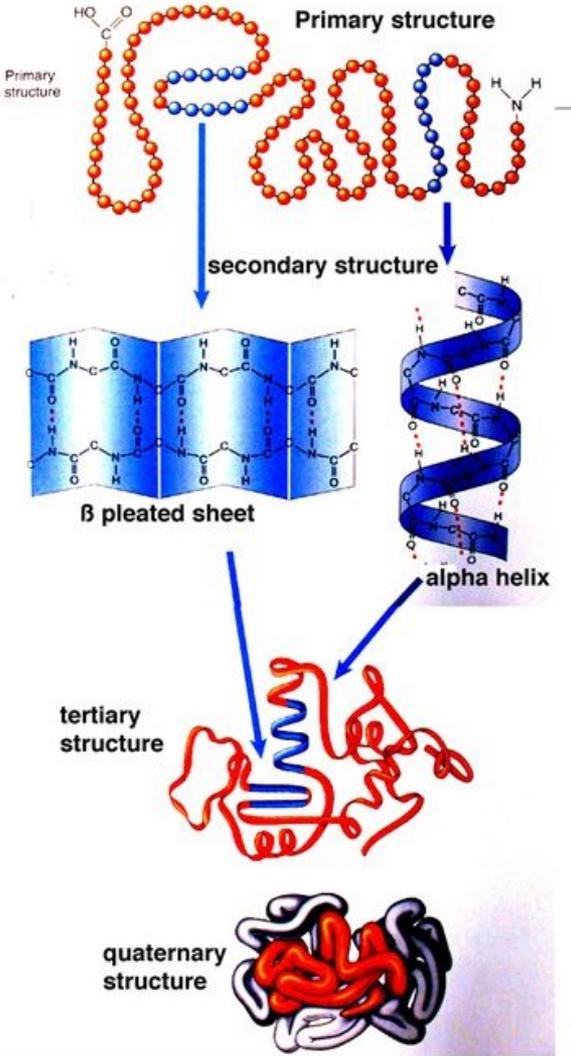


Proteine ricombinanti per studi
strutturali.

Caratterizzazione biofisica:
Analisi delle strutture secondarie

Analisi delle strutture secondarie:

Struttura delle proteine



Analisi delle strutture secondarie:

Angoli di torsione

(diedrici o di rotazione) attorno a

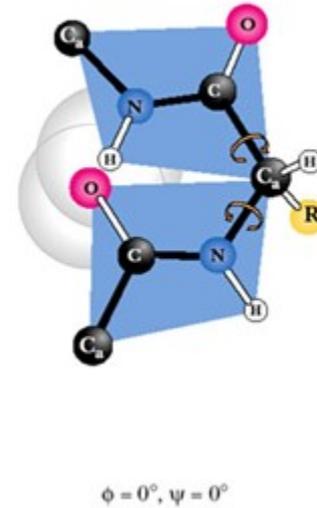
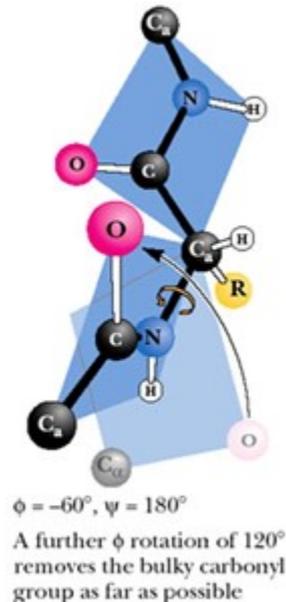
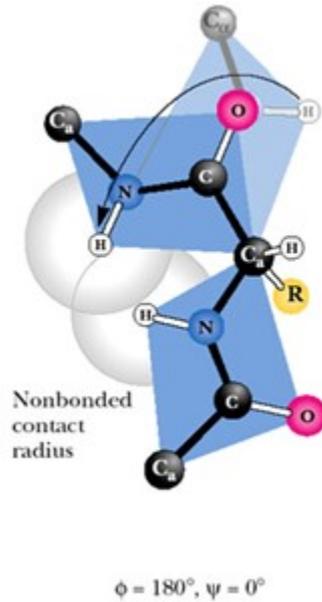
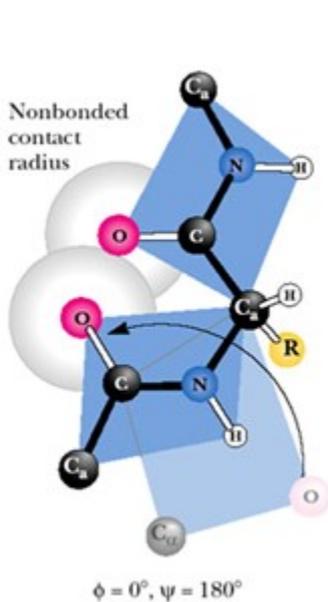
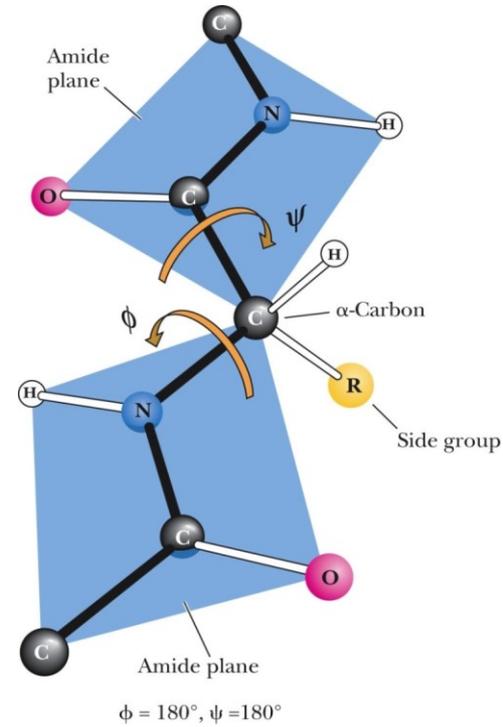
$C\alpha-N$ (ϕ)

$C\alpha-C$ (ψ)

di ciascun aa determina la conformazione del backbone

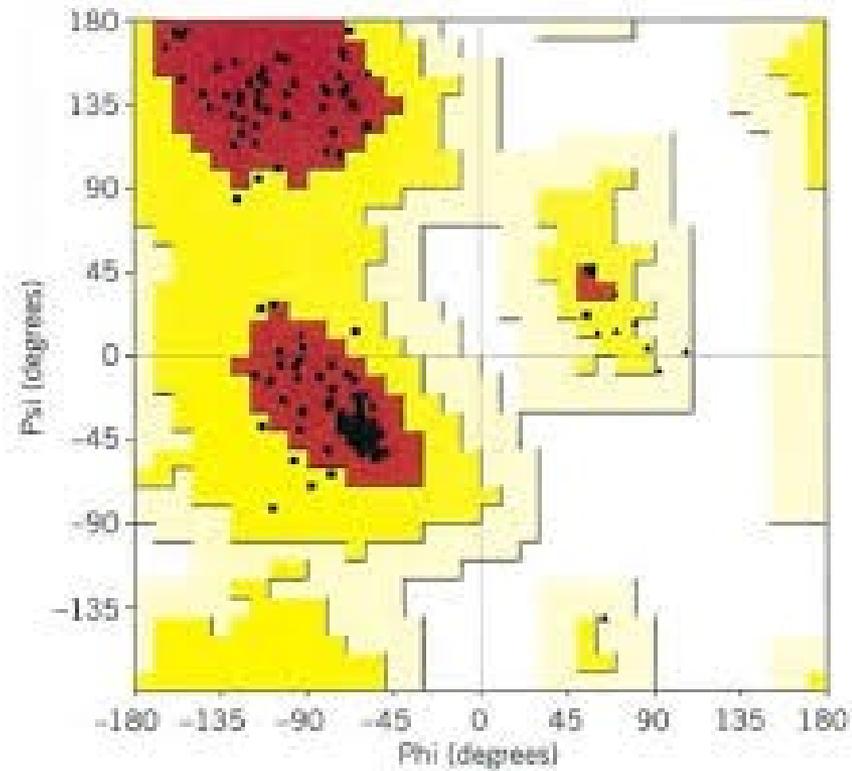
Alcuni valori più probabili:

conformazioni vietate a causa dell'ingombro ($d <$ distanza di van der Waals)



Analisi delle strutture secondarie:

Ramachandran plot

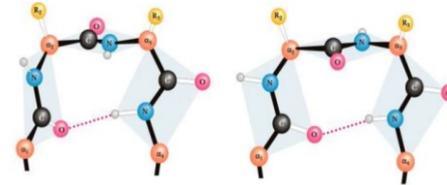
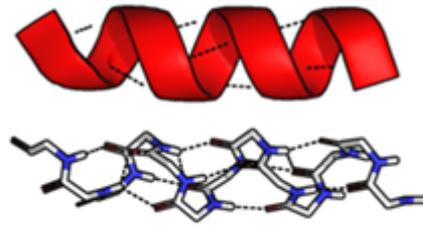
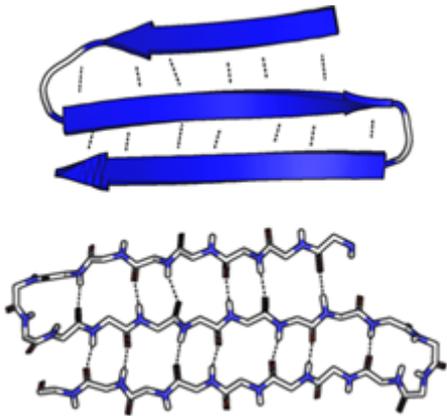
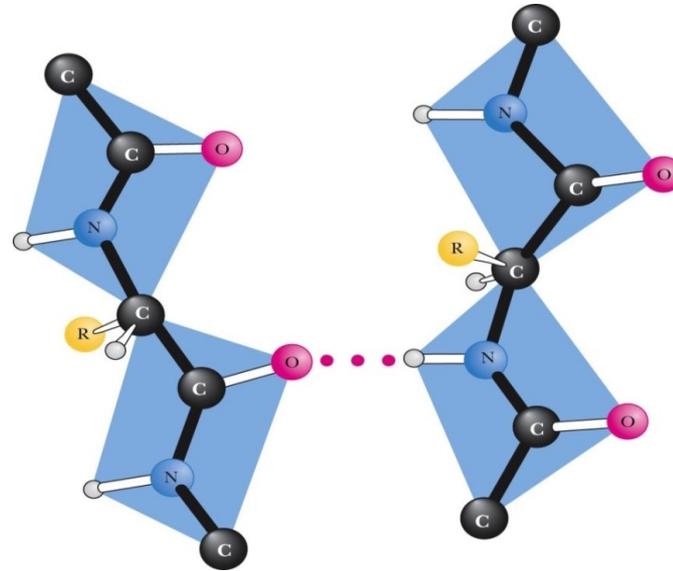


Analisi delle strutture secondarie:

Strutture secondarie delle proteine

Tutti ϕ e ψ uguali \rightarrow struttura ripetitiva

A corto raggio nelle proteine globulari.
A lungo raggio in proteine fibrose.



Beta sheet (3 beta strands)

Alpha helix

Beta turns/bends

super secondary structures

Analisi delle strutture secondarie:

Strutture elicoidali

caratterizzate da

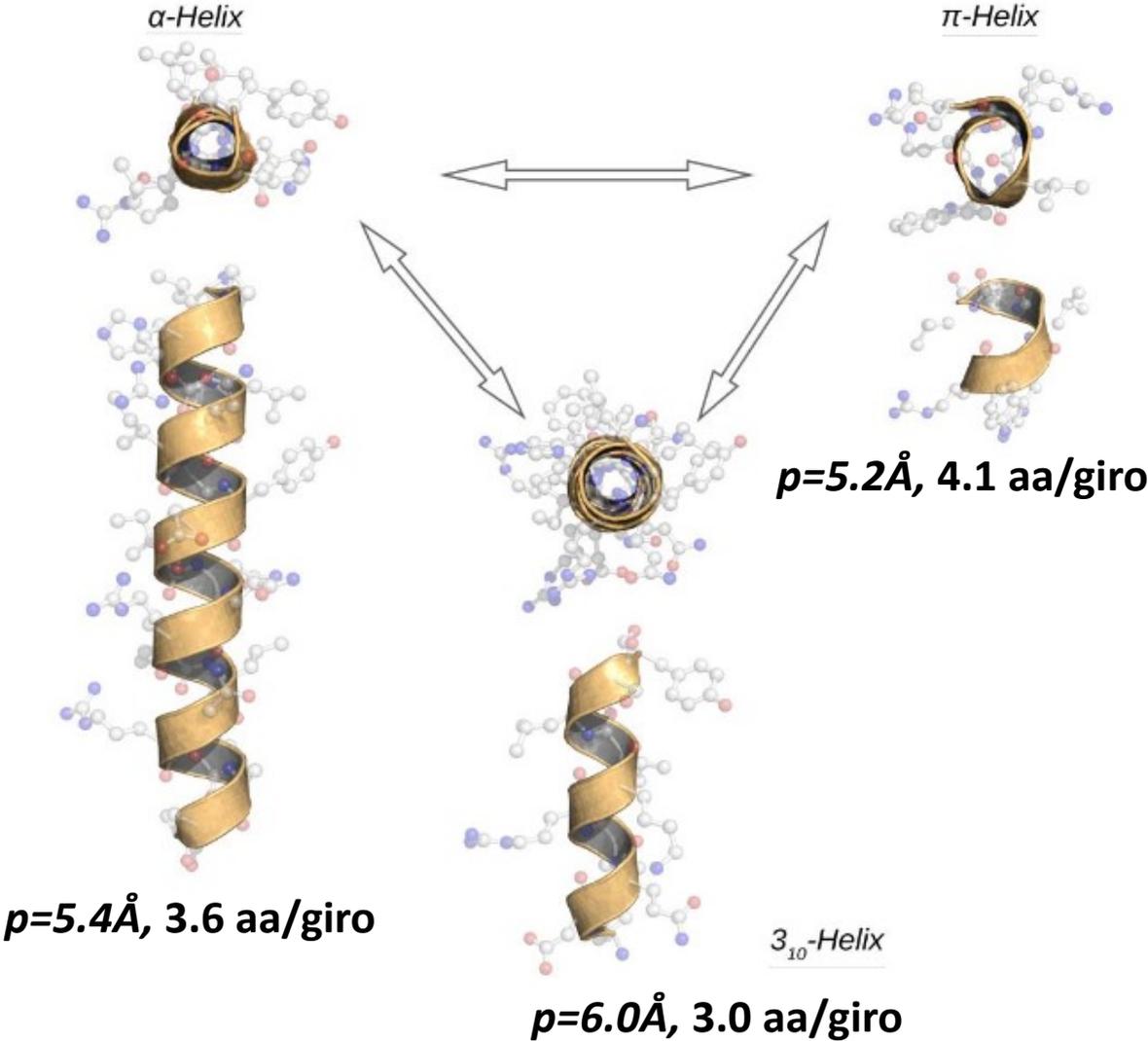
n = numero di residui per giro elicoidale

p = distanza fra residui corrispondenti
per giro elicoidale



Analisi delle strutture secondarie:

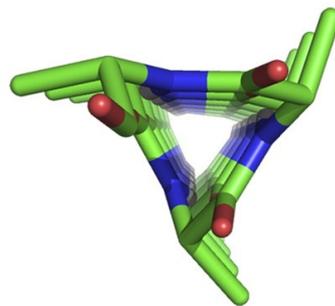
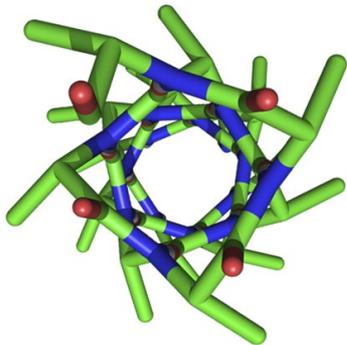
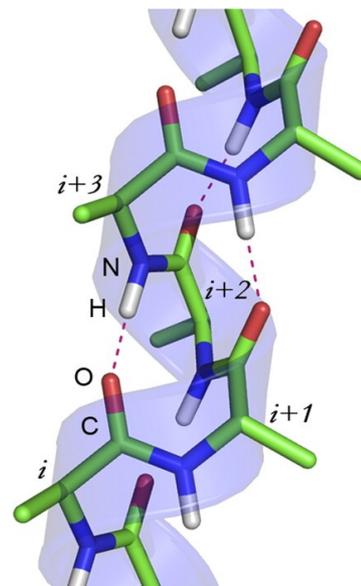
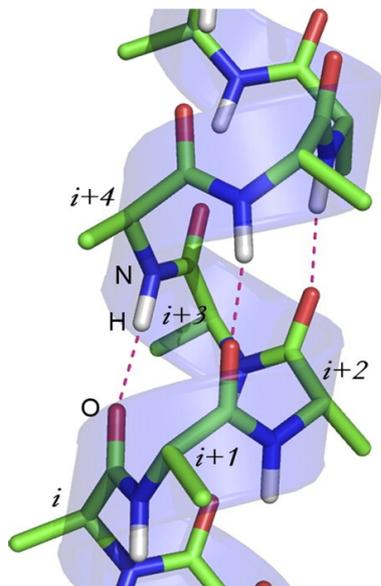
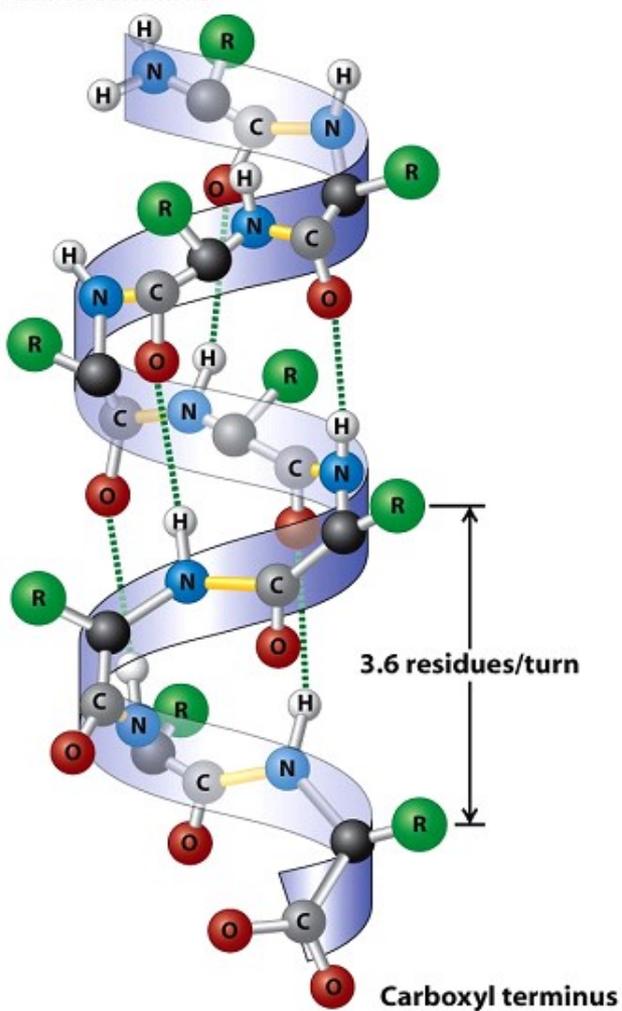
Strutture elicoidali



Analisi delle strutture secondarie:

Strutture elicoidali

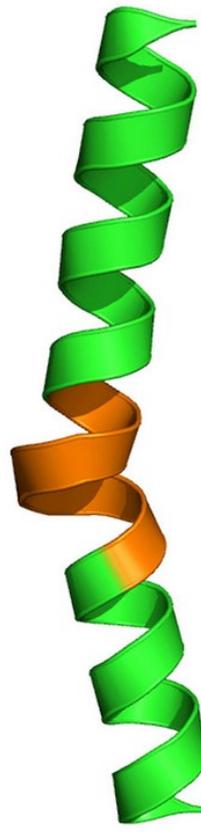
Amino terminus



α -helix

π -helix

α -helix



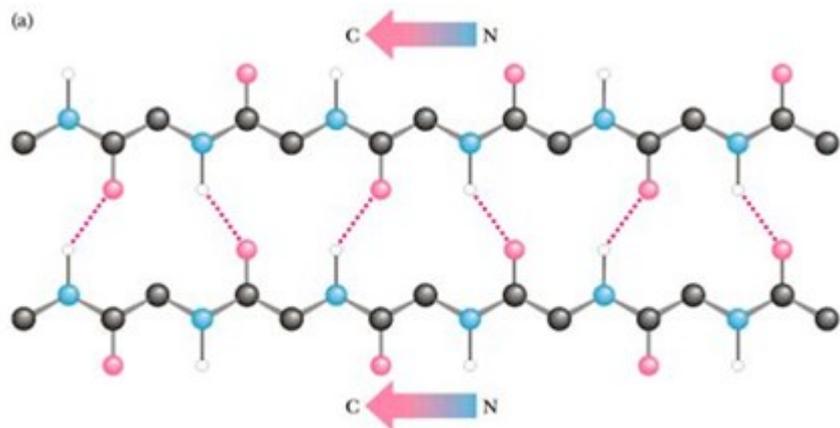
Canonical α -helix

Canonical 3(10) helix

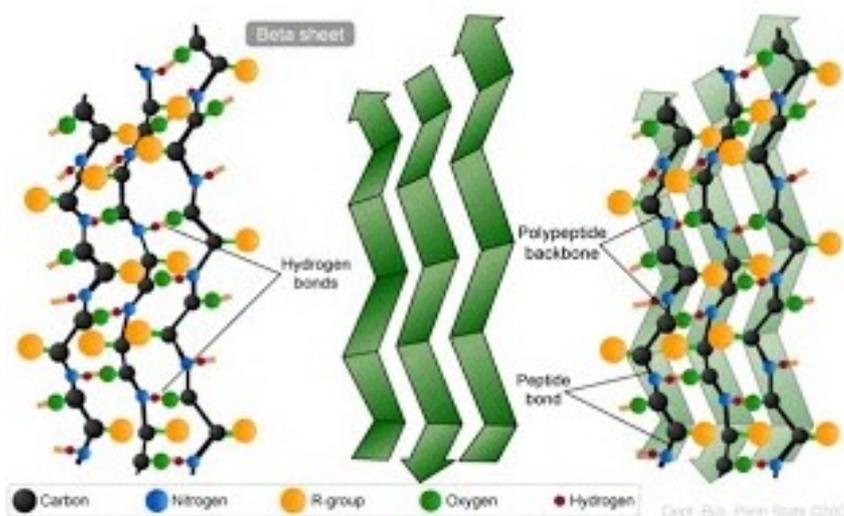
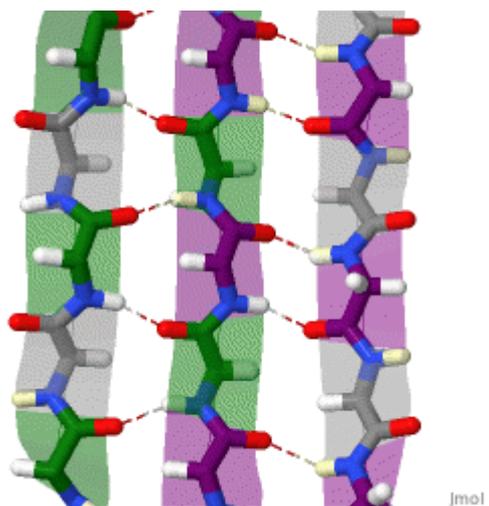
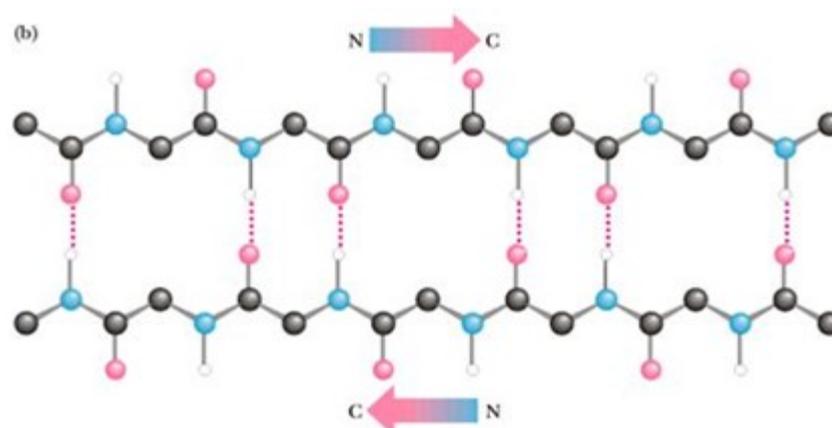
Analisi delle strutture secondarie:

Strutture a beta foglietto

Paralleli (Distanza: 3.3\AA): ≥ 5 strands



Antiparalleli (Distanza: 3.5\AA): 2-3 strands



Analisi delle strutture secondarie:

Strutture non ripetitive

Una parte significativa delle strutture è irregolare o unica pur essendo ordinata.

Coils

segmenti di catene polipeptidiche i cui aa contigui non hanno valori di ϕ e ψ simili

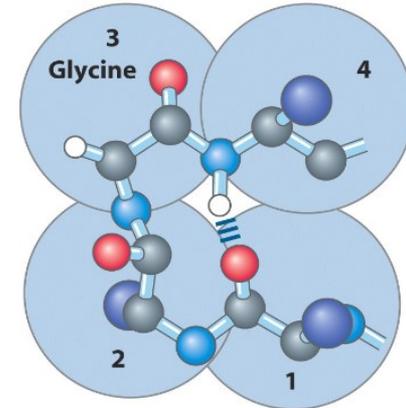
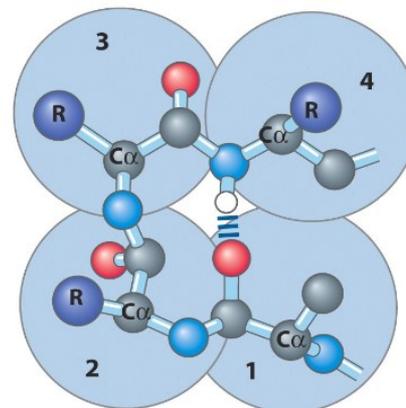
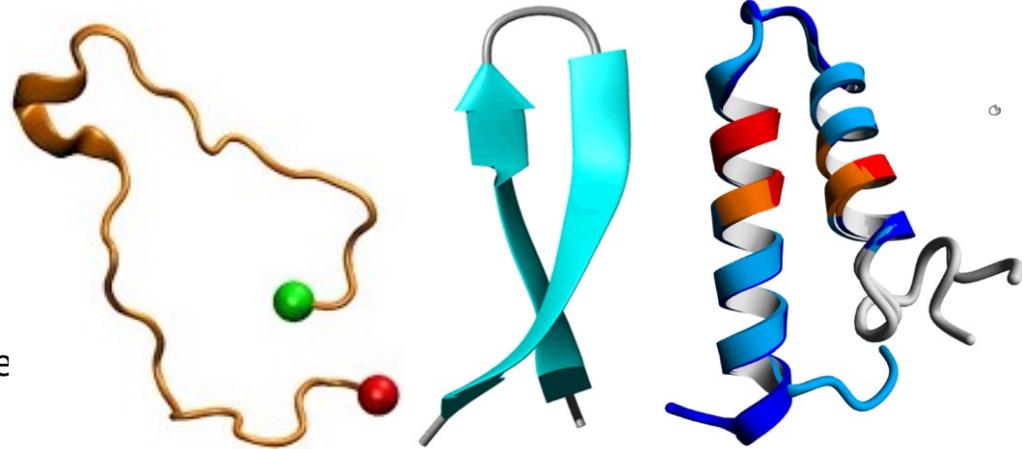
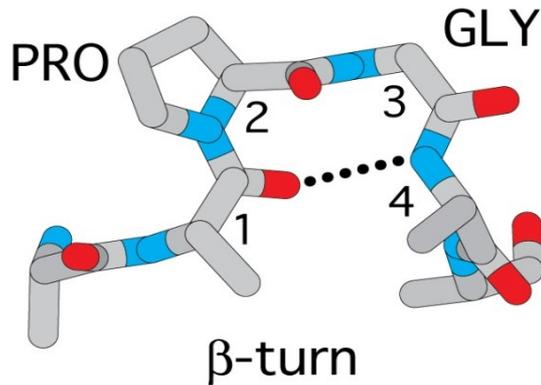
Loops

Ω : 6-16 residui

TURN (o BEND): <5 aa. In particolare

β Bends o Reverse Turns

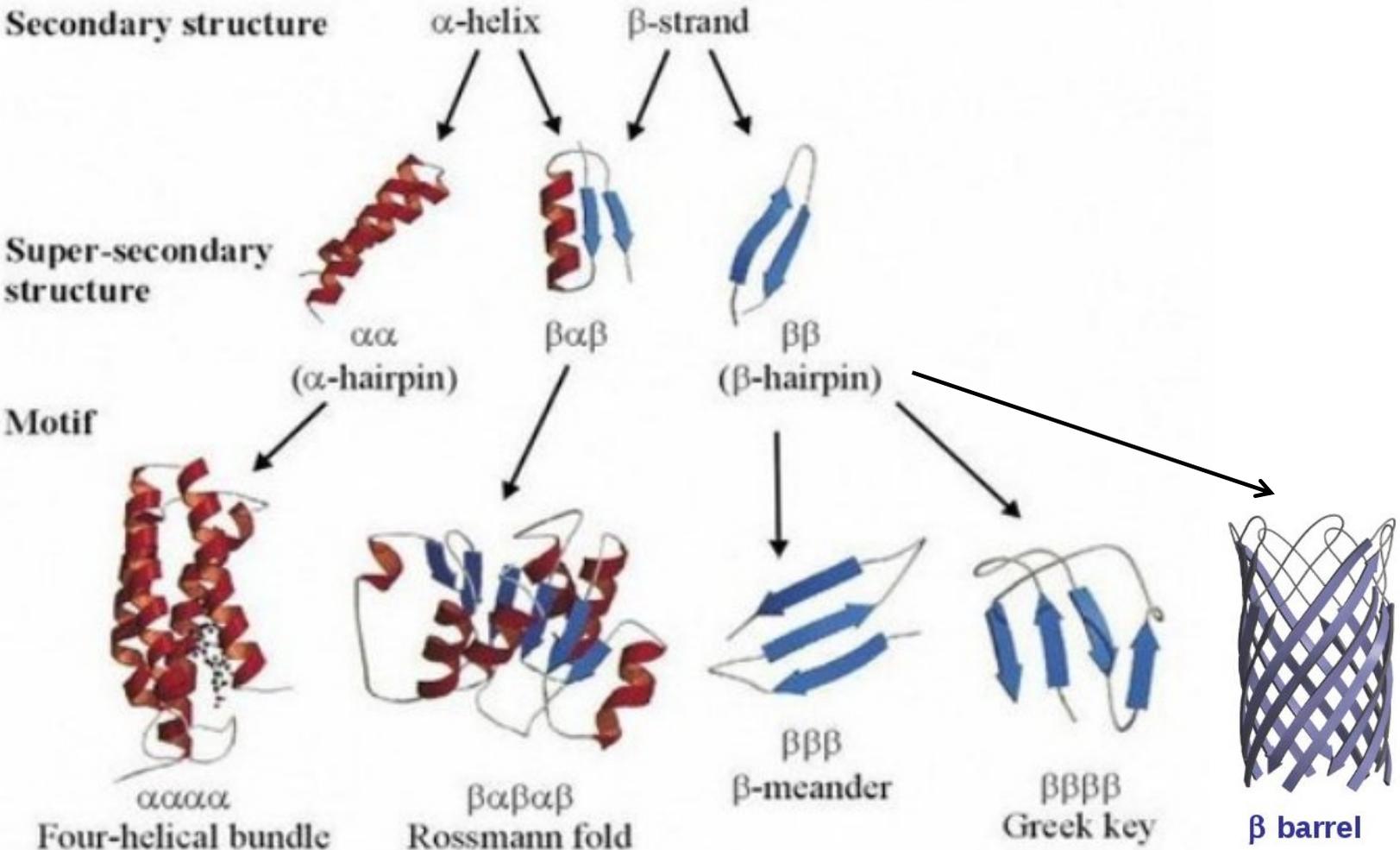
4 aa sulle superfici



sono divisi in classi in base a ϕ/ψ degli aa nelle posizioni i_{+1} e i_{+2}

Analisi delle strutture secondarie:

Strutture super secondarie e motifs



Analisi delle strutture secondarie:

Metodi:

Circular Dichroism (CD)
Jasco J-810



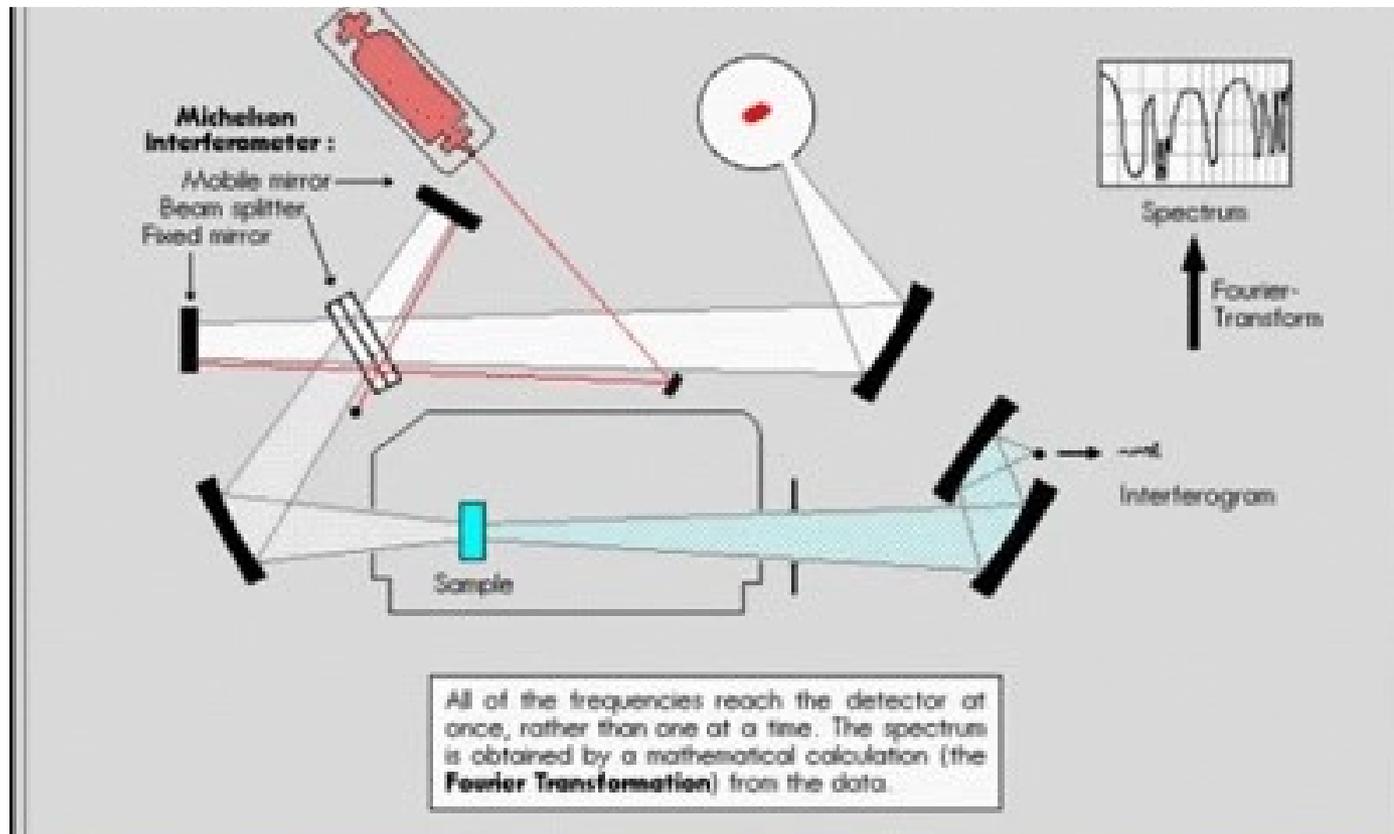
Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)
ABB Bomen Prota



Analisi delle strutture secondarie:

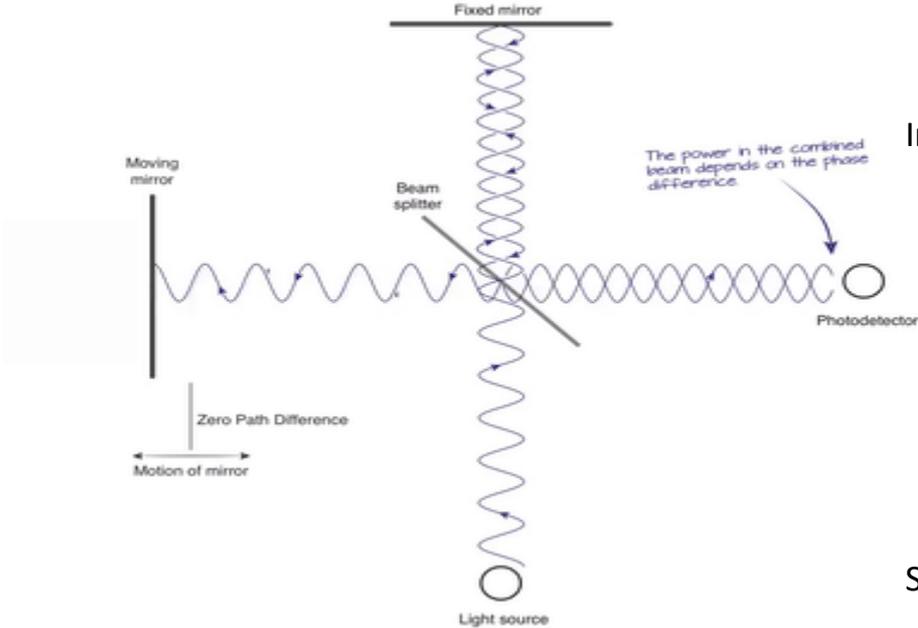
FT-IR

SPETTRI IR (**fingerprints dei campioni**) per caratterizzare campioni sia organici che inorganici

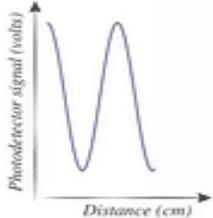


Analisi delle strutture secondarie:

FT-IR

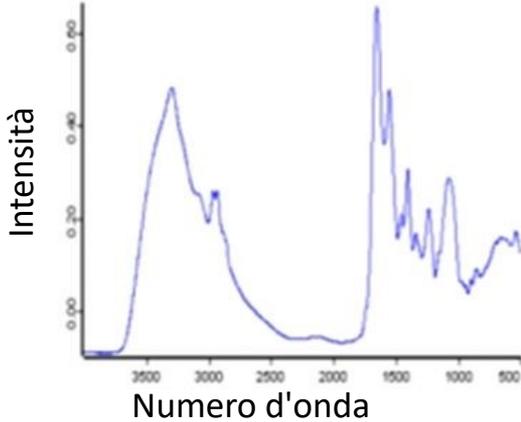


Interferogramma: I vs f(posizione dello specchio):



↓ trasformata di Fourier

Spettro FT-IR: I vs numero d'onda



Analisi delle strutture secondarie:

FT-IR: basi

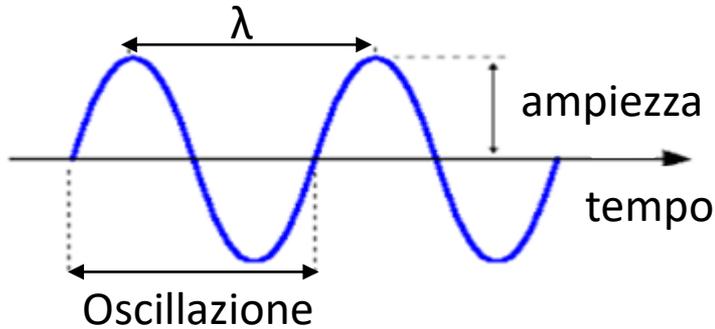
Radiazione elettromagnetica

Energia propagata nello spazio/mezzo materiale sotto forma di onde elettromagnetiche:

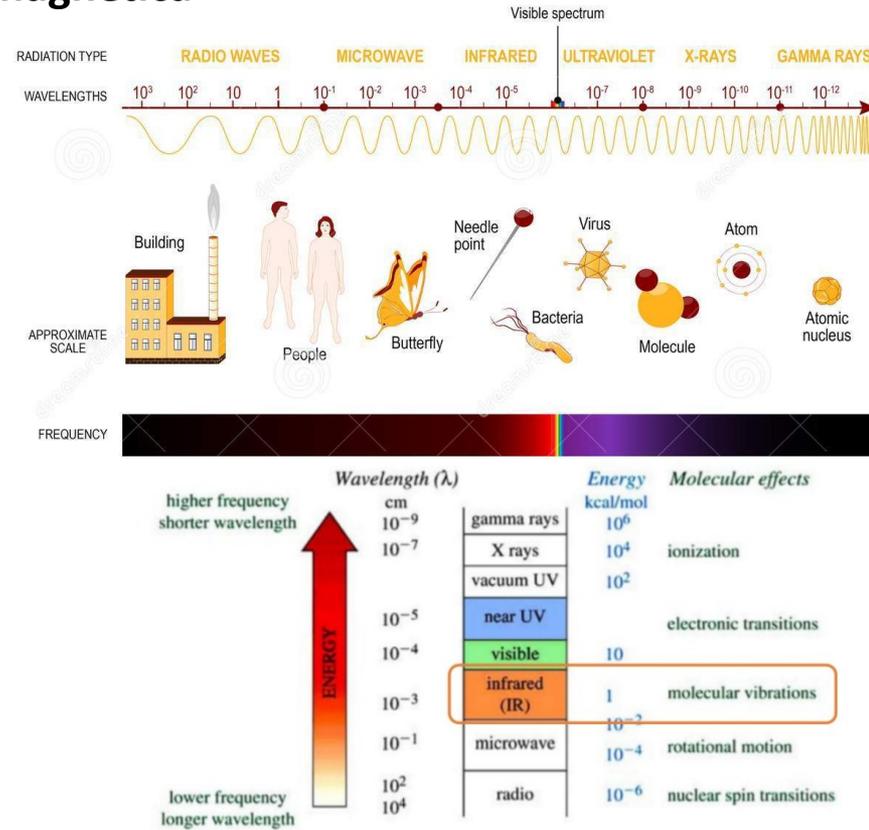
$$c = \lambda \times \nu = 3 \times 10^8 \text{ m/s nel vuoto}$$

$$\text{Numero d'onda} = 1 / \lambda \text{ (cm}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Frequenza } \nu \text{ (GHz; Hz = sec}^{-1}\text{)} = N \text{ oscillazioni/sec}$$



INFRAROSSO (IR) (1-100 micron).



Regione	Intervallo cm^{-1}	Informazioni vibrazionali / rotazionali
IR vicino	14000 - 4000	Cambiamenti nei livelli vibrazionale e rotazionale , transizioni elettroniche
IR medio	4000 - 400	Cambiamenti nei livelli vibrazionali fondamentali della maggior parte delle molecole
IR lontano	400 - 20	Cambiamenti nel livello di energia rotazionale

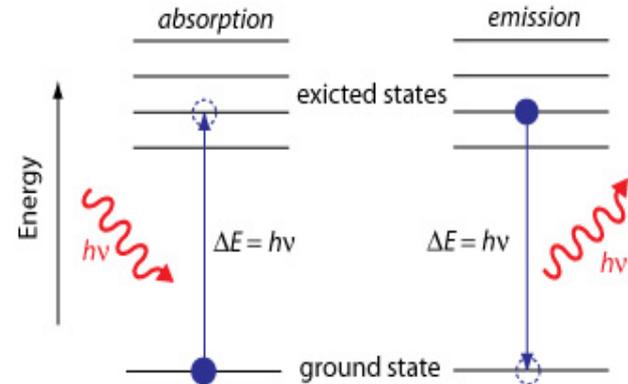
Analisi delle strutture secondarie:

FT-IR: basi

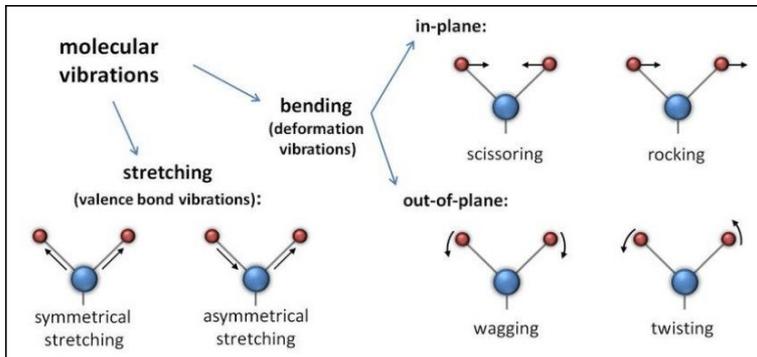
Eccitazione molecolare e atomica

Energia della molecola data da moti:

1. Elettronici
2. Rotazionali
3. Traslazionali (dipende dai moti termici)
4. **Vibrazionali**



Stretching Bending



Le molecole con legami simmetrici (N₂, O₂ o H₂) non assorbono nell'IR poiché non c'è modifica del momento di dipolo



Analisi delle strutture secondarie:

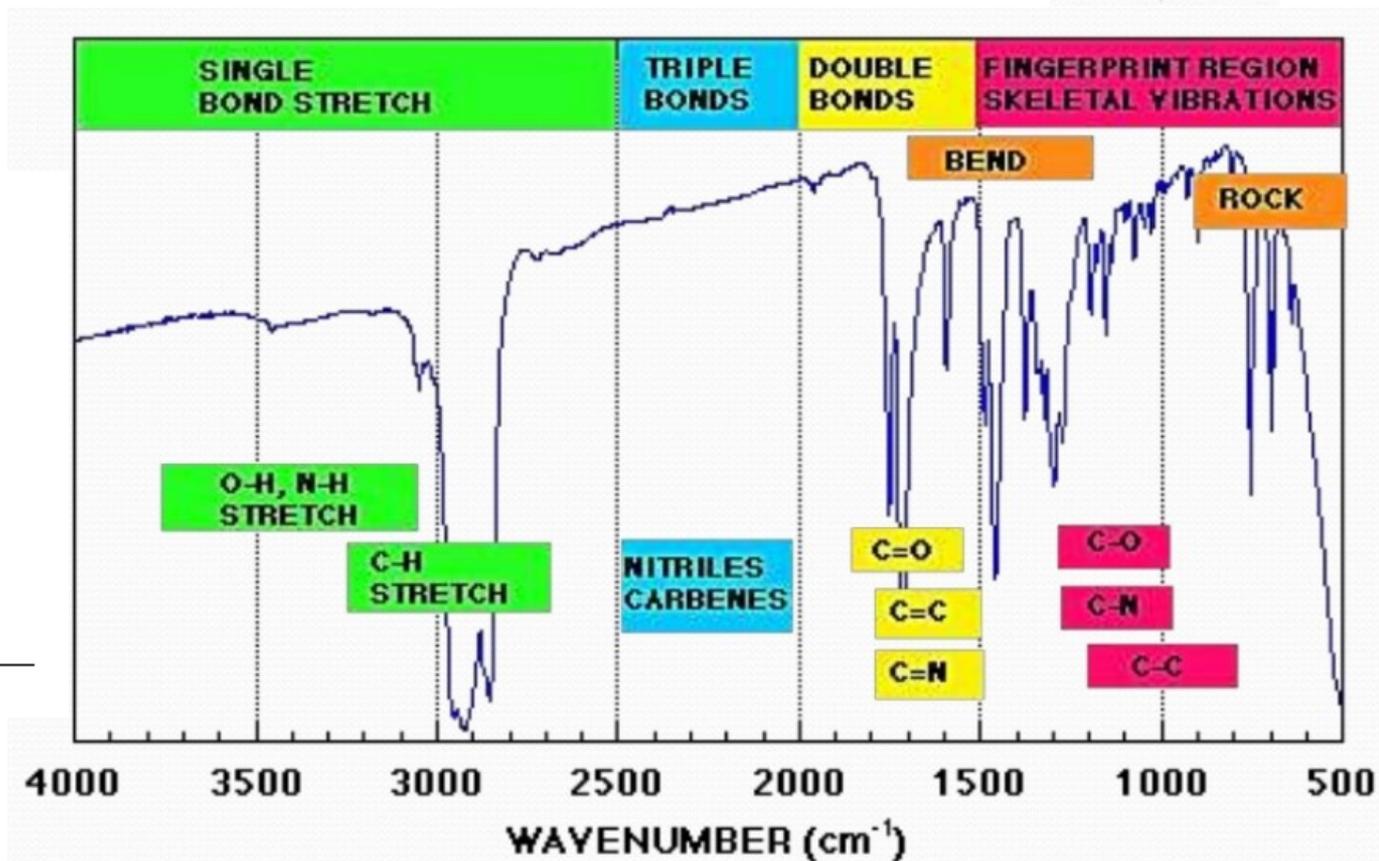
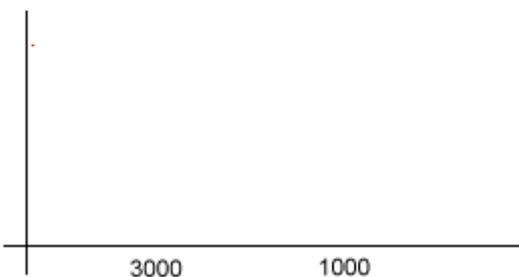
FTIR: basi

Grafico IR: 4 regioni



Proprietà dei picchi:

1. Intensità
2. Forma
3. Posizione

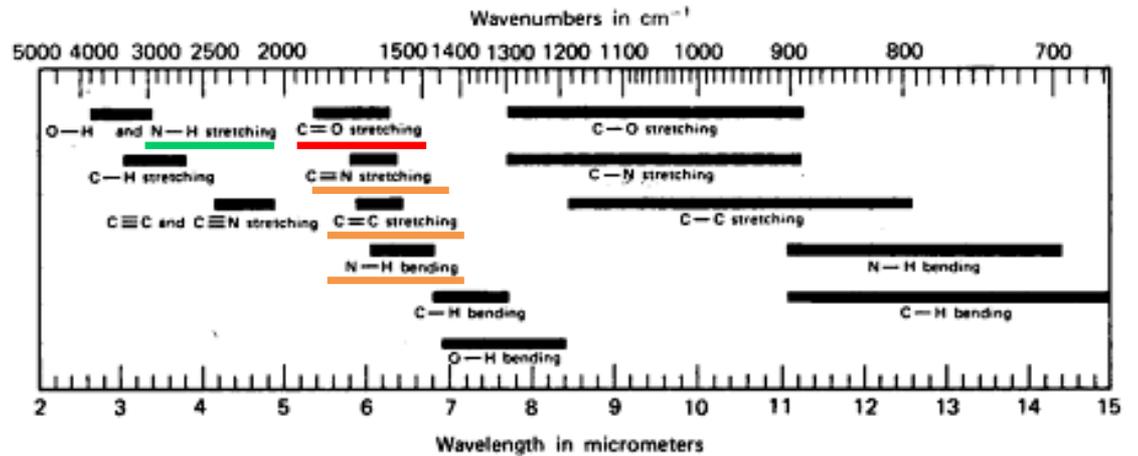


Analisi delle strutture secondarie:

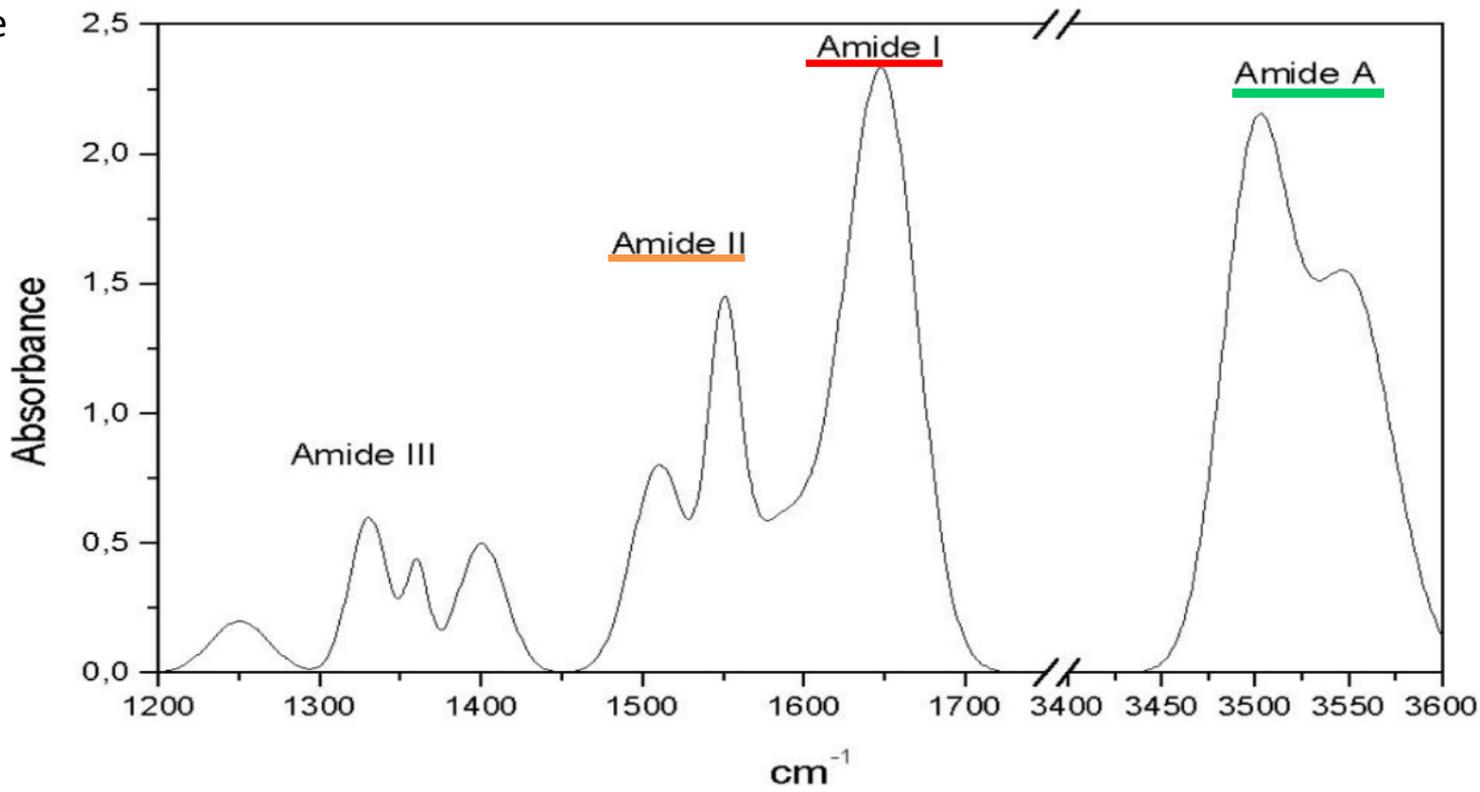
FT-IR: basi

Spettro IR delle proteine:

Dipende da gruppo peptidico:

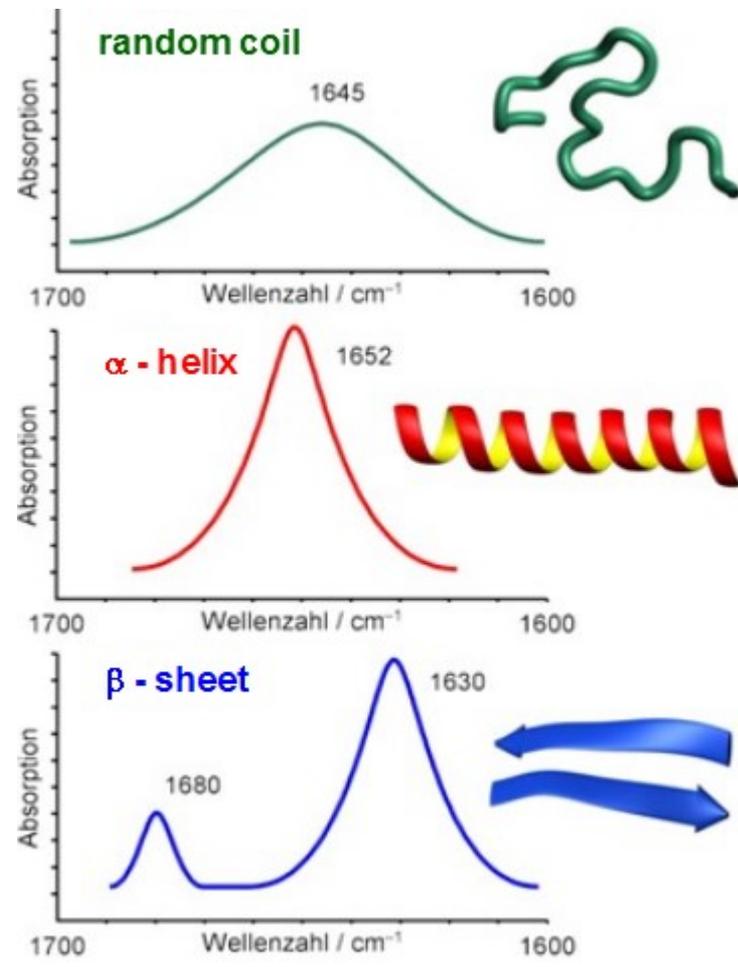
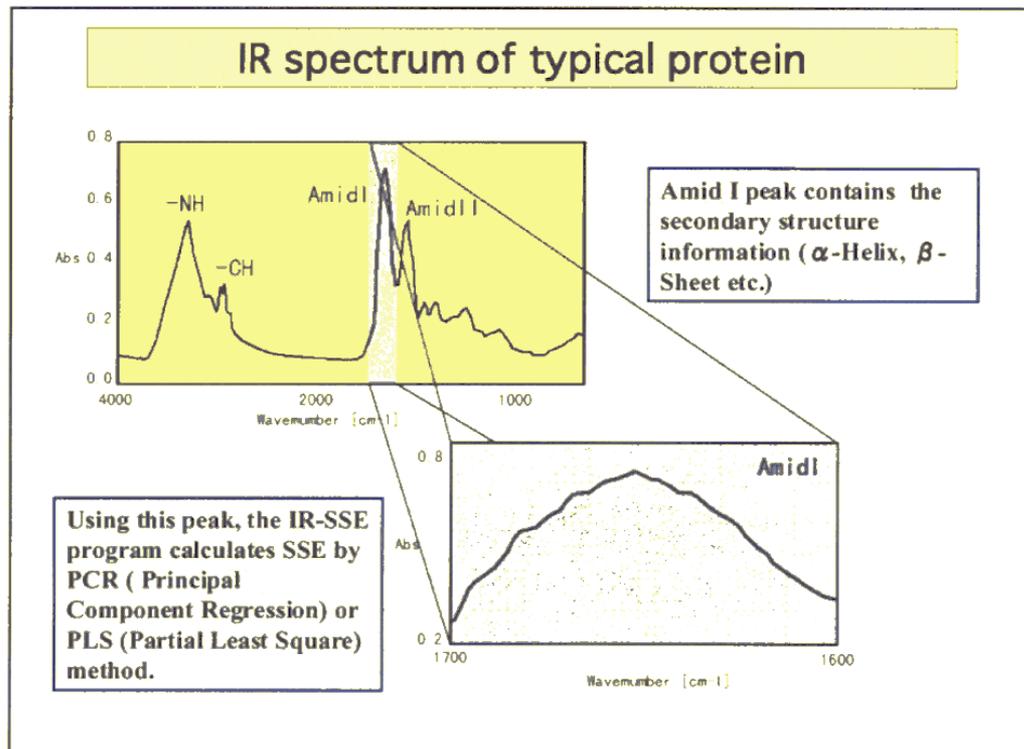


9 bande caratteristiche



Analisi delle strutture secondarie:

FT-IR: basi
Spettro IR:

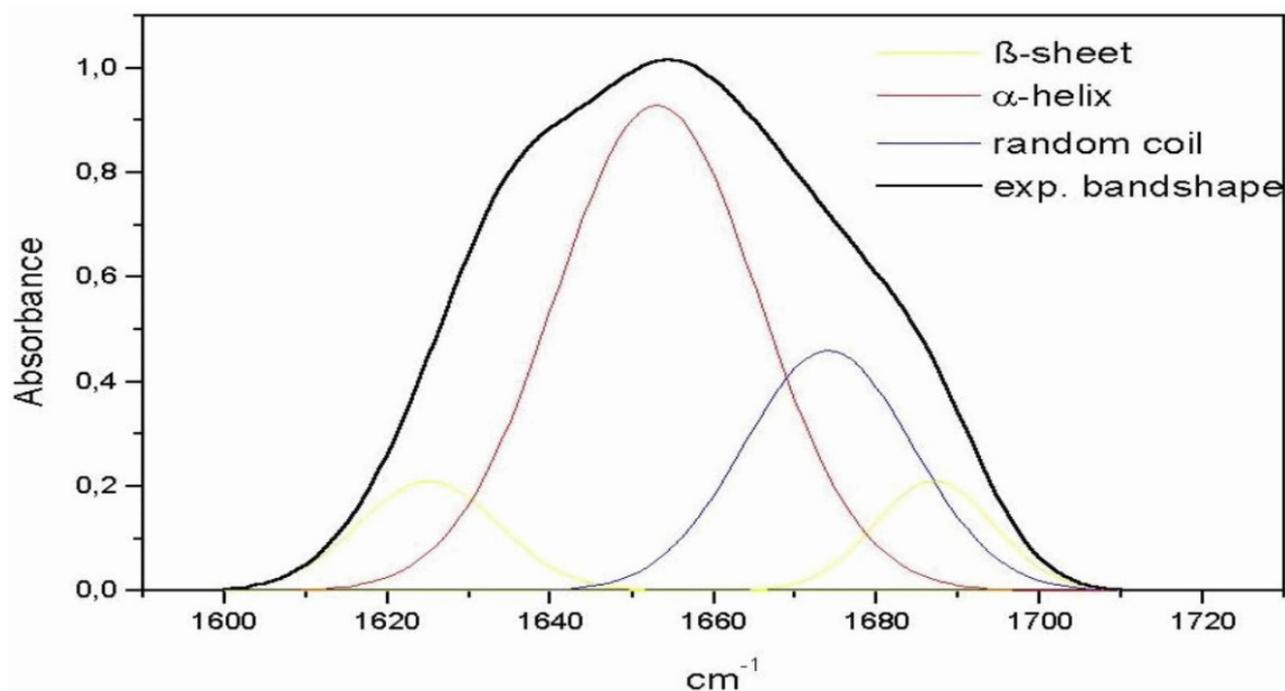


Analisi delle strutture secondarie:

FT-IR: basi

Spettro IR:

Vibrazioni della catena laterale degli aminoacidi (Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Tyr, Phe, His) contributo stimato da una somma di componenti gaussiane e lorentziane.



Struttura secondaria nelle proteine

fitting per stimare quantitativamente l'area di ciascun componente



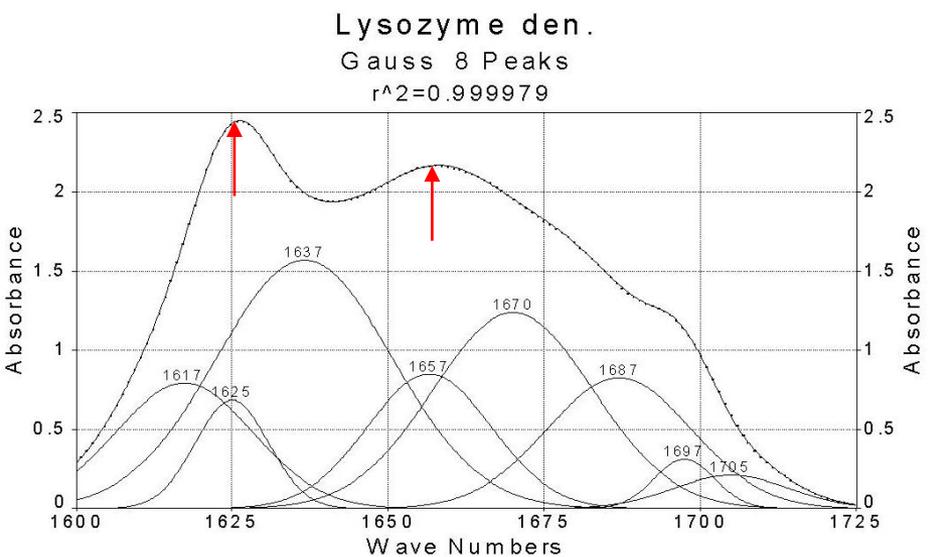
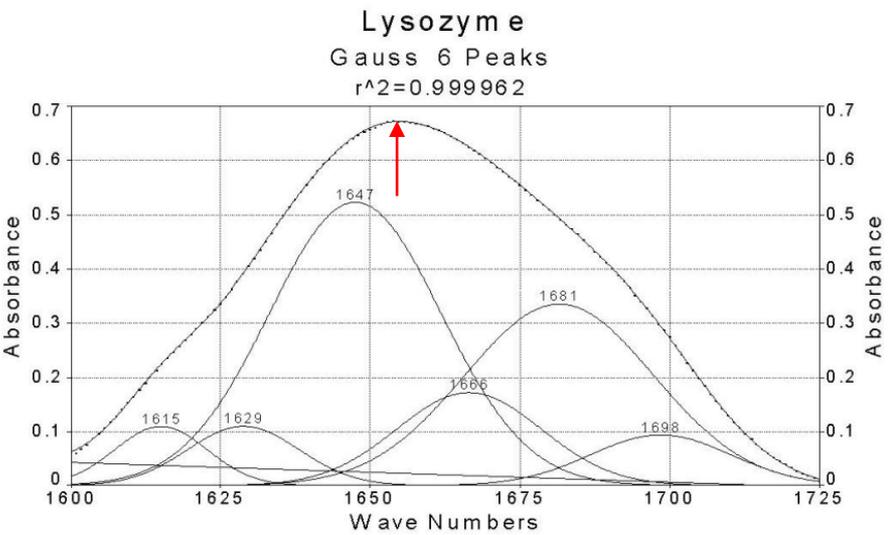
spettro deconvoluto

Analisi delle strutture secondarie:

FT-IR: basi
Spettro IR:

nativo

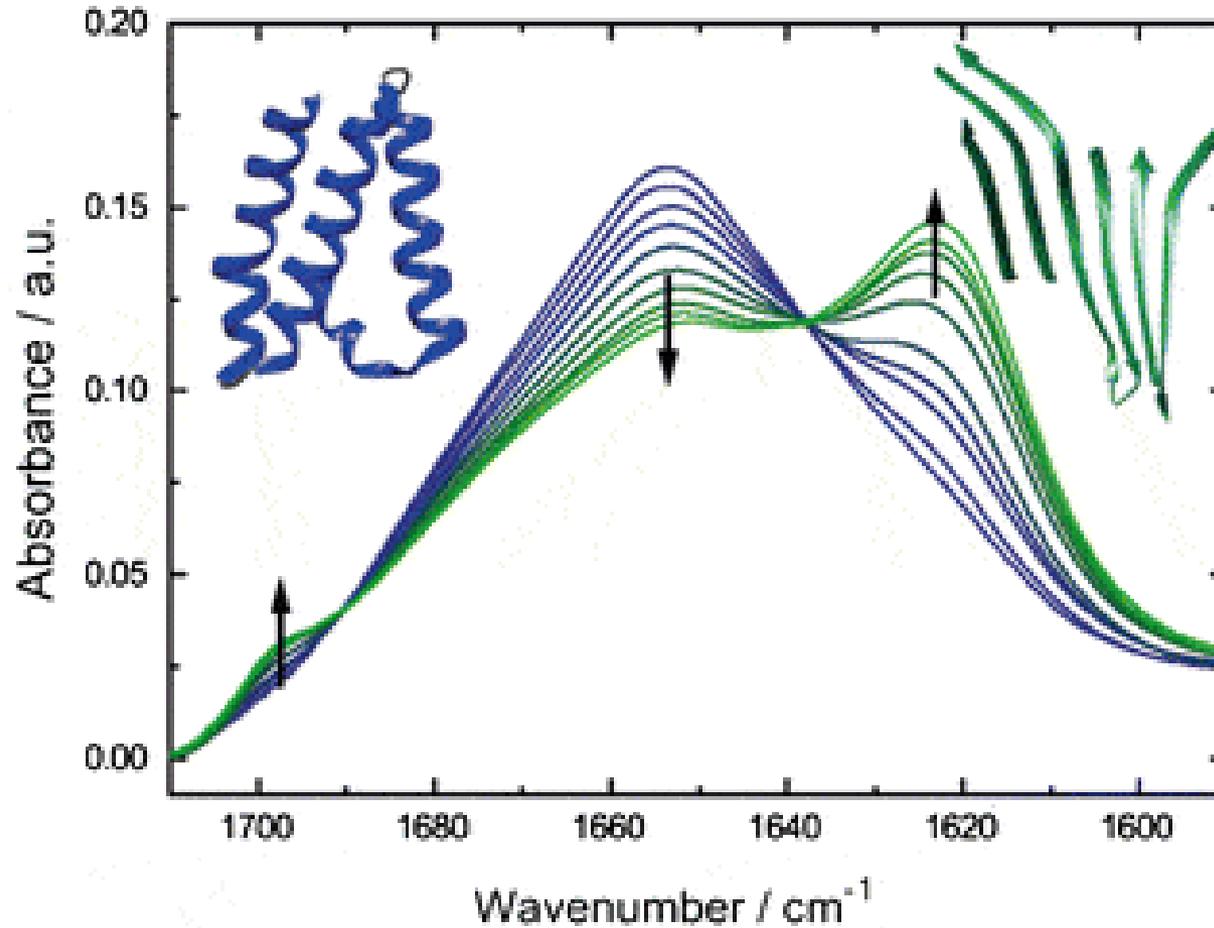
termicamente denaturato



Analisi delle strutture secondarie:

FT-IR: basi

Spettro IR:



Analisi delle strutture secondarie:

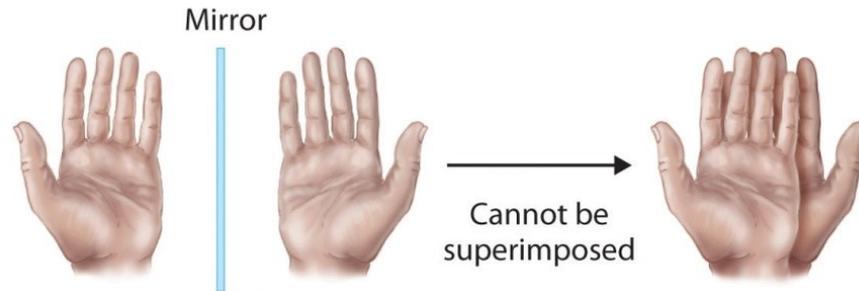
FT-IR:



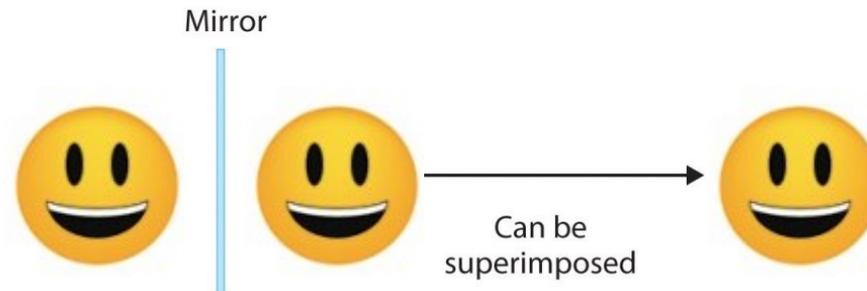
- **non distruttiva qualitativa/quantitativa**
- **nativo** (in soluzione)
- sensibile ai cambiamenti conformazionali
- dinamiche strutturali/stabilità

Analisi delle strutture secondarie:

CD: chiralità

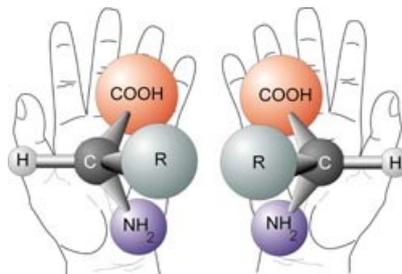


(a) Chiral objects



(b) Achiral objects

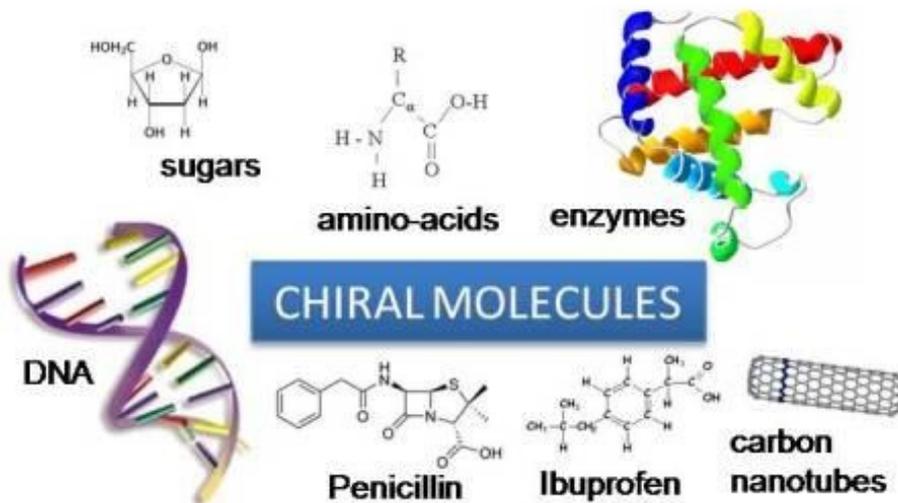
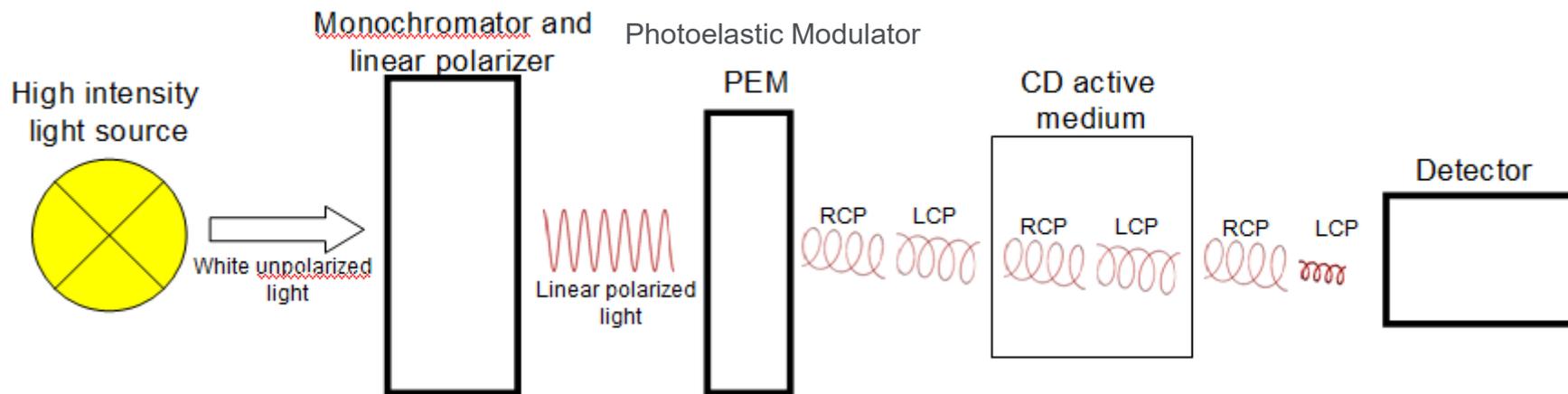
(-) levorotatorio
Enantiomero (R)
D-aa



(+) destrorotatorio
Enantiomero (S)
L-aa

Analisi delle strutture secondarie:

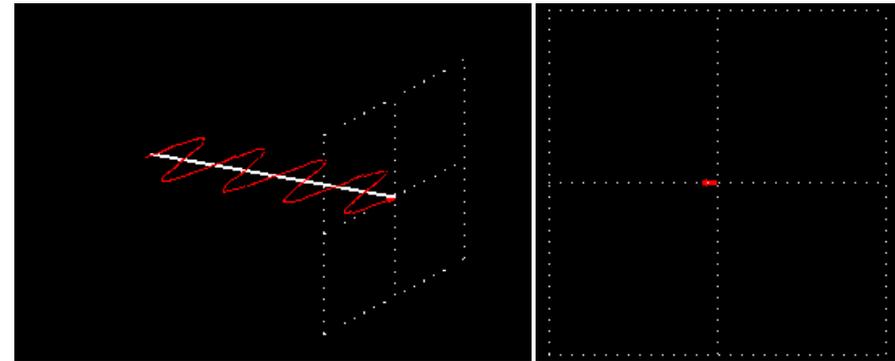
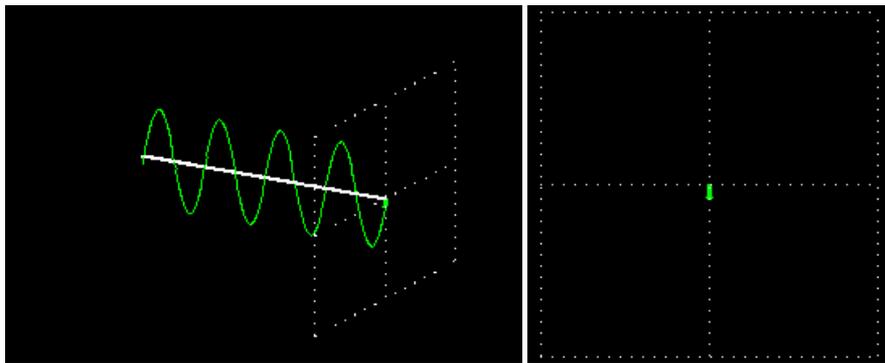
CD: chiralità



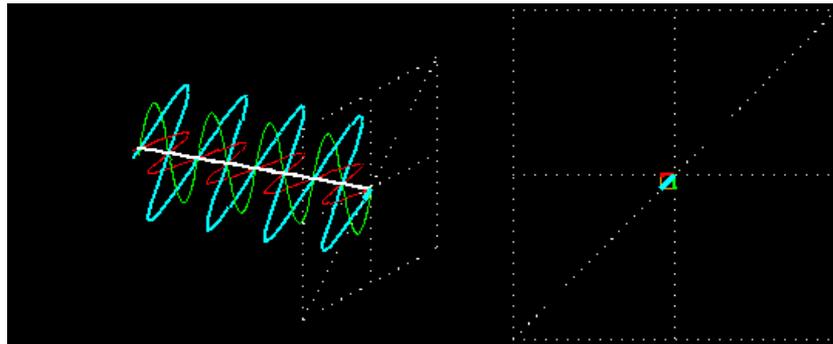
Analisi delle strutture secondarie:

CD: basi

Luce polarizzata **linearmente**: oscillazioni confinate su un unico piano



Vettore elettrico: Direzione costante – Ampiezza varia



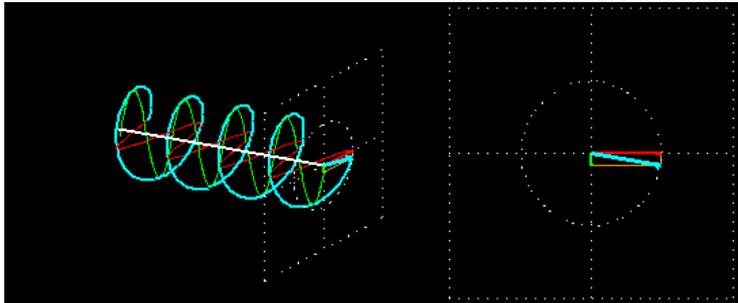
due onde elettromagnetiche polarizzate linearmente in piani perpendicolari con la **stessa ampiezza** e **lunghezza d'onda** oscillano nella **stessa fase**

Analisi delle strutture secondarie:

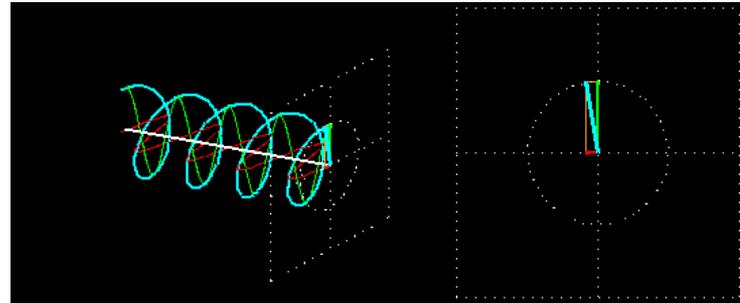
CD: basi

Luce polarizzata **circolarmente**: risulta da due onde elettromagnetiche polarizzate linearmente in piani perpendicolari con la **stessa ampiezza e lunghezza d'onda** oscillano con una **differenza di fase di 90°**

differenza di fase di 90°



differenza di fase di -90°



Vettore elettrico

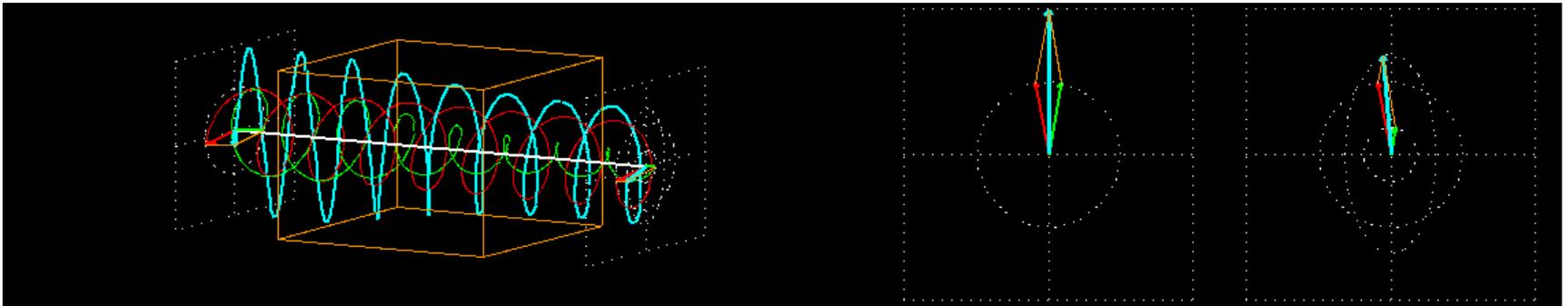
Direzione varia e gira intorno alla direzione di propagazione (in una oscillazione descrive un cerchio)

Ampiezza costante

Analisi delle strutture secondarie:

CD: basi

Alcuni materiali **OTTICAMENTE ATTIVI** o **CHIRALI** assorbono la luce polarizzata circolarmente sinistra e destra in misura diversa.



luce polarizzata **ellitticamente**

con l'asse maggiore parallelo al piano di polarizzazione dell'onda luminosa

con la direzione di rotazione determinata dalla componente circolare più forte dopo aver attraversato il materiale.

Quanto ellittica diventa l'onda polarizzata nel piano è determinata dalla **differenza tra gli assorbimenti** delle due componenti polarizzate circolarmente.

Analisi delle strutture secondarie:

CD: basi

misura la **differenza di assorbimento** della luce polarizzata circolarmente a sinistra e a destra da parte di una sostanza otticamente attiva

Storicamente, l'ellitticità (unità del CD)

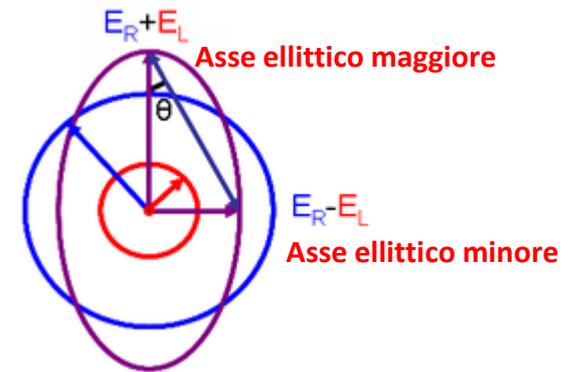
$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L}$$

E_R = ampiezza del campo elettrico della luce polarizzata circolarmente destra

E_L = ampiezza del campo elettrico della luce polarizzata circolarmente sinistra

Se $E_R = E_L$, $\theta = 0^\circ$ (luce è polarizzata linearmente).

Se $E_R = 0^\circ$ o $E_L = 0^\circ$ (quando c'è una completa assorbanza della luce polarizzata circolare in una direzione), $\theta = 45^\circ$ e la luce è polarizzata circolarmente.



Empiricamente (Legge di Lambert-Beer)

$$I = I_0 10^{-\epsilon L [c]}$$

ϵ coefficiente di estinzione molare

a una determinata λ , $A = \log (I / I_0) \rightarrow \Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R) L [c]$

Visto che l'assorbimento di una sostanza chirale modifica anche gli ϵ delle componenti destra e sinistra:

Il CD misura la differenza $\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ in funzione della λ (SPETTRO CD), espressa in

Ellitticità $(\theta) = 2.303 (A_L - A_R) / 4L = 2.303 [c] (\epsilon_L - \epsilon_R) / 4$

Ellitticità molare $[\theta] = 100 \theta / [c] L = 3298 (\epsilon_L - \epsilon_R)$

Analisi delle strutture secondarie:

CD: Attività ottica nelle proteine

Spettro CD lontano UV: 170 ~ 260 nm

Dipende da A degli e- del legame peptidico:
l'intensità e l'energia di queste transizioni dipendono da ϕ e ψ :

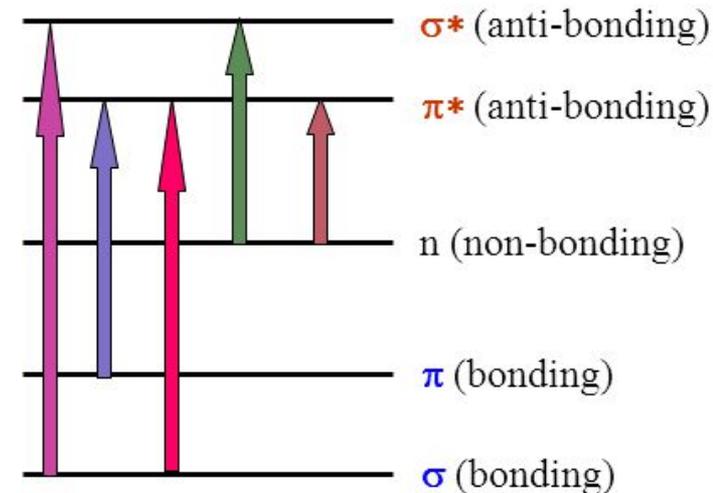
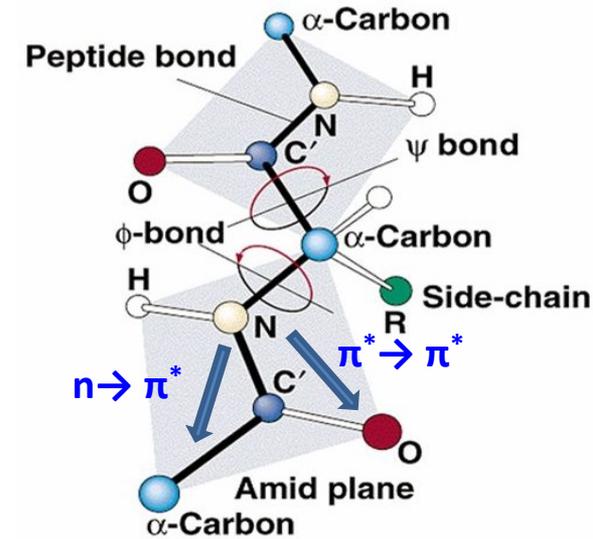
→ struttura secondaria proteina

La transizione $n \rightarrow \pi^*$ (debole assorbanza molare perché transizione di dipolo elettrico proibita).

La transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ (assorbanza molare più forte: transizione di dipolo elettrico permessa).

SE cromofori peptidici vicini con intense transizioni permesse del dipolo elettrico

si accoppiano → **ACCOPPIAMENTO ECCITONICO**, sensibile alle disposizioni geometriche e agli orientamenti dei peptidi nello spazio 3D

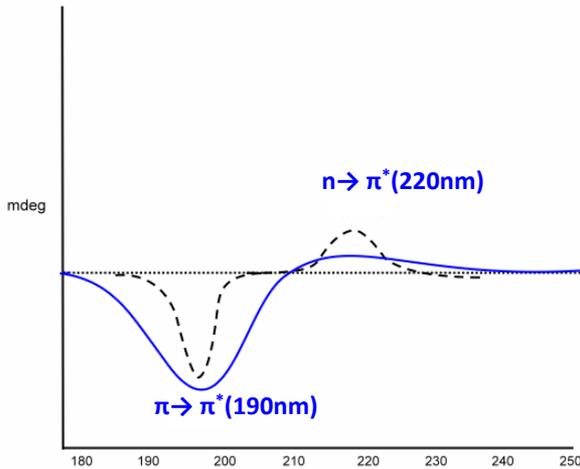


Analisi delle strutture secondarie:

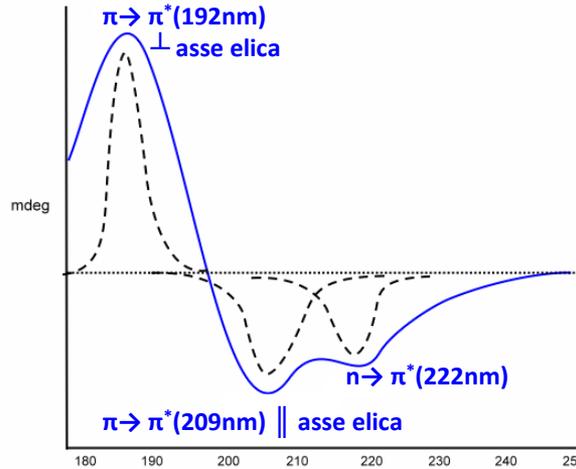
CD: Attività ottica nelle proteine

Questo accoppiamento fornisce segnali CD che sono distintivi per diverse disposizioni spaziali e in genere molto più intensi rispetto a quelli dei singoli cromofori isolati

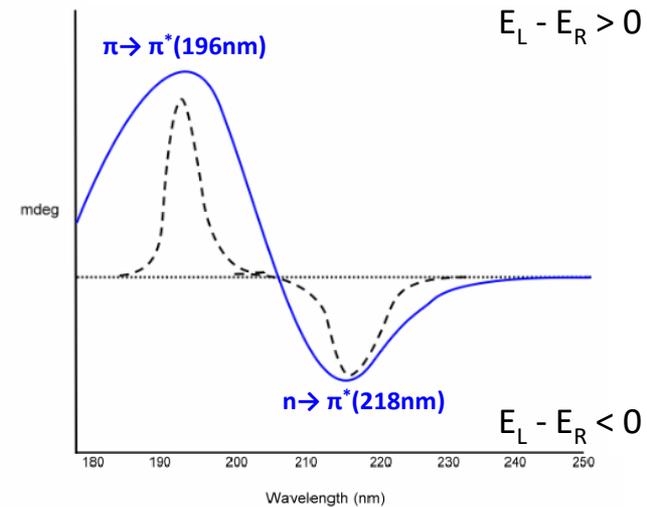
random coil



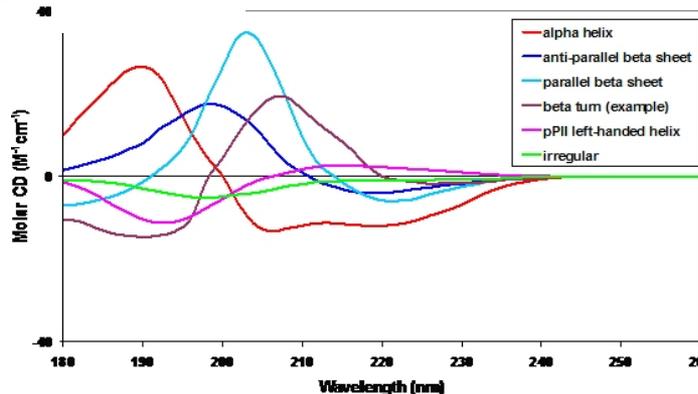
alfa-elica



foglietto beta



	-ve band (nm)	+ve band (nm)
α -helix	222 208	192
β -sheet	216	195
β -turn	220-230 (weak) 180-190 (strong)	205
L.H polypro II helix	190	210-230 weak
Random coil	200	



Lo spettro CD nella regione dell'UV lontano può essere complicato dall'assorbimento di Phe, Tyr, Trp e legami S-S attraverso transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ permesse

Analisi delle strutture secondarie:

CD: Attività ottica nelle proteine

La chiralità della molecola può essere conformazionale piuttosto che strutturale:

Spettri CD della **poli-L-lisina** nelle conformazioni a pH 11.1

1 (nero) α -elicoidale

2 (rosse) β -foglietto anti-parallelo

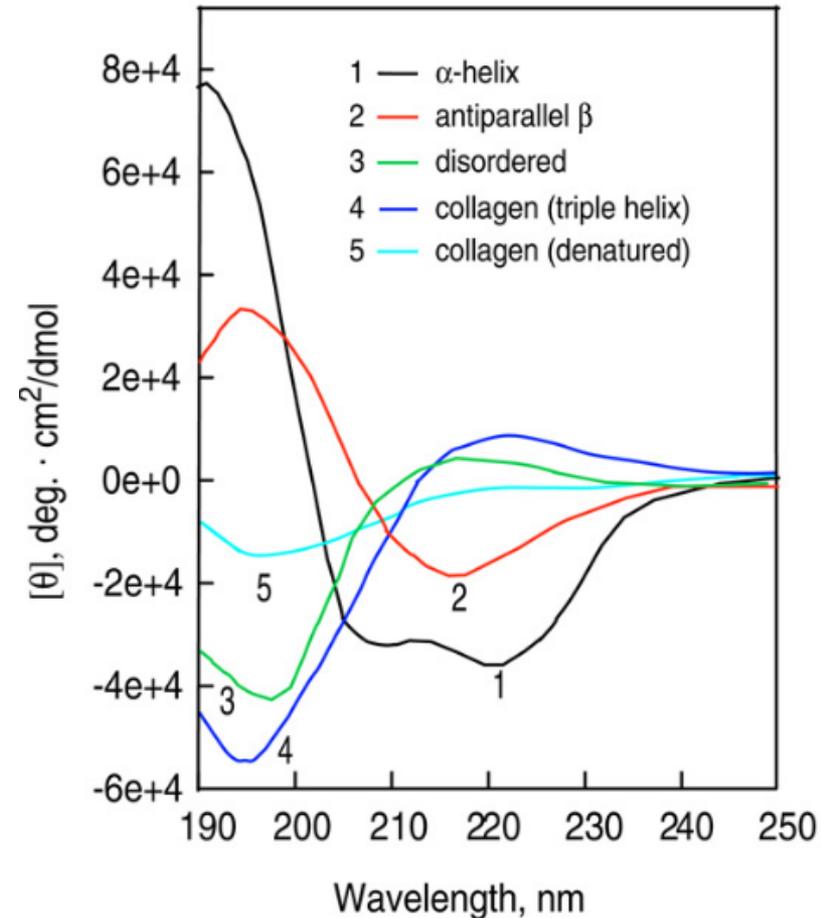
3 (verdi) random coil

a pH 5.7

Spettri CD del **collagene** placentare nelle sue conformazioni

4 (blu) nativa a tripla elica

5 (ciano) denaturata



Analisi delle strutture secondarie:

CD: Attività ottica nelle proteine

Spettro CD UV vicino di proteine: 250 ~ 350 nm - struttura terziaria

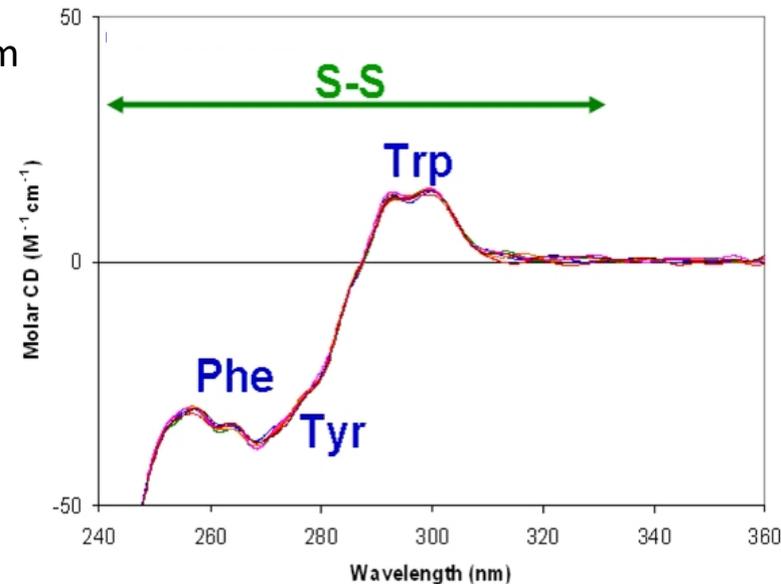
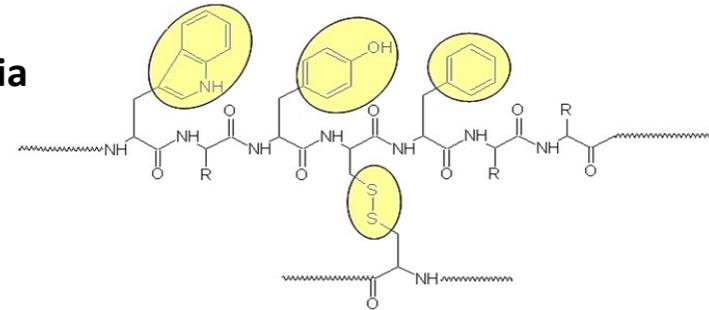
dovuti all'assorbimento, all'orientamento del dipolo e alla natura dell'ambiente circostante di aa aromatici e dei ponti disolfuro:

Il contributo dei ponti disolfuro è in genere ampio fino a 330 nm dipende da ϕ / ψ .

Le bande aromatiche si distinguono più facilmente a
285-310 nm (Trp)
275-285 nm (Tyr)
255-270 nm (Phe)

dipendono dall'influenza chirale dei loro ambienti → cambiano intensità, segno e, in misura minore, posizione precisa con variazioni nell'ambiente circostante.

NB: [c] più elevate o cammini ottici più lunghi.

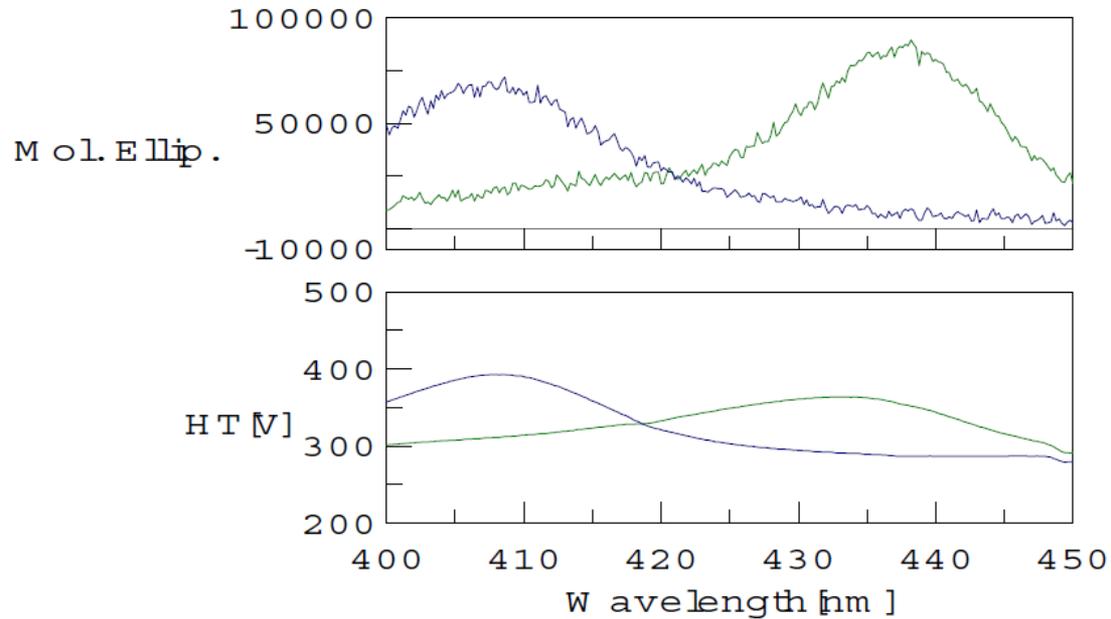


Analisi delle strutture secondarie:

CD: Attività ottica nelle proteine

Spettro CD visibile di proteine: 250 ~ 350 nm per studiare le interazioni metallo-proteina

solo quando uno ione metallico si trova in un ambiente chirale (non rileva ioni metallici liberi in soluzione).

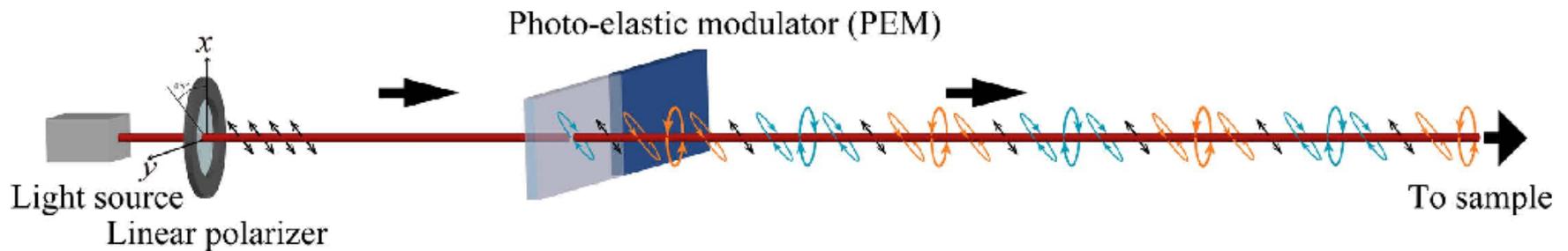


Gli spettri di mioglobina Fe (III) e mioglobina Fe (II) da liposomi estrusi

Analisi delle strutture secondarie:

CD: setup

in atmosfera di N_2 : sostituisce l' O_2 per evitare la formazione di ozono e ridurre l'assorbimento che sottrae la luce necessaria all'esperimento.



Cell Path length	Volume	Protein Conc	Wave length
0.1 mm	26 μ L	1.500 mg/mL	180.0 nm – 260.0 nm
0.2 mm	52 μ L	0.750 mg/mL	180.0 nm – 260.0 nm
1.0 mm	350 μ L	0.150 mg/mL	190.0 nm – 260.0 nm
2.0 mm		0.075 mg/mL	190.0 nm – 260.0 nm
10 mm		0.015 mg/mL	200.0 nm – 260.0 nm

OD_{max} at 280 nm: 0.5-0.8 AU

Analisi delle strutture secondarie:

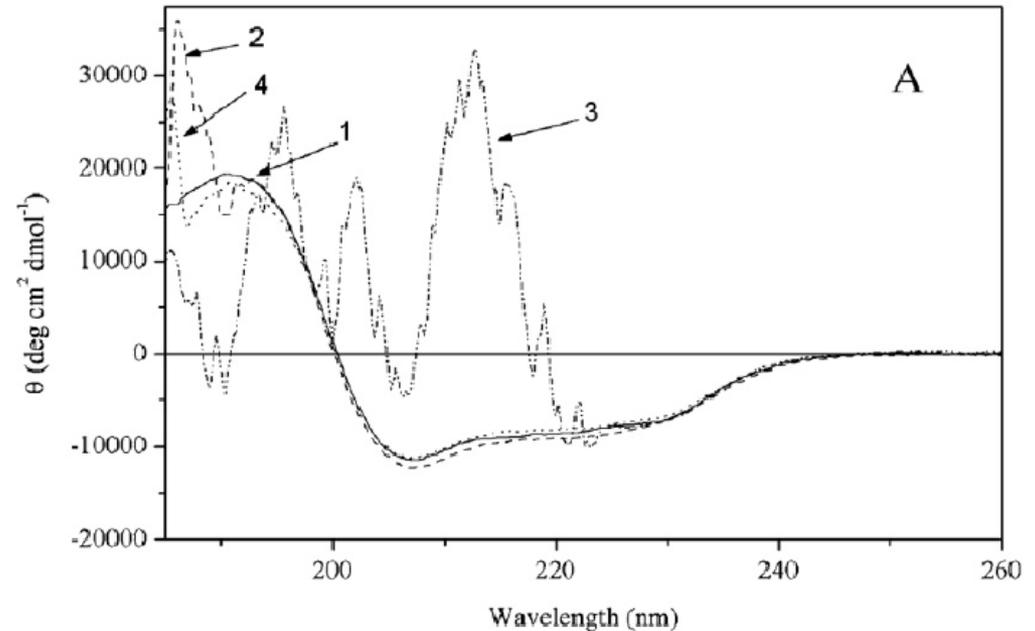
CD: Importanza del tampone

Spettri CD nell'UV lontano del lisozima in

1. 50mM Na fosfato pH 7.5
2. 50mM Na fosfato pH 7.5, 150mM NaCl
3. 50mM Na fosfato pH 7.5, 150mM imidazolo
4. 50mM Tris/Acetato pH 7.5

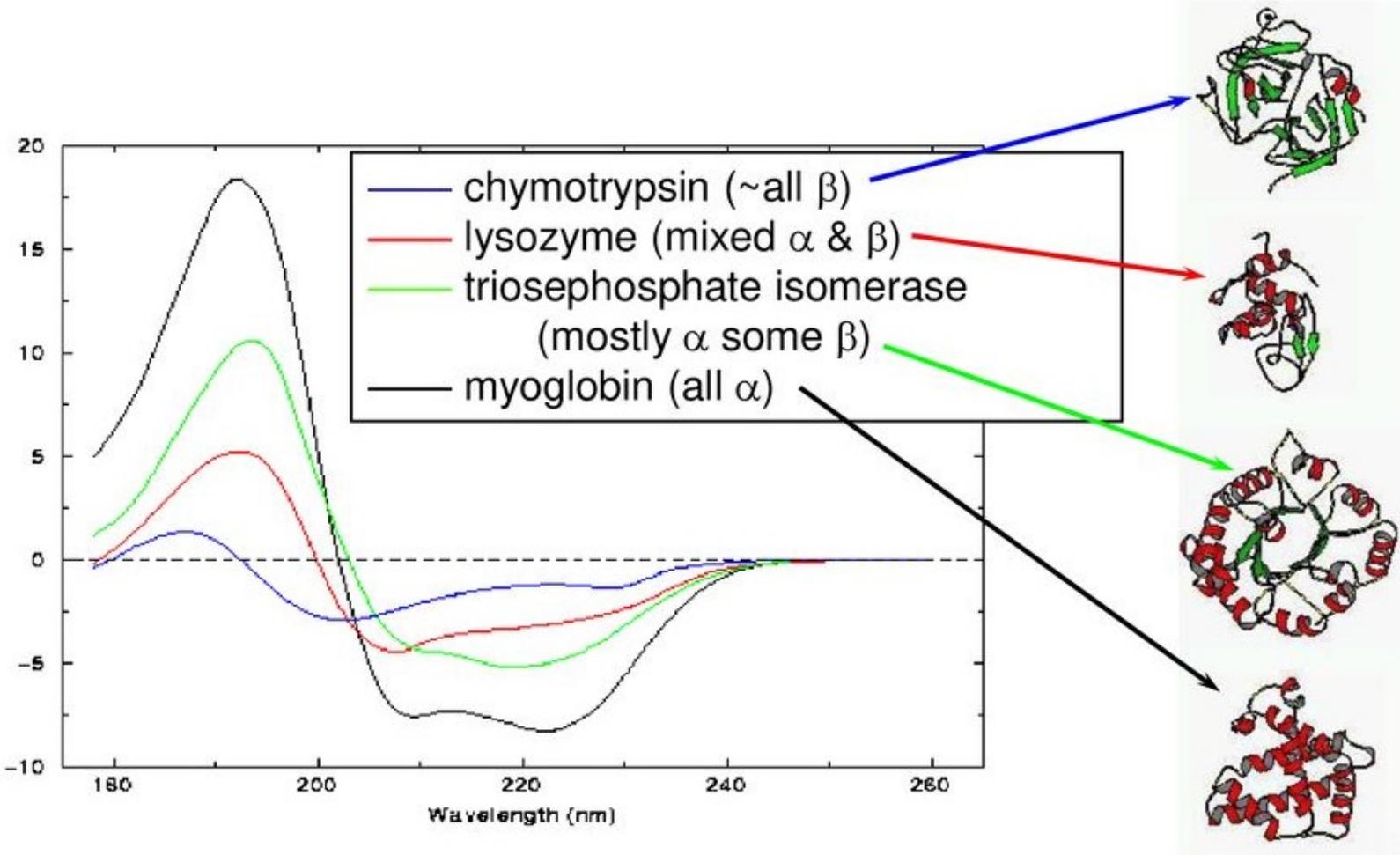
limiti di λ per tamponi e solventi comuni

Water	<185
Trifluoroethanol	<185
Hexafluoroisopropanol	<185
Acetonitrile	185
Methanol	195
Ethanol	196
2-Propanol	196
Cyclohexane	<185
Dimethylsulfoxide	251
Dioxane	232
<hr/>	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.15 M	191
NaCl 0.15 M	196
NaClO ₄ 0.15 M	<185
NaNO ₃ 0.15 M	245
<hr/>	
Phosphate 100 mM	<185
Tris 100 mM	195
Pipes 100 mM	215
Mes 100 mM	205
<hr/>	
GdnHCl 4 M	210
Urea 4 M	210
<hr/>	
(For one mm pathlength.)	



Analisi delle strutture secondarie:

CD: esempi



Analisi delle strutture secondarie:

CD: fitting degli spettri

Ad ogni λ , l'ellitticità (θ) dello spettro conterrà una combinazione lineare dei 3 componenti:

$$\theta_T = \chi_1 \theta_\alpha + \chi_2 \theta_\beta + \chi_3 \theta_c$$

Un intero spettro di CD consente di minimizzare la deviazione totale tra tutti i punti sperimentali e i valori del modello calcolati mediante la somma dei residui quadrati (s.r.s.)

$$s.r.s. = \sum_{i=1}^{ndata} (x_1 \cdot \theta_{h(i)} + x_2 \cdot \theta_{s(i)} + x_3 \cdot \theta_{c(i)} - \theta_{T(i)})^2$$



On-line analysis for protein Circular Dichroism spectra

<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

[Apply for a user-account](#)

[Analyse data](#) (registered users only)

Citing DichroWeb:

If you use DichroWeb for your analysis you agree to cite the publications detailing the original methods and reference data used, as well as one of the specific DichroWeb papers:

Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2008) *Biopolymers* 89: 392-400. (PDF)

Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004) *Nucleic Acids Research* 32: W668-673. (PDF)

DichroWeb News

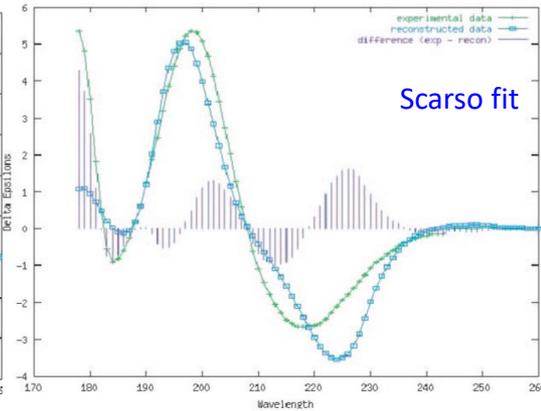
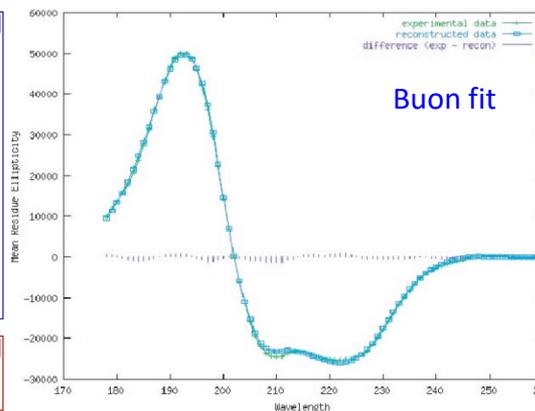
Video guides:

- ★ [Accurate measuring of the true pathlength of optical CD cells](#)
- ★ [Cleaning and Loading Circular Dichroism Cells](#)
- ★ [Calibrating CD Spectra with CDTool and MS Excel](#)
- ★ [Measuring a CSA spectrum](#)
- ★ [PCDDB Tutorial](#)
- ★ [Analysing Protein CD Data using DichroWeb](#)

Related Projects [ValidDichro: CD validation and quality control](#), [2Struc: The Secondary Structure Server](#), [Dichromatch](#), and the [Protein Circular Dichroism Data Bank](#) are now open for use.

Stats

DichroWeb currently has 7200+ registered users and has performed 940,108 deconvolutions.



- [Home](#)
- [Input Data](#)
- [User Guide](#)
- [Background Information](#)
- [FAQ](#)
- [References](#)
- [Links](#)
- [Contact Us](#)
- [Terms and Conditions](#)
- [Cookies](#)

Analisi delle strutture secondarie:

CD: applicazioni

- struttura secondaria/terziaria
- stabilità conformazionale
- Termodinamica/cinetica del folding/denaturazione di proteine e acidi nucleici
- Cambiamenti conformazionali dovuti all'interazione fra diverse molecole
- Costanti di legame

Analisi delle strutture secondarie:

SRCD: Dicroismo Circolare mediante Luce di Sincrotrone

dati a λ più basse contenenti più transizioni elettroniche



segnale-rumore
intensità che consente uso di additivi
più rapide (HT e time-resolved)

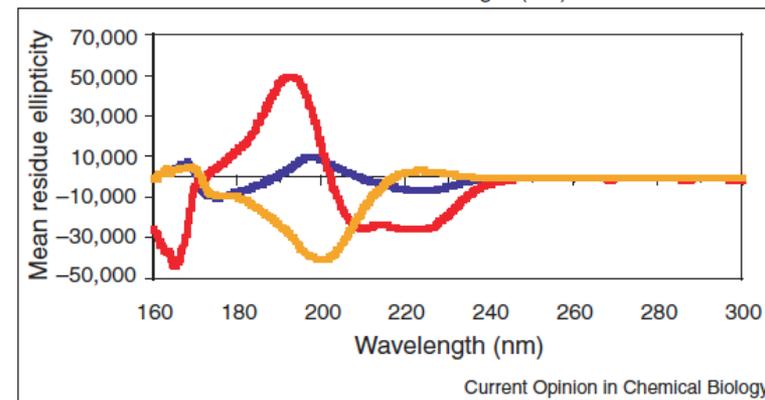
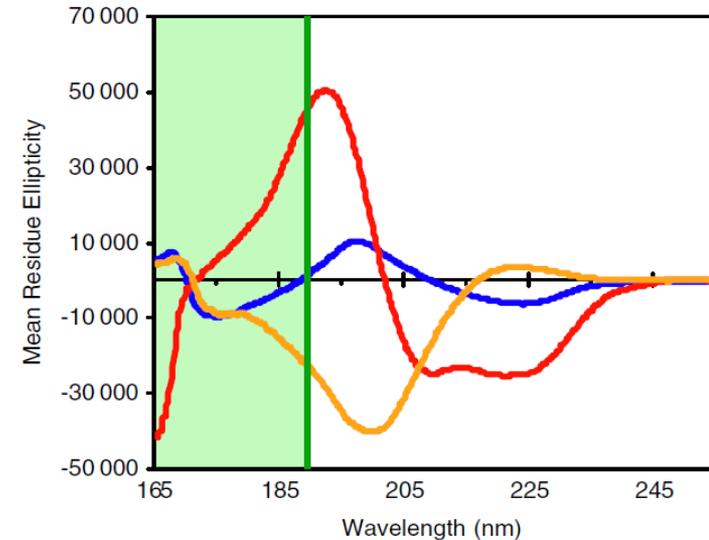
nuove applicazioni

nella genomica strutturale (SG)

- folding per la selezione dei target
- proteine di membrana e delle glicoproteine
- formazione di complessi proteina-proteina/proteina-lipidi

nella genomica funzionale (FG)

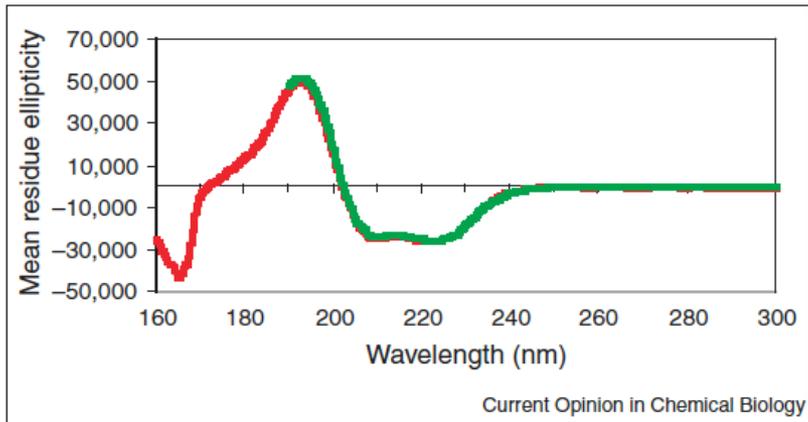
- screening con ligandi per identificare la funzione
- differenze strutturali nei mutanti per ottenere informazioni funzionali



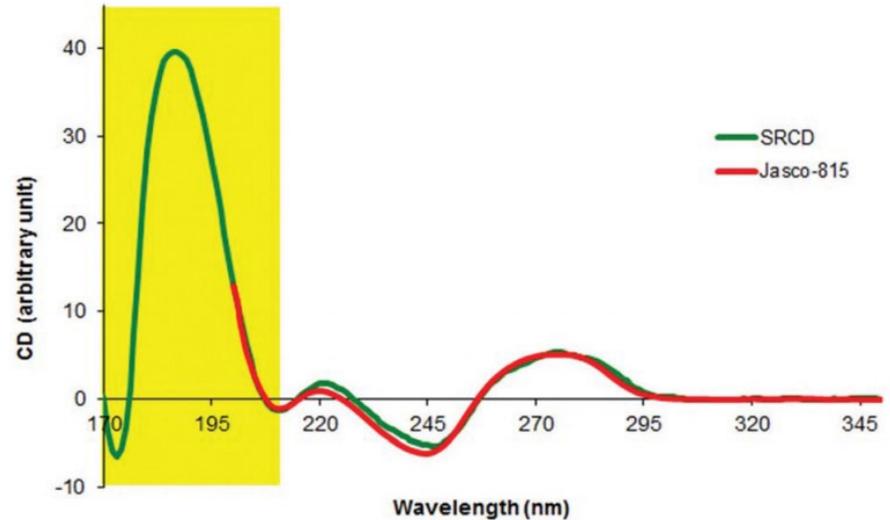
SRCD spectra of proteins representing primarily α -helical (myoglobin; red), β sheet (concanavalin A; blue), and polyproline II helical (type VI collagen; yellow) secondary structures, showing substantial differences are present in the low-wavelength region.

Analisi delle strutture secondarie:

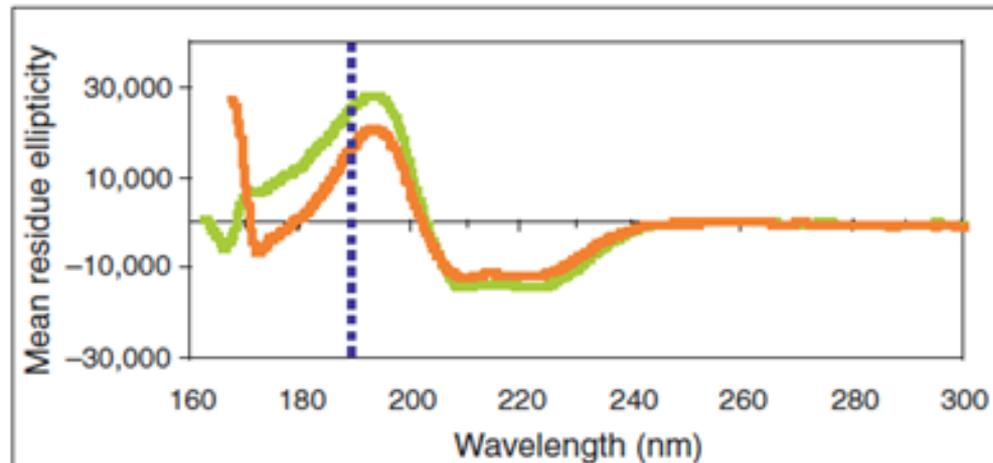
SRCD:



CD (green) and SRCD (red) spectra of horse myoglobin, showing additional transitions in the low-wavelength data present in the SRCD spectra (adapted from [11•]).



SRCD spectra of two proteins with substantially different secondary structures (74% helix, 0% sheet, 10% turn, 16% other [orange] and 48% helix, 5% sheet, 16% turn, 31% other [green]). Over the wavelength range obtained in conventional CD spectroscopy (to the right of the dotted vertical line), the spectra are nearly identical. It is only when the low-wavelength data (left of the vertical line) are considered that the differences in these structures are obvious.



Analisi delle strutture secondarie:

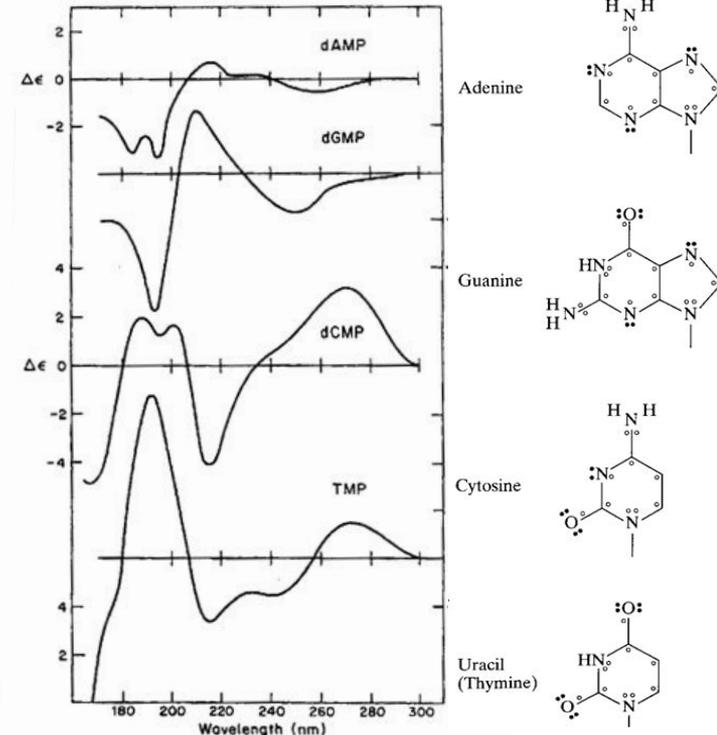
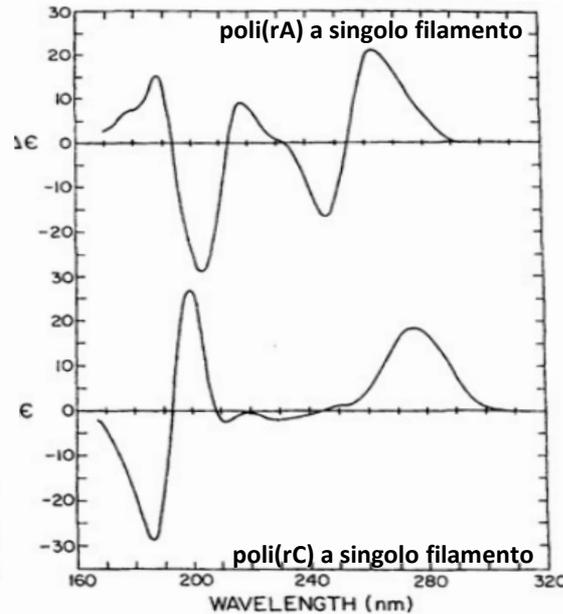
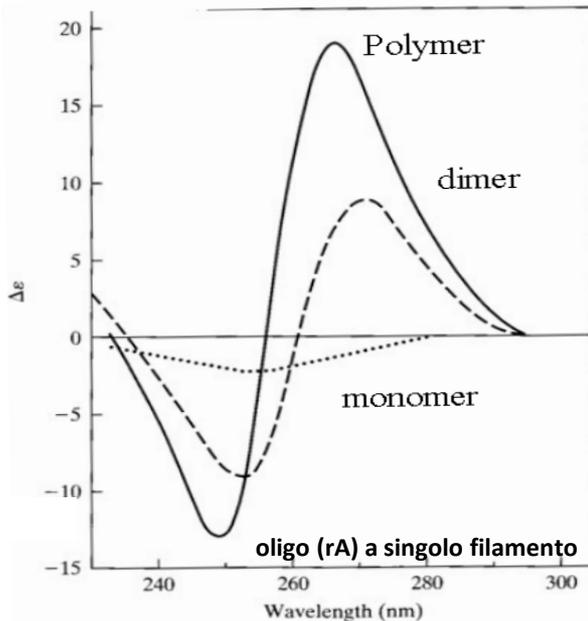
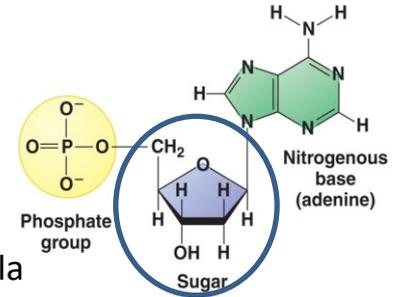
CD di acidi nucleici

La componente dello zucchero è chirale e conferisce l'asimmetria intrinseca:

Le transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ (di zuccheri chirali e le basi cromoforiche) intorno a 300nm mascherano le transizioni $n \rightarrow \pi^*$

Il segnale CD

- deriva dall'interazione fra transizioni di dipolo elettrico delle basi e di altri gruppi della molecola
- dipende dalla lunghezza e composizione



Analisi delle strutture secondarie:

CD di acidi nucleici

I sistemi elettronici delle basi le rendono idrofobiche → si impilano nel solvente per minimizzare la superficie degli e- π esposta al solvente.

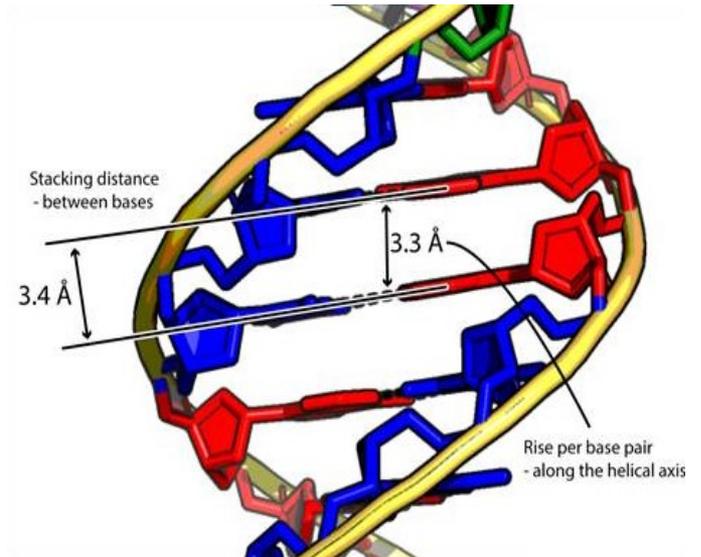
I gruppi idrofili NH, NH₂ e CO formano legami H con il solvente esterno.

→ struttura elicoidale

Le transizioni elettroniche delle basi cromoforiche sono molto vicine e possono interagire

→ spettri di alta intensità per le eliche (super-asimmetria)

→ Sensibile alla conformazione e alla struttura secondaria



Polimorfismo nella struttura secondaria

- bp/giro
- Inclinazione/Distanza della base rispetto all'asse dell'elica

Analisi delle strutture secondarie:

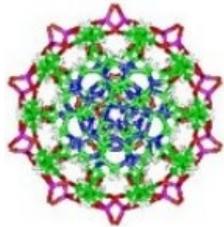
CD di acidi nucleici

DNA forma B:

Picchi:

190nm e 270nm

210nm e 240nm



DNA forma A/RNA:

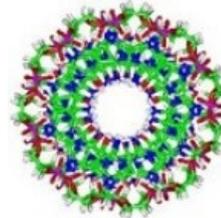
Picchi:

190nm e 260nm

210nm



A

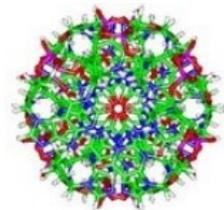


DNA forma Z:

Picchi:

185nm e 260nm

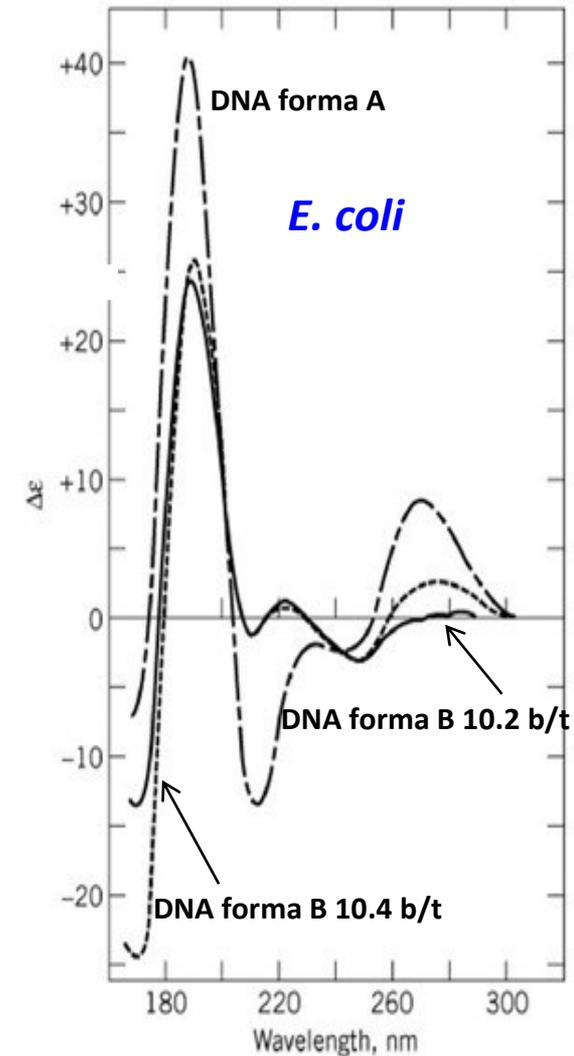
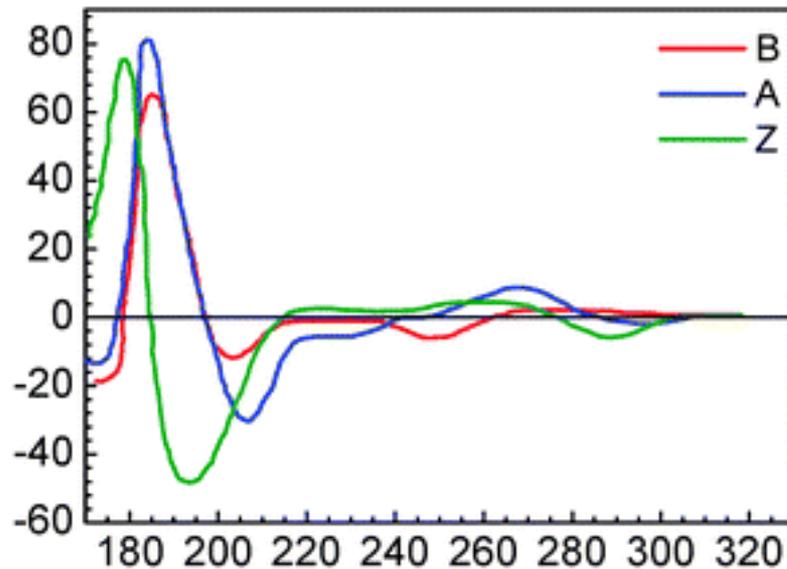
195nm e 290nm



B

Z

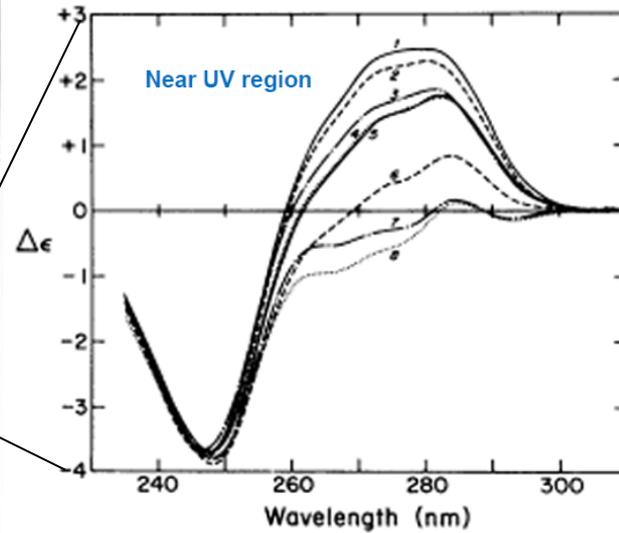
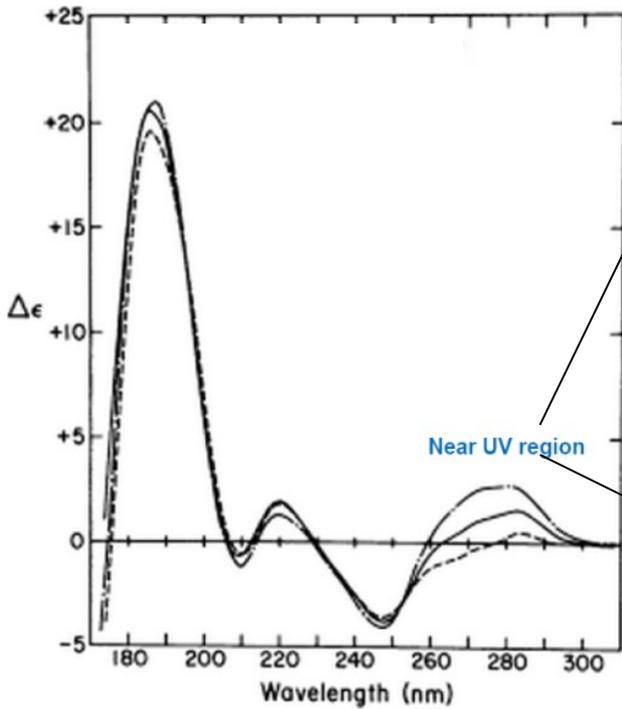
CD signal (mdeg nmol⁻¹ cm²)



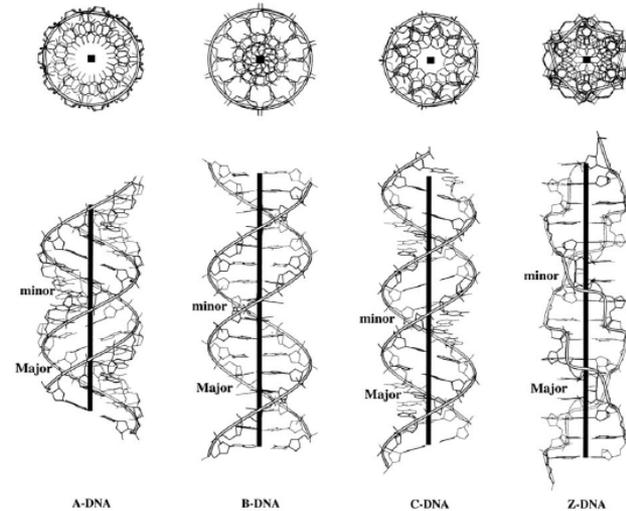
Analisi delle strutture secondarie:

CD di acidi nucleici:

DNA circolare Superavvolto Nicked del Fago PM2: transizione forma B → C



1. 0.05M NaCl
2. 0.2M NaCl
3. 0.1M CsCl
4. 0.3M CsCl
5. 0.2M NH₄Cl
6. 3.0 M CsCl
7. 6.2M LiCl
8. 5.4M NH₄Cl

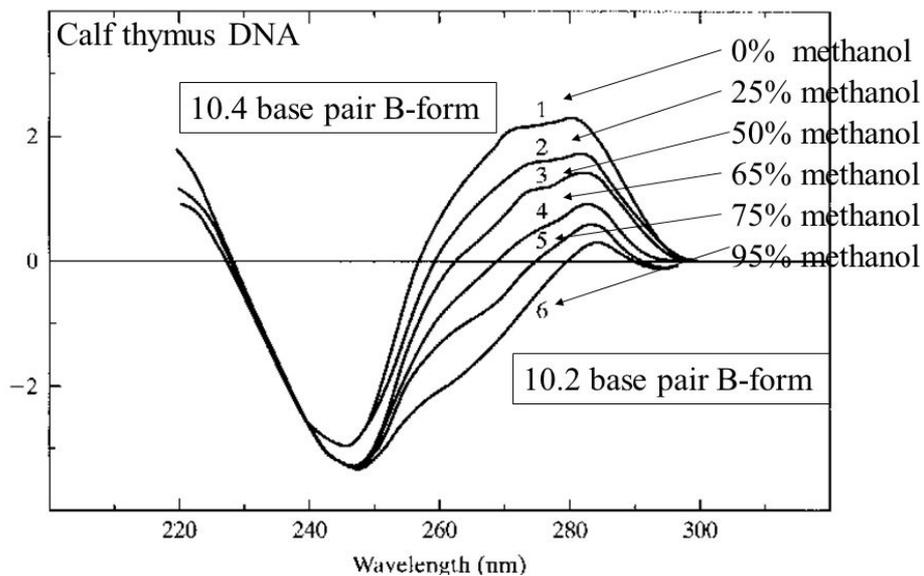


Analisi delle strutture secondarie:

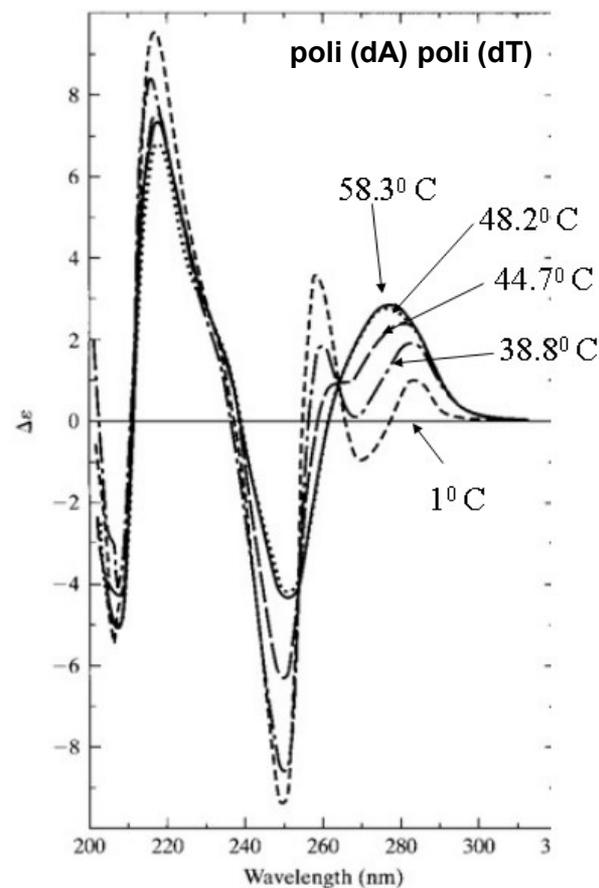
CD di acidi nucleici:

Effetto del

Solvente



Temperatura



Analisi delle strutture secondarie:

CD :



Non distruttivo

Processi dinamici, ad es. folding proteico

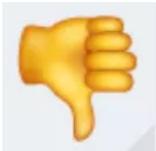
Effetti dell'ambiente sulla struttura proteica

Struttura secondaria e struttura super-secondaria delle proteine di membrana

Studio dei cambiamenti conformazionali indotti dal ligando

Conformazione dei carboidrati

Interazioni proteina-proteina e acido proteina-nucleico



Interferenza con l'assorbimento del solvente

accuratezza media $\pm 10\%$