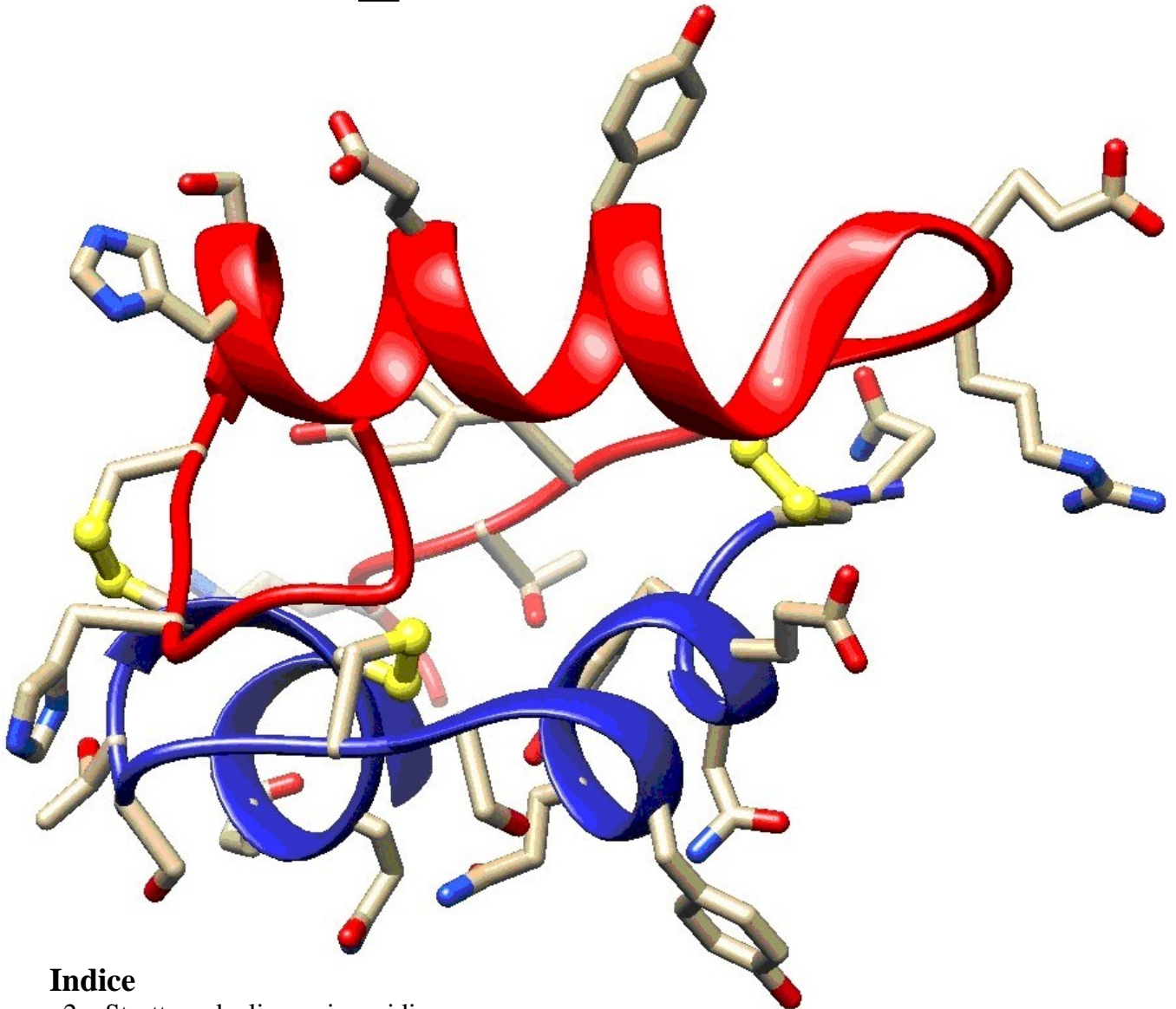


Mauro Tonellato

Amminoacidi e proteine

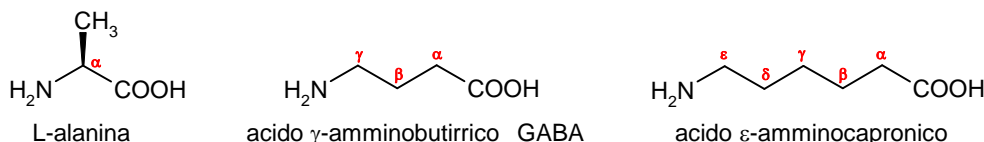


Indice

- 2 – Struttura degli amminoacidi
- 6 – Proprietà acido-base degli amminoacidi
- 10 – Separazione di amminoacidi
- 13 – Sintesi di amminoacidi
- 14 – Legame peptidico
- 16 – Peptidi e proteine
- 18 – Struttura delle proteine 1^a, 2^a, 3^a, 4^a
- 22 – Determinazione della struttura delle proteine
- 26 – Sintesi di peptidi
- 30 – Sintesi di peptidi in fase solida

Struttura degli amminoacidi

Gli amminoacidi naturali sono i costituenti delle proteine e si legano uno all'altro per formare lunghe catene proteiche. Gli amminoacidi, come si deduce dal loro nome, hanno sia un gruppo carbossilico che un gruppo amminico. Gli amminoacidi che costituiscono le proteine, come l'alanina mostrata qui sotto, sono tutti alfa-amminoacidi, cioè hanno il gruppo amminico legato sul C-2 della catena. Al di fuori delle proteine, esistono anche amminoacidi col gruppo amminico legato a carboni diversi dal C-2, per esempio l'acido γ -amminobutirrico (GABA), un neurotrasmettitore ad azione inibitoria, ha il gruppo amminico sul C-4, mentre l'acido ϵ -amminocapronico, il costituente del nylon 6, ha il gruppo amminico sul C-6.

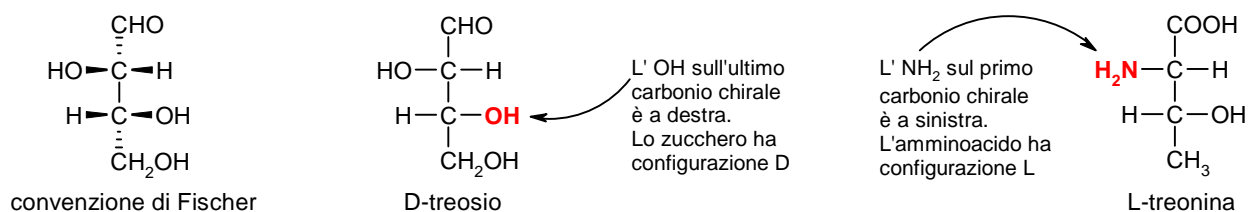


In questo capitolo tratteremo solo gli amminoacidi che formano le proteine.

La prima cosa da osservare è che sono tutti chirali (a parte il più piccolo, la glicina) e appartengono alla serie L secondo la definizione di Fischer. Per disegnare una molecola con la **proiezione di Fischer**, la catena principale va disegnata verticale, con il gruppo più ossidato in alto. I legami lungo la catena vanno disegnati a croce, i legami orizzontali, per convenzione, sporgono verso chi guarda, mentre i legami verticali sprofondano sotto il foglio.

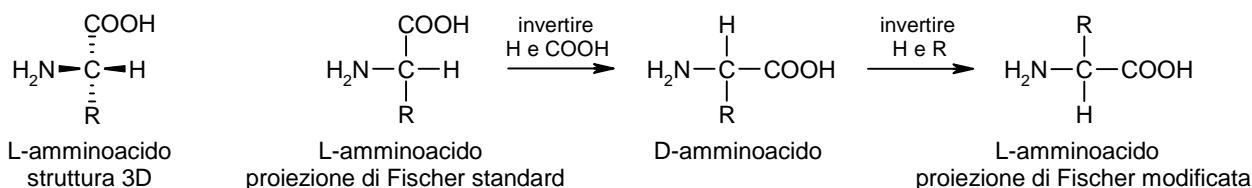
Negli zuccheri, la configurazione D o L va attribuita in base alla posizione del gruppo OH sull'ultimo carbonio chirale in basso, come nel D-treosio qui sotto.

Negli amminoacidi, la configurazione D o L va attribuita in base alla posizione del gruppo amminico sul primo carbonio chirale (alfa), come nella L-treonina qui sotto.



Il carbonio alfa (C-2) è il cuore della struttura degli amminoacidi. Attorno a questo carbonio vi sono quattro sostituenti: il gruppo carbossilico in alto, il gruppo amminico a sinistra, l'idrogeno a destra e la catena laterale R in basso (diversa per ogni amminoacido) che nella treonina è $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$.

Dato che gli amminoacidi si legano tra loro per formare catene lineari (chiamate peptidi se sono corte o proteine se superano le 50 unità), è più conveniente disegnarli con una proiezione di Fischer modificata ponendo a sinistra il gruppo amminico e a destra il gruppo carbossilico. In questo modo la catena laterale R si trova in alto e l'idrogeno in basso come è mostrato qui sotto per un L-amminoacido generico. Infatti, invertendo tra loro due sostituenti in una struttura di Fischer, si inverte la configurazione, quindi si devono fare due inversioni per tornare alla configurazione iniziale iniziale.



Non esiste una vera ragione per cui gli amminoacidi naturali debbano appartenere alla serie L piuttosto che alla serie D. La cosa fondamentale è che abbiano tutti la stessa configurazione perché così possono costruire proteine con una struttura ben definita. Infatti, basta un solo amminoacido D in un punto critico di una proteina perché questa assuma una conformazione errata e diventi inattiva.

In natura gli amminoacidi D si incontrano molto raramente. I batteri, per esempio, utilizzano D-alanina per costruire un breve tratto della loro parete cellulare chiamata peptidoglicano, ma non sintetizzano la D-alanina in modo diretto, la ottengono isomerizzando la normale L-alanina.

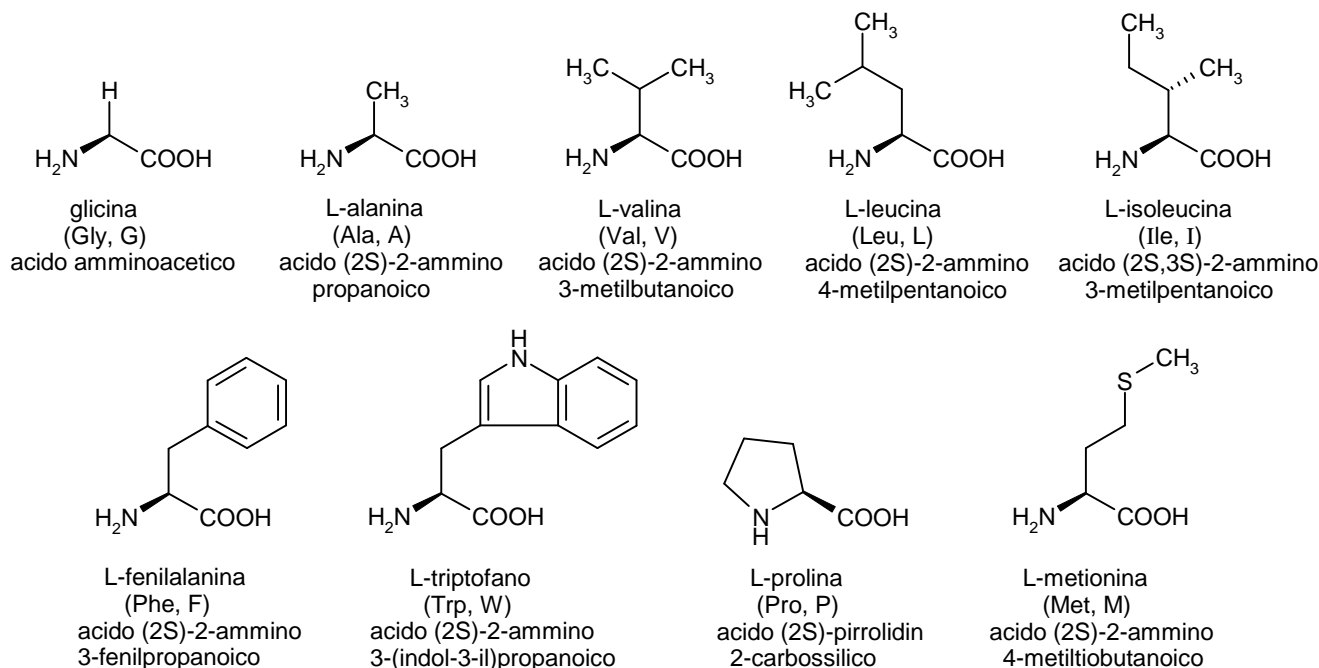
Nelle proteine sono presenti 20 diversi amminoacidi più alcuni amminoacidi speciali (selenocisteina e selenometionina) sintetizzati solo per realizzare alcuni enzimi anti radicali liberi.

Gli amminoacidi, in base alle caratteristiche della loro catena laterale, vengono classificati in quattro categorie: apolari (9), polari (6), acidi (2) e basici (3).

Qui sotto è mostrata, per ogni amminoacido, la formula di struttura, il nome comune, il nome IUPAC e, tra parentesi, l'abbreviazione a tre lettere e quella ad una lettera.

Le formule di struttura sono mostrate secondo la convenzione più moderna a cunei pieni o tratteggiati piuttosto che con le proiezioni di Fischer. La punta del cuneo (sia pieno che tratteggiato) va sempre posta sull'atomo a cui si riferisce la proiezione. Il cuneo pieno indica un legame che sporge verso di noi, il cuneo tratteggiato indica un legame che sprofonda sotto il foglio.

Gli amminoacidi apolari sono nove:



Glicina è l'amminoacido più piccolo, l'unico non chirale dato che ha due atomi di idrogeno sul carbonio alfa. Il suo nome deriva dal greco *glykos*, dolce, a causa del suo sapore.

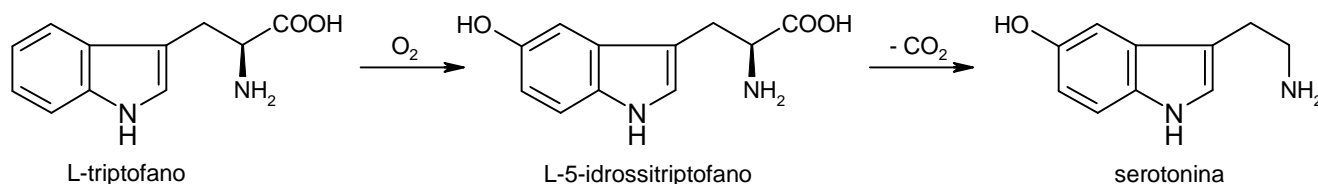
Alanina è l'amminoacido con la più piccola catena laterale alchilica che, infatti, è costituita da un solo carbonio. La sua struttura è ripresa da molti altri amminoacidi.

Valina, come catena laterale, ha un gruppo isopropilico. Questo ha la forma di una V che è facile associare al nome Valina.

Leucina e **isoleucina** sono gli amminoacidi alchilici più apolari. La loro catena laterale è un isobutile e un secbutile rispettivamente. La loro struttura può essere ricordata osservando che il sec butile ha la forma di una L che sembrerebbe logico associare a Leucina, invece l'associazione è opposta. La forma ad L è di isoleucina, il gruppo isobutile è di leucina. Isoleucina ha un secondo centro chirale S sul C-3.

Fenilalanina ha un anello benzenico (chiamato fenil nei sostituenti) legato alla catena laterale di un'alanina.

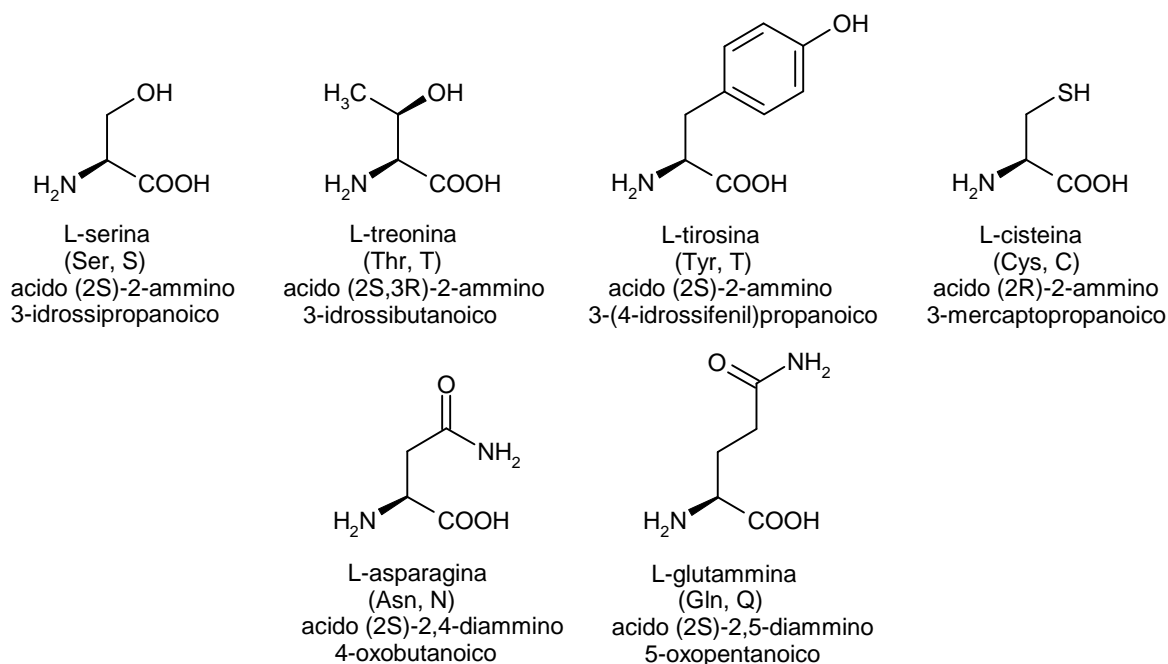
Triptofano (si pronuncia triptòfano) ha un indolo legato alla catena laterale di un'alanina. È l'amminoacido con il più forte assorbimento UV a 270 nm. Il triptofano è la molecola di partenza per la sintesi della serotonina, un ormone che regola l'umore, le emozioni, la sessualità, il sonno e l'appetito.



Prolina è l'unico amminoacido che non ha un gruppo amminico primario in alfa, dato che la sua catena laterale chiude un anello a cinque termini che incorpora l'azoto (pirrolidina) e forma un'ammina secondaria. La prolina, per questo, è l'unico amminoacido che diventa giallo per reazione con ninidrina, mentre tutti gli altri diventano viola.

Metionina ha un gruppo CH_3S- (metiltio) che però è legato ad una catenella di due carboni e non di uno solo come in fenilalanina. Il ferro eme del citocromo *c* è tenuto in posizione dall'atomo di zolfo di una metionina e dall'atomo di azoto di un'istidina.

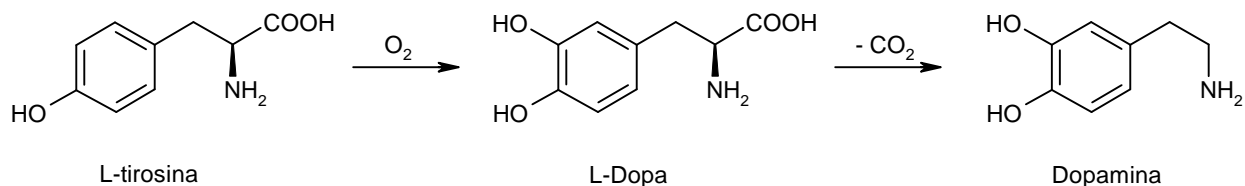
Gli aminoacidi polari sono sei:



Serina è il più piccolo aminoacido alcolico ed ha l'OH legato al metile dell'alanina.

Treonina è un aminoacido alcolico con un carbonio in più della serina. Il suo nome ha la radice treo che deriva dal D-treosio, lo zucchero di quattro carboni con due centri chirali diversi (2S,3R). Anche la treonina ha quattro carboni e due centri chirali diversi (2S,3R), le due molecole sono state messe a confronto a pagina 2. La treonina è l'unico aminoacido profumato, ha un deciso aroma di liquirizia. Anche gli idrolizzati proteici profumano di liquirizia se contengono treonina.

Tirosina è un aminoacido alcolico aromatico. Dopo il triptofano, è quello che assorbe di più all'UV, mentre gli altri aminoacidi, a parte fenilalanina, non assorbono a 270 nm. Nel nostro corpo, la tirosina è sintetizzata a partire dalla fenilalanina. Se l'enzima che fa questa conversione è difettoso, la fenilalanina si può accumulare e diventa tossica per il sistema nervoso provocando ritardi mentali irreversibili fin dai primi mesi di vita. Questa sindrome è chiamata fenilchetonuria e i suoi effetti tossici possono essere prevenuti solo con una dieta povera di fenilalanina. Per questo, nelle bevande addolcite con aspartame, un dipeptide formato da acido aspartico e fenilalanina, è riportata l'avvertenza: contiene una fonte di fenilalanina. La tirosina può essere polimerizzata da un enzima chiamato tirosinasi per formare un pigmento scuro. Tutti abbiamo osservato questo fenomeno in alcuni vegetali, come patate, mele e banane, che, una volta tagliati ed esposti all'aria, si scuriscono in modo evidente. La tirosina è anche la molecola di partenza per la sintesi della dopamina, un importante neurotrasmettitore.

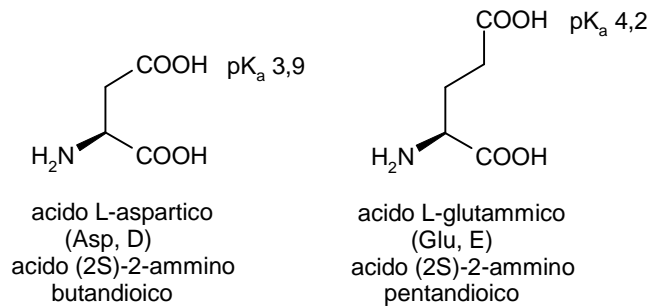


Cisteina è un aminoacido tioalcolico. Il fatto che lo zolfo pesi più dell'ossigeno, cambia la priorità secondo le regole CIP e quindi la sua configurazione sul C-2 è R invece di S come negli altri aminoacidi. In realtà la sua stereochimica è in linea con quella degli altri L-amminoacidi, questo è un esempio di come la nomenclatura storica DL per gli aminoacidi sia più affidabile della moderna RS. La cisteina, nelle proteine, è importante perché, per ossidazione, può legarsi ad un'altra cisteina formando un ponte disolfuro. Questo è il solo legame covalente che si può formare tra punti diversi di una proteina ed è importante per mantenere stabile la struttura tridimensionale (terziaria) delle proteine.

Nella copertina di questa dispensa è mostrata l'insulina, una proteina che contiene tre ponti disolfuro.

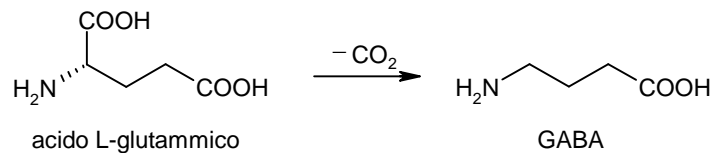
Asparagina e **glutammina** sono le ammidi derivate dai corrispondenti aminoacidi che hanno un carbossile in catena laterale: acido aspartico e acido glutammico. L'asparagina, come suggerisce il suo nome, è stata isolata per la prima volta dagli asparagi.

Gli aminoacidi acidi sono due:



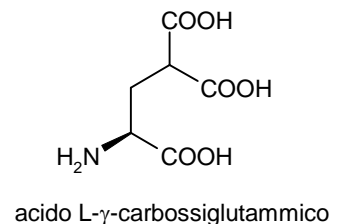
Acido aspartico è l'amminoacido acido più piccolo, ha il secondo carbossile (pK_a 3,9) legato direttamente al primo carbonio in catena laterale, quello dell'alanina.

Acido glutammico ha il secondo carbossile (pK_a 4,2) legato ad una catenella di due carboni. A pH fisiologico si presenta come glutammato, con il carbossile in alfa sotto forma di sale carbossilato. Il glutammato è usato in cucina per dare sapidità ai cibi ed è anche un importante neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale, mentre un suo derivato che si ottiene per decarbossilazione, il GABA, acido gamma aminobutirrico, è un neurotrasmettitore inibitorio.

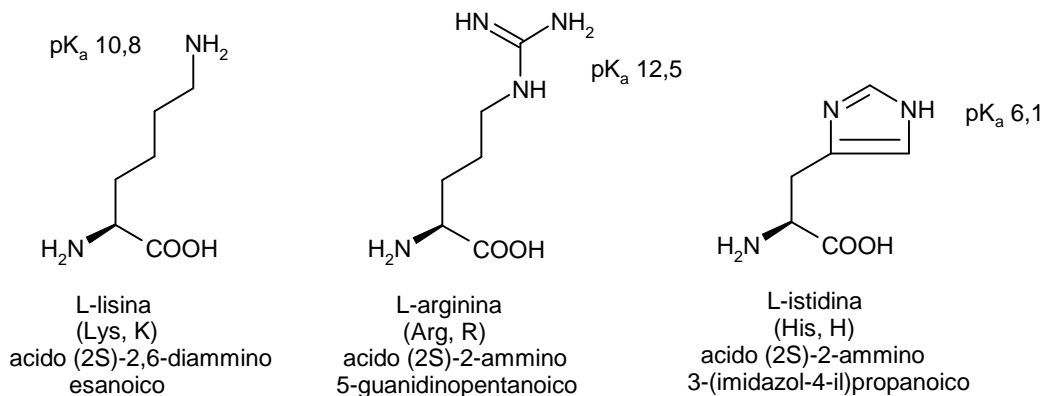


Una variante dell'acido glutammico, l'acido γ -carbossi-glutammico, possiede nella catena laterale due gruppi carbossilici vicini che sono ideali per legare ioni calcio. Il fattore VII di coagulazione e la protrombina hanno schiere di acidi γ -carbossi-glutammici con i quali si ancorano alla superficie interna dei vasi sanguigni dove vi sono molti ioni calcio legati ai gruppi fosfato delle membrane cellulari.

Anche le proteine che sintetizzano biominerale (come lo smalto dei denti o il guscio d'uovo) usano schiere di acidi γ -carbossi-glutammici per trattenere nella posizione corretta gli ioni che così formano cristalli perfetti.



Gli aminoacidi basici sono tre:



Lisina ha un gruppo amminico in catena laterale (pK_a 10,8) legato ad una catenella di 4 carboni.

Arginina ha un gruppo guanidinico in catena laterale (pK_a 12,5) legato ad una catenella di tre carboni, e quindi è l'amminoacido più basico.

Istidina ha un anello imidazolico legato ad una catenella di un solo carbonio. Questo anello non è molto basico (pK_a 6,1), ma è versatile e così lo troviamo sia a legare il ferro dell'eme nell'emoglobina e nei citocromi, sia a partecipare attivamente alla catalisi enzimatica, per esempio, nel sito attivo di enzimi proteolitici come la tripsina, nel quale agisce la terna di aminoacidi: acido aspartico, istidina, serina.

Proprietà acido base degli aminoacidi

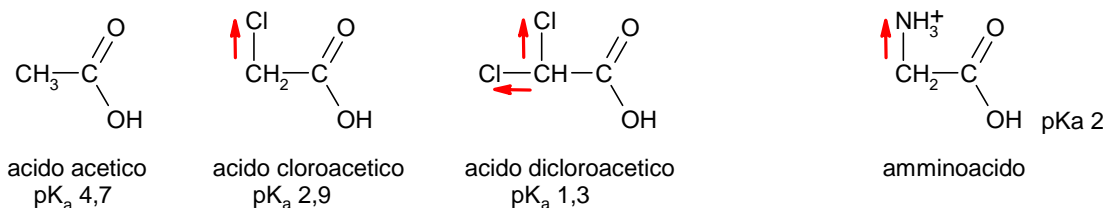
Mentre le ammine primarie hanno un pK_a di circa 10,5, il gruppo amminico primario in alfa di un aminoacido ha un pK_a di circa 9 e quindi è più acido di un'ammina primaria di 1,5 unità di pH.

Nello stesso modo, mentre gli acidi carbossilici, come l'acido acetico, hanno un pK_a di circa 4,5, il gruppo carbossilico in alfa di un aminoacido ha un pK_a di circa 2 e quindi è più acido dell'acido acetico di 2,5 unità di pH.

Entrambi i gruppi, amminico e carbossilico, di un aminoacido sono più acidi di quanto sarebbero se fossero da soli nella molecola. Questo fatto è facilmente spiegabile con l'effetto induttivo elettrone-attrattore che esercitano uno sull'altro.

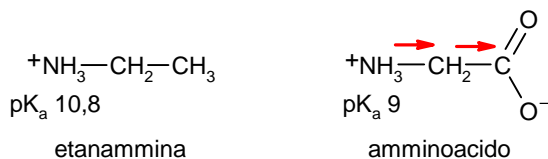
Il carbossile diventa più acido se ha un gruppo elettrone-attrattore alle spalle perché questo stabilizza la carica negativa del carbossilato e gli consente di sopravvivere fino a pH più acidi.

Questo stesso effetto si osserva negli acidi carbossilici sostituiti. Mentre l'acido acetico ha un pK_a di 4,7, l'acido cloroacetico ha un pK_a di 2,9 e l'acido dicloroacetico ha un pK_a di 1,3.

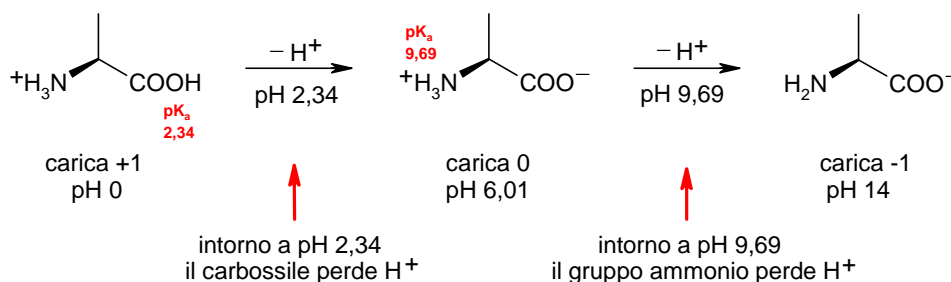


Il carbossile di un aminoacido ha pK_a 2 perché il gruppo amminico in posizione alfa esercita un effetto induttivo intermedio tra quello dell'acido cloroacetico e dicloroacetico. L'azoto ha la stessa elettronegatività del cloro (3,0), ma l'effetto induttivo è maggiore perché il gruppo amminico, a pH acidi, è protonato.

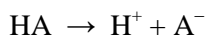
Il gruppo amminico di un aminoacido ha pH_a 9 perché il carbossile (anche se a pH basico è presente come carbossilato negativo), con l'elettronegatività dei suoi due ossigeni, destabilizza la carica positiva del gruppo amminico protonato che perde H^+ a pH meno basici rispetto all'etanammina.



Un aminoacido semplice come **alanina**, al variare del pH della soluzione, si può presentare in tre forme acido base diverse, come è mostrato qui sotto. I suoi due pK_a sono rispettivamente 2,34 e 9,69.



Per calcolare come varia la carica netta dell'amminoacido col pH, si consideri la reazione di dissociazione di un generico acido debole HA con costante di dissociazione acida K_a .



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

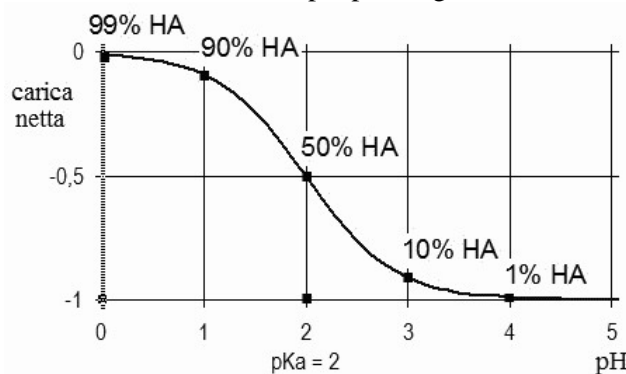
$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Se $[HA] = 100 [A^-]$ Quando $pH = pK_a - 2$	si ha $pH = pK_a - \log 100$ $[HA]$ è circa 99% $[A^-]$ è circa 1%	quindi $pH = pK_a - 2$
Se $[HA] = 10 [A^-]$ Quando $pH = pK_a - 1$	si ha $pH = pK_a - \log 10$ $[HA]$ è circa 90% $[A^-]$ è circa 10%	quindi $pH = pK_a - 1$
Se $[HA] = [A^-]$ Quando $pH = pK_a$	si ha $pH = pK_a - \log 1$ $[HA]$ è 50% $[A^-]$ è 50%	quindi $pH = pK_a$
Se $[HA] = 1/10 [A^-]$ Quando $pH = pK_a + 1$	si ha $pH = pK_a + \log 10$ $[HA]$ è circa 10% $[A^-]$ è circa 90%	quindi $pH = pK_a + 1$
Se $[HA] = 1/100 [A^-]$ Quando $pH = pK_a + 2$	si ha $pH = pK_a + \log 100$ $[HA]$ è circa 1% $[A^-]$ è circa 99%	quindi $pH = pK_a + 2$

In generale, durante la titolazione dell'acido debole HA con una base forte, si osserva che:

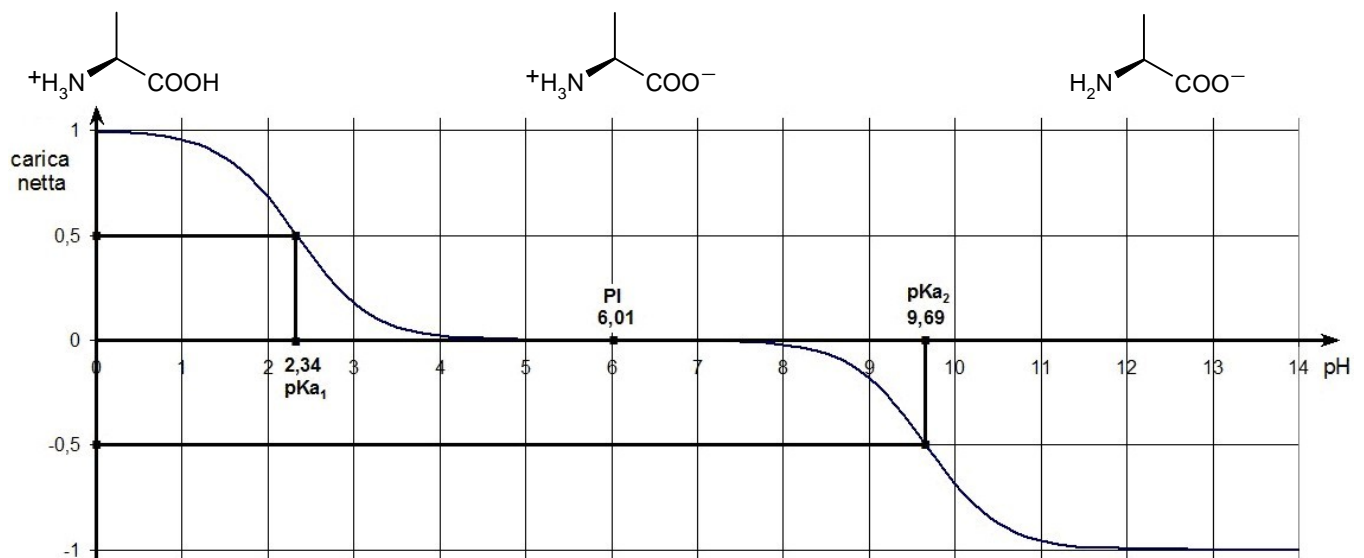
quando $[HA]$ è 99% 90% 50% 10% 1%,
il pH vale $pK_a - 2$ $pK_a - 1$ pK_a $pK_a + 1$ $pK_a + 2$

Qui sotto è mostrato il grafico carica netta di HA contro pH per un generico acido HA con $pK_a = 2$.



Con un amminoacido come **alanina**, che ha due soli gruppi acido-base, questo calcolo può essere eseguito in modo indipendente attorno ad ognuno dei due pK_a dato che questi hanno valori molto lontani tra loro e distano più di 4 unità di pH: l'alanina ha un carbossile con pK_a 2,34 e un gruppo amminico con pK_a 9,69.

Il grafico della carica netta dell'alanina al variare del pH della soluzione, è mostrato qui sotto:



A pH zero la carica netta dell'alanina è +1.

A $pH = pK_{a1} = 2,34$ la carica netta è +0,5 perchè il carbossile è dissociato nella metà delle molecole.

A $pH = 6,01$ la carica netta è zero (e resta vicina a zero tra pH 5 e 7). Questo pH è chiamato punto isoelettrico PI e si trova nel punto medio tra i due pK_a . $PI = (pK_{a1} + pK_{a2})/2$. Quando $pH = PI$, l'alanina è presente come zwitterione o ione ermafrodita con due cariche, una positiva e una negativa, che si annullano tra loro.

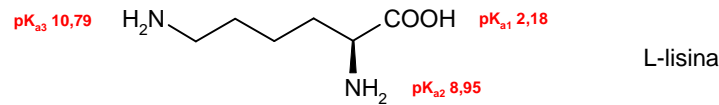
A $pH = pK_{a2} = 9,69$ la carica netta è -0,5.

Oltre pH 12, la carica netta dell'alanina è -1.

Con gli amminoacidi che hanno un gruppo acido o basico in catena laterale, il calcolo della carica netta è un po' più complesso.

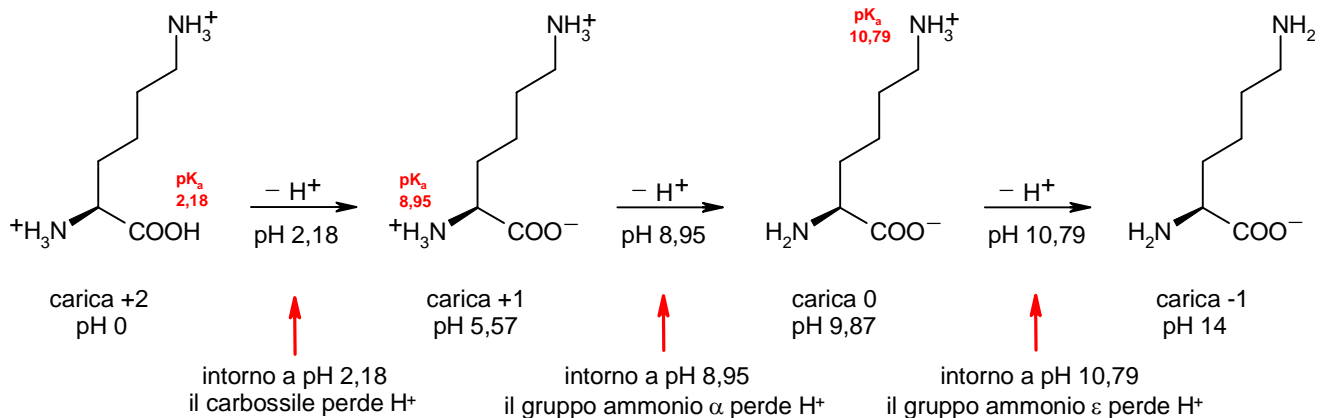
Consideriamo, ad esempio, la **lisina**, un amminoacido basico con tre gruppi acido base:

il carbossile in α (pK_{a1} 2,18), il gruppo amminico in α (pK_{a2} 8,95), il gruppo amminico in epsilon (pK_{a3} 10,79).

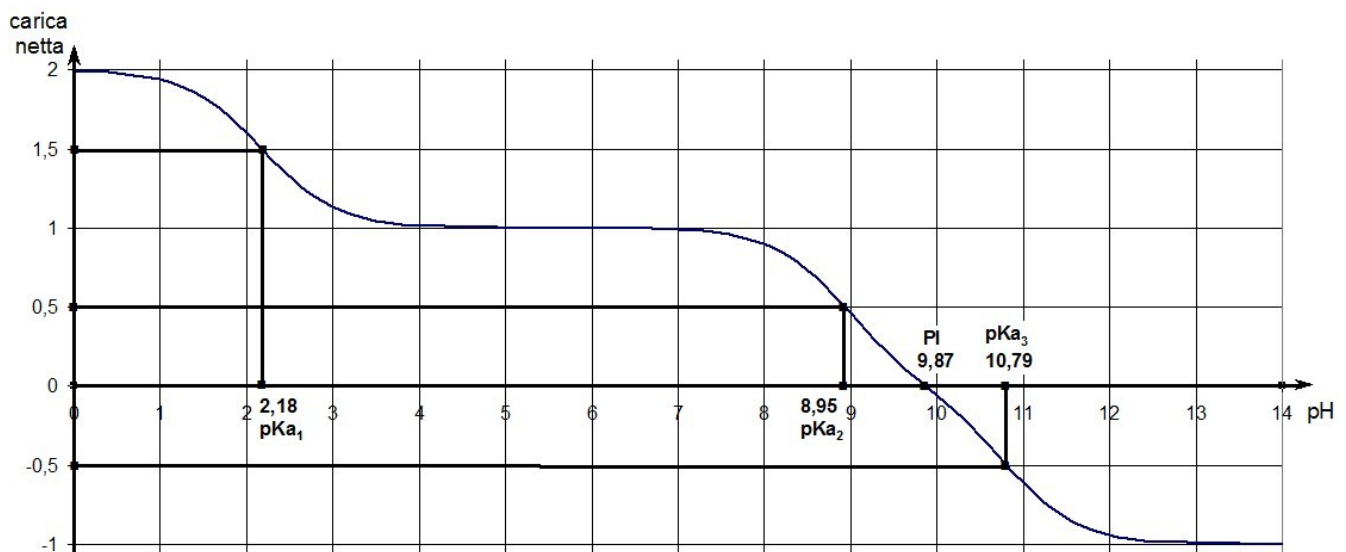


Gli ultimi due valori differiscono meno di 4 unità pH e quindi le rispettive curve carica netta contro pH si sovrappongono. In questo caso si può ancora disegnare il grafico con il calcolo approssimato mostrato più sopra, ma le due curve si dovranno interpolare manualmente nelle zone di conflitto.

Al variare del pH della soluzione, la lisina si può presentare in quattro forme acido base diverse:



Il grafico carica netta contro pH per la lisina è mostrato qui sotto.



A pH 0 la carica netta è +2.

A pH 2,18 la carica netta è +1,5 perché il carbossile ha perduto H^+ nel 50% delle molecole.

Tra pH 5 e 6,5 la carica netta rimane stabile a +1.

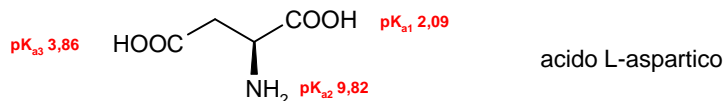
A pH 8,95 la carica netta è +0,5 perché il gruppo α -amminico protonato ha perduto H^+ in metà delle molecole.

A pH 9,87 la carica netta è zero, siamo al punto isoelettico che si trova a metà tra i pK_a dei due gruppi amminici. In questo caso, al punto isoelettico, per minime variazioni del pH, la molecola diventa positiva o negativa, la curva, in questo punto, è ripida.

A pH 10,79 la carica netta è -0,5 perché il gruppo ϵ -amminico protonato ha perduto H^+ in metà delle molecole.

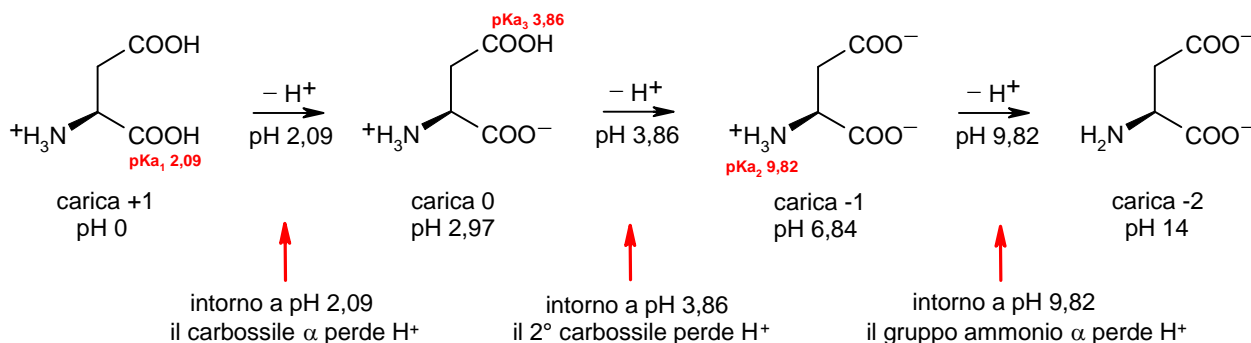
Oltre pH 13 la carica netta è -1.

Come ultimo esempio consideriamo l'**acido aspartico**, un amminoacido acido con tre gruppi acido base: il carbossile in α (pK_{a1} 2,09), il gruppo amminico in α (pK_{a2} 9,82), il carbossile in catena laterale (pK_{a3} 3,86).

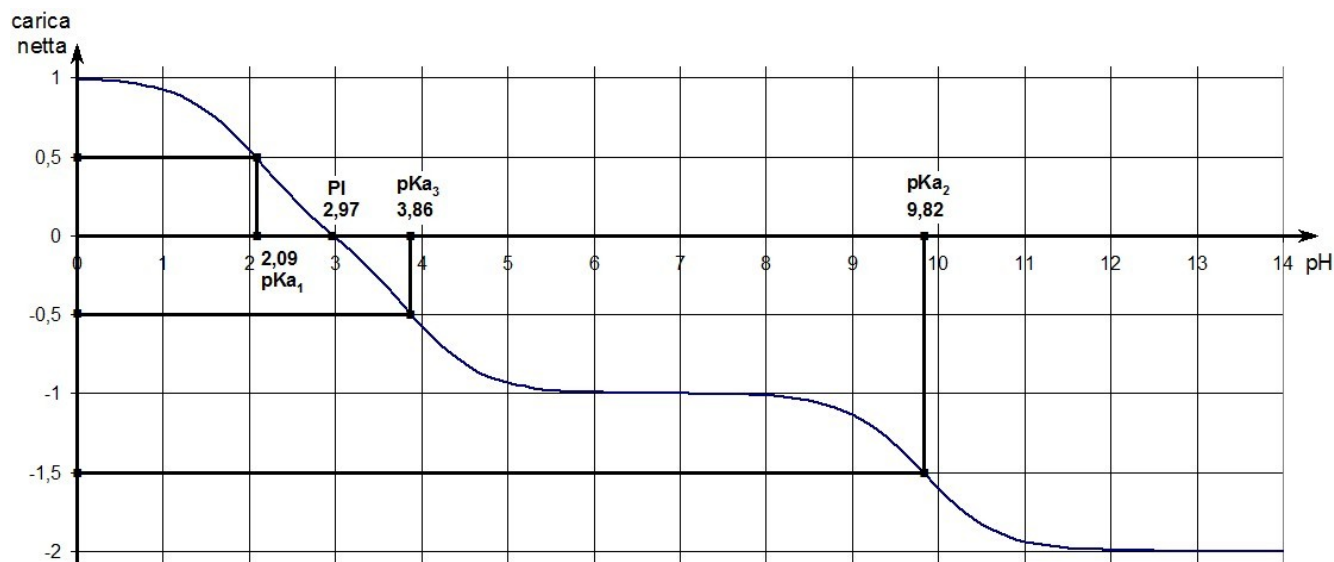


I due carbossili hanno valori di pK_a che differiscono meno di 4 unità pH e le loro curve carica netta contro pH, tracciate col metodo approssimato, si sovrappongono. In questo caso le due curve si devono interpolare nelle zone di conflitto.

Al variare del pH della soluzione, l'acido aspartico si può presentare in quattro forme acido base diverse:



Il grafico della carica netta dell'acido aspartico contro il pH è mostrato nella figura seguente.



A pH 0 la carica netta è +1.

A pH 2,09 la carica netta è +0,5 perché il carbossile in α ha perduto il protone nel 50% delle molecole.

A pH 2,97 la carica netta è zero, siamo al punto isoelettrico PI che si trova a metà tra i pK_a dei due gruppi carbossilici. La curva, in questo punto, è ripida e quindi, per minime variazioni del pH, la molecola diventa positiva o negativa,

A pH 3,86 la carica netta è -0,5 perché il gruppo carbossilico in catena laterale ha perduto l' H^+ in metà delle molecole.

Tra pH 6 e 7,5 la carica netta rimane stabile a -1.

A pH 9,82 la carica netta è -1,5 perché il gruppo amminico protonato in alfa ha perduto l' H^+ in metà delle molecole.

Oltre pH 12 la carica netta è -2.

Separazione di amminoacidi

Le tecniche più comuni di separazione degli amminoacidi sono l'elettroforesi, la cromatografia su strato sottile (TLC) e la cromatografia a scambio ionico.

Elettroforesi

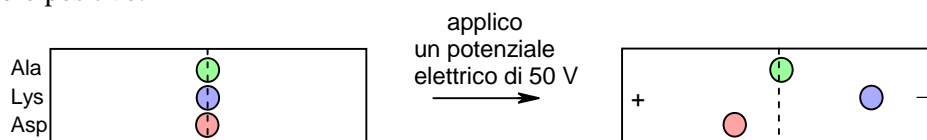
È una tecnica potente che separa le molecole in base alla loro carica netta costringendole a muoversi su un supporto (che storicamente era di carta imbevuta di un solvente a pH tamponato) sotto l'azione di un campo elettrico. Come abbiamo visto nel precedente paragrafo, gli amminoacidi hanno una carica netta che dipende dal pH della soluzione. Per separare una miscela di amminoacidi si dovrà scegliere il pH più opportuno per avere su ogni amminoacido una carica netta diversa.

Gli amminoacidi con carica netta positiva, quelli più basici, si muovono verso il polo negativo tanto più velocemente quanto maggiore è la loro carica elettrica.

Gli amminoacidi con carica zero, che hanno il punto isoelettrico coincidente col pH della soluzione, restano fermi al punto d'inizio.

Gli amminoacidi con carica negativa, quelli più acidi, si muovono verso il polo positivo tanto più velocemente quanto più negativa è la loro carica elettrica.

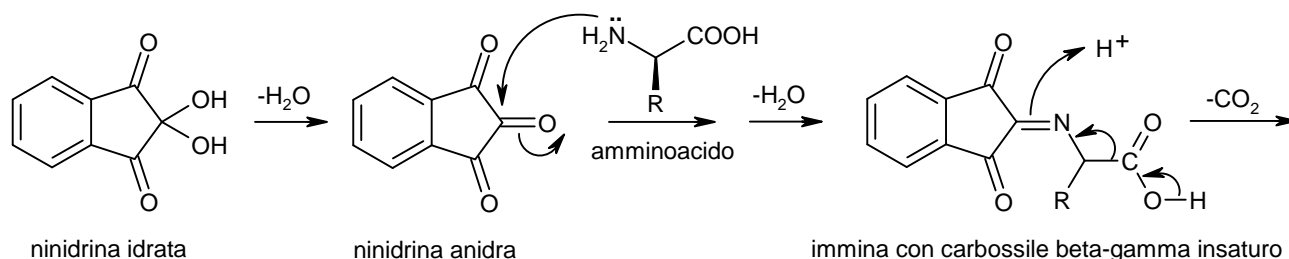
In un'elettroforesi a pH 4, per esempio, l'alanina ha carica netta +0,02 e si muove di pochissimo verso il polo negativo. La lisina ha carica +1,01 e si muove molto verso il polo negativo. L'acido aspartico ha carica -0,57 e si muove verso il polo positivo.



L'elettroforesi è usata anche nella separazione di proteine e di segmenti di DNA. Nella separazione di proteine spesso si usa come supporto il gel di poliacrilammide. Questo è anche usato per determinare la sequenza del DNA perché riesce a discriminare catene che differiscono anche per un solo nucleotide. Nell'elettroforesi di frammenti di DNA di dimensioni maggiori si usa come supporto il gel di agarosio, un polisaccaride. Dato che il DNA contiene gruppi fosfato, ha una carica negativa e si muove sempre verso il polo positivo.

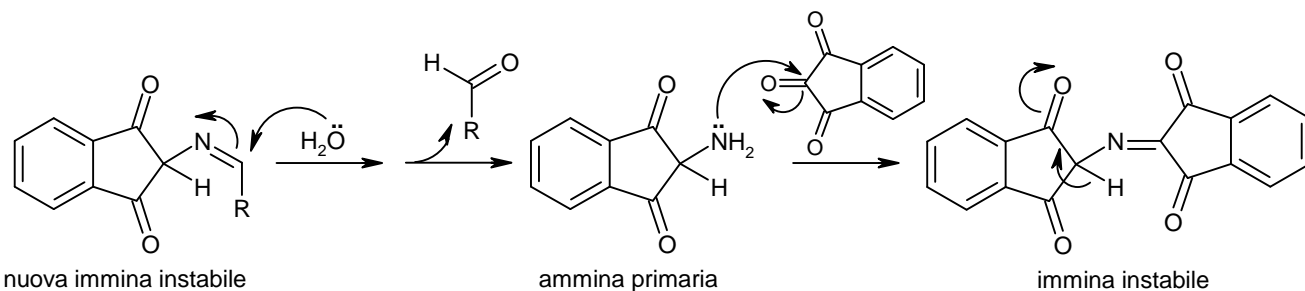
Cromatografia su strato sottile

È la tecnica cromatografica più semplice ed economica. Il campione viene depositato su una lastra ricoperta di uno strato sottile di gel di silice, ad 1 cm dal bordo inferiore. Questo viene immerso in un solvente che sale per osmosi trascinandosi gli amminoacidi meno affini alla fase stazionaria. Dato che il gel di silice ha in superficie gruppi silanoliche Si-OH, è un supporto polare un po' acido che trattiene di più gli amminoacidi basici e quelli polari, mentre quelli apolari hanno una corsa vicina al fronte del solvente. Dato che gli amminoacidi non assorbono all'UV (a parte poche eccezioni), vengono rivelati con la reazione con **ninidrina** che produce un intenso colore **blu-magenta** con tutti gli amminoacidi ad eccezione della prolina che forma un colore giallo. La reazione è illustrata qui sotto:

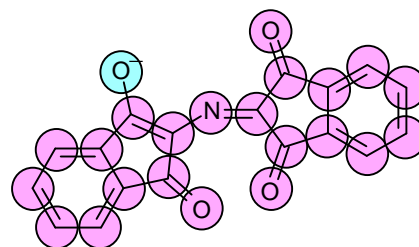
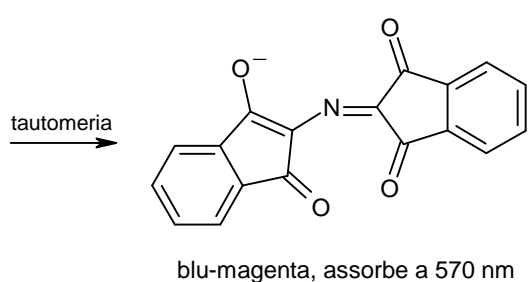


La ninidrina in forma anidra ha tre carbonili adiacenti, quello centrale è particolarmente reattivo per l'effetto elettrone-attrattore degli altri due carbonili. Per questo la ninidrina si trova prevalentemente in forma idrata come le aldeidi, ma all'equilibrio esiste sempre una quantità di ninidrina anidra che può reagire con i nucleofili come ammoniaca, ammine primarie e secondarie.

Il gruppo amminico primario degli amminoacidi attacca il carbonile centrale della ninidrina anidra formando un'immina (base di Schiff) instabile. In questa molecola il carbossile dell'amminoacido può essere facilmente perduto perché è beta-gamma insaturo a causa del doppio legame dell'immina. La reazione di decarbossilazione forma una nuova immina instabile.



Questa immina viene subito idrolizzata dall'acqua liberando l'aldeide, che contiene il carbonio alfa del vecchio amminoacido, e una nuova ammina primaria nella quale è rimasto l'azoto dell'amminoacido. L'ammina primaria reagisce ancora con ninidrina formando un'altra immina instabile di notevoli dimensioni. Questa, per tautomeria, forma un enolo stabilizzato per risonanza.



Quest'ultima molecola è fortemente colorata e assorbe a 570 nm (assorbe nel verde) e infatti è di color magenta (blu + rosso). Tutti i doppi legami della molecola sono coniugati tra loro. Infatti nella molecola ci sono 23 orbitali atomici $2p\pi$ (evidenziati nella figura qui sopra) che, mescolandosi tra loro, danno luogo a 11 orbitali di legame, 11 di antilegame e uno di non legame. I livelli energetici degli orbitali π e π^* sono molto vicini tra loro (con un ΔE nel vicino ultravioletto). L'orbitale di non legame si trova a metà tra i livelli e quindi la transizione elettronica $n \rightarrow \pi^*$ può avvenire a frequenze particolarmente basse che entrano abbondantemente nel visibile (nel verde).

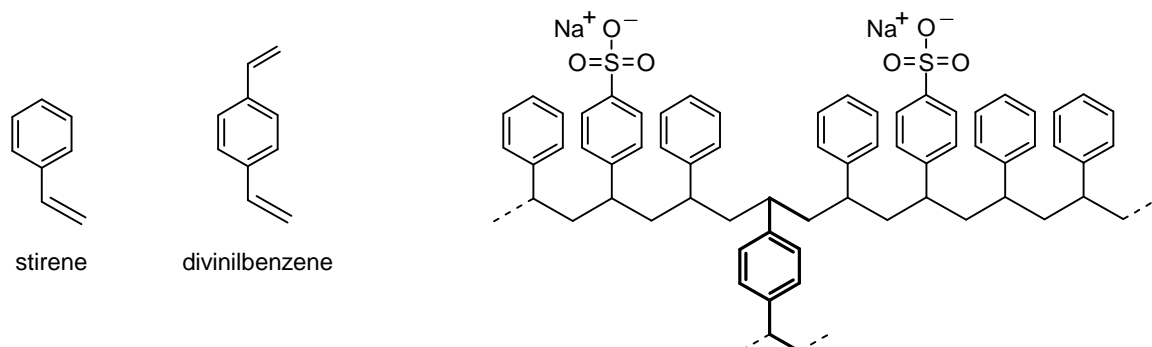
La prolina è un'ammina secondaria che reagisce con ninidrina formando uno ione immonio invece di un'immina. Questa reazione, mostrata più avanti, forma un composto giallo che assorbe a 440 nm (assorbe nel blu e quindi appare giallo: verde + rosso).

La reazione con ninidrina è così sensibile che è utilizzata anche nelle indagini di polizia per rivelare le impronte digitali latenti sulla scena del delitto dato che contengono sempre tracce di amminoacidi.

Cromatografia a scambio ionico

Questa è la tecnica analitica più utilizzata per l'analisi quantitativa degli amminoacidi e permette di conoscere la composizione in amminoacidi di una proteina. Si realizza con una semplice cromatografia liquida che dura circa 2 ore. Gli amminoacidi si ottengono dall'idrolisi acida di un campione di proteina di pochi milligrammi. Si procede così: si mette in una fiala di vetro il campione da analizzare, si aggiungono 2 mL di HCl 6M, si raffredda la soluzione in un bagno di acetone e ghiaccio secco a -80°C , si chiude sotto vuoto la fiala alla fiamma di soffieria, si idrolizza a 110° per 22 ore. Passato questo tempo, si rompe la punta della fiala, si elimina l'HCl tirando a secco in evaporatore rotante, si riprende con un tampone citrato a pH 2,5. Il campione è pronto per la corsa cromatografica.

La cromatografia si realizza con resine solfoniche scambiatrici forti di cationi. Si usa una resina di polistirene copolimerizzato con l'8% di divinilbenzene in cui sono stati introdotti alcuni gruppi solfonici. Il divinilbenzene serve per formare legami incrociati tra le catene che rendono più rigida la resina.

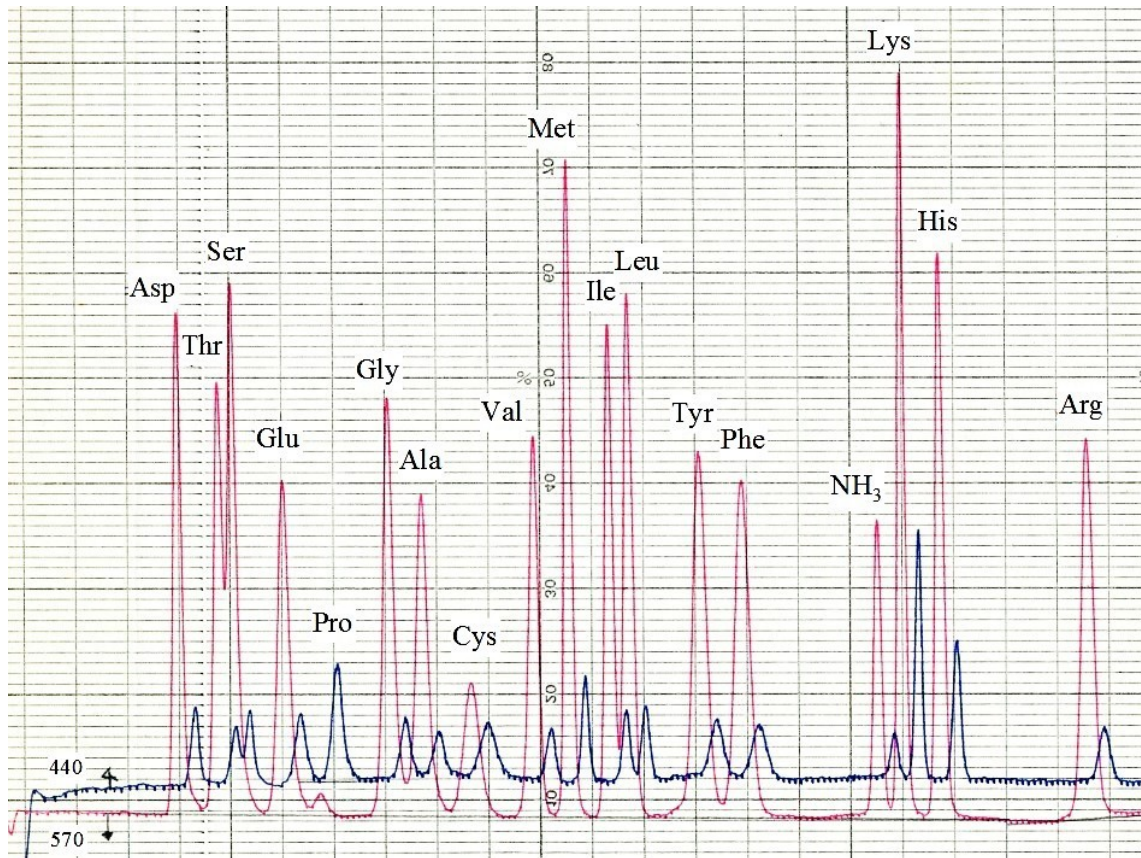


La resina, con i gruppi solfonici negativi, trattiene le molecole cationiche e inoltre, con gli anelli benzenici, trattiene le molecole apolari. Operando a pH 3,3 i primi amminoacidi eluiti (quelli meno trattenuti dalla resina) sono quelli acidi (negativi) e quelli polari con piccola catena. Gli ultimi amminoacidi eluiti (i più trattenuti dalla resina) sono quelli basici (positivi) e con catena apolare e aromatica.

Il solvente con cui si inizia ad eluire la colonna è un tampone citrato a pH 3,3. Dopo alcuni minuti si passa ad un tampone a pH 4,3 e infine, per far uscire gli amminoacidi più trattenuti, si usa un tampone a pH 5,3 con maggiore forza ionica. L'ordine di eluizione degli amminoacidi è il seguente:

Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, NH₃, Lys, His, Arg.

Il triptofano Trp non è eluito perché è più trattenuto in colonna di Arg e uscirebbe dopo altri 10 minuti.



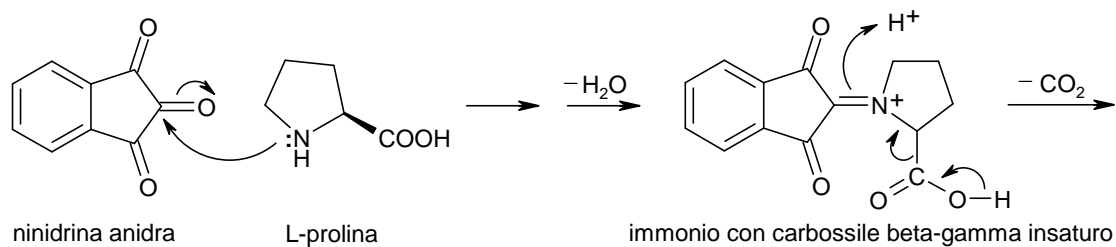
Con questa tecnica non si possono analizzare asparagina e glutammina perché, nella fase di idrolisi acida, perdono l'ammide in catena laterale e diventano acido aspartico e acido glutammico.

Nello spettro finale si trova il segnale dell'ammoniaca NH₃ che si libera in questa reazione.

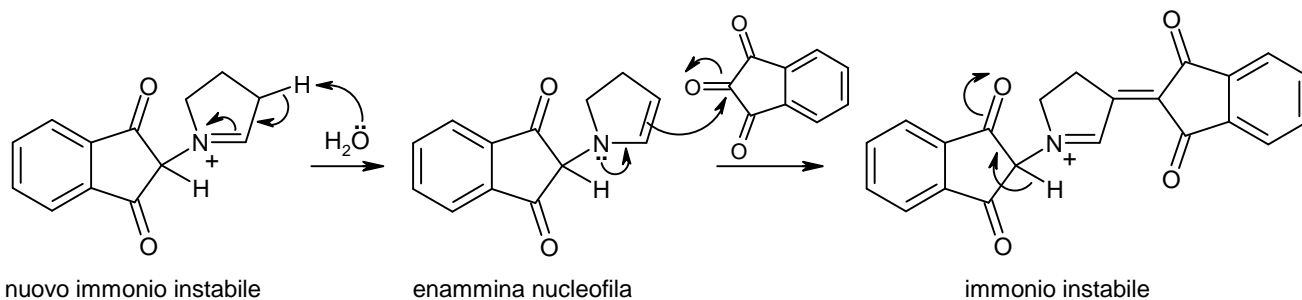
Il dato di Asp che si ottiene è la somma di Asp e Asn contenute nella proteina in esame, e così il dato di Glu si deve interpretare come la somma di Glu e Gln.

Dopo che gli amminoacidi sono usciti dalla colonna, vengono addizionati con ninidrina e il flusso è fatto passare in un bagno di acqua bollente. La reazione trasforma gli amminoacidi in un composto blu-magenta tranne la prolina che forma un composto giallo. Il flusso passa poi in un rivelatore che legge l'assorbanza a 570 nm (composto blu-magenta) e a 440 nm (composto giallo).

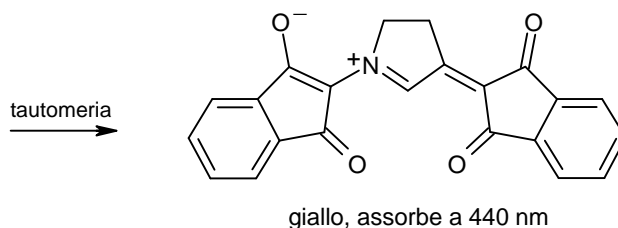
La reazione della ninidrina con la prolina, un'ammina secondaria, è mostrata qui sotto.



Il gruppo amminico secondario della prolina attacca la ninidrina anidra sul carbonile centrale (quello col carbonio più positivo) formando uno ione immonio instabile che ha un carbossile beta-gamma insaturo che può facilmente decarbossilare perdendo CO₂.



Dopo la decarbossilazione si è formato un nuovo ione immonio instabile che con una tautomeria forma la corrispondente enammina. L'enammina è leggermente nucleofila sul carbonio beta e attacca il carbonile di una nuova molecola di ninidrina. Si forma così un altro ione immonio instabile che, con una tautomeria cheto enolica, forma la molecola finale stabilizzata dalla risonanza che assorbe a 440 nm (nel blu) e quindi appare gialla.



Sintesi di amminoacidi

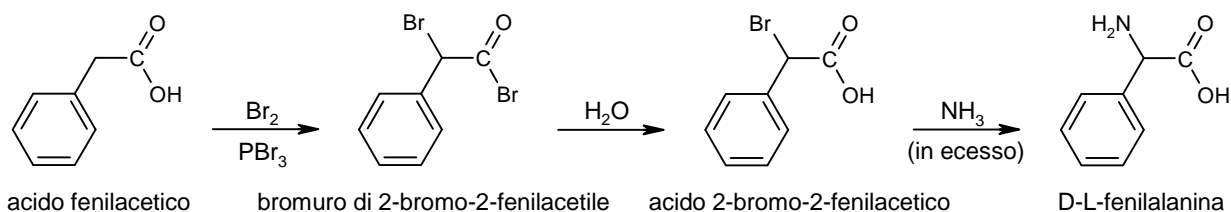
La migliore sintesi di amminoacidi è quella realizzata in natura dagli enzimi che non solo sintetizzano ogni amminoacido, ma lo fanno in modo stereospecifico producendo solo gli isomeri L.

La sintesi di laboratorio, invece, produce miscele di D ed L-amminoacidi che poi devono essere separate con tecniche opportune perché solo l'isomero L è quello desiderato.

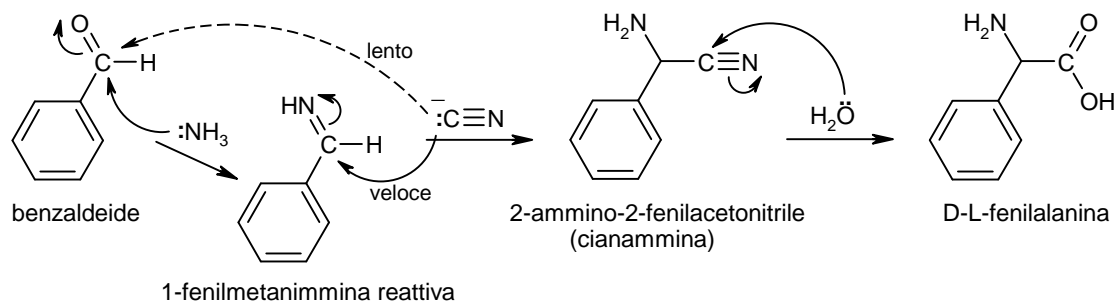
Qui sono riportate le tre sintesi più comuni di amminoacidi: quella che usa la reazione di Hell-Volhard-Zelinsky, la sintesi di Strecker e l'amminazione riduttiva.

La prima di queste tecniche parte da un acido carbossilico e aggiunge in posizione alfa un bromo con la reazione di **Hell-Volhard-Zelinsky** (che avviene in due passaggi senza isolare l'intermedio dibromurato). Poi trasforma l'alfa-bromoacido ottenuto in un alfa-amminoacido sostituendo il bromo in alfa con un gruppo amminico in una reazione SN2 con un eccesso di ammoniaca.

Di seguito è riportata la sintesi della fenilalanina.

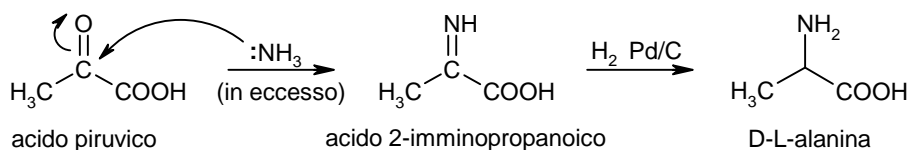


La sintesi di **Strecker** parte invece da un'aldeide che viene fatta reagire con acido cianidrico in presenza di ammoniaca. Lo ione cianuro può attaccare l'aldeide formando la cianidrina, ma attacca molto più velocemente l'immina instabile che si forma per reazione tra l'aldeide e l'ammoniaca, così si forma solo la cianammina. Questa viene poi idrolizzata formando il D-L-amminoacido.

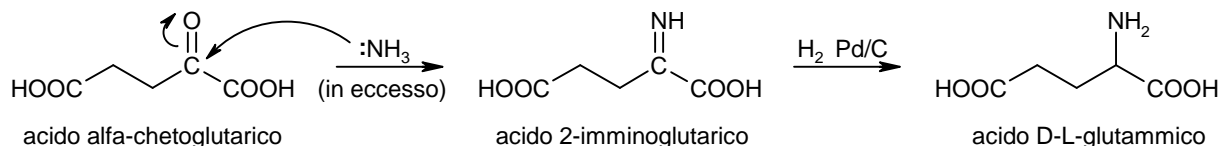


(Il meccanismo di queste reazioni, qui, è stato solo accennato. Per vederlo in dettaglio, consultate il capitolo su aldeidi e chetoni e quello sugli acidi carbossilici).

La sintesi degli amminoacidi per **amminazione riduttiva** parte dagli α -chetoadidi che reagendo con ammoniaca formano gli α -imminoacidi e questi, per riduzione con H_2 Pd/C, sono convertiti in D-L-amminoacidi. L'acido piruvico, per esempio, con questa sintesi è convertito in D-L-alanina.

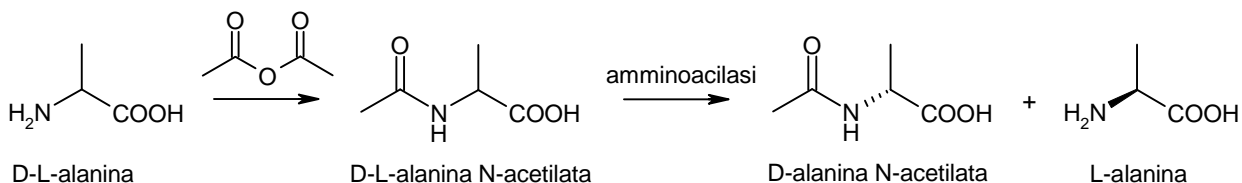


L'acido alfa-chetoglutarico (un intermedio del ciclo di Krebs) è convertito in acido D-L-glutammico.



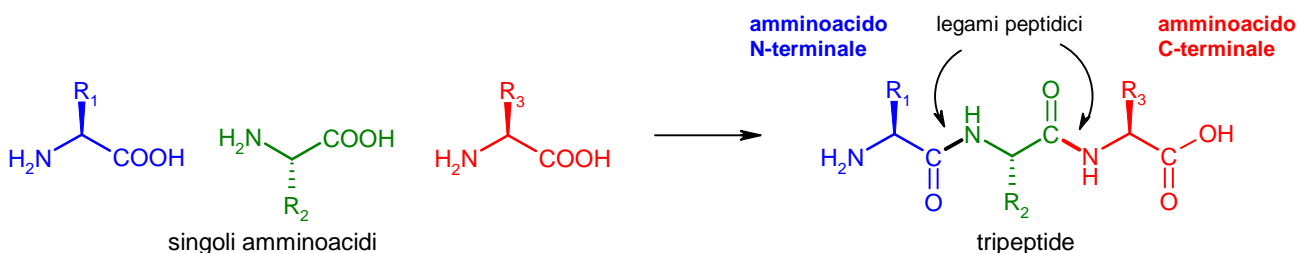
Separare una coppia di enantiomeri non è affatto semplice dato che hanno proprietà chimico-fisiche identiche. Gli enantiomeri possono essere differenziati solo quando interagiscono con molecole chirali o con la luce polarizzata. Se, per esempio, vengono sottoposti ad una reazione catalizzata da un enzima, solo uno dei due enantiomeri potrà reagire velocemente. L'enzima, infatti, è chirale e si può legare ad uno solo dei due enantiomeri per accelerarne la reazione. L'altro enantiomero, senza l'aiuto dell'enzima, reagirà ad una velocità molto minore. Una tecnica di separazione dei due isomeri D-L di un amminoacido consiste nell'acetilare il loro gruppo amminico con anidride acetica per poi trattare la coppia di D-L-amminoacidi N-acetilati con l'enzima amminoacilasi di maiale (N-acil-L-amminoacido-amminoidrolasi) che rompe il legame ammidico tra l'acetile e l'azoto in alfa degli L-amminoacidi.

Da questa reazione si ottengono l'L-amminoacido libero e il D-amminoacido N-acetilato che possono essere separati con facilità dato che hanno polarità molto diverse.



Legame peptidico

Il legame ammidico che lega tra loro gli amminoacidi è chiamato legame peptidico. Gli amminoacidi si legano con legame peptidico per formare lunghe catene chiamate **proteine** che contengono sequenze di centinaia o anche migliaia di amminoacidi. Le catene più corte di amminoacidi sono chiamate **peptidi**. Il confine tra proteine e peptidi non è netto, ma molti considerano che la proteina più piccola sia l'insulina, un ormone proteico di 51 amminoacidi che induce le cellule ad assorbire glucosio dal sangue. Una catena di due amminoacidi è chiamata dipeptide, una di tre è un tripeptide, catene di pochi amminoacidi sono dette oligopeptidi, catene più lunghe sono chiamate polipeptidi. Queste catene, per convenzione, vanno scritte orizzontali con l'amminoacido N-terminale (quello con il gruppo α -amminico libero) posto a sinistra e quello C-terminale (con il gruppo α -carbossilico libero) a destra.

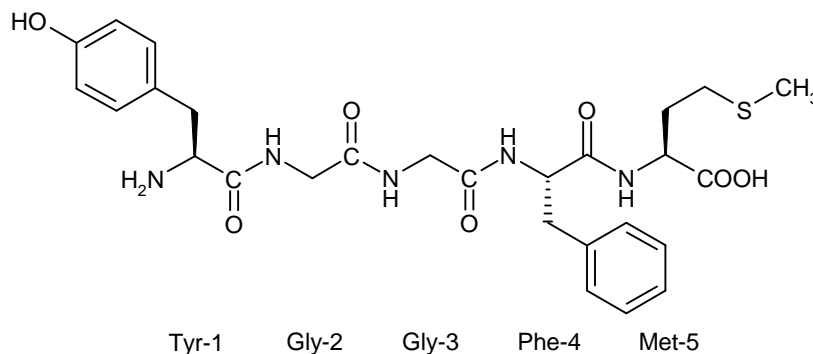


Per descrivere la nomenclatura dei peptidi, consideriamo, per esempio le encefaline, pentapeptidi naturali che modulano la trasmissione dei segnali di dolore nel sistema nervoso (la morfina si lega agli stessi recettori delle encefaline perché ne imita la struttura). Una delle encefaline, chiamata **met-enkefalina**, ha la sequenza: tirosina-glicina-glicina-fenilalanina-metionina. Può essere nominata elencando i nomi degli amminoacidi come sostituenti (cambiando il terminale in con il) e lasciando invariato solo il nome dell'ultimo, quello C-terminale.

Il nome sistematico della met-enkefalina è quindi:

tirosil-glicil-glicil-fenilalanil-metionina

La struttura della met-enkefalina è la seguente:



La numerazione degli amminoacidi inizia da sinistra, dall'amminoacido N-terminale.

La sequenza di amminoacidi si può indicare in modo più compatto usando le abbreviazioni a tre lettere separate da trattini e ricordando che l'amminoacido N-terminale va posto a sinistra.

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

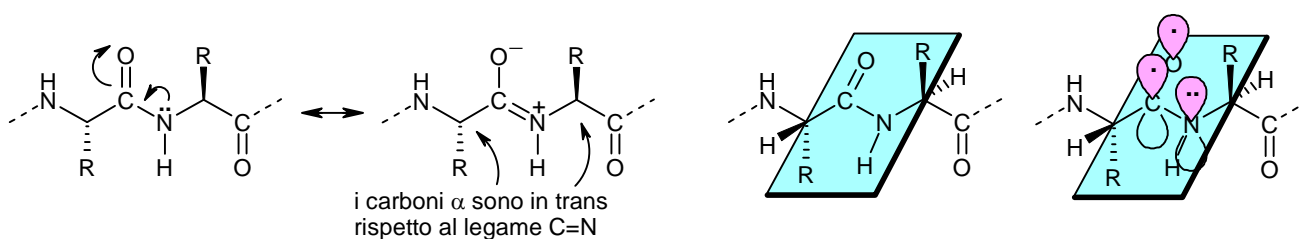
Quando è necessaria una scrittura ancora più compatta (per esempio con le catene più lunghe), si usano le abbreviazioni ad una lettera. La sequenza della met-enkefalina, così, diventa:

YGGFM

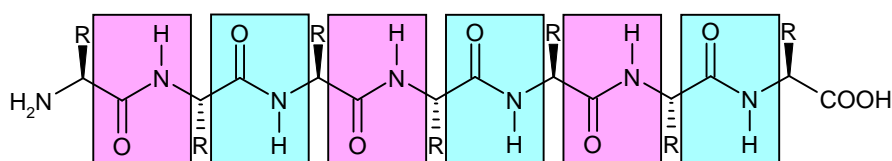
Infine, se il carbossile terminale è trasformato in ammide, la sequenza termina, a destra, con NH_2 :

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met- NH_2

Il legame peptidico è planare a causa della risonanza dell'azoto con il carbonile che dà al legame C-N il 40% di carattere di doppio legame e impedisce la rotazione attorno a questo legame che rovinerebbe l'allineamento degli orbitali $2p\pi$, mostrati qui sotto sulla destra. I carboni alfa, per questioni di ingombro sterico, si dispongono in posizione **trans** rispetto al doppio legame C=N. La prolina in questo fa eccezione a causa del suo anello anomalo e può assumere sia la configurazione cis che trans.



Dato che il legame peptidico deve stare su un piano, la catena proteica è composta da una successione di blocchetti planari che si possono snodare solo in corrispondenza dei carboni alfa come una collana fatta di tanti medaglioni rettangolari legati uno all'altro da un gancetto.



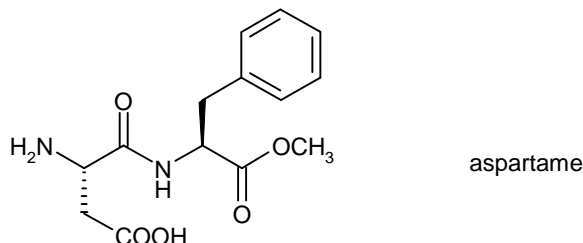
Rispetto alla posizione dei sostituenti R e H sul carbonio alfa, ciascuno dei due legami peptidici adiacenti può ruotare in modo indipendente. Al variare di questi due angoli la struttura della catena proteica assume diverse conformazioni che definiscono la struttura tridimensionale locale della proteina, che è chiamata struttura secondaria, come vedremo più avanti.

Peptidi e proteine

Piccoli peptidi significativi.

Tra i peptidi più noti, quello più piccolo è l'**aspartame**, un dipeptide di due soli aminoacidi usato nell'industria alimentare come sostituto dello zucchero nelle bibite dietetiche perché ha un potere dolcificante 200 volte maggiore del saccarosio e così lo si può usare in minime quantità.

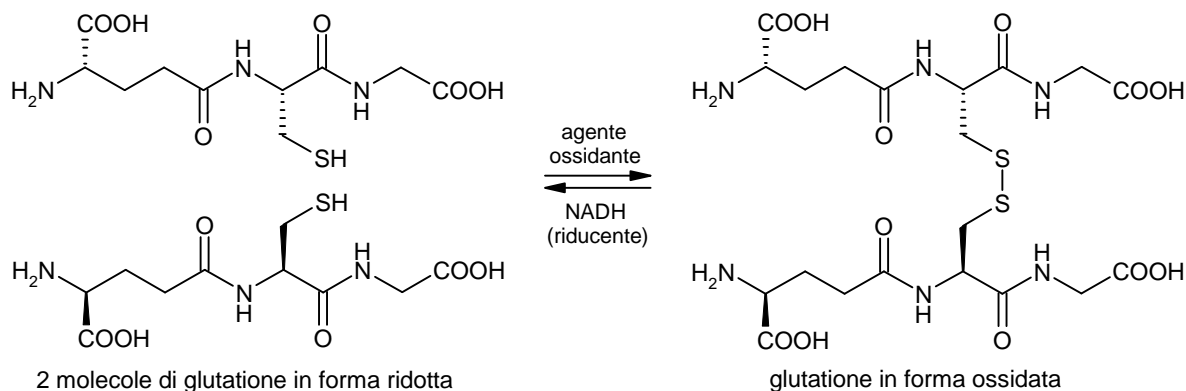
L'aspartame è formato da acido L-aspartico e dall'estere metilico della L-fenilalanina.



Se al posto dell'estere metilico si prepara l'estere etilico, il peptide non è più dolce, mentre, se si sostituiscono i due L-amminoacidi con D-amminoacidi, il peptide diventa addirittura amaro.

Va ricordato, però, che le persone con la malattia genetica fenilchetonuria devono evitare di assumere aspartame perché mancano dell'enzima che trasforma la fenilalanina in tirosina e un eccesso di fenilalanina è tossico per il sistema nervoso.

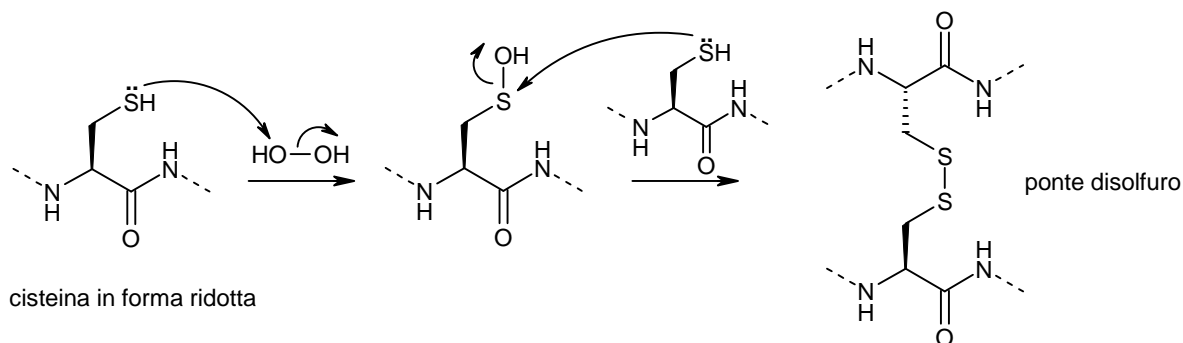
Un altro importante piccolo peptide è il **glutathione**, un tripeptide ad azione antiossidante che protegge il nostro fegato dalle molecole ossidanti potenzialmente pericolose. Reagendo con queste, il glutathione si ossida formando un dimero legato da un ponte disolfuro. La successiva riduzione da parte del NADH rigenera la forma ridotta del glutathione.



La struttura del glutathione è anomala. La sua sequenza è γ Glu-Cys-Gly, dove γ Glu indica che il primo aminoacido forma il legame peptidico usando il suo carbossile in catena laterale, in posizione γ , invece del normale carbossile in alfa. Il secondo aminoacido, cisteina, è quello attivo nella reazione. Il gruppo SH in catena laterale della cisteina riduce i composti ossidanti formando un ponte disolfuro.

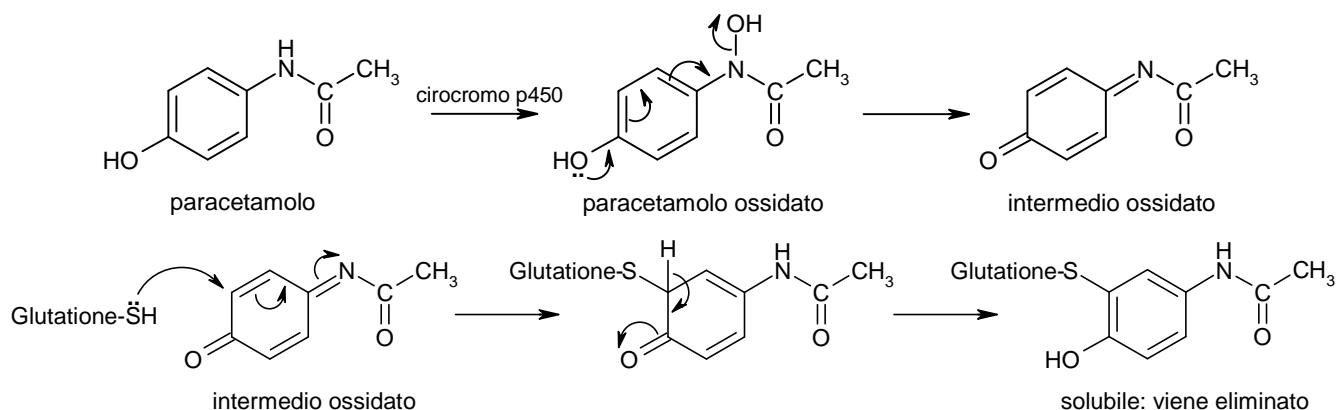
La reazione col NADH ripristina la forma ridotta, attiva, del glutathione.

Mostriamo qui il meccanismo di formazione del ponte disolfuro quando l'ossidante è acqua ossigenata.



La cisteina, nelle proteine, forma spesso **ponti disolfuro** creando legami covalenti tra cisteine lontane nella catena e consentendo alla proteina di assumere la corretta forma tridimensionale e di mantenerla in modo più stabile.

Il glutazione elimina anche i metaboliti dei farmaci che assumiamo. Il paracetamolo (principio attivo della Tachipirina) è un comune analgesico. Il paracetamolo, però, diventa molto pericoloso quando viene assunto in dosi troppo alte (ogni anno, negli Stati Uniti, sono molte decine i decessi per overdose di paracetamolo). La ragione di questa pericolosità sta in un diverso meccanismo d'azione del glutazione che viene catturato da un intermedio ossidato del paracetamolo che si forma durante il processo di eliminazione del farmaco per opera del citocromo p450. La reazione è la seguente:



La perdita di un po' di glutazione non è un problema per il fegato che ne possiede a sufficienza, ma, se la quantità di paracetamolo da eliminare diventa troppo alta, consuma tutto il glutazione disponibile e il fegato resta senza difese contro le sostanze ossidanti e subisce danni irreversibili.

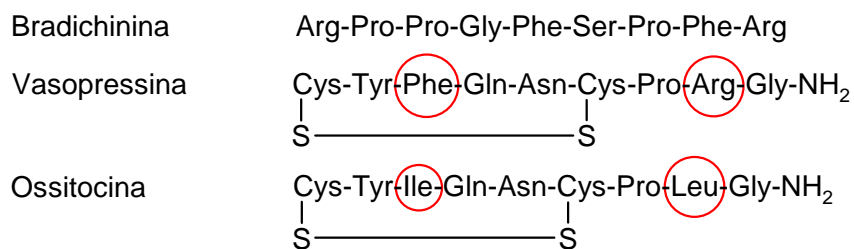
Altri importanti piccoli peptidi sono le **encefaline**. Si tratta di pentapeptidi ad azione morfino-simile che controllano la soglia del dolore nel sistema nervoso. Vi sono due diverse encefaline, una ad azione più intensa, la met-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) e l'altra ad azione tre volte più blanda, la leu-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Entrambe agiscono per un tempo molto breve perché vengono rapidamente degradate dagli enzimi proteolitici.

Citiamo, infine, tre ormoni nonapeptidici: bradichinina, vasopressina e ossitocina.

La **bradichinina** ha azione vasodilatatrice e rilassante della muscolatura dei vasi in risposta ai traumi.

La **vasopressina** ha un'azione vasocostrittrice che fa aumentare la pressione arteriosa in caso di emorragia e inoltre ha un'azione antidiuretica in caso di disidratazione.

L'**ossitocina** stimola la contrazione della muscolatura uterina durante le ultime fasi della gravidanza e nel travaglio, e inoltre induce la secrezione di latte in risposta allo stimolo della poppata.



Le sequenze di vasopressina e ossitocina sono molto simili e differiscono per due soli amminoacidi (evidenziati in rosso), inoltre, entrambe terminano con il gruppo carbossilico trasformato in ammide.

Proteine significative

Le proteine sono macromolecole polipeptidiche che hanno molteplici funzioni.

Alcune hanno una semplice **funzione strutturale** come il **collagene** (che forma cavi molecolari che rinforzano i tendini e fogli elastici che sostengono la pelle e gli organi interni), la **cheratina** (che forma unghie e capelli), la **tubulina** (che forma i microtubuli del citoscheletro), la **actina** (che forma i microfilamenti del citoscheletro e delle fibre muscolari).

Altre proteine generano il **movimento** consumando ATP come la **miosina** (che scorre lungo le fibre di actina e provoca la contrazione muscolare), la **dineina** e la **chinesina** (che trasportano carichi nella cellula muovendosi lungo i microtubuli del citoscheletro).

Altre proteine sono **enzimi** e catalizzano le reazioni in modo altamente specifico ed efficiente. Vi sono migliaia di enzimi e non è possibile nominarli tutti. Tra i più conosciuti vi sono quelli digestivi come la **pepsina** (che taglia le proteine nello stomaco), la **tripsina** e la **chimotripsina** (che tagliano le proteine nell'intestino), le **amilasi** (che tagliano le molecole di amido in bocca e nell'intestino). La **DNA polimerasi** (che sintetizza le catene di DNA), la

DNA ligasi (che unisce due catene di DNA) e gli **enzimi di restrizione** (che tagliano il DNA in punti specifici) sono usati anche dagli scienziati in laboratorio nelle tecniche di ingegneria genetica. Infine citiamo un enzima speciale, la **ATP sintasi** (che sintetizza nuovo ATP nei mitocondri) che è una vera e propria macchina molecolare con alcune parti fisse e altre che ruotano come in un motore per realizzare la loro azione enzimatica.

Altre proteine hanno funzione di **trasporto** come l'**emoglobina** (che trasporta O₂ nel sangue dai polmoni fino alla periferia del nostro corpo), le **lipoproteine** (che trasportano i lipidi, insolubili in acqua, nel flusso sanguigno).

Altre proteine sono **ormoni** come l'**insulina** (che regola i livelli di glucosio nel sangue inducendo le cellule ad assorbirlo dopo i pasti), il **glucagone** (che regola i livelli di glucosio nel sangue inducendo, tra un pasto e l'altro, la liberazione di glucosio dal glicogeno accumulato nel fegato e nei muscoli).

Altre proteine sono di **membrana**, cioè sono inserite nella membrana cellulare, come i **canali del potassio** (che fanno uscire dalle cellule nervose ioni K⁺ durante la trasmissione dell'impulso nervoso) o i **canali meccano-sensibili** (che sono permeabili agli ioni calcio e ci danno il senso del tatto).

Altre proteine di membrana sono recettori come il **recettore dell'adrenalina** (che lega l'adrenalina fuori dalla membrana cellulare e manda un potente segnale alla cellula perché è accoppiato ad una proteina G), la **rodopsina** (proteina fotosensibile della retina, anch'essa accoppiata ad una proteina G).

Altre proteine, gli **anticorpi**, sono costruite in modo modulare dai linfociti. Nel nostro sangue ci sono più di un miliardo di anticorpi diversi pronti, all'occorrenza, ad attaccare virus e batteri invasori.

Potete trovare una descrizione più dettagliata di queste proteine, accompagnata da immagini della loro struttura 3D, nelle pagine della Molecola del Mese sul sito pianetachimica.it.

Struttura delle proteine 1^a, 2^a, 3^a, 4^a

La struttura delle proteine è molto complessa e può essere definita in quattro livelli che vengono detti struttura 1^a, 2^a, 3^a e 4^a.

La **struttura primaria** di una proteina è la sequenza di amminoacidi che formano la catena.

Le **strutture secondarie** di una proteina sono le sue strutture tridimensionali locali, le conformazioni assunte dai vari tratti della catena.

La **struttura terziaria** di una proteina è la sua struttura tridimensionale complessiva.

La **struttura quaternaria** si riferisce solo alle proteine composte da più catene o subunità. Definisce la struttura tridimensionale complessiva assunta dalle varie subunità che si incastrano una nell'altra.

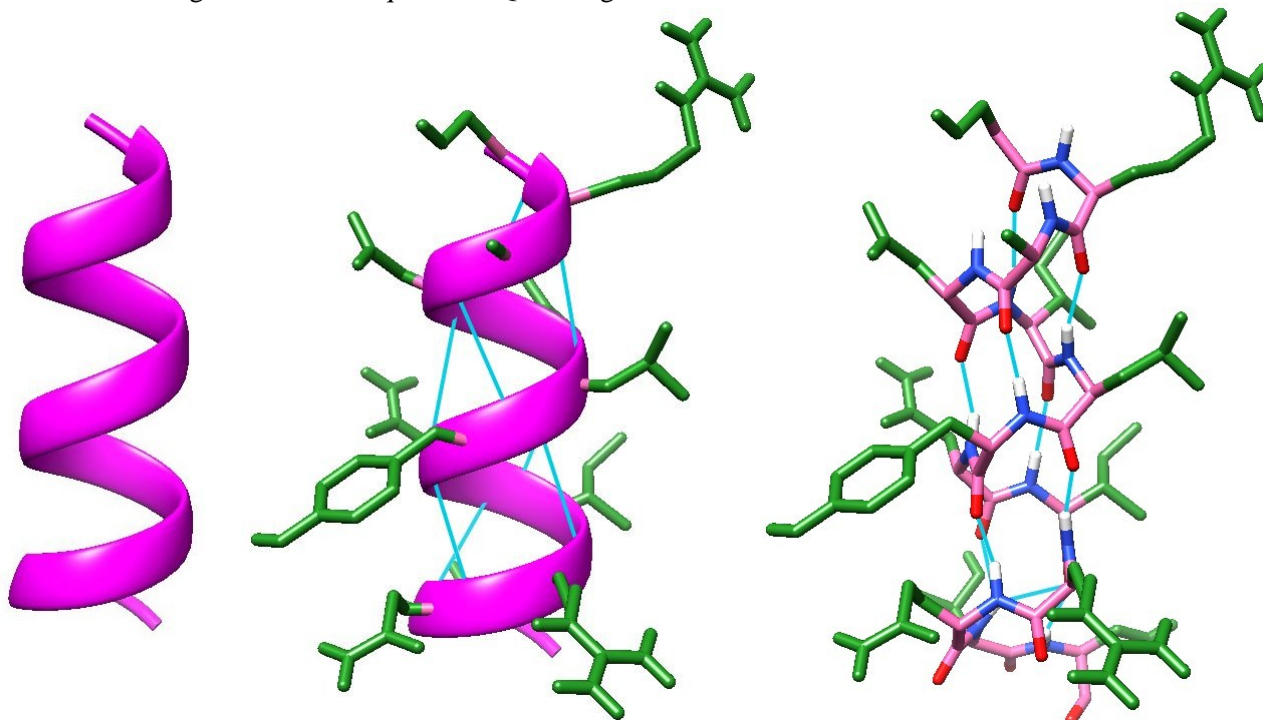
La **struttura primaria** di una proteina, cioè la sua sequenza di amminoacidi, determina in modo univoco la sua struttura tridimensionale. Le proteine, infatti, si avvolgono su se stesse gradualmente man mano che la catena viene sintetizzata nei ribosomi. Alcune proteine più grandi non riescono ad avvolgersi correttamente perché sono disturbate da altre proteine che si trovano nel citoplasma. In questi casi intervengono speciali proteine chiamate **chaperon**, cioè assistenti, che hanno la forma di una botte cava e ospitano al loro interno la proteina che si deve avvolgere. Questa, nell'ambiente protetto del chaperon può avvolgersi senza disturbi e trovare la sua corretta forma tridimensionale.

Le **strutture secondarie** di una proteina, cioè le strutture tridimensionali locali, sono sostanzialmente di tre tipi: **alfa elica**, **foglietto pieghettato beta**, e **random coil** cioè ad avvolgimento casuale.

Le strutture alfa e beta sono state immaginate a tavolino alcuni anni prima che la loro esatta struttura venisse determinata con esperimenti di cristallografia ai raggi X. La prima struttura individuata è stata chiamata alfa e la seconda beta, con lettere dell'alfabeto greco come spesso si usava fare in quel tempo, attorno agli anni 1950.

La struttura ad **alfa elica** è stata proposta da Pauling e Corey nel 1951 utilizzando dei modellini molecolari per assemblarla. L'alfa elica è destrorsa e gli amminoacidi si avvolgono attorno ad un asse centrale con i gruppi R in catena laterale che sporgono radialmente. Ponendo in alto l'amminoacido N-terminale (l'inizio della catena), i legami peptidici ruotano in modo da rivolgere **tutti i carbonili C=O in basso** per formare legami idrogeno con i **gruppi N-H (tutti rivolti in alto)** del quarto amminoacido che segue, sull'ansa sottostante. Questo allineamento comporta una leggera sfasatura tra l'amminoacido di una spira e quello sotto di lui nella spira successiva per cui in ogni spira ci sono un po' meno di quattro amminoacidi (3,6 per la precisione).

La lunghezza di ogni spirala è di 5,4 Å. Ogni spirala è legata alla successiva da tre o quattro legami idrogeno, mostrati con un sottile segmento azzurro qui sotto. Questi legami rendono stabile la struttura.



Non tutti gli amminoacidi sono compatibili con l'alfa elica. La prolina, per esempio, è troppo rigida e non si può piegare per assecondarne la geometria, anzi ha la funzione di interrompere l'alfa elica e costringere la catena a ripiegarsi per formare un'altra struttura secondaria in una diversa direzione.

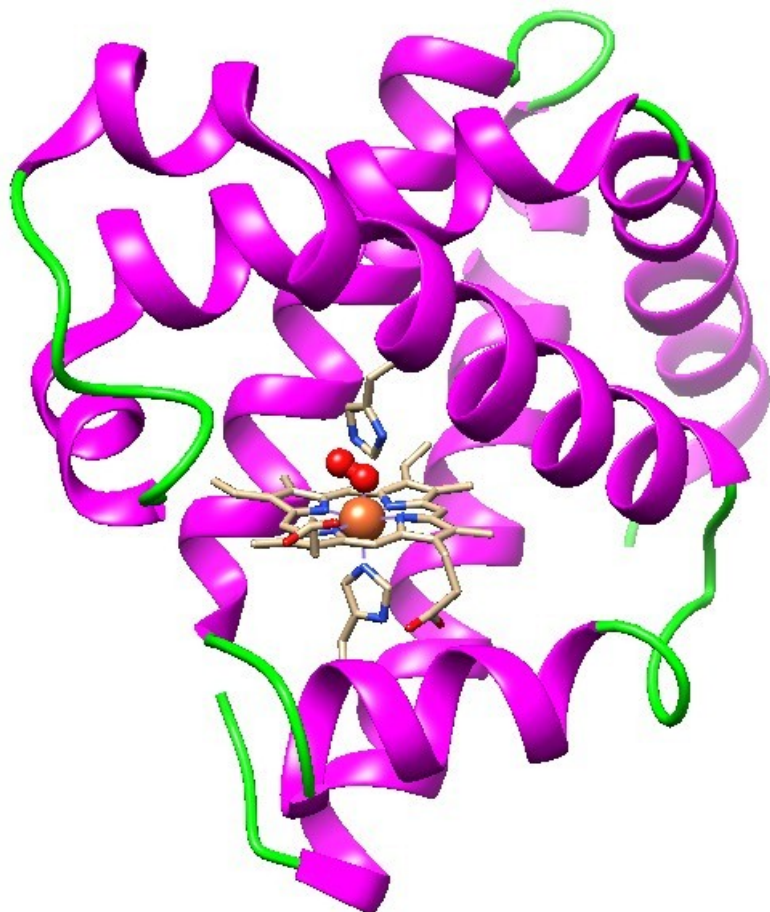
Non sono compatibili con l'alfa elica neanche gli amminoacidi che si disturbano tra loro con le catene laterali. Per esempio, sequenze di amminoacidi con la stessa carica elettrica o con catena laterale troppo ingombrante costringono l'alfa elica ad interrompersi. In alcune proteine la struttura ad alfa elica non si interrompe mai, come nella

proteina fibrosa **alfa cheratina**, che forma le unghie e i capelli. La sua catena è quindi diritta e si associa in dimeri avvolgendosi ad un'altra alfa cheratina, poi più dimeri si associano tra loro formando strutture più complesse unite anche da ponti disolfuro tra cisteine.

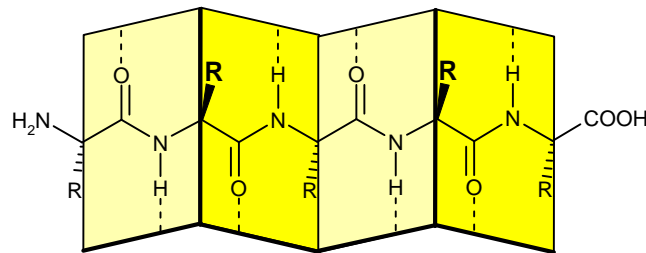
In altre proteine la struttura ad alfa elica coinvolge ampi tratti di catena, ma è interrotta qua e là da piegature e tratti con struttura casuale (random coil) che fanno avvolgere la proteina a gomitolo come nella **mioglobina** mostrata qui a fianco (alfa elica in magenta; random coil in verde). Questa proteina ha la funzione di accumulare ossigeno nei muscoli grazie ad un **ferro eme**, uno ione Fe^{2+} legato al centro di un anello porfirinico.

Nella figura si vede una molecola di O_2 (rossa) legata obliquamente sopra il ferro (marrone). La proteina tiene in posizione l'eme avvicinando da sotto l'istidina 93 e inoltre lascia sopra al ferro uno spazio appena sufficiente ad ospitare O_2 ponendo sopra l'eme un'altra istidina (64).

L'istidina 64 ha lo scopo di proteggere il ferro eme dall'avvelenamento da parte di molecole come il monossido di carbonio CO e lo ione cianuro CN^- che hanno una maggiore affinità per il ferro, ma che, per la loro struttura, si legherebbero verticalmente sopra l'eme.



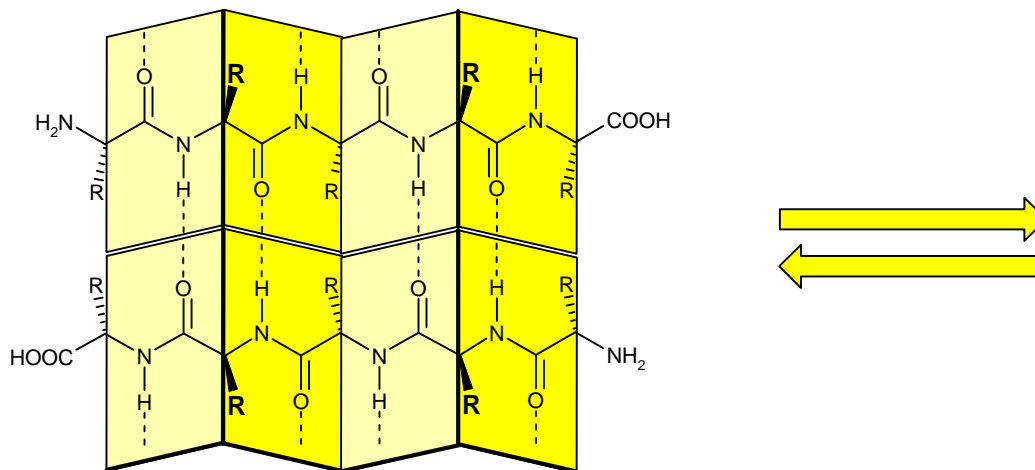
Anche la struttura a **foglietto pieghettato beta** è stata proposta da Pauling e Corey nel 1951. In questa struttura i legami peptidici planari assumono la configurazione di un foglietto pieghettato e rivolgono gli ossigeni dei carbonili **C=O alternativamente da un lato e dall'altro** e così pure fanno gli idrogeni dei gruppi N-H. Inoltre i gruppi R delle catene laterali sporgono alternativamente sotto e sopra il piano del foglietto.



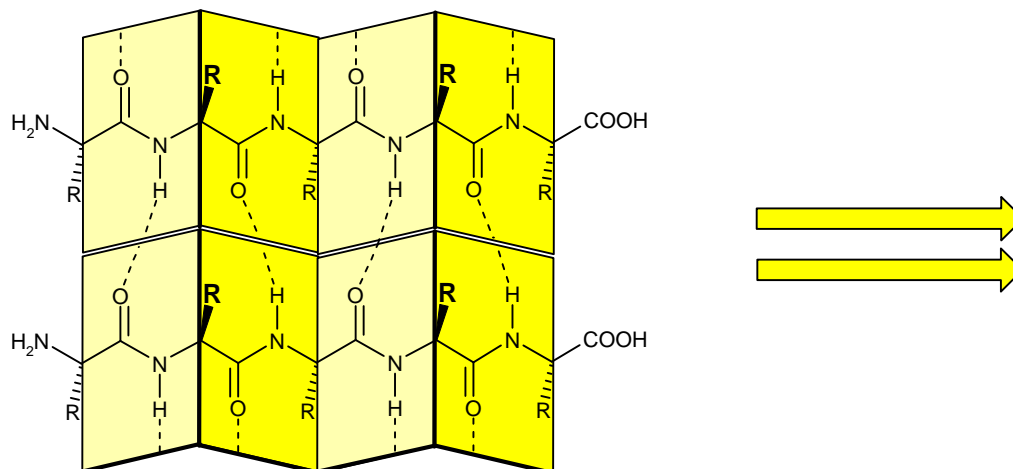
Nella struttura beta-pieghe, un tratto di catena non può realizzare legami idrogeno con sé stesso, come accade nell'alfa elica, ma si può legare solo con un'altra catena beta-pieghe adiacente. Per questo motivo i tratti beta-pieghe non possono esistere isolati, ma si formano solo quando più tratti di catena si possono avvicinare uno all'altro.

I migliori legami idrogeno si realizzano quando due tratti beta-pieghe si accostano uno all'altro in modo **antiparallelo**, come è mostrato nella figura qui sotto. In questo modo ad ogni ossigeno di carbonile C=O rivolto da un lato su una catena, si affaccia, sull'altra catena, un idrogeno di un gruppo N-H.

I legami idrogeno sono mostrati con tratteggi.



Se invece le due catene si accostano tra loro in modo **parallelo**, come è mostrato qui sotto, i legami idrogeno che si formano sono più deboli perché sono un po' più lunghi.



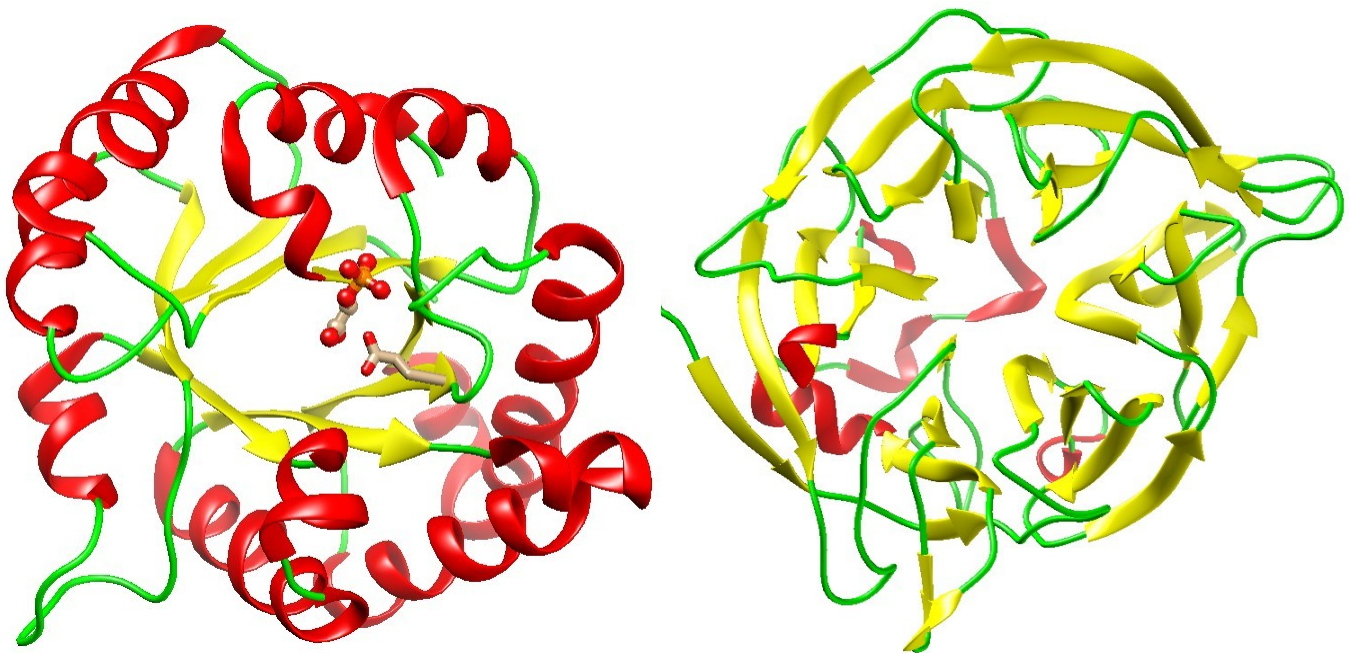
Un arrangiamento strutturale molto comune è la **forcina beta** (beta hairpin) nella quale un tratto di catena beta-pieghe si interrompe con un piccolo segmento ad arco di pochi amminoacidi, tra cui una glicina e una prolina, per poi formare un nuovo tratto beta-pieghe antiparallelo che si affianca al tratto precedente.



Quando molti tratti beta-pieghe si organizzano insieme possono formare anche strutture complesse e suggestive come quelle a forma di barile o di elica di nave.

L'immagine qui sotto, a sinistra, mostra l'enzima della 5^a reazione della glicolisi che catalizza l'isomerizzazione della gliceraldeide-3-fosfato (visibile al centro). Il sito attivo dell'enzima si trova all'interno di un **barile beta** formato da 8 tratti beta-pieghe **paralleli** connessi esternamente da brevi tratti ad alfa elica.

L'immagine qui sotto sulla destra, invece, mostra l'enzima fitasi che idrolizza l'acido fitico nel quale le piante immagazzinano il fosfato. Ha una bella struttura **beta propeller** a forma di elica di nave a sei pale. Qui i tratti beta pieghe sono **antiparalleli** e sono formati da più strutture a forcina successive. Anche qui il sito attivo si trova all'interno della cavità.



Dato che la struttura beta-pieghe si lega lateralmente con legami idrogeno ad altre catene beta-pieghe, ha un comportamento **appiccicoso** al contrario della struttura ad alfa elica che forma legami idrogeno intracatena. Questa caratteristica può diventare pericolosa e provocare l'aggregazione incontrollata di proteine. Il **morbo di Alzheimer**, per esempio, è una grave malattia neurodegenerativa provocata dall'aggregazione del **peptide beta amiloide**. Questo costituisce il breve tratto trans-membrana di un recettore delle cellule nervose. Normalmente ha una struttura innocua ad alfa elica, ma dopo che il recettore viene tagliato, questo piccolo peptide si trova libero e dovrebbe essere degradato nei proteasomi dove sono degradate le proteine obsolete nella cellula. La struttura del peptide beta amiloide, però, talvolta è instabile e può riarrangiarsi da alfa elica a beta-pieghe. A questo punto diventa appiccicoso e si può legare ad altri peptidi beta amiloidi inducendoli a trasformarsi in beta-pieghe. L'aggregato di molti di questi peptidi è intrattabile per i proteasomi, così si accumula e continua ad accrescersi fino a quando rompe la cellula e assume dimensioni così grandi da essere visibile al microscopio ottico dove appare simile alle sferette di amido che si osservano nelle cellule vegetali (per questo il peptide è detto amiloide). Questi aggregati comprimono e uccidono altre cellule nervose provocando un progressivo decadimento delle funzioni del cervello.

Infine, la terza struttura secondaria è detta **random coil**, cioè avvolgimento casuale, e si trova nei punti di transizione tra una struttura ordinata e un'altra. Nelle immagini precedenti è rappresentata con filamenti verdi.

Determinazione della struttura delle proteine

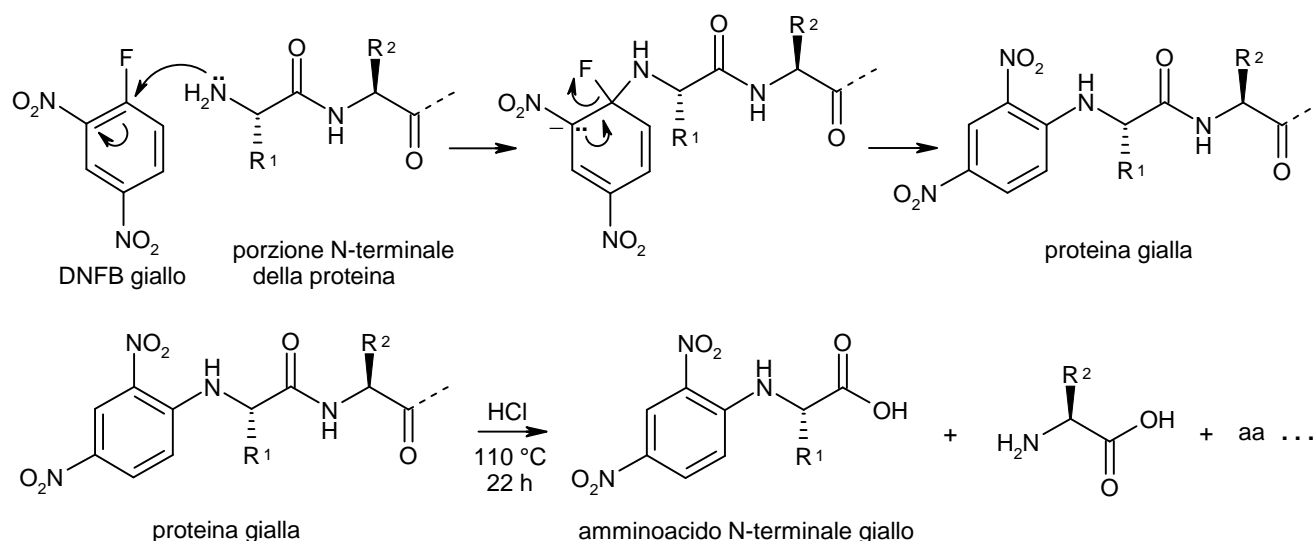
La più semplice descrizione della struttura di una proteina, ancora più semplice della struttura primaria, è la sua composizione in amminoacidi. L'**analisi degli amminoacidi** è già stata descritta nelle pagine precedenti e consente di conoscere quanti e quali amminoacidi vi sono in una proteina. Va ricordato, però, che l'idrolisi acida rompe tutti i legami amidici compresi quelli in catena laterale di Asn e Gln che vengono convertite in Asp e Glu. La quantità determinata di acido aspartico, quindi, è la somma di Asp e Asn per questo spesso si scrive Asx. Nello stesso modo, la quantità di acido glutammico è la somma di Glu e Gln e spesso si scrive Glx. Inoltre il triptofano non viene letto sia perché è labile in ambiente acido e la quantità che ne rimane dopo l'idrolisi acida è poco affidabile, sia perché richiederebbe di allungare di molto la corsa cromatografica dato che esce vari minuti dopo l'arginina. La composizione in amminoacidi va scritta elencando gli amminoacidi in ordine alfabetico, separati da una virgola e preceduti dai prefissi di quantità.

La met-enkefalina, per esempio, ha la seguente composizione: 2 Gly, Met, Phe, Tyr.

La prima proteina di cui è stata determinata la **struttura primaria** è stata l'insulina, negli anni 50, grazie al lavoro pionieristico di **Frederick Sanger** che per questo ha ricevuto il premio Nobel nel 1958.

Sanger ha usato un reattivo fortemente colorato di giallo **1-fluoro-2,4-dinitrobenzene** (DNFB) che reagisce con le proteine legandosi al gruppo α -amminico dell'amminoacido N-terminale. Dopo l'idrolisi acida della proteina, l'amminoacido N-terminale è giallo e può essere identificato con una cromatografia. Sanger ha poi rotto la proteina in frammenti con metodi diversi (idrolisi con tripsina e idrolisi parziale con HCl) e per ogni frammento ha individuato gli amminoacidi componenti e quello N-terminale. In questo modo ha scoperto che l'insulina ha due amminoacidi N-terminali e quindi è composta di due catene distinte una di 21 e l'altra di 30 amminoacidi e ne ha determinato la sequenza. Ha trovato che le due catene sono legate insieme da due ponti disolfuro, mentre un terzo ponte disolfuro coinvolge solo la catena più piccola (la struttura dell'insulina è illustrata in copertina).

Le reazioni usate da Sanger sono mostrate qui sotto:

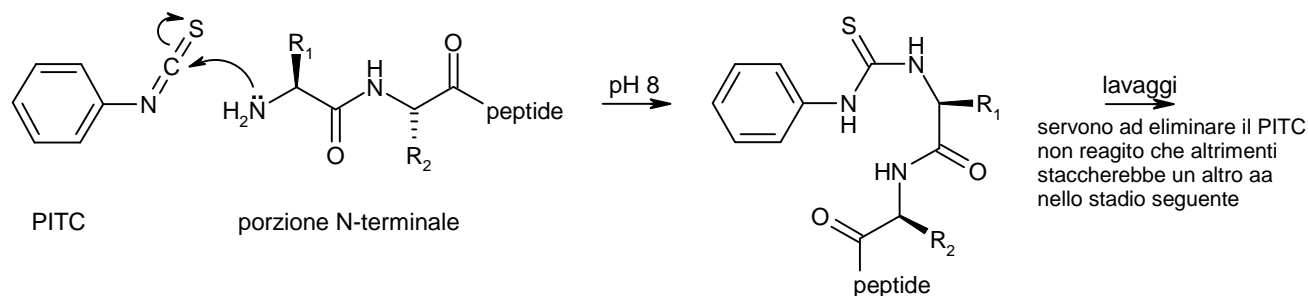


La **sequenziazione di Edman** è la tecnica oggi più utilizzata per determinare la struttura primaria di una proteina. Consente di identificare uno dopo l'altro i primi 30 (circa) amminoacidi di una proteina fino a quando le reazioni collaterali non coprono il segnale dell'amminoacido cercato. Per identificare anche i successivi amminoacidi, si deve tagliare la proteina in frammenti con due diverse tecniche enzimatiche, tipicamente con **tripsina**, che taglia la proteina sul carbossile degli amminoacidi basici (Arg e Lys) e con **chimotripsina**, che taglia la proteina sul carbossile degli amminoacidi aromatici (Phe, Tyr, Trp e, più lentamente, di Leu) e quindi si determina la sequenza di ogni frammento. Come in un puzzle, i vari frammenti vanno poi ricomposti a tavolino per ottenere la sequenza della proteina intera (i frammenti ottenuti con un enzima fanno da guida per capire come vanno ricomposti i frammenti ottenuti col secondo enzima).

Il reattivo della sequenziazione di Edman è il **fenilisotiocianato** (PITC) che consente di staccare dalla catena solo l'amminoacido N-terminale sotto forma di PTH-aa (feniltioidantoina dell'amminoacido) e di identificarlo in una corsa cromatografica HPLC. La procedura di sequenziazione può essere subito ripetuta per staccare e identificare l'amminoacido successivo della proteina.

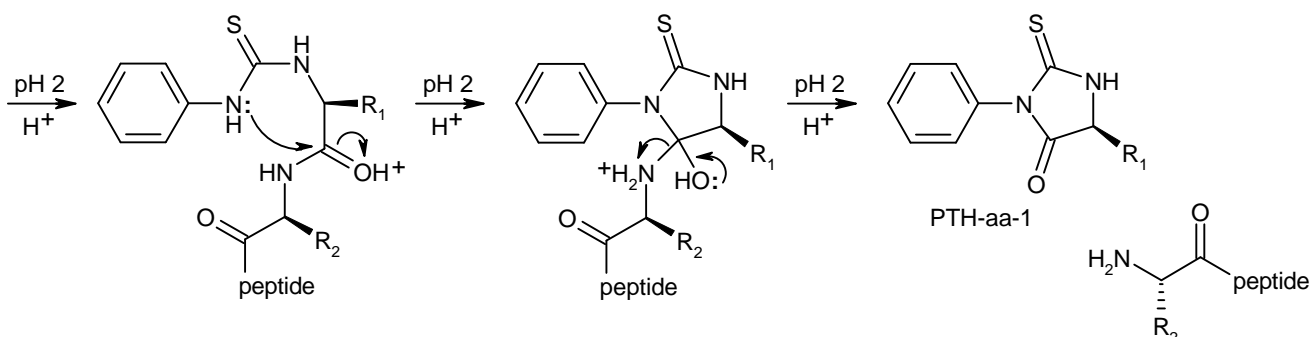
La reazione ha successo solo perché avviene in due fasi distinte.

Nella prima fase a pH 8 il gruppo amminico dell'amminoacido aa-1 si lega al PITC, ma la catena della proteina non si rompe. Prima di procedere oltre, bisogna eliminare ogni traccia di PITC non reagito con dei lavaggi, mentre la proteina resta adsorbita sulle pareti del reattore.



Nella seconda fase si opera a pH acido. Il meccanismo mostrato qui sotto è semplificato. Il primo attacco al carbonile, in realtà, è portato dallo zolfo, più nucleofilo, il tioestere che si forma è instabile, si riapre con facilità e l'anello a 5 termini si richiude per opera dell'azoto del PITC che forma un'ammide più stabile.

Per semplicità, qui è mostrato direttamente l'attacco dell'azoto del PITC al carbonile dell'amminoacido aa-1 che poi si stacca dalla catena sotto forma di feniltioindantoina (PTH-aa-1).



Il PTH-aa-1 viene allontanato con un ulteriore lavaggio per identificarlo in HPLC, mentre la proteina, che ora termina con l'amminoacido aa-2, resta adsorbita nel reattore e può essere sottoposta ad un altro ciclo di reazioni.

A fianco del segnale HPLC dell'amminoacido atteso, vi può essere un piccolo segnale (in anticipo) dell'amminoacido successivo se tracce di PITC non reagito sono rimaste dopo il primo lavaggio. Vi può anche essere un piccolo segnale (in ritardo) dell'amminoacido precedente se le reazioni non sono andate a completezza.

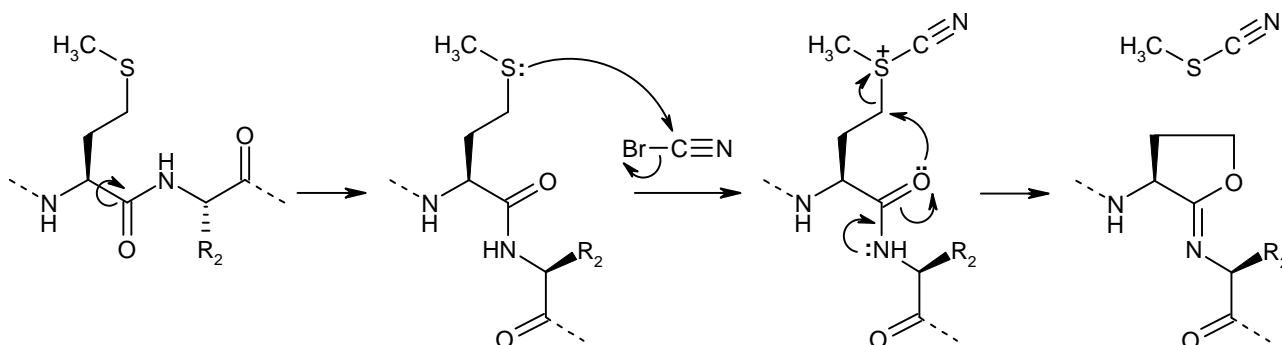
All'inizio, questi piccoli segnali non disturbano, ma con il progredire della sequenziazione (dopo circa 30 stadi) costituiscono una folla di segnali che può arrivare a coprire il segnale dell'amminoacido in esame.

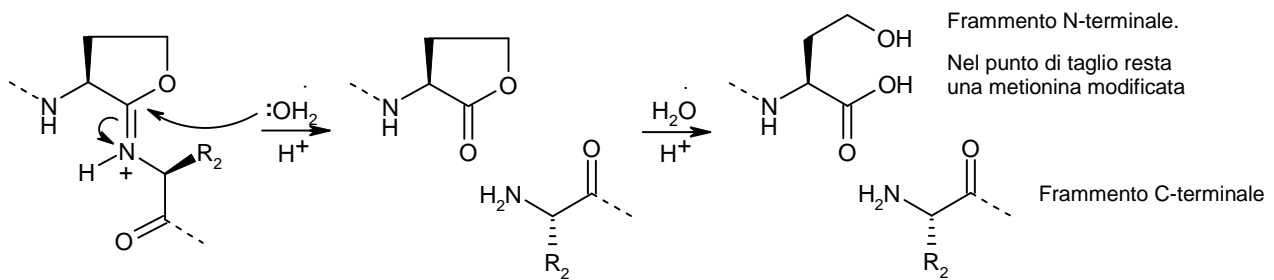
La sequenziazione non si può applicare a proteine che abbiano il gruppo amminico N-terminale acetilato, questo dovrà essere liberato prima di eseguire la sequenziazione di Edman.

Se la quantità di proteina disponibile è troppo bassa si deve eseguire la sequenziazione con un metodo alternativo come la spettrometria di massa o, come accade sempre più spesso, sequenziando il gene che codifica per quella proteina.

Oltre ai due enzimi **tripsina** (che taglia la proteina sui carbossili di Arg e Lys) e **chimotripsina** (che taglia sui carbossili di Phe, Tyr e Trp), vale la pena di ricordare anche un reattivo non enzimatico, il **bromuro di cianogeno** CNBr, che taglia le catene proteiche in modo ancora più selettivo: taglia solo sul carbossile della metionina.

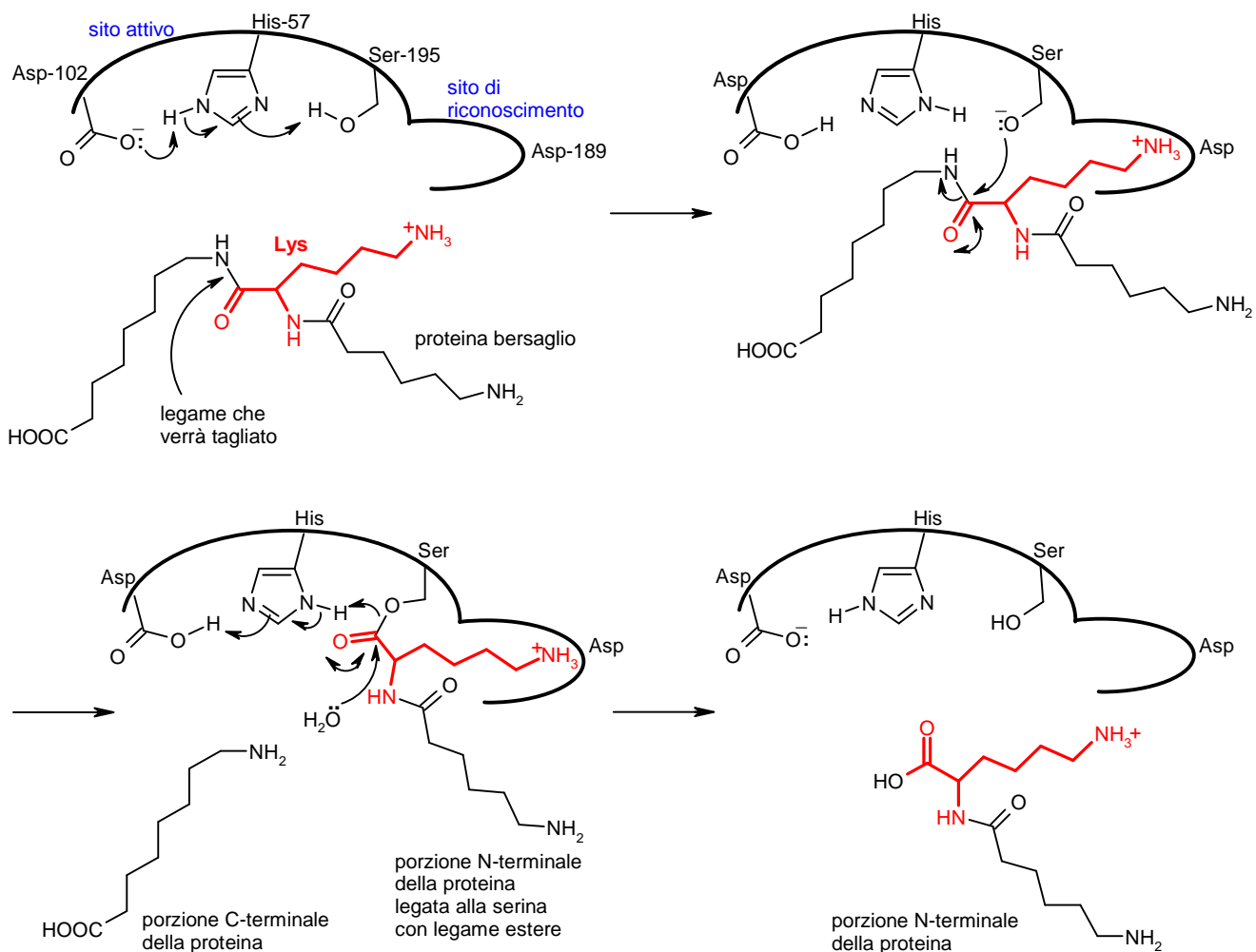
Il meccanismo di reazione è mostrato qui sotto:





Il taglio delle proteine da parte di tripsina e chimotripsina, invece, avviene grazie ad una terna di amminoacidi del sito attivo: acido aspartico, istidina e serina. Dato che l'attacco al carbonile della proteina bersaglio è portato dalla serina, questi enzimi vengono anche chiamati **proteasi alla serina**. La loro selettività verso specifici amminoacidi dipende da una tasca, posta accanto al sito attivo, che riconosce la catena laterale dell'amminoacido bersaglio. Nella tripsina, sul fondo della tasca di riconoscimento, vi è un acido aspartico che può interagire col gruppo amminico in catena laterale di lisina e arginina.

Il meccanismo d'azione della **tripsina** è illustrato qui sotto:



L'istidina 57 e l'acido aspartico 102 strappano un H^+ alla serina 195 che diventa più nucleofila e può attaccare con forza il legame ammidico della lisina bersaglio (rossa) formando con questa un legame estere. La porzione N-terminale della proteina, in questa fase, è legata all'enzima con un legame covalente. Questo legame deve essere rotto nella seconda parte della reazione con l'intervento di una molecola d'acqua che attacca il legame estere e stacca il frammento N-terminale dalla serina 195. L'enzima così può ricominciare la sua azione proteolitica.

La tripsina, a causa della sua attività proteolitica, è un enzima pericoloso e viene prodotto nel pancreas in una forma inattiva, detta **tripsinogeno**, con una catena leggermente più lunga che interferisce con l'attività del sito attivo. Quando il tripsinogeno giunge nell'intestino, altri enzimi proteolitici staccano il tratto in più generando la tripsina attiva che può cominciare a demolire le proteine introdotte col cibo.

Per individuare la **posizione dei ponti disolfuro** in una proteina, si conducono due esperimenti distinti.

Nel primo, si analizza la sequenza della proteina dopo che è stata ridotta con 2-mercaptoetanolo, cioè si analizza la proteina privata dei ponti disolfuro.

Nel secondo, si fa un'idrolisi enzimatica (per esempio con chimotripsina) della proteina nativa, cioè con i ponti disolfuro intatti, e si determina la composizione in amminoacidi di ogni frammento ottenuto. I frammenti coinvolti in ponti disolfuro contengono amminoacidi di due porzioni distinte della catena proteica. Il confronto dei dati ottenuti dai due esperimenti permette di individuare le cisteine legate tra loro da ponti disolfuro.

Le strutture 2^a, 3^a e 4^a delle proteine non possono essere individuate con metodi chimici, ma richiedono un approccio del tutto diverso.

La **cristallografia a raggi X** è la tecnica più comune per determinare la struttura tridimensionale di una proteina. Consiste nel sottoporre un cristallo perfetto di una proteina ad un fascio coerente di raggi X (prodotto da un sincrotrone) e nel ruotarlo progressivamente per ottenere una serie di immagini di diffrazione. Da queste si possono dedurre le densità elettroniche nella molecola e quindi la posizione nello spazio di tutti gli atomi (ad eccezione di quelli di idrogeno, troppo piccoli) con una incertezza di circa 2 Angstrom. Questa tecnica ha due grandi limiti. Innanzitutto non vede eventuali **parti mobili** della proteina che hanno assunto posizioni diverse in ogni molecola del cristallo.

Inoltre molte proteine sono **difficili da cristallizzare** perché sono troppo apolari e quindi insolubili in acqua. Mentre le normali proteine hanno la parte interna idrofobica e la superficie polare, le proteine di membrana sono apolari in superficie dato che devono interagire con i lipidi della membrana cellulare. Per ottenere cristalli da questa categoria di proteine bisogna ricorrere a particolari espedienti, come legare la proteina ad un anticorpo per formare un complesso solubile in acqua e cristallizzabile, oppure inserire la proteina di membrana in un doppio strato di fosfolipidi legato da una lipoproteina, queste strutture vengono chiamate nanodischi, sono solubili in acqua e possono essere cristallizzate.

La **spettrometria NMR** è una tecnica alternativa che permette di ricavare la struttura tridimensionale di proteine in soluzione acquosa a diversi pH. Il procedimento è molto laborioso perché richiede di arricchire la proteina con isotopi attivi all'NMR come ¹⁵N e ¹³C (la proteina viene prodotta da batteri fatti crescere in terreni di coltura che contengono ¹⁵NH₄Cl e ¹³C-glucosio) e richiede l'uso di strumenti NMR di grande potenza, inoltre consente di determinare solo la posizione reciproca degli atomi della catena principale della proteina. La disposizione delle catene laterali di ogni amminoacido viene determinata successivamente in silico, cioè viene calcolata al computer con un programma di modellistica molecolare.

Sintesi di peptidi

La sintesi di peptidi non è affatto semplice anche se consiste nel realizzare un solo tipo di legame, quello ammidico, tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e quello amminico del successivo. Gli amminoacidi, infatti, sono molecole bifunzionali, alcuni anche trifunzionali, e quindi non è sufficiente realizzare il legame ammidico desiderato, ma bisogna anche impedire che reagiscano tutti gli altri gruppi funzionali compresi quelli che si trovano nelle catene laterali. La sintesi, poi, è ulteriormente complicata perché bisogna preservare l'attività ottica dei carboni chirali in posizione alfa.

L'apparato biochimico della cellula è molto più bravo di noi nel sintetizzare peptidi e proteine e lo fa ad una velocità strabiliante, al ritmo di 20 amminoacidi al secondo. Per questo motivo oggi la maggior parte delle sintesi di proteine si realizzano con le tecniche dell'ingegneria genetica, cioè ponendo il tratto di DNA che codifica per quella proteina in un batterio e lasciando a questo il compito della sintesi. Quando avremo bisogno di una nuova quantità di quella proteina, non sarà necessario iniziare una nuova sintesi chimica, ma basterà lasciare che quel batterio ne sintetizzi ancora.

Se però si deve sintetizzare una sequenza peptidica di non più di 20 o 30 amminoacidi, allora può essere preferibile la sintesi chimica in laboratorio.

Gruppi protettori

Per comprendere il problema della formazione del legame peptidico, consideriamo la sintesi di un semplice dipeptide: alanil-glicina, Ala-Gly.

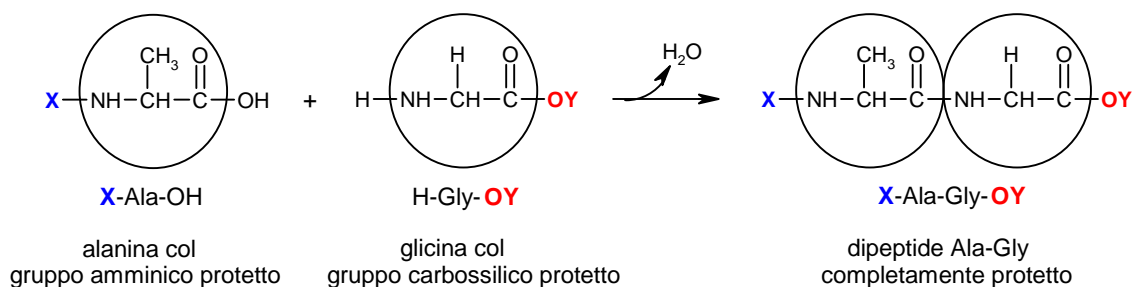
Se provassimo ad ottenere questo dipeptide per semplice riscaldamento dei due amminoacidi, alanina e glicina, otterremmo una miscela di quattro diversi dipeptidi: Ala-Gly, Gly-Ala, Ala-Ala e Gly-Gly. Inoltre si formerebbero anche tripeptidi, tetrapeptidi, ecc.

Per sintetizzare correttamente il dipeptide Ala-Gly è necessario che siano liberi di reagire solo due gruppi funzionali: il gruppo carbossilico dell'alanina e quello amminico della glicina. Gli altri due gruppi funzionali non devono reagire durante la formazione del legame ammidico e per questo devono essere protetti cioè legati temporaneamente a molecole chiamate **gruppi protettori**.

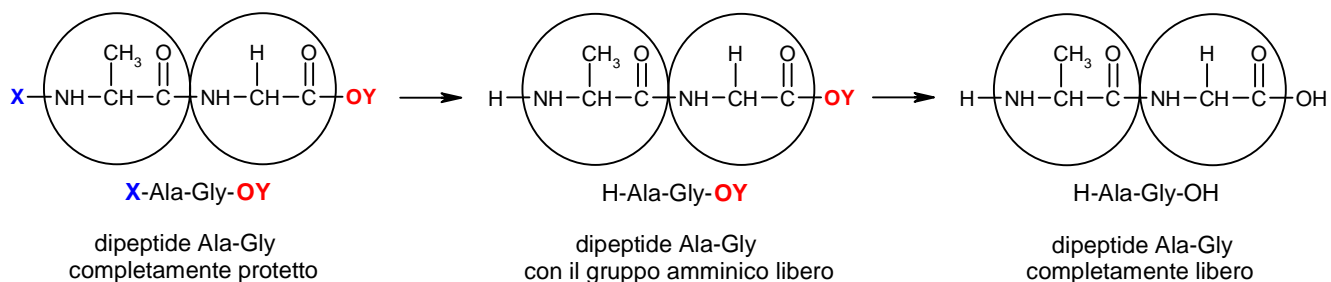
Di seguito, per maggior chiarezza, con il simbolo a tre lettere dell'amminoacido indicheremo il **residuo amminoacilico**, cioè quella parte dell'amminoacido che resta in un peptide dopo la formazione del legame peptidico, quindi l'amminoacido senza H sul gruppo amminico e OH sul carbossilico.

L'alanina andrà scritta, quindi, H-Ala-OH e il dipeptide Ala-Gly andrà scritto H-Ala-Gly-OH.

La sintesi di H-Ala-Gly-OH può essere realizzata correttamente solo se alanina e glicina vengono prima protette nella forma **X-Ala-OH** e **H-Gly-OY**, dove **X** e **OY** rappresentano due generici protettori rispettivamente del gruppo amminico e di quello carbossilico. La condensazione dei due amminoacidi protetti produce il dipeptide **X-Ala-Gly-OY** completamente protetto.



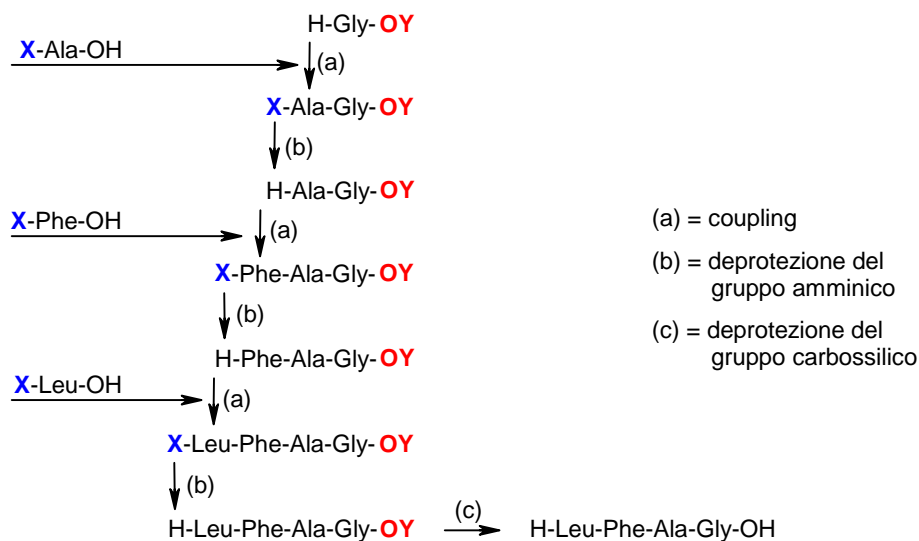
Alla fine della sintesi i due gruppi protettori devono essere rimossi uno per volta (con due reazioni distinte) senza danneggiare il peptide sintetizzato.



Per ottenere peptidi più lunghi, si usano queste stesse reazioni, ma dopo ogni condensazione (coupling) si deve staccare il protettore del gruppo amminico (ma non quello del carbossile) per procedere poi ad un nuovo coupling con l'amminoacido successivo che deve avere il gruppo amminico protetto.

Nello schema seguente è mostrata, come esempio, la sintesi del tetrapeptide Leu-Phe-Ala-Gly.

La sintesi inizia dalla parte C-terminale, quindi dall'ultimo aminoacido Gly-4. Si prepara dapprima il dipeptide Ala-Gly a cui successivamente viene unita fenilalanina e per ultima leucina. Il primo aminoacido, glicina, viene introdotto con il gruppo carbossilico protetto, come H-Gly-OY, mentre tutti gli aminoacidi successivi vengono introdotti con il gruppo amminico protetto, come X-AA-OH.

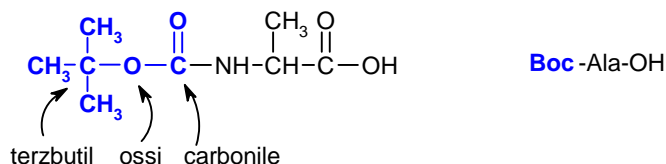


Durante la sintesi di peptidi si devono gestire tre tipi di legami: il legame col protettore X del gruppo amminico, il legame col protettore OY del carbossile (e con eventuali protettori dei gruppi funzionali in catena laterale) e il legame ammidico. Questi devono avere stabilità molto diverse tra loro. Il primo deve essere il più fragile, si deve rompere in condizioni blande nelle quali restano inalterati gli altri legami. Il secondo si deve rompere in condizioni un po' più drastiche nelle quali, però, il legame ammidico tra i vari aminoacidi rimane stabile.

Protezione del gruppo amminico

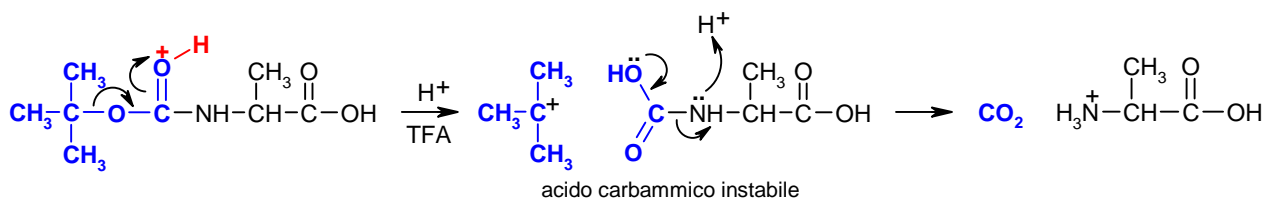
Uno dei più usati protettori del gruppo amminico in alfa è il *terzbutil-ossi-carbonile*, Boc. E' un protettore di tipo uretanico che inibisce la reattività del gruppo amminico trasformandolo in una amide, e che è labile in ambiente moderatamente acido.

La Boc-alanina ha la seguente struttura:



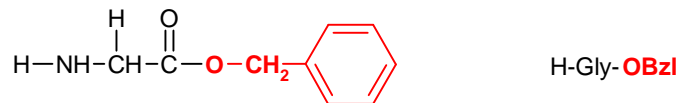
Il Boc è labile in ambiente acido, infatti viene staccato con acido trifluoroacetico (TFA) al 50% in diclorometano (DCM). La sua instabilità agli acidi dipende dal fatto che contiene due ottimi gruppi uscenti: il **catione terzbutilico**, che è relativamente stabile in ambiente acido, e la CO_2 , che si libera come gas dall'acido carbammico che resterebbe. Il catione terzbutilico, in un secondo tempo, può dare un'eliminazione E1 formando 2-metilpropene, un altro prodotto volatile.

Il meccanismo del distacco del Boc nella Boc-alanina è il seguente:



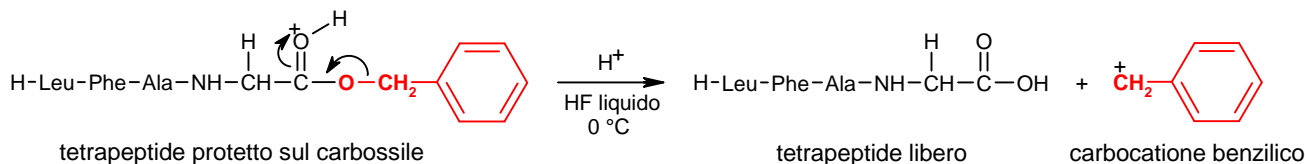
Protezione del gruppo carbossilico

Uno dei più usati protettori del gruppo carbossilico terminale è il gruppo benzilico, Bzl. Questo inibisce la reattività del carbossile trasformandolo in un estere benzilico. La glicina protetta come H-Gly-OBzl ha la seguente struttura:



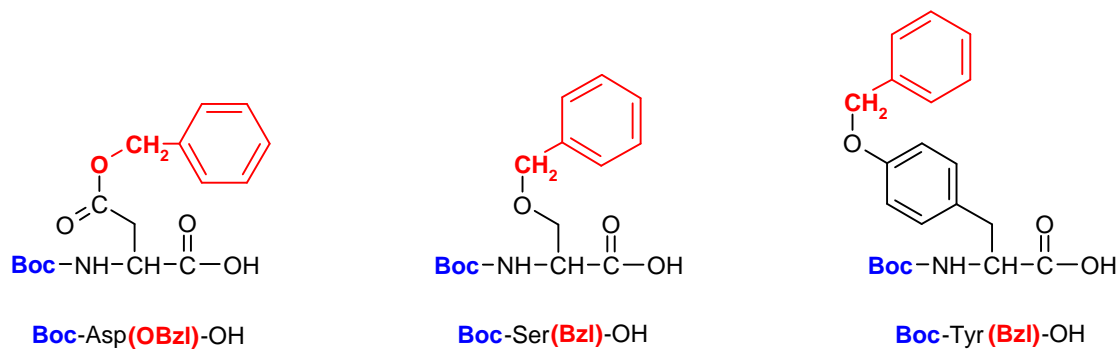
L'estere benzilico è stabile nelle condizioni di sblocco del Boc (TFA 50% in DCM), ma viene scisso in HF liquido anidro a 0 °C, ambiente in cui il legame ammidico è stabile. Le ammidi, infatti, per essere scisse in ambiente acido, richiedono la presenza di un nucleofilo come l'acqua. In HF liquido anidro non ci sono buoni nucleofili, quindi il legame ammidico è stabile. L'estere benzilico, invece, si scinde dato che può reagire con un meccanismo diverso, SN1, grazie alla stabilità del carbocatione benzilico. Questo, in seguito, reagendo con lo ione fluoruro, forma fluoruro di benzile che viene eliminato.

Lo sblocco del gruppo benzilico nel tetrapeptide H-Leu-Phe-Ala-Gly-OBzl è illustrato di seguito:



Il gruppo benzilico è anche usato come protettore dei gruppi funzionali in **catena laterale** di alcuni aminoacidi. Per esempio, i carbossili β e γ degli acidi aspartico e glutammico vengono protetti come **esteri benzilici**. Questi aminoacidi, quindi, devono essere utilizzati nella sintesi di peptidi con una **doppia protezione**, al gruppo amminico in α e al carbossile in catena laterale e cioè nella forma di Boc-Asp(OBzl)-OH e Boc-Glu(OBzl)-OH (il protettore in catena laterale è indicato tra parentesi).

Gli ossidrili di serina, treonina e tirosina vengono protetti come **eteri benzilici** e quindi entrano nella sintesi come Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Tyr(Bzl)-OH.



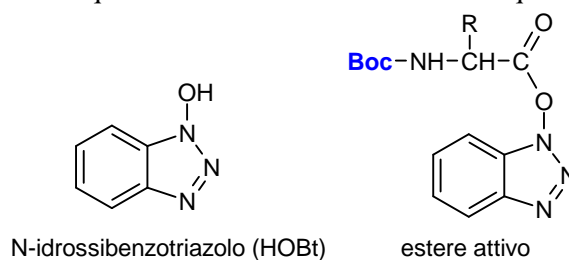
Attivazione del gruppo carbossilico

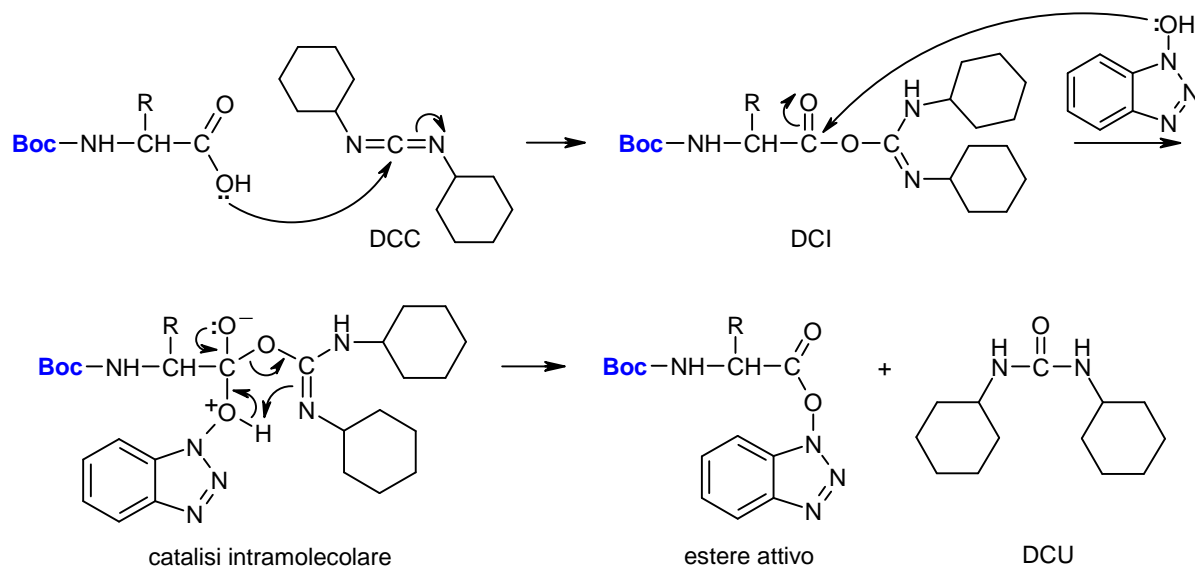
Il legame ammidico viene realizzato facendo reagire il Boc-amminoacido attivato al carbossile con il gruppo amminico del peptide protetto al carbossile. Si possono usare diverse tecniche di attivazione: anidridi simmetriche, esteri attivi o con DCC aggiunta in situ.

La tecnica più diffusa è quella degli **esteri attivi** con un alcol particolare, HOBT (N-idrossibenzotriazolo), che si è dimostrato in grado di rendere minima la racemizzazione del Boc-amminoacido.

Gli esteri attivi sono esteri nei quali l'alcol ha un certo carattere acido e quindi hanno una reattività simile a quella delle anidridi.

L'estere attivo si prepara facendo reagire il Boc-amminoacido con dicicloesilcarbodiimmide (DCC) in presenza di HOBT a 0 °C in diclorometano.



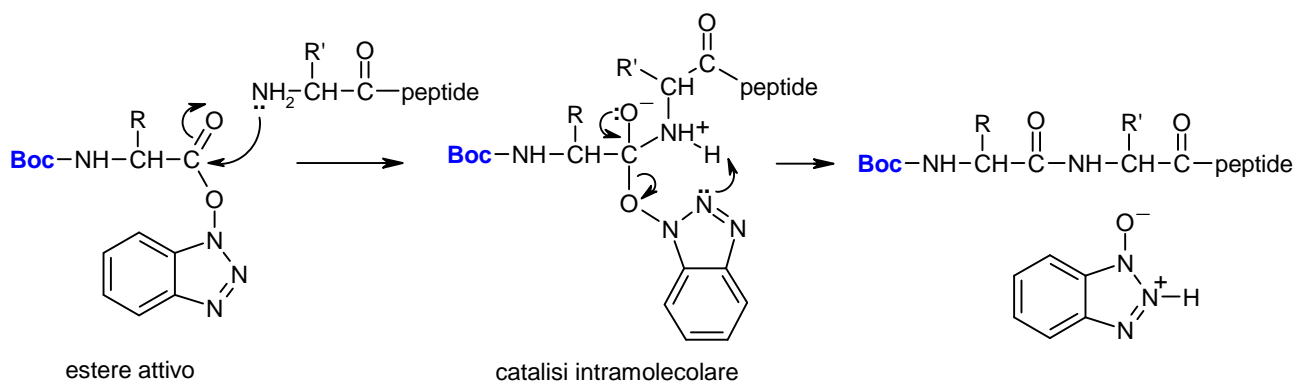


La DCC, reagendo con il carbossile dell'amminoacido, forma O-(Boc-amminoacil)-dicicloesilisourea, DCI, una specie acilante molto reattiva che reagisce con l'alcol HOBT per formare l'estere attivo e DCU, dicicloesilurea. Questa non è solubile in DCM e viene eliminata per filtrazione. La sintesi dell'estere attivo è molto efficiente perché la DCI aiuta la reazione con una **catalisi intramolecolare** nell'intermedio tetraedrico, infatti strappa l' H^+ all'alcol ed esce come DCU.

Sintesi del legame ammidico

L'estere attivo viene fatto reagire con il gruppo amminico terminale del peptide in allungamento.

Questa reazione avviene con grande facilità non solo per le caratteristiche acide dell'alcol, ma anche per la **catalisi intramolecolare** fornita da **HOBT** che strappa l' H^+ all'azoto del peptide e così favorisce la formazione del legame ammidico.



Sintesi di peptidi in fase solida

Strategia Boc/Bzl

Il vero problema della **sintesi di peptidi in soluzione** non è nelle reazioni per creare la catena, ma piuttosto nelle lunghe operazioni che servono ad isolare e purificare i peptidi tra una reazione e l'altra. L'estrema efficienza della biosintesi delle proteine, che avviene nel citoplasma delle cellule al ritmo di 20 amminoacidi al secondo, è stata uno stimolo forte per esplorare nuove strade.

Durante la biosintesi, le proteine non si trovano in soluzione, ma sono ancorate con legame estere ad una molecola di RNA transfer il quale, a sua volta, è legato al complesso ribosoma-RNA messaggero. Le proteine, quindi, crescono ancorate ad un supporto solido dal quale si staccano solo alla fine della sintesi.

Nel 1963 Merrifield ha messo a punto una tecnica di **sintesi di peptidi in fase solida**, basata sulla strategia di protezione Boc/Bzl, che richiama in parte la biosintesi delle proteine. L'idea chiave consiste nel far crescere la catena peptidica legata covalentemente ad un polimero insolubile. In questo modo i reagenti in eccesso e i sottoprodotti della sintesi possono essere rimossi per semplice lavaggio e filtrazione del polimero al quale è legato il peptide. I **lunghe tempi di purificazione**, tipici della sintesi di peptidi in soluzione, sono trasformati in **veloci filtrazioni**. La sintesi in fase solida si differenzia dalla biosintesi per la **direzione di crescita** del peptide. Mentre nella biosintesi le proteine si allungano dal lato C-terminale, nella sintesi in fase solida si allungano dal lato N-terminale. Questa strategia è indispensabile per limitare il rischio di racemizzazione al carbonio alfa, che si verifica nei peptidi attivati al carbossile, ma che è quasi assente nei Boc-amminoacidi attivati.

Questa nuova tecnica ha reso la sintesi di peptidi molto più veloce: gli amminoacidi vengono introdotti al ritmo di uno ogni 2 ore, cioè il tempo strettamente necessario per eseguire le reazioni (con doppio coupling). Inoltre, data la semplicità delle operazioni richieste, l'intero processo può essere automatizzato. Una macchina automatica per la sintesi di peptidi in fase solida può introdurre fino a dodici amminoacidi al giorno.

Date queste premesse, la sintesi in fase solida dovrebbe essere in grado di sintetizzare proteine di qualsiasi lunghezza. In realtà, si possono preparare facilmente solo peptidi fino a 30 o 40 amminoacidi. Questo dipende dal fatto che le reazioni usate non hanno un'efficienza del 100% e quindi si ottengono, accanto a catene peptidiche cresciute correttamente, anche un certo numero di catene errate. Per questo motivo è necessario che la resa delle reazioni con cui si introducono gli amminoacidi sia il più possibile vicina al 100%. Per chiarire questo fatto, consideriamo la sintesi di un peptide di 40 amminoacidi. Se ciascun amminoacido viene incorporato con una resa del 90%, la resa finale è $0,9^{40} = 1,5\%$, cioè si ottiene 1,5% di peptide corretto e 98,5% di peptidi errati. Solo con una resa per ogni amminoacido del 99% si ottiene una resa complessiva accettabile: $0,99^{40} = 67\%$. Inoltre, all'aumentare della lunghezza della catena peptidica, la resa finale diventa sempre più bassa. Infatti, la sintesi di un peptide di 100 amminoacidi con una resa media del 99% produce una resa complessiva del: $0,99^{100} = 37\%$.

Dopo la reazione di coupling, si esegue un test con ninidrina su una minima quantità di prodotto per verificare che non ci siano più gruppi amminici liberi, cioè che tutti i gruppi amminici abbiano legato l'ultimo amminoacido.

Se il test non è soddisfacente, i gruppi amminici rimasti liberi vengono bloccati acetilandoli con anidride acetica, operazione chiamata end capping, cioè chiusura della catena. In questo modo la resa non aumenta, ma sarà più facile la purificazione finale dato che i peptidi troncati sono molto più corti del peptide corretto.

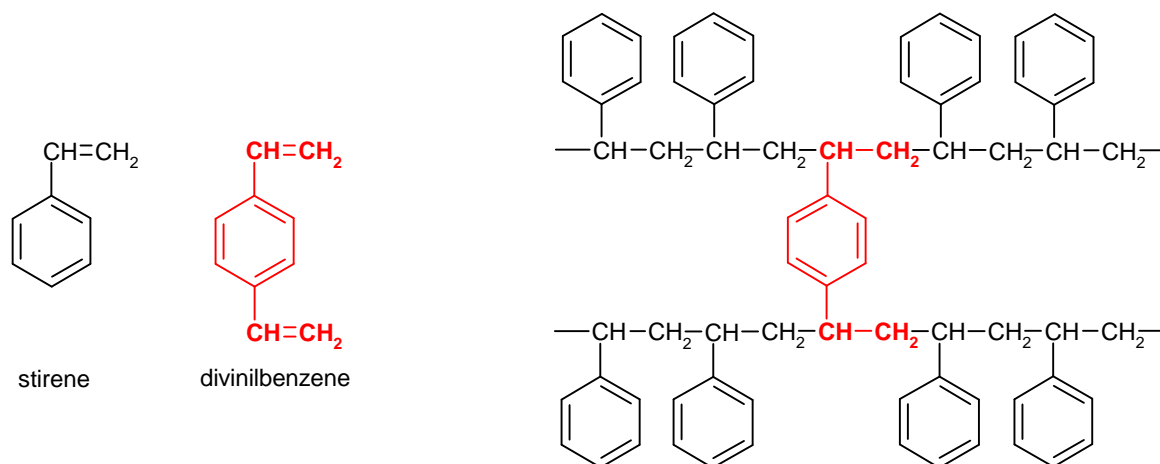
Oltre che per i peptidi, la sintesi in fase solida è usata con successo anche per i polinucleotidi e i polisaccaridi. I primer di DNA, per esempio, necessari per le operazioni di ingegneria genetica, vengono sintetizzati in fase solida.

Le operazioni necessarie per realizzare la sintesi di peptidi in fase solida con la strategia Boc/Bzl sono le seguenti:

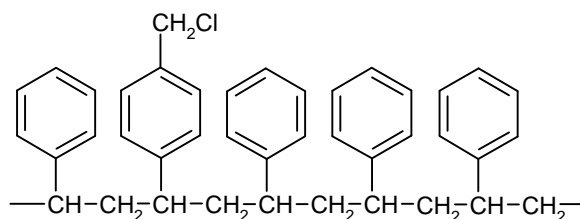
Inizio	Attacco del primo Boc-AA alla resina	sale di cesio del Boc-AA
Ciclo di reazioni da ripetere per ogni amminoacido	Sblocco del Boc Neutralizzazione Aggancio del nuovo Boc-AA	50% TFA 10% TEA estere attivo con HOBt
Operazioni finali	Sblocco del Boc Distacco del peptide dalla resina e sblocco dei protettori in catena laterale	50% TFA HF liquido 0 °C

Il supporto polimerico solido

Il supporto polimerico insolubile proposto da Merrifield è costituito da una resina polistirenica copolimerizzata con l'1% di divinilbenzene che forma legami tra le catene che rendono la resina insolubile nei solventi organici. La piccola percentuale di divinilbenzene garantisce un basso livello di reticolazione che non irrigidisce la resina che deve essere rigonfiabile come una spugna quando viene bagnata dal solvente per permettere l'ingresso e l'uscita dei reattivi.



Per legare come estere benzilico il primo aminoacido alla resina, su alcuni anelli benzenici si introduce un **gruppo clorometilico**. Il polimero viene fatto reagire con $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-Cl}$ (clorometil-metil-etero) usando ZnCl_2 come catalizzatore e così si ottiene la resina clorometilica:

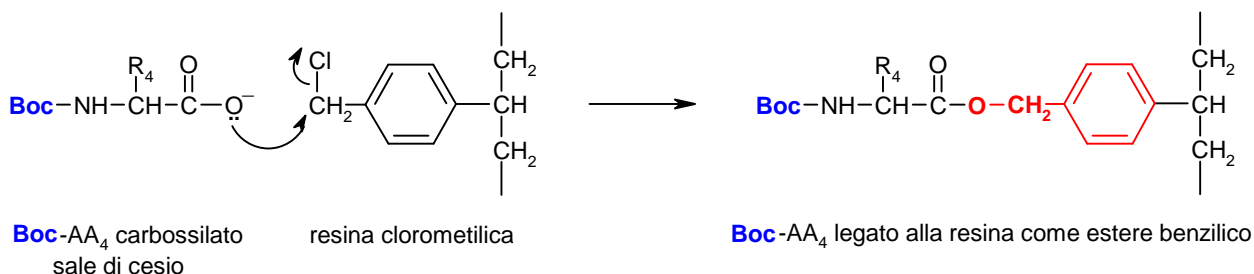


Attacco del primo Boc-amminoacido alla resina

Descriviamo ora la sintesi in fase solida di un generico tetrapeptide $\text{H-AA}_1\text{-AA}_2\text{-AA}_3\text{-AA}_4\text{-OH}$.

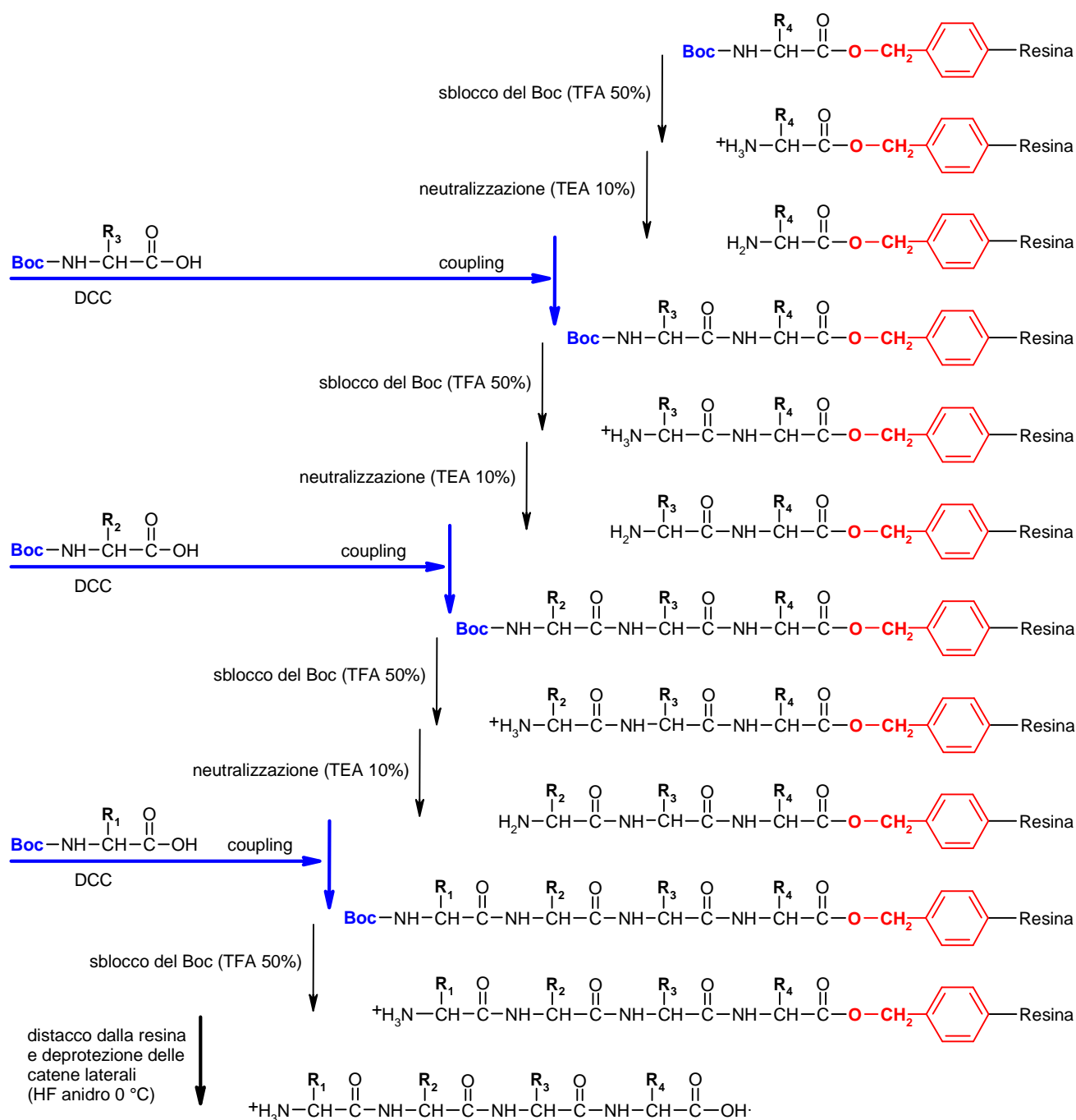
Il primo passo della sintesi consiste nel legare covalentemente alla resina, come **estere benzilico**, l'amminoacido C-terminale col gruppo amminico protetto, cioè **Boc-AA₄-OH**. La sintesi dell'estere avviene in un modo poco usuale, con il carbossilato che attacca come nucleofilo il cloruro di benzile con una reazione $\text{S}_{\text{N}}2$. Questa reazione è possibile solo con cloruri molto reattivi come, appunto, il cloruro di benzile.

Si fa reagire il **Boc-AA₄-OH** con Cs_2CO_3 per formare il sale carbossilato di cesio nel quale il grosso catione Cs^+ lascia più libero, e quindi più nucleofilo, il carbossilato dell'amminoacido. Questo sale viene fatto reagire con la resina clorometilica in DMF a 50°C per 24 ore.



Schema della sintesi in fase solida di un tetrapeptide

Le operazioni necessarie per inserire gli altri aminoacidi si ripetono sempre uguali fino ad ottenere il peptide della lunghezza desiderata.

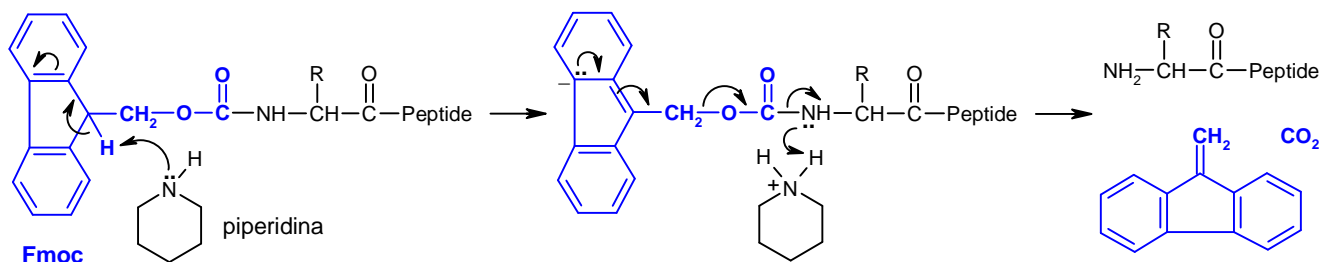


Evoluzione della sintesi di peptidi in fase solida: strategia Fmoc/tBu

La sintesi di peptidi in fase solida di Merrifield, basata sulla strategia Boc/Bzl, ha un punto debole. I ripetuti trattamenti acidi con 50% TFA provocano, anche se in minima parte, il distacco di alcuni protettori dalle catene laterali e il distacco di alcune catene di peptide dalla resina. Questo problema è legato alla logica stessa dei protettori Boc/Bzl che sono entrambi labili in ambiente acido anche se a livelli diversi di acidità.

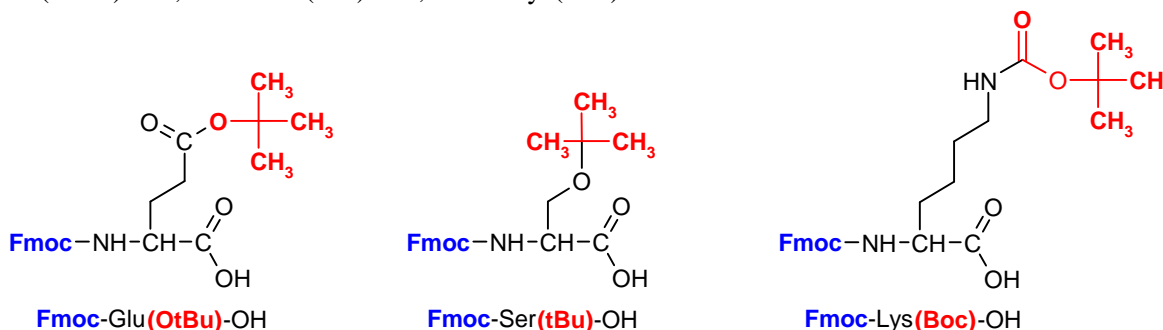
Per risolvere questo problema, nel 1978 Atherton e Sheppard hanno proposto di usare uno schema di **protezione ortogonale** detto **Fmoc/tBu** che, per il gruppo alfa amminico, usa il protettore Fmoc, labile in ambiente moderatamente **basico**, e, per le catene laterali di Asp, Glu, Ser e Thr, usa protettori tBu, labili in ambiente moderatamente **acido**. Le reazioni di sblocco dei protettori in catena laterale e di distacco del peptide dalla resina sono eseguite in condizioni acide più delicate rispetto alla tecnica Boc/Bzl che richiedeva HF. Qui è sufficiente usare acido trifluoroacetico TFA al 95% in acqua e quindi si può operare direttamente nel reattore della sintesi, mentre con HF, che intacca il vetro ed è molto tossico, era necessario un apparato dedicato in polipropilene o in teflon.

Il protettore **Fmoc** è di tipo uretanico (come il Boc) e inibisce la reattività del gruppo amminico trasformandolo in un'amide. Fmoc sta per 9-fuorenil-metil-ossi-carbonil e viene staccato con **piperidina** 20% in DMF, un'ammina secondaria che ha pK_a 11,2.



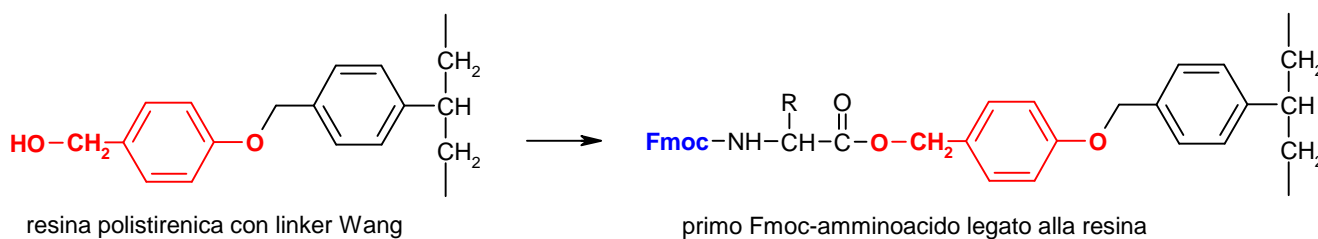
Dato che il peptide, dopo lo sblocco del Fmoc, viene rilasciato con il gruppo finale amminico in forma basica, non è necessario il passaggio di neutralizzazione e si può procedere, dopo i normali lavaggi, al coupling con l'estere attivo del prossimo Fmoc-amminoacido. Il protettore Fmoc del nuovo amminoacido è stabile durante il coupling perché non viene staccato dal gruppo amminico terminale del peptide che ha un pK_a intorno a 9 e quindi è molto meno basico della piperidina.

La protezione in **catena laterale** di tre tipici amminoacidi Glu, Ser e Lys è la seguente: Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.



Questi protettori in catena laterale sono stabili durante i trattamenti basici con piperidina, ma si staccano in TFA 95% in acqua. Anche la resina deve offrire all'amminoacido C-terminale un aggancio che si rompa in TFA 95%. Una delle resine più utilizzate è detta Wang, è una resina polistirenica simile a quella di Merrifield, ma usa come aggancio un gruppo idrossimetil-fenilossi che quindi lega il primo amminoacido come estere benzilico, ma in modo più labile agli acidi di quello di Merrifield grazie al secondo ossigeno legato all'anello che stabilizza il carbocatione che si forma durante lo sblocco.

Per legare il primo Fmoc-amminoacido alla resina, lo si fa reagire come estere attivo con HOBt.



Le operazioni necessarie per realizzare la sintesi di peptidi in fase solida Fmoc/tBu sono le seguenti:

Inizio	Attacco del primo Fmoc-AA alla resina	estere attivo con HOBt
Ciclo di reazioni da ripetere per ogni amminoacido	Sblocco del Fmoc Aggancio del nuovo Fmoc-AA	piperidina 20% in DMF estere attivo con HOBt
Operazioni finali	Sblocco del Fmoc Distacco del peptide dalla resina e sblocco dei protettori in catena laterale	piperidina 20% in DMF TFA 95%