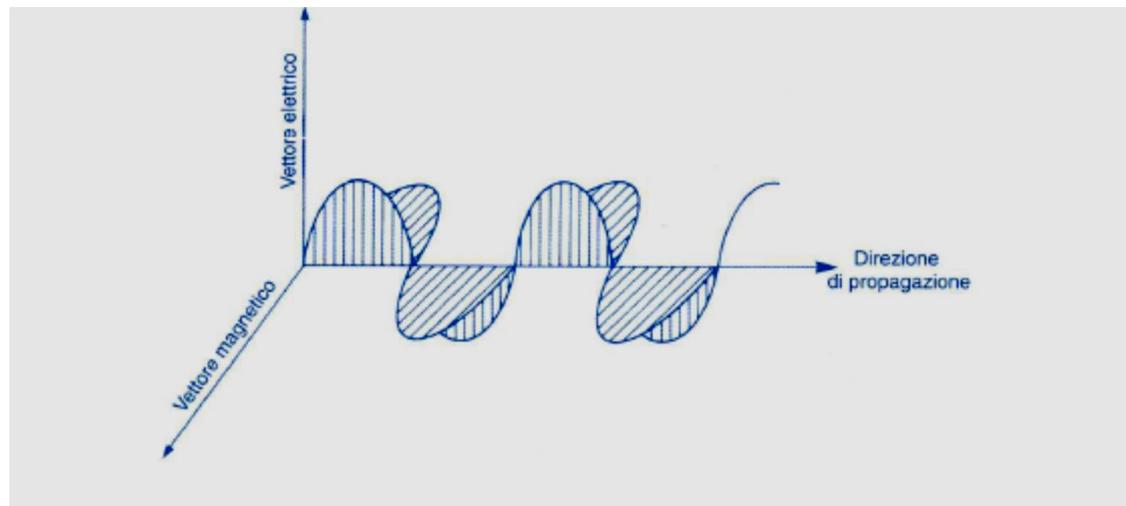
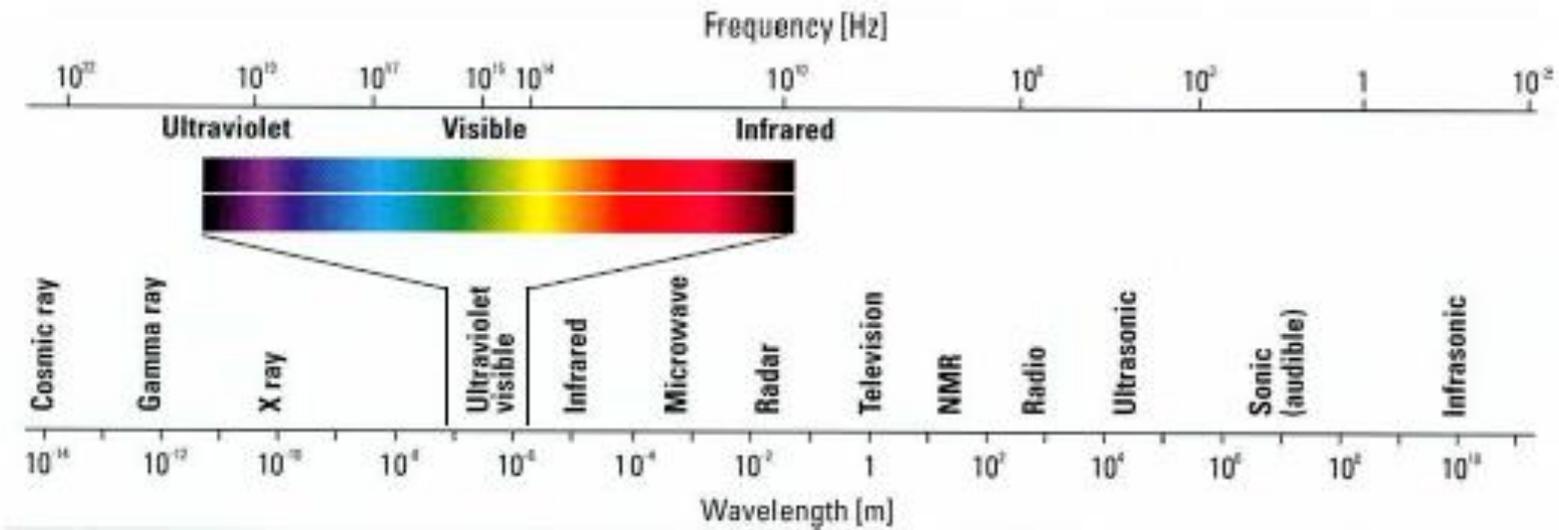


# TECNICHE SPETTROSCOPICHE

- La *radiazione elettromagnetica* è composta da un vettore elettrico e da un vettore magnetico che oscillano su piani tra loro perpendicolari, a loro volta perpendicolari alla direzione di propagazione.



- Le radiazioni *visibili* o *ultraviolette (UV)* comprendono solo una piccola parte dello spettro elettromagnetico, che include molte altre forme di radiazioni: onde radio, infrarosse, cosmiche, raggi  $\gamma$  e raggi X

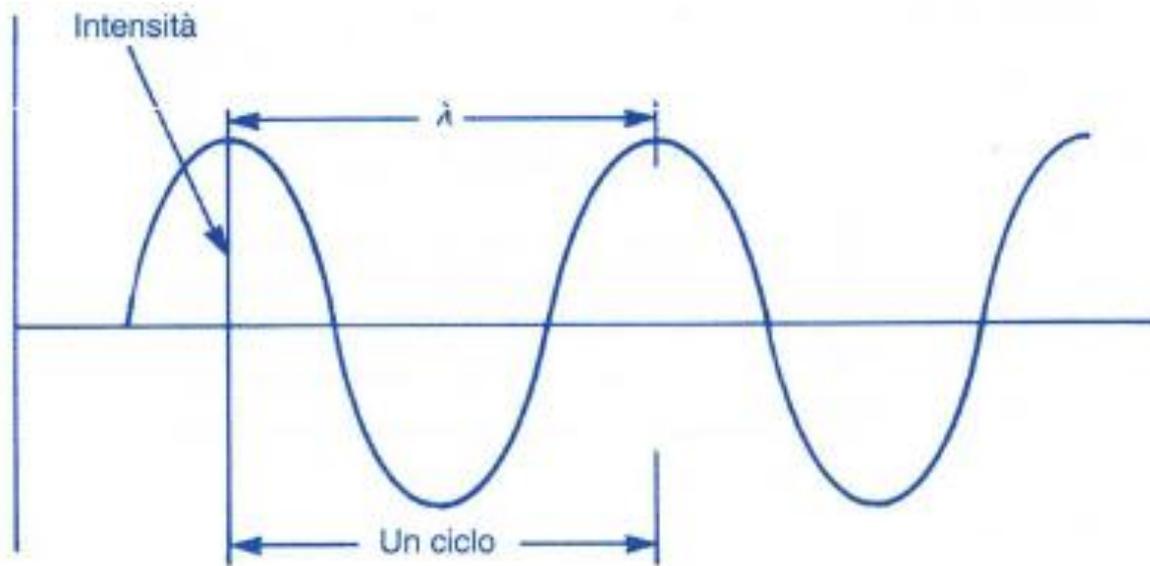


L'energia è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda  $E = h\nu$

$\nu$ , la frequenza (in hertz) della radiazione è definita come  $\nu = c/\lambda$

$c$  è la velocità della radiazione elettromagnetica ( $300.000 \text{ Km s}^{-1}$ )

$\lambda$  è la sua lunghezza d'onda



$$E = h\nu = hc/\lambda \quad h = \text{costante di Planck } 6.6 \times 10^{-34} \text{ Js}$$

- L'interazione della materia con le radiazioni elettromagnetiche determina:
- Riflessione
- Dispersione
- Assorbimento
- Fluorescenza
- Reazione e trasformazione chimica

Quando la materia assorbe le radiazioni elettromagnetiche il contenuto di energia degli atomi o molecole di cui è composta **aumenta**. Passando da uno **stato fondamentale** ad uno **stato eccitato** Gli elettroni sono normalmente distribuiti in diversi livelli energetici e occupano nello stato fondamentale i livelli più bassi. Un elettrone può assorbire una radiazione elettromagnetica passando nello stato eccitato.

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu$$

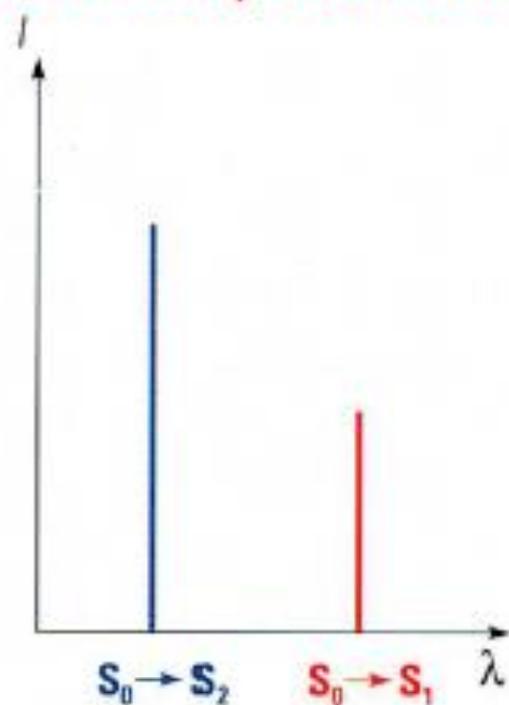
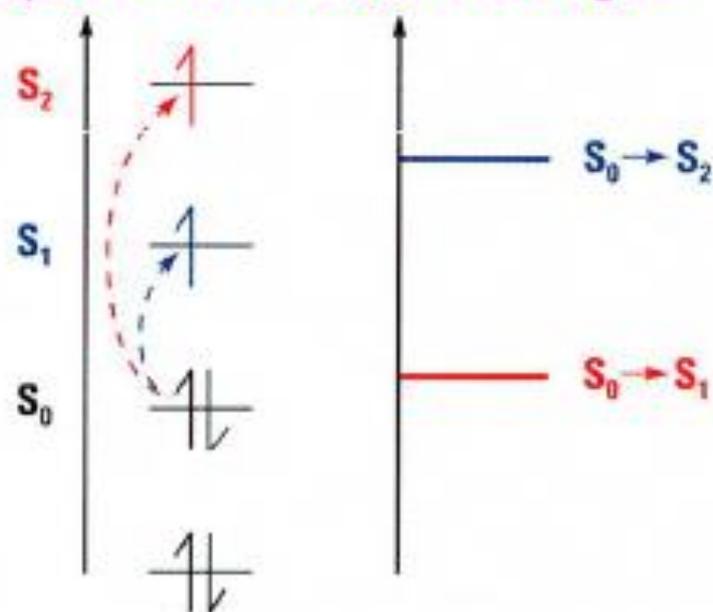
*h* è la **costante di Planck** ( $6,63 \times 10^{-34}$  J s) mentre *ν* è la **frequenza** della radiazione elettromagnetica assorbita

➤ L'energia associata alla radiazione elettromagnetica assorbita deve

corrispondere esattamente al  $\Delta E$  dell'elettrone che passa dallo stato

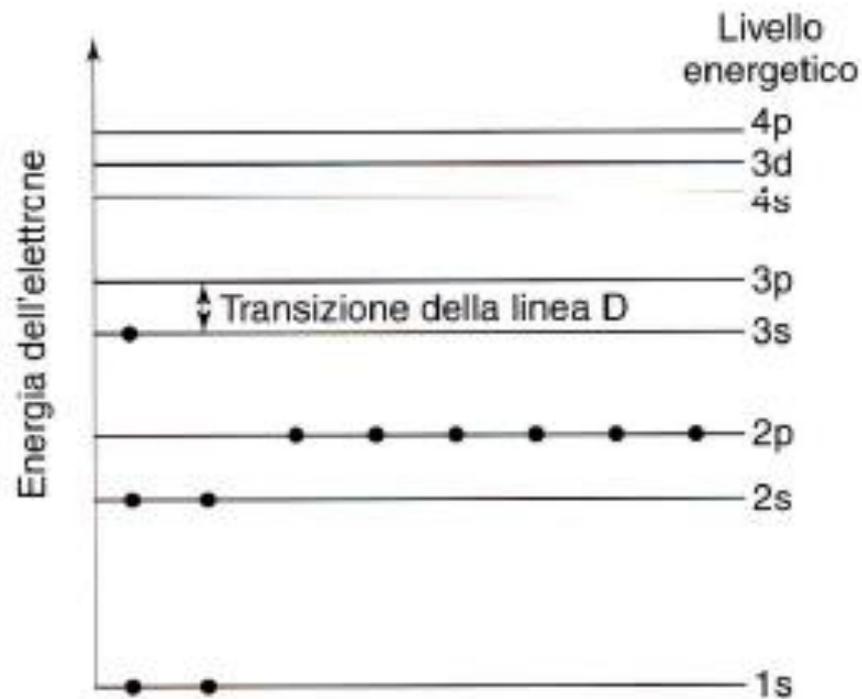
fondamentale ( $S_0$ ) a quello eccitato ( $S_1$  o  $S_2$ ).

➤ Per questo motivo un atomo che assorbe la luce presenta uno spettro di assorbimento a righe

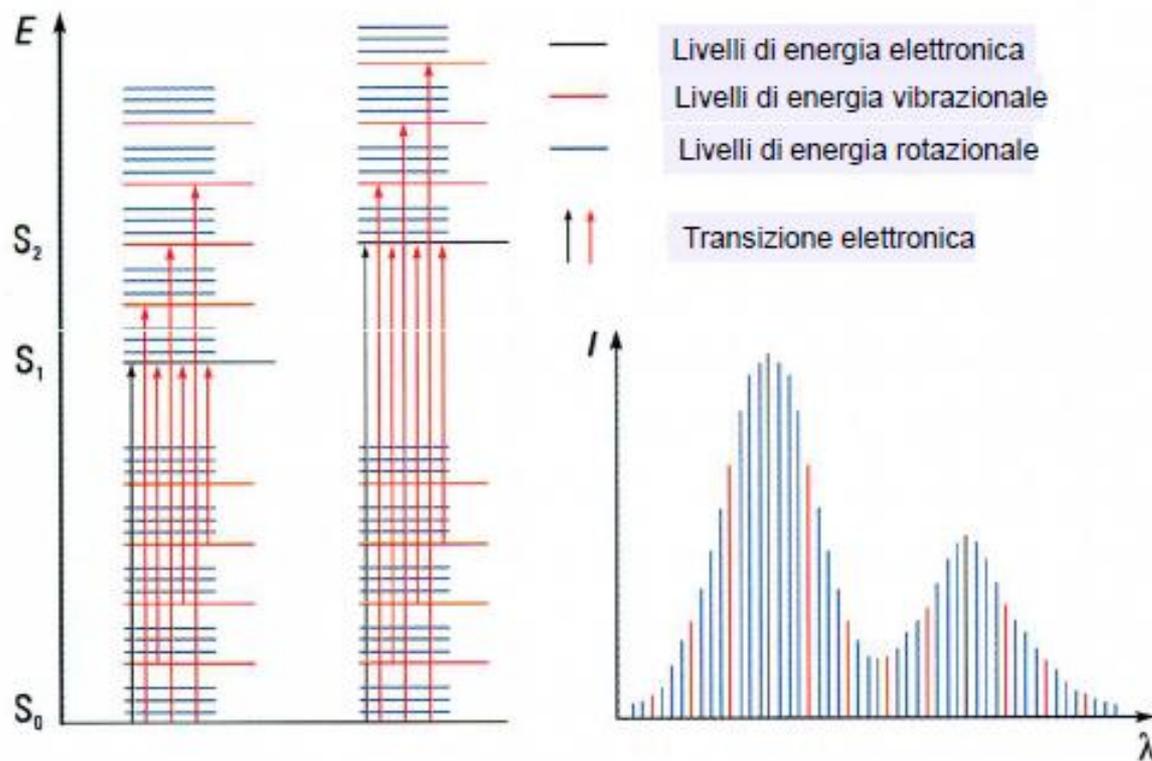


- La quantità di energia che un elettrone può assorbire non varia in modo continuo ma dipende dalla caratteristica serie di *livelli energetici* o *stati* dell'atomo a cui appartiene.
- L'interazione tra le *radiazioni elettromagnetiche* e la materia è quindi un *fenomeno quantico*.

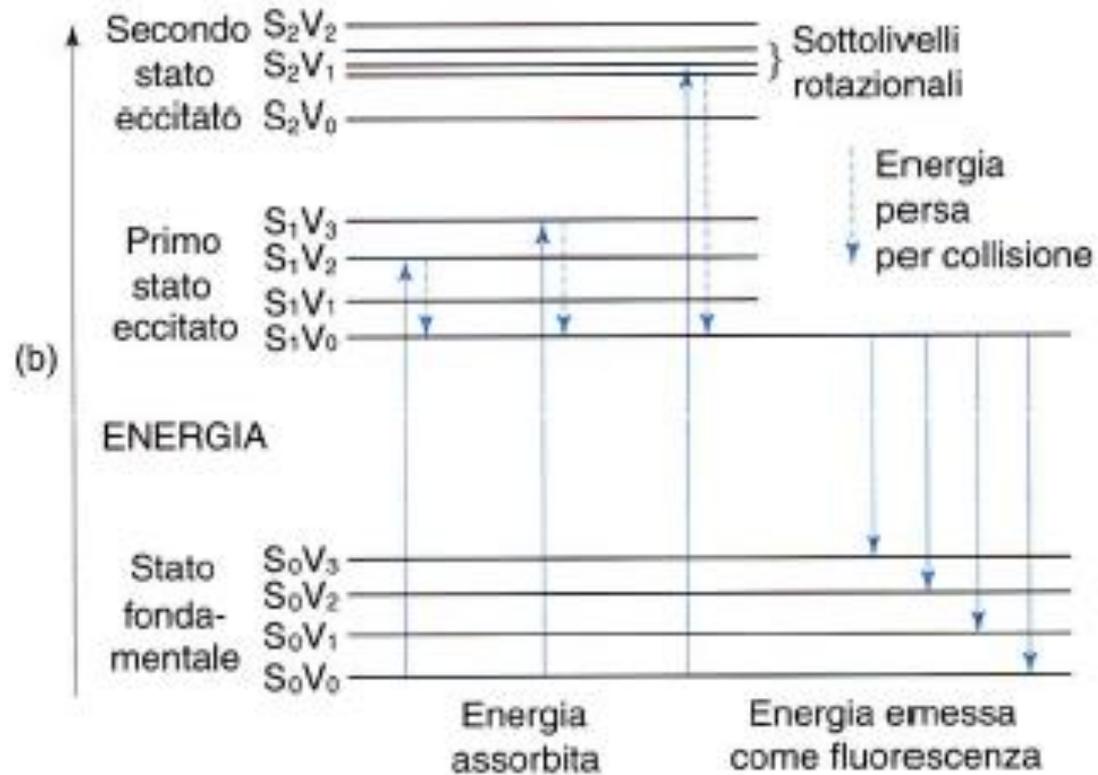
Sodio



Una molecola che assorbe la luce presenta uno spettro di **assorbimento a bande** che sono il risultato della sovrapposizione di più righe di assorbimento corrispondenti ai diversi livelli e sottolivelli energetici vibrazionali e rotazionali



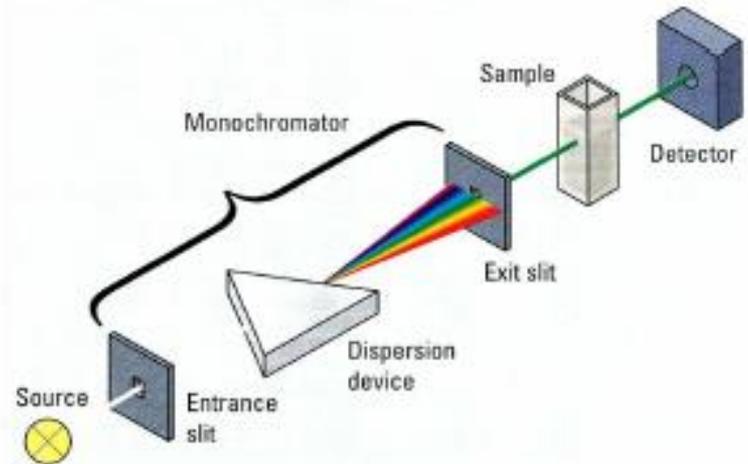
$$E_{\text{tot}} = E_{\text{elettronica}} + E_{\text{vibrazionale}} + E_{\text{rotazionale}}$$



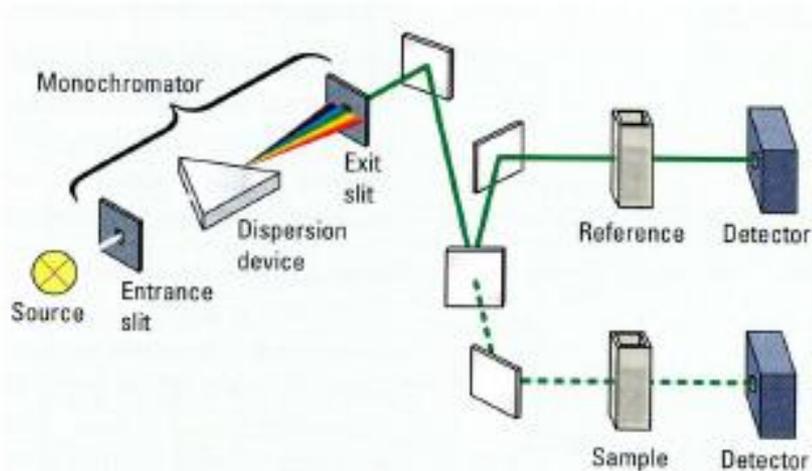
Livelli energetici e transizioni elettroniche in una molecola fluorescente

- La **spettrofotometria** : tecnica che misura l'assorbimento di radiazione nella regione del visibile e ultravioletto
- La quantità di radiazione assorbita è proporzionale al numero di molecole che essa incontra nel cammino
- La legge di Lambert e Beer  
 $A = \log(I_o/I_t) = \epsilon cl$
- $\epsilon$  = coeff di estinzione molare  $M^{-1}.cm^{-1}$
- $I_o$  = luce incidente  $I_t$  = luce trasmessa

Spettrofotometro  
a singolo raggio

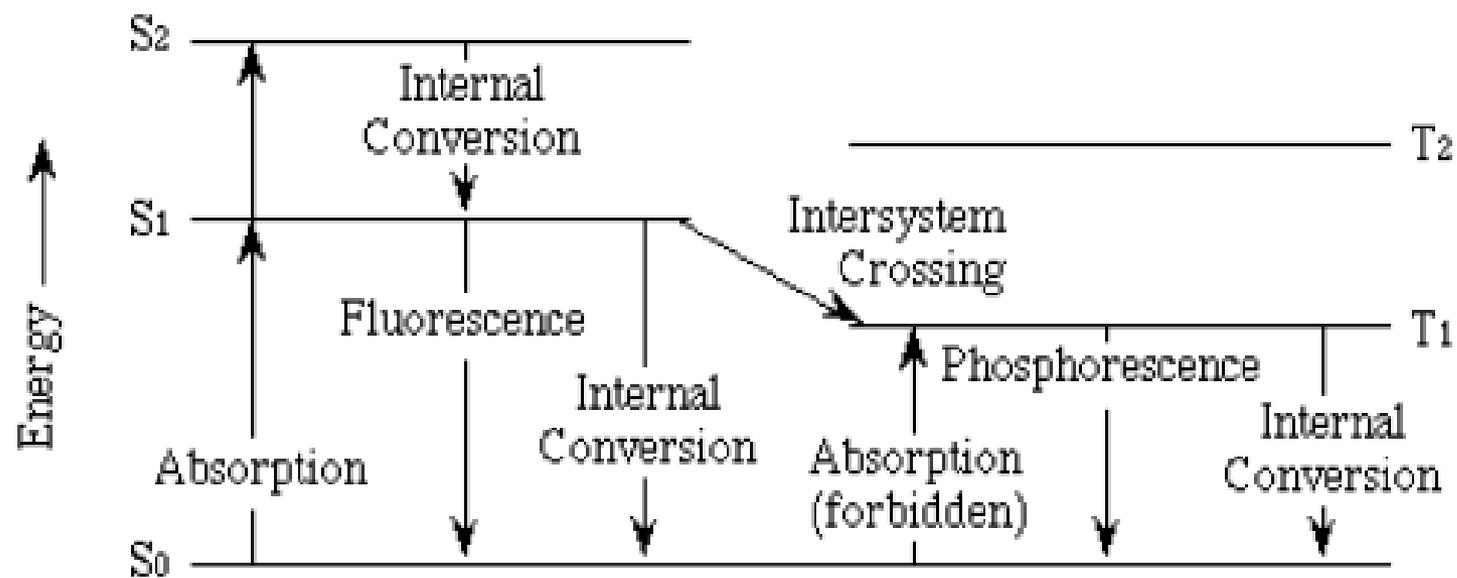


Spettrofotometro  
a doppio raggio



# SPETTROFLUORIMETRIA

- La fluorescenza è l' *emissione* di luce dovuta alla transizione di elettroni da un livello energetico maggiore ad uno minore
- La fluorescenza segue ad un evento di *eccitazione*, causato dall'assorbimento di una radiazione elettromagnetica
- La *lunghezza d'onda* della radiazione assorbita ha valori minori rispetto a quella emessa    **Shift di Stokes**
- La *differenza di energia* tra radiazione assorbita ed emessa viene dissipata sotto forma di calore (collisioni tra le molecole)
- Le radiazioni emesse appaiono come *spettri a banda*



L'emissione di fotoni in seguito all'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche può avvenire in un tempo più o meno breve:

*Fluorescenza*  $\Rightarrow$  intervallo di tempo tra eccitazione ed emissione dell'ordine di  $10^{-9} - 10^{-8}$  secondi;

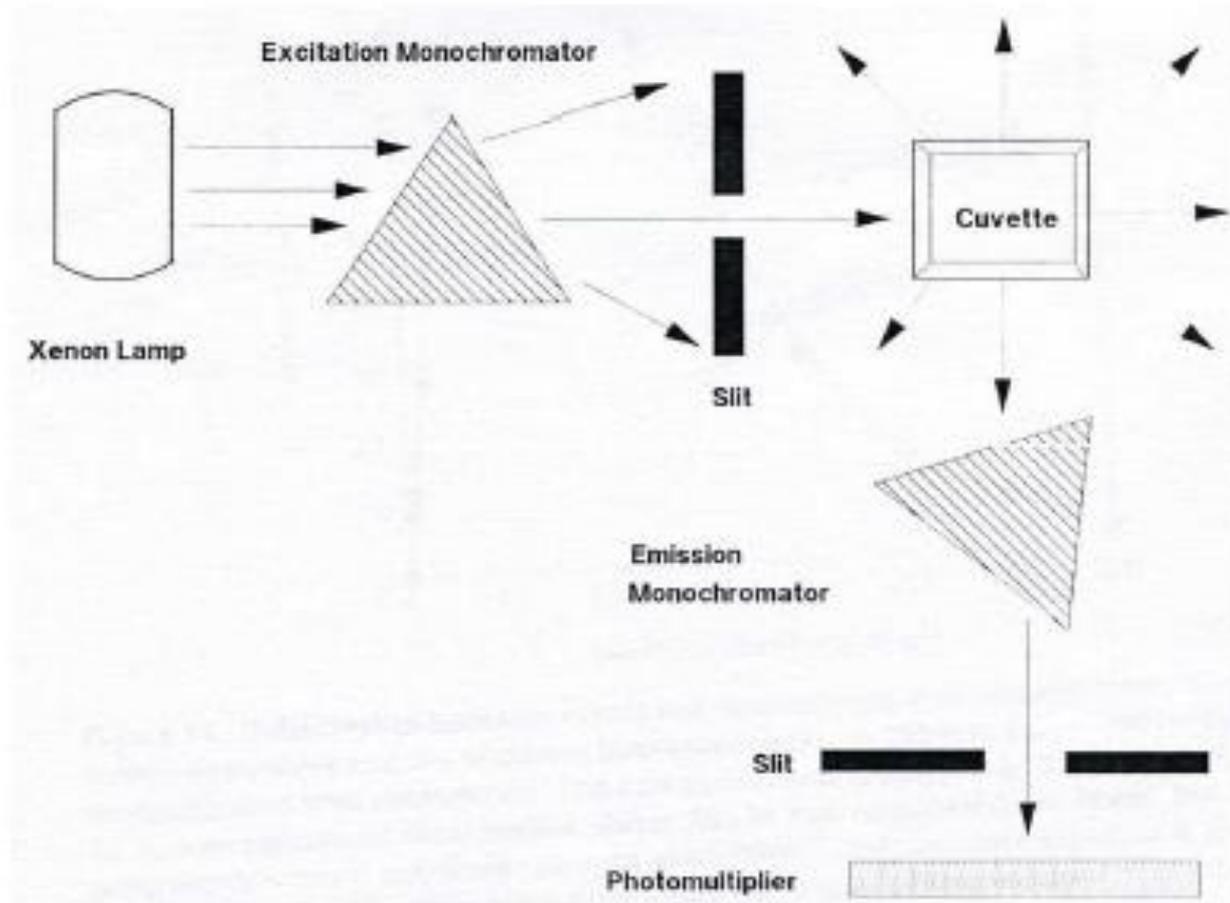
*Fosforescenza*  $\Rightarrow$  intervallo di tempo tra eccitazione ed emissione  $> 10^{-8}$  secondi.

Nel fenomeno della fluorescenza si distingue una luce eccitante ed una luce fluorescente, che sono caratteristiche di ogni molecola fluorescente.

Dall'analisi delle radiazioni capaci di eccitare la fluorescenza si ricava lo spettro di eccitazione, che è in pratica lo spettro di assorbimento della sostanza; lo spettro di fluorescenza o di emissione è l'analisi della luce emessa per fluorescenza.

La fluorescenza si può sfruttare sia per analisi qualitative che quantitative  $\Rightarrow$  fluorimetria e spettrofluorimetria.

# Componenti di uno spettrofluorimetro



La misura della fluorescenza è una misura relativa

- Si definisce *EFFICIENZA QUANTICA*

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

- L'efficienza quantica è *indipendente* dalla lunghezza d'onda di eccitazione
- A basse concentrazioni della sostanza fluorescente (*fluoroforo*), l'intensità della fluorescenza ( $I_f$ ) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = 2,3I_0\varepsilon_\lambda cdQ$$

$c$  è la *concentrazione del fluoroforo*

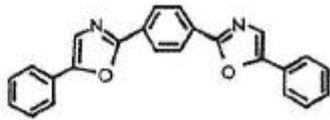
$d$  è il *cammino ottico* della luce nella soluzione fluorescente

$\varepsilon_\lambda$  è il *coefficiente di estinzione molare* del fluoroforo

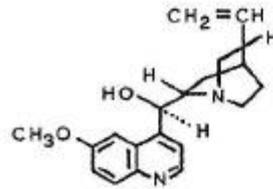
$I_0$  è l'*intensità della radiazione incidente*

- | L'analisi di spettri di fluorescenza permette di avere informazioni sulla struttura di proteine, di catene polinucleotidiche, di membrane cellulari. Lo spettro di fluorescenza, sia quello *intrinseco*, dovuto agli amminoacidi aromatici o di eventuali coenzimi, che quello *estrinseco*, acquisito per aggiunta di derivati fluorescenti, si modifica in presenza di ligandi fisiologici o artificiali, e ciò consente anche lo studio di modificazioni conformazionali delle proteine.

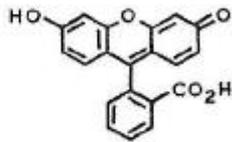
# *FLUOROFORI ESTRINSECI*



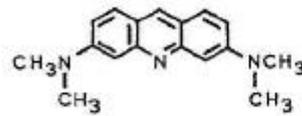
**POPOP**



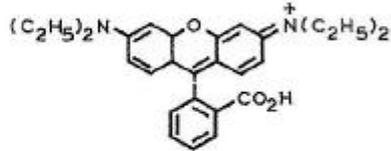
**Quinine**



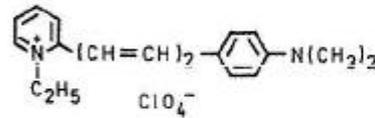
**Fluorescein**



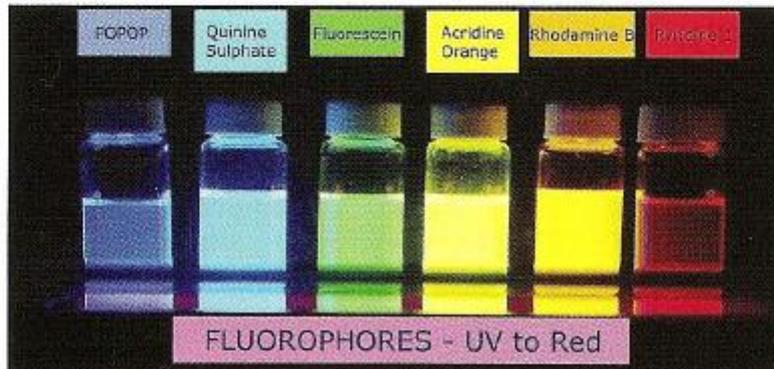
**Acridine Orange**



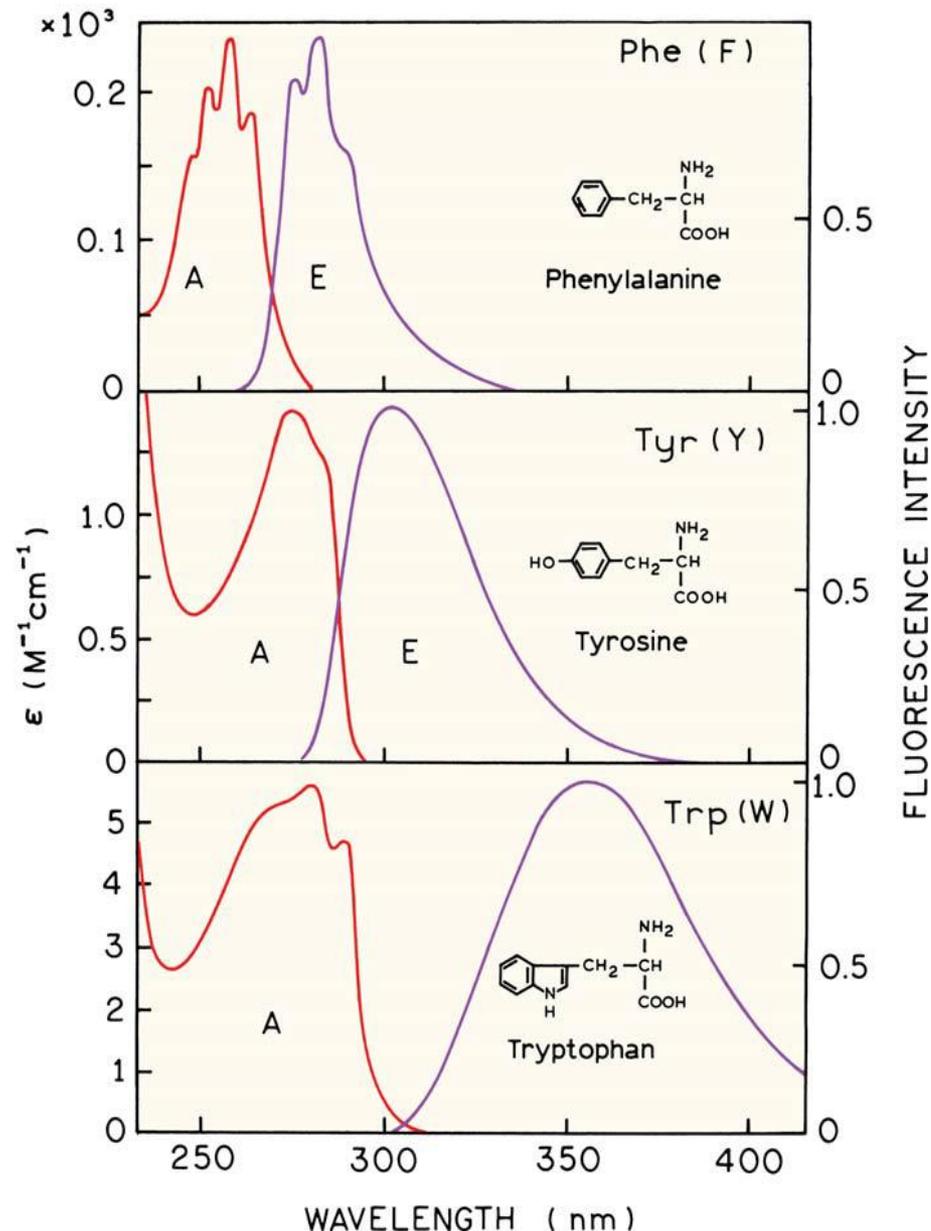
**Rhodamine B**



**Pyridine 1**



# Spettri di assorbimento ed emissione degli amminoacidi aromatici

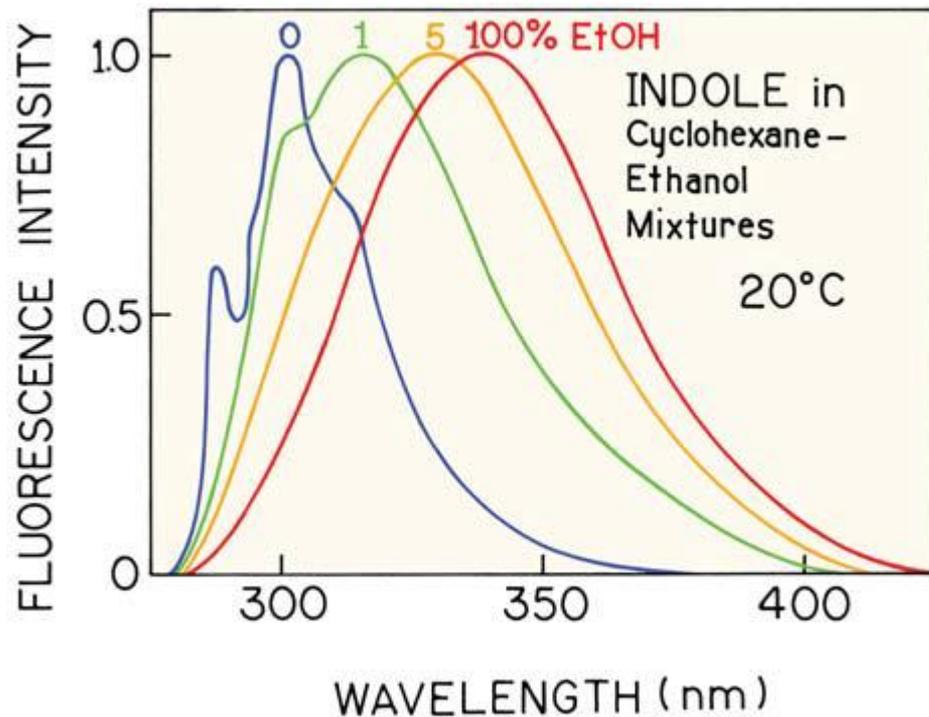


Analisi della fluorescenza intrinseca del triptofano

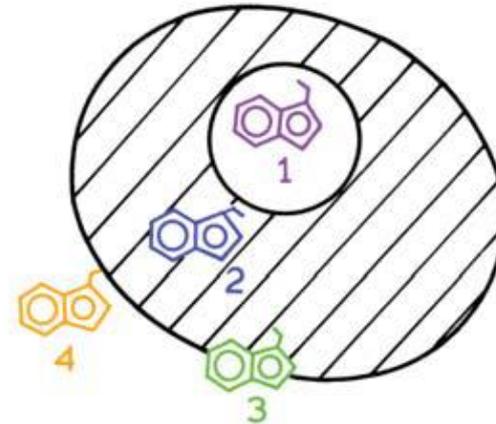
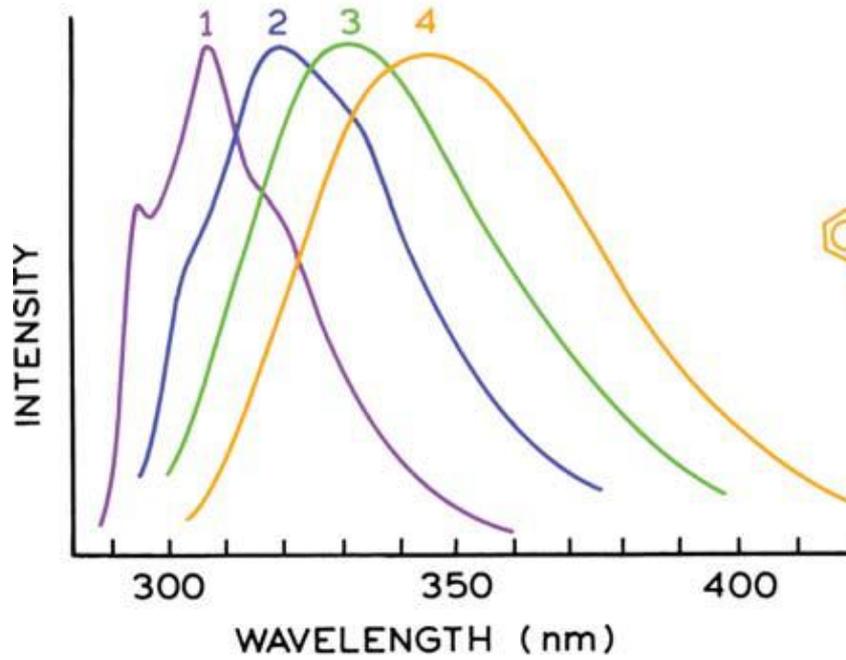
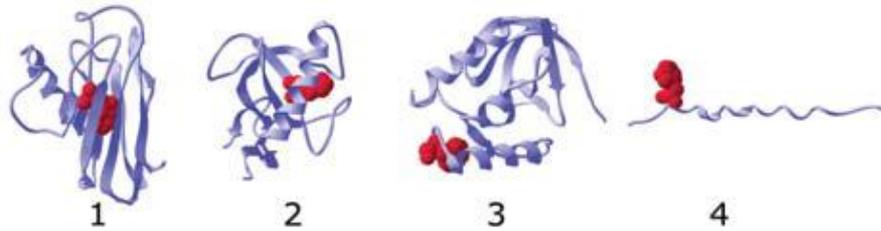
Lo spettro di emissione del triptofano è sensibile alla polarità del mezzo

Red Shift → ambiente polare

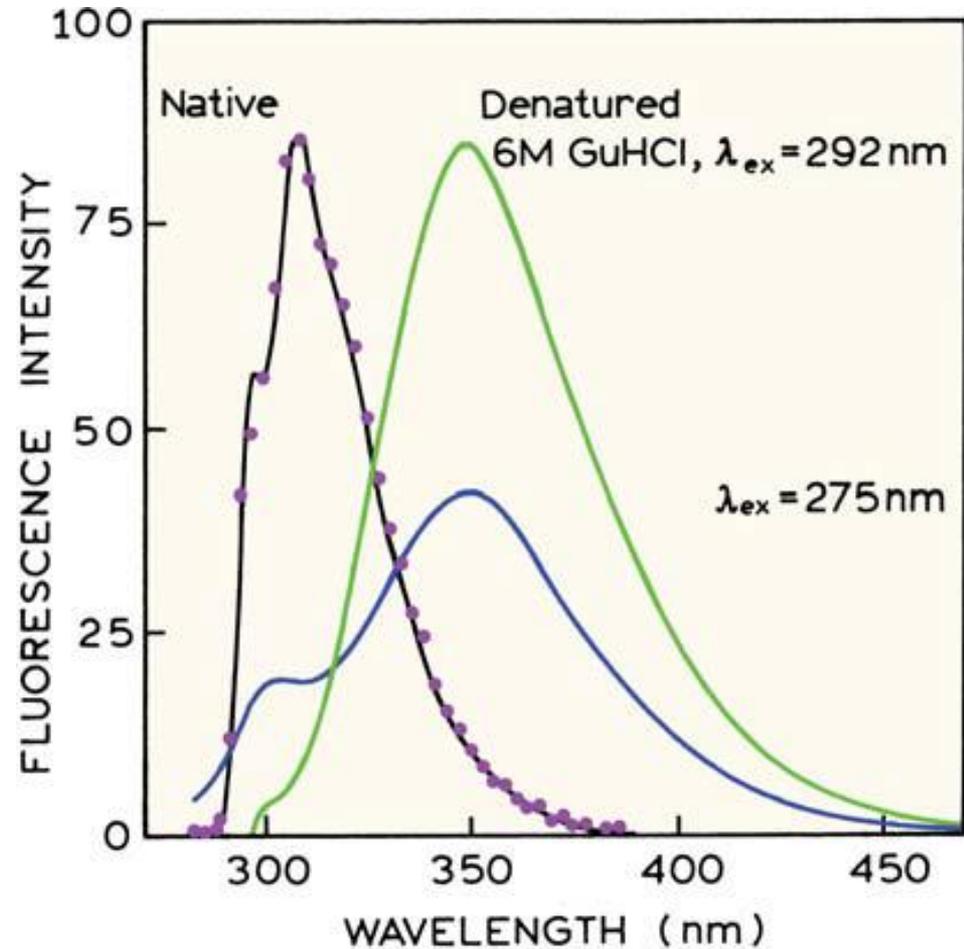
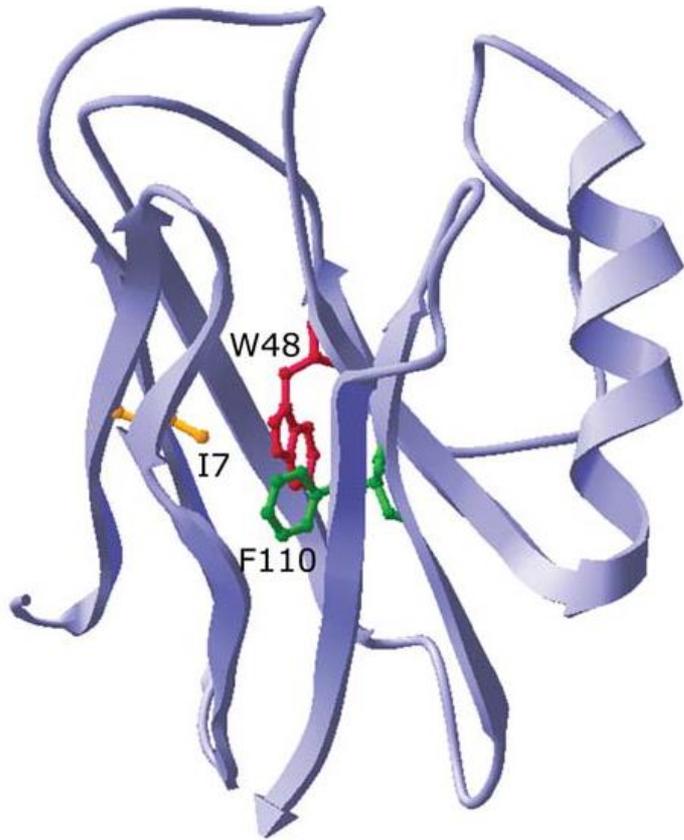
blu Shift → ambiente apolare

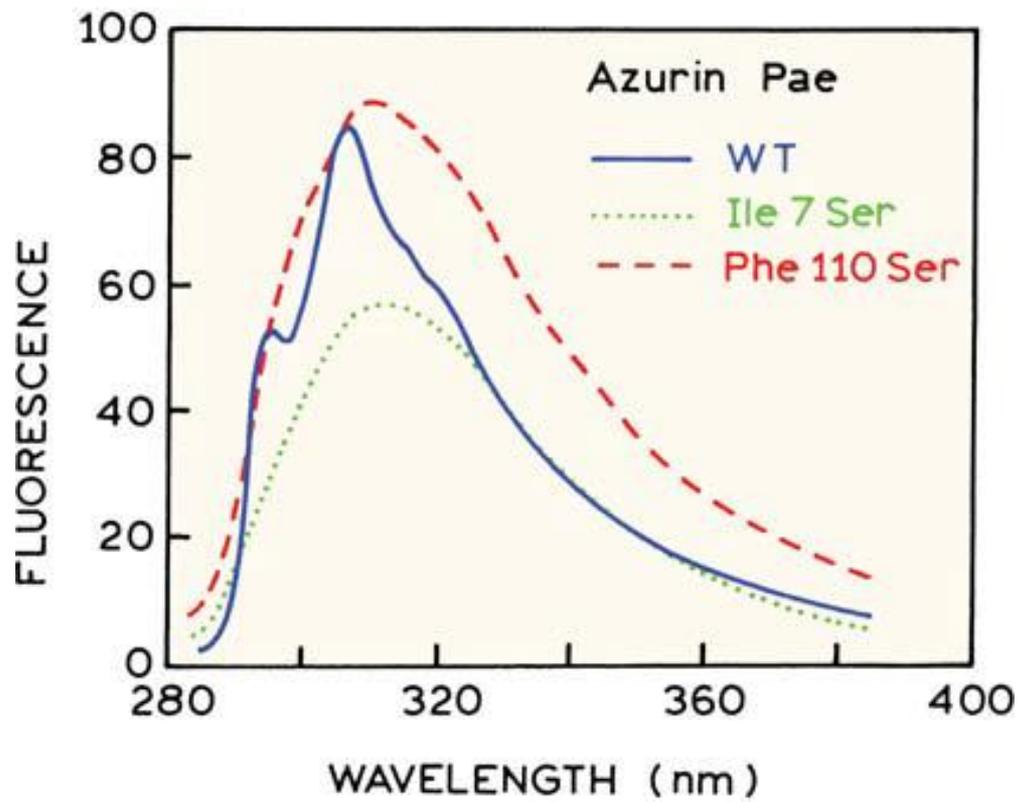
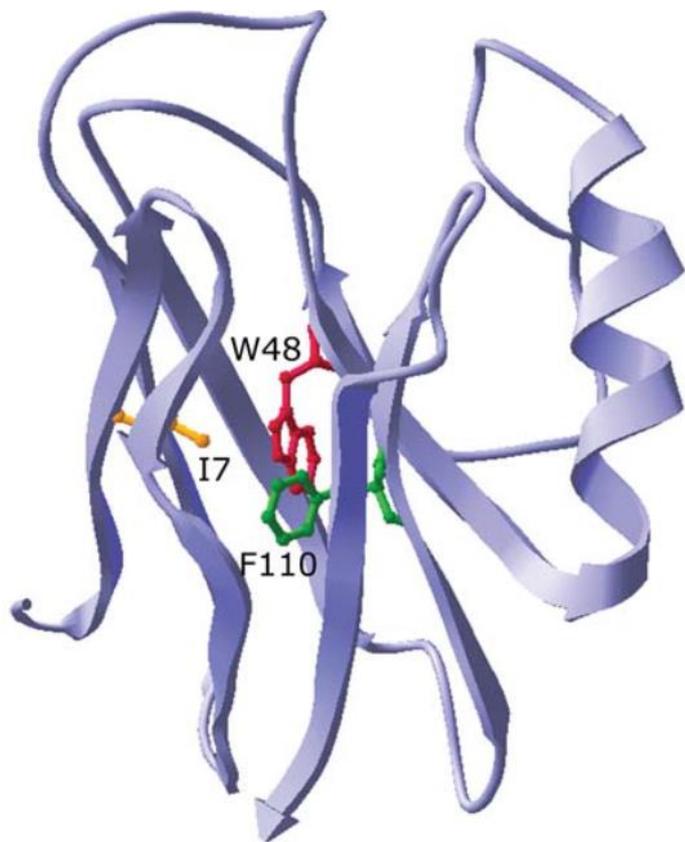


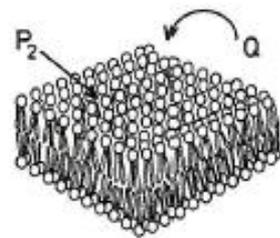
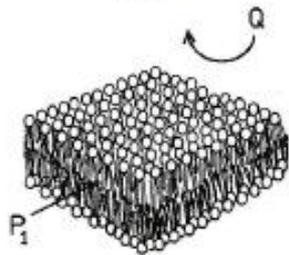
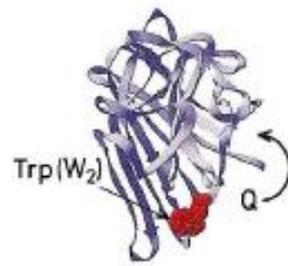
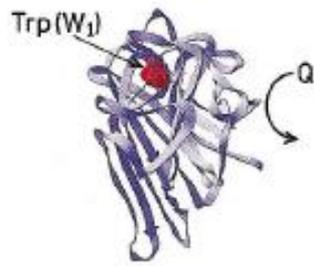
- 1 apo azzurrina
- 2 ribonucleasi
- 3 nucleasi
- 4 glucagone



# Spettri di fluorescenza dell'Azzurrina nella forma nativa e denaturata

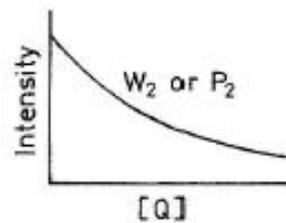
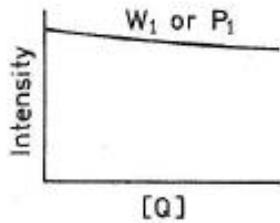
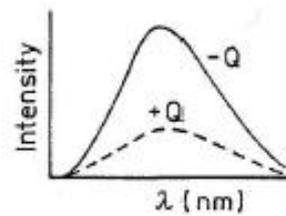
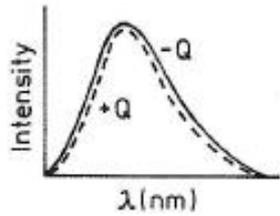






Buried Tryptophan  
or Probe

Surface Tryptophan  
or Probe



# QUENCHING DELLA FLUORESCENZA

Ci sono quencher dinamici e quencher statici

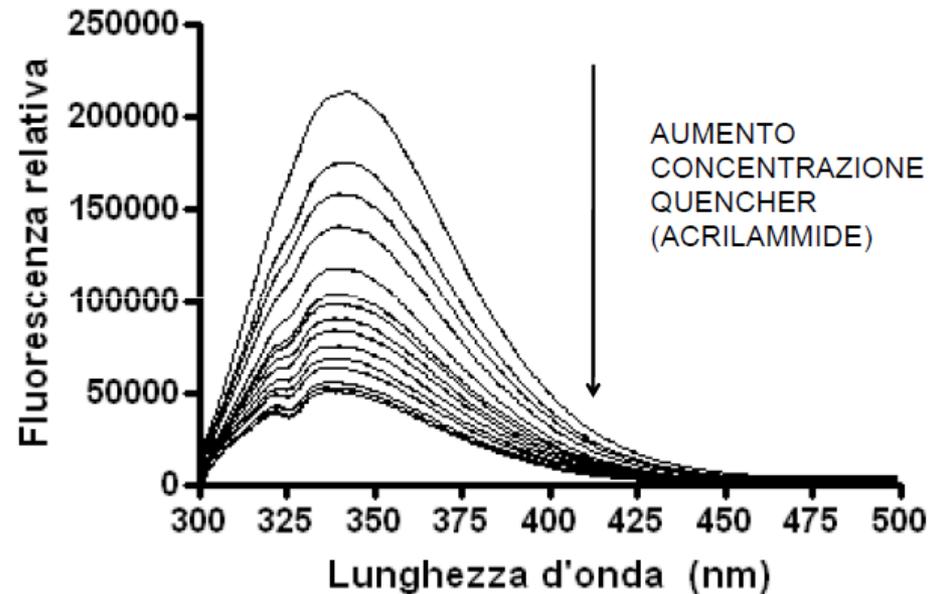
- Dinamici interagiscono con il fluoroforo eccitato producendo una diseccitazione del fluoroforo che porta ad una riduzione dell'intensità della fluorescenza ed ad una diminuzione dell'emivita del fluoroforo
- Statici interagiscono con il fluoroforo non eccitato quindi non interferiscono con l'emivita del fluoroforo

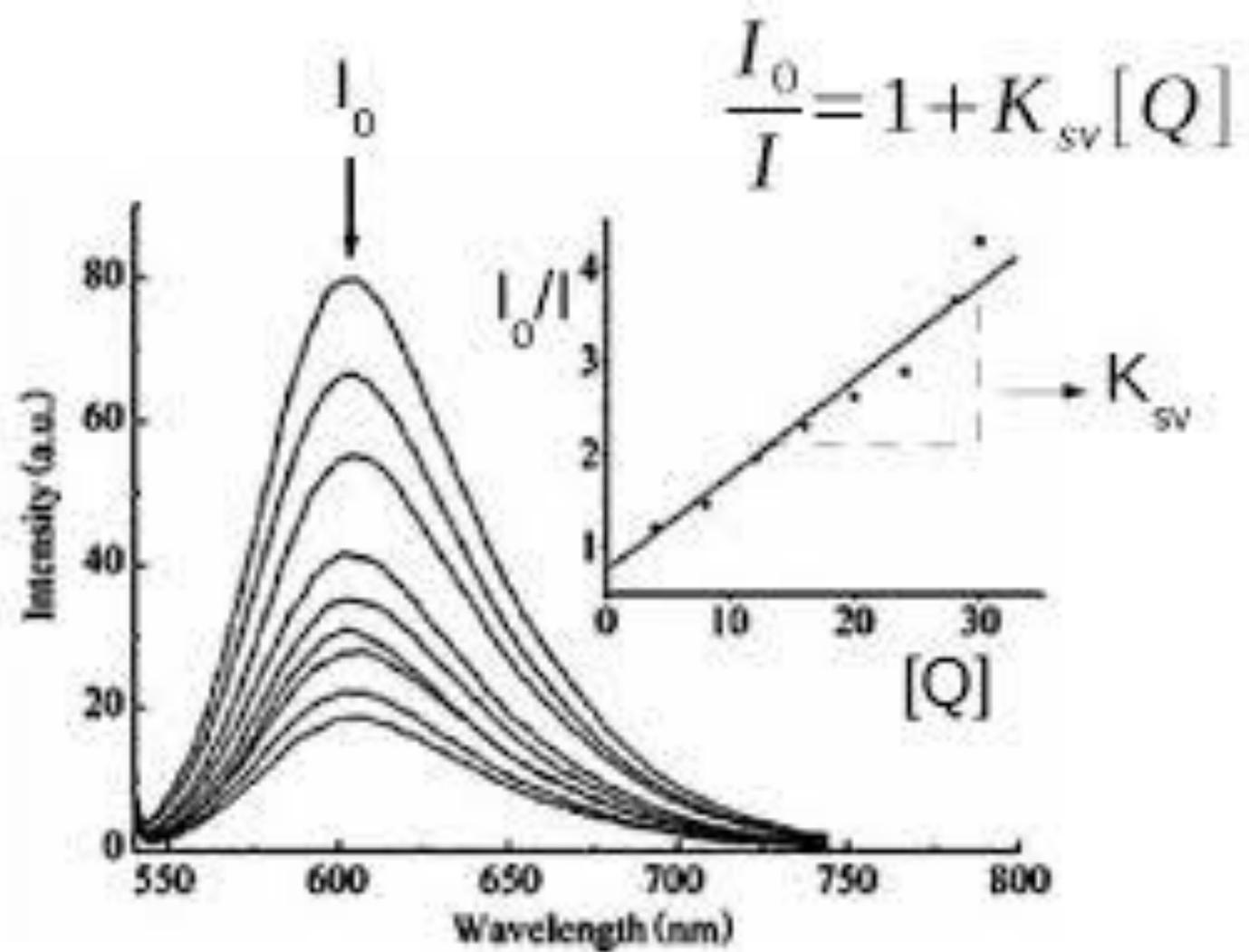
Acrilammide piccola molecola neutra in grado di quenchare sia fluorofori esterni che interni proteina

Ioduro molecola carica in grado di interagire con fluorofori esterni alla proteina

$$F_0/F = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

- $K_{SV}$  Costante di Stern-Volmer  
 $= K_q \cdot \tau_0$  (tempo di vita del Fluoroforo)
- $K_{SV}$





Se l'interazione tra Ligando e Proteina porta ad una variazione dell'intensità della fluorescenza

Una equazione analoga può essere utilizzata per ricavare la costante di legame  $K_a$

$$F_0/F = 1 + K_a[L]$$

$F_0$  fluorescenza in assenza di Ligando

$F$  fluorescenza in presenza di Ligando

# cAMP Receptor CRP

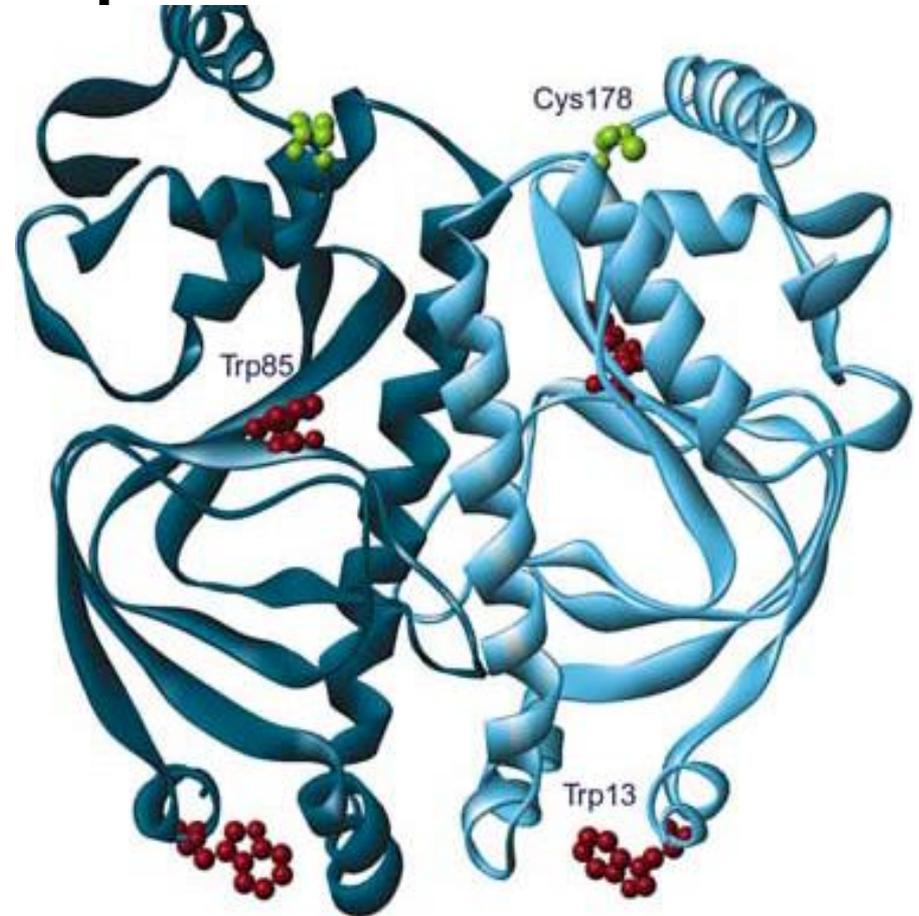
È un fattore di trascrizione che regola l'espressione di molti geni nei procarioti costituito da due subunità di 23kD

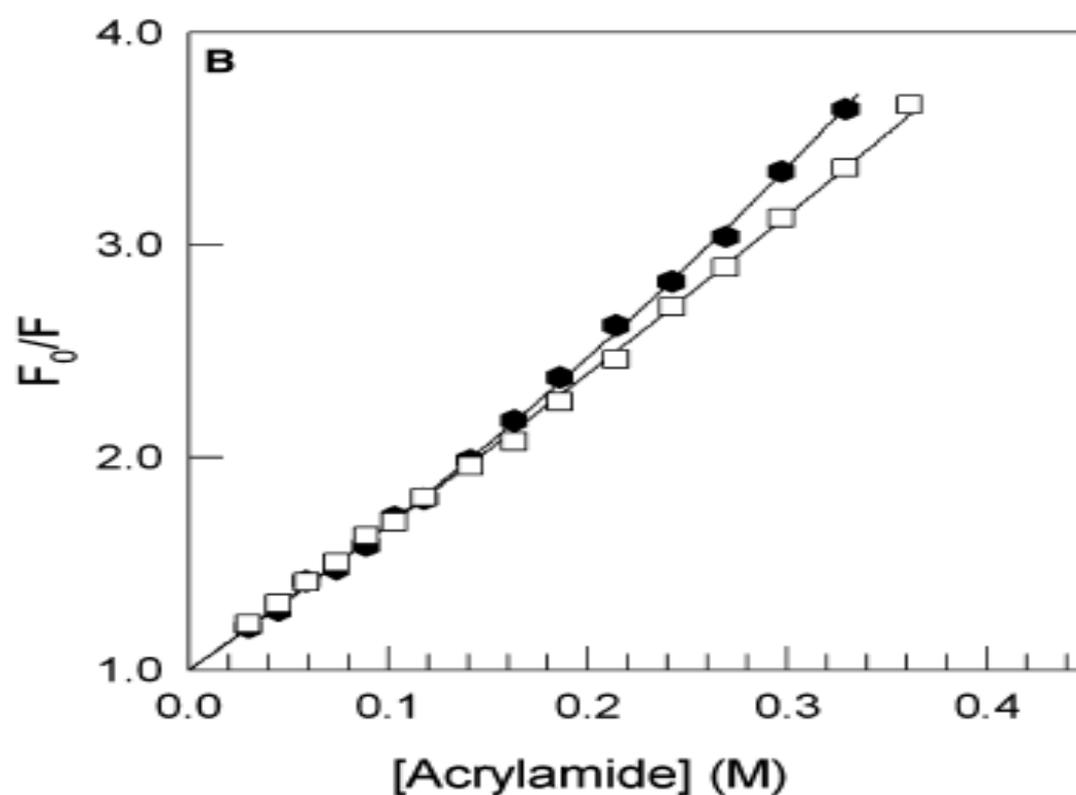
Nterminale 1-133 dominio di dimerizzazione e di legame con CRP  
Cterminale lega il DNA

134-138 ansa flessibile che collega i due domini

Ogni subunità lega 2 cAMP con diversa affinità

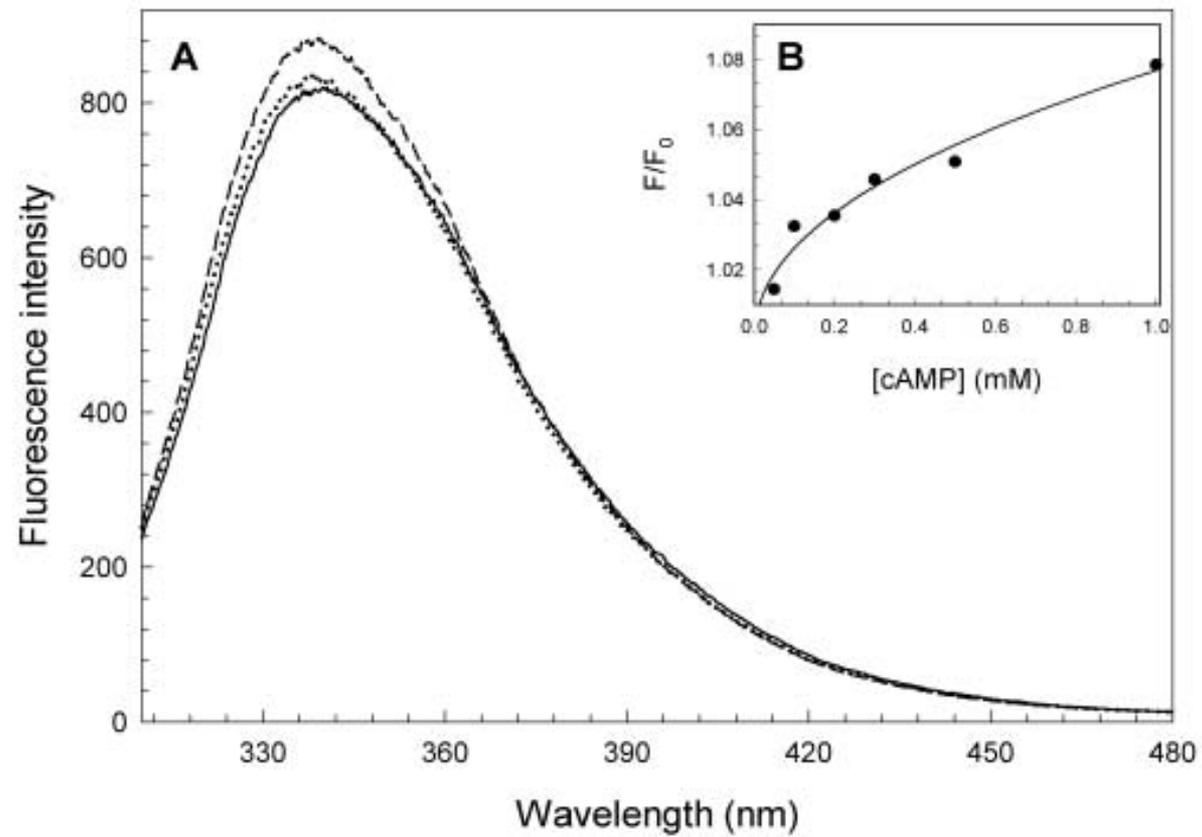
cAMP è un attivatore allosterico





$f_2 = 0.40$ . (B) Typical Stern-Volmer plots for acrylamide quenching of CRPW85A (●) and of CRPW85A-(cAMP)<sub>2</sub> (□). The solid lines represent the best fits with the following parameters: CRPW85A,  $K_{SV} = 5.64 \text{ M}^{-1}$ ,  $V = 0.74 \text{ M}^{-1}$ ,  $f = 1$ ; CRPW85A-(cAMP)<sub>2</sub>,  $K_{SV} = 6.45 \text{ M}^{-1}$ ,  $V = 0.22 \text{ M}^{-1}$ ,  $f = 1$ . The excitation was at 295 nm and the emission at 340 nm.

# CRPW13A



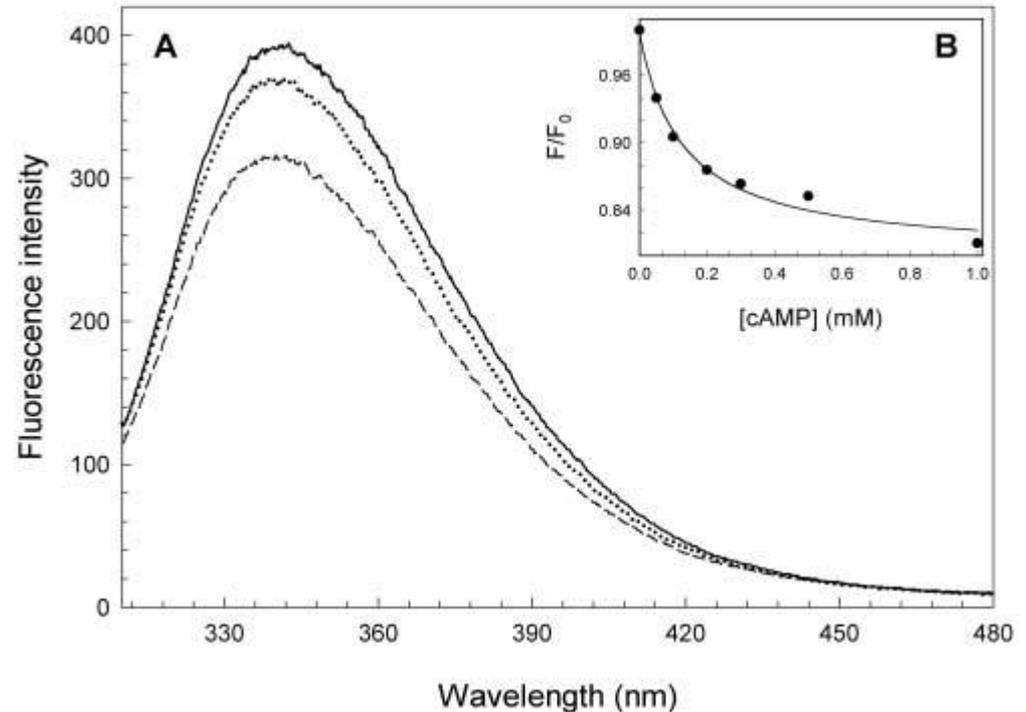
# Determinazione della costante di equilibrio $K_d$ tra cAMP e CRP

## • CRPW85A

cAMP 200 $\mu$ M causa

- decremento del 13% dell'intensità di fluorescenza e uno
- shift verso il blu da 340 a 342,5

cAMP determina un cambiamento conformazionale



# FRET

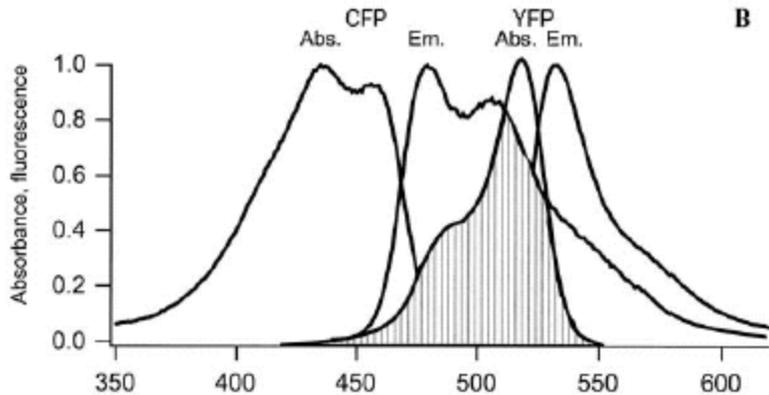
## Fluorescence Resonance Energy Transfer

•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(1-10nm)

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

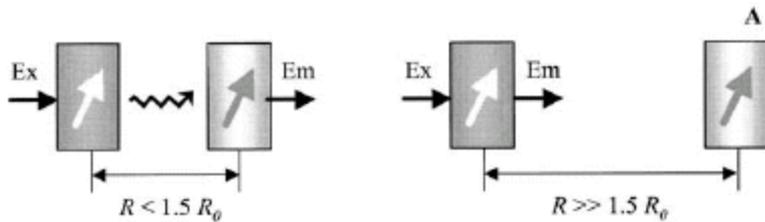


$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

E efficienza di trasferimento

R distanza tra cromofori

$R_0$  distanza critica di trasferimento alla quale avviene il 50% del trasferimento di energia

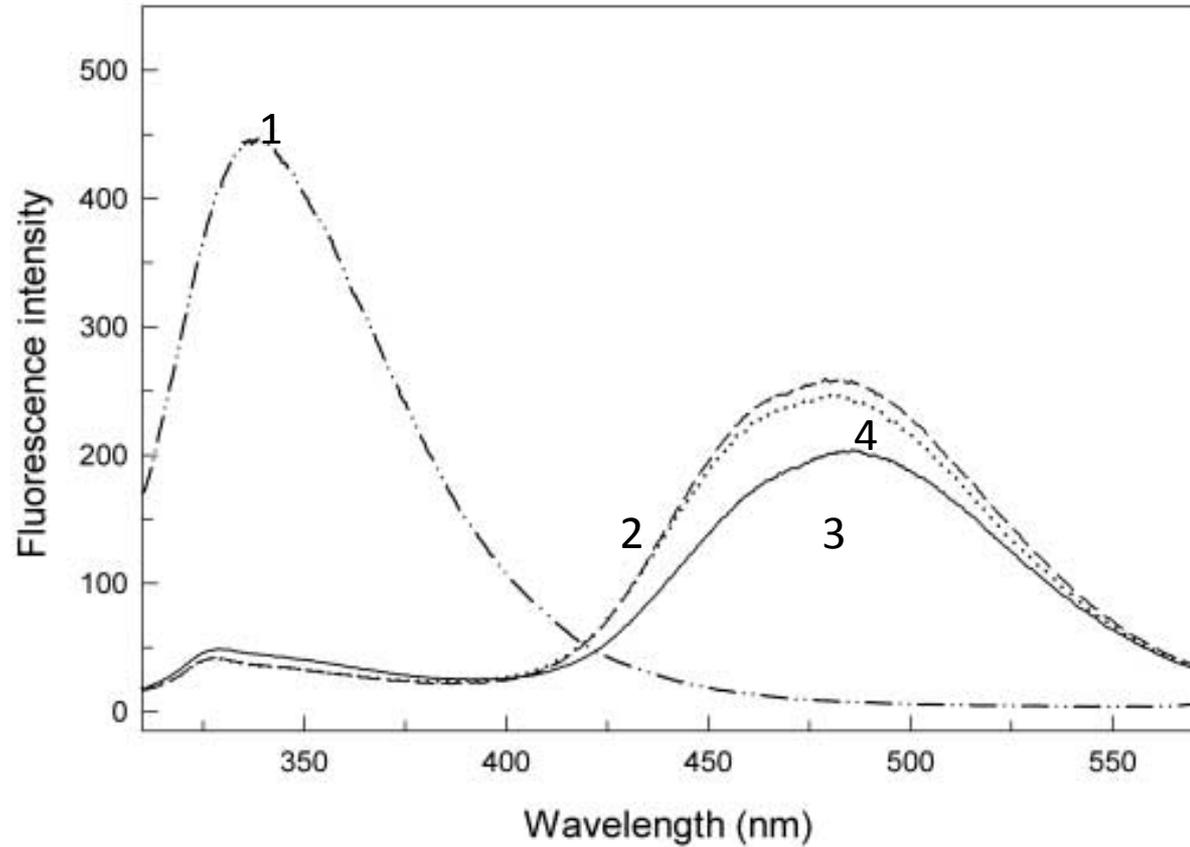
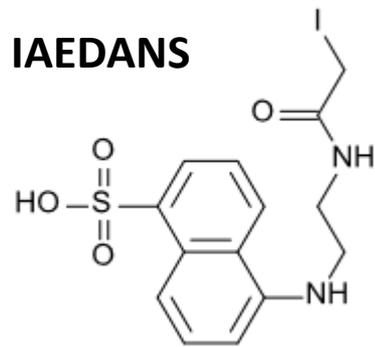


# Applicazioni della FRET

- ◆ Interazioni proteina-proteina *in vitro*  
(Cambiamenti conformazionali di  
proteine)

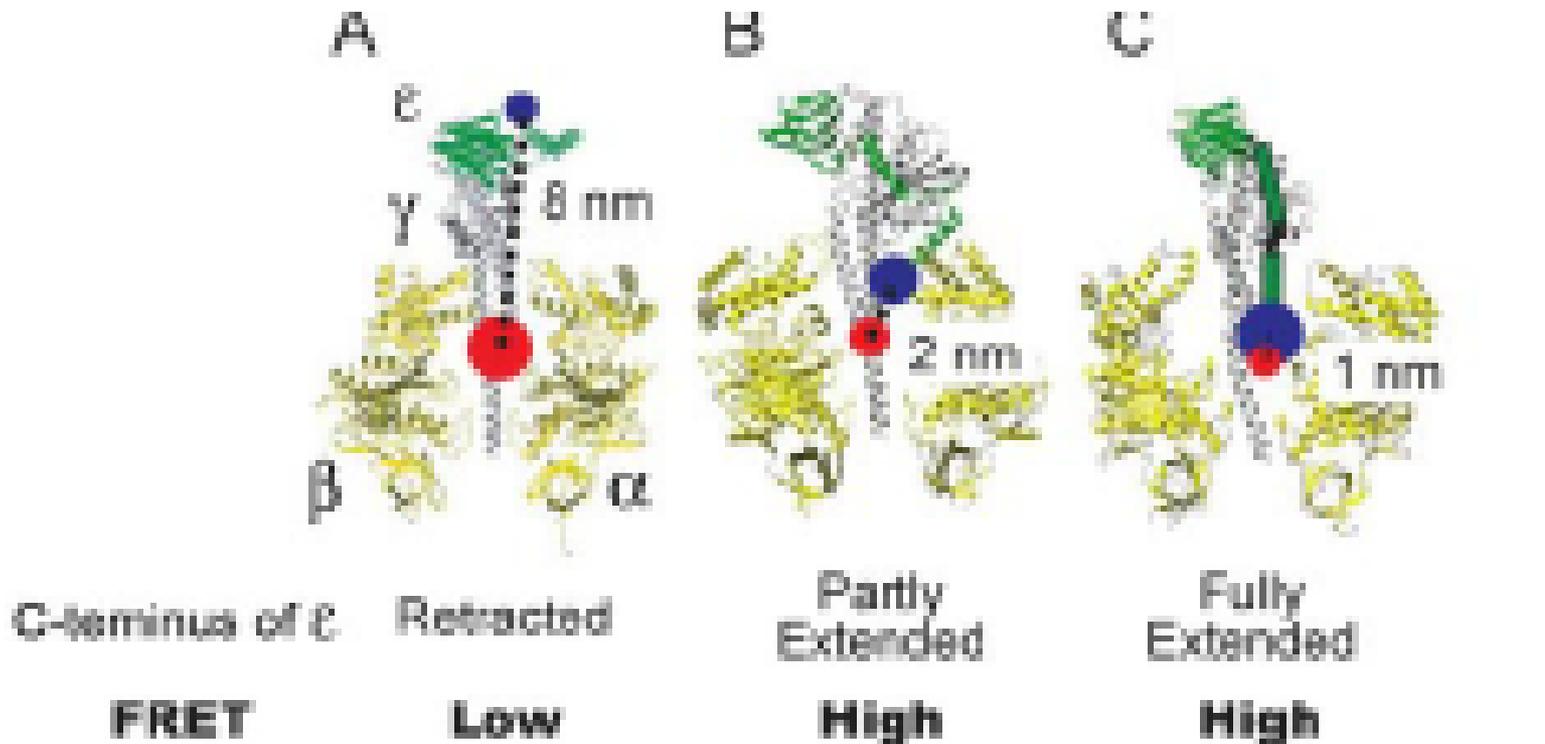
# FRET tra W85 e C178

- CRPW13A



5-({2-  
[(iodoacetyl)amino]et  
hyl}amino)naphthalen  
e-1

# Analisi delle modifiche conformazionali della subunità $\epsilon$ della Fo F1 ATPasi mediante FRET

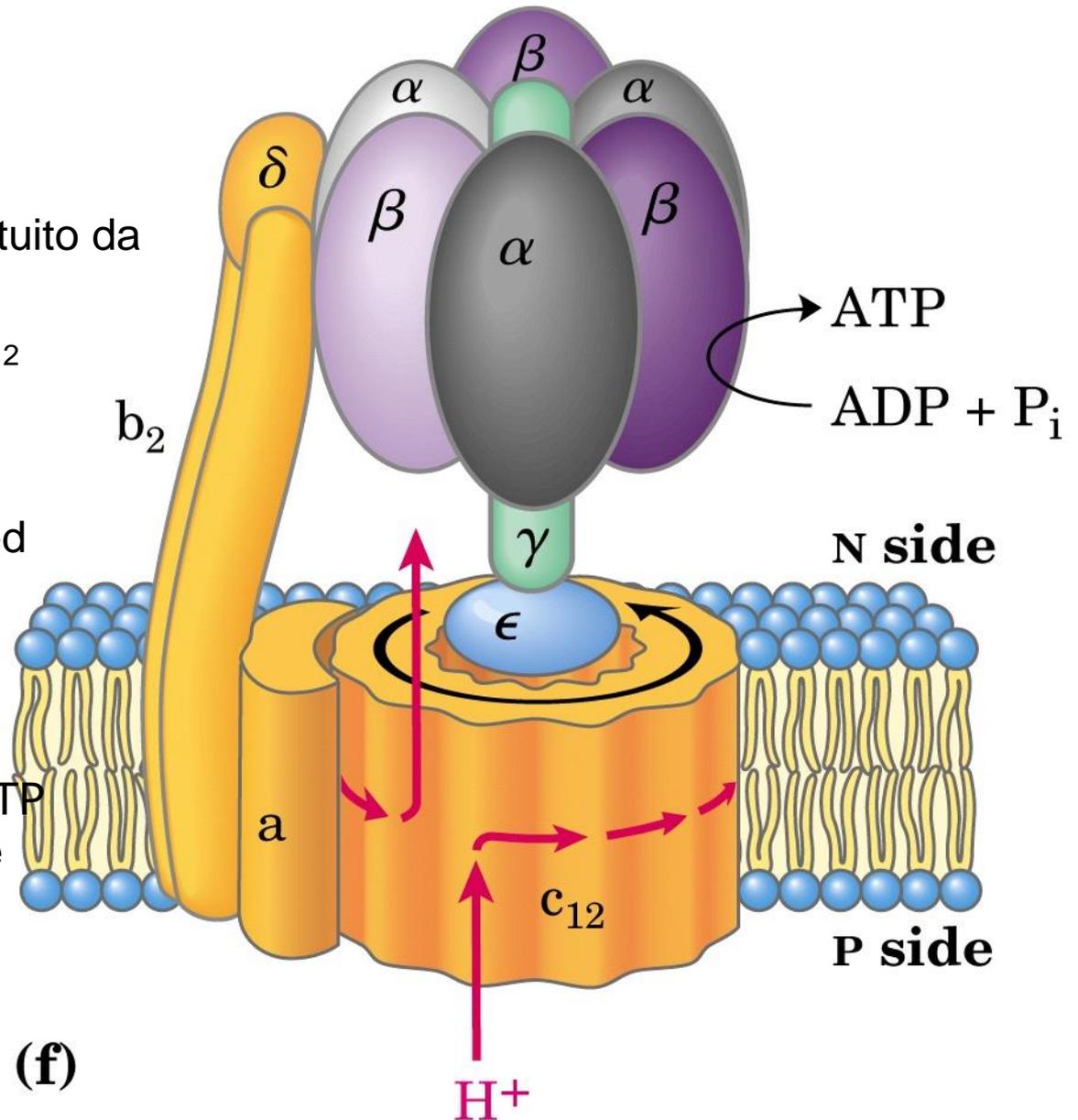


# F0 F1 ATPasi

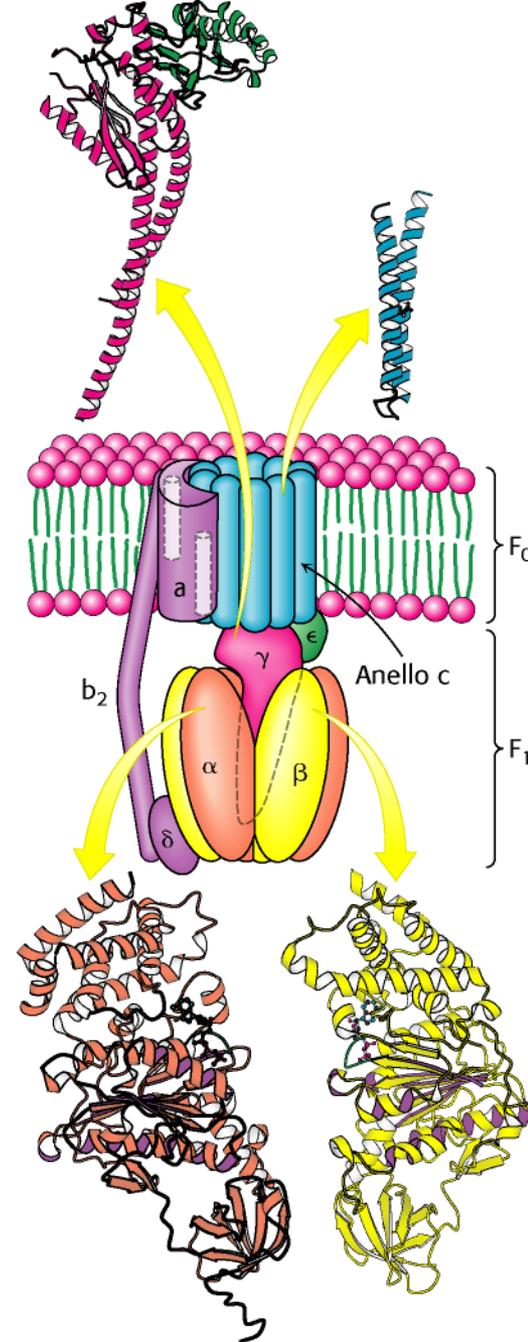
F0 è un canale protonico costituito da tre tipi di subunità **a, b, c**  
Nelle seguenti quantità  $ab_2c_{10-12}$

F1 catalizza la sintesi di ATP ed è costituito da nove subunità  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$

ogni subunità  $\beta$  ha un sito catalitico per la sintesi di ATP  
La subunità  $\gamma$  è l'asse centrale



L'enzima è costituito da due parti una **mobile** costituita da **c** e da  **$\gamma$  $\epsilon$**  in grado di ruotare e una **unità immobile** o statore costituito dal resto della molecola



Mediante FRET è stato dimostrato che le due alfa eliche di  $\epsilon$  cambiano conformazione passando in presenza di ATP da una forma estesa HIGH FRET ad una forma ritratta LOW FRET

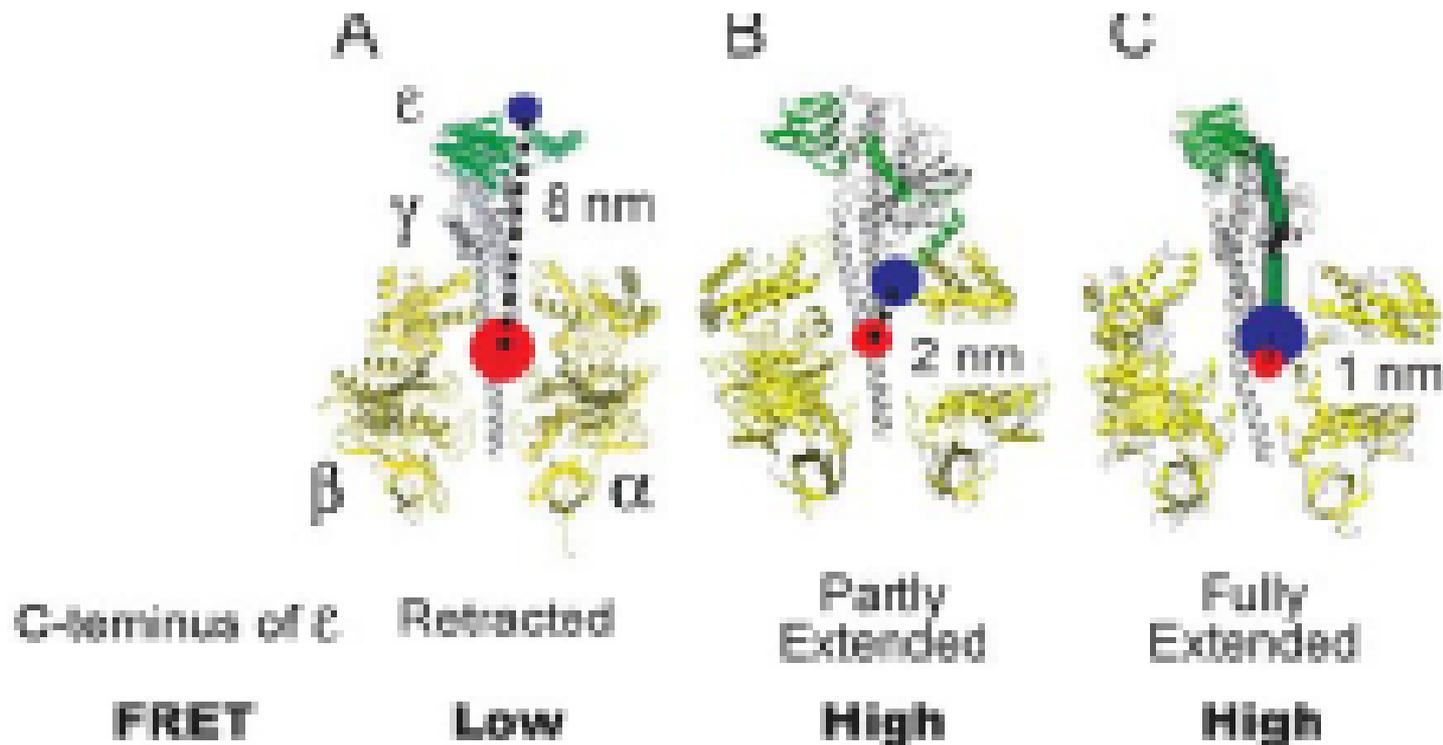
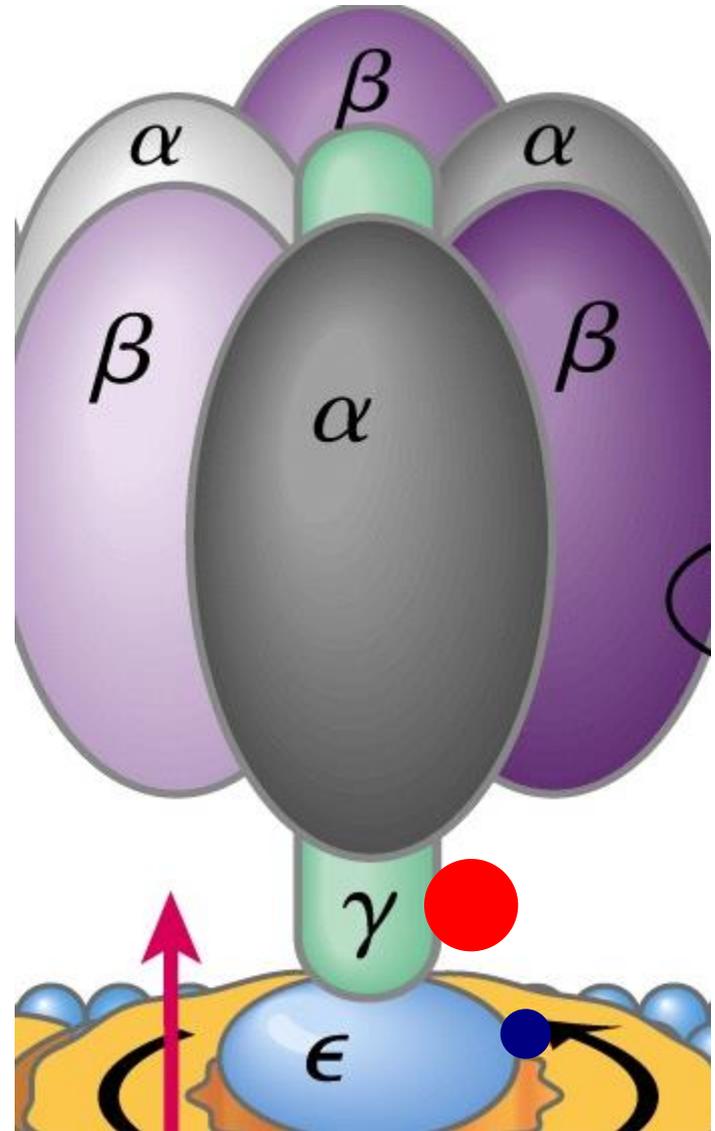


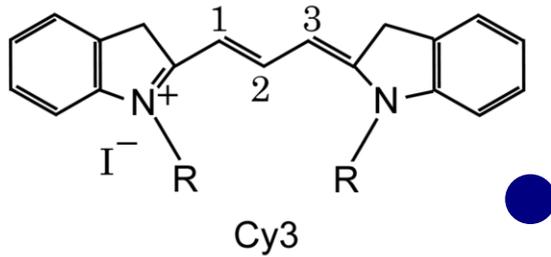
FIGURE 1. Probing conformational dynamics of the  $\epsilon$  subunit by FRET. Structure of

Espressione di  $\alpha_3\beta_3\varepsilon\gamma$

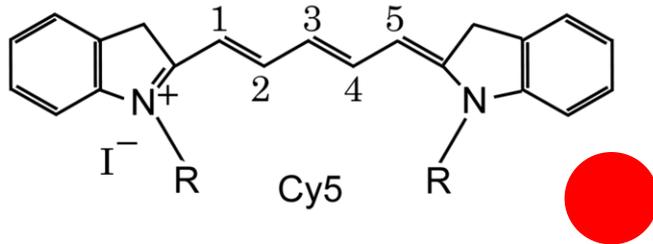
$\alpha_3\beta_3\gamma(S3C-Cy3)$  ●

$\varepsilon(134C-Cy5)$  ●



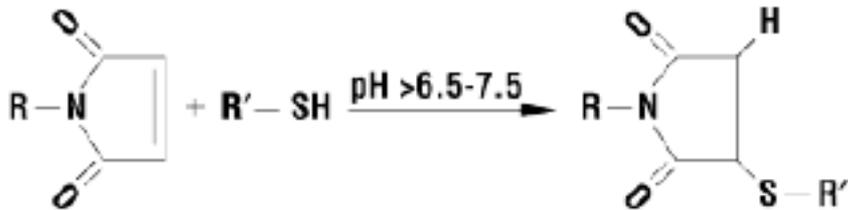


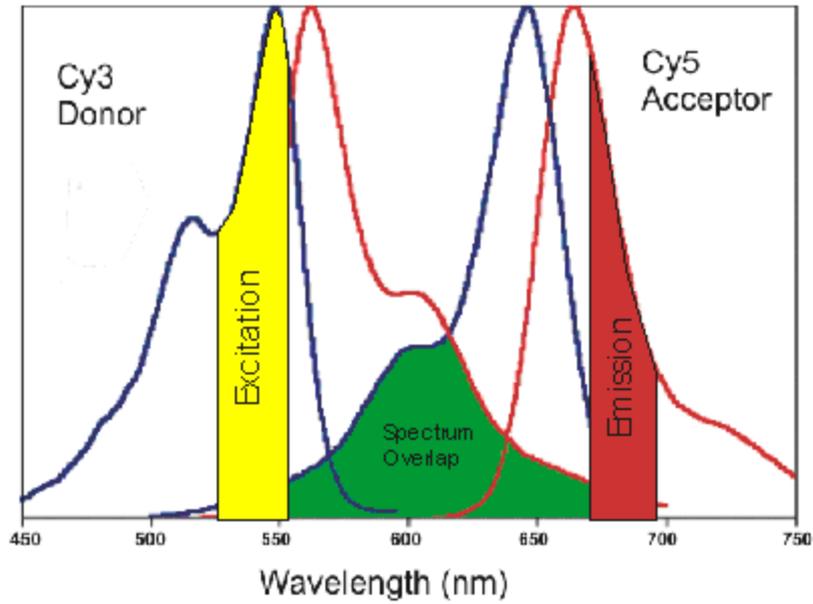
Assorbe a 530 [nm](#) and emette at 570 (615) [nm](#)



Assorbe a 625 [nm](#) and emette at 670 [nm](#),

I due fluorofori sono stati coniugati ad una cisteina della proteina mediante reazione con la maleimide





Spettri di fluorescenza di

$\alpha_3\beta_3\gamma(S3C-Cy3)$

linea tratteggiata

Assorbe a 530 [nm](#) emette a 570 [nm](#),

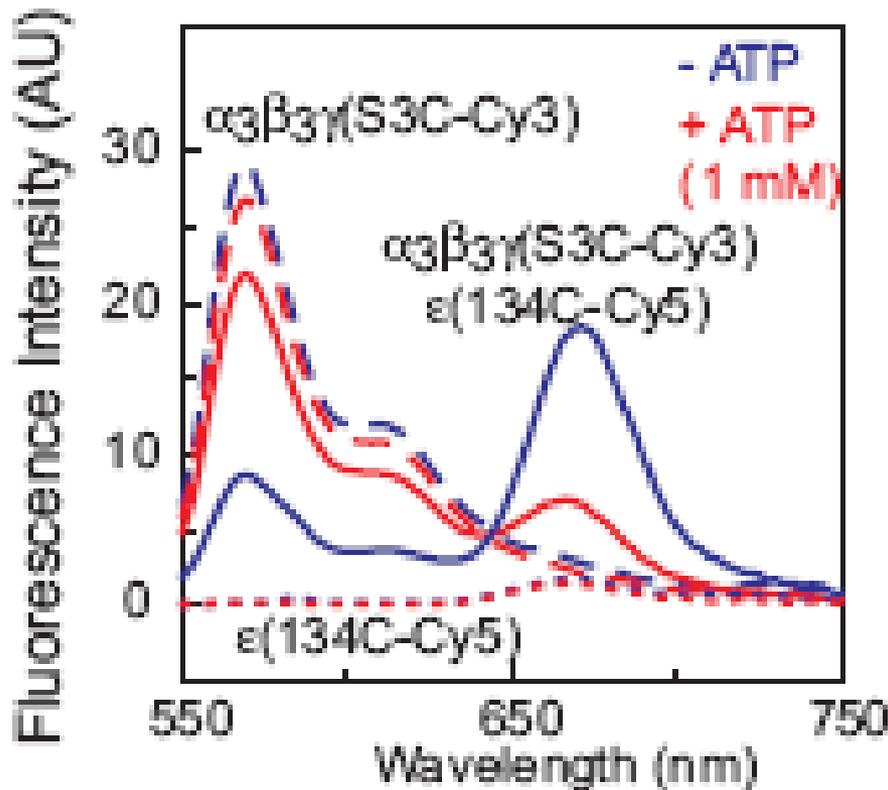
$\epsilon(134C-Cy5)$ ,

linea punteggiata

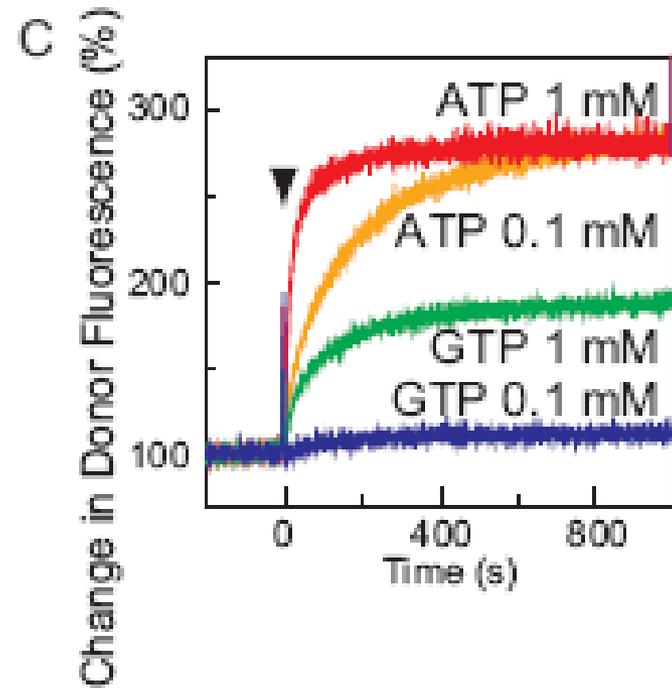
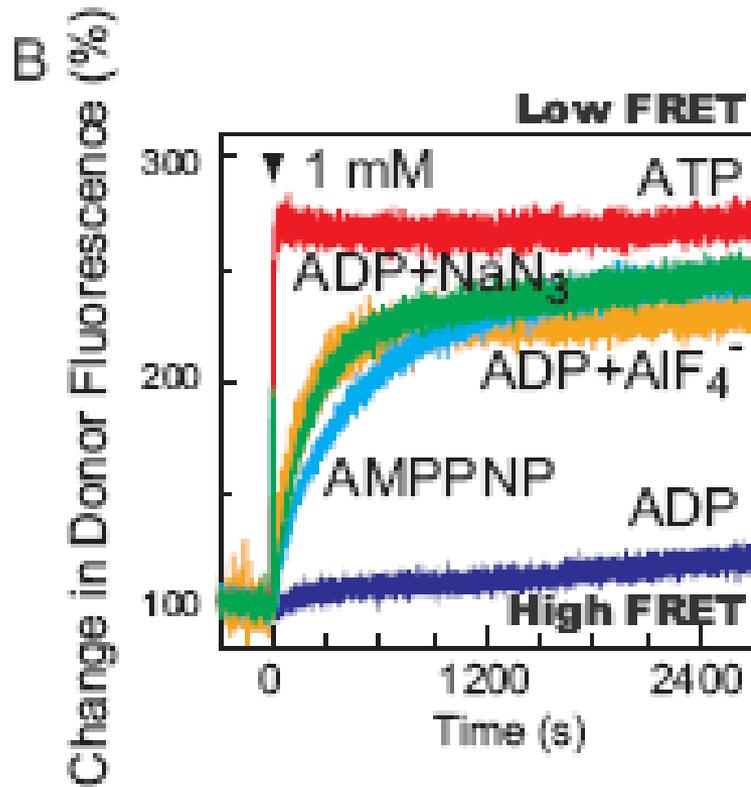
Assorbe a 649 nm emette a 670 [nm](#),

$\alpha_3\beta_3\gamma(S3C-Cy3) \epsilon(134C-Cy5)$ ,

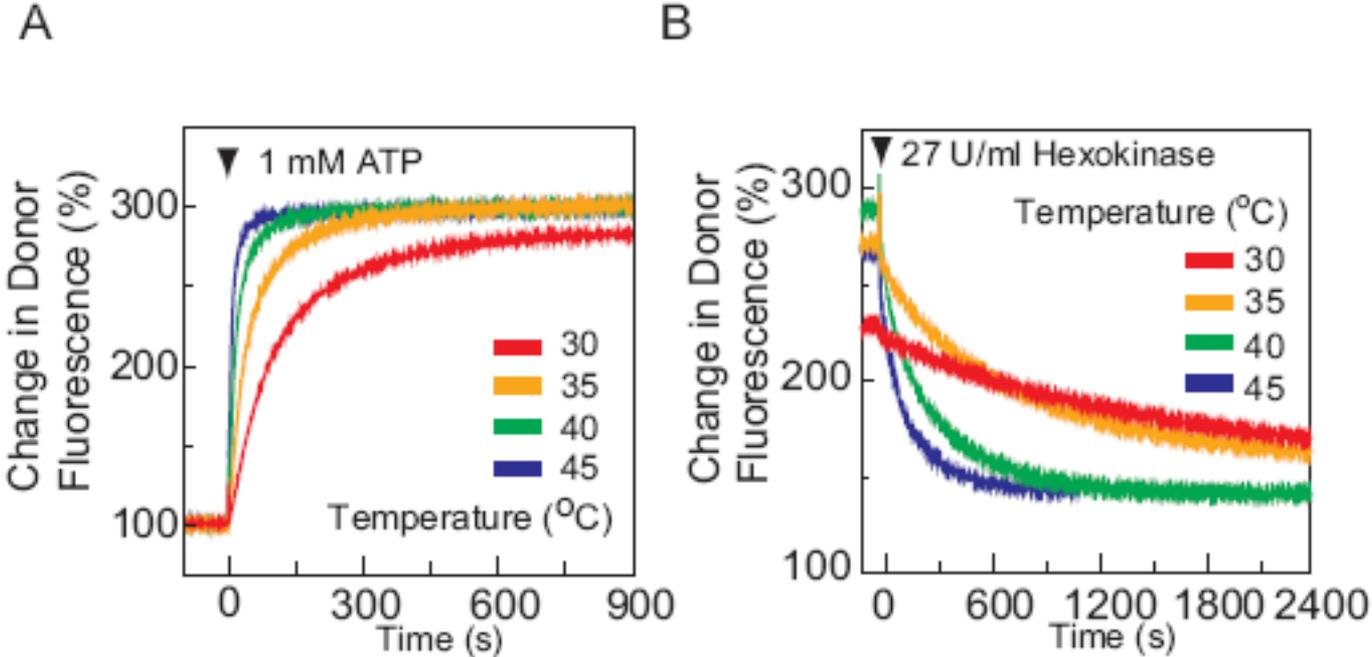
linea continua



L'ATP ma non l'idrolisi di ATP incrementa lo spettro di fluorescenza del donatore



Il cambiamento conformazionale indotto dall' ATP è reversibile infatti l' aggiunta di esochinasi porta ad una decremento della fluorescenza donatore



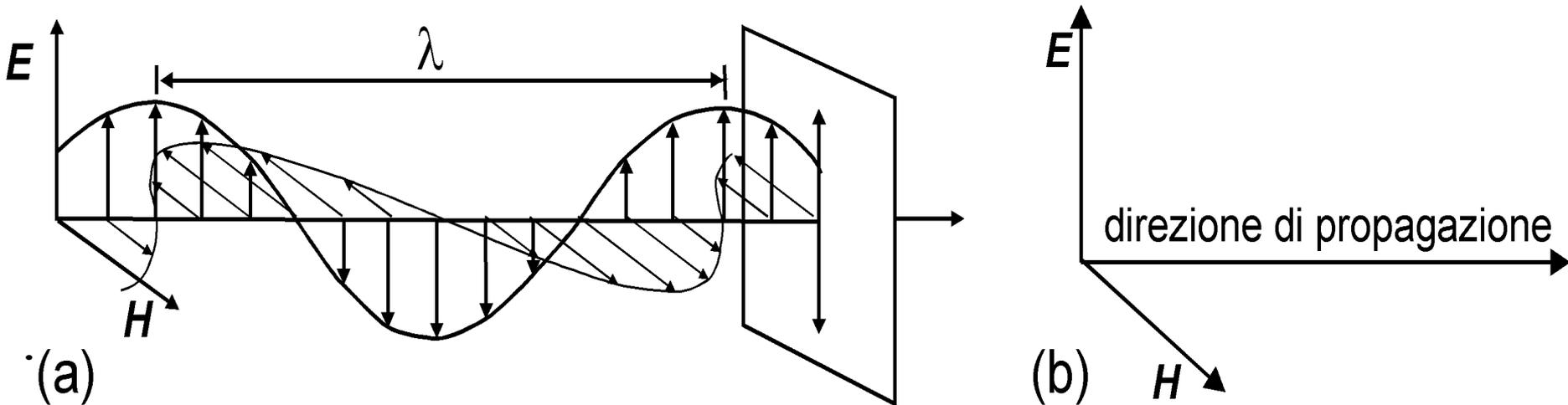
# Il Dicroismo circolare

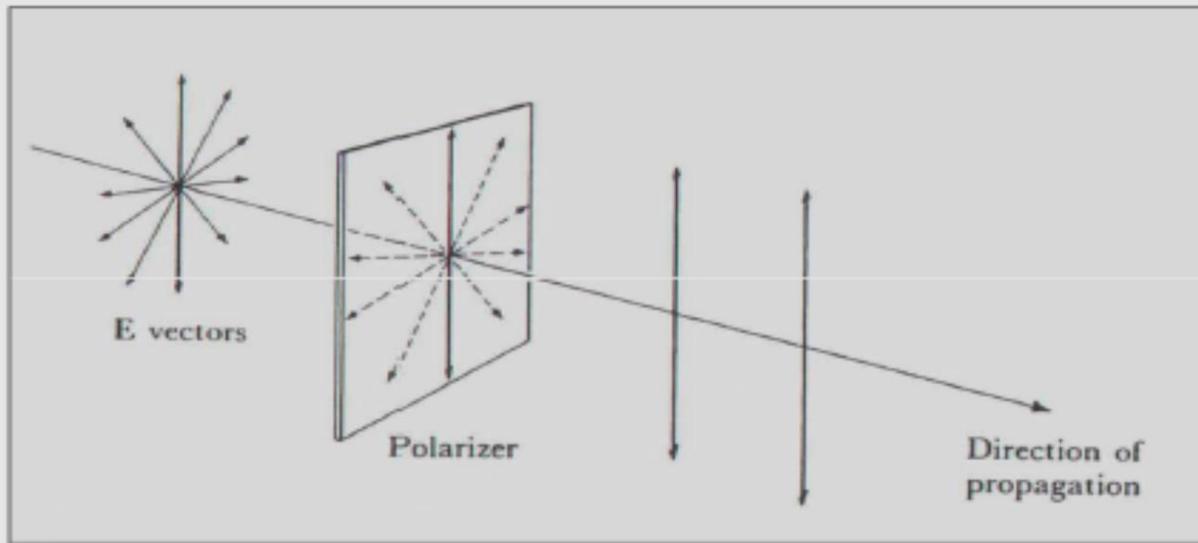
Il dicroismo circolare è una tecnica di analisi strutturale simile alla spettrofotometria in quanto è basata sull'assorbimento da parte del campione di una radiazione UV o visibile.

La radiazione usata è polarizzata

# La luce polarizzata

La luce è un'onda elettromagnetica che consiste in un campo elettrico  $E$  ed un campo magnetico  $H$  oscillanti, che possono essere rappresentati da vettori perpendicolari tra loro, e perpendicolari alla direzione di propagazione.

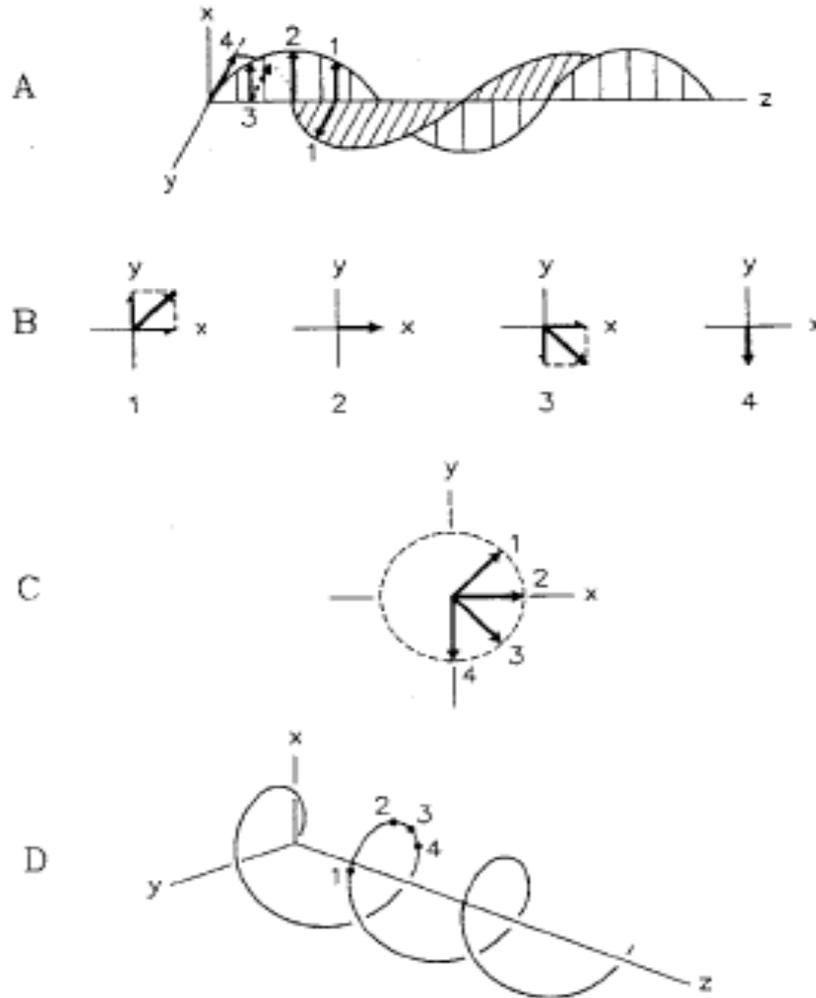




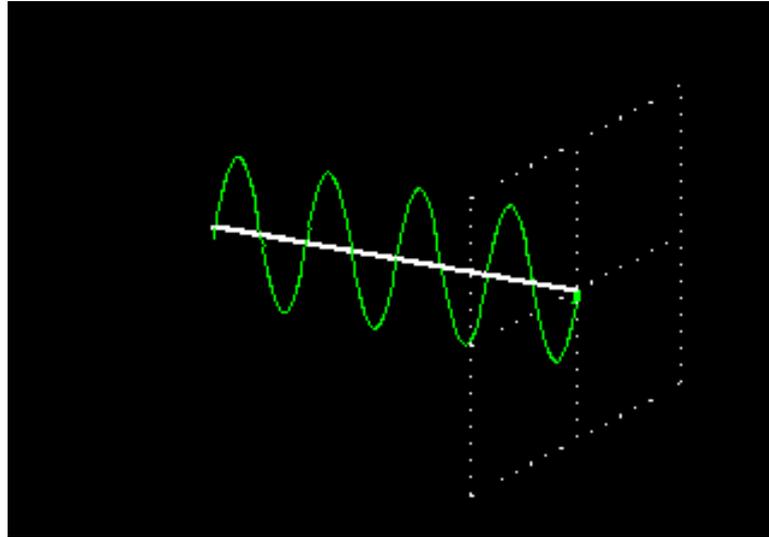
I piani sono infiniti e disposti a raggiera lungo l'asse di propagazione dell'onda.

La luce polarizzata linearmente, invece, è una radiazione elettromagnetica in cui il vettore  $E$  oscilla in un solo ben preciso piano di polarizzazione.

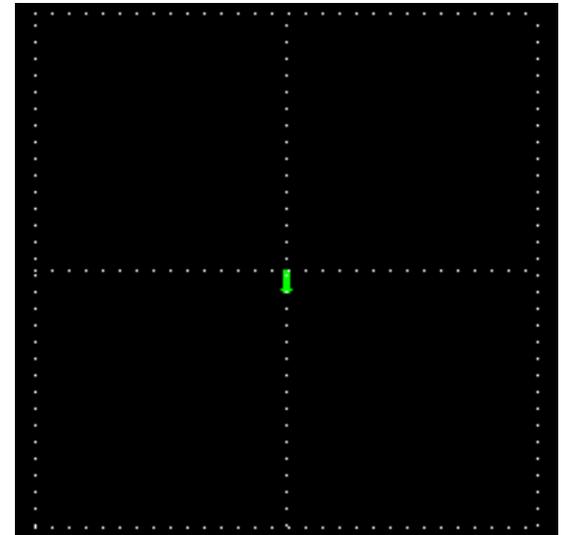
se il piano di vibrazione ruota con regolarità periodica attorno all'asse di propagazione si ha luce circolarmente polarizzata



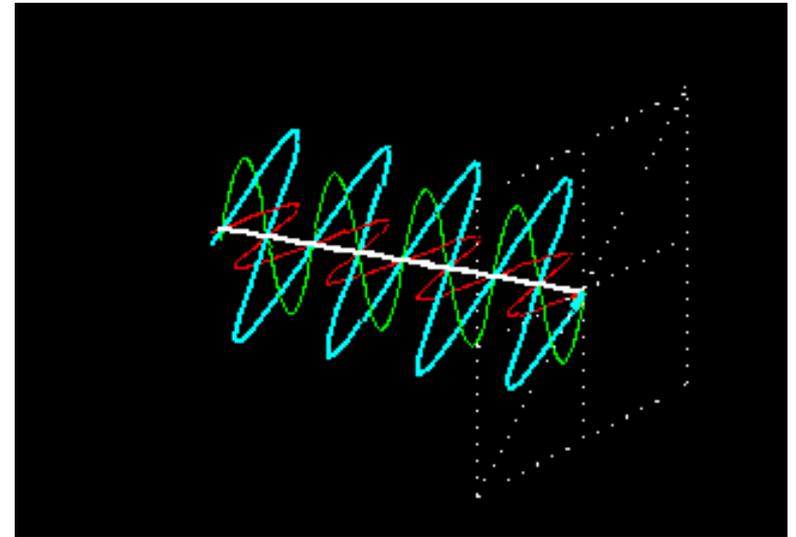
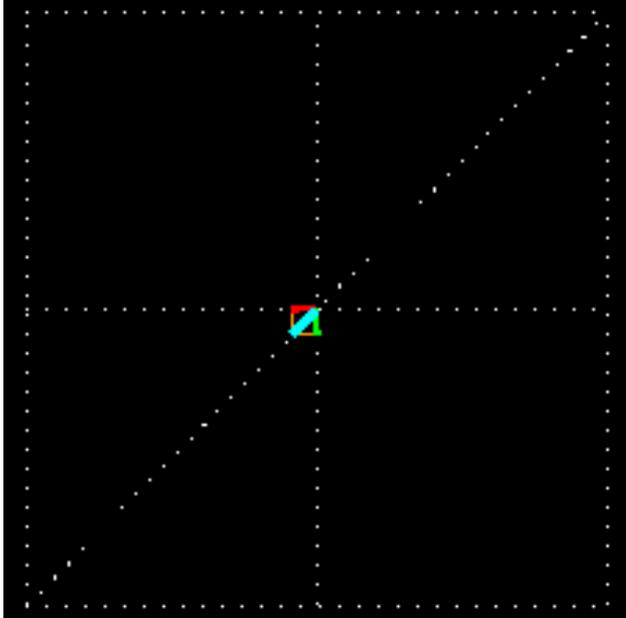
# Luce linearmente polarizzata



Se l'osservatore si pone lungo l'asse di propagazione.

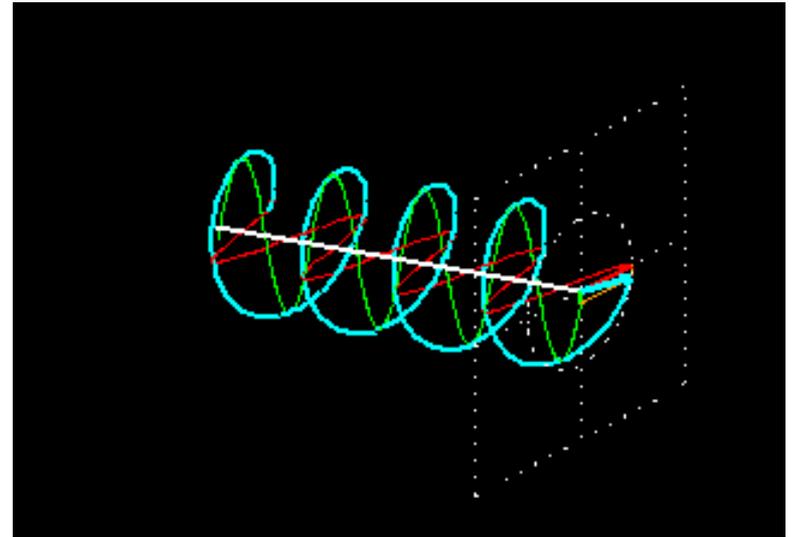
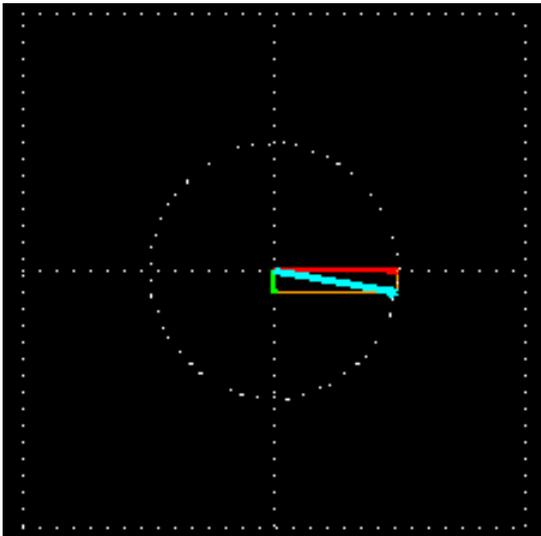


Quando due onde piano polarizzate sono presenti simultaneamente in due piani perpendicolari, le proprietà dell'onda che ne risulta dipendono dall'intensità e dalle fasi delle due onde componenti.



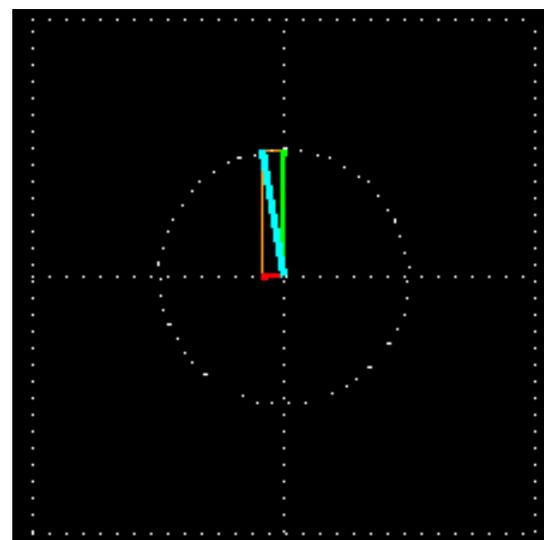
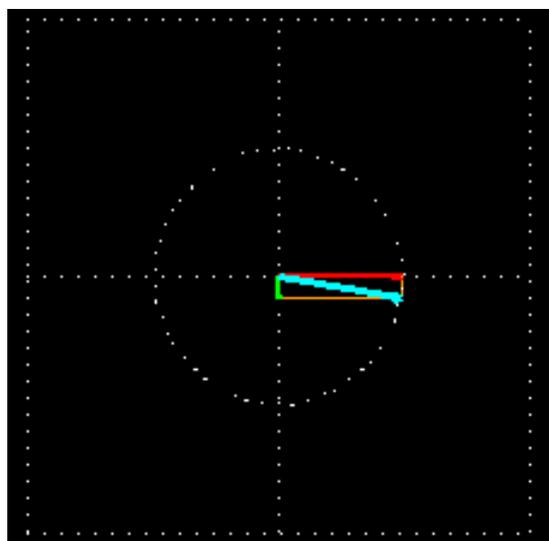
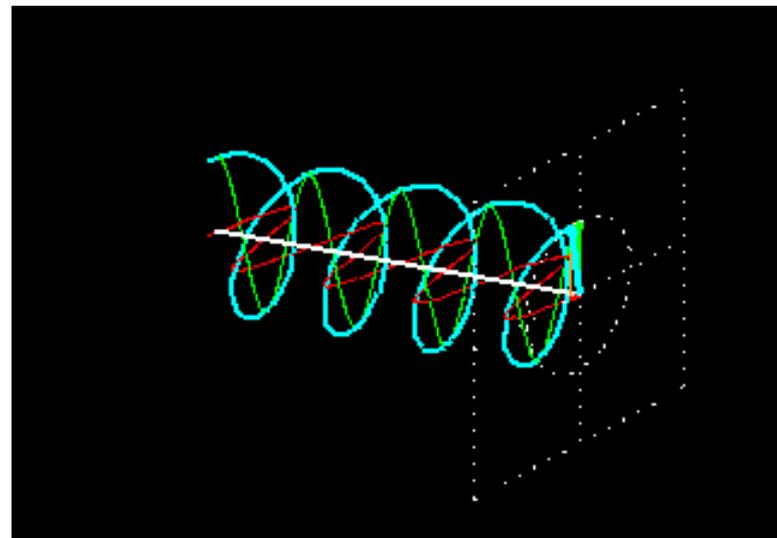
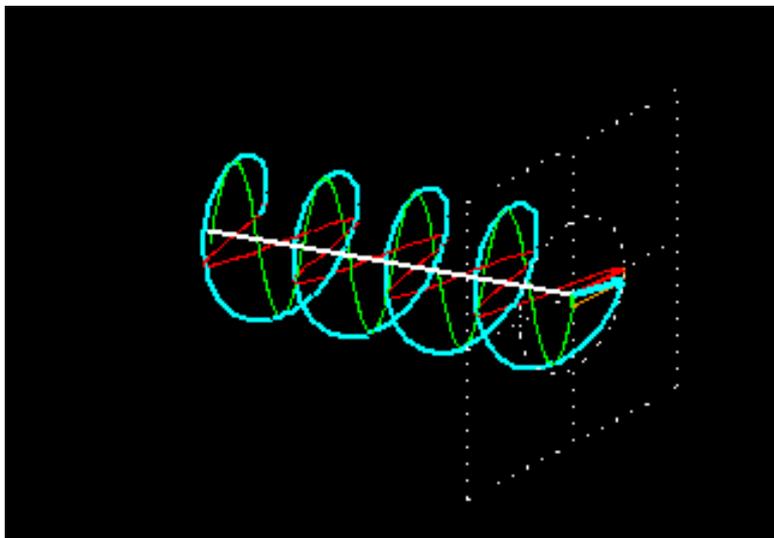
Il risultato della somma tra le due onde, è un'altra onda piano polarizzata (quella **azzurra**) con il piano di polarizzazione spostato di  $45^\circ$  rispetto ai piani di polarizzazione delle due onde originarie

Se le due onde non sono in fase (c'è una differenza di  $90^\circ$  tra le loro fasi) l'onda elettromagnetica che ne risulta è circolarmente polarizzata.

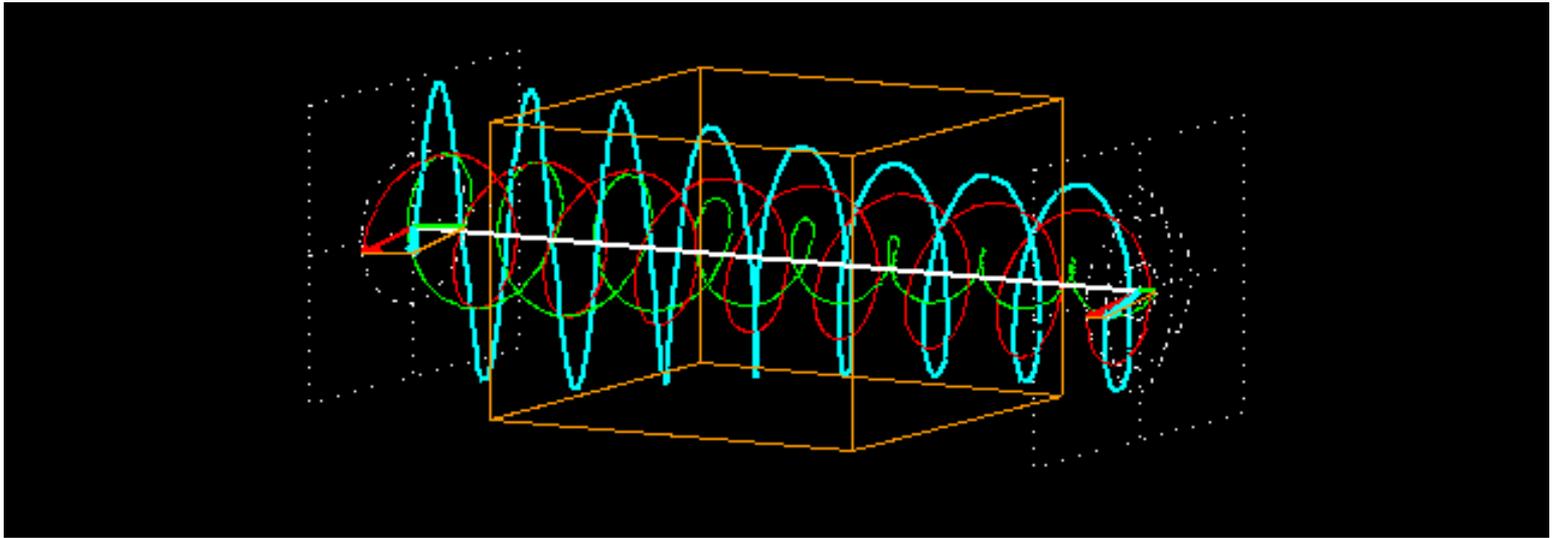


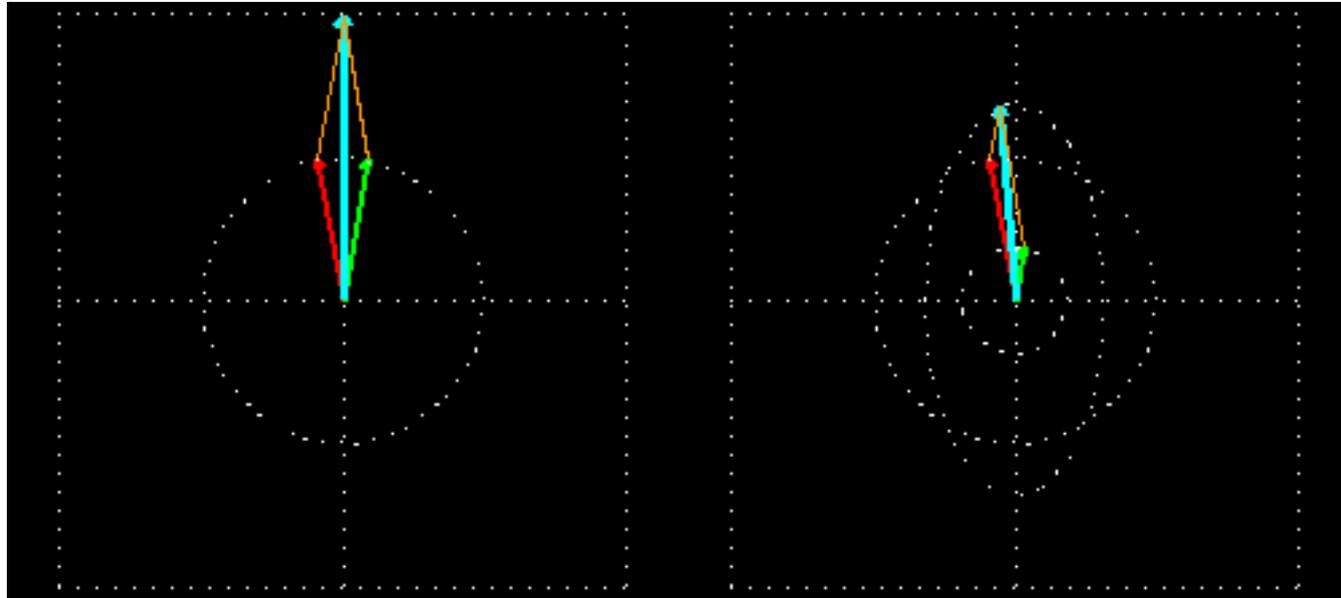
- Un raggio linearmente polarizzato può essere considerato come la somma di due raggi circolarmente polarizzati uguali ma con segno opposto
- Quando i due raggi circolarmente polarizzati sono assorbiti in maniera differente dal cromoforo portano alla produzione di luce ellitticamente polarizzata
- Questo fenomeno è il **dicroismo circolare**

# Luce circolarmente polarizzata destra e sinistra



Se le due componenti circolarmente polarizzate della luce linearmente polarizzata sono assorbite differenzialmente: la circolarmente polarizzata destra (**rossa**) non è assorbita mentre la circolarmente polarizzata sinistra (**verde**) è assorbita.





I vettori campo elettrico escono dal mezzo con intensità differenti e il vettore somma descrive una traiettoria ellittica.

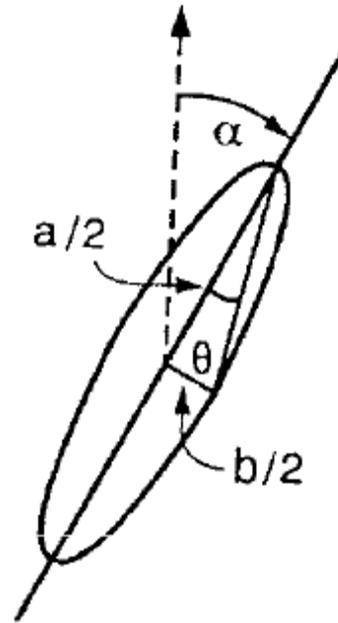
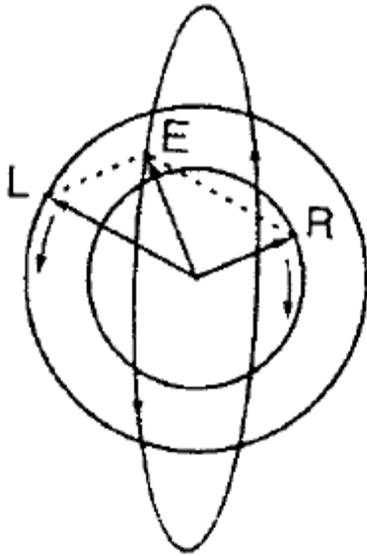
# CD : Lambert e Beer

Il dicroismo circolare può essere definito come differenza tra l'assorbanza della luce polarizzata circolarmente levogira e destrogiro

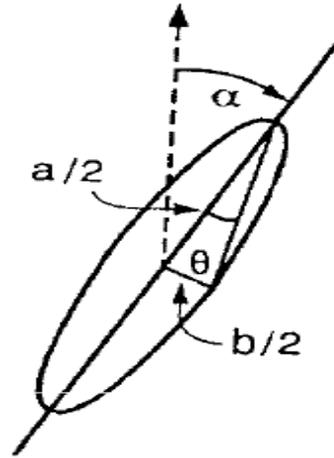
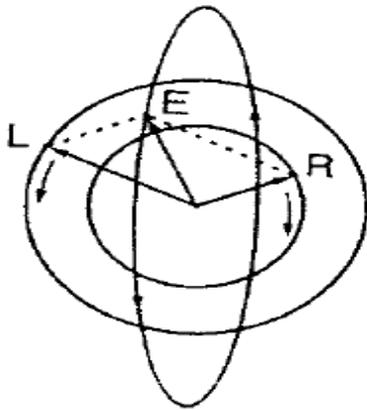
$$\Delta A = A_l - A_r = \epsilon_l c l - \epsilon_r c l = \Delta \epsilon c l$$

$\Delta \epsilon =$  differenza del coefficiente di estinzione  $< 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

CD valore molto piccolo differenza tra due segnali molto alti tipicamente  $\epsilon = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



- La luce ellitticamente polarizzata è la somma vettoriale della componente destrogira (R) e levogira(L) della luce polarizzata circolarmente



- $\theta$  è l'angolo la cui tangente è pari al rapporto tra il semiasse minore e il semiasse maggiore dell'ellisse  
Cioè  $\text{tang } \theta = (b/a)$   
 $\text{tang } \theta = \frac{L-R}{L+R} = \Delta A$
- $\theta^\circ = \Delta A \cdot 32.982$
- Ellitticità molare  $[\theta] = \theta / cl$   
dove  $l$  cammino ottico e  $c$  concentrazione

Ellitticità molare[  $\theta$  ] =  $\theta/cl$

Non viene espressa in gradi  $M^{-1} c^{-1}$

gradi  $cm^2dmole^{-1}$

$\theta \rightarrow$  mgradi,  $M \rightarrow$  moli / $dm^3$ ,  $l \rightarrow$   $cm^{-1}$

# Ellitticità molare

$$\Delta A = \Delta \varepsilon C l$$

- Allo stesso modo si può definire l'ellitticità molare  $[\theta]$ .

$$\theta = [\theta] C l$$

- Sempre per motivi storici, in genere  $[\theta]$  non si riporta in gradi  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , ma in **gradi  $\text{cm}^2 \text{ dmole}^{-1}$** .

$$\theta \rightarrow \text{mgradi}; C \rightarrow M = \text{mol l}^{-1} = \text{mol dm}^{-3}; l \rightarrow \text{cm}$$

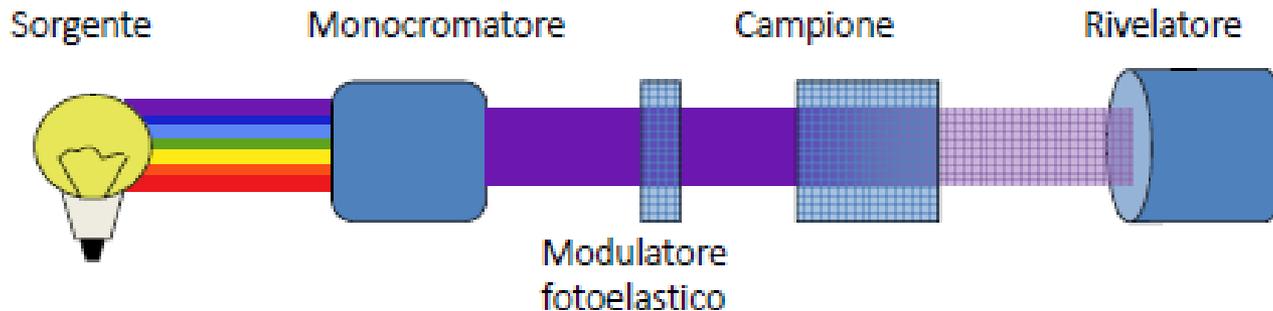
$$[\theta] = \theta / Cl \rightarrow \text{mgradi dm}^3 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

$$\text{mgradi} \rightarrow \text{gradi } 10^{-3}; \text{dm}^3 \rightarrow \text{cm}^3 10^3; \text{mol} \rightarrow \text{dmol } 10$$

$$[\theta] (\text{gradi cm}^2 \text{ dmol}^{-1}) = \theta (\text{mgradi}) / [10 \cdot C(M) l(\text{cm})]$$

- Nel caso di omopolimeri in cui il cromoforo sia nel monomero (ad esempio catene polipeptidiche), conviene riferirsi alla concentrazione di monomeri anziché a quella di polimero.

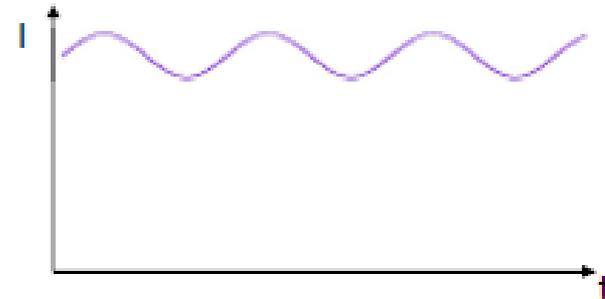
# Apparato sperimentale



- Il modulatore fa variare periodicamente la luce dalla polarizzazione circolare destra alla sinistra.
- La luce rivelata oscilla tra  $I_L$  e  $I_R$ .

$$I_L = I_0 10^{-A_L}$$

$$I_R = I_0 10^{-A_R}$$



- Dall'ampiezza dell'oscillazione si risale a  $\Delta A$ .

# Applicazioni

- Informazioni sulla struttura secondaria (lontano uv)
- Informazioni sulla struttura terziaria (vicino ultravioletto)
- Variazioni della struttura secondaria e terziaria durante processi di denaturazione di una proteina in funzione della temperatura o di agenti denaturanti
- Può essere utilizzato per valutare l'effetto di sostituzioni amminoacidiche

# CD di polipeptidi lontano UV

- 
- L'unico cromoforo presente è quello associato al legame peptidico, cioè quello ammidico. Le due transizioni possibili sono a 210-230 nm e a 180-200 nm
- 
- 
- La struttura secondaria di una catena polipeptidica può essere fondamentalmente di 3 tipi:  $\alpha$ -elica, foglietto  $\beta$  e  $\beta$ -turn. Gli spettri CD consentono di distinguere tra queste tre differenti conformazioni .

# CD di proteine: lontano UV

- Nel **lontano UV** ( $\lambda < 250$  nm) l'assorbimento (e quindi il CD) è dovuto principalmente ai **legami peptidici**.
- Diverse **strutture secondarie** causano una diversa interazione tra legami peptidici vicini, influenzando fortemente lo spettro CD.

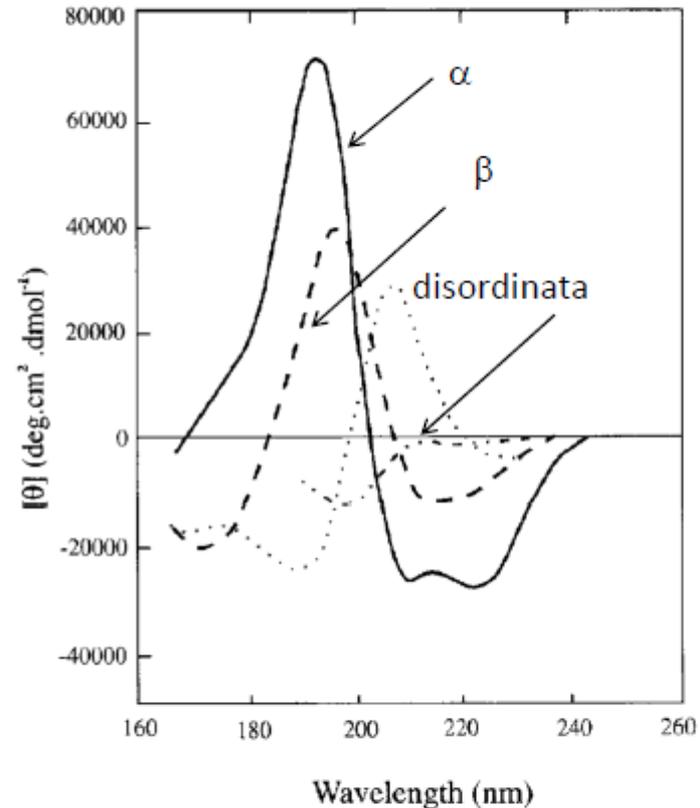
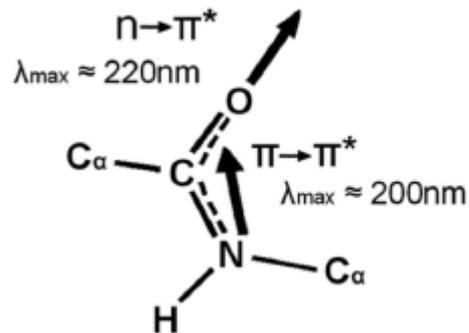
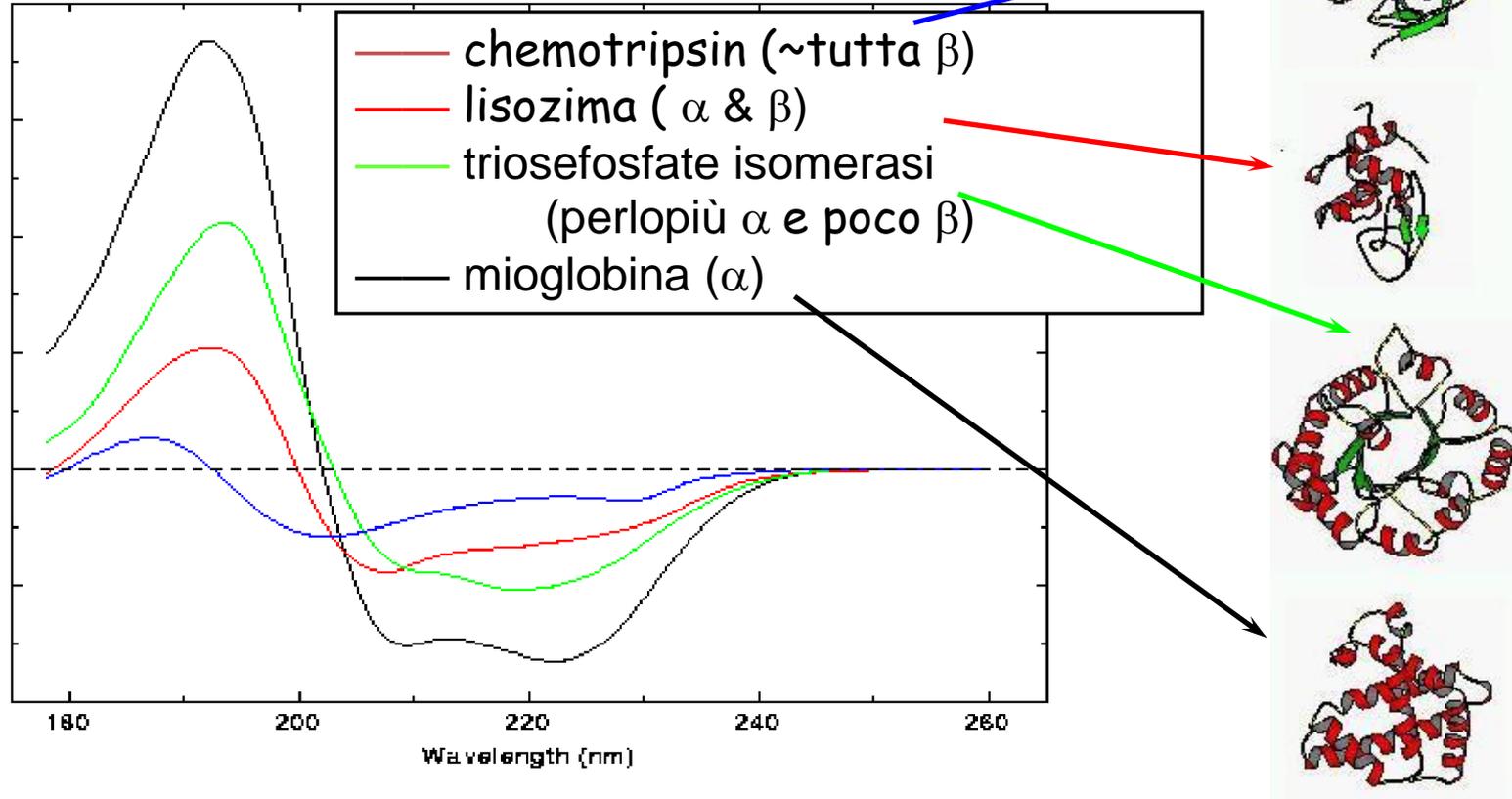


Fig. 2. Far-UV CD spectra associated with various types of secondary structure: solid curve,  $\alpha$ -helix; long dashes, anti-parallel  $\beta$ -sheet; dots, type I  $\beta$ -turn; dots and short dashes, irregular structure [23].

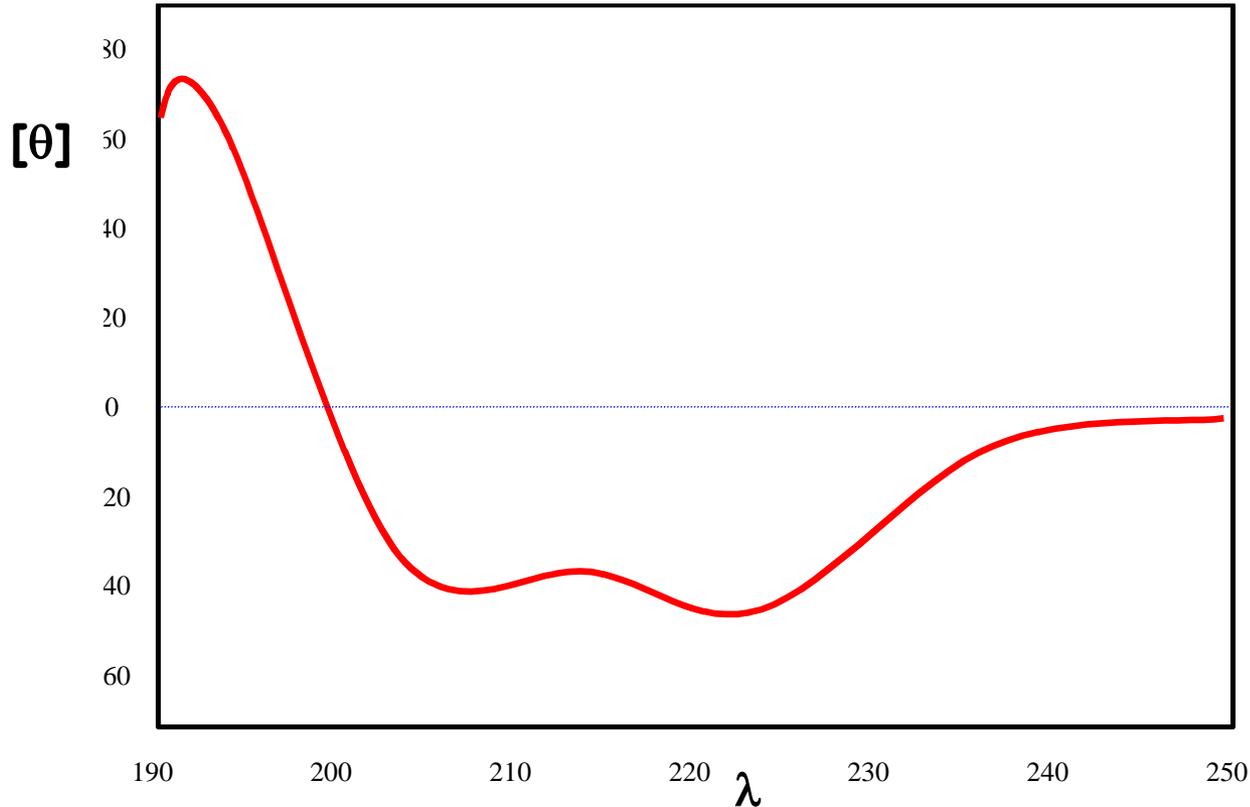
# Il CD di una proteina dipende dalla sua struttura secondaria



- Notare il progressivo cambiamento a  $\theta_{222}$  con l'incrementare della struttura a elica

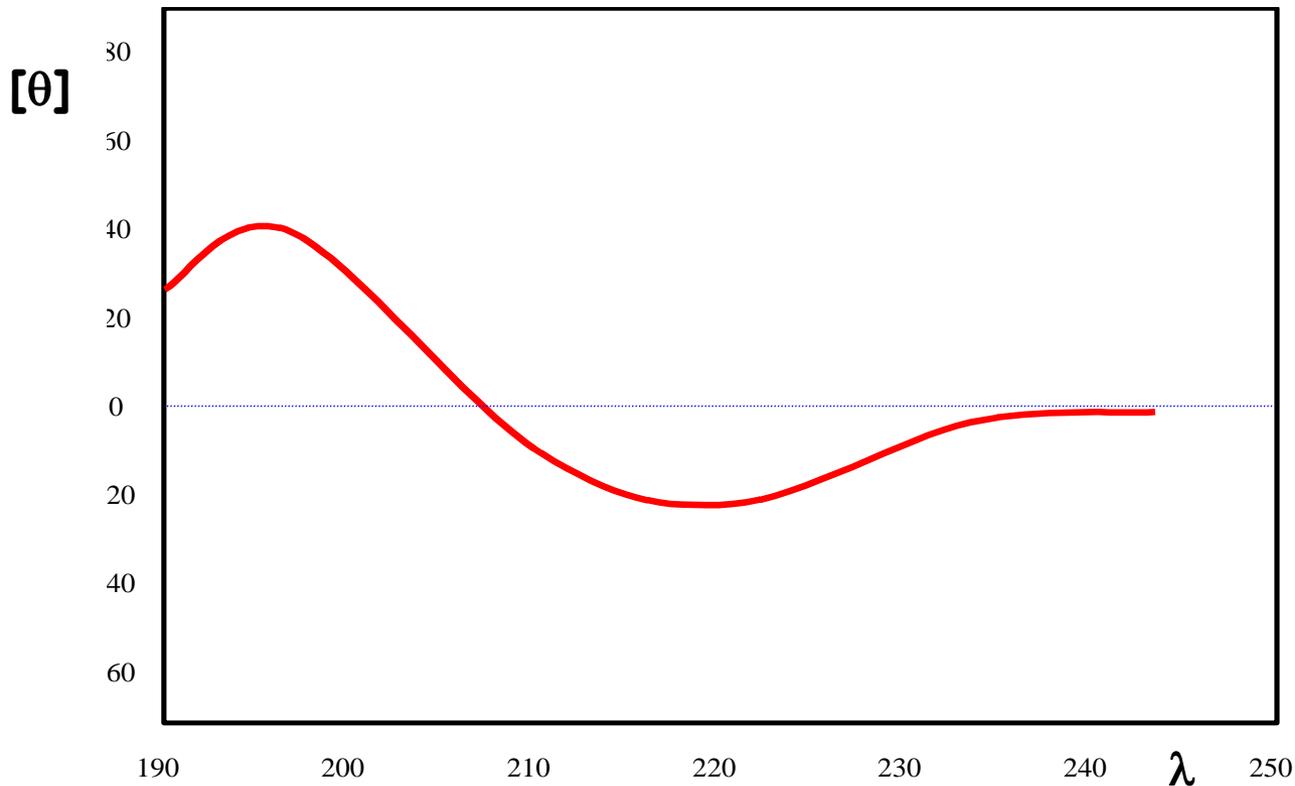
# $\alpha$ -elica

. Uno spettro CD di un polipeptide ad  $\alpha$ -elica è tipicamente caratterizzato da una banda negativa a 222 nm dovuta alla transizione  $n-\pi^*$  e da una banda negativa a 208 nm e una positiva a 198 nm relativa all'exciton coupling delle transizioni  $\pi-\pi^*$  del peptide.



# Foglietto $\beta$

lo spettro CD mostra due assorbimenti uno positivo a 195 nm e uno negativo a 216 nm, di comparabile intensità.

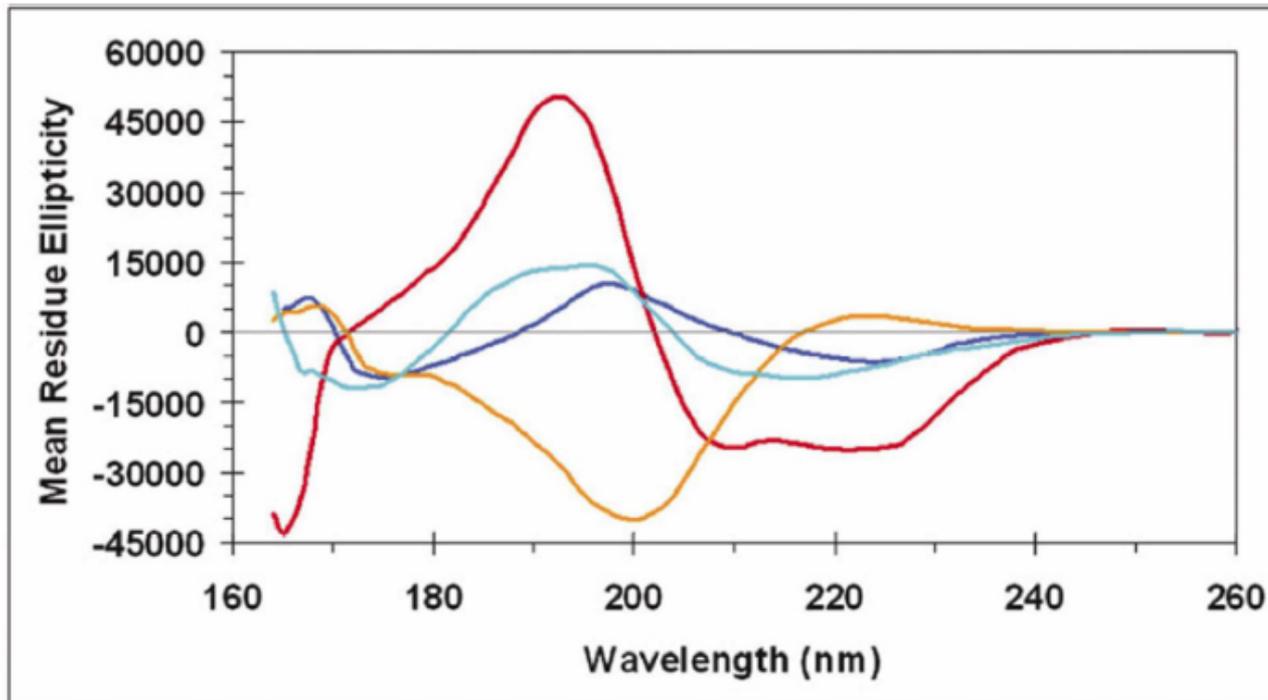


A causa però della maggiore variabilità conformazionale della  $\beta$  struttura rispetto alla  $\alpha$ , i CD di polipeptidi a struttura  $\beta$  sono molto meno riproducibili di quelli relativi a peptidi a struttura secondaria  $\alpha$  e dipendono fortemente dalla lunghezza della catena e dal solvente.

Esistono diversi algoritmi che permettono di predire la percentuale di struttura ordinata in base agli spettri CD

## CD di proteine: lontano UV

- Effettuando la deconvoluzione dello spettro di una proteina come somma degli spettri delle diverse strutture secondarie è possibile determinarne la frazione.



A mostly helical protein, myoglobin (in red), two mostly beta-sheet proteins, concanavalin A (blue) and beta-lactoglobulin (cyan), and a polyproline-rich protein, collagen (orange).

# Dicroismo circolare e conformazioni

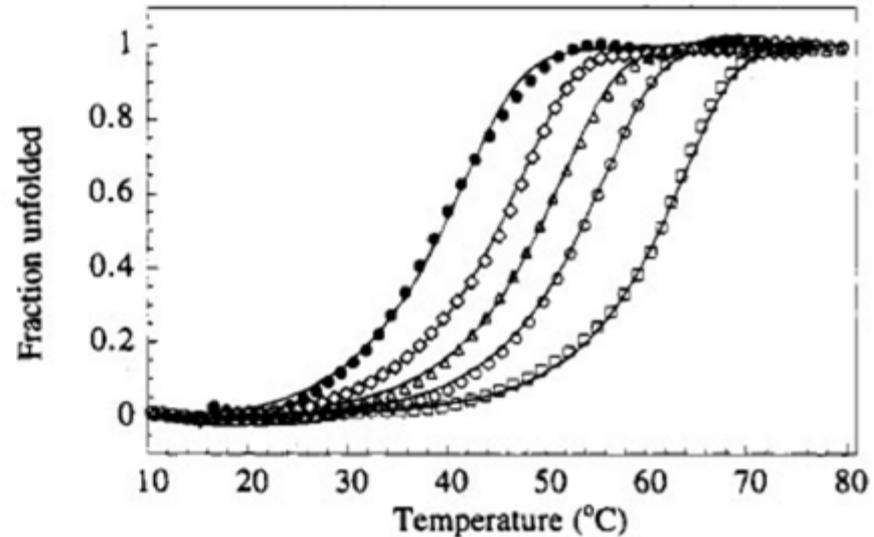
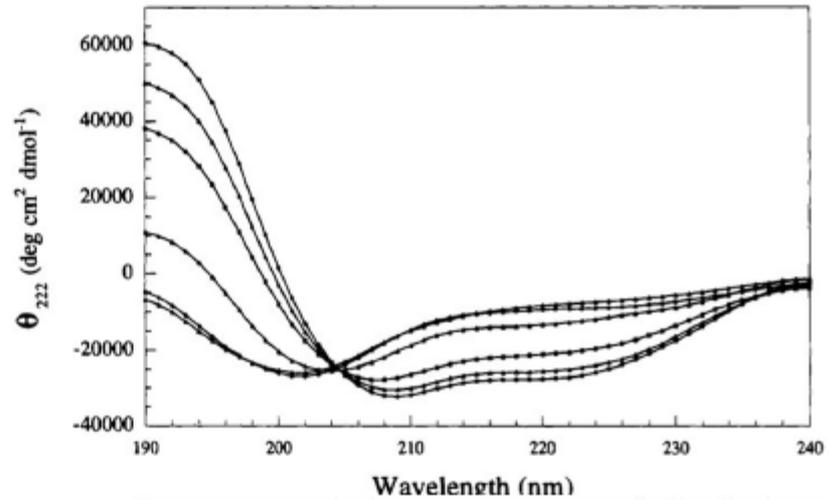
PROTEIN SECONDARY STRUCTURES DETERMINED BY INFRARED SPECTRAL DECONVOLUTION AND CIRCULAR DICHROISM SPECTRA AND X-RAY CRYSTALLOGRAPHY<sup>a</sup>

Protein	Secondary structure (%)				Method
	$\alpha$ Helix	$\beta$ Sheet	Turn	Random	
Hemoglobin	78 <sup>b</sup>	12	10	<sup>b</sup>	IR-SD
	87	0	7	6	X-Ray
	68-75	1-4	15-20	9-16	CD
Myoglobin	85 <sup>b</sup>	7	8	<sup>b</sup>	IR-SD
	85	0	8	7	X-Ray
	67-86	0-13	0-6	11-30	CD
Lysozyme	40	19	27	14	IR-SD
	45	19	23	13	X-Ray
	29-45	11-39	8-26	8-60	CD
Cytochrome <i>c</i> (oxidized)	42	21	25	12	IR-SD
	48	10	17	25	X-Ray
	27-46	0-9	15-28	28-41	CD
$\alpha$ -Chymotrypsin	9	47	30	14	IR-SD
	8	50	27	15	X-Ray
	8-15	10-53	2-22	38-70	CD
Trypsin	9	44	38	9	IR-SD
	9	56	24	11	X-Ray
Ribonuclease A	15	40	36	9	IR-SD
	23	46	21	10	X-Ray
	12-30	21-44	11-22	19-50	CD
Alcohol dehydrogenase	18	45	23	14	IR-SD
	29	40	19	12	X-Ray
Concanavalin A	8	58	26	8	IR-SD
	3	60	22	15	X-Ray
	3-25	41-49	15-27	9-36	CD
Immunoglobulin G	3	64	28	5	IR-SD
	3	67	18	12	X-Ray
Major histocompatibility complex antigen A2	17	41	28	14	IR-SD
	20	42			X-Ray
	8-13	74-77			CD
$\beta_2$ -Microglobulin	6	52	33	9	IR-SD
	0	48			X-Ray
	0	59			CD

# CD di proteine: lontano UV

Si seguono con elevata sensibilità tutti i cambiamenti di conformazione:

- Denaturazione
- Processi di associazione



# CD di proteine: vicino UV

- L'assorbimento nel vicino UV ( $\lambda > 250$  nm) è dominato dalle catene laterali aromatiche.
- Questi cromofori danno origine ad un CD indotto, molto sensibile all'intorno.
- Il CD nel vicino UV fornisce informazioni sulla struttura terziaria intorno alle catene aromatiche.

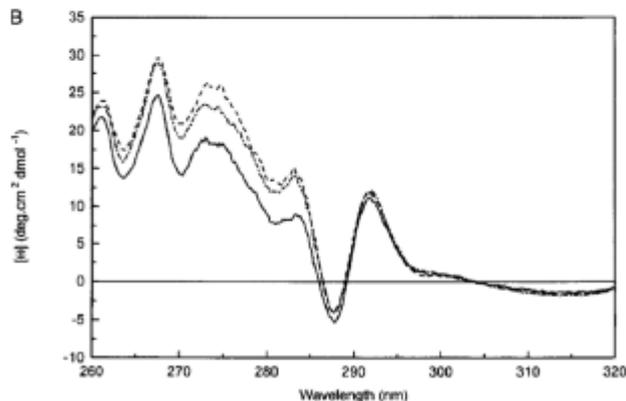


Fig. 6. CD spectra of type II dehydroquinase from *Streptococcus coelicolor*. (a) far-UV CD spectra, (b) near-UV CD spectra. (—), (---) and (- - -) represent the spectra of wild type, R23A and R23K mutants respectively [53].

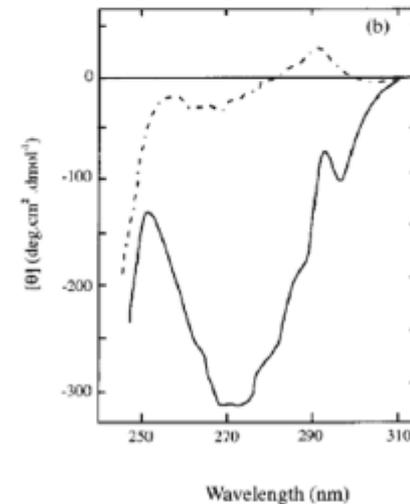
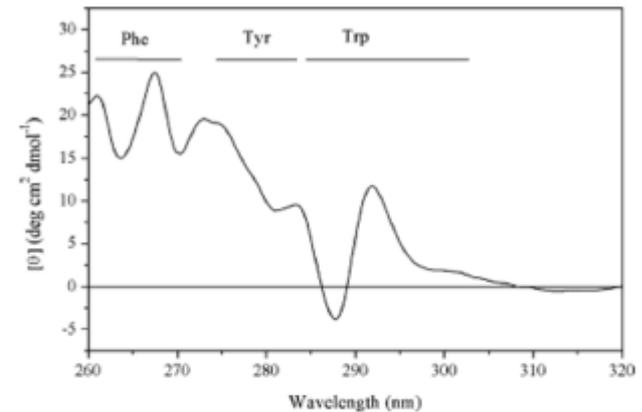


Fig. 7. CD spectra of  $\alpha$ -lactalbumin. (a) and (b) represent far-UV and near-UV CD spectra respectively. The solid and dashed lines represent spectra obtained at pH 7 and pH 2 respectively [63,64].

# CD di proteine: visibile

- L'assorbimento nel visibile è dovuto ad eventuali gruppi prostetici (es. eme). Questi cromofori danno origine ad un CD indotto..
- Il CD nel **visibile** fornisce informazioni sulla **struttura terziaria intorno gruppo prostetico**.

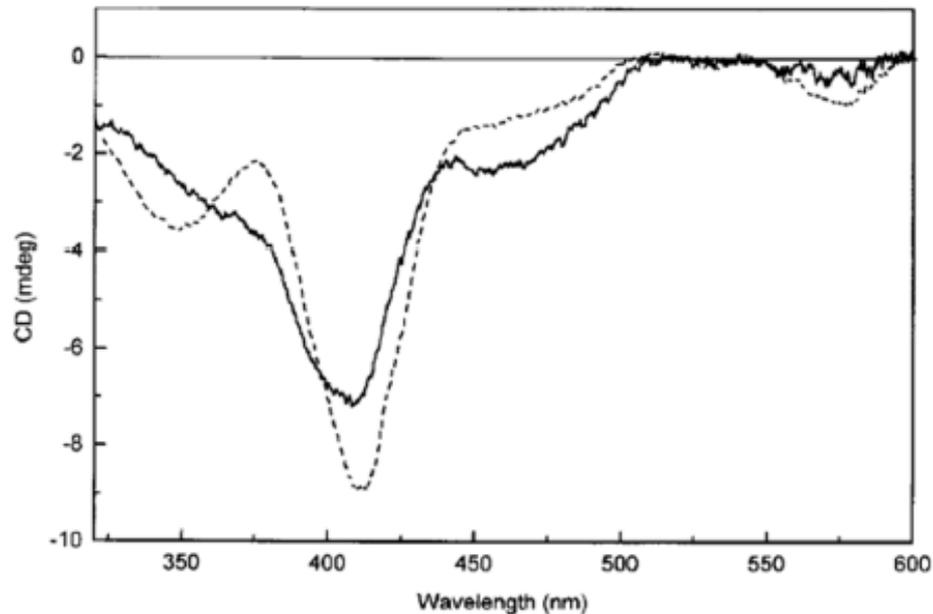


Fig. 4. The near-UV/visible CD spectrum of BM3 flavocytochrome. The solid line shows the CD spectrum of the intact flavocytochrome; the dashed line shows the CD spectrum of the stoichiometric mixture of the separately expressed *P*-450 and reductase domains of the enzyme [37].

# Condizioni sperimentali

- Il rapporto segnale/rumore migliore si ottiene per assorbanza della molecola otticamente attiva  $\sim 1$  (idealmente 0.87).
- Qualunque assorbimento del solvente, tampone, sali, stabilizzanti deve essere minimizzato. Per il lontano UV conviene usare cammini ottici  $< 0.1$  cm.
- Bisogna flussare lo strumento con azoto per evitare che l'ozono prodotto dalla lampada danneggi l'ottica, e per eliminare l'assorbimento dell'aria nel lontano UV.

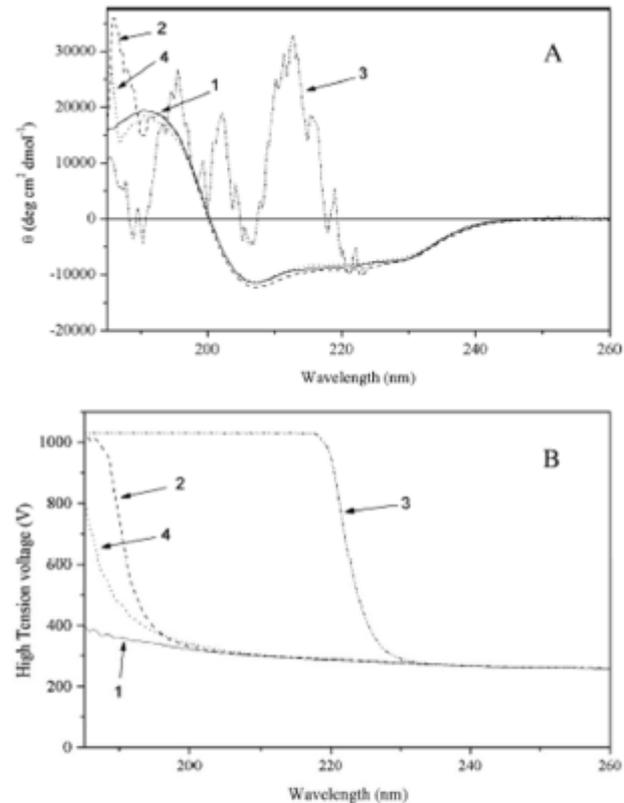


Fig. 9. The effects of buffer components on far UV CD spectra. Lysozyme (0.2 mg/ml) was dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5 (spectrum 1, solid line), or sodium phosphate buffer containing either 150 mM NaCl (spectrum 2, dashed line) or 150 mM imidazole (spectrum 3, dash-dot-dot line), or in 50 mM Tris/acetate, pH 7.5 (spectrum 4, dotted line). Spectra were recorded in a 0.02-cm pathlength cell on a Jasco J-810 spectropolarimeter using a scan speed of 50 nm/min, a time constant of 0.5 s and a bandwidth of 1 nm. 8 scans were accumulated. The upper panel shows the CD spectra and the lower panel the corresponding High Tension voltage traces.

## Condizioni sperimentali

- Evitare (o minimizzare): Cl<sup>-</sup>, DTT, EDTA, HEPES, PIPES.
- Tamponi migliori: fosfato, tris.

Table 1  
Absorption properties of selected buffer components in the far UV

Component	Absorbance (50 mM solution in 0.02 cm pathlength cell)			
	180 nm	190 nm	200 nm	210 nm
NaCl	>0.5	>0.5	0.02	0
NaF	0	0	0	0
NaClO <sub>4</sub>	0	0	0	0
Boric acid	0	0	0	0
Na borate (pH 9.1)	0.3	0.09	0	0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	>0.5	0.3	0.05	0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15	0.01	0	0
Na acetate	>0.5	>0.5	0.17	0.03
Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 8.0)	>0.5	0.24	0.13	0.02
HEPES/Na <sup>+</sup> (pH 7.5)	>0.5	>0.5	0.5	0.37
MES/Na <sup>+</sup> (pH 6.0)	>0.5	0.29	0.29	0.07

Spettri lontano  
(A)UV e vicino  
UV(B) di CRP  
wild type ● e  
mutanti nel loop  
coinvolto nel  
legame con  
cAMP

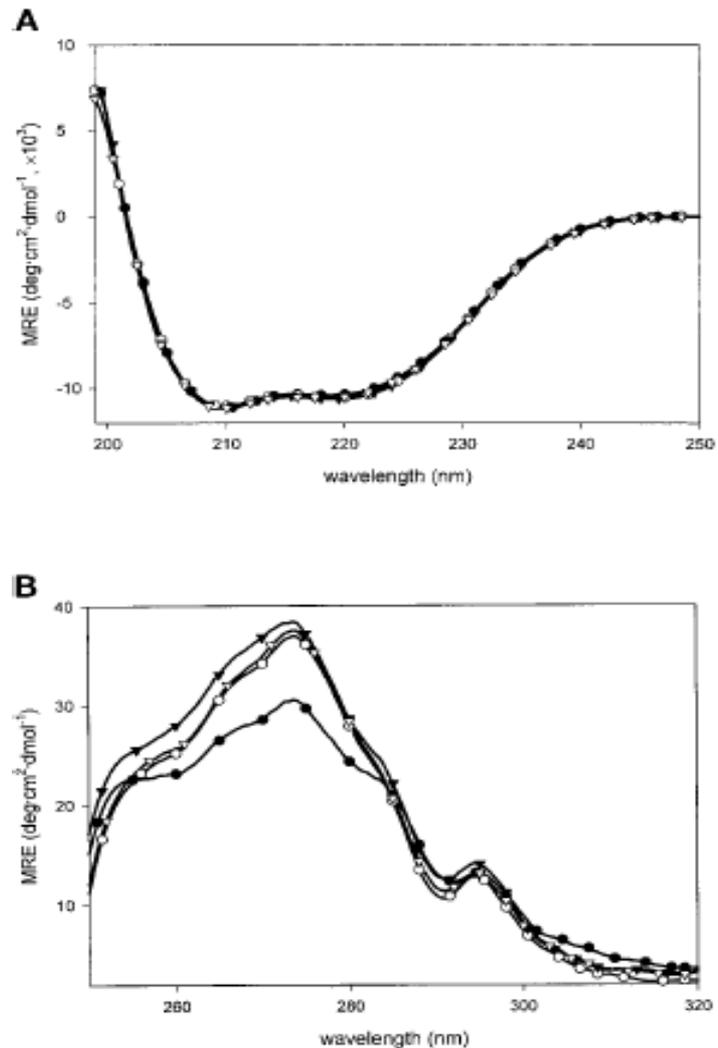
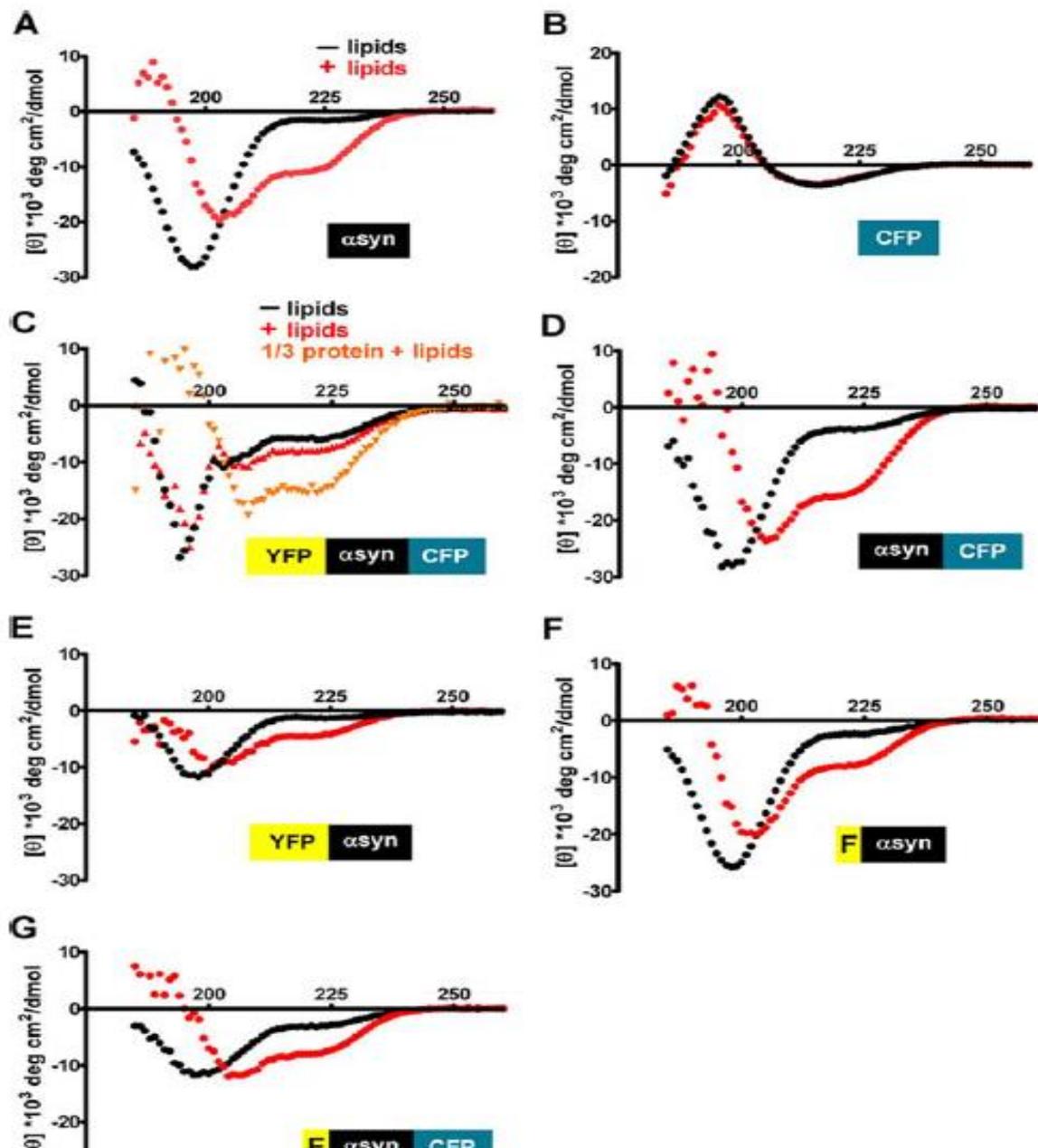


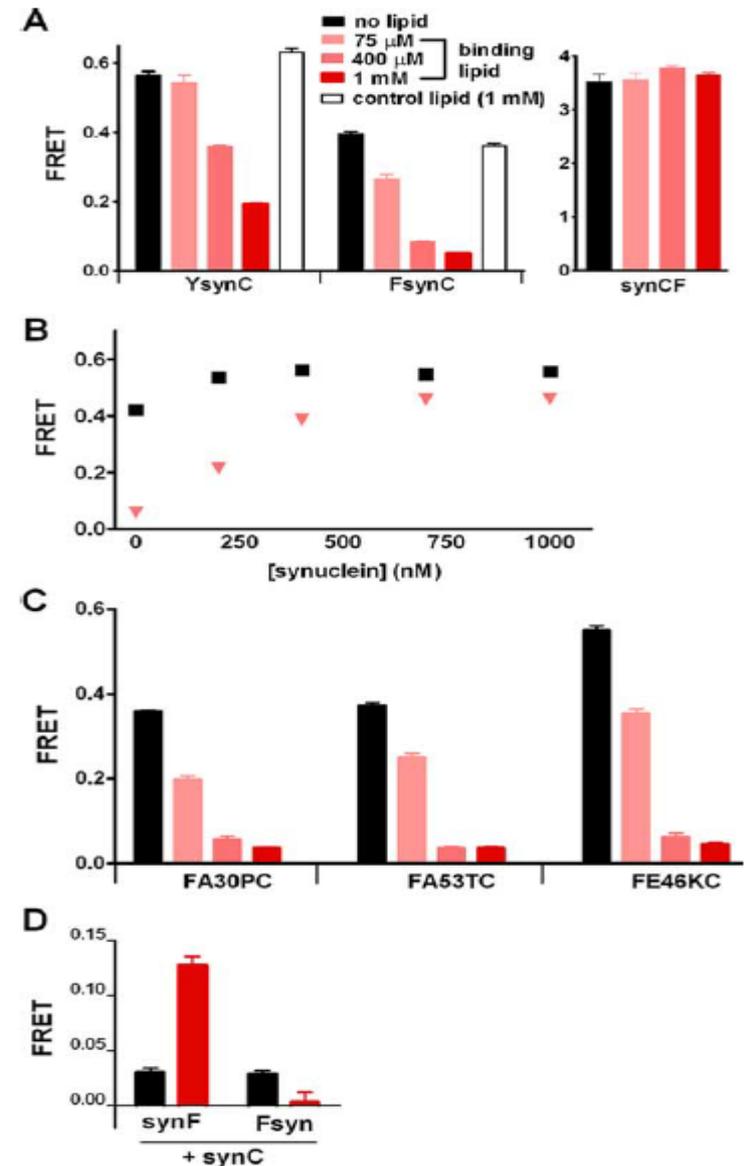
FIG. 4. CD spectra of CRPs in TEK (100) buffer at pH 7.8 and 22.5 °C. Protein concentrations were 5  $\mu$ M (●) wild-type, (○) deletion, (▼) insertion, (▽) double mutant. A, far-UV region; B, near-UV region.

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

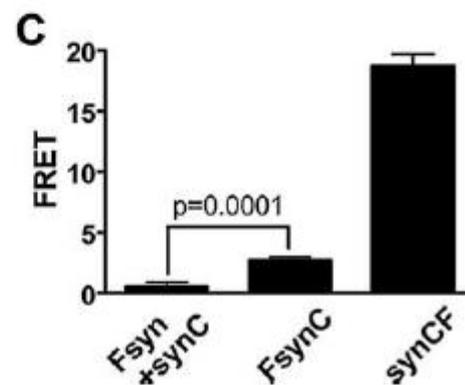
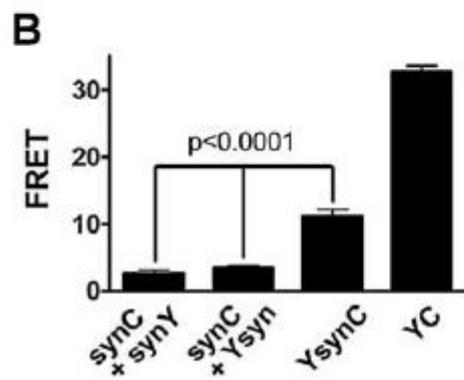
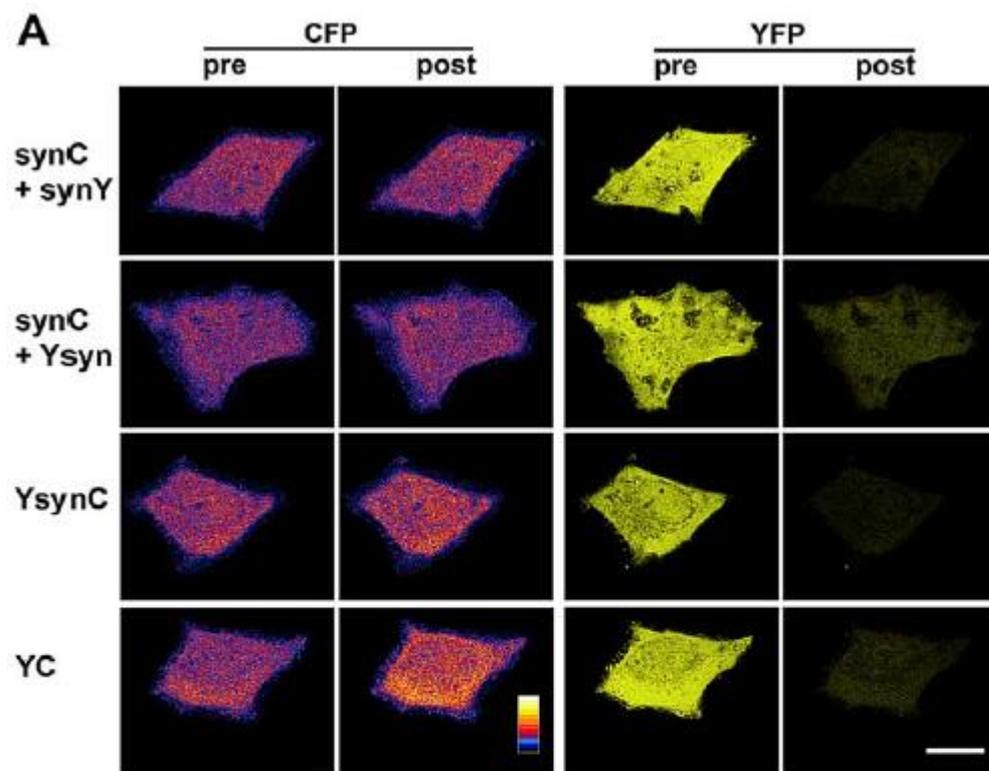
L'interazione dell'alfa sinucleina con i lipidi determina un cambiamento conformazionale dalla forma distesa ad un forma ad alfa elica



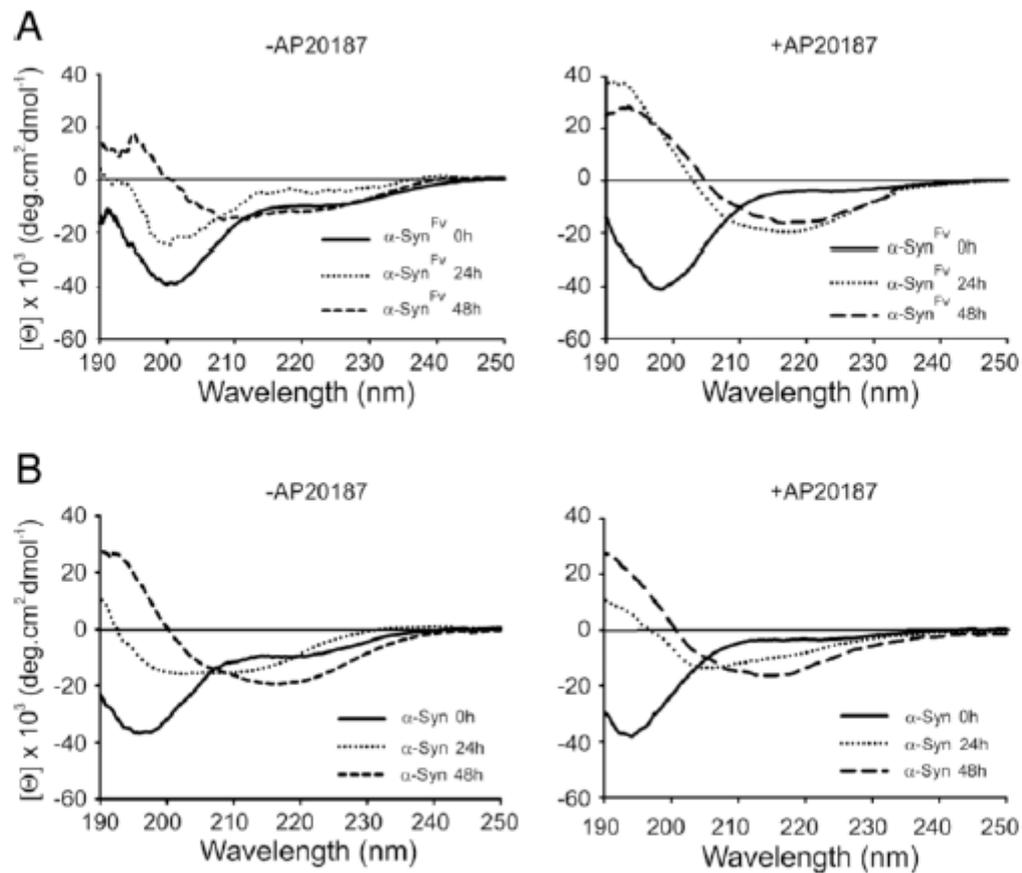
Cambiamenti conformazionali dell'alfa sinucleina osservati mediante FRET  
 L'interazione con le membrane determina un cambiamento conformazionale dalla forma chiusa a quella aperta



**Figure 3.** Membrane association reduces the intramolecular FRET of  $\alpha$ -synuclein. **A**, YsynC, FsynC and synCF fusion proteins (400 nM) were incubated with increasing concen-



**Figure 4.**  $\alpha$ -Synuclein adopts a closed conformation in HeLa cells. **A, B**, HeLa cells were transfected with either synC and synY,



**Figure 1** Circular dichroic spectra of  $\alpha\text{-Syn}^{\text{FV}}$  and  $\alpha\text{-Syn}$ . **(A)**  $\alpha\text{-Syn}^{\text{FV}}$  was incubated at different times in the absence (-AP20187) or in the presence (+AP20187) of dimerizer at 37°C with agitation. **(B)**  $\alpha\text{-Syn}$  was incubated different times as indicated in **(A)**. Both  $\alpha\text{-Syn}^{\text{FV}}$  and  $\alpha\text{-Syn}$  displayed structural transition from random coil to  $\beta$ -sheet conformation.