

Dicroismo Circolare

Jan Peter Ebbing, Beatrice Fiumara, Giovanni Laganà

11 Marzo 2024

Indice

1	Introduzione teorica	2
1.1	Dicroismo circolare	2
1.2	Denaturazione di una proteina	2
1.3	CD proteina	4
2	Strumentazione e Setup	4
3	Procedimento	5
4	Analisi Dati	6
4.1	Risultati fit nel range 224-226 nm	9
5	Conclusioni	9

Abstract

In questo esperimento si è indagato l'effetto della denaturazione della proteina Beta-Lactoglobulina (BLG) al variare della concentrazione del denaturante cloruro di guanidinio (GuHCl), impiegando il dicroismo circolare (DC). Si è misurata l'ellitticità della luce polarizzata circolarmente nei campioni con differenti concentrazioni di GuHCl. In seguito, si è correlata l'ellitticità alla concentrazione di GuHCl, ottenendo un buon fit con il modello teorico.

1 Introduzione teorica

1.1 Dicroismo circolare

Il dicroismo circolare è la differenza di assorbimento di luce UV-Vis polarizzata circolarmente destrorsa (R) e levogira (L):

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_R - A(\lambda)_L \quad (1)$$

Questa differenza nell'assorbimento provoca una rotazione del piano di polarizzazione della luce, risultando in un'ellitticità della luce emergente. Questa tecnica è spesso usata per studiare la struttura di molecole chirali, come proteine e acidi nucleici, perché la loro struttura tridimensionale influisce sulla loro capacità di interagire con la luce polarizzata circolarmente in modi diversi.

Il dicroismo circolare avviene quando una molecola contiene uno o più cromofori chirali (non deve avere un centro, un piano e un asse proprio di simmetria). Una delle due componenti viene assorbita maggiormente dell'altra, il risultato è quindi una polarizzazione ellittica (questo vale solo per un'onda piana polarizzata linearmente, in quanto scomponibile in due componenti polarizzate circolarmente levogira e destrorsa).

Il dicroismo circolare dipende fortemente dalla struttura della proteina (in particolare da quella secondaria), di conseguenza lo si può usare per studiare la sua conformazione e in particolare il suo stato di denaturazione. Il dicroismo circolare è collegato all'ellitticità θ , secondo:

$$\theta = 2.303 (A_L - A_R) \frac{180}{4\pi}$$

L'ellitticità si riferisce al grado di ellitticità della polarizzazione della luce dopo che è passata attraverso un campione chirale. Essa è quindi un parametro importante che fornisce informazioni sulla conformazione molecolare e su come questa cambia in risposta a varie condizioni ambientali o al legame con altri composti.

1.2 Denaturazione di una proteina

La denaturazione di una proteina consiste nel passaggio dallo stato nativo a quello denaturato. La denaturazione può avvenire in vari modi, tra cui:

Cambiando la temperatura, in questo caso si parla di denaturazione termica. Aumentando la temperatura, ad un certo punto, i legami a idrogeno si rompono e la struttura secondaria della proteina viene destabilizzata, di conseguenza il minimo livello energetico è rappresentato dallo stato unfolded.

Aggiungendo un denaturante, il quale compete con i legami a idrogeno interni alla proteina, si induce la denaturazione della struttura secondaria della stessa. Questo processo è noto come denaturazione chimica. La variazione dell'energia libera di Gibbs per la denaturazione è data dalla formula:

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - m \cdot C_D(k_p) \quad (2)$$

Dove:

- ΔG_D è il cambiamento nell'energia libera di Gibbs associato alla denaturazione,

- $\Delta G_D^{H_2O}$ rappresenta il cambiamento nell'energia libera di Gibbs per la denaturazione in assenza del denaturante,
- m è una costante di proporzionalità,
- $C_D(k_p)$ è la concentrazione del denaturante che promuove la denaturazione.

All'equilibrio, la frazione di proteine denaturate (f_D) è uguale alla frazione di proteine non denaturate (f_N), e il cambiamento netto dell'energia libera di Gibbs (ΔG_D) è zero:

$$\Delta G_D^{H_2O} = m \cdot C_D^{\text{mezzo}} \quad (3)$$

Per studiare la denaturazione delle proteine, l'obiettivo è identificare una tecnica spettroscopica in grado di distinguere la proteina nella sua forma nativa e nella sua forma denaturata, in modo che ciascuna fornisca un segnale distinto.

Si definisce y come il segnale spettroscopico, il quale varia a seconda che la proteina sia in forma nativa o denaturata. Se assumiamo un modello a due stati (stato nativo e stato denaturato) allora abbiamo:

$$\begin{aligned} y_N &= \text{segnale proteina nativa,} \\ y_D &= \text{segnale proteina denaturata,} \\ y &= y_N f_N + y_D f_D \quad \text{con} \quad f_D + f_N = 1, \\ f_N &= \frac{C_N}{C_N + C_D}, \\ f_D &= \frac{C_D}{C_N + C_D}, \\ \Rightarrow \frac{C_D}{C_N} &= \frac{f_D}{f_N} = K_D = e^{-\Delta G_D/RT}. \end{aligned} \quad (4)$$

Dove:

- f_N e f_D rappresentano le frazioni di proteina nativa e denaturata, rispettivamente,
- C_N e C_D sono le concentrazioni delle forme nativa e denaturata della proteina,
- K_D è la costante di equilibrio per la denaturazione,
- ΔG_D è il cambiamento nell'energia libera di Gibbs per la denaturazione,
- R è la costante universale dei gas, e
- T è la temperatura assoluta.

Considerando che la somma delle frazioni nativa e denaturata è pari a 1:

$$f_D = 1 - f_N, \quad (5)$$

e sostituendo nella formula del segnale spettroscopico:

$$y = y_N f_N + y_D f_D,$$

otteniamo:

$$y = y_N(1 - f_D) + y_D f_D,$$

$$y = y_N + (y_D - y_N)f_D,$$

$$f_D = \frac{y - y_N}{y_D - y_N}. \quad (6)$$

La relazione inversa per la frazione nativa è:

$$f_N = \frac{y_D - y}{y_D - y_N}. \quad (7)$$

Infine, il segnale spettroscopico può essere espresso come:

$$y = \frac{y_N + y_D e^{-\Delta G_D / RT}}{1 + e^{-\Delta G_D / RT}}. \quad (8)$$

Queste equazioni permettono di analizzare la transizione da proteina nativa a denaturata e viceversa, attraverso misurazioni spettroscopiche. Sotto l'ipotesi di modello lineare si ha:

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - m \cdot C_D \quad (9)$$

sostituendo la [9] nella [8], si ottiene:

$$y = \frac{y_N + y_D \cdot \exp \left[-m \left(C_D^{\text{mid point}} - C_D \right) / RT \right]}{1 + \exp \left[-m \left(C_D^{\text{mid point}} - C_D \right) / RT \right]} \quad (10)$$

Eseguendo un fit è possibile trovare $C_D^{\text{mid point}}$, da cui si ritrova la variazione di entropia del processo di denaturazione per la sola proteina in H_2O senza denaturante, cioè la stabilità termodinamica della proteina: $\Delta G_D = 0 \Rightarrow \Delta G_D^{H_2O} = m \cdot C_D^{\text{mid point}}$.

1.3 CD proteina

Il dicroismo circolare delle proteine nella banda UV (di interesse in questo esperimento) è dovuto ai cromofori dei legami peptidici; per questo motivo lo spettro di CD, o analogamente dell'ellitticità, è caratterizzato dalla struttura secondaria della proteina. Quindi si può studiare lo stato di denaturazione di una proteina attraverso tale spettro, confrontandolo con quello della proteina nativa. Infatti, la curva di denaturazione ha per la proteina nello stato nativo una struttura ben definita, che poi si perde perché nello stato unfoldato la proteina assorbe in maniera circa uguale luce polarizzata levogira o destrogira.

2 Strumentazione e Setup

Per effettuare le misure dell'ellitticità, si è utilizzato uno spettro-polarimetro, in particolare uno JASCO J-500A. Lo strumento è in grado di effettuare la differenza tra le misure di assorbimento di luce polarizzata circolarmente destrogira e levogira.

Schematicamente (immagine[1]), uno spettro-polarimetro è formato da una lampada, che funge da sorgente luminosa; un monocromatore, per selezionare la lunghezza d'onda della luce; un polarizzatore, per polarizzare la luce; un modulatore foto-elastico (PEM), che permette di produrre la polarizzazione circolare voluta sfruttando la birifrangenza del mezzo prodotta per effetto foto-elastico; il campione in esame; e infine un rivelatore, per misurare l'intensità della luce dopo il passaggio attraverso il campione.

Mediante l'utilizzo di due polarizzatori e due PEM si possono produrre due fasci di luce polarizzati circolarmente levogiro e destrogira.

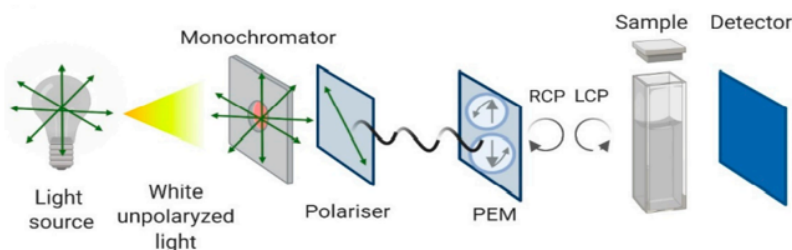


Figura 1. Spettro-polarimetro: rappresentazione schematica del funzionamento dello spettro-polarimetro. Si ha in successione: una sorgente, un monocromatore, un polarizzatore, un modulatore fotoelastico (PEM), il campione e infine il detector.

Negli spettro-polarimetri UV-vis il rivelatore è costituito da un tubo fotomoltiplicatore. Il segnale di dicroismo circolare è in genere molto debole e nel processo di polarizzazione della luce viene persa buona parte dell'intensità emessa dalla sorgente; anche per questo vengono eseguite decine di migliaia di medie per lunghezza d'onda. Inoltre, il tempo di misurazione e rielaborazione di un sampling completo è relativamente lungo, sull'ordine dei 10-12 minuti.

La regione spettrale del lontano UV è molto importante nella spettroscopia di CD, in quanto i legami peptidici delle proteine assorbono in questa fascia spettrale.

Di conseguenza è necessario eliminare l'ossigeno all'interno dello spettro-polarimetro, in quanto quest'ultimo, oltre a diminuire la sensibilità dello strumento in questa regione spettrale, subirebbe un processo di fotodissociazione (processo di Champman¹) producendo O_3 , il quale deteriorerebbe le ottiche dello strumento. Per evitare questo, si apporta un flusso continuo di azoto all'interno dello strumento, che, essendo inerte, non provoca danni alle ottiche.

Inoltre, è necessario utilizzare delle cuvette di quarzo, in quanto sono altamente trasparenti alla radiazione UV a differenza di quelle di vetro. Per motivi analoghi è conveniente scegliere un tampone che sia il più possibile trasparente alla radiazione UV; per questo motivo si è utilizzato il tampone fosfato.

3 Procedimento

Si vogliono preparare sette campioni contenenti una stessa concentrazione di proteina ($4\mu M$) e concentrazioni diverse di denaturante. In particolare si sono preparate delle provette con le seguenti concentrazioni di $GuHCl$: $0M$, $1M$, $2.5M$, $2M$, $3M$, $4M$, $5M$. Per far sì che la concentrazione della proteina fosse la stessa in ciascun campione, si è aggiunta una soluzione tampone affinché tutti i preparati raggiungessero un volume totale di $1500\mu l$.

Prima di procedere con la preparazione dei campioni, si è calcolata la concentrazione dello stock di proteina a partire da $C_{stock}V_{stock} = C_{diluita}V_{diluita}$ e $C_{diluita} = A/\epsilon l$ (derivante dalla legge di Beer-Lambert). Da queste due formule si ottiene:

$$C_{stock} = \frac{AV_{diluita}}{\epsilon l V_{stock}}$$

dove l'assorbanza è stata misurata mediante uno spettro-fotometro (si è preso il valore al picco a cui si è sottratto il valore di fondo). Si è ottenuta una concentrazione dello stock di proteina di: $C_{ps} = 133\mu M$.

¹Vedi S. Chapman, *A Theory of Upper-atmospheric Ozone*, Memoirs of the Royal Meteorological Society, Edward Stanford, 1930. <https://books.google.it/books?id=Dd0VGwAACAAJ>.

In pratica, le concentrazioni di BLG nei vari campioni non sono risultate identiche a causa delle limitazioni intrinseche degli strumenti di laboratorio utilizzati, quali bilance e pipette. Infatti, la precisione nella misurazione delle quantità richieste di componenti è ostacolata dalla variabilità e dall'errore di misura propri di tali strumenti, nonché dall'errore umano. Questi fattori hanno portato a lievi variazioni nelle concentrazioni proteiche tra i campioni, aspetto di cui si è dovuto tener conto calcolando la reale concentrazione della proteina (a partire dalle misure della bilancia effettuate durante la preparazione dei campioni) e utilizzandola successivamente per normalizzare l'ellitticità.

Una volta preparati i campioni, si preleva una piccola quantità da ciascuno e la si inserisce in una cuvetta di quarzo; quest'ultima viene successivamente inserita all'interno dello spettro-polarimetro e si acquisisce l'ellitticità in funzione della lunghezza d'onda, nel range: 200 – 260 nm.

4 Analisi Dati

Per ottenere l'ellitticità molare $(\theta_M)^2$ in funzione della concentrazione di denaturante, sono state scelte tre bande spettrali in cui mediare il valore di θ_M : 224 – 226 nm, 227 – 229 nm e 224 – 229 nm.

Queste bande sono state scelte perché nella zona interessata si osserva una buona aderenza con quanto atteso teoricamente (come verrà discusso successivamente), inoltre il rumore statistico è lieve.

Sono state normalizzate le baseline (figura [2]) degli spettri prendendo la media della coda (255 – 260 nm) e sottraendola a ciascuno spettro.

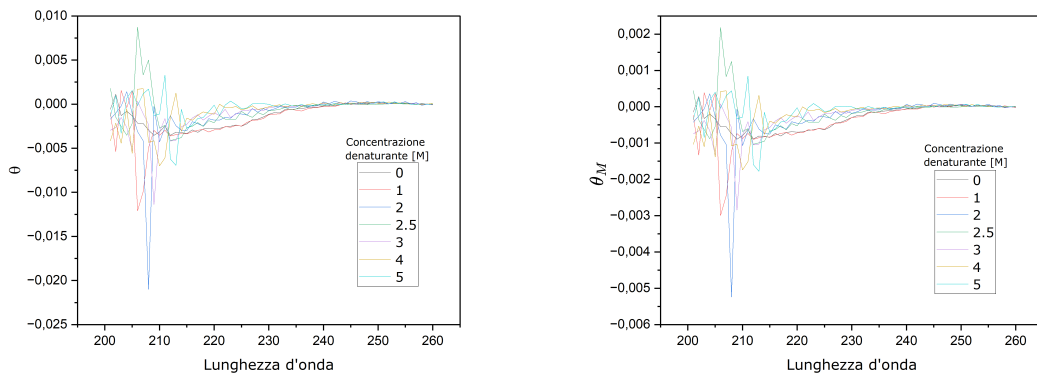


Figura 2. *Sinistra: Spettri θ normalizzati. Destra: Spettri θ_M molare normalizzati.*

Successivamente, è stato diviso ciascuno spettro per la relativa concentrazione della proteina nel campione, al fine di ottenere l'ellitticità molare. Questo passaggio è necessario visto che, come già accennato, la concentrazione della proteina in ciascun campione non è esattamente la stessa per via dell'errore umano e sperimentale. Di conseguenza, in fase di preparazione dei campioni, si è registrata la quantità in massa dei vari elementi aggiunti. Successivamente da questi ultimi si sono calcolate le corrette concentrazioni di proteina utilizzate (tabella[1]).

²Si noti che si è diviso solamente per la concentrazione della proteina e non per la lunghezza del cammino ottico, in quanto quest'ultimo rimane costante avendo utilizzato sempre la stessa cuvetta.

$C_{\text{denaturante}} \text{ (M)}$	$C_{\text{proteina}} \text{ (}\mu\text{M)}$
0	3.96
1	4.04
2	4.01
2.5	4.00
3	3.99
4	4.02
5	3.90

Tabella 1. *Concentrazioni di GuHCl e BLG: valori corretti delle diverse concentrazioni di proteina utilizzate; per le concentrazioni del denaturante si sono considerate quelle target.*

Negli spettri di dicroismo circolare di una proteina è previsto che, con l'aumentare della concentrazione del denaturante nella soluzione, questi ultimi tendano progressivamente ad appiattirsi attorno al valore $\theta = 0$. In altre parole, si osserva che il dicroismo circolare della proteina diventa progressivamente meno marcato. Analizzando il grafico in figura [2], l'andamento registrato in laboratorio sembra confermare questa previsione (cosa che si osserva molto bene nel range spettrale $220 - 230 \text{ nm}$).

Infine, sono stati calcolati i valori medi per ciascuno spettro e in ciascuno dei tre range spettrali scelti. Come errore è stata utilizzata la deviazione standard. Quindi, è stato effettuato il fit dei valori di ellitticità molare in funzione della concentrazione di denaturante, utilizzando la (10)³.

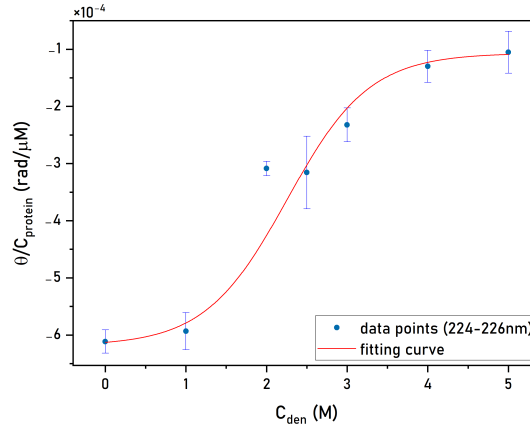
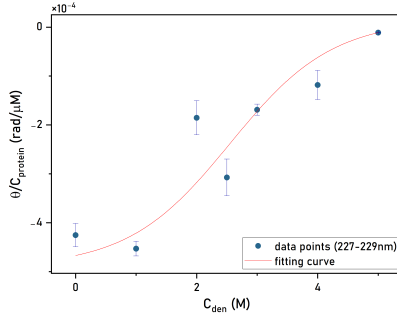
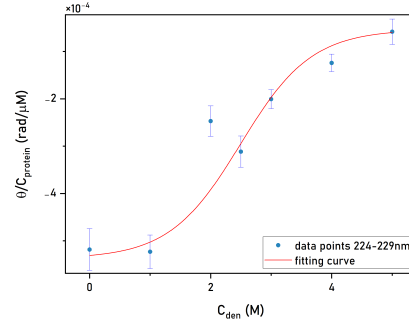


Figura 3. *Fit nel range 224-226nm: per ciascuno spettro è stata calcolata la media nell'intervallo e questi valori sono stati rappresentati in funzione della concentrazione di denaturante nel campione e l'andamento osservato è stato interpolato con la relazione (10). $\tilde{\chi}_o^2 \approx 29$.*

³Si noti che per far convergere il fit si è impostata la temperatura $T = 300K$



(a) Fit nel range 227-229nm. $\tilde{\chi}_o^2 \approx 9$.



(b) Fit nel range 224-229nm. $\tilde{\chi}_o^2 \approx 8$.

Figura 4. *Fit nei range 227-229nm e 224-229nm: per ciascuno spettro è stata calcolata la media nell'intervallo e questi valori sono stati rappresentati in funzione della concentrazione di denaturante nel campione e l'andamento osservato è stato interpolato con la relazione (10).*

Il range su cui si è ottenuto un miglior adattamento è 224 – 226 nm. Nei range 227 – 229 nm e 224 – 229 nm l'adattamento risulta peggiore, soprattutto nel primo caso. Il fatto che il range 224 – 229 presenti un miglior adattamento rispetto al 227 – 229 è intuitivo, poiché include anche i valori del range 224 – 226, che, come già menzionato, mostrano un buon adattamento. Si è quindi deciso di utilizzare i valori ricavati dal fit nel range 224 – 226 nm.

Si nota che, in tutti i range considerati, il dato corrispondente alla concentrazione 2 M è completamente discostato dall'andamento dettato dal resto dei dati. Tale discrepanza è attribuibile a un errore sistematico, la cui origine non è stata identificata. Tuttavia, la causa più probabile sembra essere la presenza di impurità sulla superficie della cuvetta, che non sarebbe stata adeguatamente pulita.

Si è quindi provato a scartare questo valore e ri-effettuare il fit nel range 224 – 226 nm. In questo modo si è ottenuto un fit migliore con un $\tilde{\chi}_o^2 \approx 0.14$.

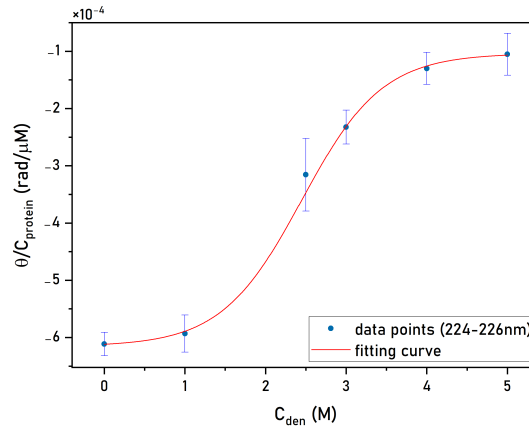


Figura 5. *Fit nel range 224-226nm, outlier escluso: l'adattamento dei dati al modello migliora significativamente se si esclude la misura a $C_{den} = 2M$. Infatti $\tilde{\chi}_o^2 \approx 0.14$.*

Stavolta $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 90\% > 5\%$, quindi - entro il loro errore - l'andamento delle misure è ben descritto dalla funzione [10].

4.1 Risultati fit nel range 224-226 nm

Nella tabella che segue sono raccolti i parametri restituiti dall'ultimo fit⁴ (quello in cui è stato escluso il dato a 2M), accompagnati dalle relative incertezze.

$y_N[\mu M^{-1}]$	$y_D[\mu M^{-1}]$	$C_D^{midpoint}[M]$	$m[kJ \cdot l \cdot mol^{-2}]$
$(-6.16 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	$(-1.04 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$	2.45 ± 0.08	5.0 ± 0.5

Tabella 2. Parametri restituiti dal fit (nel range 224 – 226 nm).

A partire dai parametri m e $C_D^{midpoint}$ è stata stimata la differenza nell'energia libera di Gibbs associata al processo di denaturazione in acqua:

$$\Delta G_D^{H_2O} = m \cdot C_D^{midpoint} = (12.2 \pm 1.2) J/mol$$

L'incertezza è stata ottenuta propagando opportunamente l'errore sui due parametri, secondo la formula $\sigma_{\Delta G_D^{H_2O}} = \Delta G_D^{H_2O} \sqrt{(\sigma_m/m)^2 + (\sigma_{C_D^{midpoint}}/C_D^{midpoint})^2}$.

5 Conclusioni

Nel corso di questo esperimento si è indagato l'effetto della denaturazione della proteina Beta-Lactoglobulina (BLG) in presenza di diverse concentrazioni del denaturante cloruro di guanidinio (GuHCl), utilizzando la tecnica del dicroismo circolare (DC) per misurare l'ellitticità della luce polarizzata circolarmente. I dati raccolti hanno permesso di osservare come l'ellitticità varia in funzione della concentrazione di denaturante, mostrando una chiara transizione dalla forma nativa a quella denaturata della proteina. Questi risultati confermano l'efficacia del dicroismo circolare nel monitorare le modifiche conformazionali delle proteine, in risposta a variazioni delle condizioni ambientali.

Nonostante la presenza di errori sperimentali, dovuti specialmente alla preparazione del campione, è stato possibile osservare un andamento in accordo con quello previsto (equazione (10)), soprattutto nella fascia spettrale 224 – 226nm. Un'altra possibile fonte di errore potrebbe essere attribuita ad una inadeguata pulizia della cuvetta; ciò si ritiene abbia influenzato specialmente il valore alla concentrazione 2M di denaturante.

L'analisi dei dati ha dimostrato che l'ellitticità molare, misurata in diversi intervalli di lunghezza d'onda, fornisce informazioni sullo stato di denaturazione della BLG. In particolare, dal fit dei dati sperimentali con il modello teorico, si è stimata la differenza di energia libera di Gibbs associata al processo di denaturazione in acqua: $\Delta G_D^{H_2O} = (12.2 \pm 1.2) kJ/mol$, commettendo un errore percentuale pari a $\sim 10\%$.

⁴Le stime di $C_D^{midpoint}$ e di m risultano più precise quando si ignora il punto anomalo.