

Saetta Laura

Studio di Aggregazione di Proteine Globulari

Study of Aggregation of Globular Proteins

Questo lavoro di tesi affronta lo studio dell'aggregazione delle proteine globulari utilizzando il Lisozima come prototipo per la ricerca scientifica. Si è deciso di strutturare l'esperimento in tre parti. Nella prima si è caratterizzata la proteina in tutte le condizioni in cui la si è sottoposta alle misure: allo stato nativo, marcata con 5-Tamra e marcata con Fluoresceina. Le prove di denaturazione termica e di dicroismo circolare hanno dimostrato che le specie fluorescenti non modificano la struttura del Lisozima. Nella seconda parte sono stati raccolti i risultati del DLS sulla proteina nativa e dell'FCS sul Lisozima marcato con 5-Tamra. Entrambe le spettroscopie studiano le proprietà dinamiche delle particelle che si muovono in soluzione di un moto browniano e vi associano un coefficiente di diffusione. Questo non è però esattamente lo stesso nei due casi: dal DLS si ricava il 'mutual diffusion coefficient' che indica quanto velocemente una molecola, non una specifica ma una qualsiasi del pool, arriva in una data posizione mentre l'FCS fornisce il 'self diffusion coefficient' che è lo spostamento quadratico medio di una singola particella nel tempo.

Nella terza parte la presenza o la mancanza degli aggregati proteici in soluzione viene determinata dal fenomeno di trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza, un processo che si verifica quando un fluoroforo (donatore) emette in una regione dello spettro in cui un'altra specie (l'accettore) è in grado di assorbire. Dato che l'interazione è di tipo dipolo-dipolo, donatore ed accettore devono essere sufficientemente vicini. Nel caso studiato il donatore era il Lisozima marcato con Fluoresceina e l'accettore il Lisozima marcato con Tamra.

Si è determinato che il Lisozima forma spontaneamente dei cluster e che il processo di aggregazione dipende dalla concentrazione della proteina presente in soluzione. Risulta inoltre che nei campioni più concentrati, tra quelli che sono stati sottoposti alla misura, permangono monomeri tra i quali prevalgono le interazioni repulsive. Infatti il coefficiente di mutua diffusione dei monomeri di Lisozima nelle soluzioni più concentrate è maggiore rispetto a quello rilevato nei campioni diluiti, in cui i cluster non si formano. Il processo di aggregazione risulta invece indipendente dal pH della soluzione, almeno nel range di valori che va da 3 a 6.

Relatore: Debora Berti berti@csgi.unifi.it

Correlatore: Emiliano Fratini fratini@csgi.unifi.it