

INTRODUZIONE

In questa introduzione verranno richiamati alcuni concetti di fisiologia utili ad inquadrare il contesto nel quale agiscono i biopolimeri. Senza avere la pretesa di voler scrivere un capitolo di fisiologia o di chimica biologica verranno schematicamente riassunti alcuni punti che potranno essere approfonditi in altri corsi.

I livelli strutturali che possono essere considerati in un sistema biologico sono diversi e la loro definizione è strettamente correlata alle relative dimensioni. Qui di seguito vengono definiti alcuni sistemi funzionali in ordine crescente di complessità.

Molecole: intervengono nelle reazioni chimiche che caratterizzano la vita; oggi molte di queste reazioni sono conosciute e possono essere realizzate in laboratorio.

Organelli: unità funzionali sopramolecolari; negli organelli sono localizzati molti stadi metabolici che si realizzano in modo coordinato. Hanno solo funzioni parziali all'interno dell'organismo. Esempi: nucleo, mitocondri, ribosomi.

Cellula: è il livello di integrazione nel quale tutti i processi vitali avvengono in modo coordinato. La cellula è la più piccola unità che può eseguire funzioni metaboliche, può autoriprodursi e mutare.

Organismi: gli organismi superiori sono composti di molte cellule la cui attività è controllata ad un livello superiore. Se questa regolazione fallisse ne sarebbe influenzata l'integrità dell'intero organismo.

La cellula è un sistema aperto. Alcune cellule necessitano solo di energia, di ioni e sostanze inorganiche semplici; esse le assumono dall'ambiente esterno e le trasformano in molecole biologiche molto complesse: tali cellule si dicono autotrofe e sono tipiche delle piante. Altre cellule devono essere nutrite con molecole organiche, esse quindi dipendono dall'attività di altri organismi e vengono chiamate eterotrofe. In ogni caso, le cellule possono vivere in un ambiente caratterizzato da una struttura meno complessa della loro, al contrario dei virus e dei batteriofagi.

Raramente una cellula ha un diametro più grande di 100 micron e più piccolo di 1 micron. La struttura di una cellula di un organismo eucariota è molto complessa e riflette il grado di coordinazione

che deve avere per permettere il funzionamento di organismi superiori, in altre parole la complessità consiste in una maggiore compartimentazione dei componenti cellulari.

Qui di seguito viene riportata una breve descrizione degli organelli che si trovano nelle cellule.

Plasmalemma: il plasmalemma separa l'intorno non citoplasmatico dalla matrice citoplasmatica; controlla lo scambio di sostanze con l'ambiente. Spesso questo processo avviene con la partecipazione di enzimi che sono localizzati nel o sul plasmalemma. Sulla superficie esterna, la membrana citoplasmatica porta spesso dei carboidrati legati chimicamente a delle molecole lipidiche o a delle proteine di membrana (es.: l'acido sialico nei gangliosidi o gli antigeni dei globuli rossi). Gli scambi dei prodotti metabolici avvengono mediante processi di citosi: L'endocitosi avviene quando parti della membrana si invaginano ed alla fine formano una vescicola interna al citoplasma; l'esocitosi avviene quando vescicole interne si fondono con la membrana ed il loro contenuto può essere restituito all'ambiente esterno.

Nucleo: il nucleo contiene gran parte del DNA della cellula e controlla i processi vitali; nella cromatina il DNA è associato a particolari proteine, esse sono chiamate istoni e sono proteine a carattere basico. La cromatina è organizzata in unità discrete: i cromosomi. Essi sono riconoscibili soltanto durante la divisione cellulare. L'80% del peso secco del nucleo è dato da proteine, il 10-15% da DNA, il 5% da RNA e circa il 3% da lipidi.

Hyaloplasma: è quella parte del citoplasma nella quale non si distinguono strutture; contiene enzimi solubili ed è sede di molti processi metabolici (fermentazione, glicolisi, sintesi di acidi grassi, legame di amminoacidi a t-RNA).

Ribosomi: sono il sito della sintesi proteica. Il loro diametro varia da 15 a 25 nm. Singoli ribosomi sono piuttosto rari, più spesso essi sono aggregati e formano i cosiddetti polisomi.

Microfilamenti: sono strutture costituite da due proteine: actina e miosina. Esse formano filamenti con funzione contrattile; altri filamenti hanno funzioni di citoscheletro.

Microtubuli: sono formati da una proteina (la tubulina, avente peso molecolare di 55000 daltons) riunita in complessi dove sembra che il calcio giochi un ruolo essenziale. I microtubuli fanno parte dello scheletro citoplasmatico, rendono possibile la citosi ed intervengono nei meccanismi di motilità cellulare, specialmente nella divisione nucleare.

Reticolo endoplasmatico: ha funzioni metaboliche (es.: sintesi di trigliceridi, fosfolipidi e steroidi), vi si formano le membrane (sintesi di lipidi di membrana), ed ha importanza nel trasporto intracellulare.

Apparato del Golgi: ha funzioni metaboliche. Le proteine sono trasformate in glicoproteine; gruppi solfato vengono legati a proteoglicani (es.: condroitin-solfato). Vi si sintetizzano i polisaccaridi, specialmente quelli che poi vengono utilizzati per formare pareti cellulari o sono escreti come mucillagini.

Lisosomi: sono vescicole riempite con enzimi idrolitici: es. fosfatasi, proteasi, nucleasi e lipasi.

Mitocondri: sono organelli della respirazione tipici degli organismi eterotrofi e producono molto dell'ATP usato dalla cellula. L'ATP è la molecola che trasporta l'energia chimica necessaria a favorire i processi della catena respiratoria, della fosforilazione ossidativa e della degradazione degli acidi grassi. I mitocondri contengono DNA circolare e sono organelli semiautonomi, nel senso che possono produrre parte delle proteine che sono loro necessarie.

Plastidi (Cloroplasti): sono gli organelli della fotosintesi tipici degli organismi autotrofi. Essi trasformano l'energia della luce solare in energia chimica e quindi sono tra i più importanti produttori di molecole organiche sulla terra. Si trovano in tutte le piante ad eccezione dei funghi. I plastidi contengono DNA e, come i mitocondri, sono organelli semiautonomi.

LIVELLI DI STRUTTURA NELLE MACROMOLECOLE DI INTERESSE BIOLOGICO

E' importante avere un'idea delle dimensioni e della complessità dei biopolimeri e degli aggregati molecolari di cui essi fanno parte. I pesi molecolari dei sistemi che verranno presi in esame vanno da 10^3 a 10^{12} Daltons. In molti casi il sistema è composto da molte macromolecole tenute insieme da legami non-covalenti .

Le informazioni strutturali che possono essere ottenute sui sistemi descritti nella tabella 1 dipendono dalla complessità dei sistemi stessi: per i più semplici si può arrivare alla risoluzione atomica, cioè si possono conoscere le coordinate dei singoli atomi ed avere una visione tridimensionale completa della macromolecola. Per i sistemi più complicati questo è difficile, ma, anche se fosse facile ottenere il numero di informazioni sperimentali necessarie per conoscere le singole posizioni atomiche, la mole di dati sarebbe così elevata da essere molto difficile da manipolare se non con l'ausilio di computer. In questo caso è bene dividere il sistema in regioni o subunità.

I residui monomerici che formano le proteine, gli acidi nucleici ed i polisaccaridi sono, rispettivamente, amminoacidi, nucleotidi e carboidrati. La struttura atomica di questi monomeri è generalmente nota. Si può definire l'identità di ogni singolo atomo, la posizione media dei nuclei nello spazio e localizzare la funzione di densità elettronica. Queste strutture non sono rigide, su di esse operano le vibrazioni molecolari e le rotazioni attorno ai legami covalenti, a patto che essi siano legami singoli.

La "configurazione" di un residuo monomerico consiste nella sua struttura atomica, che include la conoscenza della stereochimica dei centri chirali, cioè asimmetrici. La "conformazione" è una descrizione più completa che include le orientazioni preferenziali dei gruppi atomici che sono capaci di movimenti attraverso "rotazioni interne". In generale, la conformazione è una media sulle strutture molecolari energeticamente accessibili ed è la descrizione più completa possibile di una molecola sia isolata che in presenza di altre molecole, come per esempio avviene in soluzione.

Struttura primaria

La struttura covalente della catena polimerica dei biopolimeri può essere indicata come $R_1R_2...R_i...R_n$, dove R_i designa l'identità dell'*i*-esimo residuo della catena. Una caratteristica delle macromolecole naturali è quella di avere i residui legati tra loro con una "polarità" definita (si può dire "testa-coda"), per cui la sequenza $...R_aR_b...$ è diversa da $...R_bR_a...$, ed i due residui alle estremità della catena

macromolecolare hanno proprietà chimiche diverse. Per descrivere la struttura covalente si deve conoscere la sequenza e l'identità dei vari residui. Si deve tener presente che la struttura covalente totale della macromolecola può anche essere costituita da due o più catene unite da legami covalenti; come avviene per esempio attraverso i ponti disolfuro (-S-S-) nelle proteine.

La struttura covalente completa è chiamata "struttura primaria". Essa deve includere la specificazione della configurazione di tutti i centri asimmetrici sia sullo scheletro che sulle eventuali catene laterali, ma non implica la conoscenza delle conformazioni dei singoli residui o di parte della catena polimerica. Le strutture primarie vengono abbreviate per comodità con dei codici alfabetici, di cui vengono riportati qui alcuni esempi:

proteine: -Ala-Ser-Gly-

acidi nucleici: ..ApUpC..

polisaccaridi: ..-Fuc(1→2)-β-Gal(1→3)-β-GlcNAc..

Struttura secondaria

Molte catene di biopolimeri possono formare strutture tridimensionali localmente ordinate. Per un polimero lineare, avente unità monomeriche asimmetriche, il solo tipo di struttura tridimensionale ordinata possibile è un'elica. Essa contiene un asse di simmetria rototraslazionale.

Qui di seguito viene riportata una descrizione matematica di un'elica. Il sistema viene descritto in coordinate cilindriche che, data la simmetria che esso presenta, offre una rappresentazione più comoda. Ponendo l'asse di simmetria, che coincide con l'asse lungo del cilindro, nella stessa posizione dell'asse "z", la posizione del j-esimo residuo di catena, in un polimero elicoidale avente n+1 residui, è data da:

$$\begin{aligned} z_j &= jz_0 + \delta_z \\ x_j &= r \cos(2\pi j z_0/P + \delta) \\ y_j &= r \sin(2\pi j z_0/P + \delta) \end{aligned} \quad \text{per } j=0,1,2,\dots,n$$

i simboli usati hanno il seguente significato:

r = distanza di un residuo dall'asse z nel piano x-y

z_0 = distanza tra due residui proiettata sull'asse z

P = altezza di una spira dell'elica lungo l'asse z

δ_z e δ definiscono la posizione del residuo iniziale.

I valori dell'argomento del cos e del sin si ottengono dalla semplice relazione :

$$2 \pi : P = x : j z_0 \quad \text{quindi} \quad x = 2 \pi j z_0 / P.$$

Le formule precedenti hanno i seguenti tre casi particolari:

- 1) $r = 0$; una fila lineare di punti spazati di z_0 su z .
- 2) $P = z_0$; una fila lineare di punti spazati di z_0 e spostati di r rispetto a z .
- 3) $P = 2 z_0$; un'elica planare a zig-zag.

La quantità P/z_0 è il numero di monomeri per spira; non è necessario che essa sia un numero intero. Un'elica con n monomeri per spira è chiamata n -aria (Un polipeptide in α -elica è un'elica 3,6-naria). Strutture elicoidali multiple possono essere formate dall'unione di più eliche singole: in questo caso possiamo avere eliche doppie o triple, che sono abbastanza comuni in natura. Queste possono essere descritte con la stessa matematica, ma dobbiamo assumere diversi valori di δ e δ_z per ciascuna componente elicoidale.

La struttura secondaria di un biopolimero è definita come l'elencazione di quelle regioni della struttura primaria che siano coinvolte in eliche di qualsiasi tipo. Più in generale, la struttura secondaria è una lista di tutte le regioni tridimensionali che localmente sono caratterizzate da catene ordinate e simmetriche. In realtà si devono specificare quali residui della struttura primaria sono coinvolti in strutture secondarie. Quei residui che non sono coinvolti in strutture secondarie sono detti essere in conformazioni casuali (in inglese: random conformations oppure random coil conformations), anche se questo termine usato in questo contesto è molto improprio.

Struttura terziaria

La "struttura terziaria" di un biopolimero consiste nella struttura tridimensionale completa di una sua unità indivisibile. La struttura terziaria comprende una descrizione sia delle strutture secondarie che della locazione spaziale di tutti i residui. Spesso il termine "conformazione" viene utilizzato come sinonimo di struttura terziaria, infatti se si conoscono tutte le conformazioni dei residui (cioè gli angoli di rotazione interni) si conosce anche la struttura terziaria. Spesso i problemi che coinvolgono la struttura terziaria di una proteina non necessitano di informazioni dettagliate a livello atomico, per esempio potrebbero riguardare la conoscenza dei soli residui di amminoacidi di una proteina che sono situati sulla superficie esterna.

Struttura quaternaria

Il più alto livello di struttura che si considera è la "struttura quaternaria". Essa è formata dall'associazione di unità indipendenti ciascuna caratterizzata da struttura terziaria. Per esempio l'emoglobina, la proteina che è contenuta nei globuli rossi del sangue, consiste di quattro subunità uguali a due a due e chiamate α e β , ciascuna delle quali è una singola catena polipeptidica che lega un gruppo eme. Il tetramero $\alpha_2\beta_2$ (peso molecolare 66000) può essere dissociato in due dimeri:



In condizioni più drastiche i dimeri possono essere dissociati in monomeri.

Una tipica struttura quaternaria è il "ribosoma". Questo è un organello presente nelle cellule ed è sede del processo della sintesi proteica; nel caso del microorganismo chiamato *Escherichia coli* il ribosoma contiene tre molecole di RNA e circa 55 catene proteiche differenti (peso molecolare totale: $2,6 \times 10^6$). Il peso di questo organello viene espresso in unità S (Svedberg) utilizzate in esperimenti di velocità di sedimentazione mediante ultracentrifuga. L'intero ribosoma (70 S) viene facilmente separato in due subunità (30 S e 50 S); in condizioni più drastiche può essere separato nei suoi componenti elementari.

PROBLEMI CONNESSI CON LA DETERMINAZIONE DELLE PROPRIETA' CHIMICHE E CHIMICO-FISICHE DEI BIOPOLIMERI

Vengono riportate e discusse qui di seguito alcune problematiche generali che si incontrano spesso nello studio dei biopolimeri.

Il composto è puro? La sua composizione è omogenea?

Questo problema può essere risolto attraverso misure di peso molecolare mediante tecniche quali: ultracentrifugazione, elettroforesi, cromatografia di esclusione per dimensioni. Un'analisi più dettagliata sull'omogeneità chimica richiede specifiche analisi chimiche spesso accompagnate da misure spettroscopiche (p. es. proteine contaminate da acidi nucleici; polisaccaridi contaminati da proteine). Spesso le piccole molecole sono "contaminanti" difficili da eliminare, a volte è semplicemente impossibile (es. controioni nei polielettroliti). Spesso esse sono necessarie all'attività biologica.

E' nativo? E' completo?

Questa domanda si riferisce al problema di sapere se un biopolimero isolato ha la stessa struttura e le stesse proprietà che avrebbe se fosse all'interno di una cellula vivente. Sappiamo che in molti casi la risposta è "no". Si pensi solo ai danni che possono essere apportati durante la fase di purificazione.

Quale è la sua struttura?

Questo problema può essere trattato a diversi livelli. Infatti, conoscere la struttura primaria di un biopolimero coinvolge una serie di analisi biochimiche; conoscere la struttura secondaria spesso coinvolge studi spettroscopici (dicroismo circolare, risonanza magnetica); la struttura terziaria è accessibile mediante studi di diffrazione dei raggi X su cristallo singolo. In alcuni casi, anche in assenza di struttura cristallina, alcune informazioni strutturali utili possono essere ricavate da tecniche sperimentali, quali: la microscopia elettronica, misure idrodinamiche e qualche metodo spettroscopico.

Si può predire la struttura?

Questo problema verrà trattato con un certo dettaglio durante il corso. Esso coinvolge spesso una mole enorme di calcolo mediante grandi calcolatori; raramente si arriva ad una soluzione sicura e comunque c'è bisogno di un certo numero di dati sperimentali. La domanda può essere riformulata in molti modi. Per esempio: data una struttura primaria, e la possibilità di diverse scelte fra strutture secondarie, si può predire lo schema generale della struttura secondaria (o delle strutture secondarie) che si formerà in condizioni date? Per una proteina, questo vuol dire conoscere quali residui sono coinvolti in α -eliche, quali vanno a far parte di aggregati di eliche β . Oppure, per un acido nucleico, quali residui sono coinvolti in doppie eliche.

Per fare questo tipo di predizioni è necessario sapere in che modo le diverse catene laterali influiscono sull'energia conformazionale della struttura secondaria, ed è anche necessario avere a disposizione un metodo per valutare tutte le possibili disposizioni strutturali del frammento della molecola in studio. Il secondo stadio nella predizione di strutture consiste nel tentare di passare direttamente dalla sola conoscenza della struttura primaria alla determinazione della struttura secondaria e poi terziaria della macromolecola. La complessità matematica di questo lavoro è notevole, se non addirittura impossibile, oggi. Tuttavia sono stati fatti dei progressi nella predizione del modo in cui proteine, acidi nucleici e polisaccaridi possano ripiegarsi nello spazio fino ad assumere una certa conformazione, partendo da

approssimazioni o semplificazioni ragionevoli. **Si deve ammettere, però, che una vera predizione di una struttura terziaria di un polimero non è ancora stata ottenuta.**

Un po' più semplice potrebbe essere predire una struttura quaternaria, una volta nota la struttura terziaria. In generale, si può prevedere per il futuro un notevole sviluppo dei metodi di predizione delle strutture conformazionali, non tanto basate su calcoli "a priori", ma piuttosto facendo uso di tutte le informazioni strutturali disponibili in modo da raggiungere un notevole dettaglio della descrizione. Una domanda strettamente correlata alla precedente è la seguente: in che modo un frammento di biopolimero va ad influenzare la struttura di un altro frammento? Facendo un caso concreto: è possibile che un segmento di proteina in α -elica possa perdere la sua conformazione secondaria senza influenzare il resto della molecola? Spesso è possibile rispondere a queste domande anche dal punto di vista sperimentale, p. es. isolando il frammento della proteina in questione mediante metodi enzimatici e verificando cosa succede. Dati di questo tipo possono poi essere utilizzati come condizioni al contorno di metodi generali per la previsione di strutture.

Se una piccola perturbazione è capace di causare una grande variazione nella struttura secondaria e terziaria di una macromolecola si dice che si è in presenza di una "transizione strutturale cooperativa". Una transizione strutturale di questo tipo implica che regioni della macromolecola differenti e, probabilmente, distanti abbiano interazioni termodinamiche significative.

La molecola è rigida o flessibile?

Tutte le molecole sono, almeno un po', flessibili. In una molecola grande è interessante sapere se avvengono dei movimenti a livello delle catene laterali oppure se questi coinvolgono parti più grandi della molecola ("dominii molecolari"). Alcune macromolecole, come l'emoglobina, posseggono un certo numero, discreto, di conformazioni accessibili; questa possibilità viene utilizzata a livello di "regolazione delle funzioni biologiche". A volte le macromolecole possono esistere in un numero grande di diverse conformazioni che coinvolgono tutta la macromolecola; come esempio in una proteina "denaturata" o in un polimero nello stato di "gomitolo statistico" (in inglese "random coil"). In questi casi è possibile descrivere solo una struttura media del sistema e bisogna ricorrere ai metodi della termodinamica statistica.

Un modo per studiare la varietà delle conformazioni accessibili ad una macromolecola consiste nel variare il suo "intorno chimico". Si può infatti ragionevolmente immaginare che variazioni di temperatura, pH, concentrazione salina e del solvente abbiano la potenzialità di causare variazioni di

struttura. Una sensibilità preferenziale ad una di queste variabili spesso fornisce un indizio importante sul tipo di interazione "non-covalente" che è responsabile del mantenimento di una particolare struttura, piuttosto di un'altra.

Il modello più semplice di una molecola che riconosca e si leghi ad un singolo sito di legame su di una macromolecola è quello di immaginare un "templato" (cioè una stampo) rigido che si adatti precisamente al sito di legame. A volte però le interazioni specifiche sono "assistite" dalla flessibilità sia del substrato che della macromolecola.

E' possibile riconoscere schemi strutturali simili?

Spesso, anche se non si può predire la struttura accuratamente, è possibile trovare elementi strutturali che rispondono a schemi piuttosto generali. Per esempio, nelle proteine globulari può essere definito, anche se in modo approssimato, un "dentro" ed un "fuori". Certe catene laterali di amminoacidi non vengono mai trovate all'interno di una proteina. Gruppi carichi, come quelli della lisina e dell'arginina, sono generalmente solvatati e nel loro intorno immediato si trovano controioni. Portare un gruppo chimico di questo tipo all'interno della proteina vuol dire perdere l'energia di solvatazione, ma in più si deve pagare un alto prezzo in termini di energia elettrostatica. Infatti l'attrazione tra due cariche di segno opposto è data approssimativamente da $e^2/\epsilon r$ e poichè la costante dielettrica (ϵ) all'interno della proteina è circa 20 volte più piccola di quanto sia all'esterno, l'unico modo vantaggioso di portare un gruppo elettricamente carico all'interno della proteina è quello di sistemarsi vicino un controione alla minore distanza possibile.

Per gli acidi nucleici e le proteine, per i quali esiste già un numero considerevole di dati strutturali, si nota una certa tendenza per molecole diverse ad assumere strutture sorprendentemente uguali. Per questo motivo è sempre interessante paragonare nuove strutture con quelle già determinate; se si trovano elementi di similitudine importanti con altri sistemi, questi possono aiutare a far capire il meccanismo biochimico di cui fanno parte i primi. Una possibile spiegazione di queste analogie strutturali nei biopolimeri può essere trovata nel concetto di "evoluzione convergente". Secondo questa ipotesi si può pensare che certe strutture biologiche rappresentino una delle migliori risposte a problemi funzionali, tanto che molecole originariamente distanti da questo optimum si sono evolute verso quello stato in risposta ad una "pressione selettiva".

Come si formano le strutture dei biopolimeri?

Tralasciando le strutture primarie, per le quali i problemi coinvolti sono sostanzialmente di natura biochimica, e le strutture secondarie, di cui si parlerà diffusamente in seguito, i problemi sorgono quando si parla di strutture terziarie e quaternarie. I meccanismi con cui queste strutture si formano sono complicati ed a volte anche controversi. Un certo numero di conformazioni particolari di acidi nucleici e proteine possono formarsi spontaneamente in provetta. Questi esperimenti vengono effettuati partendo da una struttura terziaria nativa, denaturandola quanto più possibile, e poi rimuovendo le condizioni di denaturazione. **Il monitoraggio della ricomparsa della struttura originale o dell'attività biologica della molecola è una conferma del recupero della struttura terziaria.**

In genere le strutture così ricostruite sono identiche in tutto a quelle native, dalle quali si è partiti. In qualche caso è possibile riconoscere un cammino a "stadi" lungo la via della ricostruzione della struttura terziaria, il che può aiutare la comprensione del fenomeno. Tuttavia, per qualche sistema non è ancora chiaro se l'ottenimento di una struttura terziaria particolare è un processo di tipo termodinamico oppure cinetico. Nel primo caso si ha a che fare con una struttura terziaria finale che corrisponde a quella termodinamicamente più stabile tra tutte le strutture possibili: in qualche modo, nel processo di selezione, la molecola ha esplorato l'insieme di tutte queste strutture.

Il processo guidato dalla cinetica significa che solo un piccolo numero di strutture intermedie viene raggiunto dalla molecola man mano che questa procede attraverso un cammino segnato da basse barriere cinetiche, fino al raggiungimento della struttura finale. Il risultato di questo processo consiste nel fatto che la struttura finale può essere metastabile invece di essere quella ad energia più bassa per il sistema.

Lo stesso tipo di considerazioni, ma anche di incertezze, può essere applicato al caso delle strutture quaternarie, tenendo presente che queste possono essere anche molto complicate. Come nel caso delle strutture terziarie, il problema di maggior interesse dal punto di vista biologico è capire se la "ricostruzione" in vivo procede con lo stesso meccanismo di quella in vitro. Rispondere a questa domanda è difficile.

LA FUNZIONE BIOLOGICA DEI BIOPOLIMERI

Come si vedrà, in tutto il corso il nodo centrale del discorso sarà sempre la relazione che esiste tra struttura e funzione. Qui di seguito verranno discusse alcune domande che riguardano le problematiche generali circa la funzione delle molecole biologiche.

Si può predire o razionalizzare la funzione?

Comprendere il funzionamento di una biomolecola partendo dalla sua struttura è compito difficile se non impossibile, specie se si vuole andare nel dettaglio dei meccanismi biochimici nei quali è coinvolta quella molecola. Per esempio, una volta supposta nota la struttura del "sito attivo" della Chimotripsina, si può arrivare alla conclusione che siamo in presenza di un "enzima idrolitico"? Ed in più, si può predire che la velocità di idrolisi è molto diversa per esteri e per ammidi? Forse un approccio più realistico a questa domanda sarebbe il capire quali informazioni, accanto a quelle strutturali, sono necessarie per arrivare a comprendere le funzioni biochimiche.

Generalmente per ricostruire un meccanismo di azione plausibile per un enzima sono necessari sia dati termodinamici che cinetici, oltre a quelli strutturali. C'è una grande differenza nel riconoscere che un processo è strutturalmente plausibile ed affermare che esso è anche energeticamente e cineticamente possibile e quindi, possa avere importanza biologica.

E' l'intera struttura funzione necessaria alla funzione?

La domanda può essere riferita a ciascuno dei livelli di struttura descritti nel capitolo precedente. Per esempio, è la sola struttura quaternaria intatta che può compiere certe funzioni oppure subunità isolate potrebbero compiere lo stesso lavoro? Se è così, a quale subunità può essere assegnata una certa funzione? In molti casi nella struttura quaternaria nativa ciascuna subunità altera in qualche modo le proprietà delle altre subunità: per esempio, nel caso si sia in presenza di un enzima, vengono aumentate le velocità catalitiche intrinseche.

Quali caratteristiche della struttura terziaria sono necessarie per una particolare funzione e quali sono irrilevanti? In generale l'intera struttura terziaria sembra essere necessaria per le funzioni di molte proteine ed acidi nucleici. Paragonando le strutture delle forme native e denaturate è possibile, qualche volta, riconoscere le caratteristiche delle strutture terziarie che devono essere in una disposizione particolare per dare attività biologica.

Per una molecola polifunzionale, una denaturazione strutturale progressiva spesso permette di riconoscere ed assegnare differenti ruoli strutturali a differenti regioni. E' buona regola nello studio dei processi biologici ipotizzare che l'intera struttura primaria abbia un ruolo funzionale. Se non lo avesse sarebbe difficile capire perchè il processo selettivo dell'evoluzione non abbia causato la "delezione" di quelle parti della molecola che non sono essenziali. Per esempio, parte della struttura può servire a

dirigere altre parti verso l'opportuno ripiegamento della molecola in modo da arrivare alla struttura terziaria corretta.

Con quali altre molecole i biopolimeri possono interagire?

In genere il primo indizio di un'interazione tra di una macromolecola ed una tra le migliaia di altre molecole biologiche, piccole o grandi che siano, viene da studi funzionali. A quel punto è spesso necessario conoscere quante molecole di un certo tipo possono interagire simultaneamente, quanto forte sia il loro legame, e se tutte si legano allo stesso modo. A queste domande si può rispondere sia con misure termodinamiche sull'interazione (p.es. con equilibri di dialisi), sia con un certo numero di metodi spettroscopici, più o meno diretti. Studi più rigorosi esamineranno poi la termodinamica e la cinetica del processo di legame.

Se la macromolecola interagisce specificamente con un certo numero di altre molecole, allora è interessante conoscere quanto la presenza di una di queste molecole influisce sul legame con le altre. Un legame "competitivo" suggerisce o che siano coinvolti gli stessi siti di legame oppure che ci si trovi di fronte a siti di legame diversi che si escludono a vicenda. Questo ultimo caso può esistere se il legame con una molecola causa delle variazioni strutturali che deformino il sito di legame di un'altra molecola. In alternativa, il legame può essere "cooperativo": la presenza di una molecola piccola può stimolare il legame con altre, sia dello stesso tipo che di tipo completamente diverso. Spesso capire come questo sia possibile richiede una serie di studi estremamente raffinati per riconoscere variazioni strutturali anche molto piccole. Nel caso dell'emoglobina, per esempio, perchè questo succeda è necessario che vi siano variazioni strutturali indotte all'interfaccia tra le quattro subunità: è stato verificato infatti, che quando l'ossigeno si lega ad un gruppo eme della molecola di emoglobina, l'atomo di ferro di questo gruppo si sposta; questo spostamento provoca una serie di piccole variazioni nella struttura terziaria che alla fine producono una variazione della struttura dell'interfaccia tra subunità.

Come viene regolata una certa funzione?

Una caratteristica fondamentale di molti processi biologici è la tendenza all'"omeostasi", cioè la tendenza di un organismo a resistere oppure compensare variazioni del proprio intorno. La capacità che le molecole biologiche hanno di replicarsi e di catalizzare una vasta rete di reazioni porta inevitabilmente con sé il rischio dell'instabilità chimica. Chiaramente gli organismi biologici hanno imparato a controllare la

loro chimica in modo tale da sintetizzare la giusta quantità di materia, di usare efficacemente l'energia disponibile e di addolcire convenientemente le variazioni di un certo numero di parametri ambientali. Le funzioni di molte molecole biologiche sono dedicate al controllo della risposta alle diverse necessità dell'organismo. Questa "regolazione" può avvenire a diversi livelli.

Consideriamo l'attività di un enzima nella cellula. Un primo livello di controllo consiste nel regolare la quantità totale di enzima presente. Un altro parametro da controllare è la frazione attiva della quantità totale di enzima. Questo parametro può essere controllato, per esempio, per mezzo di un equilibrio fra strutture quaternaria che corrispondono, rispettivamente, alla forma attiva ed a quella inattiva. Gli equilibri relativi possono essere regolati da "effettori", cioè da molecole che non partecipano direttamente alla funzione catalitica dell'enzima, ma, interagendo con esso sono capaci di trasformarlo da una conformazione attiva ad una inattiva.

L'attività di un enzima può anche essere controllata diminuendo il numero di siti catalitici disponibili cioè riempiendone qualcuno con molecole di "inibitore". L'attività può essere aggiustata cambiando la forza del legame delle molecole che sono coinvolte nella catalisi, cambiando la loro velocità di associazione o di rilascio, oppure alterando la velocità catalitica intrinseca dell'enzima. L'attività effettiva può anche essere controllata in modi più complicati, p. es. regolando la quantità di molecole di "substrato" sulle quali agisce l'enzima oppure controllando la loro dislocazione nella cellula.

Lo stesso tipo di considerazioni vale anche nel caso di proteine e di acidi nucleici che non abbiano ruoli catalitici. Nel caso dell'emoglobina, p. es., la molecola di difosfoglicerato (DPG) lega specificamente la forma deossigenata della proteina; in questo modo stabilizza questa forma rispetto a quella che lega l'ossigeno e quindi rende più difficile il legame dell'ossigeno ad una data concentrazione di gas. Nella figura è mostrato l'effetto della concentrazione del DPG sul legame dell'ossigeno. L'emoglobina porta l'ossigeno dai polmoni ai capillari in tutti i tessuti del corpo. La quantità di ossigeno che l'emoglobina lega nei polmoni è determinata dalla pressione parziale dell'ossigeno nell'aria: questa è circa 100 torr al livello del mare. Nei capillari l'emoglobina rilascia l'ossigeno per raggiungere un nuovo equilibrio determinato dalla pressione parziale dell'ossigeno disciolto nei tessuti, che è di circa 30 torr. Il DPG sposta la curva del legame dell'ossigeno dell'emoglobina situata all'interno dell'eritrocita. A causa della forma di questa curva di legame, un aumento della concentrazione di DPG spinge l'emoglobina a rilasciare ossigeno più efficacemente alle basse pressioni parziali di ossigeno.

In definitiva, una delle risposte immediate dell'organismo al decrescere della pressione parziale dell'ossigeno (p.es. con l'altezza sul livello del mare) consiste nell'aumento del livello di DPG. Una

soluzione a lungo termine consiste nel sintetizzare più emoglobina ed aumentare il numero degli eritrociti. Questo processo avviene realmente, ma è lento e richiede numerosi giorni, mentre l'aumento del livello di DPG avviene in ore.

L'organismo dispone di una serie di molecole grandi e piccole che sono disegnate per il solo scopo del controllo. Queste comprendono ormoni steroidei e peptidici, nucleotidi ciclici e le proteine che li sintetizzano o li riconoscono. La funzione di altre macromolecole è quella di mantenere la struttura della cellula oppure di controllare il trasporto di materiale all'interno o all'esterno della cellula.

STRATEGIE DI BASE NELLO STUDIO DI BIOPOLIMERI

Molte delle domande che sono state poste nei paragrafi precedenti richiedono una mole notevole di lavoro per ottenere delle risposte. Sarebbe comunque un lavoro difficile, anche nel caso di molecole piccole, ma la complessità delle strutture molecolari grandi impone dei vincoli severi ai possibili esperimenti ed ingigantisce lo sforzo necessario per ogni esperimento: **in pratica l'ostacolo più serio è il gran numero di variabili presenti nel sistema.** Esse consistono nel numero enorme di parametri che sono necessari per definire la struttura di una macromolecola e nel gran numero di variabili chimico- fisiche, che agiscono sulla macromolecola o sul suo intorno, che sono potenzialmente rilevanti per determinarne la funzione. Poiché il numero degli esperimenti possibili aumenta in modo geometrico con il numero delle variabili, la possibilità di scegliere a caso un esperimento significativo diventa molto bassa. Inoltre, anche se fosse stato effettuato un gran numero di esperimenti, risulta abbastanza difficile concettualmente visualizzarne in modo unitario i risultati.

In conclusione, è necessario rendere il sistema un po' più semplice al fine di effettuare uno studio chimico-fisico dettagliato; la strategia essenziale di questo processo di semplificazione è nota: isolare una porzione della struttura, una variabile o un fenomeno, controllare il resto o cercare di tenerlo costante, cosicché, di volta in volta, possa essere analizzato o capito un aspetto particolare. Per portare avanti questa strategia sono a disposizione soltanto un numero ristretto di strade.

a) Usare sistemi più piccoli come modelli.

Per esempio, utilizzare frammenti di DNA, di RNA, di proteine o di polisaccaridi.

b) osservare solo una parte del sistema.

Lavorare con frammento fisico dell'intero sistema comporta sempre il rischio che esso non si comporti nello stesso modo in cui si comporta l'intero sistema. La strada alternativa è quella di trovare un modo per osservare solo una parte per volta dell'intero sistema intatto. Questo è lo scopo fondamentale degli studi che coinvolgono "sonde" o "marcatori". A volte la macromolecola contiene una sonda "naturale" come per esempio un metallo di transizione facente parte di un sito funzionale oppure complessato in una posizione vicina, oppure contiene un gruppo prostetico "colorato", p.es. il gruppo "eme" della emoglobina. Alternativamente, lo sperimentatore può introdurre una sonda in un certo punto della struttura per mezzo di un legame covalente oppure non-covalente. Il tipo di sonda utilizzato determinerà quali caratteristiche dell'intorno essa può rivelare. Queste possono essere: polarità, flessibilità, presenza di residui specifici nella macromolecola o di altre molecole legate, dettagli della conformazione o della struttura elettronica, natura del legame con la macromolecola.

C'è ovviamente un rischio inerente a tutti gli studi che si basano sull'inserimento di una sonda: questa può perturbare la struttura della macromolecola; la regione che più probabilmente sarà perturbata sarà quella immediatamente vicina alla sonda e che sfortunatamente è anche quella sulla quale si vogliono avere informazioni.

c) Paragonare due sistemi simili.

Casi di similarità sono diffusi tra i biopolimeri. Per esempio succede tra proteine (citocromo C ed emoglobina) o tra alcuni RNA (RNA di trasporto), anche isolati da specie differenti. Spesso in questi casi sia le strutture che le proprietà funzionali sono simili e quindi si può individuare una relazione diretta tra struttura e funzione; non è difficile allora cercare di capire quali domini strutturali siano necessari per la funzione. A volte potrebbe essere più interessante paragonare strutture simili che non hanno la stessa funzione: p.es. alcuni "t-RNA" coinvolti nella sintesi di peptidoglicani delle pareti cellulari batteriche presentano delle caratteristiche strutturali proprie rispetto a quelle di molecole simili (t-RNA) che partecipano alla sintesi proteica sui ribosomi. Allo stesso modo, esistono proteine che hanno strutture omologhe, ma funzioni differenti: p.es. le "esterasi" della serina (chimotripsina, tripsina, elastasi, etc.).

Una strategia particolarmente efficace per isolare delle variabili strutturali e funzionali critiche consiste nello studio di proteine o acidi nucleici mutanti. Questi hanno il vantaggio di avere delle diversità solo in uno o pochi amminoacidi o nucleotidi: molto spesso queste piccole differenze hanno un tale effetto sulla funzione da poter far identificare le specie biologiche relative come mutanti. Oggi, problemi di

questo tipo vengono affrontati attraverso l'ingegneria genetica, tuttavia sono ben noti casi naturali correlabili a quadri clinici ben definiti, p.es. questo è il caso dell'emoglobina S che causa **anemia falciforme**. Un altro caso paradigmatico è quello **dell'emoglobina di Sidney** che ha un'unica variazione nella composizione in amminoacidi: una alanina al posto di una valina nella 67-esima posizione della catena β . Il fenotipo risultante che si osserva clinicamente è affetto da "anemia emolitica": i globuli rossi sono fragili e si rompono facilmente. Quando queste molecole di emoglobina furono purificate e studiate in laboratorio si è trovato che il gruppo eme relativo alle catene β è legato debolmente e tende a dissociarsi dalla proteina. Questa proprietà ha due conseguenze: la proteina senza eme è meno efficace come trasportatrice di ossigeno sia perchè manca di due gruppi eme, sia perchè varia l'entità del rilascio a livello dei capillari. Inoltre l'eme rilasciato è dannoso: esso probabilmente interagisce con le membrane delle cellule di eritrocita aumentandone la fragilità. L'interpretazione molecolare dell'instabilità del legame dell'eme nell'emoglobina di Sidney è immediata. . Nell'emoglobina normale la valina in questione forma è coinvolta nella formazione di una tasca nella quale si lega l'eme. L'affinità del gruppo eme per questa è dovuta anche alla tendenza dell'eme di preferire un ambiente idrofobico a quello acquoso. L'alanina presente nell'emoglobina mutante rende la tasca troppo stretta per l'interazione del gruppo eme.

In mancanza di altre possibilità possono essere introdotte delle modificazioni chimiche che però in genere sono piuttosto difficili soprattutto per la scarsa specificità.

d) Isolare stati discreti del sistema

Molti biopolimeri possono esistere in un certo numero di conformazioni differenti che sono stabilizzate in modo diverso da qualcuno dei comuni parametri chimico-fisici (T, pH, forza ionica). Se lo scopo della ricerca è uno studio strutturale dettagliato, è necessario lavorare con una forma pura per volta. Tuttavia può essere molto utile esplorare un certo numero di condizioni per determinare gli intervalli nei quali le singole conformazioni sono stabili e per quali valori di questi parametri avvengono le transizioni conformazionali. Poichè molte variazioni strutturali nelle macromolecole avvengono in un intervallo molto stretto delle variabili in gioco, ciascuno stato può essere visto come una fase del sistema e le variazioni conformazionali possono essere chiamate transizioni di fase. Tutte le conoscenze sugli effetti dell'intorno del sistema possono essere dunque riunite in un "diagramma di fase". Il punto fondamentale consiste nel fatto che, una volta disponibile il diagramma di fase, esso ci dice subito in quali intervalli di parametri chimico-fisici sia possibile studiare stati puri, ed in quali altri sia possibile studiare le transizioni

conformazionali. Si deve però sottolineare che, se le variazioni conformazionali avvengono gradualmente in un largo intervallo di condizioni, risulta difficile costruire il diagramma di fase.