

Corso di

PROPRIETA' DI BIOPOLIMERI

Prof. Ranieri Urbani

a.a. 2019-2020

INTRODUZIONE

Problematiche generali:
Struttura e funzione di un biopolimero
Rigidità e flessibilità. Strutture estese o a gomitolo

MODIFICAZIONI CHIMICHE:

Degradazione/depimerizzazione parziale della struttura
Perdita/formazione di gruppi funzionali
Formazione di ponti intracatena

MODIFICAZIONI CONFORMAZIONALI

(interazione con solventi, pH, T, ioni, piccole molecole...)
Denaturazione
Transizione conformazionale
Associazione/aggregazione di catene

PROPRIETA' STRUTTURALI di BIOPOLIMERI GERARCHIA DEI LIVELLI STRUTTURALI

STRUTTURA PRIMARIA

Monomeri R ed S

PROTEINE

Amino acidi
Legame peptidico
Chiralità
Classi di a.a.
Catene polipeptidiche

DNA / RNA

Monomeri
Basi, nucleotidi
Interazione tra basi
Legame difosfoestereo
Catena polinucleotidica

CARBONDRATI

C chirale, stereoisomeri ed enantiomeri
Aldosi/chetosi
Strutture cicliche Proiezioni di Haworth.
Conformazione monosaccaridi. Sedia , barca, twist, busta.
Carbonio anomero
Legame glicosidico
Polisaccaridi: composizione, sequenza, concatenamento, anomeria.

PROPRIETA' CONFORMAZIONALI

Peptidi: definizione degli angoli torsionali.
Interazione tra atomi legati

Interazione tra atomi non-legati
Rigid geometry approximation
Catene polipeptidiche
Mappe di Ramachandran
Proprietà conform di carboidrati, Mappe di Ramachandran

PROPRIETA' CONFORMAZIONALI:

STRUTTURA SECONDARIA

gerarchia dei livelli di organizzazione
Interazioni deboli che stabilizzano le conformazioni
Forze di dispersione di London
Parametri di un'elica

PROTEINE

L'alfa elica
Foglietto beta
Ripiegamento beta
Esempi proteine, AFM, SEM

POLISACCARIDI

proprietà strutturali
Strutture elicoidali di polisaccaridi
Effetto anomerico
Effetto eso-anomerico

STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DEGLI ACIDI NUCLEICI:

Struttura primaria di DNA ed RNA
Le regole di Chargaff
La tripla elica di Pauling
Conformazioni tautomeriche delle basi
Isomorfismo geometrico delle coppie di basi
Puckering del furanosio
1953: La doppia elica del DNA di Watson e Crick
Parametri delle doppie eliche
Struttura terziaria del DNA e RNA (cenni)

FOLDING PROTEICI E DENATURAZIONE

Folding proteico e struttura primaria di proteine
1957: esperimento di Anfinsen
Paradosso di Levinthal
Considerazioni energetiche e cinetiche
La componente idrofobica
Il misfolding e le malattie "conformazionali"

STRUTTURA TERZIARIA E QUATERNARIA DI PROTEINE

Esempi
Architettura della struttura terziaria: motivi e domini
Motivi alfa e beta (esempi)

APPROCCI BIOINFORMATICI DI PREDIZIONE

Scale di aminoacidi
Supporti informatici on-line (esempio: EXPASY)
Le scale di idropatia (Kyte-Doolittle)

Previsione della struttura secondaria: metodi di prima e seconda generazione
Previsione della struttura secondaria: metodo di Chou-Fassman

PREDIZIONE DELLA STRUTTURA

Campo di Forza
Stati conformazionali e funzione di partizione
Meccanica Molecolare e le mappe di energia conformazionale
L' "annealing" simulato
Dinamica Molecolare: definizione dei parametri del metodo
Energia cinetica e temperatura
Integrazione delle equazioni del moto (algoritmo di Verlet)
Calcolo delle traiettorie ed analisi dei risultati
Esempi.
Solvatazione: modelli implicito (continuo) o esplicito ("ALL-ATOMS")
Termodinamica di solvatazione

STATISTICA CONFIGURAZIONALE DELLE CATENE POLIMERICHE

Energia degli stati isomerici rotazionali e funzione di partizione del sistema
Dalle strutture ordinate agli stati disordinati o semi-ordinati in soluzione.
Termodinamica di mescolamento.
Simulazione di catene, definizione di legami (virtuali) di una catena.
Distanza testa-coda. Raggio di girazione. Lunghezza di persistenza.
Funzione di correlazione.
Esempi. Poliosaccaridi, proteine.
Modelli stocastici: Metodo Monte Carlo
Generatori di numeri random.

PREDIZIONE DELLA STRUTTURA SECONDARIA, TERZIARIA QUATERNARIA E DELLA FUNZIONE DELLE PROTEINE

Simmetria delle strutture quaternarie: esempi
Evoluzione convergente e divergente
Omologia e similitudine
Fold Recognition
Allineamento di sequenze
Esempio: Metodo GOR (1978)

DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI PROTEINE

Lisi delle proteine con metodi enzimatici (mappa triptica)
La degradazione di Edman
Composizione mediante HPLC
Spettrometria di massa

DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI UN POLISACCARIDE

Composizione monosaccaridica: natura e rapporti molare
Concatenazione del legame glicosidico e delle eventuali ramificazioni
Configurazione anomerica: configurazione α o β del legame glicosidico
Sequenza di monosaccaridi nell'unità ripetitiva

DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI ACIDI NUCLEICI

Metodo di Sanger

PROPRIETA' ACIDO-BASE DI AMINOACIDI E PEPTIDI

Titolazione di amino acidi. Determinazione delle costanti di equilibrio
Punto isoelettrico

CARATTERIZZAZIONE DELLE DISTRIBUZIONE DI PESI MOLECOLARI

Definizione delle masse molecolari medie, polidispersità e curve di distribuzione.
Metodi per la determinazione dei pesi molecolari (PM)
Osmometria a membrana (cenni)
Dialisi
Frazionamento per solubilità

ELETTROFORESI

Principi ed equazioni fondamentali
Applicazioni ai biopolimeri
Gel per elettroforesi
Elettroforesi denaturante: SDS-PAGE
Preparazione di un'elettroforesi su gel
Colorazione
Essiccamento del gel
Determinazione dei PM di polipeptidi
Tecnica di focalizzazione isoelettrica (IEF)
Elettroforesi 2D
Elettroforesi capillare (CE)

GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY (GPC)

Principio di separazione
Proprietà dei gel e fasi stazionarie
Schema strumentale di GPC
Rilevatori e calibrazione

POLIELETTROLITI

Definizione
Effetto delle interazioni elettriche sulla statistica conformazionale
Viscosità di soluzioni polielettrolitiche
Equilibrio di dissociazione di un poliacido debole
Modello di Smidsrod and Haug: parametro di rigidità

PROPRIETÀ MORFOLOGICHE: MICROSCOPIA AFM

Descrizione dello strumento
Modo di contatto e di Non-contatto
Tapping mode: modo di contatto intermittente
Risoluzione
Vantaggi dell'AFM
Misura dell'adesione molecolare

SISTEMI LIQUIDI, SOLIDI E VISCOELASTICI

Materiali viscoelastici
Comportamento viscoelastico: curve di flusso
Curve di stress-strain per deformazione ciclica
Modulo elastico e modulo viscoso

GEL BIOPOLIMERICI

- Struttura di gel e loro classificazione
- Gel acquosi di polisaccaridi

TRANSIZIONE ELICA-GOMITOLO

- Curve di transizione ordine-disordine
- Variabili chimico-fisiche nelle transizioni conformazionali (TC)
- Processi cooperativi
- Esempio: fusione del DNA
 - TC di polisaccaridi
- Meccanismo molecolare della transizione di peptidi
- Interazione tra i dipoli ammidici. Contributi entropici
- Modello di Schellman, grado di cooperatività
- Modello “a cerniera” (Zipper model) di Zimm-Brag (a basso ed alto PM)
- Elicità frazionaria e probabilità

RICHIAMI DI TERMODINAMICA

- Transizione tra due stati
- Grafico di Van't Hoff
- Proprietà misurabili
- Reagenti identici

TERMODINAMICA DEL LEGAME CON SUBSTRATI

- Costante macroscopica e microscopica
- Siti indipendenti ed identici
- Scatchard plot
- Scatchard plot non-lineari:

CALORIMETRIA DI TITOLAZIONE ISOTERMA

- Le principali applicazioni della ITC
- Vantaggi della tecnica
- La strumentazione
- Teoria dell'esperimento ITC
- Studio dell'affinità di binding

CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC)

- DSC a compensazione di potenza e a flusso di calore
- Equazioni fondamentali e parametri sperimentali
- Determinazione delle entalpie di transizione
- Parametri che influenzano la misura
- Applicazioni nel campo dei biopolimeri
- Analisi delle curve DSC. Cooperatività

SPETTROSCOPIA UV-VISIBILE DI BIOPOLIMERI

- Cromofori importanti in molecole biologiche
- Spettri UV di proteine e acidi nucleici
- Denaturazione del DNA e di proteine

DICROISMO CIRCOLARE

- L'attività ottica e la rotazione ottica
- Il polarimetro
- Dispersione ottica rotatoria (ORD)

Spettroscopia di dicroismo circolare
Unità di misura e sensibilità. Ellitticità molare
Lo spettro CD per strutture secondarie

GLICOPROTEINE E PROTEOGLICANI

Descrizione qualitativa della matrice extracellulare (MEC)
I Glicosoamminoglicani: struttura e funzione

SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA

Spettro di fluorescenza
Diagramma di Jablonsky delle transizioni
Cinetica delle transizioni
Rendimento quantico
Condizioni fotostazionarie o transienti
Decadimento di fluorescenza
Biomolecole fluorescenti
Strumentazione
Quenching collisionale o statico
Equazione di Stern-Volmer
Fluorescenza di proteine
Sonde fluorescenti per proteine e per acidi nucleici

BIOCOMPATIBILITÀ DEI MATERIALI POLIMERICI

Materiali polimerici in medicina
Biocompatibilità
Adesione batterica
Modifiche per indurre l'adesione cellulare

CASO STUDIO 1:

La sostanza organica marina di natura macromolecolare:
ruolo ecologico e metodologie di indagine