

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Processi Industriali

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria dei Materiali



**IMAGING MOLECOLARE
DI PROTEINE AMILOIDI:
INTERAZIONI CON SUPERFICI E
MECCANISMI DI AGGREGAZIONE**

Relatore: Dott. Carlo S. Casari

Correlatore: Dott.ssa Alessandra Apicella

Candidato:

Paolo Boschi

matr. 735025

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

<i>Elenco delle figure</i>	iii
<i>Sommario</i>	vii
<i>1. Introduzione</i>	1
<i>2. Le proteine: struttura e aggregazione</i>	4
2.1 Proteine e loro struttura	4
2.2 Il meccanismo di folding	8
2.2.1 Considerazioni energetiche ed interazioni coinvolte nel meccanismo di folding	10
2.3 Misfolding e patologie correlate	12
2.4 Amiloidi e loro proprietà	14
2.5 Malattie da espansione di poliglutammine	20
2.6 Atassina-3	22
2.6.1 Struttura e proprietà	22
2.6.2 Meccanismo di aggregazione	24
<i>3. Interazioni proteina - superfici solide</i>	28
3.1 Adsorbimento di proteine su substrati solidi	28
3.2 Interazioni coinvolte.	30
3.3 Variazioni conformazionali indotte dall'interazione tra proteina e superficie solida	37
3.3.1 Studi sperimentali delle interazioni proteina - substrato	38
3.4 Scopo del lavoro	48
<i>4. Il microscopio a forza atomica</i>	49
4.1 Principi di funzionamento	49
4.2 Modalità a non contatto (dynamic mode)	55
4.3 Risoluzione dell'AFM	58

4.4	AFM in biologia	61
5.	<i>Metodo sperimentale e risultati</i>	67
5.1	Preparazione dei substrati e loro proprietà	67
5.1.1	Mica	67
5.1.2	Silicio	70
5.1.3	Oro	71
5.1.4	Oro funzionalizzato	73
5.1.5	Griglia in oro	76
5.2	Preparazione campioni e metodologie di misura	77
5.3	Risultati	82
5.3.1	Atassina-3/291	82
5.3.2	Atassina-3/182	92
5.3.3	Grado di adsorbimento	95
5.4	Discussione dei risultati	96
6.	<i>Conclusioni</i>	107

ELENCO DELLE FIGURE

2.1	Formazione del legame peptidico	5
2.2	Aminoacidi: loro abbreviazioni e proprietà dei gruppi laterali.	6
2.3	Strutture secondarie delle proteine	7
2.4	Struttura terziaria del dominio della proteina AT-3, spettroscopia NMR	8
2.5	Processo di folding e minimo energetico	9
2.6	Interazioni che determinano la struttura di una proteina in ambiente acquoso	12
2.7	Proteine associate alle relative forme di amiloidosi	13
2.8	Formazione di fibre amiloidi: modello cinetico	15
2.9	Schema generale delle possibili conformazioni che una catena polipeptidica può assumere	16
2.10	Struttura cross- β di una fibrilla amiloide	17
2.11	Strutture cross- β possibili	18
2.12	Lista di patologie da espansione di poliglutammine	20
2.13	Modelli strutturali per proteine PoliQ e modello di aggregazione proposto	22
2.14	Struttura del dominio Josephinico della proteina AT-3 ottenuta con simulazioni di dinamica molecolare	23
2.15	Schematica rappresentazione della struttura primaria della variante AT-3Q29	24
2.16	Struttura primaria della variante AT-3Q24	25
2.17	Meccanismo di aggregazione dell'AT-3	25
2.18	Meccanismo di aggregazione dell'atassina-3	27
3.1	Adsorbimento di una proteina su substrato solido	29
3.2	Interazioni tra proteina e substrato	30
3.3	Quantità di lisozima adsorbito su diversi tipi di Self-Assembled Monolayers (SAMs) in funzione dell'idrofobicità della superficie	33

3.4	Visualizzazione schematica del contatto tra una goccia di liquido con una superficie solida in atmosfera gassosa	35
3.5	Effetto della rugosità sulla bagnabilità	37
3.6	Correlazione tra il peso molecolare di singole proteine e il rispettivo volume, calcolato da misure AFM	39
3.7	Misure AFM in aria di strutture fibrillari dell'insulina	40
3.8	Immagini AFM in liquido di aggregati di immunoglobulina	41
3.9	Immagini AFM in aria del dominio HjpF-N, lievito Ure2p e lisozima	42
3.10	Tabella riassuntiva per la morfologia della proteina AT-3/182 ottenuta a diversi tempi di incubazione e su tre differenti substrati	43
3.11	Immagini AFM delle strutture globulari del dominio-J ottenute su mica, silicio e oro	44
3.12	Immagini SEM del dominio-J su substrato in silicio	45
3.13	Immagini AFM delle strutture a filamento su oro e silicio ottenute per il dominio-J	46
3.14	Meccanismo di misfolding del dominio Josephinico della proteina atassina-3	47
4.1	Parametri geometrici per un cantilever rettangolare	51
4.2	Immagine SEM di un cantilever a V e punta conica	52
4.3	Sistema ottico di rilevazione della deflessione del cantilever e componenti principali dell'AFM	52
4.4	Energia potenziale di interazione come funzione della distanza punta-campione	53
4.5	Movimento dello scanner durante l'acquisizione di un'immagine.	54
4.6	Curva di risonanza per il sistema cantilever-punta	57
4.7	Ampiezza di oscillazione in funzione della frequenza per tre diversi valori di distanza punta-campione	58
4.8	Calcolo della risoluzione laterale ideale	60
4.9	Convoluzione punta - campione	60
4.10	Esempio di immagine AFM artefatta	61
4.11	Immagine AFM ad alta risoluzione di filamenti di DNA in soluzione	62
4.12	Superavvolgimento di DNA, immagine AFM	63
4.13	Immagini AFM <i>real-time</i> del complesso RNAP-DNA	63
4.14	Immagine AFM della superficie periplasmatica ed extracellulare della struttura cristallina formata dalla proteina OmpF	64

4.15	Immagini AFM di fibroblasti prima dell'infezione e successive alla stessa	64
4.16	Spettroscopia di forza su filamento di DNA	65
5.1	Struttura cristallina della muscovite	68
5.2	Bagnabilità della muscovite	69
5.3	Cinque diversi modelli per una superficie di silice amorfa	70
5.4	Bagnabilità del substrato in silicio	71
5.5	Tecnica 'template stripping'(TS)	72
5.6	Bagnabilità della superficie di oro ottenuta con la tecnica TS . . .	73
5.7	Immagine AFM del substrato in oro policristallino prima della funzionalizzazione	74
5.8	Immagine AFM del substrato in oro policristallino funzionalizzato con 1-dodecantiole e simulazione molecolare della struttura di uno strato auto - assemblato di tiolo alchilico	74
5.9	Misura di bagnabilità dell'oro policristallino funzionalizzato	75
5.10	Immagine SEM della griglia in oro	76
5.11	Varianti della proteina atassina-3 studiate in questa tesi	77
5.12	Preparazione di un generico campione	78
5.13	Depositi salini dovuti all'asciugatura della superficie	80
5.14	Immagini AFM, profili di linea e distribuzione delle altezze delle strutture globulari formate su mica per i due diversi tempi di incubazione	84
5.15	Immagini AFM, profili di linea e distribuzione delle altezze delle strutture globulari formate su silicio per i due diversi tempi di incubazione	85
5.16	Immagini AFM, profili di linea e distribuzione delle altezze delle strutture globulari formate su oro per i due diversi tempi di incubazione	86
5.17	Immagini AFM, profili di linea e distribuzione delle altezze delle strutture globulari formate su oro funzionalizzato per i due diversi tempi di incubazione	87
5.18	Immagini AFM rappresentative per le strutture a 'catena di perle' su mica	89
5.19	Ingrandimento e dimensioni delle unità globulari che costituiscono le singole catene	89
5.20	Struttura amorfa e grossi aggregati su silicio	90

5.21	Strutture anulari e grossi aggregati su silicio	90
5.22	Strutture anulari e altre morfologie di aggregati su oro	91
5.23	Filamenti formati su oro	91
5.24	Immagine della particolare struttura formata sul substrato funzionalizzato	92
5.25	Immagini AFM della variante AT-3/182 su substrato funzionalizzato	93
5.26	Spettri FT-IR della proteina AT-3/182 in soluzione e adsorbita su mica, oro e oro funzionalizzato per i due tempi di incubazione differenti	94
5.27	Immagine AFM che mette in evidenza il differente grado di adsorbimento dell'AT-3/291 all'interfaccia tra oro e mica e immagine SEM del campione	95
5.28	Strutture globulari del dominio-J e catene di perle formate dall'AT-3/291 su mica	100
5.29	Schematica rappresentazione di una struttura a 'catena di perle' formata da più unità globulari	100
5.30	Filamenti formati dal dominio-J e assenza di filamenti per la variante AT-3/291 su oro	102
5.31	Variante AT-3/291 depositata su mica senza essere incubata, prima e dopo trattamento termico	105
5.32	Rappresentazione schematica della cinetica di aggregazione in soluzione della proteina AT-3/291	106

SOMMARIO

Lo scorretto ripiegamento della proteina atassina-3 (AT-3) è alla base della malattia neurodegenerativa Atassia Spinocerebellare di tipo 3 (Malattia di Machado - Joseph). Così come per molte altre malattie neurodegenerative gravi e diffuse, come le malattie di Parkinson, Alzheimer, le malattie prioniche e il morbo di Huntington, non esiste alcuna cura. Lo studio del meccanismo di aggregazione che conduce alla formazione di specie tossiche per le cellule neuronali è di grande importanza per permettere lo sviluppo di efficaci metodi diagnostici e terapeutici nei confronti della patologia associata. In questo lavoro di tesi, il microscopio a forza atomica (AFM) è stato utilizzato per studiare la morfologia di una specifica variante della proteina AT-3 (AT-3/291), come risultato delle interazioni con substrati di diverse proprietà chimico - fisiche (mica, silicio, oro, oro funzionalizzato). Le interazioni con un substrato inducono infatti variazioni conformazionali della proteina adsorbita e possono portare all'aggregazione. In altre parole, simulando interazioni di diversa natura attraverso l'utilizzo di substrati con specifiche proprietà fisico - chimiche, si intende studiare la morfologia della proteina per ricondursi così al meccanismo di aggregazione. I risultati hanno permesso di ottenere interessanti informazioni circa la relazione tra la struttura della proteina studiata e le morfologie ottenute mediante lo studio AFM. Le misure sono anche state confrontate con quelle di altri studi AFM su varianti diverse della stessa proteina, in modo da fornire un'interpretazione più ampia e completa del processo di aggregazione.

1. INTRODUZIONE

Il termine nanoscienze è comunemente utilizzato per indicare le numerose e diverse aree scientifiche (fisica, chimica, biologia) di interesse delle nanotecnologie, che dovrebbero permettere originali applicazioni industriali e commerciali nei più diversi settori, dalla medicina alle tecnologie dell'informazione e della comunicazione, dalla produzione di energia a quella di nuovi materiali.

La varietà e la molteplicità delle applicazioni delle nanotecnologie richiedono e comportano un approccio interdisciplinare, necessario per coniugare conoscenze e competenze diverse ai fini della ricerca scientifica e dello sviluppo delle relative applicazioni tecnologiche: dalla chimica alla fisica, dall'ingegneria alla biologia, dall'informatica alla genetica.

Da questo punto di vista, il settore nanobiotecnologico rappresenta un importante esempio di interdisciplinarietà, essenzialmente per le possibili applicazioni in campo medico e più in generale in quello della salute. Si pensi, solo per fare alcuni esempi, alle possibilità diagnostiche e terapeutiche; in particolare i dispositivi miniaturizzati da impiantare nel corpo umano a scopo di diagnosi precoce delle malattie o i materiali capaci di migliorare la biocompatibilità degli organi trapiantati.

Nell'ambito dello sviluppo di tecniche diagnostiche e terapeutiche, in particolare nei confronti di malattie neurodegenerative gravi e diffuse come il morbo di Parkinson, Alzheimer, le malattie prioniche, di Huntington e le atassie, si collocano tutta una serie di studi volti a chiarire la relativa patogenesi. In generale, lo scorretto ripiegamento (misfolding) e l'aggregazione proteica sono alla base di queste malattie. Lo studio di tale processo comprende anche la caratterizzazione morfologica dei vari stati di aggregazione.

Da questo punto di vista, il *microscopio a forza atomica* (AFM) è sicuramente la tecnica di indagine più utilizzata. Il principio di funzionamento si basa essenzialmente sull'interazione tra una sonda di dimensioni nanometriche e la superficie da analizzare e permette così di ottenere un'immagine diretta della morfologia del campione, con risoluzione su scala nanometrica. Il principale

vantaggio offerto dall'AFM in campo biologico è quello di consentire l'analisi dei campioni in condizioni fisiologiche, senza ricorrere a particolari tecniche di preparazione.

In questo lavoro di tesi, l'AFM è stato utilizzato per studiare la morfologia di una specifica proteina come risultato delle interazioni con substrati di diverse proprietà chimico - fisiche (mica, silicio, oro, oro funzionalizzato). Le interazioni con un substrato inducono infatti variazioni conformazionali della proteina adsorbita e possono portare all'aggregazione. In altre parole tale fenomeno può essere interpretato non solo in termini di interazioni proteina - proteina ma anche come risultato di quelle tra proteina e superficie.

La proteina studiata è una variante dell'*Atassina-3* (AT-3/291), una proteina appartenente alla famiglia delle amiloidi, responsabile della malattia neurodegenerativa *Atassia Spinocerebellare di tipo 3*, anche conosciuta come malattia di Machado - Joseph. Questa malattia è legata allo scorretto ripiegamento (misfolding) della proteina durante il raggiungimento del suo stato nativo, cioè lo stato in cui la proteina riesce a svolgere la sua funzione vitale. Tutto ciò conduce alla formazione ultima di inclusioni neuronali (placche di fibre amiloidi). E' noto anche il ruolo citotossico di specie intermedie, formate durante tale processo.

Tuttavia, la complessità del meccanismo di aggregazione non è ancora del tutto chiara, così come non si conosce del tutto l'influenza giocata dai diversi tratti della proteina nei confronti di tale processo. In questo senso, il seguente lavoro di tesi si promette di fornire elucidazioni circa la relazione tra la struttura di una variante specifica dell'atassina-3 e le morfologie osservate mediante lo studio AFM della proteina depositata su substrati con diverse proprietà chimico - fisiche. Saranno quindi confrontati i risultati ottenuti con quelli di altri studi AFM su varianti diverse della stessa proteina, in modo da fornire un'interpretazione più ampia e completa del processo di aggregazione.

Riassumendo, simulando interazioni di diversa natura attraverso l'utilizzo di substrati con specifiche proprietà fisico - chimiche, si intende studiare la morfologia della proteina per ricondursi così al meccanismo di aggregazione. Se da un lato l'analisi delle interazioni tra proteine e superfici è di grande interesse in campo biotecnologico, lo studio del meccanismo di misfolding ha come obiettivo ultimo quello di permettere di sviluppare efficaci metodi diagnostici e terapeutici nei confronti della patologia associata.

Questo lavoro di tesi è stato svolto in collaborazione con il gruppo del prof. P. Tortora del Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze (Università di Milano Bicocca) e si articola come segue. Nel primo capitolo verranno riassunti

gli aspetti generali riguardo alle proteine, al processo di folding, misfolding e amiloidosi. Successivamente saranno discussi gli aspetti più importanti dell'interazione tra proteina e superfici con un richiamo alla proprietà di bagnabilità. Nel terzo capitolo sarà poi presentato il microscopio a forza atomica. L'ultimo capitolo comprende la descrizione del metodo di preparazione dei substrati così come quella delle loro proprietà chimico - fisiche, i dettagli sperimentali, i risultati e la relativa discussione. Infine, vengono presentate le conclusioni e i possibili sviluppi futuri di questo lavoro.

2. LE PROTEINE: STRUTTURA E AGGREGAZIONE

Le proteine sono una classe di macromolecole essenziali per la crescita, la riparazione, il buon funzionamento e la struttura di tutte le cellule viventi. Le loro funzioni sono estremamente diversificate: strutturali, catalitiche (enzimi), di trasporto, di regolazione e immunologiche.

In questo capitolo verrà presentata una panoramica generale riguardo la struttura e le proprietà delle proteine, focalizzando l'attenzione sul rapporto diretto tra gli aspetti conformazionali e la funzione biologica. In questo senso sarà descritto il meccanismo di ripiegamento corretto (folding proteico), cioè quello che permette alla proteina di assumere una conformazione funzionale, come risultato di un bilancio energetico tra vari tipi di interazioni. Allo stesso tempo si affronterà il ruolo del ripiegamento scorretto (misfolding) e delle patologie annesse. Particolare attenzione sarà poi rivolta ad una specifica classe di proteine e alle malattie ad essa collegate, concludendo con una descrizione delle proprietà della proteina oggetto di questo lavoro di tesi.

2.1 *Proteine e loro struttura*

Le unità costitutive delle proteine sono gli amminoacidi. Si tratta di molecole organiche in cui un atomo di carbonio ibridizzato sp^3 ($C\alpha$) è legato ad un atomo di H, ai gruppi funzionali dell'ammina ($-NH_2$) e dell'acido carbossilico ($-COOH$) e ad un sostituente laterale organico R. Una reazione di condensazione (Fig. 2.1) con eliminazione di una molecola di acqua permette al gruppo amminico di un amminoacido di legarsi al gruppo carbossilico di un altro formando così un legame ammidico (o peptidico) le cui proprietà conferiscono tra l'altro una notevole flessibilità e un elevato grado di rotazione all'intera struttura della proteina [1]. In questo modo può avvenire la sintesi di un'intera catena di amminoacidi. La catena è perciò una sequenza di amminoacidi (o residui) e prende il nome di polipeptide; uno o più polipeptidi costituiscono una proteina. I gruppi terminali della catena sono evidentemente di diversa natura chimica: la parte vicina al

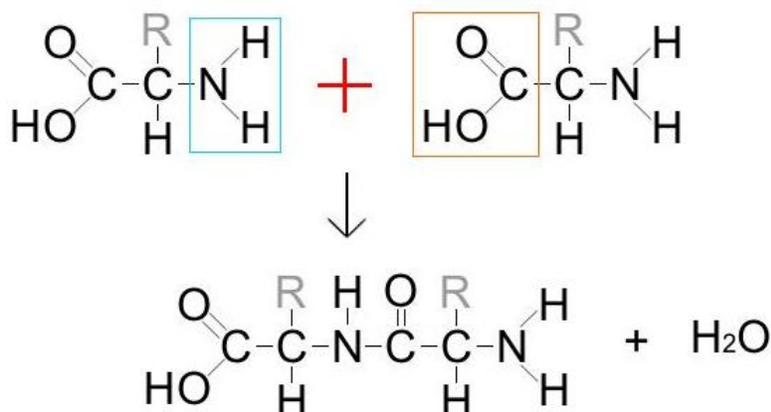


Fig. 2.1: Formazione del legame peptidico

gruppo amminico ($-\text{NH}_3^+$, anche scritto come NH_2) è detta N-terminale, quella contenente il gruppo carbossilico ($-\text{COO}^-$, anche scritto come $-\text{COOH}$) viene invece definita C-terminale. Le porzioni di ciascun amminoacido che non sono coinvolte nel legame peptidico costituiscono i gruppi laterali e sono quelle che conferiscono ad ognuno di essi le proprietà fisico-chimiche caratteristiche. E' chiaro, quindi, come ciascuna proteina differisca dalle altre sia per la sequenza sia per il numero (da decine a centinaia) di amminoacidi di cui è composta. Ciò significa anche che la sequenza di gruppi laterali conferisce ad ogni distinta proteina proprietà specifiche.

In natura esistono 20 tipi di amminoacidi diversi che vengono raggruppati in due classi principali: quelli con gruppi laterali di carattere idrofobico (apolari) e quelli con gruppi laterali idrofilici (polari), questi ultimi a loro volta suddivisi a seconda della carica netta (Fig. 2.2).

Le proprietà fisico-chimiche dei singoli residui, così come quelle dell'ambiente che circonda una proteina, influenzano e determinano il meccanismo di folding ossia il processo termodinamicamente spontaneo attraverso il quale una proteina modifica la propria struttura fino al raggiungimento di un minimo energetico conformazionale termodinamicamente stabile e che permette di svolgere correttamente la sua funzione biologica: lo stato nativo¹. E' stato infatti dimostrato come in opportuni solventi (oppure in particolari condizioni di temperatura e

¹ In realtà non sempre lo stato nativo è quello di minimo energetico ma può essere determinato da fattori cinetici e quindi riferirsi ad una conformazione di bassa energia raggiungibile in tempi veloci.

pH) sia possibile denaturare una proteina ovvero ridurla ad una catena peptidica flessibile; rimuovendo poi il solvente la proteina tende a recuperare la sua forma iniziale e quindi si ripiega nella conformazione di minimo energetico.

Amino acid		Side chain		Amino acid		Side chain	
Aspartic acid	Asp	D	negative	Alanine	Ala	A	nonpolar
Glutamic acid	Glu	E	negative	Glycine	Gly	G	nonpolar
Arginine	Arg	R	positive	Valine	Val	V	nonpolar
Lysine	Lys	K	positive	Leucine	Leu	L	nonpolar
Histidine	His	H	positive	Isoleucine	Ile	I	nonpolar
Asparagine	Asn	N	uncharged	Proline	Pro	P	nonpolar
Glutamine	Gln	Q	uncharged	Phenylalanine	Phe	F	nonpolar
Serine	Ser	S	uncharged	Methionine	Met	M	nonpolar
Threonine	Thr	T	uncharged	Tryptophan	Trp	W	nonpolar
Tyrosine	Tyr	Y	uncharged	Cysteine	Cys	C	nonpolar
POLAR AMINO ACID				NONPOLAR AMINO ACID			

Fig. 2.2: Amminoacidi: loro abbreviazioni e proprietà dei gruppi laterali.

Questo indica non solo che il processo è reversibile ma anche come la sequenza di amminoacidi contenga tutte le informazioni necessarie per generare la struttura della proteina.

La funzionalità di una proteina è legata direttamente alla propria struttura, in particolare si distinguono: la struttura primaria, secondaria, terziaria e quaternaria. La struttura primaria è costituita dalla sequenza degli amminoacidi ed è direttamente tradotta dal DNA (sintesi proteica). Quella secondaria rappresenta la conformazione ordinata che alcuni tratti di proteina possono assumere sulla base della struttura primaria ed è caratterizzata da ponti idrogeno fra i gruppi del legame peptidico di residui non adiacenti, mentre non sono direttamente coinvolte le catene laterali degli amminoacidi. All'interno della stessa proteina, diversi tratti possono assumere la medesima struttura secondaria o strutture secondarie differenti. Le principali strutture secondarie sono le α -eliche e le strutture foglietto β (Fig. 2.3). L' α -elica è una struttura regolare ben definita: l'elica è quasi sempre destrorsa, il passo è di 5.4 Å e ogni spirale è costituita da 3.6 residui. Il ponte idrogeno si forma tra l'NH di un residuo e l'ossigeno del C=O del quarto residuo successivo. I gruppi laterali R dei residui sono tutti rivolti verso l'esterno dell'elica, la loro polarità influenza la struttura tridimensionale della proteina. Alcuni amminoacidi, quali la prolina e la glicina, possono però destabilizzare l'elica provocandone un ripiegamento. Anche le strutture β sono caratterizzate da una conformazione regolare: i tratti della

catena peptidica (tipicamente 510 residui) sono distesi con andamento a zig-zag dei piani peptidici² e i gruppi laterali sono rivolti perpendicolarmente al piano mediano della struttura, orientandosi in maniera alternata nel piano stesso.

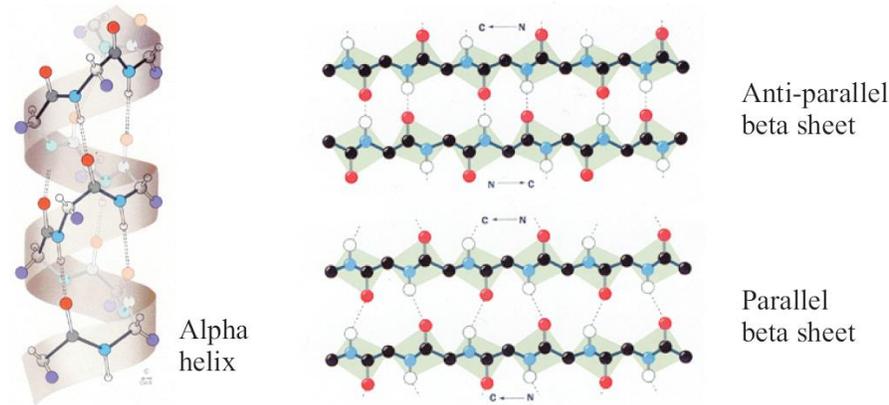


Fig. 2.3: Strutture secondarie delle proteine: α -elica e β foglietto [1]

Molto spesso due o più filamenti β tendono ad affiancarsi lateralmente generando strutture estese dette foglietti β per mezzo di legami idrogeno. Normalmente i foglietti β non sono planari ma tendono ad assumere una forma incurvata leggermente avvitata. Inoltre, essendo possibile definire una direzione per ogni catena peptidica (per convenzione definita dal tratto N-terminale a quello C-terminale), nei foglietti β le catene possono essere orientate reciprocamente in senso parallelo, antiparallelo o misto (Fig. 2.3). In quest'ultimo caso, i foglietti sono meno stabili e si incontrano pertanto più raramente nella struttura delle proteine.

Per struttura terziaria si intende il modo in cui le strutture secondarie si dispongono nello spazio a formare la struttura tridimensionale della proteina. In pratica, la struttura terziaria definisce le coordinate spaziali di tutti gli atomi del polipeptide. Per buona parte delle proteine la struttura terziaria rappresenta l'ultimo livello di organizzazione strutturale, è il caso delle proteine cosiddette monomeriche, costituite cioè da un'unica unità funzionale, biologicamente attiva. Molte altre proteine invece sono costituite dall'associazione di una o più unità di struttura terziaria. In tal caso si parla di struttura quaternaria. Le dimensioni della struttura quaternaria possono raggiungere decine di nanometri

² Il piano peptidico corrisponde allo spazio piano in cui giace un legame peptidico.

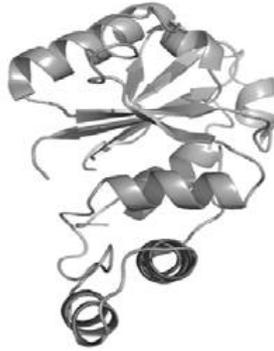


Fig. 2.4: Struttura terziaria del dominio della proteina AT-3, spettroscopia NMR. Per convenzione, le frecce indicano le strutture β mentre le eliche rappresentano le strutture α [2].

o anche più. E'infine possibile distinguere quello che è definito come il dominio di una proteina ovvero una sottostruttura di centrale importanza data la particolare funzione biologica che svolge. Il dominio è in generale composto da catene polipeptidiche in grado di ripiegarsi indipendentemente fino a raggiungere la conformazione più stabile e contiene in genere dai 40 ai 350 amminoacidi (Fig. 2.4). Le proteine più semplici contengono un solo dominio, quelle più complesse anche dozzine di domini, legati tra loro da piccole porzioni di catene non strutturate.

2.2 Il meccanismo di folding

Per poter svolgere la propria funzione biologica una proteina deve essere strutturata nella cosiddetta conformazione nativa. Più precisamente la struttura nativa è quella struttura (3D) stabile e funzionale caratterizzata da un minimo di energia potenziale e da quella conformazione unica che permette alla proteina di svolgere adeguatamente la sua funzione. Come già accennato nel paragrafo precedente il processo che dalla biosintesi del peptide porta alla proteina strutturata nella sua forma nativa (biologicamente attiva) è detto folding (ripiegamento proteico).

Questo complicato processo è un esempio di self-assembly biologico il cui studio aiuta a comprendere come l'evoluzione abbia influenzato le proprietà di un sistema molecolare per trarne un vantaggio funzionale [3],[4]. Studi hanno mostrato come il ripiegamento proteico sia un processo stocastico di ricerca di

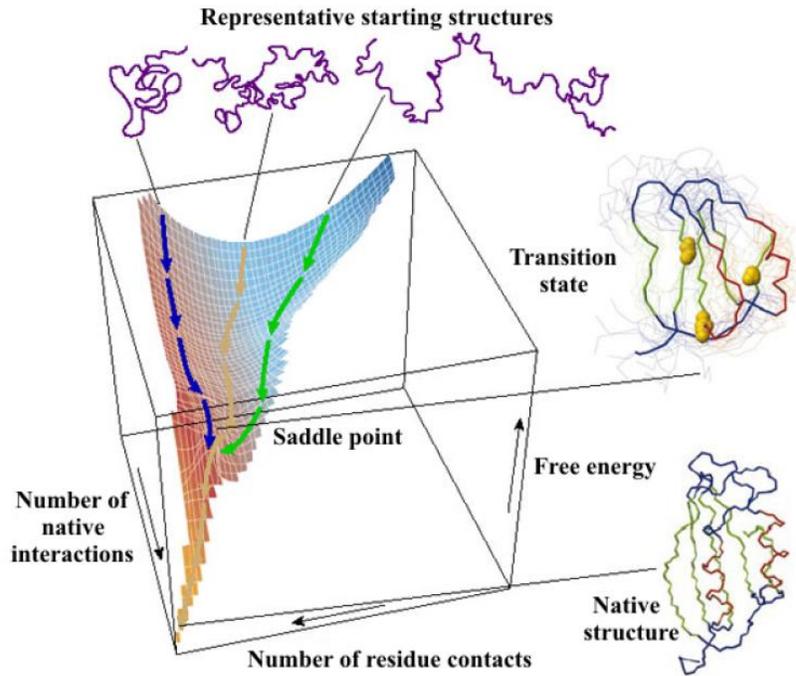


Fig. 2.5: Il processo di folding viene associato al concetto di imbuto conformazionale: il raggiungimento del minimo energetico procede con un processo di prova ed errore nel quale la proteina può raggiungere lo stato nativo solo attraverso un limitato numero di conformazioni. In figura il punto di sella della superficie rappresenta la barriera energetica da superare affinché lo stato di minimo energetico possa essere raggiunto [3]

quelle conformazioni energeticamente favorevoli³ e non comprenda diversi step in cui la proteina è solo parzialmente ripiegata.

Durante tale processo, le fluttuazioni conformazionali di una catena polipeptidica nel suo stato amorfo o solo parzialmente ripiegato, permettono anche ai residui che sono molto distanti di venire a contatto. Dato che in media le interazioni native sono energeticamente favorite rispetto a quelle non native, la catena può ripiegarsi nello stato di minimo energetico attraverso un processo di prova ed errore (Fig. 2.5).

L'evoluzione naturale ha permesso poi alle proteine di evolversi in maniera tale da perfezionare la propria sequenza di amminoacidi in modo da ottimizzare il processo di ripiegamento, per renderlo più veloce ed efficiente [5]. Questa

³ Nel processo stocastico non avviene la 'prova' di tutte le conformazioni possibili. Lo stato nativo viene infatti raggiunto attraverso un limitato numero di conformazioni.

concezione del folding proteico ha permesso lo sviluppo di studi relativi al processo che conducono alla formazione dello stato nativo, sia da un punto di vista sperimentale che teorico. Ad esempio, alcune simulazioni computazionali hanno messo in luce come la formazione di singole strutture secondarie sia molto rapida, nell'ordine dei 100 ns per l' α -elica e intorno a $1\mu\text{s}$ per il β foglietto [3].

2.2.1 Considerazioni energetiche ed interazioni coinvolte nel meccanismo di folding

La differenza di energia libera tra lo stato nativo e quello completamente destrutturato di una proteina è di soli 5-15 kCal/mol (contro un'energia libera totale di ciascuno dei due stati di circa 10^7 kCal/mol); è sufficiente un piccolo aumento di temperatura per causare denaturazione della proteina. Da un punto di vista energetico lo stato destrutturato è caratterizzato da alta entropia e bassa entalpia poichè la proteina dispone di un numero sconfinato di conformazioni accessibili a bassa energia libera. Al contrario, per lo stato nativo si ha il minimo di contributo entropico con un aumento di entalpia del sistema.

Più in generale, la stabilità termodinamica di una proteina è il risultato di un bilancio energetico di vari contributi, ciascuno relativo ad una specifica classe di interazioni (Fig. 2.6). In particolare, le interazioni non covalenti sono di prima importanza non solo nel folding proteico ma anche in molti processi biologici quali ad esempio la replicazione del DNA, il riconoscimento specifico di substrati da parte di enzimi, il riconoscimento di molecole segnale ecc.

Le interazioni che governano il folding sono:

- Interazioni elettrostatiche (e di Van der Waals)
- Legami idrogeno
- Effetto idrofobico

Una proteina contiene in genere pochi legami salini, diverse centinaia di legami idrogeno e diverse migliaia di interazioni di Van der Waals.

E' essenziale sottolineare che le energie delle varie conformazioni sono allo stesso tempo il risultato delle interazioni del peptide con l'ambiente circostante e risentono quindi fortemente di variabili esterne come la temperatura e il pH.

Interazioni elettrostatiche

Le interazioni elettrostatiche giocano un ruolo fondamentale in quanto molte proteine contengono gruppi polari e gruppi che possiedono una carica netta [6].

Sono in generale influenzate e a loro volta influenzano il comportamento strutturale e conformazionale della proteina. Il contributo di questo tipo di interazioni dipende fortemente dalla presenza di ponti salini (legame ionico) che in genere si concentrano prevalentemente sulla superficie proteica. La carica sui residui è in buona parte delocalizzata. Le interazioni di Van der Waals (potenziale di L-J), in particolare le interazioni di tipo dipolo-dipolo indotto, giocano un ruolo quando gli atomi distano tra loro pochi Å. Il processo di folding termina infatti quando il contributo repulsivo di tali forze bilancia quello attrattivo, la proteina può assumere così una struttura ben compatta e strutturata solo se sono soddisfatti requisiti di ordine e regolarità conformazionale.

Legami idrogeno

In un legame idrogeno un atomo di idrogeno viene condiviso tra due atomi, è legato covalentemente ad uno dei due (donatore di idrogeno) e interagisce con l'altro (accettore di idrogeno). Può formarsi sia tra molecole non cariche che cariche, nelle proteine l'idrogeno (legato ad un atomo di ossigeno, azoto o zolfo) si può legare con un atomo di ossigeno o azoto. I legami idrogeno sono fondamentali nelle strutture proteiche: la capacità dell'ossigeno carbonilico della catena principale di formare legami idrogeno con i gruppi amminici della catena principale promuove infatti la formazione delle strutture secondarie come α -elica e foglietti β . D'altra parte, la conformazione nativa, per mantenere la propria stabilità, deve sopperire al minor contenuto entropico attraverso la formazione di ponti intracatena (non solo legami idrogeno ma anche interazioni idrofobiche) anche tra regioni lontane della struttura primaria. Inoltre, i legami H che una proteina forma in mezzo acquoso danno anch'essi un notevole contributo alla riduzione dell'energia libera.

Effetto idrofobico

Le interazioni idrofobiche sono quelle che dominano il processo di folding in ambiente acquoso. Nel caso di un soluto apolare in un mezzo acquoso, come ad esempio una proteina, si ha una diminuzione di entropia del sistema poiché il numero di modi con cui le molecole d'acqua formano legami idrogeno sulla superficie di un gruppo non polare è inferiore a quello che farebbero in sua assenza. Il processo non è spontaneo (nonostante $\Delta H < 0$), quindi, affinché lo sia, occorre che avvenga l'aggregazione dei gruppi non polari in modo da minimizzare l'area superficiale della cavità occupata dal gruppo apolare e quindi la perdita

di entropia del sistema. Nel caso del folding proteico, il primo step verso la conformazione dello stato nativo è infatti il collasso idrofobico. Si tratta di un effetto entropico e consiste nel ripiegamento verso l'interno da parte dei residui con catene laterali idrofobiche, mentre i gruppi polari restano esposti al solvente.

Type of interaction	$\Delta G_{folding}$	Remarks
Coulomb	> 0	Depending on the pH relative to the isoelectric point of the protein/sorbent complex.
Hydrogen bond Dipole	≈ 0	Formation of protein-protein and water-water bonds compensated by loss of protein-water bonds.
Dispersion	≤ 0	Atomic packing densities in compact protein molecules higher than its water.
Hydrophobic dehydration	$< < 0$	Entropy increase in water released from contact with hydrophobic components.
Distorsion of bond lengths and angles	> 0	Some bonds are under stress in the folded structure.
Rotational freedom along the poly-peptide chain	$> > 0$	Folding reduces the conformational entropy of the polypeptide chain and, possibly, the side groups.

Fig. 2.6: Interazioni che determinano la struttura di una proteina in ambiente acquoso [7].

2.3 Misfolding e patologie correlate

Per le proteine composte da 100 residui o più, risultati sperimentali hanno dimostrato la presenza di stati intermedi solo parzialmente ripiegati durante il processo di folding [3]: questo equivale a dire che possono esistere più percorsi attraverso i quali una proteina può raggiungere la conformazione nativa. Il ruolo che gli intermedi hanno è oggetto di dibattito: non è stato infatti chiarito del tutto se siano destabilizzanti e inibiscano il corretto ripiegamento oppure se possano in qualche modo favorire la ricerca del minimo energetico limitando il numero di conformazioni accessibili [8] [9] [10]. In ogni caso, il rischio è quello che il processo di ripiegamento venga modificato e porti così ad una conformazione non corretta della proteina (misfolding). Riassumendo, il folding può essere alterato, tale alterazione può generare misfolding e far sì che la proteina non sia più in grado di svolgere la sua funzione correttamente.

Il misfolding può essere causato da una mutazione nella sequenza della proteina, ma ciò che più influenza un errato ripiegamento, è solitamente l'ambiente in cui la proteina si trova. L'informazione corretta viene infatti acquisita dal-

l'ambiente circostante attraverso l'azione di molecole assistenti, chiamate chaperones molecolari. I chaperones hanno il compito di occupare le regioni idrofobiche esposte della proteina, in modo da evitare che per effetto di interazioni idrofobiche, essa possa aggregarsi e precipitare. In altre parole, i chaperones agiscono in modo da impedire alla proteina, durante il processo di folding, di intraprendere un percorso di strutturazione errato.

Quando questo processo fallisce, la proteina può essere soggetta a misfolding che in alcuni casi può condurre all'insorgere di patologie. Alcune di queste sono semplicemente correlabili al fatto che le proteine non sono più in grado di esercitare la loro funzione se strutturate incorrettamente [11], molte altre sono associabili alla formazione di aggregati tossici. In generale, le malattie connesse al misfolding sono state raggruppate sotto il nome di 'disordini conformazionali proteici' e comprendono il morbo di Alzheimer, l'encefalopatia spongiforme trasmissibile, il morbo di Huntington, il morbo di Parkinson, il diabete tipo II, il morbo di Creutzfeldt Jakob, la sclerosi laterale amiotrofica e molte altre meno note patologie accomunate dalla deposizione nei tessuti di aggregati proteici di grandi dimensioni. Fattore comune di queste malattie è che le proteine normalmente solubili si aggregano in strutture insolubili che possono formare depositi tossici nel tessuto scheletrico, muscolare o in organi come il cuore, il fegato e cervello [4]. Dovuta al misfolding di proteine è l'amiloidosi, che prevede la formazione di depositi tissutali di grandi dimensioni contenenti un distinto materiale fibrillare di natura proteica (Fig. 2.7).

Disease	Aggregation polypeptide
Alzheimer's disease	A β peptide (plaques); Tau protein (tangles)
Spongiform encephalopathies	Prion protein or fragments
Parkinson's disease	α -Synuclein
Fronto-temporal dementia	Tau protein
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase
Huntington's disease	Hungtintin (with polyQ expansion)
Spinocerebellar ataxia	Ataxins (with polyQ expansion)
Lysozime amyloidosis	Mutants of lysozime
Hemodialysis-related amyloidosis	β 2-microglobulin
Type II diabetes	Amylin (islet amyloid polypeptide)
Senile systemic amyloidosis	Transthyetin (wild-type)
Familial amyloidotic polyneuropathy	Transthyretin (mutants)

Fig. 2.7: Proteine associate alle relative forme di amiloidosi [12]

Per molto tempo si è pensato che solo le proteine responsabili delle rispettive patologie fossero in grado di formare amiloidi. Solo nell'ultimo decennio si è

scoperto che anche proteine non coinvolte in malattie di questo tipo, perfino oligopeptidi contenenti solo 4-6 amminoacidi, possono aggregarsi in quel modo [13] [14]. Clinicamente, come già accennato, l'amiloidosi può interessare più organi (forme sistemiche o disseminate) oppure essere localizzata ad un singolo organo o tessuto. Fra le forme localizzate si classifica anche la malattia di Alzheimer. La quantità di deposito amiloide varia da livelli molto bassi come per il morbo di Alzheimer e il morbo di Creutzfeldt Jakob [4] a Kg di proteina amiloide per le forme di amiloidosi sistemica [15].

2.4 Amiloidi e loro proprietà

Sebbene la formazione di un generico aggregato amiloide coinvolga solamente la specifica proteina, tutti i tipi di amiloidi sono accomunati da alcune ben precise caratteristiche. Il termine amiloide viene così associato direttamente alla proteina precursore quando i suoi aggregati posseggono tali caratteristiche:

Cinetica di aggregazione

L'aggregazione di proteine può essere vista come un vero e proprio processo di polimerizzazione, è un processo ordinato che procede attraverso tre fasi principali seguendo un meccanismo di nucleazione e crescita [16] [14]. La prima coincide con una fase lenta di nucleazione in cui le proteine in forma monomeriche globulare formano nuclei oligomerici, risultato di interazioni non specifiche.

Esiste sempre una concentrazione critica di proteina al di sotto della quale non è osservabile aggregazione. E'anche dimostrato che al di sopra di questa è richiesto più tempo per la polimerizzazione e che questo coincide proprio con quello necessario alla formazione dei nuclei.

La seconda fase corrisponde alla crescita: le dimensioni dei nuclei crescono esponenzialmente grazie all'aggiunta di monomeri che vanno a legarsi ai nuclei stessi sino a formare catene polimeriche passando attraverso varie strutture intermedie.

Infine, nell'ultima fase, le fibre amiloidi e le strutture restanti rimangono in equilibrio (Fig. 2.8).

Più in dettaglio è stato chiarito come oligomeri [18] e aggregati amorfi [19] si trasformino in specie con morfologie più caratteristiche, definite protofibrille o protofilamenti. Queste strutture, comunemente corte, sottili, a volte si avvolgono l'una con l'altra, a formare fibrille mature. Uno schema più generale che

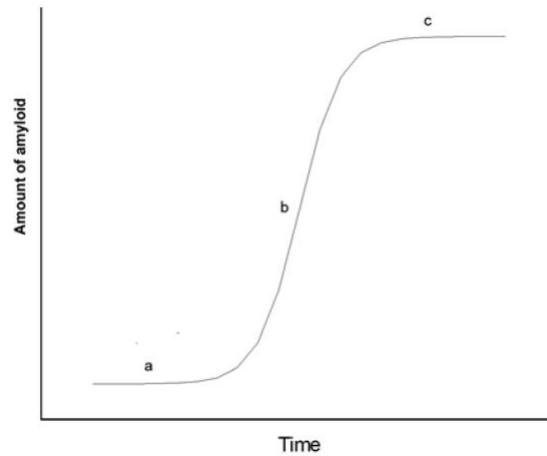


Fig. 2.8: Formazione di fibre amiloidi: modello cinetico. A Nucleazione B Crescita C Equilibrio [17]

aiuta a visualizzare e comprendere meglio le varie conformazioni che una catena polipeptidica può assumere (dentro e fuori la cellula) è rappresentato in Fig.2.9.

È importante sottolineare che, a differenza degli oligomeri, le fibrille mature sono insolubili: in altre parole quest'ultima conformazione è particolarmente stabile e il relativo processo di strutturazione è irreversibile.

Citotossicità

Per molto tempo la conoscenza dei meccanismi neurotossici coinvolti nelle malattie neurodegenerative si è focalizzata sul ruolo citotossico⁴ delle fibrille, e quindi tutti gli interventi terapeutici sono stati diretti verso l'inibizione dell'aggregazione proteica e la formazione di quest'ultime. Si è poi scoperto che anche le fasi iniziali del processo di aggregazione (oligomeri e protofibrille) hanno un ruolo neurotossico [20]; inoltre durante la fibrillogenesi la formazione di forme oligomeriche è favorita dalla presenza di proteine mutate specifiche di ogni malattia [21]. Si pensa, ad esempio, che non solo le amiloidi mature ma anche gli aggregati oligomerici possano intaccare le membrane cellulari rendendole più permeabili [22]. Il meccanismo patogenetico non è stato chiarito del tutto, sono però stati ipotizzati una serie di effetti causati dagli oligomeri e che potrebbero agire in parallelo fino a causare la morte della cellula o la sua disfunzione [23].

⁴ Per citotossicità si intende l'effetto di un agente chimico, fisico o biologico in grado di indurre danno ad una cellula.

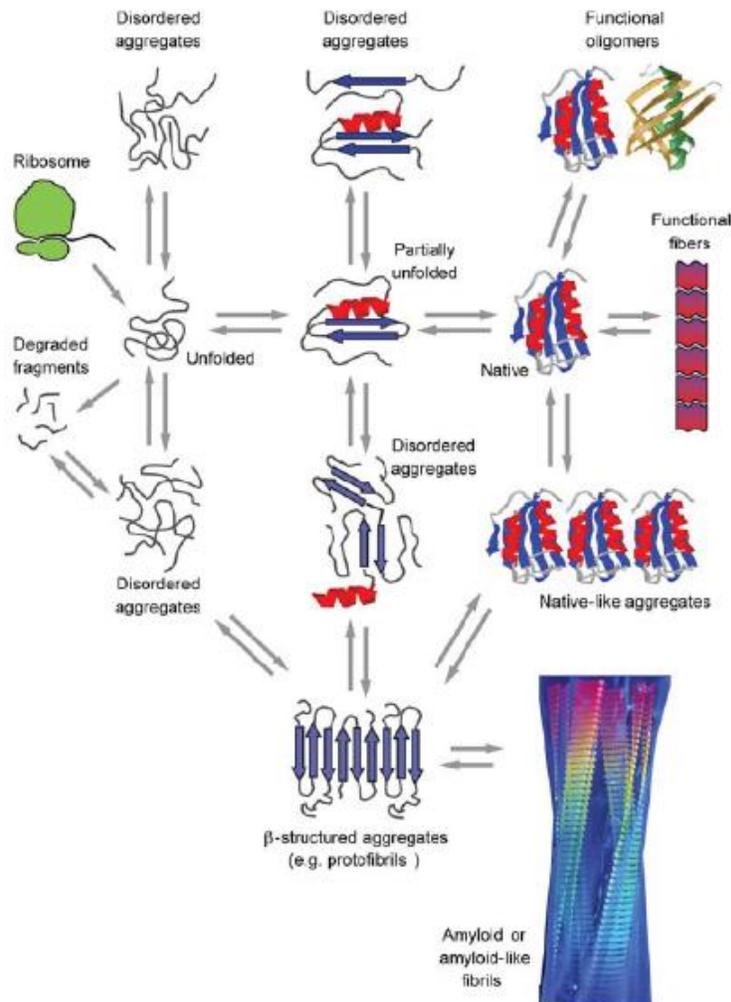


Fig. 2.9: Schema generale delle possibili conformazioni che una catena polipeptidica può assumere. A seconda del tipo di proteina, la transizione da aggregati β a fibrille vere e proprie può avvenire con l'aggiunta di monomeri oppure protofibrille. L'equilibrio tra le conformazioni è determinato dall'ambiente biologico che circonda la proteina. Se i meccanismi regolatori delle cellule funzionano correttamente e quindi se il folding non viene alterato anche gli stati destrutturati e le fibre amiloidi possono avere una funzione biologica specifica. Se però questi vengono alterati si perde la funzionalità e si può così verificare l'insorgere della patologia associata [12].

E' noto inoltre che nel caso della transtiretina solo gli aggregati formatosi nei primi stadi sono tossici, mentre le fibrille mature sono in realtà inerti e possono perfino servire a contrastarne gli effetti dannosi [24]. Per quanto riguarda oligomeri e protofilamenti esiste una forte relazione tra struttura e citotossicità. Indipendentemente dal tipo di proteina, l'epitopo⁵ della catena viene riconosciuto dallo specifico anticorpo. Questo non accade però per le fibrille mature, monomeri o proteine nel loro stato nativo. Ciò indica appunto la forte relazione che c'è tra tossicità e struttura degli oligomeri amiloidi [25]. Un ulteriore aspetto di fondamentale importanza su cui la ricerca si concentra per sostenere lo sviluppo di terapie efficaci consiste nel capire la relazione che c'è tra i domini di una proteina e la sua propensione a causare la patologia.

Morfologia e struttura

Durante la formazione di fibrille si verifica un cambiamento conformazionale coinvolgente una transizione da α -elica a foglietto β [26] [27]. Da un punto di vista morfologico e strutturale le fibrille amiloidi sono infatti contraddistinte dalla presenza di foglietti β decorrenti lungo l'asse della fibra, con i propri filamenti disposti perpendicolarmente rispetto ad esso (struttura cross- β) [28] [29] (Fig. 2.10).

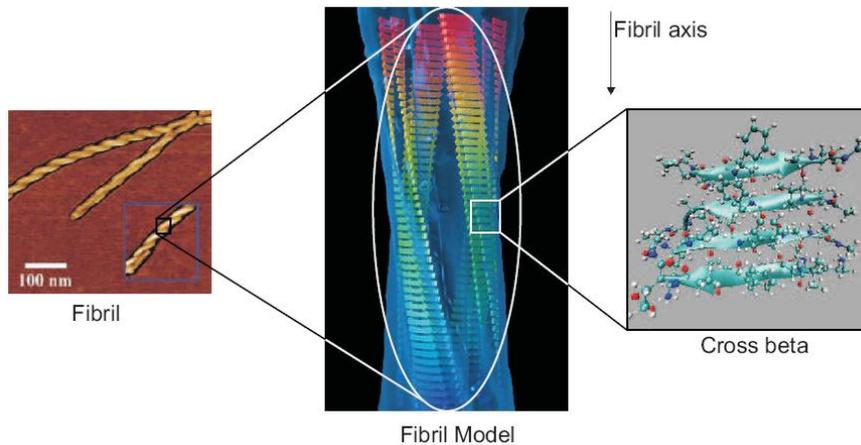


Fig. 2.10: Struttura cross- β di una fibrilla amiloide: l'immagine a sinistra è ottenuta con microscopio a forza atomica (AFM) [30].

⁵ parte dell'antigene che lega l'anticorpo

Un metodo per verificare la formazione di amiloidi è usare coloranti particolari, cui solo le specie amiloidi si legano. I più usati sono il Congo red e la Tioflavina-T (THT) [31]. Questa particolarità è considerata un'ulteriore prova della comune struttura cross- β . In realtà la struttura cross- β non corrisponde all'unico modello proposto in letteratura anche se è quello che più studi sono riusciti a descrivere in maniera maggiormente dettagliata e convincente [32] [1]. Inoltre, per lo stesso modello cross- β sono state proposte più strutture (Fig. 2.11).

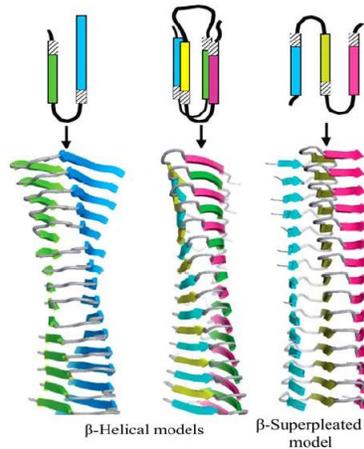


Fig. 2.11: Strutture cross- β possibili [33].

In generale la fibrilla è stabilizzata da legami idrogeno intramolecolari che si formano tra i gruppi amminici e quelli carbonilici delle catene, interazioni di tipo idrofobico oppure ponti salini tra coppie cariche si possono invece stabilire tra i gruppi laterali [34].

Per quanto riguarda invece gli aggregati oligomerici è stato dimostrato che queste specie si uniscono a formare catene lineari oppure aggregati anulari. Questi ultimi sono ritenuti essere i maggiori responsabili in patologie quali il morbo di Alzheimer e in quello di Parkinson [35].

A livello macromolecolare la morfologia delle fibrille amiloidi è stata studiata usando tecniche come il microscopio a forza atomica (AFM) [36] e quello elettronico rivelando come siano composte da due a sei protofilamenti che si attorcigliano gli uni con gli altri. Sono state osservate anche protofibrille isolate, aggregati globulari, anulari [37] e perfino sferuliti come ad esempio nel caso dell'insulina [38], dove sono evidenti le somiglianze di queste strutture rispetto

a quelle tipiche dei polimeri sintetici.

Stabilità e resistenza all'attacco enzimatico

La formazione di amiloidi è in generale favorita ogni volta che le interazioni intermolecolari tra catene polipeptidiche sono più rilevanti rispetto a quelle native intramolecolari tra i gruppi laterali di una proteina ripiegata correttamente e quindi nel suo stato nativo. Questo significa che, in determinate condizioni, moltissime proteine sono potenzialmente in grado di formare fibrille amiloidi [39]. La formazione di queste strutture rappresenta un processo alternativo a quello di folding ed è contraddistinto dal raggiungimento di un minimo energetico (non nativo) attraverso la graduale riduzione di superficie idrofobica esposta e la formazione di legami idrogeno fino a loro saturazione.

Tipicamente, per le proteine in forma globulare, la formazione di fibre può essere indotta da variazioni destabilizzanti quali basso pH, alta pressione idrostatica, aggiunta di denaturanti, alta temperatura, sostituzione di amminoacidi in sequenza. Come detto si raggiunge uno stato energetico molto stabile: ad esempio, la stabilità termica delle fibrille è in genere molto maggiore di quella della proteina nativa, a volte infatti le fibrille amiloidi possono dissociarsi a temperature superiori ai 100° C [40]. Queste non si riducono però sempre in monomeri, ma piuttosto in aggregati di dimensioni minori e con proprietà diverse.

Per quanto riguarda le proteine legate a patologie associate all'amiloidosi, è da sottolineare il fatto che la formazione di fibre mature avviene ovviamente in condizioni fisiologiche e il processo di misfolding è correlabile direttamente a mutazioni nella sequenza del polipeptide, oltre che all'ambiente in cui si trova la proteina. L'effetto si riflette in variazioni di proprietà come l'idrofobicità e la carica superficiale.

Un ultimo aspetto importante che contraddistingue le amiloidi è l'eccezionale resistenza all'attacco enzimatico, in particolare nei confronti dell'enzima proteasi, ovvero di quell'enzima che è in grado di catalizzare la rottura del legame peptidico. Se la proteina non viene degradata non verrà nemmeno allontanata dalle cellule e dai tessuti e quindi formerà depositi. La resistenza alla degradazione enzimatica da parte delle fibre amiloidi è in generale dovuta a molecole che si legano ad esse proteggendole e inibendo l'efficacia dell'attacco [41]. Ne è un esempio il componente sierico P dell'amiloidi (SAP), proteina dalla caratteristica organizzazione pentamerica costituita da cinque unità identiche.

Il SAP si lega agli amiloidi e, in particolare, è stata dimostrata la sua funzione di inibizione nei confronti della degradazione proteolitica. In campo diagnostico si sfrutta la caratteristica stessa di legare le fibrille amiloidi per valutare l'estensione dei depositi [42] [43].

2.5 Malattie da espansione di poliglutammine

Una particolare classe di patologie associate alla formazione di fibre amiloidi è quella delle malattie da espansione di poliglutammine (Fig. 2.12). Si tratta di malattie neurodegenerative che causano morte cellulare quasi esclusivamente localizzata al sistema nervoso centrale. Esse sono causate da una tipologia di mutazione caratterizzata da espansione anomala di un tratto ripetuto di DNA: il trinucleotide CAG. Questa espansione viene trascritta e tradotta, nelle proteine corrispondenti, in una lunga sequenza di poliglutammine. Si ritiene che queste mutazioni conferiscano una nuova proprietà tossica alla proteina, dovuta principalmente ad alterazione del controllo cellulare dei processi di conforma-

Disease	Normal (CAG) _n	Expanded (CAG) _n	Protein	Subcellular localization
SCA1	6-39	40-88	Ataxin-1	Predominantly nuclear
SCA2	14-32	33-200	Ataxin-2	Predominantly cytoplasmatic
SCA3	12-40	55-86	Ataxin-3	Predominantly cytoplasmatic
SCA6	4-18	21-31	P/Q Ca^{2+} channel subunit	Cell membrane
SCA7	7-39	40-200	Ataxin-7	Predominantly nuclear
SCA17	29-42	44-63	TBP	Nuclear
HD	6-35	38-68	Hungtingtin	Predominantly cytoplasmatic
SBMA	9-36	36-62	Androgen receptor	Nuclear and cytoplasmatic
DRPLA	3-36	49-88	Atrophin-1	Predominantly cytoplasmic

Fig. 2.12: Lista di patologie da espansione di poliglutammine associate alle proteine responsabili e alla lunghezza del tratto poliQ [7].

zione terziaria della proteina stessa. Il 'guadagno' tossico di funzione si associa a complessi eventi cellulari, non del tutto noti, che interferiscono con i meccanismi omeostatici (ossia di controllo della stabilità interna) di alcuni tipi di cellule neuronali quali principalmente: il controllo del folding proteico, la degradazione delle proteine, il controllo trascrizionale, il trasporto assonale, il metabolismo energetico [44].

In generale il tratto poliglutamminico (poliQ) determina un'instabilità conformazionale della proteina con tendenza all'aggregazione e alla successiva formazione di depositi nelle cellule neuronali. Più in dettaglio è stato chiarito come tutte queste malattie si manifestino quando il tratto poliQ è composto da più di 35-45 glutamine: in questo caso si parla di forma espansa della proteina. Un'altra caratteristica comune è data dal fatto che le proteine poliQ si aggregano nel citoplasma o nei nuclei dei neuroni.

Il ruolo citotossico delle inclusioni non è del tutto chiarito ed è oggetto di dibattito: alcuni studi hanno sostenuto una correlazione tra i due aspetti [45], altri non fanno invece coincidere la citotossicità con la formazione dei depositi [17]. La formazione di inclusioni potrebbe infatti essere il risultato della risposta che le cellule danno in queste condizioni [46].

Per le forme espanse, la prima struttura ad essere stata ipotizzata con modelli molecolari è quella con foglietti β di orientazione antiparallela [47] (Fig. 2.13 A) ma ne sono state proposte anche altre tra cui: foglietti β con orientazione parallela (Fig. 2.13 B), a gomitolo statistico compatto (Fig. 2.13 D), a forcina (Fig. 2.13 C), a β elica con 20 residui per spira (Fig. 2.13 F).

Gli aggregati della forma espansa hanno anch'essi rivelato la presenza di strutture β ma in questo caso mancano informazioni più dettagliate [47] [48] [49]. L'aggregazione di proteine poliQ procede quindi con l'accumularsi di strutture a foglietto β verso la formazione delle strutture fibrillari ed è del tutto simile al modello di aggregazione degli amiloidi [50] [51]. Non è però ancora chiara la complessità del meccanismo, in particolare non si conosce se l'aggregazione proceda o meno attraverso intermedi oligomerici. Questi sono presenti ad esempio per l'huntingtina [52] ma in un altro caso è stato invece ipotizzato che la cinetica di aggregazione verso le fibrille mature può essere caratterizzata da una fase di nucleazione con formazione di un gomitolo statistico a foglietti β e dalla successiva aggiunta di singole proteine poliQ [49]. Ciò che è certo è che la lunghezza del tratto poliQ influenza, oltre alla stabilità degli aggregati, anche e soprattutto la cinetica di aggregazione [53].

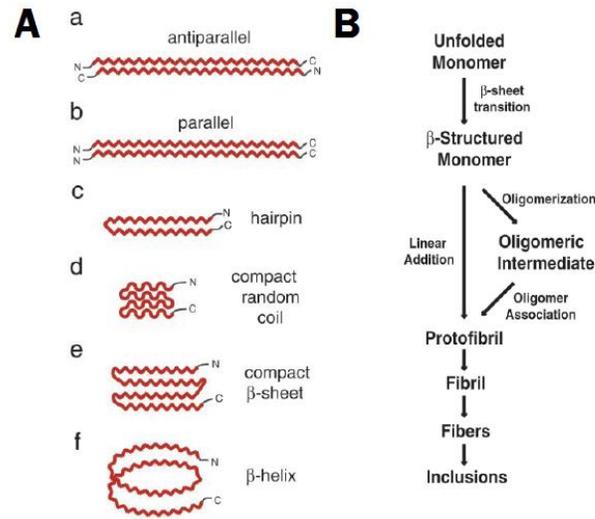


Fig. 2.13: Modelli strutturali per proteine PoliQ e modello di aggregazione proposto. Non è ancora chiaro se l'aggregazione proceda o meno attraverso la formazione di intermedi oligomerici.

2.6 Atassina-3

L'Atassina-3 è la proteina responsabile della malattia neurodegenerativa atassia spinocerebellare di tipo 3 (SCA3 o *malattia di Joseph-Machado*). Questa patologia colpisce aree specifiche del sistema nervoso e appartiene alla famiglia di 'malattie da espansione di poliglutammine' descritte nel paragrafo precedente. Come già spiegato, l'insorgere di queste malattie è direttamente correlato all'espansione del tratto poliglutamminico oltre una lunghezza soglia. Per l'AT-3, la più piccola delle proteine poliQ legate a patologie, il limite critico è intorno ai 40 residui. Va sottolineato che tale valore è indicativo dei casi clinici studiati, legati quindi a soggetti malati.

2.6.1 Struttura e proprietà

La massa molecolare dell'AT-3 è pari a 42 kDa. In soluzione, la sua struttura è caratterizzata da un dominio compatto ricco di α -eliche, il dominio *Josephinico* (dominio-J), e da una parte non strutturata. Il dominio è composto dai primi 182 residui della sequenza amminoacidica ed è localizzato nella parte N-terminale.

La coda flessibile, destrutturata, è invece composta da 24 residui glutamminici⁶ (tratto poliQ) ed è situata nella parte C-terminale. La proteina è stata studiata in soluzione con tecniche quali la spettroscopia in dicroismo circolare (CD) e la risonanza magnetica nucleare (NMR) [2].

Il dominio-J ricopre un ruolo centrale sia per la funzione della proteina nella sua forma non espansa sia per quella espansa [54]. Il dominio consiste in una struttura piuttosto rigida composta da quattro α -eliche e sei foglietti β . In soluzione, altre due α -eliche costituiscono un pendaglio, più flessibile del corpo centrale del dominio e legato ad esso attraverso ponti salini, legami idrogeno e interazioni idrofobiche (2.14 A).

La carica superficiale del dominio è globalmente negativa (Fig. 2.14) B e sono presenti diverse zone esposte di carattere idrofobico. In particolare, come è più chiaro dalla fig. 2.14 C, una di queste è localizzata intorno al residuo Trp-87. La flessibilità del pendaglio rende questa struttura particolarmente adatta

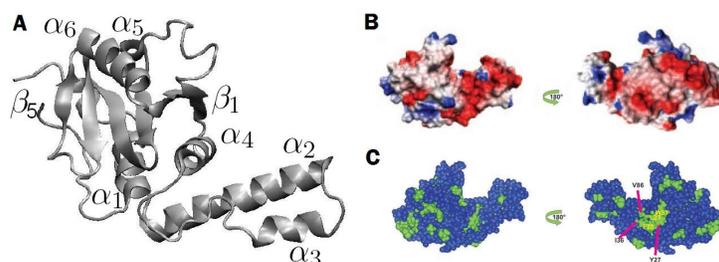


Fig. 2.14: Struttura del dominio Josephinico della proteina AT-3 ottenuta con simulazioni di dinamica molecolare (A). Distribuzione di carica superficiale (B), distribuzione (C) delle regioni idrofobiche (in verde) [7].

a stabilire interazioni con altre molecole. Da questo punto di vista gli *istoni*⁷ sono i candidati ideali grazie alla loro carica positiva, complementare a quella altamente negativa del pendaglio [55]. Anche l'*ubiquitina*⁸ (Ub) è particolarmente adatta a legarsi al dominio-J. In particolare, uno studio ha mostrato che nel dominio-J esistono due siti di aggancio per l'ubiquitina, molto vicini tra loro [56] [57].

⁶ Questa è la lunghezza tipica per la variante umana dell'atassina-3, nella sua struttura corretta.

⁷ Gli istoni sono proteine tipiche degli organismi eucarioti. Esse si associano al DNA, che è carico negativamente, per formare strutture dette nucleosomi.

⁸ L'ubiquitina è una proteina regolatoria con un ruolo centrale nella degradazione proteica: essa si lega alle proteine da degradare fungendo da marcatore.

Tornando ad analizzare più in generale l'atassina-3, la figura 2.15 aiuta a chiarire meglio la struttura primaria della proteina. In questo caso è stata considerata la variante umana AT-3Q29 quindi il tratto poliQ è composto da ventinove residui glutamminici. La parte destrutturata è composta da diverse regioni. Il tratto poliQ inizia dopo il residuo 291, questa è una caratteristica peculiare di tutte le varianti dell'atassina-3. Nel tratto compreso tra l'ultimo

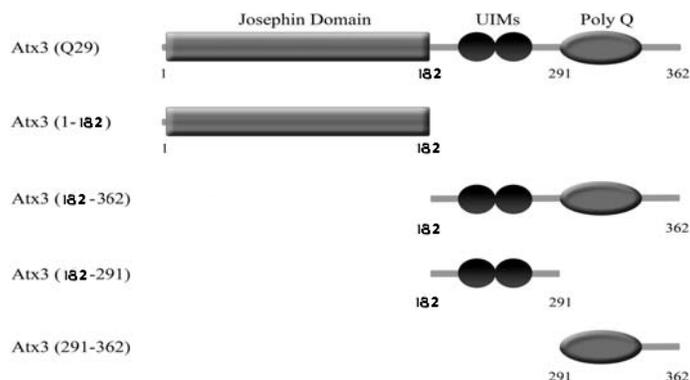


Fig. 2.15: Schematica rappresentazione della struttura primaria della variante AT-3Q29. I vari tratti sono stati separati in modo da essere meglio visualizzati.

residuo del dominio-J e il primo del tratto poliQ compaiono due siti attivi nei confronti dell'ubiquitina (*Ubiquitin Interacting Motifs* - UIMs) [58].

Va sottolineato il fatto che, mentre per visualizzare il dominio-J è possibile servirsi di simulazioni di dinamica molecolare, questo non è possibile per le varianti dotate di tratto destrutturato. In questi casi non è infatti possibile modellizzare una precisa struttura, si può però immaginare il tratto destrutturato come una coda flessibile caratterizzata da una ben determinata sequenza amminoacidica (fig.2.16) e dotata di siti catalitici specifici [58].

2.6.2 Meccanismo di aggregazione

Un primo modello di aggregazione dell'atassina-3 prevede che il processo di misfolding proceda attraverso la formazione di stati intermedi, corrispondenti a cambiamenti significativi nella struttura secondaria e terziaria della proteina [59]. Sfruttando la denaturazione chimica della proteina, è stata dimostrata la formazione di una quantità significativa di fibrille come risultato dell'equilibrio tra stato nativo e specie intermedie ($N \leftrightarrow I$, fig. 2.17). Si presuppone

```

MESIFHEKQEGSLCAQHCLNLLQGEYFSPVELSSI
AHQLDEEERMRMAEGGVTSEDYRFLQQPSGNMD
DSGFFSIQVISNALKVWGLELILFNSPEYQRLRIDPIN
ERSFICNYKEHWFTVRKLGKQWFNLNSLLTGPR LIS
DTYLALFLAQLQQEGYSIFVVKGDLPDCEADQLLQ
MIRVQQMHRPKLIGEELAQLKEQRVHKTDLERML
EANDGSGMLDEDEEDLQRALALSRQEIDMEDEEAD
LRRAIQLSMQSSRNISQDMTQTSGNTLTSEELRK
RREAYFEKQQQKQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ
QQQQRDLSGQSSHPCERPATSSGALGSDLGKAC
SPFIMFATFTLYLT

```

Fig. 2.16: Struttura primaria della variante AT-3Q24. Il tratto poliglutamminico è evidenziato in rosso.

quindi che in questa transizione lo stato nativo possa essere destabilizzato fino alla formazione delle fibrille. Il tratto poliQ, espanso oltre la soglia critica, agisce sull'equilibrio spostandolo verso destra e promuovendo quindi la formazione delle specie intermedie. Si tratta di aggregati solo parzialmente ripiegati che favoriscono la successiva fibrillogenesi. I restanti tratti destrutturati e il dominio dell'atassina sono invece importanti per mantenere la proteina nel suo stato solubile. In questo senso il dominio-J ha una funzione stabilizzante. In particolare è stato osservato che nel suo stato stabile i tre residui Trp sono rivolti verso l'interno della struttura. Con la formazione degli intermedi, questi residui vengono esposti al solvente, ad indicare una sostanziale variazione conformazionale del dominio. Non si esclude poi un possibile riarrangiamento anche del tratto C-terminale.

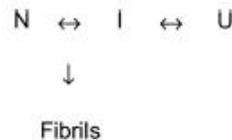


Fig. 2.17: Meccanismo di aggregazione dell'AT-3: U - unfolded state (ripiegamento scorretto), I - specie intermedie, N - stato nativo [59].

Un altro studio, più recente del primo (2007), confrontando una variante non espansa (AT-3Q15) con una espansa (AT-3Q64) propone un meccanismo di aggregazione caratterizzato da due step in cui il primo risulta indipendente dal tratto poliglutamminico [60] [61]. La cinetica di aggregazione viene monitorata sfruttando la fluorescenza della THT (paragrafo 2.4) ed è così stato dimostrato che entrambe le varianti formano aggregati le cui proprietà sono però diverse. In particolare, la variante non espansa genera aggregati solubili in

SDS⁹ attraverso un meccanismo di tipo nucleazione-dipendente mentre quella non espansa procede verso un secondo step di aggregazione caratterizzato dalla formazione di aggregati insolubili. Il modello di aggregazione a due stadi tiene in considerazione il dominio-J e il tratto poliQ. Il primo step comprende la formazione di aggregati solubili ed è determinato da variazioni conformazionali di tutte i tratti della proteina, eccetto quello poliglutamminico. Solo le forme espanse dell'atassina-3 possono invece generare fibre mature, insolubili, la cui formazione è mediata direttamente dal tratto poliQ (Fig. 2.18).

La formazione di fibrille coincide con la caratteristica tipica delle amiloidi ossia una diminuzione di strutture α -eliche e un aumento dei foglietti β [62]. Spettri CD mostrano inoltre che tale transizione è ancor più consistente per le forme espanse. Lo stesso dato è confermato da misure FT-IR (*Spettroscopia IR in trasformata di Fourier*) dove la presenza di foglietti β intermolecolari è testimoniata dal tipico aumento di segnale corrispondente al picco a 1625 cm^{-1} .

Entrambe le analisi sopra presentate sono state effettuate in soluzione, in condizioni fisiologiche. La caratterizzazione morfologica degli aggregati dell'AT-3 è stata invece effettuata in aria con misure al microscopio a forza atomica (AFM) [63], la stessa tecnica utilizzata in questo lavoro di tesi (vedi Capitolo 3). L'analisi è condotta per alcune varianti della proteina su substrato in mica¹⁰, considerando anche l'effetto di un trattamento termico.

Un primo dato, consistente con l'ipotesi di aggregazione a due step, testimonia che il dominio-J e più in generale le varianti prive del tratto poliQ, formano aggregati oligomerici, globulari o sotto forma di piccole catene ('catene di perle'). Le varianti prive del tratto poliglutamminico oppure dotate di un tratto al di sotto di una lunghezza critica¹¹ hanno esclusivamente questo tipo di morfologia. Quando il tratto eccede tale soglia, esso assume un ruolo centrale nel processo di aggregazione e determina la formazione di grossi aggregati anulari e amorfi. Il tratto poliQ gioca come detto un ruolo destabilizzante. Anche il trattamento termico a cui vengono sottoposte le proteine in questo studio ha come effetto quello di indurre il misfolding (vedi paragrafi 2.2.1 e 2.3). In questo senso, le strutture indagate sono il risultato di un effetto sinergico tra tempe-

⁹ Dodecilsolfato di sodio, tipicamente utilizzato per solubilizzare le proteine e quindi denaturarle.

¹⁰ La mica è considerata un substrato inerte nei confronti delle molecole biologiche, per questo è molto utilizzato proprio in campo biologico. Struttura e proprietà sono discusse in dettaglio nel quarto capitolo di questa tesi.

¹¹ E' solo una prima soglia, valida in particolare in questo studio morfologico e non corrisponde a quella che permette di distinguere tra forma espansa e non espansa della proteina.

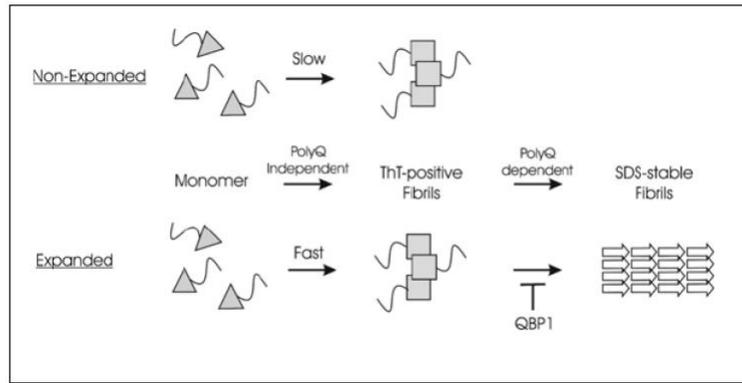


Fig. 2.18: Rappresentazione schematica del meccanismo di aggregazione dell'atassina-3 secondo [60] [61]. Il primo step è indipendente dal tratto poliQ, è quindi lo stesso sia per la forma espansa sia per quella non espansa. Il secondo è caratteristico delle varianti espanse e porta alla formazione di fibrille insolubili.

ratura, variabile esterna, e tratto poliQ, componente propria della proteina. In particolare, gli aggregati di forma anulare non erano mai stati scoperti in nessuno degli studi precedenti relativi all'atassina-3. La loro tossicità, che pare essere direttamente correlata alla forma, è però documentata per l' α -sinucleina, proteina che riveste un ruolo centrale nel morbo di Parkinson [64].

Un altro dato interessante che emerge dalla caratterizzazione morfologica indica che, solo quando il tratto poliQ eccede un'ulteriore soglia limite, si ha la formazione di fibrille mature, corrispondenti agli aggregati insolubili indicati nel lavoro citato in precedenza. Tale soglia corrisponde a quella che permette di distinguere tra forma espansa e non espansa dell'atassina-3 ed è quindi intorno ai 40 residui.

Lo studio morfologico presentato affronta un aspetto fino a questo punto ancora non discusso. L'ambiente che circonda la proteina è in questo caso determinante nell'indurre e regolare il misfolding. Come detto infatti, un aumento di temperatura ha effetto destabilizzante sulla struttura della proteina. Ciò che però non è stato spiegato è il ruolo che le interazioni tra proteina e substrato hanno in questo contesto, aspetto che verrà discusso in dettaglio nel prossimo capitolo.

3. INTERAZIONI PROTEINA - SUPERFICI SOLIDE

L'adsorbimento di proteine su una superficie solida è un aspetto di centrale importanza non solo in campo biologico ma anche in quello medico, biochimico e biotecnologico [65]. Tale fenomeno corrisponde ad una perturbazione della struttura della proteina adsorbita e, in particolare, può indurre significative variazioni conformazionali. Una proteina nel suo stato nativo, depositata su una superficie, può infatti andare incontro al processo di misfolding, esponendo residui che favoriscono l'aggregazione. Lo studio dell'influenza che superfici di diverse proprietà fisico chimiche hanno sul meccanismo di misfolding è di grande importanza per capire come interazioni specifiche di diversa natura possano determinare le variazioni conformazionali. D'altra parte, come nel caso di patologie associate all'espansione di poliglutammine, la comprensione del ruolo giocato dall'ambiente che circonda la proteina durante il processo di aggregazione è certamente un primo passo verso lo sviluppo di tecniche diagnostiche e terapie specifiche.

3.1 Adsorbimento di proteine su substrati solidi

In generale, quando la soluzione acquosa in cui è dispersa una proteina viene a trovarsi a contatto con una superficie solida, la proteina viene adsorbita all'interfaccia solido - liquido [66].

Il processo di adsorbimento è caratterizzato da più step: quella di trasporto di massa, in cui la proteina passa dalla soluzione alla zona di interfaccia con la superficie, quella di contatto con la superficie stessa e infine quella di rilassamento che permette la stabilizzazione delle interazioni proteina - superficie. Il fenomeno è irreversibile infatti, una volta adsorbita, il desorbimento di una proteina dalla superficie alla soluzione è trascurabile. Il desorbimento può avvenire solo quando il sistema viene perturbato, ad esempio con variazioni di pH e di forza ionica [67] [68], con l'aggiunta di sostanze attive nei confronti della

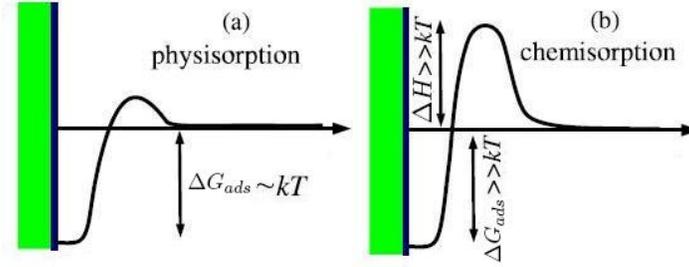


Fig. 3.1: Adsorbimento di una proteina su substrato solido: adsorbimento fisico (a) e chimico (b). E' chiaro come i valori di energia libera (riportati qui in funzione della distanza proteina - superficie) siano significativamente diversi. Nel primo caso la barriera energetica è molto ridotta e l'adsorbimento avviene simultaneamente al contatto. Al contrario, nel secondo caso la barriera energetica è ben due ordini di grandezza maggiore di k_bT .

superficie [69] [70] oppure tramite un meccanismo di adsorbimento competitivo con altre proteine [71] [72] [73].

L'adsorbimento di una proteina su un substrato solido può essere di due tipi: fisico o chimico¹. Si parla di adsorbimento fisico quando le interazioni coinvolte sono deboli, come quelle a lungo raggio di Van der Waals ($\Delta H_{fis} \approx 20 kJmol^{-1}$), in questo caso le proteine si dispongono in maniera casuale e alcune possono andare incontro a denaturazione. L'adsorbimento chimico, o chemiadsorbimento, è il risultato di interazioni forti a corto raggio ed è caratterizzato dalla presenza di una barriera energetica un ordine di grandezza superiore rispetto a quella dell'adsorbimento fisico (Fig. 3.1), legata alla formazione di veri e propri legami chimici tra proteina e substrato ($\Delta H_{chem} \approx 200 kJmol^{-1}$).

La maggior parte delle proteine sono molecole anfifiliche, questa caratteristica le rende particolarmente attive nei confronti di una superficie. Le interazioni coinvolte sono molte, quelle Coulombiane, di Van der Waals, forze acido - base e interazioni legate ad aspetti entropici - conformazionali come ad esempio quelle idrofobiche (Fig. 3.2).

L'adsorbimento avviene quando il valore dell'energia libera di adsorbimento ΔG_{ads} è negativo. E' stato chiarito che i contributi maggiori al ΔG_{ads} provengono dalle interazioni elettrostatiche, in particolare da quelle di Van der Waals, e da quelle idrofobiche; è per questo che verranno qui di seguito descritte più in dettaglio, così da inquadrare meglio il fenomeno anche da un punto di vista chimico-fisico.

¹ L'adsorbimento chimico è molto raro nel caso delle proteine.

Un altro aspetto che verrà affrontato è quello relativo agli aspetti legati alle variazioni conformazionali che una proteina può subire quando in contatto con un substrato solido, poichè anch'esse forniscono un notevole contributo all'adsorbimento in termini di energia libera [66].

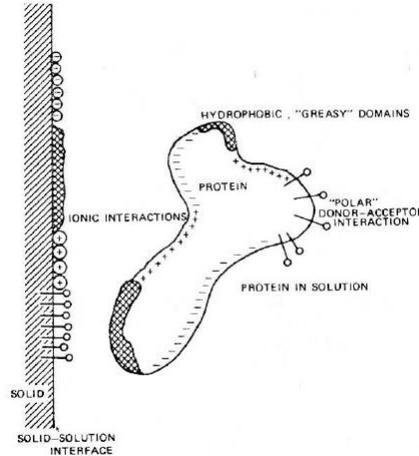


Fig. 3.2: Interazioni tra proteina e substrato. La proteina possiede diversi domini sulla sua superficie esterna, lo stesso vale per il substrato. Il bilancio tra le interazioni tra i vari domini determina l'adsorbimento.

3.2 Interazioni coinvolte.

Forze di Van der Waals

Le forze di Van der Waals tra atomi o molecole possono derivare dall'interazione tra due dipoli permanenti (forze di Keesom), tra un dipolo permanente e un dipolo indotto (forze di Debye) oppure tra due dipoli indotti (forze di London o di dispersione) [65]. In tutti i casi il potenziale corrispondente è negativo, si ha quindi un'interazione di tipo attrattivo che diminuisce al crescere della distanza r , con andamento $1/r^6$.

Se si vuole modellizzare l'interazione tra due corpi si possono considerare i singoli contributi attrattivi tra coppie di atomi di corpi diversi. Si ottiene così una relazione che dipende dalla geometria dei corpi e dalle proprietà dei materiali, informazione contenuta nella costante di Hamaker. Considerando un oggetto sferico, come ad esempio una molecola, che interagisce con una superficie idealmente piana, l'approssimazione di Hamaker permette di calcolare l'energia

libera delle interazioni di V.d.W. come:

$$\Delta G = -\frac{A_{213}}{6} \left(\frac{R}{d} + \frac{R}{d+2R} + \ln \frac{d}{d+2R} \right) \quad (3.1)$$

dove R è il raggio della molecola e d la sua distanza dalla superficie. La costante di Hamaker A_{213} è il risultato delle singole costanti relative al tipo di molecole considerate (A_{22}), alla superficie (A_{33}) e all'ambiente (A_{11}), liquido o gassoso. In particolare vale:

$$A_{213} = \left(\sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{11}} \right) \left(\sqrt{A_{33}} - \sqrt{A_{11}} \right) \quad (3.2)$$

Da questa equazione è chiaro come le interazioni di V.d.W. siano sempre attrattive tra materiali dello stesso tipo ($A_{22} = A_{33}$) mentre si può avere repulsione se la costante di Hamacher è negativa, ovvero quando $A_{22} \leq A_{11} \leq A_{33}$.

Per una proteina all'interfaccia acqua/silicio, $A_{213} = 1.65$ kT e, assumendo $R = 2$ nm e $d = 0.5$ nm, $\Delta G = -0.62$ kT. Questo valore diminuisce rapidamente fino a -4.6 kT, quando la proteina viene a trovarsi praticamente a contatto con la superficie ($d = 0.1$ nm) [65]. E' stato però dimostrato che, modellizzare la proteina come una macromolecola di forma sferica, ha come effetto quello di sovrastimare la forza dell'interazione [74].

In generale, per modellizzare le interazioni elettrostatiche tra una proteina e una superficie solida si può utilizzare l'equazione di Poisson [75]:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (3.3)$$

dove ψ è il potenziale elettrostatico per il volume considerato, caratterizzato dalla costante dielettrica relativa ϵ_r e dalla densità di carica ρ (ϵ_0 è la costante dielettrica in vuoto). Questa equazione può essere applicata sia alle interazioni interne alla proteina stessa, sia alla soluzione salina in cui generalmente le proteine vengono conservate. Nel primo caso la densità di carica è determinata dalle cariche sui residui laterali della catena polipeptidica.

Per quanto riguarda invece la soluzione elettrolitica, la concentrazione delle varie specie ioniche si riflette direttamente sul valore di ρ . Se tale concentrazione segue la distribuzione di Boltzmann, allora la densità di carica della soluzione è data da:

$$\rho_e = \sum_i z_i e c_{i\infty} \exp \frac{-z_i e \psi_e}{kT} \quad (3.4)$$

dove z_i e $c_{i\infty}$ sono rispettivamente la valenza e la concentrazione di bulk delle specie ioniche i (e è la carica dell'elettrone). Risolvendo le equazioni di Poisson per la proteina e per l'elettrolita si ottiene il potenziale elettrostatico relativo al volume considerato da cui è infine possibile calcolare l'energia associata all'interazione proteina-superficie come:

$$G = \frac{1}{2} \int_A \sigma \psi_e dA + \frac{1}{2} \sum_j q_j \psi_i(r_j) \quad (3.5)$$

dove ψ_e e ψ_i sono rispettivamente i potenziali della soluzione e della proteina, σ è la densità di carica superficiale relativa alla superficie su cui avviene l'adsorbimento e q_i indica il valore di densità di carica in una specifica regione della proteina, individuata da r_j . Si effettua l'integrazione sull'intera area di adsorbimento A mentre la sommatoria include tutte le cariche j della proteina.

Come esempio si può considerare il caso della lisozima, in soluzione a $pH = 7$. Per questa proteina, se si considera una superficie con $\sigma = -2,2 \mu C/cm^2 = 0.14 e/nm^2$, a seconda della sua orientazione si ottiene $-1.9kT \leq G \leq -0.8kT$ [65].

Interazioni idrofobiche e bagnabilità di una superficie

Il termine idrofobico descrive la caratteristica tipica di soluti con bassa solubilità in acqua che tendono quindi ad associarsi. In altre parole, le interazioni idrofobiche possono essere giustificate considerando un sistema in cui le interazioni non polari soluto - soluto e quelle polari tra le molecole d'acqua sono favorite rispetto a quelle acqua - soluto.

In generale è dimostrato che il fenomeno che favorisce maggiormente l'adsorbimento è la deidratazione a cui la proteina va incontro quando in contatto con substrati idrofobici. Ad esempio, la deidratazione di dieci residui laterali apolari aventi solo una piccola superficie accessibile al solvente contribuisce all'energia libera di interazione con un valore compreso tra $-3.4kT$ e $7.3kT$ [65].

Questo significa che, nel caso di una superficie idrofobica, le interazioni idrofobiche prevalgono di gran lunga sulle repulsioni elettrostatiche. In altre parole tutte le proteine si adsorbono su substrati idrofobici, anche in condizioni sfavorevoli dal punto di vista elettrostatico.

Per quanto riguarda invece le superfici idrofiliche è evidente che il contributo della deidratazione è assente, diventa così necessario concentrare l'attenzione sulla 'rigidità' della struttura della proteina. Proteine con una struttura meno

compatta possono andare incontro a riarrangiamenti conformazionali che permettono un guadagno energetico dal punto di vista entropico e quindi adsorbirsi anche in presenza di repulsioni elettrostatiche. Viceversa per quelle proteine la cui struttura interna è particolarmente compatta: in questo caso la proteina si adsorbirà sulla superficie polare solo in condizioni elettrostatiche favorevoli.

È stato inoltre dimostrato che l'adsorbimento su superfici idrofobiche è maggiore rispetto a quelle idrofiliche e che solitamente cresce proporzionalmente con il grado di idrofobicità del substrato [76] [77] (Fig. 3.3).

Un concetto più generale riferito al contatto tra un liquido (non necessariamente una soluzione acquosa) e un substrato solido è la bagnabilità. Questa proprietà è determinata essenzialmente dalla tensione superficiale e dalla rugosità della superficie. La tensione superficiale è direttamente legata all'energia libera superficiale ed è intrinseca nella natura di qualunque superficie. Ad esempio, una molecola che si trova sulla superficie di un liquido, sente l'interazione delle molecole vicine ma la distribuzione di tali interazioni non è simmetrica a causa della prossimità con l'interfaccia. In particolare, tale sbilanciamento sarà sempre maggiore più ci si avvicina all'interfaccia stessa. L'effetto netto è una forza che preme uniformemente sulla superficie (*pressione superficiale*). In altre parole, mentre la contrazione della superficie libera di un liquido è un processo spontaneo, per portare una molecola dall'interno di un liquido verso l'esterno

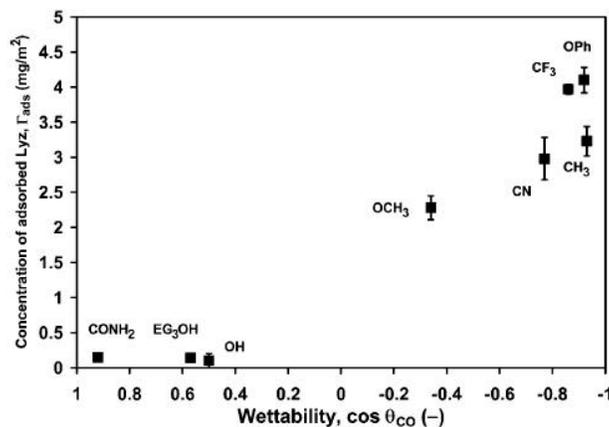


Fig. 3.3: Quantità di lisozima adsorbito su diversi tipi di Self-Assembled Monolayers (SAMs) in funzione dell'idrofobicità della superficie. La bagnabilità è proporzionale al coseno dell'angolo di contatto. Nel grafico sono riportati i gruppi terminali di ciascun SAM, la superficie funzionalizzata è in tutti i casi Au [77].

occorre vincere queste forze di coesione.

Dal punto di vista termodinamico la tensione superficiale può essere così definita come la forza che si oppone ad un aumento (di una quantità unitaria) della superficie del liquido, in particolare:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{P,T} \quad (3.6)$$

dove G è l'energia libera di Gibbs, A è la superficie, P e T rispettivamente la pressione e la temperatura. Dimensionalmente, la tensione superficiale non è altro che una forza per unità di lunghezza e si misura quindi in N/m (S.I.) oppure in $dine/cm$ (C.G.S.).

Nel caso di una superficie non piana, è possibile visualizzare meglio l'effetto della tensione superficiale considerando ad esempio una bolla di sapone. In assenza di gravità o altri campi esterni la bolla assumerà forma sferica, ovvero quella che a parità di volume permette di minimizzare l'area superficiale.

L'energia libera superficiale di una bolla di raggio r è pari a $4\pi r^2\gamma$ e, per una diminuzione infinitesima dr la variazione equivale a $8\pi r\gamma dr$. Una contrazione riduce quindi l'energia superficiale, questo effetto deve essere bilanciato da una variazione di pressione ΔP tra l'interno e l'esterno della bolla. In particolare la diminuzione di energia superficiale deve essere uguale al lavoro che si oppone a tale differenza di pressione. Sarà quindi:

$$\Delta P 4\pi r^2 dr = 8\pi r\gamma dr \quad (3.7)$$

e così:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (3.8)$$

In pratica, più piccola risulta la bolla, maggiore sarà la differenza di pressione tra l'interno e l'esterno della stessa. L'eq. 3.8 rappresenta un caso particolare di un'equazione più generale nota come relazione di *Young - Laplace*. In questo caso si considera una generica superficie curva definita da due raggi di curvatura R_1 ed R_2 e si arriva a:

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (3.9)$$

Nel caso di una sfera ($R_1 = R_2$), questa equazione si riduce alla 3.8 mentre per una superficie idealmente piana risulta $\Delta P = 0$.

E' stato quindi chiarito meglio il ruolo della tensione superficiale, verrà ora

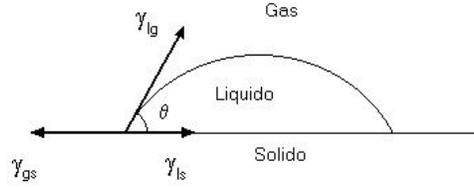


Fig. 3.4: Visualizzazione schematica del contatto tra una goccia di liquido con una superficie solida in atmosfera gassosa. Le tre fasi determinano tre diverse interfacce, ciascuna caratterizzata da uno specifico valore di tensione superficiale. Il bilancio di questi tre contributi influenza direttamente l'angolo di contatto ovvero la bagnabilità della superficie.

discussa l'influenza di questa proprietà sulla bagnabilità di una superficie.

Sperimentalmente è comune osservare come un liquido in contatto con una superficie solida piana non si spanda completamente ma formi una goccia caratterizzata da un *angolo di contatto* finito tra le due fasi. Tale concetto è schematicamente visualizzato in fig. 3.4. La variazione di energia libera ΔG associata ad una variazione dell'area ricoperta dal liquido ΔA è pari a:

$$\Delta G = \Delta A(\gamma_{ls} - \gamma_{gs}) + \Delta A\gamma_{lg} \cos(\theta - \Delta\theta) \quad (3.10)$$

All'equilibrio $\Delta G = 0$ e così la 3.10 diviene:

$$\gamma_{ls} - \gamma_{gs} + \gamma_{lg} \cos \theta = 0 \quad (3.11)$$

o anche:

$$\gamma_{lg} \cos \theta = \gamma_{gs} - \gamma_{ls} \quad (3.12)$$

dove g = fase gas, l = fase liquida, s = fase solida e le tre tensioni superficiali si riferiscono alle tre diverse interfacce. Una superficie sarà più bagnabile quando γ_{ls} e γ_{lg} assumono valori piccoli ovvero quando le interfacce tra il liquido e il solido e tra il liquido e la fase gas sono stabili. In particolare, si considera una superficie idrofobica quando $\theta > 90^\circ$, idrofilica quando $\theta < 90^\circ$. L'equazione 3.10 è nota come *equazione di Young*, dalla quale Dupré derivò successivamente

una forma equivalente che introduce il lavoro di adesione²:

$$w_{slg} = \gamma_{lg}(1 + \cos \theta) \quad (3.13)$$

Un'altra proprietà particolarmente influente sulla bagnabilità, è la rugosità superficiale. Si possono distinguere due modelli fondamentali: nel primo la goccia penetra tra le asperità (*Wenzel*), nel secondo rimane sospesa (*Cassie - Baxter*).

Il modello di *Wenzel* corregge il valore dell'angolo di contatto considerando il rapporto di rugosità r definito come il rapporto tra area effettiva e area proiettata:

$$\cos \theta_a = r \cos \theta \quad (3.14)$$

dove θ_a è l'angolo di contatto misurato (apparente). Il valore di r risulta sempre maggiore dell'unità pertanto nel caso idrofobico $\theta_a > \theta$ e in quello idrofilico $\theta_a < \theta$.

Il caso in cui la goccia rimane sospesa sulle asperità della superficie è particolarmente interessante. Infatti, quando la superficie è 'sufficientemente' rugosa (ad esempio quando R_q è dell'ordine dei nanometri), si possono formare delle piccole sacche d'aria tra le asperità che incrementano la repellenza. In pratica questo comportamento è dominato dall'interfaccia tra il liquido e l'aria rimasta 'intrappolata' (Fig. 3.5). Una prima stima dell'effetto che la rugosità ha sulla bagnabilità si può ottenere ricalcolando l'angolo di contatto 'reale' a partire da quello misurato secondo la relazione di *Cassie - Baxter*:

$$\cos \theta_a = \phi_1 \cos \theta - \phi_2 \quad (3.15)$$

dove ϕ_1 e ϕ_2 sono rispettivamente la frazione di area della goccia in contatto con la superficie e con le sacche d'aria. Ulteriori studi sono stati poi effettuati per approfondire questo aspetto considerando anche l'effetto della rugosità sulla forma della goccia [78] [79].

Dopo aver inquadrato l'idrofobicità come driving force per l'adsorbimento di proteine su un substrato solido, sono stati chiariti gli aspetti che determinano la bagnabilità di una superficie sia in termini di tensione superficiale (quindi di composizione chimica) sia morfologici, ovvero legati alla rugosità della superficie.

² Il lavoro di adesione è definito come la quantità di energia necessaria per separare l'interfaccia di due fasi differenti.

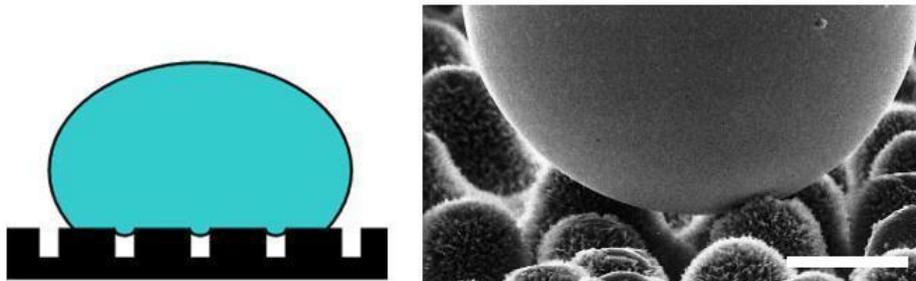


Fig. 3.5: Effetto della rugosità sulla bagnabilità. Le sacche d'aria tra le asperità determinano una variazione dell'angolo di contatto. A destra l'immagine di una goccia di zinco è ottenuta al microscopio elettronico e la scala è di $20\mu m$.

Come già accennato in precedenza, non si può trascurare il ruolo delle variazioni conformazionali a cui una proteina può andare incontro quando adsorbita su un substrato solido.

3.3 Variazioni conformazionali indotte dall'interazione tra proteina e superficie solida

Quando una proteina viene in contatto con un substrato solido essa può subire variazioni conformazionali volte a migliorare l'interazione con la superficie, quindi a minimizzare l'energia del sistema. In particolare, la graduale scomparsa di strutture secondarie permette un significativo aumento di entropia conformazionale [65]. Questo parziale misfolding può in alcuni casi rappresentare la principale driving force per l'adsorbimento della molecola. Anche le interazioni intramolecolari influenzano le variazioni conformazionali ma è molto difficile quantificarne l'effetto [80].

Nel caso di proteine amiloidi, è stato dimostrato che la formazione di fibre amiloidi è favorita su superfici idrofobiche [81] [82] [83]. Anche in studi condotti *in vivo* le interazioni con superfici, ad esempio membrane cellulari, possono indurre le proteine ad aggregare in fibre mature attraverso la formazione di intermedi e specie prefibrillari [84] [85]. Questa evidenza supporta tra l'altro l'ipotesi per cui la citotossicità delle amiloidi sembra essere legata alla loro attività nei confronti delle membrane, come ad esempio una perturbazione a livello delle proprietà di permeazione (vedi paragrafo 2.3) [86] [87].

E' noto che il misfolding di una proteina a partire dal suo stato nativo, è il

primo passo verso la formazione di strutture ricche di foglietti β come le amiloidi e depositi di prioni.

Il processo di aggregazione a cui vanno incontro le proteine quando adsorbite in ambiente acquoso su un substrato solido è stato oggetto di numerosi studi sperimentali e teorici [88] [89] [90]. In particolare si è visto come, una volta avvenuto l'adsorbimento, un certo numero di residui sia coinvolto in interazioni non native ed esposto quindi all'interfaccia con il substrato. In altre parole c'è evidenza di una chiara perturbazione della conformazione. Interessante è il caso delle superfici idrofobiche infatti una proteina può subire perturbazioni della propria struttura esponendo i residui idrofobici, prima rivolti verso l'interno, all'interfaccia con le molecole d'acqua. L'interazione con la superficie idrofobica stabilizza i residui, il cui contatto con un'interfaccia polare sarebbe infatti termodinamicamente sfavorito.

3.3.1 Studi sperimentali delle interazioni proteina - substrato

Lo studio delle interazioni che regolano l'adsorbimento di una proteina su un substrato solido inorganico è particolarmente importante per quei sistemi dove sono state effettuate analisi da un punto di vista macroscopico (ad esempio studi sulla cinetica di aggregazione [91] [92]), ma per i quali mancano indagini specifiche circa le interazioni coinvolte nel fenomeno.

Esistono diverse tecniche sperimentali in grado di ottenere informazioni quantitative per sistemi proteina - substrato, a diversi livelli di dettaglio. Ad esempio, lo spessore di uno strato adsorbito può essere misurato grazie all'ellissometria [93] mentre la densità per mezzo della spettroscopia neutronica [94]. Tecniche elettrochimiche come la ciclovoltammetria e la spettroscopia di impedenza possono rilevare variazioni di permeabilità, di proprietà dielettriche e ancora di spessore dello strato adsorbito. La risonanza plasmonica di superficie (SPR) viene spesso applicata per rilevare l'adsorbimento di anticorpi su substrati metallici e sfrutta la possibilità che queste proteine hanno di formare legami con i reattivi antigeni. Il microscopio a forza atomica (AFM), ovvero la tecnica di indagine utilizzata in questo lavoro di tesi e presentata nel capitolo successivo, viene utilizzato per studiare la morfologia di proteine depositate su substrati, con risoluzione nanometrica [63] [7]. Correlando poi le misure AFM con simulazioni computazionali è possibile ottenere precise informazioni circa le interazioni proteina - substrato [7]. E' inoltre possibile studiare le variazioni di energia libera superficiale con misure di angolo di contatto. Esistono infine tec-

nologie micro - meccaniche (BioMEMS) che permettono di manipolare molecole biologiche e misurarne l'attività in specifici sistemi [95].

Studi AFM di proteine

Rispetto ad altre microscopie, l'AFM (Capitolo III) permette di analizzare molecole nel loro stato nativo senza danneggiarle e per di più in condizioni 'ottimali' quali ad esempio quelle fisiologiche. L'analisi morfologica di proteine al microscopio a forza atomica necessita che le molecole da analizzare siano adsorbite su una superficie solida. L'AFM può fornire importanti informazioni circa l'aggregazione di proteine, l'adsorbimento e la formazione di veri e propri strati. In questo campo, il limite dello strumento è l'impossibilità di indagare la struttura secondaria delle proteine e quindi anche la capacità di provare, l'effetto del substrato in termini di eventuali variazioni conformazionali.

Uno studio ha mostrato l'esistenza di una forte correlazione tra il volume delle proteine (nel loro stato nativo oppure denaturate) misurato con l'AFM e il loro peso molecolare (Fig. 3.6 [96]). E' stato utilizzato un substrato di mica e per il calcolo del volume hanno considerato le proteine come oggetti semi-sferici.

L'AFM è molto utile per studiare la natura e il tipo di interazioni tra enzimi e superfici, aspetto importante soprattutto per lo sviluppo di biosensori. Ad

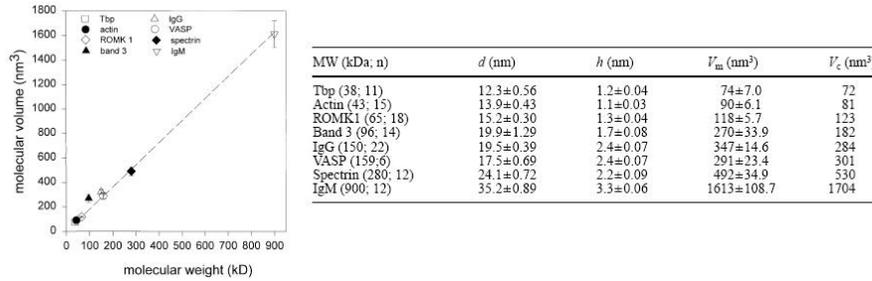


Fig. 3.6: Correlazione tra il peso molecolare di singole proteine e il rispettivo volume, calcolato da misure AFM. La linea tratteggiata rappresenta la curva di regressione dei dati. I simboli scuri si riferiscono a proteine denaturate, quelli bianchi a proteine native. In tabella sono riportati i valori delle dimensioni delle varie proteine analizzate: n numero di misurazioni, d diametro, h altezza, V_m volume misurato con AFM, V_c volume calcolato. Proteine analizzate: Tbp proteina TATA binding, ROMK1 proteina del canale renale del potassio, IgG immunoglobulina G, VASP fosfoproteina vasodilatatore, IgM immunoglobulina M [96].

esempio, l'interazione tra glucosio ossidasi e substrato in oro è stata studiata al variare della concentrazione dell'enzima stesso [97]. In questi casi l'AFM può operare anche in modo da investigare le proprietà elettroniche delle molecole sfruttando le caratteristiche della superficie.

In generale il microscopio a forza atomica è in grado di identificare tutte le diverse morfologie che una proteina può assumere se adsorbita su una superficie. In questo modo è possibile anche ricostruire un percorso di aggregazione. Una classe di proteine la cui morfologia è molto studiata con il microscopio a forza atomica è quella delle proteine amiloidi, difficili da cristallizzare a causa delle loro eccessive dimensioni e quindi anche da analizzare con tecniche di diffrazione ai raggi-X.

L'AFM è stato utilizzato per studiare la morfologie di fibre amiloidi di diverse classi di proteine ed è stato chiarito che queste strutture posseggono caratteristiche morfologiche molto simili (Par. 2.4): si tratta di forme attorcigliate con diametri di pochi nanometri. Inoltre, anche il percorso di strutturazione è comune a diversi tipi di amiloidi. Gli aggregati formati dall'insulina, riportati in fig.3.7, sono stati ottenuti depositando la proteina da $5 \mu\text{l}$ di soluzione acquosa

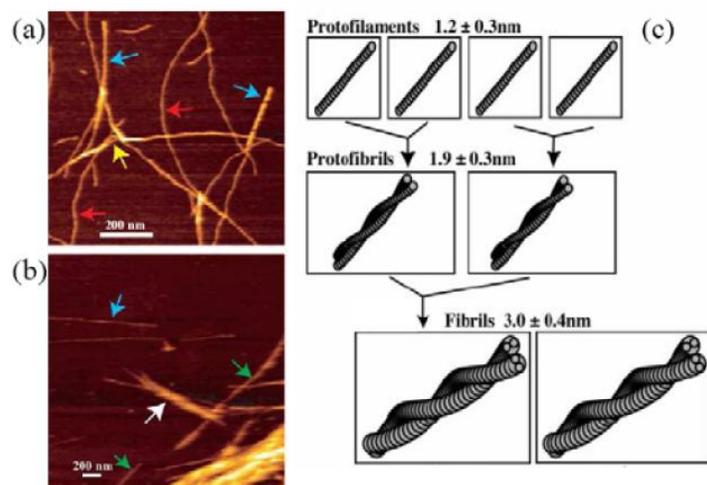


Fig. 3.7: Misure AFM in aria di strutture fibrillari dell'insulina dopo 1h (a) e 3h (b) di incubazione a 37°C . In (a) le frecce rosse indicano i protofilamenti, quelle blu le protofibrille, quella gialla il punto di 'unione' di due filamenti a formare una protofibrilla. In (b) sono presenti ancora protofibrille (frecce blu), fibre mature (frecce verdi) e fasci fibrosi. In (c) è schematizzato il modello di aggregazione proposto [98].

e lasciando asciugare in aria su substrato in mica [98]. L'immagine evidenzia la formazioni di aggregati fibrillari a due differenti tempi di aggregazione. In fig. 3.7 (a) si possono distinguere due specie di differenti dimensioni: alcuni filamenti hanno altezze caratteristiche pari a 1.2 ± 0.3 nm (frecce rosse), altri 1.9 ± 0.3 nm (frecce blu). In fig. 3.7 (b) sono presenti strutture fibrillari di maggiori dimensioni e anche aggregati a fasci di fibre. Sulla base delle osservazioni compiute gli autori hanno suggerito un meccanismo di aggregazione (Fig. 3.7 (c)) che prevede dapprima la formazione di filamenti (o protofilamenti) i quali si legano a formare protofibrille. A loro volta le protofibrille generano altre strutture come fibre mature fasci fibrosi. E' stato inoltre provato che questo modello può essere applicato ad altre proteine amiloidi come ad esempio l' α - sinucleina.

Misure AFM in liquido hanno reso possibile lo studio dell'influenza del pH e dalla concentrazione salina (forza ionica) sul processo di aggregazione [37]. Sempre utilizzando un substrato in mica si sono osservate una grande varietà di morfologie dell'immunoglobulina (Fig. 3.8) al variare delle condizioni della soluzione. Ad esempio, sono state osservate specie oligomeriche, con altezze comprese tra 0.8-13 nm al variare del tempo di incubazione, le sole ad essere presenti a pH 3. A pH 4.5 compaiono anche intermedi anulari e toroidali mentre

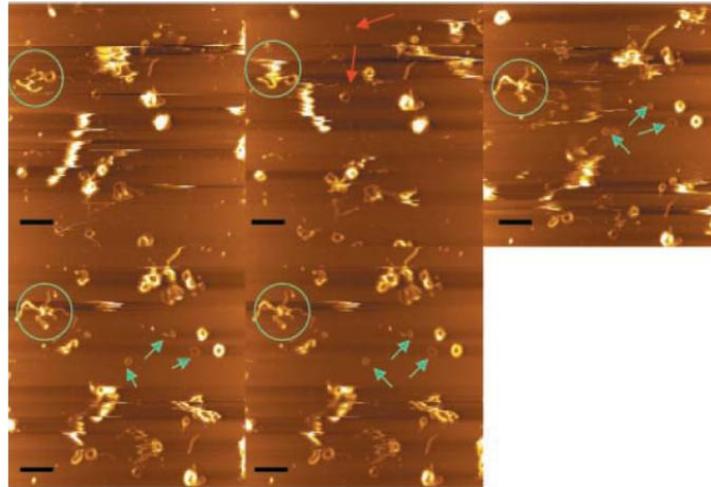


Fig. 3.8: Immagini AFM in liquido di aggregati di immunoglobulina formati dopo 18h di incubazione, in soluzione salina a pH 4.5. La scala è di $1\mu\text{m}$ in tutte le immagini. Le immagini sono state ottenute in sequenza, a distanza di 30 min l'una dall'altra. Le frecce verdi e rosse indicano rispettivamente strutture anulari comparire e scomparire dalla superficie del substrato [37].

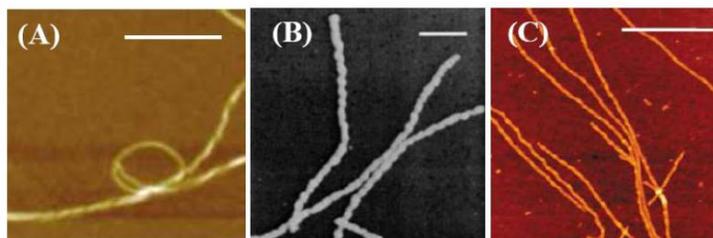


Fig. 3.9: Immagini AFM in aria del dominio HjpF-N ((A), scala 500 nm; lievito Ure2p ((B), scala 200 nm) e lisozima ((C), scala 500 nm).

a pH 7.5 predominano fibre e aggregati amorfi. Inoltre, le strutture fibrillari in alcuni punti sembrano crescere direttamente dalle strutture anulari, come evidenziato dai cerchi verdi.

Quello che è stato dimostrato è la complessità del meccanismo di aggregazione. Non è del tutto chiaro il ruolo che i vari intermedi hanno nel processo e nemmeno è spiegato quali di queste forme di aggregazione sia necessaria per la formazione delle fibre mature e quali di esse possano invece ostacolarla. Ciò che è però comunemente accettato è l'aspetto gerarchico che lega le varie specie, caratteristica peculiare del processo amiloidogenico.

Confrontando le morfologie delle fibre mature di diverse proteine amiloidi ci si accorge che, rispetto alle strutture prefibrillari, la forma delle fibre amiloidi risente molto meno del variare delle condizioni esterne e dipende poco dal tipo di proteina (Fig. 3.9). Le amiloidi sono caratterizzate da strutture allungate, non ramificate, composte da catene disposte lungo un asse principale e con altezze variabili da pochi a decine di nanometri. In conclusione, si pensa che le strutture di partenza, unità base delle fibre mature, siano i protofilamenti e che la loro formazione segua il processo gerarchico descritto precedentemente. Anche i protofilamenti potrebbero intervenire nella formazione delle fibre, la cui periodicità e le cui dimensioni potrebbero dipendere direttamente dal numero di filamenti che le hanno generate.

Studio AFM della proteina AT-3/182 - stato dell'arte

Nel paragrafo 2.6 è stata descritta la proteina atassina-3, oggetto di questo lavoro di tesi. Verrà ora presentato lo studio AFM del dominio Josephinico (AT-3/182) [7]. Va sottolineato che questa analisi, assieme ad un altro lavoro incentrato però sull'influenza del tratto poliQ nei confronti dell'aggregazione [63], rappresentano gli unici studi AFM dell'AT-3 presenti in letteratura. I dati raccolti dal lavoro sul dominio-J rappresentano un importante punto di partenza e verranno utilizzati come termine di confronto con le misure relative ad un'altra variante della stessa proteina.

Lo studio AFM in aria dell'AT-3/182 è stato effettuato su tre differenti substrati: oro, silicio (dopato-n) e mica. La preparazione delle superfici, così come i dettagli sperimentali saranno discussi in dettaglio nel quarto capitolo poichè sono per molti aspetti coerenti con il metodo sperimentale seguito in questo lavoro di tesi. Sono state effettuate misure della proteina incubata a 37°C in soluzione acquosa di PBS (tampone fosfato salino) per 0, 4, 24, 48h e successivamente depositata sulla superficie di ogni substrato. Questa scelta è motivata dal fatto che è dimostrato come la cinetica di aggregazione della proteina in soluzione possa continuare fino ad una settimana [2]. I risultati ottenuti sono riassunti in fig. 3.10: a 0h, su mica, la proteina assume solo morfologie di tipo globulare, mentre su oro e silicio è provata la compresenza di strutture globulari e di filamenti di differenti dimensioni. Queste differenze non sono più osservate per tempi di incubazione superiori alle 0h dove le misure hanno evidenziato l'assenza di filamenti su tutti e tre i substrati.

Incubation time	Substrate	Morphology
t=0h	Mica	globular
	Gold	fibrillar + globular
	Silicon	fibrillar + globular
t>0h	Mica	globular
	Gold	globular
	Silicon	globular

Fig. 3.10: Tabella riassuntiva per la morfologia della proteina AT-3/182 ottenuta a diversi tempi di incubazione e su tre differenti substrati [7].

Le strutture globulari, presenti a 0h e 48h su tutte e tre le superfici hanno altezze caratteristiche pari a 1.8 ± 0.3 nm, in fig. 3.11 è presentato un quadro riassuntivo delle immagini ottenute per questo tipo di morfologia. Per quanto riguarda i filamenti, presenti a 0h su silicio e oro, sono presentate anche im-

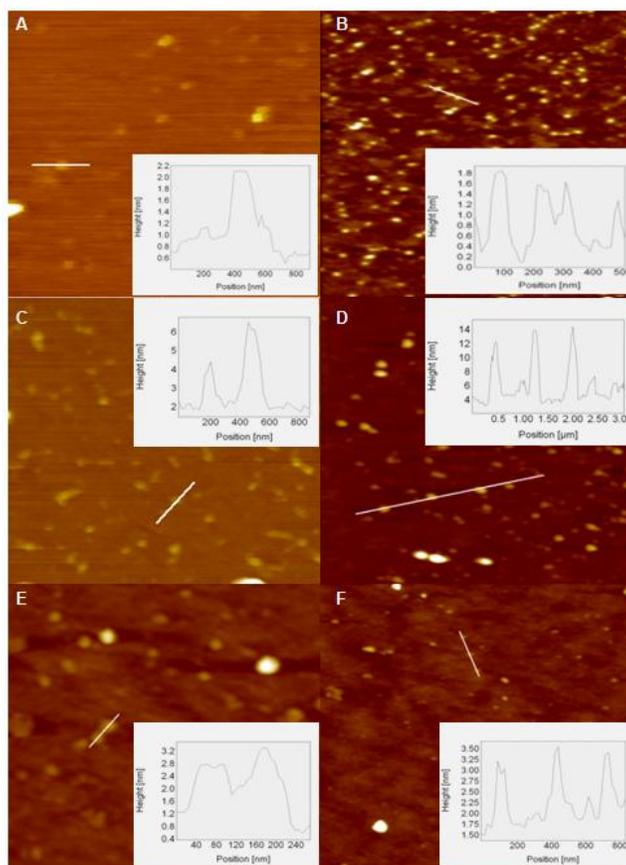


Fig. 3.11: Immagini AFM delle strutture globulari del dominio-J ottenute su mica (A 0h, B 48h), silicio (C 0h, D 48h) e oro (E 0h, F 48h). Le aree analizzate corrispondono a $5\mu m \times 5\mu m$ in A, C, D, F e a $2,5\mu m \times 2,5\mu m$ in B ed E.

magini al microscopio elettronico (Fig. 3.12), a supporto di quelle AFM. Da queste misure si possono notare due differenti tipi di filamenti: alcuni più chiari sembrano originarsi da grossi aggregati, gli altri scuri hanno una morfologia a fasci filamentosi e si distendono su tutta la superficie. Il diverso contrasto è dovuto alle diverse proprietà elettroniche, questo suggerisce una diversa natura per le due strutture (quelle più scure potrebbero essere più 'dense' e assumere tale colorazione come conseguenza di una minore conduttività). Le immagini AFM consentono di chiarire meglio le caratteristiche dei filamenti (Fig. 3.13 (A) e (C)). E' individuata anche la formazione di strutture a 'catena di perle', come quelle in fig. 3.13 (B). Si pensa che la loro formazione proceda attraver-

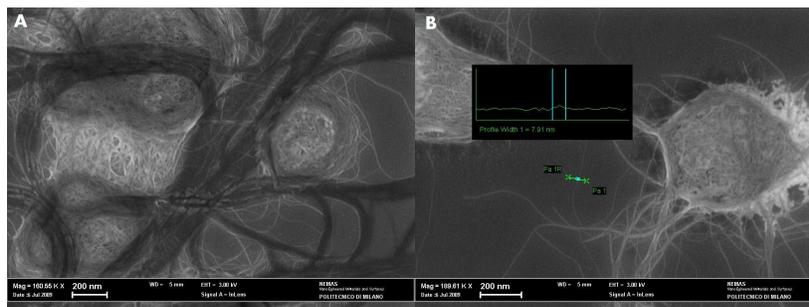


Fig. 3.12: Immagini SEM del dominio-J a tempo di incubazione 0h su substrato in silicio. Testimoniano la compresenza (A) di grossi aggregati di filamenti (strutture chiare, ingrandimento in (B)) e fasci filamentosi (strutture scure).

so l'aggregazione di monomeri e/o oligomeri globulari. Queste strutture sono considerate specie prefibrillari (in particolare precursori dei filamenti), come nel caso di altre proteine quali l'huntingtina [52] e la proteina amiloide $A\beta$ [99]. Appaiono inoltre piuttosto flessibili, in grado quindi di legarsi facilmente tra di loro e formare fasci filamentosi come quelli descritti in precedenza.

Lo studio della proteina AT-3/182 è stato effettuato parallelamente a quello dell'enzima glutatione - S - transferasi (GST), una molecola molto più stabile in soluzione rispetto al dominio-J ma che può andare incontro a misfolding e, in determinate condizioni, aggregare formando fibre amiloidi [100]. Sono state ottenute immagini del GST sulle tre superfici e per gli stessi tempi di incubazione dell'atassina. Quello che è interessante notare è come il GST su mica abbia un comportamento analogo al dominio-J mentre su silicio e oro formi filamenti per tutti i tempi di incubazione.

Questo dato prova che anche una proteina molto stabile in soluzione può andare incontro a significative variazioni conformazionali quando adsorbita su un substrato idrofobico come oro e silicio.

In pratica la superficie agisce come sito catalitico per l'aggregazione di proteine e l'idrofobicità risulta essere la principale driving force del fenomeno. In altre parole il contributo delle interazioni idrofobiche è qui molto maggiore rispetto a quello delle interazioni elettrostatiche e conduce a variazioni conformazionali come già spiegato nel paragrafo 3.3. In particolare, come dimostrato da simulazioni computazionali, l'adsorbimento su silicio e oro causa una transizione $\alpha - \beta$ e un riarrangiamento strutturale tale da favorire l'aggregazione della proteina

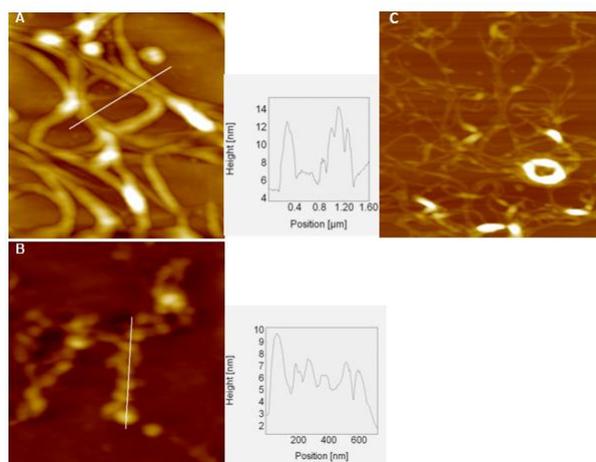


Fig. 3.13: Immagini AFM delle strutture a filamento su oro (A) e silicio (C) ottenute per il dominio-J a tempo di incubazione 0h. In (B), su superficie in oro, si distinguono le strutture precursori dei filamenti: catene di perle composte da piccoli monomeri/oligomeri globulari. Si tratta di immagini $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ per (A) e (C) e $1,5\mu\text{m} \times 1,5\mu\text{m}$ per (B).

in filamenti, catene di perle e altri tipi di aggregati³.

Per quanto riguarda invece il substrato in mica, idrofilico e ritenuto inerte rispetto all'interazione con molecole biologiche, la presenza di strutture globulari per tutti i tempi di incubazione non è altro che una conferma di quanto spiegato. Nonostante la semplice introduzione di una superficie sia causa di denaturazione (risultati), il substrato idrofilico non gioca un ruolo determinante nel riarrangiamento strutturale delle proteine e proprio per questo l'aggregazione non è favorita. In particolare la proteina assume una morfologia globulare dove ogni globulo è formato da singole unità monomeriche o al massimo da due o tre monomeri uniti tra loro.

Le misure sul dominio-J per tempi di incubazione successivi alle 0h mostrano come già spiegato l'assenza di filamenti su tutti i substrati. Il risultato non stupisce nel caso della mica mentre è più interessante discutere il caso dei substrati idrofobici. Considerando la proteina AT-3, l'incubazione determina la formazione di un intermedio strutturalmente più stabile nei confronti delle interazioni idrofobiche. Infatti, le immagini ottenute dopo aver mantenuto la proteina in soluzione per 48h a 37°C rivelano la presenza di sole strutture globulari e di altre morfologie di aggregati. Al contrario, nel caso del GST, filamenti sono

³ Si tratta di aggregati amorfi e, molto più raramente, anulari.

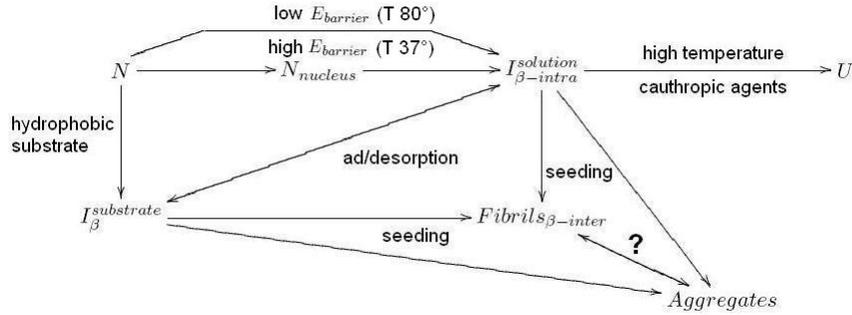


Fig. 3.14: Meccanismo di misfolding del dominio Josephinico della proteina atassina-3 secondo [7].

presenti anche a $t > 0h$. Questo è giustificato dalla maggiore stabilità del GST rispetto all'AT-3/182, che determina una cinetica di misfolding e aggregazione (in soluzione a $37^\circ C$) molto più lenta. In questo senso, dallo studio AFM e dal confronto tra le due proteine, si deduce che le variazioni conformazionali subite in soluzione a $37^\circ C$ dal dominio Josephinico sono tali da portare alla formazione di un intermedio più stabile nei confronti delle interazioni idrofobiche.

Tutte le considerazioni fatte sono riassunte nello schema in fig. 3.14. Il meccanismo di misfolding del dominio-J dell'atassina-3 può procedere in soluzione oppure può essere indotto dalle interazioni con un substrato idrofobico. In soluzione, il misfolding a partire dallo stato nativo N è lento e procede attraverso la formazione di un intermedio $N_{nucleus}$ fino alla formazione di aggregati intermedi. Il processo è accelerato da un incremento di temperatura che abbassa la corrispondente barriera energetica. Se invece la proteina viene in contatto con un substrato idrofobico subisce un riarrangiamento strutturale tale da accelerare l'aggregazione fino alla formazione di filamenti, aggregati amorfi e, più raramente, anulari. Quando però lo stato nativo è alterato (tempi di incubazione $> 0h$) allora verrà meno l'effetto di idrofobicità della superficie e non saranno presenti più filamenti. Gli intermedi $N_{nucleus}$, $I_{\beta}^{substrate}$ e $I_{\beta}^{solution}$ sono tutti caratterizzati da variazioni significative della struttura secondaria e terziaria. Non è ancora chiaro se la formazione dei filamenti rappresenti un passo necessario verso quella degli aggregati oppure se le due morfologie siano piuttosto in competizione fra loro.

3.4 *Scopo del lavoro*

In questo capitolo è stato discusso in dettaglio il ruolo che le proprietà chimico - fisiche delle superfici hanno nei confronti dell'interazione con una proteina. Si è visto come tali proprietà siano direttamente collegate all'adsorbimento così come al processo di misfolding e aggregazione.

Il mio lavoro di tesi si focalizza sullo studio del misfolding indotto da interazioni superficiali tra proteina e substrato. In particolare viene studiata da un punto di vista morfologico, mediante l'uso del Microscopio a Forza Atomica (AFM), l'aggregazione di una variante della proteina Atassina-3 (AT-3).

Lo scopo è sostanzialmente quello di capire come questa proteina si leghi al substrato e in che modo il substrato stesso possa influenzare i cambiamenti della struttura. Gli aspetti dell'aggregazione dell'Atassina-3 non sono infatti del tutto chiari così come non sono compresi appieno quelli di citotossicità. Se da un lato l'analisi delle interazioni tra proteine e superfici sia di grande interesse nel campo bio-tenologico, lo studio del meccanismo di misfolding ha come obiettivo ultimo quello di permettere di sviluppare efficaci metodi diagnostici e terapeutici nei confronti della patologia associata.

4. IL MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA

Fin dalla sua invenzione (1986) il microscopio a forza atomica (AFM) è oggetto di grande interesse da parte dei biologi i quali sono attratti dalle enormi potenzialità dello strumento. La risoluzione subnanometrica lungo la direzione verticale, la capacità di analizzare anche campioni non conduttivi, quella di operare in aria o in liquido e più in generale in condizioni fisiologiche, la possibilità di ottenere misure in tempo reale su sistemi dinamici, sono tutte caratteristiche che a partire dagli anni '90 hanno fatto crescere rapidamente il numero di applicazioni di questa tecnica in campo biologico. Inoltre, il microscopio a forza atomica non è solo utilizzato come mezzo di indagine ma è anche uno dei principali strumenti usati per la funzionalizzazione e la modifica chimica di superfici e più in generale per la manipolazione della materia su scala nanometrica.

In questo lavoro di tesi il microscopio a forza atomica viene usato come tecnica di caratterizzazione morfologica di proteine depositate su substrati di diverse proprietà fisico-chimiche. In particolare lo strumento permette di indagare la struttura terziaria e quaternaria delle proteine permettendo lo studio dell'influenza che ogni substrato ha sull'assorbimento delle molecole.

4.1 *Principi di funzionamento*

Il microscopio a forza atomica fa parte della famiglia di microscopi genericamente indicata con l'acronimo SPM (*Scanning Probe Microscopes* o microscopi a scansione di sonda). Gli SPM costruiscono un'immagine del campione in osservazione attraverso l'interazione di una sonda con gli strati atomici superficiali del campione. Nel caso dell'AFM la sonda è costituita da una punta (*tip*) con raggio di curvatura che può variare tra 1 e 10 nm, fissata all'estremità di una microleva (*cantilever*). Quando la punta si avvicina sufficientemente al campione inizia ad interagire con la superficie e il cantilever subirà di conseguenza una deflessione come risultato della forza esterna applicata e dei vari contributi di interazione. Eseguendo la scansione della superficie con un sistema di controllo

retroazionato in grado di mantenere costante la deflessione della leva, è possibile ricostruire la topografia della superficie.

Più in dettaglio, le componenti principali dell'AFM sono:

- *sonda* (sistema punta - cantilever);
- *scanner*: in materiale piezoelettrico, sposta il campione (oppure la sonda) lungo le tre direzioni con elevata precisione;
- *sistema di rilevamento* della deflessione della leva: quello più diffuso monitora la deflessione della leva utilizzando un fascio laser riflesso dalla sommità della microleva verso una matrice di fotodiodi;
- *meccanismo di retroazione*: utilizzato per mantenere costante un determinato parametro di riferimento. Permette così di ricostruire la morfologia della superficie del campione analizzato.

Ciascuno di questi componenti verrà di seguito discusso più in dettaglio, dopo aver descritto brevemente gli aspetti legati all'interazione punta - campione.

In accordo con la legge di Hooke, la deflessione di una leva fissata rigidamente ad una sua estremità è esprimibile secondo la relazione:

$$F = -kz \quad (4.1)$$

dove F è la componente della forza normale all'asse del cantilever, z è lo spostamento verticale dell'estremo libero e k è la costante elastica della leva che dipende dalle caratteristiche meccaniche e geometriche della stessa. Per un cantilever rettangolare vale:

$$k = \frac{Ewt^2}{4l^3} \quad (4.2)$$

dove E è il modulo di Young del materiale, w la larghezza della leva, l la lunghezza e t lo spessore (Fig.4.1).

Il cantilever è anche libero di deformarsi attorno al proprio asse, in regime elastico la torsione è proporzionale al momento angolare T :

$$T = k_\varphi\varphi \quad (4.3)$$

dove φ è l'angolo torsionale e k_φ è la costante elastica torsionale. Anche in questo caso la costante è esprimibile in funzione delle proprietà meccaniche e

geometriche della leva:

$$k_\varphi = \frac{Gwt^3}{3h^2l} \quad (4.4)$$

dove G è il modulo di taglio del materiale e h l'altezza della punta.

E' infine fondamentale ricordare che il cantilever può oscillare e, in analogia con il modello di oscillatore armonico semplice, è possibile esprimere la frequenza di risonanza dell'oscillazione di una leva rettangolare come:

$$f_0 = 0.162 \frac{t}{l^2} \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad (4.5)$$

dove ρ è la densità del materiale.

Da queste equazioni è chiaro come il cantilever sia modellizzabile come una molla elastica e anche come la deflessione sia proporzionale all'intensità delle forze risultanti dalle varie interazioni presenti tra punta e la superficie del campione. Le principali forze di interazione si possono dividere in quelle a lungo e corto raggio: le prime, come le interazioni di Van der Waals attrattive e le forze capillari, sono influenti quando la distanza punta-campione è compresa approssimativamente tra 10 e 100 nm, le seconde, come le repulsioni coulombiane, sono importanti per distanze di pochi Å.

Le tipiche dimensioni del cantilever sono riportate in fig.4.1 e sono dell'ordine dei micron. In particolare, lo spessore varia in genere tra 1-5 μm , la larghezza nelle decine di μm e la lunghezza nelle centinaia di μm . La punta ha anch'essa dimensioni micrometriche, l'estremità libera della punta è caratterizzata da un raggio di curvatura che determina la risoluzione laterale dello strumento. Il raggio di curvatura è in genere compreso tra 1-10 nm. Per quanto riguarda la rigidità della leva, per ottenere una migliore risoluzione laterale è necessario utilizzare cantilever rigidi [101]. Cantilever più flessibili vengono invece usati su campioni delicati, come quelli biologici, per evitare di danneggiarli. I cantilever



Fig. 4.1: Parametri geometrici per un cantilever rettangolare (a destra), deflessione verticale (al centro) e torsione angolare (a sinistra)

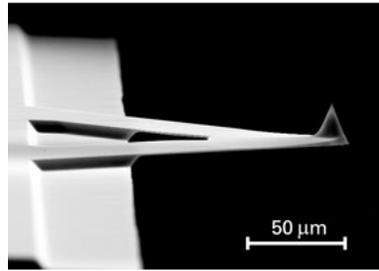


Fig. 4.2: Immagine SEM di un cantilever a V e punta conica.

possono avere geometrie diverse, quelle più usate sono a V (Fig.4.2) e rettangolare. Anche per le punte sono commercialmente diffuse diverse forme, le più comuni sono quelle coniche (Fig.4.2) e quelle piramidali.

La misura della deflessione del cantilever è un punto cruciale per l'acquisizione di un'immagine AFM: sono stati sviluppati diversi metodi e vari tipi di sensori [102] [103] ma quello più diffuso, che appartiene anche all'apparato sperimentale utilizzato in questo lavoro di tesi, è costituito da un sistema ottico. In pratica un fascio laser è indirizzato sul dorso del cantilever e viene riflesso su un fotodiodo a quattro quadranti. La deflessione della leva provoca uno spostamento del fascio riflesso e, di conseguenza, una variazione di intensità su ciascuno dei quattro quadranti. Se si indicano le rispettive intensità misurate su ogni quadrante con quattro lettere diverse come in Fig.4.3 allora il segnale dato da $(A+B)-(C+D)$ è proporzionale allo spostamento verticale della leva mentre quello dato da $(A+C)-(B+D)$ è proporzionale alla torsione subita dal cantilever.

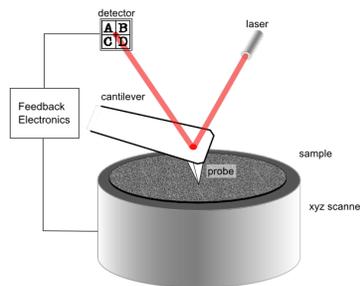


Fig. 4.3: Sistema ottico di rilevazione della deflessione del cantilever e componenti principali dell'AFM

Il microscopio a forza atomica può operare essenzialmente in due diverse modalità: a contatto (*contact mode*) o non a contatto (*noncontact-dynamic mode*) a seconda che le interazioni prevalenti siano repulsive o attrattive [104]. In altre parole le due modalità si distinguono a seconda della distanza tra punta e campione e quindi anche in base al tipo di forze in gioco.

Nella modalità non a contatto la punta viene fatta oscillare vicino alla frequenza di risonanza e portata in prossimità della superficie del campione dove comincerà ad interagire con lo stesso. L'oscillazione può essere indotta essenzialmente in due modi. Nel primo è indotta da un attuatore piezoelettrico collegato all'apparato che sostiene il cantilever [105], nel secondo si sfrutta un campo magnetico sinusoidale e un cantilever magnetizzato [106]. Il risultato dell'interazione è una variazione delle caratteristiche dell'oscillazione del cantilever quali l'ampiezza e la frequenza. Proprio attraverso il controllo di questi due parametri è possibile ottenere un'immagine topografica del campione, in *amplitude-modulation* (AM-AFM) e in *frequency-modulation* (FM-AFM) rispettivamente. Le caratteristiche dell'oscillazione sono infatti utilizzate come parametri di riferimento (*feedback*) dal meccanismo di retroazione che agisce mantenendoli costanti facendo variare la distanza media tra punta e campione. Mentre la punta oscilla un sistema piezoelettrico permette al campione di muoversi nel piano e l'immagine è così ricostruita su tutta l'area analizzata.

Nella modalità in contatto la punta è forzata contro la superficie e la deflessione subita dal cantilever dipende strettamente dalla risultante tra le forze repulsive e quella applicata esternamente. In questo caso la deflessione del cantilever viene mantenuta costante durante la scansione. In Fig. 4.4 è infine riportata una schematica rappresentazione che permette di visualizzare la differenza tra le modalità operative in termini di energia potenziale di interazione U_{ts} . Più in dettaglio è possibile esprimere l'energia in funzione della distanza z tra punta e

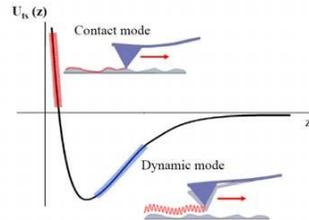


Fig. 4.4: Energia potenziale di interazione come funzione della distanza punta-campione.

campione:

$$F_{ts} = - \frac{\partial U_{ts}(z)}{\partial z} \quad (4.6)$$

La modalità a contatto opera in prossimità della superficie ed è caratterizzata da forze di tipo repulsivo, quella non a contatto opera a distanze molto maggiori ed è caratterizzata da forze di tipo attrattivo.

Come già accennato, un sistema piezoelettrico (*scanner*) controlla gli spostamenti del campione e permette così alla punta di eseguire una scansione sull'intera superficie da analizzare. Un materiale piezoelettrico ha la proprietà di generare una differenza di potenziale se sottoposto a deformazione meccanica oppure viceversa, di deformarsi se sottoposto ad una differenza di potenziale. Tale effetto è reversibile e si verifica sulla scala dei nanometri. Questi piccoli spostamenti controllati permettono di muovere il campione nelle tre dimensioni e di acquisire dati ad intervalli spaziali ben definiti, come mostrato in fig.4.5. In genere l'area più estesa misurabile con una singola scansione è di poche centinaia di μm mentre il limite inferiore è intorno al μm .

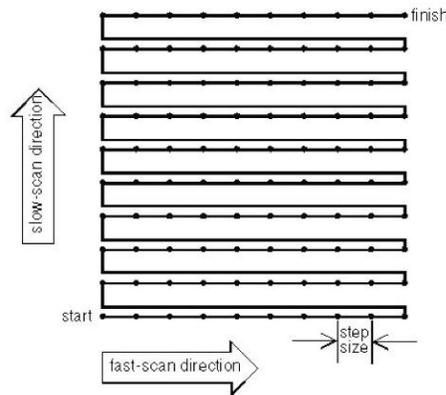


Fig. 4.5: Movimento dello scanner durante l'acquisizione di un'immagine.

Il sistema piezoelettrico presenta una serie di caratteristiche che possono avere effetti negativi sulle immagini acquisite (artefatti). La relazione tra deformazione e campo elettrico applicato non è lineare, questo provoca una distorsione della griglia in fig.4.5 i cui punti non sono più equispaziati, dando origine ad una curvatura dell'immagine. I materiali piezoelettrici hanno inoltre un tipico comportamento ad isteresi per cui l'espansione in una direzione non è identica a quella nella direzione opposta, si possono così avere errori nell'acquisizione

dati in tutte e tre le direzioni. Un'altra problematica è legata al creep, ovvero ad un ritardo della risposta all'input (differenza di potenziale applicato), particolarmente significativo quando si passa da grandi a piccole scale di scansione. I movimenti lungo le direzioni del piano possono avere una componente lungo z e generare quello che è definito come *cross coupling*. Si tratta di un effetto puramente geometrico relativo alla deformazione del materiale piezoelettrico ed è causato dalla distribuzione non uniforme del campo elettrico all'interno dello scanner. L'effetto è un rigonfiamento nell'immagine. Un ultimo problema è l'invecchiamento dello scanner sia nel caso che rimanga inutilizzato per troppo tempo sia nel caso di utilizzo costante ma prolungato nel tempo. Consiste in una variazione molto significativa del coefficiente di deformazione, ossia di quella proprietà del materiale relativa alla variazione di forma.

Tutti questi effetti possono essere corretti mediante utilizzo di software ad hoc che permettono la calibrazione dello scanner. In particolare, le correzioni effettuate dal software sono valide se la calibrazione è effettuata nelle stesse condizioni in cui viene poi effettivamente utilizzato lo strumento.

4.2 Modalità a non contatto (*dynamic mode*)

La modalità a non contatto è quella più adatta ad analizzare campioni soffici come ad esempio quelli biologici poichè si evita ogni forma di attrito con la superficie e quindi non c'è il rischio di danneggiare le molecole biologiche ¹. Lo svantaggio principale di una misura a non contatto in aria, rispetto ad una eseguita in contatto, è la risoluzione. Ad esempio, nel caso di misure a non contatto in aria, l'umidità presente sul campione ha come effetto quello di 'intrappolare la punta' non permettendo la sua corretta oscillazione e riducendo significativamente la risoluzione.

Una soluzione per ovviare parzialmente alla perdita di risoluzione è sfruttare la modalità dinamica (*tapping mode* o a contatto intermittente) in cui la punta è periodicamente in contatto con la superficie, in maniera intermittente, evitando così di danneggiare il campione e permettendo di avere una migliore risoluzione. Inoltre, quando la punta viene in contatto con la superficie, l'effetto delle forze capillari (interazioni a lungo raggio) viene meno. Questo significa che, a differenza della modalità non a contatto 'pura', dove questo tipo di interazione

¹ In qualche caso è stato comunque possibile misurare molecole biologiche in modalità a contatto senza danneggiarle [107]

disturba la misura riducendone la risoluzione², la modalità a contatto intermittente non soffre di questo problema. La misura risulta infatti più stabile, nel senso che l'oscillazione della punta risulta meno influenzata dalle forze capillari, anche in condizioni di elevata umidità.

In questo lavoro di tesi verranno presentate misure eseguite tutte in modalità a contatto intermittente e in particolare in modalità AM-AFM. La trattazione rigorosa dell'equazione di moto in tre dimensioni per il sistema cantilever-punta è molto complicata, per questo si introducono alcune semplificazioni e si approssima il sistema a una molla cui all'estremo libero è vincolata una massa puntiforme m . L'approssimazione permette in ogni caso di visualizzare l'influenza che le interazioni punta-campione hanno sull'oscillazione. Il sistema viene descritto come un *oscillatore armonico forzato con termine di smorzamento*:

$$m\ddot{z} + kz + \frac{m\omega_0}{Q}\dot{z} = F_{ts}(z) + F_0 \cos(\omega t) \quad (4.7)$$

dove z è lo spostamento verticale della molla, k la costante di forza, ω_0 la frequenza di risonanza, Q il fattore di merito del cantilever che è tanto maggiore quanto più stretta (cioè migliore) è la risonanza, F_0 e ω rispettivamente la forza 'esterna' e la frequenza associata. Il termine $F_{ts}(z)$ descrive invece l'interazione punta-campione. La soluzione per il moto semplice del cantilever cioè quella che non considera il contributo delle interazioni si ottiene ponendo $F_{ts}(z) = 0$:

$$z = B \exp(-\alpha t) \cos(\omega_0 t + \beta) + A \cos(\omega t - \varphi) \quad (4.8)$$

Il sistema ha dunque un transiente oscillante iniziale che svanisce esponenzialmente col tempo, lasciando il posto ad un'oscillazione pura ad ampiezza costante A ; questa oscillazione è determinata essenzialmente dalla forza esterna, e presenta uno sfasamento φ con essa:

$$A(\omega) = \frac{\frac{F_0}{m}}{[(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\frac{\omega\omega_0}{Q})^2]^{1/2}} \quad (4.9)$$

$$\tan \varphi = \frac{\frac{\omega\omega_0}{Q}}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad (4.10)$$

Se ora si considera anche il termine di interazione dobbiamo capire come il termine $F_{ts}(z)$ modifichi la soluzione dell'eq. 4.7. Assumendo una distanza

² Questo problema può essere risolto operando in ultra-alto vuoto.

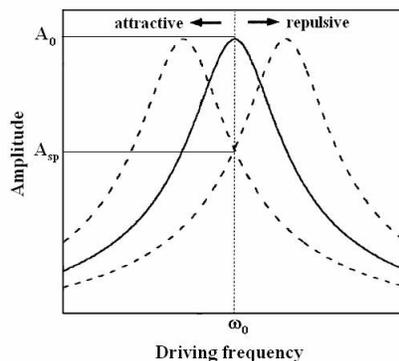


Fig. 4.6: Curva di risonanza per il sistema cantilever-punta nel caso di: nessuna interazione (curva continua), interazione repulsiva o attrattiva (curve tratteggiate).

punta-campione costante z_0 è possibile esprimere $F_{ts}(z)$ in serie di potenze:

$$F_{ts}(z) = F_{ts}(z_0) + \left(\frac{dF_{ts}}{dz} \right)_{z_0} (z - z_0) + \dots \quad (4.11)$$

Nel caso di piccoli spostamenti è possibile troncare la serie al termine lineare e nell'eq. 4.7 si possono così raccogliere nello stesso termine la risposta elastica $-kz$ e il gradiente della forza di interazione $\left(\frac{dF_{ts}}{dz} \right)_{z_0}$. La soluzione è ancora un oscillatore armonico, con costante elastica e frequenza di risonanza effettive:

$$k_e = \left(k - \left(\frac{dF_{ts}}{dz} \right)_{z_0} \right) \quad (4.12)$$

$$\omega_e = \sqrt{\frac{k_e}{m}} \quad (4.13)$$

Come si vede la risonanza è ancora descritta come nell'eq. 4.8 dove però ω_0 è sostituito da ω_e . Questo provoca uno shift della curva di risonanza come è chiaro in fig. 4.6. Così, se inizialmente il cantilever viene fatto vibrare con frequenza ω_0 e ampiezza A_0 , allora l'interazione con il campione farà diminuire l'ampiezza dell'oscillazione. E' chiaro che se la punta è eccitata ad una frequenza diversa da quella di risonanza allora l'ampiezza aumenterà o diminuirà a seconda del verso dello shift della curva di risonanza. L'approssimazione a oscillatore armonico semplice è sufficiente per descrivere il principio di funzionamento dell'AM-AFM e si basa sulla variazione dell'ampiezza di oscillazione determinata dalle interazioni di lungo raggio tra punta e campione. Tuttavia le

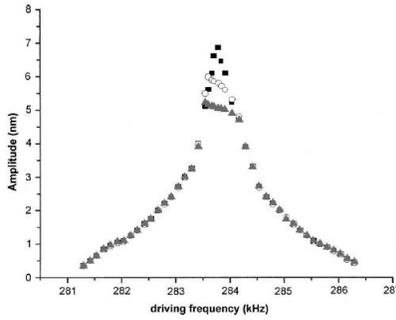


Fig. 4.7: Ampiezza di oscillazione in funzione della frequenza per tre diversi valori di distanza punta-campione: $z_0 = 12nm$ (quadrati), $z_0 = 6nm$ (cerchi), $z_0 = 5nm$ (triangoli) [108].

semplificazioni introdotte non permettono di ottenere una descrizione del moto che sia in perfetto accordo con i dati sperimentali [108]. Un esempio di curva di risonanza ottenuta da dati sperimentali è riportato in fig.4.7 [109]. La punta in silicio inizia a sentire l'interazione ad una distanza di 12 nm dalla superficie del campione (Mica) e la curva inizia a perdere il suo andamento Lorentziano, senza però mostrare shift significativi. Anche in questo caso l'ampiezza di oscillazione diminuisce a causa dell'interazione. Risulta comunque chiaro come l'approssimazione a oscillatore armonico non sia adeguata per descrivere con precisione l'influenza del termine F_{ts} nell'eq. 4.7.

E'importante sottolineare che l'ampiezza dell'oscillazione per una frequenza vicina a quella di risonanza è funzione della distanza punta-campione. Nella modalità a contatto intermittente il parametro di feedback è proprio l'ampiezza di oscillazione. In questo modo, durante la scansione, la distanza media tra punta e campione viene mantenuta costante.

Se si vuole analizzare più in dettaglio il moto del cantilever risulta necessario risolvere in maniera rigorosa l'eq.4.7 e sviluppare modelli per descrivere accuratamente il termine di interazione.

4.3 Risoluzione dell'AFM

A differenza di molti altri microscopi (ottici ed elettronici) una caratteristica peculiare dell'AFM è quella di generare immagini tridimensionali della superficie analizzata. Poiché l'AFM ha risoluzione atomica lungo la direzione verticale

mentre quella nel piano è fortemente limitata dal raggio di curvatura della punta, è necessario distinguere tra risoluzione verticale e laterale³.

La risoluzione verticale, o sensibilità, è principalmente limitata dal rumore termico che induce fluttuazioni della punta. Le vibrazioni provenienti dal suolo o più in generale dall'ambiente circostante possono essere trascurate poichè esistono ormai sistemi di isolamento efficienti. Per un sistema ottico come quello descritto nel paragrafo 4.1, considerando un cantilever rettangolare vale [104]:

$$\Delta z = \sqrt{\frac{4k_B T}{3k}} = \frac{0.074}{\sqrt{k}} \quad (4.14)$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, k la costante elastica del cantilever, T la temperatura. La relazione permette di calcolare il rumore termico come uno spostamento Δz della punta dalla sua posizione di equilibrio. A temperatura ambiente, utilizzando cantilever con costante elastica pari a 40 N/m (tipico valore per misure in modalità non a contatto) la maggior parte dei microscopi a forza atomica raggiunge una risoluzione verticale dell'ordine dei 0.01 nm. In realtà questo valore è limitato dalla sensibilità del fotodiodo, così come dall'efficienza del sistema di feedback e scende fino a 0.1 nm.

La risoluzione laterale è fortemente legata a quella verticale ed è determinata dal raggio di curvatura della punta R . Assumendo piccola la differenza di altezza Δh tra due picchi vicini allora la risoluzione d è data da [104]:

$$d = \sqrt{2R}(\sqrt{\Delta z} + \sqrt{\Delta z + \Delta h}) \quad (4.15)$$

In figura 4.8 sono riportati valori di d calcolati per diversi R e Δh , per un fissato valore di $\Delta z = 0.02$ nm. Idealmente, utilizzando punte 'sharp' l'AFM dovrebbe essere in grado di ottenere risoluzione laterale subnanometrica. In questo senso, come verificato sperimentalmente [101], la geometria e la forma della punta determinano e limitano la risoluzione laterale dello strumento. Un aspetto importante che va considerato per interpretare correttamente le immagini AFM è l'*effetto di convoluzione* della punta (fig. 4.9).

Una semplice descrizione si basa su semplici considerazioni geometriche [110]. La punta viene appoggiata alla superficie ovvero viene portata ad una distanza (nulla nel caso della modalità a contatto) necessaria per rispettare i parametri imposti dal sistema di feedback. Una volta effettuato l'approccio, viene registrata la posizione verticale della punta. Questa operazione va poi ripetuta su

³ La risoluzione laterale è definita come la minima distanza misurabile tra due punti.

R (nm)	d (nm)			
	$\Delta h = 0$ nm	$\Delta h = 0.20$ nm	$\Delta h = 0.50$ nm	$\Delta h = 1.0$ nm
0.2	0.13	0.39	0.55	0.73
0.5	0.2	0.61	0.86	1.2
1.0	0.28	0.86	1.2	1.6
2.0	0.4	1.2	1.7	2.3
5.0	0.63	1.9	2.7	3.6
10	0.89	2.7	3.9	5.1
20	1.3	3.9	5.5	7.3
50	2.0	6.1	8.6	12

Fig. 4.8: Risoluzione laterale ideale calcolata per diversi valori di R e Δh , fissando $\Delta z = 0.02$ nm [101].

tutta la linea di scansione. Si otterrà così un insieme di punti corrispondenti a tutte le posizioni misurate in precedenza. Come è più chiaro dalla fig.4.9 si può concludere che le limitazioni imposte dalle caratteristiche strutturali delle punte devono essere tenute in seria considerazione in quanto le dimensioni misurate dallo strumento sono sempre maggiori di quelle effettive dell'oggetto. In questo senso hanno particolare importanza sia il raggio di curvatura della punta, sia l'angolo del relativo apice.

Sono stati sviluppati numerosi algoritmi per ricostruire l'immagine 'reale' direttamente dalla misura AFM [110]. Una prima stima dell'effetto si basa su semplici considerazioni geometriche:

$$w_m = w_r - 2\sqrt{2hR} \quad (4.16)$$

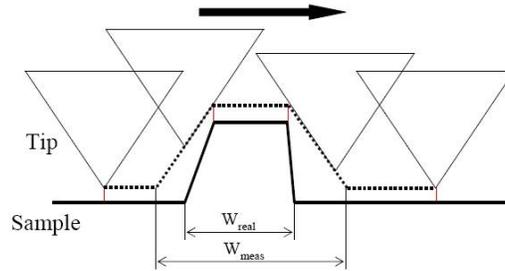


Fig. 4.9: Effetto delle caratteristiche strutturali della punta. La linea tratteggiata rappresenta l'insieme delle posizioni effettivamente registrate dallo strumento mentre la linea continua è la superficie del campione: è evidente che le dimensioni misurate dallo strumento sono maggiori di quelle reali. In particolare, la linea tratteggiata è la *convoluzione* della struttura della punta con la topografia della superficie che viene analizzata.

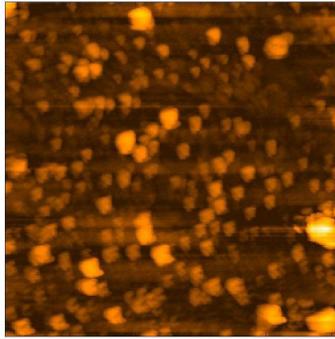


Fig. 4.10: Immagine artefatta ($5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$). In questo caso la punta ha raccolto materiale organico con cui era a contatto.

dove R è ancora il raggio di curvatura della punta (approssimabile come una sfera), h è l'altezza dell'oggetto, w_m e w_r sono rispettivamente la sua larghezza misurata e quella reale. Questa equazione vale per forme sferiche o cilindriche il cui asse principale è perpendicolare alla direzione di scansione ma è ragionevole ritenerla una buona approssimazione anche per altre forme [111].

La risoluzione laterale dipende poi dalla natura del campione analizzato. Ad esempio, se si tratta di materiali particolarmente delicati come i campioni biologici, il contatto con la punta può causare significative deformazioni e indurre un'intensificazione dell'effetto descritto in precedenza. In questi casi la risoluzione laterale è dell'ordine dei 5-15 nm mentre solo nel caso di materiali duri può raggiungere la scala atomica.

Un tipo di artefatto è presentato in fig.4.10: strutture con forma molto simile si ripetono su tutta l'area di scansione. L'effetto è dovuto ad asimmetrie della punta: se infatti l'apice presenta fratture o una marcata rugosità allora queste caratteristiche sono convolute con la reale topografia del campione. Il risultato finale è appunto l'acquisizione di un'immagine totalmente artefatta.

4.4 AFM in biologia

Fin dalla sua invenzione, è cresciuto molto l'interesse e l'utilizzo dell'AFM in campo biologico. In questo campo, il principale vantaggio della microscopia a forza atomica rispetto ad altre tecniche di indagine microscopica e spettroscopica (SEM, TEM, XRD) è sicuramente la possibilità di misurare campioni biologici in condizioni fisiologiche (in aria o in liquido) senza una particolare preparazione del campione stesso. Le applicazioni dell'AFM in biologia vanno dalla semplice

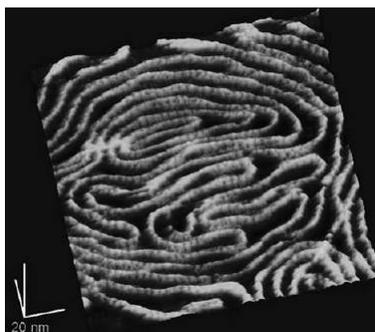


Fig. 4.11: Immagine ad alta risoluzione di filamenti di DNA in soluzione. I filamenti sono adsorbiti su un doppio strato di lipidi cationici depositato su mica [112].

indagine topografica (*Imaging*) allo studio di altre proprietà fisico-chimiche. In questo lavoro di tesi l'AFM viene usato come tecnica di indagine a livello molecolare di proteine depositate su substrati con differenti proprietà chimico-fisiche. A tal proposito, in questo paragrafo verrà presentato lo stato dell'arte rispetto a tale tipo di indagine. Alcuni degli esempi più importanti riguardano lo studio di DNA e RNA, proteine, virus, batteri e più in generale delle membrane cellulari.

Affinchè si possa ottenere un'immagine AFM non solo è necessario che queste molecole si leghino al substrato ma anche che la rugosità del substrato sia tale da permettere di distinguere chiaramente la superficie del substrato stesso dalle molecole da analizzare. Per questo si utilizzano substrati particolarmente piatti, con valori di rugosità media anche al di sotto del nanometro. Il legame con la superficie deve comunque essere tale da evitare che l'interazione con la punta possa romperlo ma non deve causare la distorsione della molecola poiché indurrebbe significative variazioni conformazionali.

Immagini ad alta risoluzione di DNA in liquido (fig.4.11) sono state ottenute facendo adsorbire le molecole su un doppio strato costituito da lipidi cationici depositato su mica [112].

Da questo studio sono stati ricavati valori del passo d'elica pari a 3-4 nm e 2 nm per la larghezza del filamento, in perfetto accordo con le dimensioni note da precedenti studi sperimentali di altra natura. Un altro esempio di imaging molecolare di superavvolgimento di DNA (*supercoiling*) [113] è riportato in fig. 4.12. In questo caso le molecole sono nella forma di *supercoil*, vengono depositate in soluzione su un substrato di mica, a due diverse concentrazioni

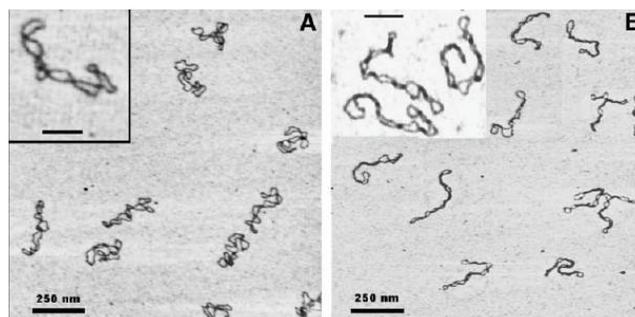


Fig. 4.12: Superavvolgimento di DNA: influenza dell'ambiente ionico. Strutture meno compatte (a destra) derivano dalla soluzione salina meno concentrata, strutture compatte (a sinistra) da quella più concentrata [113].

saline. Il DNA adsorbito dalla soluzione più concentrata (fig.4.12B) assume una tipica conformazione plectonemica mentre quello depositato dalla soluzione più diluita ha una struttura decisamente meno compatta. Anche in questo caso i risultati sono in perfetto accordo con quelli di altri lavori sperimentali e teorici sull'effetto dell'ambiente ionico rispetto alla conformazione supercoil del DNA.

Come già accennato, il microscopio a forza atomica permette anche di seguire in tempo reale la dinamica di un sistema molecolare. In questo caso la risoluzione è principalmente limitata dalla velocità di scansione. In fig.4.13 è riportato il processo trascrizionale⁴ dell'RNA polimerasi⁵ dell'*Escherichia coli* [114].

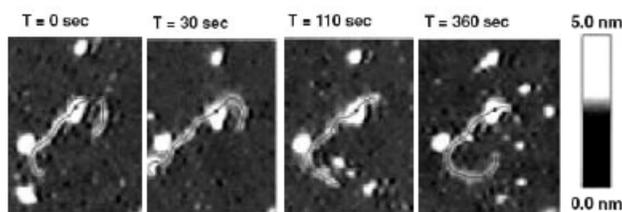


Fig. 4.13: Immagini *real-time* del complesso RNAP-DNA. La misura è effettuata in liquido utilizzando un substrato di mica. A $t = 30s$ viene introdotto il nucleotide trifosfato e inizia così la trascrizione del DNA. In particolare si vede come il filamento di DNA scorra sulla struttura globulare corrispondente all'RNA polimerasi. L'adesione del DNA al substrato è infatti minore rispetto a quella dell'RNAP [114].

⁴ Per processo trascrizionale si intende la sintesi proteica ovvero quel processo che, a partire dal DNA, servendosi dell'RNA, sintetizza gli amminoacidi.

⁵ Si tratta di un enzima che catalizza la sintesi di un filamento di RNA, necessario quindi per la successiva trascrizione del DNA.

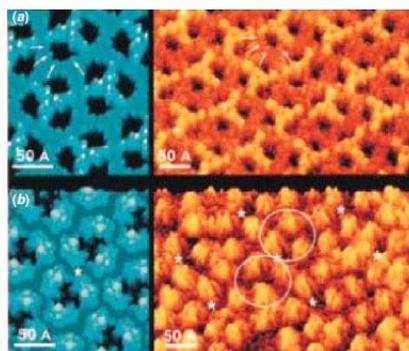


Fig. 4.14: Superficie periplasmatica (a) ed extracellulare (b) della struttura cristallina formata dalla proteina OmpF. A destra sono riportate le misure XRD, a sinistra quelle AFM [115].

Il lavoro è svolto in liquido e la misura ottenuta in modalità non a contatto (FM-AFM). E'interessante notare che, solo dopo aver aggiunto nella soluzione il nucleotide trifosfato (composti organici essenziali per attivare la reazione con l'RNA), avviene l'attivazione dell'RNA polimerasi e inizia quindi la trascrizione del DNA. Risoluzioni laterali dell'ordine del nanometro sono state ottenute per strati ordinati di proteine densamente impaccate. L'elevato rapporto segnale-

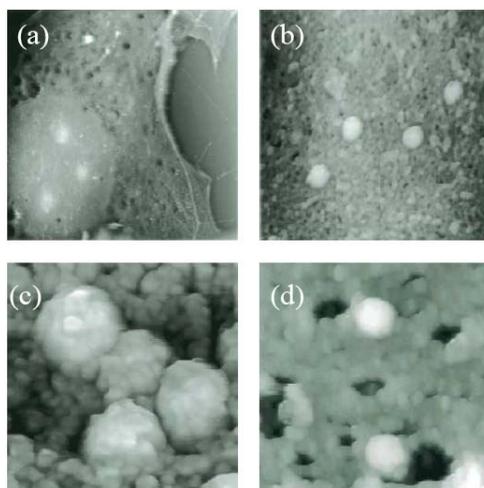


Fig. 4.15: Immagini di fibroblasti prima dell'infezione (a) e successive alla stessa. Si notano chiaramente le particelle virali sulla membrana cellulare. Le aree di scansione sono pari a $40 \times 40 \mu m^2$ (a), $2 \times 2 \mu m^2$ (b), $430 \times 430 nm^2$ (c) e $200 \times 200 nm^2$ (d) [116].

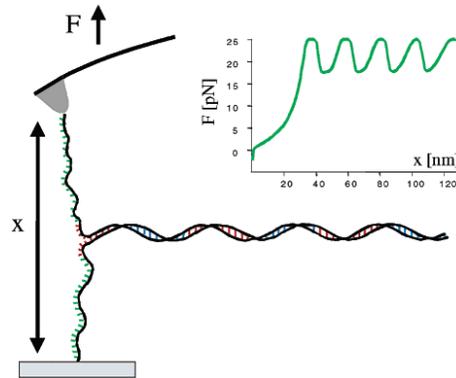


Fig. 4.16: Spettroscopia di forza su filamento di DNA. Una volta che il filamento è attaccato alla punta funzionalizzata, questa viene ritratta. Il movimento è ripetuto ciclicamente in modo tale da 'sgrovigliare' tutti i domini della macromolecola [117].

rumore (e quindi l'elevata risoluzione) è dovuto al fatto che le proteine sono immobilizzate molto meglio sul substrato quando formano questo tipo di strutture rispetto a quando si trovano ad essere più isolate. In fig.4.14 è riportato uno studio di strutture di proteine impaccate, si tratta della proteina porina OmpF (proteina di membrana). Le misure sono state effettuate in liquido in modalità in contatto e sono state confrontate con misure XRD (Diffrazione ai raggi X) che di fatto sono in accordo con quelle AFM. L'analisi ha permesso anche di visualizzare l'apertura e la chiusura del canale proteico al variare delle condizioni esterne quali pH e variazioni di concentrazione di specie ioniche [115]. Da questo punto di vista va sottolineato come l'AFM sia l'unica tecnica di indagine microscopica in grado di monitorare variazioni morfologiche in risposta a stimoli esterni.

Un altro campo della biologia in cui l'AFM è molto utilizzato riguarda lo studio della cellula. Un esempio è presentato in fig.4.15 dove sono riportate immagini di fibroblasti 3T3 infettati dal virus della leucemia acuta dei topi. Le cellule sono state 'fissate' alla superficie con un trattamento in glutaraldeide e la misura è stata effettuata in etanolo. Dapprima sono state analizzate le cellule sane (fig.4.15 (a)), poi sono state infettate e sono comparse così le particelle virali sulle membrane dei fibroblasti. Come ulteriore importante applicazione del microscopio a forza atomica in campo biologico va ricordata la spettroscopia di forza. Questa tecnica permette di esplorare le caratteristiche meccaniche di singole molecole, come ad esempio quelle di DNA (fig.4.16) [117] [118]. Si

utilizza una punta funzionalizzata che viene ciclicamente avvicinata e allontanata dalla superficie del campione in modo da 'agganciare' le molecole per poi distenderle. Misurando la deflessione in funzione della distanza, è possibile ricostruire le curve di forza come risultato dello 'sgrovigliamento' delle catene di DNA[119]. Un'ultima possibilità offerta dall'AFM, particolarmente interessante e sviluppata soprattutto in campo nano-biotecnologico, è quella relativa alla nano-manipolazione di cellule e macromolecole in generale [120] così come alla funzionalizzazione di superfici.

5. METODO SPERIMENTALE E RISULTATI

In questo capitolo si presentano le modalità di preparazione dei substrati utilizzati e le loro proprietà chimico - fisiche. Successivamente vengono descritti il metodo sperimentale, i risultati ottenuti, e la relativa discussione.

Lo studio della variante AT-3/291 è dettato dall'esigenza di chiarire il ruolo che la coda destrutturata (residui 182 - 291) gioca sul processo di aggregazione. La variante AT-3/182, corrispondente al dominio Josephinico ovvero al dominio nativo della proteina, è stata studiata in un lavoro di tesi precedente [7]. I risultati sono già stati riportati nella sezione 3.3.1 come stato dell'arte, con lo scopo di permettere il confronto tra le due varianti, così da evidenziarne analogie e differenze.

5.1 *Preparazione dei substrati e loro proprietà*

Sono stati utilizzati substrati con diverse proprietà chimico - fisiche al fine di indagare il ruolo delle interazioni proteina - superficie nei confronti del processo di aggregazione. A tal fine sono stati scelti un substrato metallico (Au), uno semiconduttore (Si) e uno ceramico (Mica), tutti caratterizzati da una rugosità inferiore di un ordine di grandezza rispetto alle dimensioni della proteina. E' stata anche utilizzata una superficie di oro funzionalizzata con 1-dodecantiolo caratterizzata da valori di rugosità maggiori ma con caratteristiche superficiali completamente diverse dagli altri substrati. Da questo punto di vista molto interessanti risultano essere la bagnabilità e quindi le proprietà di idrofilità/idrofobicità.

Le misure di angolo di contatto sono state svolte presso il dipartimento di Ingegneria Chimica e Materiali 'G.Natta' del Politecnico di Milano (sig.ra Clerici, gruppo prof.ssa C.Castiglioni).

5.1.1 *Mica*

Il termine mica indica un gruppo di filossilicati, minerali caratterizzati da una struttura cristallina a strati. Questi minerali cristallizzano tutti nel sistema mo-



Fig. 5.1: Struttura cristallina della muscovite ($KAl_2(OH)_2AlSi_3O_{10}$): struttura a strati in cui è visibile un pacchetto (A), spessore di ogni strato, composto da piani di tetraedri con orientazioni opposte uniti da unità ottaedriche. Strati adiacenti sono legati gli uni agli altri da ioni K^+ , situati nelle cavità tra i tetraedri. Il clivaggio produce due superfici piatte a livello atomico in cui solo metà delle cavità sono occupate da questi ioni (C) poiché solo una cavità su due è carica negativamente.

noclino con una tendenza a formare cristalli pseudo-esagonali; la caratteristica sfaldatura della mica è legata appunto alla disposizione laminare degli atomi simile a fogli esagonali. Posseggono un'alta costante dielettrica e un'eccellente stabilità chimica. Esistono diversi tipi di mica e si distinguono rispetto alla specie ionica metallica che contengono. Il più usato per studi AFM corrisponde alla muscovite ($KAl_2(OH)_2AlSi_3O_{10}$) che viene normalmente fornita sotto forma di piccoli fogli. E' il substrato più utilizzato per le caratterizzazioni AFM in campo biologico poiché ritenuto inerte chimicamente rispetto alle specie molecolari. Questa struttura può essere clivata facilmente lungo il piano (001) inserendo una punta in uno dei quattro angoli del foglio oppure usando un semplice nastro adesivo. In questo modo si ottiene una superficie pulita con una rugosità quadratica media pari a $R_q = 0.25\text{Å}$.

Più in dettaglio la struttura cristallina è costituita da due strati principali:

- un tetraedro di anioni ortosilicati SiO_4^{4-} in cui ogni atomo di Si è coordinato con quattro atomi di O condividendo una carica positiva con ciascuno di essi e lasciando così una carica negativa su ognuno. Per bilanciare questo eccesso di carica gli atomi di O si legano con altri due atomi di Si adiacenti, formando così un piano cristallino di tetraedri, uno affianco all'altro come nel caso del quarzo;
- un'unità ottaedrica caratterizzata dalla presenza di atomi di Al. Ogni atomo è coordinato con sei atomi di O e condivide con ciascuno di essi un valore della sua carica pari a +0.5 lasciando così una carica pari a -1.5 su

ogni atomo di O. Questo eccesso viene bilanciato dai legami che ciascuno di questi O forma con altri due atomi di Al adiacenti.

Ogni strato di ottaedri è disposto tra due strati di tetraedri. I vertici dei tetraedri e degli ottaedri sono legati tra loro, questo insieme di tre strati è chiamato 'pacchetto' (Fig. 5.1 A). I metalli alcalini sono disposti tra un pacchetto e l'altro. Le forze che tengono uniti i metalli alcalini ai pacchetti sono deboli, mentre le forze all'interno del pacchetto sono forti. Questo fatto spiega la sfaldatura delle miche in lamelle lungo il piano (011).

La muscovite è costituita dall'insieme di pacchetti di spessore pari a 10\AA , disposti l'uno sopra l'altro. Tra un pacchetto e l'altro si inseriscono ioni K^+ (Fig. 5.1 B). Questi ioni neutralizzano l'eccesso di carica negativa che è presente sulla superficie di ciascun pacchetto inserendosi nelle 'cavità' come è più chiaro in fig. 5.1. Quando la muscovite è in contatto con una soluzione acquosa essa è globalmente carica negativamente, è noto inoltre che gli ioni potassio possono desorbire ed essere rimpiazzati da altri cationi [121] [122]. In particolare l'affinità a legarsi alla cavità è $K^+ > Na^+ > Li^+$ e si pensa che questa sia legata all'energia di idratazione delle singole specie (bassa per K^+). Ci si aspetta quindi che l'adsorbimento di una molecola biologica sia influenzato dalla composizione della soluzione. E'infatti dimostrato che l'adsorbimento di una proteina può essere inibito da ioni metallici monovalenti [123]. Per favorire l'adsorbimento è quindi necessario usare concentrazioni di proteina maggiori oppure ridurre la presenza di ioni con alta affinità.



Fig. 5.2: Bagnabilità della muscovite. E'visibile la siringa dalla quale è stata depositata una goccia di acqua MilliQ con volume pari a $2\mu\text{l}$. La misura è stata ripetuta per ottenere una statistica significativa del valore dell'angolo di contatto. La media di questi valori permette di determinare $\theta = 32^\circ$.

La bagnabilità è stata investigata con una misura dell'angolo di contatto (C.A.) di una goccia ($2\mu l$) di acqua MilliQ, ovvero il solvente utilizzato per diluire il pellet di proteina e nel quale viene poi depositata sulla superficie (vedi par. 5.2). La fig. 5.2 mostra come la superficie della muscovite sia altamente idrofilica e l'angolo di contatto misurato in condizioni ambientali standard ($25^\circ C$ e $1 atm$) è $\theta = 32^\circ$.

5.1.2 Silicio

I substrati in silicio sono stati ricavati da wafer monocristallini, caratterizzati da $R_q < 0.5 nm$. Prima della deposizione della proteina sono stati immersi in soluzione Piranha ($1/3 H_2 SO_4, 2/3 H_2 O_2$) per circa 45 min., sonicati in isopropanolo così da eliminare residui organici dalla superficie. Una superficie in silicio espone due tipi di gruppi funzionali: silanoli ($-SiOH$) e silossani ($-SiO-$). Si può qualitativamente assegnare un carattere idrofilico ai primi, idrofobico ai secondi. Quando l'area ricoperta dai silanoli diminuisce (es. dopo trattamento termico ad alta T), aumenta quella relativa ai silossani quindi la superficie diventa più idrofobica.

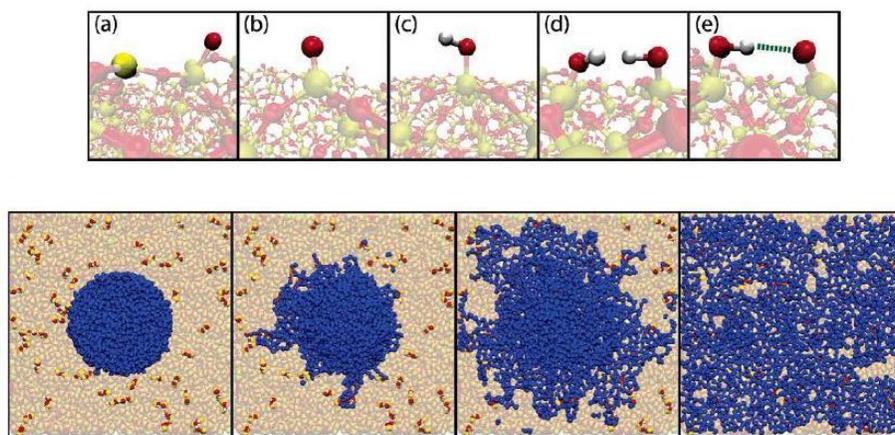


Fig. 5.3: Cinque diversi modelli per una superficie di silice amorfa. Superficie ricotta, presenta atomi di Si e di O esposti (a). Superficie con soli atomi di O esposti (b), presenza di silanoli (c), silanoli vicini (d), deprotonazione di un silano e formazione di un legame idrogeno con un silano vicino [124]. Sotto è mostrata una simulazione dell'effetto dell'idrofilicità dei silani (puntini rossi e gialli) nei confronti di una goccia d'acqua (blu). Gli step mostrati corrispondono a 0, 0.12, 0.64 e 2 ns.

Inoltre va sottolineato che molecole in grado di formare legami idrogeno si adsorbono facilmente su una superficie idrossilata. E' inoltre importante notare che non tutti i gruppi silanoli sono equivalenti infatti, data la natura amorfa dello strato di silicio, alcuni gruppi possono essere classificati come isolati, altri possono invece legarsi tramite un legame idrogeno (Fig. 5.3). E' possibile ricavare il valore dell'angolo di contatto (valore teorico) dalla relazione:

$$\cos \theta = 0.257 a_{SiOH} + 0.743 \quad (5.1)$$

dove a_{SiOH} è il numero di silani per nm^2 diviso per $4.6 nm^2$ ovvero la densità superficiale massima relativa a questi gruppi funzionali. Ad esempio, se sulla superficie non c'è presenza di gruppi silani allora $\theta = 42^\circ$, in accordo con dati sperimentali [124].

Quanto detto vale per una superficie amorfa di ossido nativo di silicio, che non ha subito nessuna modifica. Nel caso dei substrati utilizzati in questa tesi, il trattamento chimico di etching superficiale con soluzione Piranha rimuove lo strato di ossido, almeno parzialmente. Dalla misura di bagnabilità si ottiene infatti $\theta = 29^\circ$. In altre parole l'attacco acido ha reso molto più idrofilica la superficie.



Fig. 5.4: Bagnabilità del substrato in silicio. Volume goccia $2\mu l$, $\theta = 29^\circ$.

5.1.3 Oro

La superficie di oro è stata preparata seguendo la tecnica del 'template stripping' (TS) [125]. Si tratta di una tecnica molto utilizzata per preparare superfici metalliche (principalmente Au, Pt o Ag) con rugosità molto basse. Consiste nel

depositare il metallo su un substrato di mica (muscovite), mediante Physical Vapour Deposition (PVD). La superficie metallica viene successivamente incollata ad un wafer di silicio (colla epossidica bicomponente, 140°C per 1h). Infine avviene uno stripping meccanico che mette a nudo l'interfaccia tra oro e mica. Si ottiene così una superficie piatta e priva di contaminazioni (Fig. 5.5). In pratica la superficie ottenuta ricalca quella della mica e ha così bassissima rugosità.

Per mezzo di questa tecnica sono stati preparati i substrati in oro policristallino con spessore pari a 40nm, in particolare la deposizione è stata effettuata in vuoto ($P < 2 \times 10^{-3}\text{Pa}$) in un evaporatore E306A EDWARDS monitorando lo spessore di materiale evaporato con una microbilancia al quarzo.

Durante il processo di evaporazione la mica è stata mantenuta ad una temperatura di circa 400°C , una volta terminata l'evaporazione il substrato è stato mantenuto alla stessa temperatura per 1h, così da permettere la diffusione dell'oro e ridurre di conseguenza le disomogeneità superficiali.

Per quanto riguarda la carica superficiale, bisogna considerare un aspetto importante. Studi sugli effetti di polarizzazione della superficie metallica legati alla densità di carica delle molecole adsorbite, devono tenere necessariamente conto della presenza della proteina. In altre parole in questo caso non si

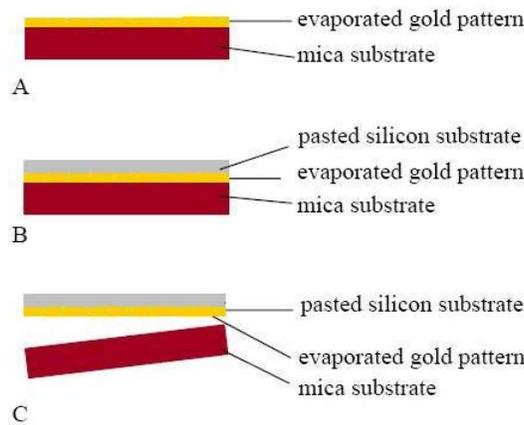


Fig. 5.5: Tecnica 'template stripping'(TS). Evaporazione del metallo (A), adesione del wafer di silicio (B) e stripping meccanico (C).

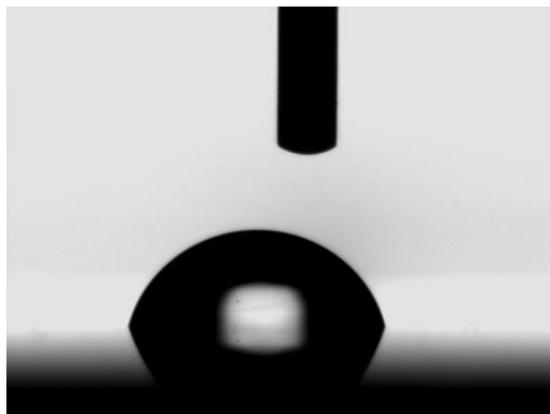


Fig. 5.6: Bagnabilità della superficie di oro ottenuta con la tecnica TS, spessore 40 nm. Volume della goccia $2\mu\text{l}$, si ottiene un valore medio $\theta = 76^\circ$.

può trattare la polarizzazione considerando l'interfaccia con un liquido puro ma è fondamentale focalizzare l'attenzione sulle proprietà della proteina. La polarizzazione dell'oro influenza infatti sia l'interazione con la proteina, sia le interazioni tra le proteine adsorbite [126].

La misura di bagnabilità ha infine evidenziato un carattere maggiormente idrofobico rispetto ai substrati in mica e silicio, come mostrato in fig. 5.6. Si è misurato un angolo di contatto pari a $\theta = 76^\circ$.

5.1.4 Oro funzionalizzato

È noto che è possibile funzionalizzare superfici di natura differente per favorire o inibire l'adsorbimento di molecole biologiche. Gli studi che trattano la funzionalizzazione di substrati di oro policristallino con diversi tipi di molecole organiche sono molto numerosi e trovano molte applicazioni in campo nanotecnologico e più in generale in quello della scienza dei materiali. In particolare, si utilizzano molto spesso tioli alchilici ovvero catene alchiliche in cui una delle due estremità esibisce il gruppo -SH (tiolo o mercaptano), favorevole a legarsi con l'oro [127] [128] [129] [130]. Si sfruttano le proprietà fisico-chimiche di queste specie molecolari poiché, attraverso un processo di strutturazione spontaneo, permettono la formazione di singoli strati sulla superficie in oro. I cosiddetti *Self Assembled Monolayers* (SAMs) si ottengono immergendo semplicemente il substrato che si vuole ricoprire in una soluzione contenente le molecole da adsorbire. In un primo momento, il tiolo si va a legare covalentemente ad un atomo di Au eliminando

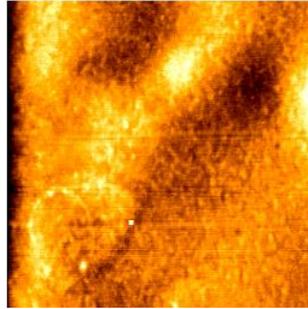


Fig. 5.7: Immagine AFM acquisita in modalità a contatto intermittente (*tapping mode*) del substrato in oro policristallino prima della funzionalizzazione, $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$.

idrogeno (adsorbimento chimico), successivamente l'adsorbimento procede con una progressiva strutturazione.

Nel caso specifico si è utilizzata una soluzione $10^{-3}M$ di 1-dodecantiolo ($HS - (CH_2)_{11} - CH_3$), gruppo funzionale all'estremità libera $-CH_3$ in etanolo e un substrato in oro policristallino depositato come descritto nel paragrafo precedente. È importante notare che in questo caso non si è seguita la procedura del 'template stripping': si è visto infatti che tale operazione, inducendo uno stress meccanico al metallo, non permetteva di ottenere una topografia uniforme su scala micrometrica. Questo è probabilmente dovuto al fatto che sulla superficie dell'oro ottenuto con TS, a causa della deformazione subita, localmente si vengono a creare zone ad alta energia superficiale che fungono quindi come

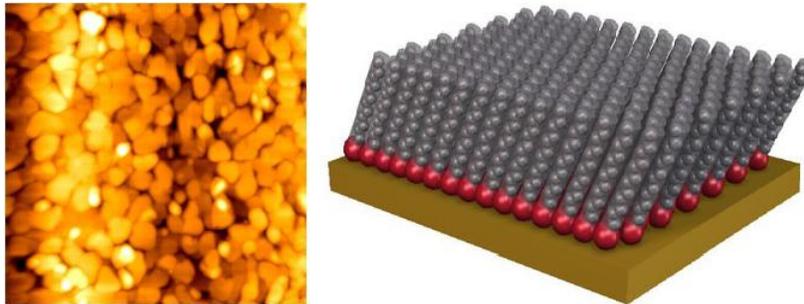


Fig. 5.8: A sinistra: immagine AFM del substrato in oro policristallino funzionalizzato con 1-dodecantiolo. Area di scansione: $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$. A destra: simulazione molecolare della struttura di uno strato auto-assemblato di tiolo alchilico. L'inclinazione è tipica della natura delle interazioni tiolo - substrato e di quelle tra le molecole adsorbite stesse.

siti di aggancio preferenziale per le molecole organiche disperse in soluzione. Le misure AFM sulla proteina risultano critiche con tali superfici, si è quindi preferito utilizzare il substrato evaporato, pulito in etanolo ed asciugato lentamente con un leggero flusso di azoto (Fig. 5.7). Si ottengono valori di rugosità $R_q = 0.3 \div 0.5nm$.

La funzionalizzazione avviene immergendo il substrato in soluzione per 5h, poi risciacquato con isopropanolo. La scelta della variabile temporale è stata effettuata al fine di ottimizzare il valore di rugosità e l'uniformità della superficie su scala micrometrica, servendosi dell'AFM come strumento di indagine. Il risultato ottenuto è presentato in fig. 5.8, la rugosità misurata è pari a $R_q = 2 \div 3nm$ quindi un'ordine di grandezza maggiore rispetto a quella del substrato prima della funzionalizzazione.

La struttura a 'isole' è probabilmente dovuta alla formazione di diversi strati di tiolo che nucleano in siti preferenziali (ad esempio difetti dello strato sottostante) e crescono poi fino a formare questa caratteristica morfologia. La rugosità è in gran parte determinata dalle valli tra un'isola e un'altra mentre la superficie delle singole isole è piuttosto piatta [131] [132].

È stata infine effettuata la misura di bagnabilità, come per gli altri substrati. Il valore dell'angolo di contatto è significativamente più alto rispetto agli altri substrati, infatti $\theta = 90^\circ$ indica il carattere idrofobico della superficie. Il risultato non sorprende in quanto il gruppo funzionale esposto è il metile ovvero un gruppo idrofobico. In pratica la funzionalizzazione ha l'effetto di incrementare l'idrofobicità dell'oro policristallino [77].

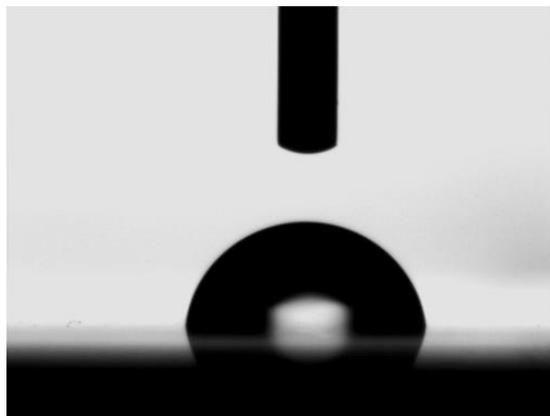


Fig. 5.9: Misura di bagnabilità dell'oro policristallino, funzionalizzato. Volume goccia $2\mu l$, $\theta = 90^\circ$.

5.1.5 Griglia in oro

Per verificare l'effettiva differenza del grado di adsorbimento al variare delle proprietà di bagnabilità di una superficie si è deciso di utilizzare un substrato come quello in fig. 5.10. Si tratta di un supporto in mica sul quale sono stati evaporati 25 nm di oro utilizzando come maschera una griglia TEM¹.

L'esperimento rappresenta una prova volta preparare campioni composti da più superfici di diverse proprietà in modo da studiare l'adsorbimento della proteina al variare delle caratteristiche di bagnabilità in un unico campione. In questo modo è inoltre possibile eseguire un'analisi a parità di condizioni di deposizione e di misura (es. zona goccia), per diverse superfici.

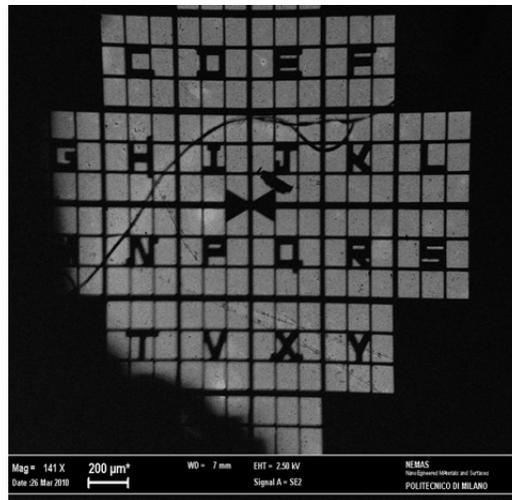


Fig. 5.10: Immagine SEM su grande scala che permette di visualizzare il campione: l'oro (zone chiare) è stato evaporato su mica (zone scure) utilizzando come maschera una griglia TEM.

¹ Si tratta di piccole griglie in rame utilizzate come supporto per le analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

5.2 Preparazione campioni e metodologie di misura

La sintesi della proteina è stata effettuata dal gruppo del Prof. P.Tortora (Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze - Università di Milano Bicocca). La variante AT-3/291 (così come il dominio-J) è stata espressa a partire dall'E.Coli, immobilizzata su appropriate matrici ed eluita con GST oppure con l'aggiunta di imidazolo. La proteina purificata è stata poi conservata prima della deposizione a -20°C in soluzione di PBS (tampone fosfato salino). La soluzione è stata centrifugata a 14000 RPM per 15 minuti così da eliminare possibili aggregati formatosi nel frattempo. I pellet ottenuti dalla centrifuga di 0.5 mg/ml di soluzione sono stati poi risospesi in acqua MilliQ e incubati a 37°C per tempi differenti.

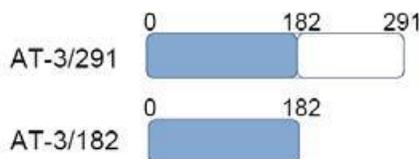


Fig. 5.11: Varianti della proteina atassina-3 studiate in questa tesi.

Dopo tempi di 0 e 48h su ciascun substrato è stata poi depositata una goccia di $2\mu\text{l}$ di tale soluzione. Questa è stata fatta evaporare in aria, successivamente la superficie è stata sciacquata con $40\mu\text{l}$ di acqua MilliQ per rimuovere l'eccesso di sale e proteina non adsorbita (Fig:5.12).

In tale maniera sono preparati campioni per i due diversi tempi di incubazione e per diverse diluizioni della soluzione di partenza in MilliQ: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Il motivo per cui si usano diverse diluizioni è sia quello di verificare l'influenza della concentrazione della proteina sia di ottenere le migliori condizioni in fase di acquisizione immagini. I differenti tempi di incubazione sono stati scelti per indagare l'influenza della cinetica di aggregazione in soluzione, confrontandola poi con l'effetto delle interazioni con il substrato.

Il microscopio a forza atomica è utilizzato per studiare come la morfologia sia influenzata dall'interazione proteina - substrato. A supporto delle misure AFM è stato utilizzato anche il microscopio elettronico (SEM), per avere informazioni su aree più ampie rispetto a quelle ottenibili dall'AFM ($\text{max } 100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$). Inoltre, come verrà di seguito discusso più in dettaglio, il SEM ha permesso di capire quali aree della goccia fossero meno ricche di residui salini e aggregati proteici abnormi, così da escludere tali zone nella successiva analisi al micro-

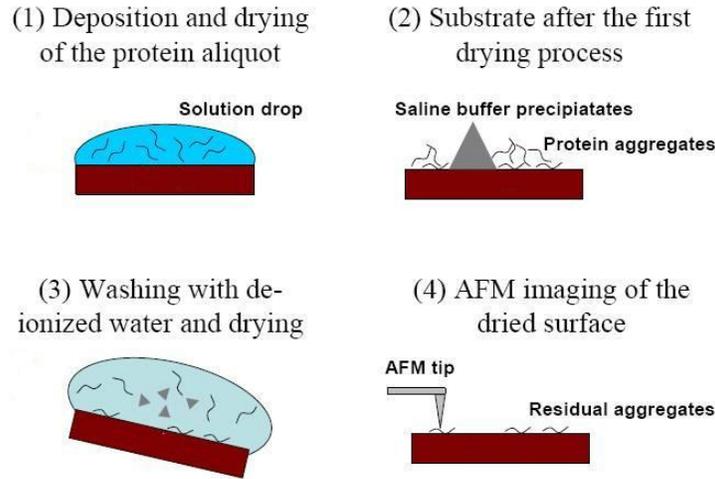


Fig. 5.12: Preparazione di un generico campione: deposizione della goccia e prima asciugatura in aria (A) e (B), risciacquo (C) e fase di analisi (D).

scopio a forza atomica. Infatti, una rugosità troppo accentuata, così come la presenza di cristalli salini, rendono tecnicamente impossibile l'acquisizione di un'immagine AFM.

Tutte le misure AFM sono state effettuate in aria in modalità a contatto intermittente utilizzando un microscopio a scansione di sonda Autoprobe CP II Research (Thermomicroscope). Lo strumento incorpora anche un microscopio ottico, così da permettere la visualizzazione dell'area di scansione su scala macroscopica. Sono stati usati due diversi scanner piezoelettrici le cui aree massime misurabili sono rispettivamente $100\mu m \times 100\mu m$ e $5\mu m \times 5\mu m$. Il primo è stato utilizzato per ottenere immagini su larghe scale, quindi per ottenere informazioni morfologiche più generali e per comprendere e superare le eventuali difficoltà tecniche dovute alla natura dei campioni. Il secondo ha reso possibile l'acquisizione di immagini più dettagliate. Sono state utilizzate punte in silicio con raggio di curvatura 10 nm e 2 nm, queste ultime per un guadagno in risoluzione. Il cantilever ha una costante elastica pari a $40N/m$ e una propria frequenza di risonanza dell'oscillazione di circa $300kHz$. Ciascuna immagine è composta da 256×256 pixel, la direzione di acquisizione 'veloce' è quella corrispondente all'asse x .

Settando un rate di scansione pari a 1 Hz, tempi caratteristici di una misura sono dell'ordine dei 5 minuti. Per ogni campione sono state effettuate mol-

te acquisizioni, sia per poter avere una statistica significativa delle morfologie analizzate, sia per permettere di capire e risolvere le problematiche via via riscontrate. Infatti, la natura della proteina AT-3/291, e più in generale quella del deposito, hanno spesso reso le misure particolarmente difficoltose. In questo senso, la punta del microscopio raccoglie con molta facilità le proteine e ogni genere di molecole organiche non adsorbite bene sulla superficie, producendo così immagini artefatte e rendendo necessaria la sostituzione della stessa.

Dopo l'acquisizione l'immagine è stata elaborata con software specifici in modo da compensare l'inclinazione relativa tra punta e superficie. Inoltre, ogni riga di scansione è stata processata individualmente con un fitting polinomiale (tipicamente del second'ordine). Per quanto riguarda le morfologie globulari, la distribuzione delle altezze è ottenuta con il software SPIP: si sfrutta un algoritmo in grado di effettuare l'analisi delle altezze di tali strutture rispetto ad un soglia limite pre - impostata. In pratica, una volta scelto tale parametro (si sceglie un'altezza che coincide con il profilo della superficie) il software scarta le strutture con altezze inferiori e evidenzia invece quelle con altezze maggiori. In questo modo la statistica delle altezze viene eseguita trattando i singoli globuli come oggetti geometrici separati.

Deposizione della goccia e asciugatura

Anche dopo la fase di risciacquo, l'asciugatura della goccia determina la formazione di depositi salini che possono presentare due diverse morfologie: depositi lungo la linea di contatto (interfaccia solido - liquido) oppure cristalli salini. L'osservazione di queste strutture permette di ottenere informazioni sulla dinamica di asciugatura e quindi anche di interpretare le immagini relative alla goccia.

Sulla base di osservazioni sperimentali è stato dimostrato che la formazione di depositi all'interfaccia (Fig. 5.13) non può essere attribuito ad effetti diffusivi, a campi elettrostatici o forze legate alla tensione superficiale [133]. Si crede piuttosto che i depositi siano il risultato di un flusso convettivo dall'interno della goccia all'interfaccia, in grado di trasportare anche la totalità di soluto. Infatti, l'evaporazione del solvente (acqua) lungo la linea di contatto è maggiore rispetto a tutti gli altri punti della goccia e di conseguenza questa diminuzione deve essere compensata dalla soluzione.

La formazione di strutture cristalline segue invece un meccanismo diverso. In questo caso l'aggregazione è limitata dalla diffusione: le molecole in soluzione si muovono secondo moti Browniani, vengono a contatto formando cluster e successivamente aggregati. La morfologia di queste strutture è determinata dalle interazioni sale - proteina, sale - substrato e proteina - substrato.

Sono stati discussi brevemente gli aspetti legati all'asciugatura della goccia poichè, come già accennato nel paragrafo precedente, le analisi su grandi scale al microscopio elettronico permettono di distinguere quali zone sono ricche di depositi salini o di aggregati proteici abnormi. In questo modo è possibile esclu-

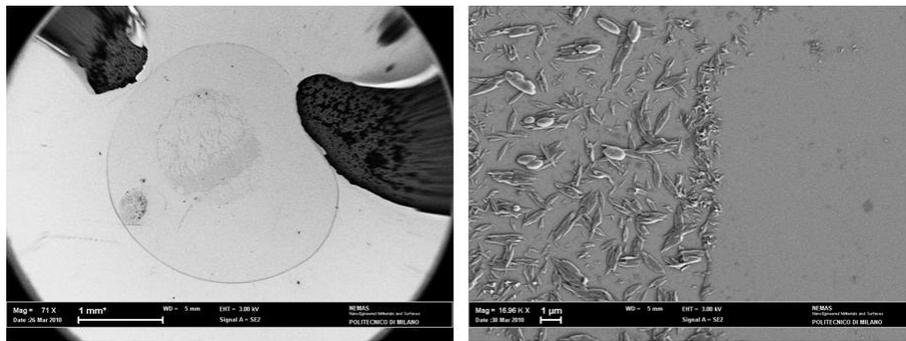


Fig. 5.13: A sinistra: depositi sulla linea di contatto su un substrato in oro. A destra: cristalli di sale su substrato in silicio.

derle nella successiva indagine AFM, così da evitare difficoltà tecniche dovute alla natura del campione. Ad esempio, a causa della rugosità superficiale troppo elevata, risulta praticamente impossibile acquisire buone immagini AFM lungo la linea di contatto (troppo sale) e al centro della goccia (patina di materiale organico), mentre in zone intermedie tra queste due il campione può essere più facilmente analizzato. E' chiaro che la misura SEM è possibile solo sulle superfici di oro e silicio date le loro proprietà conduttive, per quanto riguarda la mica non è stato possibile ottenere questo tipo di informazioni prima dell'analisi AFM.

5.3 Risultati

Le misure AFM permettono di ottenere precise informazioni circa la struttura quaternaria e terziaria della proteina. In particolare, è possibile analizzarne la morfologia con un'alta risoluzione (Capitolo III).

In questa sezione saranno presentati i risultati relativi alla variante AT-3/291; le misure AFM sono state eseguite in aria in modalità a contatto intermittente. I substrati utilizzati sono quelli descritti nel paragrafo 5.1 (mica, silicio, oro, oro funzionalizzato). Nel paragrafo successivo verranno mostrati anche i risultati della variante AT-3/182 (dominio Josephinico) adsorbita sul substrato di oro funzionalizzato, a completamento di quelle ottenute nel lavoro di tesi precedente (Par. 3.3.1), relative all'AT-3/182 depositata su mica, silicio e oro.

5.3.1 Atassina-3/291

I risultati sono stati raggruppati secondo la morfologia delle strutture analizzate. Saranno presentate separatamente immagini di strutture globulari e non globulari. È importante sottolineare che, per la quasi totalità dei campioni è provata la compresenza di entrambe queste morfologie, senza apprezzabili differenze al variare della concentrazione di proteina. È riportato il confronto tra i campioni depositati immediatamente dopo essere stati portati da 25 a 37°C ($t = 0h$) e quelli incubati a 37°C per $t = 48h$.

Strutture globulari

Le immagini delle strutture globulari adsorbite sulle quattro diverse superfici sono di seguito riportate in funzione del substrato usato per la deposizione. Sono riportati analisi dei profili di linea e istogrammi rappresentativi della distribuzione statistica delle altezze.

Da una prima osservazione si può notare che i globuli sono in genere molto più dispersi sulla mica rispetto agli altri substrati (Fig. 5.14 - Fig. 4.15). Per quanto riguarda le dimensioni, le distribuzioni indicano che le altezze variano poco attorno ai 3.5 nm su mica e ai 4 nm su silicio e oro, il tempo di incubazione sembra non avere influenza sulla morfologia della proteina. In generale, quindi, su mica i globuli hanno dimensioni verticali minori rispetto a quelli su silicio e oro.

È inoltre possibile affermare che, mentre su mica non si osservano strutture alte più di 6 nm, su oro e silicio (specialmente per $t = 0h$) è comune la presenza

di grossi globuli caratterizzati da altezze fino ai 12 nm (Fig. 5.15 e 5.16). Questo dato conferma che il modo in cui la proteina si lega al substrato influenza certamente l'aggregazione.

Rispetto alle altezze, le dimensioni laterali dei globuli sono molto più variabili. Effettuando la misura a metà altezza del picco (*Full width at half maximum*, FWHM) si ottengono valori compresi tra 50 e 200 nm, indipendentemente dal substrato e dal tempo di incubazione. Se poi si tiene conto degli effetti di convoluzione tra punta e campione tali valori vanno in prima approssimazione corretti secondo la relazione 4.16: $w_m = w_r - 2\sqrt{2hR}$. Considerando un raggio di curvatura della punta $R = 10nm$ e un'altezza media $h = 3nm$ per i globuli più piccoli (es. mica) e $h = 10nm$ per quelli più grossi (es. silicio e oro) si ottengono così dimensioni laterali che variano tra 34 e 170 nm, quindi inferiori a quelle misurate. E' comunque noto che l'interazione con il substrato può indurre la proteina a disporsi in modo da aumentare le proprie dimensioni laterali [7].

Per quanto riguarda il substrato di oro funzionalizzato con 1-dodecantiolo, dalla fig. 5.17 è chiaro come la proteina si adsorba sulle isole di tioli ma è difficile interpretare i profili di linea e praticamente impossibile ottenere una distribuzione delle altezze significativa. Questo è dovuto al fatto che la rugosità della superficie è di un ordine di grandezza maggiore rispetto alle altre (Par. 5.1.4). Nel caso specifico, $R_q = 2 \div 3nm$ rappresenta un valore comparabile con le dimensioni della proteina. I dati risultano quindi di difficile interpretazione, in quanto per determinare le dimensioni della proteina occorrerebbe quanto meno conoscere esattamente il profilo della superficie prima della funzionalizzazione. In ogni caso, se si considerano i picchi più accentuati nei profili di linea e si esegue una semplice sottrazione rispetto al valore medio dell'altezza delle isole di tiolo, si ottengono dimensioni paragonabili a quelle riportate in precedenza.

In conclusione, se si considera un'altezza media di 3.5 nm e una larghezza di 34 nm si può affermare che la variante AT-3/291 adsorbita su substrati in mica silicio e oro ha dimensioni significativamente maggiori rispetto a quelle del dominio-J ottenute nelle stesse condizioni (Par. 3.3.1 [7]).

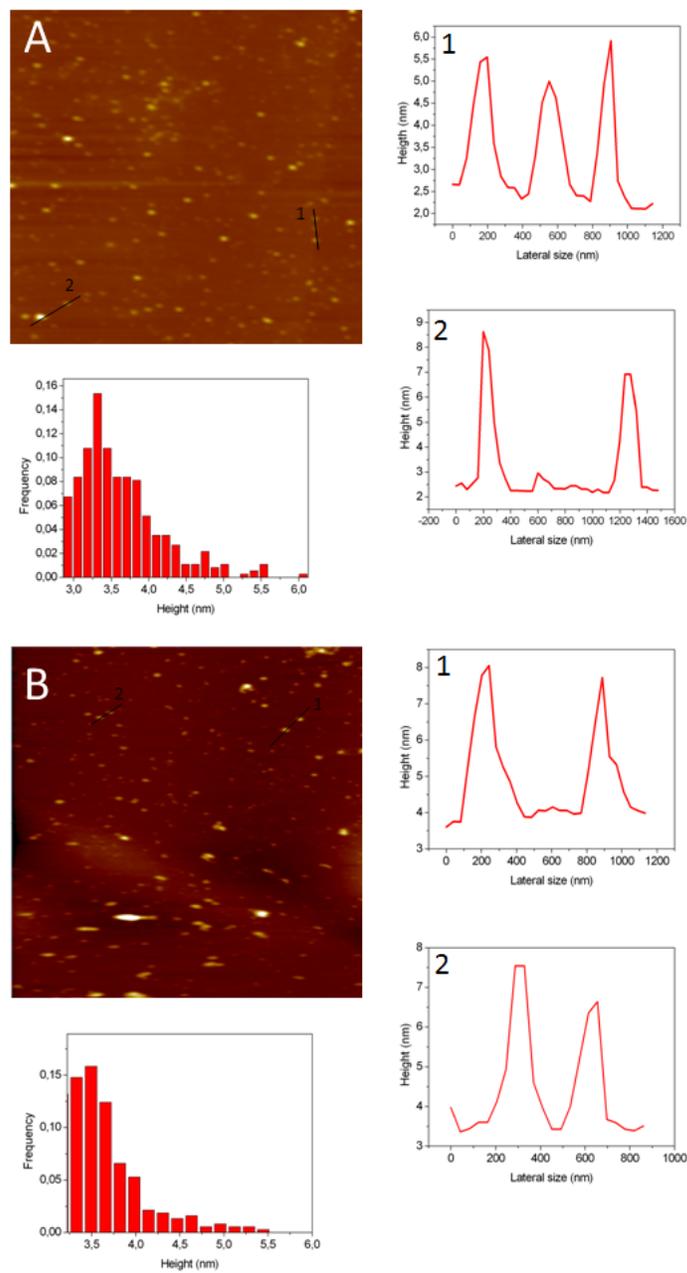


Fig. 5.14: Immagini AFM a contatto intermittente eseguite in aria, profili di linea e distribuzione delle altezze delle strutture globulari formate su mica per $t = 0h$ (A) e $t = 48h$ (B). Aree di scansione: $10\mu m \times 10\mu m$.

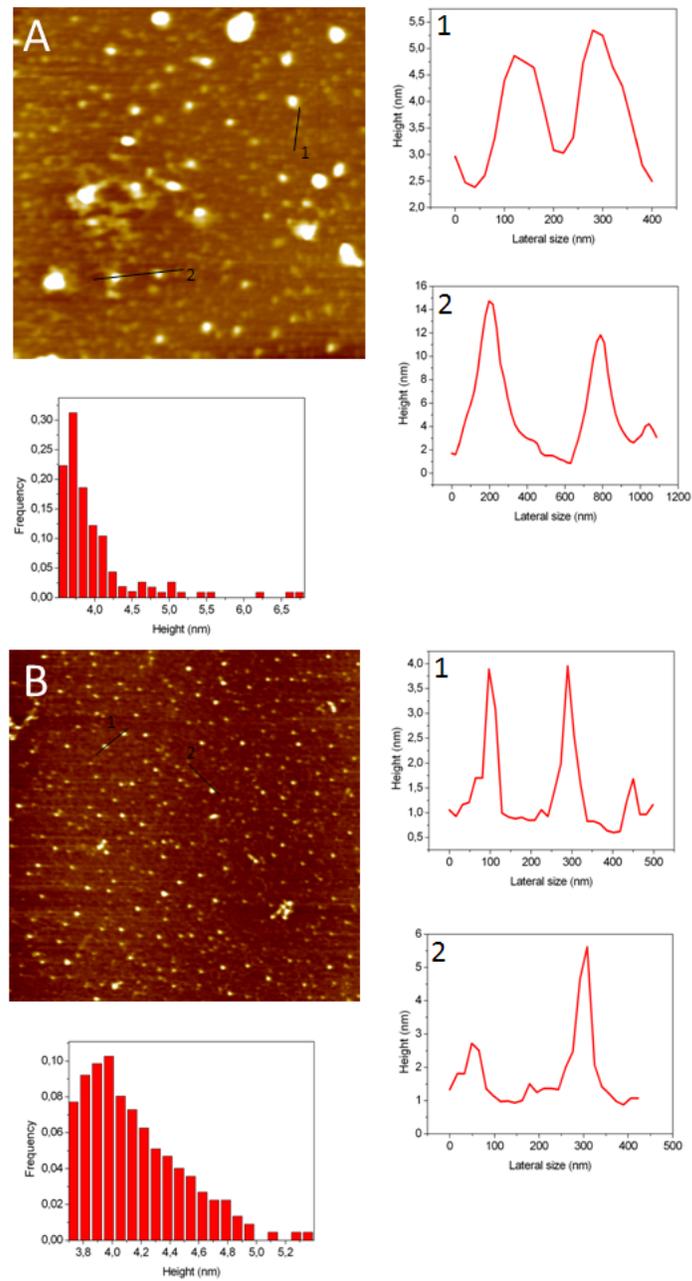


Fig. 5.15: Immagini AFM a contatto intermittente eseguite in aria, profili di linea e distribuzione delle altezze delle strutture globulari formate su silicio per $t = 0h$ (A) e $t = 48h$ (B). Aree di scansione: $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

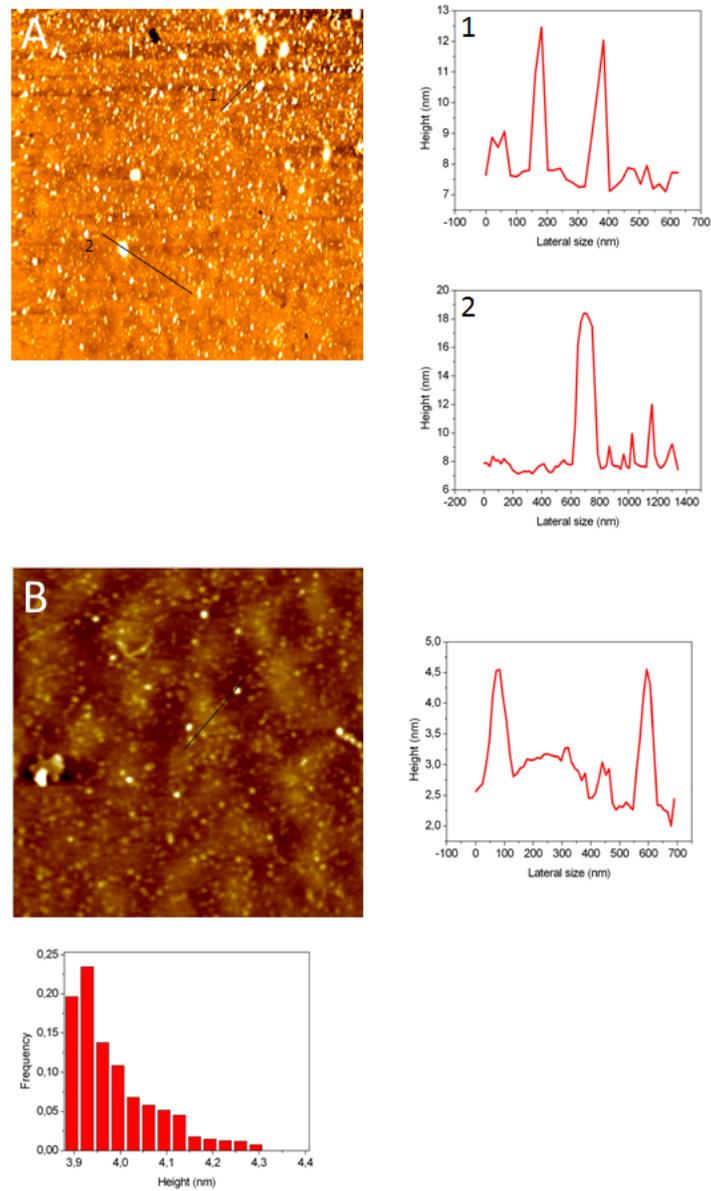


Fig. 5.16: Immagini AFM a contatto intermittente eseguite in aria, profili di linea e distribuzione delle altezze delle strutture globulari formate su oro per $t = 0\text{h}$ (A) e $t = 48\text{h}$ (B). Aree di scansione: $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ (A) e $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ (B).

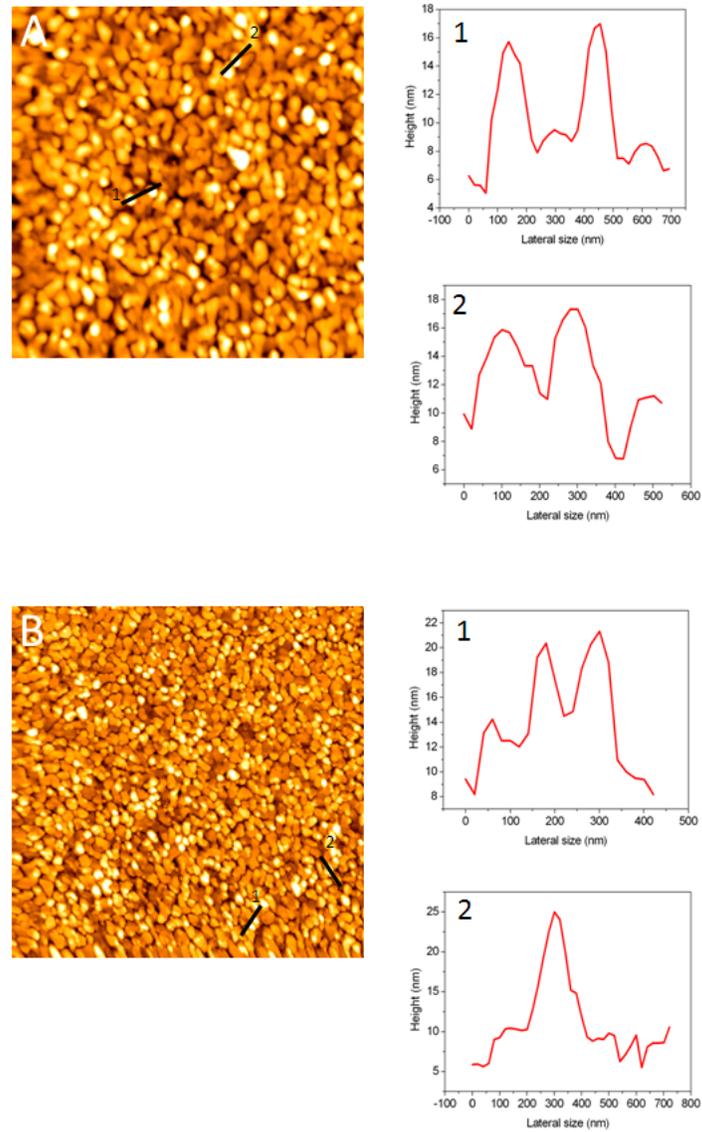


Fig. 5.17: Immagini AFM a contatto intermittente eseguite in aria e profili di linea delle strutture globulari formate su substrato funzionalizzato per $t = 0h$ (A) e $t = 48h$ (B). Aree di scansione: $5\mu m \times 5\mu m$.

Strutture non globulari

Su tutti i substrati sono state osservate strutture associabili a diverse forme di aggregazione della proteina.

Su mica, sono presenti 'catene di perle' per entrambi i tempi di incubazione. La loro morfologia appare però leggermente diversa al variare del tempo di incubazione (Fig. 5.18). A $t = 48h$ le catene sono meno definite, come se fossero 'sfaldate'. Queste strutture sembrano essere costituite da più unità globulari, la cui morfologia è meglio definita ad un ingrandimento maggiore (Fig. 5.19).

Le immagini delle strutture non globulari per i restanti substrati non mostrano più la presenza di morfologie come quelle descritte. Motivo ricorrente per queste superfici è invece la formazione di una struttura amorfa che appare come una sorta di patina, più o meno densa² e ramificata, con spessore di pochi *nm* (Fig. 5.20 e 5.22). Su tale struttura si addensano poi aggregati di forma distorta e non perfettamente globulare. Altre morfologie caratteristiche per i substrati in oro e silicio sono aggregati anulari e amorfi come quelli in fig. 5.21 e 5.22 di dimensioni molto variabili (altezze dai 10 ai 150 nm circa).

Si ritiene importante riportare la formazione di filamenti su oro nonostante sia necessario sottolineare che l'immagine in fig. 5.23 non è affatto rappresentativa della totalità dei campioni analizzati. Poche misure AFM testimoniano, infatti, la formazione di queste strutture. Analisi al microscopio elettronico ne hanno evidenziato la presenza, anche se scarsa, solamente su campioni in oro. La morfologia di queste strutture è comune a quella dei filamenti descritti nel lavoro di tesi precedente per la variante AT-3/182 (Par. 3.3.1), presenti in questo caso sia su oro sia su silicio per $t = 0h$ [7]. Le misure SEM evidenziano, per entrambe le varianti, la formazione di filamenti che possono essere distinti in base al contrasto nelle immagini. Contrasto diverso corrisponde ad una diversa natura delle strutture. I filamenti sembrano originarsi da grossi agglomerati, quelli più scuri appaiono però maggiormente distesi.

Va infine discusso il caso del substrato di oro funzionalizzato. Solo per il tempo di incubazione pari a $48h$ è stata osservata una morfologia di tipo non globulare come quella in fig. 5.24. Si tratta di una struttura simile alla patina descritta in precedenza ma molto più definita, sembra infatti essere costituita da unità globulari aggregate a formare uno strato particolarmente denso di proteine.

² La presenza di tale struttura ha reso critiche le misure su molti campioni. In altre parole risultava particolarmente densa e 'appiccicosa', così da intaccare la punta con materiale organico.

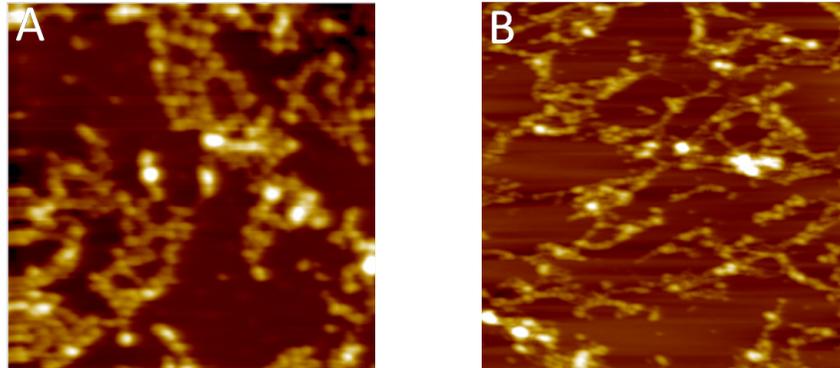


Fig. 5.18: Immagini rappresentative per le strutture a 'catena di perle' su mica, per $t = 0h$ (A) e $t = 48h$ (B). Le scale sono rispettivamente $5\mu m \times 5\mu m$ e $3\mu m \times 3\mu m$.

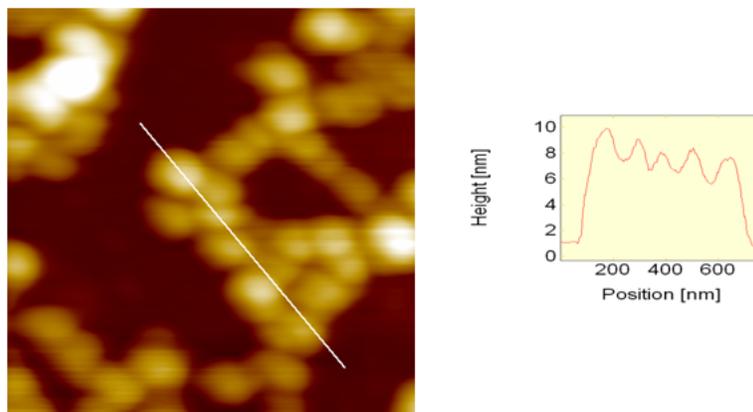


Fig. 5.19: Ingrandimento e dimensioni delle unità globulari che costituiscono le singole catene. Immagine ottenuta su mica per $t = 0h$, l'area di scansione è pari a $1\mu m \times 1\mu m$

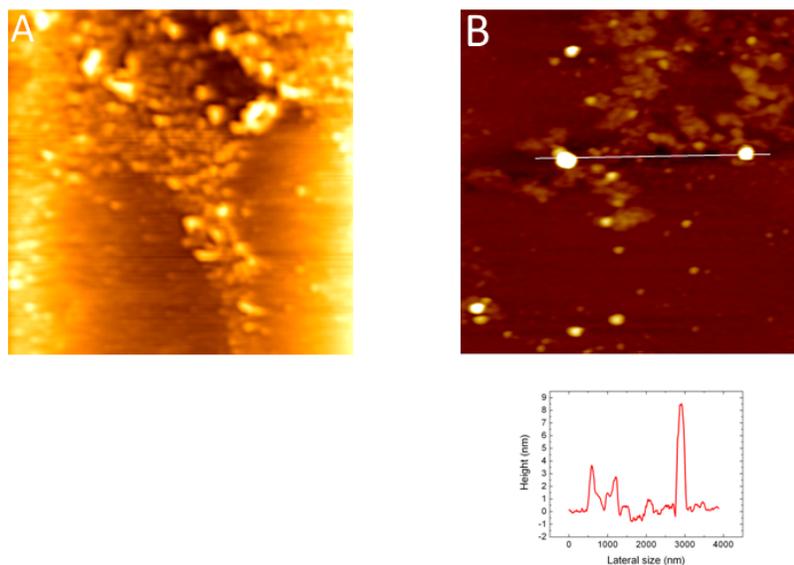


Fig. 5.20: Struttura amorfa e grossi aggregati su silicio per $t = 0h$ (A) e $t = 48h$ (B). Area di scansione: $5\mu m \times 5\mu m$.

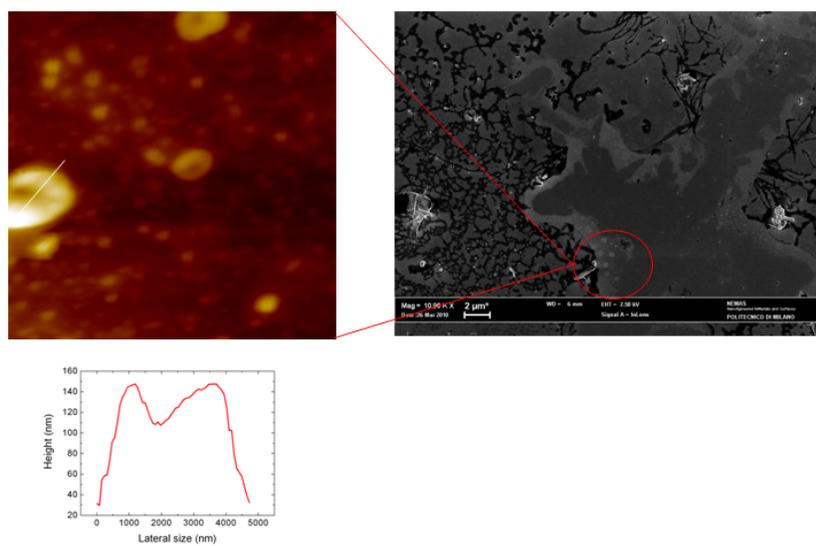


Fig. 5.21: Strutture anulari e grossi aggregati su silicio a $t = 0h$, l'area di scansione è $20\mu m \times 20\mu m$. Anche l'immagine SEM testimonia la presenza di tali strutture. Inoltre è visibile una patina amorfa molto ramificata.

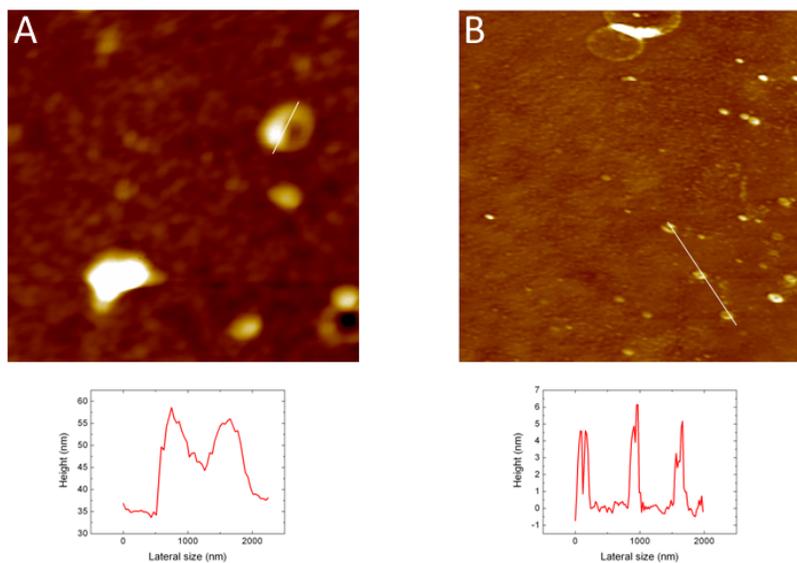


Fig. 5.22: Misure su oro mostrano la presenza di strutture anulari e di altri aggregati per $t = 0h$ (A) e $t = 48h$ (B). Area di scansione: $5\mu m \times 5\mu m$.

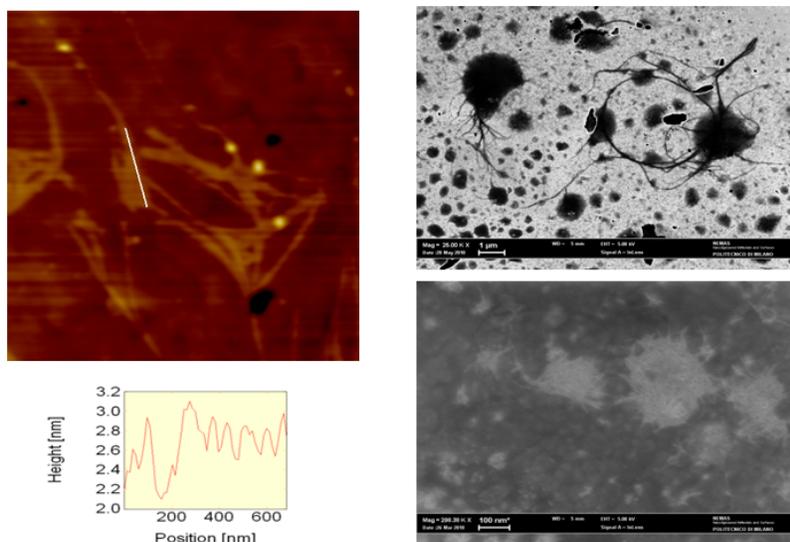


Fig. 5.23: Immagine AFM di filamenti su oro a $t = 0h$, area di scansione $3\mu m \times 3\mu m$. Immagini SEM sullo stesso campione che testimoniano la presenza di filamenti di diversa natura.

In conclusione, l'analisi effettuata necessita di essere integrata con alcune importanti considerazioni:

- il deposito è sempre piuttosto disomogeneo, zone centrali della goccia sono spesso ricche di strutture proteiche amorphe e particolarmente aggregate mentre lungo la linea di contatto si accumulano strutture saline;
- su mica e oro funzionalizzato è osservata una netta prevalenza di strutture globulari isolate, per entrambi i tempi di incubazione;
- su silicio e oro prevalgono invece strutture aggregate, amorphe e anulari, per entrambi i tempi di incubazione.

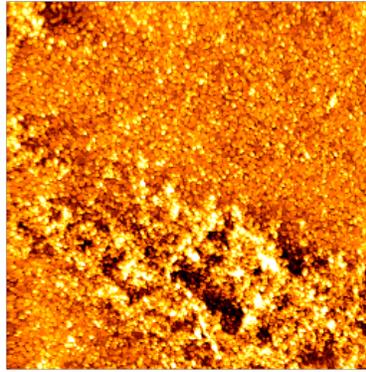


Fig. 5.24: Immagine della particolare struttura formata sul substrato funzionalizzato per $t = 48$. Area di scansione: $10\mu m \times 10\mu m$.

5.3.2 *Atassina-3/182*

A completamento delle misure del lavoro di tesi precedente, effettuate su mica silicio e oro (Par. 3.3.1), sono state raccolte immagini del dominio Josephinico dell'atassina-3 depositato sul substrato di oro funzionalizzato.

Si osservano solamente strutture globulari ma la morfologia appare leggermente diversa da quella della variante AT-3/291 presentate nel paragrafo precedente. La morfologia è infatti meglio definita e la proteina si distingue piuttosto nettamente dalla superficie funzionalizzata. Dall'analisi delle dimensioni laterali è possibile affermare che le unità globulari sono composte da oligomeri. Anche se non sembrano esserci significative differenze tra i tempi 0h e 48h, per $t = 0h$ le unità globulari appaiono maggiormente aggregate e tendono a disporsi più ravvicinate fra loro (Fig. 5.25).

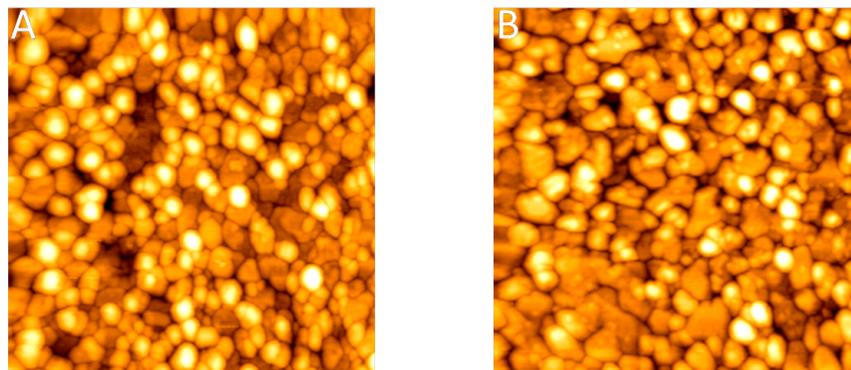


Fig. 5.25: Immagini AFM della variante AT-3/182 su substrato funzionalizzato per $t = 0$ (A) e $t = 48$ (B). Aree di scansione: $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$.

Analisi FT-IR

A conferma dei dati AFM e del modello di aggregazione proposto per il dominio Josephinico nel paragrafo 3.3.1 sono di seguito riportati i risultati della spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR). Le misure sono state effettuate dal gruppo del prof. Tortora (Dip. di Biotecnologie, Università di Milano Bicocca).

Tale analisi è particolarmente utile ed è a supporto di quella AFM. Permette di verificare le variazioni conformazionali che la proteina subisce, valutando l'effetto di qualsiasi trattamento cui essa viene sottoposta in soluzione, così come quelli dovuti all'adsorbimento su un substrato. In altre parole, questa tecnica fornisce importanti informazioni circa la struttura secondaria della proteina ed ai cambiamenti ad essa associati. In fig. 5.26 sono riportati gli spettri raccolti per i due differenti tempi di incubazione, in soluzione e per i substrati di mica, oro e oro funzionalizzato. Le misure sul silicio non vengono riportate in quanto sono risultate particolarmente complesse e imprecise. In fig. 5.26 sono riportate le derivate seconde degli spettri di assorbimento IR così da permettere l'analisi dei singoli picchi³ associati a vibrazioni specifiche. Ogni picco è associato alla presenza di una determinata struttura secondaria. In particolare i picchi attorno a 1660 e 1640 cm^{-1} corrispondono rispettivamente alle strutture α native e β intramolecolari. Quelli a circa 1690 e 1625 cm^{-1} testimoniano la formazione

³ Gli spettri corrispondenti alle derivate seconde vanno letti a partire dal basso. In altre parole un picco intenso corrisponde ad una valle particolarmente accentuata.

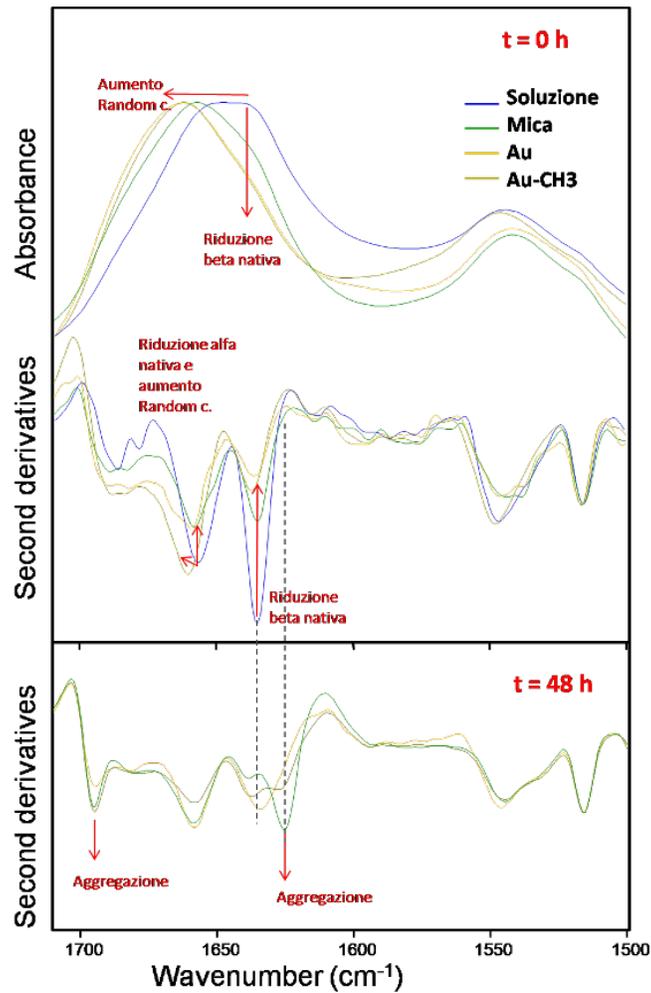


Fig. 5.26: Spettri FT-IR della proteina AT-3/182 in soluzione e adsorbita su mica, oro e oro funzionalizzato per i due tempi di incubazione differenti. Le frecce rosse indicano variazioni dell'intensità o della posizione dei picchi e permettono di focalizzare l'attenzione sulle importanti informazioni ricavabili dall'analisi FT-IR.

di foglietti β intermolecolari e sono quindi una prova dell'aggregazione della proteina.

Le informazioni ricavabili da queste misure sono essenzialmente due:

- a $t = 0h$, l'adsorbimento su tutte le superfici induce una diminuzione delle strutture α e β native (intramolecolari) e un aumento di porzioni di catena destrutturate rispetto alla proteina in soluzione. Questo suggerisce un

riarrangiamento conformazionale a seguito dell'interazione con il substrato (Capitolo II);

- a $t = 48h$, si osserva l'aggregazione su tutti i substrati. La comparsa di picchi a 1690 e 1625 cm^{-1} e la diminuzione dell'intensità di quelli a 1640 e 1660 cm^{-1} testimoniano infatti la formazione di foglietti β intermolecolari a partire dalle strutture α e β native, quindi una denaturazione ormai completa.

I risultati sono in accordo con il modello di aggregazione proposto nel lavoro di tesi precedente per il dominio Josephinico dell'atassina-3 (Par. 3.3.1). Infatti, a $t = 0$ si osserva il riarrangiamento strutturale dovuto all'adsorbimento, passo necessario per la formazione di filamenti su oro e silicio. Inoltre, a $t = 48h$, l'aggregazione a cui va incontro la proteina incubata a 37° in soluzione, determina la presenza di intermedi la cui conformazione è tale da non permettere più la formazione dei filamenti sui relativi substrati.

5.3.3 Grado di adsorbimento

Per verificare il differente grado di adsorbimento al variare della proprietà di idrofobicità di una superficie, è stata effettuata l'analisi AFM della proteina depositata sul substrato di oro evaporato su mica utilizzando una griglia TEM (Par. 5.1.5).

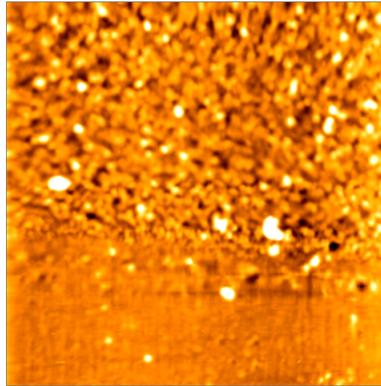


Fig. 5.27: Immagine AFM che mette in evidenza il differente grado di adsorbimento dell'AT-3/291 all'interfaccia tra oro (in alto) e mica (in basso). Area di scansione: $10\mu m \times 10\mu m$. A sinistra un'immagine SEM su grande scala permette di visualizzare il campione: l'oro (zone chiare) è stato evaporato su mica (zone scure) utilizzando come maschera una griglia TEM.

L'immagine AFM è stata eseguita all'interfaccia tra mica e oro e mostra come la proteina AT-3/291, incubata per $t = 0h$, si adsorba preferenzialmente sul metallo. Questo risultato è in accordo con quanto presentato nel terzo capitolo. Il grado di adsorbimento di una proteina è infatti maggiore su superfici idrofobiche (oro) rispetto a quelle idrofiliche (mica).

La morfologia delle strutture analizzate è sempre globulare, sia su oro sia su mica. Per quanto riguarda l'oro, questo risultato è probabilmente determinato dalla topografia della superficie, piuttosto irregolare. Lo spessore evaporato è di soli 25 nm e le isole nucleate non riescono a crescere a sufficienza in modo da coalescere e formare uno strato più compatto.

5.4 *Discussione dei risultati*

In letteratura non esistono studi AFM specifici della variante 291 dell'atassina-3, proteina oggetto di questo lavoro di tesi. Il modello cinetico di aggregazione in soluzione non è conosciuto, così come non è noto il modo in cui l'ambiente circostante possa influenzarne la struttura. La caratterizzazione morfologica al microscopio a forza atomica, l'analisi FT-IR e la conoscenza dello stato dell'arte riguardo al dominio Josephinico (AT-3/182) hanno permesso però di formulare valide ipotesi sul modello di aggregazione della proteina studiata.

In particolare, il confronto con lo studio AFM della variante AT-3/182 (Par. 3.3.1) presentato in questo paragrafo, mette in luce significative differenze riguardo alle dimensioni e alle morfologie analizzate. Questo confronto è necessario per comprendere il ruolo della parte destrutturata (residui 182-291). Verranno di seguito discusse separatamente le morfologie globulari e quelle non globulari.

In principio, occorre fare un'importante precisazione. Il substrato in silicio utilizzato in questo lavoro di tesi ha proprietà superficiali differenti rispetto a quello su cui è stato effettuato lo studio del dominio-J. Il primo è stato infatti sottoposto ad un trattamento di etching in soluzione Piranha per rimuovere lo strato di ossido superficiale ed espone una superficie idrofilica come descritto nel paragrafo 5.1.2. Il secondo, non essendo trattato in tale soluzione, mantiene un maggiore grado di idrofobicità (C.A. $\cong 50^\circ$). Per questo motivo, il confronto tra le morfologie ottenute su silicio non verrà discusso poichè non confrontabile. La proprietà di bagnabilità, ovvero quella che determina maggiormente l'adsorbimento della proteina, varia troppo tra i due substrati e non permette di comparare il comportamento delle due diverse proteine. La scelta di trattare

il silicio prima di depositare la proteina è stata dettata dall'esigenza di rimuovere l'ossido superficiale, così da poter escludere l'influenza di tale strato amorfo sull'aggregazione della proteina, aspetto che non era stato considerato per lo studio del dominio-J.

Va infine sottolineato che, per quanto riguarda la variante oggetto di questo lavoro di tesi, ogni campione è stato analizzato per quattro differenti concentrazioni della soluzione contenente la proteina, come descritto nel paragrafo 5.2. L'analisi dei risultati non ha permesso però di fare alcuna ipotesi circa l'influenza della concentrazione in relazione alle morfologie ottenute. In altre parole, nelle nostre condizioni di lavoro l'aggregazione non è direttamente associabile alle interazioni proteina - proteina, quanto piuttosto alle proprietà chimico - fisiche dei substrati, così come alla cinetica di aggregazione in soluzione della proteina stessa.

Strutture globulari

Dati FT-IR ottenuti da campioni in soluzione non incubati mostrano che la proteina si presenta in forma monomerica per ogni variante, che dal punto di vista morfologico corrisponde ad una struttura globulare. L'analisi morfologica della proteina depositata su una superficie non è in grado di fornire informazioni circa la struttura secondaria e non permette quindi di distinguere se un'unità globulare sia formata da proteine nella loro conformazione nativa piuttosto che da specie intermedie.

Da questo punto di vista, l'analisi FT-IR fornisce importanti informazioni. D'altra parte va sottolineato che abbiamo ad oggi effettuato questa analisi solo per la variante AT-3/182 (dominio Josephinico). Gli spettri FT-IR indicano la formazione di strutture β intermolecolari a $t = 48h$ in soluzione e su tutti i substrati, assenti invece a $t = 0h$. Questo risultato permette di concludere che le strutture globulari osservate tramite AFM su mica a $t = 0h$, rispetto a quelle formate dopo 48 h di incubazione delle proteina, corrispondono a strutture con conformazione differente anche se identiche da un punto di vista morfologico e dimensionale.

Riguardo all'AT-3/291, dall'analisi dimensionale delle strutture globulari osservate con l'AFM su tutti i substrati, è chiaro che le dimensioni verticali sono leggermente maggiori di quelle del dominio-J depositato sulle stesse superfici. Il dominio presenta infatti altezze che variano attorno a 1.8 ± 0.3 nm indipendentemente dal tipo di superficie su cui è depositato e dal tempo di incubazione.

Per la variante 291 si ottengono invece dimensioni verticali medie pari a 3.5 su mica e 4 nm oro. Questo risultato è giustificabile se si pensa al dominio-J come una struttura composta da un nucleo 'rigido', non influenzato dall'adsorbimento. Al contrario, la coda destrutturata dell'AT-3/291 è particolarmente flessibile ed è quindi molto più sensibile al variare del tipo di interazioni con superfici di diversa natura.

Per quanto riguarda le dimensioni laterali, sono significativamente maggiori per l'AT-3/291 rispetto al dominio-J. Si tratta di una differenza di un ordine di grandezza confermata su tutte le superfici. E' quindi lecito supporre che, indipendentemente dal tipo di substrato, la coda destrutturata determini un' 'espansione' della proteina, particolarmente evidente nel piano.

In conclusione, le dimensioni delle strutture globulari della variante 291 sono significativamente maggiori di quelle del dominio-J misurate nelle stesse condizioni. Questo risultato non è probabilmente dovuto unicamente alla presenza del tratto destrutturato (residui 182 - 291) o alla distorsione indotta dal substrato quanto piuttosto alla natura delle strutture globulari. In altre parole, una valida ipotesi suggerisce che tali strutture possano essere costituite da due o più oligomeri, la cui formazione è sicuramente legata alla forte tendenza ad oligomerizzare dell'AT-3/291, già evidente in soluzione [134]. Altezze pari a 3-4 nm, ovvero paragonabili con quelle del dominio della proteina, associate a dimensioni laterali maggiori di 30 nm, indicano che gli oligomeri sono disposti prevalentemente uno a fianco all'altro. Altezze maggiori indicano come più monomeri e oligomeri si dispongano anche uno sopra l'altro.

Merita un'ultima considerazione l'analisi delle strutture osservate su substrato funzionalizzato. Sia il dominio-J sia l'AT-3/291 sono presenti in forma globulare, ciascuna unità è costituita certamente da oligomeri, come chiaro dalle dimensioni calcolate. Ciò che va sottolineato è il ruolo che la rugosità superficiale gioca nei confronti delle morfologie ottenute. In pratica, il valore di rugosità è comparabile con le dimensioni della proteina. L'adsorbimento avviene così preferenzialmente sulle isole di tiolo più accessibili alla soluzione depositata. E' infatti noto, come spiegato nel paragrafo 3.2, che rugosità di questo ordine di grandezza possono influenzare molto la proprietà di bagnabilità. A conferma di queste ipotesi, la proteina non forma strutture diverse da quelle globulari poichè la rugosità non le permette di distendersi su tutta la superficie e quindi di aggregare assumendo altre morfologie diverse per minimizzare l'energia all'interfaccia.

Strutture non globulari

Strutture non globulari possono rappresentare un'evidenza sperimentale del processo di aggregazione della proteina in soluzione oppure indicare il ruolo primario giocato dalle interazioni proteina - superficie.

Per questo tipo di strutture sono state evidenziate importanti differenze morfologiche tra AT-3/291 e dominio-J. Più in dettaglio:

- su mica, per entrambi i tempi di incubazione, il dominio-J è presente solo in strutture globulari. Per l'AT-3/291 sono state invece osservate anche le cosiddette 'catene di perle' (Fig. 5.28);
- su oro, a $t = 0h$ il dominio-J forma strutture globulari e filamenti. Le misure SEM evidenziano la presenza dei filamenti su tutta la superficie dei campioni. Per l'AT-3/291 i filamenti sono stati osservati, sempre a $t = 0h$ (Fig. 5.30), ma non sono statisticamente rappresentativi delle morfologie comunemente rilevate. Le misure SEM confermano questa affermazione. Sempre per l'AT-3/291 su oro, a $t = 0h$ e $t = 48h$, oltre alle strutture globulari è provata la compresenza di strutture anulari e grossi aggregati amorfi, oltre che la formazione di una patina densa e ramificata.

Le strutture a 'catena di perle' sono formate da più unità globulari. Le dimensioni calcolate lungo il profilo della singola catena suggeriscono inoltre che ogni unità è composta a sua volta da oligomeri. Infatti, come evidente dall'analisi del profilo lungo una singola catena, le altezze dei globuli non sono regolari e sono decisamente superiori a quelle delle strutture globulari isolate (Fig. 5.14). Si tratta di strutture caratterizzate da dimensioni verticali nell'ordine dei $6 \div 8nm$ che sono quindi il risultato dell'aggregazione di più monomeri (Fig. 5.19). Inoltre, come più chiaro in fig. 5.29, data la flessibilità della catena, è molto probabile che la struttura tenda a distorcersi e a non estendersi completamente sul piano. Si vengono così a creare zone con altezze maggiori rispetto alle dimensioni verticali medie della catena.

Riassumendo, si può affermare che l'irregolarità delle strutture a 'catena di perle' è dovuta sia dalla differente natura di ciascuna unità globulare, sia dalla distorsione indotta dall'interazione con il substrato.

Particolare attenzione merita appunto il confronto con il dominio-J. Su mica, questa variante si presenta infatti sempre in forma globulare ($t = 0h$ e $t = 48h$) e dispersa in maniera più o meno omogenea sull'intera superficie. Non forma mai altre strutture, a differenza della variante 291.

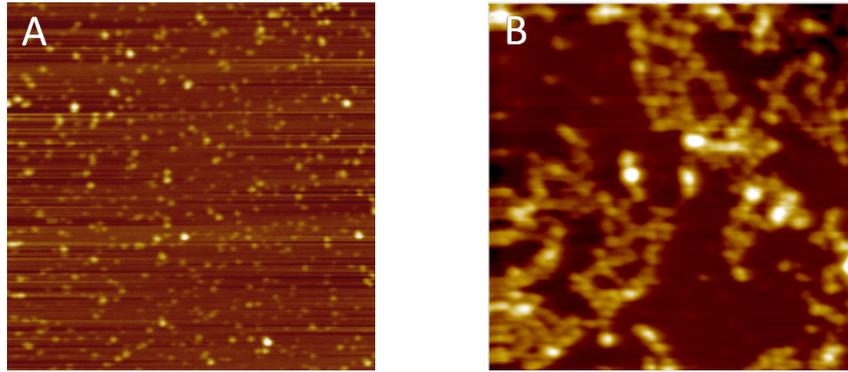


Fig. 5.28: Strutture globulari del dominio-J su mica a $t = 0h$ (A) e catene di perle formate dall'AT-3/291 sempre su mica a $t = 0h$ (B). Scale di scansione: $10\mu m \times 10\mu m$ (A) e $3\mu m \times 3\mu m$ (B).

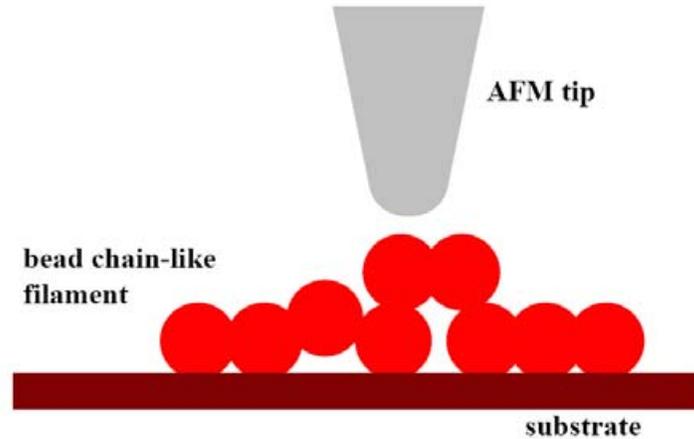


Fig. 5.29: Schematica rappresentazione di una struttura a 'catena di perle' formata da più unità globulari. Ciascun globulo è qui assunto identico agli altri, così da mettere in evidenza la distorsione subita dalla catena. Data la particolare flessibilità di tale struttura, l'interazione con il substrato può indurre la catena a non estendersi completamente sulla superficie fino a formare zone caratterizzate da altezze maggiori rispetto a quella 'media' delle singole unità.

Una giustificazione può essere data se si considera la differente natura delle due proteine in termini di cinetica di aggregazione in soluzione. In pratica, si pensa che la variante 291 tenda ad oligomerizzare molto più rapidamente rispetto al dominio-J. Questa affermazione è basata su osservazioni spettroscopiche

in soluzione e su altre considerazioni da parte dei biologi [134]. Il ruolo della coda, in soluzione a 37°C , è appunto quello di accelerare il processo di aggregazione. In altre parole, l'AT-3/291 depositata a $t = 0h$ è in gran parte già in forma oligomerica. Al contrario il dominio-J è ancora prevalentemente in forma monomerica globulare.

Il substrato in mica, inerte nei confronti della proteina, non mostra un'interazione tale da alterare le strutture presenti in soluzione e l'indagine AFM dell'AT-3/291 dimostra così la formazione di catene di perle.

A $t = 48h$ le catene sono sempre presenti ma la loro morfologia appare leggermente diversa, poichè la proteina incubata in soluzione ha evidentemente subito variazioni conformazionali che ne influenzano l'aggregazione e, di conseguenza, la morfologia.

Come si è detto, il dominio-J possiede una cinetica di oligomerizzazione in soluzione molto più lenta. Inoltre, col procedere del tempo di incubazione, tende molto più facilmente ad aggregare in strutture amorfe [54]. Proprio per questo, $t = 48h$ a $T=37^{\circ}\text{C}$ non rappresentano condizioni tali da permettere al dominio-J di oligomerizzare in soluzione. Come provato dall'analisi FT-IR, a $t = 48h$ in soluzione e adsorbita sui substrati, questa proteina subisce variazioni conformazionali in grado di generare stadi intermedi di aggregazione (incremento strutture β intermolecolari) più stabili nei confronti delle interazioni con le superfici.

Il risultato conferma il modello di aggregazione proposto nel lavoro di tesi precedente per il dominio-J (Par. 3.3.1). A $t = 48h$, l'aggregazione a cui va incontro la proteina incubata a 37° in soluzione, determina la presenza di intermedi la cui conformazione è tale da non permettere più la formazione di filamenti.

In particolare, filamenti come quelli formati dall'AT-3/182 su oro a $t = 0h$ non sono presenti per la variante 291 (Fig. 5.30). Nel paragrafo precedente è stata per completezza riportata un'immagine di tali morfologie per l'AT-3/291 a $t = 0h$ ma si è anche sottolineato come tale misura non fosse affatto significativa della totalità dei risultati.

Una spiegazione dell'assenza di filamenti può essere legata direttamente alla natura delle specie presenti in soluzione a $t = 0h$. Come detto si presuppone che la variante 291, a differenza del dominio-J, subisca oligomerizzazione durante il passaggio dalla temperatura ambiente a 37°C ($t = 0h$). Ciò significa che, avvenuta la deposizione, la superficie di oro interagisce con strutture in generale differenti da quelle globulari formate dall'AT-3/182 in soluzione a $t = 0h$. In

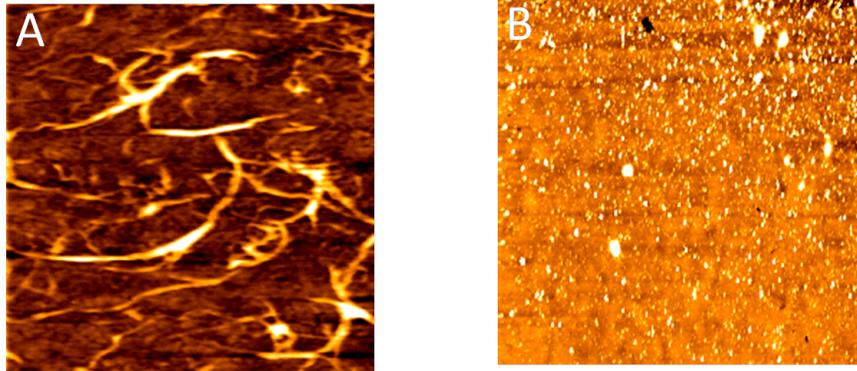


Fig. 5.30: Filamenti formati dal dominio-J su oro, a $t = 0h$ (A), assenza di filamenti per la variante AT-3/291 sempre su oro a $t = 0h$ (B). Le aree di scansione corrispondono a $5\mu m \times 5\mu m$.

altre parole si suppone che l'adsorbimento di oligomeri della variante dotata di coda destrutturata sia accompagnato da variazioni conformazionali molto differenti da quelle a cui va incontro il dominio-J quando adsorbito su substrati idrofobici.

Per l'AT-3/182, simulazioni di dinamica molecolare hanno permesso di chiarire il ruolo delle interazioni idrofobiche [7]. E' stato infatti dimostrato che la proteina adsorbita su oro a $t = 0h$ va incontro ad un riarrangiamento strutturale accompagnato da una lenta transizione da strutture α native a foglietti β intramolecolari. Questa transizione indica un riarrangiamento tipico per le proteine adsorbite su superfici idrofobiche e ampiamente documentato in letteratura [135] [136].

Sethuraman et al. hanno proposto un meccanismo che descrive il passaggio $\alpha - \beta$ per il lisozima: l'interazione con un substrato idrofobico può portare in generale alla formazione di foglietti β intramolecolari e intermolecolari [77]. Questi ultimi sono considerati precursori dell'aggregazione.

Nell'analisi FT-IR effettuata per il dominio-J depositato a $t = 0h$ non compaiono però i picchi relativi alle strutture β intermolecolari ma solo quello corrispondente alle strutture β intramolecolari. Questo dato è in accordo con le simulazioni di dinamica molecolare effettuate sullo stesso sistema. Per la proteina AT-3/182, l'aggregazione in filamenti su oro non è quindi preceduta dalla formazione di foglietti β intermolecolari quanto piuttosto dal riarrangiamento strutturale indotto dall'idrofobicità del substrato. In altre parole, le strutture

globulari presenti in soluzione nella conformazione nativa si adsorbono esponendo alla superficie il nucleo idrofobico e tale variazione conformazionale induce la successiva aggregazione.

Considerando i risultati AFM per la variante 291, è chiaro che l'assenza dei filamenti indica che le interazioni idrofobiche non sono in grado di indurre la formazione di queste particolari strutture. Come già accennato, il riarrangiamento strutturale cui va incontro l'AT-3/291 quando adsorbita su oro è differente da quello subito dal dominio-J. Questo diverso comportamento non può essere supportato da simulazioni di dinamica molecolare perchè non è possibile costruire un modello della coda (residui 182-291) poichè destrutturato, ma è giustificabile. La natura delle due proteine è infatti molto diversa, la coda destrutturata accelera il meccanismo di oligomerizzazione in soluzione a $37^{\circ}C$. Le specie oligomeriche formate interagiscono così con il substrato in oro senza subire riarrangiamenti tali da indurre la formazione di filamenti. In altre parole, la motivazione può essere direttamente correlata alla natura di queste strutture, differente da quella delle strutture globulari del dominio-J, presenti in soluzione a $37^{\circ}C$ e $t = 0h$.

Ciò che si osserva per la variante 291 adsorbita su oro è la compresenza di una patina amorfa, aggregati amorfi e anulari. La formazione di specie anulari è nota in letteratura per quanto riguarda le proteine amiloidi, in particolare per l' α -sinucleina, proteina coinvolta nella patogenesi legata al morbo di Parkinson [64]. Si pensa che tali strutture, la cui tossicità è stata provata, corrispondano a stadi intermedi nel processo di aggregazione.

Va ricordato poi che anche il dominio-J aggrega su oro in forma amorfa e anulare, è però da sottolineare che queste morfologie sono molto più rappresentative per l'AT-3/291. Non è inoltre stata osservata una significativa differenza al variare del tempo di incubazione, ad indicare che la conformazione assunta dall'AT-3/291 in soluzione a $37^{\circ}C$ per $t = 0h$ e $t = 48h$ è molto simile e determina lo stesso tipo di morfologie.

Rispetto agli aggregati amorfi e anulari formati dal dominio-J, quelli relativi alla variante 291 hanno dimensioni generalmente molto maggiori e la morfologia appare anche meno definita. In particolare, le strutture ad anello sono considerate come una particolare forma di aggregazione tra specie oligomeriche. Se si considera la maggiore tendenza ad oligomerizzare in soluzione dell'AT-3/291 è chiaro che la grande concentrazione di oligomeri, presente già a $t = 0h$, porti all'adsorbimento e all'aggregazione strutture di dimensioni molto maggiori rispetto a quelle formate dal dominio-J.

E' molto complicato discutere la presenza della patina amorfa, anche per-

chè non si hanno a disposizione dati confrontabili con altre varianti della stessa proteina. Data l'impossibilità di spiegare la formazione di questa patina, attribuendone l'origine ad un'interazione specifica, è lecito supporre che la natura della proteina, le interazioni con il substrato idrofobico e il processo di asciugatura sono tutti fattori che possono in qualche modo indurre la formazione di tale struttura.

Modello di aggregazione

Il modello di aggregazione proposto si basa sui risultati presentati. Per chiarire ancora meglio l'importanza della cinetica di aggregazione in soluzione dell'atassina-3/291 verrà di seguito riportato il risultato dello studio AFM di un altro lavoro di tesi [63], effettuato sulla stessa proteina depositata su mica prima (T ambiente) e dopo un trattamento termico (da 25°C a 90°C con velocità di riscaldamento di $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, in soluzione). La natura della mica, praticamente inerte nei confronti delle interazioni chimiche con la proteina, permette di confrontare la cinetica di aggregazione considerando trascurabile l'influenza delle interazioni con il substrato rispetto alle morfologie ottenute.

La proteina depositata senza essere stata incubata (T= 25°C) forma solamente strutture globulari ben disperse su tutta la superficie (Fig. 5.31 (A)). Dopo il trattamento termico sono presenti morfologie a 'catene di perle' (Fig. 5.31 (B)), come risultato dell'aggregazione indotta dalla variazione di temperatura. In pratica, la proteina è andata incontro ad unfolding (denaturazione) e le variazioni conformazionali sono tali da permettere l'aggregazione.

Questo lavoro di tesi ha dimostrato che, la stessa proteina, incubata a 37°C per $t = 0\text{h}$ o $t = 48\text{h}$ e poi depositata su mica, forma 'catene di perle'. La morfologia (Fig. 5.31 (C)) è molto simile a quella osservata dopo trattamento termico anche se le dimensioni sono significativamente diverse. Sembra infatti che dopo il trattamento termico le singole unità delle catene siano significativamente più piccole rispetto a quelle delle catene ottenute a $t = 0\text{h}$ e 37°C . In ogni caso l'aggregazione origina morfologie simili e quindi confrontabili.

Il fatto che la proteina, non incubata e depositata a 25°C non sia presente in forme aggregate su mica, come invece accade dopo averla incubata a 37°C indica che anche un modesto innalzamento di temperatura causa significative variazioni conformazionali della proteina in soluzione. Queste osservazioni confermano l'ipotesi che la variante 291 sia caratterizzata da una cinetica di aggregazione (oligomerizzazione) in soluzione a 37°C molto rapida, molto più

di quella del dominio-J. Tale considerazione è unicamente attribuibile al tratto destrutturato, flessibile e attivo nei confronti dell'interazione con altre molecole. L'AT-3/291 è quindi molto sensibile all'innalzamento di temperatura. Se si considera la barriera energetica per l'aggregazione in soluzione a 25°C questa sarà significativamente maggiore rispetto a quella a 37°C (Fig. 5.32).

L'influenza delle proprietà di una superficie solida nei confronti degli aggregati oligomerici può determinare la formazione di altre morfologie rispetto alle sole strutture globulari e alle catene di perle. E' il caso dei substrati in oro e silicio: l'interazione è tale da causare un ulteriore riarrangiamento conformazionale delle specie in soluzione che si adsorbono sulla superficie. La proteina è così presente sotto forma di grossi aggregati amorfi oppure strutturati, come nel caso delle strutture anulari, specie costituite da catene oligomeriche aggregate fra loro. In altre parole, un substrato inerte come la mica esercita un'influenza molto differente rispetto all'oro e al silicio. Le proprietà di idrofilità - idrofobicità non sembrano giocare un ruolo primario come invece accade per il processo di aggregazione del dominio-J. Infatti, le stesse morfologie, con dimensioni con-

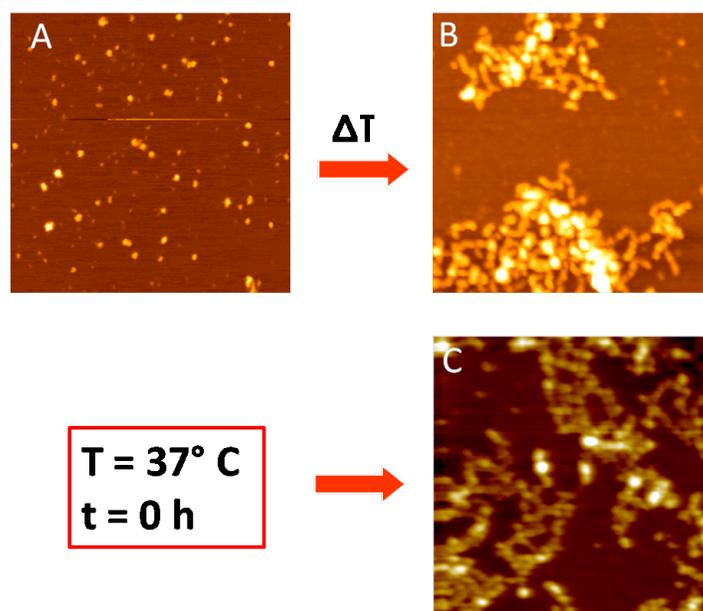


Fig. 5.31: Variante AT-3/291 depositata su mica: senza essere incubata (A), incubata a 37°C per $t = 0\text{h}$ (C) e dopo trattamento termico in soluzione da 25°C a 80°C (B). Scale di scansione: $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ per (A) e (B), $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ per (C).

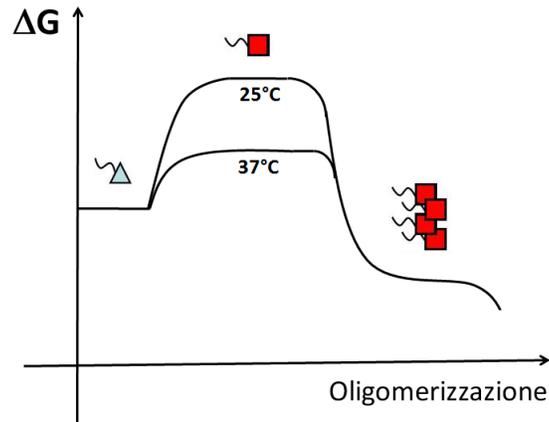


Fig. 5.32: Rappresentazione schematica della cinetica di aggregazione in soluzione della proteina AT-3/291 dedotta dai risultati ottenuti, confrontati con quelli ottenuti da recenti studi AFM [63] [7] per la stessa variante e per il dominio-J. La barriera energetica da superare per la formazione di specie oligomeriche è significativamente più alta per la proteina mantenuta e depositata a 25°C senza essere incubata. A 37°C la barriera può essere superata più facilmente così da permettere l'aggregazione della proteina a formare strutture oligomeriche.

frontabili, sono osservate su oro (idrofobico) e silicio (idrofilico, poichè trattato con soluzione Piranha).

Le differenze relative alle morfologie osservate su mica rispetto a quelle ottenute su oro e silicio sono quindi da ricondurre ad altre proprietà di superficie, come ad esempio quelle elettroniche, chimiche e morfologiche.

6. CONCLUSIONI

Lo studio morfologico della variante AT-3/291, costituita dal dominio Josephinico della proteina atassina-3 (AT-3/182) e da un tratto destrutturato (residui 182 - 291), è stato effettuato in aria con il microscopio a forza atomica (AFM). Un primo obiettivo è stato quello di chiarire aspetti legati al meccanismo di aggregazione, attraverso lo studio morfologico e la comprensione del ruolo che interazioni di diversa natura possono avere nei confronti di tale processo. Per indagare l'effetto della cinetica di aggregazione in soluzione, sono stati scelti differenti tempi di incubazione a $37^{\circ}C$ ($t = 0h$ e $t = 48h$). Dopo essere stata incubata, la proteina è stata depositata su diversi substrati: mica, silicio, oro e oro funzionalizzato. I primi due hanno caratteristiche di idrofilicità molto simili, al contrario, le altre due superfici sono molto più idrofobiche. In particolare la mica, ovvero il substrato più usato per studi AFM in campo biologico, è stata scelta come superficie di riferimento, data la sua inerzia nei confronti delle molecole biologiche.

A completamento del lavoro di tesi precedente, effettuato sulla variante AT-3/182 (dominio Josephinico), sono state eseguite anche misure FT-IR del dominio-J in soluzione e depositato sui quattro substrati. Lo studio AFM del dominio-J effettuato in un precedente lavoro, in relazione all'analisi della variante AT-3/291, è stato infatti estremamente utile. Il confronto tra le morfologie osservate ha permesso di comprendere il ruolo del tratto destrutturato, flessibile e attivo nei confronti delle interazioni.

I risultati ottenuti per l'AT-3/291 mostrano evidenti differenze tra le morfologie ottenute su mica rispetto a quelle analizzate su silicio e oro. Strutture oligomeriche aggregate sotto forma di 'catene di perle' sono osservate solo su mica, strutture anulari e amorfe su silicio e oro. La presenza di strutture aggregate su mica è piuttosto sorprendente in quanto si tratta di un substrato chimicamente inerte che non induce significative variazioni conformazionali e morfologiche della proteina adsorbita. In particolare, uno studio AFM della stessa variante mantenuta a $25^{\circ}C$ prima di essere depositata su mica, non indi-

ca la formazione di tale morfologia. Confrontando queste evidenze sperimentali con quelle ottenute da precedenti studi della stessa variante in soluzione a 25 e 37°C [134], si è potuto chiarire il ruolo del tratto destrutturato nei confronti della cinetica di aggregazione in soluzione. In pratica, si pensa che la cinetica di aggregazione della proteina AT-3/291 sia molto più rapida a 37°C (nel passaggio da 25 a 37°C) rispetto quella a 25°C (temperatura ambiente) e conduca alla formazione di specie oligomeriche. Non è quindi l'interazione con la mica a indurre significative variazioni morfologiche poiché le specie osservate sono già presenti in soluzione.

I confronti con lo studio AFM del dominio Josephinico e la relativa analisi FT-IR, hanno anch'essi supportato tale ipotesi in maniera indiretta.

Questo lavoro di tesi ha dimostrato che la variante 291, a differenza del dominio-J, non forma strutture regolari quali filamenti quando adsorbita su substrati idrofobici. Infatti, poiché la cinetica di aggregazione in soluzione è differente e la tendenza ad oligomerizzare è molto maggiore per quanto riguarda l'AT-3/291, le specie con cui vengono ad interagire le superfici dei substrati sono estremamente diverse a seconda della variante di proteina. In pratica, i risultati suggeriscono che l'influenza dell'idrofobicità del substrato, in termini di variazioni conformazionali subite dalla proteina adsorbita, sia molto differente per la variante 291 e non permetta la formazione dei filamenti.

Inoltre, le misure FT-IR hanno confermato il modello di aggregazione proposto per la variante 182 [7]. Gli spettri ottenuti per il dominio-J in soluzione e depositato dopo 0 h di incubazione a 37°C non mettono in luce la formazione di strutture β intermolecolari, quindi non suggeriscono alcuna forma di aggregazione. Questo dato è in accordo con il modello ipotizzato che indica la formazione di strutture quali filamenti come il risultato delle interazioni proteina - proteina, a seguito del riarrangiamento strutturale subito su superfici idrofobiche. Gli spettri dopo 48 h di incubazione giustificano invece l'assenza di tali strutture quando la proteina è depositata su superfici idrofobiche dopo essere stata incubata (37°C) per un tale periodo. In pratica, l'incubazione determina nel tempo la variazione conformazionale e la formazione di strutture β intermolecolari in soluzione. Tali strutture sono così differenti rispetto a quelle presenti in soluzione a $t = 0h$. In particolare, sono più stabili nei confronti dell'interazione con i substrati e per questo non formano più filamenti.

Per quanto riguarda il substrato funzionalizzato, è stato dimostrato come la topografia di una superficie possa determinare le morfologie ottenute. Quando infatti la rugosità diventa comparabile con le dimensioni delle mole-

cole adsorbite, le strutture formate risultano morfologicamente molto simili, indipendentemente dal tipo di proteina.

L'utilizzo di un substrato in parte idrofobico (oro) e in parte idrofilico (mica) ha infine permesso di dimostrare che la proteina studiata si adsorbe preferenzialmente su substrati maggiormente idrofobici piuttosto che su quelli idrofilici, come del resto provato in letteratura per molti altri tipi di proteine.

Sviluppi futuri

Simulazioni di dinamica molecolare volte a chiarire aspetti legati alla struttura secondaria della proteina adsorbita sulle diverse superfici non sono state possibili per la variante 291, a causa della presenza del tratto destrutturato. In questo senso, analisi FT-IR o di dicroismo circolare (CD) per la proteina AT-3/291 potrebbero fornire importanti informazioni a supporto dei risultati ottenuti.

Partendo dal presupposto che anche altre varianti dell'atassina-3, diverse dal dominio-J, possano formare filamenti in determinate condizioni, sarebbe interessante studiare il comportamento morfologico dell'AT-3/291 su substrato idrofobico, senza incubare tale proteina e quindi senza indurne l'aggregazione in soluzione prima di essere depositata.

Allo stesso modo potrebbero essere studiate varianti dotate di tratto poliglutamminico, generalmente favorevoli alla formazione di filamenti, in modo da chiarire meglio il ruolo di tale tratto nei confronti dell'interazione con superfici di diversa natura. Da questo punto di vista, infatti, l'unico studio esistente è stato effettuato su substrato in mica oppure in soluzione [63]. D'altra parte, i risultati di uno studio AFM sempre più completo e dettagliato sarebbero di grande importanza per i biologi, al fine di ottenere una precisa comprensione del meccanismo di aggregazione e quindi anche per lo sviluppo di tecniche diagnostiche e terapeutiche utili alla cura della patologia associata.

Lo sviluppo di altre superfici adatte alla caratterizzazione AFM di proteine, come ad esempio substrati polimerici, potrebbe essere di grande interesse anche nel campo biomedico, ad esempio per studiare il grado di adesione tra le molecole e il substrato stesso. In generale, la realizzazione di campioni in cui sono presenti, in regioni separate, due o più materiali dalle diverse proprietà chimico-fisiche, può rivelarsi molto utile per studiare il meccanismo di aggregazione e le differenti interazioni su un unico substrato, escludendo così l'effetto di alcune variabili sperimentali legate al metodo di preparazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. W. Nelson, Electrophoresis (2009).
- [2] G. Nicastro et al., PNAS **102**, 10493 (2005).
- [3] C. M. Dobson, Nature **426**, 884 (2003).
- [4] C. M. Dobson, Seminars in Cell & Developmental Biology **15**, 3 (2004).
- [5] V. Sharma, V. Kaila, and a. Annala, Physica A: Statistical Mechanics and its Applications **388**, 851 (2009).
- [6] A. Leach, Molecular Modelling: Principles and Applications, 2nd Edition, 2001.
- [7] S. Furlan, Master thesis, Politecnico di Milano (2009).
- [8] H. Roder and W. Colón, Current opinion in structural biology **7**, 15 (1997).
- [9] I. E. Sanchez and T. Kiefhaber, Journal of Molecular Biology **325**, 367 (2003).
- [10] F. Khan, J. I. Chuang, S. Gianni, and A. R. Fersht, Journal of Molecular Biology **333**, 169 (2003).
- [11] U. Shinde and M. Inouye, Seminars in cell & developmental biology **11**, 35 (2000).
- [12] F. Chiti and C. M. Dobson, Annual Review of Biochemistry **75**, 333 (2006).
- [13] M. Fandrich et al., PNAS **100**, 15463 (2003).
- [14] A. Baumketner and J.-E. Shea, Biophysical journal **89**, 1493 (2005).
- [15] G. M. Hirschfield, Seminars in cell & developmental biology **15**, 39 (2004).

-
- [16] T. R. Serio, *Science* **289**, 1317 (2000).
- [17] F. Saudou, S. Finkbeiner, D. Devys, and M. E. Greenberg, *Cell* **95**, 55 (1998).
- [18] R. Kaye et al., *Biochemistry*, 46363 (2004).
- [19] J. Modler, K. Gast, G. Lutsch, and G. Damaschun, *Journal of Molecular Biology* **325**, 135 (2003).
- [20] M. P. Lambert et al., *PNAS* **95**, 6448 (1998).
- [21] K. A. Conway et al., *PNAS* **97**, 571 (2000).
- [22] A. Demuro et al., *The Journal of biological chemistry* **280**, 17294 (2005).
- [23] C. G. Glabe, *Neurobiology of aging* **27**, 570 (2006).
- [24] K. Andersson, A. Olofsson, E. H. Nielsen, S.-E. Svehag, and E. Lundgren, *Biochemical and biophysical research communications* **294**, 309 (2002).
- [25] R. Kaye et al., *Science* **300**, 486 (2003).
- [26] S. Fujiwara, F. Matsumoto, and Y. Yonezawa, *Journal of Molecular Biology* **331**, 21 (2003).
- [27] Y. Yonezawa et al., *Journal of Molecular Biology* **323**, 237 (2002).
- [28] D. a. Kirschner et al., *PNAS* **84**, 6953 (1987).
- [29] D. A and D. J, *Neurobiology* **83**, 503 (1986).
- [30] M. Sunde et al., *Journal of molecular biology* **273**, 729 (1997).
- [31] H. Levine, *Pharmaceutical Research*, 404 (1993).
- [32] O. S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson, and L. C. Serpell, *PNAS* **102**, 315 (2005).
- [33] A. Kajava, J. Squire, and D. Parry, *Adv. protein chem.* **73**, 1 (2006).
- [34] A. T. Petkova et al., *Science* **307**, 262 (2005).
- [35] H. a. Lashuel et al., *Journal of Molecular Biology* **322**, 1089 (2002).
- [36] R. Jansen, W. Dzwolak, and R. Winter, *Biophysical journal* **88**, 1344 (2005).

-
- [37] M. Zhu, S. Han, F. Zhou, S. a. Carter, and A. L. Fink, *The Journal of biological chemistry* **279**, 24452 (2004).
- [38] M. R. H. Krebs et al., *PNAS* **101**, 14420 (2004).
- [39] M. Bucciantini et al., *Nature* **416**, 507 (2002).
- [40] K. Sasahara, H. Naiki, and Y. Goto, *Biochemistry* **45**, 8760 (2006).
- [41] R. Shringarpure, T. Grune, N. Sitte, and K. J. a. Davies*, *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 1802 (2000).
- [42] M. B. Pepys, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **356**, 203 (2001).
- [43] M. B. Pepys et al., *Nature* **417**, 254 (2002).
- [44] H. Zoghbi and H. Orr, *Annual Review of Neuroscience* **23**, 217 (2000).
- [45] S. W. Davies et al., *Cell* **90**, 537 (1997).
- [46] R. R. Kopito, *Cell* **68**, 524 (2000).
- [47] M. F. Perutz, *Brain research bulletin* **50**, 467 (1999).
- [48] S. Chen, V. Berthelie, W. Yang, and R. Wetzel, *Journal of molecular biology* **311**, 173 (2001).
- [49] S. Chen, F. A. Ferrone, and R. Wetzel, *PNAS* **99**, 11884 (2002).
- [50] L. C. Serpell, J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert, and R. A. Crowther, *PNAS* **97**, 4897 (2000).
- [51] J. C. Rochet and P. T. Lansbury, *Current opinion in structural biology* **10**, 60 (2000).
- [52] M. Poirier et al., *Journal of biological Chemistry* **277**, 114 (2002).
- [53] F. a. C. Klein et al., *Journal of molecular biology* **371**, 235 (2007).
- [54] L. Masino et al., *Journal of molecular biology* **344**, 1021 (2004).
- [55] F. Li, T. Macfarlan, R. N. Pittman, and D. Chakravarti, *The Journal of biological chemistry* **277**, 45004 (2002).
- [56] G. Nicastro et al., *Biopolymers* **91**, 1203 (2009).

-
- [57] S. J. S. Berke, Y. Chai, G. L. Marrs, H. Wen, and H. L. Paulson, *The Journal of biological chemistry* **280**, 32026 (2005).
- [58] E. Pirogova, V. Vojisavljevic, I. Cosic, and J. L. Herna, *Medical, & Biological Engineering & Computing*, 303 (2010).
- [59] M. K. M. Chow, A. M. Ellisdon, L. D. Cabrita, and S. P. Bottomley, *The Journal of biological chemistry* **279**, 47643 (2004).
- [60] A. M. Ellisdon, B. Thomas, and S. P. Bottomley, *The Journal of biological chemistry* **281**, 16888 (2006).
- [61] A. M. Ellisdon, M. C. Pearce, and S. P. Bottomley, *Journal of molecular biology* **368**, 595 (2007).
- [62] a. E. Bevivino and P. J. Loll, *PNAS* **98**, 11955 (2001).
- [63] A. Baserga, PhD Thesis, Politecnico di Milano (2008).
- [64] T. T. Ding, S.-J. Lee, J.-C. Rochet, and P. T. Lansbury, *Biochemistry* **41**, 10209 (2002).
- [65] B. C. Czeslik, *Z. Phys. Chem.* **218**, 771 (2004).
- [66] J. G. Fraaije, W. Norde, and J. Lyklema, *Biophysical chemistry* **41**, 263 (1991).
- [67] F. Galisteo and W. Norde, *J. of colloid and interface science*, 1995.
- [68] A. Kondo and H. Fukuda, *Adsorption Journal Of The International Adsorption Society* **41**, 34 (1998).
- [69] W. Norde and J. Favier, *Adsorption Journal Of The International Adsorption Society* **64**, 87 (1992).
- [70] W. Norde, F. Macritchie, G. Nowicka, and J. Lyklema, *Journal of Colloid and Interface Science* **112**, 447 (1986).
- [71] J. L. Brash, *Journal of Colloid and Interface Science* **95**, 2836 (1983).
- [72] V. Ball et al., *PNAS* **91**, 7330 (1994).
- [73] a. Bentaleb, V. Ball, Y. Haïkel, J. C. Voegel, and P. Schaaf, *Langmuir* **13**, 729 (1997).

-
- [74] C. Roth, B. Neal, and a. Lenhoff, *Biophysical Journal* **70**, 977 (1996).
- [75] A. Yekta, J. Duhamel, H. Adiwidjaja, P. Brochard, and M. A. Winnik, *Langmuir* **9**, 881 (1993).
- [76] K. L. Prime and G. M. Whitesides, *Advancement Of Science* **252**, 1164 (2010).
- [77] A. Sethuraman and G. Belfort, *Biophysical journal* **88**, 1322 (2005).
- [78] D. Li and F. Y. H. Lin, *Journal of Colloid and Interface Science* **142**, 224 (1991).
- [79] F. Lin, D. Li, and W. Neumann, *Interface*, 1993.
- [80] W. Norde, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **61**, 1 (2008).
- [81] C. E. Giacomelli and W. Norde, *Biomacromolecules* **4**, 1719 (2003).
- [82] U. Kingdom, *Biophysics* **96**, 3688 (1999).
- [83] C. Schladitz, *Biophysical Journal* **77**, 3305 (1999).
- [84] W. Mueller, C. Kirsch, and G. P. Eckert, *Biochemical Society Transactions* , 617 (2001).
- [85] Y. Porat, S. Kolusheva, R. Jelinek, and E. Gazit, *Biochemistry* **42**, 10971 (2003).
- [86] J. J. Kremer, M. M. Pallitto, D. J. Sklansky, and R. M. Murphy, *Biochemistry* **39**, 10309 (2000).
- [87] B. L. Kagan, Y. Hirakura, R. Azimov, R. Azimova, and M.-c. Lin, *Brain Research* **23**, 1311 (2002).
- [88] V. Castells, S. Yang, and P. Van Tassel, *Physical Review E* **65**, 1 (2002).
- [89] M. F. M. Engel, A. J. W. G. Visser, and C. P. M. van Mierlo, *PNAS* **101**, 11316 (2004).
- [90] J. Buijs et al., *Journal of Colloid and Interface Science* **263**, 441 (2003).
- [91] R. J. Green et al., *Biomaterials* **21**, 1823 (2000).
- [92] F. Xu et al., *Journal of the American Chemical Society* **127**, 13084 (2005).

-
- [93] H. Elwing, *Biomaterials*, 1996.
- [94] R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, and S. K. Satija, *J. Am. Chem. Soc.* **7863**, 9787 (1998).
- [95] R. Bashir, *Advanced drug delivery reviews* **56**, 1565 (2004).
- [96] S. W. Schneider, J. Lärmer, R. M. Henderson, and H. Oberleithner, *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **435**, 362 (1998).
- [97] M. Quinto, A. Ciancio, and P. Zambonin, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1998.
- [98] R. Khurana, *Biophysical Journal* **85**, 1135 (2003).
- [99] A. Parbhu, H. Lin, J. Thimm, and R. Lal, *Peptides* **23**, 1265 (2002).
- [100] W. Kaplan et al., *Protein science* **6**, 399 (1997).
- [101] T. P. Weihs, Z. Nawaz, S. P. Jarvis, and J. B. Pethica, *Applied Physics Letters* **59**, 3536 (1991).
- [102] D. Rugar et al., *Journal of Applied Physics* **68**, 1169 (1990).
- [103] M. Tortorese, R. Barrett, and C. Quate, *Applied Physics Letters* **62**, 834 (1993).
- [104] Y. Gan, *Surface Science Reports* **64**, 99 (2009).
- [105] X.-Y. Jiang et al., *Nanotechnology* **37**, 383 (2010).
- [106] W. Han, S. M. Lindsay, and T. Jing, *Applied Physics Letters* **69**, 4111 (1996).
- [107] D. P. Allison, N. P. Mortensen, C. J. Sullivan, and M. J. Doktycz, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* **2**, 618 (2010).
- [108] R. Garcia, *Surface Science Reports* **47**, 197 (2002).
- [109] H. Holscher, *Applied Surface Science* **140**, 344 (1999).
- [110] J. S. Villarrubia, *Journal Of Research Of The National Institute Of Standards And Technology* **102**, 345 (1997).

-
- [111] C. Odin, J. Aime, Z. Elkaakour, and T. Bouhacina, *Surface Science* **317**, 321 (1994).
- [112] J. Mou, D. M. Czajkowsky, Y. Zhang, and Z. Shao, *Molecular Physiology* **371**, 279 (1995).
- [113] Y. L. Lyubchenko, *Cell Biochemistry and Biophysics* **41**, 75 (2004).
- [114] M. Guthold et al., *Biophysical Journal* **77**, 2284 (1999).
- [115] D. J. Mu, E. Sass, S. A. Mu, G. Bu, and A. Engel, *J. Mol. Biol.* , 1903 (1999).
- [116] Y. G. Kuznetsov, S. Datta, N. H. Kothari, A. Greenwood, and H. Fan, *Biophysical Journal* **83**, 3665 (2002).
- [117] R. Krautbauer, M. Rief, and H. E. Gaub, *Nano Letters* **3**, 493 (2003).
- [118] T. E. Fisher, a. F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, P. E. Marszalek, and J. M. Fernandez, *Trends in biochemical sciences* **24**, 379 (1999).
- [119] B. Cappella and G. Dietler, *Surface Science Reports*, 1999.
- [120] D. Fotiadis et al., *The Journal of biological chemistry* **276**, 1707 (2001).
- [121] M. Osman and U. Suter, *Journal of colloid and interface science* **224**, 112 (2000).
- [122] M. Osman, C. Moor, W. Caseri, and U. Suter, *Journal of colloid and interface science* **209**, 232 (1999).
- [123] D. M. Czajkowsky and Z. Shao, *Journal of microscopy* **211**, 1 (2003).
- [124] E. R. Cruz-Chu, A. Aksimentiev, and K. Schulten, *The journal of physical chemistry. B* **110**, 21497 (2006).
- [125] S. Rozhok et al., *Small* **1**, 445 (2005).
- [126] F. Iori and S. Corni, *Journal of Computational Chemistry* , 16 (2008).
- [127] C. D. Hahn et al., *Bioconjugate chemistry* **18**, 247 (2007).
- [128] L. L. Wood, S.-s. Cheng, P. L. Edmiston, and S. S. Saavedra, *Langmuir* **7863**, 812 (1997).

-
- [129] C. Cotton, A. Glidle, G. Beamson, and J. M. Cooper, *Journal of Colloid and Interface Science* **7463**, 5139 (1998).
- [130] C. Tlili et al., *Materials Science and Engineering: C* **28**, 861 (2008).
- [131] A. Arce, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, A. J. Arvia, and F. Tera, *Electrochimica Acta* **44**, 1053 (1998).
- [132] D. Gonçalves and E. Irene, *Electroanalysis* **15**, 652 (2003).
- [133] M. a. Rotter, S. Kwong, R. W. Briehl, and F. a. Ferrone, *Biophysical journal* **89**, 2677 (2005).
- [134] A. Frana, Master Thesis, Università di Milano Bicocca (2006).
- [135] S. U. Sane, S. M. Cramer, and T. M. Przybycien, *Analytical biochemistry* **269**, 255 (1999).
- [136] R. J. Green, I. Hopkinson, and R. a. L. Jones, *Langmuir* **15**, 5102 (1999).