

Corso di

PROPRIETA' DI BIOPOLIMERI

Prof. Ranieri Urbani

a.a. 2021-2022

INTRODUZIONE

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

MODIFICAZIONI CHIMICHE:

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

MODIFICAZIONI CONFORMAZIONALI

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

PROPRIETA' STRUTTURALI di BIOPOLIMERI GERARCHIA DEI LIVELLI STRUTTURALI

STRUTTURA PRIMARIA

Monomeri R ed S

PROTEINE

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

DNA / RNA

Monomeri
Basi, nucleotidi
Interazione tra basi
Legame difosfoestereo
Catena polinucleotidica

CARBOIDRATI

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

PROPRIETA' CONFORMAZIONALI

Peptidi: definizione degli angoli torsionali.
Interazione tra atomi legati

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

PROPRIETA' CONFORMAZIONALI:

STRUTTURA SECONDARIA

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

PROTEINE

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

POLISACCARIDI

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

STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DEGLI ACIDI NUCLEICI:

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

FOLDING PROTEICI E DENATURAZIONE

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

STRUTTURA TERZIARIA E QUATERNARIA DI PROTEINE

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

APPROCCI BIOINFORMATICI DI PREDIZIONE

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

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

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

Simmetria delle strutture quaternarie: esempi
Evoluzione convergente e divergente
Omologia e similitudine

Fold Recognition

Allineamento di sequenze
Esempio: Metodo GOR (1978)

Ripasso PREDIZIONE DELLA STRUTTURA

Meccanica Molecolare e le mappe di energia conformazionale

Dinamica Molecolare: definizione dei parametri del metodo

Energia cinetica e temperatura

Integrazione delle equazioni del moto (algoritmo di Verlet)

Calcolo delle traiettorie ed analisi dei risultati

Solvatazione: modelli implicito (continuo) o esplicito (“ALL-ATOMS”)

DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI PROTEINE

Lisi delle proteine con metodi enzimatici (mappa triptica)

La degradazione di Edman

Composizione mediante HPLC

Spettrometria di massa

DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI UN POLISACCARIDE

Composizione monosaccaridica: natura e rapporti molare

Concatenazione del legame glicosidico e delle eventuali ramificazioni

Configurazione anomeric: configurazione α o β del legame glicosidico

Sequenza di monosaccaridi nell'unità ripetitiva

DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA DI ACIDI NUCLEICI

Metodo di Sanger

PROPRIETA' ACIDO-BASE DI AMINOACIDI E PEPTIDI

Titolazione di amino acidi. Determinazione delle costanti di equilibrio

Punto isoelettrico

ELETTROFORESI

Principi ed equazioni fondamentali

Applicazioni ai biopolimeri

Gel per elettroforesi

Elettroforesi denaturante: SDS-PAGE

Preparazione di un'elettroforesi su gel

Colorazione

Essiccamento del gel

Determinazione dei PM di polipeptidi

Tecnica di focalizzazione isoelettrica (IEF)

Elettroforesi 2D

Elettroforesi capillare (CE)

DIFFUSIONE DINAMICA DELLA LUCE (DLS)

Dipendenza dall'angolo

SPETTROSCOPIA UV-VISIBILE DI BIOPOLIMERI

Cromofori importanti in molecole biologiche

Spettri UV di proteine e acidi nucleici

Denaturazione del DNA e di proteine

RICHIAMI DI TERMODINAMICA

Transizione tra due stati

Grafico di Van't Hoff

Proprietà misurabili

Reagenti identici

DICROISMO CIRCOLARE

L'attività ottica e la rotazione ottica

Il polarimetro

Dispersione ottica rotatoria (ORD)

Spettroscopia di dicroismo circolare

Unità di misura e sensibilità. Ellitticità molare

Lo spettro CD per strutture secondarie

CALORIMETRIA DSC E ITC.

Deconvoluzione di termogrammi

Termodinamica delle transizioni

TRANSIZIONE ELICA-GOMITOLO

Curve di transizione ordine-disordine

Variabili chimico-fisiche nelle transizioni conformazionali

Processi cooperativi

Esempio: fusione del DNA

TC di polisaccaridi

Meccanismo molecolare della transizione di peptidi

Interazione tra i dipoli ammidici. Contributi entropici

Modello di Schellman, grado di cooperatività

Modello "a cerniera" (Zipper model) di Zimm-Brag (a basso ed alto PM)

Elicità frazionaria e probabilità

TERMODINAMICA DEL LEGAME CON SUBSTRATI

Costante macroscopica e microscopica

Siti indipendenti ed identici

Scatchard plot

Scatchard plot non-lineari

Modello di Hill

SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA

Spettro di fluorescenza

Diagramma di Jablonsky delle transizioni

Cinetica delle transizioni

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

CASO STUDIO 1: Misfolding proteico

CASO STUDIO 2: Caratterizzazione della proteina HUG

CASO STUDIO 3: Caratterizzazione di biopolimeri marini