

Le interazioni non covalenti

Interazioni fra atomi che non sono legati da *legami covalenti*.

Le interazioni non covalenti sono molto meno intense rispetto alle interazioni covalenti (poche kcal/mol rispetto ad esempio a 83 kcal/mol per un legame C-C).

Questi '*legami deboli*' possono formarsi sia fra parti diverse della stessa macromolecola, sia fra parti di macromolecole diverse.

Essi giocano un ruolo fondamentale in molti processi biologici, fra cui la fedele replicazione del DNA, il folding delle proteine, il riconoscimento specifico di substrati da parte di enzimi, il riconoscimento di molecole segnale.

Le interazioni non covalenti si possono classificare in:

- interazioni elettrostatiche
- interazioni di van der Waals
- legami idrogeno
- effetto idrofobico

1

Le interazioni non covalenti

Energie di legame associate alle principali interazioni non covalenti:

Tipo di interazione non covalente	Energia di legame (kcal/mole)
Interazioni elettrostatiche	0.3-4
Legame idrogeno	0.5-4
Interazioni di van der Waals	0.03-0.1

Nel considerare i vari contributi energetici che stabilizzano una proteina non si può prescindere dal fatto che la proteina è immersa in un solvente, che è costituito principalmente da *acqua*. Le proprietà fisiche del solvente sono estremamente importanti per la stabilità della proteina.

2

Le interazioni non covalenti

Le interazioni elettrostatiche, i legami idrogeno e le interazioni di van der Waals tra due molecole in un ambiente acquoso non sono particolarmente favorevoli dal punto di vista energetico, perché sono in competizione con interazioni di analoga intensità fra le molecole e l'**acqua** che le circonda.

Infatti, l'acqua è una molecola polare, con una grande capacità di formare *legami idrogeno*.

Inoltre l'acqua indebolisce fortemente le interazioni elettrostatiche e i legami idrogeno fra molecole polari:

- l'acqua diminuisce l'intensità delle interazioni elettrostatiche di un fattore di circa 80 (**costante dielettrica**) rispetto alle stesse interazioni nel vuoto;
- l'acqua può competere con gruppi della proteina nella formazione di legami idrogeno.

3

Interazioni elettrostatiche

Due gruppi elettrostaticamente carichi si attraggono o si respingono con una forza:

$$\vec{F} = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_1 q_2}{r^2} \hat{r} \quad \text{forza di Coulomb}$$

dove q_1 e q_2 sono le cariche (Coulomb) dei due gruppi
 r è la distanza tra q_1 e q_2 , ϵ è la costante dielettrica del mezzo in cui si trovano le cariche.

L'interazione è maggiore nel vuoto, minore in un mezzo come l'acqua ($\epsilon = 80$). Non è facile misurare ϵ **per una proteina**: in genere viene assegnato un valore di 3-5.

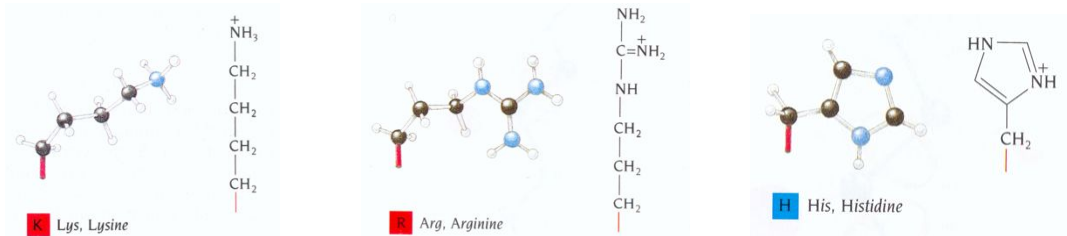
4

Interazioni elettrostatiche di ordine superiore

- carica-dipolo (l'energia va come $1/R^2$)
- **dipolo-dipolo** ($1/R^3$)
- carica-dipolo indotto ($1/R^4$)
- **dipolo-dipolo indotto** ($1/R^6$) = van der Waals

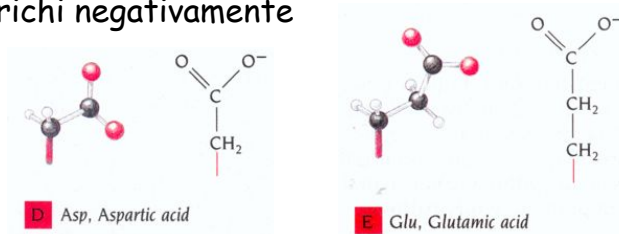
Lisina, Arginina e Istidina

Sono tre aminoacidi basici, carichi positivamente a pH fisiologico.



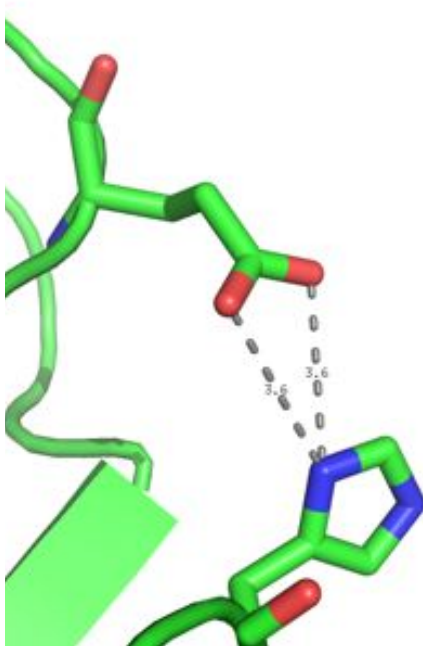
Acido aspartico e Acido glutammico

Sono due aminoacidi acidi, carichi negativamente sopra pH = 4



5

Interazioni elettrostatiche



Esempio di **ponte salino** (o **legame ionico**):

Interazione elettrostatica tra l'acido glutammico che porta una carica di -1, e la istidina che ha carica +1.

I ponti salini sono poco numerosi nelle proteine e si concentrano prevalentemente sulla superficie proteica.

Ponti salini in zone meno accessibili delle proteine si realizzano se gli aminoacidi carichi sono coinvolti nel meccanismo catalitico di un enzima (per es. la triade catalitica Asp-His-Ser delle proteasi a serina).

6

Interazioni di van der Waals

Sono **interazioni** aspecifiche fra molecole **non cariche**, che giocano un ruolo quando gli atomi distano tra loro 3-4 Å.

Esprimono il fatto che esiste una mutua attrazione fra molecole od atomi anche uguali fra loro e con distribuzione di carica simmetrica. Tale simmetria è però presente solo da un punto di vista statistico e l'origine di queste forze attrattive è dovuta all'effetto di **fluttuazioni temporane di distribuzione elettronica** che generano **dipoli transienti** nell'atomo o nella molecola considerata.



A loro volta tali dipoli transienti inducono dei dipoli transienti (detti dipoli indotti) nelle molecole più vicine e quindi **forze attrattive** di natura elettrostatica.

7

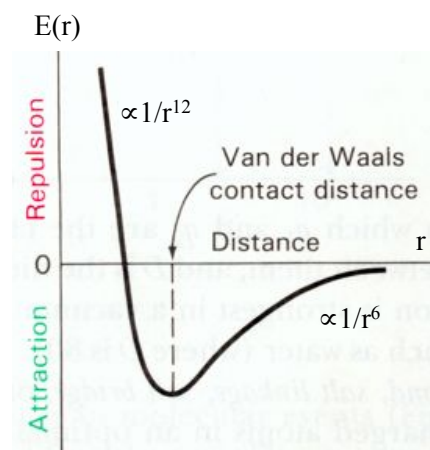
Interazioni di van der Waals

Le interazioni di van der Waals possono essere rappresentate da un'energia potenziale $E(r)$, funzione della distanza r , che include sia una componente attrattiva, sia una componente repulsiva a corto raggio.

Questa energia è rappresentata dal **potenziale di Lennard-Jones**:

$$E(r) = \frac{B}{r^{12}} - \frac{A}{r^6}$$

Termine repulsivo Termine attrattivo



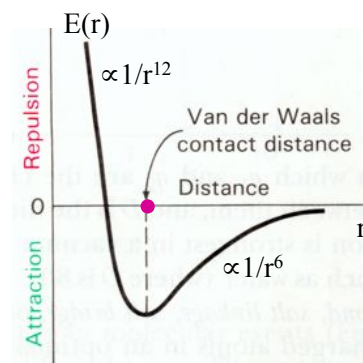
A e B sono delle costanti che possono essere determinate empiricamente

8

Interazioni di van der Waals

Per una coppia di atomi la distanza in corrispondenza della quale si ha un minimo del potenziale, corrisponde alla somma dei rispettivi raggi di van der Waals.

Il '**raggio di van der Waals**' si estrapola dalla minima distanza di contatto fra due atomi adiacenti, non legati covalentemente.



La forza attrattiva fra due atomi aumenta quando essi si avvicinano, fino a quando raggiungono la distanza di van der Waals di contatto.

A distanze inferiori a quella di contatto diventano predominanti forti forze repulsive, perché le nuvole elettroniche più esterne tendono a sovrapporsi.

Table 1-2
Van der Waals contact radii
of atoms (Å)

Atom	Radius
H	1.17
C	1.75
N	1.55
O	1.40
S	1.80

9

Legami idrogeno

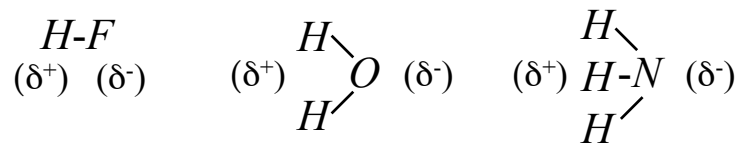
Il legame idrogeno può essere formato sia tra molecole non cariche che cariche.

In un legame idrogeno **un atomo di idrogeno viene 'condiviso' da due atomi**. L'atomo di idrogeno è legato covalentemente a uno dei due atomi, chiamato **donatore (D)** di idrogeno, ed interagisce con l'altro atomo, chiamato **accettore (A)** di idrogeno.

Una molecola non carica può essere polarizzata, cioè i suoi orbitali elettronici possono essere distribuiti in modo tale che una parte della molecola ha meno elettroni (quindi porta una carica positiva) mentre un'altra parte ha un eccesso di elettroni (quindi porta una carica negativa).

In una molecola nella quale uno o più atomi di H sono legati covalentemente ad un elemento più **elettronegativo (O, S, N)**, si genera un dipolo in cui l'atomo/gli atomi di H rappresentano la parte positiva

Legami idrogeno



Se l'atomo a cui è legato l'idrogeno è **elettronegativo** (*S, O, N*) l'atomo *H* si carica positivamente e può legare un altro atomo carico negativamente.

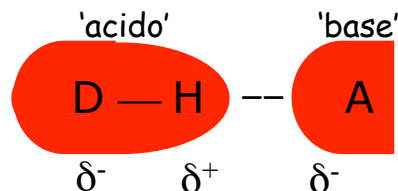
Le **piccole dimensioni dell'atomo di H** e la presenza in esso di un solo elettrone (assenza di elettroni di schermo) rendono particolarmente intenso il campo elettrostatico di H che può dunque legarsi con un altro atomo che disponga di un **doppetto elettronico libero** (*lone pair*, orbitale atomico completo con 2 elettroni).

11

Legami idrogeno

Se sia *D* che *A* sono elettronegativi, allora la nuvola elettronica relativa a *D-H* è polarizzata verso *D*, cioè si ha un eccesso δ^- di carica negativa su *D*.

A ha una parziale carica negativa δ^- che attrae l'atomo di idrogeno. In questo senso, il legame idrogeno si può pensare come un intermedio nel trasferimento di un protone da un acido ad una base.



- interazione elettrostatica di δ^- e δ^+
- deformazione degli orbitali molecolari
- depauperamento di elettroni nell'orbitale di *H* \Rightarrow avvicinamento fra *H* ed *A*

12

Legami idrogeno

Nelle proteine il donatore in un legame idrogeno è un atomo di **ossigeno o azoto** (o zolfo nella Cys) che ha un atomo di idrogeno legato covalentemente. L'accettore può essere sia un atomo di ossigeno che di azoto.

- la lunghezza di un legame idrogeno è intermedia tra quella di un legame covalente e di un'interazione di van der Waals.

Di solito la distanza tra atomo *H* e accettore *A* è 10-25% inferiore della somma dei corrispondenti raggi di van der Waals.

- i legami idrogeno sono altamente **direzionali**. I legami idrogeno più intensi si hanno quando *A* e *D* sono collineari

Dist. tra il primo e l'ultimo atomo

Table 1-1

Typical hydrogen-bond lengths

Bond	Length (Å)
O—H···O	2.70
O—H···O ⁻	2.63
O—H···N	2.88
N—H···O	3.04
N ⁺ —H···O	2.93
N—H···N	3.10

13

Legami idrogeno

In generale, le energie in gioco nel legame idrogeno sono dell'ordine di qualche kcal/mol.

In realtà, se consideriamo il legame idrogeno che si può formare tra due gruppi in una proteina, l'energia associata è minore, circa 0.5-1 kcal/mole.

Si deve pure tenere conto del fatto che una proteina non si trova nel vuoto ma in una soluzione acquosa: affinché si formi un legame idrogeno fra due gruppi appartenenti alla proteina, si devono prima rompere i legami idrogeno che ciascun gruppo fa con una molecola d'acqua.

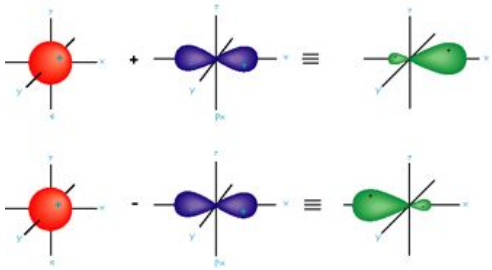
Tenendo conto dell'energia che si spende per rompere tali legami idrogeno, si arriva ai valori di 0.5-1 kcal/mole.

14

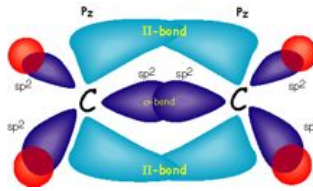
Ibridizzazione

Ibridizzazione = **combinazione lineare di orbitali atomici**

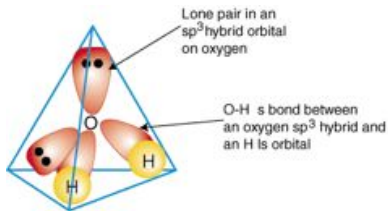
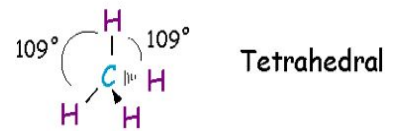
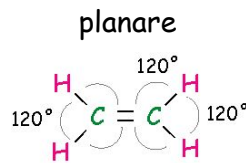
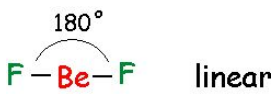
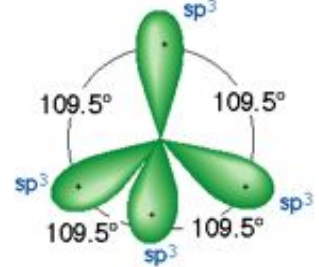
$s+p =$ orbitale sp
2 orb. molecolari



$s+2$ orbitali $p = sp^2$
3 orb. molecolari



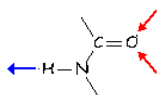
$s+3$ orbitali $p = sp^3$
4 orb. molecolari



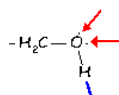
H2O

15

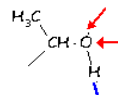
Legami idrogeno



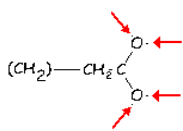
peptide



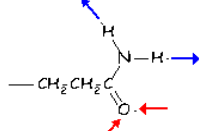
serine



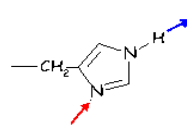
threonine



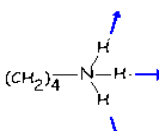
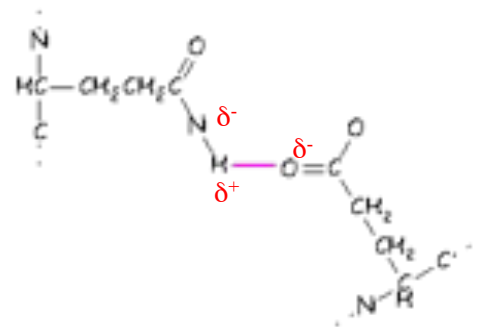
glutamic/aspartic acid



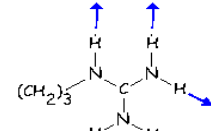
glutamine/asparagine



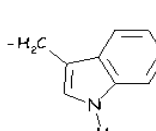
histidine



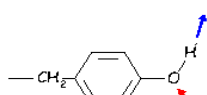
lysine



arginine



tryptophan

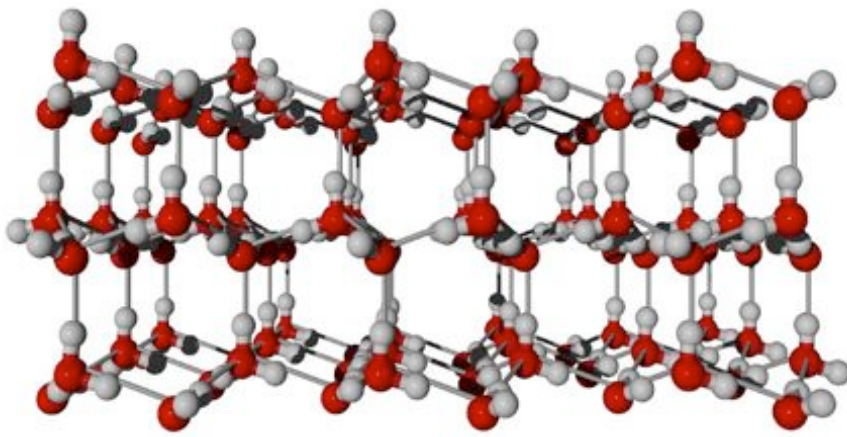


tyrosine

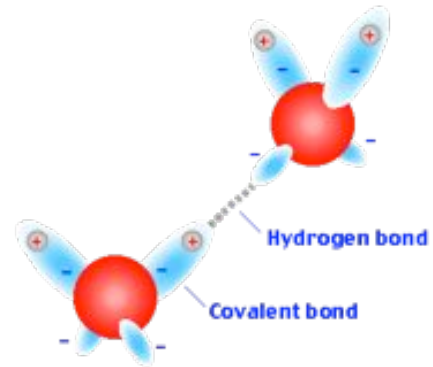
hydrogen bond donor \rightarrow
hydrogen bond acceptor \leftarrow

Una variante del legame idrogeno particolarmente forte si ha in presenza di gruppi carichi.

16



ghiaccio

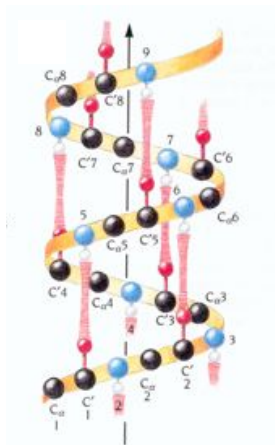


17

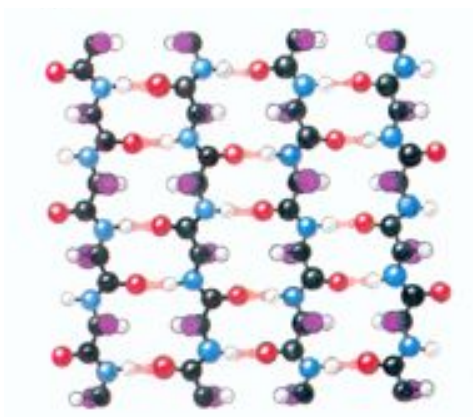
Legami idrogeno

I legami idrogeno sono fondamentali nelle strutture proteiche. La capacità dell'ossigeno carbonilico della catena principale di formare legami idrogeno con i gruppi amminici della catena principale promuove la formazione delle **strutture secondarie** come α -eliche e foglietti β .

α -elica



foglietto β



18

Dinamica molecolare

cos'è ?

metodologia per descrivere alcune proprietà dinamiche di un sistema

come funziona ?

legge che mette in relazione forze e proprietà cinematiche nel sistema: MQ, MC

$$\mathbf{F}_i = m_i \mathbf{a}_i$$

applicazione allo studio di una proteina: si parte dalla struttura della proteina:

$$\{\mathbf{r}_i\}_{i=1}^N$$

si sceglie un force field



modello delle interazioni tra gli atomi della proteina

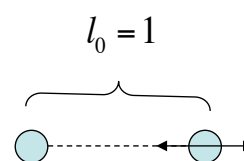
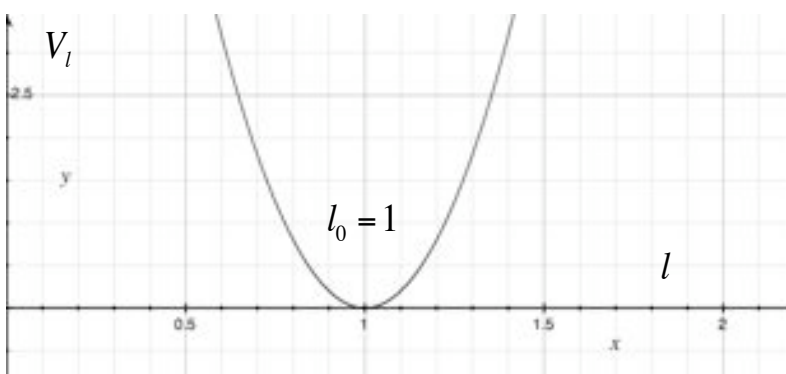
Force field

$$V(\mathbf{r}) = V_{legame} + V_{non-legame} \longrightarrow \mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} = -\vec{\nabla}_i V$$

$$V_{legame} = V_l + V_\vartheta + V_\varphi + \dots = \sum_{i=1}^{N_{legami}} \frac{1}{2} b_i (l_i - l_{i0})^2 + \sum_{i=1}^{N_{legami}} \frac{1}{2} a_i (\vartheta_i - \vartheta_{i0})^2 + \sum_{i=1}^{N_{legami}} d_i (1 + \cos(n\varphi_i - \varphi_{i0}))$$

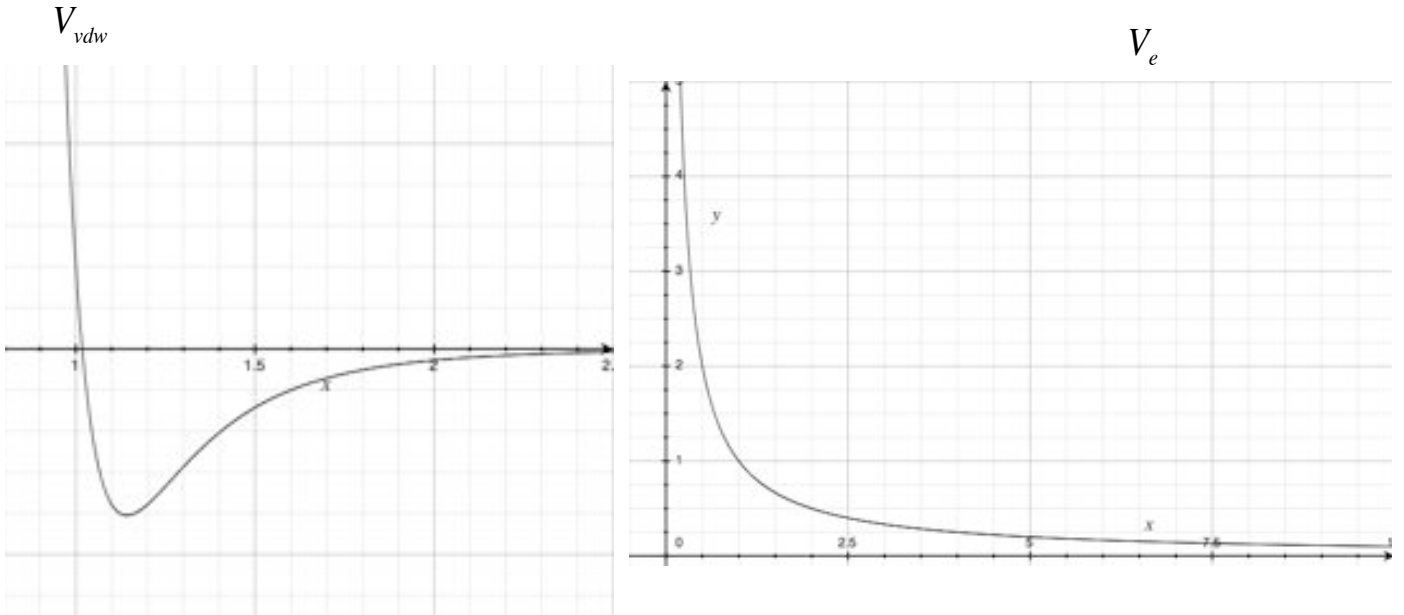
↓
↓
↓

dist. di legame
angoli di legame
rot. attorno ai legami



Interazioni di non legame

$$V_{non-legame} = V_{vdw} + V_e = \sum_{i \neq j} \left[\left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i \neq j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}}$$



Evoluzione del sistema nel tempo

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \frac{\partial \mathbf{r}_i}{\partial t} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} \Delta t^2 + o(\Delta t^3)$$

Serie di Taylor

$$\mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \frac{\partial \mathbf{r}_i}{\partial t} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} \Delta t^2 - o(\Delta t^3)$$



algoritmo di Verlet

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} \Delta t^2 + o(\Delta t^4)$$

$$\begin{cases} \mathbf{r}_i(t=0) \\ \mathbf{v}_i(t=0) \end{cases} \longrightarrow \begin{cases} \mathbf{r}_i(\Delta t) \\ \mathbf{v}_i(\Delta t) \end{cases} \dashrightarrow \begin{cases} \mathbf{r}_i(n\Delta t) \\ \mathbf{v}_i(n\Delta t) \end{cases}$$

$$\Delta t = 10^{-15} \text{ sec} = 1 \text{ fs}$$

Stima degli errori nella traiettoria

$$\frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}kT \longrightarrow v = \sqrt{\frac{kT}{m}} \approx 10 \text{ \AA/ps}$$

$$v = \frac{\Delta r}{\Delta t} \rightarrow \Delta r = v\Delta t = 10 \times 10^{-3} = 10^{-2} \text{ \AA}$$

$$\text{errore di algoritmo su } r \approx v \times \Delta t^4 \approx 10^{-11} \text{ \AA}$$

errore su r = er. di alg. + er. di arrotondamento + er. di derivata + er. di cut off



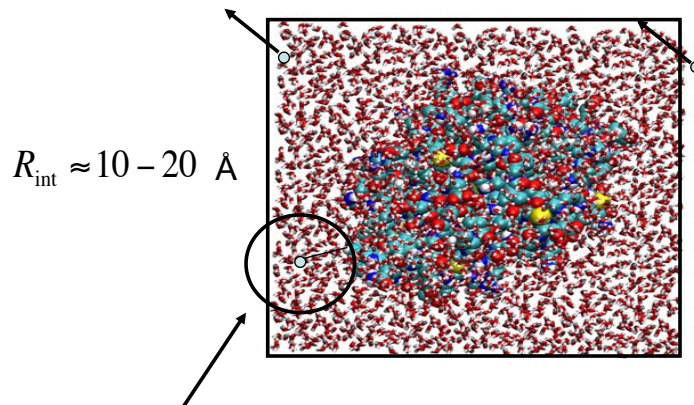
La traiettoria percorsa non è quella "vera" ma è formata da tante traiettorie possibili dato un force field (E) e delle condizioni al contorno (T,P).

Schema operativo

$$\{\mathbf{r}_i(t=0)\}_{i=1}^N \longrightarrow \text{Parametri del Force field (l, q, \dots)}$$



Definizione di un box attorno alla proteina (>10 Å): aggiunta di acqua, condizioni al contorno periodiche, neutralità della carica elettrica nel box



definizione di un range per le interazioni (R_{int}) di non legame: VdW e elettrostatiche

Minimizzazione

Modificazione delle coordinate in accordo al force field: ricerca di una conformazione che minimizza l'energia definita dal f.f.

Termalizzazione

Aumento graduale della temperatura fino alla temperatura di riferimento

Equilibratura

Raggiungimento di uno stato di energia minima/cost. alla temperatura desiderata

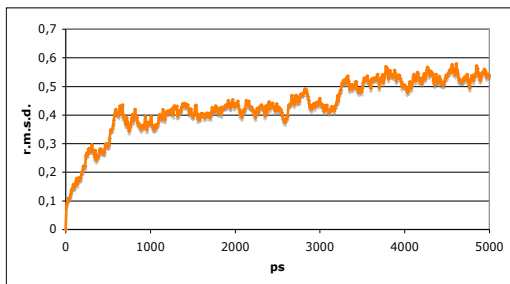
Evoluzione, NPT

Controllo

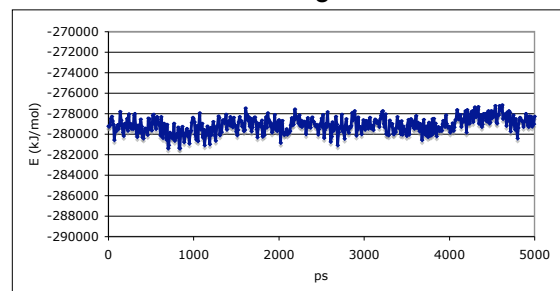
Analisi

Controllo

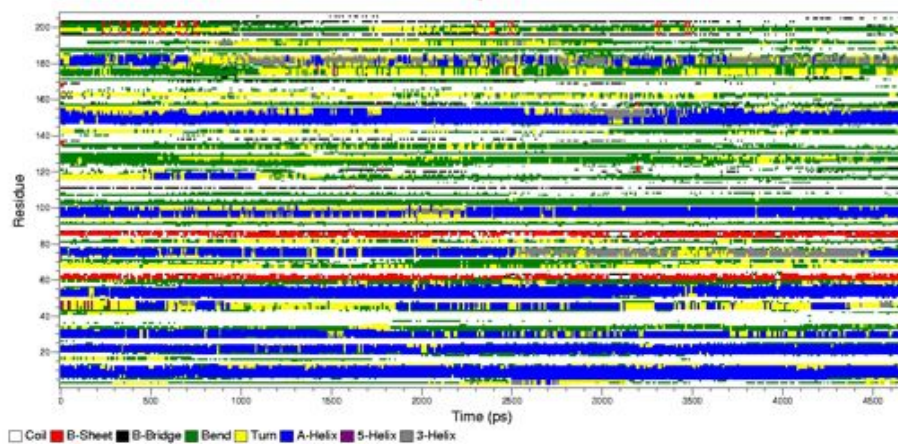
r.m.s.d



energia



Secondary structure



Effetto idrofobico

Le interazioni fra **acqua e molecole non polari** non sono favorevoli: proprio come l'olio disperso nell'acqua tende a raccogliersi in un'unica goccia, anche i gruppi non polari nelle proteine tendono ad aggregarsi, per ridurre la superficie apolare a contatto con l'acqua.

Questa preferenza di specie idrofobiche per ambienti non polari viene detta **effetto idrofobico**: esso è uno delle principali cause del folding delle proteine.

L'effetto idrofobico fa sì che sostanze non polari minimizzino il loro contatto con l'acqua, e molecole **anfipatiche** (come per esempio i detergenti) formino micelle in soluzioni acquose.

Il meccanismo fisico per cui entità non polari sono escluse da soluzioni acquose dipende dall'**entropia**.

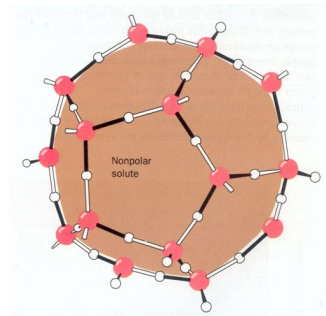
27

Effetto idrofobico

Le molecole d'acqua allo stato liquido formano dinamicamente (in funzione della temperatura) un alto numero di legami idrogeno.

L'introduzione di una molecola non polare nell'acqua crea una sorta di **cavità nell'acqua**, che temporaneamente rompe alcuni legami idrogeno, (un gruppo non polare infatti non può formare legami idrogeno con le molecole d'acqua)

Le molecole d'acqua spostate si riorientano per formare il maggior numero di nuovi legami idrogeno, creando una **struttura ordinata**, una specie di gabbia, detta **clatrato**, intorno alla molecola non polare.



28

Effetto idrofobico & folding

ΔH = variazione di entalpia **fra stato finale ed iniziale** (interazioni di van der Waals, elettrostatiche, legami idrogeno). ΔH risulta $\ll 0$.

T = temperatura assoluta (K)

ΔS = variazione di entropia (disordine del sistema) **fra stato finale ed iniziale**.

Poiché $S_U \gg S_F \rightarrow \Delta S \ll 0$

Nel $\Delta G_{\text{FOLDING}}$ il contributo $-T\Delta S$ è positivo e sia ΔH che $-T\Delta S$ assumono valori grandi (migliaia di kcal/mol). Al contrario $\Delta G_{\text{FOLDING}}$ ha valori piccoli:

$$\Delta G_{\text{FOLDING}} = -10, -15 \text{ kcal/mol}$$

Quindi il processo di folding avviene grazie ad un minimo prevalere di ΔH su $T\Delta S$; è sufficiente un piccolo aumento di T per causare unfolding (e denaturazione) della proteina.

Effetto idrofobico & folding

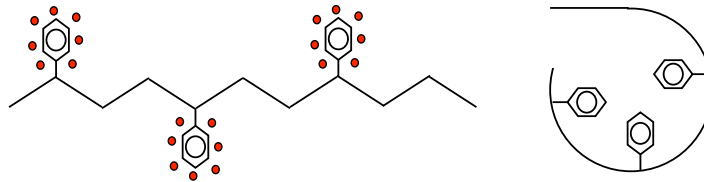
Responsabile della variazione di entropia è anche l'effetto idrofobico.

$$\Delta S_{\text{FOLDING}} = S_{\text{F}} - S_{\text{U}} = \Delta S_{\text{CATENA}} + \Delta S_{\text{SOLVENTE}}$$

sempre < 0

Nel caso di un soluto apolare in un mezzo acquoso, le molecole d'acqua che formano il clatrato attorno alla molecola apolare sono caratterizzate da una variazione di entropia negativa. Spontaneamente le molecole apolari si riuniscono in modo da minimizzare la variazione negativa di $\Delta S_{\text{SOLVENTE}}$.

Nel caso del folding proteico di proteine globulari solubili, si forma una zona interna, "core" idrofobico di molecole d'acqua che, nella forma proteica unfolded erano coinvolte nella formazione dei clatrati con molecole d'acqua ordinate attorno alle catene laterali degli aminoacidi idrofobici.



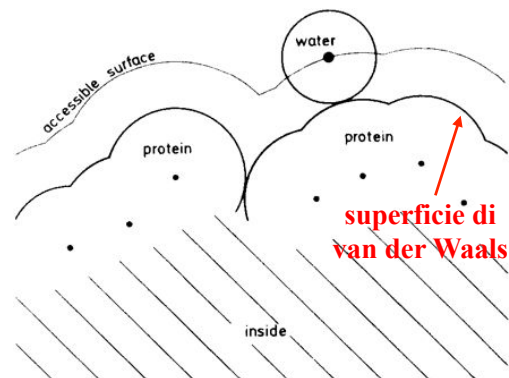
33

Effetto idrofobico

Superficie accessibile al solvente di una proteina

La superficie proteica è definita dall'insieme dei punti degli atomi esterni, ciascuno descritto come una sfera rigida avente come raggio il raggio di van der Waals (superficie di van der Waals). Le molecole d'acqua sono considerate sfere con raggio di van der Waals pari a 1.4 Å.

La **superficie accessibile al solvente (ASA)** è definita come l'area descritta dal centro di una molecola d'acqua che rotola sopra la superficie di van der Waals della proteina



34

Effetto idrofobico

ΔG di trasferimento delle catene laterali degli aminoacidi

E' stato misurato il ΔG di trasferimento di ciascun aminoacido dall'acqua ad un solvente organico (per esempio etanolo o diossano).

Per avere la misura del ΔG di trasferimento della sola catena laterale, bisogna non considerare il contributo della catena principale (che falserebbe la misura, avendo sempre una carica negativa del gruppo carbossilico $-\text{COO}^-$ e una positiva del gruppo amminico $-\text{NH}_3^+$).

Ciò equivale a sottrarre dal valore di ΔG di trasferimento di ciascun aminoacido il ΔG di trasferimento della Gly.

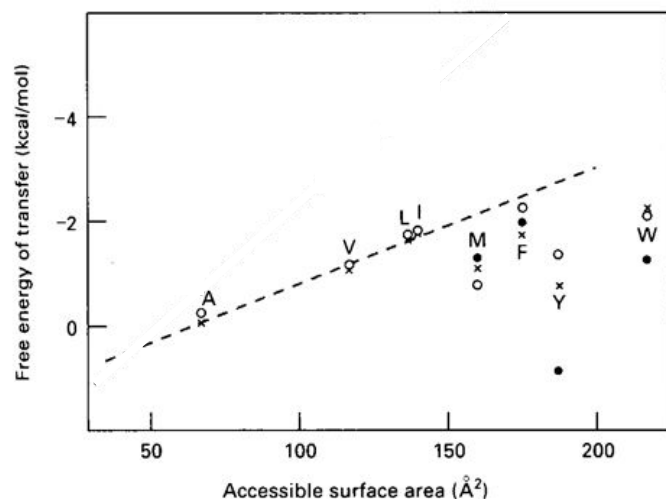
$$\Delta G_{\text{cat.lat.}} = \Delta G_{\text{aa}} - \Delta G_{\text{Gly}}$$

35

Effetto idrofobico

Esiste una relazione lineare tra ΔG di trasferimento (dall'acqua ad un solvente apolare) e superficie accessibile al solvente per catene laterali completamente non polari.

Nel caso di aminoacidi moderatamente polari (Thr, Ser, Met, Tyr e Trp) una relazione analoga è relativamente valida, applicando una diminuzione di circa 1.5 kcal/mole nel ΔG di trasferimento.



36

Effetto idrofobico

Si può quindi dire che il ΔG di trasferimento è proporzionale alla superficie non polare accessibile al solvente.

La costante di proporzionalità (coefficiente angolare della retta) vale $0.025 \text{ kcal/mole } \text{\AA}^2$.

Questo significa che si guadagnano 0.025 kcal/mole (o equivalentemente 25 cal/mole) per ogni \AA^2 di superficie non polare che si seppellisce nel cuore di una proteina.