

Metodi Biofisici per lo studio del folding

Per studiare il folding sono necessari metodi in grado di rilevare differenze tra stati iniziali, finali e conformazioni intermedi della proteina.

Tecniche molto utilizzate sono le tecniche *spettroscopia*.

La spettroscopia misura l'interazione tra la radiazione elettromagnetica e la luce.

Le interazioni di interesse sono l'assorbimento, l'emissione, la diffusione e lo scattering della luce. Dal modo in cui la molecola interagisce con la radiazione elettromagnetica ricaviamo informazioni strutturali sulla nostra molecola.

Questi metodi devono permettere studi al livello di struttura secondaria e terziaria, non solo sulla singola proteina ma anche sulla aggregazione tra proteine. Devono permettere anche di valutare la dinamica delle strutture, per esempio per mezzo di studi di scambio idrogeno/deuterio (H/D). Devono anche permettere di misurare delle perturbazioni della proteina, e come la perturbazione va a cambiare le proprietà conformazionali di questa, ad esempio in studi di denaturazione termica, chimica o fisica.

In condizioni di equilibrio, dove gli effetti di queste perturbazioni sono reversibili, è possibile ottenere informazioni sui parametri termodinamici e sulla stabilità della proteina.

Anche lo studio di parametri cinetici è interessante. Ad esempio studi in cui la proteina è in condizioni denaturanti, si rimuovono le condizioni denaturanti e si misura la cinetica del processo di folding.

Studi di unfolding e di refolding necessitano metodi che non lavorano solo in equilibrio, e che permettono di effettuare caratterizzazioni spettroscopiche con risoluzioni temporali elevate, anche in termini di millesimi di secondo.

Si sono sviluppate varie tecniche a questo scopo. Ne vedremo una.

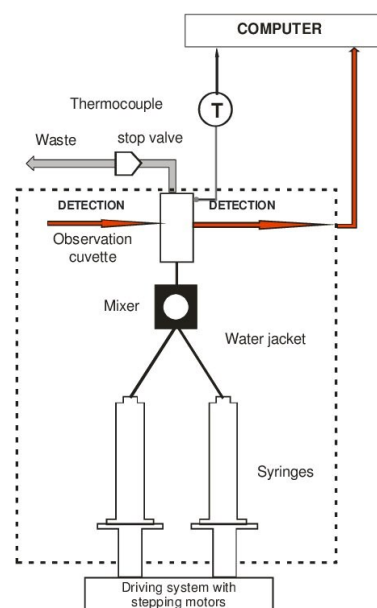
Stopped flow

Quando effettuiamo una misura allo spettrometro generalmente valutiamo lo stato della proteina all'equilibrio.

Immaginiamo di avere una proteina completamente denaturata con una concentrazione di guanidinio cloruro di 5 M. Si effettuano delle misure spettroscopiche ed ottengo misurazioni tipiche dello stato denaturato.

Se diluisco la soluzione fino a guanidinio 0,5 M e ripeto le misure vedo che la misura spettroscopica è molto simile a quella della proteina in stato nativo, il che indica che la proteina si è rifoldata. Si decide quindi di studiare il processo di folding, partendo dallo stato denaturato.

Per fare misure con elevata risoluzione temporale per ottenere dati cinetici, c'è necessità di un ulteriore strumento. Un metodo che si può utilizzare è lo *stopped flow*.



Questo strumento è costituito da due siringhe. In una delle siringhe si mette la soluzione con proteina in 5M di guanidinio, dove la proteina è quindi denaturata.

Nella seconda siringa mettiamo solo il solvente, tampone fosfato, senza guanidinio.

Queste siringhe sono collegate ad un miscelatore, connesso alla cuvette in cui avviene la misura spettroscopica.

Regolando il flusso dalle due siringhe si riesce a diluire in maniera precisa il campione. L'unico tempo morto nel passaggio dal miscelatore alla cuvette è nell'ordine di qualche millesimo di secondo. Con il solvente nella cuvette si riesce ad effettuare la misura spettroscopica del folding con una risoluzione spaziale nell'ordine del millesimo di secondo, che permette di studiare la cinetica del folding.

Possiamo effettuare varie misure spettroscopiche.

Dicroismo circolare

Il dicroismo circolare è una tecnica di studio dell'assorbimento che usa una luce circolarmente polarizzata. In questa luce abbiamo il campo elettrico che ruota lungo la direzione di propagazione. Il campo elettrico può ruotare sia in senso orario che in senso antiorario.

Nel dicroismo circolare a ciascuna lunghezza d'onda si misura l'assorbimento della luce circolarmente polarizzata sia a sinistra che a destra, e se ne calcola il delta, a ciascuna lunghezza d'onda. Mentre per un assorbimento ci aspettiamo sempre un valore positivo, nel dicroismo circolare, in cui calcoliamo un delta, possiamo avere sia un delta positivo che negativo, in base a quale delle due polarizzazioni è stata assorbita di più o di meno dalla molecola.

La prima condizione affinché ci sia un segnale di dicroismo circolare è che alla lunghezza d'onda che utilizziamo, la molecola studiata deve avere assorbimento.

La seconda condizione è che chi assorbe sia chirale o si trovi in ambiente chirale, altrimenti assorbirà nello stesso modo la luce circolarmente polarizzata, e non avremo la possibilità di calcolare un delta.

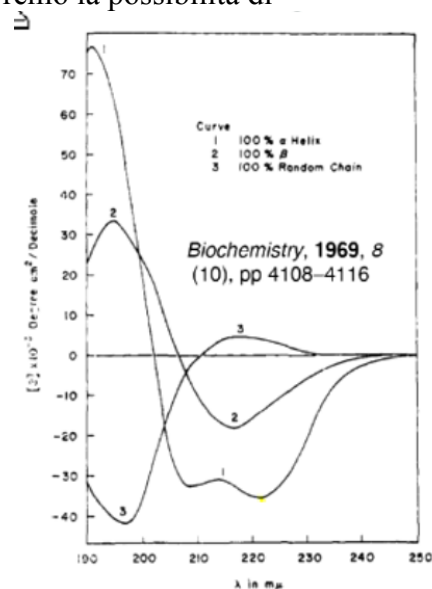
Far UV (190 – 250 nm)

Studiando proteine, quando utilizziamo la regione spettrale del *far UV* (190-250nm) il cromoforo (il gruppo che assorbe) è il legame peptidico. All'assorbimento avviene una transizione elettronica nel cromoforo.

Informazioni sulla struttura secondaria

Ciò che si osserva è che le diverse strutture secondarie hanno degli spettri di dicroismo circolare differenti.

Nello spettro abbiamo in x la lunghezza d'onda, mentre in y abbiamo un parametro legato al delta assorbimento. Abbiamo diverse unità di misura che possiamo utilizzare, tutte riconducibili al delta assorbimento.



In figura possiamo vedere gli spettri della polilisina. La polilisina a pH neutro ha struttura *random coil* (spettro 3), lo spettro è caratterizzato da un minimo negativo alla lunghezza d'onda di circa 200nm. Questo è il segnale tipico del dicroismo circolare per strutture disordinate.

La polilisina a pH basico assume una struttura ad *alfa-elica* (spettro 1). Questo spettro è molto diverso dallo spettro del random coil. Troviamo un massimo tra i 190 e i 200nm e due minimi a 208 e 222 nm.

Sempre la polilisina a pH basico portata ad alta temperatura cambia struttura, da *alfa-elica* a *beta-foglietto* (spettro 2), che alla spettrometria ha un picco positivo ai 200nm e un minimo a 218-219 nm.

La forma spettrale nel far UV evidenzia 3 conformazioni diverse, con spettri caratteristici.

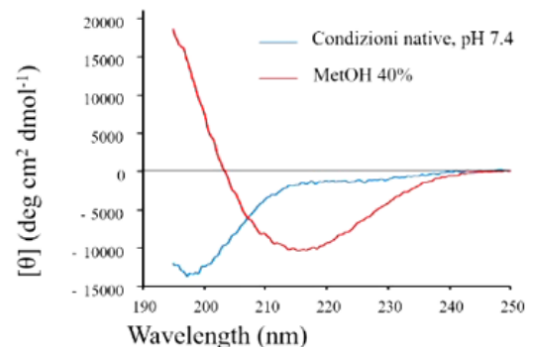
Il dicroismo circolare è tuttora un metodo molto usato nello studio del folding e della stabilità delle proteine.

Se si analizzano proteine ad alta prevalenza di una particolare struttura secondaria risulta agevole differenziare la struttura secondaria semplicemente guardando al grafico della spettrometria.

α -synucleina

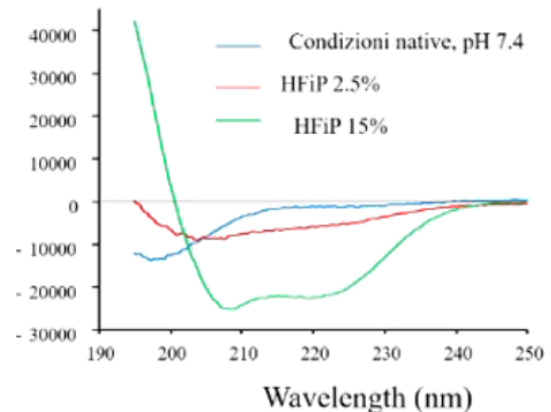
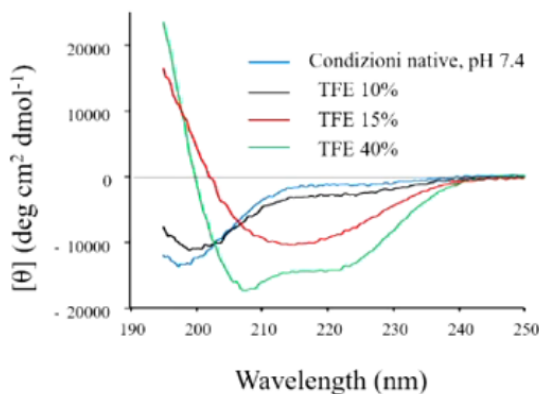
Lo spettro di questa proteina nel range del far UV in condizioni native permette di identificare un minimo a 200nm, senza minimi a lunghezze d'onda più alte, indicativo di una struttura disordinata.

In presenza di metanolo al 40% si evidenzia un minimo tra i 210 e i 220nm, che ricorda una struttura a *foglietto-beta*.



In presenza di un alcol fluorurato HFIP vediamo che in concentrazioni di HFIP del 15% si osserva un doppio minimo, identificativo di una strutturazione ad *alfa-elica*.

Anche in presenza di TFE (trifluoroetanolo) ci accorgiamo che un aumento di concentrazione di TFE si passa ad una configurazione a *beta-foglietto* con TFE 15%, mentre si evidenzia uno spettro tipico delle *alfa eliche* a TFE 40%.



Informazioni sulla stabilità termica

Informazioni quantitative sulla stabilità delle proteine possono essere ottenute mediante il dicroismo circolare.

Un primo sistema consiste nel misurare lo spettro della proteina nel far UV.

Nell'esempio nell'immagine vediamo che a 15°C la proteina mostra uno spettro tipico di una struttura ad alfa elica.

Lo spettro viene poi misurato a temperatura crescente, fino a 90°C.

Nello spettro a 90°C si evidenzia uno spettro che ricorda quello delle proteine disordinate, il che indica che la proteina, esposta ad alta temperatura, ha perso la struttura ad alfa elica per rilassarsi in uno stato disordinato.

Se ci interessa caratterizzare meglio la stabilità termica della proteina, si possono analizzare gli spettri ottenuti studiando come varia la risposta spettrale ad ogni singola lunghezza d'onda al variare della temperatura. Si analizza quindi la differenza tra lo spettro della proteina in condizioni di partenza e lo spettro a tutte le altre temperature in cui si è fatta l'analisi col dicroismo circolare, alle varie lunghezze d'onda.

Otterremo quindi per ogni lunghezza d'onda misurata il delta tra i segnali registrati sulla proteina ai vari step di temperatura (immagine a destra). Gli autori nel caso dell'immagine a destra hanno scelto la lunghezza d'onda dei 222 nm, perché la loro proteina era ricca in strutture ad alfa elica.

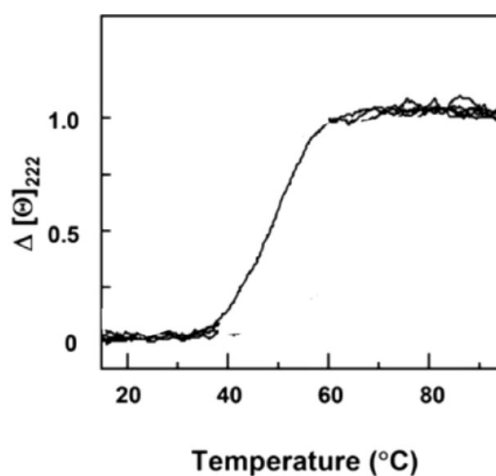
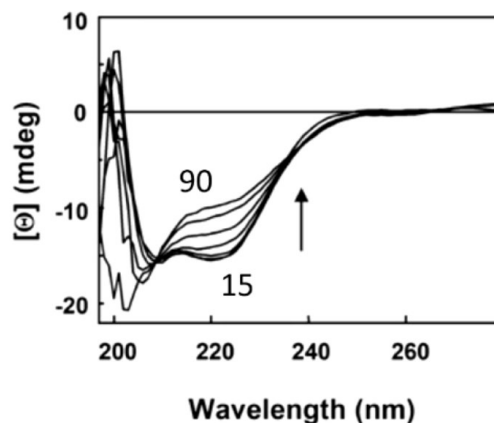
Si vede che fino a circa 40° il delta con la struttura di partenza è 0, quindi la struttura non cambia. A circa 40°C si vede che iniziano ad esserci delle differenze, che aumentano fino a circa 60°C, dove la differenza con lo stato nativo è massima e si mantiene costante all'aumentare della temperatura.

Questo indica che a circa 40°C la proteina ha iniziato il processo di denaturazione, che si completa a circa 60°C, con la proteina nella sua forma distesa.

Una curva di questo tipo ci da informazioni quantitative sulla proprietà della proteina. Si può vedere fino a che temperatura la proteina mantiene la conformazione nativa. Si può inoltre identificare la *temperatura di midpoint* (T_m), che ci indica a che temperatura si ha il 50% della transizione da stato nativo a stato denaturato.

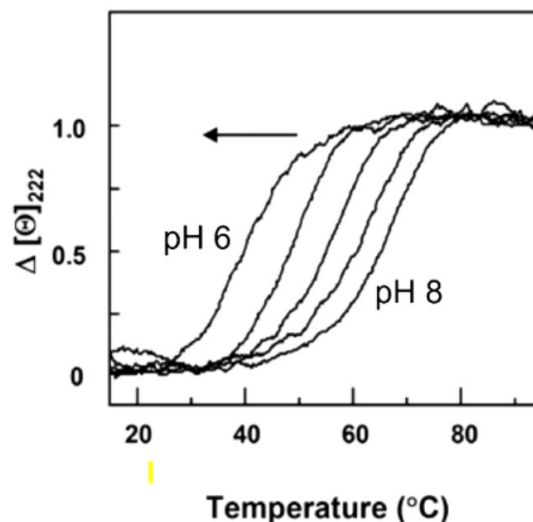
Per capire se la reazione è reversibile, arrivati alla massima temperatura si fa raffreddare la soluzione fino alla temperatura di partenza, lasciando la soluzione inalterata, e poi si ripete il processo di denaturazione e relativa misurazione. Se il risultato è uguale al primo ciclo di misurazioni allora il processo è reversibile, e si possono utilizzare questi dati per ottenere informazioni termodinamiche sul processo.

Se invece il risultato è diverso il processo è irreversibile. In questo caso i dati saranno utili a ricavare la T_m .



Analizzando vari mutanti, oppure la stessa proteina in condizioni di soluzione diverse, il dicroismo circolare può sempre essere usato per ricavare informazioni sulla T_m , per vedere se determinate mutazioni o determinate condizioni alterino la proteina stabilizzandola o meno. Se la T_m aumenta la proteina sarà più stabile, se invece diminuisce la proteina sarà meno stabile.

Lo stesso può essere fatto variando il pH della soluzione, come si può vedere dall'immagine a destra. In questo caso la proteina sarà più stabile a pH 8.



Le stesse misurazioni possono essere fatte per valutare la denaturazione chimica, dove al posto della variazione di temperatura si avrà la variazione di denaturante. Più spesso nella denaturazione chimica il processo è reversibile, mentre nella denaturazione termica il processo è spesso irreversibile.

Si possono avere anche misure quantitative sulla percentuale di struttura secondaria attraverso metodi di dicroismo circolare. C'è un errore attorno al 5-6% dato dagli algoritmi utilizzati, e molti di questi sono disponibili su server.

L'algoritmo di *bestsel.elte.hu* ad esempio, tramite l'immagine del grafico della misurazione eseguita col dicroismo circolare, per confronto con database di strutture note e relativi spettri di dicroismo circolare, fornisce la percentuale di struttura secondaria.

L'informazione sulla struttura secondaria è dovuta al fatto che l'assorbimento nel range del far UV è fornito dal backbone, ed è da lì quindi che provengono le informazioni che misuriamo.

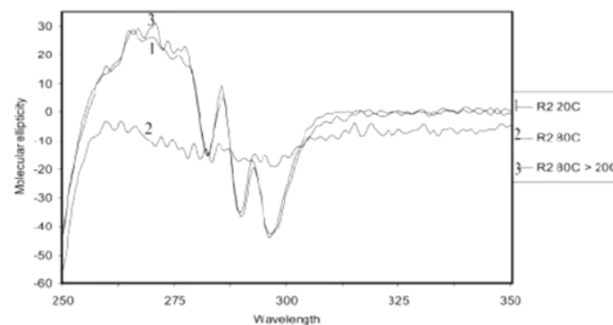
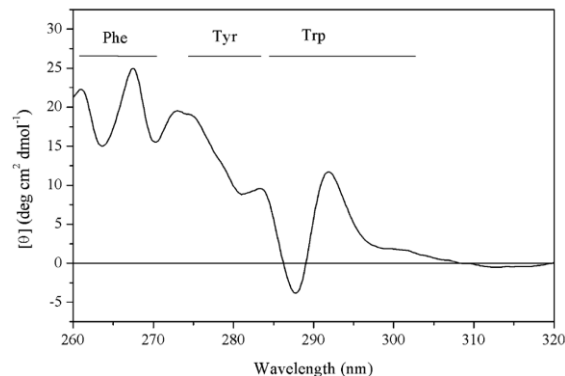
Near UV (260 – 320)

Alle lunghezze d'onda del near UV l'assorbimento è fornito dagli aminoacidi aromatici. Si possono quindi utilizzare misure con dicroismo circolare per studiare la struttura terziaria della proteina.

L'informazione ottenuta è una sorta di impronta della struttura terziaria.

Gli spettri nel near UV di proteine in conformazione nativa tendono ad avere picchi ben risolti dovuti all'assorbimento differenziale della luce circolarmente polarizzata da parte degli aminoacidi aromatici. Anche nella proteina denaturata si avrà l'assorbimento differenziale da parte degli aminoacidi aromatici, ma ciò che viene a mancare è l'intorno chirale, per cui lo spettro si appiattisce.

Dopo raffreddamento possiamo ripetere la misurazione. Se lo spettro si sovrapporrà a quello della conformazione nativa la reazione di denaturazione sarà reversibile.



Il dicroismo circolare permette di ottenere vari tipi di informazioni sulla proteina:

- Informazioni sulla struttura secondaria (far UV) e terziaria (near UV) della proteina

- Folding ed unfolding
- Parametri termodinamici e cinetici del folding
- Integrità dei siti di legame
- Interazione proteina-ligando
- Conformazione degli acidi nucleici

Infrarosso

Se ci spostiamo a lunghezze d'onda superiori, dove l'energia della radiazione elettromagnetica è inferiore, le proteine continueranno ad assorbire radiazione.

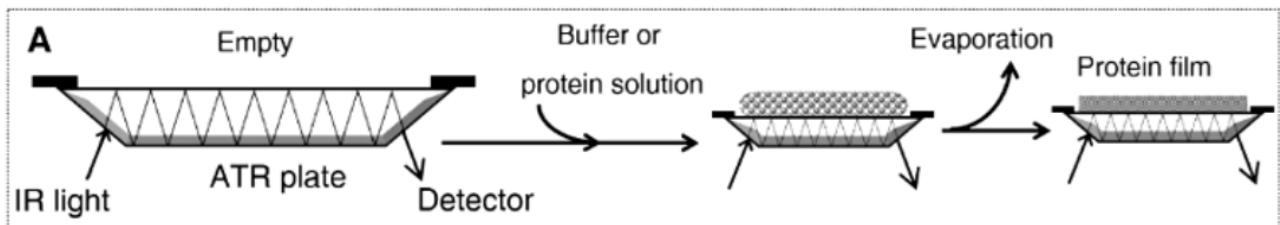
Nello spettro dell'infrarosso (1000nm – 100µm) la radiazione indurrà nella proteina transizioni di tipo vibrazionale. Cioè sono le vibrazioni della molecola ad assorbire le radiazioni.

Di maggior interesse è l'intervallo del medio infrarosso, dove ad assorbire è il legame peptidico, sempre come transizione vibrazionale, al contrario della transizione elettronica che si verifica con i far UV.

Ci sono diversi metodi per studiare le proteine con l'infrarosso. Noi ci focalizzeremo sul metodo FTIR-ATR.

FTIR-ATR

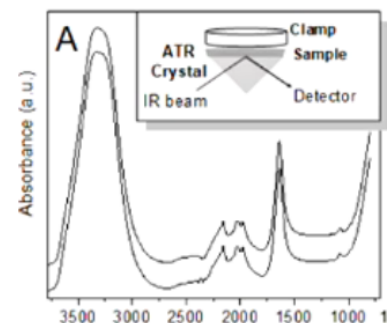
Il metodo Fourier Transform Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) consiste nel deporre la proteina su un cristallo ad alto indice di rifrazione, che viene raggiunto da una radiazione elettromagnetica nell'infrarosso con un angolo tale per cui si ha una riflessione totale nel cristallo. La luce quindi oscilla nel cristallo fino ad uscire ed essere rilevata da un rilevatore. Nel corso dell'oscillazione nel cristallo la luce genererà un'onda sulla superficie del cristallo, e questa può essere assorbita dal campione, che è posto sopra il cristallo. L'assorbimento è rilevato dal rilevatore.



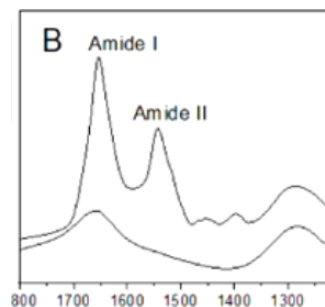
Uno dei problemi dell'infrarosso è il forte assorbimento dell'acqua nella stessa regione di assorbimento delle proteine, che come si può vedere dall'immagine (A) mostrano due spettri di assorbimento quasi sovrapponibili.

Una soluzione è misurare con lo stesso strumento lo spettro della soluzione contenente la proteina ed il solo solvente senza proteina. Dallo spettro della soluzione contenente la proteina si sottrae lo spettro del solo solvente per ottenere lo spettro della proteina.

Questo metodo è comunque di difficile applicazione, per cui si può usare un altro metodo.



Si può depositare il campione sul cristallo e si fa evaporare il solvente. Si otterrà una sorta di film di proteine sulla superficie del cristallo, che quindi si è arricchito nel contributo di assorbimento della proteina. Nell'immagine (B) si vede in basso lo spettro di assorbimento del solo tampone dopo evaporazione del solvente, ed in alto lo spettro di assorbimento della proteina con la parte non evaporata del tampone.



Nei grafici abbiamo in Y abbiamo l'assorbanza, in x abbiamo il numero d'onda. Il numero d'onda è $(1 / \text{lunghezza d'onda in cm})$. L'unità di misura è cm^{-1} .

La regione che più ci interessa nelle proteine è la banda Amide I che va 1600 e 1700 cm^{-1} , che è dovuta all'assorbimento del gruppo COO del legame peptidico. Un'altra regione interessante è la banda Amide II che va dai 1500 ai 1600 cm^{-1} , che è dovuta all'NH del legame peptidico.

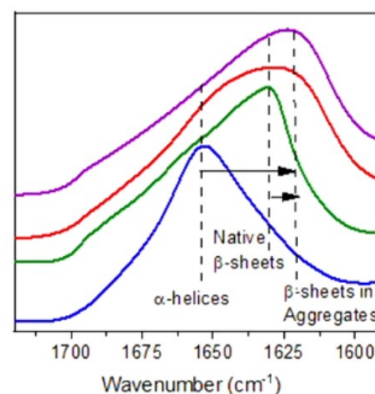
Ci focalizzeremo sulla banda Amide I che ci dà informazioni più dirette sulla struttura secondaria della proteina.

L'immagine a destra ci dà gli spettri di assorbimento di due proteine.

Lo spettro blu (BSA) è l'albumina sierica bovina in condizioni native, proteina ricca di strutture ad *alfa-elica*.

Lo spettro in verde (BLG) è la betalattoglobulina in condizioni native, proteina ricca di strutture a *beta-foglietto*.

BSA Native
BLG Native
BSA Th. Aggr.
BLG Th. Aggr.



La BSA è una proteina ricca in strutture alfa-eliche mentre la BLG è ricca in strutture beta foglietto, e come si vede dagli spettri questi sono ben diversi.

La BSA ricca in alfa eliche ha un massimo di assorbimento attorno ai 1652-1653 cm^{-1} .

La BLG, ricca in strutture beta foglietto ha un picco di assorbimento intorno ai 1630 cm^{-1} .

Strutture diverse hanno quindi bande di assorbimento diverse.

Le due proteine sono state incubate ognuna per 15 minuti a 90 gradi per ottenere un aggregato di tipo amorfo, ed in entrambi i casi quello che si osserva uno spostamento del massimo di assorbimento verso numeri d'onda sotto i 1625 cm^{-1} .

Strutture secondarie diverse hanno picchi di assorbimento a numeri d'onda diversi nella regione della banda Amide I.

Sulla base delle caratteristiche dello spettro FTIR-ATR è ora possibile correlare i valori del numero d'onda a determinate strutture proteiche.

Analizzando le caratteristiche dello spettro vediamo che i picchi non sono costituiti dal contributo di una singola componente di assorbimento, ma sono costituiti dalla somma di più spettri di assorbimento che si hanno in una stessa regione dello spettro.

Ci sono metodi per scomporre la curva per vedere come varia la pendenza della curva. Per fare questo dobbiamo fare la derivata seconda della curva, che ci permette di ricavare una serie di curve più informative.

Così facendo vediamo che i picchi diventano dei minimi.

Avendo i minimi della derivata seconda dello spettro si riesce ad associare meglio la derivata seconda dello spettro alle strutture secondarie.

Dall'immagine vediamo quali siano le regioni dello spettro associate alle strutture secondarie.

L'FTIR permette anche di discriminare tra strutture beta intramolecolari ed intermolecolari, queste ultime tipiche dell'aggregato proteico.

Strutture beta intramolecolari sono associate a numeri d'onda in media a 1633 cm^{-1} , mentre strutture beta intermolecolari si possono associare a numeri d'onda medi di 1625 cm^{-1} .

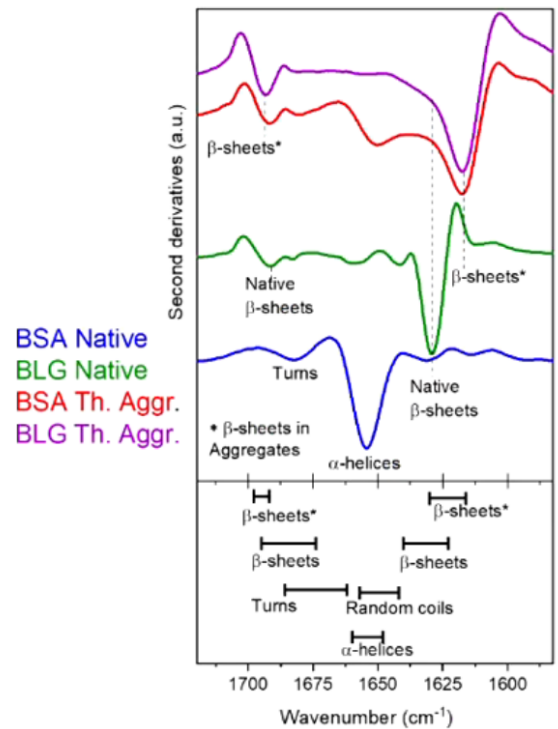
Le strutture random coil ed alfaelica sono sovrapposte sul numero d'onda 1654 cm^{-1} .

L'analisi di queste due strutture può essere eseguita in acqua pesante D₂O, lo spettro della struttura alfa elica cambia poco, mentre le strutture random coil cambiano molto il loro assorbimento dell'infrarosso, passando a circa 1645 cm^{-1} .

Esempio di analisi FTIR

Questo esempio studia la denaturazione termica della proteina Wrba. La proteina viene misurata a temperature diverse, con una velocità di riscaldamento di 0.2°C al minuto.

Per ogni temperatura è stato misurato lo spettro della soluzione e lo spettro del solvente; lo spettro del solvente è stato sottratto dallo spettro della soluzione, ottenendo così lo spettro della proteina.



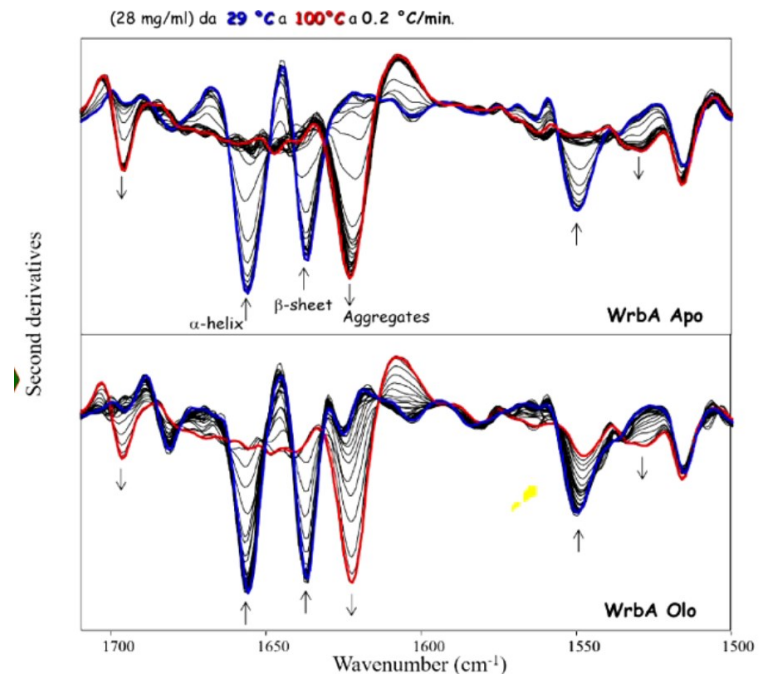
Nello spettro di assorbimento della proteina ci siamo focalizzati nella banda Amide 1 ed abbiamo effettuato la derivata seconda di questa regione, ottenendo lo spettro in blu nell'immagine.

Da questo spettro possiamo correlare attraverso tabelle di correlazione le lo spettro a strutture secondarie.

Scaldiamo poi la proteina. All'inizio non avremo variazioni nello spettro, ma con l'aumento di temperature vediamo che i picchi si abbassano fino ad appiattirsi, il che indica il disfacimento delle strutture secondarie della proteina.

Compare però un nuovo minimo a circa 1625 cm^{-1} , indicativo dell'aggregazione della proteina.

La misurazione può essere ripetuta in condizioni diverse.



Si possono così costruire curve di denaturazione, che ci dà informazioni sullo stato della proteina e sulla sua transizione da stato nativo a stato disordinato, dando informazioni sulla stabilità termodinamica e sulla T_m .

Si può così studiare anche la formazione di strutture beta intermolecolari.

La spettroscopia FTIR può essere usata per ricavare vari parametri:

- Ottenimento di informazioni strutturali della proteina, come stabilità, folding e unfolding, caratteristiche della struttura secondaria.
- È possibile ottenere parametri termodinamici e cinetici del folding
- Caratterizzazione della formazione di strutture secondarie
- Proprietà dinamiche (scambio H/D)

Fluorescenza

Nella fluorescenza abbiamo una molecola, che prende il nome di fluoroforo, che viene eccitata ad una specifica lunghezza d'onda ed emette fluorescenza ad una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella che l'ha eccitata.

Da questo spettro di emissione è possibile avere informazioni sulla proteina.

Il fluoroforo che si può utilizzare può essere intrinseco, già presente all'interno della proteina come gli aminoacidi aromatici. Oppure può essere estrinseco, quando la fluorescenza è data da una proteina aggiunta dall'esterno.

Tra i fluorofori estrinseci troviamo:

- l'ANS: che permette di evidenziare la presenza di regioni idrofobiche accessibili
- ThT: si lega a fibrille amiloidi e ne permette lo studio
- SYPRO Orange: sonda molecolare utilizzata per lo studio della stabilità e della stabilizzazione termica al legame col ligando.

ANS

L'ANS permette di studiare strutture idrofobiche esposte. L'ANS in soluzione ha una bassa fluorescenza, così come quando interagisce debolmente con delle proteine.

Se invece si incontrano regioni idrofobiche accessibili, aumenta la resa quantica della sua fluorescenza, e anche il massimo di emissione si sposta a lunghezze d'onda più piccole. L'intensità di emissione dell'ANS aumenta molto alla denaturazione della proteina. Queste caratteristiche sono utili per cercare conformazioni con strutture idrofobiche estese ed accessibili.

ThT

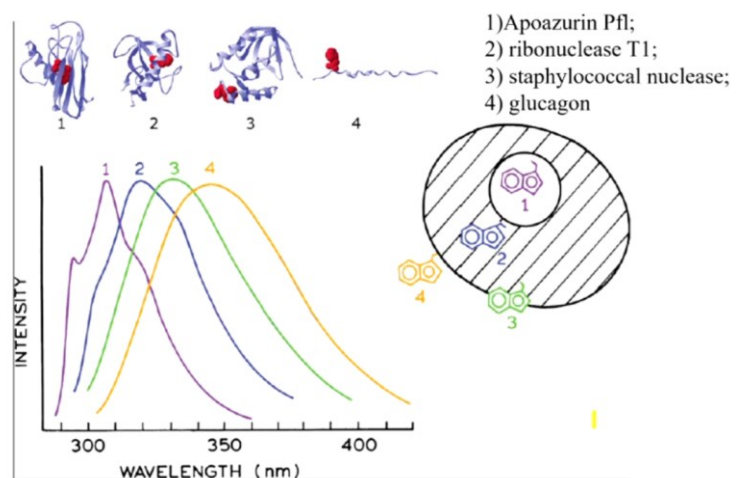
La tioflavina T (ThT) è un fluoroforo estrinseco che ha una intensità di fluorescenza che aumenta al legame con aggregati. Maggiore è la concentrazione di aggregati e maggiore è l'intensità del fluoroforo.

Fluorescenza intrinseca

I fluorofori intrinseci sono gli aminoacidi aromatici. Ciò che si osserva in una proteina è che se questa contiene triptofano, oltre a fenilalanina e tirosina, la fluorescenza del triptofano sarà quella preponderante nello spettro.

Inoltre se misuriamo la fluorescenza intrinseca nella proteina in stato denaturato notiamo un abbassamento della fluorescenza ed uno spostamento dell'emissione verso lunghezze d'onda più grandi. Questo ci dice non solo che il triptofano ha una fluorescenza maggiore rispetto agli altri aminoacidi aromatici, ma anche che il fluoroforo è sensibile allo stato di folding con riferimento alla struttura terziaria.

In base all'intorno del triptofano cambia la sua emissione. Sono comparate 4 proteine con un solo triptofano. Triptofano all'interno di una tasca idrofobica da una emissione minore e a lunghezze d'onda più corte. Maggiore è la lunghezza d'onda della fluorescenza del triptofano, maggiore è l'esposizione dell'aminoacido al solvente. Questo permette di analizzare il processo di denaturazione ed ottenere la T_m .



In generale è evidente un comportamento tipico: quando la proteina viene

denaturata monitorando la variazione di fluorescenza si vede una variazione del massimo di emissione a lunghezze d'onda maggiori, tranne se la proteina non è già denaturata.

L'intensità dipende invece dalla proteina che si sta analizzando. Spesso si osserva una diminuzione dell'intensità di fluorescenza, ma a volte si può osservare un aumento di fluorescenza, il che indica che il triptofano nella struttura nativa si trovava in condizioni che attenuavano l'emissione.

La fluorescenza è utile in varie occasioni:

- Studio delle proprietà conformazionali, folding/unfolding, stabilità della struttura terziaria
- Possibilità di ottenere parametri termodinamici e cinetici
- Interazioni proteina-ligando
- Studi di prossimità (FRET)
- Microscopia

Microscopia

La differenza tra aggregati amiloidi ed aggregati di altro tipo è legata agli aspetti morfologici peculiari, la cui analisi richiede metodi di microscopia ad alta risoluzione, dato che il diametro delle fibrille è al di sotto dei 20nm.

L'uso della microscopia ottica è limitato dalla diffrazione della luce. Nelle condizioni migliori si può ottenere una risoluzione spaziale pari alla metà della lunghezza d'onda della luce utilizzata. Difficilmente si distinguono oggetti a distanza inferiore a qualche centinaio di nanometri.

Recentemente sono state messe appunto tecniche dette di super risoluzione, che permettono di arrivare a risoluzioni al di sotto della lunghezza d'onda della luce.

Nel campo dell'aggregazione amiloide sono molto usate le tecniche di microscopia elettronica, soprattutto TEM e SPM (scanning probe microscopy), specialmente la AFM (atomic force microscopy).

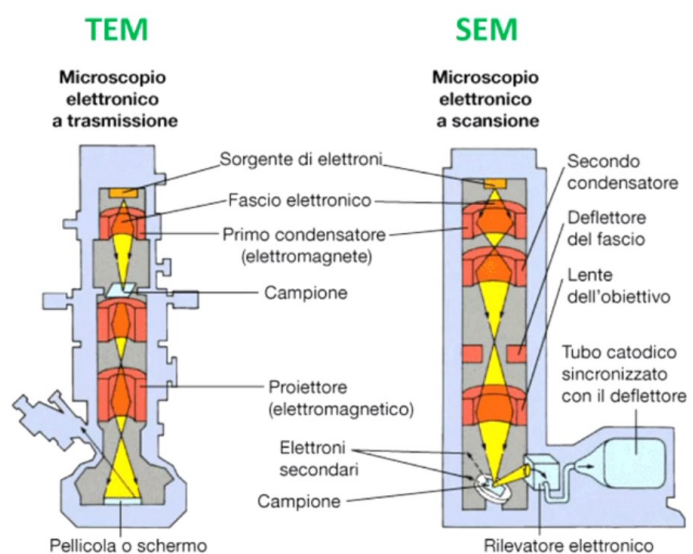
Microscopia elettronica

I microscopi elettronici possono essere descritti, in linea di principio, in maniera simile ad un microscopio ottico.

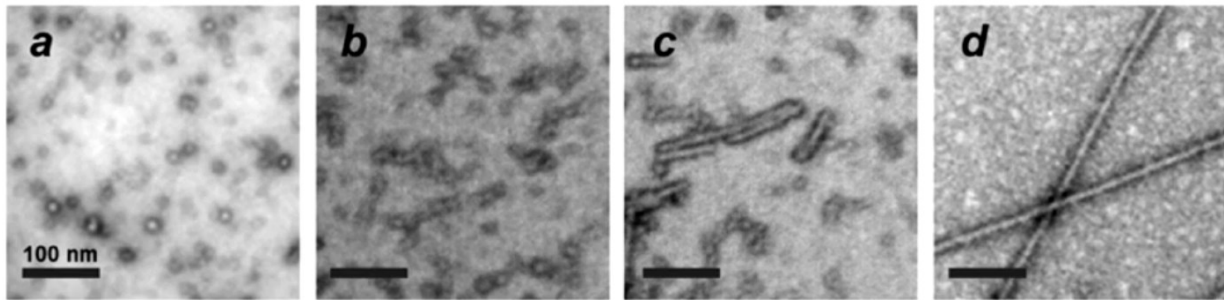
Le lenti sono sostituite da elettromagneti e il fascio di fotoni è sostituito da un fascio di elettroni.

Nella TEM vediamo la densità elettronica del campione. Il campione è preparato in modo da ottenerne sezioni molto sottili; viene poi attraversato da fascio di elettroni che viene rilevato da un rivelatore posto sulla superficie opposta del campione. Quello che vedremo è l'immagine data dal fascio di elettroni che viene attenuato dal campione nel passaggio attraverso quest'ultimo. Con un contrasto relativamente basso, perché il materiale biologico non contiene atomi pesanti, per cui il campione va adeguatamente preparato.

Nella SEM invece quello che vediamo è lo scattering degli elettroni sul campione, dando una scansione della superficie del campione.



Entrambe le tecniche di microscopia elettronica lavorano in condizioni di vuoto spinto. Il campione va adeguatamente preparato per evitare danni al campione durante l'esposizione al fascio di elettroni. Si guadagna però molto in risoluzione spaziale.



Aliquots collected at time points of (a) 9, (b) 15, (c) 21 and (d) 60 h from the kinetics were examined using TEM, which revealed (a) granular forms of α -synuclein oligomers, (b) associated granules, (c) short fibrils and (d) mature amyloid fibrils. All scale bars represent 100 nm

Cryo-EM

Negli ultimi anni la tecnologia Cryo-EM si è molto sviluppata, e la sua importanza è evidenziata dal Nobel per la chimica del 2017, dato proprio per questa importante innovazione.

Questa tecnica permette di ottenere informazioni strutturali del campione a risoluzione quasi atomica.

Nella cristallografia a raggi X la proteina o l'aggregato amiloide deve essere cristallizzato per essere analizzato. È difficile realizzare cristalli di aggregati di piccoli peptidi.

Nella Cryo-EM non si deve ottenere il cristallo, quindi si possono analizzare complessi proteici difficili o impossibili da cristallizzare.

La preparazione consiste nel congelare, rapidamente ed a temperature molto basse, la soluzione contenente il peptide o l'aggregato da analizzare.

Il campione vetrifica per via della rapida esposizione a basse temperature.

Data l'ampia quantità di molecole nel campione, nel momento della vetrificazione queste avranno diverso orientamento e conformazione.

Ottenute immagini del campione con varie proiezioni della proteina di interesse, si utilizzano algoritmi per ricostruire strutture tridimensionali del campione.

La risoluzione è in continuo miglioramento ed il numero di strutture risolte con Cryo-EM depositate nelle banche dati di strutture proteiche è in continuo aumento.

Questa tecnologia risulta molto utile per risolvere strutture di grandi dimensioni, ma coi progressi della risoluzione e nelle tecniche di preparazione si riescono già a risolvere proteine di dimensioni relativamente piccole.

Il range di risoluzione della Cryo-EM è molto interessante per la risoluzione della struttura tridimensionale di aggregati amiloidi.

La tecnologia è stata utilizzata per ottenere ed analizzare strutture di aggregati amiloidi *ex-vivo* da campioni di pazienti deceduti affetti da patologia di Alzheimer.

Atomic Force Microscopy

La microscopia a forza atomica è una tecnica molto utilizzata nello studio dell'aggregazione. La risoluzione spaziale è data da una sonda.

Questo microscopio è formato da un'asta (cantilever) alla cui estremità si ha una sonda (tip), la quale ha una punta di dimensioni nanometriche.

Attraverso un sistema di laser e rilevatori viene rilevata con estrema precisione la variazione in altezza e la torsione dell'asta al passaggio della punta sulla superficie del campione.

Il campione è fissato su una piattaforma che si muove in maniera regolata nelle tre dimensioni. Questa piattaforma permette di far muovere il campione e ne permette la scansione dell'intera superficie da parte della sonda.

La risoluzione della AFM dipende dalla dimensione della punta. Una punta sottile ha una risoluzione maggiore.

L'AFM può lavorare in medium come l'aria o l'acqua, ma il campione deve essere ben saldo al supporto. Il campione non richiede particolari preparazioni, per cui la tecnologia si adatta a misurare le caratteristiche topografiche di molti materiali.

Un utilizzo recente per la AFM è l'ottenimento di informazioni aggiuntive alla topografia. L'AFM può misurare forze. In alcune applicazioni è possibile misurare la forza di unfolding di regioni di proteina, ad esempio tirare porzioni di struttura secondaria transmembrana di una proteina transmembrana, misurando la forza necessaria a rimuovere la porzione dalla membrana. Da questo si può calcolare l'energia di interazione.