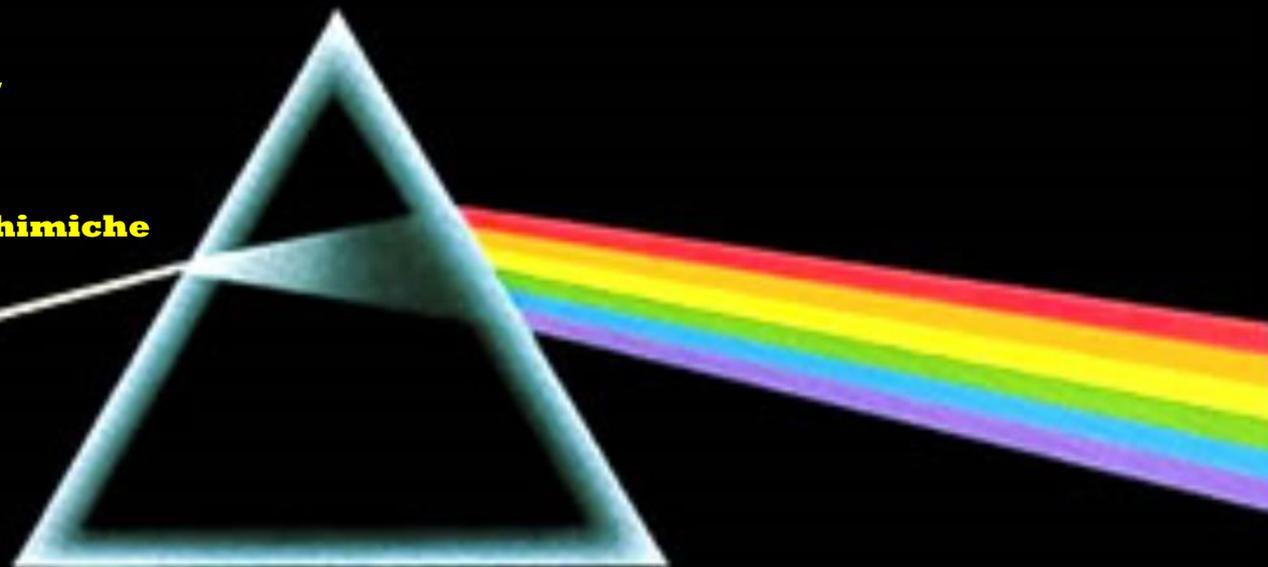


**Corso di**  
**Proprietà di**  
**Biopolimeri**

***Prof. R. URBANI***

**LM Chimica**  
**Dipartimento di Scienze Chimiche**  
**e Farmaceutiche**  
**a.a. 2023-2024**



**SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO**

# Interazione tra luce e materia

**Cosa succede quando una radiazione elettromagnetica interagisce con la materia?**

◆ **parte della radiazione può essere assorbita**

◆ **Può variare la velocità della radiazione**

**(tutti i materiali hanno un indice di rifrazione!!!)**

$$n = \frac{c}{v}$$

$$v = \frac{c}{\sqrt{1 + \chi}}$$

Il fattore  $\sqrt{1 + \chi}$  è l'indice di rifrazione  
 $\chi$  suscettività elettrica



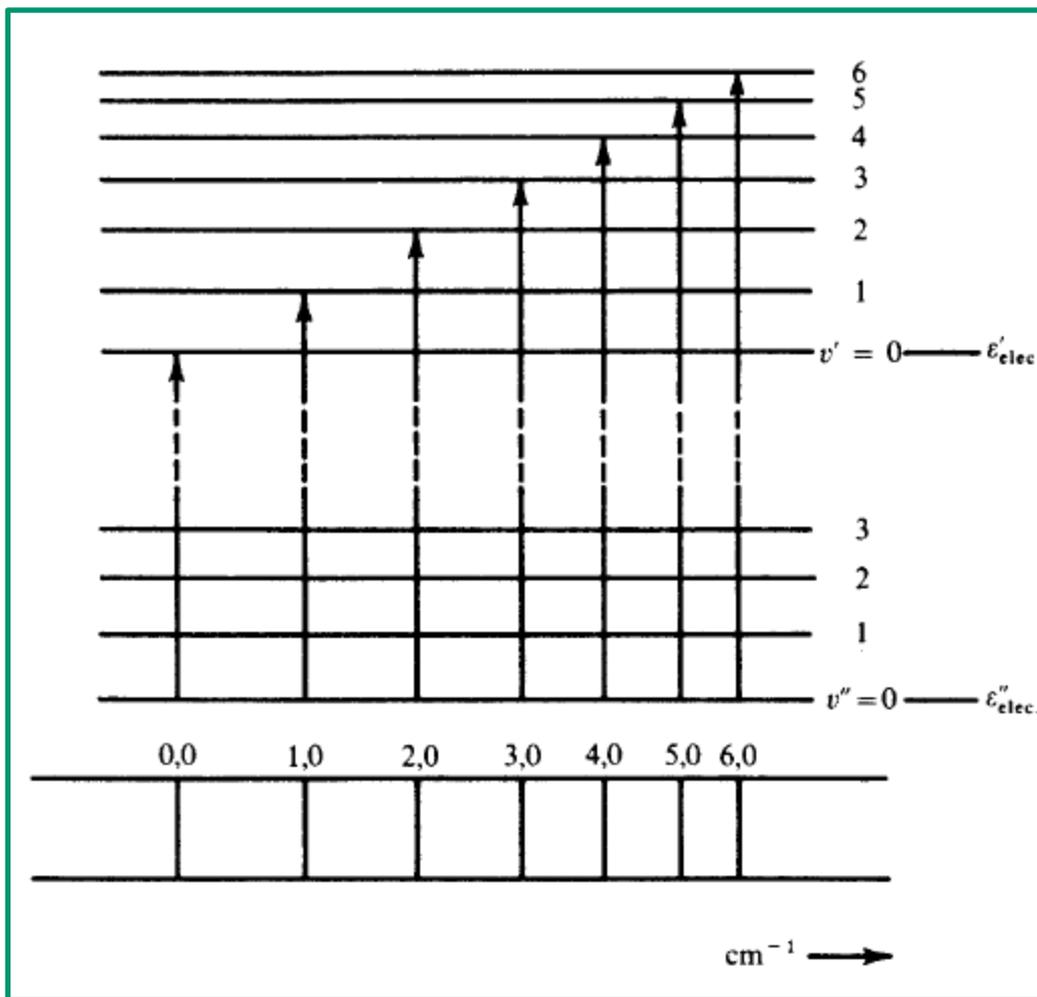
La regione spettrale di interesse per la spettroscopia UV-Vis copre l'intervallo

$$3 \times 10^{14} \text{ Hz} - 3 \times 10^{16} \text{ Hz}$$
$$1000 \text{ nm} - 10 \text{ nm}$$

che corrisponde a valori di energia in grado di provocare transizioni elettroniche.

Questo tipo di spettroscopia trova applicazioni sia in assorbimento che in emissione.

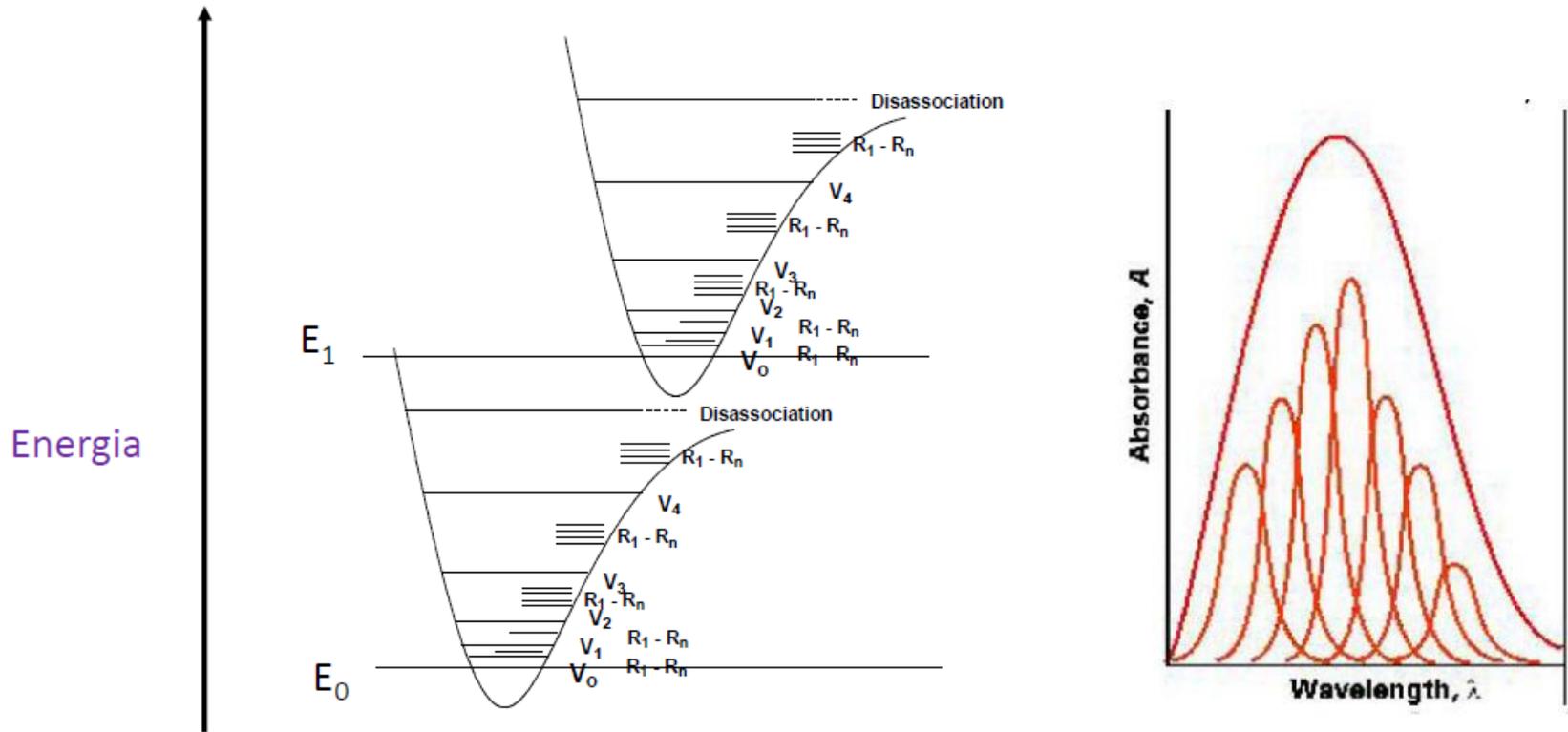
L'assorbimento della luce da parte di una molecola comporta la conversione dell'energia radiante in energia di rotazione e vibrazione nonché in calore



Normalmente, le molecole hanno molti stati eccitati elettronici, così l'intero spettro di assorbimento, anche di una molecola biatomica, è più complicato di quello in figura.

L'intensità della banda di assorbimento dipende dalla **probabilità della transizione** elettronica e, inoltre, dal rispetto o meno delle regole di selezione quanto-meccaniche. Se non vengono rispettate, le transizioni vengono definite transizioni proibite.

# Bande Spettri UV-Vis



A differenza di altre spettroscopie (IR, NMR) dove è possibile osservare picchi risolti, nell'UV-Vis la sovrapposizione dei livelli energetici dà luogo a bande sovrapposte

Le transizioni elettroniche si distinguono per il tipo di cambiamenti che avvengono nella struttura elettronica della molecola quando viene assorbito un quanto di luce.

Quelle a  $\lambda$  **maggiori** sono le transizioni nei **composti insaturi** dallo stato fondamentale allo stato  $\pi$  eccitato (**transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$** ).

Le transizioni tra i livelli  $\sigma$  ( **$\sigma \rightarrow \sigma^*$** ) si trovano nella regione a **onde più corte**.

Se un gruppo cromoforo è costituito da eteroatomi con coppie di elettroni indivisibili (elettroni **n**), come l'azoto, l'ossigeno o lo zolfo, può avvenire la transizione degli elettroni dai livelli **n** a quelli  $\pi^*$  e  $\sigma^*$  ( **$n \rightarrow \pi^*$**  ed  **$n \rightarrow \sigma^*$** ).

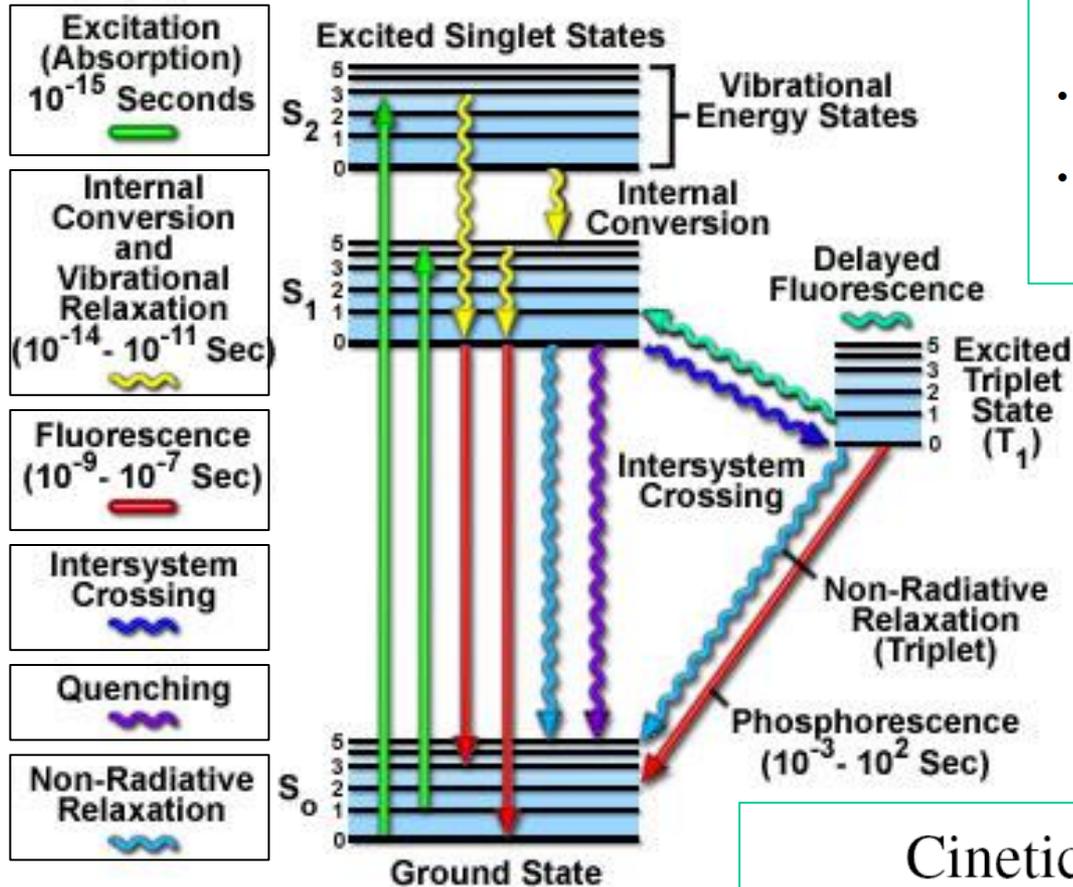
L'assorbimento di un quanto di luce da parte della molecola allo stato fondamentale porta alla formazione di uno stato eccitato di singoletto che può rilassarsi o decadere di nuovo allo stato fondamentale attraverso una serie di processi foto-fisici.

Esistono processi di decadimento

- 1) che comportano l'emissione di quanti di luce (**forforescenza, fluorescenza**)
- 2) processi non radiativi che non sono seguiti dall'emissione di luce (**conversione interna, intersystem crossing**).
- 3) Reazioni chimiche/processi di trasferimento di energia (**quenching**)

# Elettroni

## Jablonski Energy Diagram

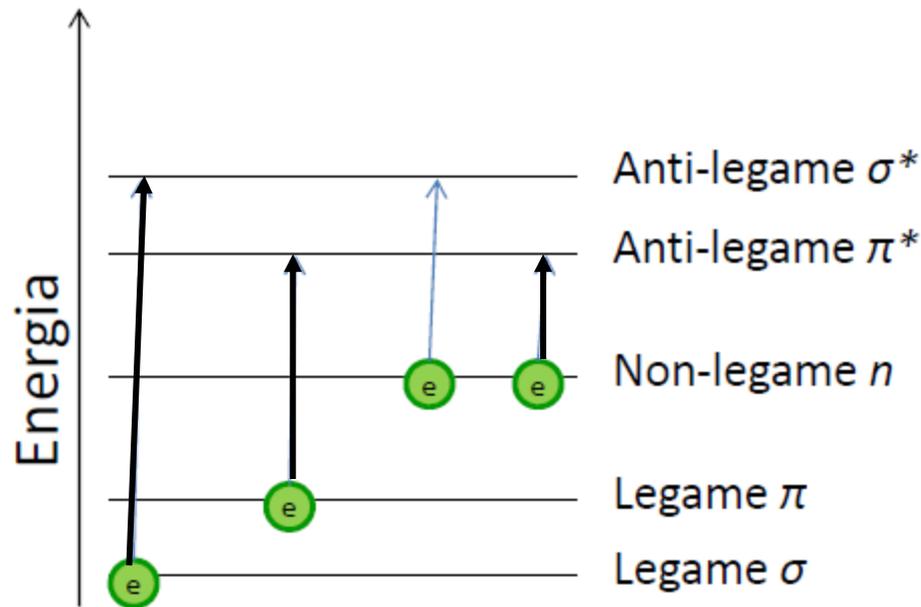


- Le transizioni elettroniche coinvolte sono in genere del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  o  $\pi \rightarrow \pi^*$  (molto raramente sono coinvolti elettroni  $\sigma$ ).
- Gli elettroni coinvolti nella transizione di fluorescenza sono generalmente elettroni  $\pi$ .
- La fluorescenza si osserva generalmente nei composti che presentano transizioni  $\pi^* \rightarrow \pi$ .

## Cinetica dei fenomeni

- Fluorescenza  $k_R = 10^8 \text{ s}^{-1}$
- Fosforescenza  $k_P = 10^2 - 10^4 \text{ s}^{-1}$
- Intersystem crossing  $k_{IC} = 10^8 \text{ s}^{-1}$
- Conversione interna  $k_{CI} = 10^{13} \text{ s}^{-1}$

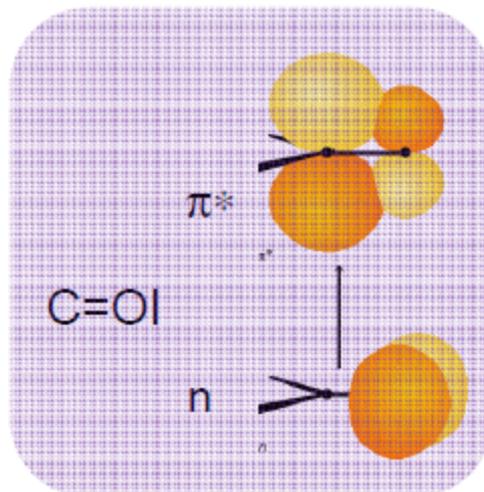
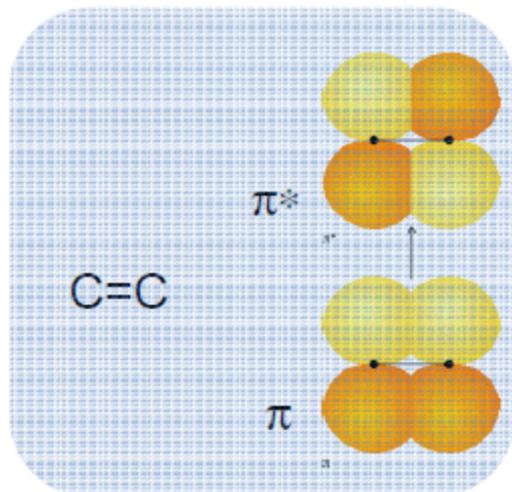
# Transizioni elettroniche ( $\pi$ , $\sigma$ o $n$ )



- $\sigma \rightarrow \sigma^*$  : transizioni altamente energetiche (range tipico  $\sim 125\text{nm}$ )  
Es. legame C-H degli alcani

- $n \rightarrow \sigma^*$  : meno energetiche delle precedenti ( $150\text{-}250\text{ nm}$ ) Es. composti saturi contenenti doppietti solitari (C, N, S, alogeni)

- $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  : la maggior parte dei composti studiati tramite UV-Vis ricade in questo tipo di transizioni. ( $200\text{-}700\text{ nm}$ )

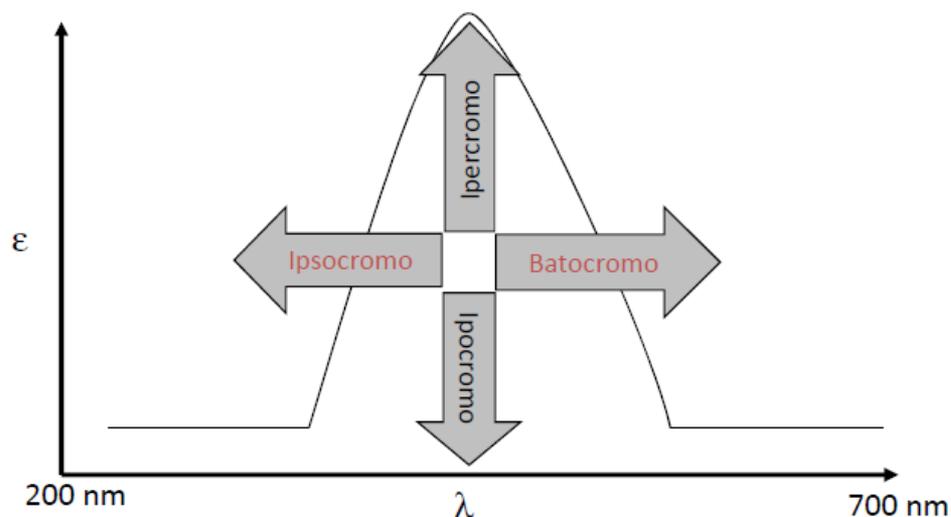


# Effetto dei sostituenti /della coniugazione

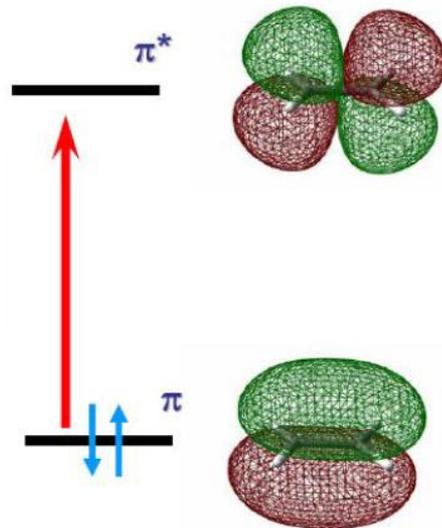
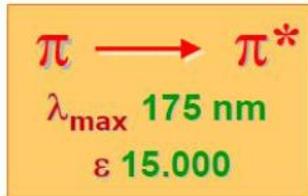
Quando in una molecola sono presenti due o più cromofori in coniugazione diretta tra loro si assiste ad un marcato **effetto batocromico/ipsocromico** quasi sempre accompagnato da un **effetto ipercromico/ipocromico** attribuibile alla maggiore/minore facilità della transizione elettronica.

I sostituenti possono avere uno dei seguenti quattro effetti su un cromoforo

- Effetto batocromo (red shift) – spostamento verso  $\lambda$  maggiori (energia minore)
- Effetto Ipsocromo (blue shift) – spostamento verso  $\lambda$  minori (energia maggiore)
- Effetto Ipercromo – Aumento di  $\epsilon$  (maggiore intensità)
- Effetto Ipocromo – Diminuzione di  $\epsilon$  (minore intensità)
- Effetto Auxocromo – contemporaneo aumento di  $\lambda$  ed  $\epsilon$

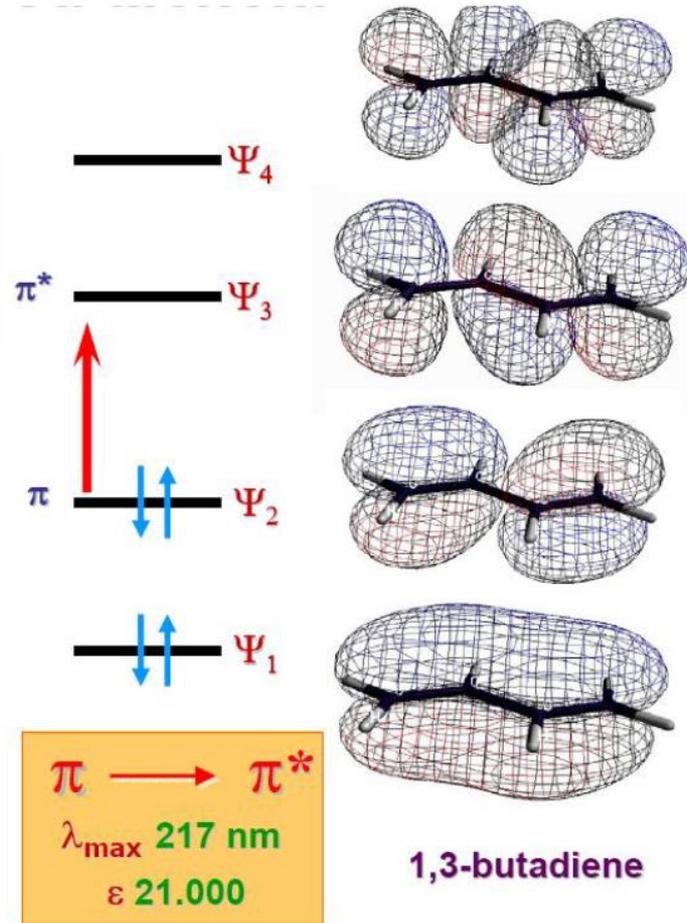


# Effetto della coniugazione



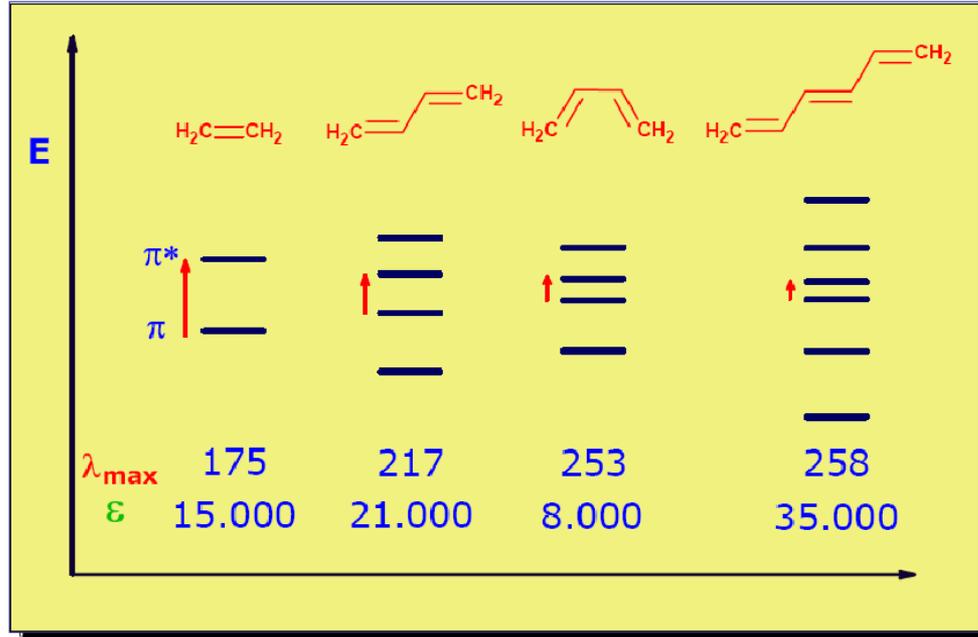
Etilene

l'aumento della facilità della transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  è correlata ad una minore richiesta energetica per la transizione



1,3-butadiene

# Effetto della coniugazione



## Coniugazione più estesa:

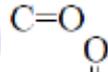
✓ assorbimento a lunghezze d'onda maggiori

✓ assorbimento più intenso

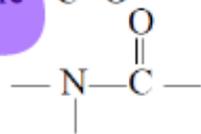
✓ aumento di  $\epsilon$  conseguenza di un aumentato momento dipolare

# Cromofori importanti in molecole biologiche

- Gruppo carbonile



- Gruppo peptidico

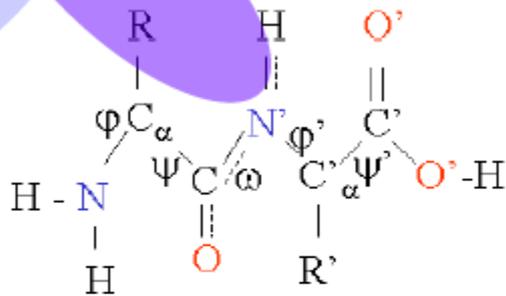


- Doppi legami coniugati in polieni lineari (caroteni, retinolo) e ciclici (derivati porfirinici, amminoacidi aromatici, basi degli acidi nucleici)
- Ioni di metalli di Transizione in metallo-proteine: Mn, Fe, Co, Cu, Mo, V

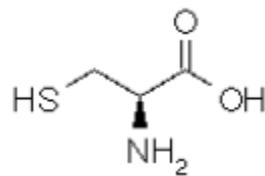
## Uso pratico della spettroscopia UV-visibile

- Misura della concentrazione di acidi nucleici mediante  $A_{260}$
- Misura della concentrazione di proteine mediante  $A_{280}$
- Studio delle Transizioni conformazionali !

# Cromofori nelle proteine

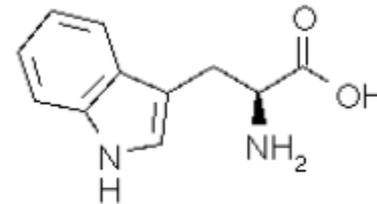


Il legame peptidico  
(214 nm, lontano UV)



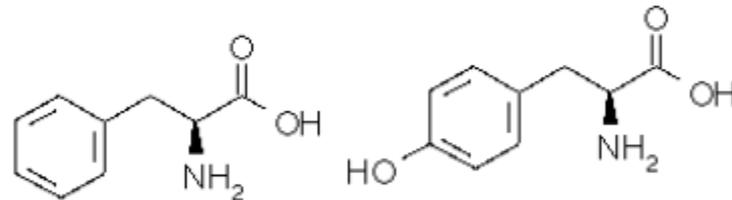
**cys** c Cystein

Ponte disolfuro  
(250 nm)



**trp** w Tryptophan

Anello aromatico  
(280 nm, vicino UV)

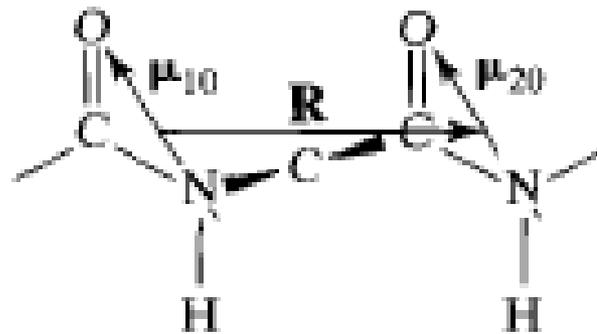


**phe** f Phenylalanin

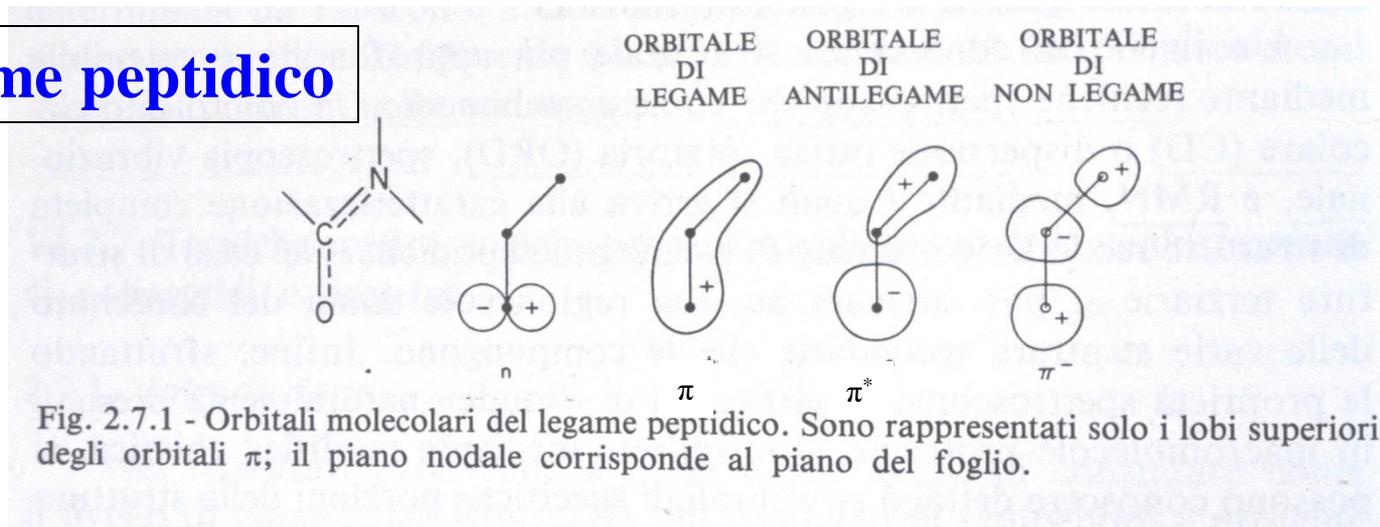
**tyr** y Tyrosin

## Legame peptidico

The energy of interaction between the  $\pi\pi^*$  transition dipoles of an amide dimer depends on the relative orientation of the dipole vectors and the vector distance between them.



# Legame peptidico



Il cromoforo della **catena peptidica** nelle proteine è il cromoforo ammidico.  
 Il suo spettro di assorbimento può essere osservato nel vuoto e nell'ultravioletto lontano.

Sono state rivelate **due** transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$ :

$\pi_1 \rightarrow \pi^*$  a 190 nm (**FORTE**)

$\pi_2 \rightarrow \pi^*$  a 165 nm

**Una** transizione  $n \rightarrow \pi^*$  a 210-220 nm (**DEBOLE**)

$$\mu_e = \int \varphi^0 M \varphi^* dt = \langle i | \mu | f \rangle$$

$$\mu_e \neq 0$$

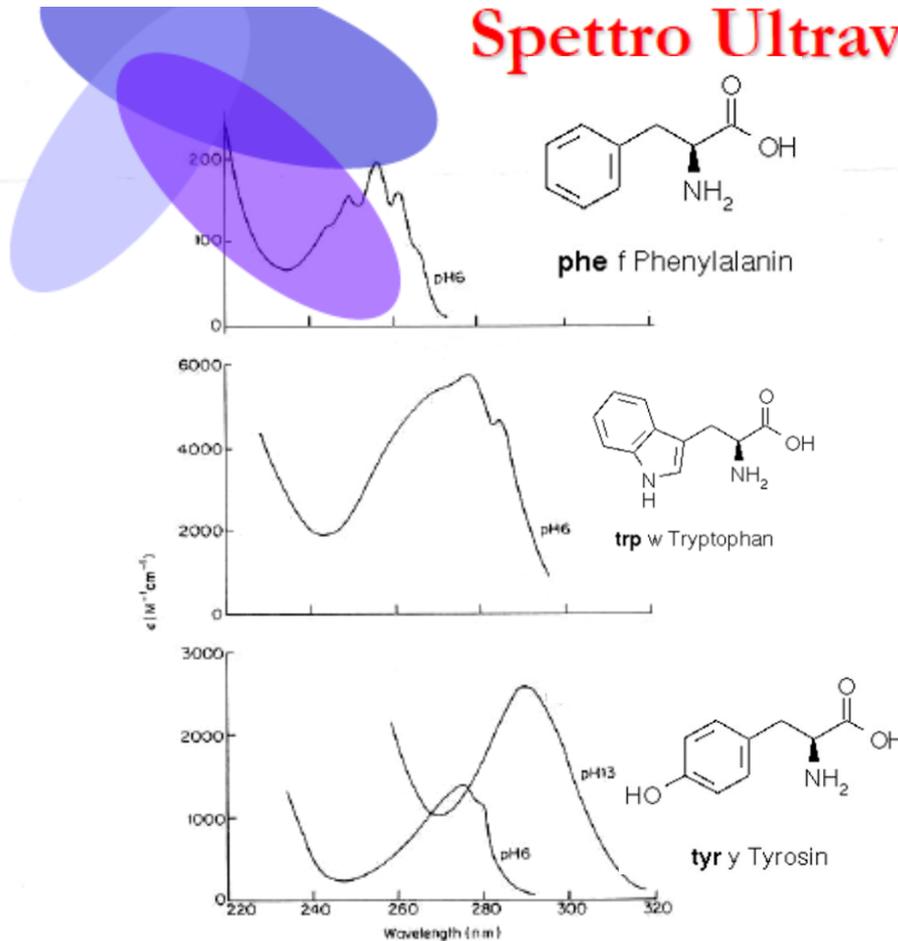
Assorbimento a 190-200 nm  
(legame peptidico)

**Table 9.3** Extinction Coefficient at 190 nm for Some Proteins

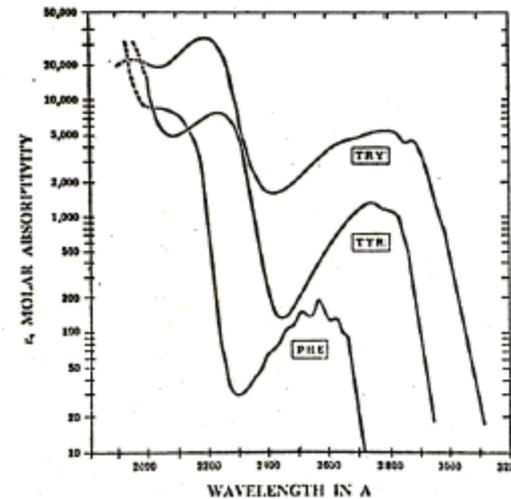
<b>Protein</b>	<b><math>\epsilon(190) \times 10^{-3}</math></b>
$\alpha$ -Chymotrypsin	9.69
Cytochrome c	9.72
Elastase	10.29
Hemoglobin	9.62
Lactate dehydrogenase	8.51
Lysozyme	11.46
Myoglobin	9.15
Papain	10.10
Ribonuclease	9.64

# anello aromatico

## Spettro Ultravioletto delle proteine



ABSORPTION SPECTRA OF THE AROMATIC AMINO ACIDS AT pH 6



La banda della fenilalanina è la meno intensa e si osserva a minori lunghezze d'onda. Il suo contributo è completamente oscurato da quello di tirosina e triptofano, quando sono presenti questi residui.

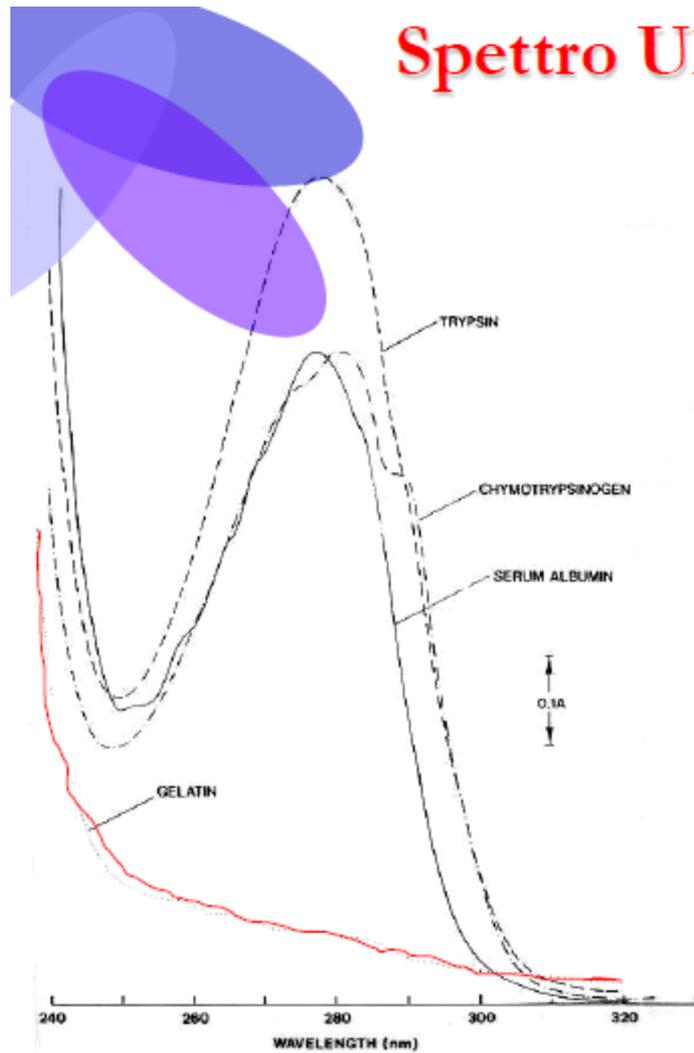
Fig. Ultraviolet absorption spectra of amino acids and proteins. A. UV spectra of aromatic amino acids. Phenylalanine and tryptophane at pH 6, tyrosine at pH 6 and pH 13 (tyrosinate): see Table 3 (Brown, 1980). Reproduced by permission from Brown (1980), *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*. Copyright: Academic Press Inc. (London) Ltd.

**Table 1.1.** Molar coefficients of extinction of amino acid residues in the far UV-range<sup>a</sup> (Gratzer 1967)

Side chain	$\epsilon_{190}^M$	$\epsilon_{197}^M$	$\epsilon_{205}^M$
Trp	17700	20540	20020
Tyr	38130	35400	13150
Phe	53600	25500	13800
His	5600	4110	5020
Cys-SH	2070	1760	620
$1/2$ (Cys) <sub>2</sub>	2510	1480	930
Met	1930	1930	1770
Arg	12450	6500	1180
—COO <sup>-</sup>	900	270	110
Amide	5600	2000	350

La tirosina (acido  $\alpha$ (-amino- $\beta$ -p-ossifenilpropionico) si differenzia dalla fenilalanina per la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione para. Questa differenza di struttura comporta differenze significative nelle proprietà spettroscopiche.

# Spettro Ultravioletto delle proteine



Spettro di assorbimento di quattro proteine:

- La **tripsina** ha un alto contenuto in tirosina,
- l' **albumina** ha un alto contenuto in fenilalanina,
- il **chimotripsinogeno** ha un alto contenuto in triptofano
- la gelatina (**collagene**) ha un basso contenuto in tutti e tre questi aminoacidi.

# Spettro Ultravioletto delle proteine

Tipicamente per poter quantificare la concentrazione di una proteina viene usata la regione del vicino UV piuttosto che il lontano UV in quanto molti solventi assorbono o diffondono in questa ultima regione spettrale, pertanto interferendo con l'assorbimento del cromoforo amidico

Gli amino acidi aromatici hanno un coefficiente di estinzione molare ben caratterizzato nell'intervallo 250-300 nm. Pertanto, se si conosce il numero di tirosine o triptofano nella proteina, si può calcolare un coefficiente di estinzione per la proteina ad una determinata lunghezza d'onda ed usare questo per misurare la concentrazione della proteina in soluzione

$$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{PHE}) = 160 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

$$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{tirosina}) = 1280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

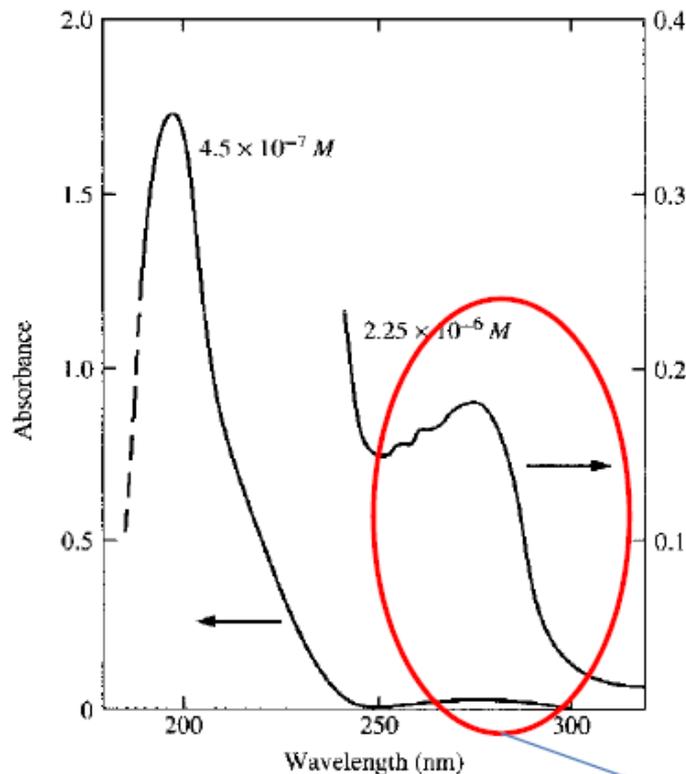
$$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{triptofano}) = 5690 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

$$A = A_{\text{tyr}} + A_{\text{trp}} + A_{\text{phe}} = \epsilon l c$$

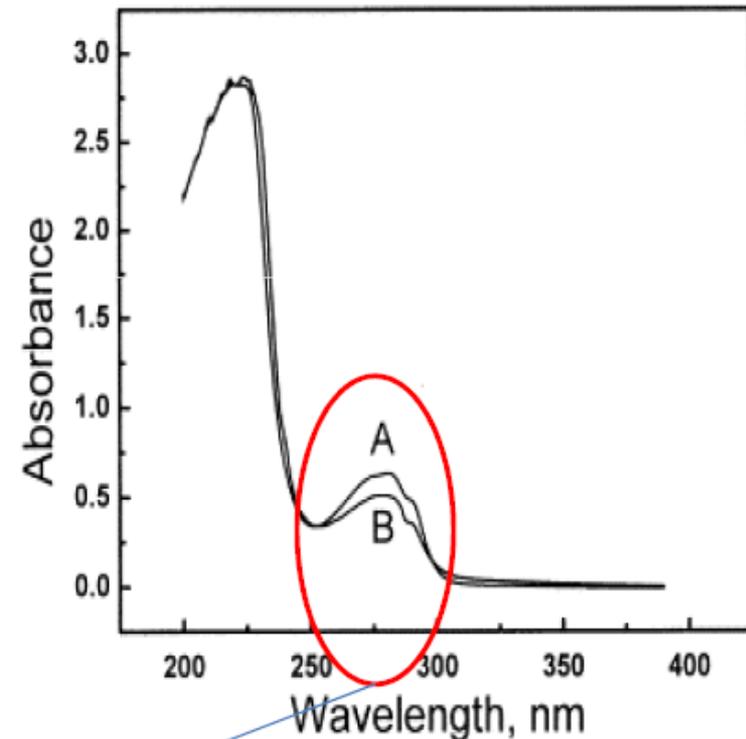
$$\epsilon = n_{\text{tyr}} \epsilon_{\text{tyr}} + n_{\text{trp}} \epsilon_{\text{trp}} + n_{\text{phe}} \epsilon_{\text{phe}}$$

# Spettri UV-Vis di proteine

Albumina di siero bovino (BSA)



Lisozima da albume d'uovo



La misura dell'assorbanza alla  $\lambda$  nel range 260-280 nm permette la determinazione quantitativa di proteine in soluzione

# Transizione conformazionale

Nella figura è mostrato come lo spettro del polipeptide poli-L-lisina possa modificarsi per:

- l'effetto di un aumento di pH che induce la formazione dell'  $\alpha$ -elica da una struttura random coil

- l'effetto di un aumento di temperatura che converte il polipeptide in  $\beta$ -foglietto.

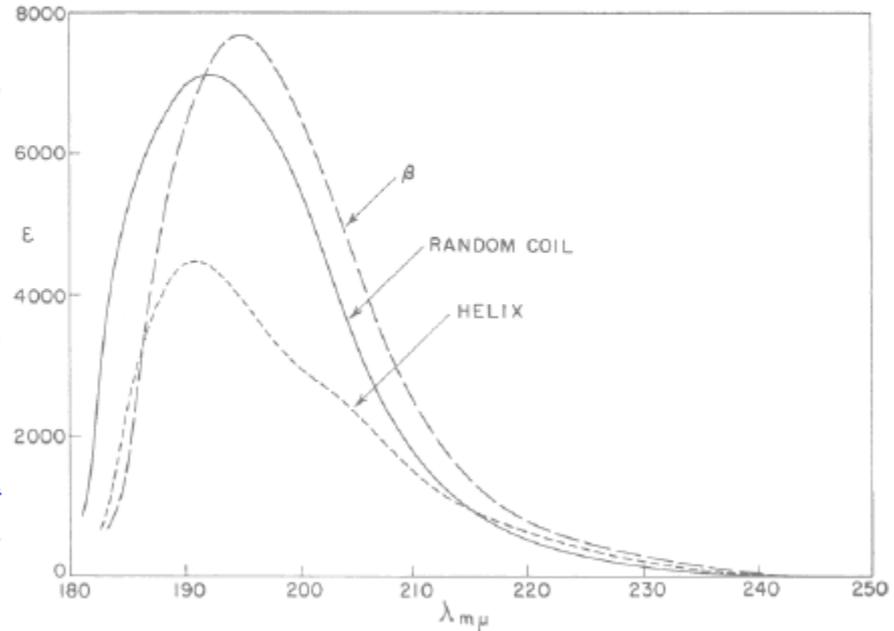
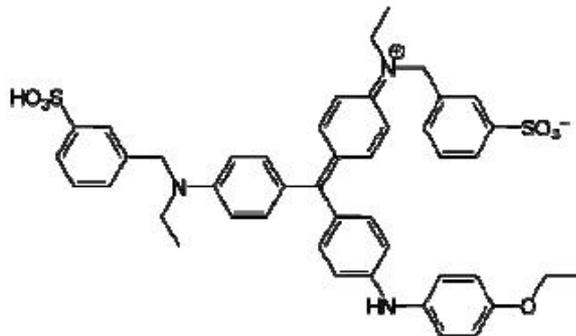


FIG. 2.—Ultraviolet absorption spectra of poly-L-lysine hydrochloride in aqueous solution: random coil, pH 6.0, 25°; helix, pH 10.8, 25°;  $\beta$ -form, pH 10.8, 52°.

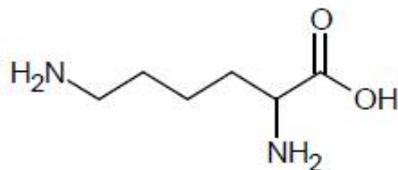
Il fenomeno può essere usato nello studio dei processi di **denaturazione** e **rinaturazione**, sfruttando i diversi coefficienti di assorbimento, per determinare quantitativamente le frazioni di forma nativa e denaturata.

# Saggio di Bradford

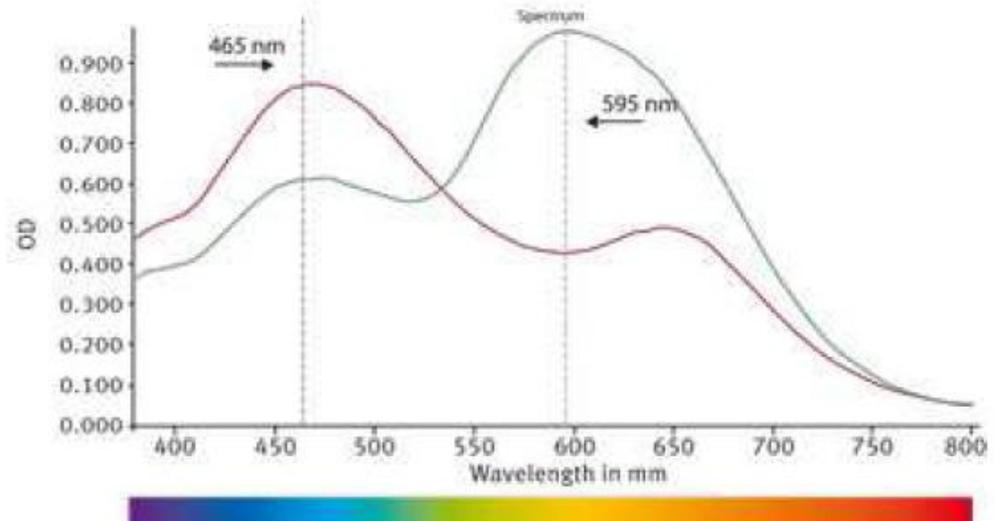
Il metodo di Bradford permette di determinare la concentrazione di una proteina per reazione tra i gruppi amminici delle lisine e un colorante (cromoforo) Coomassie blue. In seguito a una taratura con una proteina usata come standard (BSA) è possibile determinare la concentrazione incognita di proteina.



Coomassie brilliant blue



Lisina



*Spettro del "Coomassie® Brilliant Blue" libero (linea rossa) e legato ai residui amminici (linea verde)*

*Il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G- 250 alle proteine provoca uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide*

# Saggio di Bradford

- Tale colorante forma **forti complessi non covalenti** con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con gruppi aminici e carbossilici e tramite forze di van der Waals
- Il colorante è preparato come soluzione *stock* in acido fosforico
- Il metodo è un semplice procedimento costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina **l'assorbanza a 595 nm**
- La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione, pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica. In genere quantità uguali di proteine differenti legano la stessa quantità di colorante → **il saggio è indipendente dal tipo di proteina**

# Saggio di Bradford

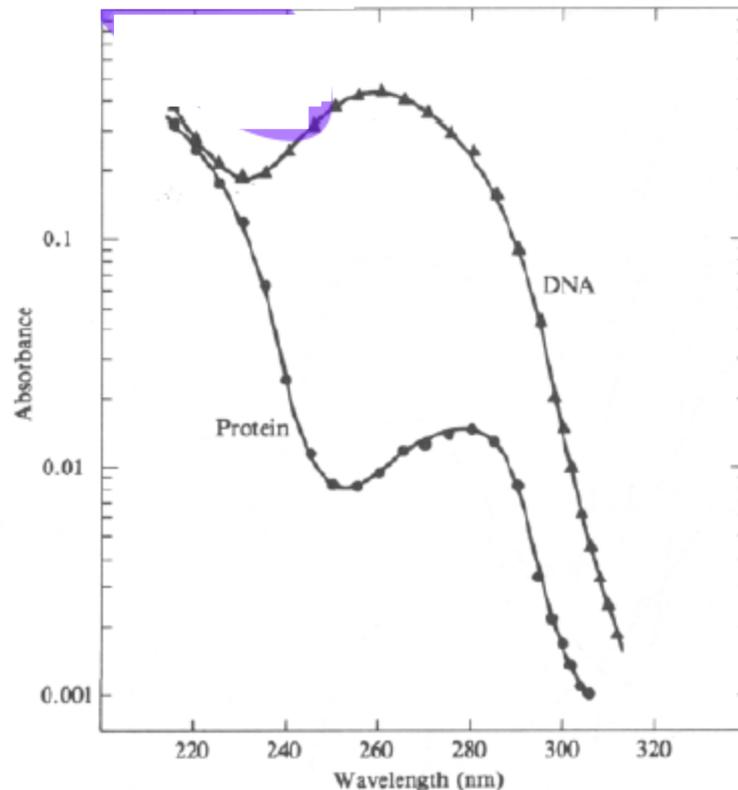
## VANTAGGI

- Semplicità di preparazione del reattivo
- Sviluppo del colore immediato
- Stabilità del complesso
- Elevata sensibilità (fino a **22 µg/ml**)
- Il saggio è compatibile con la maggior parte dei tamponi comuni, degli agenti denaturanti come guanidina·HCl 6M e urea 8 M e dei preservanti come sodio azide

## SVANTAGGI

- Il reagente colora le *cuvette* ed è piuttosto difficile da rimuovere
- Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida

## Spettro Ultravioletto di Acidi Nucleici

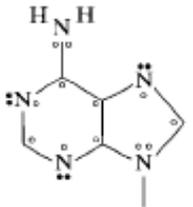
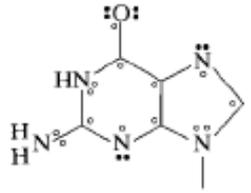
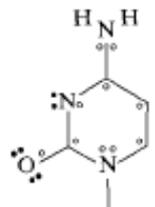
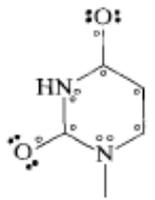


Il forte assorbimento nel vicino UV degli acidi nucleici è determinato quasi esclusivamente dalle basi pirimidiniche e puriniche.

Infatti gli zuccheri e i gruppi fosfato hanno assorbimenti a < 150 nm.

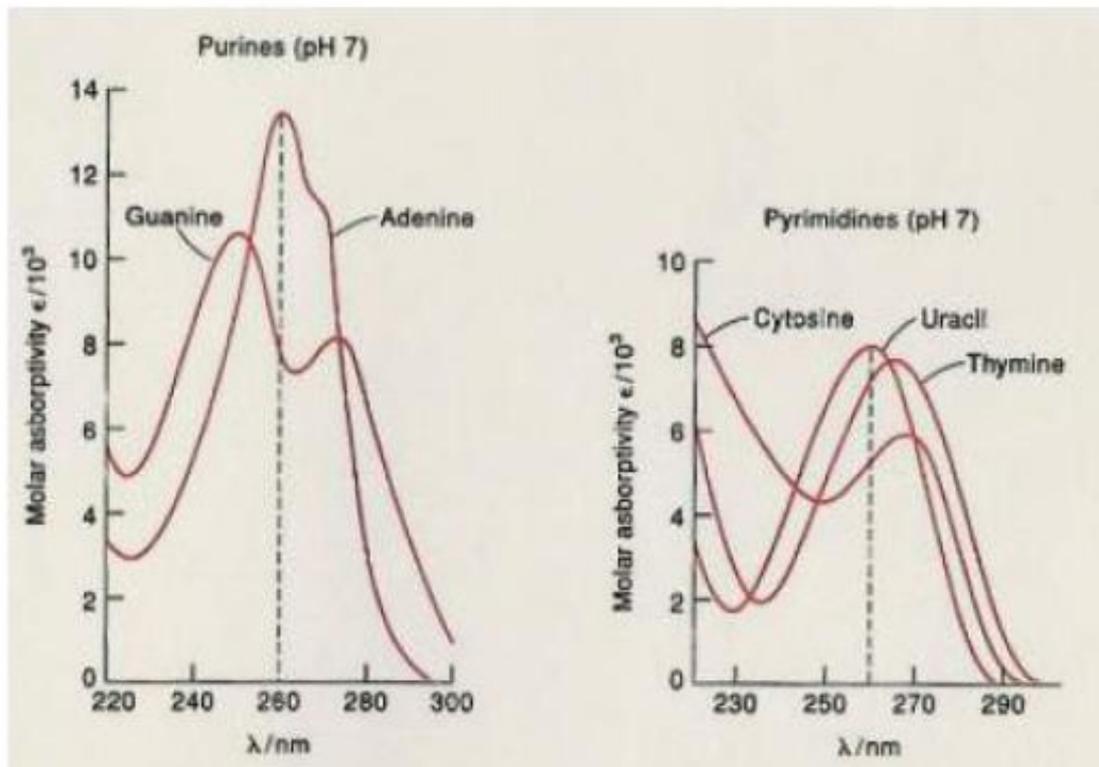
Le basi presentano sistemi delocalizzati in anelli eterociclici, e le transizioni sono di tipo  $\pi-\pi^*$ .

**Table 9.1** Electronic Structure of the Bases

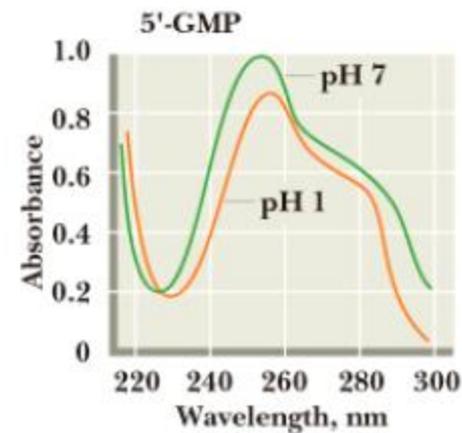
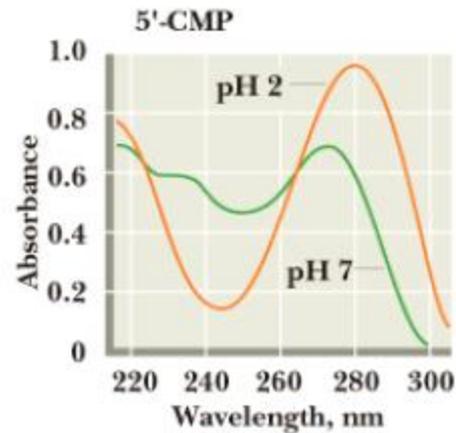
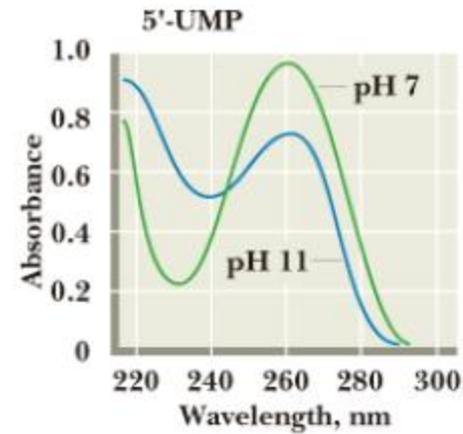
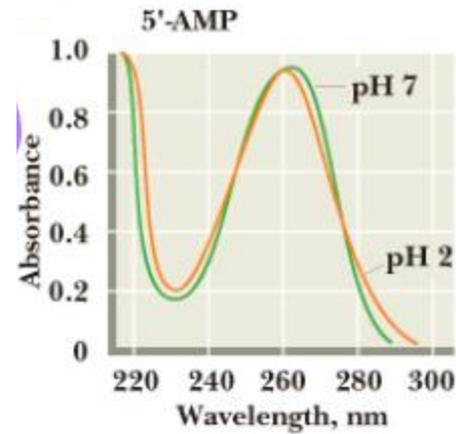
Compound	Structure	Number of $\pi$ Orbitals	Number of $\pi$ Electrons	Number of Filled $\pi$ Orbitals	Number of Unfilled $\pi$ Orbitals
Adenine		10	12	6	4
Guanine		11	14	7	4
Cytosine		8	10	5	3
Uracil (Thymine)		8	10	5	3

# Spettro Ultravioletto di Acidi Nucleici

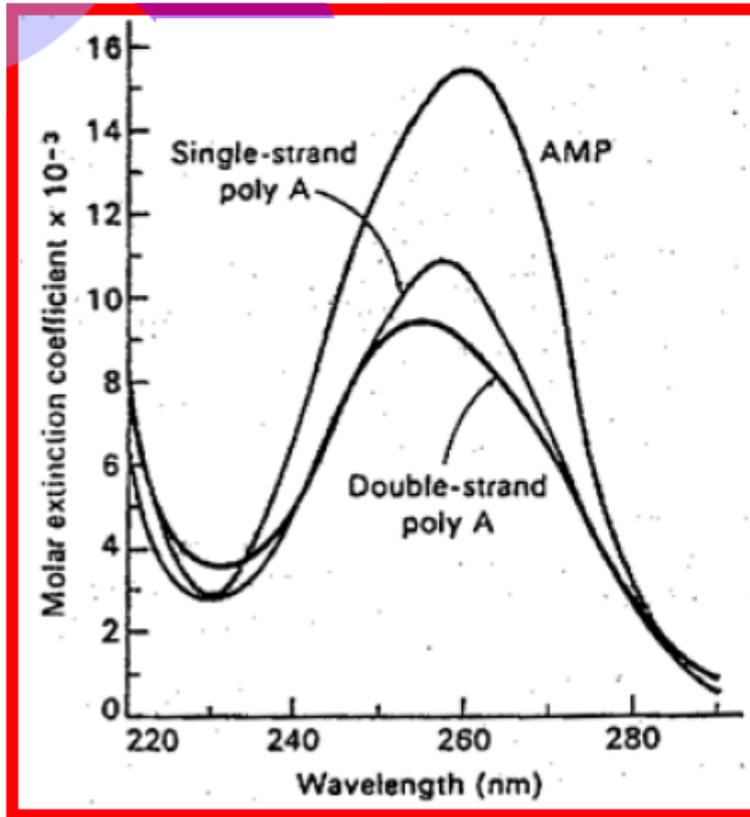
Tutti gli spettri delle basi mostrano un forte assorbimento intorno a **260 nm**.



# Spettro Ultravioletto di Acidi Nucleici



# Ipercromicità/Ipercromicità



$A_{(260)}$

DNA doppio filamento 1.00

DNA singolo filamento 1.37

Basi libere 1.67

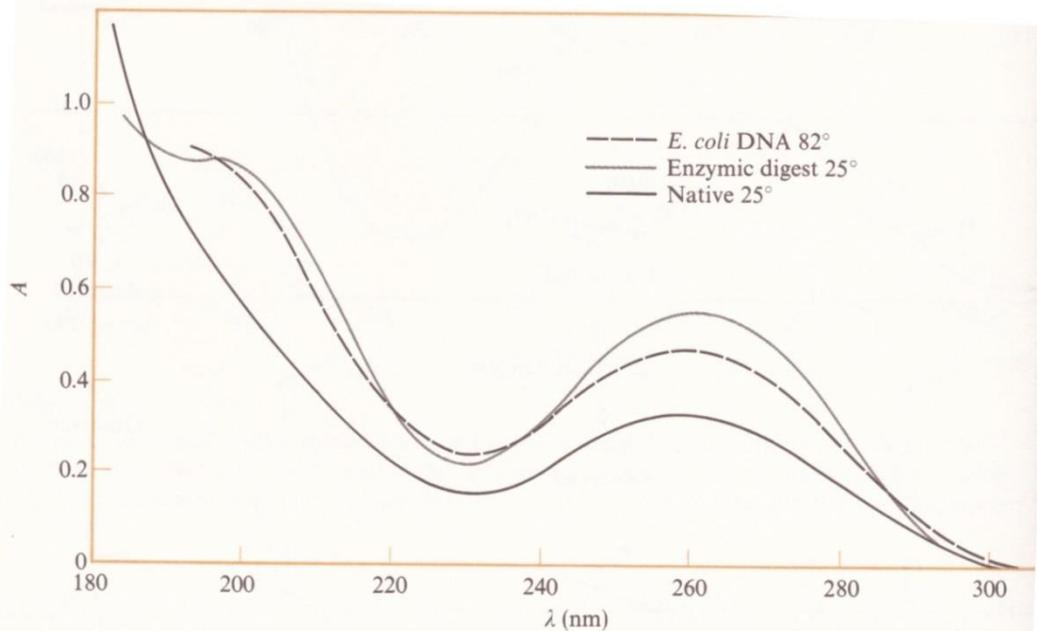
In generale, gli acidi nucleici hanno un assorbimento inferiore alla somma delle assorbanze dei nucleotidi individuali

$$(\%) \text{ipercromicità} = \frac{A_{ss}(\text{DNA}_{\text{fuso}}) - A_{ss}(\text{DNA}_{\text{nativo}})}{A_{ss}(\text{DNA}_{\text{nativo}})} * 100$$

**Effetto ipocromico !**

L'ipocromismo è un fenomeno in cui l'intensità integrale dell'assorbimento della luce da parte di un sistema di più cromofori è inferiore alla somma delle intensità dei singoli cromofori.

Questo fenomeno è ben noto nella spettroscopia degli acidi nucleici. La formazione della doppia elica nativa del DNA si traduce in una riduzione dell'intensità di assorbimento del **40%**.

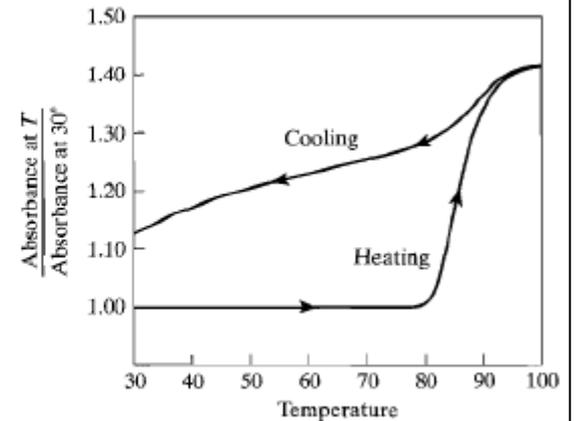


**Figure 7-14**

*Spectrum of DNA as a function of temperature. The enzymic digest should result in a solution of only mononucleotides and possibly a few short oligomers. Note that the high-temperature spectrum is fairly close to the digested spectrum. [After D. Voet, W. B. Gratzer, R. A. Cox, and P. Doty, *Biopolymers* 1:193 (1963).]*

L'ipercromicità viene utilizzata per seguire le transizioni conformazionali in funzione della T

$\lambda=260 \text{ nm}$



**Figure 9.23** The thermal denaturation of DNA as measured through electronic absorption spectroscopy.

Una regola generale prevede che

**MODIFICAZIONI CONFIGURAZIONALI CHE  
NON CAMBIANO  
LA STRUTTURA ELETTRONICA  
NON MODIFICANO  
L'ASSORBIMENTO TOTALE**



## Denaturazione del DNA

Sotto l'azione di vari agenti esterni come valori estremi di pH, aumento della temperatura, aggiunta al mezzo acquoso di particolari reagenti, il DNA in soluzione può andare incontro a significative modificazioni strutturali che ne cambiano l'aspetto, la funzionalità e le caratteristiche, **passando dalla doppia elica regolare a uno stato disordinato in cui i filamenti complementari si separano e la struttura secondaria viene persa.**

**(denaturazione)**

# Denaturazione termica del DNA

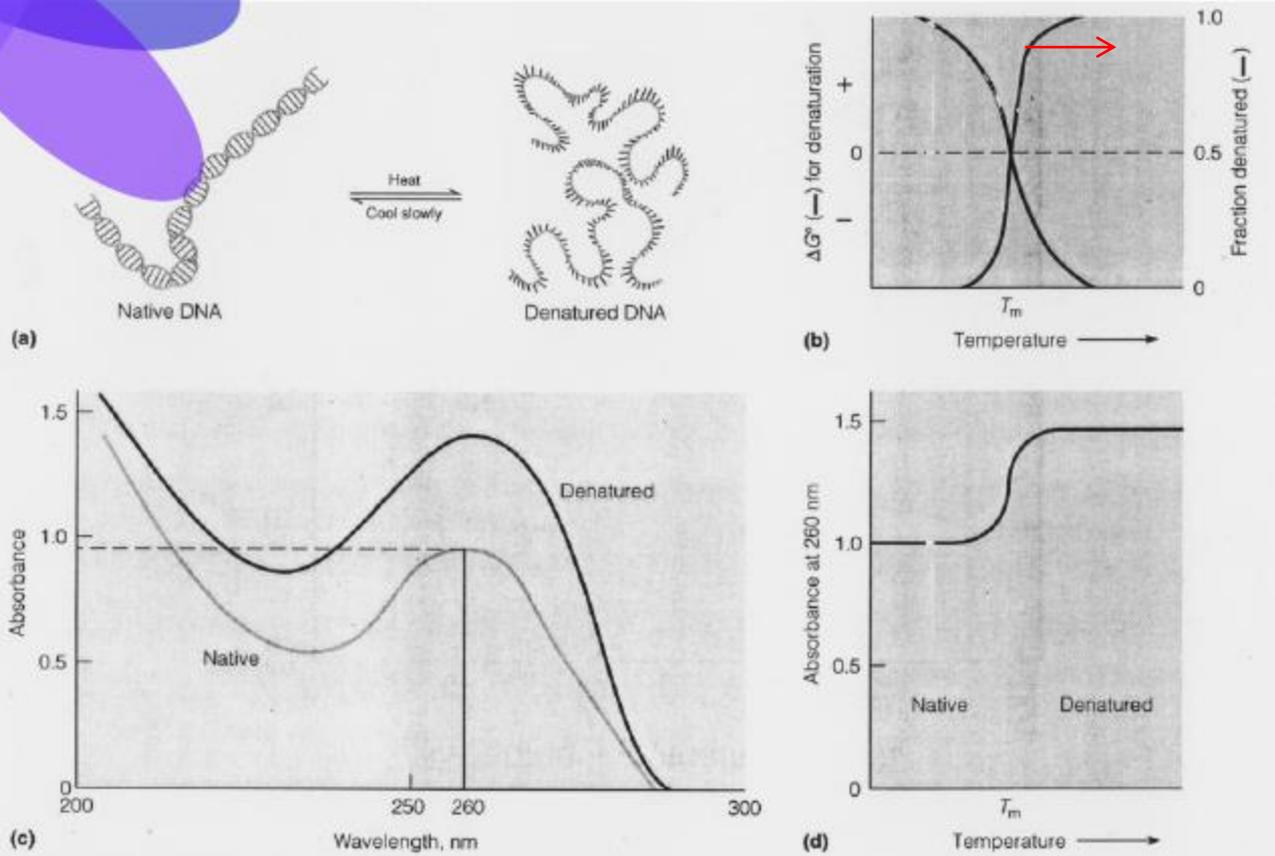
Durante un processo di denaturazione non si rompe alcun legame covalente, ma si assiste alla sola **separazione dei due filamenti della doppia elica**: in altre parole, i ponti idrogeno tra le coppie di basi complementari vengono spezzati e diminuiscono le interazioni tra basi adiacenti.

La denaturazione termica degli acidi nucleici avviene in un intervallo di temperatura piuttosto ristretto e provoca cambiamenti significativi delle proprietà fisiche della macromolecola.

Questa particolare transizione ordine-disordine può essere facilmente osservata seguendo **l'aumento dell'assorbimento ottico a 260 nm in funzione dell'aumento della temperatura**.

La curva sperimentale dell'assorbanza in funzione della temperatura può essere analizzata per ottenere informazioni termodinamiche relative al processo in esame.

# Denaturazione del DNA

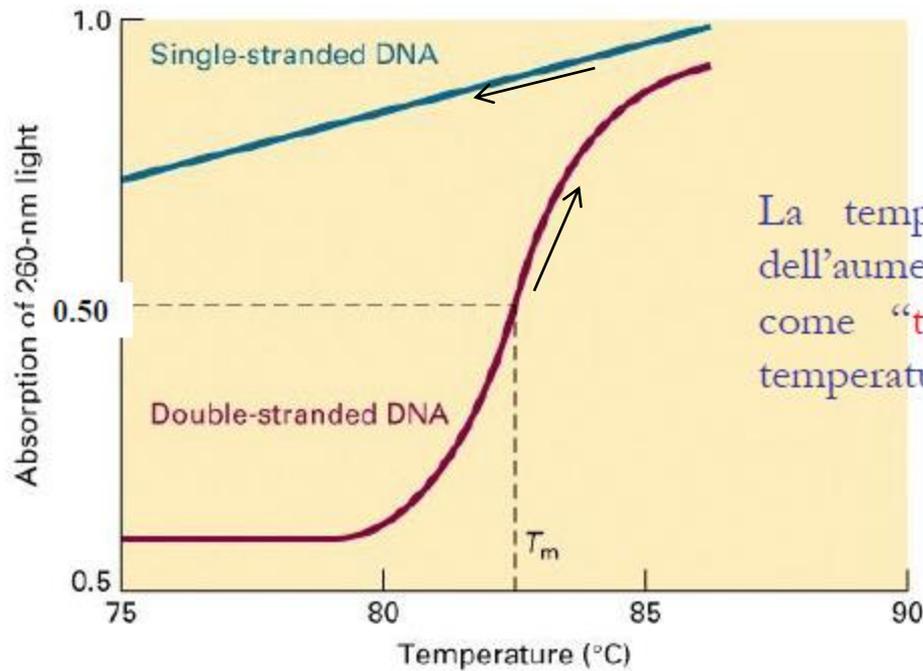


From Mathews and van Holde: *Biochemistry* 2/e. © The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.

# Denaturazione termica del DNA



(a)



La temperatura corrispondente a metà dell'aumento osservato nell' $A_{260}$  è definita come “temperatura di *melting*”,  $T_m$  o temperatura di fusione del DNA.



# Denaturazione termica del DNA

Molti sono i fattori che influenzano il punto di melting del DNA:

- **Lunghezza della molecola:** DNA più lunghi  $\Rightarrow T_m$  più elevate;
- **Contenuto delle basi:** maggiore % GC  $\Rightarrow T_m$  più elevate
- **Sequenza delle basi:** non solo il contenuto, ma anche l'ordine con cui le basi si presentano nella sequenza polinucleotidica condiziona la stabilità del DNA;
- **Forza ionica:** a più elevata forza ionica, è presente un maggior numero di ioni positivi che schermano la carica negativa lungo lo scheletro del DNA. In questo modo, le forze repulsive tra catene diminuiscono e, di contro, aumenta la  $T_m$ ;

## Stabilizzazione: impilamento delle basi

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

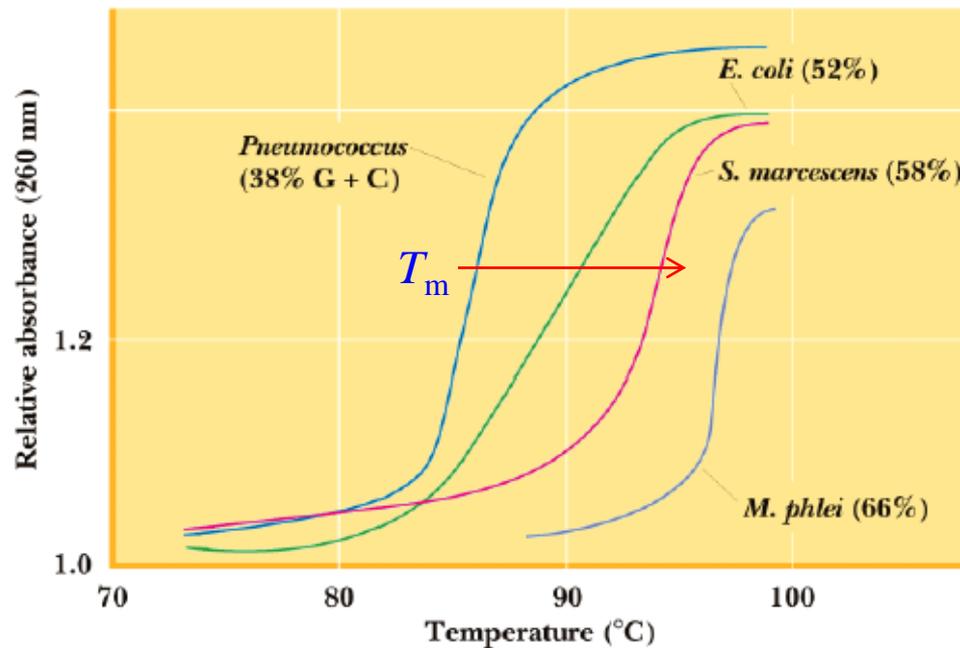
Stacked Dimer	Stacking Energy (kJ · mol <sup>-1</sup> )
C · G	-61.0
G · C	-61.0
C · G	-44.0
A · T	-44.0
C · G	-41.0
T · A	-41.0
G · C	-40.5
C · G	-40.5
G · C	-34.6
G · C	-34.6
G · C	-28.4
A · T	-28.4
T · A	-27.5
A · T	-27.5
G · C	-27.5
T · A	-27.5
A · T	-22.5
A · T	-22.5
A · T	-16.0
T · A	-16.0

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



➤ **Valori di pH:** valori estremi di pH possono ionizzare le basi azotate e rompere i legami idrogeno. Al di fuori del range  $5 < \text{pH} < 9$  la  $T_m$  decresce bruscamente; \_\_

➤ **Contenuto delle basi:** maggiore % GC  $\Rightarrow T_m$  più elevate



# Denaturazione delle proteine



Si può studiare la denaturazione di una proteina attraverso il suo spettro UV?

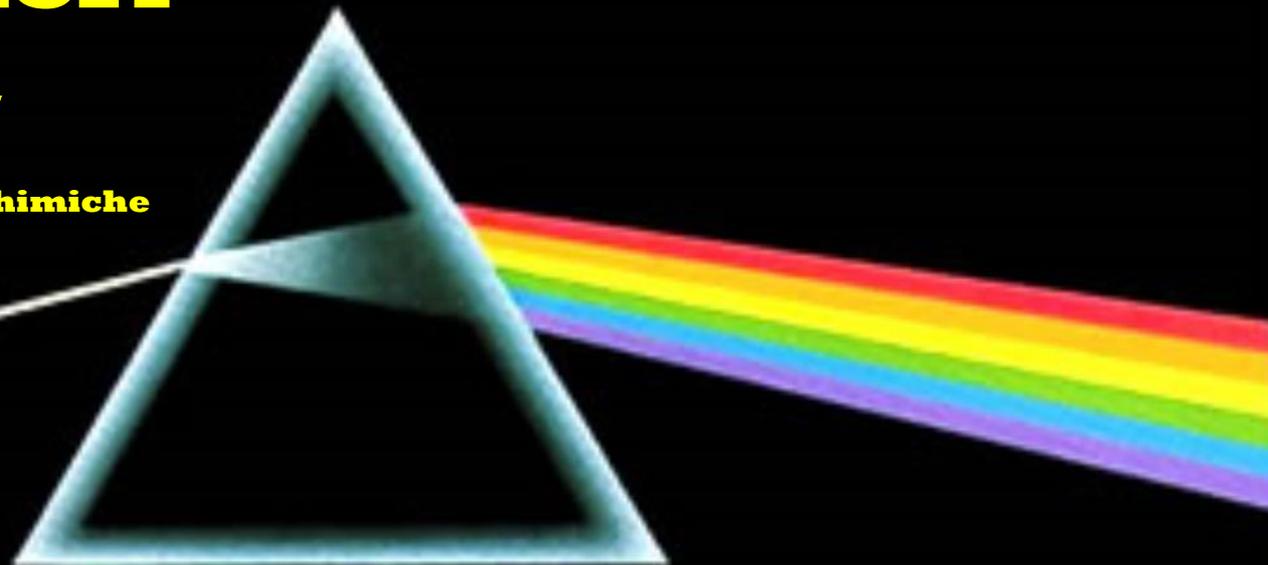
Modificazioni nella struttura secondaria di una proteina sono comunemente osservate attraverso il suo spettro UV, in quanto l'assorbimento degli aminoacidi aromatici e dei legami peptidici è significativamente influenzato dall'ambiente locale.

Pertanto, lo spettro UV di una proteina denaturata differisce da quello della stessa proteina nella forma nativa. Tuttavia, le modificazioni spettrali sono generalmente di piccola entità tanto che questo metodo non è quasi mai usato per questo tipo di studio. Al contrario, la denaturazione di una proteina può essere più sensibilmente monitorata attraverso il dicroismo circolare

**Corso di**  
**Proprietà di**  
**Biopolimeri**

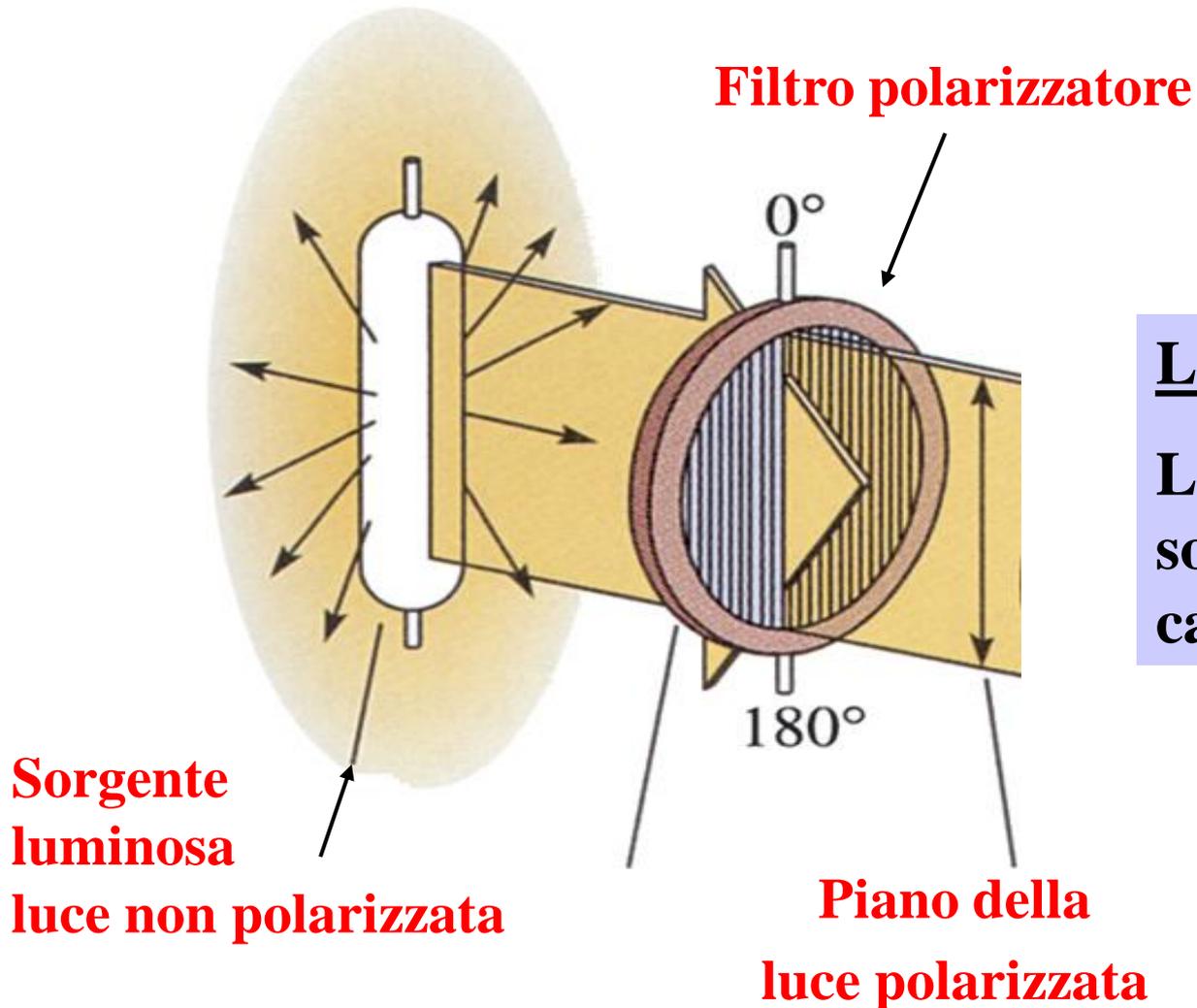
***Prof. R. URBANI***

**Dipartimento di Scienze Chimiche  
e Farmaceutiche  
a.a. 2023-2024**



**DICROISMO CIRCOLARE**

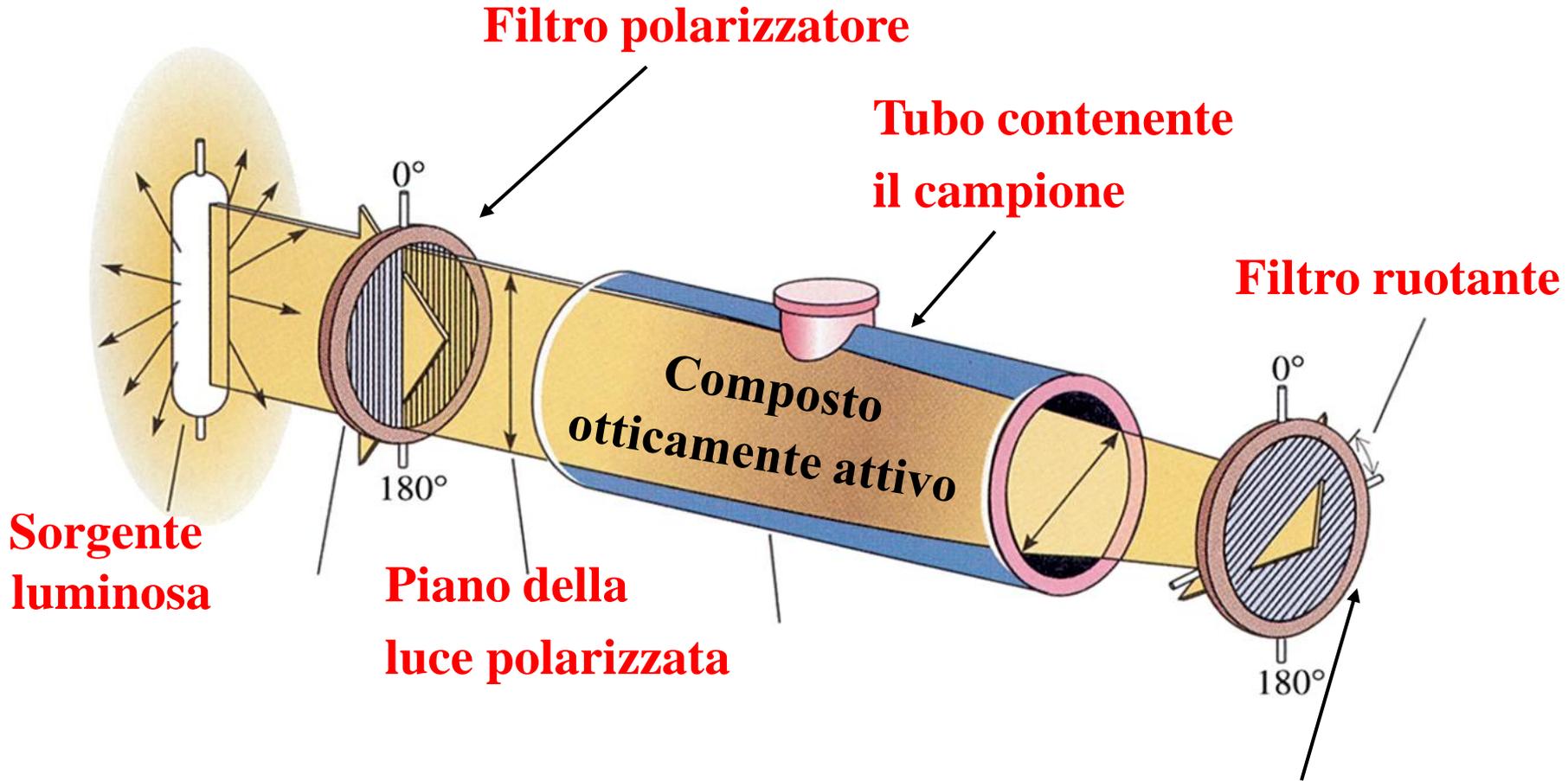
# L'attività ottica



**Luce polarizzata:**

**Luce che vibra in un solo piano (il vettore campo elettrico)**

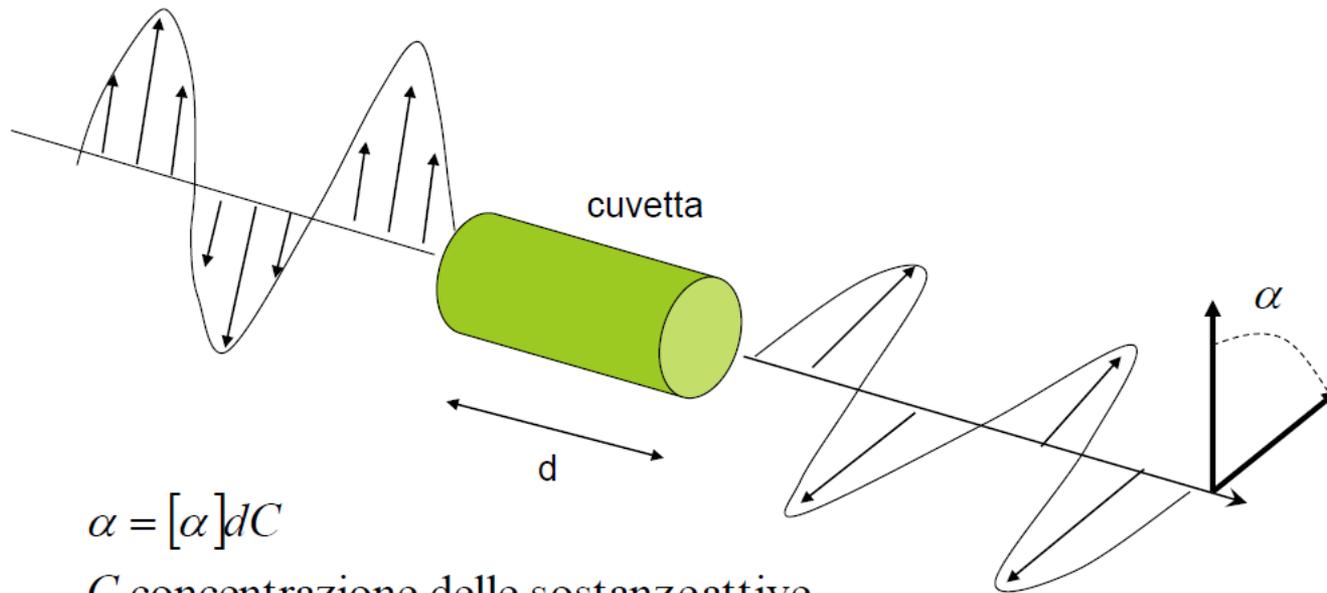
# Polarimetro



Consente di stabilire la rotazione  
del piano della luce polarizzata

Un enantiomero è un composto otticamente attivo

## Rotazione ottica



$$\alpha = [\alpha]dC$$

$C$  concentrazione delle sostanze attive

$d$  spessore della cuvetta

$[\alpha]$ : rotazione specifica, dipende dalla sostanza

## *Attività Ottica*

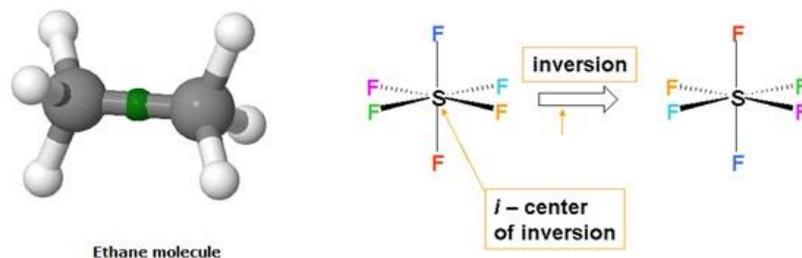
Una sostanza è attiva otticamente se ruota la luce polarizzata

Affinchè una sostanza esibisca attività ottica, essa deve essere chirale e un enantiomero deve essere in eccesso rispetto all'altro.

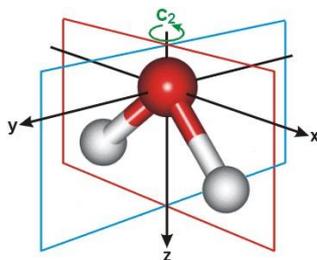
Gli enantiomeri si differenziano per il senso di rotazione del piano della luce polarizzata

Una molecola **È otticamente attiva** quando **NON possiede** alcuno degli elementi di simmetria seguenti:

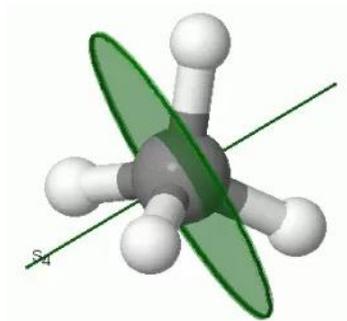
- 1) **Centro di simmetria (i)**: una molecola ha un centro di simmetria quando, per ogni atomo presente nella molecola vi è un altro diametralmente opposto al centro di simmetria a pari distanza.



- 2) **Asse di simmetria ( $C_n$ , rotazioni proprie)**: consistono in rotazioni intorno ad un asse di un angolo di  $2\pi/n$  in cui  $n$  rappresenta un qualsiasi numero intero e viene chiamato ordine dell'asse.



3) **Asse improprio ( $S_n$ )**: si intende la combinazione della operazione  $C_n$  con una riflessione rispetto al piano normale dell'asse stesso



Pertanto le precedenti condizioni si possono ridurre ad **un'unica condizione** secondo la quale **una molecola otticamente attiva non possiede assi di rotazione impropria  $S_n$** .

Al fine di comprendere meglio l'attività ottica è essenziale conoscere l'esatto significato dei termini: **simmetrico**, **dissimmetrico** e **asimmetrico**.

Una molecola è detta

- **simmetrica** e quindi **otticamente inattiva** se possiede un asse improprio  $S_n$  ;
- **dissimmetrica** e quindi di solito **otticamente attiva** se non ha assi impropri, ma può avere un asse di simmetria di rotazione propria;
- **asimmetrica** e quindi **otticamente attiva** se non ha né assi propri né assi impropri.

# Polarimetria

La **legge di Biot del potere rotatorio specifico delle soluzioni** determina la dipendenza della rotazione dalla concentrazione della sostanza otticamente attiva:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

dove ***l*** è il cammino ottico (in dm) della cella in cui è contenuta la soluzione e ***c*** è la concentrazione in g/ml.

La relazione (empirica) che lega il potere rotatorio alla temperatura è invece:

$$[\alpha]^t = [\alpha]^{20} + n(t - 20)$$

dove ***t*** è la temperatura in °C e ***n*** una costante di temperatura caratteristica per ciascuna sostanza.

## VIDEO ANIMAZIONI DI OTTICA

<http://cddemo.szialab.org/>

## Birifrangenza e dicroismo circolare

In termini generali, il fenomeno dell'attività ottica si può spiegare considerando che una **sostanza chirale** interagisce in modo diverso **con le due componenti chirali** – ovvero polarizzate circolarmente – della luce polarizzata linearmente.

In particolare, la rotazione ottica è dovuta al fatto che le radiazioni polarizzate circolarmente a sinistra e a destra si propagano nel mezzo otticamente attivo **con velocità diverse** (***birifrangenza circolare***).

In altre parole

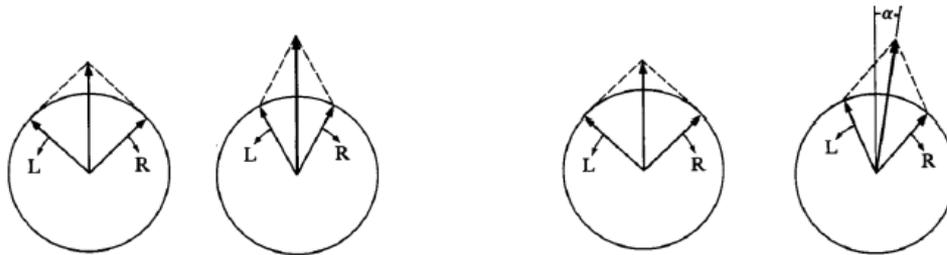
$$n_L(\lambda) \neq n_R(\lambda)$$

dove  $n_L(\lambda)$  e  $n_R(\lambda)$  sono gli indici di rifrazione per la radiazione di lunghezza d'onda  $\lambda$  con polarizzazione circolare rispettivamente a sinistra e a destra.

Lo studio della variazione della rotazione ottica al variare della lunghezza d'onda si dice **dispersione ottica rotatoria** (**optical rotation dispersion, ORD**)

**Attività Ottica** è la differente interazione con luce polarizzata circolarmente a destra e a sinistra

*Rotazione ottica* – conseguenza di diversi indici di rifrazione tra polarizzazione a destra e a sinistra -- i.e.,  $n_L \neq n_R$  (*birifrangenza circolare*).



Otticamente inattiva,  $n_L = n_R$

Otticamente attiva,  $n_L \neq n_R$

$$\alpha = 1800 / \lambda (n_L - n_R)$$

essendo  $\lambda$  la lunghezza d'onda della luce incidente. In pratica si misura la rotazione specifica  $[\alpha]$  definita dalla relazione già vista:

$$[\alpha] = \alpha / l c$$

Dove  $\alpha$  è misurato in gradi,  $l$  in decimetri e  $c$  in grammi di sostanza otticamente attiva disciolta in 1 mL di soluzione.

La dipendenza della rotazione ottica dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente  $\lambda$ , per lunghezze d'onda non troppo vicine a bande di assorbimento del soluto, può essere espressa tramite **l'equazione di Drude**:

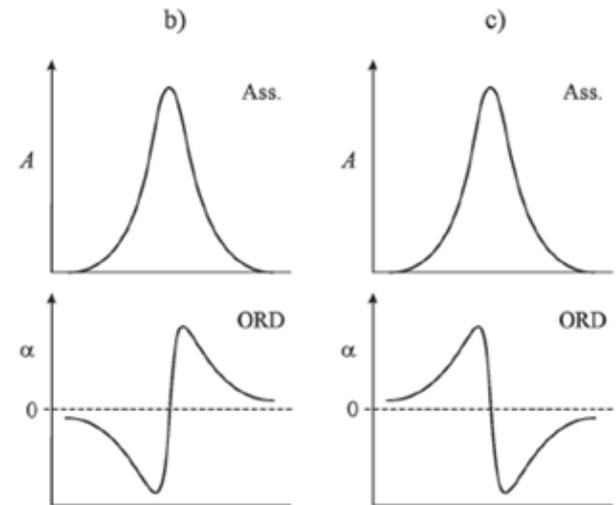
$$[\alpha] = \sum_j \frac{A_j}{\lambda^2 - \lambda_j^2}$$

dove gli  $A_j$  sono dei parametri empirici costanti che dipendono dal numero di bande di assorbimento.

L'equazione di Drude è **una legge empirica** che però trova conferma nello sviluppo rigoroso della teoria della **Dipersione Ottica Rotatoria (ORD)**.

I composti che **non presentano assorbimenti elettronici otticamente attivi** nel campo delle lunghezze d'onda indagato, hanno curve ORD prive di massimi e di minimi.

Invece, in vicinanza di bande di assorbimento, che siano otticamente attive, si hanno brusche variazioni dell'angolo di rotazione con attraversamenti dell'asse di rotazione zero (**effetto Cotton**).



# Dispersione ottica rotatoria ORD

- Si misura l'ottica rotatoria a lunghezze d'onda diverse
- Collegata matematicamente al dicroismo circolare
- Tecnica specialistica, CD è molto più usato.

Circa 10 anni prima che la strumentazione per CD diventasse disponibile in commercio, sono stati introdotti gli spettropolarimetri in grado di misurare la rotazione ottica in funzione della lunghezza d'onda e applicati a proteine e polipeptidi.

Questi strumenti hanno permesso di misurare la dispersione ottica rotatoria, che è la spettroscopia di birifrangenza circolare, che misura cioè la **differenza dell'indice di rifrazione** per la luce circolarmente polarizzata in funzione della lunghezza d'onda.

La differenza di indici di rifrazione tra l.c.p. (left) e r.c.p.(right) porta a una differenza di fase che fa ruotare il piano della luce polarizzata quando la luce attraversa il mezzo.

La rotazione ottica  $\alpha$  è correlata alla birifrangenza circolare

$$\alpha \text{ (deg)} = 180 \cdot \mathbf{l} \cdot (n_L - n_R) / \lambda = 180 \cdot \mathbf{l} \cdot \Delta n / \lambda$$

Nella regione di lunghezze d'onda in cui il campione **assorbe** la radiazione, si può verificare un assorbimento diverso da parte della sostanza otticamente attiva per le due componenti polarizzate circolarmente di un'onda linearmente polarizzata.

Ciò significa che la sostanza possiede diversi coefficienti di assorbimento per la luce levogira e destrógira,

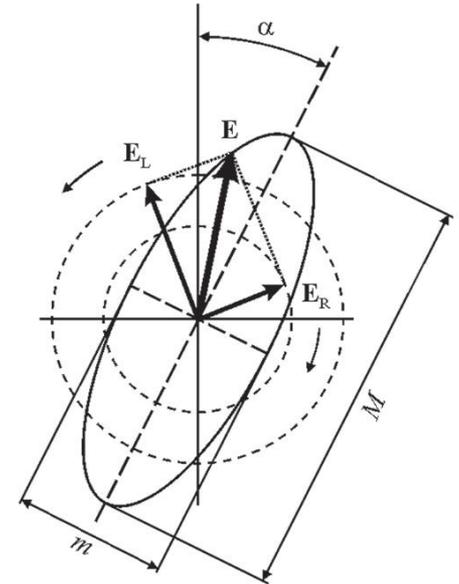
$$\epsilon_L(\lambda) \neq \epsilon_R(\lambda).$$

Questo fenomeno prende il nome di **dicroismo circolare (circular dichroism, CD)**.

In questo caso, quando le due componenti polarizzate circolarmente fuoriescono dal campione avranno, **oltre ad uno sfasamento diverso, anche diversa ampiezza.**

La loro composizione dà origine ad una radiazione polarizzata non più linearmente, ma **ellitticamente**:

L'estremità del vettore campo elettrico risultante, nella sua proiezione su un piano perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda, **descrive ora un'ellisse**



L'asse principale dell'ellisse e la direzione di polarizzazione della luce incidente individuano **l'angolo di rotazione ottica** ( $\alpha$  nella Figura) dovuto ai diversi valori dell'indice di rifrazione per la luce levogira e destrogira.

Il **diverente assorbimento** per le due componenti polarizzate circolarmente si esprime attraverso **l'ellitticità**  $\theta$ , definita come l'angolo la cui **tangente** è pari al rapporto fra **l'asse minore** ( $m$ ) e quello **maggiore** ( $M$ ) dell'ellisse:

$$\tan \theta = \frac{m}{M}$$

Il valore dell'ellitticità  $\theta$  è legato alla **differenza di assorbanza** per le due componenti polarizzate circolarmente e dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione.

La misura dell'ellitticità in funzione della lunghezza d'onda costituisce l'obiettivo della spettroscopia di dicroismo circolare.

Poiché la dispersione rotatoria ottica e il dicroismo circolare sono causati dallo stesso fenomeno (**diversa interazione della luce levogira e destrogira con una sostanza otticamente attiva**), esiste una stretta relazione fra gli spettri ORD e CD della stessa sostanza.

Essi sono legati fra loro dalle cosiddette **equazioni di Krönig-Kramers**, che permettono di risalire allo spettro ORD conoscendo lo spettro CD e viceversa.

Solitamente lo spettro ORD si registra nei campi spettrali in cui il composto esaminato **non presenta bande di assorbimento**;  
al contrario, esso presenterà uno spettro CD nella regione di **assorbimento**.

L'ORD e il CD sono strettamente correlati tra loro, proprio come l'assorbimento e l'indice di rifrazione.

Se si conosce lo spettro CD completo, si può calcolare lo spettro ORD e viceversa.

Le relazioni tra i due tipi di spettri sono chiamate **trasformazioni di Krönig-Kramers** e sono le seguenti:

$$[\phi] = (9000 \ln 10 / \pi^2) \int_0^{\infty} \Delta\varepsilon(\lambda') \lambda' d\lambda' / (\lambda^2 - \lambda'^2)$$

$$\Delta\varepsilon = -(2250 \ln 10 \lambda)^{-1} \int_0^{\infty} [\phi(\lambda')] \lambda'^2 d\lambda' / (\lambda^2 - \lambda'^2)$$

## Differenza degli spettri di indice di rifrazione (ORD) e di assorbimento (CD)

La Figura mostra i contributi CD e ORD di una singola transizione elettronica rispetto alla banda di assorbimento associata alla transizione elettronica.

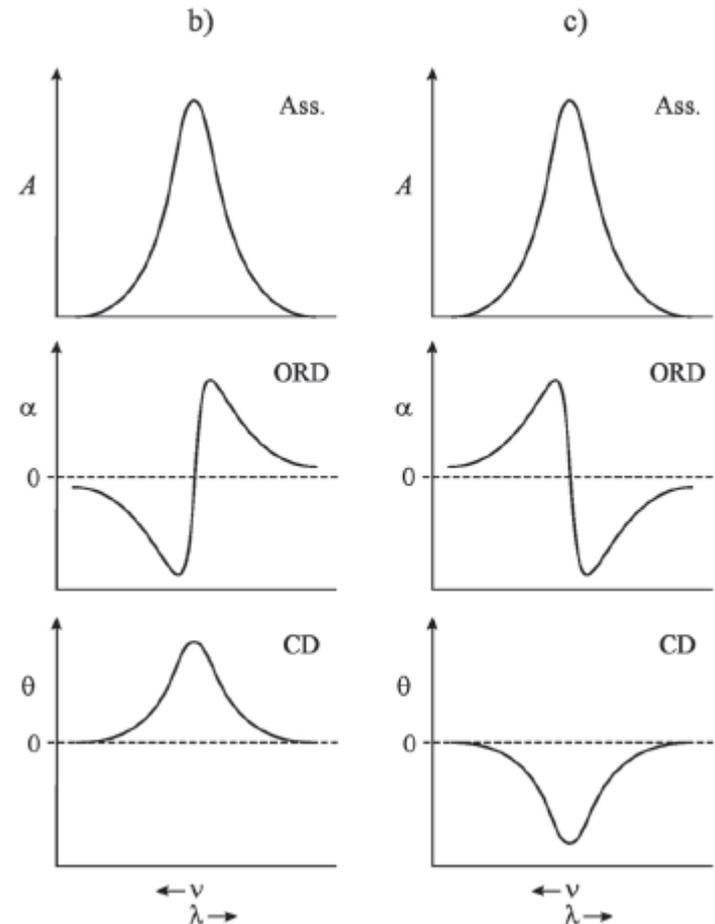
Nell'**effetto Cotton positivo** la dispersione rotatoria ottica (ORD) si verifica in corrispondenza di una banda CD positiva.

Viceversa, l'**effetto Cotton negativo** si verifica in corrispondenza di una banda CD negativa.

La lunghezza d'onda alla quale la rotazione ottica si annulla corrisponde al massimo dell'ellitticità.

Come mostrato in Figura, la banda CD associata a una transizione elettronica diminuisce bruscamente man mano che ci si allontana da  $\lambda_{\max}$ , generalmente come una funzione **gaussiana**, mentre per ORD, il contributo di una transizione diminuisce molto più lentamente, come  $(\lambda^2 - \lambda_{\max}^2)^{-1}$ .

L'unico vantaggio dell'ORD è che si possono studiare molecole per le quali le misure CD sono impossibili perché le regioni in cui assorbono sono al di fuori dell'intervallo della strumentazione CD o per esempio sono oscurate da un forte assorbimento del solvente.



## Dicroismo circolare e conformazioni

- Nel caso delle molecole biologiche, l'informazione sulla configurazione non è interessante (già si conosce!).
- Vogliamo studiare la conformazione.
- A causa dell'interazione tra cromofori, il dicroismo circolare è molto sensibile anche alla conformazione!

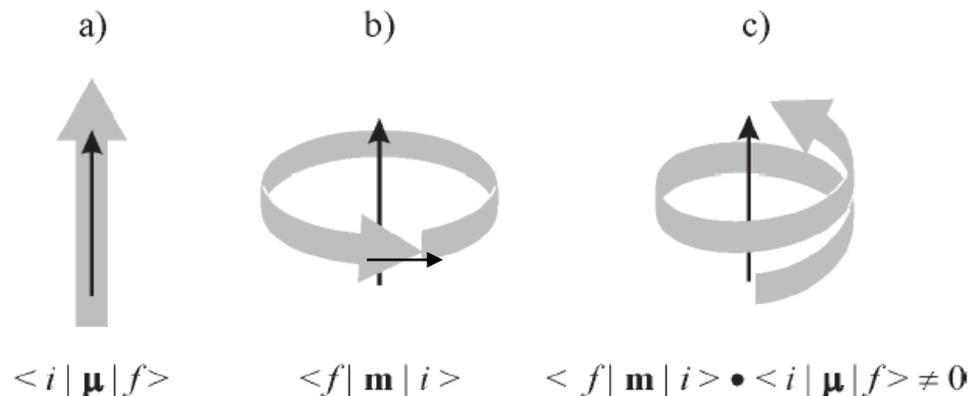
La discussione dettagliata dell'origine del dicroismo circolare va fatta in termini **quantomeccanici** e, data la complessità dell'argomento, è al di fuori dello scopo di questo corso.

Vale comunque la pena di ricordare che qualsiasi transizione elettronica da uno stato iniziale ***i*** a uno stato finale ***f*** è caratterizzata da una **forza rotatoria  $R_{i \rightarrow f}$** .

**Essa determina l'intensità dello spettro di dicroismo circolare** e può essere calcolata integrando lo spettro CD nella regione spettrale della transizione esaminata.

In assenza di orientazione preferenziale delle molecole, la **forza rotatoria della transizione** è uguale alla parte immaginaria del prodotto scalare fra il momento di dipolo elettrico  **$\mu$**  e il momento di dipolo magnetico  **$m$**  indotti dalla luce sulla molecola (**momenti di transizione**):

$$R_{i \rightarrow f} = \text{Im}(\langle f | \mathbf{m} | i \rangle \cdot \langle i | \boldsymbol{\mu} | f \rangle)$$



Se la distribuzione delle orientazioni molecolari non è isotropa, l'espressione di  $R_{i \rightarrow f}$  diventa molto più complessa.

Come discusso in precedenza, il dicroismo circolare si osserva per **molecole chirali**, cioè prive di un piano o di un centro di simmetria perché dotate di atomi stereogenici o perché intrinsecamente asimmetriche per motivi strutturali (ad esempio con composti stericamente ingombranti) o conformazionali (come le proteine con struttura ad elica).

Per una data transizione la forza rotatoria di un enantiomero è uguale e di segno opposto a quella dell'altro enantiomero.

Nelle molecole achirali, per ragioni di simmetria, si verifica che i due vettori  $\mu$  e  $m$  sono perpendicolari fra loro oppure uno di essi è uguale a zero, pertanto  $R_{i \rightarrow f} = 0$  e non si ha dicroismo circolare.

Si può osservare dicroismo circolare anche per **molecole achirali immerse in ambienti chirali** (ad esempio, sciolte in un solvente chirale o complessate da molecole chirali). Questo effetto, generalmente molto debole, prende il nome di **dicroismo circolare indotto (ICD)**.

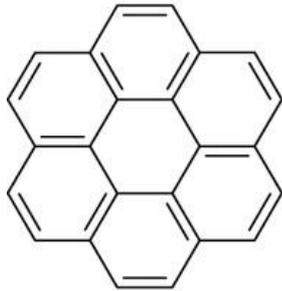
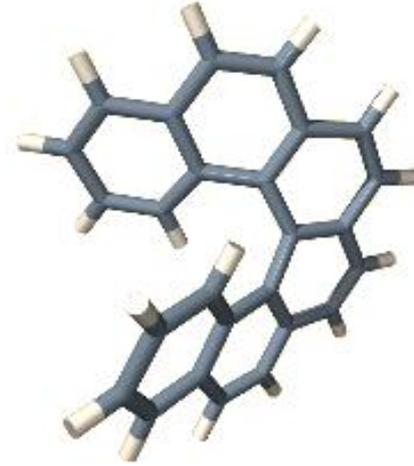
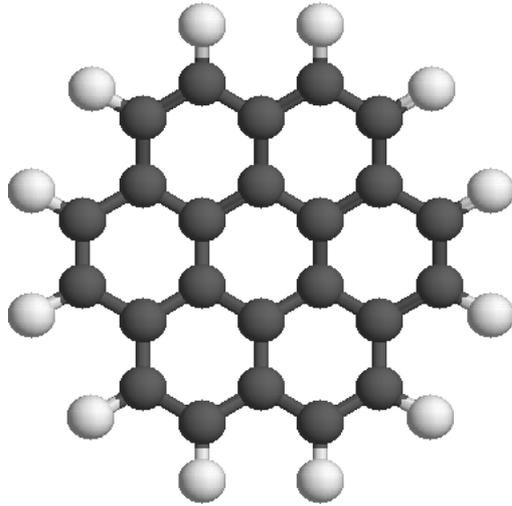
## CD: unità di misura e sensibilità

- La differenza di assorbanza  $A_L - A_R$  è molto piccola (generalmente di circa 0.0001 unità di assorbanza)
- Necessita di apparato di rivelazione molto sensibile ecco perché uno strumento CD è più costoso di uno UV/VIS
- Questa differenza si misura in **ellitticità molare**  $\theta_r$

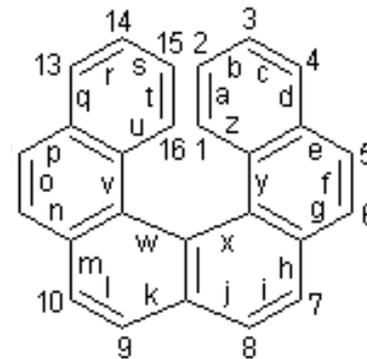
## N.B.

Una struttura ad elica ( ***$\alpha$ -elica proteica ma anche pseudoelica di polisaccaridi, doppia elica DNA, ...***) ha **due motivi chirali: l'elica stessa e i singoli amminoacidi** che contengono almeno un carbonio asimmetrico (unica eccezione la glicina).

# cromoforo NON CHIRALE CHE SI TROVI IN UN INTORNO CHIRALE



coronene



esaelicene

# Lo spettro CD

Un cromoforo chirale, ma anche un cromoforo NON CHIRALE CHE SI TROVI IN UN INTORNO CHIRALE, può assorbire le luci polarizzate circolarmente destra e sinistra in maniera diversa, cioè con assorbanze  $A_D$  ed  $A_S$  (e quindi anche assorbanze specifiche molari  $\varepsilon_D$  ed  $\varepsilon_S$ ) diverse.

Uno spettro CD è un grafico del **dicroismo circolare**:  $\Delta A = A_S - A_D$

o del **dicroismo circolare molare**:

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_R - \varepsilon_S$$

in funzione della lunghezza d'onda. Uno spettro CD assomiglia quindi ad un normale spettro UV, ma  $\Delta A$  e  $\Delta \varepsilon$  possono anche assumere valori negativi. Naturalmente la relazione tra  $\Delta A$  e  $\Delta \varepsilon$  è ancora la legge di Lambert-Beer:

$$\Delta A = \Delta \varepsilon l c$$

dove  $l$  è il cammino ottico (in cm) e  $C$  è la concentrazione molare.

Di solito il dicroismo circolare è espresso sotto forma di **ellitticità molare**.

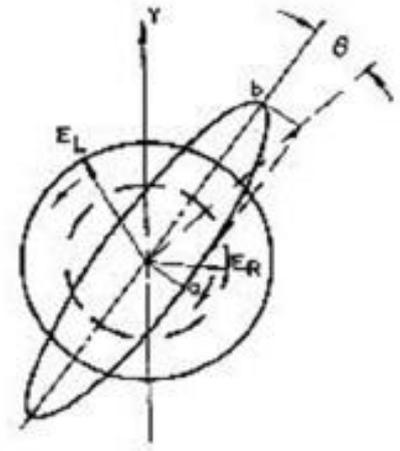
L'ellitticità è definita come un angolo la cui tangente è uguale al rapporto tra l'asse minore ed asse maggiore dell'ellisse, e va da  $0^\circ$  per una luce polarizzata linearmente a  $45^\circ$  per una luce polarizzata circolarmente.

$$\tan \theta = \frac{m}{M}$$

Tuttavia poiché la differenza di assorbanza è sempre molto piccola, anche l'angolo assume sempre valori piccoli (si possono misurare ellitticità di  $1/1000$  di grado), ed è proporzionale alla concentrazione. Si può allora definire una ellitticità molare  $[\theta]$ :

$$[\theta] = \frac{\theta}{l \cdot c}$$

dove  $l$  è espresso in dm e  $c$  è la concentrazione decimolare, ossia espressa in moli per 100 ml (o dmol/L).



Sperimentalmente, misuriamo l'angolo  $\theta$  (mdeg)

$$[\theta] = \frac{\theta}{l \cdot C}$$

$$[\theta] = \frac{\theta(\text{mdeg})}{10 \cdot C \left( \frac{\text{mol}}{L} \right) \cdot l(\text{cm})}$$

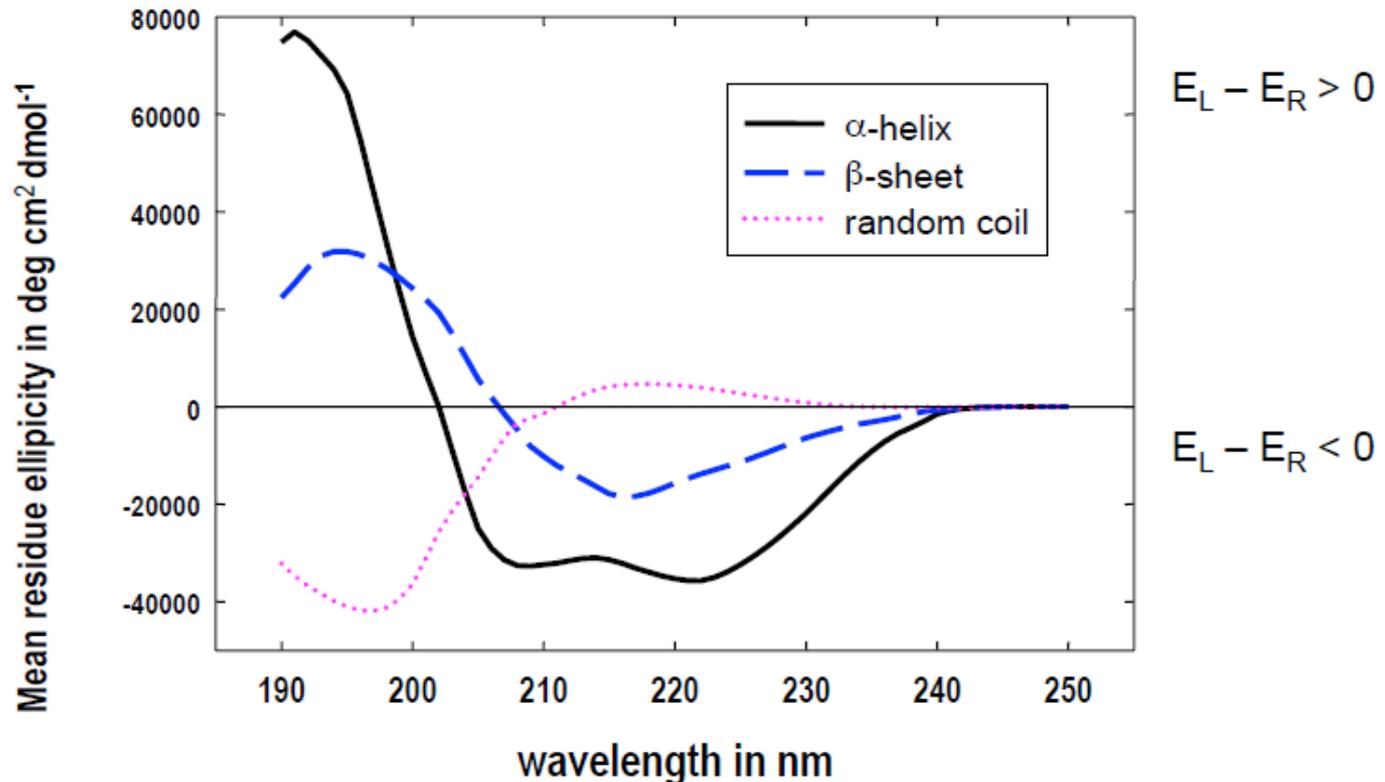
$$[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]$$

$$[\theta]_{MWR} = \frac{MWR \cdot \theta(\text{mdeg})}{10 \cdot C \left( \frac{g}{L} \right) \cdot l(\text{cm})}$$

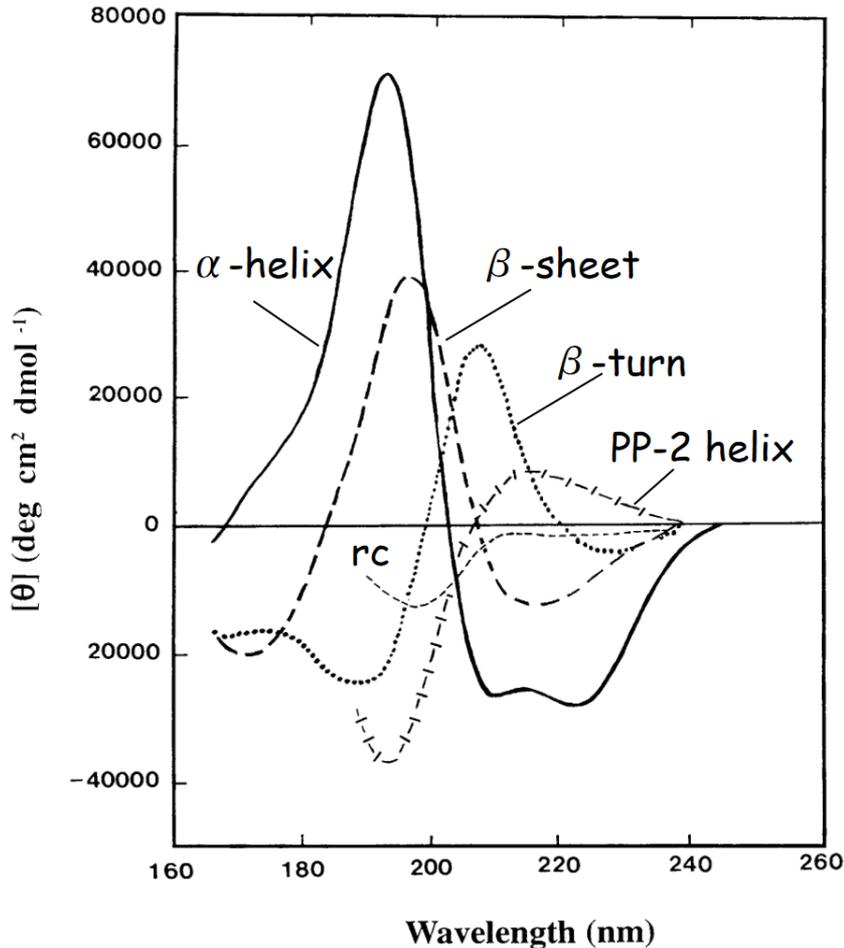
MWR=peso medio del residuo a.a.

$$[\Delta\varepsilon] = \frac{MWR \cdot \theta(\text{mdeg})}{10 \cdot C \left( \frac{g}{L} \right) \cdot l(\text{cm}) \cdot 3298} \quad [M^{-1} \text{cm}^{-1}]$$

# Segnali CD per strutture secondarie pure



- Queste sono **curve standard di Fasman** per poly-lysine in differenti ambienti.



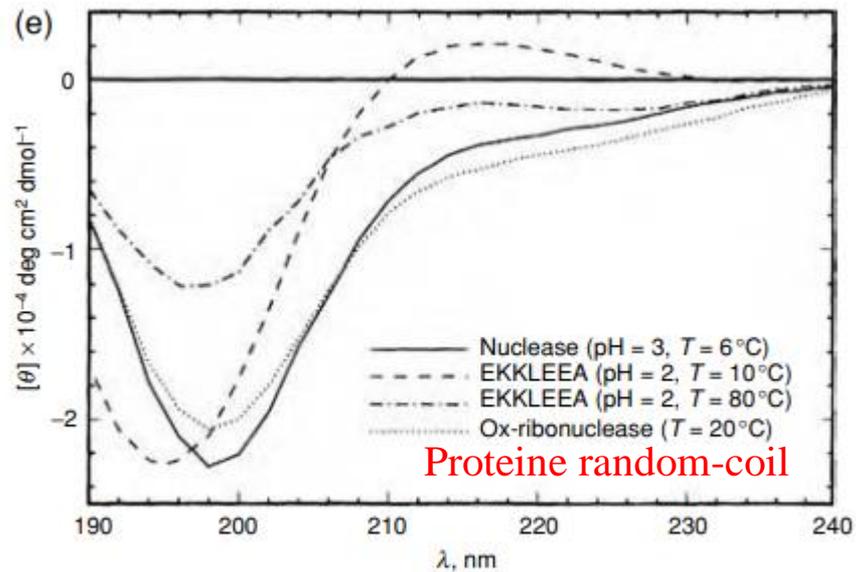
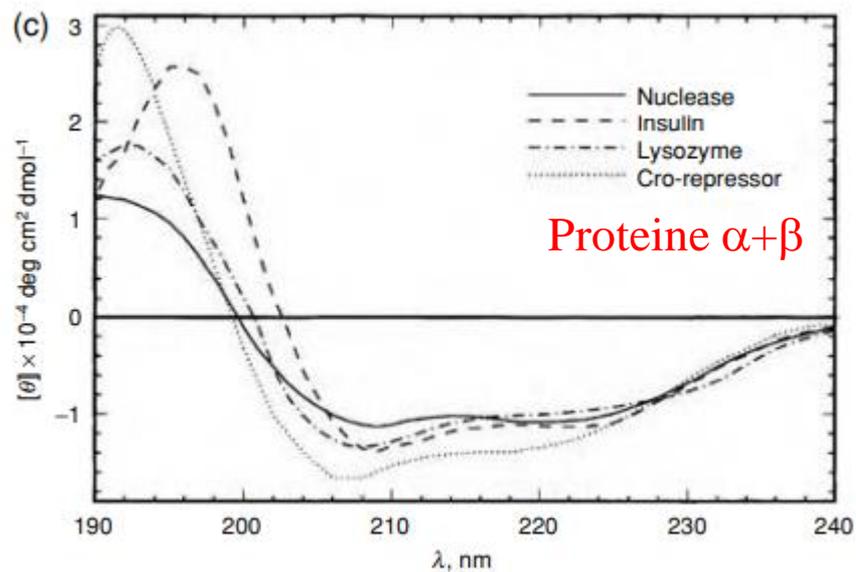
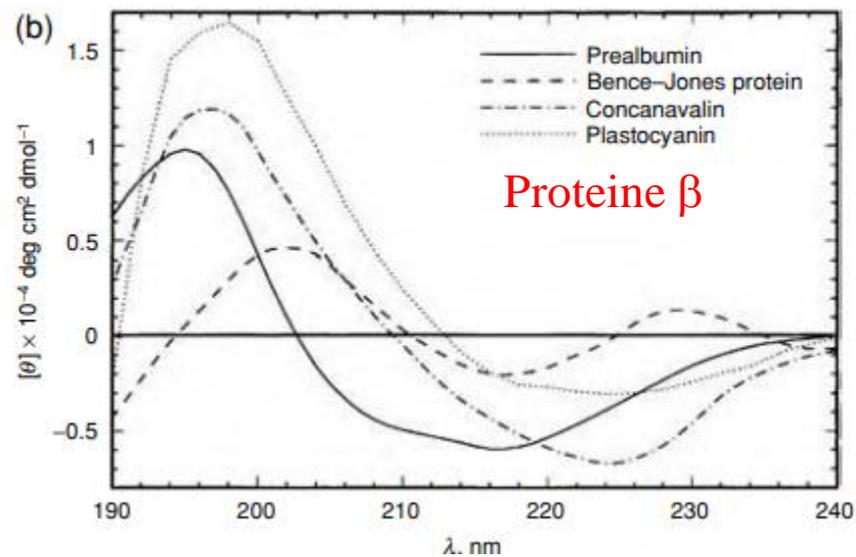
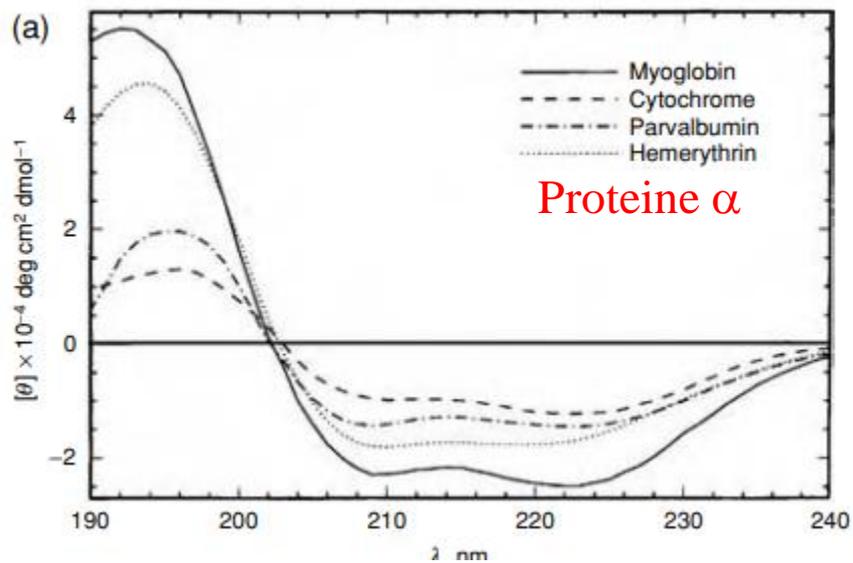
Un polipeptide tutto  $\alpha$ -elica  
ha un'ellitticit  di  $-38000 \text{ deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$  a  
222 nm

Un polipeptide tutto random-coil ha  
un'ellitticit  di  $-1200 \text{ deg cm}^2 \text{mol}^{-1}$  a 200 nm

In generale, nello spettro CD:

- dai picchi a 190 nm (positivo) e 208 nm e 222 nm (negativo) si calcola il contenuto di  **$\alpha$ -elica**;
- dai picchi a 195-200 nm (positivo) e 215 nm (negativo) la frazione di **foglietto  $\beta$** ;
- dal picco a 215 nm il contenuto di  **$\beta$ -turn**.
- La struttura **rc** ha un solo picco negativo attorno a 195 nm.

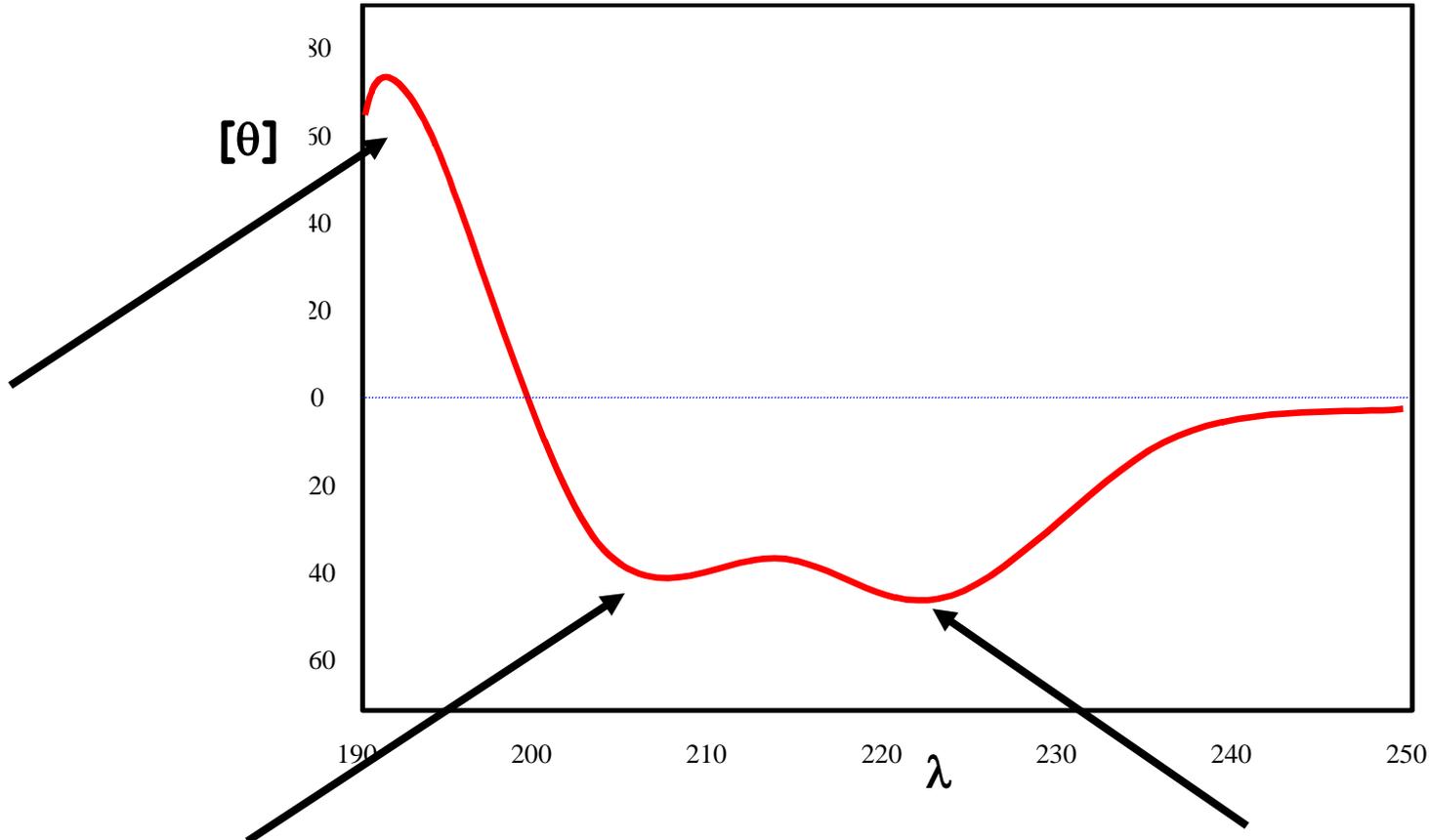
<i>Secondary structure element</i>	<i>Signal</i>	<i>Electron transition</i>	<i>Position of minimum or maximum</i>	<i>Molar ellipticity of minima and maxima</i> [deg·cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> ]
α-helix	positive	π->π*	190-195 nm	60.000 to 80.000
	negative	π->π*	208	-36.000 ± 3.000
	negative	n->π*	222	-36.000 ± 3.000
β-sheet	positive	π->π*	195 - 200	30.000 to 50.000
	negative	n->π*	215 - 220	-10.000 to -20.000
random	negative	π->π*	ca. 200	-20.000
	positive	n->π*	220	



# $\alpha$ -elica

La conformazione ad  $\alpha$ -elica è la più comune in molte proteine soprattutto quelle globulari.

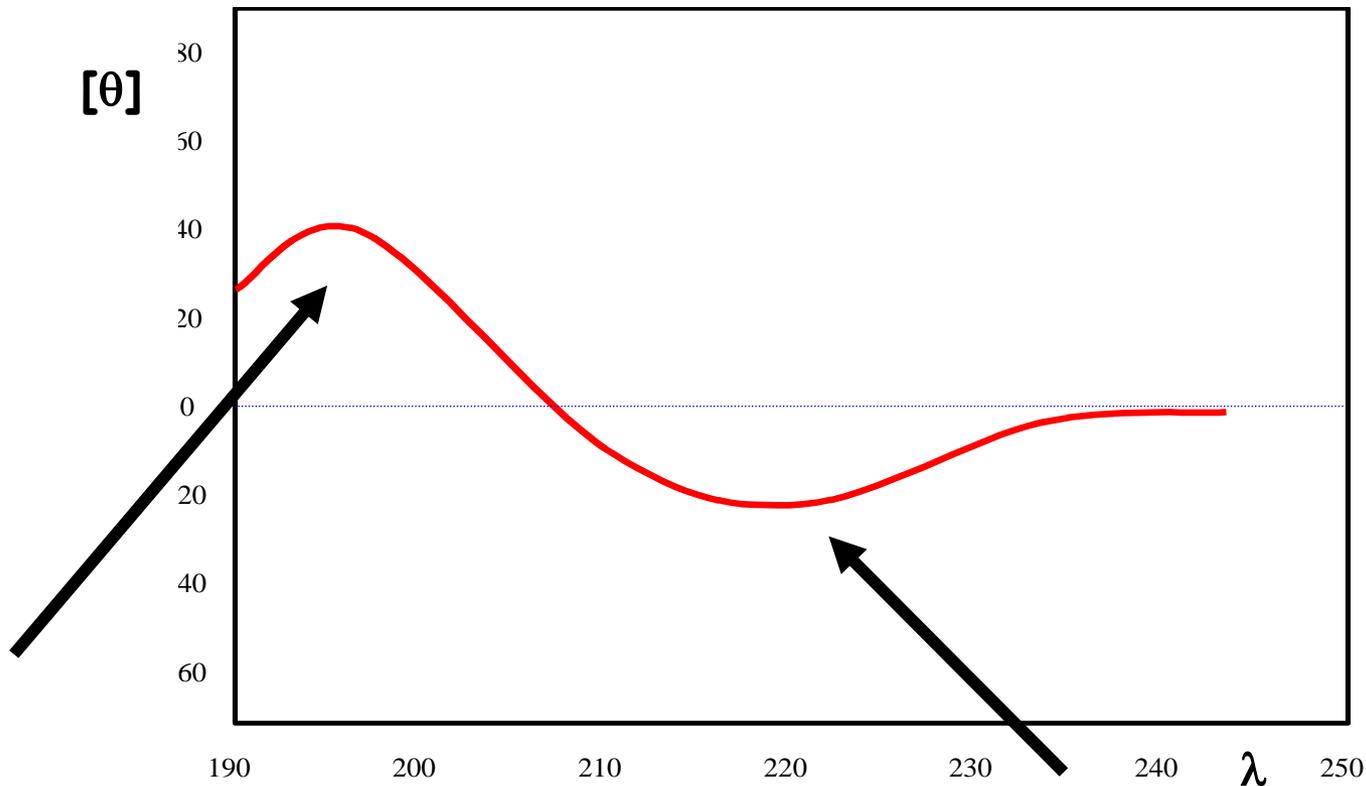
Uno spettro CD di un polipeptide ad  $\alpha$ -elica è tipicamente caratterizzato da una **banda negativa a 222 nm dovuta alla transizione  $n-\pi^*$**  e da **una banda negativa a 208 nm e una positiva a 198 nm** relativa all'exciton coupling delle **transizioni  $\pi-\pi^*$**  del peptide.



# Foglietto $\beta$

Le misure CD di polipeptidi con struttura secondaria di tipo  $\beta$  sono complicate dalla scarsa solubilità del peptide stesso nel solvente solitamente utilizzato per la misura e dalla possibilità che esistano catene parallele o anti parallele.

In genere lo spettro CD mostra due assorbimenti **uno positivo a 195 nm e uno negativo a 216 nm**, di comparabile intensità.

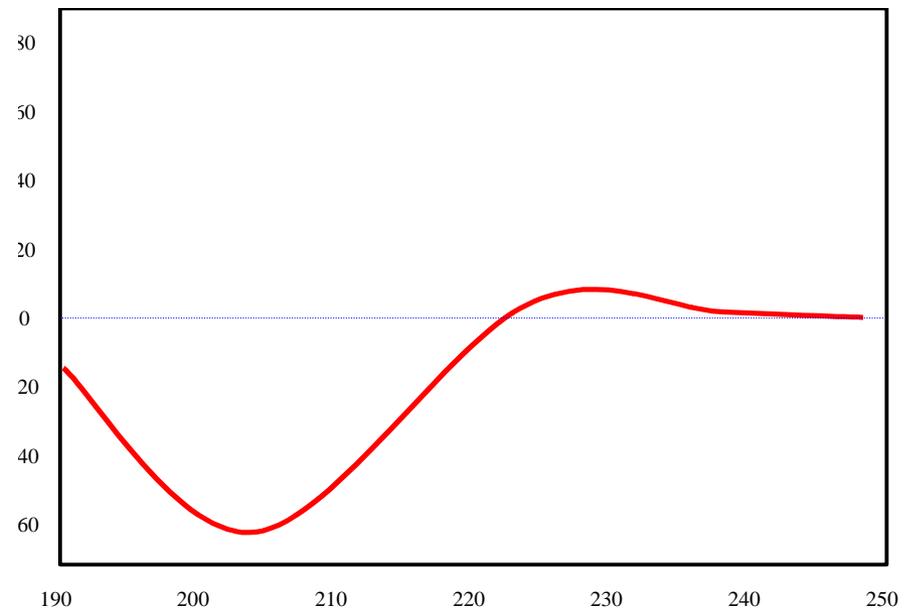
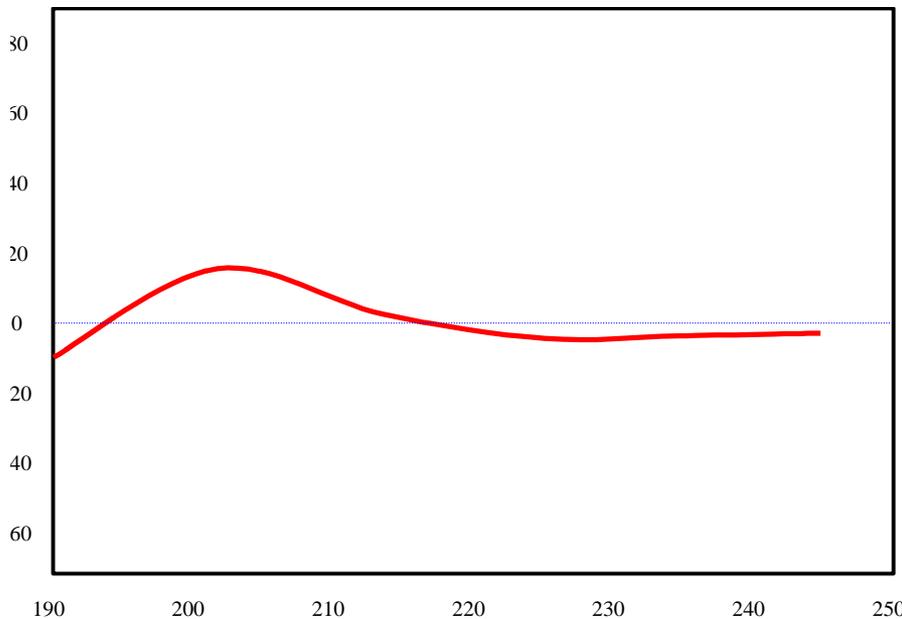


# $\beta$ -turn

**Le strutture secondarie definite  $\beta$ -turn sono quelle in cui la catena peptidica va incontro ad una inversione della sua direzione.**

**Le strutture di questo tipo sono tipicamente presenti in polipeptidi ciclici ricchi di residui di prolina.**

**Gli spettri CD di queste strutture secondarie sono molto meno informativi dei precedenti e possono essere a secondo dei casi simili a quelli dei peptidi a conformazione di foglietto pieghettato o ad  $\alpha$ -elica**



# Applicazioni del CD in biologia strutturale

- Determinazione della struttura secondaria di **proteine che non possono essere cristallizzate**
- Studio dell'effetto di farmaci legati sulla struttura secondaria di proteine.
- Processi dinamici, e.g. **folding** delle proteine
- Studi gli **effetti dell' "intorno"** sulla struttura delle proteine
- Struttura secondaria e super secondaria delle **proteine di membrana**
- Studi sui cambiamenti conformazionali indotti dai leganti
- Conformazione dei carboidrati
- Analisi delle **interazioni proteina-proteina** e proteina-acido nucleico

# Perchè utilizzare il CD?

- Facile e veloce
- Preparazione minima del campione
- Misure in soluzione
- Concentrazioni/quantità di campioni basse
- Tempi di risoluzione di microsecondi
- Qualsiasi dimensione macromolecolare

La facilità delle misure CD è attraente, ma il CD, a differenza di altre due potenti tecniche - la diffrazione dei raggi X dei cristalli di proteine e la NMR per le soluzioni di proteine - non è in grado da solo di determinare la struttura tridimensionale di una proteina.

Il metodo di diffrazione dei raggi X richiede proteine cristalline, molte delle quali sono spesso difficili o addirittura impossibili da ottenere.

Il metodo alternativo NMR è ancora limitato alle proteine di peso molecolare relativamente basso (circa 15.000 o meno).

Entrambi i metodi fisici richiedono molto tempo di esecuzione.

Gli spettri CD possono solo fornire buone stime delle percentuali di residui aminoacidici nella struttura secondaria delle proteine.

Gli elementi della struttura secondaria nelle molecole proteiche reali sono ben lontani dai modelli ideali ( $\alpha$  elica e  $\beta$  foglietto); pertanto, l'assegnazione della struttura secondaria delle proteine rimane ancora problematica.

I cristallografi spesso determinano la conformazione locale di un residuo aminoacidico in relazione ai residui vicini e lo schema dei legami idrogeno coinvolti ispezionando il modello atomico della proteina. Spesso tali assegnazioni possono essere piuttosto soggettive e spesso incomplete.

Sia i calcoli teorici che le numerose misure sperimentali hanno dimostrato un'elevata sensibilità degli spettri CD nella definizione della struttura secondaria delle proteine.

N.B.

## I contributi CD sono additivi

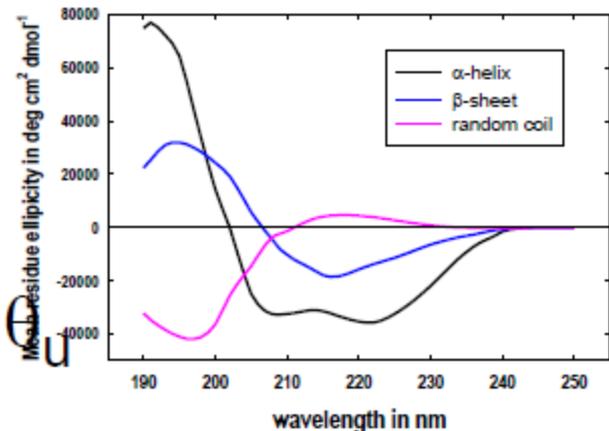
Si può determinare il contributo della struttura  $\alpha$  elica, della  $\beta$  foglietto e del “random coil” mediante misure CD del peptide in soluzione

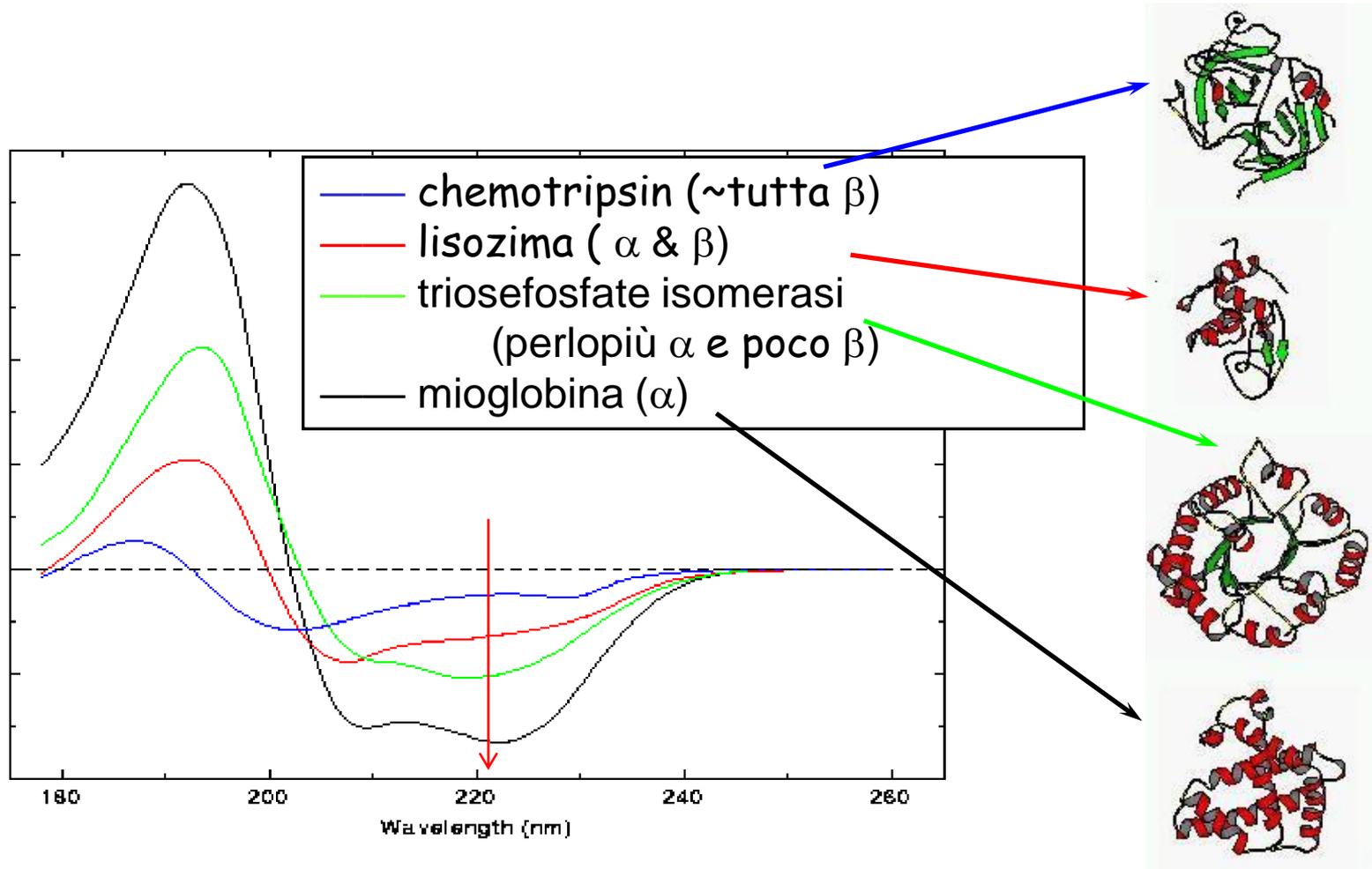
Se misuriamo il segnale CD per una proteina di struttura sconosciuta possiamo trovare la proporzione della struttura secondaria

- Fittare la curva sconosciuta  $\theta_u$  ad una combinazione di curve standard.
- Nel caso più semplice usare gli standard di Fasman

$$\theta_t = x_\alpha \theta_\alpha + x_\beta \theta_\beta + x_c \theta_c$$

- variare  $x_\alpha$ ,  $x_\beta$  and  $x_c$   
per avere il fit migliore di  $\theta_t$  su  $\theta_u$   
mentre  $x_\alpha + x_\beta + x_c = 1.0$



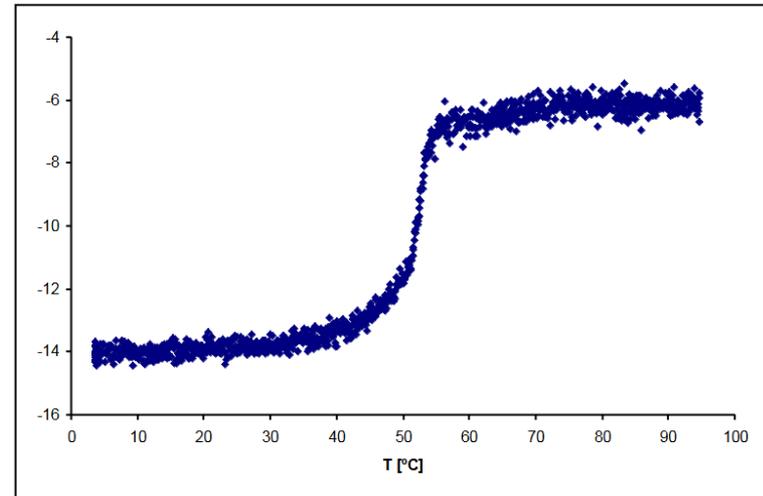
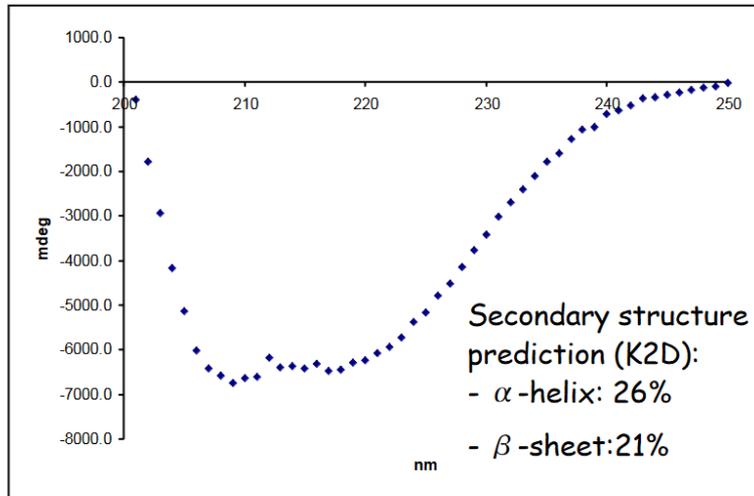


- N.B. il progressivo cambiamento a  $\theta_{222}$  con l'incremento della struttura a elica

# CD e variazioni conformazionali

Il monitoraggio a  $\theta=222$  di una proteina in funzione della temperatura o di denaturante chimico fornisce importanti informazioni sulla stabilità della proteina, permettendo di calcolare le grandezze termodinamiche  $\Delta g_u$ ,  $\Delta h_u$ ,  $\Delta s_u$ ,  $T_m$

## Unfolding of Procaspase-8

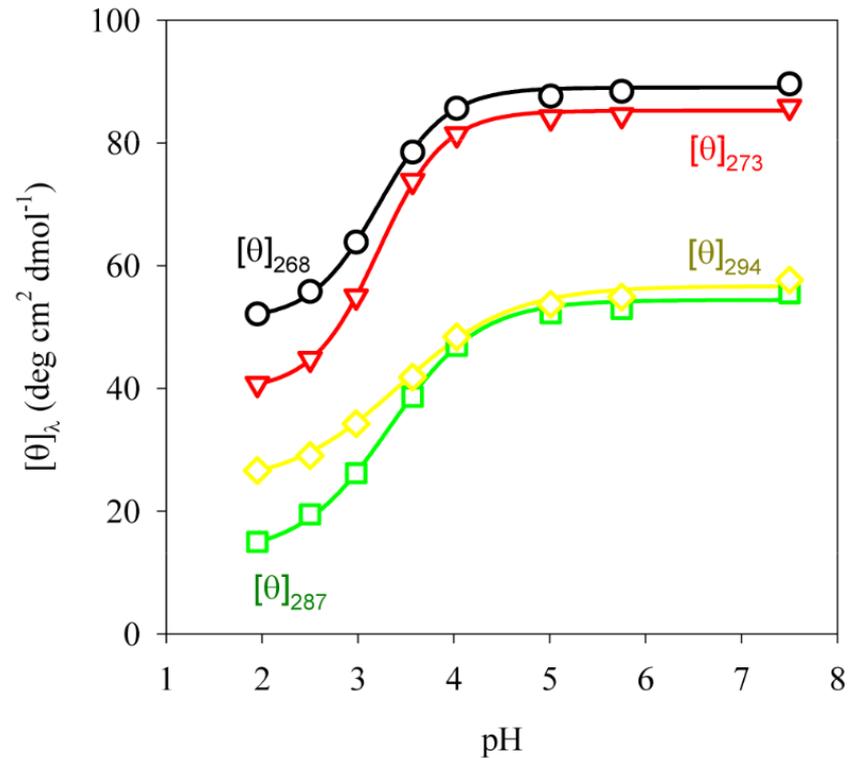
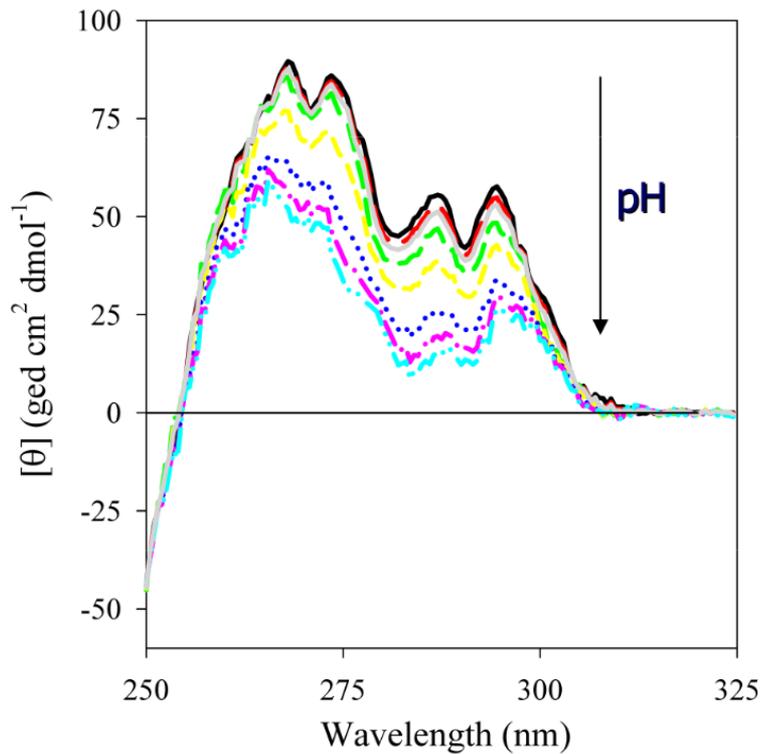


La caspasi 8 esiste come proenzima inattivo chiamato Procaspase-8, che è composto da 479 aminoacidi e ha un peso di 55kDa. È codificata dal gene CASP8 e va ad innescare la cascata di segnalazione a valle che porta all'apoptosi cellulare.

# Monitoring pH-induced Denaturation

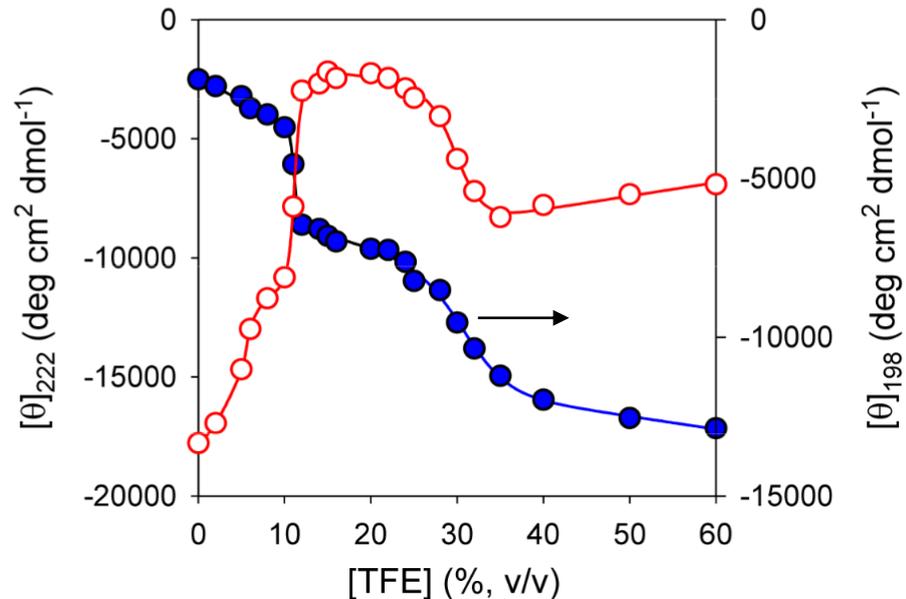
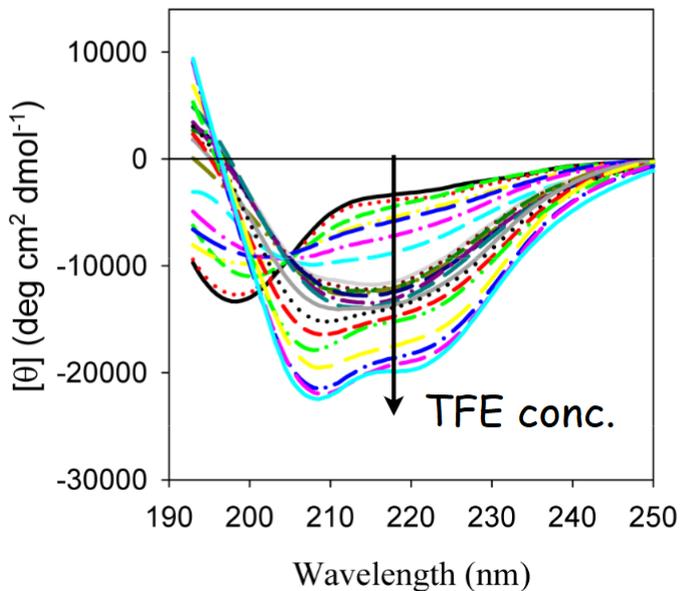
## pH-Induced denaturation of natively folded HuIL-1 $\beta$

(artrite reumatoide)

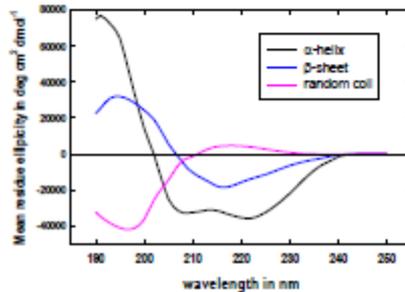
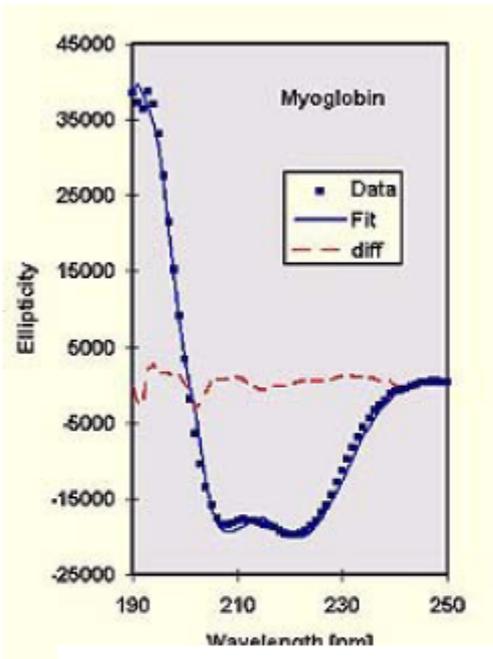


È probabile che un aumento dei livelli di  $\alpha$ -sinucleina nella cellula favorisca una maggiore aggregazione della proteina e determini la sua citotossicità. Come altri **amiloidi**, l' $\alpha$ -sinucleina acquisisce una struttura  $\beta$ -sheet nel processo di nucleazione dell'aggregato (malattia di Parkinson).

## TFE-induced folding of natively unfolded - $\alpha$ -synuclein



# Esempio di fitting : mioglobina



- In questo caso:

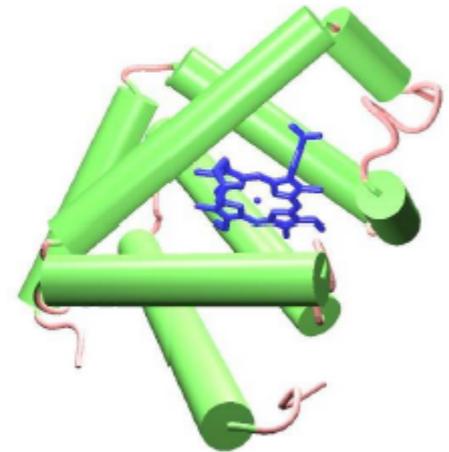
$$\square \theta_t = x_\alpha \theta_\alpha + x_\beta \theta_\beta + x_c \theta_c$$

- Il fitting migliore :

$$x_\alpha = 80\%$$

$$x_\beta = 0\%$$

$$x_c = 20\%$$



- Che è ben in accordo con la struttura 78% helix, 22% coil (dai raggi X)

La struttura della **subtilisina** ottenuta da dati CD e calcoli al computer è in accordo con la struttura trovata da dati di diffrazione di raggi X



58% helix

26% sheet

16% coil

La subtilisina è un enzima proteolitico

# Dicroismo circolare e conformazioni

PROTEIN SECONDARY STRUCTURES DETERMINED BY INFRARED SPECTRAL DECONVOLUTION AND CIRCULAR DICHROISM SPECTRA AND X-RAY CRYSTALLOGRAPHY<sup>a</sup>

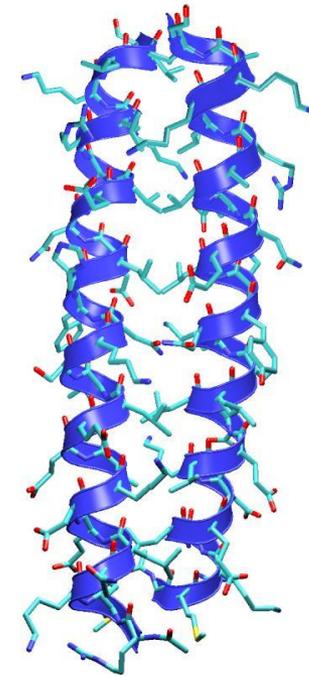
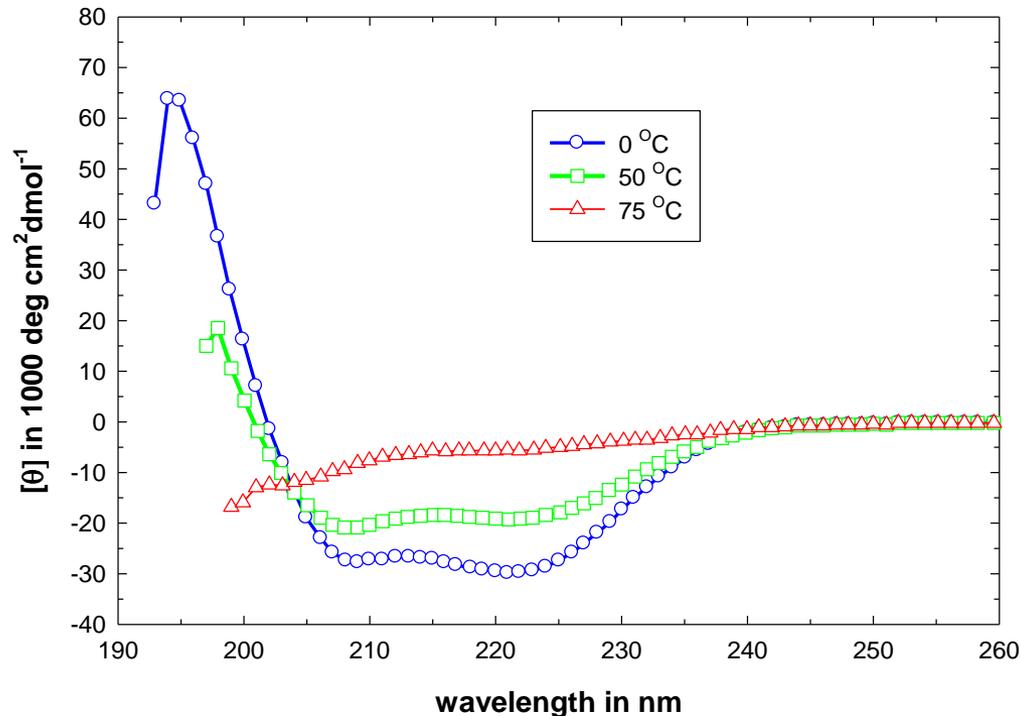
Protein	Secondary structure (%)				Method
	$\alpha$ Helix	$\beta$ Sheet	Turn	Random	
Hemoglobin	78 <sup>b</sup>	12	10	<sup>b</sup>	IR-SD
	87	0	7	6	X-Ray
	68-75	1-4	15-20	9-16	CD
Myoglobin	85 <sup>b</sup>	7	8	<sup>b</sup>	IR-SD
	85	0	8	7	X-Ray
	67-86	0-13	0-6	11-30	CD
Lysozyme	40	19	27	14	IR-SD
	45	19	23	13	X-Ray
	29-45	11-39	8-26	8-60	CD
Cytochrome c (oxidized)	42	21	25	12	IR-SD
	48	10	17	25	X-Ray
	27-46	0-9	15-28	28-41	CD
$\alpha$ -Chymotrypsin	9	47	30	14	IR-SD
	8	50	27	15	X-Ray
	8-15	10-53	2-22	38-70	CD
Trypsin	9	44	38	9	IR-SD
	9	56	24	11	X-Ray
Ribonuclease A	15	40	36	9	IR-SD
	23	46	21	10	X-Ray
	12-30	21-44	11-22	19-50	CD
Alcohol dehydrogenase	18	45	23	14	IR-SD
	29	40	19	12	X-Ray
Concanavalin A	8	58	26	8	IR-SD
	3	60	22	15	X-Ray
	3-25	41-49	15-27	9-36	CD
Immunoglobulin G	3	64	28	5	IR-SD
	3	67	18	12	X-Ray
Major histocompatibility complex antigen A2	17	41	28	14	IR-SD
	20	42			X-Ray
	8-13	74-77			CD
$\beta_2$ -Microglobulin	6	52	33	9	IR-SD
	0	48			X-Ray
	0	59			CD

# Gli spettri CD dipendono dalle condizioni sperimentali

La temperatura è il parametro più critico !

## CD signals for GCN4-p1

O'Shea *et al.* Science (1989) **243**:538  
figure 3: 34 $\mu$ M GCN4-p1 in 0.15M NaCl,  
10mM phosphate pH 7.0

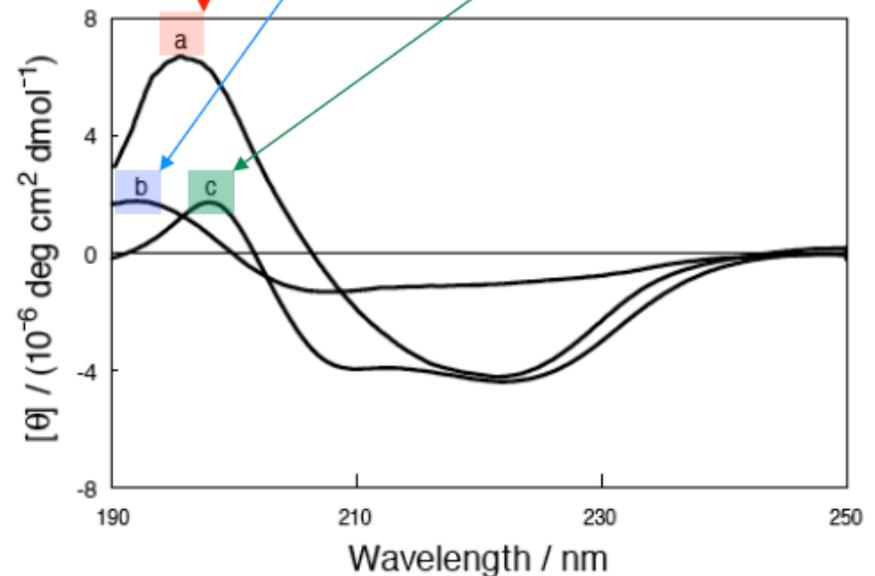


- 100% di elica a 0°C
- Diventa random coil aumentando la T

# Esempi: Proteine Globulari

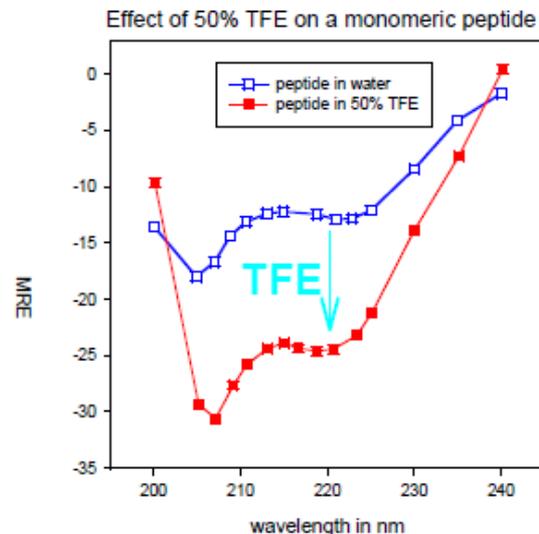
Protein	Ref	Structural Type	Characteristic spectral features
Concanavalin A	—	$\beta$ -sheet	Single minimum at 224 nm
Poly-L-lysine	15	$\beta$ -sheet	Single minimum at 218 nm
Lysozyme	—	$\alpha + \beta$	$\alpha$ -Helical spectral features dominate, but the intensities of the double minimum are roughly reversed relative to an $\alpha$ -helix
Myoglobin	—	$\alpha$ -helical	Double minimum at about 209, 222 nm
Poly-L-lysine	15	$\alpha$ -helical	Double minimum at about 209, 221 nm

**N.B.: Poli-L-Lisina**  
 riferimento per strutture  
 tutta  $\alpha$ -elica o tutta  $\beta$ -  
 foglietto

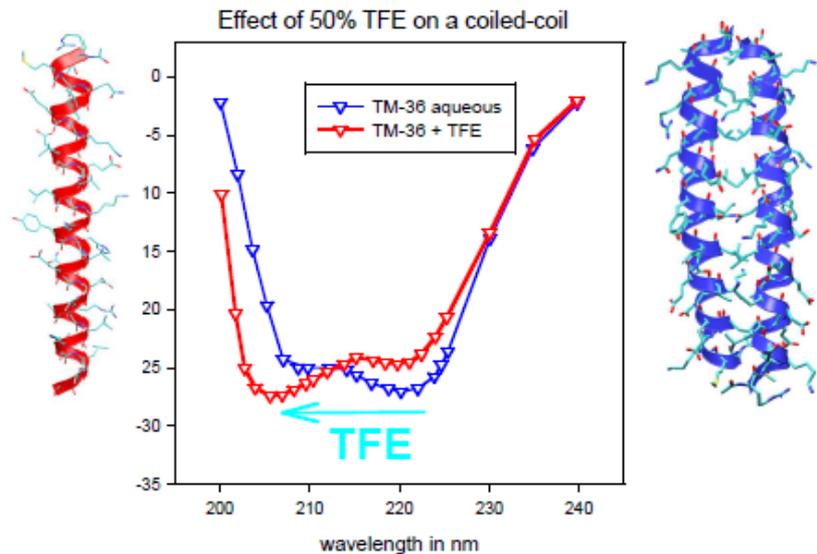


# Effetto del Solvente

- Effetto di trifluoroethanol (TFE) su un coiled-coil simile a GCN4-p1
- TFE induce ellitticità in tutti i peptidi



- Ma su un coiled-coil rompe le eliche dimere portando a eliche singole



Lau, Taneja and Hodges (1984)  
J.Biol.Chem. **259**:13253-13261

Le proteine che generalmente mostrano poca o nessuna propensione a strutturarsi in  $\alpha$ -elica in acqua, possono essere indotte ad assumere tale conformazione in presenza di agenti elicogenici come il TFE.

La costante dielettrica del TFE, più debole di quella dell'acqua, comporta una diminuzione della formazione di legami idrogeno tra i protoni ammidici e le molecole di solvente che li circondano, promuovendo in questo modo la formazione di **legami H intramolecolari** e quindi stabilizzando la struttura secondaria dei peptidi.

Alcuni autori hanno osservato che la struttura  $\alpha$ -elicoidale è assunta preferenzialmente in presenza di TFE perché è una conformazione compatta che **minimizza l'esposizione al solvente** e pertanto massimizza i legami H intramolecolari.

# CD di acidi nucleici

- In questo caso i cromofori sono le basi (la catena principale assorbe solo sotto 150 nm).
- Assorbimento e CD dipendono dalla **sequenza** oltre che dalla **conformazione**!

UV

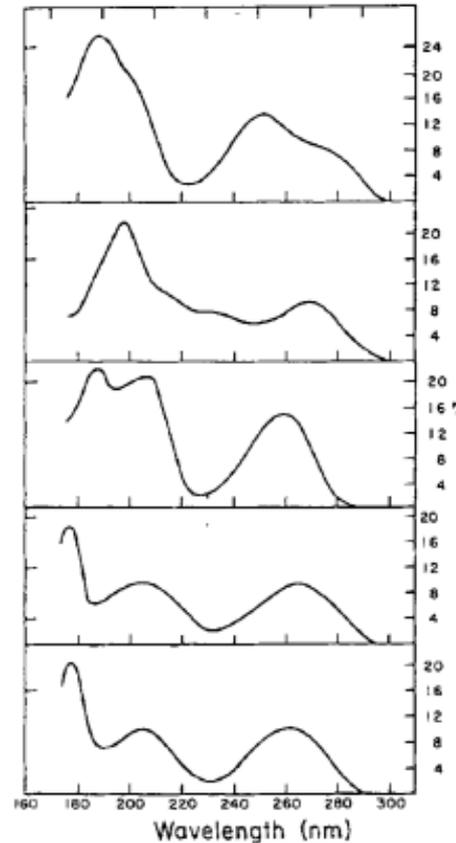


Figure 2. Electronic absorption spectra for the deoxyribomonophosphates of (from top to bottom) adenine, guanine, cytosine, thymine, and uracil in neutral aqueous buffer. (Reprinted with permission from *Biopolymers* 16:2243-2264, 1977. © 1977, John Wiley and Sons, Inc.)

CD

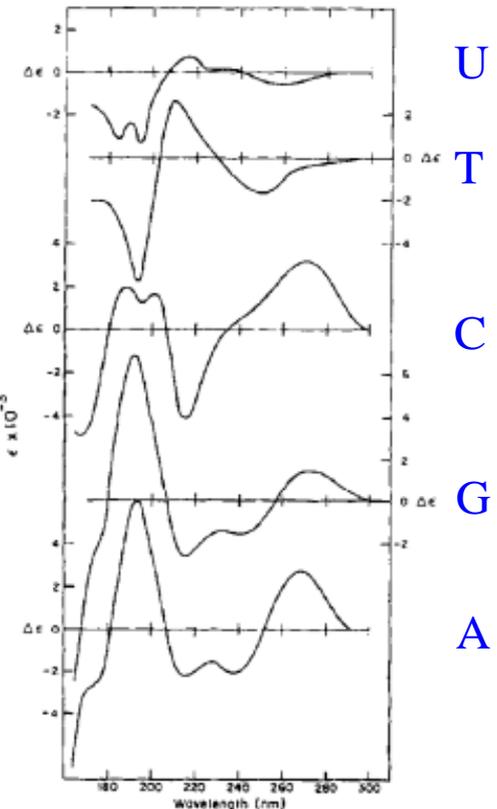
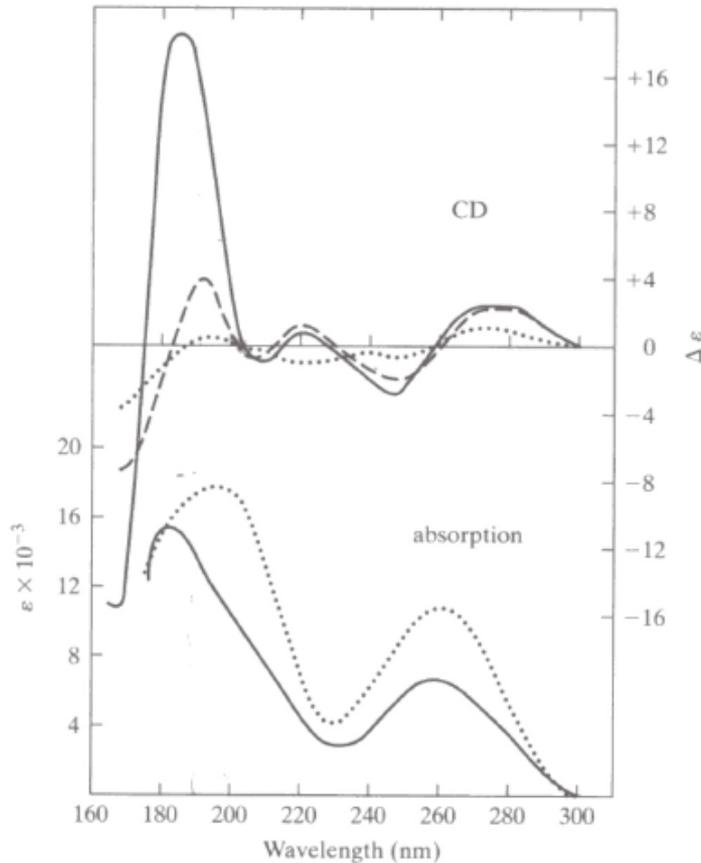


Figure 3. CD spectra for the five deoxyribomonophosphates of (from top to bottom) adenine, guanine, cytosine, thymine, and uracil in neutral aqueous buffer. (Reprinted with permission from *Biopolymers* 16:2243-2264, 1977. © 1977, John Wiley and Sons, Inc.)

# Esempio: DNA



- CD of *E. Coli* DNA

— Nativo

- - - Denaturato

- Per esempio a 260 nm

$$\Delta\epsilon = \sim 3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon = \sim 6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

# Set di base: molte proteine

- Ci sono diversi algoritmi.
  - Tutti contano sull'uso di fino a 20 spettri CD di proteine di struttura nota.
  - Miscelando questi è possibile ottenere uno spettro che fitta un incognito
  - Per tutti i dettagli vedi:
    - Dichroweb: il sistema di analisi CD online  
[www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/)
  - è possibile ottenere un'accuratezza: (coeff. di regressione R)
    - 0.97 per eliche,
    - 0.75 per foglietti beta,
    - 0.50 per turns, e
    - 0.89 per altri tipi di strutture
- (Manavalan & Johnson, 1987, Anal. Biochem. **167**, 76-85).



# NIH Public Access

## Author Manuscript

*Nat Protoc.* Author manuscript; available in PMC 2009 August 18.

Published in final edited form as:

*Nat Protoc.* 2006 ; 1(6): 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202.

## Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure

**Norma J. Greenfield**

Department of Neuroscience and Cell Biology, Robert Wood Johnson Medical School, 675 Hoes Lane West, Piscataway, New Jersey 08854-8021, USA

### Abstract

Circular dichroism (CD) is an excellent tool for rapid determination of the secondary structure and folding properties of proteins that have been obtained using recombinant techniques or purified from tissues. The most widely used applications of protein CD are to determine whether an expressed, purified protein is folded, or if a mutation affects its conformation or stability. In addition, it can be used to study protein interactions. This protocol details the basic steps of obtaining and interpreting CD data and methods for analyzing spectra to estimate the secondary structural composition of proteins. CD has the advantage that it is that measurements may be made on multiple samples containing 20  $\mu\text{g}$  or less of proteins in physiological buffers in a few hours. However, it does not give the residue-specific information that can be obtained by X-ray crystallography or NMR.

---

## Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set

Narasimha Sreerama and Robert W. Woody<sup>1</sup>

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523*

Received April 7, 2000

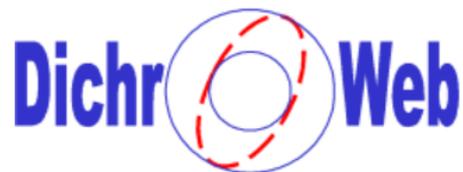


## Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra

Caroline Louis-Jeune,<sup>1</sup> Miguel A. Andrade-Navarro,<sup>2</sup> and Carol Perez-Iratxeta<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Sprott Center for Stem Cell Research, Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Ontario K1H 8L6, Canada

<sup>2</sup>Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin 13125, Germany



## On-line analysis for protein Circular Dichroism spectra

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

[Apply for a user-account](#)

### Citing DichroWeb:

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

Miles, A.J, Ramalli, S.G, and Wallace, B.A. (2021) DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*: <https://doi.org/10.1002/pro.4153>  
[Pubmed](#)

Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers* **89**: 392-400.  
[Pubmed](#)

Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**: W668 - 73.  
[Pubmed](#)

### DichroWeb related videos on the PCDDB Youtube channel

- [Analysing Protein CD Data using Dichroweb](#)
- [Data processing using CDToolX video](#)
- [Accurate measuring of the true pathlength of optical CD cells](#)
- [Cleaning and Loading Circular Dichroism Cells](#)
- [Calibrating CD Spectra with CDTool and MS Excel](#)
- [Measuring a CSA spectrum](#)
- [Performing Single Value Decomposition Analysis Using CDToolX](#)
- [Setting up the CDToolX database video](#)
- [Using the CDToolX database video](#)
- [Depositing Data Into The PCDDB](#)
- [PCDDB Youtube Channel!](#)

### Dichroweb-Related Tools

- [ValiDichro: CD validation and quality control](#)
- [2StrucCompare](#)
- [CDToolsX](#)
- [2Struc: The Secondary Structure Server](#)
- [DichroMatch](#)
- [Protein Circular Dichroism Data Bank](#)
- [PDBMD2CD](#)
- [PDB2CD](#)
- [Protein Circular Dichroism Data Bank](#) are now open for use.

[Home](#)

[Input Data](#)

[User Guide](#)

[Background Information](#)

[Datasets](#)

[FAQ](#)

[References](#)

[Links](#)

[Contact Us](#)

[Terms and Conditions](#)

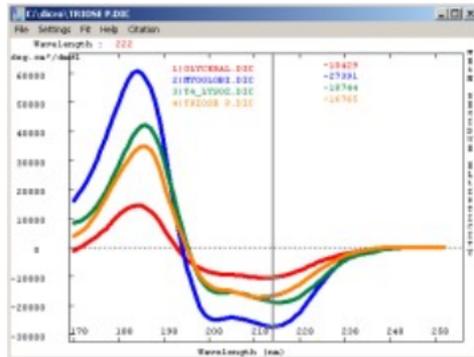
[Cookies](#)



# DICROPROT



Home	Download	Citation	Methods	Features	About
------	----------	----------	---------	----------	-------



**Dicroprot**  
Dicroprot is a  
analyses in term

- Least square fit
- Variable selection from [E]222 nm
- Self consistent
- K2D
- CONTIN

for Windows OS for CD spectra  
structure content.

Developed at **IBCP**  
**UMR 5086 CNRS Lyon University**

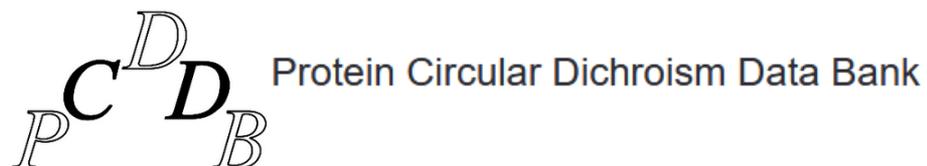
7, passage du Vercors  
69 367 Lyon cedex 07 FRANCE  
Tel : +33(0) 4 72 72 26 00  
Fax : +33(0)4 72 72 26 01



1 user(s) connected 350673 visits  
Mercredi 23 novembre 2022 : 14:08  
Your IP : 140.105.167.238 © GD-1993-2022



<https://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/>



Search the PCDDB



 Information >

 Search Database

 Sequence Search

 Make Deposition

 Download Database

 Validate Spectra

 SMP180 (Dataset)

 SP175 (Dataset)

### Welcome to the PCDDB - a public repository for circular dichroism spectral data

The Protein Circular Dichroism Data Bank (PCDDB) is a public repository that archives and freely distributes circular dichroism (CD) and synchrotron radiation CD (SRCD) spectral data and their associated experimental metadata.

All entries undergo validation and curation procedures to ensure completeness, consistency and quality of the data included. A web-based interface enables users to browse and query sample types, sample conditions, experimental parameters and provides spectra in both graphical display format and as downloadable text files.

The entries are linked, when appropriate, to primary sequence (UniProt) and structural (PDB) databases, as well as to secondary databases such as the Enzyme Commission functional classification database and the CATH fold classification database, as well as to literature citations.

[View Tutorials On Our PCDDB Youtube channel](#)

about  
supplement  
use K2D2  
contact us

## K2D3

Welcome to K2D3, a web server to estimate the  $\alpha$  helix and  $\beta$  strand content of a protein from its circular dichroism spectrum. K2D3 uses a database of theoretical spectra derived with [Dichrocalc](#).

### Estimates protein secondary structure from CD spectra

*[Proteins \(2012\) Vol 80-2](#)*

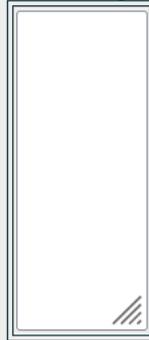
Input your CD data [help](#) [example](#)

1. **Wavelength range in nm**: from  to

2. **CD units**:

3. **Protein size**: length in aa  **OR** weight in kDa

4. **CD spectrum**:



## Analysis of Protein CD spectra using CDPro suite of programs *via* an Internet Browser

### Programs and Purpose:

Program	CRDATA	CONTINLL	SELCON3	CDSSTR	CLUSTER
Purpose	Creates the input file for CD analysis	CD analysis using a modified Contin method	CD analysis using Selcon method	CD analysis using CDSstr method	Determines tertiary class; modifies INPUT
Input file	A text file ( <a href="#">smpl</a> )	INPUT ( <a href="#">smpl</a> )	INPUT ( <a href="#">smpl</a> )	INPUT ( <a href="#">smpl</a> )	INPUT ( <a href="#">smpl</a> )
Output files	INPUT ( <a href="#">smpl</a> )	continll.out ( <a href="#">smpl</a> ) protSS.out ( <a href="#">smpl</a> ) Contin.CD ( <a href="#">smpl</a> )	selcon3.out ( <a href="#">smpl</a> ) protSS.out CalcCD.OUT( <a href="#">smpl</a> )	cdsstr.out ( <a href="#">smpl</a> ) protSS.out reconCD.OUT( <a href="#">smpl</a> )	INPUT ( <a href="#">smpl</a> ) cluster.out ( <a href="#">smpl</a> )

- The programs and the data files should be in **C:\CDPro** directory.
- The **INPUT** and **Output files** will be created in the same directory, and will be overwritten everytime a program that creates or modifies it is executed. **Save your work.**
- The CD data should be in **per residue  $\Delta\epsilon$**  units (Molar absorbance).
- Open **RunCDPro.html** in the browser. (Netscape 4.7x and IE6.0 work; Mozilla does not work) **(a)** A program can be executed by **clicking** on the name, which results in browser asking you to either save it or open it; select **OPEN**. A DOS window (interactive) is opened. Follow the instructions in the DOS window. **(b)**
- Output files can be opened in a similar way. The results either appear in the bottom section of the screen or in a separate window (using Notepad or Wordpad), depending on the browser.
- The programs can also be run by double-clicking on the file name from a directory list, as was done previously.
- One can execute the programs and access outputs from the readme.htm file also.
- Use the **largest possible reference set** for the wavelength range of your CD data.
- Browser Interphase (**RunCDPro.html**) does not work with newer operating systems. The programs can be run in BATCH MODE. Instructions for doing so are here: [Running CDPro in Batch Mode](#)
- Read [Output.htm](#) (open it in a browser) to understand the output from CD Analysis

# BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra

András Micsonai<sup>1</sup>, Frank Wien<sup>2</sup>, Éva Bulyáki<sup>1</sup>, Judit Kun<sup>1</sup>, Éva Moussong<sup>1</sup>, Young-Ho Lee<sup>3</sup>, Yuji Goto<sup>3</sup>, Matthieu Réfrégiers<sup>2</sup> and József Kardos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>ELTE NAP Neuroimmunology Research Group, Department of Biochemistry, ELTE Eötvös Loránd University, Budapest H-1117, Hungary, <sup>2</sup>Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette 91192, France and <sup>3</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

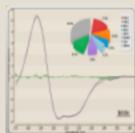


BeStSel (Beta Structure Selection) is a novel method for the secondary structure determination and fold recognition from protein circular dichroism spectra.

## References:

**NEW** Micsonai et al. Nucleic Acids Res. gkac345 (2022),  
**NEW** Micsonai et al. Front. Mol. Biosci. 863141 (2022),  
Micsonai et al. Methods in Mol. Biol. vol 2199 (2021),  
Micsonai et al. Nucleic Acids Res. 46:W315-22 (2018),  
Micsonai et al. PNAS 112:E3095-103 (2015)

Department of Biochemistry  
Institute of Biology  
Eötvös Loránd University  
Pázmány Péter sétány 1/C  
Budapest, H-1117 HUNGARY



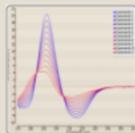
### Single spectrum analysis

Secondary structure determination distinguishing parallel beta-sheets and antiparallel beta-sheets of different twists, and fold recognition.



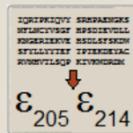
### Secondary structure from PDB files

Eight components of BeStSel and for comparison, DSSP and SELCON3 decomposition are calculated from the PDB file.



### Multiple spectra analysis

Analysis of a series of spectra as a function of temperature, time, ligand concentration, etc.



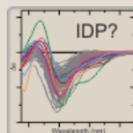
### Extinction coefficient calculation

Calculation of extinction coefficients at 205 nm and at 214 nm based on amino acid sequence and number of disulfide bonds.



### Fold recognition

Prediction of fold class, architecture, topology and homology for the provided secondary structure contents.



### Disordered-Ordered Classification

Binary disorder-order classification by analysing far-UV CD data.



### Guide to CD and data analysis

Here is a guide to what to look out for when preparing and carrying out the measurement and analysing the data.



### Cited by...

Find articles of interest in which BeStSel has been used.



# BESTSEL

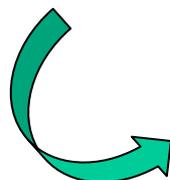
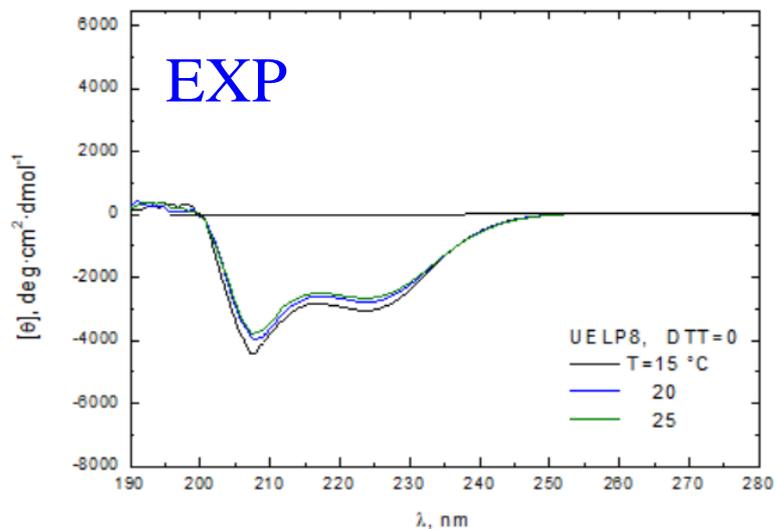
Proteina UELP

$M_n=43050$  Da

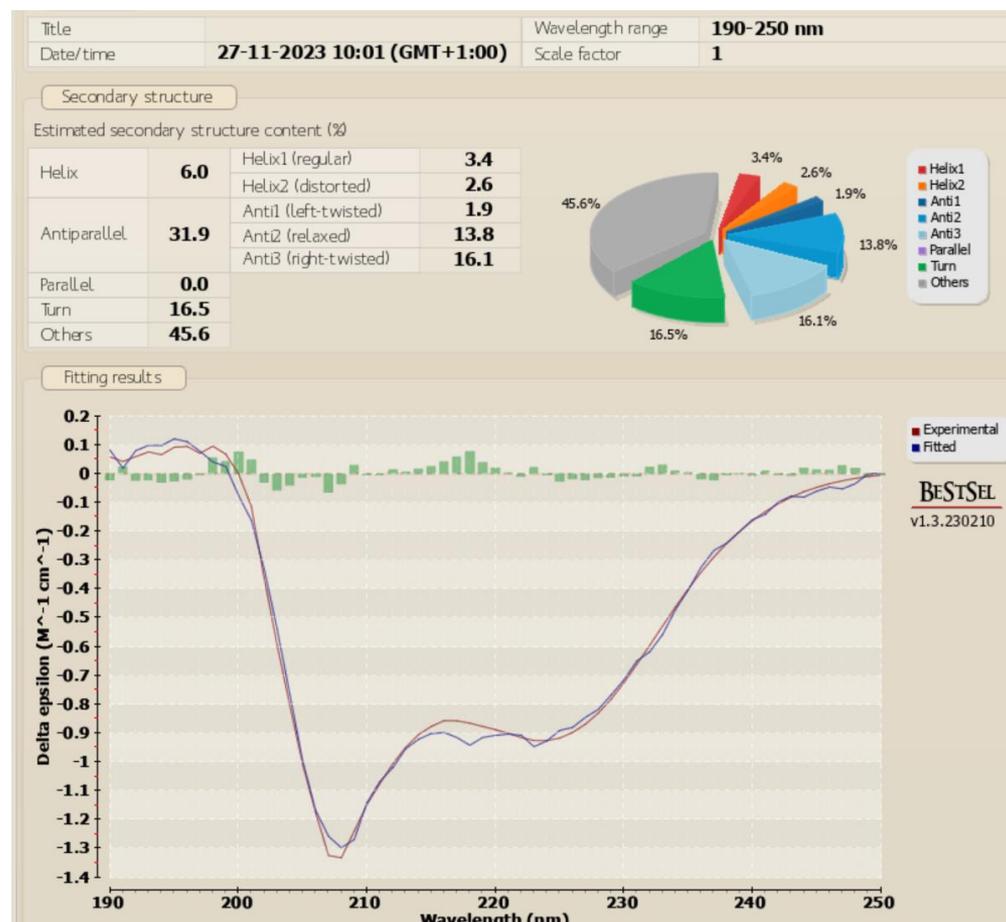
$M_r=81.38$

530 a.a.

Struttura primaria nota



**CALC**



# Aspetti pratici



- Il CD si basa sul misurare una differenza veramente piccola tra due segnali grandi: deve essere fatta attentamente
- L' Abs deve essere ragionevole, max tra  $\sim 0.5$  and  $\sim 1.5$ .
- Celle di quarzo di lunghezza tra 0.0001 cm e 10 cm. 1cm e 0.1 cm sono comuni

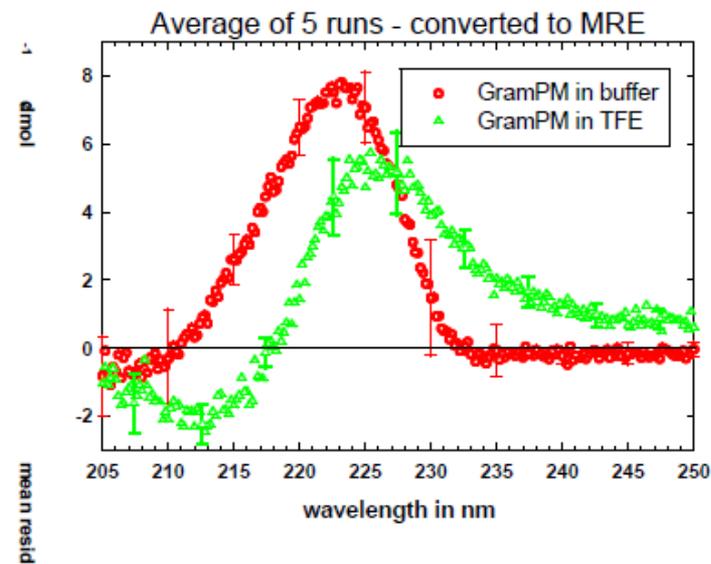
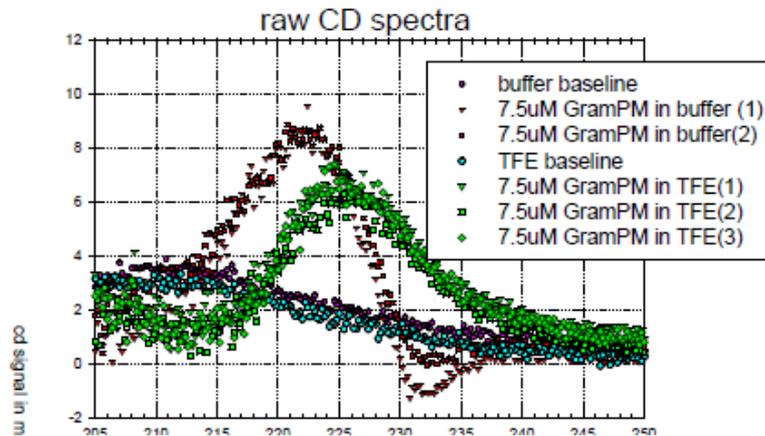


- Misurare la linea di base della cella con il solvente
- La torbidità uccide la misura- filtrare le soluzioni
- Ogni cosa deve essere pulita
- **Per un accurata valutazione della struttura secondaria deve essere misurata attentamente la concentrazione**

# Tipiche condizioni per il CD

- Concentrazione delle proteine: 0.25 mg/ml
- Lunghezza della cella: 1 mm - 1 cm
- Volume 400  $\mu$ l - 2 mL
- Necessità di poco campione 0.1 mg

# Un esperimento CD reale



- CD di una sospensione di gramicidina in acqua
- Raw spectra - dati ogni 0.2nm da 205nm a 250nm, ciascun punto misurato 5 volte al 1sec in media.
- Notare che la linea di base varia da cella a cella e se lo strumento viene mosso, cambiata la lampada, ricalibrato ...
- Notare il rumore – è il motivo per cui misuriamo gli stessi punti molte volte
- Spettro finale la media di 5 cicli (con circa 3 linee di base).

# Ulteriori Informazioni in rete

- Lawrence Livermore National Laboratory CD tutorial  
[www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm](http://www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm)
- Birkbeck College CD Tutorial  
[www.cryst.bbk.ac.uk/BBS/whatis/cd\\_website.html](http://www.cryst.bbk.ac.uk/BBS/whatis/cd_website.html)
- Karolinska Institutet PPS material on CD  
[broccoli.mfn.ki.se/pps\\_course\\_96/ss\\_960723\\_21.html](http://broccoli.mfn.ki.se/pps_course_96/ss_960723_21.html)
- CD links page at Daresbury  
[www.srs.dl.ac.uk/VUV/CD/links.html](http://www.srs.dl.ac.uk/VUV/CD/links.html)
- Dichroweb: online CD analysis tool  
[www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/)