



Corso di
Proprietà di Biopolimeri

Prof. R. URBANI

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

Folding-unfolding di proteine

FOLDING DELLE PROTEINE

Perché è importante il folding delle proteine?

La funzione biologica di una proteina è legata alla sua struttura tridimensionale.

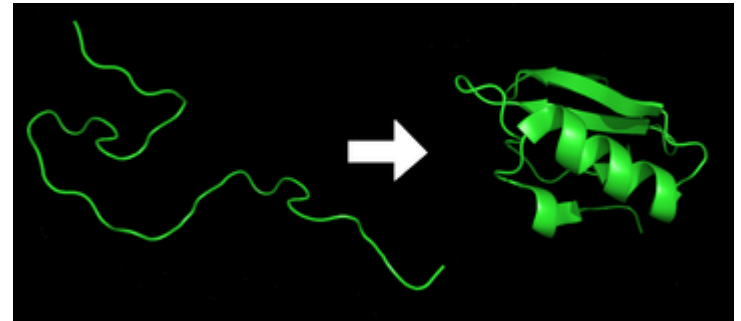
Il processo di organizzazione della struttura 3D è chiamato «protein folding»

La struttura della proteina è in relazione con le funzioni di canali, recettori e siti di legame, e influenza il modo in cui interagisce con altre proteine e molecole.

Studiare il folding/unfolding delle proteine permette di comprendere in dettaglio i principi che governano la formazione delle strutture native.

Quando le proteine si piegano correttamente, la loro funzione è conservata

Gli errori di folding possono derivare da una mutazione di uno degli amminoacidi nella struttura primaria o da un altro errore casuale.



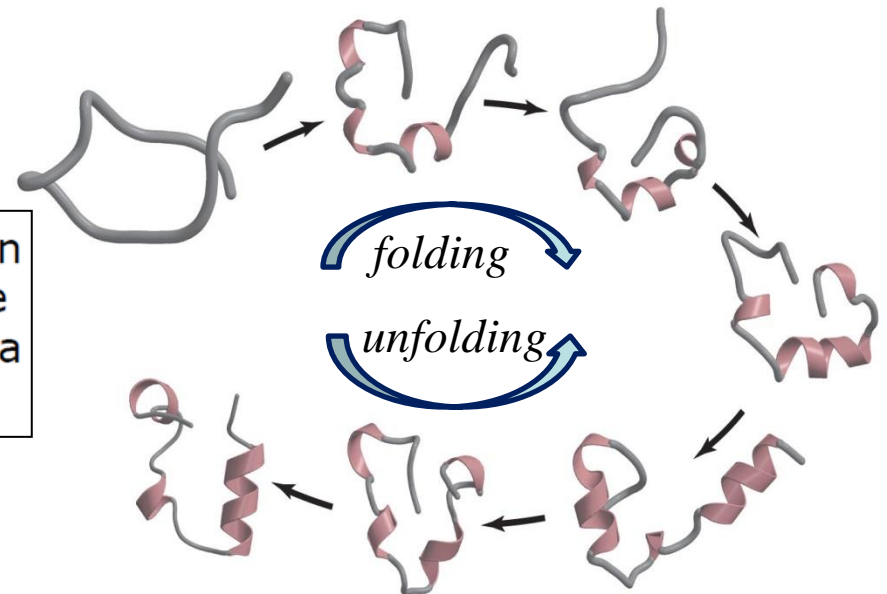
FOLDING DELLE PROTEINE

Perché è importante il folding delle proteine?

Importante è studiare e comprendere il **meccanismo con il quale il folding avviene**, poiché proprietà fondamentale delle proteine è la loro tendenza di adottare una singola e specifica struttura - la forma nativa – tra un numero immenso di strutture possibili (Paradosso di Levinthal, esperimento di Anfinsen).

Considerazioni termodinamiche e cinetiche ci permettono di individuare stadi intermedi di (parziale) folding/unfolding.

es.: Domini di α -eliche o β -sheet che si formano in certe regioni di una catena denaturata, come centro di nucleazione della struttura nativa.



La comprensione del "protein folding" non può essere disgiunta dalla comprensione della **stabilità delle proteine** e della natura dello stato nativo e denaturato.

Le proteine sono solo marginalmente stabili

- Quando una proteina assume la conformazione nativa, scambia le molte interazioni non covalenti dello stato denaturato con l'acqua con interazioni intramolecolari.
- Le principali forze che favoriscono il folding sono le interazioni idrofobiche (ed i legami idrogeno). La principale forza che si oppone è l'entropia conformazionale.
- Durante il processo di folding le catene laterali idrofobiche sono schermate dal solvente ed impaccate l'una con l'altra. La maggior parte di donatori ed accettori di legami H si appaiano, specialmente quelli dello scheletro peptidico.
- L'energia coinvolta in ciascuna interazione è piccola ma il numero di interazioni è molto elevato. Quindi l'energia di interazione totale nello stato nativo o in quello denaturato è molto alta, fino a migliaia di kcal/mol.
- Comunque le proteine sono solo marginalmente stabili, con una differenza netta (ΔG) tra lo stato nativo e denaturato di 5-15 kcal/mol.

Contributi

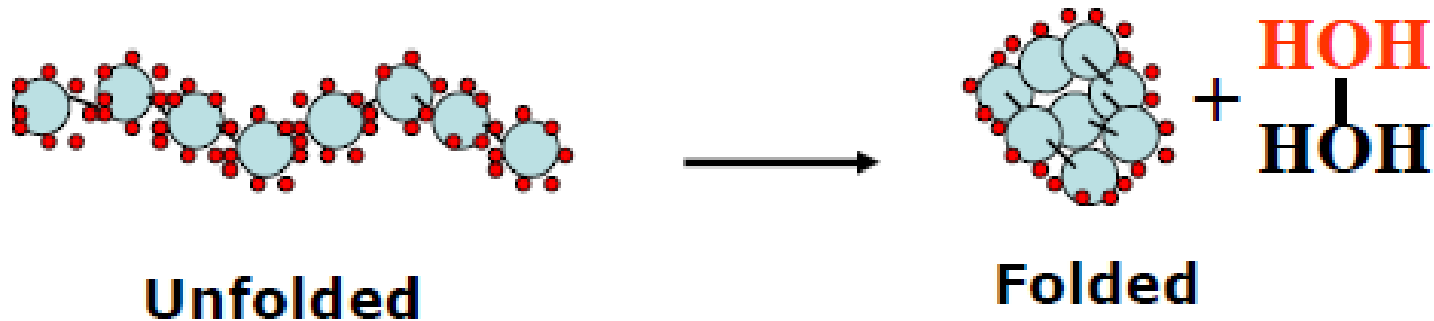
- interazioni ioniche (< 10 kcal/mol)
- interazioni di Van der Waals (< 1.5 kcal/mol)
- legami H (2-5 kcal/mol)
- Interazioni idrofobiche
- Ponti disolfurici

Legami H

- Le proteine contengono un enorme numero di legami H
- Sono importanti determinanti nella conformazione della proteina, ma non sono considerati il fattore predominante nella stabilità.
- Perché?
 - La stabilità di una proteina è la differenza in energia libera tra lo stato nativo e denaturato.
 - Nello stato denaturato i gruppi che possono formare legami H li formano con l'acqua e questi sono energeticamente simili a quelli formati all'interno della proteina.
 - Lo stato nativo deve contenere circa tanti legami H intramolecolari quanti i possibili tra la proteina e l'acqua altrimenti la proteina denatura

Effetto idrofobico

- E' generalmente accettato che è la principale driving force del folding essendo la sola interazione specifica dello stato nativo.
- E' il risultato dell'interazione del polipeptide con l'acqua nello stato nativo e denaturato.
- E' un complesso fenomeno termodinamico spesso descritto come la conseguenza entropica dell'interazione delle catene laterali idrofobiche con l'acqua



Maggiore superficie esposta,
più molecole d'acqua ordinate

Minore superficie esposta,
meno molecole d'acqua ordinate

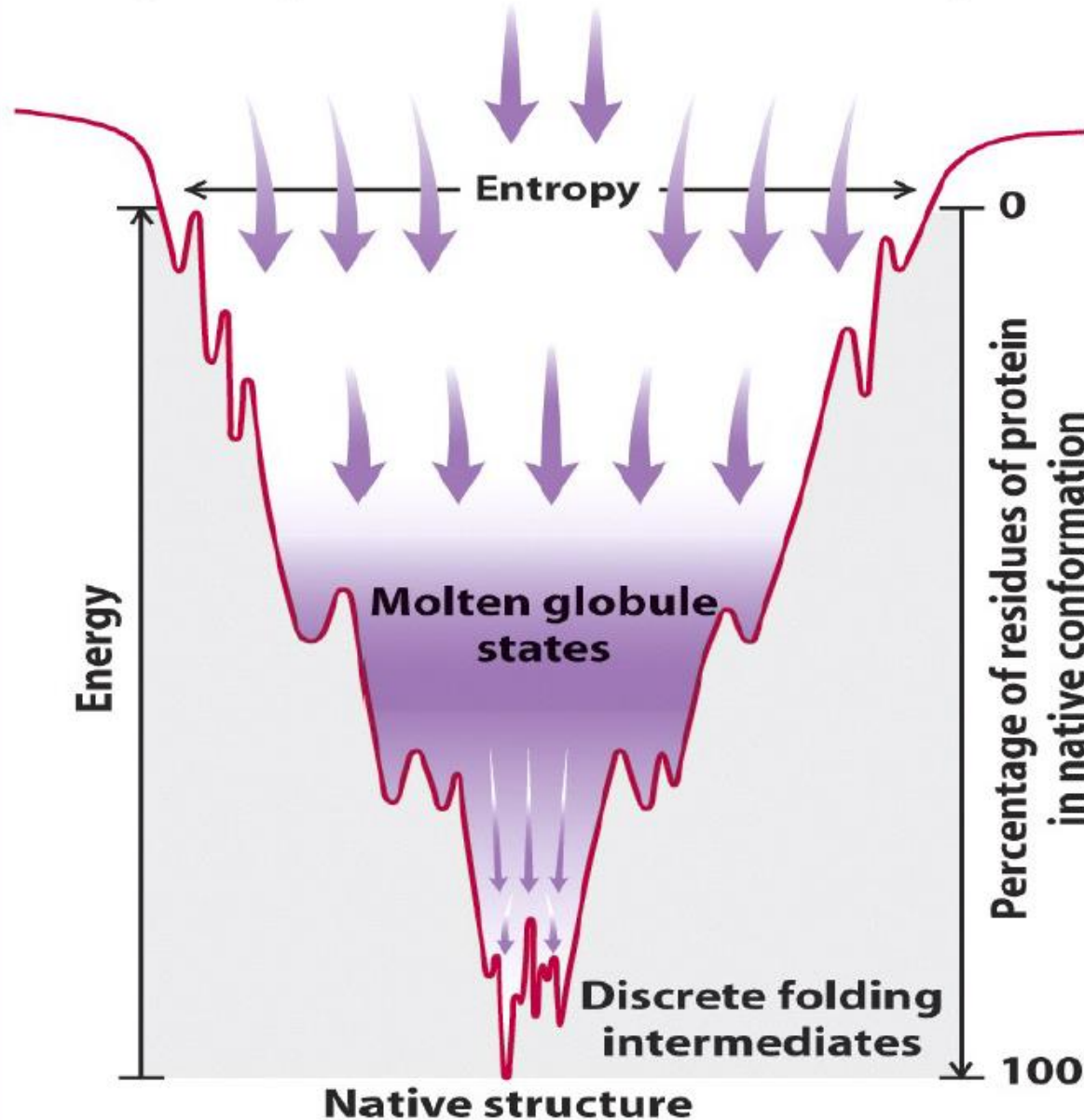
Effetto idrofobico

The Process of Protein Folding

- 1) Protein folding occurs by the progressive formation of stabilizing interactions that compensate for the decrease in conformational entropy
- 2) During folding proteins must form their secondary structure, collapse into a compact globule, and make tertiary interactions
- 2) Folding is a statistical process in which individual molecules follow different trajectories
- 3) The overall folding process can be described as motion in a free energy surface with a funnel-like shape. The gradient in stabilization energy is what drives the Process to make it so fast.

The Process of Protein Folding

Beginning of helix formation and collapse



Folding \equiv reazione $r \xrightleftharpoons{k} n$

r : random coil (unfolded)

n : stato nativo (folded)

k : costante della reazione

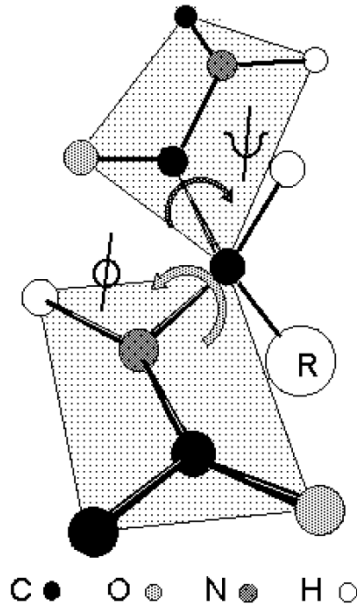
La variazione di energia libera nella reazione (folding) sarà

$$\Delta G_{Tot} = \Delta H_{Tot} - T\Delta S_{Tot} \quad \text{con} \quad \Delta S_{Tot} = \Delta S_{catena} + \Delta S_{solvente}$$

nel vuoto

$$\Delta S_{Tot} = \Delta S_{catena} = S_n - S_r = R \ln W_n - R \ln W_r = R \ln \frac{W_n}{W_r}$$

Dove W_n e W_r sono le probabilità che il sistema si trovi nei due stati n e r rispettivamente (\equiv molteplicità dello stato)



Esempio: catena polipeptidica composta da 100 aa

Stato $n \rightarrow$ singola α -elica $\rightarrow \phi \text{ e } \psi \sim -60^\circ$

Stato $r \rightarrow$ random coil $\rightarrow \phi \text{ e } \psi \text{ qualsiasi}$

(N.B. i valori degli angoli diedri nelle catene laterali sono supposti essere qualsiasi, a meno degli impedimenti sterici, in entrambi i casi)

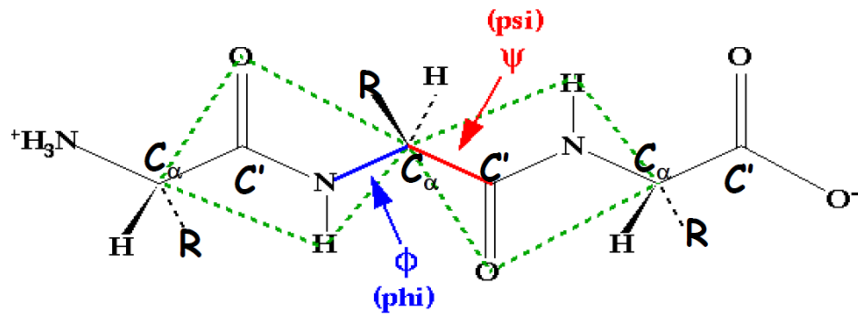
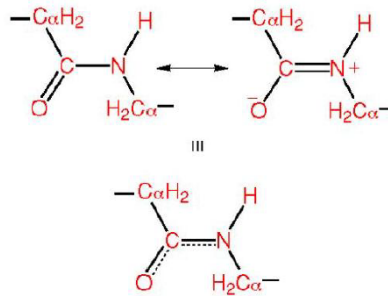
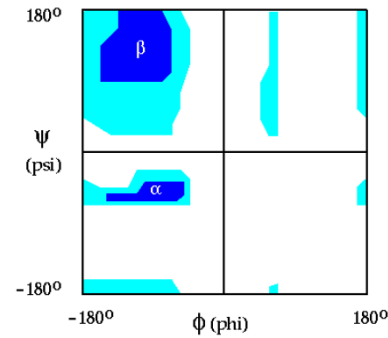


Grafico di Ramachandran

α -elica ~ 10% della superficie accessibile

→ La probabilità che un singolo residuo si trovi in α -elica è ~ 10%

$$W_n = 0.1 \quad \text{per residuo}$$

→ La probabilità che ϕ e ψ assumano un valore qualsiasi

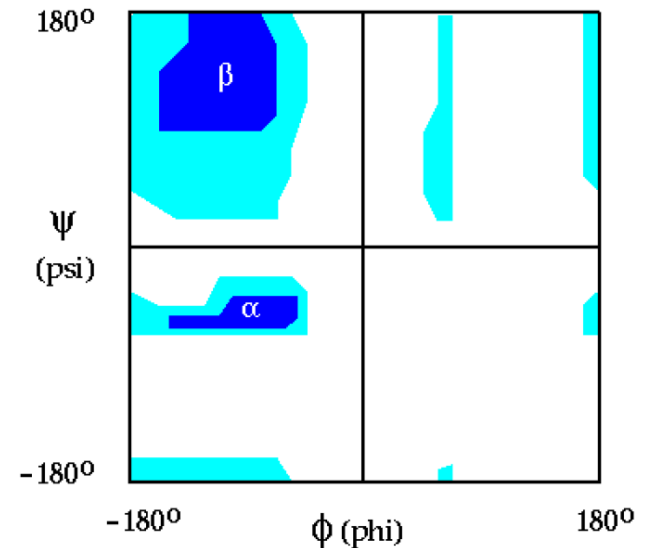
$$W_r = 1 \quad \text{per residuo}$$

$$(W_n)^{catena} = (0.1)^{100}$$

$$(W_r)^{catena} = (1)^{100} = 1 \quad \text{per l'intera catena}$$

$$\begin{aligned} \Delta S_{catena} &= S_n - S_r = R \ln(W_n)^{catena} - R \ln(W_r)^{catena} = R \ln(0.1)^{100} = \\ &= 100R \ln \frac{1}{10} = -100R \ln 10 = -0.457 \text{ Kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \end{aligned}$$

$$R = 1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} = 1.987 \times 10^{-3} \text{ Kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$



Trascurando il contributo del solvente (folding nel vuoto)

$$\Delta G_{cat} = \Delta H_{cat} - T\Delta S_{cat} = \Delta H_{cat} - 310 * (-0.46) = \Delta H_{cat} + 143 \text{ Kcal mol}^{-1}$$

Perché il folding sia «spontaneo»

$$\Delta G_{cat} < 0 \rightarrow \Delta H_{cat} < 0 \rightarrow |\Delta H_{cat}| > 143 \text{ Kcal mol}^{-1}$$

$$\Delta H_{cat} = 100\Delta H_{residuo} \rightarrow |\Delta H_{residuo}| > 1.43 \text{ Kcal mol}^{-1}$$



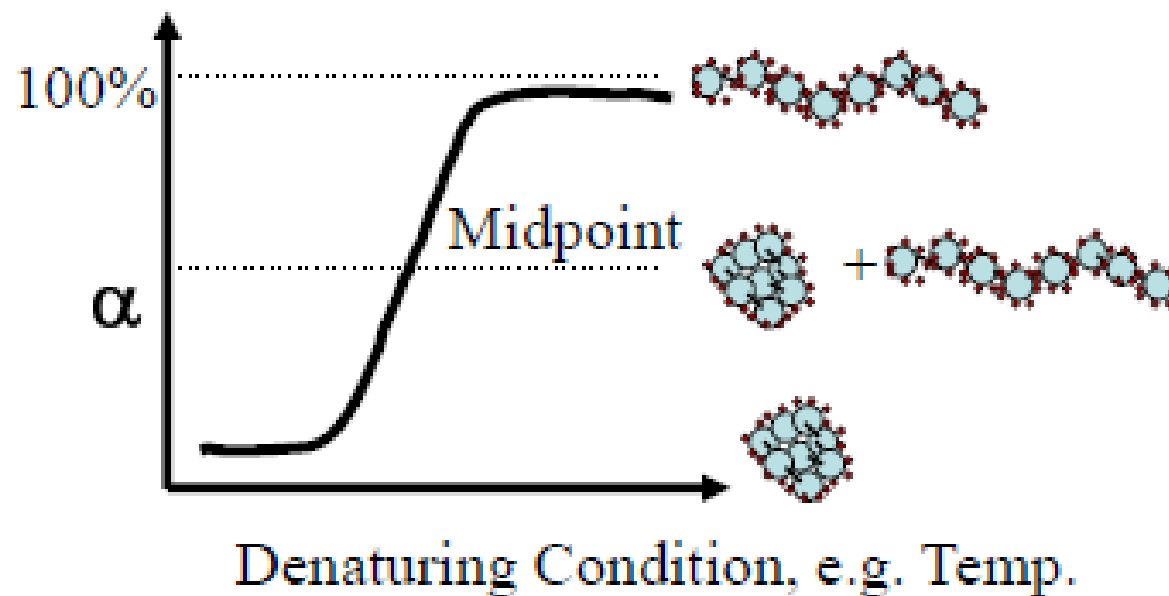
~ energia del legame idrogeno

F-H...:F (161.5 kJ/mol or 38.6 kcal/mol)
O-H...:N (29 kJ/mol or 6.9 kcal/mol)
O-H...:O (21 kJ/mol or 5.0 kcal/mol)
N-H...:N (13 kJ/mol or 3.1 kcal/mol)
N-H...:O (8 kJ/mol or 1.9 kcal/mol)
HO-H...:OH ₃ ⁺ (18 kJ/mol or 4.3 kcal/mol)

DENATURAZIONE DELLE PROTEINE

Le proteine possono essere denaturate cambiando le proprietà chimiche o fisiche dell'ambiente circostante.

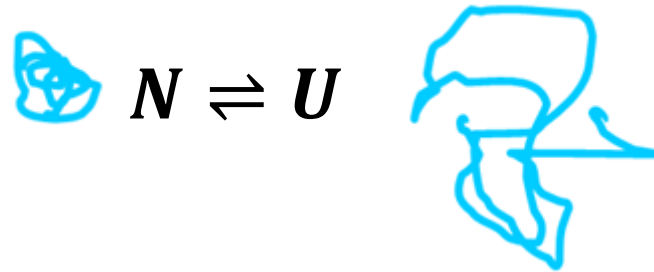
La denaturazione reversibile delle proteine consente l'analisi termodinamica.



Techniques for Measuring Stability

- Any methods that can distinguish between U and F
 - Absorbance (e.g. Trp, Tyr) (UV-visible)
 - Fluorescence (Trp).
 - CD (far or near UV)
 - NMR
 - DSC (differential scanning calorimetry)
 - Urea gradient gels - difference in the migrating rates between F and U.

La denaturazione di una proteina: Il modello a due stadi



$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

$$\alpha = \frac{[U]}{[U] + [N]} = \frac{K}{1 + K}$$

$$K = e^{-\Delta G^0/RT}$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + e^{\Delta G^0/RT}}$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

La temperatura alla quale il 50% della proteina è nello stato nativo (folded) oppure il DNA è ibridizzato al 50% è definita come temperatura di fusione T_m

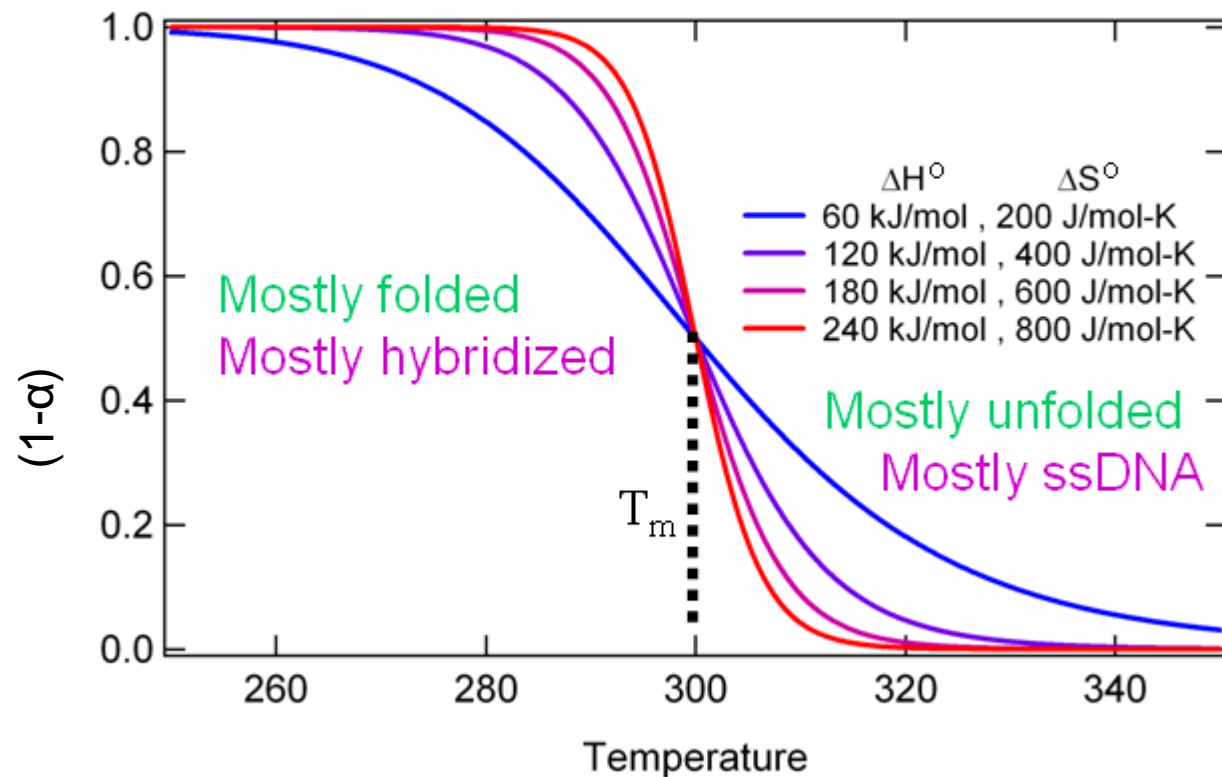
$$\text{A } T=T_m, \Delta G^0 = 0 \text{ e } T_m = \Delta H^0 / \Delta S^0$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + e^{\Delta G^0/RT}}$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Equilibrium melt curves

Proteins or DNA



In this case: $T_m = 300 \text{ K} = \Delta H^0 / \Delta S^0$

Variazione di K con la temperatura

La dipendenza di K da T è a volte espressa direttamente dall'equazione di Van't Hoff originariamente ricavata empiricamente:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + A \quad A \text{ costante}$$

Questa equazione può essere facilmente ricavata dalla relazione tra ΔG° e $\ln K$ e dalla dipendenza di ΔG° da T:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

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

che implicano:

$$\Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K$$

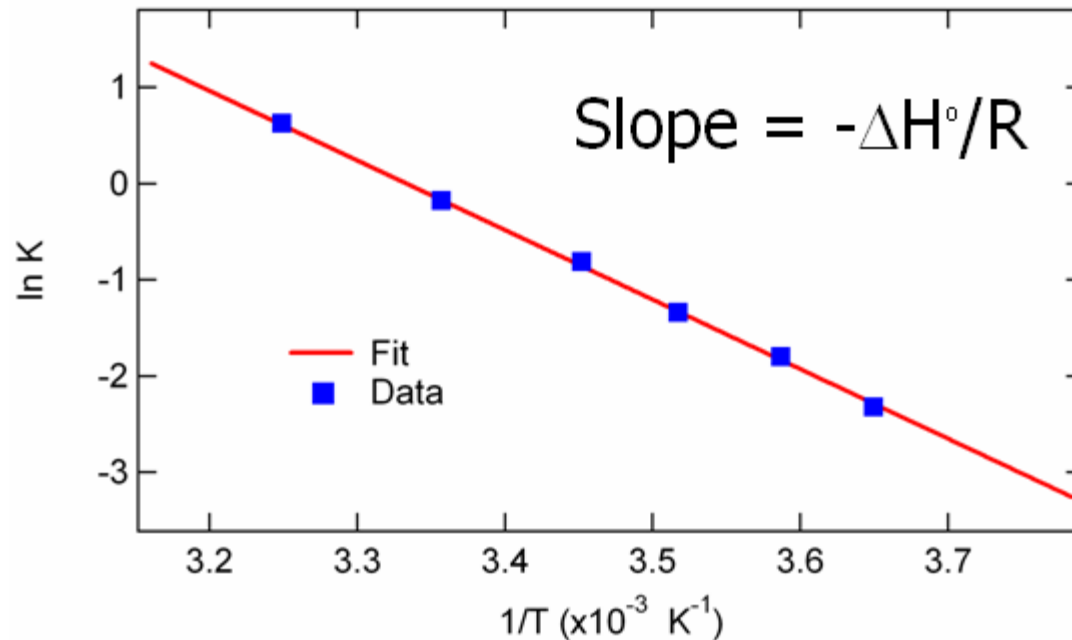
da cui:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Che permette di identificare la costante A con $\Delta S^\circ/R$

$$\frac{\partial \ln K^\phi}{\partial T} = \frac{\Delta H^\phi}{RT^2}$$

Van't Hoff plots



The standard method for obtaining the reaction enthalpy is a plot of $\ln K$ vs. $1/T$

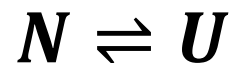
$$\ln K = -\frac{\Delta_r H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta_r S^\circ}{R}$$

La relazione tra la costante di equilibrio e la differenza di energia libera standard di un processo è data da:

$$K = e^{-\frac{\Delta G^{\circ}}{RT}}$$

e da questa equazione si vede qual è l'importanza delle **interazioni deboli**, **piccole variazioni di ΔG° si riflettono in grandi variazioni di K.**

Consideriamo una transizione unimolecolare dallo stato N allo stato U, dove N potrebbe essere la forma nativa di una proteina ed U la sua forma denaturata, oppure N potrebbe rappresentare una forma elicoidale o-complementare con associazione di basi di un polinucleotide ed U la forma a gomitolo statistico dissociata.



$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{\alpha C_T}{(1 - \alpha) C_T} = \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

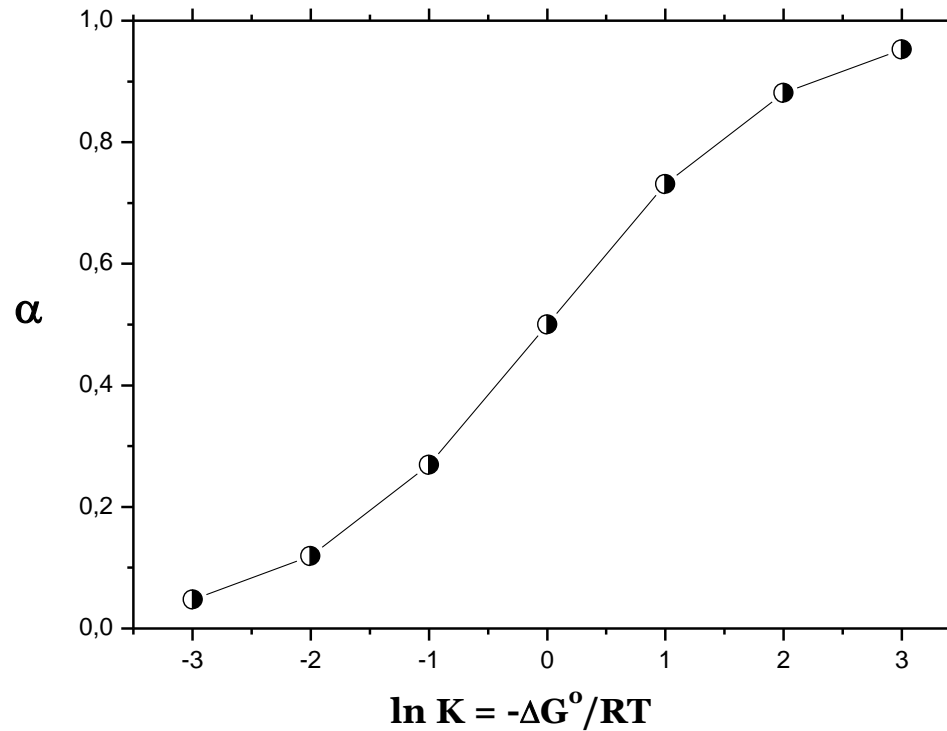
$$\alpha = \frac{[U]}{[U] + [N]} = \frac{K}{1 + K}$$

$$\alpha = e^{\Delta G^0/RT} / (1 + e^{\Delta G^0/RT})$$

$$= e^{\Delta G^0/RT} / (1 + e^{\Delta H^0/RT} e^{-\Delta S^0/R})$$

$\Delta G^0/\text{kJ}$	$\Delta G^0/\text{kcal}$	$\Delta G^0/RT$	K	α
7.43	1.78	3	0.050	0.047
4.95	1.18	2	0.135	0.119
2.48	0.59	1	0.368	0.269
0.00	0.00	0	1.000	0.500
-2.48	-0.59	-1	2.718	0.731
-4.95	-1.18	-2	7.389	0.881
-7.43	-1.78	-3	20.086	0.953

Si vede subito che una variazione di ΔG^0 di $6RT$ (che corrisponde a pochi legami idrogeno oppure a poche interazioni idrofobiche) porta la frazione dello stato denaturato dal 5% al 95%.



Proprietà misurabili come l'assorbanza, l'intensità di fluorescenza e l'ellitticità del dicroismo circolare sono (spesso) linearmente proporzionali alla concentrazione.

Per una transizione di una proteina da N ad U:

$$A = A_N + A_U = \varepsilon_N [N] + \varepsilon_U [U] = [\varepsilon_N (1 - \alpha) + \varepsilon_U \alpha] C_T$$

Da cui α :

$$\alpha = \frac{A - \varepsilon_N C_T}{\varepsilon_U C_T - \varepsilon_N C_T} = \frac{A - A_N}{A_U - A_N}$$

Deve essere sottolineato che questo trattamento assume che si prendano in considerazione solo gli stati N ed a U e cioè che la transizione sia **a due stadi**.

Questa è un'assunzione molto comune in biochimica, ma deve essere controllata attentamente per ogni caso particolare poiché non sempre è vera.

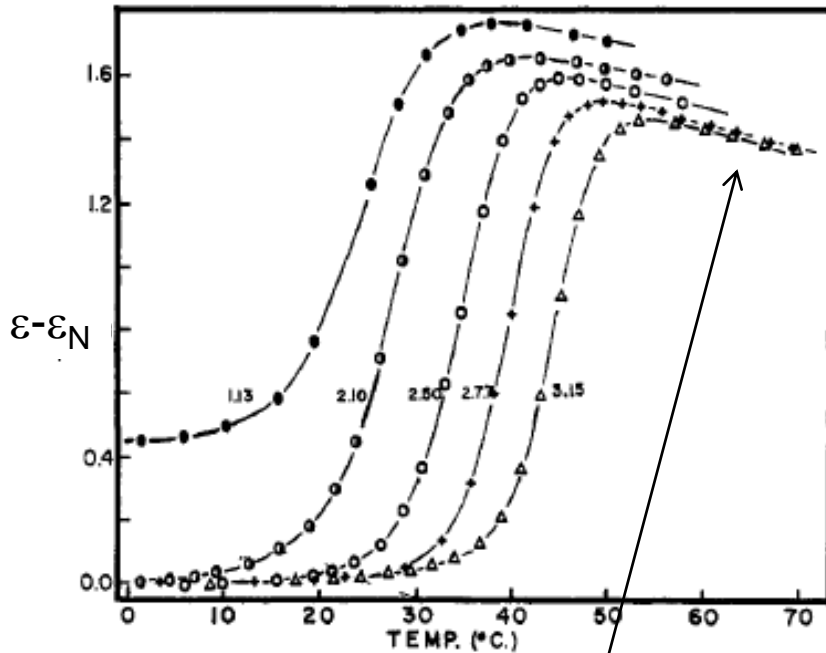


Figure 1. The change in extinction coefficient at 287 m μ for ribonuclease A at five pH values. The samples at pH 2.77 and 3.15 were buffered with 0.04 M glycine, while the other samples contain only HCl. Protein concentrations are 0.03–0.04 g/100 ml.

Variatione negativa con la temperatura:

L'aumento di temperatura provoca una maggior agitazione termica nelle molecole, agendo negativamente sull'adsorbimento dei fotoni.

Variatione dello spettro di assorbimento in funzione della temperatura:

- effetto della temperatura sull'indice di rifrazione di un solvente,
- effetto della temperatura sulla distribuzione di Boltzmann tra i livelli energetici vibrazionali e rotazionali.

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{[\epsilon(T) - \epsilon_N(T)]}{[\epsilon_U(T) - \epsilon(T)]}$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

$$\Delta H^0 = -R \left[\frac{\partial (\ln K)}{\partial \left(\frac{1}{T} \right)} \right]_p$$

$$\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0) / T$$

$$\Delta C_p^0 = \left(\frac{\partial \Delta H^0}{\partial T} \right)_p = T \left(\frac{\partial \Delta S^0}{\partial T} \right)_p$$

Tra i molti tipi di interazioni dipendenti dalla temperatura, l'interazione dovuta al legame a idrogeno è quella che si verifica più spesso negli esperimenti di assorbimento e la nostra attenzione si è concentrata su questa interazione.

La rottura del legame a idrogeno procede con l'aumento della temperatura, ci si aspetta pertanto che l'effetto del legame a idrogeno sugli spettri di assorbimento sia più facilmente riconoscibile a T più elevate

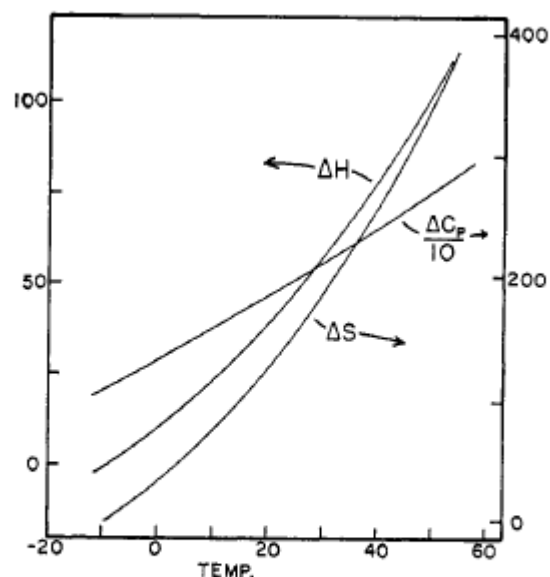


Figure 3. The values of ΔH° , ΔS° , and ΔC_p for the ribonuclease transition. These values have been calculated from eq 3, after appropriate differentiation, using the best values of the fitting parameters determined at pH 2.50.

Table I. Values of the Molar Free Energy, Enthalpy, Entropy, and Heat Capacity Changes (30°) for the Ribonuclease Thermal Transition, Assuming a Two-State Reaction

pH	ΔF° , cal	ΔH° , kcal	ΔS° , eu	ΔC_p , cal deg $^{-1}$	Av rel dev, ^a %
1.13	-1085	60.3	202	2072	0.20
2.10	-466	62.3	207	1980	0.25
2.50	912	57.2	186	1985	0.14
2.77	2045	56.6	180	2040	0.13
3.15	3094	53.0	165	1987	0.19

^a These values represent the average deviation of the experimental extinction coefficients from the analytical values (eq 4) using the best values of the fitting parameters, as compared to the total change in extinction coefficient ($\epsilon_D - \epsilon_N$) for complete denaturation. All experimental points (22 for each transition except that at pH 1.13) were considered and, in general, the deviations in the transition region were not significantly greater than the deviations in temperature regions where the pure states existed.

In molti casi, invece di K si misura direttamente l'avanzamento frazionario di una reazione, α .

Per determinare K dal valore di α , è necessario conoscere n , il numero di molecole coinvolte nella reazione.

Nell'esempio della proteina, se si considera la denaturazione si ha $n = 1$, per la dimerizzazione $n = 2$, per la formazione di tetrameri $n = 4$, ecc.

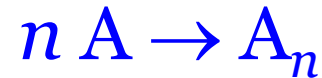
Per gli acidi nucleici, se si considera la denaturazione di un "hairpin" intramolecolare $n = 1$, la denaturazione di una doppia elica $n = 2$, la denaturazione di un triplex $n = 3$, ecc.

E' possibile ricavare i parametri termodinamici a partire da n e dalla dipendenza di α dalla temperatura.

Tuttavia bisogna distinguere fra reagenti identici o non-identici.

REAGENTI IDENTICI

- oligonucleotidi auto-complementari
- oligomeri proteici formati da sub-unità identiche danno luogo alla reazione (di associazione)



Consideriamo la frazione α di catene A nello stato A_n e la concentrazione totale di catene C_T

L'espressione dell'equilibrio è:

$$K = \frac{[A_n]}{[A]^n} = \frac{\alpha (C_T / n)}{[(1 - \alpha)C_T]^n} = \frac{\alpha}{nC_T^{n-1} (1 - \alpha)^n}$$

Alla temperatura di metà reazione T_m dove $\alpha = 1/2$, allora si ha:

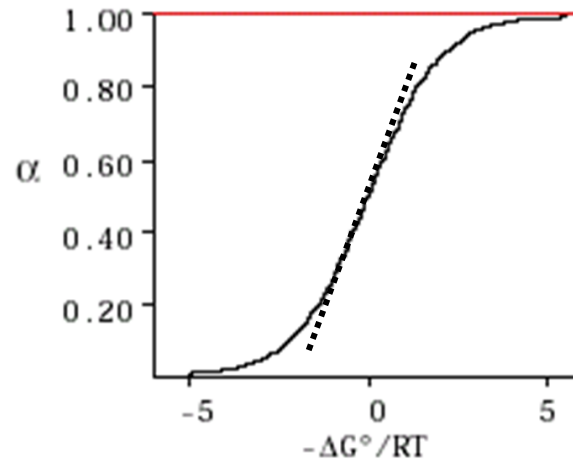
$$K(T_m) = \frac{1}{n(C_T / 2)^{n-1}}$$

permette di determinare il valore di K a partire dalla concentrazione totale in monomeri **nel punto di mezzo del processo**.

L'equazione di **van't Hoff** può essere ottenuta in funzione di α
($nC_T^{n-1} = \text{cost}$):

$$\Delta H_{vHoff} = -R \left[\frac{\partial \ln K}{\partial (1/T)} \right] = -R \frac{\partial}{\partial (1/T)} [\ln \alpha - n \ln(1 - \alpha)] = -R \left(\frac{1}{\alpha} + n \frac{1}{1 - \alpha} \right) \frac{\partial \alpha}{\partial (1/T)}$$

Valutando la pendenza di α in funzione di $1/T$ nel punto di mezzo del processo:



$$\alpha = \frac{A - \varepsilon_N C_T}{\varepsilon_U C_T - \varepsilon_N C_T} = \frac{A - A_N}{A_U - A_N}$$

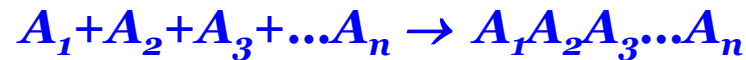
$$K(T_m) = \frac{1}{n(C_T/2)^{n-1}}$$

$$\Delta H_{vHoff} = -R(2 + 2n) \left[\frac{\partial \alpha}{\partial (1/T)} \right]_{T=T_m}$$

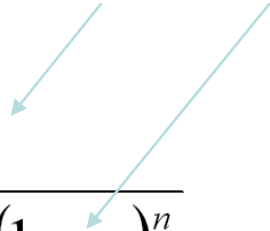
Il valore numerico di $(2 + 2n)$ è 4 per un processo unimolecolare, 6 per la dimerizzazione, ecc.

REAGENTI NON IDENTICI

Processo con **n catene non-identiche**, ciascuna alla concentrazione molare C_T/n :



si ha:

$$K = \frac{[A_1 A_2 A_3 \dots A_n]}{[A_1][A_2][A_3] \dots [A_n]} = \frac{\alpha(C_T / n)}{[(1 - \alpha)(C_T / n)]^n} = \frac{\alpha}{(C_T / n)^{n-1} (1 - \alpha)^n}$$


Questa equazione è diversa da quella relativa a catene identiche, ma la **dipendenza da α è la stessa** e quindi si ha la stessa espressione del ΔH_{vHoff} ricavata nel caso precedente.

I due metodi descritti per determinare l'entalpia di una transizione, ΔH_{vHoff} dalla dipendenza della costante di equilibrio dalla temperatura e ΔH_{cal} dalle misure calorimetriche, generalmente **non danno lo stesso valore**.

La differenza tra i due valori dipende dalla **cooperatività** della transizione:

Se $\Delta H_{vHoff} = \Delta H_{cal}$ allora la transizione coinvolge solo due stati

Se $\Delta H_{vHoff} < \Delta H_{cal}$ sono coinvolti degli stati intermedi

Se $\Delta H_{vHoff} > \Delta H_{cal}$ allora possono essere coinvolte interazioni intermolecolari che devono essere superate per passare da uno stato all'altro.

Se $\Delta H_{vHoff} < \Delta H_{cal}$ sono coinvolti degli stati intermedi.

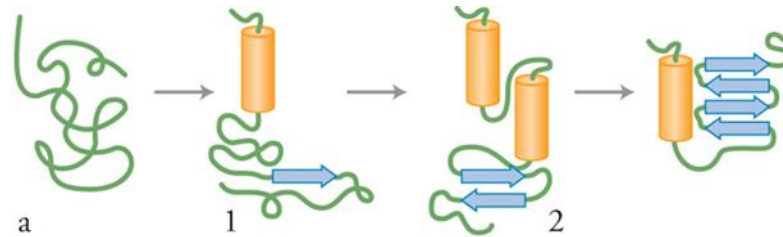
Il numero **n** di unità cooperative si ottiene dalla relazione:

$$\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{vHoff}} = n$$

Per esempio, se una proteina ha **n domini indipendenti ed identici**, che denaturano quindi in modo indipendente si ha:

$$\Delta H_{vHoff} = \frac{\Delta H_{cal}}{n}$$

Transizione a più stadi intermedi



$$y = f_N y_N + f_D y_D + \sum_i f_i y_i$$

y: proprietà sperimentale generica

$$f_N = 1 - f_D - \sum_i f_i$$

$$f_{app} = \frac{(y - y_N)}{(y_D - y_N)} = f_D + \sum_i f_i d_i$$

$$d_i = \frac{(y_i - y_N)}{(y_D - y_N)} \quad 0 \leq d_i \leq 1$$

$$K_{app} = \frac{f_{app}}{(1 - f_{app})}$$

$$K_D = \frac{f_D}{f_N} \quad ; \quad K_i = \frac{f_i}{f_N} \quad ; \quad f_{app} = \frac{(y - y_N)}{(y_D - y_N)} = f_D + \sum_i f_i d_i$$

$$\frac{f_{app}}{f_N} = \frac{f_D + \sum f_i d_i}{f_N} = \frac{f_D}{f_N} + \sum K_i d_i$$

$$\frac{f_{app}}{f_N} = K_D \left(1 + \sum_i d_i K_i / K_D \right)$$

$$(1 - f_{app}) / f_N = 1 + \sum_i (1 - d_i) K_i$$



$$K_{app} = K_D \left(1 + \sum_i d_i K_i / K_D \right) / \left(1 + \sum_i (1 - d_i) K_i \right)$$

$K_{app} = K_D$ quando $K_i = 0$ per ogni i (**NO intermedi !**)

Come si valuta la presenza di intermedi di transizione ?

Si misura la dipendenza di f_{app} dalla T per diverse grandezze osservabili.

Misurando tre diverse grandezze in funzione di T , si osserva lo stesso andamento dei punti, che provano un meccanismo a due stadi

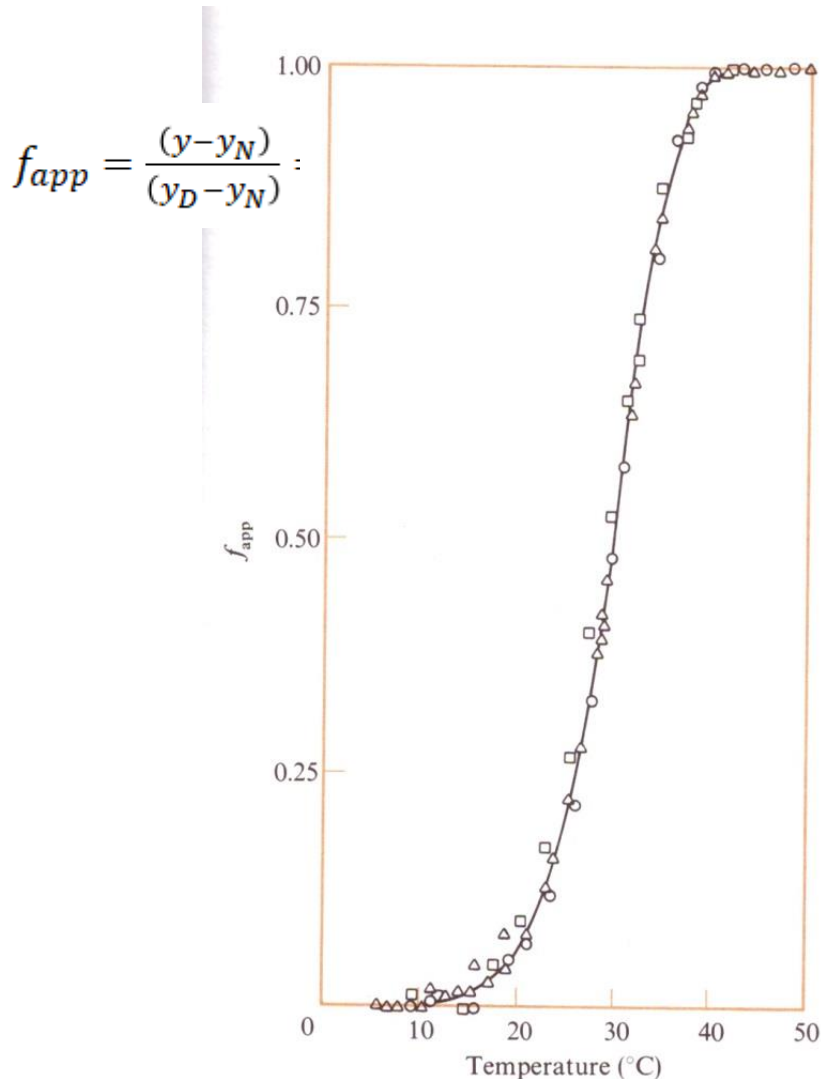


Figure 21-7

*Apparent fractional denaturation versus temperature for ribonuclease at pH 2.1. The same curve provides a good fit for experimental points determined by intrinsic viscosity (\square), optical rotation at 365 nm (\circ), and difference spectroscopy (\triangle). [After A. Ginsburg and W. R. Carroll, *Biochemistry* 4:2159 (1965).]*

Il modello a 2 stadi si valuta anche da misure calorimetriche

$$\frac{\partial \ln K_{app}}{\partial T} = \frac{\Delta H_{app}}{RT^2}$$

$$\Delta H_{app} = \Delta H_D \left(1 - \frac{\sum_i d_i (K_i/K_D) (1 - \Delta H_i/\Delta H_D)}{1 + \sum_i d_i (K_i/K_D)} - \frac{\sum_i (1 - d_i) K_i (\Delta H_i/\Delta H_D)}{1 + \sum_i (1 - d_i) K_i} \right)$$

dove

$$\partial(\ln K_i)/\partial T = \Delta H_i/RT^2$$

Da notare che ΔH_i

$N \longrightarrow X_i$

se consideriamo che in genere: $\Delta H_i / \Delta H_D \leq 1$ e che $0 \leq d_i \leq 1$

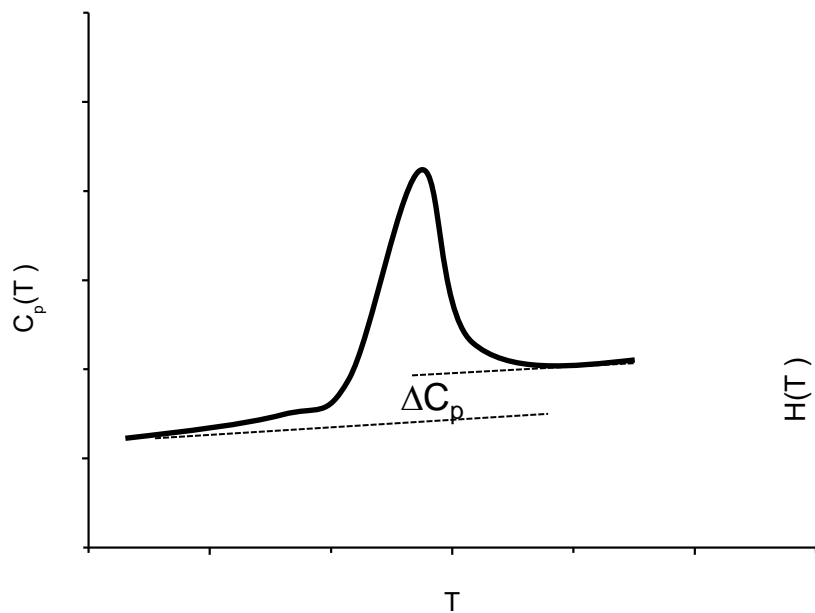
Allora ognuno dei due rapporti **sono** ≥ 0

Pertanto: $\Delta H_{app} = \Delta H_D$ in assenza di intermedi

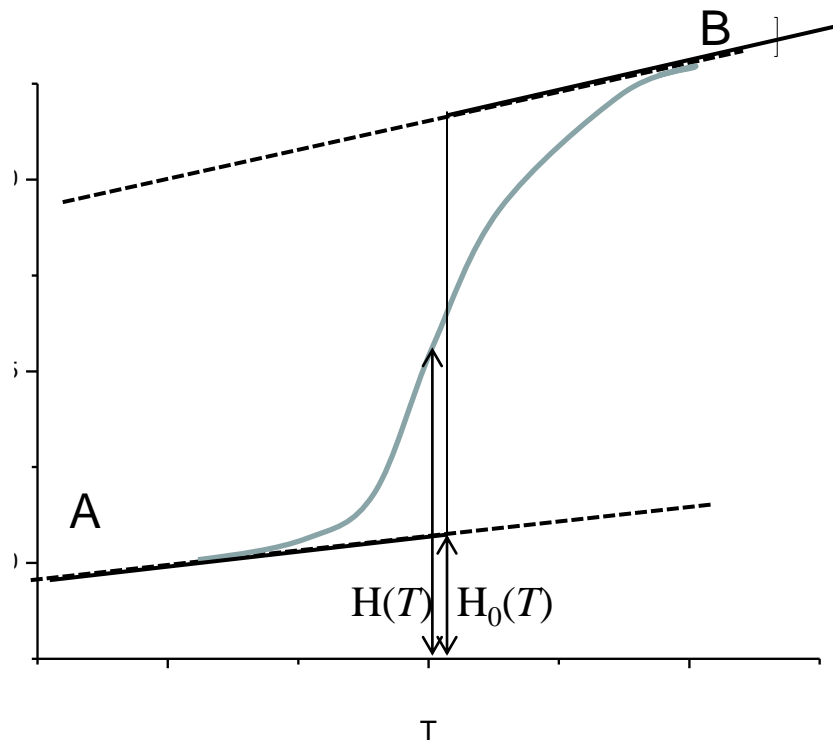
e $|\Delta H_{app}| \leq |\Delta H_D|$ in presenza di intermedi



Calorimetria differenziale a scansione (DSC)



$$\Delta C_p = C_p(T) - C_{p,0}(T) = \frac{dH(T)}{dT} - \frac{dH_0(T)}{dT}$$



$$\Delta H(T) = H(T) - H_0(T)$$

Analisi termodinamica delle curve DSC

L'area della curva calorimetrica di capacità termica (C_p) in funzione della temperatura corrisponde all'entalpia della transizione tra lo stato nativo e lo stato denaturato.

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_b}^{T_e} C_p dT \quad \text{cal/g} \rightarrow \times M_r \text{ cal/mole}$$

se stiamo osservando un equilibrio tra lo stato nativo e lo stato denaturato:

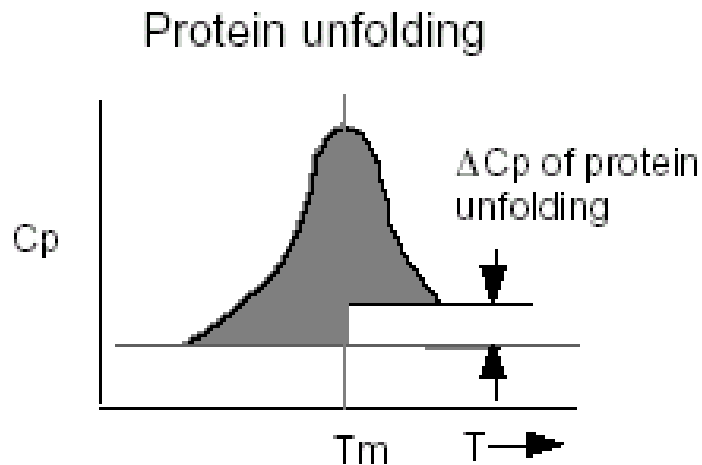
$$N \leftrightarrow D \quad \frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2}$$

è possibile definire un'entalpia di Van't Hoff (ΔH_{vH}) per la transizione, che è in relazione con l'entalpia calorimetrica (ΔH_{cal}) attraverso l'equazione:

$$\Delta H_{vH} = ART^2 \frac{C_p(T_m)}{\Delta H_{cal}}$$

Problemi nella definizione della **linea di base** in un tracciato reale.

La differenza della linea di base prima e dopo la denaturazione rappresenta la variazione di capacità termica dovuta alla variazione di struttura:



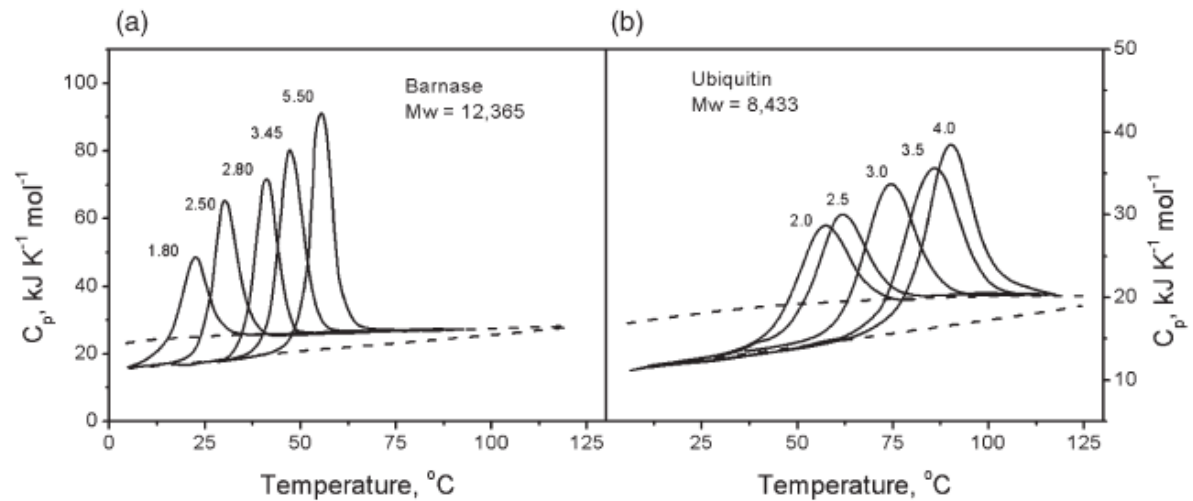
$$\Delta H_{cal}^{\circ} = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT$$

$$\Delta S^{\circ} = \int_{T_1}^{T_2} \frac{C_p}{T} dT$$

$$T_M = \frac{\Delta H_{cal}^{\circ}}{\Delta S^{\circ}} \text{ (quando } \Delta G^{\circ} = 0 \text{)}$$

FIGURE 2

The partial molar C_p functions of (A) barnase (MW = 12.4 kDa) and (B) ubiquitin (MW = 8.4 kDa) in solutions with different pH. The dashed lines represent the partial molar C_p of native and unfolded proteins.⁵⁰



$$\Delta_N^U G(T_t) = \Delta_N^U H(T_t) - T_t \Delta_N^U S(T_t) = 0 \quad \text{per } T = T_t = T_M$$

and for the transition entropy we have:

$$\Delta_N^U S(T_t) = \Delta_N^U H(T_t) / T_t$$

Since according to Kirchhoff's relation, $\partial \Delta H / \partial T = \Delta C_p$, and similarly $\partial \Delta S / \partial T = \Delta C_p / T$, using the difference between the heat capacities of the folded and unfolded forms of the protein, $\Delta_N^U C_p(T) = C_p(T)^U - C_p(T)^N$, one can determine the temperature dependencies of the enthalpy and entropy of protein unfolding:

$$\Delta_N^U H(T) = \Delta_N^U H(T_t) + \int_{T_t}^T \Delta_N^U C_p(T) dT \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \Delta_N^U S(T) &= \Delta_N^U S(T_t) + \int_{T_t}^T \Delta_N^U C_p(T) d \ln T \\ &= \Delta_N^U H(T_t) / T_t + \int_{T_t}^T \Delta_N^U C_p(T) d \ln T \quad (4) \end{aligned}$$

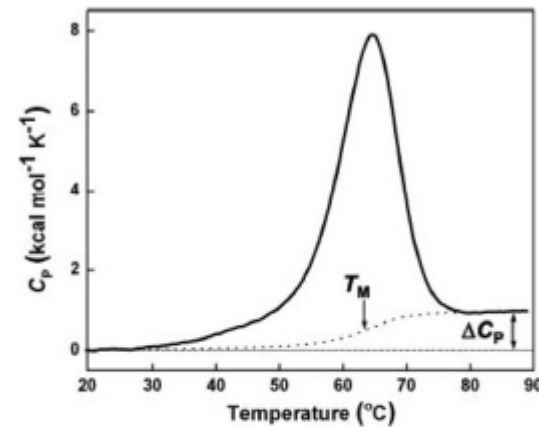
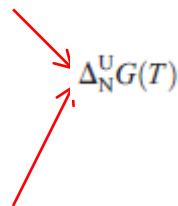
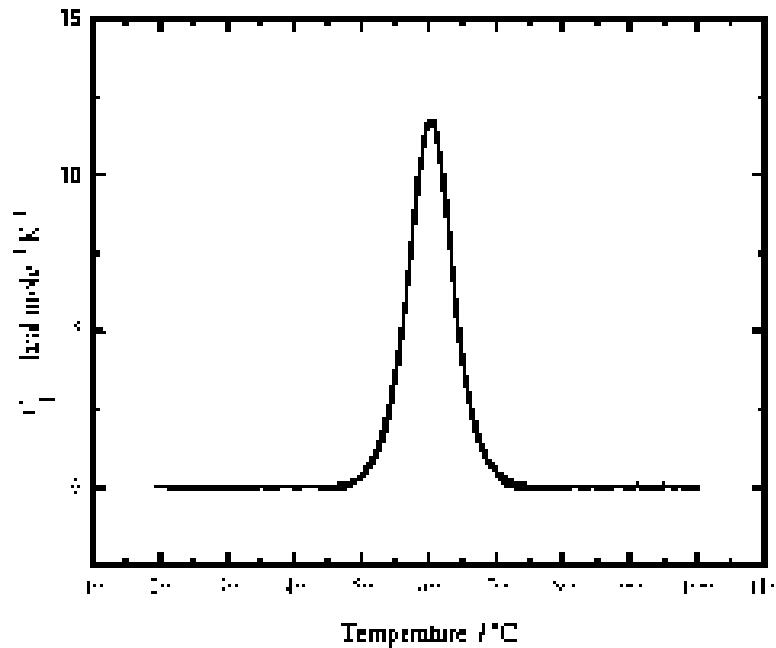


FIGURE 4

Example of DSC data for thermal melting of a 13-mer DNA duplex. The melting data (solid line) have been corrected by subtraction of a buffer blank data set and normalized for concentration of duplex. The calorimetric ΔH for the melting transition is obtained by integrating the area under the melting peak. The data can be fit to a thermodynamic model to extract the T_m and ΔC_p , as shown. ΔC_p obtained from fits to DSC data and incur uncertainty as a result of the somewhat subjective process of assigning pre- and post-transition baselines.⁷⁶

L'entalpia calorimetrica (ΔH_{cal}) è una misura assoluta della variazione di energia termica attraverso la valutazione dell'area sottesa dal picco del termogramma.



Modello a 2 Stati

$$T_m = 60.28$$

$$\Delta H_{\text{cal}} = 1.01 \times 10^5 \text{ cal/mole}$$

$$\Delta H_{\text{vH}} = 1.02 \times 10^5 \text{ cal/mole}$$

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{RT^2}$$

Valore dell'entalpia del processo secondo van't Hoff

Sia ΔH_{vHoff} che ΔH_{cal} possono essere ottenute da misure calorimetriche.

L'espressione trovata precedentemente:

$$\Delta H_{vHoff} = -R(2 + 2n) \left[\frac{\partial \alpha}{\partial (1/T)} \right]_{T=T_m}$$

oppure riscritta:

$$\Delta H_{vHoff} = RT^2(2 + 2n) \left[\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right]_{T=T_M}$$

In questo caso α può essere visto come il **grado di avanzamento del processo** (la frazione di reagente convertito nel prodotto) che può essere valutato **dalla curva calorimetria** della capacità termica:

$$\alpha(T) = \frac{1}{\Delta H_{cal}} \int_{T_1}^T C_p dT \quad \longrightarrow \quad \left[\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right]_{T=T_M} = \frac{C_{p,ex(T_M)}}{\Delta H_{cal}}$$

dove $C_{p,ex(TM)}$ è la capacità termica eccesso a metà transizione, che approssimativamente corrisponde al massimo della curva calorimetrica)

$$\Delta H_{vHoff} = (2 + 2n)RT^2 \frac{C_{p,ex(T_M)}}{\Delta H_{cal}}$$

Tuttavia la valutazione dell'entalpia di van't Hoff (ΔH_{vHoff}) è legata alla **forma dell'endoterma** e richiede un vero meccanismo a due stati.

E' indipendente dalla quantità di proteina ed è una misura della **cooperatività** della transizione:

Maggiore è la cooperatività, più netta sarà la transizione con un valore di ΔH_{vHoff} più alto.

Cosa succede in realtà!!!

Una proteina denaturata è una sostanza «interattiva» e spesso forma **aggregati**, specialmente a pH intorno alla neutralità.

L'aggregazione è spesso irreversibile e causa una distorsione endotermica del termogramma.

L'aggregazione dipende da molti fattori fra cui la concentrazione della proteina e la velocità di scansione in temperatura.

La distorsione causa un abbassamento del valore della T_m , del ΔH_{cal} e determina valori sovrastimati della ΔH_{vHoff} .

Quando la denaturazione di una proteina è irreversibile?

- Aggregazione
- Perdita del coenzima o del cofattore dal sito attivo
- Dissociazione di proteine oligomeriche in monomeri
- Cambiamenti nella struttura primaria
 - Ossidazione di Cys, Met e Trp
 - Riduzione di ponti disolfuro
 - Modificazione di gruppi –SH da parte di metalli
 - Deammidazione di Asn e Gln

