MASTER COPY
Tel. 050 8312126
Cell. 388 9837745

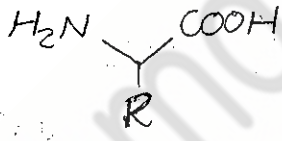
PROTEINE

Le proteine sono i polimeri biologici più importanti, assieme agli acidi nucleici ed ai polisaccaridi. Le proteine sono l'ultimo "stadio" del processo trascrizione – traduzione del DNA, descritto nel dogma fondamentale della biologia.

MASTER COPY
Tel. 050 8312126
Cell. 388 9837745

1 – I MONOMERI

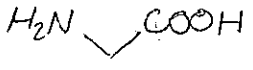
Le proteine sono costituite da AMMINOACIDI. Un amminoacido è un composto dotato di un gruppo $-NH_2$ e un $-COOH$, e quelli biologici recano tali gruppi a distanza di 1 solo carbonio. Tale carbonio lega anche un gruppo $-R$, che a seconda della sua natura differenzia i vari amminoacidi



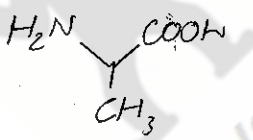
Amminoacido

Esistono 20 diversi amminoacidi in natura (e quindi 20 diversi R), e sono raggruppati convenzionalmente in 3 gruppi:

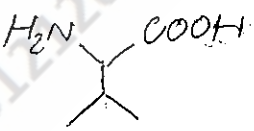
a) AMMINOACIDI NON POLARI (9)



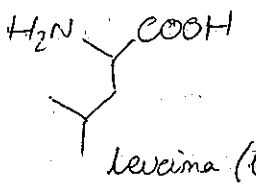
Glicina (Gly)



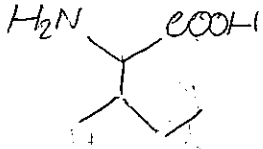
Alanina (Ala)



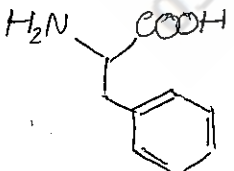
Valina (Val)



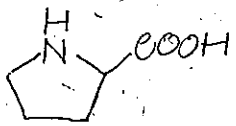
Leucina (Leu)



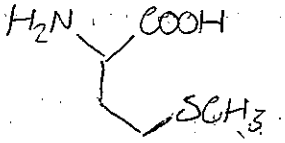
Isoleucina (Ile)



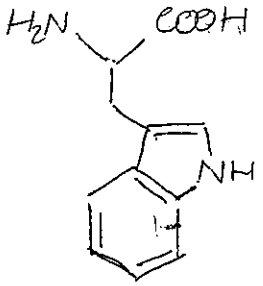
Fenilalanina (Phe)



Prolina (Pro)

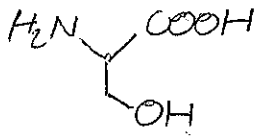


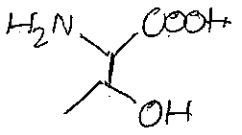
Metionina (Met)

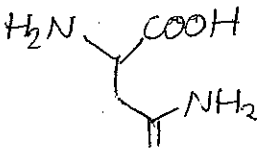


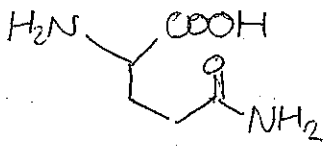
Triptofano (Trp)

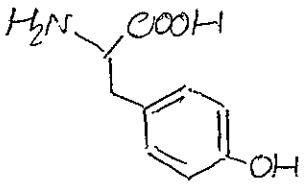
b) AMMINOACIDI POLARI (6)

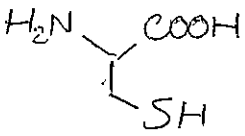

Serina (Ser)


Treonina (Thr)


Asparagina (Asn)

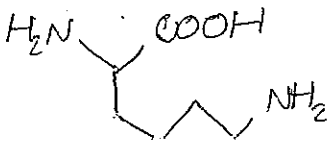

Glutammina (Glu)

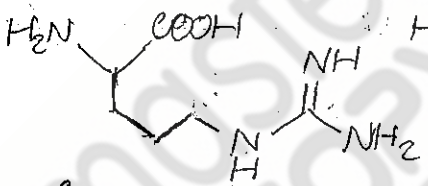

Tirosina (Tyr)

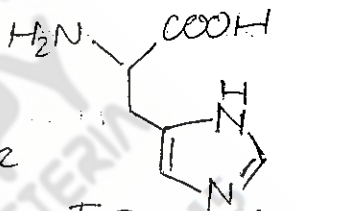

Cisteina (Cys)

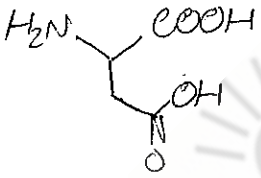
MASTER
Tel. 050 831...
Cell. 388 98377...

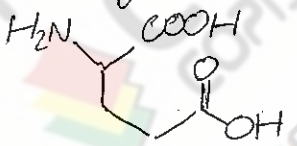
c) AMMINOACIDI CARICHI (5)


Lisina (Lys)

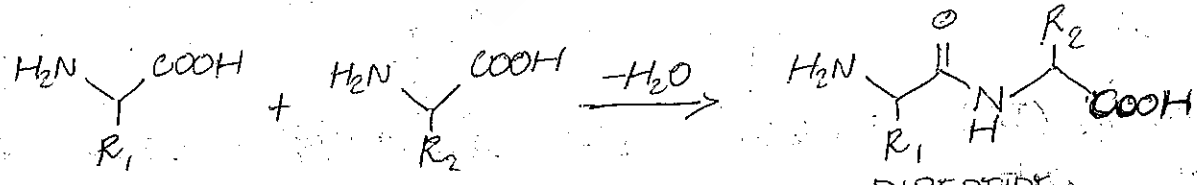

Arginina (Arg)

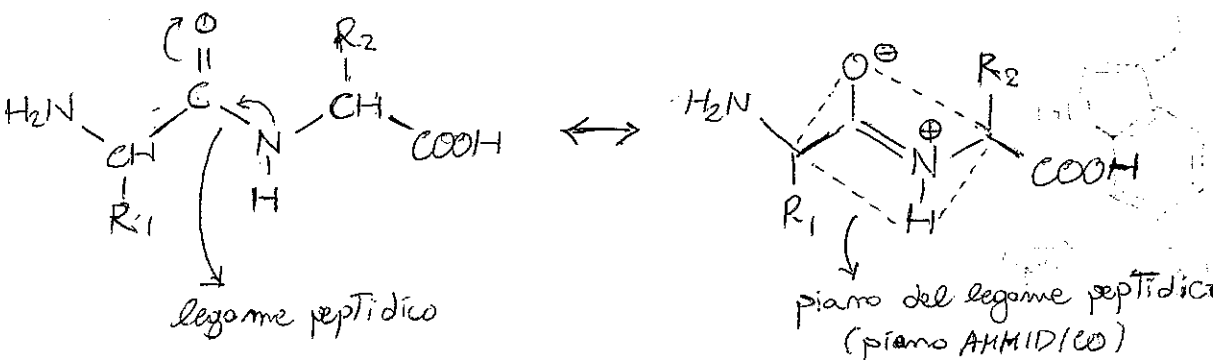

Istidina (His)


Acido aspartico (Asp)


Acido glutammico (Glu)

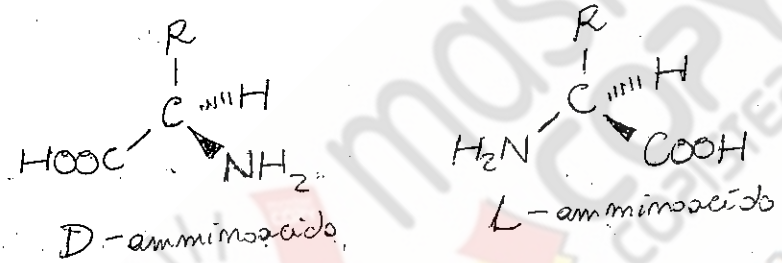
Gli amminoacidi si legano tra di loro tramite i gruppi $-NH_2$ e $-COOH$ per ottenere specie ammidiche. Il legame così formato è detto LEGAME PEPTIDICO, e le proteine vengono per questo anche dette PEPTIDI o POLIPEPTIDI. Il legame peptidico è planare per risonanza


DIPEPTIDE



In un polipeptide si avrà quindi un'estremità "N", con il gruppo $-NH_2$ non legato, e una estremità "C", con il gruppo $-COOH$ non legato. Per convenzione, l'N-Terminale è preso come primo monomero, e da esso si parte a contare.

CHIRALITÀ: La presenza di un carbonio centrale asimmetrico rende gli amminoacidi, con l'eccezione della glicina, chirali. In natura, si trova che TUTTI gli amminoacidi sono presenti nell'enantiomero S (o L, nella notazione D/L). Molti enzimi si sono evoluti in modo da riconoscere e interagire solo con gli L-amminoacidi.



MASTER COPY
Tel. 050 831[illegible]
Cell. 388 9837745

2 - STRUTTURA PRIMARIA

Con il termine struttura primaria di una proteina si intende la sequenza di amminoacidi che attraverso i legami peptidici formano la catena del biopolimero. La struttura primaria è fondamentale, poiché permette di stabilire come la proteina si disporrà tridimensionalmente nello spazio, e di prevedere quindi la sua funzione biologica. La determinazione della struttura primaria, comunemente detta "SEQUENZIAMENTO" della proteina, è dunque un campo molto importante di studio, che fa uso di numerose tecniche analitiche. Le operazioni necessarie al sequenziamento possono essere così distinte:

(i) **ISOLAMENTO**: La prima fase consiste nell'isolamento della proteina dall'ambiente cellulare in cui si trova. Questo viene solitamente eseguito tramite la rottura della cellula, con metodi meccanici,

Tecnici o chimici. Quando si lisa una cellula, si deve fare attenzione poiché, assieme alla proteina desiderata, nella poltiglia che si ottiene saranno presenti anche enzimi atti alla sua degradazione, precedentemente presenti ad esempio nei lisosomi. La funzione di tali enzimi può essere bloccata agendo sul pH o sulla Temperatura. Una volta ottenuta la miscela di molecole biologiche, si può adottare una opportuna Tecnica

1) ULTRACENTRIFUGAZIONE: L'ultracentrifuga sottopone i campioni ad elevate forze gravitazionali che causano la separazione dei componenti secondo la loro massa. L'ordine di deposizione è dato dai FATTORI DI SEDIMENTAZIONE, che si esprimono in Svedberg (S), dal nome dello sviluppatore della Tecnica, $1S = 10^{-13}$ sec.

2) DIALISI: La dialisi è la separazione di soluti disciolti in un liquido, facendo uso di una membrana che consente loro il passaggio in una sola direzione. Il processo è chiaramente di Tipo entropico, poiché sfrutta la diffusione. In questo modo si allontanano facilmente piccole molecole e ioni dalla matrice, mentre le macromolecole rimangono nella soluzione iniziale.

3) SOLUBILITÀ: Le macromolecole cariche come le proteine risentono apprezzabilmente della forza ionica della soluzione in cui si trovano. In particolare, si distingue un andamento generale:

- BASSE FORZE IONICHE: proteina moderatamente solubile
- MEDIE FORZE IONICHE → SALTING-IN: Gli ioni aggiunti compensano le cariche della proteina e la trattengono in soluzione: la proteina aumenta la sua solubilità
- ALTE FORZE IONICHE → SALTING-OUT: Se la concentrazione ionica è elevata, le molecole di solvente tendono a solvatare di più gli ioni, lasciando "libere" le proteine, che divengono meno solubili a causa di questo.

MASTER COPY
Tel. 050 8312126
Cell. 388 9837745

4) DOSAGGIO : Il dosaggio è una operazione che si effettua dopo ogni processo di separazione, e consiste in un controllo della quantità di analita che si è recuperato. Il dosaggio deve essere un metodo semplice e quantitativo, le tecniche più comunemente usate sono quelle che fanno uso di anticorpi specifici per la proteina desiderata, e che dunque non presentano rischi di interferenze.

(ii) SEPARAZIONE : le tecniche di isolamento in genere permettono di isolare le proteine dagli altri componenti della poltiglia derivante direttamente dalla distruzione cellulare. Il passo successivo è dunque la separazione delle proteine tra loro.

1) CROMATOGRAFIA A PERMEAZIONE DI GEL (GPC) : la cromatografia a permeazione di gel sfrutta come fase stazionaria un gel di sfere polimeriche che sono dotate di pori in cui le molecole si possono inserire. Le molecole sufficientemente piccole seguiranno allora i percorsi interni alle sferette, impiegando più tempo a percorrere la colonna di quelle più grandi.

2) CROMATOGRAFIA IONICA (IC) : In questa cromatografia si sfrutta la carica dei siti acidi/basici delle proteine; la fase stazionaria è costituita da anioni (Tipicamente carbossilati) o cationi (Tipicamente sali di ammonio), a seconda che sia necessaria, rispettivamente, con proteine cationiche (al di sotto del loro pI) o aniomiche (al di sopra del pI). L'eluizione avviene in gradiente di pH o di forza ionica. La tecnica è molto flessibile, ma l'utilizzo di grandi quantità di ioni per l'eluizione può richiedere una dialisi dell'eluato, o addirittura causare il salting-out delle proteine

3) CROMATOGRAFIA AD AFFINITÀ (AC) : In questa cromatografia la fase stazionaria presenta siti che sfruttano la grande specificità delle proteine nelle loro funzioni biologiche; si possono ad esem-