

# 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

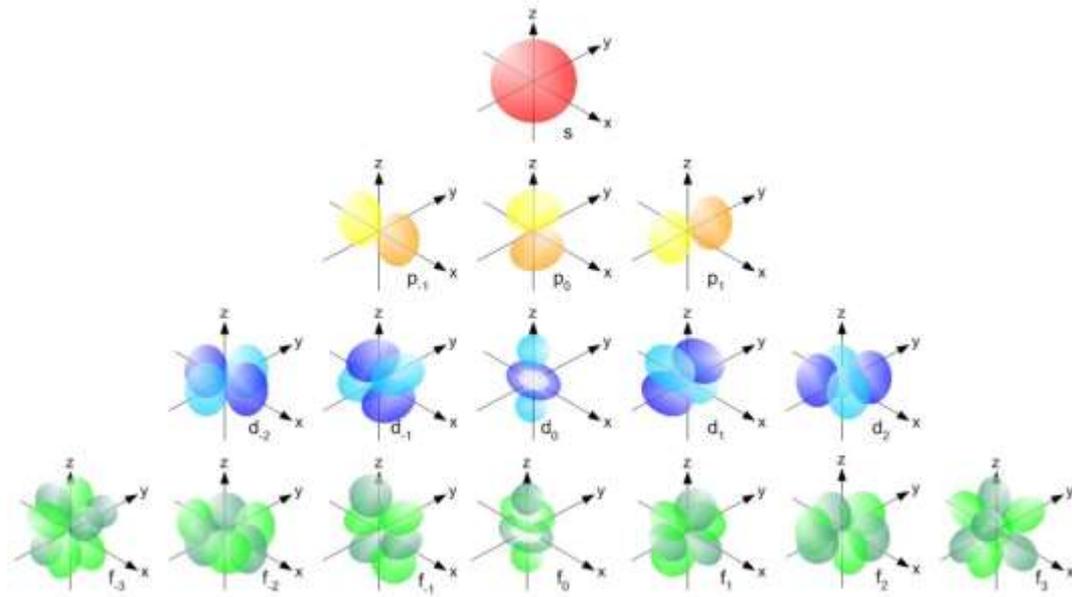
---

Electron Paramagnetic Resonance

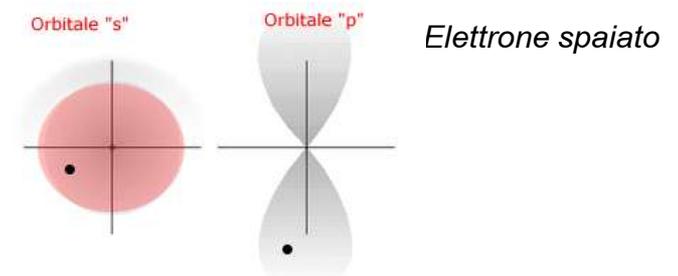
Nuclear Magnetic Resonance

# 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,...

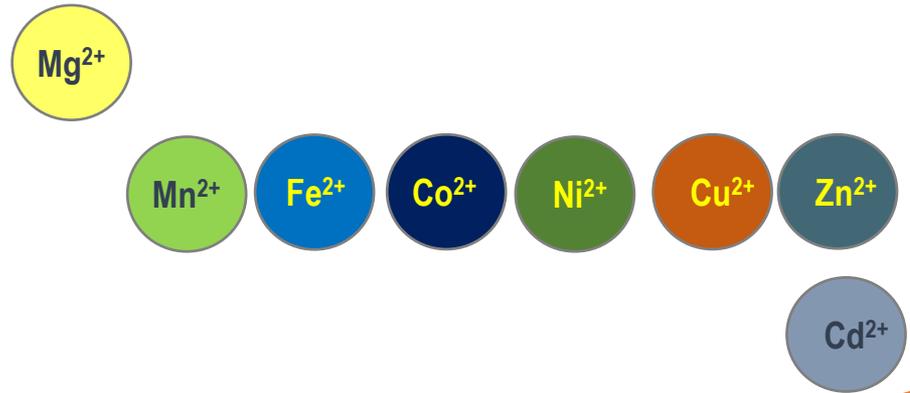
Matrici biologiche:

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

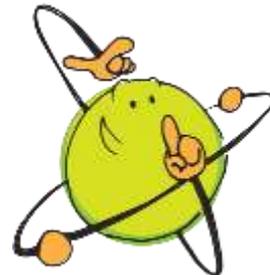
Parte 2

# EPR e metalli- quali?

Gli elementi di transizione hanno orbitali *d* incompleti.



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



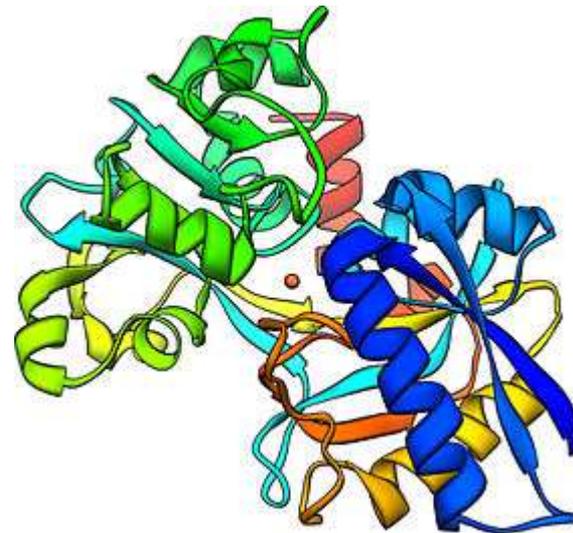
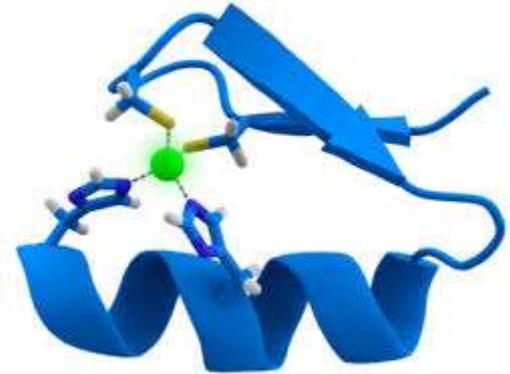
# EPR e metalli – cosa si misura?

Presenza del metallo

Concentrazione

Stato redox

Simmetria locale



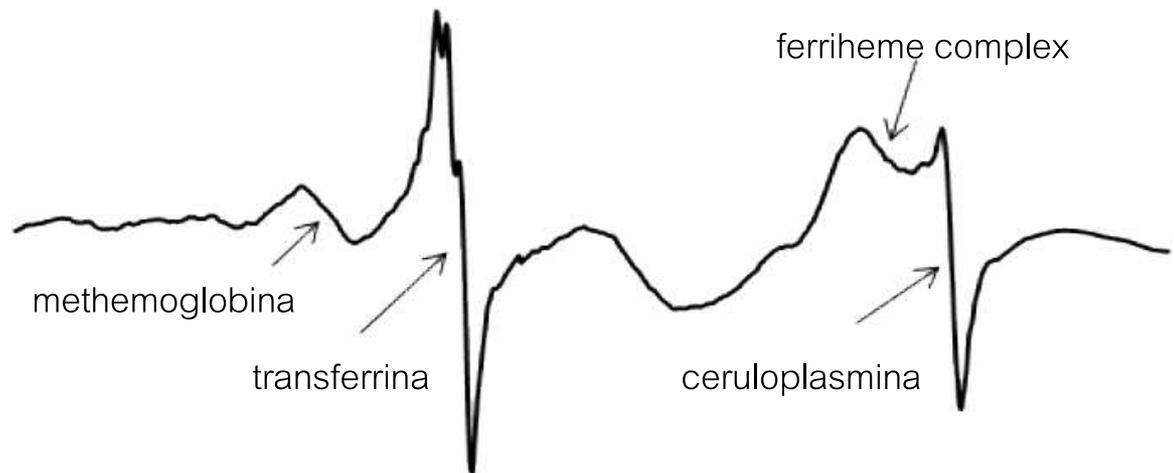
# I metalli in EPR: la caratterizzazione delle metalloproteine

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  $\text{Fe}^{3+}$

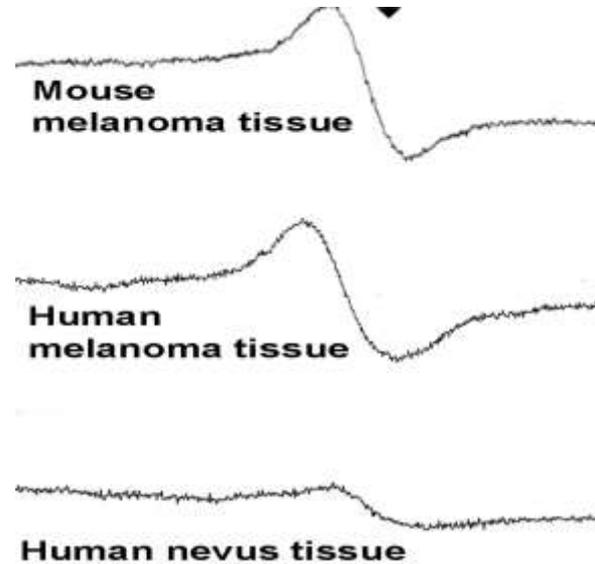
Metal Ion	Spin State
$\text{Fe}^{2+}$	$S = 0$ (ls) or $S = 2$ (hs)
$\text{Fe}^{3+}$	$S = 5/2$ (hs)
$\text{Ni}^{1+}$	$S = 1/2$
$\text{Ni}^{2+}$	$S = 0$ or $S = 1$
$\text{Ni}^{3+}$	$S = 1/2$
$\text{Cu}^{1+}$	$S = 0$
$\text{Cu}^{2+}$	$S = 1/2$



# Radicali stabili in matrici solide: radicale semichinone

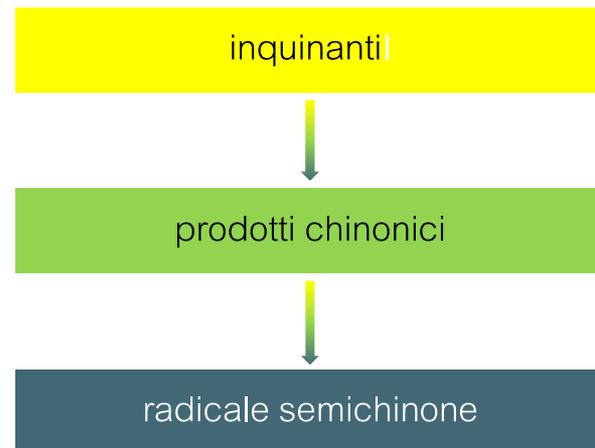
1

melanina



2

indicatore di inquinanti nelle matrici ambientali

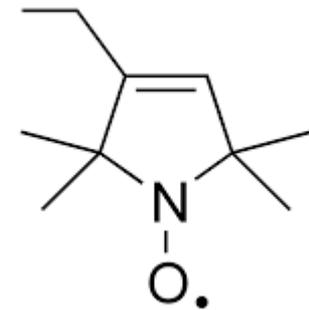


## E se la molecola (proteina) non contiene centri paramagnetici?

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

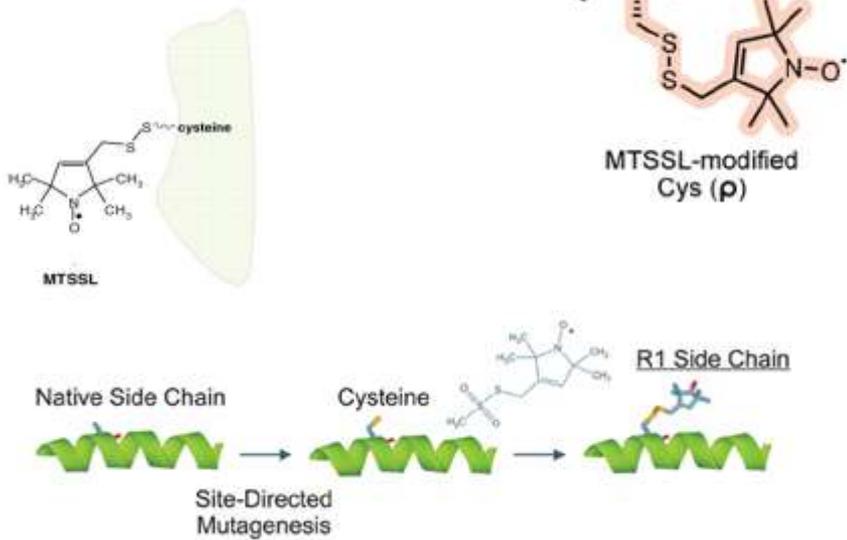
Uno "spin label" è un radicale stabile (spesso radicale nitrossido protetto) di struttura e/o reattività tali da consentirne l'introduzione in una particolare zona dei sistemi biologici e della macromolecola.

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

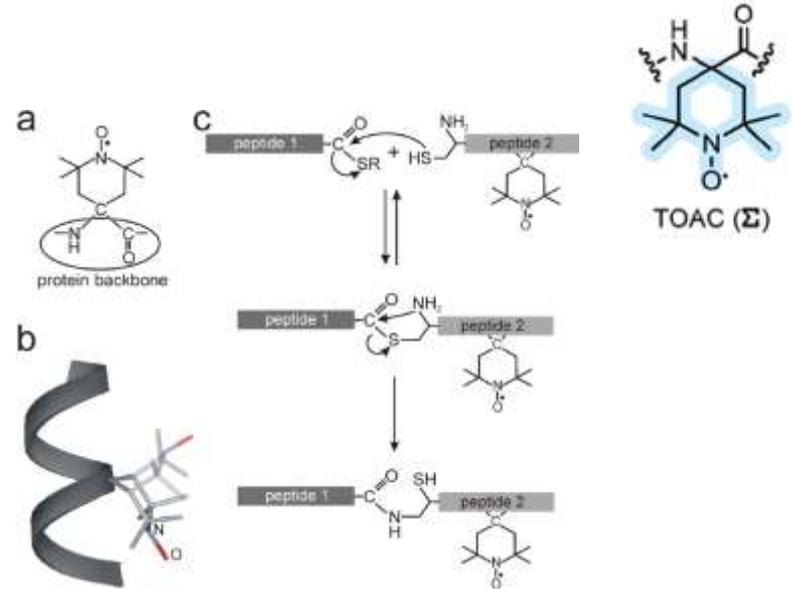


# Come introdurre uno spin label in una proteina

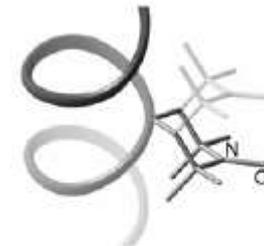
## Spin labelling di cisteine



## Spin labeling sul legame peptidico

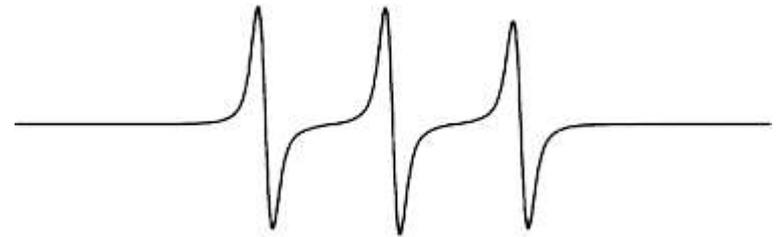


Uno spin label è introdotto nella proteina mediante mutagenesi sito specifico  
 Un aminoacido marcato con spin label è incorporato a peptidi attraverso sintesi in fase solida.

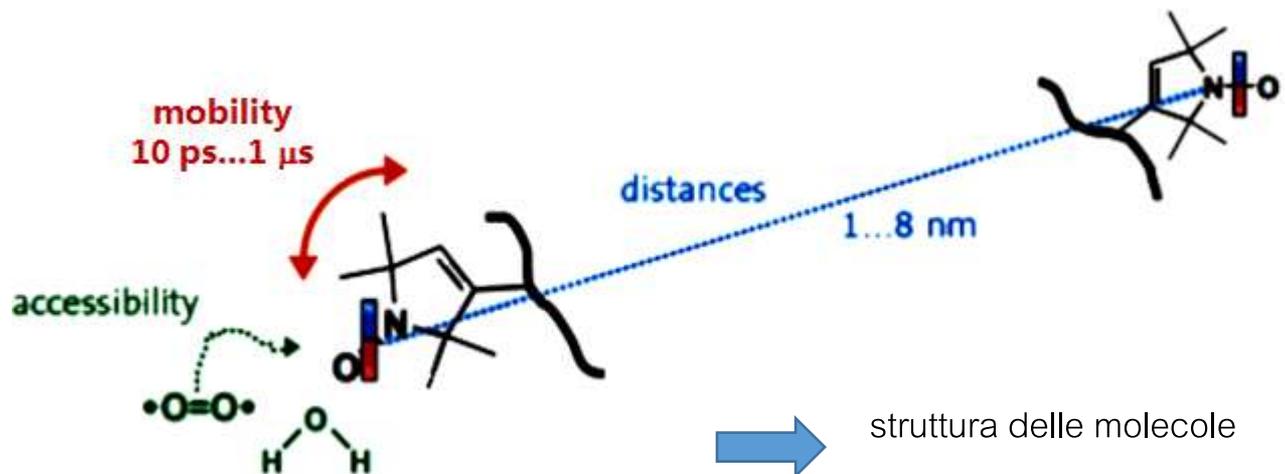


# Marcatura con spin label – quali informazioni?

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



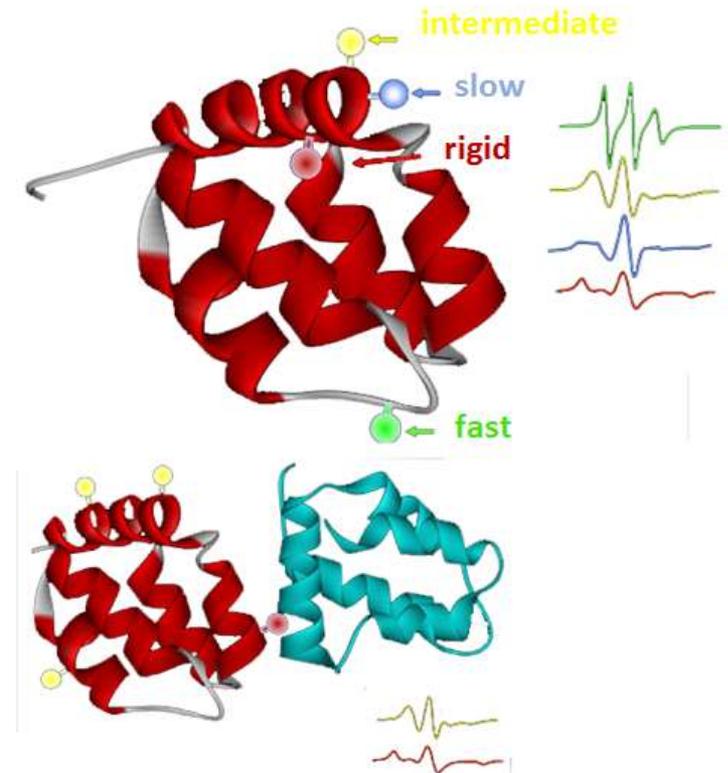
L'interazione con le molecole adiacenti ne modifica il microambiente e i movimenti, quindi la forma dello spettro.



## 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.

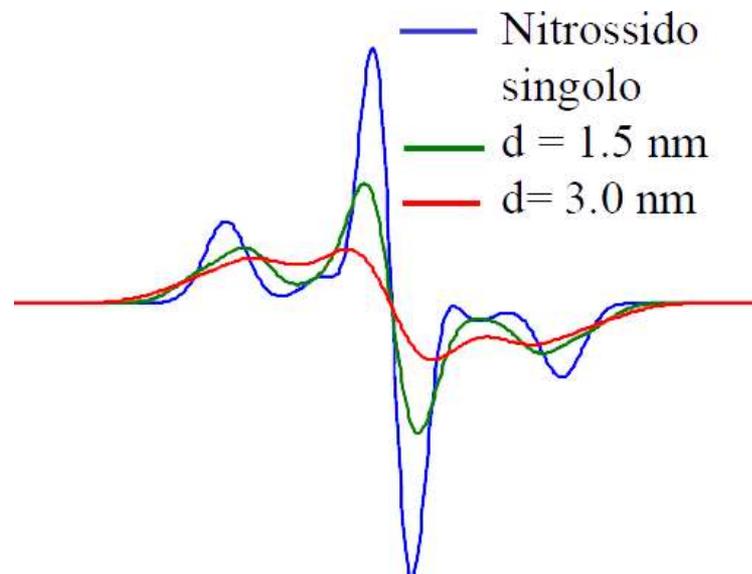
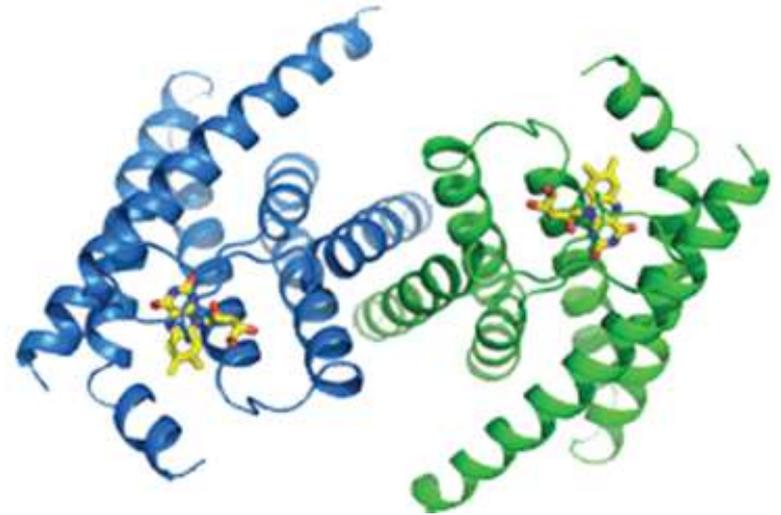


ideal liquid state: rotational averaging in less than 10 ps

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.



# Informazioni ottenibili dalla proprietà di **accessibilità**

E' possibile determinare la posizione dello spin label

rispetto alla proteina, all'acqua o alla membrana

utilizzando probe paramagnetici che si ripartiscono

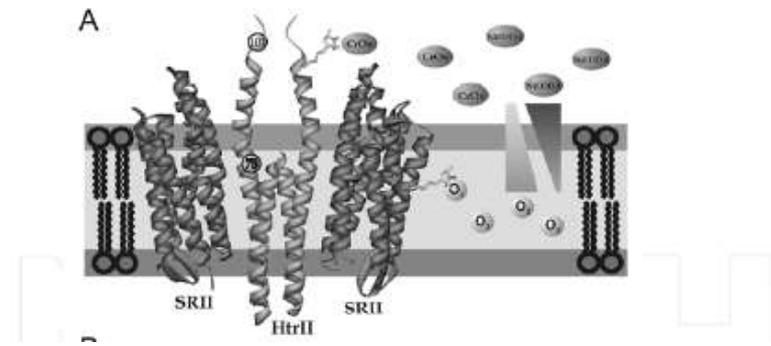
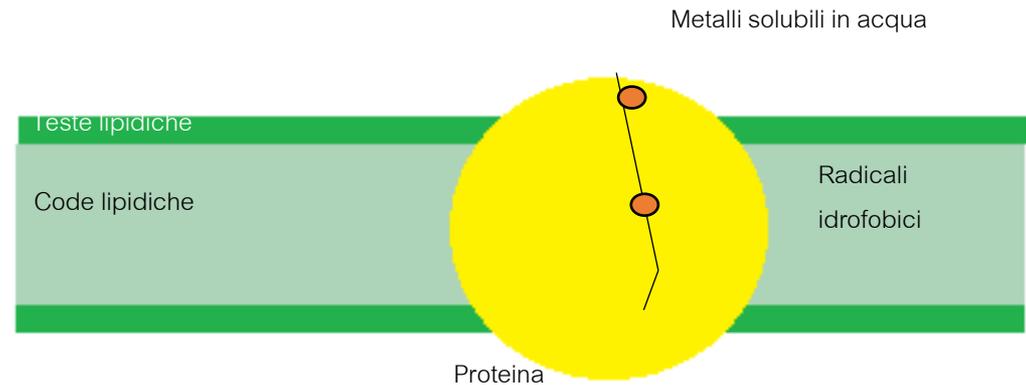
selettivamente in diversi ambienti del sistema sotto

osservazione.

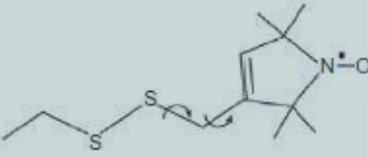
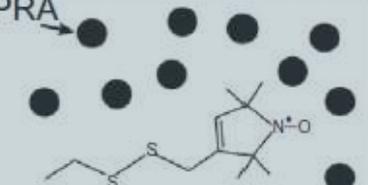
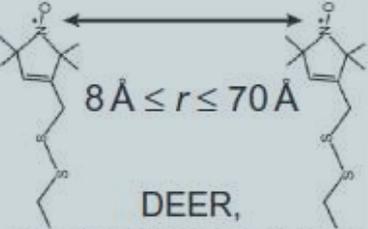
Questi probe abbreviano il tempo di rilassamento

magnetico dello spin label cambiandone quindi la

risposta EPR.



# The EPR tool kit

Parameters		Observables		Interpretation		Caveats	
<p>Mobility</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>Solvent accessibility</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>Distance</p> <p>Dipole-dipole coupling</p>		 <p><math>8 \text{ \AA} \leq r \leq 70 \text{ \AA}</math></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>	

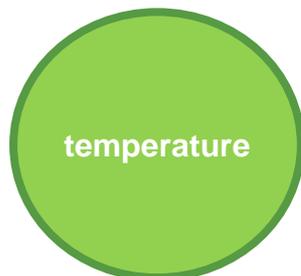
# L'EPR-ista ha a disposizione diversi metodi sperimentali...



X-band – 9 GHz

Q-band – 34 GHz

W band - 94 GHz

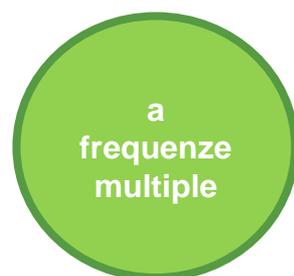


T ambiente

400 K

70 K

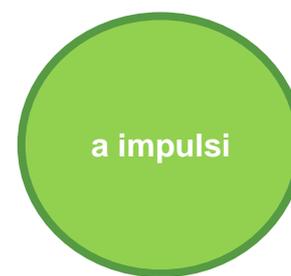
2 K



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

