

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA
SOSTENIBILITÀ**



**BIOCHIMICA APPLICATA
(6 CFU)**

LEZIONE 12

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

Analisi conformazionali

- ✓ Spettrofotometria: Perturbazione da solvente
- ✓ Fluorescenza : Perturbazione da solvente;
Fluorescenza estrinseca. FRET, FRAP
- ✓ Proteine fluorescenti
- ✓ Ultracentrifugazione analitica
- ✓ Parziale proteolisi
- ✓ Dicroismo circolare

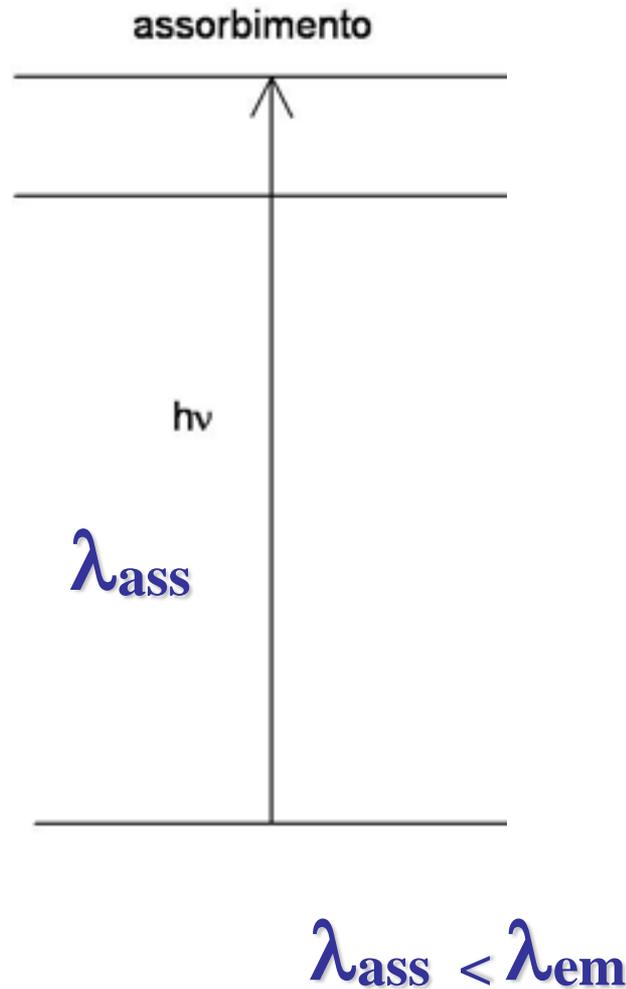
Analisi conformazionali

✓ Fluorescenza intrinseca: Perturbazione da solvente;

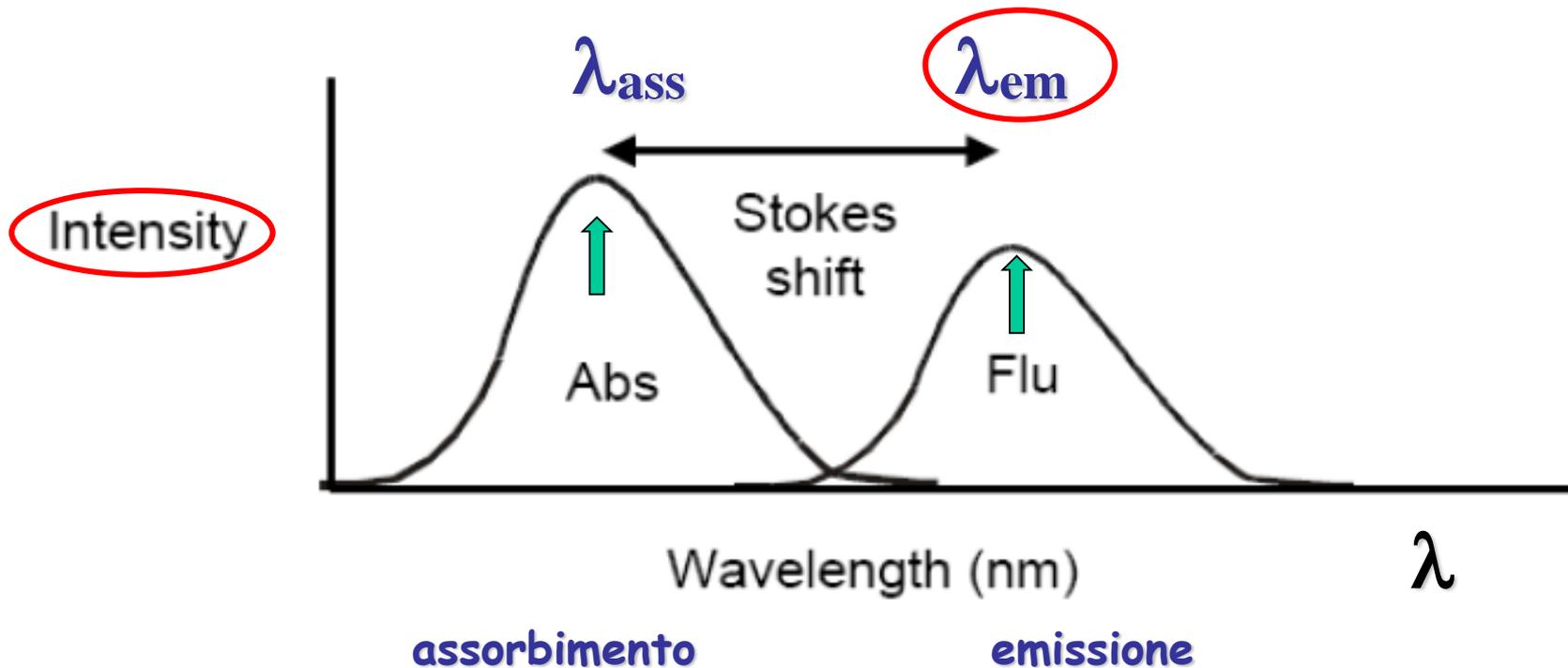
✓ Fluorescenza estrinseca: ANS; FRAP;

FRET

Il fenomeno della fluorescenza



Il fenomeno della fluorescenza



Intensità di fluorescenza

• A basse concentrazioni della sostanza fluorescente (*fluoroforo*), l'intensità della fluorescenza (I_f) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = 2,3 I_0 \varepsilon_\lambda c d \Phi$$

c è la *concentrazione del fluoroforo*

d è il *cammino ottico* della luce nella soluzione fluorescente

ε_λ è il *coefficiente di estinzione molare* del fluoroforo

I_0 è l'*intensità* della radiazione incidente

Φ è la *resa quantica*

Intensità di fluorescenza

• La resa quantica di fluorescenza è definita come il rapporto tra numero di fotoni emessi in fluorescenza (quanti di fluorescenza) e numero di molecole eccitate nel campione, cioè numero di fotoni assorbiti (quanti assorbiti)

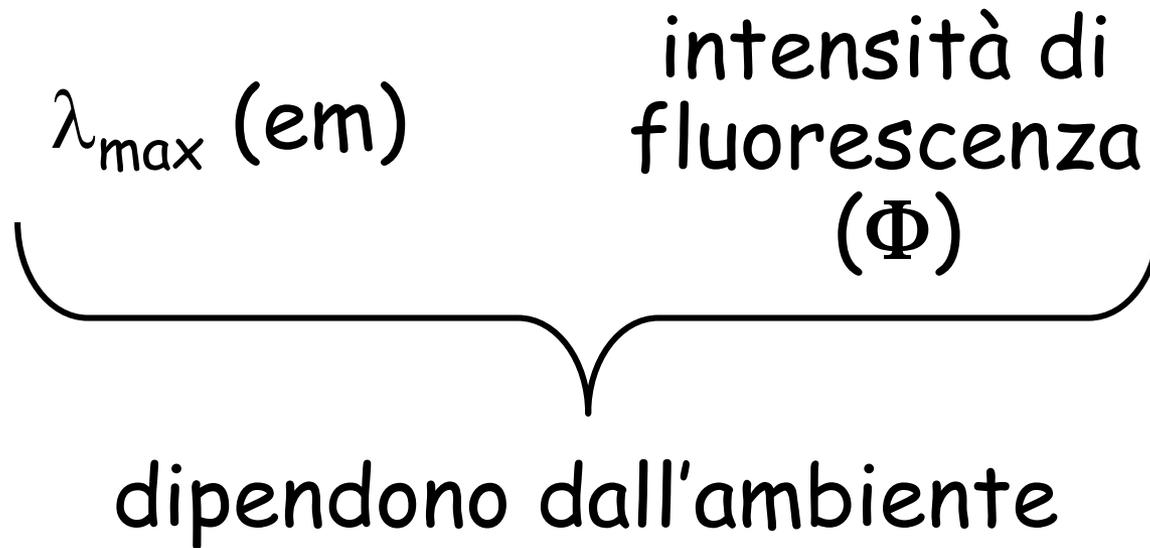
$$\Phi = \frac{\text{quanti di fluorescenza emessi}}{\text{quanti assorbiti}}$$

La resa quantica

- è *indipendente* dalla lunghezza d'onda di eccitazione
- può essere diminuita o aumentata da fattori esterni (quenchers, solvente, etc)

Effetto dell'ambiente

Il fenomeno della fluorescenza è influenzato dall'intorno chimico in cui si trova il fluoroforo



Effetto dell'ambiente

SOLVENTE: Il solvente può interagire sia con lo stato fondamentale ma ancor più con lo stato eccitato.

pH: può influenzare l'assetto elettronico della molecola, soprattutto se possiede idrogeni a carattere acido; ad es. molti fenoli sono fluorescenti a pH neutro o acido e non lo sono a pH alcalini

TEMPERATURA: incide sulla viscosità della matrice e quindi può favorire o meno le collisioni con le particelle che circondano la molecola; per le misure fluorescenti in genere si opera a temperatura ambiente proteggendo il campione dal calore generato dalle lampade.

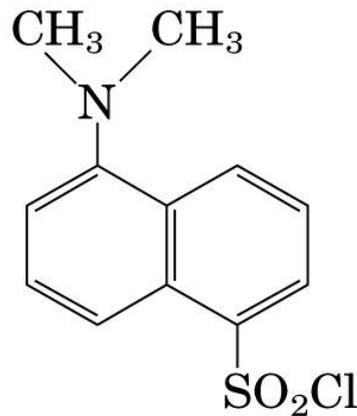
MATRICI: può contenere sostanze che assorbono parte della radiazione eccitante o emessa.

SMORZAMENTO (quenching): le varie interazioni chimiche con particolari specie chimiche eventualmente presenti nella matrice possono determinare una attenuazione del segnale.

CONCENTRAZIONE: l'emissione fluorescente aumenta con la concentrazione in modo lineare solo per valori bassi di quest'ultima.

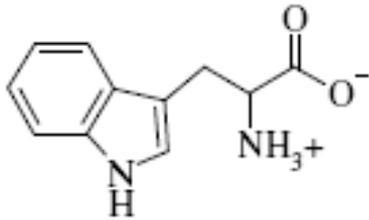
Molecole fluorescenti di interesse biochimico

- Fluorofori naturali o intrinseci
- Coenzimi, substrati e analoghi
- Fluorofori estrinseci
 - sonde ambientali
 - reagenti di modificazione chimica (ad esempio, DNSC)

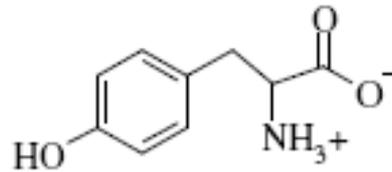


Dansyl chloride

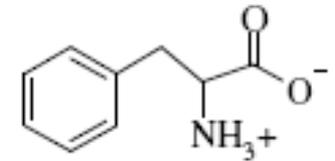
Fluorofori naturali e coenzimi



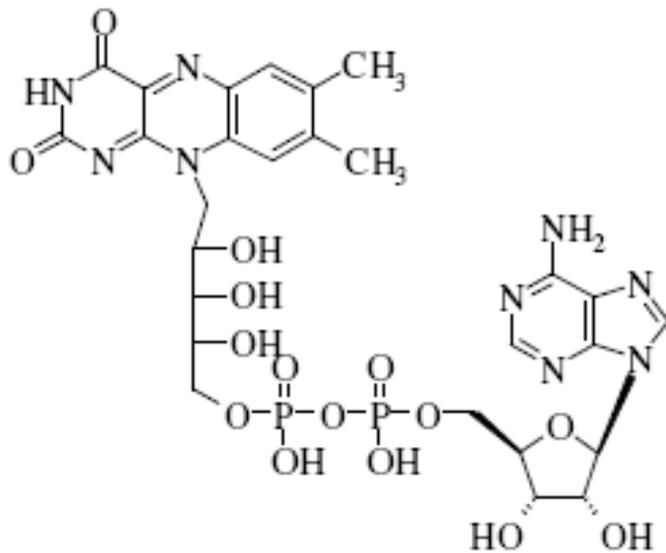
Triptofano (W)



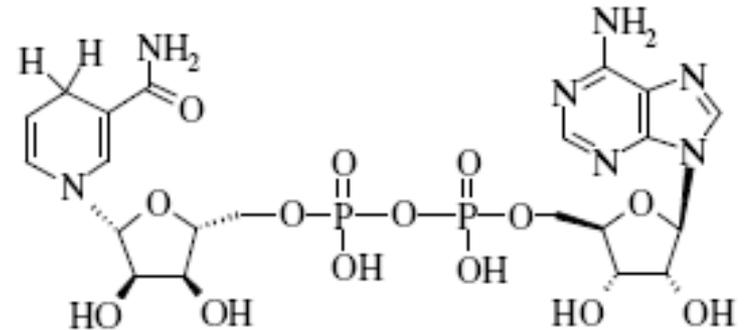
Tirosina (Y)



Fenilalanina (P)

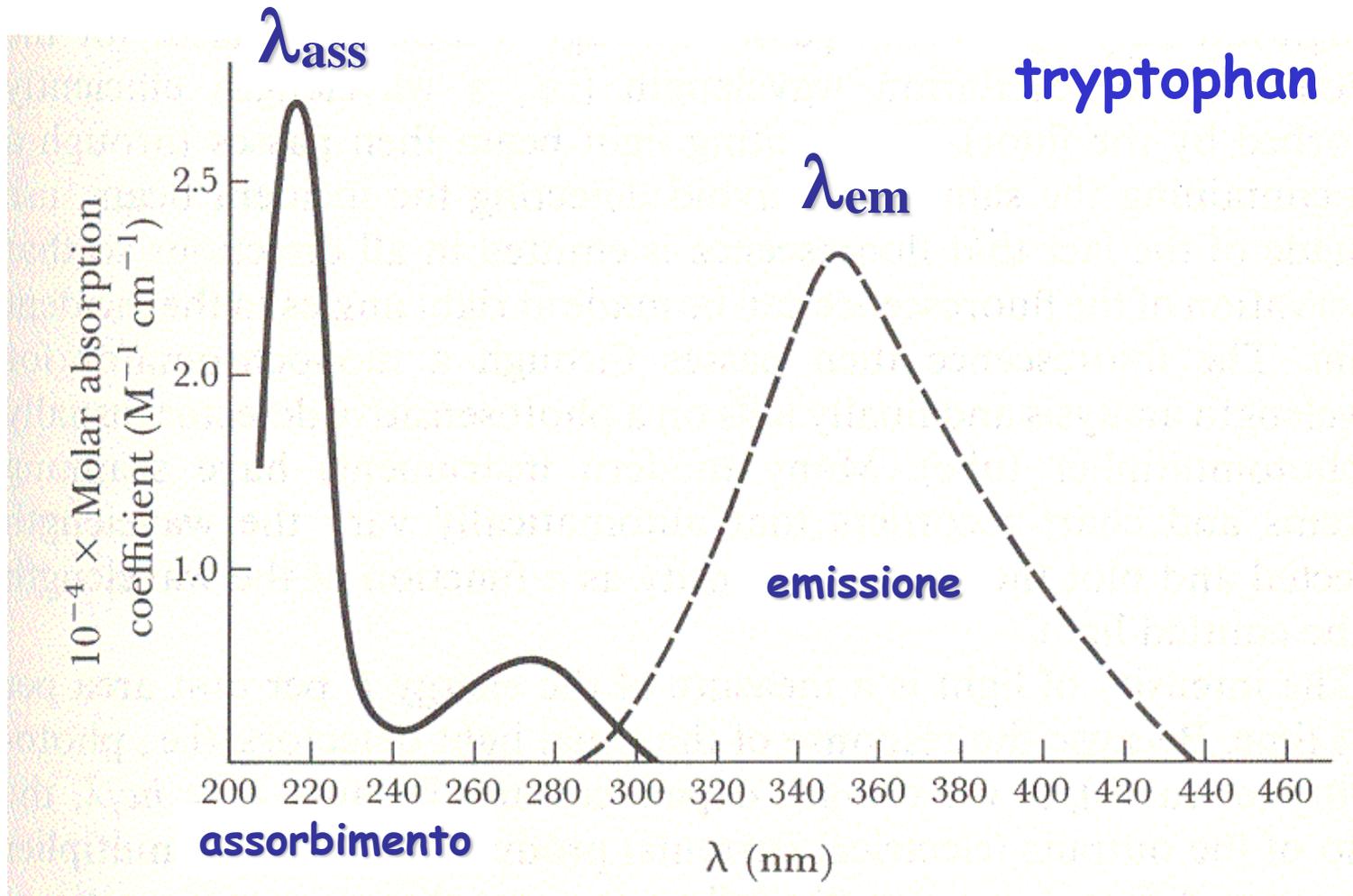


FAD



NADH

All fluorescence of a protein is due to tryptophan, tyrosine, and phenylalanine unless the protein is known to contain another fluorescent component.



Effetto della polarità del solvente

λ_{max} (em)

INTENSITÀ (Φ)

POLARITÀ

Solvente/ambiente
APOLARE

Solvente/ambiente
POLARE

As the polarity of the solvent decreases, the λ_{em} of the tryptophan fluorescence spectrum shifts to shorter wavelengths and the intensity of λ_{em} increases

- If λ_{em} is shifted to shorter wavelengths when the protein is in a polar solvent, the **tryptophan** must be **internal** and in a nonpolar environment.
- If λ_{em} is shifted to shorter wavelengths when the protein is in a **nonpolar** medium, either the **tryptophan** is on the **surface** of the protein or the solvent induces a conformational change that brings it to the surface

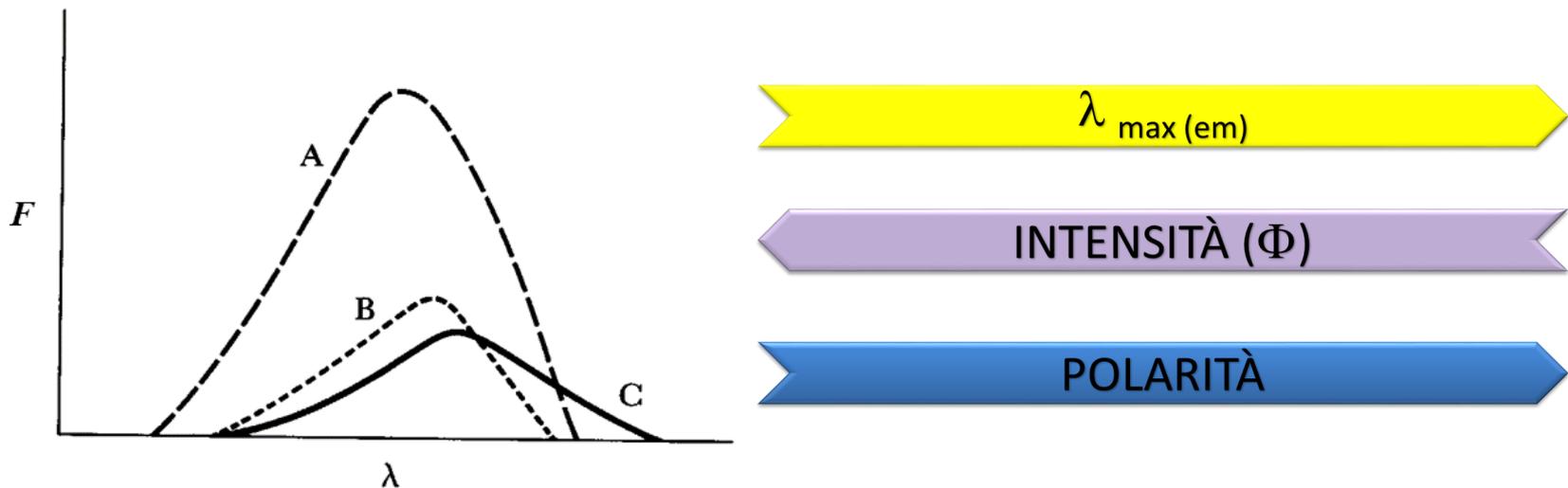


Figure 15-4

Fluorescence spectrum of a hypothetical protein in solution: (A) without added cofactor; (B) with added cofactor. Curve C is the spectrum of free tryptophan in water.

Fluorescenza intrinseca: Perturbazione da solvente

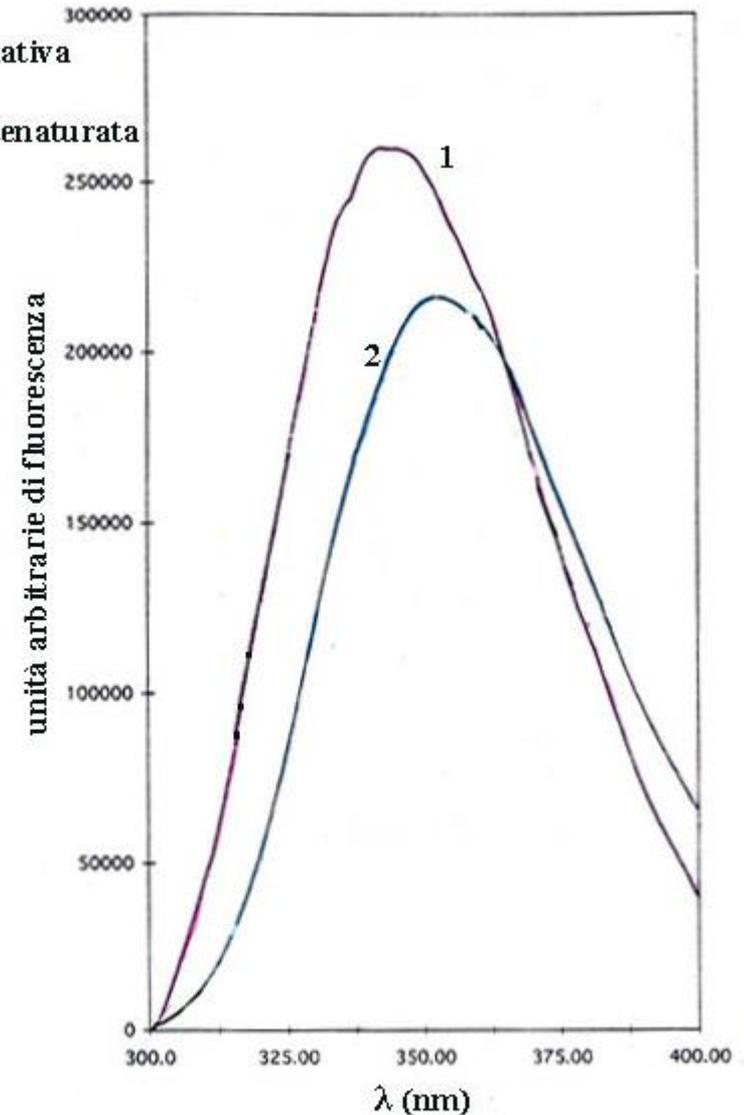
Effetto della polarità del solvente

1 = β 2-microglobulina nativa

2 = β 2-microglobulina denaturata

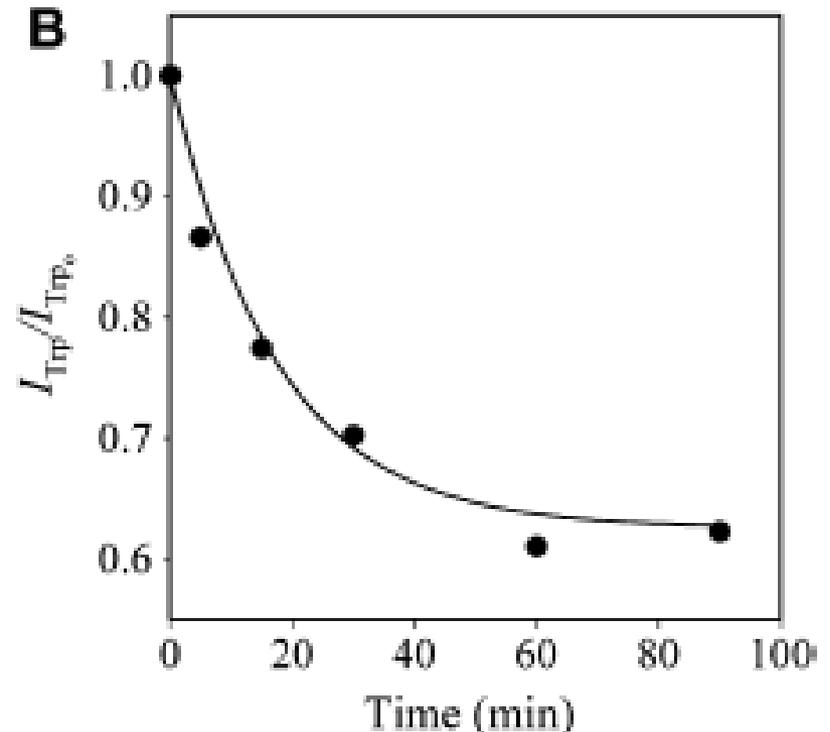
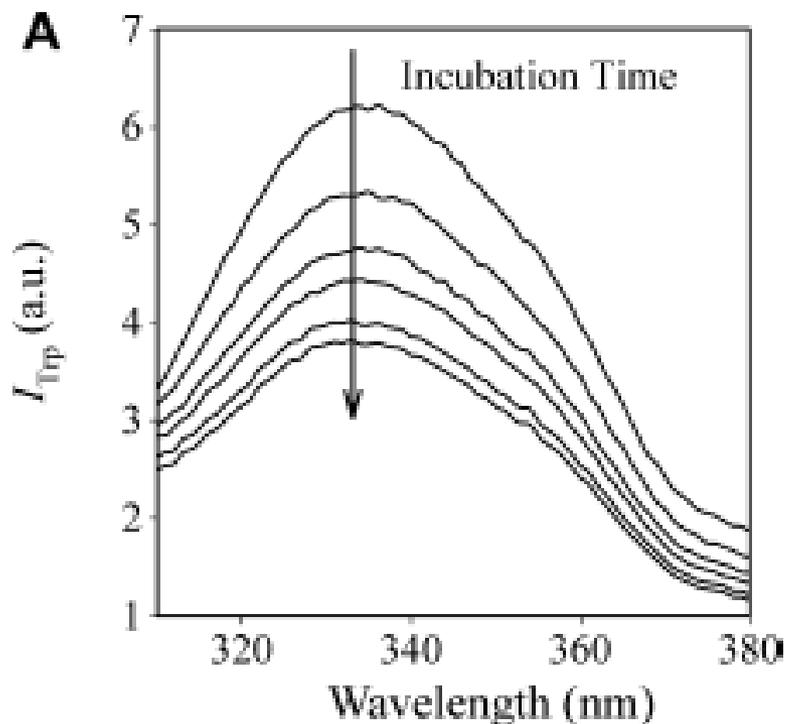
The λ_{em} of tryptophan fluorescence spectrum shifts to shorter wavelengths and the intensity of λ_{em} increases as the polarity of the solvent decreases.

If λ_{em} is shifted to shorter wavelengths when the protein is in a polar solvent the tryptophan must be internal and in a nonpolar environment (1= native protein).



Effetto della polarità del solvente

Trp fluorescence of native and thermally inactivated CopA membrane protein from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*

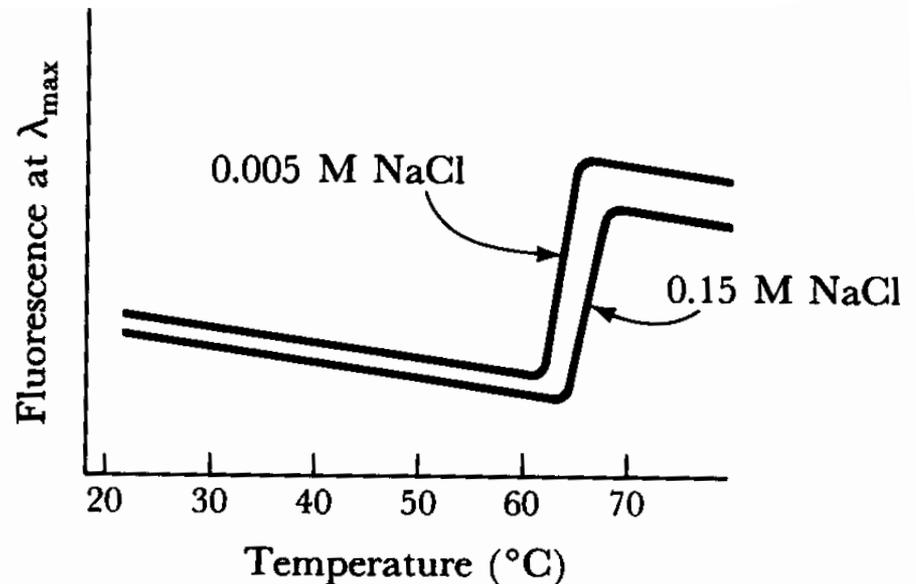


Il red-shift della λ_{em} e la diminuzione di I del Trp indicano lo spostamento del residuo in un ambiente più polare.

Effetto della polarità del solvente

- If tryptophan or tyrosine are in a polar environment, their F decreases with increasing Temperature
- Deviation from a decrease in F with increasing T indicates that heating is inducing a conformational change because the polarity of the regions to which the tryptophans are being exposed must be changing.

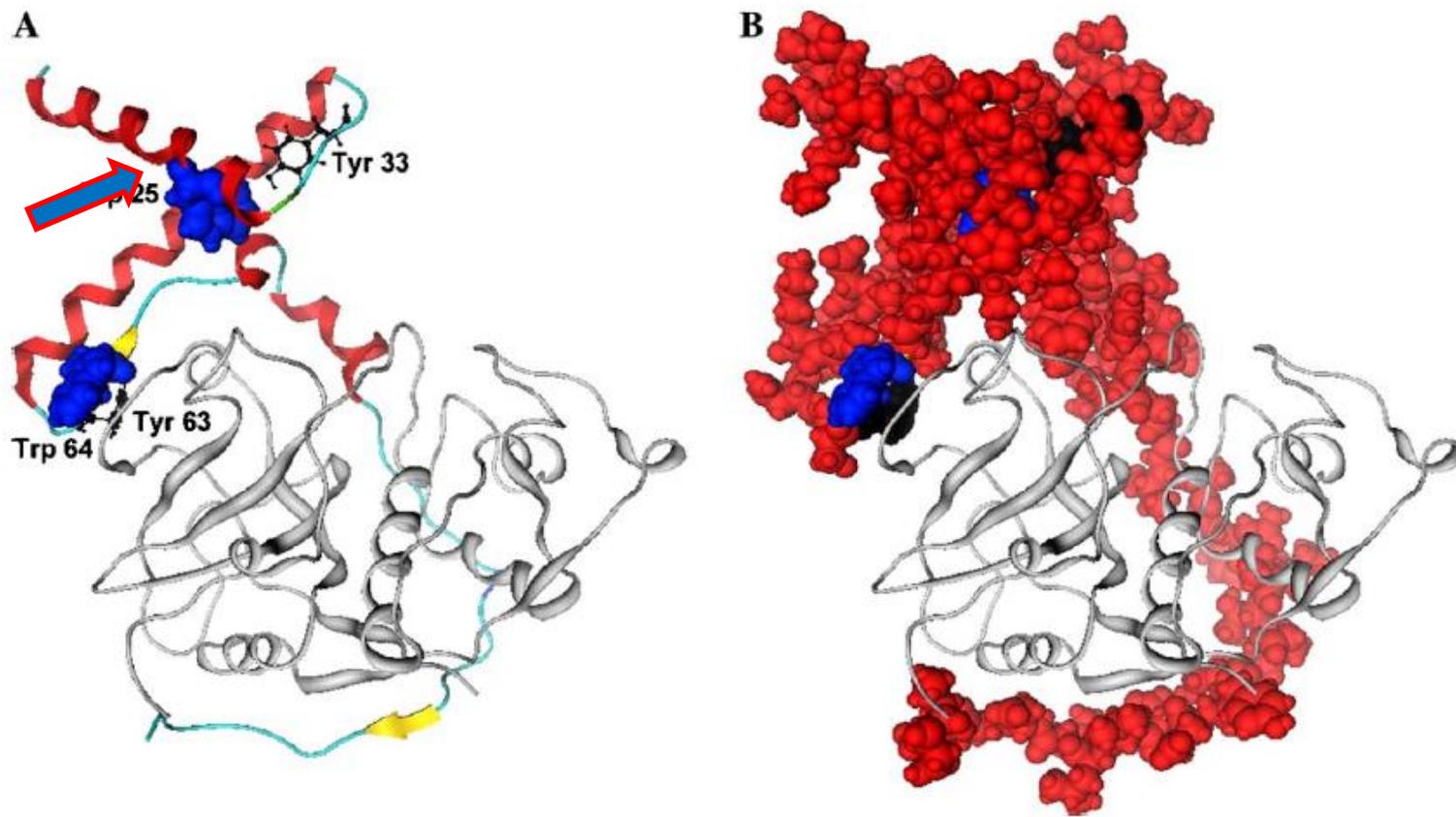
A helix-coil transition of a protein measured by changes in fluorescence. Note that, in 0.15 M NaCl, the protein is more stable in that a higher temperature is required for the transition.



Fluorescenza intrinseca: effetto temperatura

Effetto della temperatura

Intrinsic fluorescence of the papain prosegment during thermal unfolding and refolding of the polypeptide chain.



Loosely packed papain prosegment displays inhibitory activity

Gutiérrez-González, et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006 446, 151-160

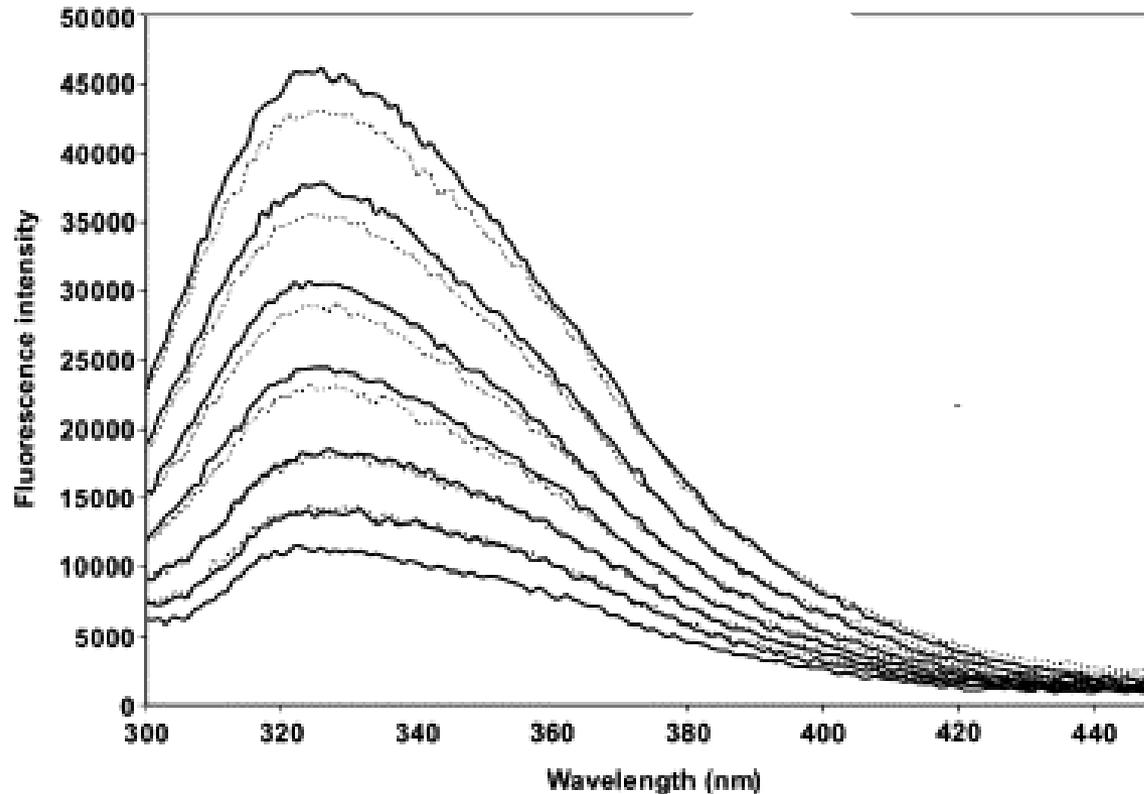
Effetto della temperatura

I precursori di alcuni zimogeni contengono una sequenza definita prosegmento (PS) che verrà poi rimossa per attivare l'enzima

PS svolge diverse funzioni tra cui indirizzare il targeting intracellulare, garantire la stabilità, controllare l'attività catalitica

In particolare, il PS svolge un ruolo chiave nel processo di folding di numerose proteasi

Effetto della temperatura



Intrinsic fluorescence of the papain prosegment at pH 7 during thermal unfolding (solid lines) and refolding (broken lines) of the polypeptide chain. Changes in spectra during heating and cooling between 20° and 85°C are indicated by solid and broken arrows, respectively. Excitation wavelength used was 280 nm.

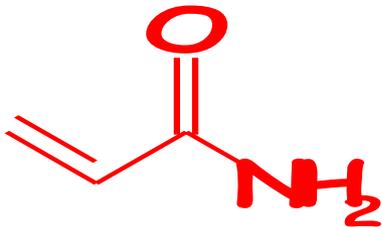
Effetto della temperatura

Intrinsic fluorescence spectra of papain prosegment show a red shift of the center of mass with temperature; this feature could imply that Trp25, embedded in the hydrophobic core in the native prosegment, becomes solvent exposed at higher temperatures.

Thermal unfolding of the chain seems to cause the loss of tertiary contacts around this tryptophan residue because the shape and the maximum of the spectrum show changes in experiments carried out at excitation wavelength of 280 nm, where energy transfer from Tyr33 to Trp25 may account for the higher intensity of the spectra at low temperatures.

Analisi di quenching o smorzamento della fluorescenza

quencher: sostanza che è in grado di ridurre la luce emessa dal fluoroforo



acrilammide: molecola neutra, di piccole dimensioni, è in grado di diffondere all'interno della proteina



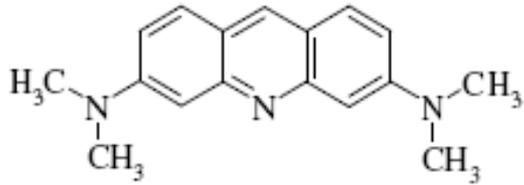
Ione ioduro: dotato di carica elettrica, di grandi dimensioni, interagisce solo con i fluorofori situati al di fuori della proteina

If a substance known to be a **quencher** (i. e., it quenches the fluorescence of the *free* amino acid), such as the iodide, nitrate, or cesium ions, **quenches** tryptophan or tyrosine fluorescence, the amino acids must be on the **surface** of the protein.

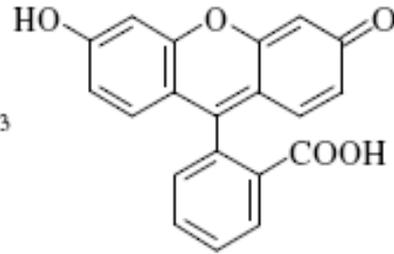
If it fails to do so:

- a. The amino acid may be internal.
- b. The amino acid may be in a **crevice** whose dimensions are too small for the quencher to enter it.
- c. The amino acid may be in a highly charged region and the charge might repel the quencher.
the **iodide** ion (a negative quencher) fails to quench tryptophan fluorescence if the tryptophan is in a negative region; the Cs^+ ion is ineffective if the fluor is in a positive region; the neutral quencher, **acrylamide**, disregards the charge.

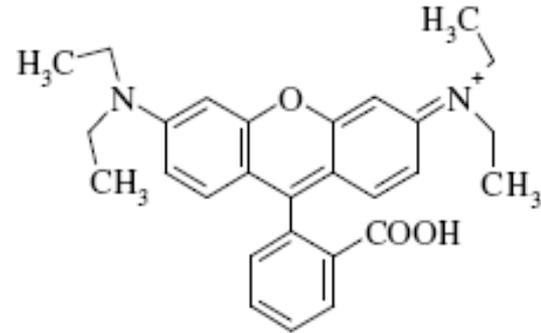
Strutture di Fluorofori estrinseci



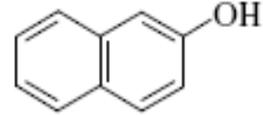
Arancio di acridina



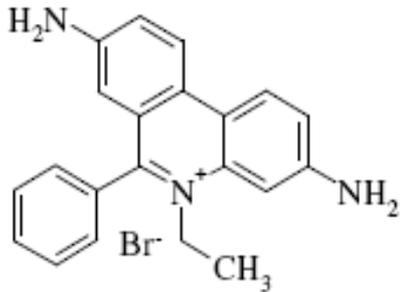
Fluoresceina



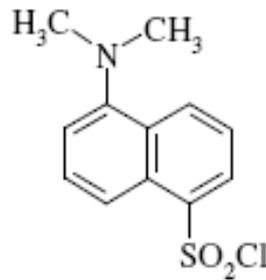
Rodamina B



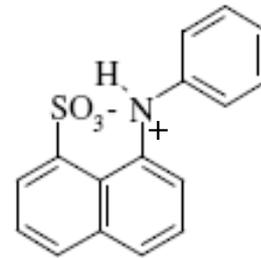
Naftolo



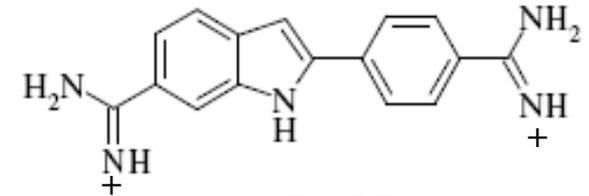
Bromuro di etidio



Dansile

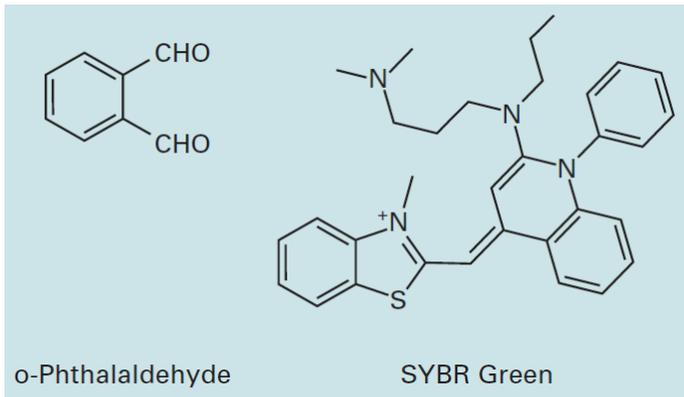


1-Anilino-8-Naftalene Sulfonato



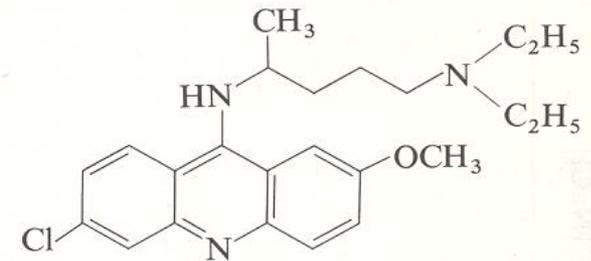
DAPI

4',6-diamidin-2-fenilindolo



o-Phthalaldehyde

SYBR Green



Quinacrine chloride

Fluorescenza estrinseca

- Dansil cloruro
 - o-ftalaldeide
- legano gruppi amminici primari

• **ANS** (1-anilino-8-naftalene-sulfonato)

Apo Hb lega **ANS**

Hb non lega **ANS** stesso sito del gruppo prostetico

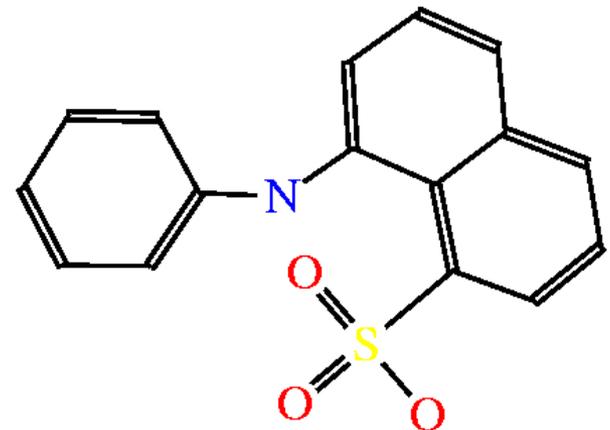
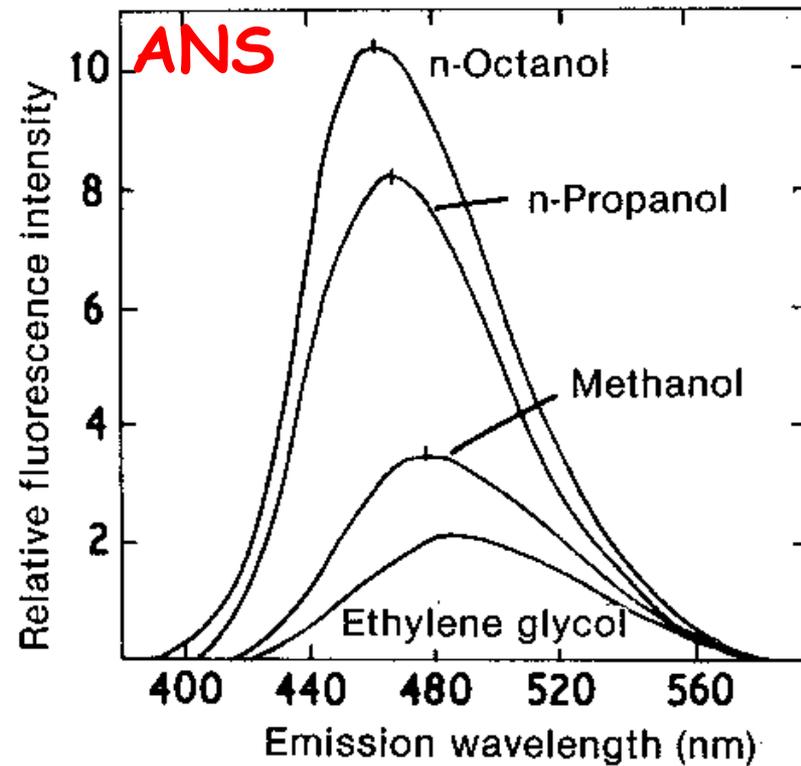
• **TNS** (2-p-toluidina-naftalene-6-sulfonato)

α -chimotripsina lega **TNS**

In presenza di substrato diminuisce Φ quindi variazione conformazionale aumento di polarità sito di legame

Effetto dell'ambiente: un esempio

- ANS si lega alla apomioglobina con uno *shift* della λ_{\max} a 454 nm ed un aumento di intensità
- L'aggiunta dell'eme riporta la fluorescenza a λ_{\max} più alte con diminuzione della intensità

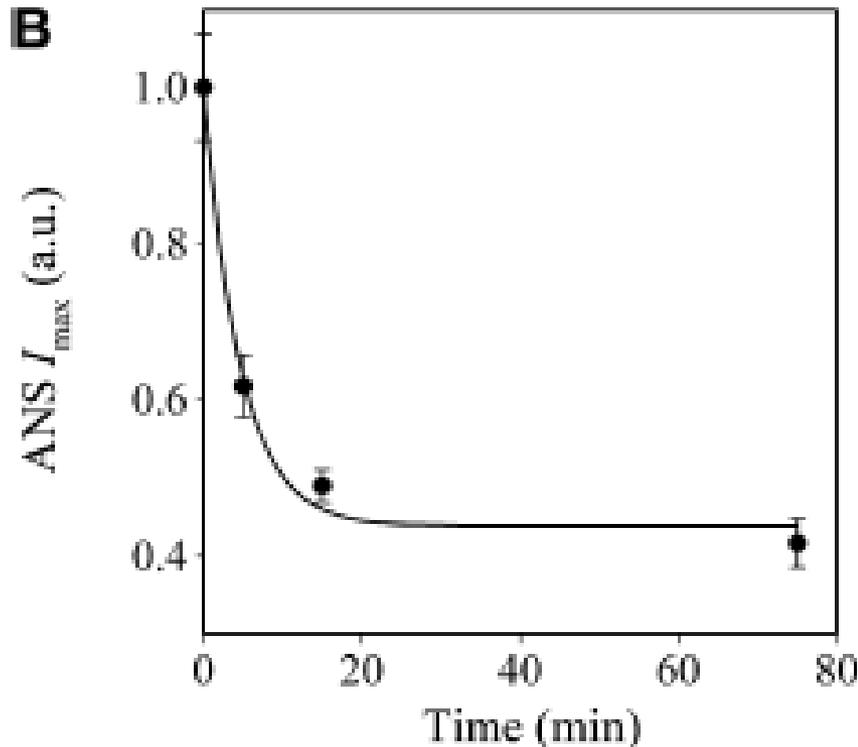


1-anilino-8-naftalene sulfonato

Fluorescenza estrinseca

Thermal stability of CopA, a polytopic membrane protein from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*

1-Aniline-8-naphtalenesulfonate binding



- ❖ Eccitazione a 380 nm (a 25°C)
- ❖ Spettro di emissione tra 420 e 550 nm

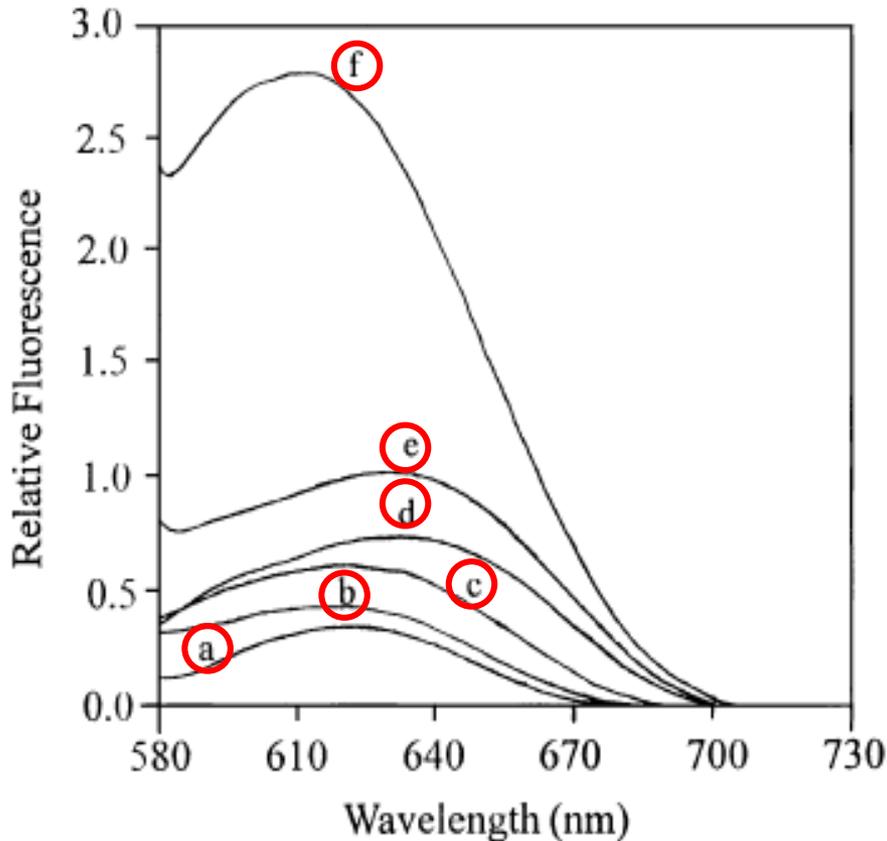
L'andamento della curva mostra progressiva diminuzione delle cavità idrofobiche in seguito al riscaldamento a 75°C e titolazione con ANS.

Fluorescenza del rosso Nilo in presenza dei mutanti della tioredoxina da *Bacillus acidocaldarius* (BacTrx)

Studio della stabilità termica di BacTrx

- Nile Red is a useful compound for the detection of major or minor hydrophobic areas on protein surfaces
- The Nile Red fluorescence is greatly enhanced upon binding to hydrophobic surfaces.
- At room temperature, BacTrx and the mutant proteins interact weakly with the dye thus, as expected, proving very similar in surface hydrophobicity.
- The relative Fluorescence of Nile Red was measured **after incubation of the proteins at 85 °C for 1 h.**

Fluorescenza del rosso Nilo in presenza dei mutanti della tioredoxina da *Bacillus acidocaldarius* (BacTrx)



Studio della stabilità termica di BacTrx

(a) Buffer

(b) BacTrx wild type

Mutanti:

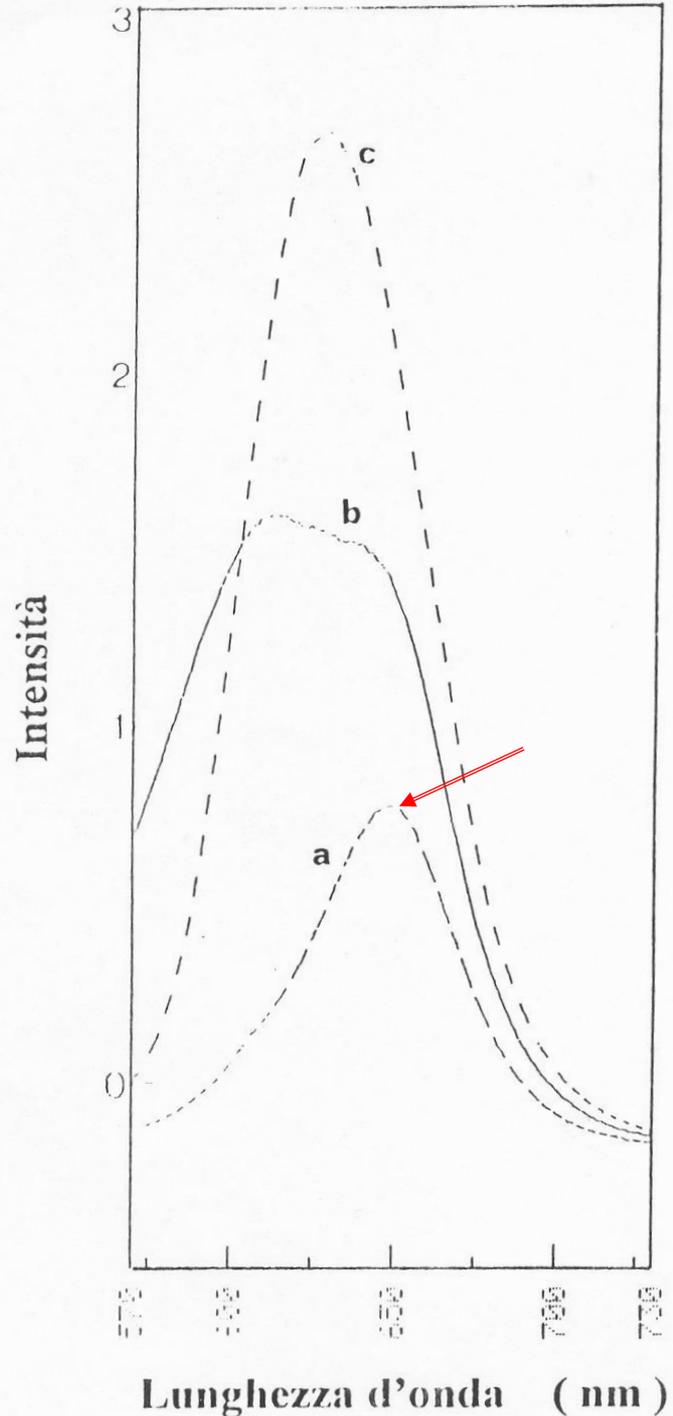
(c) Arg82Glu

(d) Lys18Gly

(e) Lys18Gly/Arg82Glu

(f) D102X

The relative Fluorescence of Nile Red was measured **after incubation of the proteins at 85 °C for 1 h**. Emission spectra are shown for (a) buffer, (b) BacTrx, (c) Arg82Glu, (d) Lys18Gly, (e) Lys18Gly/Arg82Glu and (f) D102X.



Fluorescenza del **rosso Nilo**

(a) $1 \mu\text{M}$

(b) in presenza di ADH_{wt}

(c) ADH_{mut}

λ di eccitazione 550nm.

Temperatura 25°C

Trasferimento di energia

Fluorescence Resonance Energy Transfer
Förster Resonance Energy Transfer

FRET

- Trasferimento non radiativo di energia (dipolo-dipolo) da parte di un donatore fluorescente ad un accettore fluorescente.
- Il trasferimento di energia dipende da:
 - proprietà spettrali
 - orientamento
 - distanza tra donatore e accettore (1-10 nm)

Trasferimento di energia

Fluorescence Resonance Energy Transfer
Förster Resonance Energy Transfer

FRET

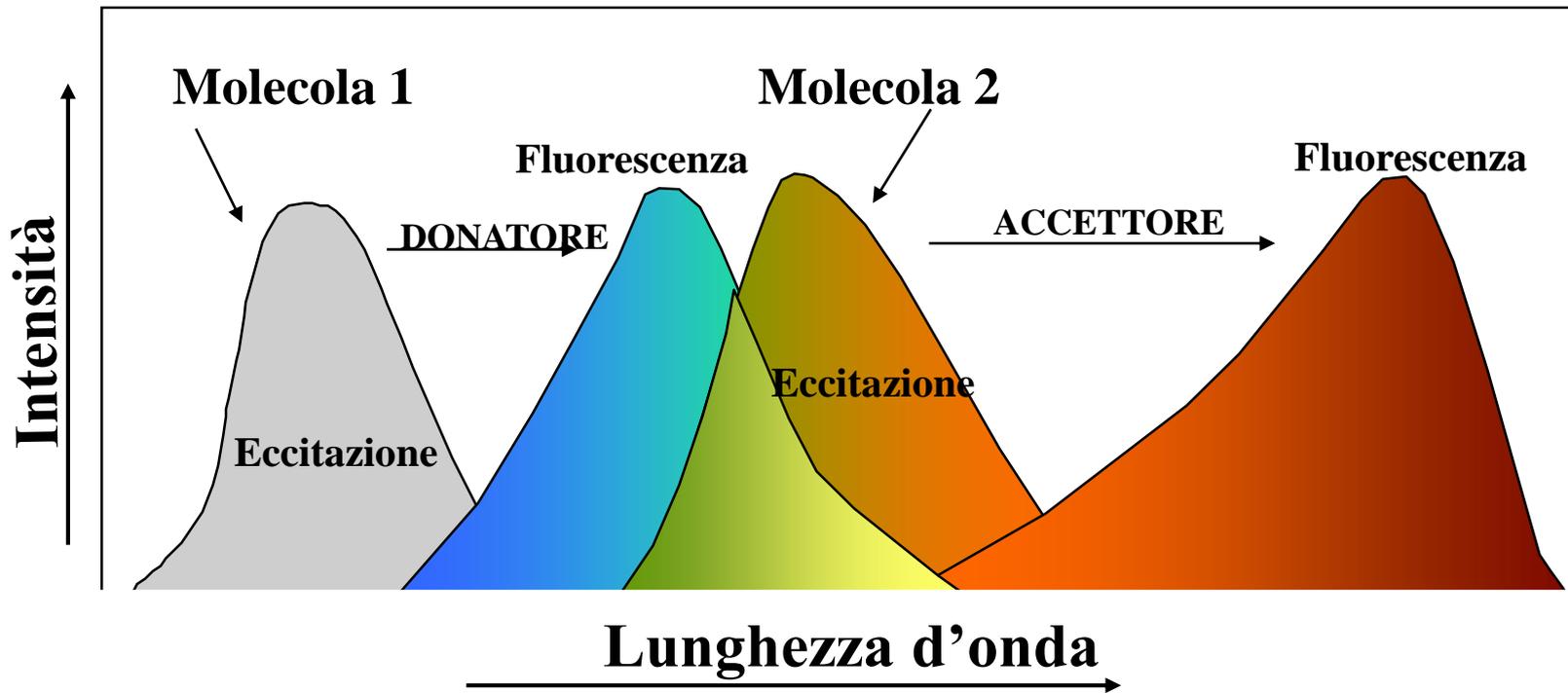
- Si basa sul fenomeno di trasferimento di energia tra fluorofori
- E' una tecnica molto usata per la visualizzazione di molecole biologiche (come proteine, lipidi o acidi nucleici) in rapporto tra loro
- Permette di individuare e caratterizzare con estrema precisione la distanza tra due molecole. Il meccanismo sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, dette donatore e accettore.

Trasferimento di energia (FRET)

- Parziale sovrapposizione degli spettri di donatore ed accettore
- Vicinanza (1-10 nm)
- Alta resa quantica del donatore

Trasferimento di Energia per Risonanza (FRET)

Lo spettro di emissione del donatore e lo spettro di eccitazione dell'accettore devono essere parzialmente sovrapposti



Fluorescenza estrinseca: FRET

Trasferimento di energia: effetto della distanza

$$E = 1 / [1 + (r / R_0)^6]$$

E = efficienza di trasferimento

r = distanza tra i fluorofori

R_0 = distanza per cui FRET è 50% per la coppia fluorofori (è un valore specifico di ogni coppia)

Trasferimento di energia: effetto della distanza

$$E = 1/[1 + (r/R_0)^6]$$

ACCETTORE

DONATORE

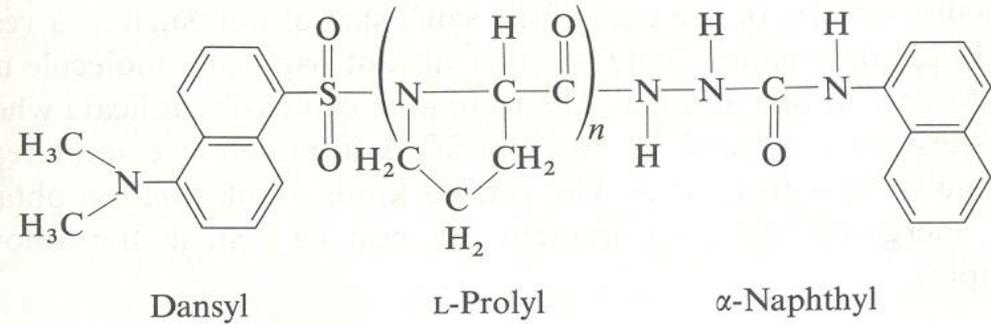
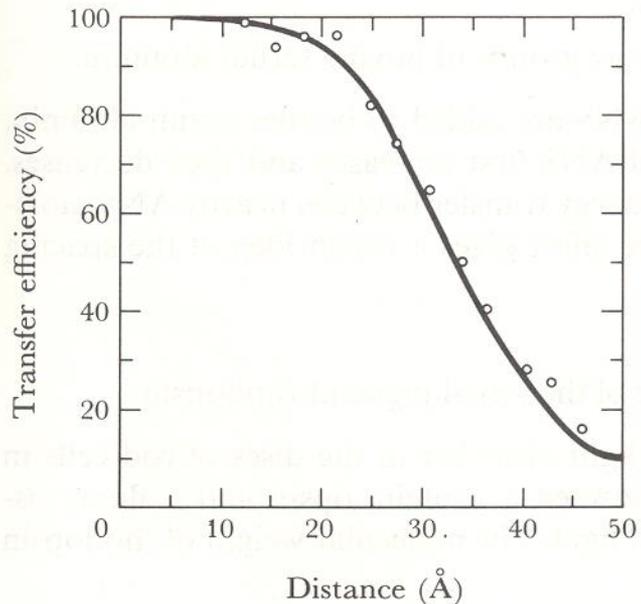


Figure 15-11

Formula for poly-L-proline separating a dansyl (acceptor) and an α-naphthyl (donor) group (n varied from 1 to 12).

Figure 15-12

Efficiency of energy transfer as a function of a distance in dansyl-(L-prolyl) $_n$ -α-naphthylene, in which n varies from 1 to 12. The distances (in Å) for each value of n were independently determined from other types of measurements. The solid line corresponds to a $1/R^6$ dependence. [From L. Stryer and R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58(1967):719–726.]



Trasferimento di energia

Fluorescence Resonance Energy Transfer
Förster Resonance Energy Transfer

FRET

I fluorofori più usati nella FRET sono quelli della famiglia della *GFP* (*Green Fluorescent Protein*).

Le *GFP* sono molecole proteiche molto più maneggevoli dei classici fluorofori organici (che presentano notevoli problemi di purificazione, modificazione chimica ed iniezioni intracellulari).

La *GFP* può infatti essere fusa con la proteina da monitorare attraverso tecnologie di ingegneria genetica.

Trasferimento di energia

Fluorescence Resonance Energy Transfer
Förster Resonance Energy Transfer

FRET

I fluorofori più usati nella FRET sono quelli della famiglia della *GFP* (*Green Fluorescent Protein*).

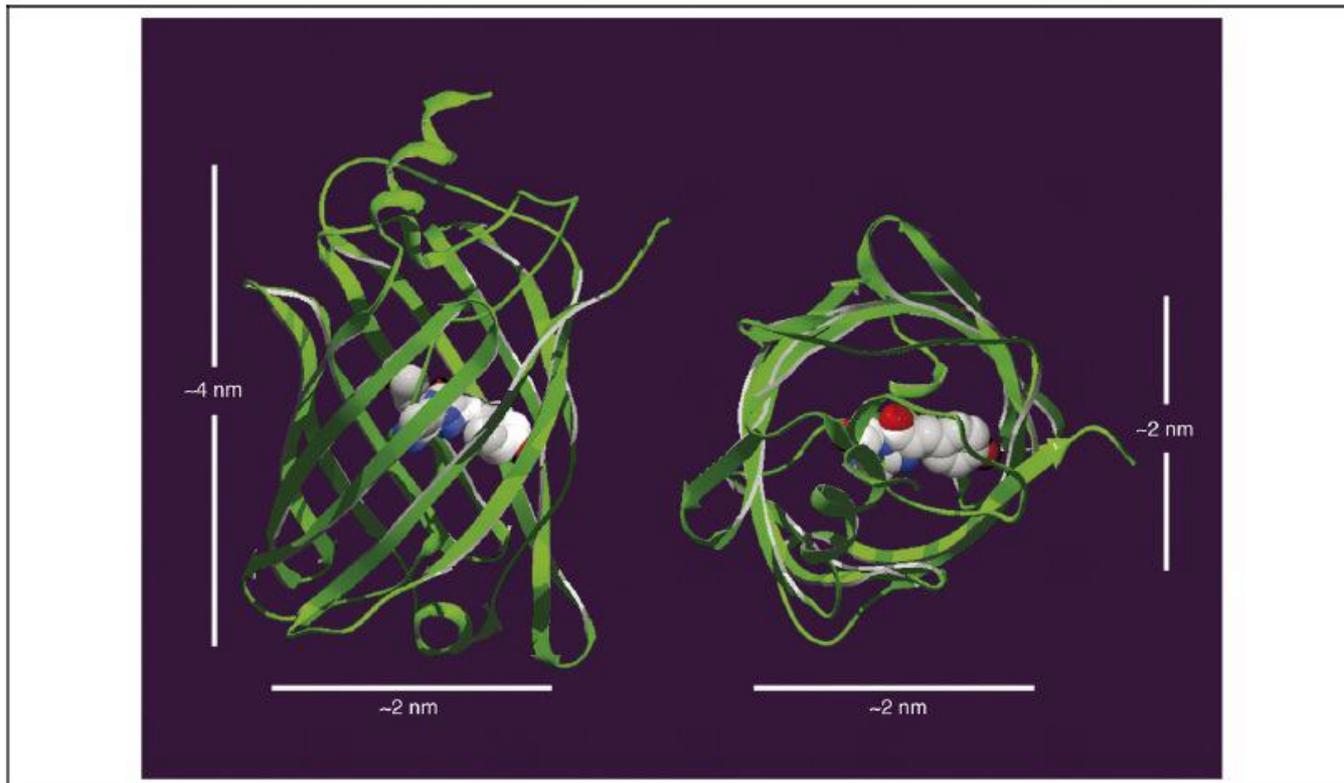


Figure 3. Crystal structure of GFP. The protein is cylindrical, with a diameter of ~2.4 nm and a length of 4.2 nm. The cylinder consists of 11 β strands with a single α helix running along its axis. The chromophore is located in the α helix at the center of the protein. All fluorescent proteins have a similar structure.

Trasferimento di energia

Fluorescence Resonance Energy Transfer

Förster Resonance Energy Transfer

FRET

Le proteine GFP

- Grazie alla sua proprietà di fluorescenza, alle sue modeste dimensioni e alla possibilità di modificarne entro certi limiti le caratteristiche spettroscopiche, la GFP è diventata negli ultimi decenni un diffuso strumento per esperimenti e tecniche di biologia molecolare.
- Le principali forme di GFP modificate sono in grado di assorbire e emettere radiazione diverse da quelle della proteina originaria: RFP che emette nel rosso, BFP e CFP nel blu, YFP nel giallo.

Trasferimento di energia

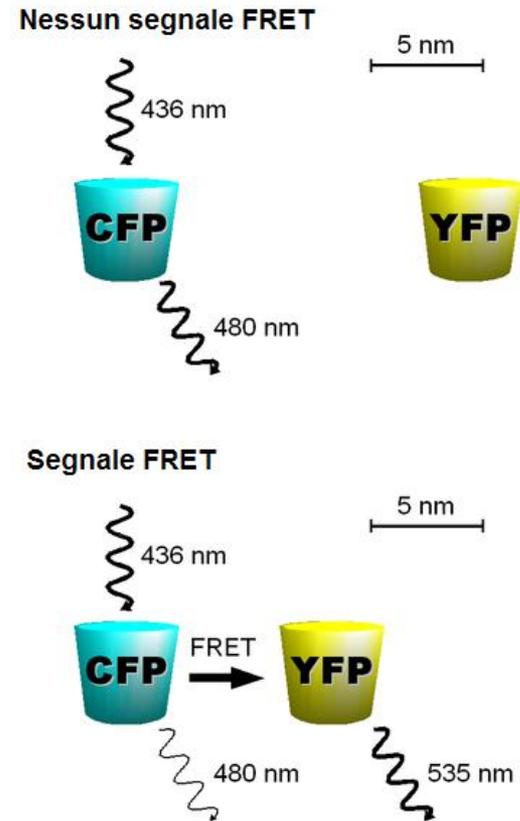
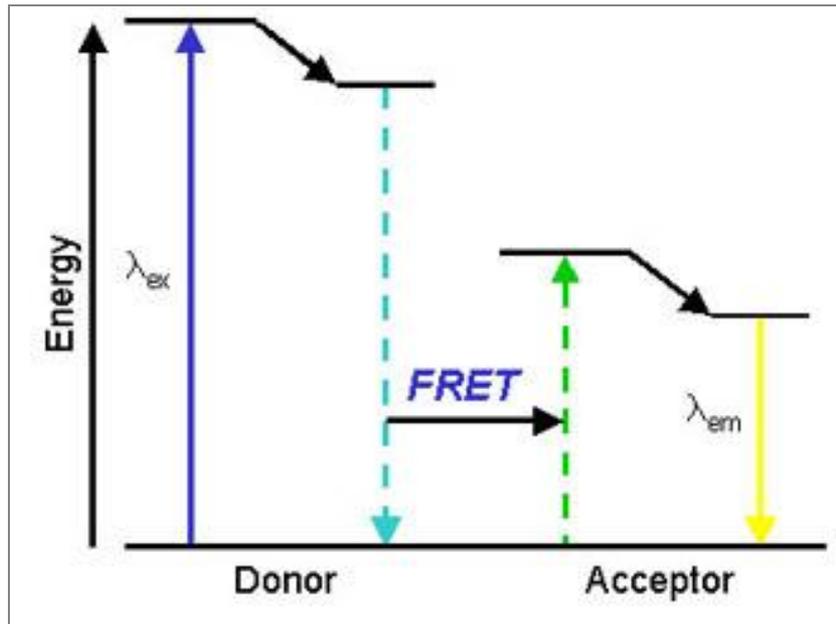
Fluorescence Resonance Energy Transfer
Förster Resonance Energy Transfer

FRET

Le proteine GFP

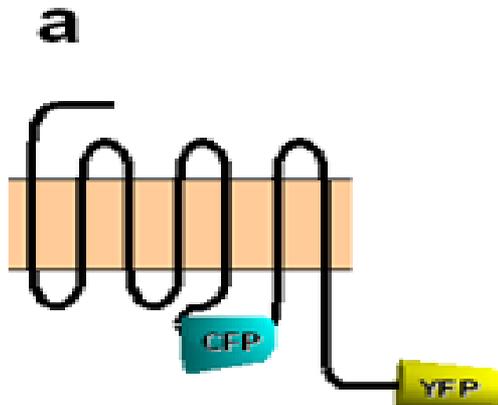
- La green fluorescent protein (GFP, in italiano proteina fluorescente verde) è una proteina prodotta dalla medusa *Aequorea victoria*.
- La GFP, quando è colpita ed eccitata da una radiazione ad una specifica lunghezza d'onda, è in grado di riemettere luce di colore verde acceso

Fluorescence Resonance Energy Transfert



FRET e studio della conformazione delle proteine

Per monitorare i cambiamenti conformazionali all'interno della macromolecola, ad esempio, è possibile marcarla in due siti differenti, lontani tra loro più di 10 nm



Fluorescenza estrinseca: FRET