

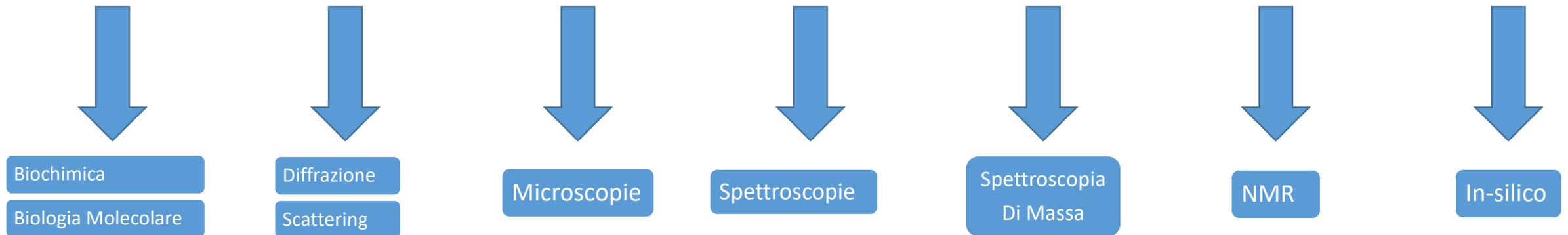
I metodi della Biologia Strutturale

TECNICHE DI INDAGINE BIOSTRUTTURALE CON LUCE DI SINCROTRONE
A.A. 2020-21

Il Toolbox del Biologo Strutturale

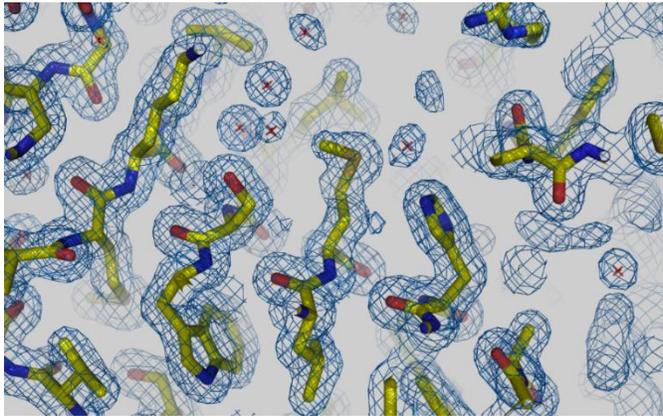
Il fine ultimo in uno studio di biologia strutturale è quello di acquisire le informazioni sulla struttura molecolare della macromolecola, in relazione al problema biologico in cui essa è coinvolta.

In questo senso il biologo strutturale ha a disposizione diversi strumenti per poter raggiungere lo scopo prefissato



Scegliere il metodo più opportuno

Abbiamo visto che esistono vari approcci allo studio della struttura delle macromolecole.
I metodi scelti devono essere i più adatti alle finalità dello studio intrapreso.



Informazione necessaria:

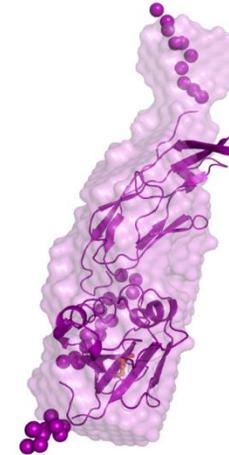
Struttura molecolare a livello atomico

Metodi Utili:

Cristallografia di raggi-X

NMR

CryoEM



Informazione necessaria:

Forma della molecola

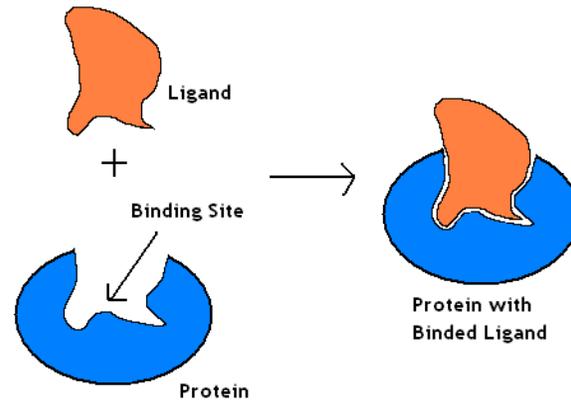
Metodi Utili:

SAXS

CryoEM (bassa risoluzione)

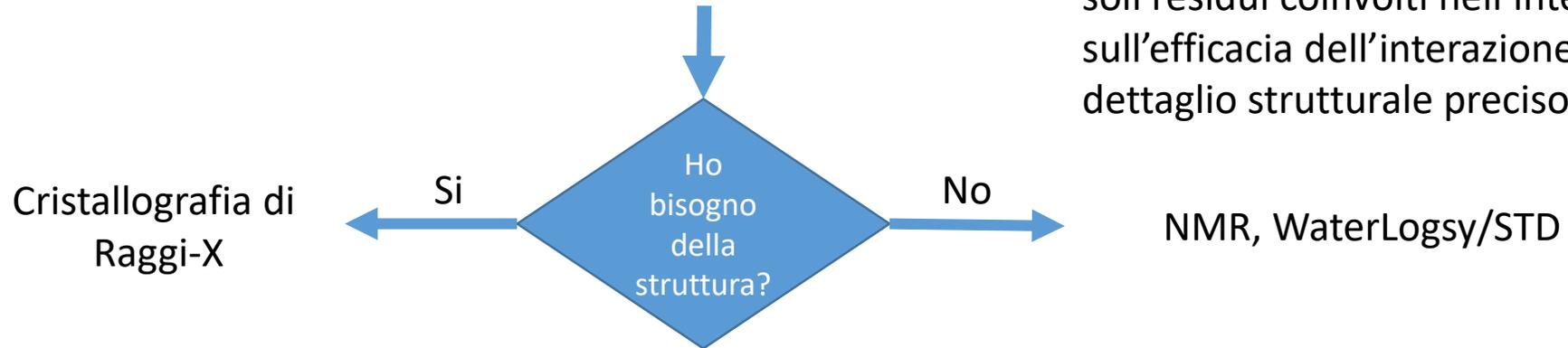
Esempio: Binding di un ligando

Lo studio dell'interazione tra una proteina e un suo ligando è uno degli studi più frequenti in biologia strutturale



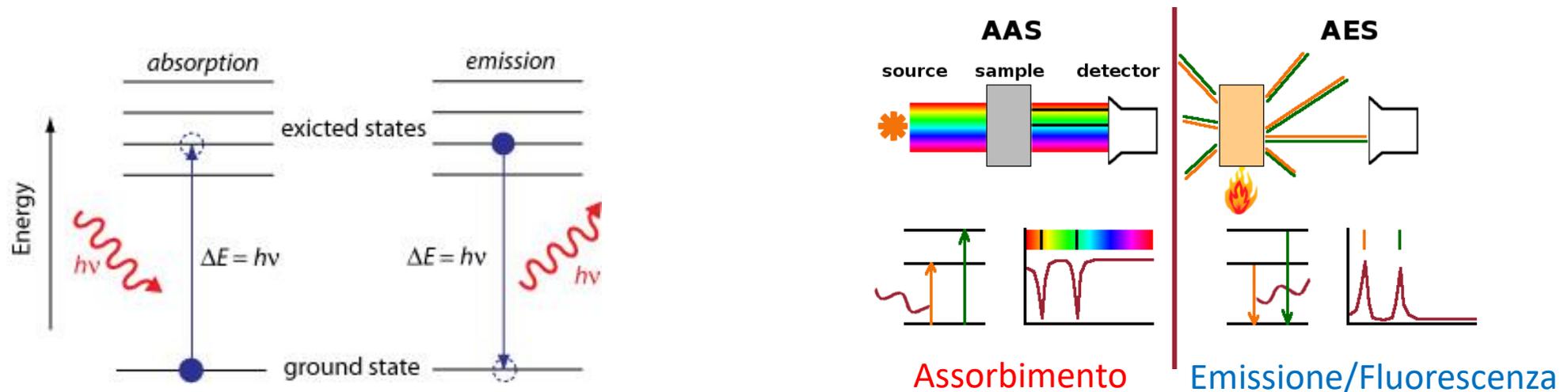
Molto spesso è richiesta la determinazione della struttura molecolare del complesso a risoluzione atomica.

Altre volte basta l'informazione relativa ai soli residui coinvolti nell'interazione, o sull'efficacia dell'interazione, senza alcun dettaglio strutturale preciso.



Spettroscopie

Sono tecniche di indagine basate sull'assorbimento di una radiazione elettromagnetica da parte della materia in relazione ad un fenomeno fisico preciso, dipendente dalla lunghezza d'onda λ della radiazione. La misura della quantità di radiazione assorbita (assorbimento) o emessa successivamente (emissione/fluorescenza) può fornire informazioni di natura strutturale sull'sistema studiato



Il principio è assolutamente generale, e la radiazione elettromagnetica usata può andare dall' Infrarosso ai raggi-X.

Spettroscopie in Biologia Strutturale

Esistono molte spettroscopie, tra loro diverse per il tipo di fenomeno fisico determinato. Diverse spettroscopie possono essere utili in Biologia Strutturale: assorbimento nell'UV-Visibile, Infrarosso, Raman, Spettroscopia di fotoemissione, Dicroismo Circolare, EXAFS.

Queste tecniche coinvolgono transizioni elettroniche (o vibrazionali, come l'Infrarosso). Altre tecniche coinvolgono invece transizioni di tipo diverso, come l'**NMR** (transizioni di spin nucleare).

Per quanto venga chiamata spettroscopia, la **spettroscopia di massa** si basa su un principio diverso da quello dell'assorbimento e emissione.

Tra le tecniche più utilizzate :

- **Dicroismo Circolare**
- **FRET**
- **EXAFS**

Dicroismo Circolare

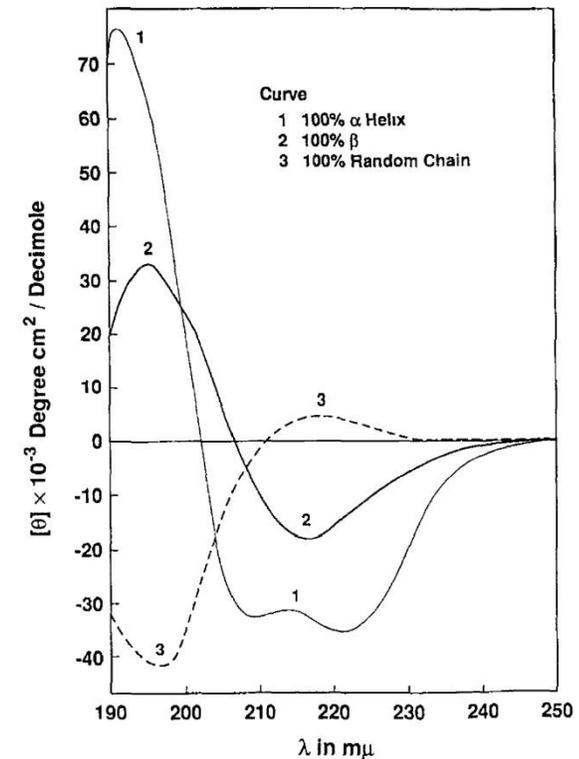
Il Dicroismo Circolare (CD) è una tecnica spettroscopica che si basa sul **diverso assorbimento delle componenti destra e sinistra della luce polarizzata circolarmente**, da parte di una molecola otticamente attiva.

Gli elementi di struttura secondaria di una proteina come α -eliche, foglietti- β e random coil, danno segnali caratteristici nello spettro CD, per cui dato uno spettro CD è possibile stimare la percentuale dei diversi elementi di struttura secondaria, nella proteina studiata.

L'informazione fornita è limitata, tuttavia la rapidità della tecnica e la piccola quantità di campione richiesto, ne fanno una tecnica utilissima in tutti quei casi in cui si vuole avere:

- **Informazioni sul contenuto dei vari elementi di struttura secondaria**
- **Verificare lo stato della macromolecola**
- **Fare studi in diverse condizioni bio-chimico/fisiche**
- **Studi risolti in tempo**

E' una tecnica che trae giovamento dall'uso della Radiazione di Sincrotrone



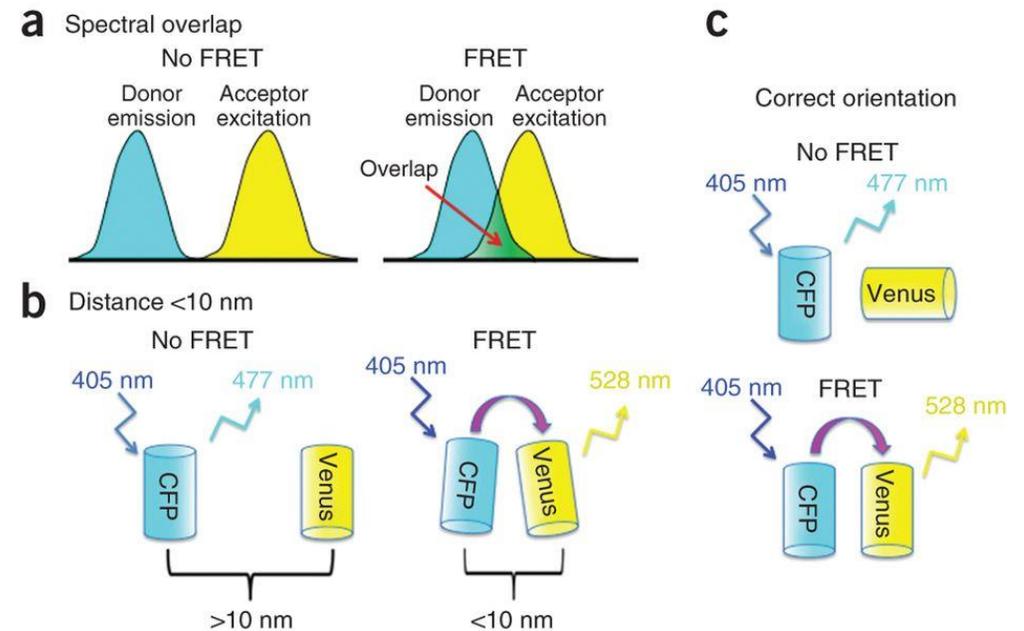
FRET

La *spettroscopia di fluorescenza con trasferimento di energia per risonanza* (fluorescence resonance energy transfer: **FRET**), è una spettroscopia basata sul trasferimento di energia tra due *fluorofori* in cui un primo fluoroforo (**donatore**) assorbe la radiazione incidente trasferendo energia (fluorescenza) ad un secondo fluoroforo (**accettore**).

Il trasferimento energetico dipende dai relativi spettri di emissione e assorbimento, nonché dalla distanza a cui si trovano i due fluorofori.

E' possibile mettere in relazione l'efficienza del trasferimento energetico con la distanza tra i fluorofori. Il FRET può quindi essere usato come un *'righello molecolare'* ed è particolarmente utile se si vuole investigare l'interazione tra due macromolecole

Esistono molte varianti di questa tecnica, dalla microscopia alle modalità con molecole singole (smFRET) per studi conformazionali risolti in tempo.



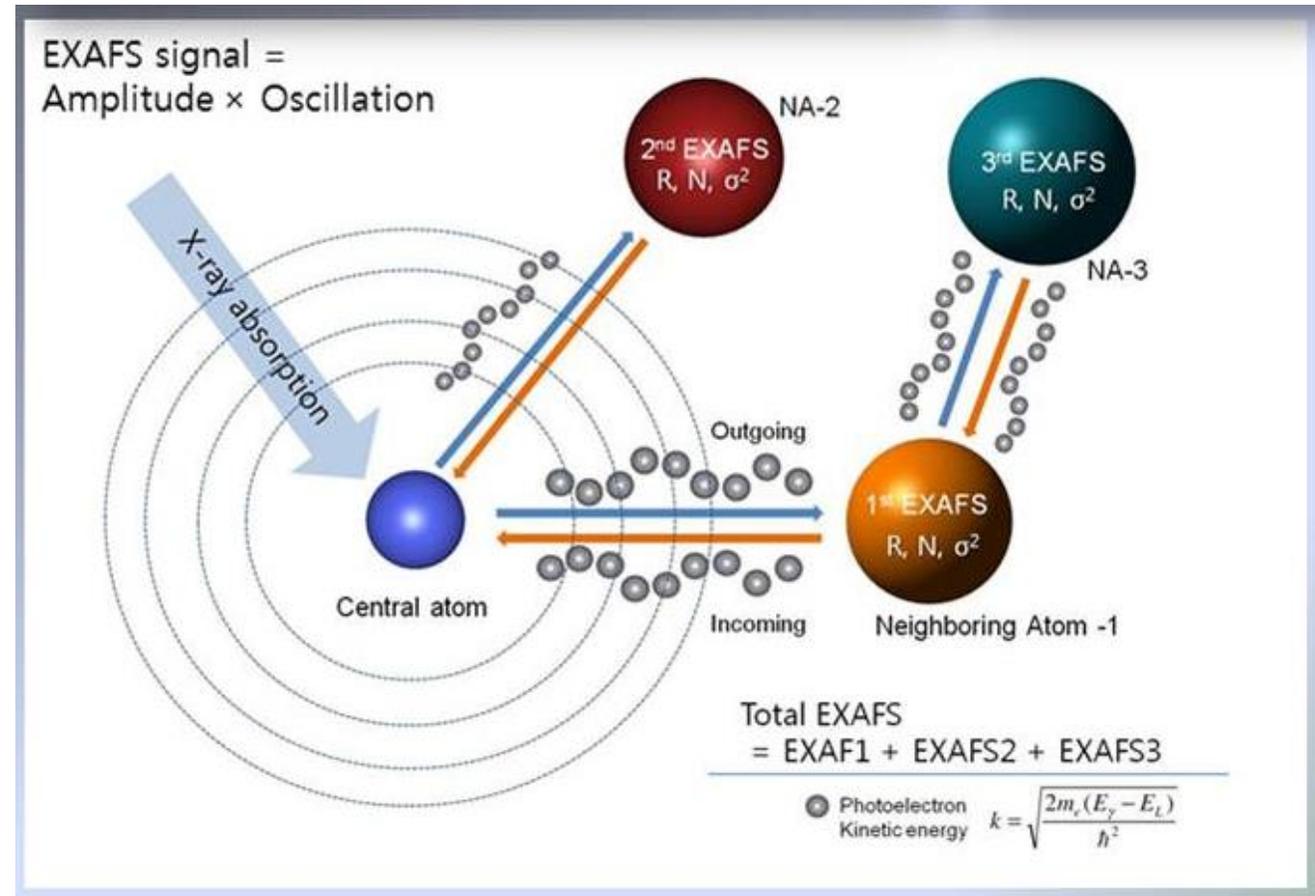
Extended X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy

La radiazione elettromagnetica (raggi-X) può essere assorbita da un atomo e avere energia tale da causare l'espulsione di un elettrone.

L'assorbimento da parte dell'atomo è però influenzato dalla presenza degli atomi vicini, causando modulazioni nel coefficiente d'assorbimento $\mu(\lambda)$

Le modulazioni del coefficiente di assorbimento dipendono dalla natura e dalla geometria degli atomi vicini.

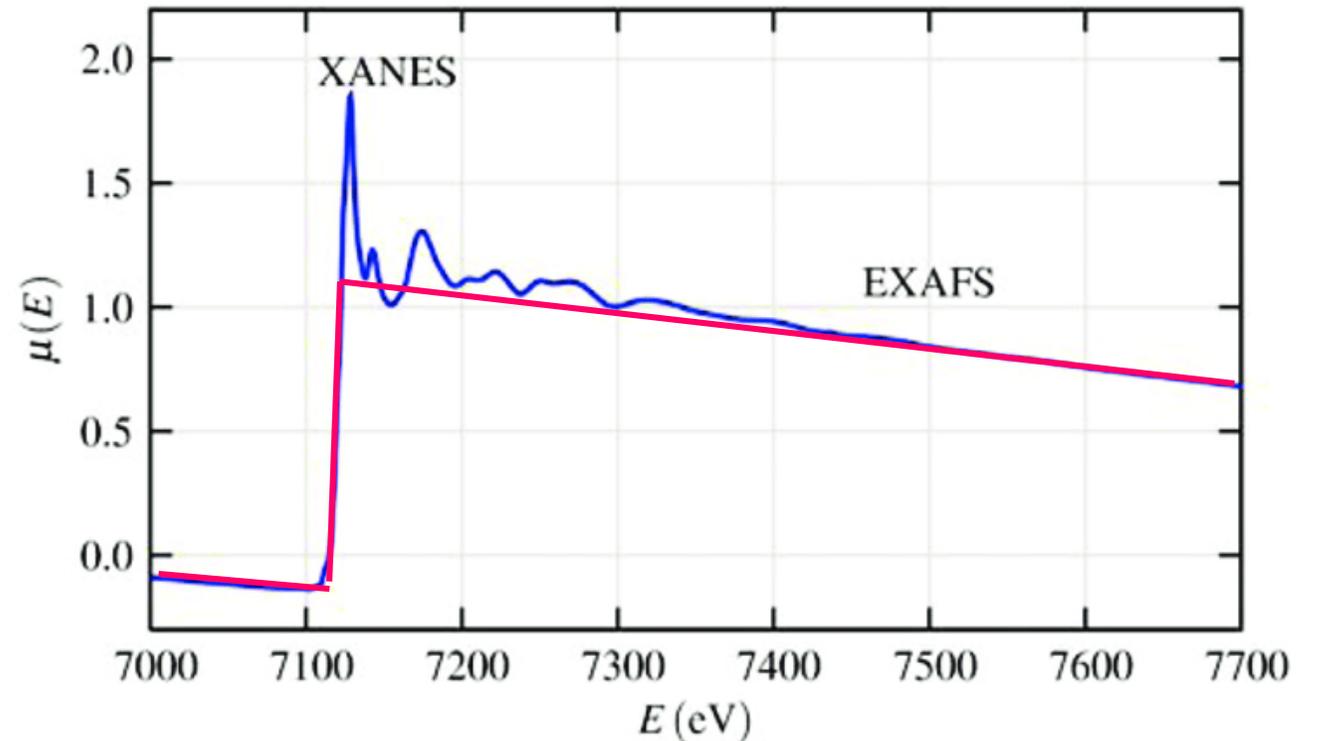
La teoria dell'**EXAFS** (*Extended X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy*) mette in relazione le modulazioni di $\mu(\lambda)$ con la struttura molecolare.



Applicazioni dell'EXAFS

Si applica tipicamente a sistemi molecolari contenenti un metallo (o un atomo 'pesante').

L'informazione strutturale che si può ottenere dalla spettroscopia EXAFS è abbastanza limitata, ovvero solo la geometria dell'intorno chimico dell'atomo assorbitore (5-6 Å).

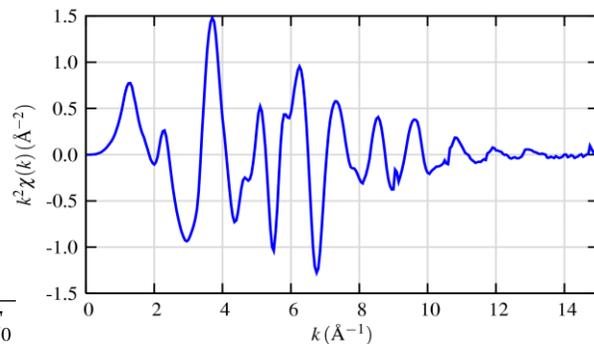
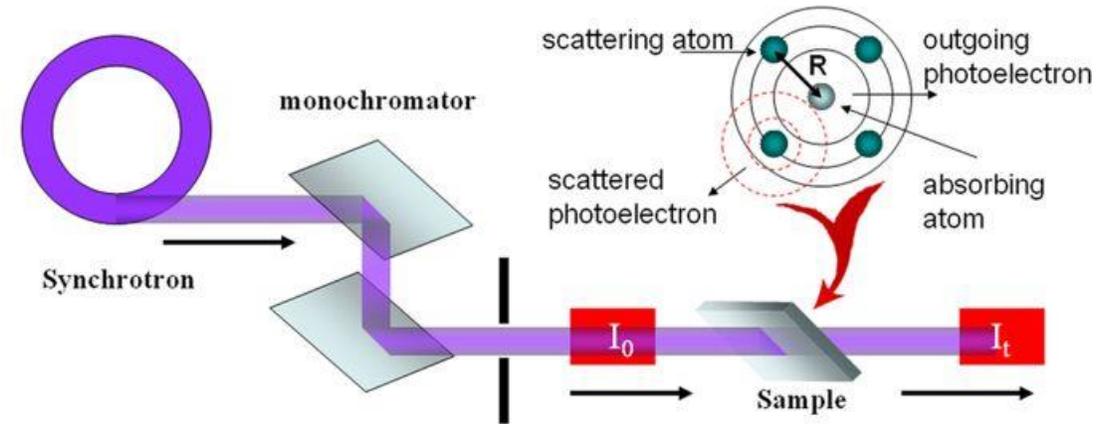


La misura EXAFS

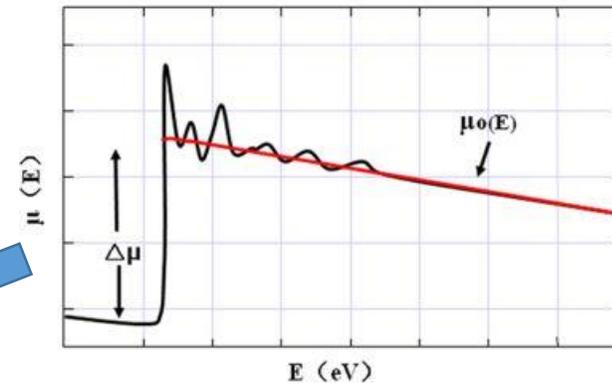
La spettroscopia EXAFS utilizza i raggi-X ed è una tecnica disponibile esclusivamente presso i sincrotroni ($\lambda = 0.1 - 3.0 \text{ \AA}$).

Viene misurato il coefficiente di assorbimento del campione, al variare della lunghezza d'onda (o dell'energia) [$\mu(E)$]

Il coefficiente di assorbimento è quindi trasformato in segnale EXAFS [$\chi(E)$]



$$k = 0.512\sqrt{E - E_0}$$



$$\mu(E) \propto -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right)$$

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\Delta\mu}$$

EXAFS: equazione

$$\chi(k) = \sum_j \frac{N_j S_0^2 f_j(k) e^{-2R_j/\lambda(k)} e^{-2k^2\sigma_j^2}}{kR_j^2} \sin[2kR_j + \delta_j(k)]$$

L'equazione dell'EXAFS mette in relazione il segnale EXAFS con la struttura molecolare:

- R è la distanza dell'atomo
- N è il numero di coordinazione dell'atomo
- f(k) and $\delta(k)$ dipendono dal numero atomico Z

Il segnale EXAFS è sensibile alla struttura atomica (posizione, e specie chimica) dell'intorno all'atomo assorbitore

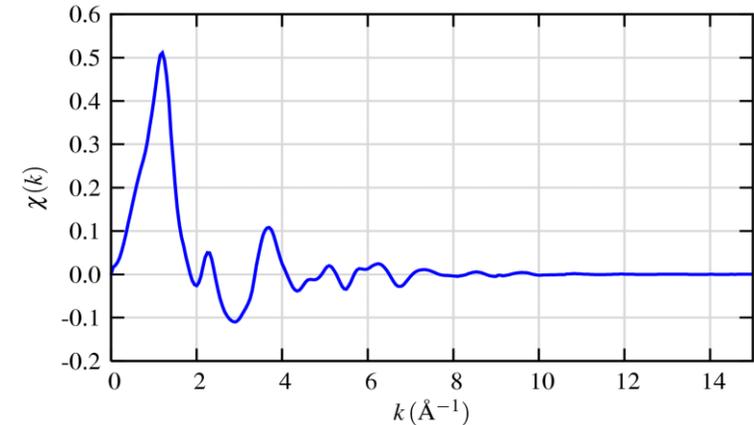
$$\chi(k) = f(R, N, Z)$$

EXAFS: analisi dei dati

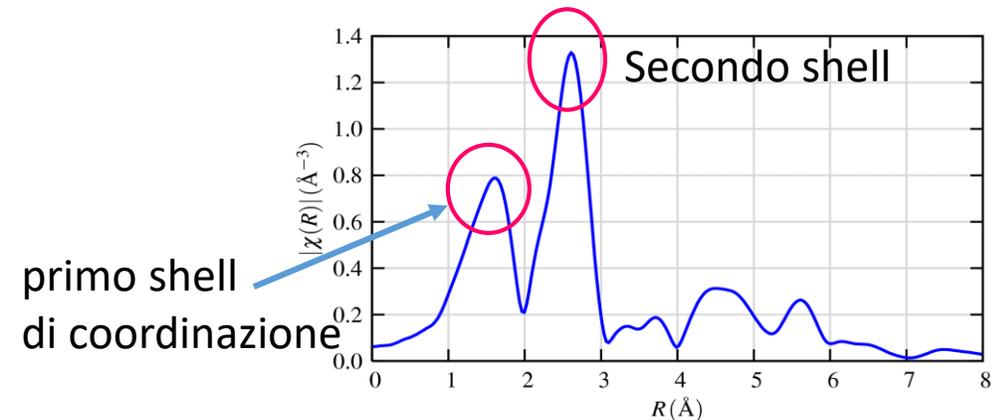
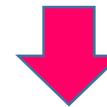
- Conversione dei dati in $\mu(E)$
- Data reduction (normalizzazione, sottrazione background...)
- Conversione dei dati in $\chi(k)$
- **Trasformata di Fourier: si passa dallo spazio di k a quello reale (R)**

I picchi nello spazio reale sono dovuti agli atomi situati a varie distanze dall'atomo assorbitore (primo shell, secondo shell...)

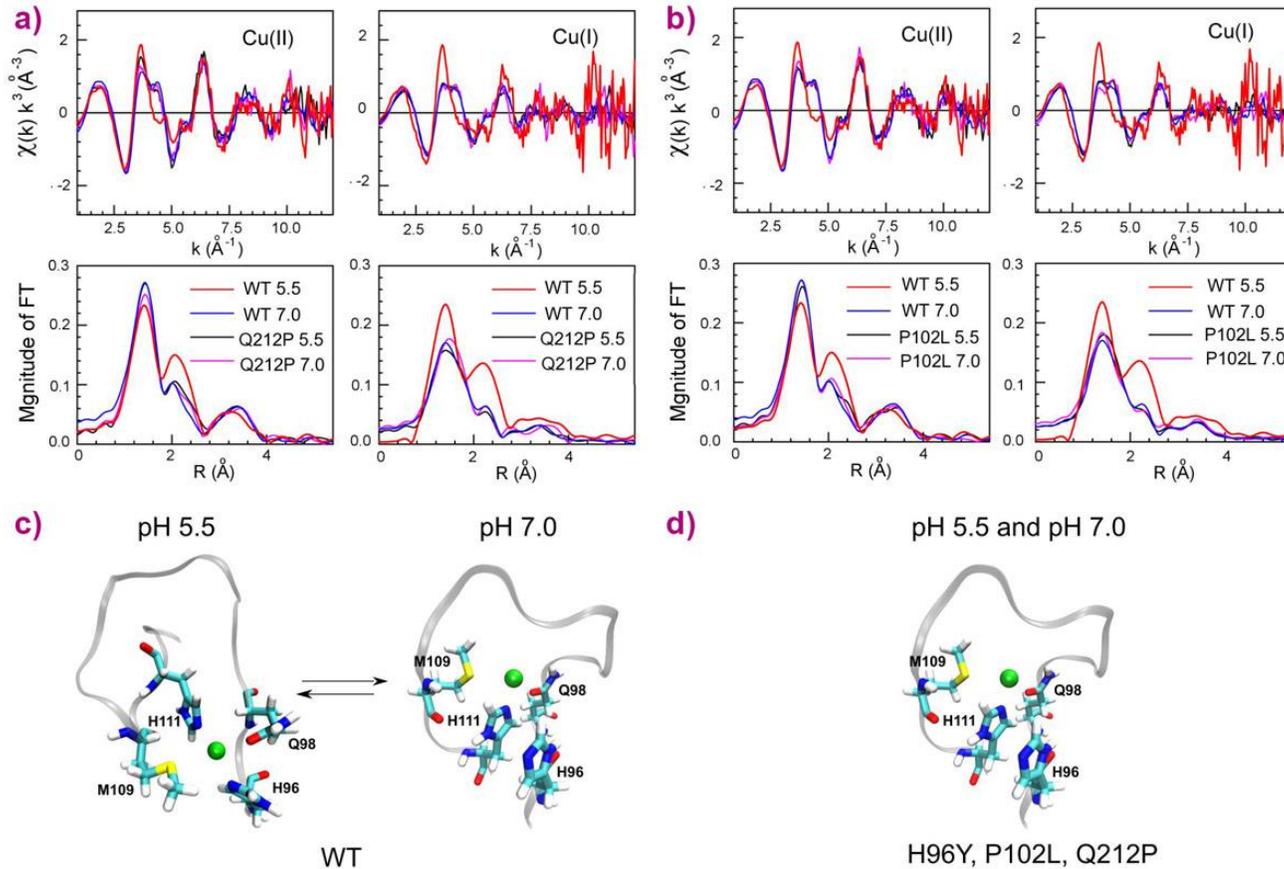
Ottimizzando il modello è possibile calcolare di nuovo $\chi(k)$. L'anti-trasformata di Fourier mi permette di passare dallo spazio reale R a quello k . Lo scopo è migliorare l'accordo tra dato sperimentale ($\chi(k)$) e modello molecolare (R).



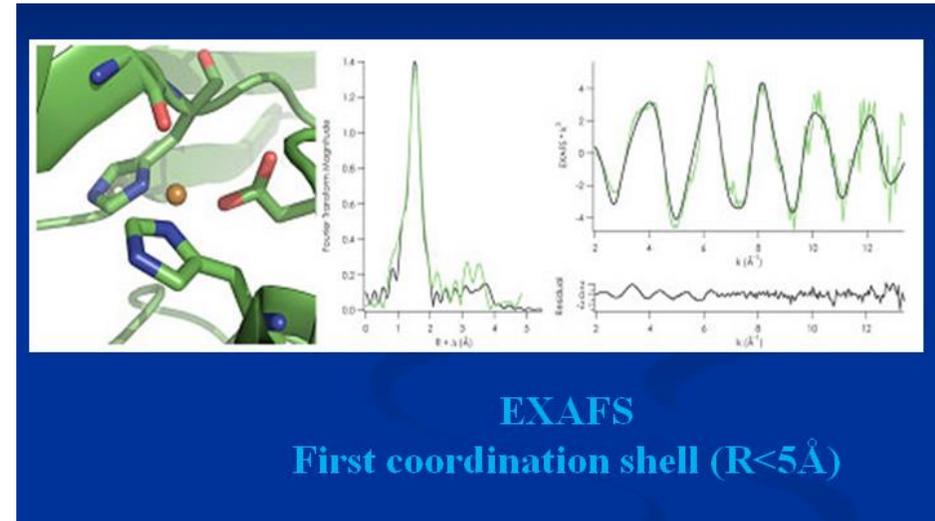
Trasformata di Fourier



EXAFS in Biologia Strutturale



Per quanto l'informazione fornita sia limitata, l'EXAFS può essere un utilissimo strumento nello studio strutturale delle metallo-proteine o dell'interazione tra un metallo e un peptide (o una macromolecola)



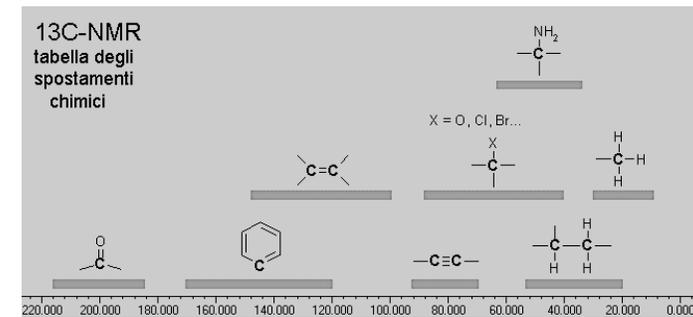
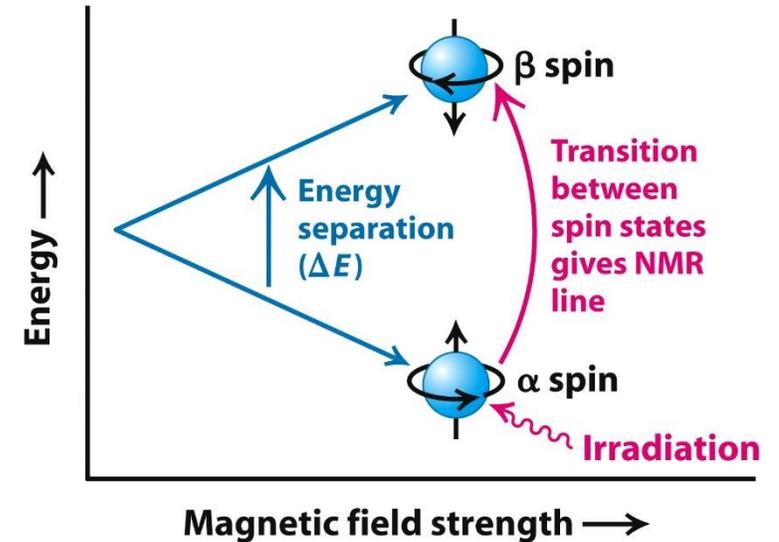
NMR

La spettroscopia NMR, si basa su principi fisici diversi dal CD e dal FRET, in quanto è coinvolto lo spin nucleare e la sua interazione con un campo magnetico esterno.

Il momento magnetico nucleare di nuclei con spin $\frac{1}{2}$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P) si orienta in presenza di un campo magnetico esterno definendo così due stati a spin opposto di diversa energia.

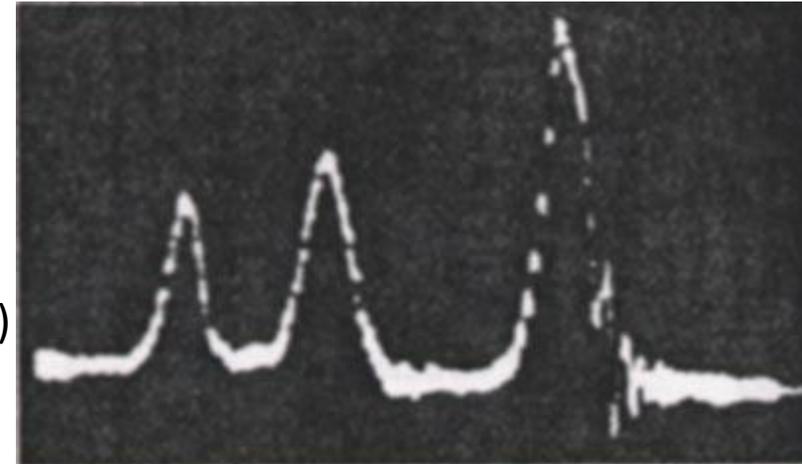
Applicando un campo elettromagnetico è possibile indurre la transizione dallo stato a più bassa energia verso lo stato a più alta energia, questo assorbimento viene rivelato e genera il segnale NMR.

I nuclei risentono del loro intorno chimico per cui nuclei di atomi appartenenti a gruppi chimicamente diversi (alifatici, aromatici...) avranno frequenze di assorbimento diverse.



Breve Storia dell'NMR

- Il fenomeno di Risonanza Magnetica Nucleare fu descritto per primo da Isidore Raabi nel 1938
- Felix Bloch e Edward Purcell, da ricerche indipendenti, dimostrarono il fenomeno dell'NMR nello stato condensato nel 1946
- Il primo spettro NMR (etanolo) fu acquisito nel 1951
- Nel 1952 Varian mette in commercio il primo spettrometro NMR (30 MHz)
- Nel 1953 Overhauser descrive l'effetto che porterà il suo nome
- Nel 1957 primi spettri della Bovine Pancreatic trypsin Inhibitor (BPTI)
- Nel 1976 Introduzione della tecnica 2D NMR
- Nel 1985 Kurt Wutrich pubblica la prima assegnazione completa della BPTI



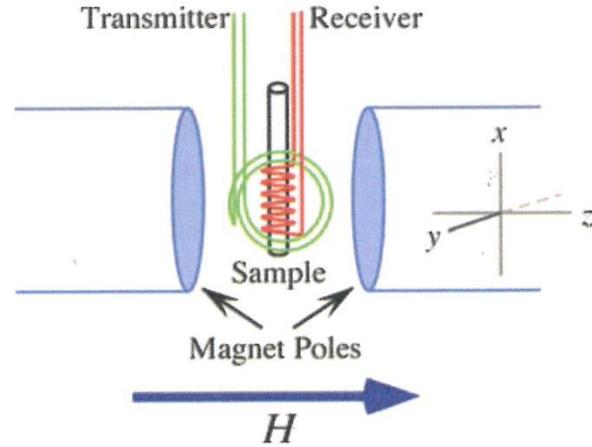
Condizioni sperimentali

- Concentrazione: 0.5 – 2 mM
- Volume: 100 – 500 μL
- Purezza: > 90%
- Stato di Aggregazione: monodisperso
- Buffers: Deuterati e concentrazione 10-20 mM
- pH: preferibile non > 7.5 (scambio protoni)

- Per spettri ^{13}C e ^{15}N è richiesta la marcatura con gli isotopi opportuni

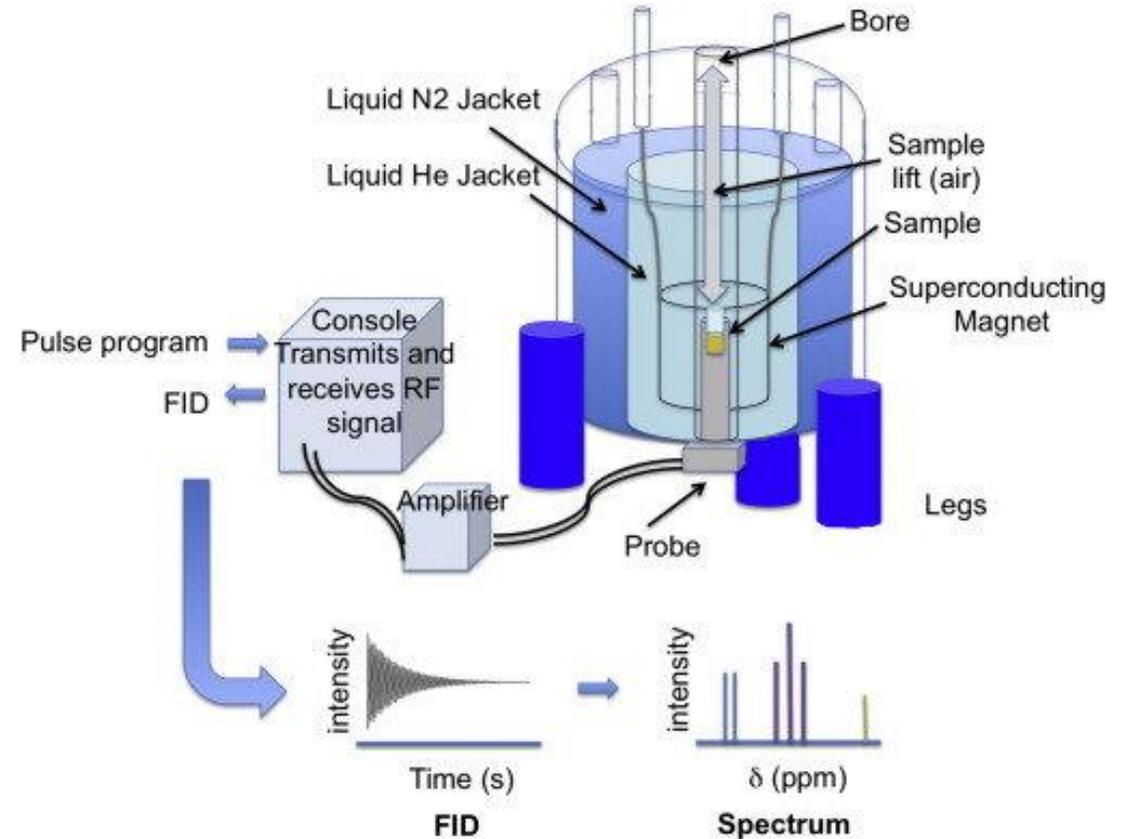
- MW: non maggiore di 50 kDa

Apparato Sperimentale



L'apparato sperimentale si compone di:

- Magnete superconduttore
- Trasmettitore (di impulsi)
- Ricevitore

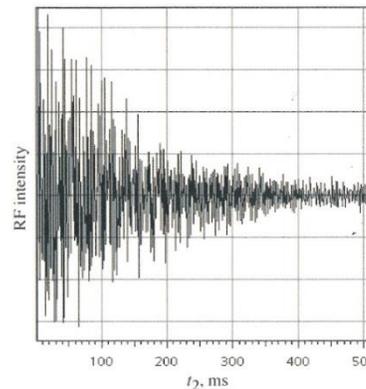


L'esperimento NMR

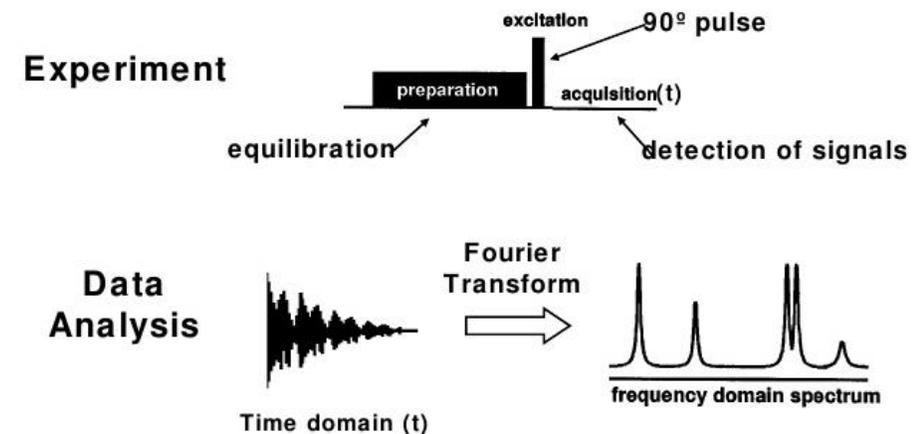
L'esperimento, nella sua forma più semplice 1D ^1H , consiste nell'inviare un impulso che ecciti tutti i nuclei, e quindi registrare il segnale (radiazione elettromagnetica) prodotto dal rilassamento dei nuclei eccitati (Free Induction Decay: FID). Rilassandosi i nuclei tornano allo stato iniziale.

Utilizzando la Trasformata di Fourier è quindi possibile avere uno spettro con in frequenza con i segnali relativi ai singoli nuclei.

Il rilassamento dei nuclei avviene sulla scala dei tempi dei ms



The Pulse FT NMR Experiment



Free Induction Decay (FID)

Il chemical shift

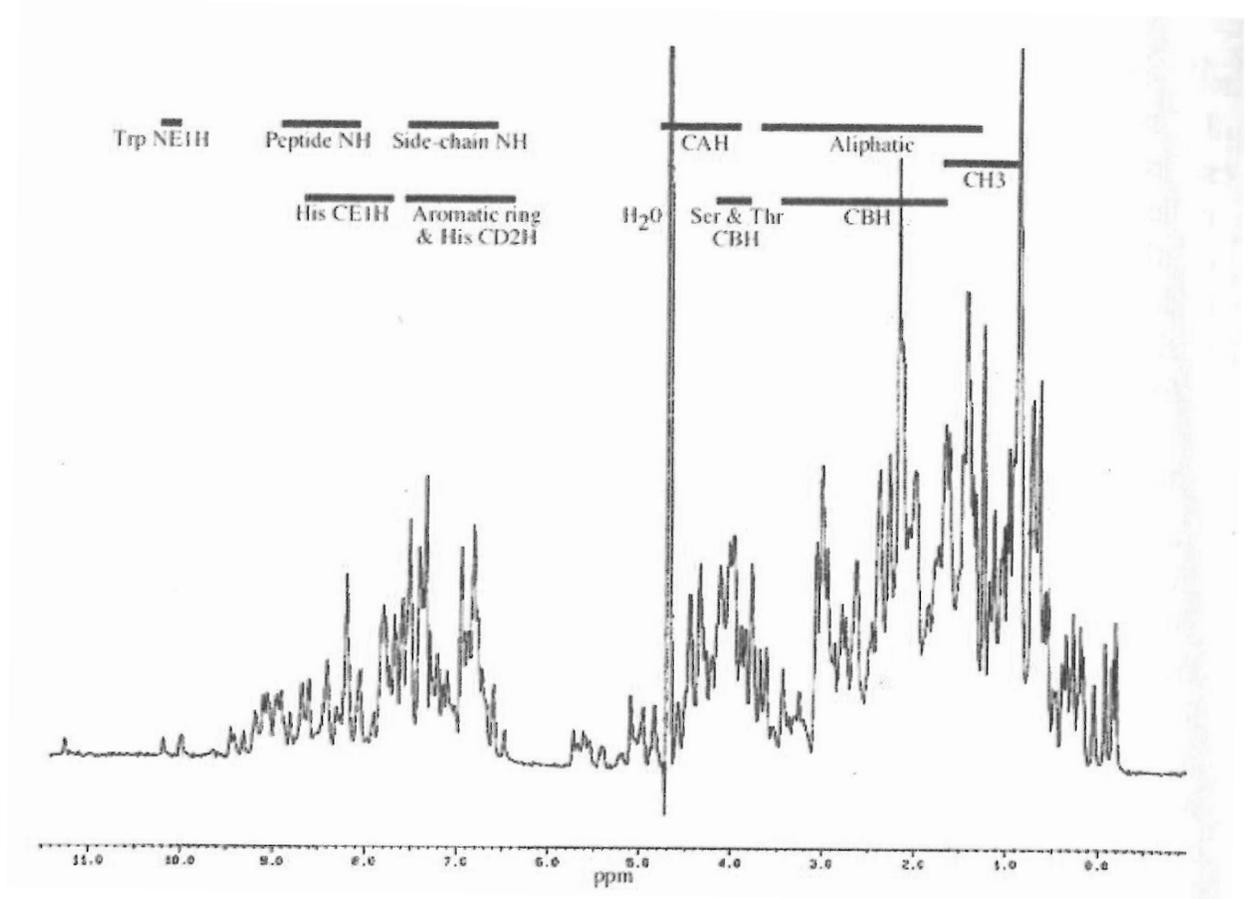
Nuclei diversi risentono dell'intorno chimico e di conseguenza *risuoneranno* (assorbiranno) a frequenze diverse

$$\delta(ppm) = 10^6 \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0}$$

ν_0 è la frequenza di assorbimento (in Hz) di uno standard di riferimento (DSS per le proteine)

L'uso di δ rende il **chemical shift** indipendente dall'intensità del campo magnetico applicato

Nelle proteine, i diversi Protoni e atomi di carbonio hanno chemical shift dipendenti dal tipo di residuo.

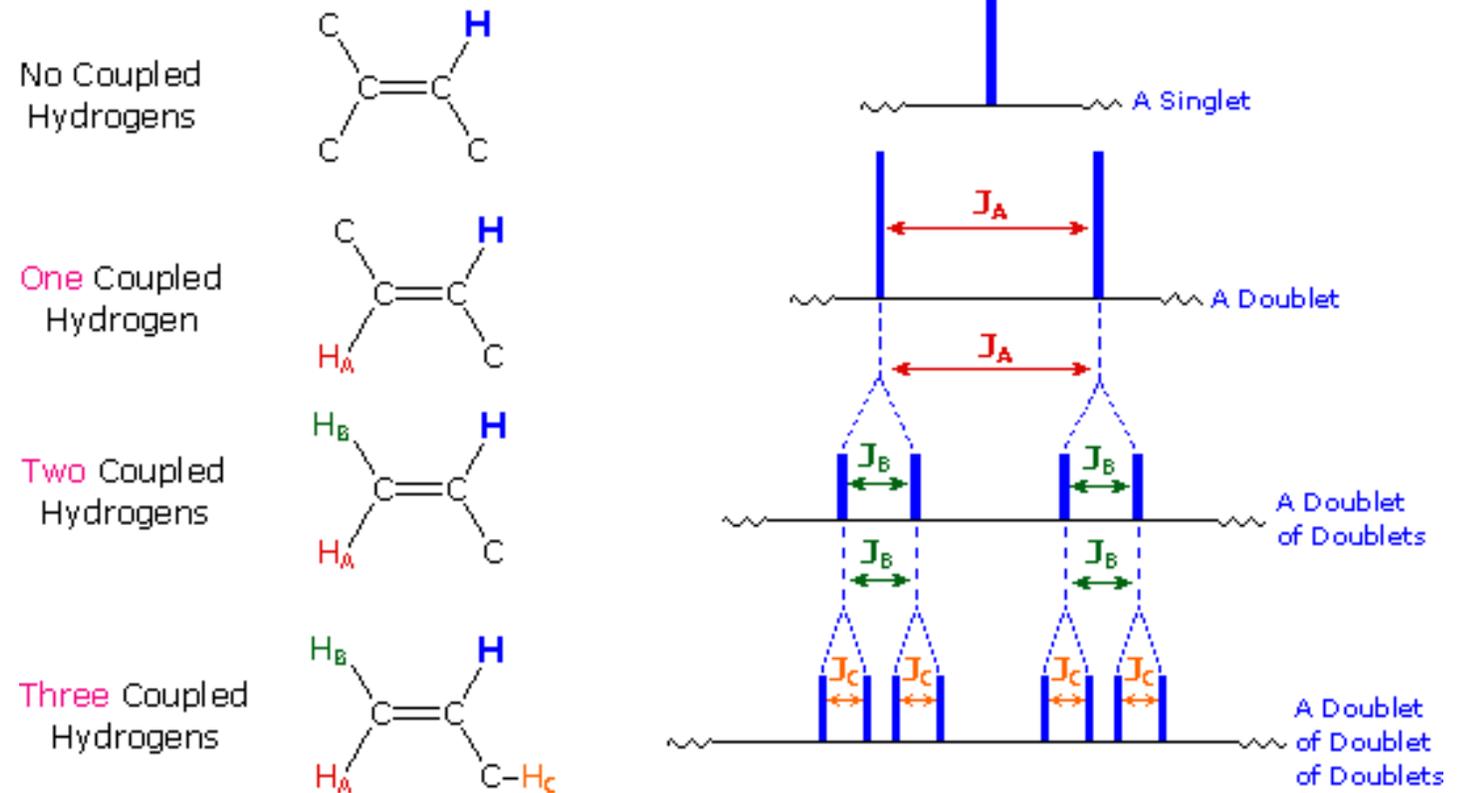


Accoppiamento scalare (J-coupling)

Il *J-coupling* o *accoppiamento scalare* è una forma di interazione che si trasmette attraverso i legami chimici (elettroni), tra nuclei 'vicini' (non più di 4 legami).

Questo accoppiamento causa uno 'sdoppiamento' dei picchi con chemical shift apparentemente simili.

L'effetto è tanto più forte quanto più i nuclei sono vicini.

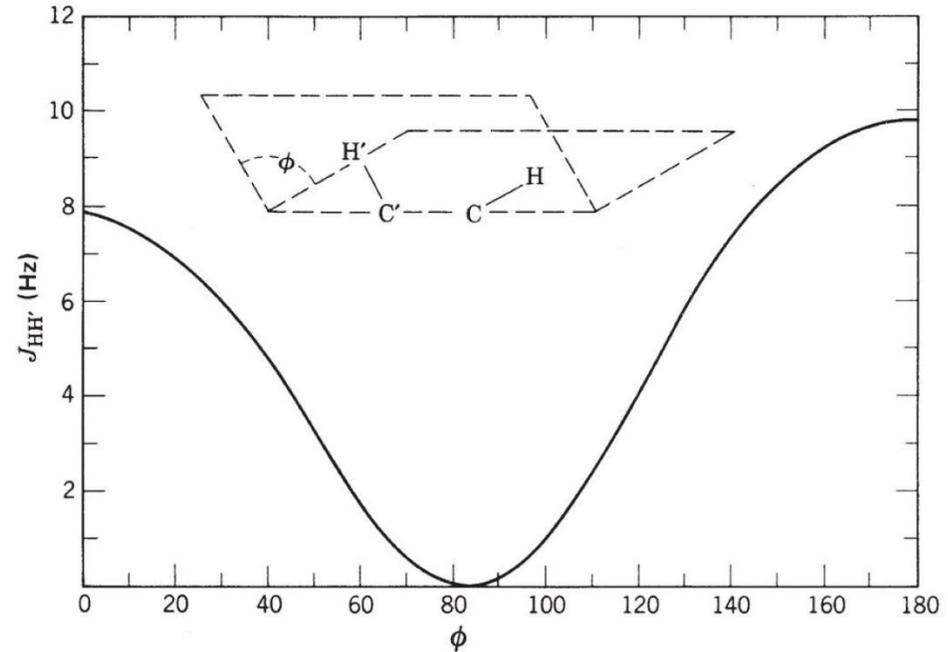


J-coupling e conformazione

$$J_{HH'}(\phi) = A + B \cos(\phi) + C \cos(2\phi)$$

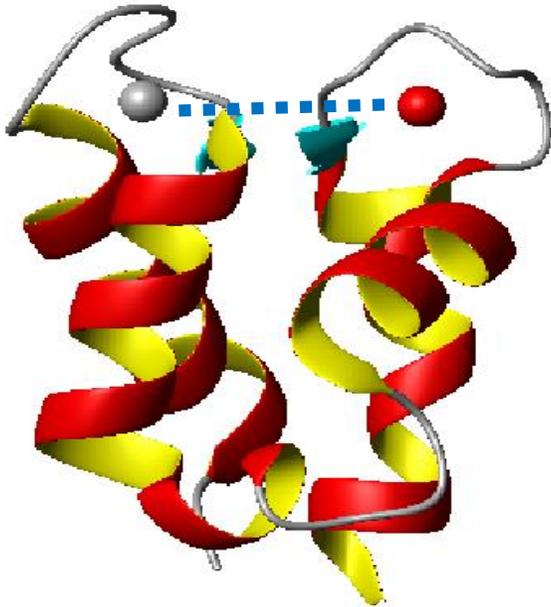
Questa equazione è nota come *equazione di Karplus* e stabilisce una relazione tra la costante di accoppiamento tra protoni legati ad atomi vicini ($J_{HH'}$) e il loro angolo diedro ϕ

Questa relazione è molto importante perché fornisce informazioni sulla conformazione della molecola.



Effetto Nucleare Overhauser

A differenza del J-coupling, l'**effetto nucleare Overhauser (NOE)** noto anche come **accoppiamento dipolare**, si trasmette nello spazio (non attraverso gli elettroni di legame). E' un trasferimento di magnetizzazione tra nuclei spazialmente vicini



Il NOE è quindi importantissimo per la determinazione del folding (struttura terziaria)

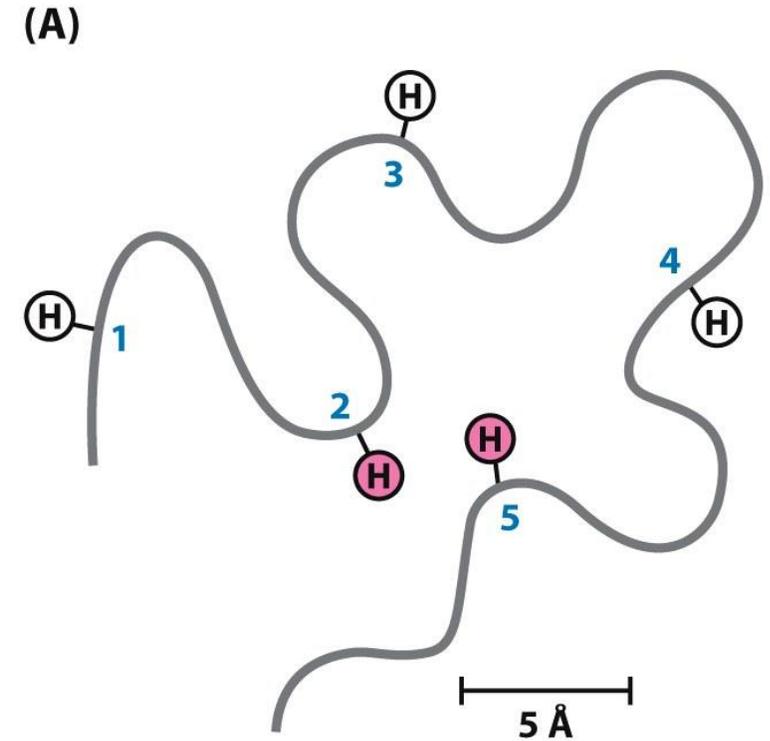


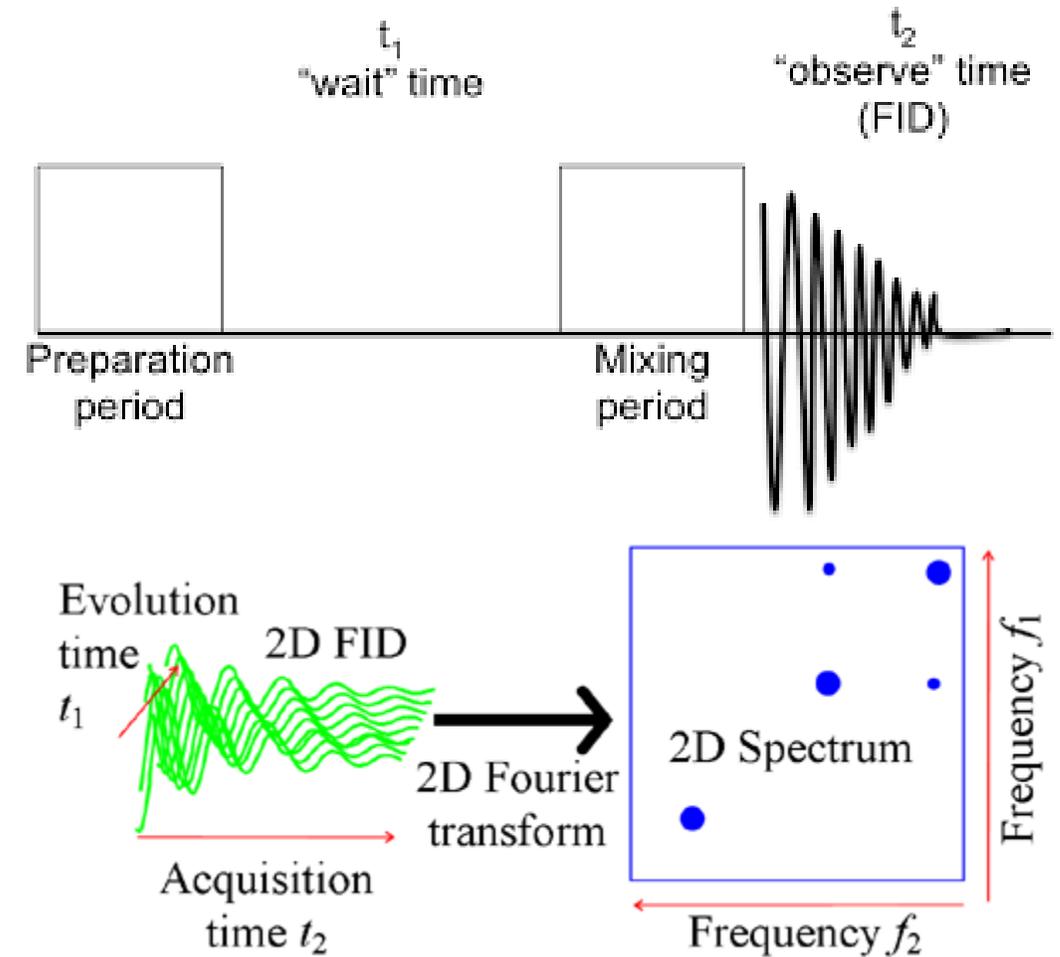
Figure 3.46
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Tecniche bidimensionali in NMR

Le tecniche multidimensionali permettono l'acquisizione in tempi rapidi degli accoppiamenti tra nuclei (sia di natura scalare che dipolare).

Lo schema generale è il seguente:

- 1) Preparazione (primo impulso)
- 2) Evoluzione (il sistema si rilassa per un tempo t_1)
- 3) Mixing (secondo impulso)
- 4) Rilevamento (per un tempo t_2)
- 5) Una volta riequilibrato il sistema, ripeto la sequenza per un tempo $t_1 = t_1 + \Delta t$ (in genere si parte da $t_1 = 0$ fino ad un valore massimo predefinito. In tal modo esploro 'osservo' l'evoluzione del mio sistema di nuclei al variare di t_1 .



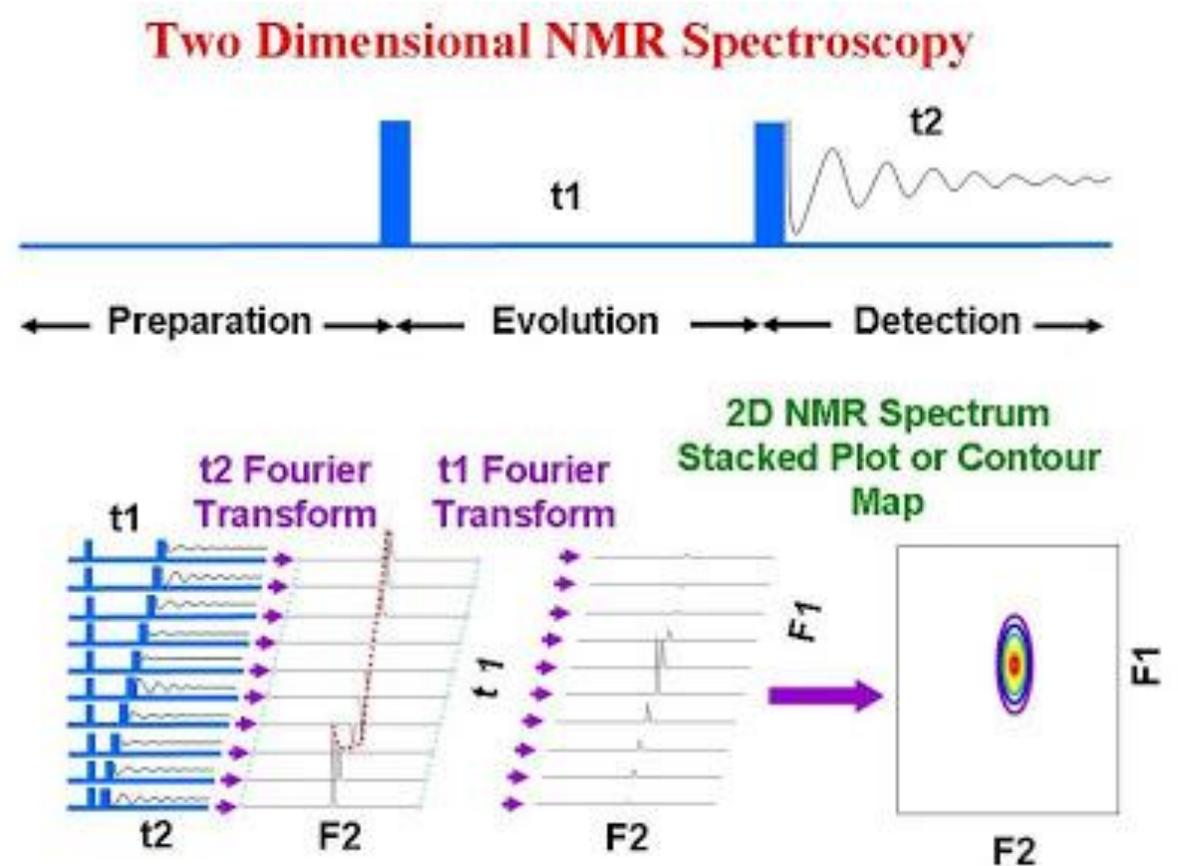
Tecniche bidimensionali

Il FID viene registrato solo durante t2

L'insieme dei FID registrati a tempi diversi viene 'trasformato' (secondo Fourier) in modo da ottenere una mappa bidimensionale dove su ascisse e ordinate o le frequenze (non più i tempi).

A seconda dell'esperimento posso avere sia accoppiamenti omonucleari (es: $^1\text{H} - ^1\text{H}$) o eteronucleari ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$, $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$)

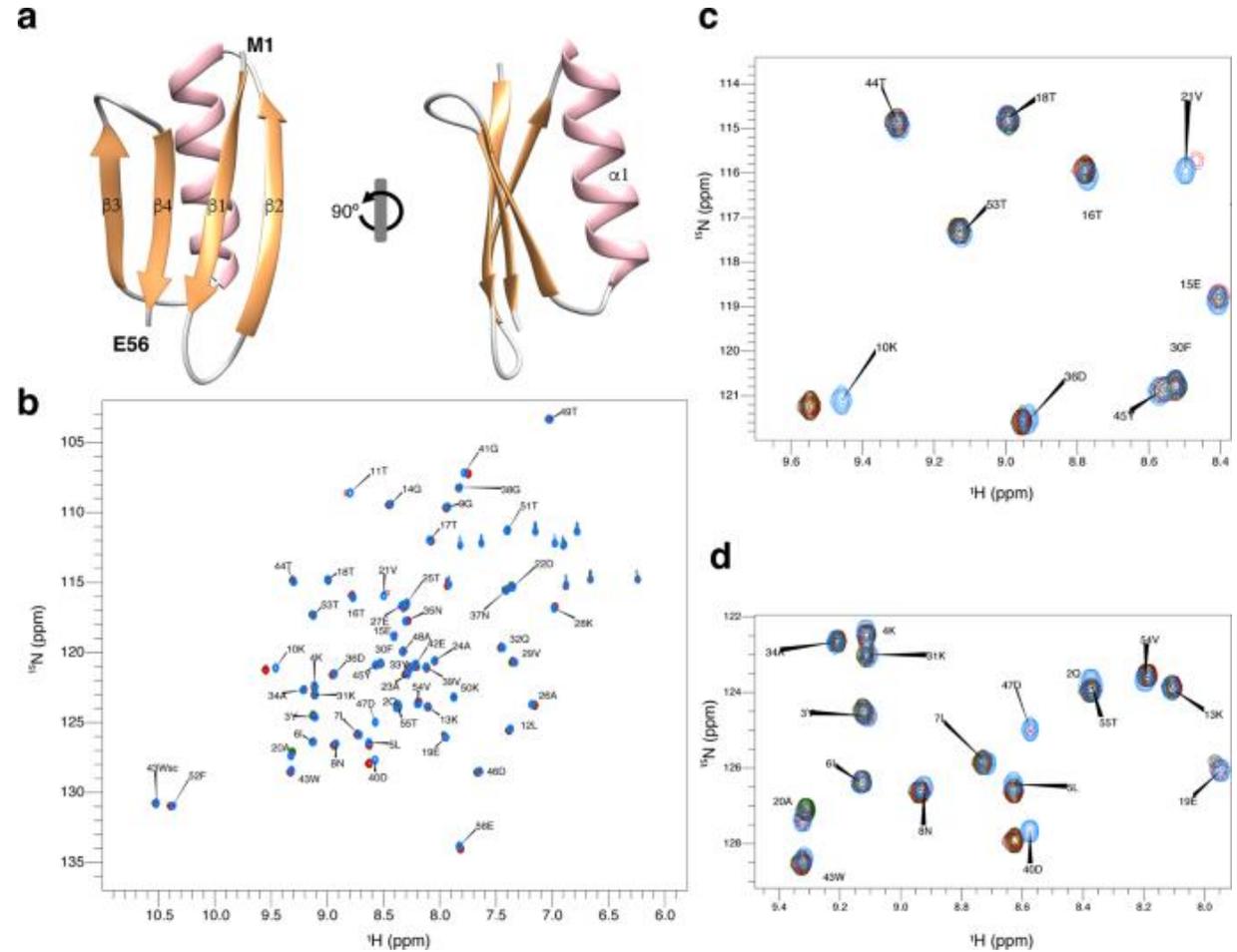
Nelle mappe bidimensionali sono importanti i picchi fuori diagonale (indicano le interazioni tra nuclei)



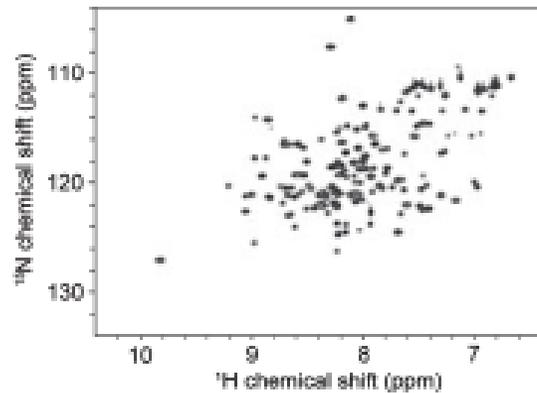
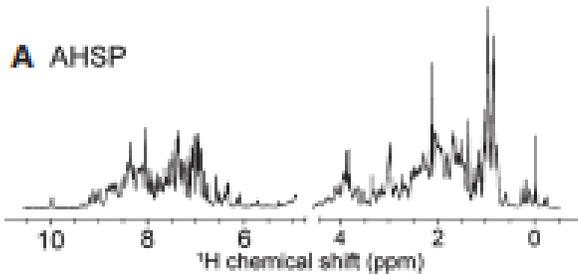
Spettri HSQC

La tecnica bidimensionale **Heteronuclear Single-Quantum Coherence (HSQC)** è una tecnica bidimensionale in cui si correla lo spettro ^1H con quello di un eteroatomo (^{13}C o ^{15}N)

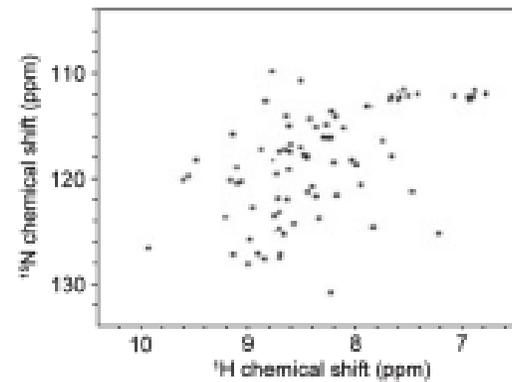
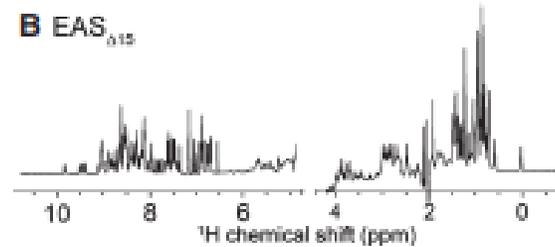
Lo spettro bidimensionale ^1H - ^{15}N HSQC permette di assegnare (identificare) i protoni ammidici di una proteina.



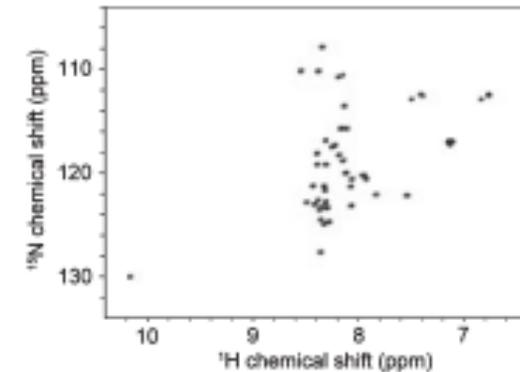
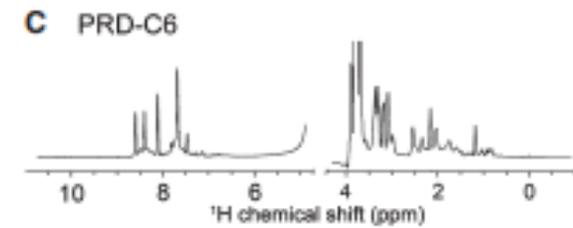
HSQC e struttura secondaria



α -elica



foglietto β



Proteina non struttura

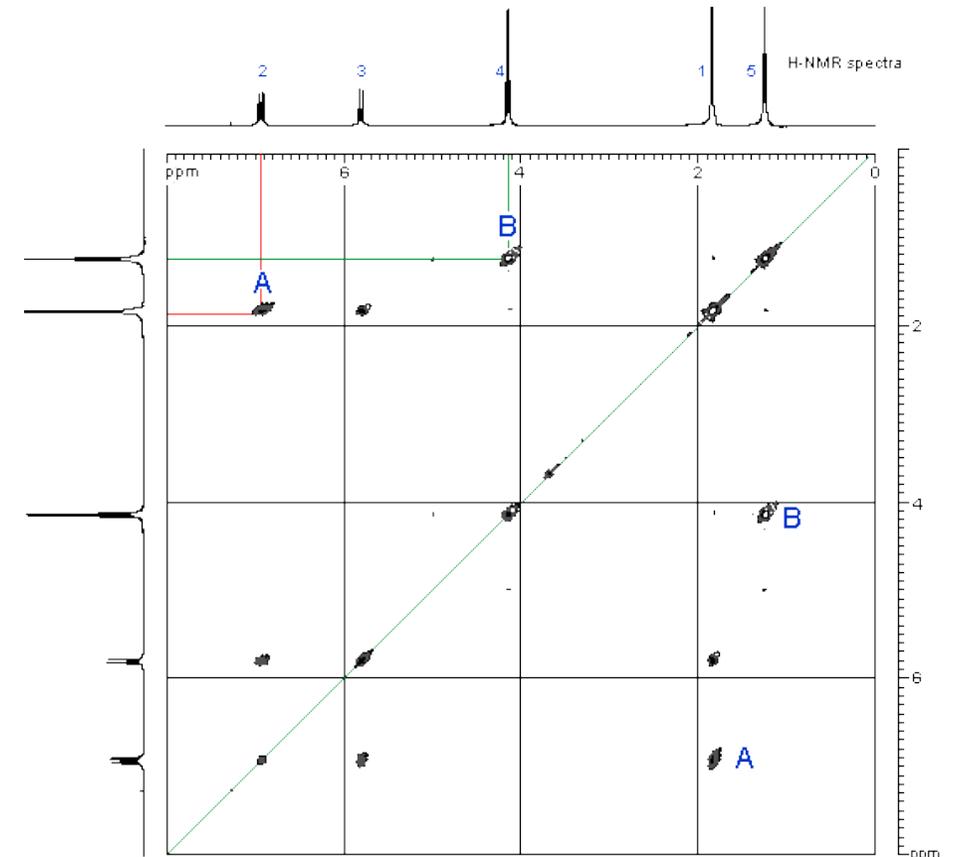
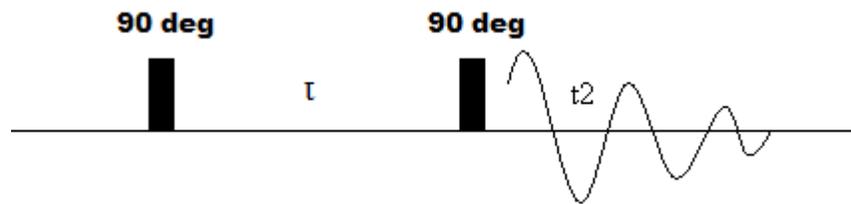
Lo spettro ¹H-¹⁵N-HSQC è sensibile alla struttura secondaria

COSY

Nel COSY ho trasmissione di magnetizzazione tra nuclei uguali (^1H ma anche ^{13}C) e legati ad atomi vicini.

La magnetizzazione si trasmette lungo i legami (J-coupling).

Dalla posizione dei picchi fuori della diagonale posso capire quali nuclei sono accoppiati e quindi vicini.

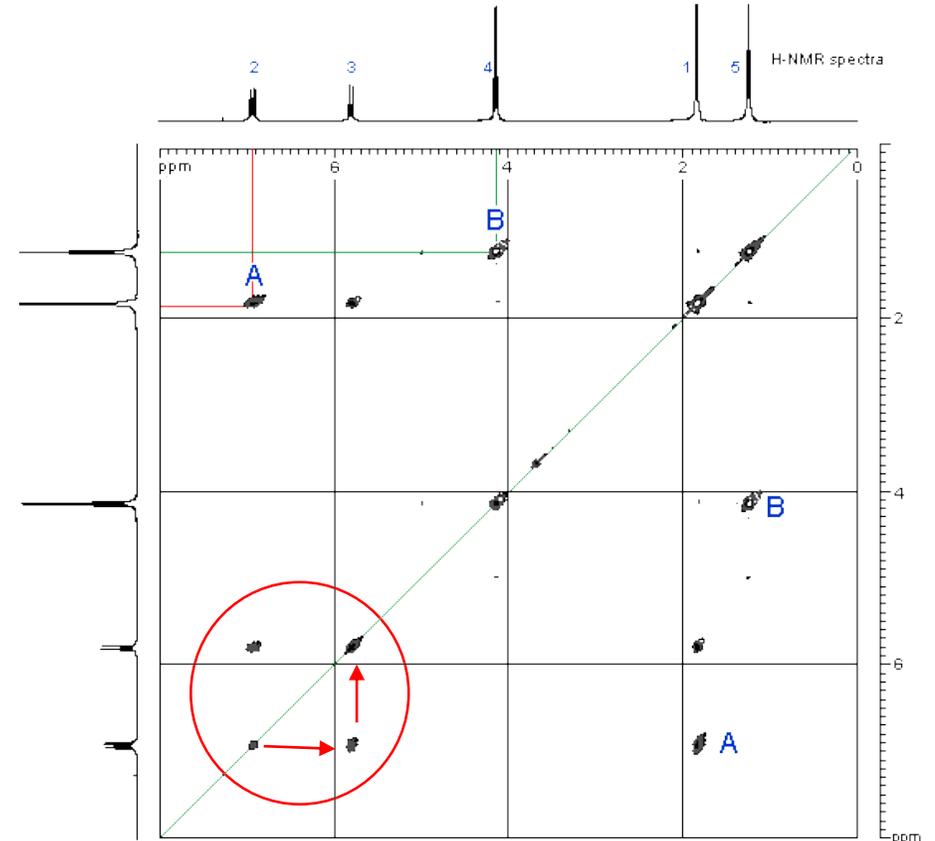


COSY

Sui due assi riporto gli spettri

I picchi lungo la diagonale corrispondono a quelli dello spettro 1-D, i picchi fuori della diagonale indicano correlazione tra nuclei vicini.

In questo modo è possibile stabilire quali nuclei sono vicini ed assegnare i picchi agli atomi.

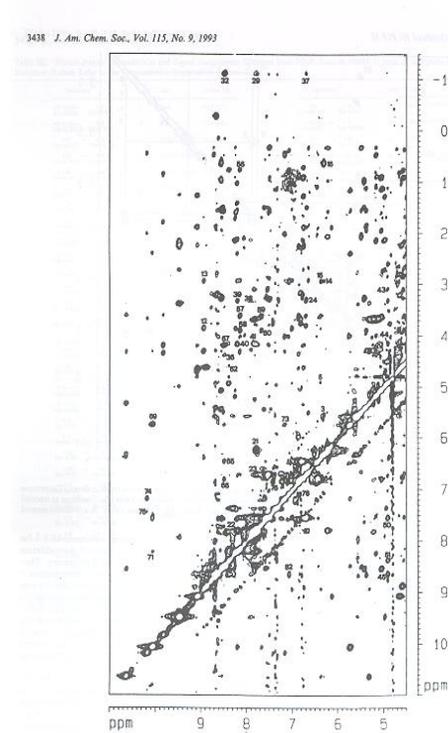


NOESY

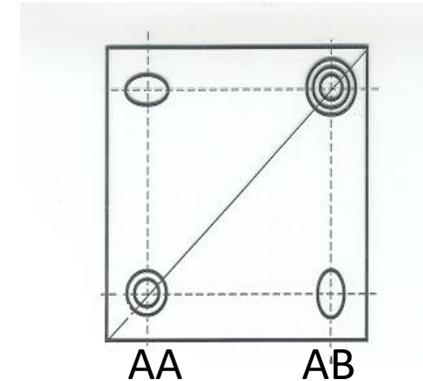
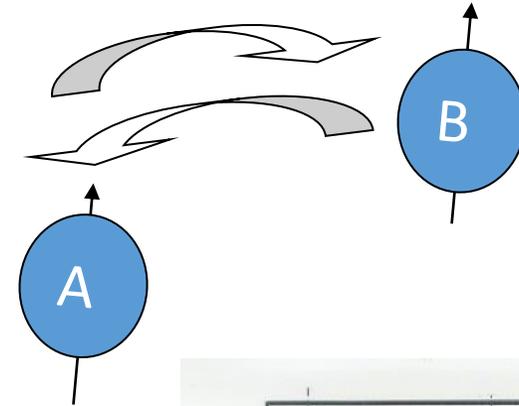
L'accoppiamento tramite NOE viene generalmente valutato tramite mappe bidimensionali.

Per capire quale atomo è correlato spazialmente con altri atomi si ricorre all'esperimento **NOESY**.

Le mappe possono essere molto complesse.



NOESY
75 aminoacidi



NOESY

Anche nel NOESY, riporto i due spettri sui due assi.

In questo caso la trasmissione della magnetizzazione è nello spazio e non attraverso i legami.

Anche in questo caso, nell'esperimento più semplice considero la trasmissione tra nuclei dello stesso tipo.

I picchi al di fuori della diagonale mi indicano quale nucleo è correlato con quale e quindi chi è vicino a chi.

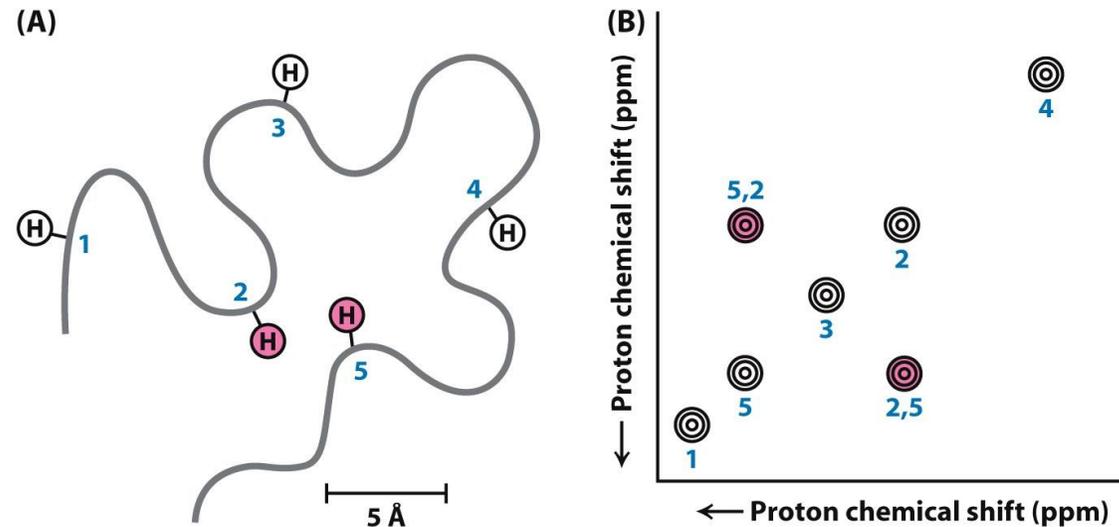
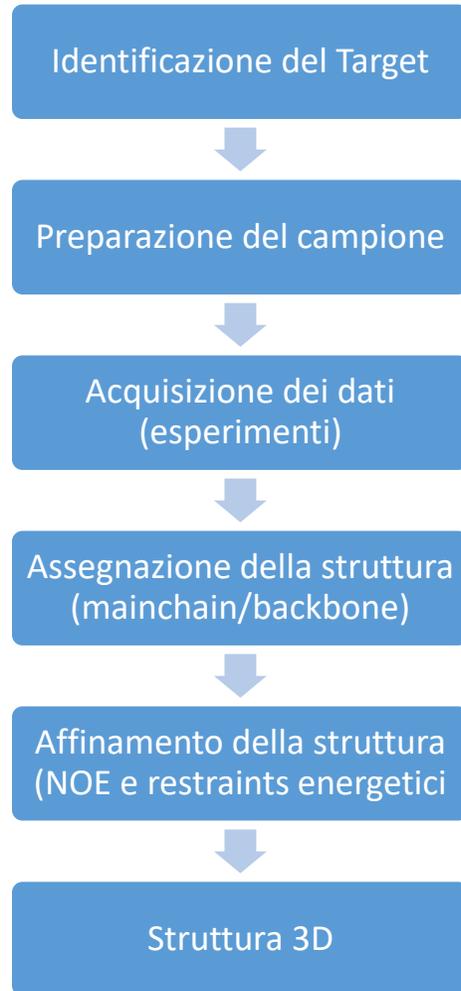


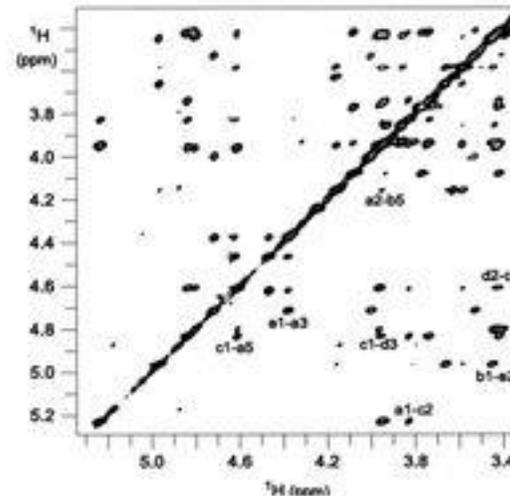
Figure 3.46
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

NMR per la determinazione strutturale



Esistono una molteplicità di tecniche che contribuiscono alla determinazione strutturale di proteine in soluzione.

La determinazione strutturale con NMR rimane comunque un problema di non semplicissima soluzione.



Determinazione strutturale di una proteina

1. Il primo step consiste nell'assegnazione delle diverse risonanze, ai diversi atomi (^1H , ^{13}C , ^{15}C). In questa fase è fondamentale l'uso di esperimenti multidimensionali HSQC basati su ^1H , ^{13}C , ^{15}C .
2. Si determinano le correlazioni NOE tra i diversi protoni. I NOE costituiscono i restraints strutturali, insieme ad altri dati come quelli derivanti dai J-couplings.
3. Viene generata una struttura che deve rispettare i criteri strutturali noti ed essere coerente con i dati NMR osservati. questa struttura viene modellata (automaticamente) cercando di migliorare (***minimi quadrati***) l'accordo tra i restraints (NOE) osservati e quelli calcolati a partire dal modello. Viene utilizzata la ***Dinamica Molecolare*** con l'aggiunta di restraints sperimentali.
4. Si ripete fino a generare un certo numero di strutture tra loro coerenti.

$$F(x, y, z) = \text{Energy}(x, y, z) + \text{Restrains}(x, y, z)$$

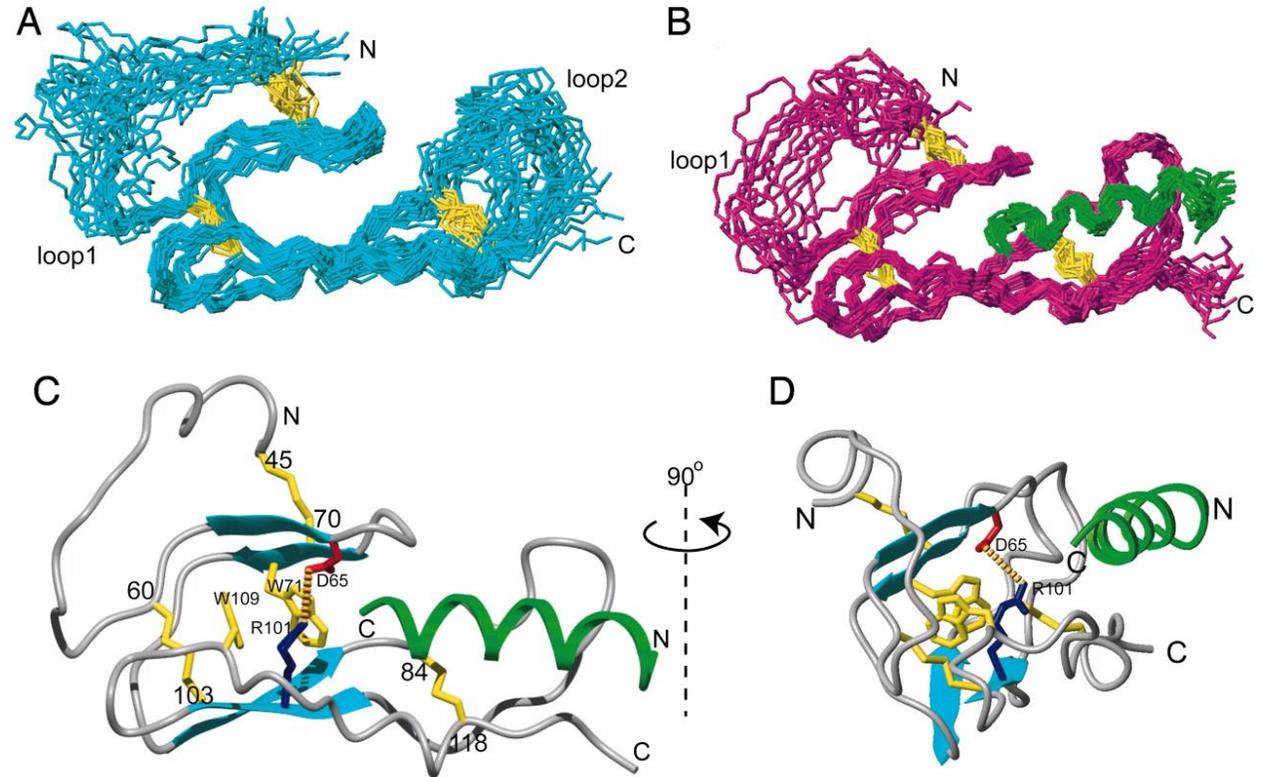
$F(x, y, z)$ viene minimizzata

La struttura NMR

Non si ottiene un modello unico ma un insieme di modelli.

Le parti più flessibili della struttura avranno pochi restraints strutturali (NOE) e quindi avranno maggiore variabilità nei modelli generati.

I modelli devono soddisfare i requisiti stereochimici noti per le macromolecole (distanze ed angoli di legame, plot di Ramachandran, collisioni tra atomi).



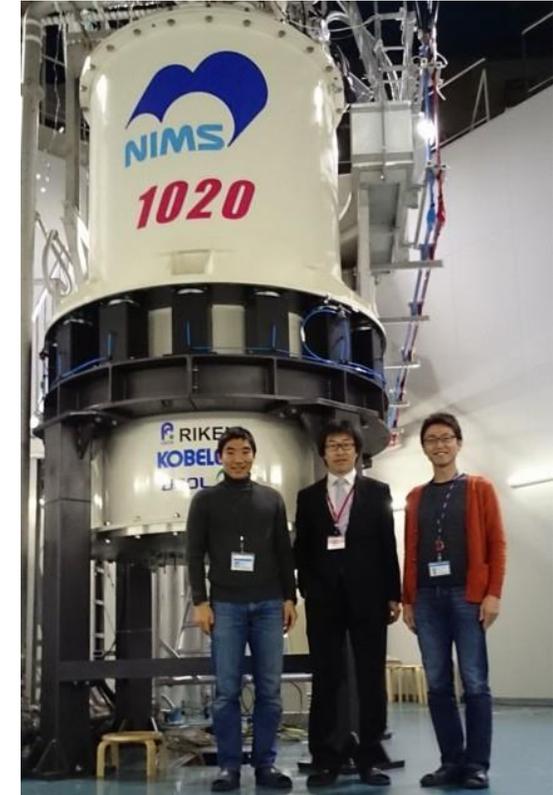
Vantaggi e svantaggi dell'NMR (per strutture 3D)

Vantaggi:

- L'NMR viene fatto in soluzione (non richiede cristalli)
- L'NMR può fornire informazione sulla dinamica delle proteine

Svantaggi:

- La complessità degli spettri limita le dimensioni dei sistemi studiabili (100 kDa?)
- La proteina è in una soluzione molto concentrata (non esattamente condizioni fisiologiche)
- Può essere richiesta una discreta mole di lavoro in laboratorio (marcatura con isotopi)
- Il modello finale non è univoco (ma può essere un vantaggio)



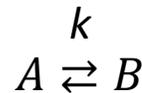
L'NMR per la determinazione strutturale richiede strumenti molto potenti e costosi, non dissimili dalle moderne beamlines presso i sincrotroni.

NMR e dinamica

L’NMR è probabilmente la tecnica strumentale più potente per lo studio della dinamica di una macromolecola, ovvero della sua evoluzione temporale in un determinato contesto biologico /chimico /fisico

Il movimento di un nucleo influenzerà la sua forma e posizione nello spettro NMR.

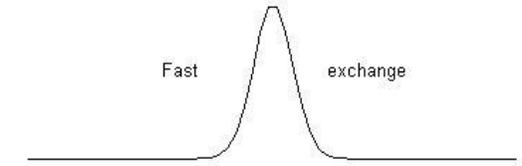
E’ quindi possibile avere informazioni più o meno accurate sull’evoluzione temporale del sistema.



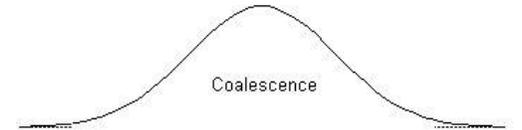
<p>k – exchange rate ν – peak frequency h – peak-width at half-height e – with exchange o – no exchange</p>
--

NMR Analysis of Protein Dynamics

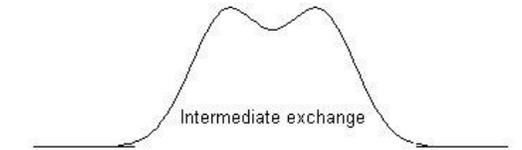
$$k = \pi \Delta\nu_o^2 / 2(h_e - h_o)$$



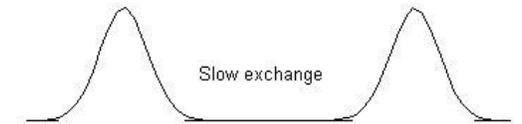
$$k = \pi \Delta\nu_o / 2^{1/2}$$



$$k = \pi (\Delta\nu_o^2 - \Delta\nu_e^2)^{1/2} / 2^{1/2}$$



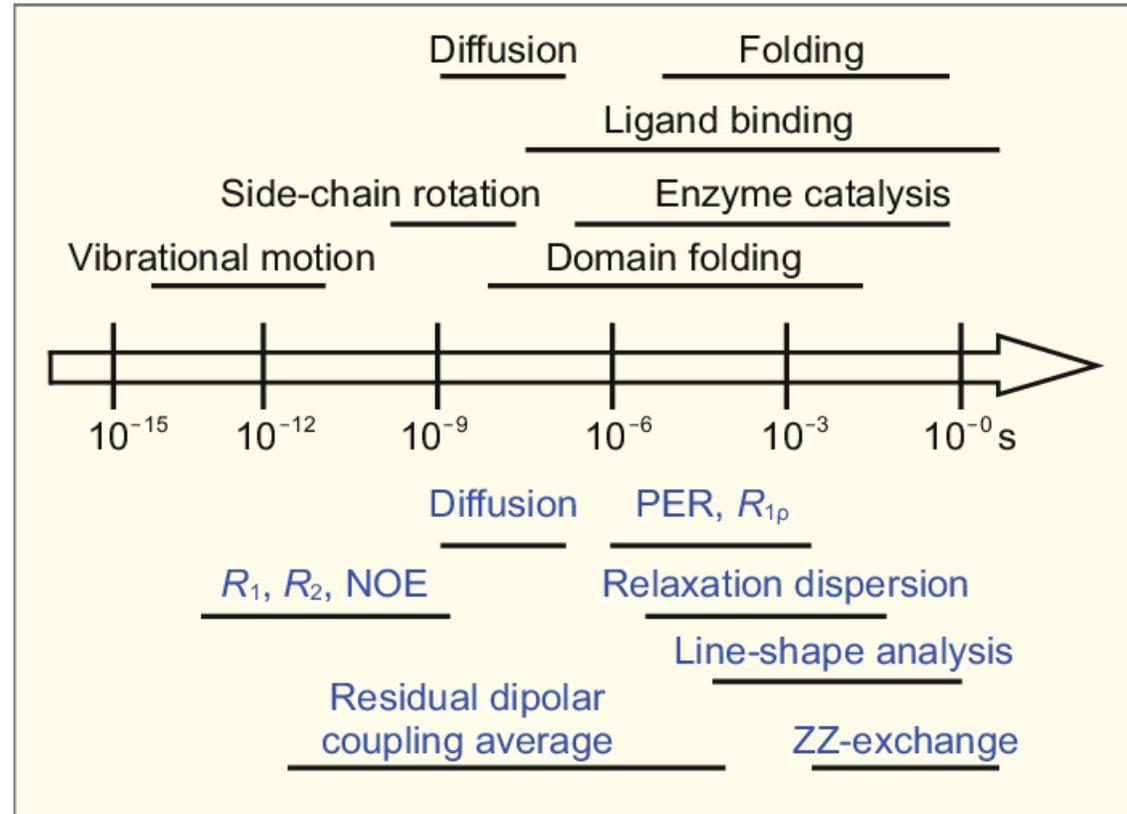
$$k = \pi (h_e - h_o)$$



Scala temporale in NMR

L'NMR è una tecnica estremamente versatile, scegliendo il metodo più opportuno è possibile studiare fenomeni che avvengono su scale temporali che vanno dai ps (rotazioni di catene laterali) fino ai ms e oltre (cinetica enzimatica, folding).

L'NMR è probabilmente lo strumento più versatile per l'analisi della dinamica di una (macro)molecola, l'unico limite è che presuppone l'assegnazione del picco spettrale di interesse



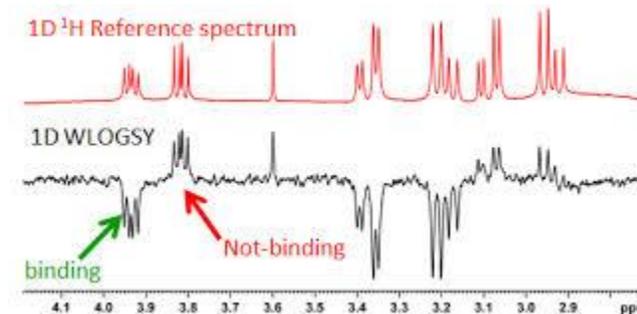
NMR e drug discovery

L'NMR trova una larghissima applicazione anche nello studio dell'interazione tra proteine e ligandi (es: proteina-farmaco).

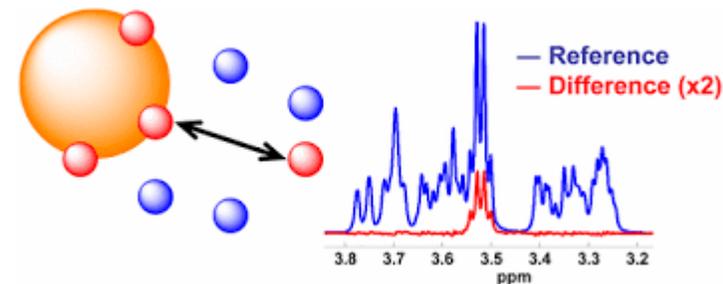
L'interazione tra target (proteina) e ligando (piccola molecola) può essere seguito analizzando lo spettro NMR del target (macromolecola) o del ligando (es: inibitore). Se si è interessati al fenomeno del binding (costante di dissociazione: K_d), **seguire il ligando è più semplice**:

Ci sono molti approcci distinti, tra i più usati:

- **WaterLogsy**, basato sul diverso trasferimento di magnetizzazione tra ligando e H_2O a seconda che il ligando interagisca con la proteina o meno.
- **STD** (*Saturation from target to ligand*) in cui si analizza il trasferimento di magnetizzazione dalla proteina al ligando, possibile solo esiste interazione tra i due.
- **T_2R** basato sul rilassamento e allargamento dei picchi (del ligando) in seguito all'interazione con la proteina



WaterLogsy



STD

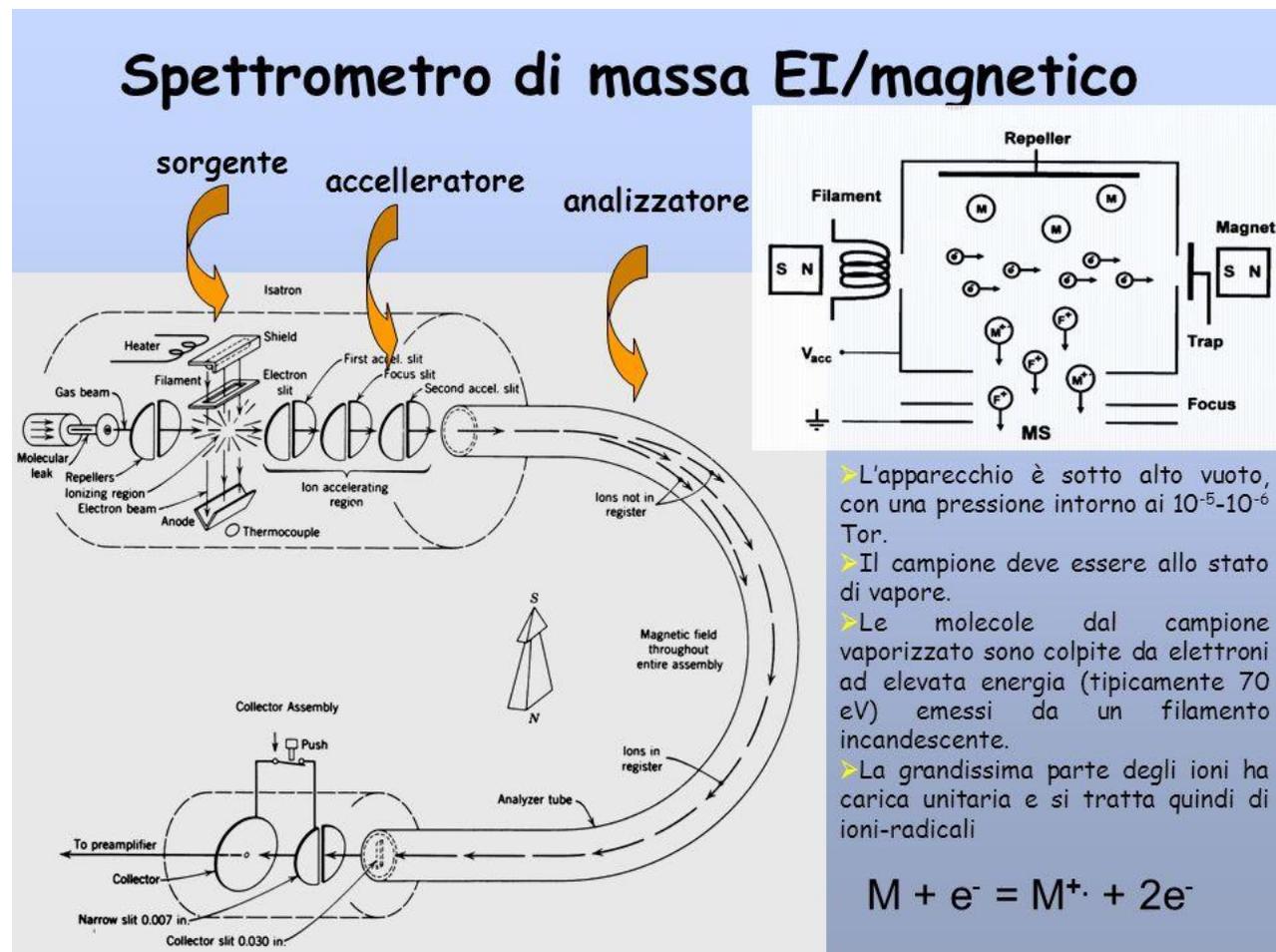
Spettroscopia di Massa

La Spettroscopia di Massa (MS) è una tecnica analitica usatissima in chimica, biologia e fisica.

Essenzialmente un campione viene evaporato in fase gassosa e quindi ionizzato e accelerato.

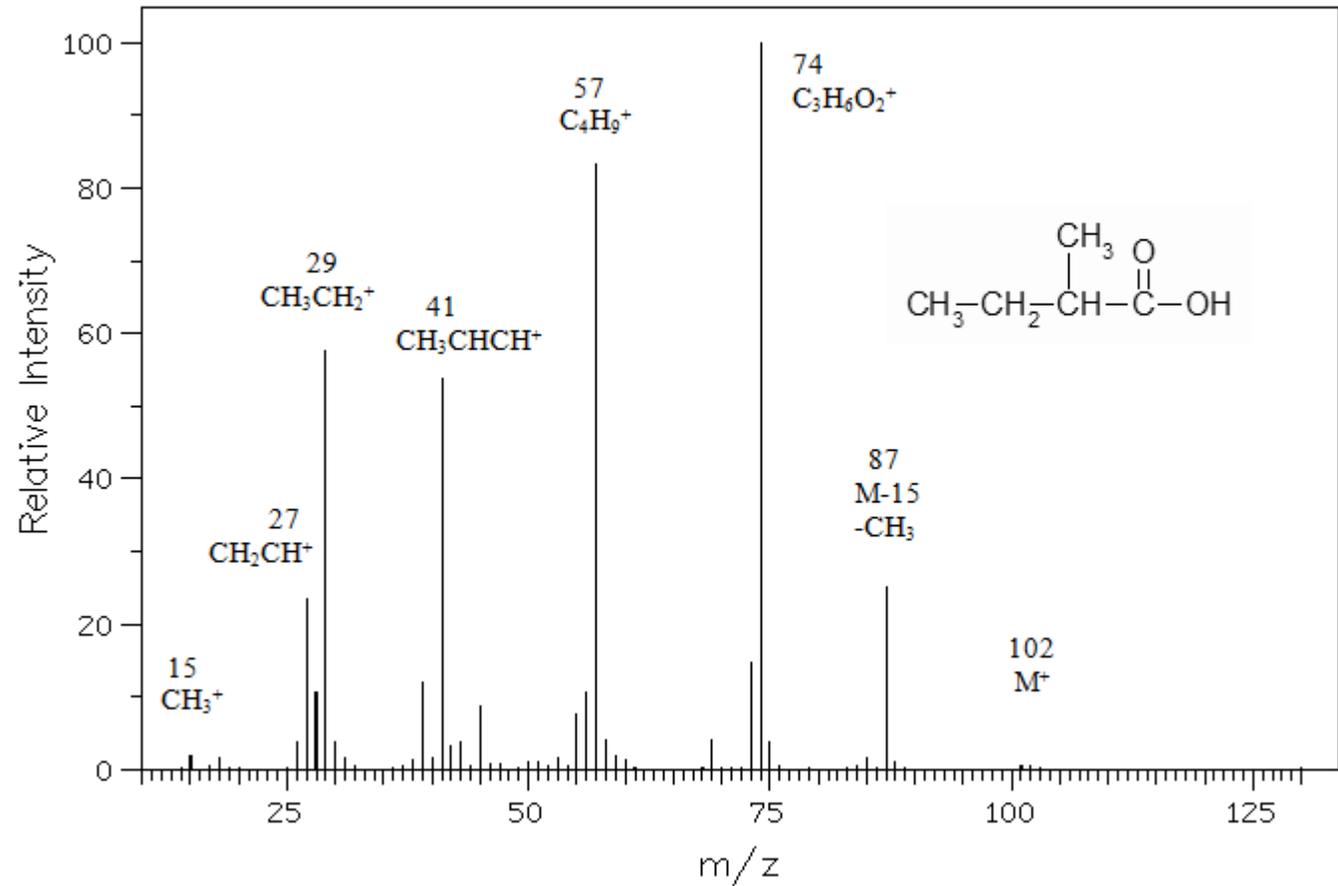
Gli ioni creati, a seconda dell'energia ad essi trasferita, possono dar luogo a frammentazioni o meno.

Un analizzatore deflette gli ioni in modo che possano essere rivelati in relazione al rapporto massa/carica.



A partire dai rapporti massa/carica dei frammenti molecolari (identificati con altissima precisione) è possibile ricostruire la 'struttura' della molecola analizzata.

E' una tecnica potentissima e trova impiego anche nello studio delle proteine

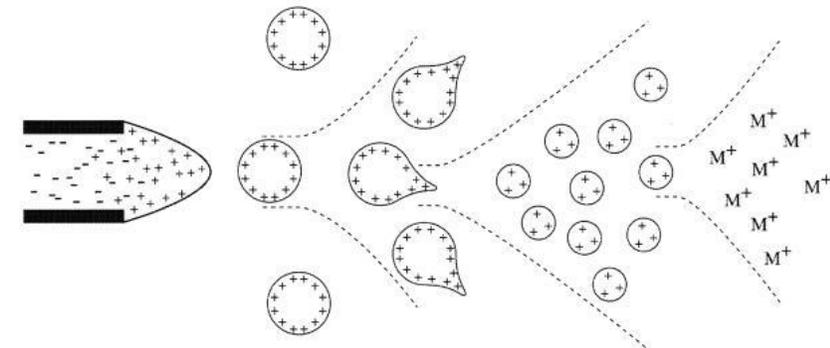
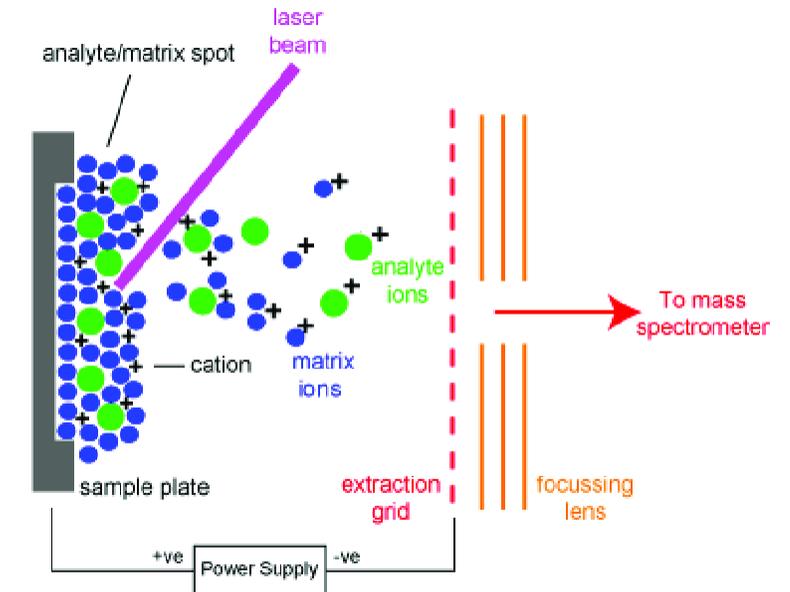


Spettroscopia di Massa su molecole biologiche

Le Macromolecole biologiche sono campioni notoriamente poco volatili, per poter portare in fase vapore delle macromolecole, come le proteine, le due tecniche principali (o loro evoluzioni) sono:

MALDI (*matrix-assisted laser desorption*): La macromolecola è intrappolata in una matrice organica di natura acida, un fascio laser diretto contro la matrice causa il desorbimento e la formazione di clusters con carica determinata (spesso singola).

ESI-MS (*Electrospray Ionization MS*): La macromolecola è dispersa in un aerosol e quindi soggette ad un campo elettrico. Le particelle cariche, per effetto della temperatura o di un gas, riducono un po' alla volta le loro dimensioni fino al semplice ione molecolare.



Usi della MS in Biologia Strutturale

Come l'NMR anche la Spettroscopia di Massa è una tecnica estremamente versatile.

Il suo uso può andare dalla semplice determinazione della massa molecolare della macromolecola fino a sofisticati studi sulla conformazione delle macromolecole.

Uno degli usi più interessanti in biologia strutturale consiste nello **studio delle interazioni proteina-proteina** e proteina-ligando.

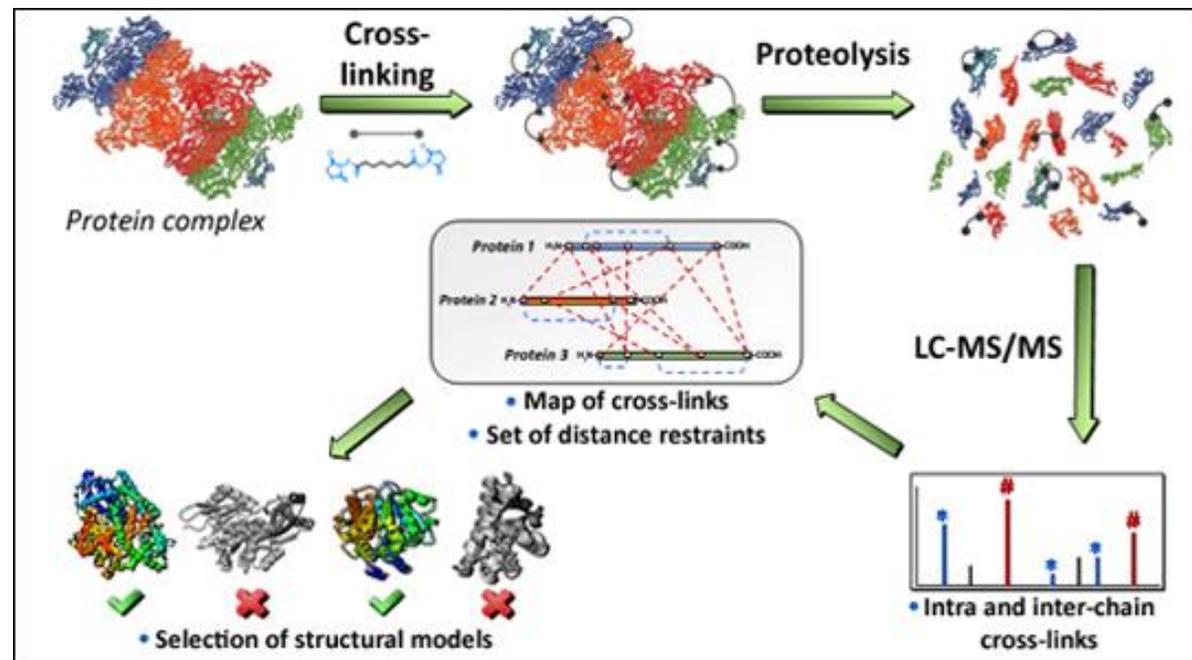
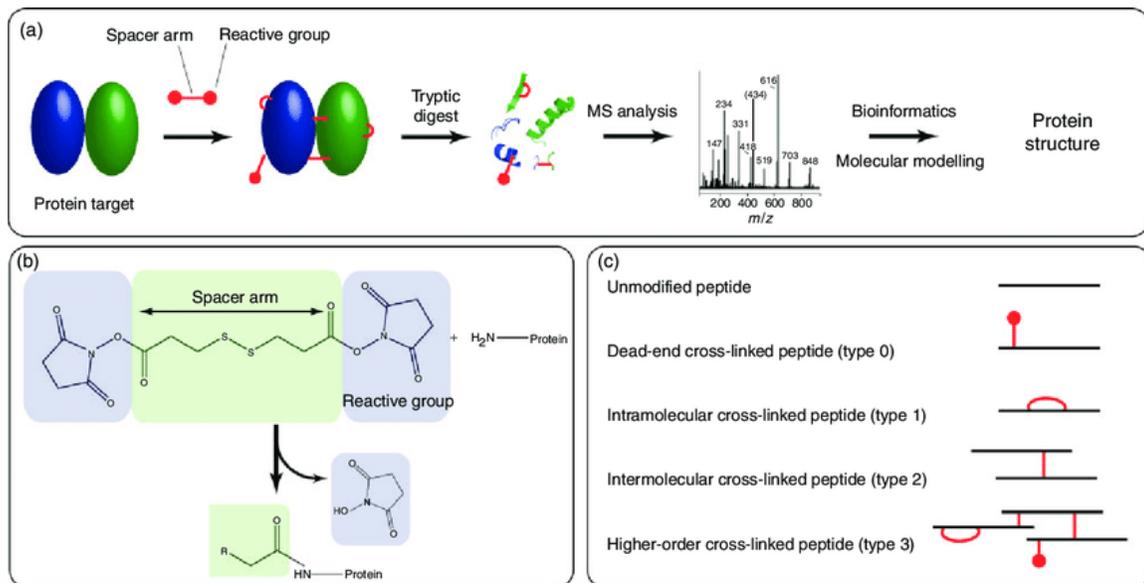
Tra le tecniche più usate (o interessanti) ricordiamo:

- **Cross-linking chimico**
- **Scambio idrogeno-deuterio (HDX)**
- **Fingerprinting**

Queste tecniche non sono in grado di produrre un vero dettaglio strutturale ma possono fornire utilissime informazioni sull'organizzazione molecolare.

Cross-linking-MS

Un reagente (di cross-linking) contiene due funzioni reattive ai termini di una catena spaziatrice. Le due funzioni possono legare due gruppi in due posizioni distinte, se la distanza lo permette. La successiva digestione e analisi MS permette di localizzare i peptidi interessati.



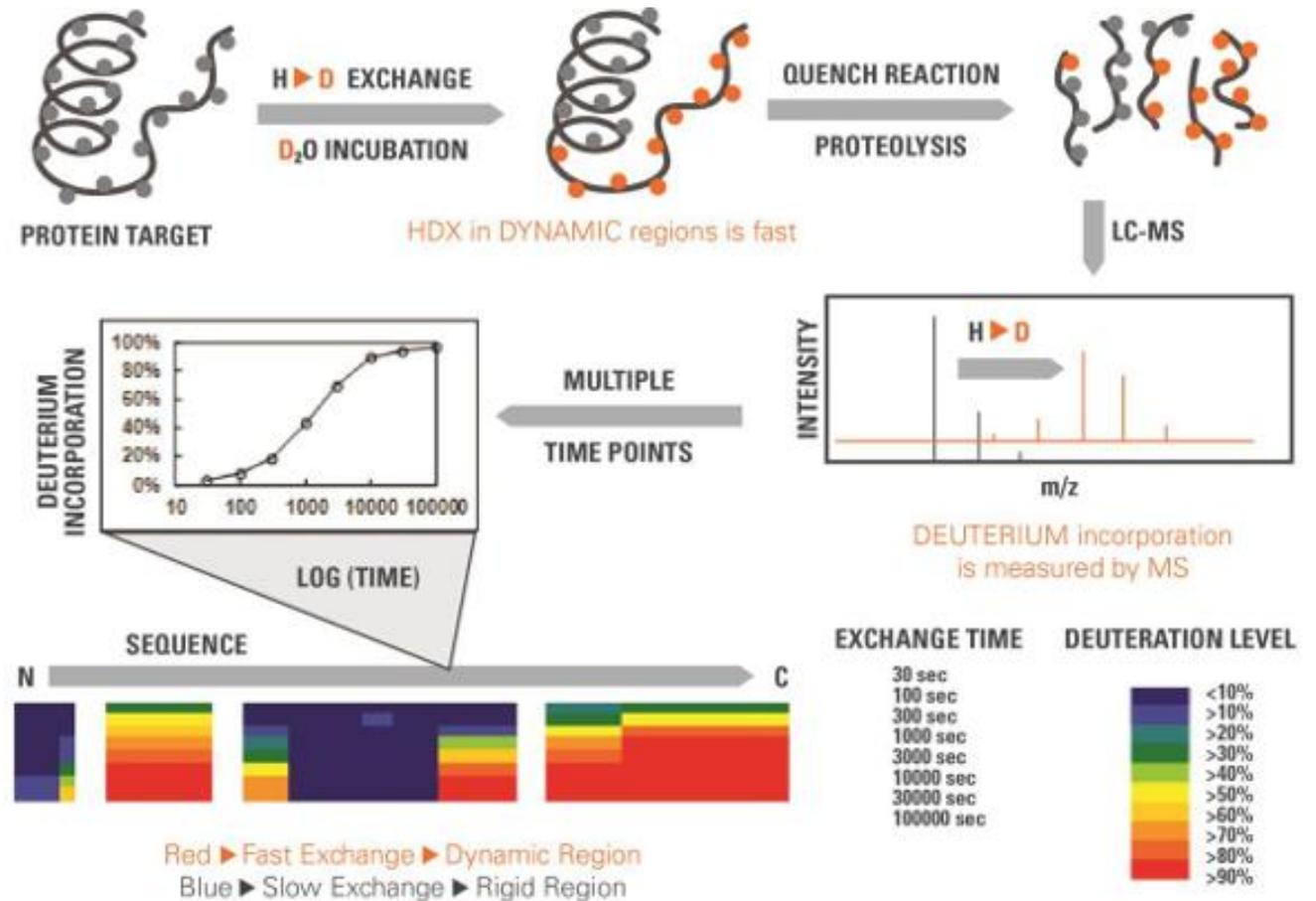
Se abbiamo due proteine che interagiscono, la tecnica della **cross-linking-MS** ci può dire quali residui sono sufficientemente vicini, e quindi interagenti da essere 'linkati'.

Scambio Idrogeno-Deuterio (HDX)

La tecnica dello scambio Idrogeno-Deuterio (**HDX**) è molto semplice e intuitiva. In sostanza dopo aver misurato lo spettro di massa della proteina nativa, si scambia l'H₂O con D₂O. In tal modo gli H esposti sulla superficie saranno scambiati, più o meno lentamente, con D.

E' una tecnica utile per capire quali parti della proteina sono esposte al solvente (residui superficiali).

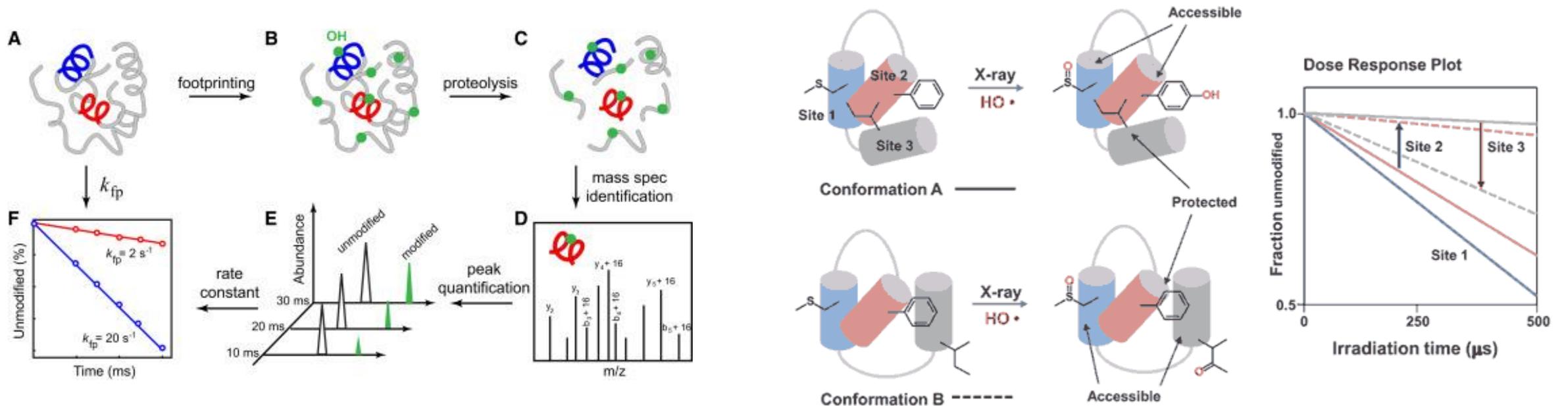
Ad esempio è utile per capire quali parti sono interessate all'interazione con un ligando, proteico o organico.



X-ray Footprinting

Una tecnica simile al HDX-MS, è il **X-ray Footprinting** (XF-MS).

In questo caso si sfrutta un intenso fascio di raggi-X per produrre *in-situ* radicali ossidrilici $\text{OH}\cdot$, molto reattivi, che reagiranno con i residui esposti sulla superficie della macromolecola. Dopo l'esposizione ai raggi-X, il campione è analizzato con digestione (con Tripsina), HPLC e MS. Sarà così possibile, come per HDX-MS, capire quali parti della macromolecola erano esposti al solvente e quali no (folding, interazione con altre molecole...). Questa tecnica usa un fascio di raggi-X molto intenso, ottenibile solo presso dei sincrotroni.

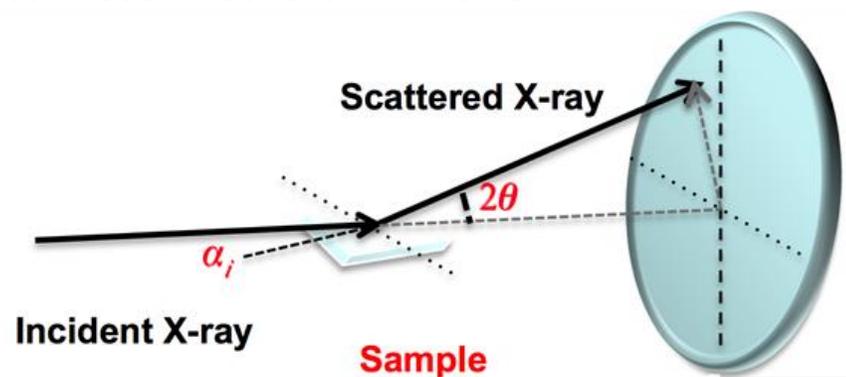


Metodi Basati sullo 'Scattering'

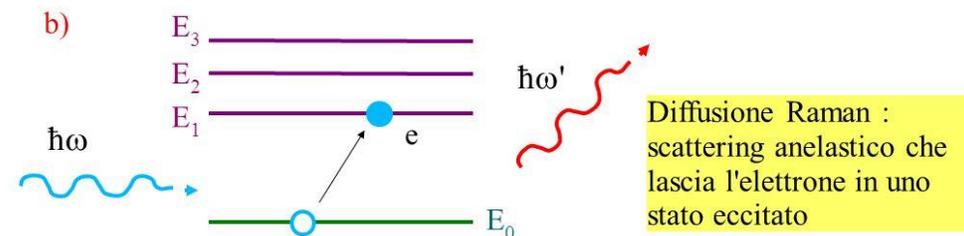
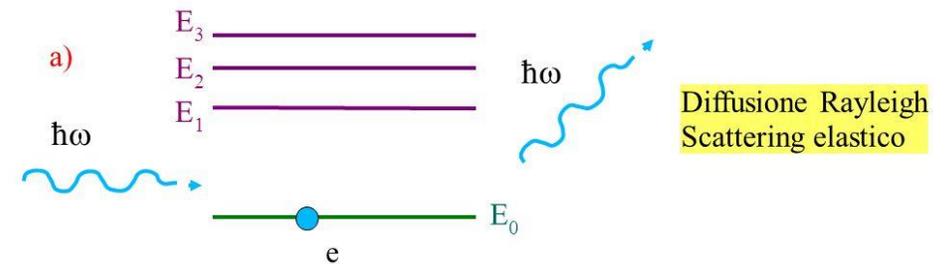
A differenza delle spettroscopie, dove la radiazione elettromagnetica viene assorbita dalla materia ed emessa a lunghezza d'onda più lunga (fenomeno dello scattering non-elastico), nei cosiddetti metodi basati sullo scattering (diffusione, in italiano) la radiazione elettromagnetica interagisce con la materia senza cambiare lunghezza d'onda ovvero senza perdere energia (scattering elastico).

Esistono diversi metodi utilizzati in biologia strutturale basati sullo scattering (elastico) della radiazione elettromagnetica:

- Dynamic Light Scattering (DLS)
- Small Angle X-ray Scattering (SAXS)
- Metodi basati sulla diffrazione



Interazione fotone – atomo

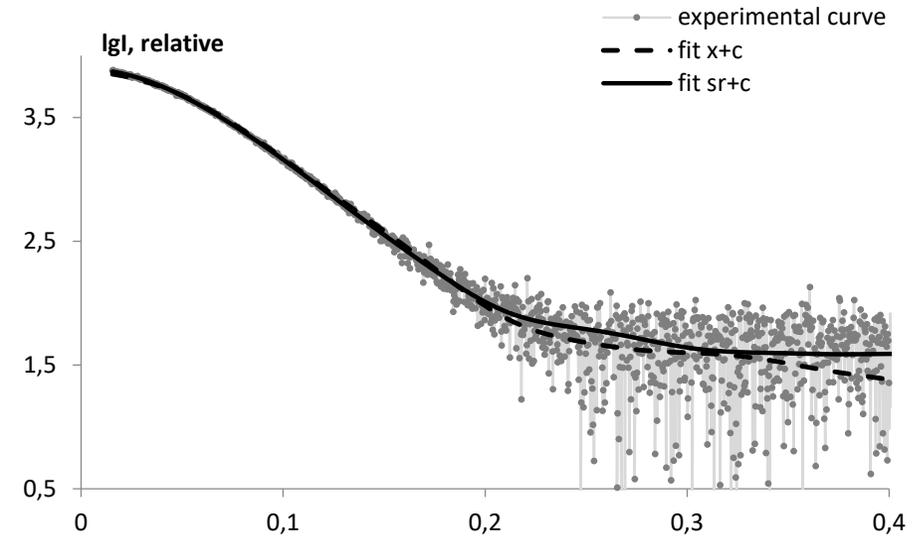
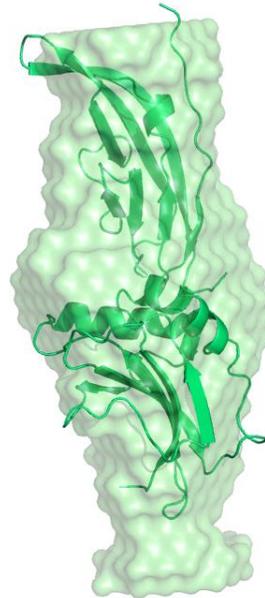


Small Angle X-ray Scattering

Se un campione omogeneo, in soluzione, viene irradiato con radiazione elettromagnetica, la radiazione stessa verrà deflessa con diversa intensità a vari angoli, in relazione alle dimensioni, forma e natura chimica delle 'molecole' in soluzione (SAXS).

Il SAXS, permette la ricostruzione della forma (shape) della macromolecola. Quindi il SAXS è utilissimo per avere indicazioni strutturali a bassa risoluzione ma in condizioni quasi fisiologiche.

Esiste una variante che usa i neutroni invece che i raggi-X (SANS)



La curva delle intensità in funzione dell'angolo è la curva SAXS, e può essere utilizzata per estrarre parametri utili a ricostruire la forma della molecola in soluzione.

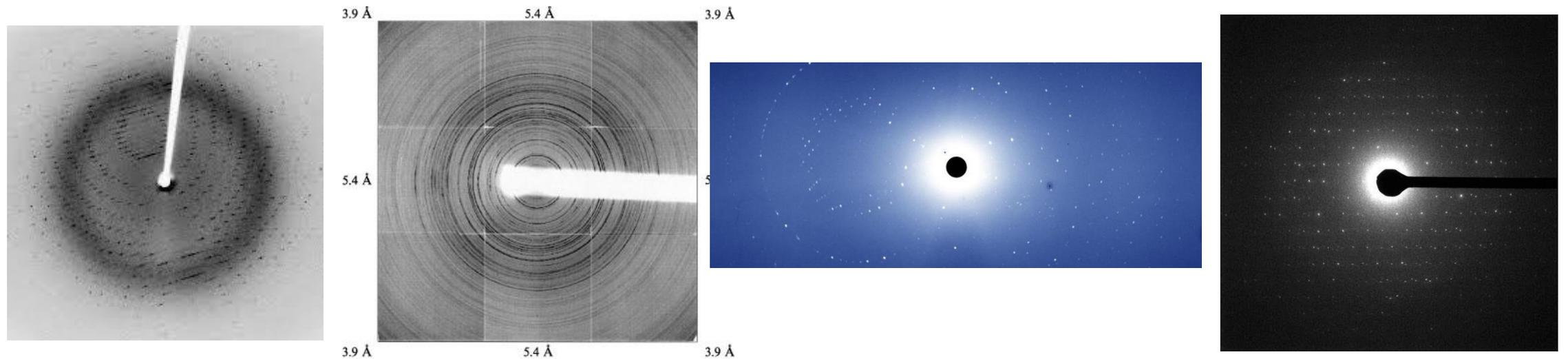
Lo scattering è analizzato solo ad angoli di 'deflessione' piccoli.

Diffrazione

Nella diffrazione ho sempre un'interazione senza perdita di energia tra radiazione elettromagnetica e materia (scattering elastico). Se la materia è però ordinata in un reticolo cristallino si verifica il fenomeno della diffrazione, ovvero interferenza costruttiva e distruttiva delle onde 'diffuse'.

La diffrazione può utilizzare radiazioni di natura diversa (raggi-X, neutroni, elettroni)

La diffrazione può investigare materiali diversi (cristalli singoli, polveri cristalline, cristalli bidimensionali, fibre)

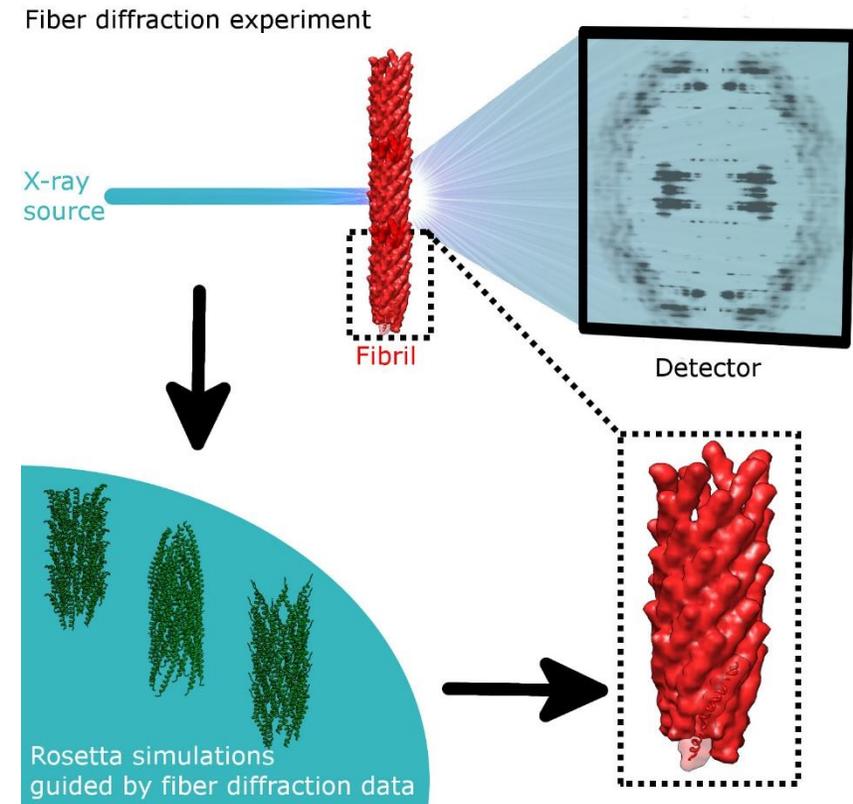
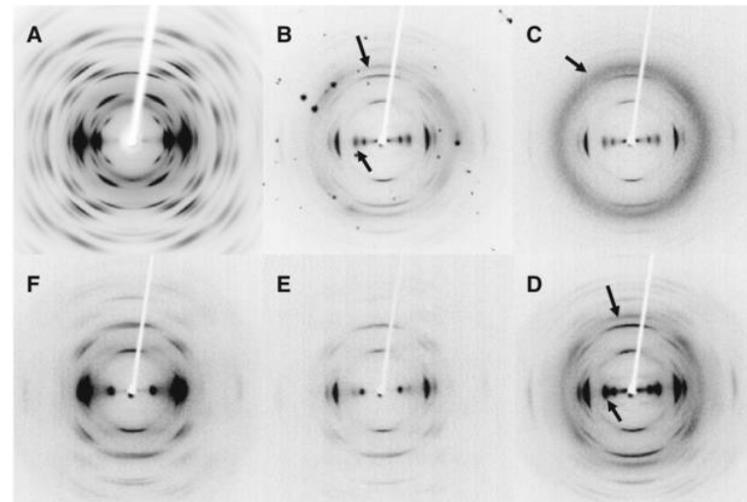


Diffrazione da fibre

Le fibre, come il DNA, alcuni polimeri e le fibrille non possiedono ordine in 3 dimensioni, tuttavia sono ordinate lungo 1 dimensione. Per questo motivo le fibre danno luogo a figure di diffrazioni da cui è possibile estrarre alcune informazioni strutturali:

- Simmetria di ciò che si ripete (es: Elicoidale)
- Spaziatura tra le unità che si ripetono (passo dell'elica)
- 'Larghezza' di ciò che si ripete

Anche la diffrazione di fibre si trae giovamento dall'uso della radiazione di sincrotrone

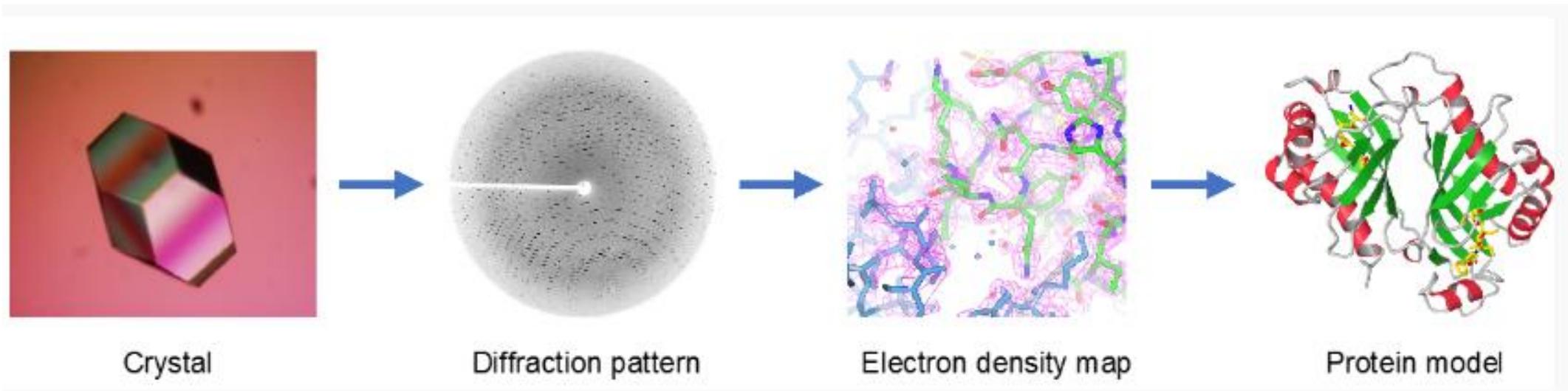


Diffrazione da cristallo singolo

La tecnica della diffrazione di raggi-X da cristallo singolo è una tecnica potentissima e consolidata, in grado di fornire modelli strutturali ad alta risoluzione di molecole di qualsiasi peso molecolare.

Questa tecnica ha fondamentalmente un solo limite: **richiede un cristallo che diffranga**.

E' una tecnica largamente basata sulla radiazione di sincrotrone (ma non è indispensabile)



Diffrazione da elettroni

Gli elettroni sono quasi sempre concepiti come particelle, tuttavia in virtù della dualità onda/particella anche gli elettroni hanno una loro lunghezza d'onda (dell'ordine di 0.05 Å), assolutamente compatibile con i fenomeni di diffrazione da parte di cristalli

- Nel 1927 viene dimostrato da Clint Davisson e Lester Germer che gli elettroni danno luogo al fenomeno della diffrazione
- Negli anni 50, più o meno nel periodo in cui Kendrew e Perutz lavorano sulla diffrazione di raggi-X, si fanno i primi esperimenti di diffrazione di elettroni su cristalli di proteine
- Anni 60-70 Aaron Klug lavora alla diffrazione di elettroni sui Virus
- Nel 1975 R. Henderson pubblica la struttura a 7 Angstrom di risoluzione della Batteriorodopsina (cristalli 2D)
- Nel 1990 R. Henderson pubblica la struttura della Batteriorodopsina a risoluzione atomica
- Introduzione della tecnica della micro Electron Diffraction (micro-ED)

La diffrazione di elettroni in biologia strutturale

Gli elettroni interagiscono fortemente con la materia, molto più dei raggi-X. Questo è sicuramente un vantaggio perché è richiesta meno 'materia' per avere un pattern di diffrazione accettabile, ma anche uno svantaggio perché il campione risulta danneggiato più rapidamente in seguito all'interazione con gli elettroni (richiede quindi trattamenti o condizioni particolari).

A differenza della diffrazione di raggi-X che usa cristalli 'tridimensionali', per molto tempo la diffrazione di elettroni ha indagato cristalli bidimensionali, ovvero cresciuti in 2 sole direzioni, questo perché l'assorbimento degli elettroni da parte della materia è molto elevato.

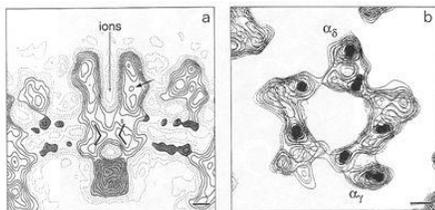
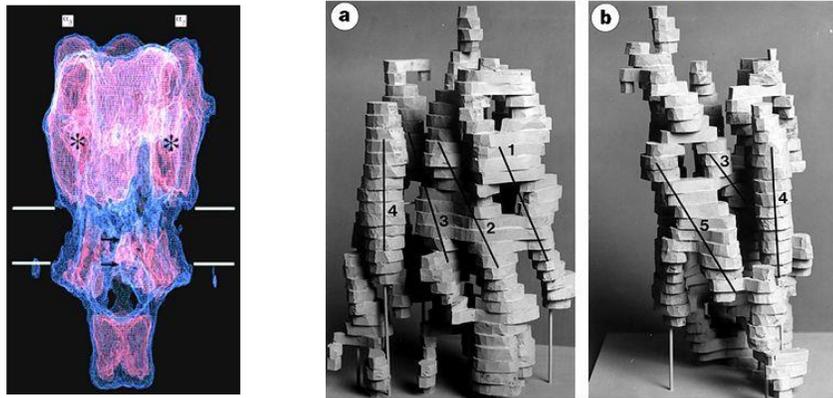
Crescere cristalli bidimensionali è forse più complesso che crescere cristalli tridimensionali

Un vantaggio della diffrazione di elettroni è che, a differenza della diffrazione dei raggi-X, non si pone 'il problema della fase', potendo ricavare le fasi direttamente dall'analisi delle immagini.

Ad oggi esiste una nuova tecnica, nota come micro Electron Diffraction (**micro-ED**), che non opera più su cristalli bidimensionali, ma su microcristalli, non adeguati a studi con raggi-X. La tecnica sembra molto promettente.

Diffrazione di elettroni: esempi

Electron diffraction from 2D crystals: Nicotinic Acetylcholine Receptor

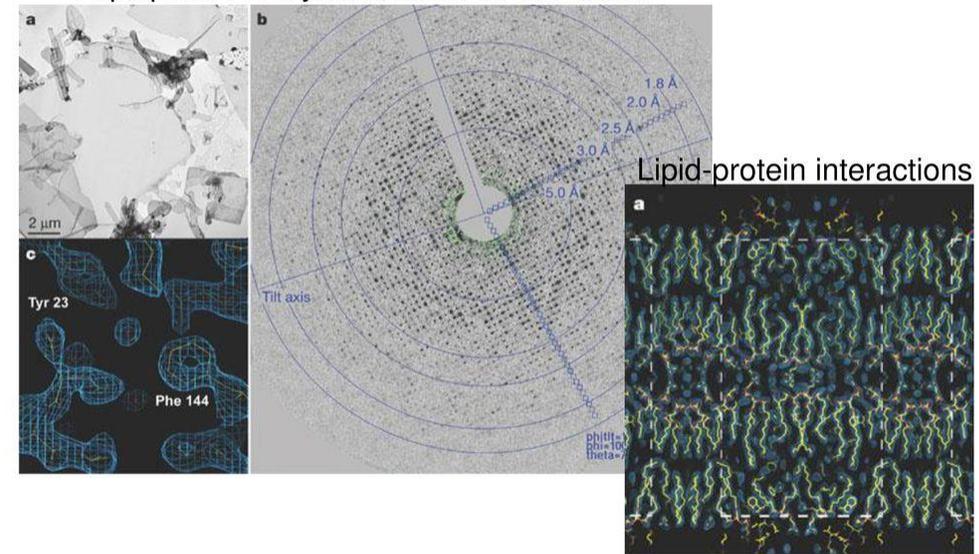


G-protein coupled receptors

Unwin et al, 2005

2D Crystals

Aquaporin 2D crystals, electron diffraction



test

Gonen et al. 2005. Nature 438:633-8.

CryoEM lecture Biophysical Chemistry Fall 2006

7

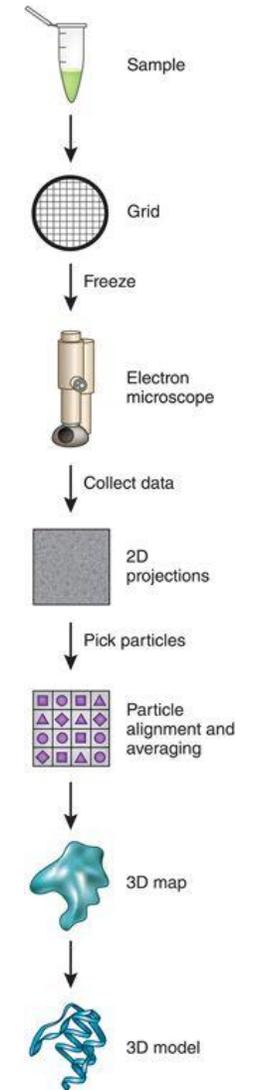
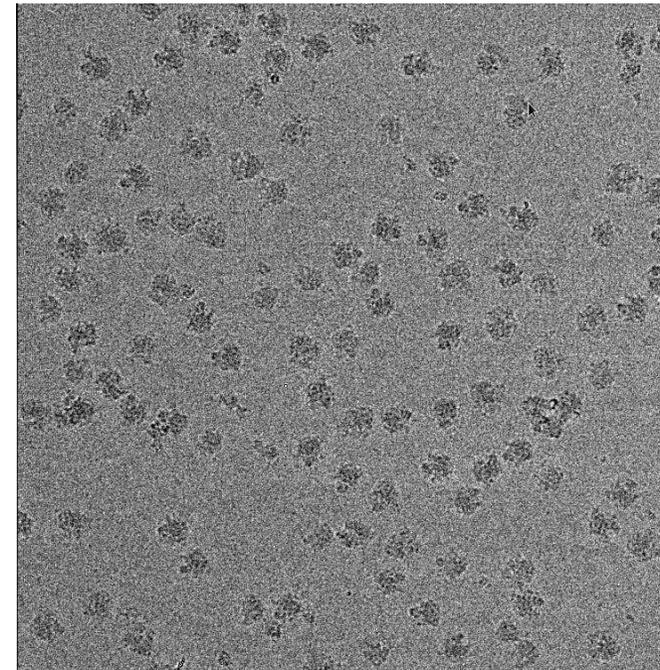
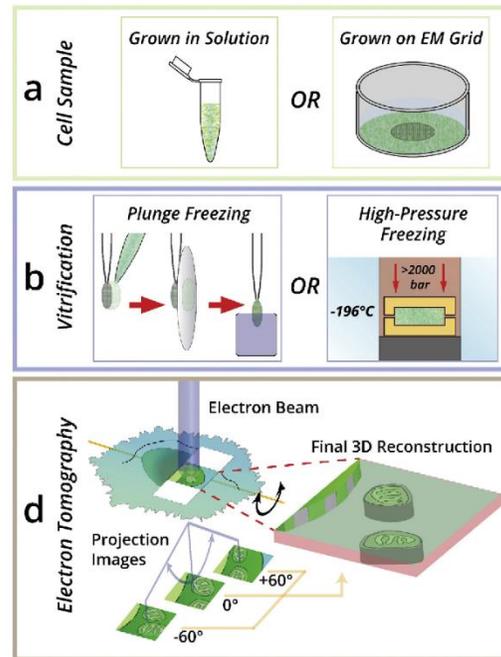
17 Jan 2006

24

Nel complesso la diffrazione di elettroni, fino alla fine degli anni 90, è stata una tecnica di nicchia, utile per esempio nello studio strutturale di proteine di membrana nel loro doppio strato lipidico. La risoluzione della struttura finale era sempre medio-bassa (per via delle problematiche sperimentali).

Single Particle Cryo-EM

I progressi tecnici e metodologici nella microscopia e nella diffrazione di elettroni, hanno portato a risultati eccezionali. Allo stato attuale la Cryo-Electron Microscopy (**Cryo-EM**) su molecola singola è in grado di fornire strutture molecolari a risoluzione atomica di molecole di dimensioni notevoli.



Cryo-EM per lo studio dei sistemi biologici

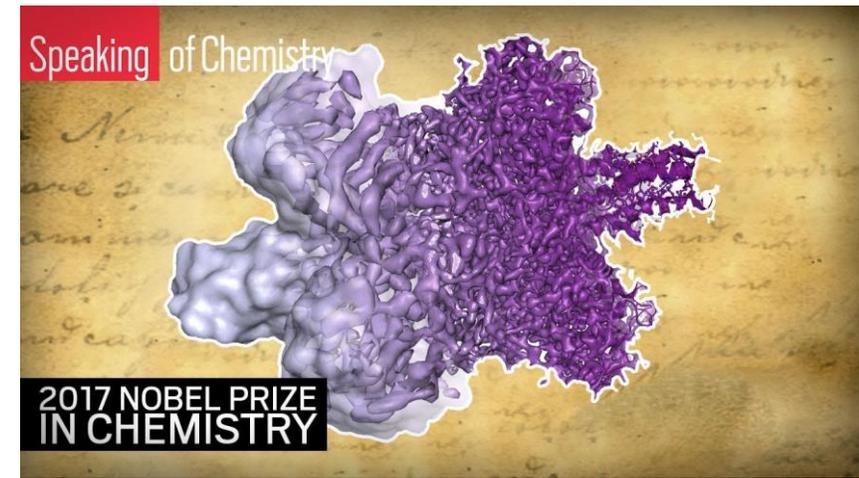
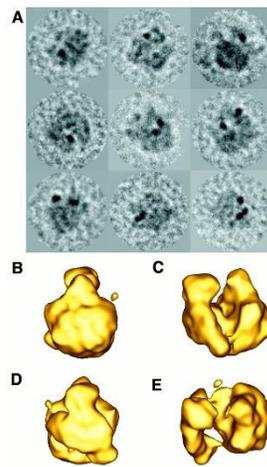
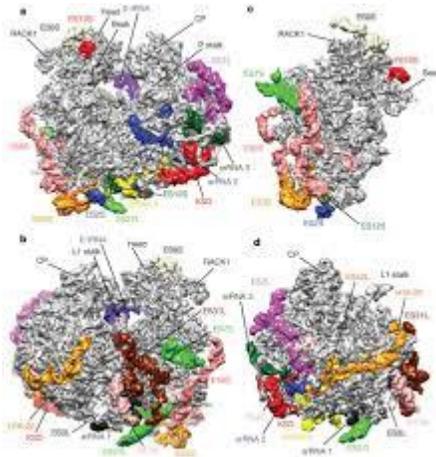
La Cryo-EM si sta dimostrando una tecnica potentissima.

Rispetto alla cristallografia di proteine mostra i seguenti vantaggi:

- Non ha bisogno di cristalli
- Può individuare stati conformazionali tra loro diversi

Gli svantaggi:

- La risoluzione media ottenibile è inferiore a quella ottenibile dai raggi-X (raramente si scende sotto i 2 Å di risoluzione, più frequentemente $> 3 \text{ \AA}$).
- La molecola studiata deve avere un peso molecolare di almeno 50 kDa



Vantaggi e Svantaggi delle diverse tecniche

Tecnica

Vantaggi

Svantaggi

Cristallografia di raggi-X:

- Non ha limiti di peso molecolare
- Tecnica consolidata
- Risoluzione Atomica

- **Ha bisogno di cristalli!**
- Struttura influenzata dal cristallo
- E' una tecnica statica

NMR:

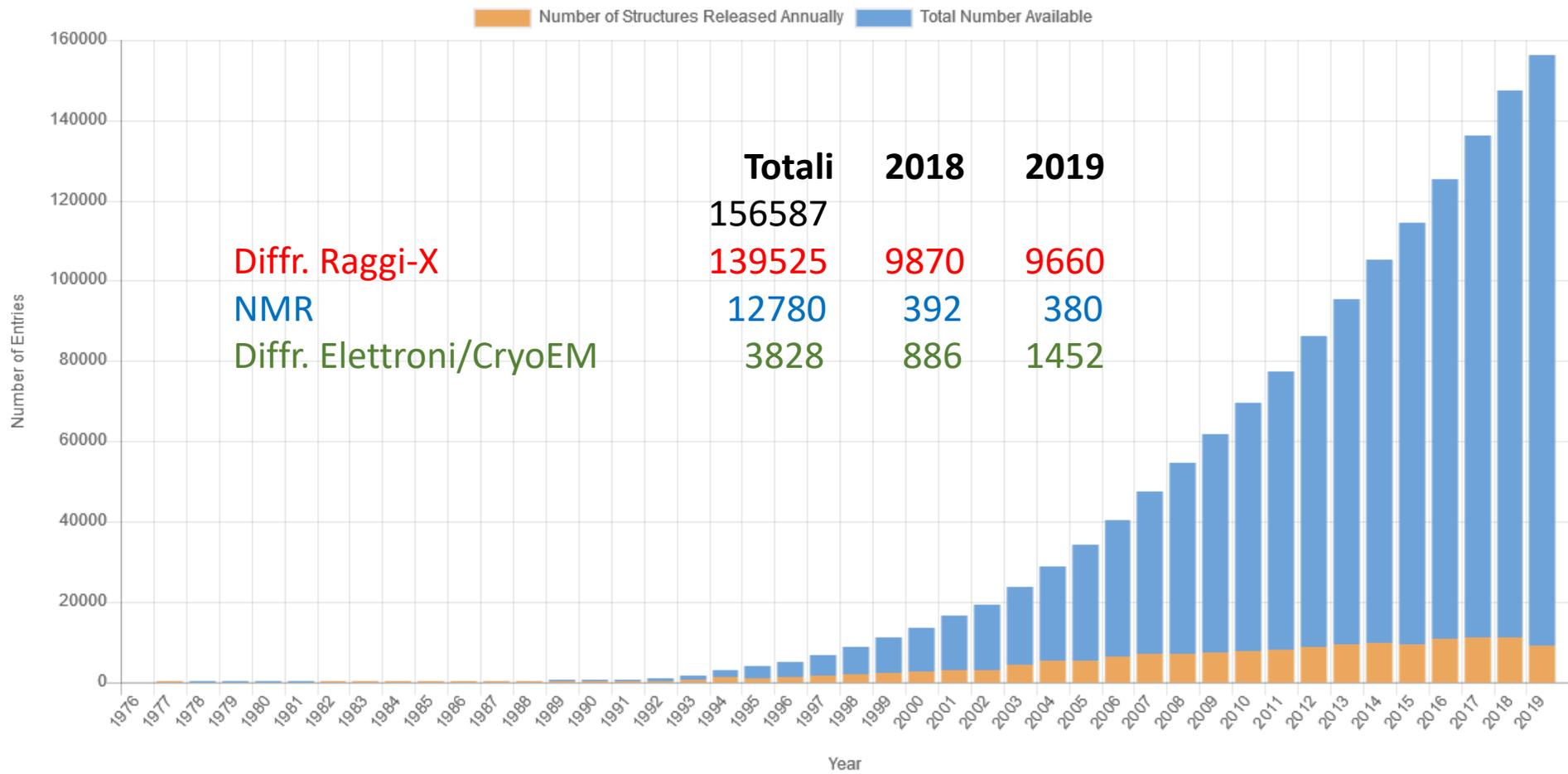
- E' in soluzione
- Fornisce informazioni sulla dinamica
- E' una tecnica molto flessibile

- **Peso molecolare \leq 50 kDa**

Cryo-EM:

- Non sono richiesti cristalli
- Funziona su sistemi molto grandi

- Risoluzione media
- Danno da Radiazione
- Peso molecolare \geq 50 kDa



Metodi *in-silico*

L'evoluzione dei computer, e la conoscenza sempre più profonda dei principi fisici o empirici che regolano la struttura di una macromolecola, ha portato all'evoluzione di metodi computazionali in grado di fornire modelli strutturali sufficientemente attendibili.

A seconda delle necessità avremo

- Modelling
- Modelli fisici
- Docking

Modelling

Il modelling è utile quando non ho un modello sperimentale della mia macromolecola. Faccio ricorso a dei modelli 'teorici' ovvero prodotti per via puramente computazionale.

Homology Modelling (Modelling Comparativo):

Sulla base della similitudine con la struttura primaria, viene generata una struttura a partire da una o più strutture sperimentalmente già determinate. La struttura così generata, ma contenente gli aminoacidi della proteina che stiamo studiando (target), viene quindi sottoposta ad una minimizzazione di Energia, o una funzione pseudo-Energetica.

Funziona bene se la proteina ha una elevata omologia di sequenza con una proteina di struttura già nota.

Modelling by Threading:

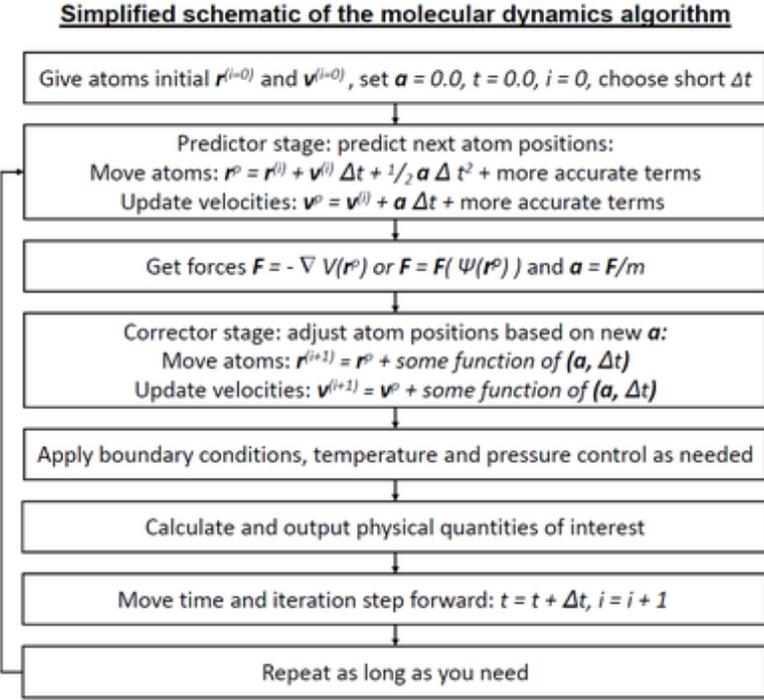
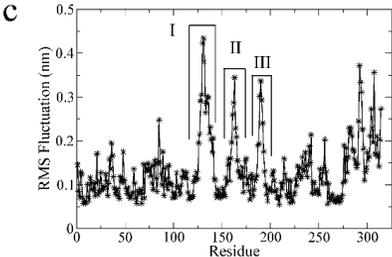
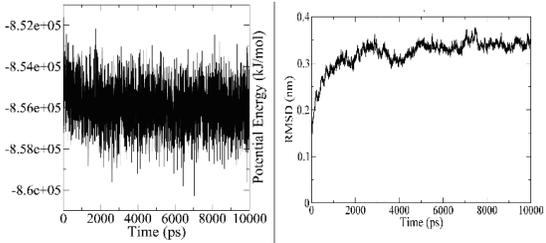
Non si basa sull'omologia con una singola macromolecola, quanto sul riconoscimento di 'parti' della macromolecola con templati aventi struttura (fold) nota. Le varie parti sono quindi *cucite* insieme e minimizzate usando funzioni di potenziale più o meno empiriche. E' l'unica possibilità quando non ho a disposizione un modello sufficientemente omologo.

Dinamica Molecolare

Non è un metodo per ipotizzare/determinare la struttura molecolare, quanto per studiare l'evoluzione temporale della struttura stessa o per validare ipotesi strutturali (modelling).

In sostanza la molecola è vista come un sistema in cui gli atomi sono palline legate da molle agli altri atomi. Per l'intero sistema viene definita una funzione di potenziale che viene minimizzata utilizzando i principi della meccanica classica.

Una variante è la MM-QM, in cui una parte del sistema è trattato quantisticamente.



The Potential Energy Function

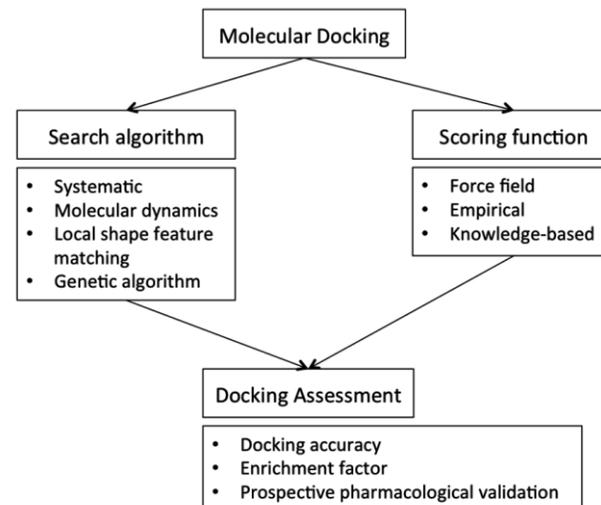
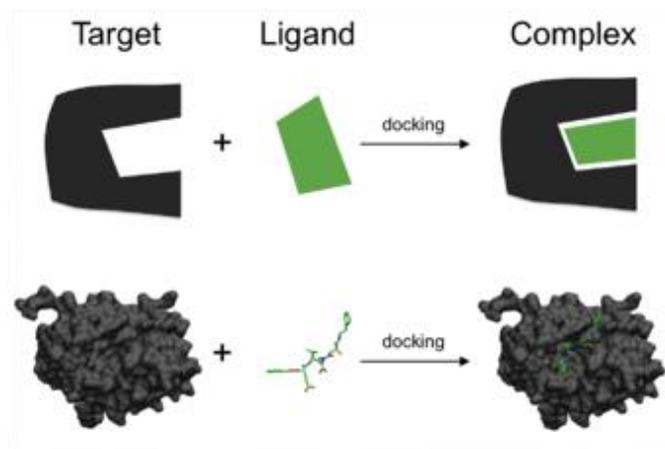
$$U(\vec{R}) = \underbrace{\sum_{bonds} k_i^{bond} (r_i - r_0)^2}_{U_{bond}} + \underbrace{\sum_{angles} k_i^{angle} (\theta_i - \theta_0)^2}_{U_{angle}} + \underbrace{\sum_{dihedrals} k_i^{dihedral} [1 + \cos(n_i \phi_i + \delta_i)]}_{U_{dihedral}} + \underbrace{\sum_i \sum_{j \neq i} 4 \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]}_{U_{nonbond}} + \sum_i \sum_{j \neq i} q_i q_j \epsilon r_{ij}$$

- U_{bond} = oscillations about the equilibrium bond length
- U_{angle} = oscillations of 3 atoms about an equilibrium bond angle
- $U_{dihedral}$ = torsional rotation of 4 atoms about a central bond
- $U_{nonbond}$ = non-bonded energy terms (electrostatics and Lenard-Jones)

Docking

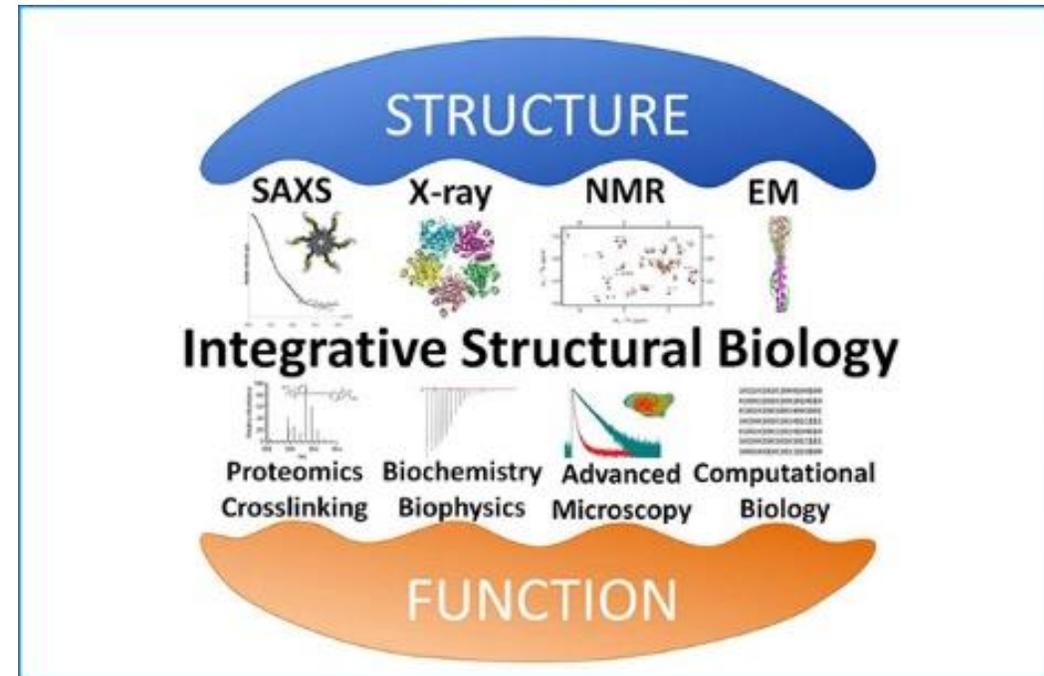
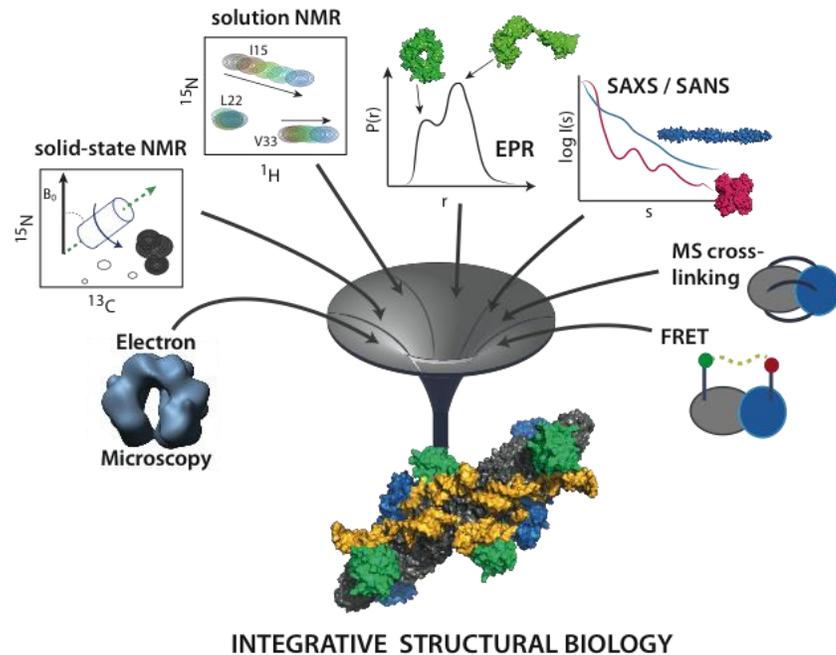
E' un metodo computazionale per identificare molecole (inibitori) potenzialmente in grado di interagire con il mio target (proteina) o più semplicemente per ipotizzare dove il sito di interazione tra target e inibitore (ligando).

A partire dalla struttura nota (sperimentalmente o per modelling) del mio target , iterativamente posiziono l'inibitore in punti diversi del target, valutando la 'compatibilità' (plausibilità dell'interazione) per mezzo di una *scoring function*. Al termine del procedimento ho una 'classifica' dei 'modi di interazione più probabili. In questo modo posso comparare diverse molecole ma anche valutare potenziali siti di interazione (sul target) con gli inibitori e decidere quali sono le soluzioni più promettenti.

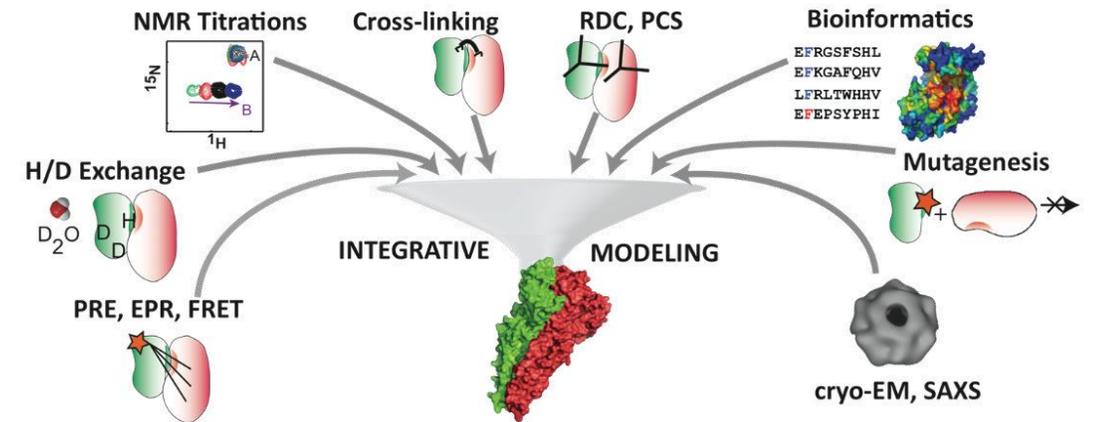
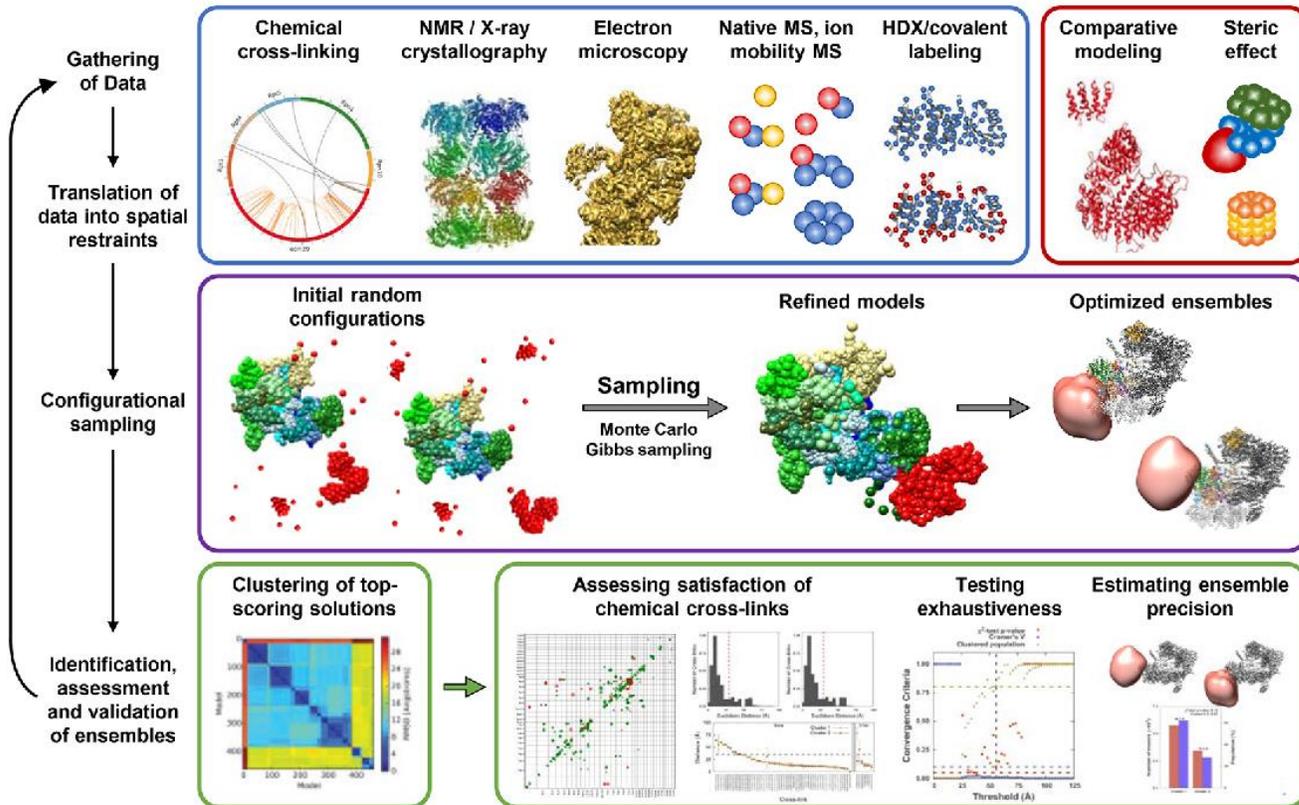


Integrative Structural Biology

Come abbiamo visto il biologo strutturale ha **diversi strumenti** a disposizione, basati su **principi fisici differenti** e in grado di fornire **informazioni strutturali diverse**. A volte la loro combinazione permette di ottenere un'informazione più approfondita e completa, si parla di Biologia Strutturale Integrata (*Integrative Structural Biology*)



Combinare le tecniche



La combinazione di tecniche, individualmente non in grado di fornire un modello sperimentale 3D, può portare a ipotizzare/definire un modello tridimensionale ragionevole.

HADDOCK

HADDOCK è un software di Docking che fa pieno uso di informazioni sperimentali, note da altri esperimenti, al fine di migliorare la qualità e l'attendibilità del docking.

