



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

**Esperimenti di singola molecola con le pinzette ottiche:
studio della risposta elastica della proteina Flavodossina**

Relatore

Prof.ssa Annamaria Zaltron

Laureando

Giorgio Palermo

Anno Accademico 2018/2019

Sommario

L'obiettivo di questo lavoro è la determinazione dei parametri elastici e la stima dei parametri cinetici della proteina Flavodossina mediante l'utilizzo della tecnica sperimentale delle pinzette ottiche. Inizialmente si illustra il principio fisico dell'intrappolamento ottico e se ne descrive l'utilizzo nella tecnica delle pinzette ottiche, successivamente si descrive il sistema biologico oggetto di studio e se ne illustra la rilevanza biofisica, introducendo anche il modello matematico *worm like chain*. Si discutono infine i risultati sperimentali ottenuti per i parametri elastici e cinetici della proteina Flavodossina.

Indice

Introduzione	1
1 Intrappolamento ottico	5
2 Mini pinzette ottiche	9
2.1 Mini pinzette ottiche a Padova	11
2.1.1 Lo strumento	11
2.1.2 Percorso ottico	12
2.1.3 Funzionalizzazione delle biglie	13
2.1.4 Camera microfluidica	15
2.2 Esperimenti di singola molecola	16
3 Sistema Biologico	19
3.1 Processo di apertura e ripiegamento delle proteine	19
3.2 Flavodossina	20
3.3 Modello WLC	22
4 Esperimenti	25
4.1 Esperimenti di pulling	25
4.2 Risultati per unfolding	28
Conclusioni	35
Bibliografia	37

Introduzione

La Biofisica è la branca della Fisica e della Biologia che studia gli organismi viventi, dalla scala molecolare fino agli ecosistemi nel loro complesso, utilizzando tecniche di studio tipiche della Fisica. In particolare, la biofisica molecolare si focalizza sullo studio di biopolimeri che ricoprono un ruolo importante per la vita, come ad esempio gli acidi nucleici e le proteine. Alcune delle questioni indagate da questa disciplina sono la funzione biologica, l'organizzazione strutturale e il comportamento dinamico delle biomolecole.

Esiste una varietà di tecniche per lo studio di sistemi biologici e ognuna di esse ha permesso di avanzare nella conoscenza delle biomolecole e formulare modelli per la previsione del loro comportamento. La maggior parte di queste si basa sullo studio di un numero molto grande di molecole, dell'ordine del numero di Avogadro ($N_a = 6.02 \times 10^{23}$); le misure sperimentali sono il risultato di una media su tutte le molecole e stati di transiente sono molto difficili da osservare, inoltre le fluttuazioni diventano trascurabili nel limite di un numero molto grande di particelle.

Gli sviluppi tecnologici nel campo delle nanotecnologie realizzati negli ultimi vent'anni hanno aperto la porta all'osservazione e alla manipolazione di molecole singole con altissima risoluzione temporale e spaziale; oggi esperimenti di questo tipo sono detti "di molecola singola". Le tecniche più comuni per la manipolazione di biomolecole sono le pinzette ottiche (OT), le pinzette magnetiche (MT) e la microscopia a forza atomica (AFM). Tutti e tre questi metodi sono in grado di esercitare forze dell'ordine dei piconewton e di misurare distanze molecolari con risoluzione nanometrica. Il range di energie esplorate è dell'ordine di $\mathcal{E} = 1 \text{ nm} \times 1 \text{ pN} \simeq k_b T$ a temperatura ambiente (25°C). Pertanto le fluttuazioni termiche, che giocano un ruolo fondamentale nello studio dei sistemi molecolari, trovano risalto nella misura della dinamica delle biomolecole tramite l'utilizzo di tecniche di molecola singola.

Un biopolimero, per poter svolgere la sua funzione biologica, ha bisogno di assumere una specifica conformazione. La comprensione di come una certa catena polimerica si ripiega verso il suo stato nativo è una delle principali questioni in biofisica molecolare. Il problema è particolarmente interessante nel caso delle proteine: nel 1969 Cyrus Levinthal osservò che per una proteina la ricerca casuale della giusta conformazione tra tutti gli stati accessibili, che per una catena peptidica di 150 elementi è dell'ordine di 10^{80} , richiederebbe più tempo dell'età stessa dell'universo [15]. Questo risultato è conosciuto come il paradosso di Levinthal, a cui l'autore propose come soluzione l'esistenza di uno specifico percorso di ripiegamento (*folding pathway*) come soluzione. Alcune decine di anni dopo si formalizzò il concetto di free energy landscape (FEL) nello studio del ripiegamento della proteina; in questo contesto l'esistenza di uno specifico

percorso di ripiegamento non è necessaria per la risoluzione del paradosso di Levinthal. Ad oggi è comunemente accettato il fatto che la ricerca della configurazione molecolare funzionale è influenzata sia da fattori cinetici che da fattori termodinamici. La questione che rimane ancora irrisolta è come determinare il FEL di una biomolecola data la sua sequenza.

Gli esperimenti di singola molecola forniscono una nuova prospettiva per lo studio dei percorsi di apertura e ripiegamento delle biomolecole. Rendono possibile lo studio della stabilità della catena peptidica e della possibilità da parte di questa di accedere allo stato nativo o a stati intermedi o di mal ripiegamento sotto diverse condizioni. A causa della loro bassa complessità strutturale, gli acidi nucleici costituiscono un sistema modello per studiare il FEL molecolare mentre, lo studio delle proteine presenta situazioni più complesse. Nondimeno, la modellizzazione di proteine e acidi nucleici è basata su diversi punti comuni, perciò in generale gli esperimenti di singola molecola costituiscono una importante opportunità per caratterizzare e testare diversi processi in cui sono coinvolti acidi nucleici e proteine.

La Flavodossina, studiata in questo lavoro di tesi, è una piccola proteina mediatrice del trasferimento di elettroni, scoperta negli anni '60 nei Cianobatteri e nei Clostridia dove sostituisce la proteina Ferredossina, che contiene ferro, nella catalizzazione di alcune reazioni di riduzione. Nonostante questo sia il loro ruolo fisiologico più conosciuto, essa ricopre un ruolo importante in una varietà di reazioni ed è una importante proteina costruttiva per alcuni organismi. Alcune Flavodossine hanno trovato una applicazione pratica nella determinazione di carenze di ferro nel fitoplancton e nella costruzione di strutture miste proteina-metallo; per la loro importanza nel ciclo di vita di certi batteri patogeni, alcune Flavodossine sono oggetto di studio come possibile bersaglio di farmaci [22]. In particolare, questo lavoro mira a studiare la risposta elastica della Flavodossina sotto l'azione di forze esterne, per determinarne i principali parametri elastici e cinetici.

La configurazione sperimentale utilizzata prevede il fissaggio della proteina, tramite opportuni legami biochimici, a due biglie micrometriche di polistirene, una delle quali è mantenuta fissa sulla punta di una micropipeta mentre l'altra è intrappolata otticamente. L'esperimento avviene in una camera microfluidica ed è monitorato tramite un opportuno sistema di imaging. Durante gli esperimenti si sono applicate alla molecola delle forze, mediante la movimentazione della trappola ottica, tali da favorire il passaggio della proteina dallo stato nativo chiuso allo stato aperto. Dall'analisi delle curve forza-allungamento ottenute si è ricavato un set di valori che è stato confrontato con il modello *worm like chain* (WLC) ed è stato utilizzato come base per la determinazione dei parametri elastici della proteina. Si è studiata la distribuzione delle forze di rottura della molecola per ricavare la probabilità di sopravvivenza di questa sotto l'applicazione di una forza f e dare una stima della forza di coesistenza f_c . Infine, la costante cinetica è stata ricavata a partire dai dati di probabilità allo scopo di stimare il tempo medio di vita della molecola nello stato nativo in funzione della sollecitazione applicata.

La tesi si articola in quattro capitoli: nel primo capitolo viene descritto il fenomeno dell'intrappolamento ottico su cui si basano i sistemi di pinzette ottiche; nel secondo capitolo è data una descrizione dell'apparato sperimentale utilizzato, con particolare attenzione verso la camera microfluidica e la preparazione del campione biologico; il terzo capitolo descrive il sistema biologico e la sua rilevanza scientifica e sperimentale; sempre nel terzo capitolo è introdotto il modello matematico WLC che descrive la risposta elastica delle catene peptidiche; nel quarto ed ultimo capitolo sono illustrati

i risultati sperimentali di questo lavoro di tesi: si ricavano i parametri elastici che descrivono la molecola nel modello WLC e si esegue una analisi probabilistica delle forze di rottura che porta all'individuazione della costanti cinetiche della proteina.

Capitolo 1

Intrappolamento ottico

La pratica sperimentale dell'intrappolamento ottico vede il suo inizio con la realizzazione di esperimenti di accelerazione di particelle microscopiche mediante l'utilizzo di radiazione elettromagnetica ad opera di Arthur Ashkin nel 1970 [REF].

Un fascio di luce coerente trasporta una quantità di momento pari a

$$\vec{p} = n \frac{h}{\lambda} \vec{k}$$

dove n è il numero di fotoni del fascio, λ è la loro lunghezza d'onda e h è la costante di Planck. Il trasporto di momento da parte di un fascio di fotoni è il fenomeno alla base della pratica dell'intrappolamento ottico. Lo studio dell'interazione tra un fascio di luce ed un oggetto da esso investito e la conservazione del momento complessivo del sistema permettono di individuare le forze che agiscono sul sistema.

Una prima descrizione del fenomeno dell'intrappolamento si può dare mostrando l'interazione di una biglia dielettrica micrometrica di polistirene con un fascio laser (figura 1.1a). Vi sono diversi approcci teorici per lo studio di questo sistema ed essi variano a seconda del rapporto tra la lunghezza d'onda λ della radiazione utilizzata e la dimensione d della biglia. Il caso $d \gg \lambda$ è detto regime di Mie e nello studio del sistema viene utilizzata l'ottica geometrica; il regime $d \ll \lambda$ è detto di Raylight: la biglia può essere considerata un dipolo sferico immerso in un campo elettrico costante, con polarizzabilità che dipende dalla dimensione della biglia. La tipica configurazione sperimentale è quella con $d \sim \lambda$, che rappresenta un regime intermedio tra quelli appena descritti e che si studia con l'ausilio della teoria generalizzata di Lorenz-Mie. L'approccio geometrico dà una descrizione qualitativa degli effetti fisici in gioco nel fenomeno dell'intrappolamento ottico e può essere utilizzato per descrivere l'interazione di una biglia micrometrica con un fascio laser nel vicino infrarosso, come quelli utilizzati per questo lavoro di tesi.

Siano quindi dati una biglia e un fascio laser diretto verso di essa; quando il fascio raggiunge la superficie della biglia parte della radiazione viene riflessa e parte viene rifratta all'interno del materiale; lo stesso accade quando il fascio oltrepassa l'interfaccia di uscita. Il processo di rifrazione varia la direzione del fascio in accordo con la legge di Snell; sussiste dunque una differenza tra momento \vec{p}_i del fascio entrante e \vec{p}_f di quello uscente che è sia di direzione che di modulo. Per assicurare la conservazione del

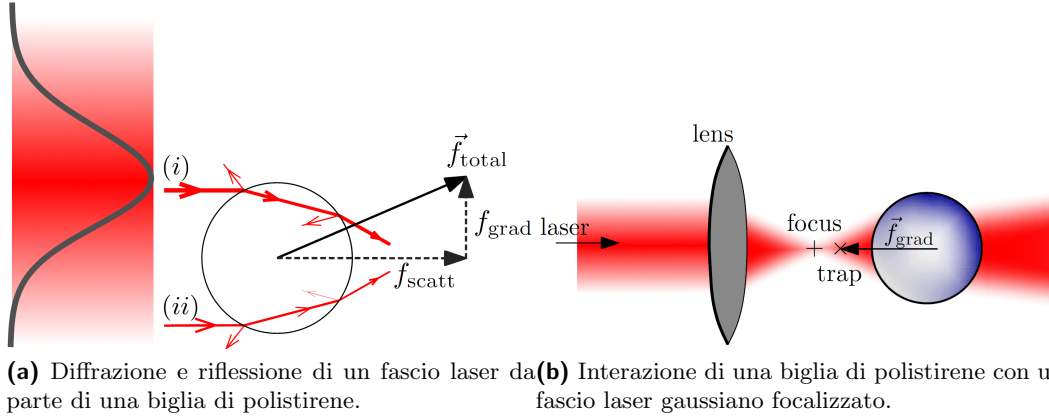


Figura 1.1: Interazione di una biglia di polistirene con un fascio laser a profilo di intensità gaussiano.

momento totale del sistema composto da fascio e biglia, deve valere l'espressione

$$\vec{p}_i = \vec{p}_b + (\vec{p}_r + \vec{p}_f)$$

dove si sono indicati con \vec{p}_b il momento acquisito dalla biglia e con \vec{p}_r il contributo di momento portato dalla componente riflessa del fascio. La biglia subirà dunque una forza nella direzione di \vec{p}_b , che sarà pari alla variazione di questo rispetto al tempo:

$$\vec{f} = \frac{d\vec{p}_b}{dt}.$$

Irradiando la biglia con un fascio di intensità uniforme è facile osservare che, grazie alla simmetria assiale del sistema, le componenti della forza dirette ortogonalmente al fascio incidente si compensano, mentre sussiste il contributo diretto parallelamente a \vec{p}_i . Questo contributo alla forza è detto *forza di scattering*, f_{scatt} , ed è direttamente proporzionale all'intensità del fascio di luce usato.

In un tipico setup sperimentale, la forza di scattering non è però l'unica ad agire sulla biglia: è comune infatti l'utilizzo di laser con profilo di intensità gaussiano, come mostrato in figura 1.1a, in cui i raggi luminosi hanno intensità decrescente all'aumentare della loro distanza dall'asse ottico centrale del fascio laser. Da questo schema si evince che, quando la biglia si sposta dal centro del fascio (detto asse ottico), la differenza di intensità tra i due fasci che illuminano le due metà della biglia risulta in una forza netta che muove la biglia verso la zona con intensità maggiore; questa è detta *forza di gradiente*, dal momento che essa risulta direttamente proporzionale al gradiente dell'intensità luminosa del fascio usato. In particolare, quando l'indice di rifrazione della biglia è maggiore rispetto a quello del fluido in cui è immersa ($n_b > n_f$), la forza di gradiente la attirerà verso le zone del fascio a maggiore intensità; al contrario, se $n_b < n_f$ la biglia risentirà di una forza di gradiente che la spingerà nelle zone del fascio laser meno luminose.

La forza totale esercitata dal fascio sulla biglia sarà data dalla somma del termine di scattering e di gradiente:

$$\vec{f} = \vec{f}_{scatt} + \vec{f}_{grad}.$$

Immergendo la biglia in una regione attraversata da due fasci contropropaganti di uguale intensità i contributi di scattering si compensano a vicenda, così che sull'oggetto intrappolato agisce solamente la forza di gradiente. Questa configurazione è assimilabile alla immersione della biglia in una buca di potenziale centrata nel picco di intensità dei due fasci: in assenza di altre forze la biglia rimane ivi intrappolata.

Nel 1986 un secondo esperimento di Ashkin [4] provò che un fascio laser fortemente focalizzato è in grado di intrappolare piccoli oggetti in una buca di potenziale simile a quella vista sopra. Lo schema in figura 1.1b mostra una biglia prossima al fuoco del fascio e la forza che agisce su di essa. In questa configurazione i raggi convergenti sono deviati dalla biglia in maniera tale che la forza sviluppi contributi positivi o negativi in funzione della posizione del centro della biglia rispetto al fuoco del fascio; più il fascio è focalizzato e più intensa la forza di intrappolamento, dal momento che questa dipende dal gradiente dell'intensità luminosa. In questo modo la forza di gradiente diventa dominante rispetto a quella di scattering, pertanto la biglia viene vincolata. Con l'introduzione della focalizzazione la biglia viene vincolata sia radialmente rispetto alla direzione del fascio che parallelamente ad essa; assume dunque una posizione fissa nello spazio.

L'ordine di grandezza delle forze che biglia e trappola sono in grado di scambiarsi è dei pN; la capacità delle trappole ottiche di esercitare forze di questo ordine di grandezza rende quindi questa tecnica particolarmente adatta allo studio di sistemi biologici. Inoltre, le recenti innovazioni tecnologiche hanno sensibilmente migliorato le prestazioni dei primi strumenti di pinzette ottiche, consentendo di aprire una nuova branca dello studio dei sistemi biomolecolari: gli esperimenti di particella singola.

Capitolo 2

Mini pinzette ottiche

Le pinzette ottiche (optical tweezers) permettono la manipolazione di oggetti di dimensioni nanometriche tramite l'utilizzo dell'intrappolamento ottico. L'introduzione di tali sistemi, capaci di applicare forze dell'ordine dei pN, unita allo sviluppo di rivelatori nanometrici [18, 23, 25] di posizione ha segnato una importante svolta nello studio nelle nanotecnologie e della Biologia molecolare [17], in cui spostamenti e forze sono tipicamente di questi ordini di grandezza.

È pratica comune in Biologia molecolare effettuare studi su un grande numero di particelle (esperimenti di *bulk*) per ricavare informazioni statistiche sul processo in esame; risulta però impossibile con questa tecnica indagare il comportamento di singole molecole, che può avere deviazioni anche significative da quello medio del campione biologico studiato. Per questa ragione si introducono gli esperimenti di molecola singola (SME), che sono in grado di definire la cinetica delle reazioni oggetto di studio e di caratterizzarne le varie configurazioni, fornendo risultati complementari a quelli ottenuti con esperimenti bulk. Le principali tecniche di spettroscopia molecolare che prevedono una misura delle forze di reazione sono la microscopia a forza atomica (Atomic Force Spectroscopy, AFM), le pinzette magnetiche (Magnetic tweezers, MT) e le pinzette ottiche (Optical tweezers, OT) [21, 19].

Nella AFM si rivelano i dettagli della superficie del campione in esame avvicinando ad

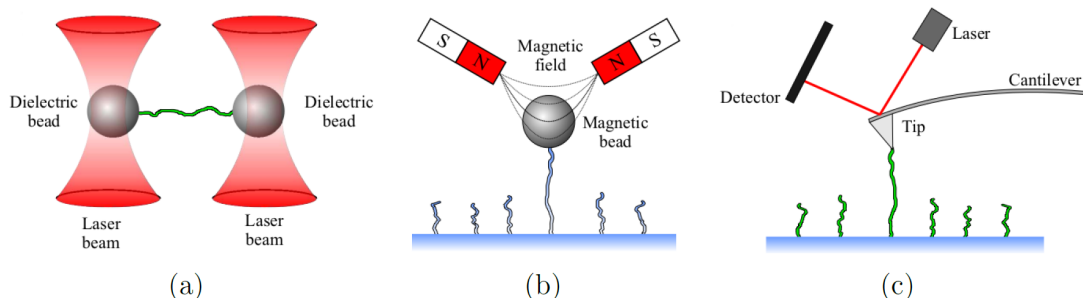


Figura 2.1: SME: Schemi illustrativi dei principali metodi di manipolazione di molecole singole che consentono la misurazione della forza agente sulle molecole. (a) Pinzette ottiche (OT), nella particolare configurazione a doppia trappola; (b) pinzette magnetiche (MT); (c) microscopia a forza atomica (AFM).

esso un'asta molto sottile che si deforma in maniera proporzionale alla distanza tra la punta di questa e la superficie in esame. Uno schema che illustra questo principio è mostrato in figura 2.1c. Questo principio è alla base della topografia superficiale tramite AFM; manipolazioni di singola molecola possono essere invece effettuate depositando alcune molecole sulla superficie e funzionalizzando la punta dell'asta in maniera tale da rendere possibile un legame chimico tra questa e l'estremità della molecola. Conoscendo la rigidità dell'asta e la sua deflessione, è possibile risalire alla forza impressa alla molecola. Le risoluzioni raggiunte a temperatura ambiente con la AFM sono di 2 Å per la posizione e di 20 pN per la forza; un valore tipico per la rigidità dell'asta è di 100 pN/nm. Alcune limitazioni all'utilizzo di questa tecnica insorgono per interazioni indesiderate tra la punta e la superficie del campione.

Le pinzette magnetiche sfruttano il principio per cui una biglia di materiale magnetico risente di una forza pari a $F = -\mu\nabla B$ se immersa in un campo magnetico disomogeneo. Negli esperimenti di singola molecola con le MT (figura 2.1b) una molecola è fissata per una estremità ad un substrato vetroso e per l'altra ad una biglia magnetica; questa viene a sua volta intrappolata nel campo generato da due magneti. La posizione della biglia è controllata movimentando i magneti, i quali possono essere ruotati allo scopo di imprimere una torsione alla molecola. La ridotta rigidità di questo tipo di trappola, pari a circa 10^{-4} pN/nm, determina grandi fluttuazioni nell'estensione della molecola, che sono nell'ordine dei 20 nm.

Le Optical Tweezers (figura 2.1a) occupano una posizione intermedia tra la AFM e le MT, poiché permettono di ottenere una ottima risoluzione nella forza (nell'ordine di 0.1 pN) con una rigidità della trappola di $10^2 - 10^4$ volte minore rispetto alla AFM. In un tipico sistema OT un laser nel vicino infrarosso è focalizzato da un obiettivo per microscopia a grande apertura numerica in modo tale da formare una trappola ottica stabile secondo il principio discusso al paragrafo 1 e allo stesso tempo evitare di alterare la struttura chimica dei campioni da osservare [8]. Vicino al punto focale il potenziale generato dalla trappola ottica è ben approssimato da una funzione armonica: la forza che agisce sulla biglia si può dunque trattare come una forza elastica, linearmente dipendente dallo spostamento della biglia dal centro della trappola.

La manipolazione della molecola avviene solitamente tramite il fissaggio delle estremità molecolari a due superfici funzionalizzate, di cui una fissa e una mobile. La superficie mobile è usualmente costituita da una biglia micrometrica di materiale dielettrico, che viene fissata nel fuoco della trappola ottica. La rimanente superficie può essere una parete della camera microfluidica all'interno della quale avvengono gli esperimenti (figura 2.2a) oppure una seconda biglia, che viene mantenuta in posizione tramite suzione da una micropipetta (figura 2.2b) [9, 7, 3]. Muovendo la superficie mobile e dunque variando la distanza relativa tra le estremità della biglia è possibile esercitare delle forze sulla molecola in esame. Alcuni fenomeni biologici che è possibile studiare con questa tecnica sono ad esempio il movimento di un motore molecolare, l'unzipping del DNA o il ripiegamento proteico. Dall'analisi delle curve di forza estratte dagli esperimenti è possibile determinare alcuni parametri fisici come le costanti cinetiche o i free energy landscapes dei sistemi in esame.

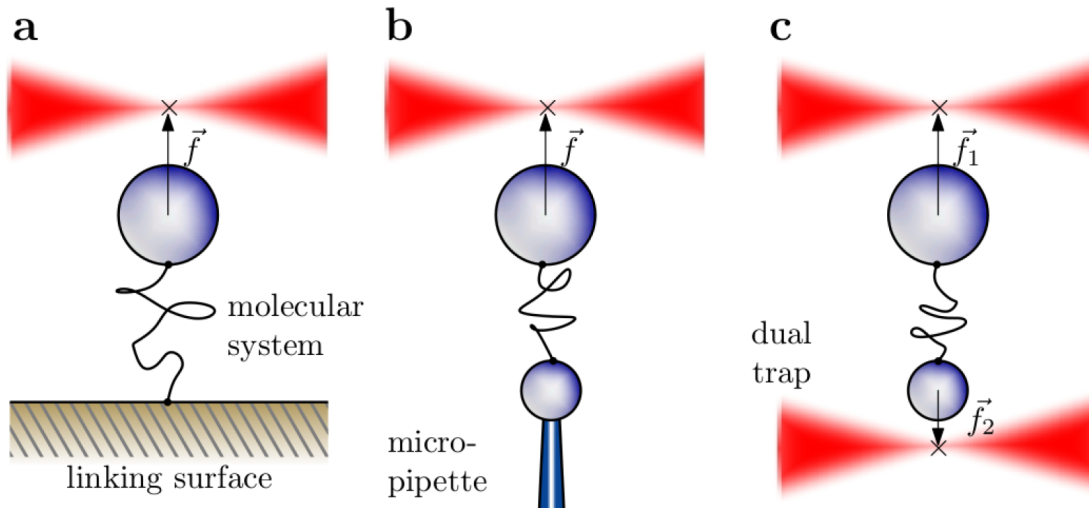


Figura 2.2: Diversi setup per pinzette ottiche [1]. (a) *Trappola singola e superficie di ancoraggio:* La molecola è legata chimicamente per un capo ad una parete della camera microfluidica, mentre per l'altro è fissata ad una biglia che viene catturata e movimentata dalla trappola ottica. Le forze sulla molecola si applicano muovendo la biglia e dunque modificando la distanza tra la trappola ottica e la superficie. (b) *Trappola singola e micropipetta:* Alla molecola sono fissate chimicamente due biglie; una di queste viene mantenuta ferma per suzione da una micropipetta, mentre la seconda viene catturata e movimentata dalla trappola ottica. (c) *Doppia trappola:* alle due estremità della molecola sono fissate altrettante biglie, ognuna delle quali è catturata da una trappola ottica; le forze sulla molecola si applicano modificando la distanza tra le trappole ottiche.

2.1 Mini pinzette ottiche a Padova

Lo strumento utilizzato per questa tesi è denominato "Mini tweezers" ed è basato sul disegno ad opera di S. B. Smith e C. Bustamante [24] in cui si utilizzano due fasci laser contropropaganti focalizzati nello stesso punto per intrappolare una biglia micrometrica di polistirene. Il sistema biologico oggetto di studio viene collegato a due biglie di polistirene opportunamente funzionalizzate; una di queste viene fissata ad una micropipetta tramite suzione, mentre la posizione dell'altra viene controllata per mezzo della trappola ottica, come illustrato in figura 2.2. Nei paragrafi successivi sarà data una descrizione del principio di funzionamento dell'apparato insieme ad un elenco delle principali caratteristiche costruttive.

2.1.1 Lo strumento

La trappola ottica è formata utilizzando due fasci laser identici, contropropaganti, di lunghezza d'onda $\lambda = 805$ nm e di potenza variabile fino a 200 mW focalizzati nello stesso punto. I fasci sono prodotti da due laser a diodo (Lumics SN0834770) e convogliati alla trappola per mezzo di una fibra ottica monomodale; il fascio prodotto ha un profilo gaussiano ed è polarizzato linearmente. L'intensità e la temperatura dei laser sono monitorate da un sistema di controllo computerizzato. Il principale vantaggio dell'utilizzo di questo setup è l'annullamento delle forze di scattering lungo la direzione di propagazione del fascio; in questo modo l'unica forza responsabile dell'intrappolamento della biglia è quella di gradiente. I laser sono focalizzati con degli obiettivi a grande apertura numerica; questo permette la raccolta di gran parte della luce deflessa dalla

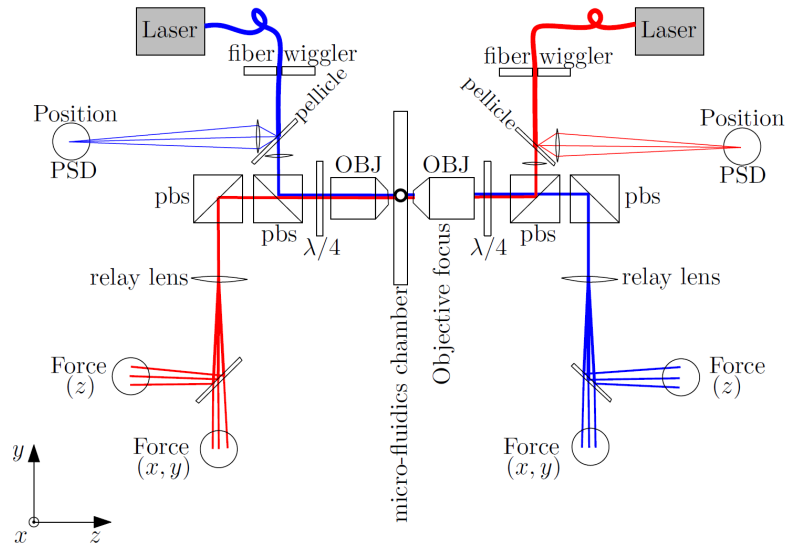


Figura 2.3: Schema e percorso ottico dello strumento utilizzato per le misurazioni.

biglia. Infatti, lo strumento è in grado di raccogliere più del 95% della radiazione che oltrepassa la biglia catturata. È dunque possibile quantificare la forza a cui è soggetta la biglia tramite la misura della differenza tra il momento della luce che incide la biglia e quella che da questa viene deflessa. Il fascio che percorre lo strumento ha un grande diametro; questo permette di aumentare la profondità di fuoco e ridurre gli effetti idrodinamici delle pareti della camera microfluidica sulla biglia fissata nella trappola ottica. Il fatto che in questo setup non si utilizzi una forte focalizzazione del fascio riduce il riscaldamento del buffer, costituito da una soluzione a base acquosa, per assorbimento infrarosso [13].

2.1.2 Percorso ottico

Uno schema dello strumento e del percorso ottico dei laser è riportato in figura 2.3. Di seguito verrà descritto il cammino seguito da uno dei due fasci; il suo omologo che viaggia in direzione opposta seguirà un percorso speculare, con la medesima disposizione di specchi e sensori.

La luce emessa dal diodo laser viene trasmessa tramite un tratto di fibra ottica monomodale. Al termine di questa è posizionato un *wiggler*, dispositivo che controlla l'orientazione del tratto di uscita della fibra ottica per mezzo di due attuatori piezoelettrici. Una volta uscita dalla fibra ottica, la luce incontra uno strato di pellicola; questa riflette una frazione pari al 5% del fascio verso un *position sensitive detector* - *PSD* che fornisce al sistema di controllo informazioni sulla posizione della trappola. La parte rimanente del fascio oltrepassa una lente collimatrice per poi venire riflessa da un beam-splitter polarizzatore (PBS) che ha l'effetto di selezionare la componente del fascio polarizzata linearmente; subito dopo il fascio incontra una lamina di spessore $\lambda/4$ che modifica la polarizzazione da lineare a circolare. La luce viene dunque raccolta da un obiettivo da microscopio, che la focalizza all'interno della camera microfluidica. L'utilizzo di una luce polarizzata circolarmente permette esercitare sulla biglia una forza che non dipende dalla polarizzazione del fascio. La luce uscente dalla camera viene raccolta da un secondo obiettivo e polarizzata linearmente per mezzo di una seconda la-

mina a $\lambda/4$; così polarizzata incontra due PBS: viene trasmessa dal primo e riflessa dal secondo nella direzione dell'ultimo apparato di rilevazione. Una lente di relay permette il trasporto del fascio verso l'ultimo beam splitter, che divide la luce tra due differenti sensori. Di questi, il primo è un PSD che ha il compito di monitorare la deviazione di posizione del fascio dal suo centro, fornendo informazioni sulla forza applicata sul piano focale (x, y) ; il secondo è un fotodiodo abbinato ad un attenuatore variabile circolare (bullseye) che rileva la dimensione trasversale del fascio, misurando una quantità legata alla forza lungo la direzione di propagazione della luce (z) .

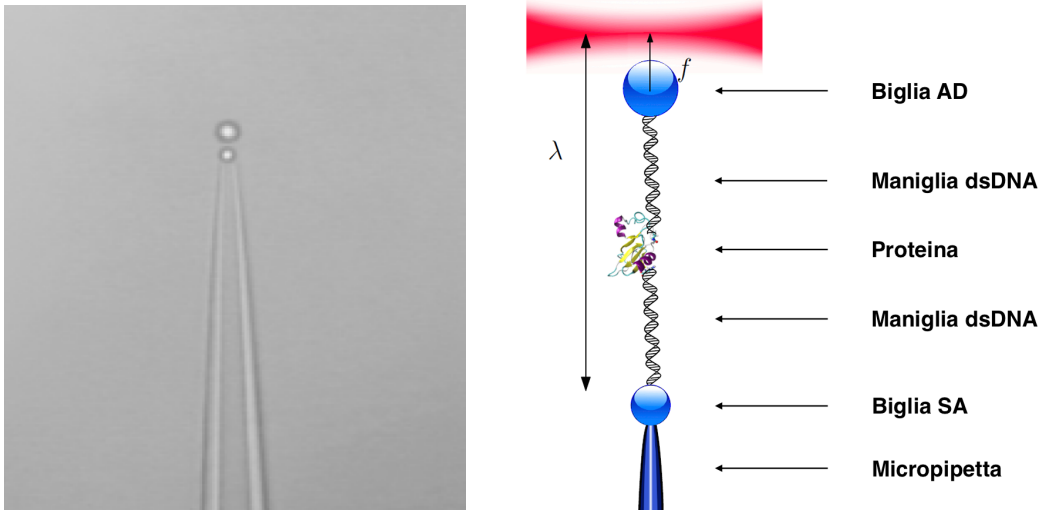
La camera microfluidica e il contenuto vengono illuminati da una luce LED ($\lambda = 470$ nm) che si trasmette all'interno della stessa ottica responsabile della trasmissione dei laser. Questa luce viene trattata in modo da ottenere una illuminazione uniforme il sistema, che è posto sul piano focale dei due obiettivi (condizione di Köhler). La camera per l'acquisizione delle immagini è sensibile a lunghezze d'onda nel visibile e nel vicino infrarosso, permettendo di visualizzare contemporaneamente l'immagine del sistema microfluidico e delle biglie sovrapposta a quella della trappola ottica. La luce laser satura il sensore della camera, pertanto quando nella trappola è presente una biglia, l'immagine di quest'ultima viene oscurata dalla saturazione; prima della camera è posto un filtro infrarosso removibile che permette di escludere la componente di luce laser durante gli esperimenti e di visualizzarla durante le operazioni preparatorie o di manutenzione.

2.1.3 Funzionalizzazione delle biglie

Alle estremità del sistema oggetto di studio, che in questo lavoro di tesi è la proteina Flavodossina, sono ancorate delle catene nucleotidiche di DNA a doppia elica costituite da 29 coppie di nucleotidi e che formano le cosiddette maniglie (*handles*) del sistema. Il sistema si completa aggiungendo le biglie; l'aggregato è tenuto insieme grazie ai legami Digoxigenina-Antidigoxigenina e Streptavidina-Biotina che si formano tra le maniglie e le superfici opportunamente funzionalizzate delle biglie. Una descrizione pittorica del sistema è data in figura 2.4b.

Le biglie utilizzate per l'esperimento sono di polistirene, con indice di rifrazione pari a $n \sim 1.5$ e dimensione diversa: circa 2 μm (PC-S-2.0 Coated Polystyrene Particles-Streptavidinepolystyrene 2.0-2.9 μm , LIFELINELAB Srl) e circa 3 μm (PC-PG-3.0 Coated Polystyrene Particles-Protein G-polystyrene 3.0-3.5 μm , LIFELINELAB Srl). Le biglie di dimensione minore (SA) sono vendute dal produttore con un ricoprimento superficiale di Streptavidina, in modo tale da creare un forte legame chimico con la estremità del sistema maniglie-molecola modificato con Biotina. Le biglie più grandi (AD), invece, presentano alla vendita un rivestimento di proteina G.

Le biglie SA vengono preparate per l'esperimento tramite una centrifuga e sospensione in un buffer fosfato salino specifico per la diluizione di materiale biologico indicato con la sigla PBS. Le biglie AD non presentano il rivestimento adatto alla creazione del legame con le maniglie, pertanto si procede alla funzionalizzazione di queste aggiungendo un secondo rivestimento, questa volta di Antidioxigenina. Le AD vengono sospese in un composto chimico che agevola il legame tra catene polimeriche (DMP *crosslinker*) per poi procedere ad una incubazione con Antidioxigenina di 60' minuti di durata perché questa si leghi alla proteina G presente sulla superficie delle biglie; le AD vengono immagazzinate come sospensione in PBS.



(a) Micropipetta e biglie funzionalizzate: immagine visualizzata sul monitor dello strumento al momento dell'esperimento; la luce LED e il sistema ottico garantiscono una illuminazione uniforme del sistema per l'imaging; sono visibili la biglia fissata per suzione alla micropipetta (SA) e la biglia intrappolata otticamente (AD); la molecola è troppo sottile per essere rilevata dal sistema di imaging

(b) Schema non in scala del setup sperimentale molecolare: La biglia SA è fissata per suzione alla punta della micropipetta; un legame Streptavidina-Biotina lega la SA alla prima maniglia; Al centro del sistema è posta la proteina oggetto di studio, in questo lavoro di tesi Flavodossina; un legame Digoxigenina-Antidigoxigenina lega la seconda maniglia alla biglia AD che, da ultima, è intrappolata otticamente.

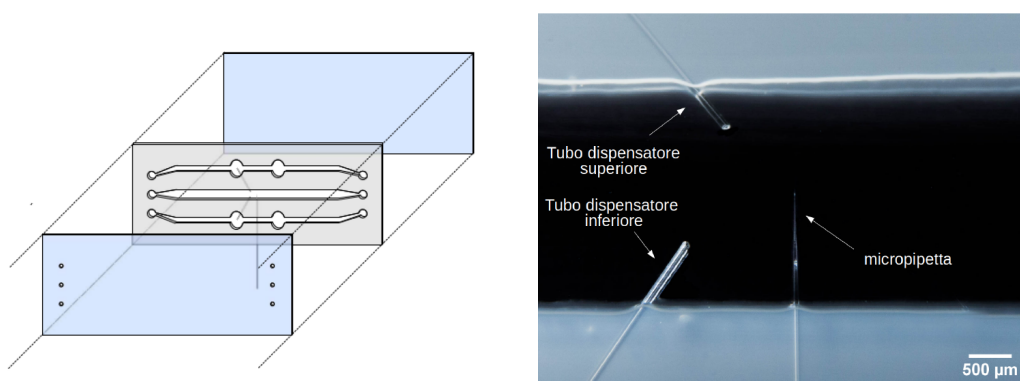
Figura 2.4: Visuale dal sistema di imaging dello strumento; schema non in scala del setup sperimentale molecolare.

Si sottolinea il fatto che i legami chimici Digoxigenina-Antidigoxigenina e Streptavidina-Biotina avvengono solamente tra le superfici delle biglie e le estremità trattate delle maniglie; questa condizione permette al sistema biglia-maniglia di non interagire direttamente con la molecola oggetto di studio, se non tramite il legame che intercorre tra la maniglia e la molecola. Si assume in generale che i legami biglia-maniglia e le maniglie stesse siano molto più rigidi della molecola in esame, in modo da poter attribuire tutte le variazioni di forza o estensione rilevate dallo strumento alla molecola e non al circostante sistema di ancoraggio.

2.1.4 Camera microfluidica

Gli esperimenti di singola molecola sono effettuati all'interno di una camera microfluidica posta nello spazio tra i due obiettivi da microscopio. Uno schema costruttivo della camera è mostrato in figura 2.5a: le dimensioni sono di 6 cm di lunghezza, 2.4 cm di altezza e 600 μm di spessore ed essa si compone di tre cavità parallele, dette *canali microfluidici* collegate con l'esterno tramite dei tubi di materiale plastico che si trovano sulla struttura metallica che fissa la camera in posizione all'interno dello strumento.

La camera microfluidica è composta da due coprivetrini da laboratorio di spessore $d \sim 145 \mu\text{m}$, che chiudono fra di essi una coppia di foglietti di parafilm sagomati in modo da formare la struttura a canali sopraccitata. La sagoma è ben visibile al centro della figura 2.5a: tre cavità di forma allungata formano i canali microfluidici che, una volta riempiti



(a) Composizione di una camera microfluidica: vetrini, parafilm, micropipetta e tubi dispensatori.

(b) Vista al microscopio della zona di reazione di una camera microfluidica

Figura 2.5: Vista esplosa di una camera microfluidica e vista al microscopio della zona di reazione.

di una fase liquida opportuna (detta *buffer*), potranno ospitare le biglie micrometriche. Agli estremi delle cavità sono presenti degli allargamenti di forma circolare che fungono da zona di accoppiamento del canale con l'esterno; essi si trovano in corrispondenza di altrettanti fori sulla superficie di uno dei coprivetrini. Nella zona centrale della camera, posti tra uno strato di parafilm e l'altro, vi sono una coppia di capillari in vetro e una micropipetta; un ingrandimento di questi realizzato al microscopio è mostrato in figura 2.5b. I capillari, realizzati con dei tubi in vetro di piccolo diametro (King Precision Glass Inc. ID: (0.040 ± 0.006) mm; OD: (0.10 ± 0.01) mm), hanno la funzione di mettere in comunicazione i canali esterni con il canale centrale, permettendo ad un numero piccolo di biglie di migrare dagli uni all'altro; sono detti *tubi dispensatori*. La micropipetta è costruita a partire da un tubo di diametro esterno minore (King Precision Glass Inc. ID: (0.040 ± 0.006) mm; OD: (0.08 ± 0.01) mm) mediante l'utilizzo di uno strumento, il *pipet puller*, che con l'ausilio di un riscaldatore elettrico e di un opportuno sostegno, esegue il tiraggio del tubo; questo, indebolito dal riscaldamento, si allunga fino a rompersi. L'estremità del tubo prossima al punto di rottura risulta allungata e ristretta tanto da avere un diametro interno nella zona della punta dell'ordine del μm . La micropipetta si allunga dalla zona dell'esperimento nel canale centrale fino all'esterno della camera, spuntando dalla zona inferiore di questa.

Delle siringhe, collegate ai fori di entrata della camera tramite dei capillari, hanno il compito di saturare i canali con un buffer liquido di composizione opportuna, spingendolo all'interno delle cavità fino al completo riempimento; il liquido in eccesso viene scartato da altri capillari collegati ai fori di scarico della camera. Una ulteriore siringa, questa volta vuota, viene collegata all'estremo della micropipetta che spunta dal lato inferiore della camera: avrà la funzione di creare la suzione che terrà ancorata la biglia fissa alla pipetta durante gli esperimenti.

2.2 Esperimenti di singola molecola

Gli esperimenti di singola molecola avvengono all'interno della camera microfluidica e prevedono che si manipoli un sistema configurato come in figura 2.4b immerso in un

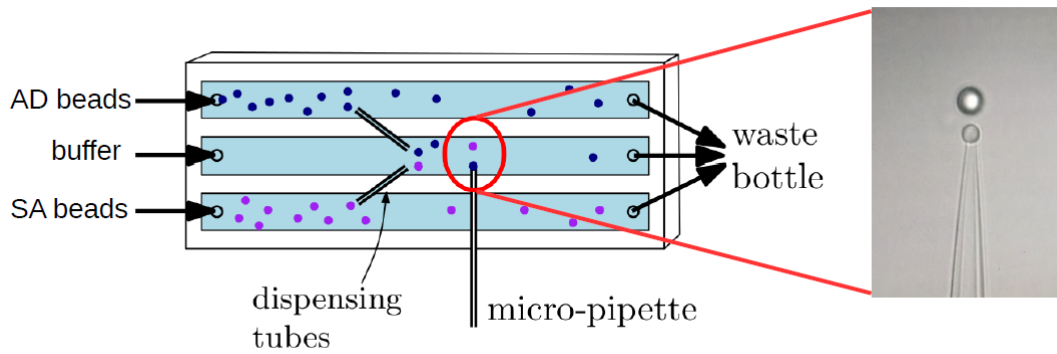


Figura 2.6: Rappresentazione schematica dell'inserimento delle biglie nel sistema microfluidico. Una sospensione di biglie SA viene fatta scorrere nel canale inferiore; una delle SA che attraversa il tubo dispensatore viene catturata con la trappola ottica e fatta aderire alla punta della micropipetta, dove viene fissata per suzione; biglie AD che trasportano proteine sulla loro superficie raggiungono la zona dell'esperimento da un tubo dispensatore e vengono intrappolate otticamente, per poi essere avvicinate alle biglie SA tramite la movimentazione della trappola ottica.

buffer di opportuna composizione. Per gli esperimenti con la proteina Flavodossina la soluzione tampone è acquosa con 50mM di Trizma e pH pari a 8.

L'esperimento vero e proprio consiste nel tiraggio a velocità costante della proteina con monitoraggio di forze e allungamenti del sistema e verrà descritto alla sezione 4.1. Il procedimento di preparazione del campione per l'esperimento di pulling prevede un protocollo che si riassume nei punti seguenti:

1. Le biglie AD funzionalizzate vengono unite ad una sospensione contenente la parte biologica del sistema, ovvero strutture molecolari formate da una maniglia di DNA a doppio filamento (dsDNA) funzionalizzata ad una estremità con Digoxigenina, una proteina e una maniglia funzionalizzata all'estremità libera con Biotina. L'incubazione ha lo scopo di creare il legame tra l'Antidigoxigenina deposta sulla superficie delle AD e la Digoxigenina presente ad una estremità delle maniglie, in modo tale da fissare le strutture molecolari alla superficie delle biglie; la concentrazione delle strutture molecolari nella sospensione è studiata in modo tale da far legare solo un numero limitato di queste (idealmente una sola) ad ogni biglia. La durata dell'incubazione è di 30' e avviene a temperatura ambiente; i rapporti dei diversi componenti usati nell'incubazione sono: 2uL (proteina diluita 1:10) + 5uL biglie AD + 13uL buffer (50mM TRIS).

Contemporaneamente viene preparata una sospensione di buffer e biglie SA in rapporto 1:1000, che viene riposta in attesa di essere introdotta nella camera microfluidica.

2. Una sospensione di biglie di tipo SA viene iniettata nel canale inferiore della camera microfluidica. Alcune delle biglie presenti nel canale attraversano il tubo dispensatore e raggiungono il canale centrale; una di queste viene trasferita, mediante l'utilizzo della trappola ottica, all'estremità della micropipetta, dove viene fissata per suzione.

3. Allo stesso modo una sospensione di biglie AD viene trasferita nel canale superiore; alcune di queste raggiungono il canale centrale viaggiando attraverso il tubo dispensatore. Usando la trappola ottica, una di queste biglie viene catturata e trasferita in prossimità della punta della micropipetta.
4. Una volta che le biglie si trovano entrambe nella zona prossima alla punta della micropipetta si procede alla creazione dell'ultimo legame necessario a completare il setup: quello tra Streptavidina sulla biglia SA e Biotina sulla estremità della maniglia rimasta libera. La biglia AD fissata nella trappola ottica viene avvicinata lentamente alla SA fissata sulla punta della micropipetta. Al contatto tra le due biglie avviene la creazione del legame molecolare e il setup è pronto per l'esperimento.

Una visione schematica di quanto descritto ai punti 2-4 è illustrata in figura 2.6.

Capitolo 3

Sistema Biologico

Le proteine compiono molte diverse funzioni in biochimica. C'è uno stretto legame tra la struttura tridimensionale e la funzione delle proteine a livello molecolare: il funzionamento biologico di una proteina è determinato dalla sua struttura tridimensionale (figura 3.1b), che è codificata in una sequenza monodimensionale di amminoacidi. Il settore di ricerca che indaga il ripiegamento delle proteine vide la sua nascita con il lavoro dei premi Nobel per la Chimica del 1962 Max Perutz e John Kendrew che furono i primi a determinare con una risoluzione di pochi Ångström la struttura di alcune proteine globulari. Ad oggi la ricerca ha portato alla realizzazione del Protein Data Bank, un database contenente le strutture di più di 80000 proteine a risoluzione atomica. Dall'analisi dei dati raccolti, emergono alcuni fenomeni chimico-fisici che influenzano il ripiegamento delle proteine, tra cui i legami Idrogeno, che determinano la struttura ad α -helices e β -sheets, le interazioni di Van Der Waals tra gli atomi strettamente allocati delle proteine ripiegate, le interazioni elettrostatiche, le interazioni idrofobiche [10].

3.1 Processo di apertura e ripiegamento delle proteine

Il problema del ripiegamento delle proteine si riassume in alcune questioni principali: com'è che la struttura tridimensionale di una proteina è determinata dalle sue proprietà chimico-fisiche che a loro volta derivano dalla sua sequenza monodimensionale di amminoacidi? Esiste un "meccanismo di ripiegamento"? Ovvero: una catena peptidica ha un numero estremamente grande di possibili conformazioni tridimensionali: com'è che la proteina sceglie esattamente quella che risulta essere il suo stato nativo e come fa a raggiungerlo così velocemente?

Alcuni studi sulla entropia della catena peptidica mostrano come in generale l'energy landscape della proteina assuma una forma ad imbuto (figura 3.1a), con molte configurazioni possibili nello stato aperto e, invece, un numero molto ridotto di configurazioni nello stato ripiegato, tra cui lo stato nativo. Questo modello per l'energy landscape della proteina spiega la rapidità del processo di ripiegamento: si è visto infatti che è sufficiente un salto energetico dell'ordine dell'energia termica $k_b T$ per "far cadere" la proteina nel collo dell'imbuto, ovvero farle raggiungere lo stato di energia minima a partire da uno stato aperto senza esplorare altri stati intermedi.

Nonostante i molti avanzamenti avvenuti nel corso di cinquant'anni, non si è ancora arrivati a capire se esista un "meccanismo di ripiegamento", ovvero una regola generale

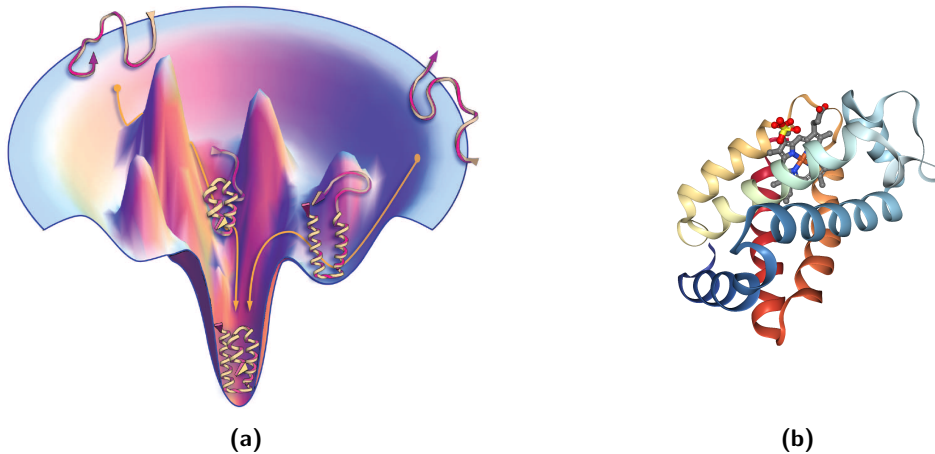


Figura 3.1: Energy landscape tipico di una proteina e struttura tridimensionale di una proteina. (a) L'energy landscape di una proteina risulta avere una forma ad imbuto: una proteina nello stato aperto risiede nella zona superiore dell'imbuto, mentre sul fondo sta la proteina nello stato nativo; il salto energetico necessario alla proteina per superare i minimi locali nella parte alta dell'energy landscape risulta essere dell'ordine dell'energia termica; da questa proprietà discende la velocità di ripiegamento delle proteine [10]. (b) Struttura tridimensionale della proteina 1h97 ottenuta da esperimenti di diffrazione a raggi X con una risoluzione di 1.17 Å [20].

che che spieghi l'evoluzione di una proteina verso il suo stato nativo a partire dalla sua sequenza di amminoacidi. È importante ricercare un meccanismo di questo tipo perché darebbe informazioni cruciali sulla scelta della proteina tra i diversi percorsi di ripiegamento possibili (*folding pathways*), intesi come la successione di stati appartenenti all'energy landscape che la proteina assume in sequenza per passare dallo stato aperto allo stato nativo. Infatti, nel passaggio dallo stato piegato a quello aperto la proteina può assumere configurazioni energetiche intermedie, la cui natura influenza le costanti cinetiche tipiche del sistema. Inoltre, lo studio del processo di ripiegamento di una proteina consente di mettere in evidenza l'eventuale presenza di stati di mal-ripiegamento, che risultano spesso correlati ad erronee funzioni biologiche della proteina e all'insorgere di malattie.

3.2 Flavodossina

Le Flavodossine (figura 3.2) sono piccole proteine mediatrici del trasferimento di elettroni che contengono una molecola fortemente legata di Flavina mononucleotide (FMN) come componente ossidoriduttiva attiva. Sono state scoperte negli anni '60 nei cianobatteri e nei Clostridia coltivati in condizioni di carenza di ferro, dove sostituiscono la proteina Ferredossina, che contiene ferro, nella catalizzazione di reazioni di riduzione di NADP^+ e N_2 . Nonostante questo rimanga il loro ruolo fisiologico forse più conosciuto e nondimeno quello che ha interessato la gran parte della ricerca sulle Flavodossine, esse sono coinvolte in una varietà di reazioni e sono, per alcuni organismi, essenziali proteine costruttive.

L'interesse della comunità biofisica nello studio della stabilità, del ripiegamento e della proprietà di riconoscimento dei ligandi da parte delle proteine ha stimolato l'uso di diverse flavodossine come modelli per comprendere i dettagli del processo attraverso il



Figura 3.2: Due Flavodossine rappresentate nella loro struttura spaziale tridimensionale: a sinistra la Flavodossina 1FUE dell'*Helicobacter Pylori* [12] con risoluzione di 2.4 Å, a destra la Flavodossina 1OBO del batterio *Anabaena* con risoluzione di 1.2 Å [16]; si riconoscono nelle figure le strutture secondarie α -helices e β -sheets caratteristiche delle proteine.

quale la Flavodossina sintetizzata diventa funzionale e i tratti fondamentali di questo, che sono comuni a tutte le proteine; inoltre le Flavodossine sono riconosciute come un modello per la classe di proteine a tre strati $\alpha\beta\alpha$ [22].

Infine, alcune Flavodossine hanno trovato applicazione pratica, come la determinazione di carenze di ferro nel fitoplancton o la costruzione di nanostrutture miste proteina-metallo; alcune Flavodossine prodotte da batteri patogeni sono in fase di studio come potenziali bersagli biologici di farmaci [22].

Tutte le Flavodossine conosciute contengono approssimativamente tra i 140 e i 180 residui. Dall'allineamento della sequenza e da considerazioni strutturali, possono essere divise in due gruppi: Flavodossine a catena lunga e corta; i due gruppi differiscono per la differenza di un loop di 20 residui la cui funzione è ad oggi sconosciuta.

Per acquisire la sua conformazione funzionale, la flavodossina deve piegarsi e legarsi all'FMN e in tale configurazione la proteina viene chiamata Holo-Flavodossina. Questi due processi, che a priori potrebbero essere accoppiati, sono sequenziali e il cofattore si lega alla proteina solo quando questa è già piegata. Nonostante il ruolo chiave giocato dal cofattore FMN nello svolgimento delle funzioni biologiche della proteina, esso non modifica in maniera apprezzabile la struttura secondaria della catena polipeptidica, così che spesso per semplicità si studia la proteina nella sua configurazione Apo, ossia in assenza del cofattore FMN. Il ripiegamento della Apoflavodossina è stato investigato in vitro utilizzando proteine a catena lunga provenienti dal batterio *Anabaena* (figura 3.2b) e dall'*Azotobacter Vinelandii*. Nonostante alcune piccole differenze, si è riscontrato che per queste due proteine il cammino di ripiegamento è essenzialmente lo stesso e presenta un transiente intermedio che è fuori percorso e rallenta la reazione. Nondimeno il ripiegamento è rapido: la Apoflavodossina è ripiegata in meno di un secondo e si osserva che la presenza del cofattore FMN non catalizza la reazione. Si suppone che l'osservazione del transiente intermedio possa essere legata alla presenza del loop di 20 amminoacidi specifico delle proteine a catena lunga, ma nessuno studio sul meccanismo di ripiegamento delle Apoflavodossine a catena corta è ancora disponibile.

3.3 Modello WLC

Una relazione quantitativa tra forza applicata alla catena peptidica e il suo allungamento indotto da una forza esterna è data dal modello *Worm Like Chain*:

$$F = \frac{K_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1-z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L_0} \right)^i \right]. \quad (3.1)$$

Qui di seguito è data una sua giustificazione.

Una catena peptidica può essere modellizzata come una corda sulla quale è possibile effettuare deformazioni di allungamento, piegamento e torsione. In particolare, detto ds il tratto infinitesimo di corda a distanza s da un estremo, le tre deformazioni si possono indicare come

$$u(s) = \frac{\Delta ds}{ds}; \quad \vec{\beta}(s) = \frac{d\hat{t}}{ds}; \quad \omega(s) = \frac{\Delta\phi}{ds}$$

dove si associano le funzioni $u(s)$, $\vec{\beta}(s)$ e $\omega(s)$ alle deformazioni di allungamento (stretching), piegamento (bending) e torsione (twisting) rispettivamente; con $\hat{t}(s)$ si è indicato il versore tangente alla corda nel punto s e con ϕ l'angolo di torsione subito dal tratto ds , come indicato in figura 3.3.

In generale si può scrivere il contributo energetico per unità di lunghezza di una deformazione così descritta come:

$$dG(s) = \frac{1}{2} \left[A(\beta(s))^2 + B(u(s))^2 + C(\omega(s))^2 + 2D u(s)\omega(s) \right] ds$$

dove A, B, C e D sono costanti fenomenologiche. Tra questi, si vede che per esperimenti di pulling dominano i termini di allungamento e piegamento sul termine di twist, che risulta infine trascurabile [6]. Il contributo energetico della deformazione di piegamento risulta proporzionale al quadrato della variazione del vettore tangente, che si può scrivere come l'inverso del quadrato del raggio di deformazione:

$$\frac{d\mathcal{E}_b(s)}{ds} = \frac{A}{2} \left| \frac{d\vec{t}(s)}{ds} \right|^2 = \frac{A}{2R^2};$$

L'apporto del termine di allungamento si scrive come

$$\frac{d\mathcal{E}_s(s)}{ds} = -F \cos \theta(s)$$

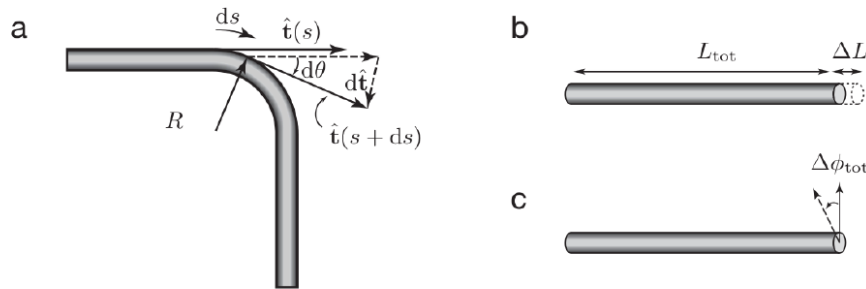


Figura 3.3: Possibili deformazioni di una corda: (a) piegamento, (b) allungamento e (c) twist.

dove $\theta(s)$ è l'angolo formato tra la direzione della forza e il versore \hat{n} che indica la direzione del tratto infinitesimo ds . L'energia totale del sistema deformato si scriverà come:

$$\mathcal{E}_{WLC} = \int_0^{L_0} \frac{A}{2} \left| \frac{d\vec{t}(s)}{ds} \right|^2 - F \cos \theta(s) ds \quad (3.2)$$

dove L_0 è la lunghezza di contorno della catena polimerica, che è definita come il massimo valore di lunghezza ottenibile per la molecola come somma delle distanze tra i monomeri che la compongono. Si ricava dunque l'espressione dell'energia libera

$$Z(L_0, F, \vec{t}_0, \vec{t}_1) = \int_{\vec{t}_0}^{\vec{t}_1} D(\vec{t}) e^{-\beta \mathcal{E}_{WLC}} d\vec{t}$$

con $\beta = 1/k_B T$ e $D(\vec{t})$ è la variabile su cui effettuare l'integrazione, nello spazio dei cammini su una sfera di raggio unitario che collegano i punti $\vec{t}(s=0) = \vec{t}_0$ con i punti $\vec{t}(s=L_0) = \vec{t}_1$. L'energia libera si può esprimere in una forma equivalente a partire dalla funzione di partizione Z [6]:

$$Z(L_0, F | \vec{t}_0, \vec{t}_1) = \left\langle \vec{t}_1 \left| e^{-\frac{L_0}{L_p} \hat{H}_{WLC}} \right| \vec{t}_0 \right\rangle$$

con L_p lunghezza di persistenza della catena e l'operatore \hat{H}_{WLC} pari a:

$$\hat{H}_{WLC} = -\frac{1}{2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} - \beta L_p F \cos \theta.$$

In particolare, L_p è definita come $L_p = A/k_b T$ e rappresenta la distanza entro la quale due vettori tangenti $t(s)$ rimangono correlati. In altri termini, L_p è legata alla rigidità del sistema e rappresenta la distanza al di sotto della quale la catena peptidica è considerata rigida, pur mostrando una certa flessibilità a distanze maggiori di L_p .

Per il primo principio della termodinamica, per il sistema vale la relazione $dU = T dS + F dz$, dove U, T, S e F rappresentano l'energia del sistema, la temperatura e la forza applicata e z è l'allungamento. Detta $G = U + PV - TS$ l'energia libera di Gibbs, si ricava che $dG = -z dF - S dT$ [14]. Derivando dunque l'energia libera rispetto alla forza, è possibile scrivere l'allungamento del sistema: $z = -dG/dF$. Ricordando la relazione tra energia libera e funzione di partizione $G = k_B T \ln Z$ si può calcolare l'allungamento in funzione di questa:

$$\langle z \rangle = k_B T \frac{\partial \ln Z}{\partial F}.$$

In virtù di ciò, nella approssimazione $L_p \ll L_0$, sussiste la relazione

$$\frac{\langle z \rangle}{L_0} = -\frac{k_B T}{L_0} \frac{\partial \ln Z}{\partial F} = \langle \Psi_0 | \cos \theta | \Psi_0 \rangle$$

con Ψ_0 stato fondamentale del sistema. Risolvendo l'equazione agli autovalori

$$\hat{H}_{WLC} \Psi_0 = \mathcal{E}_0 \Psi_0$$

emerge una relazione che descrive la relazione tra la forza esercitata sul sistema e l'allungamento di questo [8, 6]:

$$F = \frac{K_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1-z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L_0} \right)^i \right];$$

α_i sono coefficienti fenomenologici. È uso utilizzare in questo modello coefficienti nulli [8] oppure a valori $\alpha_2 = -0.5164228$, $\alpha_3 = -2.737418$, $\alpha_4 = 16.07497$, $\alpha_5 = -38.87607$, $\alpha_6 = 39.49944$, $\alpha_7 = -14.17718$ [6].

Capitolo 4

Esperimenti

La *dynamic force spectroscopy* (DFS) è lo studio delle forze a cui avvengono le transizioni tra stati molecolari aperti e chiusi. L'utilità dei dati forniti da questa tecnica per la predizione dei free energy landscapes (FEL) molecolari è stata ampiamente provata con l'utilizzo di hairpin di acidi nucleici, dove la relazione diretta tra l'estensione della molecola e il numero di coppie di amminoacidi aperte fornisce buone informazioni sugli FEL che la molecola attraversa durante i processi di apertura e ripiegamento meccanico. Tuttavia nel caso delle proteine la corrispondenza tra struttura ed estensione molecolare non è ovvia: queste sono strutturalmente molto più complesse degli hairpin di acidi nucleici e configurazioni successive nel percorso di ripiegamento non implicano necessariamente il rilascio/creazione di legami sequenziali tra amminoacidi lungo la catena peptidica, ma potrebbero invece essere relative al rilascio di domini separati della struttura proteica. Nonostante gli esperimenti di DFS offrano accesso solo all'estensione molecolare, quando combinati con simulazioni e tecniche di bulk, possono essere estremamente utili nella determinazione dei percorsi di apertura e ripiegamento delle proteine e per ottenere informazioni chiave sulla struttura molecolare e sulla stabilità termodinamica delle proteine [1].

4.1 Esperimenti di pulling

Esiste una relazione matematica quantitativa tra la forza applicata alla molecola e il suo allungamento, data dall'equazione (3.2) nei termini dei parametri L_0 e L_p , che possono essere determinati sperimentalmente osservando la risposta della molecola a sollecitazioni esterne come ad esempio il tiraggio della catena polimerica tramite esperimenti di singola molecola con le OT.

Come mostrato in figura 4.1 il sistema biologico è tenuto per le estremità da due biglie, una fissa sulla punta della micropipetta e l'altra tenuta nella posizione desiderata dalla trappola ottica. È possibile allontanare le biglie movimentando la trappola, applicando in questo modo una forza sul sistema molecolare: una prova siffatta è definita *esperimento di pulling*. La misura della forza in esperimenti questo tipo si attua osservando la deviazione della luce che oltrepassa la biglia, una quantità che è legata allo scostamento della biglia stessa dal centro della trappola.

Nel caso della proteina, allontanando le biglie si favorisce il passaggio della stessa dallo stato nativo (folded state, F) allo stato aperto (unfolded state, U). Le transizioni tra

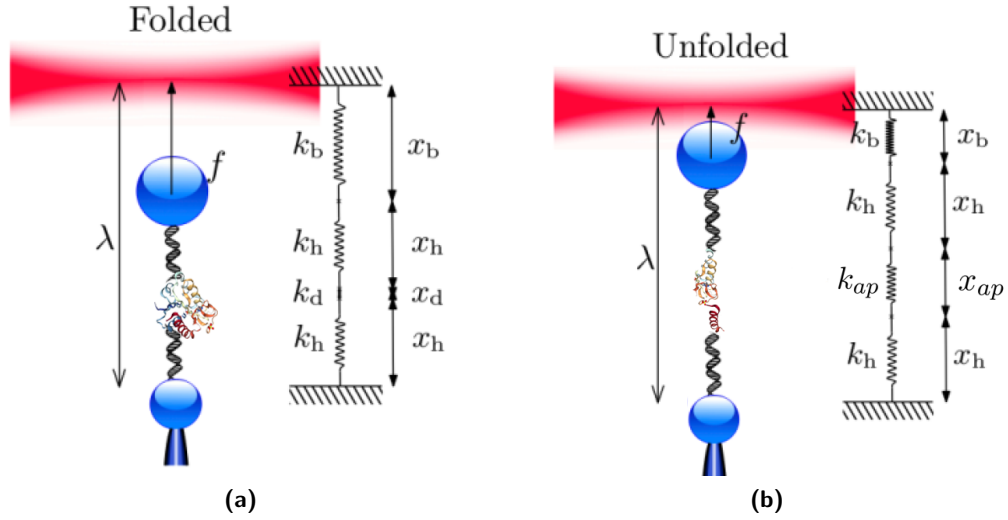


Figura 4.1: Allungamenti in un esperimento di pulling. (a) Contributi di estensione nello stato folded; (b) Contributi di estensione nello stato unfolded. L'estensione del sistema complessivo è la somma degli allungamenti delle sue componenti: $\lambda = x_h + x_b + x_{d/ap}$; x_h rappresenta l'estensione delle maniglie; $x_{d/ap}$ indica l'estensione della proteina nello stato F/U; x_b è lo scostamento della biglia dal centro della trappola. Si possono schematizzare le componenti del sistema come delle molle di opportuna costante elastica, il cui effetto complessivo si scrive: $k_{eff} = (k_h^{-1} + k_b^{-1} + k_{d/ap}^{-1})^{-1}$.

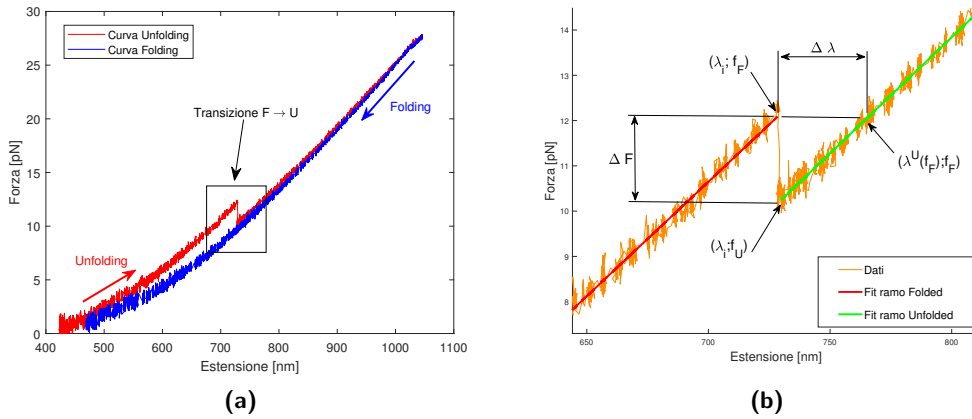


Figura 4.2: Curve sperimentali di unfolding e folding. (a) Una rappresentazione sovrapposta di curve estensione vs. forza di unfolding e folding di una Flavodossina; nella traccia della curva di unfolding (rosso) è evidenziato il salto di forza che individua la transizione $F \rightarrow U$; la curva di unfolding (blu) non presenta discontinuità: la proteina si ripiega quando si trova in condizione di rilassamento e la transizione non è osservabile come un salto di forza. (b) Ingrandimento della zona del salto per la sola curva di unfolding: dai punti dati prima e dopo la discontinuità si estrapolano due fit lineari (risp. retta rossa e verde) che ne approssimano l'andamento; il salto ΔF è determinato come la differenza tra il valore delle due rette di fit valutate al valore di estensione λ_i che identifica la transizione.

gli stati $F \rightarrow U$ si manifestano sul sistema come uno spostamento della biglia verso il centro della trappola ottica; queste sono visibili dall'output dello strumento (figura 4.2a) come delle nette discontinuità di forza. È importante notare come il processo di rottura avvenga in un tempo molto breve e con la trappola ottica in una posizione λ_i costante. Un confronto tra le situazioni prima e dopo la rottura si vede in figura 4.1, dove, in virtù di considerazioni sul potenziale armonico di intrappolamento, la trappola ottica è schematizzata come una molla di costante elastica k_b . Prima della rottura la biglia è lontana dalla trappola, la molla è estesa e la forza applicata è grande; dopo la rottura la biglia si è spostata e sul sistema agisce una forza tanto più piccola quanto più la biglia si trova prossima al centro della trappola.

In figura 4.2a è mostrato un output dello strumento per un esperimento di pulling su Flavodossina; si nota il salto di forza nella zona centrale della curva di Unfolding, segno che la proteina ha subito un cambio di stato. Si nota che la curva di folding presenta un andamento regolare, senza salti; contrariamente a quanto succede per altri sistemi, quali ad esempio catene di RNA o DNA, per la proteina Flavodossina è difficile osservare un salto di forza nella fase di ripiegamento, in quanto la transizione non avviene se non a forze/allungamenti molto ridotti. La prova che questo effettivamente accade sta nei risultati di ripetuti tiraggi della stessa molecola: eseguendo successivamente più cicli di pulling è frequente ritrovare risultati, ovvero salti di forza, compatibili tra loro in ampiezza. Ciò indica che il processo osservato è il medesimo per tutti i cicli (apertura della proteina), dunque è vero che la molecola ha avuto modo di richiudersi nell'intertempo che li separa.

Il sistema oggetto dell'esperimento di pulling si può schematizzare come l'unione di più componenti che agiscono come delle molle indipendenti collegate fra loro, ognuna con una differente costante elastica k . In particolare l'allungamento totale del sistema λ dipenderà dalla forza applicata e si scriverà come la somma dei contributi di allungamento delle maniglie, della biglia e della proteina:

$$\lambda(f) = x_h(f) + x_b(f) + x_{prot}(f)$$

dove x_b indica lo scostamento della biglia dal centro della trappola ottica, x_h indica l'allungamento delle maniglie di DNA e x_{prot} indica l'estensione della proteina. Nello specifico, x_{prot} dipende dallo stato F o U in cui si trova la molecola: se la proteina si trova nello stato ripiegato si potrà considerare come lunghezza la proiezione delle sue dimensioni sulla direzione di applicazione della forza (x_d); nello stato aperto la lunghezza della molecola sarà pari alla distanza all'equilibrio tra i suoi estremi (x_{ap}).

Per una variazione $\Delta\lambda$ del parametro λ si registrerà una variazione Δf della forza agente sul sistema; il rapporto tra queste due quantità sarà pari alla costante elastica efficace del sistema, che si potrà a sua volta esprimere come somma dei contributi delle parti che lo compongono:

$$\frac{\Delta\lambda}{\Delta f} = \frac{1}{k_{eff}} = \frac{1}{k_h} + \frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_{prot}}$$

Dunque $k_{eff} = \Delta f / \Delta\lambda$ rappresenta la rigidità effettiva del sistema e sarà pari alla pendenza delle curve sperimentali f vs. λ simili a quella mostrata in figura 4.2b ed è un parametro misurabile sperimentalmente.

Dall'espressione dell'allungamento $\lambda(f)$ del sistema è possibile derivare una espressione esplicita per la dimensione della proteina nello stato aperto. Sia $\lambda^i(f_U)$ la lunghezza

totale del sistema calcolata sulla retta che descrive i punti dopo il salto al valore di forza f_F , ovvero quello registrato nel primo punto che precede la transizione, come indicato in figura 4.2b:

$$\lambda^i(f_F) = \lambda_0 + x_h(f_F) + x_b(f_F) + x_{prot}^d(f_F)$$

con λ_0 costante e sia invece $\lambda^U(f_F)$ il valore di estensione valutato alla stessa forza, ma sulla retta che descrive la proteina nello stato U:

$$\lambda^U(f_F) = \lambda_0 + x_h(f_F) + x_b(f_F) + x_{prot}^{ap}(f_F).$$

La differenza $\Delta\lambda$ tra questi risulta:

$$\Delta\lambda = \lambda^U(f_F) - \lambda^i(f_F) = x_{prot}^{ap}(f_F) - x_{prot}^d(f_F). \quad (4.1)$$

La lunghezza della proteina aperta si può infine scrivere come

$$x_{prot}^{ap}(f_F) = \Delta\lambda(f_F) + x_{prot}^d(f_F) \quad (4.2)$$

che è una espressione di quantità note data la curva in figura 4.2b.

Per determinare la lunghezza $x_{prot}^d(f)$ della proteina nello stato folded assunto prima della rottura, è utile fare riferimento ad un modello[11] che descrive la molecola in termini di un singolo legame di dimensione d (da qui in avanti assunta pari a 3 nm), che viene orientato sotto l'azione di una forza. Il contributo energetico legato a questa descrizione è $\mathcal{E} = -fd \cos \theta$, dove $\theta \in [0, \pi]$ è l'angolo relativo tra la proteina e l'asse di applicazione della forza; a partire da questo, tramite considerazioni statistiche si giunge a dare l'espressione per il valore medio della distanza x^d lungo l'asse di applicazione della forza:

$$x^d(f) = d \left[\coth \left(\frac{fd}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{fd} \right]. \quad (4.3)$$

4.2 Risultati per unfolding

A partire dal setup sperimentale descritto ai paragrafi precedenti, si sono effettuati ripetuti esperimenti di pulling sulla proteina Flavodossina. Di seguito verranno descritti i risultati per il processo di unfolding; come già accennato in precedenza, il processo di folding è di difficile osservazione tramite esperimenti di DFS a causa della sua tendenza ad avvenire a regimi di forza molto bassi e pertanto non verrà studiato in questo lavoro di tesi.

Ogni esperimento è costituito da una fase preparatoria già descritta in sezione 2.2 e, successivamente, da una serie di cicli di pulling. Un ciclo di pulling è un protocollo automatizzato che prevede il tiraggio della molecola tramite la movimentazione della trappola ottica fino all'applicazione di un valore fissato di forza (impostato intorno ai 30 pN) ed il rilascio della stessa fino alla condizione di rilassamento sempre a velocità costante. Per consentire il corretto ripiegamento della proteina, i cicli sono stati intervallati con un tempo di attesa pari a 2 s alla forza più bassa. La velocità di tiraggio utilizzata in tutti gli esperimenti è pari a 100 nm/s, che corrisponde ad un loading rate di circa 4.5 pN/s.

Si sono selezionate, a partire del segnale complessivo in uscita dallo strumento, un insieme di curve di unfolding, che risultano essere simili a quella in figura 4.3. Le

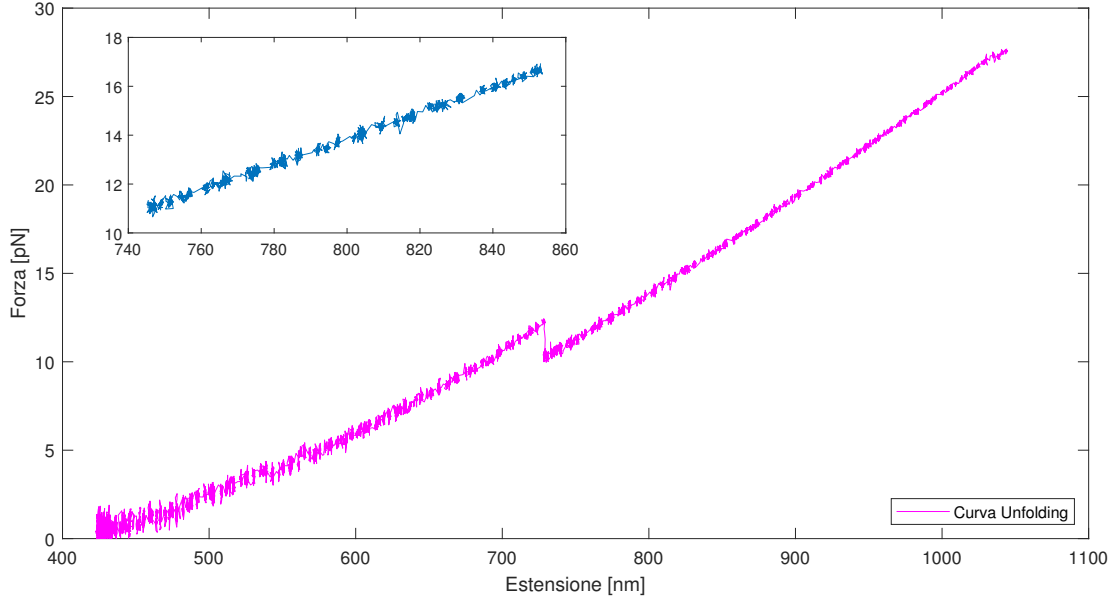


Figura 4.3: Curva di unfolding: una tipica curva di unfolding per la proteina Flaovodossina; nella zona centrale della curva, ingrandito nel box, è mostrato il salto di forza dovuto alla transizione dallo stato F allo stato U; l'ampiezza del salto è di poco meno di 3 pN.

curve presentano un andamento regolare e ben si accordano con il risultato che vede la forza dipendere linearmente dall'allungamento che discende dal modello illustrato alla sezione 4.1. L'unica discontinuità presente nei valori di forza identifica la zona di transizione dallo stato nativo allo stato aperto $F \rightarrow U$ e si presenta come un salto nei valori di forza misurati di ampiezza ΔF . Il modello Worm Like Chain prevede che l'estensione della molecola nel processo di dispiegamento aumenti all'aumentare della forza a cui il sistema si apre. Ricordando inoltre la relazione (4.2):

$$x_{prot}^{ap}(f_F) = \frac{\Delta f}{k_{eff}} + x_{prot}^d(f_F),$$

dove si è scritto $\Delta \lambda = \Delta f / k_{eff}$, se ne deriva che il salto osservato nella fase di unfolding sarà tanto maggiore quanto più alta sarà la forza di apertura della catena peptidica; esempi di salti di forza di ampiezza crescente sono riportati in figura 4.4.

Parametri elastici

In generale [1] si assume che le biomolecole come DNA, RNA o catene peptidiche nello stato unfolded seguano per la risposta elastica il modello WLC:

$$F = \frac{K_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L_0} \right)^i \right]$$

che lega la forza agente sulla molecola alla sua deformazione relativa z/L_0 e alla lunghezza di persistenza L_p . In particolare, per le catene peptidiche, la lunghezza al contorno L_0 è scrivibile come il prodotto del numero N di amminoacidi che le compongono per la distanza tra questi, che risulta essere una costante: $L_0 = N d_{aa}$. La stima dei parametri che caratterizzano una proteina si può ricavare da dati di estensione e forza tramite approssimazione ai minimi quadrati.

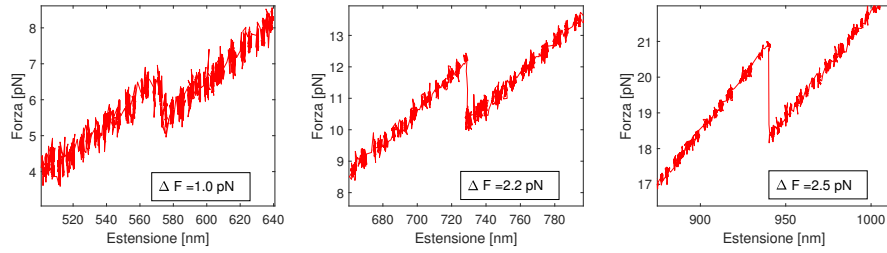


Figura 4.4: Salti di forza per transizioni $F \rightarrow U$: la transizione dallo stato ripiegato F allo stato aperto U viene identificata da una discontinuità nei valori di forza; la previsione del modello WLC è che l'estensione della molecola aumenti all'aumentare della forza a cui il sistema si apre e di conseguenza che l'ampiezza del salto di forza cresca con l'aumentare della forza di rottura della catena peptidica; in figura sono riportati tre salti di forza avvenuti a forze f_F crescenti: si vede che il salto è tanto più ampio quanto più grande è il valore f_F .

Per caratterizzare la proteina Flavodossina è necessario dunque estrapolare dalle curve in figura 4.3 informazioni relative alla lunghezza della proteina nello stato aperto: a tale scopo è utile ricordare la relazione (4.1) che indica che l'allungamento della proteina aperta è determinato dalla variazione di estensione $\Delta\lambda$ tra il ramo relativo allo stato piegato (folded) e aperto (unfolded) calcolati al valore di forza f_F .

La linearizzazione tramite fit delle curve sperimentali è il metodo utilizzato per la determinazione del valore $\Delta\lambda$: le zone adiacenti la discontinuità vengono approximate con delle rette e la variazione di estensione $\Delta\lambda$ viene calcolata come la distanza orizzontale tra queste al valore di forza di unfolding f_F che identifica la transizione; una rappresentazione ingrandita delle rette e del salto di forza è mostrata in figura 4.2b. La lunghezza della proteina $x_{prot}^d(f)$ dipende solo dal valore di forza applicata e si calcola tramite la relazione 4.3 ricavata al paragrafo precedente.

In figura 4.5b sono raccolti i risultati del procedimento appena descritto, con in ascissa i dati di estensione $x_{prot}^{ap}(f_F)$ calcolati tramite la (4.2) e in ordinata i valori di forza f_F registrati appena prima della rottura della proteina. La curva WLC calcolata su parametri stimati da [2] in uno studio sulla proteina Barnasi è mostrata in sovrapposizione; il confronto è opportuno in quanto ci si aspetta di ottenere valori simili di lunghezza di persistenza e distanza tra coppie di amminoacidi per tutte le catene peptidiche. Il numero di peptidi che compongono la catena osservata in questo esperimento è noto: la proteina è stata sintetizzata in laboratorio con 170 amminoacidi. Conoscendo dunque la lunghezza della catena peptidica è possibile ricavare la distanza tra gli amminoacidi come $d_{aa} = L_c/N$.

Per una stima quantitativa dei parametri L_P e d_{aa} a partire dai 97 punti che compongono il grafico in figura 4.5a si è scelto di eseguire un binning rispetto alla forza, ottenendo i 10 punti raffigurati alla 4.5b; le coordinate di questi sono individuate dalla media aritmetica delle coordinate dei punti contenuti in ogni bin e gli errori associati sono quelli derivati dalla loro dispersione. Si esegue su questi un fit della funzione 3.1 nella versione a coefficienti nulli proposta da Bustamante e collaboratori [6] scritta in funzione dei parametri L_P e d_{aa} . I risultati sono in accordo con i valori dei parametri elastici per catene peptidiche trovati da Alemany e collaboratori [2]; in tabella 4.1 sono riportati i valori ottenuti dal fit dei dati in figura 4.5b (a) e i valori ottenuti da [2] (b).

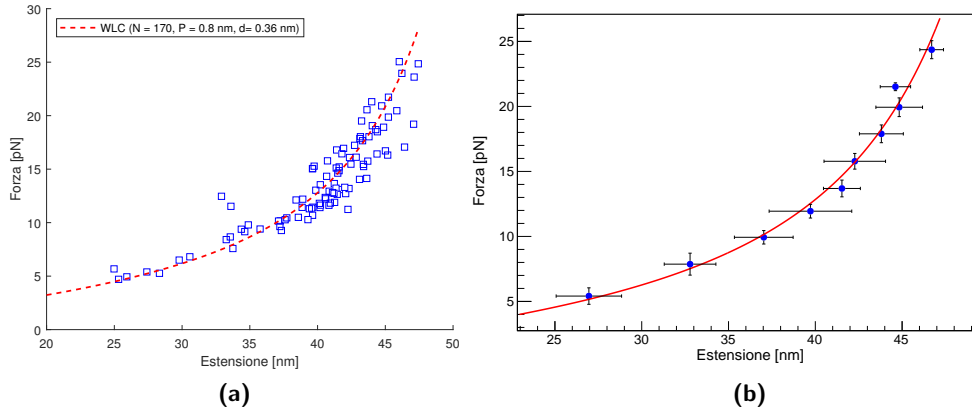


Figura 4.5: Risposta elastica della proteina: (a) Grafico dei dati raccolti a partire dalle curve di forza: alle ascisse l'estensione $x_{prot}^{ap}(f)$ e alle ordinate i corrispondenti valori della forza di unfolding f_F ; in rosso, tratteggiata, la curva della risposta elastica secondo il modello WLC per una catena peptidica di 170 amminoacidi con $L_P = 0.8$ nm e $d_{aa} = 0.36$ nm. (b) Fit lineare dei dati: i punti del grafico 4.5a sono stati divisi in 10 intervalli (bins) di forza e mediati all'interno di ogni intervallo per poi eseguire la regressione tramite la 3.1; l'errore associato ad ogni punto è pari alla deviazione standard calcolata sui dati appartenenti all'intervallo.

Tabella 4.1: Parametri elastici della catena peptidica: (a) risultati ottenuti dal fit dei dati in figura 4.5b; (b) risultati riportati da Alemany e collaboratori in [2].

	L_P [nm]	d_{aa} [nm]
a	0.8 ± 0.1	0.36 ± 0.01
b	0.85 ± 0.05	0.36 ± 0.01

Costante cinetica

Il processo di apertura delle catene peptidiche ha carattere stocastico e il valore f_F , che è il valore di forza calcolato sul ramo folded della curva al quale la proteina si apre, varia in ogni ripetizione indipendente dell'esperimento.

La probabilità di sopravvivenza $P_F(f)$ degli stati F attraverso il processo di apertura è definito come la probabilità della proteina di rimanere allo stato F alla forza f . Questa probabilità può essere calcolata a partire da una collezione di valori di forza di unfolding

$$P_F(f) = 1 - \frac{N(f_U < f)}{N_U}$$

dove N_U è il numero totale di rotture considerate. In alternativa è possibile costruire una distribuzione di probabilità delle forze di rottura f_F , in questo caso l'espressione della probabilità di sopravvivenza sarà:

$$P_F(f) = 1 - \int_0^f \rho(f_U) df_U. \quad (4.4)$$

In figura 4.6a è riportato l'istogramma normalizzato delle forze f_U di unfolding calcolate al ramo unfolded. Il fatto che la distribuzione di probabilità sia monomodale suggerisce

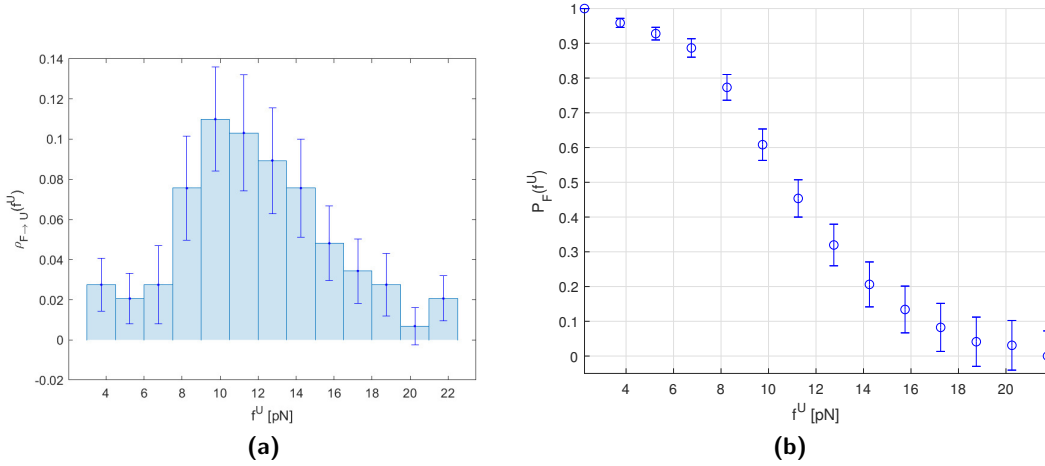


Figura 4.6: Probabilità di sopravvivenza: (a) Istogramma della densità di probabilità delle forze di rottura calcolate al ramo unfolded, ottenuto per normalizzazione delle frequenze assolute delle forze f_U al numero totale di eventi; l'istogramma si presenta come monomodale e questo suggerisce che il sistema, sollecitato alla velocità di 100 nm/s non possieda stati intermedi; (b) Probabilità di sopravvivenza del sistema alla forza f , ottenuta tramite la 4.4 dal grafico (a); il valore medio

che l'apertura della proteina sia in tutti i casi completa: è infatti ragionevole aspettarsi che una apertura parziale della proteina avvenga mediamente ad una forza inferiore a quella a cui mediamente è associata una apertura completa. Il verificarsi di una apertura parziale si tradurrebbe nella presenza di un secondo picco nella distribuzione di probabilità e questo non è osservato in figura 4.6a. La probabilità di sopravvivenza è mostrata in figura 4.6b; si può notare come questa sia decrescente con l'aumentare della forza e sia trascurabile per sollecitazioni maggiori di 20 pN. Il valore di forza f_c corrispondente ad una probabilità $P_F(f_c) = 0.5$ è detto forza di coesistenza ed è la sollecitazione tale per cui la molecola ha uguale probabilità di transire allo stato aperto e di rimanere nello stato chiuso. Per la Flavodossina questo valore si attesta intorno agli 11 pN (figura 4.6b).

Con l'assunzione che la configurazione della proteina ad ogni istante dipenda solo dall'istante appena precedente, si può trattare l'evoluzione del sistema come un processo Markoviano del primo ordine [5]: in questa ipotesi, l'espressione che lega la probabilità di sopravvivenza alla costante cinetica $k_{F \rightarrow U}(f)$ del sistema è

$$\frac{dP_F(f)}{df} = -\frac{k_{F \rightarrow U}(f)}{r} P_F(f)$$

dove si è definito $r = v k_{eff}$ il *rate di pulling* del sistema e con v velocità di pulling. La costante cinetica $k_{F \rightarrow U}(f)$ è legata al tempo di vita medio della molecola quando ai suoi estremi è applicata la forza f ; in particolare, invertendo la precedente espressione, essa si scrive:

$$k_{F \rightarrow U}(f) = -r \frac{1}{P_F(f)} \frac{dP_F(f)}{df}.$$

e il tempo di vita medio della molecola è dato da $\tau(f) = 1/k_{F \rightarrow U}(f)$. In figura 4.7 è mostrato l'andamento della costante cinetica per la proteina Flavodossina studiata in questo lavoro di tesi, calcolati nell'approssimazione di k_{eff} costante, assunto pari

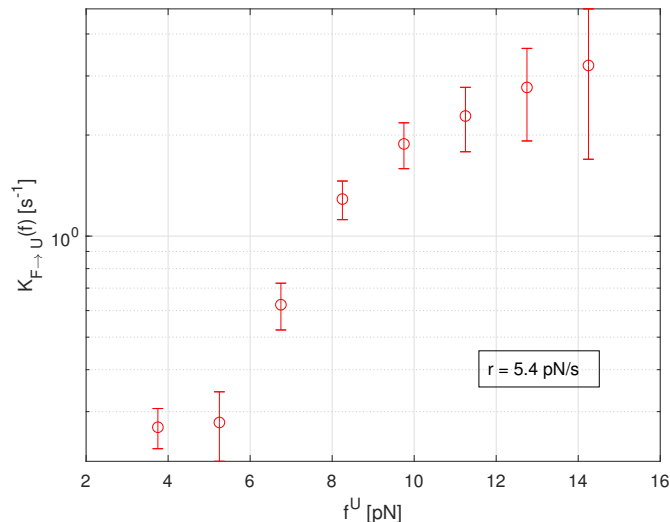


Figura 4.7: Andamento della costante cinetica in funzione della forza f_U : la costante cinetica indica la frequenza delle rotture della molecola ad una data forza; i valori misurati in questo lavoro di tesi sono compresi tra 0.3 s^{-1} e 3.2 s^{-1} , che corrispondono a tempi di vita media τ compresi tra 0.3 s e 4 s.

alla media delle pendenze di tutte le curve di unfolding considerate: risulta un rate di pulling di $r = 5.4 \text{ pN/s}$. La costante cinetica $k_{F \rightarrow U}(f)$ indica la frequenza temporale media delle rotture per molecole sottoposte all'azione di una forza f ; il suo inverso τ è dunque il tempo di vita medio per il quale una proteina sottoposta alla forza f rimane nello stato ripiegato prima di rompersi. I valori mostrati in figura 4.7 per la proteina Flavodossina ricavati a velocità di pulling $v = 100 \text{ nm/s}$ sono, per la costante cinetica, compresi tra 0.3 s^{-1} e 3.2 s^{-1} e indicano che i tempi di vita media per il range di forze esplorato vanno da 0.3 s a 4 s. Si tratta pertanto di una proteina che risulta piuttosto "lenta" nel passaggio tra i suoi diversi stati energetici. Ciò trova conferma anche in altre evidenze sperimentali, come accennato prima. Infatti, si è osservato che in seguito ad un processo di unfolding è necessario lasciare il sistema a forze basse per qualche secondo (almeno 2s) per assicurarsi che la proteina torni a richiudersi completamente e possa quindi essere nuovamente sottoposta ad un processo di unfolding; al contrario, protocolli di pulling con tempi di attesa ridotti (inferiori ad 1 secondo) hanno evidenziato un drastico calo del numero di aperture della catena peptidica, dovuto all'impossibilità della stessa di tornare allo stato nativo una volta aperta.

Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stata la determinazione dei parametri elastici e la stima dei parametri cinetici della proteina Flavodossina mediante l'utilizzo della tecnica sperimentale delle pinzette ottiche.

Nella parte iniziale si sono discussi i dettagli dell'apparato sperimentale: si è utilizzato un sistema di pinzette ottiche, denominato "Mini Tweezers", in possesso del Dipartimento di Fisica e Astronomia dal 2017, che genera una trappola ottica sfruttando due fasci laser contropropaganti focalizzati mediante l'utilizzo di lenti ad alto ingrandimento. Il sistema permette la movimentazione nanometrica della trappola ottica e la misurazione della posizione di questa e delle forze agenti sull'oggetto intrappolato con risoluzioni dell'ordine dei nanometri per la posizione e dell'ordine dei piconewton per la forza. Gli esperimenti sono avvenuti all'interno di una camera microfluidica costituita da un canale centrale e due canali esterni, comunicanti con il primo per mezzo di una coppia di capillari in vetro; la zona dell'esperimento era individuata all'interno di questa dalla punta di una micropipetta posizionata nella zona mediana del canale centrale. Il sistema biologico è stato preparato chimicamente in modo da collegare la proteina oggetto di studio a due biglie micrometriche in polistirene; due maniglie di dsDNA sono state utilizzate come elemento di connessione.

Gli esperimenti hanno prodotto una collezione di curve di forza-allungamento per il processo di unfolding della proteina; da queste si sono ricavati i valori di variazione della lunghezza molecolare nella transizione tra stato chiuso e stato aperto ($\Delta\lambda$) e si sono confrontati con il modello WLC. Si è utilizzata una regressione ai minimi quadrati per determinare i parametri elastici della catena peptidica: per la lunghezza di persistenza L_p e la distanza tra amminoacidi d_{aa} i risultati ottenuti sono i seguenti:

L_P [nm]	d_{aa} [nm]
0.8 ± 0.1	0.36 ± 0.01

Una analisi probabilistica della distribuzione delle forze di rottura ha evidenziato che il processo di apertura della proteina è a due stati: piegato (folded) e aperto (unfolded) e non sono presenti stati di apertura parziale, quantomeno nelle condizioni sperimentali utilizzate, ossia con una velocità di allungamento di 100nm/s. Si è individuata una stima della forza di coesistenza f_c della proteina attorno agli 11 pN.

Dall'analisi della costante cinetica $k_{F \rightarrow U}(f)$ è emerso che i tempi caratteristici del processo di unfolding per il range di forze a cui sono stati eseguiti gli esperimenti sono

dell'ordine del decimo di secondo o del secondo; ciò indica che le transizioni tra stati energetici diversi avvengono lentamente per la proteina Flavodossina.

Bibliografia

- [1] Anna Alemany i Arias. *Dynamic force spectroscopy and folding kinetics in molecular systems*. Università di Barcellona. Set. 2014.
- [2] A. Alemany et al. «Mechanical Folding and Unfolding of Protein Barnase at the Single-Molecule Level». In: *Biophys. J.* 110.1 (gen. 2016), pp. 63–74.
- [3] P. C. Anthony et al. «Electrostatics of nucleic acid folding under conformational constraint». In: *J. Am. Chem. Soc.* 134.10 (mar. 2012), pp. 4607–4614.
- [4] A. Ashkin et al. «Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles». In: *Opt. Lett.* 11.5 (mag. 1986), pp. 288–290. DOI: 10.1364/OL.11.000288. URL: <http://ol.osa.org/abstract.cfm?URI=ol-11-5-288>.
- [5] Eli Barkai et al. *Theory and Evaluation of Single-Molecule Signals*. Gen. 2008. DOI: 10.1142/6764.
- [6] C. Bouchiat et al. «Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements». In: *Biophysical Journal* 76.1 (1999), pp. 409–413. ISSN: 0006-3495. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77207-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77207-3). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349599772073>.
- [7] Zev Bryant et al. «Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA». In: *Nature* 424 (ago. 2003), pp. 338–41. DOI: 10.1038/nature01810.
- [8] C. Bustamante et al. «Entropic elasticity of lambda-phage DNA». In: *Science* 265.5178 (set. 1994), pp. 1599–1600.
- [9] Carlos Bustamante, Jed C. Macosko e Gijs Wuite. «Grabbing the Cat by the Tail: Manipulating Molecules One by One». In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 1 (dic. 2000), pp. 130–6. DOI: 10.1038/35040072.
- [10] Ken A. Dill e Justin L. MacCallum. «The Protein-Folding Problem, 50 Years On». In: *Science* 338.6110 (2012), pp. 1042–1046. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1219021. eprint: <https://science.sciencemag.org/content/338/6110/1042.full.pdf>. URL: <https://science.sciencemag.org/content/338/6110/1042>.
- [11] N. Forns et al. «Improving signal/noise resolution in single-molecule experiments using molecular constructs with short handles». In: *Biophys. J.* 100.7 (apr. 2011), pp. 1765–1774.
- [12] J. Freigang et al. «Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in *Helicobacter pylori*». In: *Protein Sci.* 11.2 (feb. 2002), pp. 253–261.

- [13] Joseph Maria Huguet i Casades. *Statistical and thermodynamic properties of DNA unzipping experiments with optical tweezers*. Universitat de Barcelona. PhD Thesis. 2006.
- [14] Ignacio Tinoco Jr e Carlos Bustamante. «The effect of force on thermodynamics and kinetics of single molecule reactions». In: *Biophysical Chemistry* 101-102 (2002). Special issue in honour of John A Schellman, pp. 513–533. ISSN: 0301-4622. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00177-1). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301462202001771>.
- [15] Cyrus Levinthal. «How to fold graciously». In: *Mossbauer spectroscopy in biological systems* (1969), pp. 22–24.
- [16] A. Lostao et al. «How FMN binds to anabaena apoflavodoxin: a hydrophobic encounter at an open binding site». In: *J. Biol. Chem.* 278.26 (giu. 2003), pp. 24053–24061.
- [17] Jeffrey R. Moffitt et al. «Recent Advances in Optical Tweezers». In: *Annual Review of Biochemistry* 77.1 (2008). PMID: 18307407, pp. 205–228. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225>.
- [18] K. C. Neuman e S. M. Block. «Optical trapping». In: *Rev Sci Instrum* 75.9 (set. 2004), pp. 2787–2809.
- [19] K. C. Neuman e A. Nagy. «Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy». In: *Nat. Methods* 5.6 (giu. 2008), pp. 491–505.
- [20] A. Pesce et al. «Very high resolution structure of a trematode hemoglobin displaying a TyrB10-TyrE7 heme distal residue pair and high oxygen affinity». In: *J. Mol. Biol.* 309.5 (giu. 2001), pp. 1153–1164.
- [21] F. Ritort. «Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications». In: *J Phys Condens Matter* 18.32 (ago. 2006), R531–583.
- [22] J. Sancho. «Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond». In: *Cell. Mol. Life Sci.* 63.7-8 (apr. 2006), pp. 855–864.
- [23] R. M. Simmons et al. «Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap». In: *Biophys. J.* 70.4 (apr. 1996), pp. 1813–1822.
- [24] Steven B. Smith, Yujia Cui e Carlos Bustamante. «[7] Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum». In: *Biophotonics, Part B*. Vol. 361. Methods in Enzymology. Academic Press, 2003, pp. 134–162. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)61009-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)61009-8). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687903610098>.
- [25] K. Visscher, S. P. Gross e S. M. Block. «Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing». In: *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 2.4 (dic. 1996), pp. 1066–1076. ISSN: 1077-260X. DOI: 10.1109/2944.577338.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la prof.ssa Annamaria Zaltron, relatrice di questa tesi, per avermi guidato in maniera costruttiva e appassionata durante la stesura di questo lavoro.