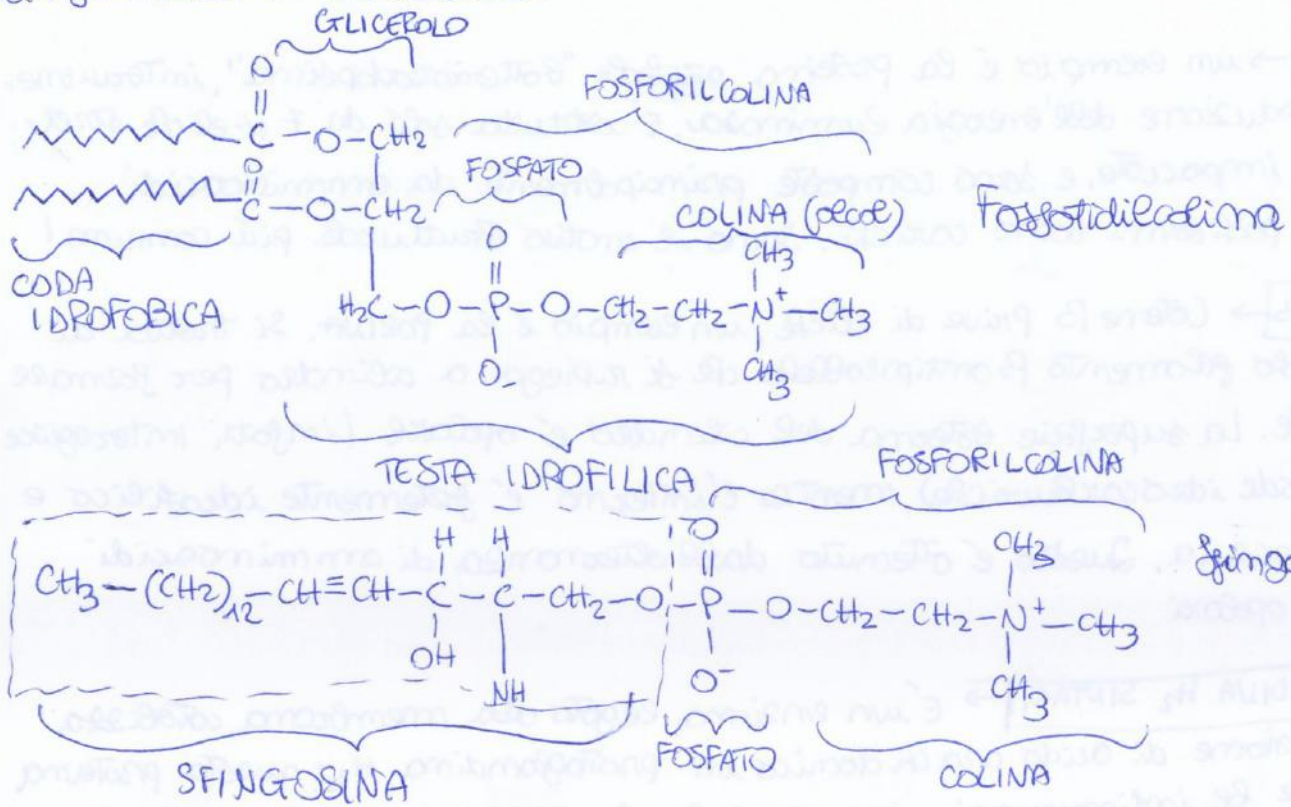
Struttura chimica degli acidi grassi

I principali componenti dei lipidi sono gli ACIDI GRASSI (otticamente idrofobici). Essi sono acide idrocarbureche che terminano con un gruppo carbossilico, la nomenclatura è l'idrocarburo da cui deriva l'acido, con desinenza -ico. Ad esempio l'acido grasso C_{18} è detto acido ottadecanico (deriva dall'ottadecano) se avesse doppi legami sarebbe acido ~~ottadecanico~~, ottadecadienico, uno con 3 doppi legami acido ottadecatrienico. Gli atomi di carbonio vengono contati a partire dall'estremità carbossiterminale (detti α, β, ω e l'ultimo), oppure per mettere in evidenza un doppio legame si può usare una nomenclatura a partire dal carbonio ω :



A pH fisiologico gli acidi grassi sono ionizzati, quindi si loro come anione e quello carbossilico.

Due formule di strutture:



Membrane biologiche

Nelle membrane cellulari i lipidi costituiscono un doppio strato che funge da barriera separando due strati acquosi. Questo permette differenze di concentrazione ai due lati della membrana, il trasporto attraverso di essa è mediato da proteine di membrana, immerse nella struttura lipidica. Le funzioni della membrana sono:

- Trasporto di nutrienti verso l'interno, e cataboliti verso l'esterno
- Blocco dell'entrata di materiale indesiderato e mantenimento dei metaboliti
- Mantenimento della composizione ionica, pH = 7.2 e p. osmotica del citosol
- Trasporto mediato da proteine
- Blocco del rilascio di ATP e amminoacidi.

Le teste idrofiliche dei lipidi sono in ambiente acquoso, le code idrofobiche interagiscono tra loro all'interno della membrana (int. di Van der Waals).

Tutte le interazioni conferiscono compattezza al sistema complessivo. I lipidi tendono a creare compartimenti circolari detti MICELLE.

Proteine di membrana

Mediante tutte le altre funzioni della membrana, specialmente trasporto, sono principalmente di due tipi:

- PROTEINE INTEGRALI DI MEMBRANA, attraversano la stessa e interagendo con le code idrofobiche.
- PROTEINE PERIFERICHE DI MEMBRANA, esiste con le teste dei lipidi in superficie, con legami idrogeno e forze elettrostatiche.

$\Delta G = mF\Delta V \Rightarrow$ rappresenta l'energia richiesta quando una mole di protoni viene trasportata attraverso un ΔV di 150mV.

carica ione \uparrow m
 cost. Faraday \uparrow F
 diff. potenziale \uparrow ΔV
 in due lati della membrana.

Nel caso più generale si scrive:

$$\Delta G_A = RT \ln \frac{[A]_{dentro}}{[A]_{fuori}} + mF\Delta V$$

contributo della diffusione contributo della diff. di carica

TERMODINAMICA
 DEL
 TRASPORTO (MOLECOLA [A])

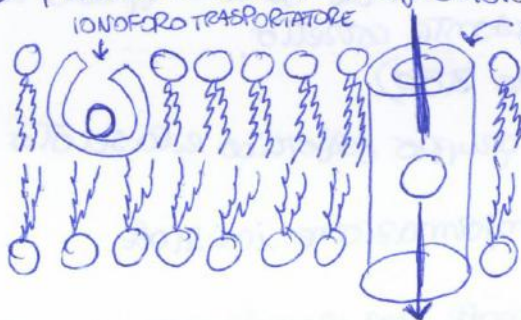
Tipi di trasporto

Può essere:

- ATTIVO MEDIATO, ad opera di una proteina trasportatrice contro gradiente di concentrazione, richiede l'accoppiamento di un processo energetico
- PASSIVO MEDIATO, ad opera di una proteina trasportatrice secondo gradiente di conc.
- NON MEDIATO, la sostanza diffonde secondo gradiente, con velocità proporzionale alla grandezza del gradiente.

Meccanismi di trasporto non mediato

Gli ioni non possono attraversare lo strato fosfolipidico (sono polari) se non attraverso canali, o legandosi a molecole specifiche dette IONOFORI, che possono essere trasportatori o formatori di canali:



Ionoforo trasportatore \rightarrow VALINOMICINA
 Ionoforo formatore di canali \rightarrow GRAMICICINA

Lo ionoforo può solo dissipare il gradiente di concentrazione, non andare contro!!

Trasporto del glucosio

È ad opera di una proteina transmembrana altamente specifica, serve a equilibrare [Glu] attraverso la cellula, senza trasportare anche altre proteine.

Meccanismi di trasporto attivo dipendente da ATP:

Avviene principalmente ad opera dell'enzima $Na^+ - K^+ - ATPasi$, la la funzione di immettere K^+ nella cellula e buttare fuori Na^+ , come sorgente di energia si usa l'idrolisi dell'ATP.

Meccanismi di trasporto passivo

ACQUAPORINE → L'acqua può attraversare le cellule per diffusione semplice o grazie a canali (velocità molto maggiore) detti acquaporine, dove il flusso è regolato da gradienti idraulici o osmotici.

Sono inibite da ioni Hg!

Le Aquaporine 1 sono selettive per l'acqua, fanno un'energia di attivazione simile a quella dell'auto-diffusione.

GlpF → Glycerol facilitator, è della stessa famiglia delle acquaporine, ma fa una particolare affinità per il GLICERolo, anche in ambiente acquoso. Essa mostra poca permeabilità all'acqua nonostante il poro sia di maggiore diametro!

Come è possibile l'alta selettività di questi canali che non fanno passare ioni, molecole indesiderate nonostante siano polari (suscetibili a legami idrogeno)? Queste operazioni di filtraggio sono dovute a più meccanismi:

1) Una prima regione indebolisce i legami H tra molecole d'acqua, e la forte carica positiva della regione costituisce un FILTRO per i protoni (effetto più pronunciato nelle GlpF).

2) Un secondo filtro riguarda le DIMENSIONI delle molecole.

3) In GlpF l'acqua è filtrata da pareti idrofobiche, il passaggio è impedito da richieste energetiche troppo elevate.

CANALI IONICI → Hanno il ruolo di trasportare corrente elettrica sotto forma di ioni. Hanno due proprietà chiave:

- SELETTIVITÀ, fa passare solo determinati ioni come ad esempio il rapido passaggio nei pori.

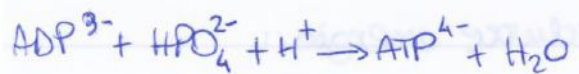
- GATING, possibilità di aprire e chiudere i canali.

Un canale fondamentale nelle membrane cellulari è il canale K^+ ; esso è implicato nella trasmissione del segnale nel SNC e altre funzioni importanti. Presenta una elevata permeabilità per il potassio ma anche per altre molecole: $K^+ > Rb^+ > Cs^+$ (per Na^+ e Li^+ più piccoli è molto bassa).

Strutturalmente è un tetramero con due subunità identiche, entrambe costituite da 2 α -eliche transmembrana. Il passaggio avviene in due fasi, all'inizio (canale più largo) lo ione passa in acqua solvente (22 Å), poi il canale si restringe e lo ione deve liberarsi dell'acqua e interagire con i gruppi carbossilici sulle pareti della proteina di trasporto (3 Å).

In base alle condizioni ambientali, i batteri possono invertire il verso del moto con una "copriola" dovuta alla rapida inversione del senso di rotazione. Il verso del moto è dovuto alla concentrazione di specie chimiche favorevoli (CHEMOATTRATTORI) o repellenti e nocive (CHEMO REPELLENTI). Il processo di risposta a tale gradiente è detto CHEMIOTASSI. Il batterio si accorge di tali specie grazie al legame di un chemioattrattore o un chemiorepellente sulla membrana del suddetto; la presenza di uno o dell'altro causa la fosforilazione di una proteina, CheY, che si lega alla base del motore flagellare causando la conseguente modificazione del moto.

ATP SINTASI → è un grande enzima responsabile della produzione di ATP. Si trova sulla membrana dei mitocondri, ed è composta da due subunità, F_1 (attività catalitica e di sintesi) e F_0 che penetra nella membrana e funge da canale protonico (segmento idrofobico). Le due subunità sono unite dal canale e da uno stelo esterno. La reazione di formazione dell'ATP è la seguente:

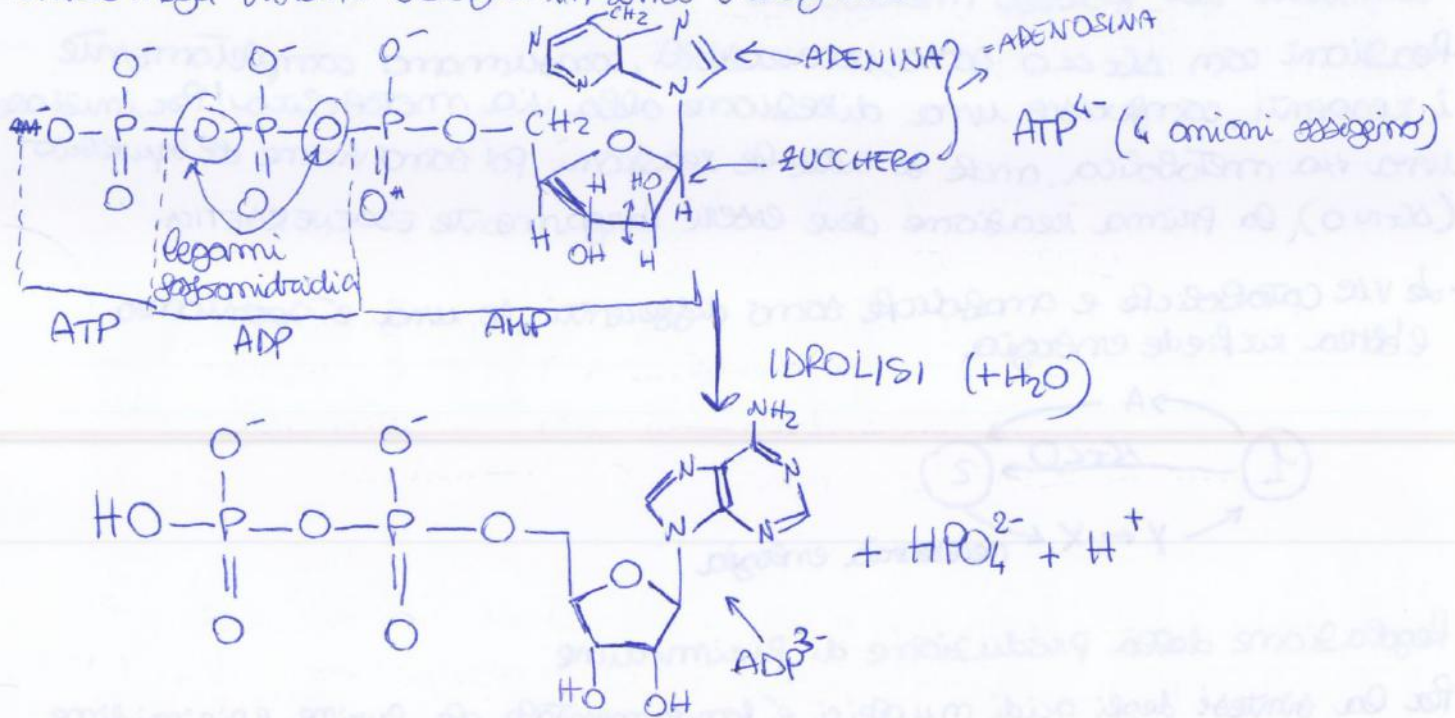


Come avviene? La subunità F_1 è composta dallo stelo centrale γ e da regioni dette β , che possono avere diverse conformazioni. Una prima conformazione serrata (T) converte ADP e P_i in ATP con alta affinità, infatti non rilascia l'ATP! Ci saranno quindi altre configurazioni (lenta, L e aperta, O) che permettono di rilasciare il nucleotide. La conversione di β nelle 3 forme è dovuta alla rotazione dello stelo γ in senso antiorario secondo il ciclo:

- La forma T contiene ATP appena sintetizzato
 - La rotazione fa diventare T in O così che libera l'ATP
 - Contemporaneamente, L viene convertita in T, permettendo la transizione di ADP e P_i legati in ATP.
 - O viene convertita in L, che intrappola ADP e P_i per poi convertirli.
- Il moto rotatorio di γ è dovuto ad un gradiente protonico ai lati della membrana.

ATP

La moneta energetica per gli scambi, ADENOSINA TRIFOSFATO, viene prodotta dall'ossidazione di sostanze nutritive. È costituita da Adenina, ribosio e un gruppo trifosforico. Questo gruppo conferisce l'energia elevata alla molecola per via dei due legami fosfoanidridici. Se l'ATP viene idrolizzato ($ADP + P_i$ o $AMP + PP_i$) viene liberata grande energia libera (tipicamente $\Delta G = -12 \frac{kcal}{mole}$), ed è sintetizzato da ADP e P_i , quindi il ciclo ATP-ADP è il sistema fondamentale dei sistemi biologici in senso energetico. (catalizzato dalla CHINASI)



Perché l'ATP è il migliore composto per fornire ΔG , con i suoi legami fosfoanidridici? L'ATP ha un alto potenziale di trasferimento dei gruppi fosforici, l'ADP e il P_i infatti hanno maggiore STABILITÀ PER RISONANZA rispetto all'ATP, inoltre, a pH = 7 l'unità trifosfato dell'ATP ha 4 cariche negative che si respingono, questa repulsione si riduce naturalmente con l'idrolisi, anche perché l'acqua si lega più facilmente al P_i rispetto che al gruppo dell'ATP. Tutte queste motivazioni rendono il ΔG° dell'idrolisi dell'ATP molto negativo e favorevole!

Altre forme di conservazione dell'energia

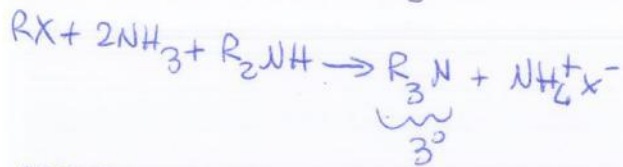
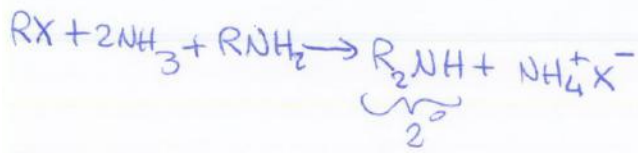
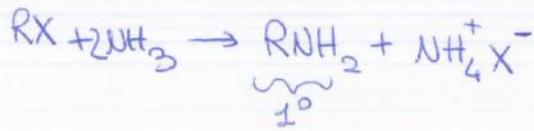
Viene rilasciata energia anche in altri casi:

- GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE (oltre l'equilibrio secondo gradiente attraverso membrane)

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{C_2}{C_1}$$
- GRADIENTE DI CARICA ELETTRICA (una mole di protoni viene trasportata attraverso una ΔV)

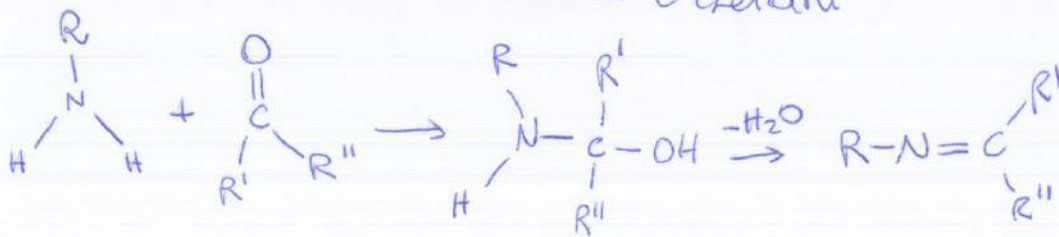
$$\Delta G^\circ = -nF\Delta V$$

REAZIONI DELLE AMMINE



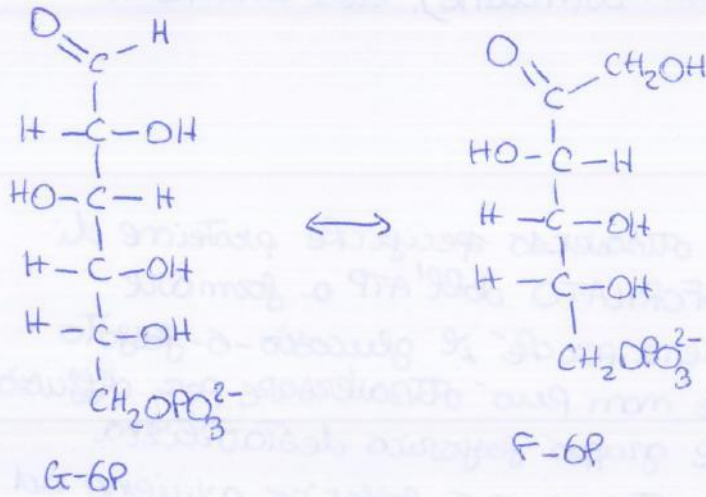
Preparazione per defilazione di ammoniacale, si forma sempre anche il sale di ammonio con l'alogenuro.

ADDIZIONE NUCLEOFILA ad aldeidi e chetoni

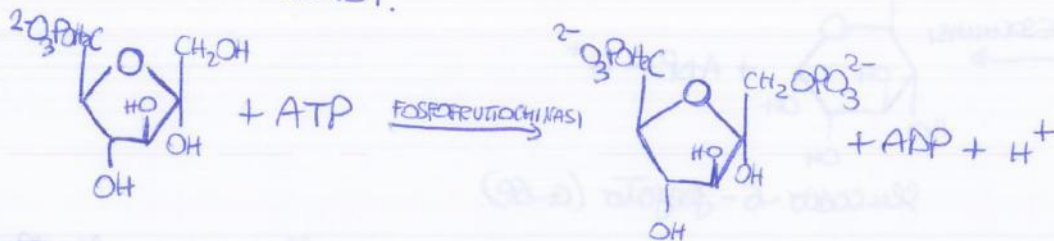


Segue ~~una~~ una seconda fosforilazione, quella del F-6P a fruttosio 1,6-bisfosfato (F-1,6-BP). Si dice "bisfosfato" perché sono presenti due gruppi monofosfato separati (se -di sarebbero due gruppi uniti da un legame anidridico).

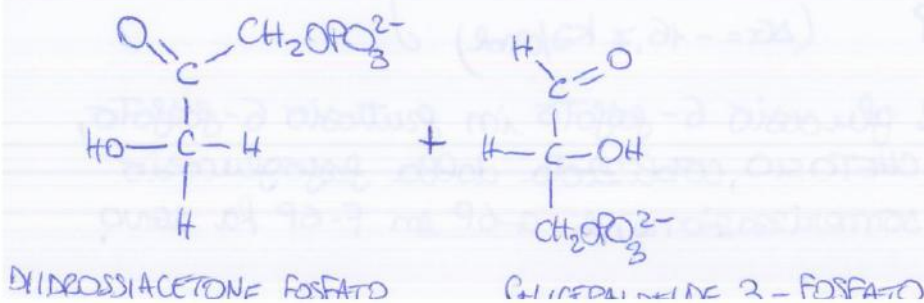
La prima reazione avviene dapprima come apertura dell'anello del glucosio in forma lineare a catena aperta, quindi lo si chiude come anello pentatomico del fruttosio. Avviene ad opera dell'enzima fosfoglucoisomerasi.



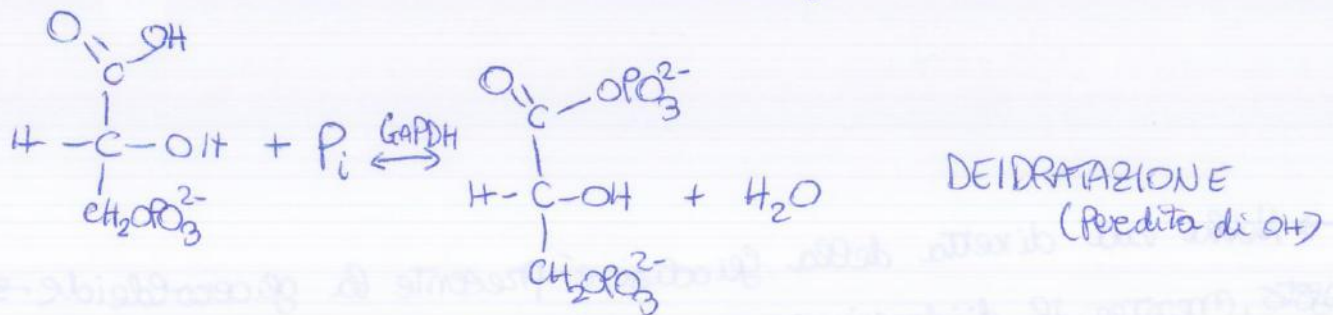
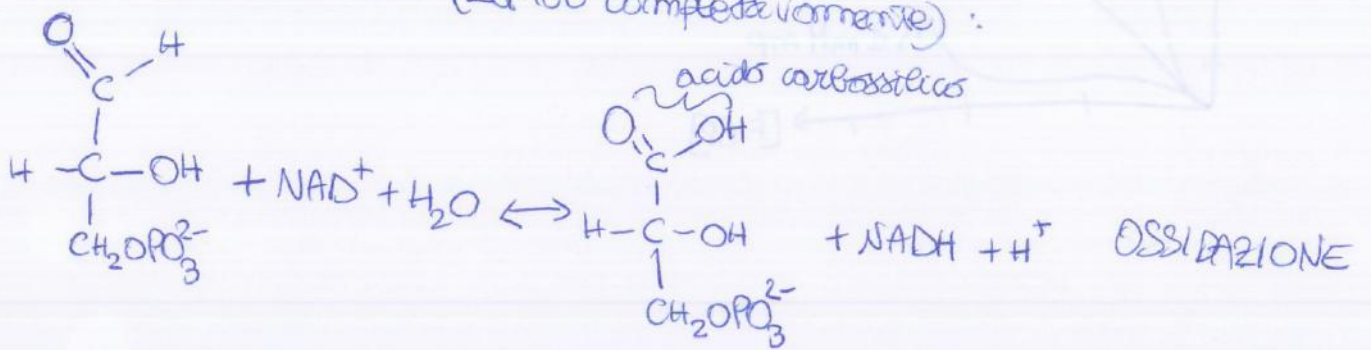
La seconda reazione di fosforilazione e di nuova resa possibile dell'ATP, diventando fruttosio 1,6-bisfosfato, e avviene ad opera dell'enzima FOSFORFRUTTOCHINASI.



[3] → A questo punto avviene la scissione del fruttosio 1,6-bisfosfato in gliceraldeide 3-fosfato e diidrossiacetone fosfato. Queste sono quindi unità a TRE atomi di Carbonio, reazione catalizzata dall'enzima ALDOLASI.

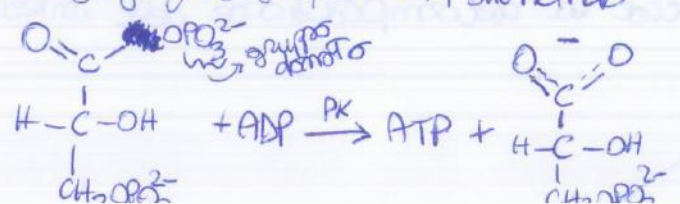


5) → avviene ora l'estrazione di energia dalla gliceraldeide, che inizia con la conversione di gliceraldeide 3-fosfato in 1,3-bisfosfoglicerato, reazione catalizzata dalla "gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi" (GAPDH). Il composto risultante è un acido fosfato con grande potenziale di trasferimento del gruppo fosforico. Tutto ciò avviene in due sotto-reazioni che sono l'ossidazione della gliceraldeide ad acido carbossilico (opera del NAD^+) e l'unione di quest'ultimo con fosfato inorganico per arrivare all'1,3-bisfosfoglicerato. Le due reazioni devono essere accoppiate per poter avvenire (ΔG non completamente):



L'accoppiamento delle due reazioni avviene grazie ad un intermedio TILOESTERE che si forma sull'enzima (è un intermedio ad alta energia) che permette alla deidratazione di avvenire, sfruttando l'energia della ossidazione.

6) Inizia lo stadio finale, formazione di ATP a partire dall'1,3-bisfosfoglicerato. L'enzima FOSFOGLICERATO CHINASI (PK), catalizza il trasferimento del gruppo fosforico dall'acido fosfato del 1,3-bisfosfoglicerato, all'ADP, ottenendo ATP e 1,3-fosfoglicerato. La reazione:



La glicolisi anaerobica ha come prodotto finale il lattato, si produce come 2 molecole di ATP ed è molto rapida $\text{glucosio} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow 2\text{CH}_3\text{C(O)COO}^- + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$

La glicolisi aerobica ha come prodotto finale anidride carbonica, necessita di O_2 e produce 38 ATP (met. ossidativo) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 38\text{ADP} + 3\text{P}_i + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 38\text{ATP} + 44\text{H}_2\text{O}$

In alcuni organismi come i lieviti, la glicolisi anaerobica produce ETANOLO.

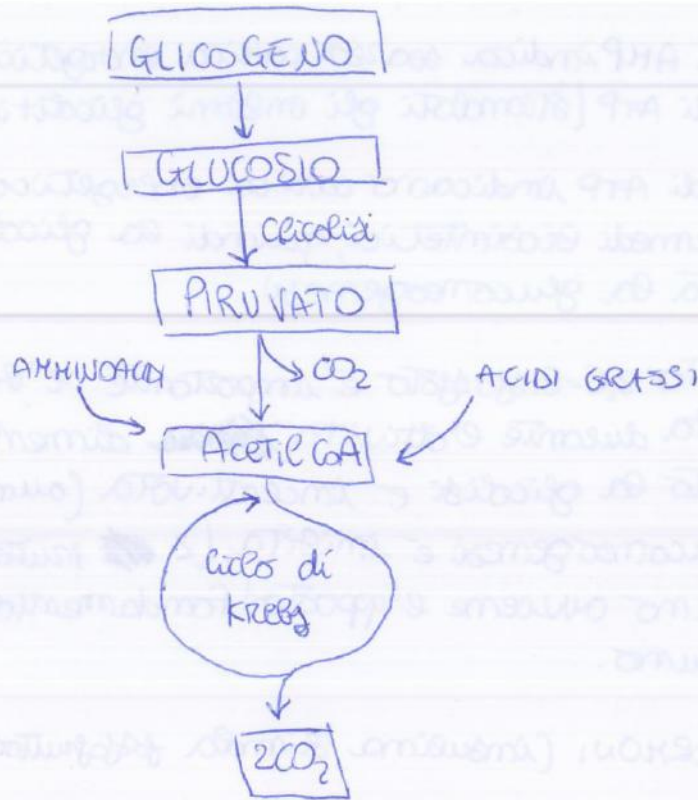
Gluconeogenesi

Avviene nel fegato nei mammiferi, è una via per produrre glucosio quando altre sorgenti sono esaurite. Usa gli stessi enzimi della glicolisi, ma non è esattamente l'inverso (alimenti come reazioni irreversibili devono essere aggirate). Essa riguarda principalmente la conversione di piruvato in glucosio. Il piruvato si forma a partire da precursori come lattato, glicerolo e amminioacidi. La funzione della gluconeogenesi è quindi garantire una sufficiente concentrazione ematica di glucosio!

Perché la gluconeogenesi non è l'inverso della glicolisi? L'equivalente è nettamente spostato verso la produzione di piruvato, a causa principalmente delle reazioni \rightarrow mediate dagli enzimi ESOCINASI (glucosio in glucosio-6 fosfato), FOSFORIBULOCHINASI (fruttosio-6 fosfato in fruttosio 1,6 bisfosfato) e PIRUVATO CHINASI (ossandipiruvato in piruvato). Queste reazioni irreversibili vengono aggirate in tre modi:

- 1) il ossandipiruvato si forma dal piruvato mediante l'ossalacetato, attraverso l'azione di due enzimi (formato nei mitocondri)
- 2) il fruttosio 6-fosfato si forma dal fruttosio 1,6 bisfosfato per azione della fruttosio 1,6 bisfosfatasi (idrolisi)
- 3) il glucosio si forma dal glucosio, 6 fosfato per idrolisi mediata dall'enzima glucosio 6-fosfatasi.

Le due vie sono regolate in modo da essere alternativamente attive nelle cellule in base alla necessità (una attiva, una inattiva), e l'attività della glicolisi dipende dalla $[\text{glu}]$ ematica, l'attività della gluconeogenesi dipende dalla concentrazione di lattato e di precursori del glucosio, altri fattori di regolazione sono importanti, ad esempio:

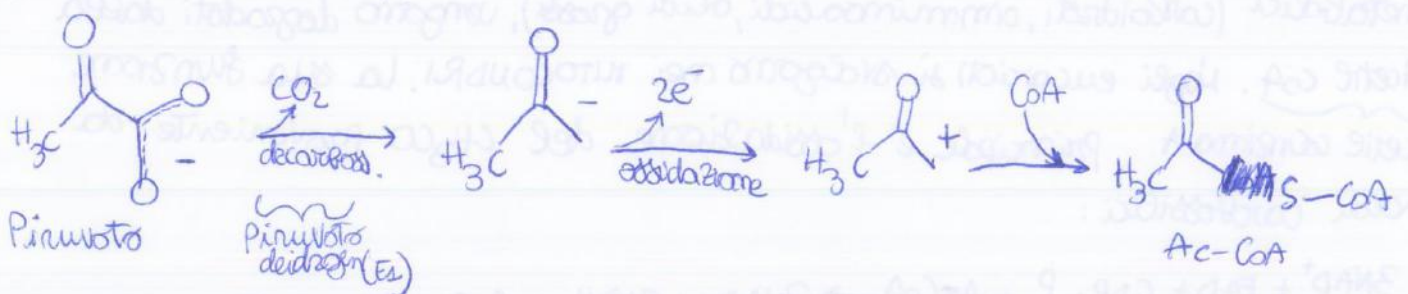


Ac-CoA è un trasportatore di gruppi Ac!

Durante il ciclo di Krebs vengono prodotti intermedi utili per la biosintesi di altri composti, come l'OSSETALATO (produzione di glucosio nella gluconeogenesi), il CITRATO (produzione di acidi grassi e chetoni). Si nota che per l'ossidazione di Ac a ~~2~~ 2CO₂ serve il trasferimento di 4 elettroni, 3 vanno a formare il NADH e l'ultimo il FADH₂.

Sintesi dell'Ac-CoA

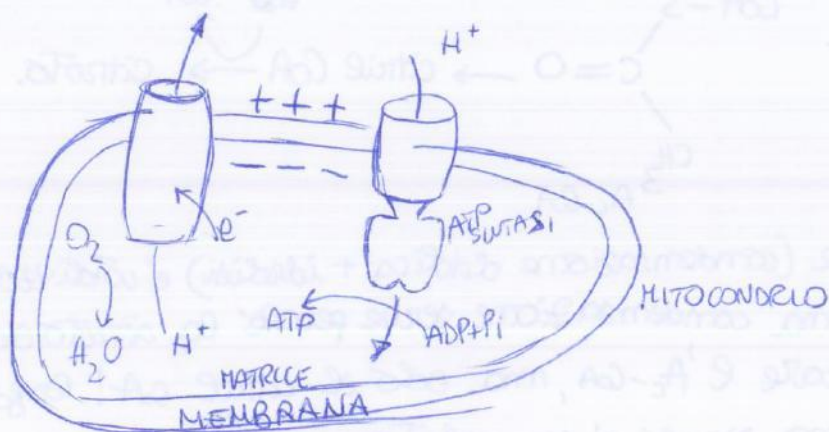
Si ottiene per decarbossilazione ossidativa del piruvato grazie al complesso enzimatico PIRUVATO DEIDROGENASI, formato da 3 enzimi (E₁, E₂, E₃) e 5 coenzimi. E₁ è il componente piruvato deidrogenasi. La formazione di Ac-CoA dal piruvato avviene in 3 fasi, decarbossilazione, ossidazione e trasferimento del gruppo acetile a CoA:



Le reazioni devono essere accoppiate per sfruttare la $\Delta G < 0$ della decarbossilazione.

FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA

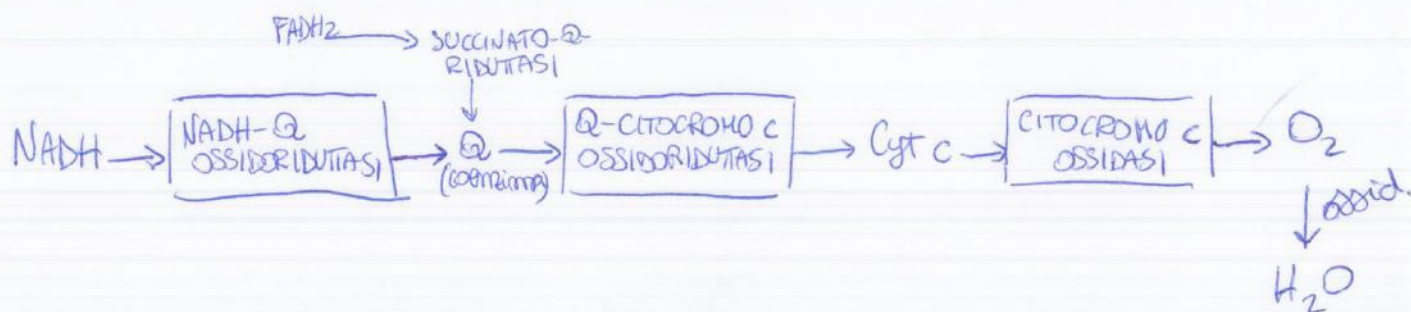
È il processo che forma ATP in conseguenza del trasferimento degli elettroni dal NADH o dal FADH all'O₂. Avviene nei mitocondri, e' la principale fonte di ATP negli organismi aerobici, lo sistema ossigenico e' questo:



La ossidazione dei combustibili avviene accoppiata alla fosforilazione dell'ADP e ad un gradiente protonico tra le facce della membrana. Viene detta anche RESPIRAZIONE CELLULARE. La riduzione di O₂ ad H₂O od opera di NADH e FADH e' fortemente esergonica e' quindi adatta su una catena di trasporto di elettroni mediata da proteine di membrana. Le due molecole hanno elevato potere di trasferimento degli elettroni, detto E₀' (o potenziale redox, coincide col ΔG₀' per il trasferimento fosforico. Una specie come NADH che ha grande capacita' di donare elettroni ha E₀' molto negativo, una specie ossidante forte come O₂ ha grande capacita' di accettare elettroni (E₀' positivo). Le due forme di potenziale sono legate da:

$$\Delta G_{0}' = mF\Delta E_{0}'$$

Come avviene la catena di trasporto degli elettroni? Vengono trasferiti dal NADH all'O₂ tramite 3 complessi proteici:



ENZIMI

Sono molecole che stabilizzano gli stati di transizione, catalizzando una reazione. Le loro caratteristiche sono il POTERE CATALITICO e la SPECIFICITÀ (per la reazione e per la scelta dei reagenti, detti substrati). Essi svolgono molti ruoli diversi negli organismi: dal trasporto tramite POMPE IONICHE, alla digestione, la trasmissione del segnale, la generazione del movimento, i virus.

Struttura generale dell'enzima



parte non proteica
(ione metallico
o coenzima)

APOENZIMA → enzima non cataliticamente attivo

COFATTORE → molecola non proteica / ione metallico (Mg^{2+}), attiva l'enzima. Se sono molecole organiche sono detti coenzimi!

OLOENZIMA → parte cataliticamente attiva dell'enzima

SITO ATTIVO → sito di legame del substrato

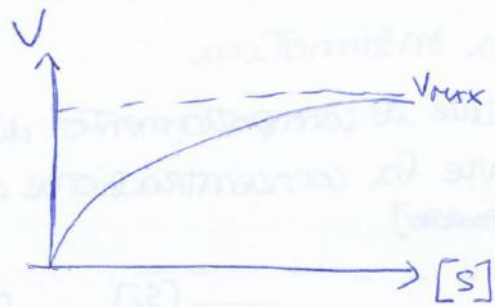
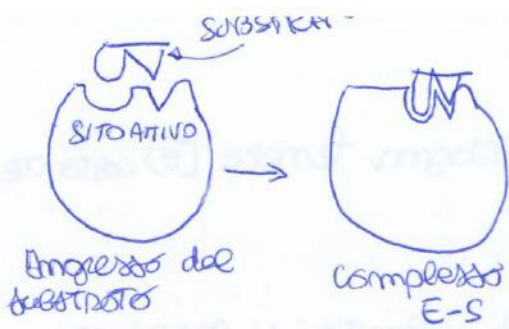
SITO ALLOSTERICO → siti interattivi, possono bloccare o attivare l'enzima, (inibitore) in base a quale molecola si lega come substrato.

Struttura e funzionamento

L'attività dell'enzima dipende dalla conformazione; dipende quindi dalla STRUTTURA QUATERNARIA (posizione e interazione delle sub-unità proteiche). L'attività catalitica avviene sul sito attivo, dove si lega l'enzima. Specificità

Un enzima è molto specifico per il suo substrato, fatto che dovuto alla complicata struttura tridimensionale. In particolare gli enzimi hanno:

STEREOSPECIFICITÀ → possibilità di generare stereoisomeri diversi a partire da uno stereoisomero diverso. Possono anche legare stereoisomeri



L'evidenza dell'esistenza di un complesso E-S è dovuta al fatto che all'aumentare di $[S]$, la velocità di reazione aumenta fino a divenire asintotico (tutti i "siti catalitici" sono occupati).

Energia libera

La ΔG determina se una reazione può avvenire spontaneamente. L'energia richiesta per convertire i reagenti nello stato di transizione determina la velocità di reazione (gli enzimi agiscono su questa energia!).

$\Delta G < 0$ Reazioni spontanee (ESOTHERMICHE)

$\Delta G = 0$ sistema in eq.

$\Delta G > 0$ Reazioni non spontanee (ENDERGONICHE), bisogna fornire G.

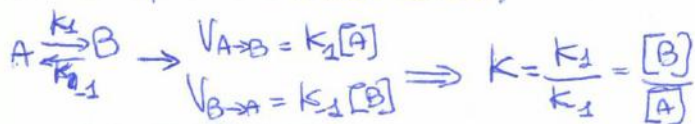
$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad \text{per una reazione } aA + bB \leftrightarrow cC + dD$$

ΔG_0 in biochimica è a $[A], [B], [C], [D] = 1 M, T = T_{amb}, p = 7$, e' detto $\Delta G_0'$

All'equilibrio, $\Delta G = 0 \rightarrow \Delta G_0' + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} = 0 \rightarrow \Delta G_0' = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} = -RT \ln K_{eq}$

Volendo ricavare K_{eq} conoscendo il resto $\rightarrow K_{eq} = 10^{-\Delta G_0'/1,36}$

Un enzima non può alterare l'equilibrio della reazione e quindi la termodinamica! L'enzima accelera la reazione in una direzione tanto quanto nell'altra!

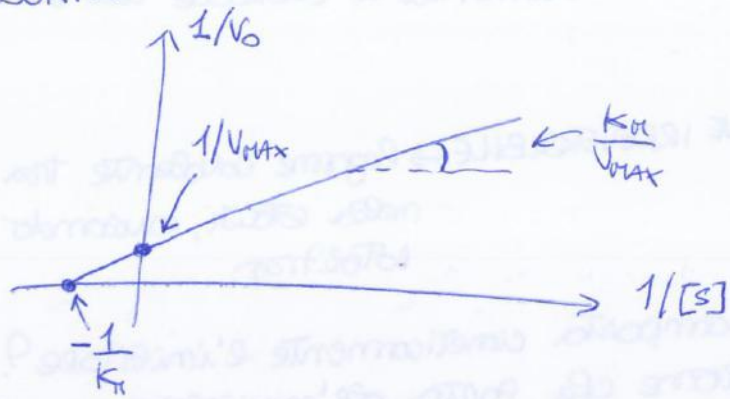


La funzione dell'enzima è quindi aumentare la velocità in base alle esigenze dell'organismo.

Può anche essere utile una trasformazione dell'eq. di Michaelis-Menten, detta RETTA DI LINEAREAUER-BURK:

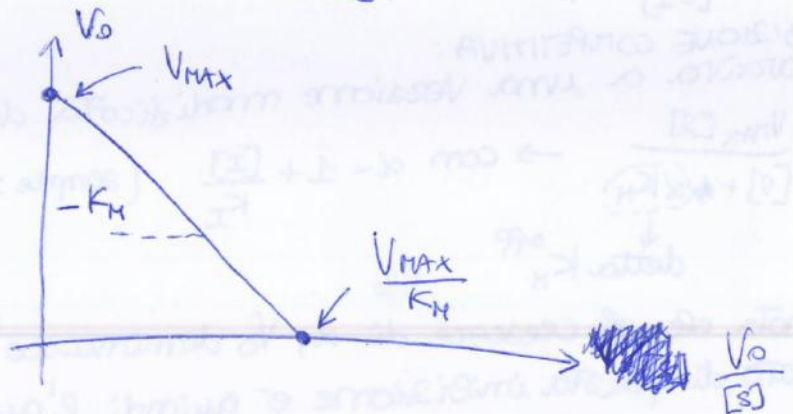
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$

Utile per calcolare V_{MAX}



Oppure la trasformazione di Eadie-Hofstee:

$$V_0 = V_{MAX} - \frac{V_0}{[S]} K_M$$



Una classe di enzimi detti ALLOSTERICI non fa l'andamento di M-M ma una curva sigmoide (si autoregolano)

Inibizione/inattivazione enzimatica

L'attività di un'enzima può essere inibita da parte di piccole molecole o ioni dette INIBITORI, agiscono sul turnover, il legame del substrato, agiscono quindi su V_{MAX} e K_M . Vi sono due forme di inibizione:

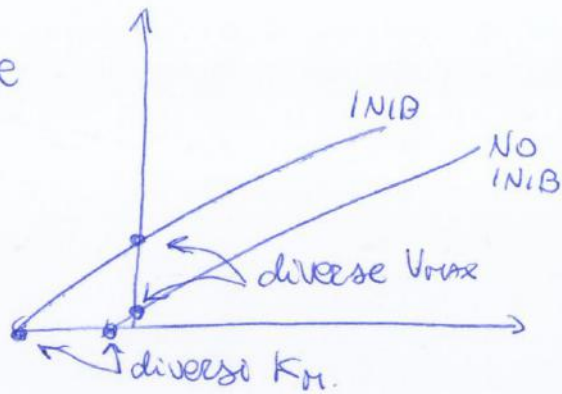
• INIBIZIONE REVERSIBILE, la molecola si lega reversibilmente diminuendo l'attività catalitica, sono rapide interazioni non covalenti. Può essere a sua volta:

Competitiva → l'inibitore I e il substrato S competono per il sito attivo dell'enzima, l'inibitore dà luogo a un complesso [EI], non porta alla formazione di prodotti. Si riduce la velocità di catalisi perché è minore il numero di molecole enzimatiche per il substrato. Un aumento di [S] annulla la competizione dell'inibitore!

Non competitiva → L'inibitore si lega all'enzima o al complesso ES, in un sito differente da quello nel substrato. Il risultato è un minore numero di molecole di substrato trasformate in prodotti, quando l'enzima è saturato del substrato. Diminuisce quindi il numero di turnover! Non può essere rimossa dall'aumento di [S].

Si fanno $V_{MAX} = \frac{V_{MAX}}{\alpha'}$, $\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{MAX}}$
 $K_M = \frac{K_M}{\alpha'}$

Cambiamo sia V_{MAX} che K_M , ma il loro rapporto rimane costante quindi il coeff. angolare non cambia!



- Quanti legami peptidici si formano al secondo nelle α -catene della caseina per avere la crescita osservata in un anno? (20 cm)

Il passo dell' α -elica è $5,4 \text{ \AA} = 5,4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$

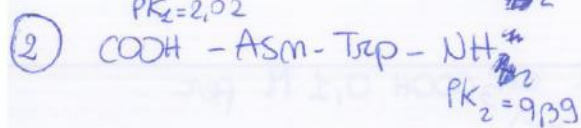
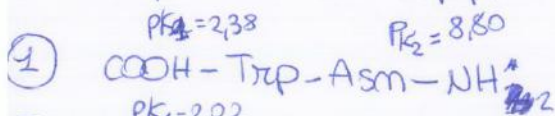
con 3,6 amminoacidi per giro \rightarrow 3,6 legami peptidici per giro.

$$3,6 : 5,4 \cdot 10^{-8} = x : 20 \rightarrow x = 13,3 \cdot 10^8 \text{ legami in un anno}$$

$$\text{legami al secondo} = \frac{x}{\text{secondi in un anno}} = \frac{x}{3,1 \cdot 10^7} = 42 \frac{\text{legami}}{\text{s}}$$

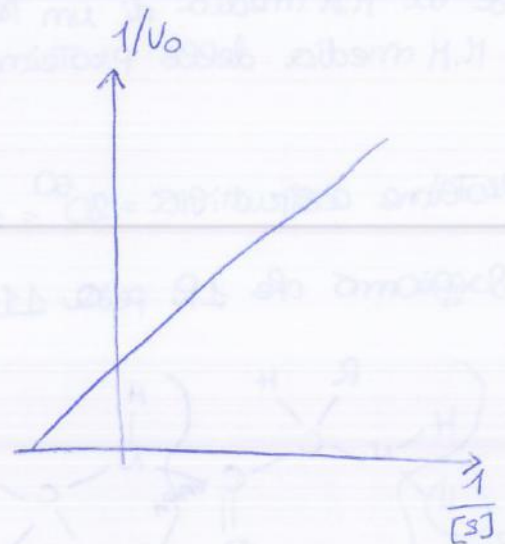
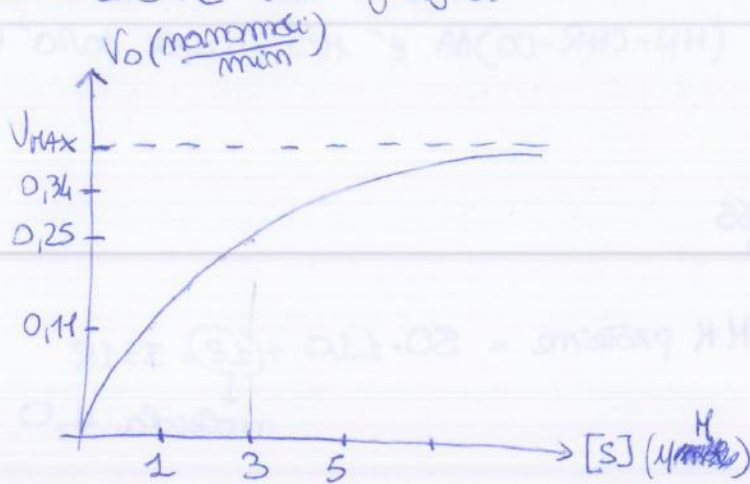
- Si fanno due dipeptidi con Trp e Asn, quali sono le loro cariche nette a $\text{pH} = 2$ e $\text{pH} = 12$?

La sequenza dei dipeptidi è:



Se $\text{pH} = 2$:

Costruzione dei grafici:



Obbedisce alla cinetica!

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Calcolo di v_{max} e K_M dai dati sperimentali,

$$\begin{cases} 0,11 = \frac{v_{max} \cdot 1}{K_M + 1} \\ 0,45 = \frac{v_{max} \cdot 10}{K_M + 10} \end{cases} \rightarrow \begin{cases} v_{max} = 0,11K_M + 0,11 = 0,68 \text{ momomi/mim} \\ 0,45 = \frac{1,1K_M + 1,1}{K_M + 10} \rightarrow 0,45K_M + 4,5 = 1,1K_M + 1,1 \\ K_M(1,1 - 0,45) = 4,5 - 1,1 \\ K_M = 5,23 \mu M \end{cases}$$

Qual'è il turnover della penicillina?

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{\text{moli s, ottim.}} = \frac{v_{max}}{\text{moli enz.}} = \frac{v_{max}}{\frac{m}{M \cdot M}} = \frac{v_{max}}{m} \cdot 29,3 \cdot 10^3 \frac{g}{mole} = 3343 \text{ s}^{-1}$$

3 Sono forniti dati in tabella con e senza ~~inibitore~~^{inibitore}, a $[I] = 2 \text{ mM}$
 Che valore hanno v_{max} e K_M in assenza e presenza di inibitore?

K_M } calcolati con valori di v_0 "senza inibitore"
 v_{max} }

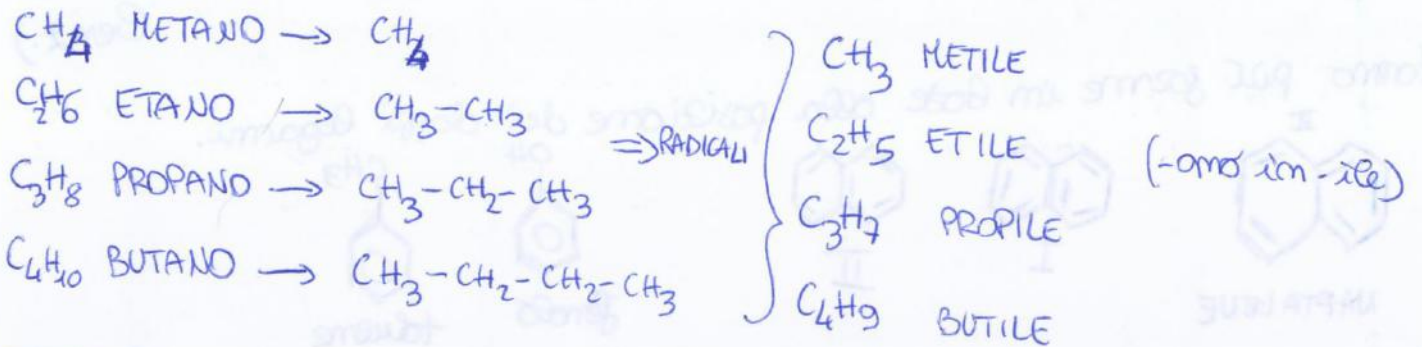
K_M^{off} } calcolati con valori di v_0 "con inibitore"
 v_{max}^{off} }

Si nota che $v_{max}^{off} = v_{max} \Rightarrow$ INIBIZIONE COMPETITIVA
 Quanto vale la costante di legame?

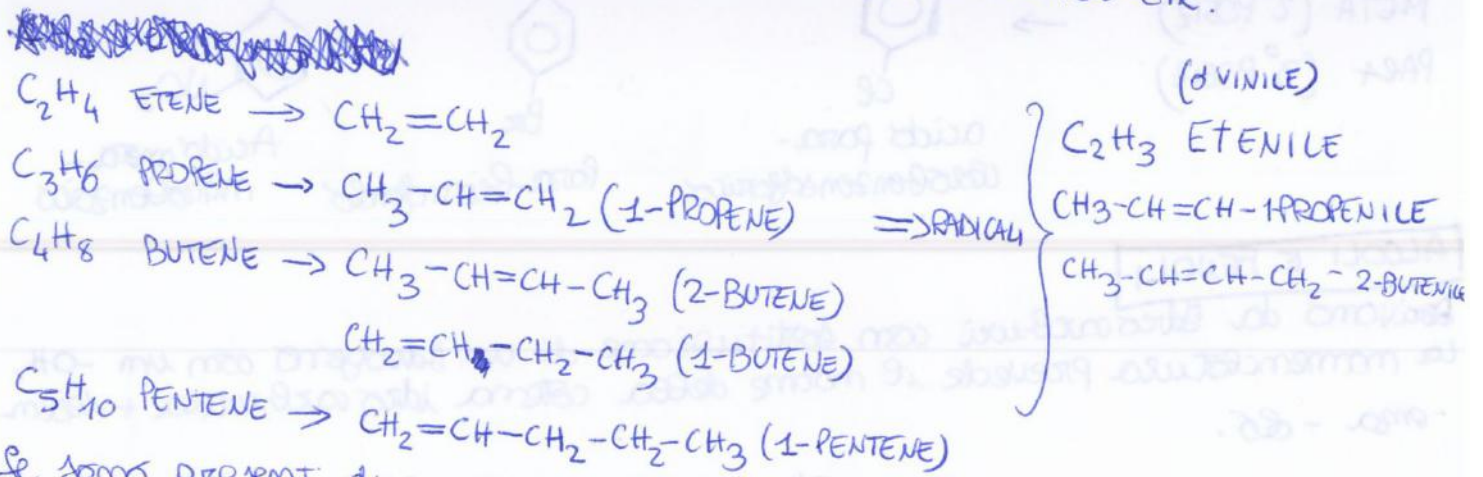
$$K_I = \frac{[I]}{\alpha - 1}, \text{ con } \alpha = \frac{K_M^{off}}{K_M} = 2,81 \rightarrow K_I = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

NOMENCLATURA ORGANICA

ALCANI C_nH_{2n+2} , legami semplici C-C (saturi). Desinenza -ano:

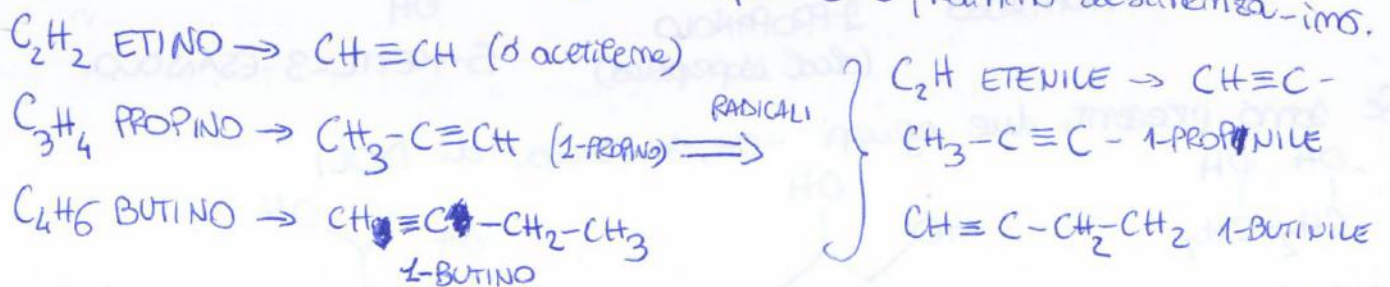


ALCHENI C_nH_{2n} , uno o più legami doppi C=C, desinenza -ene.



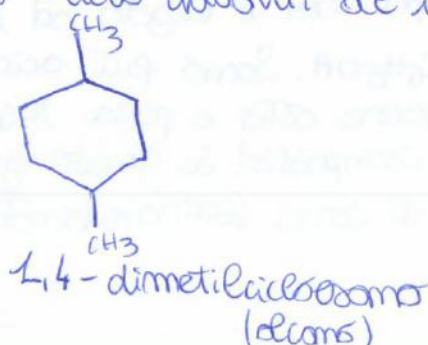
Se sono presenti due o più legami doppi si parla di DIENI!

ALCHINI (C_nH_{2n-2}) Hanno uno o più legami tripli $C\equiv C$, Hanno desinenza -ino.



ALIFATICI CICLICI

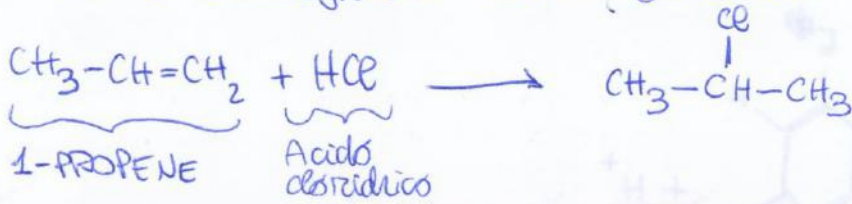
Hanno il prefisso -ciclo davanti all'idrocarburo di provenienza:



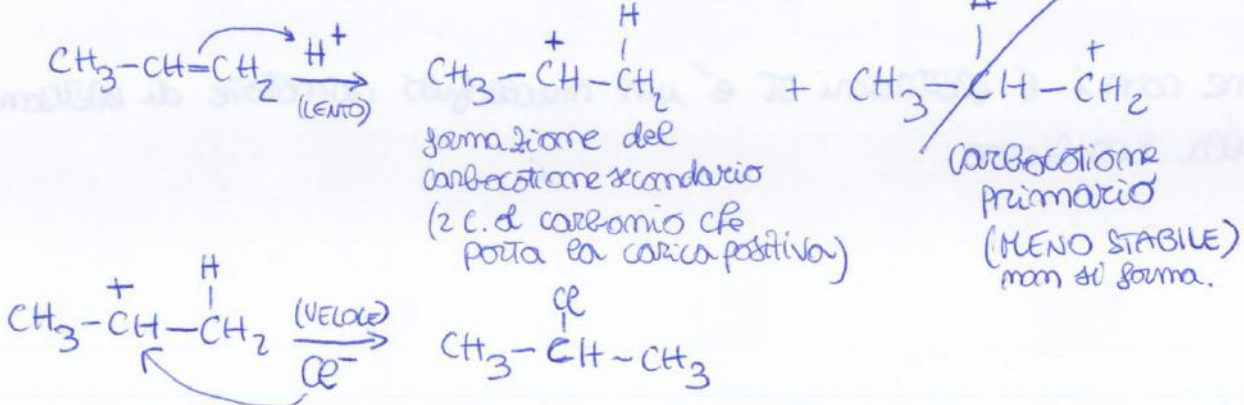
REAZIONI

ADDIZIONE ELETTROFILA

Addizione elettrofila di acidi idrogenoclorici:

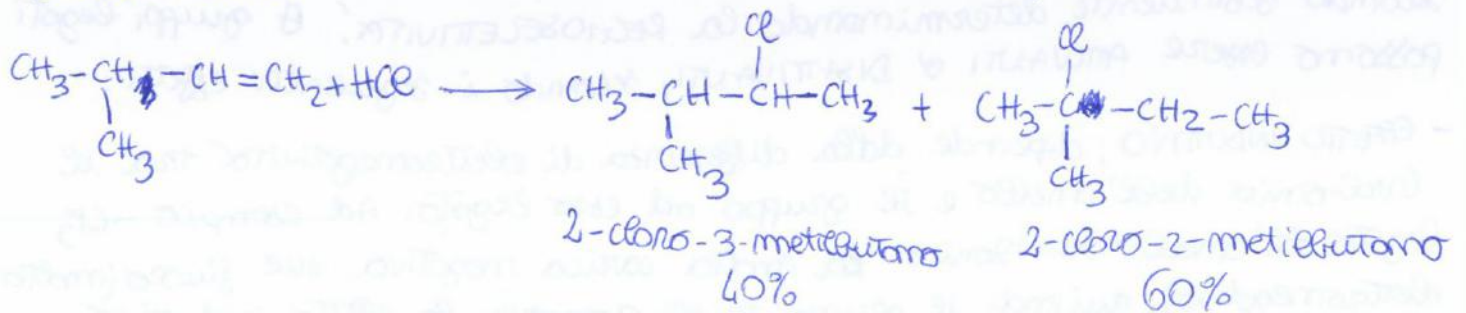


Il decorso della reazione è il seguente:

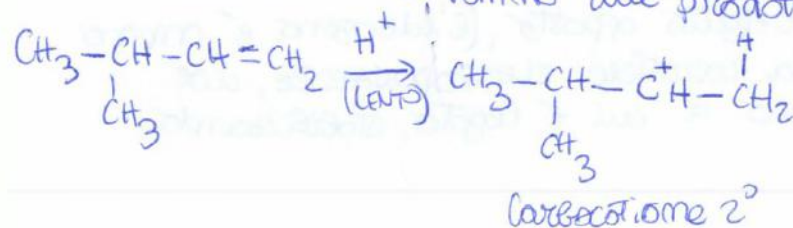


La reazione segue la regola di MARKOVNIKOV; in un'addizione ad un doppio legame, l'addendo POSITIVO o elettrofilo (un protone, il nostro H^+) si lega al carbonio che ha il maggior numero di IDROGENI legati (detto carbonio meno sostituito). Si forma così un carbocatione più stabile possibile.

Può anche avvenire addizione con TRASFUGIONE; serve a stabilizzare i carbocationi.

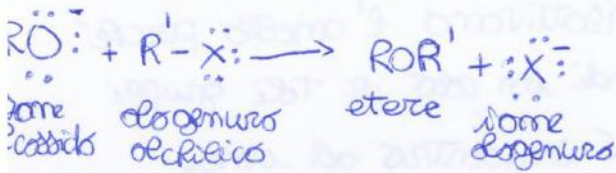
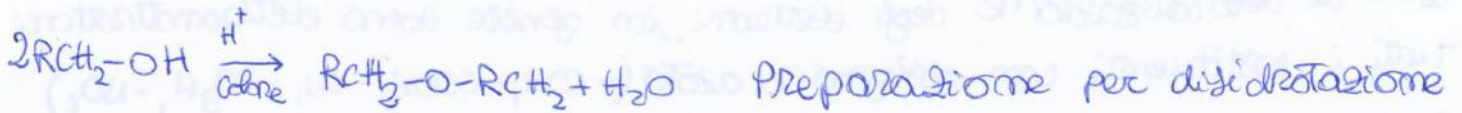


Perché succede che si formano due prodotti?

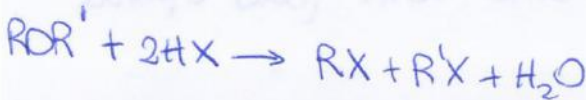


REAZIONI NEGLI ETERI

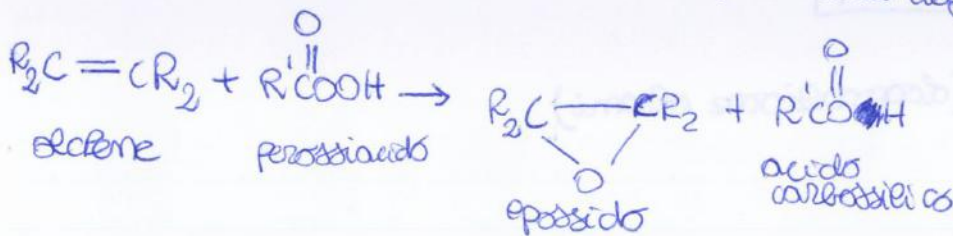
ASPIRACIONE IN ORETTA



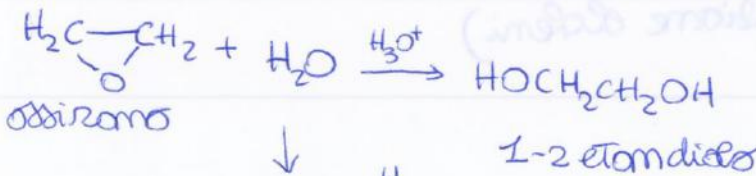
Sintesi di eteri asimmetrici, i gruppi migliori sono gli alogenuri alchilici e metilici. (SINTESI DI WILLIAMSON)



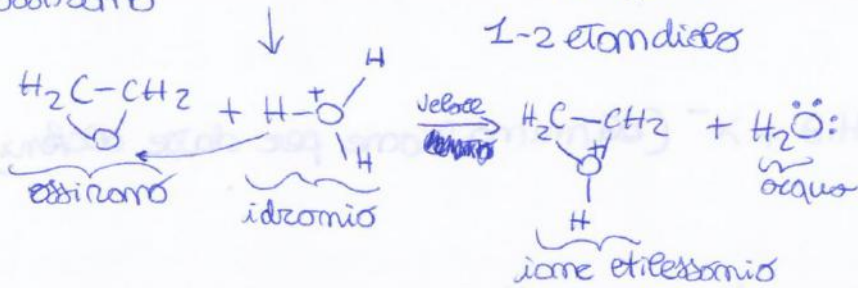
Rottura acido catalizzata (reattività degli alogeni $HI > HBr > HCl$)



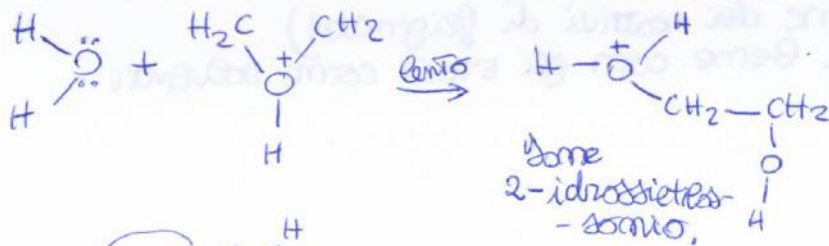
Preparazione per ossidazione di alcheni.



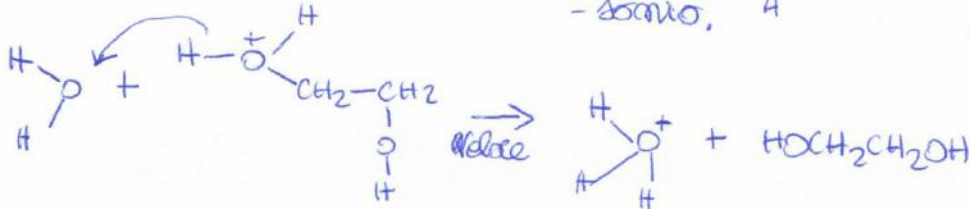
apertura dell'anello acido (ACIDO CATALIZZATA)



l'ossigeno acquista un protone dell'idronio, diventando uno ione.



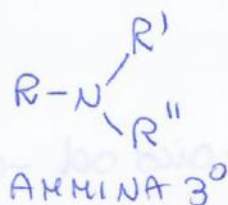
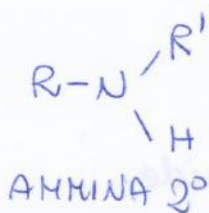
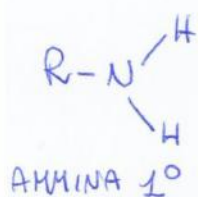
attacco nucleofilo dell'acqua sul carbonio dell'anello, avviene quindi rottura del legame CH_2-O e apertura dell'anello.



ritrasferimento di H^+ all'acqua, ripristino di H_3O^+ con prodotto alcolico finale.

AMMINE

Sono derivati dell'ammoniaca NH_3 , dove uno o più degli H sono sostituiti da gruppi R:

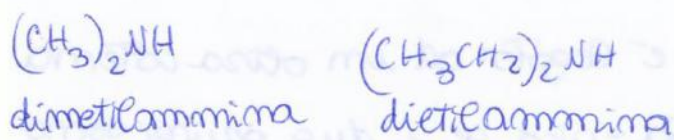


Hanno struttura piramidale con un doppietto elettronico solitario. Le ammine terziarie hanno in N un centro chirale, ma non c'è chiralità ottica (gli enantiomeri si possono convertire uno nell'altro). Per la presenza di N molto elettronegativo, le ammine sono POLARI, e quelle primarie e secondarie possono accettare o creare legami idrogeno (grazie ai legami N-H). Sono fortemente BASICHE.

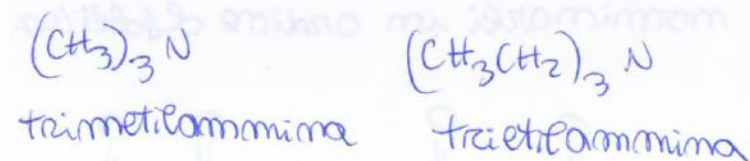
La nomenclatura prevede come desinenza "ammina", come radice il nome del sostituente R. (se sono diversi, ordine alfabetico)



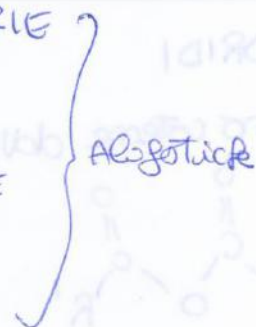
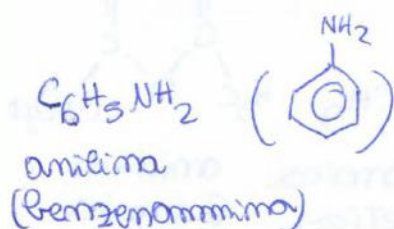
PRIMARIE



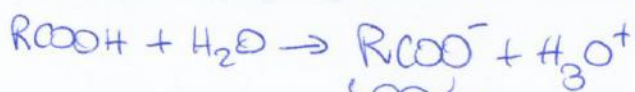
SECONDARIE



TERZIARIE



ACIDI CARBOSSILICI Hanno il gruppo funzionale carbossile $-COOH$, qui però il gruppo carbonilico è meno elettrofilo che in aldeidi e chetoni. In acqua si dissociano come:



anione carbossilato (più stabile dello ione ossido che si forma per la dissociazione di un alcol!)

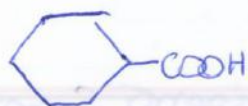
Per nomenclatura, si usa $-oico$ come desinenza, e la catena più lunga come radice:

$HCOOH$
acido metanoico
(acido formico)

CH_3COOH
acido etanoico
(acido acetico)

CH_3CH_2COOH
acido propanoico

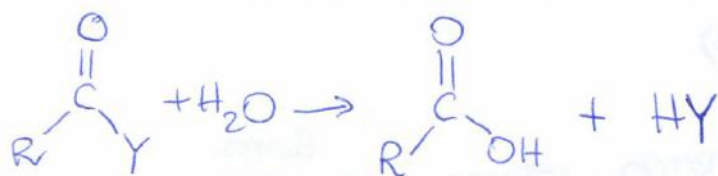
$CH_3CH(OH)COOH$
acido 2-idrossipropanoico



acido ~~metanoico~~ benzoico
(acido benzoico)

$HOOC-CH_2-COOH$
acido propanedioico

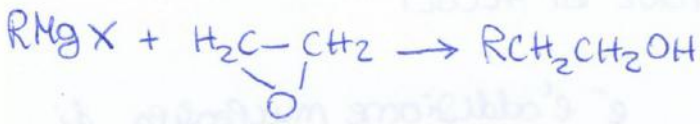
Sostituendo al gruppo $-OH$ di $COOH$, un gruppo come $-OR$, $-Cl$, $-NH_2$, $R'COO^-$, si ottengono derivati degli acidi carbossilici, che possono essere riconvertiti per i derivati. Detto Y il gruppo al posto di OH :



La presenza di Y è importante per la stabilità, infatti al crescere dell'elettronegatività di Y , diminuisce l'effetto ELETTRONATTIRANTE e quindi la stabilità del gruppo carbonilico.

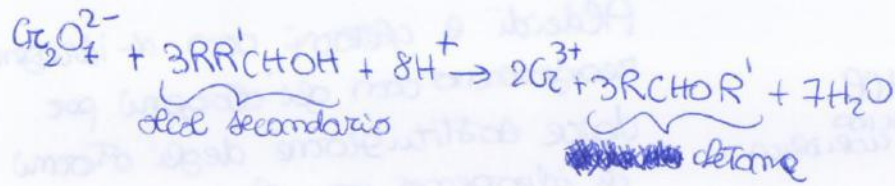
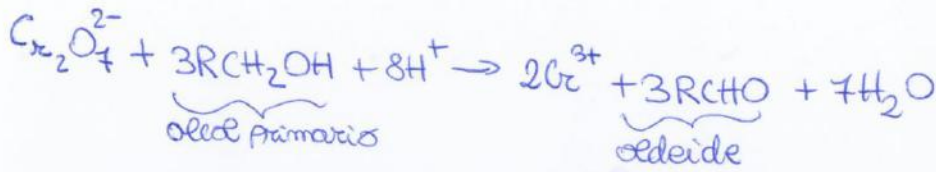
ESTERI \rightarrow OR' al posto di OH , per nominarli al posto di $-oico$ si mette $-ato$, seguito dal nome del gruppo R' .

$HCOOCH_3 \rightarrow$ metanoato di metile, $CH_3COOCH_3 \rightarrow$ etanoato di metile

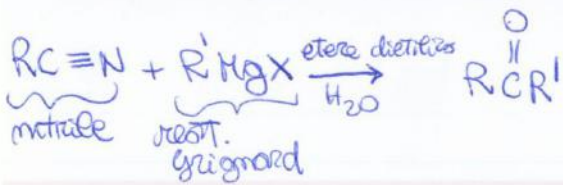


Con reattivi di Grignard
(R si lega al carbonio meno
sostituito)

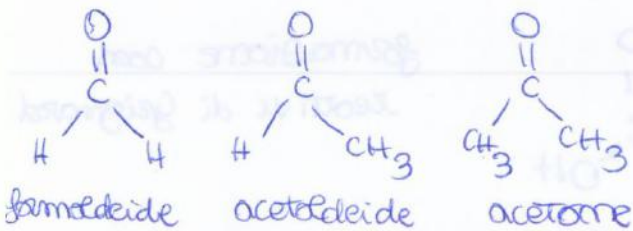
REAZIONI IN ALDEIDI E CHETONI



preparazione per
ossidazione



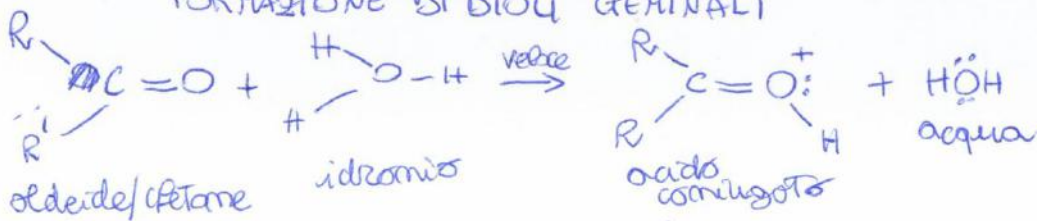
preparazione con reattivi di Grignard,
sono fortemente nucleofili e attaccano
i nitrili



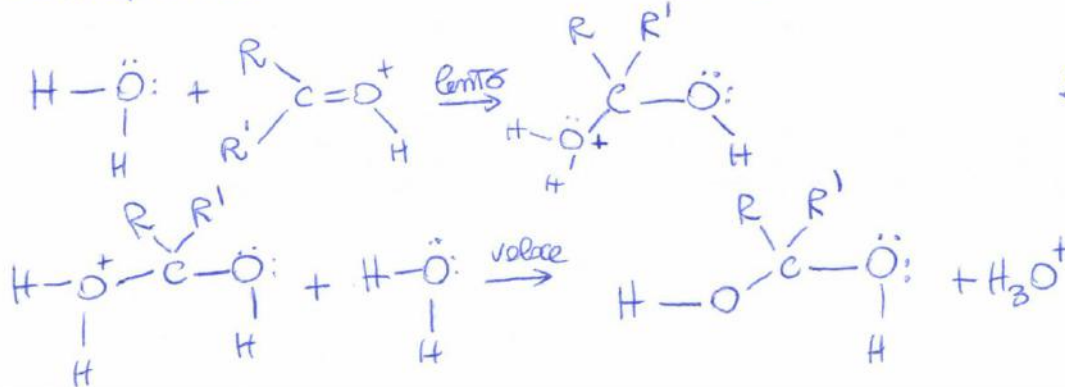
aumento stabilità C-carbonile
diminuzione di K_w

Si nota che i chetoni sono più
stabili delle aldeidi, infatti i
gruppi alkilici hanno effetto induttivo
elettron-donatore che stabilizza
l'atomo di carbonio.
CARICA DELOCALIZZATA

FORMAZIONE DI DIOLI GEMINALI



1° PROTONAZIONE
DELL'ALDEIDE/
CHETONE DA
PARTE DELL' H_3O^+



2° attacco nucleofilo
dell'acqua

3° estrazione
di H^+ da parte
dell'acqua,
formazione di
Diolo.