Principi di bioingegneria
Lezione 3
Biomolecole

Gabriele Maria Fortunato

gabriele.fortunato@unipi.it

UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

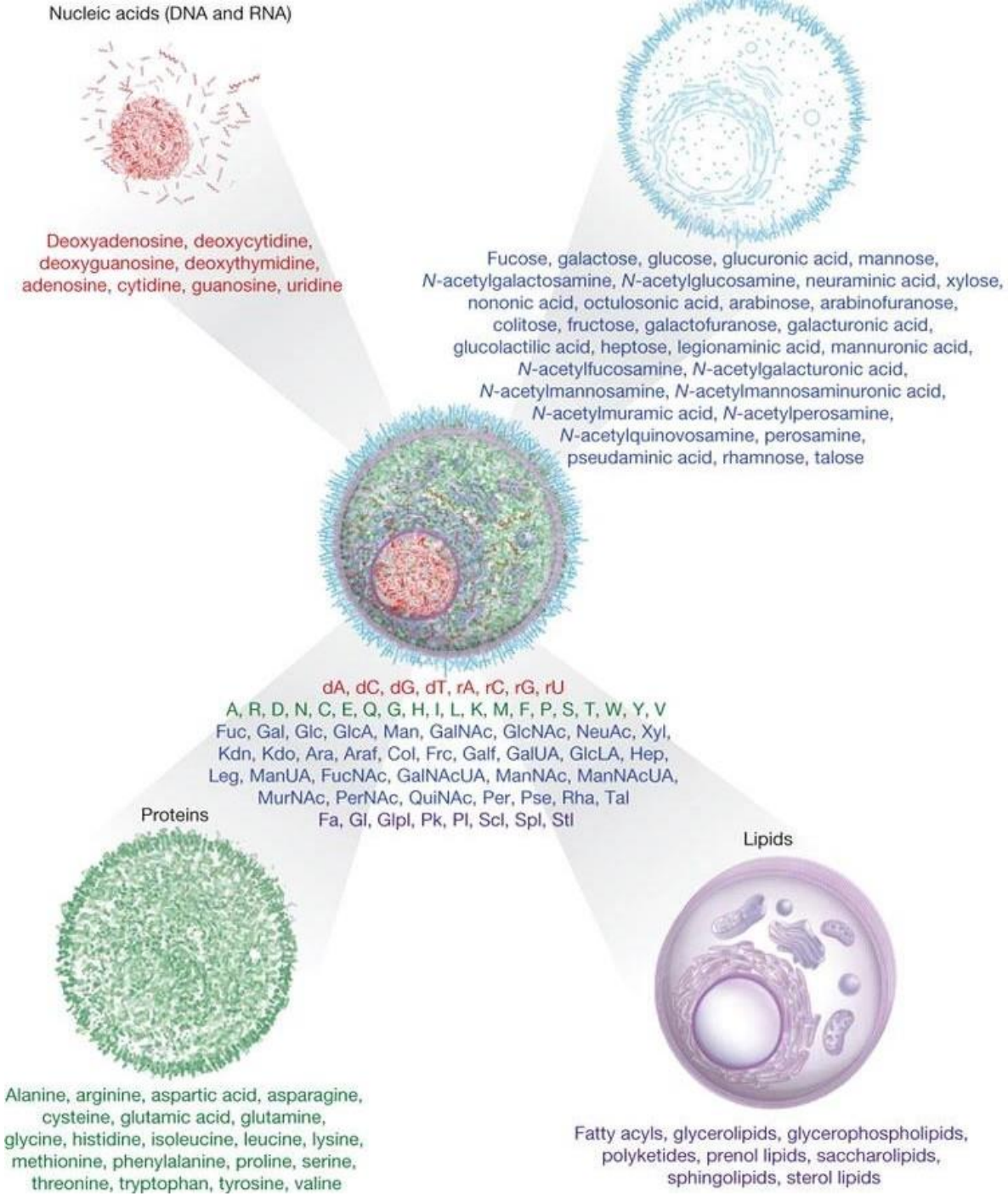
Research Center E. Piaggio
University of Pisa

Overview programma

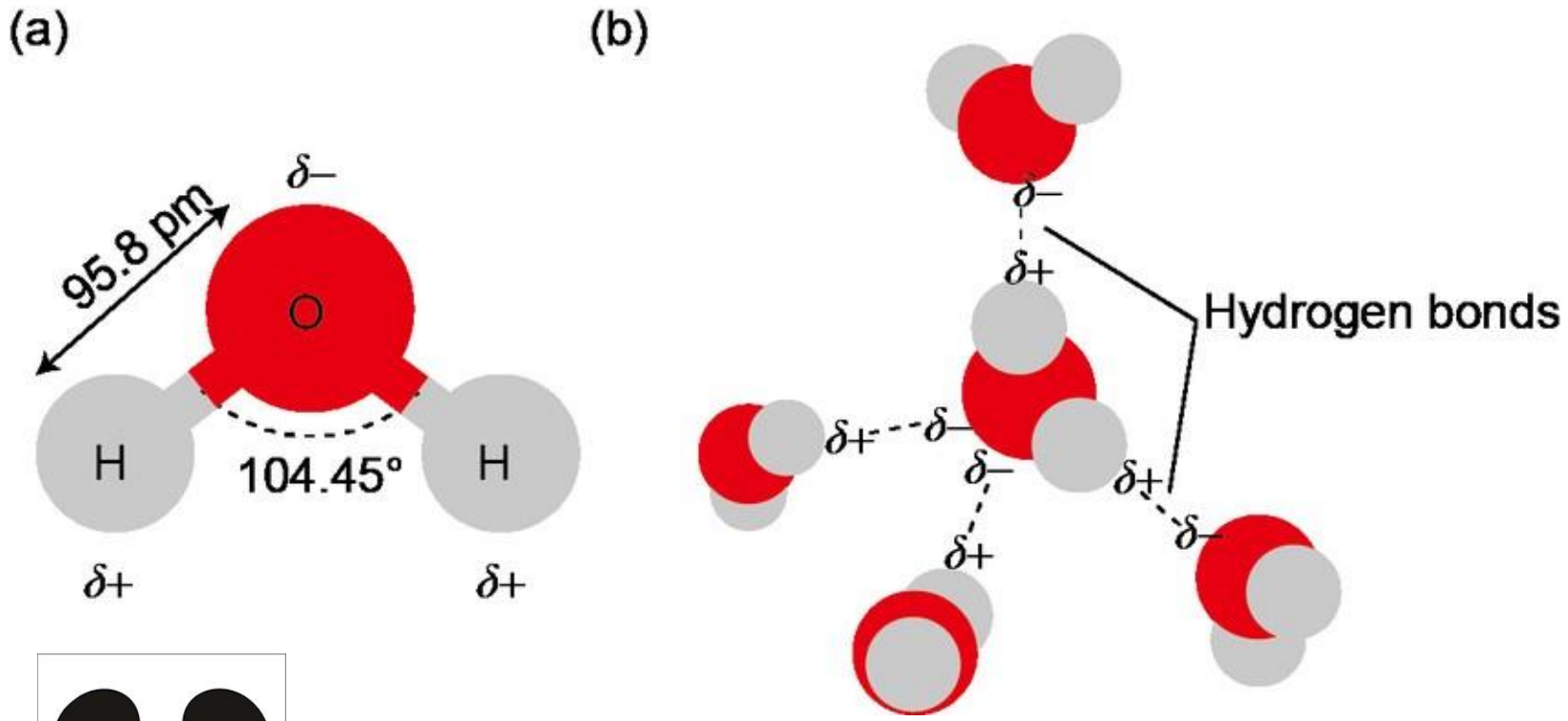
- Biomolecole (2x esercitazioni)
- Cellula
- Tessuti
- Uomo standard e tecniche di misurazione parametri fisiologici
- Catena di acquisizione segnali biomedicali
- Analisi dimensionale ed errori di misura
- Caratterizzazione meccanica dei materiali (2x esercitazioni)
- Caratterizzazione elettrica dei materiali (1x esercitazione)
- Cenni su proprietà ottiche ed elettromagnetiche

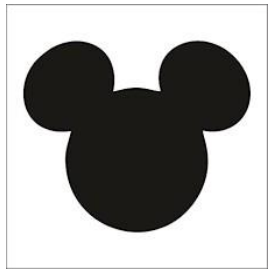
Le biomolecole principali

- lipidi
- proteine
- acidi nucleici
- carboidrati

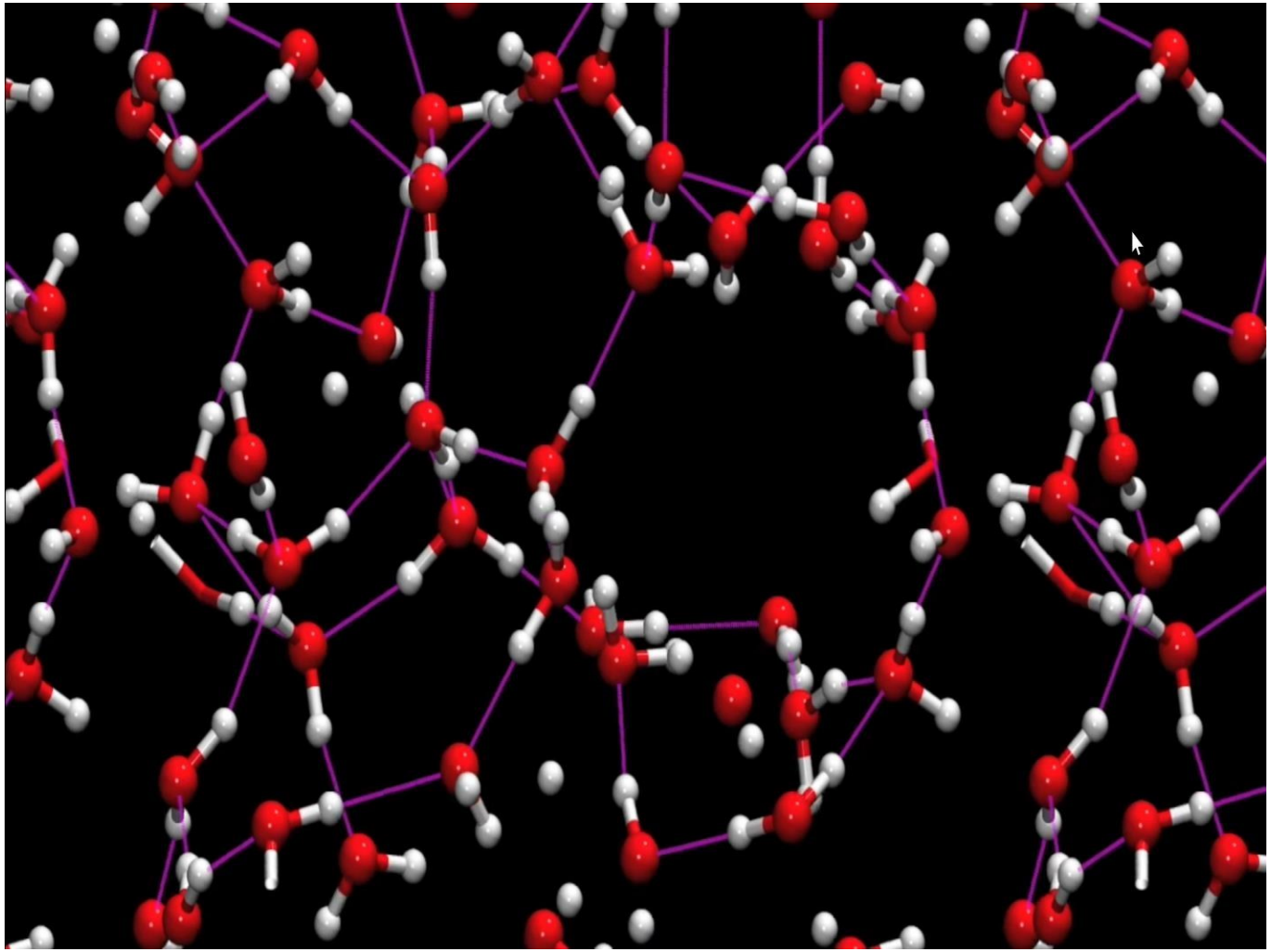

Nucleic acids (DNA and RNA)
Deoxyadenosine, deoxycytidine,
deoxyguanosine, deoxythymidine,
adenosine, cytidine, guanosine, uridine
Fucose, galactose, glucose, glucuronic acid, mannose,
N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, neuraminic acid, xylose,
nononic acid, octulosonic acid, arabinose, arabinofuranose,
colitose, fructose, galactofuranose, galacturonic acid,
glucolactilic acid, heptose, legionaminic acid, mannuronic acid,
N-acetylfucosamine, N-acetylgalacturonic acid,
N-acetylmannosamine, N-acetylmannosaminuronic acid,
N-acetylmuramic acid, N-acetylperosamine,
N-acetylquinovosamine, perosamine,
pseudaminic acid, rhamnose, talose
dA, dC, dG, dT, rA, rC, rG, rU
A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V
Fuc, Gal, Glc, GlcA, Man, GalNAc, GlcNAc, NeuAc, Xyl,
Kdn, Kdo, Ara, Araf, Col, Frc, Galf, GalUA, GlcLA, Hep,
Leg, ManUA, FucNAc, GalNAcUA, ManNAc, ManNAcUA,
MurNAc, PerNAc, QuiNAc, Per, Pse, Rha, Tal
Fa, Gl, Glpl, Pk, Pl, Scl, Spl, Stl
Proteins
Alanine, arginine, aspartic acid, asparagine,
cysteine, glutamic acid, glutamine,
glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine,
methionine, phenylalanine, proline, serine,
threonine, tryptophan, tyrosine, valine
Lipids
Fatty acyls, glycerolipids, glycerophospholipids,
polyketides, prenol lipids, saccharolipids,
sphingolipids, sterol lipids

La biomolecola più importante ma meno riconosciuta





Mickey Mouse



Proprietà

- Tensione superficiale
- Capacità termica
- Temperatura
- Densità

Energia (1 kcal=4.2 J)

ATP: 12 kcal/mol

vibrazione termica RT :0.6 kcal/mol

dissoc legame C-C: 83 kcal/mol

Ossidazione glucosio: -3000 KJ/mol (700 kcal/mol)

legami deboli: ~3 kcal/mol

Tempi

visione: 10 ps

rotazione proteine: 5 ns

disassociazione di DNA : 1 μ s

reazione enzimatica : ms

sintesi proteica: pochi s

generazione di batteri: 1 ora

Dimensioni

Legame O-H 0.1 nm

legame C-C: 0.154 nm

H_2O 0.3 nm

glucosio: 0.6 nm

emoglobina:6.5 nm

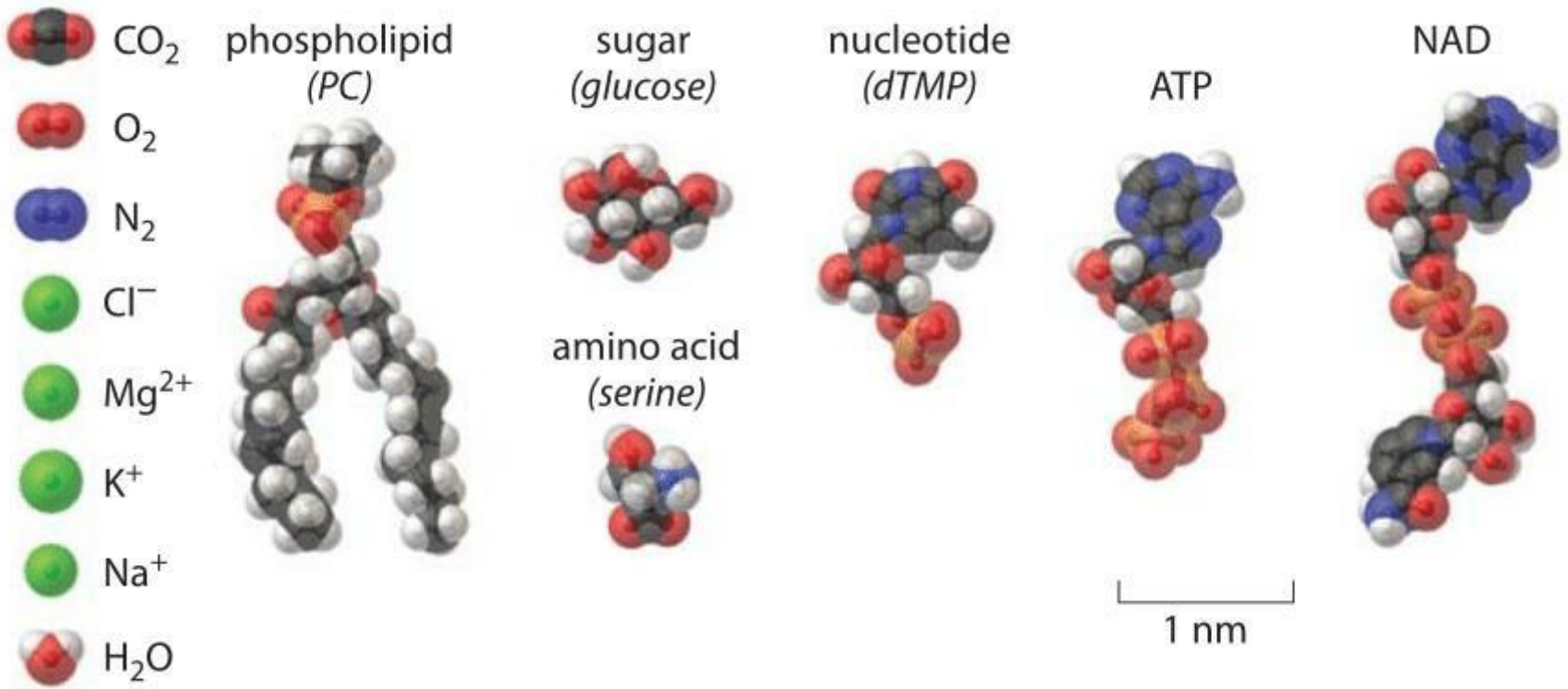
ribosomi: 30 nm

virus: 10 nm-100 nm

batterio: 5 μm

globulo rosso: 7 μm

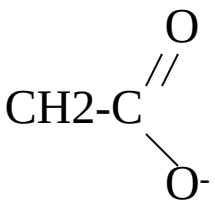
→ Risoluzione del microscopio ottico (circa 0.2 μm)


CO_2
O_2
N_2
Cl^-
Mg^{2+}
K^+
Na^+
H_2O
phospholipid
(PC)
sugar
(glucose)
amino acid
(serine)
nucleotide
(dTMP)
ATP
NAD
1 nm

Legami chimici

Legami deboli

1) elettrostatici: attrazione dato da legge di coulomb. Distanza ottimale circa 0.3 nm.



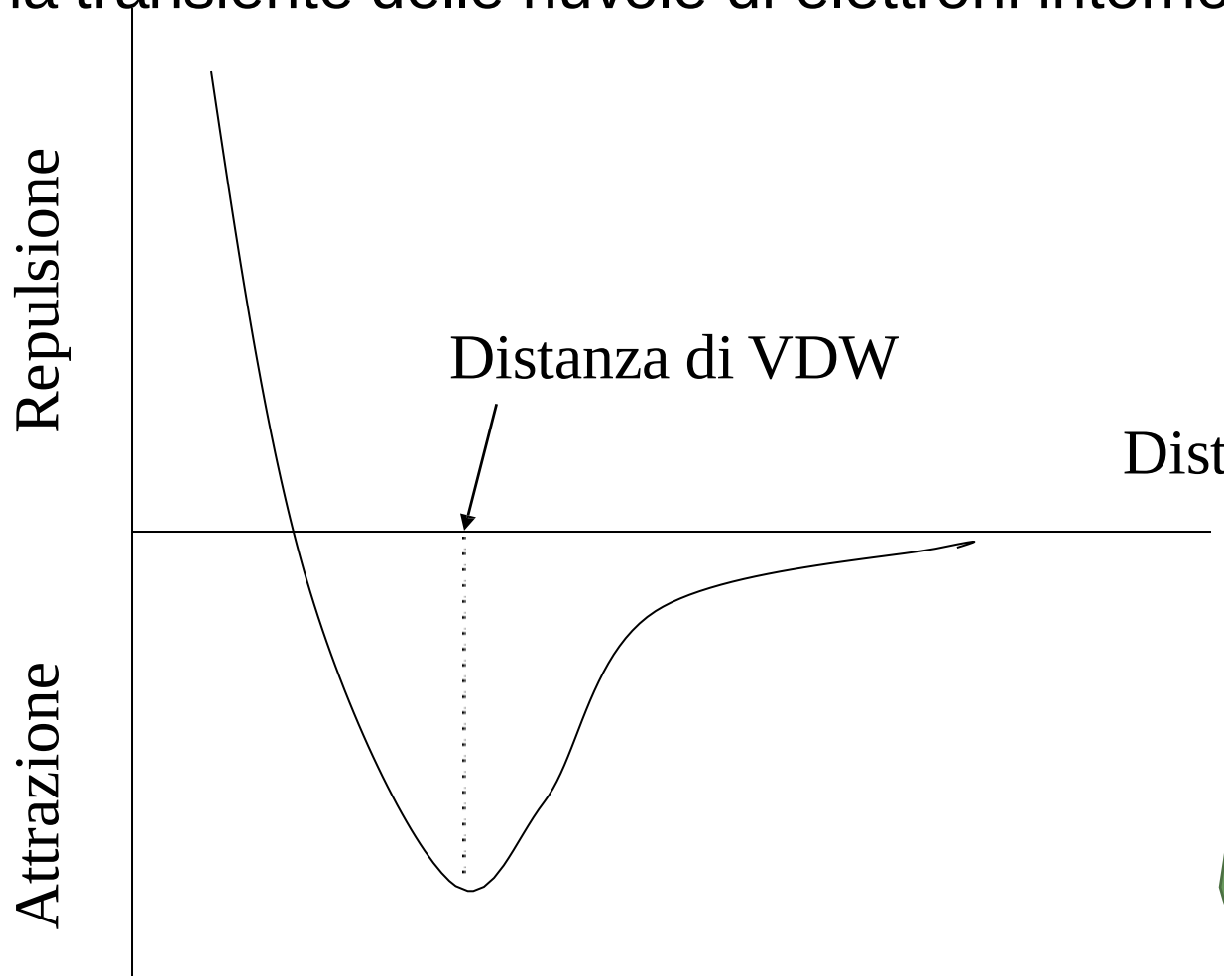
H_3N^+-CH_2

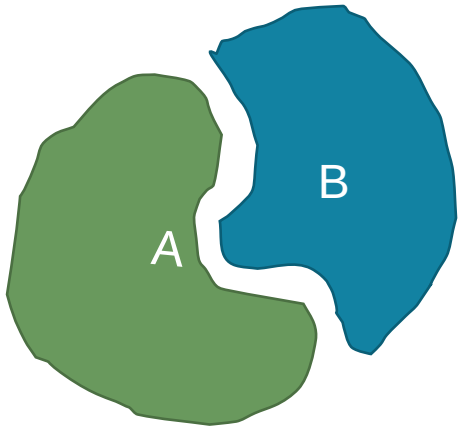
2) idrogeno: un H viene diviso tra due atomi (O o N) di cui uno è più negativo, e attrae l'H. L'altro è il donatore, che è più fortemente legato al H. E' un legame direzionale.

-O-H :::::N- N-H :::::O-

3) Van der Waals: legame non specifico attrattivo quando 2 atomi sono distanti circa 3-4 Å. Legame molto debole (1 kcal/mol). Le forze diventano importanti quando c'è un gran numero di legami VDW tra due molecole. La specificità del legame dipende dalla forma delle due molecole (lock and key).

Dovuto all’asimmetria transiente delle nuvole di elettroni intorno a un atomo





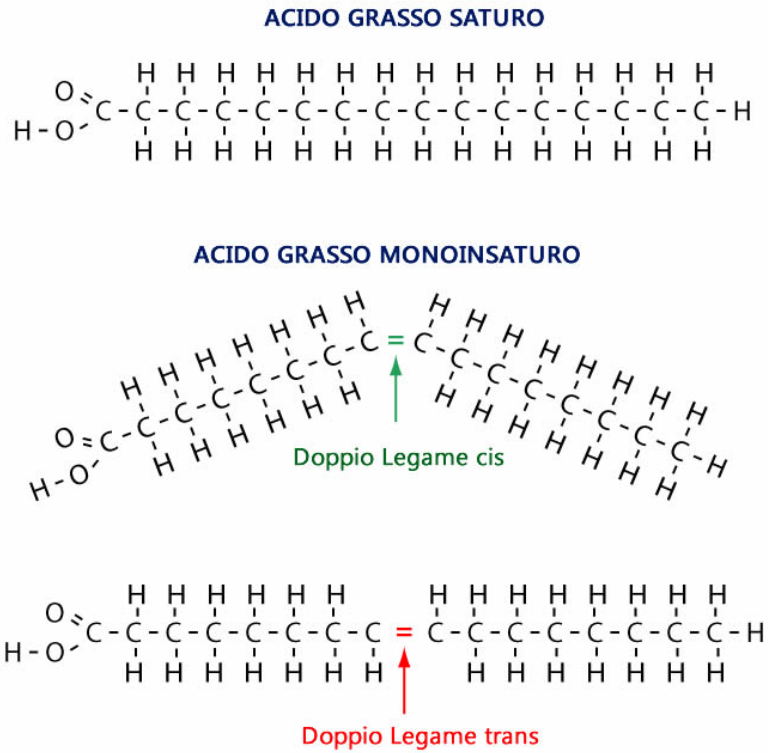
Lipidi

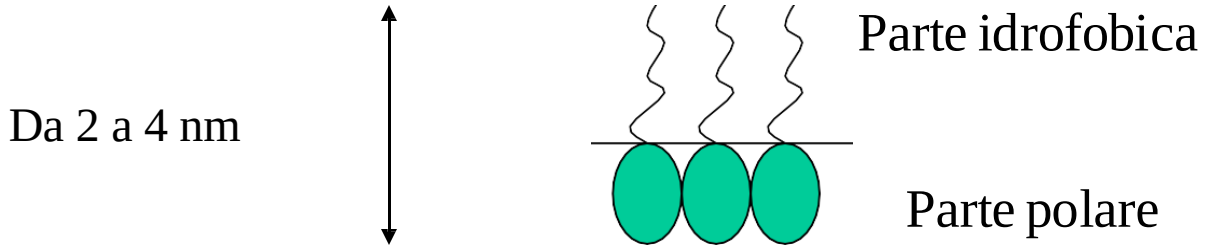
Classe di molecole eterogene che hanno in comune l'insolubilità in acqua. Invece sono solubili in solventi organici comuni (es. alcol, acetone e benzene)

- acidi grassi
- grassi e olii
- trigliceridi
- fosfolipidi
- steroidi

Acidi grassi

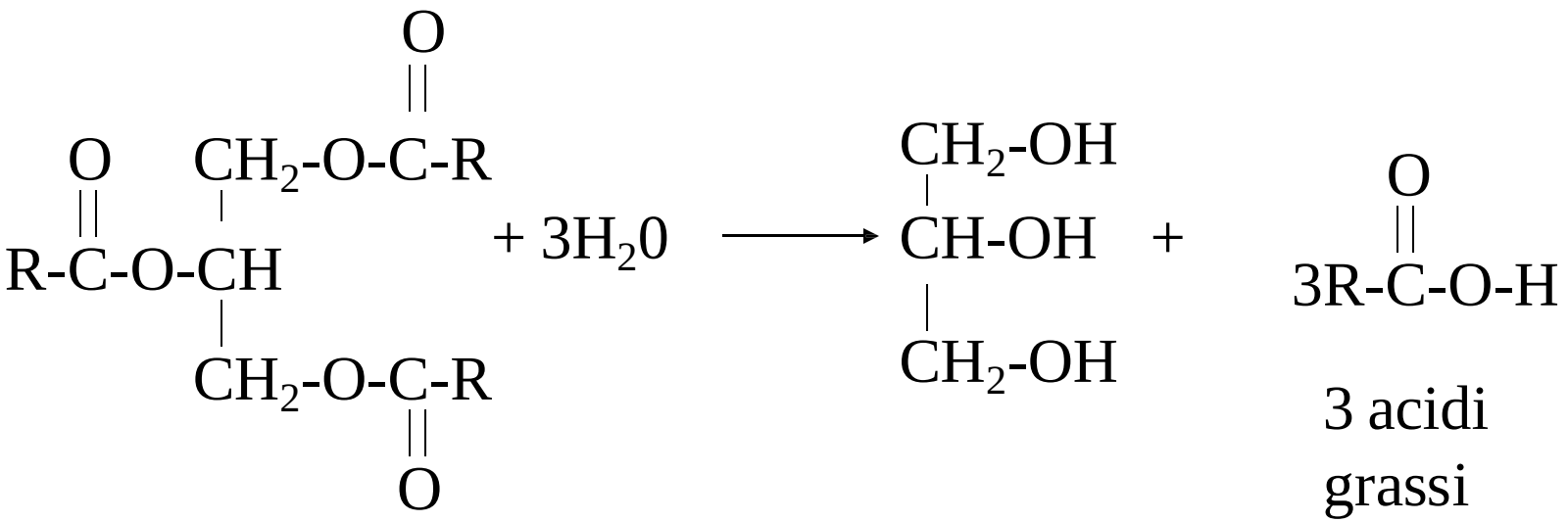
- hanno un numero pari di C tra 12 e 20, (C12, C14, C16, C18 ecc)
- I tre più comuni sono acido stearico (C18), palmitico (C16) e oleico (C18 con =)
- con aumento di C, aumenta la temp di fusione
- quelli saturi (senza=) hanno una t.f. più alta di quelli insaturi (con =). Questo è dovuto all'ingombro sterico di quelli insaturi
- hanno la proprietà di interagire con acqua formando strati
- monomolecolari: sono anfifiliche





- Formula generale: $CH_3(CH_2)_nCOOH$ (saturi),
- $CH_3(CH_2)_nCH=CH(CH_2)_mCOOH$ (non saturi)
- Gli acidi grassi saturi hanno un punto di fusione (pf) alto, mentre quelli non saturi sono liquidi a temp ambiente
- Saturi: C12: laurico; C14: miristico; C16: palmitico; C18: stearico; C20: arachidico.
- Non Saturi: C16 palmitoleico; C18 oleico, linoleico, linolenico; C20 arachidonico

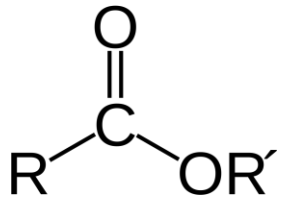
I trigliceridi sono i lipidi più abbondanti in natura. I grassi e oli che mangiamo sono praticamente dei triesteri di glicerolo. Infatti, l'idrolisi completa di un trigliceride dà 3 molecole di acidi grassi e una molecola di glicerolo.



trigliceride

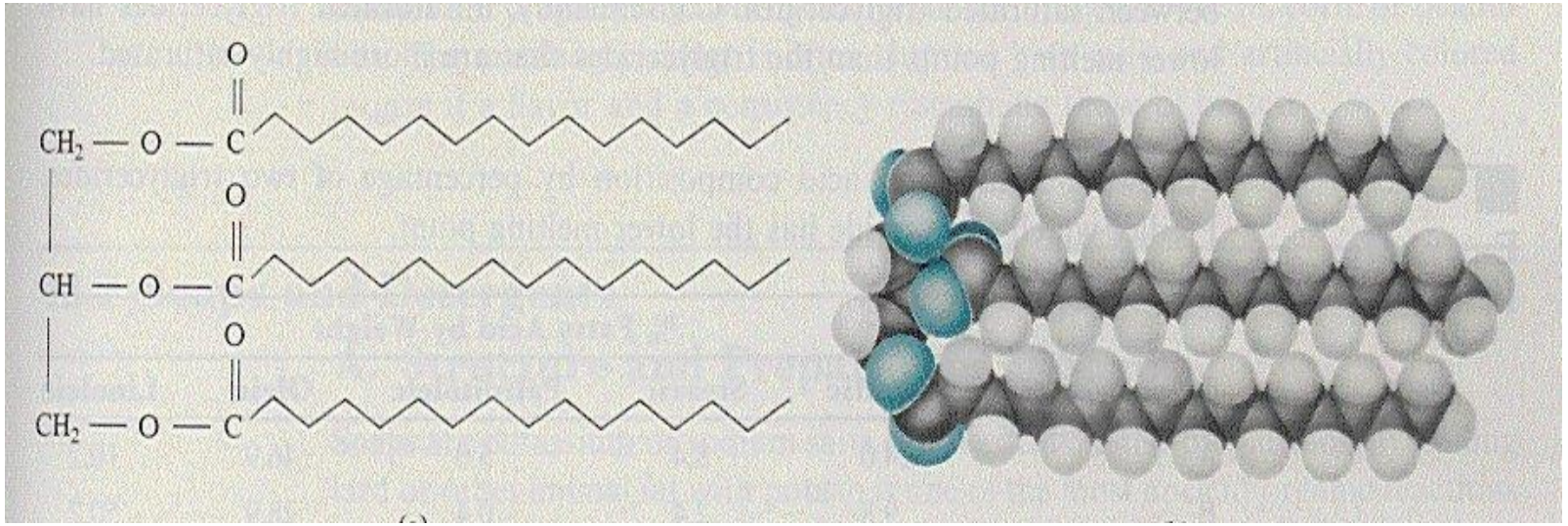
glicerolo

3 acidi grassi

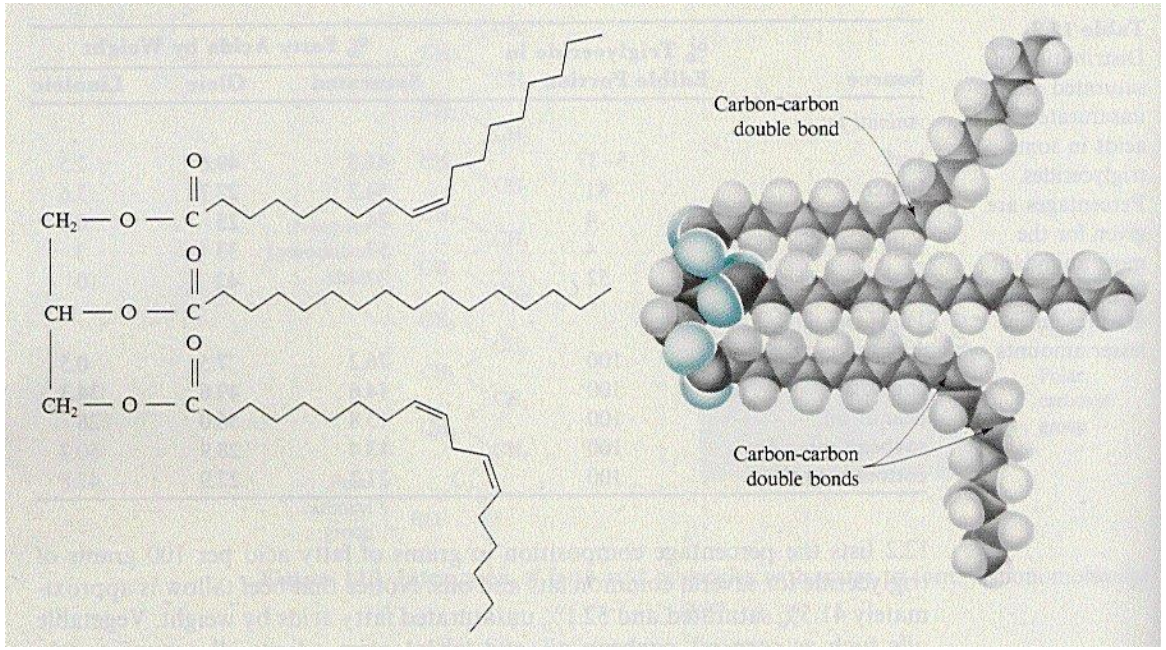


estere

Trigliceridi: hanno tre acidi grassi



Trigliceride saturo: tripalmitina
(pf alto perché è più compatto)



Trigliceride non saturo (pf basso)

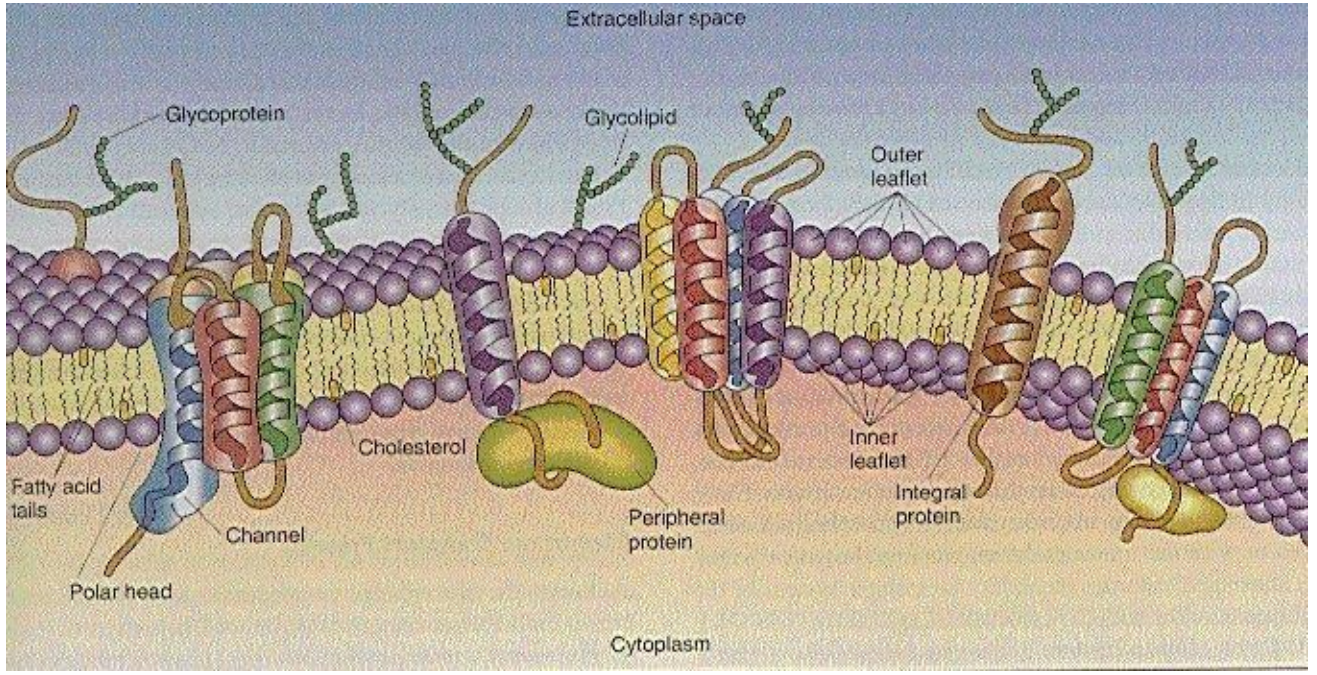
sono piu comuni i trigliceridi con tre catene di acido grasso diverse

I trigliceridi ricchi in acidi grassi saturi sono “grassi”, quelli con grassi non saturi sono olii.

Grasso	%triglicer	%ag sat	%oleico +linoleico (ns)
maiale	52	37	52
mais	100	14.6	84.3

Conversione industriale di olii a grassi: togliere i doppi legami attraverso la loro idrogenazione. Si puo modulare la “consistenza” per dare ad un grasso la giusta morbidezza (es. margarina)

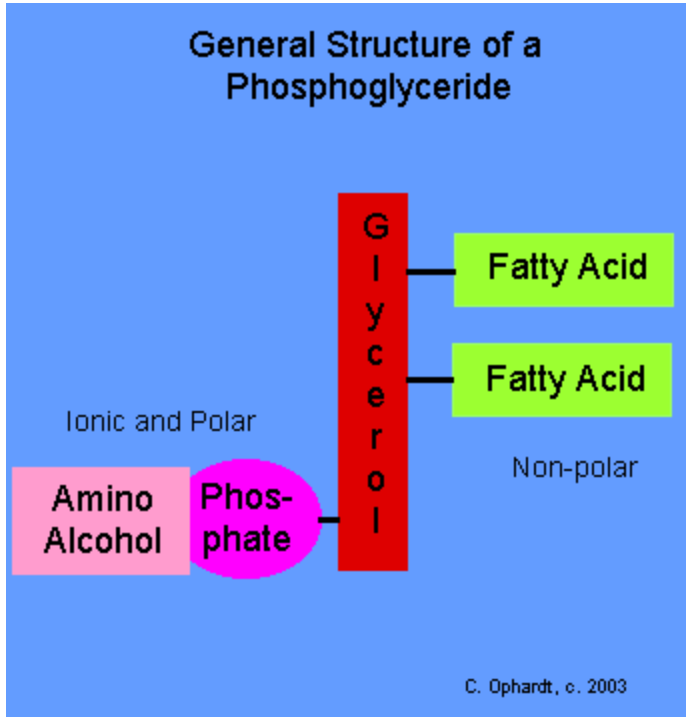
Modello di un mosacio fluido (metà della membrana cellulare è fatta di lipidi, metà di proteine). Membrana che non fa passare tante molecole

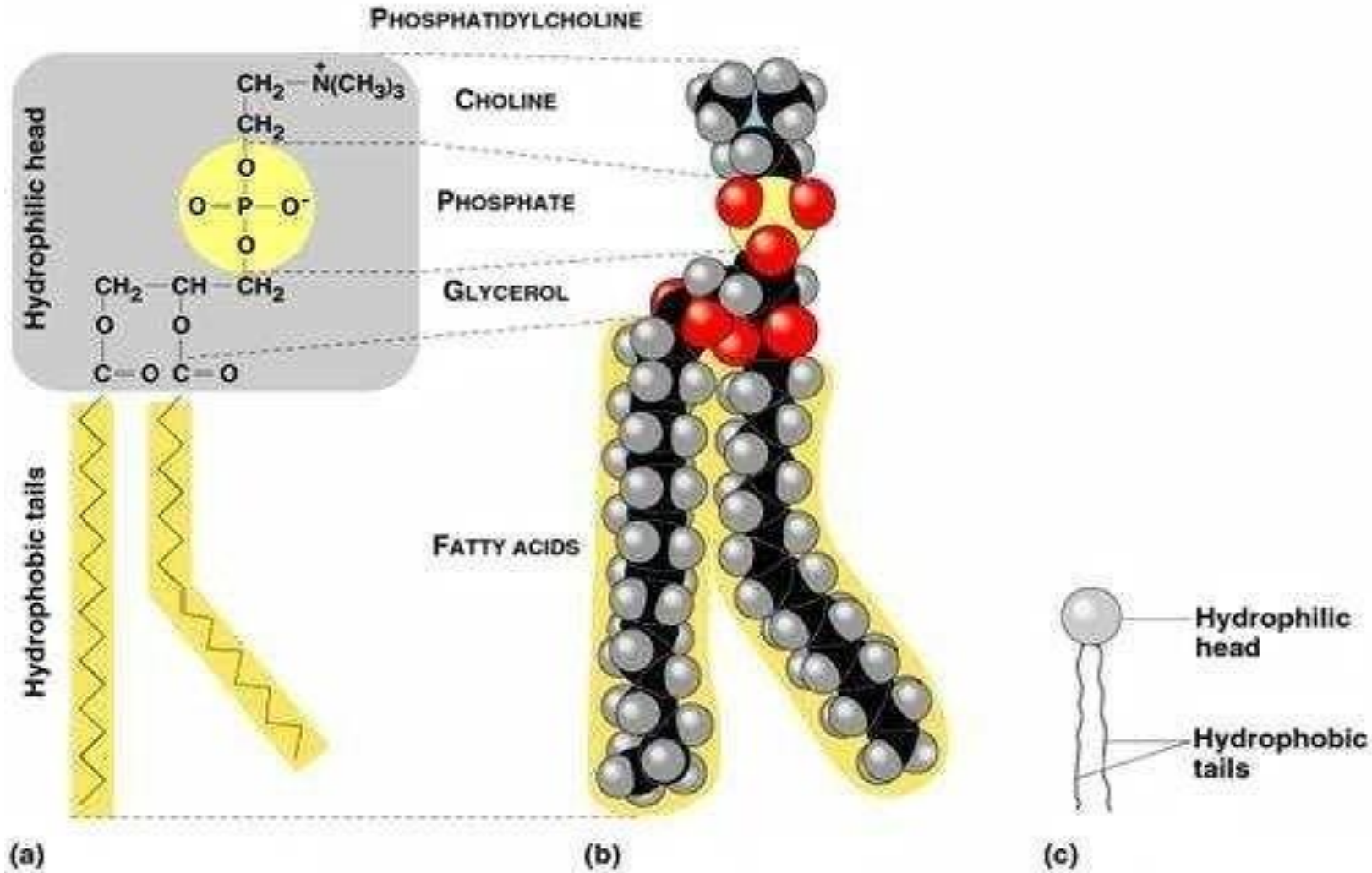


Fosfolipidi: sono secondi in abbondanza, e si trovano quasi esclusivamente nelle membrane cellulari.

Membrane=40-50% fosfolipdi+ 50-60% proteine

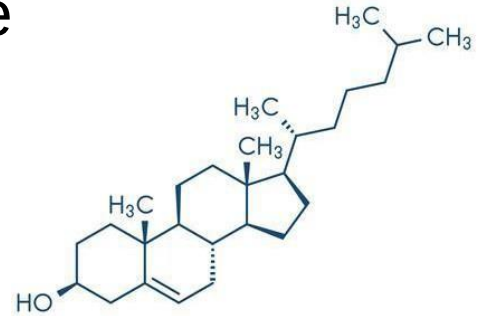
Contengono glicerolo, 2 acidi grassi, acido fosforico e un alcol.
I più abbondanti sono lecitina (fosfatidilcolina) e cefalina.




PHOSPHATIDYLCHOLINE
Hydrophilic head
CHOLINE
PHOSPHATE
GLYCEROL
FATTY ACIDS
Hydrophobic tails
(a)
(b)
(c)
Hydrophilic head
Hydrophobic tails

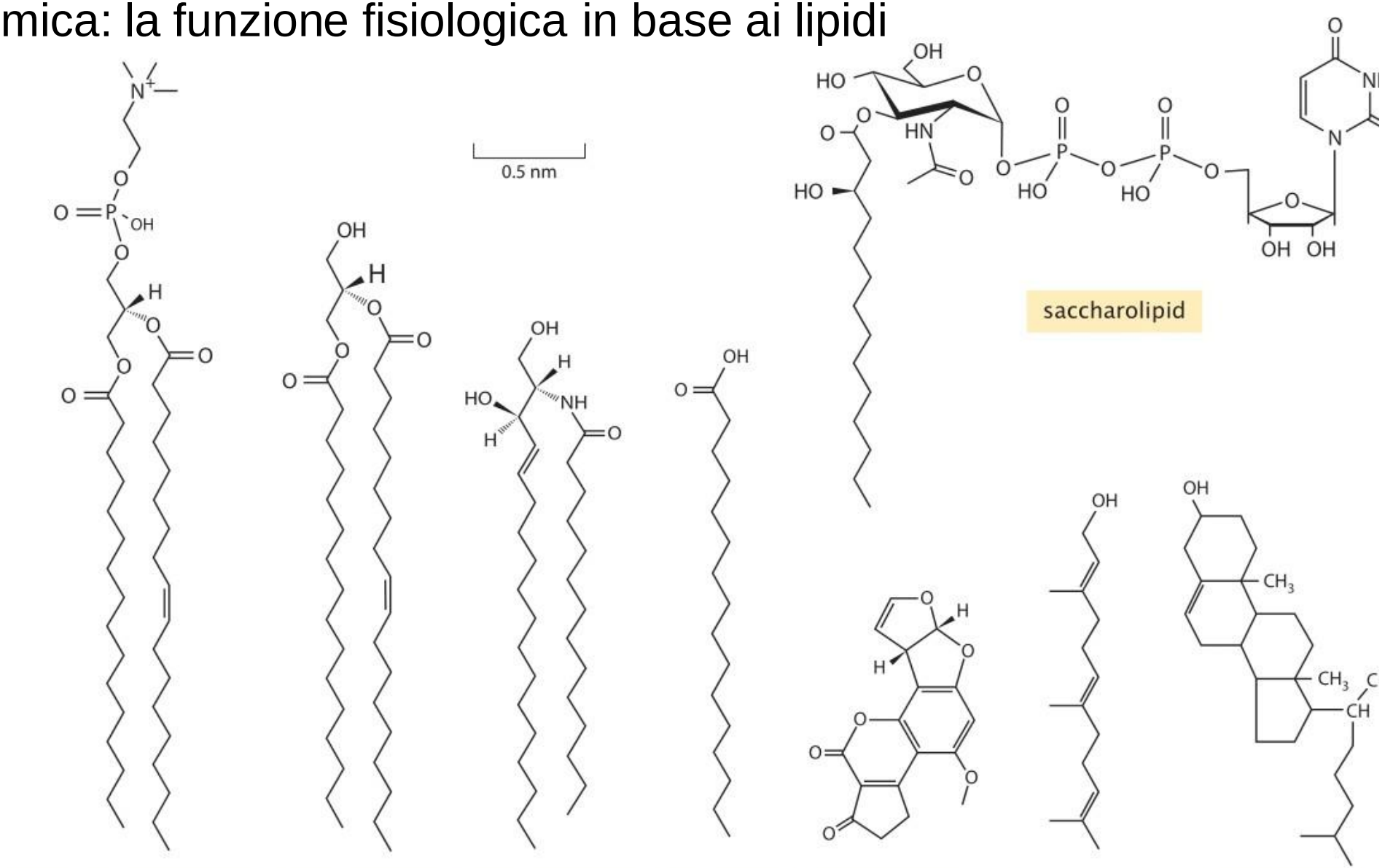
Steroidi

- Colesterolo: lipide con struttura ad anelli. E’ una parte essenziale delle membrane. Noi abbiamo circa 140 mg di colestorolo, di cui 120 mg sono nelle membrane. Più colesterolo fa irrigidire le membrane.
- Nel sangue esistono due tipi colesterolo. Essendo insolubili in H2O viaggiano nelle lipoproteine
  - Quello buono (HDL: high density lipoprotein): lipoproteine con poco grasso che portano colesterolo dalle cellule al fegato
  - Quello cattivo (LDL: low density lipoprotein): Sono lipoproteine con tanto colestorolo che vengono depositate sulle pareti delle arterie



cholesterol

Lipidomica: la funzione fisiologica in base ai lipidi



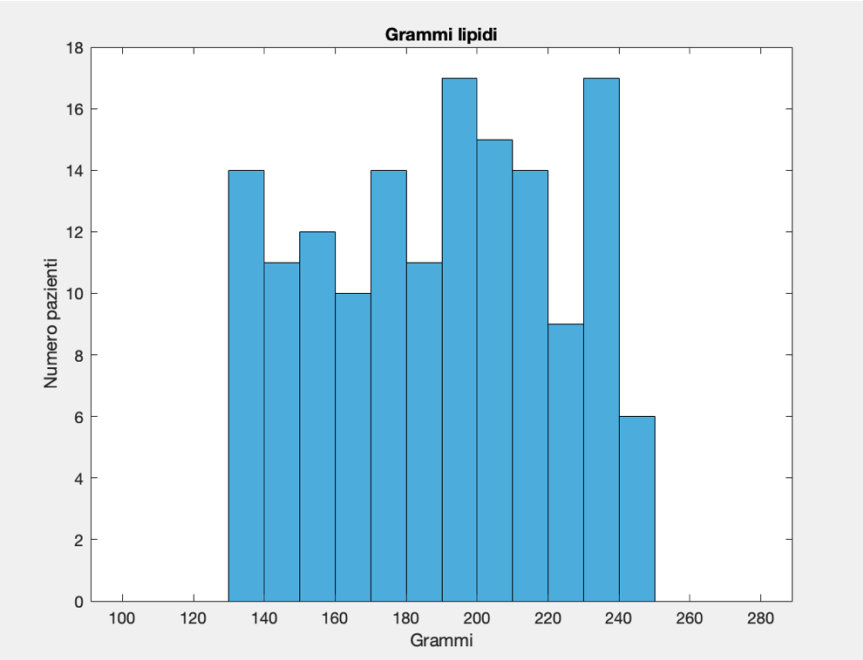
Ormoni e vitamine non idrosolubili fanno parte degli steroidi

Esercizi

- Stimare il numero di lipidi/m^2 distesi sull’acqua disposti in monostrato.
- Stimare la quantita di grasso nel corpo magro. Quasi tutto il grasso e’ contenuto nella membrana cellulare (anche gli organelli sono contenuti in membrane lipidiche).

Esercizio Matlab

- Scrivere una funzione che prenda in ingresso 5 parametri: peso minimo paziente, peso massimo paziente, numero pazienti, valore min grammi lipidi (minL), valore max grammi lipidi (maxL)
- Per ciascuno dei pazienti (peso calcolato come valore randomico tra i due estremi - *randi)* calcoli il valore in grammi dei lipidi
- Riporti su un istogramma la distribuzione dei valori ottenuti suddividendo gli intervalli tra minL e maxL con incremento 10
- Se minL e maxL sono maggiori o minori dei valori min e max calcolati, mostrare un messaggio a video che avvisi l'utente che alcuni dati non sono riportati sul grafico
- Dati:
  - Densità lipidi=4e18 lipidi/m^2
  - Densità cellule=5.314e14 cell/m^3
  - PM_lipidi=500 g
  - Diametro cellula = 20 µm
  - Densità tessuti biologici=1000 kg/m^3



Aminoacidi e Proteine

•Catalisi enzimatica: velocità aumenta di 10^6 volte.

• Trasporto e immagazinamento

•Moto

•Supporto meccanico

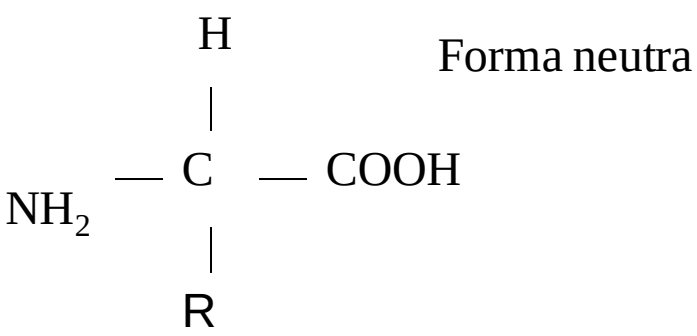
•Protezione immunitaria

•Generazione e trasmissione di impulsi nervosi (es. Recettori per la luce)

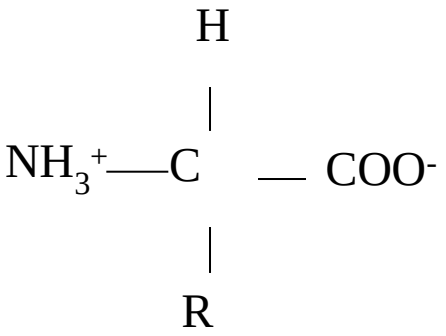
•Controllo di crescita e differenziazione (repressor proteins, NGF)

Aminoacidi

1 gruppo aminico, 1 carbossilico, 1 gruppo R (gruppo laterale), 1 H

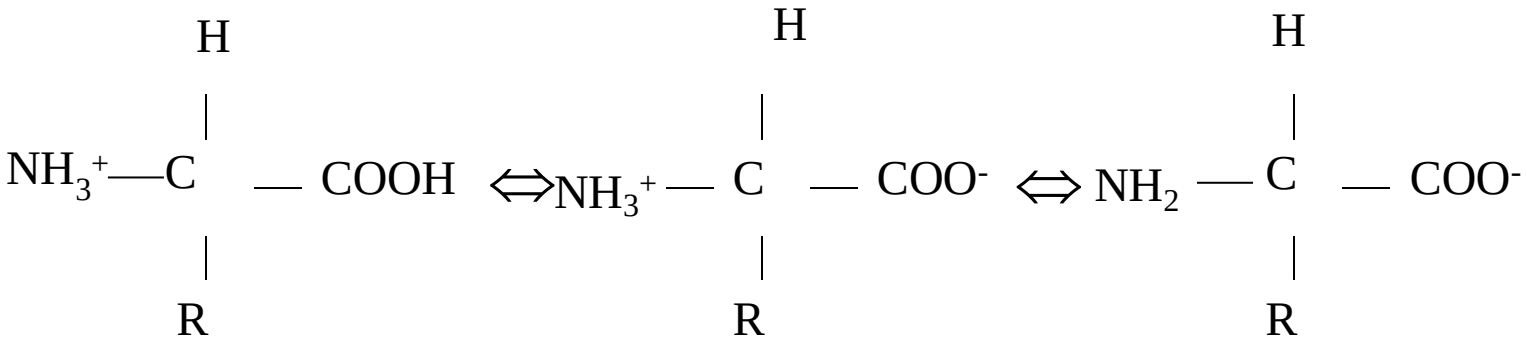


Forma neutra



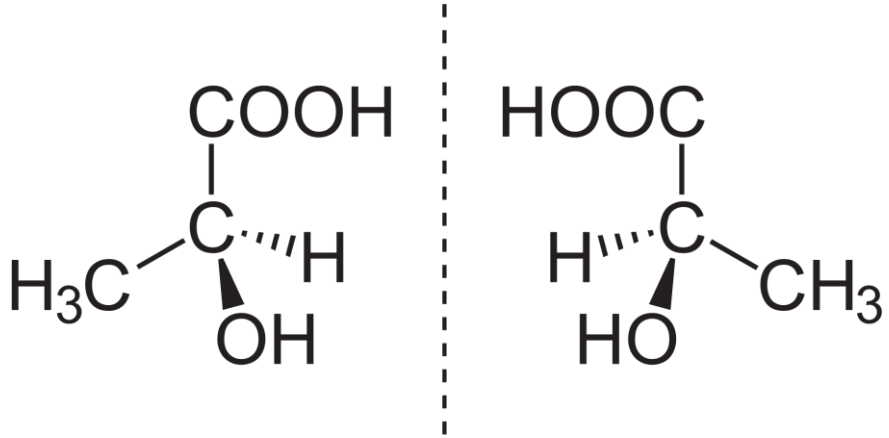
Forma dipolare-zwitterione

Lo stato di ionizzazione varia con il pH. A pH 1, il COOH è neutro, a pH 11, il NH_2 è neutro. A pH fisiologico sono entrambi carichi

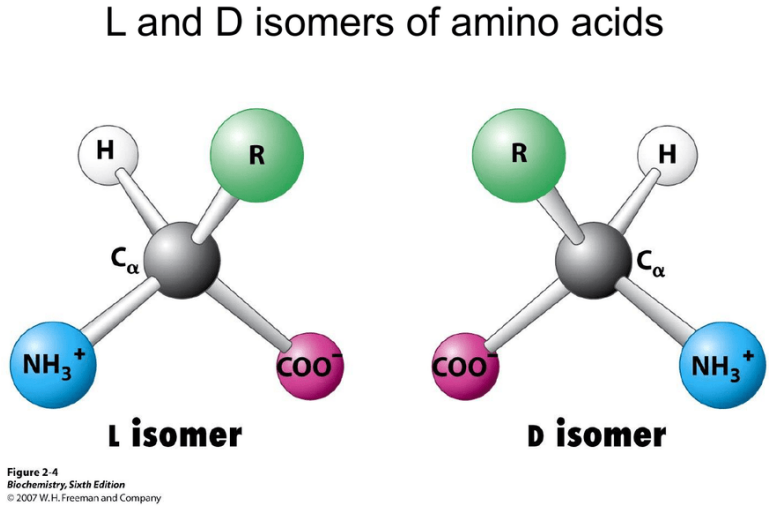


pH 1 pH 7 pH 11

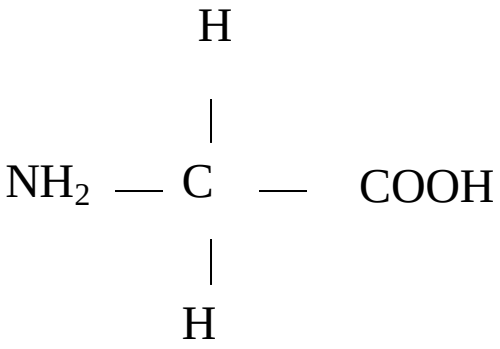
Attività Ottica: solo gli AA L esistono in natura: le proteine sono formate da AA L. Le due forme sono enantiomeri o isomeri ottici



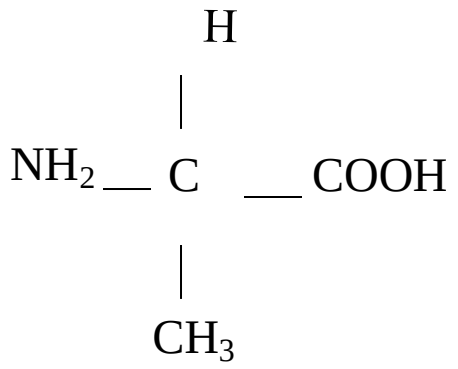
Lactic acid



R è alifatico, quindi non carico

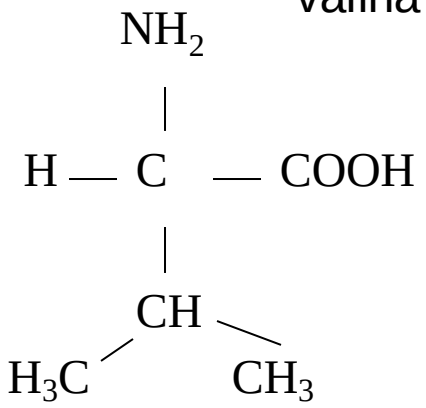


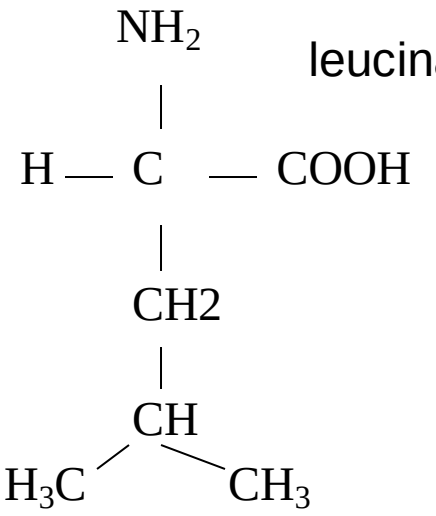
Glicina: otticamente inattivo



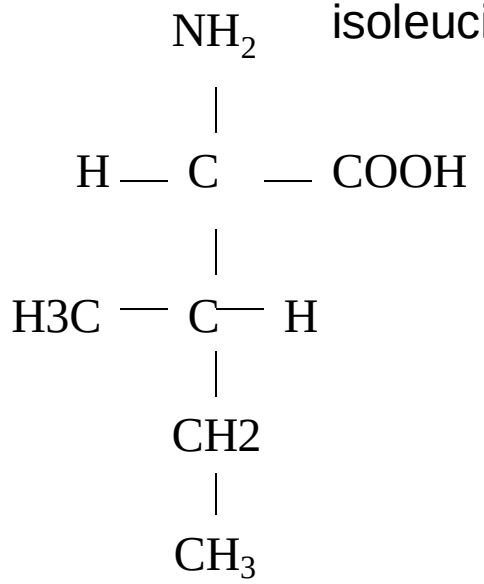
alanina

valina





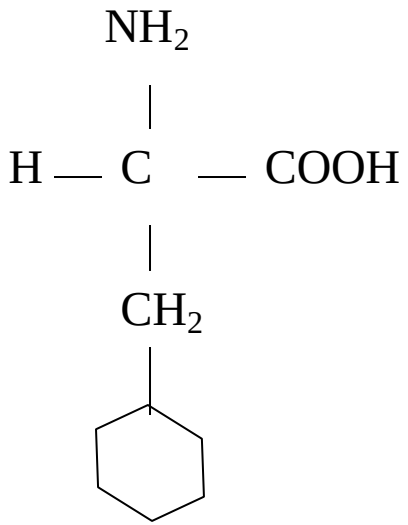
leucina



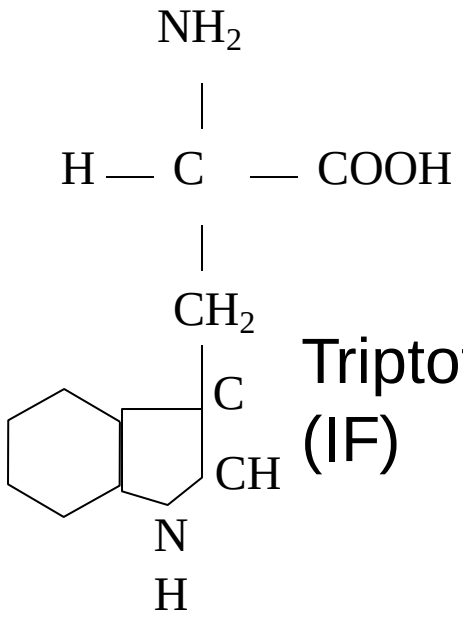
isoleucina

Gli AA grandi sono idrofobici: tendono a legarsi insieme per evitare l‘acqua, e cosi formano strutture compatte

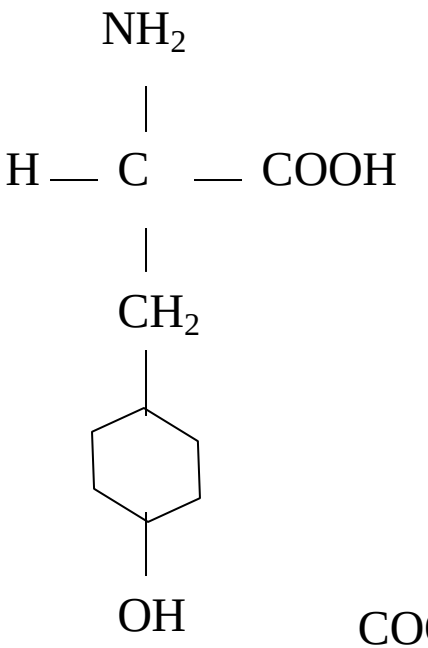
R è aromatico



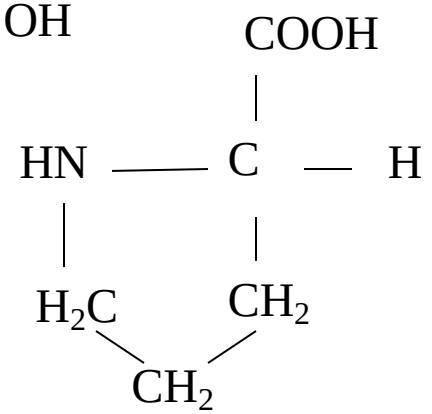
Fenilalanina: (IF)



Triptofano (IF)

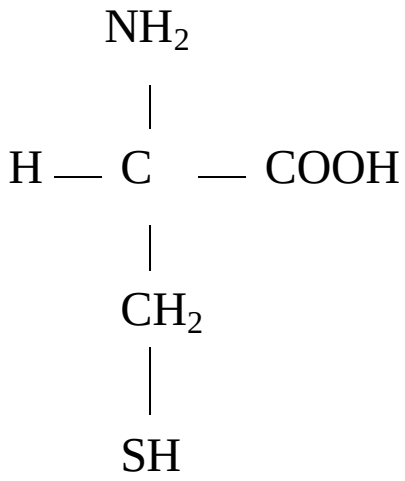


Tirosina gruppo OH reattivo

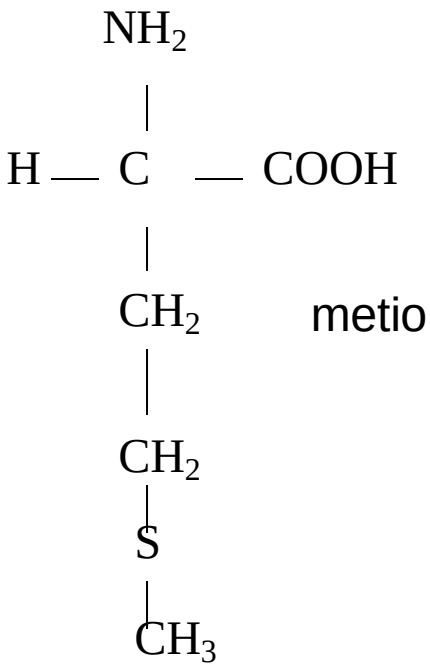


Prolina: R è legato sia al α C che all'azoto. Importante per la determinazione della struttura di una proteina

R contiene un S: idrofobici

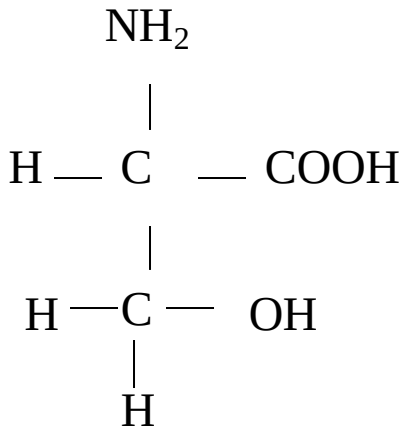


Cisteina: molto reattivo, forma legami disolforici

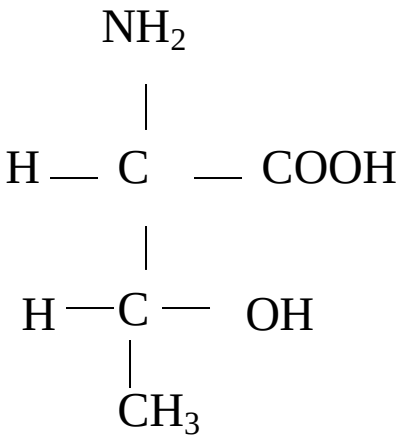


metionina

R è alifatico con un gruppo idrossilico (OH), quindi sono idrofilici

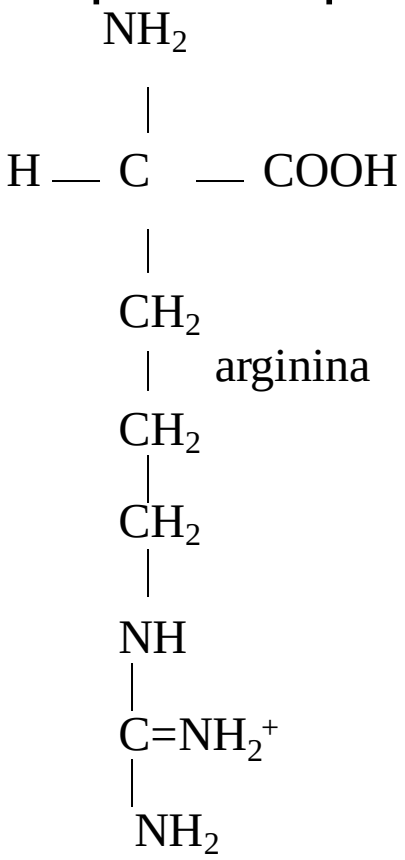


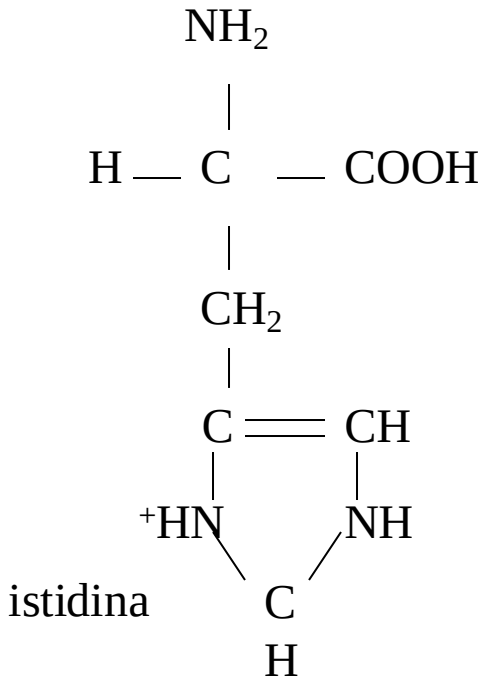
serina

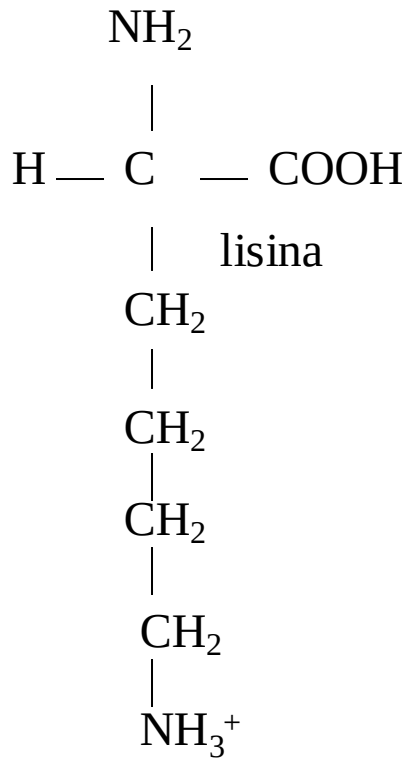


treonina

R è molto polare, quindi l'AA è molto idrofilico

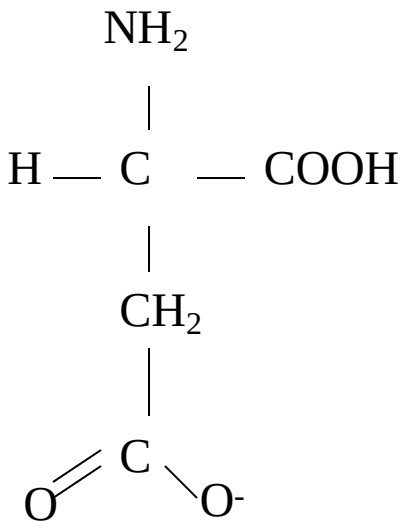




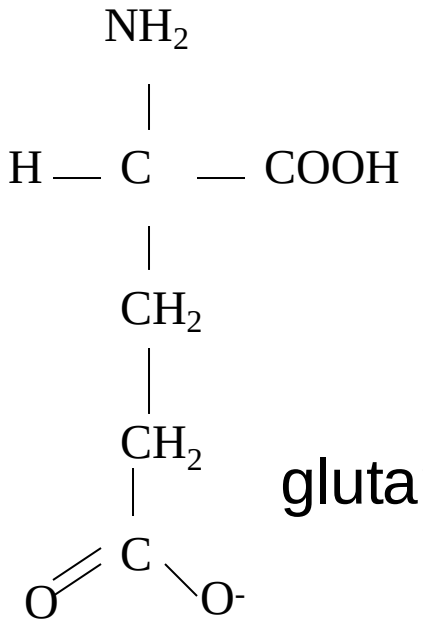


Questi sono amino acidi basici (cioe carica +). Lisina e arginina sono + a pH neutro. La carica di Istidina dipende dal ambiente locale. Istidina è molto diffuso nei siti attivi di enzimi dove l'anello imidazolo puo switchare tra + e- per formare e rompere legami.

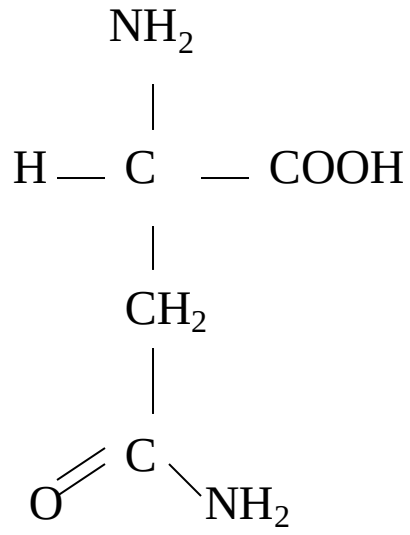
R è acidico (carica –)



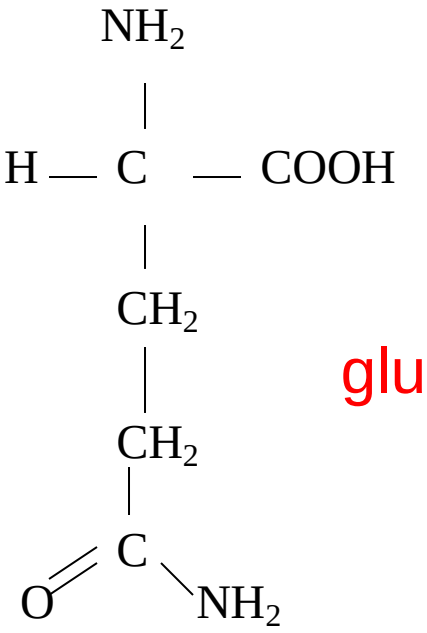
aspartato



glutammato

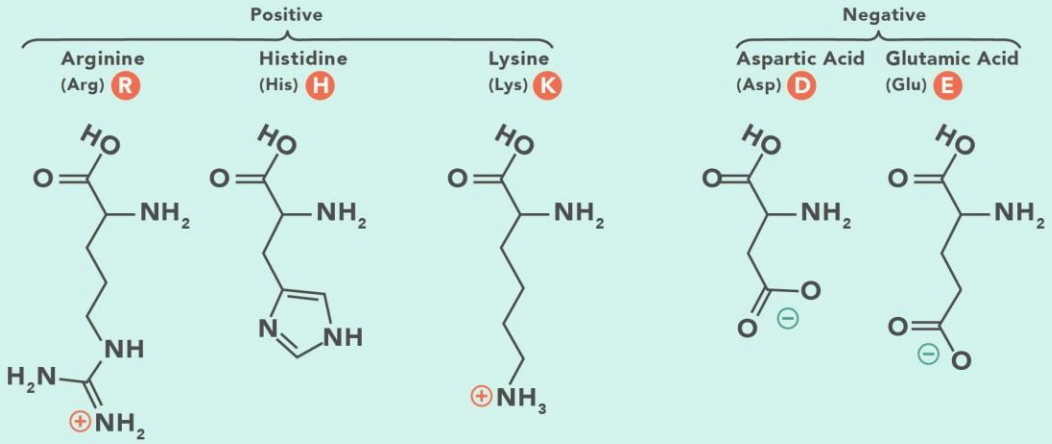


asparagina

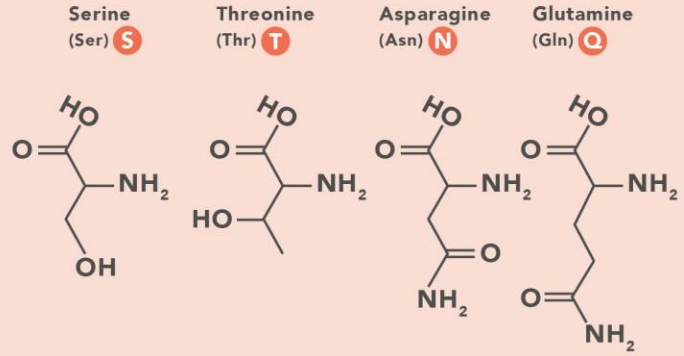


glutammina

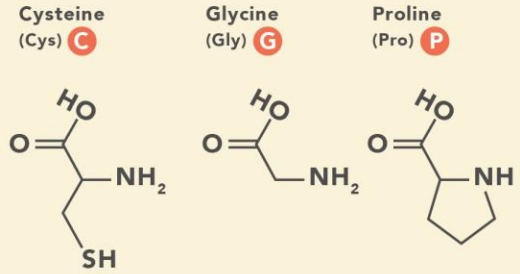
A. Amino Acids with Electrically Charged Side Chains



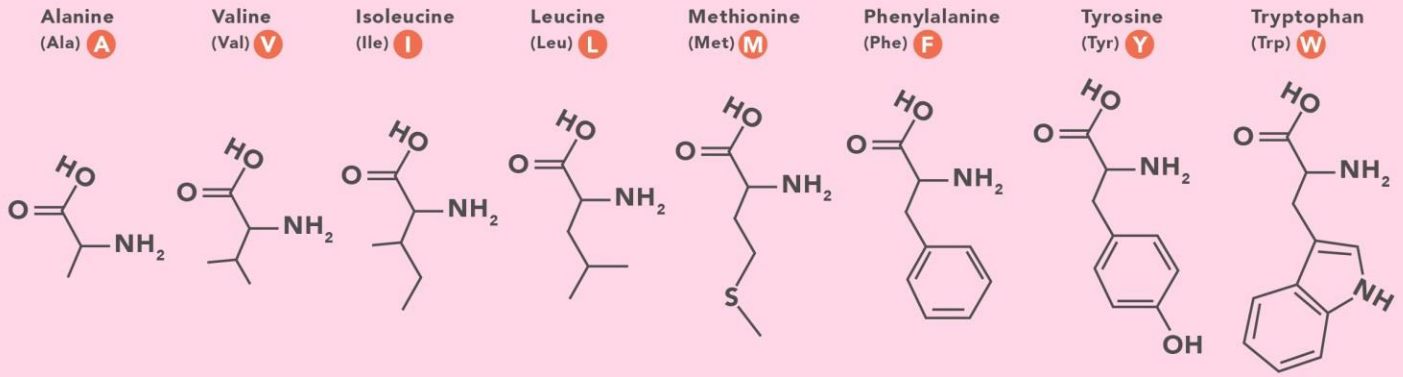
B. Amino Acids with Polar Uncharged Side Chains



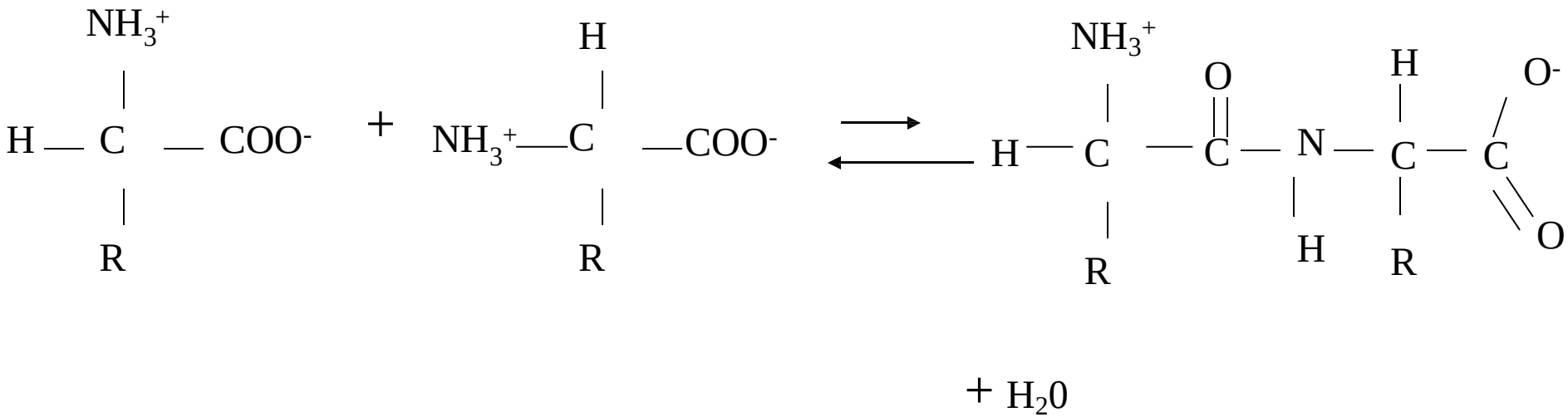
C. Special Cases



D. Amino Acids with Hydrophobic Side Chains



Il legame peptidico: Il carbonio del acido di un AA è legato al azoto del altro. La formazione di un dipeptide da due AA avviene con la perdita di una molecola di acqua. L'equlibrio di questa reazione è shiftato verso l'idrolisi, anzichè sintesi, quindi la sintesi di proteine ha bisogno di un input di energia .



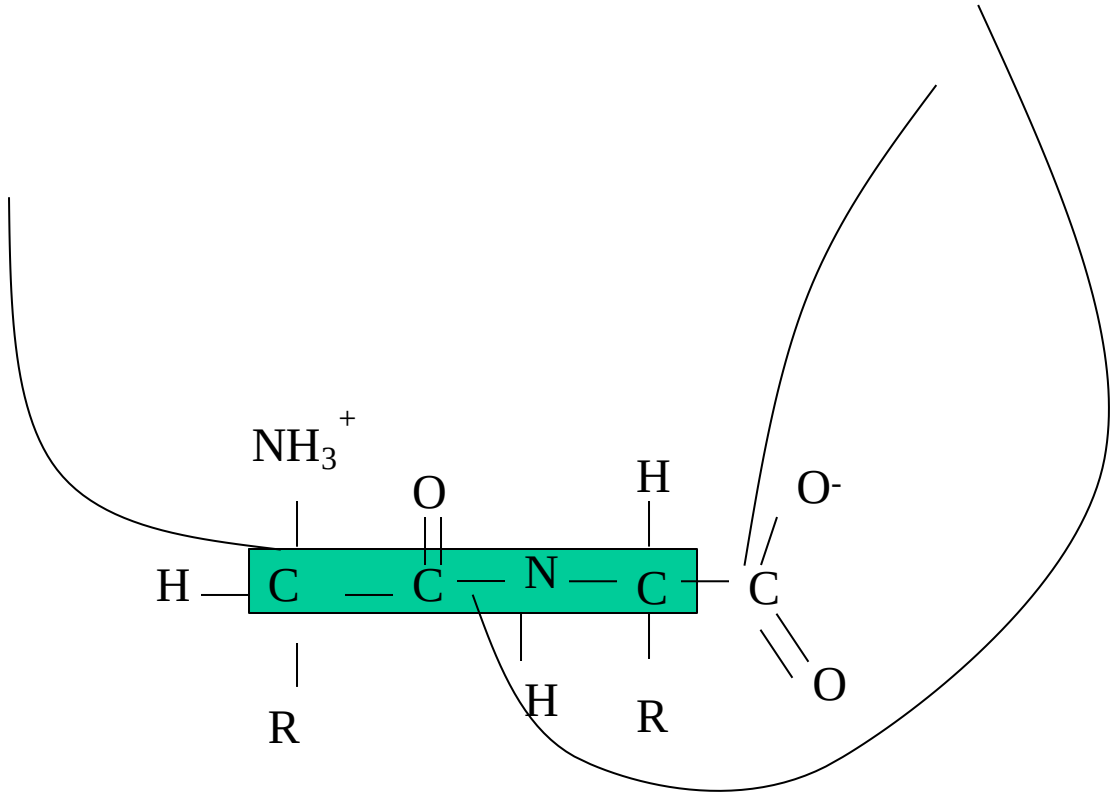
L'inizio del AA è il terminale amminico. Quindi Ala-Gly-Trp non è uguale a Trp-Gly-Ala. Il backbone è uguale, le catene laterali sono diversi.

I peptidi naturali hanno circa 50-2000 residui AA (pm 5500-220,000). Se hanno >10 residui sono definiti polipeptidi.

Le proteine

- Definite come peptidi con PM>5000
- Molto sensibili a T, pH

- La funzione dipende dalla confomazione
- La conformazione è l'organizzazione 3D
- La sequenza AA determina la conformazione
- Il legame peptidico è rigido e planare, lungo 0.132 nm
- Il legame tra α C e COOH e tra α C e NH2 è libero di ruotare



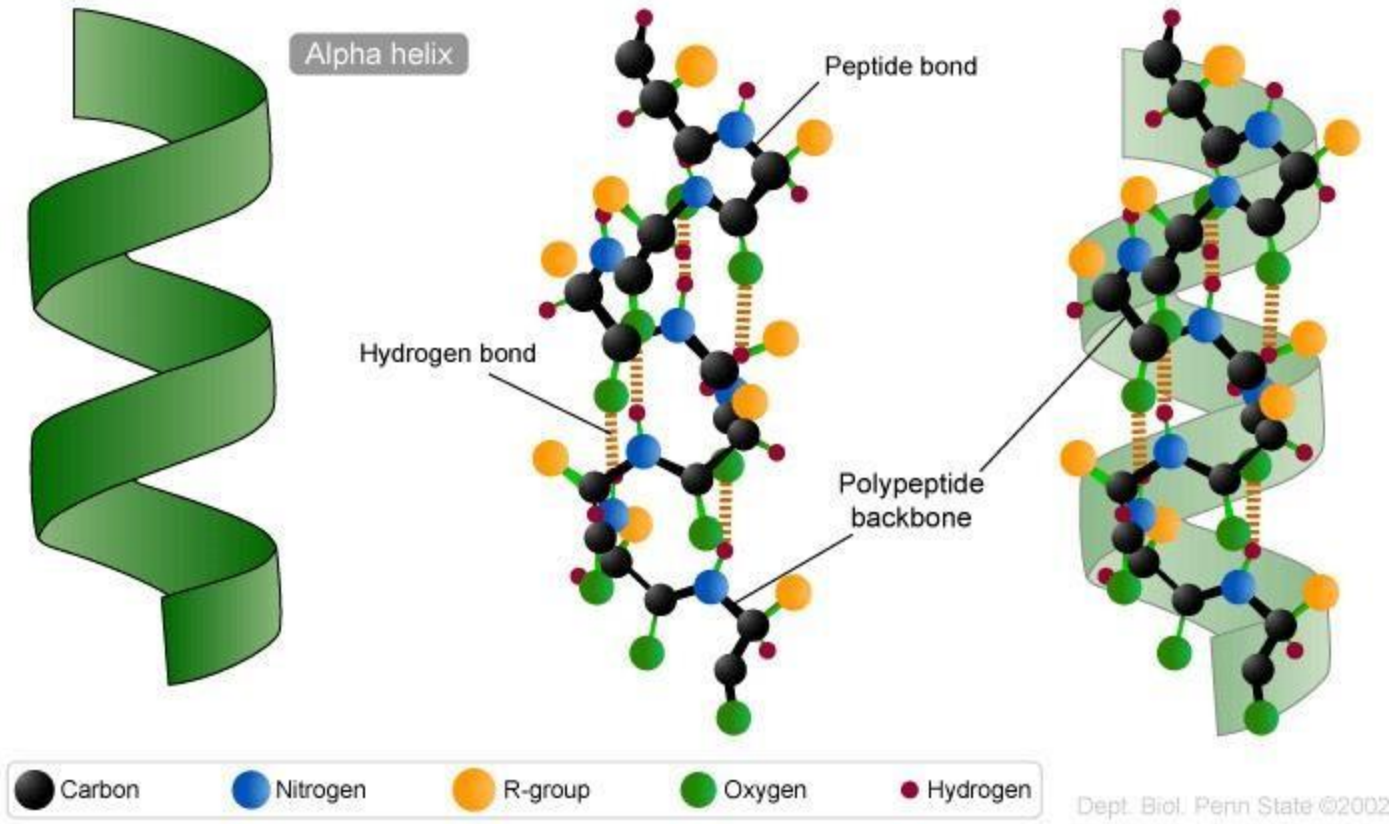
Struttura primaria

- Sequenza peptidica

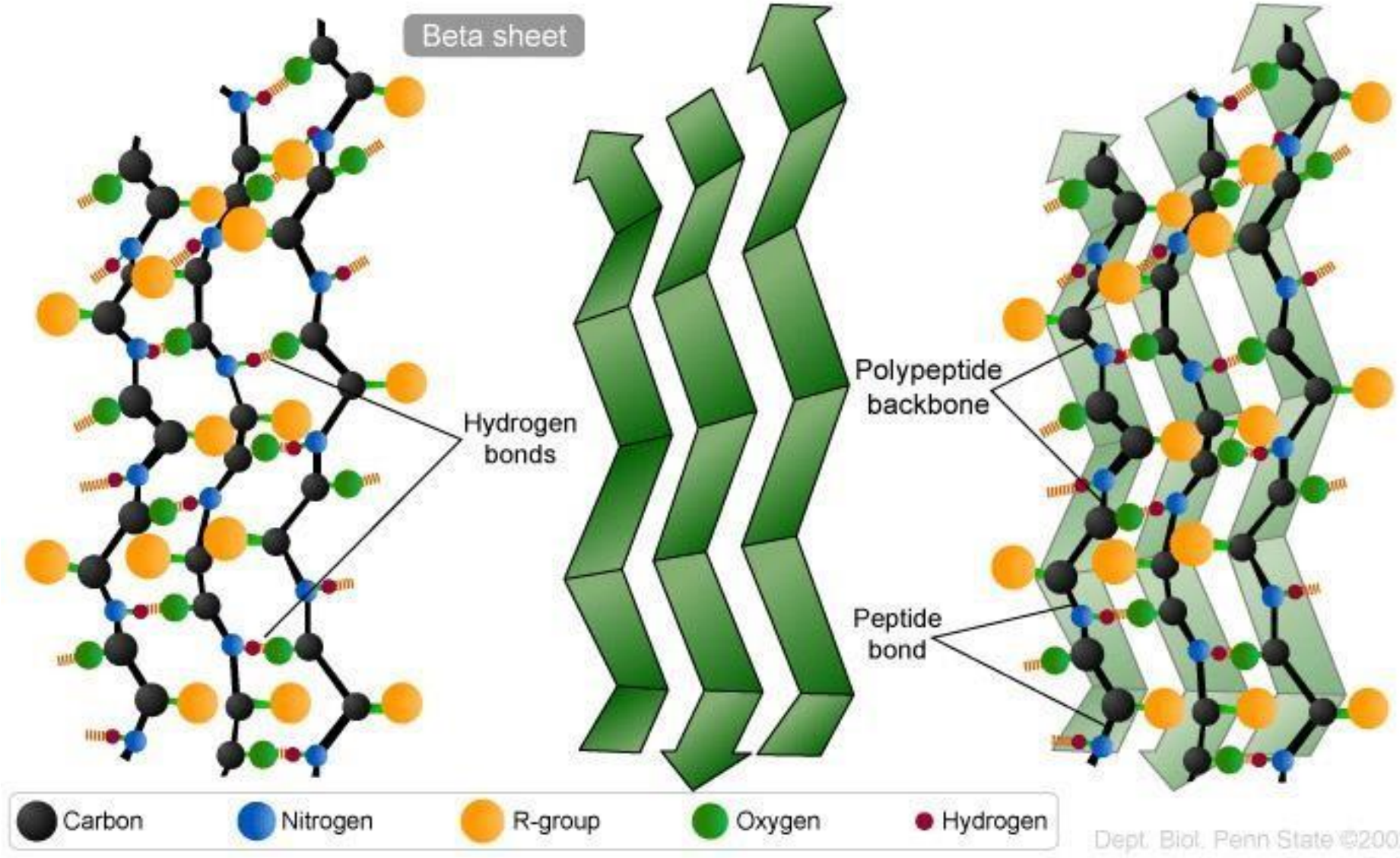
Struttura secondaria

- Organizzazione della catena

L'α elica (rotazione sinistrorsa): Tutti i gruppi CO e NH del backbone sono legati attraverso legami idrogeno. Ci sono 3.6 AA per giro. Pitch= 0.54 nm. Distanza tra AA= 0.15 nm. La cheratina è una proteina formata da due α eliche intrecciate. Anche il collagene.

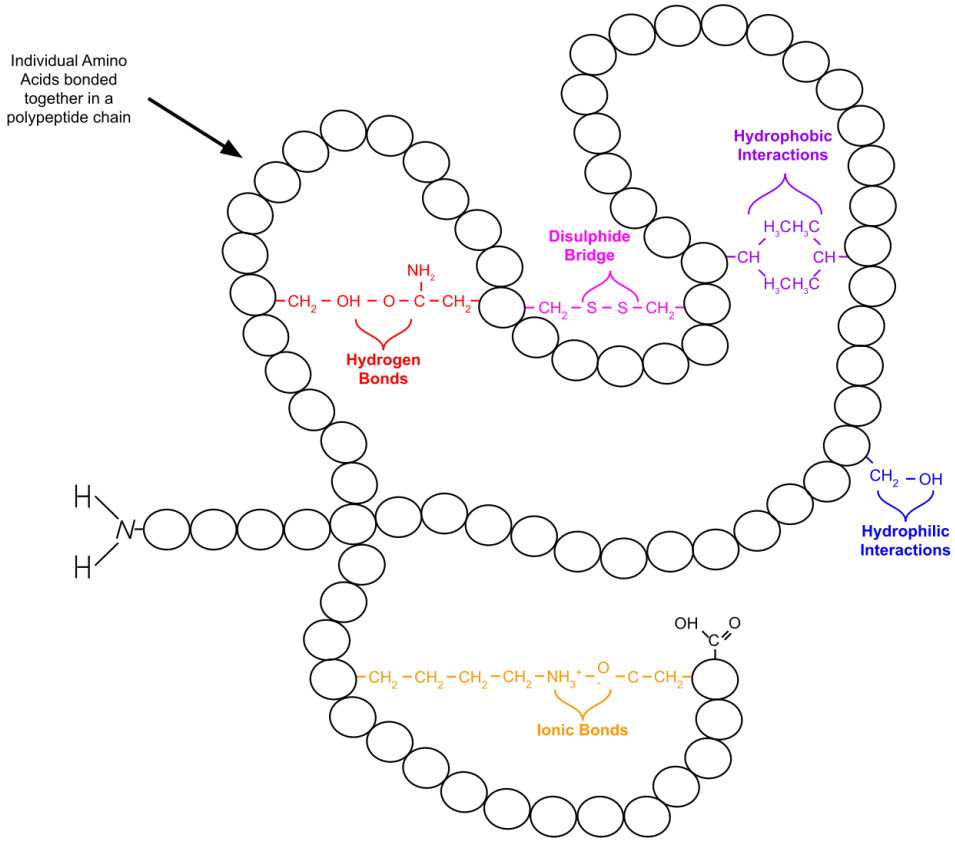


Il foglietto β: è proprio un lenzuolo piegato, ed è molto esteso. Distanza fra due AA= 3.5 Å. La stabilità è data da legami idrogeno tra catene polipeptidiche diverse. (Nell α sono tra AA nella stessa catena). La seta è una proteina che consiste in gruppi di β sheet.



Struttura terziaria: forma 3D

- Dovuto a legami S-S, interazioni steriche, idrofobiche/idrofiliche e struttura primaria



Bond Types

Hydrophobic Interactions: These amino acids orient themselves towards the center of the polypeptide to avoid the water

Disulphide Bridge: The amino acid cysteine forms a bond with another cysteine through its R group

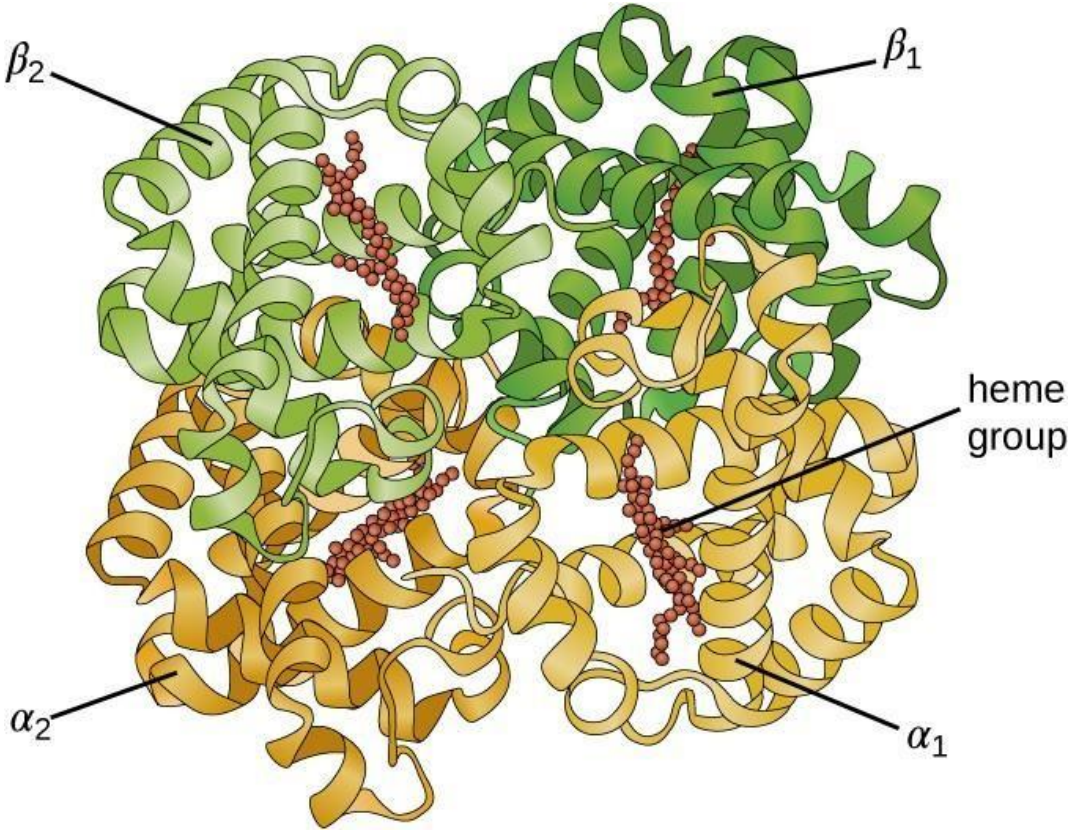
Hydrogen Bonds: Polar “R” groups on the amino acids form bonds with other Polar R groups

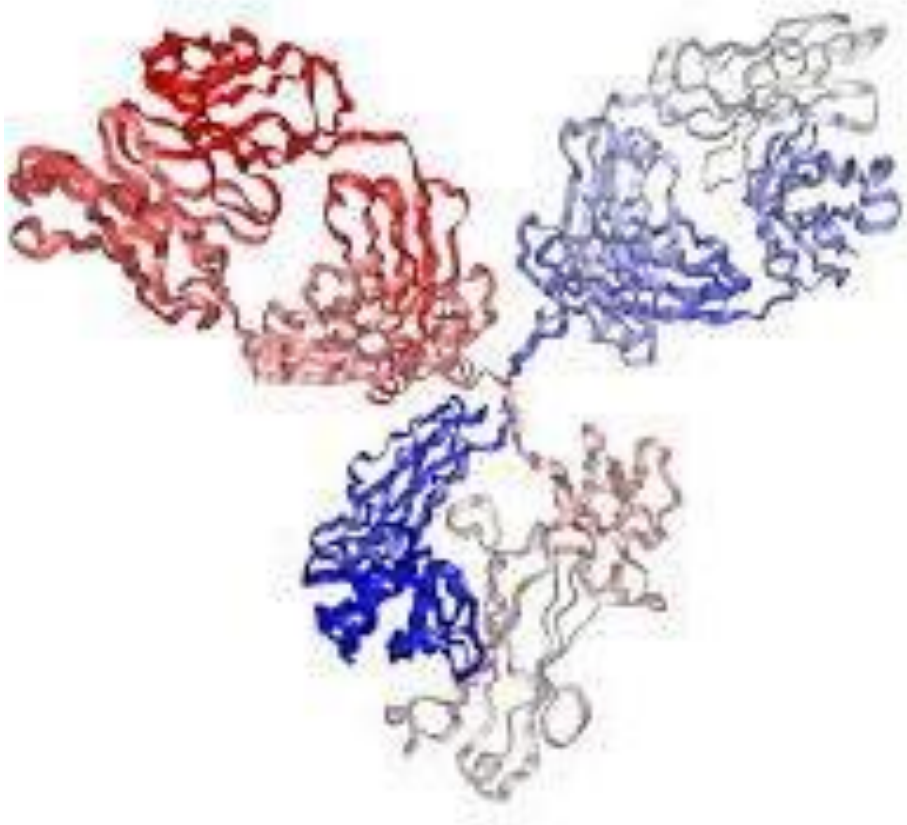
Hydrophilic Interactions: These amino acids orient themselves outward to be close to the water

Ionic Bonds: Positively charged R groups bond together

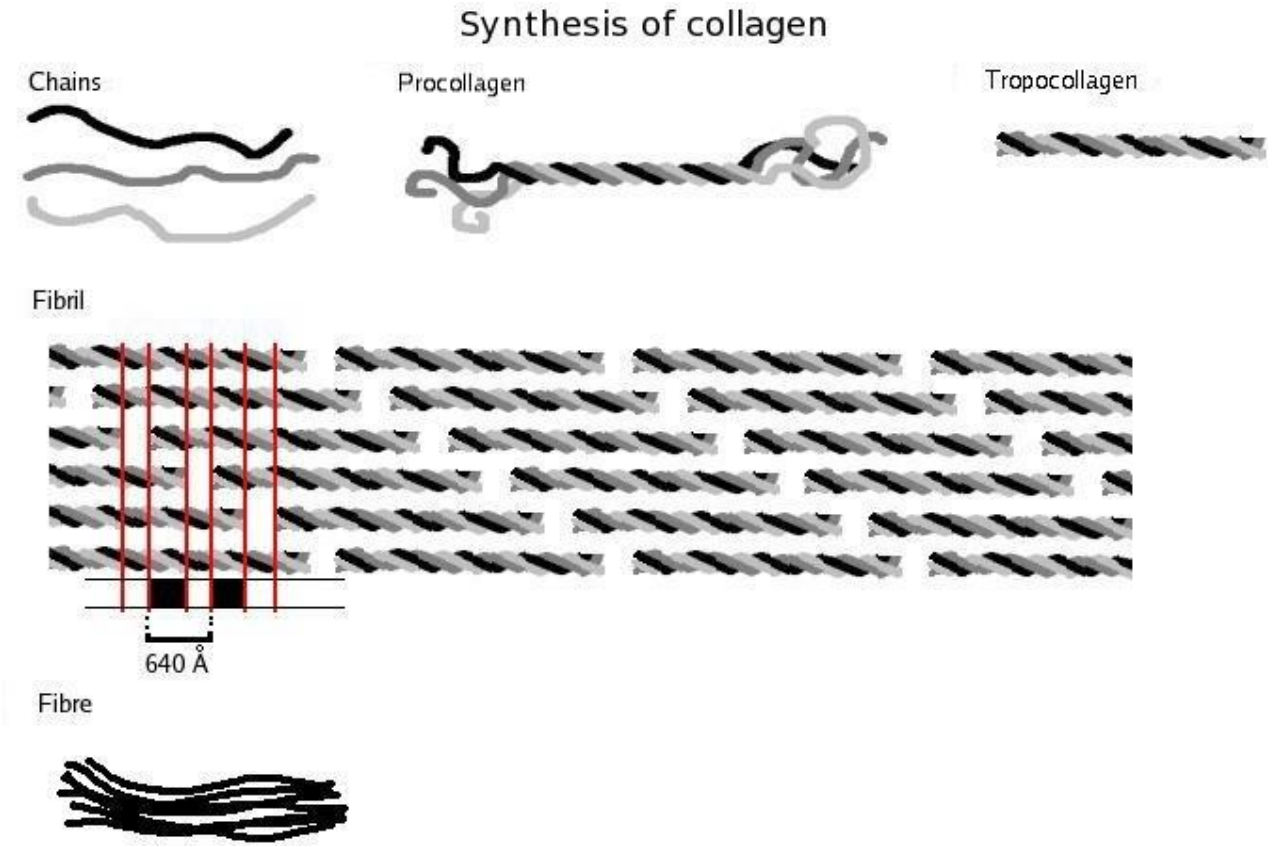
Struttura quaternaria

(proteine che hanno più catene AA, o piu domini)





Collagene


Synthesis of collagen
Chains
Procollagen
Tropocollagen
Fibril
640 Å
Fibre

Enzimi

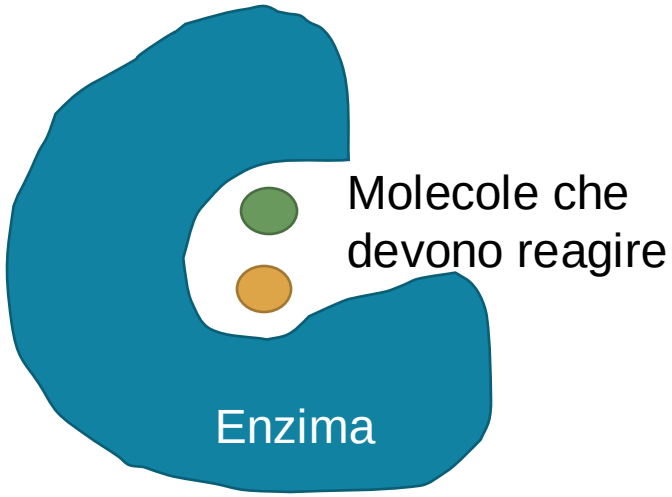
- Ossiriduttasi
- Ligasi
- Idrolasi

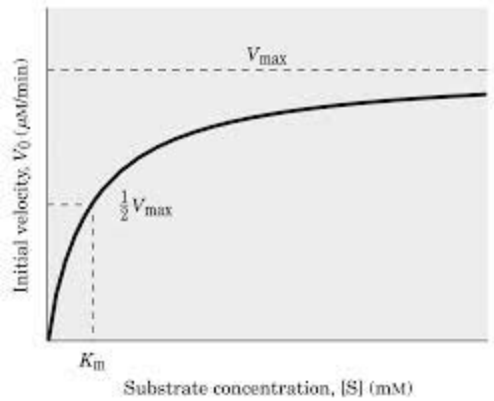
$$A + B \underset{K_r}{\overset{K_f}{\rightleftarrows}} C \qquad \frac{dC}{dt} = K_f[A][B] - K_r[C]$$

Equazione di Michaelis-Menten

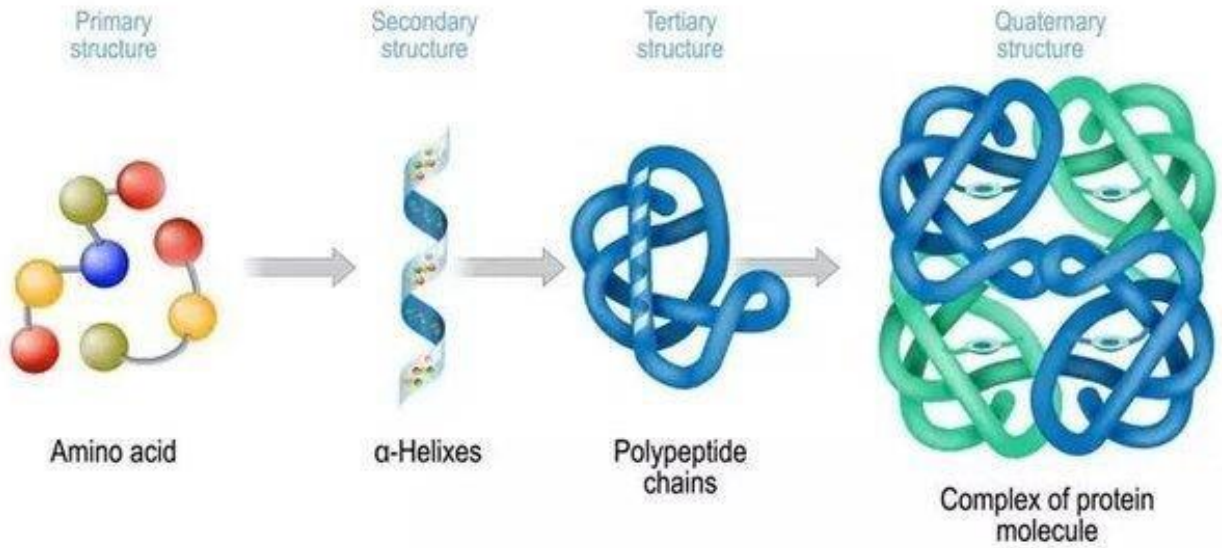
$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} ES \overset{K_2}{\rightarrow} E + P \qquad \frac{dP}{dt} = \frac{K_2[E][S]}{[S]+K_m} = \frac{Vmax\,[S]}{[S]+K_m}$$

$$K_m = \frac{K_{-1}+K_2}{K_1}$$





Protein structure



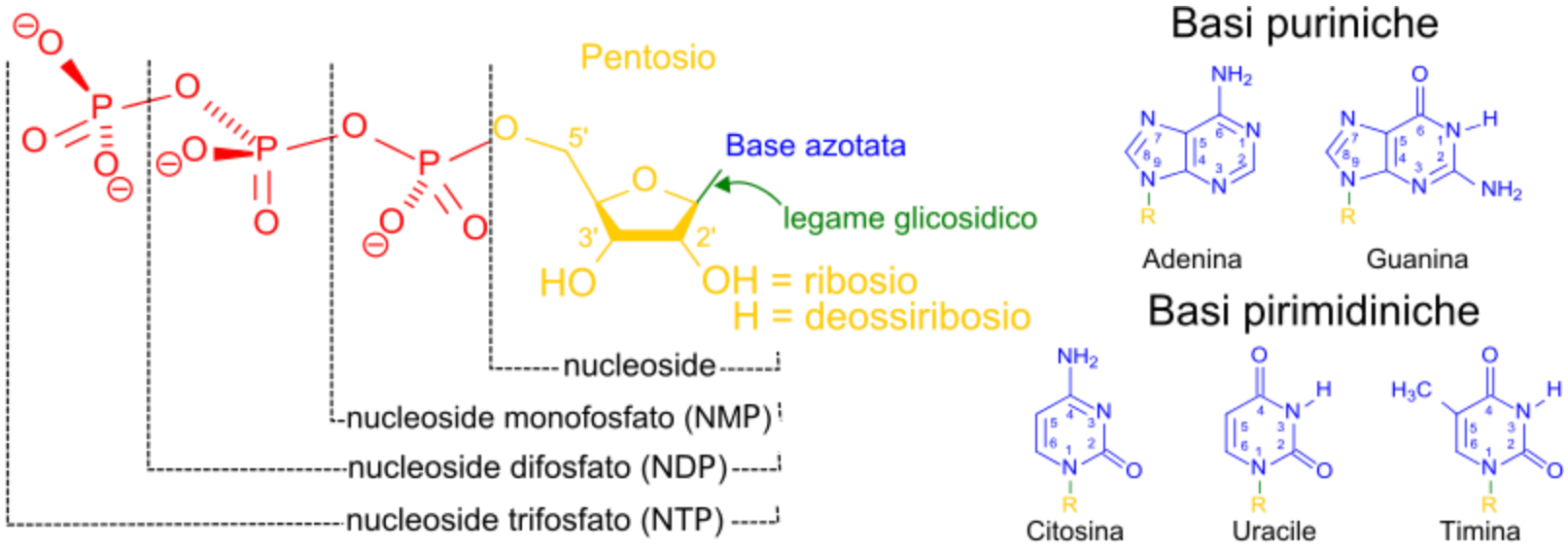
Denaturazione: tutto ciò che rompe la struttura 2°, 3° o 4° attraverso rottura di legami deboli: la struttura proteica è dovuta a un equilibrio delicato di tutte le forze deboli. E' facile denaturare una proteina.

- Calore
- Solventi
- pH
- Detergenti
- Urea

La denaturazione può essere reversibile.

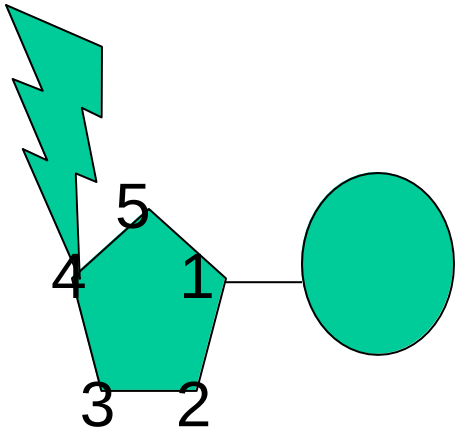
Acidi Nucleici: DNA, RNA, ADP, ATP

Nucleotidi= acido+zucchero+base

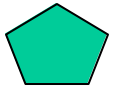


DNA (molecola negativa)

acido fosforico



Zucchero pentoso:
2 deossi D ribosio



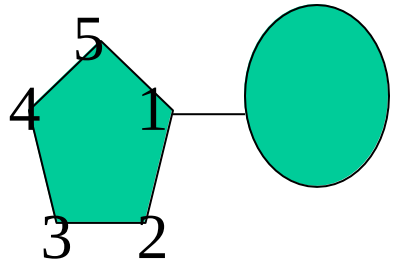
Basi amminiche aromatiche

Ci sono 4 basi, 2 che hanno un anello (si chiamano basi pirimidiniche), e 2 con due anelli (basi puriniche).

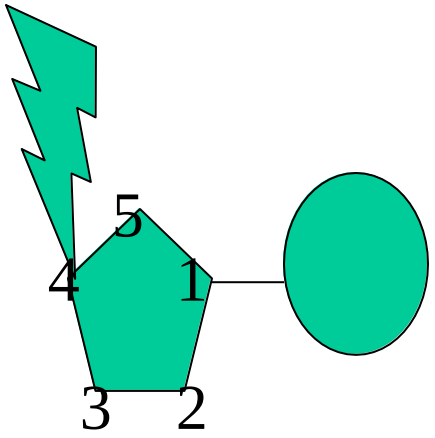
1 anello = citosina (uracile nel RNA) / timina

2 anelli= adenina /guanina

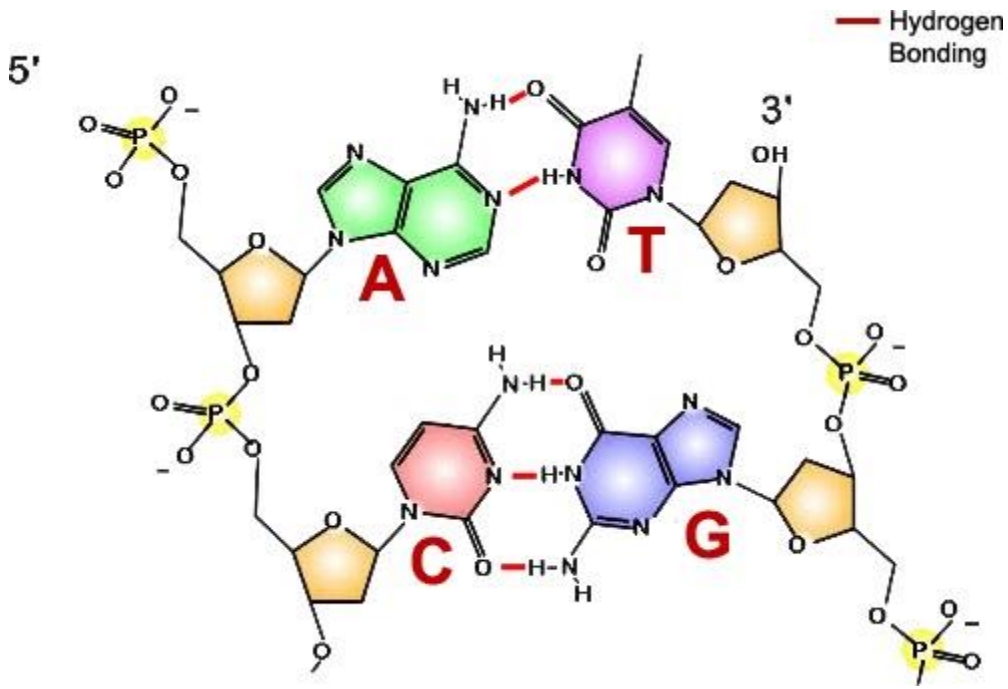
Nucleoside= base + zucchero



Nucleotide= nucleoside + acido fosforico
(dAMP; dCMP, dGMP, dTMP)
deossiadenosina monofosfato

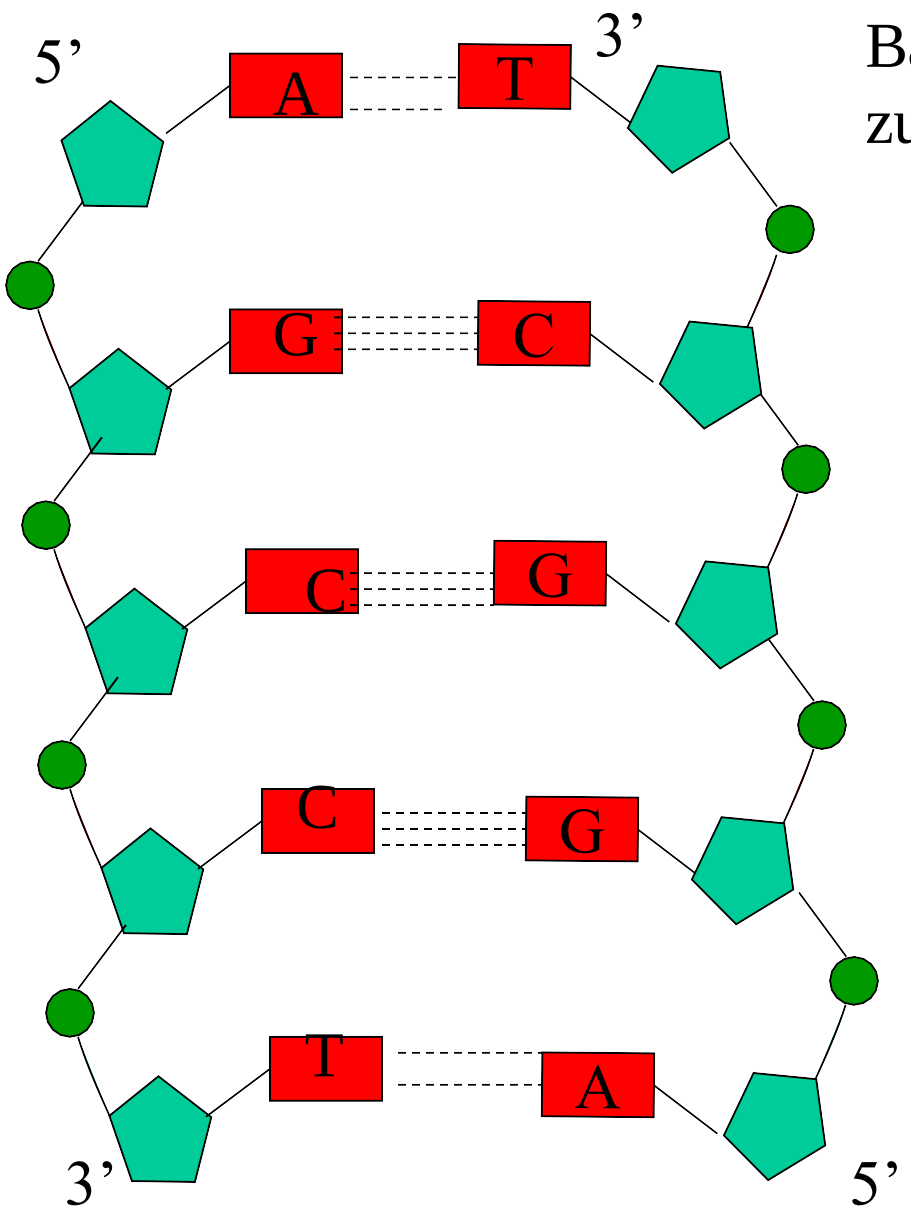


DNA: deoxyribonucleic acid



Legami H tra le basi. Legame CG è più stabile del TA

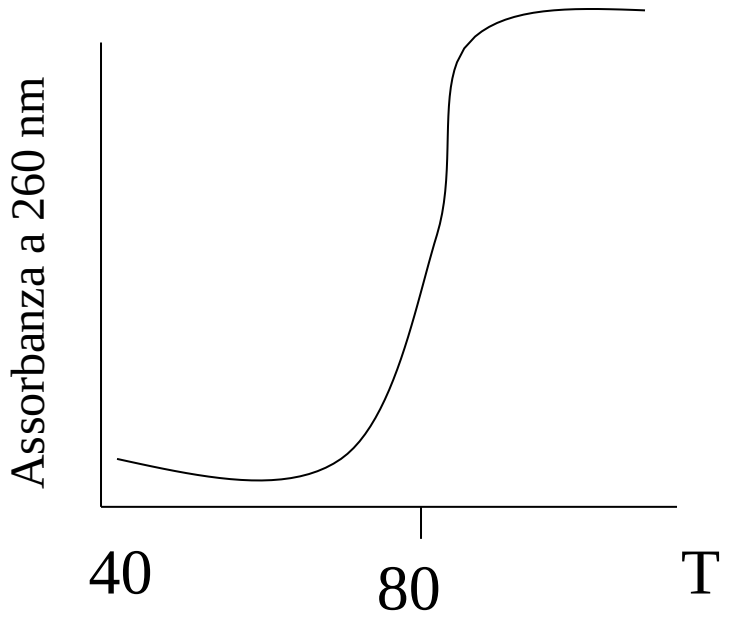
Coppie di Basi (base pairing) e complementarietà

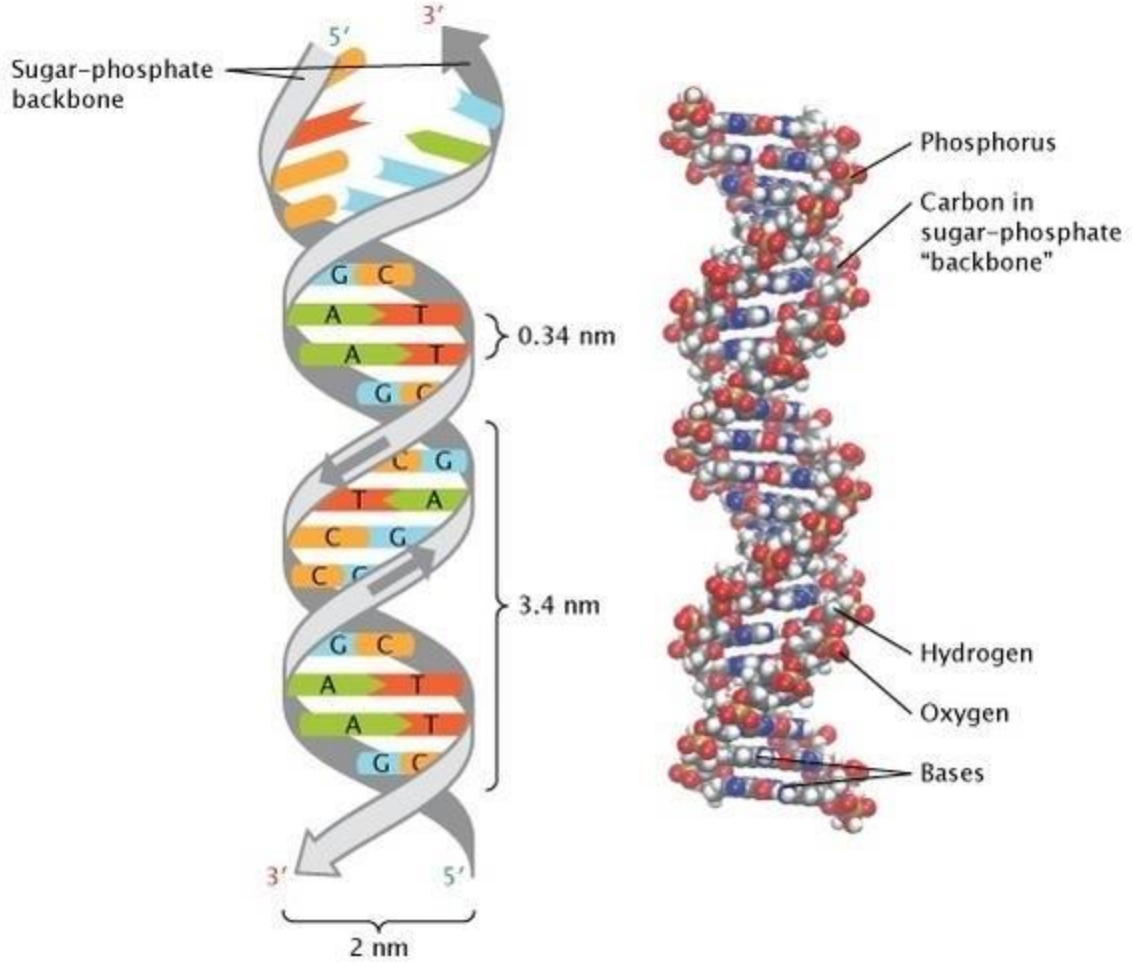


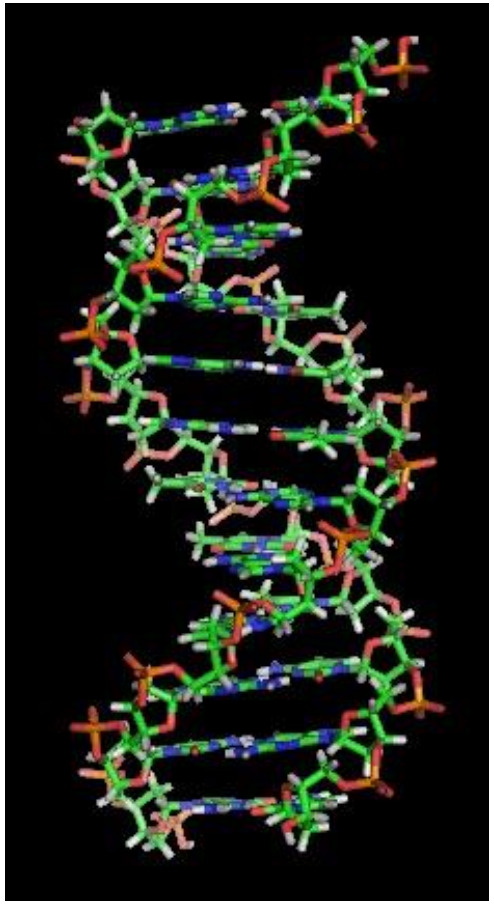
Backbone di zuccheri

5’AGCCT3’
3’TCGGA5’

La denaturazione è reversibile ma dipende dalla lunghezza





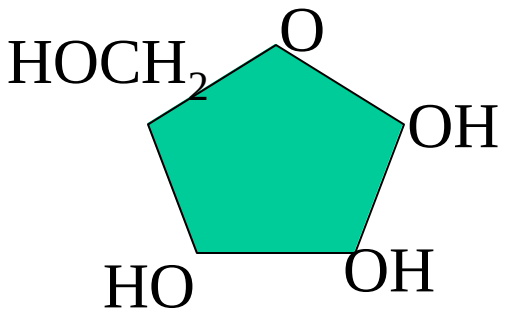


La doppia elica: struttura scoperta nel 1953. 10 basi per giro

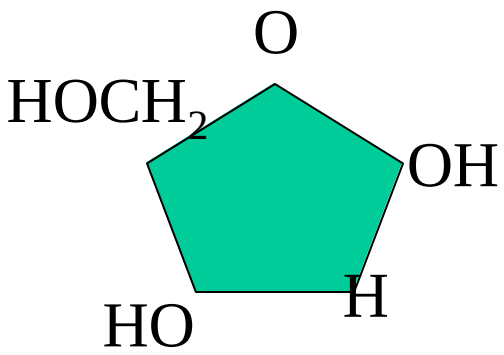
RNA-ribonucleic acid

RNA: simile a DNA ma

- lo zucchero pentoso è D-ribosio (anziche 2 deossi D ribosio)
- le basi pirimidiniche sono uracile (non timina) e citosina
- RNA è una catena singola.
- RNA si trova anche nel citoplasma
- Non si assembla o ibridizza spontaneamente



RNA



DNA

100 anni fa si pensava che info. genetica era contenuta nelle proteine. Solo negli anni 50, con la scoperta della doppia elica e il fatto che A/T e C/G=costante per una specie è stato confermato che l'informazione viene conservata nel DNA.

%adenina=%timina, %citosina=%guanina

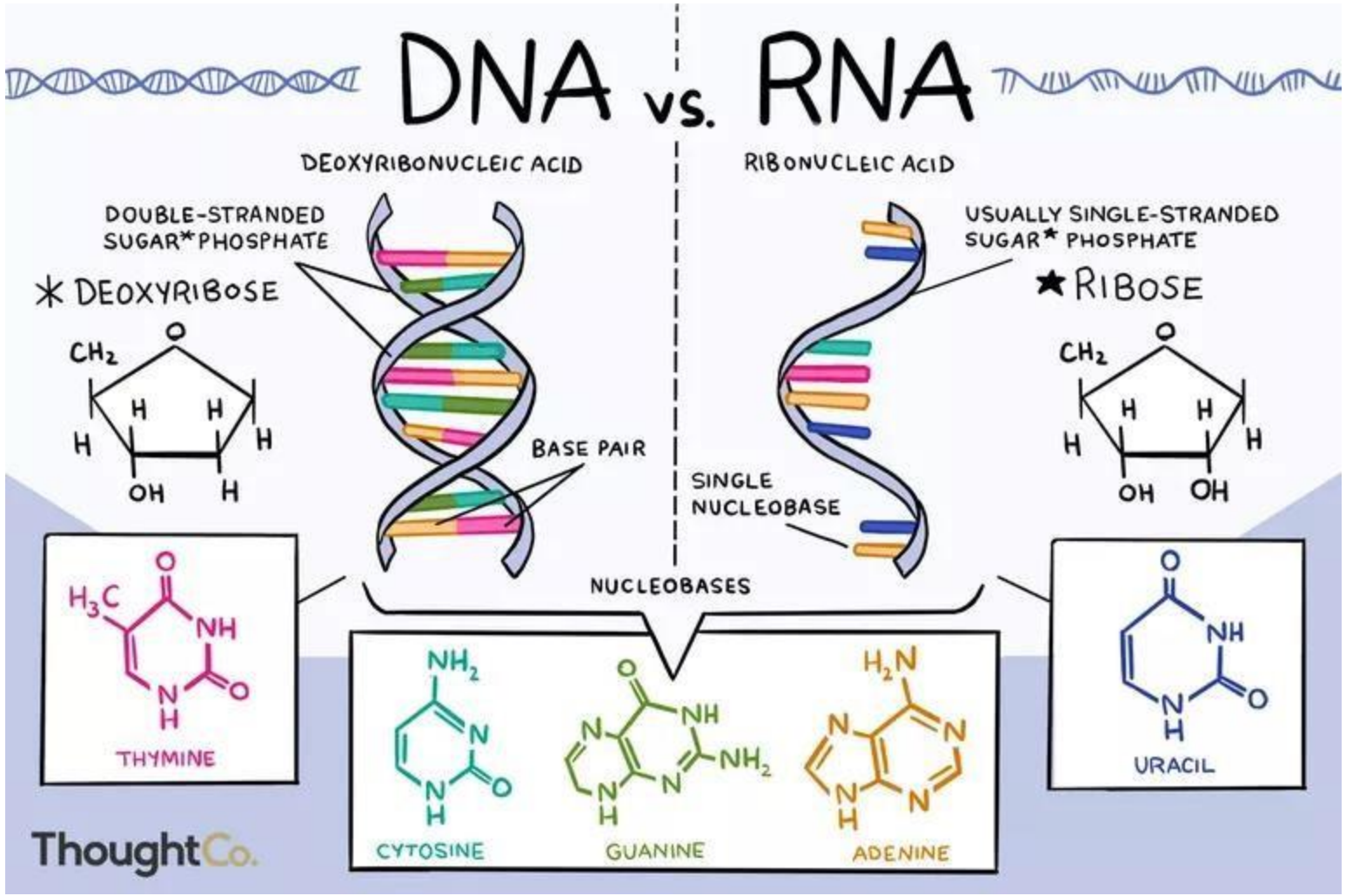
%basi purine= %basi pirimidine

per tutte le cellule di una specie

Perche info nel DNA? DNA è molto stabile grazie alla struttura a doppia elica. Catene singole di DNA sono instabili e insolubili in acqua.

NB: il DNA o RNA e' molto piu grande dell'amminoacido per cui codifica!

Immagazzina informazione trasla informazione



DNA: stabile, auto replicante

PCR: polymerase chain reaction

amplificazione di DNA: serve primer, nucleotide e DNA Polimerase

1) denaturazione

2) aggiungere i primer al termine 3’ di ogni catena

3)Nella soluzione viene aggiunta Taq polimerase + dA, dT, dC, dG e ATP.

4)Raffredamento

5) Riparto da 1)

Ogni ciclo dura circa 4 -10 minuti.

Applicazioni: studi forensici, Ingegneria proteica, paleontologia, sequenziamento DNA

Carboidrati: una classe di molecole e macromolecole che è la più abbondante in natura. Sono dolci=zuccheri

Funzioni:

immagazzinamento di energia in animali (glucosio)

supporto (cellulosa nelle piante, mucopolisaccaridi)

componente di acidi nucleici

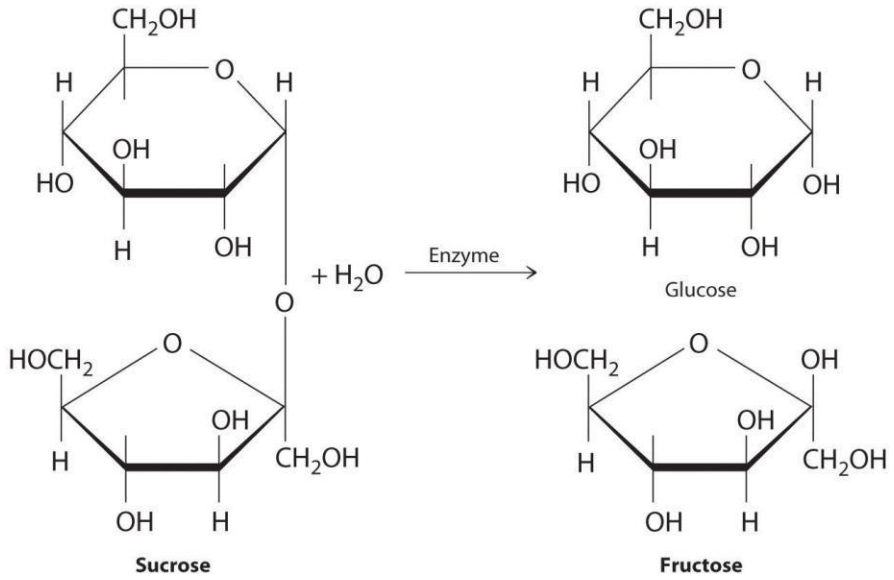
Tutte le membrane e tantissime proteine hanno dei carboidrati legati

Formula generale= $C_N(H_2O)_M$ (ma alcuni hanno anche gruppi amminici)

Carboidrati: monosaccaridi, disaccaridi, polisaccaridi

- Glucosio, galattosio, fruttosio - monosaccaridi
- Saccarosio, lattosio -disaccaride
- Cellulosa, amido, glicogeno (polisaccaridi)

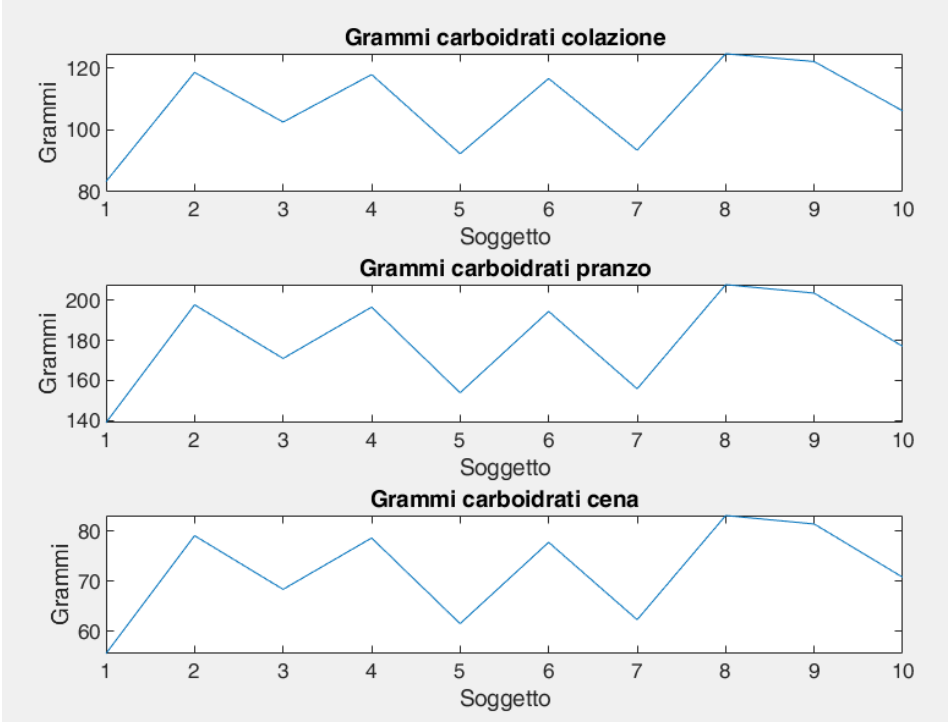
- Gli zuccheri complessi si idrolizzano per formare zuccheri semplici.

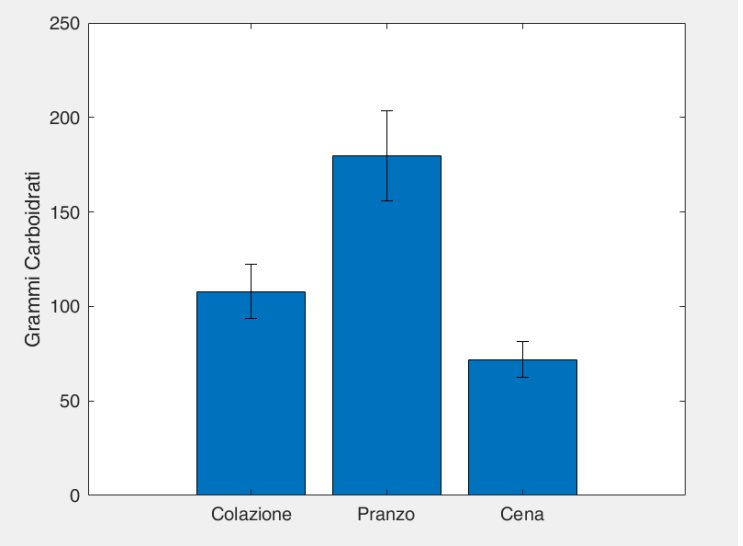


Il processo in figura e' catalizzato dall'enzima sucrasi

Esercizio Matlab

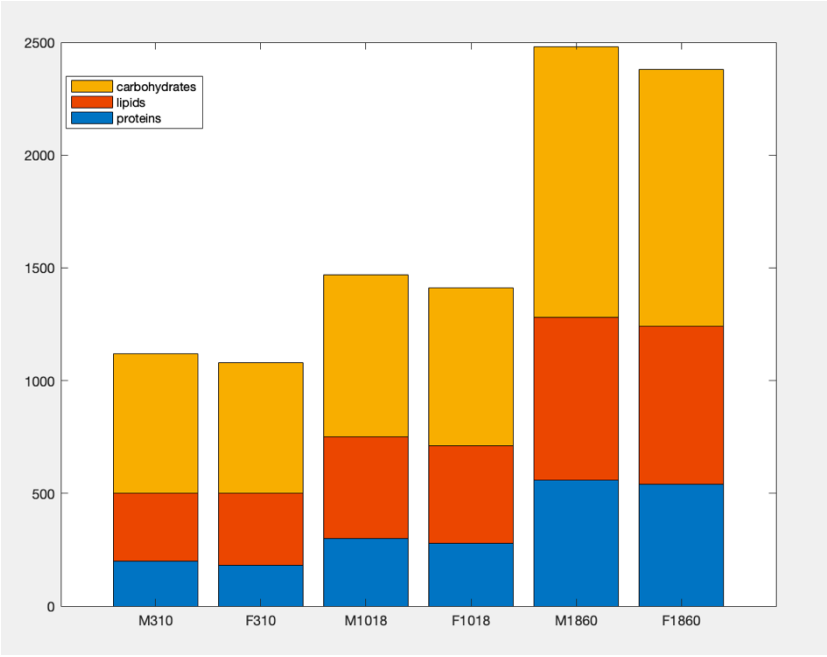
- Scrivere una funzione che prenda in ingresso numero min e max kcal/giorno e numero di soggetti (10)
- Se input non compreso nell'intervallo (2000-3000) mostrare messaggio di errore
- Calcolare grammi glucosio/giorno necessari
- $C_6H_{12}O_6$, PM=180.
- 55% energia giornaliera da carboidrati
- Reazione glucosio ossidasi 3000 kJ/mol
- Colazione 30%, pranzo 50%, cena 20%





Esercizio Matlab

- Importare i dati di peso dal file excel (6 gruppi di 50 pazienti divisi per sesso ed età). Salvare il workspace in un file .mat e richiamarlo nello script.
- Assegnare a ciascun gruppo un apporto calorico secondo il seguente schema:
- 3-10 -> M/F 5-15 kg: 1000-1300 kCal; 15-25 kg: 1300-1600 kCal; 25-35 kg: 1600:2000 kCal
- 10-18 -> M 35-50 kg 1500-1800 kCal; M 50-60 kg 1800-2000 kCal; M 60-75 kg 2000-2500 kCal

  F 30-45 kg 1200-1500 kCal; F 45-55 kg 1500-1800 kCal; F 55-65 kg 1800-2200 kCal
- 18-60 -> M 60-80 kg 2200-2500 kCal; M 80-100 kg 2500-2700 kCal; M 100-120 kg 2700-3000 kCal

  F 45-55 kg 2000-2300 kCal; F 55-65 kg 2300-2500 kCal; F 65-75 kg 2500-2800 kCal
- Considerare la seguente suddivisione media sull'apporto di nutrienti: proteine 15% - lipidi 30% - carboidrati 55%
- Riportare in un grafico con un subplot per ciascun gruppo l'apporto calorico per ogni paziente delle diverse biomolecole
- Riportare in un grafico a barre (tipo 'stacked') il valore medio dei diversi nutrienti per ciascun gruppo.