



Corso di
Proprietà di
Biopolimeri

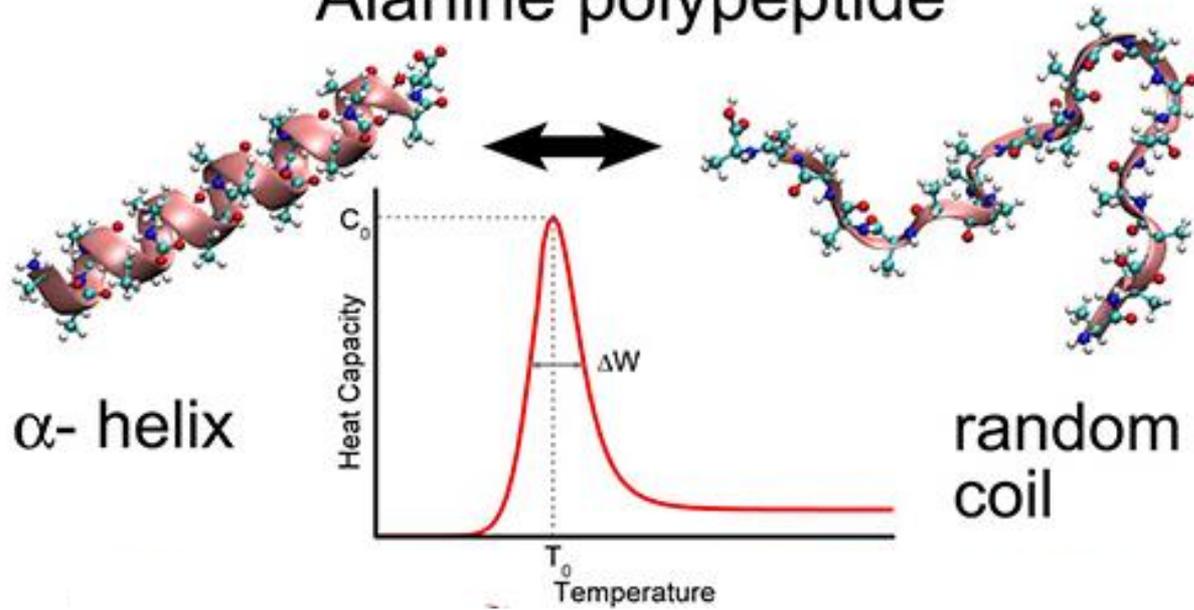
Prof. R. URBANI

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

**EQUILIBRI CONFORMAZIONALI DI
BIOPOLIMERI:**

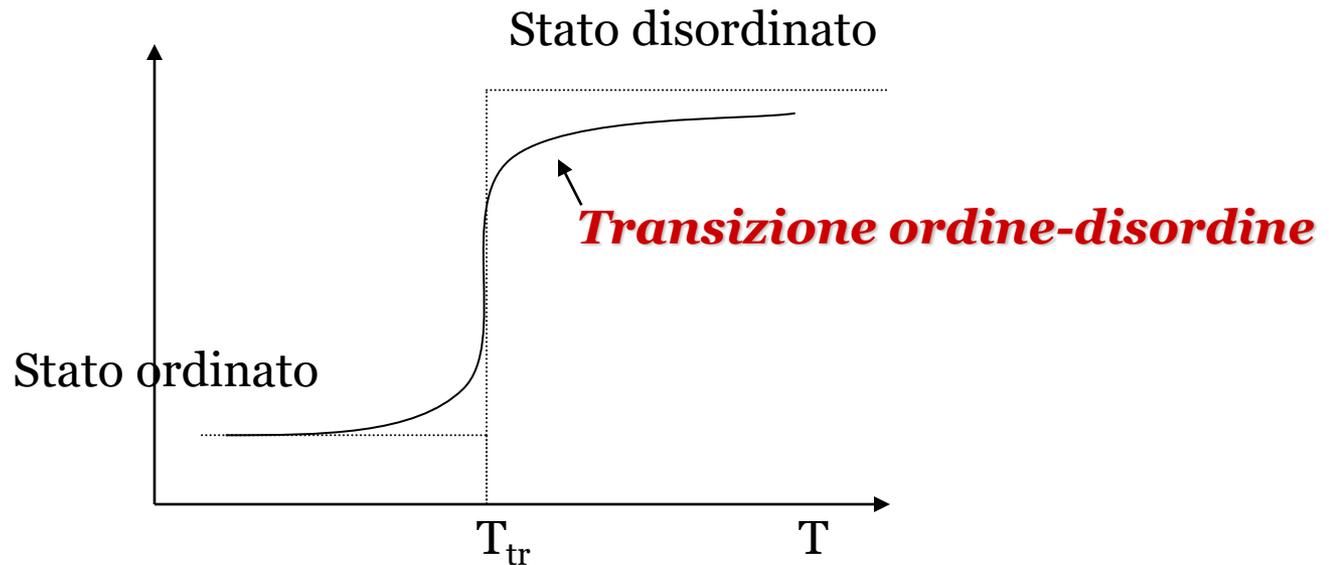
**LA TRANSIZIONE ELICA-
GOMITOLO**

Alanine polypeptide



Transizioni conformazionali di biopolimeri

Possono essere transizioni «all-or-none» (cooperative) con variazione brusca delle proprietà (ma continue)

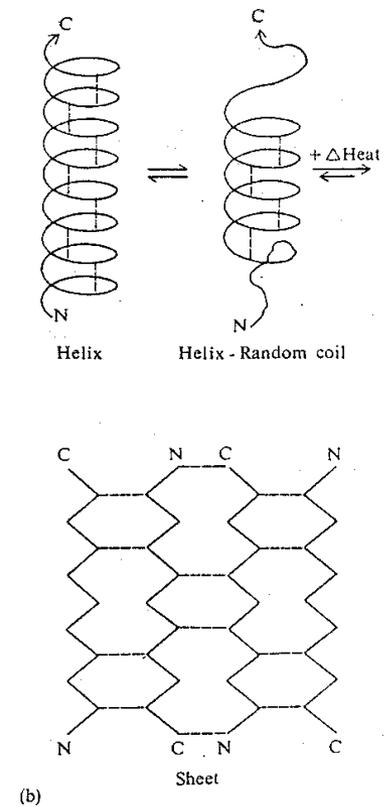
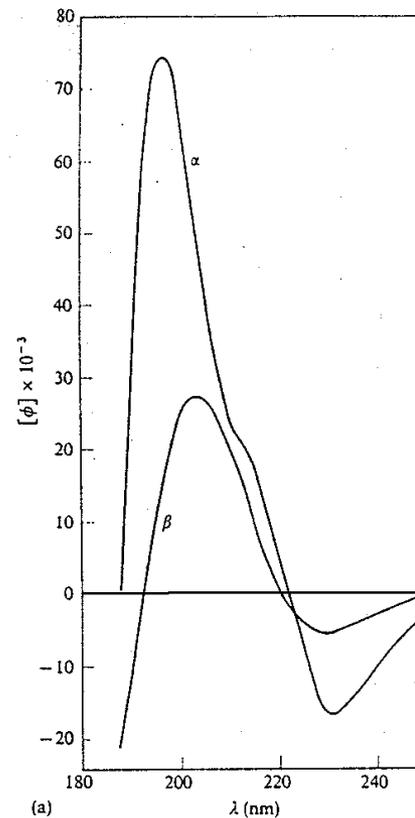


Le variazioni conformazionali avvengono in risposta a variazioni di alcuni parametri esterni, come:

- temperatura
- pH
- forza ionica
- tipo di solvente

I riarrangiamenti possono essere seguiti attraverso:

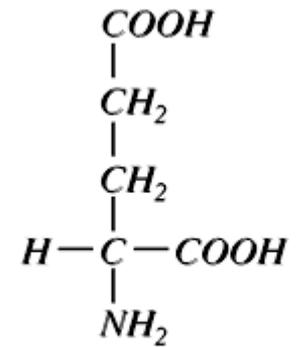
- misure spettroscopiche, come ORD e CD
- misure di proprietà idrodinamiche (viscosità, coefficiente di sedimentazione, scattering, etc.).
- misure calorimetriche
- misure microscopiche
-



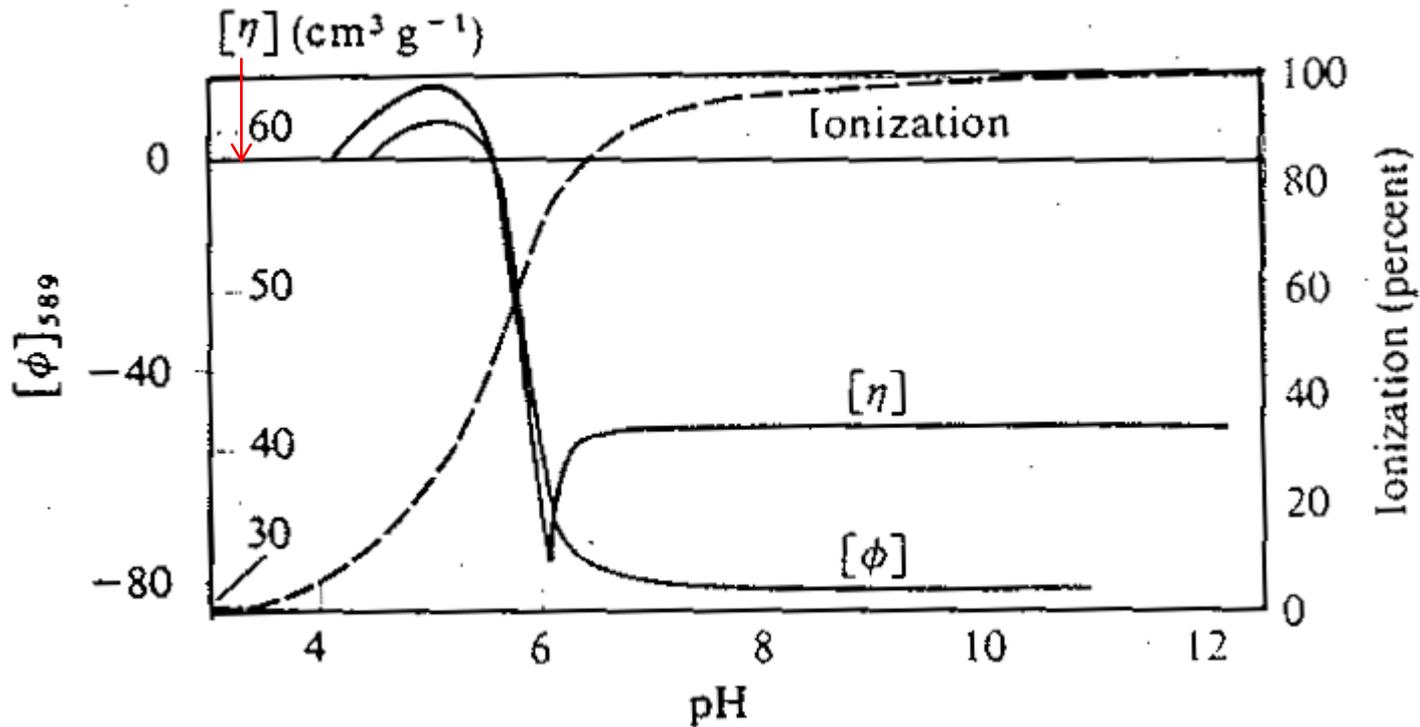
POLIPEPTIDI E PROTEINE

Esempio: ACIDO POLI-L-GLUTAMMICO

Questo polimero contiene gruppi carbossilici ionizzabili cosicché la sua carica elettrica totale è funzione del pH.



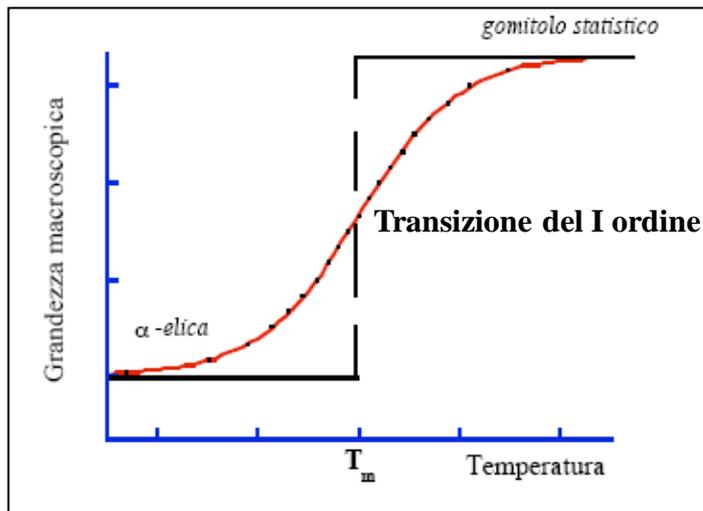
Acido glutammico (Glu, E)



Le variazioni di rotazione ottica e di viscosità sono così nette che il fenomeno viene chiamato **processo cooperativo**, cioè un tipo di fenomeno "**tutto-o-niente**"

Qualche volta viene anche adoperato il termine "**transizione di fase**", in analogia con le variazioni nette delle proprietà che hanno luogo in una transizione di fase come per esempio la fusione da solido a liquido.

Queste ultime sono fenomeni veramente discontinui, mentre le transizioni conformazionali sono fenomeni che mantengono il **carattere di continuità**.



L'andamento sigmoidale è tipico di una transizione cooperativa.

La pendenza della curva a $T=T_m$ è una misura della **cooperatività** della transizione.

Transizione elica-coil in polipeptidi

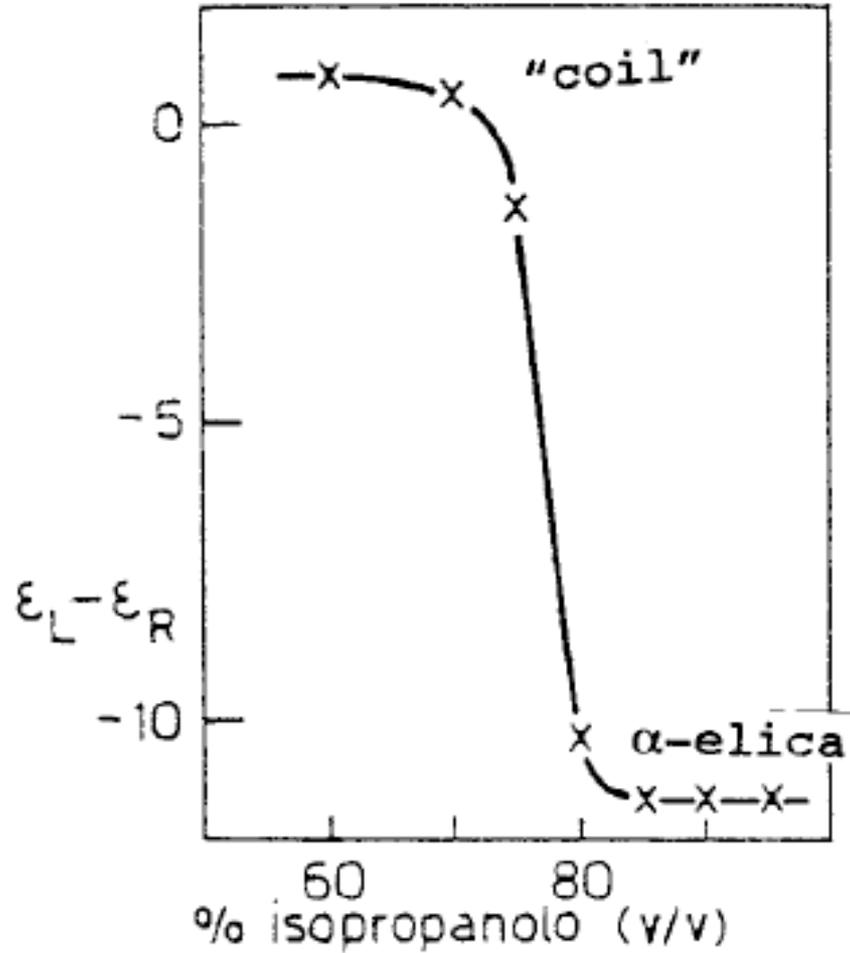
gomitolo statistico \rightleftharpoons α -elica

T_m = temperatura di transizione (m = melting, fusione)

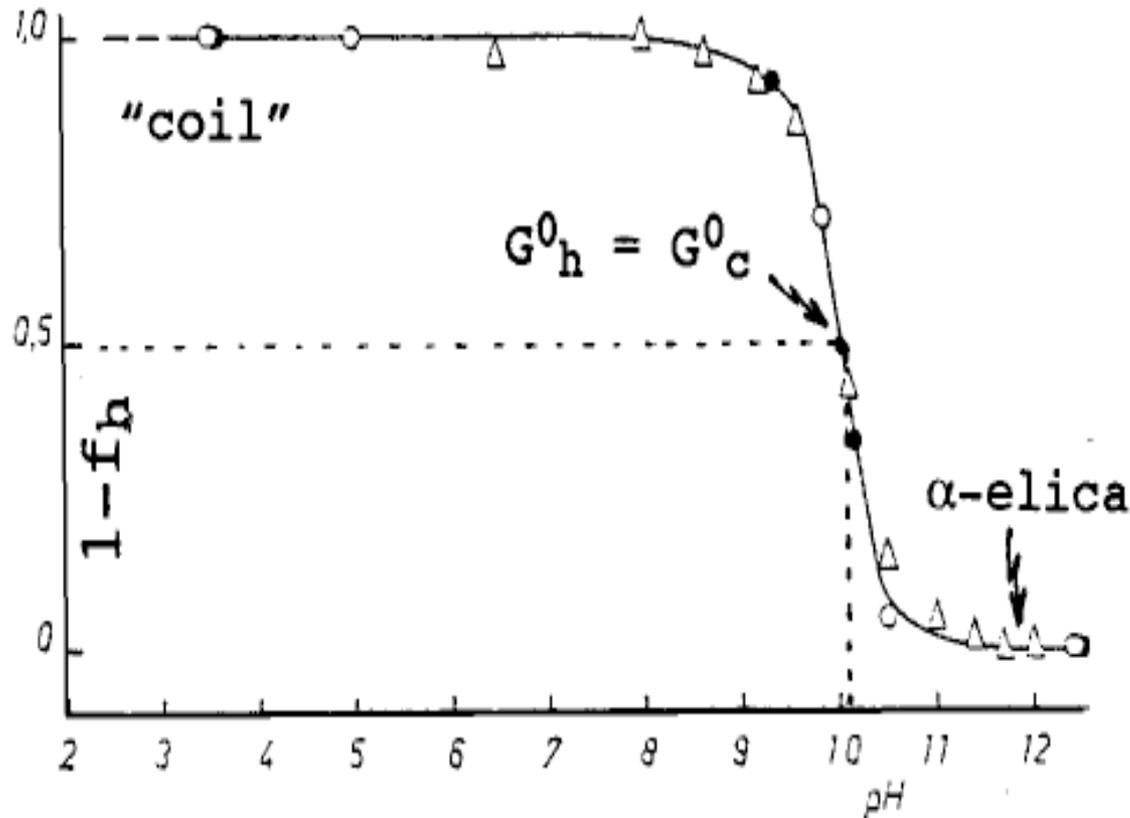
Frazione di α -elica:

$$f_h = \frac{[h]}{[h] + [c]}$$

a $T = T_m$: $f_h = f_c = 0.5$

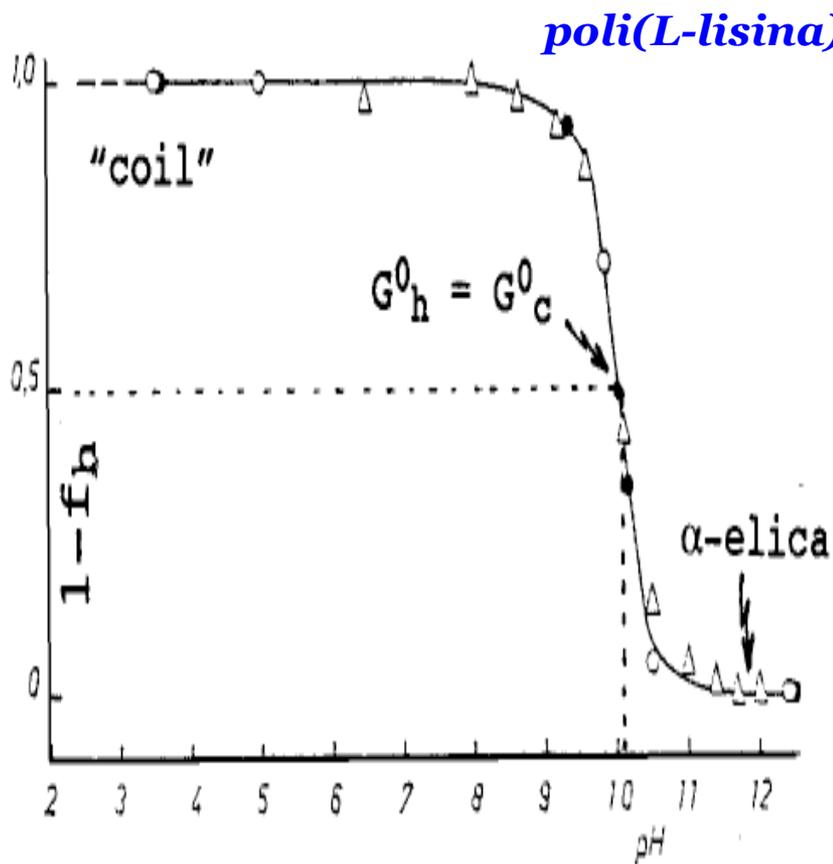


Transizione coil-elica del **poli(L-glutammato)** di sodio in funzione della percentuale di alcool isopropilico in miscela acqua/alcool.



Transizione coil-elica della poli(L-lisina) in funzione del pH

Il pH di transizione (10.1) segue da vicino il pH di deprotonazione dei gruppi amminici (10.2): $\text{—NH}_3^+ \leftrightarrow \text{—NH}_2 + \text{H}^+$



poli(L-lisina) pH < 10.2: il gruppo amminico laterale è protonato e la struttura elicoidale è destabilizzata dalle interazioni repulsive elettrostatiche tra le catene laterali.

Lo stato di 'random coil' è stabilizzato da una solvatazione ottimale delle cariche elettrostatiche grazie alla maggiore libertà conformazionale del polipeptide.

pH > 10.2: predomina la forma deprotonata del gruppo amminico e le interazioni di legame idrogeno intramolecolare rendono più stabile la conformazione ordinata.

Nel caso del **poli(L-glutammico)**:



a pH acidi predomina la forma protonata e il polipeptide assume una struttura secondaria ordinata elicoidale, mentre a $\text{pH} > 4.5$ predomina la forma deprotonata carica negativamente.

TRANSIZIONE CONFORMAZIONALE DI POLISACCARIDI

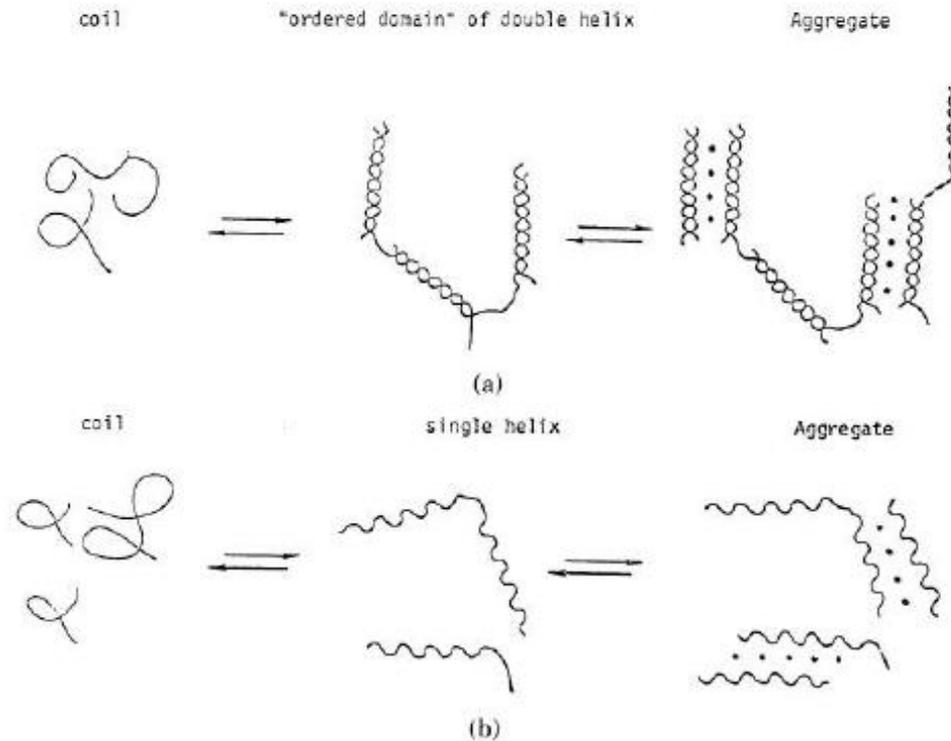
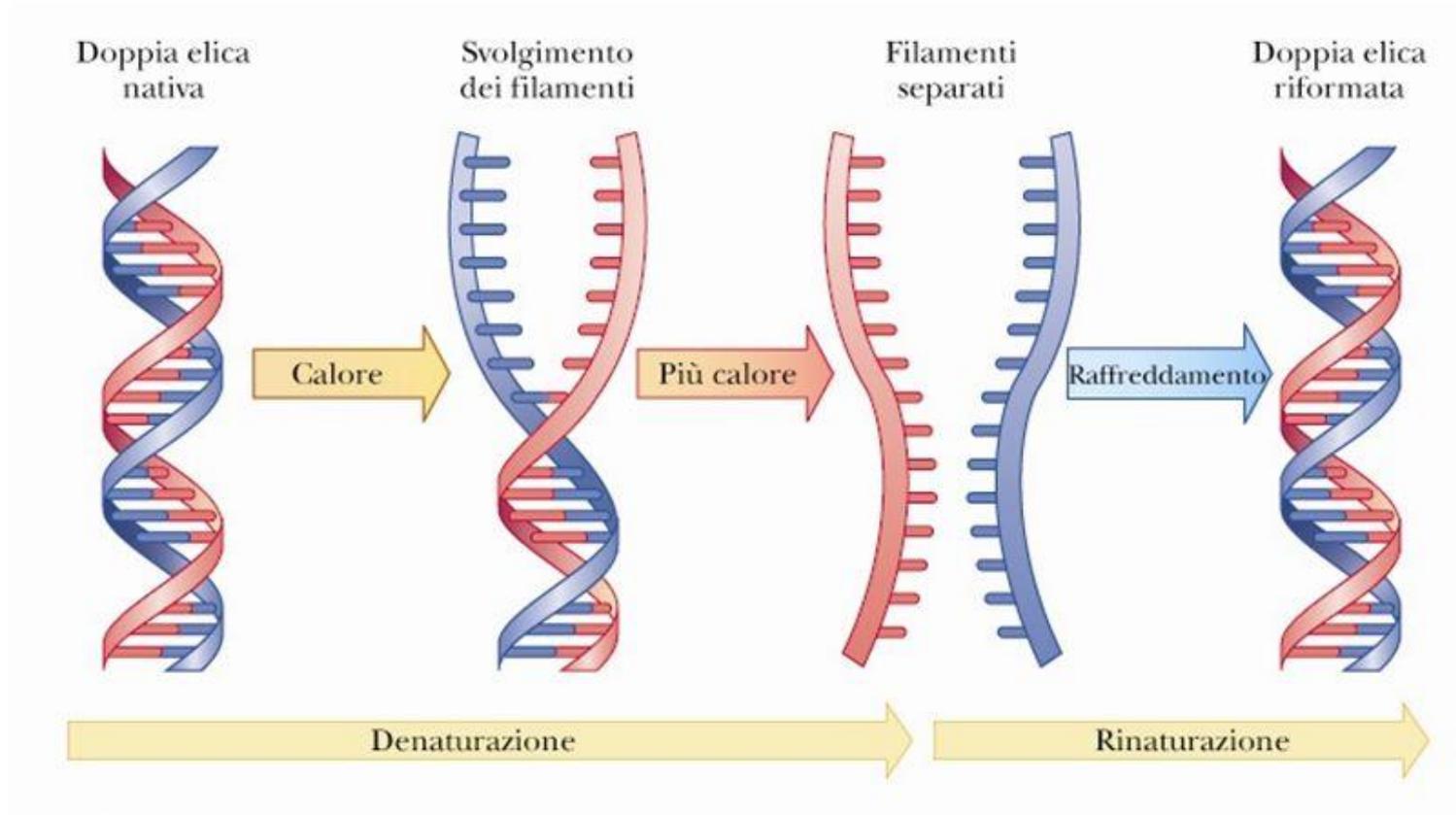


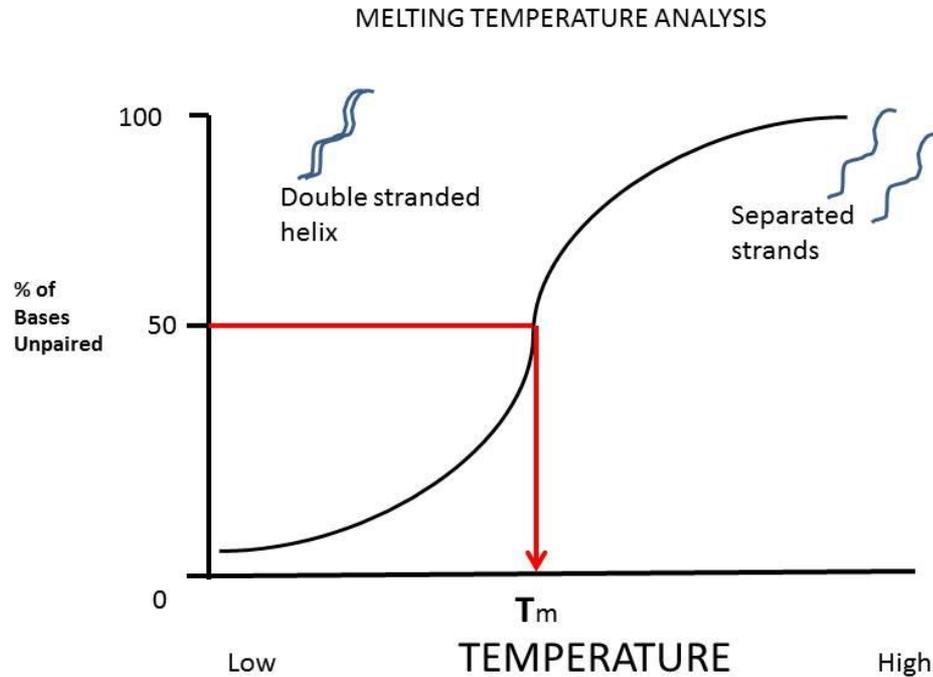
Fig. 1. Schematic models for gel formation in κ -carrageenan (a) by Morris et al. (Ref. 3) and (b) by Smidsrød (Ref. 4). K^+ counterions indicated by solid circles (\bullet).

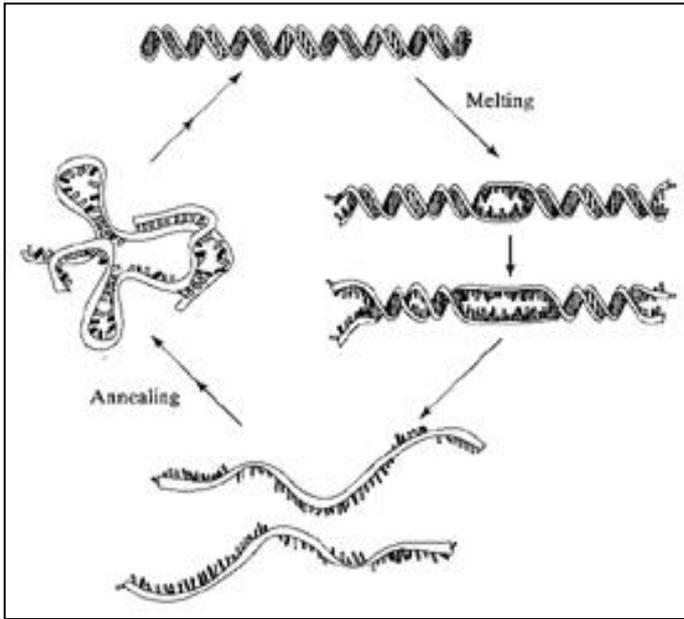
TRANSIZIONE CONFORMAZIONALE DEL DNA

Il DNA a doppia elica può essere denaturato



«FUSIONE» del DNA: denaturazione



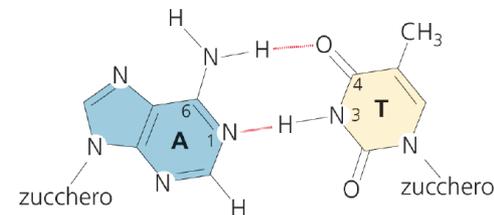
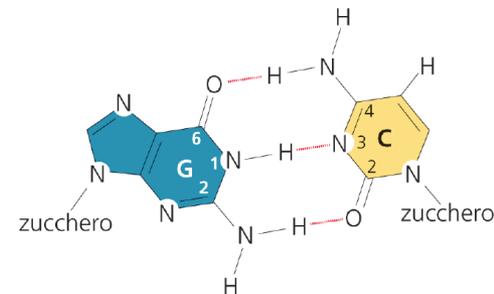
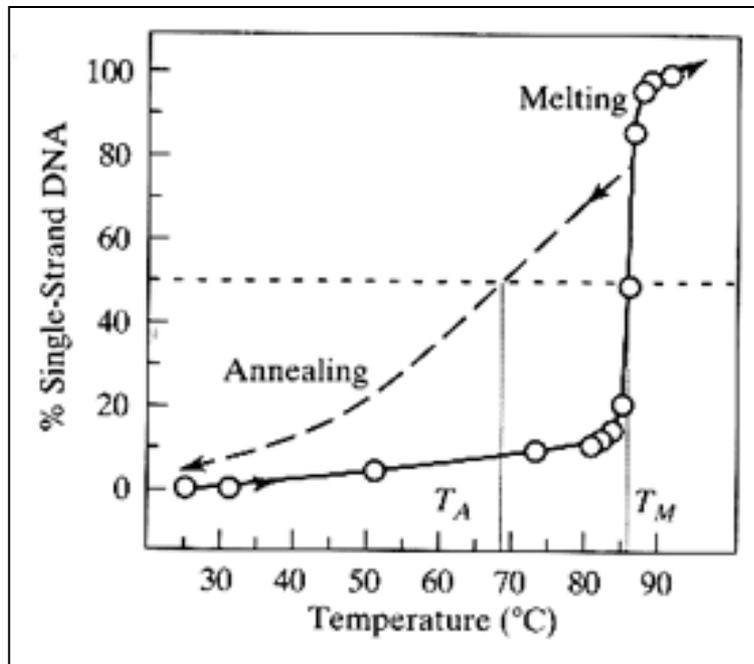


La T_m dipende sia dal **rapporto (G+C)/(A+T)** che dal contenuto salino della soluzione.

La coppia GC è stabilizzata da 3 legami ad H mentre la coppia AT da due.

l'energia dell'impacchettamento delle basi tra un GC è più forte di quello delle coppie AT.

Di conseguenza un più alto contenuto in GC porta ad una migliore stabilità dell'elica sia per un maggior numero di legami ad H che per interazioni di Van der Waals.



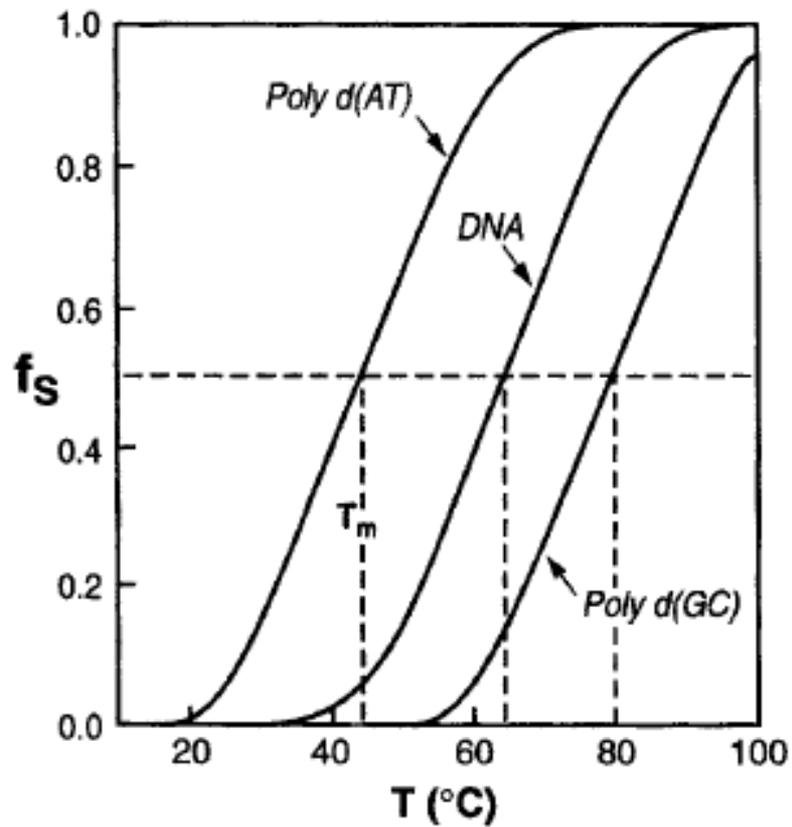
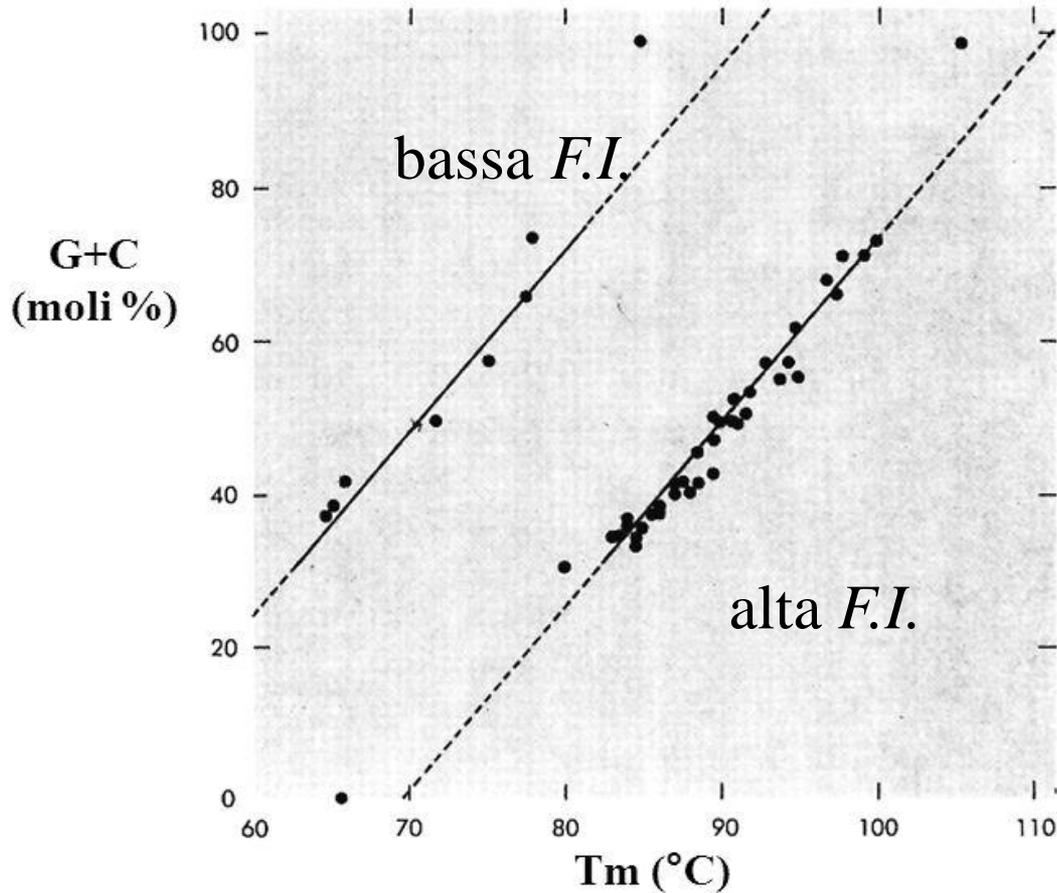


FIGURE 3-8. Hypothetical melting curves for double helix structures of poly d(AT), DNA(containing A-T and G-C base pairs), and poly d(GC).

Dipendenza della denaturazione del DNA dal contenuto in G+C

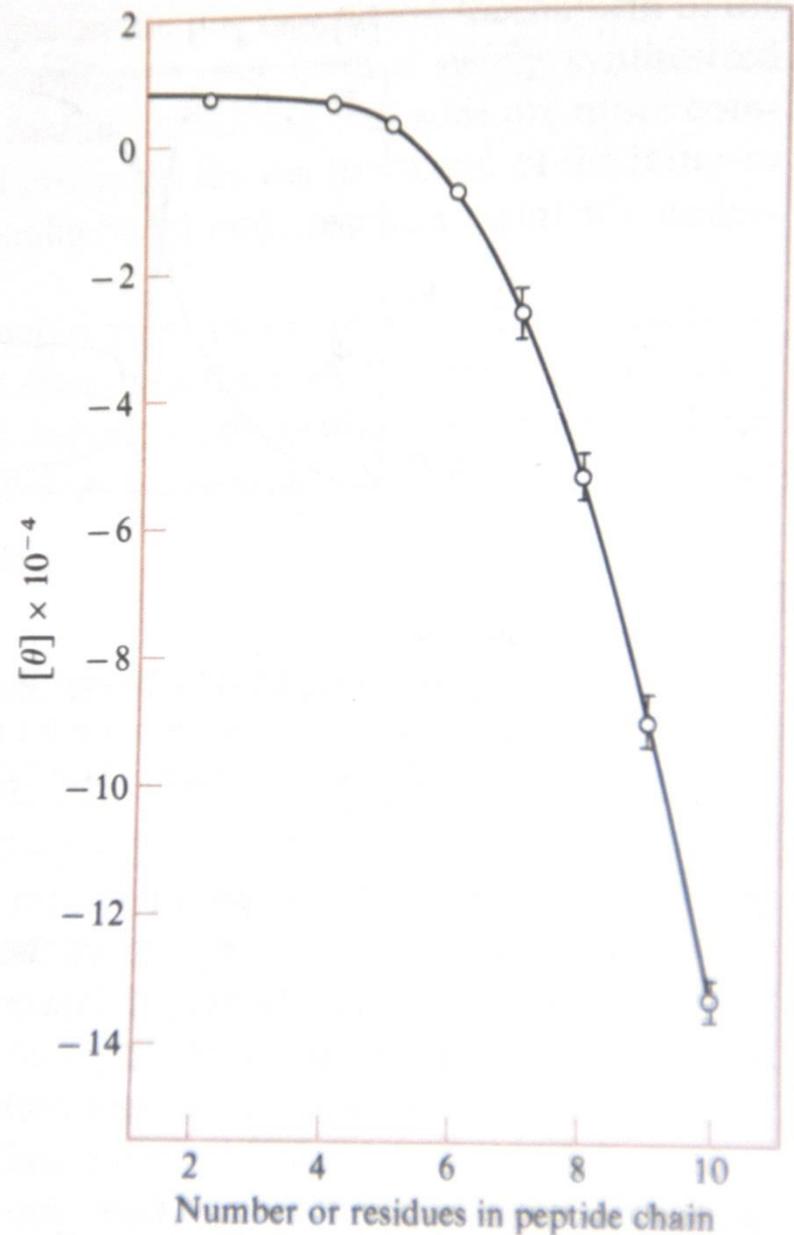


Una forza ionica alta
scherma le repulsioni
elettrostatiche dei
gruppi fosfato nello
scheletro

POLIPEPTIDI

E' noto (da dati di cristallografia a raggi X, spettroscopia infrarossa, rotazione ottica, viscosità ed altre tecniche) che i **polipeptidi** possono adottare conformazioni α -elicoidali **sia nello stato cristallino che in soluzione.**

Questa struttura coinvolge un efficace sistema di legami idrogeno nei quali l'ossigeno carbonilico del residuo **i-esimo** è legato all'idrogeno ammidico del residuo **i+4-esimo**.



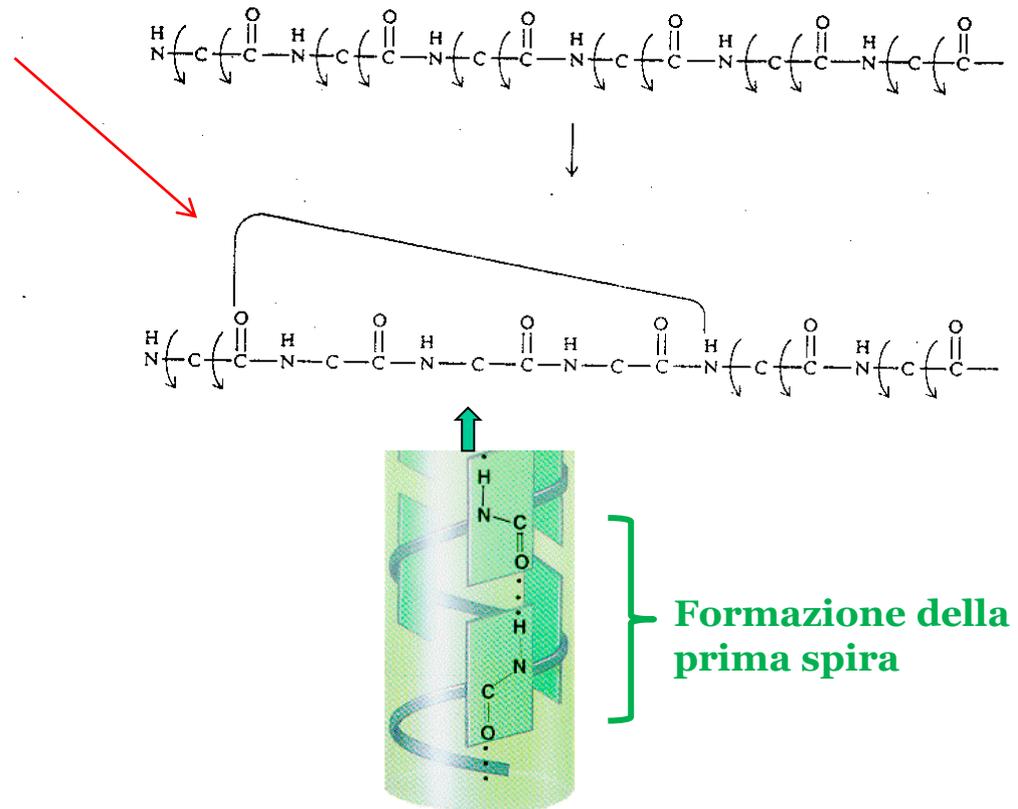
MECCANISMO MOLECOLARE DELLA TRANSIZIONE (ordine-disordine)

Perché è così difficile iniziare la transizione e come mai una volta iniziato il processo procede facilmente?

devono essere immobilizzati **6** angoli di rotazione
(**3** coppie Ψ , Φ ; **4** residui a.a.)

$\Psi = -47^\circ$; $\Phi = -57^\circ$,
elica destrogira

1° step: Nucleazione

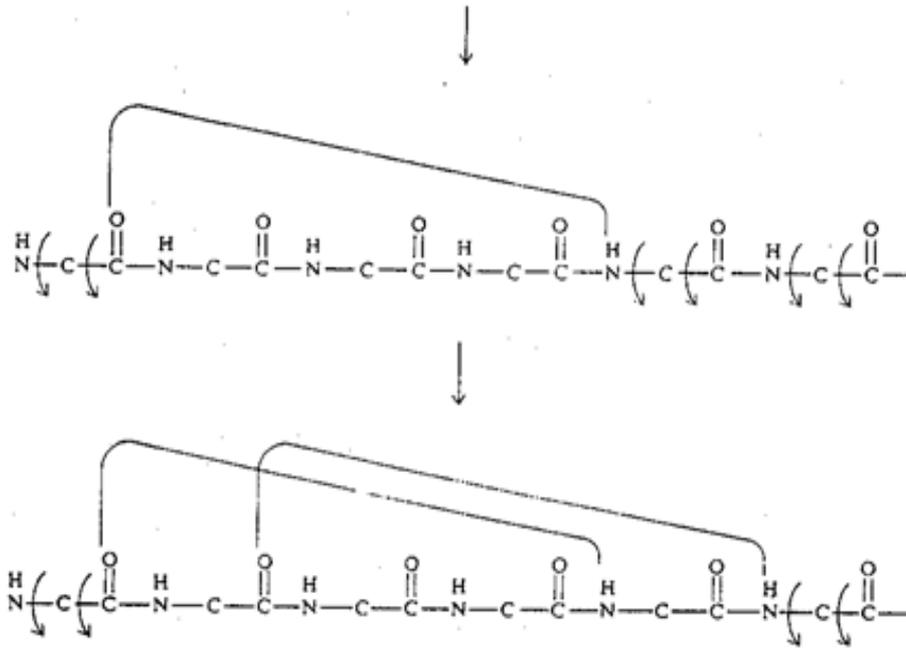


2° step: Propagazione

Formazione di un secondo legame idrogeno adiacente ad uno già formato.

Il secondo ed i legami idrogeno successivi non devono superare questa barriera entropica sfavorevole dal momento che essi si formano, in successione, adiacenti al primo.

Questo succede perché, una volta formatosi il primo legame idrogeno, quelli adiacenti necessitano di immobilizzare **soltanto** una coppia ϕ , ψ di angoli di rotazione.



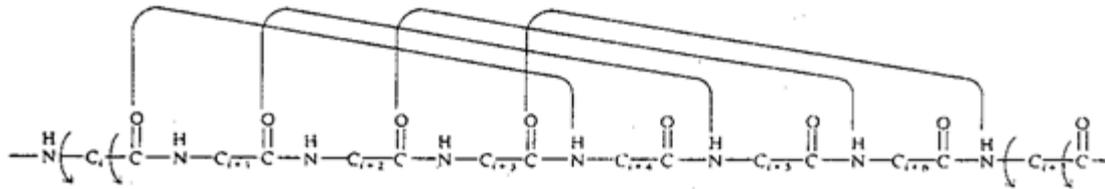
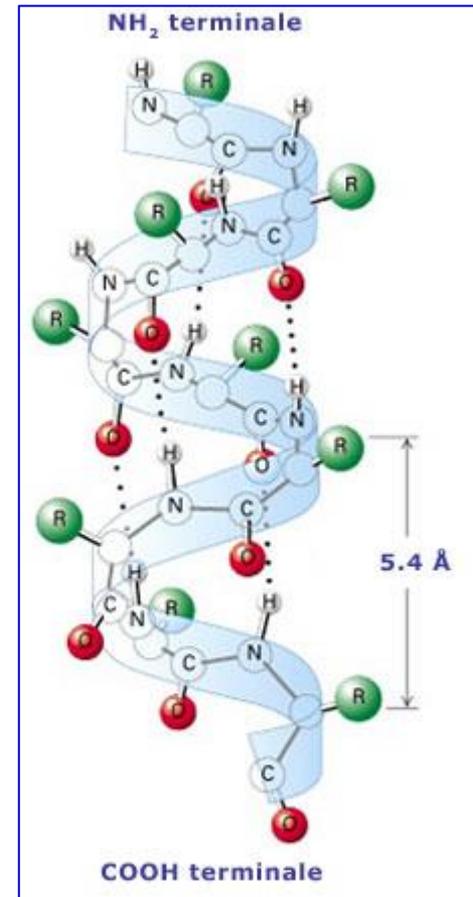


Figure 20-7

The interlacing hydrogen-bonded network of the α helix. Dihedral rotation angles about bonds attached to α -carbons C_i and C_{i+7} are indicated in this schematic drawing; side chains have been omitted for simplicity.



Dato l'equilibrio: $c \rightleftharpoons h$

La costante di equilibrio è: $K = \frac{[h]}{[c]} = \frac{n_h}{n_c}$

$$n = n_h + n_c \quad K = \frac{\frac{n_h}{n_h + n_c}}{\frac{n_c}{n_h + n_c}}$$

$$X_h = \frac{n_h}{n_h + n_c}$$

$$X_c = \frac{n_c}{n_h + n_c}$$

$$K = \frac{X_h}{X_c}$$

$$X_c = 1 - X_h$$

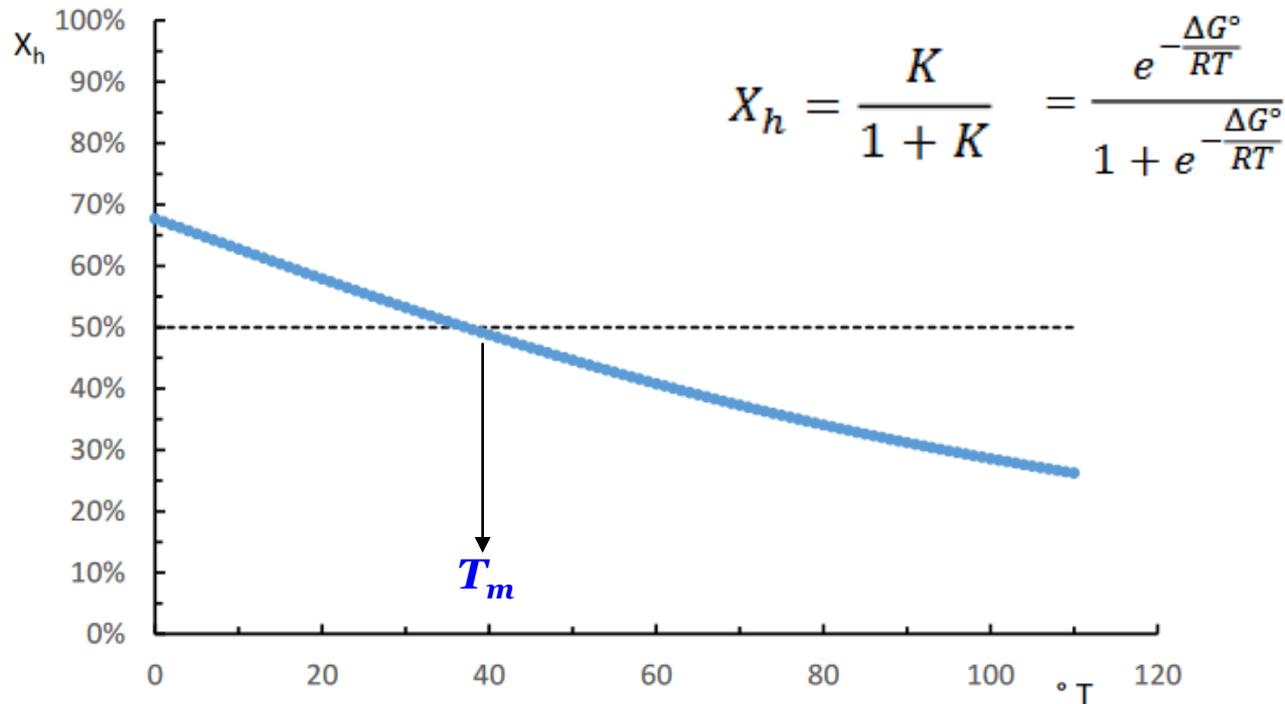
$$K = \frac{X_h}{1 - X_h}$$

$$X_h = \frac{K}{1 + K} = \frac{e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}}}$$

Dato l'ordine di grandezza delle funzioni termodinamiche:

$$\Delta H \cong -3 \text{ kcal/mole}$$

$$\Delta S \cong -10 \text{ cal/mole}\cdot^{\circ}\text{K}$$



Quando $\Delta G_o=0$, $X_h=50\%$

La temperatura corrispondente è la T di denaturazione, T_m

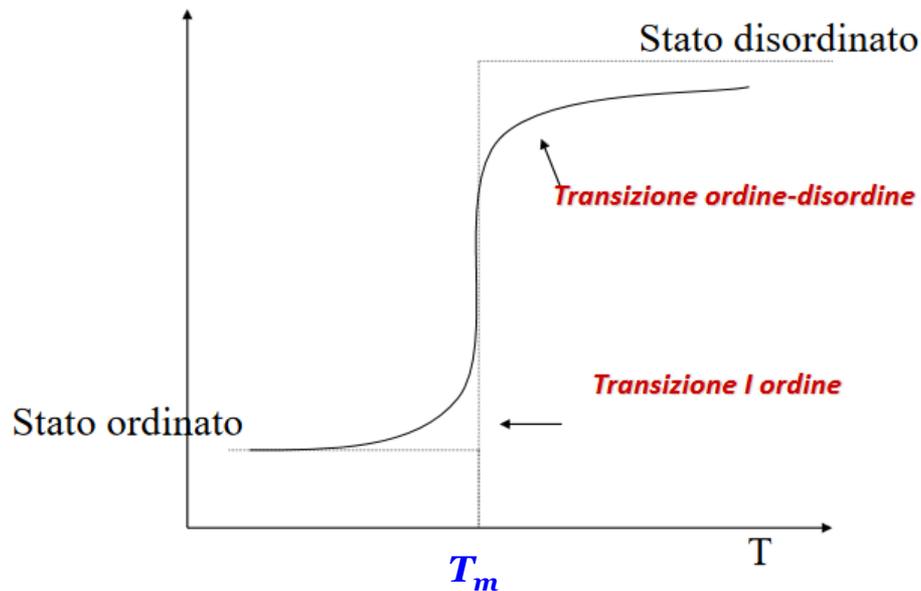
L'equilibrio si sposta verso la forma disordinata all'aumentare della T

I biopolimeri nella transizione tra stato ordinato-stato disordinato **non** mostrano questo comportamento ma una **transizione cooperativa**.

Le transizioni cooperative sono caratterizzate dal fatto che già prima della transizione di fase sono presenti domini della nuova fase, che facilitano il processo di transizione.

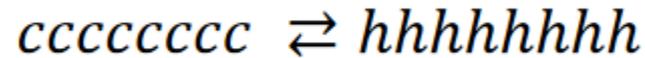
L'andamento sigmoidale è tipico di una transizione cooperativa.

La **pendenza** della curva a $T=T_m$ è una misura della **cooperatività** della transizione.



In prima approssimazione, se ho n residui che danno la stessa transizione :

ossia, per es.: $c \rightleftharpoons h$

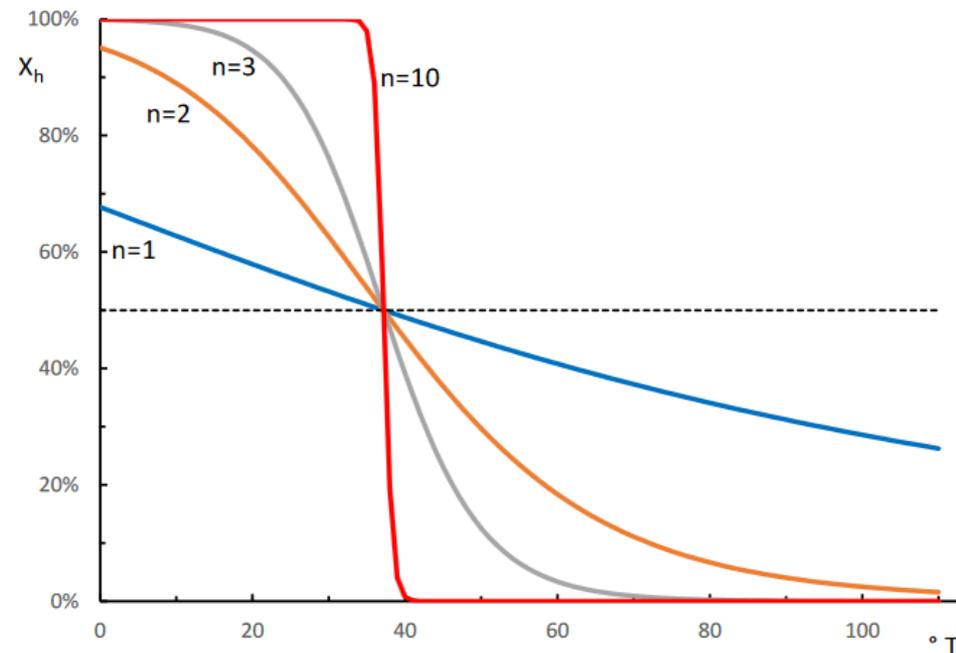


Se $n \cdot \Delta G_o$ è l'energia libera che coinvolge gli n residui, allora la frazione in elica sarà:

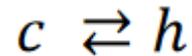
$$X_h = \frac{e^{-\frac{n \cdot \Delta G_o}{RT}}}{1 + e^{-\frac{n \cdot \Delta G_o}{RT}}}$$

dove la variazione della frazione di elica in funzione della temperatura dipende dal valore di n .

Maggiore è il valore di n , maggiore è la rapidità di passaggio tra struttura ordinata e disordinata



Termodinamica della transizione



$$\Delta G_{tr} = \Delta H_{tr} - T\Delta S_{tr}$$

$$\Delta S_{tr} < 0$$

$$\Delta H_{tr} = \Delta H_b + \Delta H_{dip} + \Delta H_{ion} + \Delta H_{solv} + \Delta H_{idrof}$$

ΔH_b : legami intermolecolari (es: legame H)

ΔH_{dip} : interazioni dipolari

ΔH_{ion} : interazioni ioniche (es: $\text{NH}_3^+ \leftrightarrow \text{COO}^-$)

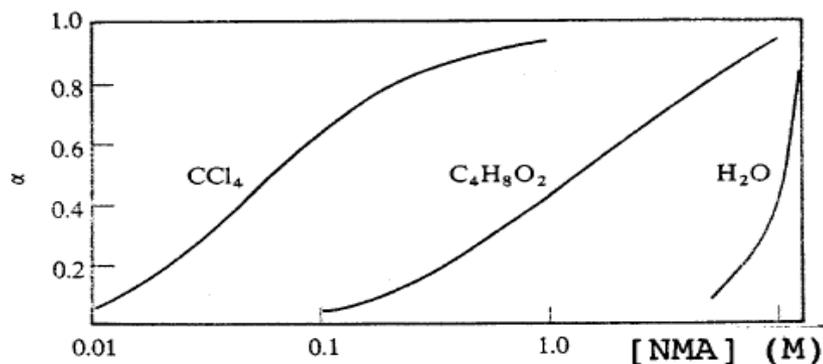
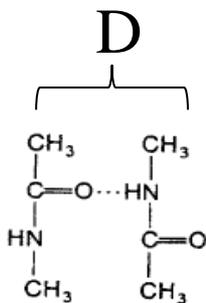
ΔH_{solv} : interazioni di solvatazione

ΔH_{idrof} : interazioni idrofobiche

Legame idrogeno VS. solvatazione

Nella formazione della struttura ordinata si hanno nuove interazioni intermolecolari (legame idrogeno, interazione di Wan der Waals). Queste danno un **contributo entalpico negativo** (si formano legami). L'entità di questo contributo dipende dal numero di interazioni.

Formazione di legame idrogeno in N-metil acetammide in diversi solventi

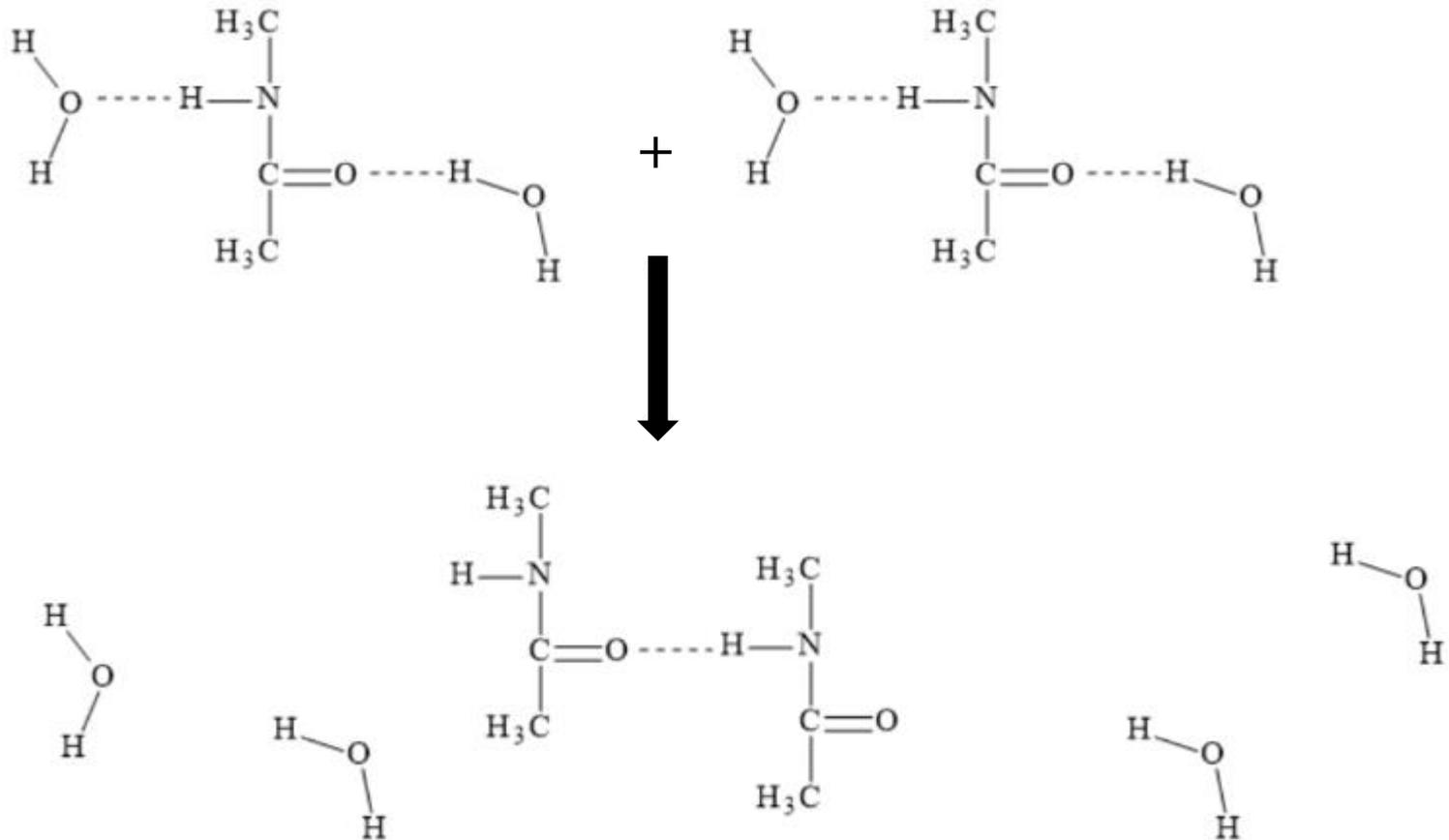


$$\Delta H_{HB} \approx -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$



$$K = \frac{[D]}{[NMA]^2} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad \alpha = \frac{[D]}{[NMA]^2 + [D]}$$

In acqua, affinché si formino i legami idrogeno intramolecolari (nei polipeptidi), si devono rompere dei legami **idrogeno** tra il legame peptidico e il solvente



Parametri termodinamici per la formazione di 1 mole di l.i. nella dimerizzazione della NMA a 25⁰C, 1 atm e C⁰ = 1 M a)

Solvente	ΔH^0 (kcal/mole)	ΔS^0 (u.e.)	ΔG^0 (kcal/mole)
CCl ₄	-4.2	-11	-0.92
diossano	-0.8	-4	0.39
H ₂ O	0.0	-10	3.1

Competizione nella formazione di legame idrogeno:



Entalpia di solvatazione

ΔH_{solv} = differenza di solvatazione tra il peptide in elica e il peptide in coil.

E' un contributo generalmente **sfavorevole** alla transizione in elica (**2-3 kcal·mol⁻¹**).

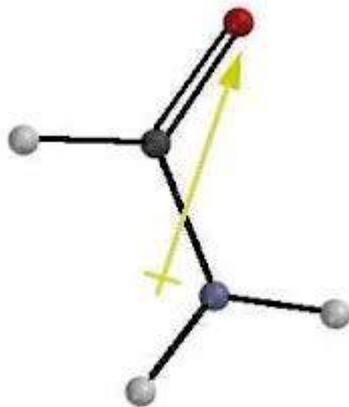


Il coil è infatti libero di riaggiustarsi in modo da ottimizzare la solvatazione della sequenza peptidica (rigonfiamento).

Interazione tra dipoli ammidici

Oltre al guadagno energetico portato dalla formazione dei legami idrogeno, la struttura compatta dell'elica favorisce **interazioni dipolo-dipolo** significative tra gruppi ammidici separati da alcuni residui.

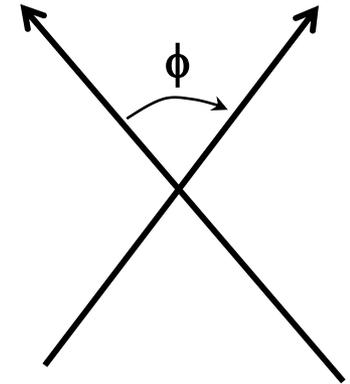
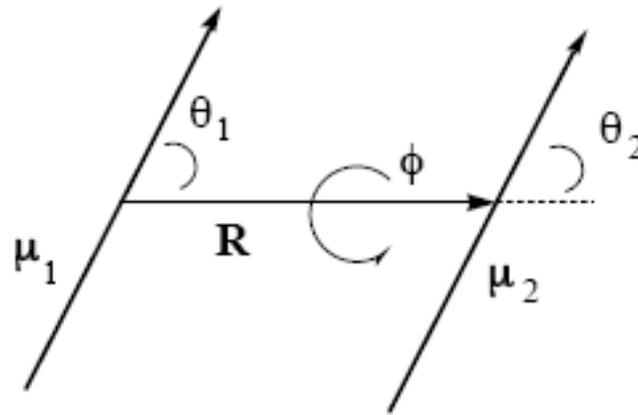
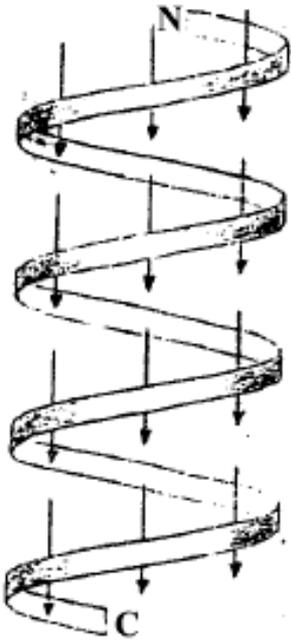
In questo modo **l'energia dipolare di un'elica può essere elevata**; inoltre la dipendenza della stabilizzazione dalla lunghezza dell'elica ha un effetto sulla cooperatività.



Posizione del dipolo elettrico in un gruppo ammidico

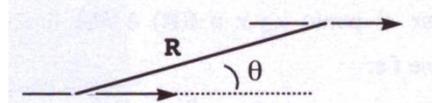
Interazione tra dipoli ammidici

$$\Delta H_{\text{dipolo}} \approx -2kcal \cdot mol^{-1} \quad (\text{testa-coda})$$



$$V_{12} = \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon_0 R_{12}^3} (\cos \phi - 3 \cos \theta_1 \cos \theta_2)$$

I) Per $0 < \theta_1 = \theta_2 = \theta < \pi/2$ (e quindi $\phi = 0$):

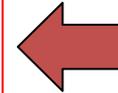
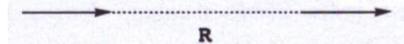


$$V_{12} = \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon_0 R^3} (1 - 3\cos^2\theta)$$

II) per $\theta_1 = \theta_2 = 0$ (a), $\cos^2\theta = 1$, l'eq (6-4) diventa:

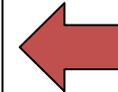
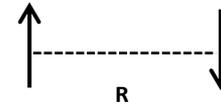
$$V_{12} = -\frac{2 \mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon_0 R^3}$$

in questo caso, $V_{12} \equiv V_{\min}$: essa corrisponde all'interazione attrattiva *testa-coda*.



III) per $\theta_1 = \theta_2 = \pi/2$ e $\phi = 0$

$$V_{12} = -\frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon_0 R^3}$$



IV) per $\theta_1 = 0, \theta_2 = \pi$ (a), e quindi $\phi = \pi$, $\cos\theta_1 = 1$ e $\cos\theta_2 = -1$:

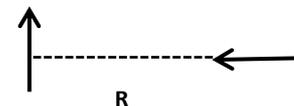
$$V_{12} = +\frac{2 \mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon_0 R^3}$$

In questo caso, V_{12} corrisponde all'interazione repulsiva *testa-testa*.



V) per $\theta_1 = 0, \theta_2 = \pi/2$ e $\phi = \pi/2$

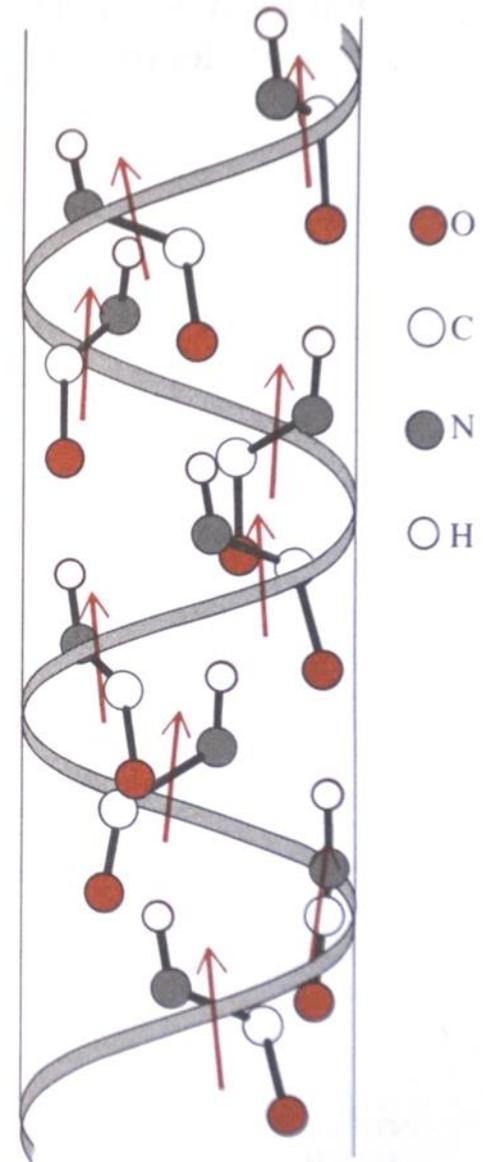
$$V_{12} = 0$$



In un' α -elica i dipoli ammidici si allineano approssimativamente **in modo parallelo** all'asse dell'elica, quindi l'interazione tra dipoli ammidici successivi è repulsiva;

tuttavia l'interazione di un certo dipolo con uno più distante può diventare favorevole quando i due hanno un allineamento **testa-coda**.

Le interazioni di un dipolo con il terzo successivo sono molto favorevoli.



«Per un numero sufficientemente grande di residui ($n \geq 10$) il contributo attrattivo dovuto all'allineamento testa-coda dei dipoli predomina sul contributo repulsivo dei residui adiacenti, con una conseguente stabilizzazione della struttura elicoidale ($-1, -2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)»

L'effetto di questa interazione è quello di favorire lungi tratti elicoidali.

E' stato stimato che un dato residuo raggiunge la massima stabilizzazione dipolare possibile se è seguito da circa **dieci** unità elicoidali.



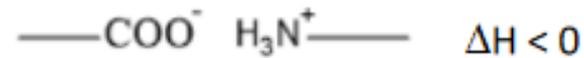
i residui vicini alla fine della sequenza elicoidale avranno energia sfavorevole e quindi l'effetto dell'interazione dipolare sarà quello di **scoraggiare la formazione di molte sequenze elicoidali corte** (dove il numero di residui vicino alla "fine dell'elica" è grande) e **di incoraggiare la formazione di lunghe sequenze** dove il numero di interazioni dipolari è ottimizzato.



Questo aspetto porta un contributo importante alla **cooperatività** della formazione dell'elica.

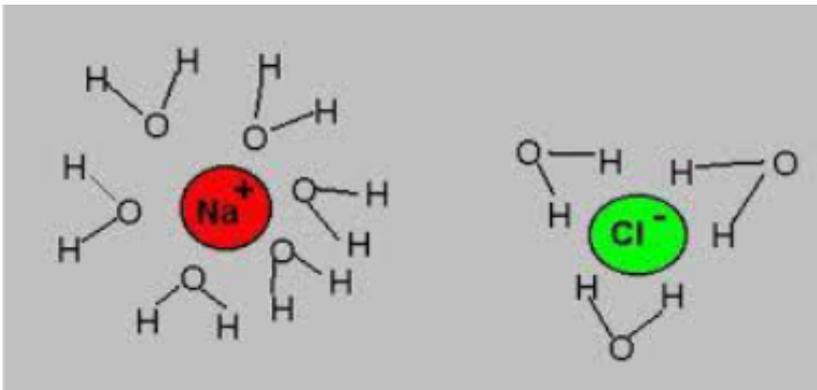
ΔH_{ion} e ΔH_{solv}

L'interazione tra un gruppo carico positivamente e un gruppo carico negativamente è un'interazione energeticamente favorevole:



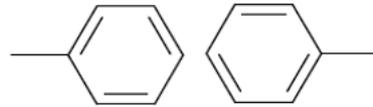
Tuttavia, se considero l'interazione tra lo ione Na^+ e lo ione Cl^- in acqua, $\Delta H \cong 0$

L'interazione ionica, dal punto di vista entalpico, comporta la rottura di interazione ione-dipolo e questo costa energia



ΔH_{idrof} e ΔH_{solv}

Se consideriamo l'interazione tra due residui idrofobici (per esempio, aromatici) devo aspettarmi un contributo negativo al ΔH .

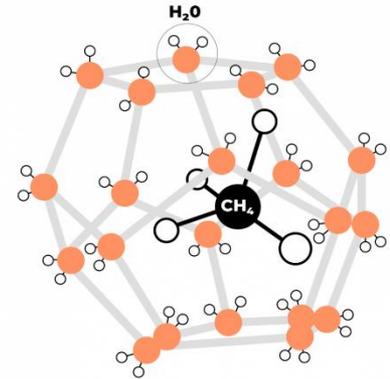


Devo anche in questo caso tener conto del contributo dell'acqua.

I residui idrofobici sono solitamente ingabbiati in **clatrati**.

Si tenga presente che l'unità di base della maggior parte dei clatrati è un **dodecaedro** composto da 20 molecole d'acqua disposte a formare 12 facce pentagonali, con un centro cavo che può essere occupato da una "molecola ospite".

Affinchè ci possa essere l'avvicinamento dei gruppi idrofobici, si devono rompere i legami idrogeno tra le molecole d'acqua che formano il clatrato e questo ha un costo energetico !

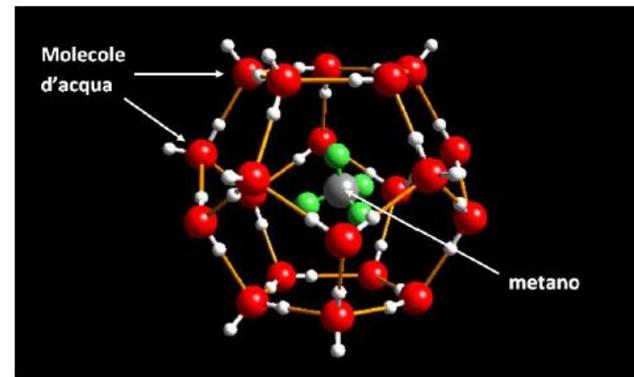
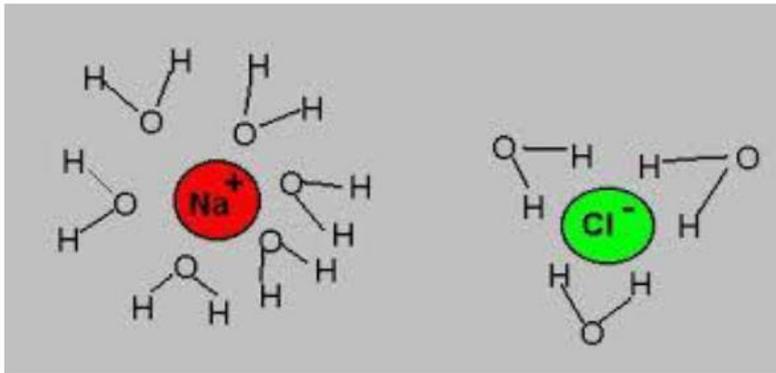


Contributo entropico

$$\Delta S_{trans} = \Delta S_{conf} + \Delta S_{solv}$$

Nel caso dell'entropia è molto importante valutare gli effetti della solvatazione.

In ambiente acquoso, ogni interazione è accompagnata da una liberazione di molecole d'acqua, quindi da un guadagno di entropia. Ovviamente, la variazione di entropia conformazionale è negativa, ma questa è quasi bilanciata dal guadagno entropico dovuto alle molecole d'acqua.



PRIMO MODELLO:
**TRATTAMENTO TERMODINAMICO SEMPLICE DELLA
TRANSIZIONE CONFORMAZIONALE**
Modello di Schellman
(Modello della massima cooperatività)

IPOTESI:

Oppure **modello a cooperatività infinita:**

le catene polipeptidiche possono esistere o in una configurazione tutta elica o in una configurazione tutto coil.

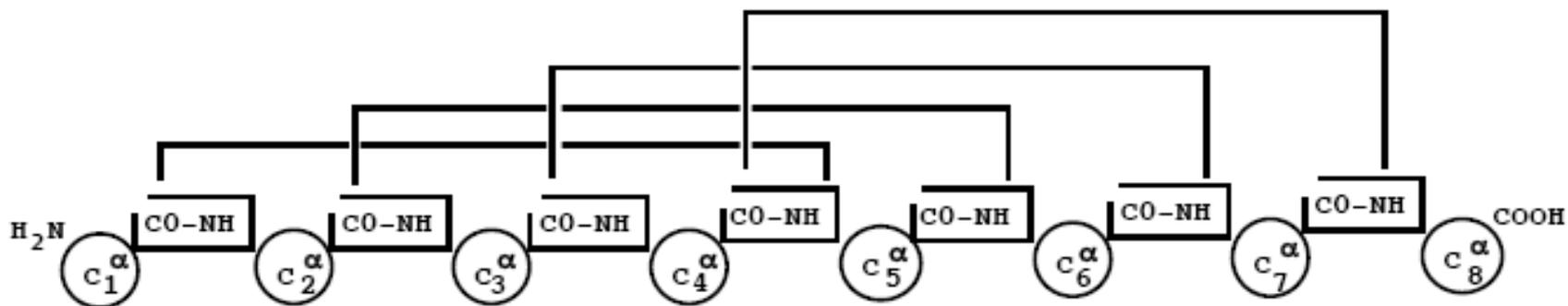
Quando la frazione di α -elica, θ , è 0.5, metà delle molecole sono **tutte in elica** e l'altra metà sono **tutte in gomitolo**.

ΔG , per convertire **un residuo** in gomitolo in uno in elica legato da legame idrogeno è:

$$\Delta G_r = \Delta H_r - T \Delta S_r$$

dove ΔH_r e ΔS_r sono le variazioni di entropia e di entalpia per residuo.

Nella formazione di un α -elica **4 residui non possono formare legame idrogeno e i due terminali restano comunque liberi di ruotare:**



La variazione di energia libera dell'intero processo sarà:

$$\Delta G_{tot} = (n - 4)\Delta H_r - (n - 2)T\Delta S_r$$

$$\Delta G_{tot} = (n - 4)\Delta H_r - (n - 2)T\Delta S_r$$

La **variazione di entalpia** è associata alla formazione di legami idrogeno e la **variazione di entropia** dipende dalla differenza in libertà conformazionale tra un residuo in gomitolo ed uno in elica.

Non vengono considerati effetti dovuti al solvente.

Quindi ΔG_{tot} per una transizione di una catena di n residui **non** è semplicemente $n \Delta G_r$ a causa degli effetti terminali.

$$\Delta G_{tot} = (n-4) \Delta H_r - (n-2)T \Delta S_r$$

La costante di equilibrio (macroscopica) K è $K = ck^n = \frac{[elica]}{[gomitolo]}$

$$\Delta G_{tot} = (n-4)\Delta H_r - (n-2)T\Delta S_r = \underbrace{n(\Delta H_r - T\Delta S_r)} - \underbrace{4\Delta H_r + 2T\Delta S_r}$$

$$= -RT \ln K$$

$$K = \exp[-n(\Delta H_r - T\Delta S_r)/RT] \cdot \exp[-(-4\Delta H_r + 2T\Delta S_r)/RT]$$

$$\ln k = -(\Delta H_r - T\Delta S_r) / RT$$

$$\ln c = -(-4\Delta H_r + 2T\Delta S_r) / RT$$

$k, c =$ costanti microscopiche

da cui: **$K = ck^n$**

Se **n** è grande, anche piccole variazioni di **k** , dovute per esempio a variazioni di temperatura, possono causare **grandi variazioni** nella **costante di equilibrio macroscopica K** .

Calcoliamo la dipendenza della temperatura, relativa a metà transizione (T_m) dalla lunghezza di catena n .

Per $T=T_m$, :
 $\theta = 0.5$ frazione in elica
 $1 - \theta = 0.5$ frazione in coil

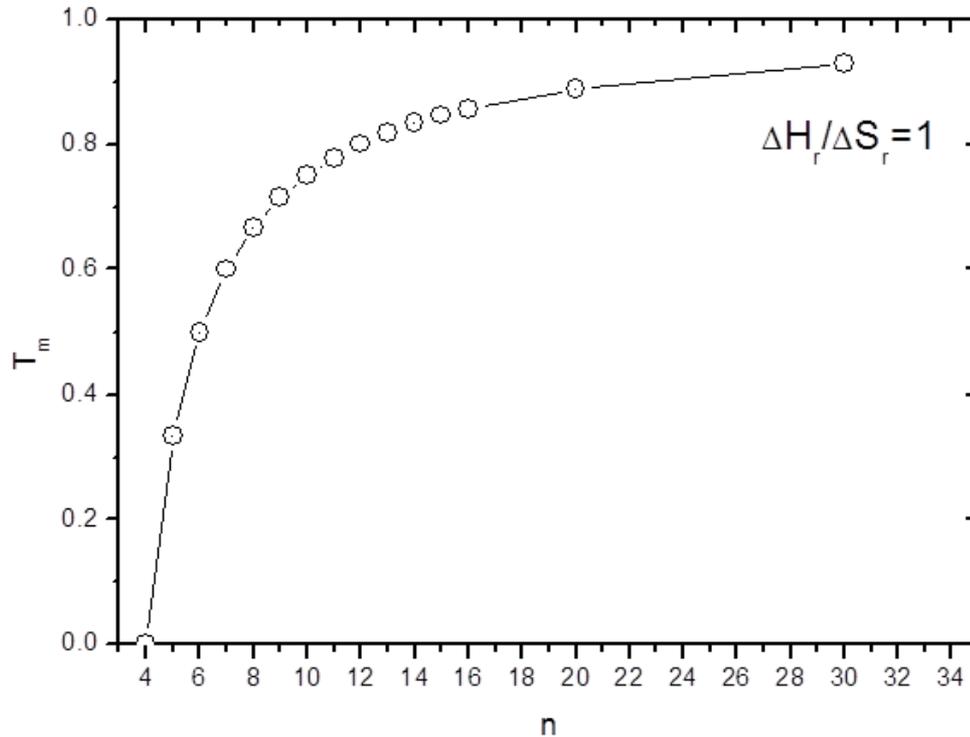
avremo che $\Delta G_{tot}=0$ e $K=1$, quindi:

$$\Delta G_{tot} = 0 = (n - 4)\Delta H_r - T_m (n - 2)\Delta S_r$$

$$T_m = \frac{(n - 4)\Delta H_r}{(n - 2)\Delta S_r} \quad \text{per } n \geq 5$$

T_m dipende dalla lunghezza della catena n .

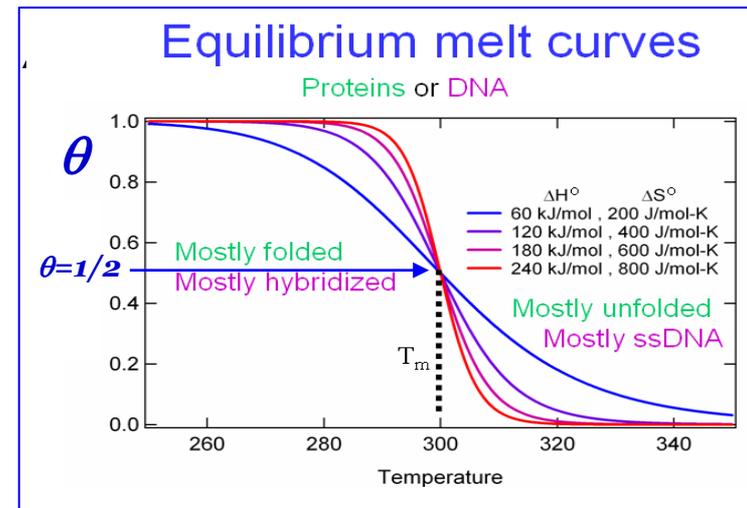
se n è molto grande, T_m tende asintoticamente a $\Delta H_r / \Delta S_r$.



Buon accordo qualitativo con i risultati sperimentali, ma basso accordo quantitativo poichè T_m varia in un intervallo più ampio di valori di n .

Calcoliamo la dipendenza del **grado di cooperatività** della transizione dalla lunghezza della catena che è **definito dalla pendenza della curva $\theta(T)$** nel punto $\theta=1/2$ o $T=T_m$.

θ rappresenta la frazione di residui che sono in elica. Dobbiamo ottenere un'espressione per **$(d\theta/dT)$** nel punto $T=T_m$.



$$\ln K = \ln \frac{\theta}{1-\theta} = \ln \theta - \ln(1-\theta) = -\frac{(n-4)\Delta H_r - (n-2)T\Delta S_r}{RT}$$

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{1}{\theta} \frac{d\theta}{dT} - \frac{1}{1-\theta} \left(-\frac{d\theta}{dT} \right)$$

$\theta=1/2$ per $T=T_m$:

$$\frac{1}{\theta} \frac{d\theta}{dT} - \frac{1}{1-\theta} \left(-\frac{d\theta}{dT} \right) = 2 \frac{d\theta}{dT} + 2 \frac{d\theta}{dT} = 4 \frac{d\theta}{dT} = \frac{d \ln K}{dT}$$

applicando la **relazione di van't Hoff**:

$$\left(\frac{d \ln K}{dT} \right)_{T=T_m} = \frac{\Delta H_{tot}}{RT^2} = \left(\frac{(n-4)\Delta H}{RT^2} \right)_{T=T_m}$$

eguagliando le due espressioni per $\frac{d \ln K}{dT}$

$$4 \left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T=T_m} = \frac{(n-4)\Delta H_r}{RT_m^2} \quad \text{poichè per } \Delta G_r = 0$$

$$T_m = \frac{(n-4)\Delta H_r}{(n-2)\Delta S_r}$$

$$\longrightarrow \left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T=T_m} = \frac{1}{4} \frac{(n-2)^2 \Delta S_r^2}{(n-4)R\Delta H_r}$$

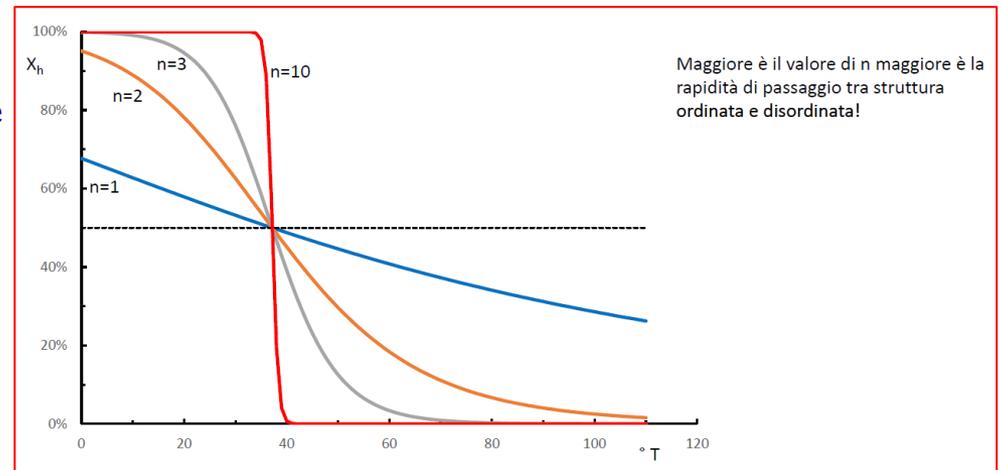
$$\left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T=T_m} = \frac{1}{4} \frac{(n-2)^2 \Delta S_r^2}{(n-4)R\Delta H_r} = \text{misura della cooperatività della transizione}$$

Secondo l'equazione il **grado di cooperatività aumenta con la lunghezza della catena.**

Questa predizione è in accordo **qualitativo** con le osservazioni sperimentali. Il modello di Schellman (tutto o niente) porta a delle transizioni che sono troppo rapide, che **non concordano completamente** con i dati sperimentali.

L'aumento del grado di cooperatività è dovuto all'aumento della variazione di entropia al crescere del numero di residui.

L'equazione trovata predice pure che il **grado di cooperatività** aumenta **senza limite** all'aumentare del numero di residui, ma anche questo risultato non è in accordo con i dati sperimentali !



Il limite di questa trattazione termodinamica semplice è una conseguenza **dell'assunzione troppo restrittiva che una catena possa esistere solo e completamente o in elica o in gomito statistico.**

Ma.....

....quanto più lunga è la catena tanto più grande sarà la **probabilità di avere regioni in elica separate da sezioni in gomito.**