

Dicroismo lineare

Dicroismo circolare

Dispersione ottica rotatoria

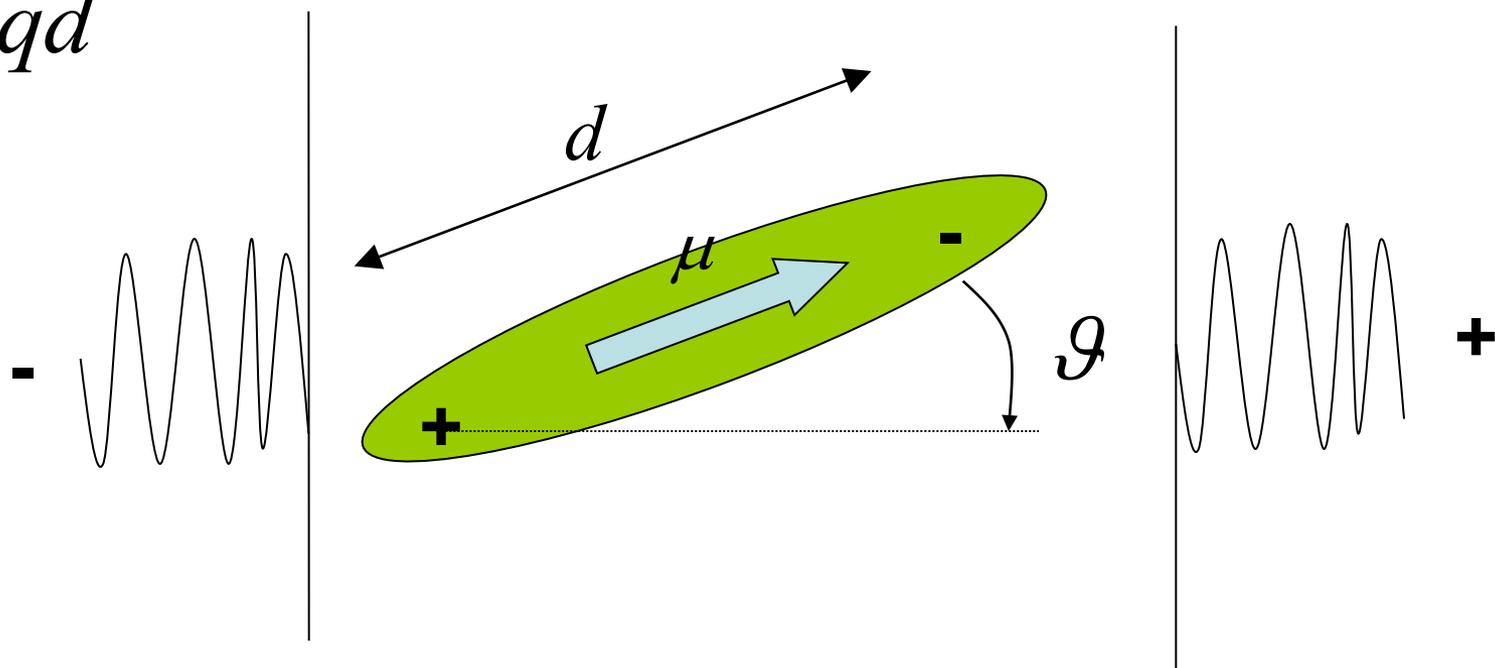
Distribuzioni asimmetriche di carica :

Permanenti: gruppi ionizzati-distribuzioni asimmetriche in legami polari

Indotte: spostamento di carica indotto da un campo elettrico esterno.

Distribuzioni asimmetriche di carica generano un momento di dipolo μ

$$\mu = qd$$



$$V = qx_1E + (-q)x_2E$$

$$x_2 - x_1 = d \cos \mathcal{G}$$

$$V = -qEd \cos \mathcal{G}$$

$$\text{se } \mu = qd \quad V = -\mu E \cos \mathcal{G}$$

$$f(\vartheta)d\vartheta = ke^{\mu E \cos\theta / kT}$$

frazione di molecole ad un angolo ϑ e $\vartheta + d\vartheta$
tra il momento di dipolo ed il campo elettrico

$$\int_0^{\pi} f(\vartheta)d\vartheta = 1$$

I momenti di dipolo permanenti o indotti possono essere valutati misurando le costanti dielettriche in campi elettrici alternati rispettivamente a frequenze molto alte (solo dipoli permanenti) ed a frequenze basse

Dicroismo lineare

L'assorbimento di luce linearmente polarizzata cambia se la direzione del campo è ortogonale o parallela al campo elettrico.

$$LD = A_{\parallel} - A_{\perp}$$

Coefficiente di estinzione del cromoforo ad un angolo θ rispetto alla direzione della luce polarizzata incidente è dato da:

$$\varepsilon(\mathcal{J}) = \varepsilon_{\parallel} \cos \mathcal{J}$$

Dicroismo lineare (LD: Linear Dichroism)

Ci sono due condizioni base perché si possa applicare la spettroscopia LD:

1. Se la posizione spaziale delle molecole nel sistema di coordinate del laboratorio è noto (le molecole sono allineate macroscopicamente), l'orientazione dei dipoli molecolari può essere determinata rispetto alle coordinate molecolari
2. Se l'orientazione del dipolo di transizione è noto rispetto al sistema di coordinate molecolari, LD porta informazioni sull'orientazione della molecola, o almeno sul dipolo di transizione rispetto all'asse di simmetria del campione.

Non tutte le molecole hanno dicroismo lineare, se sono simmetriche.

Clorofille, carotenoidi, citocromi, hanno transizioni elettroniche linearmente polarizzate e quindi hanno risposta all LD

Dicroismo lineare

Dicroismo lineare di assorbimento

Dicroismo lineare fotoacustico

Emissione di fluorescenza polarizzata

- La **dipendenza direzionale dell'assorbimento** della luce polarizzata linearmente da un serie di molecole orientate può essere usato per determinare l'orientazione delle molecole rispetto alla direzione della luce
- L'assorbimento di luce polarizzata da un serie casuale di molecole porta ad una selettiva eccitazione delle molecole parallele alla direzione di polarizzazione.
- Il **decadimento dello stato polarizzato** è dovuto al moto rotazionale del cromoforo.
- Questo decadimento della polarizzazione può essere misurata come :
 1. Una diminuzione in anisotropia di assorbimento
 2. Una diminuzione in polarizzazione di fluorescenza
- Il grado di **decadimento della polarizzazione** τ_r è il tempo di correlazione rotazionale. E' il tempo che impiega una molecola per ruotare di un radiante. (Una proteina sferica di 2.4 KDa ha un tempo di correlazione rotazionale di un nanosecondo)

Dicroismo lineare

Poiché il momento di dipolo di transizione ha una orientazione ben definita nella struttura della molecola, si può usare luce polarizzata per misurare l'organizzazione spaziale di biomolecole o di aggregati molecolari.

DNA:

- fascio è polarizzato parallelamente all'asse dell'elica
- fascio è polarizzato perpendicolarmente all'asse dell'elica

Se le basi del DNA fossero veramente ortogonali all'asse dell'elica, il primo fascio sarebbe trasmesso per il 100% mentre il secondo sarebbe parzialmente assorbito

Questo è dovuto al fatto che i dipoli di transizione delle basi del DNA sono nel piano della base e quindi conseguentemente perpendicolari all'asse dell'elica.

Dicroismo lineare

In un campione che contiene una distribuzione casuale di molecole di DNA questo effetto viene perso.

Se si riesce ad orientare le molecole di DNA in qualche modo, a seconda di come bene vengono queste molecole orientate, un differenza tra l'assorbimento della luce polarizzata parallelamente e la luce polarizzata perpendicolarmente all'asse di orientazione viene misurata.

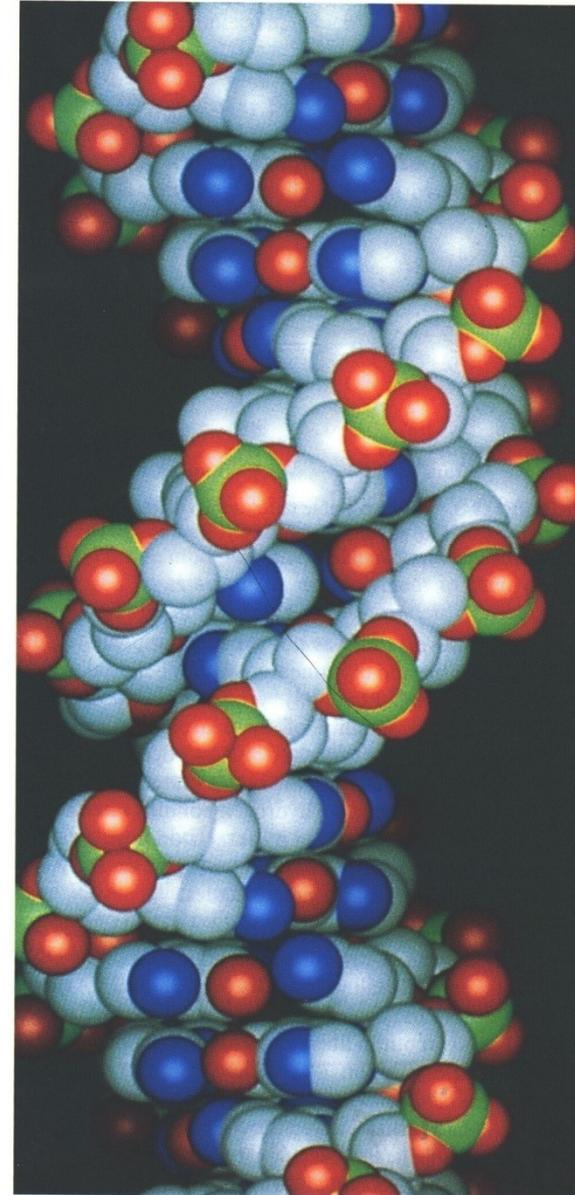
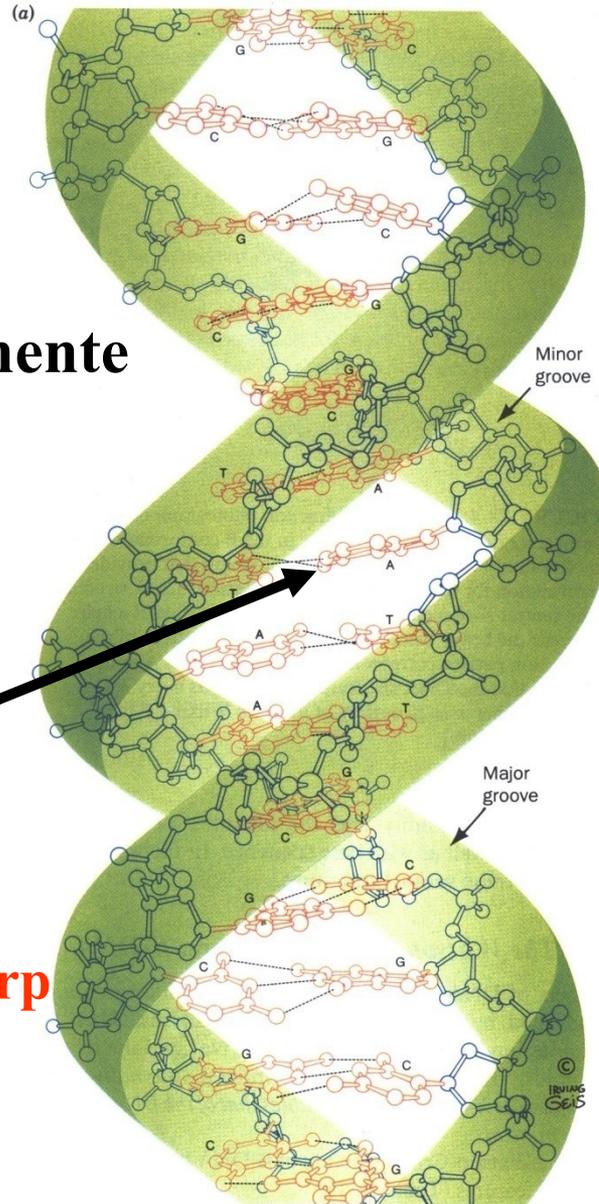
Il DNA può venire orientato in molti modi:

Campi elettrici

Flusso idrodinamico

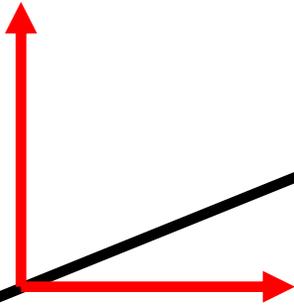
Gel compresso.

Dicroismo lineare



DNA orientato perfettamente

E_{par}



E_{perp}

Dicroismo lineare

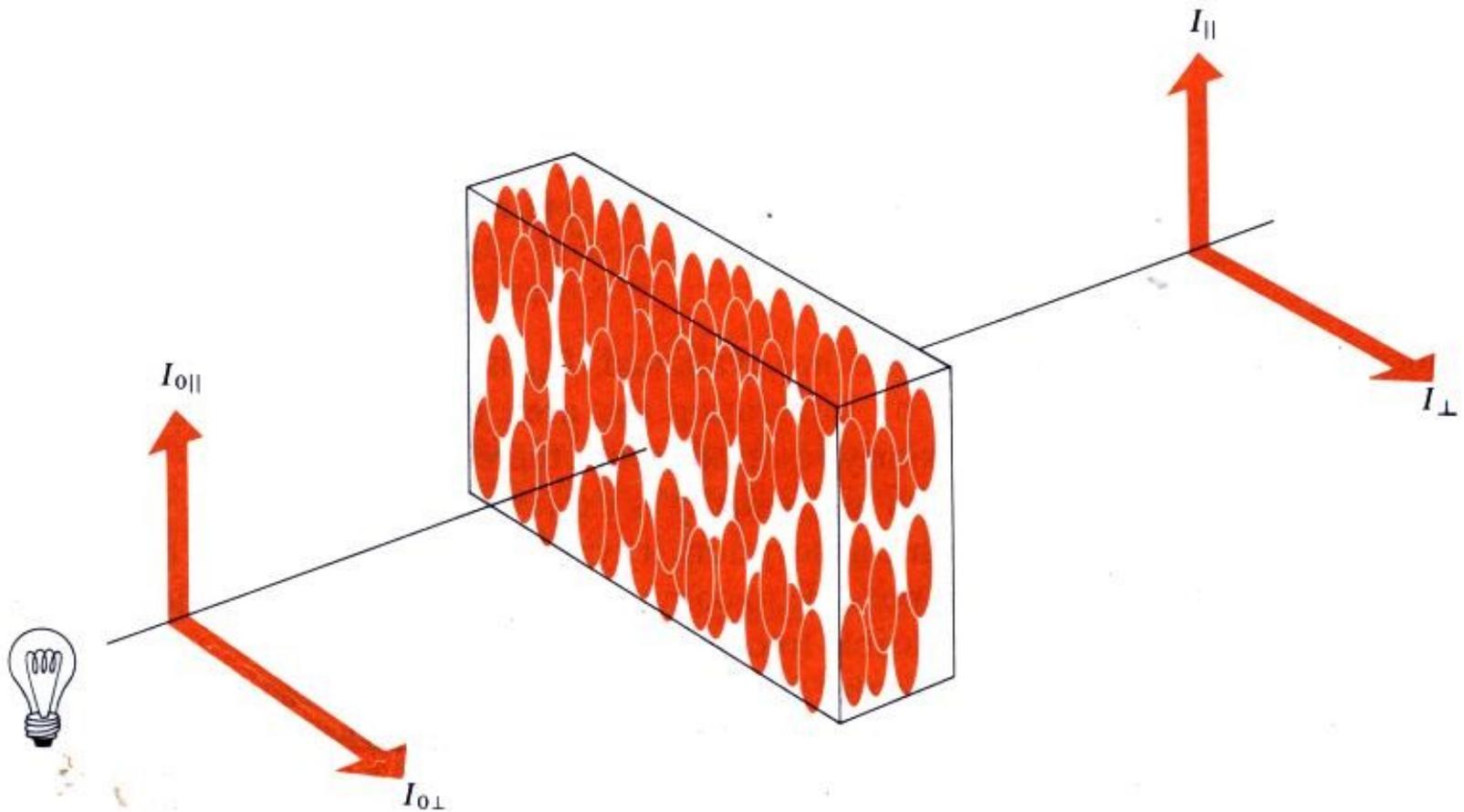


Figure 7-4

Schematic diagram of a linear dichroism experiment. Molecules in the sample all are oriented with their long axes in the direction of I_{\parallel} .

Come orientare le biomolecole

Campi elettrici o magnetici

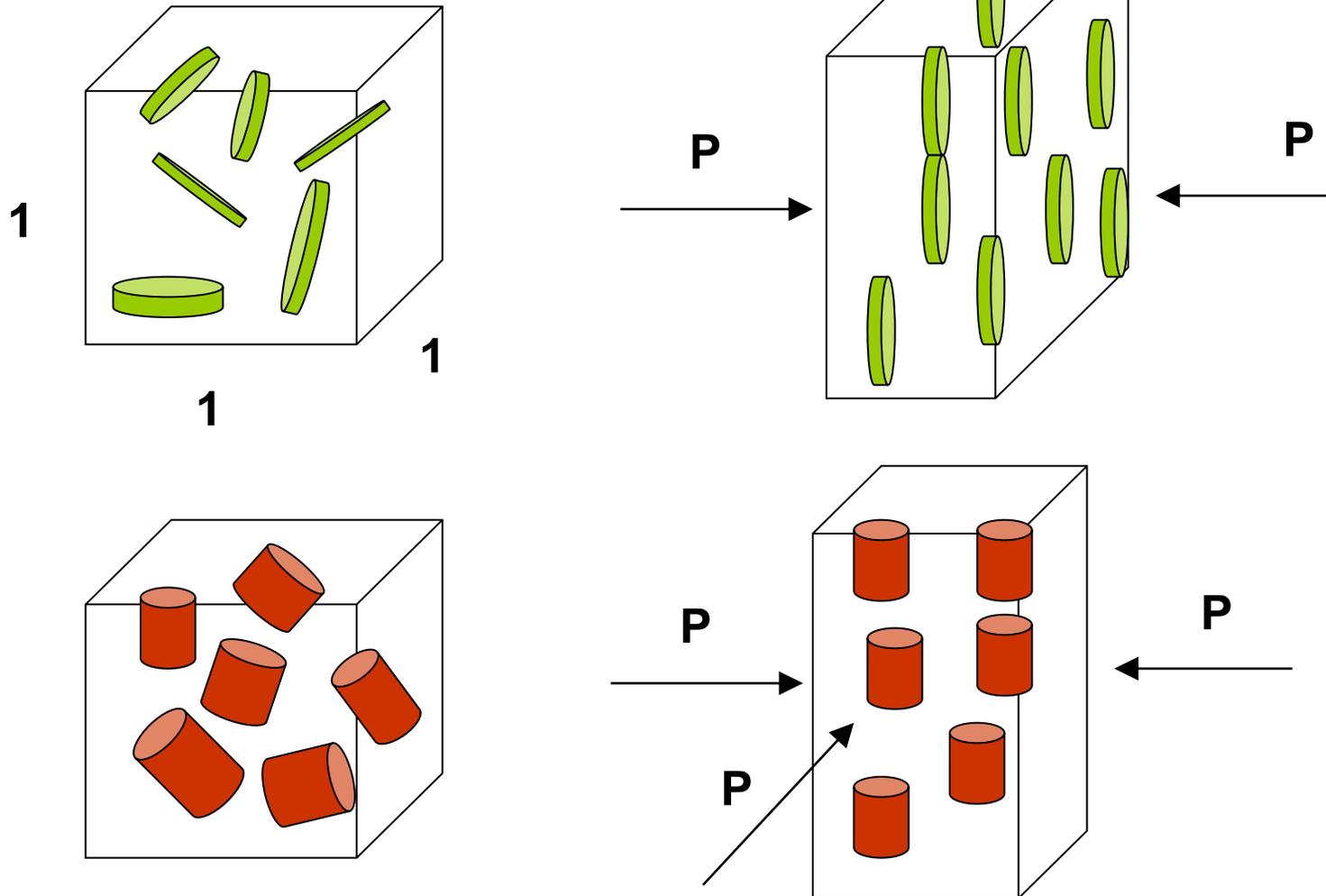
Fotoselezione

Flusso idrodinamico: particelle molecolari lunghe e cilindriche

Gel compresso: membrane piatte e particelle filiformi tendono ad allinearsi con il piano perpendicolare alla compressione unidirezionale (Gel: polyacrilamide)

Articolo di review : Current Opinion in Structural Biology 2004, 14:541–546

Come orientare le biomolecole



Dicroismo lineare

L'assorbimento per una luce incidente lungo l'asse y e polarizzata lungo l'asse x è data da:

$$A_x = k\mu_{12}^2 \langle \cos^2 \theta_x \rangle$$

Se non c'è un ordine netto:

$$\langle \cos^2 \theta_x \rangle = \langle \cos^2 \theta_y \rangle = \langle \cos^2 \theta_z \rangle = 1/3$$

Quindi:

$$A_x = A_y = A_z = A_{iso} = (1/3)k\mu_{12}^2$$

A_{iso} assorbimento di un campione isotropico misurato con luce non polarizzata.

Se la luce è incidente lungo l'asse y possiamo definire la quantità di dicroismo:

$$\Delta A = A_z - A_x$$

E il dicroismo ridotto:

$$LD_r = (A_z - A_x) / 3A_{iso} = \langle \cos^2 \theta_z \rangle - \langle \cos^2 \theta_x \rangle$$

Per un campione non orientato si ha:

$$LD_r = \left(\frac{1}{3} - \frac{1}{3} \right) = 0$$

Per un campione in cui tutti i momenti sono perfettamente orientati si ha:

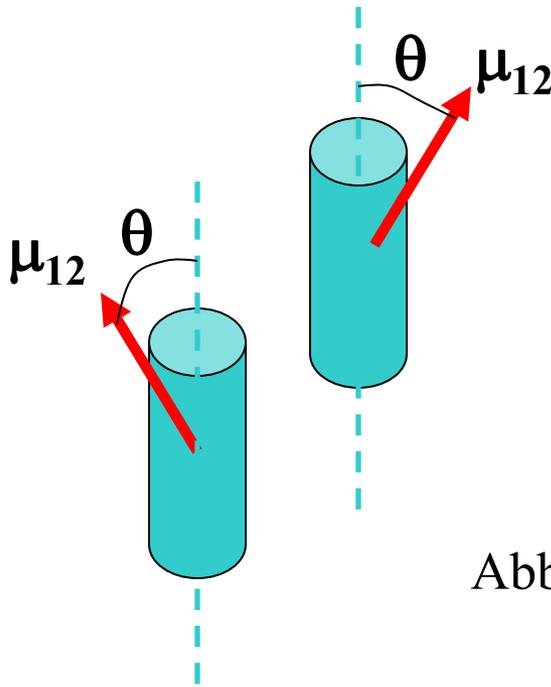
$$LD_r = (1 - 0) = 1$$

LD_r contiene l'informazione sull'orientazione della molecola.

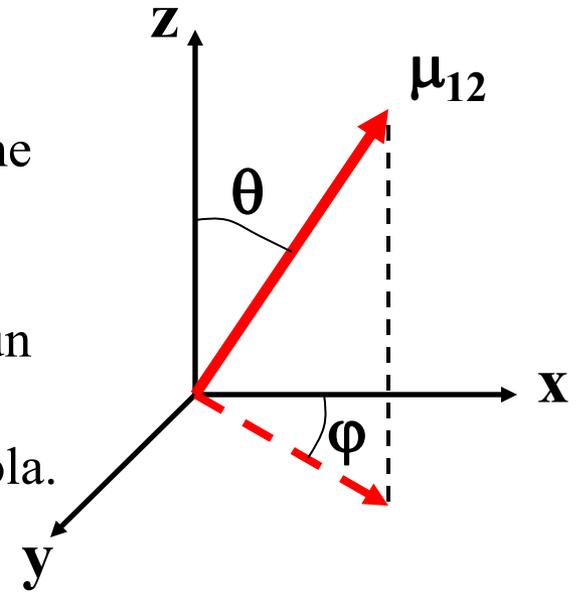
Si può ottenere l'angolo tra il dipolo di transizione e l'asse di simmetria della particella.

Il parametro non noto è il grado di orientazione per cui deve essere sviluppato un modello specifico.

Dicroismo lineare: cilindri perfettamente orientati



Campione di molecole cilindriche perfettamente orientate. Le molecole contengono un gruppo colorato, un cromoforo, che ha un dipolo di transizione μ_{12} ad un angolo θ con l'asse della molecola.



Abbiamo:

$$A_z = k\mu_{12}^2 \cos^2 \theta$$

$$A_x = k\mu_{12}^2 \int_0^{2\pi} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi d\varphi = \frac{1}{2} \mu_{12}^2 \sin^2 \theta$$

Quindi il dicroismo lineare ridotto è:

$$LD_r = \frac{(A_z - A_x)}{3A_{iso}} = \frac{\cos^2 \theta - \frac{1}{2} \sin^2 \theta}{\cos^2 \theta + \sin^2 \theta} = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

C'è un angolo θ_M per cui $LD_r=0$, anche se il campione è perfettamente orientato:

$$\cos^2 \theta_M = 1/3 \quad \text{o} \quad \theta_M = 54.7^\circ$$

: Angolo magico

Dicroismo lineare: α -elica

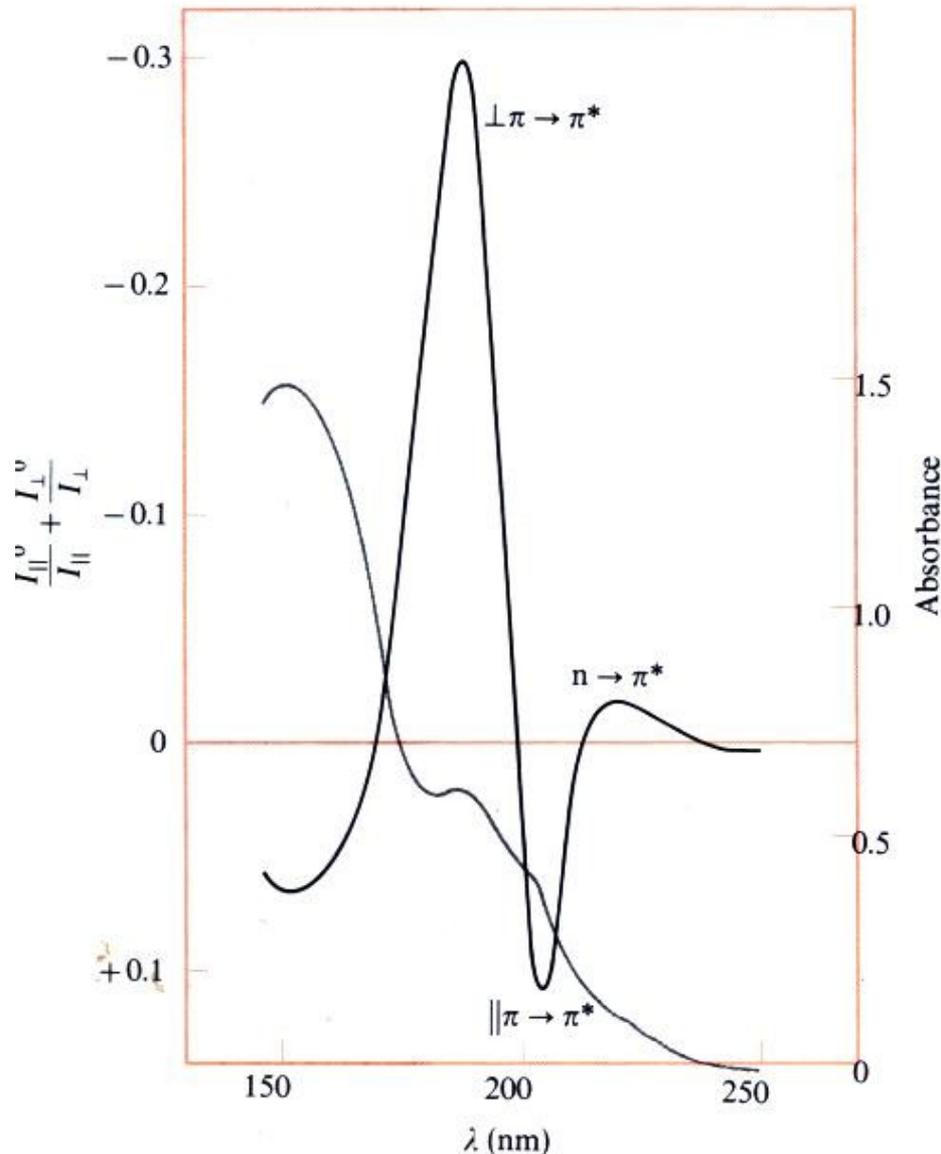
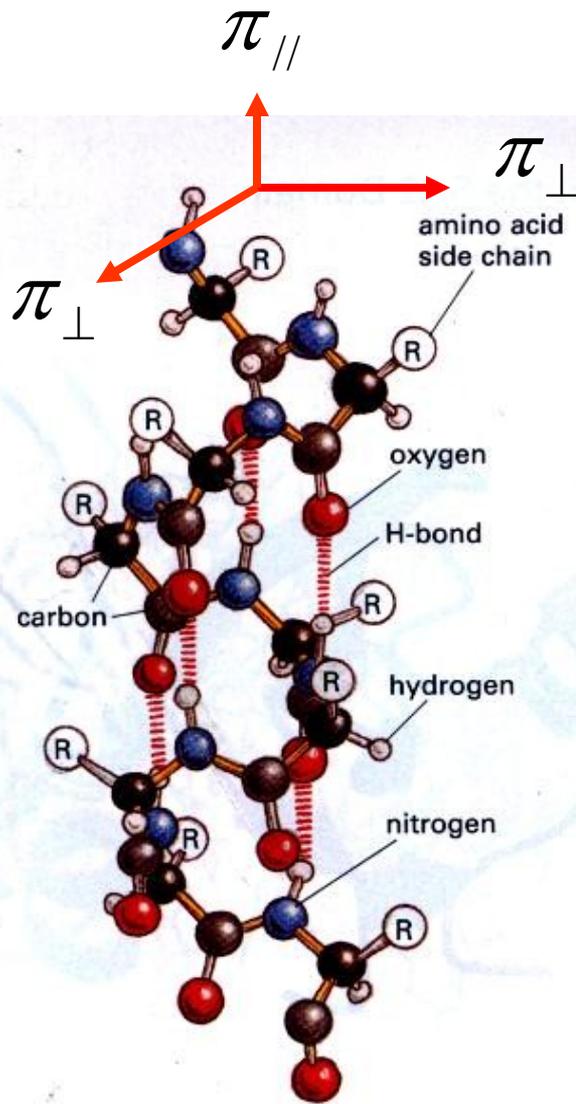


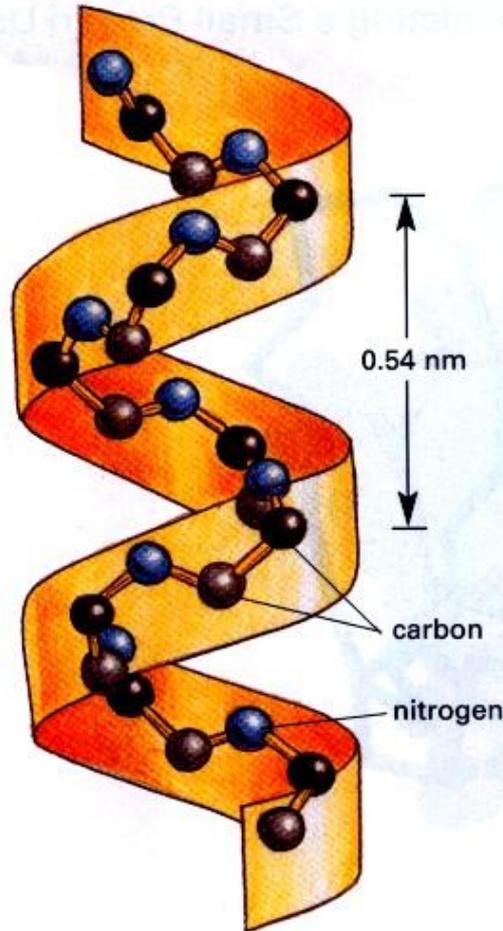
Figure 7-5

Linear dichroism (black curve) and absorbance (gray curve) of a poly-L-glutamic acid film. The polypeptide has an α -helical structure. Bands assigned to the $n \rightarrow \pi^$ and to the parallel and perpendicular polarized $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions are indicated on the dichroism spectrum. Note that this spectrum is plotted in terms of raw light intensities rather than absorbance. [After J. Brahms, J. Pilet, H. Damang, and V. Chandrasekharan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60:1130 (1968).]*

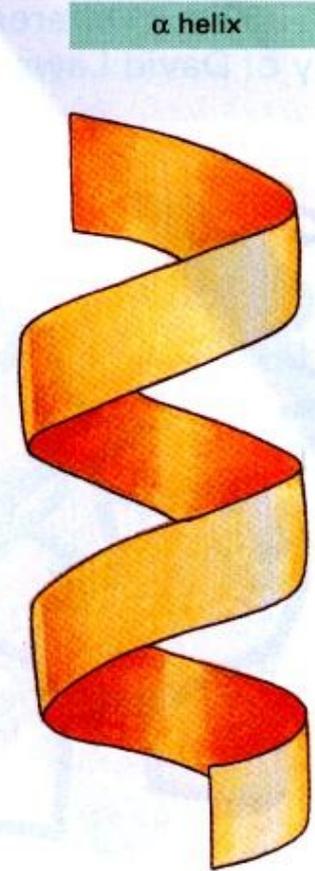
Elementi della struttura secondaria: α -elica



(A)



(B)



(C)

Dicroismo lineare: Il grado di orientazione

Generalmente non si riesce ad ottenere un'orientazione perfetta della molecola.

In un gel pressato l'orientazione può raggiungere tipicamente 10-20%, il DNA in una cella a flusso >50%, delle membrane distribuite su una superficie 30% etc.

Per cui è utile definire una funzione Φ che rappresenta il grado di orientazione

$$LD_r = \left\langle \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \right\rangle \cdot \Phi$$

In cui $\langle \dots \rangle$ indica la media degli angoli θ relativi ad una particella, e Φ è una funzione che va da 0 (no orientazione) e 1 (orientazione perfetta).

Per esempio: per un gel che è compresso sia in x e sia in y con un fattore \sqrt{n} e che si espande nella direzione z con un fattore n :

$$\Phi(n) = \frac{1}{2} [3T(n) - 1]$$

I gel possono essere compressi così che la loro lunghezza nell'asse z aumenta di 2 volte

Time-resolved linear dichroism (TRLD) spectroscopy

La **spettroscopia di dicroismo lineare risolto in tempo (TRLD)** è uno strumento per studiare le relazioni tra la struttura molecolare, la configurazione elettronica e la reattività.

In un esperimento TRLD, l'assorbimento di un fascio di luce polarizzata linearmente è usata per produrre un campione orientato di stati eccitati per fotoselezione.

Quando questo campione orientato è investito da un secondo fascio di luce polarizzata linearmente, si misura il dicroismo lineare.

L'intensità iniziale del dicroismo lineare è relativo all'angolo tra il campo elettrico ed il momento di transizione del campione. Il tempo di decadimento del dicroismo lineare è legato alla diffusione rotazionale degli stati eccitati.

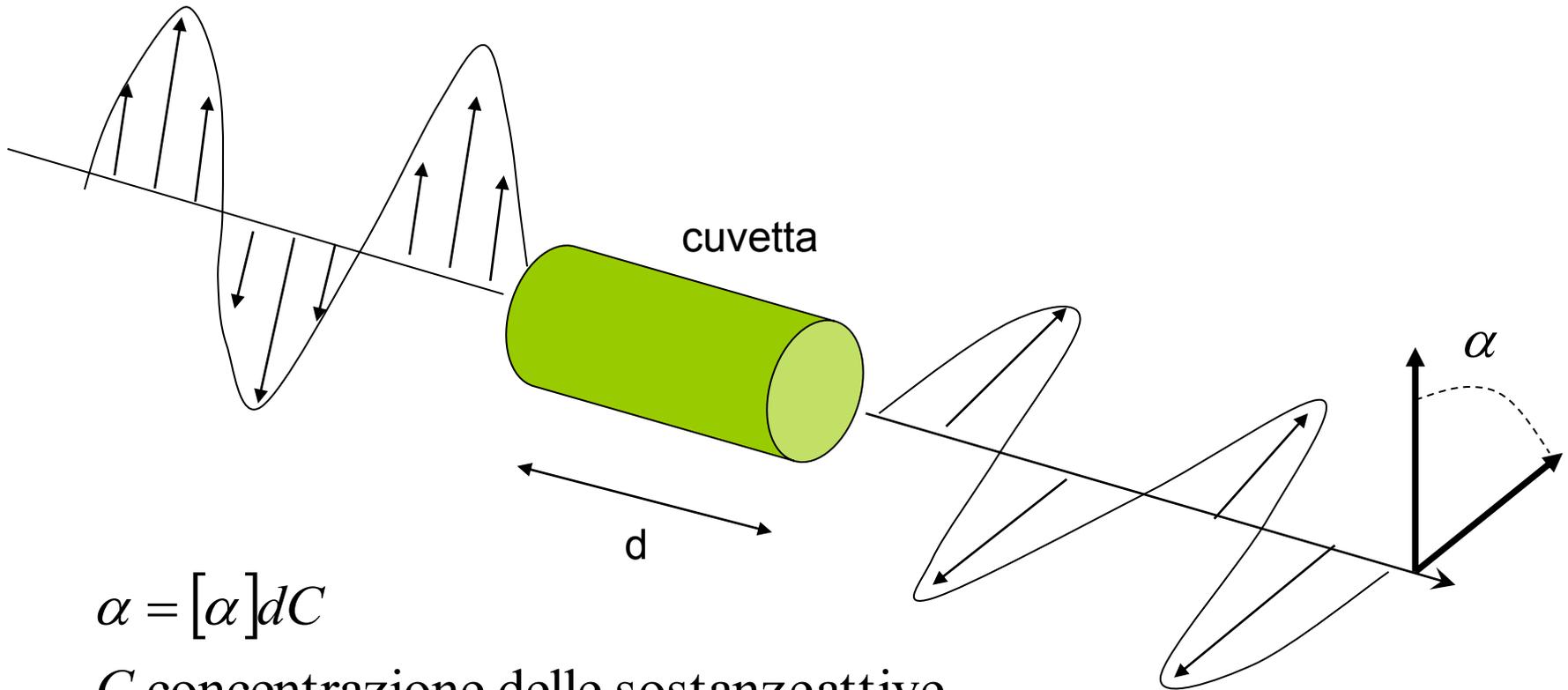
• ***Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.1997.26:327–55***

• ***Annual Review of Biophysics and Bioengineering. Volume 5, Page 511-560, Jun 1976***

OR and CD

- OR rotazione ottica
 - Misura la quantità di rotazione ad una lunghezza d'onda fissata
- CD dicroismo circolare
 - Misura la differenza nell'assorbimento tra luce polarizzata circolare destrorsa e sinistrorsa a diverse lunghezze d'onda

Rotazione ottica



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

C concentrazione delle sostanze attive

d spessore della cuvetta

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

Rotazione ottica

La rotazione ottica consiste nella differenza degli indici di rifrazione tra luce polarizzata circolarmente a sinistra e a destra.

Ogni indice di rifrazione è il risultato di una oscillazione di dipolo indotto: ogni oscillatore si comporta tipicamente rispetto alla frequenza.

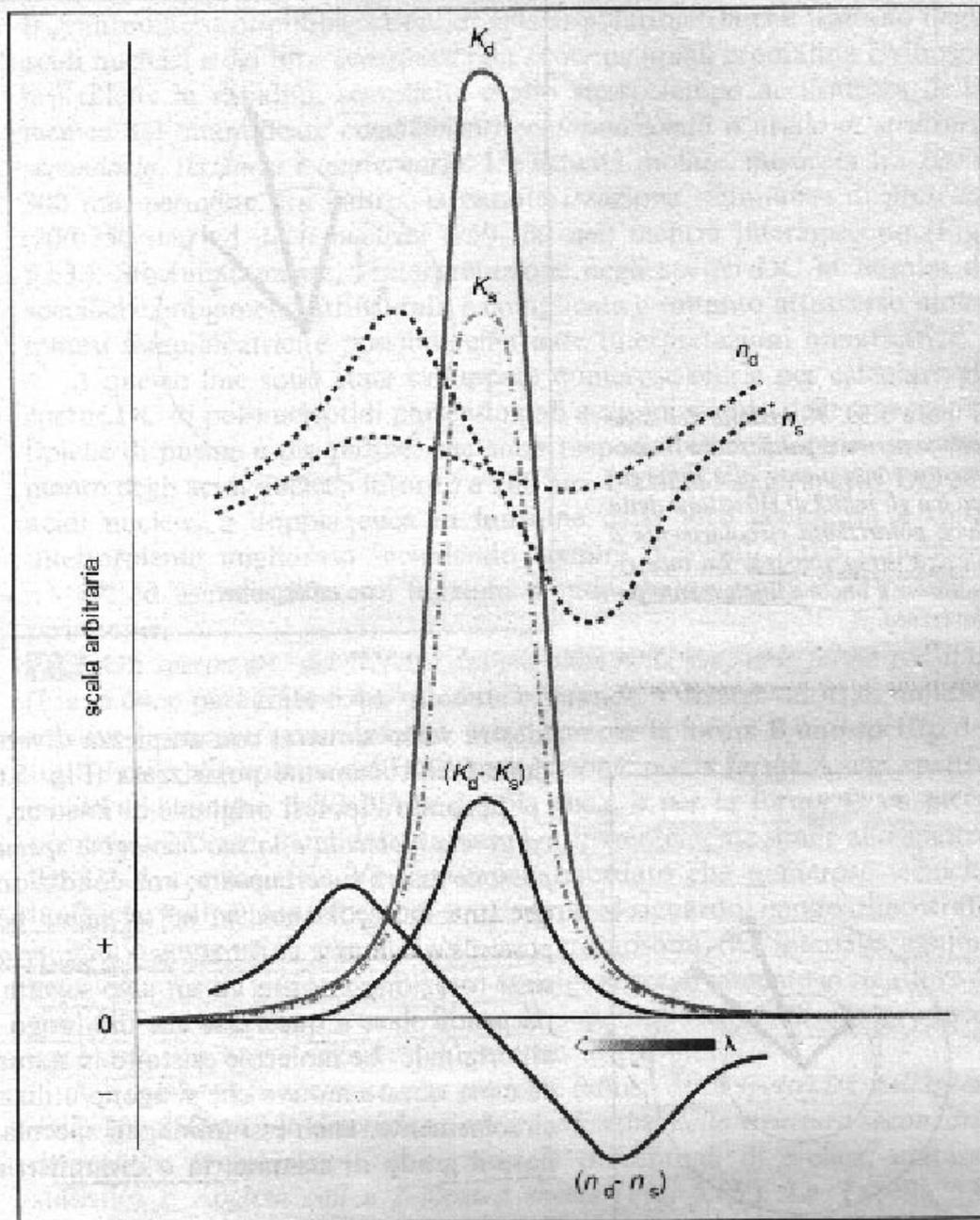
Aumentando la frequenza, la fase viene persa e addirittura a frequenze alte si sfasa anche di 180° .

In rotazione ottica si ha un vero e proprio cambio di segno di rotazione, quindi a grandi lunghezze d'onda se la rotazione positiva passa per zero per poi diventare negativa a lunghezze d'onda corte.



Effetto Cotton

Figura 5.57. Effetto Cotton, che collega l'ORD — proporzionale alla differenza negli indici di rifrazione della luce polarizzata circolarmente a destra (n_d) contro quella a sinistra (n_s) — al dicroismo circolare, proporzionale alla differenza nei relativi coefficienti di estinzione ($K_d - K_s$). Il dicroismo circolare è massimo laddove ORD va a zero.



Rotazione molare

$$[m'] = [\alpha] \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M}{100}$$

$[\alpha]$ rotazione specifica

n indice di rifrazione del mezzo

M peso molecolare del soluto

- rotazione espressa in moli piuttosto che in peso molecolare
- correzione $(3/n^2+2)$ di un piccolo effetto della polarizzabilità del mezzo sull'effettivo campo subito dalle molecole

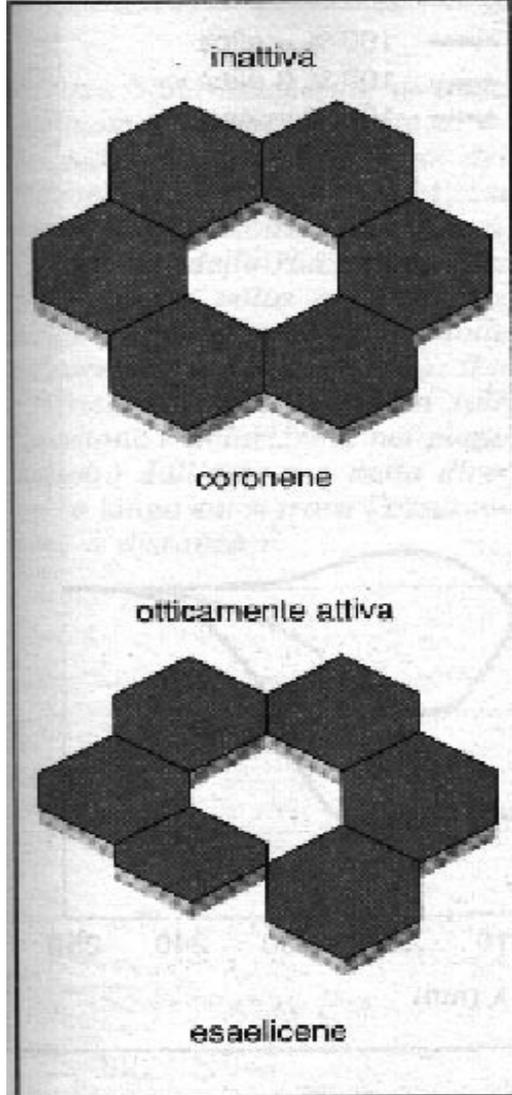


Figura 5.62. Due sostanze simili, una delle quali otticamente attiva (esaelicene) e l'altra inattiva (coronene). In quest'ultima infatti, dotata di un piano di simmetria, il momento elettrico e magnetico sono perpendicolari.

Per dispersione ottica rotatoria risolta in tempo:

***REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS
76, 083120 (2005)***

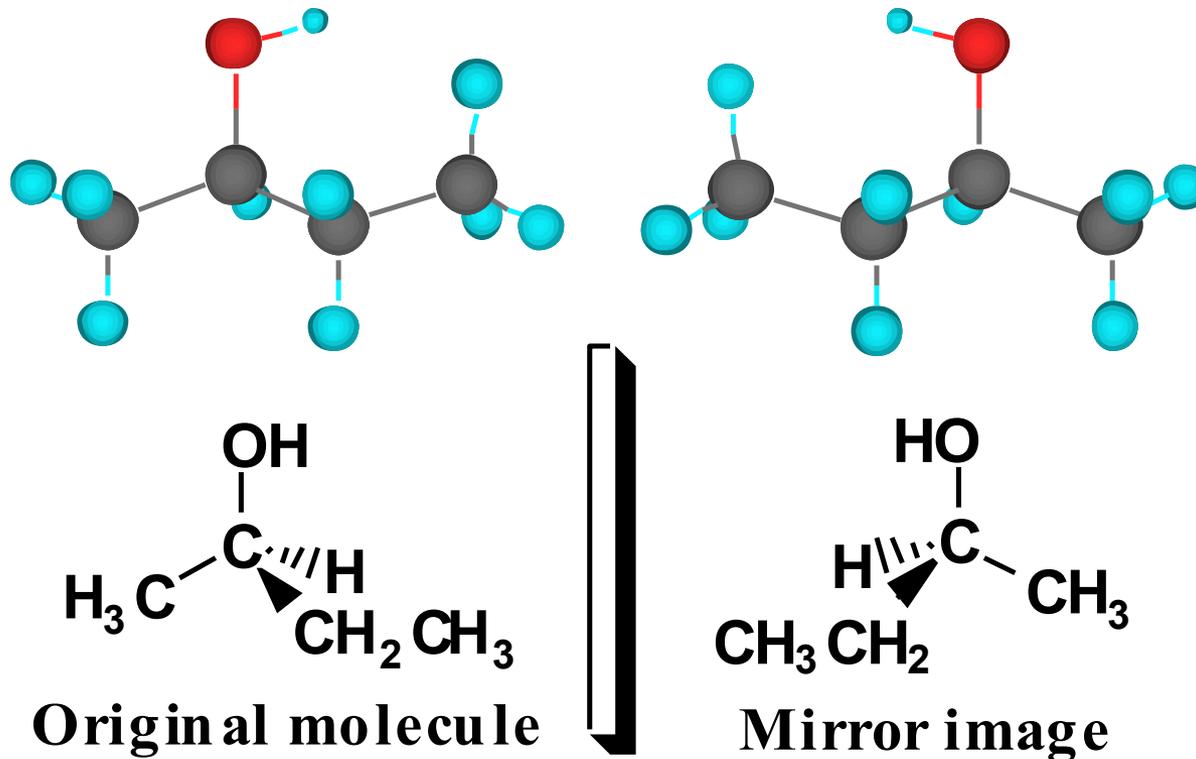
Esempio di rotazione ottica: cromatografia chirale

Cromatografia chirale : tecnologia per rivelare molecole chirali usando dispositivi ottici

LED a lunghezza d'onda singola

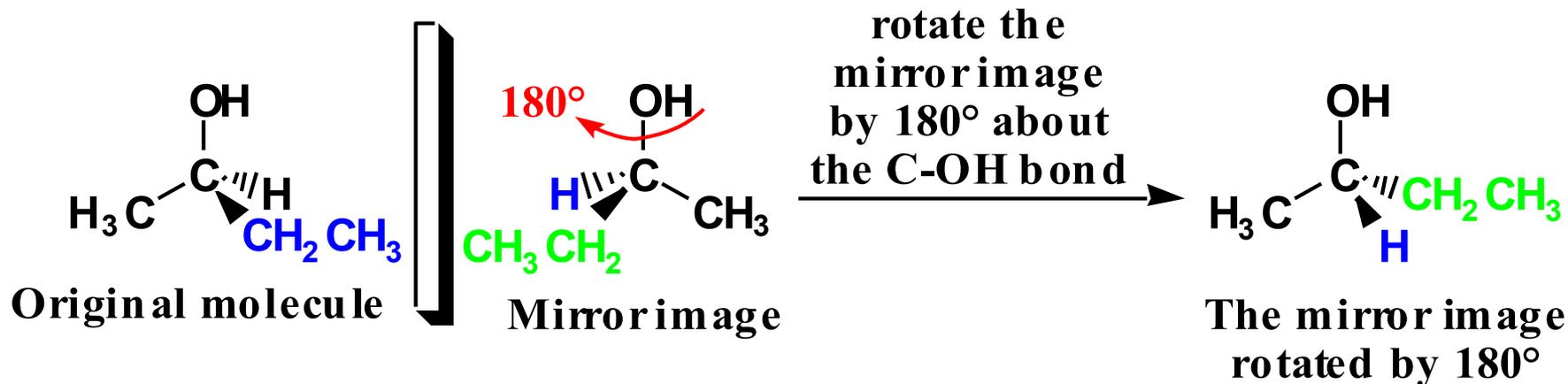
Enantiomeri

- **Enantiomeri:** immagini riflesse non sovrapponibili
 - Come esempio di una molecola che esiste come un paio di enantiomeri: 2-butanolo



Enantiomeri

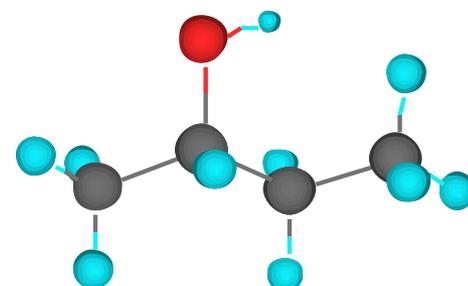
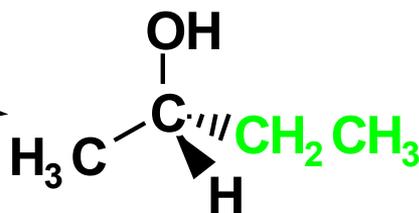
- Un modo per vedere che l'immagine riflessa del 2-butanolo non è sovrapponibile all'originale è di ruotare l'immagine riflessa



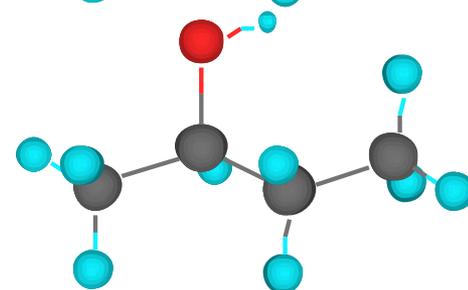
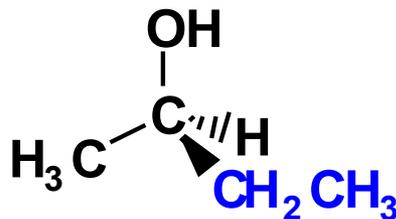
Enantiomeri

- Si cerchi di sovrapporre una molecola sopra l'altra in modo che tutti i gruppi e legami possano sovrapporsi

The mirror image
turned by 180°



The original molecule



- L'immagine originale e riflessa non sono sovrapponibili.
- Sono molecole diverse con proprietà diverse
- Sono dette **enantiomeri** (immagini riflesse non sovrapponibili)

Enantiomeri

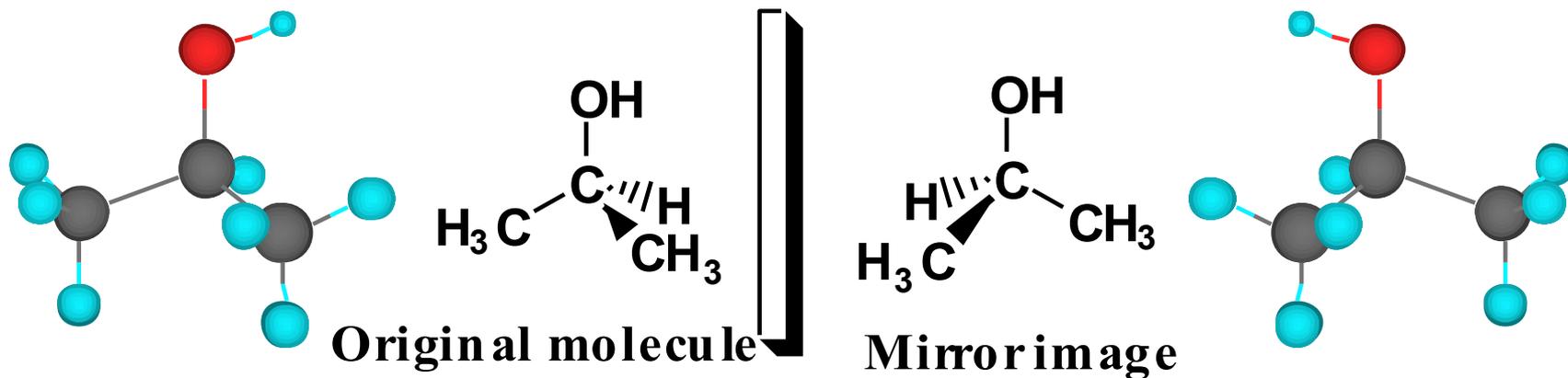
- Gli oggetti che non sono sovrapponibili sulle loro immagini riflesse sono dette chirali
- La causa maggiore di enantiomerismo in molecole organiche è la presenza di un atomo di carbonio con quattro gruppi diversi legati ad esso. Un carbonio con quattro diversi gruppi legati ad esso è detto uno stereocentro.

Enantiomeri

- Se un oggetto e la sua immagine riflessa sono sovrapponibili, non c'è enantiomerismo

Diciamo che questo oggetto è **achirale** (senza chiralità)

- Come esempio di una molecola achirale : 2-propanolo

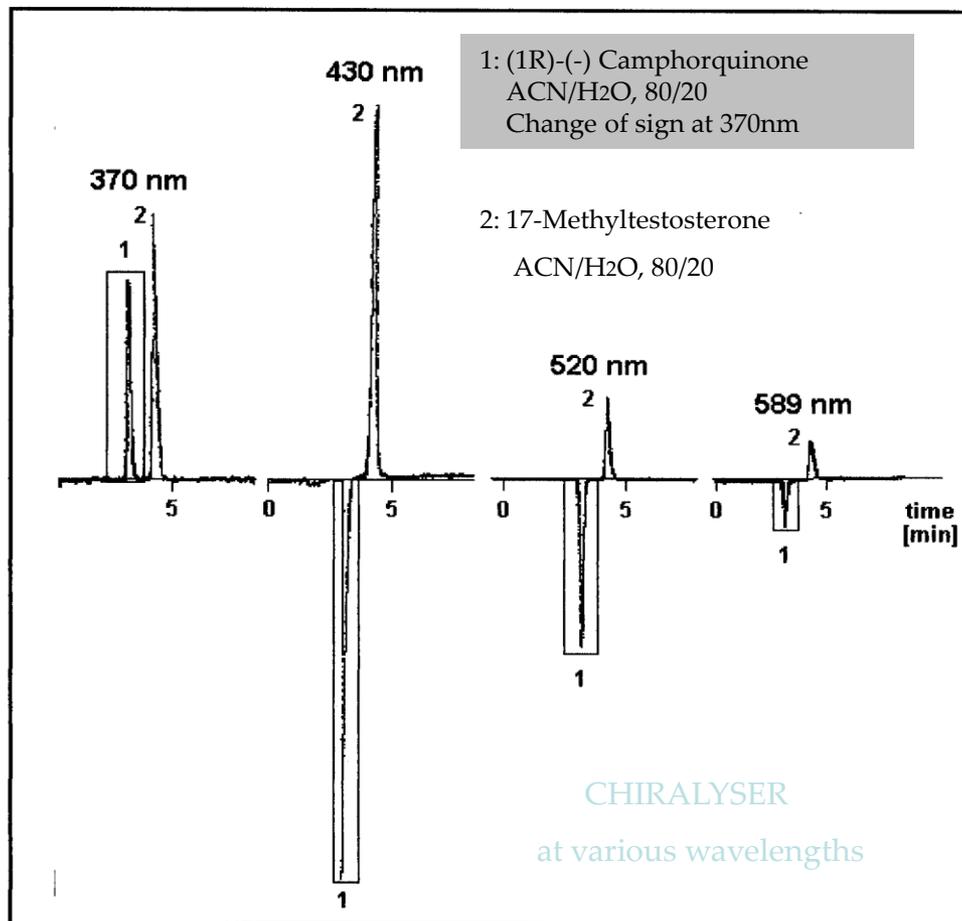


Polarimetria e Chiral Detection

- Identifica la chiralità di una molecola con segno di rotazione positivo o negativo.
- Rivela solo composti otticamente attivi.

Rotazione ottica in funzione della lunghezza d'onda

A 430nm da un LED blu ad alta potenza, la massima dispersione ottica rotatoria si ottiene con effetti di assorbimento minimi.



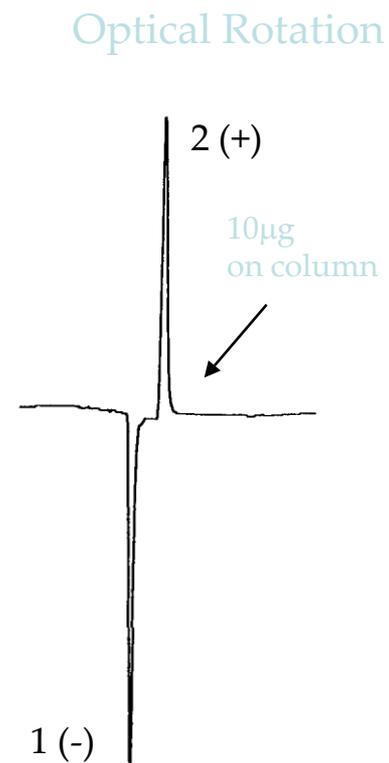
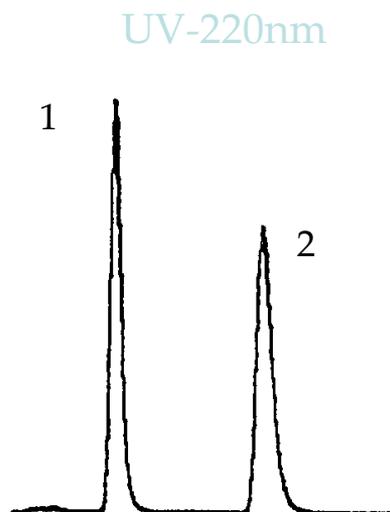
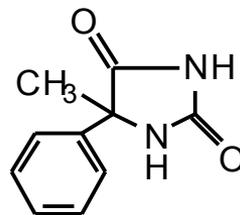
UV vs Optical Rotation

Analyte: 5-Methyl-5-phenylhydantoin

Column: CHIROBIOTIC T, 250x4.6mm

Mobile Phase: 100% Methanol

Flow Rate: 1.0 mL/min.



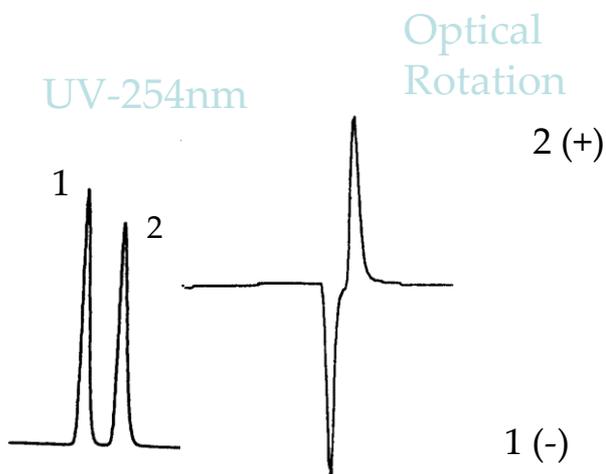
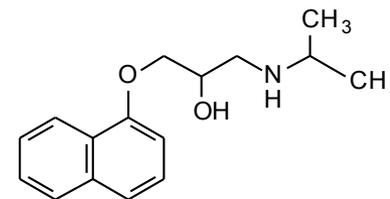
Identifying Reversal of Elution Order

Analyte: Propranolol

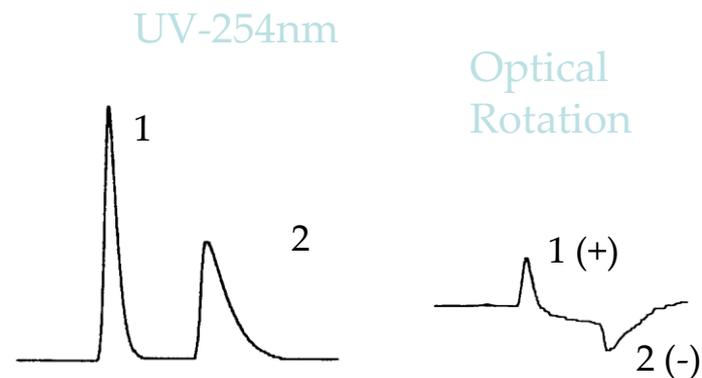
Column: CHIROBIOTIC T and CHIROBIOTIC TAG, 250x4.6mm

Mobile Phase: 100/0.1%wt.:MeOH/ATFA

Flow Rate: 1.0 mL/min.



CHIROBIOTIC T



CHIROBIOTIC TAG

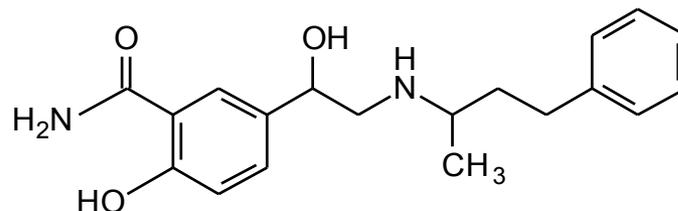
Identification of Enantiomeric Pairs

Analyte: Labetalol

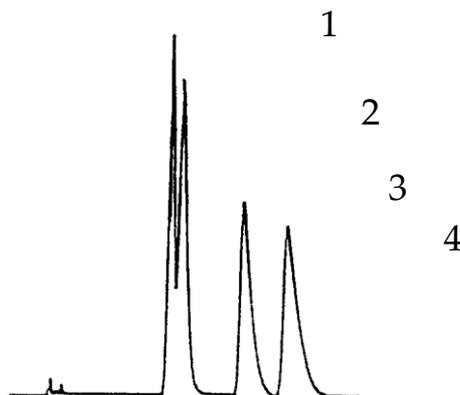
Column: CHIROBIOTIC V, 250x4.6mm

Mobile Phase: 100/0.1%wt.:MeOH/AFTA

Flow Rate:1.0 mL/min.



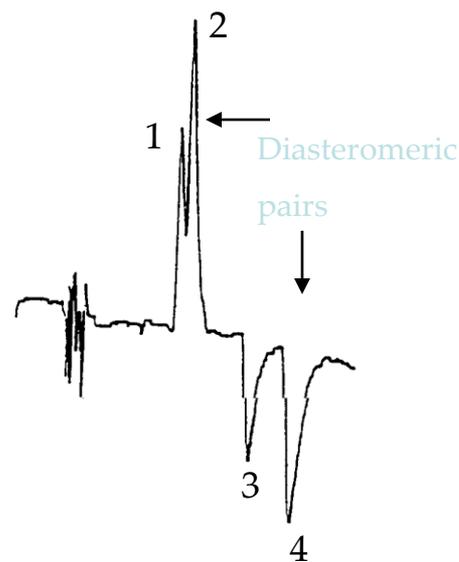
UV-254nm



Peak 1 (+);Peak 3 (-) Enantiomers

Peak 2 (+);Peak 4 (-) Enantiomers

Optical
Rotation



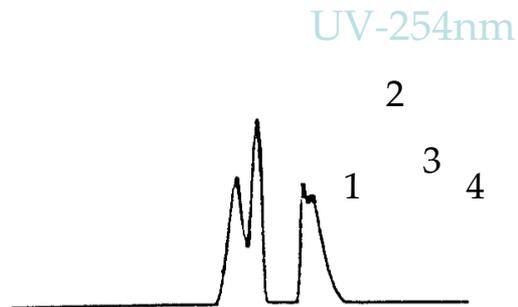
Identification of Enantiomeric Pairs

Analyte: Unknown Sample (2 chiral centers)

Column: CHIROBIOTIC V

Mobile Phase: 100/0.15/0.05; MeOH/HOAc/TEA

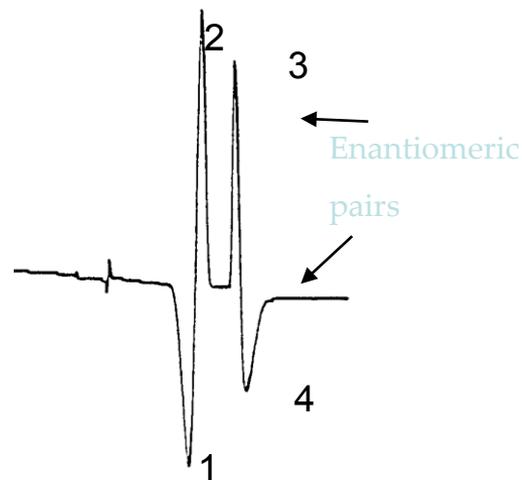
Flow Rate: 1.0 mL/min.



Peak 1(-); Peak 2 (+) Enantiomers

Peak 3 (+); Peak 4 (-) Enantiomers

Optical
Rotation

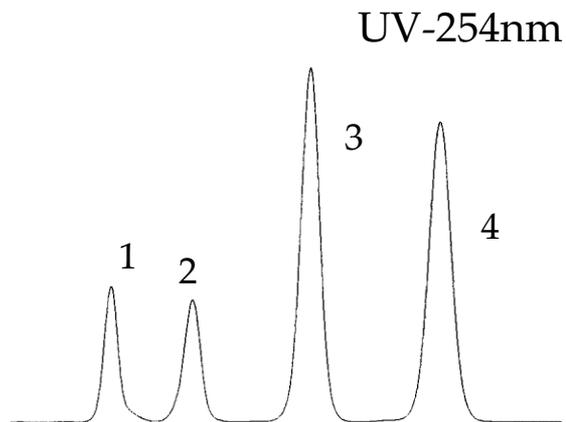


Determination cis/trans Enantiomers

Column: CYCLOBOND I 2000 RSP, 250x4.6mm

Mobile Phase: 40/60: ACN/5mM NH₄OAc, pH 3.8

Flow Rate: 0.8 mL/min.



Optical Rotation



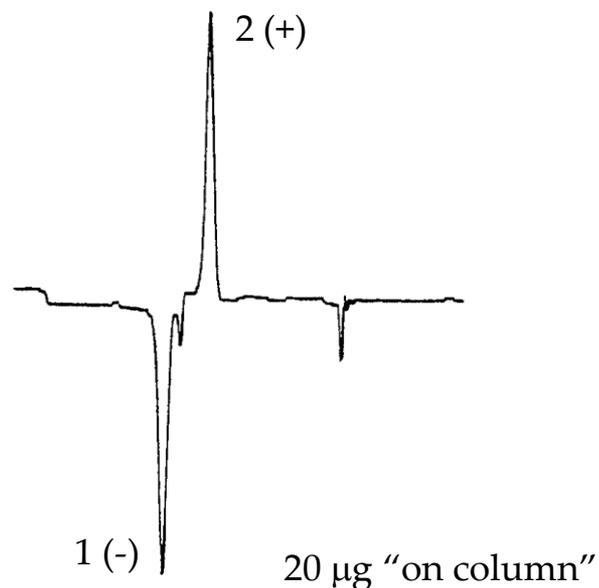
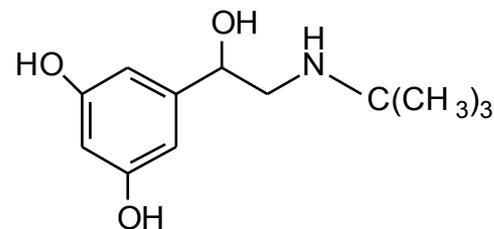
Optical Rotation of Amino Alcohol

Analyte: Terbutaline

Column: CHIROBIOTIC T, 250x4.6mm

Mobile Phase: 100/0.1%w: MeOH/ATFA

Flow Rate: 1.0 mL/min.



Determining Rotation of Analyte with No UV

Analyte: Carnitine

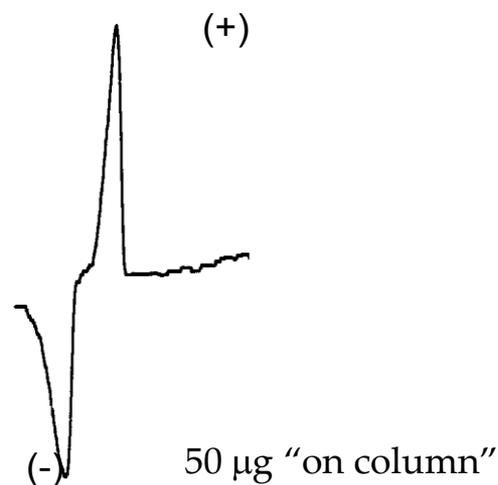


Column: CHIROBIOTIC TAG, 250x4.6mm

Mobile Phase: 85/15: MeOH/20mM NH_4OAC , pH 6.0

Flow Rate: 1.0 mL/min.

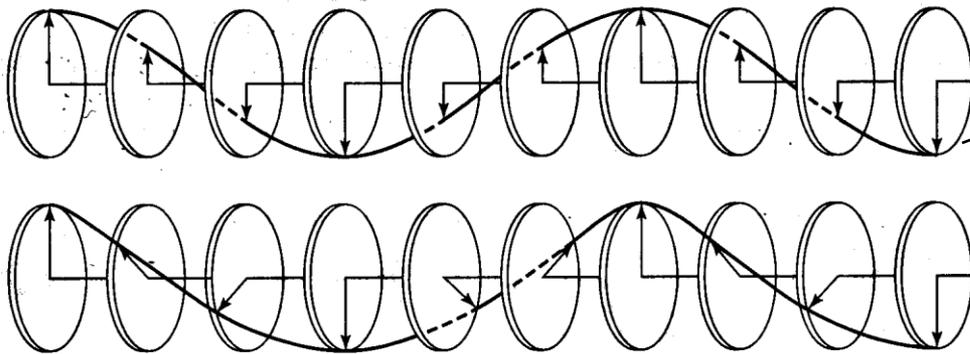
Polarimetry, unlike circular dichroism does not require that the analyte have a detectable UV wavelength. This makes it a very useful tool for detecting non-aromatic amino acids and other similar substances.



"Dicroismo" definisce l'assorbimento di luce dipendente dalla direzione.

Dicroismo lineare è l'assorbimento differenziale tra la luce polarizzata parallela e perpendicolare.

Birifrangenza: l'indice di rifrazione dipende dalla direzione



Vettore E di luce polarizzata linearmente:
Direzione costante, ampiezza modulata

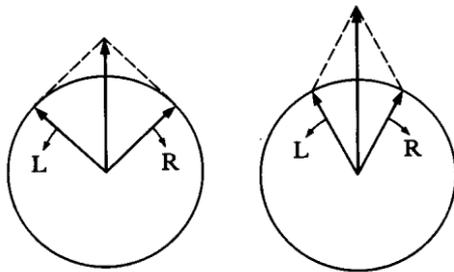
Vettore E di luce polarizzata circolarmente:
Ampiezza costante, direzione modulata

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

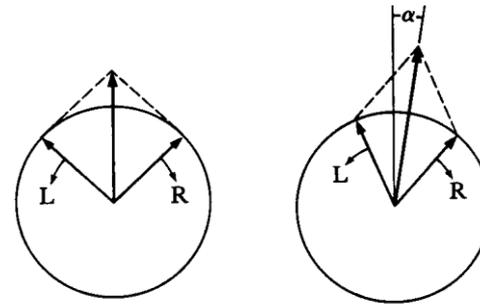
Manifestata da due distinti ma differenti fenomeni:

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

dicroismo circolare



Otticamente inattiva, $n_L = n_R$

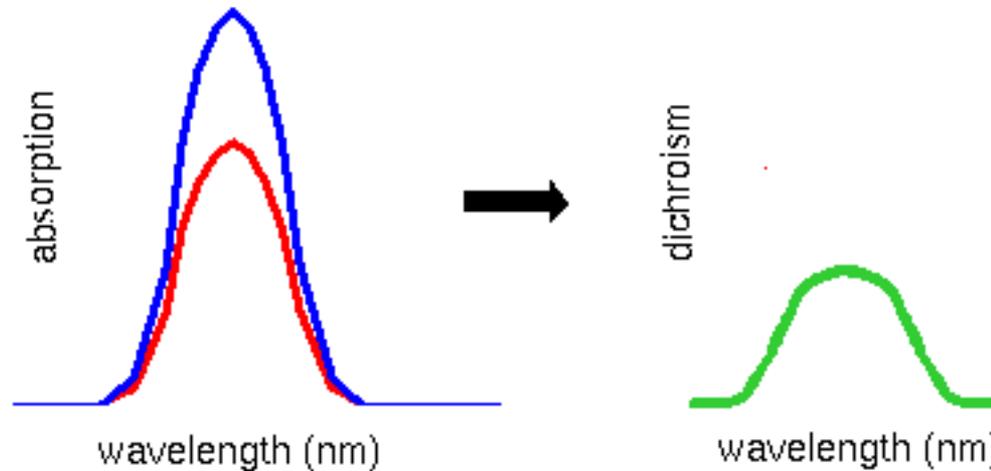


Otticamente attiva, $n_L \neq n_R$

Dispersione ottica rotatoria ORD

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

Dicroismo Circolare



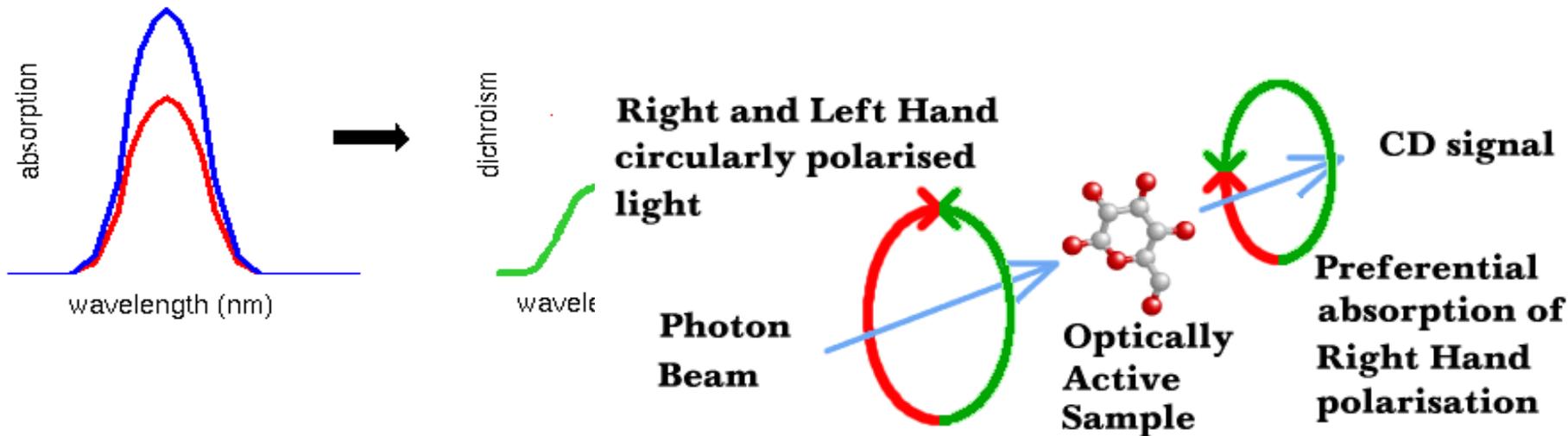
- *Dicroismo circolare* è la differenza tra l'assorbimento della luce polarizzata circolarmente di sinistra e di destra ed è misurata come una funzione della lunghezza d'onda.
- Si sottrae lo spettro relativo alla polarizzazione a sinistra e destra

Il significato di CD

- Il dicroismo circolare (CD) è osservato quando la materia assorbe diversamente luce polarizzata circolarmente a sinistra o a destra.
(Spettropolarimetro)
- Gli spettri di CD sono differenti per tipi distinti di strutture secondarie presenti in peptidi, proteine e acidi nucleici
- Le analisi degli spettri CD possono quindi dare informazioni sulla struttura secondaria delle molecole biologiche

Dicroismo Circolare

- CD misura la **differenza** tra l'assorbimento di luce polarizzata circolarmente **sinistrorsa** e **destrorsa** :

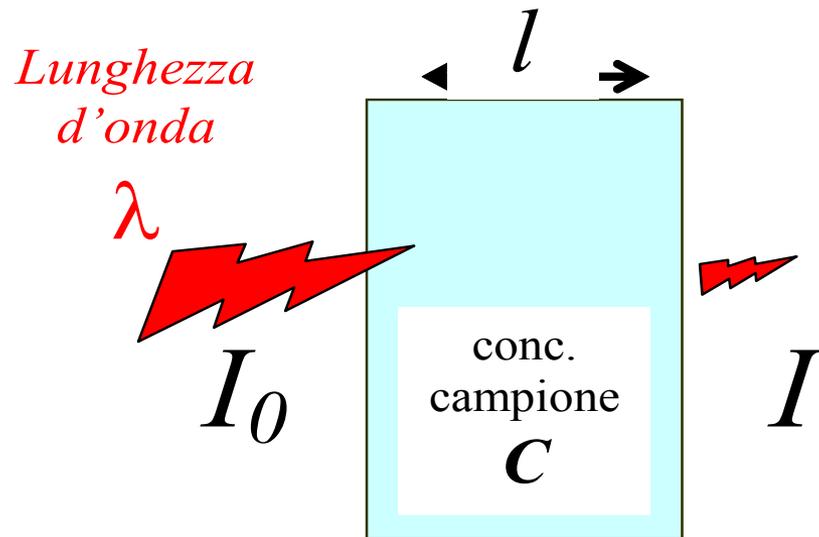


Questo è misurato in funzione della lunghezza d'onda e la differenza è molto piccola ($\ll 1/10000$ del totale). Dopo aver attraversato il campione i fasci Sinistra e Destra hanno ampiezze differenti e la combinazione dei due differenti fasci dà una luce polarizzata ellitticamente.

Quindi il CD misura l'ellitticità della luce trasmessa (la luce non viene assorbita)

Spettroscopia di assorbimento

- Assorbanza $A = \log(I_0/I)$
- Legge di Beer-Lambert :
$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lc$$



- Maggiore è la concentrazione o la lunghezza del passo maggiore è l'assorbimento

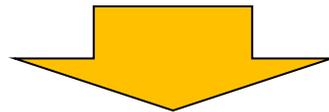
- CD misura la **differenza** tra l'assorbimento di luce polarizzata circolarmente a **sinistra** e a **destra** :

$$\Delta A(\lambda) = A_R(\lambda) - A_L(\lambda) = [\varepsilon_R(\lambda) - \varepsilon_L(\lambda)]lc$$

oppure

$$\Delta A(\lambda) = \Delta\varepsilon(\lambda)lc$$

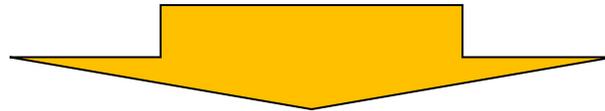
- $\Delta\varepsilon$ è la differenza nei coefficienti di estinzione tipicamente $< 10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Ordine di grandezza di ε attorno $20\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$



- Quindi il segnale CD è una piccola differenza tra due segnali grandi.

Sensibilità del dicroismo circolare

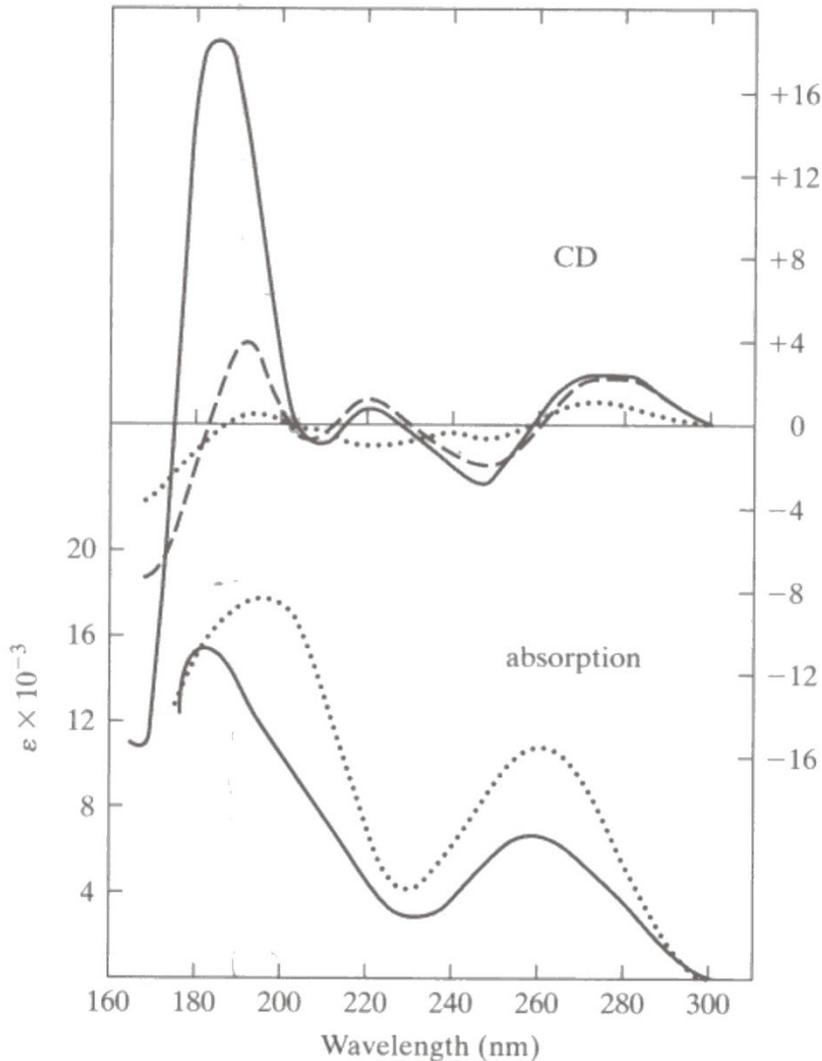
- La differenza tra l'assorbanza di sinistra e destra $\varepsilon_L - \varepsilon_R$ è molto piccolo (circa 0.0001 di unità di assorbanza)



- Strumenti molto precisi
- I dati vengono espressi come ellitticità, θ_r

$$\theta_r = \frac{2.303\pi}{720} (\varepsilon_s - \varepsilon_d) / \text{deg}$$

Il segnale CD è una piccola differenza tra due grandi segnali originari



- CD of *E. Coli* DNA

— Nativo

- - - Denaturato

- *per esempio* a 260 nm

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

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

- *p.e.* il segnale CD è lo 0.05% dell'originale

Forza rotazionale ed ellitticità molare

$$R = \frac{(2.303)(3000)hc}{32\pi^3 N} \int \frac{\Delta\varepsilon}{\lambda} d\lambda$$

R forza rotazionale :

coefficiente di estinzione integrato
sulla banda di assorbimento

$$[\theta] \cong (\varepsilon_s - \varepsilon_d) dC \quad \underline{\text{ellitticità molare}}$$

d cammino ottico

C concentrazione molare della sostanza

- CD viene osservato solo a lunghezze d'onda dove le assorbanze delle componenti destrorse e sinistrorse della luce polarizzata non sono zero cioè nelle **bande di assorbimento**.
- Il CD avviene per l'interazione tra dipoli di transizione diversi che effettuano l'assorbimento.
Siccome questo dipende dall'orientazione relativa dei diversi gruppi nello spazio il segnale è **molto sensibile alla conformazione**.
- Quindi in generale **$\Delta\varepsilon$ è molto più dipendente** dalla conformazione di ε .

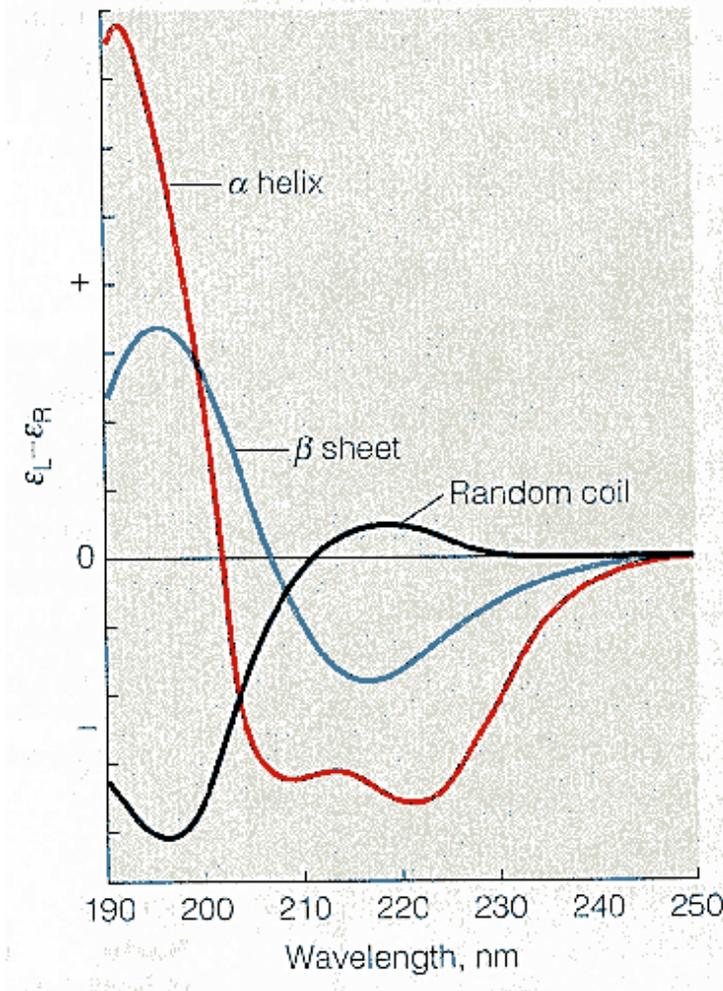
Tipi di CD

- CD elettronico: $\lambda < 240$ nm regione dominata dall'assorbimento di legami peptidici ed è sensibile ai cambiamenti nella struttura secondaria.
- CD nel vicino UV (catene laterali trp)
- CD nel visibile
- CD nelle regioni infrarossi.

Vantaggi del dicroismo circolare

- Sensibile alla struttura secondaria peptidica
- Spettri molto differenti per:
 - α -helix (α elica)
 - β -sheet (β foglietto)
 - “random coil”
- I contributi sono sommabili
 - Si può determinare misurando la soluzione la quantita' di α -helix, β -sheet e “random coil”

Spettri di dicroismo circolare



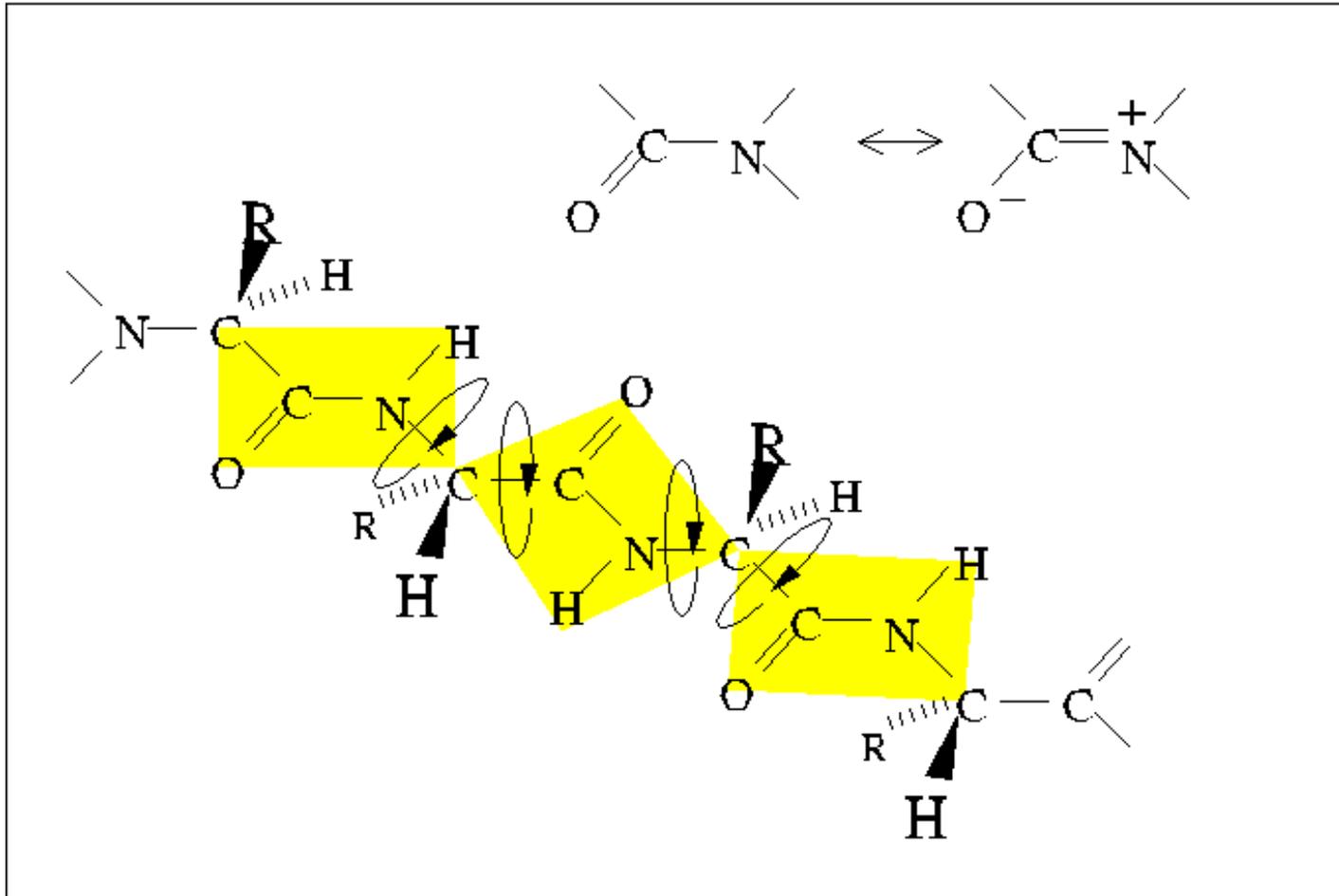
- (assorbimento di luce polarizzata circolarmente a sinistra e a destra $\epsilon_L - \epsilon_R$) di elementi di struttura secondaria in funzione della lunghezza d'onda
- Lo spettro CD di una proteina in soluzione può essere risolta nei tre elementi α -helix, β -sheet and “random coil”

Dicroismo Circolare

Il Dicroismo circolare è usato per:

- Determinazione della struttura delle proteine.
- Cambiamenti strutturali indotti, per esempio pH, calore & solvente.
- Folding/unfolding di proteine.
- Collegamento al legante.
- Aspetti strutturali di acidi nucleici, polisaccaridi, peptidi, ormoni e altre piccole molecole.

- Il legame peptidico è asimmetrico & sempre otticamente attivo.
- Ogni attività ottica da cromofori di catene laterali è indotto & risulta da interazioni con gruppi vicini asimmetrici.



Parametri sperimentali

Parametri iniziali tipici:

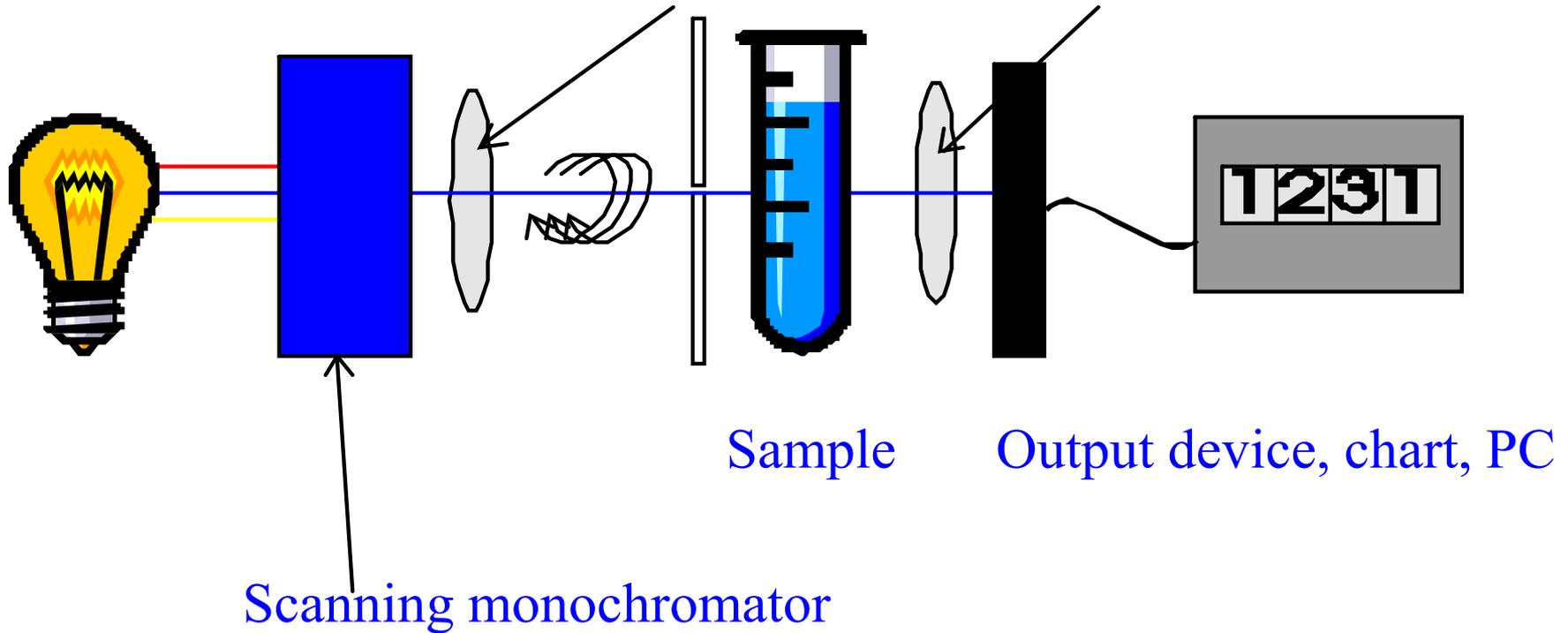
- *Concentrazione della proteina: 0.5 mg/mL*
- *Lunghezza della cuvetta: 0.5 mm*
- *Stabilizzatori (Ioni metallici, etc.).*
- *Concentrazione del buffer : 5 mM o piu' basso possibile pur mantenendo la stabilita' della proteina*

Interpretazione

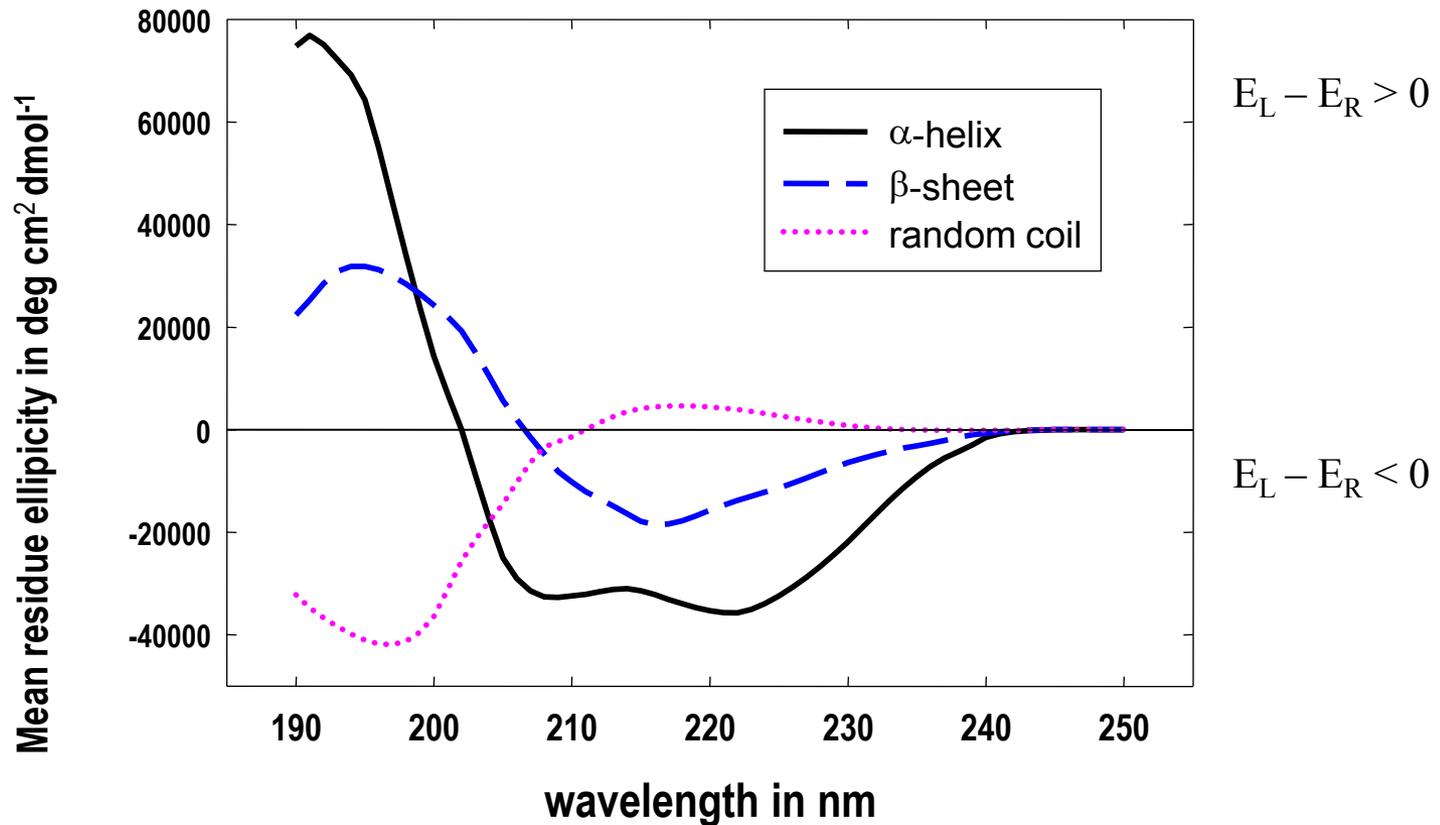
- Spettri standard per
 - α -helix, β -sheet, “random coil”
- Model data sets
 - Greenfield and Fasman, 1969
 - Chen, Yang and Chau, 1974
- Si fittano gli spettri e si hanno le percentuali di α -helix, β -sheet, “random coil”

Apparato CD

Electro-optical polariser and detector



Segnali CD per diverse strutture secondarie

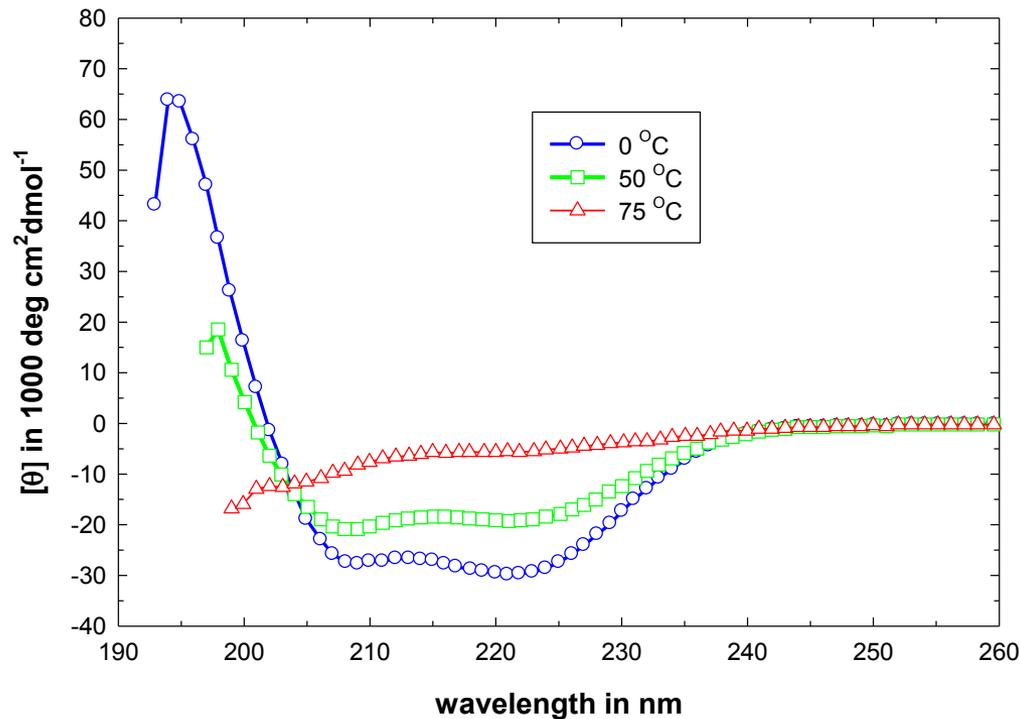


- Queste sono curve “Fasman” standard per polilisina in diversi ambienti.

I segnali CD sono sensibili alla struttura secondaria

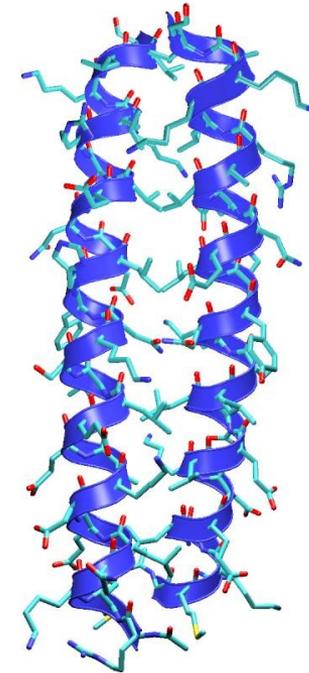
CD signals for GCN4-p1

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



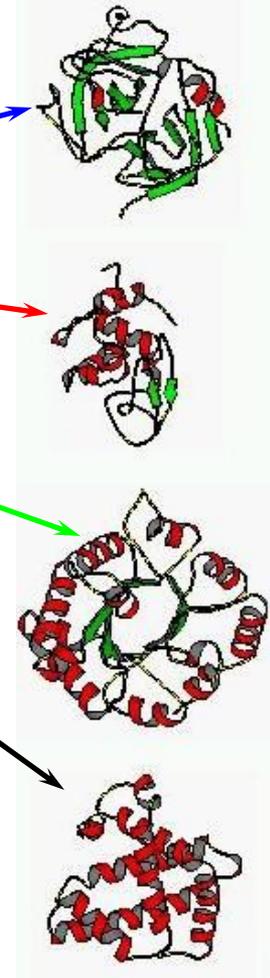
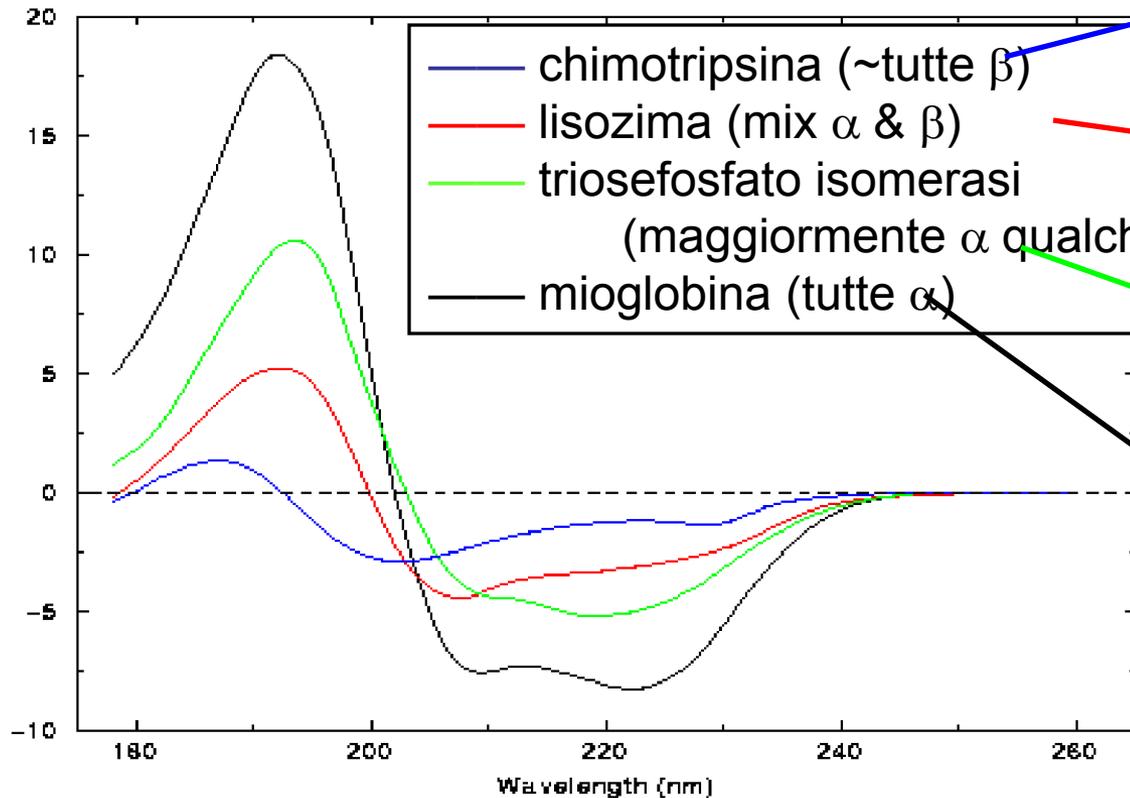
Spettro CD per una α -elica

- GCN4-p1 è un coiled-coil:



- 100% helical a 0°C
- Ad alte temperature “fonde” a random coil

Il segnale CD per una proteina dipende dalla sua struttura secondaria



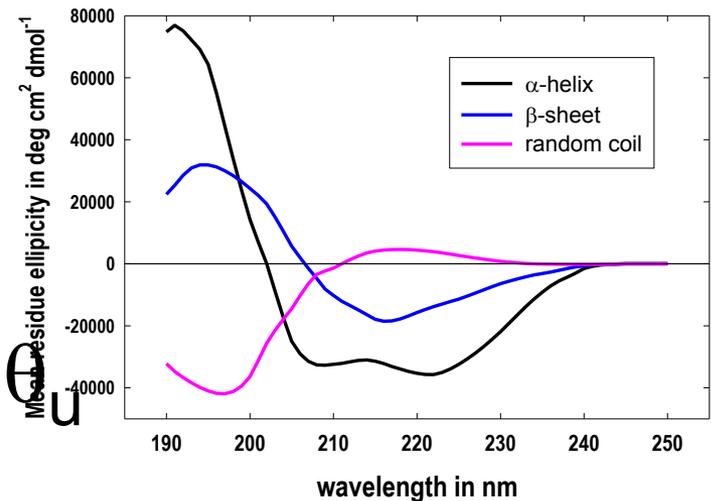
cambio progressivo di θ_{222} con l'aumento di elica da chimotripsina a mioglobina

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

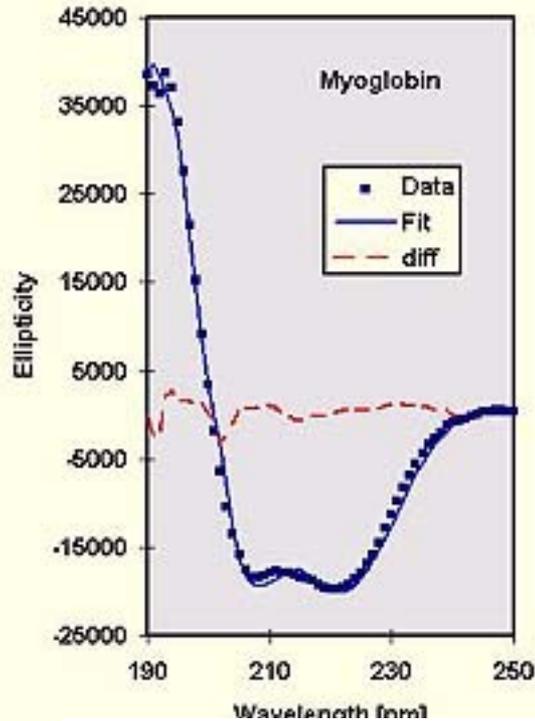
- Fittare la curva sconosciuta θ_u ad una combinazione di curve standard.
- Nel caso più semplice usare gli standard di Fasman

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

- variare x_α , x_β and x_c per avere il fit migliore di θ_t su θ_u mentre $x_\alpha + x_\beta + x_c = 1.0$



Esempio di fitting : mioglobina



- In questo caso:

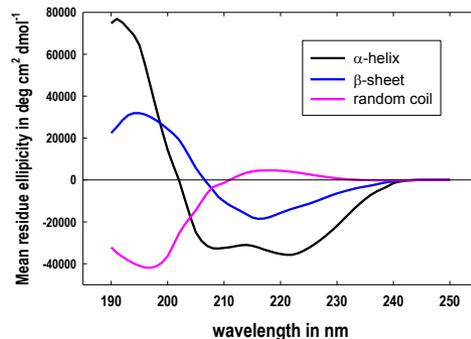
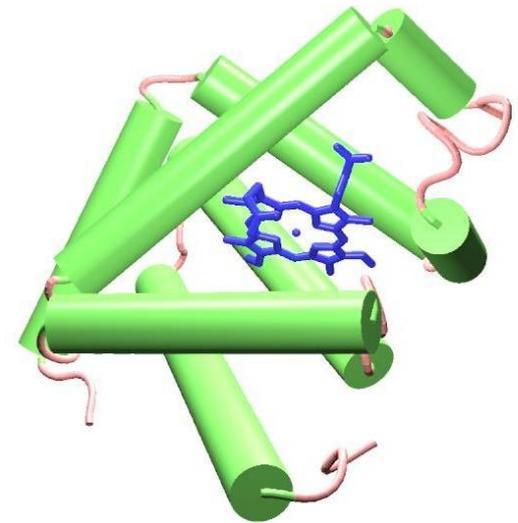
$$\square \theta_t = x_\alpha \theta_\alpha + x_\beta \theta_\beta + x_c \theta_c$$

- Il fitting migliore :

$$x_\alpha = 80\%$$

$$x_\beta = 0\%$$

$$x_c = 20\%$$

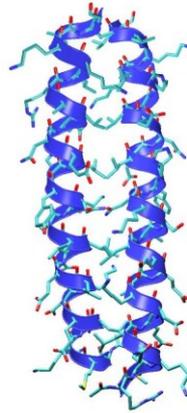
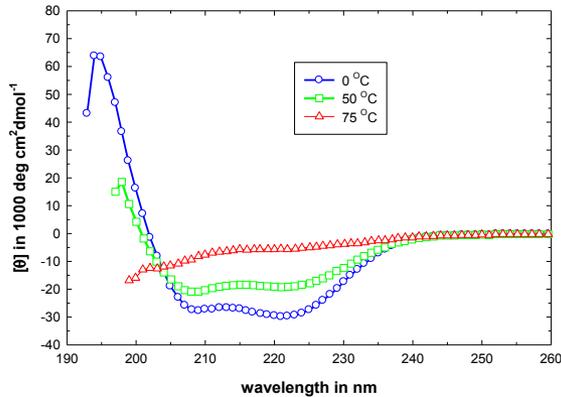


- Che è ben in accordo con la struttura 78% helix, 22% coil

Esempio 2 : GCN4-p1

CD signals for GCN4-p1

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



- A 0°C 100% helix
- A 75°C 0% helix
- A 50°C?

$$\square \theta_t = x_0 \theta_0 + x_{75} \theta_{75}$$

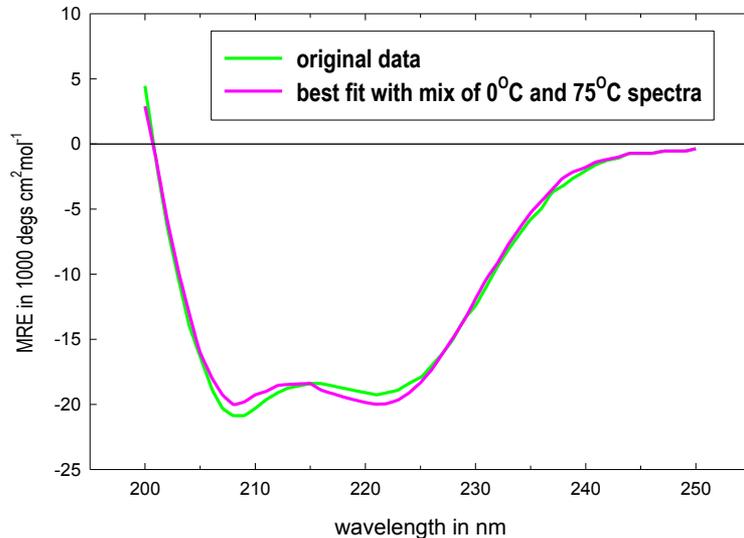
- Best fit:

$$x_0 = 50\%,$$

$$x_{75} = 50\%$$

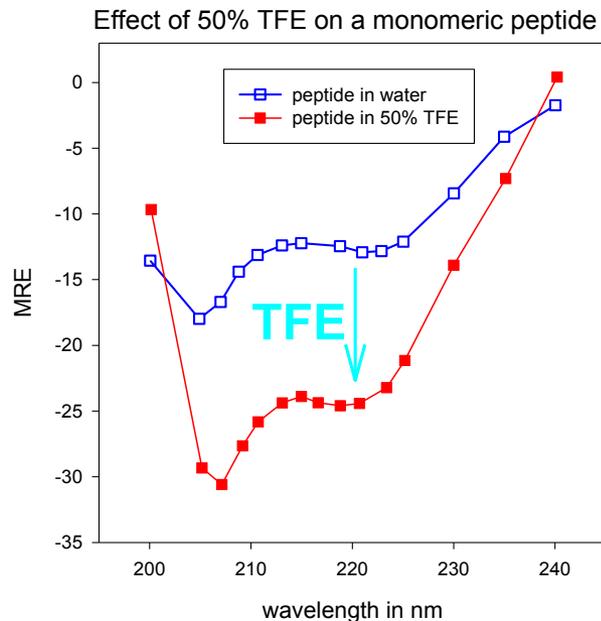
- Mostra che a 50°C
1/2 del peptide è α -helix
dimero
1/2 del peptide è random coil
monomero

fit to GCN4-p1 50°C data

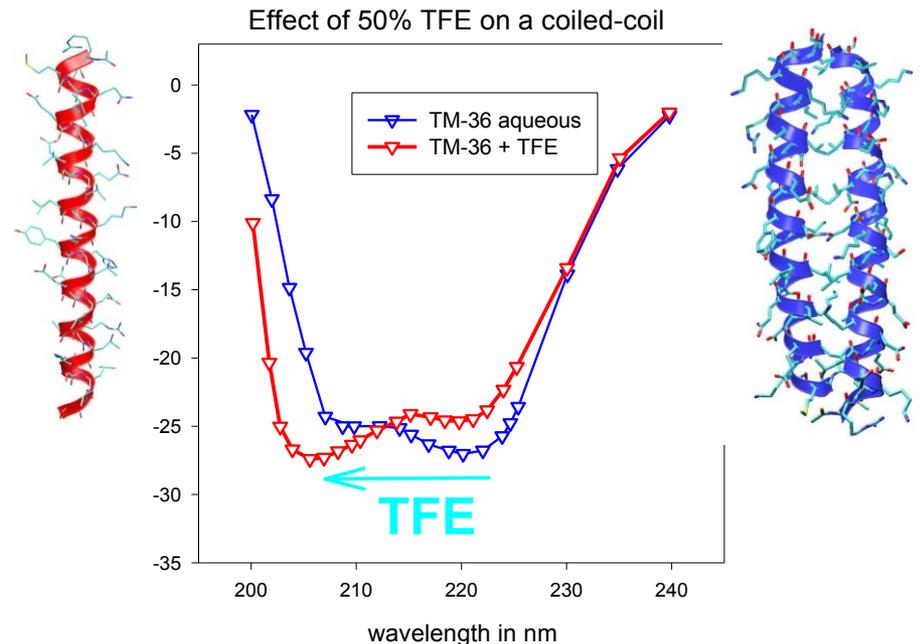


I segnali CD per lo stessa struttura secondaria possono variare con l'ambiente

- Effetto del trifluoroetano (TFE) su un coiled-coil simile a GCN4-p1
- TFE induce "elicità" in tutti i peptidi :



Ma su un coiled-coil rompe il dimero a elica a singole eliche

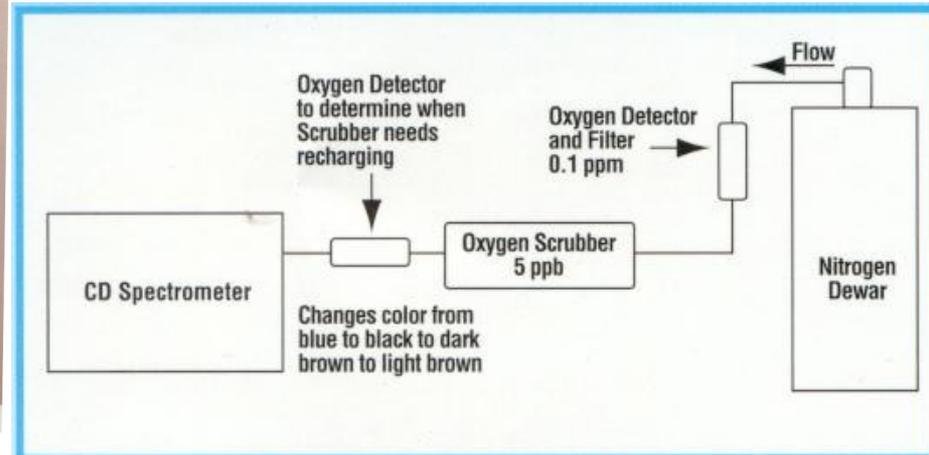


Lau, Taneja and Hodges (1984)
J.Biol.Chem. **259**:13253-13261

Strumentazione-spettropolariometro



- £80k+
- Spettri in funzione di λ , tempo, temperatura...
- down to 190nm
- 450W Xe bulb - produce ozono
- ozono danneggia ottiche con strati di argento
- Quindi necessario fluire N_2



Curtis-Johnson, PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 7:(205-214) 1990

Curtis-Johnson, Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 1988. 17." 145-66

Fine Lezione 12