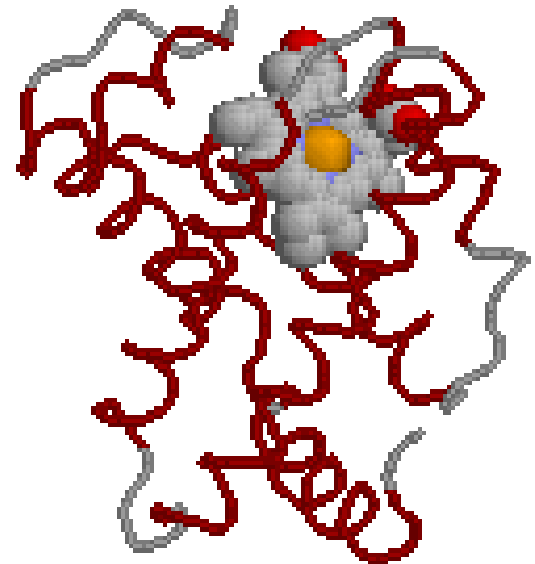
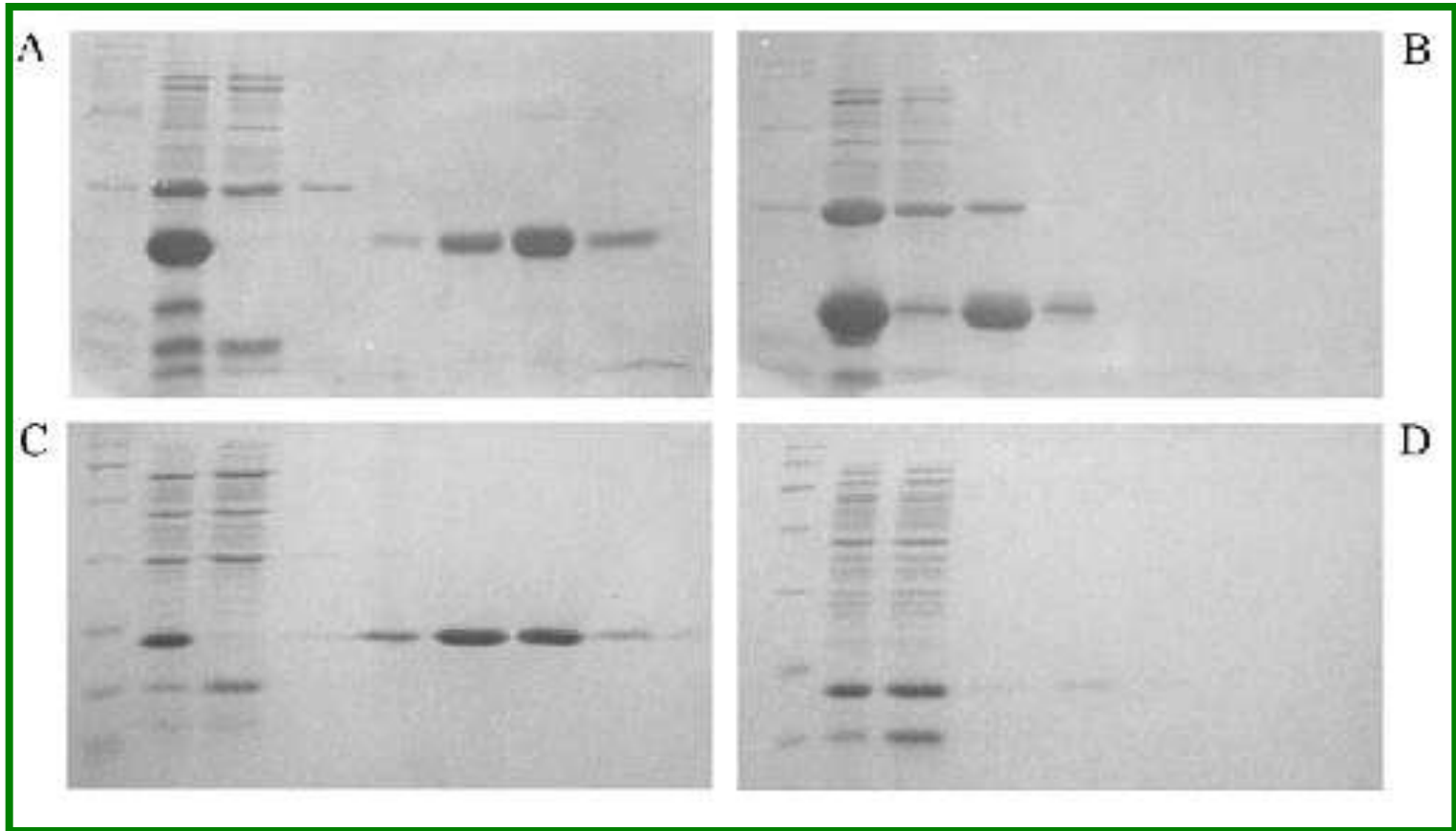


Caratterizzazione delle proteine



- Controllo di qualità (peso molecolare, modificazioni post traduzionali)
- Attività biologica
- Struttura tridimensionale

Analisi tramite SDS-PAGE (qualitativa)



Spettrometria di massa

(quantitativa - con importanti applicazioni qualitative)

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica potente usata per identificare prodotti incogniti, quindi attribuire la formula di struttura a composti sconosciuti;

E' una tecnica usata per le determinazioni quantitative di composti noti.

Le quantità di campione a disposizione possono essere anche piccolissime (pochi millesimi di milligrammo e in alcuni casi meno di un picogrammo: 10^{-12} g).

Spesso è possibile analizzare miscele complesse

Spettrometria di massa

Nella SPETTROMETRIA DI MASSA le molecole sono **ionizzate** e poi **accelerate nel vuoto** da un campo elettrico.

Le particelle sono discriminate in vario modo sulla base del diverso **rapporto tra massa e carica**

A secondo del tipo di ionizzazione si ottengono spettri a picco singolo o multiplo. I primi sono utili per determinare le masse molecolari accurate, mentre i secondi servono a determinare altre proprietà molecolari

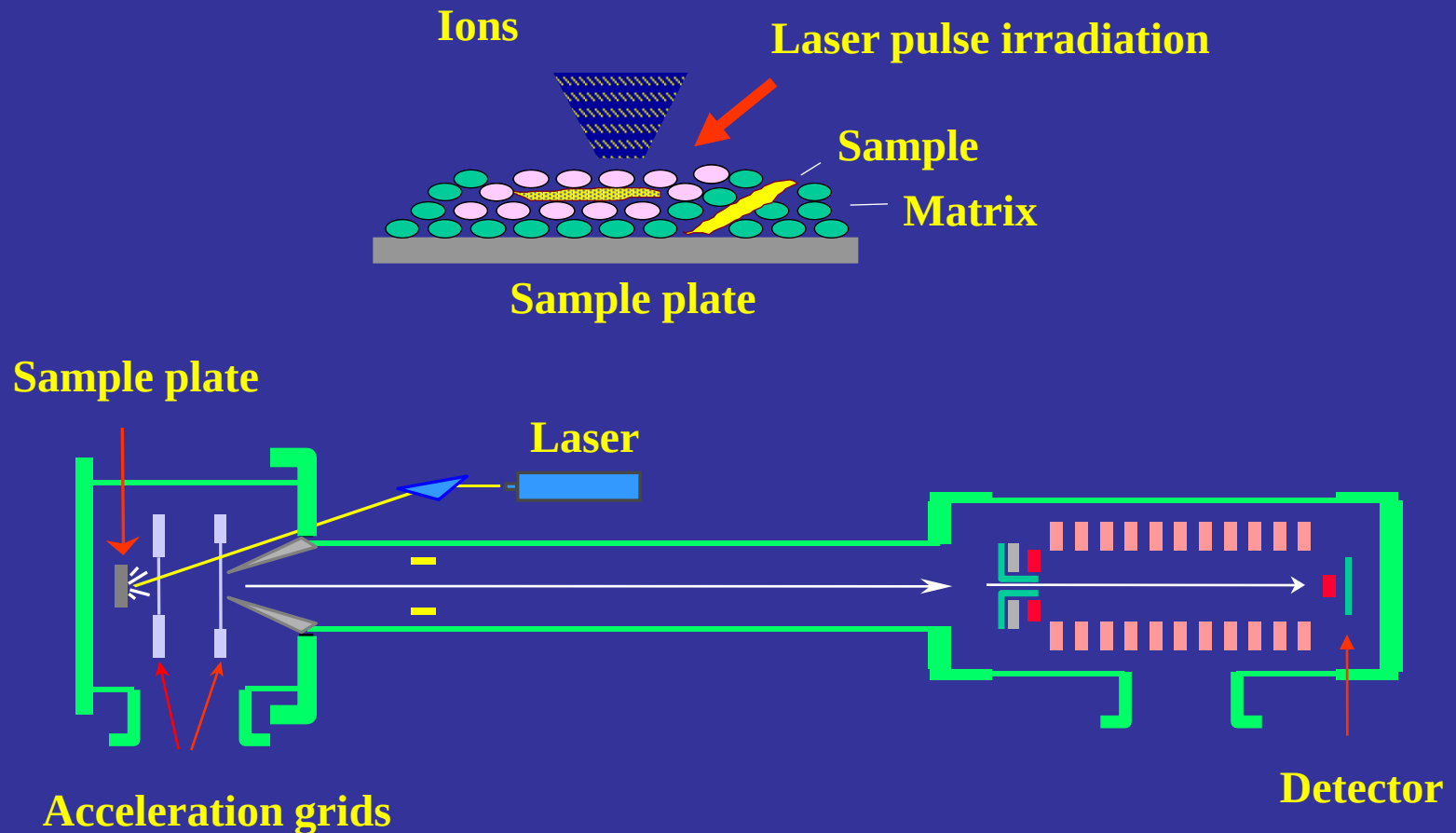
I dati ottenuti possono essere utilizzati per:

Calcolare il **peso molecolare esatto di una molecola**

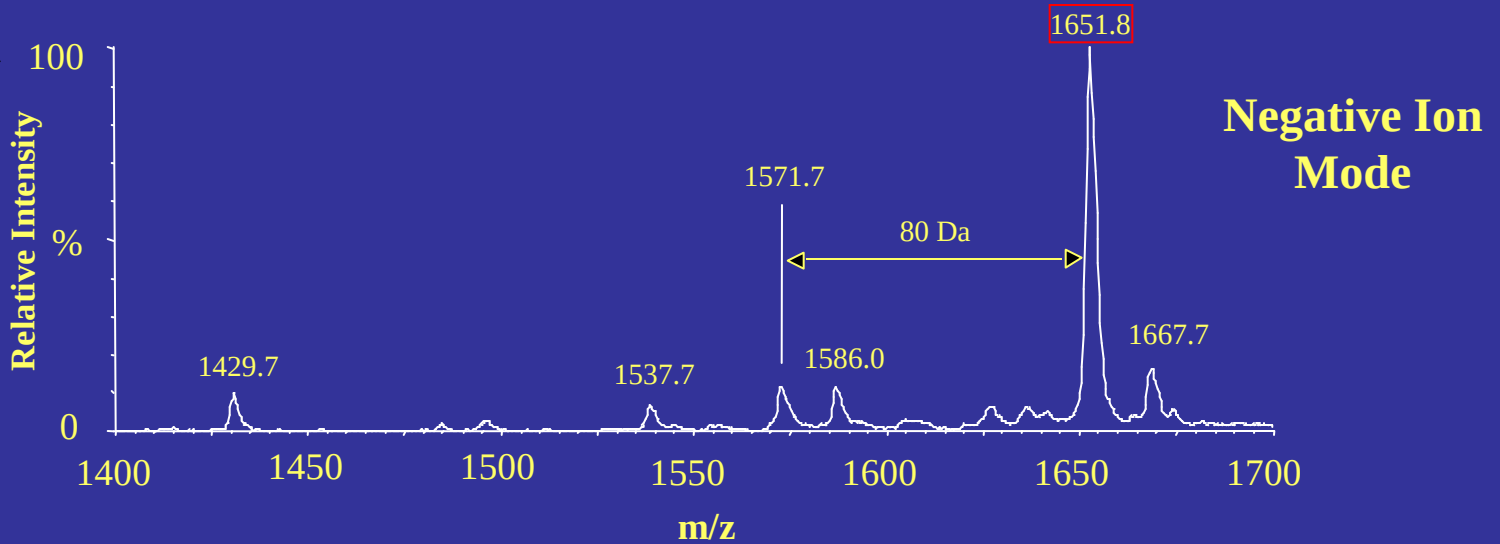
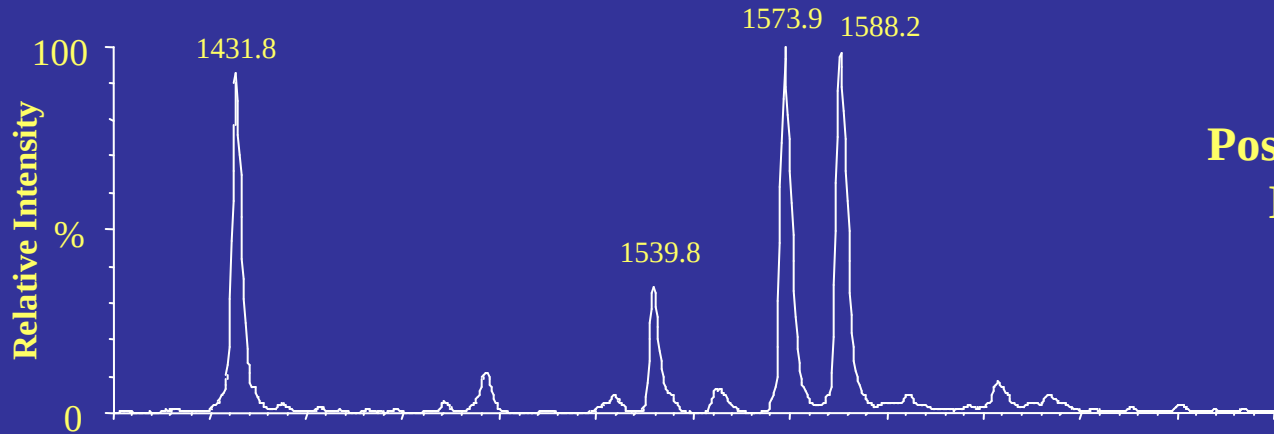
Ottenere informazioni sulla sua struttura ed eventuali modifiche post-traduzionali

Determinare l'abbondanza di specie isotopiche

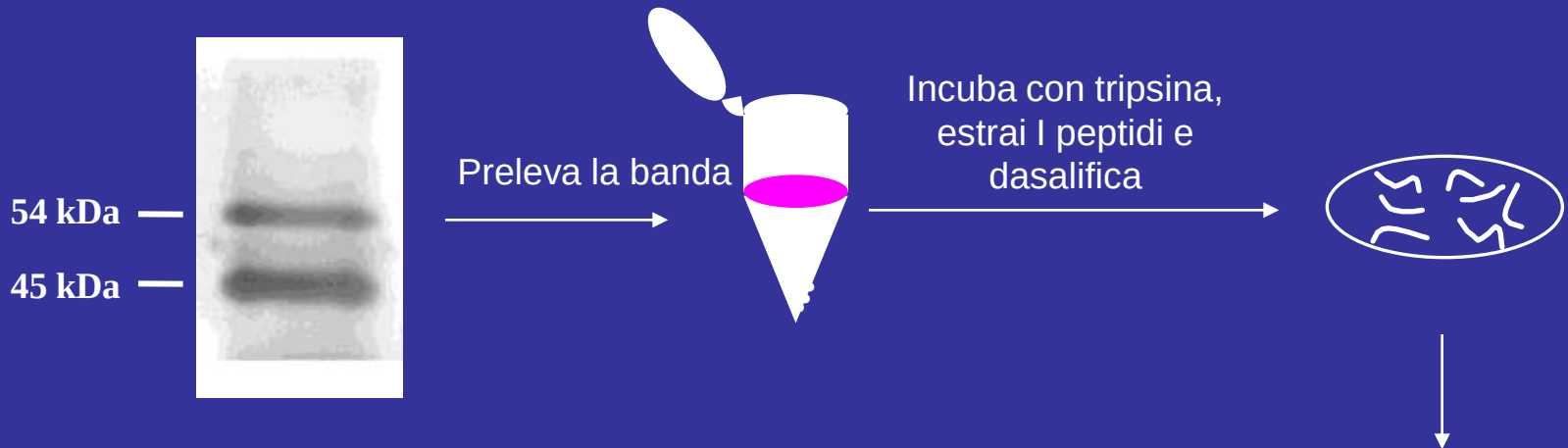
Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF)



MALDI-TOF MS of Phosphopeptides



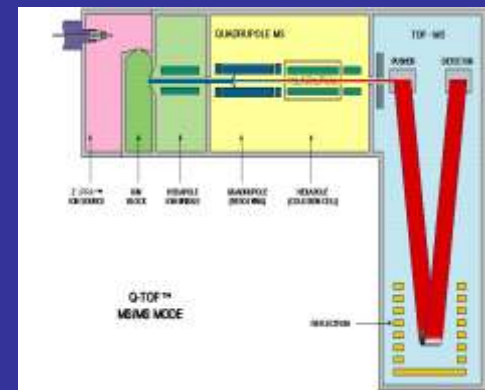
Caratterizzazione delle modificazioni post-traduzionali di una proteina



MKKCTILVVASLLLVNSLLPGYGQNKIIQA
 QRNLNELCYNEGNDNKLYHVLNSKNGKIYN
 RNTVNRLLPMLRRKKNEKKNEKIERNNKLK
 QPPPPPNPNDPPPPPNPNDPPPPPNPNDPPPP
 NPNDPPPPNANDPPPPNANDPAPPNANDPA
 PPNANDPAPPNANDPAPPNANDPAPPNAND
 PAPPNANDPPPPNPNDPAPPQGNNNPQPQP
 RPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP
 NNNNKNNNNDDSYIPSAEKILEFVKQIRDS
 ITEEWSQCNVTCGSGIRVRKRKGSNKKAED
 LTLEDIDTEICKMDKCSSIFNIVSNSLGFV
 ILLVLVFFN

Confronta I risultati
ottenuti con quelli attesi

Determina la massa
molecolare dei peptidi

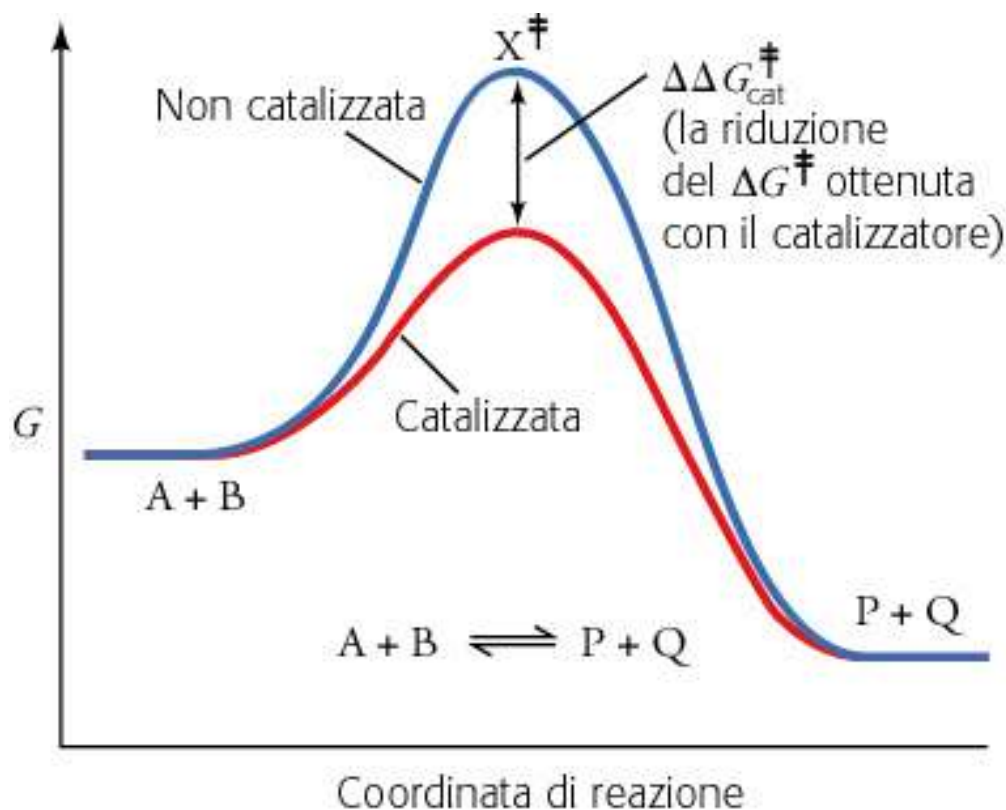


Studi enzimatici

Proprietà generali delle reazioni catalizzate dagli enzimi

- Elevate velocità di reazione (10^6 - 10^{12} volte maggiori rispetto a quella delle reazioni non catalizzate)
- Avvengono in condizioni più moderate
- Maggiore specificità di reazione
- Sono spesso soggette a regolazione

I catalizzatori aumentano la velocità della reazione abbassando l'energia di attivazione



**I catalizzatori non
modificano gli equilibri
chimici delle reazioni**

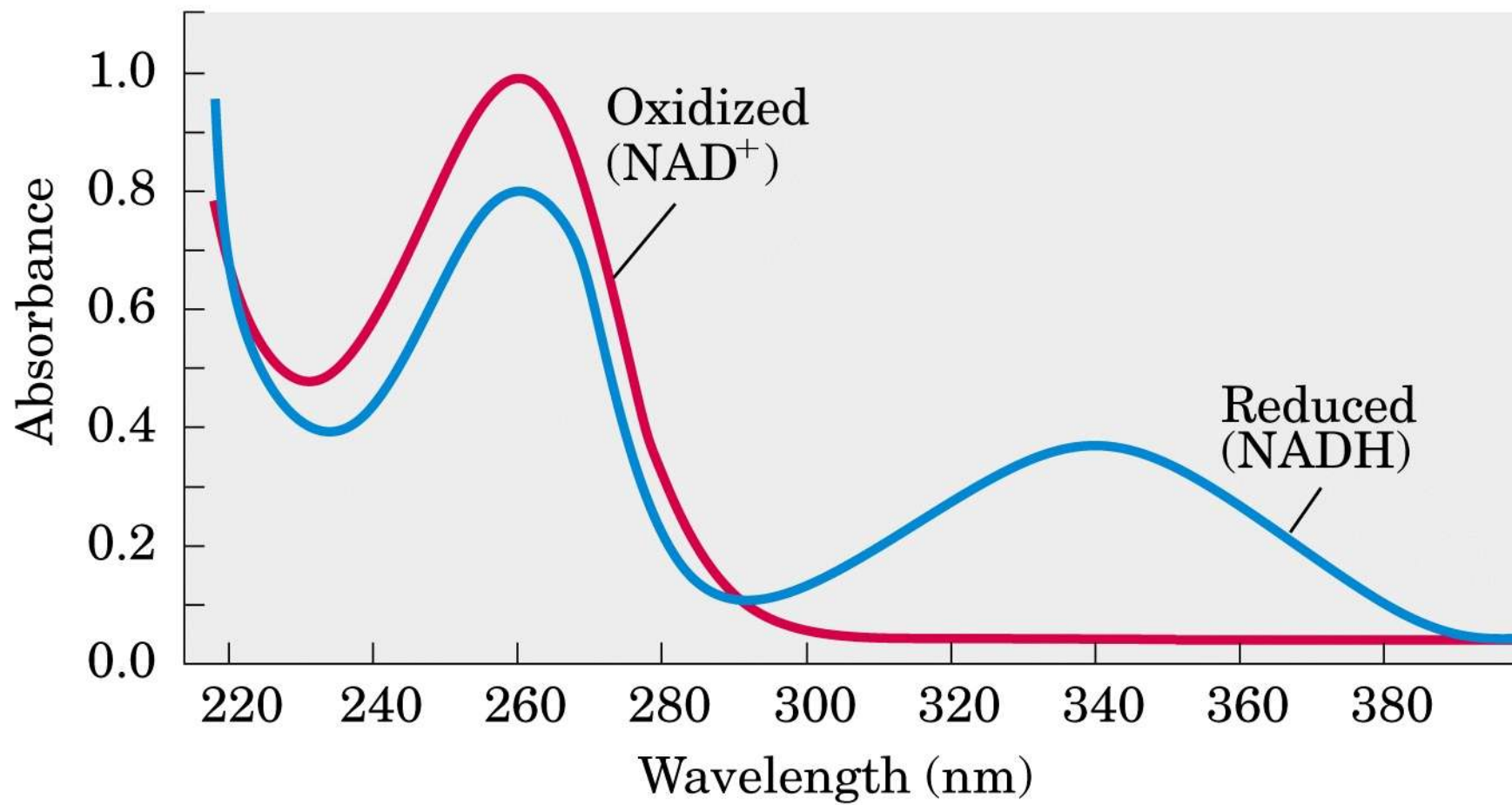
Studi enzimatici

L'attività enzimatica può essere espressa in vari modi. Ad es.

- come la quantità di substrato utilizzato per unità di tempo (ad esempio nmol min^{-1})
- Unità internazionali (UI), definite come la quantità di enzima che converte 1 mmol di substrato in prodotto in 1 min in condizioni stabilite
- Unità SI (katal), quantità di enzima che converte 1 mol di substrato in 1 s in condizioni ottimali;
- Massa di substrato consumato o di prodotto formato al minuto
-

Tipi di saggi

- **Saggi spettrofotometrici:** molti substrati o prodotti assorbono la luce visibile o UV e il cambiamento di assorbimento ad una lunghezza d'onda particolare fornisce un saggio conveniente.
- Si possono usare substrati non naturali che producono un prodotto colorato

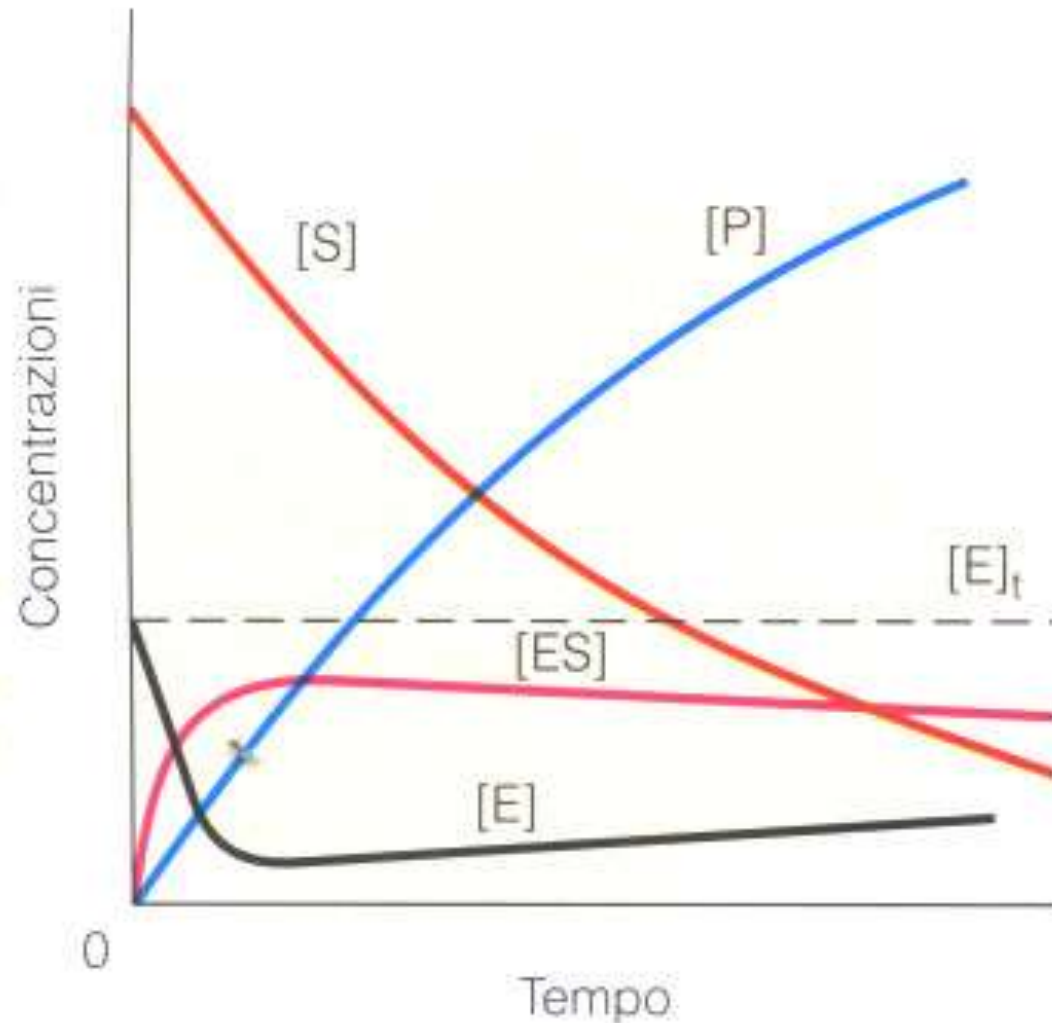


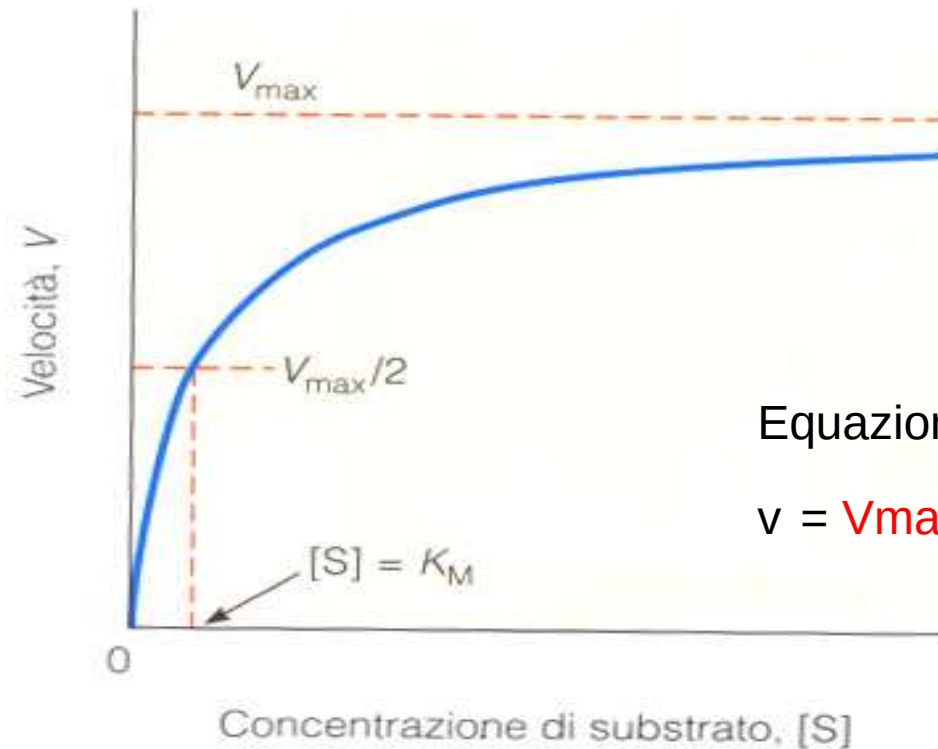
(b)

Tipi di saggi

- **Saggi fluorimetrici:** certi substrati liberano prodotti fluorescenti come risultato dell'attività enzimatica e forniscono un metodo di saggio molto sensibile
- **Saggi radioisotopici:** sono utili quando il substrato può essere liberato facilmente, ad esempio nel caso delle decarbossilasi usando un substrato marcato con ^{14}C in cui si produce $^{14}\text{CO}_2$

Curva di progresso di una reazione enzimatica





Equazione di Michaelis Menten

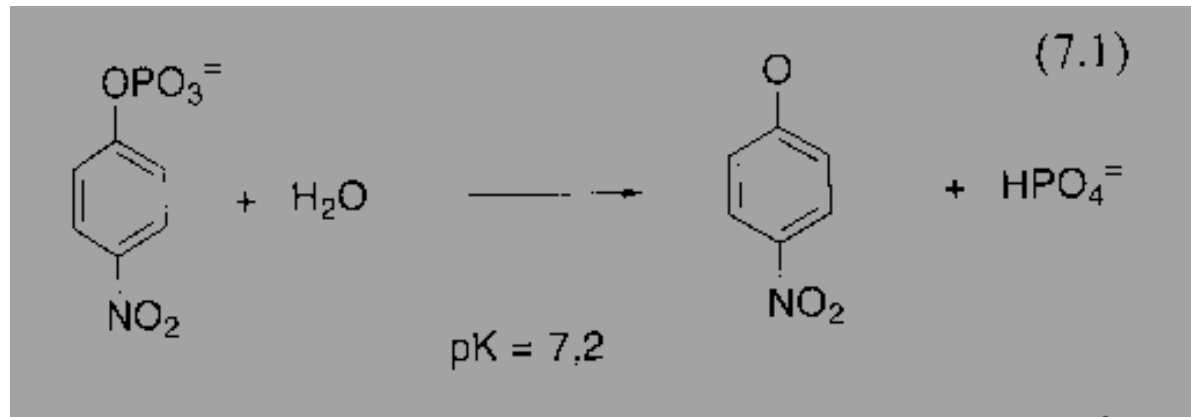
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

K_M è uguale alla concentrazione di substrato a cui la Velocità di reazione è pari alla metà di quella massima (mol/L)

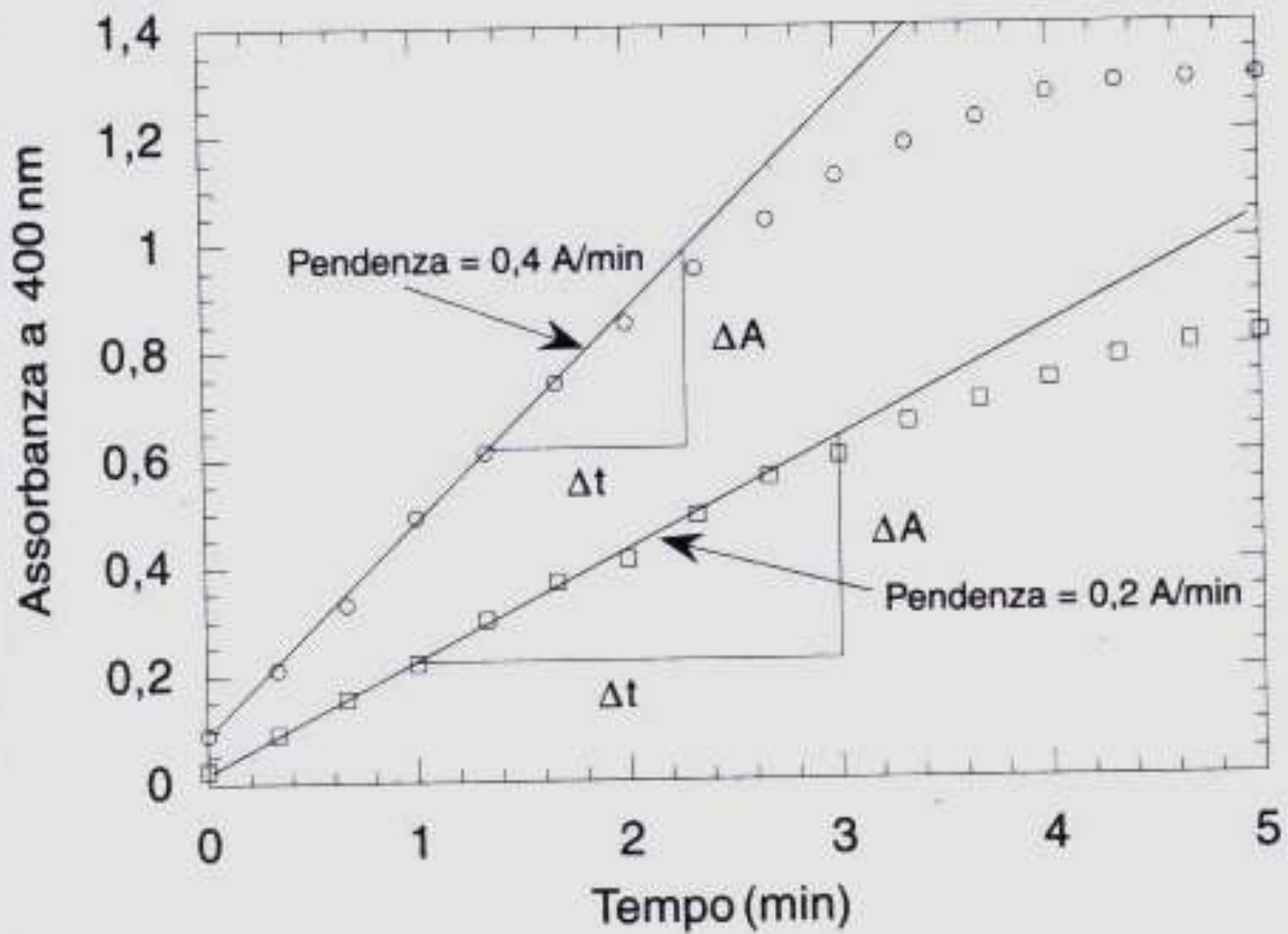
K_{cat} = rappresenta una misura diretta della formazione del prodotto in condizioni ottimali (s-1)

K_{cat}/K_M = è una costante di velocità di secondo ordine ((mol/L) s-1) e fornisce una misura dell'efficienza e della specificità di un enzima

Fosfatasi alcalina: $R-O-PO_3H + H_2O \rightarrow R-OH + H_2PO_4$



p-nitrofenil fosfato $\epsilon_{410} = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



(A)

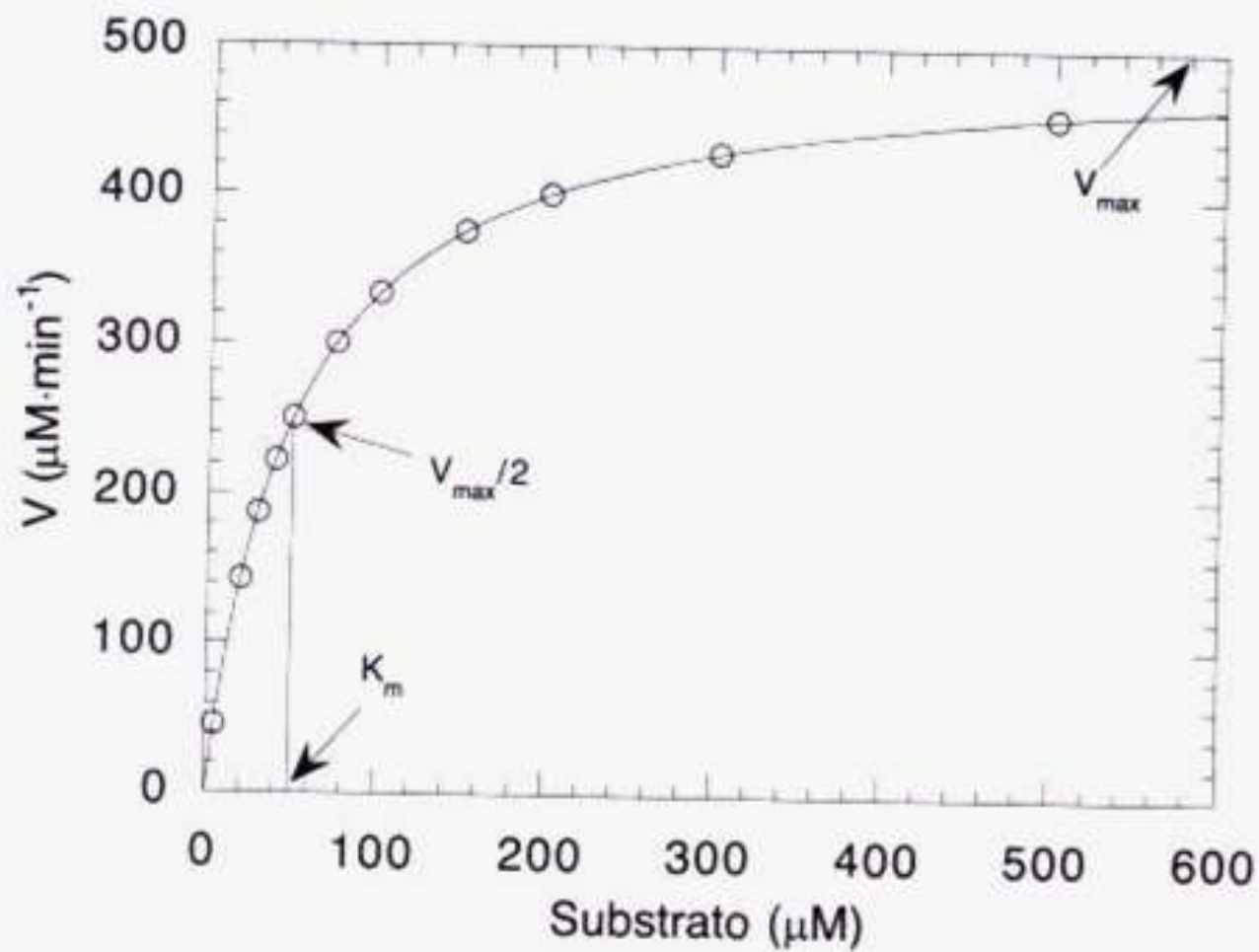
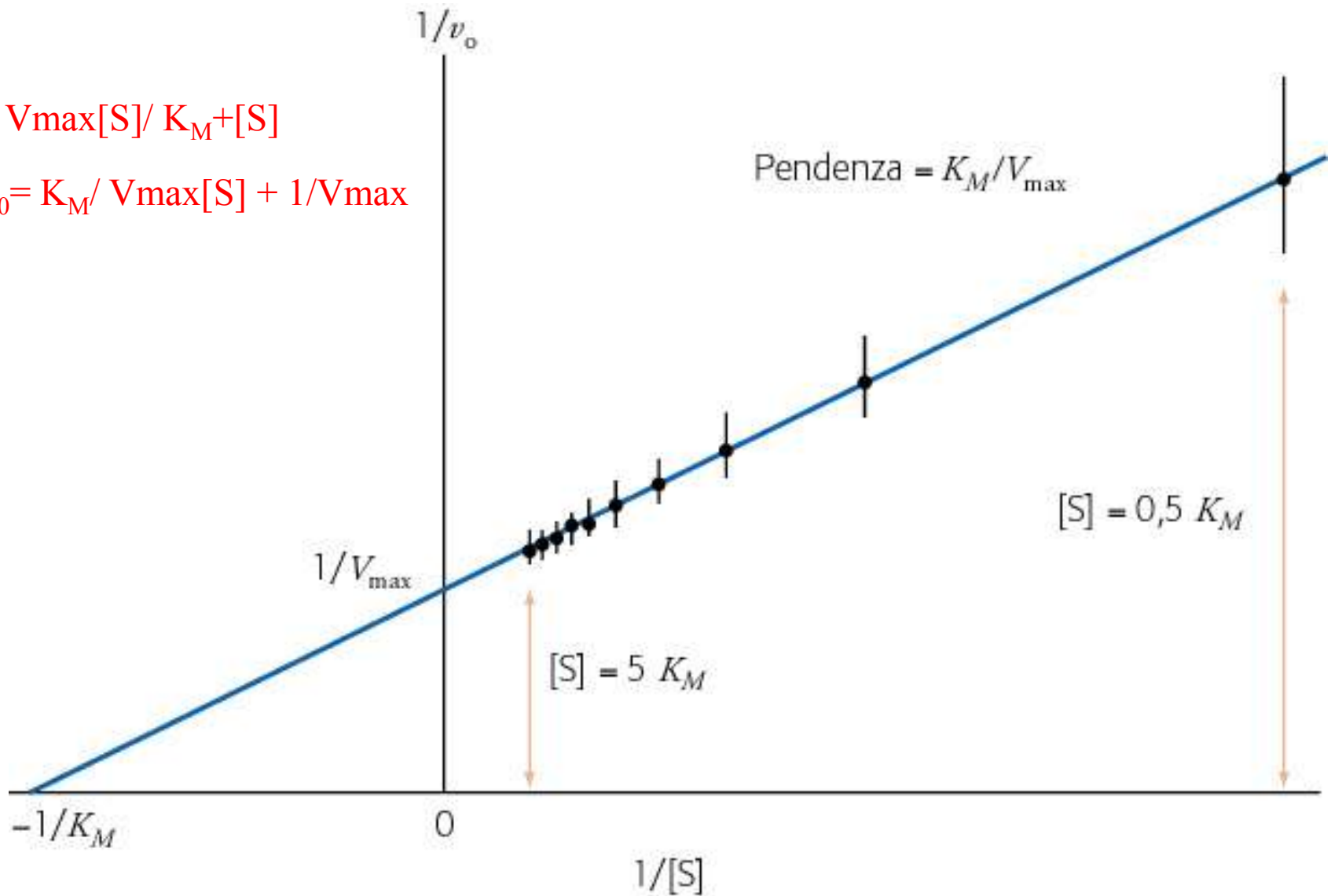
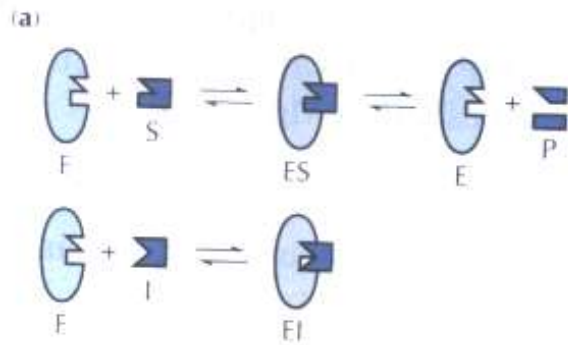


Grafico di Lineweaver-Burk

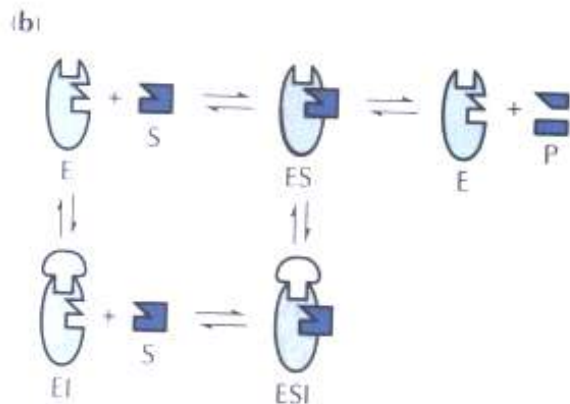
$$v = V_{\max}[S] / K_M + [S]$$

$$1/V_0 = K_M / V_{\max}[S] + 1/V_{\max}$$

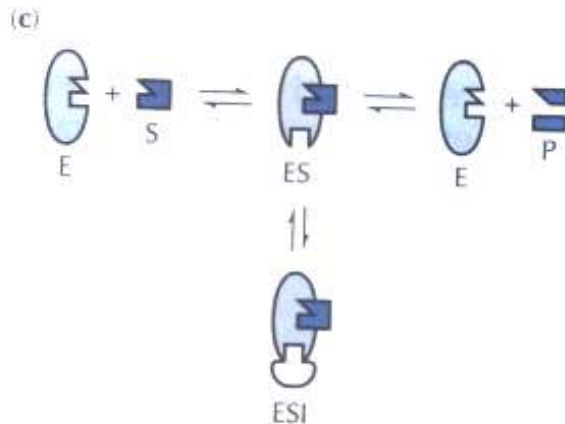




Inibizione competitiva

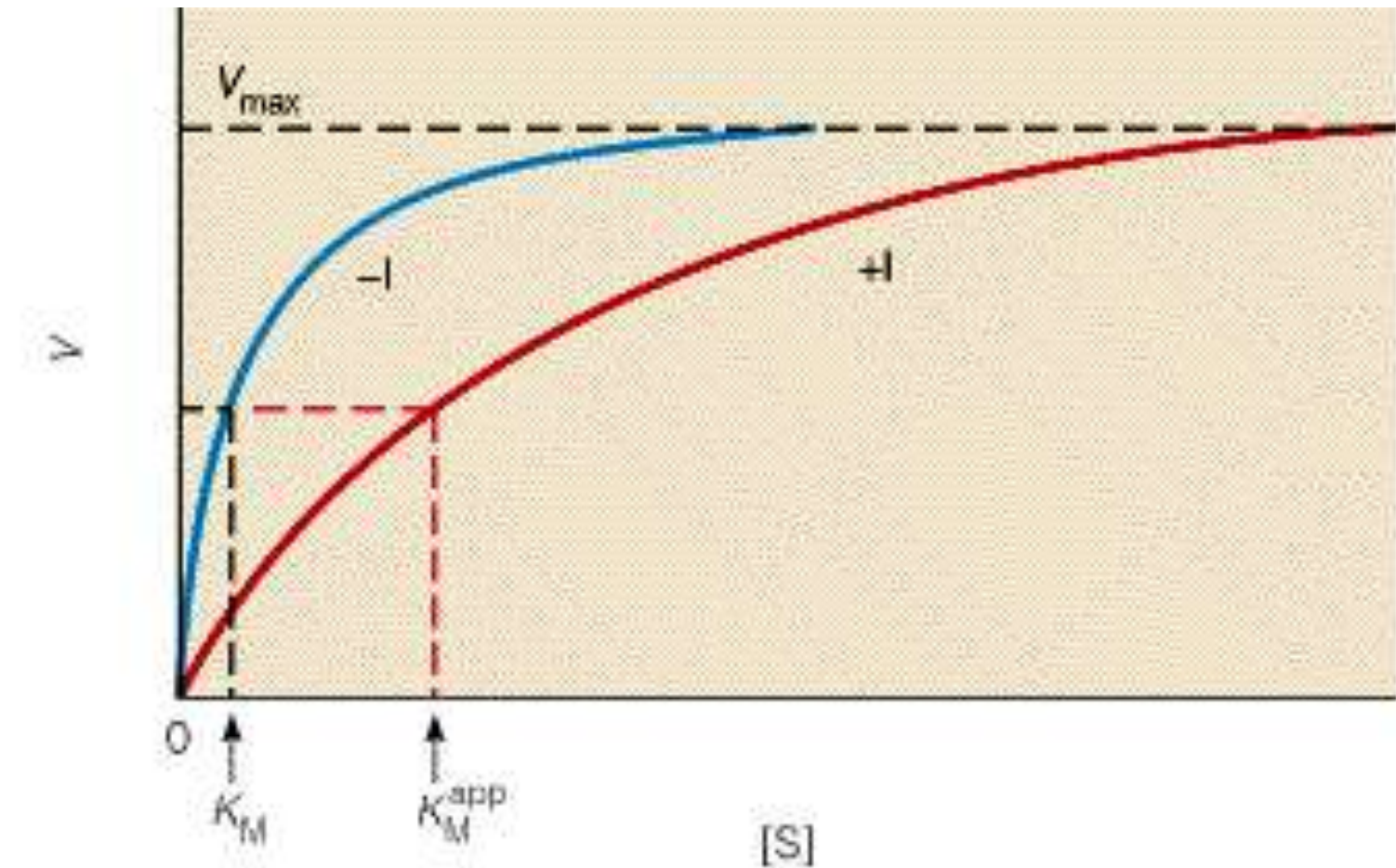


Inibizione non competitiva

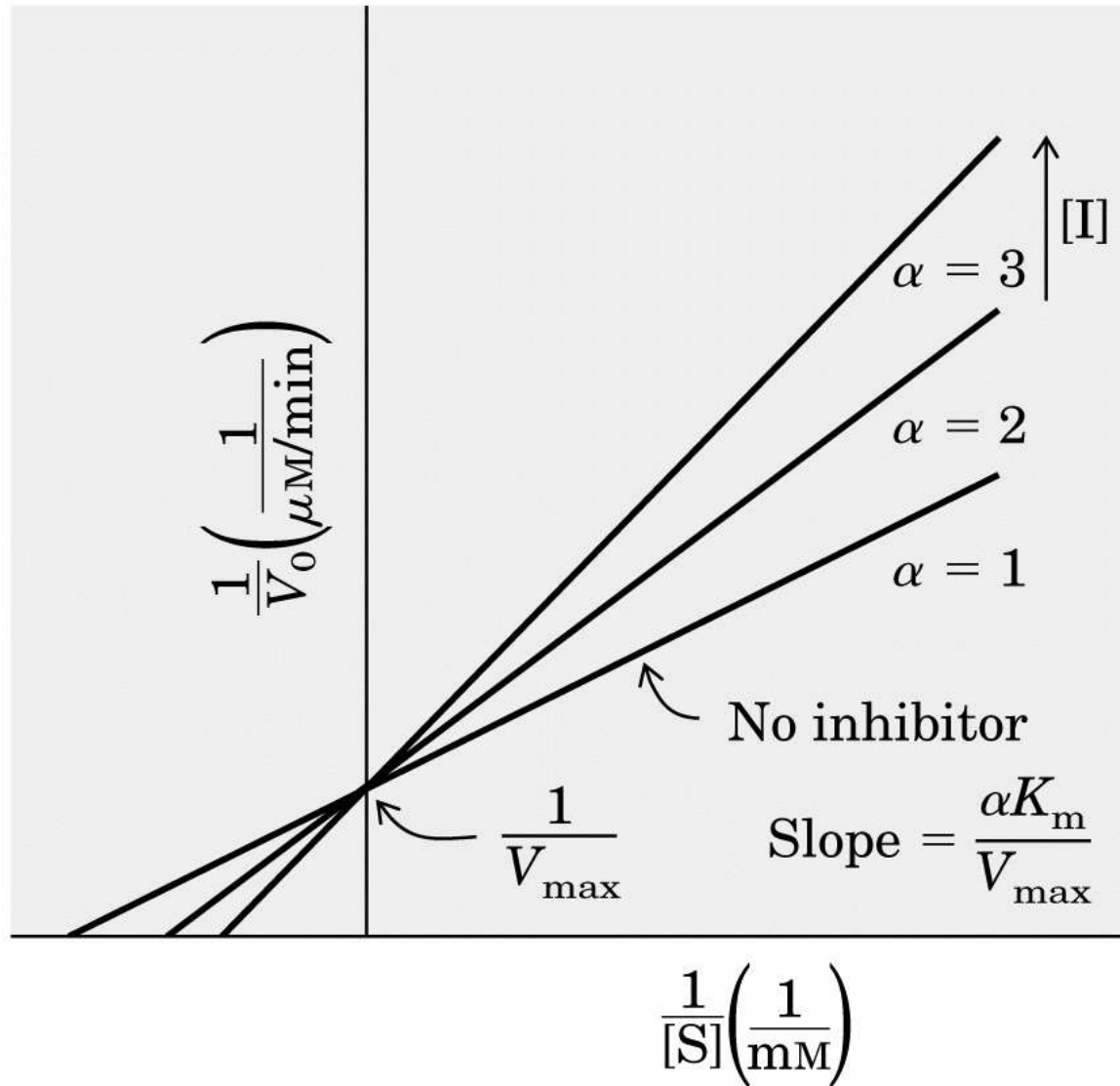


Inibizione incompetitiva

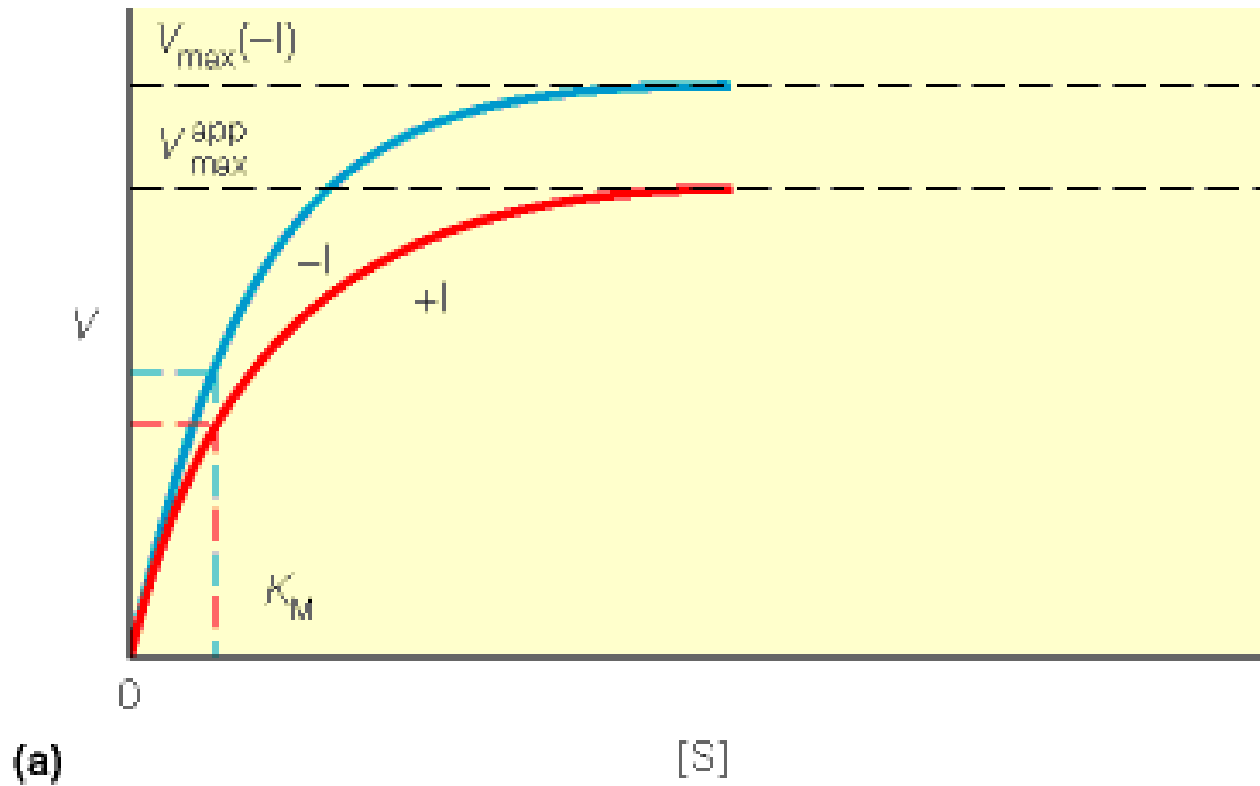
Inibizione competitiva



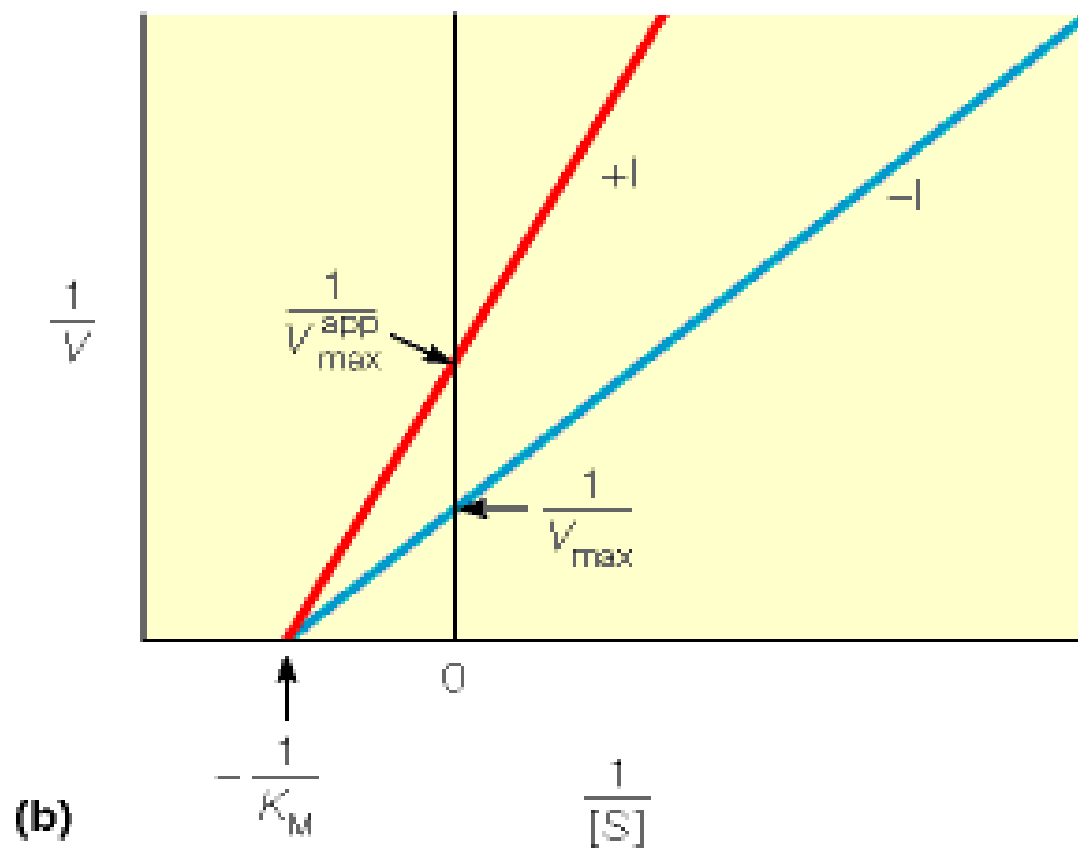
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



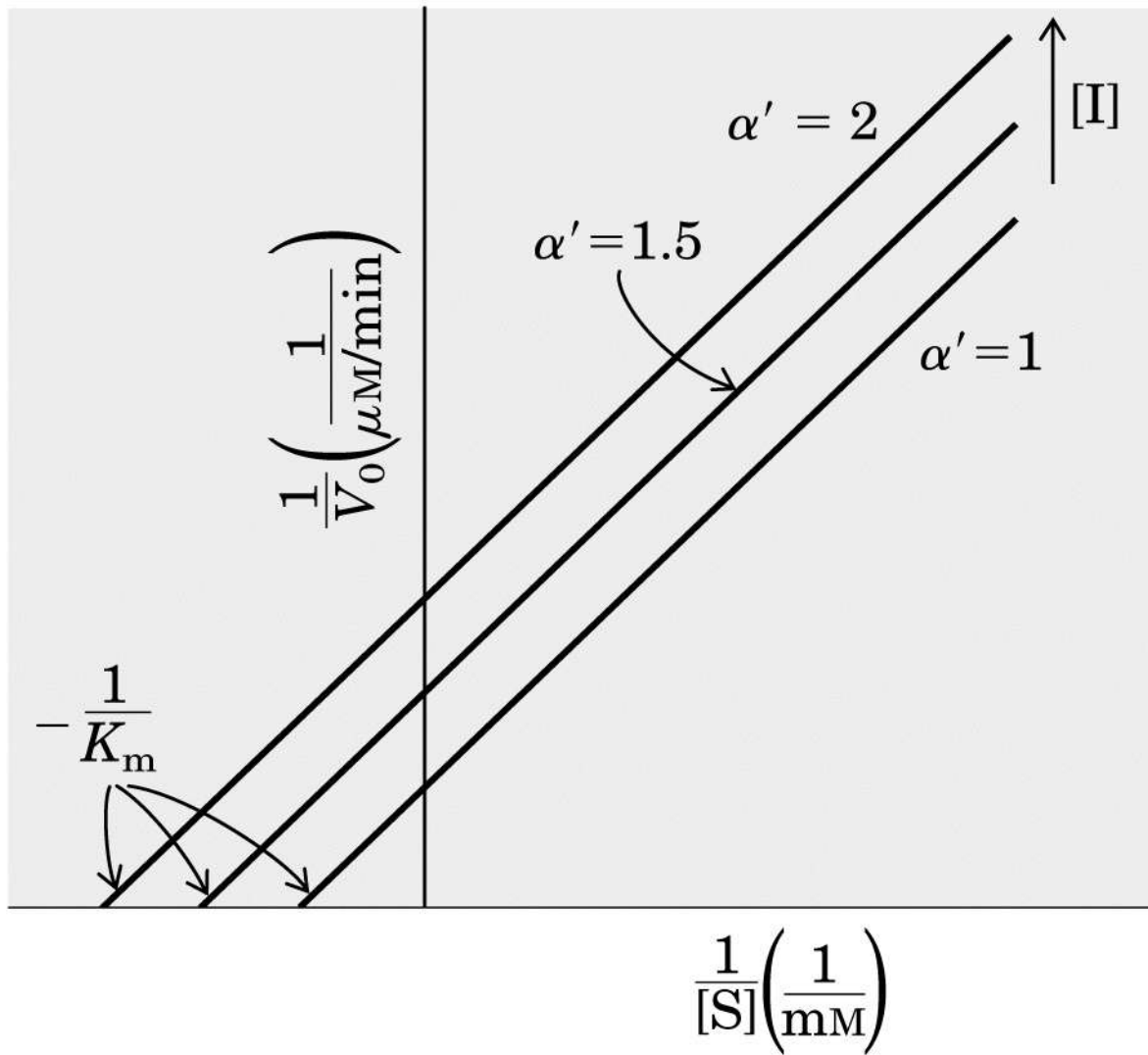
Inibizione non competitiva



...



$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



Spettroscopia

Definizione: Lo studio della struttura e della dinamica della materia (in biologia delle molecole) attraverso l'analisi dell'interazione con la luce

La lunghezza d'onda della luce (quindi la sua energia) determina il modo in cui questa interagisce con la materia

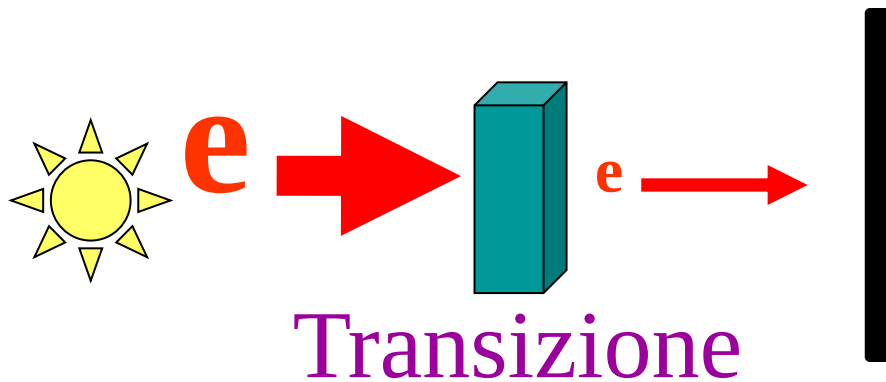
Serve per:

Quantificare molecole

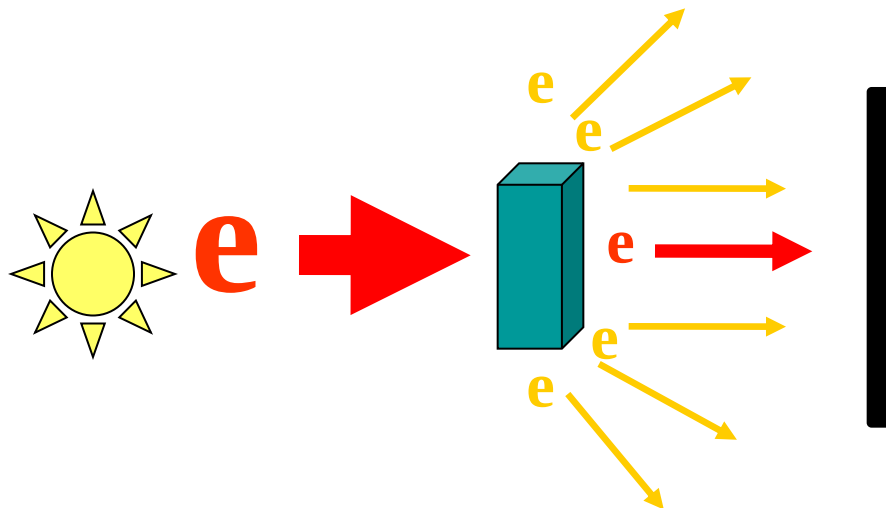
Identificare molecole

Analizzare cambiamenti dinamici nella composizione o nella struttura delle molecole (cinetica di reazioni ...)

- Una transizione avviene quando l'energia di una molecola cambia da uno stato all'altro.



- L'assorbimento avviene quando la radiazione causa un aumento di energia nel sistema con cui interagisce.



- L'emissione avviene quando la radiazione è prodotta da un sistema durante una transizione da un alto livello energetico a uno più basso

Spettri di assorbimento ed eccitazione differenza tra le due risposte spettrali

- Assorbimento è il segnale di estinzione della luce a causa della transizione elettronica.
- Eccitazione è il segnale di emissione della luce assorbita ad una data lunghezza d'onda.
- Quando una molecola emette luce significa che ha sempre assorbito energia. Quando una molecola assorbe non sempre emette luce.

Spettroscopia di assorbimento

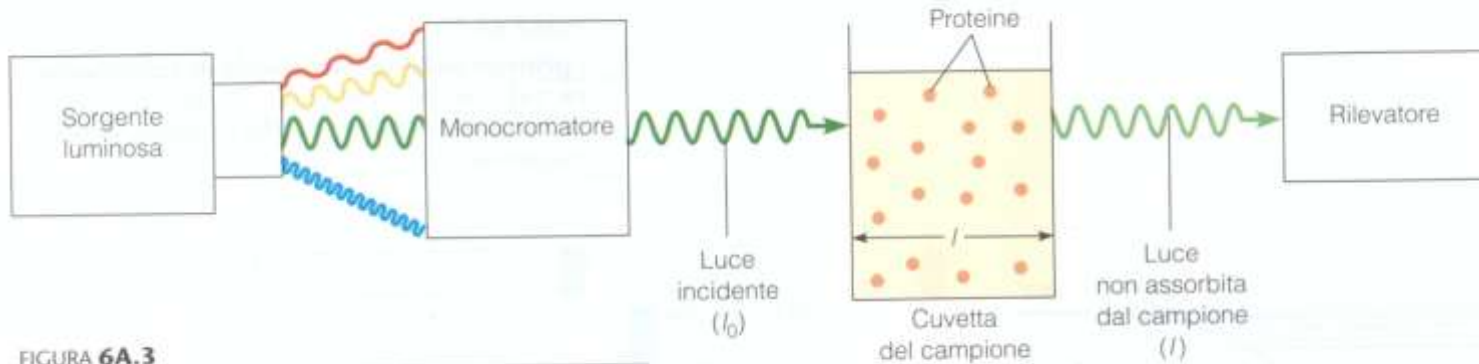


FIGURA 6A.3

Misura dell'assorbimento della luce mediante uno spettrofotometro.

$$T = I/I_0$$

$$A = \log 1/T = \log I_0/I$$

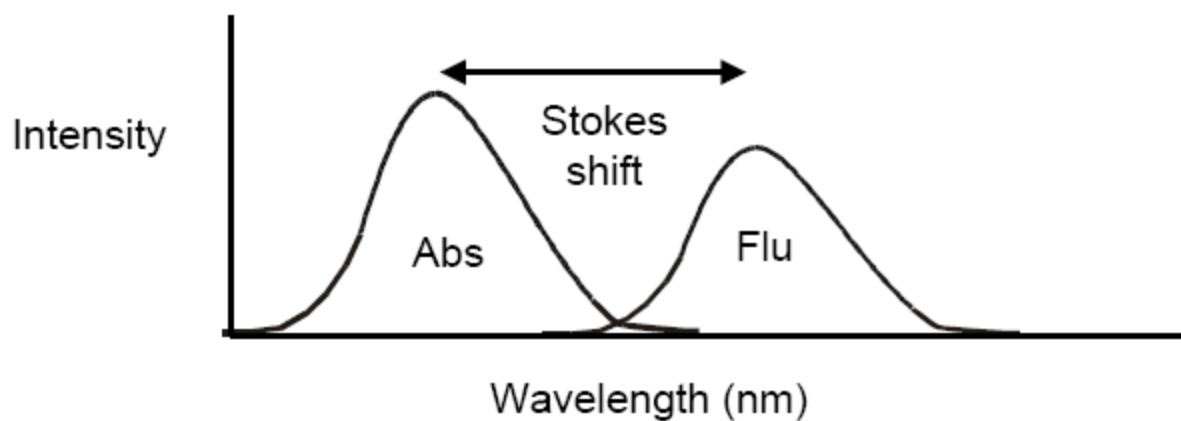
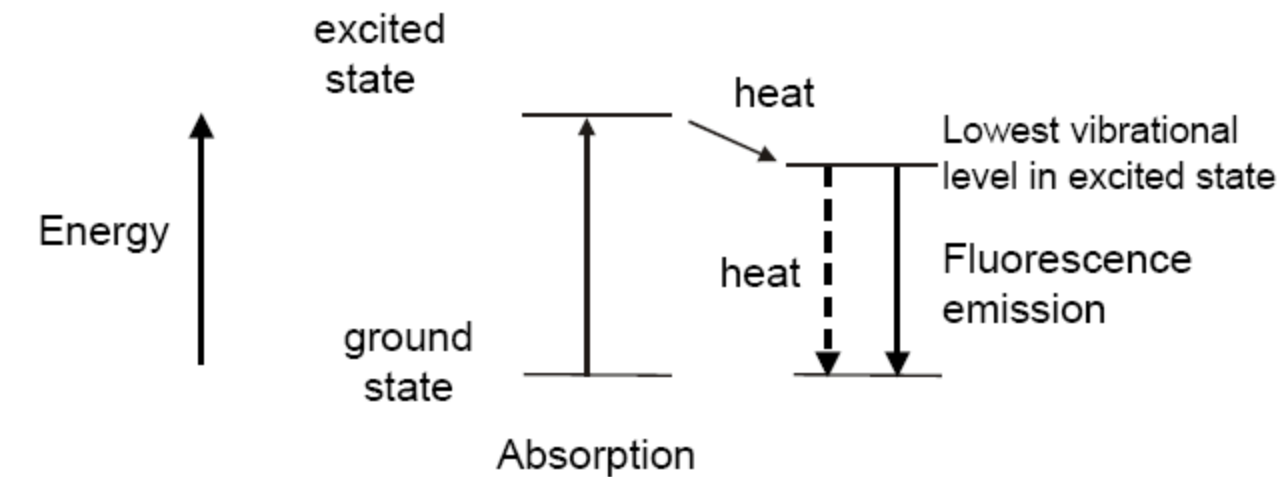
$$A = \epsilon_{\lambda} cd$$

Spettroscopia di fluorescenza

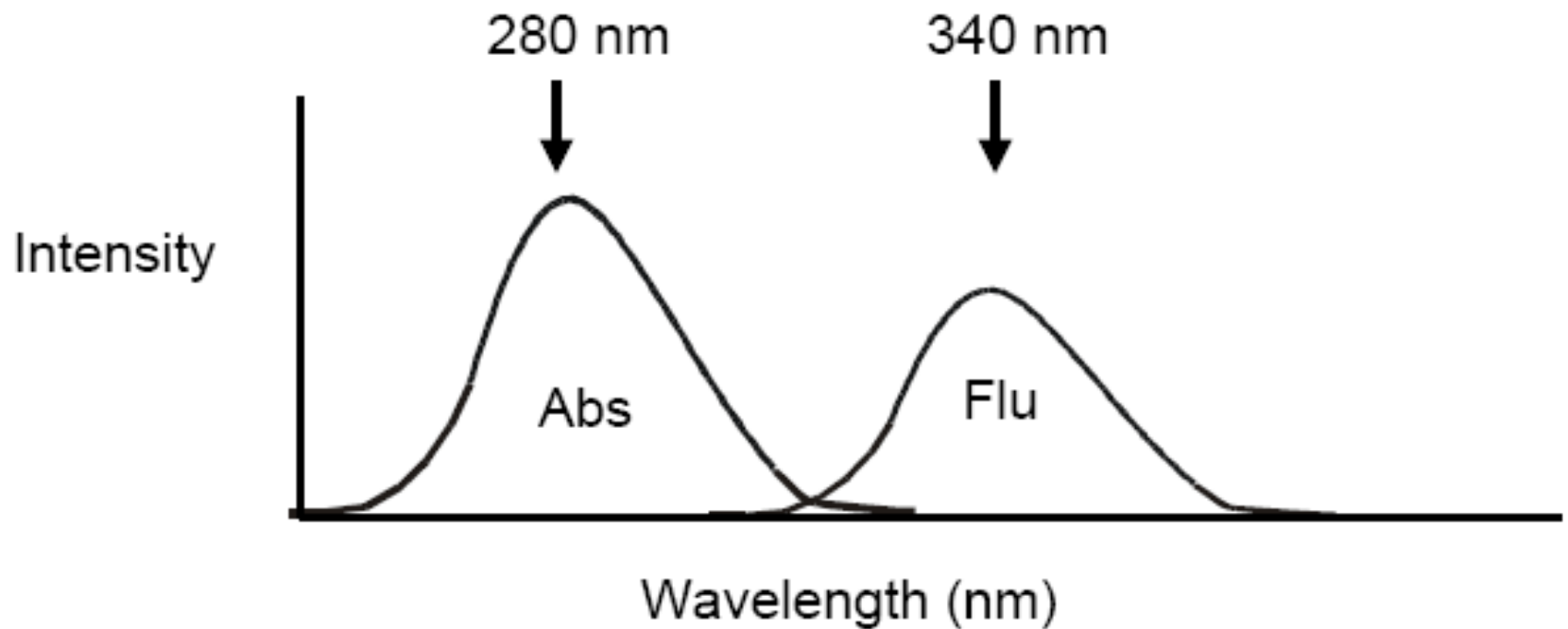
La fluorescenza consiste nell'emissione, da parte della molecola che ha assorbito una radiazione, di un'altra radiazione di lunghezza d'onda maggiore. Ad esempio una sostanza può assorbire nell'ultravioletto ed emettere una radiazione nel visibile: l'aumento di lunghezza d'onda è chiamato *spostamento o shift di Stokes*.

Premettendo che un quanto è pari all'energia necessaria per permettere il salto di un elettrone, l'efficienza quantica Q è il **rapporto** tra i quanti emessi per fluorescenza e i quanti assorbiti ed è indipendente dalla lunghezza d'onda della luce di eccitamento.

Fluorescence



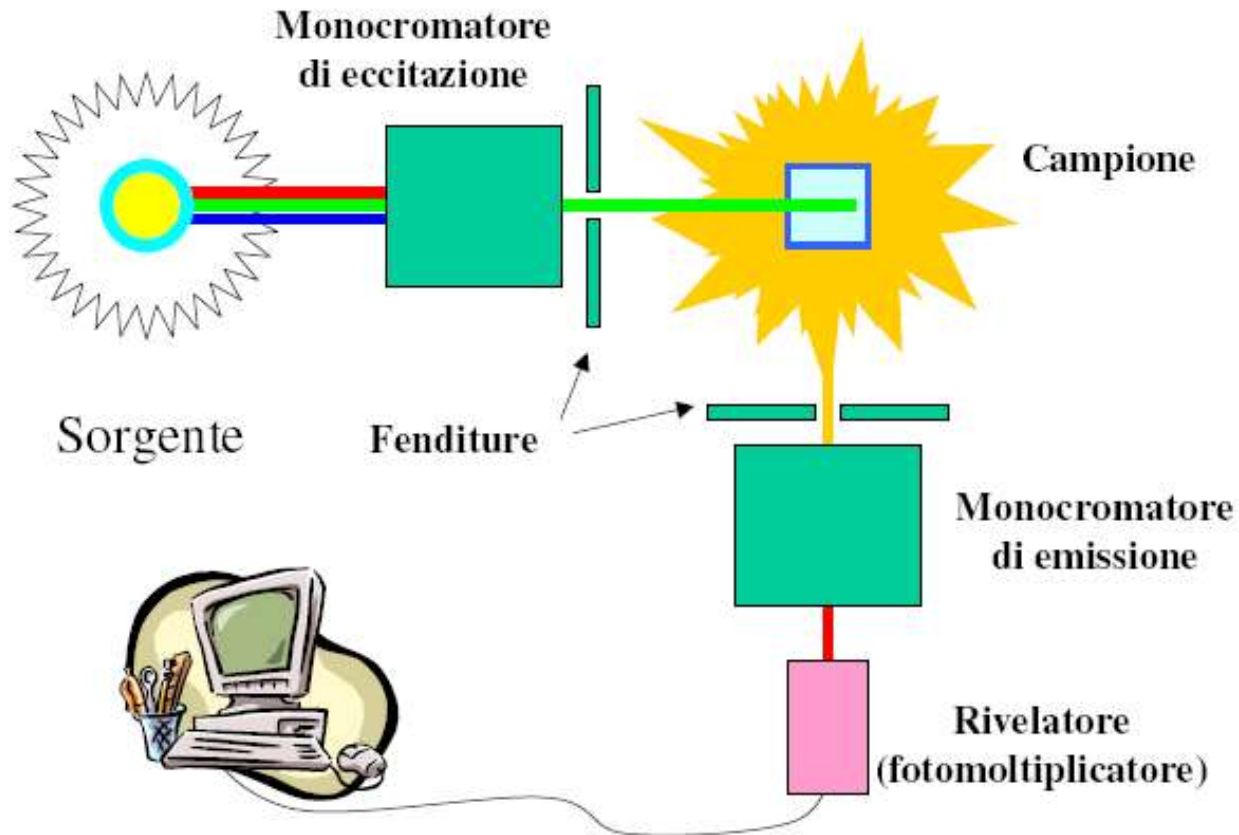
Fluorescence of Trp



Fluorescent amino acids: Trp, Phe, Tyr

Fluorescence of proteins is dominated by Trp

Geometria a 90°

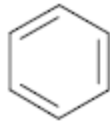


La spettrofluorimetria è una tecnica molto impiegata in biochimica in quanto molte proteine presentano una fluorescenza intrinseca legata alla presenza di residui aromatici quali tirosina, fenilalanina e triptofano e una fluorescenza determinata da molecole non proteiche quali coenzimi legati in modo diverso alla catena polipeptidica

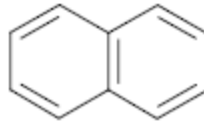
Analisi qualitativa e quantitativa

Sono in genere fluorescenti...

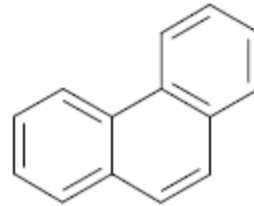
- I policiclici aromatici e i loro derivati:



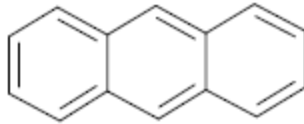
Benzene



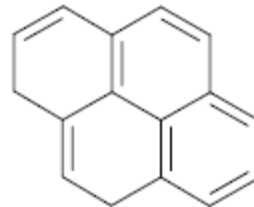
Naftalene



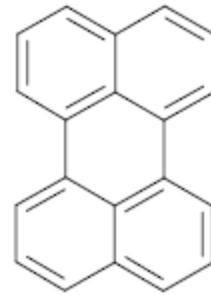
Fenantrene



Antracene

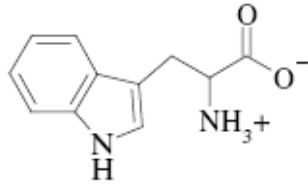


Pirene

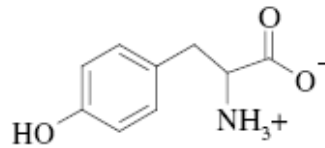


Perilene

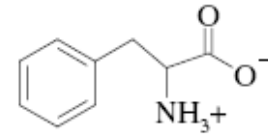
Biomolecole fluorescenti...



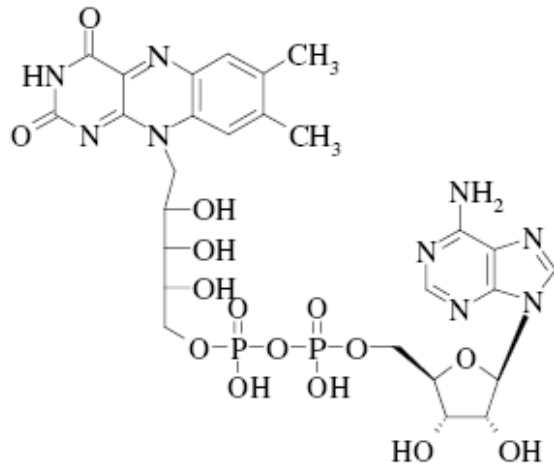
Triptofano (W)



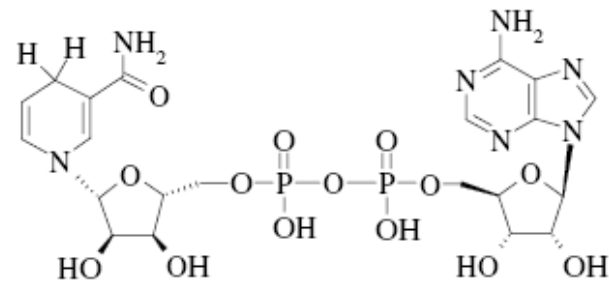
Tirosina (Y)



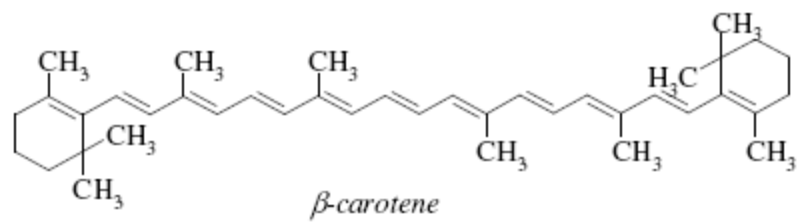
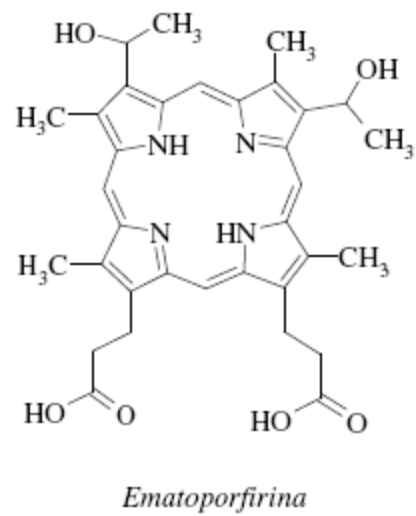
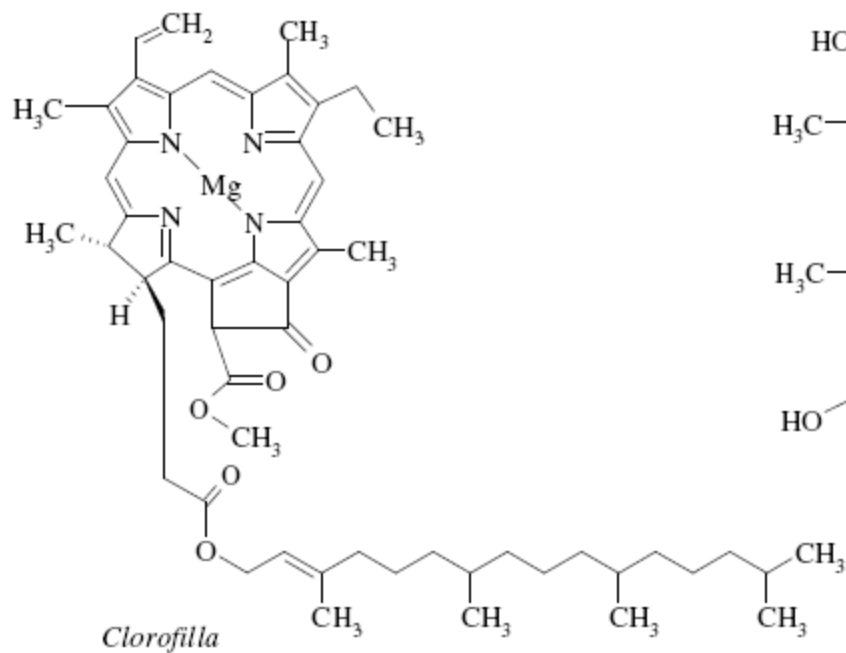
Fenilalanina (P)

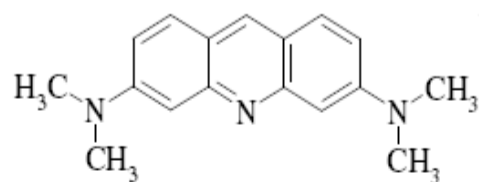


FAD

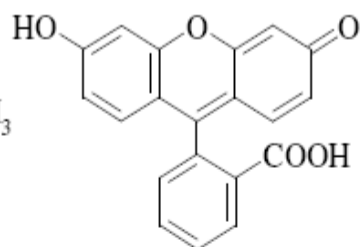


NADH

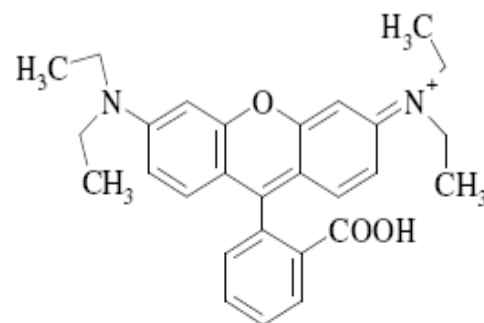




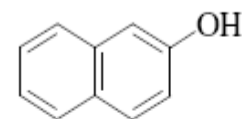
Arancio di acridina



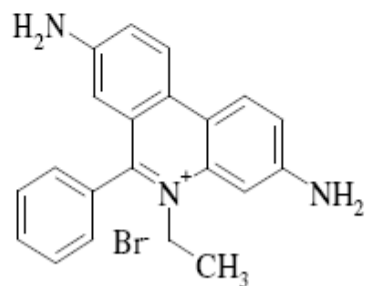
Fluoresceina



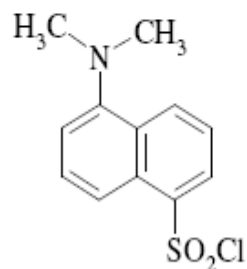
Rodamina B



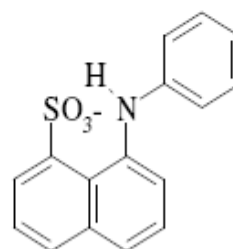
Naftolo



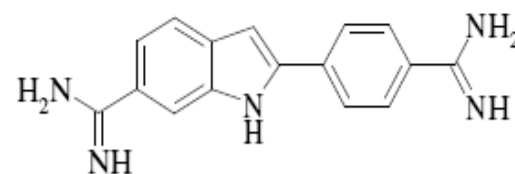
Bromuro di etidio



Dansile



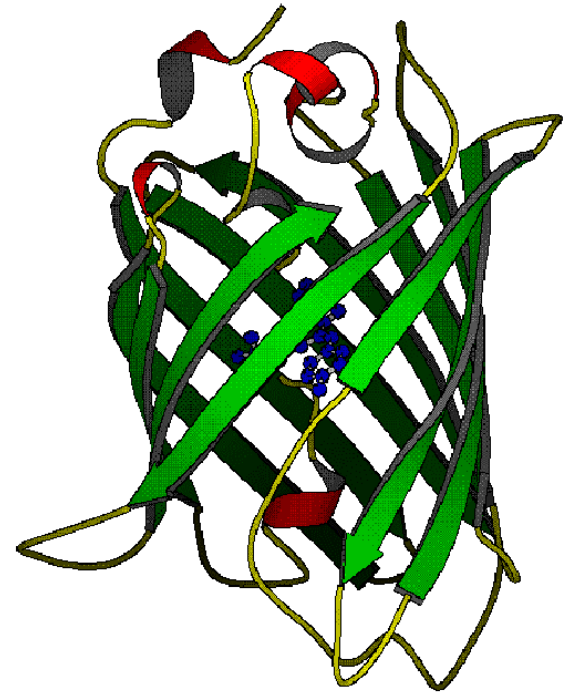
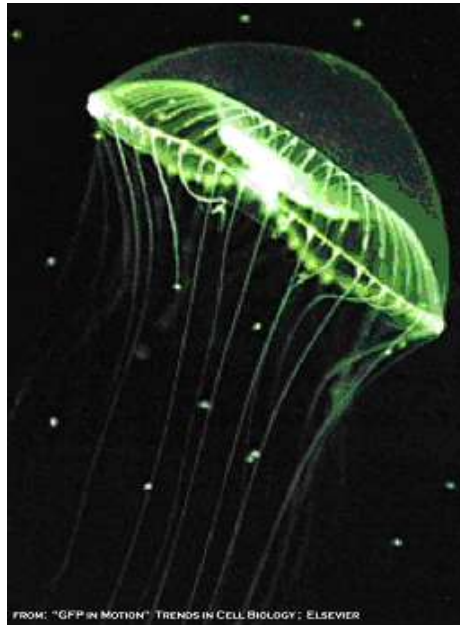
ANS



DAPI

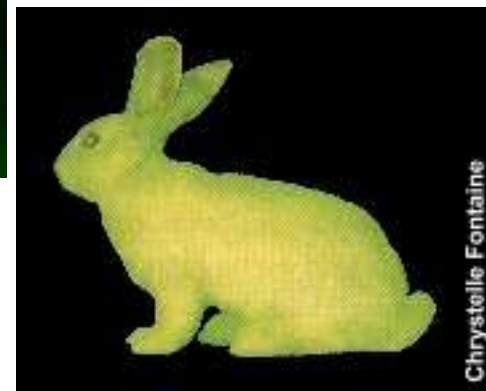
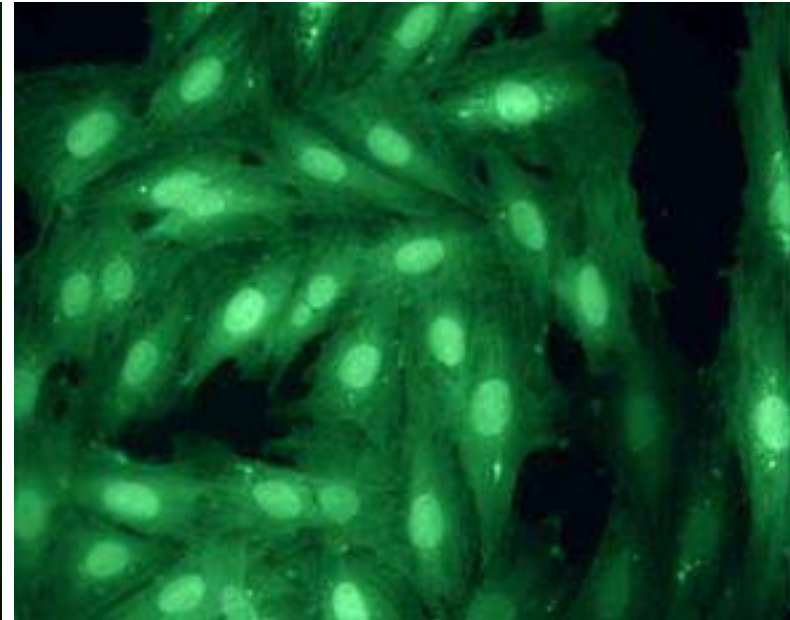
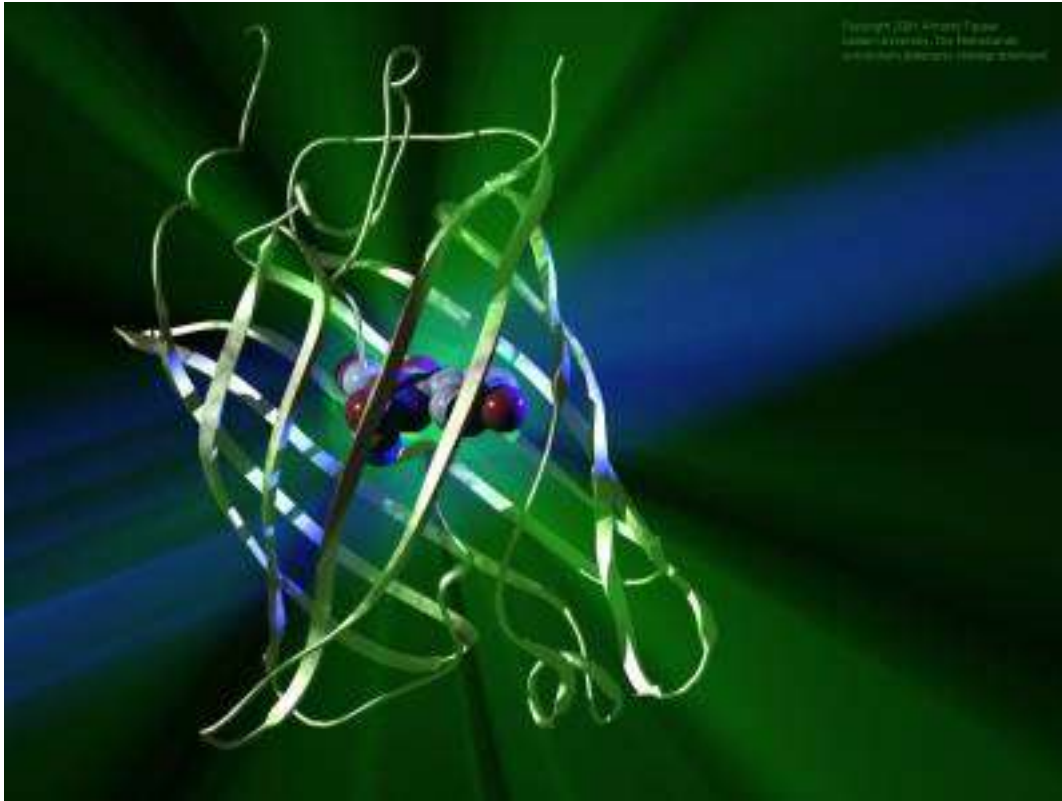
Gruppi fluorescenti nelle proteine

- Green Fluorescent Protein (GFP)
- Isolata da una medusa
- Intrinsecamente fluorescente



Gruppi fluorescenti nelle proteine

- Espressi in cellule selezionate o fuse ad altre proteine



Rispetto alla spettrofotometria UV/Vis, la spettroscopia a fluorescenza può avere dei vantaggi:

- a) Alta sensibilità (anche fino a 1000 volte superiore)
- b) Aumentata specificità

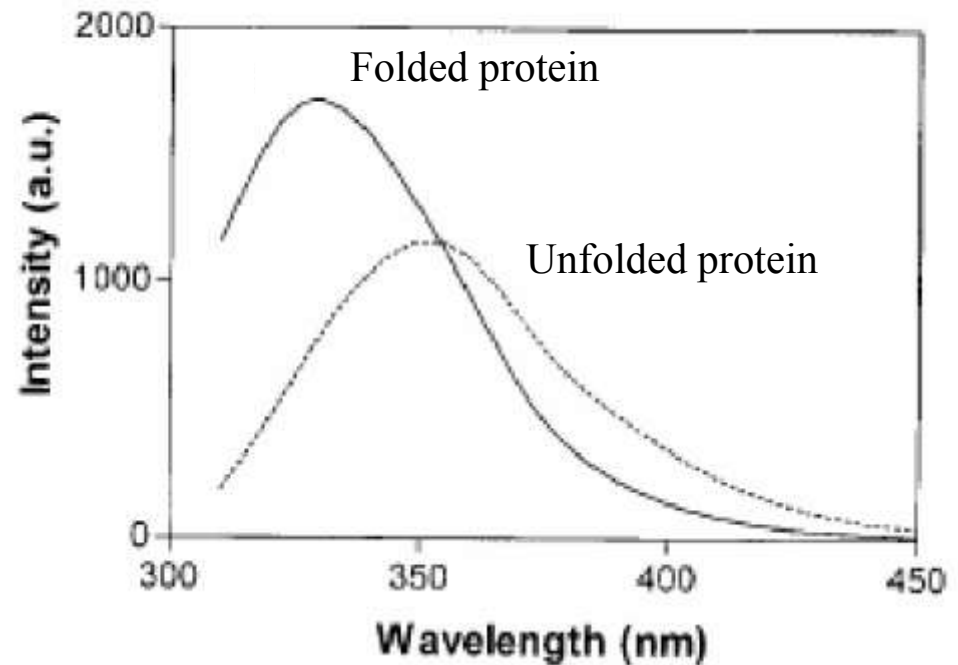
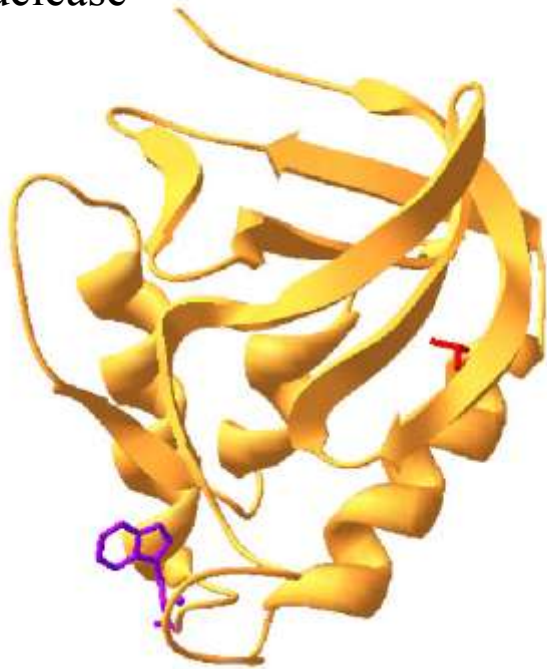
Limiti o complessità:

- a) Non tutti i composti sono fluorescenti
- b) Possibilità di quenching

La fluorescenza del triptofano (o di altri Fluorofori) dipende dalla localizzazione

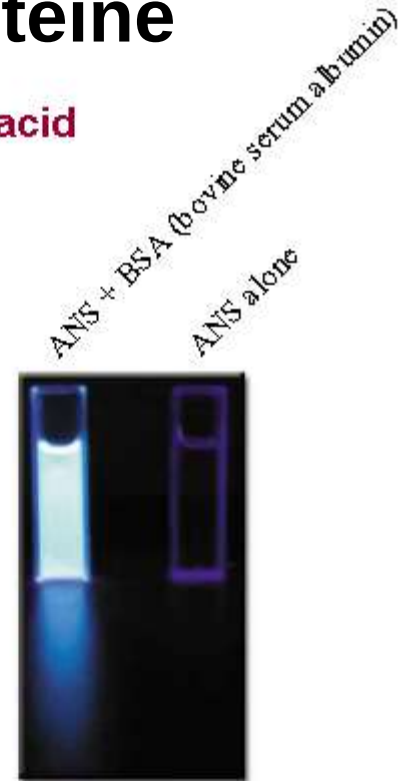
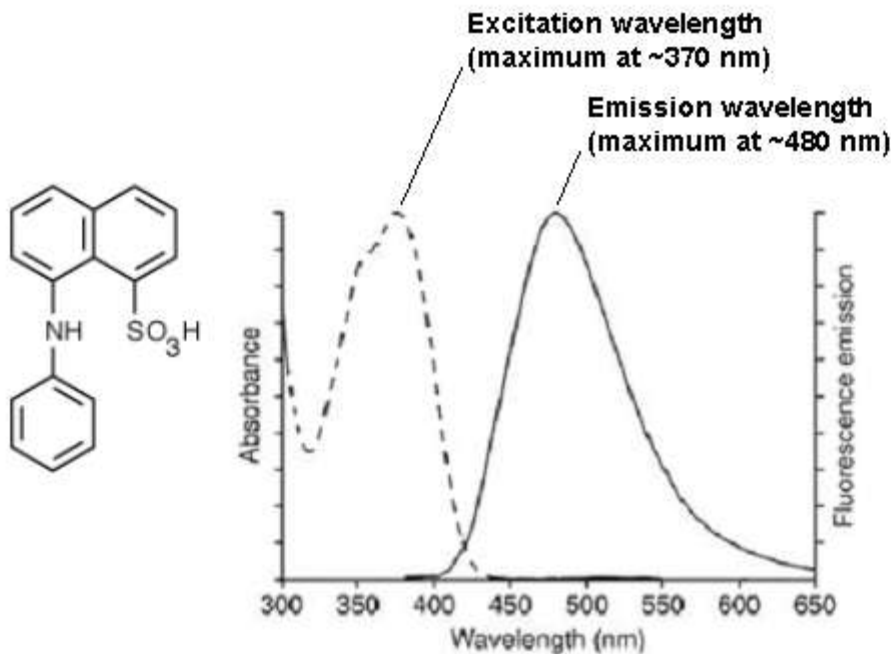
Typical result:

Nuclease



L'ANS può essere usato per studiare la conformazione delle proteine

1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid

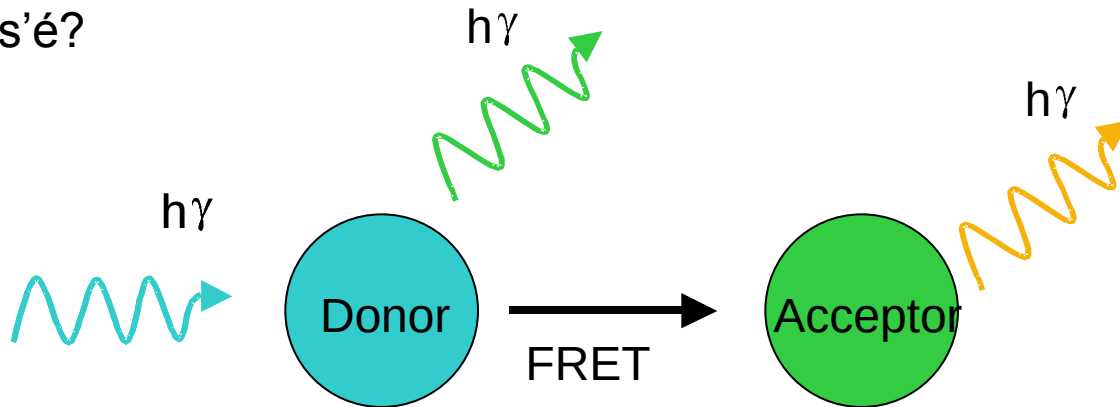


L'intensità ed il massimo di fluorescenza cambiano in seguito al legame ad una regione idrofobica delle proteine

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

(o Förster Resonance Energy Transfer)

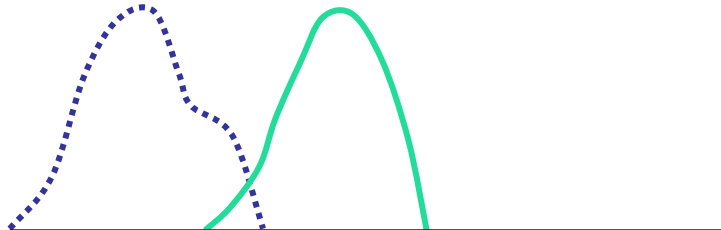
Cos'è?



E' una tecnica che sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, dette donatore e accettore. Il donatore può essere eccitato ad una specifica lunghezza d'onda. Tale molecola emette energia che, a sua volta, può essere trasmessa all'accettore, in grado di conseguenza di emettere una fluorescenza visualizzabile dall'operatore. Tale processo avviene in modo ottimale solo se le due molecole sono a distanza ragionevolmente ristretta.

Donor

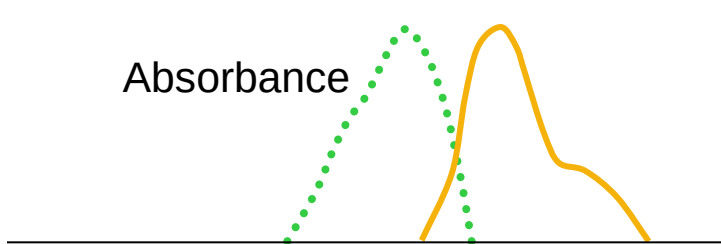
Absorbance Fluorescence



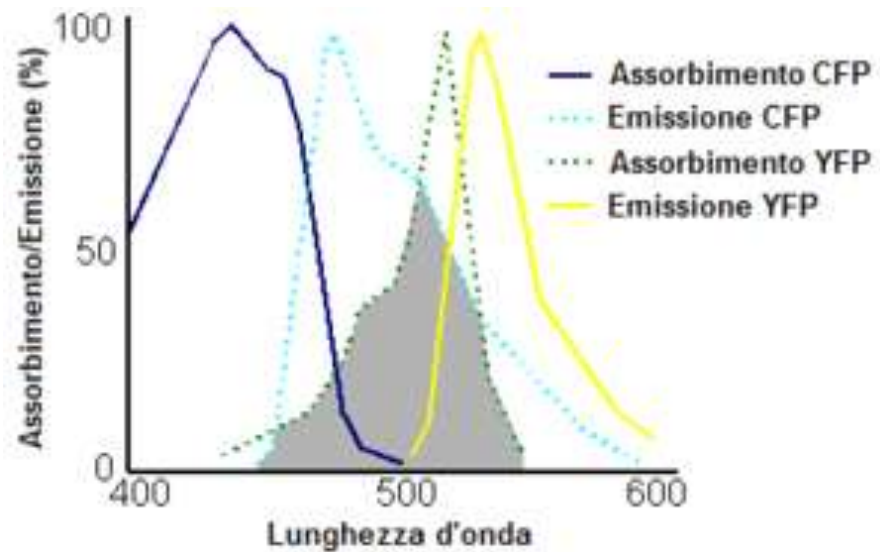
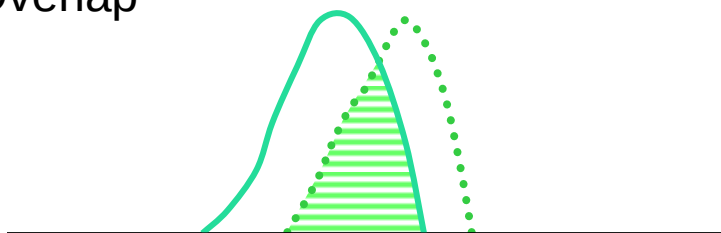
Acceptor

Fluorescence

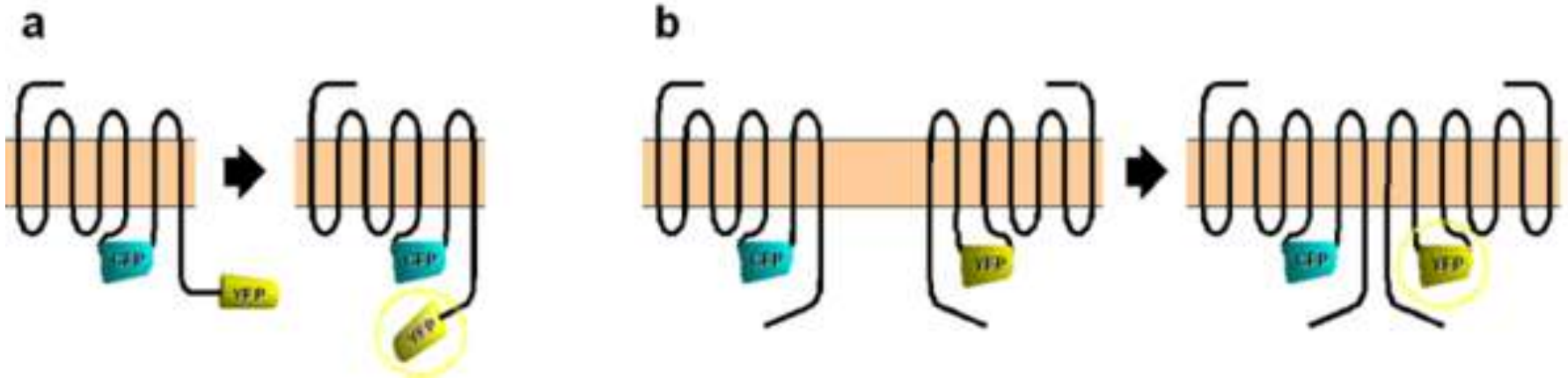
Absorbance



Overlap

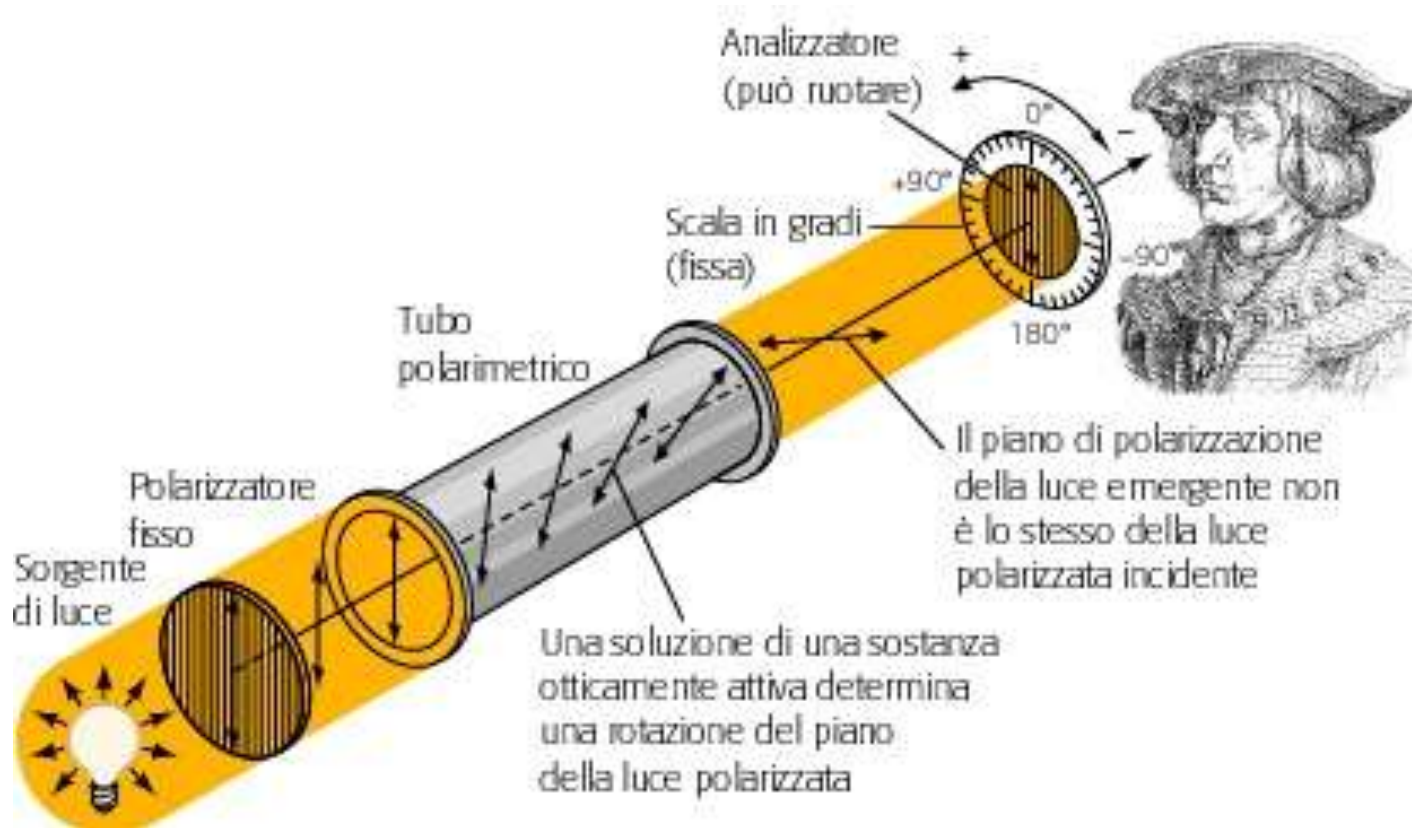


FRET è la tecnica ideale per studiare le interazioni tra diverse proteine o diverse macromolecole



DICROISMO CIRCOLARE

Questo tipo di spettroscopia sfrutta la capacità degli isomeri ottici di ruotare il piano della luce polarizzata



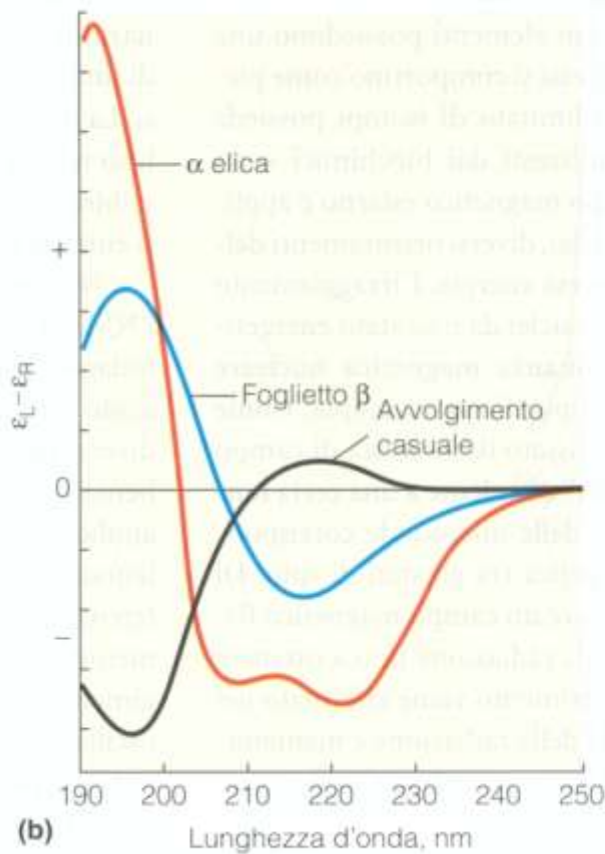
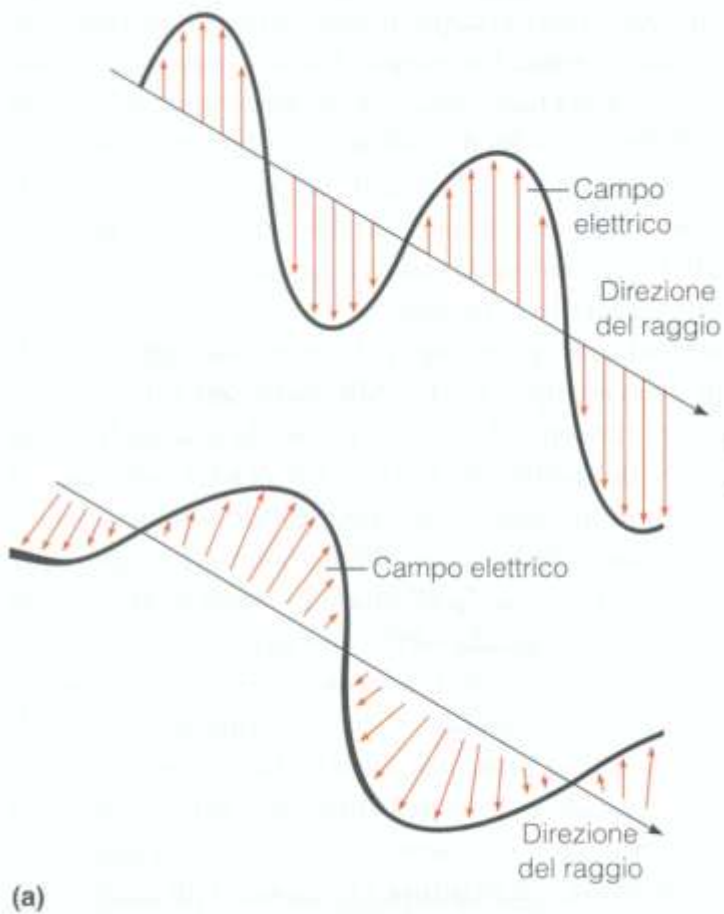


FIGURA 6A.5

Dicroismo circolare. (a) Polarizzazione della luce. Sopra: luce polarizzata planarmente. Sotto: luce polarizzata circolarmente.

(b) Spettri di dicroismo circolare di polipeptidi in varie conformazioni.

$$\Delta A = A_L - A_R / A$$

Spettrometria di risonanza di spin elettronico (ESR) o risonanza elettronica paramagnetica (EPR)

E' una tecnica utile per analizzare **metalli di transizione** e i loro complessi, **radicali liberi** o stati eccitati delle molecole. Gli elettroni sono dotati di spin e di carica e quindi si comportano come piccoli magneti, cioè possiedono un momento magnetico. In presenza di un campo magnetico esterno gli elettroni possono esistere in due stati: spin parallelo al campo (bassa energia), spin antiparallelo (alta energia). Per passare da uno stato all'altro l'elettrone deve assorbire un opportuno quanto di energia. Nel caso di un elettrone spaiato, applicando una radiazione elettromagnetica, si **ha inversione di spin (risonanza)** quando:

$$h\nu = g\beta H$$

h = costante di Planck

ν = frequenza della radiazione applicata

G = costante nota come fattore spettroscopico di separazione

β = momento magnetico dell'elettrone

H = campo magnetico applicato

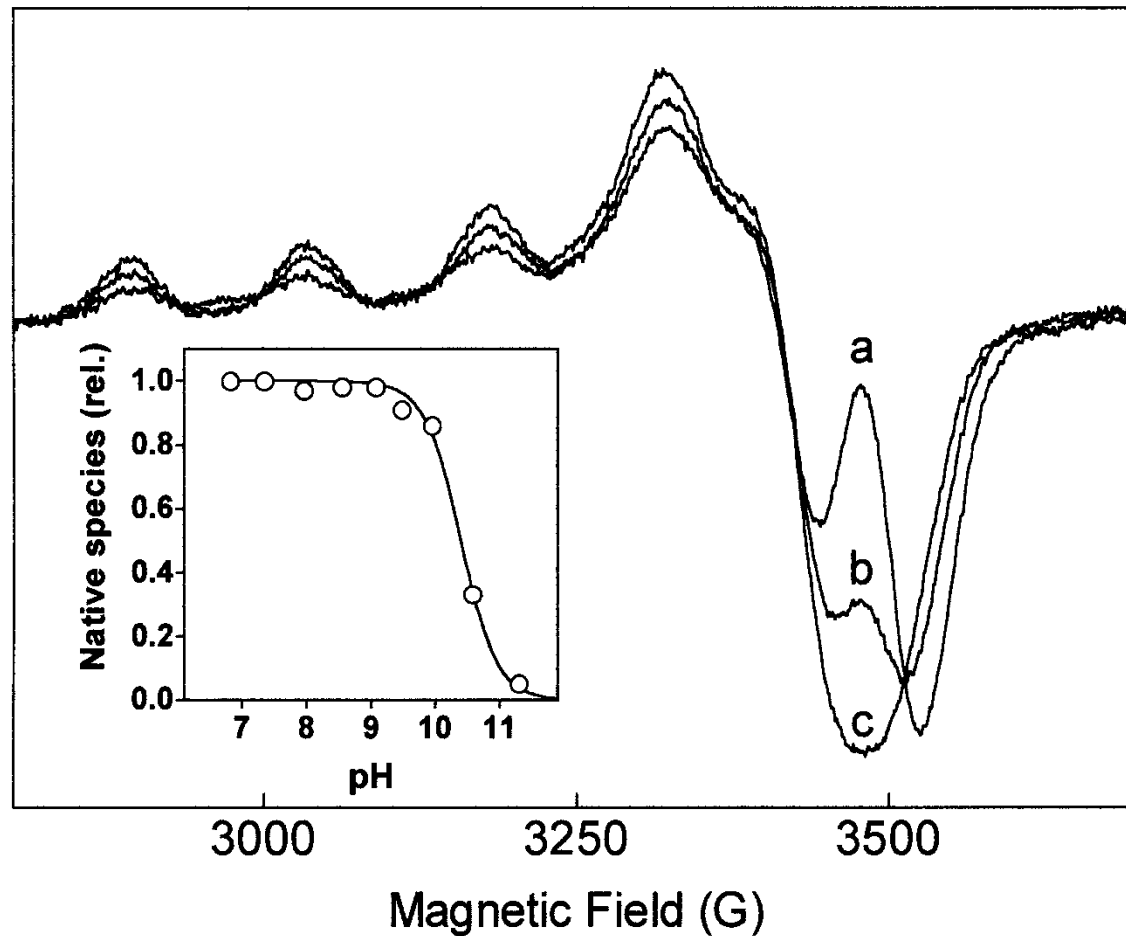
Si irradia il campione con **microonde a frequenza fissa e si fa variare il campo magnetico**, fino ad ottenere il fenomeno della risonanza.

Tale fenomeno è registrato come un **picco** di assorbimento caratteristico della specie paramagnetica in esame e viene rivelato come derivata prima dell'assorbimento, in funzione dell'intensità del campo magnetico

Tale tecnica viene usata per lo studio di metalli di transizione e radicali che presentando un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno dotato di carica e spin, si comportano come magneti

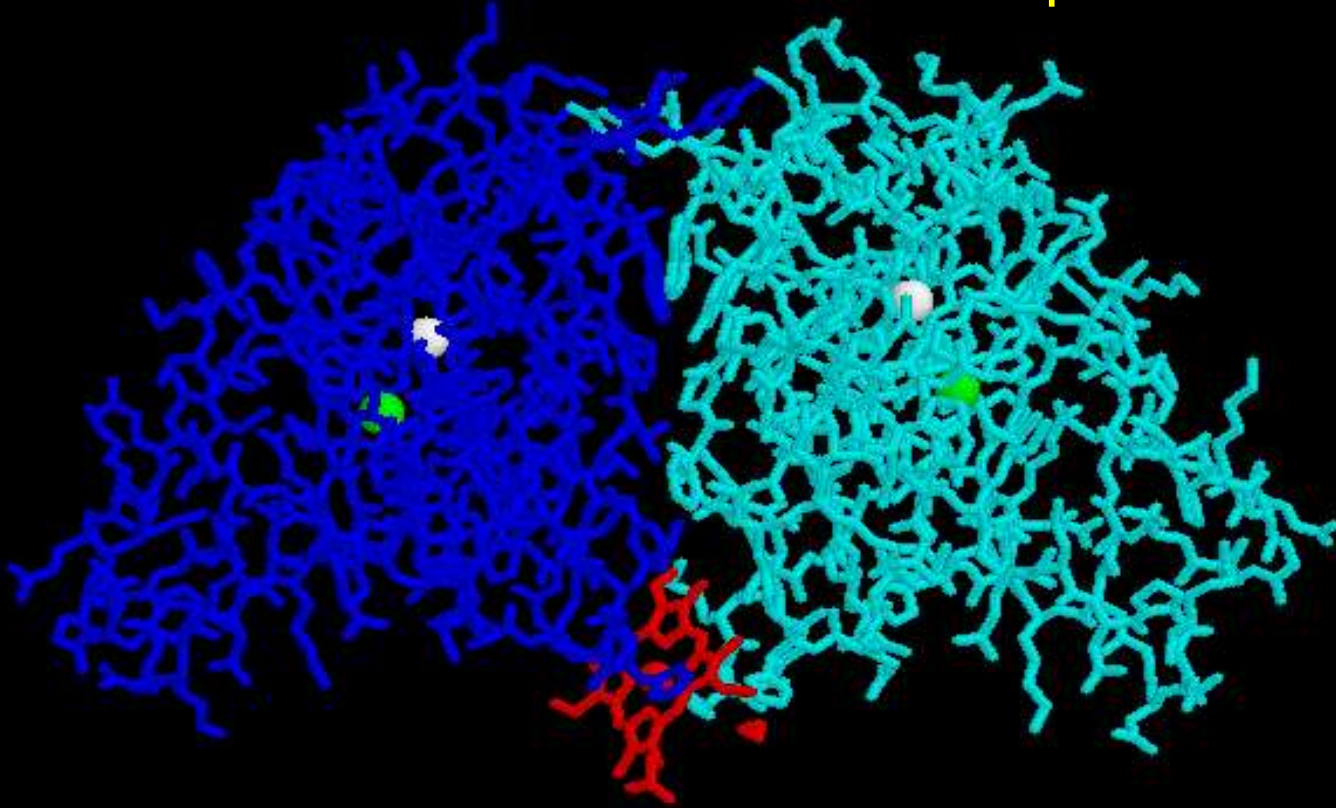
Informazioni qualitative, quantitative, dinamiche.

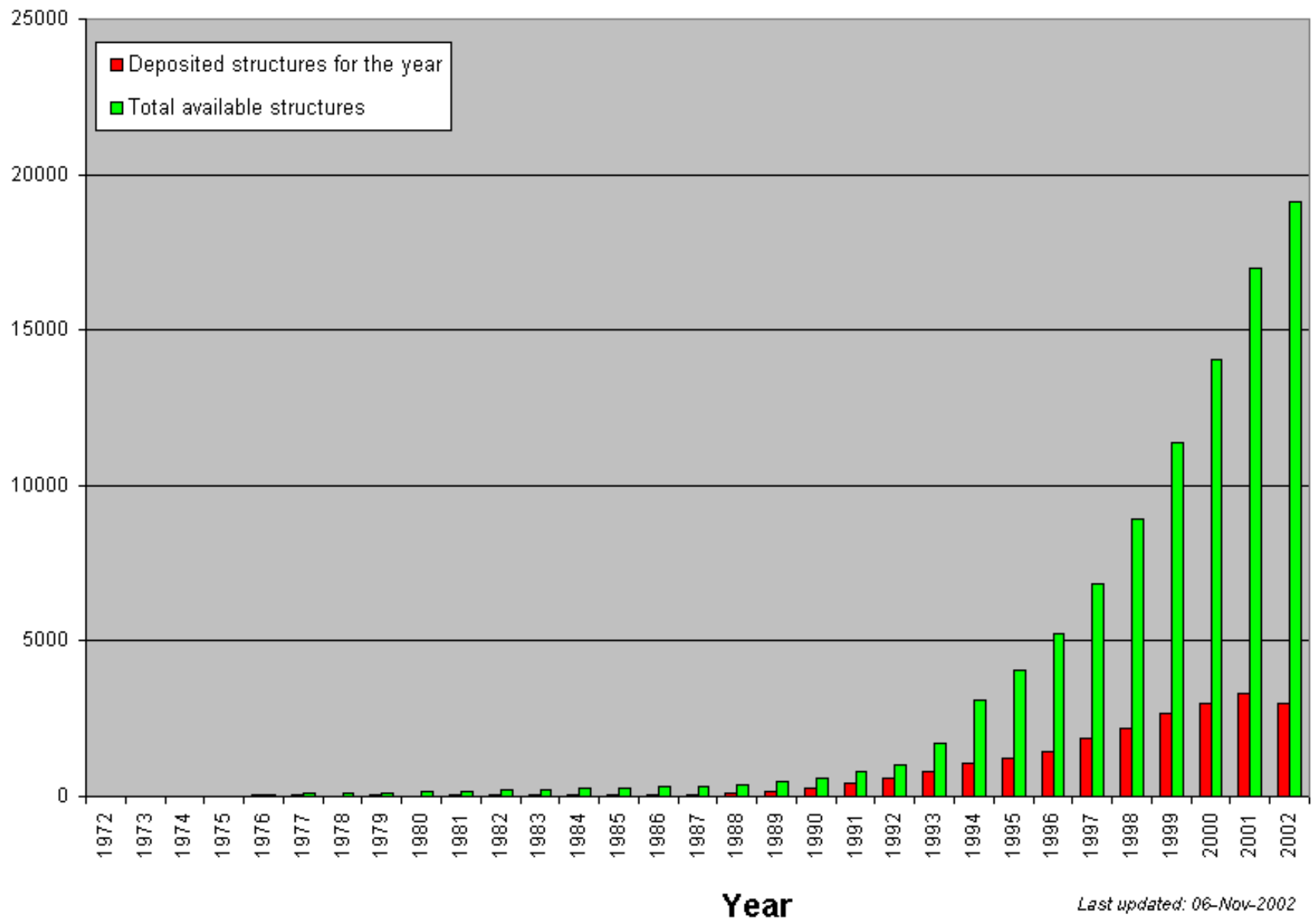
Spettro EPR di una Cu,ZnSOD



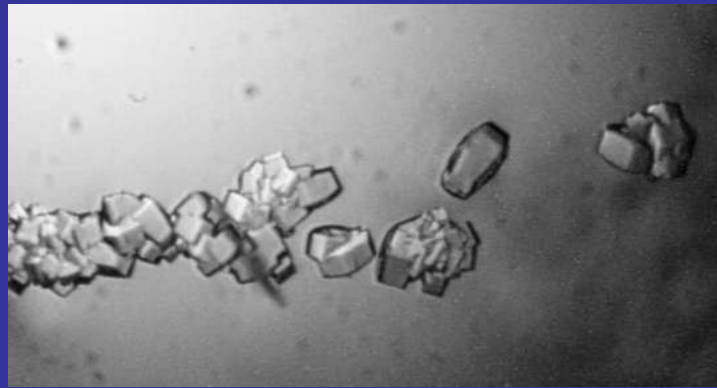
**LO SPETTRO DEL RAME CAMBIA IN
FUNZIONE DEL pH, INDICANDO CHE AVVENGONO
CAMBIAMENTI CONFORMAZIONALI**

La struttura tridimensionale delle proteine

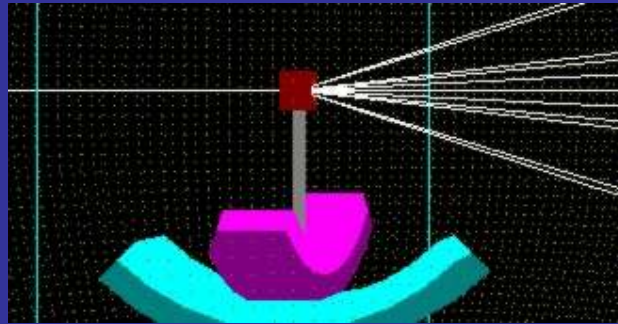




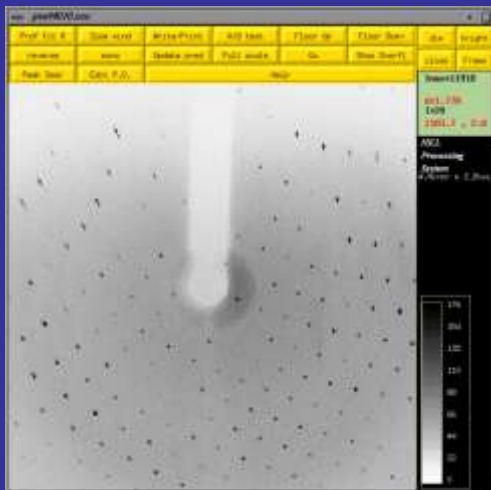
Un cristallo proteico



È posto sotto una sorgente diraggi X



I raggi X sono diffratti dalle
Nuvole elettroniche
Intorno agli atomi

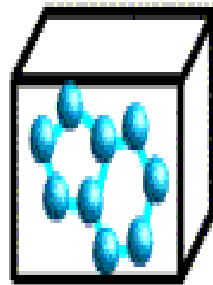


da questi dati si può dedurre
la struttura atomica

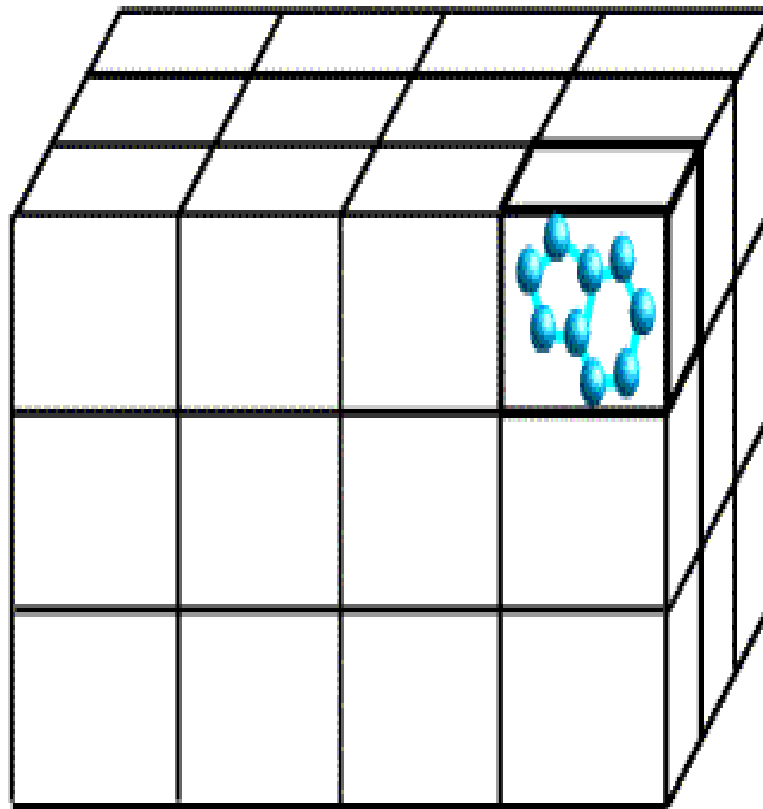
molecule



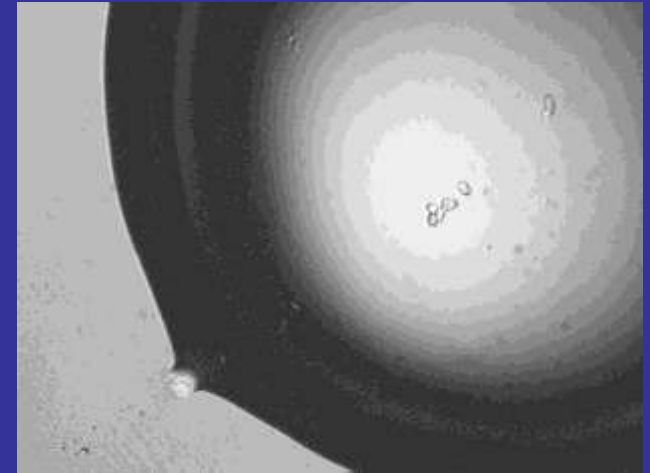
unit cell



crystal



I cristalli si ottengono per precipitazione lenta della molecola da una soluzione, in condizioni che non dovrebbero alterare la sua struttura



E' necessario ottenere alte concentrazioni di proteina purificata.
Molte proteine richiedono una soluzione acquosa
Alcune sono insolubili
La precipitazione è comune, ma non quella in un cristallo,
trovare le condizioni.

La cristallizzazione è il passaggio limitante nella cristallografia.

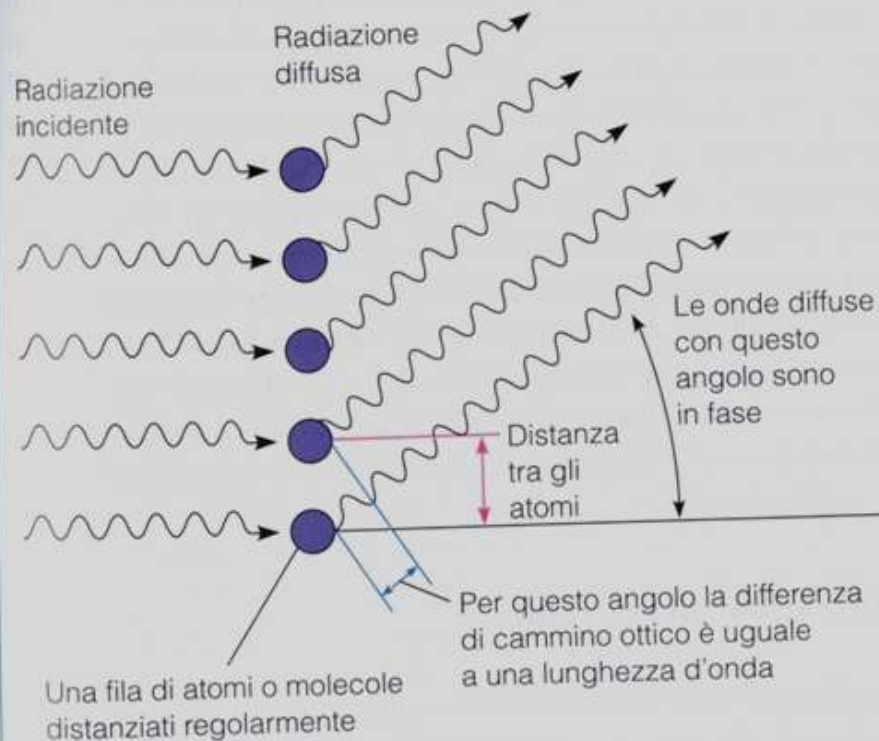


FIGURA 4B.1

Diffrazione di una struttura molto semplice: una fila di atomi o di molecole.

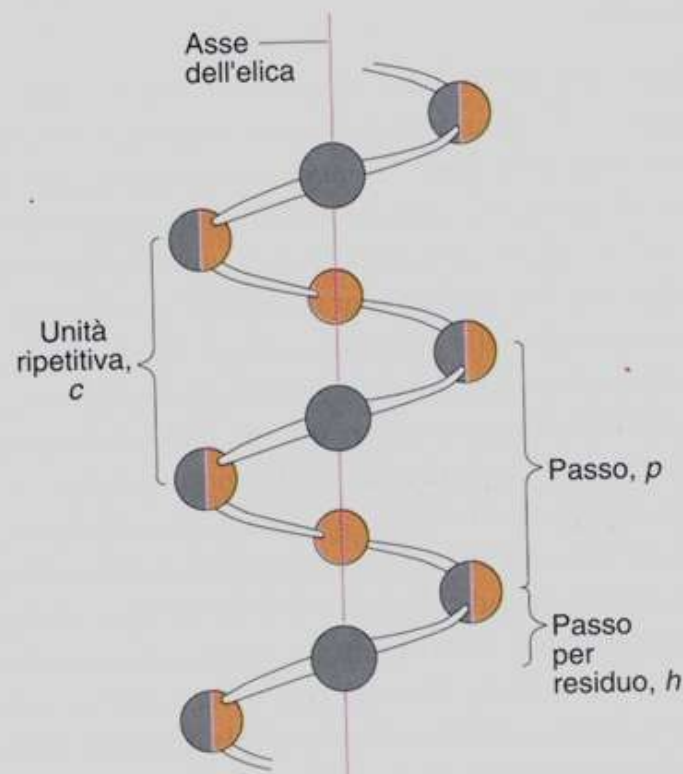


FIGURA 4B.2

Una semplice molecola a elica.

Cristallizzazione

Raccolta dei dati

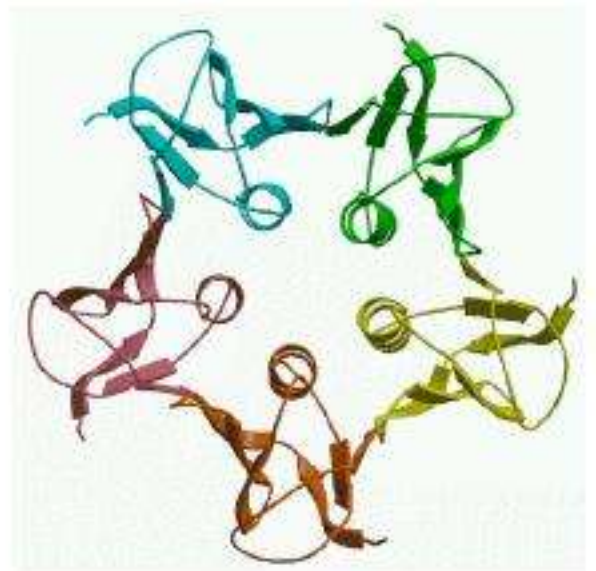
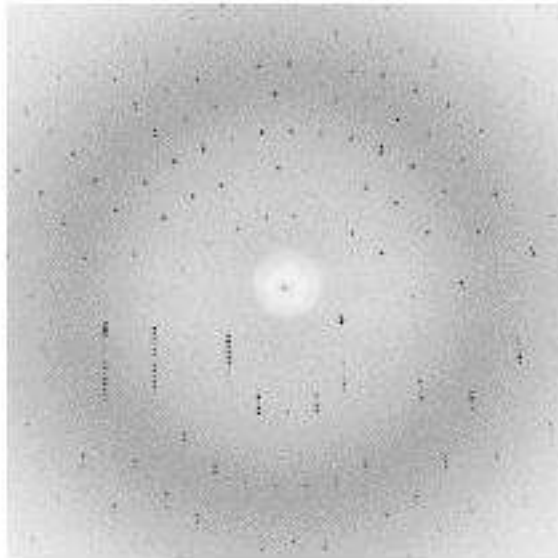
Determinazione della fase

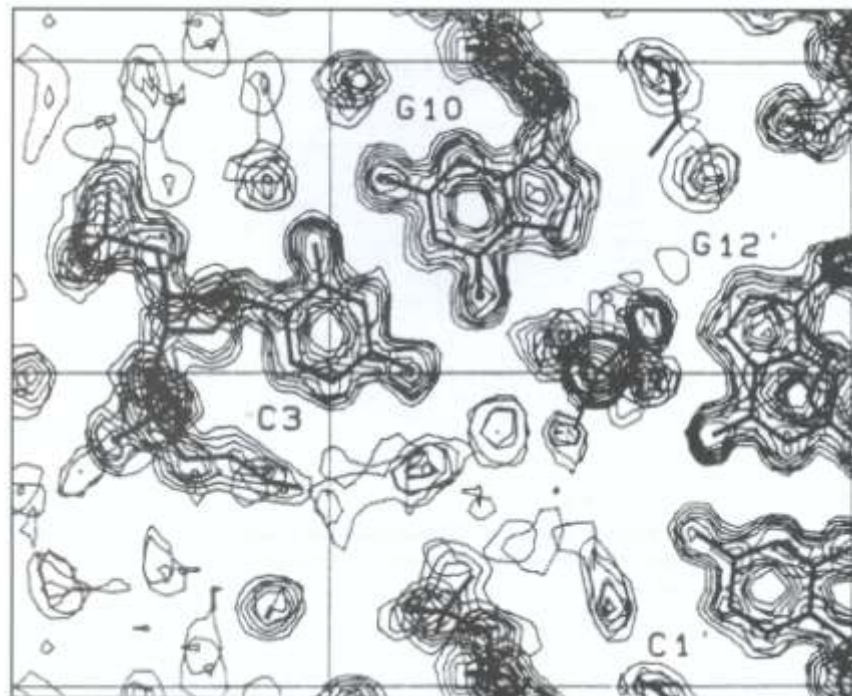
Raffinamento

Determinazione delle mappe di densità elettronica

Costruzione del modello

Valutazione del modello





RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

Tra le differenti tecniche di indagine chimico-fisica, la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è quella che nel corso degli ultimi 20 anni si è venuta affermando come unica alternativa all'approccio cristallografico nella determinazione di strutture di biopolimeri complessi quali le proteine, gli acidi nucleici ed i polisaccaridi. Questo sviluppo è stato reso possibile dai concomitanti sviluppi nel campo dell'elettronica, della tecnologia dei superconduttori e della teoria NMR vera e propria. Lo sviluppo dell'elettronica ha contribuito fornendo soluzioni efficienti sia per la rivelazione ed il trattamento del segnale, sia per l'elaborazione dei dati sperimentali ad opera di computer sempre più potenti. I progressi nel campo della tecnologia dei superconduttori hanno permesso di ottenere magneti ad elevata intensità di campo e stabilità. L'avanzamento della teoria NMR ha condotto all'elaborazione di un corpo di conoscenze senza eguali nell'ambito della spettroscopia applicata.

I nuclei di determinati isotopi possiedono una proprietà nota come spin, che fa sì che essi si comportino come piccoli magneti.

TABELLA 6A.1
NUCLEI PIÙ FREQUENTEMENTE USATI IN ESPERIMENTI BIOCHIMICI DI NMR

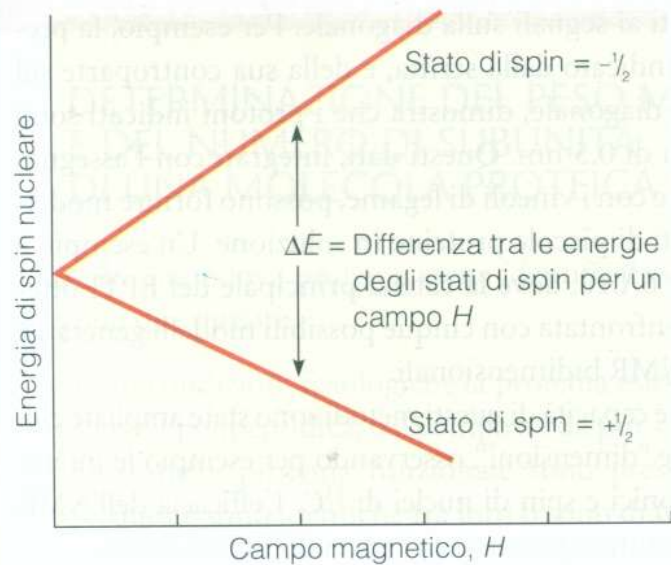
Isotopo	Spin	Abbondanza naturale ^a (%)	Sensibilità relativa ^b	Applicazioni
¹ H	½	99.98	(1.000)	Quasi qualsiasi tipo di studio biochimico
² H	1	0.02	0.0096	Studio su composti deuterati selettivamente
¹³ C	½	1.11	0.0159	Studi su gruppi specifici contenenti carbonio
¹⁹ F	½	100.00	0.834	Analogo dell' ¹ H impiegato come sonda per saggiare la struttura locale
³¹ P	½	100.00	0.0664	Studi di acidi nucleici e composti fosforilati

^aQuesto valore rappresenta la percentuale del particolare isotopo nella miscela di isotopi esistente in natura per quell'elemento. Gli isotopi con abbondanze vicine al 100% possono essere studiati direttamente nei biopolimeri esistenti in natura. Gli isotopi rari, come il ²H (deuterio) e il ¹³C, normalmente devono essere arricchiti artificialmente nelle sostanze da studiare.

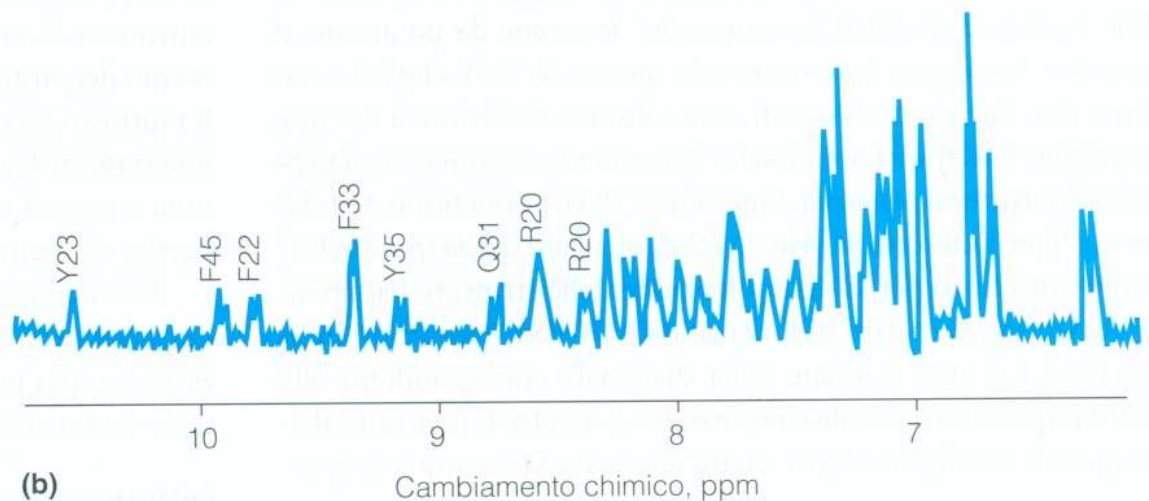
^bIndica la sensibilità (relativa all'¹H) di strumenti NMR convenzionali a ciascun isotopo. Bassi valori significano che l'esperimento sarà più difficile o più lungo.

Se un campo magnetico esterno è applicato a un campione contenente tali nuclei, diversi orientamenti dello spin nucleare saranno dotati di diversa energia.

L'irraggiamento con microonde può far passare questi nuclei da uno stato energetico all'altro, un fenomeno detto RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)



(a)



(b)

Lo sperimentatore, per ottenere la risonanza, generalmente fa variare il campo magnetico, mantenendo costante la lunghezza d'onda della radiazione

I livelli energetici di un nucleo dotato di spin sono molto **sensibili all'ambiente** che circonda l'atomo in questione.

I diversi atomi di idrogeno di un composto ad esempio **risuonano a diverse intensità di campo magnetico**. Queste differenze sono generalmente espresse in termini di spostamento chimico (**chemical shift**)(δ) definito come :

$$\delta = H_{\text{ref}} - H / H_{\text{ref}} \times 10^6$$

H = intensità del campo a cui si ha risonanza

H_{ref} = risonanza di un nucleo di riferimento

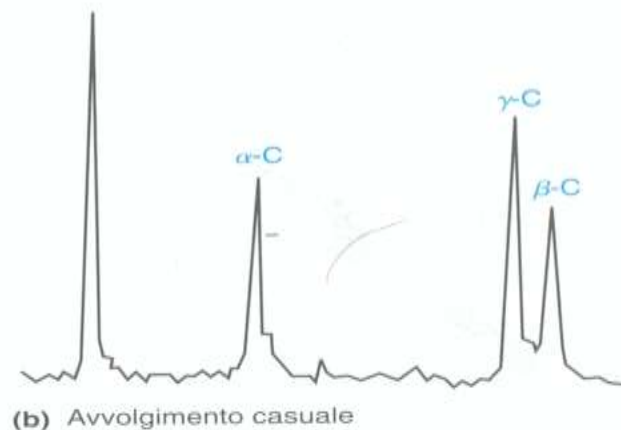
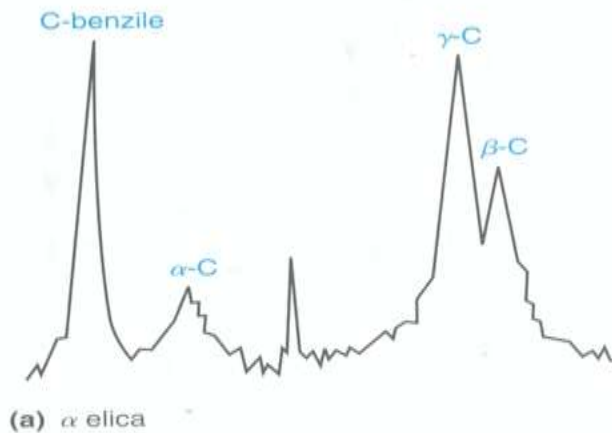


FIGURA 6A.8

Gli spettri ^{13}C NMR di un polipeptide in due diverse conformazioni. I singoli picchi relativi agli atomi di carbonio α , β , γ e benzilici delle catene laterali sono risolti chiaramente. **(a)** Spettro del poli(γ -benzil)-L-glutamato in conformazione ad α elica. **(b)** Spettro dello stesso polipeptide in conformazione ad avvolgimento casuale. Si noti la ridotta larghezza dei picchi.

Riprodotta su autorizzazione di A. Allerhand and E. Oldfield, *Biochem.* (1973) 12:3428–3433. © 1973 American Chemical Society.