



Proprietà di Biopolimeri

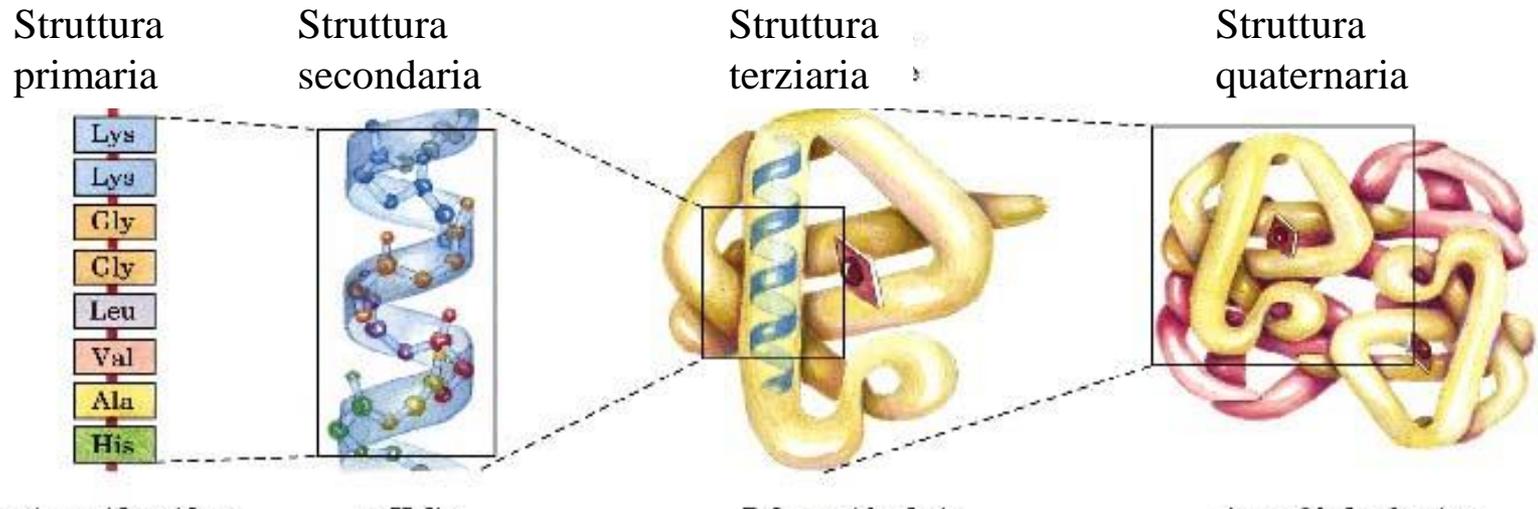
a.a. 2021-2022

Prof. R. Urbani

**PROPRIETA' CONFORMAZIONALI:
Struttura secondaria**

GERARCHIA DEI LIVELLI DI ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE

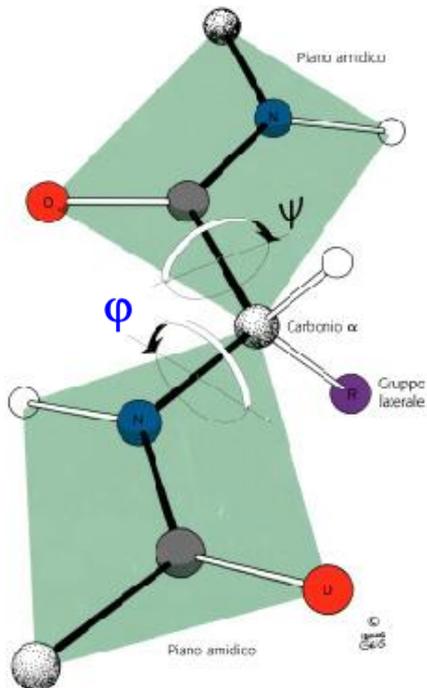
Esempio: proteina



LIVELLI DI STRUTTURA:

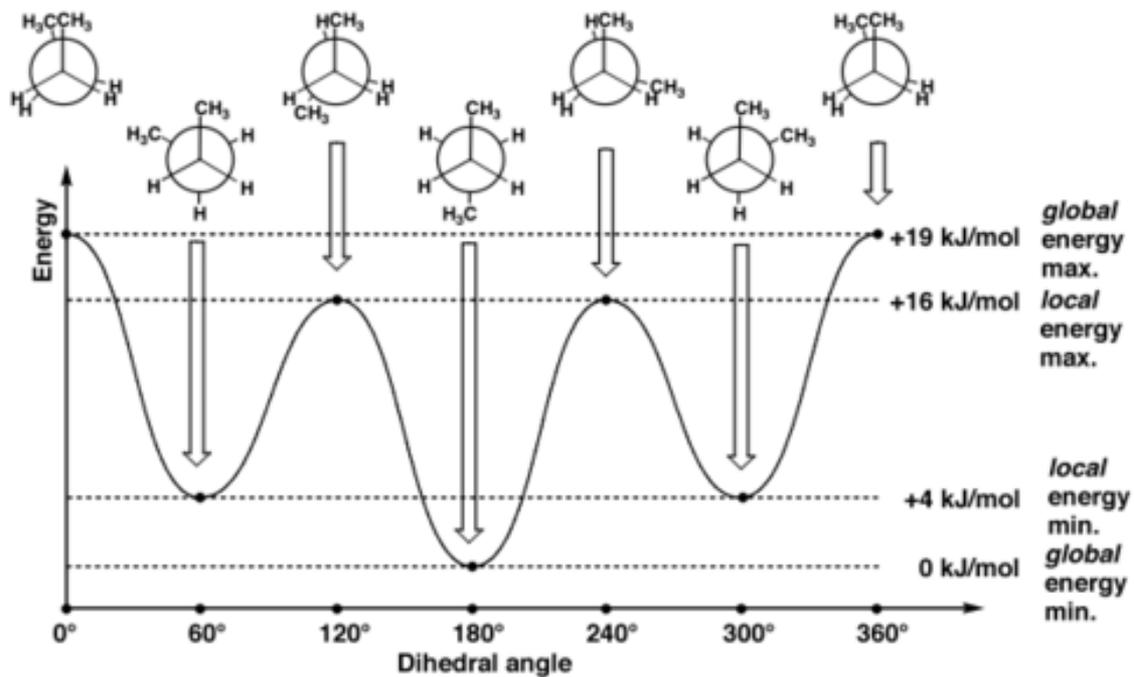
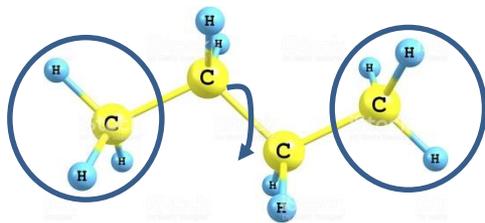
STRUTTURA SECONDARIA

Conformazioni **locali** di una catena biopolimerica stabilizzate da legami non covalenti (**interazioni deboli**).



Esempio: proteina

I valori dei diedri Ψ e Φ determinano la conformazione assunta in ogni punto dallo scheletro peptidico



Interazioni che stabilizzano le conformazioni:

1) *forze di van der Waals* :

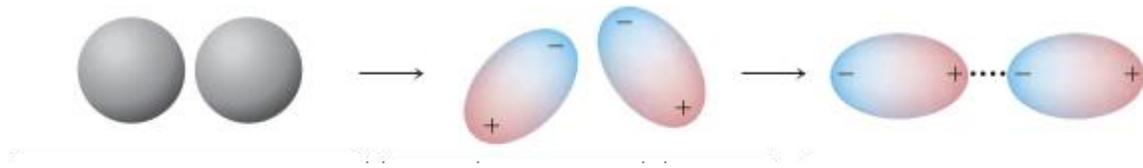
- forza dipolo permanente-dipolo permanente o **forza di Keesom** (esempio: legame idrogeno) (energia dell'ordine di 4 kJ/mole);
- forza dipolo permanente-dipolo indotto (o **forza di Debye**);
- forza dipolo indotto istantaneo-dipolo indotto istantaneo (o **forza di dispersione di London**)

2) forza di Coulomb :

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

3) legame idrogeno:

Forze di dispersione di London



- ◇ Deriva dalle fluttuazioni della carica (e quindi della densità elettronica) di una molecola A . Queste fluttuazioni creano un campo elettromagnetico che interagisce con la densità di carica della seconda molecola B . Il risultato netto è un termine di energia attrattivo. ■
- L'espressione per l'energia potenziale si ricava attraverso un trattamento quantomeccanico dell'oscillatore armonico, in cui le frequenze di oscillazione per A e B sono ν_A e ν_B (modello di Drude),

$$U_{\mu_A^{\text{ind}} \mu_B^{\text{ind}}}(R) = -\frac{3h\alpha_A\alpha_B}{2(\epsilon_0\epsilon)^2} \frac{\nu_A\nu_B}{(\nu_A + \nu_B)} \frac{1}{R^6}$$

h è la costante di Planck.

L'energia media è sempre attrattiva e varia come R^{-6}

Carica-dipolo

- ◇ Immaginiamo che la molecola B abbia un momento di dipolo elettrico permanente μ_B (come l'acqua) e che interagisca con uno ione A dotato di carica Q_A .
- ◇ Conviene calcolare prima il campo elettrico \mathbf{E} generato da A e quindi scrivere l'energia di interazione tra \mathbf{E} e μ_B

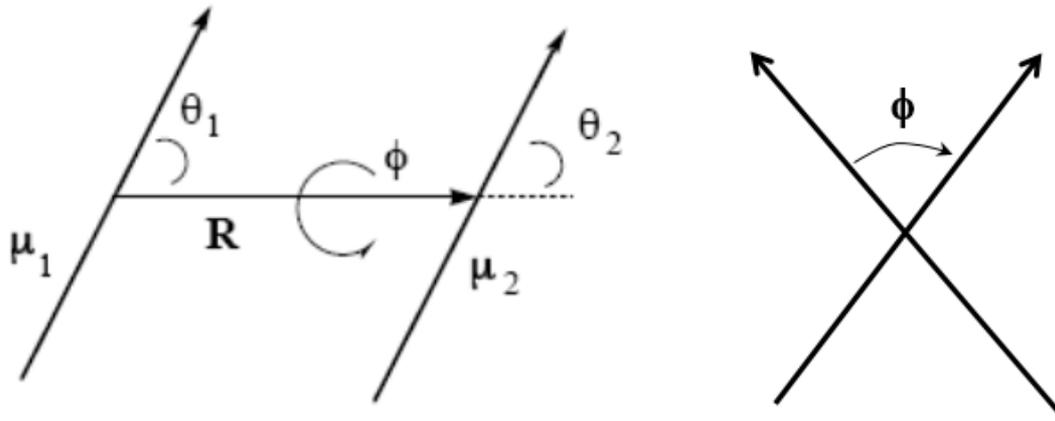
$$\mathbf{E} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{Q_A}{R^2} \mathbf{u}_R \quad \mathbf{u}_R \text{ vettore unitario lungo } \mathbf{R}$$

$$U_{Q_A\mu_B}(R, \theta) = -\mu_B \cdot \mathbf{E} = -\mu_B E \cos \theta = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \cos \theta \frac{Q_A\mu_B}{R^2}$$

L'energia è repulsiva o attrattiva in funzione di θ

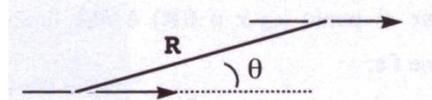
Dipolo-dipolo

- ◇ In questo caso sia A che B hanno momenti di dipolo permanenti.
 μ_A e μ_B .



$$V_{12} = \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon_0 R_{12}^3} (\cos \phi - 3 \cos \theta_1 \cos \theta_2)$$

I) Per $0 < \theta_1 = \theta_2 = \theta < \pi/2$ (e quindi $\phi = 0$):

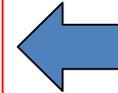
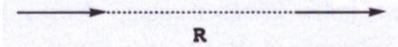


$$V_{12} = \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 R^3} (1 - 3\cos^2\theta)$$

II) per $\theta_1 = \theta_2 = 0$ (a), $\cos^2\theta = 1$, l'eq (6-4) diventa:

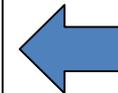
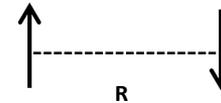
$$V_{12} = -\frac{2 \mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 R^3}$$

in questo caso, $V_{12} \equiv V_{\min}$: essa corrisponde all'interazione attrattiva *testa-coda*.



III) per $\theta_1 = \theta_2 = \pi/2$ e $\phi = 0$

$$V_{12} = -\frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 R^3}$$



IV) per $\theta_1 = 0, \theta_2 = \pi$ (a), e quindi $\phi = \pi$, $\cos\theta_1 = 1$ e $\cos\theta_2 = -1$:

$$V_{12} = +\frac{2 \mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 R^3}$$

In questo caso, V_{12} corrisponde all'interazione repulsiva *testa-testa*.



V) per $\theta_1 = 0, \theta_2 = \pi/2$ e $\phi = \pi/2$

$$V_{12} = 0$$



Tabella riassuntiva

Tipo di interazione	$U(R, \Omega)$
Carica-carica	$\frac{Q_A Q_B}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{1}{R}$
Carica-dipolo	$-\frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \cos\theta \frac{Q_A \mu_B}{R^2}$
Dipolo-dipolo	$\frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} [\sin\theta_A \sin\theta_B \cos(\phi_A - \phi_B) - 2 \cos\theta_A \cos\theta_B] \frac{\mu_A \mu_B}{R^3}$
Carica-dipolo indotto	$-\frac{Q_A^2 \alpha_B}{2(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2} \frac{1}{R^4}$
Dipolo-dipolo indotto	$-\frac{\mu_A^2 \alpha_B}{2(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2} (3 \cos^2\theta + 1) \frac{1}{R^6}$
Dipolo-quadrupolo	...
Quadrupolo-quadrupolo	...
Dipolo indotto-Dipolo indotto	$-\frac{3h\alpha_A\alpha_B}{2(\epsilon_0\epsilon)^2} \frac{\nu_A\nu_B}{(\nu_A+\nu_B)} \frac{1}{R^6}$

- Tutti i termini di tipo R^{-6} sono compresi nel cosiddetto termine "attrattivo" dell'interazione di van der Waals, e rappresentano la parte sostanziale dell'interazione a corto raggio.

Potenziale di Lennard-Jones

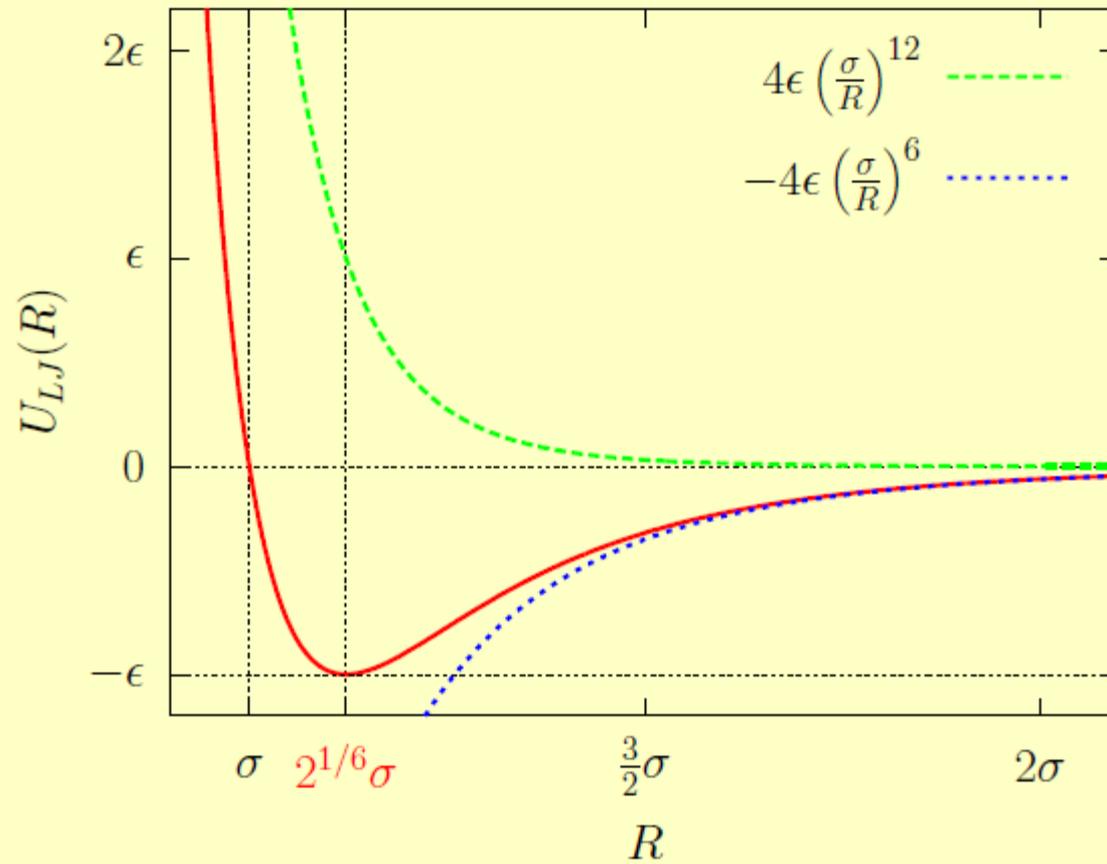
- ◇ E' uno dei potenziali più frequentemente utilizzati per descrivere l'interazione tra due molecole prive di carica.

$$U_{LJ}(R) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{R} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{R} \right)^6 \right]$$

- E' costituito da una parte repulsiva di tipo R^{-12} e una parte attrattiva di tipo van der Waals R^{-6} . I due parametri che lo caratterizzano sono la distanza σ che annulla U_{LJ} e la profondità della buca ϵ . La distanza d'equilibrio risulta $2^{1/6}\sigma \approx 1.122\sigma$.

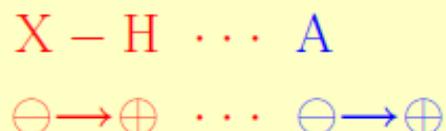
Esempio: per H_2O si ha $\sigma = 3.1655\text{\AA}$ e $\epsilon = 0.6502 \text{ kJ/mol}$

Plot di $U_{LJ}(R)$



Legame idrogeno

- ◇ Il legame idrogeno è un caso particolare di interazione fra dipolo-dipolo fra dipoli permanenti.



- X è un atomo molto elettronegativo come N, O, o F, che attrae gli elettroni di valenza, acquisendo una parziale carica negativa δ^- lasciando l'idrogeno con una parziale carica positiva δ^+ . Il gruppo $X - H$ viene detto donatore D.
- Il legame idrogeno si forma quando la carica positiva su H viene in contatto con un doppietto elettronico di un gruppo funzionale di un'altra molecola, il quale lega l'H e viene definito accettore A.

Legame idrogeno

D	A	R_{AD} (Å)
N – H	:: O =	2.90
N – H	: OH	2.90
N – H	: N =	3.10
N – H	: S	3.70
O – H	:: O =	2.75
O – H	: OH	2.75

- ◇ L'energia del legame idrogeno $U_{HB} \simeq 40$ kJ/mol è inferiore al legame covalente ($\simeq 500$ kJ/mol), ma superiore alla energia di Van der Waals ($\simeq 1$ kJ/mol).

Legame idrogeno

- Una descrizione quantitativa di U_{HB} si ha con un trattamento quantomeccanico

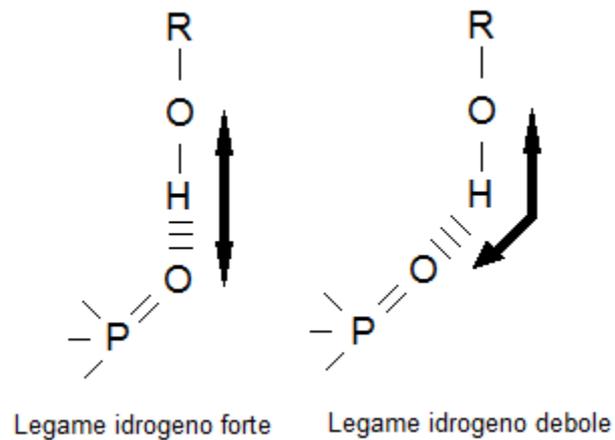
$$\psi_{HB} = a\psi_{A,D}^0 + b\psi_{A-D}^1$$

$\psi_{A,D}^0$ è la funzione d'onda di A e D separati, ψ_{A-D}^1 quella di una coppia ionica in cui un elettrone è passato da D a A. a e b sono due parametri "aggiustabili".

- ◇ Una recente approssimazione dell'energia di interazione risulta

$$U_{HB} = \cos \theta \left(\frac{B'_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{A'_{ij}}{R_{ij}^6} \right) + (1 - \cos \theta) \left(\frac{B_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{A_{ij}}{R_{ij}^6} \right)$$

θ è l'angolo DHA, le costanti A'_{ij} , B'_{ij} , A_{ij} e B_{ij} dipendono dalla coppia ij accettore/donatore.



L'attrazione i dipoli è massima quando gli atomi coinvolti (in questo caso O, H e O) sono disposti in linea retta sullo stesso piano.

Interazione di van der Waals	0.1-10 (kJ/mole)
Legame H	2-50
Legame covalente	500

Energia e conformazione di una macromolecola

- ◇ Si studia nel dettaglio l'energia potenziale conformazionale di una macromolecola. Si distingue tra energia potenziale di legame (b) e di non-legame (nb)

$$U = U^b + U^{nb}$$

- Il termine U^b rappresenta l'energia conformazionale dovuta ai legami chimici. Dipende:
 1. Dalla distanza di legame r di ciascun legame
 2. Dall'angolo di legame θ tra 3 atomi adiacenti
 3. Dall'angolo diedro ϕ tra 4 atomi adiacenti

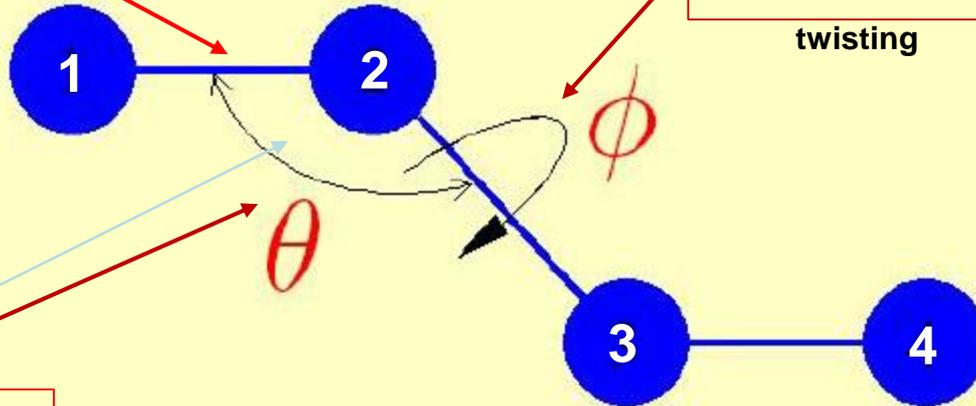
Energia potenziale di legame

Quattro atomi adiacenti

$$U_1^b = K_1(r - r_0)^2$$

stretching

r



$$U_3^b = \frac{V}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)]$$

twisting

$$U_2^b = K_2(\theta - \theta_0)^2$$

bending

Energia potenziale di non-legame

- ◇ E' dovuta a tutti gli altri effetti ad esclusione dei legami chimici. Distinguiamo almeno tre termini

1. Interazione di Coulomb

$$U_1^{nb} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{1}{r_{ij}}$$

2. Interazione di Lennard-Jones

$$U_2^{nb} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

3. Legami idrogeno

$$U_3^{nb} = \cos \theta \left(\frac{B'_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{A'_{ij}}{r_{ij}^6} \right)$$

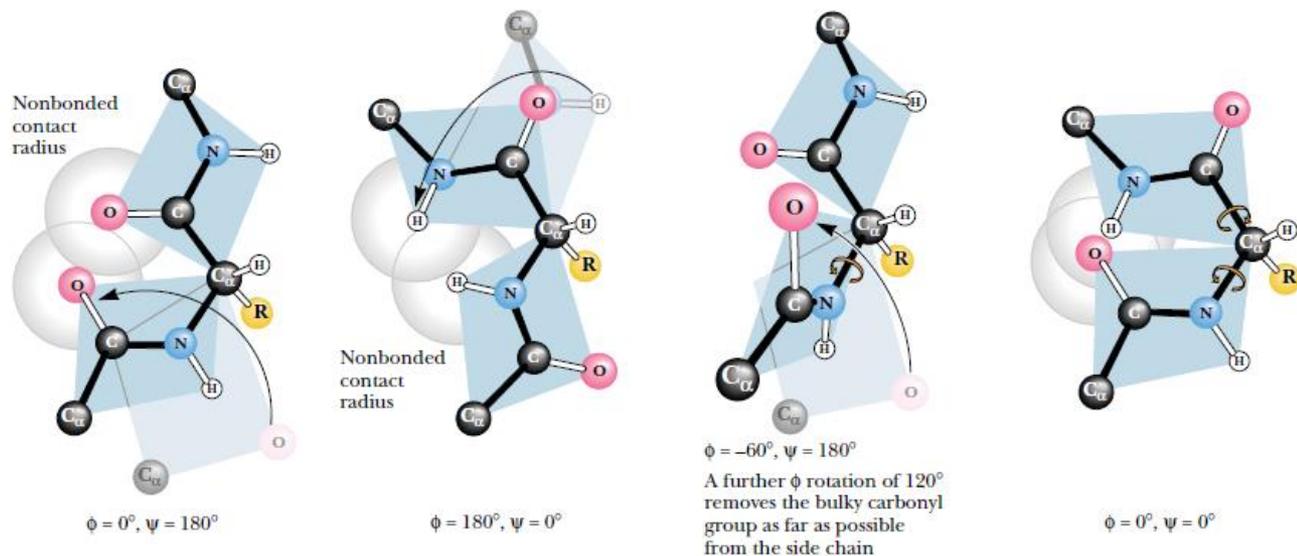
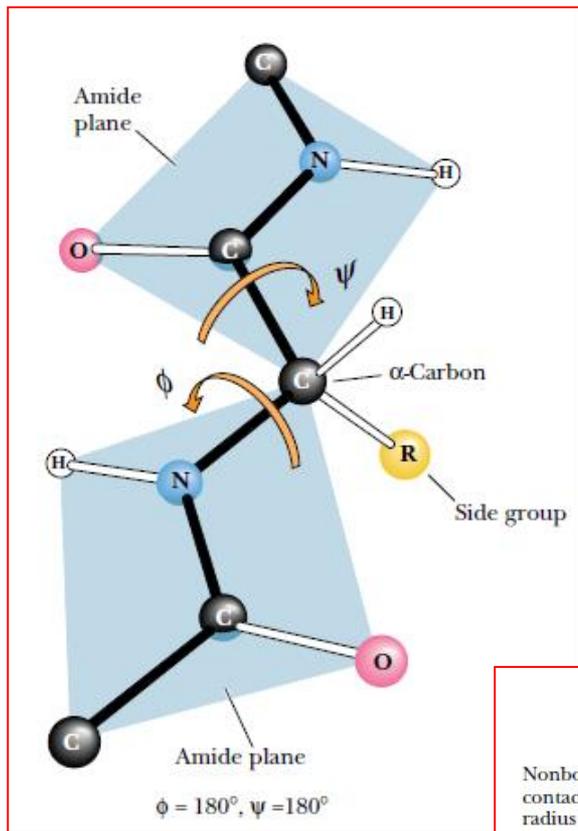


FIGURE 6.3 • Many of the possible conformations about an α -carbon between two peptide planes are forbidden because of steric crowding. Several noteworthy examples are shown here.

$$E = \underbrace{\sum_i^{\text{bonds}} k_i (r_i - r_{i,e})^2 + \sum_i^{\text{angles}} k_i (\theta_i - \theta_{i,e})^2}_{\text{costante}} + \sum_i^{\text{some dihedrals}} v_i [1 \pm \cos(n_i \phi_i)]^2 + \sum_i^{\text{atoms}} \sum_{j>1}^{\text{atoms}} \left(-\frac{A_i A_j}{r_{ij}^6} + \frac{B_i B_j}{r_{ij}^{12}} + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right)$$

costante

«Approssimazione del residuo rigido»

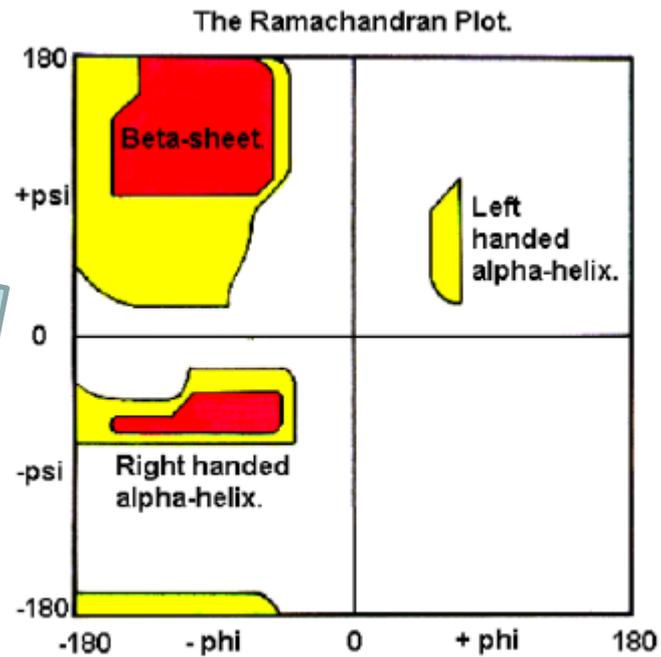
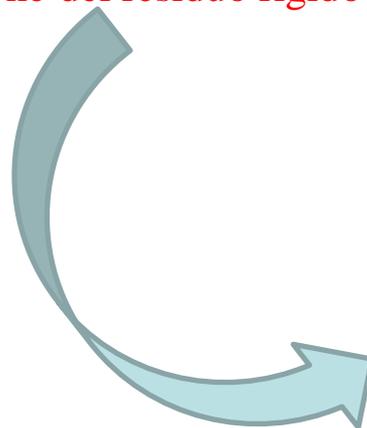
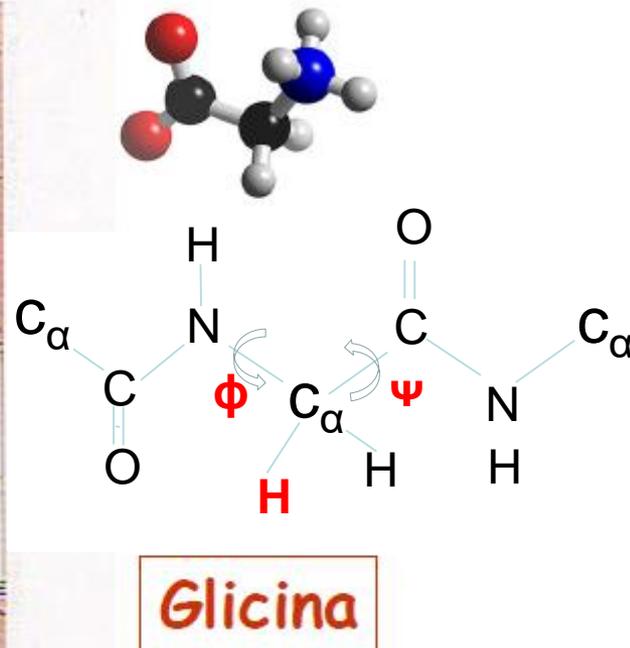
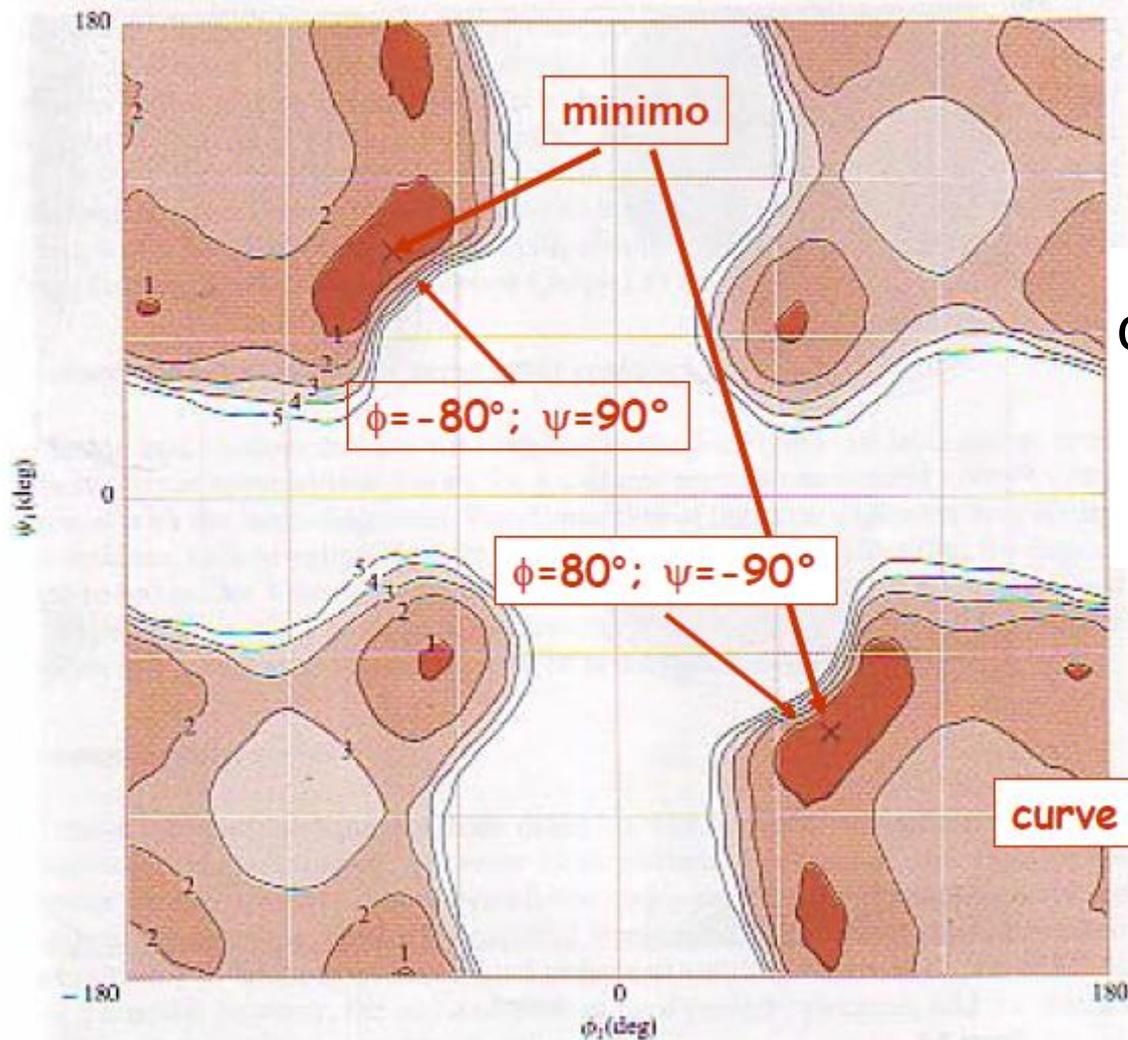
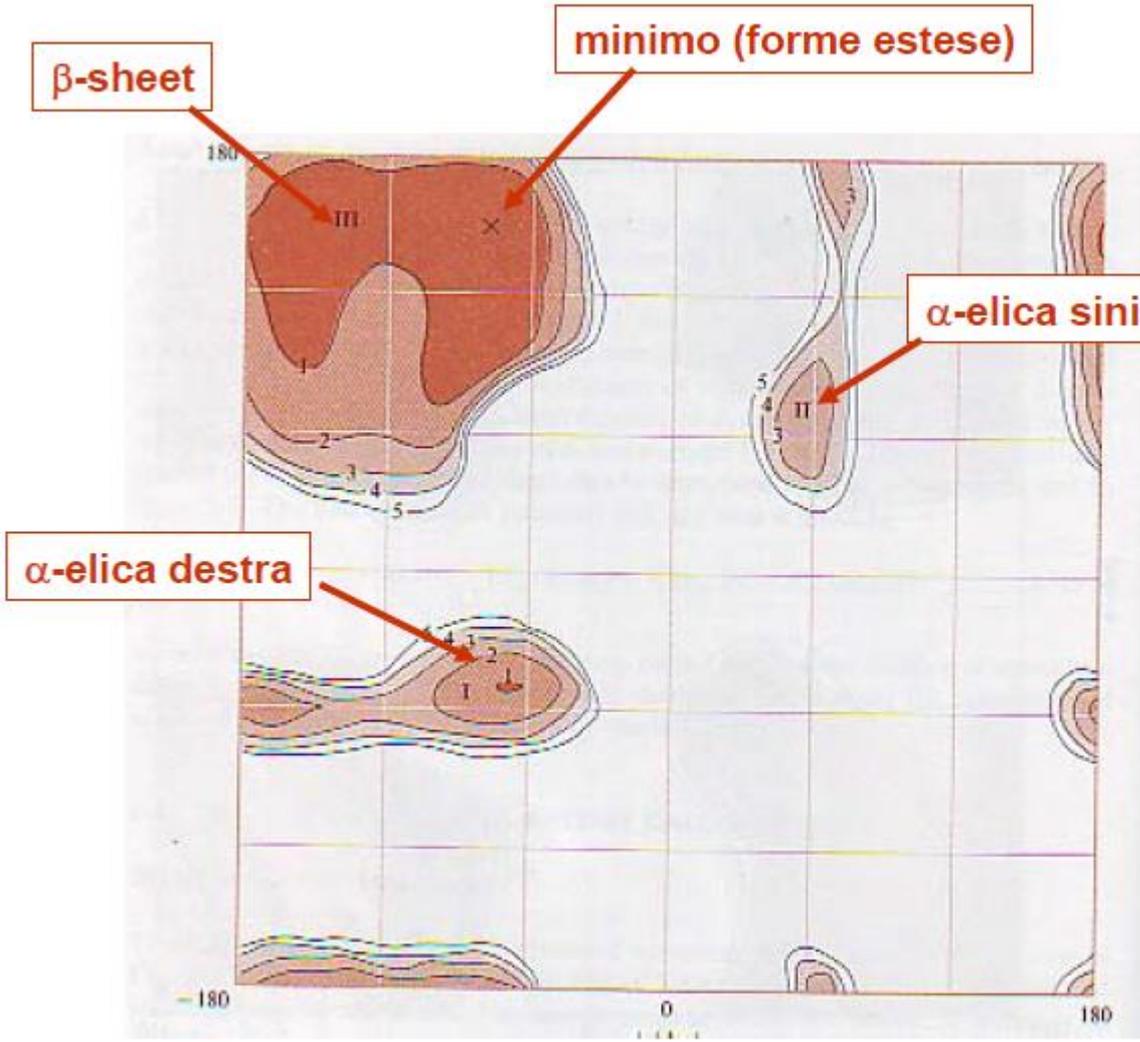


Figura 2.7: In rosso gli angoli accessibili a tutti gli amminoacidi tranne la prolina. In giallo le coppie addizionali accessibili alla glicina.

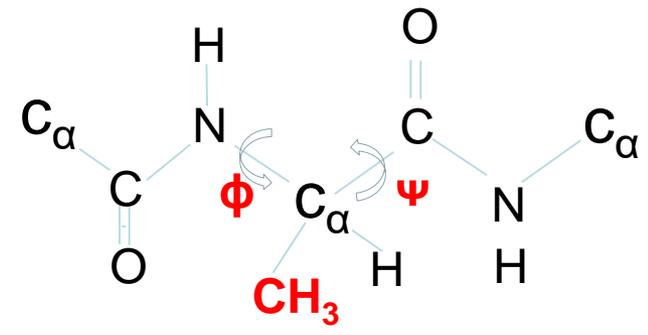
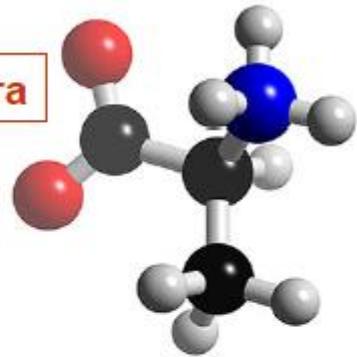
Mappe di Ramachandran

$$E(\varphi_i, \psi_i) = E_{LJ}(\varphi_i, \psi_i) + E_C(\varphi_i, \psi_i) + E_{tor}(\varphi_i, \psi_i)$$

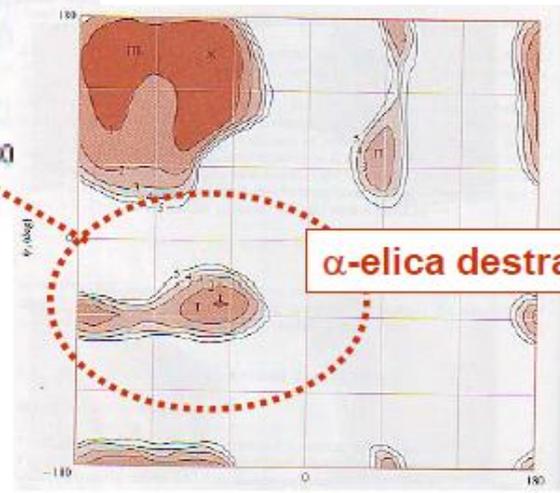
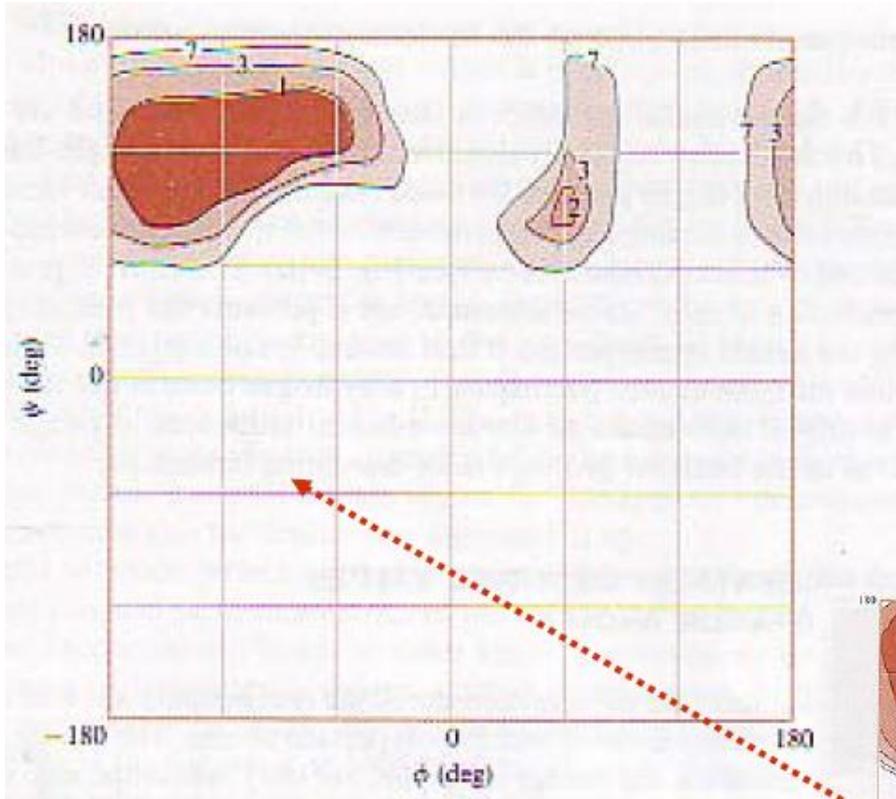




Alanina

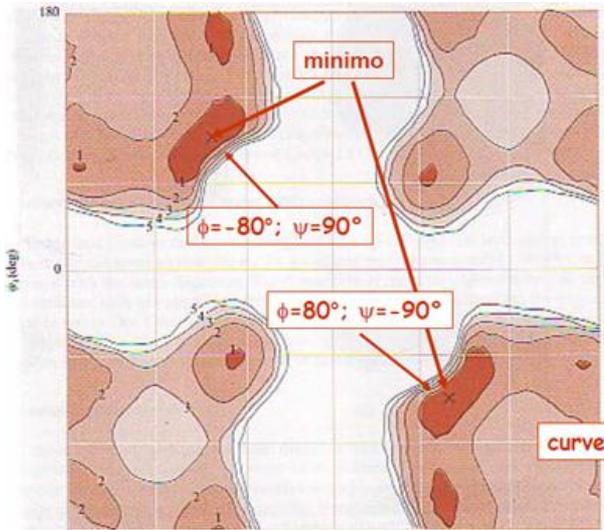


Alanina-Prolina

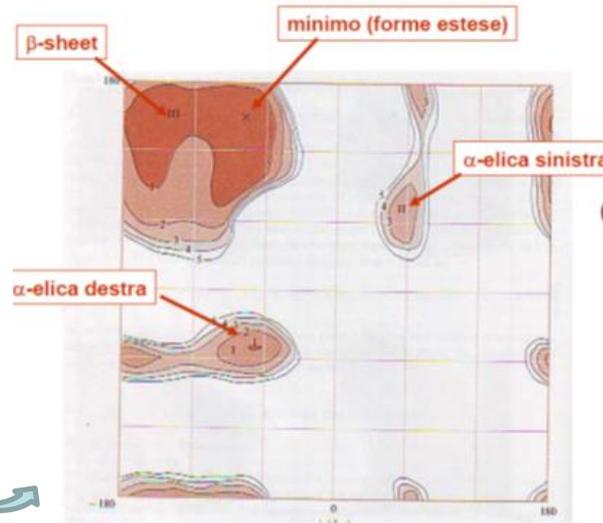


α -elica destra

Alanina



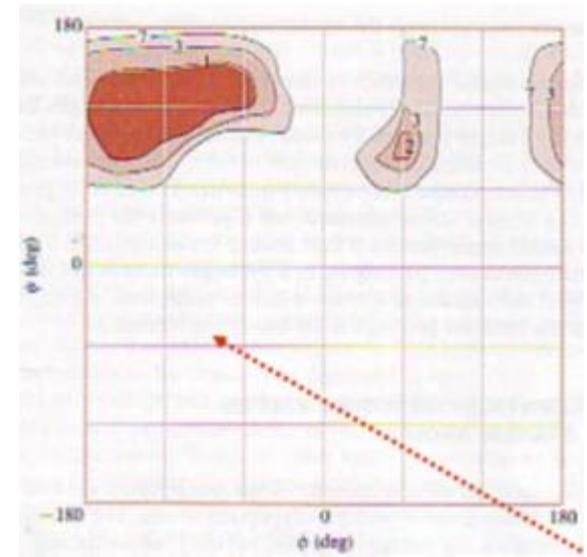
glicina



alanina



alanina-prolina



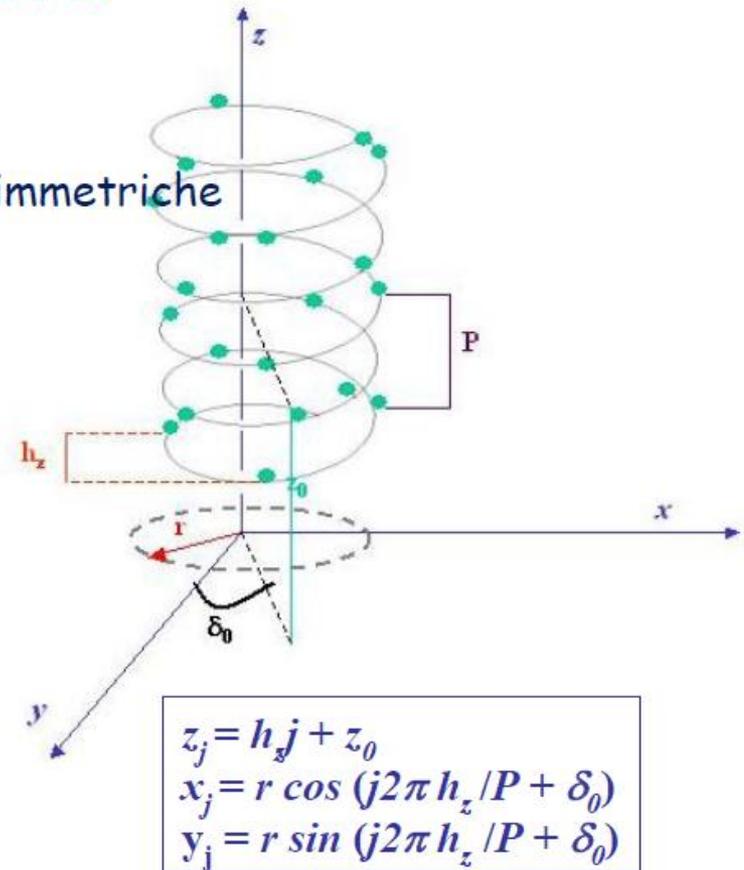
Possiamo distinguere tre tipi
di struttura secondaria:

α -elica
foglietto- β
 β -turn

Struttura secondaria

Struttura localmente ordinata

- Polimeri lineari ad unità monomeriche asimmetriche
- elica



$j = 0, 1, 2, \dots, N$

N = numero di residui

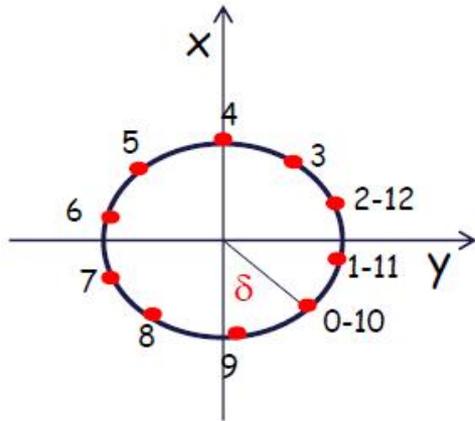
r : raggio dell'elica;

h_z : distanza, sull'asse z , tra due residui adiacenti

P : distanza in z che l'elica deve percorrere per fare un giro intero

z_0 e δ_0 danno la posizione dello 0-esimo residuo ($x_0 = r \cos \delta_0$; $y_0 = r \sin \delta_0$)

Proiezione sul piano x-y

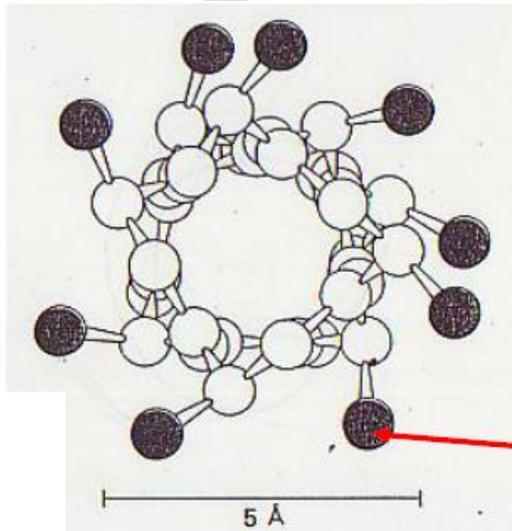


Due residui risultano sovrapposti dopo un giro completo dell'elica:

$$J = \frac{P}{h_z} \quad \text{grado (passo) dell'elica} \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{Numero di residui} \\ \text{per spira} \end{array} \right.$$

Struttura lineare → un solo residuo per giro:

- $r = 0 \quad \rightarrow x_j = y_j = 0 \quad z_j = jh_z + z_0$
- $P = h_z \quad \rightarrow x_j = r \cos \delta; y_j = r \sin \delta$

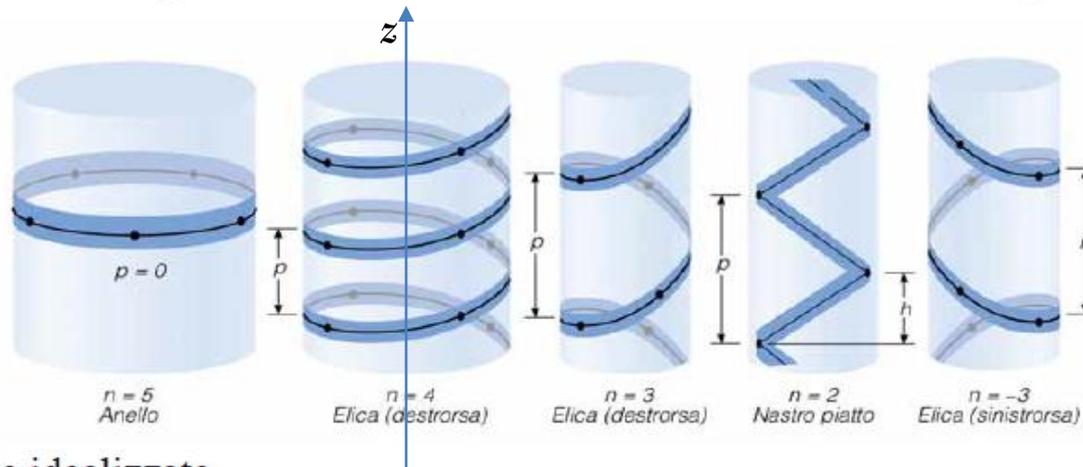


Catene laterali

STRUTTURA ELICOIDALE

Struttura Secondaria

Parametri geometrici delle Strutture Secondarie regolari



eliche idealizzate

Parametri per la descrizione di un'elica:

n: numero di residui per giro d'elica

p: passo dell'elica

h: passo per residuo

segno di *n*: verso dell'elica (positivo = destrorso, negativo = sinistrorso)

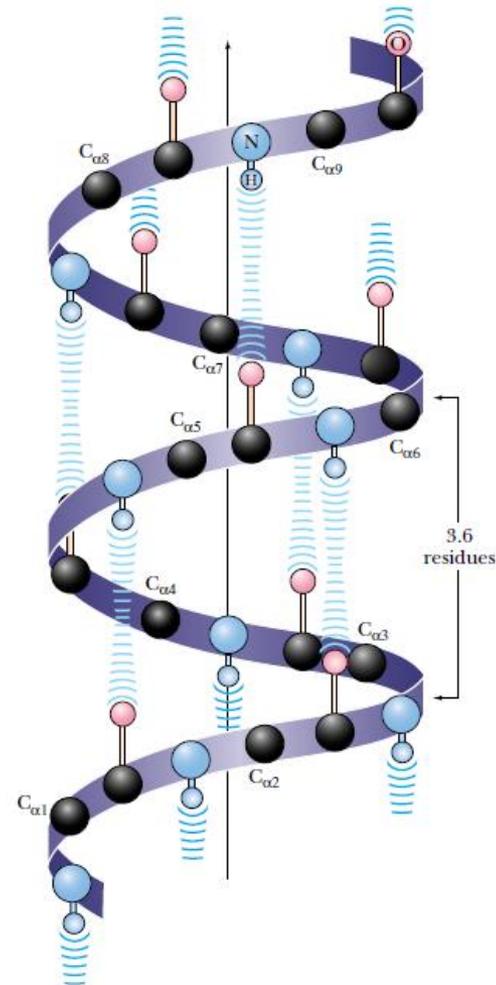
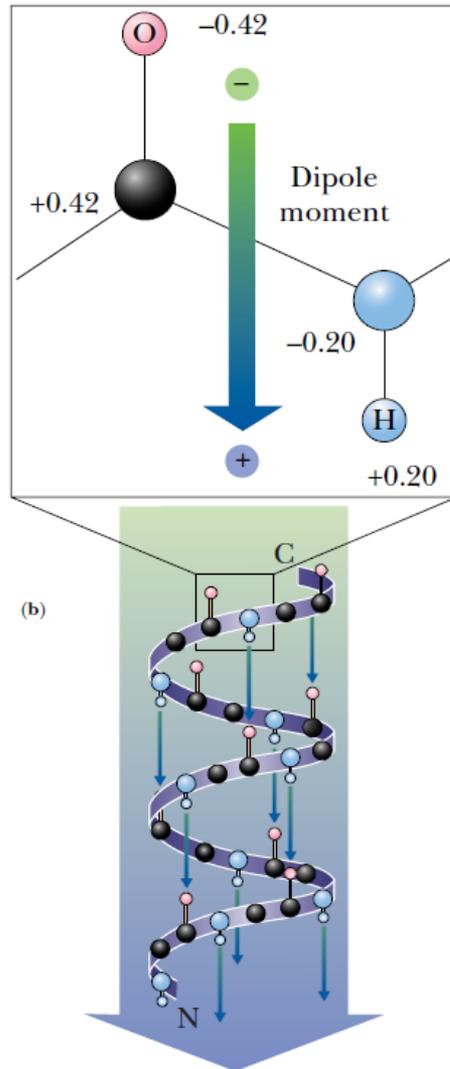
“regola della mano destra”

$$h = \frac{p}{n}$$

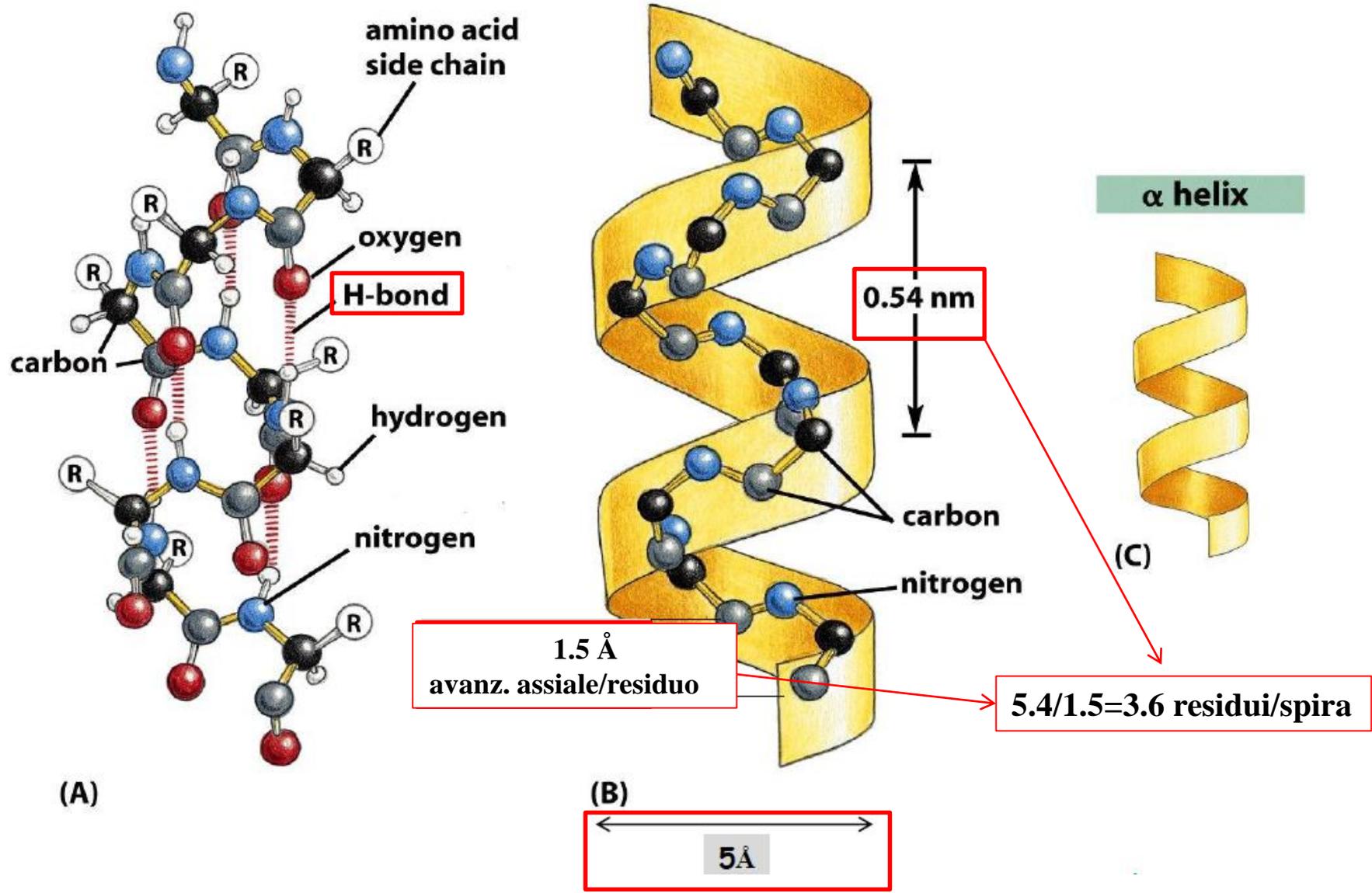
h_z

α -elica

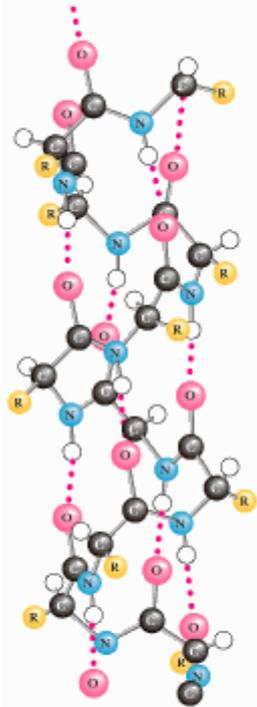
L' α elica è stata prevista 6 anni prima della prima evidenza sperimentale (Pauling & Corey)
come la struttura che massimizza i legami H, NH...OC



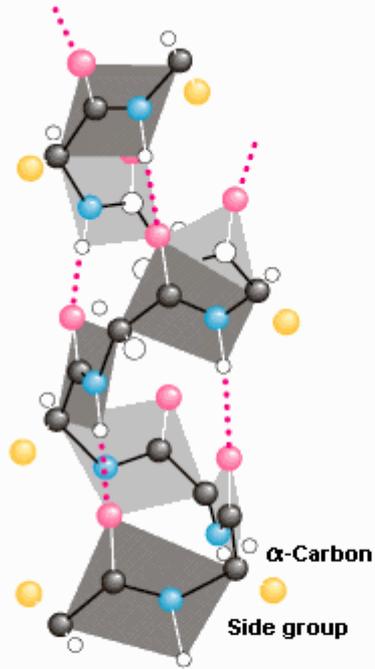
α -elica



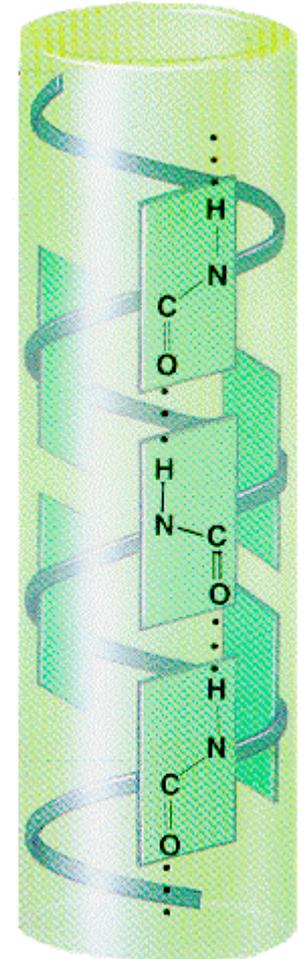
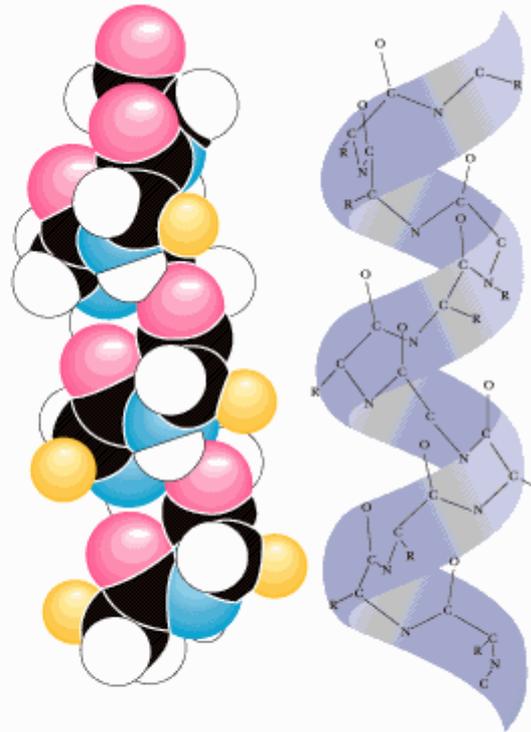
Geometria dell' α -elica

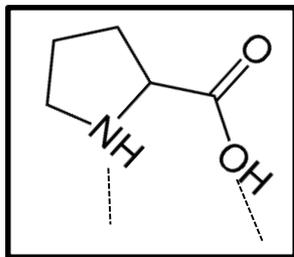


Hydrogen bonds stabilize the helix structure.

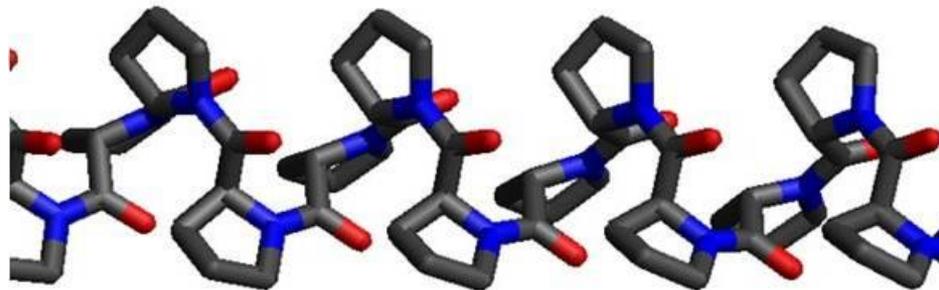
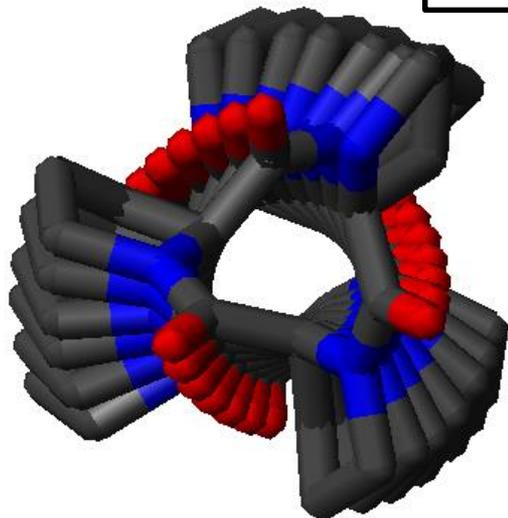


The helix can be viewed as a stacked array of peptide planes hinged at the α -carbons and approximately parallel to the helix.

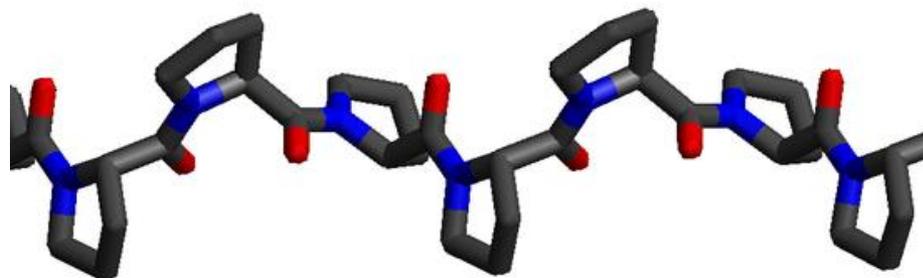
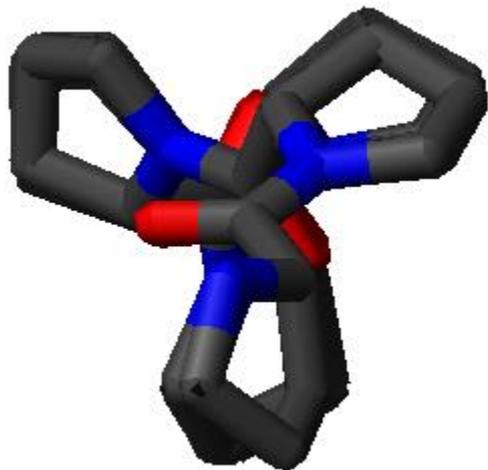




Poliprolina I: $n=3.33$, $h=1.9$

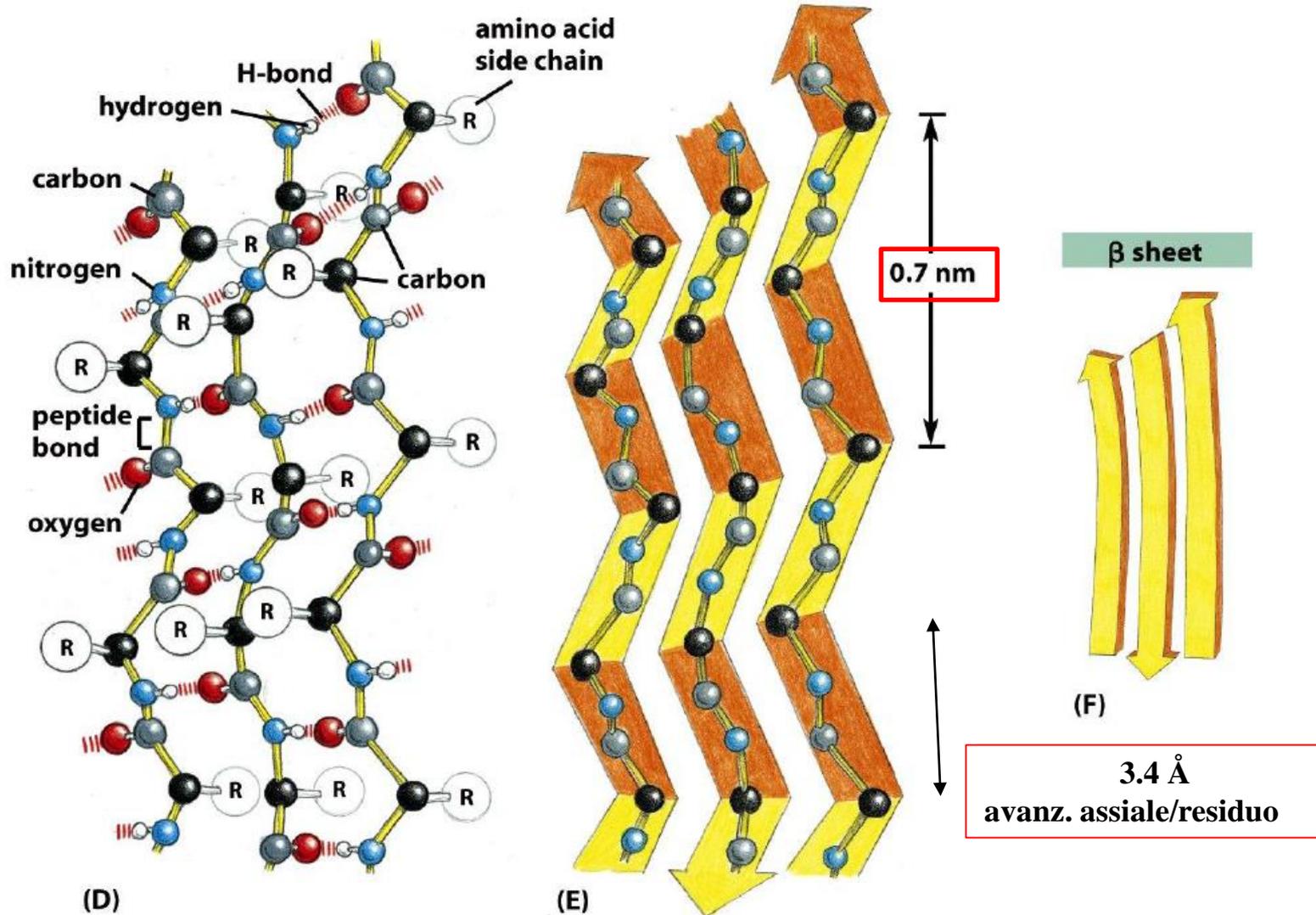


Poliprolina II: $n=-3.0$, $h=3.12$



foglietto β

1. Struttura estesa con unità ripetitive a zig-zag
2. I legami idrogeno si formano tra segmenti adiacenti
3. Le catene possono essere parallele o antiparallele
4. I segmenti adiacenti possono anche essere lontani nella sequenza aminoacidica



Tab. 2.4.1. Parametri ed angoli di torsione (approssimati) di eliche polipeptidiche.

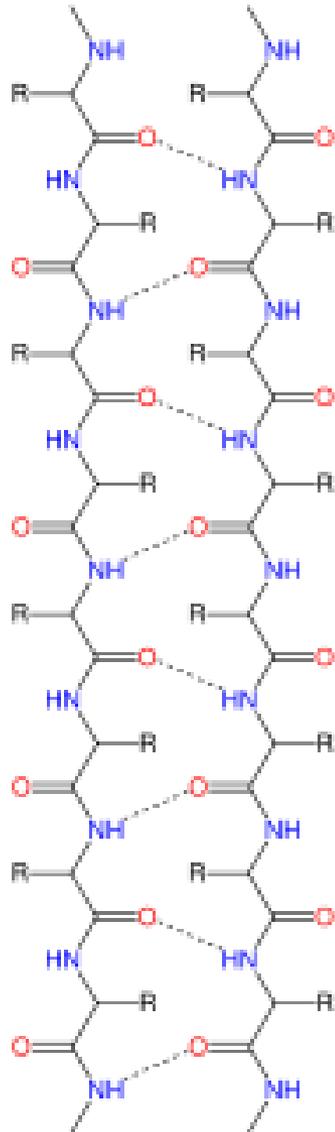
Struttura	$n^{a,c}$	$\varphi(\text{gradi})$	$\psi(\text{gradi})$	$h(\text{\AA})^b$
α -Elica destrogira	3.60	— 57	— 47	1.50
α -Elica levogira	— 3.60	+ 57	+ 47	1.50
Struttura β parallela	2.0	— 119	+ 113	3.25
Struttura β antiparallela	2.0	— 139	+ 135	3,3 — 3.5
Poliglicina II	\pm 3.0	\pm 80	\pm 150	3.10
Poliprolina I	3.33	— 83	+ 158	1.9
Poliprolina II	— 3.0	— 80	+ 150	3.12

^a n È il numero di residui per giro di elica.

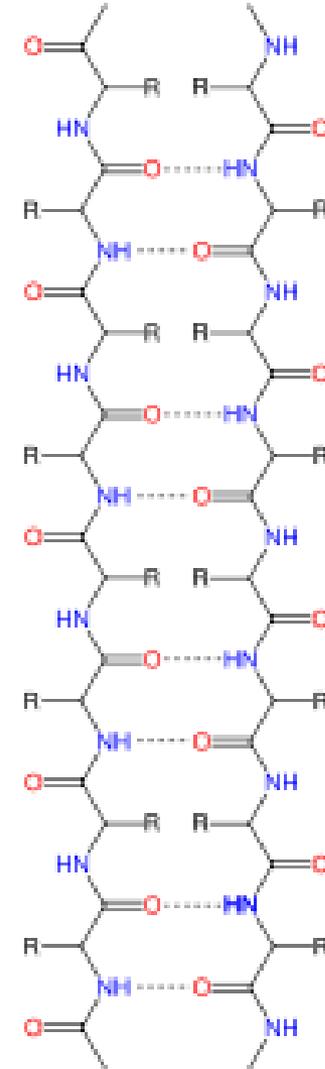
^b h È la proiezione della distanza testa-coda di un residuo sull'asse dell'elica.

^c valori di n negativo sono riferiti ad eliche sinistrogire, valori positivi ad eliche destrogire.

β -sheet paralleli



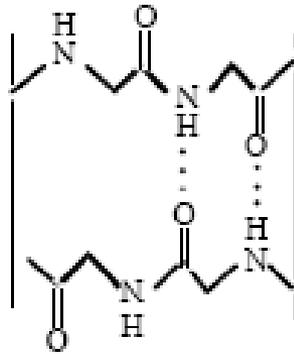
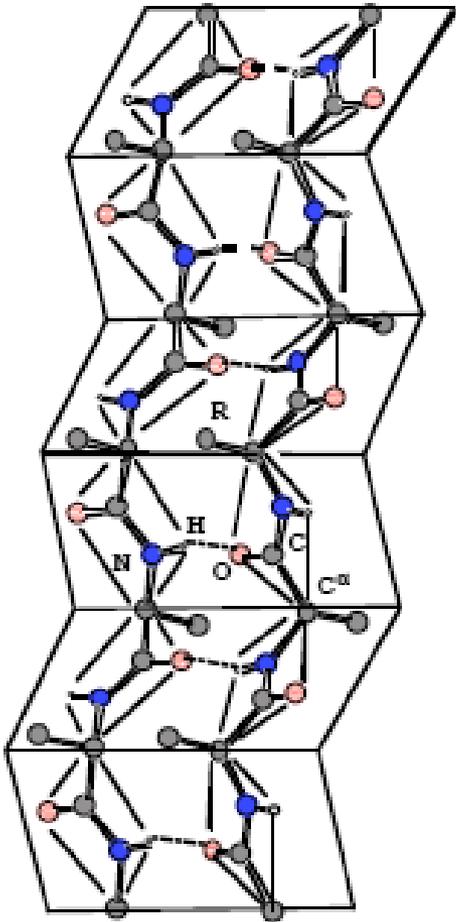
β -sheet antiparalleli



Filari di eliche β
(eliche binarie)
2 residui per spira
avanz.assiale=3.4Å

Strutture β -sheet antiparallele sono piú stabili

In questo caso i gruppi N—H e C—O sono allineati e il legame idrogeno risultante è piú forte.



Tab. 2.4.3. Conformazioni elicoidali di omopolipeptidi allo stato solido, determinate mediante diffrazione di raggi X.

Omopolipeptide	Catena laterale, R	Conformazione
Poliglicina	-H	Poliglicina I (PGI), struttura β
	-H	Poliglicina II (PGII)
Poli-L-Alanina	-CH ₃	α -Elica destrogira
Poli-L-Valina	-CH(CH ₃) ₂	Struttura β
Poli-L-Serina	-CH ₂ OH	Struttura β
Poli-O-Acetil-L-Serina	-CH ₂ O-COCH ₃	Struttura β
Poli-O-Benzil-L-Serina	-CH ₂ O-COCH ₂ -Ph	Struttura β
Poli-L-Acido aspartico	-CH ₂ COOH	α Elica destrogira
Poli- β -Benzil-L-Aspartato	-CH ₂ COOCH ₂ -Ph	α -Elica sinistrogira, struttura β
Poli-L-Acido glutammico	-CH ₂ CH ₂ COOH	α -Elica destrogira
Poli- γ -Metil-L-Glutammato	-CH ₂ CH ₂ COOCH ₃	α -Elica destrogira, Struttura β
Poli- γ Etil-L-Glutammato	-CH ₂ CH ₂ COOC ₂ H ₅	α -Elica destrogira
Poli- γ -Benzil-L-Glutammato	-CH ₂ CH ₂ COO-CH ₂ -Ph	α -Elica destrogira
Poli-L-Lisina	-(CH ₂) ₄ NH ₂	α -Elica destrogira
Poli- ϵ -Carbobenzossi L-Lisina	-(CH ₂) ₄ NHOCOCH ₂ -Ph	α -Elica destrogira
Poli-L-Fenilalanina	-CH ₂ -Ph	α -Elica destrogira
Poli-L-Triptofano	-CH ₂ -Trp*	α -Elica destrogira
Poli-S-Benzil-L-Cisteina	-CH ₂ -S-CH ₂ -Ph	Struttura β
Poli-L-Metionina	-(CH ₂) ₂ SCH ₃	α -Elica destrogira
Poli-L-Prolina	-(CH ₂) ₃	Poliprolina I (PPI) Poliprolina II (PPII)

*Trp = triptofano

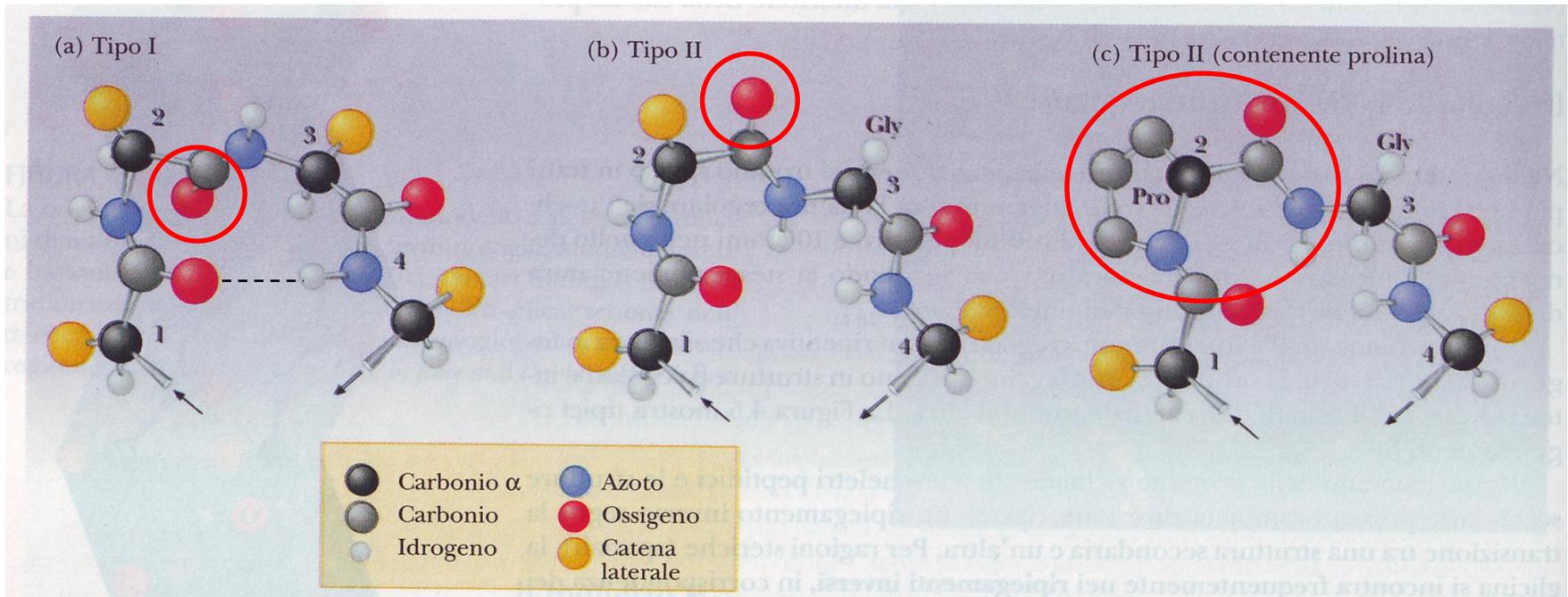
β -turn



...le catene polipeptidiche possono cambiare direzione!

Un ripiegamento spesso segna il passaggio da una struttura ad un'altra.

Spesso nei ripiegamenti dominano la **glicina** e la **prolina**.



- I **β -turn** sono abbondanti nelle proteine globulari.
- Sono strutture secondarie composte da **quattro residui** che compiono un curva di 180, con un legame idrogeno fra l'ossigeno del primo residuo e l'azoto del quarto, mentre i due residui centrali non partecipano.
- Particolarmente frequenti in queste strutture sono le **glicine**, per la loro flessibilità, e le **proline**, data la relativa tendenza ad esistere come isomero cis, dato che i due stereoisomeri sono molto simili.
- **Esistono vari tipi di β -turn**, classificati in base agli angoli diedri fra i residui.
- I più importanti sono il tipo I e II, ma sono presenti anche i tipi I' e II', rispettivamente speculari a I e II.
- **I tipi I e II si differenziano per la disposizione spaziale dell'ossigeno del secondo residuo e dell'azoto del terzo residuo, inoltre il tipo II presenterà sempre un residuo glicinico.**

	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
Tipo I	-60°	-30°	-90°	0°
Tipo I'	60°	30°	90°	0°
Tipo II	-60°	120°	80°	0°
Tipo II'	60°	-120°	-80°	0°

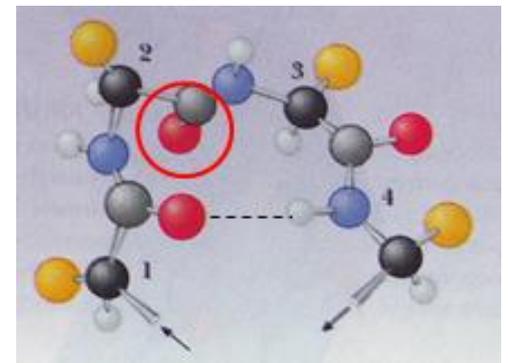
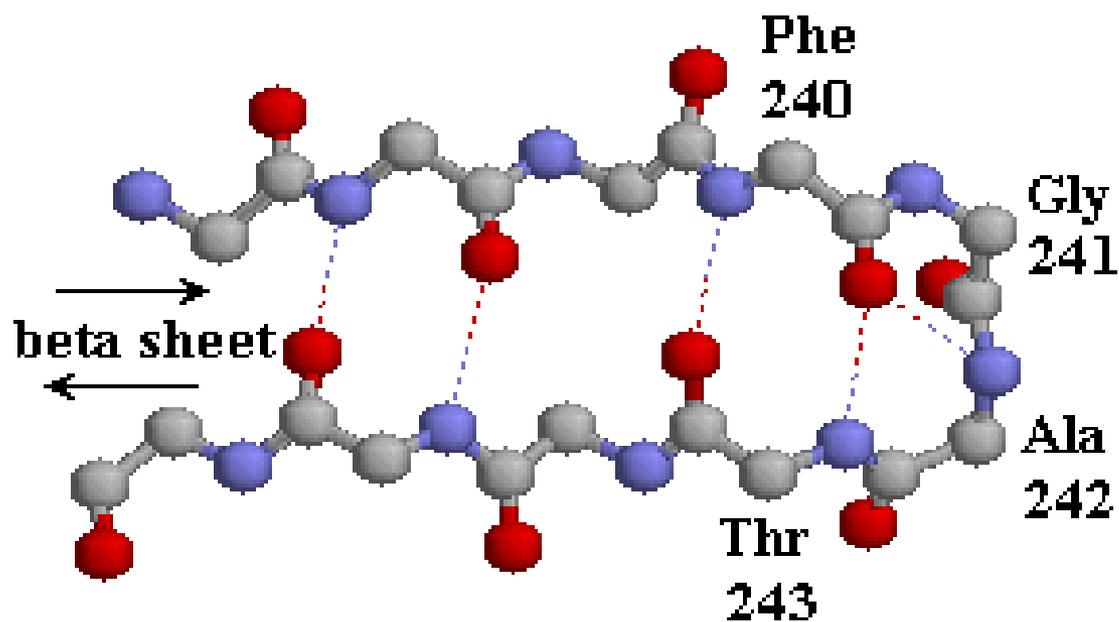


Tabella 2.1: Angoli diedri ideali fra i piani in quattro tipi di β -turn [13].

Esempio di inserimento del ripiegamento β in un foglietto β



2. Driving force

Il processo di folding è un processo spontaneo, quindi, per definizione, porterà ad una diminuzione di energia libera di Gibbs del sistema:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.1)$$

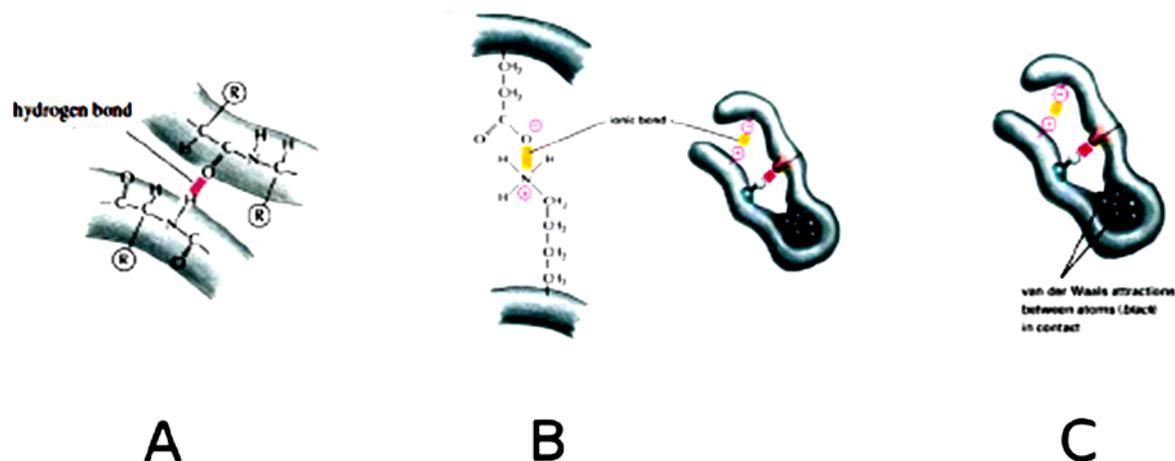


Figura 2.19: A: legame idrogeno interno, B: legame ionico, C: contributo di vdW.

Folding Proteico e Struttura Primaria

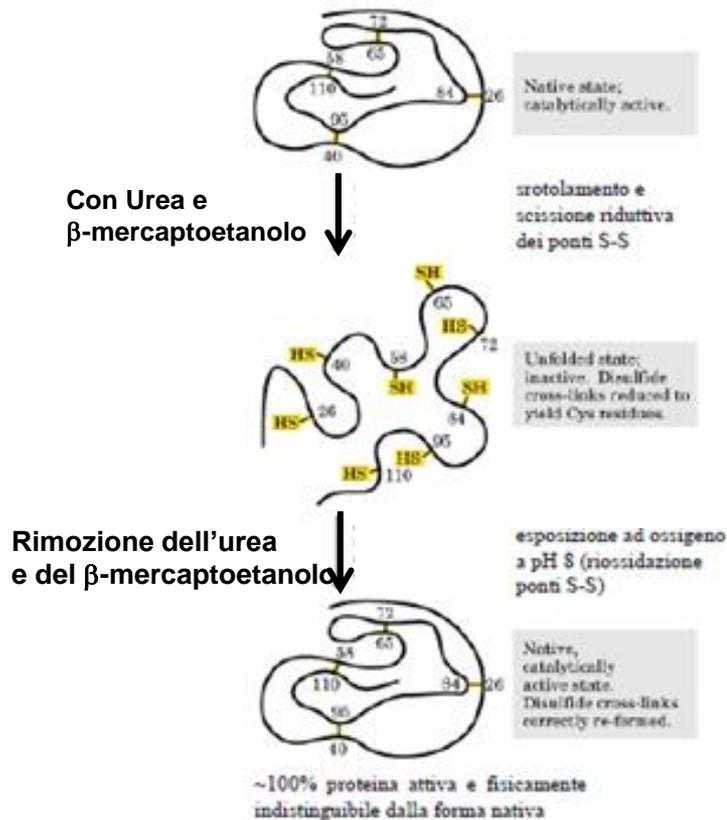
- molte proteine (ma non tutte e non in tutte le condizioni) dopo essere state *denaturate* sono in grado di ripiegarsi spontaneamente nella propria conformazione nativa

⇒ processo reversibile

(la proteina può tornare spontaneamente alla conformazione nativa

⇒ ogni proteina è dotata di una propria caratteristica **conformazione nativa**
determinata dalla sua struttura primaria

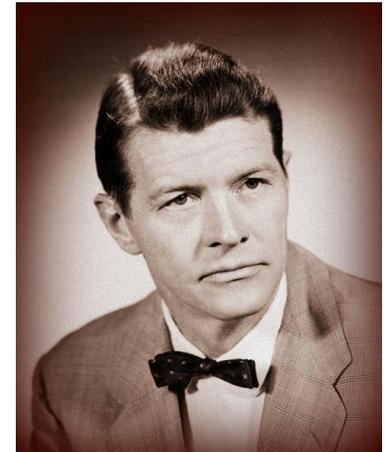
Esperimento di Anfinsen (1957) sulla ribonucleasi A (RNasi)



La **RNasi** denaturata e ridotta riassume la sua conformazione nativa e riforma i corretti **4 punti disolfuro** quando viene rimosso il denaturante e il riducente

RNasi:

- proteina a catena singola (124 residui)
- 4 ponti disolfuro

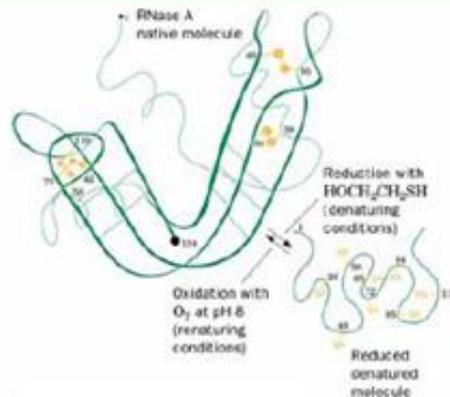


Christian Anfinsen
1916-1995
Premio Nobel 1972

Esperimento di Anfinsen (1957) sulla RNasi

⇒ nella RNasi i ponti S-S non si riformano in modo casuale
(altrimenti solo ~1% della proteina sarebbe cataliticamente attivo)

Il lavoro di Anfinsen ha dimostrato che le proteine si possono ripiegare spontaneamente nelle loro conformazioni native in condizioni fisiologiche e quindi che la struttura primaria è in grado di dirigere la costruzione dello stato nativo



Paradosso di Levinthal

Come fa una proteina a ripiegarsi nella sua conformazione nativa?

L' **plorazione casuale** di tutte le sue possibili conformazioni fino al raggiungimento di quella corretta **NON è una procedura possibile!!!**

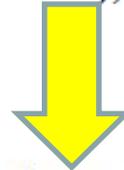
DIMOSTRAZIONE:

Se una proteina ha n residui e per ogni legame peptidico ci sono 2 angoli torsionali ϕ e ψ (phi relativo al legame C α -N e psi relativo al legame C α -C) e ciascun angolo di torsione ha 3 conformazioni stabili, le conformazioni possibili per la proteina sono $3^{2n} \sim 10^n$ (valore sottostimato perché non sono considerate le catene laterali).

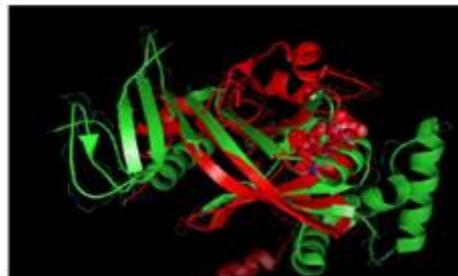
la proteina può esplorare una conformazione in 10^{-13} s
(velocità con cui si riorientano i legami singoli)

$$\longrightarrow t = 10^n * 10^{-13}$$

Es: proteina di 100 residui (molto piccola), $t = 10^{87} \gg$ età dell'Universo!!!



“ Le proteine raggiungono la loro conformazione nativa in meno di qualche secondo e pertanto il ripiegamento avviene necessariamente attraverso vie dirette, piuttosto che attraverso la scelta casuale della struttura. ”

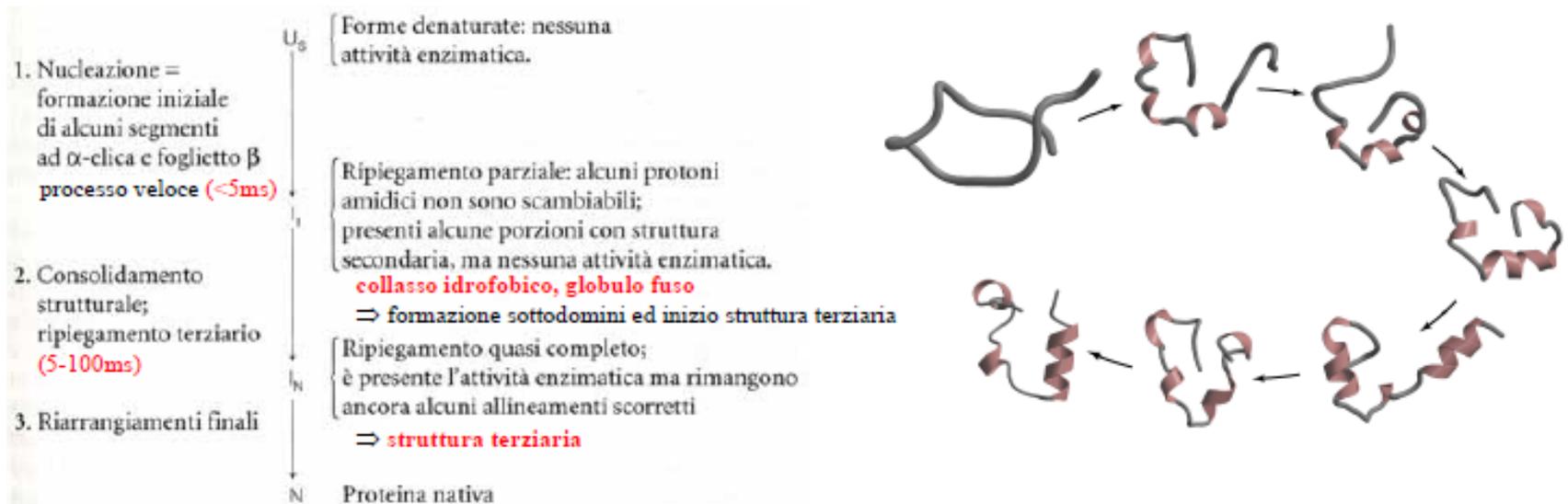


Paradosso di Levinthal

- il ripiegamento è un processo cooperativo: alcuni elementi di struttura si formano per primi
- gli elementi di struttura che via via si formano guidano il resto della catena polipeptidica nell'assumere la conformazione nativa

(struttura terziaria)

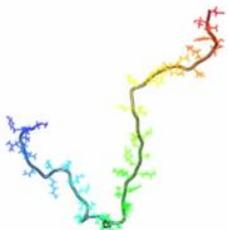
⇒ processo gerarchico



Considerazioni energetiche

- Stato unfolded: alta entropia, bassa entalpia
- Stato nativo: bassa entropia, più bassa entalpia
- La differenza di energia libera tra due stati è minima (poche kcal/mole)

U \rightleftharpoons F



Unfolded
Protein

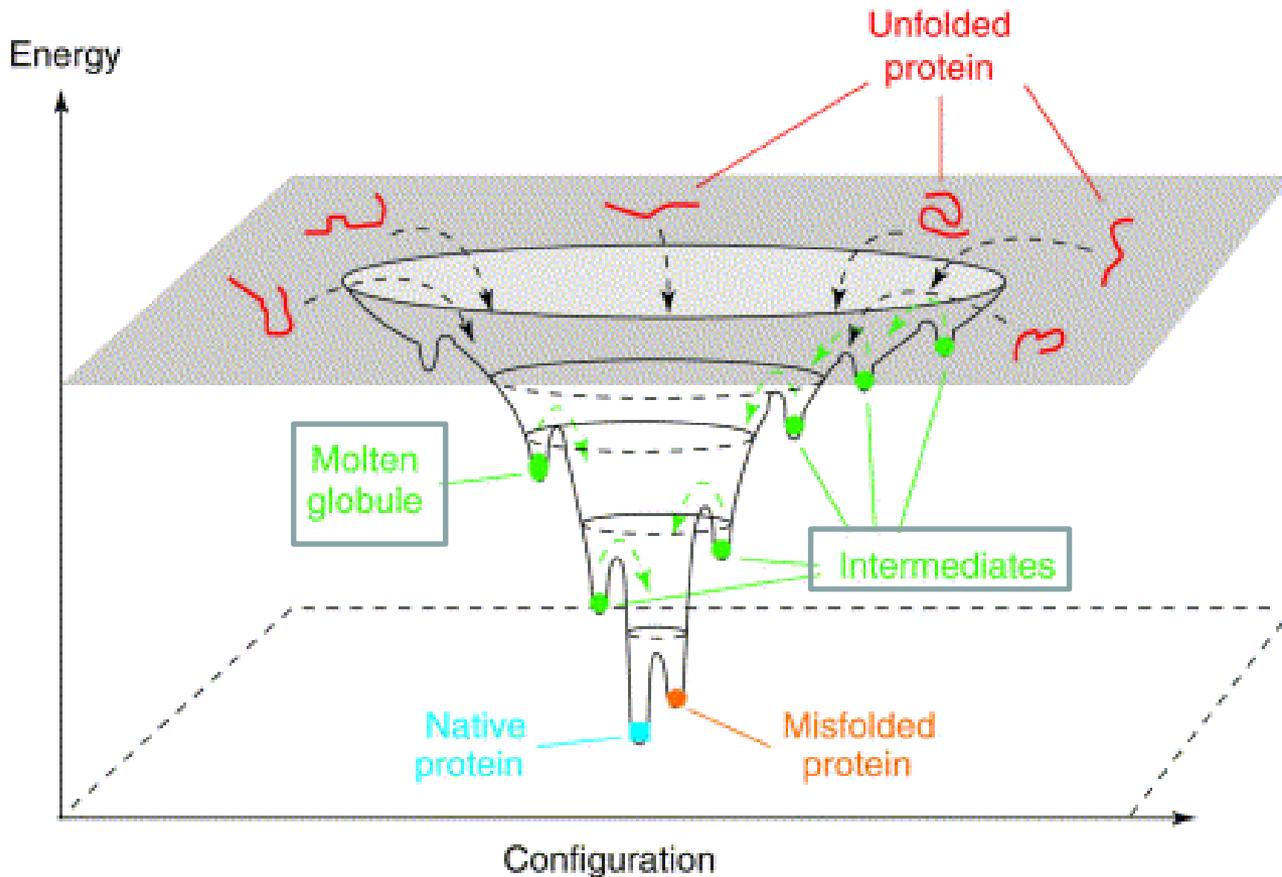


Folded
Protein

Energia o cinetica?

- La struttura nativa può essere determinata da fattori termodinamici: è la conformazione con energia minima.
- Oppure da fattori cinetici: la conformazione con bassa energia raggiungibile in tempi veloci (minimo locale)

La superficie dell'energia libera configurazionale di una proteina (di un biopolimero, in generale) è tipicamente complessa, poichè esistono molti stati energetici metastabili, alcuni dei quali hanno un'energia molto vicina al minimo globale (*problema della ricerca del minimo assoluto*)



La componente idrofobica

- Il primo passaggio verso la struttura nativa è definito “collasso idrofobico”:
- Le catene idrofobiche si allontanano dall’acqua
- Questo induce la formazione delle strutture secondarie per accomodare lo scheletro idrofilo in ambiente idrofobico.
- I gruppi idrofobici sono distribuiti lungo la sequenza, alcuni di essi si “sotterrano” velocemente nella proteina.

L'effetto idrofobico è il vero motore alla base dei ripiegamenti.

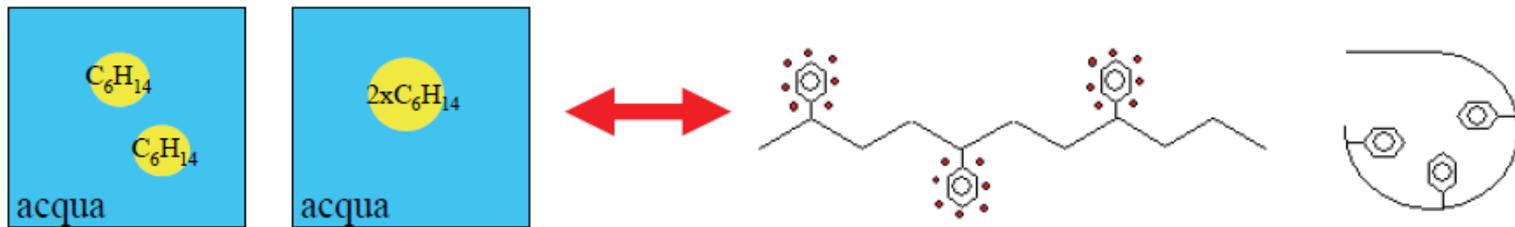
- tendenza alla separazione fra una fase polare ed una apolare. In una soluzione biopolimerica, questa separazione conduce alla formazione di una **struttura compatta in cui le catene apolari sono nascoste all'acqua.**
- Questa driving force e' caratteristica dell'acqua, in quanto le **interazioni dipolo-dipolo sono molto piu forti delle interazioni dipolo-dipolo indotto che l'acqua farebbe con una struttura apolare.**
- La perdita energetica dovuta al fatto che, dove c'è la catena apolare, l'acqua non può formare legami idrogeno, viene compensata dalla formazione di legami idrogeno acqua-acqua molto corti e lineari. Questi legami idrogeno comportano però un riarrangiamento locale dell'acqua intorno alla proteina in un ordine simile a quello del ghiaccio, una situazione sfavorevole dal punto di vista entropico.
- Il ripiegamento delle catene apolari consente un rilassamento della struttura con **perdita di entropia ma una totale diminuzione dell'energia libera** del sistema.

Effetto idrofobico e Folding Proteico

$$\Delta G_{\text{FOLDING}} = G_{\text{F}} - G_{\text{U}} = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta S_{\text{FOLDING}} = S_{\text{F}} - S_{\text{U}} = \Delta S_{\text{CATENA}} + \Delta S_{\text{SOLVENTE}}$$

sempre < 0



L'effetto idrofobico rappresenta una interazione chiave per il **folding delle proteine**, in cui residui con catene laterali idrofobiche si ripiegano verso l'interno della proteina lasciando esposti al solvente in superficie residui polari.

Effetto idrofobico e Folding Proteico

$$\Delta G_{\text{FOLDING}} = G_{\text{F}} - G_{\text{U}} = \Delta H - T\Delta S$$

ΔH = variazione di entalpia fra stato finale ed iniziale (interazioni di van der Waals, elettrostatiche, legami idrogeno). $\Delta H \ll 0$ (T = temperatura assoluta (K)).

ΔS = variazione di entropia (disordine del sistema) fra stato finale ed iniziale. Poiché $S_{\text{U}} \gg S_{\text{F}} \rightarrow \Delta S \ll 0$

Nel $\Delta G_{\text{FOLDING}}$ il contributo $-T\Delta S$ è positivo e sia ΔH che $-T\Delta S$ assumono valori grandi (migliaia di kcal/mol). Al contrario $\Delta G_{\text{FOLDING}}$ ha valori piccoli:

$$\Delta G_{\text{FOLDING}} = -10, -15 \text{ kcal/mol} \quad (40-63 \text{ kJ/mol})$$

Quindi il processo di **folding** avviene grazie ad un **minimo prevalere di ΔH su $T\Delta S$** ; è sufficiente un piccolo aumento di T per causare denaturazione della proteina.

Effetto idrofobico e Folding Proteico

TABELLA 6.3 Parametri termodinamici relativi al ripiegamento di alcune proteine globulari a 25 °C in soluzione acquosa

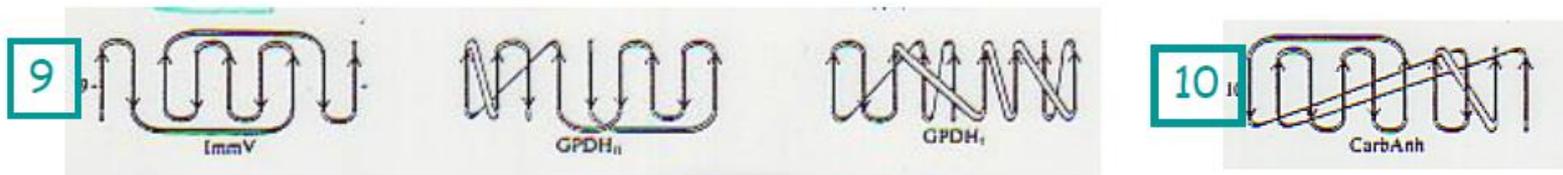
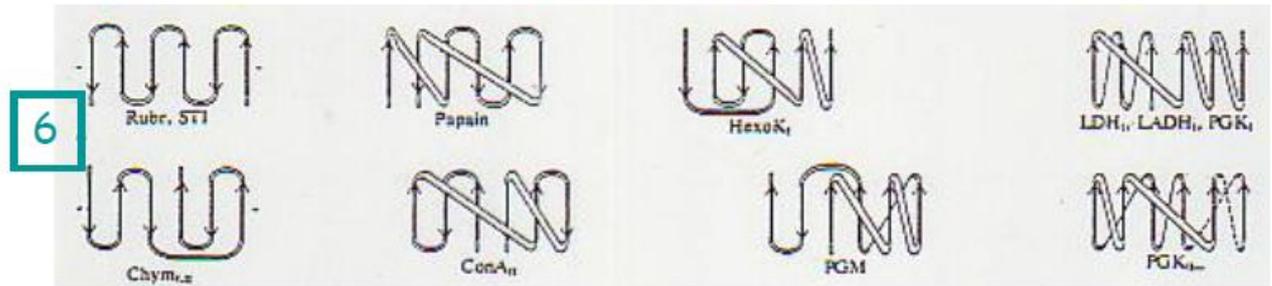
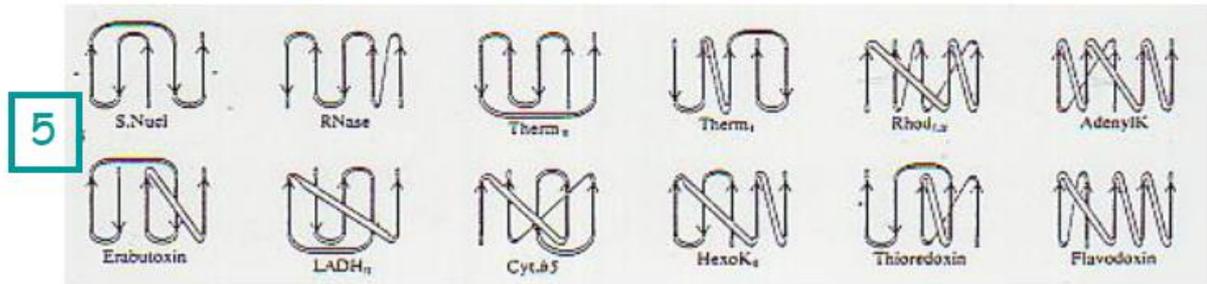
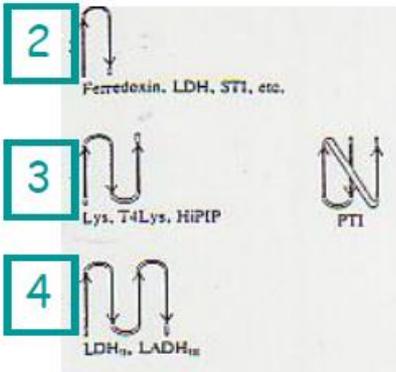
Proteina	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS [J/(mol · K)]
Ribonucleasi	-46	-280	-790
Chimotripsina	-55	-270	-720
Lisozima	-62	-220	-530
Citocromo c	-44	-52	-27
Mioglobina	-50	0	+170

Note: dati adattati da P.L. Privalov e N.N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* (1974) 86:665-684. Ciascun insieme di dati è stato determinato al valore di pH a cui la proteina mostra la massima stabilità; questi sono tutti prossimi al valore di pH fisiologico. I dati si riferiscono alla reazione di ripiegamento: denaturata \rightleftharpoons nativa.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Ogni proteina possiede una propria caratteristica struttura tridimensionale: la sua **conformazione nativa**.

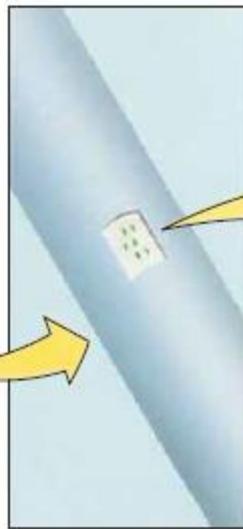
In condizioni fisiologiche la conformazione nativa corrisponde alla conformazione termodinamicamente più stabile della molecola proteica.



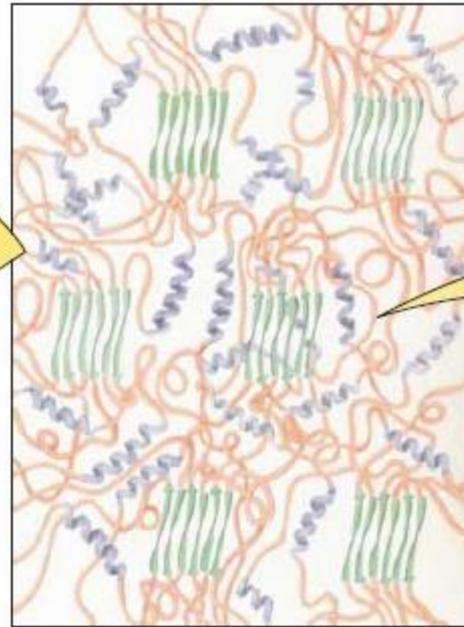
Helix–Sheet Composites in Spider Dragline Silk



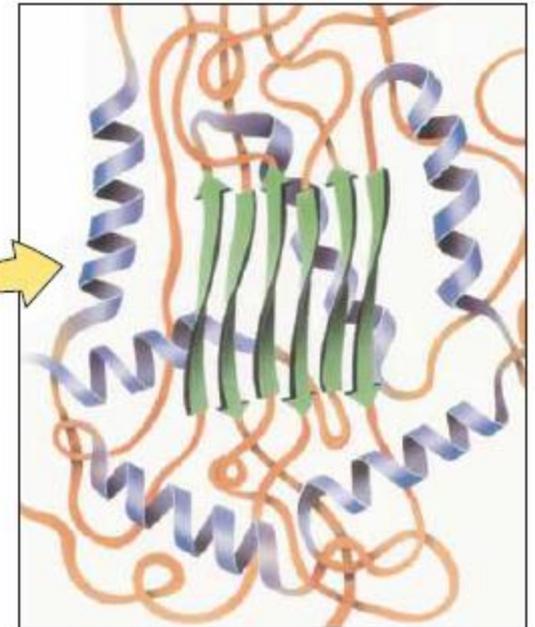
(a) Spider web



(b) Radial strand

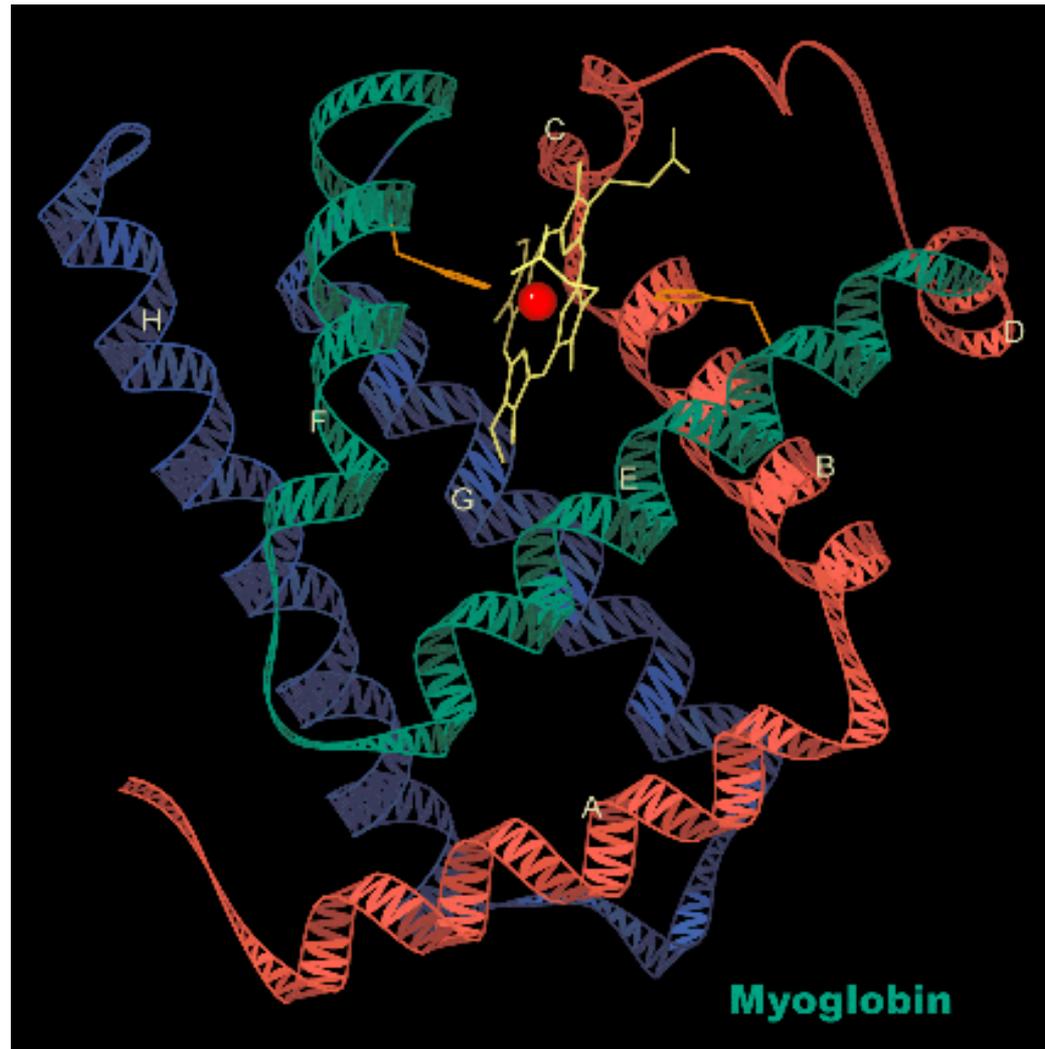


(c) Ordered β -sheets surrounded by disordered α -helices and β -bends.

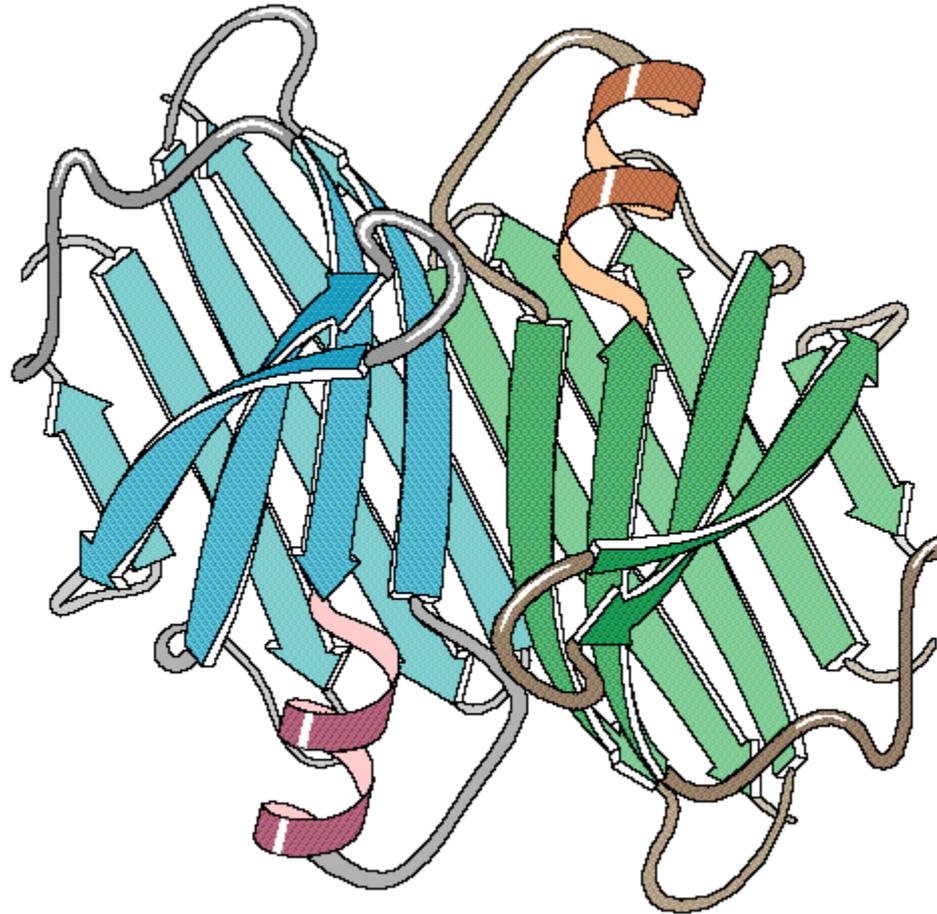


(d) β -sheets impart strength and α -helices impart flexibility to the strand.

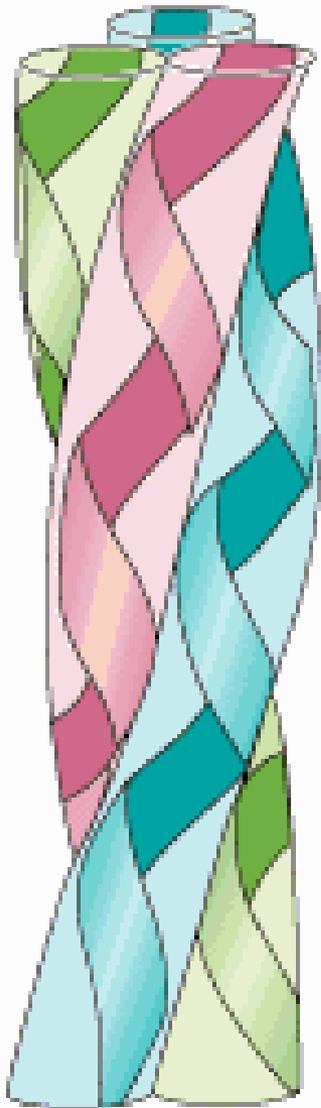
Esempio di struttura (terziaria) di una proteina con alta percentuale di struttura α e β -turns



Esempio di struttura (terziaria) di una proteina con alta percentuale di struttura β



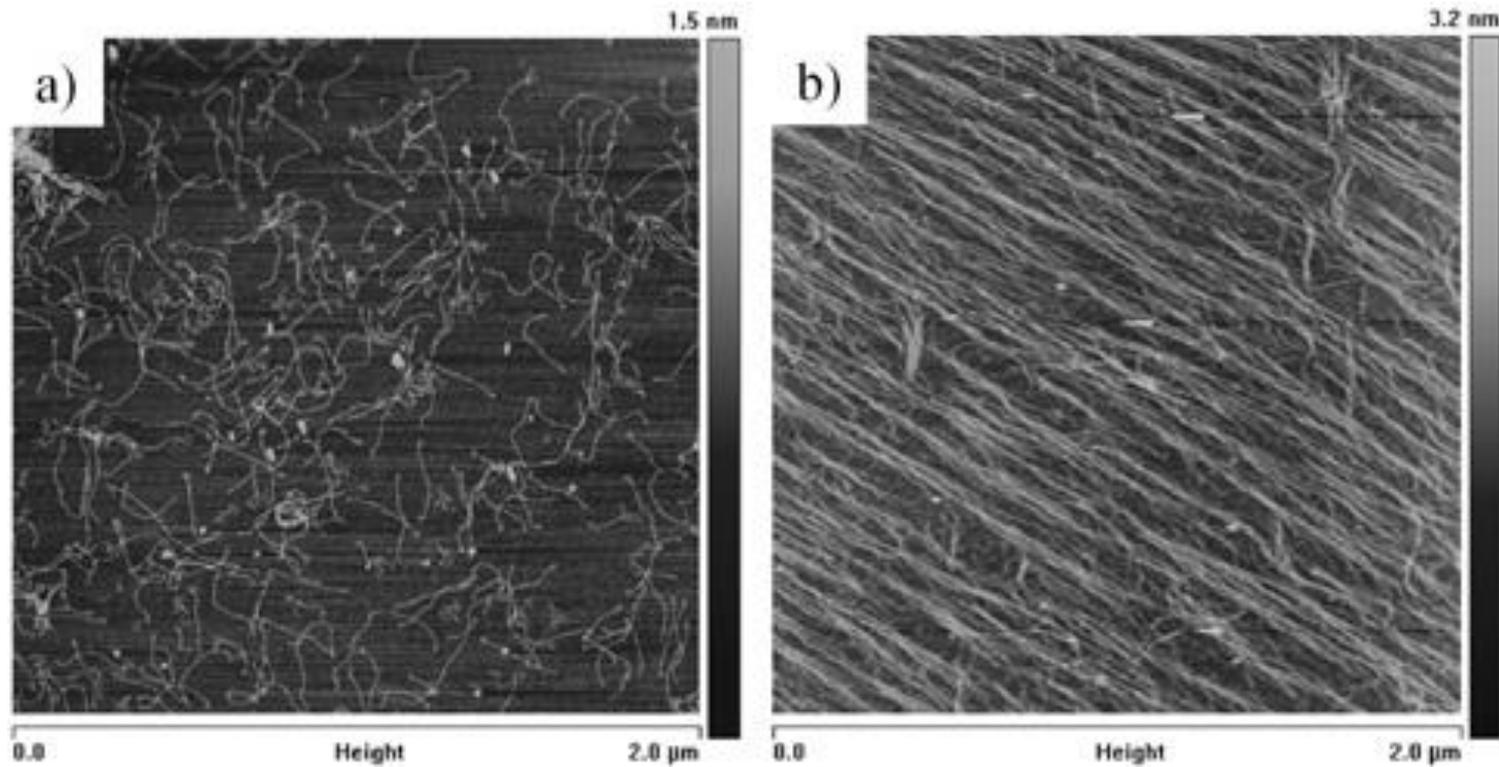
Prealbumin Dimer



Collagen, a

La superstruttura secondaria del collagene è una tripla elica.

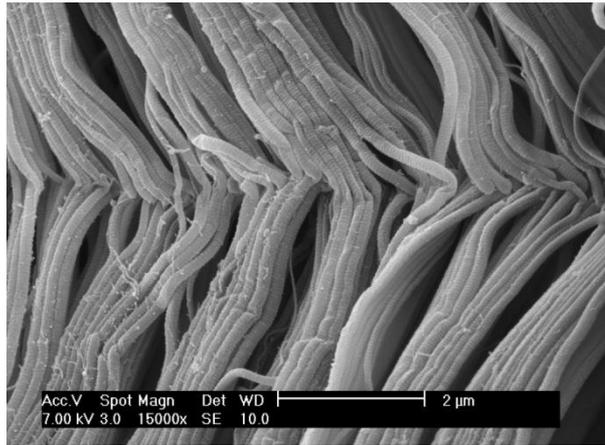
Il collagene fa parte di diversi materiali biologici quali cartilagini, tendine, pelle.



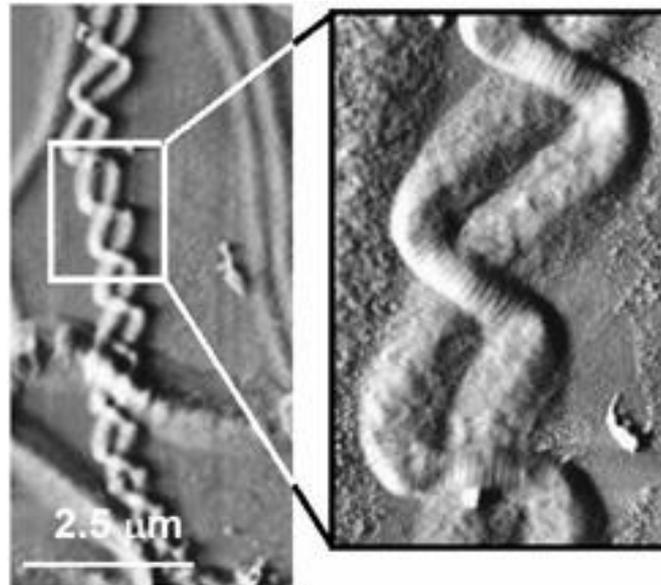
Immagini topografiche AFM del **collagene di tipo I su un substrato di mica (tapping mode, in aria):**

a) Microimmagine da soluzione a bassa concentrazione (1 mg/ml)

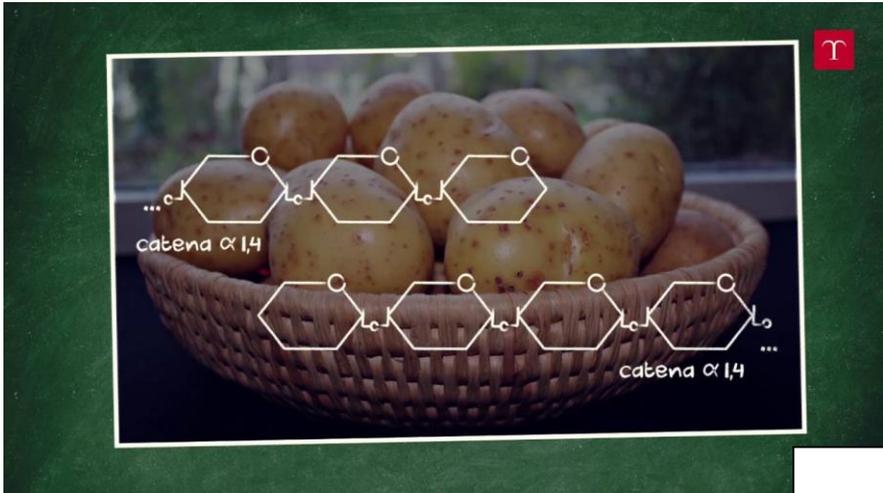
b) Microimmagine da soluzione ad alta concentrazione (10 mg/ml)



**Microimmagine mediante
microscopia elettronica a
scansione (SEM) del tendine
di Achille di ratto**



**Visualizzazione microscopica dell'intreccio su scala
micrometrica di due **fibrille di collagene** (SEM)**



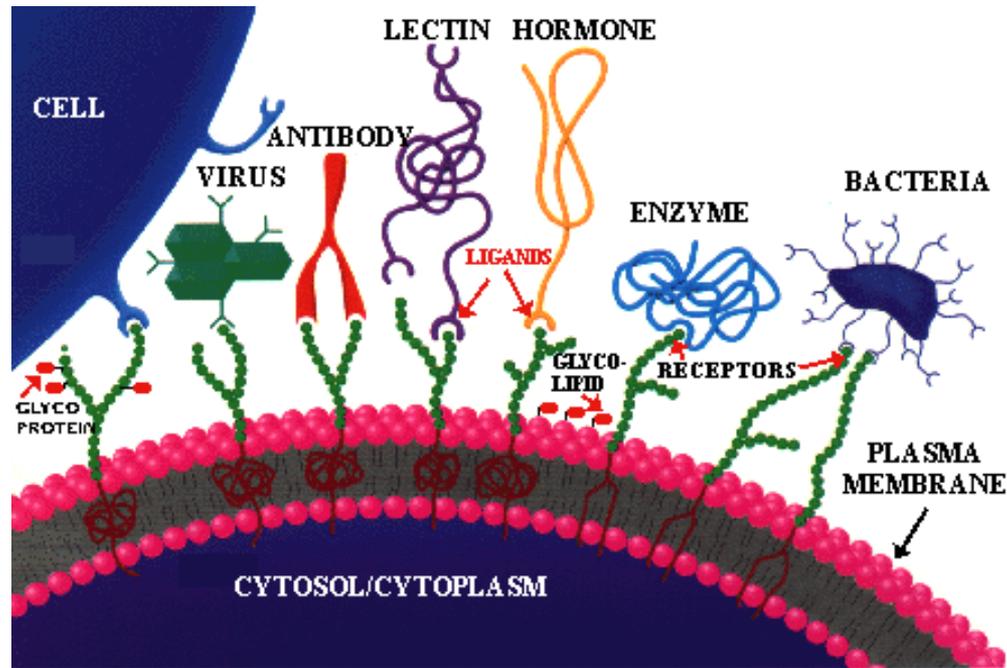
STRUTTURA SECONDARIA DI POLISACCARIDI



POLISACCARIDI: CARATTERISTICHE STRUTTURALI E CHIMICO-FISICHE

I polisaccaridi hanno importanti funzione biologiche negli organismi che li producono (piante, batteri, animali). Ma hanno anche un larghissimo utilizzo industriale.

- Per le proprietà generali che ne caratterizzano le **funzioni**:
- Per le caratteristiche di scorrimento del sistema in cui sono disciolti (reologia, viscosità).
- Per l'interazione nello stato idratato con specie molecolari disperse o disciolte (legare, complessare, chelare, emulsificare, incapsulare, flocculare, stabilizzare, sospendere).
- Per la funzione da adsorbenti, trasportatori, supporti idrofilici, rivestimenti, scambiatori di ioni.
- Per la produzione di gel e film.



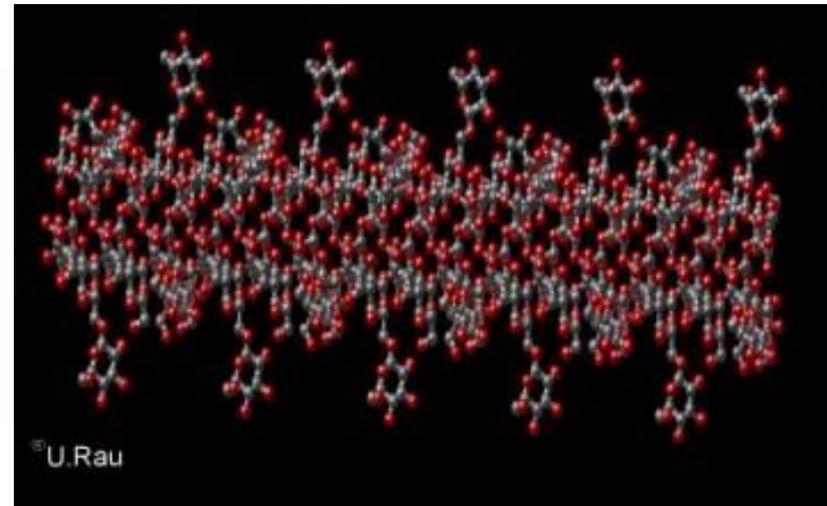
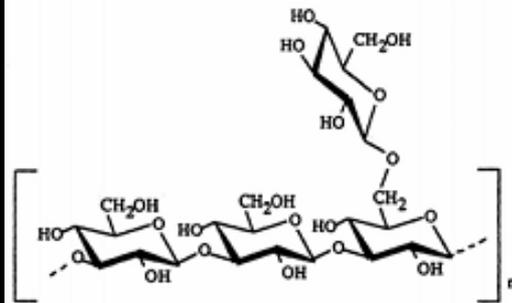
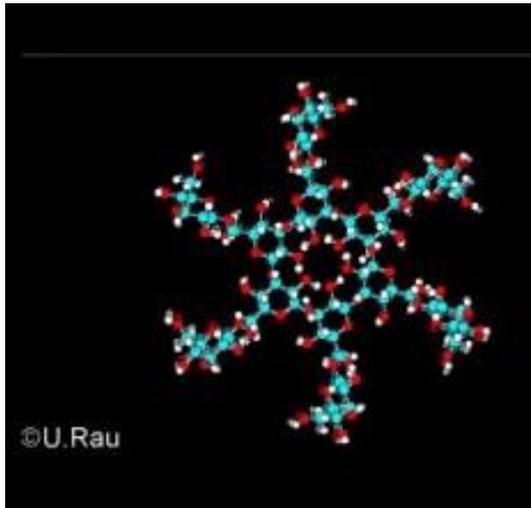
Alcune di queste proprietà si riscontrano nelle funzioni biologiche

- Associazione con ormoni, lipidi, proteine.
- Funzionare da materiale strutturale o da riserva di energia, formare capsule protettive.
- Mediare processi di adesione, riconoscimento cellulare e crescita.

Caratteristiche generali della geometria di una catena polisaccaridica

In forma di fibra (più o meno cristallina) i polisaccaridi possono adottare una **forma elicoidale** (struttura secondaria) che in soluzione o nello stato amorfo può essere in parte conservata (in modo dinamico) in segmenti della macromolecola.

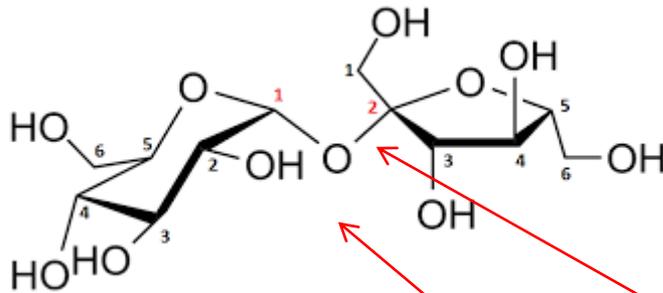
Alcuni (es. scleroglucano) conservano in larga parte la struttura elicoidale anche in soluzione



Tripla elica dello scleroglucano (stabile fino a 90°C).
Il glucosio legato β -1,6 si posiziona all'esterno della struttura elicoidale.

POLISACCARIDI

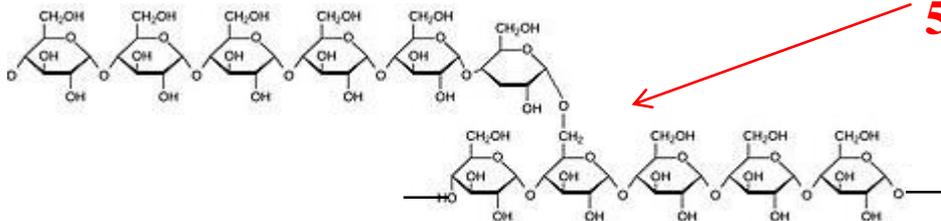
- 1) Composizione monosaccaridica
- 2) Sequenza



- 3) Tipo di concatenamento: 1-2
1-3
....

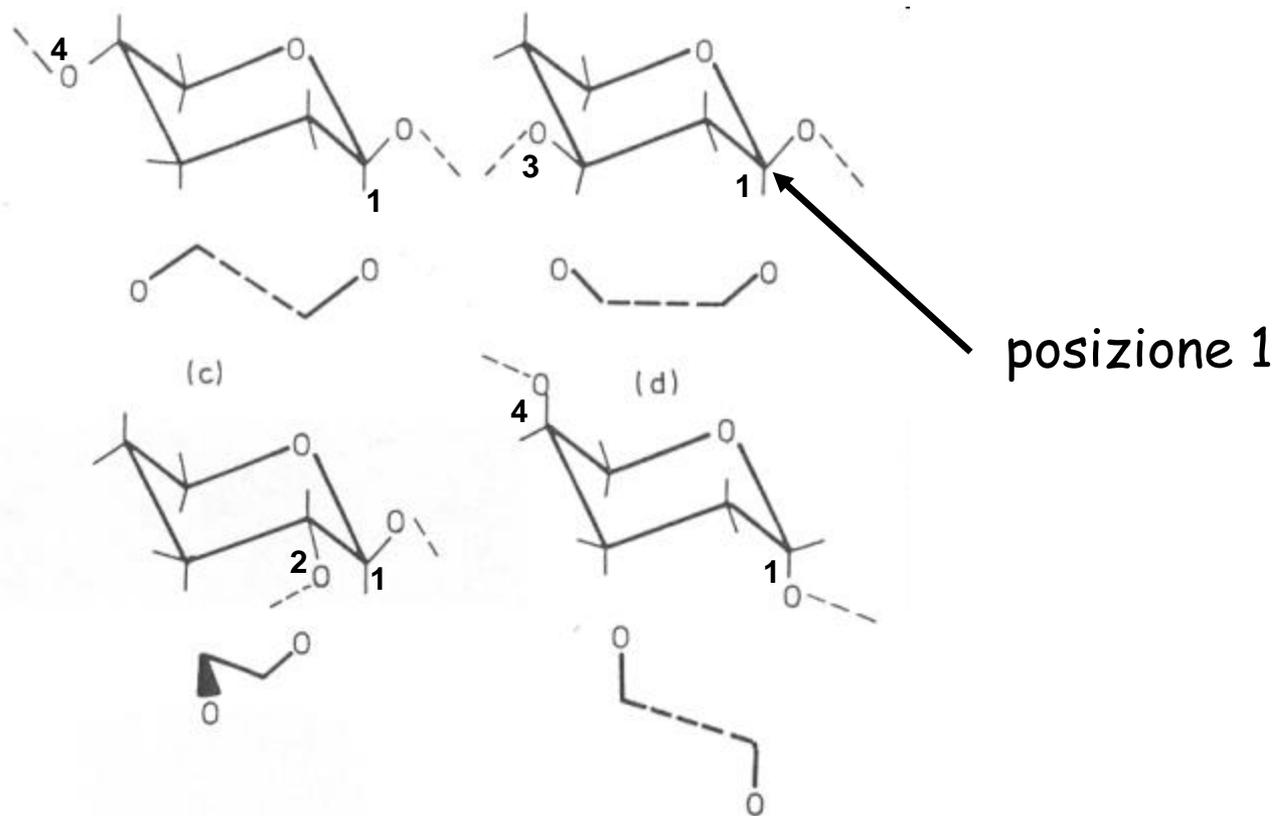
α / β

- 4) Anomeria (α o β)



- 5) Ramificazioni

I motivi conformazionali locali della catena polisaccaridica sono dettati dal tipo di **legame glicosidico (concatenamento)** e dall'**anomeria del carbonio C1**.



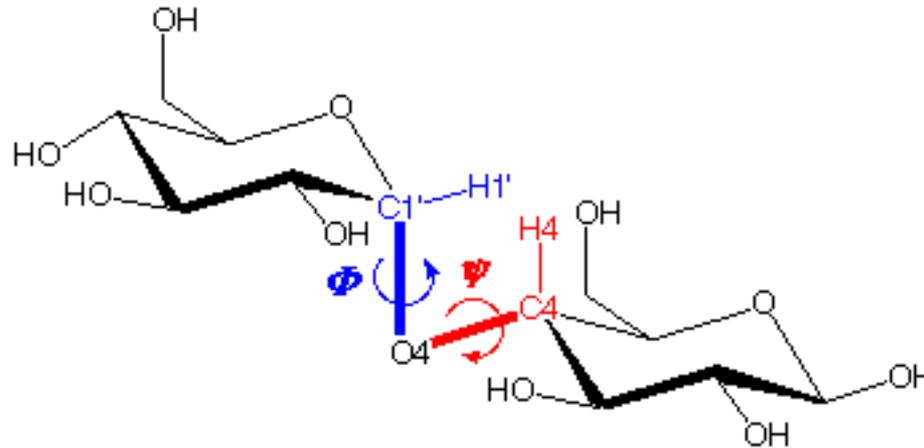
Disaccaridi e polisaccaridi

La definizione degli angoli φ e ψ nei disaccaridi è la seguente:

$$\varphi = \text{H1-C1-O-C}'(x) \ ; \ \psi = \text{C1-O-C}'x\text{-H}'(x)$$

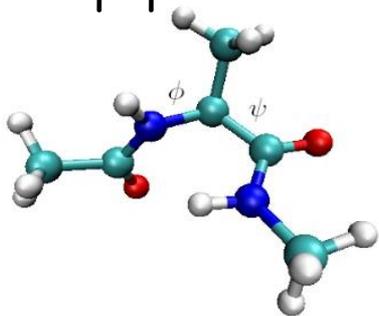
per un legame glicosidico (1 \rightarrow x).

Il valore zero è dato per la conformazione cis. Ma è ancora usata la definizione che utilizza come riferimento, invece degli idrogeni H1 e H(x), il C legato al C1 o al C'(x).

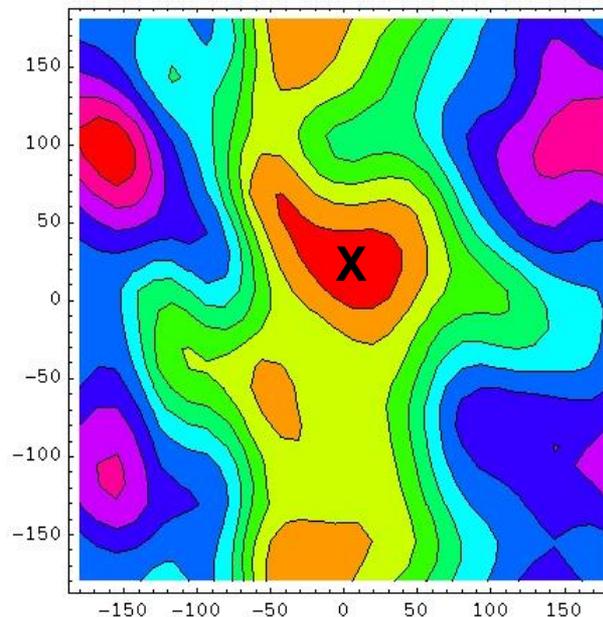
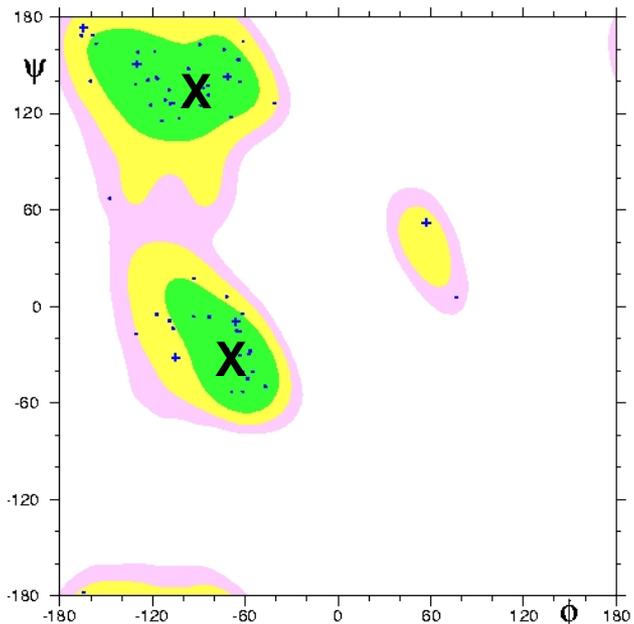
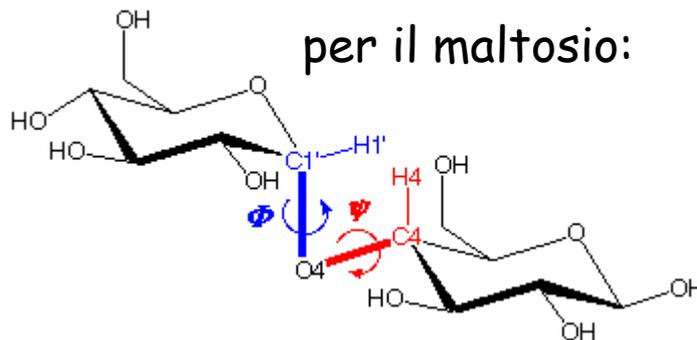


La libertà conformazionale è data dalle regione a bassa energia dei grafici di Ramachandran. I grafici relativi a disaccaridi sono molto diversi da quelli relativi a dipeptidi

per un dipeptide:



per il maltosio:



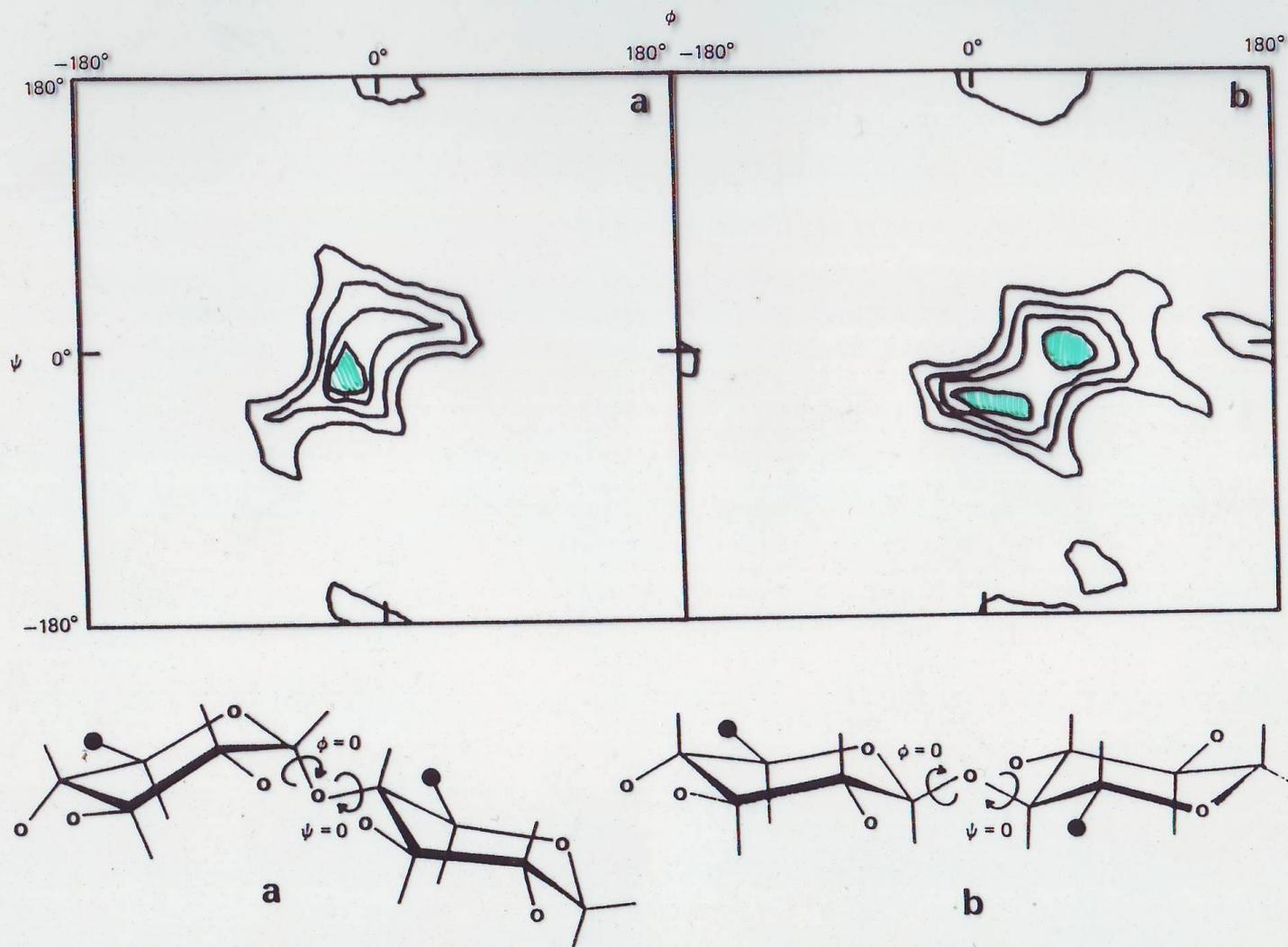
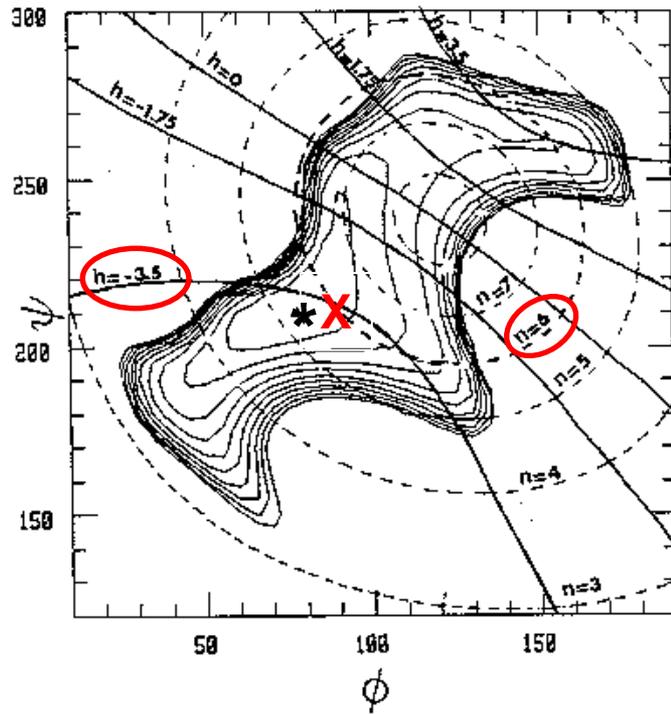


Figure 2 Conformational energy maps calculated for D-maltose (a) and for D-cellobiose (b), according to the procedure of ref. 12. Contours are (1) $-1, 0, 5, 25 \text{ kcal mol}^{-1}$ and (b) $-1, 0, 2, 10 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively



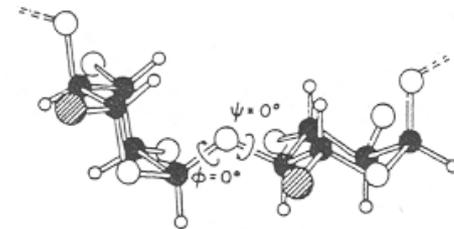
Mappa di Ramachandran del maltosio con le linee iso- n e iso- h (in Å) sovrapposte. Le linee isoenergetiche hanno un intervallo di una 1 kcal/mol rispetto al minimo calcolato (*). La linea $h = 0$ divide la mappa in una regione “elica destra” ($h > 0$) e elica sinistra ($h < 0$).

I parametri elicoidali generati da ogni combinazione di ϕ e ψ sono riportati sulla mappa di Ramachandran.

Le conformazioni in accordo con i dati sperimentali sono alle intersezioni delle linee $n = 6$ e $h = 0.35$ nm (per una chiralità destra) o $h = -0.35$ nm (per una chiralità sinistra)

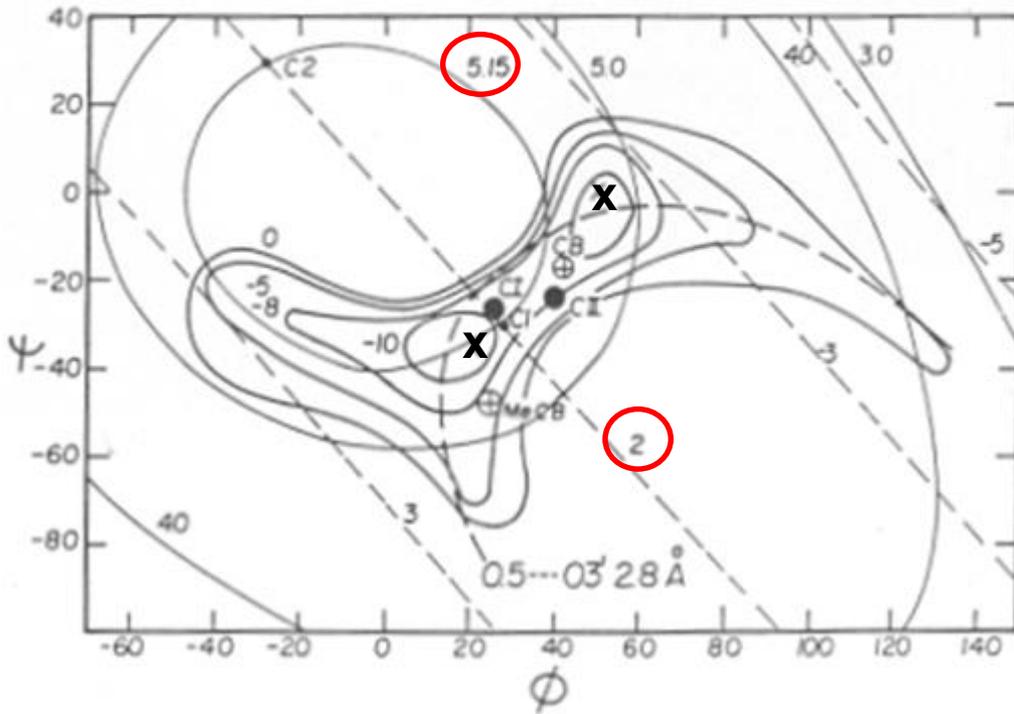
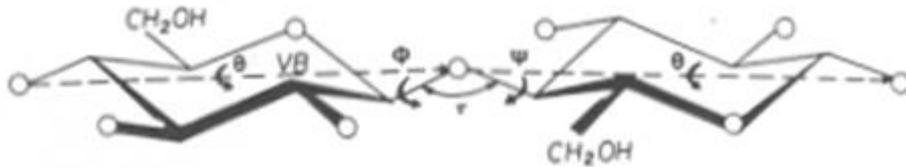
Le conformazioni che generano eliche sinistre sono vicine al minimo di energia conformazionale calcolato, mentre quelle destre sono instabili.

Quindi il modello ad elica sinistra è quello reale.



Attenzione alla convenzione su ϕ e ψ

Cellulosa



Le linee tratteggiate designano il numero di monomeri per spira.

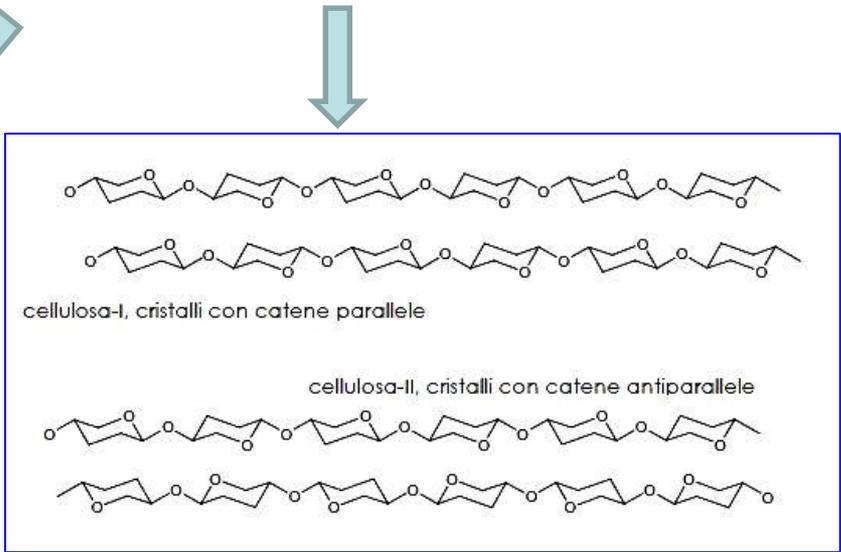
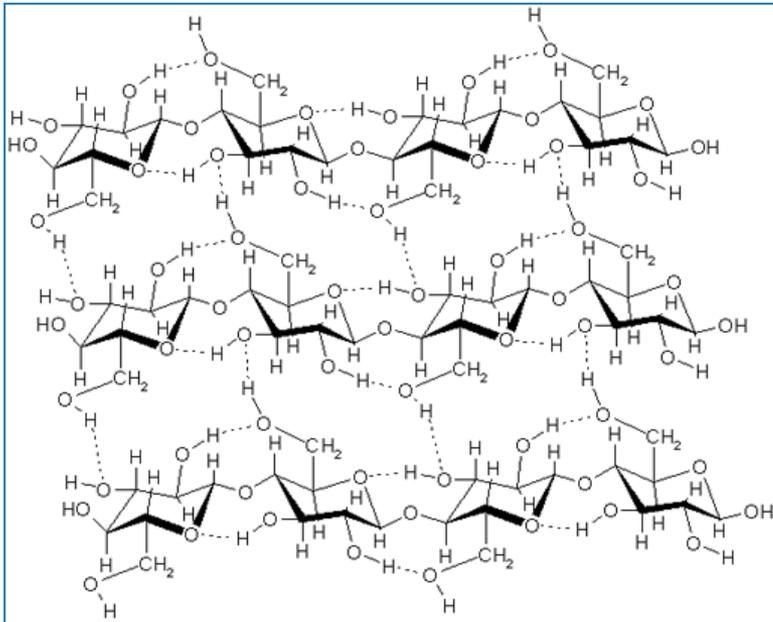
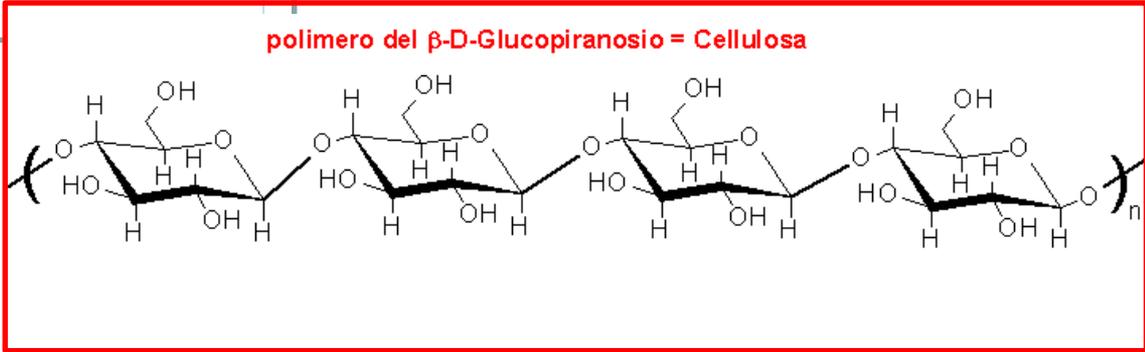
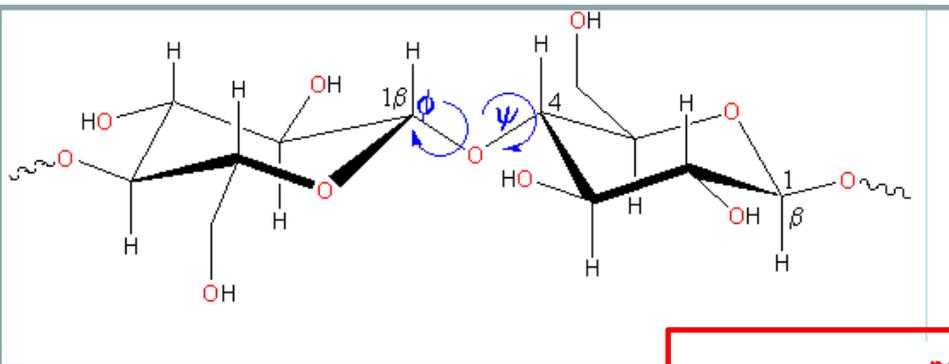
I cerchi grandi: l'avanzamento per monomero.

Le croci: i minimi calcolati.

I cerchietti con croci: strutture cristalline di cellobiosio e metil-cellobiosio.

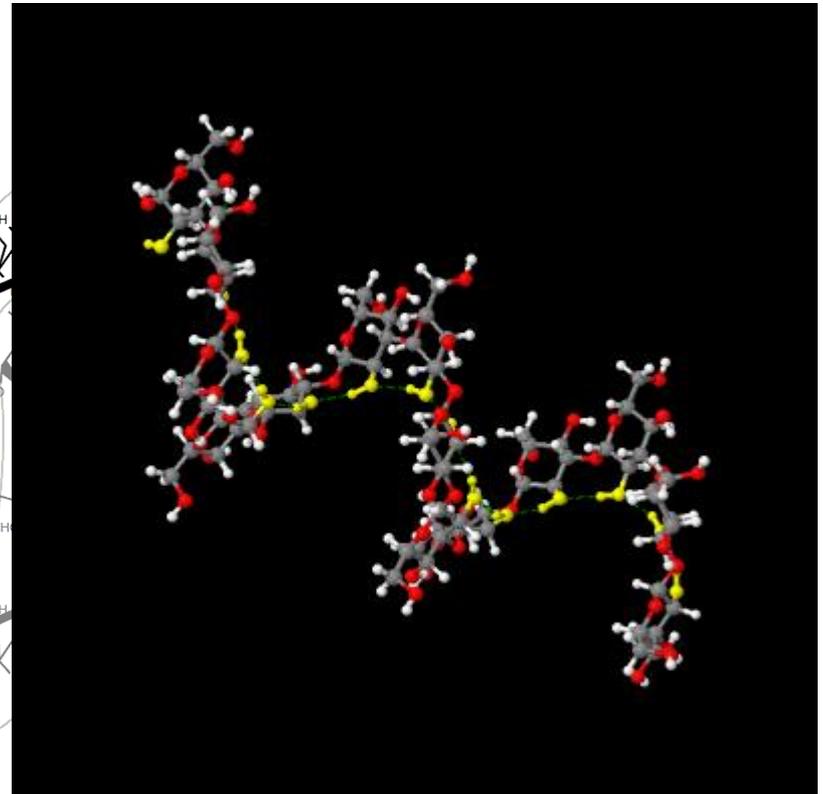
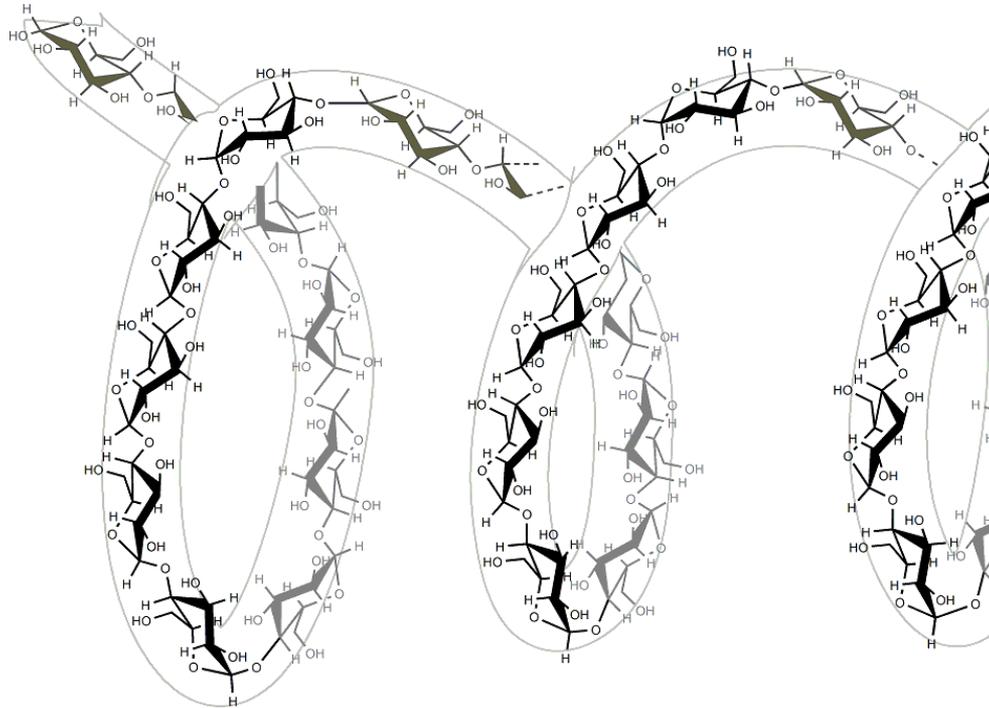
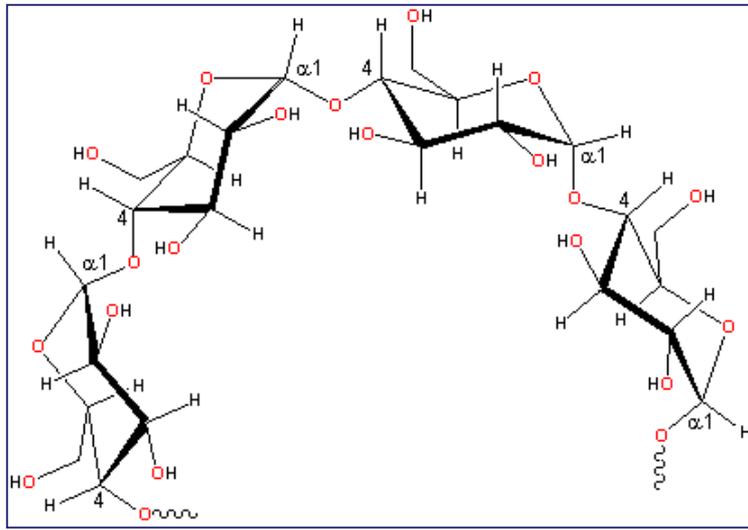
C-I e C-II indicano cellulosa I e cellulosa II.

$$n=2, h=5.15$$



**Struttura cristallina (*terziaria*)
della cellulosa I e II**

Struttura cristallina dell'amilosio



$n=2, h=5.15 \text{ \AA}$



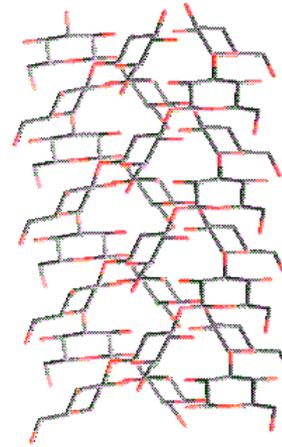
cellulosa amilosio
polimeri lineari

$n = 6 \text{ e } h = 3.5 \text{ \AA}$

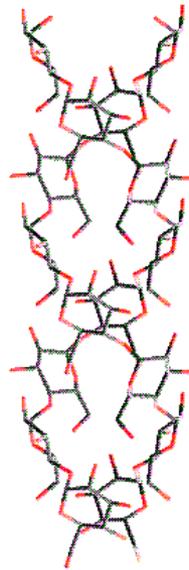
Cellulosa
 β (1-4) glc

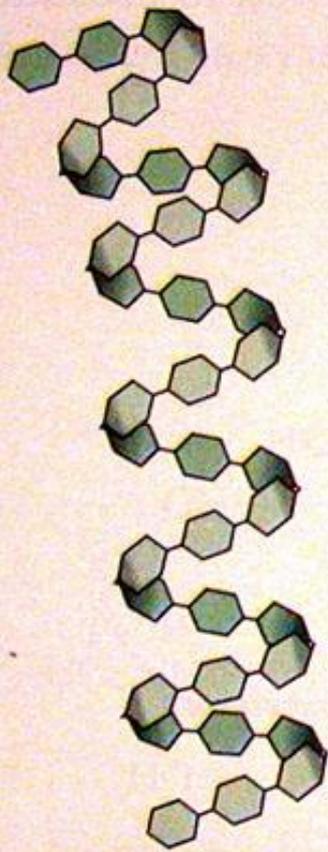


β (1-3) glc
tripla elica

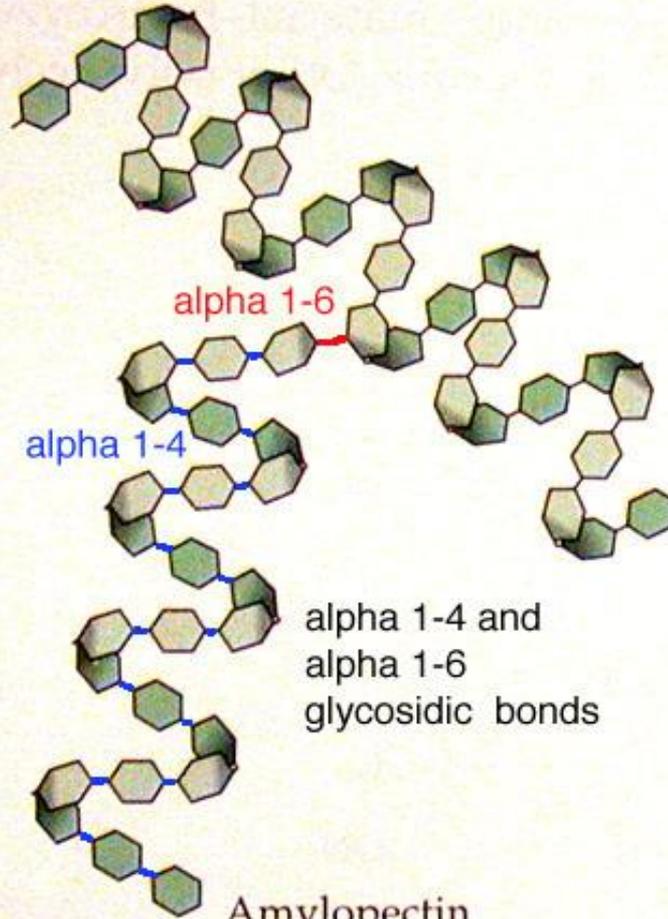


amilosio
 α (1-4) glc
doppia elica





Amylose
only alpha 1-4
glycosidic bonds



alpha 1-4

alpha 1-6

alpha 1-4 and
alpha 1-6
glycosidic bonds

Amylopectin

(a) Two forms of starch

α -D-(1 \rightarrow 4)GalpA α -L-(1 \rightarrow 4)GulpA β -D-(1 \rightarrow 4)ManpA β -D-(1 \rightarrow 4)Glc pA

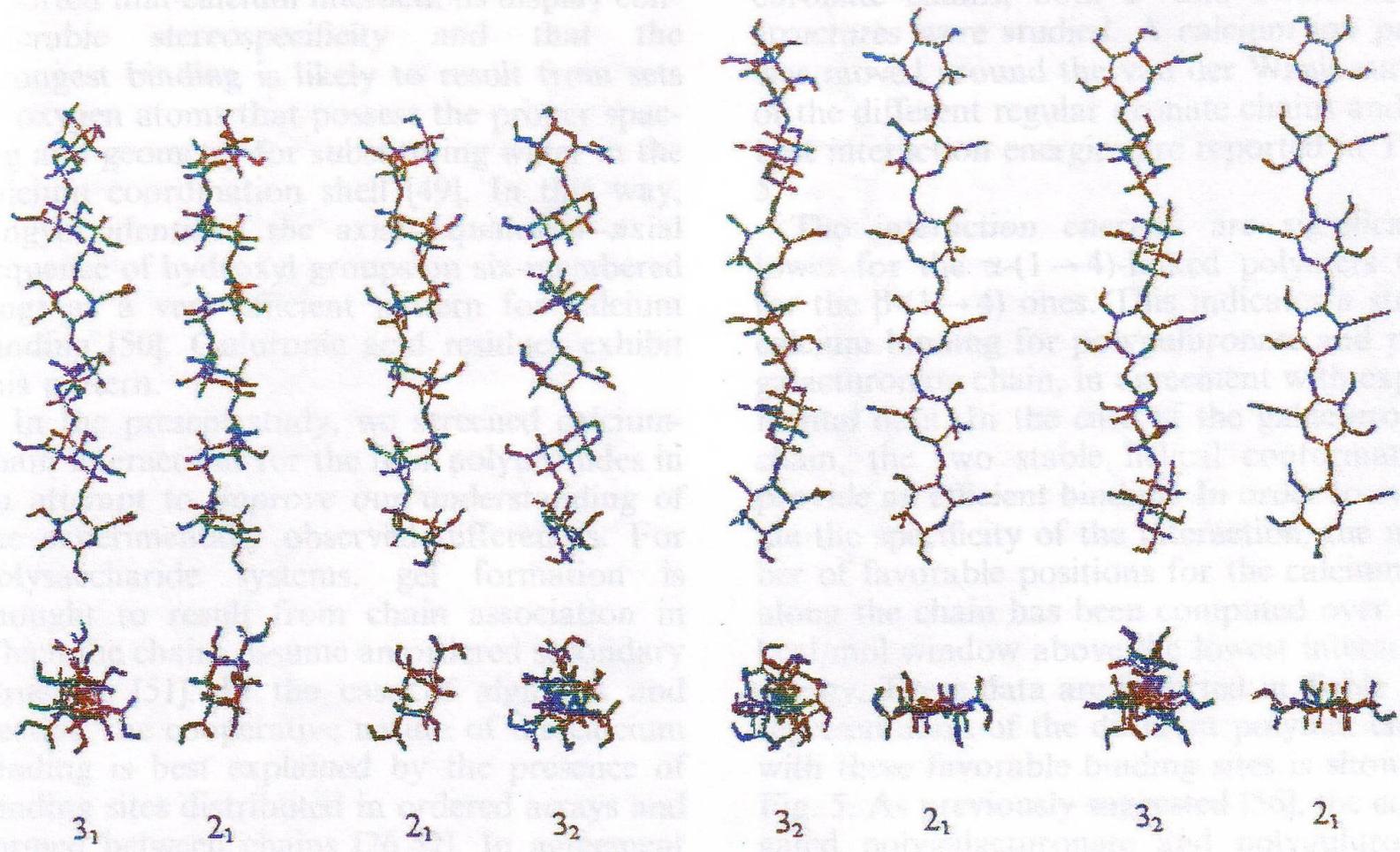
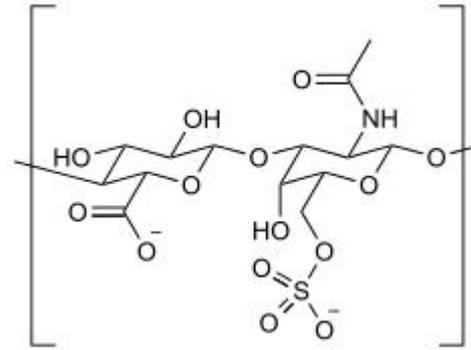
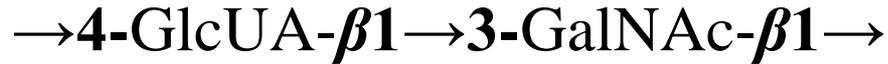


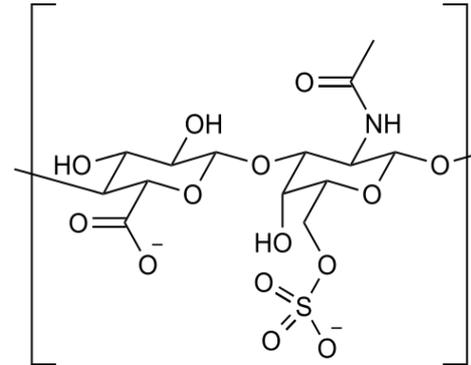
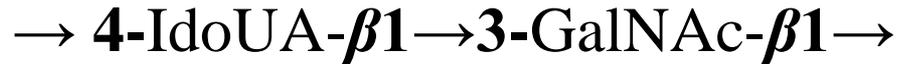
Fig. 4. Stable regular helical conformations of the four acidic polysaccharides. The helices are represented using projection parallel and orthogonal to their axes.

Strutture secondarie di polisaccaridi. Esempio di glucosaminoglicani

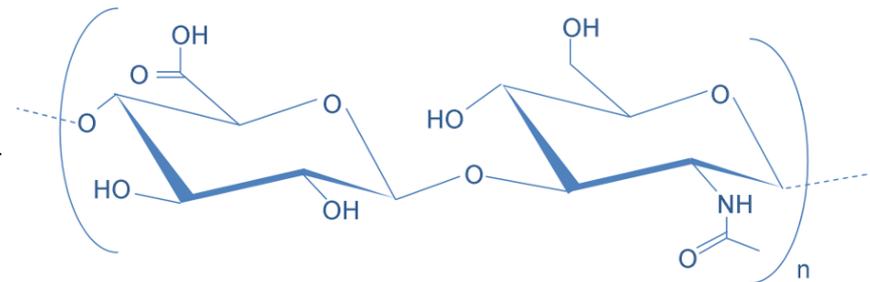
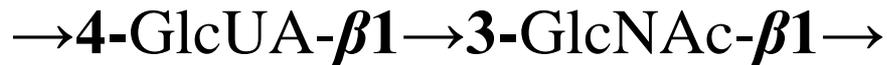
Condroitin solfato (CS)



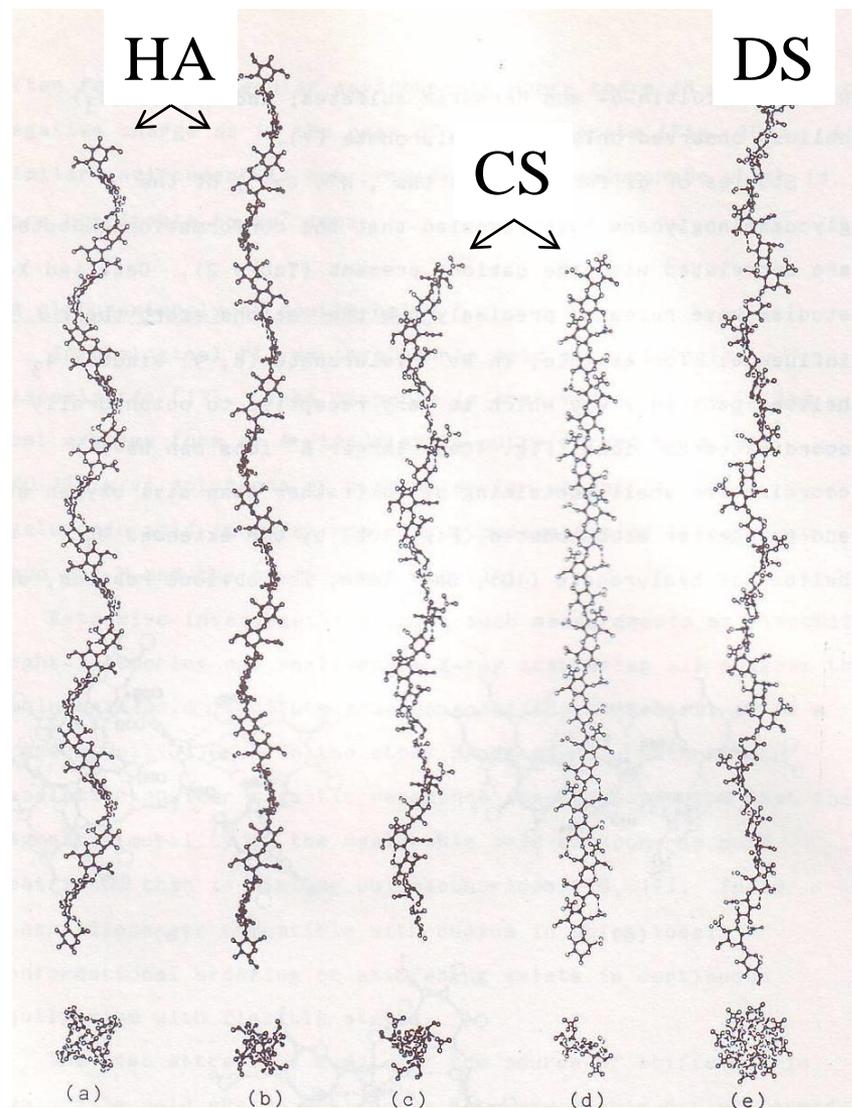
Dermatan solfato (DS)



Acido ialuronico (HA)



Strutture secondarie di polisaccaridi



Simmetria

4_3

4_3

3_2

2_1

8_3

Passo/residuo, nm

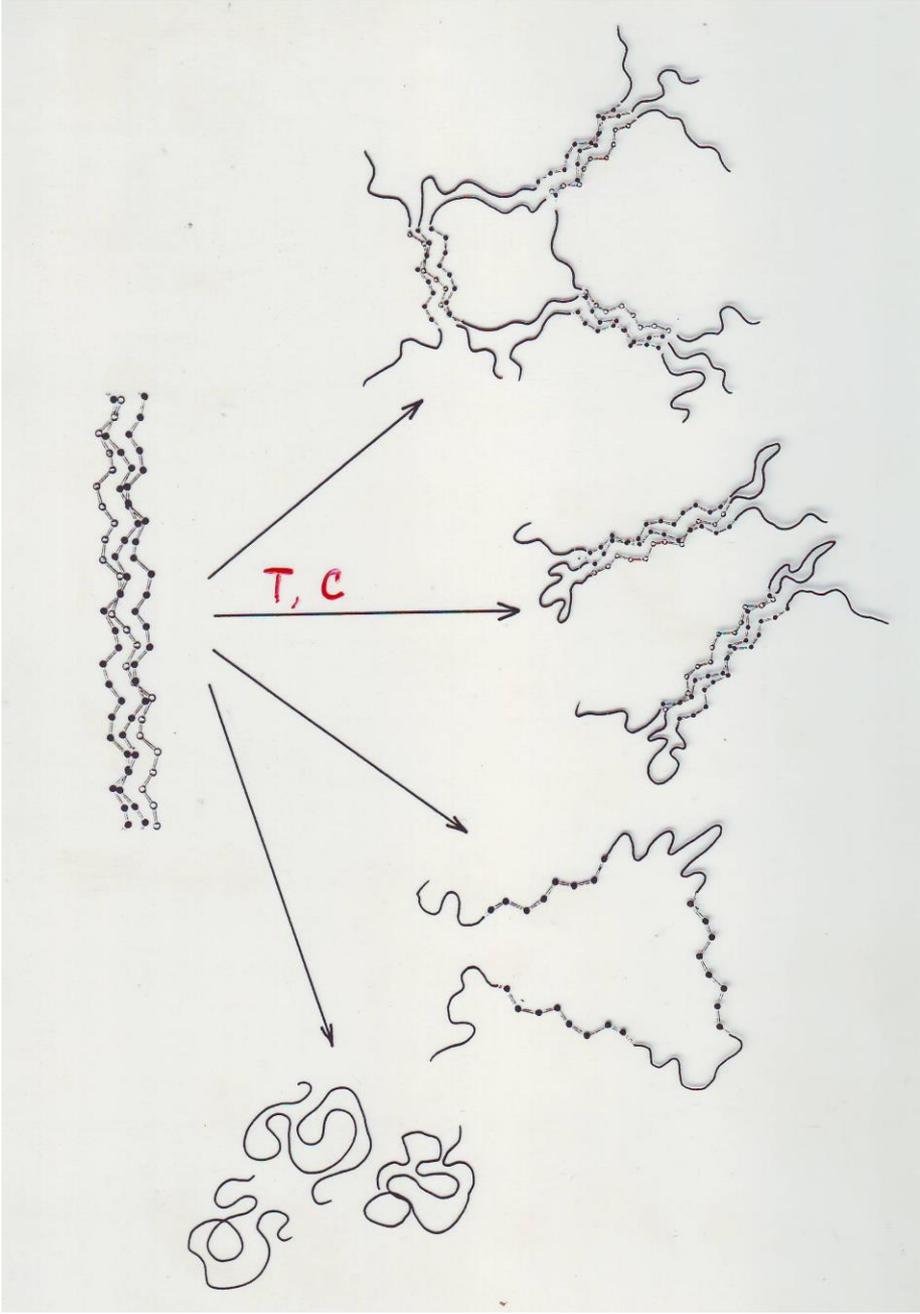
0.82

0.95

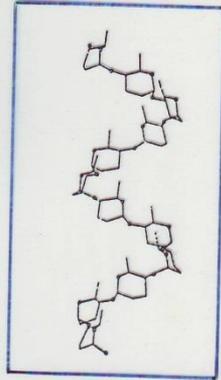
0.95

0.93

0.95

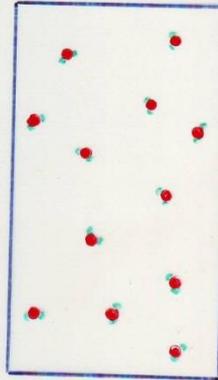


Solido
polimerico

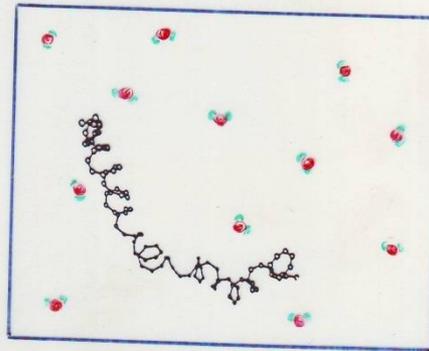


+

Solvente



$$\Delta G^{\text{mix}} = \Delta H^{\text{mix}} - T\Delta S^{\text{mix}} < 0$$



Soluzione

Dissoluzione di un polimero

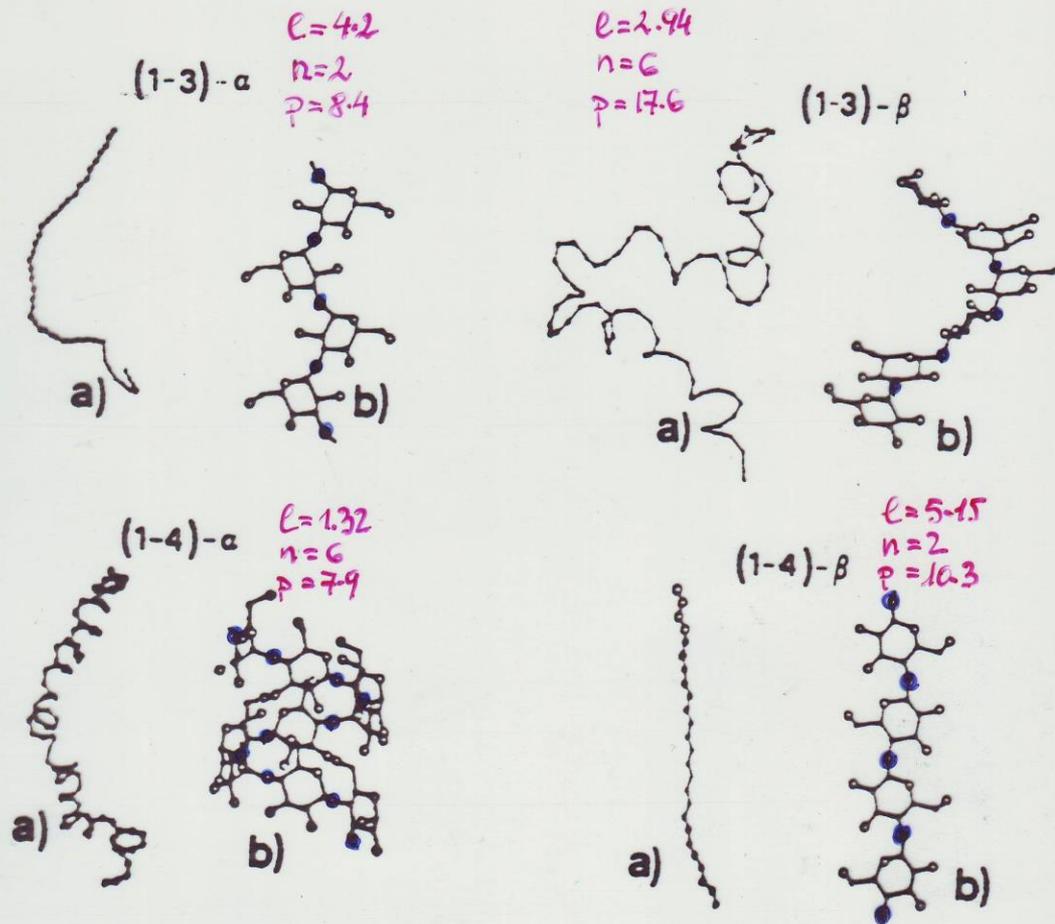
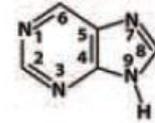


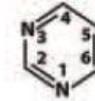
Fig. 2—(a) Schematic representation of the random chain conformations of homoglucans as obtained from Monte Carlo calculations and (b) Schematic representation of the helical ordered structures (enlarged) as deduced from X-ray fiber diffraction studies

STRUTTURA SECONDARIA DNA/RNA





Purine



Pyrimidine

Table 3-1 Names and Abbreviations of Nucleic Acid Bases, Nucleosides, and Nucleotides

Base Formula	Base (X = H)	Nucleoside (X = ribose ^a)	Nucleotide ^b (X = ribose phosphate ^a)
	Adenine Ade A	Adenosine Ado A	Adenylic acid Adenosine monophosphate AMP
	Guanine Gua G	Guanosine Guo G	Guanylic acid Guanosine monophosphate GMP
	Cytosine Cyt C	Cytidine Cyd C	Cytidylic acid Cytidine monophosphate CMP
	Uracil Ura U	Uridine Urd U	Uridylic acid Uridine monophosphate UMP
	Thymine Thy T	Deoxythymidine dThd dT	Deoxythymidylic acid Deoxythymidine monophosphate dTMP

Chargaff 1950:

$A+G/T+C= 1$
 $A=T; A/T=1$
 $G=C; G/C=1$



Erwin Chargaff
1905-2002

Per primo misurò accuratamente la percentuale dei quattro nucleotidi nel DNA

Prima di conoscere la struttura tridimensionale degli acidi nucleici erano note le regole di Chargaff:

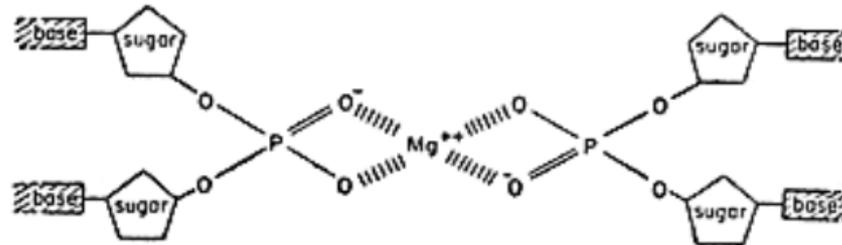
La composizione in basi del DNA varia in generale da una specie all'altra

la frazione molare di A è uguale a quella di T

la frazione molare di G è uguale a quella di C

$$\chi_A = \chi_T \quad \chi_G = \chi_C$$

Il primo modello di Watson e Crick fu un modello a tripla elica con le basi all' esterno della molecola.



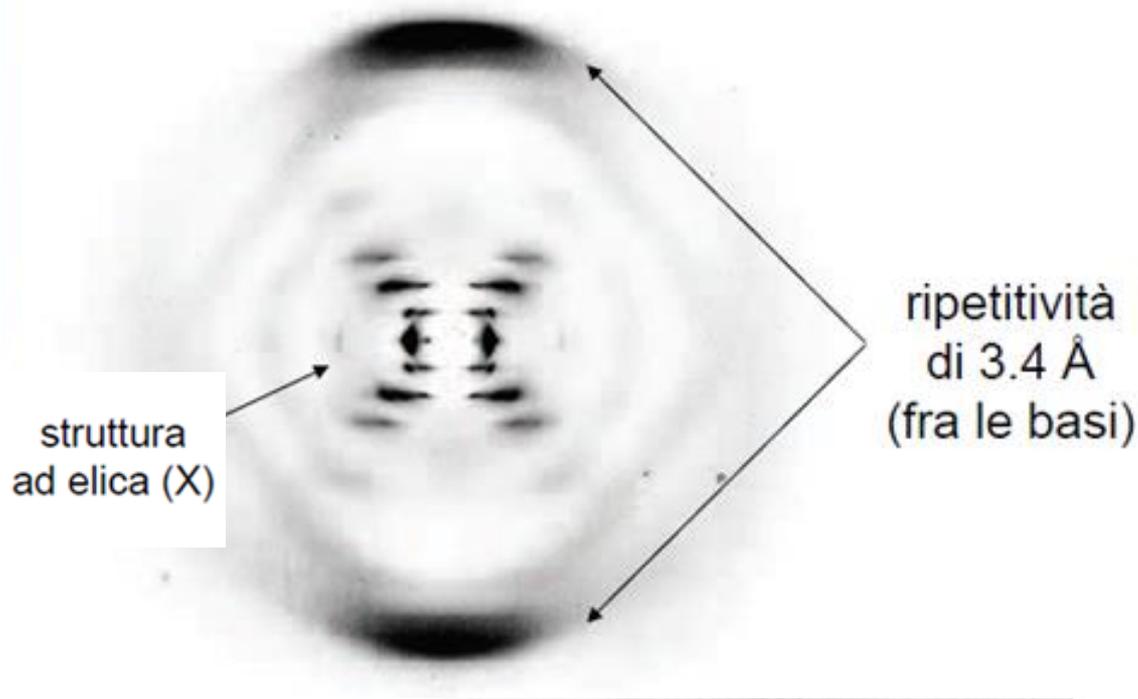
Il modello fu aspramente criticato da R Franklin: gli ioni magnesio se presenti sarebbero legati da molecole di H_2O .

ROSALIND FRANKLIN

1920-1958



*Rosalind
mise a punto una tecnica innovativa che
utilizzava i raggi X per fotografare i
costituenti di tutti i materiali viventi e non
viventi.*



*Il dispositivo consisteva in
una microcamera capace di
produrre fotografie ad alta
definizione dei singoli
filamenti del DNA. La
Franklin riuscì dunque a
fare la prima fotografia
dello scheletro del Dna...*

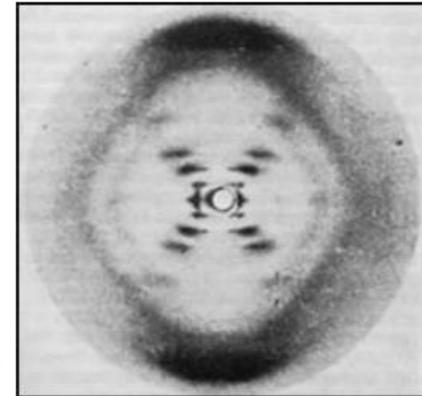


Rosalind Franklin 1920-58

Franklin's X-ray crystallographic images of DNA enabled Watson to deduce that DNA was helical

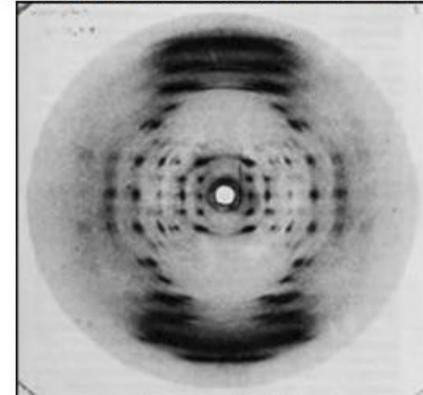
E' possibile indurre la transizione da una conformazione di DNA ad un'altra variando le condizioni ambientali.

Alta umidità (fibre idratate): B DNA



Franklin's X-ray photograph shows DNA's 'B'-form (1952)

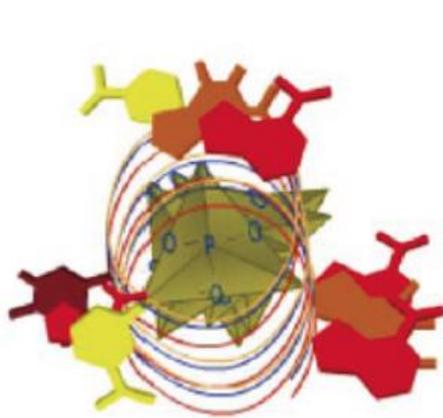
Bassa umidità: A DNA



An X-ray photograph of DNA's 'A'-form

Il modello a tripla elica di Pauling

Nel 1953 Linus Pauling annunciò di avere scoperto la struttura del DNA, presentando in un lavoro un modello a tripla elica con i gruppi fosfati all'interno.

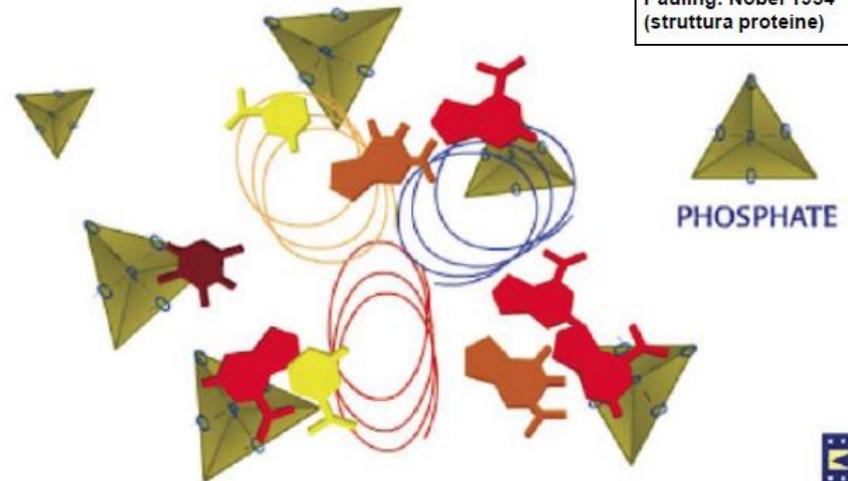


Linus Pauling
(1901 - 1994)

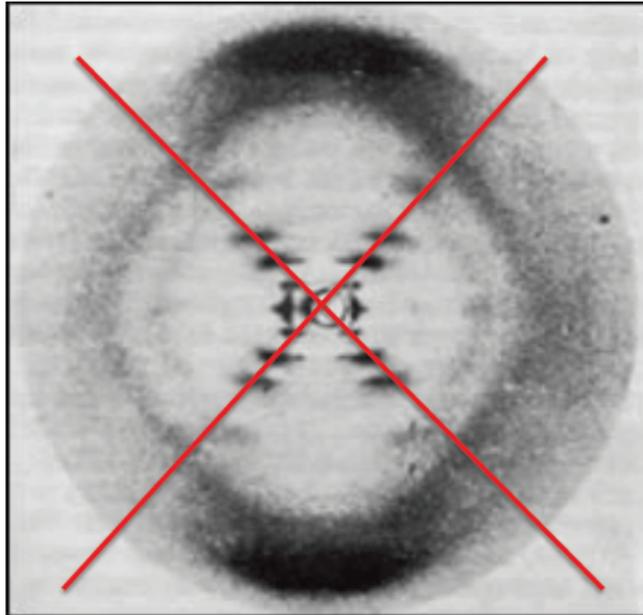


Pauling: Nobel 1954
(struttura proteine)

Incredibilmente lo scienziato che ha scritto un libro sulla natura del legame chimico non ha considerato che le forze repulsive generate dalle cariche negative dei gruppi fosfati avrebbero fatto collassare la struttura.

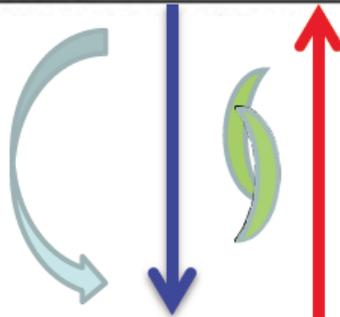


Watson e Crick si resero conto dell'errore di Pauling



La X dell'immagine di diffrazione dimostra un profilo ad elica con un diametro costante per tutta la sua lunghezza

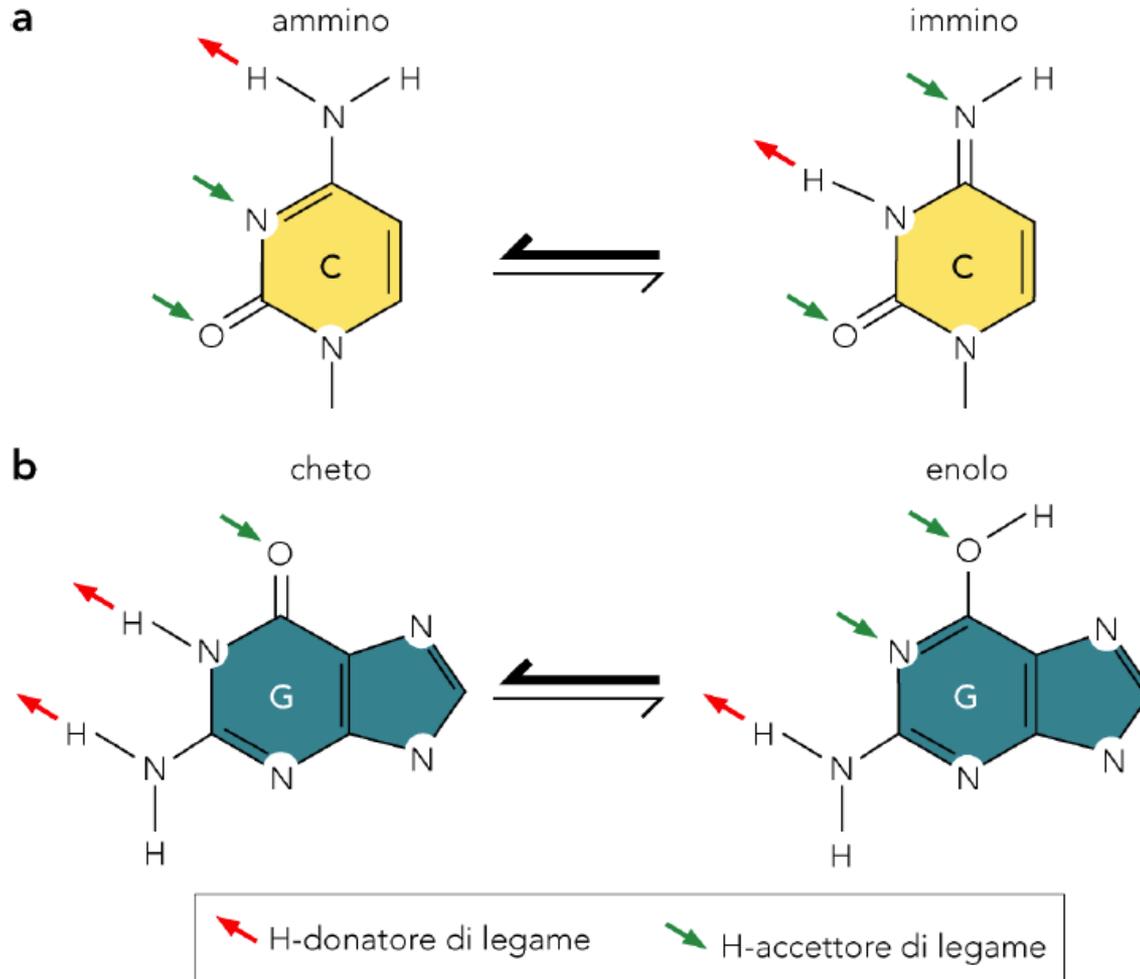
Rotazione di 180°

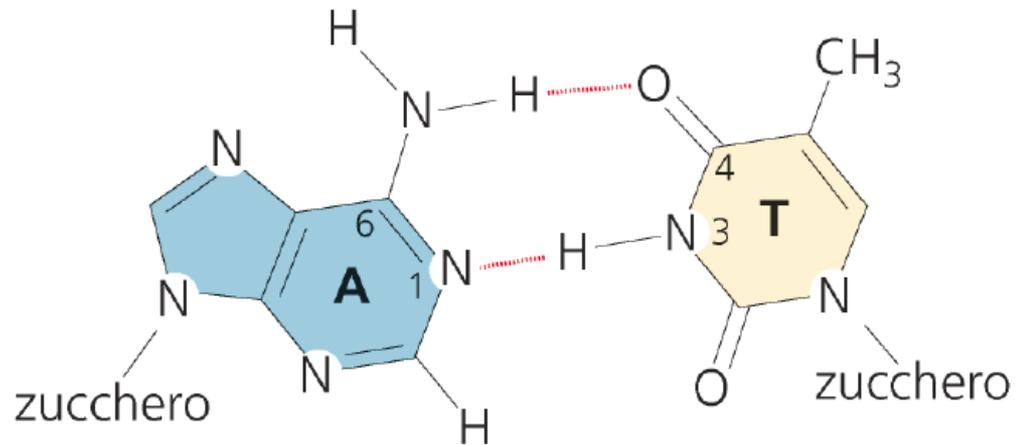
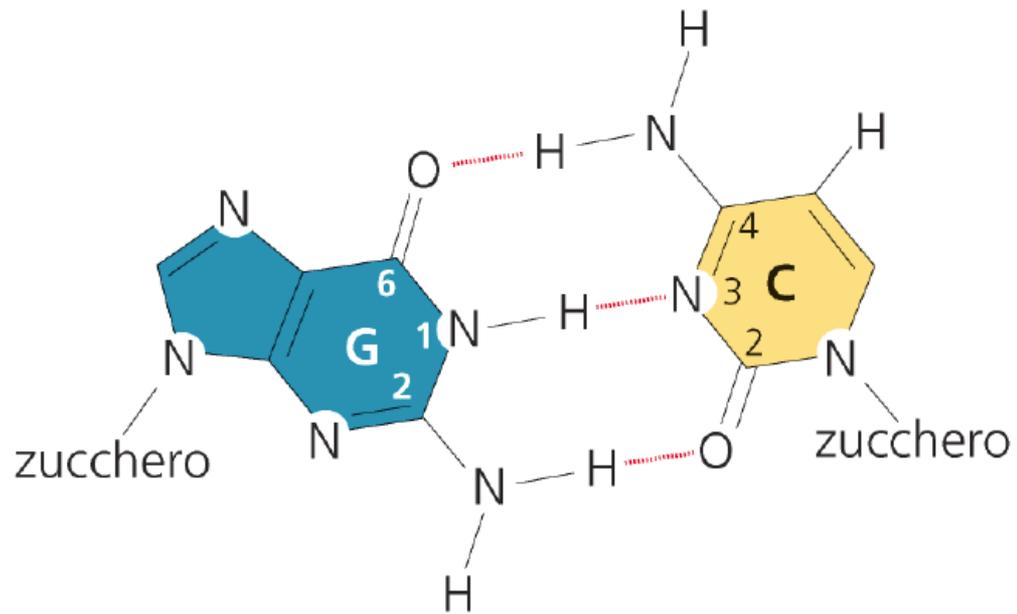


La distribuzione ad X indica una simmetria rotazionale doppia, quindi i due filamenti sono antiparalleli

La fotografia della Franklin, disegnata da Watson, fu utilizzata da Crick per calcolare alcuni parametri dell'elica.

CONFORMAZIONI TAUTOMERICHE DELLE BASI



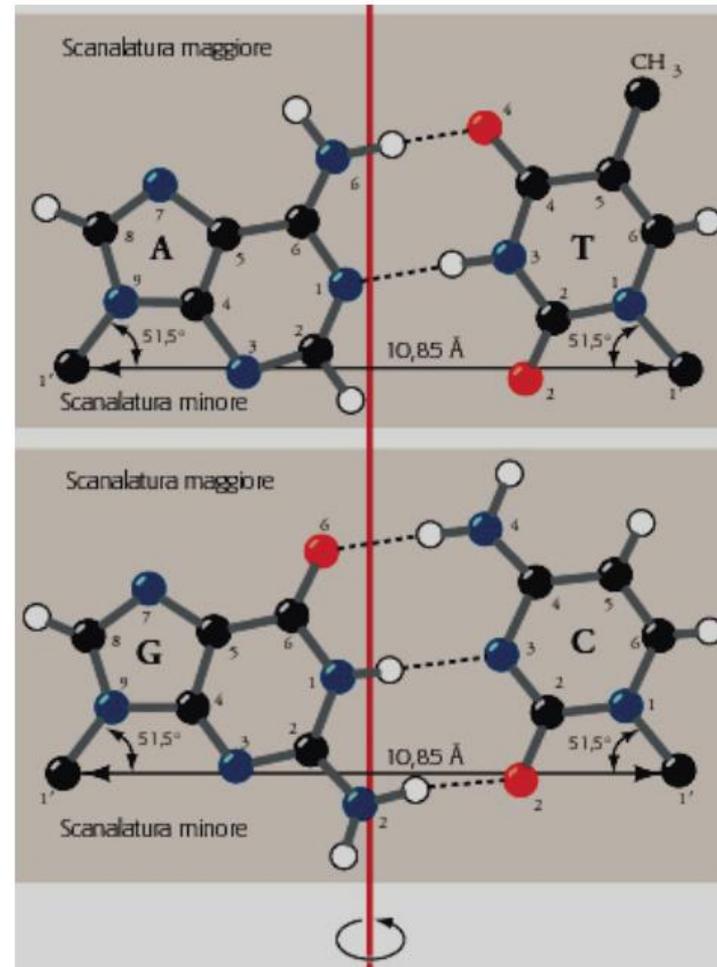


ISOMORFISMO GEOMETRICO DELLE COPPIE DI BASI

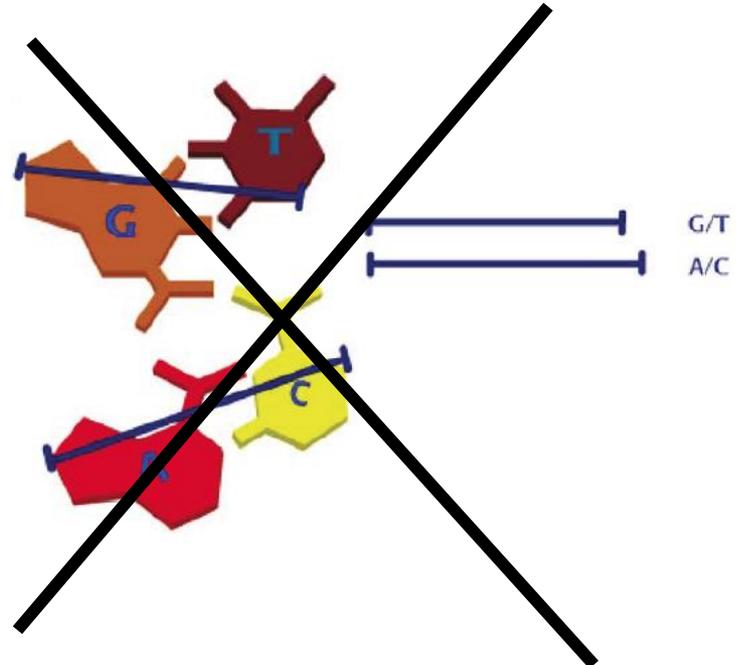
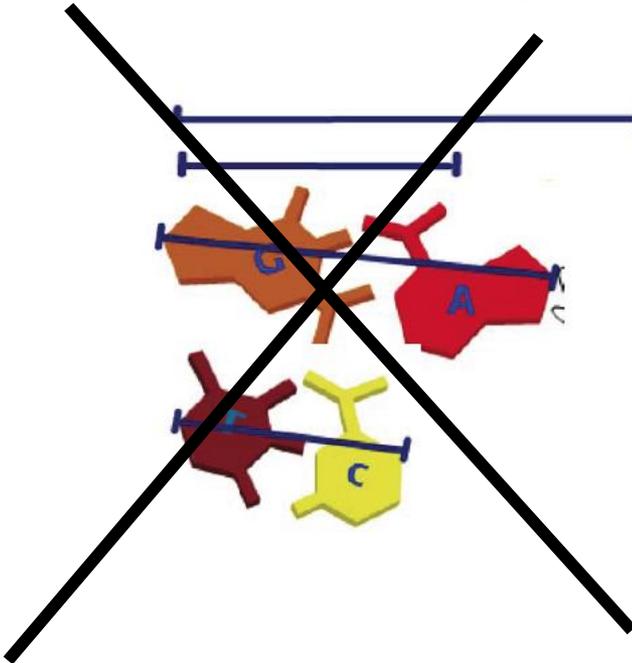
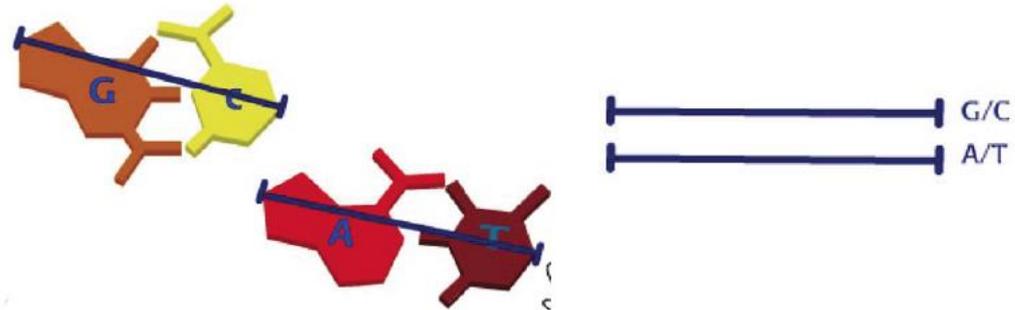
Lo spessore costante della doppia elica di DNA dipende dal fatto che le coppie di basi complementari W-C, hanno forma e dimensione molto simili (sono isomorfe).

Hanno valori quasi identici di :

- ampiezza
- distanza tra i C1'
- angoli dei legami C1'-N1.



Delle 28 possibili interazioni tra le basi azotate, quelle W-C tra basi complementari formano delle coppie della stessa ampiezza



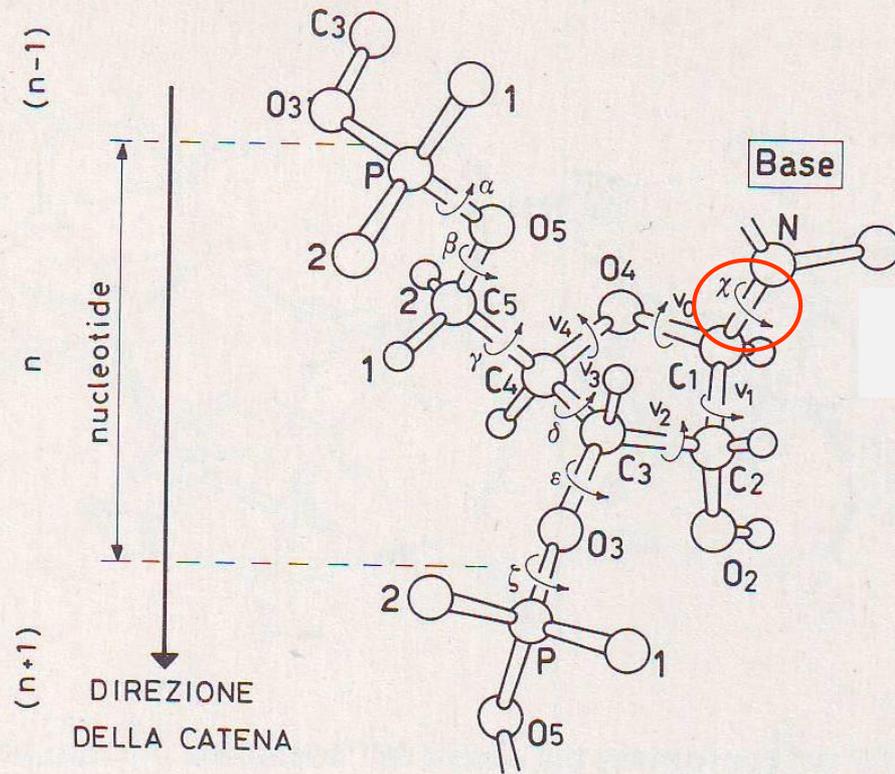
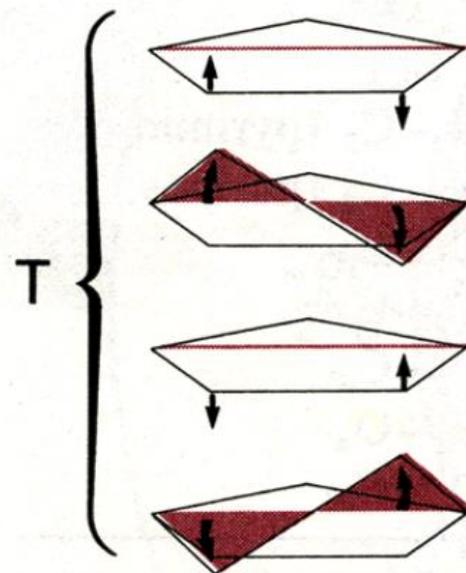
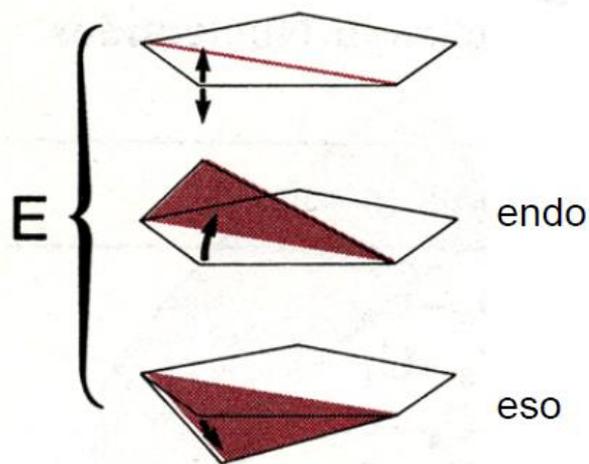


Fig. 3.4.2 - Rappresentazione degli angoli torsionali della catena polinucleotidica.

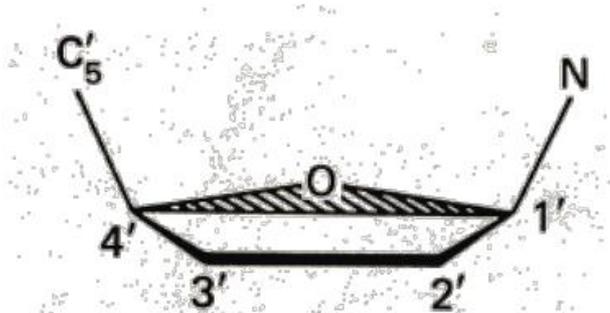
PUCKERING DEL FURANOSIO

Lo zucchero non ha una struttura planare per la presenza di sostituenti.
Per evitare interazioni non covalenti tra i sostituenti, il furanosio adotta una conformazione increspata.

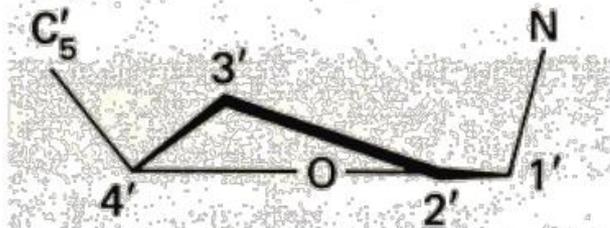
1. Envelope (E): Quattro dei cinque atomi sono coplanari e uno devia giacendo o sopra il piano (endo) o sotto il piano (eso).
2. Twist (T): Tre atomi sono coplanari e gli altri due giacciono su facce opposte del piano



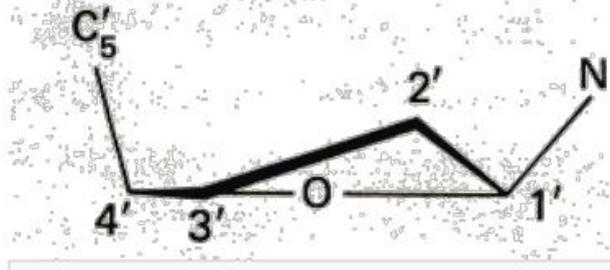
DEFINIZIONE DEL PUCKERING DEL FURANOSIO



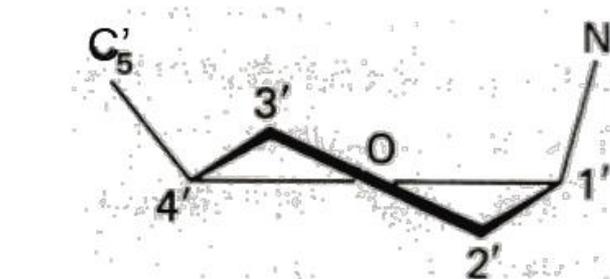
Coplanare, energeticamente sfavorita



Envelope: C3' endo

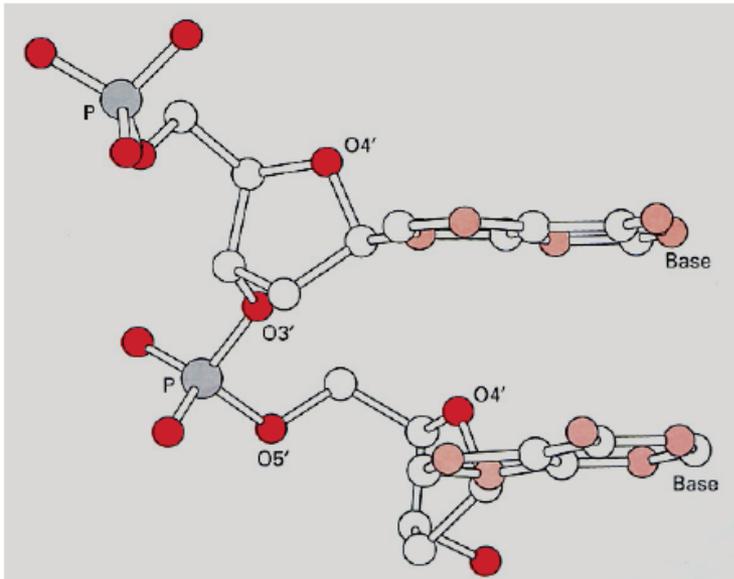


Envelope: C2' endo



Twist $\begin{matrix} 3 \\ 2 \end{matrix} T$: C3'-endo / C2'-eso

I due atomi sono increspanti della stessa entità:
TWIST SIMMETRICO

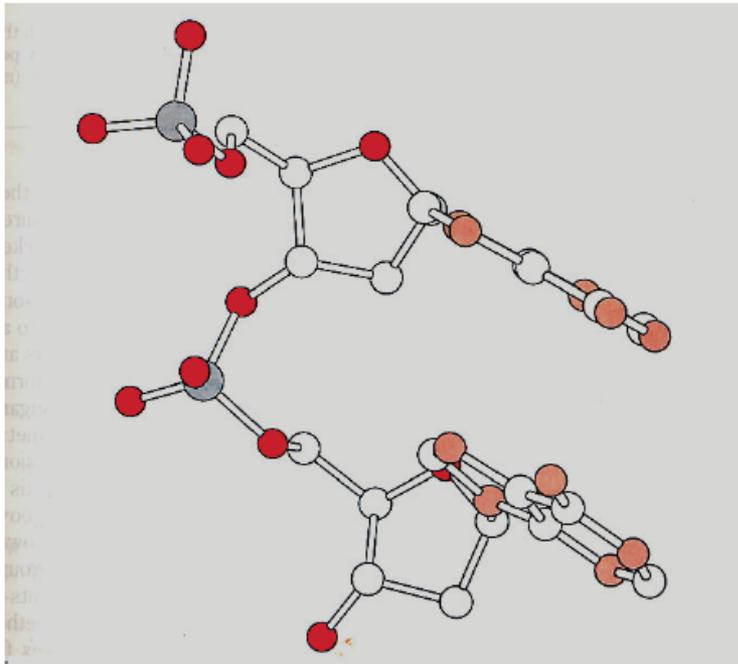


Conformazione di due basi successive in un elica di DNA B.

Deossiribosio in C 2' endo;

χ in high anti ($-60^\circ/-110^\circ$)

Basi perpendicolari all'asse dell'elica



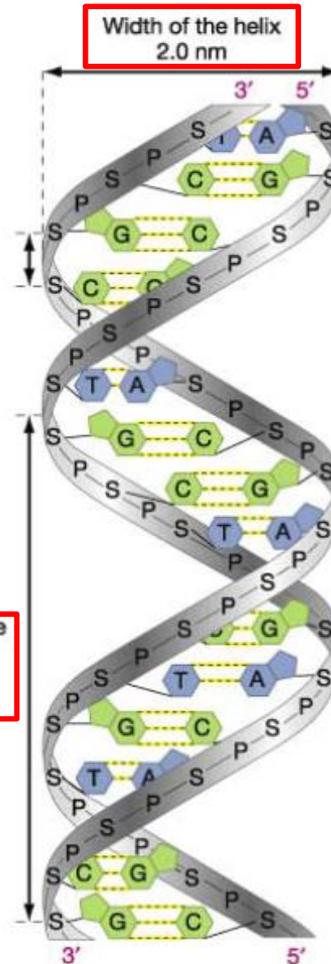
Conformazione di due basi successive in un elica di DNA A.

Deossiribosio in C 3' endo;

χ in anti ($-110^\circ/-180^\circ$)

Conseguentemente le basi sono inclinate

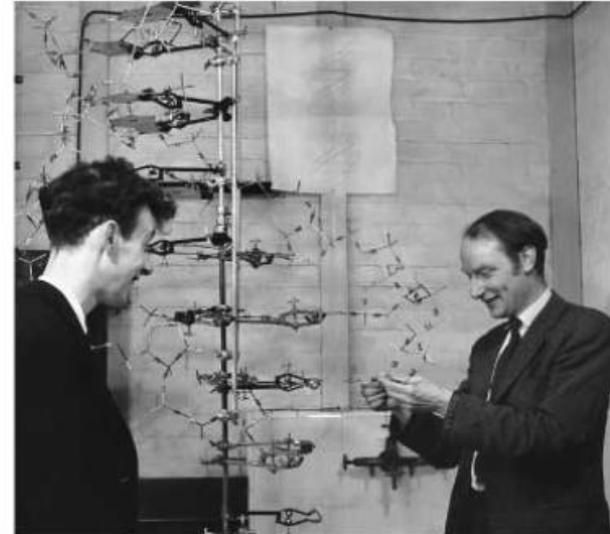
Watson and Crick 1953: Il modello



$$N = p/h = 3.4/0.33 = 10.4 \text{ b per giro}$$

Passo dell'elica:

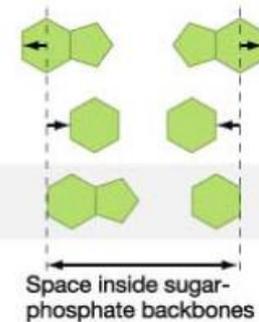
Length of one complete turn of helix
3.4 nm



Purine-purine pair
TOO WIDE

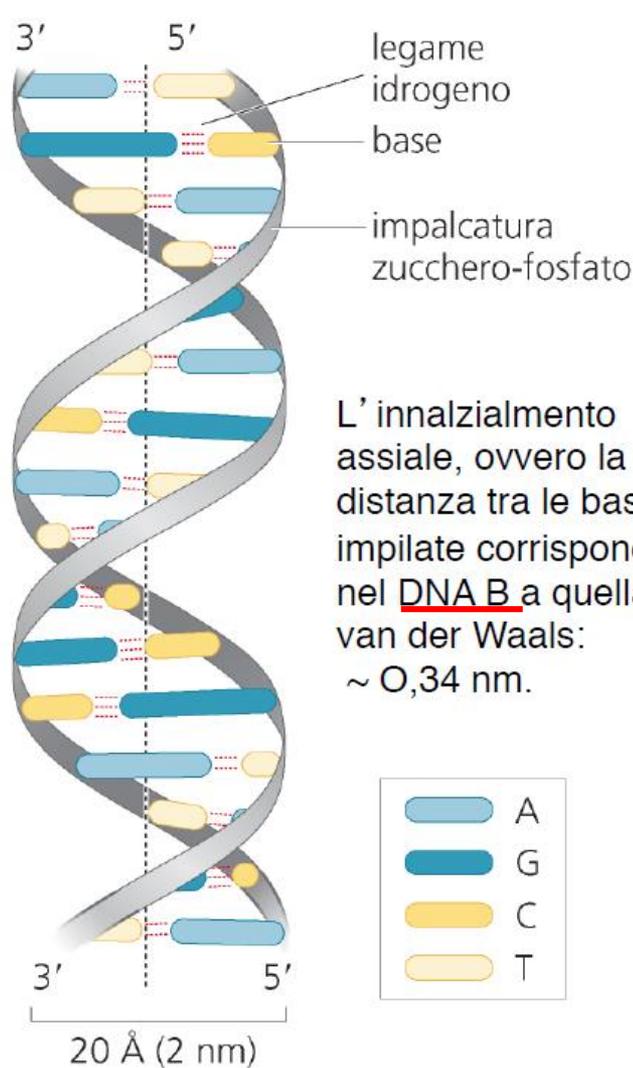
Pyrimidine-pyrimidine pair
TOO NARROW

Purine-pyrimidine pair
JUST RIGHT

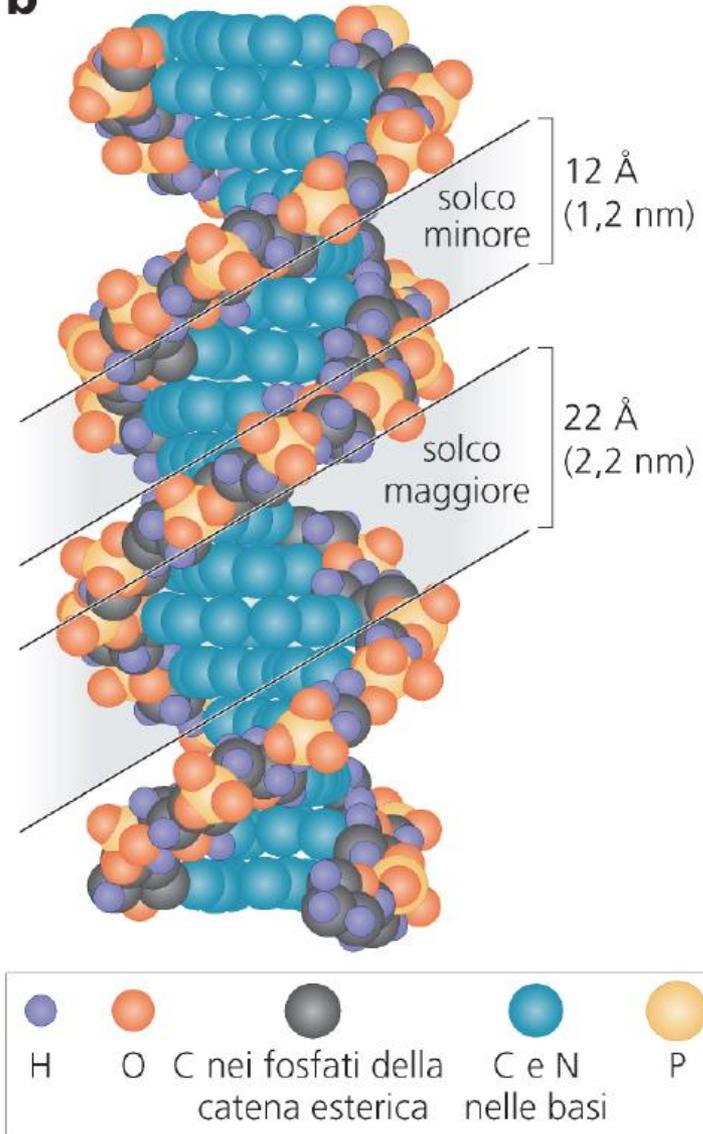


Passo dell'elica

1 giro d'elica = $34 \text{ \AA} \approx 10,5$ coppie di basi



b



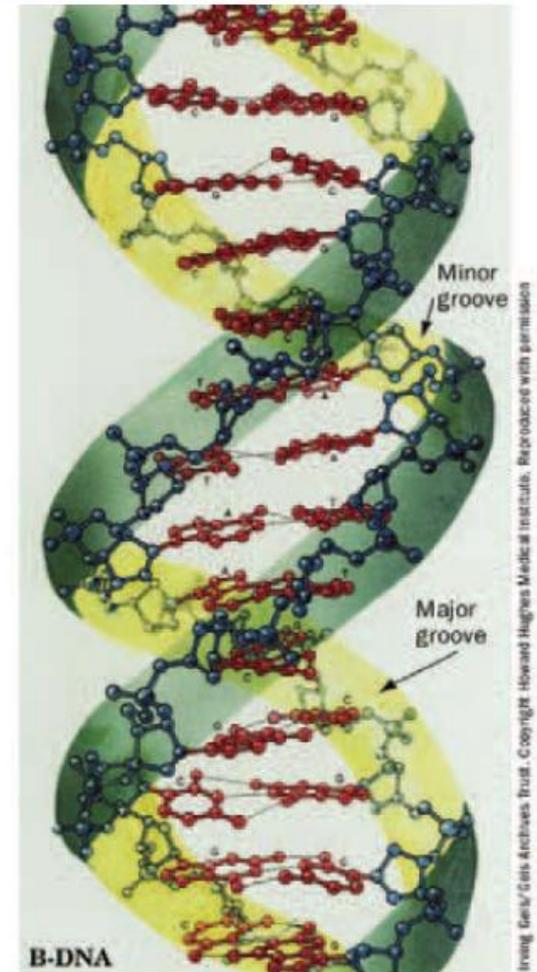
$3.4 / 0.33 = 10.4$ coppie di basi/spira

...riassumendo:

Struttura DNA

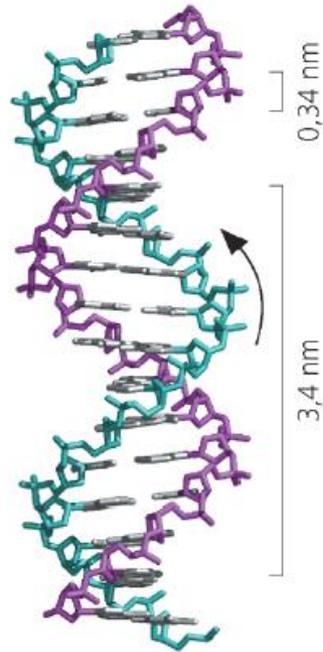
Struttura del DNA B

- doppia elica (catene antiparallele destrorse)
 - 2 scanalature: scanalatura maggiore e minore
 - scheletro covalente di unità ribosio e gruppi fosforici
 - gruppi fosforici all'esterno (repulsione elettrostatica minimizzata)
 - basi nella parte interna dell'elica
 - coppie di basi planari (da catene opposte) legate da legami a H ($A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$) e $\sim \perp$ all'asse dell'elica
- ⇒ **appaiamento complementare delle basi**

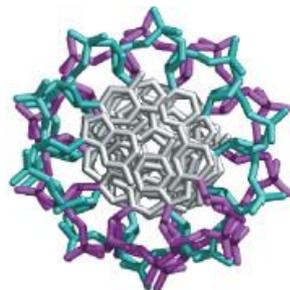


Il DNA ha una struttura dinamica che gli consente di assumere diverse conformazioni.

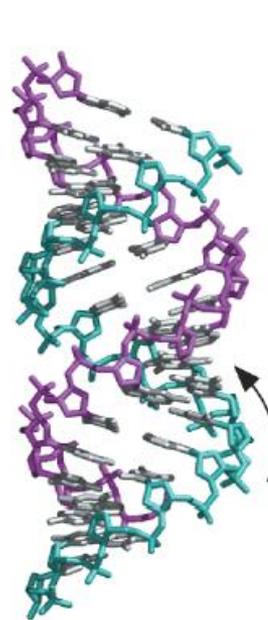
a DNA B



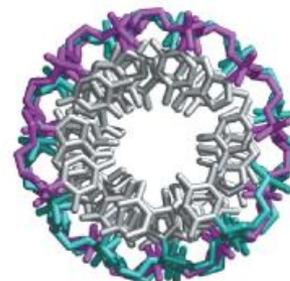
d=2 nm



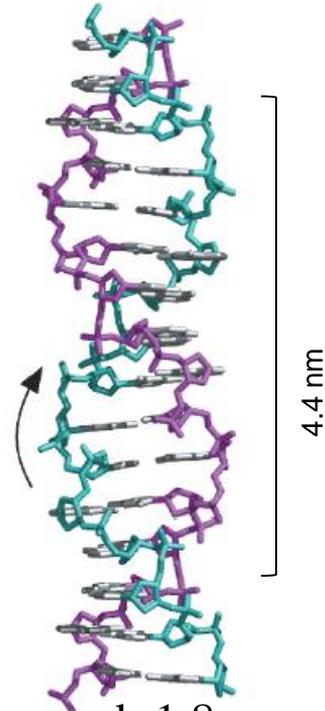
b DNA A



d=2.6 nm



c DNA Z



d=1.8 nm

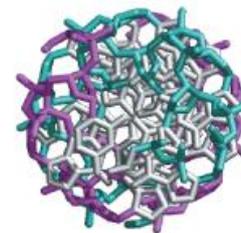


TABELLA RIASSUNTIVA

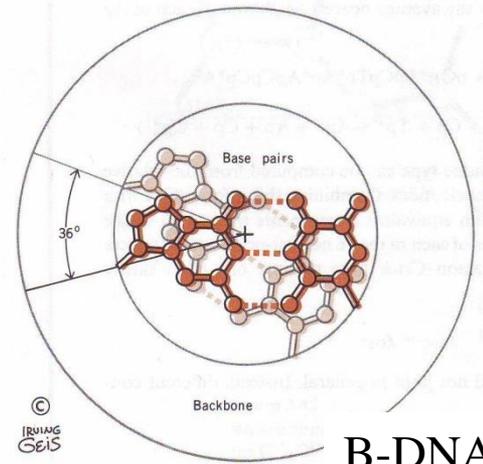
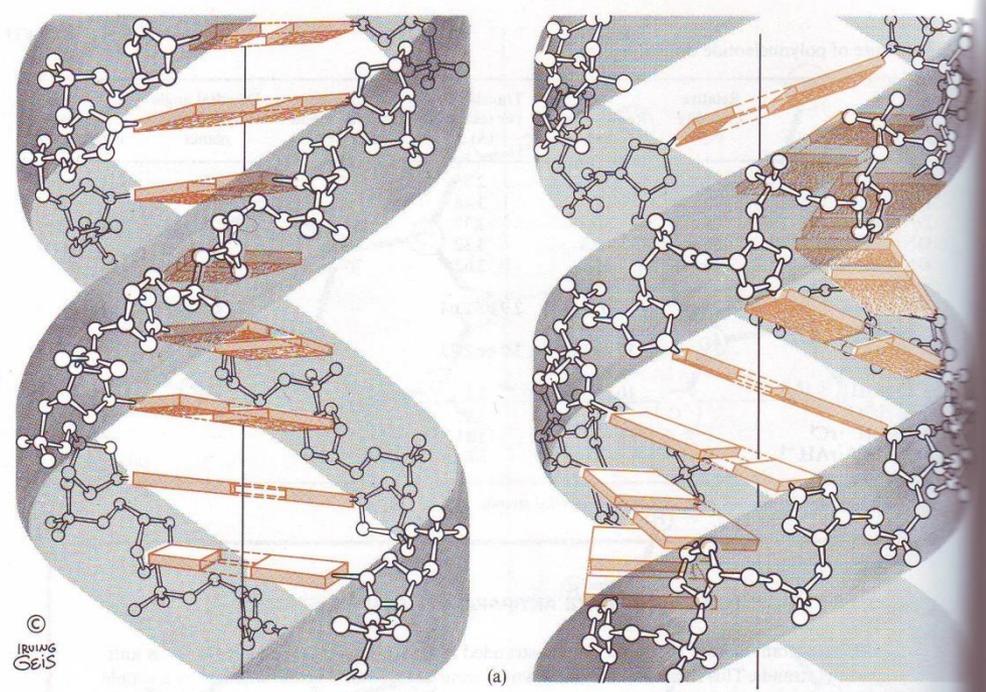
Confronto fra le forme A, B e Z

Caratteristiche generali comuni:

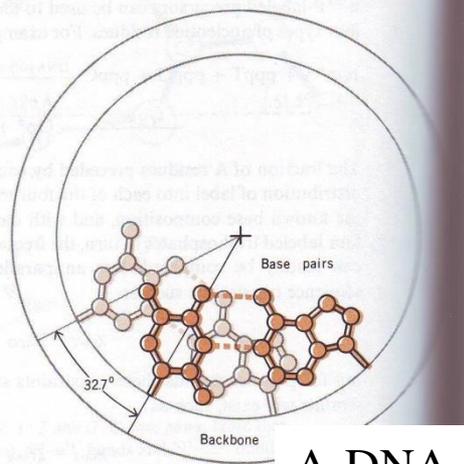
1. Le due catene sono antiparallele
2. L'appaiamento delle basi è a geometria Watson-Crick

	Forma A	Forma B	Forma Z
Senso dell'elica	Destrorsa	Destrorsa	Sinistrorsa
Diametro	26 Å	20 Å	18 Å
Coppie basi/giro	11	10.5	12
Distanza fra le basi	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Piegamento basi rispetto alla normale all'asse	20°	6°	7°
Solco maggiore	stretto, profondo	largo, medio	assente
Solco minore	largo, poco prof.	stretto, medio	stretto, profondo
Conformazione	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (Pyr)
Conformazione legame N-glicosidico	Anti	Anti	Syn (Pur) Anti (Pyr)

Struttura di Watson-Crick

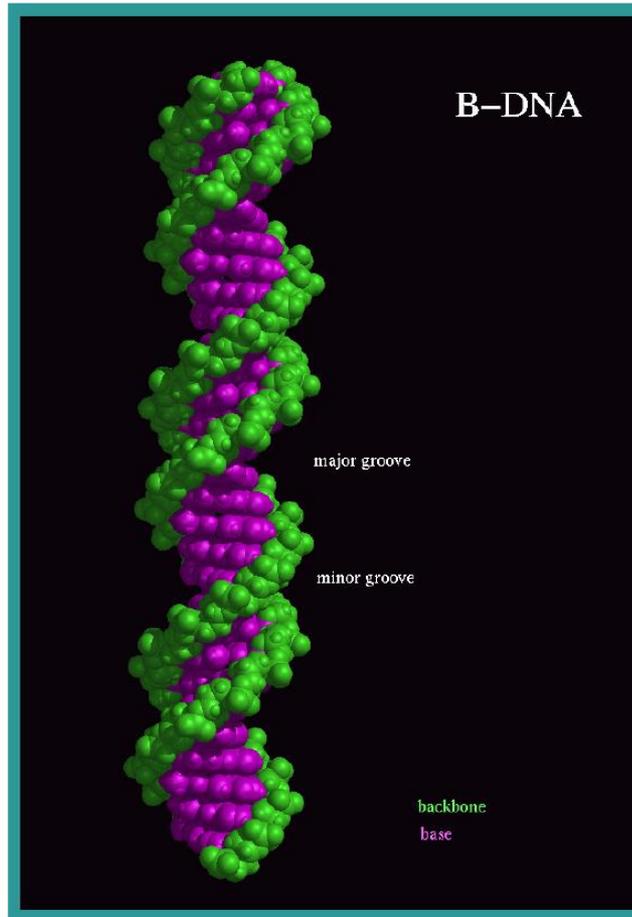
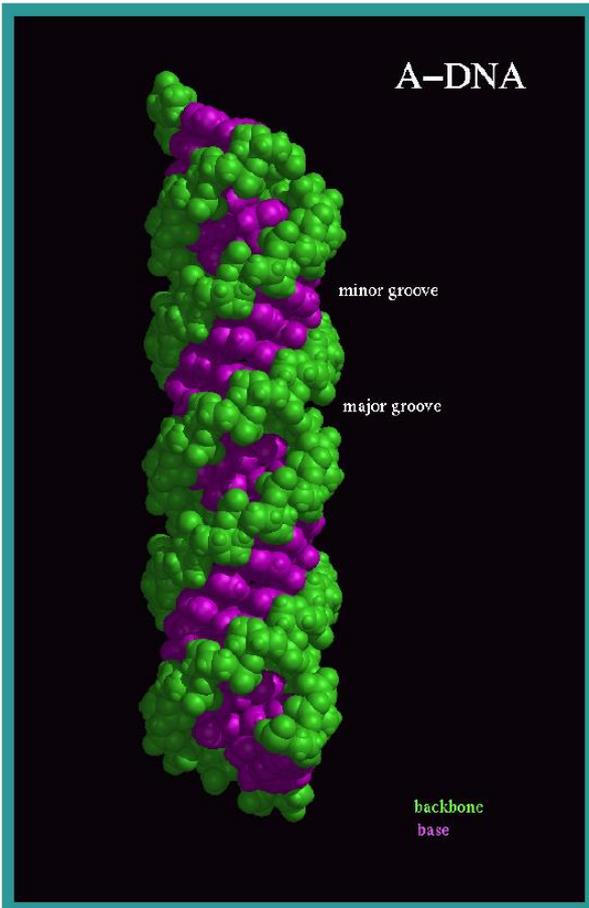


B-DNA



A-DNA

	Forma A	Forma B
Senso dell'elica	Destrorsa	Destrorsa
Diametro	26 Å	20 Å
Coppie basi/giro	11	10.5
Distanza fra le basi	2.6 Å	3.4 Å
Piegamento basi rispetto alla normale all'asse	20°	6°

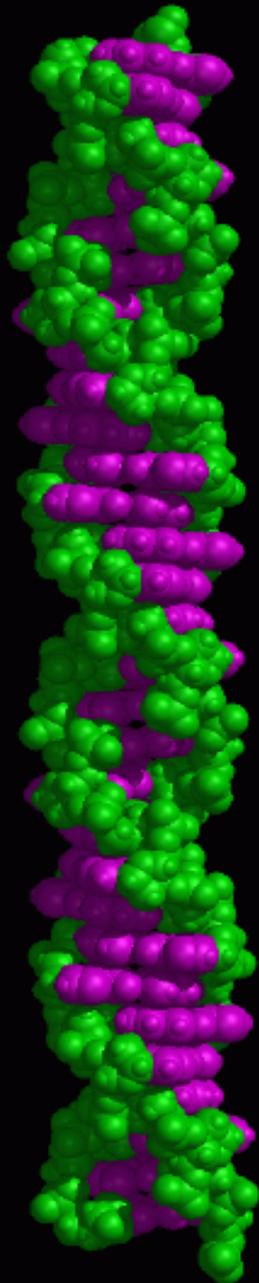


Struttura del DNA Z

DNA Z

- polinucleotidi complementari che alternano purine a pirimidine ad alta concentrazione di sali assumono conformazione Z
es: poli d(GC) • poli d(GC), poli d(AC) • poli d(GT)
- **elica sinistrorsa**, passo dell'elica 44 Å, diametro ~18 Å, d-basi **7.4 Å**, nucl/giro 12
- stretta e profonda scanalatura minore
- il sale stabilizza la struttura Z riducendo la repulsione elettrostatica fra i gruppi fosfati dei filamenti opposti (nell'elica Z sono più vicini rispetto all'elica B: 8 Å vs 12 Å)

Z-DNA

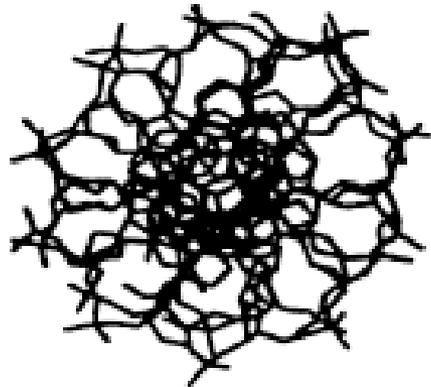


backbone

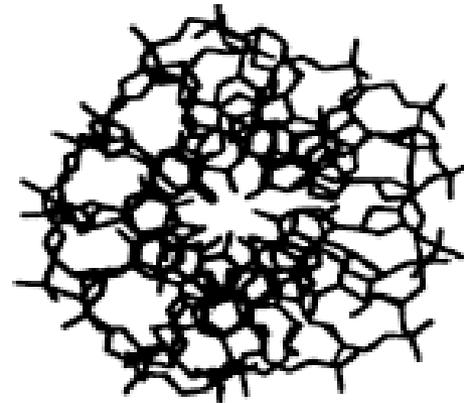
bases

- particolare sequenza di purine e pirimidine
- elica localmente sinistrorsa
andamento a zig-zag (da cui il nome)
- i due solchi, maggiore e minore, dell'elica B sono qui sostituiti da un singolo (profondo) solco minore

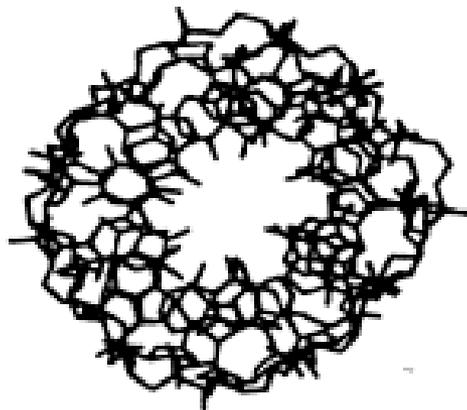
La transizione tra forma A e B del DNA avviene nella scala dei tempi dei nanosecondi.



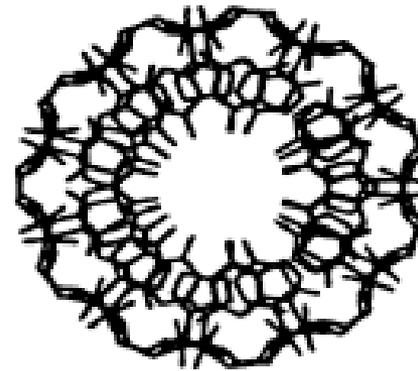
B-DNA (0 ns)



0.5 ns



2.0 ns



A-DNA (teorico)

RIASSUMENDO:

Stabilizzano la doppia elica:

- **Legami idrogeno;**
- **Interazioni di impilamento-stacking- legami deboli che stabilizzano l'elica: orbitali pi greco delle basi (mantengono minimo il contatto con l'acqua);**
- **Interazioni idrofobiche interne;**
- **Forze di Van der Waals.**

Destabilizzano la doppia elica:

Le interazioni elettrostatiche dovute principalmente ai gruppi fosfato carichi negativamente che modificano le interazioni intra- ed intercatena.

Ioni carichi positivamente, proteine e poliammine possono neutralizzare la repulsione mutua delle cariche negative e contribuire alla stabilità della doppia elica.

...un calcolo interessante:

Se lo spessore medio delle basi è 3.4 \AA
e il DNA umano è di $3 \times 10^9 \text{ bp}$

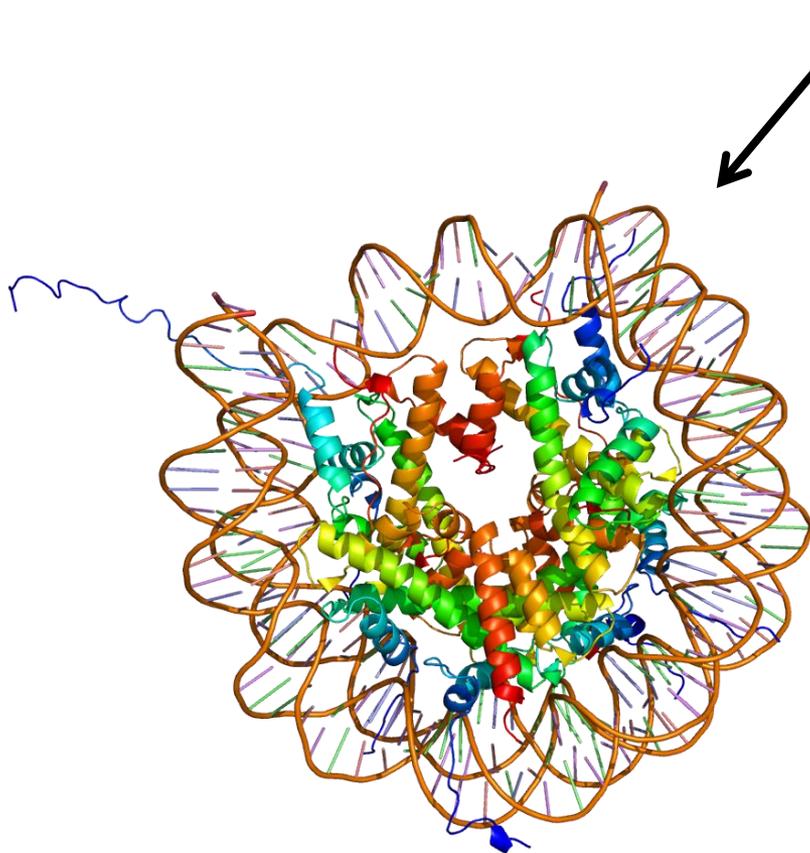
La lunghezza media di una doppia elica sarà:

$$L = 3 \times 10^9 \text{ bp} \times 0.34 \text{ (m=nm} \times 10^{-9} \text{)} = 1.02 \text{ m !!!}$$

La domanda ovvia a questo punto è:

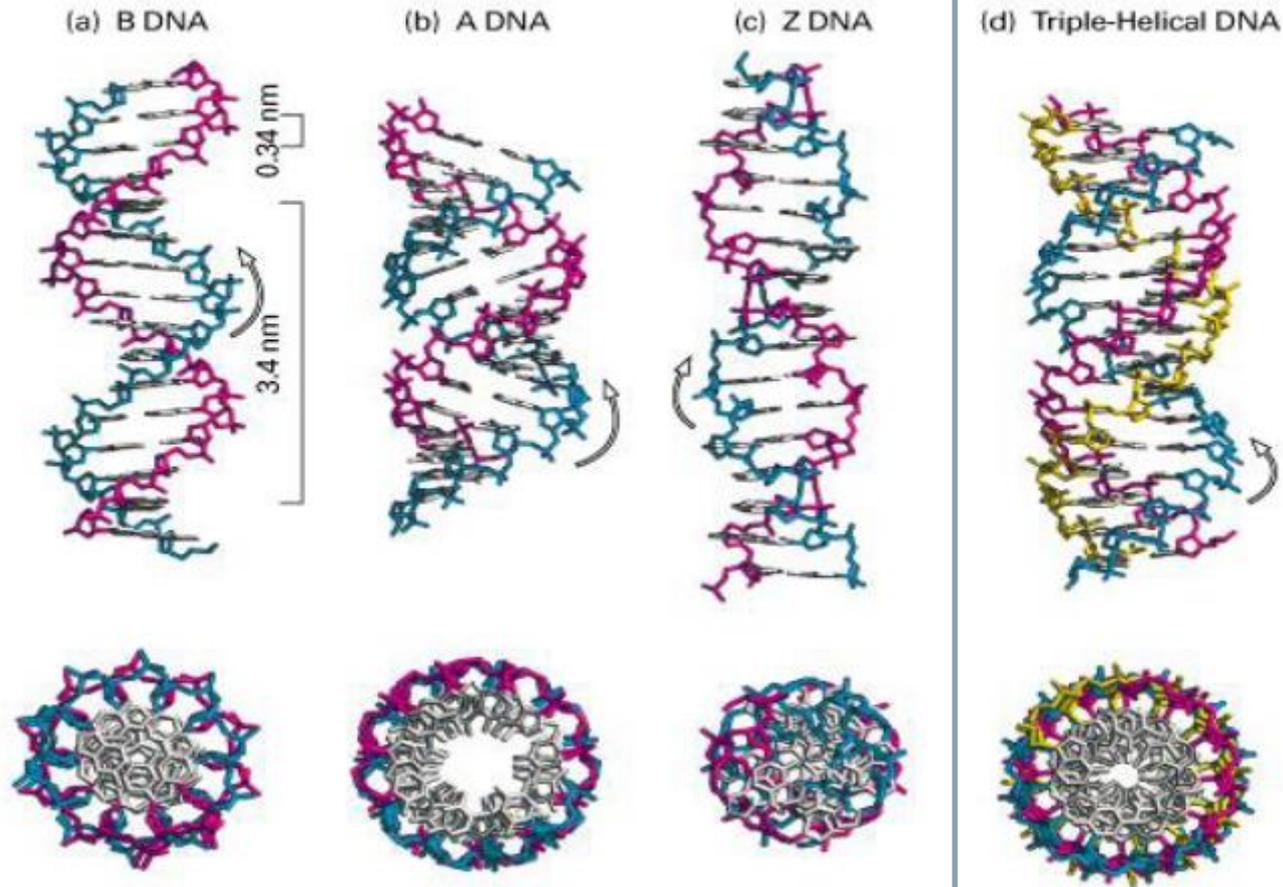
ma come può starci 1 metro di DNA all'interno del nucleo cellulare, le cui dimensioni sono di circa 6-8 μm ?

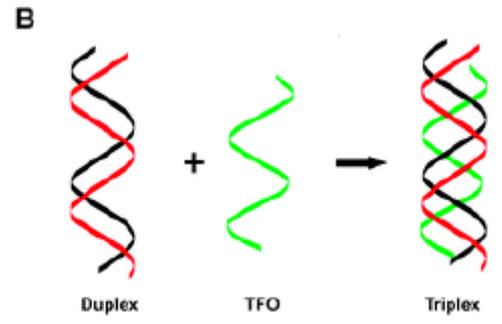
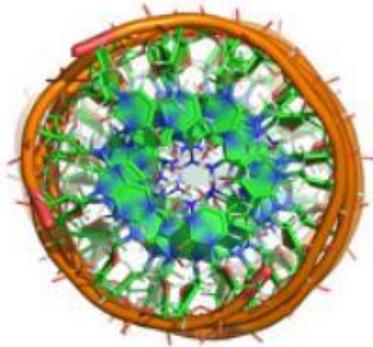
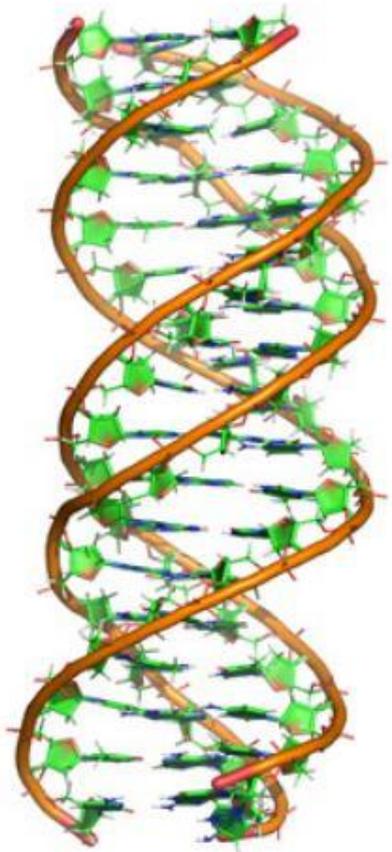
La risposta è che il DNA, il cui spessore è comunque di circa 2 nm, è impacchettato e **superavvolto** su strutture proteiche particolari (basiche) denominate **istoni**, formando i **nucleosomi (11 nm)**.



Questi istoni, presenti in tutte le cellule eucariotiche, hanno la caratteristica di essere proteine basiche, quindi con parziale carica positiva, il che permette un naturale avvolgimento su di esse del DNA

DNA forms

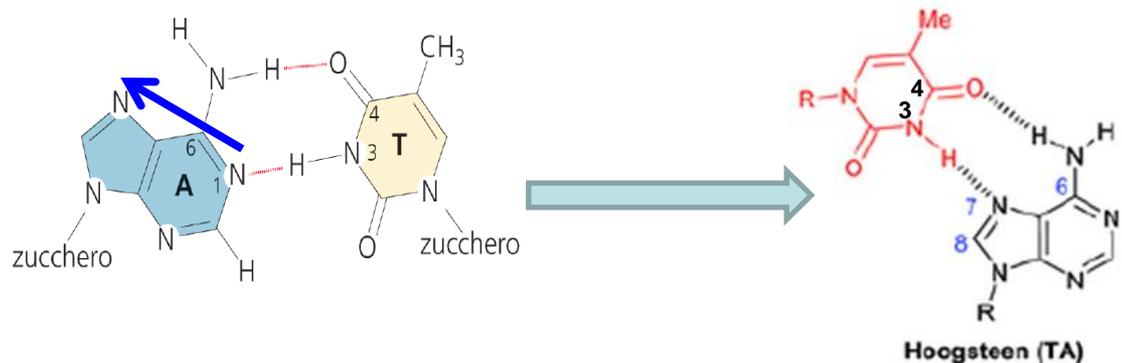




Le tre forme di DNA A, B e Z sono dette duplex, in quanto coinvolgono due filamenti nucleotidici. Sono state osservate però strutture **di tipo triplex e quadruplex**, nelle quali rispettivamente tre e quattro tratti deossiribosio-fosfodiesteri (strands) interagiscono tra loro. **Alla base di queste vi è la formazione di legami ad idrogeno diversi rispetto al caso del DNA duplex**, in particolare con i gruppi funzionali localizzati nel solco maggiore delle strutture a due filamenti. Queste interazioni deboli, non previste nel modello di Watson e Crick, sono note col nome di **appaiamenti di Hoogsteen**, descritti per la prima volta nel 1963.

L'**appaiamento di Hoogsteen** per A-T prevede la base purinica ribaltata con l'-NH₂ in posizione 6 e l'N in posizione 7 dell'adenina che formano legami idrogeno rispettivamente con l'O in posizione 4 e l'H in posizione 1 della timina. (L'N-7 dell'adenina diventa accettore e l'NH₂ – 6 donatore per la formazione del legame idrogeno, portando così ad una struttura contorta con disposizione non lineare). Allo stesso modo, il ribaltamento si può verificare anche per G–C. In questa coppia di basi l'appaiamento di Hoogsteen prevede l'O in posizione 6 e l'N in posizione 7 della guanina a formare dei legami idrogeno rispettivamente con l'-NH₂ in posizione 4 e l'N protonato in posizione 1 della citosina.

Inoltre, mentre nella coppia di basi Watson–Crick il legame glicosidico di entrambi i nucleotidi ha la conformazione anti, nella coppia di basi Hoogsteen il legame glicosidico del nucleotide purinico ha la conformazione sin.



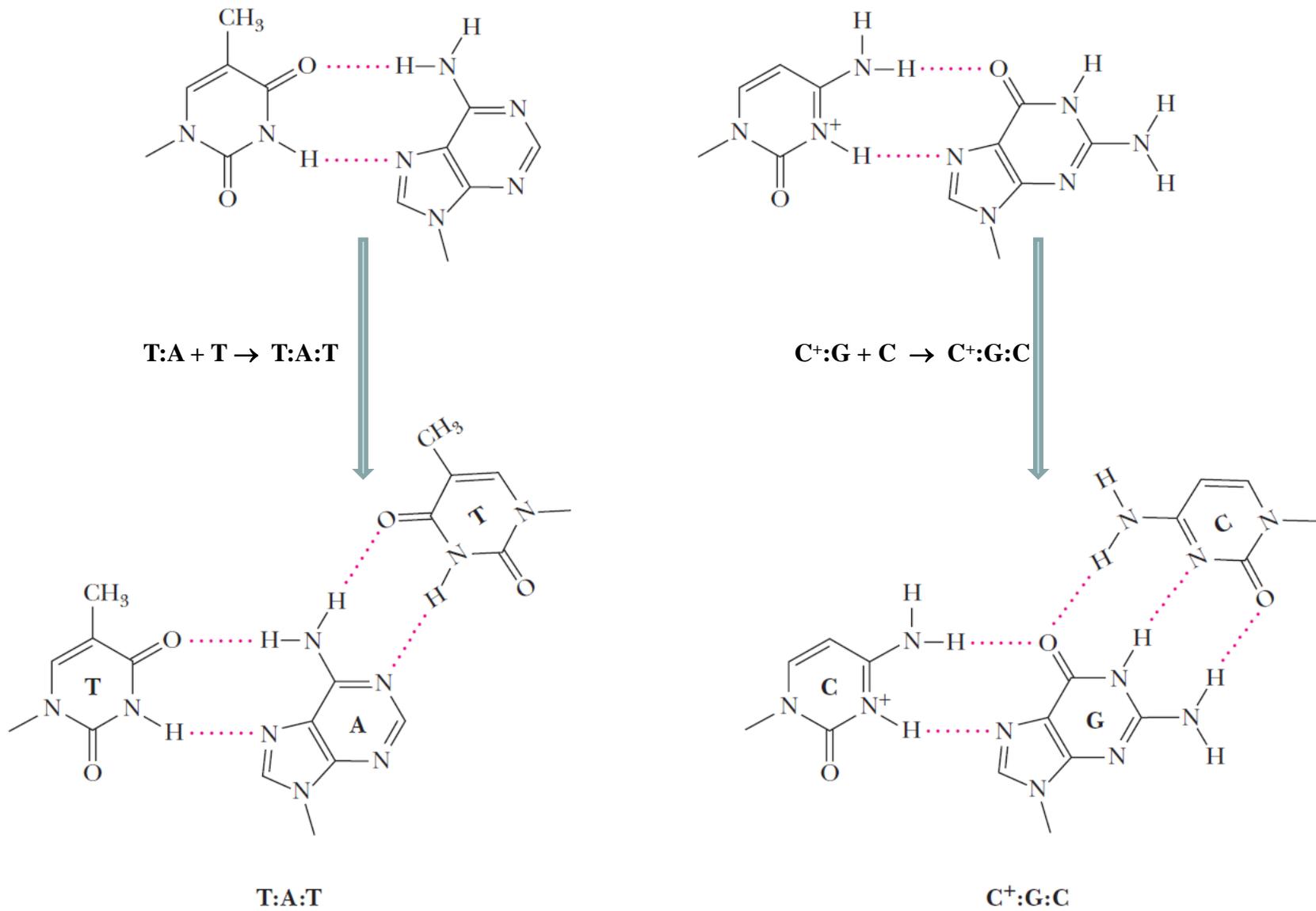


FIGURE 11.18 Base triplets formed when a purine interacts with one pyrimidine by Hoogsteen base pairing and another by Watson–Crick base pairing.

Examples of Hoogsteen and reverse Hoogsteen hydrogen bonding in the triplex formation.



Structure of RNA-DNA triplex. The third-strand RNA (brown) binds to the major groove of the DNA duplex.

2016

Please cite this article as: Li et al., RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs, *Cell Chemical Biology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.09.011>

Cell Chemical Biology

Review

CellPress

RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs

Yue Li,¹ Junetha Syed,¹ and Hiroshi Sugiyama^{1,2,*}

¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa-ohiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

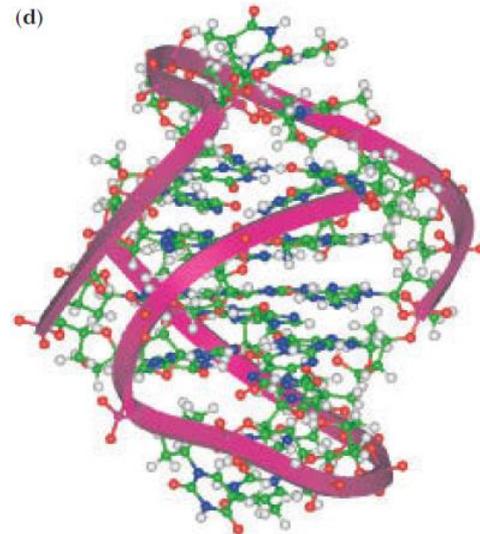
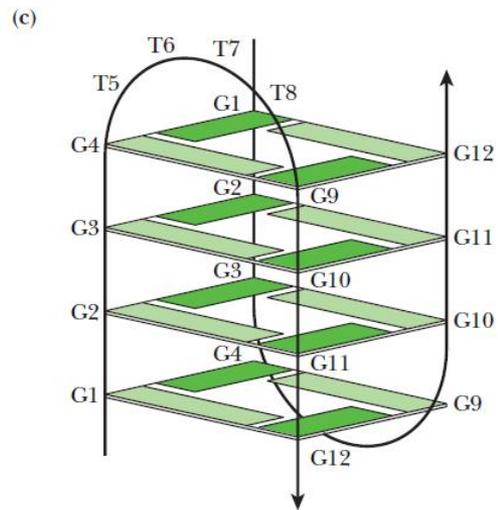
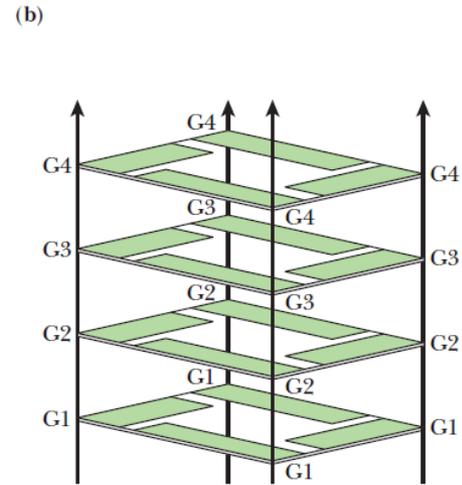
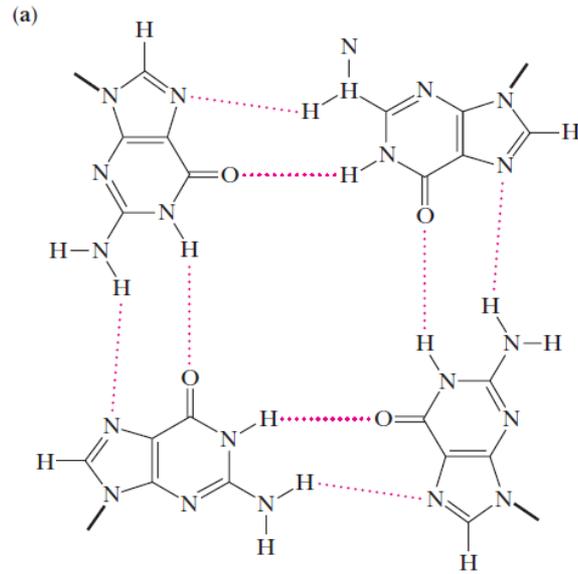
²Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-ushinomiyacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

*Correspondence: hs@kuchem.kyoto-u.ac.jp

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.09.011>

Long noncoding RNAs (lncRNAs) play a pivotal role in the regulation of biological processes through various mechanisms that are not fully understood. Proposed mechanisms include regulation based on RNA-protein interactions, as well as RNA-RNA interactions and RNA-DNA interactions. Here, we focus on one possible mechanism that lncRNA might be using to impact biological function, the RNA-DNA triplex formation. We summarize currently available examples of lncRNA triplex formation and discuss the details surrounding orientation of triplex formation as one of the key properties guiding this process. We propose that symmetrical triplex-forming motifs, especially those in *cis*-acting lncRNAs, favor triplex formation. We also consider the effects of lncRNA structures, protein or ligand binding, and chromatin structures on the lncRNAs triplex formation.

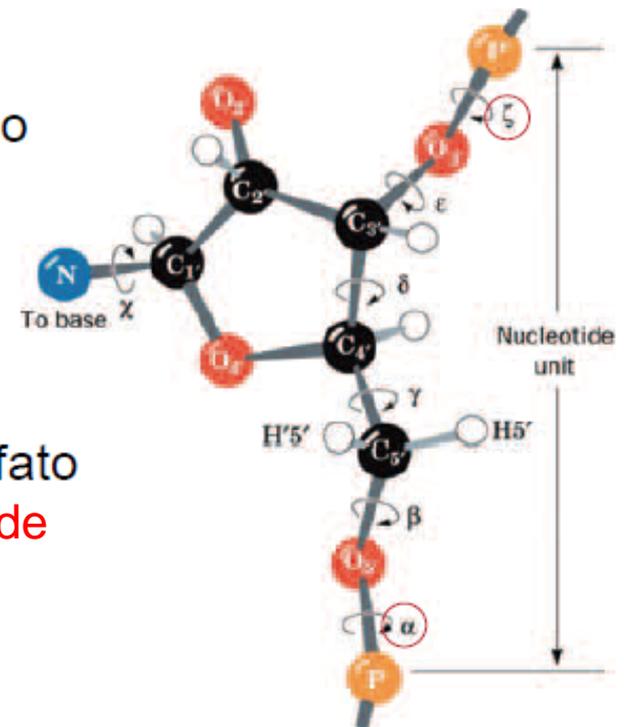
DNA Quadruplex



Struttura DNA

Limitata flessibilità del DNA

- lo scheletro **zucchero-fosfato** ha costrizioni conformazionali (angoli α e ζ)
 - interazioni non-covalenti tra anello di ribosio e gruppi fosforici
 - interferenze steriche tra residui vicini (nei polinucleotidi)
- ⇒ le catene costituite da unità zucchero-fosfato nelle doppie eliche sono *relativamente rigide*

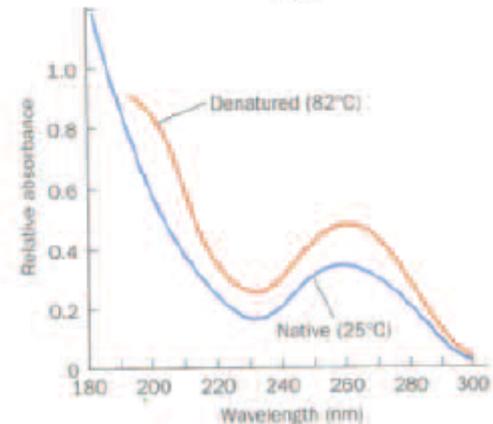
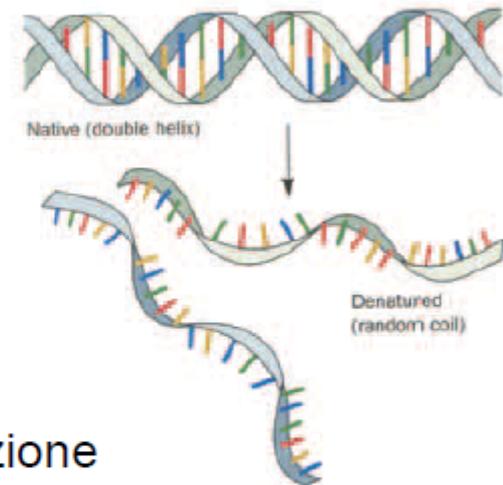


complessità strutturale del DNA inferiore a quello delle proteine

Denaturazione

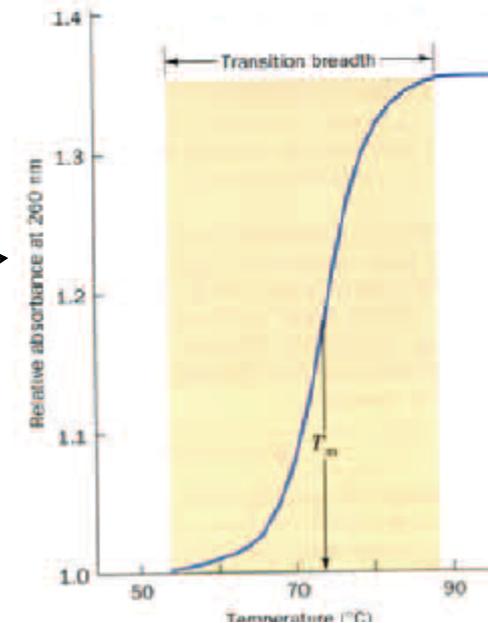
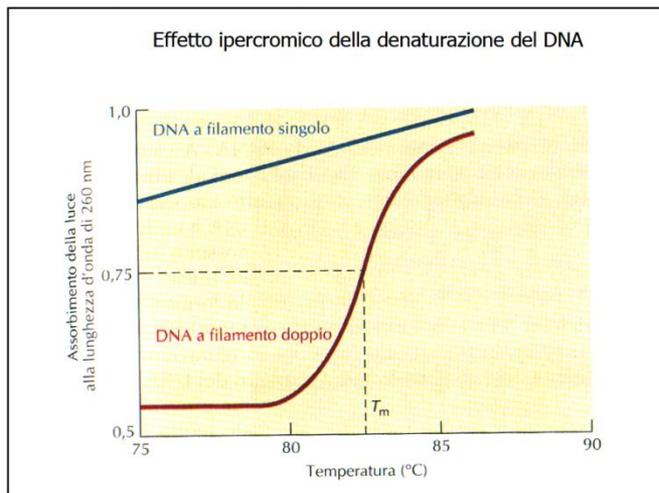
riscaldamento DNA duplex

- ⇒ si separano le 2 catene complementari che assumono conformazioni casuali
- ⇒ diminuzione drastica della viscosità della soluzione
- ⇒ aumento del 40% dell'assorbimento di luce ultravioletta (a causa della rottura delle interazioni elettroniche tra basi vicine)



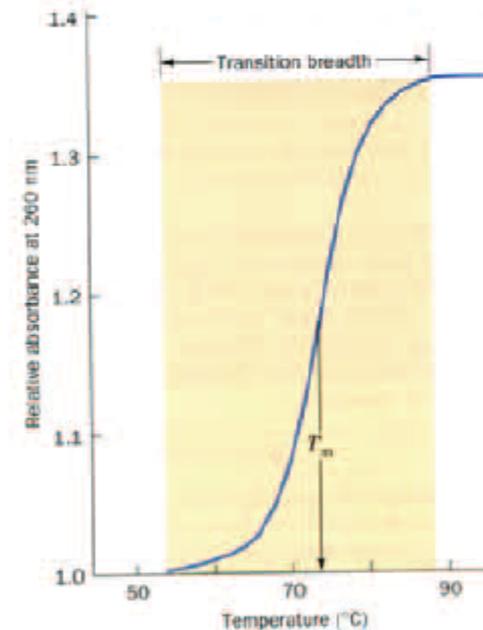
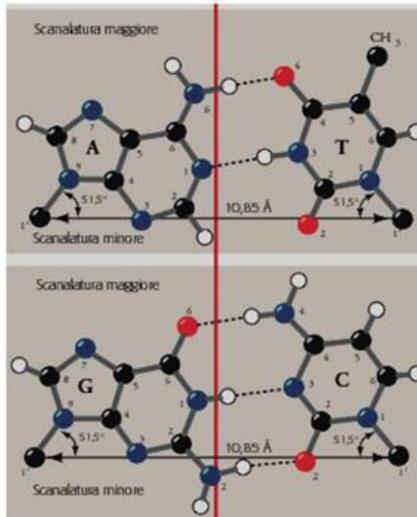
Denaturazione

- brusco incremento nell'assorbimento della luce (di solito a 260 nm) in un ristretto intervallo di T
- ⇒ la denaturazione del DNA è un fenomeno cooperativo in cui il collasso di una parte della struttura destabilizza la parte rimanente
- l'aumento dell'assorbanza è noto come "effetto ipercromico"
- l'assorbimento relativo è il rapporto tra l'assorbimento della luce a 260 nm a T indicata rispetto a quello a T = 25 °C



- **T_m = temperatura di fusione**
la stabilità della doppia elica di DNA dipende dalla natura del solvente, dal tipo e concentrazione degli ioni

T_m aumenta linearmente con la quantità molare di coppie di basi G•C



T_m temperatura a cui si raggiunge la metà dell'aumento dell'assorbimento totale della luce UV

Rinaturazione

raffreddamento DNA duplex

- se rapidamente sotto $T_m \Rightarrow$ parziale riappaiamento casuale delle basi
- se a $\sim 25^\circ\text{C}$ sotto T_m (condizione di riassociazione o annealing)
 \Rightarrow energia termica sufficiente per rinaturazione completa
- allo stesso modo le catene complementari di DNA ed RNA possono formare **doppie eliche ibride** (ibridizzazione) che sono solo di poco meno stabili delle doppie eliche di DNA

Forze che stabilizzano la struttura degli acidi nucleici

Stabilizzazione: impilamento delle basi (stacking)

- i legami a H sono alla base delle interazioni di appaiamento delle basi (specificità di appaiamento nel DNA)
 - i legami a H contribuiscono poco alla stabilità (in condizioni di denaturazione sono rimpiazzati da legami H con molecole di H₂O)
- ⇒ altri tipi di forze
- organizzazione impilate delle strutture planari delle basi puriniche e pirimidiniche (interazioni di van der Waals)
 - le **energie di impilamento** variano con il contenuto delle basi:
 - ⇒ (interazioni tra le basi G e C impilate più resistenti di quelle fra le basi A e T ⇒ maggior stabilità termica DNA ad alto contenuto G + C)
 - ⇒ energia di impilamento di una doppia elica è sequenza dipendente

Forze che stabilizzano la struttura degli acidi nucleici

Stabilizzazione: impilamento delle basi

Table 24-2 Stacking Energies for the Ten Possible Dimers in B-DNA

Stacked Dimer	Stacking Energy (kJ · mol ⁻¹)
C · G	-61.0
G · C	-61.0
C · G	-44.0
A · T	-44.0
C · G	-41.0
T · A	-41.0
G · C	-40.5
C · G	-40.5
G · C	-34.6
G · C	-34.6
G · C	-28.4
A · T	-28.4
T · A	-27.5
A · T	-27.5
G · C	-27.5
T · A	-27.5
A · T	-22.5
A · T	-22.5
A · T	-16.0
T · A	-16.0

L'energia di **stacking** in una doppia elica dipende dal contenuto in C-G e dalla sequenza !



Forze che stabilizzano la struttura degli acidi nucleici

Stabilizzazione: interazioni ioniche

- la stabilità delle strutture degli acidi nucleici dipende dalle interazioni elettrostatiche dei loro gruppi fosforici carichi

Esempio:

la T_m del DNA duplex aumenta con la concentrazione di ioni Na^+ (schermatura elettrostatica dei gruppi fosforici anionici)
Litio e potassio (cationi monovalenti) simili effetti non specifici

Cationi divalenti (Mg^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+}) si legano specificamente ai gruppi fosforici

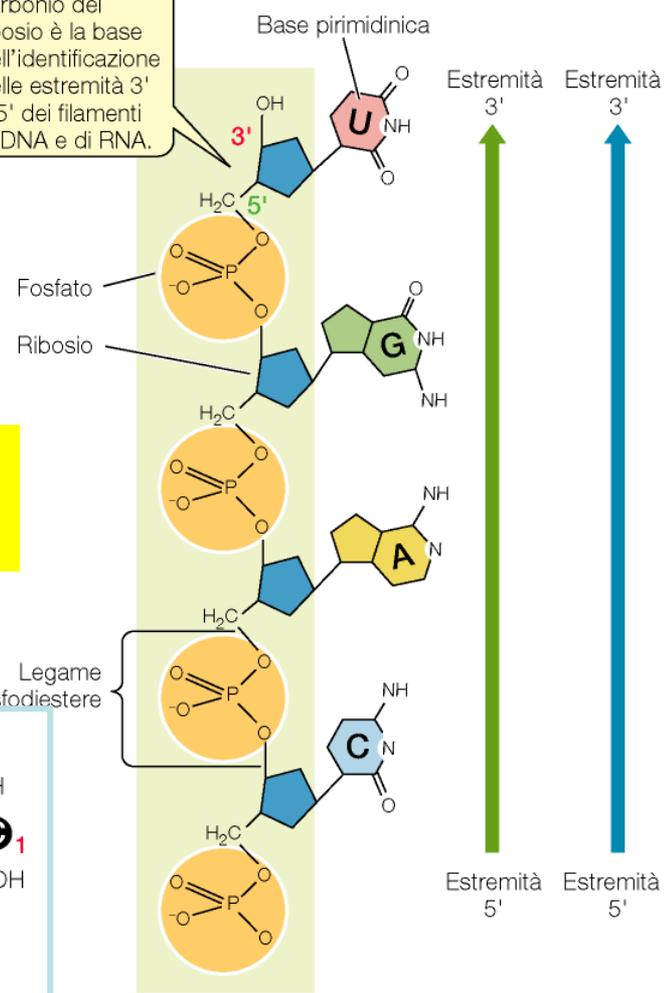
⇒ più efficaci di quelli monovalenti nello schermare i gruppi fosforici

- gli enzimi che mediano reazioni con acidi nucleici e nucleotidi quasi sempre richiedono Mg^{2+} come cofattore
- gli ioni Mg^{2+} contribuiscono a stabilizzare le complesse strutture assunte da molti tipi di RNA

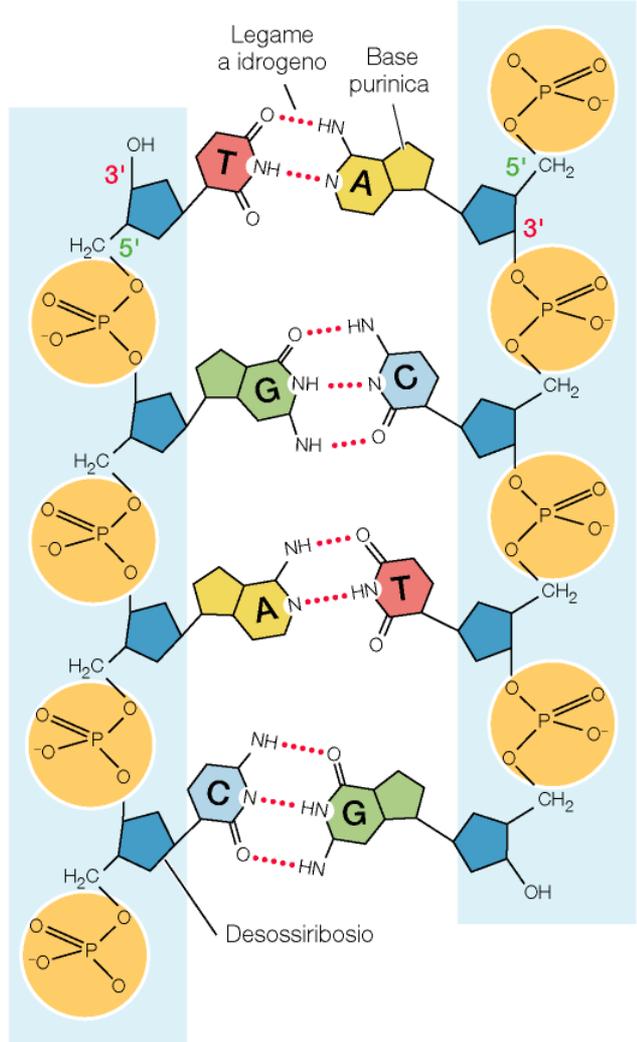
GLI ACIDI NUCLEICI

La numerazione degli atomi di carbonio del ribosio è la base dell'identificazione delle estremità 3' e 5' dei filamenti di DNA e di RNA.

RNA (singolo filamento)



DNA (doppio filamento)

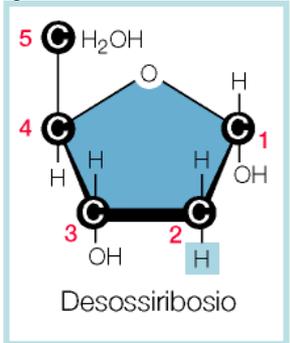
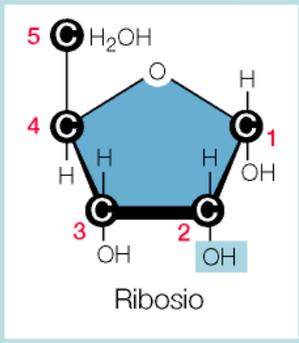


Estremità 5'

Estremità 3'

RNA

DNA

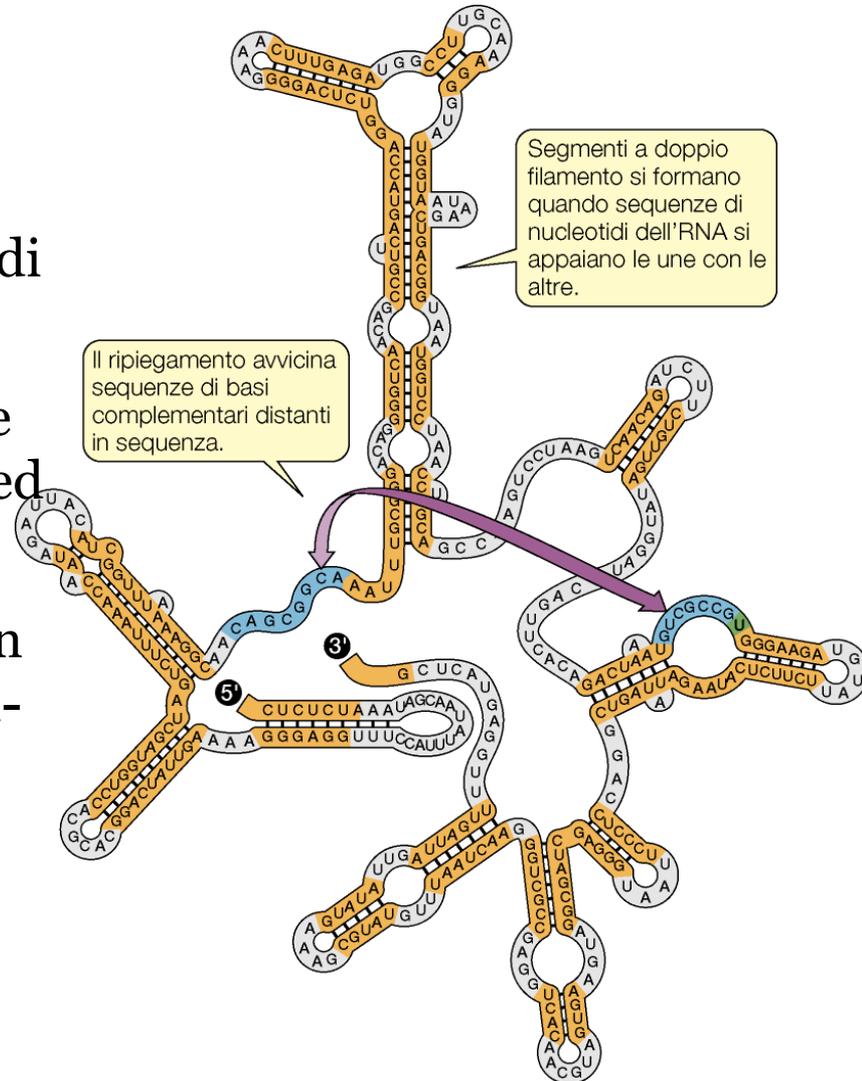


Nell'RNA le basi sono legate al ribosio. Le basi dell'RNA sono le purine adenina (A) e guanina (G) e le pirimidine citosina (C) e uracile (U).

Nel DNA le basi sono legate al desossiribosio e al posto dell'uracile (U) è presente la timina (T). Legami a idrogeno tra le purine e le pirimidine tengono insieme i due filamenti di DNA.

GLI ACIDI NUCLEICI - RNA

- Nell' RNA lo zucchero pentoso e' il ribosio ed al posto della Timina si ritrova l' Uracile (U)
- La principale funzione dell' RNA è di tipo informazionale, e risiede nel trasferimento di informazione dal DNA alle proteine
- Molecole di RNA possono ripiegarsi grazie all'appaiamento delle basi complementare ed assumere forme specifiche nello spazio 3D
- Esistono RNA con funzione catalitica e con **moltissime** altre funzioni molecolari → non-coding RNAs



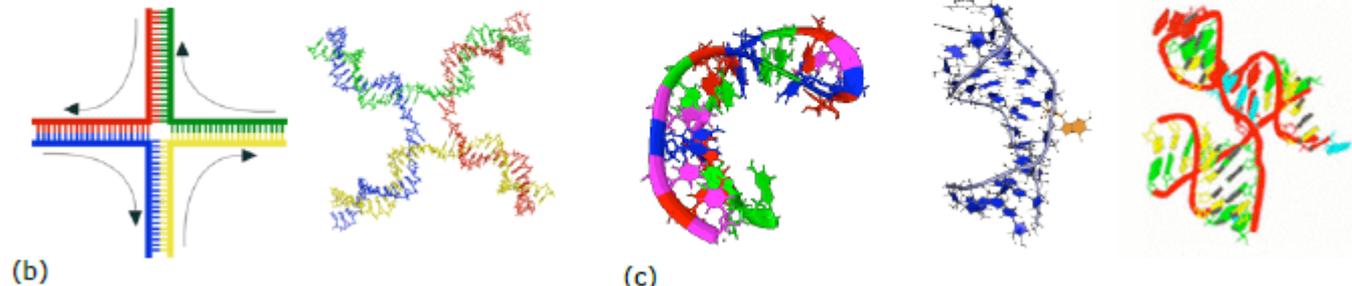
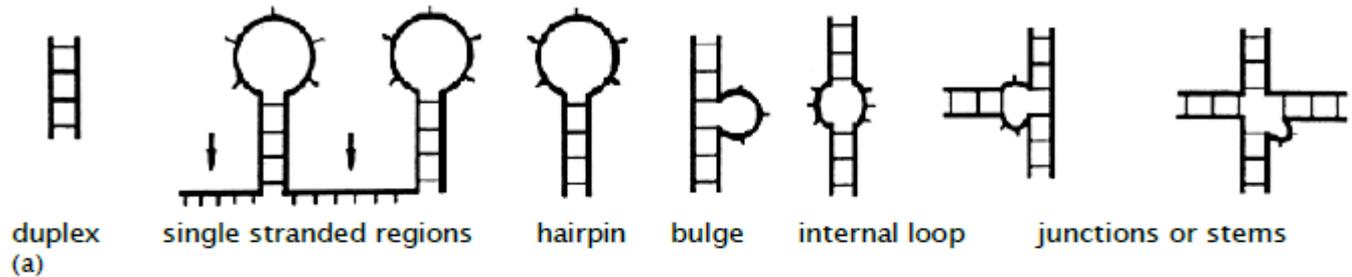
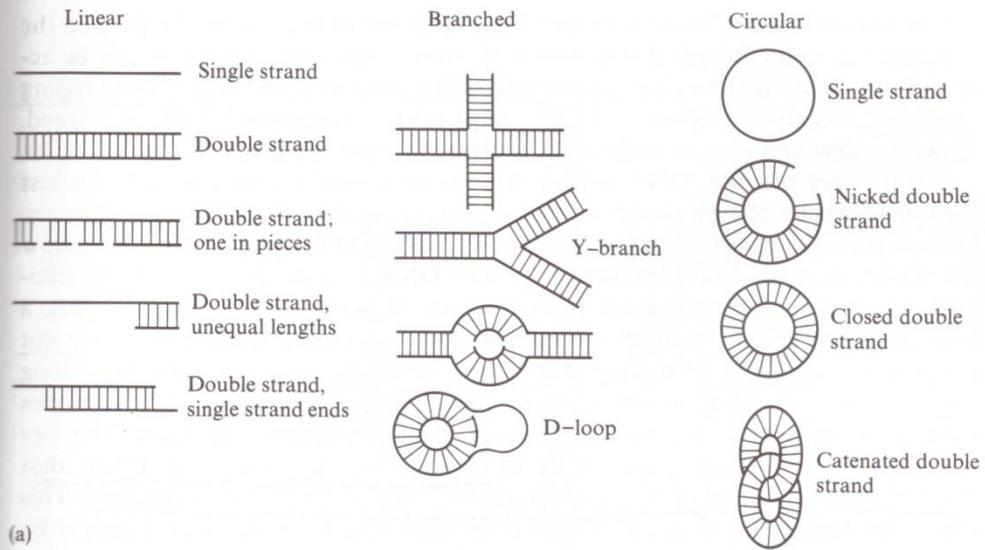
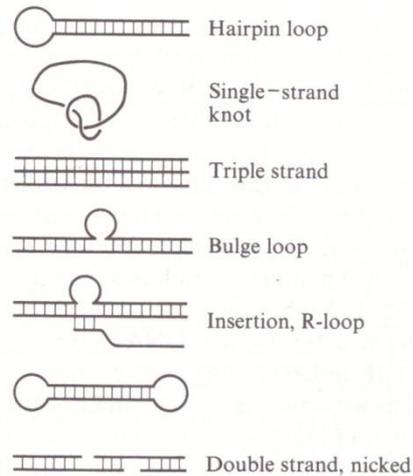


Fig 3.4 (a) Schema della topologia dei motivi strutturali secondari tipici. (b) Giunzione di Holliday, tipica in DNA. (c) Rappresentazione 3D di un hairpin, un loop interno e una giunzione tripla in RNA

in DNA si riscontrano (raramente) giunzioni quaduple a croce (di Hollyday), in RNA si trova una maggiore varietà e frequenza di altri motivi strutturali, tipo tratti di singola elica, *hairpin*, *bulge*, *loop* interni anche asimmetrici e giunzioni, non solo quaduple, ma anche triple e quintuple.



(a)



(b)

Figure 3-4

Some covalent nucleic acid chain structures. Regions with perfect base pairing are shown hatched. (a) Structures that have been observed in naturally occurring nucleic acids. (b) Structures that have been prepared synthetically.

Tipi di strutture secondarie nell'RNA

Singolo filamento



Doppio filamento
Elica (forma A)



Stem and loop
Hairpin loop



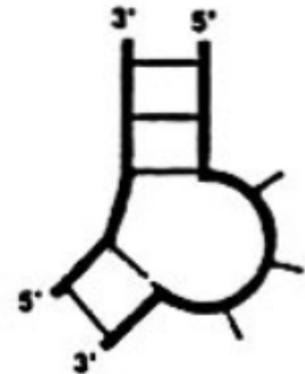
Loop interno simmetrico



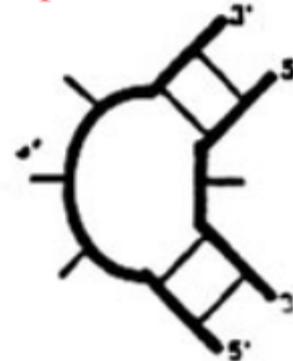
Bulge loop singolo



Bulge loop multiplo



Loop interno asimmetrico



La combinazione regioni a doppio filamento (ds) e a singolo filamento (ss) genera vari tipi di strutture. Regioni non appaiate di un elica di distinguono in **bulge** (rigonfiamento) quando la regione ss interessa un singolo filamento, **hairpin** (molletta) quando la regione a ss interessa la parte terminale di un elica e **loop interni** quando la regione ss interessa entrambi i filamenti. Queste regioni destabilizzano le regioni a ds circostanti. L'hairpin è tra tutte la regione più stabile a condizione che abbia un numero minimo di basi ss (quattro o più).

Differenze tra le strutture secondarie e terziarie: alcuni esempi

Secondary structures

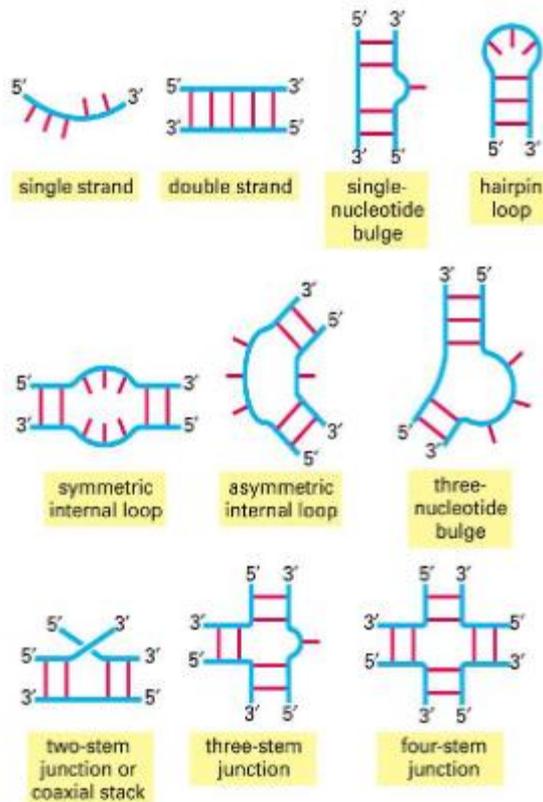


Figure 6-94. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Tertiary structures

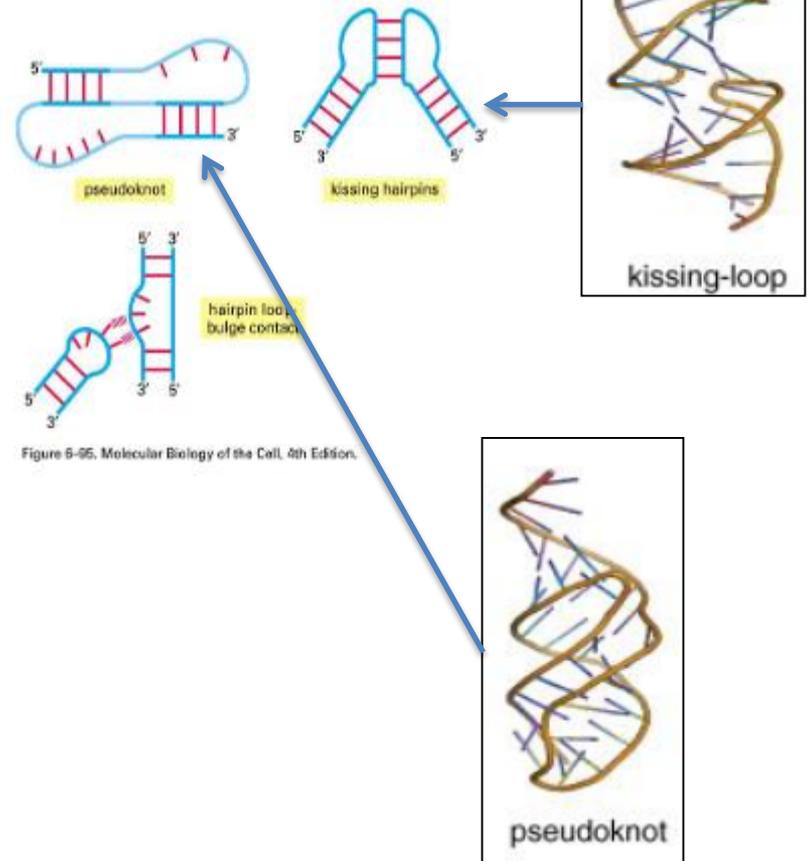
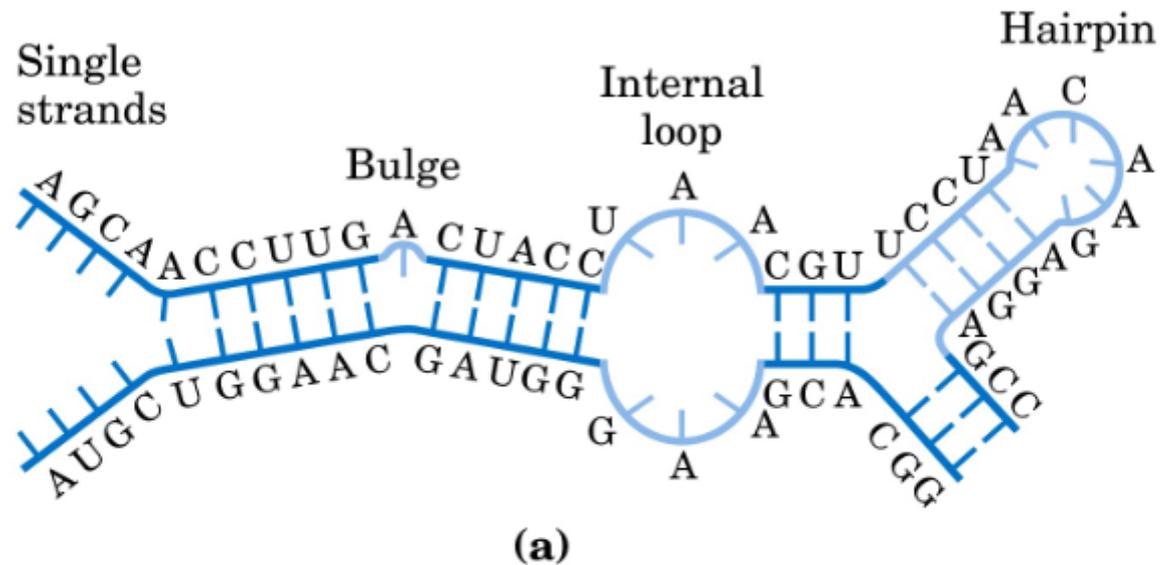


Figure 6-95. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Tipi di strutture secondarie nell'RNA



	DNA	RNA
Meccanismi di stabilità-degradazione	Scarsa propensione all'idrolisi della catena	Alta propensione all'idrolisi della catena
Denaturazione	Propensione a subire danni dai raggi UV Temperatura di denaturazione tra 30 e 110 gradi, dipendentemente da lunghezza e composizione	Suscettibilità di mutazione di C in U con formazioni di wobble pairs A parità di lunghezza e composizione, temperatura di denaturazione mediamente più alta di circa 10 gradi
Nucleotidi	Fosfato + desossiribosio + base azotata	Fosfato + ribosio + base azotata
Basi	Adenina Guanina Timina Citosina	Adenina Guanina Uracile Citosina (raramente: Inosina, ribotimina, pseudouridina...)
Struttura primaria	Catene molto lunghe, mediamente intorno ai 100 milioni di bp (~3 cm)	Catene relativamente corte, mediamente 20 -100 nucleotidi
Tipo di accoppiamenti tra basi	Principalmente accoppiamenti WC	Accoppiamenti WC, wobble pairs, accoppiamenti di Hoogsten
Conformazione del backbone	Zucchero in conformazione C2-endo (in BDNA) oppure in C3-endo (in ADNA)	Zucchero in conformazione esclusivamente C3-endo
Eliche	Conformazione principale: B-DNA A bassa idratazione: A-DNA Raramente, Z-DNA	solo A-RNA
Lunghezza di persistenza	~50nm	~60nm
Altri tipi di struttura secondaria	Piccoli tratti di triple o quadruple eliche Giunzioni di Hoilyday	Tratti di elica disaccoppiata, hairpins, bulges, internal loops, giunzioni
Struttura terziaria	Superavvolgimenti	Accoppiamenti estesi tra strutture secondarie tramite base pairing, knot e pseudoknot, eliche triple, accoppiamenti paralleli tra eliche.
Struttura quaternaria	Nucleosomi, elementi di organizzazione strutturale del genoma	Ribosomi, elementi del macchinario cellulare
Tipi principali-organizzazione	DNA codificante e non costituente il genoma, organizzato in cromosomi o plasmidi	mRNA, tRNA, ribozimi e altri tipi di RNA funzionale. RNA ribosomiale (rRNA). RNA codificante in virus
Funzioni	Conservazione e trasmissione dell'informazione genetica Ruoli strutturali (centromeri, telomeri)	Conservazione e trasmissione dell'informazione in alcuni virus. Trasporto dell'informazione all'interno della cellula (mRNA, tRNA). Ruoli funzionali nella duplicazione, trascrizione, traduzione del DNA o di RNA codificante, ruoli enzimatici (ribozimi) o altri ruoli funzionali

Tab 5.1 Caratteristiche e differenze principali tra DNA e RNA