



Corso di
Proprietà di Biopolimeri

Prof. Ranieri URBANI

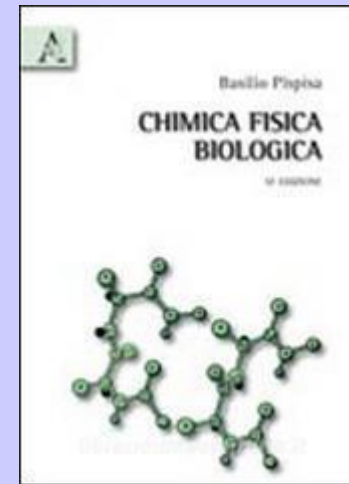
**Dipartimento di Scienze Chimiche
e Farmaceutiche**

Tel 040 558 3684
e-mail: rurbani@units.it

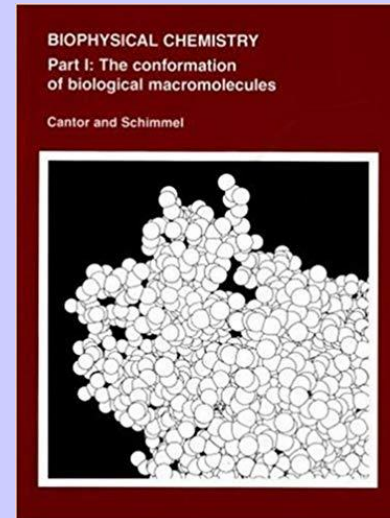
a.a. 2023-2024

Testi:

**B. Pispisa,
CHIMICA FISICA BIOLOGICA
Aracne Ed.**



**Cantor-Schimmel
BIOPHYSICAL CHEMISTRY
Vol. I, II, III
Freeman Ed.**



NB:

**1) Il materiale elettronico fornito (slides e dispense)
non sostituisce il materiale cartaceo**

2) Wikipedia NON è una fonte controllata e non fa testo

PROVA D'ESAME

L'esame del corso è costituito da una prova orale che prevede almeno tre domande sugli argomenti trattati

Le diapositive e gli appunti del corso sono inserite nella apposita pagina in Moodle.

INTRODUZIONE

Problematiche generali:

Struttura e funzione di un biopolimero

Rigidità e flessibilità. Strutture estese o a gomitolo

MODIFICAZIONI CHIMICHE:

Degradazione/depimerizzazione parziale della struttura

Perdita/formazione di gruppi funzionali

Formazione di ponti intracatena

MODIFICAZIONI CONFORMAZIONALI

Denaturazione

Transizione conformazionale

Associazione/aggregazione di catene

PROPRIETA' MACROMOLECOLARI

PREDIZIONE delle STRUTTURE

Meccanica (MM) e Dinamica Molecolare (MD)

Metodo Monte Carlo di predizione della conformazione di catene

STRUTTURA PRIMARIA

PROTEINE

Amino acidi, Monomeri R ed S

Proprietà acido-base di aminoacidi e peptidi

Titolazione di amino acidi. Determinazione delle costanti di equilibrio

Punto isoelettrico

Legame peptidico

Chiralità

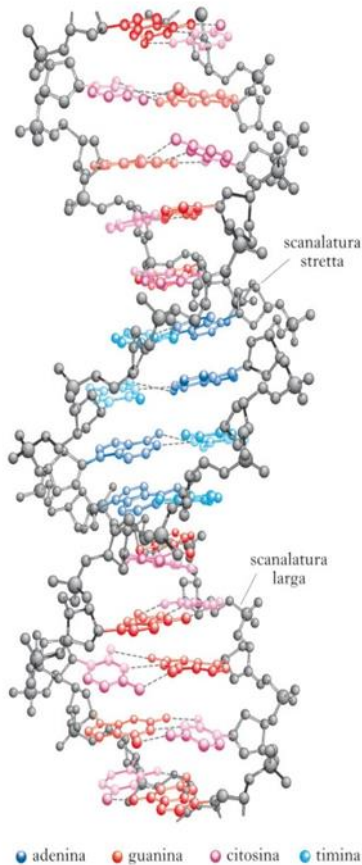
DNA / RNA

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
Catene polipeptidiche
Mappe di Ramachandran
Proprietà conform di carboidrati, Mappe di Ramachandran

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 anomeroico

STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DEGLI ACIDI NUCLEICI:

- Struttura primaria di DNA ed RNA
- Le regole di Chargaff
- La tripla elica di Pauling
- 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

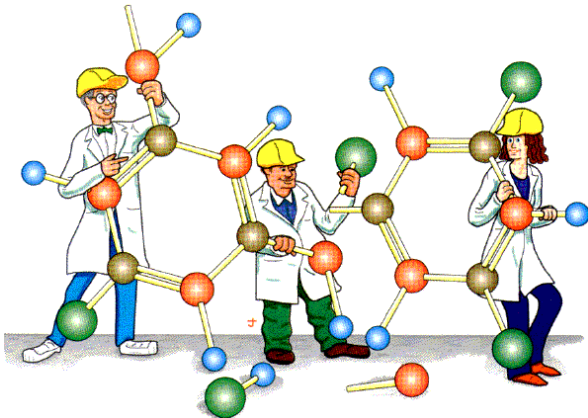
- Folding proteico e struttura primaria di proteine
- 1957: esperimento di Anfinsen
- Paradosso di Levinthal
- Considerazioni energetiche e cinetiche
- La componente idrofobica

STRUTTURA TERZIARIA E QUATERNARIA DI PROTEINE

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

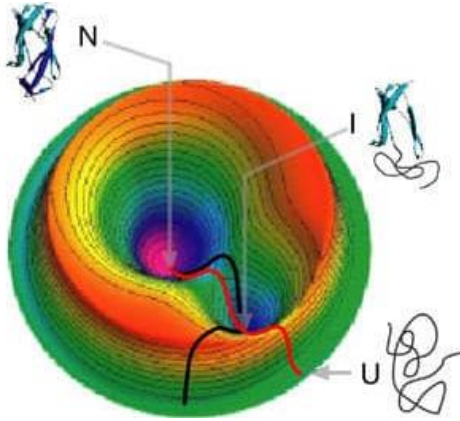
APPROCCI BIOINFORMATICI DI PREDIZIONE

- Scale di aminoacidi
- Supporti informatici on-line (esempio: EXPASY)
- Le scale di idropatia (Kyte-Doolittle)
- Previsione della struttura secondaria: metodi di 1^a e 2^a 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)



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

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)
Pulsed-Field Gel Electrophoresis

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



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

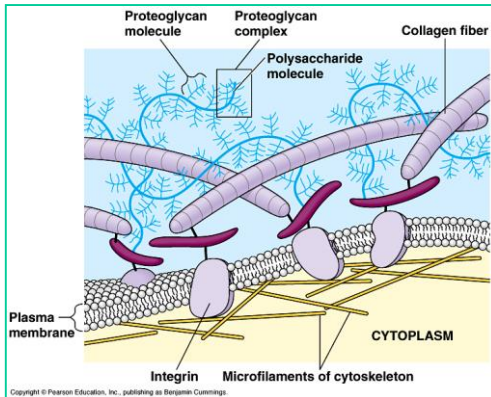


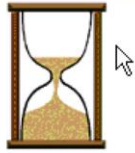
SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA

- 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

RICHIAMI DI TERMODINAMICA

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





Panta rei

La reologia è lo studio della deformazione
e del flusso della materia.

TRANSIZIONE ELICA-GOMITOLO

Curve di transizione ordine-disordine

Variabili chimico-fisiche nelle transizioni conformazionali

Processi cooperativi

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

Modelli di *binding* biopolimero-ligando

Costante macroscopica e microscopica

Siti indipendenti ed identici

Scatchard plot

Scatchard plot non-lineari

Modello di Hill

CALORIMETRIA DSC E ITC

Deconvoluzione di termogrammi

Termodinamica delle transizioni

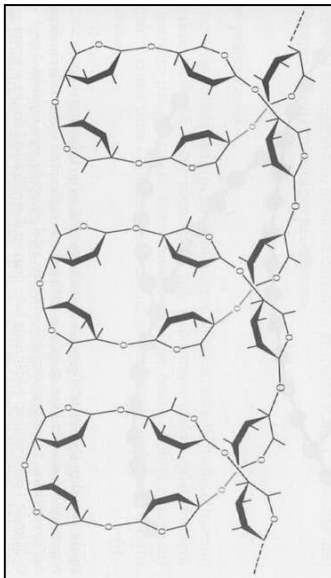


TABELLA 1.2 Dimensioni delle biomolecole

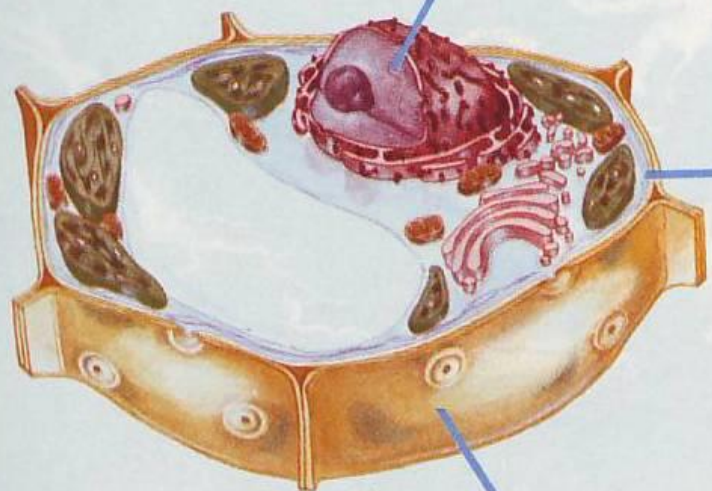
Biomolecola	Lunghezza (unità di misura della lunghezza, nm)	Massa	
		Dalton	Picogrammi
Acqua	0,3	18	
Alanina	0,5	89	
Glucosio	0,7	180	
Fosfolipide	3,5	750	
Ribonucleasi (una piccola proteina)	4	12.600	
Immunoglobulina G (IgG)	14	150.000	
Miosina (una grande proteina muscolare)	160	470.000	
Ribosoma (nel batterio)	18	2.520.000	
Batteriofago $\phi \times 174$ (un virus batterico molto piccolo)	25	4.700.000	
Complesso della piruvato deidrogenasi (un complesso multienzimatico)	60	7.000.000	
Virus del mosaico del tabacco (un virus delle piante)	300	40.000.000	$6,68 \times 10^{-5}$
Mitocondrio (nelle cellule epatiche)	1.500		1,5
Cellula di <i>Escherichia coli</i>	2.000		2
Cloroplasto (nelle cellule di foglia di spinacio)	8.000		60
Cellula epatica	20.000		8.000

BIOPOLIMERI

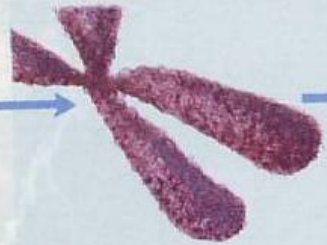
- Materiale Genetico: *DNA, RNA*
- Materiale scheletrico: *cellulosa, chitina, collagene, elastina, cheratina, proteine di membrana*
- Trasporto e Muscoli: *emoglobina, miosina, actina*
- Catalisi: *tutti gli enzimi*
- Stoccaggio: *amido, amilosio, glicogeno*

Classe	Esempio specifico	Dim. tipiche, Å (forma)	Peso mol. tipico (g/mol)
Oligomeri	Actinimicina D	20 (sfera)	$10^3 - 10^4$
Piccole proteine	Chimotripsina	40 (sfera)	$10^4 - 10^5$
Acidi nucleici	t - RNA	100 (bacchetta)	$10^4 - 10^5$
Grandi proteine	Aspartato transcarbam.	70 (sfera)	$10^5 - 10^7$
Piccoli aggregati	Ribosoma	200 (sfera)	$10^5 - 10^7$
Grandi aggregati	Membrane, virus	1000 (sfera)	$10^7 - 10^{12}$
DNA intatto	DNA di <i>E. coli</i>	10^7 (0.1 cm) (sfera)	$10^7 - 10^{12}$

**Livello 4:
la cellula
ed i suoi organelli**



**Livello 3:
i complessi
sopramolecolari**



Cromosomi

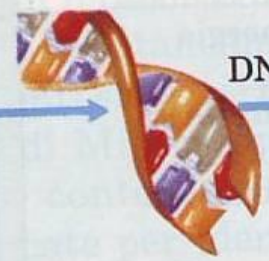


Membrana plasmatica



Parete cellulare

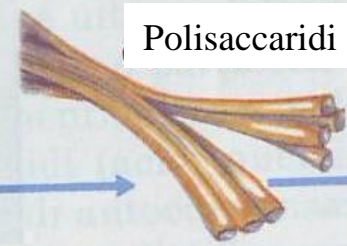
**Livello 2:
le macromolecole**



DNA

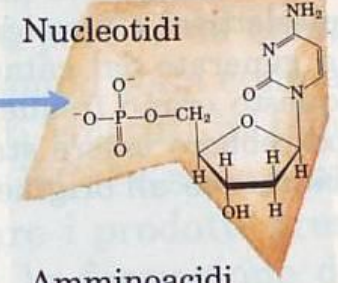


Proteina

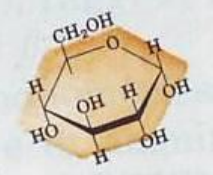


Polisaccaridi

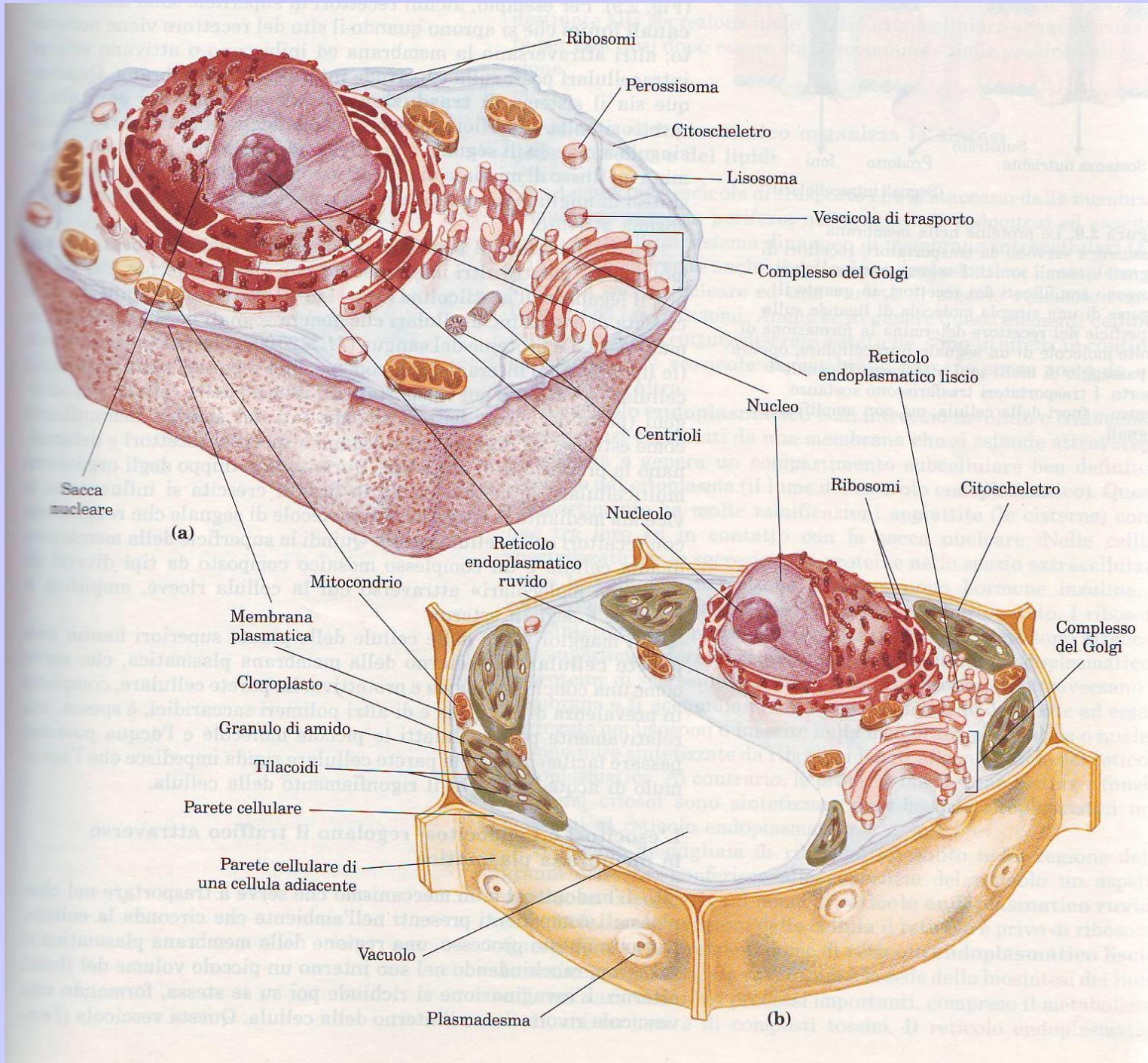
**Livello 1:
le biomolecole**



Amminoacidi

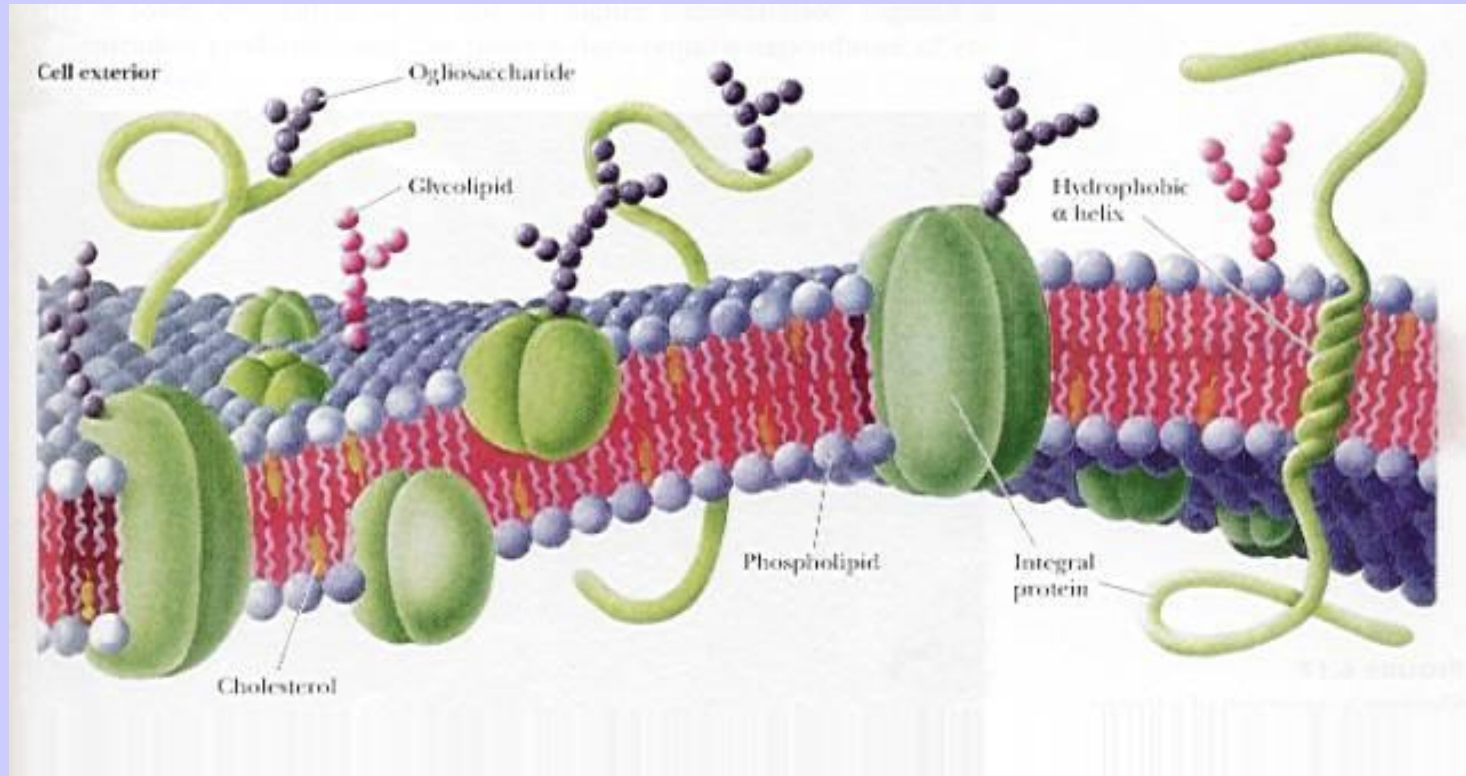


Monosaccaridi



Modello “mosaico fluido”

di Singer-Nicolson (1972)



Le membrane sono **MOSAICI** strutturali e funzionali

Le proteine di membrana sono di diversi tipi e
quindi hanno funzioni diverse

Recettori

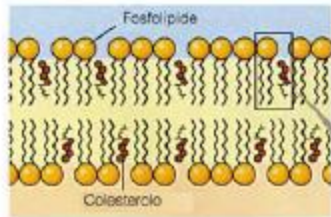
Enzimi

Trasportatori

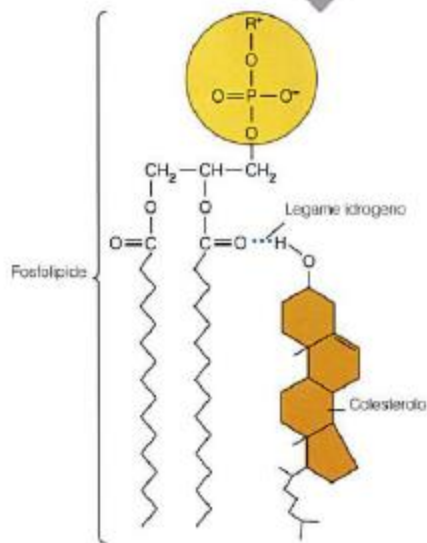
Come le **tessere di un mosaico** danno figure diverse nel loro complesso

Il modello strutturale della membrana è **uno**, ma
le membrane **sono tutte diverse per composizione** e assortimento delle
singole “tessere”

- **Proteine:** le proteine di membrana, che possono essere intrinseche ed estrinseche, diminuiscono la fluidità delle membrane biologiche
- **Colesterolo:** influisce sulla fluidità delle membrane biologiche
- **Acidi grassi:** gli acidi grassi contenuti nei fosfolipidi influenzano la fluidità delle membrane sia in base alla lunghezze delle catene alchiliche sia in base alla presenza di insaturazioni.
- Maggiore sarà la lunghezza delle catene alchiliche, minore sarà la fluidità.
Maggiore sarà la percentuale di acidi grassi insaturi, maggiore sarà la fluidità della membrana plasmatica.



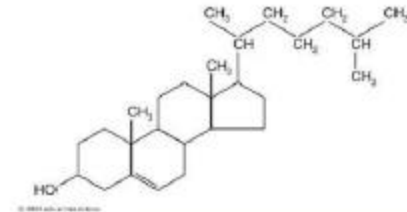
(a) Colesterolo nella membrana plasmatica



(b) Legame del colesterolo ad un fosfolipide

Figura 7-15

Il colesterolo



Impedisce alle catene di $-CH_2$ di interagire troppo e di cristallizzare, quindi inibisce transizioni di fase troppo brusche.

Effetti sulla fluidità:

1- a T relativamente alta ($37^\circ C$) stabilizza le membrane riducendo il movimento dei fosfolipidi

2- a T relativamente bassa **impedisce l'impacchettamento stretto dei fosfolipidi**

Funzioni delle membrane cellulari

1) Supporto strutturale

Preservare *l'individualità* della cellula

Delimitazione: cellula-ambiente; organulo citoplasma

Mantenimento della forma, plasticità: rapporti con il citoscheletro

2) Scambio di molecole

Mantenere una permeabilità altamente *selettiva*

Trasporto regolato in modo attivo

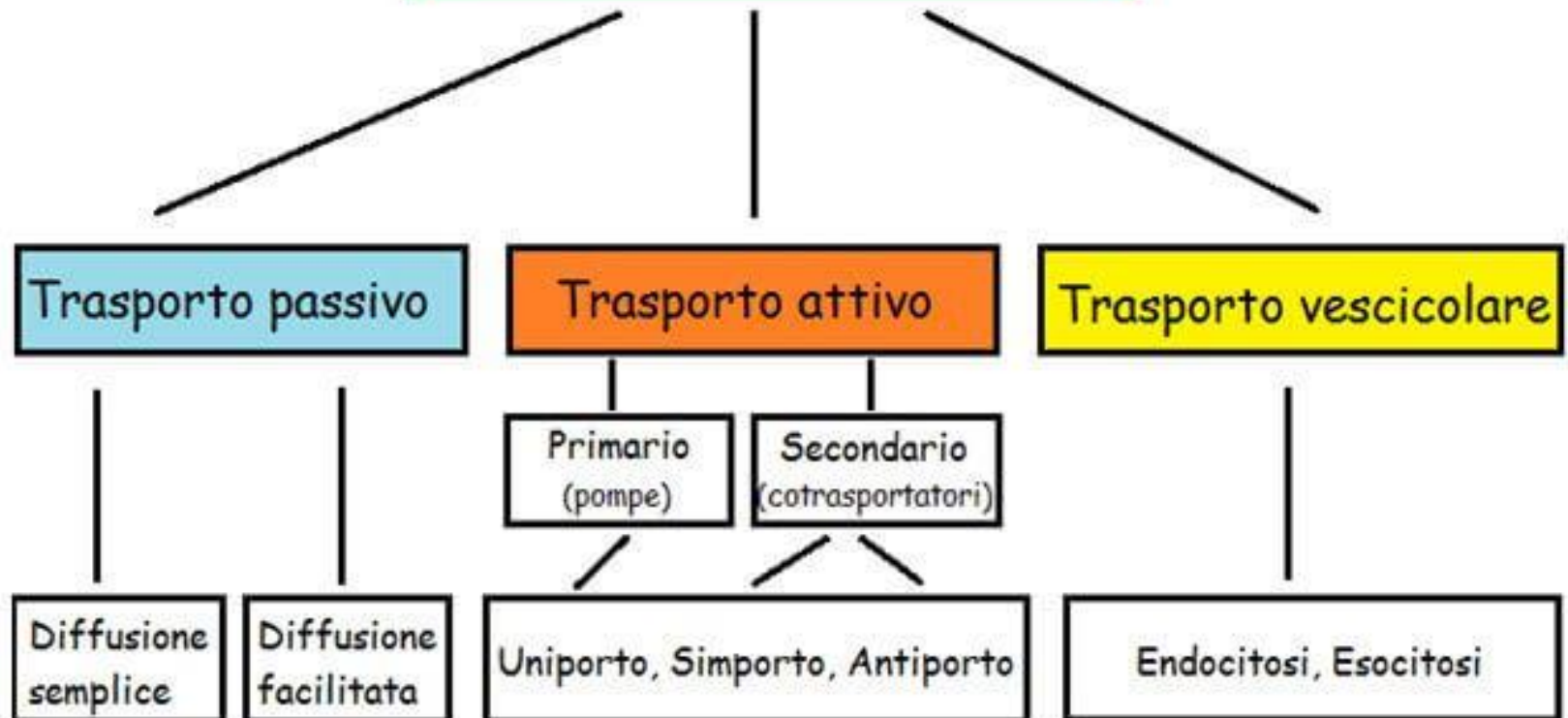
3) Scambio di informazione

Controllare il flusso di informazione

Rapporti cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare

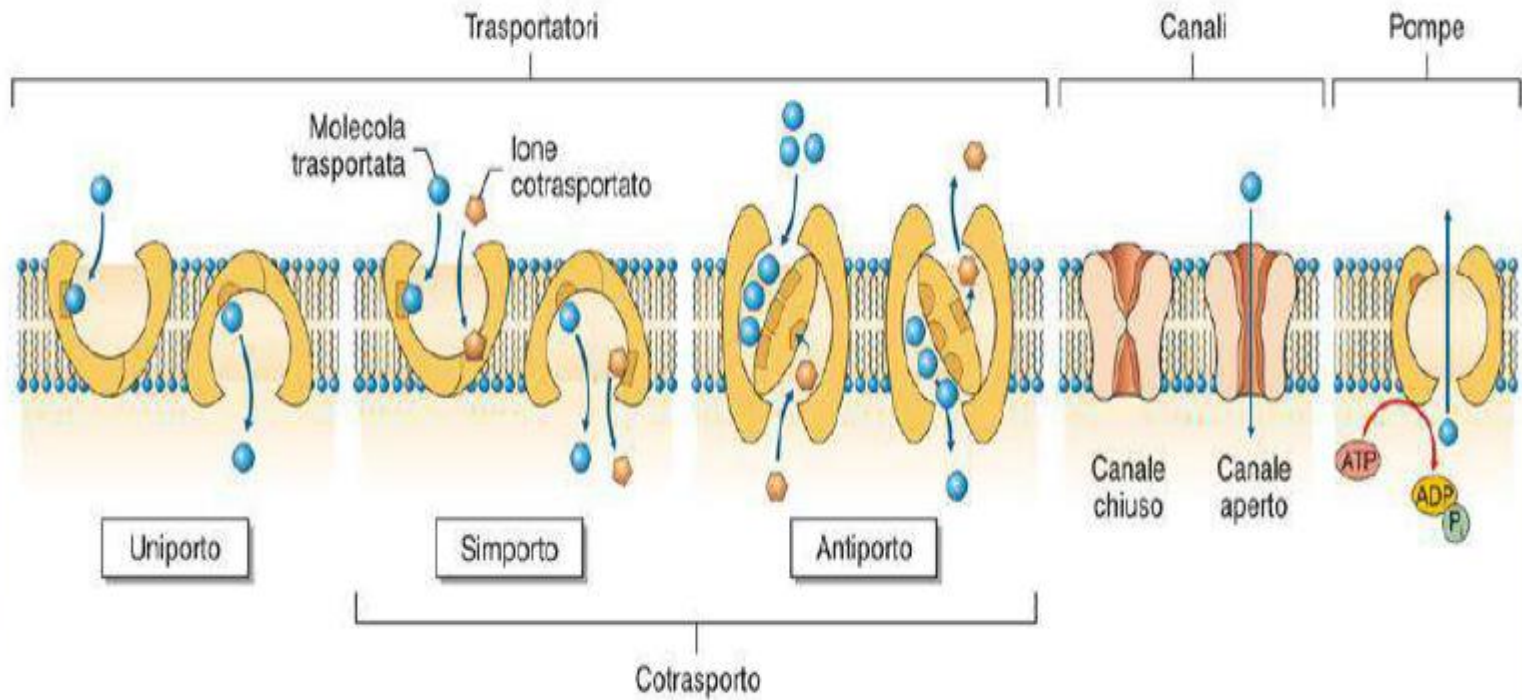
Riconoscimento e “trasduzione” di segnali chimici

TRASPORTO DI MEMBRANA



MECCANISMI DI TRASPORTO -Membrana

«ATTIVO»



La parete cellulare è una struttura cellulare che circonda la **membrana cellulare**.

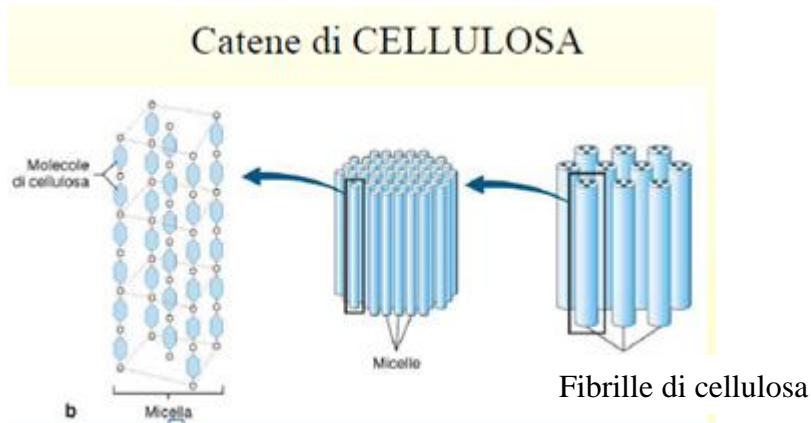
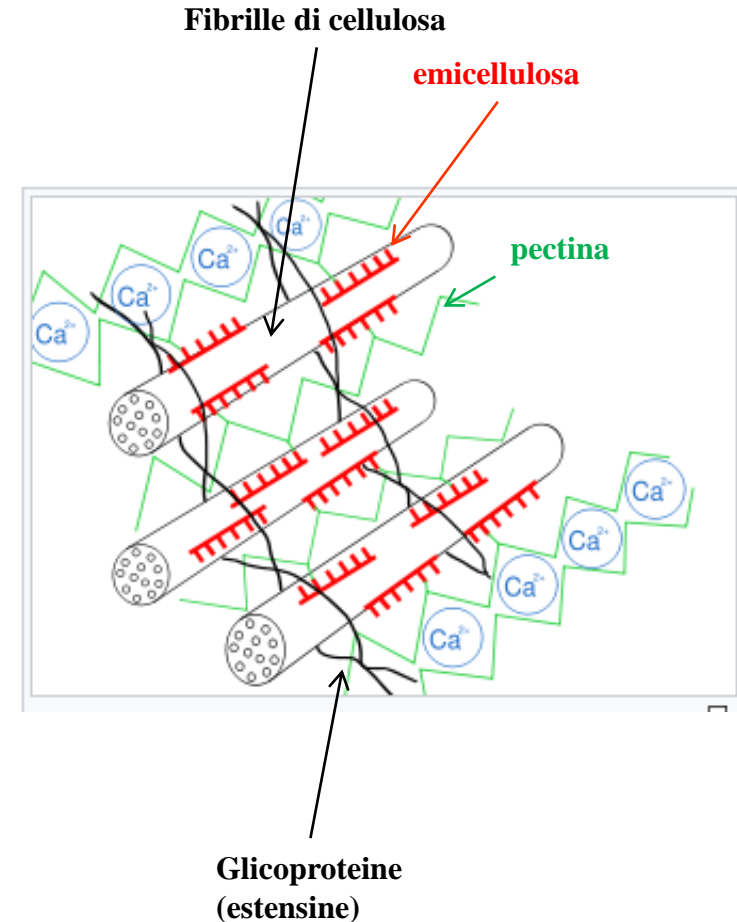
E' presente nelle piante, nei **funghi**, nella maggior parte dei **procarioti**, ed è assente nelle cellule degli animali.

La composizione della parete cellulare è differente nei diversi organismi.

Nelle piante la parete è composta principalmente da **cellulosa**, nei funghi da **chitina** e nei **batteri** da peptidoglicani.

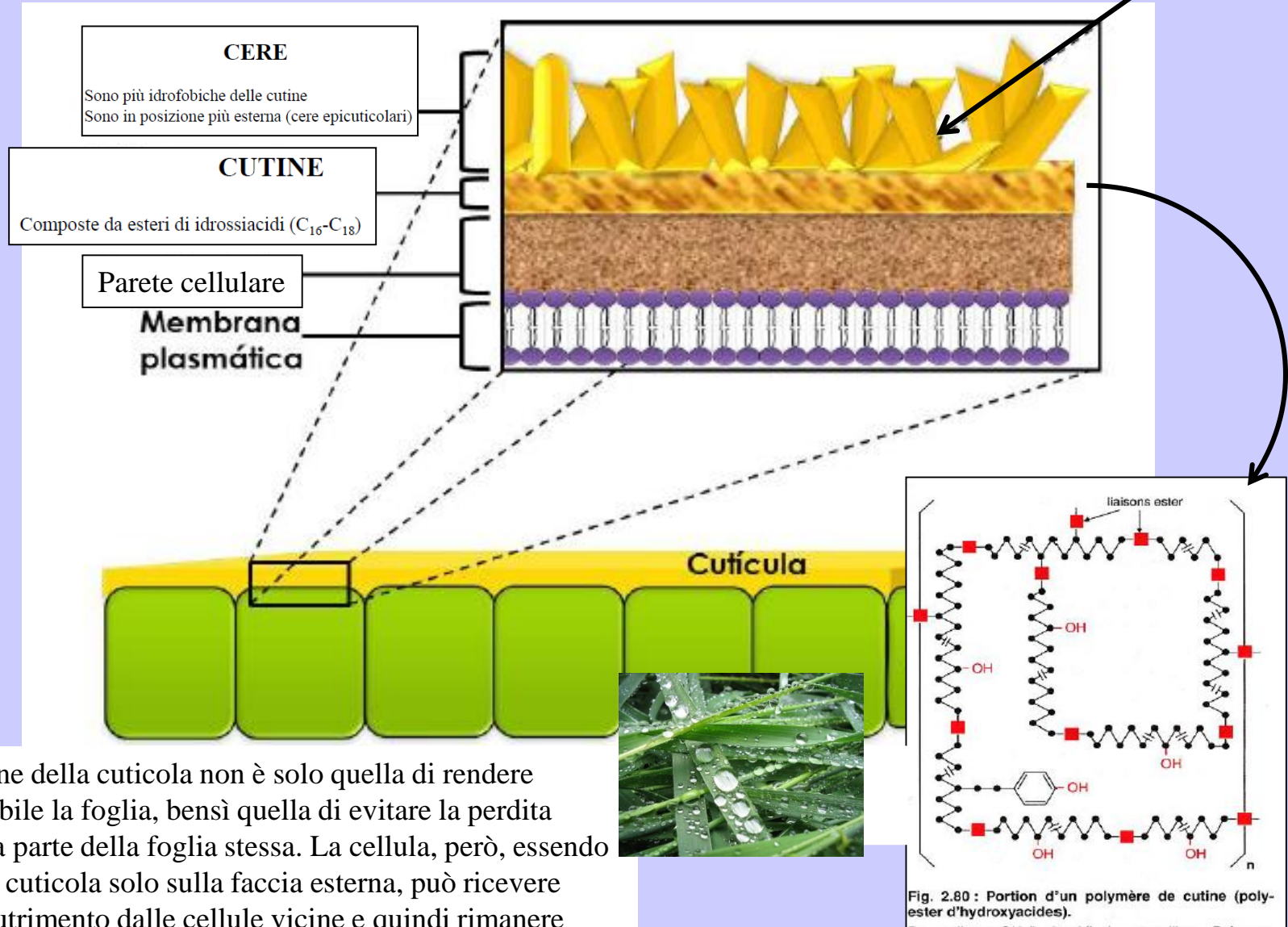
La parete cellulare può avere diverse funzioni, come proteggere la cellula dagli agenti esterni, impedire il disseccamento o l'assorbimento eccessivo di liquidi, mantenere la forma ed il turgore cellulare (si veda: **pressione di turgore**).

In alcuni batteri la parete cellulare è coinvolta nei meccanismi di patogenesi.



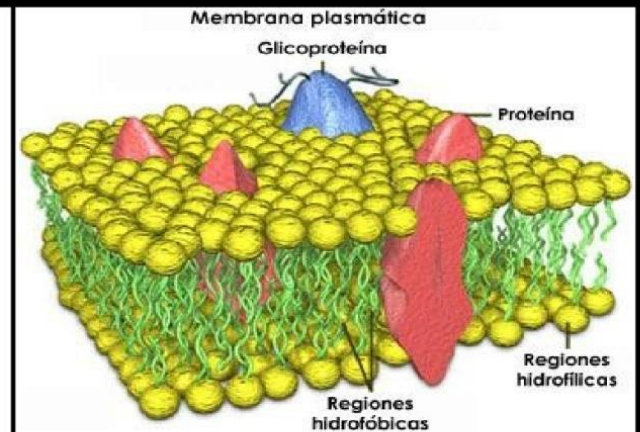
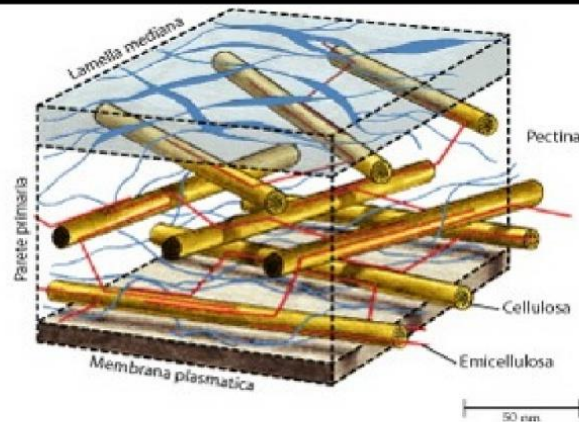
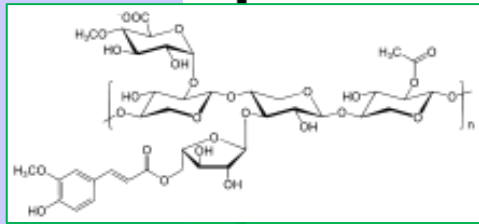
Parete cellulare vegetale

- Idrocarburi alifatici a lunga catena (alcani $C_{21}-C_{37}$)
- Ceridi: esteri tra alcoli alifatici e acidi grassi a lunga catena ($>C_{18}$)



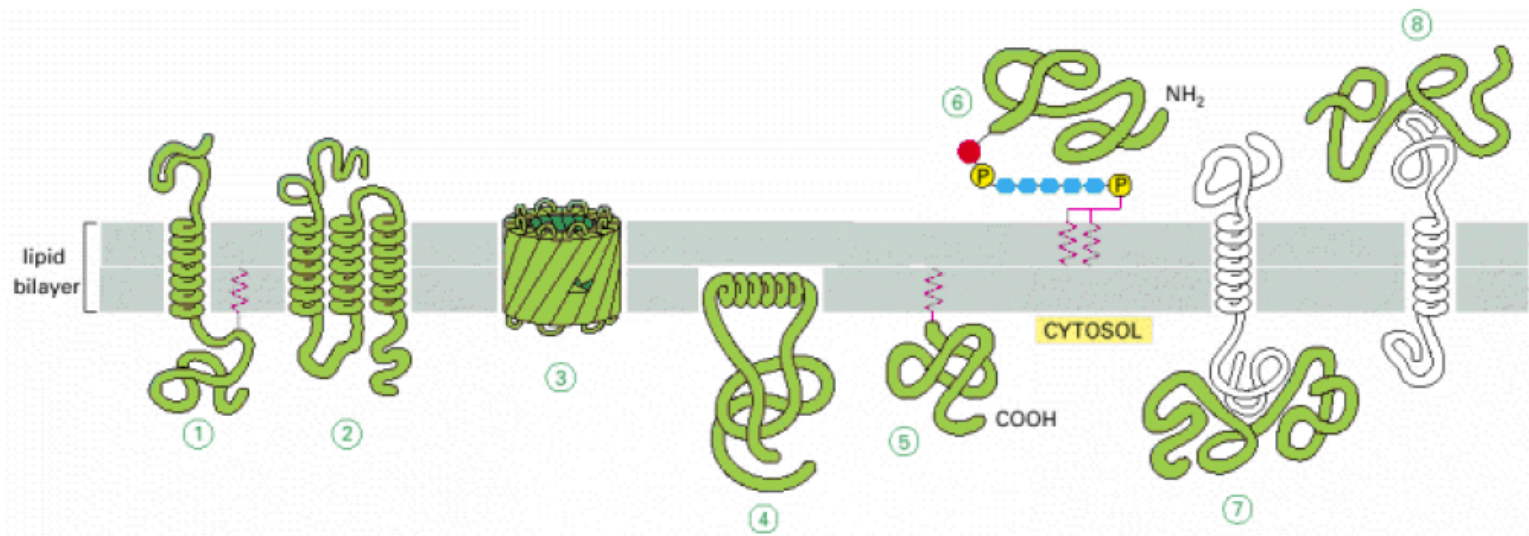
La funzione della cuticola non è solo quella di rendere impermeabile la foglia, bensì quella di evitare la perdita d'acqua da parte della foglia stessa. La cellula, però, essendo coperta di cuticola solo sulla faccia esterna, può ricevere acqua e nutrimento dalle cellule vicine e quindi rimanere vitale.

Differenze tra **parete cellulare** e **membrana plasmatica**



Struttura	Spessore di parecchi μm Lamella mediana + Parete I e II	Spessore di pochi μm Mosaico fluido
Componenti principali	Polisaccaridi: Cellulosa, Emicellulosa, Pectine, proteine in minor quantità	Doppio strato Fosfo-lipidico strutture proteiche e glico- proteiche
Resistenza e Selettività	Notevoli resistenza meccanica. Poco efficace come barriera chimica, si lascia attraversare passivamente da un gran numero di sostanze chimiche senza discriminare tra l'una e l'altra	Poca resistenza meccanica. Formidabile barriera chimica, altamente selettiva

I vari modi in cui le proteine si associano con il doppio strato



Attraversando la membrana con

1. una singola elica α , (possono essere covalentemente legate ad un acido grasso inserito nel monostrato)
2. eliche α multiple,
3. β sheet “arrotolato” (β barrel)

Interagendo con un solo strato con

4. un α elica anfifilica,
5. un acido grasso,
6. via un oligosaccaride
7. e 8. Molte sono ancorate alle membrane via legami non covalenti con un'altra proteina

PROBLEMATICHE GENERALI RELATIVE ALLO STUDIO DEI BIOPOLIMERI

STRUTTURA DELLA MOLECOLA:

- E' pura? E' nativa? E' completa?
- Qual è la struttura? Si può predire la struttura?
- E' rigida o flessibile?
- Come si forma la struttura?

FUNZIONE DELLA MOLECOLA:

- Si può predire o razionalizzare?

MODIFICAZIONI CHIMICHE

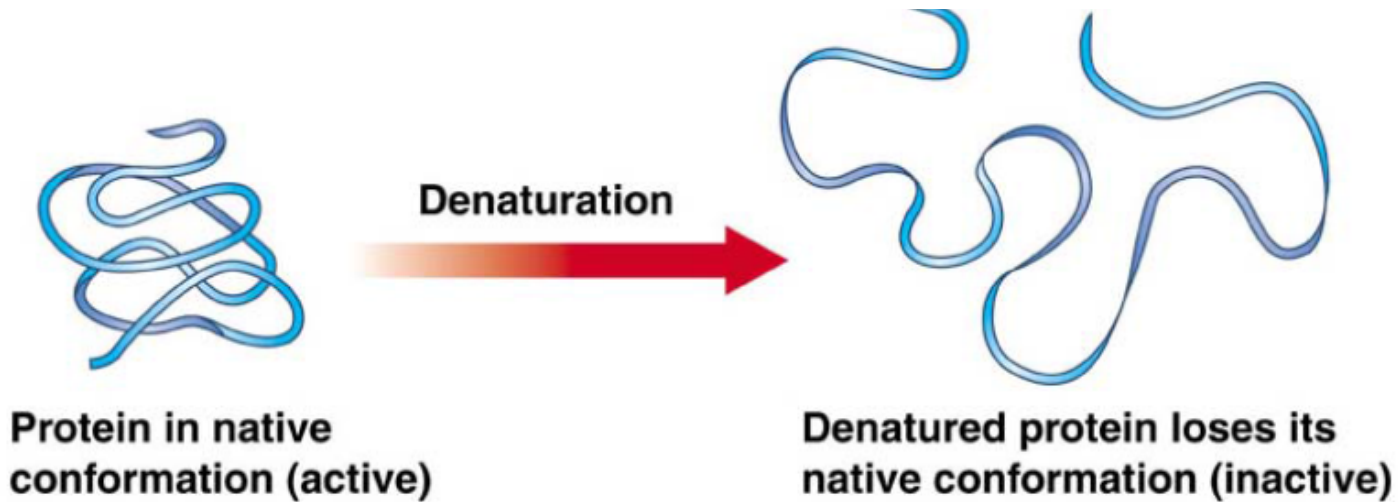
- Degradazione/depimerizzazione parziale della struttura
- Perdita/formazione di gruppi funzionali
- Formazione o distruzione di ponti intra/inter-catena

MODIFICAZIONI CONFORMAZIONALI

(interazione con solventi, pH, T, ioni, piccole molecole...)

- Denaturazione
- Transizione conformazionale
- Associazione/agggregazione di catene

Denaturazione



Any chemical reaction (e.g. acid-base, oxidation-reduction), that disrupts the interactions of secondary and tertiary structures (not the primary structure), results in **denaturation** of the protein. Heat (e.g. frying an egg), changes in solvent, and heavy metals can also cause denaturation.

Transizioni conformazionali

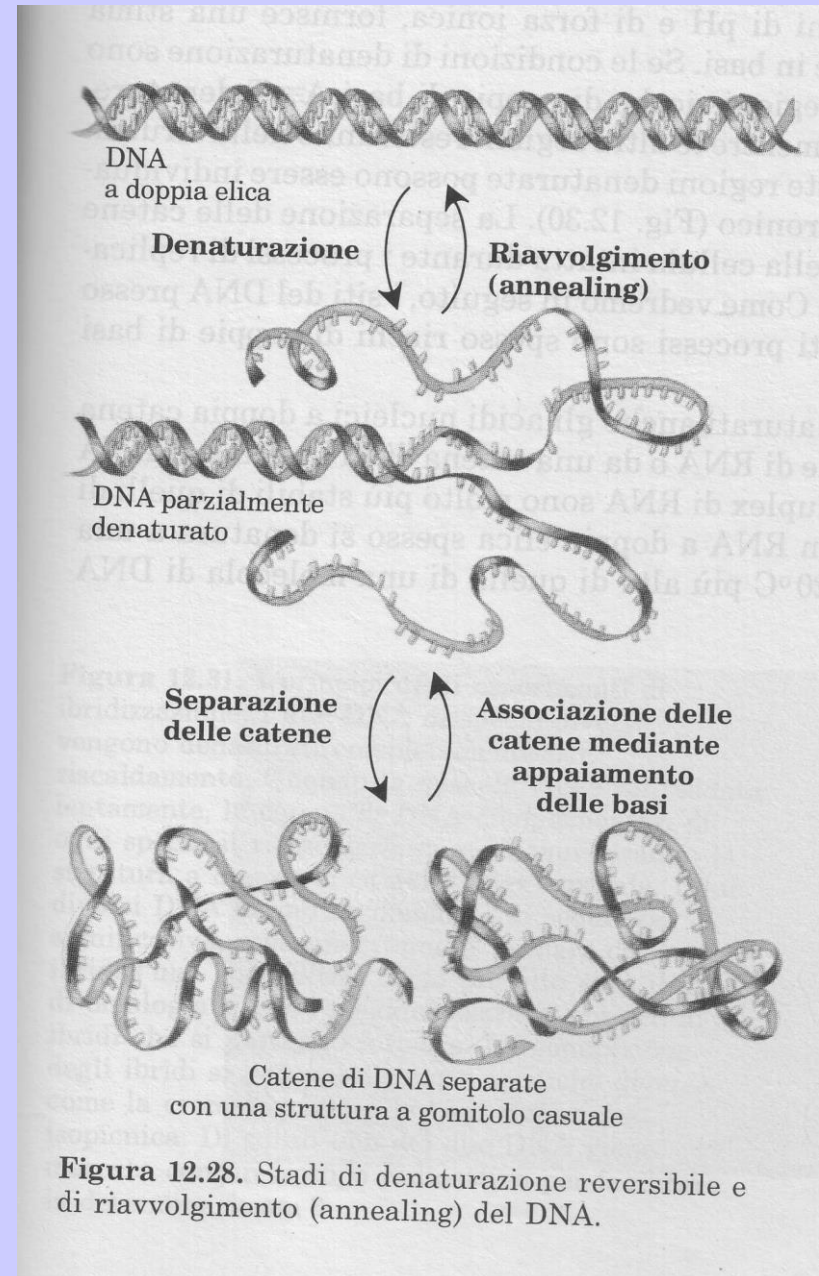
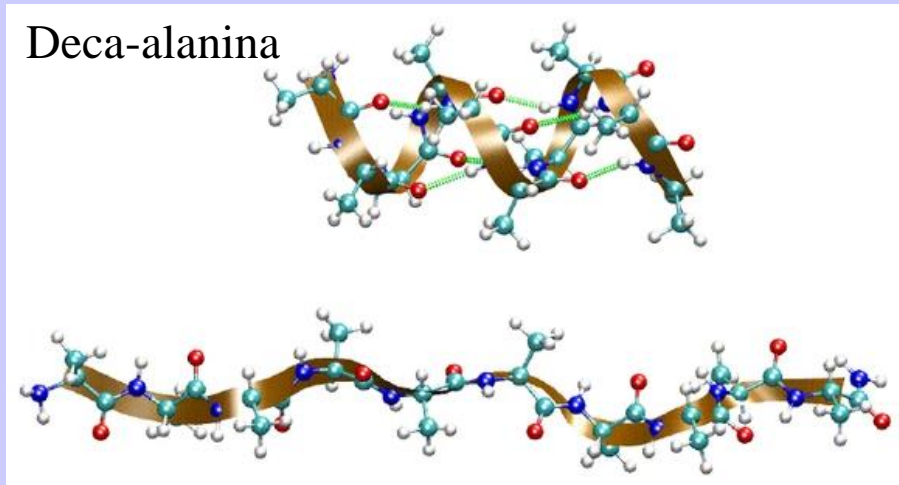
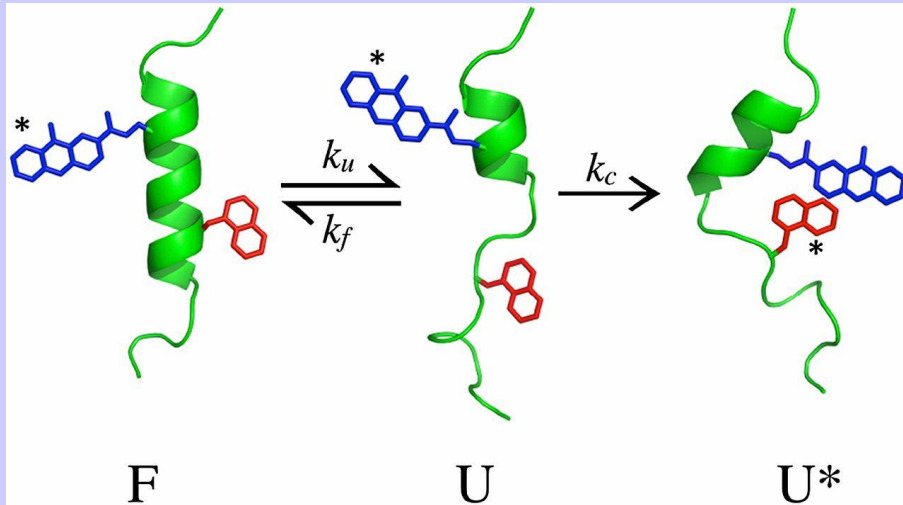
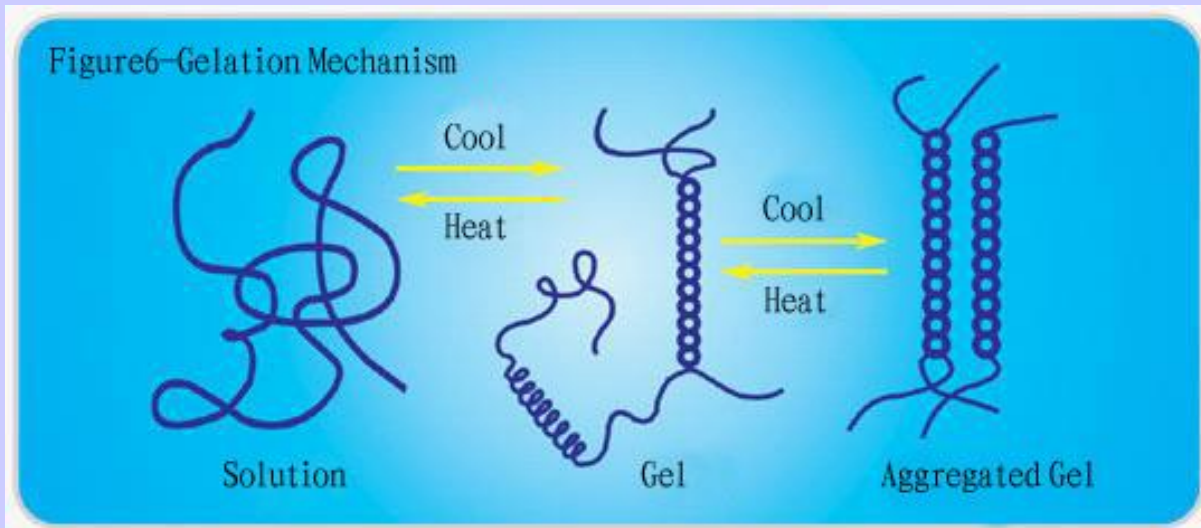
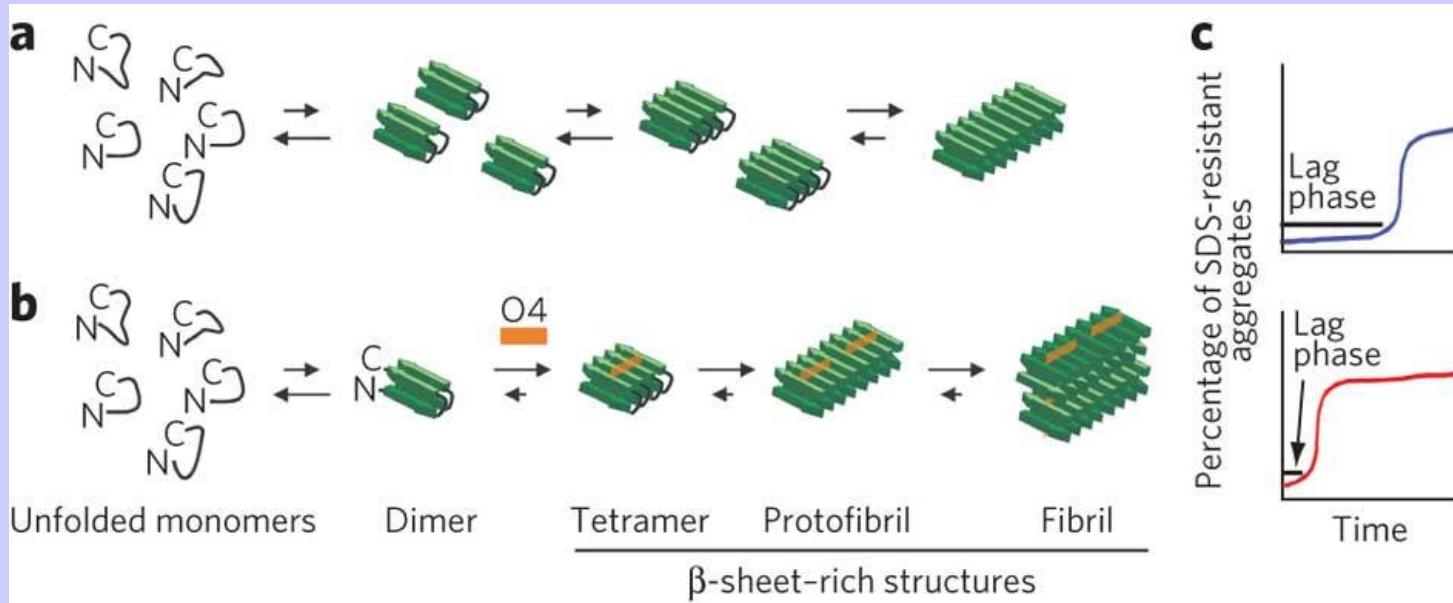


Figura 12.28. Stadi di denaturazione reversibile e di riavvolgimento (annealing) del DNA.

Associazione/aggregazione di catene



PROBLEMATICHE GENERALI

STRUTTURA DELLA MOLECOLA:

- E' pura? E' nativa? E' completa?
- Qual è la struttura? Si può predire la struttura?
- E' rigida o flessibile?
- Come si forma la struttura?

FUNZIONE DELLA MOLECOLA:

- Si può predire o razionalizzare?

L'**intelligenza artificiale (AI)** è riuscita a vincere una delle sfide più complesse della biologia: ha infatti trovato la chiave per prevedere la struttura delle proteine a partire dalla sequenza di amminoacidi che le compongono

Algoritmo:
AlphaFold

L'azienda britannica *DeepMind* di Google con l'algoritmo **Alphafold** ha sbaragliato la concorrenza nella competizione internazionale CASP (Critical Assessment of Protein Structure Prediction), superando circa 100 altri team in nella sfida biennale di predizione della struttura delle proteine.

Nella competizione *CASP* per la previsione delle strutture proteiche i partecipanti ricevono le sequenze amminoacidiche di 100 proteine di struttura ignota: alcuni gruppi provano a calcolarne il ripiegamento, mentre altri lo determinano sperimentalmente.

I risultati vengono poi confrontati per valutare l'efficacia dei metodi di previsione.

Sebbene i dettagli di come funzioni AlphaFold non siano stati ancora resi noti, come racconta *Nature* i ricercatori della società hanno migliorato la versione precedente di DeepMind sviluppando una rete di AI in grado di incorporare informazioni aggiuntive che determinano il modo in cui una proteina si piega

Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold


<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Received: 11 May 2021

Accepted: 12 July 2021

Published online: 15 July 2021

Open access

 Check for updates

John Jumper^{1,4,5}, Richard Evans^{1,4}, Alexander Pritzel^{1,4}, Tim Green^{1,4}, Michael Figurnov^{1,4}, Olaf Ronneberger^{1,4}, Kathryn Tunyasuvunakool^{1,4}, Russ Bates^{1,4}, Augustin Židek^{1,4}, Anna Potapenko^{1,4}, Alex Bridgland^{1,4}, Clemens Meyer^{1,4}, Simon A. A. Kohl^{1,4}, Andrew J. Ballard^{1,4}, Andrew Cowie^{1,4}, Bernardino Romera-Paredes^{1,4}, Stanislav Nikolov^{1,4}, Rishub Jain^{1,4}, Jonas Adler¹, Trevor Back¹, Stig Petersen¹, David Reiman¹, Ellen Clancy¹, Michal Zielinski¹, Martin Steinegger^{2,3}, Michalina Pecholska¹, Tamas Berghammer¹, Sebastian Bodenstein¹, David Silver¹, Oriol Vinyals¹, Andrew W. Senior¹, Koray Kavukcuoglu¹, Pushmeet Kohli¹ & Demis Hassabis^{1,4,5}

Proteins are essential to life, and understanding their structure can facilitate a mechanistic understanding of their function. Through an enormous experimental effort^{1–4}, the structures of around 100,000 unique proteins have been determined⁵, but this represents a small fraction of the billions of known protein sequences^{6,7}. Structural coverage is bottlenecked by the months to years of painstaking effort required to determine a single protein structure. Accurate computational approaches are needed to address this gap and to enable large-scale structural bioinformatics. Predicting the three-dimensional structure that a protein will adopt based solely on its amino acid sequence—the structure prediction component of the ‘protein folding problem’⁸—has been an important open research problem for more than 50 years⁹. Despite recent progress^{10–14}, existing methods fall far short of atomic accuracy, especially when no homologous structure is available. Here we provide the first computational method that can regularly predict protein structures with atomic accuracy even in cases in which no similar structure is known. We validated an entirely redesigned version of our neural network-based model, AlphaFold, in the challenging 14th Critical Assessment of protein Structure Prediction (CASP14)¹⁵, demonstrating accuracy competitive with experimental structures in a majority of cases and greatly outperforming other methods. Underpinning the latest version of AlphaFold is a novel machine learning approach that incorporates physical and biological knowledge about protein structure, leveraging multi-sequence alignments, into the design of the deep learning algorithm.

AlphaFold apre nuovi scenari per la ricerca biotech, promettendo di mettere il *turbo* allo sviluppo di nuovi farmaci (come fatto, p.es., contro Covid-19) ed è già risultato decisivo per velocizzare l'analisi della struttura di proteine virali.

'It will change everything: DeepMind's AI makes gigantic leap in solving protein structures'

PROBLEMATICHE GENERALI

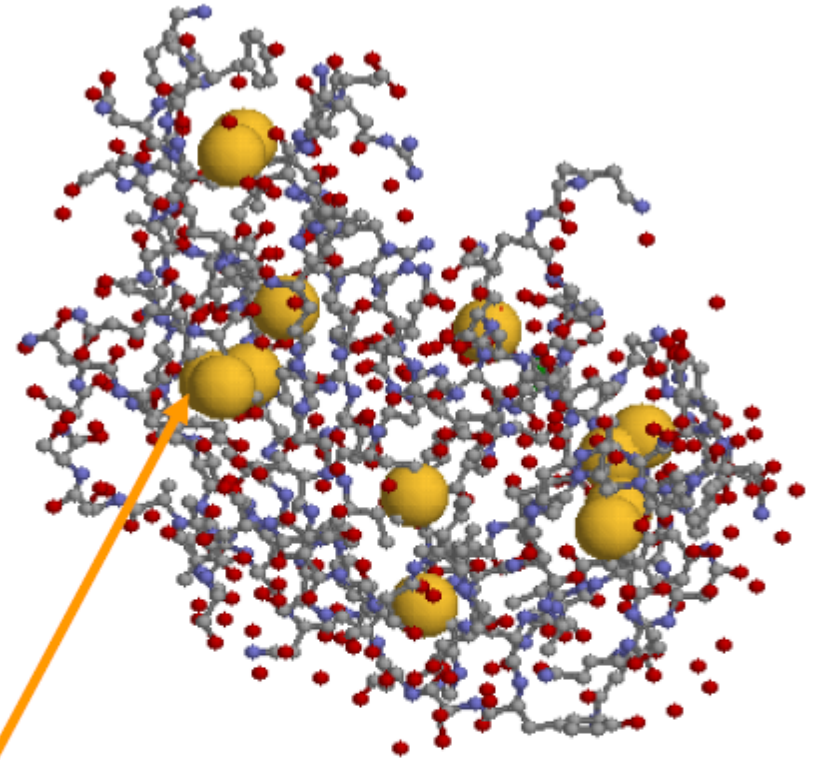
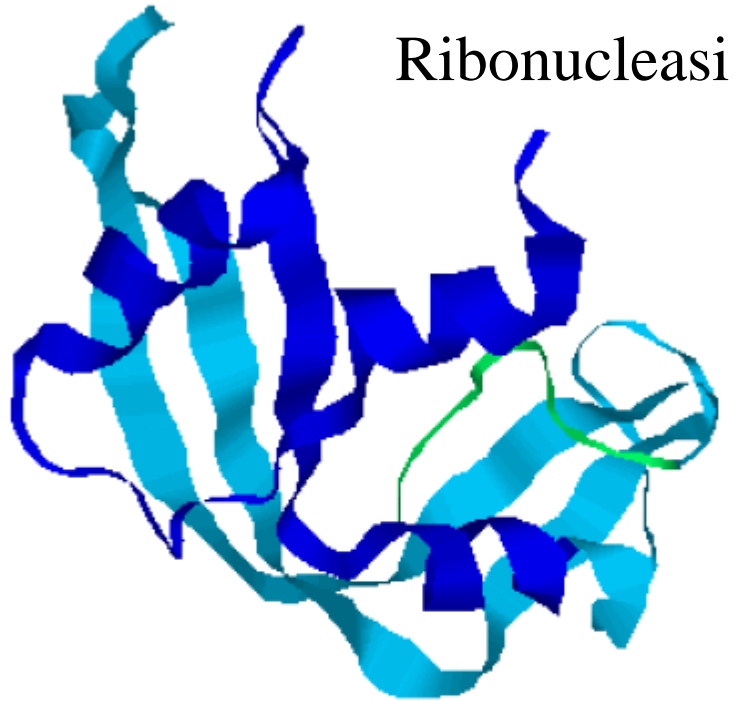
STRUTTURA DELLA MOLECOLA:

- E' pura? E' nativa? E' completa?
- Qual è la struttura? Si può predire la struttura?
- E' rigida o flessibile?
- Come si forma la struttura?

FUNZIONE DELLA MOLECOLA:

- Si può predire o razionalizzare?

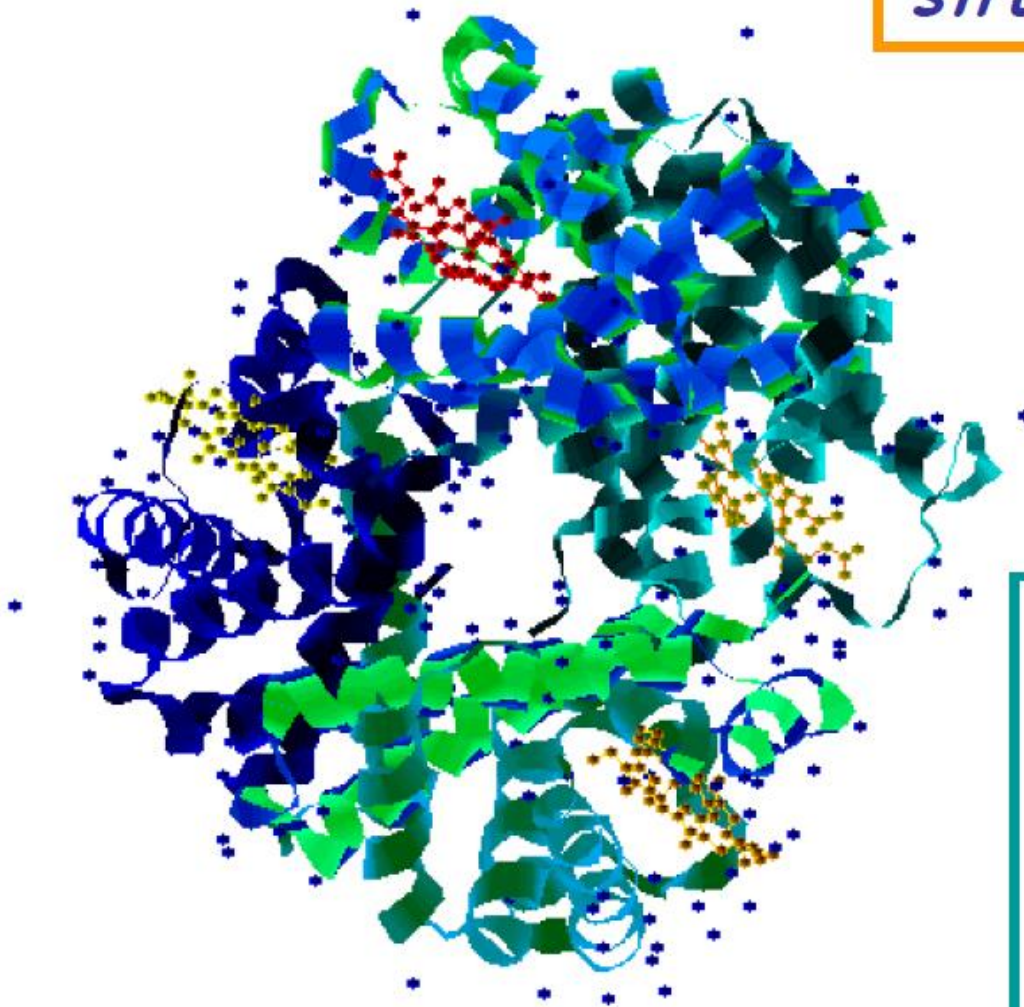
Forme compatte (*globulari*)
raggomitolate (*random-coil*)
Unità (anche ordinate) statisticamente indipendenti



ponti disolfuro (Cys-Cys)

PDB

EMOGLOBINA: *struttura quaternaria*



Mioglobina

Strutture estese e/o rigide (*rigid rod*):

Esempio del collagene

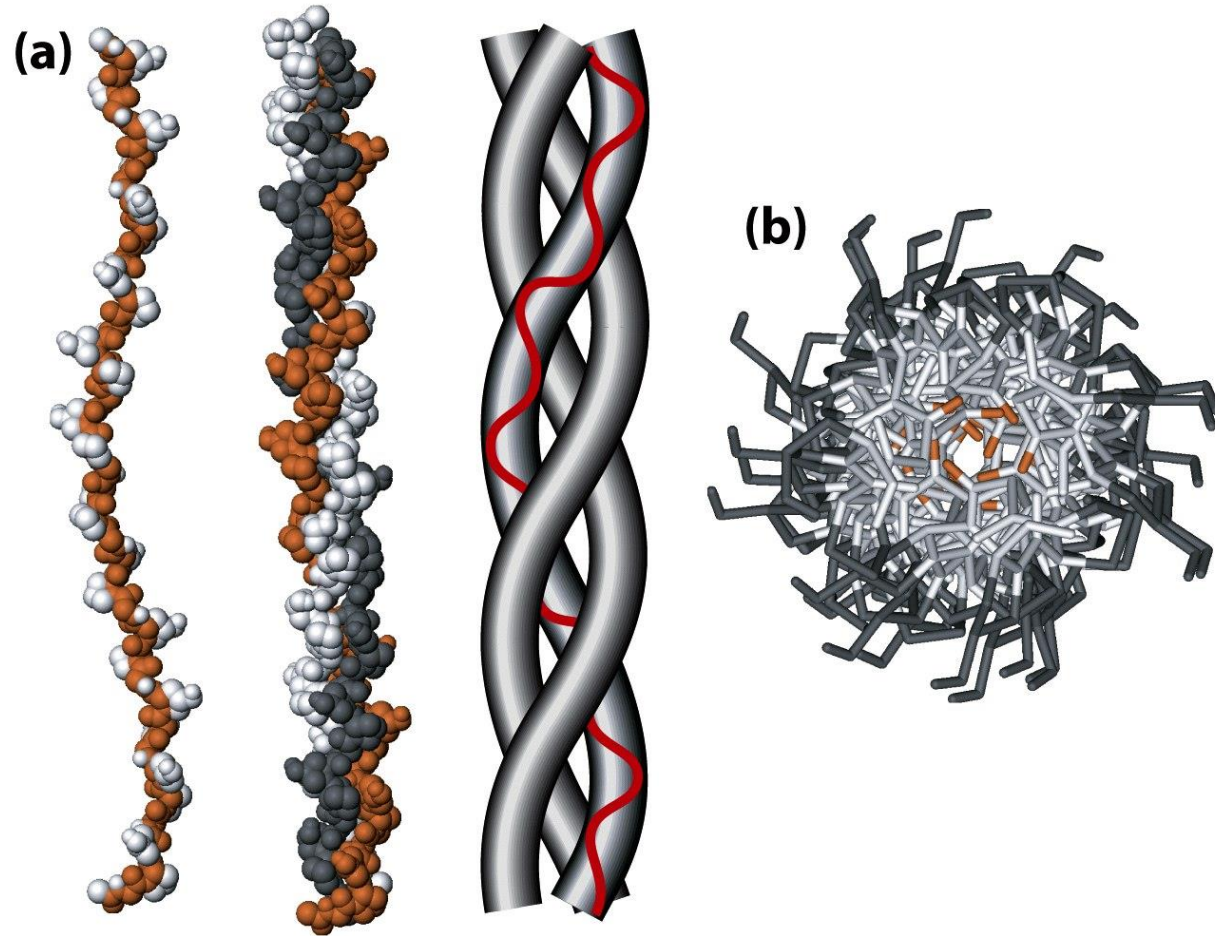
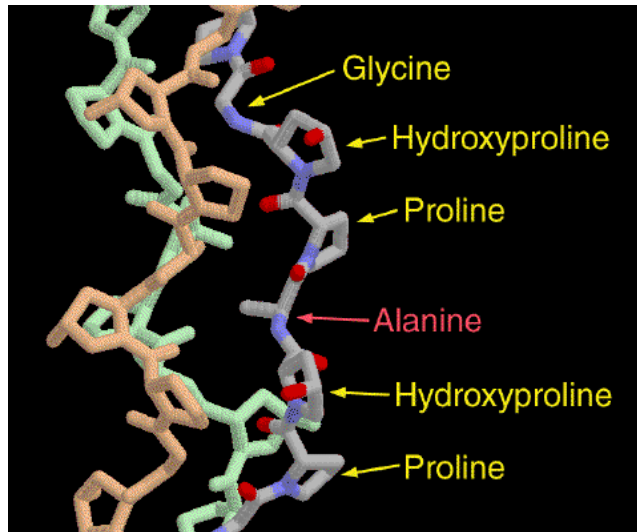
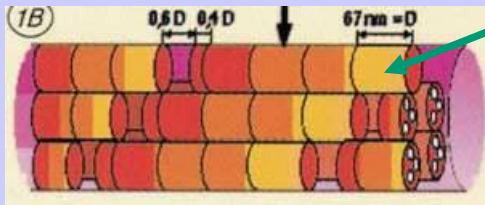
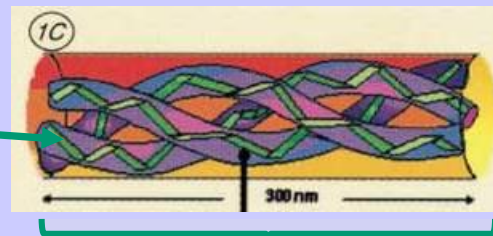
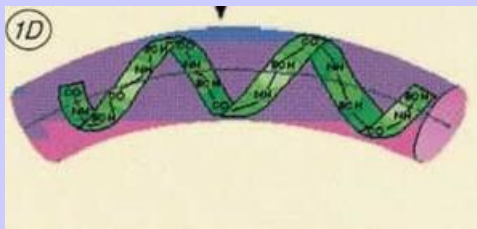
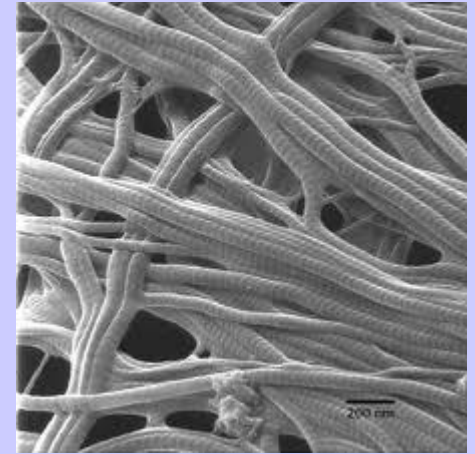
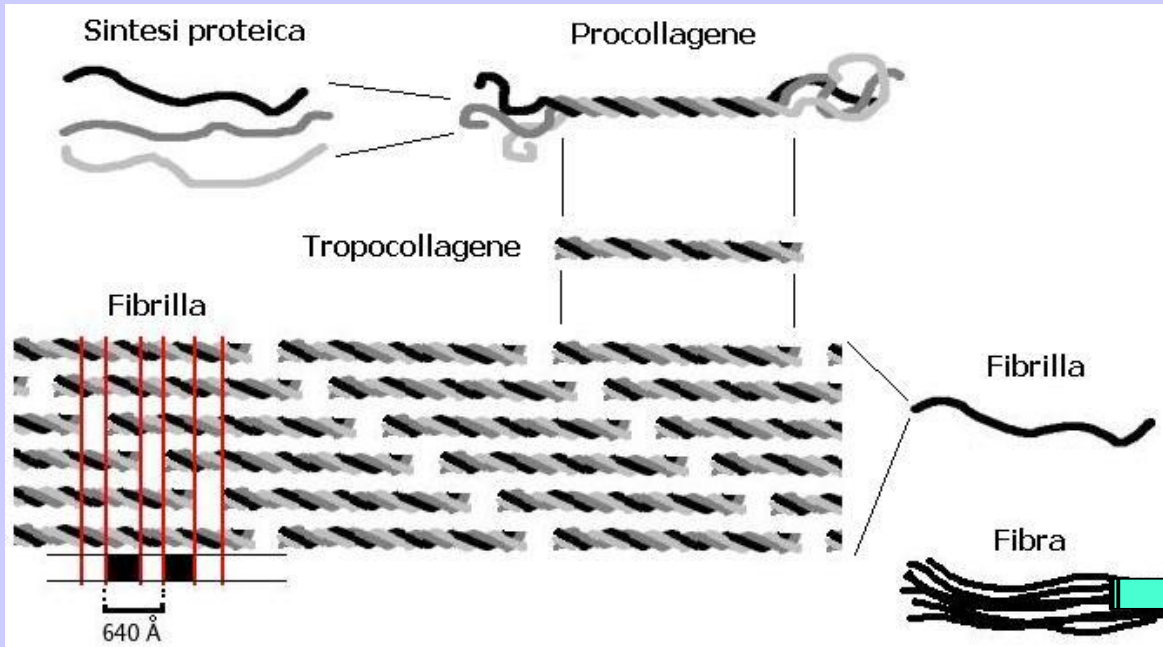
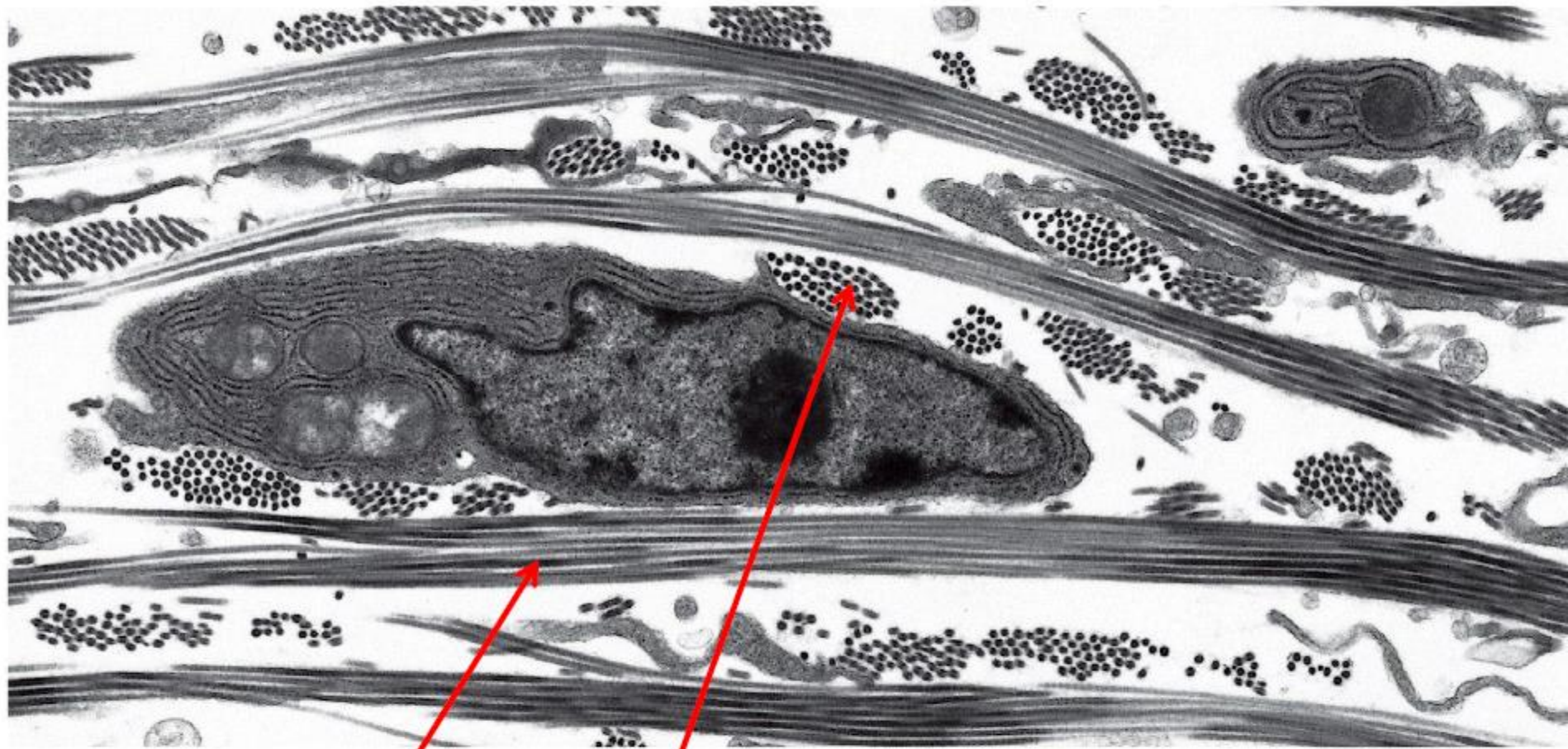


Figure 19-22
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

procollagene

Dal procollagene alla fibra di collagene

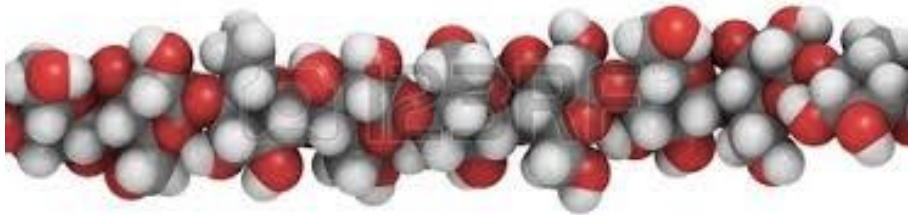
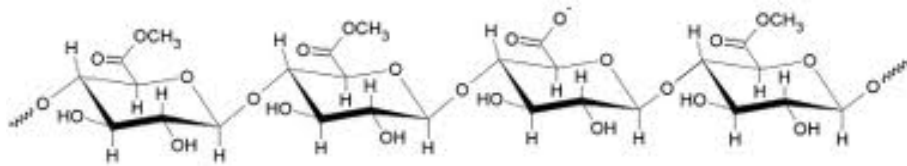




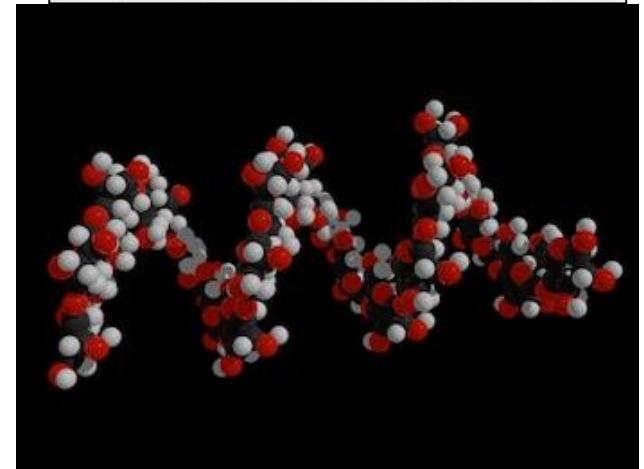
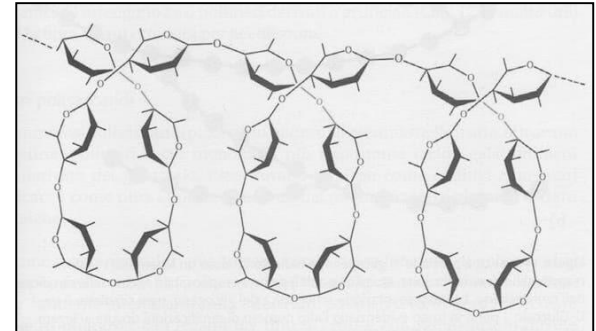
Fibrille di collagene disposte a 90° una rispetto all'altra

esempio di struttura estesa e/o rigida, ordinata o coil di polisaccaridi

cellulosa

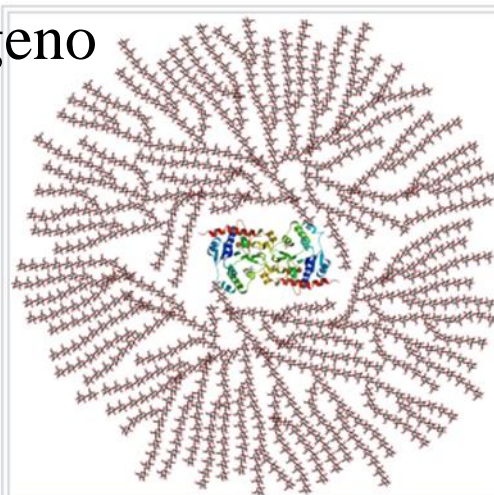
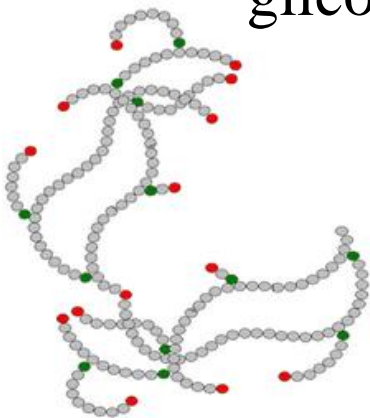


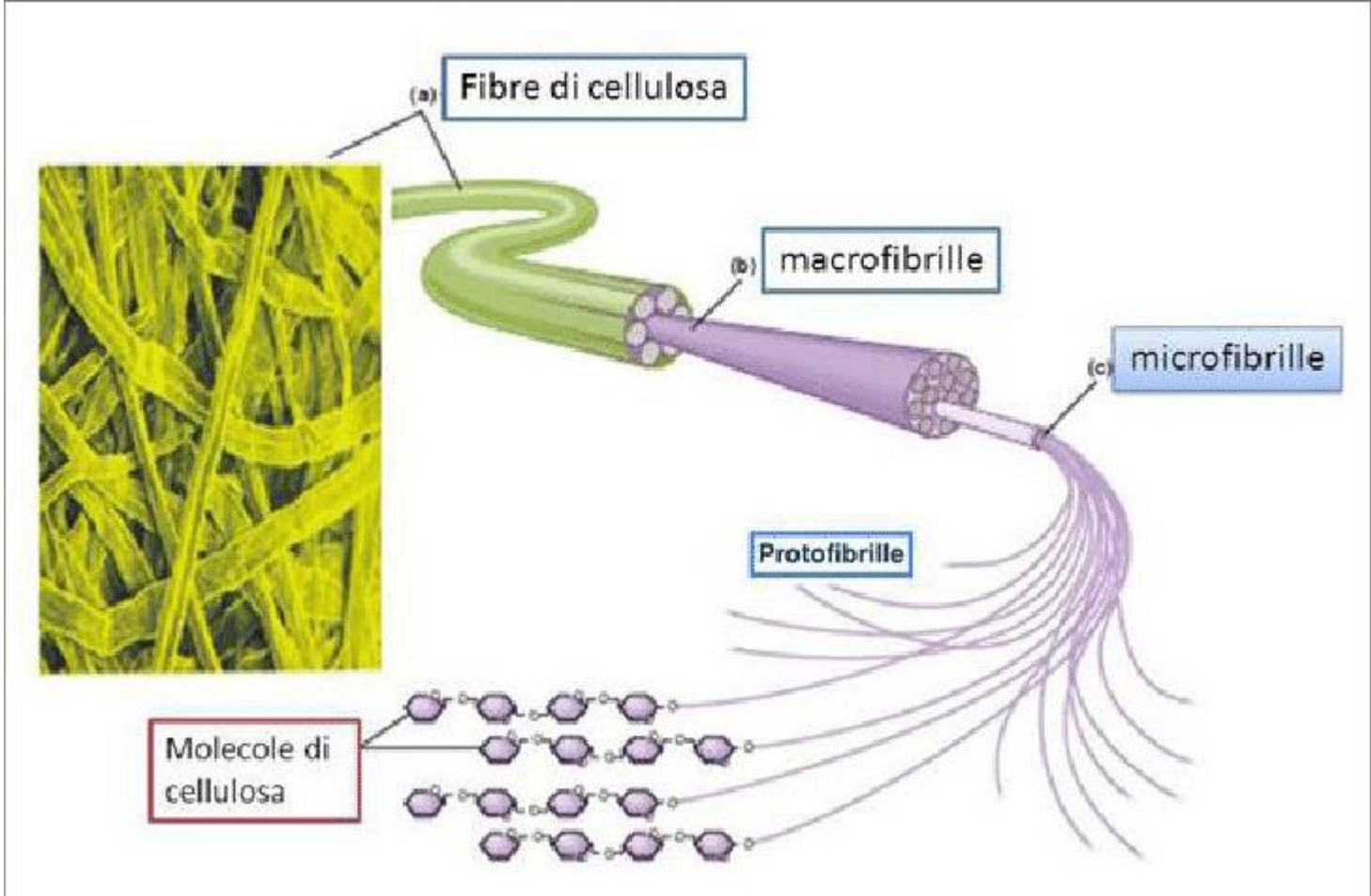
amilosio



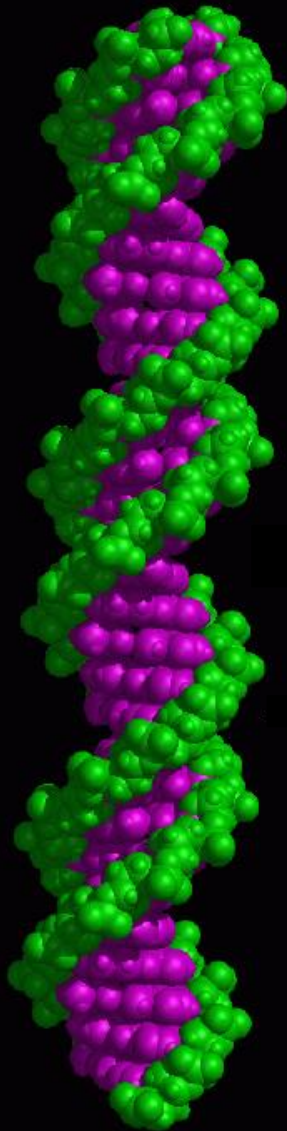
shutterstock.com • 1006068784

glicogeno

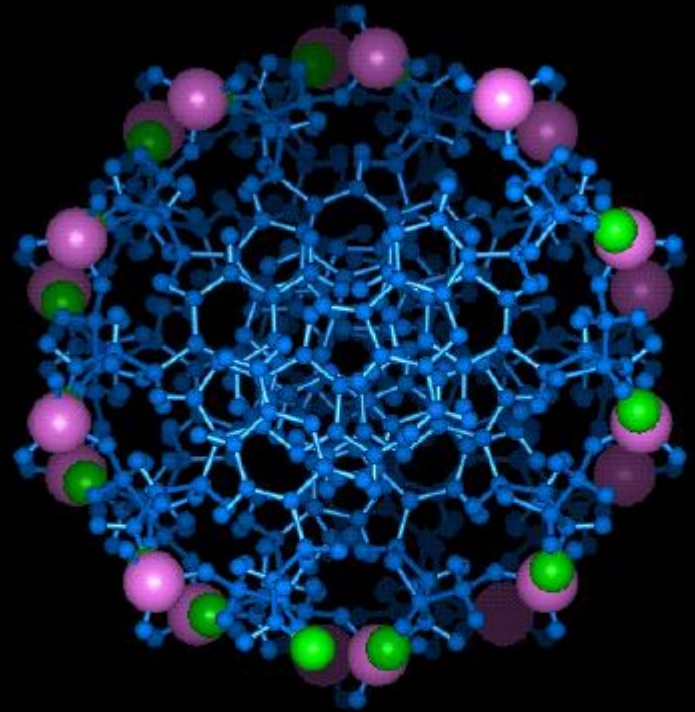




B-DNA



backbone
base

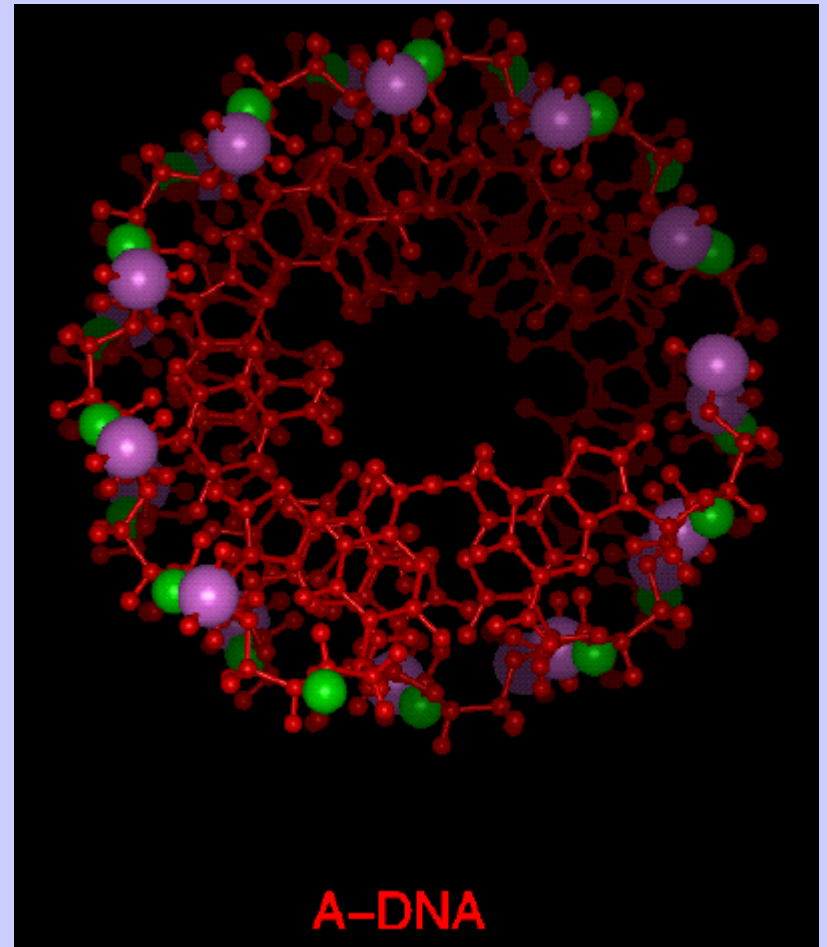


B-DNA

A-DNA



backbone
base



A-DNA

PROBLEMATICHE GENERALI

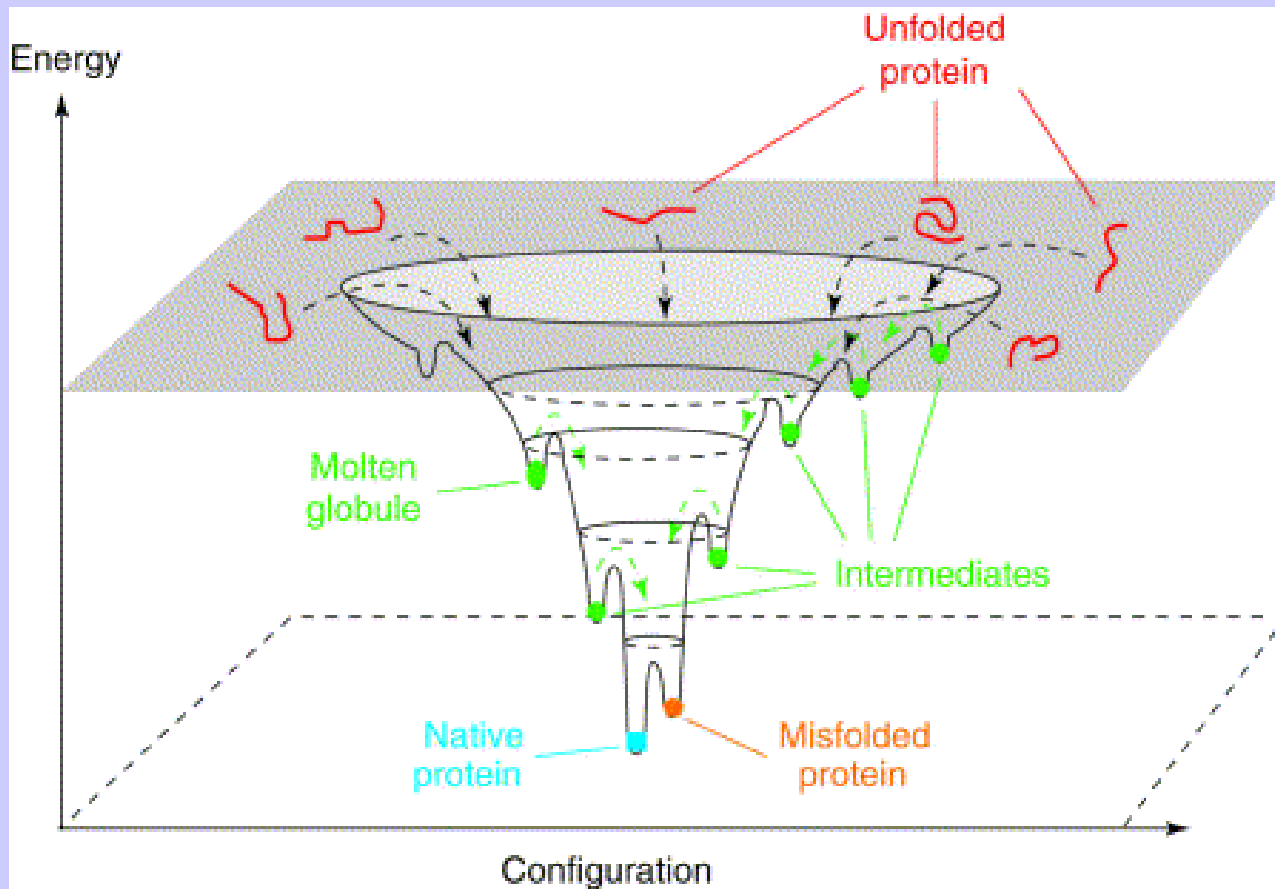
STRUTTURA DELLA MOLECOLA:

- E' pura? E' nativa? E' completa?
- Qual è la struttura? Si può predire la struttura?
- E' rigida o flessibile?
- **Come si forma la struttura?**

FUNZIONE DELLA MOLECOLA:

- Si può predire o razionalizzare?

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



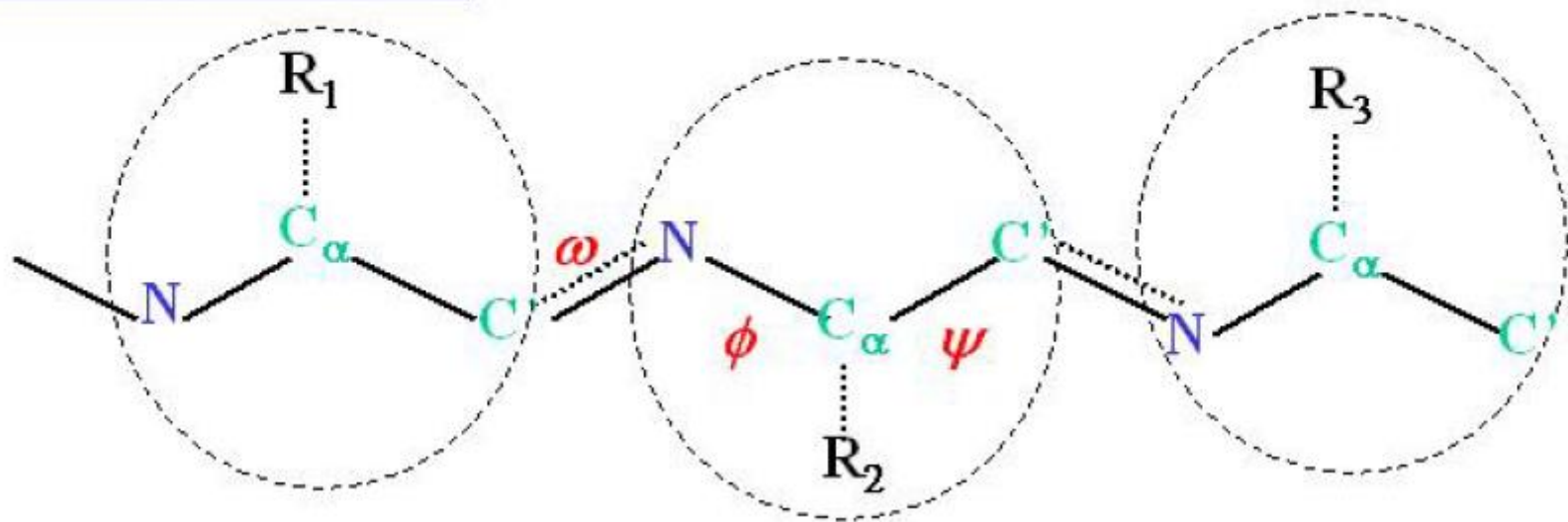
Come si forma la struttura?

- **Interazioni tra atomi vicini**
- **Interazione tra atomi lontani nella catena**
- **Interazioni con le molecole di solvente/co-soluti**

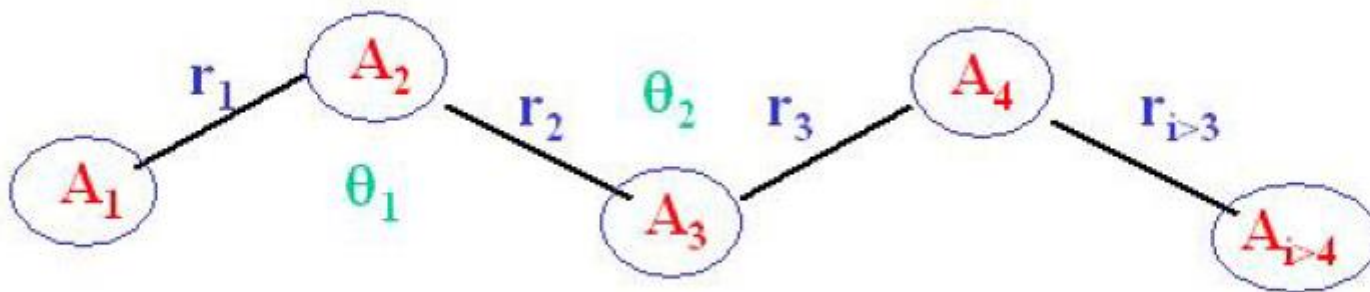
Come si forma la struttura?

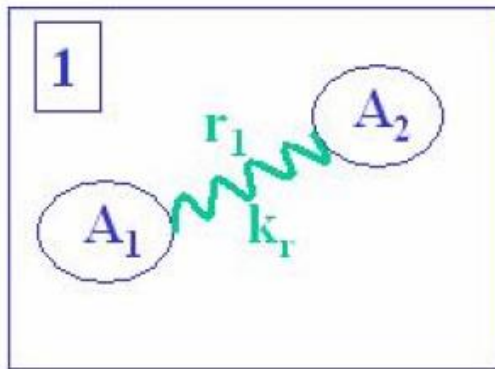
- **Interazioni tra atomi vicini**
- **Interazione tra atomi lontani nella catena**
- **Interazioni con le molecole di solvente**

Catena di amino acidi α

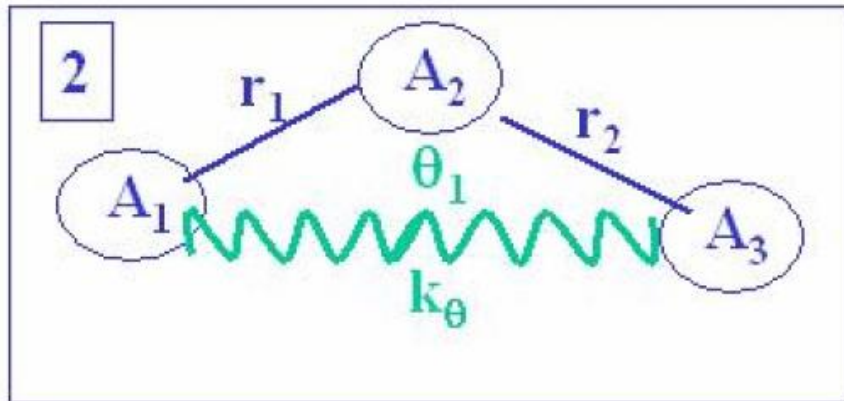


Polimero generico

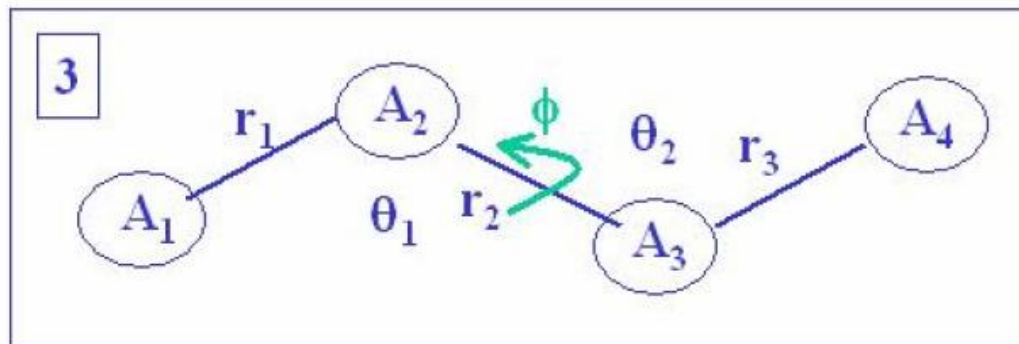




$$U(r) = \frac{1}{2} K_r (r - r_0)^2$$



$$U(\vartheta) = \frac{1}{2} K_\vartheta (\vartheta - \vartheta_0)^2$$

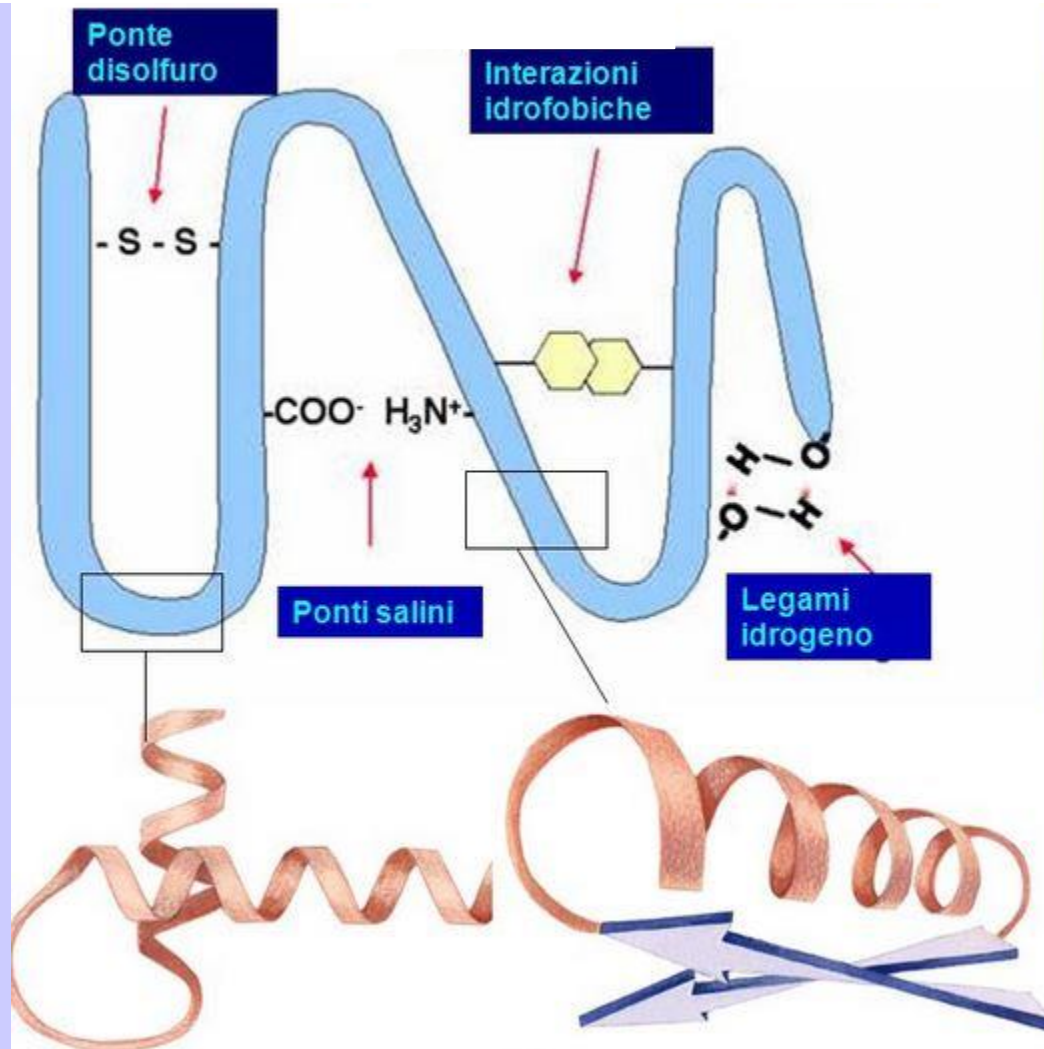


$$U(\varphi) = \sum_k c_k \cos^k \varphi \approx \frac{1}{2} [1 + \cos(3\varphi)]$$

Come si forma la struttura?

- **Interazioni tra atomi vicini**
- **Interazione tra atomi lontani nella catena**
- **Interazioni con le molecole di solvente**

Interazione tra atomi lontana in catena



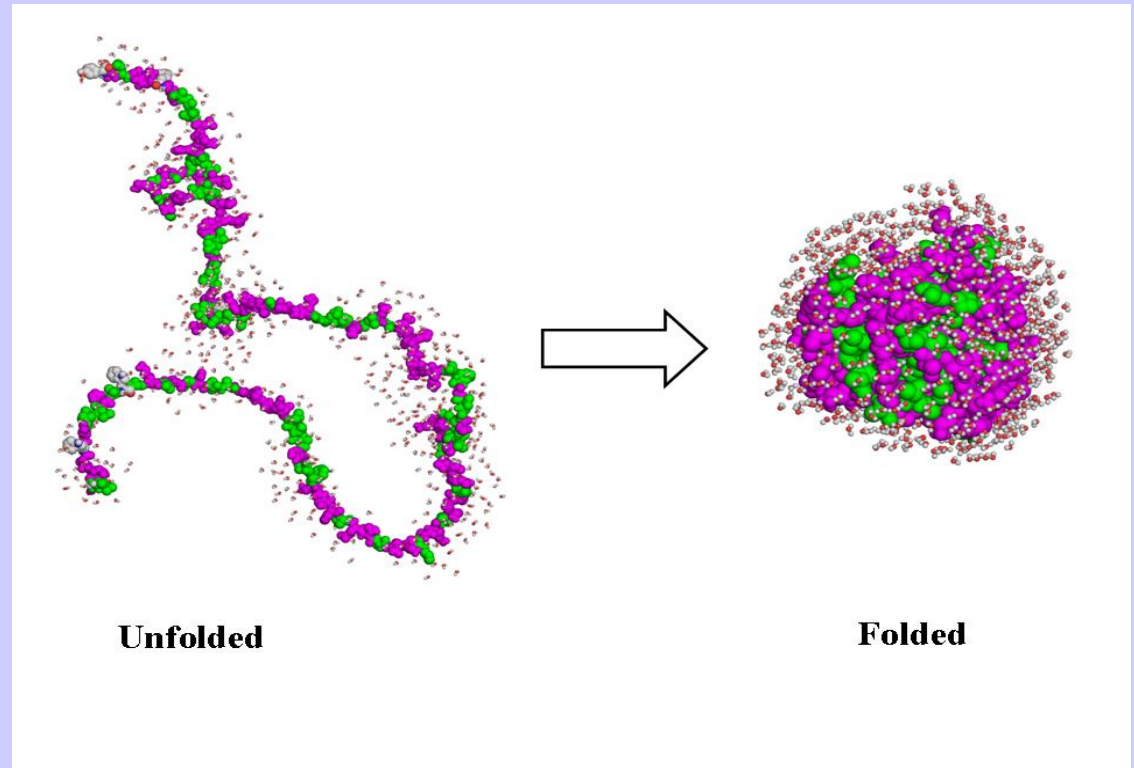
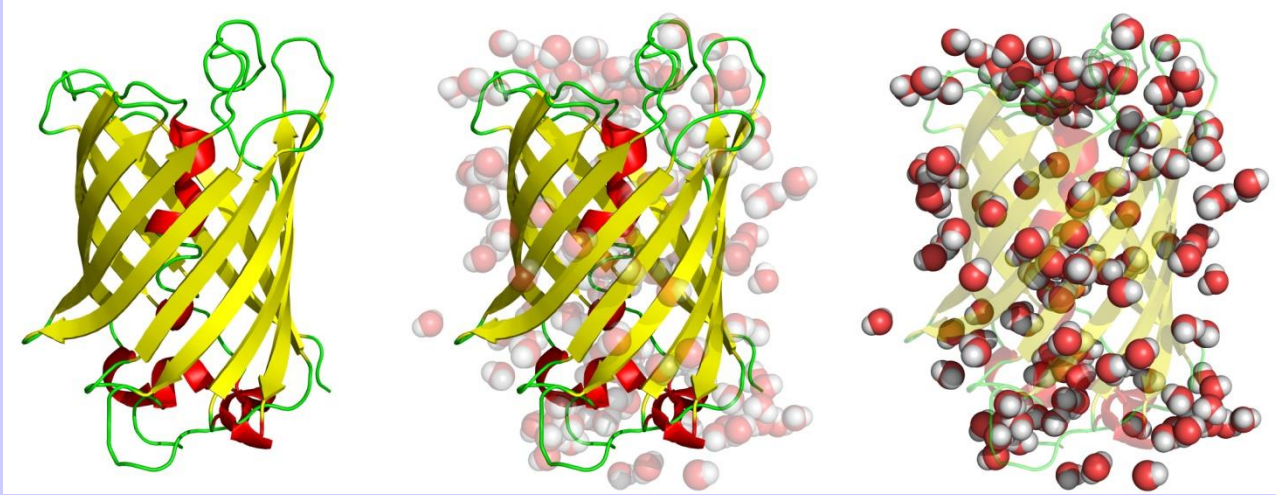
Struttura terziaria

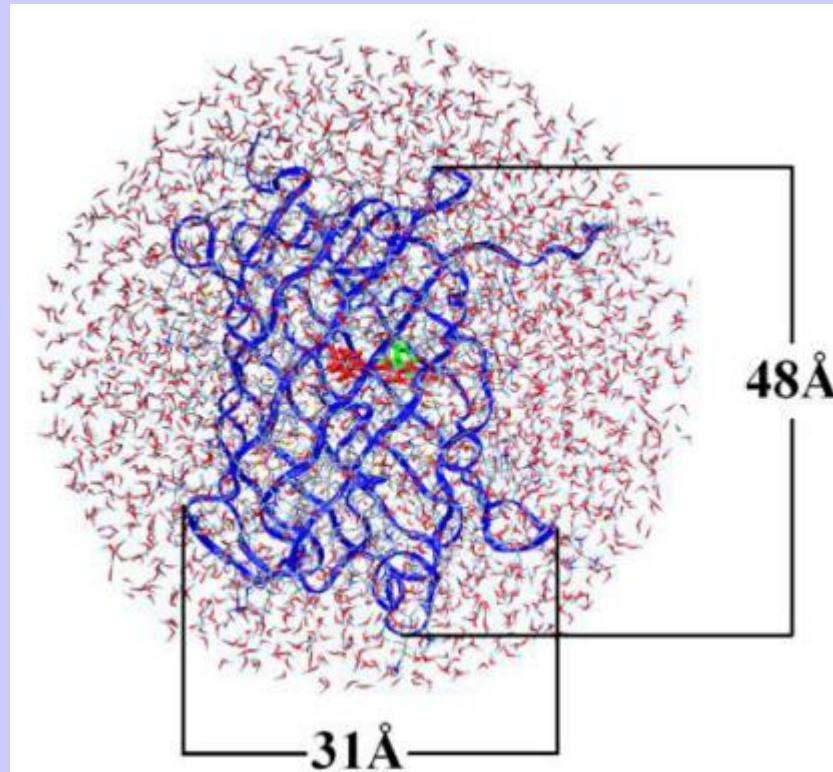
- Definisce la disposizione di tutti gli atomi nello spazio tridimensionale
- Ulteriore ripiegamento della catena polipeptidica già organizzata in una struttura secondaria
- Amminoacidi localizzati in regioni lontane della sequenza polipeptidica possono interagire tra loro

Come si forma la struttura?

- **Interazioni tra atomi vicini**
- **Interazione tra atomi lontani nella catena**
- **Interazioni con le molecole di solvente**

Interazioni con le molecole di solvente





PROBLEMATICHE GENERALI

LA STRUTTURA DELLA MOLECOLA:

- E' pura? E' nativa? E' completa?
- Qual è la struttura? Si può predire la struttura?
- E' rigida o flessibile?
- Come si forma la struttura?

Relazione STRUTTURA-FUNZIONE:

- **Si può predire o razionalizzare?**

Si può predire o razionalizzare la relazione struttura-funzione?

La risposta è «NI» !

Per predire un meccanismo di azione, la funzione, di un biopolimero sono necessari sia **dati termodinamici che cinetici**, oltre a quelli **strutturali e teorici**

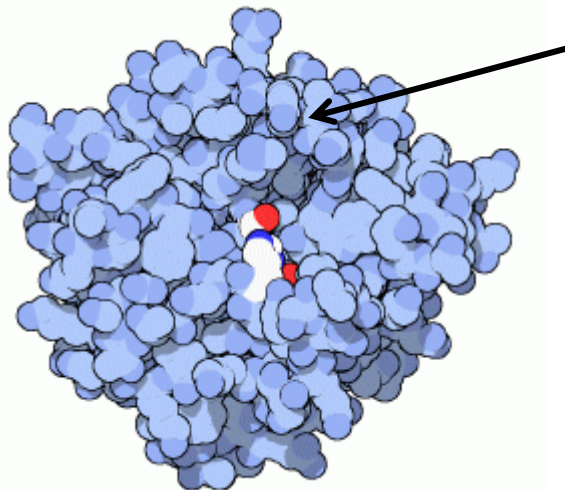
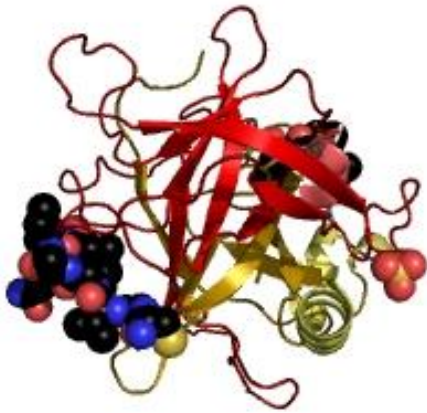
Comprendere il funzionamento di una biomolecola partendo dalla sua struttura è compito difficile, specie se si vuole andare nel dettaglio dei meccanismi biochimici nei quali è coinvolta quella molecola.

ESEMPIO: La **chimotripsina** è un enzima, appartenente alla classe delle proteasi, che catalizza la rottura del legame peptidico.

STRUTTURA

È una proteina **globulare** e possiede, come la tripsina, una **tasca idrofobica**, ricoperta da residui di aminoacidi apolari.

La cavità idrofoba contiene una **triade catalitica** (Ser 195, His 57 e Asp 102) orientata sempre nello stesso modo.



FUNZIONE

La chimotripsina idrolizza il legame solo in corrispondenza di determinati **amminoacidi idrofobici**, e scorre lungo la catena fino a trovare questi aminoacidi.

L'idrolisi della proteina avviene sui residui Tyr, Trp, Phe e Leu.

Quali caratteristiche della struttura terziaria sono necessarie per una particolare funzione e quali sono irrilevanti?

In generale l'intera struttura terziaria sembra essere necessaria per le funzioni di molte proteine ed acidi nucleici. Paragonando le strutture delle forme native e denaturate è possibile, qualche volta, riconoscere le caratteristiche delle strutture terziarie che devono essere in una disposizione particolare per dare attività biologica.

In generale, nello studio dei processi biologici si assume che **l'intera struttura primaria** abbia un ruolo funzionale.

Se non lo avesse, sarebbe difficile capire perchè il processo selettivo dell'evoluzione non abbia causato la "delezione" di quelle parti della molecola che non sono essenziali o funzionali.

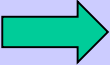
Strategie di base nello studio dei biopolimeri

- ➔ • Utilizzare sistemi più piccoli come modelli
- Utilizzo di sonde o marcatori
- Paragonare due sistemi simili (*omologia e similitudine*)

Strategie di base nello studio dei biopolimeri

- Utilizzare **sistemi più piccoli** come modelli
- • Utilizzo di **sonde** o **marcatori**
- Paragonare due sistemi simili (*omologia e similitudine*)

Strategie di base nello studio dei biopolimeri

- Utilizzare **sistemi più piccoli** come modelli
- Utilizzo di **sonde** o **marcatori**
-  • Paragonare due sistemi simili (*omologia e similitudine*)

Paragonare due sistemi simili

Casi di **similarità** sono diffusi tra i biopolimeri.

Le proprietà funzionali sono simili e quindi si può individuare una relazione diretta tra struttura e funzione; non è difficile allora cercare di capire quali domini strutturali siano necessari per la funzione.

Allo stesso modo, esistono proteine che hanno strutture **omologhe**, ma funzioni differenti: p.es. le "esterasi" della serina (chimotripsina, tripsina, elastasi, etc.).

Proprietà macromolecolari

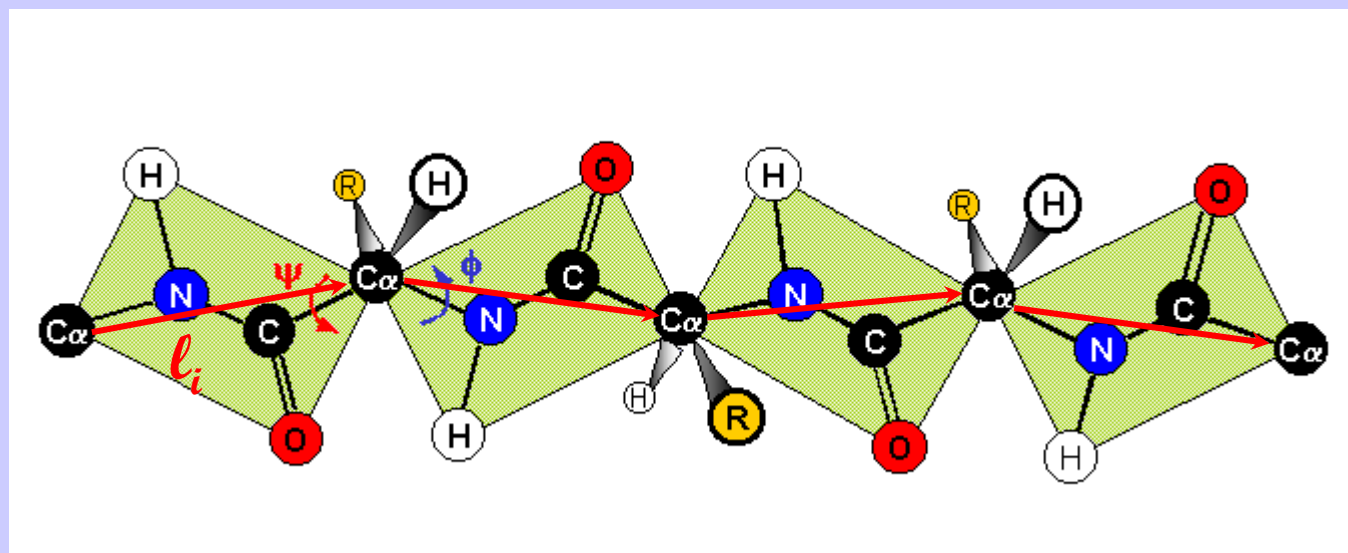
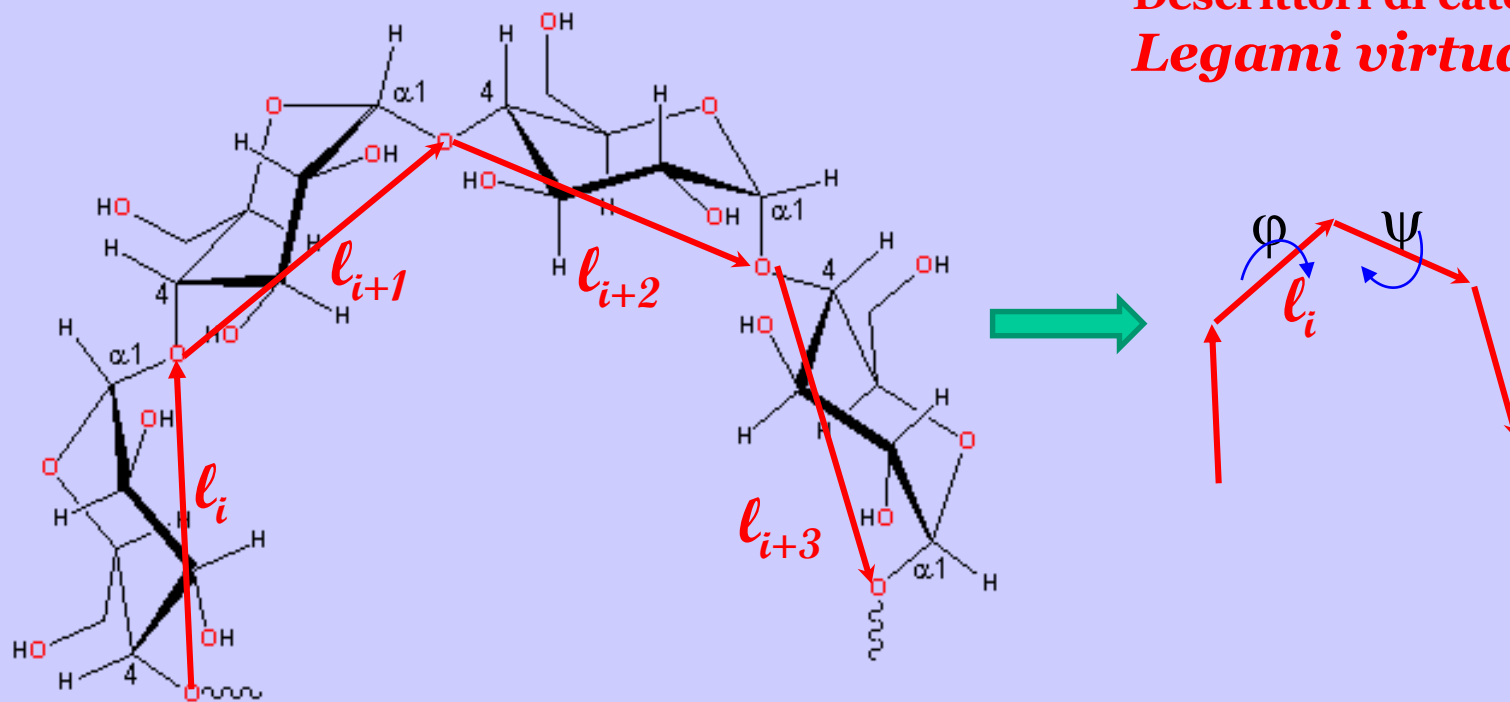
Proprietà macromolecolari

Con questo termine si indicano tutte quelle proprietà di catena che mi servono per la definizione della **topologia** (**forma e dimensione**) di un particolare sistema macromolecolare.

Si ottengono con metodi sperimentali ed attraverso il calcolo delle **proprietà macromolecolari** che implicano l'utilizzo della statistica della catena polimerica in termini di distanze medie tra segmenti della catena stessa.

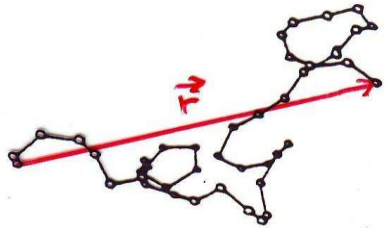
Tra le proprietà, due importanti sono la **distanza testa-coda** ed il **raggio di girazione** che possono essere misurate sperimentalmente.

**Descrittori di catena:
*Legami virtuali***

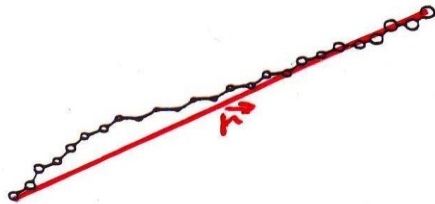


Proprietà medie di polimeri

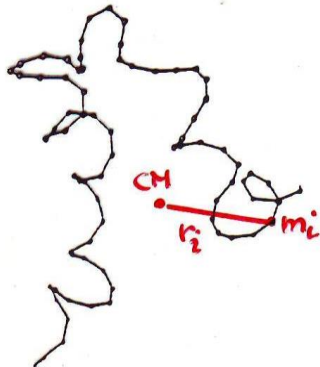
Distanza testa-coda



$$\vec{r} = \sum_{i=1}^n \vec{l}_i \quad \rightarrow \quad \langle r^2 \rangle$$



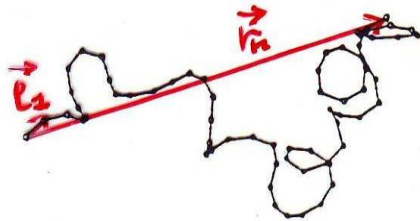
Raggio di girazione



$$\langle R_G^2 \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \langle m_i r_i^2 \rangle}{\sum_{i=1}^n m_i}$$

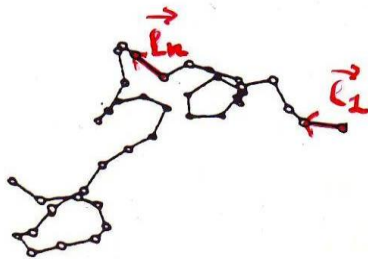
Proprietà medie di polimeri

Lunghezza di persistenza



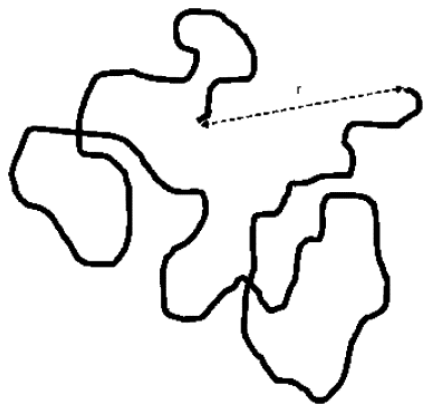
$$P_n = \left\langle \frac{\vec{l}_1}{l_1} \cdot \vec{r}_n \right\rangle = a_n$$

Funzione di correlazione

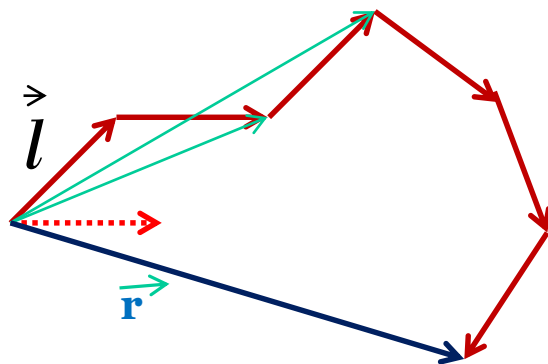


$$F_n = \left\langle \frac{\vec{l}_1}{l_1} \cdot \frac{\vec{l}_n}{l_n} \right\rangle$$

Distanza quadratica media testa-coda



Distanza testa-coda di un polimero (correlata alla rigidità del polimero)



Calcolo della distanza testa-coda come somma di vettori ciascuno lungo un legame della catena (tutti i legami hanno stessa lunghezza).

$$\vec{r} = \sum_{i=1}^n \vec{l}_i$$

Il modulo del vettore \mathbf{r} è:

$$\left(\vec{r} \cdot \vec{r} \right)^{1/2}$$

$$r^2 = \sum_{i=1}^n \vec{l}_i \cdot \sum_{j=1}^n \vec{l}_j = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j$$

La doppia sommatoria è composta da termini $i=j$ e da termini $i \neq j$ uguali a due a due.

$$r^2 = nl^2 + 2 \sum_{j>i}^n \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \quad \text{mediando su diverse catene}$$

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 + 2 \sum_{j>i}^n \langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle$$

Il calcolo si riduce al prodotto di vettori (proiezione media di un legame su ogni altro legame).

$$r^2 = \sum_{i=1}^n \vec{l}_i \cdot \sum_{j=1}^n \vec{l}_j = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j$$



$l_1 \cdot l_1$	$l_1 \cdot l_2$	$l_1 \cdot l_3$	$l_1 \cdot l_4$	$l_1 \cdot l_n$
$l_2 \cdot l_1$	$l_2 \cdot l_2$	$l_2 \cdot l_3$	$l_2 \cdot l_4$
$l_3 \cdot l_1$	$l_3 \cdot l_2$	$l_3 \cdot l_3$	$l_3 \cdot l_4$
....
$l_n \cdot l_1$	$l_n \cdot l_2$	$l_n \cdot l_3$	$l_n \cdot l_n$

$$r^2 = nl^2 + 2 \sum_{j>i}^n \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j$$

Rapporto caratteristico:

$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2} = 1 + 2/nl^2 \sum_{j>i}^n \langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle$$

$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2} = 1 \quad \text{per una catena liberamente snodata con } n \text{ grande}$$

$$C_\infty = \lim_{n \rightarrow \infty} C_n$$

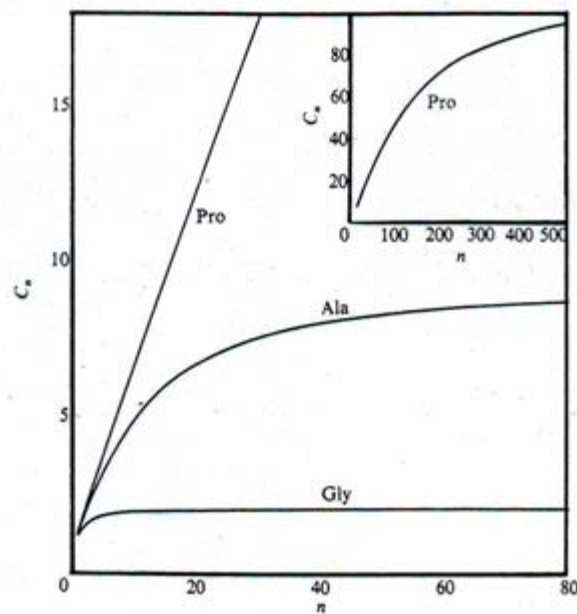
$$C_n \neq 1 \quad \text{per una catena reale}$$

la velocità di convergenza di C_n a C_∞ è una misura della rigidità della catena polimerica.

Questo concetto viene meglio esplicitato con la definizione della ***lunghezza di persistenza.***

Table 18-1Limiting characteristic ratios C_∞

Polymer	Free rotation	Dipolar interaction omitted	Dipolar interaction included	Experimental
Polyglycine	1.93	1.79	2.16	—
Poly-L-alanine	1.93	2.97	9.27	9.0
Poly-L-proline II	1.86	116	—	—
Poly(L-lactic acid)	1.92	1.24	2.13	2.1

SOURCE: Data from P. J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules* (New York: Wiley, 1969), p. 277.**Figure 18-16**

Characteristic ratio for various polypeptide homopolymers. The characteristic ratio C_n is plotted versus n for polyglycine, poly-L-alanine, and poly-L-proline. [After P. R. Schimmel and P. J. Flory, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:52 (1967).]

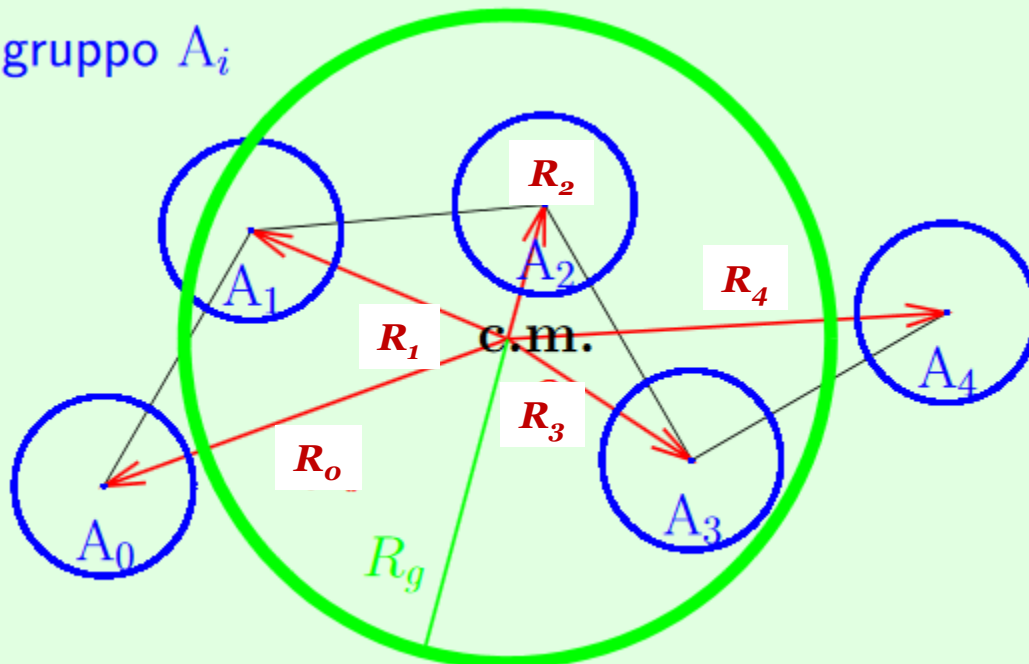
Raggio di girazione

- ◇ E' uno dei parametri principali per descrivere le dimensioni di una catena. La sua definizione viene dalla meccanica classica

$$R_g^2 = \frac{1}{n+1} \sum_{i=0}^n R_i^2$$

catena di $n+1$ atomi (uniti da n legami)

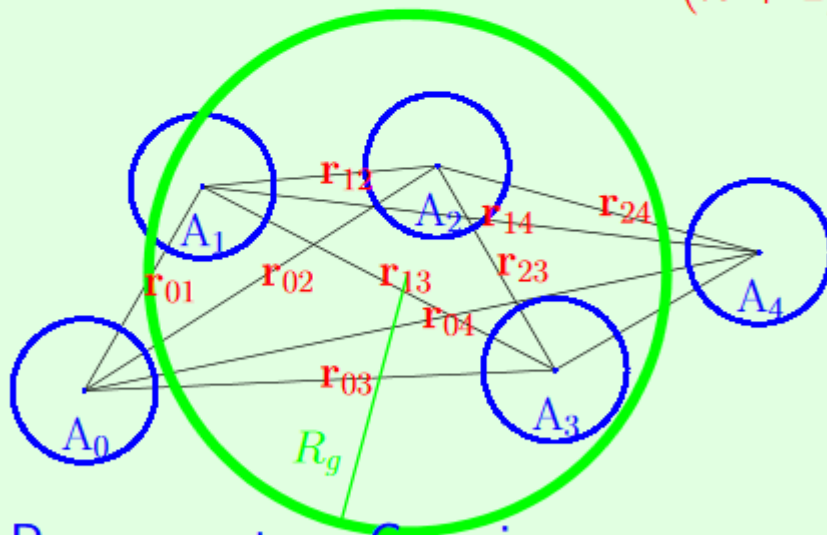
R_i è il modulo del vettore che unisce il centro di massa della catena con il gruppo A_i



Raggio di girazione

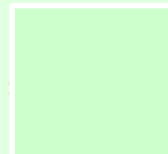
- ◇ E' possibile anche dimostrare che R_g^2 è la metà della media dei quadrati di tutte le possibili distanze r_{ij} tra gli $(n + 1)$ gruppi

$$R_g^2 = \frac{1}{(n + 1)^2} \sum_{i < j}^n r_{ij}^2$$



- ◇ Per una catena Gaussiana e per n molto grande, si dimostra

$$R_g^2 = \frac{\langle r^2 \rangle}{6}$$

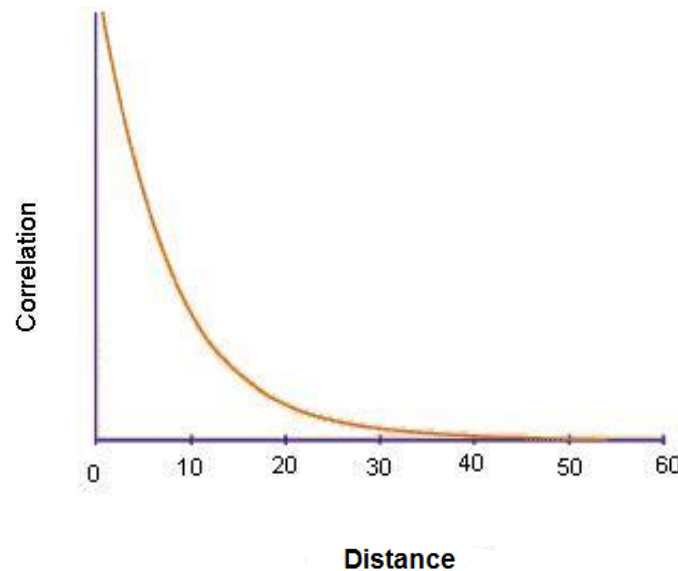


LA LUNGHEZZA DI PERSISTENZA

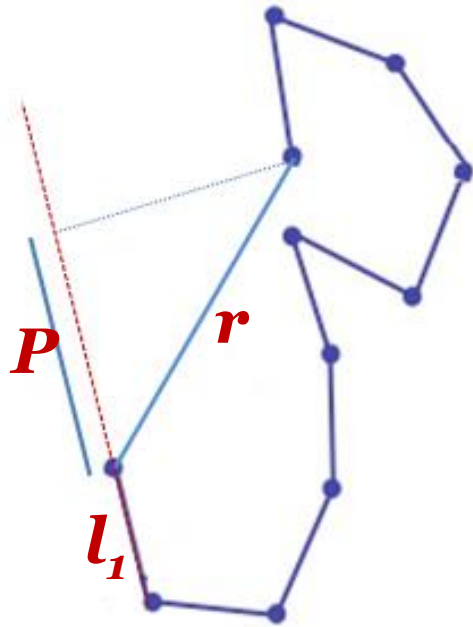
E' una misura della flessibilità della catena polimerica.

Consideriamo una corda leggermente flessibile: a corta distanza le tangenti per due punti puntano (quasi) nella stessa direzione (i due angoli alle tangenti sono correlati), ma per due punti a distanze grandi le due tangenti puntano (in media) in direzioni molto diverse (i due angoli alle tangenti non sono correlati).

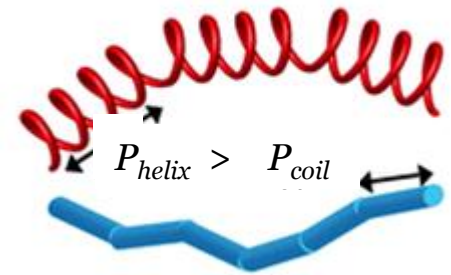
Se si riporta un grafico di correlazione, all'aumentare della distanza tra i due punti questa parte da 1 (perfetta correlazione) e diminuisce esponenzialmente.



La lunghezza di persistenza è definita come la **proiezione media (P)** della distanza testa coda media (\mathbf{r}) sulla direzione del primo legame della catena (\mathbf{l}_1) e quindi una misura della **tendenza della catena a persistere in una certa direzione** e pertanto della **rigidità della catena**.



$$P = \left\langle \left(\frac{\vec{l}_1}{l_1} \right) \cdot \sum_{i=1}^n \vec{l}_i \right\rangle$$

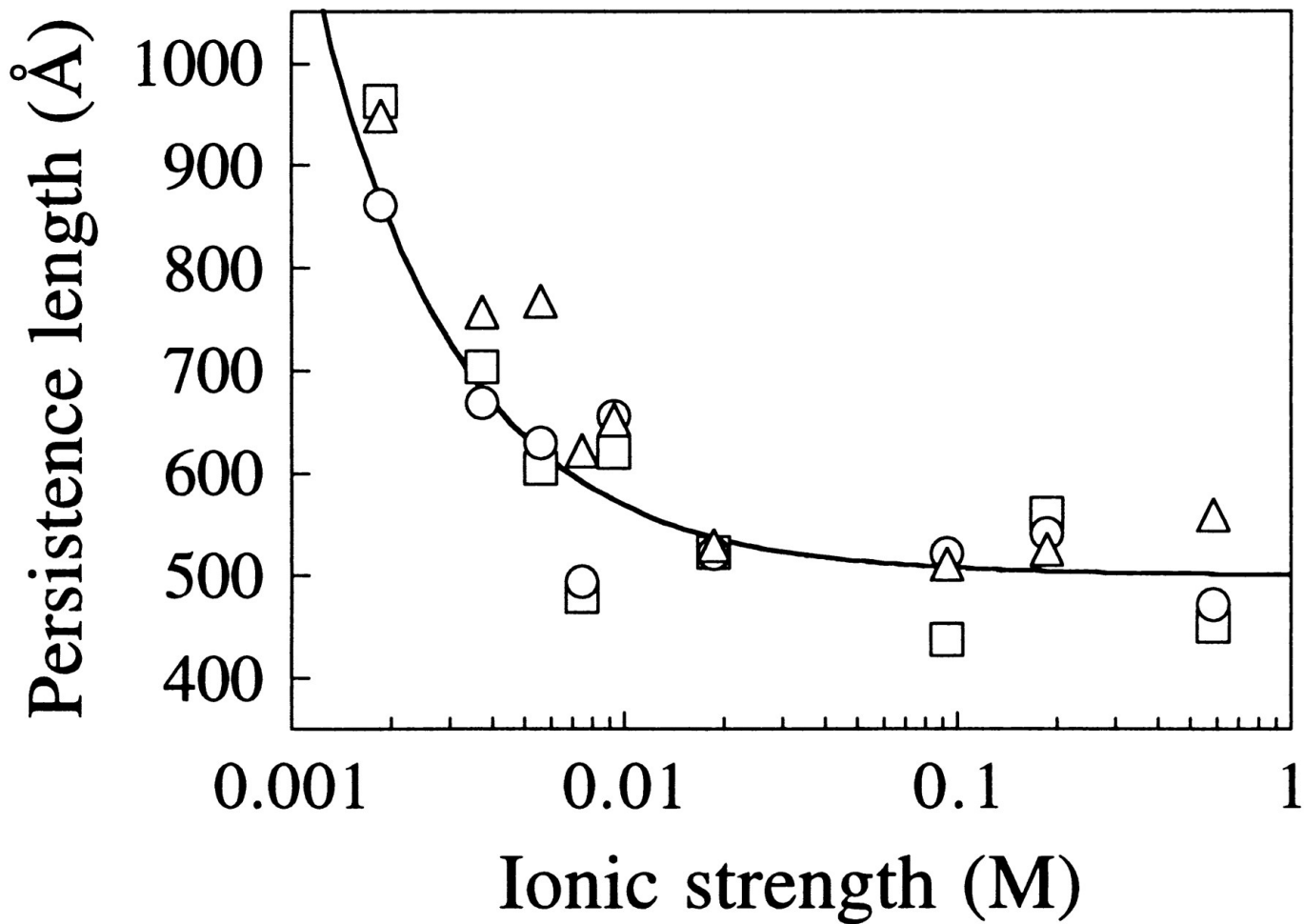


Poiché P è la proiezione di \mathbf{r} su un legame è possibile dimostrare che è correlata al **rapporto caratteristico** (vedi: Cantor-Schimmel, Biophysical Chemistry, vol.III)

$$P = (C_\infty + 1) \frac{l}{2}$$

dando quindi un significato fisico più preciso a questo in termini di rigidità di catena.

Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules



$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2} = 1 + 2/nl^2 \sum_{j>i}^n \langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle$$

$$C_\infty = \lim_{n \rightarrow \infty} C_n$$

Tabella 1: Rapporto caratteristico per alcuni polimeri reali (i valori dipendono dal solvente)

Polimero	elemento ripetuto	C_∞
<i>freely jointed chain</i>		1
Polimetilene	-CH ₂ -	6.7
Polistirene (atattico)	-CH ₂ -CH(C ₆ H ₅)-	10.2
Polipropilene (atattico)	-CH ₂ -CH(CH ₃)-	7.0
Polipropilene (isotattico)	-CH ₂ -CH(CH ₃)-	5.7
Polimetilmetacrilato (PMMA)	-CH ₂ -C(CH ₃)(COOCH ₃)-	6.9
Polidimetilsilossano	-O-Si(CH ₃)(CH ₃)-	6.2
l-poliipeptidi	-NH-CH(CH ₂ R)-CO-	8.5-9.5
Polifosfato	-O-PO ₂ -	7.1
DNA		600

L'EFFETTO DI VOLUME ESCLUSO

Nelle *catene reali*:

→ Interazioni a corta distanza dovute a vincoli di geometria di legame e ad effetti di impedimento di rotazioni che possono essere valutati (es. catena liberamente ruotante).

→ Interazioni a lunga distanza all'interno della catena o tra catene.

Interazioni a lunga distanza tra catene (intermolecolari) possono essere eliminati dalla **diluizione**.

Interazioni all'interno della catena (intramolecolari) non possono essere eliminate e tra queste importanti sono quelle di due segmenti di catena che non possono occupare lo stesso volume → «effetti di volume escluso»

Il polimero si dice «**in condizioni imperturbate**» quando vengono minimizzati/eliminati gli effetti di volume escluso.

Le grandezze «**imperturbate**» si indicano con uno zero al pedice (r_0).

...quindi nello stato imperturbato

La formula: $\langle r^2 \rangle = nl^2 + 2 \sum_{j>i}^n \langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle$ può essere usata per calcolare

qualsiasi distanza r_{ij} quindi anche in: $R_G^2 = \left[\frac{1}{(n+1)^2} \right] \sum_{i>j}^n r_{ij}^2$

Indicheremo con $\langle \mathbf{r} \rangle_0$ ed $\langle R_G \rangle_0$ le due grandezze imperturbate che sono correlate (nel limite $n \rightarrow \infty$) e si dimostra che:

$$\langle R_G^2 \rangle_0 = \frac{\langle r^2 \rangle_0}{6}$$

valida per una catena lunga nello stato imperturbato.

Nel calcolo di $\langle r^2 \rangle$ per $n \rightarrow \infty$ saranno sempre più numerose le configurazioni di catena che si **incrociano** su se stesse e che dovranno essere escluse nella media.

Gli effetti di volume escluso portano a

$$\langle r^2 \rangle \neq \langle r^2 \rangle_0$$

che possiamo rappresentare come:

$$\langle r^2 \rangle = \alpha^2 \langle r^2 \rangle_0,$$

dove α è un **fattore di espansione**.

Le catene che si «*auto-incrociano*» sono più probabili in una configurazione di catena molto lunga: pertanto sarà $\alpha > 1$

α dipende dalla massa molecolare e dal solvente

- α aumenta con l'aumento del peso molecolare.
- $\alpha \gg 1$: in un **buon solvente** dove le catene sono più aperte per favorire una maggior interazione col solvente
- In un **cattivo solvente** α **diminuisce** a causa della presenza di configurazioni di catena molto compatte.
- Se sono preferite le interazioni di segmenti di polimero tra loro, **il polimero si contrae**.
- La qualità del solvente dipende dalla composizione chimica del polimero e del solvente, oltre dalla temperatura.

Può succedere che **gli effetti di volume escluso** (cioè espansione della **forma** del polimero) **siano compensati** dalla compattazione della catena: pertanto $\alpha = 1$ $\langle r^2 \rangle = \langle r^2 \rangle_0$



$(\alpha > 1)$



$(\alpha = 1)$



$(\alpha < 1)$

Solventi in cui $\alpha = 1$ sono detti **solventi theta (θ)**, ma va valutata anche la temperatura, per cui è definita anche una **temperatura θ** .

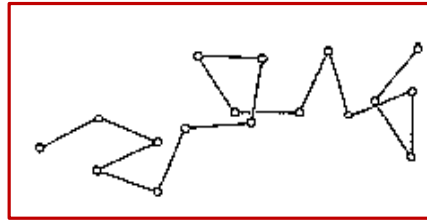
Il punto θ per i polimeri è analogo al **punto di Boyle** per i gas reali dove le forze attrattive compensano quelle repulsive ed i gas si comportano come gas perfetti.

Nella pratica le condizioni θ (solvente e temperatura) sono difficili da raggiungere e quindi α va valutato attraverso la teoria delle soluzioni polimeriche.

Condizioni theta per alcune coppie polimero/solvente

<u>polymer</u>	<u>solvent</u>	<u>Θ/K</u>	
polystyrene	cyclohexane	307.2	34°C
polyethylene	nitrobenzene	503	230°C
poly(methyl methacrylate)	4-heptanone	305	32°C
poly(acrylic acid)	dioxane	302.2	29°C
polymethacrylonitrile	butanone	279	6°C

LA CATENA LIBERAMENTE SNODATA (FREELY JOINTED CHAIN oppure RANDOM WALK CHAIN»).



La direzione di ogni vettore-legame non è correlata con ogni altro vettore della catena e gli angoli di legame possono essere qualsiasi.

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 + 2 \sum_{j>i}^n \langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle$$

La quantità $\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle$ è zero per ogni $i \neq j$, ogni proiezione di \vec{l}_i su \vec{l}_j ha un termine uguale e di segno contrario quindi:

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2$$

non valida per una catena reale.

ESEMPIO:

Una catena ideale di 10^6 monomeri ciascuno lungo 6 Å ha una distanza testa coda di 600 nm.

Rapporto caratteristico:

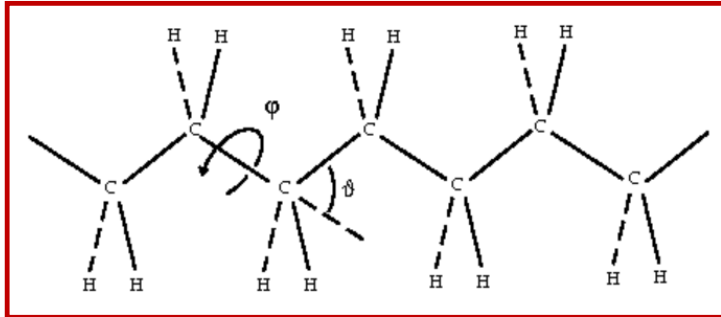
$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2} = 1 \quad \text{per una catena liberamente snodata}$$

$$C_\infty = \lim_{n \rightarrow \infty} C_n$$

$C_n \neq 1$ per una catena reale

LA CATENA LIBERAMENTE RUOTANTE

(FREELY ROTATING CHAIN)



Si può ruotare liberamente intorno ai legami, ma l'angolo di legame è fissato

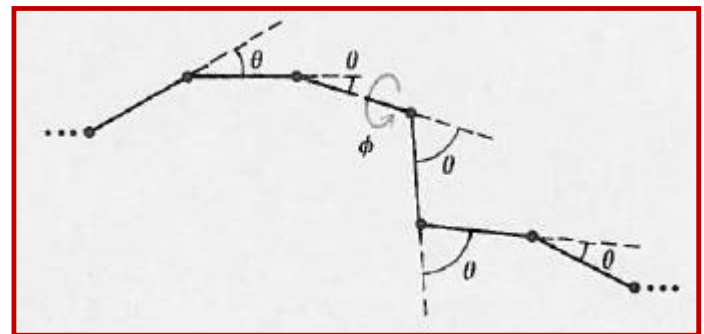
$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2 \sum_{j>i}^n \langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle$$

Il calcolo di $\langle r^2 \rangle_0$ richiede la valutazione del secondo termine dell'equazione

$$\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_{i+1} \rangle = l^2 \cos \theta$$

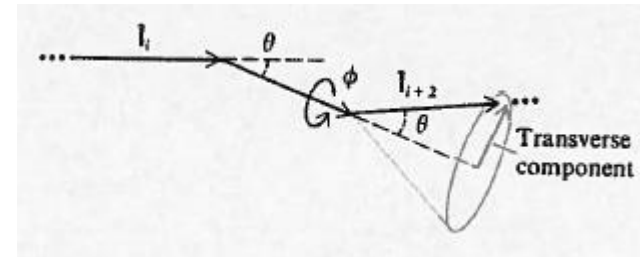
Va calcolato il termine:

$$\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_{i+2} \rangle$$



Al ruotare dell'angolo ϕ , la sommatoria delle componenti perpendicolari al legame $i+1$ si cancellano tutte, rimane la componente lungo il legame $i+1$ che vale $l \cos \vartheta$ che proiettata sul legame i diventa $l \cos \vartheta \cos \vartheta = l \cos^2 \vartheta$:

$$\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_{i+2} \rangle = l^2 \cos^2 \vartheta$$



Proseguendo il calcolo per $i+3$, $i+4$, etc, si ha:

$$\langle \vec{l}_i \cdot \vec{l}_j \rangle = l^2 \cos^{j-i} \vartheta$$

quindi:

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 + 2l^2 \sum_{j>i}^n \alpha^{j-i} \quad \text{con} \quad \alpha = \cos \vartheta$$

$$\langle r^2 \rangle_0 = nl^2 \left\{ \frac{(1+\alpha) - \frac{2\alpha}{n}}{(1-\alpha)} - \frac{2\alpha(\alpha - \alpha^n)}{n(1-\alpha)^2} \right\} = nl^2 \left\{ \frac{(1+\alpha)}{(1-\alpha)} - \left[\frac{2\alpha(1-\alpha)}{n(1-\alpha)^2} + \frac{2\alpha(\alpha - \alpha^n)}{n(1-\alpha)^2} \right] \right\}$$

$$= nl^2 \left\{ \frac{(1+\alpha)}{(1-\alpha)} - \left[\frac{2\alpha - 2\alpha^2 + 2\alpha^2 - 2\alpha^{n+1}}{n(1-\alpha)^2} \right] \right\} = nl^2 \left\{ \frac{(1+\alpha)}{(1-\alpha)} - \frac{2\alpha(1-\alpha^n)}{n(1-\alpha)^2} \right\}$$

Risultato per il rapporto caratteristico:

$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle_0}{nl^2} = \left\{ \frac{(1+\alpha)}{(1-\alpha)} - \frac{2\alpha(1-\alpha^n)}{n(1-\alpha)^2} \right\}$$

Contrariamente alla catena liberamente snodata
il rapporto caratteristico dipende da n .

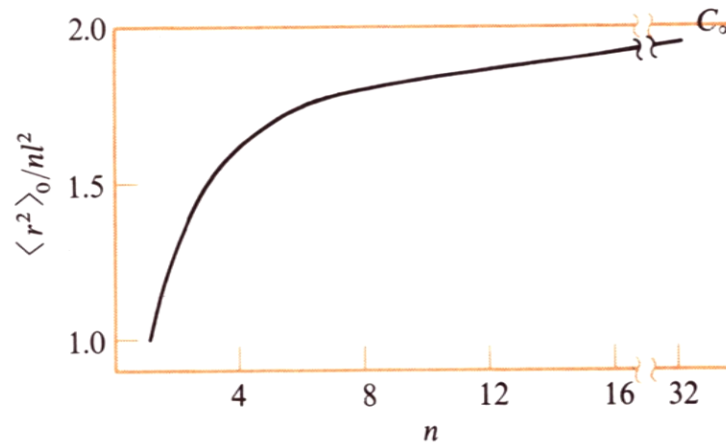
Per valori di n molto grandi (al limite di $n \rightarrow \infty$):

$$C_{\infty} = \left(\frac{\langle r^2 \rangle_0}{nl^2} \right)_{n \rightarrow \infty} = \frac{(1 + \alpha)}{(1 - \alpha)}$$

Nel caso del polietilene con atomi di carbonio tetraedrici il valore di α è $1/3$ (il complemento all'angolo tetraedrico è circa 70° il cui \cos è $1/3$) il valore massimo è 2 che viene raggiunto praticamente con una catena di 30 legami.

Figure 18-9

The characteristic ratio. Plot of $\langle r^2 \rangle_0/nl^2$ versus n for a tetrahedrally bonded, freely rotating chain.



Per una catena completamente rigida: $\langle r^2 \rangle_0 \propto n^2 l^2 \rightarrow C_n \propto n$

Riassumendo:

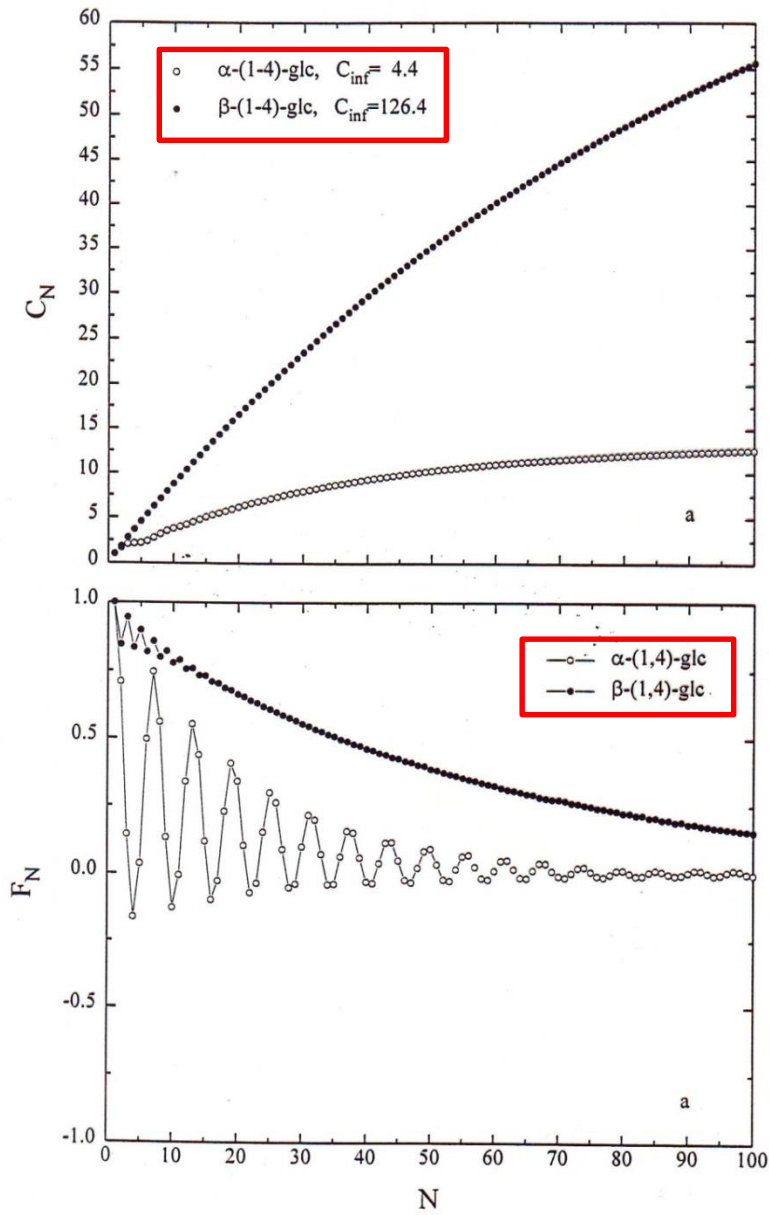
Per una catena **liberamente snodata** C_n non dipende da n

Per una catena **liberamente ruotante** C_n prima dipende da n ma poi diviene indipendente (C_∞) e quindi si avvicina alla catena liberamente snodata;

Quindi:

la velocità di convergenza di C_n a C_∞ è una misura della rigidità della catena polimerica.

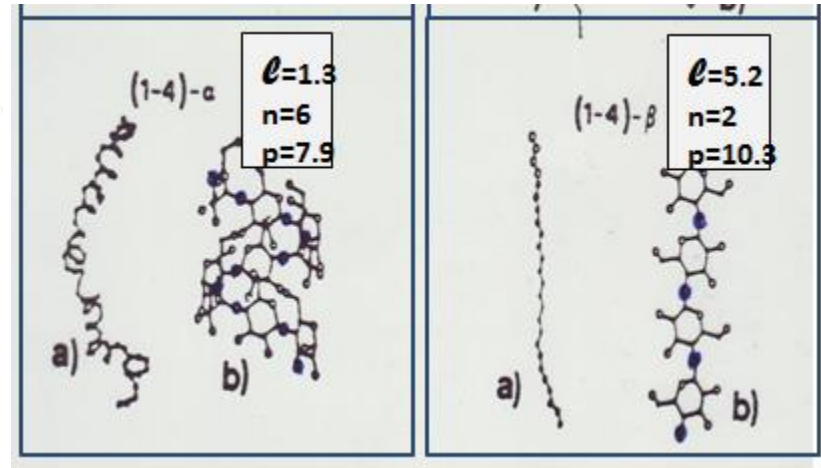
Questa proprietà si spiega meglio (come visto) con la definizione della ***lunghezza di persistenza***.



$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2}$$

$$F_n = \left\langle \frac{\bar{l}_1}{l_1} \cdot \frac{\bar{l}_n}{l_n} \right\rangle$$

$$C_\infty = \lim_{n \rightarrow \infty} C_n$$



Amilosio
poli[α -(1-4)-glucosio]

Cellulosa
poli[β -(1-4)-glucosio]