

# L'EPR svelato: una sonda per esplorare le macromolecole

Paola Fattibene

Emanuela Bortolin, Cinzia De Angelis, Sara Della Monaca,  
Donatella Pietraforte, Maria Cristina Quattrini



EPR – the smaller elder sister of NMR

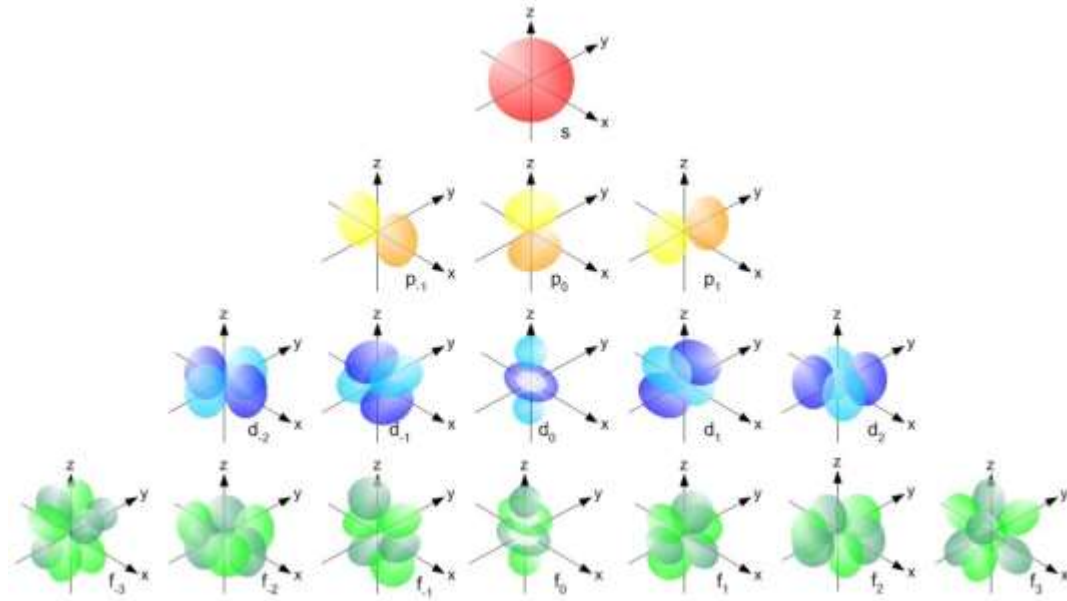
---

Electron Paramagnetic Resonance

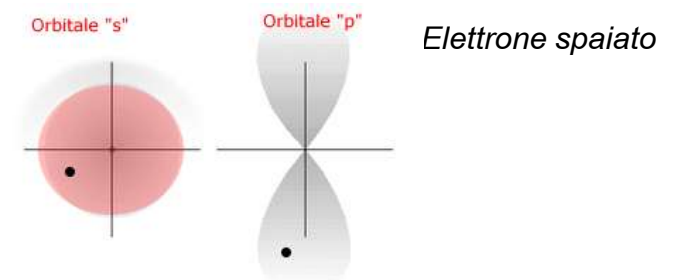
Nuclear Magnetic Resonance

# Un rapido ripasso del paramagnetismo

Negli atomi e molecole gli elettroni possono occupare solo zone chiamate orbitali. In ogni orbitale possono esserci due elettroni.



Alcuni elementi hanno la proprietà di avere un solo elettrone su uno o più orbitali.



# Cosa possiamo studiare con l'EPR?

Elementi intrinsecamente paramagnetici:

- Metalli
- Radicali liberi e target biologici ossidati
- Radicali stabili in matrici solide – endogeni e indotti da agenti esterni (es. radiazioni)

...ma anche

complessi non paramagnetici

Parte 1

Matrici ambientali:

suolo, particolato, licheni, muschi, sedimenti, lignite,...

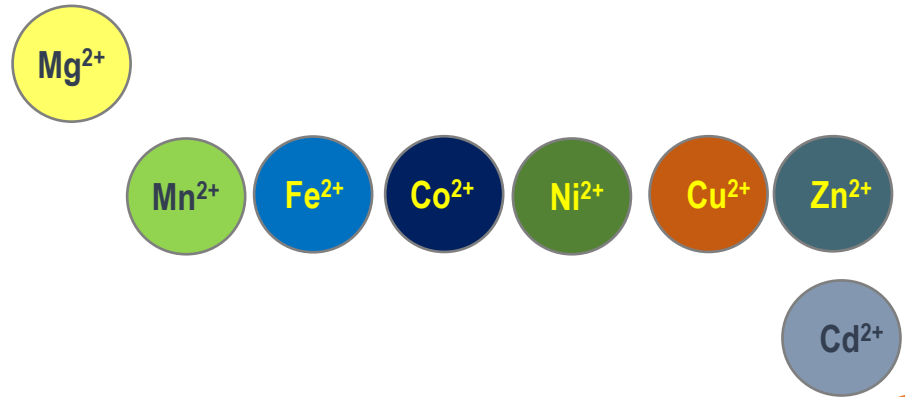
Matrici biologiche:

- tessuti – cutanei, ossei, capelli, unghie, sangue
- cellule
- proteine

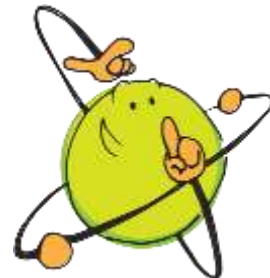
Parte 2

# EPR e metalli- quali?

Gli elementi di transizione hanno orbitali *d* incompleti.



$1H$																	$2He$
$3Li$	$4Be$											$5B$	$6C$	$7N$	$8O$	$9F$	$10Ne$
$11Na$	$12Mg$											$13Al$	$14Si$	$15P$	$16S$	$17Cl$	$18Ar$
$19K$	$20Ca$	$21Sc$	$22Ti$	$23V$	$24Cr$	$25Mn$	$26Fe$	$27Co$	$28Ni$	$29Cu$	$30Zn$	$31Ga$	$32Ge$	$33As$	$34Se$	$35Br$	$36Kr$
$37Rb$	$38Sr$	$39Y$	$40Zr$	$41Nb$	$42Mo$	$43Tc$	$44Ru$	$45Rh$	$46Pd$	$47Ag$	$48Cd$	$49In$	$50Sn$	$51Sb$	$52Te$	$53I$	$54Xe$
$55Cs$	$56Ba$		$72Hf$	$73Ta$	$74W$	$75Re$	$76Os$	$77Ir$	$78Pt$	$79Au$	$80Hg$	$81Tl$	$82Pb$	$83Bi$	$84Po$	$85At$	$86Rn$
$87Fr$	$88Ra$		$104Rf$	$105Db$	$106Sg$	$107Bh$	$108Hs$	$109Mt$	$110Ds$	$111Rg$	$112Cn$	$113Uut$	$114Fl$	$115Uup$	$116Lv$	$117Uus$	$118Uuo$



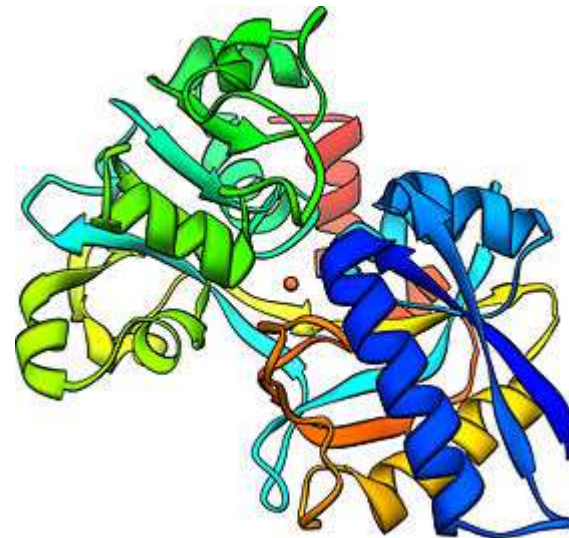
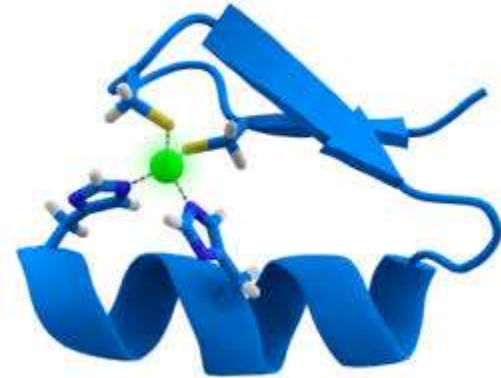
# EPR e metalli – cosa si misura?

Presenza del metallo

Concentrazione

Stato redox

Simmetria locale



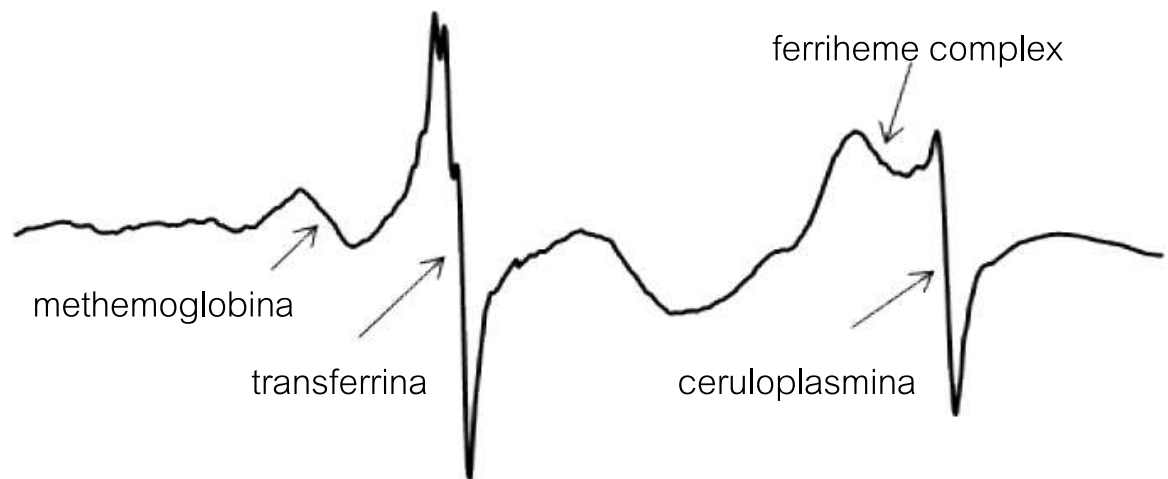
# I metalli in EPR: la caratterizzazione delle metalloproteine

Solo alcune configurazioni elettroniche dei metalli sono paramagnetiche (EPR-active)

Misurando il campione tal quale e dopo ossidazione e riduzione si può risalire al metallo presente.

Spettro EPR di sangue intero di una persona sana con segnali di  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$

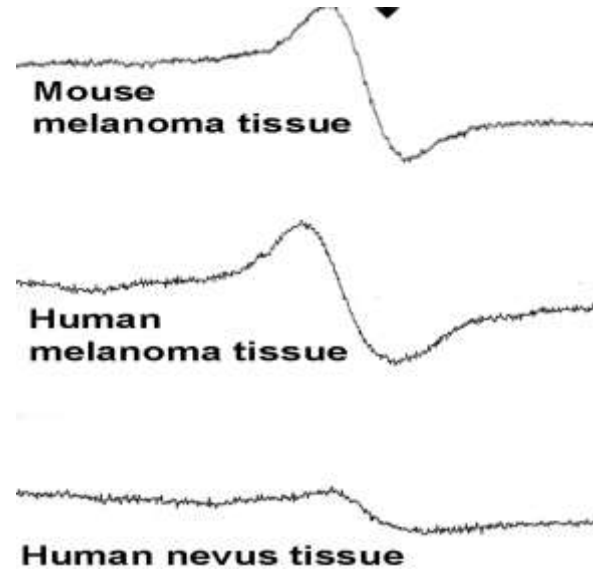
Metal Ion	Spin State
$\text{Fe}^{2+}$	$S = 0$ (ls) or $S = 2$ (hs)
$\text{Fe}^{3+}$	$S = 5/2$ (hs)
$\text{Ni}^{1+}$	$S = 1/2$
$\text{Ni}^{2+}$	$S = 0$ or $S = 1$
$\text{Ni}^{3+}$	$S = 1/2$
$\text{Cu}^{1+}$	$S = 0$
$\text{Cu}^{2+}$	$S = 1/2$



# Radicali stabili in matrici solide: radicale semichinone

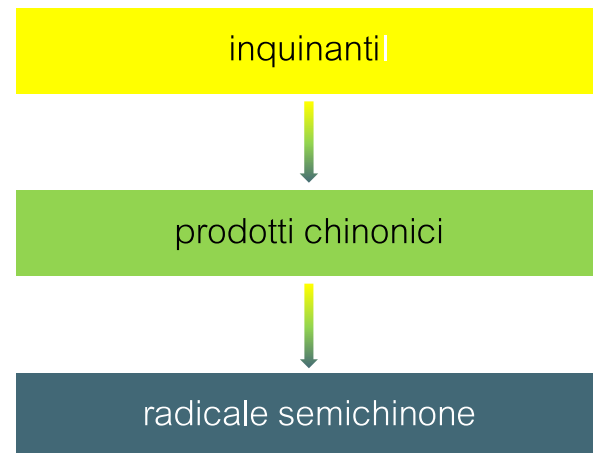
1

melanina



2

indicatore di inquinanti nelle matrici ambientali



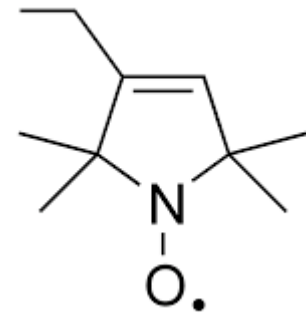


## E se la molecola (proteina) non contiene centri paramagnetici?

Analogamente a altre tecniche, anche in EPR possiamo usare sonde molecolari (spin label)

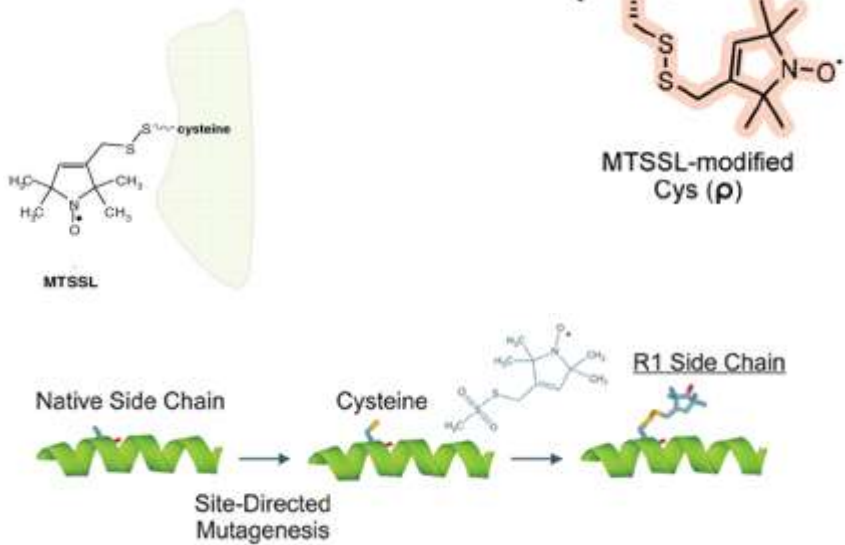
Uno "spin label" è un radicale stabile (spesso radicale nitrossido protetto) di struttura e/o reattività tali da consentirne l'introduzione in una particolare zona dei sistemi biologici e della macromolecola.

Il tipo di spin label dipende dalla proteina e dal parametro che si vuole investigare.

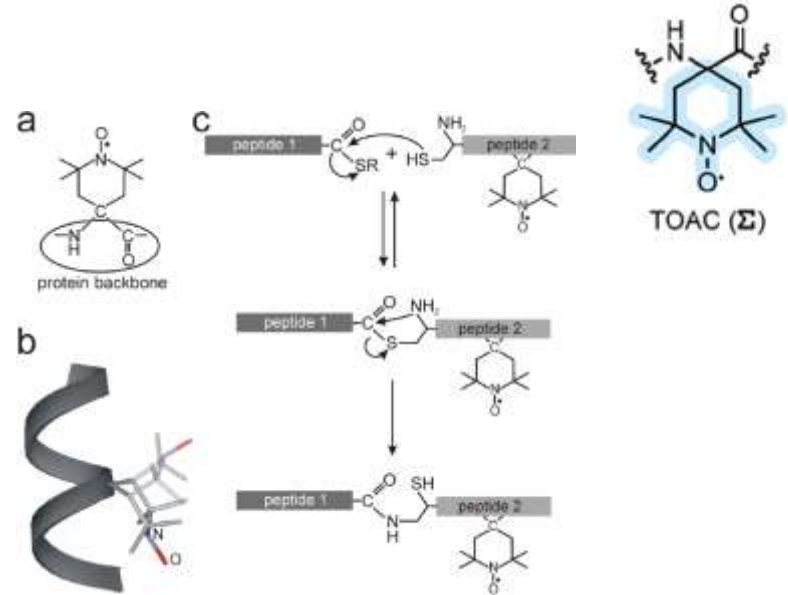


# Come introdurre uno spin label in una proteina

## Spin labelling di cisteine

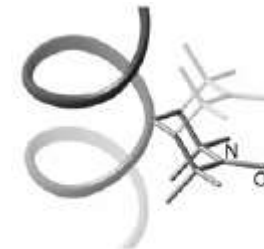


## Spin labeling sul legame peptidico



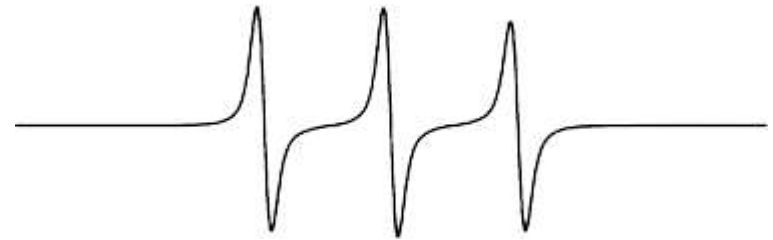
Uno spin label è introdotto nella proteina mediante mutagenesi sito specifico

Un aminoacido marcato con spin label è incorporato a peptidi attraverso sintesi in fase solida.

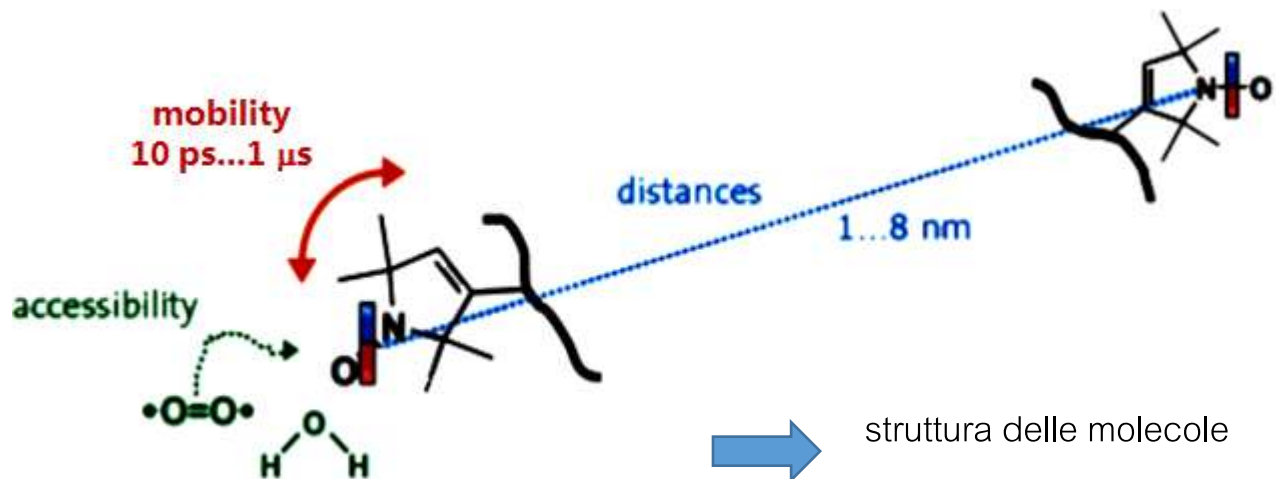
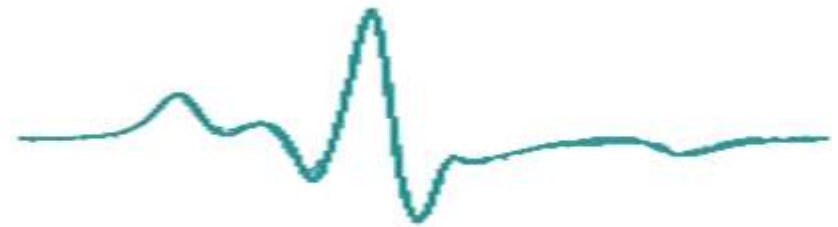


# Marcatura con spin label – quali informazioni?

Il segnale EPR di uno spin label libero in soluzione acquosa è molto semplice



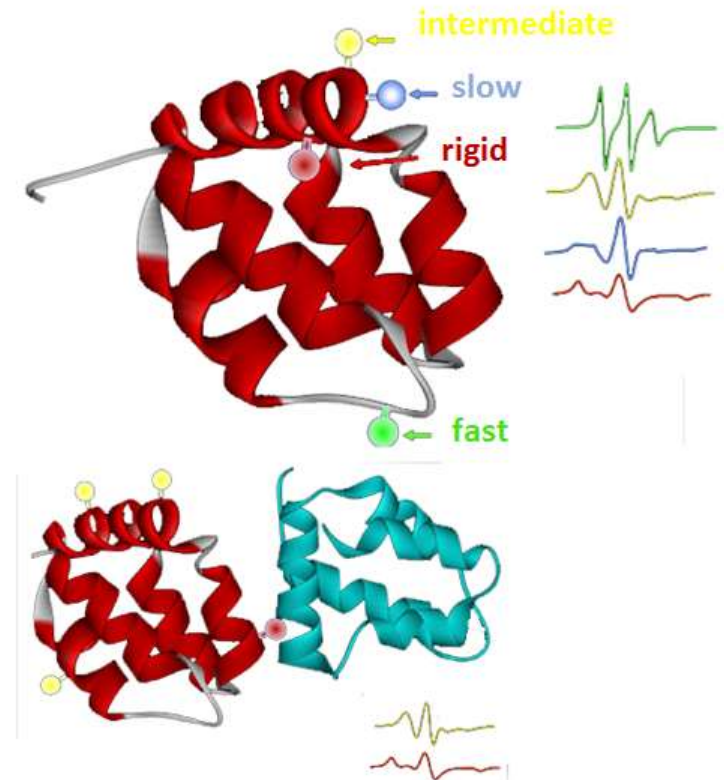
L'interazione con le molecole adiacenti ne modifica il microambiente e i movimenti, quindi la forma dello spettro.



## Informazioni ottenibili dalla **mobilità** dello spin label

La velocità, l'ampiezza e l'anisotropia dei movimenti dello spin label si riflettono sulla forma del suo spettro EPR.

Se la mobilità dello spin label è influenzata dall'interazione con la proteina a cui è marcato o altre proteine vicine, lo spettro EPR ne risente.

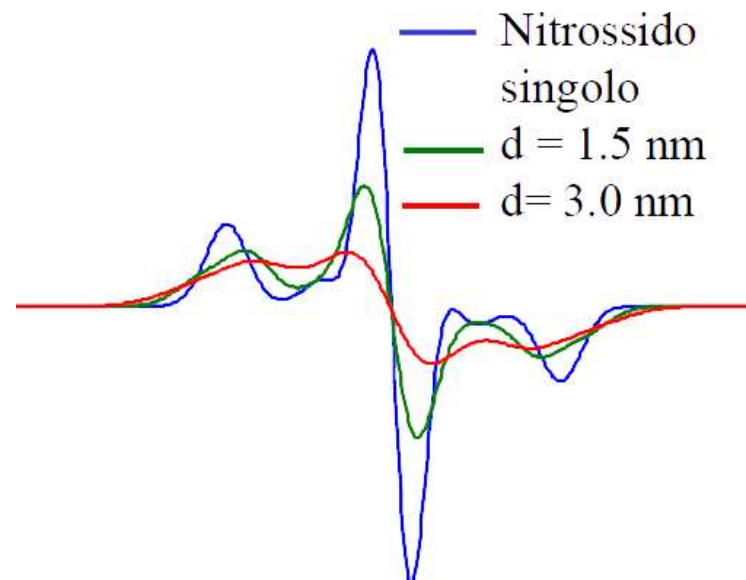
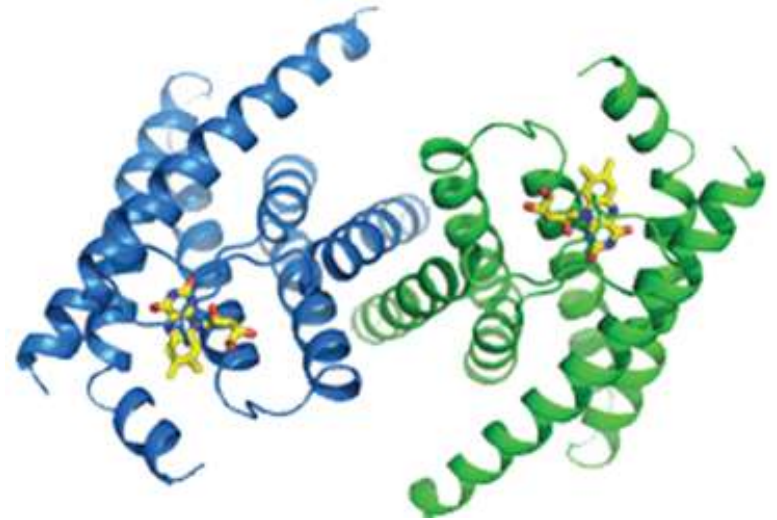


ideal liquid state: rotational averaging in less than 10 ps

ideal solid state: rotational averaging in more than 1 ms


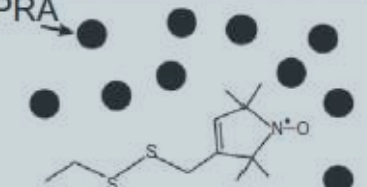
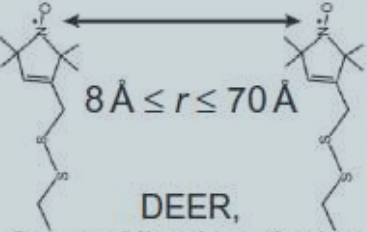
## Informazioni ottenibili dalle **distanze** molecolari

Introducendo due spin label in una stessa molecola o in due molecole, è possibile misurare la distanza tra gli spin label attraverso le modifiche osservate nello spettro EPR.





# The EPR tool kit

Parameters		Observables		Interpretation		Caveats	
<p><b>Mobility</b></p> <p>Isomerization around internal bonds</p>		 <p>EPR spectral lineshape</p>		<p>Assignment of structural class (i.e., buried, surface, etc.)</p> <p>Local packing of structural elements</p> <p>Backbone fluctuations</p>		<p>Dependent on spin label structure</p> <p>Overlapping structural classes</p> <p>Label dynamics convoluted with backbone fluctuations</p>	
<p><b>Solvent accessibility</b></p> <p>Spin exchange between label and PRA</p>		 <p>Power saturation curves</p>		<p>Topological location</p> <p>Identification of aqueous or lipid phases</p> <p>Secondary structure assignment</p>		<p>Requires diffusing paramagnetic species to induce spin exchange</p> <p>Low throughput</p>	
<p><b>Distance</b></p> <p>Dipole-dipole coupling</p>		 <p>DEER, Spectral line broadening</p>		<p>Global structural organization</p> <p>Conformational heterogeneity</p> <p>Magnitude and direction of structural movements</p>		<p>Analysis sensitive to protein aggregation</p> <p>Uncertain label position relative to backbone</p> <p>Performed under cryogenic conditions</p>	

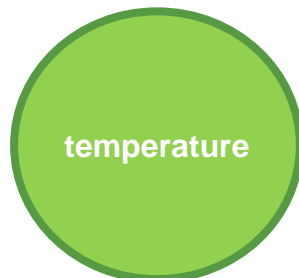
# L'EPR-ista ha a disposizione diversi metodi sperimentali...



X-band – 9 GHz

Q-band – 34 GHz

W band - 94 GHz

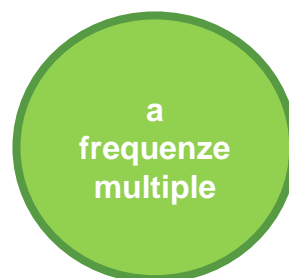


T ambiente

400 K

70 K

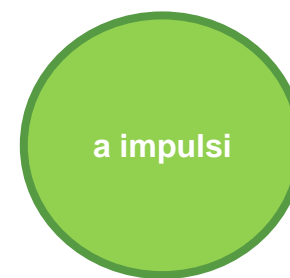
2 K



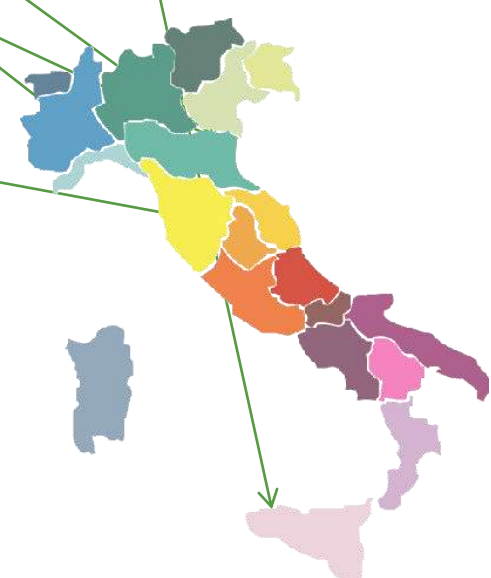
ELDOR

ENDOR

ODMR



...e una rete di laboratori amici





# Non è tutto oro quel che luccica...

La quantità di campione dipende da:

- proprietà paramagnetiche del complesso e sensibilità dello spettrometro
- tempo e budget a disposizione (misure criogeniche o presso altro laboratorio)
- concentrazione di proteine da 50–100  $\mu\text{M}$  (per es. la forma ferrosa delle emo-proteine) a mM

Il volume di campione: Banda X: 100  $\mu\text{l}$ ; Banda Q: 10  $\mu\text{l}$ .

Preparazione del campione sofisticata (a volte)



# L'esperimento EPR

