

TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Introduzione alla spettroscopia

Le tecniche spettroscopiche *misurano l'assorbimento ed emissione di radiazione elettromagnetica* da parte delle molecole. Sono utilizzate per la *caratterizzazione biochimica e biofisica* delle proteine attraverso la generazione di uno *spettro* che rappresenti l'energia emessa o assorbita in funzione della lunghezza d'onda.

Le molecole sono associate a stati energetici diversi e *interagiscono preferenzialmente con radiazioni che presentano specifica lunghezza d'onda*. Ciò fornisce informazioni sulla struttura delle molecole stesse.

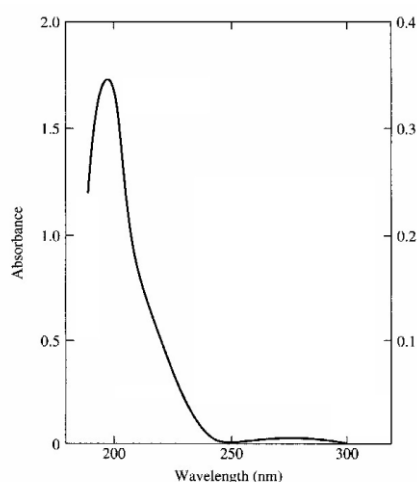


Figura 1 Spettro di assorbimento (assorbanza in funzione di λ)

Si possono distinguere spettri elettronici e vibrazionali-rotazionali. Gli **spettri vibrazionali-rotazionali** sono dovuti a diversi stati rotazionali e vibrazionali della molecola, ma non coinvolgono salti di elettroni. Questi spettri si misurano nell'**infrarosso**. Mentre gli **spettri elettronici** sono associati a transizioni di elettroni (più esterni) tra diversi livelli energetici. Gli spettri elettronici si misurano nell'**UV** e nel **visibile**.

IR vicino e lontano - 750nm VISIBILE 380nm – UV vicino e lontano

Vicino e lontano sono usati in riferimento alla luce visibile.

Gli elettroni coinvolti nei *salti quantici* tra livelli energetici (HOMO/LUMO) sono accompagnati da assorbimento o emissione di discreti pacchetti di energia che può essere definito fotone.

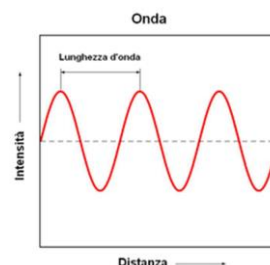
$$E = h\nu$$

$h = 6,62 \times 10^{-34} \text{ (J}\cdot\text{s)}$ costante di Planck

ν = frequenza

L'energia è proporzionale alla frequenza ed inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda.

$$\nu = 1/\lambda$$



Un sistema molecolare capace di passare da uno stato di base a uno stato eccitato è definito *cromoforo*.

Quando si tratta di radiazione assorbita si fa riferimento a spettri di assorbimento e a tecniche spettroscopiche in assorbimento, come assorbimento UV-VIS e dicroismo circolare.

Se invece si tratta di radiazione emessa si fa riferimento a spettri di emissione e a tecniche spettroscopiche in emissione, come la fluorescenza.

ASSORBIMENTO UV-VIS

Assorbanza

L'assorbanza è misurata dallo spettrofotometro ed è definita come: $A = \log I_0/I = \log 1/T$ dove I_0 è la radiazione incidente sul campione e I è la radiazione *trasmessa* dal campione, e il rapporto I_0 su I è definito trasmittanza (T).

La *legge di Lambert-Beer* mette in relazione lineare la concentrazione di un campione (concentrazioni basse) e l'assorbanza:

$$A = \epsilon c d$$

Dove A = assorbanza, ϵ è il coefficiente di estinzione molare calcolabile sperimentalmente ($M^{-1} cm^{-1}$), d è il cammino ottico (cm) e c è la concentrazione (M).

Coefficiente di estinzione

Il coefficiente di estinzione è una proprietà del cromoforo e viene ricavata sperimentalmente. Una proteina denaturata e in struttura nativa presentano differente ϵ .

$$\epsilon (\text{nativa}) \neq \epsilon (\text{denaturata})$$

In caso proteina denaturata sarà necessario utilizzare ϵ calcolato in condizioni denaturati, lo stesso per quanto riguarda ϵ in condizioni non denaturanti.

Si calcola misurando un campione a concentrazione nota ad una determinata lunghezza d'onda. Noto ϵ è possibile *calcolare la concentrazione incognita* del cromoforo in esame alla lunghezza d'onda scelta.

Spettrofotometro

È lo strumento utilizzato per la misurazione dell'assorbanza di un campione per scopi analitici o preparativi. Lo spettrofotometro utilizza una *sorgente di luce bianca* che viene scomposta in diverse radiazioni monocromatiche da un monocromatore, che permette di selezionare la lunghezza d'onda desiderata. Questa costituirà il raggio incidente sul campione, che è posto in una cuvetta con sezione rettangolare e di spessore definito (cammino ottico solitamente di 1 cm). Per il visibile è possibile utilizzare cuvette in plastica, mentre per l'UV vengono utilizzate cuvette in quarzo poiché la plastica scherma gli UV.

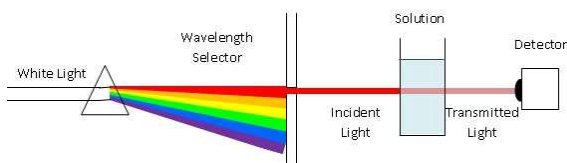


Figura 2 a lunghezza d'onda fissa o variabile (\Rightarrow spettro)

La radiazione che attraverserà il campione, verrà trasmessa e rilevata dal detector.

Come riferimento per il calcolo dell'assorbanza di un campione proteico, si utilizza un campione *plane* (bianco) che contiene la soluzione in assenza del cromoforo e si fa la differenza.

$$\text{Lettura campione} - \text{lettura solvente (nelle stesse condizioni)} = \text{Assorbanza del composto contenuto nel campione (acromoforo)}$$

Esistono spettrofotometri a doppio raggio che misurano contemporaneamente il bianco e il campione e restituiscono la differenza.

Assorbimento delle proteine

Le proteine sono cromofori che assorbono nel far e near UV:

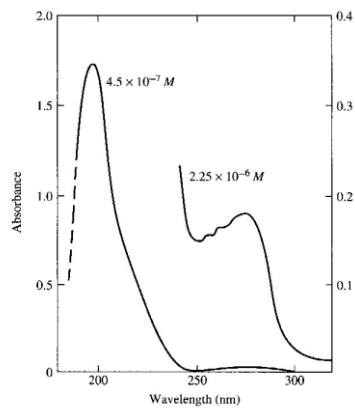
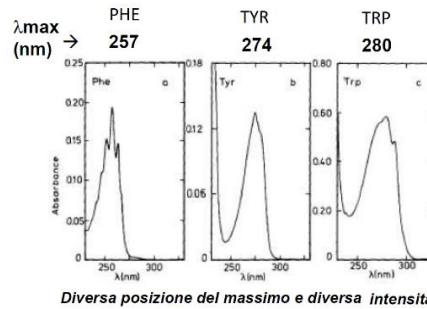


Figura 3 UV spectrum of BSA (albumina)

legame peptidico (backbone)
catene aromatiche degli aa

190-220 nm (far UV)
260-280 nm (near UV)



Diversa posizione del massimo e diversa intensità

Figura 4 UV Absorption of aromatic amino acids

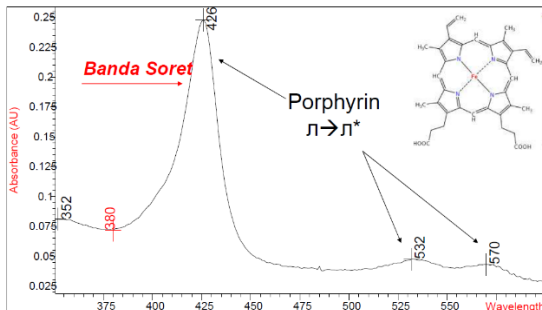
Tutte le proteine hanno uno spettro di assorbimento di questo tipo, con due picchi (il secondo picco è un ingrandimento). Il Trp ha intensità di assorbimento maggiore e assorbe a lunghezza d'onda maggiore. Spesso si utilizza eccitazione a 295 nm per vedere solo il contributo del Trp.

Contributo dei cofattori e gruppi prostetici

Il contributo dei cofattori e gruppi prostetici è solitamente nel visibile.

esempio. mioglobina (gruppo eme)

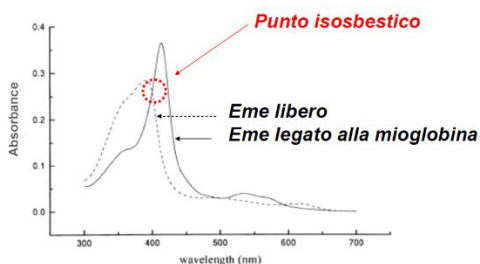
Lo spettro di assorbimento del gruppo EME è caratterizzato da 3 bande: una banda più prominente a 426nm (*banda sorè*) e le altre due bande sono a 532nm e a 570nm.



Le proteine solitamente in una assorbono nel visibile, ma siccome la mioglobina è legata a un gruppo prostetico è possibile utilizzare la spettrometria di assorbimento nel range del visibile. *Lo spettro di assorbimento di EME nel visibile influenza l'assorbimento della proteina libera.*

Queste interferenze ci permettono di studiare le interazioni tra proteina e cofattore.

I due spettri si intersecano in un punto definito *isosbetrico*, punto in cui le due specie hanno stesso coefficiente di estinzione molare.



esempio. Le flavoproteine (FMN, FAD) presentano gruppi prostetici che assorbono a 380-450nm e appaiono gialli. Anche in questo caso lo spettro è diverso in base all'interazione proteina-cofattore.

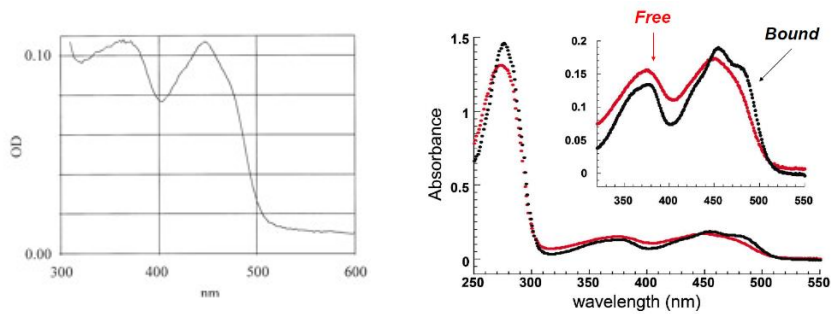


Figura 5 Absorbance spectrum of free- and protein-bound FAD

Acidi nucleici

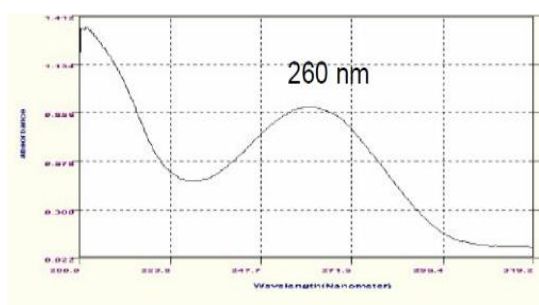


Figura 6 acidi nucleici



Figura 7 Miscela DNA + proteine

Il rapporto **A₂₆₀/A₂₈₀** è caratteristico per gli acidi nucleici:

- DNA puro: ~1.8
- RNA puro: ~2

Per le proteine invece dipende dalla composizione aa, ma hanno rapporti in media molto bassi (intorno a 0.6). Ciò permette di determinare la purezza di un campione biologico di acidi nucleici, ad esempio.

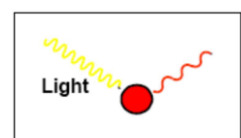
Applicazioni

- Seguire variazioni relative di concentrazione proteica (cromatogramma)
- determinare concentrazione proteica conoscendo ϵ
- seguire associazione e rilascio dei cofattori
- determinare la purezza di acidi nucleici

FLUORESCENZA

Principio

La fluorescenza è il fenomeno di emissione di energia sottoforma di radiazione elettromagnetica nel momento di *rilassamento dell'elettrone* che si trova in uno stato di eccitazione. La fluorescenza non è caratteristica di tutti i composti: i cromofori che emettono fluorescenza sono detti *fluorofori*.



In alcune condizioni può però avvenire il fenomeno del *quenching*: in questo caso l'energia viene dissipata senza produzione di luce (smorzamento della fluorescenza). Spesso avviene in concomitanza con la denaturazione.

Fluorimetro

Il fluorimetro è lo strumento che permette la misurazione della fluorescenza.

Le radiazioni da considerare sono due, pertanto saranno due anche le lunghezze d'onda:

- radiazione incidente – λ incidente
- radiazione emessa – λ emessa

Le λ_{MAX} di eccitazione in fluorescenza, sono le stesse λ_{MAX} del picco di assorbanza.

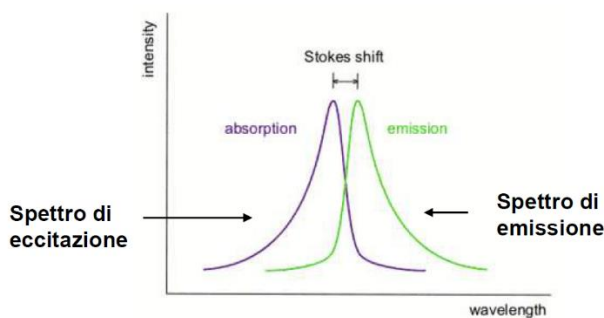
Nel fluorimetro sono presenti anche 2 monocromatori:

- monocromatore di eccitazione che selezione la λ incidente di eccitazione
- monocromatore di emissione, che permette la caratterizzazione del monocromatore di emissione

Le cuvette utilizzate per analizzare il campione sono trasparenti su tutti i lati e, per evitare interferenza della luce incidente e avere una misura esclusiva dei fotoni emessi, i due monocromatori sono messi a 90° l'uno rispetto all'altro.

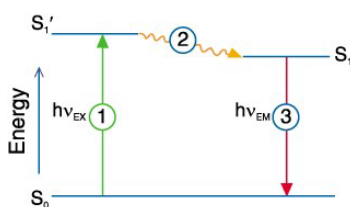
Assorbimento ed emissione

Lo strumento permette di generare spettri di eccitazione e spettri di emissione: se misuro la fluorescenza ad una λ di emissione fissa al variare della λ incidente, si ottiene lo spettro di eccitazione. Se misuro la fluorescenza ad una λ incidente fissa al variare della λ di emissione, ottengo uno spettro di emissione.



Shift di Stokes

Tra spettro di emissione e assorbimento di uno stesso fluoroforo è presente uno *shift* dovuto alla *dissipazione di energia*: l'energia di emissione è sempre più bassa di quella incidente. La dissipazione è dovuta principalmente alla presenza di sottolivelli energetici rispetto ai livello di stato base/eccitato: il salto di eccitazione verso un livello energetico superiore è unico, ma il salto di ritorno può equilibrarsi nei sottolivelli.



Fluorescenza intrinseca delle proteine

	Excitation (nm)	Emission (nm)
Tryptophan	280	348
Tyrosine	274	303
Phenylalanine	257	282

La fluorescenza del Trp è largamente predominante su quella degli altri aa aromatici. Il backbone invece non è fluorescente.

La fluorescenza delle proteine è influenzata dalla polarità dell'intorno, il quale cambia con i

cambiamenti conformazionali. È possibile utilizzare la fluorescenza intrinseca delle proteine per *studi conformazionali*.

Effetto dell'intorno strutturale

Dato che le catene laterali aromatiche degli aa si trovano solitamente nel core proteico, la denaturazione avrà un effetto importante sulla fluorescenza della proteina.

Durante la denaturazione le catene R degli aa aromatici vengono esposte al solvente e non si trovano più situate nel core idrofobico (apolare) della proteina in forma nativa. Il solvente polare o apolare (sempre più polare del core idrofobico) influisce su:

- intensità
- lunghezza d'onda.

L'ambiente polare fa diminuire l'intensità di fluorescenza, in generale a causa del quenching più forte da parte del solvente, rispetto ad altri gruppi della proteina stessa. In alcuni casi, invece, il quenching è più forte se la proteina è in forma nativa, a causa dall'interazione con diversi gruppi della proteina. In questi casi l'intensità di fluorescenza aumenta con la denaturazione.

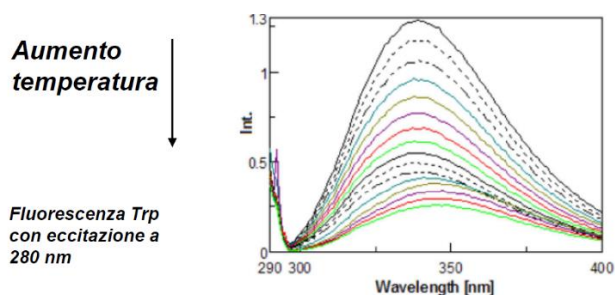


Figura 8 Esempio di comportamento TIPICO

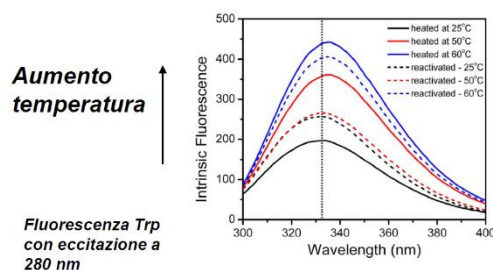


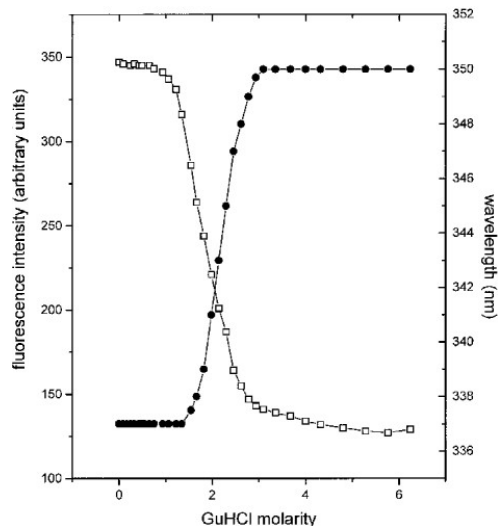
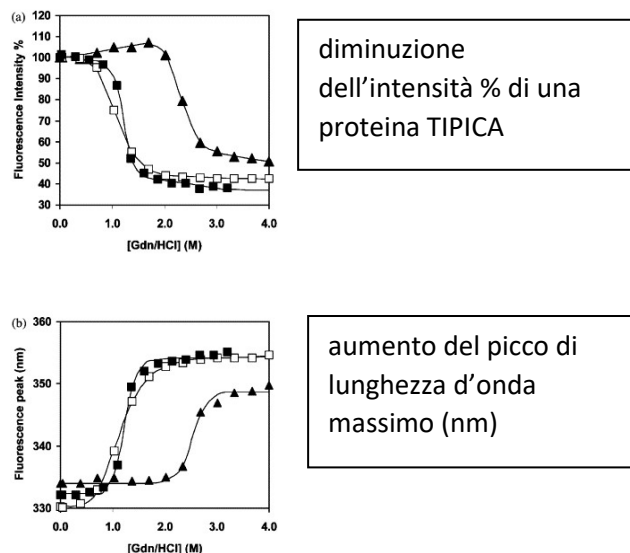
Figura 9 Esempio di comportamento ATIPICO

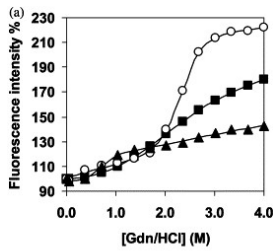
Sempre in relazione all'ambiente polare, la denaturazione fa sempre aumentare la λ di emissione e perciò il picco si sposterà verso *destra* e lo *shift di stokes* sarà più elevato. La rinaturazione invece permette di tornare ad un ambiente apolare e perciò si avrà una diminuzione della λ di emissione.

Si parla di **red shift** con la **denaturazione** e di **blue shift** con il **folding**.

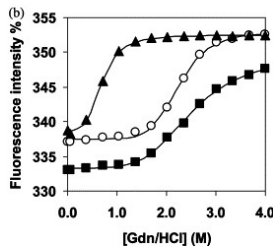
Analisi di transizioni conformazionali

Le variazioni di intensità e λ sono utilizzate per **seguire l'andamento di denaturazione** di una proteina, quindi variazioni nella struttura 3D (alterazioni del core idrofobico e dei contatti tra catene laterali).





diminuzione dell'intensità % di una proteina ATIPICA



aumento del picco di lunghezza d'onda massimo (nm)

Un esempio di comportamento atipico è il Trp (eccitazione a 280nm): in acqua emette a 350nm mentre nel core idrofobico a 330nm. Si tratta quindi di una proteina atipica.

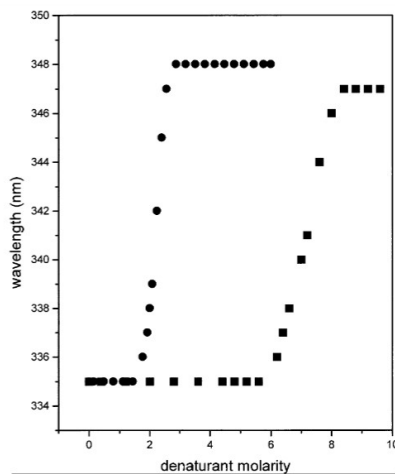
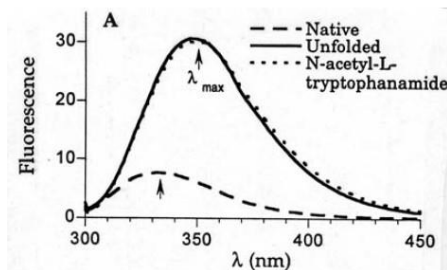
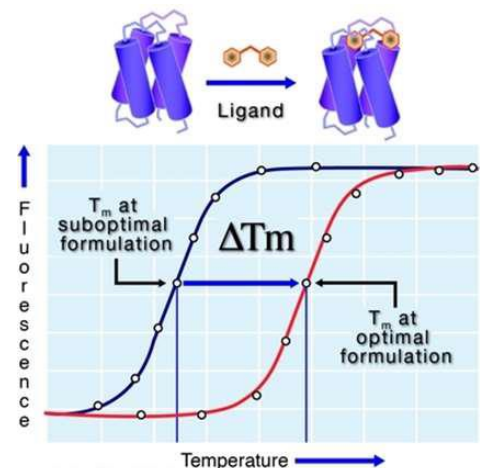
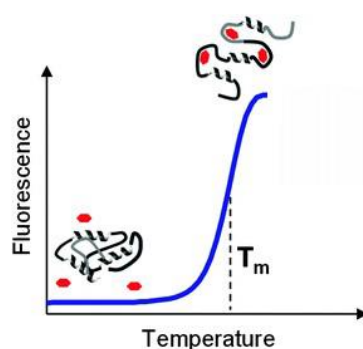


Figure 5 Urea- (■) and GuHCl-induced (●) equilibrium unfolding curves of AFEST at pH 7.5 and 20 °C obtained by recording the shift in the wavelength corresponding to the maximum of the fluorescence spectrum

In questo esperimento si ha un aumento della concentrazione di due agenti denaturanti: urea e guanidinio. All'aumentare della concentrazione si misura un aumento della lunghezza d'onda e perciò si misura denaturazione. È necessario aggiungere minori quantità di guanidinio ottenere denaturazione.

La fluorescenza permette anche di calcolare la **temperatura di melting** T_m di proteine pure e di proteine associate con un ligando.

La T_m è la temperatura alla quale il 50% delle proteine sono in folding e 50% sono unfolded.



Fluorescenza estrinseca

Si tratta di uno studio di fluorimetria nei casi in cui le proteine non presentano aa aromatici. In questi casi si utilizzano molecole fluorescenti come sonde per effettuare studi conformazionali.

Una tipica sonda è ANS, la cui fluorescenza aumenta drasticamente se si trova a contatto con strutture apolari. L'unfolding aumenterà la fluorescenza.

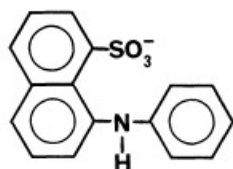


Figura 10 8-anilino-1-naphtalene sulfonate (ANS)

Assorbimento $\lambda_{\text{max}} = 374 \text{ nm}$

Emissione $\lambda_{\text{max}} = 454 \text{ nm}$

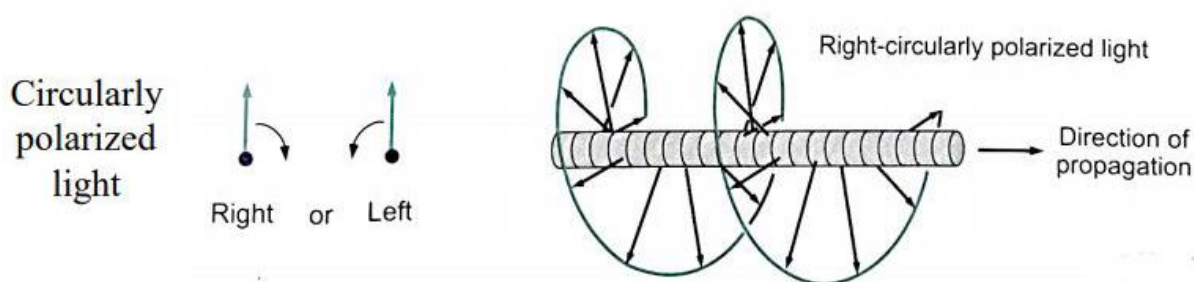
DICROISMO CIRCOLARE

Principio

Il dicroismo circolare si osserva quando *molecole otticamente attive* poste in soluzione assorbono diversamente luce circolarmente polarizzata destrorsa e levogira. Queste sostanze sono generalmente *chirali*.

Questo fenomeno viene osservato e misurato tramite lo *spettropolarimetro*.

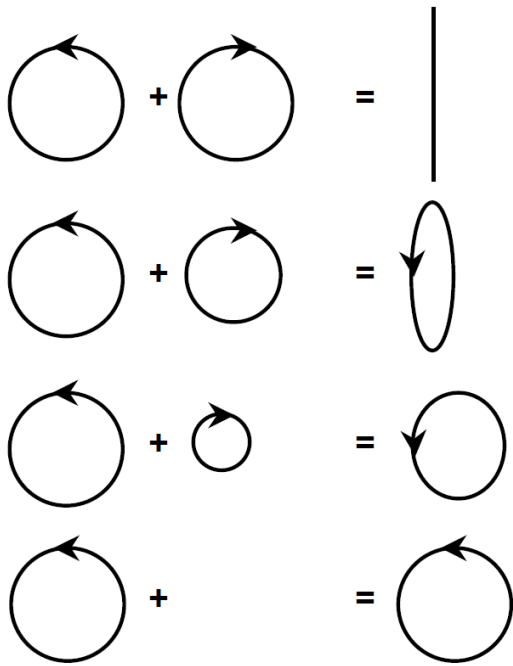
La luce (monocromatica) circolarmente polarizzata è composta da un'onda elettromagnetica che oscilla lungo piani che ruotano intorno all'asse di propagazione. La luce circolarmente polarizzata può essere prodotta dalla risultante di due componenti perpendicolari tra di loro. Queste, sono due componenti planarmente polarizzate di uguale intensità e uguale λ , ma sfasate di $\frac{1}{4}$ di λ .



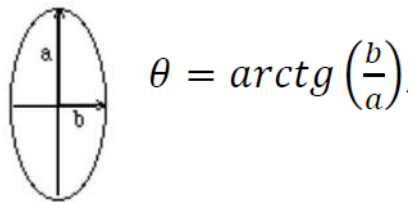
Considerando due raggi di luce circolarmente polarizzata di uguale intensità, fase e lunghezza d'onda, ma di *verso opposto* (dx e sx), si ottiene un raggio di luce planarmente polarizzata. Questa sarà utilizzata come sorgente.

La radiazione circolarmente polarizzata è *chirale* e *interagirà quindi in modo differenziale con molecole chirali*. Quando il raggio attraversa il campione, questo assorbirà parte dell'energia di una delle due componenti e perciò la risultante dei due fasci di luce circolarmente polarizzati con diversa intensità genera una luce ellitticamente polarizzata.

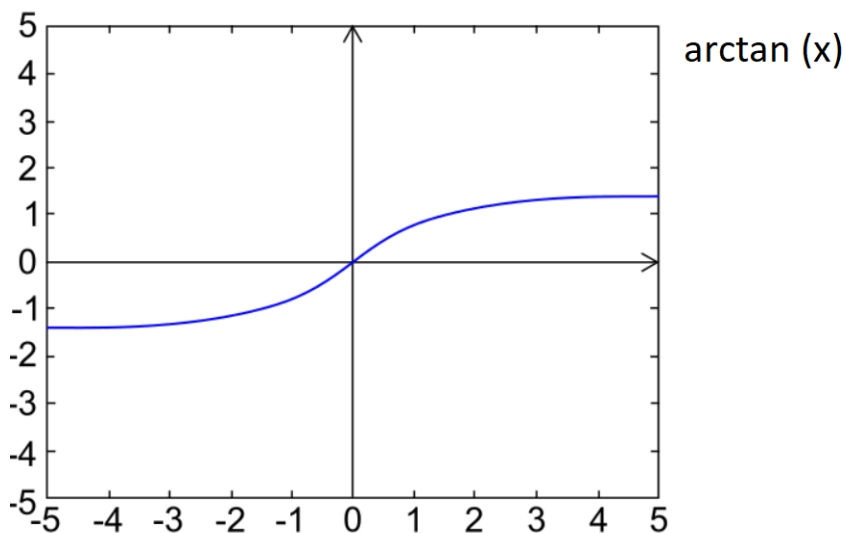
Quindi a seguito di un cambiamento di intensità di uno dei due raggi, la risultante dei raggi, che inizialmente è planarmente polarizzata, *diventa ellitticamente polarizzata*. Lo spettropolarimetro misura l'ellitticità della radiazione uscente.



Con *ellitticità* si intende:



Più l'ellisse è "grosso" più l'ellitticità sarà grande.



L'ellitticità può essere normalizzata per la concentrazione e il cammino ottico: $\text{degM}^{-1}\text{cm}^{-1} \rightarrow \frac{\text{degcm}^2}{\text{dmoli}}$

- Ellitticità molare: $[\theta] = \frac{\theta}{c \cdot d}$ ha come unità di misura $\text{degM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- Ellitticità molare media per residuo: $[\theta] = \frac{\theta}{c \cdot d \cdot N^{\wedge}_{\text{residui}}}$ ha come unità di misura $\text{degM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Questa seconda unità di misura dà valori 100 volte più grandi della prima perché i segnali sono più piccoli.

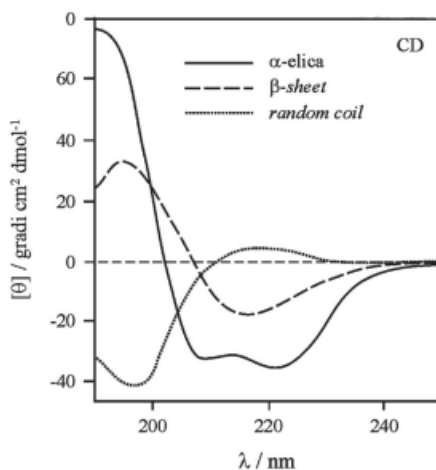
I segnali CD nelle proteine si misurano nelle catene laterali aromatiche e nel backbone:

- Catene laterali aromatiche: 260-280 nm (near UV)
- Legami peptidici (backbone): 190-220 nm (far UV)

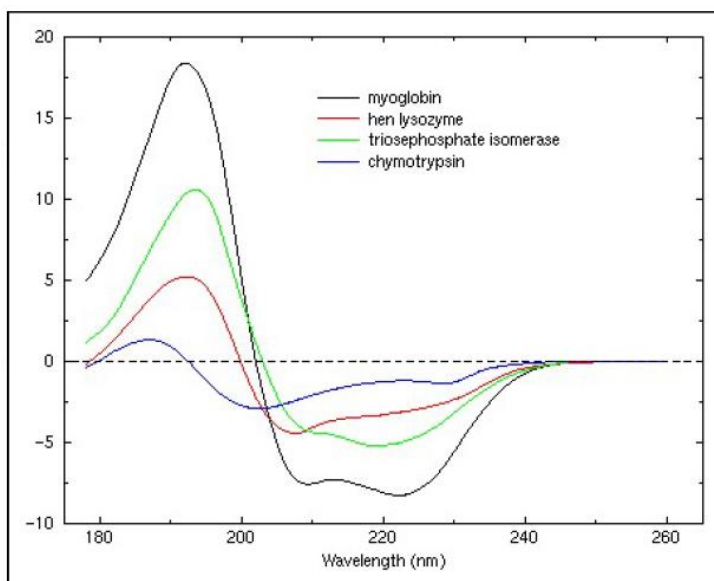
Analisi della struttura secondaria

Le interazioni del **backbone** (legami ad idrogeno) stabilizzano la struttura secondaria di una proteina, e da questa dipenderanno i segnali DC nell'**UV lontano**. Tutte e tre le conformazioni secondarie danno grafici diversi:

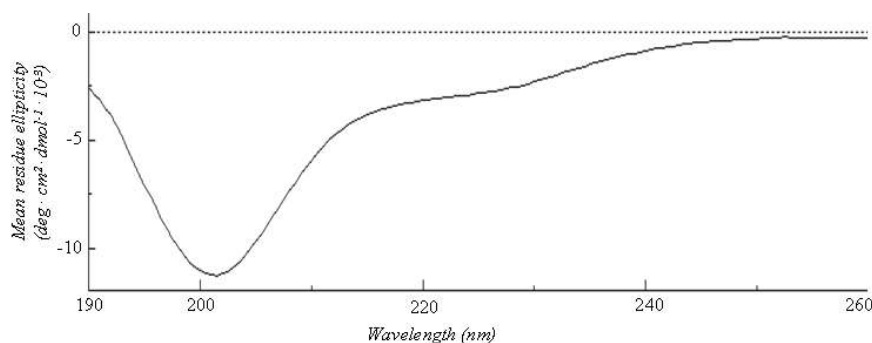
- **α -elica**: doppio minimo negativo a **208nm** e **222nm** e picco positivo intorno a **190nm**;
- **β -foglietto**: unico minimo negativo intorno a **215nm** e picco positivo intorno a **195nm**;
- **random coil**: minimo negativo intorno ai **195nm** e poi, dove le altre conformazioni hanno il minimo negativo, rimane più o meno piatto;



Le proteine reali hanno in realtà una combinazione di questi 3 spettri. Verranno quindi usati algoritmi di deconvoluzione per trovare le varie % di α – elica, β – foglietto e random coil nel far UV.



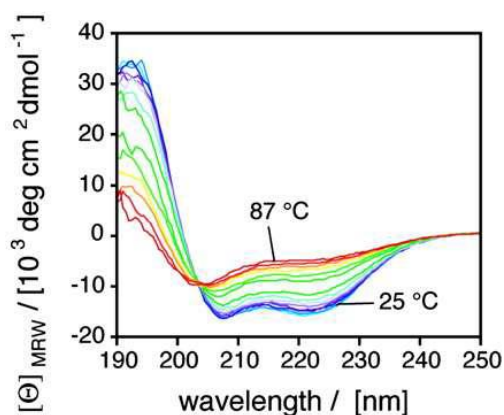
Le proteine intrinsecamente disordinate sono caratterizzate da una plasticità strutturale elevata e instaurano molte interazioni. Sono molto abbondanti (30% del proteoma eucariotico).



La proteina intrinsecamente disordinata Sic1 del lievito *S.c.*

La piccola curva a livello dei 230 nm corrisponde a una percentuale minima di α -elica.

Il DC permette di seguire la *denaturazione termica* di una proteina.



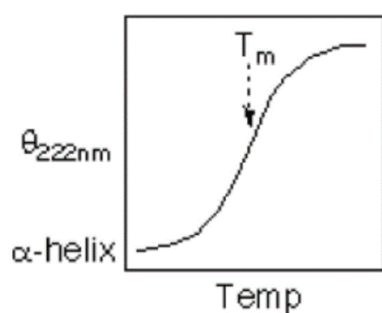
Ad esempio, col riscaldamento si nota che la mioglobina passa da una struttura secondaria α -elica a random coil. I tratti tipici dell' α -elica si appiattiscono.

C'è un punto in cui tutti gli spettri si intersecano, dunque una λ in cui l'ellitticità è la stessa, viene definito *punto isodicroico*. A questa lunghezza d'onda le due componenti assorbono in ugual modo. Il segnale quindi non cambia se le due componenti si interconvertono l'una con l'altra.

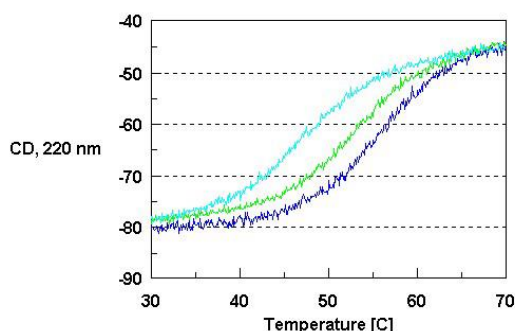
La denaturazione termica avviene ad una determinata temperatura definita T_m *melting point*, temperatura alla quale il

50% delle specie presenti sono denaturate.

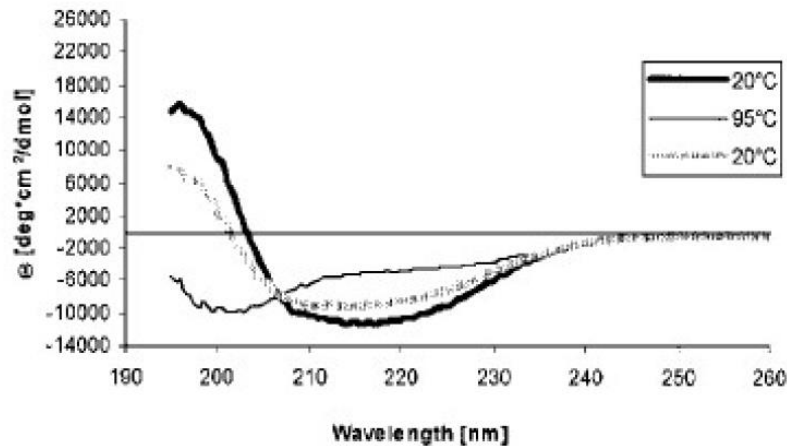
I valori ottenuti dagli spettri grezzi di DC possono essere plottati per descrivere la transizione della proteina da forma nativa a forma denaturata. Si può prendere un valore di λ , misurare l'ellitticità in funzione della temperatura per ottenere un grafico caratteristico.



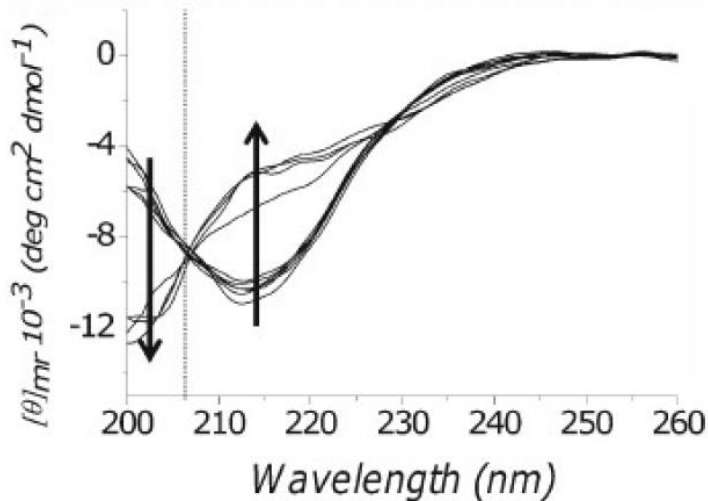
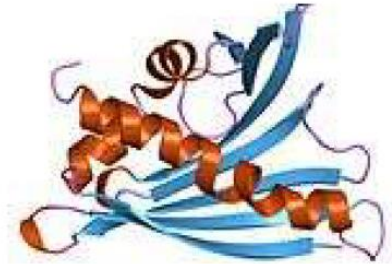
Può essere utile per studiare la presenza di mutazioni che ad esempio causano un abbassamento della T_m .



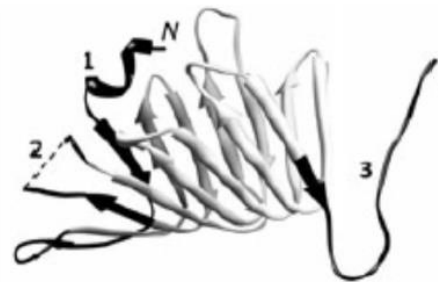
CD Spectra of rBet v 1



Bet v 1

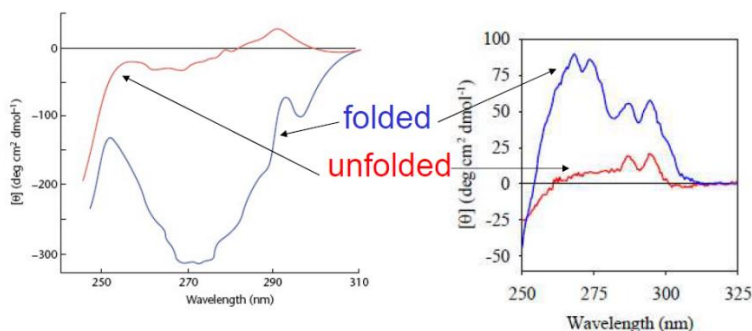


LptA



Analisi della struttura terziaria

I segnali DC delle *catene aromatiche* si rilevano nel *near UV* e sono utili per lo studio della struttura terziaria di una proteina. Segnale near-UV CD dei residui aromatici nelle proteine strutturate può essere positivo o negativo a seconda che assorba più luce destrogiro o levogiro. Questo segnale scompare quando la catena laterale non si trova più in un ambiente ordinato. Il profilo può essere più o meno frastagliato a seconda della composizione amminoacidica o della struttura e quindi non c'è una regola generale per prevedere l'andamento.

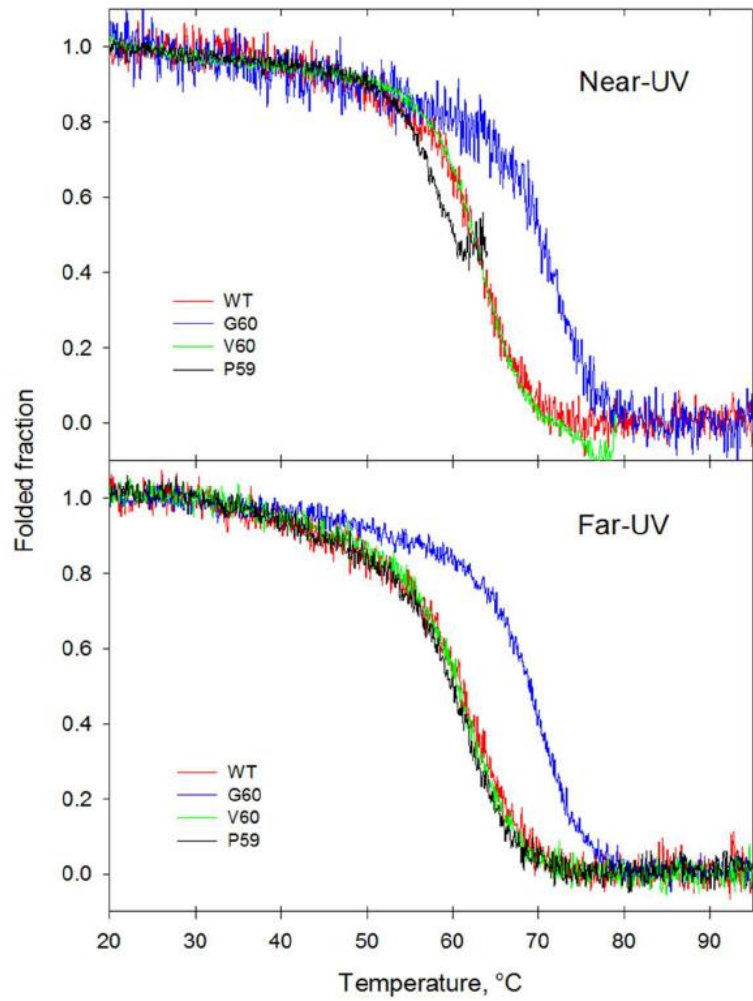


Nel near UV il segnale è più debole e quindi occorre compensare con la concentrazione oppure con il cammino ottico, si useranno cuvette da 1cm (nel far si usano anche cuvette da 1mm).

β 2microglobulin

1.4 mg/mL

0.1 mg/mL



Fluorescenza Trp

Polarità
dell'intorno
delle catene
laterali
aromatiche

CD near UV

Ordine
dell'intorno
delle catene
laterali
aromatiche