



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea Triennale

Studio del dispiegamento della proteina Flavodossina
tramite misure di spettroscopia di forza ad alta risoluzione
temporale con le pinzette ottiche

Relatore

Dr.ssa Annamaria Zaltron

Laureando

Pasquale Porcu

Anno Accademico 2019/2020

Indice

Introduzione	iii
1 Esperimenti di singola molecola	1
2 Pinzette ottiche	3
2.1 Intrappolamento ottico	4
2.1.1 Regime di Mie (o regime di ottica geometrica)	4
2.1.2 Regime di Rayleigh	5
2.2 Apparato sperimentale	6
3 Sistema biologico	9
3.1 Flavodossina	9
3.2 WLC Model	10
4 Esperimento	13
4.1 Analisi di una tipica curva di unfolding	13
4.2 Verifica del WLC Model e stima di N	16
4.3 Probabilità di sopravvivenza	18
Considerazioni conclusive	21
Riferimenti bibliografici	23

Introduzione

La Biofisica concilia l'approccio prettamente quantitativo della Fisica con quello prevalentemente descrittivo della Biologia. Un terreno comune in cui le idee e le intuizioni della Fisica emergono pienamente nell'analisi dei sistemi biologici sono gli studi che prendono in considerazione una singola molecola volta per volta. Questo tipo di esperienze, che chiameremo nel corso di questa tesi **SMEs**, sigla che si riferisce all'inglese *single molecule experiments*, rappresenta ad oggi lo strumento più utile per indagare le proprietà intrinseche delle biomolecole quali DNA, RNA e proteine. L'obiettivo primario è infatti quello di caratterizzare le funzionalità dei principali costituenti degli organismi viventi e della chimica della vita. Nel nostro caso, ci concentreremo sulle proprietà elastiche di una catena polipeptidica che prende il nome di Flavodossina.

In che cosa si contraddistinguono gli SMEs? Cosa li rende così profondamente utili in questo ambito della ricerca scientifica? Siamo abbastanza convinti che sarebbe molto più "semplice", o per meglio dire "intuitivo", magari in termini di tempo di presa dati, realizzare un esperimento nel quale si prendono in esame una grande quantità di molecole, dello stesso tipo, secondo un approccio direttamente mutuato dalla termodinamica, la quale risulta spesso vincente nel caso in cui si vogliono determinare le caratteristiche del comportamento d'insieme di molte particelle o in generale di costituenti comunque sufficientemente piccoli. Ma chiaramente non è questo il caso. Infatti ci aspettiamo anche che ogni biomolecola segua un qualche "cammino" (in inglese *pathway*) tra i diversi livelli energetici all'interno di quello che impareremo a chiamare *Free Energy Landscape* (**FEL**). Ma pensiamo anche che non tutte le biomolecole seguano questo cammino allo stesso modo, ovvero potremmo supporre che esistano diversi percorsi tra due stati di energia del FEL. In poche parole ogni biomolecola del nostro esperimento sarà inevitabilmente soggetta a delle proprie fluttuazioni rispetto al comportamento d'insieme, fluttuazioni che, accontentandoci di una trattazione media del sistema, chiaramente verrebbero assorbite da quelle di tutte le altre biomolecole dell'insieme. Il problema sorge dal momento in cui in Biofisica siamo interessati proprio a queste fluttuazioni, nel senso che ad esempio vorremmo poter riconoscere l'esistenza di "cammini privilegiati" che collegano stati diversi del FEL e discriminarli da altri eventualmente "impossibili". Questo ci porta inevitabilmente a bocciare l'approccio degli esperimenti d'insieme, e muove la ricerca riguardo a metodi per determinare i parametri delle singole molecole, gli SMEs appunto.

Gli esperimenti di singola molecola di cui discuteremo in questa tesi sono stati realizzati usando lo strumento di Optical Mini-Tweezers, impiegate nello specifico per realizzare esperimenti di spettroscopia di forza ad alta risoluzione temporale su singole proteine di Flavodossina. La Flavodossina è una proteina coinvolta in processi di ossidoriduzione e lo studio presentato in questa tesi mira a mettere in risalto l'eventuale presenza di stati intermedi nel processo di apertura (denaturazione) di questo sistema biologico. La tesi è strutturata come segue:

- Nel primo capitolo viene fatto un rapido confronto tra le varie tecniche ad oggi maggiormente usate per realizzare esperimenti di singola molecola;
- Nel secondo capitolo vengono presentati i principi fisici alla base dell'intrappolamento ottico e lo strumento di pinzette ottiche usato per l'acquisizione dei dati presentati in questa tesi;
- Nel terzo capitolo viene presentato il sistema biologico in esame e il modello teorico del Worm Like Chain, che permette di descriverne le principali proprietà elastiche;
- Nel quarto capitolo vengono presentati i risultati di spettroscopia di forza relativi all'apertura della catena polipeptidica della Flavodossina.

Esperimenti di singola molecola

Gli esperimenti di singola molecola che negli anni sono stati elaborati sono tanti e sono stati realizzati ciascuno con uno strumento di manipolazione che privilegia lo studio di alcune caratteristiche intrinseche della biomolecola invece di altre. Di seguito riporto le tecniche maggiormente diffuse per la realizzazione di esperimenti di singola molecola (SMEs) cercando di mettere in risalto la peculiarità di ciascuno di essi:

Atomic Force Microscopy (AFM) L'apparato è basato sulla capacità di un'asta, alla cui estremità si trova una punta (funzionalizzata biochimicamente) di rivelare la presenza di opportune biomolecole disposte su una superficie. L'asta viene infatti movimentata al di sopra di questa superficie e si flette nel momento in cui la punta all'estremità, o per meglio dire il substrato di cui è ricoperta, riesce ad agganciare una o più delle biomolecole presenti sulla superficie di ancoraggio. La forza di legame dipende proporzionalmente dalla densità delle biomolecole catturate ed è anche proporzionale all'angolo di flessione dell'asta, che viene misurato sfruttando la riflessione sull'asta stessa di un fascio luminoso prodotto da un laser (Fig. 1.1). Il risultato sarà una immagine topografica che rappresenta la distribuzione delle biomolecole sulla superficie. Il principale limite nell'uso della tecnica di AFM è l'impossibilità di prevedere le eventuali interazioni tra la punta dell'asta e le molecole del substrato di cui è ricoperto. La risoluzione delle misure impiegate con l'AFM dipendono fortemente dalle fluttuazioni termiche. Tali imprecisioni sono nell'ordine di $\sqrt{\langle \delta x^2 \rangle} = \sqrt{k_B T / k} \approx 2 \text{ \AA}$ e $\sqrt{\langle \delta f^2 \rangle} = \sqrt{k_B T k} \approx 20 \text{ pN}$, dove k è la rigidità dell'asta considerata, in questo caso dell'ordine di 100 pN/nm [9]. L'AFM perciò è una tecnica ideale per investigare forti interazioni intermolecolari e intramolecolari.

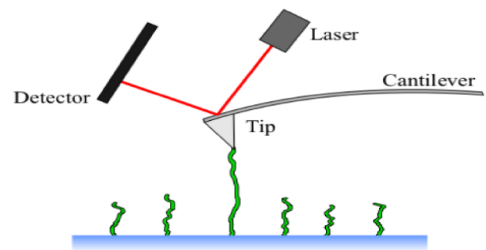


Figura 1.1: Schema di funzionamento [5]

Magnetic Tweezers (MTs) La forza subita da una biglia magnetizzata all'interno di una zona nella quale è presente un campo magnetico \vec{B} non uniforme dipende dal gradiente del campo magnetico e dal momento di dipolo magnetico $\vec{\mu}$ della biglia secondo la relazione $\vec{F} \propto \nabla(\vec{\mu} \cdot \vec{B})$. Il principio sul quale si basano le MTs consiste in una biglia magnetica intrappolata in una regione caratterizzata da un opportuno gradiente di campo magnetico il cui profilo segue dalla configurazione spaziale di due magneti (Fig. 1.2). Il corretto posizionamento della biglia viene determinato osservando il sistema dall'obiettivo microscopico di una CCD camera. La superficie della biglia è funzionalizzata biochimicamente per l'attacco di un'opportuna biomolecola. Seguono quindi esperimenti di *pulling* (trazione) e *twisting* (torsione) a seconda della movimentazione dei magneti i quali modificano il profilo del campo magnetico che intrappola la biglia. L'uso delle MTs ha numerosi vantaggi, riguardanti principalmente la sensibilità che questo sistema possiede nel range di basse forze (tipicamente per $F < 10 \text{ pN}$). D'altra parte le esigue dimensioni della biglia consentono di approssimare il gradiente del campo magnetico

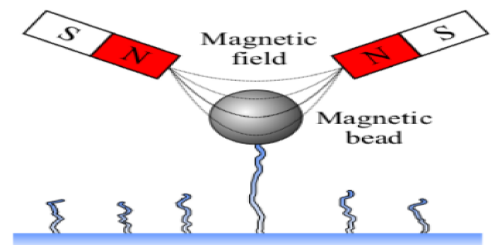


Figura 1.2: Schema di funzionamento [5]

come localmente costante. Valori tipici della rigidità della trappola sono di 10^{-4} pN/nm, si tratta quindi di una sistema molto sensibile al di sotto dei 10 pN con una non ottimale risoluzione spaziale. Le MT sono utilizzate specialmente per indagare le proprietà elastiche, soprattutto quelle torsionali, delle biomolecole di DNA e nello studio di processi che riguardano motori molecolari.

Optical Tweezers (OTs) Rappresentano un'ottima via di mezzo tra un sistema molto sensibile (adatto però a investigare interazioni molto deboli e per questo soggetto anche a una possibile scarsa risoluzione spaziale come nel caso dell'MT) e un sistema come quello dall'AFM con un potere risolutivo maggiore ma con una rigidezza adatta esclusivamente alla misura di interazioni "forti" e per questo soggetta ad una scarsa risoluzione in forza. Le pinzette ottiche, di cui parleremo maggiormente in dettaglio nel corso dell'elaborato e di cui è possibile osservare un semplice schema in Fig. 1.3, possiedono infatti una risoluzione nella forza sufficientemente bassa da permettere lo studio delle biomolecole, nell'ordine di 0.1 pN e al tempo stesso si tratta di un sistema caratterizzato da valori di rigidezza compresi all'incirca tra 10^2 e 10^4 volte più piccoli dell'AFM. Questo consente prima di tutto un adeguato controllo del corpo intrappolato sia in termini di forza che di movimentazioni.

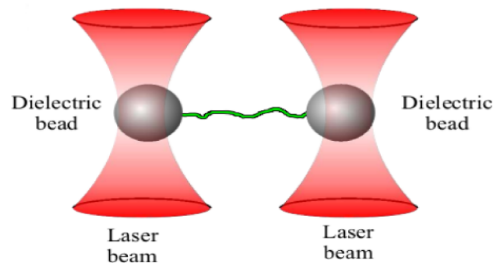


Figura 1.3: Schema di funzionamento [5]

	AFM	MT	OT
Risoluzione spaziale (nm)	0.5/1	5/10	0.1/2
Risoluzione temporale (s)	10^{-3}	$10^{-1}/10^{-2}$	10^{-4}
Rigidezza ($\text{pN} \cdot \text{nm}^{-1}$)	$10/10^5$	$10^{-3}/10^{-6}$	0.005/1
Range di forza (pN)	$10/10^4$	$10^{-3}/10^2$	0.1/100
Range di spostamento (nm)	$0.5/10^4$	$5/10^4$	$0.1/10^5$
Dimensione della sonda (μm)	100/250	0.5/5	0.25/5

Tabella 1.1: Confronto sinottico delle principali caratteristiche di esperimenti di singola molecola realizzati con diverse tecniche [7]. Nel nostro caso la risoluzione temporale delle pinzette ottiche usate è un ordine di grandezza inferiore per l'implementazione del set-up, di cui parleremo in seguito, di un sistema di campionamento del segnale ad alta frequenza

Pinzette ottiche

Il sistema delle pinzette ottiche nasce nel 1970 da un'idea di Artur Ashkin, il quale si rese conto che fasci luminosi altamente focalizzati sono in grado di accelerare oggetti molto leggeri. Questa idea è stata poi sviluppata nel corso degli anni e ad oggi la tecnica delle OTs viene sfruttata principalmente per esperimenti di manipolazione ottica, che permettono di realizzare non solo studi di biofisica, ma anche di termodinamica, microreologia e nano-strutturazione.

Nella sua prima formulazione, una luce nell'infrarosso, focalizzata da un obiettivo a grande apertura numerica (NA), viene sfruttata in una conformazione tale per cui si riesce a creare una trappola stabile pur senza danneggiare i composti biologici che si intendono studiare. Vicino al punto di fuoco del fascio laser il potenziale ottico generato dalla trappola ha un andamento pressoché armonico e pertanto la forza esercitata è di tipo elastico, cioè proporzionale alla distanza dell'oggetto intrappolato rispetto al centro della trappola. Vedremo maggiormente in dettaglio nella successiva sezione l'espressione delle forze che interessano il sistema. In Figura 2.1 sono rappresentate alcune possibili configurazioni di pinzette ottiche, nello specifico utilizzando due fasci contropropaganti anziché uno solo come nella prima trappola di Ashkin.

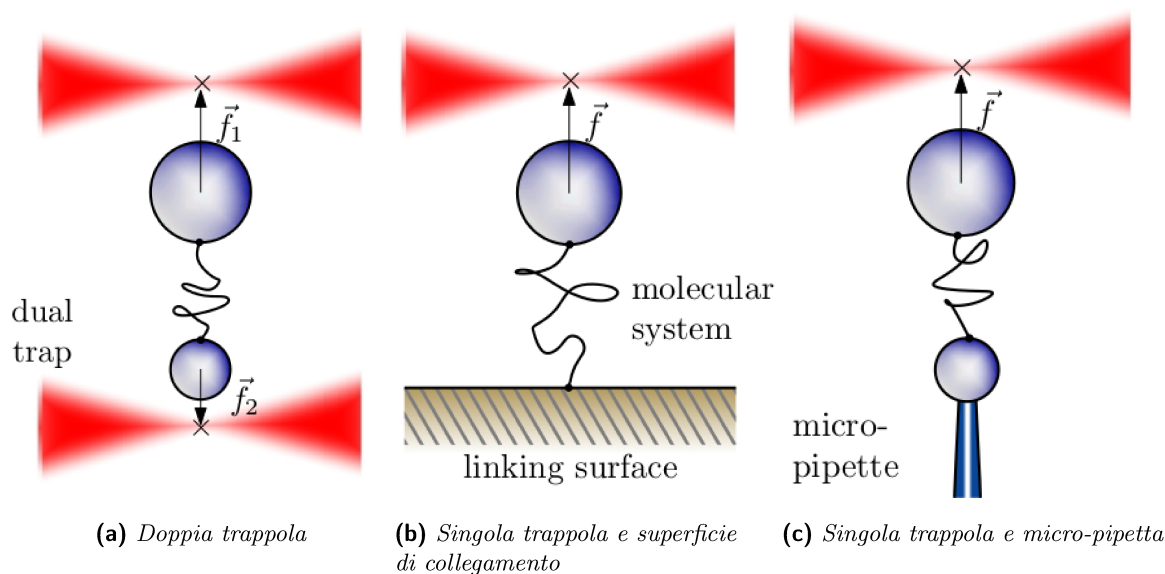


Figura 2.1: Esistono diversi modi per sfruttare l'intrappolamento ottico in esperimenti di singola molecola [1]: (a) La biomolecola è attaccata al substrato di cui sono ricoperte le superfici delle due sferette, in questo caso l'applicazione della forza sulla molecola avviene agendo su ciascuna delle due trappole ottiche; (b) La biomolecola è ancorata ad una superficie da un lato, mentre l'altra estremità è legata alla sferetta intrappolata dal fascio di luce, la forza che agisce sulla biglia è data dallo spostamento della trappola ottica; (c) In questa configurazione una delle biglie è intrappolata otticamente, l'altra invece è fissata per suzione ad una micropipetta, anche in questo caso si agisce sul sistema muovendo opportunamente la trappola ottica. Sarà proprio quest'ultima la configurazione usata nell'esperienza descritta in questa tesi.

Per spiegare il principio di funzionamento delle pinzette ottiche esistono tre principali modelli teorici fenomenologici. Essi fondamentalmente si distinguono per le dimensioni in gioco, espresse nel rapporto tra la grandezza del diametro d della biglia intrappolata e la lunghezza d'onda λ del fascio luminoso

intrappolante: nel caso in cui ($d \gg \lambda$) siamo in regime di Mie, in cui prevalgono gli effetti dell'Optica geometrica, nel caso opposto ($d \ll \lambda$) ci troviamo in regime di Rayleigh: la biglia si può considerare come un dipolo elettrico immerso in un campo magnetico uniforme. Considerazioni intermedie ai due regimi sono quelle riguardanti il caso in cui $d \approx \lambda$, in questo caso si usa la teoria generalizzata di Lorenz-Mie (GLMT), in cui si cerca di risolvere le equazioni di Maxwell con opportune condizioni al contorno. Notare che nel nostro caso la lunghezza d'onda è quella dell'infrarosso con $\lambda = 0.805 \mu\text{m}$ e il diametro della biglia misura $d = 1 - 2 \mu\text{m}$, perciò ricadiamo nell'ultima casistica, questo come vedremo avrà conseguenze importanti nell'espressione della forze agenti.

2.1 Intrappolamento ottico

La pressione di radiazione è quella esercitata da una radiazione elettromagnetica su una qualsiasi superficie. Nel 1970 Arthur Ashkin dimostrò sperimentalmente che la pressione di radiazione dovuta a sorgenti di luce sufficientemente intense (come i laser) poteva essere utilizzata per spostare particelle microscopiche (nell'ordine di grandezza di pochi micrometri) sospese in liquidi o gas. Questo comportamento può essere spiegato servendoci della legge di conservazione della quantità di moto e in generale delle leggi dell'Optica e dell'Elettromagnetismo. Infatti, in quanto veicolata dai fotoni, la luce possiede una quantità di moto e per ciascun fotone possiamo scrivere:

$$\vec{p} = n_\lambda \frac{h}{\lambda} \hat{e}_p \quad (2.1)$$

dove h è la costante di Planck, λ è la lunghezza d'onda della radiazione, \hat{e}_p è il versore diretto lungo il verso della quantità di moto del fascio, che corrisponde con la direzione della sua propagazione, n_λ rappresenta il numero di fotoni appartenenti al fascio.

2.1.1 Regime di Mie (o regime di ottica geometrica)

Ci si aspetta che, dall'interazione del fascio luminoso proveniente dal laser e la biglia, una piccola porzione della radiazione venga riflessa mentre la restante parte venga rifratta seguendo la legge di Snell, per cui il raggio luminoso continua a propagarsi all'interno della sfera seguendo una direzione diversa rispetto a quella di incidenza. Di conseguenza, la radiazione continua a propagarsi all'interno della sfera fintanto che non incontra per la seconda volta la superficie (stavolta dall'interno) della biglia, proprio come è possibile vedere schematicamente in Fig. 2.2. Anche in questo caso continueranno a valere la conservazione dell'energia e la legge di Snell, per cui la radiazione in parte viene nuovamente trasmessa, con angolazione differente da quella di incidenza, e in parte riflessa.

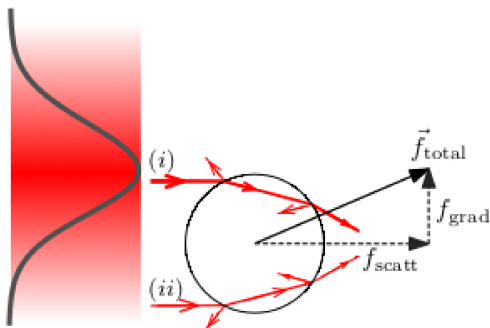


Figura 2.2: Schema Ottico dell'interazione tra fascio laser di forma Gaussiana e sferetta [1]

L'Eq. 2.1 impone che la quantità di moto debba cambiare, sia in modulo, perché il numero di fotoni trasmessi e riflessi varia in accordo con i coefficienti di trasmissione e riflessione del materiale di cui è fatta la biglia, sia in direzione per effetto della legge di Snell. Tuttavia la quantità di moto complessiva del sistema fascio luminoso+biglia *deve* conservarsi. Cioè la quantità di moto persa dal fascio necessariamente viene acquisita dalla biglia o viceversa e questo vale anche per ciascuna delle componenti spaziali della quantità di moto. La legge di conservazione della quantità di moto diventa in realtà una condizione su ciascuna delle tre direzioni del moto (in Fig. 2.2 è riportato per semplicità il caso in 2d). Vedremo di qui a poco come l'adozione di un determinato sistema di coordinate

(quello delle coordinate cilindriche) consenta di tradurre la variazione della quantità di moto per la biglia in due componenti di forza tra loro ortogonali, dette *di scattering* (\vec{F}_{scatt}) e *di gradiente* (\vec{F}_{grad}) [13]. Nel corso di tutta questa piccola trattazione assumeremo che il fronte d'onda del laser abbia un profilo

gaussiano, questo significa che l'intensità possiede un picco centrale e decresce gradualmente dal centro allontanandoci dall'asse di propagazione. Se l'intensità è maggiore significa che il fattore n_λ deve essere maggiore sul picco della gaussiana. Delle due forze che agiscono sulla biglia colpita dal raggio luminoso, la forza di scattering agisce lungo la direzione di propagazione \hat{e}_p , mentre la forza di gradiente costringe la biglia a restare presso la zona dove l'intensità è maggiore, nel nostro caso corrispondente al centro del fascio.

2.1.2 Regime di Rayleigh

Forza di scattering L'espressione della forza di scattering può essere ricavata direttamente dalla nozione di pressione di radiazione (P_{rad}) per cui: $F_{scatt} = P_{rad} \cdot \sigma$ in cui $P_{rad} = \frac{n_m \langle S \rangle}{c}$; n_m è l'indice di rifrazione del mezzo, $\langle S \rangle$ rappresenta il modulo del vettore di Poynting il quale corrisponde a sua volta all'intensità incidente I_{inc} del fascio, σ è la sezione d'urto tra fascio luminoso e biglia e data la forma sferica di quest'ultima vale:

$$\sigma = \frac{8\pi k^4 r^6}{3} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2$$

dove nel passaggio abbiamo sostituito l'espressione del numero d'onda $k = \lambda/2\pi$, m rappresenta il rapporto dei coefficienti di rifrazione di biglia e mezzo: $m = n_b/n_m$. Sostituendo nella espressione iniziale della F_{scatt} otteniamo:

$$F_{scatt} = n_m \frac{I_{inc}}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (2.2)$$

Forza di gradiente Possiamo ricavare un'espressione per \vec{F}_{grad} a partire dalla nozione della forza elettrostatica che agisce su un dipolo elettrico (a questo proposito occorre ricordare che la biglia intrappolata è dielettrica), per cui avremo che il momento di dipolo elettrico è $\vec{p} = \alpha \cdot \vec{E}$, dove α rappresenta la polarizzabilità del materiale di cui è fatta la sferetta, nel nostro caso vale:

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)$$

Ricordando che per un dipolo elettrico la forza è data da $\vec{F} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E}$ e, data la simmetria del sistema, sfruttando un sistema di coordinate cilindriche si ottiene per la forza di scattering la stessa espressione riportata in Eq. 2.2 e per la forza di gradiente:

$$\vec{F}_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{n_m^2 c} \nabla I_{inc} = r^3 \frac{2\pi}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I_{inc} \quad (2.3)$$

Per $m > 1$, $n_b > n_m$, la biglia viene spinta dalla forza gradiente verso il centro del fascio perché, stando all'ipotesi di fronte d'onda gaussiano, è lì che l'intensità è maggiore, altrimenti ($m < 1$) la biglia scapperebbe via dal fascio decretando il fallimento del processo d'intrappolamento.

Sebbene le precedenti considerazioni siano ottenute in regimi differenti rispetto a quello in cui in realtà operiamo nel nostro esperimento, si dimostra che i risultati ai quali giungiamo tramite la trattazione appena esposta restano validi con buona approssimazione anche nel regime intermedio.

Non solo, per una trappola ottica generata da un singolo fascio avremo bisogno di una lente a grande apertura numerica (NA) affinché il raggio sia ben focalizzato e le forze di gradiente possano prevalere su quelle di scattering. Nel nostro caso invece, la configurazione dell'apparato prevede che l'intrappolamento della biglia avvenga usando un sistema di due fasci contropropaganti, questo significa che, nell'equazione della dinamica della biglia $\vec{F}_{tot} = \vec{F}_{scatt} + \vec{F}_{grad}$, le forze di scattering relative a ciascun fascio luminoso si compensino l'una con l'altra. Quella di gradiente resta perciò l'unica componente di

forza ad agire realmente sul sistema dato che quelle di ciascun fascio luminoso si sommano all'interno dell'equazione delle forze con verso concorde.

2.2 Apparato sperimentale

Diamo adesso un'occhiata nel dettaglio a quali sono gli strumenti che rendono possibile l'intrappolamento ottico e l'esperimento di singola molecola di cui parleremo nelle prossime sezioni.

Il sistema di pinzette ottiche che impiegheremo, noto come mini-tweezers, è stato sviluppato dal gruppo di ricerca di Steve B. Smith e Carlos Bustamante della University of Berkeley nel 2003 [10,11]. Il nome deriva dal fatto che questo set-up sperimentale è più "compatto" rispetto ad altri sistemi di OTs.

L'esperimento avviene all'interno di una camera microfluidica riempita con una soluzione salina. Il sistema molecolare in oggetto viene studiato seguendo la geometria schematizzata in Fig. 2.1(c); come accennato in precedenza una delle due biglie è intrappolata tramite l'uso di due raggi luminosi contro-propaganti emessi da due laser nell'infrarosso, una seconda biglia è invece attaccata per suzione all'estremità di una micropipetta. Le biglie sono funzionalizzate biochimicamente, e costituiscono i siti di aggancio delle estremità della biomolecola studiata. In Fig. 2.3 sono riportati alcuni dettagli che riguardano l'apparecchiatura impiegata.

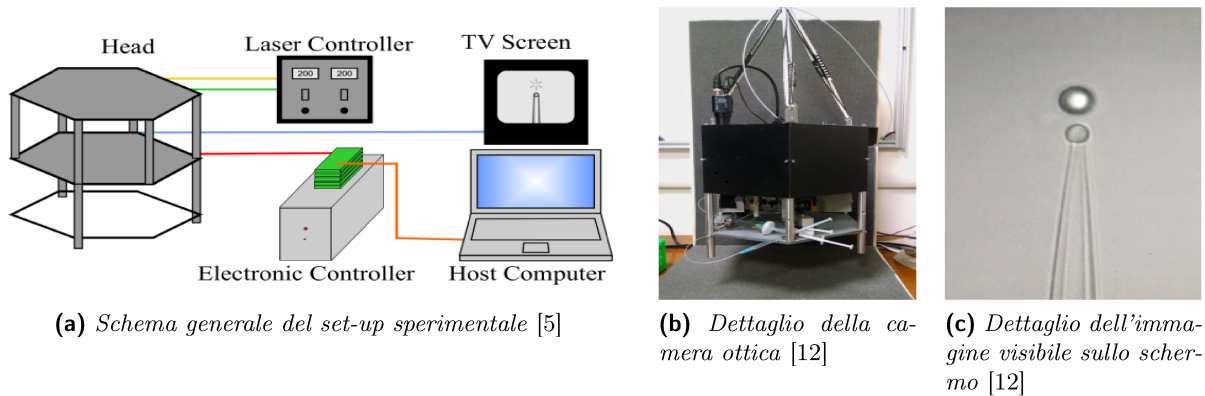


Figura 2.3: Immagini dell'apparato sperimentale delle Optical mini-Tweezers utilizzato nell'esperienza

Laser e cammino ottico La trappola ottica è generata da due fasci contropropaganti di lunghezza d'onda pari a 805 nm, ciò come già visto consente di eliminare la presenza della forza di scattering, rendendo il sistema più stabile ed inoltre, permette di raccogliere in maniera più efficiente la luce deflessa dalla biglia. La non eccessiva focalizzazione del fascio permette anche di ridurre il riscaldamento per assorbimento nell'infrarosso dell'acqua presente all'interno della camera microfluidica. I fasci sono generati da due laser a diodo LUMICS SN0834770, la luce prodotta entra in una fibra ottica monomodale, che fornisce la componente trasversale del campo elettromagnetico. Il fascio prodotto ha un profilo gaussiano ed è polarizzato linearmente. L'intensità e la temperatura del laser sono monitorati tramite un apposito sistema di controllo. I fasci seguono un percorso speculare all'interno dello strumento. In Fig. 2.4 è riportato schematicamente il percorso ottico dei due fasci luminosi.

Dal momento che i due fasci compiono lo stesso percorso in maniera simmetrica, per semplicità verrà descritto solo quello di un singolo fascio. Come detto prima, la luce in uscita dal laser entra in una fibra ottica monomodale, la quale è manovrata da un sistema chiamato *wiggler* che ne permette lo spostamento tramite due cristalli piezoelettrici detti anche *attuatori*, in particolare i due attuatori piezoelettrici hanno il ruolo di movimentare l'estremità della fibra, questo movimento comporta anche lo spostamento della trappola ottica. Il fascio, in uscita dalla fibra, incontra una pellicola che riflette il 5% della luce verso un sensore di posizione, il *Position Sensitive Detector*, PSD detto anche *light-lever*. Esso fornisce informazioni sulla posizione della trappola ottica. Prima di arrivare al PSD la luce attraversa una lente asferica, che permette di focalizzare il fascio senza introdurre aberrazioni. Il rimanente fascio trasmesso viene collimato da una lente ed incontra il *Polarising Beam Splitter* (PSB) il quale lo riflette completamente e seleziona la luce polarizzata orizzontalmente che verrà subito dopo

convertita in polarizzazione circolare da una lamina quarto d'onda ($\lambda/4$). La radiazione viene quindi nuovamente focalizzata da un obiettivo a immersione (Olympus UPLSAPO 60xW, NA=1.2) in un punto focale interno alla camera fluidica. Utilizzare luce polarizzata circolarmente garantisce che la forza che agisce sulla biglia non dipenda dalla polarizzazione della luce incidente. La luce che fuoriesce dalla parte opposta della camera microfluidica viene raccolta da una seconda lamina $\lambda/4$. Incontra due PBS: viene completamente trasmessa dal primo mentre il secondo la riflette, direzionandola verso i sensori di forza. Dopo aver incontrato una lente di relay il fascio incide su un altro Beam Splitter, che direziona la parte trasmessa sul detector delle forze lungo le componenti trasverse x e y e la parte riflessa su un secondo sensore che registra la forza lungo la componente z . La polarizzazione prima orizzontale e poi verticale del fascio garantisce la non interazione dei due fasci nei cammini ottici comuni.

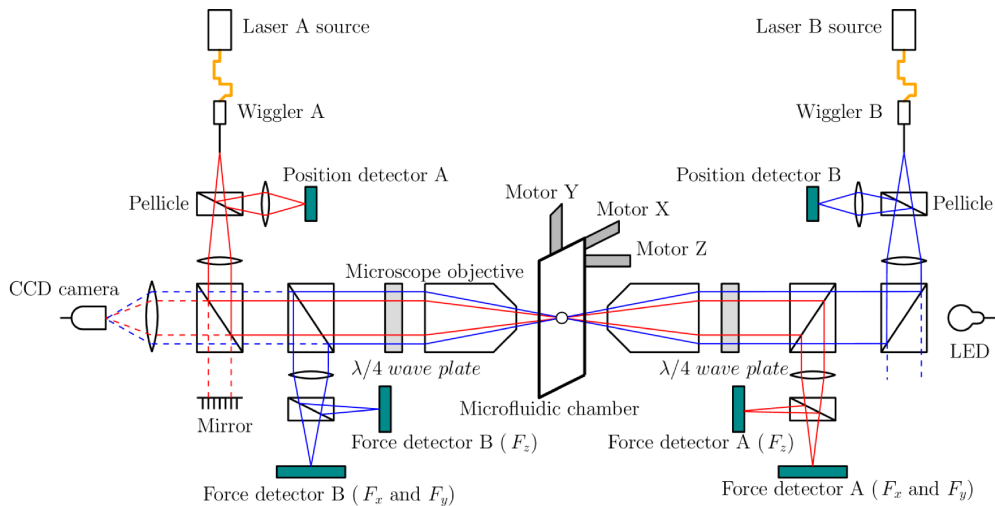


Figura 2.4: Schema del cammino ottico dei due fasci luminosi, i due fasci contro-propaganti sono segnalati con colori diversi, rosso e blu [12]

Sensori di posizione e forza Il rilevamento della posizione della trappola e dei valori di F_x e F_y avviene tramite sensori PSD (PSI Optoelectronics, DL-10), che forniscono un segnale di corrente proporzionale allo spostamento del centroide dello spot luminoso che colpisce l'area attiva. In particolare la corrente raccolta risulta proporzionale alla distanza tra il punto su cui ha inciso il fascio e uno dei quattro elettrodi posti in ciascuno dei suoi lati. La posizione in z viene invece ricavata antepoendo un filtro *bulleye* a un fotodiode (OSI Optoelectronics, PIN-10DI). Il detector rivelerà una potenza che dipende dalla dimensione del fascio, che varia a sua volta a seconda della posizione lungo l'asse z della biglia.

Sistema di imaging La configurazione composta dalla biglia intrappolata otticamente e dalla micropipetta viene visualizzata grazie ad un sistema di imaging costituito da una luce LED blu ($\lambda = 470\text{nm}$), la cui posizione è riportata anche in Fig. 2.4 e una camera CCD Watec WAT-902H3 SUPREME. La luce di illuminazione passa attraverso una lente che permette di ottenere la condizione di Köhler, illuminando in maniera uniforme l'oggetto, posto in questo caso sul piano focale dei due obiettivi. Il risultato è l'immagine riportata anche in Fig. 2.3(c). L'immagine viene proiettata tramite un'altra lente sul CCD della camera, che rileva nel vicino infrarosso, così da poter vedere all'occorrenza sia il laser, sia l'esperimento (biglia e micropipetta). Quando la biglia viene intrappolata dal fascio laser, le immagini dello spot luminoso e della biglia sono sovrapposte, ma la luce del fascio satura la zona del CCD che colpisce e questo rende impossibile la visuale della biglia. Per evitare questo problema prima della camera viene collocato un filtro infrarosso che permette di oscurare il fascio durante l'esperimento.

Camera micro-fluidica L'esperimento è condotto all'interno di una camera microfluidica inserita tra due obiettivi ad immersione (in acqua). La camera è costituita di due coprivetrini ($24\text{ mm} \times 60$

mm \times 150 μ m ognuno) tra i quali sono posti due strati di parafilm, opportunamente tagliato così da formare tre canali paralleli, come visibile in Fig. 2.5. Tra i due strati di parafilm sono inseriti i tubi dispensatori e la micropipetta. I canali laterali sono messi in comunicazione tramite dei tubi dispensatori (King Precision Glass, Inc. $ID = (0.040 \pm 0.006)$ mm, $OD = (0.10 \pm 0.01)$ mm), mentre la micropipetta è posta al centro della camera, in maniera tale che la sua punta sia al centro del canale centrale. La micropipetta è stata realizzata tramite uno strumento chiamato *Pipet Puller*, di cui parleremo più tardi, a partire da tubi simili a quelli dispensatori, ma di spessore minore (King Precision Glass, Inc. $ID = (0.040 \pm 0.006)$ mm, $OD = (0.08 \pm 0.01)$ mm). Su uno dei due coprivetrini sono realizzati dei fori in corrispondenza delle estremità dei canali per permettere l'inserimento e la fuoriuscita del buffer del materiale biologico e delle biglie. La camera micro-fluidica viene montata su un opportuno supporto, che permette di posizionarla in mezzo ai due obiettivi nell'OT, in una posizione tale che il centro del canale centrale si trovi nella zona in cui i due fasci contropropaganti vengono focalizzati. La posizione del supporto, e della camera, una volta montato può essere variata utilizzando dei motori che permettono movimenti lungo le tre direzioni.

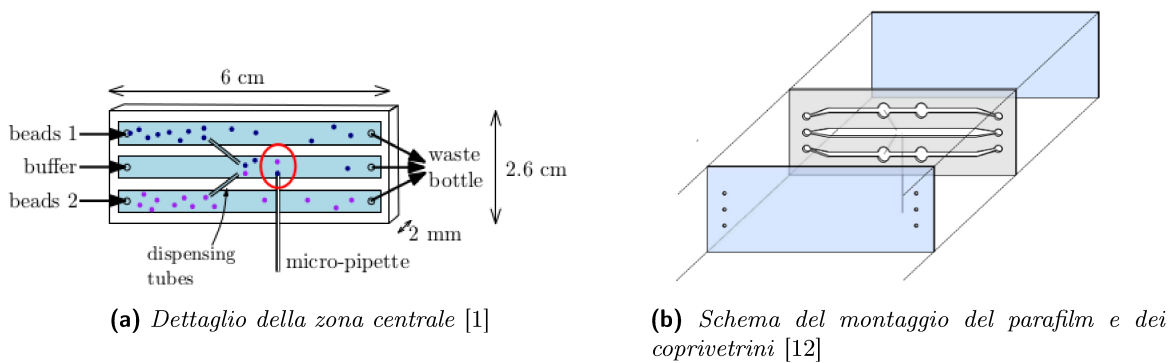


Figura 2.5: Alcune immagini relative alla camera micro-fluidica dell'apparato sperimentale

Pipet Puller Il Pipet Puller è uno strumento che permette di realizzare delle pipette con punta micrometrica usando dei capillari di vetro. Il principio del funzionamento sfrutta le alte temperature e la forza di gravità per fondere il capillare e conferirgli una forma allungata. Si veda a proposito la Fig. 3.3. Il sistema è costituito da un filo di tungsteno arrotolato in due spire collegato ad un generatore che fornisce una differenza di potenziale $\Delta V = 1.5$ V. Il filamento viene percorso dalla corrente e si scalda per effetto Joule, la zona racchiusa tra le spire subisce un incremento di temperatura che viene utilizzato per fondere e modellare il vetro. Il circuito compreso di generatore e filamento di tungsteno può essere trattato come un RC, il cui tempo caratteristico τ può essere variato tramite un potenziometro. Si può mostrare che la variazione della distanza tra le spire incide notevolmente sulla dimensione finale della punta della micropipetta, in particolare tanto maggiore è τ , tanto più larga è la punta che si ottiene.

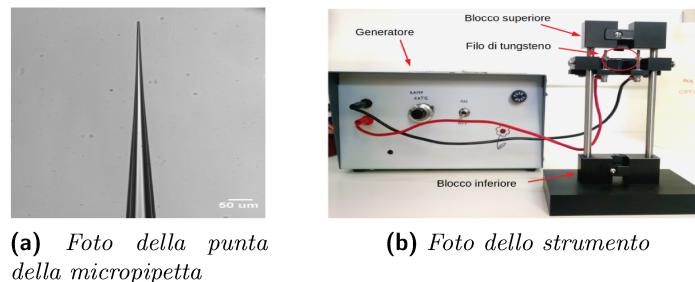


Figura 2.6: Alcune immagini relative al Pipet Puller impiegato nell'esperimento [12]

Sistema biologico

3.1 Flavodossina

Le proteine sono catene di amminoacidi scelti tra 20 tipi diversi. La tipologia e il numero di amminoacidi che compongono la catena polipeptidica, nonché la conformazione nell'insieme della proteina legata al ripiegamento spaziale della catena su sé stessa, ne determina la funzionalità biologica. Da qui l'interesse verso lo studio di tali modalità di ripiegamento, infatti la presenza di proteine "difettose" nel compiere il processo di folding o unfolding determina la presenza di difetti nello svolgimento di eventuali funzioni biologiche, anche importanti per le cellule che necessitano della proteina. In generale possiamo riconoscere per una proteina differenti tipi di strutture a seconda del livello di descrizione nel quale si svolge la propria indagine:



Figura 3.1: Rappresentazione della conformazione spaziale della proteina Flavodossina

- **Struttura primaria:** indica la sequenza di amminoacidi;
- **Struttura secondaria:** si tratta dell'insieme di sotto-strutture altamente modellate (α elica e β foglietto ripiegato) o segmenti di catena che assumono una forma non stabile. Le strutture secondarie sono definite a livello locale, il che significa che possono esistere molti differenti modelli secondari in una singola molecola proteica;
- **Struttura terziaria:** rappresenta la forma globale di una singola molecola proteica, ossia la relazione spaziale del modello della struttura secondaria con un altro;
- **Struttura quaternaria:** determina la forma o la struttura che risulta dall'unione di più molecole proteiche, le cui singole funzioni prendono parte alla funzione globale del complesso proteico.

Il sistema biologico oggetto di studio di questa tesi è la proteina Flavodossina, una catena polipeptidica che lavora come trasportatrice di elettroni. È costituita di 170 amminoacidi raggruppati in una struttura secondaria $\alpha\beta\alpha$, come osservabile nella Fig. 3.1, in essa possiamo notare 5 foglietti β e 5 eliche α ordinati in maniera ben precisa. Nello svolgimento della sua funzione biologica, la proteina è fortemente legata ad una molecola di Flavina mononucleotide (FMN) che costituisce la componente ossidoriduttiva del sistema. Tuttavia, in questo preliminare lavoro di tesi si è studiato la proteina nella sua forma holo, ossia in assenza del cofattore FMN, mentre l'interazione tra quest'ultimo e la proteina stessa sarà oggetto di studi futuri.

Il prossimo capitolo verterà sull'indagine sperimentale della forza di legame tra gli amminoacidi della Flavodossina, prima però è necessario introdurre un modello per spiegare la risposta elastica della proteina stessa alle forze che intendiamo applicare.

3.2 WLC Model

La corretta interpretazione degli stati di ripiegamento esplorabili da una proteina all'interno del proprio FEL passa attraverso lo studio delle proprietà elastiche della biomolecola. A questo proposito, abbiamo già ribadito l'importanza di eseguire esperimenti di singola molecola, ed in particolare di pulling tramite le pinzette ottiche, i quali consentirebbero infatti di creare una statistica sufficiente ad individuare tutte le modalità di ripiegamento della catena polipeptidica. Ciò rappresenta un aspetto cruciale dal momento che differenti configurazioni spaziali di ripiegamento, a cui corrispondono diverse strutture terziarie, favoriscono l'una o l'altra funzione biologica. Alcuni esempi di FEL sono riportati in Fig. 3.2.

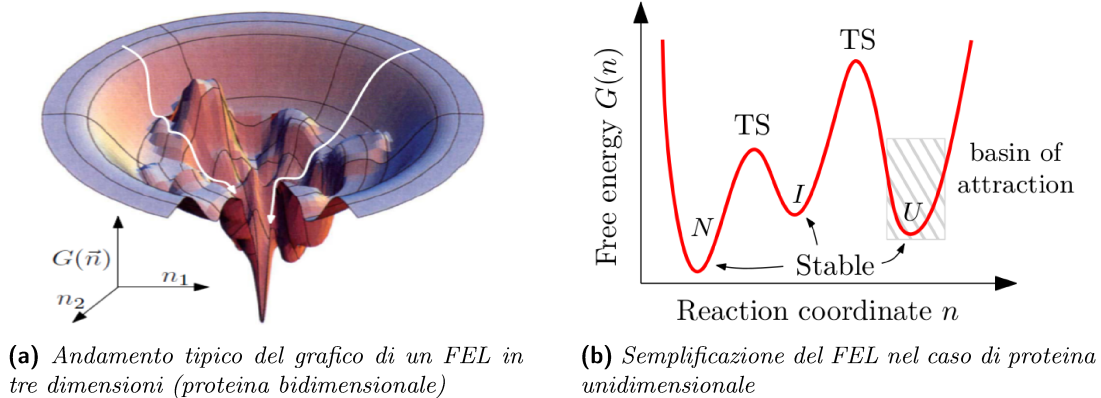


Figura 3.2: Il Free-Energy Landscape possiede graficamente la caratteristica forma ad imbuto [1]

Le proprietà elastiche delle biomolecole possono essere indagate tramite opportuni modelli teorici, uno di questi è il *Worm Like Chain Model (WLC)* che tratta le biomolecole alla stregua di un polimero, ovvero come una "catena"¹. In questo senso la proteina in questione può subire fondamentalmente tre tipologie di deformazione:

- *stretching* (o "allungamento"): descritto da $u(s) = \Delta(ds)/ds$ in cui ds rappresenta il segmento infinitesimo di "catena" attorno a un qualunque suo punto s ;
- *bending* (o "piegamento"): misura come varia il vettore unitario tangente alla corda nel punto s , in questo caso la deformazione è data da $\vec{\beta}(s) = d\hat{t}/ds$;
- *twisting* (o "torsione"): definisce la rotazione della "catena" attorno al proprio asse, data da $\omega(s) = \Delta\phi/ds$ con ϕ che denota l'angolo di rotazione.

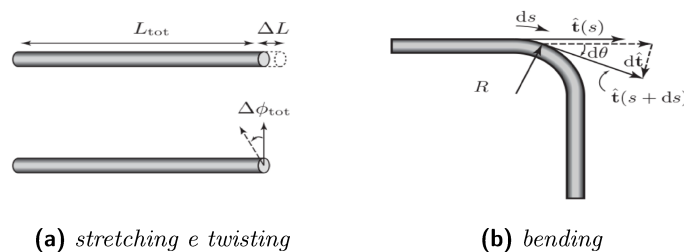


Figura 3.3: Rappresentazione delle possibili deformazioni di un polimero nel modello WLC [12]

¹Nel spiegare i calcoli che seguiranno non faremo distinzione tra proteina, corda e catena

Possiamo calcolare la variazione di energia del polimero proteina sommando i contributi dovuti a ciascuna delle distorsioni:

$$dE(s) = \frac{1}{2} \left[A(\beta(s))^2 + B(u(s))^2 + C(\omega(s))^2 + 2D u(s) \omega(s) \right] ds \quad (3.1)$$

con gli opportuni coefficienti dati dalle costanti fenomenologiche A , B , C , D .

Nel caso di esperimenti di pulling come il nostro, i termini di allungamento e piegamento prevalgono su quelli di torsione, quindi trascureremo quest'ultimo nel seguito della trattazione ponendo idealmente $\omega(s) = 0$. Decidiamo inoltre di non tenere conto neanche dei possibili effetti di allungamento della catena, cioè consideriamo il polimero come inestensibile.

Il contributo di piegamento è proporzionale al quadrato della variazione del vettore tangente, la quale si può scrivere come l'inverso del cosiddetto raggio osculatore R .

$$\frac{dE_b(s)}{ds} = \frac{A}{2} \left| \frac{d\vec{t}}{ds} \right|^2 = \frac{A}{2R^2} \quad (3.2)$$

Il termine di piegamento lungo la direzione di tiraggio si scrive come:

$$\frac{dE_a(s)}{ds} = -F \cos \theta(s) \quad (3.3)$$

dove $\theta(s)$ è l'angolo formato dalla direzione della forza di trazione e quella del tratto infinitesimo ds . Per calcolare l'energia complessiva del sistema secondo il modello WLC integriamo dE su tutta la catena.

$$E_{WLC} = \int_0^{L_0} \left[\frac{A}{2} \left| \frac{d\vec{t}}{ds} \right|^2 - F \cos \theta(s) \right] ds \quad (3.4)$$

dove $L_0 = N \cdot d_{aa}$ è la *lunghezza al contorno* della "corda" polimerica (proteina), definita come il massimo valore di lunghezza possibile per la corda, ottenuto sommando le distanze dei monomeri (amminoacidi) che la compongono, infatti N rappresenta il numero di legami peptidici mentre d_{aa} è la lunghezza media del legame.

Ricaviamo un'espressione per la funzione di partizione come:

$$Z(L_0, F, \vec{t}_0, \vec{t}_1) = \int_{\vec{t}_0}^{\vec{t}_1} g(\vec{t}) e^{-\beta E_{WLC}} d\vec{t} = \left\langle \vec{t}_1 \left| e^{-\frac{L_0}{L_p} \hat{H}_{WLC}} \right| \vec{t}_0 \right\rangle \quad (3.5)$$

Spieghiamo i termini che compaiono nell'Eq. 3.5. Nel membro di mezzo, $\beta = 1/k_B T$ è il fattore di Boltzmann, $g(\vec{t})$ rappresenta la variabile su cui effettuare l'integrazione nello spazio dei cammini che collegano il punto $\vec{t}(s=0) = \vec{t}_0$ con il punto $\vec{t}(s=L_0) = \vec{t}_1$, situati sulla superficie di una sfera di raggio unitario.

L'ultimo membro rappresenta un modo equivalente di esprimere la funzione $Z(L_0, F, \vec{t}_0, \vec{t}_1)$ di partizione come media tra lo stato $|\vec{t}_0\rangle$ e $|\vec{t}_1\rangle$ dell'operatore di Hamilton \hat{H}_{WLC} dato dalla seguente espressione:

$$\hat{H}_{WLC} = -\frac{1}{2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} - \alpha \cos \theta \quad (3.6)$$

$\alpha = \beta L_p F$ dove L_p definita da $L_p = A/k_B T$ è detta *lunghezza di persistenza* e rappresenta la distanza entro la quale i vettori tangenti \vec{t} restano correlati, ovvero corrisponde alla distanza al di sotto della quale la catena può essere considerata rigida.

Ottenuta un'espressione per \hat{H}_{WLC} , possiamo risolvere l'equazione agli autovalori

$\hat{H}_{WLC} \Psi_n = \epsilon_n \Psi_n$, dove gli ϵ_n rappresentano gli autovalori e le Ψ_n le autofunzioni ad essi relative. Nella pratica $L_0 \gg L_p$, questo giustifica l'utilizzo di metodi perturbativi nella risoluzione dell'equazione appena citata e ci consente di considerare il solo contributo dello stato fondamentale ϵ_0 , ed eventualmente aggiungere elementi correttivi fino ad un certo ordine a seconda della risoluzione ricercata. Il problema consiste quindi nel risolvere l'equazione per lo stato fondamentale, di cui adesso cerchiamo

un'espressione più semplice. All'ordine zero vale la seguente relazione:

$$\ln Z = -\frac{L_0}{L_p} \epsilon_0(\alpha) + O(1) \quad (3.7)$$

L'energia libera (di Gibbs) è calcolabile a partire dalla funzione di partizione come: $G = k_B T \ln Z$. Per la relazione di Eulero $G = U + PV - TS$, con ovvi significati per le grandezze in gioco. Nel nostro caso converrà scriverla in termini di coordinate infinitesime dove possiamo mettere in evidenza il fattore di allungamento z , da $dG = -z dF - S dT$ si ha:

$$z = \frac{\partial G}{\partial F} = k_B T \frac{\partial \ln Z}{\partial F} \quad (3.8)$$

Dividendo entrambi i membri per L_0 si ottiene:

$$\frac{z}{L_0} = \frac{1}{\beta L_0} \frac{\partial \ln Z}{\partial F} = -\frac{\partial \epsilon_0(\alpha)}{\partial \alpha} \quad (3.9)$$

Di conseguenza si ha un'espressione per l'equazione agli autovalori nel modello WLC per lo stato fondamentale, troncata al primo ordine in α :

$$\left[\frac{1}{2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right] \Psi_0(\theta) = -(\alpha \cos \theta + \epsilon_0) \Psi_0(\theta) \quad (3.10)$$

In cui occorre imporre le condizioni al contorno per $\theta = 0$ e $\theta = \pi$. Siano Ψ_a e Ψ_b due soluzioni per l'equazione agli autovalori 3.10 rispettivamente nell'intorno di 0 e π , allora per ottenere una soluzione definita su tutto l'intervallo $I =]0; \pi[$ bisogna imporre il soddisfacimento della continuità della funzione d'onda e della sua derivata per ogni $\theta = \theta_0 \in I$.

$$\frac{1}{\Psi_a} \frac{\partial \Psi_a}{\partial \theta} - \frac{1}{\Psi_b} \frac{\partial \Psi_b}{\partial \theta} = 0 \quad (3.11)$$

L'equazione 3.11 si risolve utilizzando opportuni metodi iterativi.

Andando a ritroso risolvendo la catena di uguaglianze in 3.9 emerge una relazione tra la forza esercitata sul sistema e il suo allungamento:

$$F = \frac{K_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} a_i \left(\frac{z}{L_0} \right)^i \right] \quad (3.12)$$

dove i coefficienti a_i possono essere considerati nulli o pari a $a_2 = -0.5164228$, $a_3 = -2.737418$, $a_4 = 16.07497$, $a_5 = -38.87607$, $a_6 = 39.49944$ e $a_7 = -14.17718$. I coefficienti sono dati dai termini correttivi (fino al settimo ordine) aggiunti da Bouchiat et al. nel 1999 [2]. La formula che non tiene conto dei termini correttivi in questione era infatti già stata introdotta da Bustamante et al. in un articolo del 1994 [3]. Assumendo la trattazione secondo il modello WLC, useremo la espressione in (3.12), trascurando gli ordini successivi al primo, per interpolare i dati.

Esperimento

4.1 Analisi di una tipica curva di unfolding

Abbiamo visto come gli esperimenti di singola molecola consentano di manipolare una biomolecola per volta e di studiarne le proprietà, principalmente elastiche e meccaniche, agendo su di esse tramite piccole sollecitazioni comparabili con quelle che normalmente la proteina subisce svolgendo le sue funzioni biologiche ($\text{pN} \times \text{nm}$).

In particolare nel nostro caso, sfruttiamo lo strumento di Optical Tweezers per intrappolare, grazie alla quantità di moto trasportata dalla luce, una biglia di dimensione micrometrica alla quale si aggancia, con opportune "maniglie" di materiale biologico, la proteina di nostro interesse, la Flavodossina. Sottoponiamo la biomolecola a una forza di tiraggio sempre maggiore nel tempo (ma sempre nell'ordine dei pN), tale che la sua estensione aumenti in maniera costante con la velocità che nei nostri esperimenti sarà pari a $v \approx 100 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Solitamente la proteina ad una certa forza rompe i legami peptidici che tengono assieme i suoi amminoacidi e quindi si apre. Abbiamo appena descritto il processo di unfolding proteico che sarà oggetto del nostro studio e dal quale sarà possibile ottenere preziose informazioni sulla struttura della Flavodossina.

L'obiettivo finale è determinare il numero di legami tra amminoacidi aperti nella catena durante il dispiegamento. Per farlo ricorremo sperimentalmente a misure di forza e di distanza tra micropipetta e biglia intrappolata al variare del tempo con lo scopo di misurare l'evoluzione temporale dell'estensione della Flavodossina ed individuarne i parametri elastici.

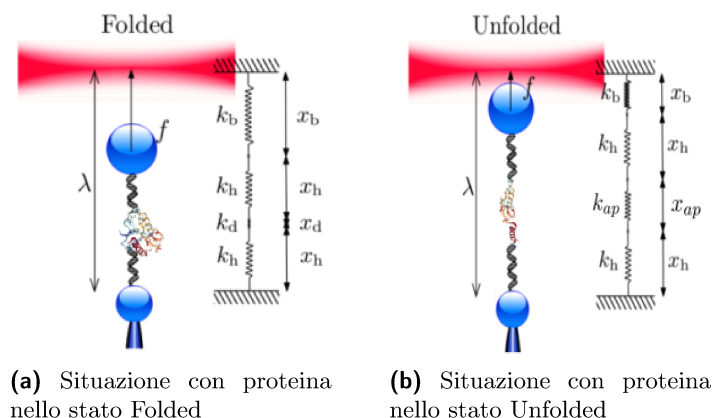


Figura 4.1: Rappresentazione dell'unfolding proteico dovuto al tiraggio e del bilanciamento delle forze nelle due fasi di dispiegamento all'interno della camera microfluidica

Come già accennato in precedenza, il sistema delle Optical Tweezers permette di controllare la relativa distanza, λ , tra la punta della micropipetta (dove si trova la biglia più piccola) e il centro della trappola ottica (dove si trova la biglia più grande). Come si vede dal disegno in Fig. 4.1(a), questa distanza è uguale alla somma dei contributi provenienti dalla lunghezza delle maniglie di DNA, della proteina in esame oltre che dalle dimensioni delle biglie, proiettate lungo la direzione nella quale sta agendo la forza di allungamento (di pulling appunto):

$$\lambda(f) = x_h(f) + x_b(f) + x_{Flav.}(f) \quad (4.1)$$

In Fig. 4.1(b) si vede che muovendo la trappola ottica si varia la distanza tra quest'ultima e la biglia nella micropipetta di una quantità $\Delta\lambda$. Nell'approssimazione in cui la proteina si comporti in maniera elastica otteniamo il seguente risultato:

$$\frac{\Delta\lambda}{\Delta f} = \frac{1}{k_{eff}} = \frac{1}{k_h} + \frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_{Flav.}} \quad (4.2)$$

Dove k_{eff} è la costante elastica efficace del sistema Flavodossina + maniglie + biglie. Il suo inverso è la somma delle rigidezze delle singole componenti del sistema.

Ricaviamo $\Delta\lambda$ come sottrazione membro a membro delle Eq. 4.1 scritte nel caso in cui la proteina si trovi nello stato Nativo piuttosto che nello stato Unfolded:

$$\begin{aligned} \lambda_{fin.}(f) &= x_h(f) + x_b(f) + x_{Flav.}^U(f) \\ \lambda_{ini.}(f) &= x_h(f) + x_b(f) + x_{Flav.}^N(f) \end{aligned}$$

Poiché nel range di forze di tiraggio a cui il sistema è sottoposto, la rigidezza della biglia e delle maniglie di DNA è molto maggiore rispetto a quella della proteina, queste non risentiranno della forza applicata e si avrà quindi $x_{h,fin.}(f) = x_{h,ini.}(f) = x_h(f)$ e $x_{b,fin.}(f) = x_{b,ini.}(f) = x_b(f)$. Arriviamo quindi alla conclusione che, nota la $x_{Flav.}^N(f)$ della proteina, possiamo ricavare la sua estensione $x_{Flav.}^U(f)$ nello stato Unfolded semplicemente sommando la variazione di distanza tra la micropipetta e l'equilibrio della trappola ottica.

$$x_{Flav.}^U(f) = \Delta\lambda + x_{Flav.}^N(f) = \frac{\Delta f}{k_{eff}} + x_{Flav.}^N(f) \quad (4.3)$$

Studi [4] hanno mostrato che l'espressione per $x_{Flav.}^N(f)$ non è banale, la riportiamo di seguito:

$$x_{Flav.}^N(f) = d \left[\coth \frac{fd}{k_B T} - \frac{k_B T}{fd} \right] \quad (4.4)$$

Dove $d = 2.1$ nm rappresenta le dimensioni della proteina ripiegata (ottenuta da studi cristallografici) mentre $k_B T \approx 4.12 \cdot 10^{-21}$ J = 4.12 pN × nm è l'inverso del fattore β di Boltzmann a temperatura ambiente $T = 25^\circ$ C, f invece esprime la forza alla quale è avvenuto il rilassamento del sistema, cioè la rottura dei legami peptidici della biomolecola in esame.

Riepilogando quanto visto fino ad adesso, possiamo sostituire le espressioni in Eq. 4.4 e in Eq. 4.2 dentro l'Eq. 4.3 ottenendo:

$$x_{Flav.}^U(f) = \frac{\Delta f}{k_{eff}} + d \left[\coth \frac{fd}{k_B T} - \frac{k_B T}{fd} \right] \quad (4.5)$$

L'espressione di sopra dipende dalla costante elastica k_{eff} , dal "salto di forza" Δf subito dal sistema in seguito al passaggio dallo stato ripiegato N a quello disteso D, e dalla forza al quale questo passaggio è avvenuto. Si tratta quindi di sfruttare misure di forza e di estensione del sistema al variare del tempo per ottenere i suddetti parametri, da cui poter ricavare poi l'estensione della proteina aperta. Questo genere di misure sono riassunte in *curve di unfolding* in cui la proteina viene ciclicamente sottoposta a misure di allungamento tra 1 e 30 pN e lasciata rilassare per 2 secondi alla forza più bassa prima di ripartire al ciclo successivo, come si vede in Fig. 4.2. In essa è apprezzabile il "salto di forza" di cui stiamo discorrendo, segno che il sistema si è ripiegato una volta che la forza esercitata è stata ridotta fino a 1 pN.

La curva può apparire rumorosa, specialmente per le forze più basse, questo è essenzialmente dovuto al moto Browniano della biglia nella trappola ottica, che può risultare più o meno smorzato a seconda della presenza della proteina o dell'intensità della forza applicata al sistema. Inoltre, il rumore è accentuato dall'aver introdotto per questo esperimento un campionamento ad alta frequenza ($\nu = 50$ kHz) che effettua una misura di forza e lunghezza del sistema ogni 20 μ s. Il vantaggio di aver introdotto un

campionamento temporale così fitto risiede nella migliore risoluzione temporale delle misure effettuate, che permettono di visualizzare la presenza di eventuali stati intermedi nel dispiegamento della Flavodossina. La vita dello stato intermedio osservato è estremamente breve, come si può notare osservando la Fig. 4.2(b), questo giustifica una frequenza di presa dati così elevata. Almeno inizialmente pertanto

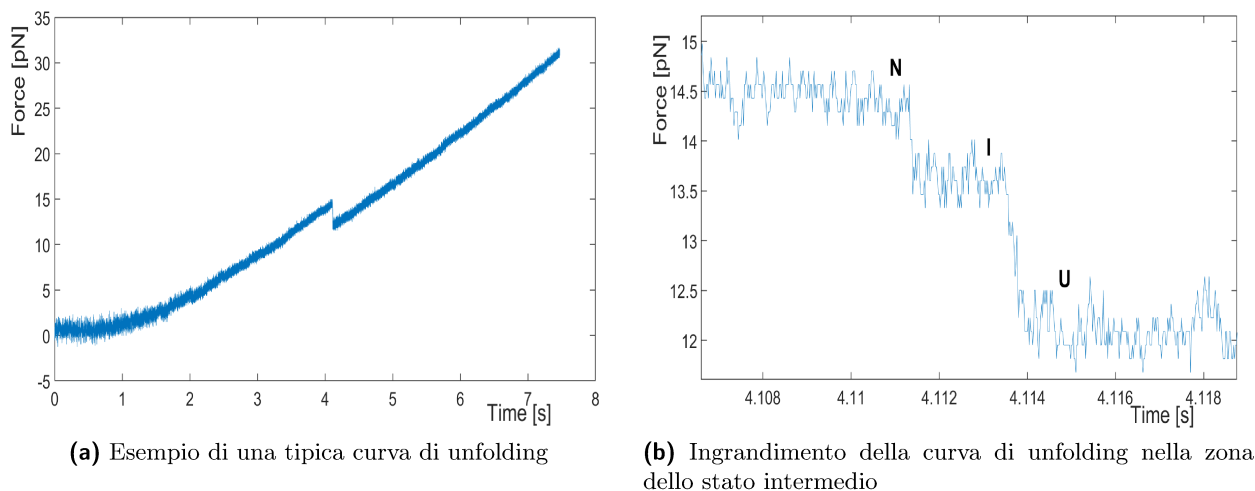


Figura 4.2

occorre concentrarsi sull'individuazione all'interno della curva di unfolding di due piccoli salti di forza: uno che sancisce il passaggio della proteina dallo Stato Nativo a quello Intermedio ($N \rightarrow I$) e l'altro dallo stato Intermedio a quello Unfolded ($I \rightarrow U$), vale a dire che in ciascun salto di forza potremo assumere che la rottura dei legami peptidici sia *cooperativa*, cioè avvenga "istantaneamente" ma solo su due blocchi di legami peptidici distinti e comunque ben definiti.

Di seguito, per semplicità, descriverò il processo di analisi effettuato ad esempio nella individuazione del numero di legami peptidici aperti nel passaggio dallo stato Nativo a quello Intermedio, i restanti casi da Intermedio ad Unfolded o da Nativo ad Unfolded sono ottenuti in modo analogo.

Per la misura del salto di forza si è proceduto con una media dei valori di forza dello stato intermedio, ricavando una stima di f_I . Per lo stato Nativo (f_N) e Unfolded (f_U) si è proceduto sempre con una media di circa un centinaio di misure di forza prima e dopo il salto, dobbiamo infatti tenere conto del fatto che la forza cambia nel tempo con una certa *loading rate*, ma mettendoci sufficientemente vicini al salto, la forza può essere considerata in buona approssimazione fluttuante attorno a un valore "costante", quest'ultima affermazione è giustificata ancora una volta dall'ingrandimento della curva di unfolding in Fig. 4.2(b).

A causa delle profonde fluttuazioni subite dalla misura della forza si è preferito assumere una distribuzione triangolare dell'incertezza legata alla media, si tratta di una scelta indubbiamente conservativa, come discuteremo nel seguito, ma giustificata dal fatto che la risoluzione della misura di forza si trova nell'ordine del decimo di pN. Definiamo poi la differenza Δf associata al relativo salto di forza e calcoliamo la sua incertezza per propagazione degli errori.

A destra, in Fig. 4.3, sono stati eseguiti dei fit lineari per individuare la costante elastica del sistema prima e dopo il salto. Ci si aspetterebbe che la pendenza della retta riferita ai dati dopo il salto sia minore rispetto a quella prima del salto: la rottura di parte dei legami che compongono la catena polipeptidica infatti comporta una minor resistenza della proteina all'allungamento. È da notare che nel grafico non compare lo stato intermedio, dal momento che questo risulta difficilmente visibile in un grafico di forza in funzione dell'estensione. Avendo a disposizione la differenza di forza corrispondente al salto Δf e la

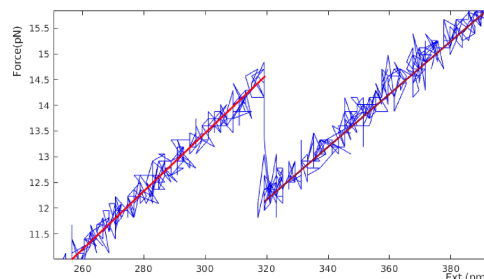


Figura 4.3: Esempio di fit lineare per il calcolo della costante elastica efficiente k_{eff} del sistema

costante elastica k_{eff} , si può calcolare $\Delta\lambda$ usando la relazione in Eq. 4.2. Non solo, avendo a disposizione una stima di f poco prima della rottura, possiamo sfruttarla per calcolare $x_{Flav.}^N(f)$ usando l'Eq. 4.4 ed infine $x_{Flav.}^I(f)$ come descritto in Eq. 4.5. Le incertezze sono state calcolate usando la formula di propagazione degli errori.

4.2 Verifica del WLC Model e stima di N

Nel capitolo precedente abbiamo introdotto il modello WLC come quello che meglio descrive il comportamento elastico della Flavodossina, assumendo che la stessa si comporti appunto "come una catena elastica inestensibile" che non è in grado di piegarsi su sé stessa né di allungarsi, trascurando così dal calcolo della funzione di partizione il contributo sia di twisting che di stretching. Alla fine siamo arrivati alla formula in Eq. 4.6 che riporto in seguito:

$$F = \frac{K_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} \right] = \frac{K_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - z/(N \cdot d_{aa}))^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{N \cdot d_{aa}} \right] \quad (4.6)$$

Nell'ultimo passaggio abbiamo esplicitato la definizione di lunghezza di contorno $L_0 = N \cdot d_{aa}$, in cui d_{aa} rappresenta la distanza media tra due amminoacidi consecutivi mentre N è il numero di legami aperti come specificato in precedenza.

Dal punto di vista analitico, L_0 costituisce l'asintoto verticale della curva descritta dal modello WLC ed essendo proporzionale a N ci aspettiamo che, per una curva descritta dal WLC, più l'asintoto è situato "a destra" maggiore è il numero di legami peptidici rotti nel passaggio da uno stato all'altro. Si è proceduto quindi con l'interpolazione, secondo l'Eq. 4.6, dei valori di forza di rottura in funzione della lunghezza della Flavodossina immediatamente dopo il passaggio di stato (z) per i vari salti di forza osservati nelle diverse curve di unfolding analizzate (in totale sono state 48).

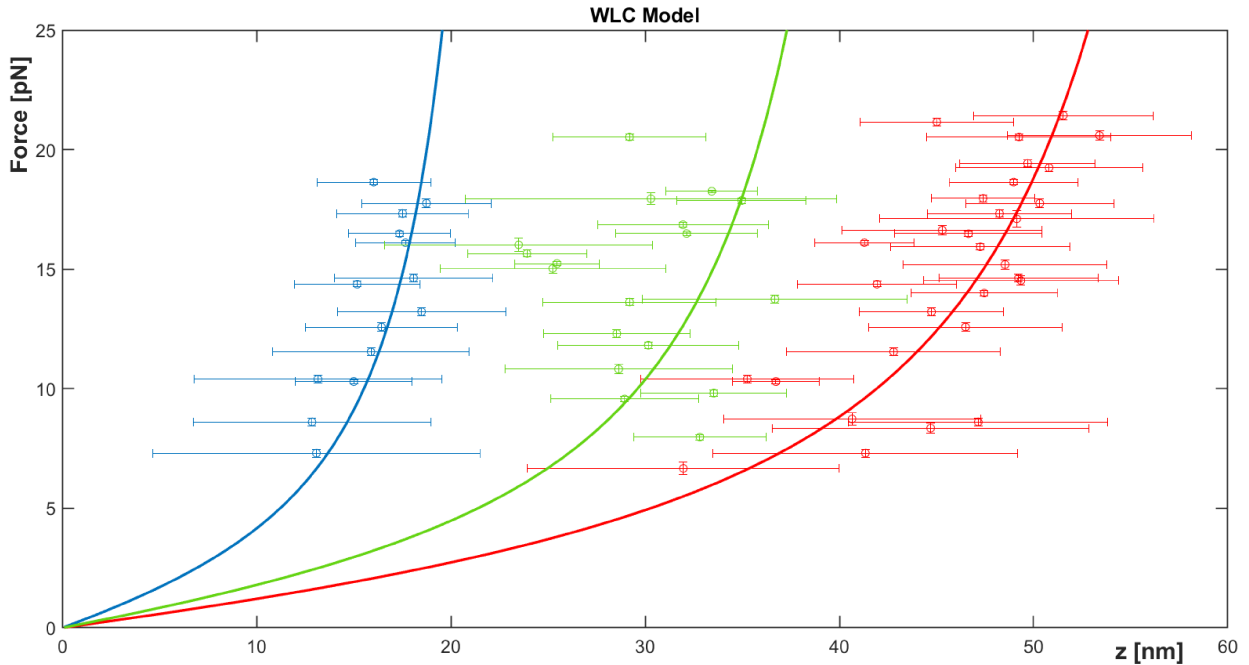


Figura 4.4: Fit eseguito nell'ipotesi che i dati raccolti seguano l'andamento dato in Eq. 4.6. Sono stati riportati i dati relativi ai vari valori di forza ed estensione della molecola per i vari salti osservati nelle differenti misure di unfolding

In Fig. 4.4 sono riconoscibili tre differenti tipologie di salto di forza.

Stando a quanto detto prima, la curva in rosso rappresenta il caso in cui sono stati aperti il maggior numero possibile di legami peptidici, cioè tutti, questo insieme di dati è pertanto assimilabile al pas-

saggio dallo stato ripiegato a quello totalmente dispiegato. A partire dall'analisi di tale processo $N \rightarrow U$, dove sappiamo per certo che l'apertura della Flavodossina sia stata completa di tutti i suoi 170 legami tra aminoacidi, sono state stimate la lunghezza di persistenza e la distanza tra gli aminoacidi usando la formula 4.6. Dall'interpolazione dei dati si è ottenuto $L_p = (0.80 \pm 0.07)$ nm e $d_{aa} = (0.41 \pm 0.08)$ nm che risultano ottimamente compatibili con valori ottenuti in precedenza per proteine simili [1]: $L_p^{true} = (0.82 \pm 0.03)$ nm e $d_{aa}^{true} = (0.37 \pm 0.02)$ nm.

In Fig. 4.5, sono riportati alcuni esempi delle diverse modalità di transizione osservate negli esperimenti

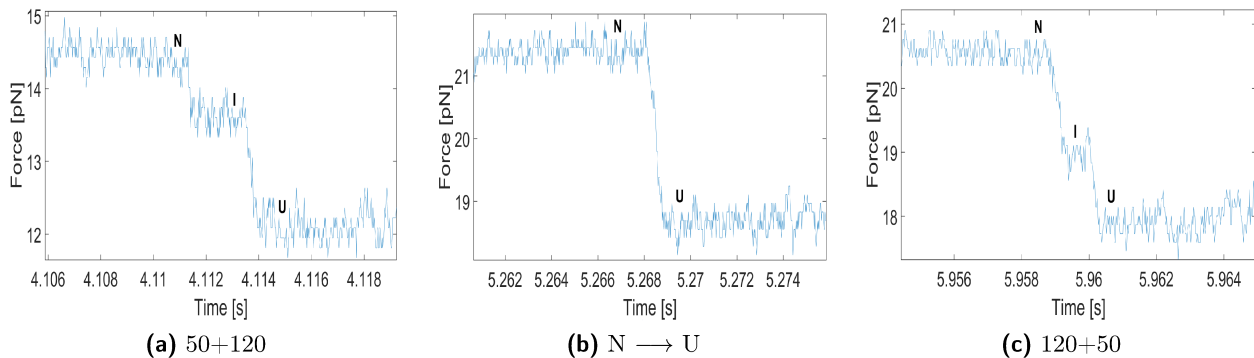


Figura 4.5

ti eseguendo un ingrandimento della curva di unfolding nella zona del salto di forza.

Fissati i due parametri, L_p e d_{aa} , si è proceduto con il fit relativo alle altre due curve tenendo come parametro libero il numero di legami N aperti nel passaggio da uno stato all'altro. In entrambi i casi è stata richiesta l'esclusione di alcuni outliers prima di fare l'interpolazione, l'esclusione è giustificata dal confronto della stima della costante elastica del sistema per la data curva di unfolding (ottenuta eseguendo il fit lineare $F(\text{Ext})$) con l'andamento medio delle costanti elastiche del campione di curve di unfolding. Ciò potrebbe infatti essere segno che il processo di dispiegamento della proteina potrebbe non essere avvenuto correttamente, ad esempio a causa di impurità nella soluzione salina della camera microfluidica che ha inficiato il comportamento elastico della Flavodossina. Otteniamo $N_{blu} = 63 \pm 3$ e $N_{verde} = 120 \pm 8$. La somma dei due $N_{tot} = 183 \pm 8$ ha compatibilità buona ($\lambda = 1.6$) con il totale di aminoacidi della Flavodossina che sappiamo essere 170.

La fenomenologia che emerge dall'analisi delle diverse curve di unfolding mostra effettivamente tre tipologie di transizione dallo stato nativo a quello aperto, ciascuna caratterizzata da una propria probabilità di verificarsi e da una diversa combinazione di aminoacidi aperti durante il processo di unfolding. In maniera più frequente (nel 59% delle curve di unfolding prese in esame) si osserva un primo salto più corto del secondo, questo caso è compatibile con la presenza di uno stato intermedio lungo il cammino di unfolding della proteina. La presenza dello stato I1 (Fig. 4.6) favorisce l'apertura di circa 60 legami peptidici nel passaggio dallo stato Nativo ad Intermedio ed infine una seconda fase di completamento dell'apertura con la separazione dei rimanenti circa 120 legami (i quali costituiscono la maggior parte della catena) nel passaggio dallo Stato Intermedio allo stato Unfolded. Un secondo caso tipico è quello in cui non osserviamo alcuno stato intermedio, cioè assistiamo al passaggio diretto

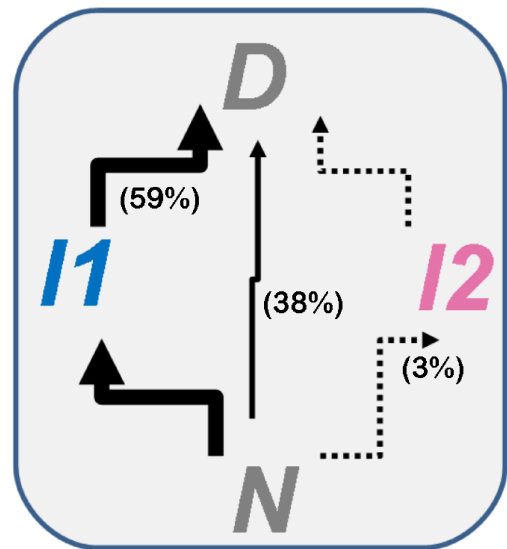


Figura 4.6: Schema delle possibili modalità di transizione per la proteina Flavodossina: N rappresenta lo stato Nativo, D quello Unfolded. I1 e I2 corrispondono agli stati intermedi ottenuti rispettivamente percorrendo le transizioni on pathway 63+120 o 120+63. La freccia tratteggiata e lo spessore delle frecce continue descrivono le stime, a partire dalle curve analizzate, delle differenti probabilità che la particella segua un dato cammino all'interno del FEL durante il processo di unfolding

$N \rightarrow U$ con la corrispondente apertura di tutti e 170 gli amminoacidi che compongono la proteina (freccia continua e sottile in Fig. 4.6). Questo caso corrisponde alla presenza di un unico salto di forza nella curva di unfolding, cioè all'apertura della proteina in un'unica fase. Nel nostro caso, questa tipologia di transizione si è presentata nel 38 % delle curve di unfolding esaminate. In un solo caso dei 48 totali abbiamo invece osservato lo stato intermedio I2 dopo l'apertura di 120 legami peptidici, mentre i restanti vengono aperti nel passaggio da stato Intermedio ad Unfolded. Una possibile interpretazione dei risultati ottenuti può essere quella riportata nel seguito. La struttura della Flavodossina è costituita di una zona centrale con legami più forti in cui sono presenti 5 β -sheet allineati tra di loro e una zona esterna più debole, che a partire dal terminale C è costituita da una α elica e un loop (parte azzurra in Fig. 3.1). Questa parte più debole consta di 50 amminoacidi ed è plausibile che sotto l'azione di una forza di tiraggio prima cedano i legami di questa sezione della proteina, provocando l'apertura di 50 amminoacidi, e poi si assista alla denaturazione dei rimanenti 120 amminoacidi. Riepilogando, riconosciamo che la proteina di Flavodossina possa trovarsi in ben determinate conformazioni per lo stato Intermedio, vale a dire che in questo stato o possiede 50 legami aperti oppure ne possiede 120. Perciò dato che nella proteina in esame si possono aprire 50 oppure 120 legami peptidici alla volta, associamo rispettivamente queste due possibilità di apertura alle curve blu e verde in Fig. 4.4. In Tab. 4.1 si riportano i risultati del fit, cioè della stima finale di N per ciascuna curva e della compatibilità con il risultato previsto secondo la struttura della proteina.

	$N^{sper.}$	$N^{th.}$	λ
WLC _{blu}	63 ± 3	50	4.3 (incompatibile)
WLC _{verde}	120 ± 8	120	0.01 (eccellente)

Tabella 4.1: Risultato del fit dei dati sperimentali con il modello WLC

I risultati riportati in Tabella manifestano una forte incompatibilità per quanto riguarda il primo salto, quello relativo alla rottura di 50 legami peptidici: possiamo spiegare questa incompatibilità con la difficoltà di determinare correttamente nel caso di salti così piccoli la differenza di forza tra lo stato Nativo ed Intermedio a causa del rumore presente nella curva di unfolding, nel senso che sicuramente in questo caso l'errore ha influito in maniera relativamente significativa sulla stima dell'incertezza sulla differenza in forza tra i due stati con ripercussioni sui dati del fit, lo si vede anche dall'estensione delle barre d'errore per la curva blu. A proposito bisognerebbe anche tenere conto che disponiamo di pochi dati, in quanto i dati interpolati sono stati ripuliti di diversi outliers dalla distribuzione, per cui dovremmo tenere presente che con qualche elemento in più la stima di N sarebbe potuta cambiare in maniera determinante. Nel caso della curva verde i valori di compatibilità sono molto buoni e rimuovono qualsiasi dubbio circa la corretta stima del livello di forza in cui lo stato Intermedio vive rispetto allo stato Unfolded o nell'unico caso in cui lo stato Nativo ed Intermedio distinto di 120 legami peptidici di differenza (salto più ampio in forza).

4.3 Probabilità di sopravvivenza

La forza di rottura, vale a dire quella applicata alla Flavodossina al momento della transizione dallo stato ripiegato a quello (parzialmente) disteso non è fissato e cambia per ciascuna curva di unfolding. Definiamo *probabilità di sopravvivenza* la quantità:

$$P(f) = 1 - \frac{N(f_U < f)}{N_U} \quad (4.7)$$

dove $N(f_U < f)$ rappresenta il numero di curve di unfolding in cui la cosiddetta "forza di rottura" f_U è minore di un dato valore di forza f . N_U rappresenta invece il numero di curve di unfolding analizzate nel totale.

Trasferendoci al caso continuo possiamo definire un'opportuna distribuzione di probabilità $\rho(f_U)$ per

le forze di rottura con significato analogo all'Eq. 4.7.

$$P(f) = 1 - \int_0^f \rho(f_U) df_U \quad (4.8)$$

Rappresentiamo di seguito l'andamento della densità di probabilità $\rho(f)$ per la nostra analisi dati e il successivo andamento di $P(f)$ così come definite sopra.

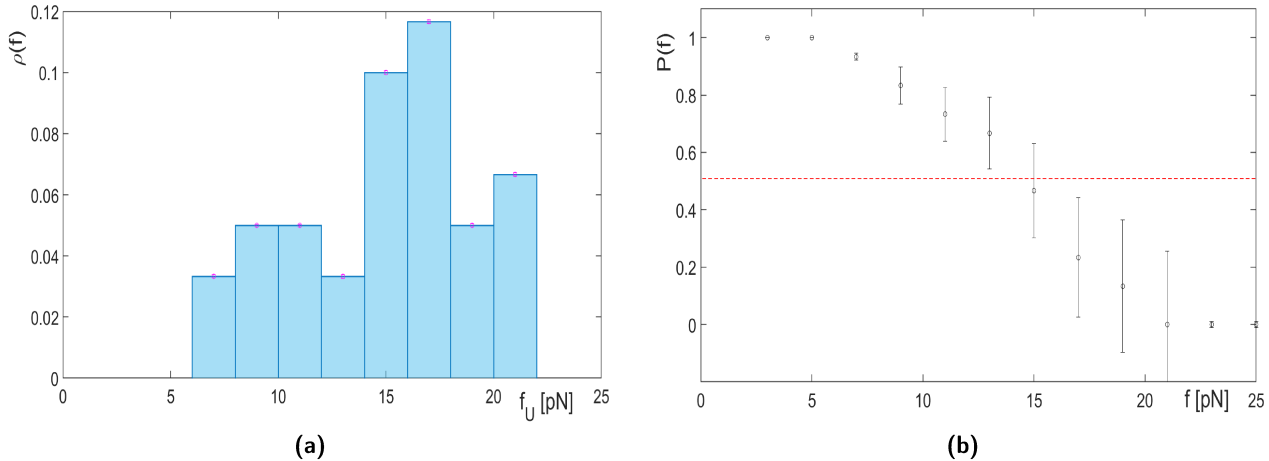


Figura 4.7: Istogramma relativo alle forze di rottura e successivo calcolo della probabilità di sopravvivenza a diversi livelli di forza

La distribuzione che emerge in Fig. 4.7 è una distribuzione antisimmetrica. Questo profilo rispecchia il fatto che l'apertura della proteina avviene solamente per forze sufficientemente "elevate" oppure solo oltre una certa soglia di forza di rottura. L'istogramma delle forze di rottura presenta due valori particolarmente piccati rispetto al resto della distribuzione corrispondentemente a $f_U = 15$ pN e $f_U = 17$ pN, i due bin differiscono nell'istogramma delle frequenze assolute per un unico conteggio.

In Fig. 4.7(b) è invece rappresentato l'andamento della probabilità di sopravvivenza in funzione di un dato valore di forza f . $P(f)$ quantifica la probabilità che, per una data forza f , la Flavodossina si trovi nella configurazione ripiegata (N) ed è ottenuta per complementarità sottraendo la probabilità, misurata a partire dal numero di conteggi nell'istogramma 4.7(a), che invece la proteina a quel determinato livello di forza abbia viceversa già compiuto la transizione dallo stato N a un qualsiasi altro, U oppure I. Da notare allora che il caso $P(f) = 0.5$ corrisponde a una forza in cui la proteina ha uguale probabilità di trovarsi nello stato ripiegato oppure aperto, tale valore risulta essere $f = 15$ pN e viene individuato tracciando la linea rossa tratteggiata che si vede anche in grafico. Tale valore risulta prossimo al picco nella distribuzione della forza di apertura.

Considerazioni conclusive

L'obiettivo dell'elaborato è stato quello di stimare il numero di legami peptidici aperti in processi di unfolding della proteina Flavodossina e individuare le corrette modalità di apertura della catena proteica. A questo proposito lo strumento delle Optical Mini-Tweezers è stato implementato opportunamente per poter eseguire misure di spettroscopia di forza con un campionamento ad alta frequenza (50 kHz) necessario per l'individuazione del livello di forza corrispondente allo stato Intermedio a partire dall'osservazione della curva di unfolding per ciascun evento considerato.

L'esperimento di pulling di singola molecola eseguito con l'utilizzo dello strumento delle pinzette ottiche, di cui abbiamo trattato nel corso di questa tesi, ha consentito di riconoscere per la Flavodossina tre differenti tipologie di "salto" di forza, le quali corrispondono a un differente numero di legami peptidici aperti durante le tre diverse modalità di dispiegamento per la proteina in esame e di fornirne una stima quantitativa sfruttando il modello del Worm Like Chain in cui abbiamo ipotizzato che la proteina fosse inestensibile e non potesse torcersi attorno al proprio asse.

In Tab. 4.2 riepiloghiamo i principali risultati dell'analisi dati eseguita sulla proteina Flavodossina.

$N \rightarrow U$	$L_p = (0.080 \pm 0.07) \text{ nm}$	$d_{aa} = (0.41 \pm 0.08) \text{ pN}$
$N \rightarrow I1 \rightarrow U$	$N_{N \rightarrow I1} = 63 \pm 3$	$N_{I1 \rightarrow U} = 120 \pm 8$
$N \rightarrow I2 \rightarrow U$	$N_{N \rightarrow I2} = 120 \pm 8$	$N_{I2 \rightarrow U} = 63 \pm 3$

Tabella 4.2: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti

Si è visto quindi che con maggiore probabilità (59 %) la proteina si apre in due fasi, prima in un dispiegamento di circa 60 amminoacidi e poi con la successiva apertura dei rimanenti 120 amminoacidi. Si sono comunque potute osservare transizioni dirette tra lo stato nativo e quello aperto, con una probabilità di circa il 38 %, mentre la transizione che prevede la prima rottura di 120 amminoacidi e la successiva di 60 amminoacidi è risultata poco favorita. Prospettive future di questa tesi riguardano la realizzazione di esperimenti simili a diverse velocità di tiraggio, per verificare se le probabilità di transizione osservate sono più o meno influenzate dalla velocità con cui la proteina viene sottoposta a pulling, così come la realizzazione di esperimenti a frequenza di campionamento maggiore (possibilmente 100 kHz o oltre) per avere conferma che le transizioni dirette osservate siano tali e non transizioni caratterizzate piuttosto da uno stato intermedio con vita insufficientemente lunga da essere osservata.

Bibliografia

- [1] Anna Alemany; *Dynamic force spectroscopy and folding kinetics in molecular systems*, PhD thesis; Università di Barcellona, 2014
- [2] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. F. Allemand, T. Strick, S. M. Block and V. Croquette; *Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements*; Biophysical Journal, Vol.76 (January 1999) 409-413.
- [3] C. Bustamante, J. Marko, E. D. Siggia and S. B. Smith; *Entropic elasticity of -phage DNA*; Science, Vol 265 (1994) 1599–1600
- [4] N. Forns et al; *Improving signal/noise resolution in single-molecule experiments using molecular constructs with short handles*; Biophysical Journal, Vol 100.7 (April 2011), 253-261
- [5] J.M.Huguet; *Statistical and thermodynamic properties of DNA unzipping experiments with optical tweezers*, PhD thesis; Università di Barcellona, 2010
- [6] P. H. Jones, O. M. Maragò and G.Volpe; *Optical Tweezers, Principles and Applications*; Cambridge University Press, 2015
- [7] Keir C. Neuman and Attila Nagy; *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*; Nat Methods., Vol 5 (June 2008) 491-505
- [8] Giorgio Palermo; *Esperimenti di singola molecola con le pinzette ottiche: studio della risposta elastica della proteina Flavodossina*; Università di Padova, 2019
- [9] F. Ritort; *Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications*; J. Phys.: Condens. Matter, Vol 18 (2006) 531-583
- [10] S.B. Smith, Yujia Cui and Carlos Bustamante; *Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum*; Methods in enzymology, Vol 361 (2003) 134-162
- [11] S.B. Smith and C. Rivetti; <http://tweezerslab.unipr.it>; 2013
- [12] Clara Zaccaria; *Optical mini-Tweezers: un esperimento di singola molecola*; Università di Padova, 2018
- [13] <http://home.uni-leipzig.de/pwm/web/?section=introductionpage=opticaltraps>
- [14] http://nanobionano.unibo.it/macromolecole/3-Proteine_noanim.pdf