

CHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE: due facce della stessa medaglia – Parte II¹

*“Per comprendere la struttura di una proteina
dovremmo considerare non solo la sua composizione chimica e
le sue proprietà fisiche, che corrispondono alla sua anatomia,
ma anche le sue specifiche reazioni e funzioni biologiche.”*
(Langmuir)

ALESSANDRA BARBIN*

Introduzione

Gran parte delle problematiche dell'insegnamento si evidenziano in relazione al rapporto di quest'ultimo con la realtà. Ne consegue che un percorso educativo efficace dovrebbe sempre partire dalla consapevolezza che la realtà presenta molteplici sfaccettature e che queste vengono colte solo parzialmente da ogni singola disciplina. Si delinea quindi come necessario il tentativo di sviluppare negli alunni la progressiva coscienza di questa pluralità, unitamente al desiderio di una riorganizzazione unitaria del sapere.

Tale riflessione riconduce ad un altro aspetto centrale nel processo di apprendimento: la ricerca del filo logico che lega l'osservazione, l'esperienza diretta, il sedimentato di tale esperienza, traducibile nella formalizzazione di "immagini" quali metafore di quanto osservato ed esperito, e il loro utilizzo nel processo di costruzione di propri schemi mentali. Solo percorrendo le tappe di questo processo è possibile plasmare nei discenti la capacità di intuizione e di "saper vedere" con sguardo critico e consapevole la realtà molteplice che li circonda.

Nel presente contributo si è inteso descrivere il percorso didattico realizzato in un laboratorio d'informatica del Liceo Scientifico Statale 'A. Righi' di Bologna con gli studenti di una classe quarta "tradizionale".

Tale lavoro è stato progettato allo scopo di collegare e applicare le nozioni generali acquisite in aula, in relazione alla struttura delle proteine, alle nuove conoscenze inerenti la *Green Fluorescent Protein* (GFP), precedentemente apprese durante la partecipazione della classe a un percorso formativo di biologia molecolare presso i laboratori del "Life Learning Center" (LLC) della stessa città. A tal fine, si è ritenuto che potesse risultare di grande efficacia l'utilizzo di un programma di visualizzazione molecolare tridimensionale: *RasMol* 2.7.2.

Premessa metodologico-didattica

Alla fine degli anni '70, lo sviluppo delle tecnologie del DNA ricombinante e la pubblicazione delle prime sequenze di acidi nucleici fecero emergere nella comunità scientifica l'esigenza di poter disporre di archivi informatici di libero accesso in cui immagazzinare i numerosi dati che si andavano accumulando e che sarebbero stati prodotti nel tempo in quantità sempre maggiore. In genere, è a tale periodo che si fa risalire la nascita della *bioinformatica*, quale materia multidisciplinare il cui scopo principale è la gestione e l'analisi dell'enorme mole di dati provenienti dagli studi della moderna biologia e dalle biotecnologie. Relativamente di recente le attività di bioinformatica sono state raggruppate con diversi altri approcci matematici, quali la simulazione, il "modelling" e la statistica, in una nuova disciplina a cui è stato attribuito il nome di *biologia computazionale* (*Nature*, Vol. 420, pag. 205, novembre 2002). Sono proprio le metodologie bio-computazionali che consentono di effettuare le analisi più innovative sulle biomolecole: confronto di biosequenze per la ricerca di regioni di similarità, studi di evoluzione molecolare, studi di predizioni strutturali.

Ad oggi, le *banche dati biologiche* sono numerosissime e in esse sono raccolte le informazioni e i dati relativi alle principali molecole biologiche (DNA, RNA, proteine) di svariati organismi.

In riferimento alle proteine, l'analisi della loro sequenza amminoacidica riveste un ruolo fondamentale nello studio e nella comprensione della loro funzione. In generale, infatti, è la sequenza amminoacidica che determina la struttura tridimensionale di una proteina e quindi la sua funzione, sebbene sia stata identificata una serie di peptidi, detti *chaperonine*, che intervengono nel determinare il corretto ripiegamento di alcune proteine. Inoltre, in molti casi solo l'analisi della struttura 3D di una macromolecola può aiutare a comprendere in quale modo e per quale motivo una determinata sequenza possa codificare una specifica funzione.

¹ Il lavoro è tratto da una tesi di specializzazione svolta nell'ambito della SSIS-Bologna, indirizzo Scienze Naturali, classe A060: "La chimica di base per comprendere la struttura e le proprietà di molecole complesse: le proteine" di Alessandra Barbin, a.a. 2003/2004.
² A tale proposito si veda l'articolo "Chimica e biologia molecolare: due facce della stessa medaglia. - Parte I" pubblicato in CnS, anno XXVIII, n° 1, 2006.

Attualmente, nonostante sia nota la sequenza amminoacidica di un numero molto elevato di proteine, non è ancora stato messo a punto un sistema che, a partire dalla sola sequenza, riesca a predire la struttura proteica corrispondente in modo affidabile. I due principali metodi utilizzati a tal fine rimangono, quindi, la cristallografia a raggi X e la spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) che consentono di determinare le coordinate degli atomi costituenti la struttura molecolare. Tali coordinate cartesiane, archiviate in files di formato standard facilmente scaricabili da Internet consultando una delle tante banche dati proteiche disponibili (tra cui, ad esempio, *Protein Data Bank 3*, PDB) e per questo identificati di solito come *files PDB4*, vengono poi utilizzate per analisi computazionali e grafiche al fine di ricostruire la struttura atomica del peptide analizzato. È quest'ultimo aspetto che presenta significative ricadute didattiche in relazione al tentativo di aiutare gli studenti a costruirsi corrette ed efficaci "immagini mentali" riguardanti gli aspetti curriculari affrontati.

Tra i programmi di grafica molecolare, scaricabili gratuitamente dalla rete, vi è *RasMol*. Tale programma presenta due importanti caratteristiche: la notevole semplicità di utilizzo e la possibilità di produrre rappresentazioni tridimensionali "dinamiche" di discreta qualità.

In particolare, *RasMol 2.7.25* (versione utilizzata nel progetto) consente di ricostruire diversi tipi di rappresentazioni strutturali 3D di una specifica proteina. Il tipo di

³ Indirizzo web del *Protein Data Bank*: <http://www.rcsb.org/pdb/>

⁴ Per ulteriori informazioni relative alla *bioinformatica* e ai *file PDB* si consiglia di fare riferimento al testo "Introduzione alla bioinformatica" riportato in bibliografia e all'articolo "La didattica in 3D: come studiare le proteine al computer" di Giovanni Casavecchia - CnS, anno XXVII, n° 5, 2005.

rappresentazione prescelto dipende dal particolare aspetto della struttura proteica che si desidera analizzare.

Da quanto appena riportato, risulta evidente il carattere multidisciplinare e interdisciplinare dell'approccio bioinformatico allo studio delle molecole proteiche, metodo di analisi che si avvale in gran parte di competenze chimiche.

Visualizzazione tridimensionale della proteina verde fluorescente

Nei giorni precedenti l'esercitazione, tutto il "materiale" didattico necessario alla realizzazione dell'intervento (programma *RasMol 2.7.2* e *file PDB* relativo alle coordinate atomiche della GFP) era stato memorizzato nella cartella "Documenti" di ciascun computer del laboratorio informatico, in modo tale che fosse di facile accesso per gli studenti.

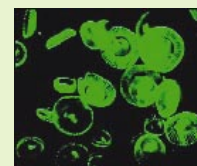
La lezione ha quindi avuto inizio con l'apertura del programma grafico *raswin* (versione di *RasMol* eseguibile per Windows) che consente la visualizzazione tridimensionale della struttura proteica considerata. Cliccando sull'icona relativa si aprono due finestre: la prima (*RasMol Version 2.7.2*), a sfondo nero, dove si crea l'immagine tridimensionale, l'altra, a sfondo bianco (*RasMol Command Line*), in cui è possibile digitare specifici comandi grazie alla presenza di una linea di testo.

Al fine di visualizzare la GFP nella prima delle due finestre, gli studenti sono stati invitati a digitare i primi comandi riportati su una dispensa consegnata loro in precedenza e recante la successione delle operazioni da effettuare.

⁵ Scaricabile dal sito <http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol>

SCHEDA 1 - Visualizzazione tridimensionale della proteina verde fluorescente (GFP: Green Fluorescent Protein) mediante il programma *RasMol 2.7.2*

La proteina verde fluorescente (GFP), utilizzata nelle esercitazioni di laboratorio effettuate presso il "Life Learning Center", è stata isolata dalla medusa tropicale *Aequorea victoria*. Tale organismo, come molti altri celenterati, manifesta il fenomeno della bioluminescenza, riconducibile alla presenza della proteina GFP all'interno di cellule specifiche. Questa proteina ha una caratteristica forma cilindrica (β -barile) e, al suo interno, racchiude un cromoforo sensibile alla luce ultravioletta. Esso, infatti, se colpito da tali lunghezze d'onda, tende a emettere a sua volta luce visibile nella lunghezza d'onda del verde.



Il nostro scopo, nella presente esercitazione, è di visualizzare la proteina e analizzarne le principali caratteristiche.

Apriamo il programma *raswin* cliccando sull'icona relativa.

Utilizzando la barra dei comandi (BC) del programma di visualizzazione apriamo il *file PDB*, relativo ai dati cristallografici della GFP, premendo in successione:

File → Open → Cartella contenente il programma PDB (ad esempio: "EsercitazBioInf") → *File PDB* contenente i dati cristallografici (ad esempio: "1EMA-GFP") → Apri.

[La proteina viene visualizzata in modalità wireframe (Display) e CPK (Colours)].

Innanzitutto, cerchiamo di riconoscere le diverse porzioni della struttura secondaria della proteina.

A tal fine, digitiamo nella *RasMol Command Line* (CL), che si apre insieme a *raswin*, i seguenti comandi:

CL zoom 150 → Invio
 CL structure → Invio
 BC Colours → Structure
 BC Display → Cartoons
 BC Options → Specular
 (CL select turns → Invio)

Nella struttura della proteina, costituita nella rappresentazione da 1717 atomi, si possono riconoscere 4 α -eliche, 11 β -foglietti e 20 loop (originati dalla presenza di specifici legami a idrogeno tra porzioni contigue della catena amminoacidica ove questa è priva di una specifica struttura secondaria). È evidente la forma a barile della proteina che risulta essere attraversata per tutta la sua lunghezza da un'unica α -elica solo apparentemente suddivisa in quattro porzioni distinte (Figura 1).

CL select protein → Invio
 CL hbonds on → Invio
 BC **Display** → Backbone

Vengono evidenziati i numerosi legami a idrogeno (161) che legano stabilmente tra loro i β -foglietti conferendo alla proteina la sua caratteristica struttura secondaria. Questi stessi legami stabilizzano anche le α -eliche ed i loop. Si tratta di legami deboli che si formano per interazione tra l'ossigeno carbossilico di un amminoacido ed un gruppo amminico di un altro amminoacido della sequenza (Figura 3).

Ora mettiamo in evidenza il cromoforo (questo nel *file PDB* viene indicato con la sigla *cro*).

CL select cro → Invio
 CL colour green → Invio
 BC **Display** → Ball and stick

Il cromoforo, porzione più delicata di tutto il complesso molecolare, è collocato nel centro geometrico della proteina in una posizione protetta (Figura 4). Con il termine *cromoforo* s'intende un gruppo atomico insaturo presente in alcune molecole o composti organici che ha la capacità di assorbire radiazione elettromagnetica nella regione del visibile e dell'ultravioletto e che rende colorate le sostanze in cui è contenuto. Talvolta sono necessari più gruppi cromofori affinché una sostanza cromogena (ossia un composto contenente uno o più cromofori) appaia colorata.

CL select protein → Invio
 BC **Display** → Strands
 CL hbonds off → Invio

Ora evidenziamo gli amminoacidi polari e non polari della proteina. Queste porzioni sono diversamente distribuite nella struttura proteica e la loro posizione relativa ha grande importanza in rapporto alla solubilità della proteina stessa.

CL select polar → Invio
 CL colour red → Invio
 BC **Display** → Ball and Stick
 (sfere e bastoncini)

CL select hydrophobic → Invio
 CL colour white → Invio
 BC **Display** → Ball and Stick
 CL select backbone → Invio
 BC **Display** → Ribbons
 (nastri)

È evidente una maggiore distribuzione dei residui amminoacidici polari sulla superficie esterna del β -barile e, conseguentemente, una maggiore presenza di residui idrofobici all'interno della struttura proteica (Figure 5 e 6). Questo è dovuto al fatto che la GFP, essendo una proteina citoplasmatica, deve poter essere solubile in un ambiente acquoso. Tuttavia, la non trascurabile presenza di residui idrofobici direttamente a contatto con l'ambiente esterno rende questa molecola facilmente purificabile mediante cromatografia ad interazione idrofobica (HIC).

CL select protein → Invio
 BC **Display** → Spacefill
 (sfere piene)
 BC **Options** → Specular

Cliccando con il tasto sinistro del mouse su uno degli amminoacidi della proteina se ne può leggere la natura sulla *RasMol Command Line*.

Ora osserviamo più da vicino il cromoforo.

Cliccando con il tasto sinistro del mouse su uno degli atomi del cromoforo se ne può leggere la natura chimica sulla *RasMol Command Line*. Oppure si può utilizzare la funzione Pick Label (sotto la funzione Settings nella barra dei comandi) con la stessa

CL restrict cro → Invio
 CL zoom 250 → Invio

BC **Colours** → CPK
 CL zoom 150 → Invio
 CL colour green → Invio

La colorazione CPK distingue gli atomi in base alla loro specie chimica. Il cromoforo è costituito da tre amminoacidi (Ser o Thr65 - Tyr66 - Gly67) in seguito a loro ciclizzazione, deidratazione e ossidazione. Esso in realtà è direttamente collegato all' α -elica centrale. Gli anelli a 5 e 6 atomi di carbonio sono complanari e l'intero cromoforo è provvisto di un esteso sistema di doppi legami coniugati: caratteristiche alla base delle sue proprietà fluorescenti (Figure 7e8).
 [Cromoforo → "croma" = colore + "foro" = porto]

Evidenziamo alcuni dei principali amminoacidi polari che interagiscono direttamente, mediante legami a idrogeno, con il cromoforo contribuendo, in tal modo, sia alla sua stabilità sia probabilmente alle sue proprietà fluorescenti. (Anche in questo caso le informazioni relative agli amminoacidi si ottengono dalla lettura del *file PDB*).

CL select protein → Invio
 BC **Colours** → Structure
 BC **Display** → Backbone
 CL select 69,94,96,148,203,222 → Invio
 BC **Display** → Balls and sticks
 CL restrict 69,94,96,148,203,222,cro → Invio
 CL zoom 250 → Invio
 BC **Display** → Spacefill

Cliccando con il tasto sinistro del mouse su un residuo amminoacidico se ne può leggere la natura sulla *RasMol Command Line*.

La proteina è così apparsa in modalità *wireframe*: questo tipo di rappresentazione consente di visualizzare tutti gli atomi descritti nel file di coordinate (carbonio in grigio, ossigeno in rosso e azoto in bluette) come intersezioni di segmenti che rappresentano i legami chimici esistenti tra gli atomi stessi (Valle et al., 2003).

Gli allievi sono quindi stati esortati a ruotare l'immagine (posizionando il mouse sulla figura e mantenendone il tasto sinistro premuto mentre lo si sposta) e a notare se in essa osservavano "architetture" particolari. Al fine di favorire tale ricerca, sono stati loro suggeriti i comandi per ingrandire la struttura; tuttavia, nemmeno in questo modo gli studenti sono riusciti a distinguere particolari significativi.

Si è allora deciso di far digitare loro i comandi successivi in modo da cambiare modalità di rappresentazione: è apparsa così evidente la struttura terziaria della proteina GFP (Figura 1), costituita da quattro porzioni ad α elica (in fucsia), da undici foglietti ripiegati β (in giallo) e da venti ripiegamenti β o anse (in bluette).

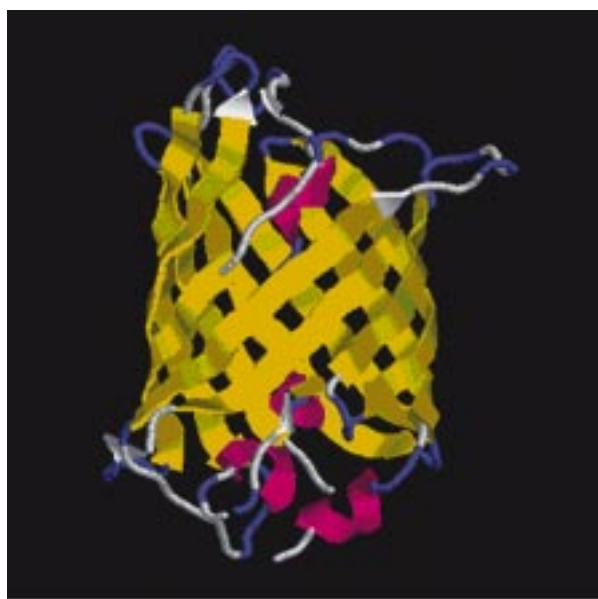


Figura 1 Struttura terziaria di ciascuna subunità proteica.

Per evitare di trasmettere agli studenti concetti errati è stato immediatamente chiarito loro che la figura osservata non era una "fotografia" della realtà, bensì solo un'utile rappresentazione grafica, come pure tutte le immagini che avrebbero esaminato successivamente.

A partire dalla struttura tridimensionale visualizzata, sono quindi state descritte le principali caratteristiche della proteina in esame. La *Green Fluorescent Protein*, costituita da 238 amminoacidi, è stata isolata per la prima volta dalla medusa tropicale *Aequorea victoria* ([http://www.biochemtech.uni-halle.de/...](http://www.biochemtech.uni-halle.de/)). Essa, in realtà, è un dimero funzionale (Figura 2) costituito da due subunità identiche associate tra loro mediante interazioni deboli fra amminoacidi idrofobi e idrofili presenti alla sua superficie (Tsien, 1998).

Ciascuna subunità della proteina presenta una struttura terziaria cilindrica costituita da 11 foglietti ripiegati β , che ne formano le "pareti". Inoltre, mentre tre piccole porzioni ad α elica costituiscono una sorta di "coperchio" o "diagramma" sulle parti terminali di ciascuna struttura cilindrica, la quarta ed ultima porzione (un segmento irregolare ad α elica visibile solo parzialmente nella Figura 1) si snoda lungo l'asse longitudinale di ciascun cilindro

(Tsien, 1998). Nel centro geometrico di quest'ultimo è localizzato il cromoforo, che deriva dalla ciclizzazione di tre amminoacidi appartenenti proprio alla quarta porzione ad α elica. Grazie alla presenza di un elevato numero di legami a idrogeno tra i foglietti ripiegati β , ogni dominio del dimero risulta estremamente stabile e compatto, evitando, in tal modo, l'accesso al cromoforo da parte di ligandi diffusibili potenzialmente nocivi. Nel suo complesso, questo tipo di ripiegamento (*beta-barrel*: barile beta), in cui i foglietti β si dispongono alla superficie e le α eliche all'interno della struttura, rappresenta una nuova classe di pro-



Figura 2 Struttura quaternaria della proteina GFP.

teine definite *beta-can* ([http://dwb.unl.edu/...](http://dwb.unl.edu/)).

Visto il ruolo fondamentale che i legami a idrogeno svolgono nella formazione delle strutture secondarie, si è ritenuto utile visualizzarli in una fase successiva. Al fine di poter osservare più chiaramente questi stessi legami (161), è stata cambiata la tipologia di rappresentazione (*Backbone*: "colonna vertebrale"), in modo tale che la proteina venisse raffigurata mediante una linea spezzata unente i carboni α della catena principale (Figura 3) e i legami a idrogeno apparissero come linee "puntinate".

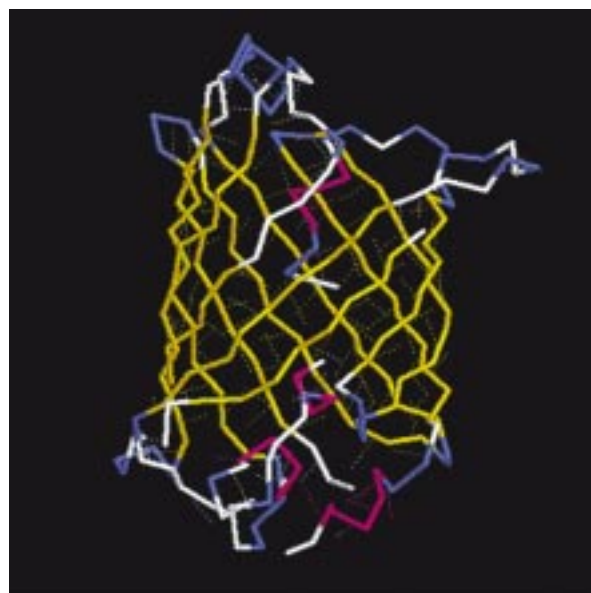


Figura 3 Legami a idrogeno stabilizzanti il ripiegamento a barile di ciascun dominio del dimero.

A questo punto sono stati indicati alla classe i comandi per evidenziare, all'interno della struttura a beta barile, il cromoforo (*cro*) (Figura 4).

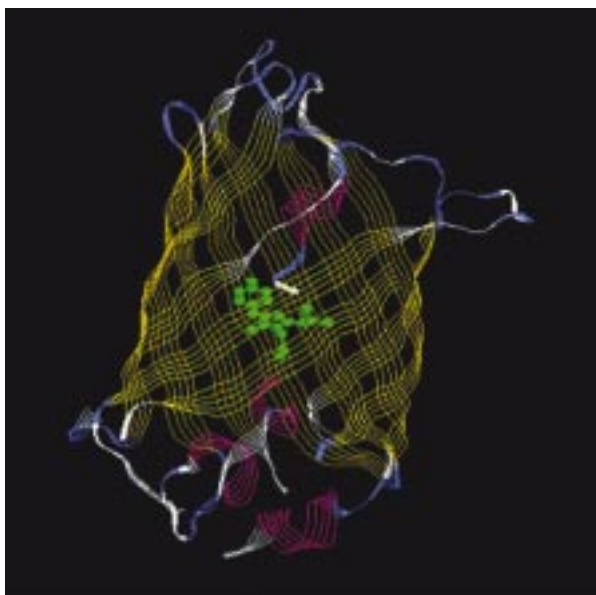


Figura 4 Posizione centrale del cromoforo all'interno della struttura a barile.

Anche in relazione a questo, dopo averne dato la definizione generale (“croma” = colore, “fero” = porto), sono state descritte le caratteristiche principali. Esso è, senza dubbio, la porzione più delicata del complesso proteico ed è presumibilmente per questo motivo che si trova al centro di ciascuna subunità. Come già accennato, è formato da tre residui amminoacidici (65, 66, 67) interni alla sequenza e corrispondenti, rispettivamente, a una serina, a una tirosina e a una glicina (Ser-Tyr-Gly).

Il cromoforo funzionale si genera, attraverso un meccanismo sequenziale di ciclizzazione post-trascrizionale, in un processo autocatalitico nel quale, cioè, non è richiesto l'intervento né di cofattori, né di componenti enzimatiche. In tale processo, fondamentale è la presenza della glicina che non può essere sostituita da nessun altro amminoacido. La reazione di formazione del cromoforo è termosensibile: la resa diminuisce per temperature superiori ai 30 °C.

Tuttavia, una volta formata completamente, la proteina GFP è estremamente resistente ai processi di denaturazione sia fisici che chimici (<http://dwb.unl.edu/...>).

Di seguito, è stata presa in considerazione la distribuzione degli amminoacidi polari e apolari della proteina: questi, infatti, risultano diversamente distribuiti nella struttura terziaria influenzando, in tal modo, sulla solubilità della proteina stessa.

Dopo aver digitato i comandi opportuni e aver ruotato la proteina (Figura 5), è apparsa evidente la maggiore distribuzione dei residui amminoacidici polari (in colore rosso) sulla superficie esterna del beta barile e, conseguentemente, la maggiore presenza dei residui idrofobici (in colore bianco) all'interno della struttura proteica.

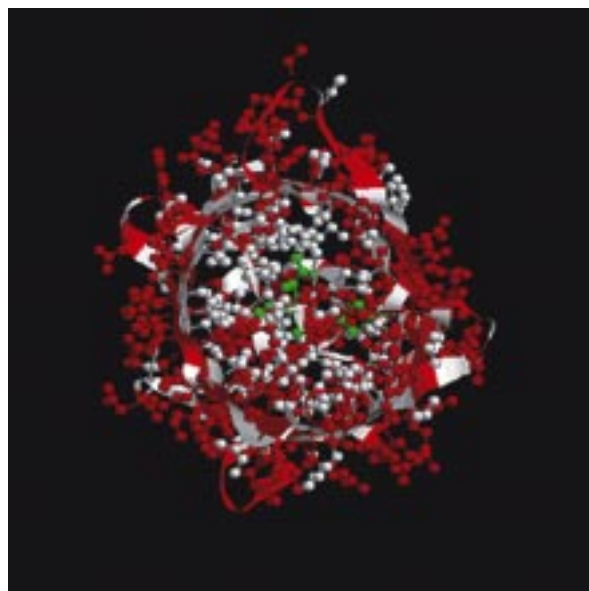


Figura 5 Distribuzione degli amminoacidi idrofilici (rosso) e idrofobici (bianco).

Si è così potuto spiegare agli studenti come questa caratteristica non sia casuale, ma diretta conseguenza del ripiegamento della catena polipeptidica della GFP, guidato dalla forte tendenza dei residui idrofobici ad escludere l'acqua (componente principale del citoplasma). In questo modo, mentre le catene polari superficiali, interagendo con il citoplasma, promuovono la solubilizzazione della proteina, i residui non polari, protetti il più possibile all'interno della struttura a barile, conferiscono a questa un'elevata stabilità termodinamica. A conferma di quanto espresso, è stata nuovamente cambiata la tipologia di rappresentazione (*Spacefill*): questa, raffigurando gli atomi costituenti la proteina con “sfere piene” di raggio equivalente ai raggi atomici di Van der Waals, consente una facile definizione della superficie e del volume occupato dalla biomolecola (Figura 6).

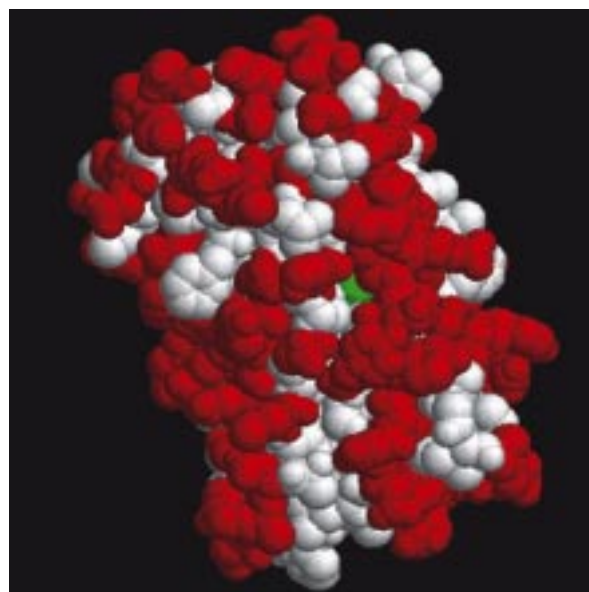


Figura 6 Subunità proteica in formato *Spacefill*: è evidente l'estrema compattezza della struttura terziaria.

A tale proposito, la classe è stata invitata a memorizzare quanto appena esposto e la struttura visualizzata poiché, nelle successive lezioni, inerenti le tecniche cromatografiche, il concetto sarebbe stato ripreso e approfondito (sarà illustrato e discusso nel prossimo contributo, Parte III).

Si è allora deciso di tornare ad osservare più da vicino il cromoforo, visualizzandolo mediante la colorazione CPK che consente di distinguerne gli atomi in base alla loro specie chimica (Figure 7 e 8).



Figura 7 Cromoforo in formato CPK: è evidente la disposizione complanare dei due anelli.



Figura 8 Cromoforo in formato Sticks: residui aminoacidici costituenti ciclizzati

Agli studenti è stata fatta notare la presenza in esso di due anelli complanari a cinque e sei atomi di carbonio, struttura molecolare sulla quale sono stati invitati a ragionare.

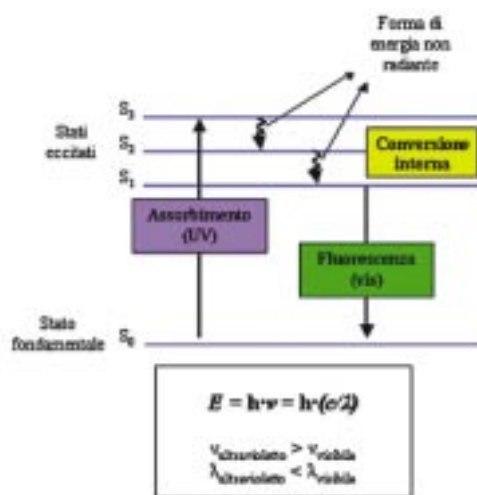
Utilizzando le loro conoscenze pregresse di chimica generale e di chimica organica si è giunti a stabilire che:

- 1) i due anelli risultano effettivamente giacenti sul medesimo piano, data l'ibridazione sp^2 degli atomi di carbonio e azoto costituenti,
- 2) l'atomo di carbonio intermedio tra i due anelli, essendo anch'esso ibridizzato sp^2 , deve presentare un doppio legame.

Maggio - Giugno 2006

Ne risulta così una struttura altamente insatura a causa dell'elevato numero di doppi legami coniugati. Questi, oltre a conferire una considerevole stabilità al cromoforo, risultano anche i principali responsabili delle sue proprietà fluorescenti.

A tale proposito, la domanda di una studentessa ha dato l'opportunità di spiegare alla classe il processo che è alla base della fluorescenza. Così, disegnando alla lavagna lo schema riportato in Figura 9, questo fenomeno è stato brevemente illustrato.



ν = frequenza di un'onda
 λ = lunghezza d'onda
 E = energia di un'onda (radiazione) di frequenza ν
 h = costante di Planck (pari a $6,626 \cdot 10^{-34}$ Js)
 v = velocità di propagazione di un'onda, $v = \lambda \nu$
 [nel caso della radiazione elettromagnetica, $v = c$ (velocità della luce)]

Figura 9 Schematizzazione del processo radiativo di fluorescenza.

Il processo di fluorescenza consiste nell'emissione spontanea di radiazione elettromagnetica da parte di una molecola che si trova in uno stato elettronicamente eccitato. Il nome del fenomeno deriva dalla fluorite, minerale costituito da ioni calcio e ioni fluoruro (CaF_2) che, in alcuni casi, può manifestare appunto il fenomeno della fluorescenza. Nella maggior parte delle molecole, l'assorbimento di una radiazione di opportuna energia provoca una transizione di un elettrone dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato. Immediatamente dopo il salto energetico, ha luogo una serie di eventi, estremamente rapidi e in competizione tra loro, volti a rilasciare l'energia assorbita dalle molecole. Il fenomeno più comune che si realizza in queste circostanze è il così detto *decadimento non radiativo* in cui l'energia eccedente si trasferisce dalle molecole eccitate alle altre molecole circostanti sotto forma di energia di vibrazione, rotazione e traslazione. L'energia di eccitazione può essere rilasciata anche sotto forma di agitazione termica dell'ambiente, ossia come calore, e allora si parla di *degradazione termica*. Oppure, le molecole possono liberarsi dell'energia acquisita sotto forma di un fotone tramite il

⁶ Al riguardo è stato puntualizzato agli studenti che l'aggettivo *radiativo* deriva dal termine radiazione e, pertanto, non va confuso con *radioattivo*.

processo di *decadimento radiativo*, di cui la fluorescenza è un esempio.

In ultimo, le molecole eccitate possono sfruttare l'energia eccedente per prendere parte ad una *reazione chimica*.

Tra questi diversi processi alla fine si realizzerà quello più rapido in ordine di tempo, ossia quello cineticamente favorito e/o con maggiore probabilità relativa di verificarsi. Così, ad esempio, è molto più probabile che la perdita di energia di eccitazione si realizzi come dispersione di calore nell'ambiente in seguito alla collisione tra molecole (trasferimento di energia che si attua in tempi dell'ordine di 10^{-13} s), piuttosto che attraverso l'emissione per fluorescenza (processo a vita media di circa 10^{-8} s). Tuttavia, in alcune condizioni specifiche, quali la presenza di doppi legami coniugati e, quindi, di delocalizzazione elettronica e di "anelli rigidi" a livello della struttura della molecola eccitata, il processo di fluorescenza può essere favorito rispetto agli altri fenomeni e quindi realizzarsi.

Questo spiega il perché non tutte le molecole eccitate danno luogo a fluorescenza o fosforescenza, processi, come già detto, di decadimento radiativo. Per quanto riguarda la fluorescenza, l'assorbimento iniziale innalza l'energia della molecola dallo stato fondamentale S_0 ad uno stato elettronico eccitato, ad esempio S_1 (Figura 9). Immediatamente dopo il salto energetico, ha luogo la così detta *conversione interna*: indipendentemente da quale livello energetico eccitato sia stato raggiunto, la molecola subisce una rapida e parziale perdita di energia, emessa in forma non radiante come energia termica dell'intorno, in seguito agli urti con le molecole circostanti. In questo modo, le molecole eccitate raggiungono rapidamente il più basso stato eccitato S_1 , dal quale tornano poi al livello energetico fondamentale mediante l'emissione di un quanto di luce, ossia rilasciando l'eccesso di energia residua in forma di radiazione. La radiazione "fluorescente" così ottenuta presenta una frequenza ν , e quindi un'energia, inferiore a quella della radiazione eccitante assorbita, poiché la transizione finale, dal più basso livello eccitato S_1 al livello elettronico fondamentale S_0 , ha luogo solo dopo che una certa quantità di energia assorbita si è "scaricata" in altro modo. La lunghezza d'onda λ della radiazione emessa è tanto minore quanto maggiore è il salto energetico verificatosi: così l'onda elettromagnetica rilasciata sarà visibile come luce blu fluorescente se il salto energetico è elevato, come luce verde o rossa fluorescente se il salto è ridotto. Ciò spiega anche perché per l'eccitazione sia necessaria la radiazione ultravioletta che possiede una λ inferiore a quella della luce visibile. In generale, le molecole che danno fluorescenza presentano, a livello della loro struttura molecolare, anelli rigidi e complanari e un numero rilevante di doppi legami coniugati, con conseguente delocalizzazione elettronica estesa. Questo infatti è ciò che si riscontra anche nella struttura molecolare del cromoforo della proteina verde fluorescente, come appare evidente nelle Figure 7 e 8.

Nel caso della fluorescenza, la radiazione emessa spontaneamente cessa subito dopo che si è estinta quella responsabile dell'eccitazione. Al contrario, nella fosforescenza l'emissione spontanea può persistere a lungo (anche ore, ma il più delle volte per secondi o frazioni di secondo) dopo la fine dello stimolo. Questa differenza fa supporre che, mentre nella fluorescenza si verifica una conversione immediata dell'energia assorbita in energia riemessa, la fosforescenza comporti l'accumulo dell'energia di eccitazione in una sorta di "serbatoio" dal quale poi

essa sfuggirebbe lentamente. Tuttavia, poiché la spiegazione del processo di fosforescenza richiede conoscenze chimico-fisiche molto approfondite e complesse ed esula dagli intenti specifici di questa trattazione, l'argomento in questa sede non sarà approfondito oltre quanto detto.

Ritornando all'esercitazione di bioinformatica, da ultimo sono stati fatti visualizzare alla classe alcuni dei principali amminoacidi polari che, interagendo direttamente con il cromoforo, contribuiscono a determinarne l'alta stabilità e, probabilmente, parte delle proprietà fluorescenti (Figura 10).

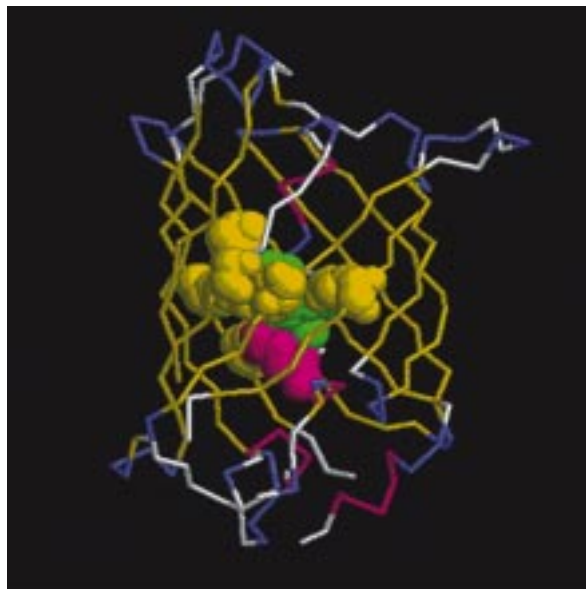


Figura 10 Posizione degli amminoacidi polari interagenti con il cromoforo (Spacefill) nella struttura terziaria della subunità proteica (Backbone).

Tra questi particolarmente importanti risultano le glutamine 69 e 94, l'arginina 96, l'istidina 148, la treonina 203 e il glutamato 222, ciascuno dei quali interagisce direttamente, attraverso legami a idrogeno, con il cromoforo (Figura 11) (Tsien, 1998).

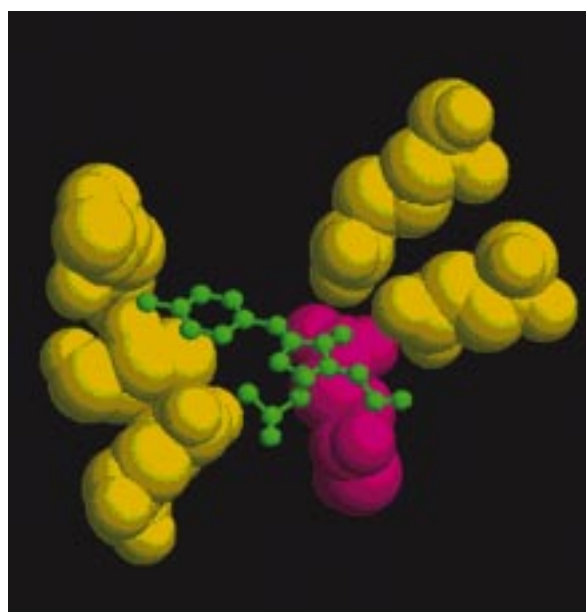


Figura 11 Principali amminoacidi polari stabilizzanti il cromoforo.

I primi tre amminoacidi, inoltre, sembra che partecipino attivamente alla stabilizzazione e alla delocalizzazione della carica sul cromoforo stesso. In questo articolo si riporta anche la procedura relativa alla visualizzazione tridimensionale dell'enzima di restrizione EcoRI, noto agli studenti come uno degli strumenti principali della tecnologia del DNA ricombinante e da loro utilizzato per digerire il DNA plasmidico durante l'esercitazione del *DNA Fingerprinting* presso il LLC⁷.

Come momento di consolidamento delle conoscenze apprese e di verifica, ai ragazzi è stato infatti assegnato il compito di visualizzare tale enzima fuori dall'ambito scolastico, fornendo loro quale strumento di lavoro la dispensa relativa (*SCHEDA 2*), recante la successione dei comandi da digitare, e un CD-ROM sul quale era stato in precedenza memorizzato tutto il "materiale" didattico necessario allo scopo.

⁷ Illustrato nel prossimo contributo (Parte III).

SCHEDA 2 - Visualizzazione tridimensionale dell'enzima di restrizione EcoRI (*Escherichia coli* restriction enzyme I) mediante il programma RasMol 2.7.2

EcoRI è un enzima di restrizione (dimero funzionale) isolato dal batterio *Escherichia coli*. Esso è in grado di legarsi alla doppia elica di DNA sulla quale riesce a riconoscere una specifica sequenza consenso (sequenza di restrizione) lunga 6 pb. L'enzima, a tutti gli effetti un'endonucleasi, taglia la doppia elica di DNA all'interno di tale sequenza (**GAATTC**): più precisamente tra l'adenina e la guanina, sia sul filamento 3' → 5' che sul filamento complementare 5' → 3'. Per la caratteristica modalità di taglio vengono prodotte due estremità libere dette *sticky ends* o estremità apicciose.

Il nostro scopo, nella presente esercitazione, è quello di visualizzare la proteina (presente nel file *PDB* come monomero), la sequenza di restrizione sul DNA (presente nel file come singolo filamento) e il dominio di legame (sito attivo) di EcoRI al DNA.

Apriamo il programma *raswin* cliccando sull'icona relativa.

Utilizzando la barra dei comandi (BC) del programma di visualizzazione apriamo il file *PDB*, relativo ai dati cristallografici dell'enzima, premendo in successione:

File → Open → (EsercitazBioInf) → IERI → Apri.

[La proteina viene visualizzata in modalità wireframe (Display) e CPK (Colours)].

Innanzitutto, cerchiamo di riconoscere il DNA, la porzione proteica e la struttura secondaria di quest'ultima.

A tal fine digitiamo nella *RasMol Command Line* (CL), che si apre insieme a *raswin*, i seguenti comandi:

CL zoom 150 → Invio
BC **Colours** → Structure
BC **Display** → Cartoons
[CL structure → Invio]

Si possono riconoscere distintamente un singolo filamento di DNA legato a una subunità dell'enzima. Questa presenta 11 α -eliche, 16 β -foglietti e 25 loop (originati dalla presenza di specifici legami a idrogeno (192) tra porzioni contigue della catena amminoacidica ove questa è priva di una specifica struttura secondaria).

Il secondo filamento di DNA e la seconda subunità dell'enzima non sono visualizzabili

BC **Display** → Sticks
CL select backbone → Invio
BC **Display** → Ribbons
BC **Colours** → Monochrome

Vengono evidenziate come "fettucce" la catena carboniosa della proteina e lo scheletro del filamento di DNA. Rimangono visibili i residui amminoacidici della proteina e le basi azotate del DNA.

Ora mettiamo in evidenza la sequenza di restrizione (GAATTC) presente sul frammento di DNA e riconosciuta dal sito attivo dell'enzima EcoRI.

(Le informazioni relative si ottengono dalla lettura del file *PDB*).

Cliccando con il tasto sinistro del mouse su una base azotata del DNA se ne può leggere la natura sulla RasMol Command Line.

CL select *B → Invio
CL select G5 → Invio
CL colour green → Invio
CL select A6,A7 → Invio
CL colour red → Invio
CL select T8,T9 → Invio
CL colour yellow → Invio
CL select C10 → Invio
CL colour violet → Invio

*B = filamento di DNA
G = guanina
A = adenina
T = timina
C = citosina

Infine, mettiamo in evidenza la sequenza amminoacidica del sito attivo dell'enzima EcoRI attraverso cui questo riconosce la sequenza di restrizione presente sul frammento di DNA.

(Anche in questo caso le informazioni relative agli amminoacidi si ottengono dalla lettura del *file PDB*).

Cliccando con il tasto sinistro del mouse su un residuo amminacidico se ne può leggere la natura sulla *RasMol Command Line*

CL select *A → Invio
 CL select 115,137,138,140,141,142,144,145,200,203,301 → Invio
 CL colour magenta → Invio

*A = proteina
 115,137,ecc. = amminoacidi

CL restrict 115,137,138,140,141,142,144,145,200,203,301,*B → Invio
 BC **Display** → Ball and stick

Restringo la visualizzazione al filamento di DNA ed agli amminoacidi del sito attivo.

CL select *B → Invio
 BC **Display** → Sticks
 BC **Display** → Spacefill

Viene evidenziata l'interazione diretta tra residui amminoacidici del sito attivo di EcoRI e lo scheletro del filamento di DNA.

Riflessioni didattiche

Nella sua interezza, il progetto didattico presentato in questo articolo ha consentito di applicare nozioni di chimica studiate in precedenza e di introdurre di nuove, così da costruire una "rete di concetti".

In particolare, il percorso qui descritto consente di realizzare importanti collegamenti con la chimica delle proteine. A tale proposito si vedano il concetto di radicale idrofobico e idrofilico e l'importanza del mantenimento di condizioni d'ambiente costanti, le sole che permettono la conservazione della struttura tridimensionale della proteina.

Allo stesso modo, la visualizzazione tridimensionale mediante il programma *RasMol* della proteina GFP ha consentito di verificare concretamente quanto sia fondamentale conoscere la teoria del legame chimico e ciò che ne consegue al fine di apprezzare con piena consapevolezza ciò che in genere viene solamente descritto.

Ringraziamenti

Si desidera ringraziare il Prof. Gabriele Hakim, docente del Dipartimento di Biochimica dell'Università di Bologna, per la grande disponibilità dimostrata nel fornire indicazioni e suggerimenti riguardanti alcune tecniche utilizzate nel percorso didattico attuato.

Si desidera altresì ringraziare in modo particolare il Prof. Rinaldo Cervellati, docente del Dipartimento di Chimica dell'Università di Bologna, e la Prof.ssa Vittoria Stagni, docente di Scienze presso il Liceo Scientifico 'A. Righi' di Bologna, per il loro insostituibile apporto alla realizzazione del progetto formativo e del presente articolo.

Bibliografia e opere consultate

- **Bertolini P.**: *Introduzione al convegno*. Encyclopaideia – rivista di fenomenologia, pedagogia, formazione. CLUEB, Bologna. 2002; 12: 7-14.
- **Cerruti L.**: *Bella e potente. La chimica del Novecento fra scienza e società*. 2003. Editori riuniti, Roma.
- **Cervellati R., Perugini D.**: *Guida alla didattica della chimica nella Scuola Secondaria Superiore*. 1987, Zanichelli, Bologna.
- **Dallari M.**: *Identità personale e politica dell'insegnante*. Encyclopaideia – rivista di fenomenologia, pedagogia, formazione. CLUEB, Bologna. 2002; 12: 21-34.
- **Mortari L.**: *Per una presenza responsabile*. Encyclopaideia –

rivista di fenomenologia, pedagogia, formazione. CLUEB, Bologna. 2002; 12: 49-56.

· **Pellerey M.**: *Progettazione didattica*. S.E.I., Torino. 1979: 171, 181-182.

· **Sternberg R.J.**: *Stili di pensiero*. 1998, Centro studi Erickson, Trento.

· **Tartarotti L.**: *La programmazione didattica*. Giunti-Lisciani, Firenze.

· **Tsien R.Y.**: *The Green Fluorescent Protein*. *Ann. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 509-544.

· **Valle G., Citterich M.H., Attimonelli M., Pesole G.**: *Introduzione alla bioinformatica*. 2003, Zanichelli, Bologna.

· **Atkins P.W.**: *Chimica Fisica*. 3a Edizione, 1997, Zanichelli, Bologna.

· **Brady J.E., Holm J.R.**: *Fondamenti di chimica*. 1985, Zanichelli, Bologna.

· **Campbell N.A., Mitchell L.G., Reece J.B.**: *Immagini della biologia*. 2000, Zanichelli, Bologna.

· **Chang R.**: *Chimica Fisica*. 2° volume, 2003, Zanichelli, Bologna.

· *La nuova enciclopedia delle scienze Garzanti*. 3a Edizione, 1991, Garzanti, Milano.

· *Le Tavole M A F B I C*. 1a Edizione, 1989, Zanichelli, Bologna.

· **Moore W.J.**: *Chimica Fisica*. 1990, Piccin, Padova.

· **Russell P.J.**: *Genetica*. 2a Edizione, 1996, EdiSES, Napoli.

· **Solomons T.W.G.**: *Chimica organica*. 2a Edizione, 1988, Zanichelli, Bologna.

· **Stryer L.**: *Biochimica*. 4a Edizione, 1996, Zanichelli, Bologna.

· **Wilson K., Walker J.**: *Metodologia Biochimica*. 2001, Cortina Editore.

· **Zumdahl S. S.**: *Chimica*. 1993, Zanichelli, Bologna.

Siti internet consultati

- <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pps99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/gfp.htm>
- <http://www.bio-rad.com>
- <http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/jonda/index.htm>
- http://www.bernstein-plus-sons.com/software/RasMol_2.7.2/README.html
- <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>
- <http://www.llc.it>
- <http://www.pdb.bnl.gov>
- <http://www.rcsb.org/pdb>