Proprietà di Biopolimeri

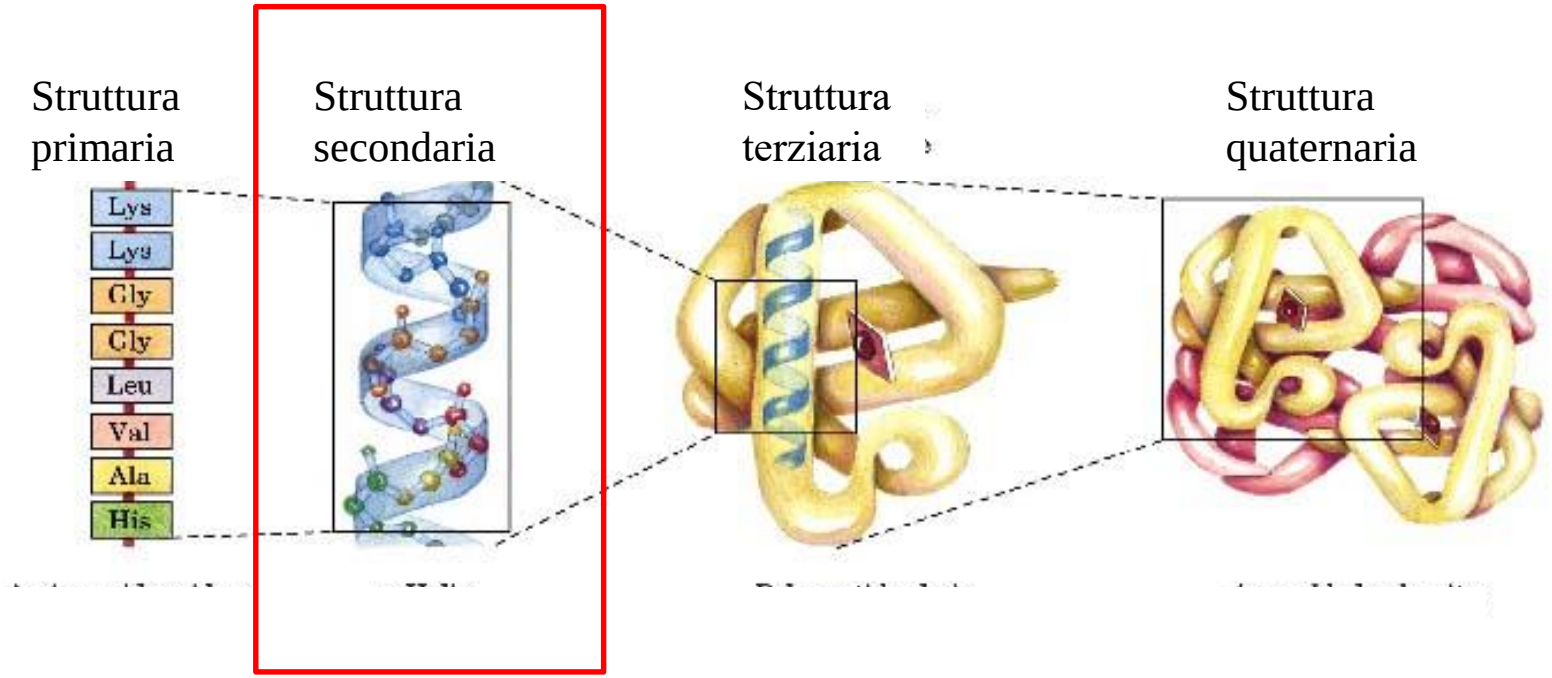
a.a. 2023-2024

Prof. R. Urbani

PROPRIETA' CONFORMAZIONALI: Struttura secondaria

GERARCHIA DEI LIVELLI DI ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE

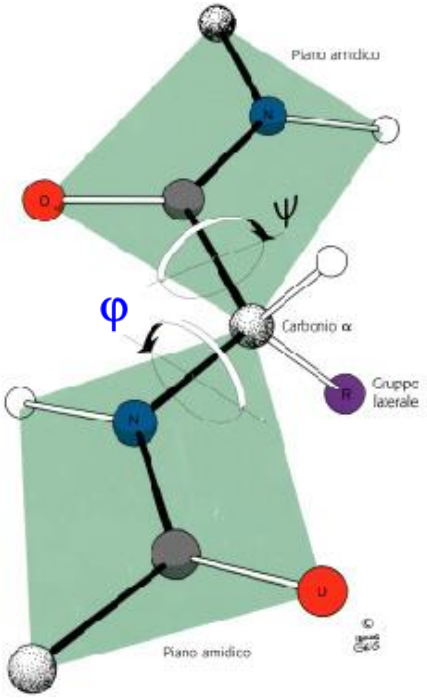
Esempio: proteina



LIVELLI DI STRUTTURA:

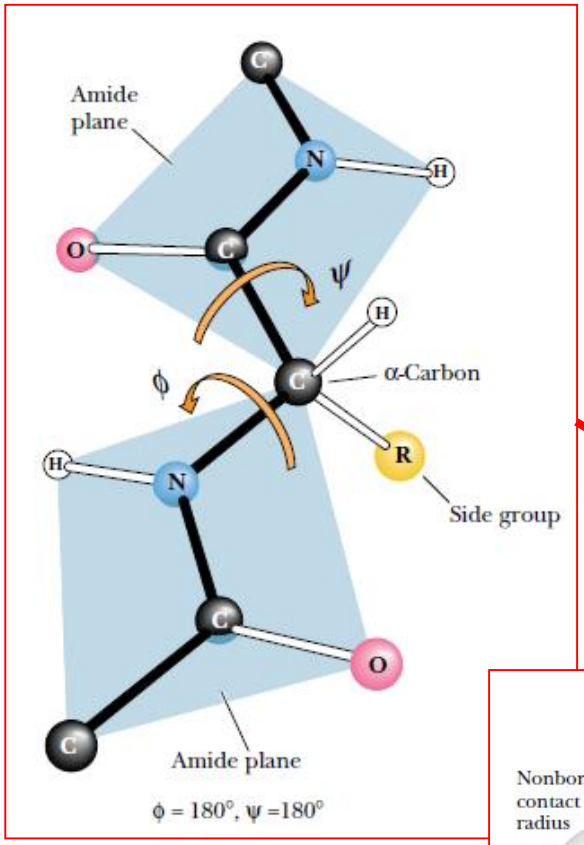
STRUTTURA SECONDARIA

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



Esempio: proteina

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



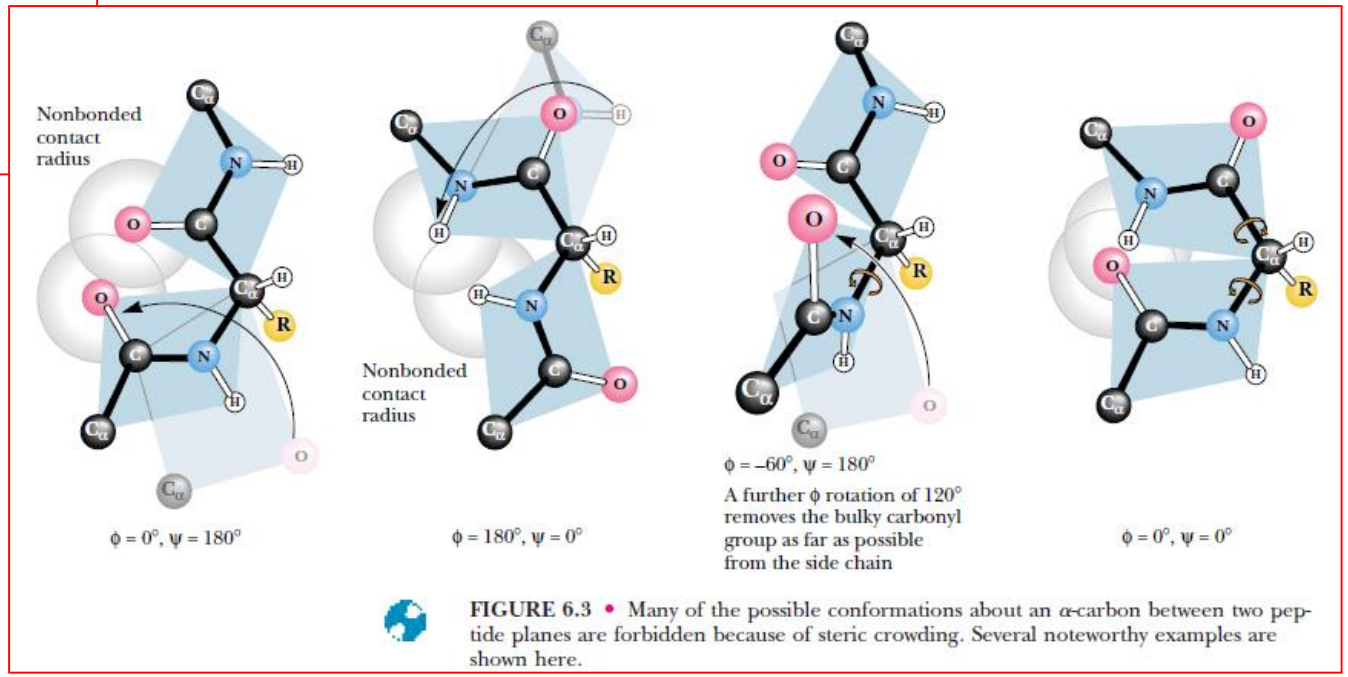


FIGURE 6.3 • Many of the possible conformations about an α-carbon between two peptide planes are forbidden because of steric crowding. Several noteworthy examples are shown here.

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

costante

«Approssimazione del residuo rigido»

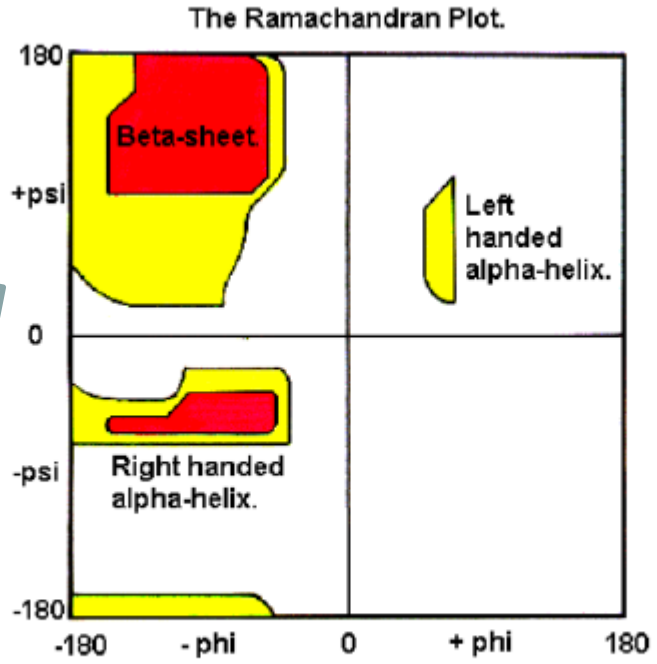
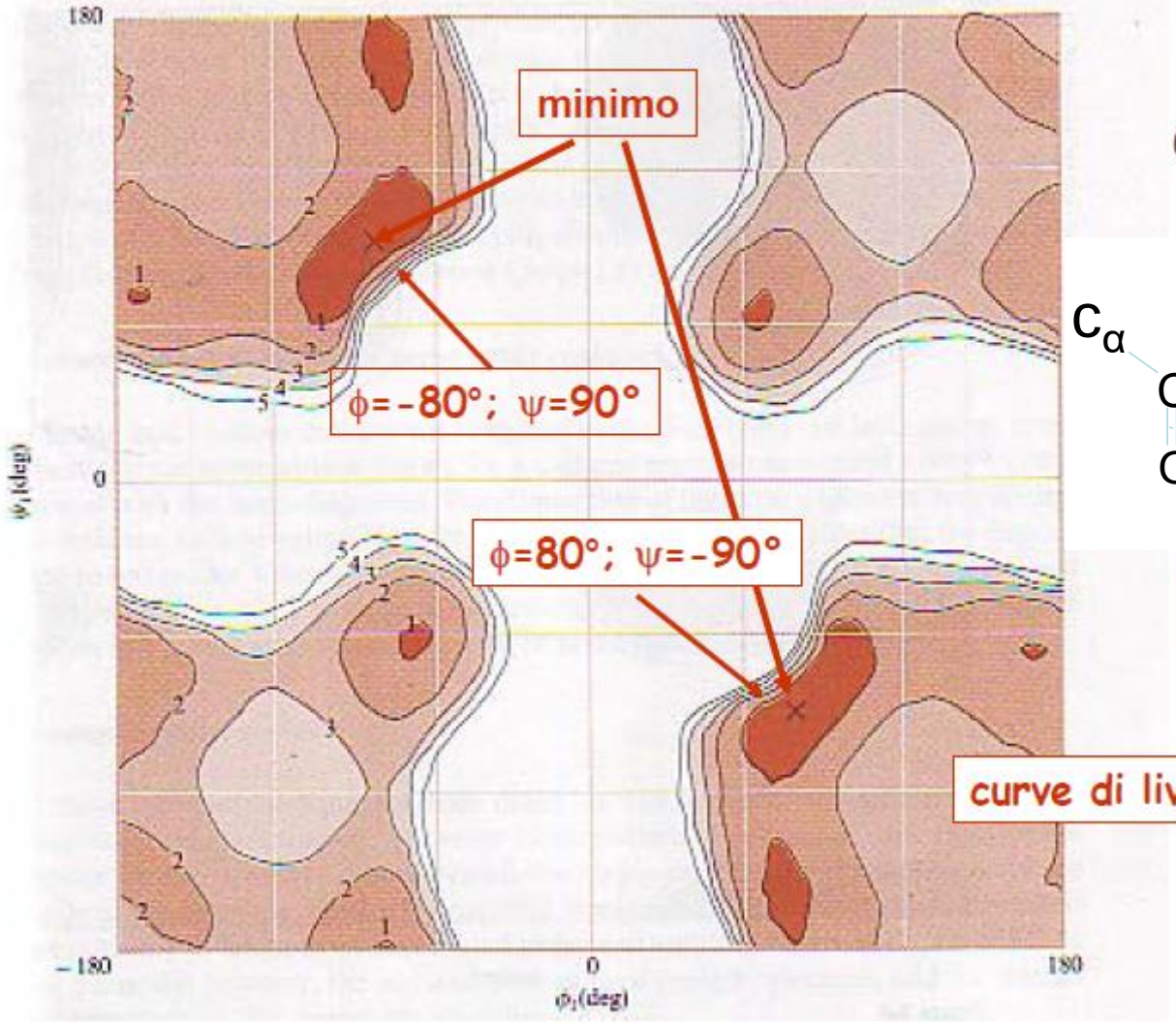
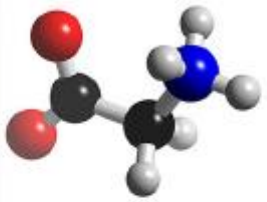


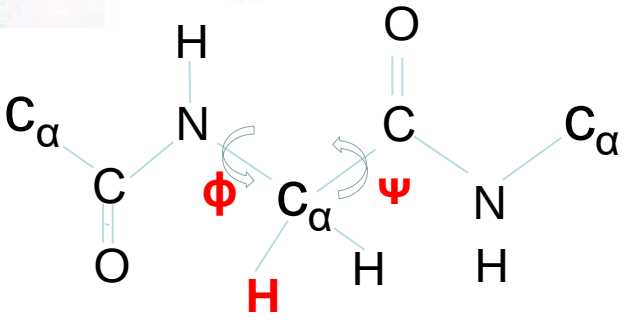
Figura 2.7: In rosso gli angoli accessibili a tutti gli amminoacidi tranne la prolina. In giallo le coppie addizionali accessibili alla glicina.

Mappe di Ramachandran

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







Glicina

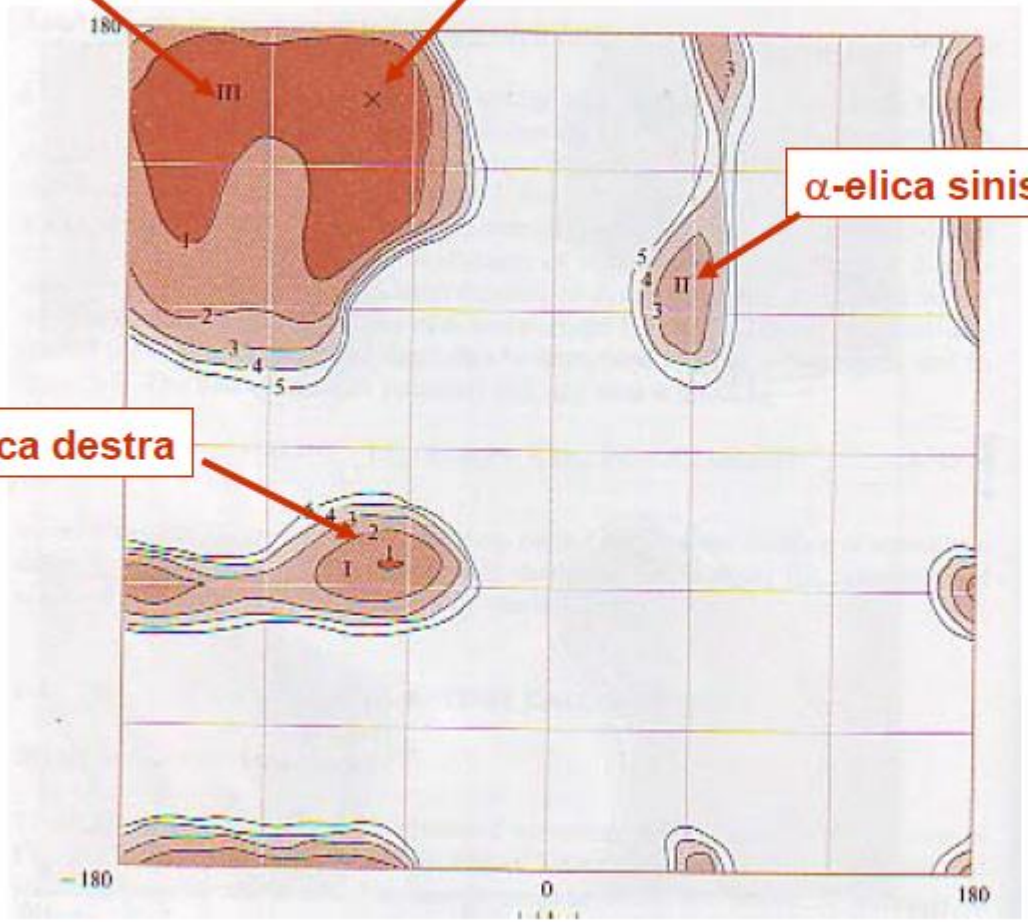
curve di livello ogni 1 Kcal

β-sheet

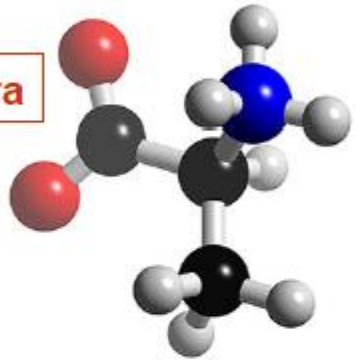
minimo (forme estese)

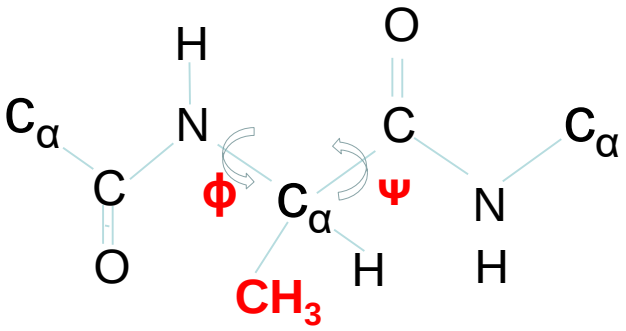
α-elica sinistra

α-elica destra

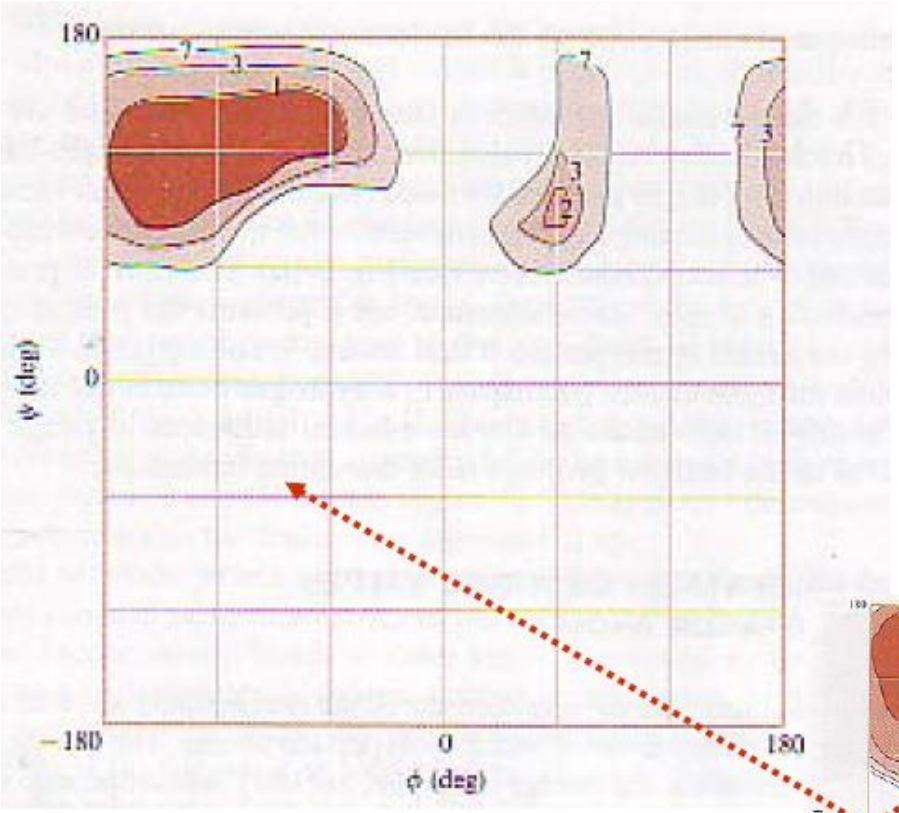


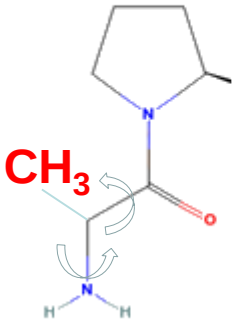
Alanina

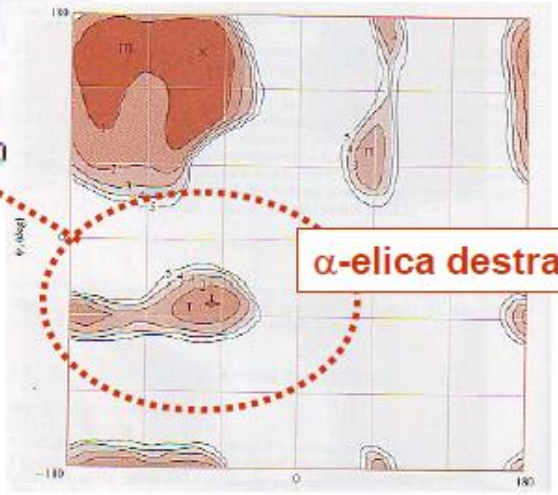




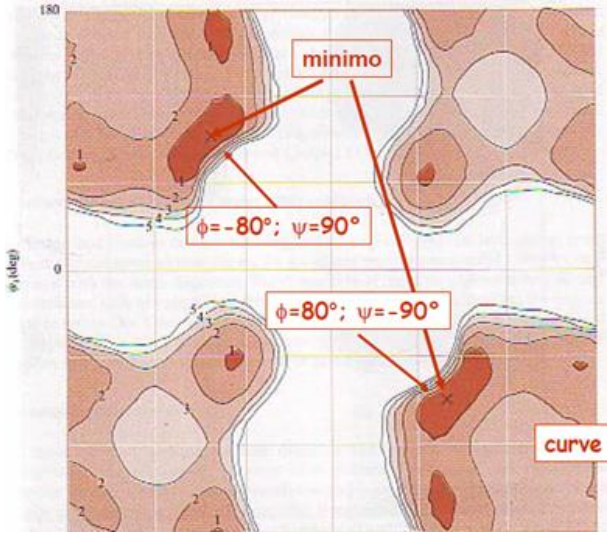
Alanina-Prolina



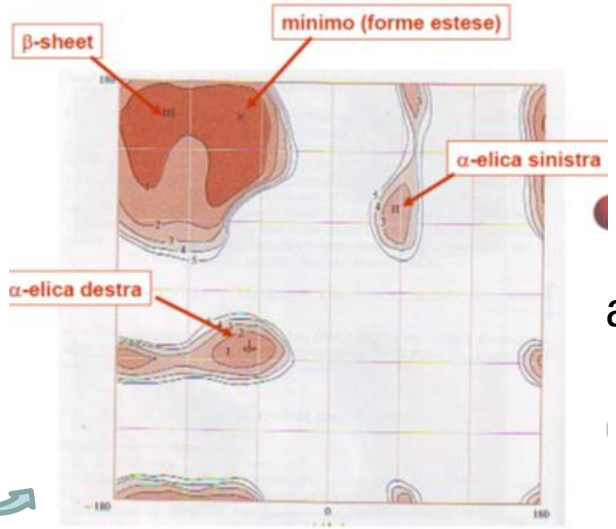




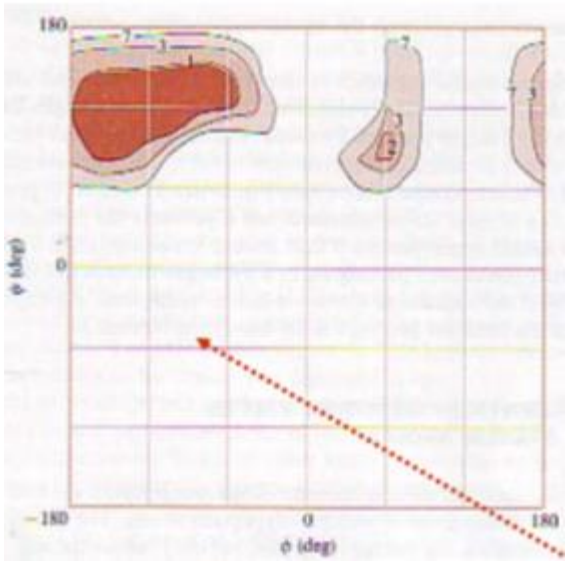
Alanina



glicina



alanina



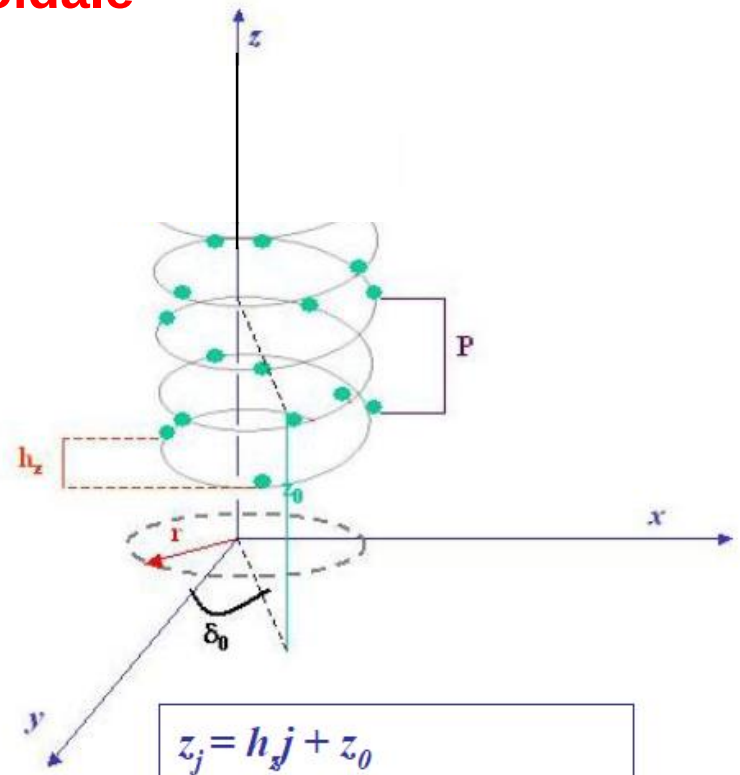
alanina-prolina

Possiamo distinguere tre tipi
di struttura secondaria:

α-elica
foglietto-β
β-turn

Struttura elicoidale

Struttura localmente ordinata



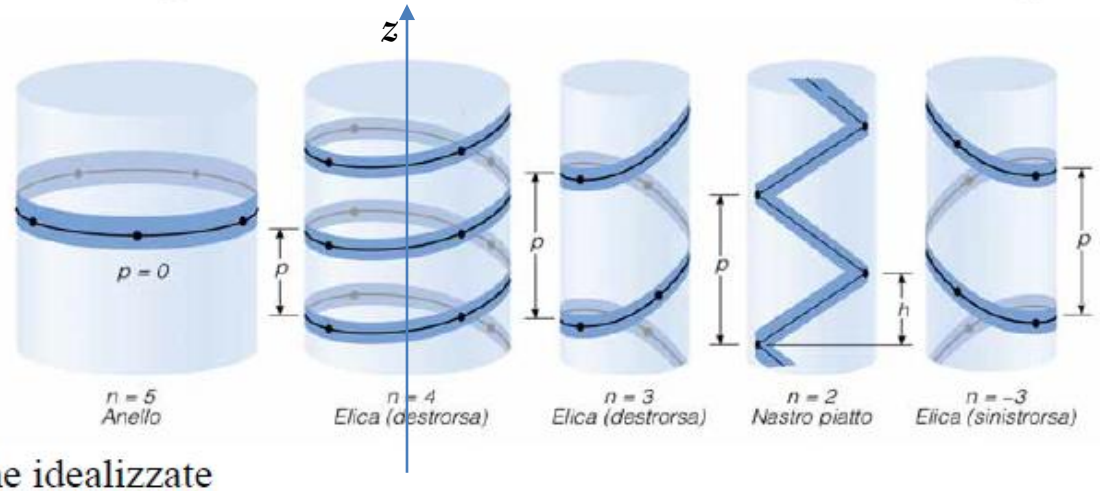
$$z_j = h_z j + z_0$$
$$x_j = r\ cos\ (j2\pi\, h_z/P + \delta_0)$$
$$y_j = r\ sin\ (j2\pi\, h_z/P + \delta_0)$$

j = 0,1,2, ..., N
N = numero di residui

r :raggio dell'elica;
h_z : distanza, sull'asse z, tra due residui adiacenti
P: distanza in z che l'elica deve percorrere per fare un giro intero
z_0 e δ_0 danno la posizione dello 0-esimo residuo $(x_0 = r\cos\delta_0;\ y_0 = r\sin\delta_0)$

STRUTTURA ELICOIDALE

Parametri geometrici delle Strutture Secondarie regolari



eliche idealizzate

Parametri per la descrizione di un'elica:

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

n: numero di residui per giro d'elica

p: passo dell'elica

h: passo per residuo

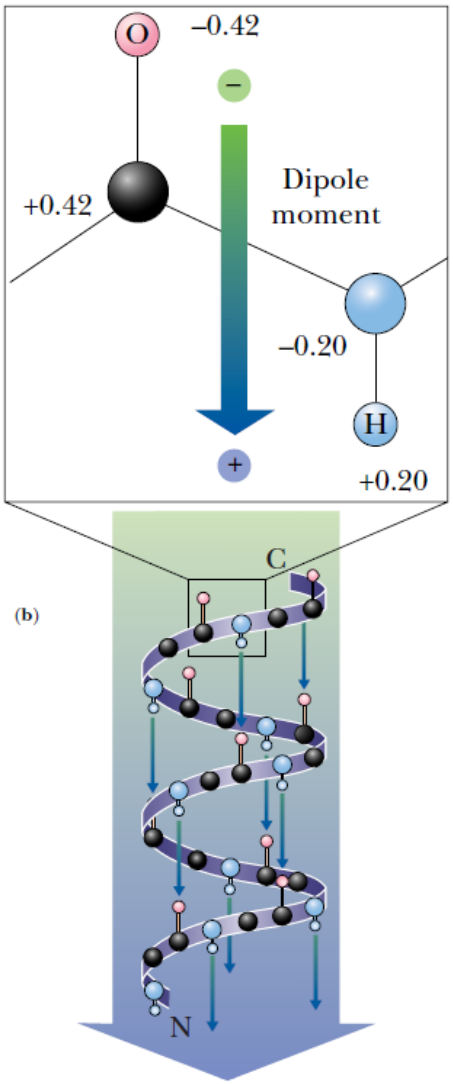
segno di *n*: verso dell'elica (positivo = destrorso, negativo = sinistrorso)

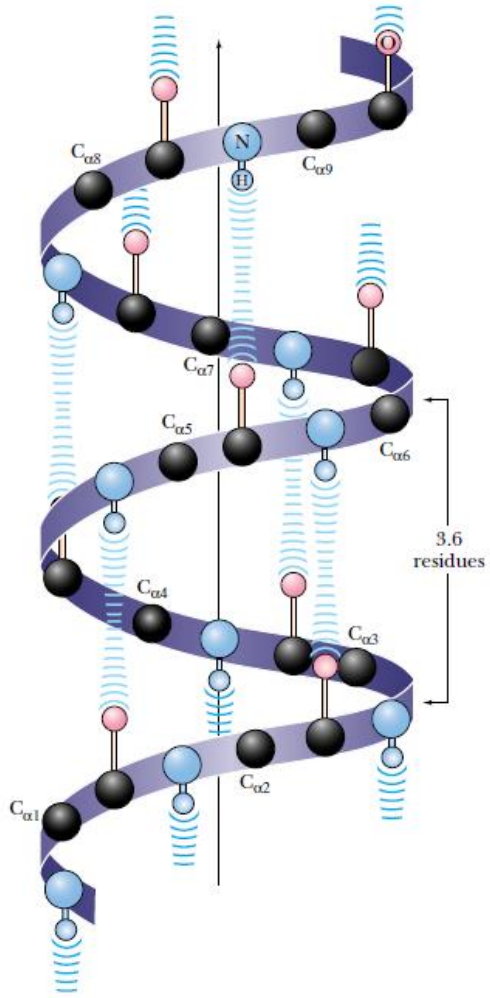
"regola della mano destra"

h_z

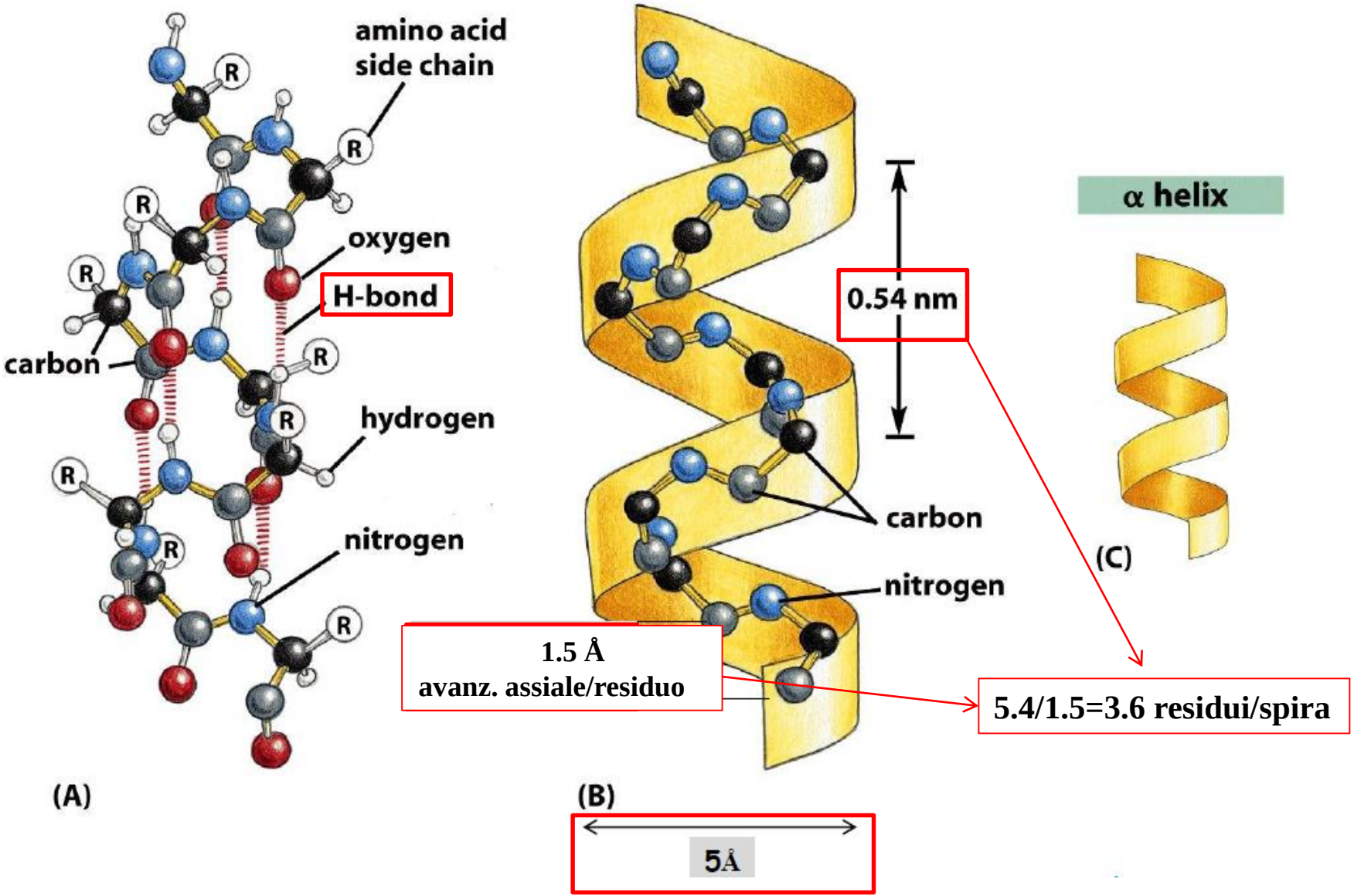
α-elica

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

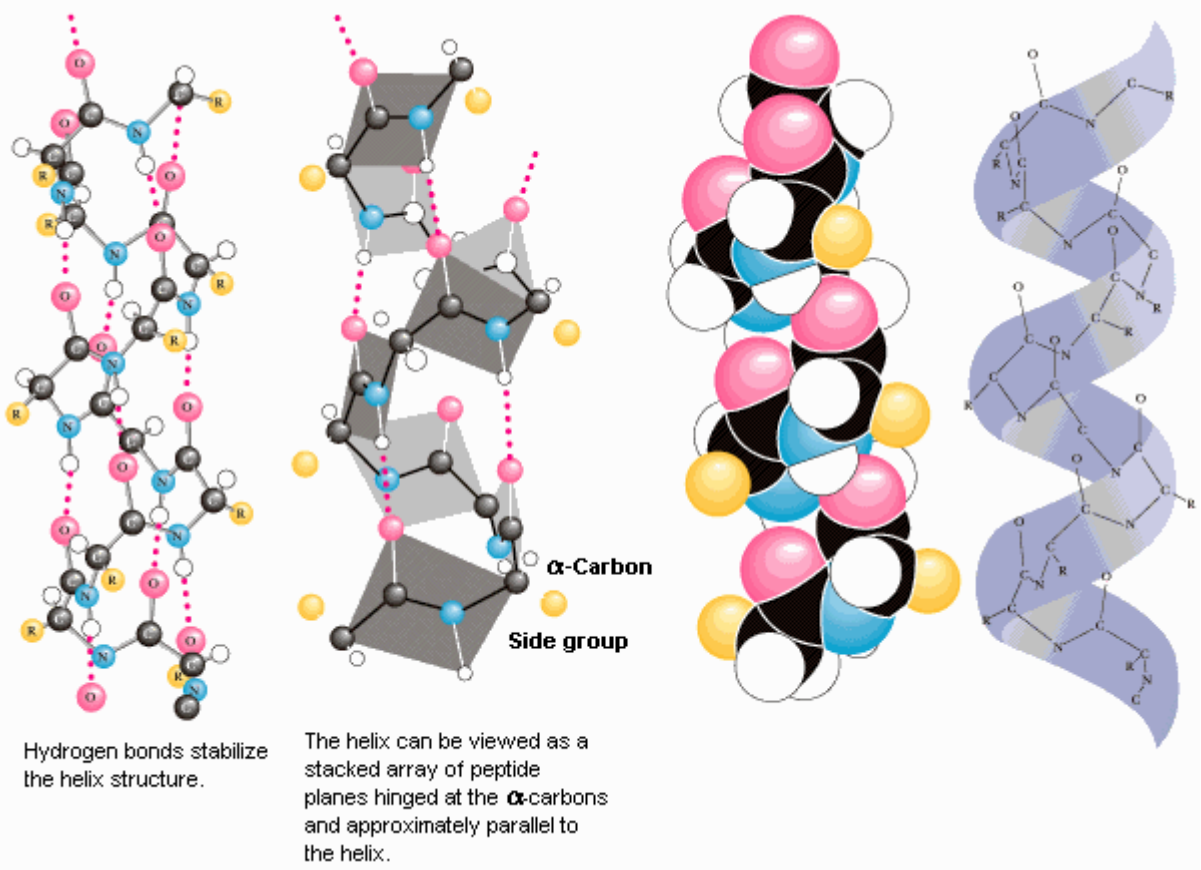


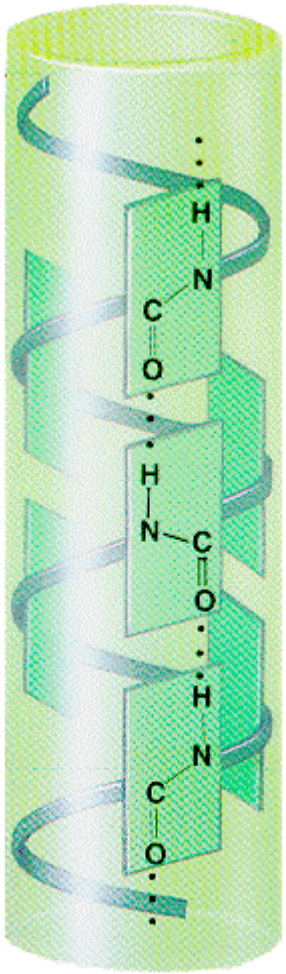


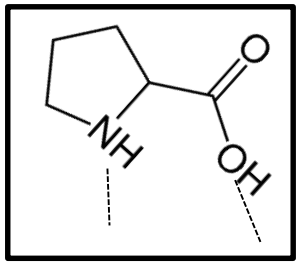
α-elica

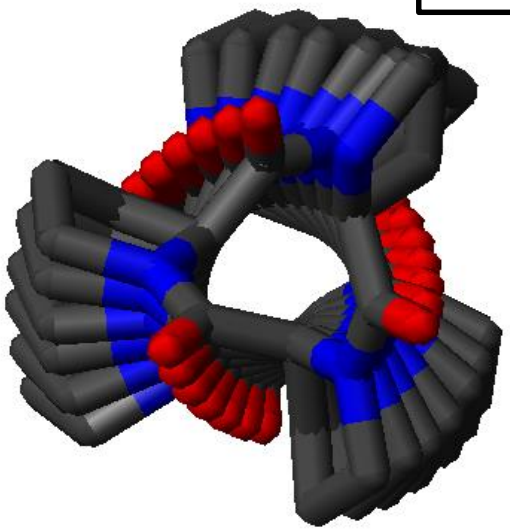

amino acid
side chain
oxygen
H-bond
carbon
hydrogen
nitrogen
R
(A)
0.54 nm
carbon
nitrogen
(B)
5Å
α helix
(C)
1.5 Å
avanz. assiale/residuo
5.4/1.5=3.6 residui/spira

Geometria dell'α-elica

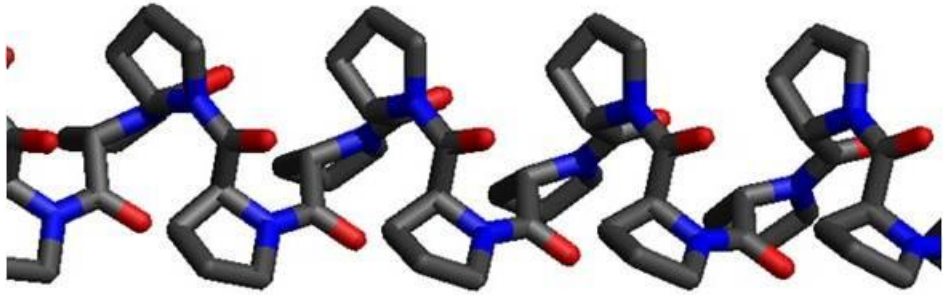


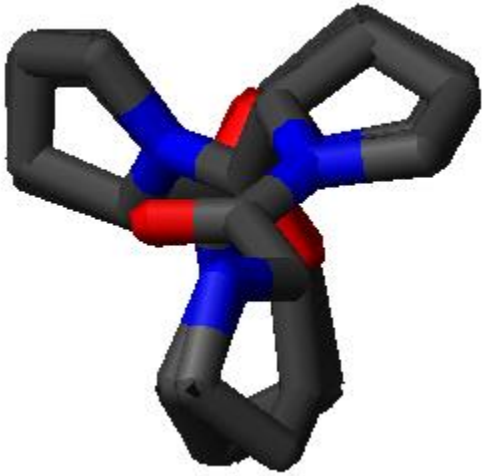




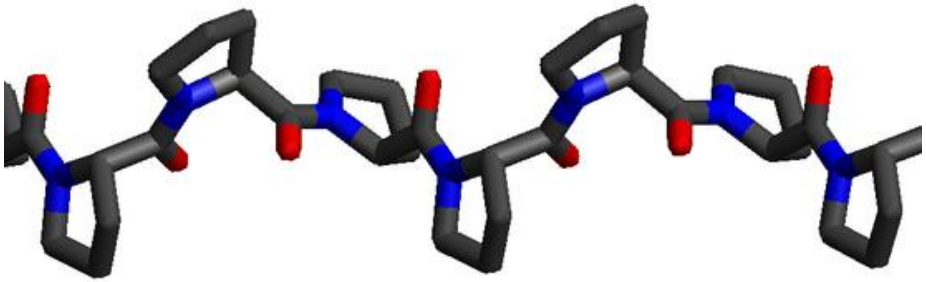


Poliprolina I: n=3.33, h=1.9



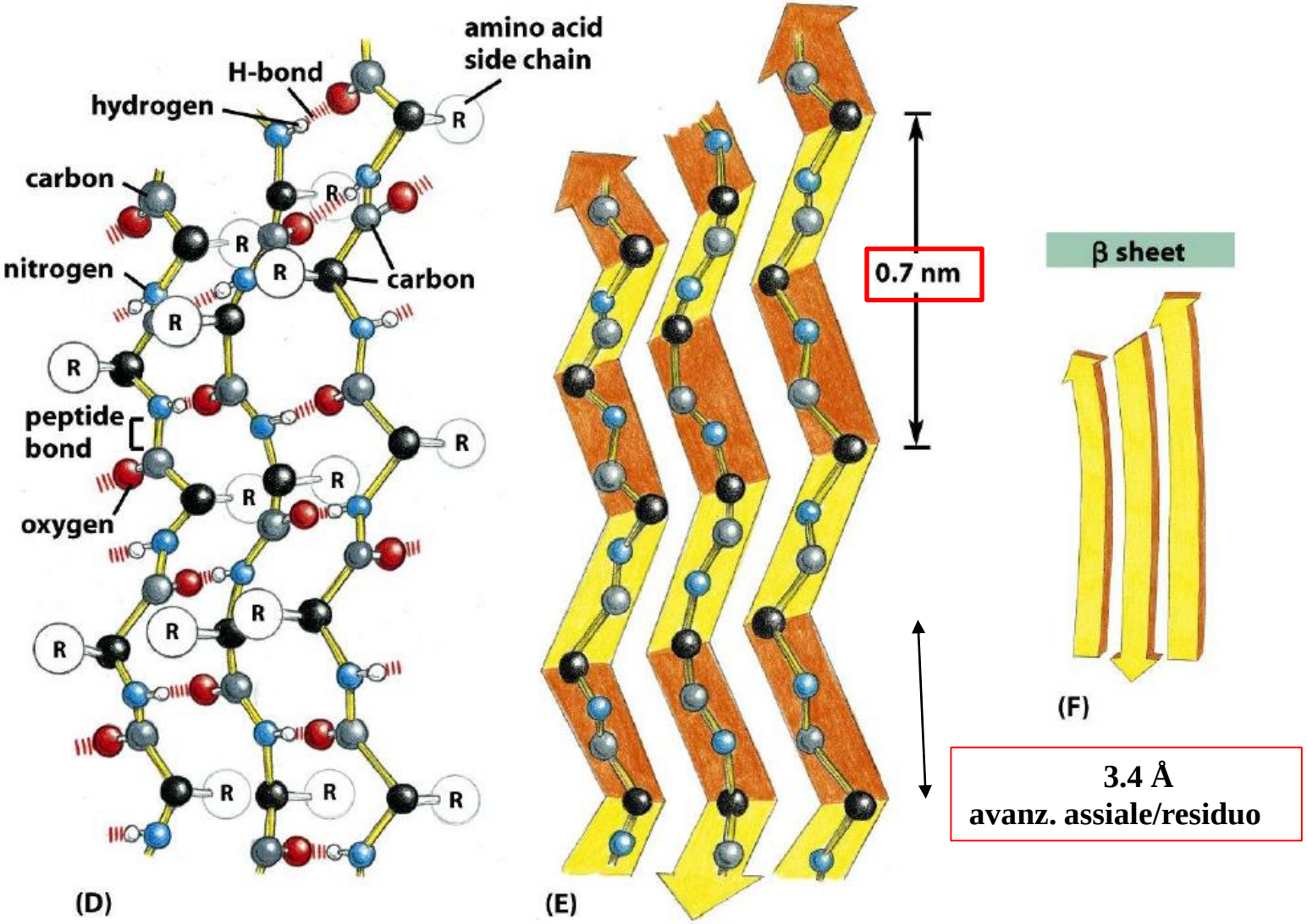


Poliprolina II: n=-3.0, h=3.12



foglietto β

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



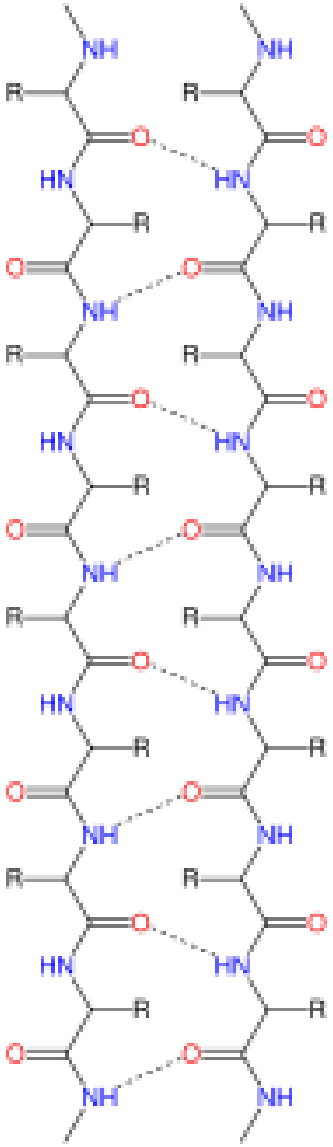
Tab. 2.4.1. Parametri ed angoli di torsione (approssimati) di eliche polipeptidiche.

Struttura	n[a,c]	φ(gradi)	ψ(gradi)	h(Å)[b]
α-Elica destrogira	3.60	— 57	— 47	1.50
α-Elica levogira	— 3.60	+ 57	+ 47	1.50
Struttura ß parallela	2.0	— 119	+ 113	3.25
Struttura ß antiparallela	2.0	— 139	+ 135	3,3 — 3.5
Poliglicina II	± 3.0	± 80	± 150	3.10
Poliprolina I	3.33	— 83	+ 158	1.9
Poliprolina II	— 3.0	— 80	+ 150	3.12

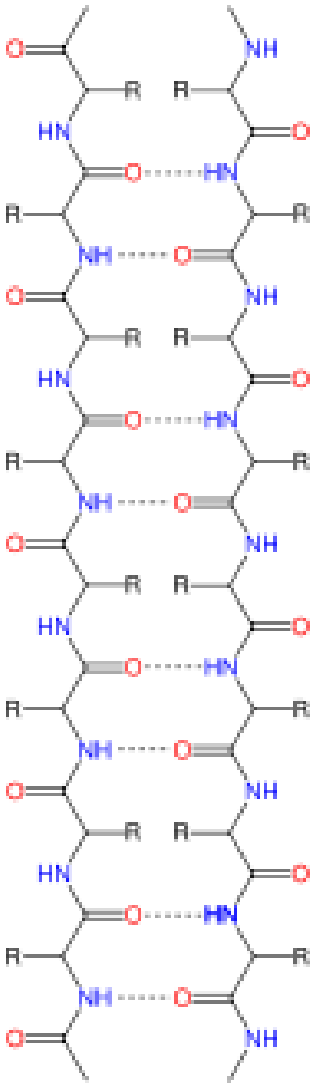
[a] $\underline{n}$ È il numero di residui per giro di elica.
[b] $\underline{h}$ È la proiezione della distanza testa-coda di un residuo sull'asse dell'elica.
[c] valori di n negativo sono riferiti ad eliche sinistrogire, valori positivi ad eliche destrogire.

β-sheet paralleli

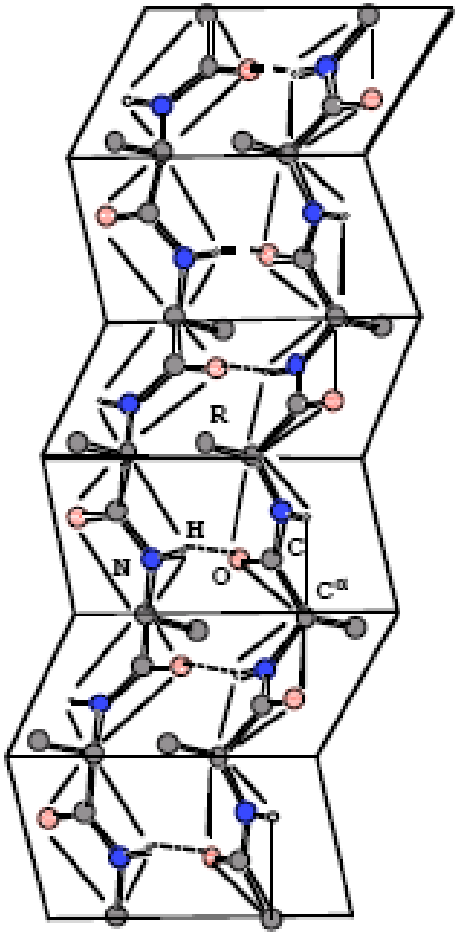
β-sheet antiparalleli



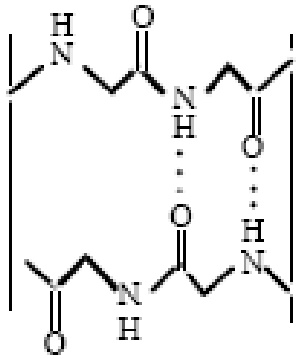
Filari di eliche β
(eliche binarie)
2 residui per spira
avanz.assiale=3.4Å



Strutture β-sheet antiparallele sono più stabili



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



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

Omopolipeptide	Catena laterale, R	Conformazione
Poliglicina	-H	Poliglicina I (PGI), struttura ß
	-H	Poliglicina II (PGII)
Poli-L-Alanina	$-CH_3$	α-Elica destrogira
Poli-L-Valina	$-CH(CH_3)_2$	Struttura ß
Poli-L-Serina	$-CH_2OH$	Struttura ß
Poli-O-Acetil-L-Serina	$-CH_2O-COCH_3$	Struttura ß
Poli-O-Benzil-L-Serina	$-CH_2O-COCH_2-Ph$	Struttura ß
Poli-L-Acido aspartico	$-CH_2COOH$	αElica destrogira
Poli-ß-Benzil-L--Aspartato	$-CH_2COOCH_2-Ph$	α-Elica sinistrogira, struttura ß
Poli-L-Acido glutammico	$-CH_2CH_2COOH$	α-Elica destrogira
Poli-γ-Metil-L--Glutammato	$-CH_2CH_2COOCH_3$	α-Elica destrogira, Struttura ß
Poli-γEtil-L-Glutammato	$-CH_2CH_2COOC_2H_5$	α-Elica destrogira
Poli-γ-Benzil-L-Glutammato	$-CH_2CH_2COO-CH_2-Ph$	α-Elica destrogira
Poli-L-Lisina	$-(CH_2)_4NH_2$	α-Elica destrogira
Poli-ε-Carbobenzossi L-Lisina	$-(CH_2)_4NHOCOCH_2-Ph$	α-Elica destrogira
Poli-L-Fenilalanina	$-CH_2-Ph$	α-Elica destrogira
Poli-L-Triptofano	$-CH_2-$Trp*	α-Elica destrogira
Poli-S-Benzil-L-Cisteina	$-CH_2-S-CH_2-Ph$	Struttura ß
Poli-L-Metionina	$-(CH_2)_2SCH_3$	α-Elica destrogira
Poli-L-Prolina	$-(CH_2)_3$	Poliprolina I (PPI) Poliprolina II (PPII)

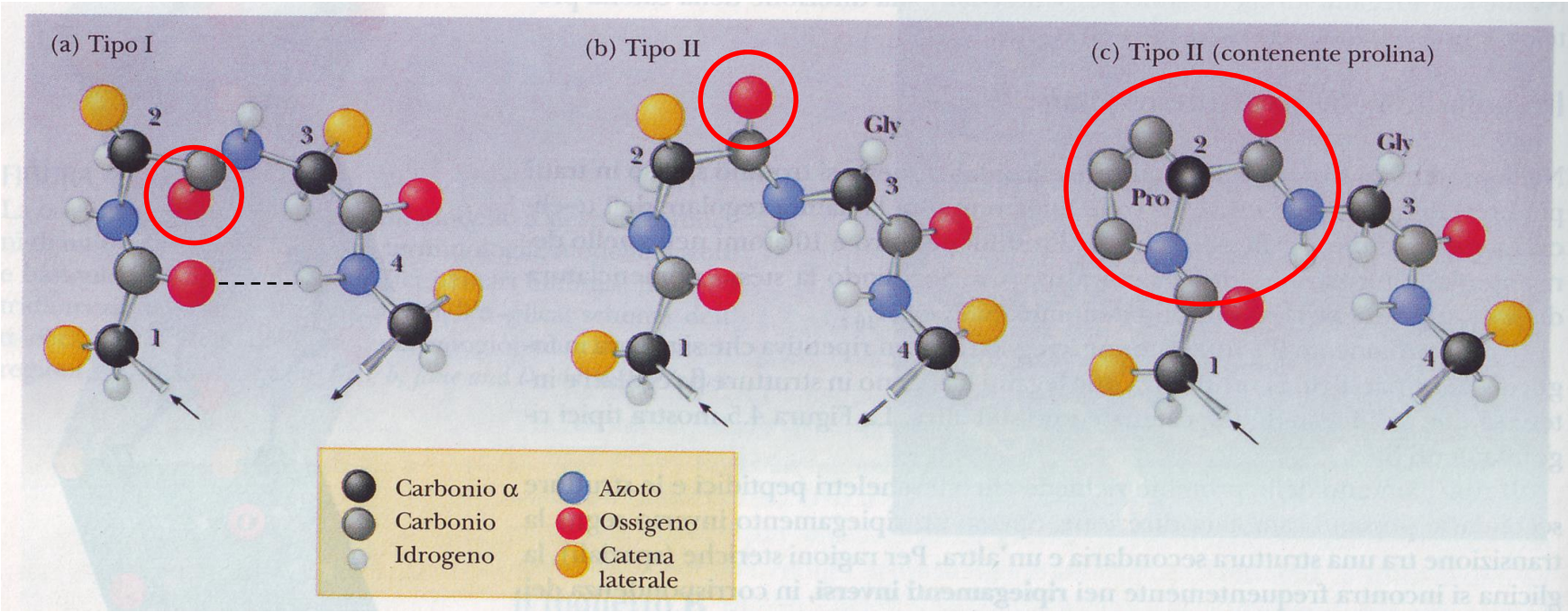
*Trp = triptofano

β -turn

...le catene polipeptidiche possono cambiare direzione!

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

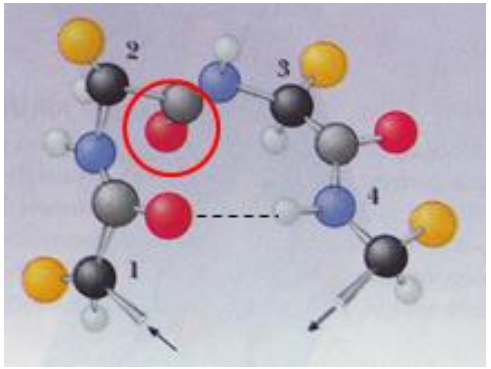
Spesso nei ripiegamenti dominano la glicina e la prolina.



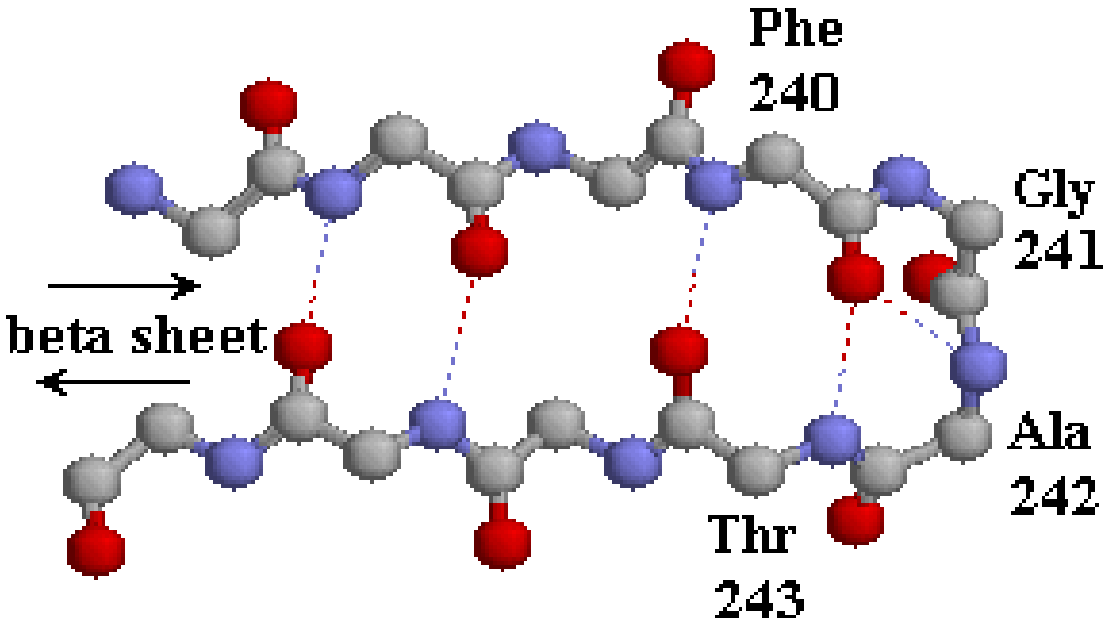
- I **β -turn** sono abbondanti nelle proteine globulari.
- Sono strutture secondarie composte da quattro residui che compiono un curva di 180°, con un legame idrogeno fra l'ossigeno del primo residuo e l'azoto del quarto, mentre i due residui centrali non partecipano.
- Particolarmente frequenti in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

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

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



Esempio di inserimento del ripiegamento β in un foglietto β



2. Driving force

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

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{2.1}$$

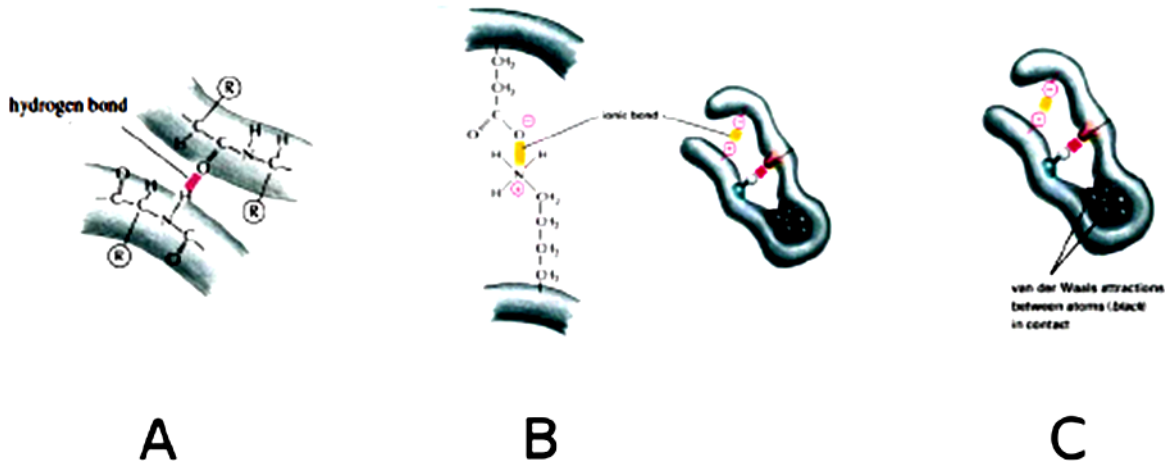


Figura 2.19: A: legame idrogeno interno, B: legame ionico, C: contributo di vdW.

Folding Proteico e Struttura Primaria

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

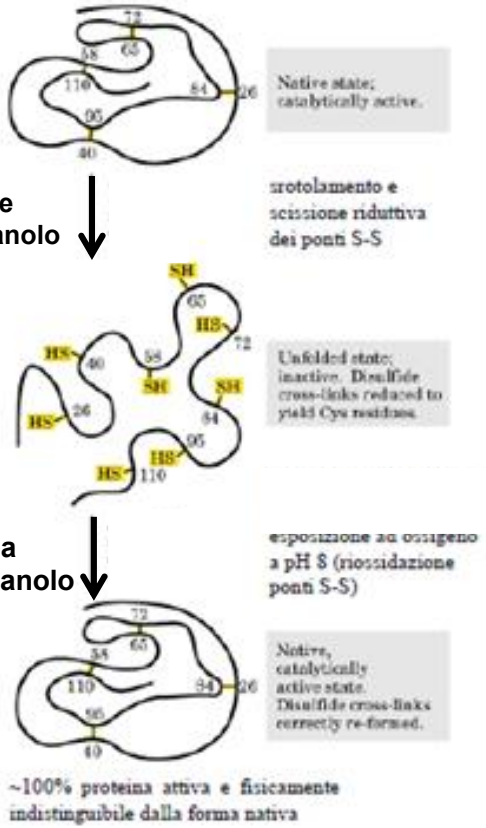
⇒ processo reversibile

(la proteina può tornare spontaneamente alla conformazione nativa

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

Come si realizza la struttura tridimensionale delle proteine ?

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



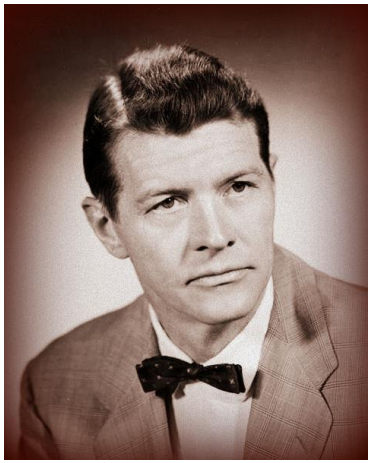
Con Urea 8 M e β-mercaptoetanolo

Rimozione dell'urea e del β-mercaptoetanolo

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

RNasi:

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

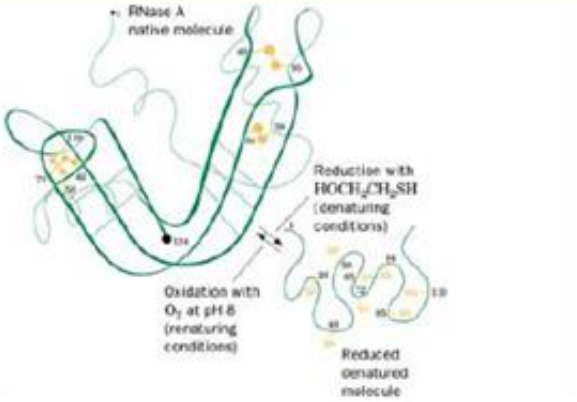


Christian Anfinsen
1916-1995
Premio Nobel 1972

Esperimento di Anfinsen (1957) sulla RNasi

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

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



L'esperimento di Anfinsen, con la *Ribonucleasi A*: dimostra la relazione tra sequenza e conformazione (*biologicamente attiva, nativa*) di una proteina

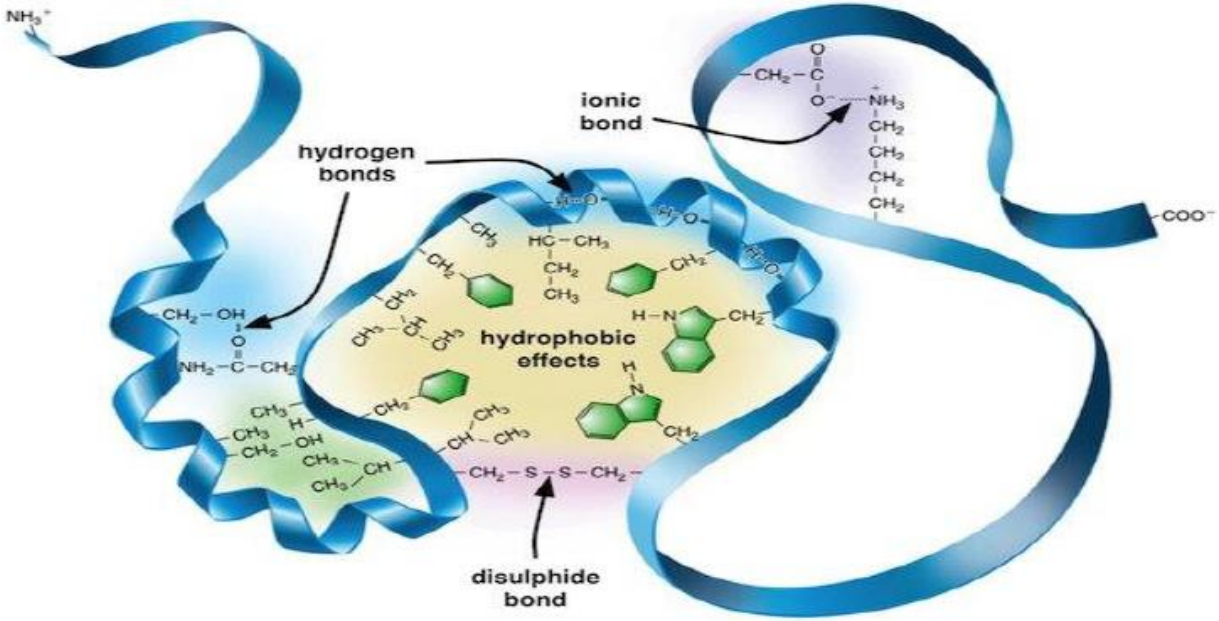
Folding ed attività biologica delle proteine

"La forma è l'immagine plastica della funzione."

(Angelo Ruffini)

Le **proteine** sono molecole flessibili con struttura a rapida fluttuazione e le loro mobilità strutturali sono collegate alla loro funzione.

Protein Folding: auto-assemblamento e ripiegamento intramolecolare attraverso cui il polipeptide, mediante interazioni non covalenti, assume la propria conformazione nativa che gli permette di svolgere la sua peculiare funzione fisiologica.



Paradosso di Levinthal

Come fa una proteina a ripiegarsi nella sua conformazione nativa?

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

DIMOSTRAZIONE:

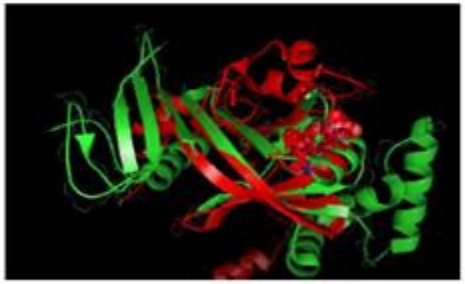
Se una proteina ha n residui e per ogni legame peptidico ci sono 2 angoli torsionali ϕ e ψ (phi relativo al legame Cα-N e psi relativo al legame Cα-C) e ciascun angolo di torsione ha 3 conformazioni stabili, le conformazioni possibili per la proteina sono $3^{2n} \sim 10^{n}$ (valore sottostimato perché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

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

→ $\mathbf{t = 10^{n} * 10^{-13}}$

Es: proteina di 100 residui (molto piccola), t = 10^87 >> età dell'Universo!!!

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

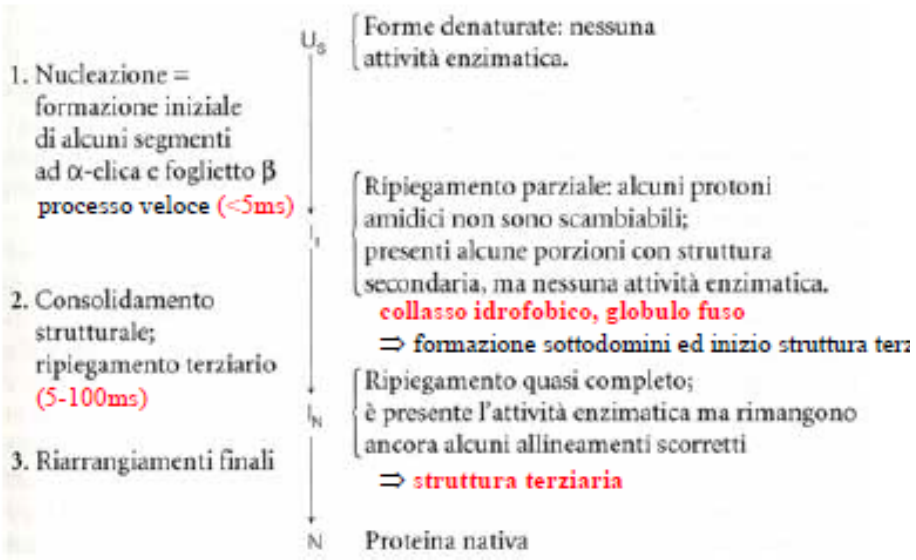


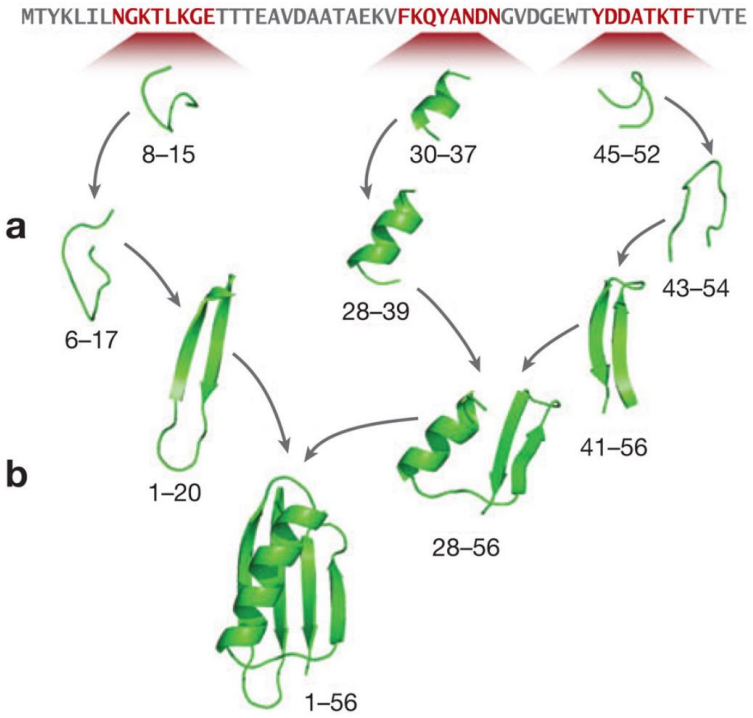
Paradosso di Levinthal

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

⇒ processo gerarchico

(struttura terziaria)



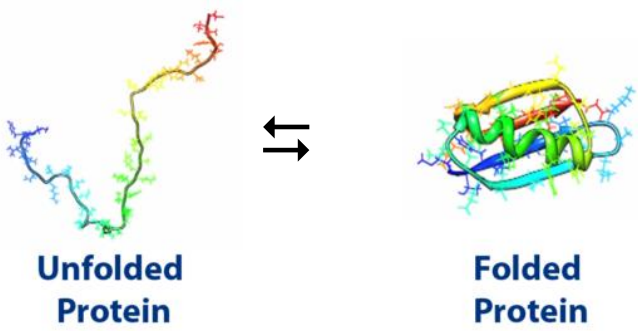


Addotta ripiegamenti OTTIMALI che consentono di raggiungere la maggiore stabilità (e quindi uno stato di minima energia)

Considerazioni energetiche

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

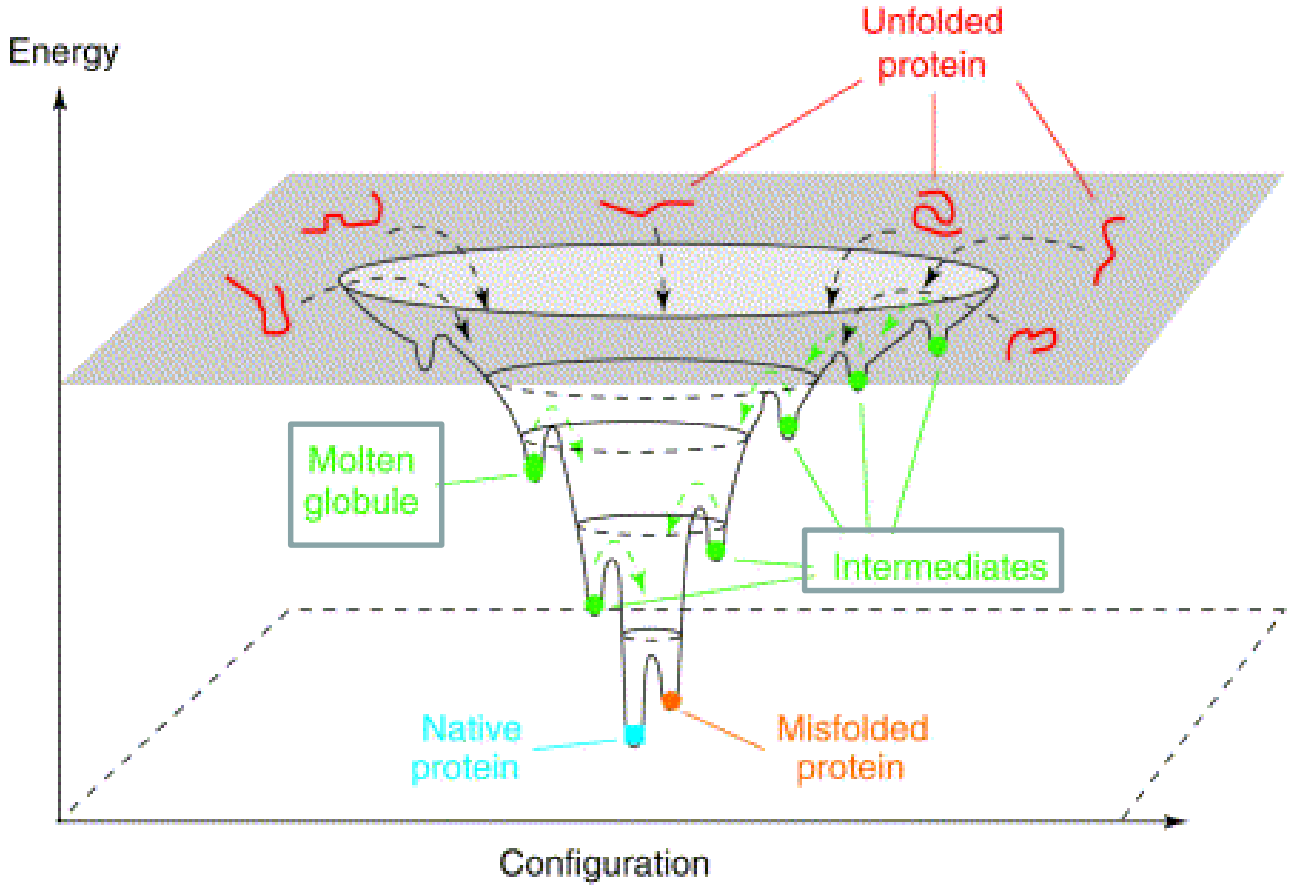
$U \leftrightarrows F$



Energia o cinetica?

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

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



La componente idrofobica

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

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

- tendenza alla separazione fra una fase polare ed una apolare. In una soluzione biopolimerica, questa separazione conduce alla formazione di una struttura compatta in cui le catene apolari sono nascoste all'acqua.

- Questa *driving force* e' caratteristica dell'acqua, in quanto le interazioni dipolo-dipolo sono molto piu forti delle interazioni dipolo-dipolo indotto che l'acqua farebbe con una struttura apolare.

- La perdita energetica dovuta al fatto che, dove c'è la catena apolare, l'acqua non può formare legami idrogeno, viene compensata dalla formazione di legami idrogeno acqua-acqua molto corti e lineari. Questi legami idrogeno comportano però un riarrangiamento locale dell'acqua intorno alla proteina in un ordine simile a quello del ghiaccio, una situazione sfavorevole dal punto di vista entropico.

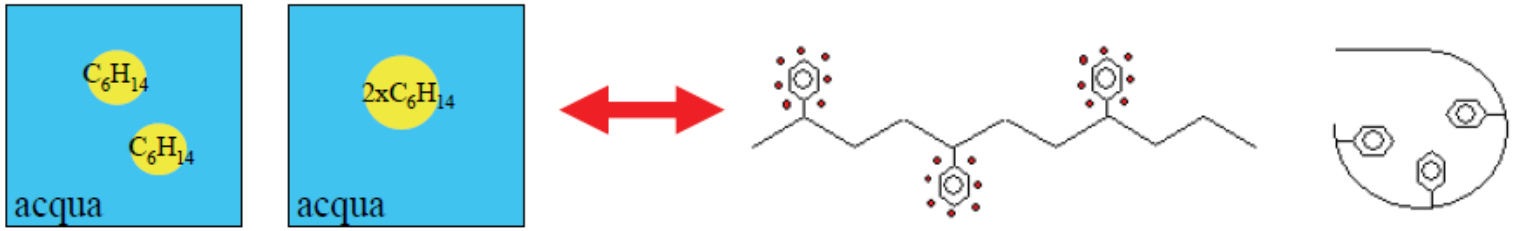
- Il ripiegamento delle catene apolari consente un rilassamento della struttura con perdita di entropia ma una totale **diminuzione** dell'energia libera del sistema.

Effetto idrofobico e Folding Proteico

$$\Delta G_{FOLDING} = G_F - G_U = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta S_{FOLDING} = S_F - S_U = \Delta S_{CATENA} + \Delta S_{SOLVENTE}$$

sempre < 0



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

Effetto idrofobico e Folding Proteico

$$\Delta G_{FOLDING} = G_F - G_U = \Delta H - T\Delta S$$

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

ΔS = variazione di entropia (disordine del sistema) fra stato finale ed iniziale. Poiché $S_U >> S_F \rightarrow \Delta S << 0$

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

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

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

Effetto idrofobico e Folding Proteico

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

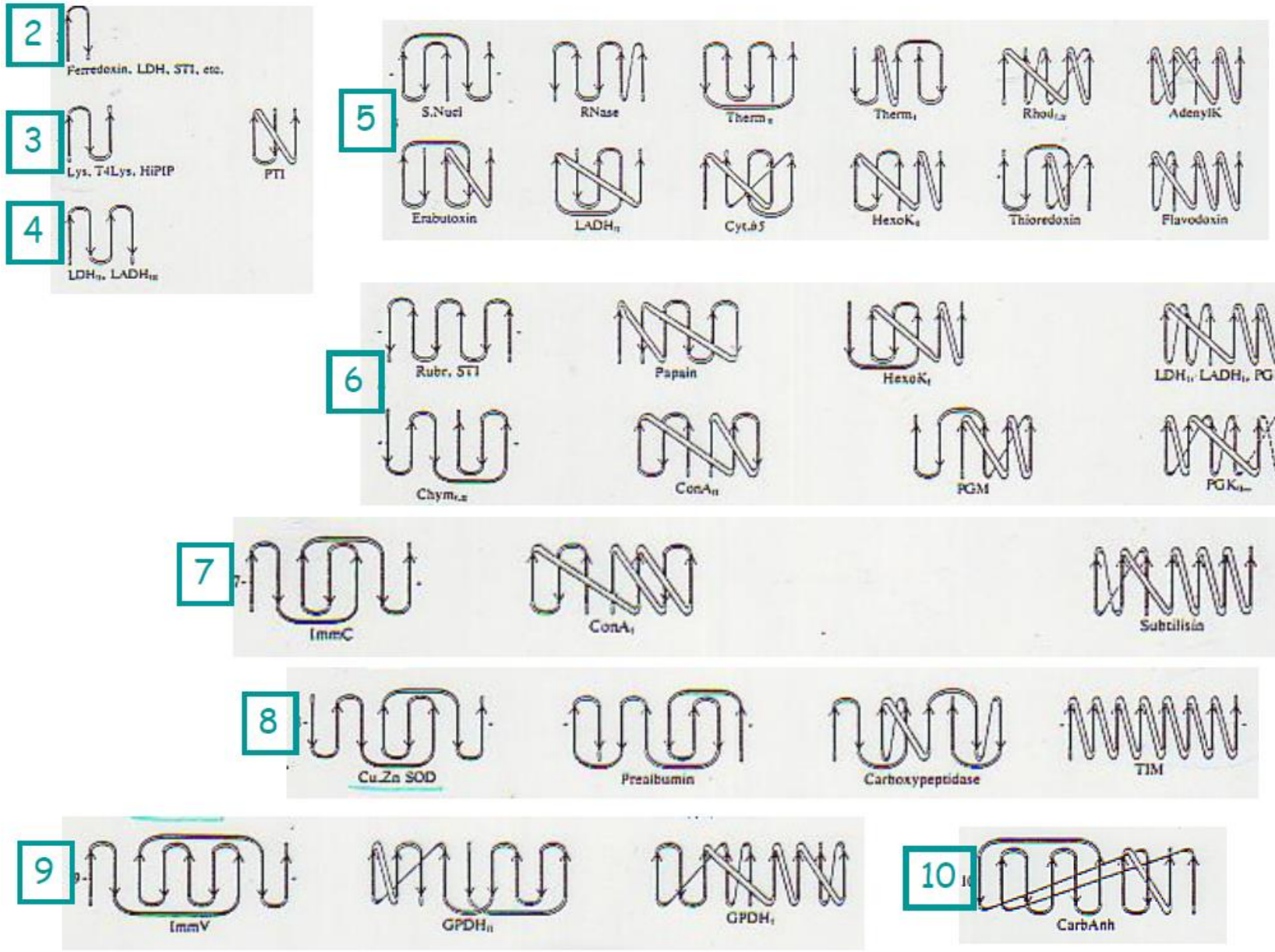
Proteina	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS [J/(mol · K)]
Ribonucleasi	−46	−280	−790
Chimotripsina	−55	−270	−720
Lisozima	−62	−220	−530
Citocromo *c*	−44	−52	−27
Mioglobina	−50	0	+170

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

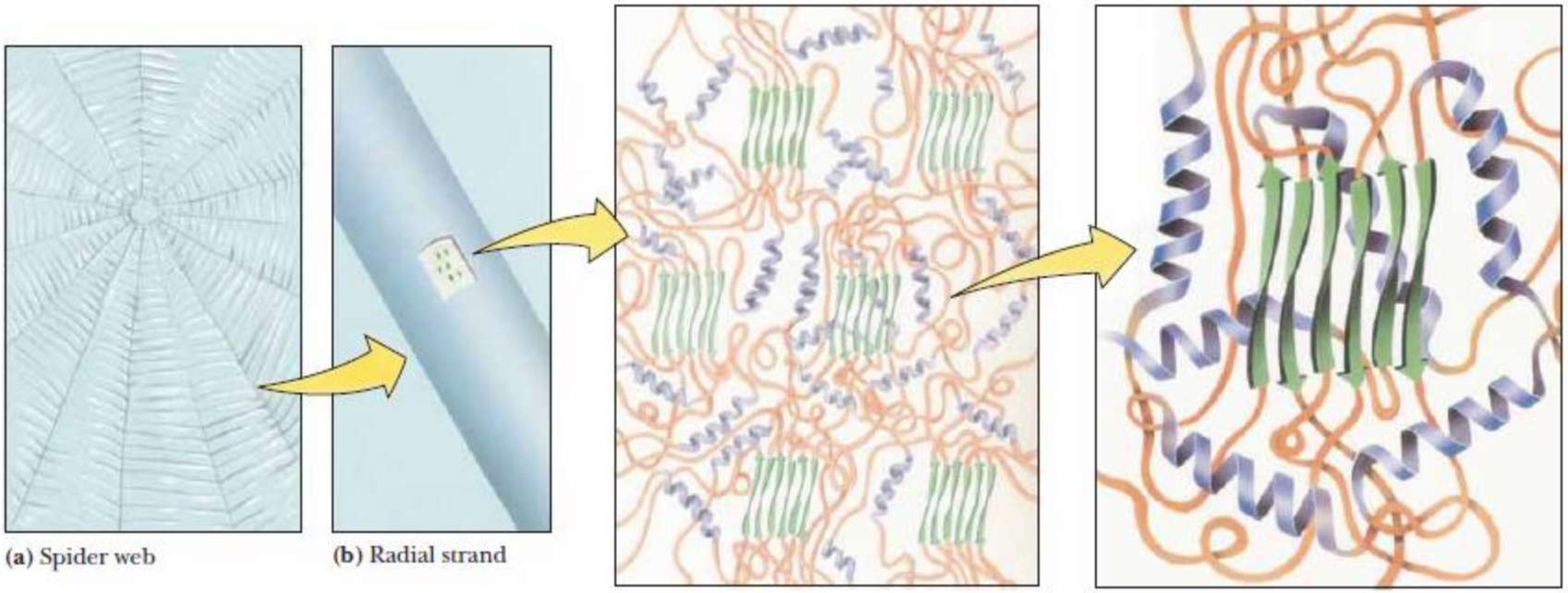
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

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

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


2
Ferredoxin, LDH, STI, etc.
3
Lys, T4Lys, HiPIP
PTI
4
LDH$_{II}$, LADH$_{III}$
5
S.Nucl
RNase
Therm$_{II}$
Therm$_{I}$
Rhod$_{I,II}$
AdenylK
Erabutoxin
LADH$_{II}$
Cyt.b5
HexoK$_{II}$
Thioredoxin
Flavodoxin
6
Rubr. ST1
Papain
HexoK$_{I}$
LDH$_{II}$, LADH$_{I}$, PGK$_{I}$
Chym$_{I,II}$
ConA$_{II}$
PGM
PGK$_{I-}$
7
ImmC
ConA$_{I}$
Subtilisin
8
Cu,Zn SOD
Prealbumin
Carboxypeptidase
TIM
9
ImmV
GPDH$_{II}$
GPDH$_{I}$
10
CarbAnh

Helix–Sheet Composites in Spider Dragline Silk



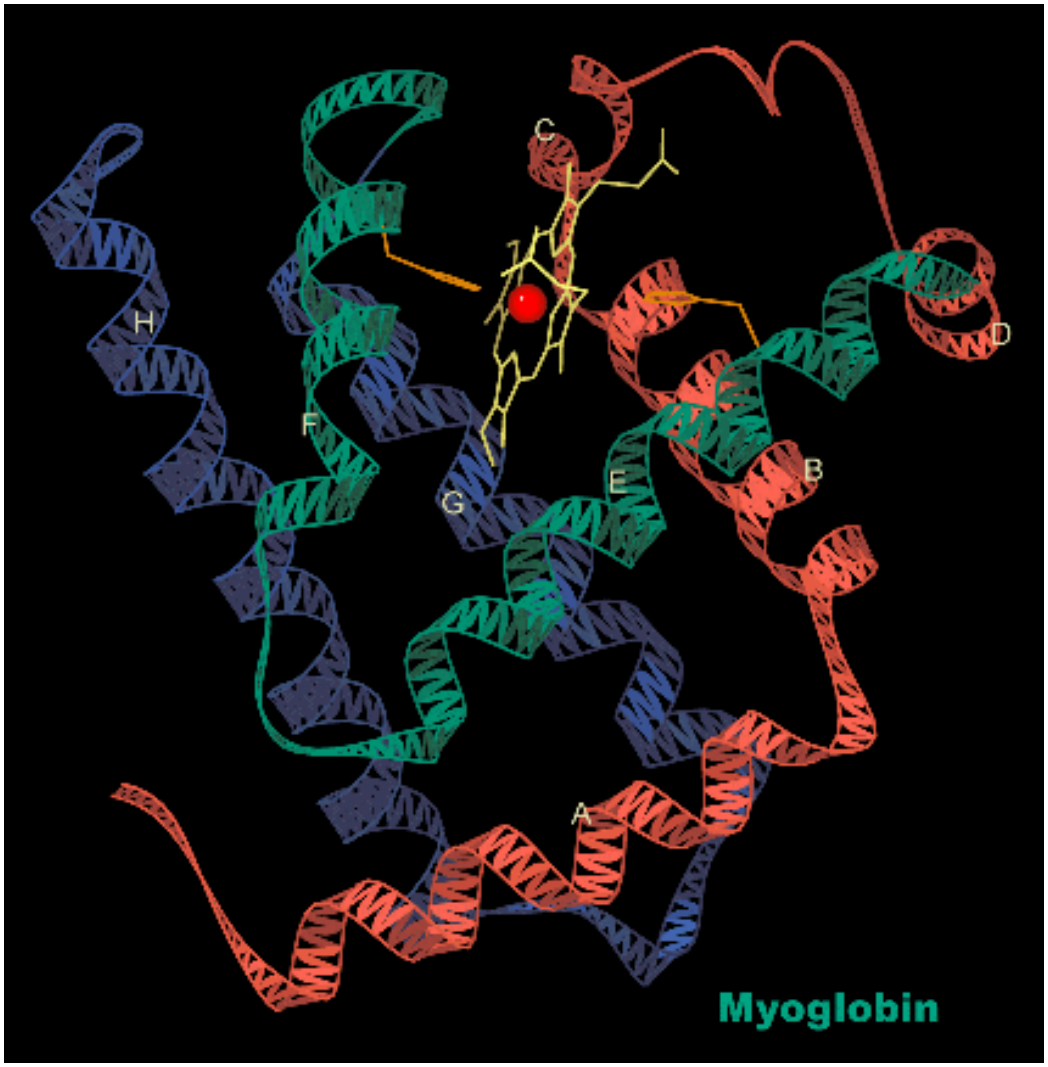
(a) Spider web

(b) Radial strand

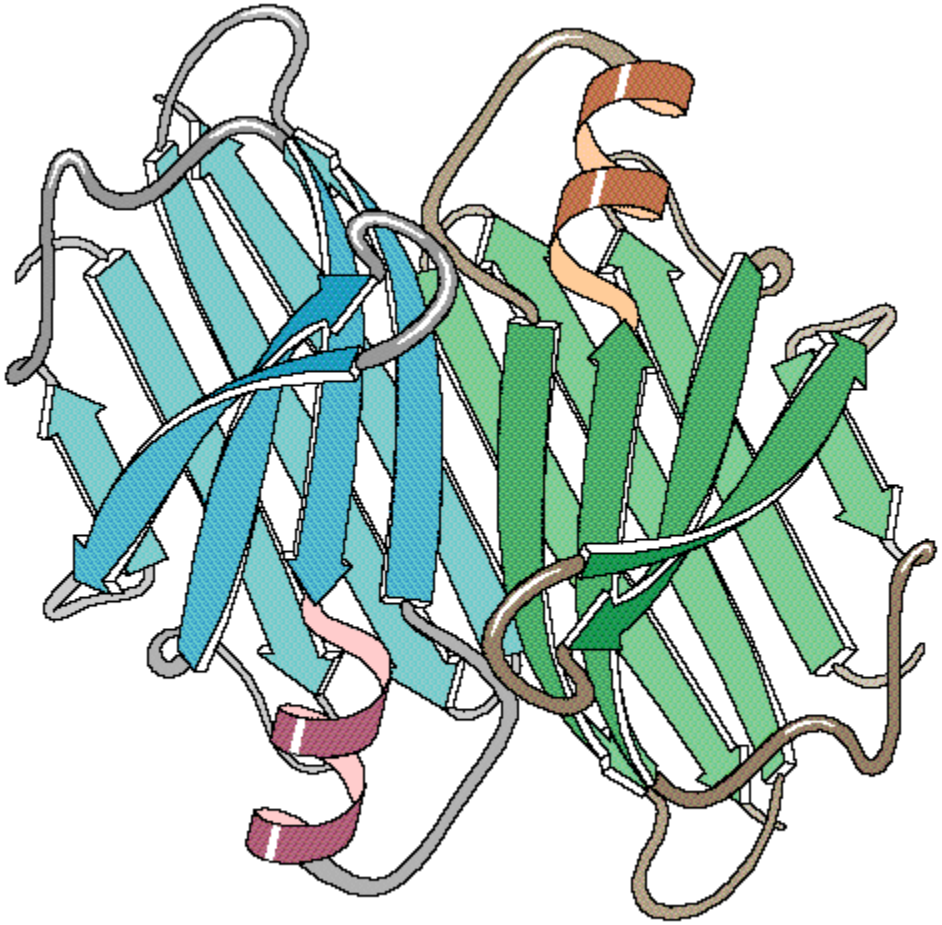
(c) Ordered β-sheets surrounded by disordered α-helices and β-bends.

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

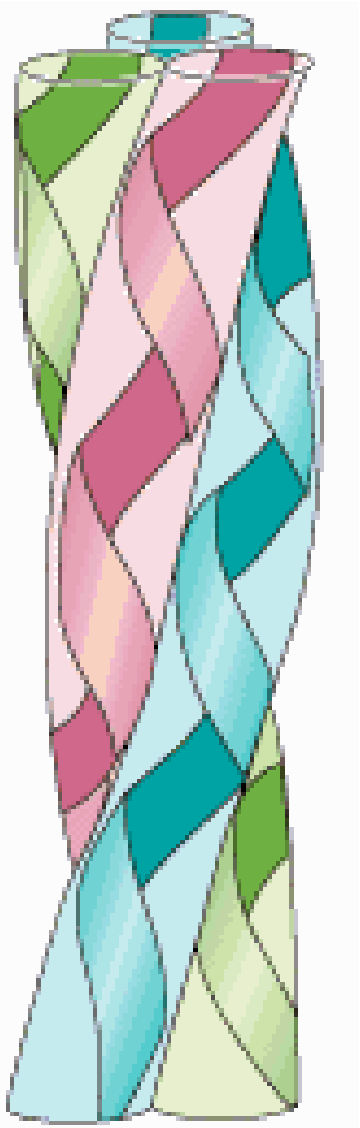
Esempio di struttura (terziaria) di una proteina con alta percentuale di struttura α e β-turns



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



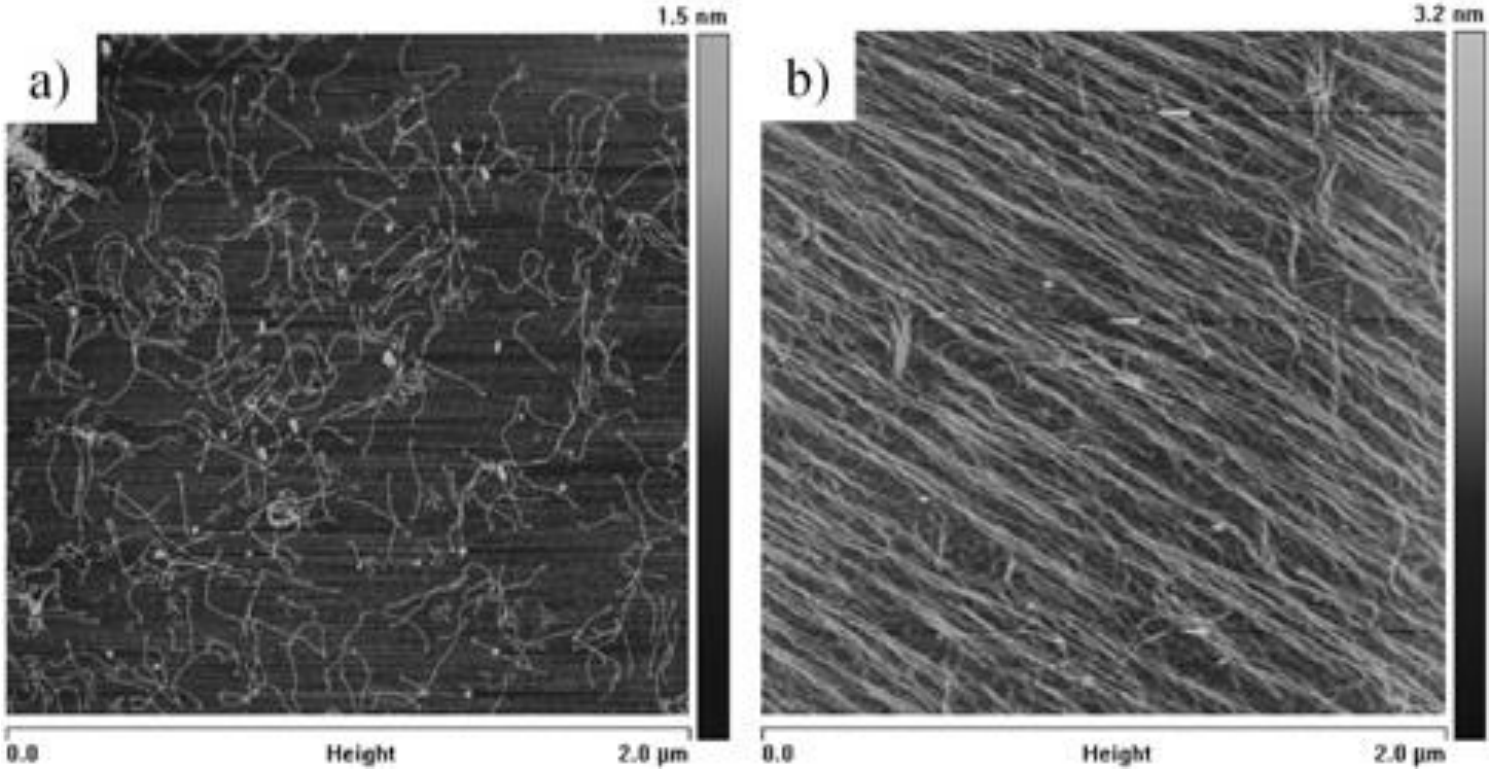
Prealbumin Dimer



Collagen, a

La superstruttura secondaria del collagene è una tripla elica.

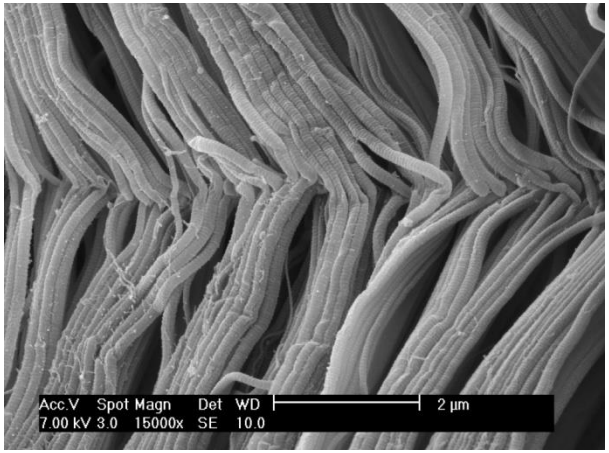
Il collagene fa parte di diversi materiali biologici quali cartilagini, tendine, pelle.



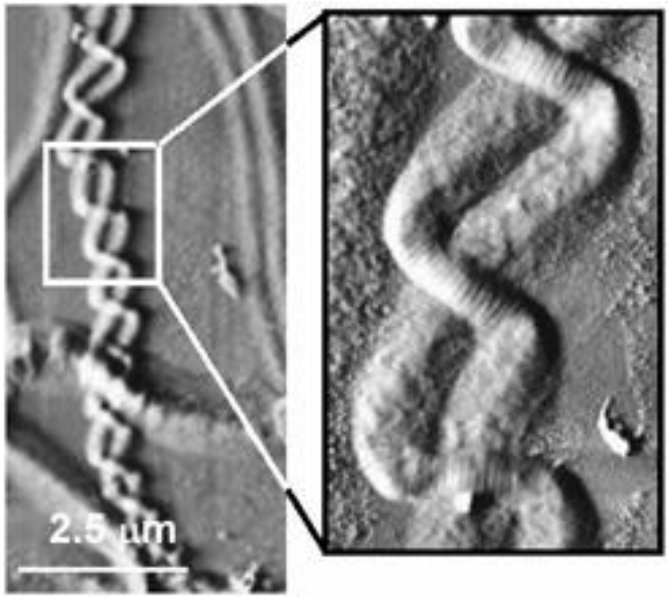
Immagini topografiche AFM del collagene di tipo I su un substrato di mica (tapping mode, in aria):

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

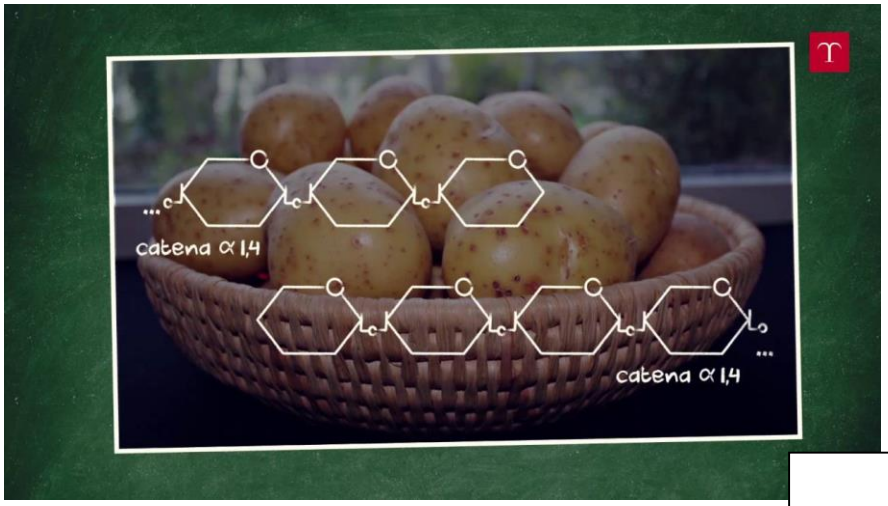
b) Microimmagine da soluzione ad alta concentrazione (10 mg/ml)



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



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

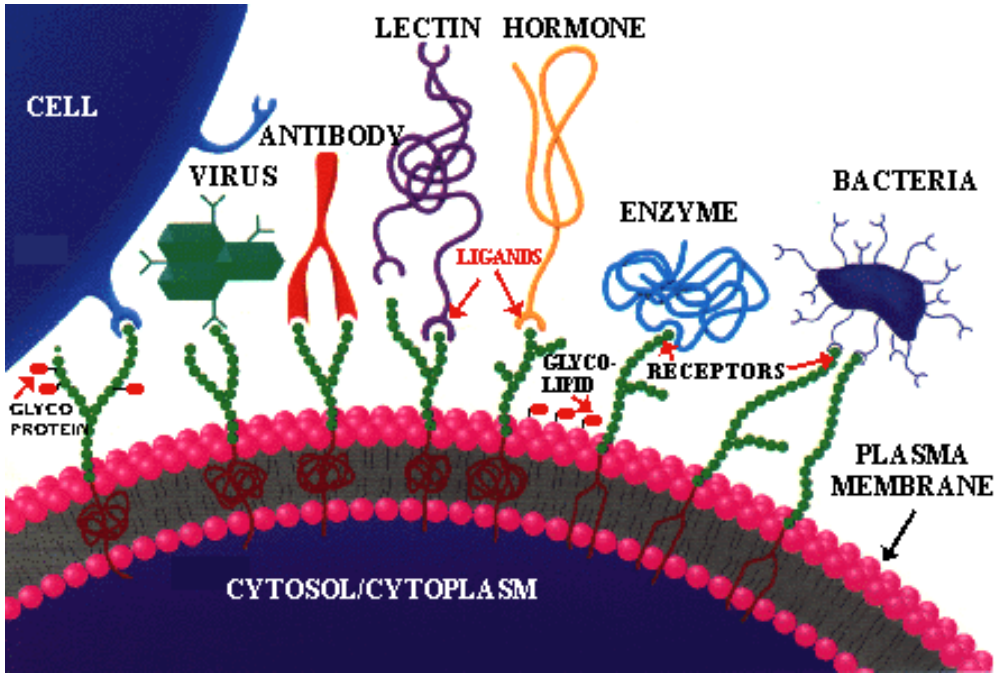


STRUTTURA SECONDARIA DI POLISACCARIDI

POLISACCARIDI:
CARATTERISTICHE STRUTTURALI E CHIMICO-FISICHE

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

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



Alcune di queste proprietà si riscontrano nelle funzioni biologiche

- Associazione con ormoni, lipidi, proteine.

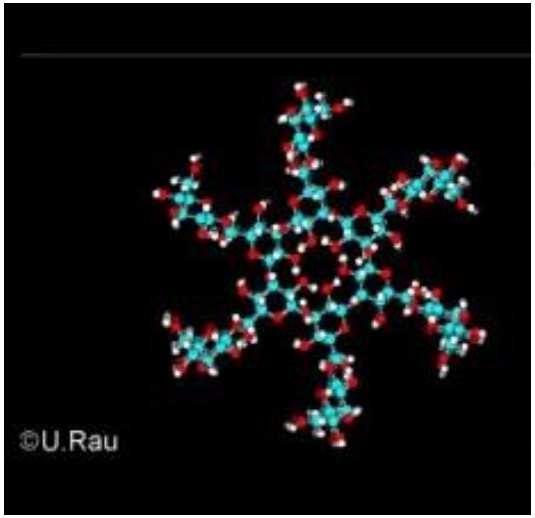
- Funzionare da materiale strutturale o da riserva di energia, formare capsule protettive.

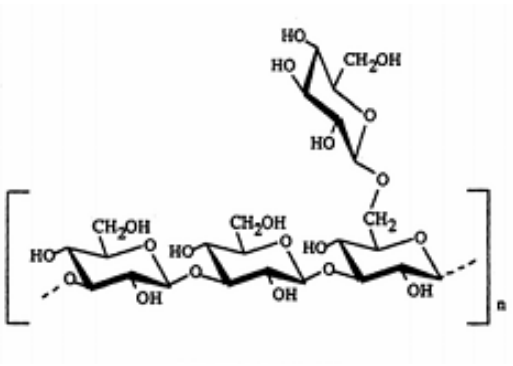
- Mediare processi di adesione, riconoscimento cellulare e crescita.

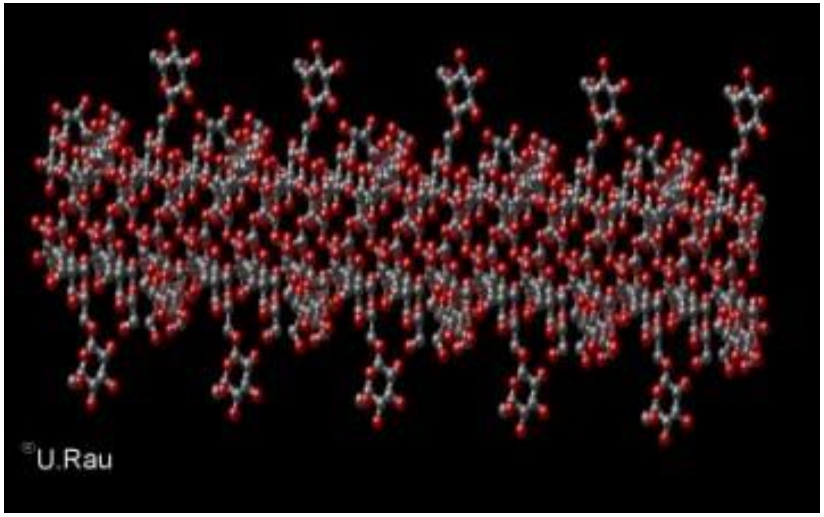
Caratteristiche generali della geometria di una catena polisaccaridica

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

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







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

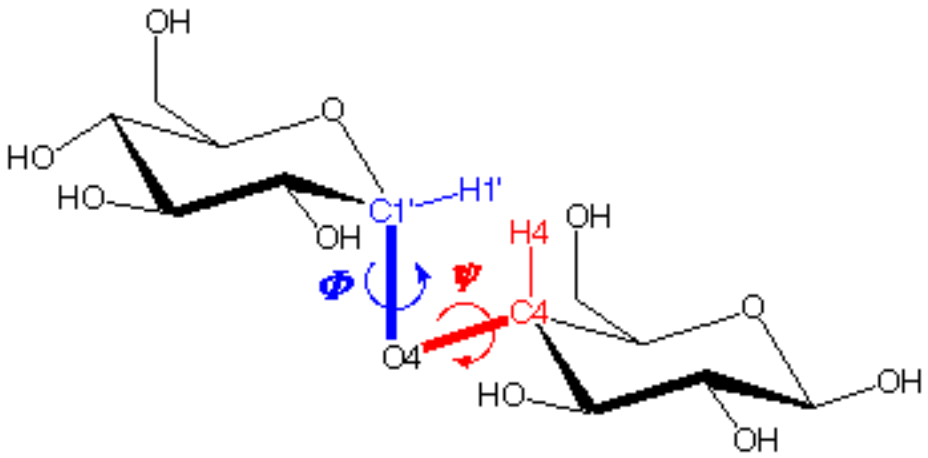
Disaccaridi e polisaccaridi

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

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

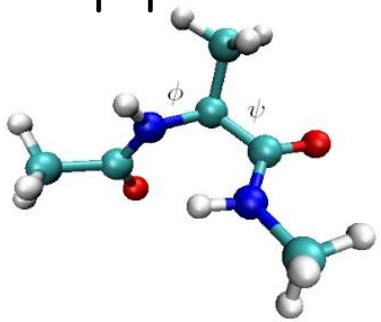
per un legame glicosidico (1→ x).

Il valore zero è dato per la conformazione ***cis***.

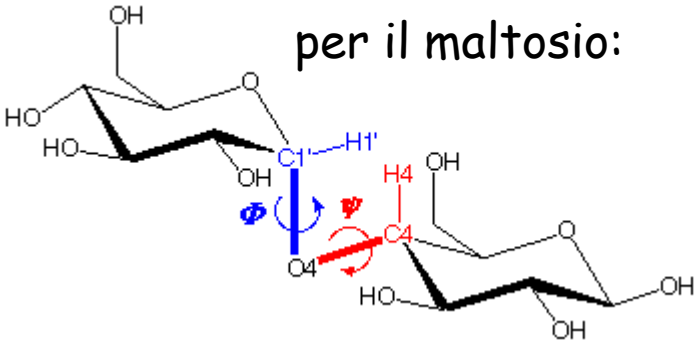


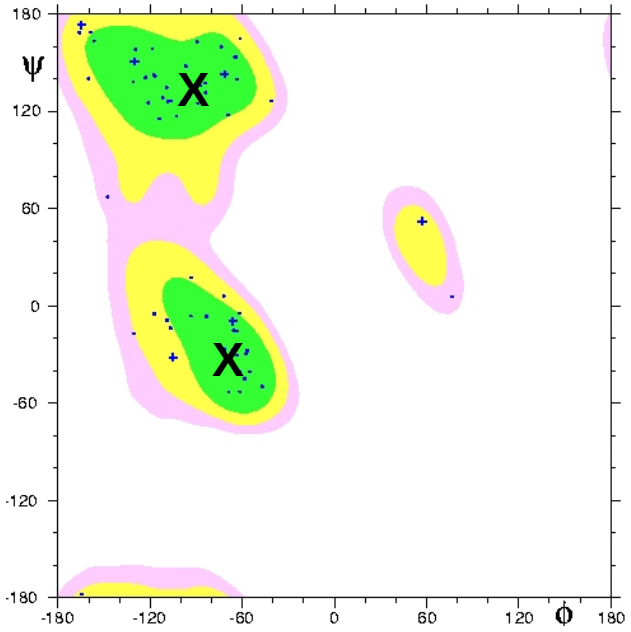
La libertà conformazionale è data dalle regione a bassa energia dei **grafici di Ramachandran**. I grafici relativi a disaccaridi sono molto diversi da quelli relativi a dipeptidi

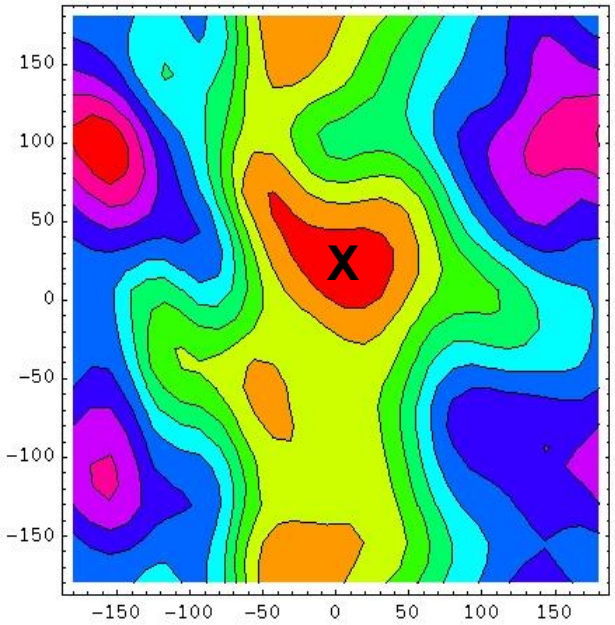
per un dipeptide:



per il maltosio:







tonga.usip.edu/gmoyna/biochem341/ramachandran.jpg

tonga.usip.edu/gmoyna/biochem341/rama_glyco.jpeg

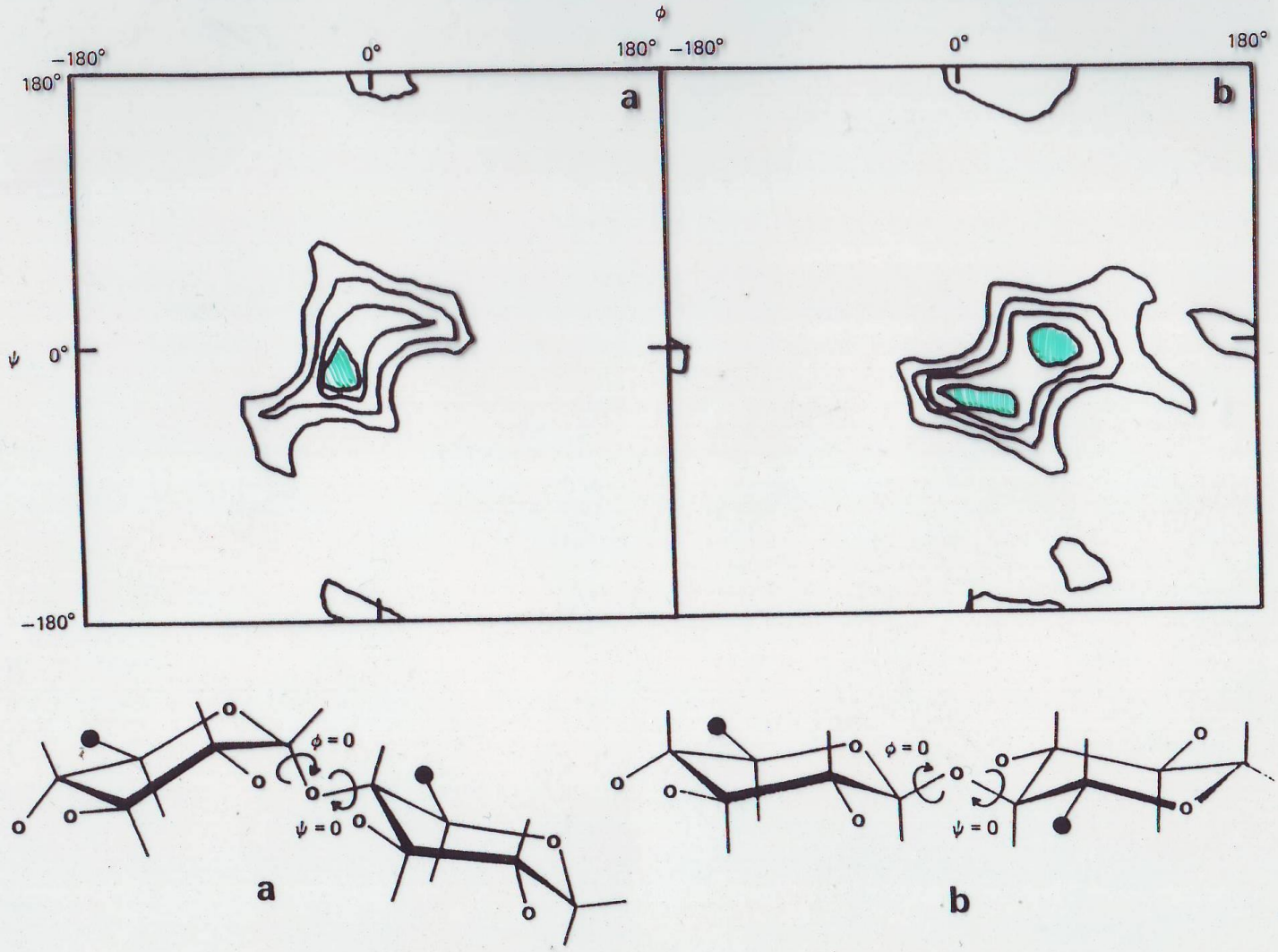
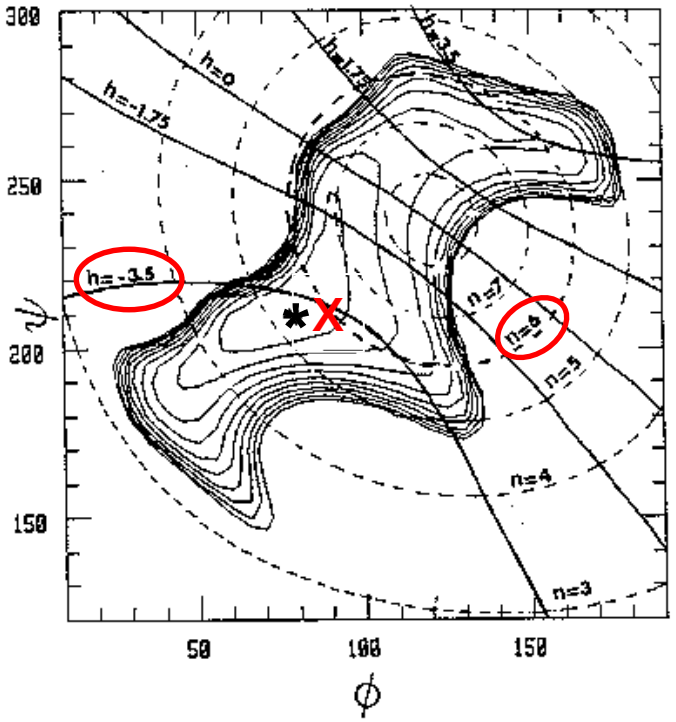


Figure 2 Conformational energy maps calculated for D-maltose (a) and for D-cellobiose (b), according to the procedure of ref. 12. Contours are (1) −1, 0, 5, 25 kcal mol^{-1} and (b) −1, 0, 2, 10 kcal mol^{-1}, respectively



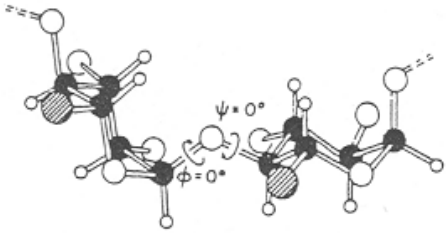
Mappa di Ramachandran del maltosio con le linee **iso-*n*** e **iso-*h*** (in Å) sovrapposte. Le linee isoenergetiche hanno un intervallo di una 1 kcal/mol rispetto al minimo calcolato (*). La linea ***h* = 0** divide la mappa in una regione "elica destra" ($h > 0$) e elica sinistra ($h < 0$).

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

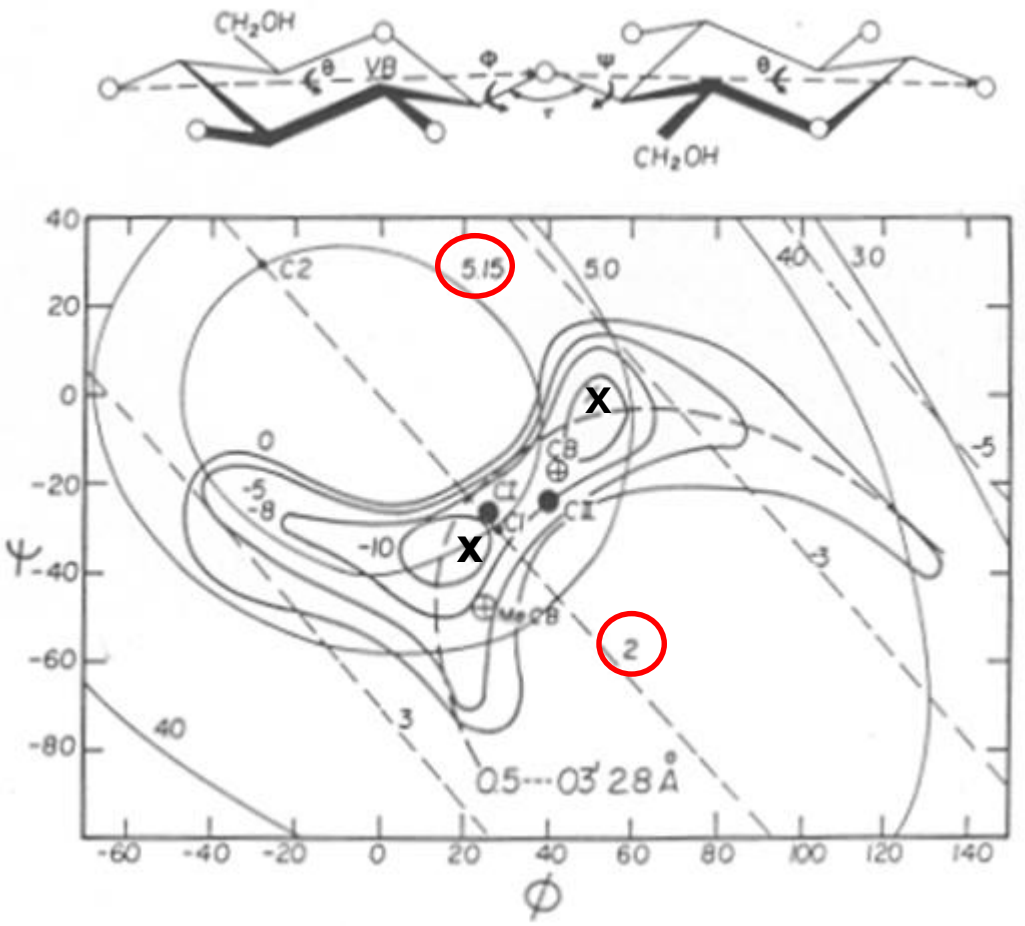
Le conformazioni in accordo con i dati sperimentali sono alle intersezioni delle linee ***n* = 6 e *h* = 0.35 nm** (per una chiralità destra) o ***h* = -0.35 nm** (per una chiralità sinistra)

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

Quindi il modello ad elica sinistra è quello reale.



Cellulosa



Le linee tratteggiate designano il numero di monomeri per spira.

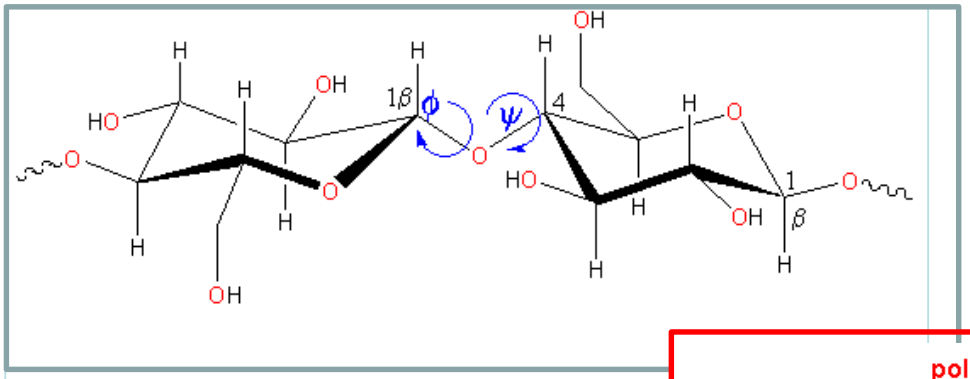
I cerchi grandi: l'avanzamento per monomero.

Le croci: i minimi calcolati.

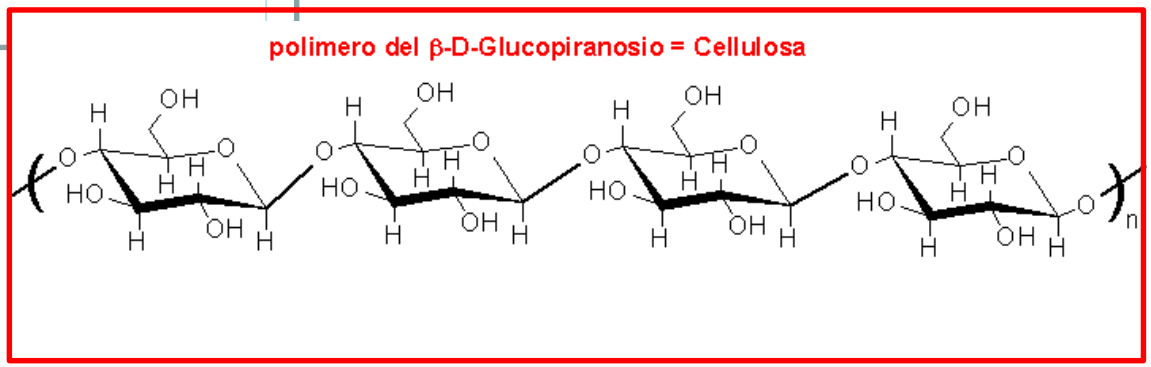
I cerchietti con croci: strutture cristalline di cellobiosio e metil-cellobiosio.

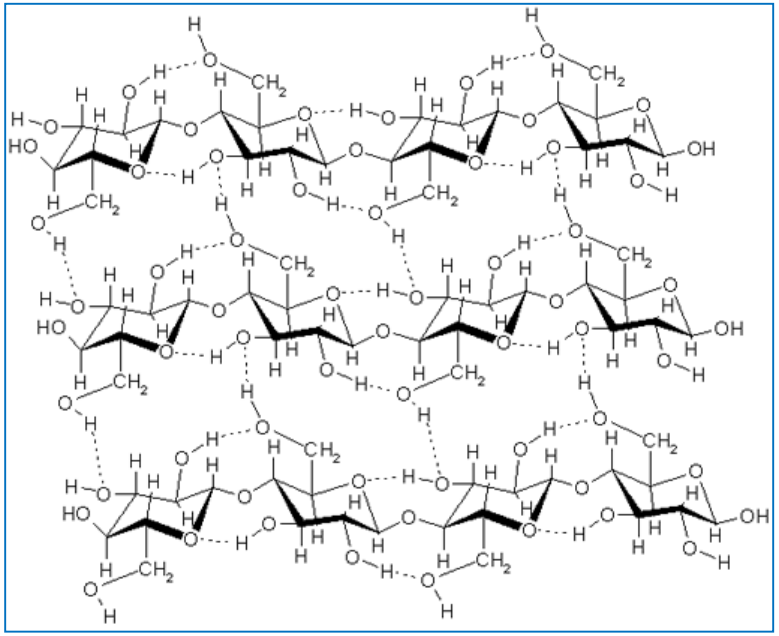
C-I e C-II indicano cellulosa I e cellulosa II.

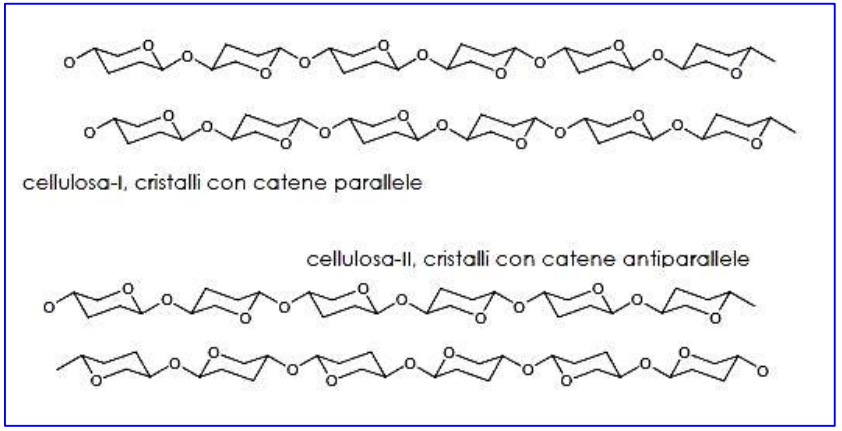
n=2, h=5.15



Struttura secondaria della cellulosa I e II

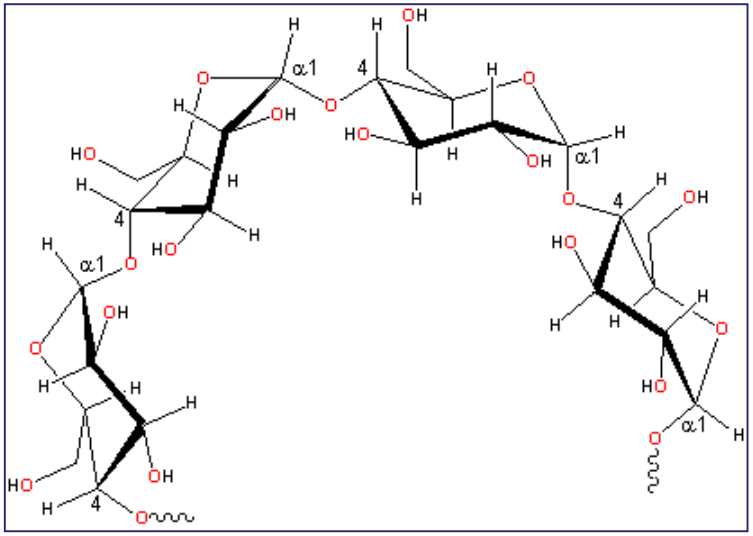


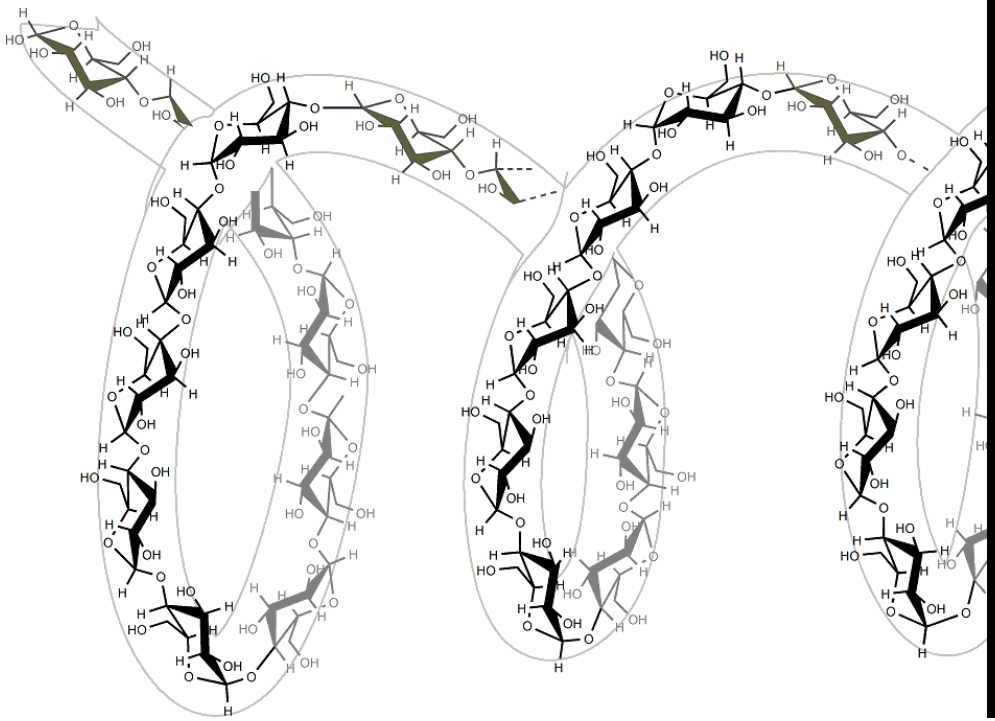


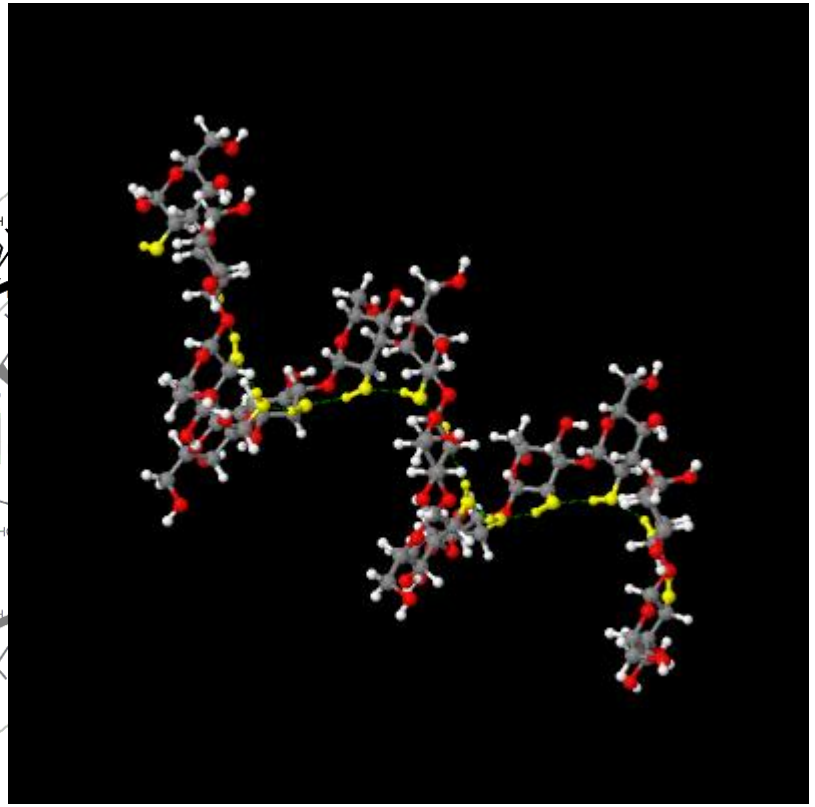


Struttura cristallina (*terziaria*) della cellulosa I e II

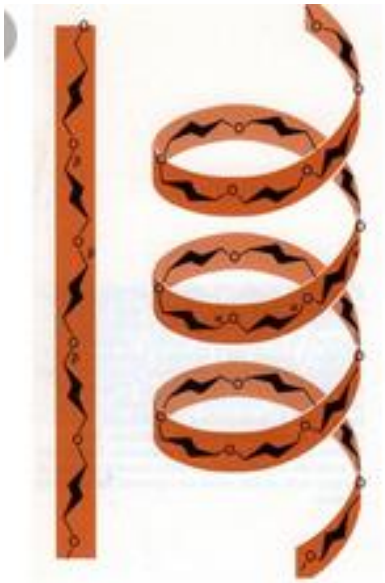
Struttura cristallina dell'amilosio







***n*=2, *h*=5.15 Å**

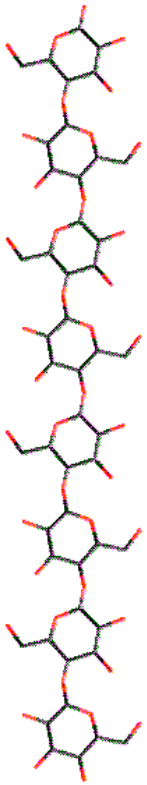


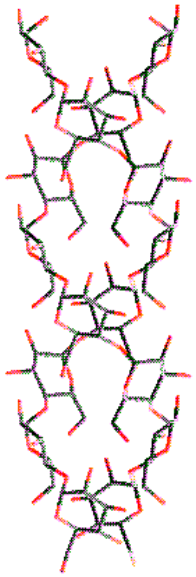
cellulosa amilosio

polimeri lineari

***n* = 6 e *h* = 3.5 Å**

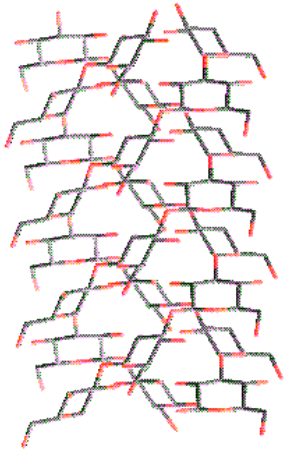
Cellulosa
β (1-4) glc

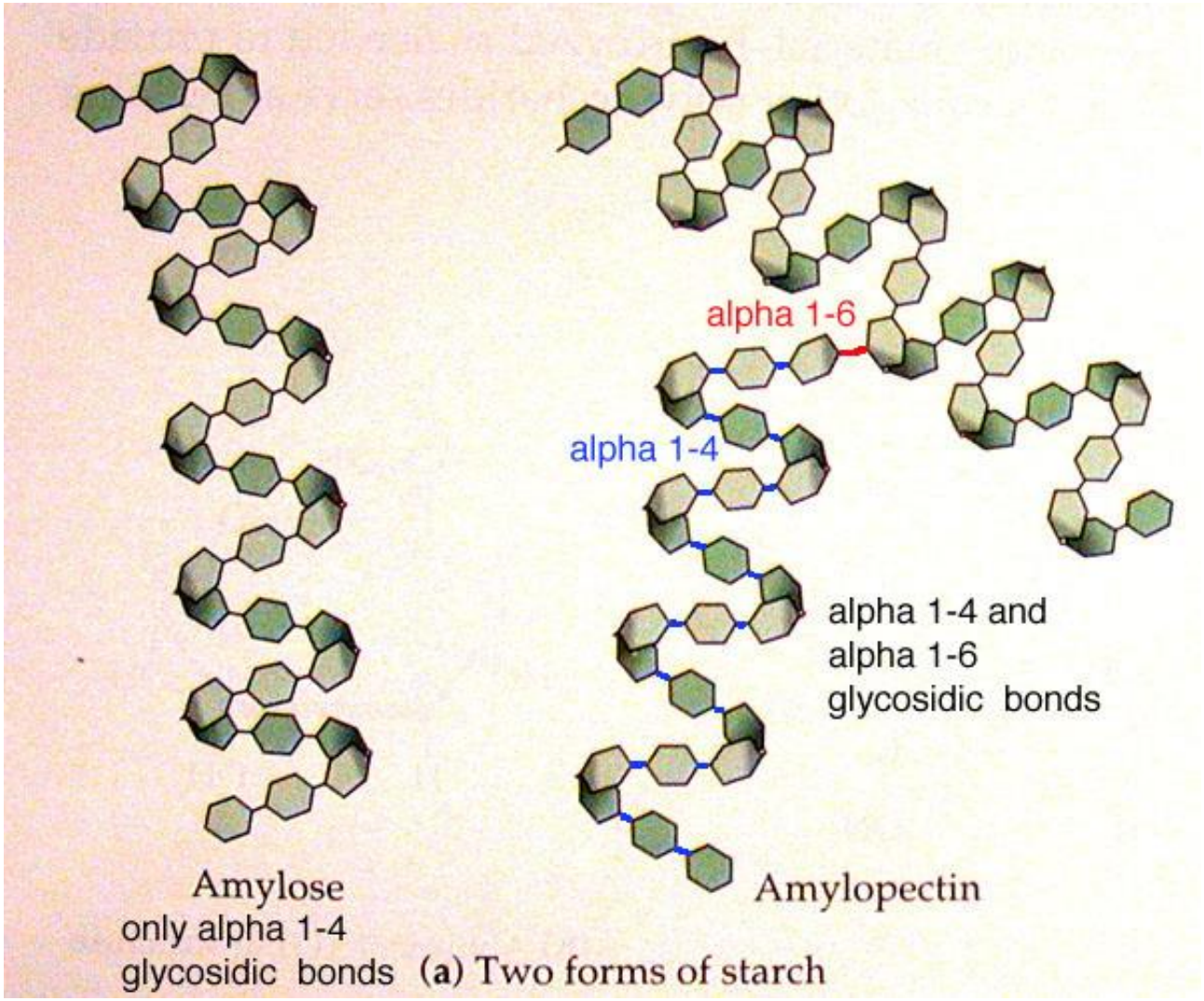




amilosio
α(1-4) glc
doppia elica

β(1-3) glc
tripla elica





(a) Two forms of starch

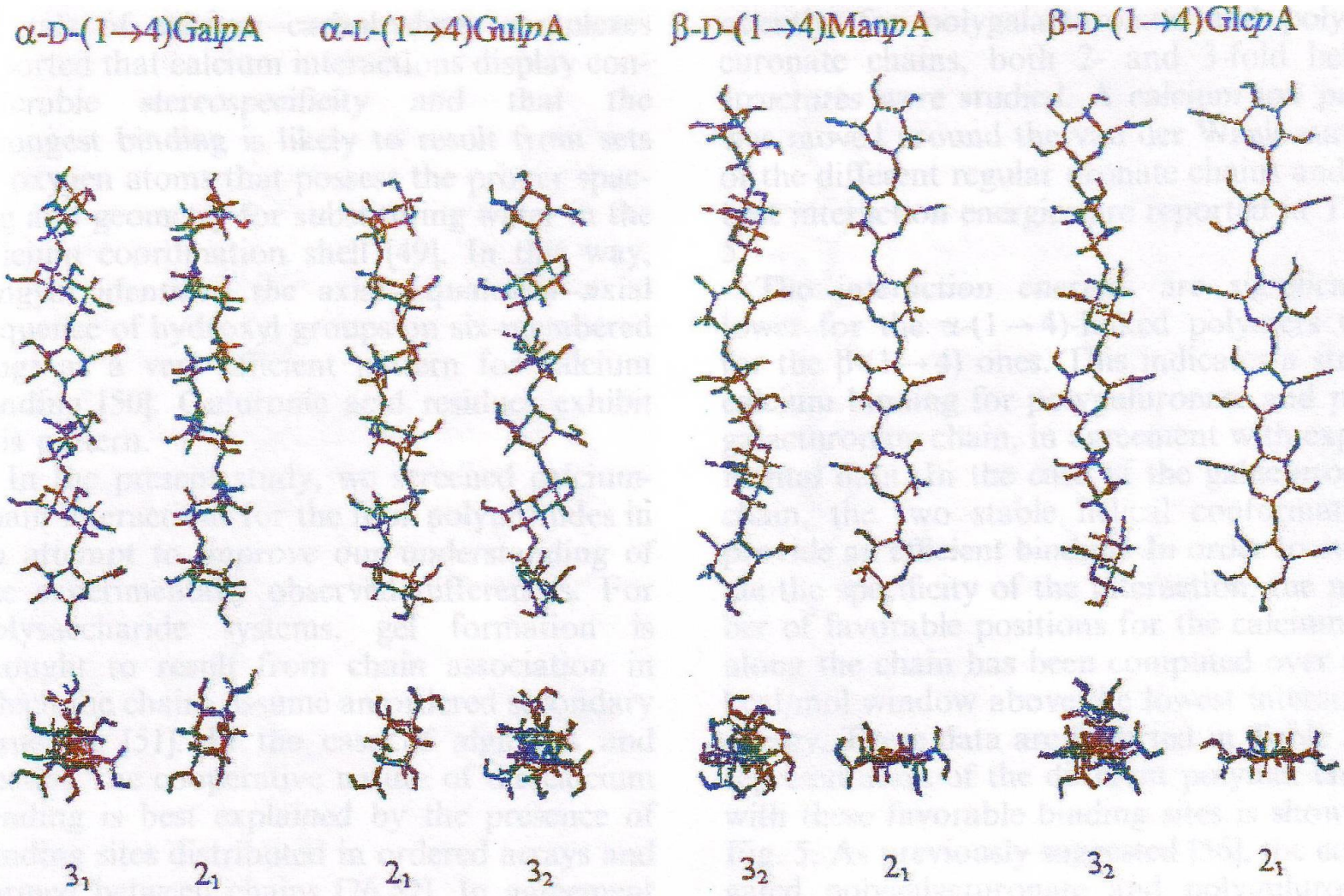
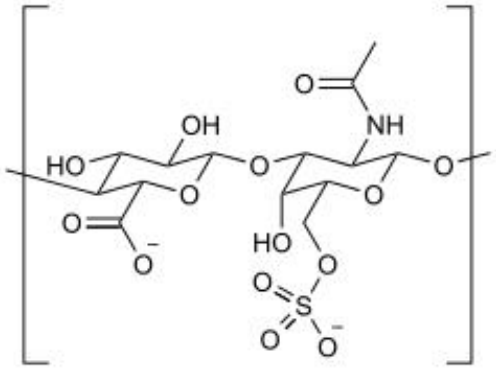


Fig. 4. Stable regular helical conformations of the four acidic polysaccharides. The helices are represented using projection parallel and orthogonal to their axes.

Strutture secondarie di polisaccaridi. Esempio di glucosaminoglicani

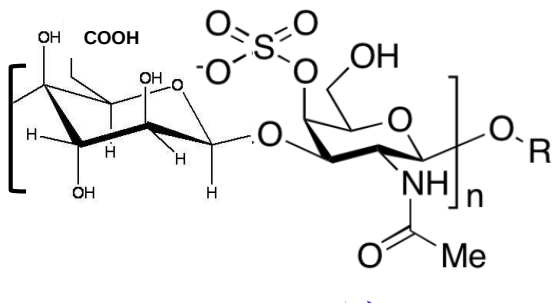
Condroitin solfato (CS)

→**4-**GlcUA-***β*1→**3-**GalNAc-***β*1→



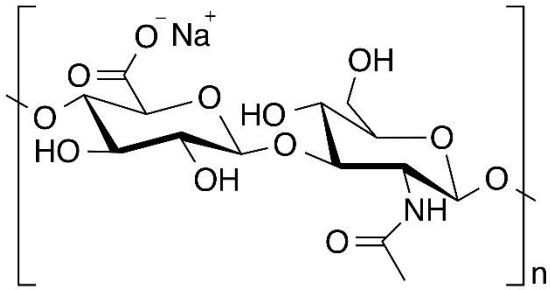
Dermatan solfato (DS)

→ **4-**IdoUA-***β*1→**3-**GalNAc-***β*1→

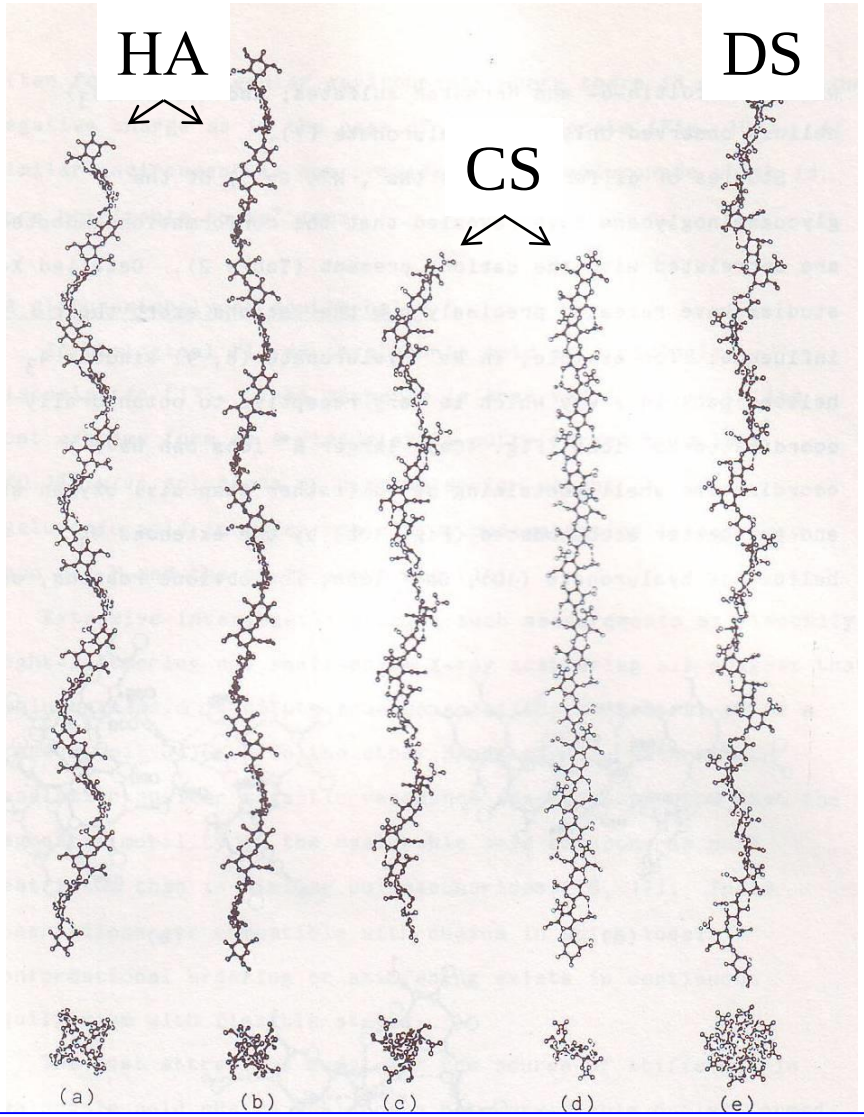


Acido ialuronico (HA)

→**4-**GlcUA-***β*1→**3-**GlcNAc-***β*1→



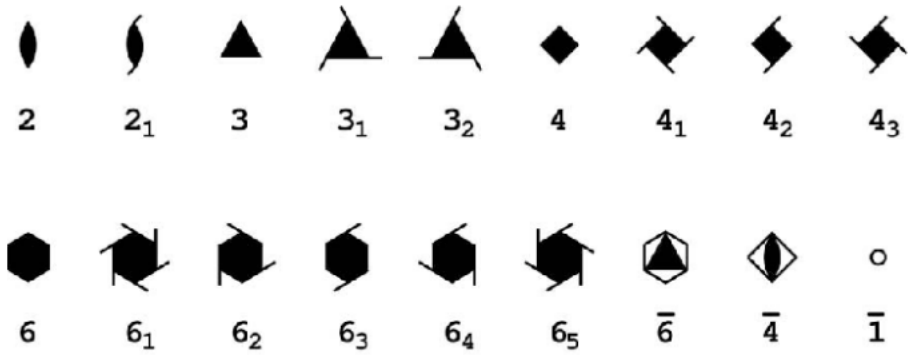
Strutture secondarie di polisaccaridi

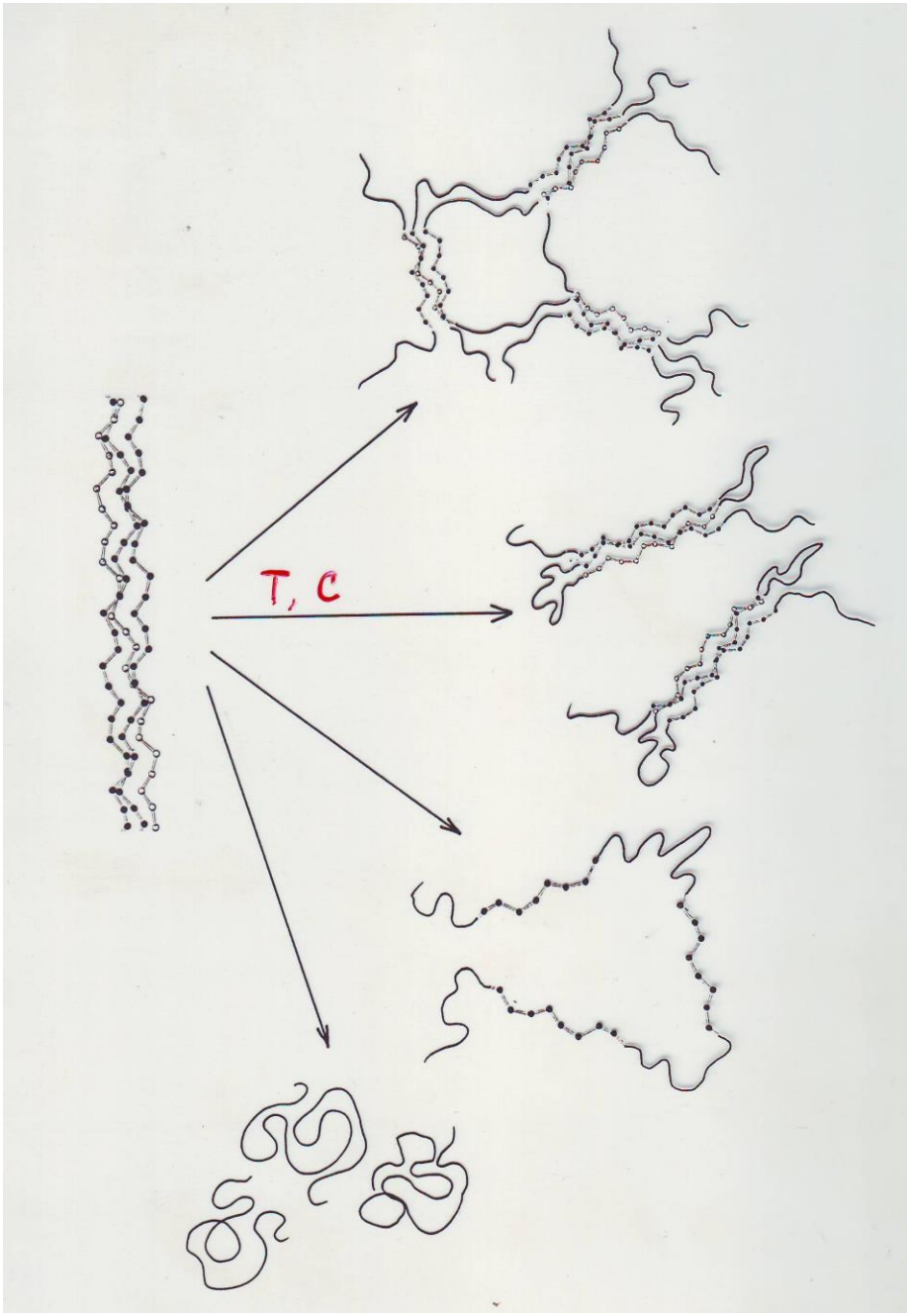


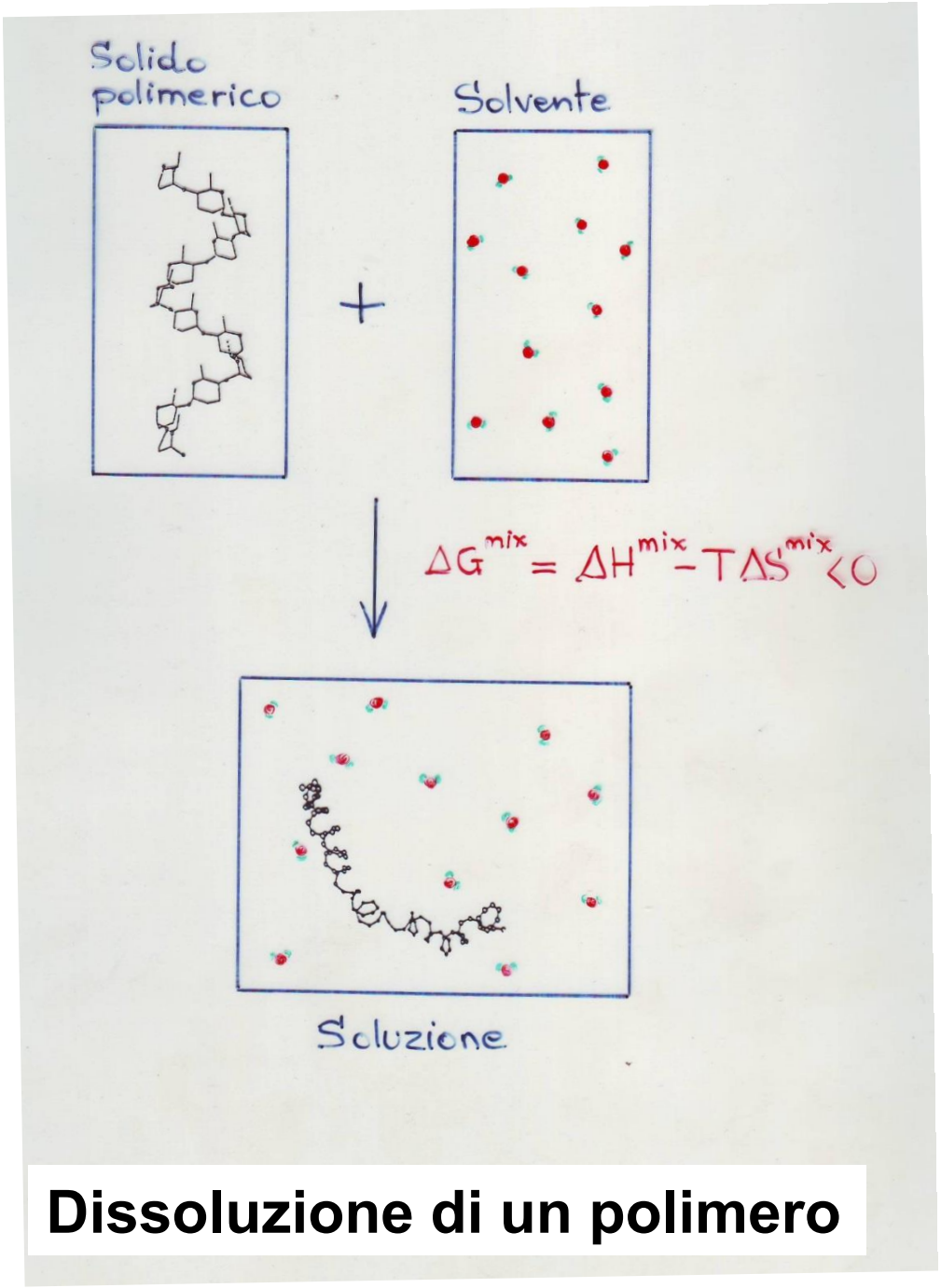
Simmetria	4_3	4_3	3_2	2_1	8_3
Passo/residuo, nm	0.82	0.95	0.95	0.93	0.95

Tabelle Internazionali: simboli

I vari elementi di simmetria, sono indicati con dei simboli ben precisi




T, C



Dissoluzione di un polimero

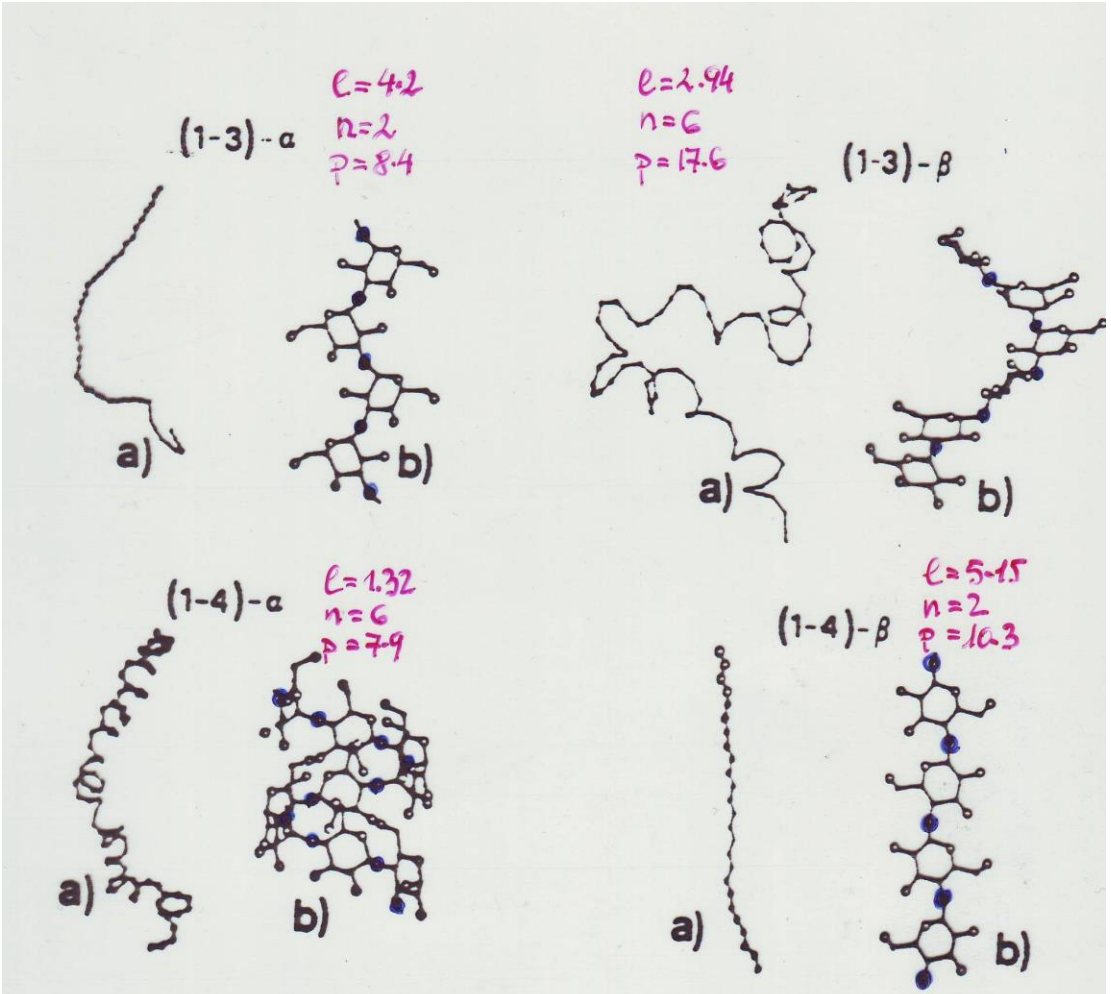
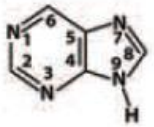


Fig. 2—(a) Schematic representation of the random chain conformations of homoglucans as obtained from Monte Carlo calculations and (b) Schematic representation of the helical ordered structures (enlarged) as deduced from X-ray fiber diffraction studies

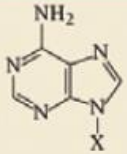
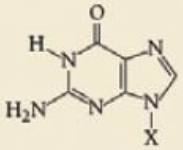
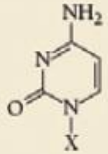
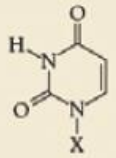
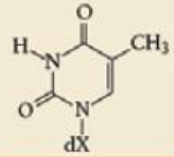
STRUTTURA SECONDARIA DNA/RNA



Purine

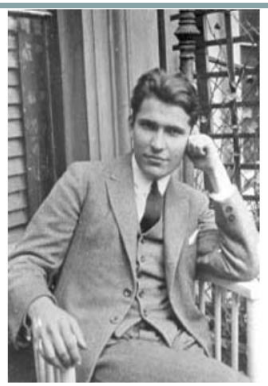
Pyrimidine

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

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

Chargaff 1950:

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



Erwin Chargaff
1905-2002

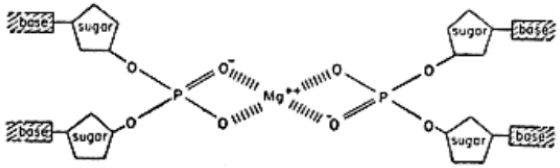
Per primo misurò accuratamente la percentuale dei quattro nucleotidi nel DNA

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

- **La composizione in basi del DNA varia in generale da una specie all'altra**
- **la frazione molare di A è uguale a quella di T**
- **la frazione molare di G è uguale a quella di C**

$$\chi_A = \chi_T \qquad \chi_G = \chi_C$$

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



Nel loro modello, tre lunghe torsioni della catena zucchero-fosfato erano tenute insieme da ioni magnesio e le basi fluttuavano verso l'esterno da questa spina dorsale centrale.

Watson e Crick invitarono con entusiasmo Wilkins, Franklin e Gosling a vedere il modello. Quando Franklin arrivò, si accorse subito che Watson aveva ricordato male diverse cose, in particolare aveva dimenticato la **quantità di acqua** che circondava ogni filamento.

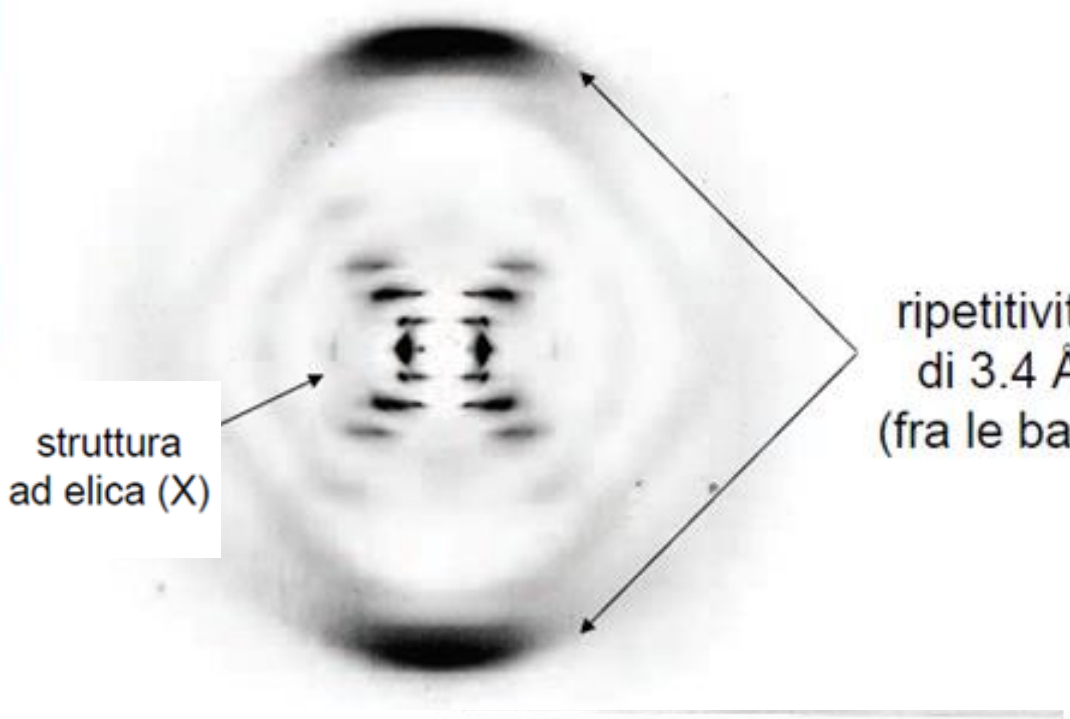
I cristalli di DNA contenevano una quantità d'acqua almeno dieci volte superiore a quella prevista dal modello e **non c'era alcuna prova che il DNA contenesse magnesio**. Se così fosse, tutta l'acqua si sarebbe aggrappata agli ioni di magnesio, distruggendo la molecola.

Era chiaro che l'ipotesi formulata da Watson e Crick con i loro modelli a metallo e filo non si adattava alle evidenze disponibili sul DNA. **Doveva essere scartata !**

ROSALIND FRANKLIN

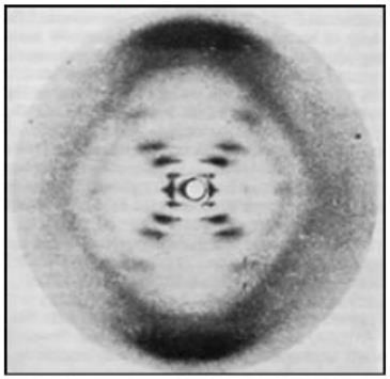
1920-1958

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



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

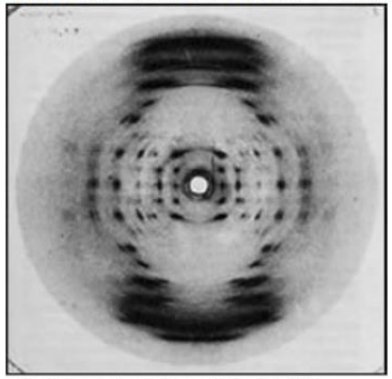
Alta umidità (fibre idratate): B DNA



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

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

Bassa umidità: A DNA



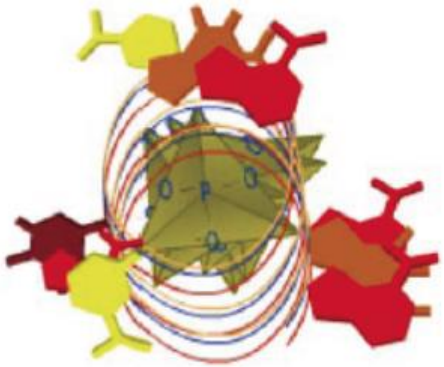
An X-ray photograph of DNA's 'A'-form

Franklin e Gosling si sono concentrati sul **DNA-A**, producendo molte immagini chiare e scoprendo la dimensione delle unità ripetute che compongono la molecola e la simmetria.

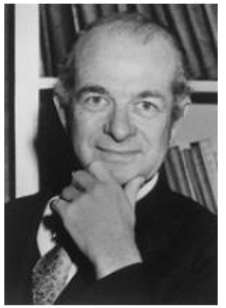
- Ogni immagine richiedeva molte ore di esposizione ai raggi X per svilupparsi, a volte fino a 100 ore
- La mattina del 2 maggio 1952, tornando in laboratorio, scoprirono che il DNA si era idratato durante la notte e l'immagine che avevano ottenuto era in realtà quella del **DNA B**. Mostrava un'evidente **forma a X**, un modello che il lavoro precedente associava a strutture elicoidali.
- L'immagine confermava anche che le basi del DNA fossero impilate a **0,34 nm** di distanza l'una dall'altra, e indicava che ci fossero **10** di questi strati ogni giro dell'elica.
- Si è ottenuto anche il diametro dell'elica: **2 nm**.
- Misero da parte l'immagine e decisero di tornare su di essa una volta risolta la struttura del DNA-A.

Il modello a tripla elica di Pauling

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

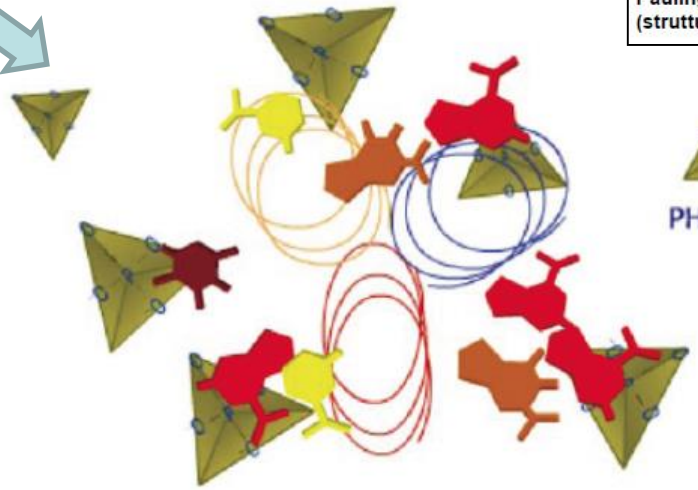


Linus Pauling
(1901 - 1994)

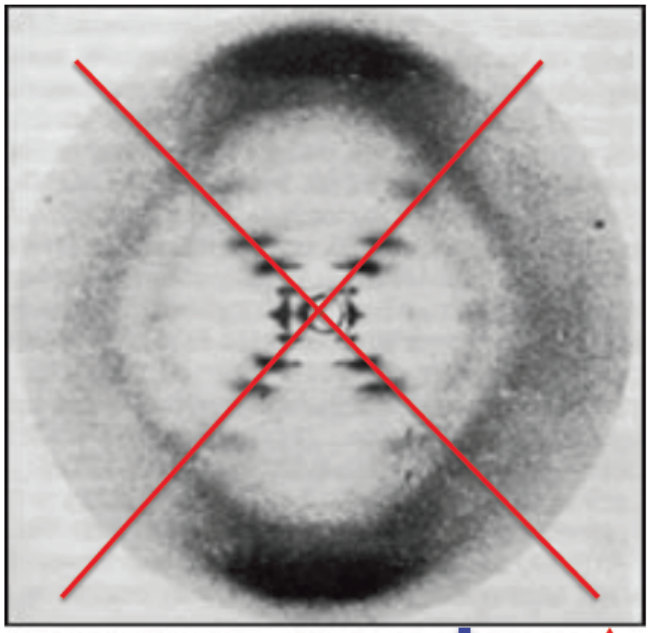


Pauling: Nobel 1954
(struttura proteine)

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

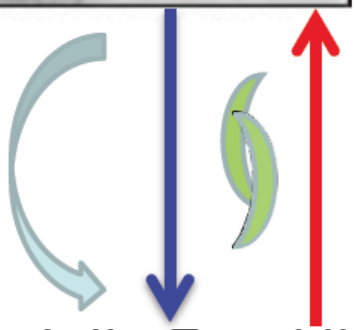


Watson e Crick si resero conto dell'errore di Pauling



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

Rotazione di 180°



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

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

Wilkins era sempre stato più interessato al DNA B, e notò in modo particolare l'immagine chiara e informativa. Più tardi, quello stesso mese, Watson si recò a Londra per un altro colloquio scientifico. Dopo la conferenza, Wilkins cenò con Watson e gli mostrò la bella immagine del DNA B prodotta da Franklin.

Poiché Crick aveva aiutato Watson a imparare a interpretare i modelli a raggi X prodotti dalle eliche, Watson riconobbe immediatamente la prova rivelatrice di un'elica.

Quando tornò a Cambridge, Watson condivise i nuovi risultati con Crick e i due applicarono le informazioni ai loro modelli stick&balls.
Watson volle provare a creare un modello in cui solo due catene **«fosfato-zucchero-base»** fossero collegate tra loro.

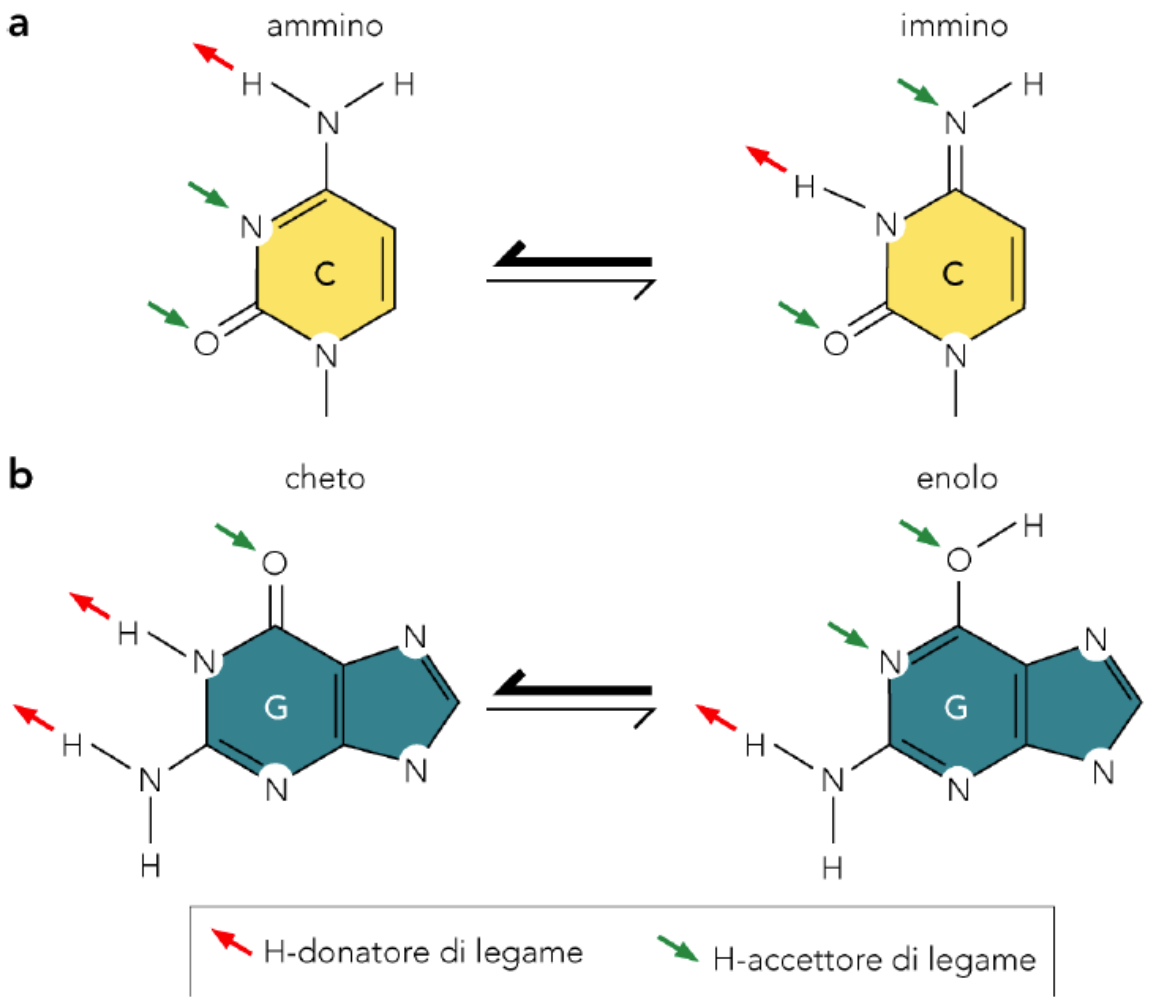
Watson e Crick decisero anche di provare a orientare le basi verso il centro della coppia.

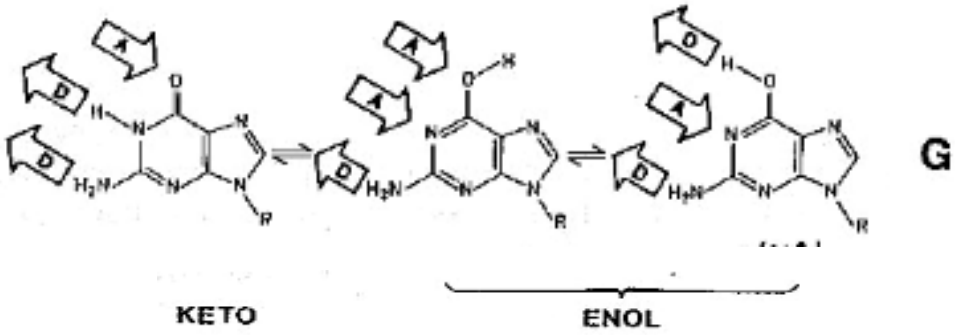
Franklin aveva precedentemente dato loro buone informazioni per pensare che le basi dovessero trovarsi all'interno e i fosfati all'esterno della molecola, dove potevano attirare l'acqua.

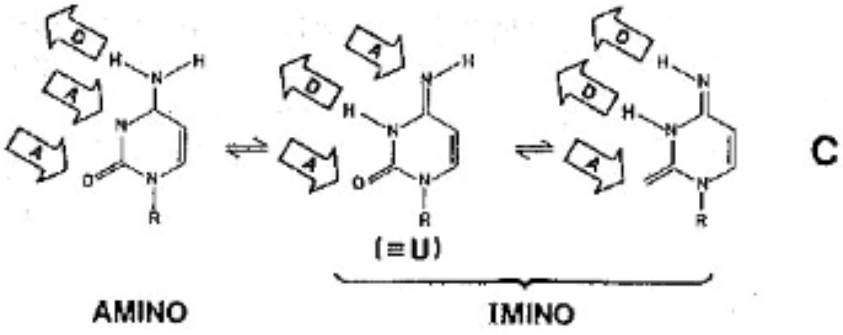
Entrambi furono sorpresi da quanto il nuovo modello a due filamenti e con basi all'interno si adattasse agli indizi che Watson aveva scarabocchiato durante una cena con Wilkins.

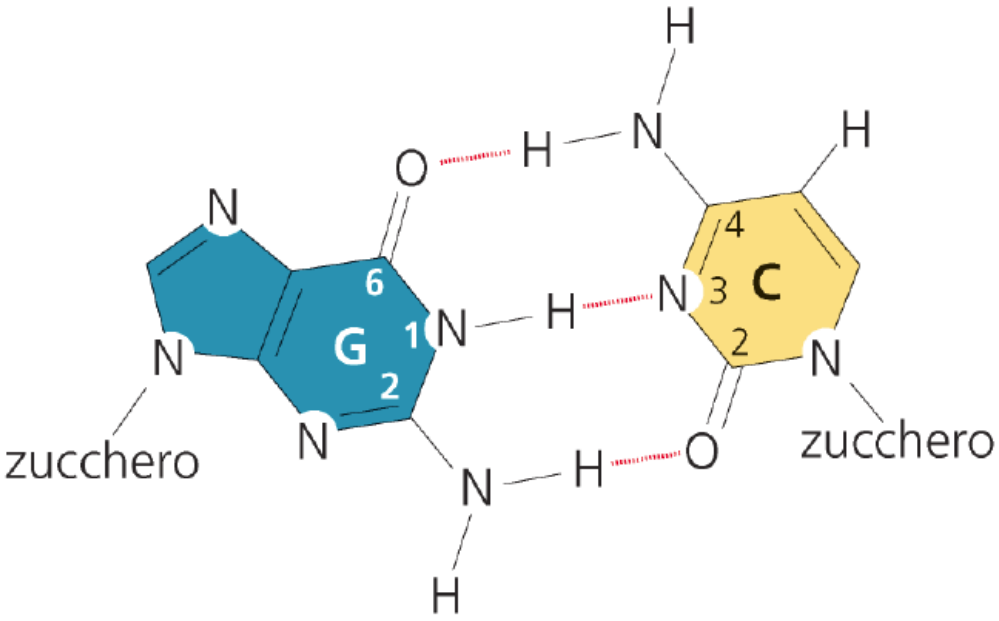
Ma Watson e Crick non erano gli unici a pensare a una doppia elica: gli appunti di Rosalind Franklin del 10 febbraio mostrano che, nello stesso periodo, iniziò a pensare il DNA B come un'elica a due catene.

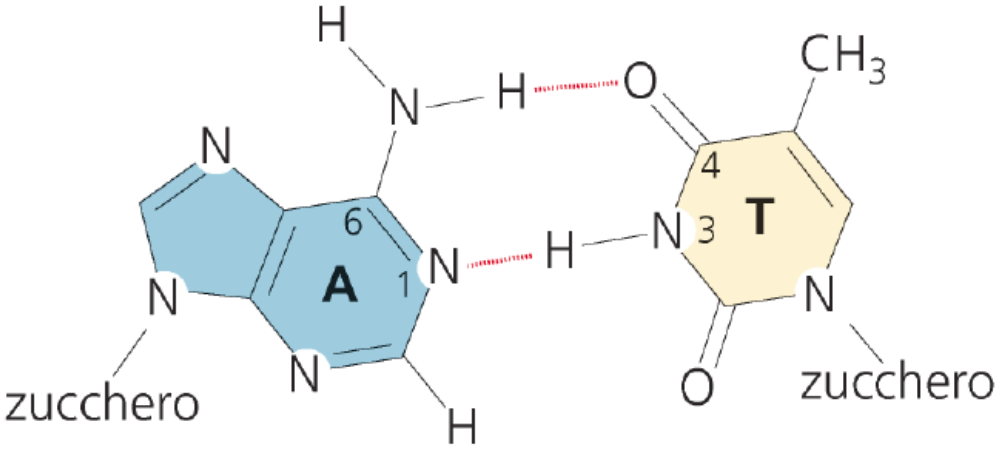
CONFORMAZIONI TAUTOMERICHE DELLE BASI



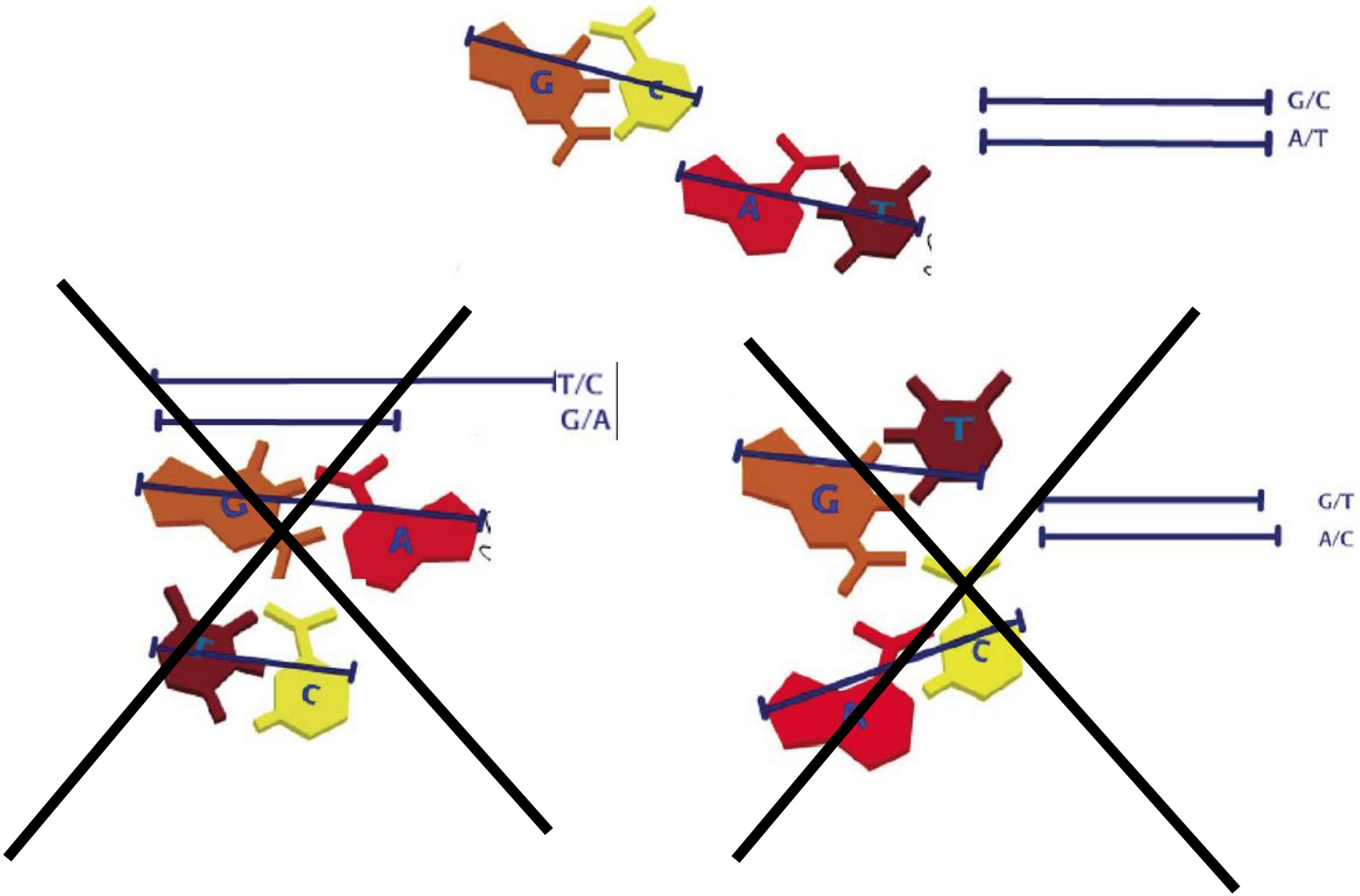

G
KETO
ENOL


C
(≡U)
AMINO
IMINO


H
N
H
O
H
N
4
6
N
3
C
G
1
N
H
2
N
N
2
zucchero
N
H
O
zucchero
N
H


H
N
H
O
CH3
N
4
6
N
3
T
A
1
N
H
N
N
zucchero
N
O
zucchero
H

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

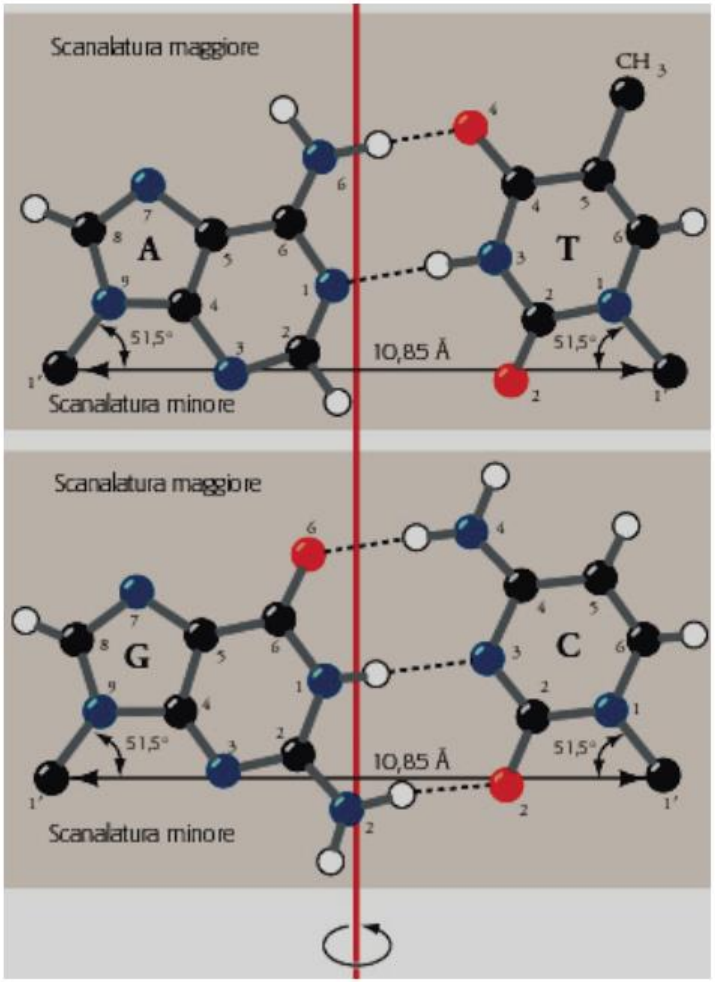


ISOMORFISMO GEOMETRICO DELLE COPPIE DI BASI

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

Hanno valori quasi identici di :

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



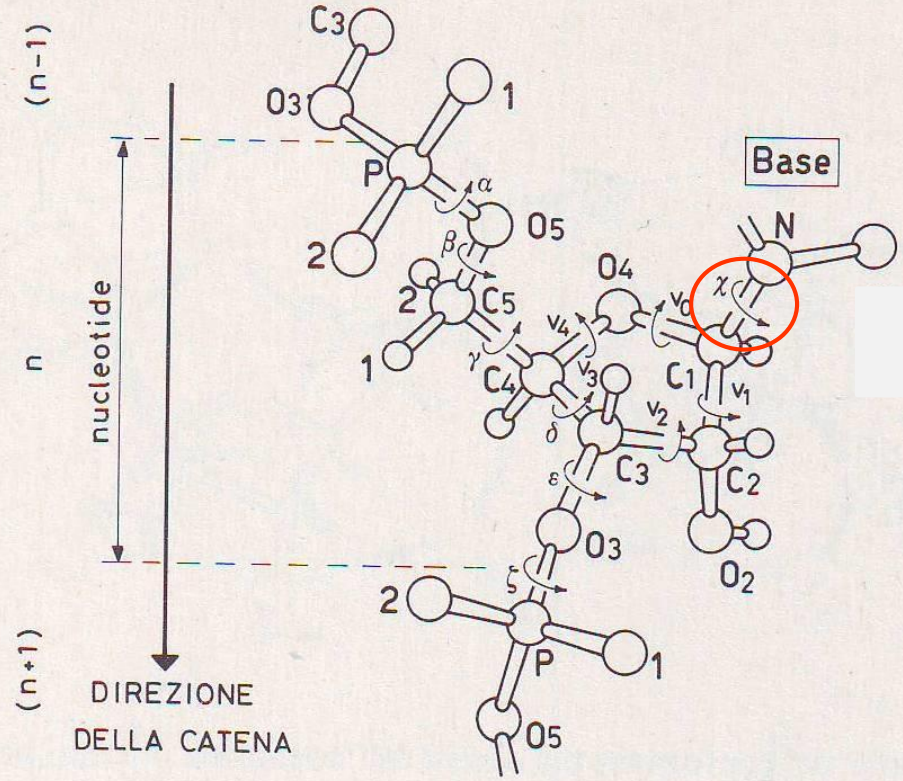


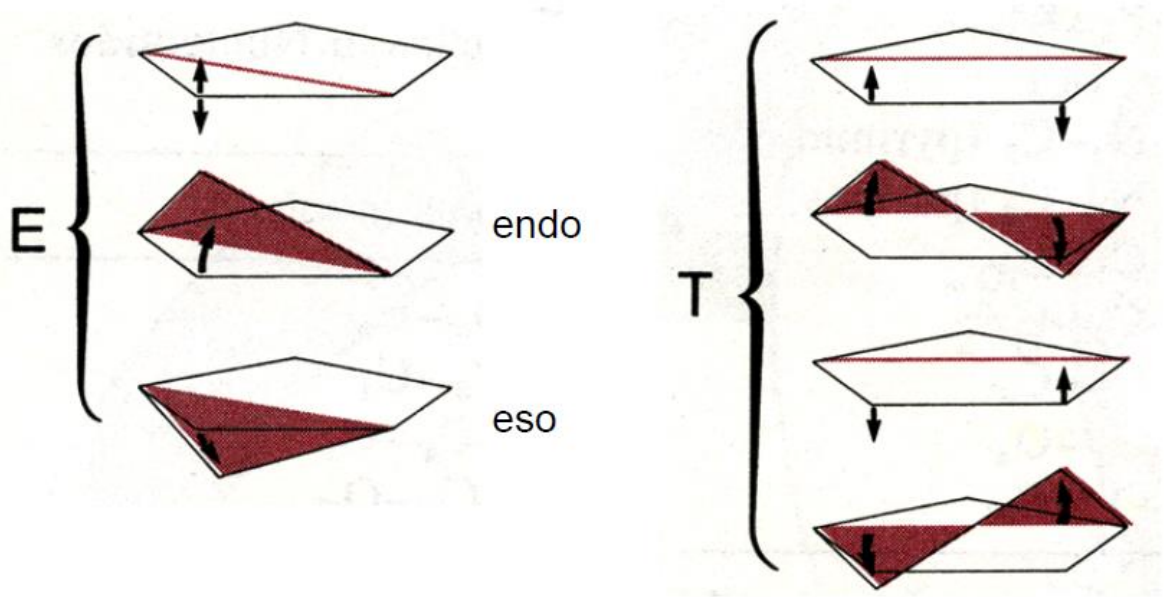
Fig. 3.4.2 - Rappresentazione degli angoli torsionali della catena polinucleotidica.

PUCKERING DEL FURANOSIO

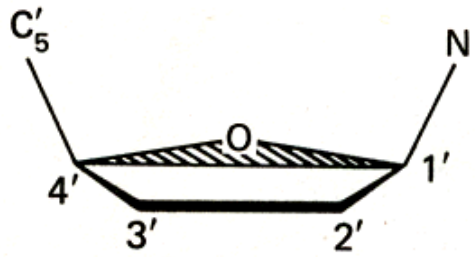
Lo zucchero non ha una struttura planare per la presenza di sostituenti. Per evitare interazioni non covalenti tra i sostituenti, il furanosio adotta una conformazione increspata.

1. Envelope (E): Quattro dei cinque atomi sono coplanari e uno devia giacendo o sopra il piano (endo) o sotto il piano (eso).

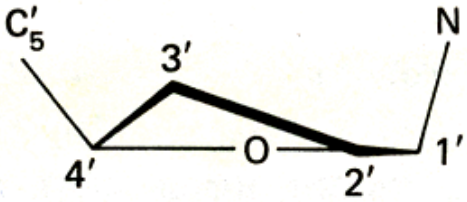
2. Twist (T): Tre atomi sono coplanari e gli altri due giacciono su facce opposte del piano



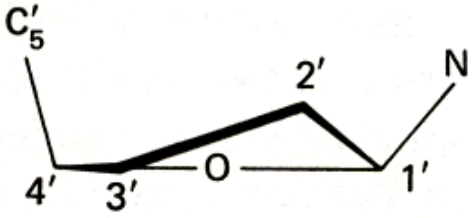
DEFINIZIONE DEL PUCKERING DEL FURANOSIO



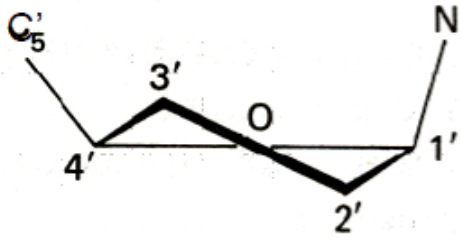
Coplanare, energeticamente sfavorita



Envelope: C3' endo



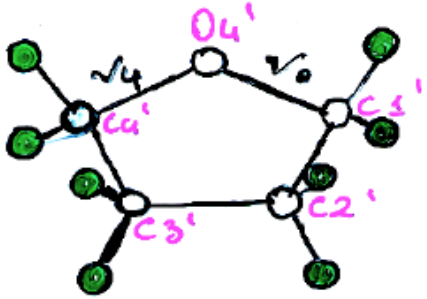
Envelope: C2'endo



Twist $^{3}_{2}T$: C3'-endo / C2'-eso

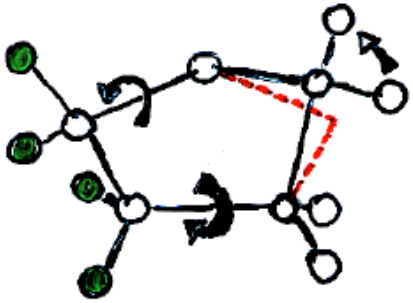
I due atomi sono increspati della stessa entità:
TWIST SIMMETRICO

Il puckering del furanosio serve a ridurre la sua energia

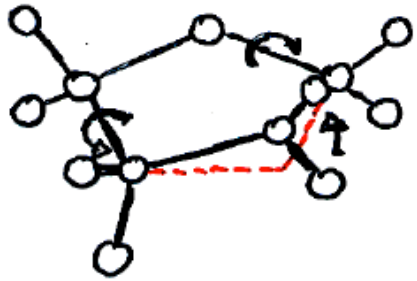


Struttura planare: i sostituenti sono cis e coplanari.

Tutti gli angoli torsionali ν_0-ν_4 = 0.



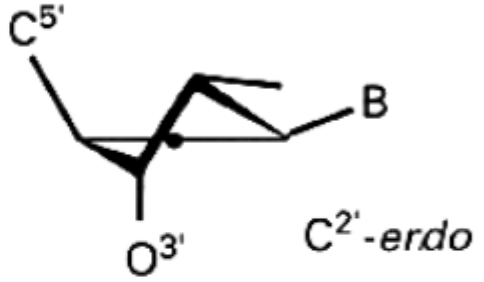
ν_3 = 0. C1' – endo. I contatti tra i sostituenti del C2' e C3' sono eliminati. Tuttavia, i sostituenti in C4' e C3' sono cis e coplanari. Contenuto energetico relativamente alto e struttura non energeticamente favorita, anche se consentita.



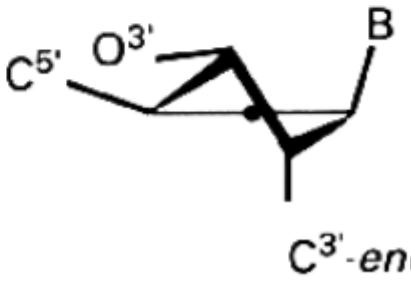
ν_4 = 0. C2' -endo. Nessuno dei sotituenti è eclissato. Struttura con livello energetico più basso e quindi favorita

Le conformazioni con il più basso contenuto energetico sono le C2’ endo e C3’ endo

Le conformazioni increspate C 2’ endo e C 3’ endo sono in realtà un “quasi twist”, per l’atomo di carbonio in eso meno increspato di quello in endo.

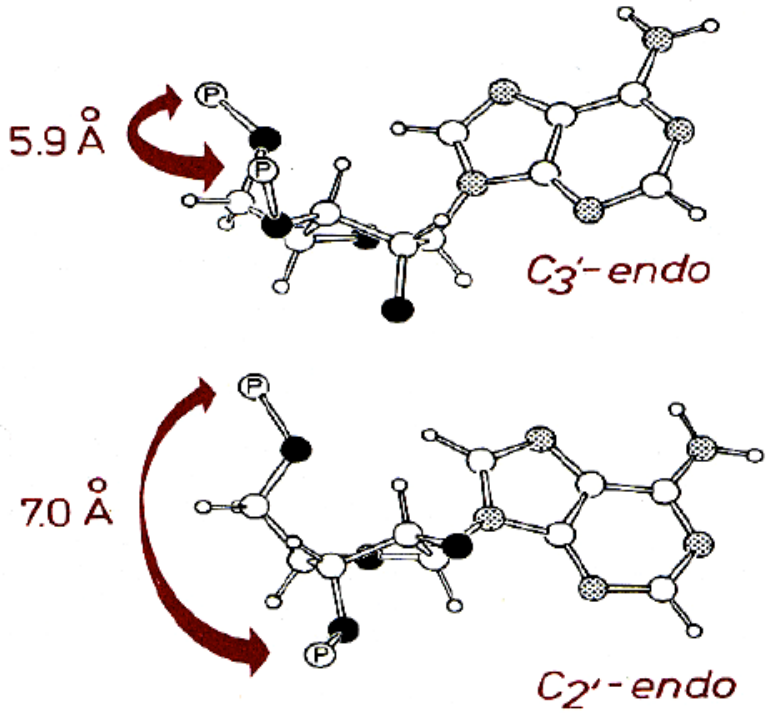


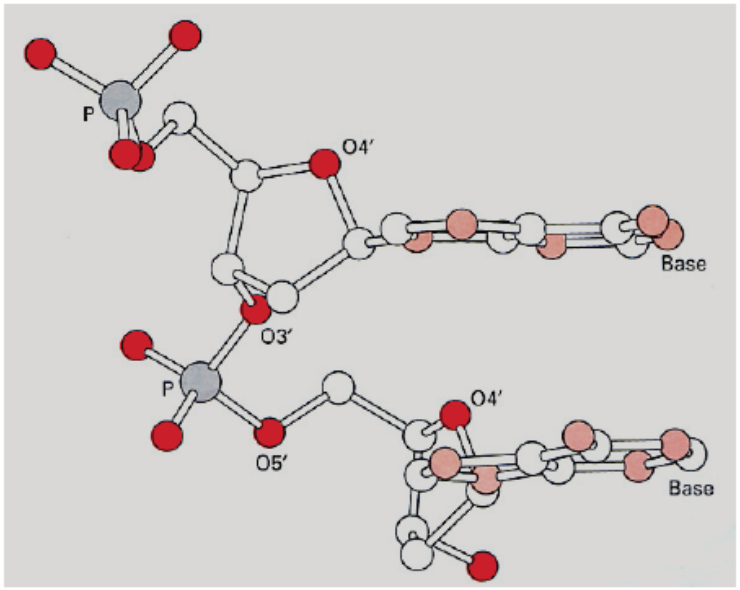
S



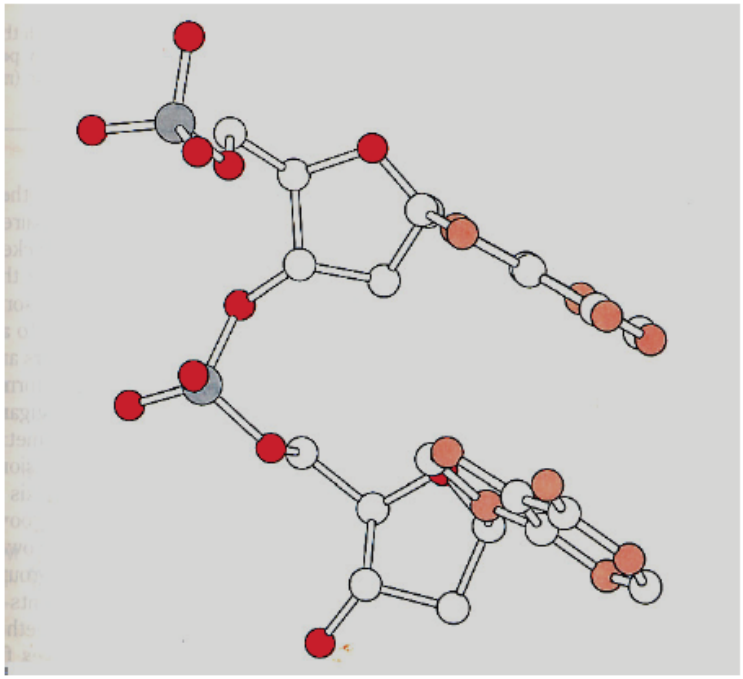
N

Nella conformazione increspata C3' -endo i gruppi P sono più vicini. La doppia elica risulta più tozza ed è di tipo A

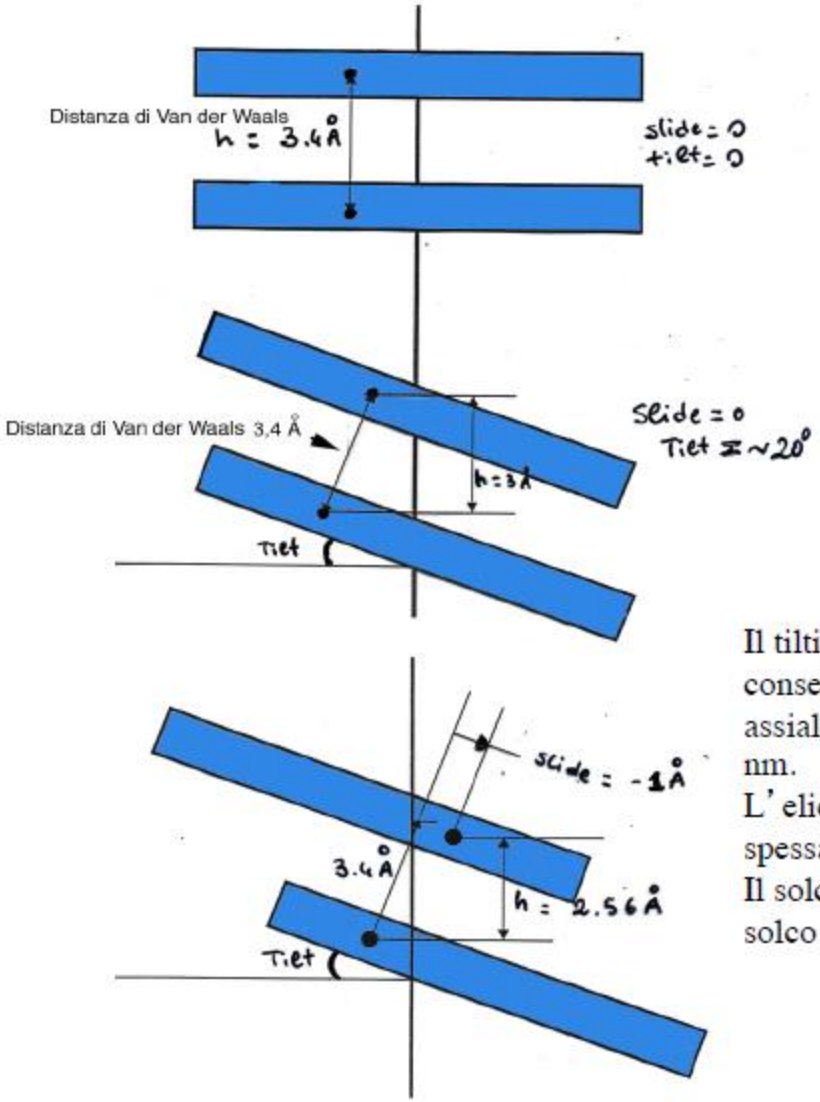




Conformazione di due basi successive in un elica di DNA B.
Deossiribosio in C 2' endo;
χ in high anti (-60°/-110)
Basi perpendicolari all' asse dell' elica



Conformazione di due basi successive in un elica di DNA A.
Deossiribosio in C 3' endo;
χ in anti (-110/-180)
Conseguentemente le basi sono inclinate



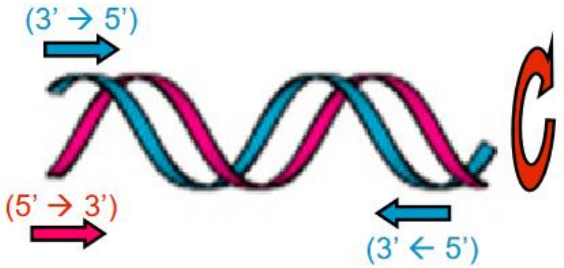
Il tilting delle coppie di basi, associate allo sliding, consente alle basi di porsi ad una distanza (innalzamento assiale) minore della distanza di van der Waals di = 0,34 nm.

L'elica del DNA è di tipo A; risulta così più corta e più spessa del DNA B.

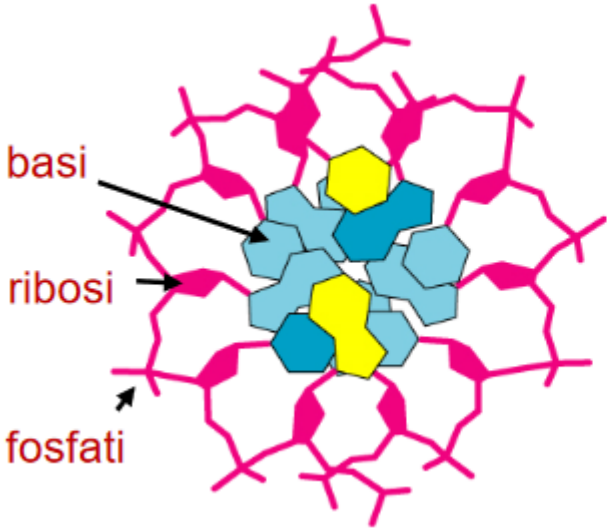
Il solco Maggiore risulta più profondo e meno ampio.Il solco Minore meno profondo e più ampio

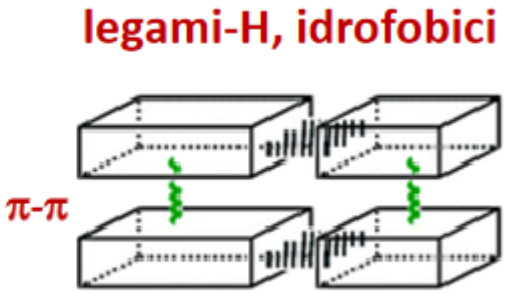
Watson and Crick 1953: Il modello

La struttura 2° è una doppia elica destrogira con le due catene orientate in modo antiparallelo con asse comune

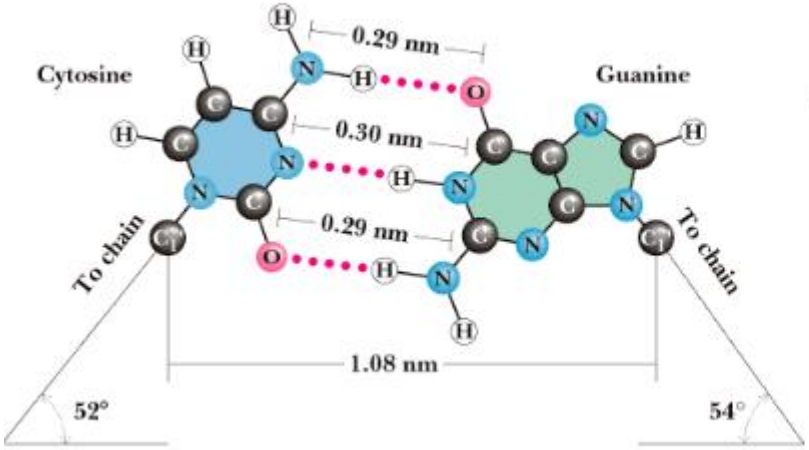


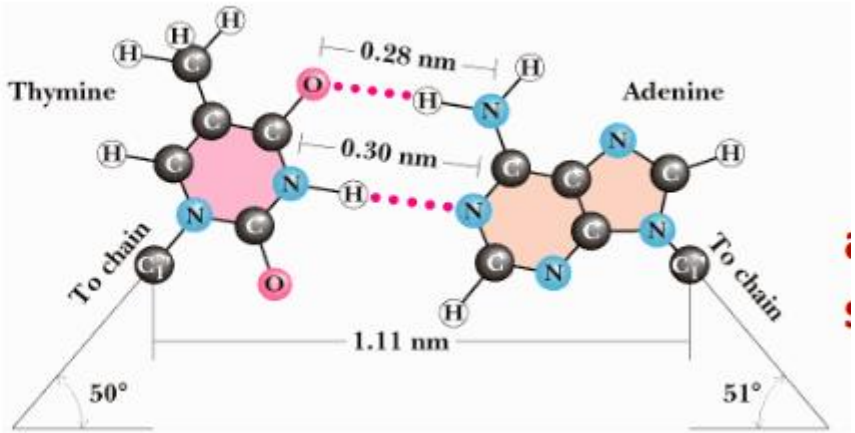
il piano delle basi è perpendicolare all'asse – **i ribosi e gruppi fosfato sono esterni**, e le **basi interne all'elica** (interazioni idrofobiche, interazione π-π e legami-H).



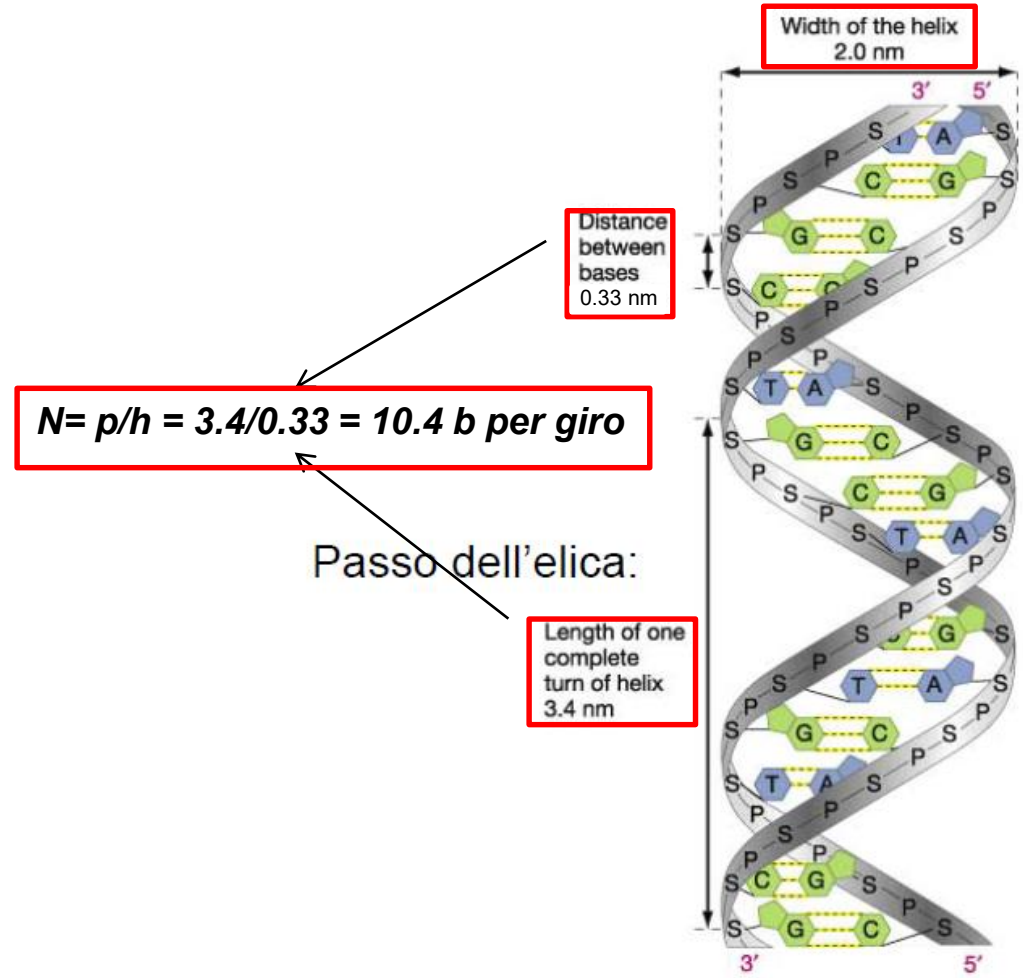


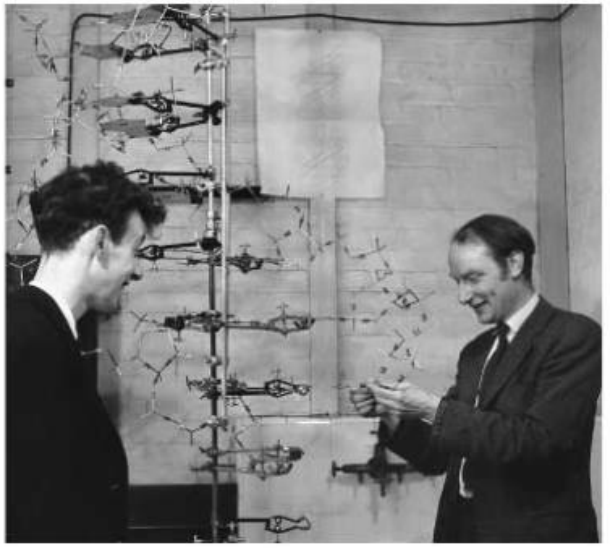
le basi interagiscono all'interno dell'elica in **maniera SPECIFICA** (G:C e A:T; **appaiamento WC**) mediante legami-H (questa specificità determina i processi di replicazione/traduzione)

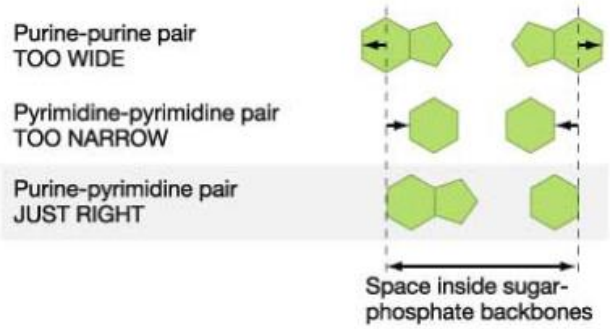


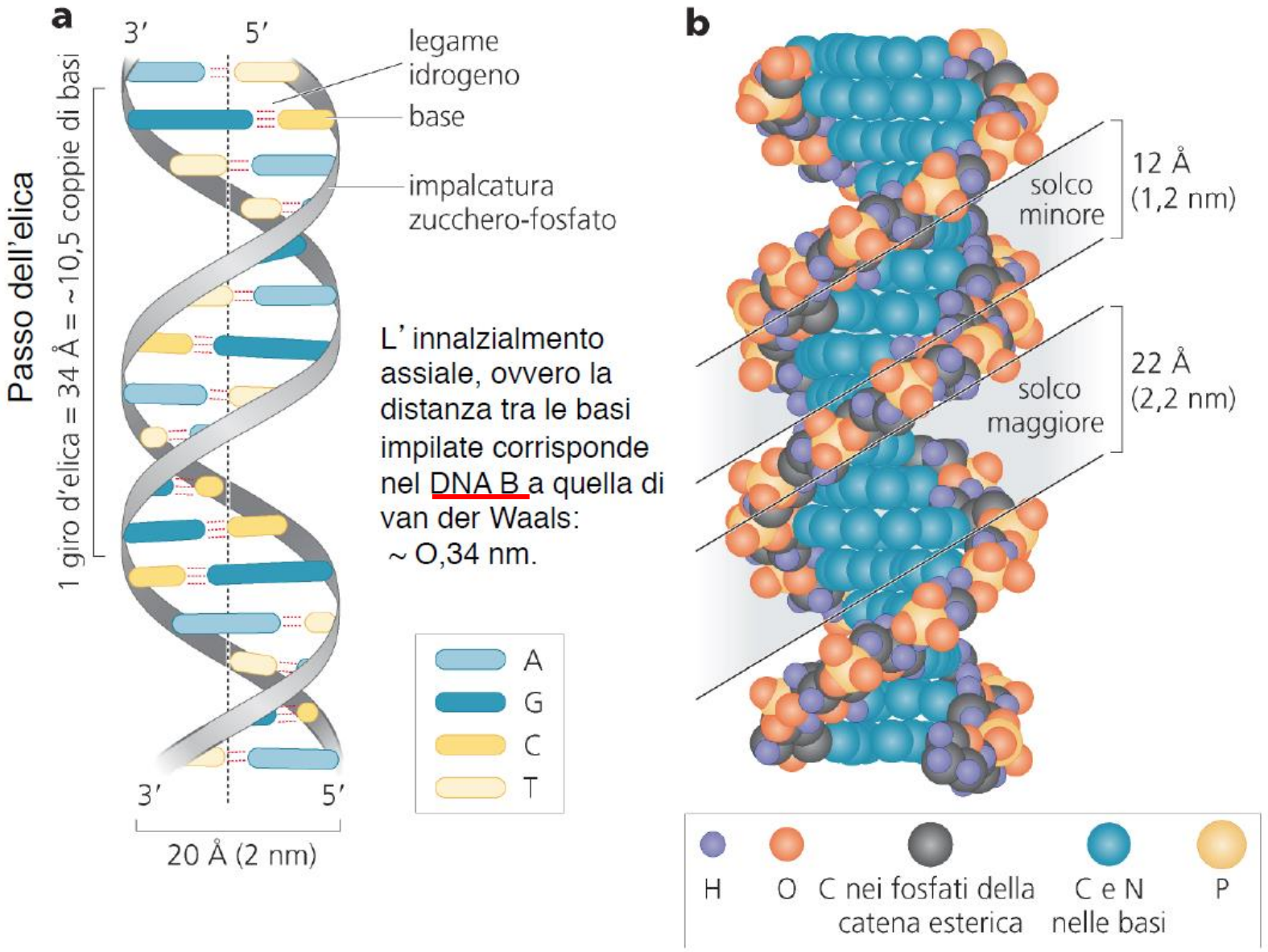


Watson and Crick 1953: Il modello



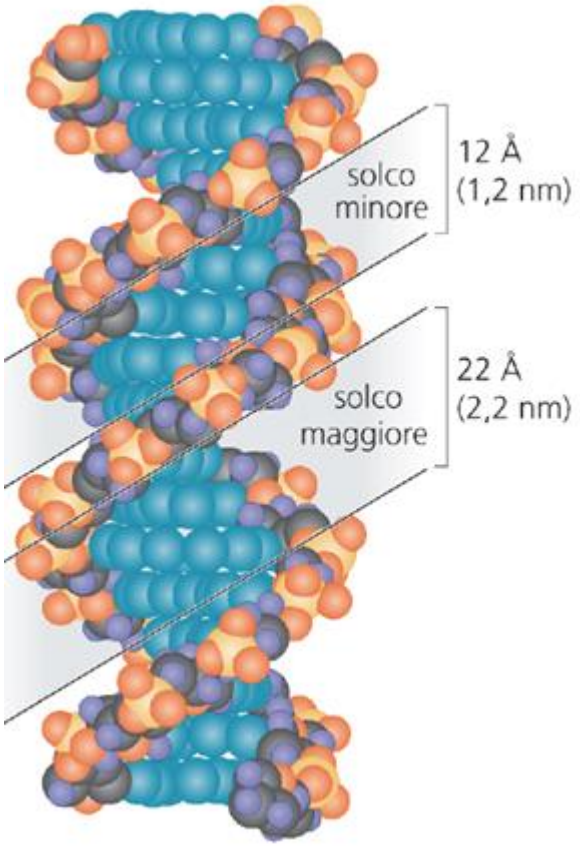


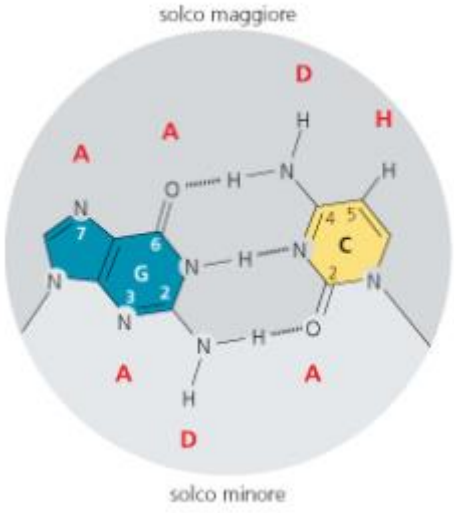


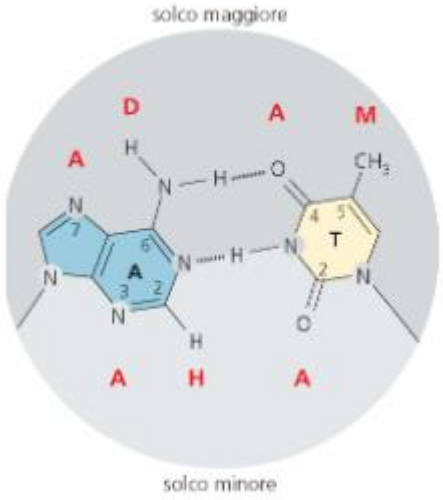


3.4 / 0.33 = 10.4 coppie di basi/spira

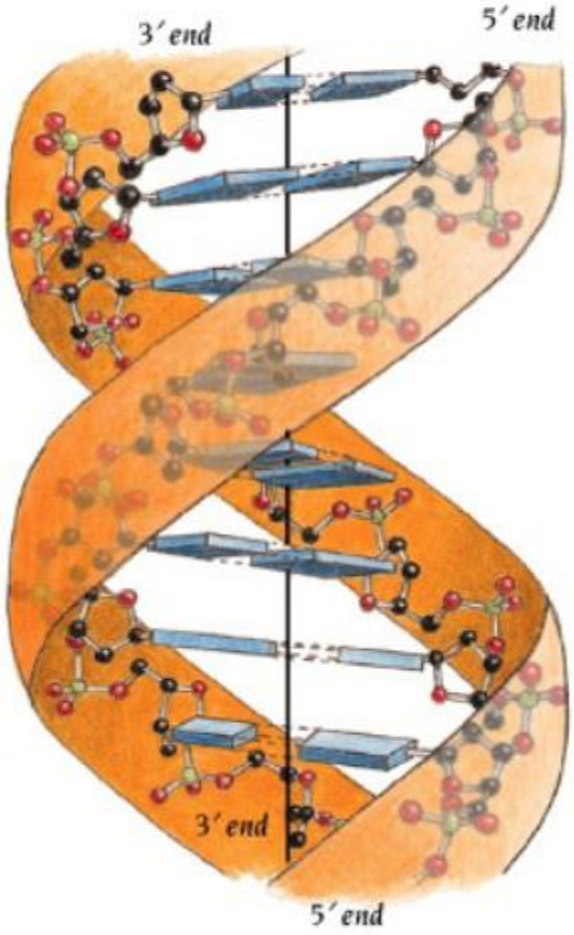
- la doppia elica presenta due scanalature avvolte attorno all'asse (i solchi)
- il solco maggiore e il solco minore sono «foderati» dagli atomi sui lati esterni delle basi
- questo permette interazioni non covalenti con le proteine che si legano al DNA e che possono riconoscere specifiche sequenze di basi
- i lati delle basi che si affacciano nei solchi maggiore e minore creano un sistema di donatori ed accettori di idrogeno e superfici di van der Waals
- molte proteine che legano al DNA sono in grado di riconoscere specifici pattern di questi donatori/accettori e agiscono in prossimità di quelle sequenze



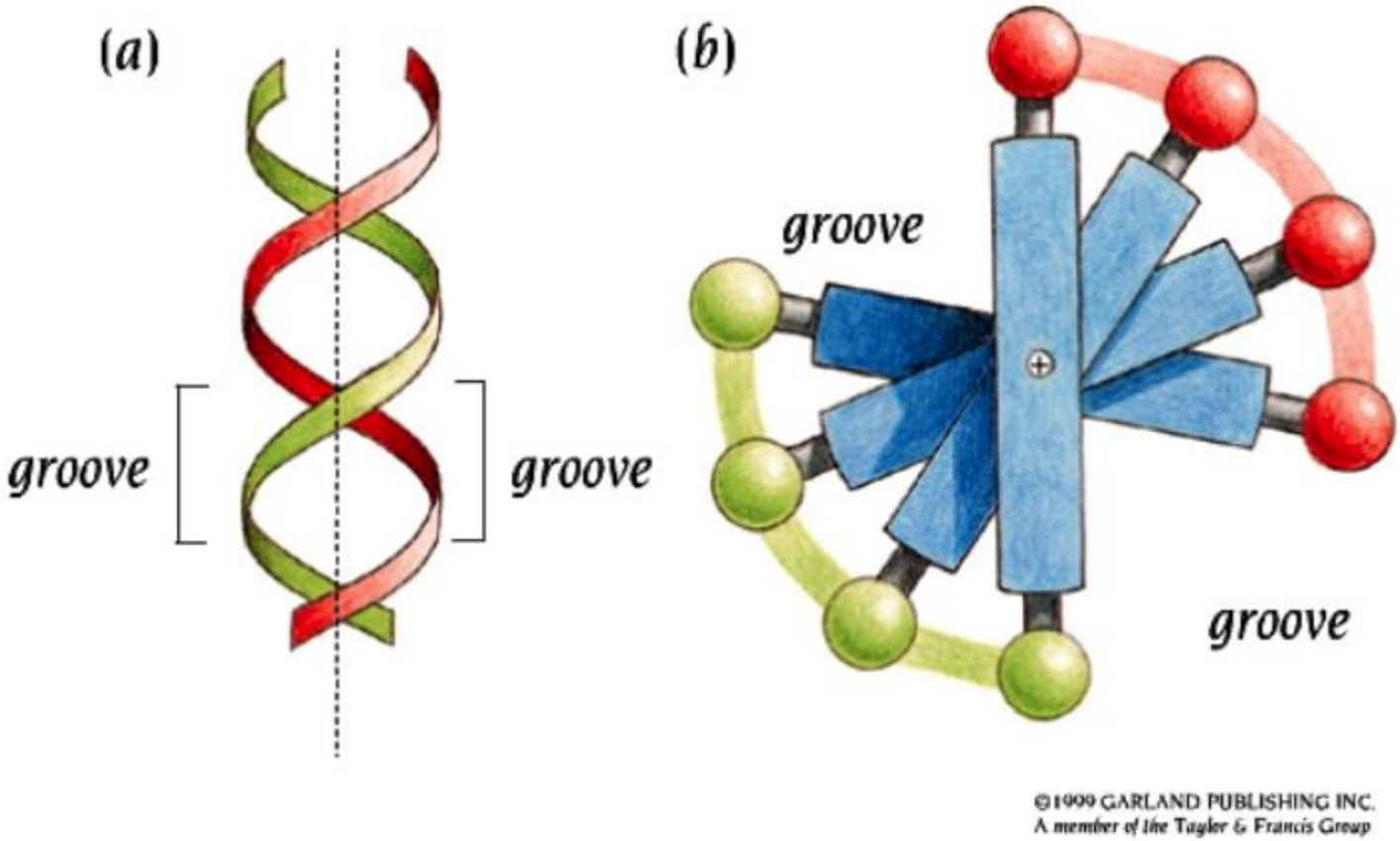




Perché nella doppia elica di DNA sono presenti due solchi di diversa ampiezza?



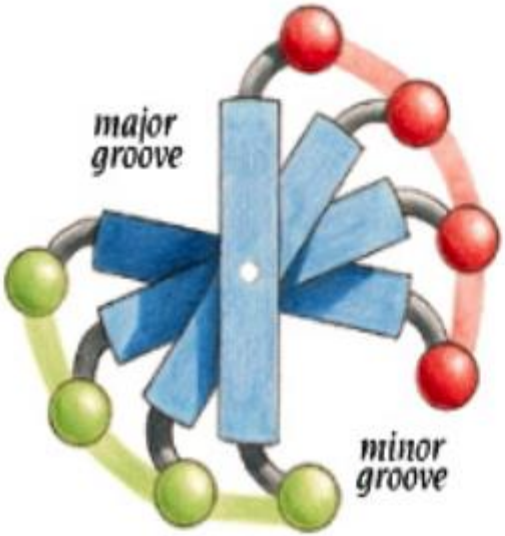
L' attacco simmetrico delle basi azotate allo zucchero dell' impalcatura darebbe luogo ad una doppia elica con due solchi di uguale ampiezza



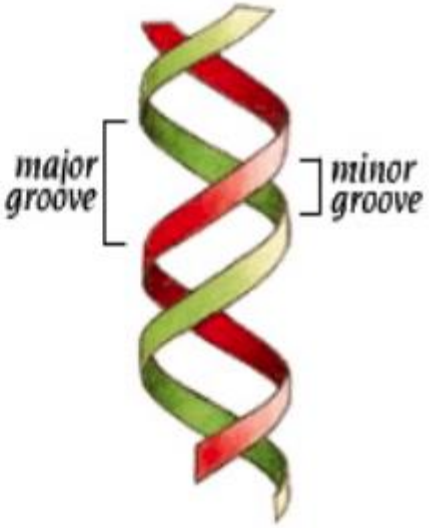
©1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group

L' attacco elle coppie di basi allo zucchero è asimmetrico.

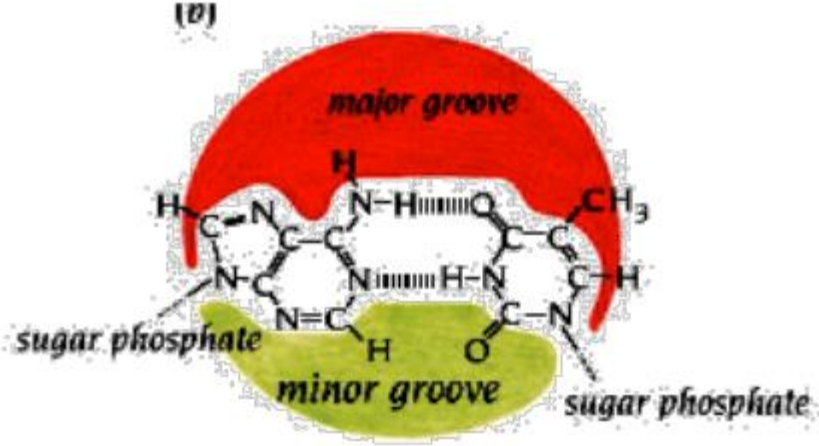
Il margine delle coppie di basi nella cui parte l' angolo tra i due punti di attacco è maggiore di 180° è detto margine del solco **MAGGIORE.**
Il margine delle coppie di basi nella cui parte l' angolo tra i due punti di attacco è minore di 180° è detto margine del solco **MINORE.**



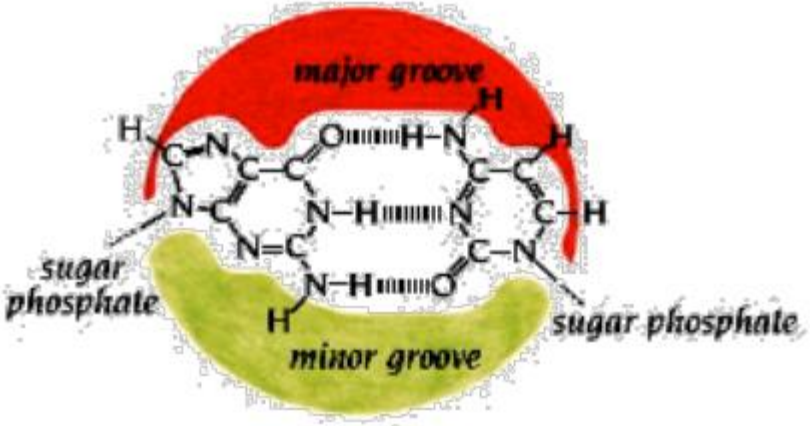
B-DNA



B-DNA

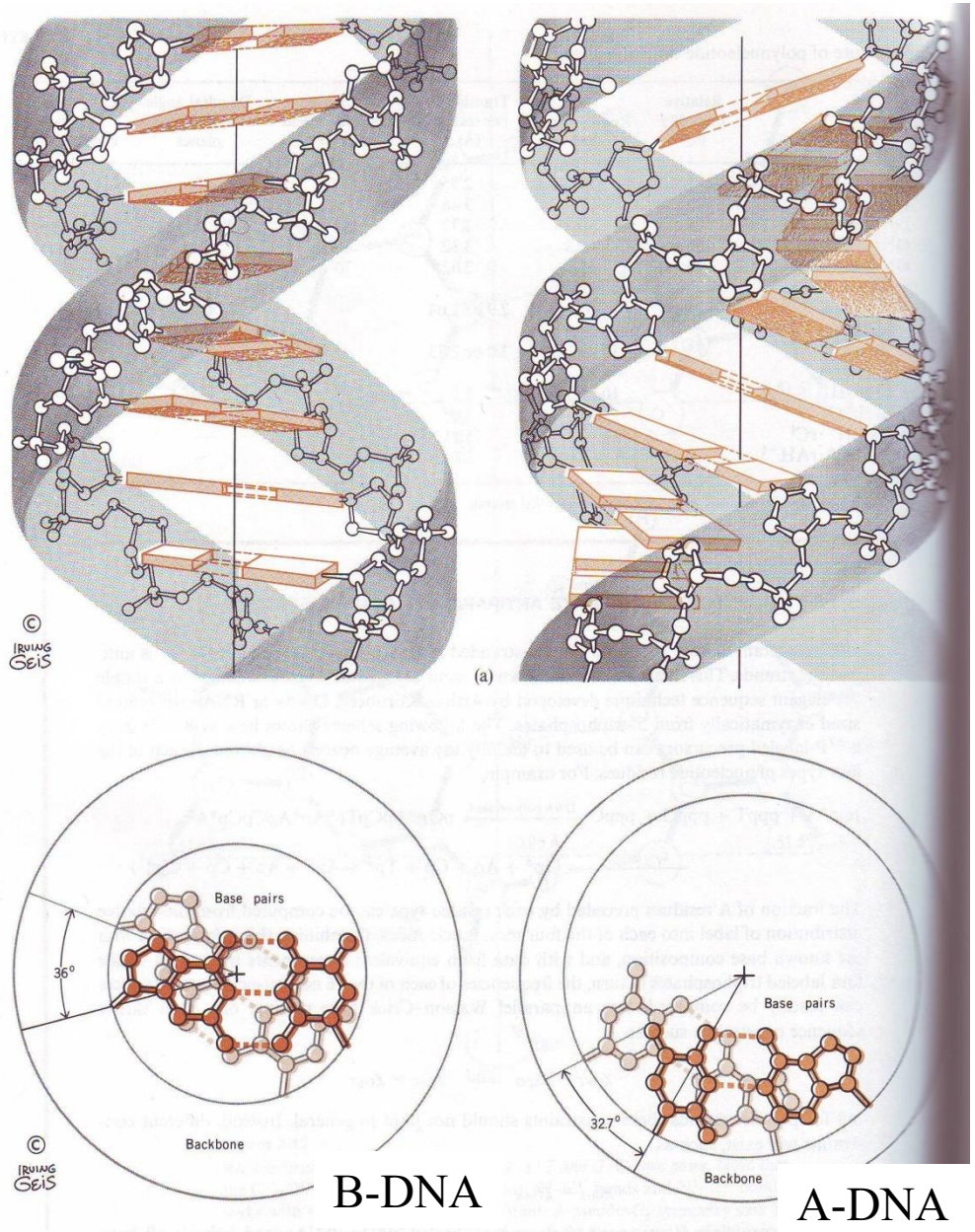


ADENINE : THYMINE



GUANINE : CYTOSINE

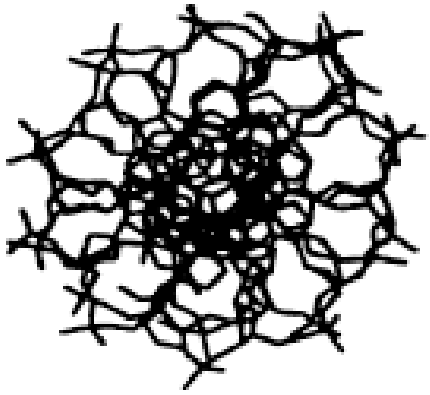
Struttura di Watson-Crick



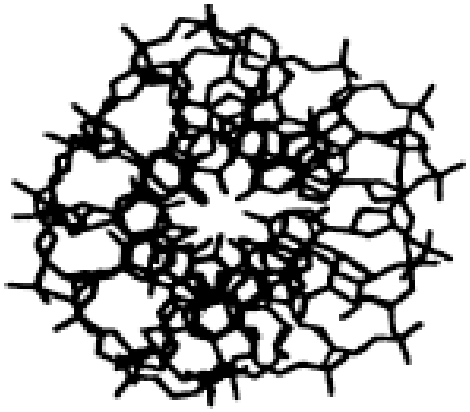
B-DNA

A-DNA

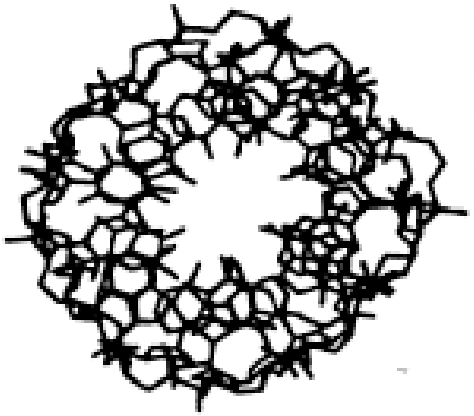
La transizione tra forma A e B del DNA avviene (per idratazione) nella scala dei tempi dei nanosecondi.



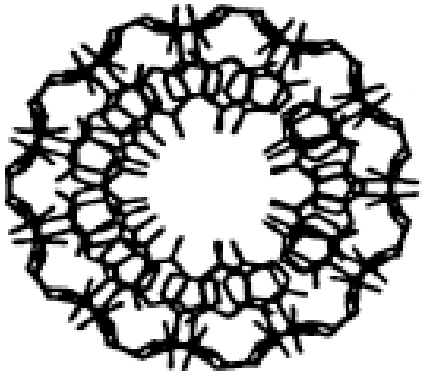
B-DNA (0 ns)



0.5 ns



2.0 ns



A-DNA (teorico)

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

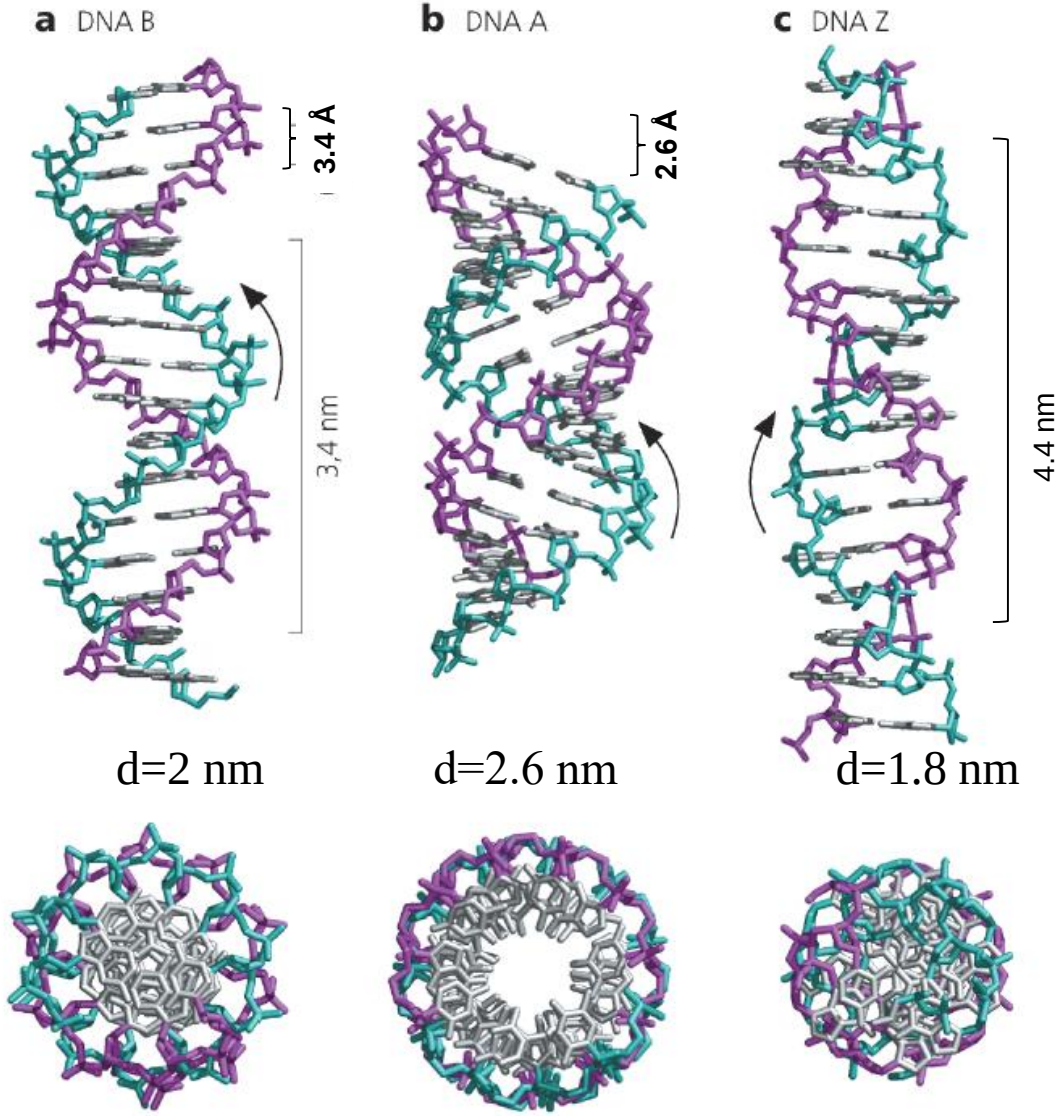


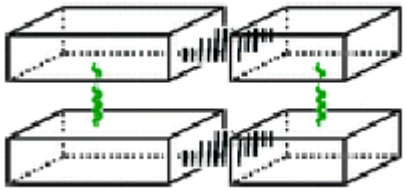
TABELLA RIASSUNTIVA

Confronto fra le forme A, B e Z

Caratteristiche generali comuni:

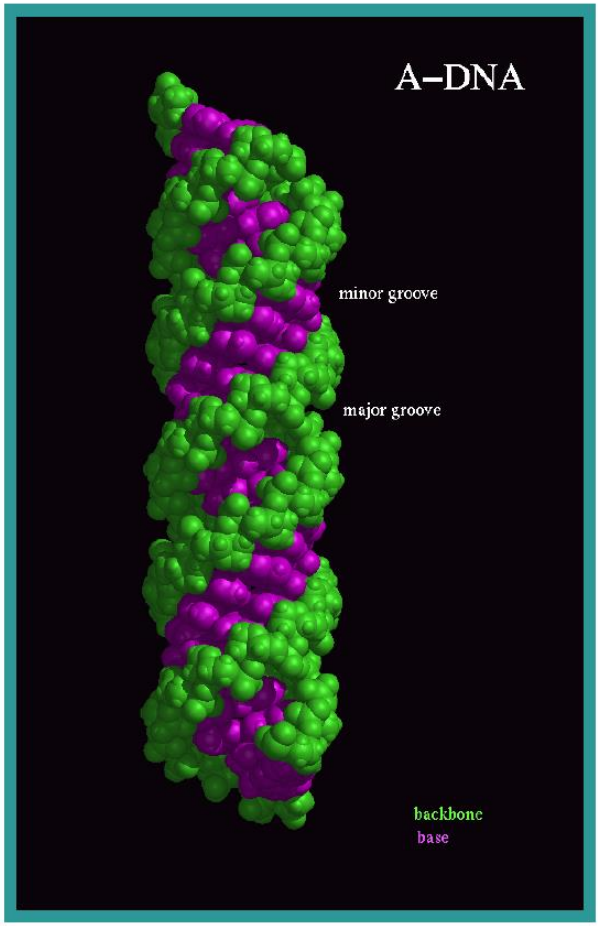
1. **Le due catene sono antiparallele**
2. **L'appaiamento delle basi è a geometria Watson-Crick**

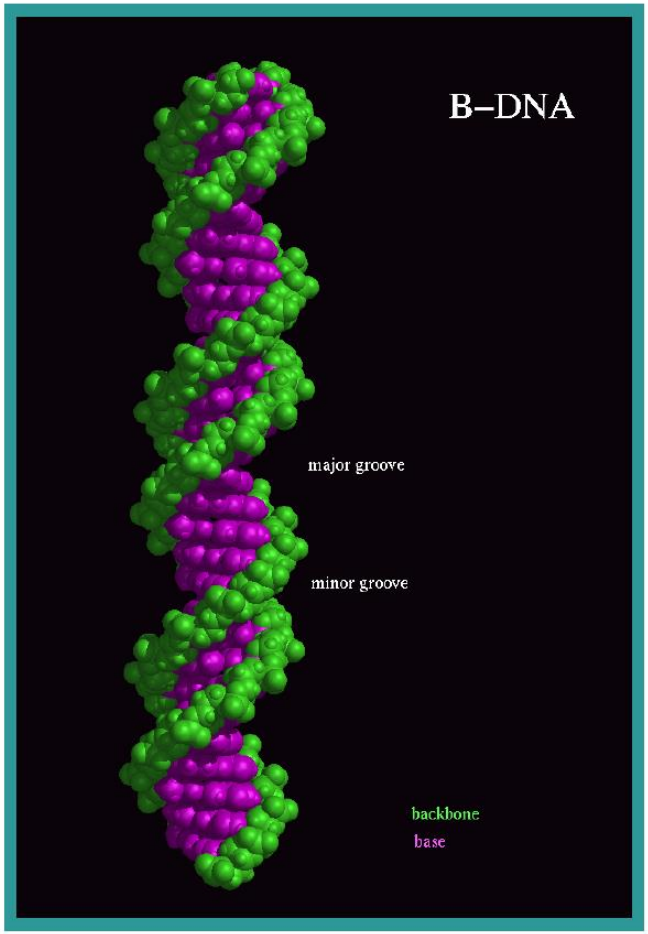
	Forma A	**Forma B**	**Forma Z**
Senso dell'elica	Destrorsa	Destrorsa	Sinistrorsa
Diametro	26 Å	20 Å	18 Å
Coppie basi/giro	11	10.5	12
Distanza fra le basi (Passo dell'elica)	2.6 Å (P=28.6 Å)	3.4 Å (P=36 Å)	3.7 Å (P=44.4 Å)
Piegamento basi rispetto alla normale all'asse	20°	6°	7°
Solco maggiore **Solco minore**	stretto, profondo largo, poco prof.	largo, medio stretto, medio	assente stretto, profondo
Conformazione	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (Pyr)
Conformazione legame N-glicosidico	Anti	Anti	**Syn (Pur) Anti (Pyr)**



3.4Å

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

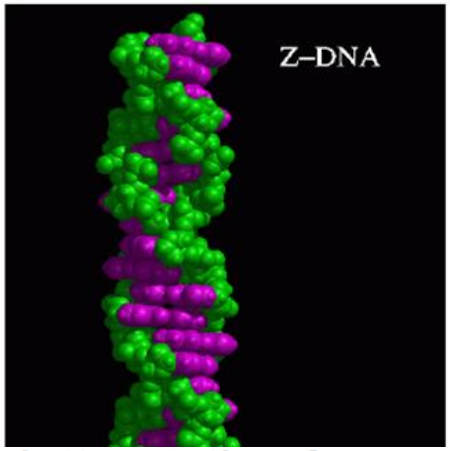




Struttura DNA

DNA Z

- polinucleotidi complementari con che alternano purine a pirimidine ad alta concentrazione di sali assumono conformazione Z



- **Elica sinistrorsa**
- **Passo = 44.4 Å**
- **Dist. Basi = 3.7 Å**
- **Coppia di basi / giro = 12**

- **Un solo solco più stretto e profondo**

- il sale stabilizza la struttura Z riducendo la repulsione elettrostatica fra i gruppi fosfati dei filamenti opposti (nell'elica Z sono più vicini rispetto all'elica B: 8 Å *vs* 12 Å)

RIASSUMENDO:

Stabilizzano la doppia elica:

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

Destabilizzano la doppia elica:

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

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

...un calcolo interessante:

Se lo spessore medio delle basi è 3.4 Å
e il DNA umano è di $3x10^9$ bp

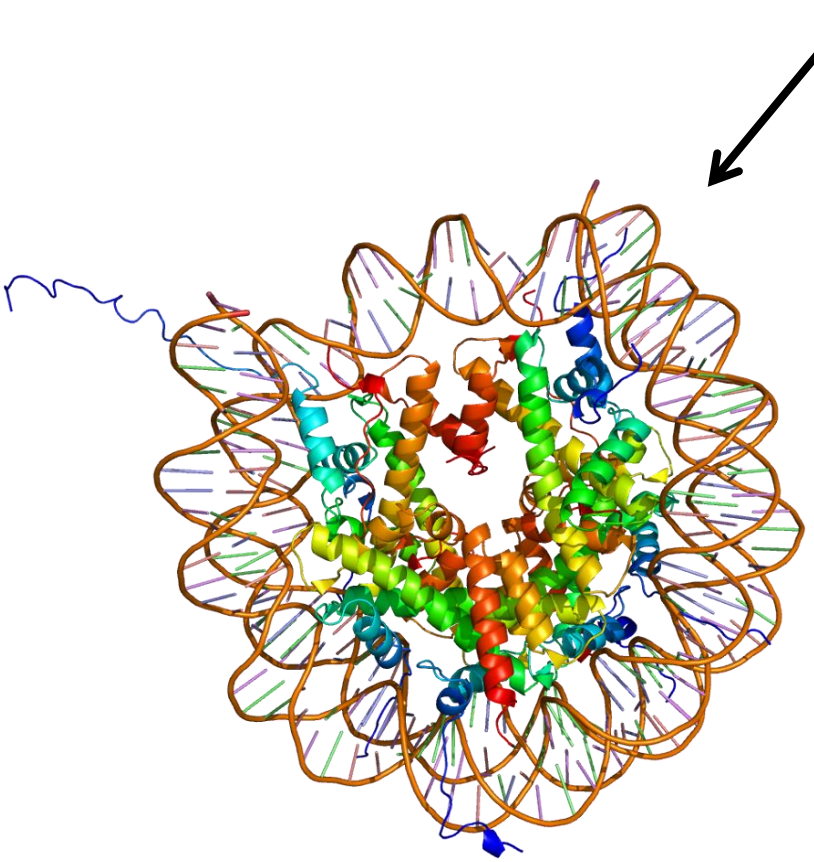
La lunghezza media di una doppia elica sarà:

L= $3x10^9$ bp x 0.34 (m=nm x 10^{-9}) = 1.02 m !!!

La domanda ovvia a questo punto è:

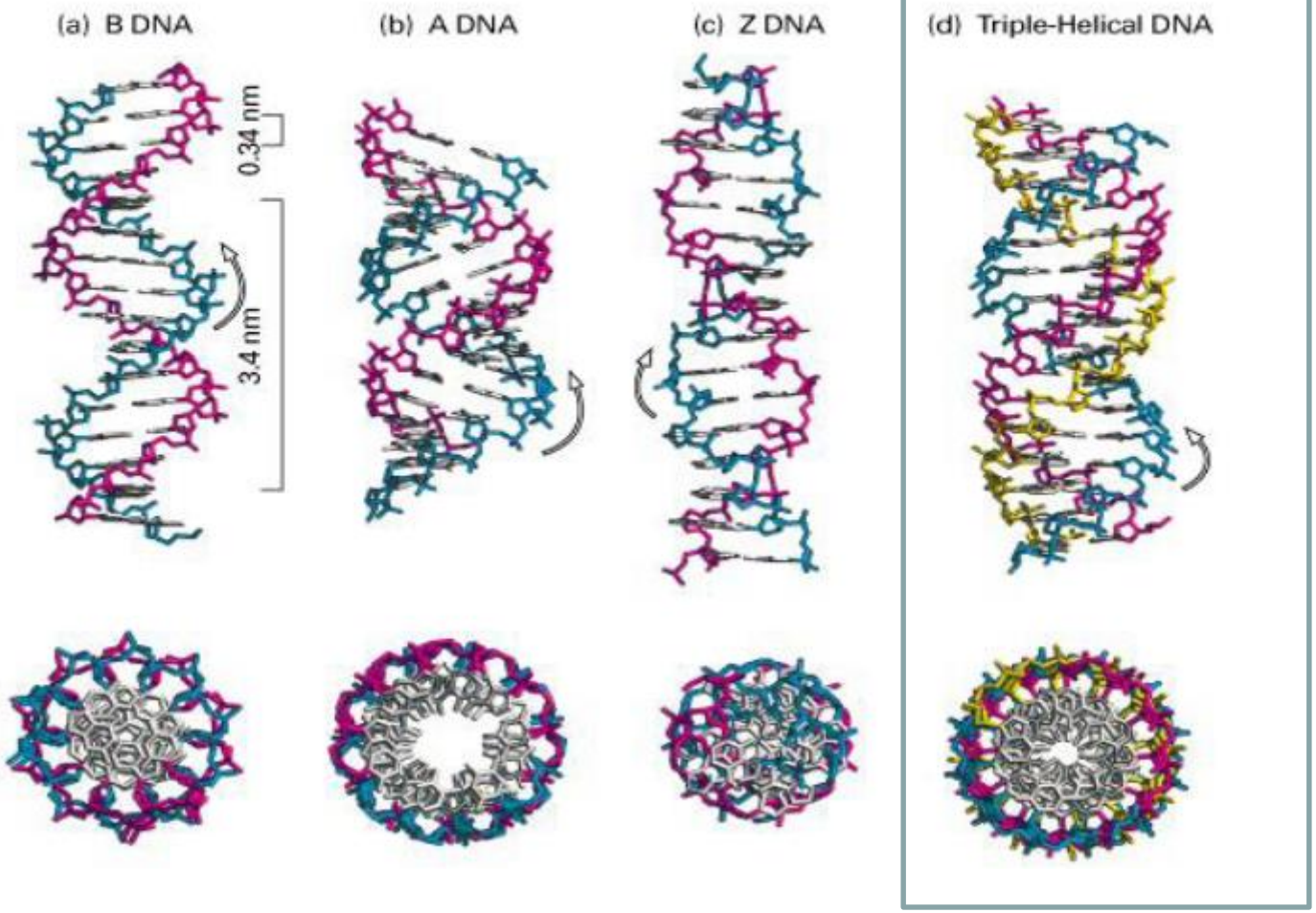
ma come può starci 1 metro di DNA all'interno del nucleo cellulare, le cui dimensioni sono di circa 6-8 µm?

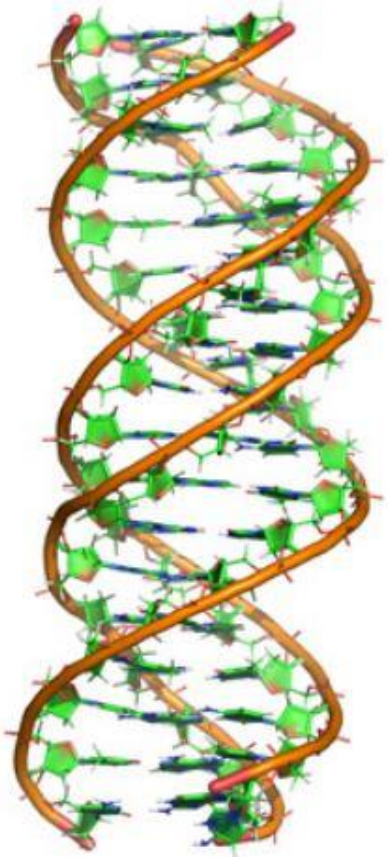
La risposta è che il DNA, il cui spessore è comunque di circa 2 nm, è impacchettato e **superavvolto** su strutture proteiche particolari (basiche) denominate **istoni,** formando i **nucleosomi (11 nm)**.

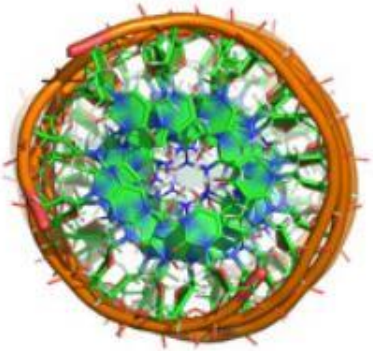


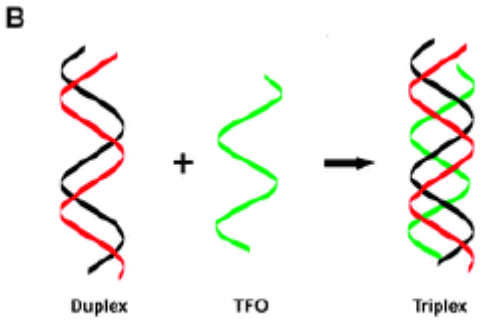
Questi istoni, presenti in tutte le cellule eucariotiche, hanno la caratteristica di essere proteine basiche, quindi con parziale carica positiva, il che permette un naturale avvolgimento su di esse del DNA

DNA forms









MolecularLab.it

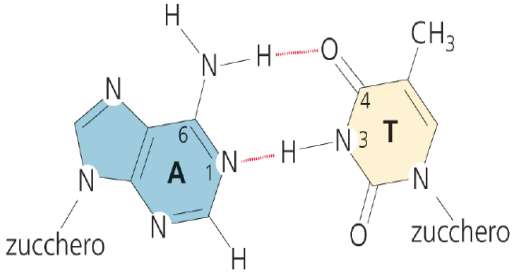
L'**appaiamento di Hoogsteen** per A-T prevede la base purinica ribaltata con l'-NH_2 in posizione 6 e l'N in posizione 7 dell'adenina che formano legami idrogeno rispettivamente con l'O in posizione 4 e l'H in posizione 1 della timina. (L'N-7 dell'adenina diventa accettore e l'NH2 – 6 donatore per la formazione del legame idrogeno, portando così ad una struttura contorta con disposizione non lineare).

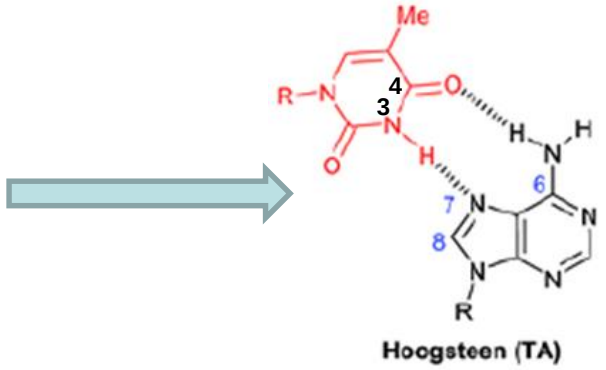
Allo stesso modo, il ribaltamento si può verificare anche per G–C. In questa coppia di basi l'appaiamento di Hoogsteen prevede l'O in posizione 6 e l'N in posizione 7 della guanina a formare dei legami idrogeno rispettivamente con l'-NH_2 in posizione 4 e l'N protonato in posizione 1 della citosina.

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

Le tre forme di DNA A, B e Z sono dette duplex, in quanto coinvolgono due filamenti nucleotidici. Sono state osservate però strutture di tipo triplex e quadruplex, nelle quali rispettivamente tre e quattro tratti deossiribosio-fosfodiestere (strands) interagiscono tra loro.

Alla base di queste vi è la formazione di legami ad idrogeno diversi rispetto al caso del DNA duplex, in particolare con i gruppi funzionali localizzati nel solco maggiore delle strutture a due filamenti. Queste interazioni deboli, non previste nel modello di Watson e Crick, sono note col nome di **appaiamenti di Hoogsteen** , descritti per la prima volta nel 1963.





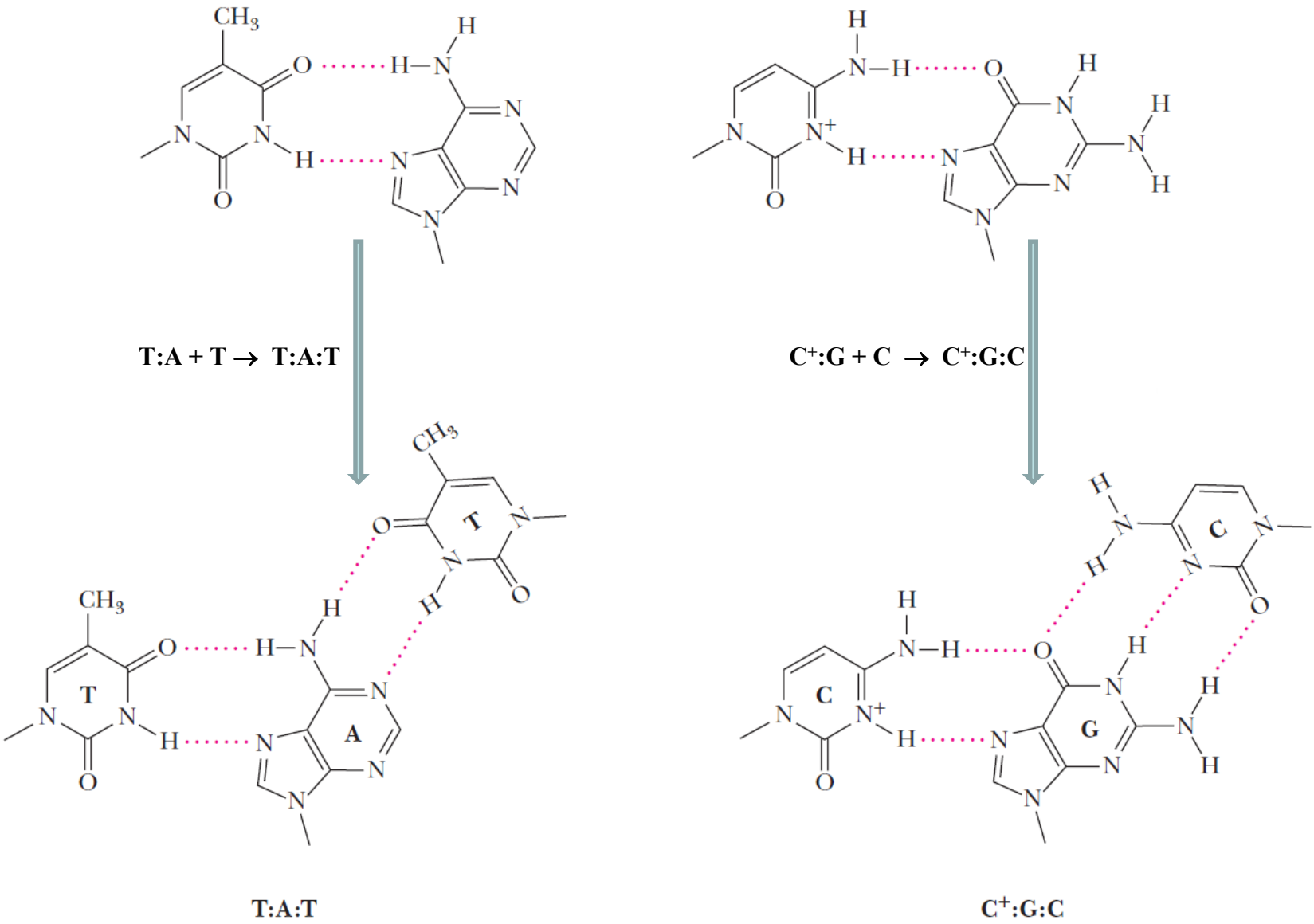
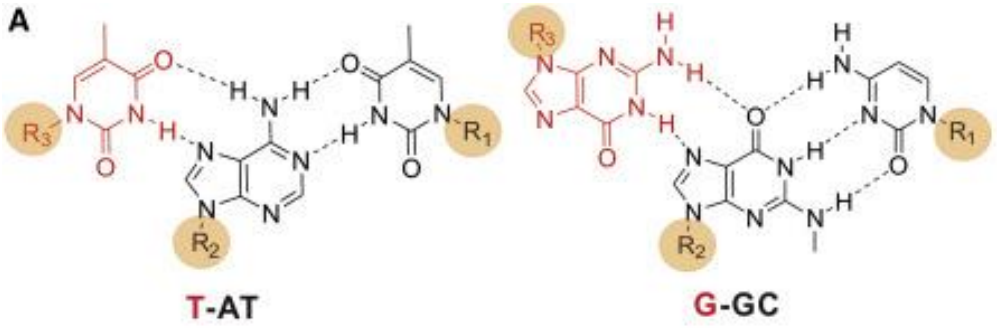


FIGURE 11.18 Base triplets formed when a purine interacts with one pyrimidine by Hoogsteen base pairing and another by Watson–Crick base pairing.

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



C

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

REF: Li Y, Syed J, Sugiyama H. (2016) **RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs.** *Cell Chem Biol*

2016

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

Cell Chemical Biology

Review

CellPress

RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs

Yue Li,[1] Junetha Syed,[1] and Hiroshi Sugiyama[1,2,*]

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

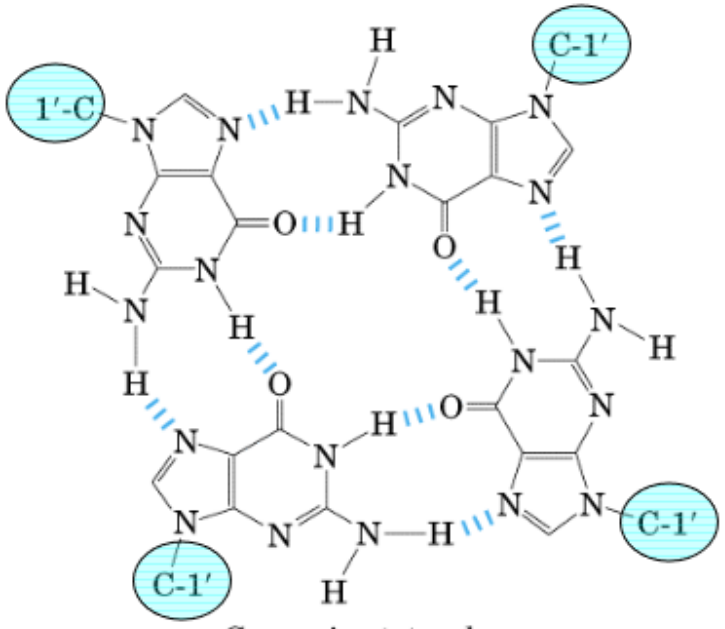
[2]Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-ushinomiyacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

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

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

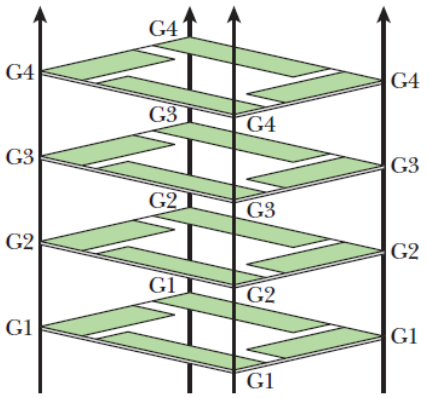
Long noncoding RNAs (lncRNAs) play a pivotal role in the regulation of biological processes through various mechanisms that are not fully understood. Proposed mechanisms include regulation based on RNA-protein interactions, as well as RNA-RNA interactions and RNA-DNA interactions. Here, we focus on one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

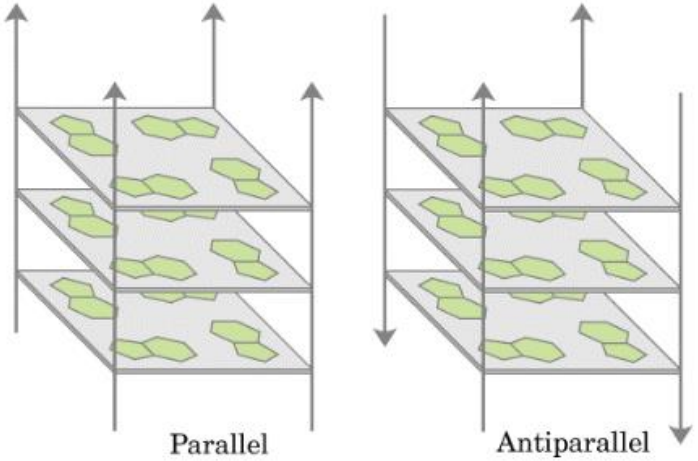
DNA Quadruplex



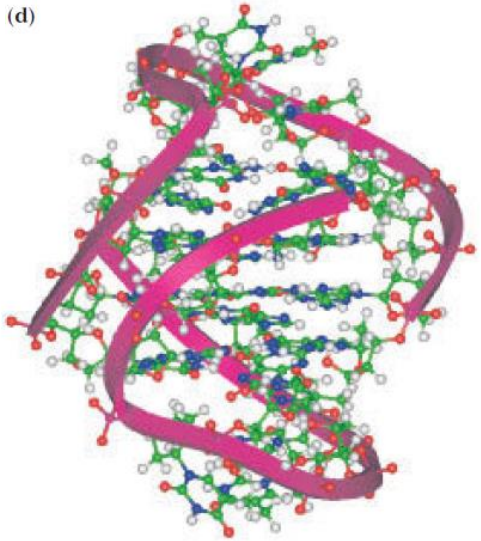
Guanosine tetraplex

(b)





(d)



Struttura DNA

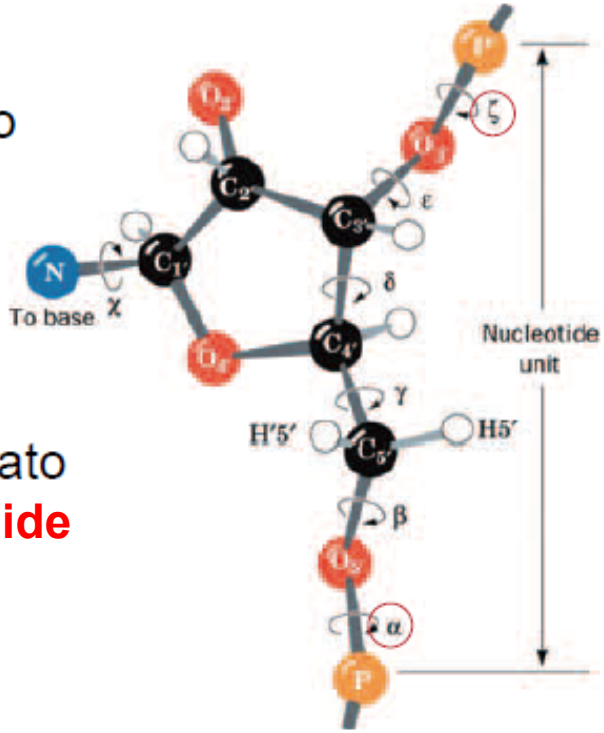
Limitata flessibilità del DNA

- lo scheletro **zucchero-fosfato** ha costrizioni conformazionali (angoli α e ζ)

- interazioni non-covalenti tra anello di ribosio e gruppi fosforici

- interferenze steriche tra residui vicini (nei polinucleotidi)

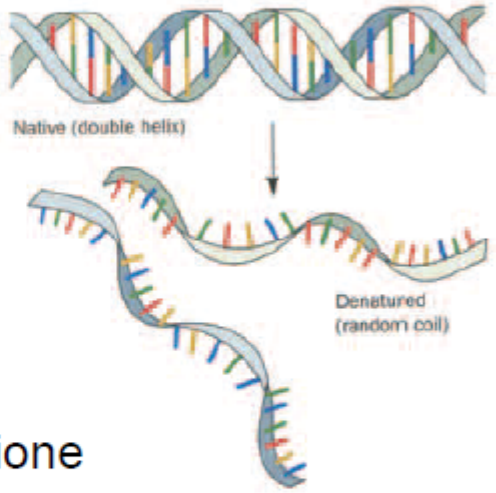
$\Rightarrow$ le catene costituite da unità zucchero-fosfato nelle doppie eliche sono ***relativamente*** **rigide**



complessità strutturale del DNA inferiore a quello delle proteine

Denaturazione

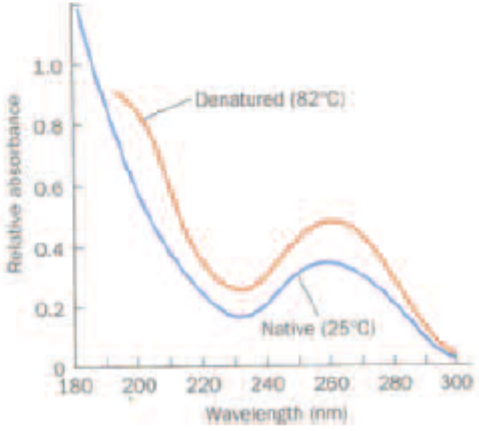
riscaldamento DNA duplex



⇒ si separano le 2 catene complementari
che assumono conformazioni casuali

⇒ diminuzione drastica della viscosità della soluzione

⇒ aumento del 40% dell'assorbimento
di luce ultravioletta (a causa della rottura
delle interazioni elettroniche tra basi vicine)



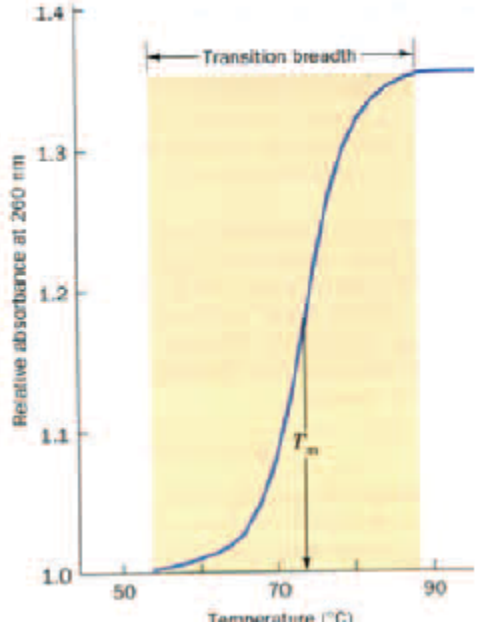
Denaturazione

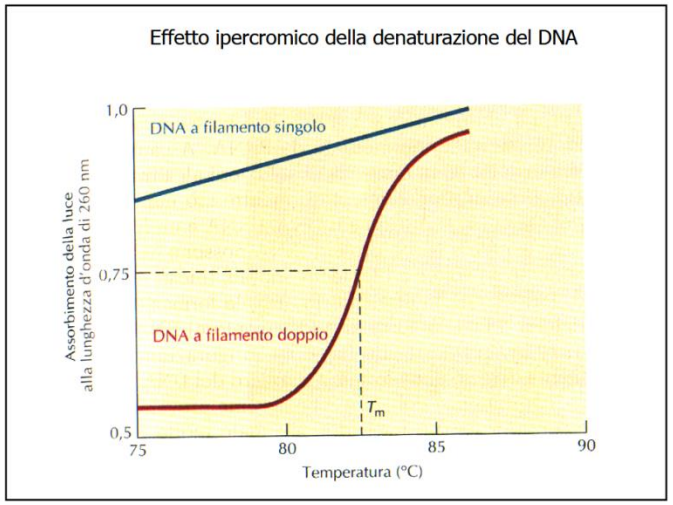
- brusco incremento nell'assorbimento della luce (di solito a 260 nm) in un ristretto intervallo di T

  ⇒ la denaturazione del DNA è un fenomeno cooperativo in cui il collasso di una parte della struttura destabilizza la parte rimanente

- l'aumento dell'assorbanza è noto come "effetto ipercromico"

- l'assorbimento relativo è il rapporto tra l'assorbimento della luce a 260 nm a T indicata rispetto a quello a T = 25 °C





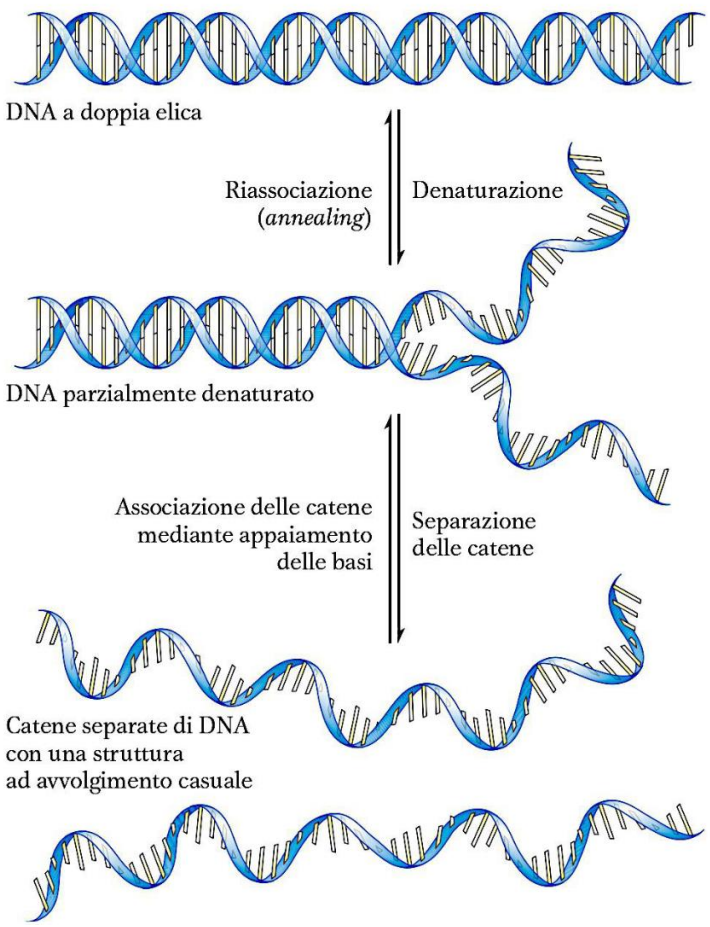
Il pH e le temperature estreme provocano la denaturazione del DNA interrompendo i legami H e l'impilamento delle basi.

Questo provoca la separazione parziale o totale in due filamenti singoli.

I legami covalenti NON vengono interrotti.

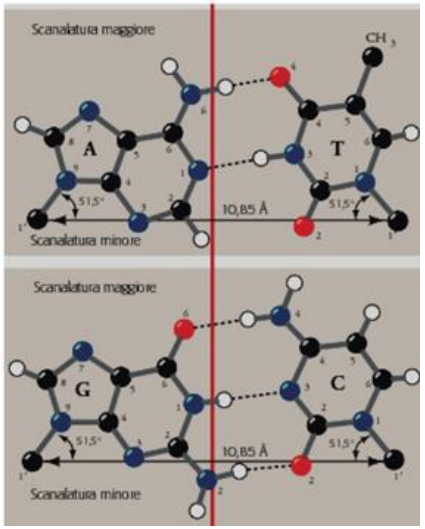
Quando T e/o pH tornano alla normalità i filamenti si riassociano.

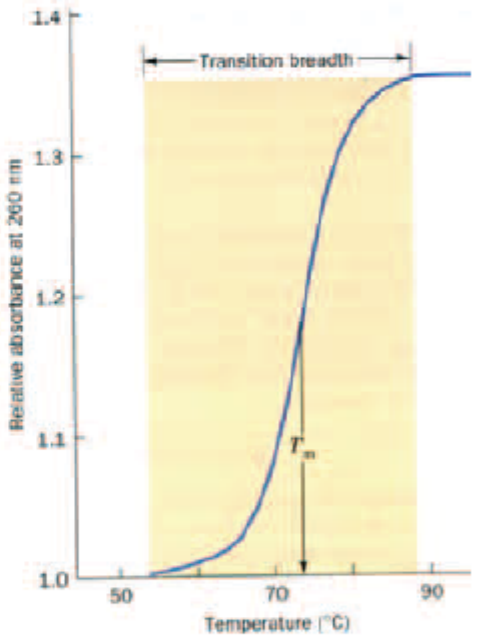
Il DNA si denatura reversibilmente.
Se la denaturazione è stata parziale, la riassociazione è più rapida: come una cerniera



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

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



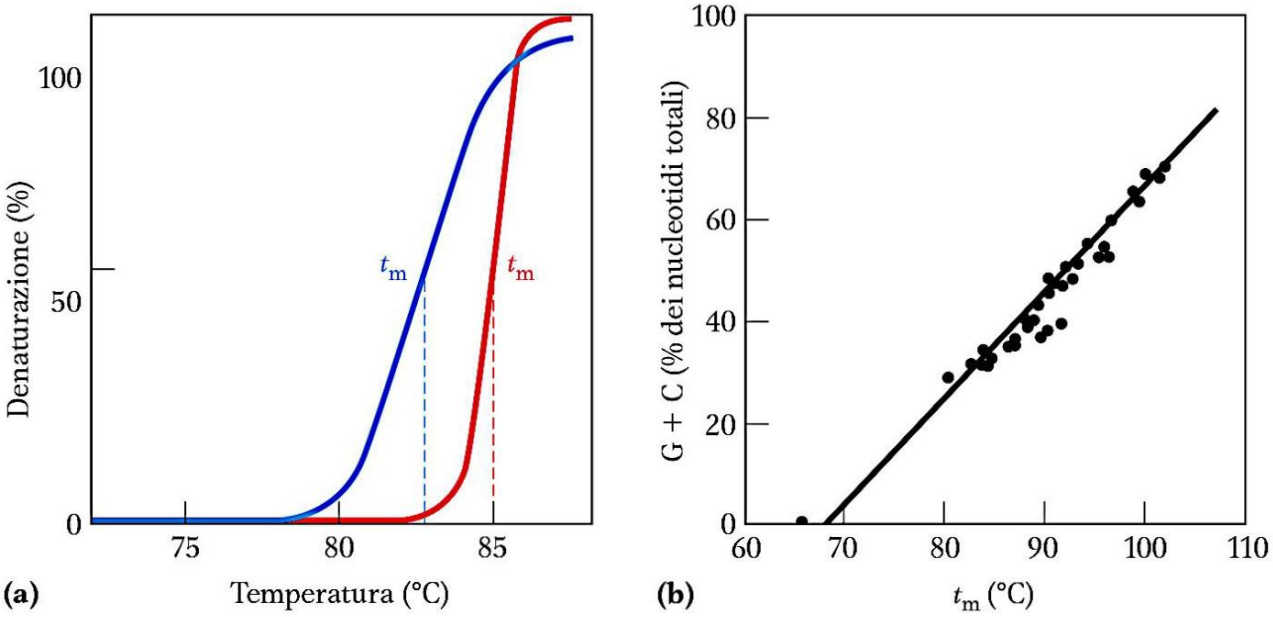


Tm temperatura a cui si raggiunge la metà dell'aumento dell'assorbimento totale della luce UV

Ogni specie di DNA ha una caratteristica temperatura di denaturazione o punto di fusione T_m dato dal punto di flesso della curva.

Il punto di fusione è tanto più elevato quanto più è alto il numero di coppie G : C.

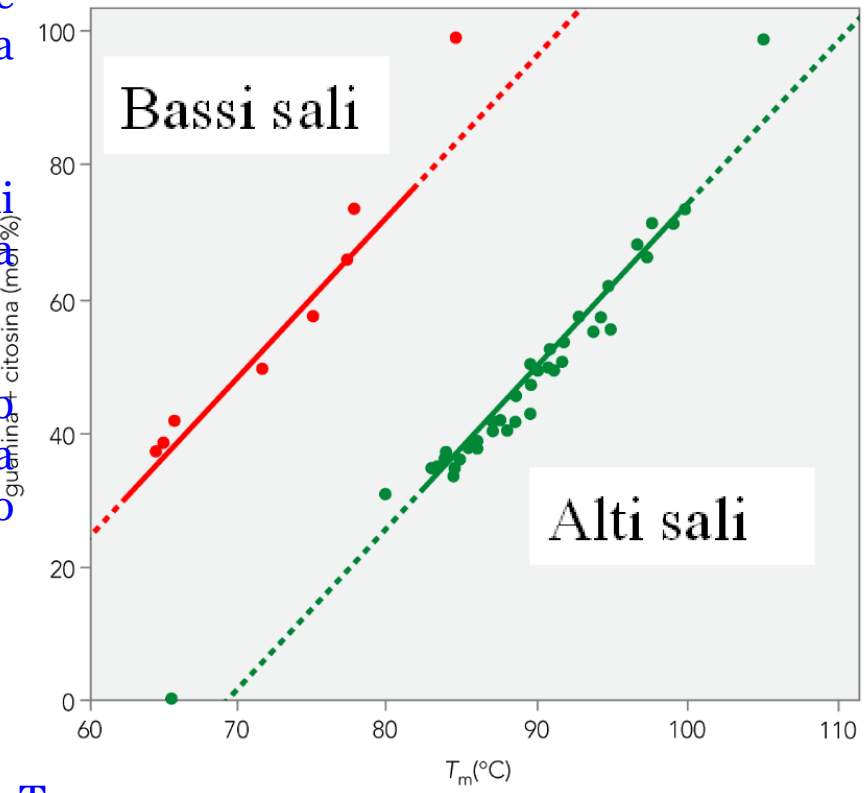
Questo dipende dal fatto che le coppie G : C formano tre legami H mentre le coppie A : T solo due e quindi richiedono più energia per la loro separazione.



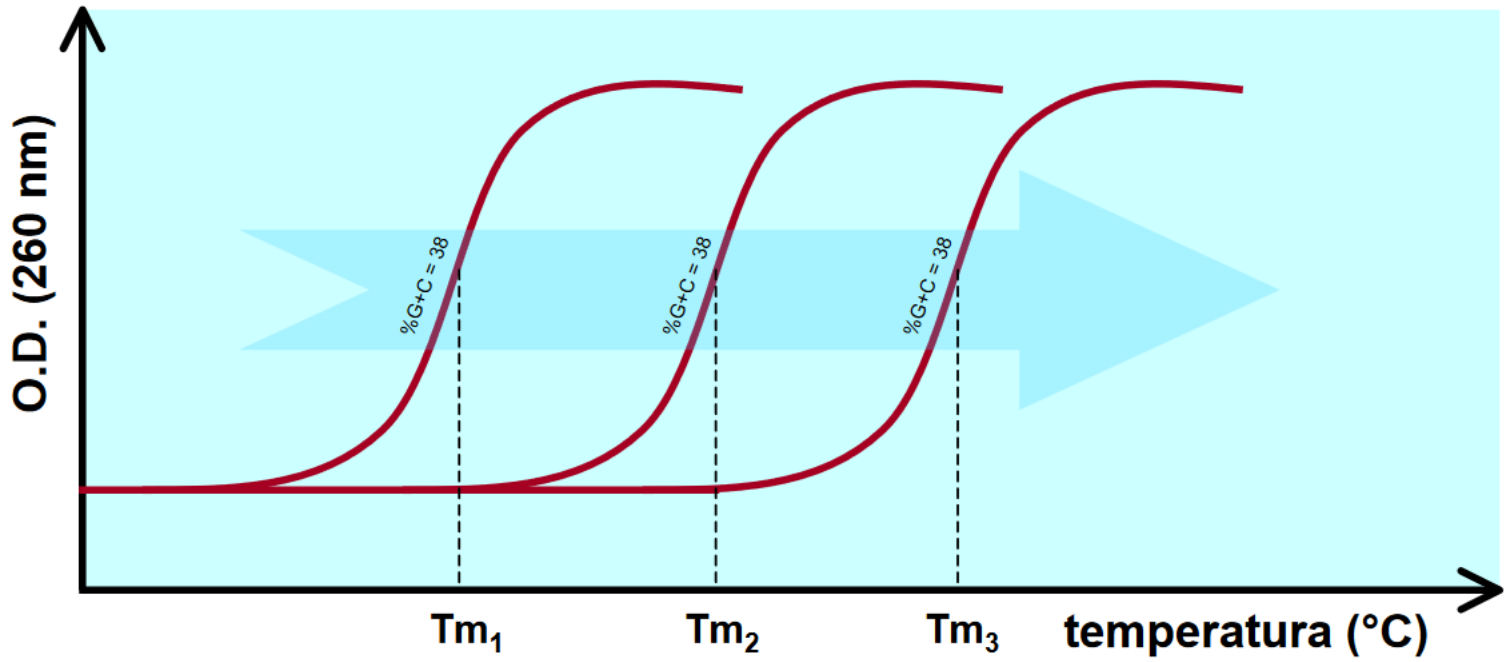
Ogni DNA ha una T_m caratteristica, che cresce linearmente con la % di coppie GC e la forza ionica della soluzione.

Ciò dipende dall'aumento del numero di legami a H e dall'aumento dell'energia di stacking della coppia GC rispetto a quella AT.

La **forza ionica** agisce con effetto di schermo esercitato dai cationi nei confronti della repulsione elettrostatica fra i gruppi fosfato (negativi) dei due filamenti vicini.



La forza ionica ha un profondo effetto su T_m.
Tra 0.01 M e 0.1 M: 16°C per ogni incremento di 10 volte della forza ionica.
I cationi divalenti hanno un effetto maggiore di quelli monovalenti.



Il valore di **Tm** per un dato DNA varia in funzione della **forza ionica** del mezzo. Più è elevata la concentrazione salina maggiore sarà la l'energia termica che dovrà essere fornita per denaturare la molecola di DNA.

Rinaturazione

raffreddamento DNA duplex

- se rapidamente sotto T_m $\Rightarrow$ parziale riappaiamento casuale delle basi

- se a ~ 25 °C sotto T_m (condizione di riassociazione o annealing)
  $\Rightarrow$ energia termica sufficiente per rinaturazione completa

In genere la denaturazione termica del DNA in soluzione è un processo molto rapido.

Per contro il processo inverso, la **rinaturazione** (riformazione del duplex) in seguito ad abbassamento della temperatura, è un processo la cui velocità (cinetica) può essere **estremamente variabile** a seconda della natura del DNA all'esame, andando da velocità non molto minori di quelle di denaturazione nel caso di oligonucleotidi, o DNA costituito da sequenze brevi ripetute, a velocità talmente basse da richiedere giorni o addirittura mesi per osservare un grado di rinaturazione apprezzabile.

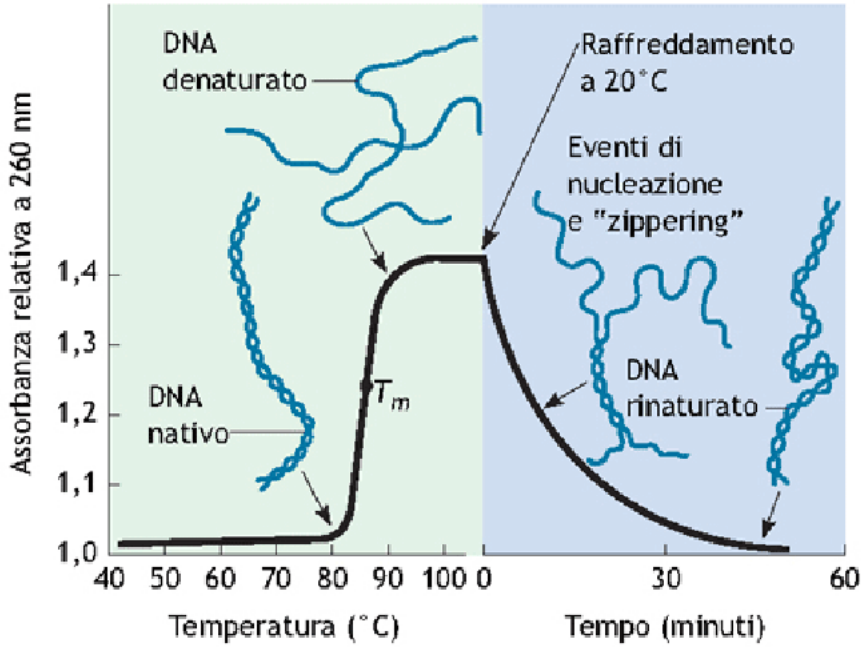


Figura 1.66 Denaturazione e rinaturazione del DNA. Riscaldando lentamente una soluzione di DNA nativo (a doppia elica), il DNA fonde, cioè le due eliche si separano. Quando la soluzione viene raffreddata si osserva una riassociazione delle due eliche con una cinetica che dipende dalla concentrazione iniziale del DNA e dalla sua lunghezza. I due filamenti si "urtano" e quando collidono tratti complementari c'è l'inizio della "nucleazione" e il successivo "zippering" delle basi complementari.

$$N = k*C_{bp}*t_{1/2}$$

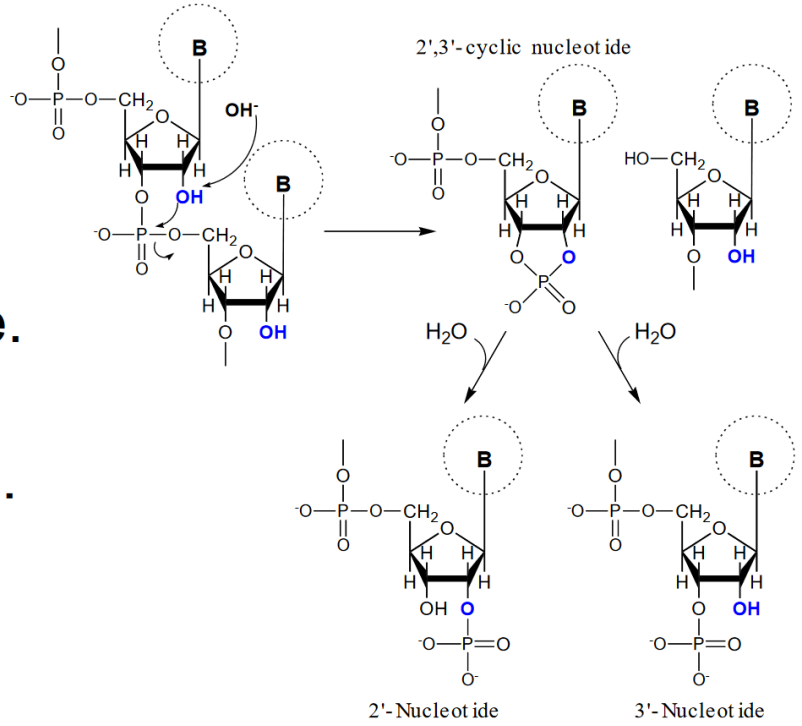
Stabilità dei polinucleotidi

- I polinucleotidi sono più instabili dei nucleotidi, ma il processo di idrolisi è, fortunatamente, molto lento *in vivo* e *in vitro* nelle condizioni di pH neutro.

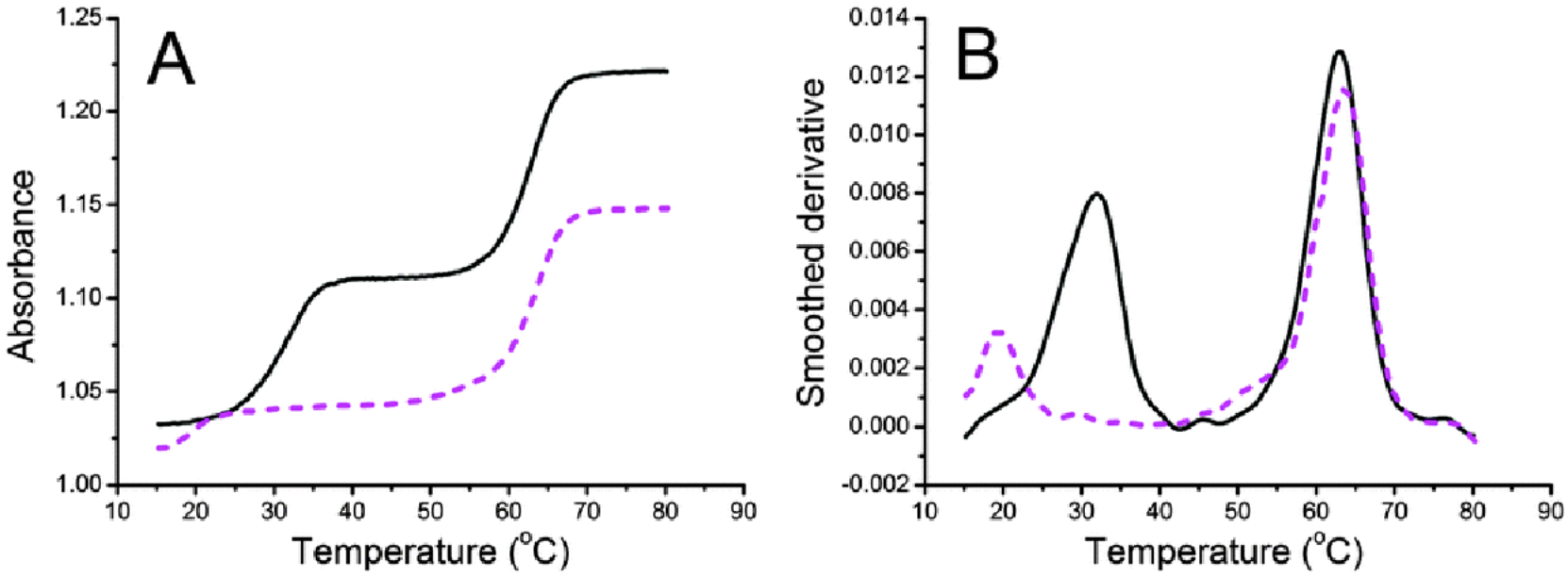
- In presenza di catalizzatori, l'idrolisi può essere rapida.
  - **Catalisi acida**: genera miscele di nucleotidi
  - **Condizioni fortemente acide**: idrolisi anche del legame glucosidico
  - **Catalisi basica**: funziona solo sull'RNA (non sul DNA) generando miscele di 2 e 3 nucleotidi
  - **Catalisi con nucleasi**: *rottura del lagame fosfodiestere*

Idrolisi alcalina dell'RNA

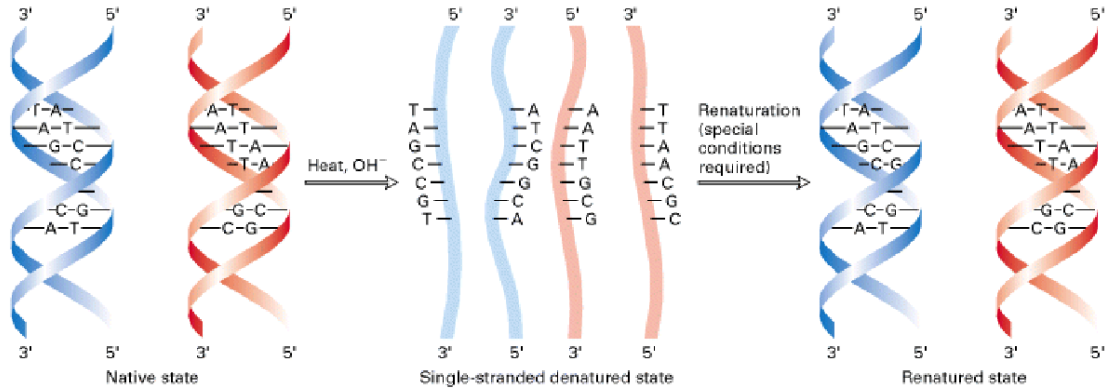
- RNA suscettibile di idrolisi catalizzata dalle basi.
- DNA non suscettibile.
- Idrolisi facilitata dal gruppo ossidrile al 2'.

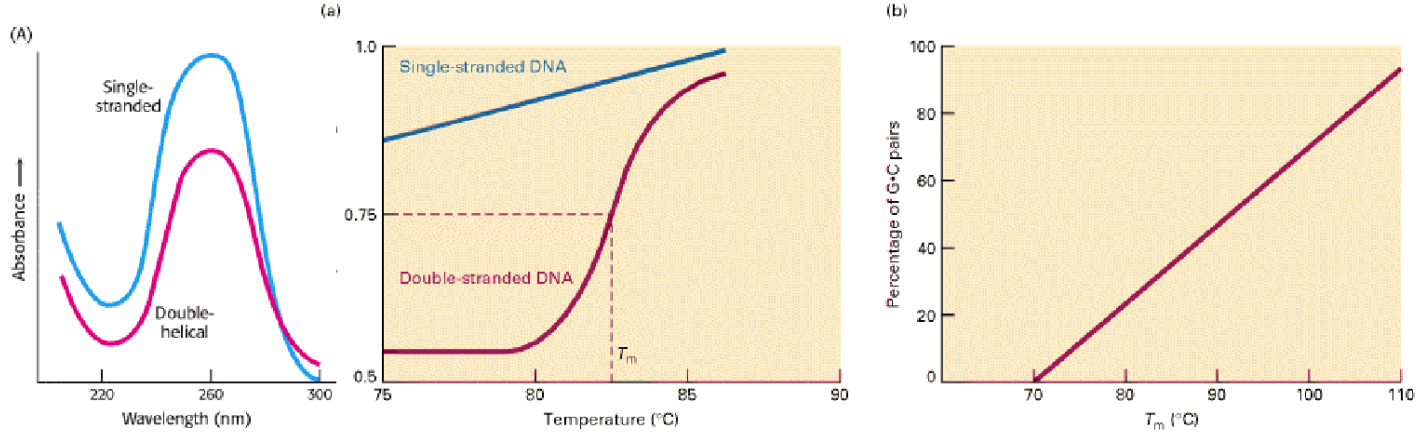


Transizione duplex-triplex



RIASSUMENDO……





Forze che stabilizzano la struttura degli acidi nucleici

Stabilizzazione: impilamento delle basi (stacking)

- i legami a H sono alla base delle interazioni di appaiamento delle basi (specificità di appaiamento nel DNA)

- i legami a H contribuiscono poco alla stabilità (in condizioni di denaturazione sono rimpiazzati da legami H con molecole di H_2O)

⇒ altri tipi di forze

- organizzazione impilate delle strutture planari delle basi puriniche e pirimidiniche (interazioni di van der Waals)

- le **energie di impilamento** variano con il contenuto delle basi:

  ⇒ (interazioni tra le basi G e C impilate più resistenti di quelle fra le basi A e T ⇒ maggior stabilità termica DNA ad alto contenuto G + C)

  ⇒ energia di impilamento di una doppia elica è sequenza dipendente

Forze che stabilizzano la struttura degli acidi nucleici

Gli effetti di stacking sono molto importanti per tenere insieme le due catene

Dinucleotide Pairs	Stacking Energy (kJ/mol dinucleotide)
C·G / G·C	−60.15
C·G / A·T + T·A / G·C	−43.33
C·G / T·A + A·T / G·C	−40.45
G·C / C·G	−39.95
G·C / G·C + C·G / C·G	−34.06
T·A / A·T	−27.09
G·C / T·A + A·T / C·G	−27.09
G·C / A·T + T·A / C·G	−27.95
A·T / A·T + T·A / T·A	−22.14
A·T / T·A	−15.75

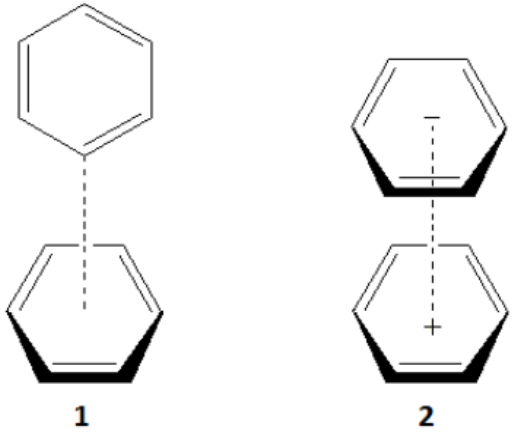
Interazioni π-π stacking

L'interazione π-π di stacking è un legame non covalente che si instaura tra due composti aromatici, soprattutto nel caso che uno di loro risulti elettron-ricco, l'altro elettron-povero.

Esistono 2 tipologie di interazioni π-π stacking:

1. "edge to face"

2. "face to face"



La tipologia "face to face" vede i sistemi aromatici disporsi parallelamente e sovrapposti secondo i piani identificati dalle molecole stesse; le interazioni avverranno in modo tale che le polarità presenti sulle molecole interagenti siano disposte in maniera da generare attrazione.

La tipologia "edge to face", invece, rende conto di un'interazione tra sistemi aromatici che si dispongono perpendicolarmente, cosicché le parti di segno opposto, presenti come quadrupoli permanenti su tali molecole, interagiscano fra loro.

Nel caso limite si può arrivare ad avere un vero e proprio trasferimento di carica dalla specie elettron-ricca a quella elettron-povera con conseguente formazione di un sale.

Forze che stabilizzano la struttura degli acidi nucleici

Stabilizzazione: interazioni ioniche

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

Esempio:

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

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

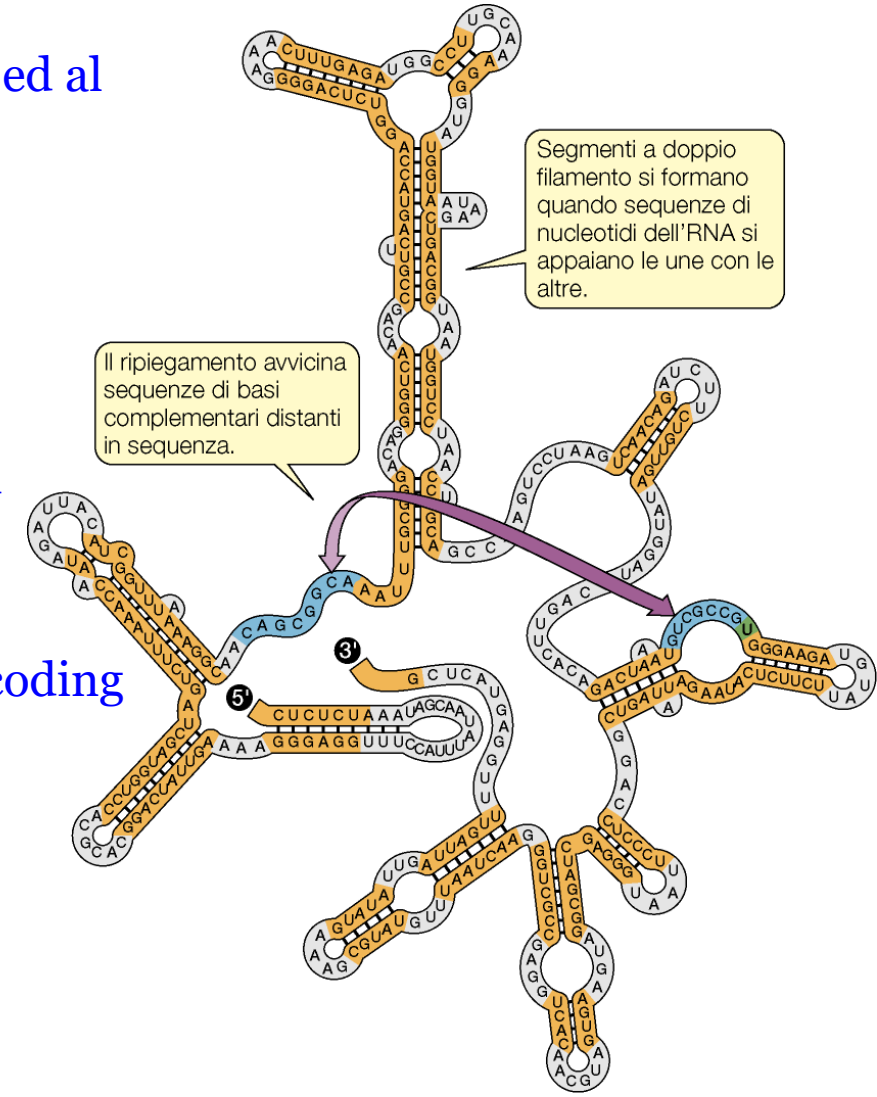
$\Rightarrow$ più efficaci di quelli monovalenti nello schermare i gruppi fosforici

- gli enzimi che mediano reazioni con acidi nucleici e nucleotidi quasi sempre richiedono Mg^{2+} come cofattore

- gli ioni Mg^{2+} contribuiscono a stabilizzare le complesse strutture assunte da molti tipi di RNA

GLI ACIDI NUCLEICI - RNA

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



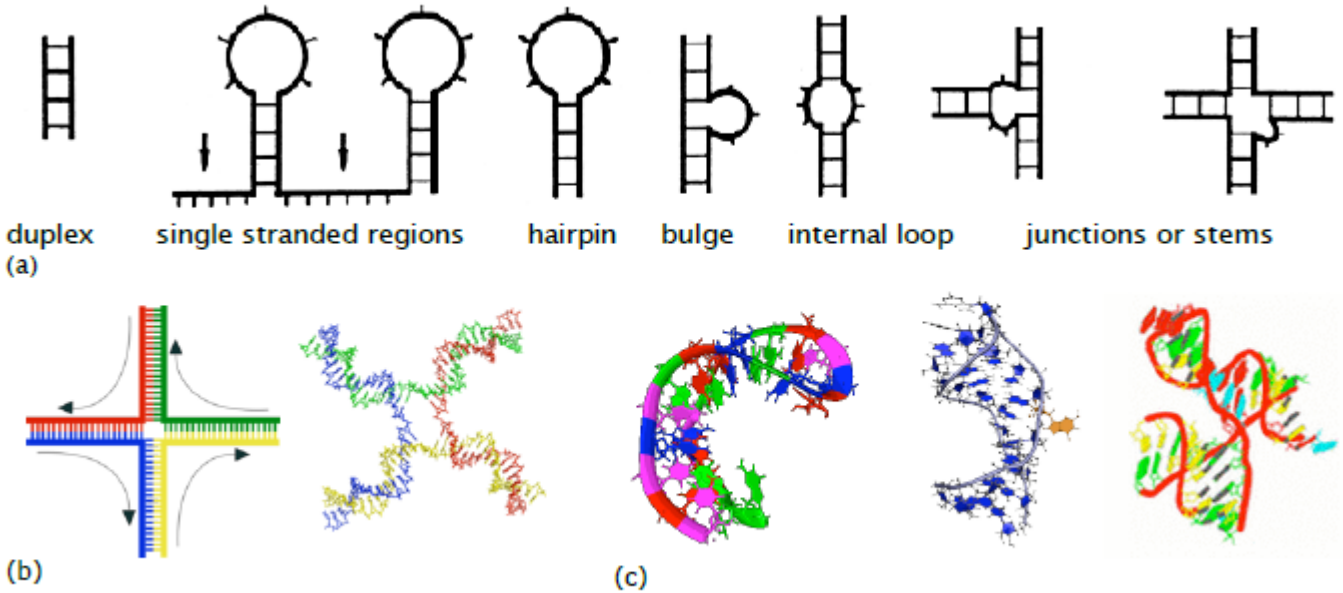
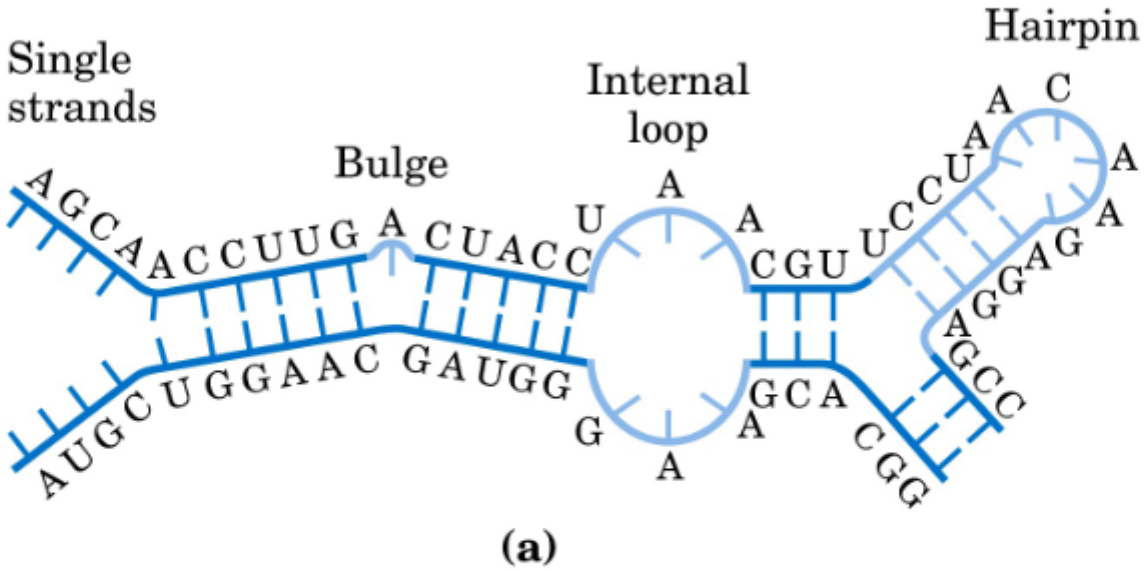


Fig 3.4 (a) Schema della topologia dei motivi strutturali secondari tipici. (b) Giunzione di Holliday, tipica in DNA. (c) Rappresentazione 3D di un hairpin, un loop interno e una giunzione tripla in RNA

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

Tipi di strutture secondarie nell'RNA



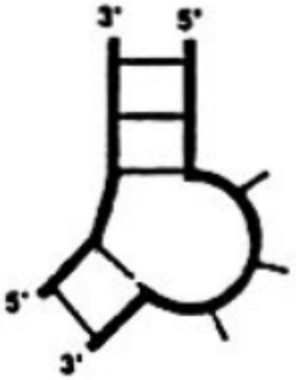
Tipi di strutture secondarie nell'RNA

Singolo filamento

Doppio filamento
Elica (forma A)

Bulge loop singolo

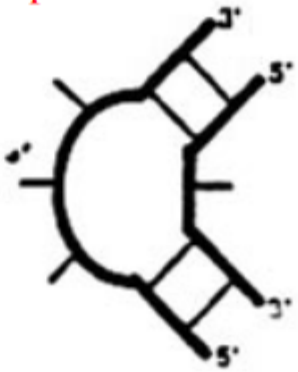
Bulge loop multiplo



Stem and loop
Hairpin loop

Loop interno simmetrico

Loop interno asimmetrico



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

Differenze tra le strutture secondarie e terziarie: alcuni esempi

Secondary structures

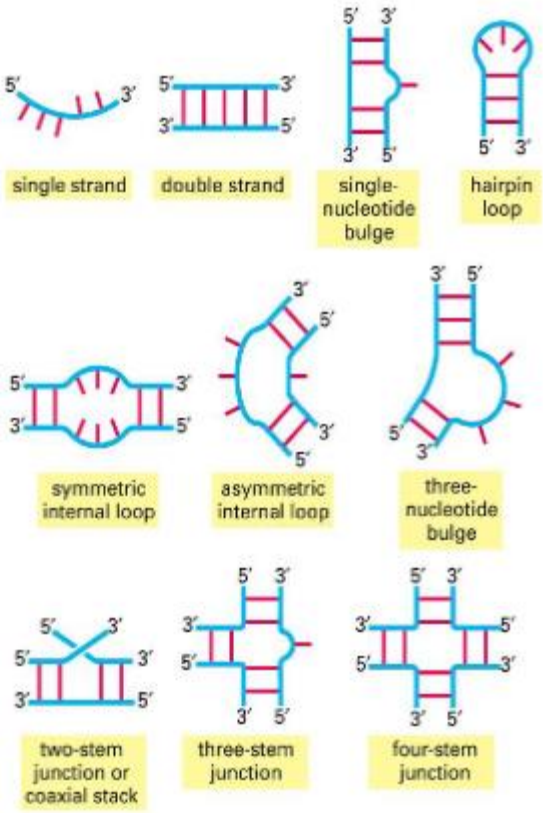


Figure 6–94. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Tertiary structures

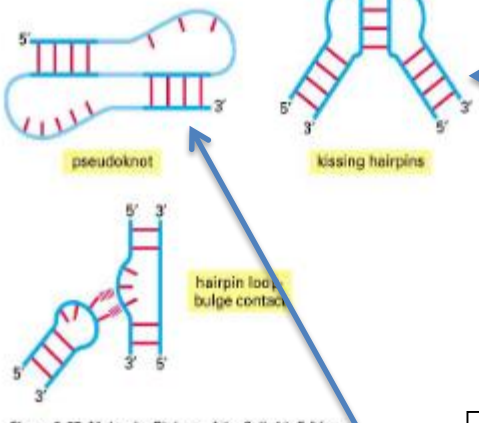
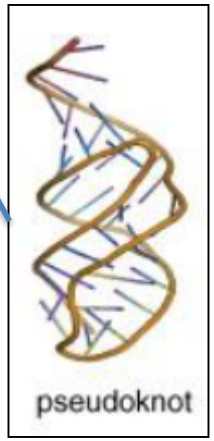


Figure 6–95. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



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

Tab 5.1 Caratteristiche e differenze principali tra DNA e RNA