

Università degli Studi di Firenze
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea Triennale in Chimica



Studio di Aggregazione di Proteine
Globulari
Study of Aggregation of Globular Proteins

Tesi di Laurea di
Laura Saetta

Relatore *Prof.ssa Debora Berti*

Correlatore *Prof. Emiliano Fratini*

Anno accademico 2010/2011

Indice

Indice	I
Elenco Abbreviazioni	II
Capitolo 1: Introduzione	1
Capitolo 2: Risultati e Discussione	12
2.1 Caratterizzazione della Proteina	12
2.2 Dynamic Light Scattering	21
2.3 Fluorescence Correlation Spectroscopy	37
2.4 Confronto tra DLS ed FCS	49
2.5 Fluorescence Resonance Energy Transfer	56
Capitolo 3: Materiali e Metodi	61
3.1 Materiali	61
3.2 Metodi di Preparazione dei Campioni.....	62
3.3 Tecniche Sperimentali.....	65
Capitolo 4: Conclusioni	73
Bibliografia	76

Elenco Abbreviazioni

- 2Y Two- Yukawa
- ACF Autocorrelation function
- CD Circular Dichroism
- D Coefficiente di diffusione
- D_0 Coefficiente di diffusione a diluzione infinita
- D_m Mutual diffusion coefficient
- D_s Self diffusion coefficient
- DLS Dynamic Light- Scattering
- FCS Fluorescence Correlation Spectroscopy
- FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer
- R_h Raggio idrodinamico

Introduzione

In questo lavoro di tesi si affronta lo studio dell'aggregazione di proteine globulari utilizzando il Lisozima come prototipo per la ricerca scientifica.

Le proteine sono macromolecole costituite da più amminoacidi uniti mediante un legame peptidico ovvero un legame covalente tra il carbonio di un gruppo carbossilico e l'azoto di un gruppo amminico. La figura 1.1 mostra la struttura di un generico amminoacido in cui il carbonio tetraedrico prende il nome di C α ed è quasi sempre un centro chirale mentre R è la catena laterale che differisce nei 20 amminoacidi esistenti.

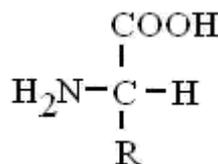


Fig. 1.1. Struttura di un generico amminoacido. R è la catena laterale che cambia da amminoacido ad amminoacido.

Ogni proteina è caratterizzata da una sequenza di amminoacidi caratteristica, la quale costituisce la sua struttura primaria. La figura 1.2 mostra due amminoacidi uniti dal legame peptidico che è riquadrato in rosso.

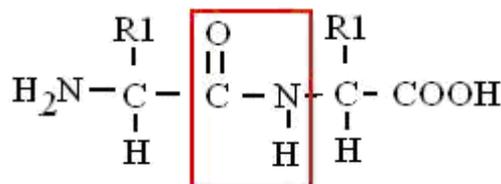


Fig. 1.2. Legame peptidico fra due amminoacidi. Il carbonio del gruppo carbossilico di un amminoacido si unisce all'azoto del gruppo amminico dell'altro amminoacido creando un legame covalente.

Le proteine non esistono però come catene polipeptidiche distese ma piuttosto come strutture ripiegate e compatte. La disposizione spaziale dei residui amminoacidici che sono adiacenti nella struttura primaria determina la struttura secondaria della proteina.

Le principali conformazioni sono la α - elica e la β - foglietto. La struttura ad α - elica ha una forma elicoidale e un passo di 5.4 Å che comprende 3.6 residui amminoacidici; il diametro dell'elica è di 6.0 Å. Questo tipo di conformazione è stabilizzata da numerosi legami a idrogeno intramolecolari.

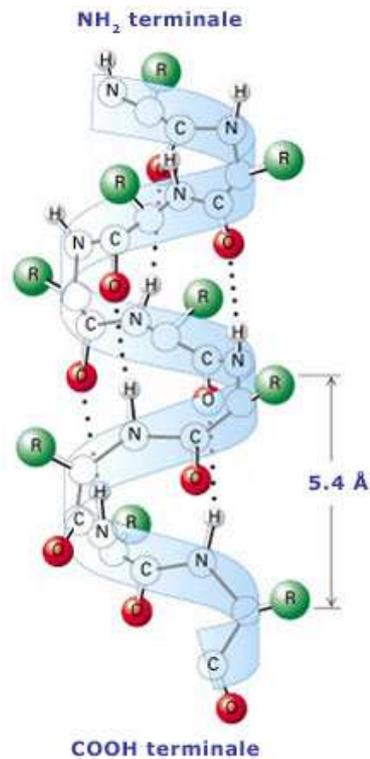


Fig. 1.3. Struttura ad α - elica. Essa ha una forma elicoidale e un passo di 5.4 Å che comprende 3.6 residui amminoacidici; il diametro dell'elica è di 6.0 Å. Questo tipo di conformazione è stabilizzata da numerosi legami a idrogeno intramolecolari.

La struttura a β - foglietto mostra invece una catena polipeptidica quasi completamente distesa e il passo è di 7Å. In questo tipo di conformazione i legami ad idrogeno si formano tra catene polipeptidiche vicine e sono possibili due tipi di configurazione: parallela e antiparallela, quest'ultima è la più stabile.

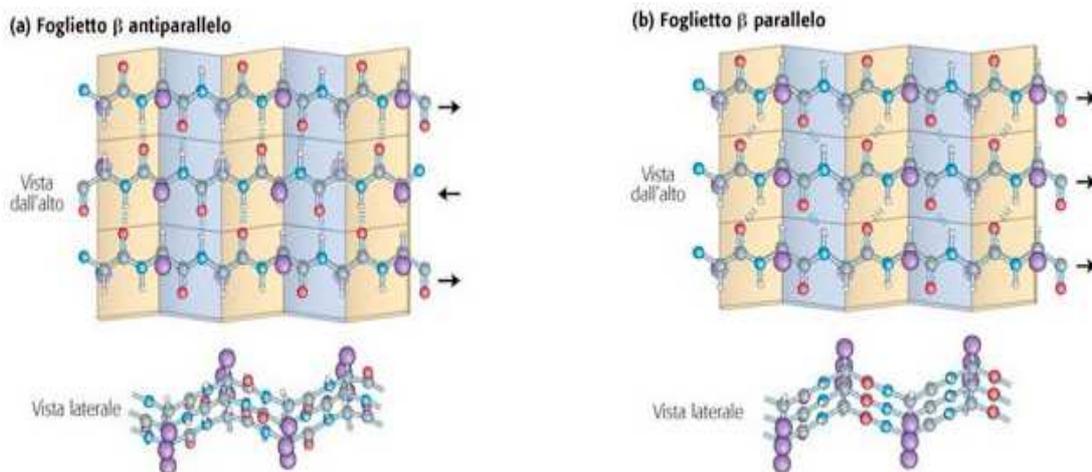


Fig. 1.4. Struttura di tipo β - foglietto. La catena polipeptidica è quasi completamente distesa e il passo è di 7Å. I legami a idrogeno si formano tra catene diverse e determinano la conformazione a) antiparallela e b) parallela.

La disposizione tridimensionale globale della proteina prende il nome di struttura terziaria ed è strettamente collegata al ruolo biologico della molecola. Un gran numero di proteine possiede una struttura globulare, altre sono proteine fibrose. Queste ultime sono costituite da un solo tipo di struttura secondaria e sono insolubili in acqua a causa dei numerosi residui idrofobici presenti. Esempi di proteine fibrose sono : l' α - cheratina che troviamo nei capelli, nelle unghie, nella lana, etc; il collagene che è il principale costituente del tessuto connettivo, dei tendini, della cartilagine, ossa, denti, pelle e vasi sanguigni.

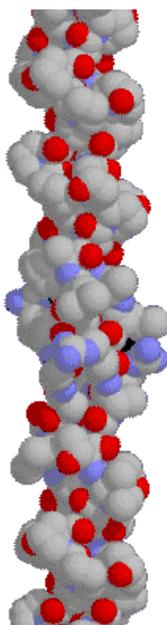


Fig. 1.5. Struttura tridimensionale del collagene preso come esempio di una proteina fibrosa.

La struttura secondaria del Lisozima è in parte una α - elica (soprattutto se la proteina è sciolta in una soluzione acida) e in parte β - foglietto antiparallelo, per il resto assume una forma disordinata [4]. Sia l'enzima umano che quello presente nell'uovo di gallina hanno quattro ponti disolfuro a collegare i gruppi sulfidrici appartenenti a catene peptidiche diverse, essi sono fondamentali per il mantenimento della corretta struttura della proteina e per lo svolgimento della sua attività biologica.

Il Lisozima ha la forma tipica delle proteine globulari: è compatto ed elissoidale; è relativamente piccolo, le sue dimensioni sono 4.5 nm x 3.0 nm x 3.0 nm ed il suo peso molecolare è di 14.3 kDa [5].

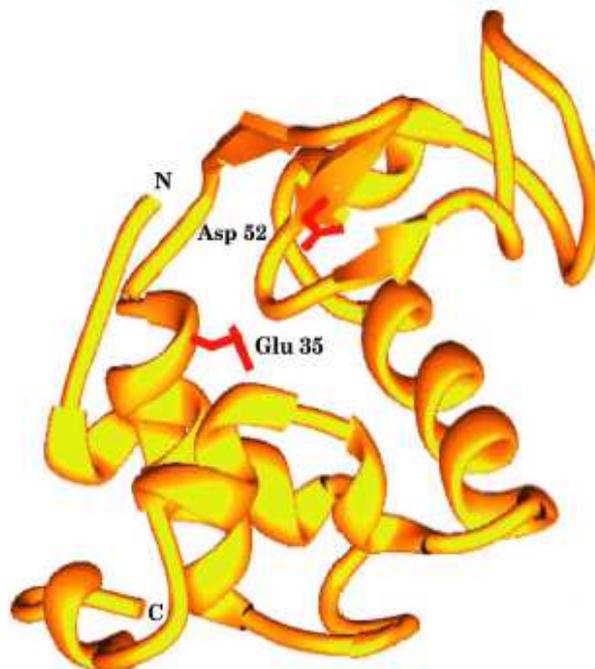


Fig. 1.7. Struttura tridimensionale del Lisozima di uovo di gallina.

Una caratteristica tipica di un sistema vivente è la sua capacità di costituire spontaneamente strutture tridimensionali complesse. Questo fenomeno prende il nome di Self- Assembly e il suo esempio più interessante è costituito dal caso delle proteine in merito alla loro abbondanza e diversità. Un ulteriore passo in avanti sta nel comprendere come le proteine interagiscano spontaneamente in soluzione le une con le altre. La formazione di aggregati è sempre un'associazione spontanea anche se a livello supramolecolare. Tuttavia se per i cluster costituiti dai polimeri o dai liposomi carichi si hanno dati piuttosto chiari, le interazioni tra le proteine rimangono in gran parte oscure. Una prima ipotesi è che gli aggregati si costituiscano in seguito alla formazione di legami deboli, generalmente elettrostatici, tra alcuni amminoacidi delle catene laterali.

Nel caso del Lisozima si potrebbero formare legami a idrogeno tra i residui carichi positivamente come la Lisina e l'Arginina e quelli carichi negativamente come l'Aspartato ed il Glutammato.

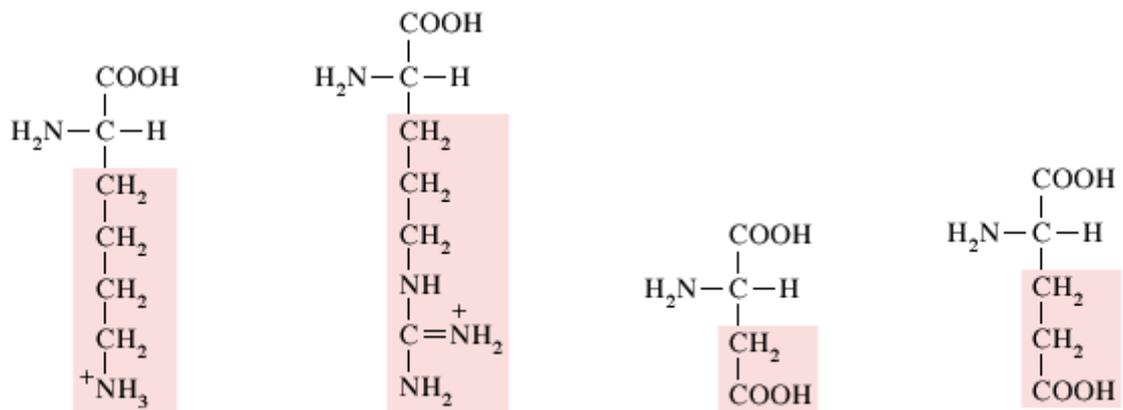


Fig. 1.8. Da sinistra a destra: Lisina, Arginina, acido Aspartico e acido Glutammico.

Studi recenti sostengono invece che le interazioni coinvolgono i gruppi CO ed NH della catena polipeptidica e in particolare quelli presenti nella zona periferica della proteina, essendo i più liberi di interagire [6].

Al di là della determinazione dei siti di legame tra le proteine, le forze attrattive agiscono quando i monomeri sono sufficientemente vicini e guidano il Self-Assembly. Gli aggregati si formano quando queste forze attrattive a corto raggio abbassano sufficientemente l'energia superficiale, che è il lavoro necessario per aumentare di una unità la superficie del liquido considerato. In realtà una proteina globulare sciolta in acqua non costituisce propriamente un fluido semplice, ma una dispersione colloidale. Un colloide è una particella dal diametro compreso tra 1 nm ed 1 µm, che si trova dunque in uno stato finemente disperso, intermedio fra la soluzione omogenea e quella eterogenea. Le forze attrattive a corto raggio non sono le uniche ad agire sulle proteine globulari in soluzione, esistono anche delle forze repulsive a lungo raggio di carattere elettrostatico dovute ai residui amminoacidici che presentano cariche dello stesso segno. Mentre le particelle si avvicinano per formare i cluster subentrano delle ulteriori forze repulsive Coulombiane che limitano la crescita degli aggregati [7].

La formazione di cluster in stati colloidali all'equilibrio è stata prevista dagli studi teorici e simulata al computer. Trovare un modello che associ al sistema un potenziale termodinamico ha enorme rilevanza nello sviluppo industriale e in tutti gli altri ambiti che coinvolgono questa classe di materiali. La teoria più nota per le particelle disperse in soluzione è stata elaborata indipendentemente da Derjaguin e Landau (1941)

nell'allora URSS e da Verwey e Overbeek (1948) in Olanda e prende il nome di DLVO. Il potenziale DLVO è la somma di interazioni di tipo attrattivo che agiscono quando le particelle colloidali sono sufficientemente vicine da risentire delle forze di van der Waals con interazioni elettrostatiche repulsive a lungo raggio.

La figura 1.9 mostra la situazione di due particelle disperse in un liquido, come due monomeri di Lisozima in acqua.

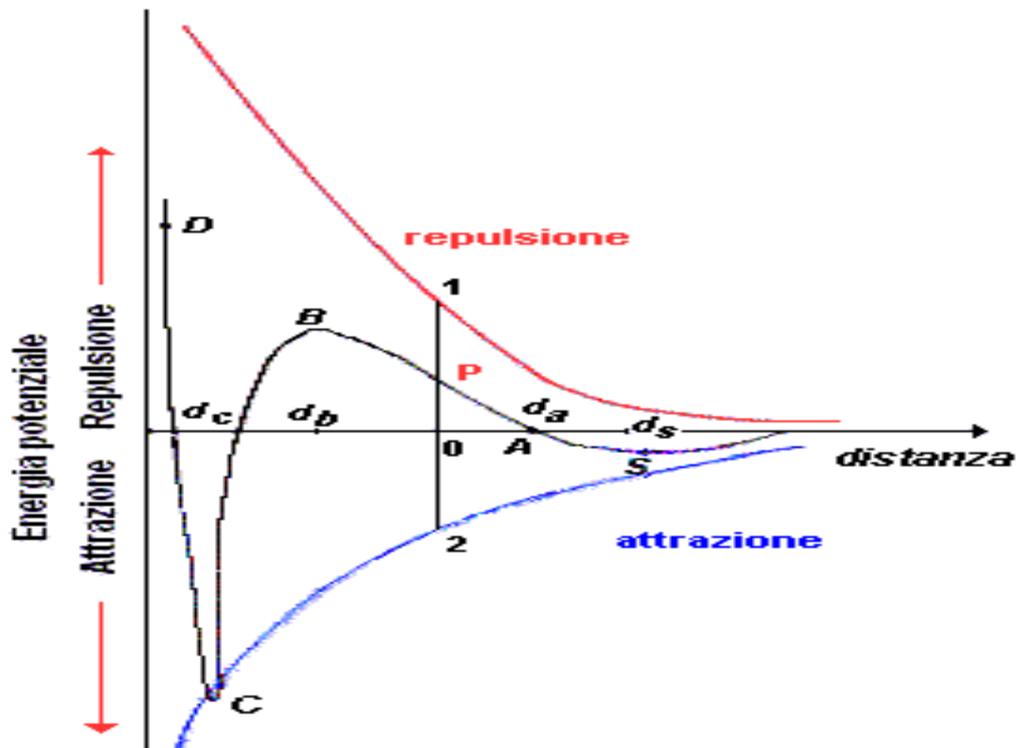


Fig. 1.9. Rappresentazione grafica del modello DLVO. L'asse delle ascisse rappresenta la distanza tra due particelle disperse in soluzione. La curva di colore rosso indica le forze elettrostatiche repulsive mentre quella blu mostra le forze attrattive di van der Waals; la curva nera è data dalla somma algebrica delle altre due e rappresenta il potenziale del sistema.

Al diminuire della distanza tra le particelle sia le interazioni attrattive che quelle repulsive aumentano, ma le ultime tendono più velocemente all'infinito per cui prevalgono sulle altre. Sommando algebricamente le equazioni per le due differenti energie si ottiene una risultante che rappresenta il potenziale del sistema. Poniamo che le proteine, che si muovono in soluzione di un moto browniano, collidano. Gli amminoacidi dell'una e dell'altra che presentano la stessa carica danno luogo a interazioni elettrostatiche di carattere repulsivo (A). Se le particelle continuano ad avvicinarsi si raggiunge un massimo positivo (B). Nel caso in cui le energie cinetiche

dei monomeri siano sufficienti a superare la barriera di potenziale B le particelle continuano ad avvicinarsi e arrivano alla distanza a cui prevalgono le forze attrattive di van der Waals. L'energia potenziale dell'interazione tende a zero e quando diventa negativa (C) le particelle si uniscono strettamente formando degli aggregati. Se esse si avvicinassero ulteriormente si avrebbe un rapido aumento dell'energia potenziale perchè le particelle dovrebbero compenetrarsi e sovrapporre i propri orbitali (D). Oltre al minimo in C ce ne può essere un altro a distanze superiori ma non nel caso di molecole piccole come il Lisozima.

Data la sua complessità, il comportamento delle proteine in soluzione rimane tuttavia un problema solo parzialmente risolto e il potenziale DLVO non sempre descrive il sistema nella maniera adeguata. Recentemente sono stati introdotti altri modelli teorici, tra i quali il Two-Yukawa (2Y) che è più flessibile del DLVO perchè presenta un numero superiore di parametri:

$$\beta u(r) = \begin{cases} \infty & r \leq \sigma \\ -\sigma K_1 \left[e^{-z_1(r-\sigma)} / r \right] + \sigma K_2 \left[e^{-z_2(r-\sigma)} / r \right] & r \geq \sigma \end{cases}$$

dove σ è il diametro dell'hard core, Z_1 e Z_2 sono dei parametri che definiscono il range e la forma del potenziale, $z_1 = Z_1 / \sigma$ mentre $z_2 = Z_2 / \sigma$.

Nel caso in cui le forze che agiscono sulle proteine siano di tipo attrattivo a corto raggio e repulsivo a lungo raggio allora $Z_1 > Z_2$. Il modello 2Y prevede anche la situazione in cui siano le interazioni repulsive a risultare predominanti quando le particelle sono vicine e quelle attrattive quando sono più lontane dunque $Z_2 > Z_1$. Quest'ultimo caso non riguarda tanto i cluster quanto le micelle presenti in una data soluzione, le quali presentano variazioni di dimensione e di forma meno pronunciate rispetto a quelle che caratterizzano gli aggregati proteici [8]. Il modello 2Y ha però dei limiti: per prima cosa vale nell'approssimazione che le particelle siano sferiche e inoltre per ottenere il potenziale in forma analitica occorre risolvere un set di equazioni non lineari. Nonostante questi ultimi aspetti messi in evidenza il Two-Yukawa è attualmente l'approccio teorico più completo ed efficiente nel descrivere lo stato colloidale delle proteine. Inoltre è facile da trasformare in un codice che sia leggibile per i computer, il che ci consente di ottenere senza troppe difficoltà il fitting dei dati sperimentali [9].

Il fatto che le proteine in soluzione formino aggregati amorfi è una questione che riveste un particolare interesse anche nell'ambito medico-farmaceutico. Infatti molte malattie

sono legate alla precipitazione delle proteine globulari: per quanto è noto ad oggi il morbo di Alzheimer, la polineuropatia familiare amiloidotica, l'anemia falciforme, la formazione della cataratta, etc [7]. La produzione di farmaci in grado di inibire l'aggregazione delle proteine rallenterebbe il decorso di tali malattie.

Un'ulteriore applicazione riguarda il miglioramento delle tecniche industriali attualmente impiegate per la purificazione delle proteine. Una volta note le interazioni che si vengono a creare al momento della formazione dei cluster e le dinamiche del processo di aggregazione sarebbe possibile ottenere proteine più pure [10].

Questa tesi prende spunto da recenti studi condotti su soluzioni di Lisozima a diverse concentrazioni utilizzando le tecniche NSE (neutron spin echo) e SANS (small angle neutron scattering). La prima spettroscopia misura la precessione dei momenti magnetici dei neutroni attorno alla direzione di un campo di induzione magnetica esterno omogeneo, al fine di determinare il tempo impiegato da un singolo neutrone per attraversare le posizioni corrispondenti a due solenoidi situati prima e dopo il campione. In un tipico esperimento di SANS, invece, si investe il campione con un flusso di neutroni e si rileva la distribuzione spaziale dei neutroni scatterati a piccoli angoli, in seguito alla variazione della direzione del momento. La figura 1.10 mostra gli apparati strumentali necessari per le misure delle particelle di NSE, a sinistra, e di SANS, a destra.



Fig. 1.10. A sinistra l'apparato strumentale necessario per le misure di NSE, a destra quello utilizzato per la tecnica SANS.

NSE dà accesso al 'self diffusion coefficient' (D_s), legato allo spostamento quadratico medio nel tempo di una singola particella di Lisozima presente in soluzione. In un sistema ad un unico componente, nel quale non sono presenti aggregati, il D_s è messo in relazione con la frazione di volume della proteina dall'espressione:

$$D_s/D_0 = \eta_0/\eta_\infty C(\phi)$$

dove D_s è il 'self diffusion coefficient', D_0 è il coefficiente di diffusione a diluizione infinita, η_0 è la viscosità del solvente, η_∞ la viscosità della soluzione e $C(\phi)$ è un termine correttivo che dipende dalla frazione di volume del Lisozima (ϕ). Per un sistema costituito da sfere rigide $C(\phi) = 1+0.67\phi$ e $\eta_\infty/\eta_0 = 1+2.5\phi+5.0023\phi^2+9.09\phi^3$. Aumentando il valore di ϕ , D_s diminuisce rapidamente e ciò si riconduce alla formazione di cluster proteici. I risultati sperimentali hanno evidenziato che il coefficiente di diffusione diminuisce all'aumentare della quantità di proteina in soluzione. L'equazione che segue permette determinare anche le dimensioni medie degli aggregati di Lisozima:

$$R_h/R_0 = (D_0/D_s)(\eta_0/\eta_\infty)C(\phi)$$

dove R_h ed R_0 sono il raggio idrodinamico degli aggregati e della proteina in forma monomeric. Dai valori determinati per R_h risulta che, a concentrazioni relativamente basse, il sistema è costituito soprattutto da monomeri e da dimeri mentre a concentrazioni più elevate si formano aggregati di dimensioni maggiori [11].

Traendo spunto da questa ricerca scientifica si è deciso di affrontare lo studio dell'aggregazione di proteine globulari servendosi di due tecniche spettroscopiche che, nonostante siano indipendenti ed autonome, danno risultati comparabili: il Dynamic Light Scattering e la Fluorescence Correlation Spectroscopy.

Questo lavoro di tesi è costituito da tre parti. La prima è la caratterizzazione del Lisozima in tutte le condizioni in cui è stato utilizzato per gli esperimenti successivi: allo stato di proteina nativa e marcato con i fluorofori 5-Tamra e Fluoresceina.

La seconda parte è costituita dalle misure effettuate su campioni di Lisozima in acqua di diverse concentrazioni e dall'elaborazione dei dati sperimentali relativi alle spettroscopie a correlazione di fotoni (DLS) e di correlazione della fluorescenza (FCS).

L'obiettivo di questa fase, che è centrale nello studio dell'aggregazione del Lisozima, è rilevare la formazione di cluster proteici e determinarne l'eventuale dipendenza dalla concentrazione dei campioni.

La terza e ultima parte riguarda il fenomeno del trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza applicato a delle soluzioni di Lisozima marcato con 5-Tamra e con Fluoresceina. Questo esperimento consente di determinare la distanza media delle particelle e se il valore trovato sperimentalmente risulta minore rispetto a quello calcolato nell'approssimazione che le proteine non interagiscano e si dispongano ai

vertici di un reticolo a facce centrate, si suppone che si siano formati degli aggregati proteici.

Risultati e Discussione

2.1 Caratterizzazione della Proteina

Nell'affrontare lo studio di aggregazione di proteine globulari e del Lisozima come prototipo per la ricerca scientifica in questo ambito si è deciso di utilizzare due diverse tecniche: la spettroscopia a correlazione di fotoni e la spettroscopia di correlazione della fluorescenza. Il primo metodo di analisi è divenuto ormai uno strumento tradizionale di cui servirsi per determinare il coefficiente di mutua diffusione di quelle particelle presenti in soluzione che si muovono di un moto browniano. La spettroscopia di correlazione di fluorescenza costituisce, invece, un approccio più recente allo studio di aggregazione delle proteine, ma molto interessante poichè è in grado di quantificare anche la mobilità di una singola molecola. Lo scopo del lavoro esposto in questa tesi è quello di ottenere dalle due tipologie di misura, che sono autonome e del tutto indipendenti l'una dall'altra, dei risultati confrontabili ed il più possibile completi. Dal momento che per gli esperimenti di FCS si è marcata la proteina con il fluoroforo 5-Tamra è stato necessario verificare che il marcatore non denaturasse il Lisozima. Inoltre, allo studio delle proteine globulari condotto con le due tecniche spettroscopiche appena citate ne è seguito uno sul fenomeno del trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza (FRET), che permette di rilevare l'eventuale presenza degli aggregati proteici nei campioni sottoposti all'analisi e di determinare la distanza media tra le particelle presenti in soluzione. Per questo tipo di esperimento il Lisozima è stato marcato sia con il 5-Tamra che con la Fluoresceina. Per caratterizzare la proteina allo stato nativo e legata all'uno e all'altro dei due fluorofori sono state eseguite delle prove di denaturazione termica effettuate misurando l'assorbanza del Lisozima a 300 nm in funzione della temperatura e di dicroismo circolare.

Il Lisozima è una proteina enzimatica dal peso molecolare di 14.3 kDa composta da 129 amminoacidi che presenta quattro ponti disolfuro a collegare i gruppi sulfidrici appartenenti a catene peptidiche diverse.

La figura 2.1 mostra una rappresentazione della struttura 3D del Lisozima di uovo di gallina [12]. Lo spettro di assorbimento della proteina presenta un picco caratteristico a 280 nm dovuto agli amminoacidi aromatici in particolare Triptofano, Tirosina e Fenilalanina. A tale lunghezza d'onda il coefficiente di assorbività molare del Lisozima è di $38000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [13]. La figura 2.2 mostra lo spettro di assorbimento UV del Lisozima nativo in acqua (0.25 mg/mL).

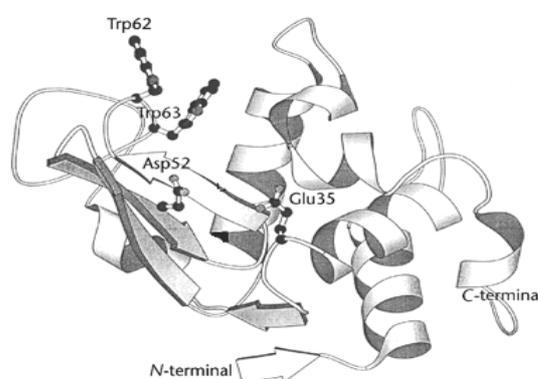


Fig. 2.1. Rappresentazione della struttura 3D del Lisozima di uovo di gallina [12].

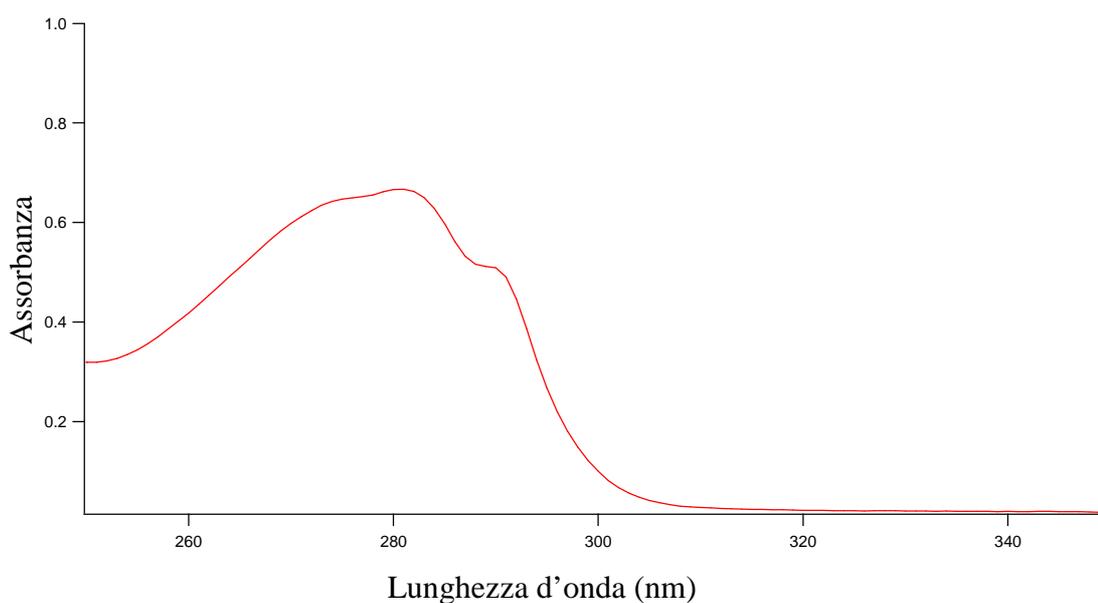


Fig. 2.2. Spettro di assorbimento UV del Lisozima nativo in acqua (0.25 mg/mL).

E' inoltre possibile monitorare lo spettro di assorbimento della proteina ad una data lunghezza d'onda in funzione della temperatura e quindi studiare il cambiamento che l'innalzamento della temperatura determina nella struttura proteica. Infatti l'aumento della temperatura provoca nel Lisozima (come nelle altre proteine solubili) un incremento della frequenza vibrazionale degli atomi intorno alle loro posizioni di equilibrio. Durante un processo di questo tipo i legami covalenti che costituiscono la struttura primaria della proteina non vengono alterati ma lo sono i legami deboli (legami a idrogeno, forze dipolari di Van der Waals, etc). Il mutamento, che prima è localizzato, porta infine allo svolgimento della struttura proteica secondaria e terziaria, fenomeno che prende il nome di "unfolding". Tale processo comporta un incremento nei valori di assorbanza del Lisozima a 300 nm dal momento che alcuni gruppi funzionali che erano rivolti verso l'interno della struttura quando la proteina era allo stato nativo, in seguito allo svolgimento si trovano esposti all'eccitazione ultravioletta e assorbono maggiormente la radiazione. Proprio perchè il processo di denaturazione termica è così strettamente correlato alla struttura della proteina, è interessante confrontare gli spettri di assorbimento del Lisozima nativo con quelli del Lisozima marcato con Tamra e con Fluoresceina. La figura 2.3 mostra la variazione dell'assorbimento a 300 nm di un campione di Lisozima in acqua di concentrazione 0.084 mg/mL in funzione della temperatura.

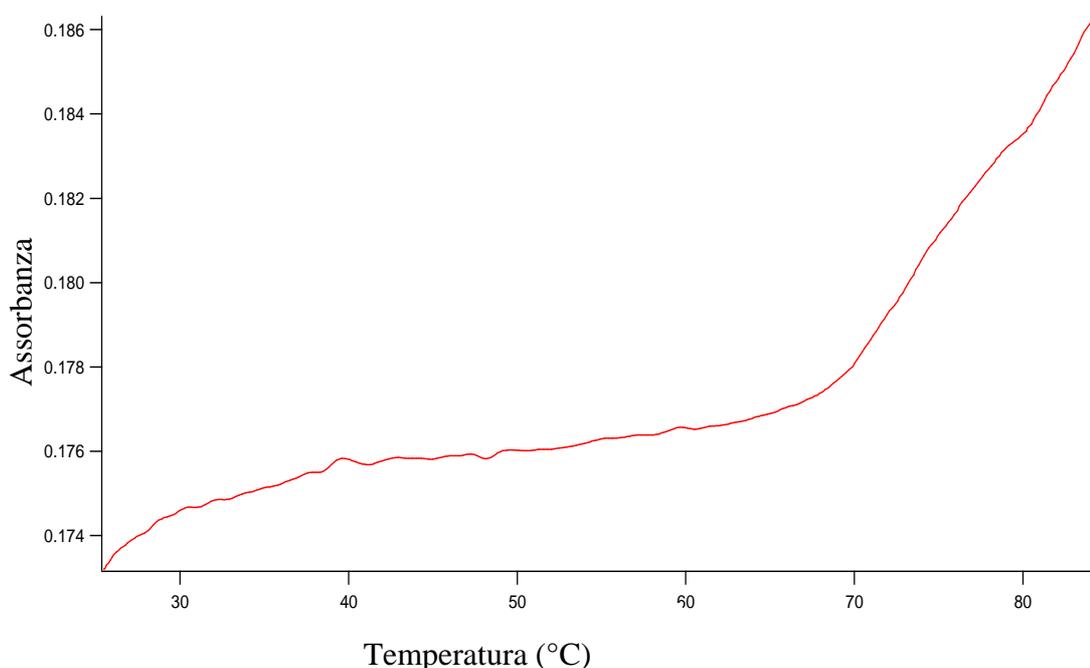


Fig. 2.3. Denaturazione termica di un campione di Lisozima in acqua di concentrazione 0.084 mg/mL. La variazione dell'assorbimento della proteina a 300 nm è stata registrata alla velocità di 0.05°C al minuto.

Facendo sempre riferimento alla figura 2.3, è evidente che l'assorbanza del Lisozima varia molto dai 65°C spostandosi verso le temperature più elevate. Infatti, la proteina è denaturata al 50% a 74°C e scaldando ancora si denatura del tutto. Nel caso del Lisozima lo svolgimento della struttura terziaria coincide con quello della struttura secondaria [14]. Lo spettro di assorbimento in funzione della temperatura della proteina allo stato nativo non differisce molto da quello registrato nelle medesime condizioni sperimentali per il Lisozima marcato con Tamra (0.066 mg/mL), figura 2.4.

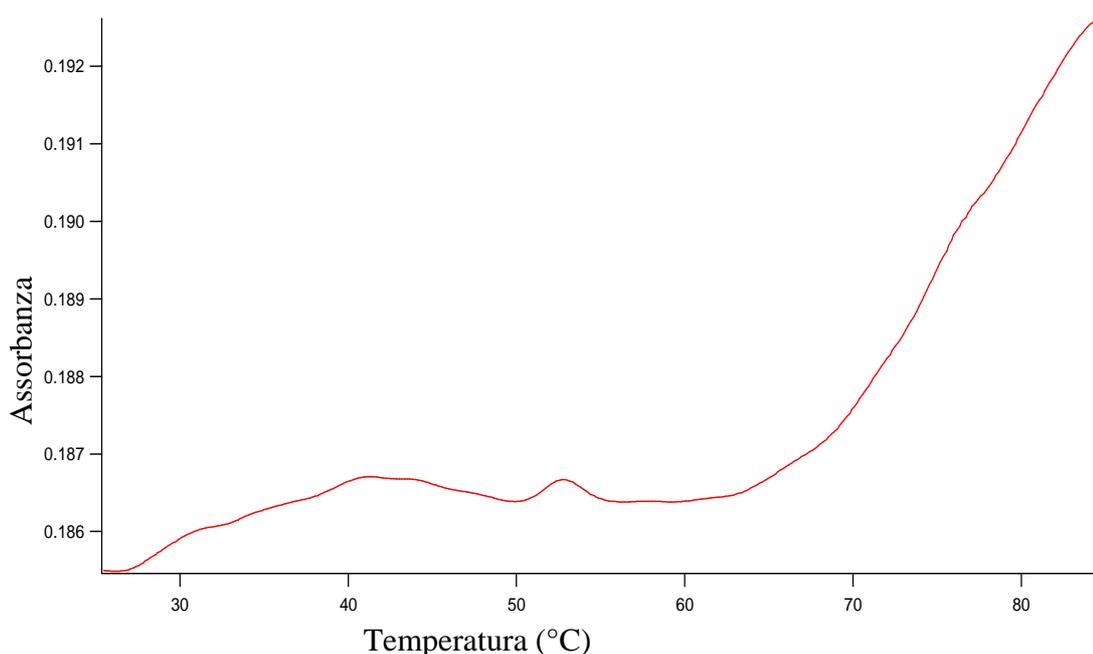


Fig. 2.4. Lisozima marcato con Tamra solubilizzato in acqua, concentrazione 0.066 mg/mL. La variazione dell'assorbanza della proteina a 300 nm è stata registrata alla velocità di 0.05°C al minuto.

Gli spettri di assorbimento alla lunghezza d'onda di 300 nm registrati in funzione della temperatura sono particolarmente simili nel caso del Lisozima nativo e di quello marcato con il 5-Tamra, mentre la figura 2.5 mostra che un campione di proteina marcata con Fluoresceina (0.068 mg/mL) ha un andamento che in parte si discosta da quello delle prime due soluzioni. Tuttavia, è utile sovrapporre gli spettri relativi a tutti e tre i campioni ed evidenziarne la parte terminale che corrisponde alla variazione dell'assorbanza (normalizzata per le concentrazioni) nel range di temperature in cui si ha lo svolgimento della struttura proteica, figura 2.6.

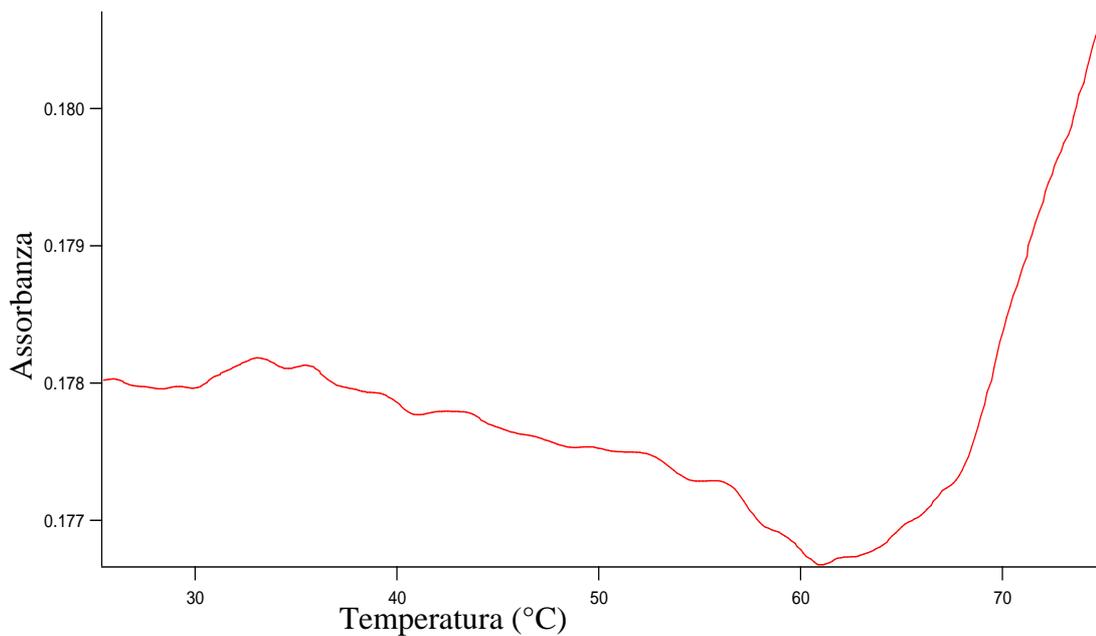


Fig. 2.5. Lisozima marcato con Fluoresceina, concentrazione 0.068 mg/mL.

La variazione dell'assorbanza della proteina a 300 nm è stata registrata alla velocità di 0.05°C al minuto.

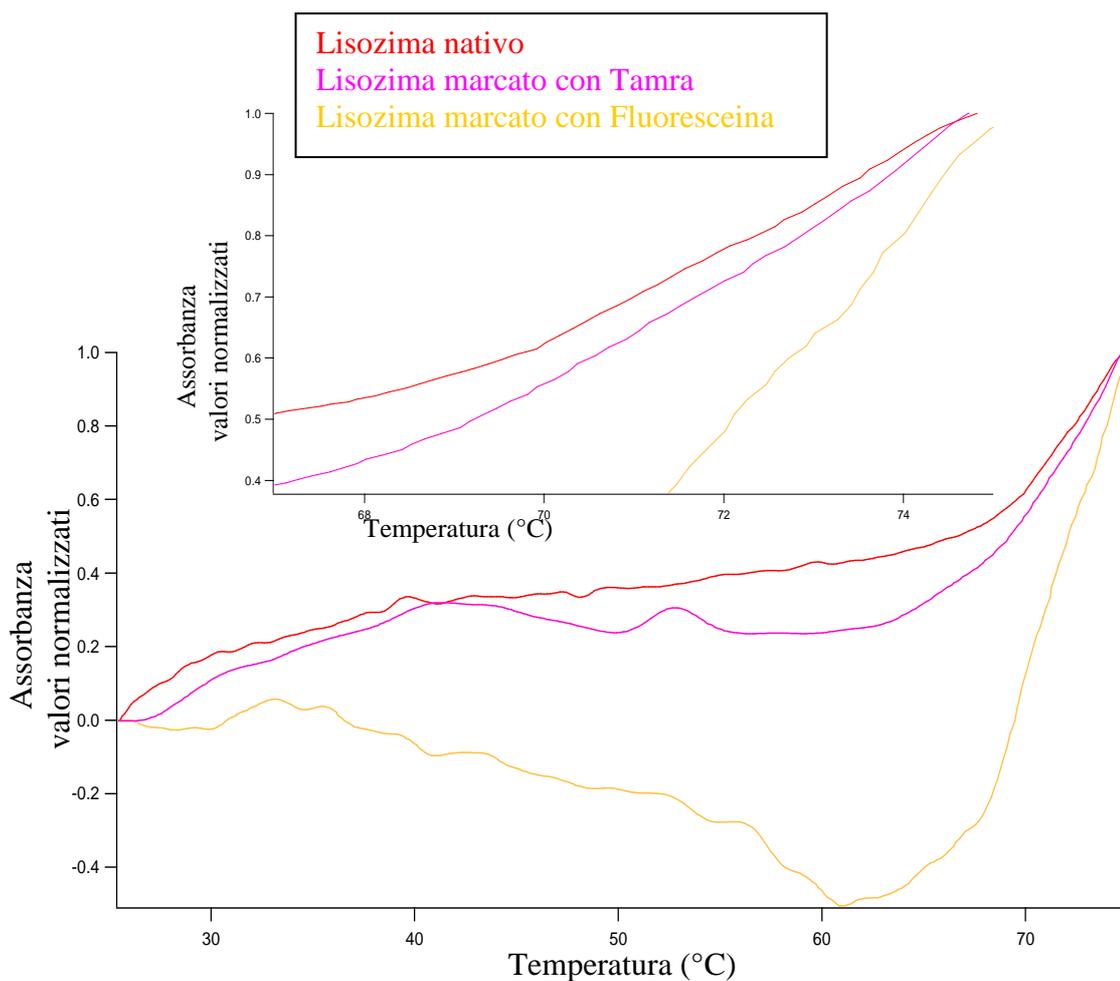


Fig. 2.6. Sovrapposizione dei grafici di assorbanza (normalizzati per la concentrazione di proteina

in soluzione) a 300 nm dei campioni di Lisozima nativo (0.084 mg/mL), Lisozima marcato con Tamra (0.066 mg/mL) e Lisozima marcato con Fluoresceina (0.068 mg/mL).

Confrontando la parte terminale degli spettri di assorbimento del Lisozima nativo e di quello marcato non si riscontrano grosse differenze, infatti l'intervallo di temperature in cui si verifica la denaturazione del Lisozima è il medesimo. La figura 2.7 mette a confronto le derivate degli spettri di assorbanza a 300 nm in funzione della temperatura relativi sempre ai tre campioni presi in esame. I valori che compaiono in corrispondenza dell'asse delle ordinate sono normalizzati tra 0 e 1. Il massimo della derivata corrisponde al cambiamento più evidente nella struttura della proteina. Come è evidenziato in celeste nella figura, lo svolgimento del Lisozima allo stato nativo e marcato ha inizio nello stesso intervallo di temperature, che è compreso tra i 65°C e i 70°C.

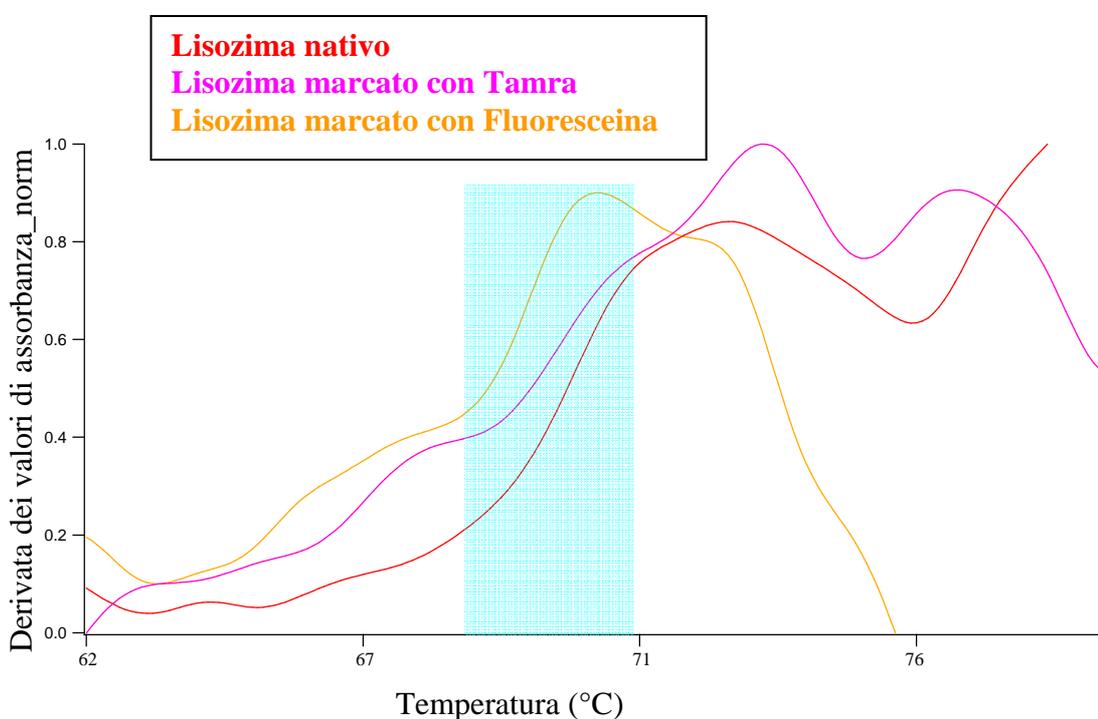


Fig. 2.7. Derivate degli spettri di assorbimento a 300 nm in funzione della temperatura.

I campioni sono: Lisozima nativo (0.084 mg/mL), Lisozima marcato con Tamra (0.066 mg/mL) e Lisozima marcato con Fluoresceina (0.068 mg/mL).

Un ulteriore confronto tra il campione costituito dal Lisozima nativo e quelli in cui la proteina è marcata con Tamra o con Fluoresceina è dato dalle misure di dicroismo circolare. La figura 2.8 mostra lo spettro CD del Lisozima nativo (0.084 mg/mL); la curva ad esso relativa ha un picco minimo negativo attorno a 215 nm, attraversa l'asse delle ascisse vicino ai 200 nm e forma un massimo positivo a 196 nm. Il segnale che ricade nel range di 190-200 nm è da ricondursi all' α - elica e al β - foglietto; entrambi i picchi, massimo e minimo, sono dovuti alla conformazione β di tipo antiparallelo [15].

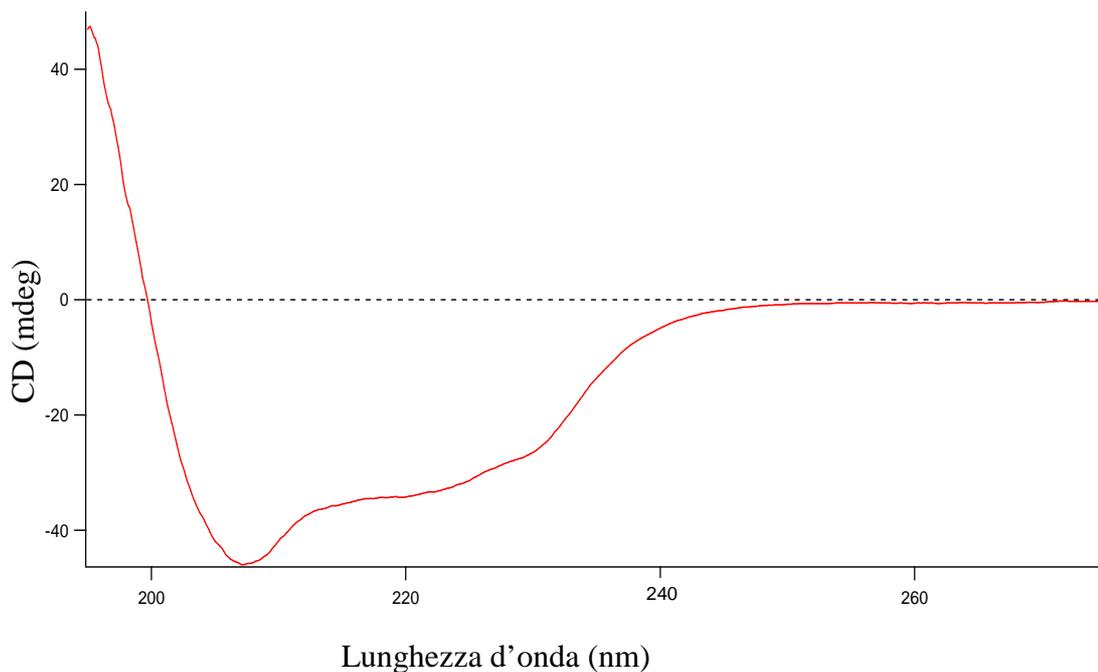


Fig. 2.8. Spettro CD ottenuto dalla media di 20 misure effettuate su di un campione di Lisozima nativo (0.084 mg/mL) posto in una cuvetta in quarzo dal cammino ottico di 0.5 cm.

La figura 2.9 mostra lo spettro CD del campione di Lisozima marcato con Tamra (0.066 mg/mL) e la 2.10 quello della soluzione di Lisozima marcato con Fluoresceina (0.068 mg/mL).

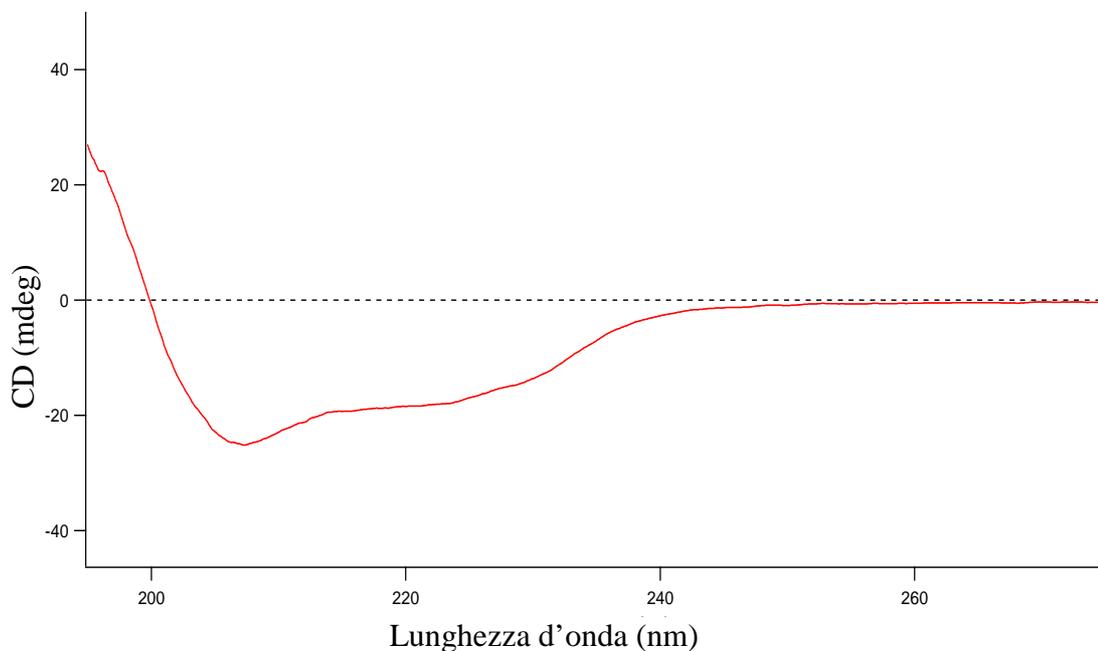


Fig. 2.9. Spettro CD ottenuto dalla media di 20 misure effettuate su di un campione di Lisozima marcato con Tamra (0.066 mg/mL) posto in una cuvetta in quarzo dal cammino ottico di 0.5 cm.

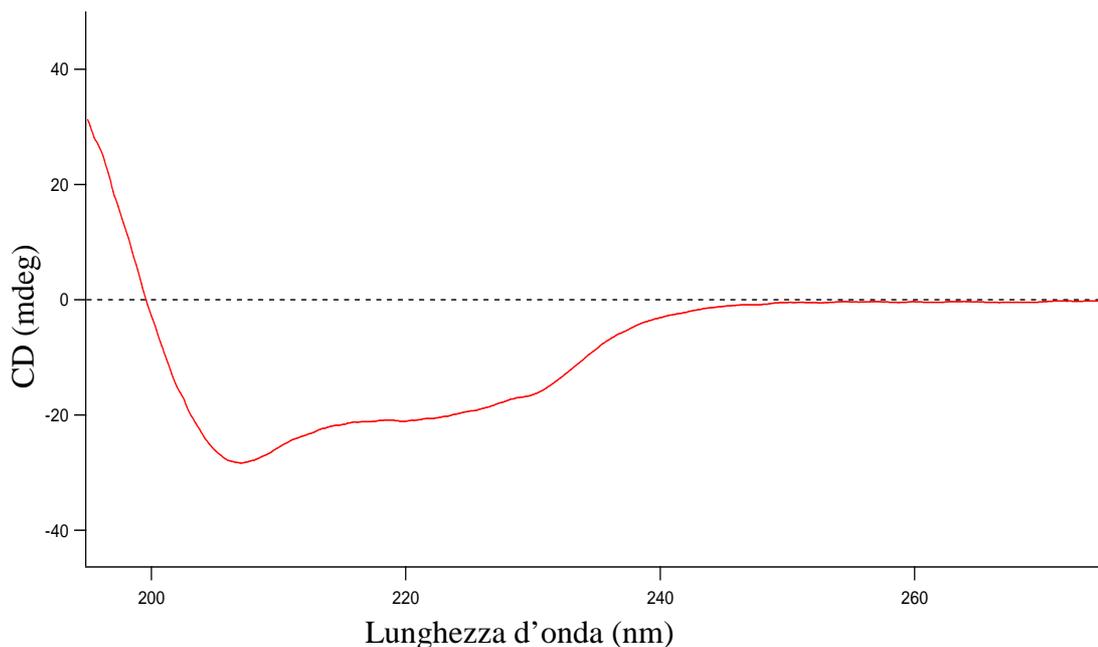


Fig. 2.10. Spettro CD ottenuto dalla media di 20 misure effettuate su di un campione di Lisozima marcato con Fluoresceina (0.068 mg/mL) posto in una cuvetta in quarzo dal cammino ottico di 0.5 cm.

Le curve dei tre campioni, una volta normalizzate per la concentrazione, sono perfettamente sovrapponibili, come si vede dalla figura 2.11.

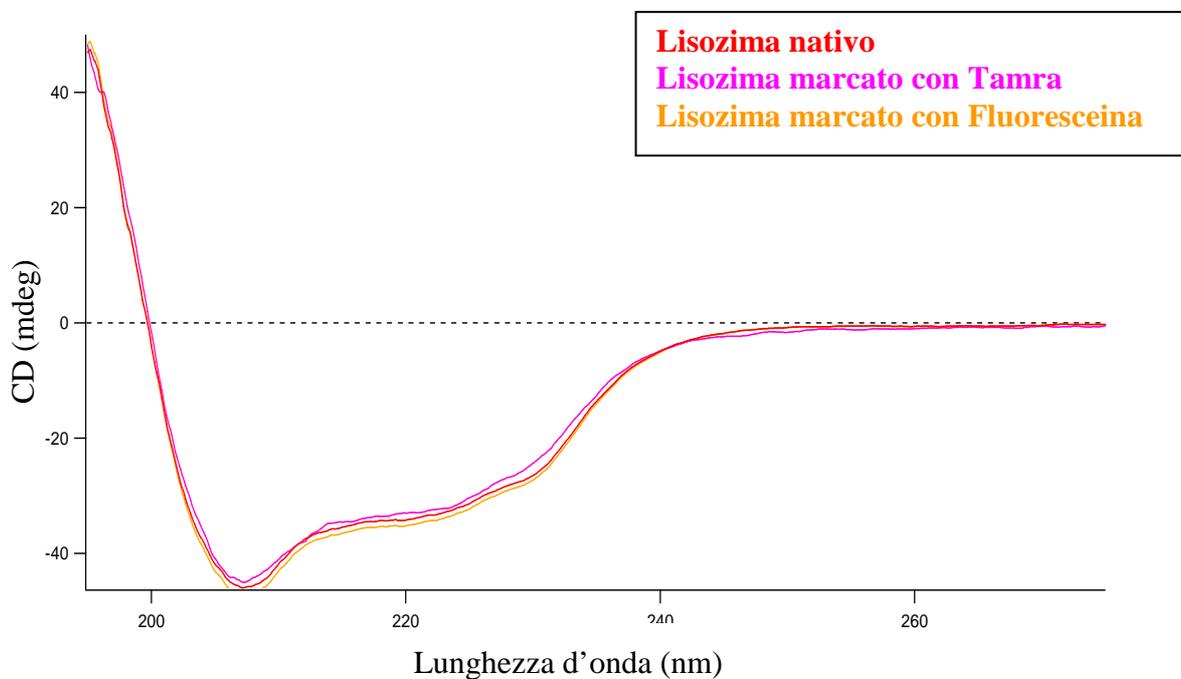


Fig. 2.11. Sovrapposizione degli spettri CD dei campioni: Lisozima nativo (0.084 mg/mL), Lisozima marcato con Tamra (0.066 mg/mL) e Lisozima marcato con Fluoresceina (0.068 mg/mL). Per rendere le curve più facilmente confrontabili, nella elaborazione le soluzioni in cui la proteina è marcata sono state riportate alla medesima concentrazione del campione di Lisozima nativo.

I marcatori Fluoresceina e Tamra non modificano la struttura del Lisozima. Nel caso del 5-Tamra, infatti, si ottengono spettri di assorbanza in funzione della temperatura e spettri CD che hanno un andamento pressochè identico a quello della proteina allo stato nativo. Per quanto riguarda il Lisozima marcato con Fluoresceina valgono le medesime considerazioni dal momento che le differenze riscontrate nelle prove di denaturazione termica della proteina non sono rilevanti in quanto l'intervallo di temperature in cui ha inizio lo svolgimento del Lisozima marcato con Fluoresceina è quello che si attribuisce anche alla proteina nativa.

2.2 Dynamic Light Scattering

La spettroscopia a correlazione di fotoni (o Dynamic Light Scattering) è uno dei metodi più utilizzati per determinare le dimensioni delle particelle presenti nella soluzione analizzata. Durante la misura una radiazione laser di 532 nm eccita il campione e una appropriata funzione di autocorrelazione descrive le fluttuazioni nel tempo dell'intensità della radiazione diffusa dal campione eccitato [16]. Tali fluttuazioni sono dovute al fatto che le particelle presenti in soluzione in moto browniano entrano ed escono continuamente dal volume di misura, determinando oscillazioni dell'intensità. In base alla velocità delle fluttuazioni si determina il coefficiente di diffusione di tali particelle e nell'approssimazione che esse abbiano forma sferica se ne calcola il raggio idrodinamico (R_h) applicando la relazione di Stokes-Einstein:

$$D = k_B T / 6\pi\eta R_h$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, T è la temperatura assoluta ed η è la viscosità del solvente.

Nell'ambito dello studio di aggregazione di proteine globulari il DLS permette di analizzare campioni a diverse concentrazioni di Lisozima in acqua in modo da verificare la presenza di cluster proteici e di determinare il coefficiente di diffusione ed il raggio idrodinamico della proteina in forma monomerica ed eventualmente in forma di aggregati. La viscosità del campione, tuttavia, non è costante ma cresce all'aumentare della concentrazione di proteina in soluzione. Noto che la densità del Lisozima è di 1.40 g/cm³ [17], si è dunque determinata la frazione di volume della proteina (ϕ) per ciascun campione e la si è inserita nell'equazione che segue [11]:

$$\eta_\infty/\eta_0 = 1 + 2.5\phi + 5.0023\phi^2 + 9.09\phi^3$$

dove η_0 è la viscosità dell'acqua ed η_∞ la viscosità della soluzione da inserire nell'equazione di Stokes-Einstein.

Si precisa che il rapporto η_∞/η_0 può essere espresso come sopra nell'approssimazione di un sistema di sfere rigide, per cui i valori del raggio idrodinamico che vengono riportati nelle pagine che seguono si accettano con un margine di errore. Inoltre nella determinazione di R_h non si tiene conto delle interazioni che si instaurano fra le particelle di Lisozima. Questo aspetto, che viene approfondito nel paragrafo 2.4, risulta avere un peso maggiore per i monomeri di proteina per cui i valori che si ottengono corrispondono in realtà ad un 'raggio apparente'.

Le soluzioni sottoposte alle misure sono campioni di concentrazione 38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL, 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL.

Le figure 2.12 e 2.13 riportano le ACF dell'intensità di scattering acquisite per i campioni di Lisozima più diluiti, esse sono state analizzate con il metodo dei cumulanti bloccato al 2° ordine. La tabella 2.1 presenta il raggio idrodinamico, il coefficiente di diffusione e la polidispersità determinati dalle ACF per entrambi i campioni.

Il Lisozima alle concentrazioni di 38.0 mg/mL e di 63.0 mg/mL è presente esclusivamente in forma monomerica. Le particelle si muovono in acqua con un coefficiente di diffusione di $1.36 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e il loro raggio idrodinamico è di 1.5 nm nel primo campione e di 1.4 nm nel secondo.

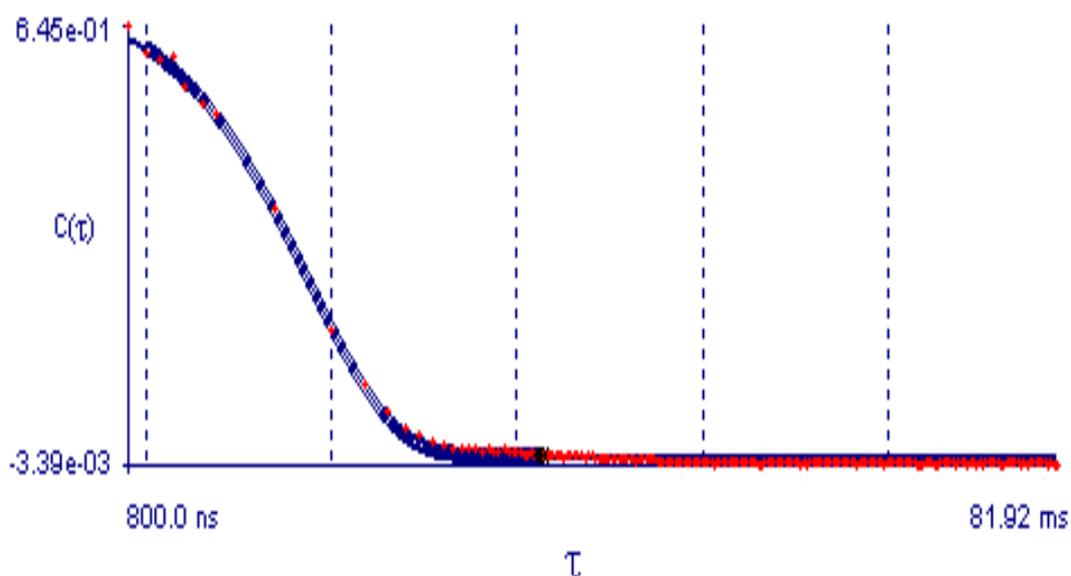


Fig. 2.12. ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione di Lisozima in acqua 38.0 mg/mL, analizzata con il metodo dei cumulanti bloccato al 2° ordine.

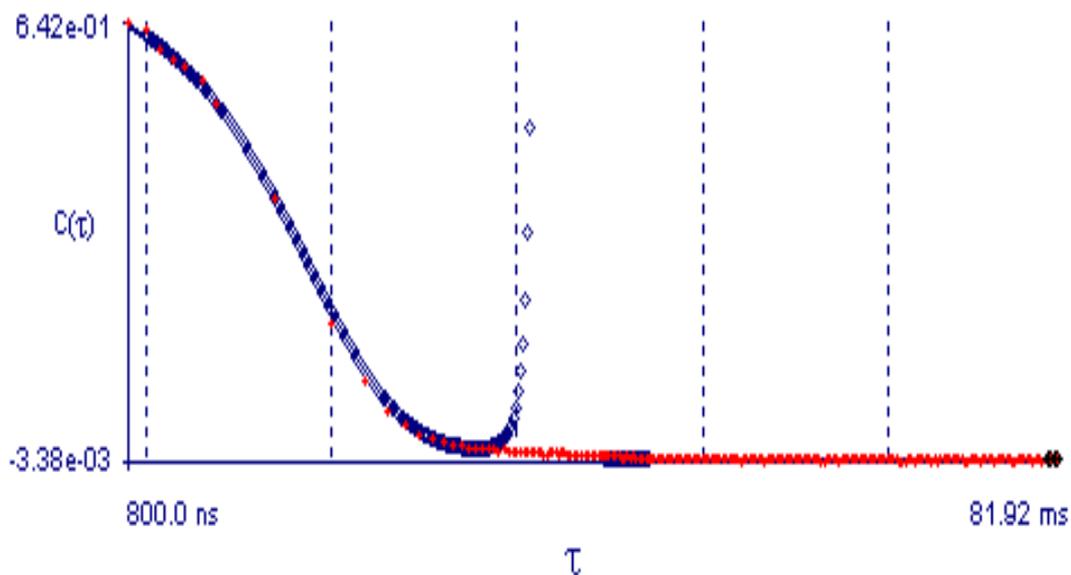


Fig. 2.13. AFC dell'intensità di scattering acquisita per il campione di Lisozima in acqua 63.0 mg/mL, analizzata con il metodo dei cumulanti bloccato al 2° ordine.

Concentrazione (mg/mL)	Raggio idrodinamico (nm)	Coefficiente di Diffusione (cm^2s^{-1})	Polidispersità
38.0	1.5	$1.36 \cdot 10^{-6}$	0.098
63.0	1.4	$1.36 \cdot 10^{-6}$	0.187

Tabella 2.1. Raggio idrodinamico, coefficiente di diffusione e polidispersità determinati dalle ACF con il metodo dei cumulanti arrestato al secondo ordine per i campioni 38.0 mg/mL e 63.0 mg/mL.

La figura 2.14 mostra l'andamento delle funzioni di autocorrelazione dei due campioni a più bassa concentrazione (38.0 mg/mL e 63.0 mg/mL). Le due curve sono sovrapponibili e presentano un decadimento monomodale.

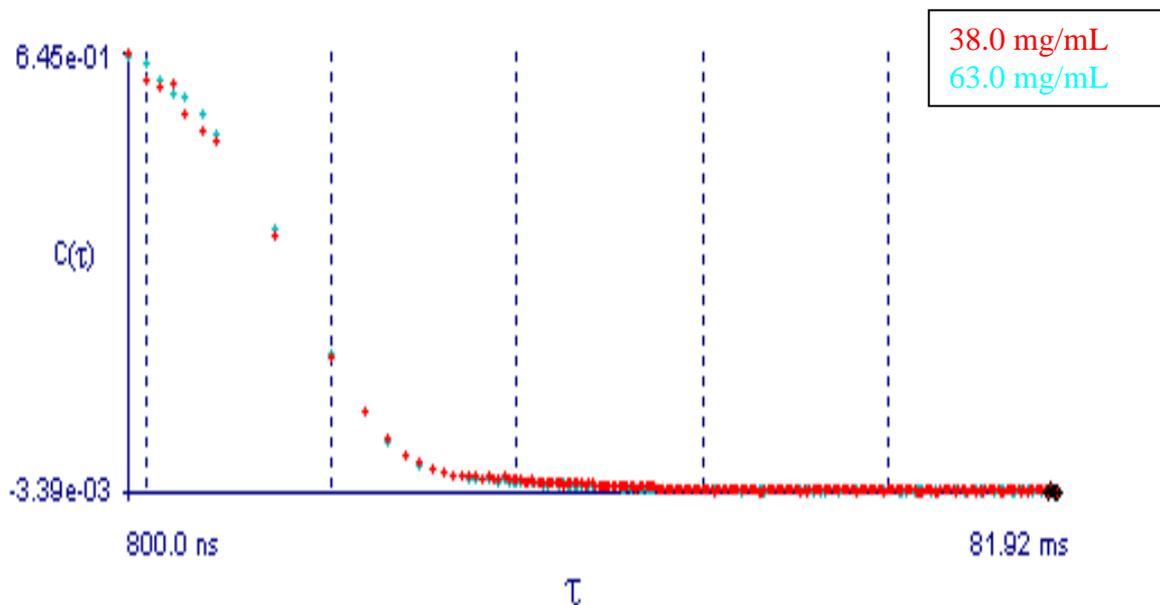


Fig 2.14. AFC dell'intensità di scattering acquisite per i campioni di Lisozima in acqua 38.0 mg/mL e 63.0 mg/mL, analizzate con il metodo dei cumulanti bloccato al 2° ordine.

La figura 2.15 riporta la ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione a concentrazione di Lisozima 83.6 mg/mL. In questo caso la ACF non è fittabile con il metodo dei cumulanti ma è stato utilizzato l'algoritmo CONTIN, basato sull'inversione di Laplace [18]. La funzione di autocorrelazione mostra due distinti decadimenti attribuibili al fatto che nel campione sono presenti due popolazioni: una di Lisozima in forma monomerica che ha un coefficiente di diffusione dell'ordine di $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e una costituita dagli aggregati di proteina che sono caratterizzati da un coefficiente di diffusione maggiore, dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

E' possibile valutare il contributo percentuale all'intensità di scattering del Lisozima monomerico e di quello presente in forma di aggregati dividendo la media pesata delle intensità relative ad una delle due popolazioni per l'intensità di scattering totale e moltiplicando per cento. Nel campione 83.6 mg/mL oltre alla proteina monomerica, la cui intensità di scattering è comunque il 70% del segnale totale, si rileva la presenza di aggregati che hanno un coefficiente di diffusione medio di $2.55 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e quindi un raggio idrodinamico medio di 72 nm.

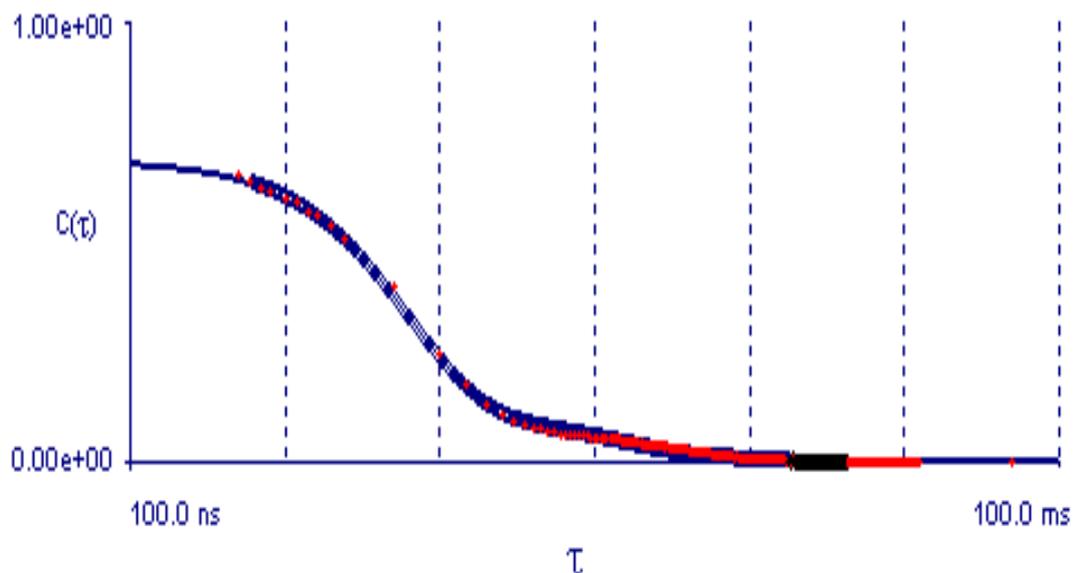


Fig. 2.15. AFC dell'intensità di scattering acquisita per il campione di Lisozima in acqua 83.6 mg/mL, analizzata con l'algoritmo CONTIN.

Le figure 2.16 e 2.17 riportano le ACF dell'intensità di scattering acquisita per i campioni a concentrazioni di Lisozima 113.6 mg/mL e 163.6 mg/mL, che sono state analizzate con l'algoritmo NNLS [19].

Le misure sulle soluzioni con le concentrazioni di 113.6 mg/mL e 163.6 mg/mL confermano quanto appena messo in evidenza. Nel primo campione alla proteina in forma monomerica è affiancata una popolazione di aggregati con coefficiente di diffusione medio $3.17 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e raggio idrodinamico medio di 55 nm; nel secondo D è $7.54 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ mentre R_h è 21 nm. In entrambi i casi i cluster costituiscono il 30% circa dell'intensità di scattering.

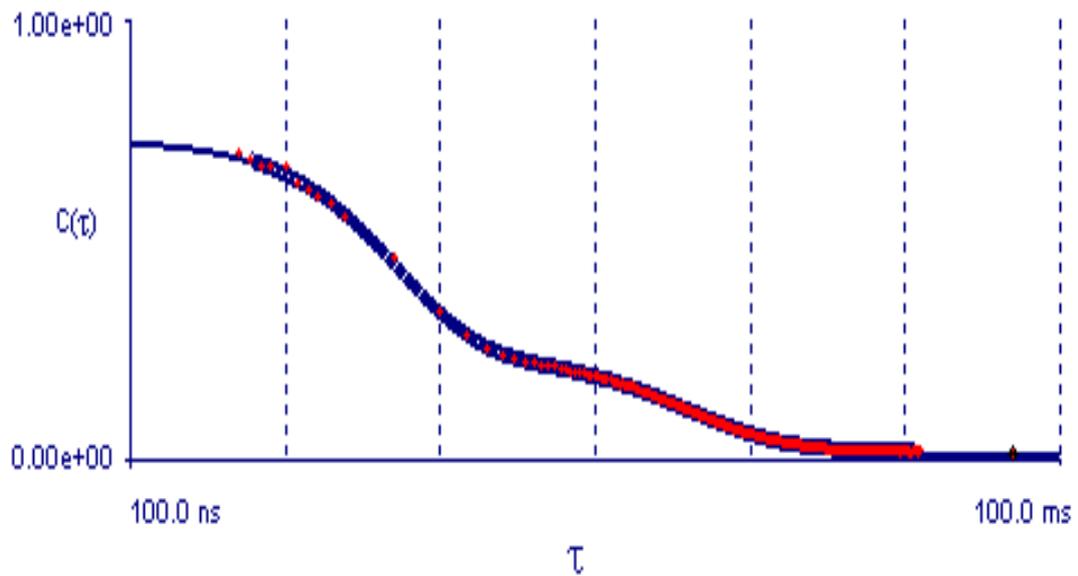


Fig. 2.16. ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione 113.6 mg/mL, analizzata con l'algoritmo NNLS.

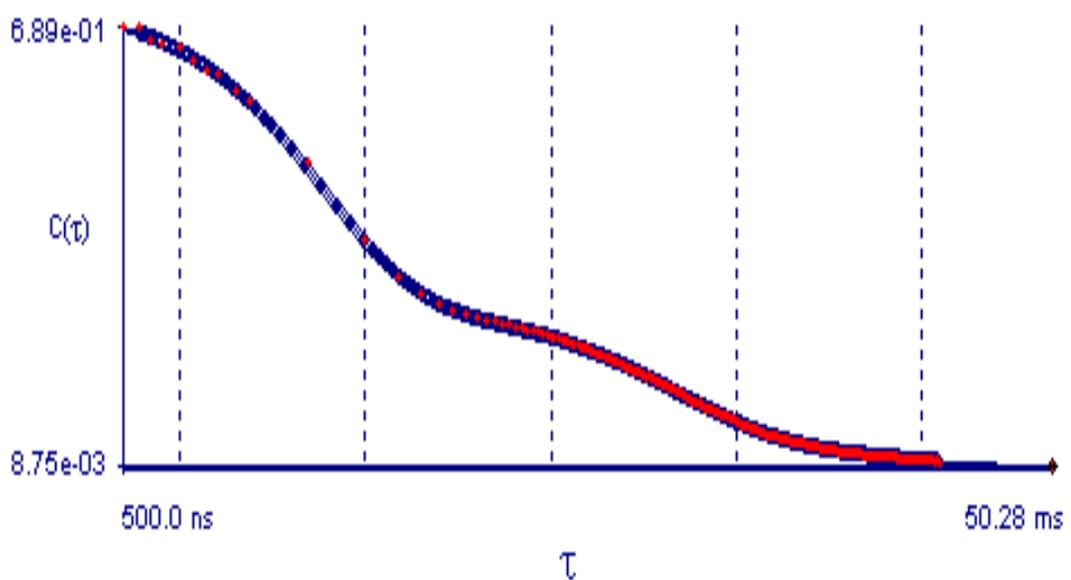


Fig. 2.17. ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione 163.6 mg/mL, analizzata con l'algoritmo NNLS.

Nella figura 2.18 è riportata la funzione di autocorrelazione acquisita per il campione a concentrazione di Lisozima 208.8 mg/mL che è stata analizzata con l'algoritmo CONTIN. Si continuano a vedere due distinte popolazioni e inoltre il secondo decadimento è ancora più accentuato rispetto a quello che si poteva notare nelle soluzioni con concentrazioni più basse. Infatti l'intensità di scattering relativa agli aggregati di proteina è salita dal 30% circa delle soluzioni 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL e 163.6 mg/mL a quasi il 40% del segnale totale. Il coefficiente di diffusione medio attribuito ai cluster è di $2.49 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ed il loro raggio idrodinamico medio è di 57 nm.

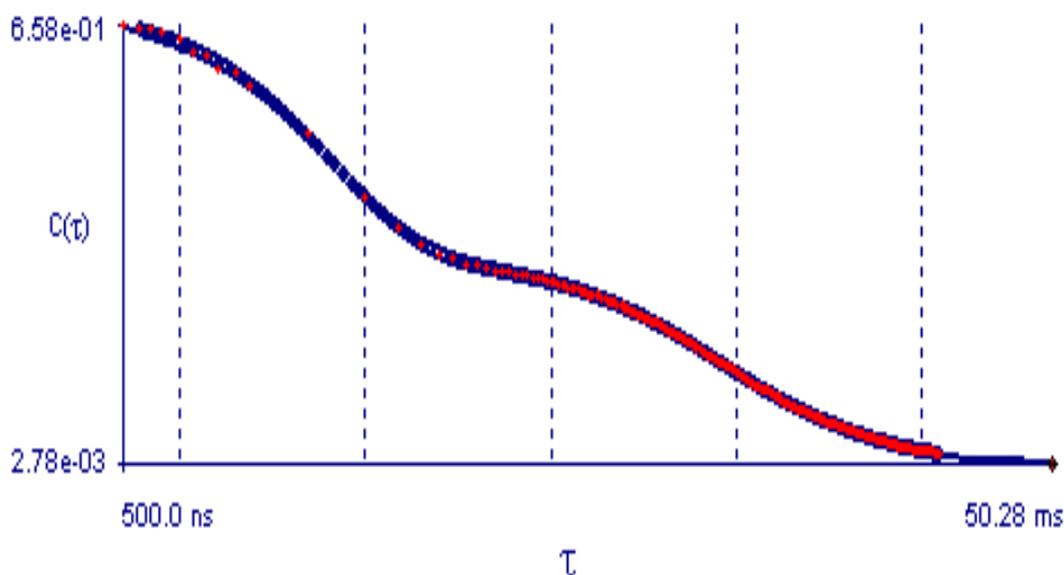


Fig. 2.18. ACF di scatterin acquisita per il campione 208.8 mg/mL, analizzata con CONTIN.

L'andamento delle funzioni di autocorrelazione dell'intensità di scattering acquisite per i campioni 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL e 208.8 mg/mL è riportato in figura 2.19. All'aumentare della concentrazione di Lisozima i due decadimenti relativi uno alla proteina in forma monomerica e l'altro agli aggregati si fanno sempre più evidenti. In particolar modo la loro separazione è molto marcata nel caso del campione 208.8 mg/mL e ciò corrisponde ad un contributo all'intensità di scattering totale che per i cluster arriva quasi al 40%.

I dati relativi ai campioni di concentrazione intermedia sono riassunti nelle tabelle che seguono: la 2.2 è relativa alla popolazione di proteina monomerica mentre la 2.3 agli aggregati di Lisozima.

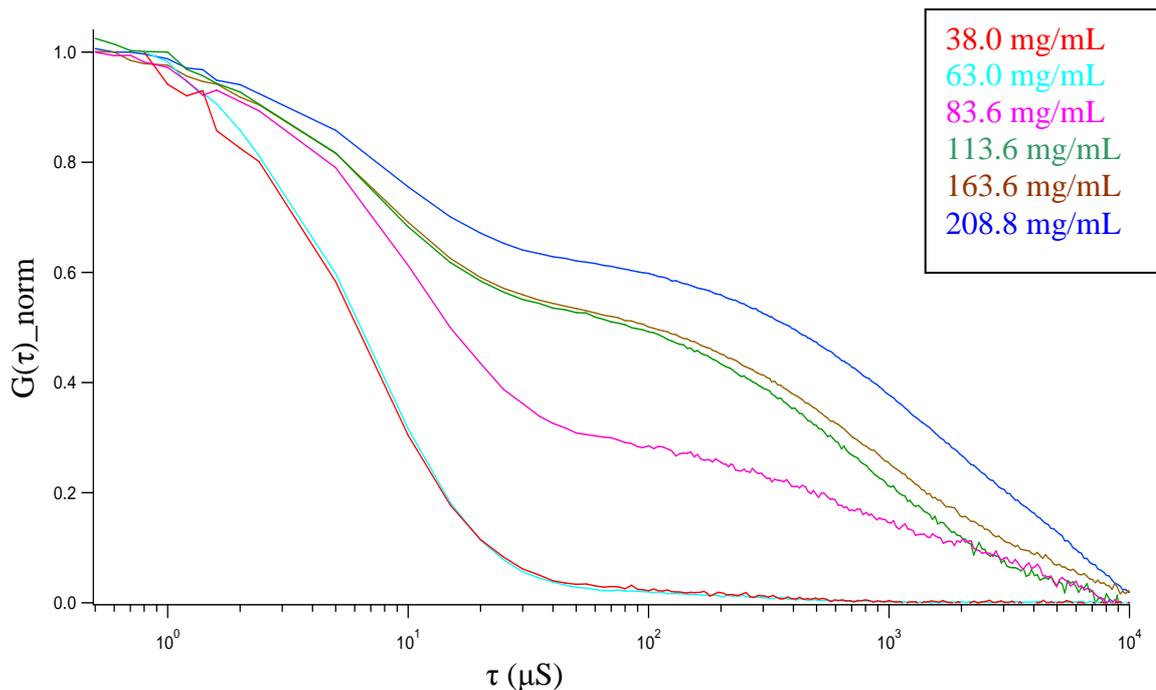


Fig 2.19. ACF dell'intensità di scattering acquisite per i campioni 38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL, 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL e 208.8 mg/mL e normalizzate fra 0 e 1.

Conc (mg/mL)	R_h (nm)	D medio (cm^2s^{-1})	Polid. D medio	Intensità (%)
83.6	1.0	$1.87 \cdot 10^{-6}$	$0.99- 2.85 \cdot 10^{-6}$	73
113.6*	0.6	$2.82 \cdot 10^{-6}$	$1.68- 4.85 \cdot 10^{-6}$	76
163.6*	0.6	$2.64 \cdot 10^{-6}$	$1.68- 4.85 \cdot 10^{-6}$	74
208.8	0.6	$2.54 \cdot 10^{-6}$	$1.68- 4.85 \cdot 10^{-6}$	62

Tabella 2.2. Dati ottenuti dalle ACF relative ai campioni di concentrazione intermedia con l'algoritmo CONTIN oppure con NNLS*. La prima colonna indica la concentrazione del campione, la seconda il raggio idrodinamico della proteina monomerica, ovvero della popolazione corrispondente al decadimento più veloce. La terza e la quarta colonna mostrano rispettivamente il coefficiente di diffusione medio dei monomeri e la sua polidispersità. L'ultima colonna indica la percentuale dell'intensità di scattering relativa alla proteina in forma monomerica.

Il raggio idrodinamico del Lisozima in forma monomerica risulta sottostimato rispetto ai valori ottenuti analizzando le ACF dei campioni 38.0 mg/mL e 63.0 mg/mL con il

metodo dei cumulanti. Quanto appena rilevato è da ricondursi ad una imprecisione dell'algoritmo di inversione di Laplace che è più affidabile in caso di particelle con R_h di almeno 2.5 nm [18,19].

Al di là del limite del metodo di Laplace, che consiste nella difficoltà di applicare il processo di inversione ad un numero finito di punti sperimentali, un'ulteriore spiegazione del differente comportamento che i monomeri di Lisozima hanno nei campioni concentrati piuttosto che in quelli diluiti è determinata dallo studio delle interazioni che si instaurano tra le particelle presenti in soluzione. All'aumentare della concentrazione di Lisozima alcune particelle interagiscono con forze di tipo attrattivo che determinano la formazione degli aggregati. Fra le altre particelle presenti in soluzione invece prevalgono interazioni repulsive che rendono maggiore il coefficiente di diffusione dei monomeri rispetto ai valori trovati nei campioni più diluiti. Come è stato già precisato, nella determinazione del raggio idrodinamico dei monomeri non si tiene conto delle interazioni repulsive che si instaurano fra le particelle, per cui quello che si ottiene dall'equazione di Stokes-Einstein è in realtà un 'raggio apparente'.

Le interazioni tra monomeri vengono trattate più approfonditamente nel paragrafo 2.4 nel quale si confrontano i risultati del DLS con quelli della FCS.

Conc (mg/mL)	R_h (nm)	D medio (cm^2s^{-1})	Polid. D medio	Intensità (%)
83.6	72	$2.55 \cdot 10^{-8}$	$1.42- 4.10 \cdot 10^{-8}$	27
113.6*	55	$3.17 \cdot 10^{-8}$	$1.42- 6.97 \cdot 10^{-8}$	24
163.6*	21	$7.54 \cdot 10^{-8}$	$1.42- 20.1 \cdot 10^{-8}$	26
208.8	57	$2.49 \cdot 10^{-8}$	$1.42- 4.10 \cdot 10^{-8}$	38

Tabella 2.3. Dati ottenuti dalle ACF relative ai campioni di concentrazione intermedia con l'algoritmo CONTIN oppure con NNLS*. La prima colonna indica la concentrazione del campione, la seconda il raggio idrodinamico degli aggregati di proteina. La terza e la quarta colonna mostrano rispettivamente il coefficiente di diffusione medio dei cluster e la sua polidispersità. L'ultima colonna indica la percentuale dell'intensità di scattering relativa alla popolazione di proteina in forma di aggregati.

La figura 2.20 riporta la ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione a concentrazione di Lisozima 246.4 mg/mL, analizzata con l'algoritmo CONTIN.

Il campione è più concentrato in assoluto e anche quello che presenta gli aggregati di Lisozima caratterizzati dal coefficiente di diffusione minore, $1.74 \cdot 10^{-8}$, e dal raggio idrodinamico maggiore, 75 nm. Inoltre più del 65% dell'intensità di scattering è dovuta proprio alla proteina presente in soluzione in forma di cluster.

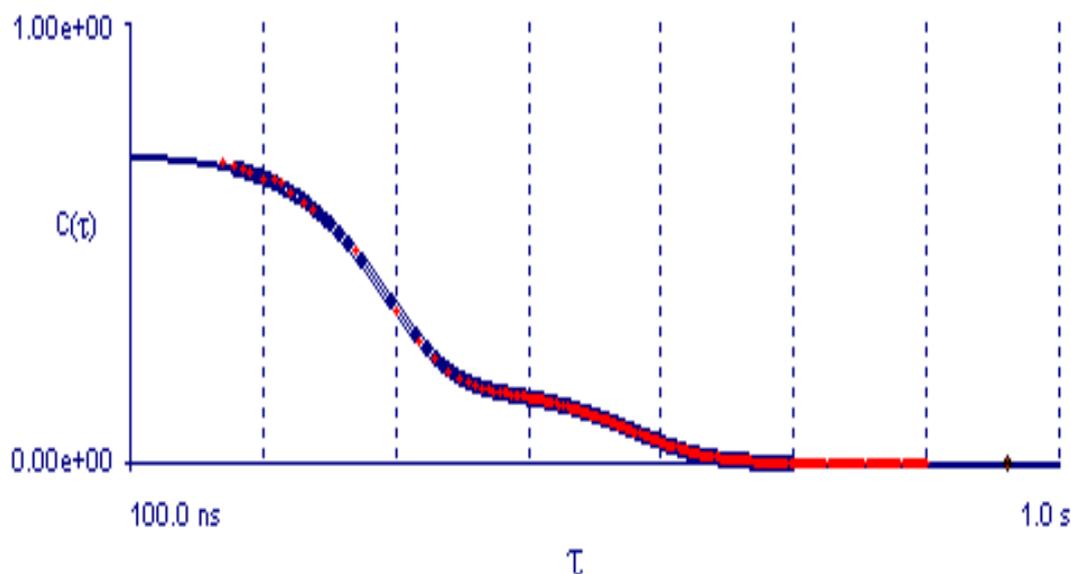


Fig. 2.20. ACF dell'intensità di scattering per il campione 246.4 mg/mL, analizzata con l'algoritmo CONTIN.

La tabella 2.3 riassume i dati relativi alle due popolazioni di Lisozima presenti nel campione.

Popolazione	R_h (nm)	D medio (cm^2s^{-1})	Polid. D medio	Intensità (%)
monomerica	0.7	$1.94 \cdot 10^{-6}$	$0.99- 2.89 \cdot 10^{-6}$	34
aggregati	75	$1.74 \cdot 10^{-8}$	$0.49- 7.01 \cdot 10^{-8}$	66

Tabella 2.3. Dati ottenuti dalla ACF dell'intensità di scattering per il campione 246.4 mg/mL, analizzata con CONTIN.

Nella figura 2.21 sono messe a confronto la ACF del campione più concentrato e quella della soluzione 38.0 mg/mL in modo da rendere più chiara la differenza tra un

decadimento unico tipico delle soluzioni che presentano solo particelle monomeriche di Lisozima e quello bimodale che invece caratterizza i campioni di concentrazione più elevata.

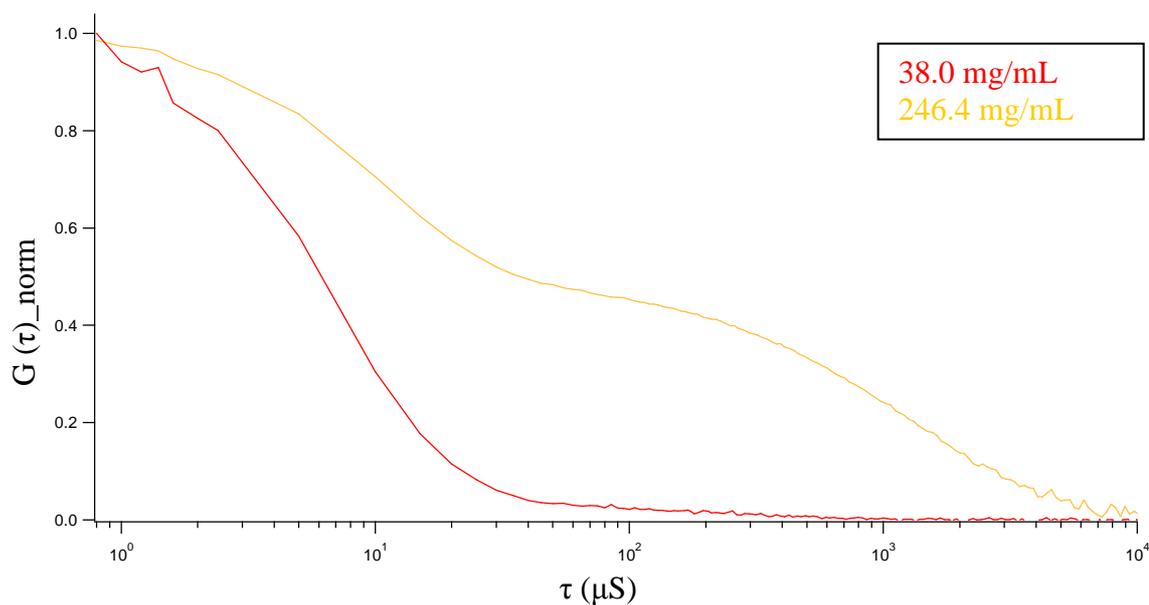


Fig. 2.21. Andamento dei punti sperimentali relativi alle misure sui campioni 38.0 mg/mL e 246.4 mg/mL. La curva è normalizzata tra 0 e 1.

La figura 2.22 mette a confronto l'andamento dei punti sperimentali relativi a tutti i campioni.

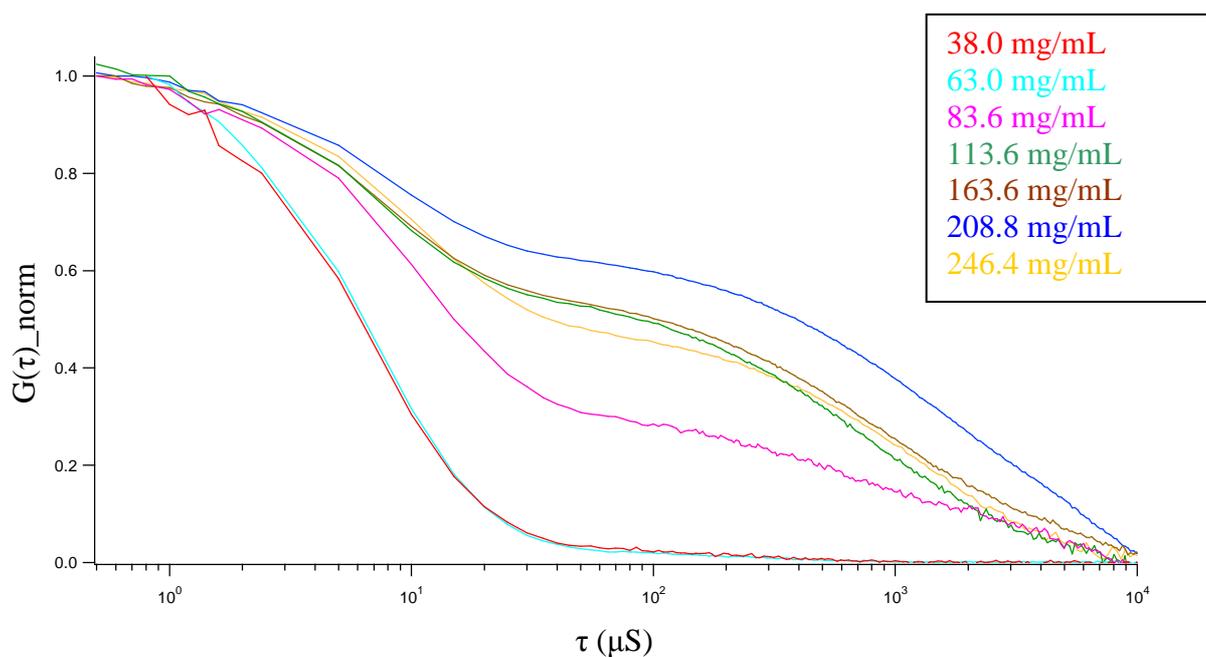


Fig. 2.22. Andamento dei punti sperimentali relativi alle misure sui campioni 38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL, 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL. Le curve sono normalizzate tra 0 e 1.

Sono evidenti due distinti trend: quello monomodale delle soluzioni 38.0 mg/mL e 63.0 mg/mL, in cui l'unico decadimento visibile si riconduce alla popolazione di monomeri caratterizzati da un coefficiente di diffusione di $10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (schema in figura 2.23 A); l'altro è quello bimodale che si riscontra in tutti i campioni più concentrati dal momento che al Lisozima in forma monomerica si affianca una seconda popolazione costituita dagli aggregati proteici (2.23 B)

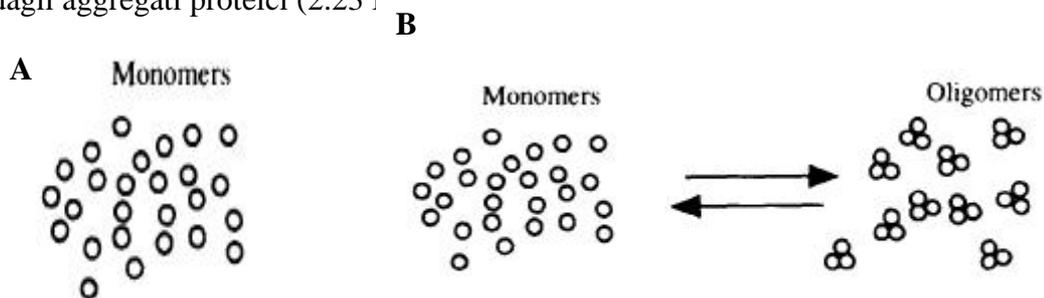


Fig. 2.23. Rappresentazione schematica A) dei campioni 38.0 mg/mL e 63.0 mg/mL; B) dei campioni 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL.

Gli aggregati di Lisozima hanno un coefficiente di diffusione medio dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ed il loro raggio idrodinamico oscilla tra i 21 nm e i 75 nm. La figura 2.24 mostra i valori dell'intensità di scattering in funzione del raggio idrodinamico di ciascuna popolazione per ognuno dei campioni sottoposti a misura.

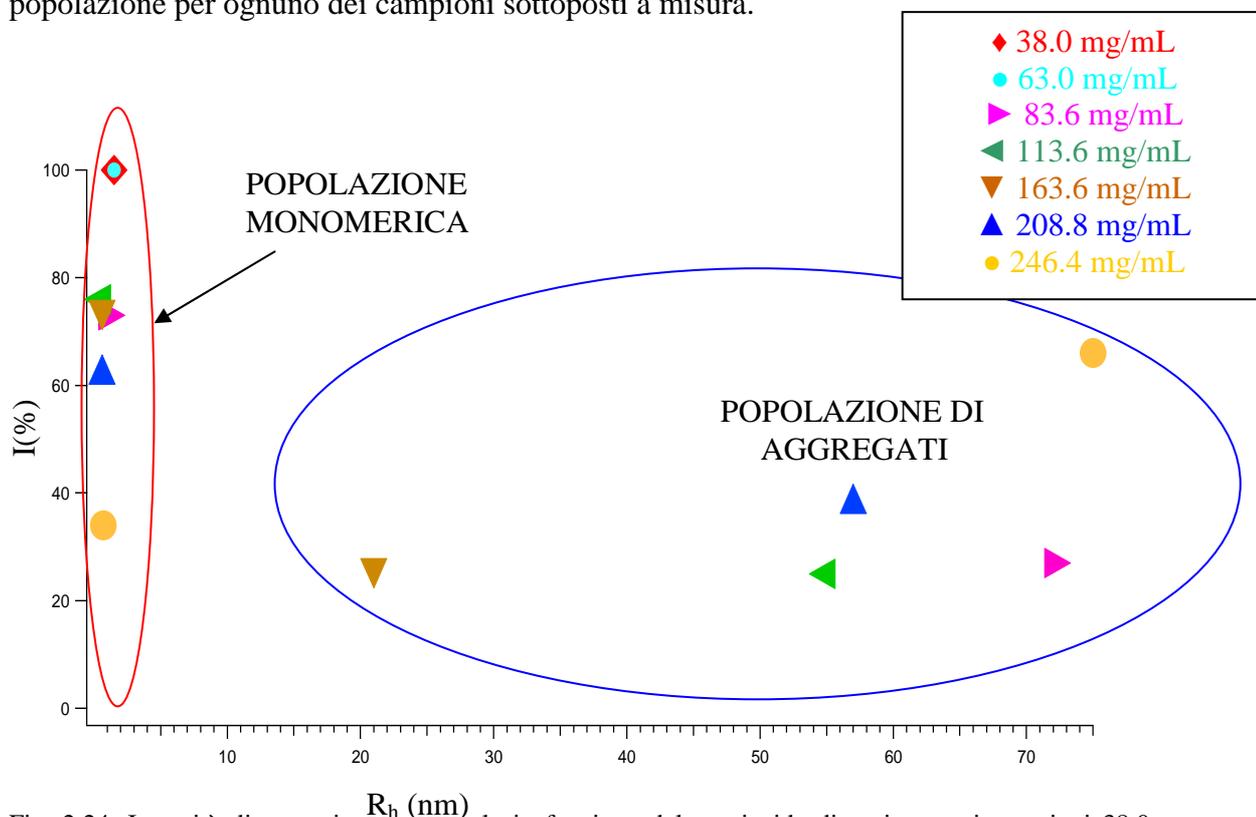


Fig. 2.24. Intensità di scattering percentuale in funzione del raggio idrodinamico per i campioni 38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL, 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL.

Il segnale di scattering relativo agli aggregati è più rilevante all'aumentare della concentrazione di Lisozima, come mostra la figura 2.25.

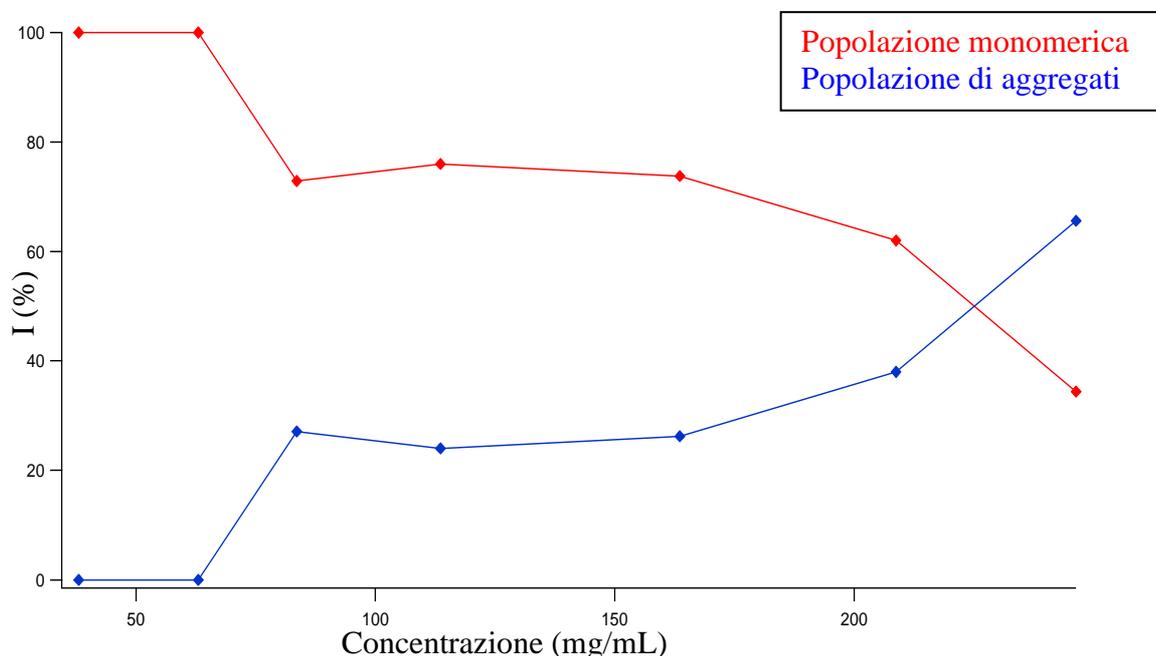


Fig. 2.25. Intensità di scattering dei campioni 38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL, 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL in funzione della concentrazione espressa in mg/mL.

E' interessante confrontare il campione 38.0 mg/mL con una soluzione della stessa concentrazione di Lisozima ma che sia stata ottenuta per diluizione da un campione più concentrato. Si indica con la sigla 40H una soluzione di Lisozima in acqua 36.0 mg/mL ricavata come è stato appena descritto. Lo scopo dell'esperimento è comprendere se gli aggregati di Lisozima una volta che si sono formati persistono in soluzione oppure se le proteine che interagivano si allontanano per effetto dell'aggiunta del solvente.

La figura 2.26 riporta la ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione 40H, analizzata con l'algoritmo CONTIN. La ACF presenta due distinti decadimenti quindi oltre al Lisozima in forma monomerica sono presenti in soluzione anche degli aggregati proteici, nonostante la concentrazione del campione sia così bassa.

I risultati del fitting della ACF relativa alla soluzione 40H evidenziano un'elevata polidispersità tanto che la popolazione monomerica e quella costituita dai cluster proteici contribuiscono in egual modo all'intensità di scattering globale. La diluizione non provoca la completa disgregazione degli aggregati proteici, i quali una volta che si sono formati sono piuttosto stabili [20].

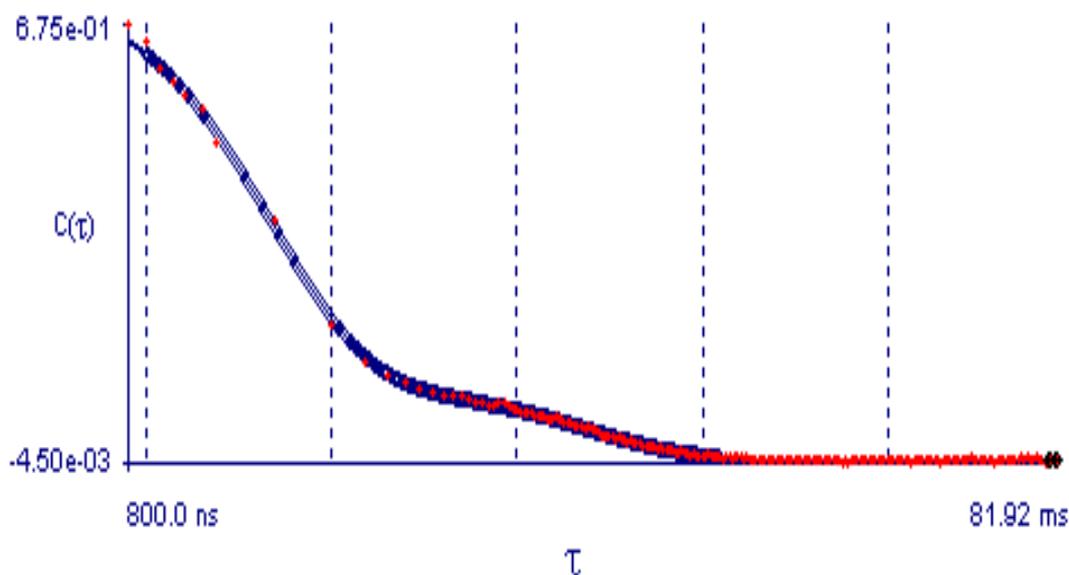


Fig. 2.26. ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione 40H (36.0 mg/mL), analizzata con l'algoritmo CONTIN.

La tabella 2.4 riassume i dati sperimentali.

Popolazione	R_h (nm)	D medio (cm^2s^{-1})	Polid. D medio	Intensità (%)
monomerica	0.7	$2.74 \cdot 10^{-6}$	$1.68- 4.85 \cdot 10^{-6}$	58
aggregati	52	$3.84 \cdot 10^{-8}$	$1.42-6.97 \cdot 10^{-8}$	42

Tabella 2.4. Dati ottenuti dalla ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione 40H (36.0 mg/mL), analizzata con CONTIN.

Per valutare l'influenza del pH sulla formazione dei cluster di Lisozima, sono stati misurati i valori relativi a tutti i campioni analizzati e dal momento che la soluzione 38.0 mg/mL è l'unica ad avere un pH di 3.3 mentre tutte le altre (compresa la 40H) oscillano tra 5.6 e 6, si può pensare che il processo di aggregazione risenta di questa variabile. Per chiarire tale aspetto è stato preparato un altro campione 36.0 mg/mL, sempre da una soluzione concentrata ma questa volta per diluire è stato utilizzato il solvente ottenuto dalla filtrazione con Amicon Bioseparator (Materiali e Metodi). Il pH di questa soluzione, che viene indicata con sigla 40A, è di 3.7. La funzione di autocorrelazione del campione 40A analizzata con l'algoritmo CONTIN, figura 2.27, ci

dà dei risultati molto simili a quelli relativi alla soluzione 40H. Alla popolazione monomerica con raggio idrodinamico di 0.7 nm circa se ne affianca una costituita da cluster con R_h pari a 50 nm e anche in questo caso l'intensità di scattering attribuita agli aggregati è molto elevata, quasi il 50% del segnale totale.

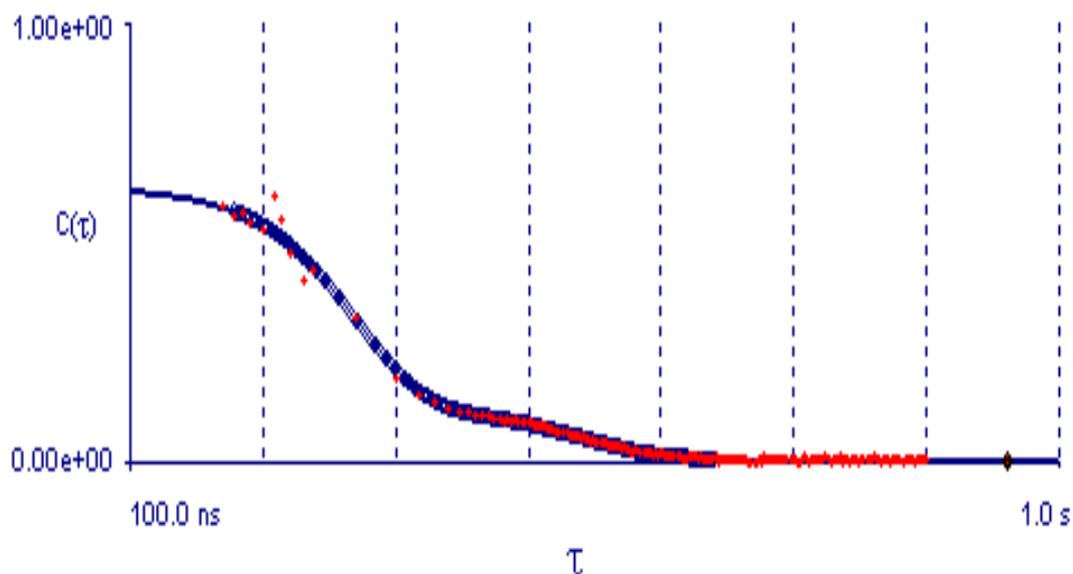


Fig. 2.27. ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione 40A (36.0 mg/mL), analizzata con l'algoritmo CONTIN.

L'elevata polidispersità di questo campione rende peggiore il fitting.

Popolazione	R_h (nm)	D medio (cm^2s^{-1})	Polid. D medio	Intensità (%)
monomerica	0.7	$2.80 \cdot 10^{-6}$	$0.99- 4.91 \cdot 10^{-6}$	55
aggregati	48	$4.19 \cdot 10^{-8}$	$0.84-11.9 \cdot 10^{-8}$	45

Tabella 2.5. Dati ottenuti dalla ACF dell'intensità di scattering acquisita per il campione 40A (36.0) mg/mL, analizzata con CONTIN.

I dati sperimentali relativi ai campioni 40H e 40A sono simili nonostante il primo abbia un pH compreso tra 5.6 e 6 mentre l'altro di 3.7, quindi il processo di aggregazione del Lisozima è guidato dalla concentrazione della proteina e non dal pH della soluzione.

Confrontando l'andamento dei punti sperimentali del campione 38.0 mg/mL e di quelli siglati come 40H e 40A si hanno delle evidenti differenze, figura 2.28.

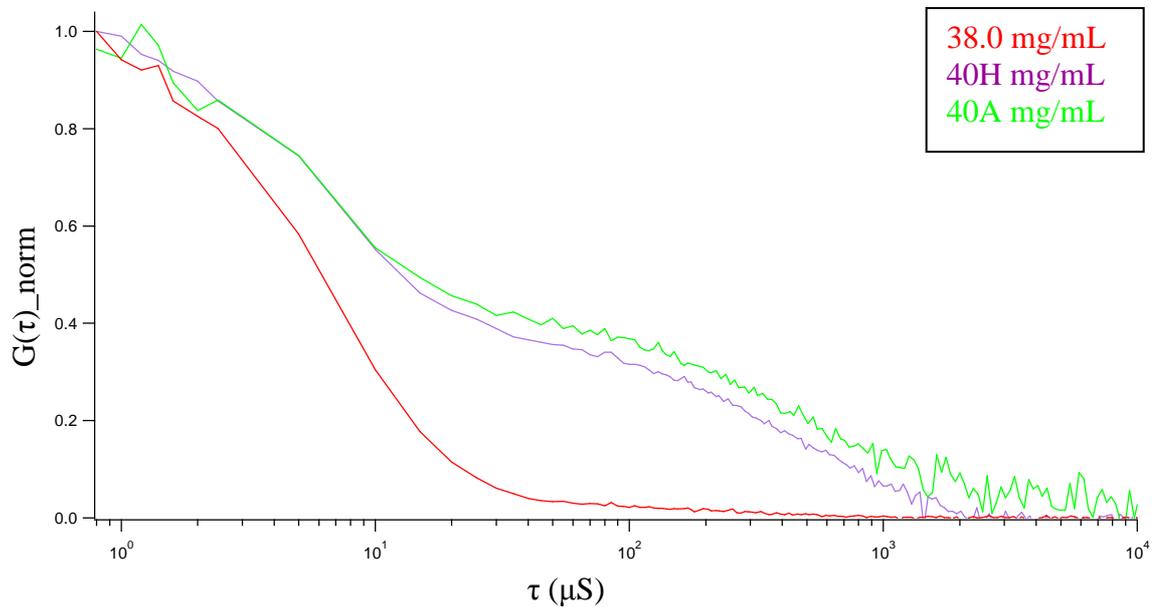


Fig. 2.28. Andamento dei punti sperimentali relativi alle misure sui campioni 38.0 mg/mL, 40H (36.0 mg/mL) e 40A (36.0 mg/mL). Le curve sono normalizzate tra 0 e 1.

Il decadimento delle funzioni di autocorrelazione del campione 38.0 mg/mL è monomodale mentre quello delle altre due soluzioni è bimodale.

2.3 Fluorescence Correlation Spectroscopy

La spettroscopia di correlazione della fluorescenza è una tecnica che permette di studiare la dinamica dei fluorofori o delle molecole marcate presenti nel sistema e di determinare il coefficiente di diffusione delle specie che si muovono in soluzione di un moto browniano. Nel corso della misura una radiazione monocromatica di 561 nm investe parte del campione definendone una porzione che prende il nome di volume confocale, figura 2.29. Un'appropriata funzione di autocorrelazione descrive le fluttuazioni che l'intensità di fluorescenza ha nel tempo. Esse sono dovute al fatto che le particelle fluorescenti presenti in soluzione entrano ed escono continuamente dal volume confocale. In base alla velocità delle fluttuazioni si determina il coefficiente di diffusione di tali particelle [21].

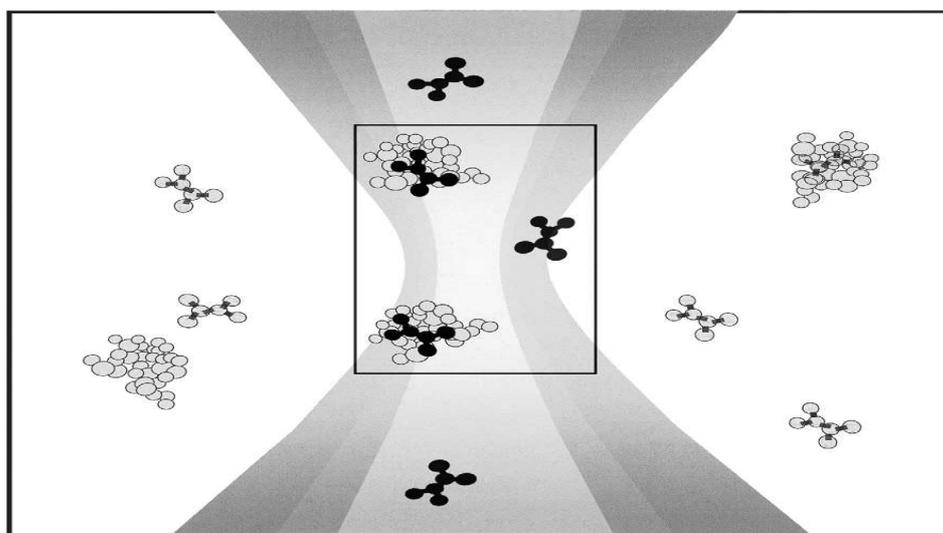


Fig. 2.29. Volume confocale definito dalla radiazione laser incidente sul campione; vengono rilevate solo le particelle che emettono nel volume confocale.

Ai fini dello studio di aggregazione delle proteine globulari la spettroscopia di correlazione della fluorescenza è un metodo molto valido per distinguere il Lisozima in forma monomerica dai cluster eventualmente presenti nella medesima soluzione.

Le misure sono state eseguite su campioni di Lisozima in acqua dalle concentrazioni di 40.4 mg/mL, 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL e 246.4 mg/mL ai quali è stata aggiunta la stessa quantità di una soluzione 2.34 mg/mL di Lisozima marcato con 5-Tamra (Materiali e Metodi).

La figura 2.30 riporta la media di cinque ACF dell'intensità di fluorescenza acquisite per il campione a concentrazione di Lisozima 40.4 mg/mL, le barre verticali indicano la deviazione standard della singola misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting. L'equazione usata per analizzare i dati è la seguente:

$$G(\tau) = \frac{1}{\pi^{3/2} \langle c \rangle w_0^2 z_0} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2}$$

dove $\langle c \rangle$ è la concentrazione nanomolare della specie fluorescente, w_0 e z_0 sono i parametri laterale ed assiale che definiscono il volume focale e D è il coefficiente di diffusione. Essa rappresenta il moto in tre dimensioni puramente browniano di un'unica specie fluorescente caratterizzata da un determinato coefficiente di diffusione.

Dal fitting della media di cinque misure si determina il valore del coefficiente di diffusione del Lisozima monomero presente in soluzione, ovvero $1.02 \pm 0.03 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

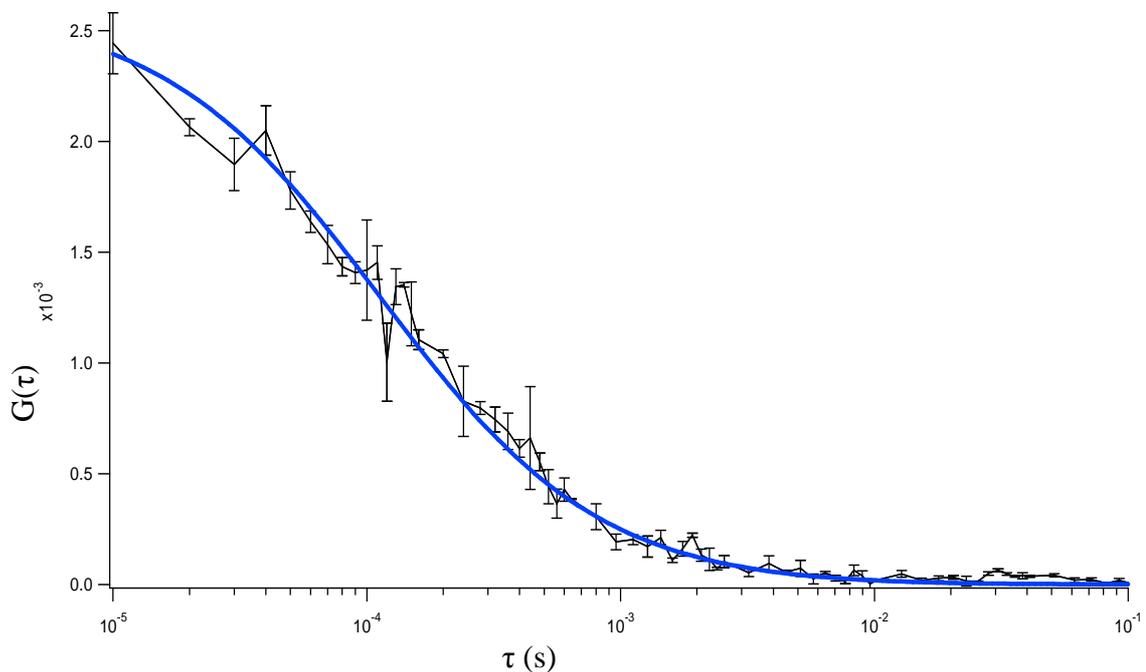


Fig. 2.30. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sul campione a concentrazione di Lisozima 40.4 mg/mL. Le barre verticali indicano la deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting (modello con un unico coefficiente di diffusione).

La ACF del campione presenta un decadimento unico, infatti a basse concentrazioni il Lisozima marcato con 5-Tamra è presente in soluzione esclusivamente in forma monomerica.

Le figure 2.31, 2.32 e 2.33 riportano le ACF dell'intensità di fluorescenza acquisite per i campioni a concentrazione di Lisozima 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL e 163.6 mg/mL. Per nessuna delle tre soluzioni risulta adeguata l'equazione di $G(\tau)$ con un unico coefficiente di diffusione che è stata utilizzata per l'analisi della ACF relativa al campione più diluito. E' necessario quindi servirsi di un modello per il fitting dei dati sperimentali che contenga due coefficienti di diffusione: uno associato alle molecole di Lisozima presenti in forma monomerica ed un altro, più piccolo, che è da ricondursi ai cluster di proteina i quali essendo di dimensioni maggiori rispetto ai monomeri si muovono più lentamente. L'equazione utilizzata è la seguente:

$$G(\tau) = \frac{1}{\pi^{3/2} \langle c \rangle w_0^2 z_0} \left[f_1 \left(1 + \frac{4D_1\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D_1\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} + (1-f_1) \left(1 + \frac{4D_2\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D_2\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \right]$$

D_1 è il coefficiente di diffusione del Lisozima in forma monomerica e D_2 si riferisce agli aggregati della proteina. f_1 è la frazione di incidenza dei monomeri e $(1-f_1)$ quella dei cluster presenti nello stesso campione.

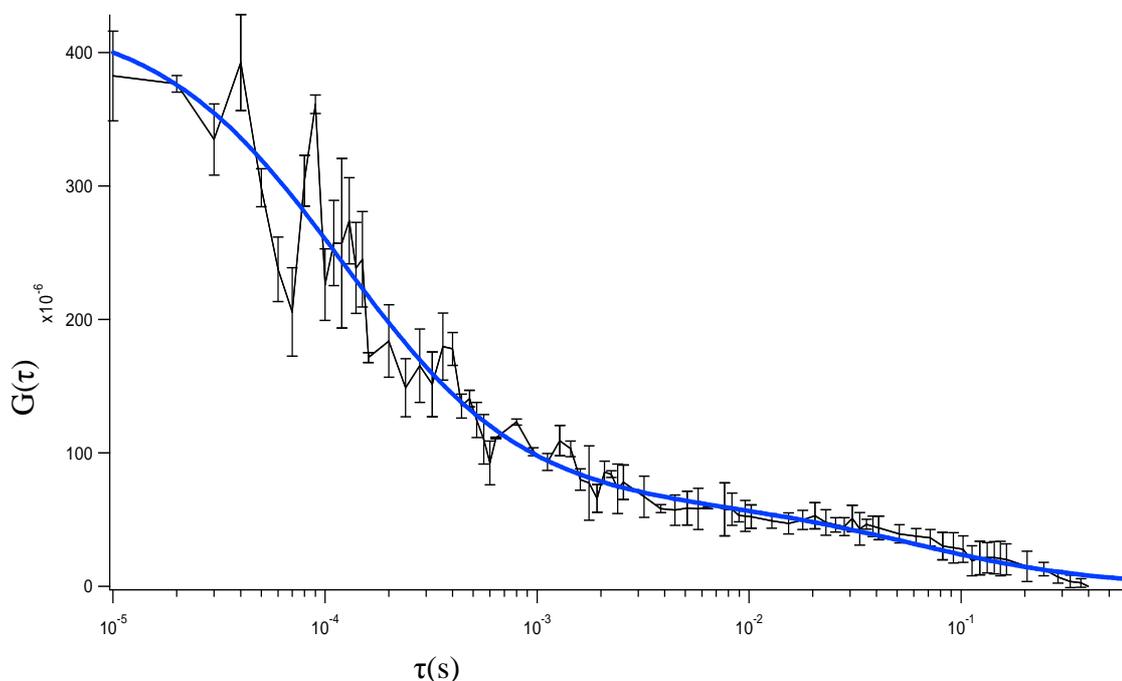


Fig. 2.31. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sul campione a concentrazione di Lisozima 63.0 mg/mL. Le barre verticali indicano la deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting (modello con due distinti coefficienti di diffusione).

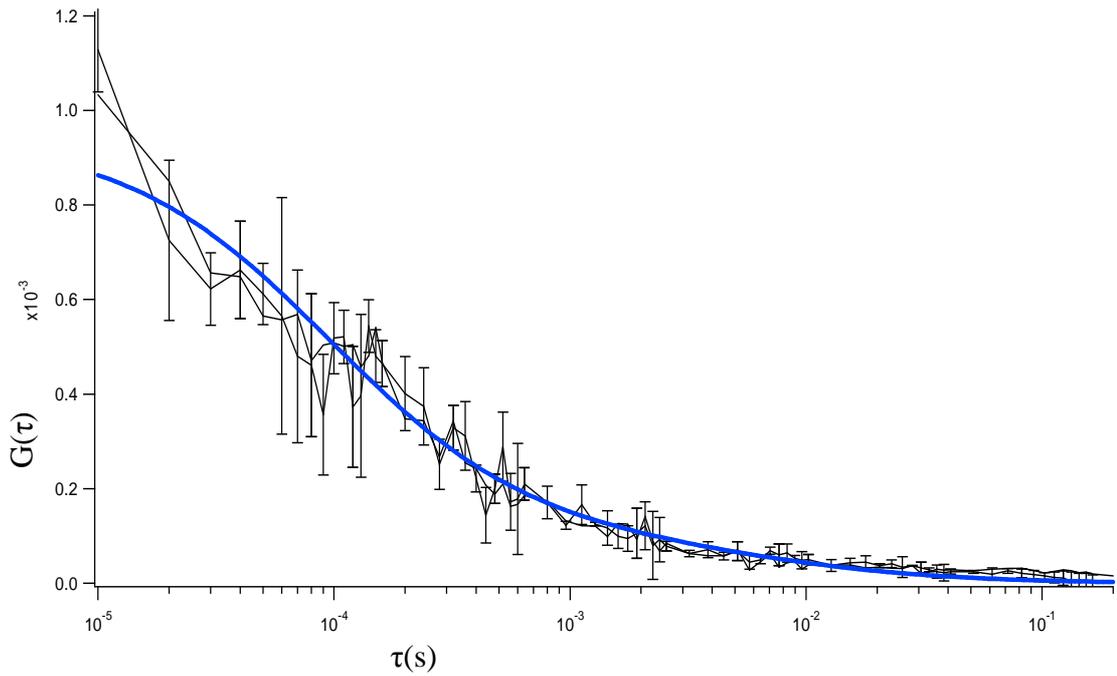


Fig. 2.32. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sul campione a concentrazione di Lisozima 113.6 mg/mL. Le barre verticali indicano la deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting (modello con due distinti coefficienti di diffusione).

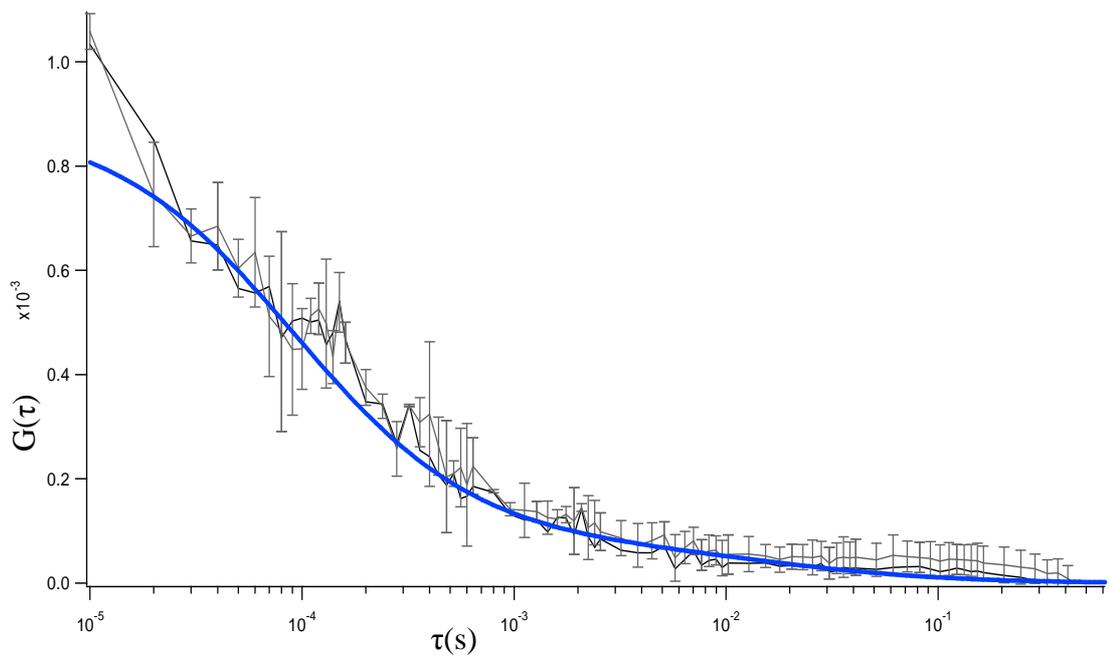


Fig. 2.33. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sul campione a concentrazione di Lisozima 163.6 mg/mL. Le barre verticali indicano la deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting (modello con due distinti coefficienti di diffusione).

Il fatto che il modello per il fitting con due distinti coefficienti di diffusione approssimi bene l'andamento dei punti sperimentali dei campioni a concentrazione di Lisozima intermedia costituisce una prova della presenza degli aggregati proteici in soluzione. I due decadimenti non sono molto marcati perchè i cluster rilevati nel campione sono pochi. La tabella 2.5 mostra i dati relativi alle soluzioni di concentrazione intermedia. La prima colonna mostra la soluzione a cui si fa riferimento, la seconda il coefficiente di diffusione del Lisozima in forma monomeric, la terza la frazione di incidenza che la prima popolazione ha sulla proteina totale e le ultime due colonne sono riferite ai cluster che si sono costituiti.

Concentrazione (mg/mL)	D_1 (cm^2s^{-1})	f_1	D_2 (cm^2s^{-1})	f_2
63.0	$3.54 \pm 0.50 \cdot 10^{-6}$	0.84	$1.0 \pm 0.37 \cdot 10^{-8}$	0.16
113.6	$3.50 \pm 0.69 \cdot 10^{-6}$	0.90	$3.01 \pm 2.71 \cdot 10^{-8}$	0.10
163.6	$3.92 \pm 0.40 \cdot 10^{-6}$	0.93	$1.86 \pm 1.23 \cdot 10^{-8}$	0.14

Tabella 2.5. Dati sperimentali relativi ai campioni di concentrazione intermedia. La prima colonna mostra la concentrazione del campione in mg/mL, la seconda il coefficiente di diffusione del Lisozima in forma monomeric espresso in cm^2s^{-1} , la terza la frazione di incidenza che la prima popolazione ha sulla proteina totale e le ultime due colonne sono riferite ai cluster che si sono costituiti.

Il coefficiente di diffusione della proteina in forma monomeric è compreso tra $2.81 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e $4.32 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e la percentuale di incidenza di questa prima popolazione sul Lisozima totale varia dall'84% al 93%. Gli aggregati hanno, invece, un D dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e costituiscono al massimo il 16% della proteina presente in soluzione. Nella figura 2.34 sono riportate le ACF dell'intensità di fluorescenza del campione meno concentrato, delle soluzioni di concentrazione intermedia ed i relativi fitting. Le funzioni di autocorrelazione dei campioni 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL e 163.6 mg/mL sono sovrapponibili per cui nel grafico compaiono solo due curve.

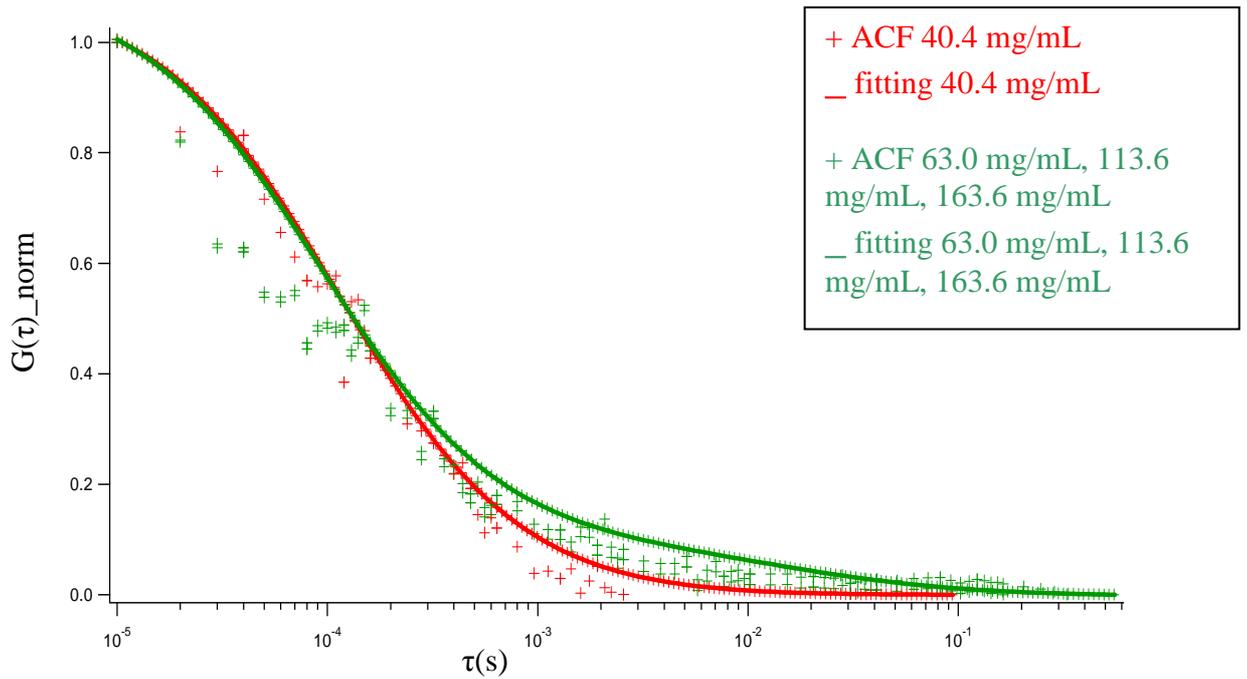


Fig. 2.34. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sui campione a concentrazione di Lisozima 40.4 mg/mL, 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL e 163.6 mg/mL e relativi fitting. Le curve sono normalizzate tra 0 e 1.

La curva relativa al campione di Lisozima a più bassa concentrazione presenta un decadimento monomodale, mentre in quella relativa alle soluzioni di concentrazione intermedia si distinguono due andamenti diversi. Infatti aumentando la concentrazione della proteina il volume confocale non è più attraversato esclusivamente da particelle monomeriche ma anche dagli aggregati proteici che hanno una mobilità minore rispetto alle particelle libere.

La figura 2.35 riporta la media di cinque ACF dell'intensità di fluorescenza acquisite per il campione a concentrazione di Lisozima 246.4 mg/mL.

La popolazione costituita dagli aggregati di Lisozima presenti in soluzione diviene più influente sul sistema. Infatti la percentuale di incidenza dei cluster sale dal 16%, riscontrato come valore massimo nei campioni intermedi, al 36%. Il coefficiente di diffusione dei monomeri è di $1.00 \pm 0.04 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, mentre quello degli aggregati è compreso tra $7.40 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1.66 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

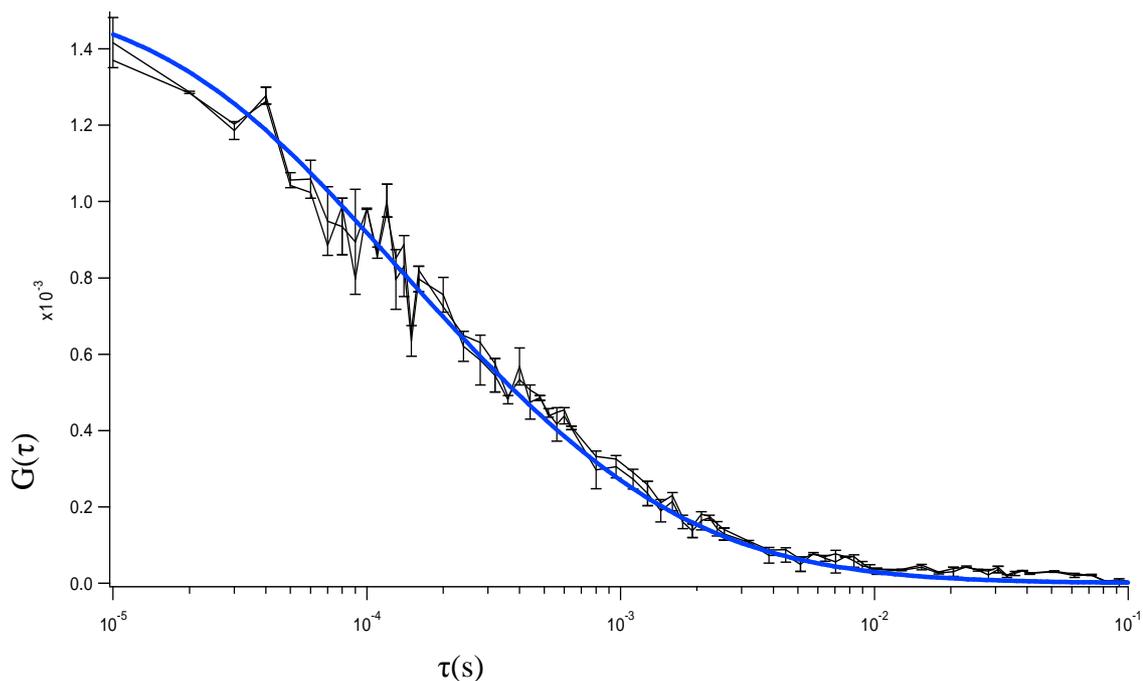


Fig. 2.35. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sul campione a concentrazione di Lisozima 246.4 mg/mL. Le barre verticali indicano la deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting (modello con due distinti coefficienti di diffusione).

Sovrapponendo le ACF dell'intensità di fluorescenza acquisite per tutti i campioni ed i relativi fitting si notano tre distinti trend, figura 2.36.

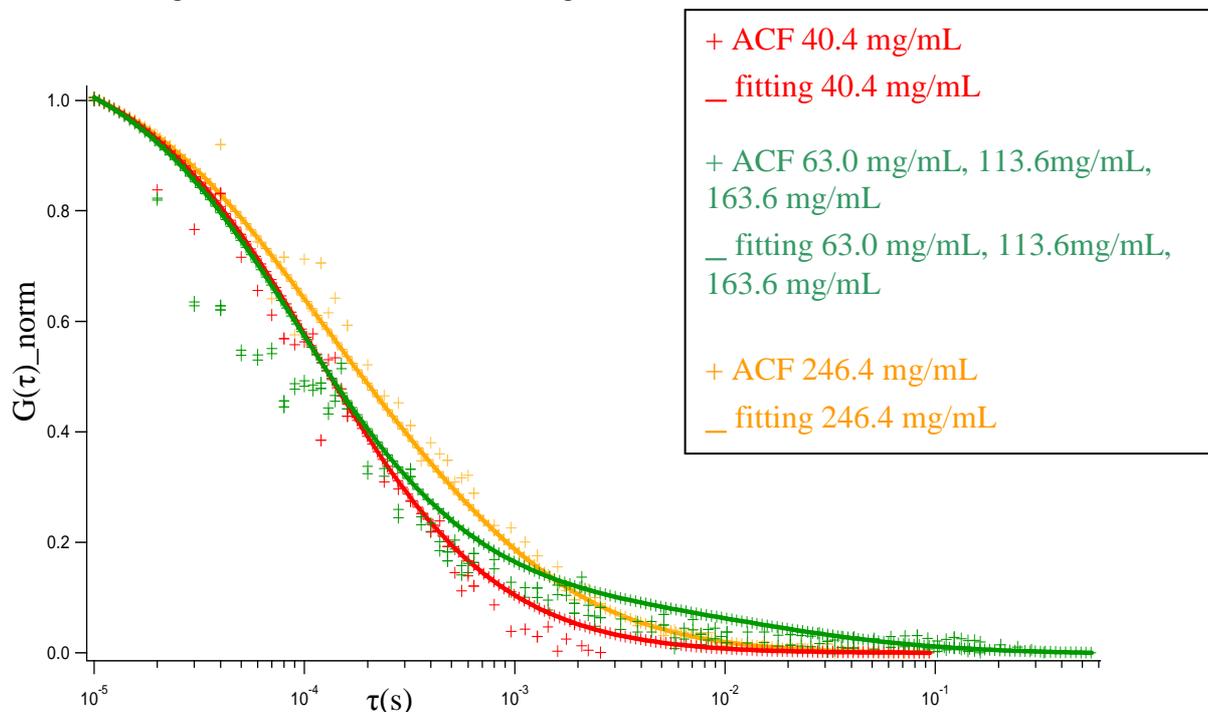


Fig. 2.36. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sui campione a concentrazione di Lisozima 40.4 mg/mL, 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL e 246.4 mg/mL e relativi fitting. Le curve sono normalizzate tra 0 e 1.

La curva di colore giallo, che rappresenta il fitting dei punti raccolti dalle misure sul campione 246.4 mg/mL, mostra tempi di decadimento superiori a quelli relativi alla soluzione 40.4 mg/mL e ha una forma che si distingue facilmente da quella della curva di colore verde, associata ai campioni 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL e 163.6 mg/mL.

In alcuni casi i risultati ottenuti dalle misure sono affetti da un errore non trascurabile, questo tuttavia non inficia la validità dell'esperimento. Infatti anche se si ricava un valore numerico del coefficiente di diffusione che ricade in un range talvolta ampio, si distinguono senza difficoltà le proteine in forma monomeriche dagli aggregati e lo scopo di questo lavoro di tesi è studiare l'aggregazione del Lisozima, preso come prototipo per le proteine globulari, rilevando la presenza o la mancanza dei cluster in soluzioni di diverse concentrazioni. La figura 2.37 mostra l'incidenza che ciascuna popolazione ha sul sistema totale. Leggendo il grafico da sinistra si nota che le particelle con coefficiente di diffusione dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ hanno una frazione di incidenza sul sistema che è sempre inferiore a 0.4.

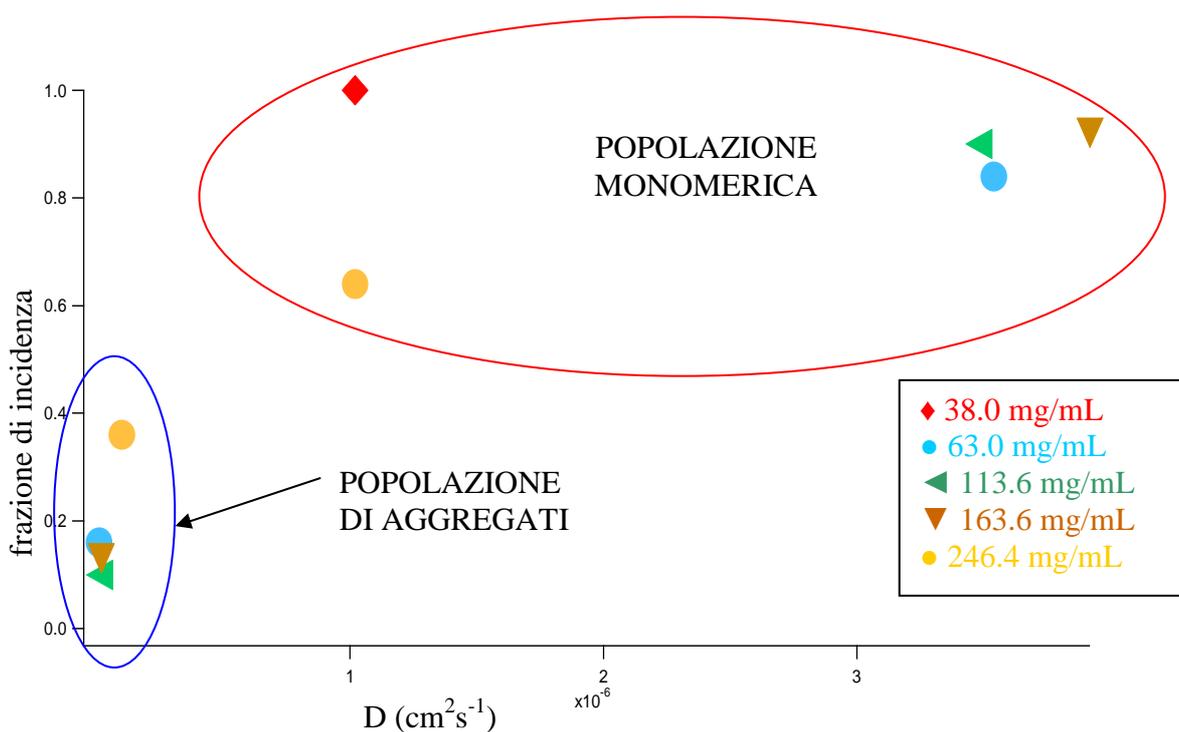


Fig. 2.37. Frazione di incidenza dei monomeri e degli aggregati sul sistema totale. Gli aggregati hanno un D dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, mentre la proteina monomeriche di $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

In soluzioni diluite di Lisozima, come la 40.4 mg/mL, la proteina è presente esclusivamente in forma monomeriche mentre nei campioni la cui concentrazione ricade nell'intervallo compreso tra 63.0 mg/mL e 163.6 mg/mL gli aggregati arrivano anche a

costituire il 20% del sistema totale. In soluzioni molto concentrate (246.4 mg/mL) l'incidenza dei cluster raggiunge quasi al 40%, figura 2.38.

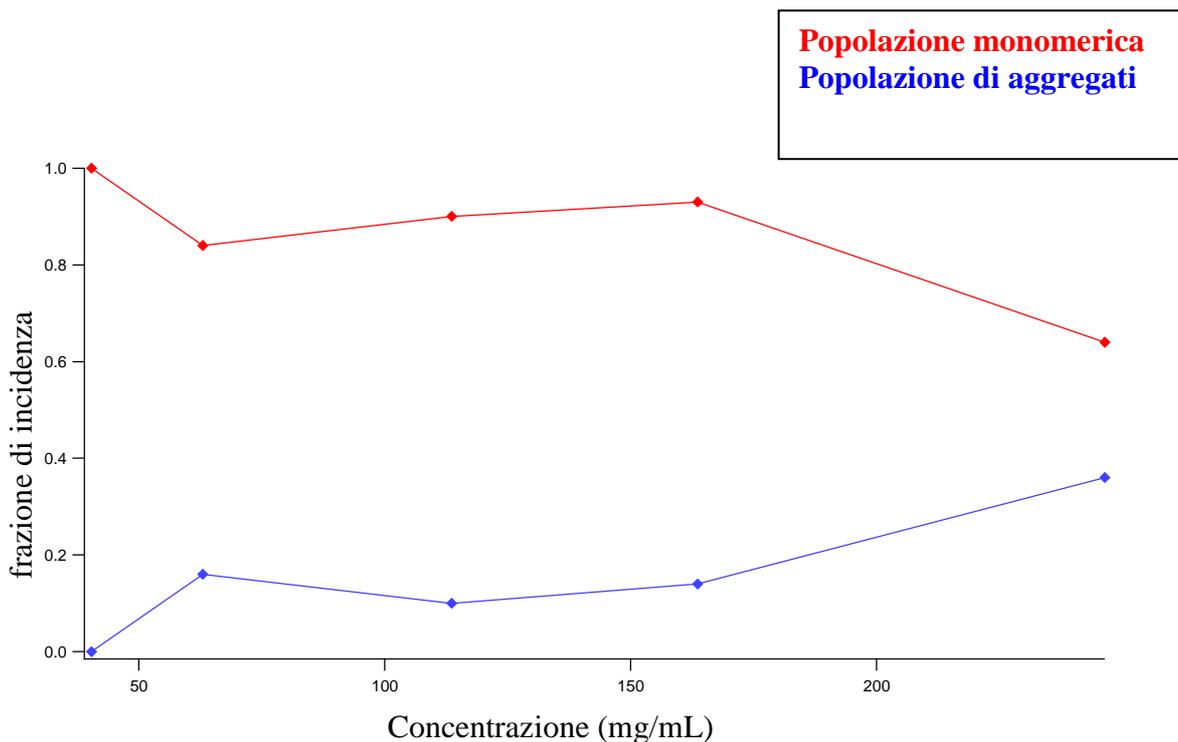


Fig. 2.38. Incidenza che la proteina monomeric e gli aggregati hanno sul sistema al variare della concentrazione dei campioni.

Analogamente a quanto effettuato nelle misure di DLS, per verificare anche tramite FCS che il pH non influisse nel processo di aggregazione della proteina e per valutare la stabilità dei cluster rispetto alla diluizione, sono state effettuate delle analisi su due campioni di concentrazione 40.0 mg/mL ottenuti diluendo la soluzione di 246.4 mg/mL (Materiali e Metodi). Uno dei due campioni aveva un pH pari a 6 e viene siglato come 40H, l'altro pari a 3.7 e viene indicato con la dicitura 40A. Le figure 2.39 e 2.40 riportano la media di cinque ACF dell'intensità di fluorescenza acquisite per i campioni 40H e 40A.

I dati sperimentali che risultano analizzando le due soluzioni sono molto simili: la proteina è presente quasi esclusivamente in forma monomeric, infatti la percentuale di incidenza di questa prima popolazione oscilla dal 99% del campione 40H al 94% del 40A. Il coefficiente di diffusione del Lisozima libero è rispettivamente $1.27 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1.34 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; entrambi i valori sono affetti da un errore piccolo. Gli aggregati sono poco influenti e il loro coefficiente di diffusione si determina con minore accuratezza, tuttavia è dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

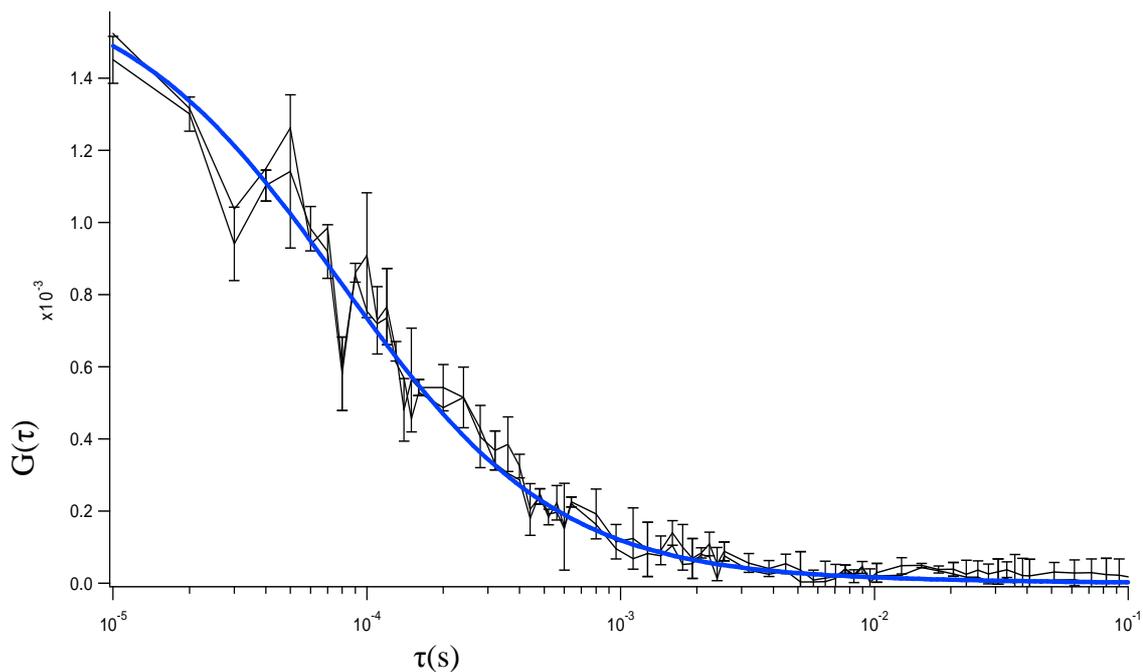


Fig. 2.39. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sul campione a concentrazione di Lisozima 40H (40.0 mg/mL). Le barre verticali indicano la deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting (modello con due distinti coefficienti di diffusione).

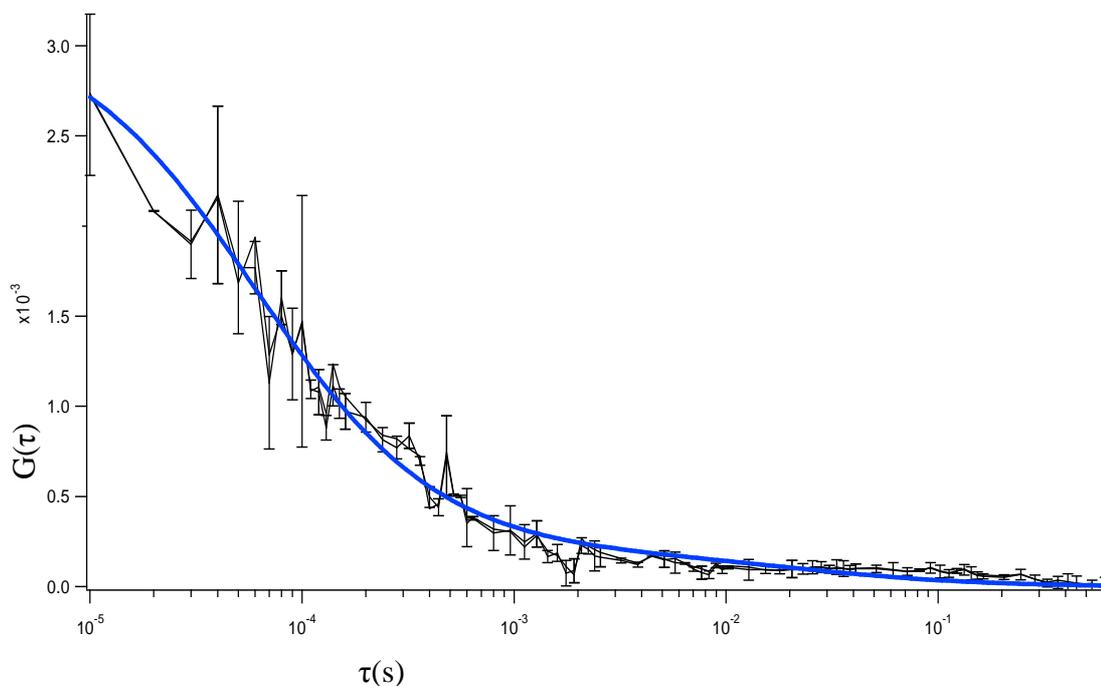


Fig. 2.40. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sul campione a concentrazione di Lisozima 40A (40.0 mg/mL). Le barre verticali indicano la deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media e la curva di colore blu mostra il fitting (modello con due distinti coefficienti di diffusione).

I dati ottenuti dal fitting sono riassunti nella tabella 2.6. La prima colonna indica il campione sottoposto alla misura. La seconda mostra il valore del coefficiente di diffusione della popolazione costituita dal Lisozima presente in soluzione in forma monomerica. Nella terza colonna è riportata la frazione di incidenza della proteina libera sul sistema. Le colonne a fianco di quelle appena citate descrivono invece la seconda popolazione di Lisozima, ovvero quella costituita dagli aggregati della proteina.

Campione	D_1 (cm^2s^{-1})	f_1	D_2 (cm^2s^{-1})	f_2
40H	$1.27 \pm 0.12 \cdot 10^{-6}$	0.99	$1.00 \pm 3.41 \cdot 10^{-8}$	0.01
40A	$1.34 \pm 0.14 \cdot 10^{-6}$	0.94	$1.00 \pm 0.72 \cdot 10^{-8}$	0.06

Tabella 2.6. Dati sperimentali relativi alle soluzioni di concentrazione 40 mg/mL ottenute per diluizione dal campione 246.4 mg/mL. La prima colonna indica il campione sul quale è stata effettuata la misura, la seconda il coefficiente di diffusione del Lisozima in forma monomerica espresso in cm^2s^{-1} , la terza la frazione di incidenza che la prima popolazione ha sulla proteina totale e le ultime due colonne sono riferite ai cluster che si sono formati.

La diluizione con acqua provoca l'allontanamento delle proteine anche se i cluster presenti in soluzione non si sciolgono completamente. Uno dei vantaggi della spettroscopia a correlazione della fluorescenza sta nel fatto che le frazioni di incidenza di ciascuna popolazione sul sistema non vengono determinate in base a dei parametri che dipendono dalle dimensioni delle particelle, per cui è attendibile il dato che solo il 6% (al massimo) delle proteine in soluzione interagiscono in modo associativo.

Non si riscontra un'evidente differenza tra il campione a pH 6 e quello più acido, infatti le funzioni di autocorrelazione di entrambi sono molto simili a quella relativa alla soluzione 40.4 mg/mL, figura 2.41.

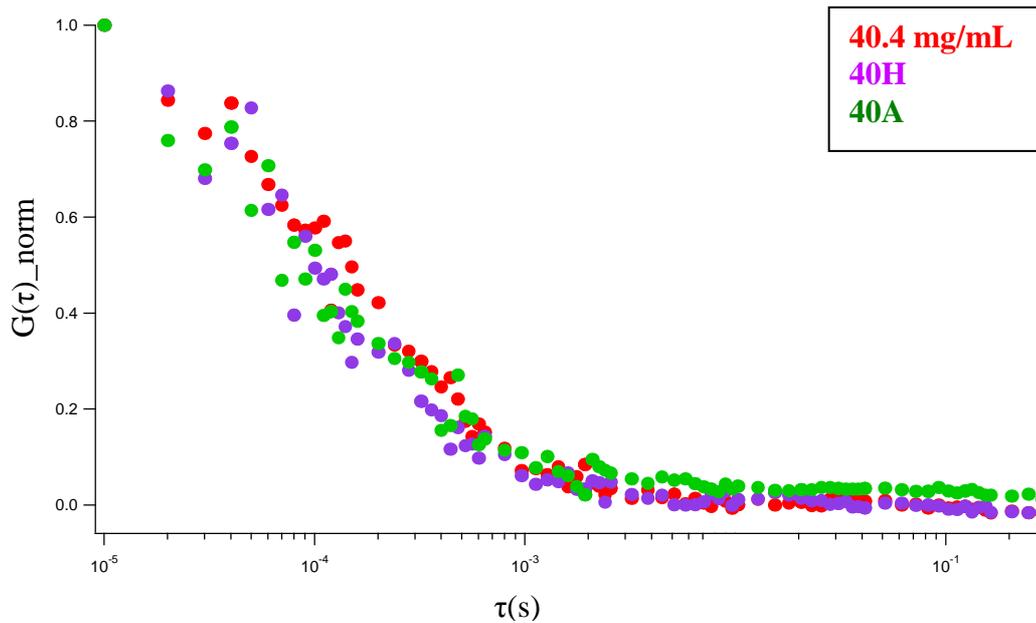


Fig. 2.41. ACF dell'intensità di fluorescenza media di cinque misure effettuate sui campioni a concentrazione di Lisozima 40.4 mg/mL, 40H (40.0 mg/mL) e 40A (40.0 mg/mL). I valori sono normalizzati tra 0 e 1.

Il decadimento relativo ai campioni 40H e 40A è approssimativamente monomodale, anche se la funzione di autocorrelazione mostra due distinti coefficienti di autocorrelazione. Questo risultato si riconduce al fatto che la popolazione costituita dagli aggregati costituisce una minima parte del sistema.

2.4 Confronto tra DLS ed FCS

Allo scopo di approfondire le informazioni ottenibili con le tecniche sperimentali utilizzate in questo lavoro di tesi e per uno sguardo sinottico che comprenda tutti i dati sperimentali raccolti, è necessario confrontare la spettroscopia a correlazione di fotoni con la spettroscopia di correlazione della fluorescenza e i risultati apportati da ciascuna delle due tecniche.

Il DLS è utilizzato dagli anni '60 del secolo scorso e ormai è un metodo affermato per la determinazione delle dimensioni delle particelle presenti in un campione [22]. Nel corso della misura una radiazione monocromatica attraversa la soluzione e interferendo con le particelle presenti viene diffusa.

La FCS nasce come tecnica spettroscopica all'inizio del 1970. Allora era adibita unicamente allo studio di fenomeni di rilassamento: si perturbava il sistema variando la temperatura o la pressione e si analizzavano i processi cinetici con i quali esso tornava nelle condizioni di equilibrio. Solo dopo diversi anni di ricerche gli scienziati Magde e Watt riuscirono ad applicare l'FCS con successo anche a soluzioni che si trovassero già all'equilibrio. In quest'ultimo caso durante la misura una radiazione monocromatica investe parte del campione preso in esame, che deve contenere al suo interno specie fluorescenti. La radiazione definisce il volume confocale e all'interno di esso si rilevano le fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza in funzione del tempo [23].

Entrambe le spettroscopie studiano le proprietà cinetiche di una soluzione in cui le particelle si muovono di un moto browniano. Misurando le fluttuazioni dell'intensità di luce diffusa (DLS) o della fluorescenza (FCS) e servendosi di appropriate funzioni di autocorrelazione si determina il coefficiente di diffusione di tali particelle e la complessità del sistema. E' necessario soffermarsi sulla diversità dei coefficienti di diffusione ai quali si perviene dalle misure di DLS e di FCS. Nel primo caso D è un 'mutual diffusion coefficient', determinato da fluttuazioni di densità nel volume di scattering. Esso indica quanto velocemente una particella arriva in una data posizione spostandone altre; tale particella non è dunque una specifica ma una del pool. Nel secondo caso, invece, si determina il 'self diffusion coefficient', che è responsabile dello spostamento quadratico medio di una singola particella nel tempo [24]. Si deduce quindi che la spettroscopia di correlazione della fluorescenza è una tecnica più sensibile rispetto a quella a correlazione di fotoni ma non per questo è limitata esclusivamente a

soluzioni poco concentrate, infatti, oggi la si utilizza anche per analizzare campioni in cui è presente un numero elevato di particelle. Inoltre per una misura di FCS è sufficiente un volume del campione minore rispetto a quello necessario per il DLS. Un ulteriore vantaggio della FCS è quello di determinare la presenza di più popolazioni all'interno dello stesso campione, in termini della loro consistenza numerica e di attribuire a ciascuna di esse una percentuale di incidenza che non dipende da parametri legati alle dimensioni delle particelle [25]. Al contrario, la spettroscopia a correlazione di fotoni sopravvaluta la presenza delle specie più grandi in quanto queste diffondono la radiazione laser incidente in base al loro volume al quadrato, e per correggere i dati ottenuti è necessario conoscere la forma degli aggregati, che non è sempre nota in maniera attendibile [26]. Confrontando i risultati ottenuti con le due tecniche, si osserva che aumentando la concentrazione di proteina si distinguono chiaramente due diverse popolazioni: una che ha un coefficiente di diffusione intorno a $10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, costituita dalla proteina in forma monomerica, ed un'altra con D dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ formata dagli aggregati. Le tecniche concordano nell'attribuire alle specie presenti nei campioni a concentrazione di 40 mg/mL una forma esclusivamente monomerica. Se dal DLS gli aggregati rilevabili nelle soluzioni intermedie (dai 100 mg ai 200 mg di Lisozima circa per millilitro) risulterebbero il 30% o addirittura il 40% del sistema, dall'FCS si hanno valori al di sotto del 20%. La discordanza è dovuta al fatto che il fattore di peso di ciascuna popolazione è il suo contributo all'intensità totale diffusa. La dipendenza di questa quantità dal volume quadratico spiega facilmente la discrepanza osservata. Un discorso analogo vale per i campioni di concentrazione 246.4 mg/mL; infatti gli aggregati sarebbero più del 65% del Lisozima in soluzione facendo riferimento al DLS ma risultano solo il 36% dall'FCS. Il divario tra le misure aumenta considerando i campioni 40H e 40A: soluzioni di 40 mg/mL circa ottenute per diluizione da quelle più concentrate, la prima ha un pH di 6 e l'altra di 3.7. I cluster presenti in queste ultime due soluzioni sono praticamente irrilevanti, dal momento che le proteine che li costituiscono sono al massimo il 6% del quantitativo totale. Invece dal DLS risulterebbe un sistema in cui monomeri e aggregati sono presenti quasi in egual misura.

Non è corretto pensare, però, che la spettroscopia di correlazione della fluorescenza sia in tutto superiore a quella a correlazione di fotoni. Infatti, anche il DLS ha dei vantaggi rispetto all'FCS. Per prima cosa non è una tecnica invasiva mentre per poter fare una misura di FCS su una proteina è necessario marcarla, come si è fatto per il Lisozima con il 5-Tamra. Bisogna però tenere conto che è sufficiente anche un volume molto piccolo

di marcatore e nell'ambito di questo esperimento il Lisozima legato al Tamra è al massimo lo 0.1% del totale. Inoltre una misura di DLS è sicuramente meno complessa dal punto di vista operativo rispetto ad una di FCS, che comprende il corretto utilizzo del microscopio confocale e la calibrazione giornaliera dello strumento e poi i costi dell'apparato di cui ci si serve nel primo caso sono inferiori. Anche l'elaborazione dei dati ottenuti dalla tecnica spettroscopica a correlazione di fotoni è più agevole rispetto a quella di correlazione della fluorescenza. Infatti, è necessario introdurre un numero inferiore di parametri per poter approssimare correttamente una curva all'andamento dei punti sperimentali grazie anche all'algoritmo CONTIN. Infine, sottoponendo un campione ad una misura di DLS si determina la polidispersità della soluzione, cosa che attualmente non è possibile per la FCS.

Nonostante le differenze che sono state messe in evidenza, le due tecniche portano a risultati molto simili. Un primo dato è che il Lisozima, se presente in soluzione nella quantità sufficiente, costituisce degli aggregati. Inoltre la formazione dei cluster proteici dipende dalla concentrazione del campione. Nelle soluzioni più diluite (40 mg/mL) il Lisozima è presente esclusivamente in forma monomeric e ha un coefficiente di diffusione di circa $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Tramite la relazione di Stokes-Einstein si determina anche il raggio idrodinamico della proteina libera che è di 1.5 nm. Portando la concentrazione del campione a 63.0 mg/mL le misure di DLS non evidenziano grosse differenze, negando la presenza di aggregati in soluzione. Dalle analisi di FCS, al contrario, si attribuisce ai cluster un'incidenza sul sistema del 16%. Essi hanno un coefficiente di diffusione dell'ordine di $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ quindi in acqua si muovono più lentamente dei monomeri a causa delle loro maggiori dimensioni. Quello della soluzione 63.0 mg/mL è l'unico caso in cui DLS ed FCS non danno un risultato univoco. Per ottenere un dato più riproducibile ci si propone di ripetere la misura un numero superiore di volte rispetto a quanto è stato possibile in questo lavoro di tesi. Le soluzioni di concentrazioni comprese tra 83.6 mg/mL e 208.8 mg/mL circa dalle misure di DLS presentano a loro volta due distinte popolazioni: una è costituita dai monomeri e l'altra da aggregati che hanno un raggio idrodinamico che va dai 21 nm ai 72 nm. Dalla spettroscopia di correlazione della fluorescenza risulta che nelle soluzioni di concentrazione intermedia la frazione di incidenza dei cluster sul sistema non supera lo 0.2. Il campione di concentrazione più alta tra quelli analizzati è il 246.4 mg/mL. In esso risultano presenti aggregati dal raggio idrodinamico di 75 nm che hanno una

percentuale di incidenza sul sistema quasi del 40%, determinata sempre dalle misure di FCS.

Sono stati misurati anche due campioni a concentrazione 40 mg/mL ottenuti per diluizione di una soluzione più concentrata. Uno dei due aveva un pH di 6 mentre l'altro di 3.7. Lo studio di questi due casi è interessante dal momento che anche in campioni così diluiti si riscontra una limitata presenza di aggregati e ciò significa che una volta che i cluster si sono formati non si dissolvono completamente per effetto del ripristino della condizione diluita [20]. Tuttavia, le forze di interazione attrattiva sono deboli quindi gran parte dei legami che si erano costituiti si rompono a causa dell'allontanamento delle proteine provocato dall'aggiunta di solvente. I dati sperimentali relativi alle due soluzioni sono molto simili nonostante in un caso il pH sia di 6 e nell'altro di 3.7. Non risulta quindi che il processo di aggregazione delle proteine dipenda dal pH, almeno nel range di valori che va da 3 a 6.

Nel paragrafo 2.2 si è accennato che il coefficiente di diffusione determinato dalle misure di DLS per i monomeri di Lisozima diminuisce all'aumentare della concentrazione della proteina. Quanto evidenziato può dipendere in parte dalla limitata precisione dell'algoritmo di inversione di Laplace, ma un'ulteriore spiegazione poggia sulle interazioni che si instaurano in seguito all'aumento di concentrazione.

La tabella 2.7 riporta le concentrazioni dei campioni analizzati, il 'mutual diffusion coefficient' determinato dalle misure di DLS e il coefficiente di diffusione ottenuto dalla FCS, entrambi relativi alla popolazione di Lisozima in forma monomerica.

Conc campione (mg/mL)	D_m (cm^2s^{-1})	D_s (cm^2s^{-1})
38.0	$1.36 \cdot 10^{-6}$	$1.02 \pm 0.03 \cdot 10^{-6}$
63.0	$1.36 \cdot 10^{-6}$	$3.54 \pm 0.50 \cdot 10^{-6}$
83.6	$1.87 \cdot 10^{-6}$	_____
113.6	$2.82 \cdot 10^{-6}$	$3.50 \pm 0.69 \cdot 10^{-6}$
163.6	$2.64 \cdot 10^{-6}$	$3.92 \pm 0.40 \cdot 10^{-6}$
208.8	$2.54 \cdot 10^{-6}$	_____
246.4	$1.94 \cdot 10^{-6}$	$1.00 \pm 0.04 \cdot 10^{-6}$

Tabella 2.7. Mutual diffusion coefficient determinato dalle misure di DLS e self diffusion coefficient ottenuto dalla FCS relativi alla popolazione di Lisozima in forma monomerica.

E' possibile determinare la natura delle interazioni che si instaurano tra i monomeri di Lisozima presenti in soluzione e valutarne la dipendenza dalla concentrazione della proteina dal momento che il coefficiente di mutua diffusione, che si ottiene dalle misure di DLS, è legato al secondo coefficiente del viriale, B_{22} . La figura 2.46 riporta il D_m dei monomeri in funzione della concentrazione di Lisozima. Le barre verticali indicano l'estensione del range di valori a cui l'algoritmo di inversione di Laplace attribuisce la maggiore intensità di scattering. Si fa riferimento ai dati del fitting con il metodo dei cumulanti bloccato al 2° ordine per i campioni più diluiti (38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL) e con CONTIN o NNLS per gli altri (83.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL).

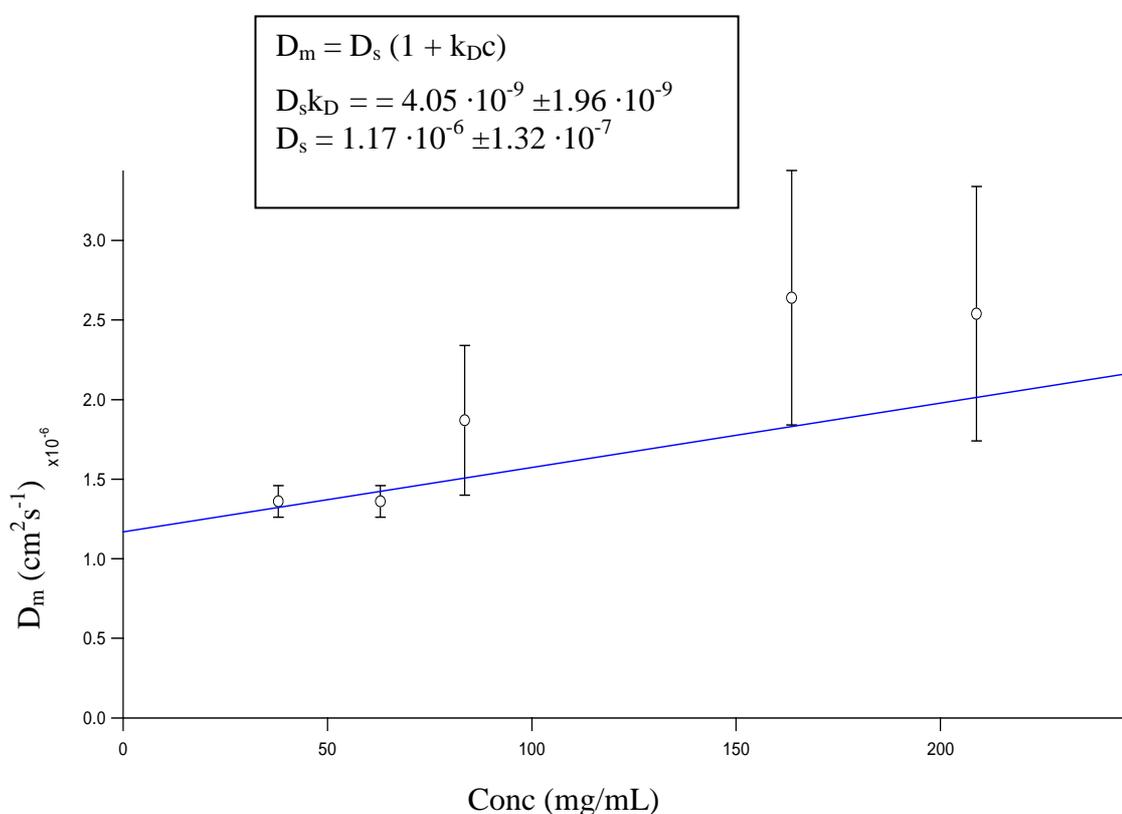


Fig. 2.46. D_m relativo alla popolazione di Lisozima in forma monomerica in funzione della concentrazione di proteina nel campione. Le barre verticali indicano il range di valori a cui corrisponde la maggiore intensità di scattering, facendo riferimento ai dati del fitting con il metodo dei cumulanti bloccato al 2° ordine per i campioni più diluiti (38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL) e con CONTIN o NNLS per gli altri (83.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL).

L'andamento dei dati sperimentali si approssima ad una retta di equazione [27]:

$$D_m = D_s (1 + k_D c)$$

dove D_m è il 'mutual diffusion coefficient', D_s è il 'self diffusion coefficient', c è la concentrazione della proteina nel campione e k_D un parametro relativo alle interazioni

fra particelle. Nella determinazione della pendenza e dell'intercetta della retta hanno avuto un peso maggiore i punti sperimentali a cui è associato un errore minore, inoltre il coefficiente di mutua diffusione del campione 113.6 mg/mL non compare nel grafico perchè includerlo peggiorerebbe la qualità del fitting lineare.

Nel caso in cui siano analizzate soluzioni di Lisozima sufficientemente diluite la relazione che segue permette di determinare quantitativamente il secondo coefficiente del viriale [28]:

$$k_D = 2 \cdot B_{22} \cdot M_w - \zeta_1 - 2v_{sp}$$

dove M_w è il peso molecolare del soluto, ζ_1 è il coefficiente di attrito e v_{sp} è il volume specifico del soluto.

I campioni misurati in questo lavoro di tesi hanno concentrazioni della proteina troppo elevate per permettere una trattazione quantitativa; tuttavia il fatto che la pendenza della retta che approssima l'andamento dei dati sperimentali sia positiva costituisce un risultato molto interessante. Infatti la pendenza della retta è associata al parametro k_D che è positivo quando le forze instauratesi tra le particelle presenti in soluzione sono di carattere repulsivo. All'aumentare della concentrazione di Lisozima alcune particelle formano aggregati proteici in seguito ad interazioni di carattere attrattivo ma sulle altre predominano delle forze repulsive. Questo si verifica per i monomeri di Lisozima che nelle soluzioni più concentrate hanno una mobilità superiore a quella riscontrata nei campioni diluiti e hanno minore coefficiente di diffusione. Nella determinazione del raggio idrodinamico delle particelle di Lisozima non si tiene conto delle interazioni di natura elettrostatica che si instaurano in soluzione. Il valore riportato per i monomeri è dunque un 'raggio apparente' che è sottostimato rispetto a quello reale, in quanto se le forze repulsive aumentano la mobilità delle particelle e quindi il loro coefficiente di diffusione, dalla relazione di Stokes-Einstein si ottengono R_h minori.

L'equazione della retta dà lo spunto per una precisazione che ancora non è stata sottolineata: il 'mutual diffusion coefficient' ed il 'self diffusion coefficient' coinciderebbero a diluizione infinita, ovvero nel caso in cui una particella di Lisozima fosse anche l'unica presente in soluzione [29]. E' interessante confrontare il valore di D_m in corrispondenza dell'intercetta sull'asse delle ordinate con il D_s determinato per la popolazione di Lisozima in forma monomerica dalle misure di FCS. $D_m(c = 0)$ è pari a $1.17 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, un valore molto vicino all' $1.02 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-2}$ rilevato analizzando il campione più diluito con la spettroscopia di correlazione della fluorescenza. I coefficienti di diffusione relativi ad alcune delle concentrazioni più elevate, determinati

sempre dalle misure di FCS, risultano maggiori di $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ perchè le ACF acquisite per questi campioni sono piuttosto rumorose e quindi anche i dati sperimentali che si ottengono sono affetti da un errore più grande.

2.5 Fluorescence Resonance Energy Transfer

Il fenomeno di trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza si verifica se un fluoroforo (il donatore) emette in una regione dello spettro in cui un'altra specie (l'accettore) è in grado di assorbire. Il trasferimento di energia non è un processo radiativo ma è un'interazione di tipo dipolo- dipolo tra due molecole che devono essere sufficientemente vicine. Nell'ambito dell'esperimento il donatore è il Lisozima marcato con Fluoresceina mentre l'accettore è il Lisozima marcato con 5-Tamra.

La figura 2.42 mostra lo spettro di emissione della Fluoresceina eccitata a 468 nm e lo spettro di assorbimento del Tamra; le curve sono normalizzate.

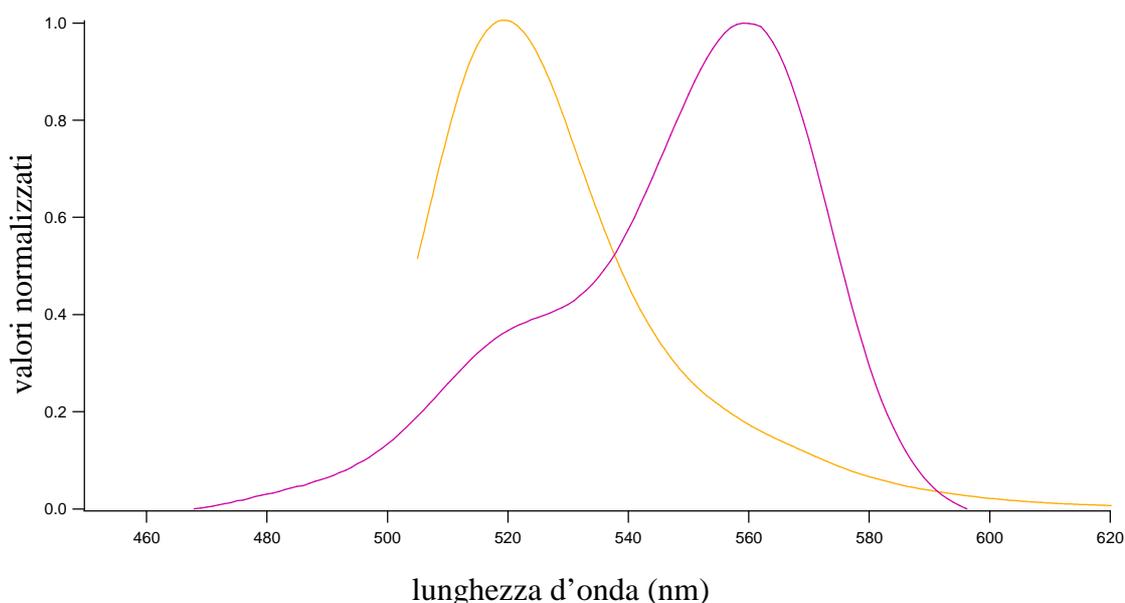


Fig. 2.42. La curva di colore giallo è lo spettro di emissione della Fluoresceina eccitata a 468 nm; la curva di colore fucsia è lo spettro di assorbimento del 5-Tamra. La Fluoresceina emette in una regione dello spettro in cui il 5-Tamra è in grado di assorbire.

La ragione per cui questa tecnica spettroscopica risulta interessante nell'ambito dello studio dell'aggregazione delle proteine globulari in una soluzione di Lisozima contenente entrambi i marcatori sta nel fatto che consente di determinare la distanza media tra le particelle di Lisozima marcato con Fluoresceina e quelle di Lisozima marcato con Tamra. Inoltre nel caso in cui tale distanza risulti di un valore compreso tra 3 nm e 10 nm si può concludere che il campione analizzato presenti aggregati proteici [30].

L'esperimento di FRET è stato eseguito su campioni a concentrazione di Lisozima 41.1 mg/mL e 130 mg/mL. Per ciascuna soluzione in uno dei campioni era presente del Lisozima marcato con Fluoresceina in concentrazione 2.1 mg/mL; in un altro del Lisozima marcato con 5-Tamra in concentrazione 0.5 mg/mL e nell'ultimo erano presenti proteine marcate con entrambi i fluorofori (Materiali e Metodi).

Per quantificare l'efficienza del trasferimento di energia è stato introdotto il parametro E_f :

$$E_f = \frac{F_D - F_{DA}}{F_D}$$

dove F_D è l'intensità di fluorescenza del donatore libero ed F_{DA} è l'intensità di fluorescenza del donatore in presenza di un accettore.

Nota l'efficienza del trasferimento di energia è possibile ricavare la distanza media (R) tra le particelle marcate con i due diversi fluorofori tramite la relazione che segue:

$$E_f = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

dove R_0 è il raggio di Foster ed ha un valore caratteristico di ogni coppia donatore-accettore; nel caso della Fluoresceina e del Tamra è 5 nm [31].

I campioni costituiti da Lisozima marcato sia con Fluoresceina che con Tamra che sono stati sottoposti alla misura hanno mostrato un comportamento diverso a seconda della concentrazione. La soluzione 41.1 mg/mL non ha dato luogo ad alcun fenomeno di trasferimento di energia e ciò è da ricondursi al fatto che non si formino aggregati di Lisozima quando la concentrazione di proteina in acqua è così bassa. Infatti le particelle libere in soluzione sono troppo distanti perchè l'emissione delle une possa influire sull'assorbimento delle altre. Quando si verifica un fenomeno di FRET l'energia emessa dal donatore è minore di quella precedentemente assorbita mentre quella dell'accettore è accresciuta [29]. Nella figura 2.43 si nota che l'intensità di emissione della Fluoresceina rilevata dalle misure effettuate sul campione in cui è presente anche il Lisozima marcato con 5-Tamra è la stessa che si riscontra in assenza dell'accettore. L'assorbimento del Lisozima marcato con Tamra è appena superiore di quanto fosse nel campione privo di Fluoresceina.

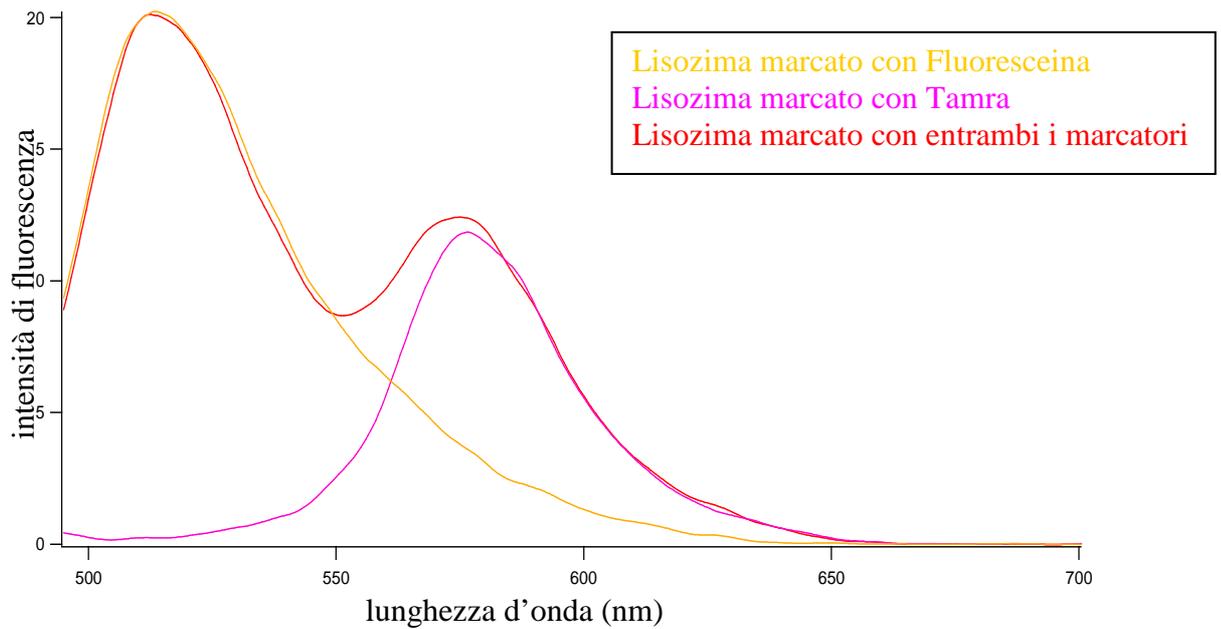


Fig. 2.43. Campioni di concentrazione 41.1 mg/mL. La curva di colore arancione è lo spettro di emissione del Lisozima marcato con Fluoresceina eccitata a 468 nm; quella fucsia è relativa all'emissione del Lisozima marcato con Tamra e quella di colore rosso rappresenta l'emissione del campione in cui il Lisozima è marcato sia con Fluoresceina che con Tamra.

Diverso è quanto si rileva dalle misure effettuate sul campione di concentrazione 130.0 mg/mL, figura 2.44.

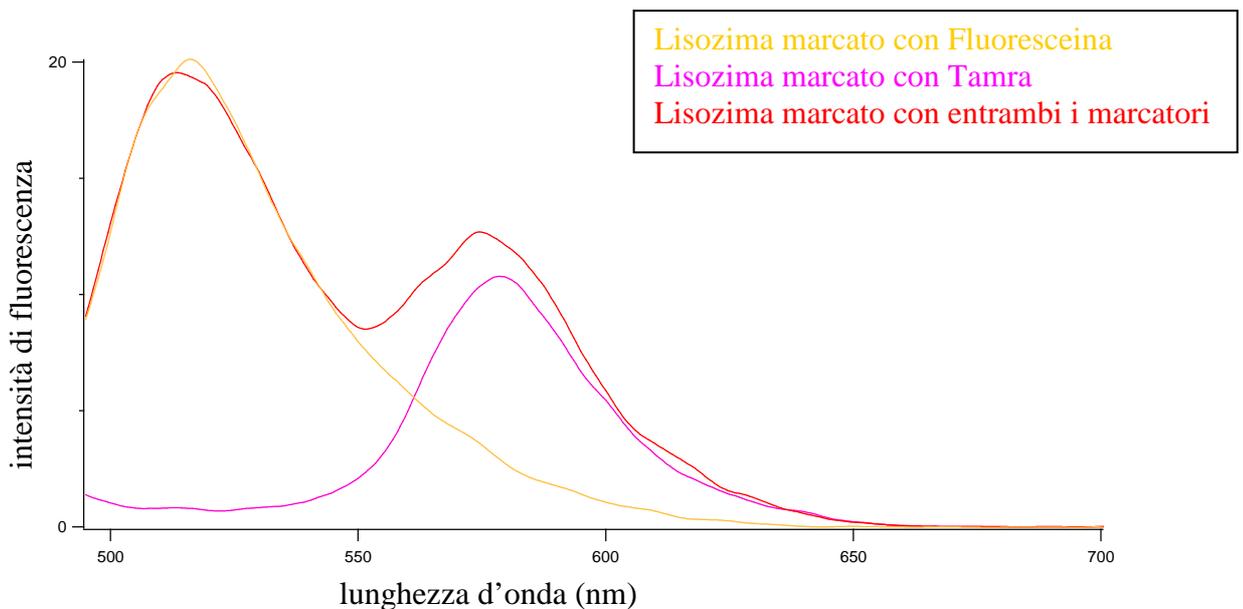


Fig. 2.44. Campioni di concentrazione 130.0 mg/mL. La Fluoresceina è eccitata a 468 nm.

L'effetto del trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza non è molto marcato ma indubbiamente la fluoresceina ha un'intensità di emissione inferiore quando nel

campione è presente anche il Tamra, dal momento che quest'ultimo assorbe parte dell'energia del fluoroforo e conseguentemente emette più di quanto farebbe se la Fluoresceina non fosse in soluzione.

La figura 2.45 mette in evidenza le variazioni dell'intensità di fluorescenza che si hanno tra il campione 40.1 mg/mL e 130.0 mg/mL in seguito al trasferimento di energia tra donatore ed accettore.

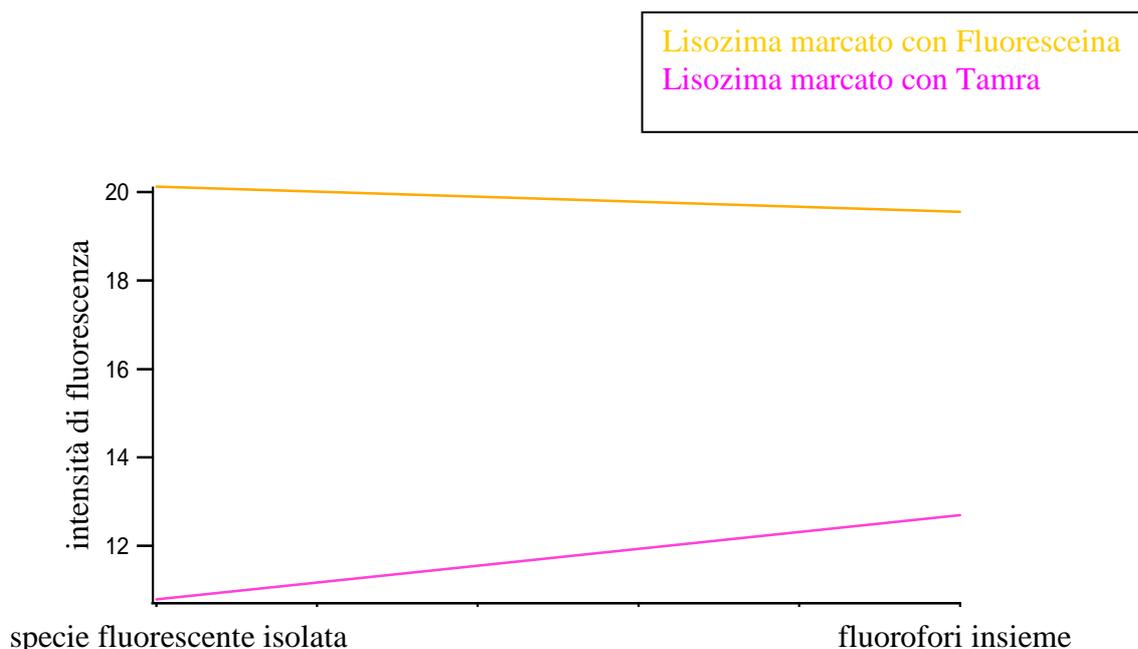


Fig. 2.45. Alla concentrazione di 130.0 mg/mL si ha un trasferimento di energia per risonanza; l'intensità di fluorescenza della Fluoresceina diminuisce in presenza dell'accettore mentre quella del Tamra aumenta in presenza del donatore.

Calcolando l'efficienza del trasferimento di energia è possibile determinare la distanza media tra l'accettore ed il donatore e quindi stabilire, in base a quanto risultano vicine fra loro le proteine, se il Lisozima formi aggregati o meno. Il campione meno concentrato non dà luogo ad alcun fenomeno di FRET per cui E_f in questo caso è pari a zero e non sono presenti cluster nella soluzione. Per quanto riguarda il campione 130.0 mg/mL, dal momento che F_D è 20.0048 e $F_{DA} = 19.5555$ l'efficienza del trasferimento è di $2.25 \cdot 10^{-2}$. Inoltre, vale la relazione:

$$R = R_0 \left[\left(\frac{1}{E} \right) - 1 \right]^{1/6}$$

per cui la distanza tra le particelle di Lisozima in soluzione risulta 9.38 nm.

Calcolando la distanza media delle particelle nell'approssimazione che esse non interagiscano e si dispongano ai vertici di un reticolo a facce centrate troveremmo per il campione a concentrazione di Lisozima 130.0 mg/mL un valore pari a 63.7 nm. La formula a cui si fa riferimento è quella che segue:

$$d = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{4000}{N_A C_M} \right)^{1/3} \cdot 10^8$$

dove N_A è il numero di Avogadro e C_M è la concentrazione molare del campione.

Risulta quindi che la concentrazione 41.1 mg/mL è troppo bassa perchè si formino aggregati di Lisozima, mentre quella 130.0 mg/mL è sufficiente, tanto che le proteine presenti in soluzione distano le une dalle altre in media 9.38 nm e non 63.7 nm. Il fenomeno del trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza si verifica solo nel caso del campione più concentrato, dal momento che le proteine marcate in soluzione sono abbastanza vicine da influenzarsi reciprocamente e l'efficienza della FRET è diversa da zero.

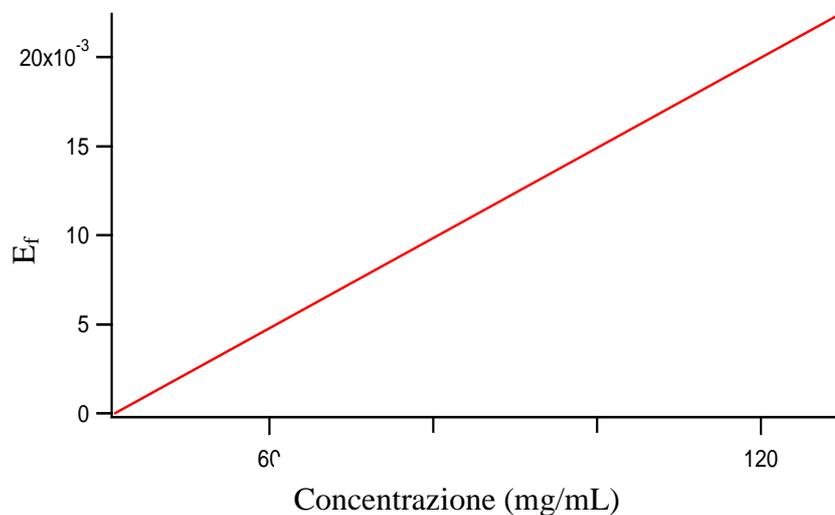


Fig. 2.46. L'efficienza della FRET cresce all'aumentare della concentrazione di Lisozima in soluzione.

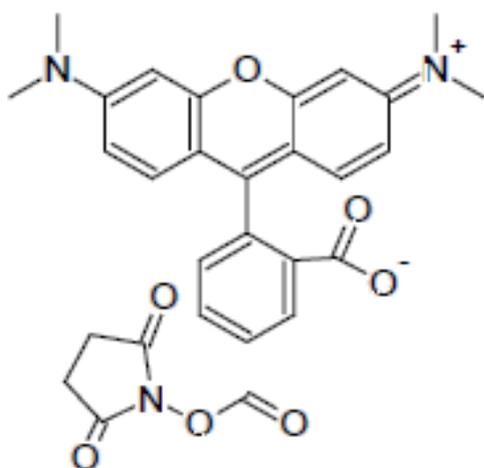
L'esperimento di FRET conferma la presenza di aggregati proteici in campioni a concentrazione di Lisozima 100 mg/mL circa e la loro assenza in soluzioni più diluite, convalidando i risultati sperimentali delle misure di DLS e di FCS.

Materiali e Metodi

3.1 Materiali

Il Lisozima L6876 è stato acquistato da Sigma- Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Il 5-Tamra assieme al resto del kit per marcare la proteina è stato comprato da AnaSpec, Inc (Fremont, California, USA). La figura 3.1 mostra la struttura del fluoroforo e il riquadro a fianco ne evidenzia le caratteristiche principali.



λ_{max} assorbimento: 547 nm

λ_{max} emissione: 574 nm

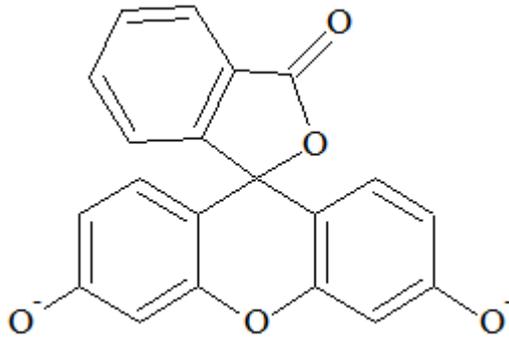
ϵ (547 nm): 80000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

peso molecolare: 527.53 g mol^{-1}

Fig. 3.1. Struttura e caratteristiche del 5-Tamra.

Il Lisozima marcato con Fluoresceina è stato gentilmente fornito dal Dr. Kunlun Hong (Center for Nanophase Materials Sciences, Oak Ridge National Laboratory, TN).

La figura 3.2 mostra la struttura e le principali caratteristiche della Fluoresceina.



λ_{max} assorbimento: 494 nm
 λ_{max} emissione: 518 nm
 ϵ (494 nm): 77000 cm⁻¹M⁻¹
 peso molecolare: 332.31 gmol⁻¹

Fig. 3.2. Struttura e principali caratteristiche della Fluoresceina.

Il fluoroforo Alexa (568), utilizzato per la procedura di calibrazione nelle misure di FCS, è stato acquistato presso la Invitrogen (Carlsbad, California, USA).

3.2 Metodi di Preparazione dei Campioni

- PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI LISOZIMA IN ACQUA

I campioni di Lisozima di concentrazione circa 40 mg/mL sono stati preparati sciogliendo direttamente la proteina in acqua; il pH è risultato 3.3. Le soluzioni più concentrate sono state ottenute dagli stessi campioni 40 mg/mL per filtrazione con Amicon Bioseparator (Millipore, Billerica MA, USA) attraverso una membrana in cellulosa rigenerata con cutoff nominale di 10 kDa, figura 3.3.



Fig. 3.3. Amicon Bioseparator

La filtrazione è stata effettuata mantenendo il sistema sotto agitazione magnetica e sotto pressione di azoto.

Da processi tra loro indipendenti sono stati ottenuti i campioni 63.0 mg/mL, 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL e 246.4 mg/mL e ciascuno di questi è stato lavato con acqua fino ad ottenere un pH compreso tra 5.7 e 6. Sono state preparate anche delle soluzioni di circa 40 mg/mL per diluizione dei campioni di concentrazione più elevata: quelli in cui è stata aggiunta l'acqua avevano un PH di 6 e sono stati indicati con la sigla 40H; quelli in cui la diluizione è stata effettuata con il solvente in eccesso raccolto durante il processo di filtrazione con Amicon Bioseparator avevano un PH di 3.7 e sono stati abbreviati come 40A.

Tutti i campioni utilizzati sono stati titolati allo spettrofotometro UV- Visibile, stimando la concentrazione finale di Lisozima dall'assorbanza misurata a 280 nm.

- PREPARAZIONE DEL LISOZIMA MARCATO CON 5-TAMRA

Per gli esperimenti di FCS e di FRET è stato necessario marcare il Lisozima con il fluoroforo 5-Tamra. La procedura di marcatura della proteina è stata effettuata seguendo le istruzioni indicate dal produttore (Ana TagTM 5-Tamra Protein Labeling Kit): è stata preparata una soluzione 10 mg/mL di Lisozima in un tampone fosfato 20 mM di pH 7.4 a cui è stato aggiunto un volume pari ad 1/10 di quello iniziale di un tampone fornito all'interno del kit Ana TagTM 5-Tamra Protein Labeling Kit. In una vial contenente il marcatore 5-Tamra in polvere sono stati aggiunti 20 µL di DMSO e la soluzione è stata riversata in quella di Lisozima precedentemente preparata. La miscela, contenente Lisozima e 5-Tamra in rapporto 1:1 (w/w) è stata tenuta in agitazione per un'ora e sempre al riparo dalla luce. La purificazione del Lisozima marcato con il 5-Tamra dal marcatore che non si è legato alla proteina è stata effettuata tramite una colonna ad esclusione dimensionale fornita nel kit. La figura 3.4 mostra che il marcatore funzionalizzato attacca la proteina istaurando un legame tra il proprio carbonio carbossilico ed il gruppo amminico posizionato all'esterno della catena polipeptidica.

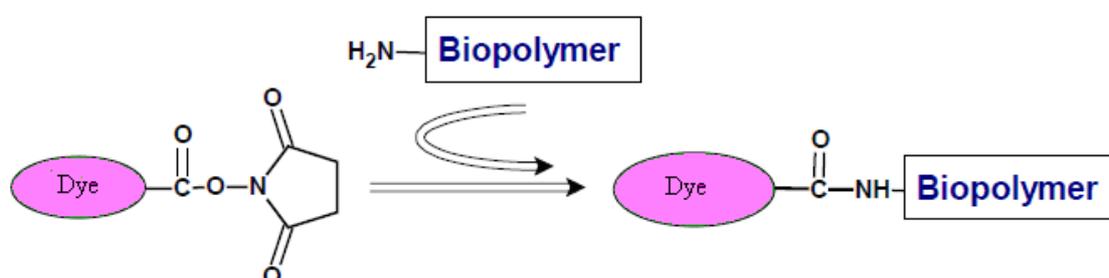


Fig. 3.4. Il marcatore funzionalizzato attacca la proteina istaurando un legame tra il proprio carbonio carbossilico ed il gruppo amminico posizionato all'esterno della catena polipeptidica.

- **DENATURAZIONE TERMICA E DICROISMO CIRCOLARE** Le due tecniche di analisi sono state applicate agli stessi tre campioni: uno costituito da Lisozima nativo sciolto in acqua di concentrazione 0.084 mg/mL; uno di Lisozima marcato con 5-Tamra, preparato secondo la procedura esplicitata prima, di concentrazione 0.066 mg/mL, un ultimo di Lisozima marcato con Fluoresceina ottenuto sciogliendo in acqua il solido, di concentrazione 0.068 mg/mL.
- **DLS** Le misure sono state effettuate su campioni nativi di concentrazioni: 38.0 mg/mL, 63.0 mg/mL, 83.6 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 208.8 mg/mL, 246.4 mg/mL, 40H (36.0 mg/mL) e 40A (36.0 mg/mL) ottenuti come si legge al punto 'preparazione delle soluzioni di Lisozima in acqua'. L'intervallo temporale tra il momento dell'analisi e la preparazione del campione è di 1- 7 giorni e per evitare che la polvere influisse sulla misura i campioni sono stati centrifugati a 4000 giri al minuto per circa due ore o comunque fino a che le ACF sono risultate stabili.
- **FCS** Le misure sono state effettuate su campioni di Lisozima in acqua di concentrazioni: 40.4 mg/mL, 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 246.4 mg/mL, 40H (40.0 mg/mL) e 40A (40.0 mg/mL) ottenuti come si legge al punto 'preparazione delle soluzioni di Lisozima in acqua'. Per ciascun campione è stato aggiunto lo stesso volume della soluzione di Lisozima marcata con 5-Tamra (2.34 mg/mL), in modo da ottenere una quantità di proteina marcata pari allo 0.1% di quella totale nel campione 40.4 mg/mL e percentuali inferiori per i campioni più concentrati di Lisozima. Da quando le soluzioni sono state marcate al momento delle analisi sono passate 12 ore.
- **FRET** Le misure sono state effettuate su soluzioni acquose rispettivamente di 41.1 mg/mL e 130.0 mg/mL di Lisozima, le prime avevano un PH di 3.3, le altre di 6. Per ciascuna soluzione in uno dei campioni era presente del Lisozima marcato con Fluoresceina in concentrazione 2.1 mg/mL; in un altro del Lisozima marcato con 5-Tamra in concentrazione 0.5 mg/mL e nell'ultimo erano presenti proteine marcate con entrambi i fluorofori. Da quando i campioni sono stati marcati al momento dell'analisi è passata una notte nella quale tutte le vial sono state mantenute a temperatura ambiente in blanda agitazione e al riparo dalla luce.

3.3 Tecniche Sperimentali

ASSORBIMENTO UV-VISIBILE Le misure di assorbimento UV sono state effettuate con uno spettrofotometro CARY 100 BIO dotato di termostato VARIAN.

Per le misure di assorbimento è stato sufficiente porre i campioni in cuvette in quarzo Hellma dal cammino ottico di 1 cm e fare le scansioni nel range di lunghezze d'onda che va da 200 nm a 500 nm. Rilevando l'assorbanza del Lisozima a 280 nm e conoscendo il rispettivo coefficiente di assorbività molare [$\epsilon(280 \text{ nm}) = 38000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$] è stato infatti possibile determinare la concentrazione della proteina in soluzione.

Per le prove di denaturazione termica della proteina sono state utilizzate delle cuvette in quarzo Hellma a volume ridotto con un cammino ottico di 1 cm nelle quali è stata messa un'ancorina magnetica in modo da rendere la temperatura interna il più omogenea possibile. Una volta fissata la lunghezza d'onda a 300 nm si è avviato il processo di riscaldamento da 25°C a 85°C alla velocità di 0.05°C al minuto. Durante la misura si è fatto passare un flusso di azoto all'interno della cella portacampione di modo da evitare la formazione di condensa sulle pareti delle cuvette ad alte temperature.

DICROISMO CIRCOLARE Le misure di Dicroismo Circolare sono state effettuate su uno spettropolarimetro JASCO J-715 usando cellette di quarzo Hellma dal cammino ottico di 0.5 cm. Gli spettri sono stati registrati da 275 nm a 195 nm e quelli riportati nel Capitolo 2.1 sono ciascuno la media di 20 misure.

DYNAMIC LIGHT- SCATTERING Le misure di DLS sono state effettuate con un apparecchio Brookhaven Instruments (BI 9000AT correlatore e BI 200 SM goniometro), il detector utilizzato è un fotomoltiplicatore BI APD, la sorgente di luce è la seconda armonica di un laser diode Nd:YAG (532 nm) Coherent Innova polarizzato linearmente nella direzione verticale. Il pinhole è stato regolato a 100, la temperatura è stata impostata a 20°C per cui prima della misura i campioni sono stati incubati per cinque minuti all'interno della cella portacampione termostata dello strumento. Ogni misura è durata cinque minuti. Le funzioni di autocorrelazione dell'intensità di scattering sono state acquisite per tutti i campioni ad un angolo di 90° in funzione del tempo e si indicano come $C(q,\tau)$. La relazione di Siegert è l'equazione che lega la

funzione di autocorrelazione del primo ordine o del campo elettrico $g_1(q, \tau)$ alla funzione di autocorrelazione misurata non normalizzata:

$$C(q, \tau) = B [1 + a |g_1(q, \tau)|^2]$$

La funzione di autocorrelazione del primo ordine $g_1(q, \tau)$ è in relazione con la funzione di autocorrelazione delle intensità di scattering, o funzione di autocorrelazione del secondo ordine normalizzata $g_2(q, \tau)$ secondo la relazione:

$$g_2(q, \tau) = 1 + |g_1(q, \tau)|^2$$

Per poter confrontare le curve relative ai campioni in cui il Lisozima è presente in diverse concentrazioni, le ACF riportate nel Capitolo 2.2 sono state normalizzate sottraendovi il loro valore massimo e dividendole per il minimo di modo che fossero comprese tra 0 e 1:

$$G(\tau) = (g_1(q, \tau) - g_{1(\min)}(q, \tau)) / (g_{1(\max)}(q, \tau) - g_{1(\min)}(q, \tau))$$

Le funzioni di autocorrelazione sono state analizzate con il metodo dei cumulanti bloccato al 2° ordine [32] per distribuzioni monomodali a bassa polidispersità e tramite l'inversione di Laplace con l'algoritmo CONTIN [18] oppure con il NNLS (non negativity constrained least squares algorithm) [19] di Lawson e Hanson nel caso distribuzioni bimodali o ad elevata polidispersità.

FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY L'apparato strumentale è composto dalle sorgenti laser ad Argon ed HeNe che emettono radiazioni rispettivamente di 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm e 561 nm e di 633 nm, dal microscopio confocale (Leica TCS SP2, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), equipaggiato con una unità FCS ISS (ISS Inc. 1602 Newton Drive Champaign, IL, USA) costituita da due APD (BP 500- 530 nm e BP 607- 683 nm) e da un correlatore collegato al PC, figura 3.5. Le misure sono state effettuate con un obiettivo ad H₂O 63x, usando la linea laser a 561 nm e l'APD con BP 607- 683 nm. Nel corso dell'analisi si rilevano le fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza dei fluorofori o delle particelle marcate che entrano ed escono dal volume confocale. Esso è una porzione del campione definita dai parametri laterale (w_0) e assiale (z_0), che dipende dalla geometria del sistema, dalla lunghezza d'onda d'eccitazione e dalla potenza del laser, figura 3.6.

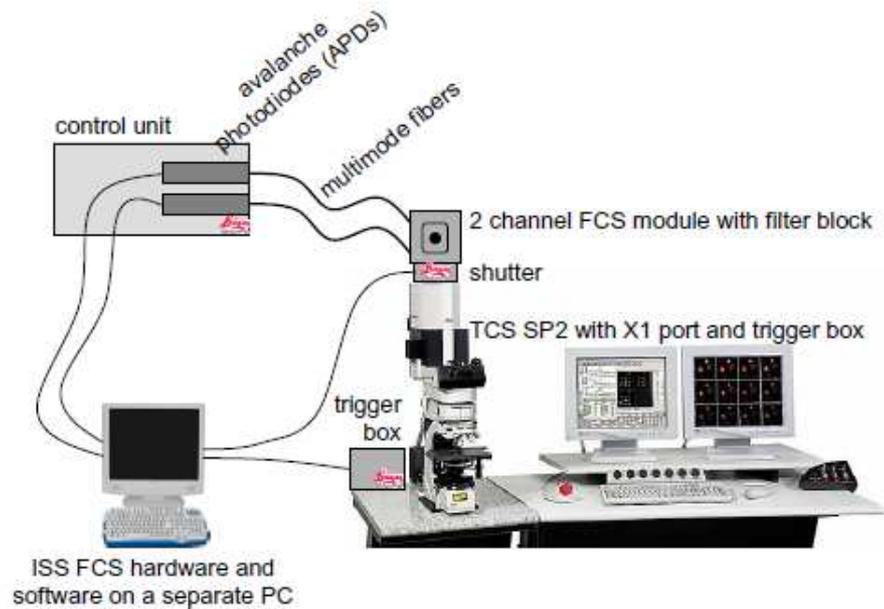


Fig. 3.5. Apparato strumentale necessario per le misure di FCS.

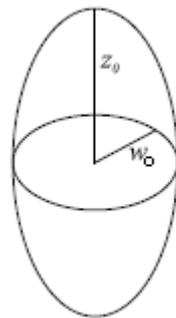


Fig. 3.6. Volume confocale definito dai parametri laterale (w_0) e assiale (z_0).

Le fluttuazioni dell'intensità di fluorescenza nel tempo sono legate ad una componente random, ovvero la direzione delle particelle e dei fotoni, e da una non casuale dovuta al tempo necessario alla molecola per attraversare il volume confocale. Lo strumento matematico che consente di ricavare delle informazioni sul sistema preso in esame dalla componente che non è random è una funzione di autocorrelazione che è proporzionale alla probabilità di rilevare un secondo fotone al tempo $t + \tau$ se un primo fotone è stato segnalato al tempo t . Le ACF si indicano come $G(\tau)$ e la loro intercetta sull'asse delle ordinate è inversamente proporzionale al numero di particelle (N) presenti nel campione, dal momento che se N cresce l'effetto relativo alla singola molecola sul segnale di fluorescenza totale diminuisce. Al tempo t , ovvero quando $\tau = 0$, vale la relazione che segue:

$$G(0) = \frac{1}{N}$$

Conseguentemente all'aumentare del numero di molecole fluorescenti che si vengono a trovare nel volume confocale diminuisce l'ampiezza della funzione di autocorrelazione relativa al campione. Un parametro interessante ai fini delle analisi di FCS è il tempo di decadimento (τ_D) che è rappresentato graficamente nella figura 3.7. Le ACF relative alle variazioni dell'intensità di fluorescenza lente hanno tempi di decadimento maggiori di quelle che corrispondono ai sistemi in cui le fluttuazioni sono più veloci [21].

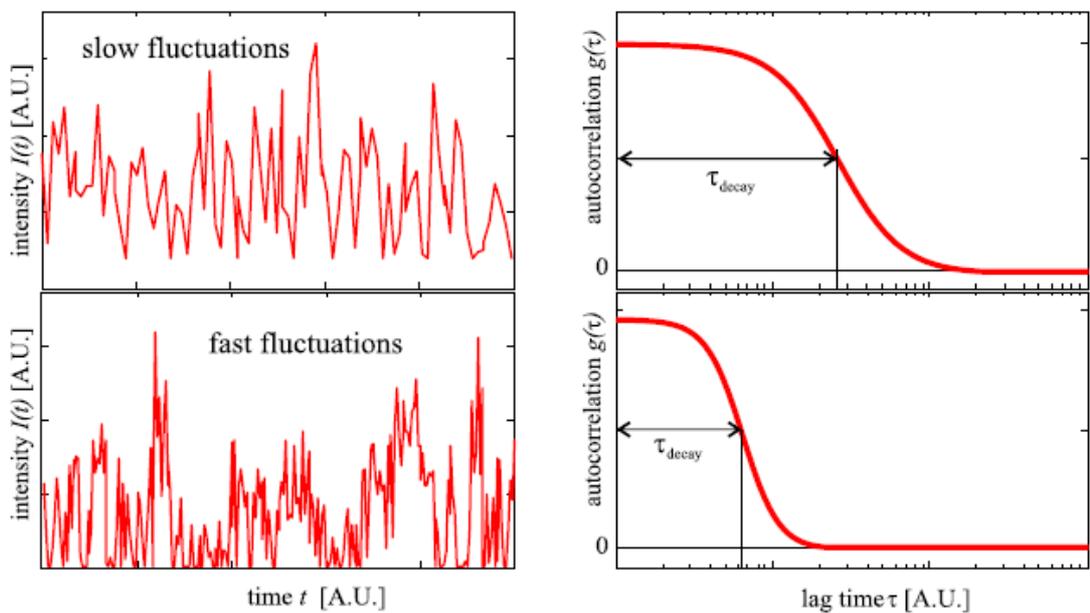


Fig. 3.7. A sinistra sono rappresentate le variazioni dell'intensità di fluorescenza delle particelle che entrano ed escono dal volume confocale mentre a destra sono rappresentate le corrispondenti ACF in funzione del tempo di decadimento. Le ACF relative a delle variazioni dell'intensità di fluorescenza lente hanno tempi di decadimento (τ_D) maggiori di quelle che corrispondono ai sistemi in cui le fluttuazioni sono più veloci.

Dall'espressione del tempo di decadimento è possibile risalire al coefficiente di diffusione delle molecole fluorescenti che entrano ed escono dal volume confocale:

$$D = \frac{w^2}{4\tau_D}$$

Sostituendo τ_D nella funzione di autocorrelazione di un sistema monodisperso in cui si assume che le particelle presenti in soluzione si muovano nelle tre dimensioni spaziali

di un moto browniano (modello teorico della Gaussiana 3D) si trova un'espressione che presenta come incognite i parametri w_0 , z_0 e il coefficiente di diffusione D :

$$G(\tau) = \frac{1}{\pi^{3/2} \langle c \rangle w_0^2 z_0} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2}$$

Per poter ricavare il coefficiente di diffusione del campione bisogna determinare il volume confocale attraverso il processo di calibrazione che consiste nel sottoporre alla misura uno standard di cui sia noto D . Per i nostri esperimenti sono state utilizzate delle soluzioni di Alexa (568) 10 nM, 25 nM, 50 nM e 100 nM; $D = 332 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. La figura 3.8 mostra la struttura di Alexa (568) e la figura 3.9 i relativi spettri di assorbimento e di emissione.

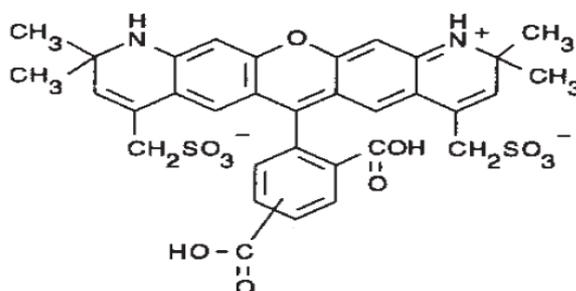


Fig. 3.8. Struttura di Alexa (568).

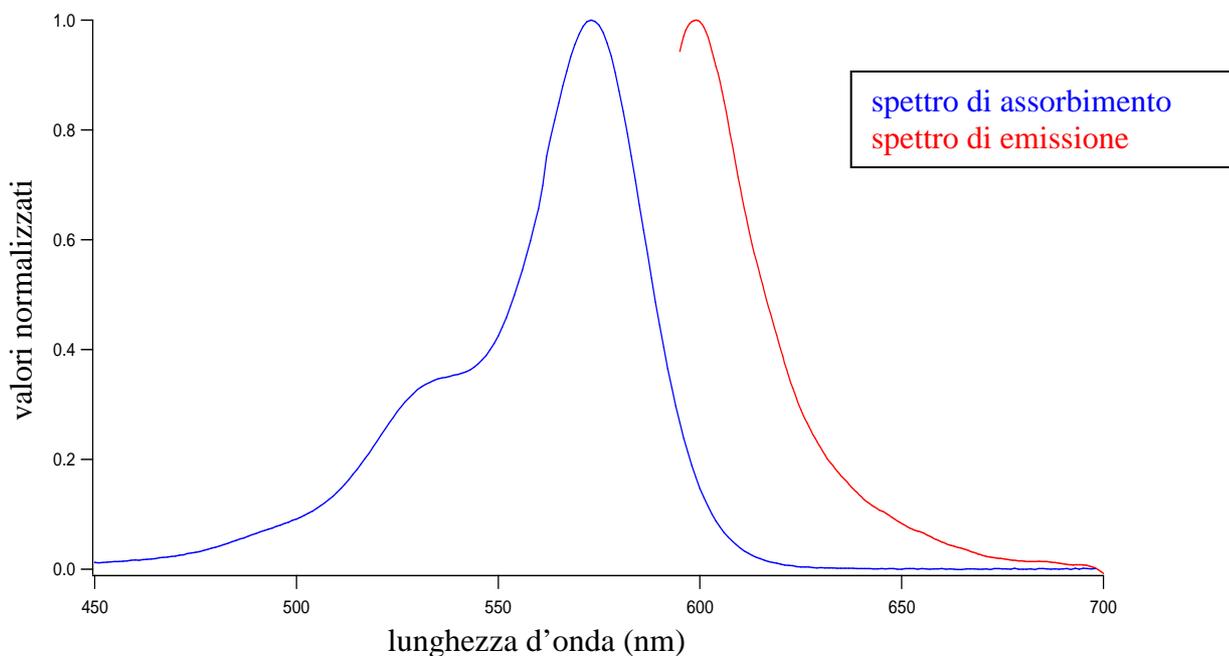


Fig. 3.9. Alexa (568) assorbe a 578 nm ed emette a 603 nm. I valori sull'asse delle ordinate sono normalizzati tra 0 e 1.

Alexa (568) assorbe a 578 nm ed emette a 603 nm; il suo coefficiente di assorbività molare è $91300 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [33]. Lo standard assorbe ed emette in un range di lunghezze d'onda simile a quello del 5-Tamra (rispettivamente 547 nm e 574 nm).

Poichè il volume confocale dipende anche dalla lunghezza d'onda di eccitazione e dalla potenza della radiazione laser è necessario che w_0 e z_0 siano stati ottenuti da una misura sullo standard di Alexa (568) condotta nelle medesime condizioni a cui viene sottoposto il campione e se tali parametri cambiano da soluzione a soluzione si devono riprodurre tutte le varianti anche nelle misure effettuate sullo standard. La figura 3.10 rappresenta le ACF delle soluzioni di calibrazione nel caso in cui la radiazione che impatta sui campioni abbia una lunghezza d'onda di 561 nm e sia mantenuta al 9% della sua potenza massima; le curve di colore blu sono relative al fitting..

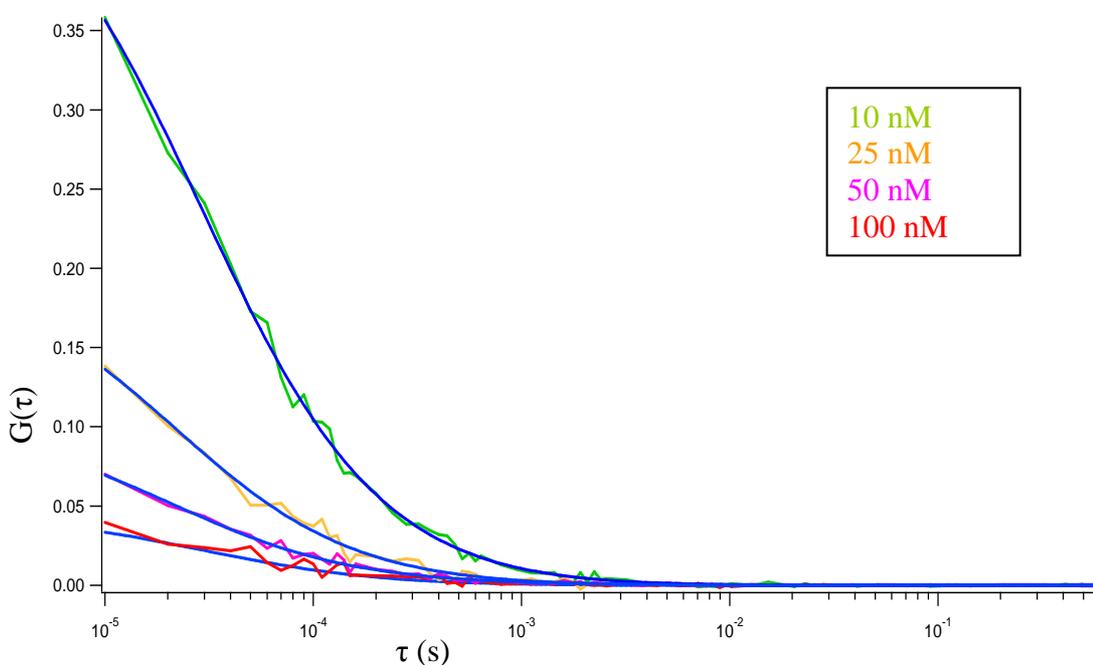


Fig. 3.10. ACF delle soluzioni di calibrazione ottenute da campioni di Alexa (568) 10 nM, 25 nM, 50 nM e 100 nM. Durante la misura la radiazione laser di 561 nm è stata mantenuta al 9% della potenza massima.

All'aumentare della concentrazione di Alexa (568) in soluzione la funzione di autocorrelazione relativa al campione ha un valore di intercetta sempre più basso. Infatti, come spiegato sopra, le ACF dipendono dalle fluttuazioni della fluorescenza di una molecola nel volume considerato. Se il numero di particelle presenti nel volume cresce, l'effetto relativo alla singola molecola sul segnale di fluorescenza totale diminuisce e quindi l'ampiezza della funzione di autocorrelazione risulta minore [23].

La funzione di autocorrelazione acquisita per il campione a concentrazione di Lisozima 40.4 mg/mL presentava un decadimento monomodale per cui è appropriata la $G(\tau)$ riportata sopra.

Le ACF dei campioni 63.0 mg/mL, 113.6 mg/mL, 163.6 mg/mL, 246.4 mg/mL, 40H e 40A avevano invece un decadimento bimodale perciò è stato necessario introdurre un'espressione che presentasse due distinti coefficienti di diffusione, D_1 e D_2 :

$$G(\tau) = \frac{1}{\pi^{3/2} \langle c \rangle w_0^2 z_0} \left[f_1 \left(1 + \frac{4D_1\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D_1\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} + (1 - f_1) \left(1 + \frac{4D_2\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D_2\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \right]$$

Le misure sono state effettuate a temperatura ambiente impostando la lunghezza d'onda di eccitazione a 561 nm e la frequenza di campionamento a 100 kHz. Per ciascun campione sono state fatte cinque misure acquisite per tempi pari a 60 s nel caso delle concentrazioni 40.4 mg/mL, 246.4 mg/mL, 40H, 40A e pari a 150 s nel caso delle restanti soluzioni. Nel Capitolo 2.3 sono riportate le medie e l'errore calcolato come deviazione standard di ciascuna misura rispetto alla media. Per confrontare le funzioni di autocorrelazione relative ai campioni di diverse concentrazioni è stato necessario normalizzare le curve tra 0 ed 1, sottraendovi il loro valore massimo e dividendole per il minimo.

FLUORESCENZA Le misure sono state effettuate con uno spettrofluorimetro PERKIN ELMER LS50B termostato a 20°C. Per gli esperimenti di FRET i campioni sono stati posti nelle cuvette Hellma in quarzo dal cammino ottico di 1 cm e prima di fare la misura essi sono stati incubati per dieci minuti all'interno della cella portacampione termostata dello strumento. Le soluzioni sono state eccitate da una radiazione laser di 468 nm e gli spettri sono stati raccolti da 478 nm a 700 nm. Per quantificare l'efficienza del trasferimento di energia è stato introdotto il parametro E_f :

$$E_f = \frac{F_D - F_{DA}}{F_D}$$

dove F_D è l'intensità di fluorescenza del donatore libero, ovvero del Lisozima marcato con Fluoresceina in assenza del Tamra, ed F_{DA} è l'intensità di fluorescenza del donatore in presenza di un accettore, misurata nei campioni che contenevano la proteina legata ad entrambi i marcatori.

Nota l'efficienza del trasferimento di energia, nel caso in cui essa sia diversa da zero, è stato possibile ricavare la distanza media (R) tra le particelle marcate con i due diversi fluorofori tramite la relazione che segue:

$$E_f = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

dove R_0 è il raggio di Foster ed ha un valore caratteristico di ogni coppia donatore-accettore; nel caso della Fluoresceina e del Tamra è 5 nm [30]. Il valore di R è stato poi confrontato con la distanza media (d) che le particelle di Lisozima in soluzione avrebbero avuto se non avessero interagito e si fossero disposte ai vertici di un reticolo a facce centrate:

$$d = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{4000}{N_A C_M} \right)^{1/3} \cdot 10^8$$

dove N_A è il numero di Avogadro e C_M è la concentrazione molare del campione.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi si affronta lo studio dell'aggregazione di proteine globulari utilizzando il Lisozima come prototipo per la ricerca scientifica. Comprendere come interagiscono fra loro le proteine nel formare prima i cluster e poi i cristalli è argomento di ricerche attuali e di grande interesse.

Numerose malattie sono legate alla precipitazione delle proteine globulari: per quanto è noto ad oggi il morbo di Alzheimer, la polineuropatia familiare amiloidotica, l'anemia falciforme, la formazione della cataratta, etc. La produzione di farmaci in grado di inibire il processo di aggregazione delle proteine rallenterebbe il decorso di tali malattie [7].

Lo studio non riguarda esclusivamente l'ambito medico- farmaceutico. Una volta note le interazioni che si vengono a creare al momento della formazione dei cluster e le dinamiche del processo di aggregazione, sarebbe possibile migliorare le tecniche di purificazione attualmente in uso per le proteine [10].

Un'ulteriore ragione per investire in questo campo di ricerca sta nel fatto che l'esistenza di cluster all'equilibrio rilevata in soluzioni proteiche costituisce una prova dell'universalità del processo di Self- Assembly, che non sarebbe limitato alle soluzioni polimeriche ed ai liposomi carichi [7].

Si è scelto di utilizzare il Lisozima tra le proteine globulari perchè è molto comune, facilmente ricavabile dall'albumina dell'uovo di gallina e molto resistente alla denaturazione.

Il lavoro presentato in queste pagine prende spunto da una ricerca scientifica che analizza delle soluzioni di Lisozima di diverse concentrazioni utilizzando le tecniche NSE e SANS [11]. Da questi studi è nata l'idea di indagare sui processi di aggregazione delle proteine servendosi principalmente delle spettroscopie a correlazione di fotoni e di correlazione della fluorescenza. Si è deciso di strutturare l'esperimento in tre parti. Nella prima si è caratterizzata la proteina in tutte le forme in cui la si è sottoposta alle misure: allo stato nativo, marcata con 5-Tamra e marcata con Fluoresceina. Le analisi di denaturazione termica e di Dicroismo Circolare hanno dimostrato che le specie

fluorescenti non modificano la struttura del Lisozima convalidando gli esperimenti successivi.

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 cinetiche delle particelle che si muovono in soluzione di un moto browniano e vi associano un coefficiente di diffusione. Esso 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 [24].

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.

Un primo risultato è che il Lisozima forma spontaneamente dei cluster.

Il processo di aggregazione dipende dalla concentrazione della proteina presente in soluzione: incrementando la quantità di Lisozima in acqua i cluster aumentano in numero. Un dato di un certo rilievo è che nei campioni più concentrati, tra quelli che sono stati sottoposti alla misura, alcune delle particelle instaurano forze di carattere attrattivo e formano appunto gli aggregati proteici, invece sulle altre prevalgono le interazioni repulsive. Infatti il coefficiente di mutua diffusione dei monomeri di Lisozima nelle soluzioni più concentrate è maggiore di 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. Inoltre dalle misure effettuate sui campioni diluiti ottenuti dalle soluzioni più concentrate di Lisozima risulta che, una volta che si sono formati, i cluster sono piuttosto stabili e non si dissolvono completamente per effetto dell'aggiunta di solvente.

Lo scopo della ricerca scientifica in questo ambito è dedurre dal risultato sperimentale i processi che sono alla base dell'aggregazione delle proteine globulari in modo da potervi associare un modello teorico più semplice e più generale possibile. Ad oggi

molti aspetti della questione rimangono irrisolti sebbene il recente modello Two-Yukawa costituisca un determinante passo in avanti. Lo studio dell'aggregazione del Lisozima in acqua è quindi il tassello di un disegno più ampio che può essere completato solo dall'interdisciplinarietà unendo le conoscenze chimiche e biologiche al progresso in medicina e verificando gli studi teorici con le simulazioni al computer.

Bibliografia

- [1] D.Nelson and M.Cox, I principi di biochimica di Lehninger, *Zanichelli*, 2010.
- [2] R.Garrett and C.Grisham, Principles of biochemistry with a human focus, *Piccin*, May 2001.
- [3] L.Stryer and J.Berg, Biochimica, *Zanichelli*, 2011.
- [4] L.N.Arnaudov and R. de Vries, Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white Lysozyme, *Biophysical Journal*, January 2005, 88: 515- 526.
- [5] C.M.Dobson, P.A.Evans, S.E.Radford, Understanding how proteins fold: the Lysozyme story so far, *Trends in Biochemical Sciences*, January 1994, 19: 31- 37.
- [6] Tjernberg, L.Hosia, W. Bark, N.Thyberg and J.Johansson, Charge attraction and propensity are necessary for amyloid fibril formation from tetrapeptides, *J. Biol. Chem*, 2002, **277**: 43243–43246.
- [7] A.Stadner, F.Cardinaux and P.Schurtenberger, A Small-Angle scattering study on equilibrium cluster in Lysozyme solutions, *J. Phys. Chem*, 2006, 110: 21222-21231.
- [8] S.Chen, M.Broccio, Y.Liu, E.Fratini and P.Baglioni, The two- Yukawa model and its applications: the case of charged proteins and copolymer micellar solutions, *J. Applied Crystallography*, 2007, 40: s321- s326.
- [9] Y.Liu, W.Chen and S.Chen, Cluster formation in two-Yukawa fluids, *J. Chem. Physics*, 2005, vol 122.
- [10] D.Rosenbaum, P.C.Zamora, and C.F.Zukoski, Phase behavior of small attractive colloidal particles, *Physical Review Letters*, 1996, vol 76 n° 1.
- [11] L.Porcar, P.Falus, W.Chen, A.Faraone, E.Fratini, K.Hong, P.Baglioni and Y.Liu, Formation of the dynamic clusters in concentrated Lysozyme protein solutions, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, November 2010, 1: 126- 129.
- [12] T.Imoto, Lysozyme, *eLS - Wiley online library*, 1972.
- [13] Diamond R. et al., *J. Mol. Biol.*, 1974, 82: 371- 391.
- [14] Jasco, Thermal denaturation of hen-egg Lysozyme with concurrent CD and fluorescence detection, *CD application note 01-03*.
- [15] R.Towned, T.F. Kumosinski and S.N. Timasheff, The Circular Dichroism of variant of β - Lactoglobuline, *The Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242 : 4538- 4545.

- [16] Berne and Pecora, "Dynamic Light Scattering" John Wiley , 1975.
- [17] K.Gekko, H.Noguchi, Effects of ionic dextran derivatives on heat precipitation of protein, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26: 1409- 1414.
- [18] S.W.Provencher, Contin: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, *Computer Physics Communications*, May 1982, 27: 229- 242.
- [19] R.Bro and S.De Jong, A Fast Non-Negativity-Constrained Least Squares Algorithm, *Journal of Chemometrics*, 1997, 11: 393- 401.
- [20] M.L.Pusey and A.Nadarajah, A model for tetragonal Lysozyme crystal nucleation and growth, *Crystal Growth & Design*, 2002, vol 2 n°6 : 475- 483.
- [21] J.Kreiger, K.Toth, J.Langowski, Practical course biophysics: absorption and Fluorescence Spectroscopy, Fluorescence Correlation Spectroscopy, *German Cancer Research Center in the Helmholtz Association*.
- [22] B.Englitz, Measuring particle-size from intensity spectrum of scattered light, *Biophysical Measurement*, 2002, 173.
- [23] S.T.Hess, S.Huang, A.A.Heikal and W.Webb, Biological and chemical applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: a review, *Biochemistry*, January 2002, vol 41 n° 3.
- [24] Z.Foldes-Papp, What it means to measure a single molecule in a solution by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy, *Experimental and Molecular Pathology*, March 2006, 80: 209-218.
- [25] E.L.Elson, Quick tour of Fluorescence Correlation Spectroscopy from its inception, *Journal of Biomedical Optics*, September/October 2004, 9: 857- 864.
- [26] G.Maulucci, M.De Spirito, G.Arcovito, F.Boffi, A.Congiu Castellano and G.Briganti, Particle size distribution in DMPC vesicles solutions undergoing different sonification times, *Biophysical Journal*, May 2005, 88: 3545- 3550.
- [27] S.Yadav, T.M.Scherer, S.J.Shire, D.S.Kalonia, Use of dynamic light scattering to determine second virial coefficient in a semidilute concentration regime, *Analytical Biochemistry*, 2011, 411: 292- 296.
- [28] J.Zhang and X.Liu, Effect of protein- protein interactions on protein aggregation kinetics, September 2003, vol. 119 n° 20.
- [29] D.F.Evans and H.Wennerström, The colloidal domain where physics, chemistry, and biology meet, *Wiley- VCH second edition*, 33- 37.

- [30] R.Schmauder, Application of FCS and FRET in protein biochemistry and biophysics, 1973.
- [31] B.Juskowiak, E.Galezowska, A.Zawadzka, A.Gluszynska and S.Takenaka, Fluorescence anisotropy and FRET studies of G-quadruplex formation in presence of different cations, *Spectrochimica Acta*, 2006, part A 64 835- 843.
- [32] B.J.Frisken, Revisiting the method of cumulants for the analysis of Dynamic Light-Scattering data, *Optical Society of America*, April 2001.
- [33] N.Panchuk-Voloshina, R.P.Haugland, J.Bishop-Stewart, M.K.Bhalgat, P.J.Millard, F.Mao, W.Leung and Richard P. Haugland, Alexa Dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates, *J. Histochem Cytochem*, 1999, 47: 1179.