

tissue : biopsy - wide field microscopy $\Delta x \sim 14\text{ }\mu\text{m}$

cell : confocal fluorescence $\Delta x \sim 200\text{ nm}$

inside the cell : super resolution $\Delta x \sim 20\text{ nm}$

virus : electron microscope $\Delta x \sim 1\text{ nm}$
↓ micro-spectroscopy (x-ray)

macro molecule ($\sim 100\text{ K atoms}$)

micro molecule ($< 100\text{ K atoms}$)

} non e' importante fare immagini
ma capirne la struttura

metodi per risalire alla posizione degli atomi in una proteina piegata ?

cristallografia

ni basta nul fatto che molte sostanze hanno una struttura a cristallo, ovvero sono formate dalla ripetizione di unità su un reticolo geometrico. Le unità possono essere costituite da atomi, molecole...

Se mi colpisce il reticolo con un raggio x di lunghezza d'onda affine alla distanza tra 2 piani del reticolo, mi ha una **diffrazione coerente**. A causa dei numerosi piani che interferiscono con il raggio, alla fine mi creano dei picchi molto stretti, simili a dei punti → **Bragg dots**

condizione per l'interferenza costruttiva: $m\lambda = 2d \sin\theta$

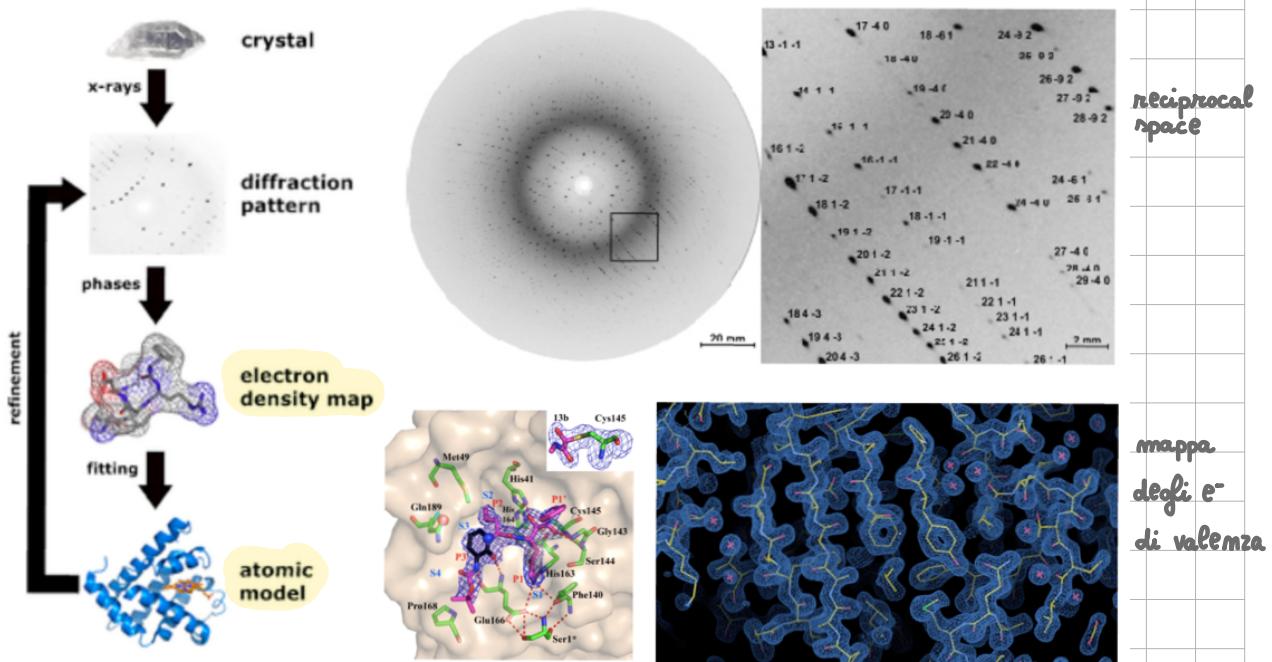
Each crystal plane produces a high number of reflections at non-trivial (non-specular) angle: one for each m (diffraction orders)

affinché avvenga non deve esserci scattering multiplo, amorfico o a cascata.

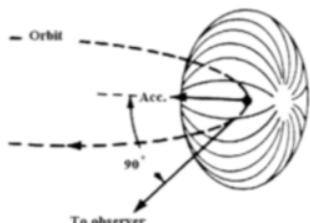
La figura di diffrazione viene usata per determinare la posizione degli atomi nella unit cell, in particolare mi deve analizzare l'intensità della figura.

Problema: non tutte le molecole biologiche cristallizzano e la cristallizzazione delle proteine è del tutto artificiale e può modificare la struttura reale.

X-ray Protein Crystallography

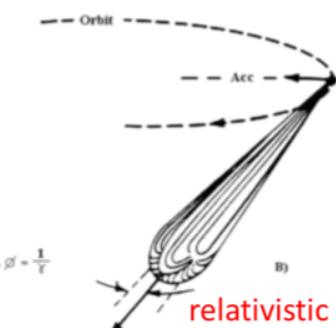


Synchrotron Radiation

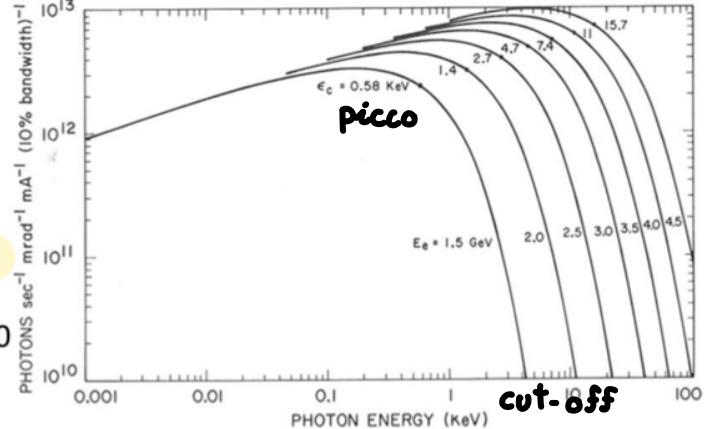


A)

non-relativistic



$$\Delta\phi = \frac{1}{T}$$



To obtain X-rays in the range of 10 keV ($\lambda=0.1 \text{ nm or } 1 \text{ \AA}$) an electron beam with at least 3 GeV is required
(note: TEM and SEM have 100 keV and 20 keV respectively!)

La radiazione di sincrotrone è emessa da fasci di elettroni relativistici con una traiettoria curva.

Se l'e- si muove su una traiettoria circolare con velocità NON relativistica, la radiazione emessa ha la forma di un dipolo ed è omogenea in tutte le direzioni.

Se l'e- è relativistico, la radiazione viene emessa lungo la direzione del vettore della velocità.

Il sincrotrone quindi consente di produrre della radiazione EM che viaggia in un'unica direzione e che proviene da una piccola sorgente.

Lo spettro della radiazione di sincrotrone è quasi bianco (veniamo prodotte quasi tutte le λ) con un cut-off in corrispondenza dell'energia critica dell'e- sorgente.

Per ottenere raggi X con $E=10 \text{ keV}$, il fascio di e- deve avere $E=3 \text{ GeV}$; per raggiungere quelle energie si usano degli acceleratori di particelle circolari (= sincrotroni).

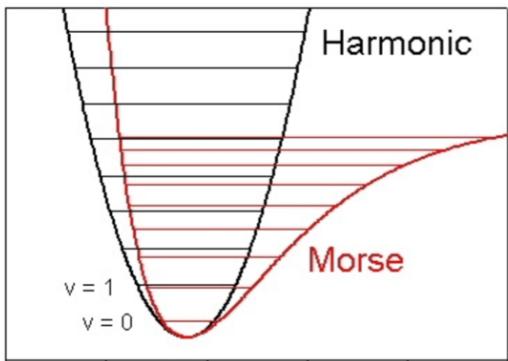
Vibrational Spectroscopy

metodo per determinare la struttura di una proteina che non puo' cristallizzare.

In spettroscopia non si e' interessati alla posizione del campione, si usa una soluzione omogenea per determinare la struttura delle proteine.

Per ricavare informazioni sulla struttura delle proteine si deve studiare lo spettro vibrazionale in quanto da informazioni sulle distanze atomiche e sugli angoli di legame, a partire dalle quali si puo' dedurre la struttura.

Vibrational transitions



Rotations are not relevant in condensed matter (including liquids, colloids, membranes, glasses.. and biosystems). The only residual effect of blocked rotations is a broadening of the vibrational transition lines

Vibrational transition selection rule: $\Delta v = \pm 1$

Most molecules at room-T have $h\nu > kT = 25 \text{ meV}$ ($100 \text{ meV} < h\nu < 500 \text{ meV}$)
→ only $v=0$ is populated

→ the $0 \rightarrow 1$ transition is most easily observed
→ the $0 \rightarrow 2$ transition ("overtone") is weak and its frequency is not exactly the double of the $0 \rightarrow 1$ (Morse potential is a better approx than harmonic parabola)

Poiche' la transizione non avviene senza emissione di luce, quello che viene rilevato e' l'assorbimento della luce. Quindi si incide sul campione con una sorgente di luce e si osserva lo spettro della radiazione mancante che e' stata assorbita.

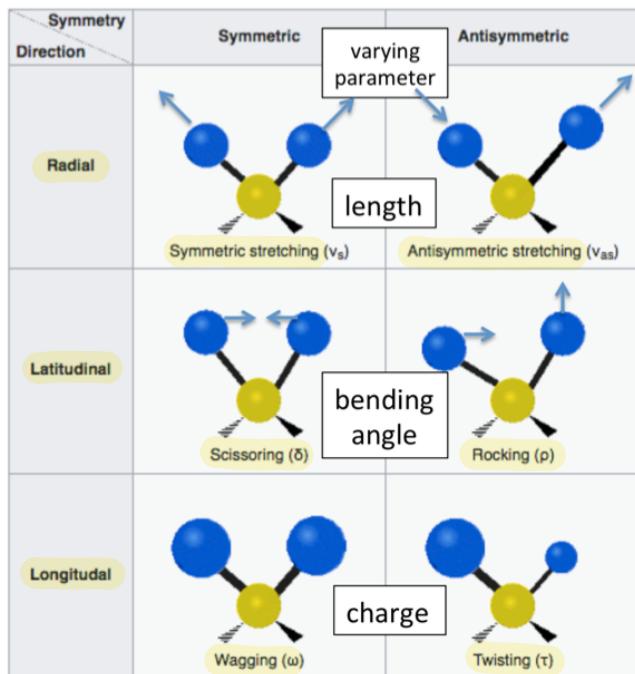
La scala di energie e' molto piu' bassa di quella che si ha in microscopia con emissione fluorescente. Nella fluorescenza avviene una transizione elettronica, in questo caso e' vibrazionale.

energie vibrazionali: $100 \text{ meV} < h\nu < 500 \text{ meV}$

sono molto piu' alte dell' energia a T ambiente: 25 meV ; quindi non puo' avvenire spontaneamente una transizione e popolare i primi stati eccitati.

Si illumina il campione con diverse frequenze nell' infrarosso, e si osserva quale di quelle frequenze ha perso energia dopo essere passata nel campione, ovvero quale frequenza e' stata assorbita (=vibrazione) dal sample.

Types of vibrational modes H_2O



high frequency
 $h\nu > 300 \text{ meV}$
 easy to calculate

mid frequency
 $100 < h\nu < 200 \text{ meV}$
 sensitive to nearest neighbors (secondary structure)
 mid-infrared range

low frequency
 $h\nu < 100 \text{ meV}$
 difficult to calculate

- gli atomi si muovono lungo la direzione del legame, cambiando di lunghezza.
 Gli spostamenti dei 2 atomi possono avvenire nella stessa direzione o in direzioni diverse.

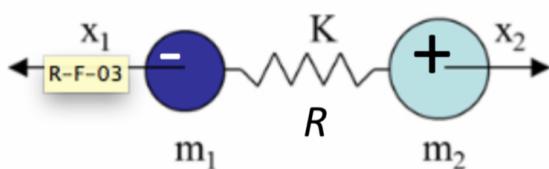
- cambia l'angolo di legame.

- cambia la carica equivalente degli atomi, cambia il momento di doppio.

*Osservando lo shift verso energie più elevate delle vibrazioni di bending angle, si deduce la presenza di altri atomi vicini.

Infrared-active vibrational modes

In the harmonic oscillator approximation, a vibrational mode corresponds to a mass-and-spring mechanical model



For the stretching mode, the interpretation of spring oscillation is correct. For other modes it is symbolic.

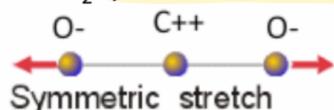
Electric dipole operator D

The matrix element between $v=0$ and $v=1$ is non-zero for the first-order Taylor term in $(R - R_0)$, called the **induced dipole moment**
 (a permanent dipole moment is not required)

$$D(R) = D(R_0) + (R - R_0) \frac{dD(R_0)}{dR} + \dots$$

pon. di eq.

All modes have resonant frequencies in the IR, but not all modes are IR-active:
 If the electric dipole moment does not change during the vibrational motion,
the mode is NOT infrared active. = NON interagisce con la radiazione EM
 Example: CO_2 symmetric stretch



Quando il momento di dipolo non c'è:

Vibrational Raman effect

effetto di 2° ordine

Consider the polarization vector of a molecule "pumped" by a strong laser field E_0 oscillating at a frequency much higher than any vibrational mode (VIS, not IR)

ν_0 : freq. laser

$$P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t),$$

linear response function

The nonresonant oscillation energy transfers to resonant vibrational modes.

The dynamic polarizability $\alpha(t)$ will have a stronger component at the vibrational mode frequency ν_m with corresponding normal mode coordinate q

$$\alpha = \alpha_0 + q \left(\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right)_{q=0} + \dots, \quad q(t) = q_0 \cos(2\pi\nu_m t)$$

ha un termine lineare e uno di 2° ordine

substituting α in the first relation we get:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + q_0 \cos(2\pi\nu_m t) E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right)_{q=0}.$$

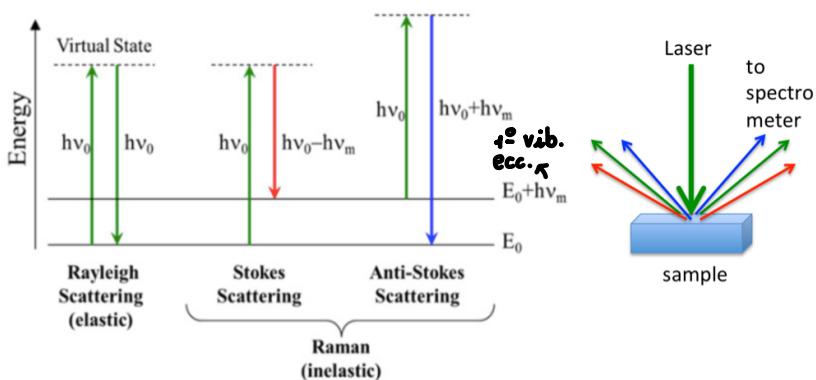
By applying trigonometric relations we obtain two beatnote oscillation frequencies at $\nu_0 + \nu_m$ e $\nu_0 - \nu_m$ in the radiation exiting the sample (scattering)

$$q_0 E_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right)_{q=0} [\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_m)t) + \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_m)t)],$$

Raman scattering processes

$$q_0 E_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial t} \right)_{q=0} [\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_m)t) + \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_m)t)],$$

Stokes Anti-Stokes



Il campione viene illuminato con un laser molto intenso. La luce viene scatterata in direzioni non normali. Non c'è riflessione né trasmissione. La luce scatterata viene analizzata con uno spettrometro.

Fluorescence vs. Raman

Raman effect:

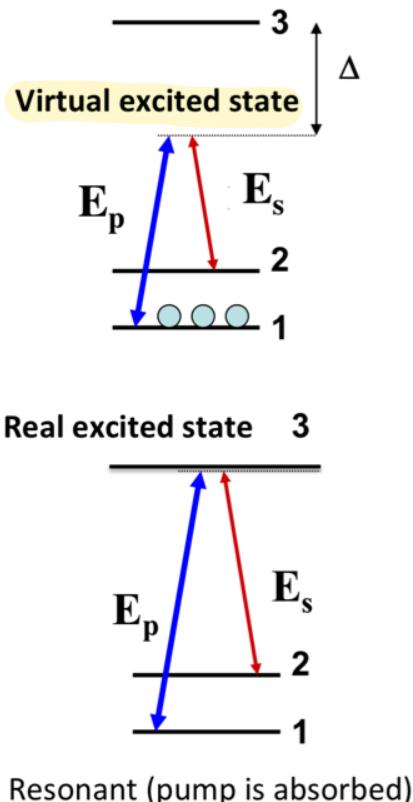
Inelastic light scattering

Ep-Es is called Raman shift and it corresponds to ONE vibrational quantum (usually a single isolated peak)

Photoluminescence/ fluorescence:

Sequence of an absorption and an emission process.

Ep-Es is called Stokes shift and it can corresponds to the sum of MANY vibrational quanta (usually, a broad spectral convolution of them)

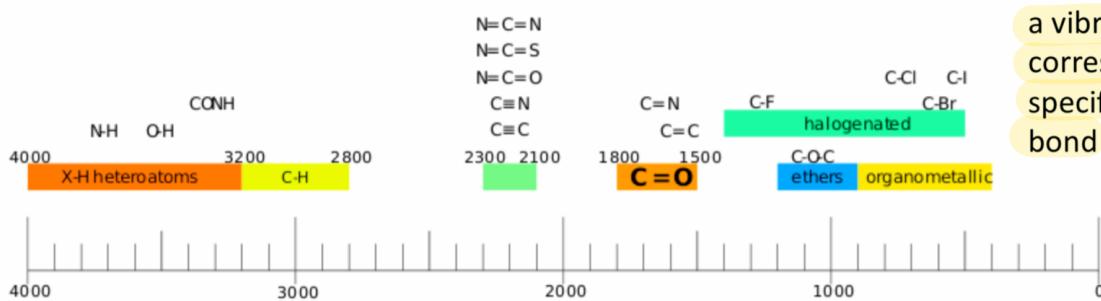


stessa strumentazione

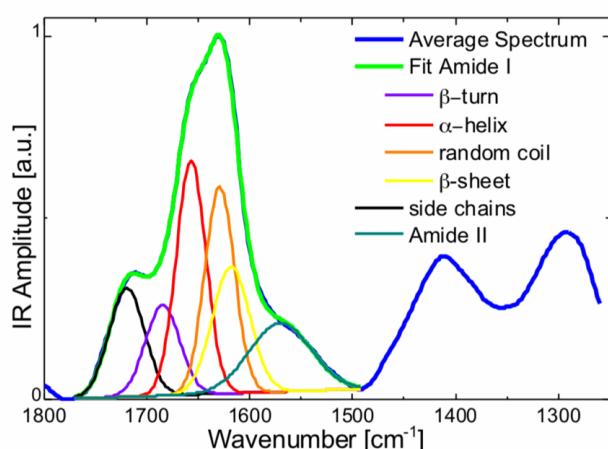
l'energia non è risonante con nessuna trans. fenomeno di 2° ordine

2 fenomeni di 1° ordine

Chemical bond identification



a vibrational line corresponds to a specific chemical bond



Important case: peptide bond

Amide band series (I, II, III etc)
The Amide-I band can be deconvolved in several contributions at different frequency related to the different secondary structures

Il pattern di assorbimento può essere de-convolto in tante lorentziane, ognuna delle quali corrisponde a una oscillazione pura di un determinato legame. In base all'intensità si ricava il numero di legami con una certa struttura.

Nuclear Magnetic Resonance

(Nobel prizes in Physics 1944 and 1952)

Energy of nuclear spin states in an external magnetic field

$$E = -\gamma m \hbar B_0 .$$

(γ is called the *gyromagnetic ratio* and depends on the particle $\gamma = eg/2m$, $g=1$ for a proton).

For a proton with spin quantum number $m = 1/2$:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 ,$$

Larmor precession frequency:

$$\omega_L = 2\pi\nu_L = -\gamma B_0$$

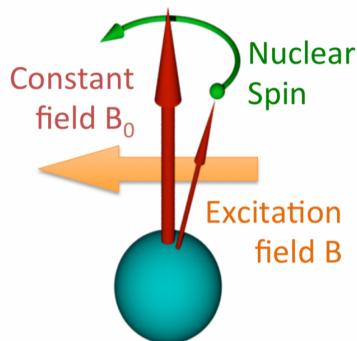
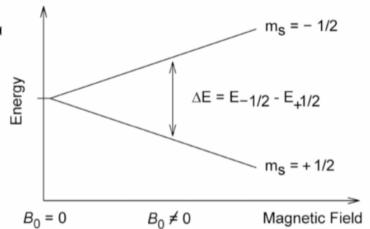
Now consider a transverse excitation field $B = B_0 \sin(\omega_L t)$

$$\vec{r} = \vec{\mu} \times \vec{B} = \gamma \vec{J} \times \vec{B},$$

the transverse magnetization generated by the resonant oscillating field is measured.

Magnetic resonance imaging (MRI) is used in medical imaging, but resolution is 1 mm, no microscopy!

In this course however we study **NMR Spectroscopy**



Dato un campo magnetico B_0 molto forte, si aspetta che tutti i nuclei siano allineati con B_0 . A questo punto si aggiunge un secondo campo B poco intenso e orientato in direzione trasverso. Lo spin inizia una precessione intorno a B_0 .

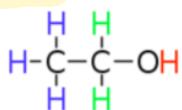
Conoscendo B , si può ricavare la frequenza della precessione di Larmor.

NMR Spectroscopy: consente nella rilevazione di piccoli shift dalla frequenza di precessione di Larmor in accordo con l'environment chimico della molecola → **Chemical Shift**

Chemical shift

Electron spin is "distributed" in space according to the electron wavefunction. Each hydrogen nucleus (proton) in a molecule "sees" a different electron wavefunction environment.

Ethanol

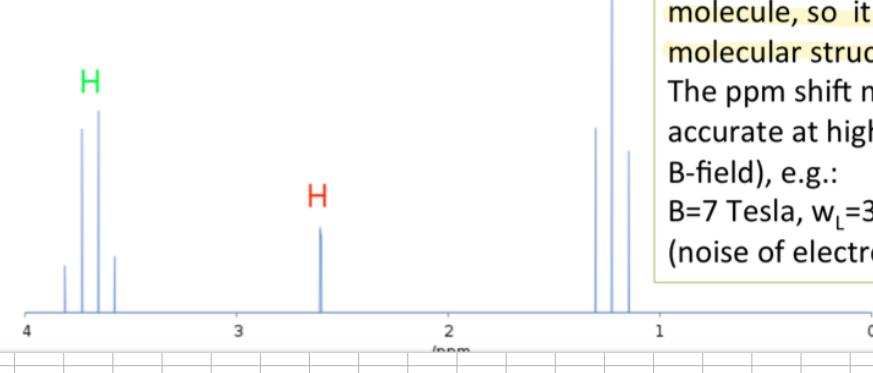


Electron spins produce a magnetic field opposite to the excitation magnetic field. This electronic shielding reduces the magnetic field at the nucleus (which is what determines the NMR frequency).

Therefore, each class of hydrogen atoms will experience a very small shift (part per million in frequency, ppm) from the bare proton Larmor frequency. The chemical shift characterizes the position of H in the molecule, so it is a fine probe of the molecular structure.

The ppm shift measurement is more accurate at higher frequency (=stronger B-field), e.g.:

$B=7$ Tesla, $\omega_L=300$ MHz, shift= 300-900 Hz
(noise of electronic receivers is $1/f$)



Protein NMR for structure calculation

No crystals required as in XRC, but liquid solution (average over all orientations): important for all proteins that do not crystallize!

H-atom position is normally not sufficient:

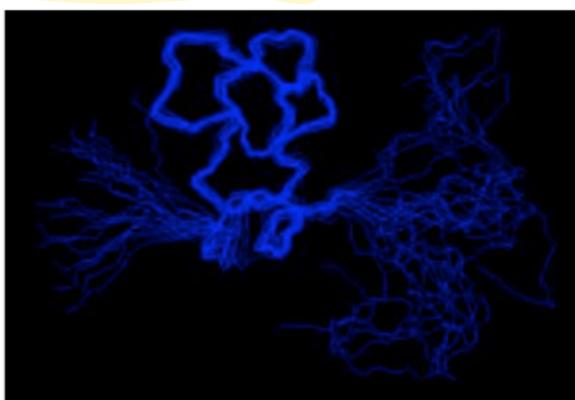
C and N NMR spectroscopy is required.

^{12}C has spin zero! ^{13}C substitution required.

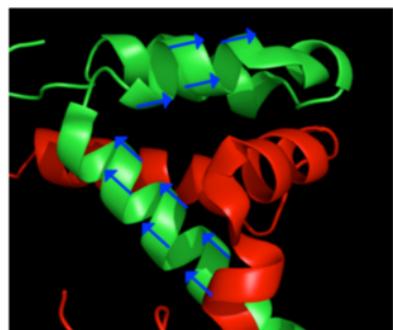
^{15}N and ^{13}C may be purposely substituted in only one of the aminoacids before protein synthesis.

C-chain

H-bond network



N-H bond direction



In order to make structure calculations, a number of **restraints** are experimentally determined:
distance restraints;
angle restraints;
helix orientation restraints; etc.