

Proteine ricombinanti per studi
strutturali.

Caratterizzazione biofisica:
Analisi dello stato di aggregazione

Analisi dello stato di aggregazione:

Aggregazione

Cause:

INTRINSECHE

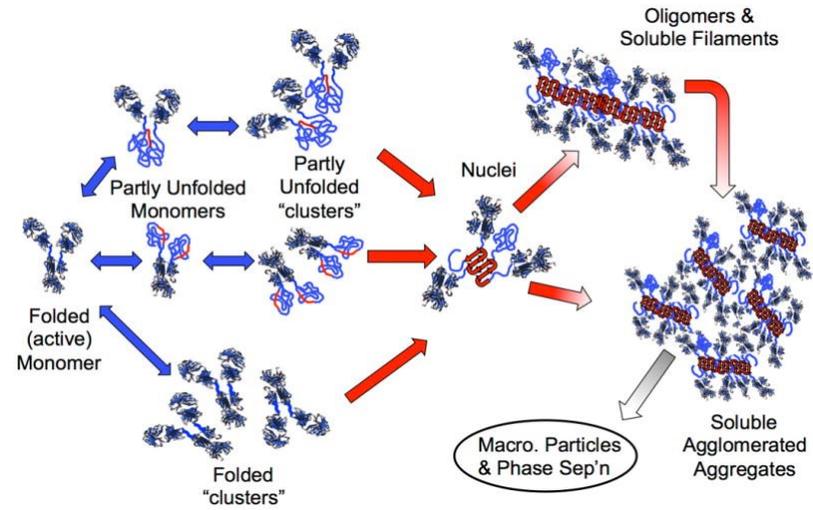
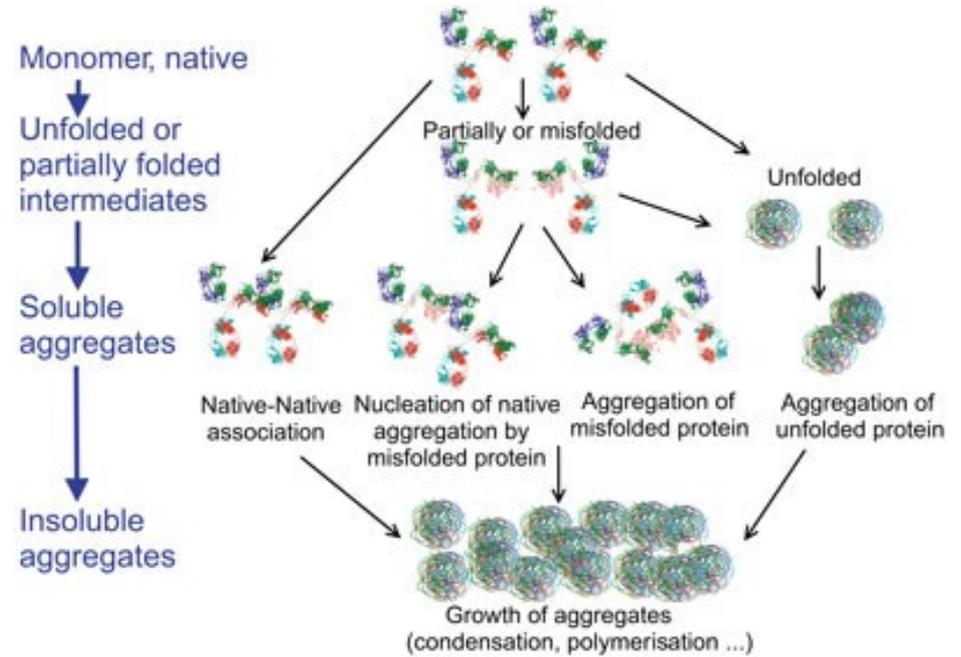
- pI
- Idrofobicità
- contenuto di strutture secondarie

AMBIENTALI

- T
- pH
- forza ionica
- [proteina]

STRESS

- congelamento/scongelamento
- Ossidazione
- deamidazione

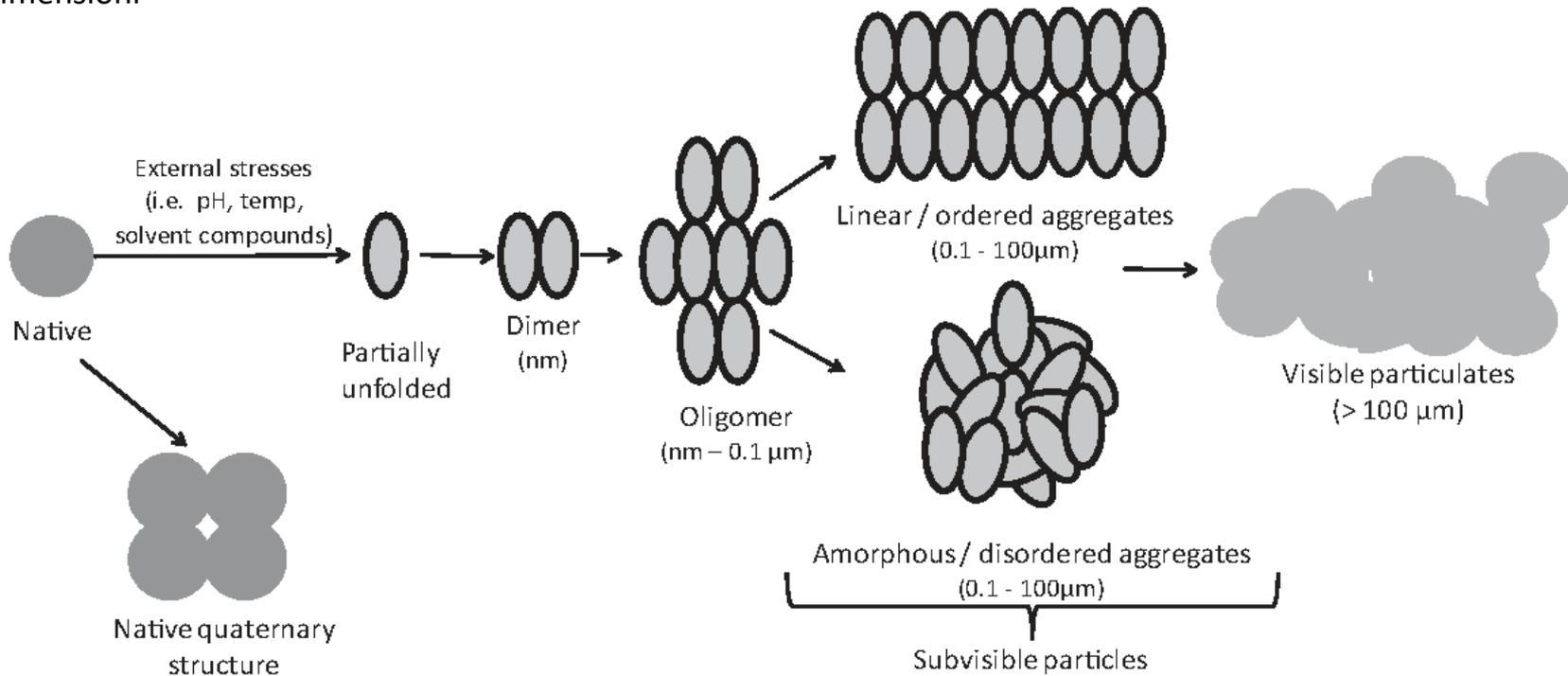


Analisi dello stato di aggregazione :

Aggregazione

Diversi Tipi di aggregati

≠ dimensioni



≠ emivita

≠ stabilità (da ms a giorni)

Analisi dello stato di aggregazione :

Metodi per l'analisi dello stato di aggregazione:

SEC

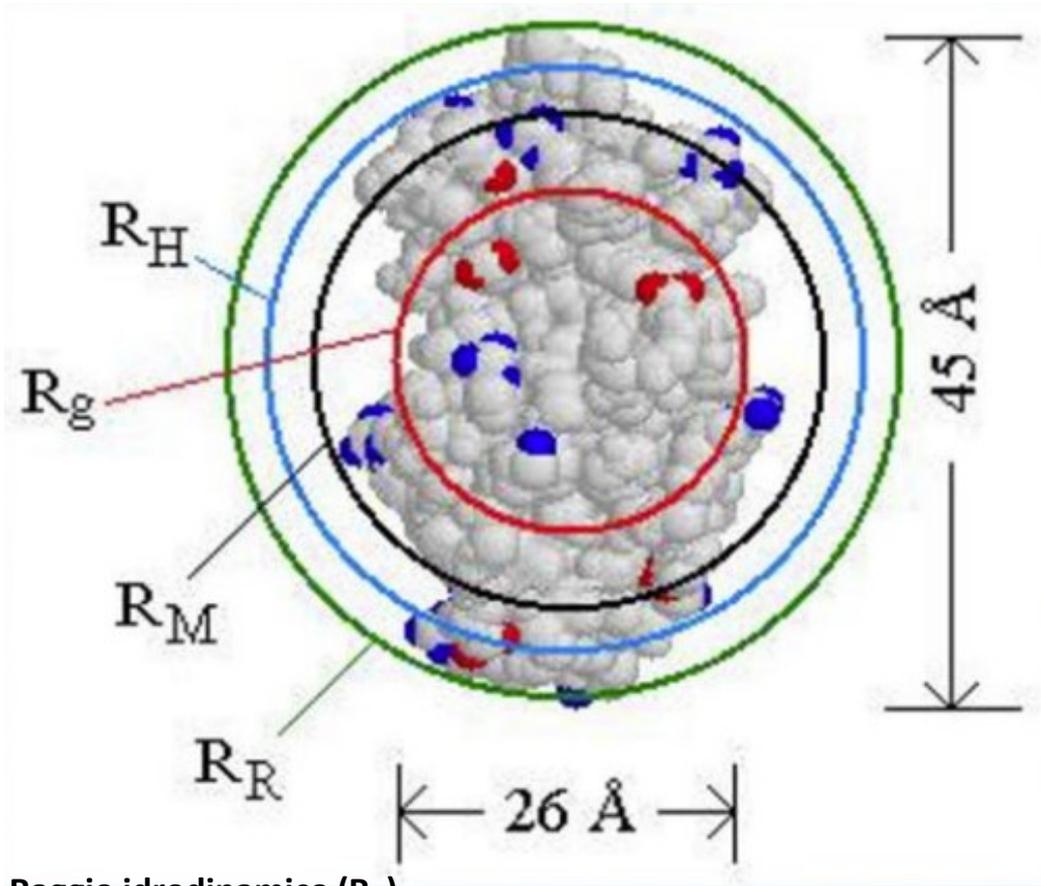
F3 (flow field fractionation)

AUC (analytical ultracentrifugation)

LS (light scattering)

Analisi dello stato di aggregazione :

DEFINIZIONI di R

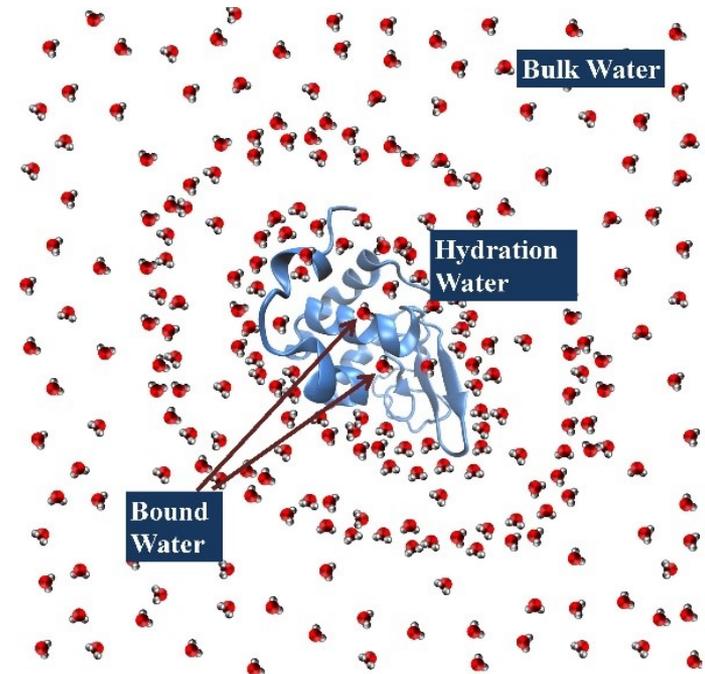


Raggio idrodinamico (R_H)

Raggio di girazione (R_g)

Raggio di rotazione (R_R)

Raggio di massa (R_M)

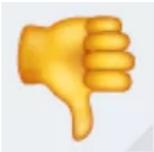
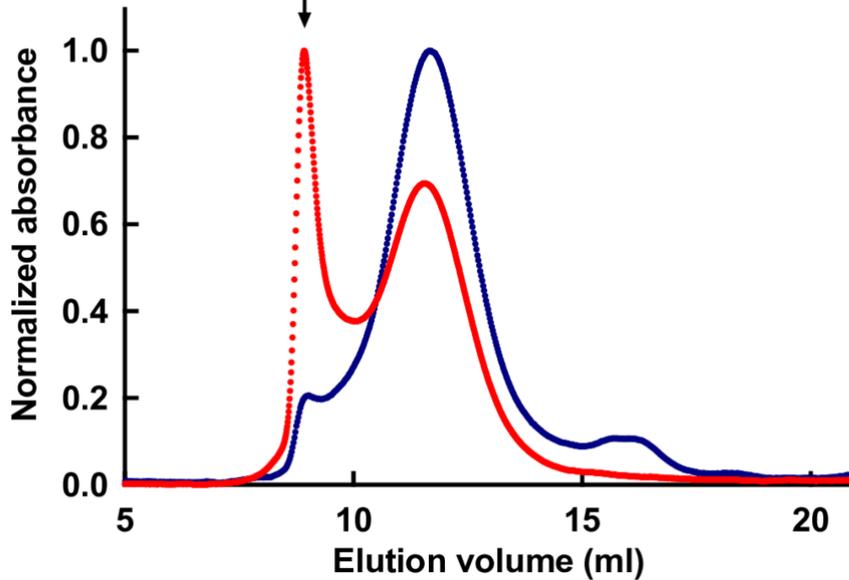


Analisi dello stato di aggregazione :

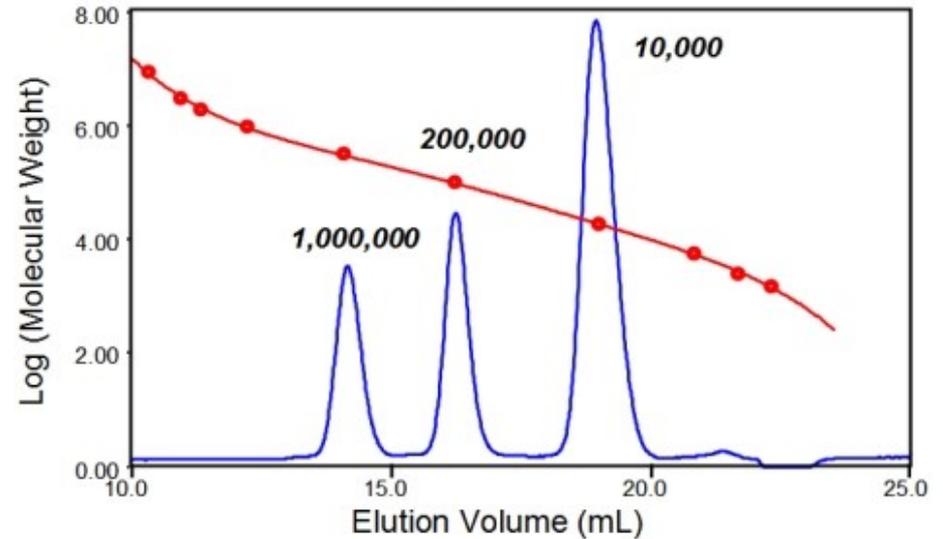
SEC

Metodo principale

void volume



Molecular Weight vs. Retention Volume



perturba la distribuzione degli aggregati:

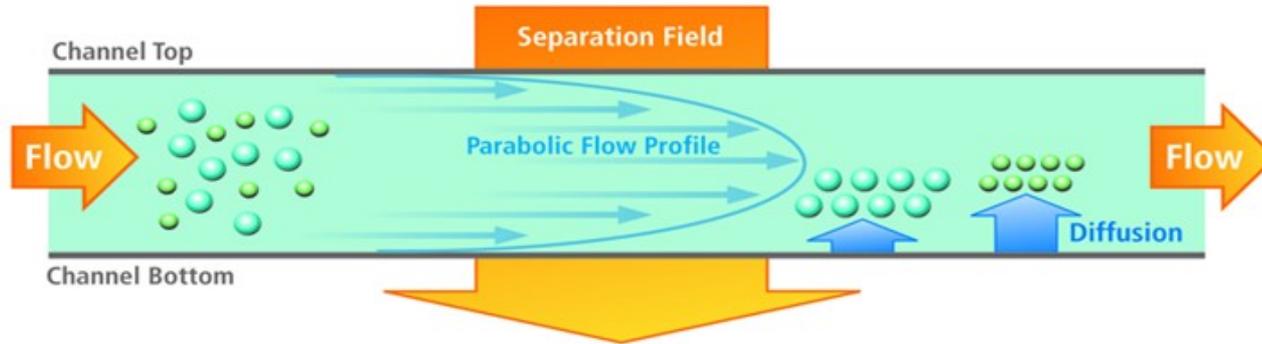
- Diluizione e Variazione del solvente
- Filtrazione di aggregati insolubili
- Interazioni aspecifiche con la matrice

Non rileva associazioni non covalenti rapide e reversibili

Bassa sensibilità ($\geq 0.1\%$)

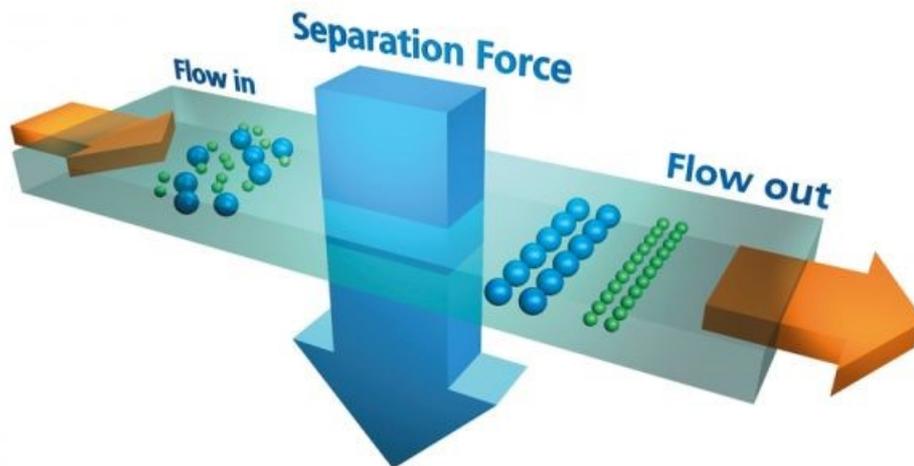
Analisi dello stato di aggregazione :

F3 (flow field fractionation)



Nel capillare ($w=1-10\mu\text{m}$) : PROFILO del FLUSSO PARABOLICO

CAMPO comprime le molecole in strati di diverso spessore λ



Ritenzione $r = \frac{6\lambda}{w} \left[\coth \frac{w}{2l} - \frac{2l}{w} \right] \approx \frac{6\lambda}{w}$

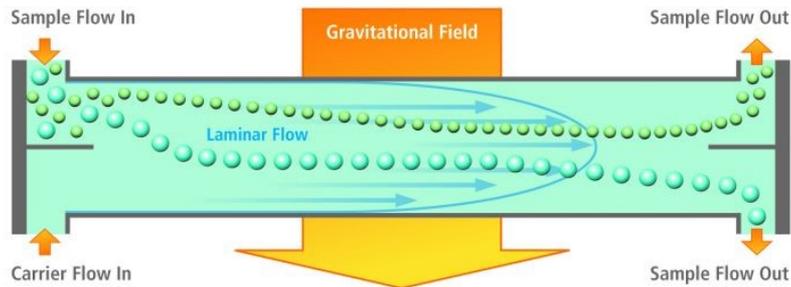
$$\lambda = \frac{RT}{F}$$

$$r = \frac{6RT}{Fw}$$

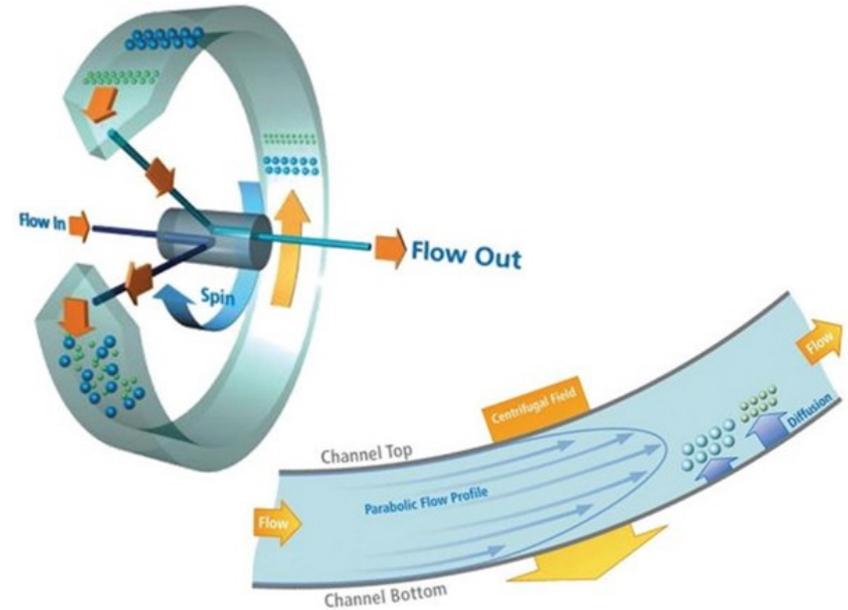
Analisi dello stato di aggregazione :

F3 (flow field fractionation)

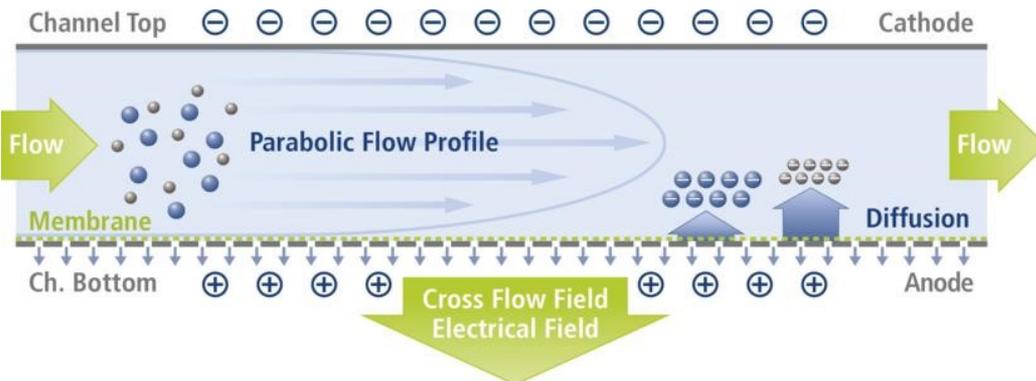
Gravitational FFF



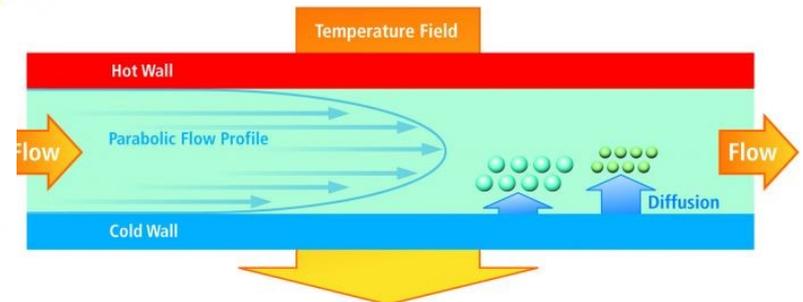
Sedimentation FFF



Electrical FFF

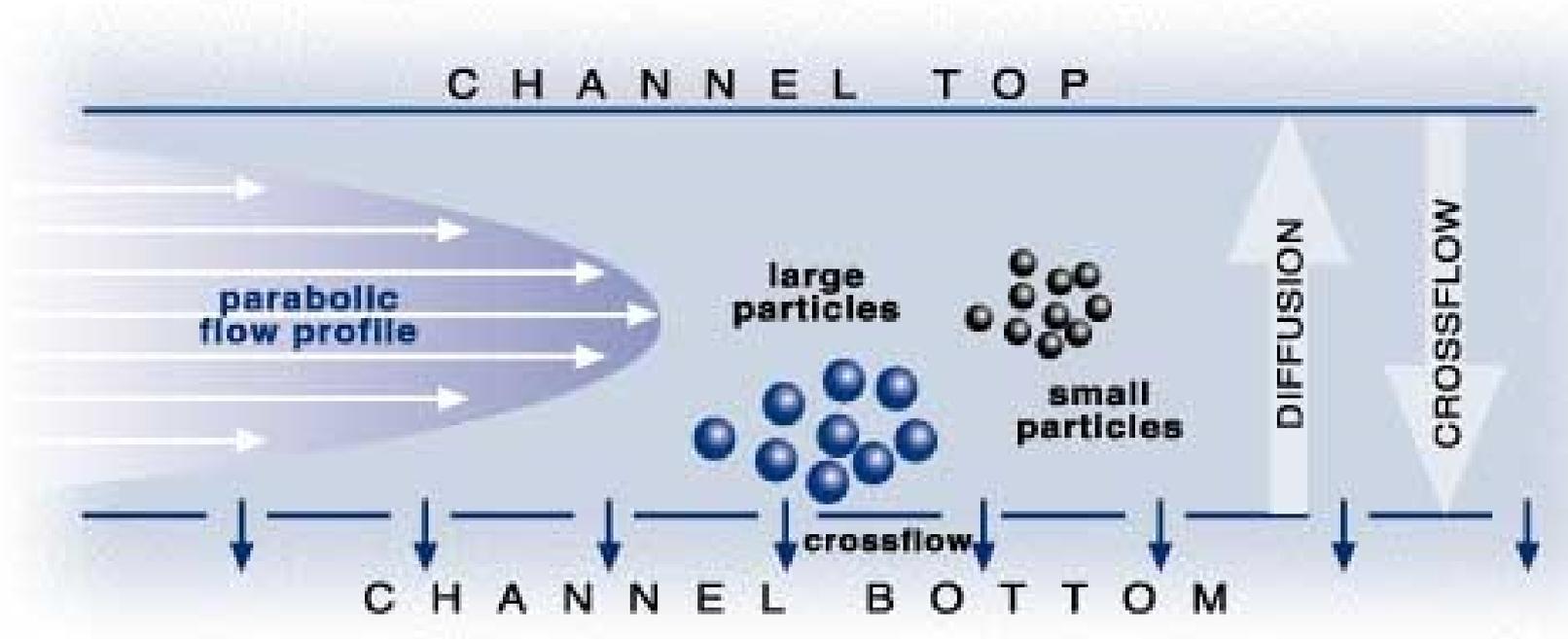


Thermal FFF (fattore termico)

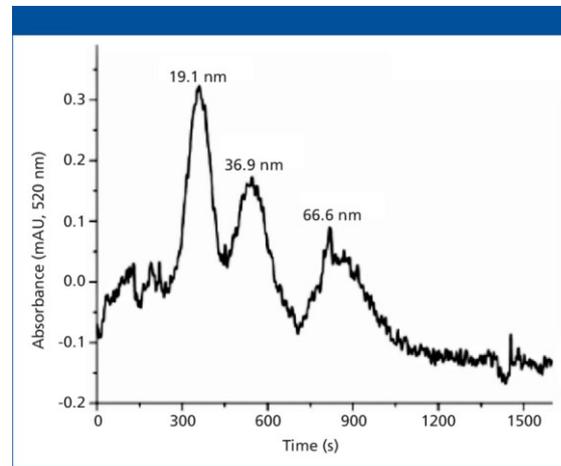


Analisi dello stato di aggregazione :

F4 (flow field flow fractionation)



FRACTOGRAM

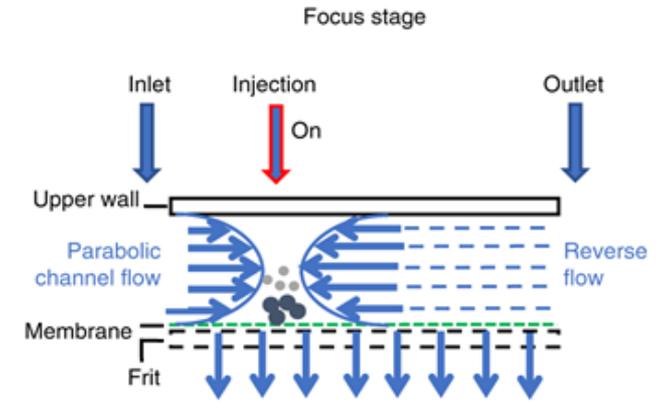
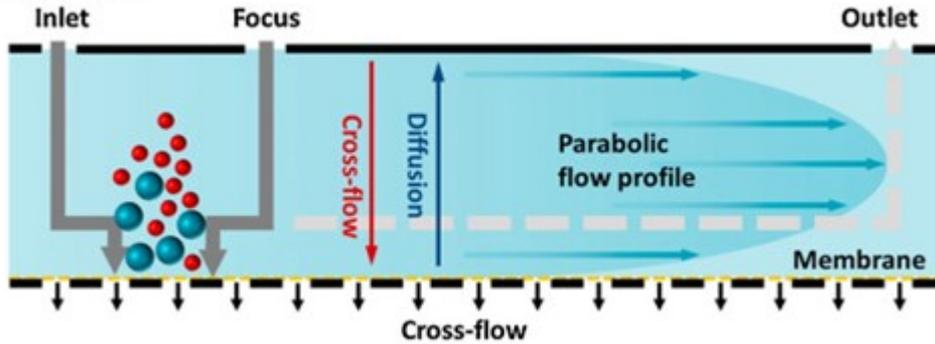


Analisi dello stato di aggregazione :

F4 (flow field flow fractionation)

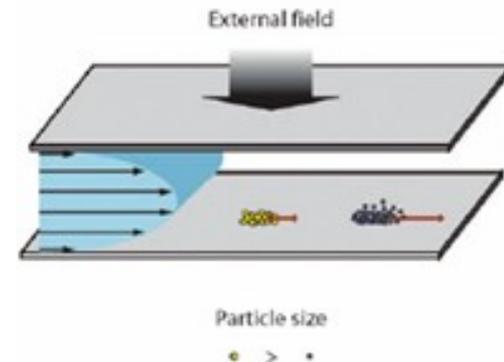
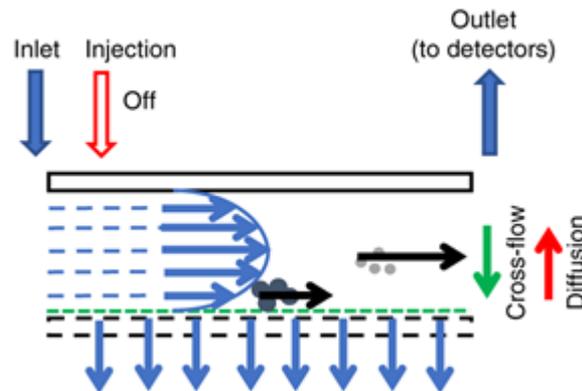
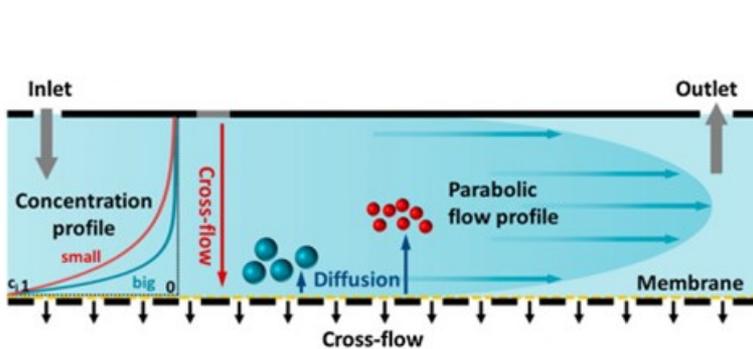
1 step: FOCUS

A: Focus step



2 step: ELUTION: MODES

a) **Normal Mode (Flow FFF/Asymmetric Flow FFF) <math>< 1\mu\text{m}</math>**

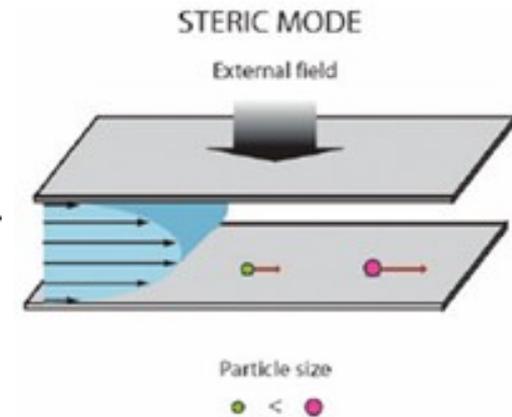
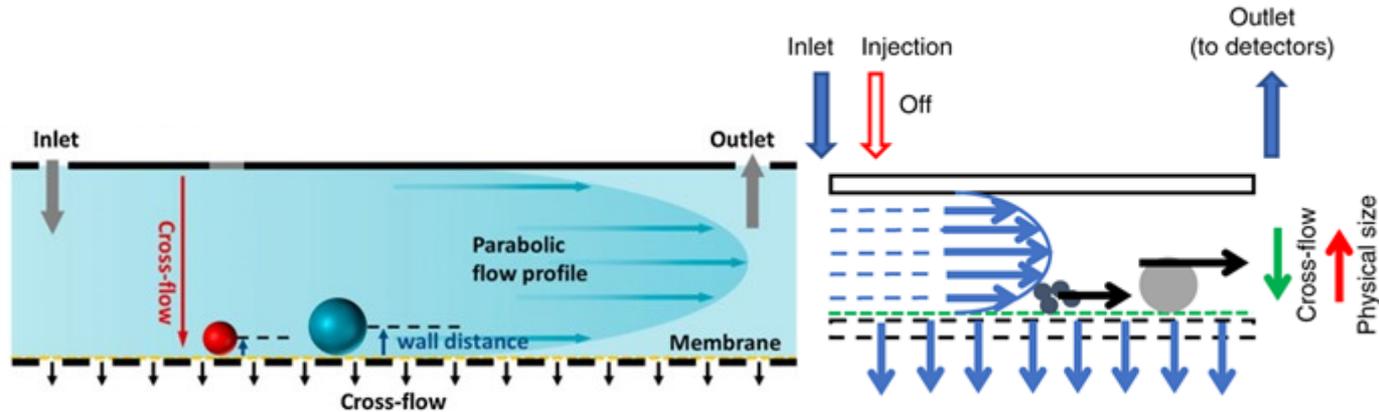


Analisi dello stato di aggregazione :

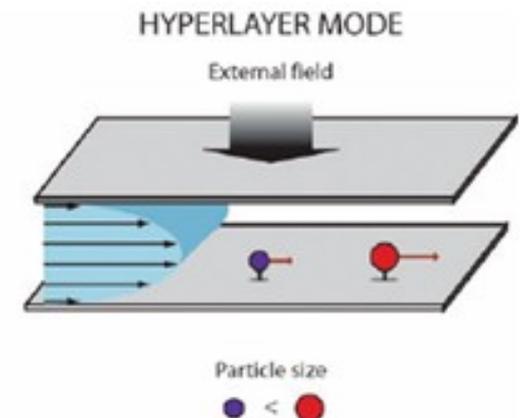
F4 (flow field flow fractionation)

b) Reversed modes

1. Steric Mode: 0.5–10 mm (dipende solo dalle dimensioni)



2. Lift-hyperlayer Mode: $\geq 10\text{mm}$ (dipende non solo dalle dimensioni ma anche su altre proprietà fisiche della particella come forma e deformabilità).



Analisi dello stato di aggregazione :

F4 (flow field flow fractionation)



- In soluzione /nativa/non distruttiva
- Elevata risoluzione/versatilità/ selettività
- Ampio intervallo di dimensioni
- Accoppiabile con diversi detectors
- Flussi e campi modificabili per una migliore separazione
- Complementare a SEC



- Risoluzione vs velocità
- Costo
- Scarsa diffusione
- Piccola scala

Analisi dello stato di aggregazione :

AUC: basi

$$RCF = 1.1118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$$

elevata velocità angolare (120.000-150.000 RPM) impone elevate forze centrifughe su particelle in soluzione (<10 μ m)
separa in base delle differenze di peso

$$F_c = \text{Forza centrifuga} = m \omega^2 r$$

con $\omega = 2\pi (\text{giri/min})/60$

Contrastata da $F_B = \text{Forza di galleggiamento}$
 $F_f = \text{Forza d'attrito}$

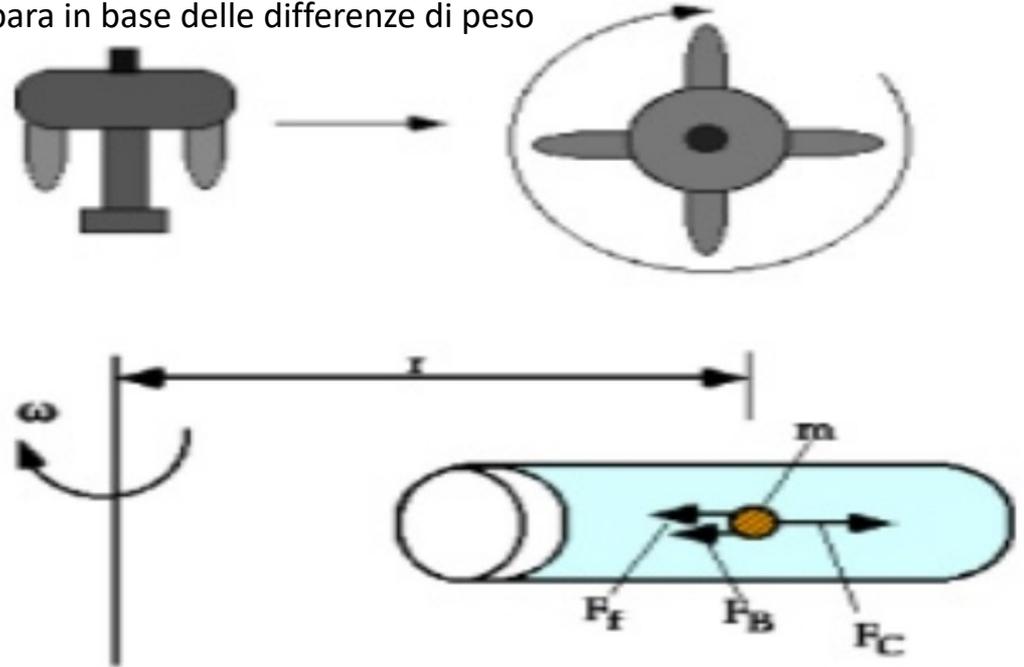
$$\text{Tasso di sedimentazione } \frac{dr}{dt} = \frac{M(1-v\rho)}{N_A f} \omega^2 r$$

$M = \text{MW}$
 $v = \text{Volume parziale molare}$
 $\rho = \text{densità}$
 $f = \text{coefficiente di frizione}$

Coefficiente di sedimentazione

Equazione di Svedberg (1923)

$$s = \frac{dr}{dt} (1/\omega^2 r) = \frac{N_A f}{M(1-v\rho)}$$



Analisi dello stato di aggregazione :

AUC: strumentazione

Rotore a T controllata: celle

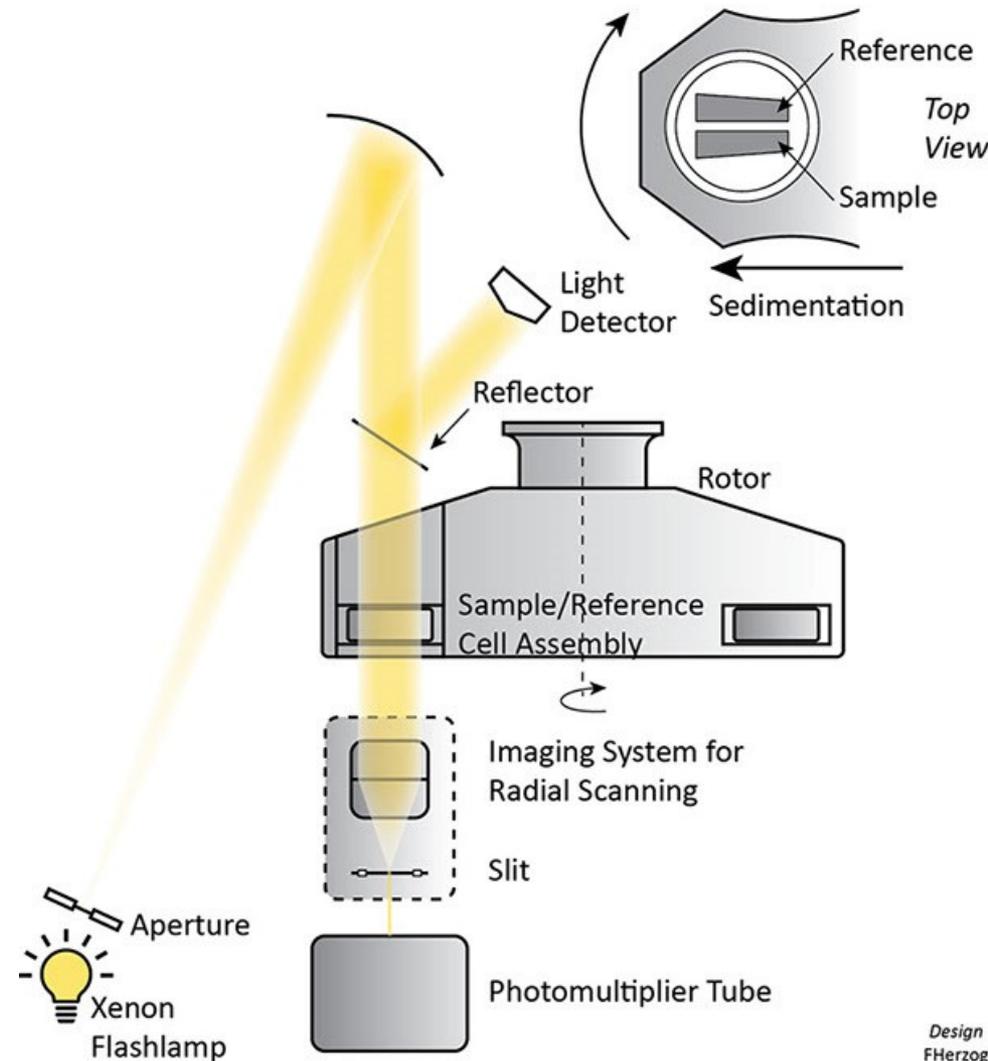
analitica
bilanciamento

Detector:

1. Assorbimento
2. Interferenza Rayleigh
3. Indice di rifrazione
4. Fluorescenza

TIPI:

**Analitica
Preparativa**

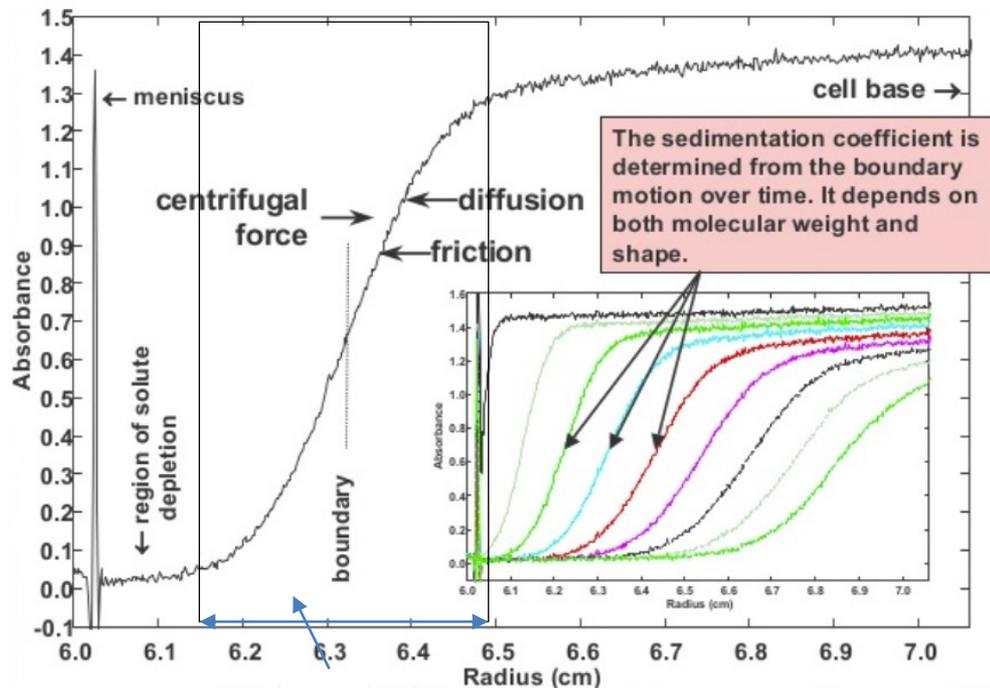


Analisi dello stato di aggregazione :

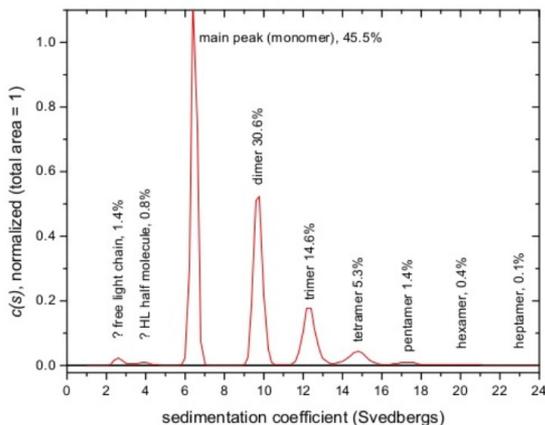
AUC: setup

- Velocità di sedimentazione (SV):**
 tecnica idrodinamica → FORMA e MASSA
 → Δ CONFORMAZIONALI

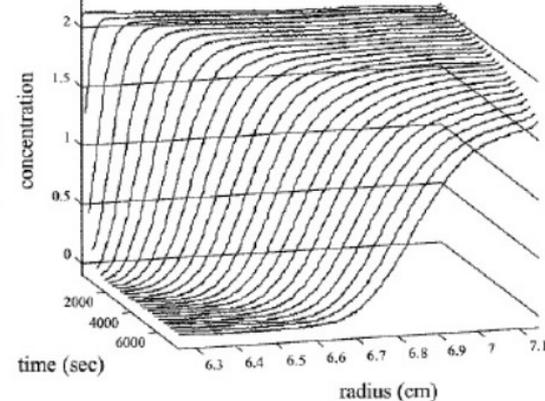
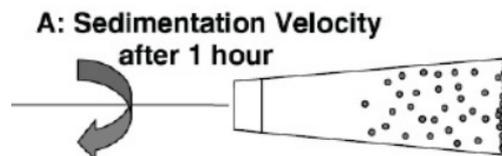
Elevata ω (40000-60000 RPM)
 → fronte unico per ogni molecola
 si muove con V caratteristica
 -> coefficiente di sedimentazione (S)
 -> coefficiente di diffusione (D)



Ampiezza dipende da coefficiente di diffusione (D)



picco con Area ([])
 Forma (omogeneità/purezza)



→ ASSEMBLY/DIS-ASSEMBLY/AGGREGAZIONE

Analisi dello stato di aggregazione :

AUC: setup

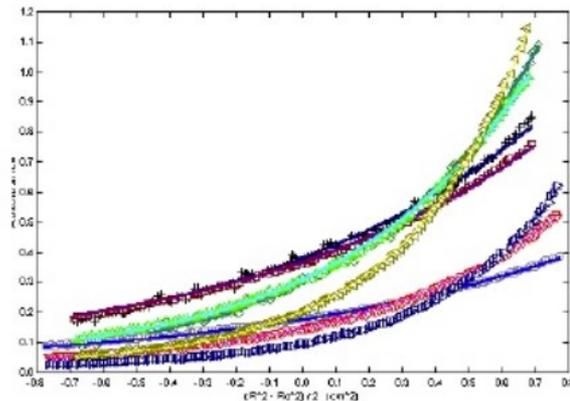
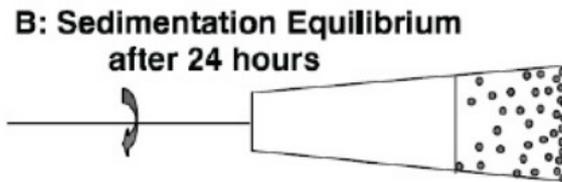
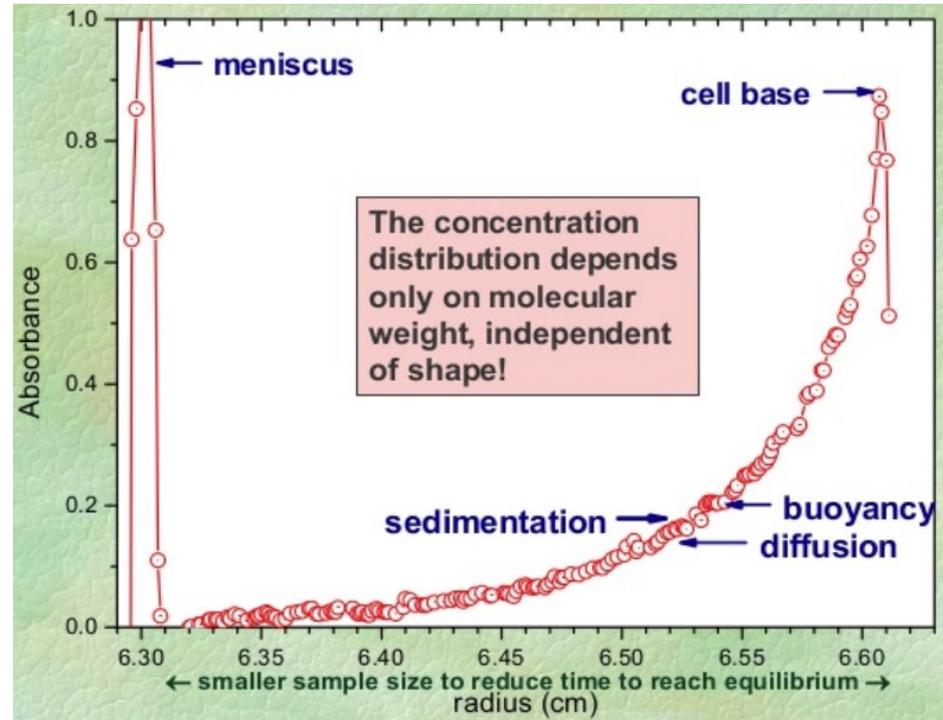
2. Equilibrio di sedimentazione (SE):

la sedimentazione è bilanciata dalla diffusione
 → gradiente esponenziale delle []

Metodo termodinamico
 → MW e STECHIOMETRIA:

$$M.W. = \frac{2RT \ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right)}{\omega^2(1 - \bar{v}\rho)(r_2^2 - r_1^2)}$$

→ ASSEMBLY/OLIGOMERIZZAZIONE



Analisi dello stato di aggregazione :

AUC



- FIRST PRINCIPLE
- In soluzione /nativa /no distruttiva
- Risoluzione
- Ampio intervallo di dimensioni
- Complementare a SEC



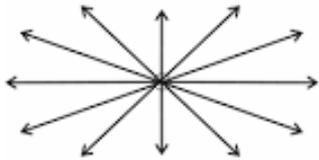
- Difficile quantificare aggregati irreversibili
- Costo
- Scarsa diffusione
- LT

Analisi dello stato di aggregazione :

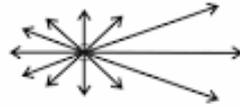
LS (Ligt Scattering)

Originata da radiazione elettromagnetica che induce un dipolo oscillante nelle molecole
ELASTICO → non è associata a transizioni elettroniche

Direction of Incident Radiation



Raleigh Scattering
 $r \ll \lambda$



Mie Scattering
 $r \gg \lambda$

MIE ratio

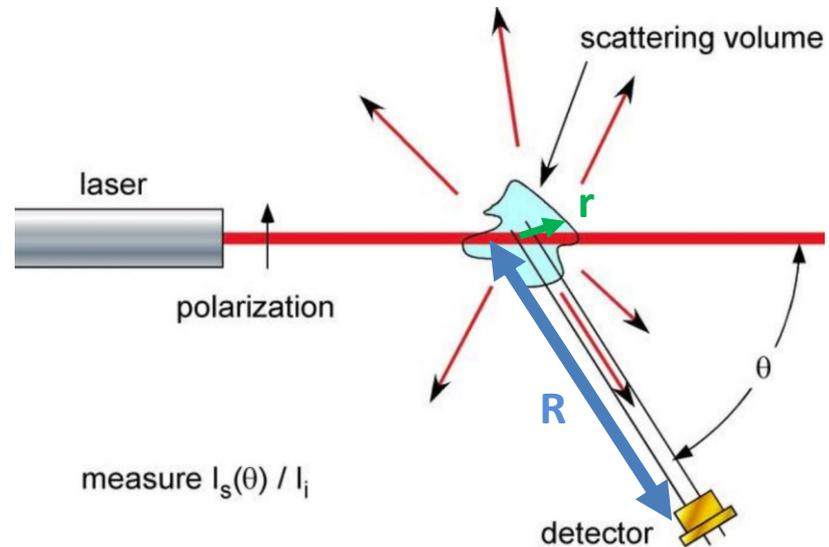
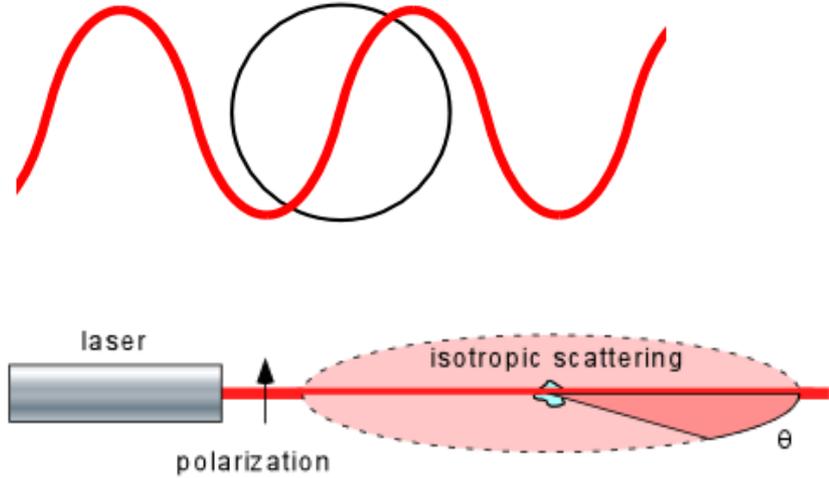
$$X_M = 2\pi r/\lambda \ll 1$$

scattering isotropico dipende da r e da λ con un intensità

$$I = I_0 \frac{8\pi^4 \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta).$$

R = distanza dal detector

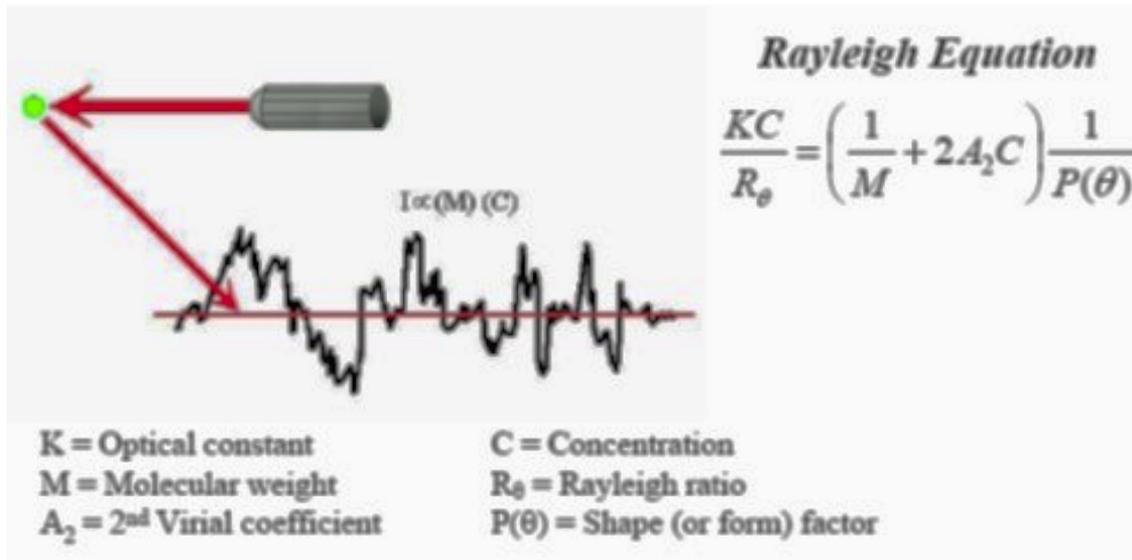
α = volume di polarizzazione



Analisi dello stato di aggregazione :

SLS (Static Light Scattering)

misura la media dell'intensità di scattering in un Δt



$A_2 < 0$ le particelle tendono a restare in soluzione
 $= 0$ (θ solvent)
 > 0 le particelle tendono ad aggregare/precipitare

Costante ottica

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_o^4 N_A} \left(n_o \frac{dn}{dc} \right)^2$$

λ_o = laser wavelength
 N_A = Avogadro's number
 n_o = Solvent RI
 dn/dc = differential RI increment

Rayleigh ratio

$$R_\theta = \frac{I_A n_o^2}{I_T n_T^2} R_T$$

I_A = Intensity of analyte (sample I – solvent I)
 n_o = Solvent RI
 I_T = Intensity of standard (toluene)
 n_T = Standard (toluene) RI
 R_T = Rayleigh ratio of standard (toluene)

Dipendenza angolare

$$P\theta = 1 + \frac{16\pi^2 n_o^2 R_g^2}{3\lambda_o^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

R_g = Radius of gyration
 θ = Measurement angle

Analisi dello stato di aggregazione :

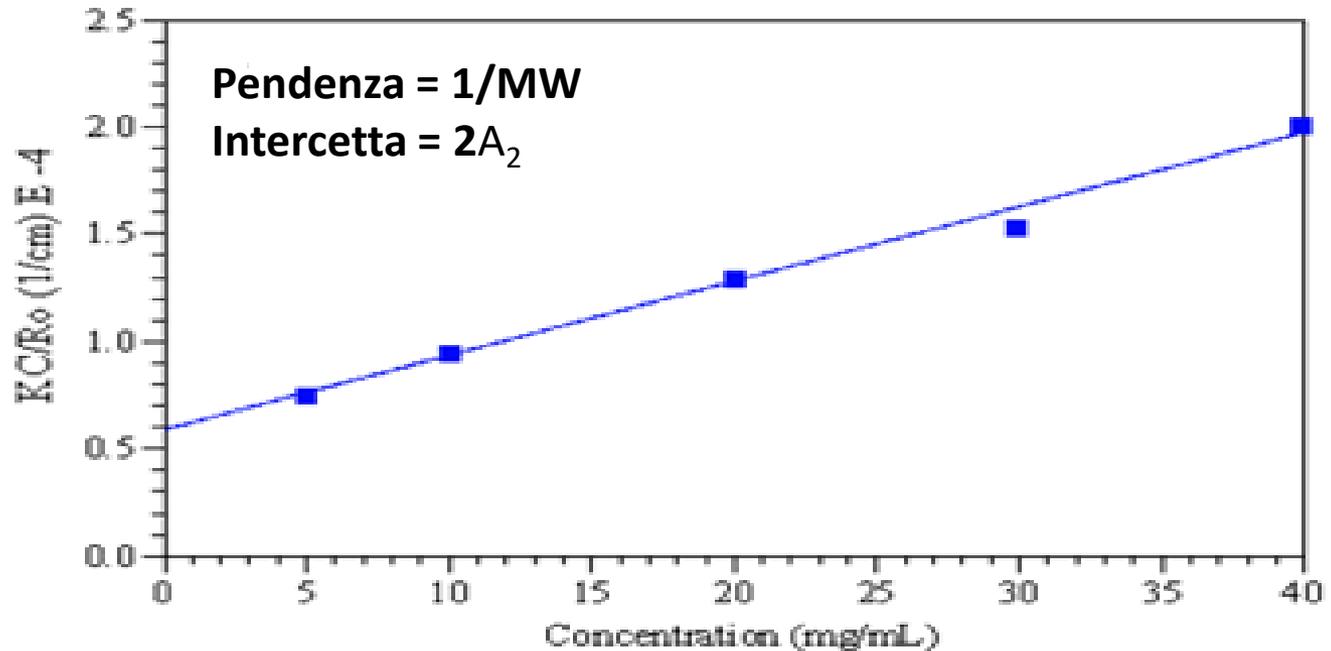
SLS (Static Light Scattering)

scattering isotropico per molecole con $R_g \leq 12\text{nm}$ e polimeri random coil con $MW \leq 100\text{kDa}$

$P(\theta) = 1$

DEBYE PLOT

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2C \right)$$



Analisi dello stato di aggregazione :

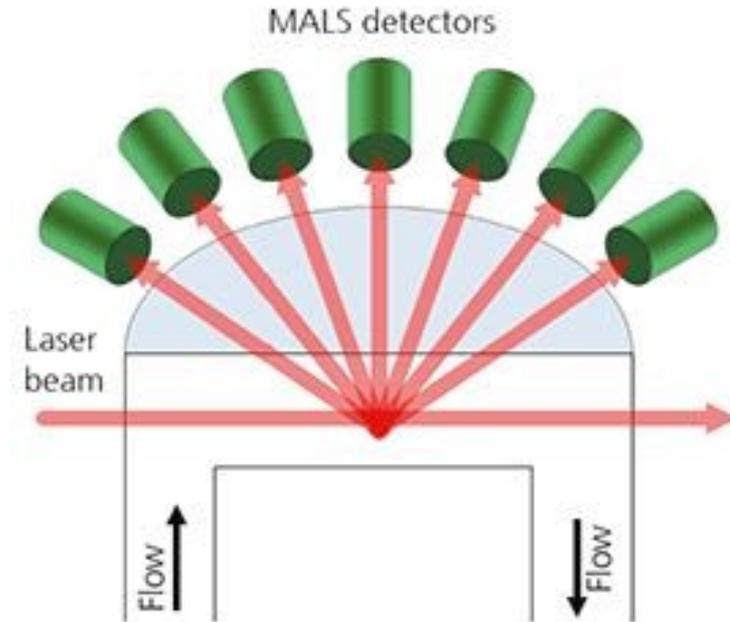
MALS (Multi Angle Light Scattering)

In caso di scattering non isotropico

molto sensibile
Veloce e accurato
media dei MW
indipendente dalla forma

R_g
 A_2

SEC/MALS



First principle
MW assoluti e per la frazione vicina al limite di esclusione
rileva/quantifica popolazioni
HT



Eredita i svantaggi della SEC
Sensibilità dipende dal detector
Basso segnale/rumore

Analisi dello stato di aggregazione : DLS (Dynamic Light Scattering): basi

basato sul **moto browniano** delle particelle in soluzione

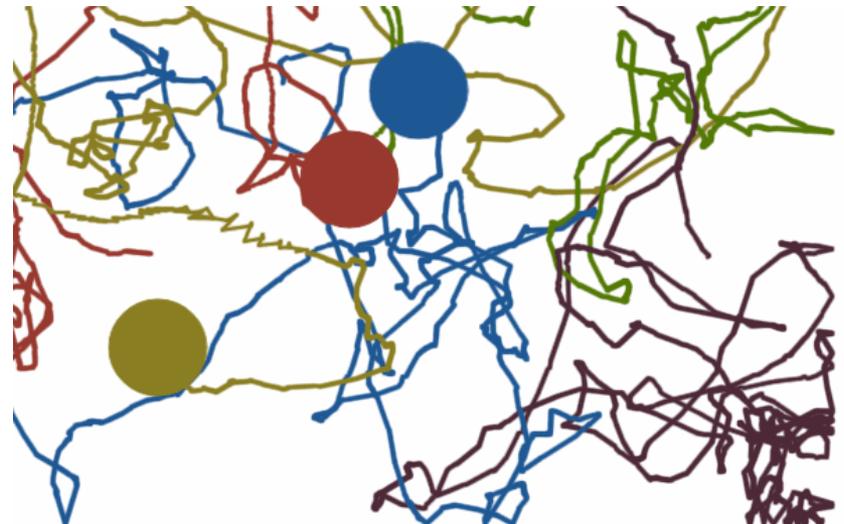
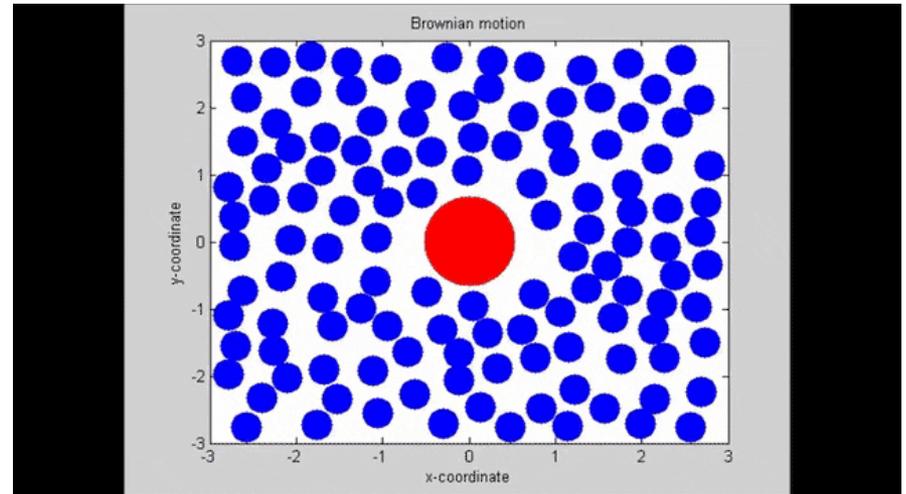
inversamente proporzionale alle dimensioni

Equazione di Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

D= coefficiente di diffusione traslazionale

η = viscosità



Analisi dello stato di aggregazione : DLS (Dynamic Light Scattering): basi

dimensione

$D_T \propto 1/R$
Small particles move faster

forma
 $D_T \propto 1/f_s$
Asphericity slows it down

$D_T \propto 1/f_h$
Attached solvent and/or interparticle interactions create drag

Rh encompasses all of these factors

$D_T \propto 1/\eta$
Viscous solvent slows it down.
...and if concentration too high, 'viscosity effects'

$D_T \propto T$
High temperature speeds it up

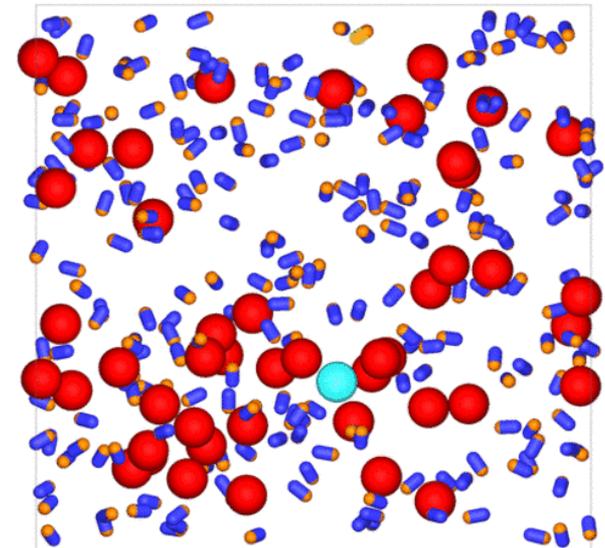
idratazione

Se c'è sedimentazione, il moto non è casuale:



limite di dimensione superiore

(limite di dimensione inferiore dipende da segnale/rumore).



Analisi dello stato di aggregazione : DLS (Dynamic Light Scattering): basi

Misura le fluttuazioni dello scattering della luce nel t intorno a un valore medio

Analizzabili mediante la **FUNZIONE DI AUTOCORRELAZIONE**:

$$g(\tau) = B + \beta \exp(-2 \Gamma \tau)$$

B linea di base della fluttuazione

β Ampiezza

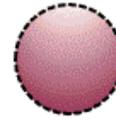
$\Gamma = q^2 D$

$$q = (4\pi n / \lambda_0) \sin(\theta/2)$$

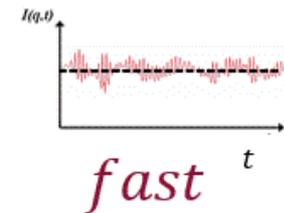
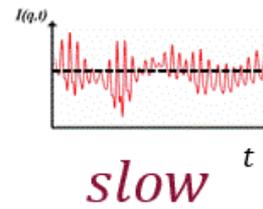
$n = IR$

$\theta =$ angolo di scattering

large d_h



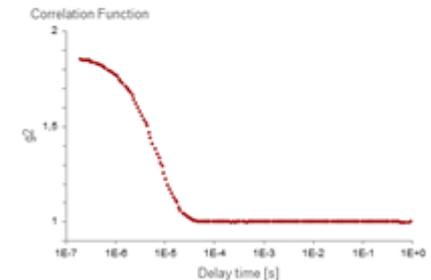
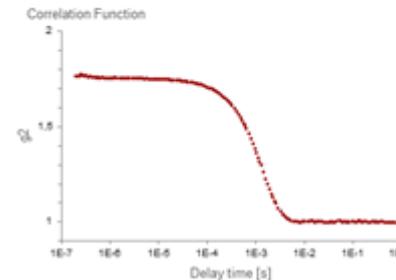
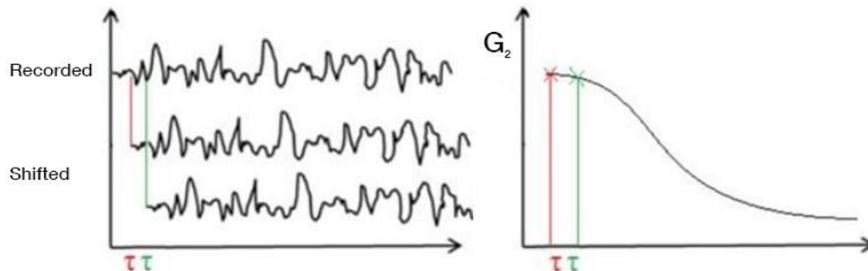
small d_h



Large particles



Small particles



Quantifica quanto è simile l'I scattering (la distribuzione delle popolazioni) fra il tempo t e il tempo t+ τ

Analisi dello stato di aggregazione :

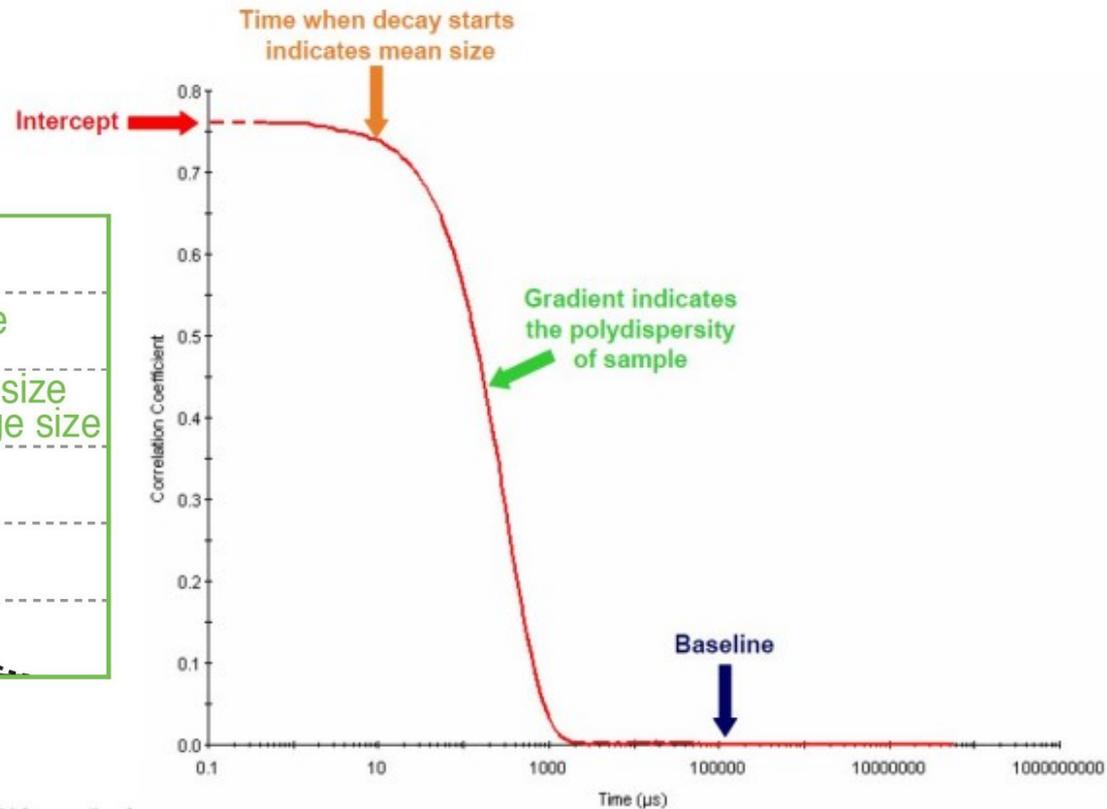
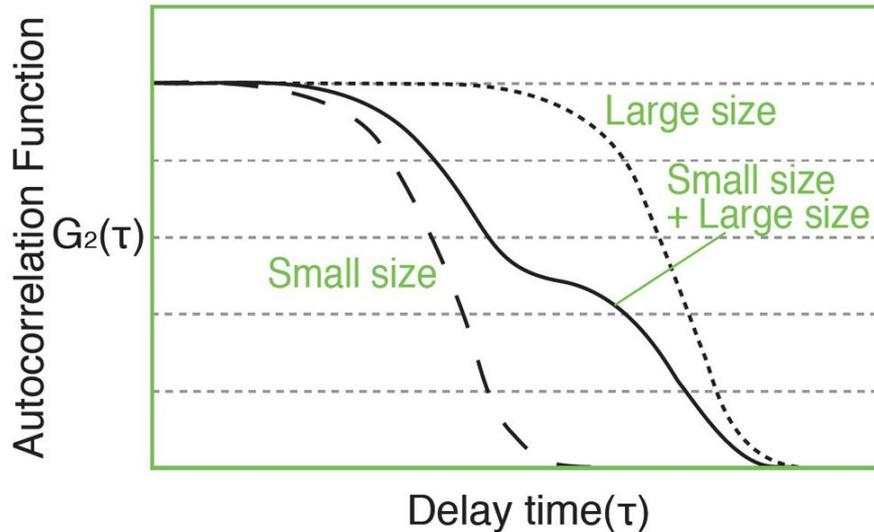
DLS (Dynamic Light Scattering): basi

FUNZIONE DI AUTOCORRELAZIONE:

Correla variabili casuali in due punti diversi (s o t) in funzione della distanza tra i punti
Contiene tutte le informazioni relative alla diffusione delle particelle

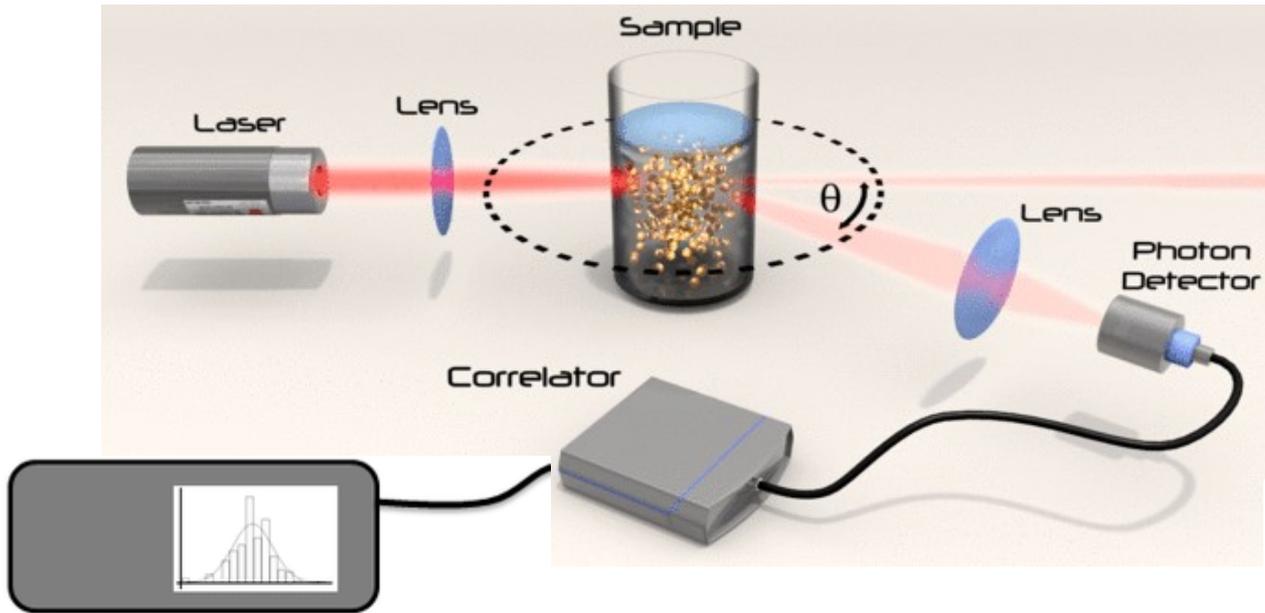
$$G(\tau)^2 = I(t) \times I(t + \tau) / (I_{\text{mean}})^2$$

CORRELOGRAMMA

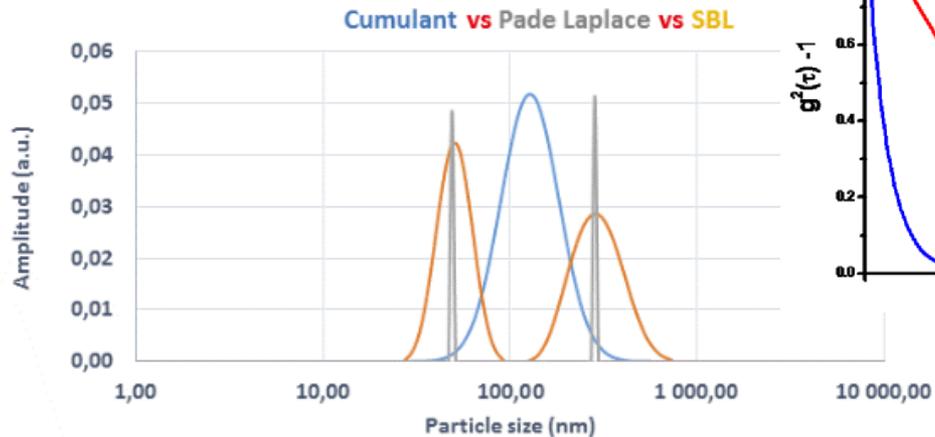
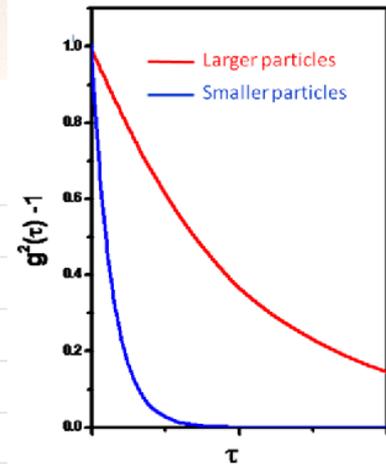
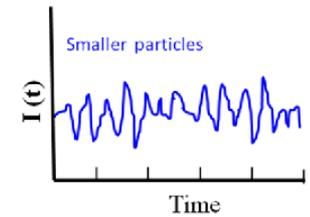
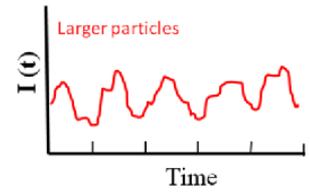


Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering): setup



Computer



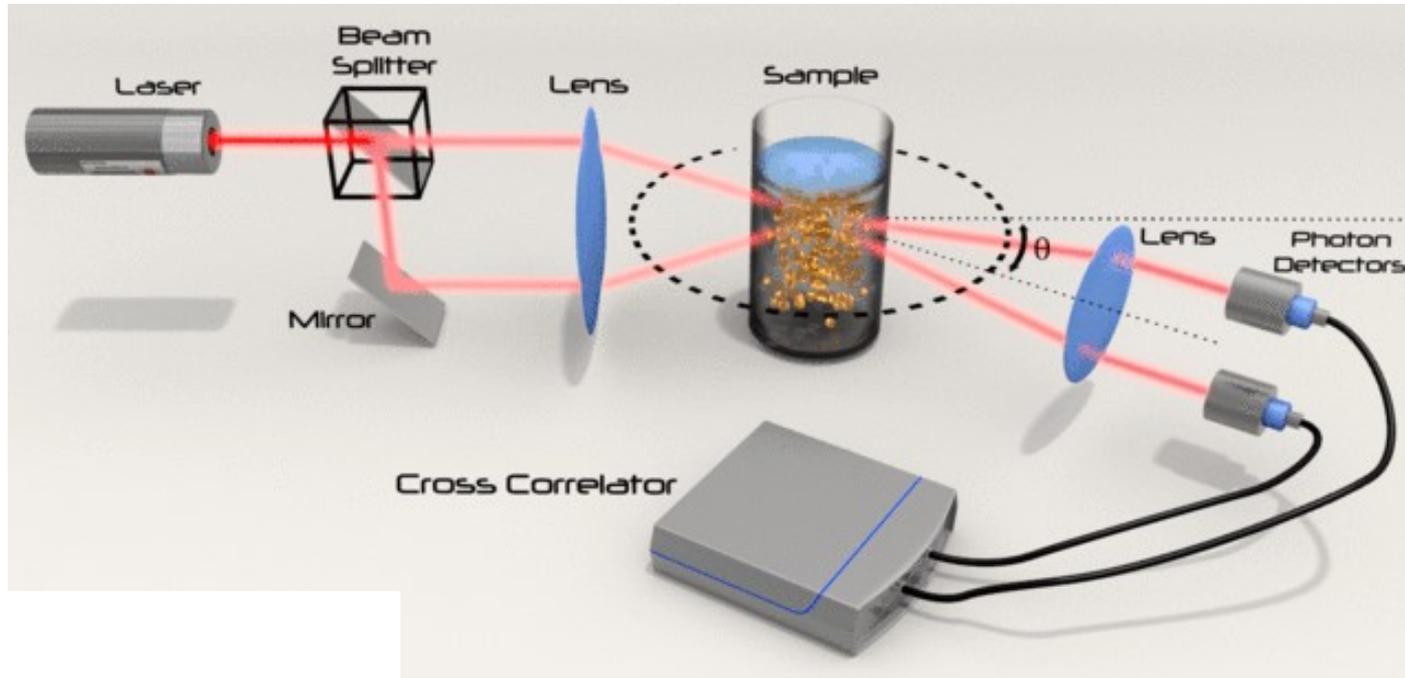
Legge di Einstein_Stokes
+ tre algoritmi matematici

Estraggono i tassi di decadimento di $G(\tau)^2 \rightarrow$

distribuzione di dimensioni

Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering): setup



CROSS-CORRELATION per risolvere il problema dello scattering multiplo

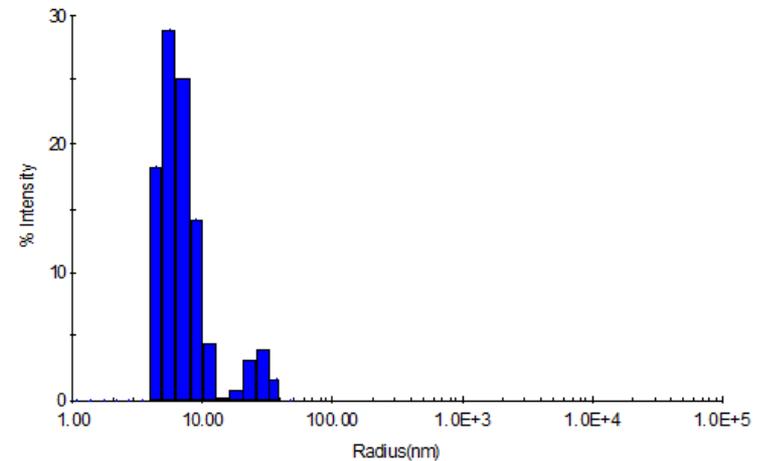
Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering): setup

$$G(\tau)^2 \rightarrow D \rightarrow R_H$$

Distribuzione di dimensioni:

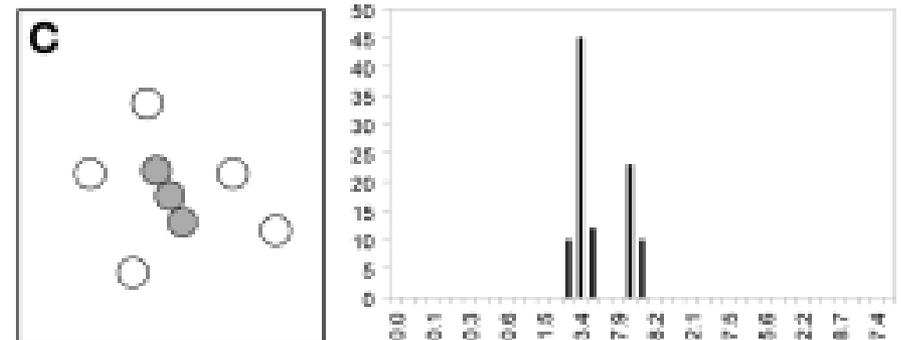
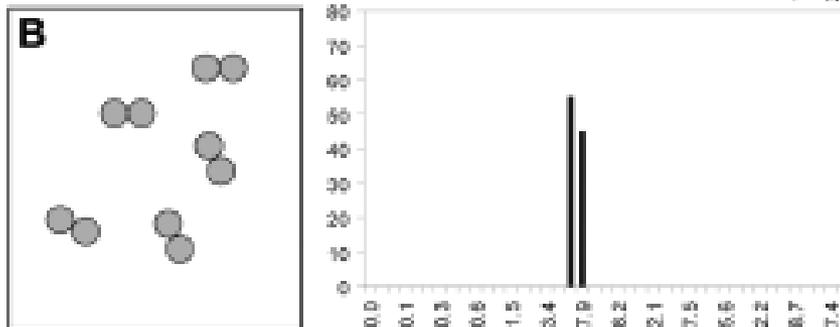
- Valore medio = R_H
- Larghezza = **POLIDISPERSIONE**



$$R_H \rightarrow \text{stima del MW} = (\alpha R_H)^\beta$$

α Dipende dalla densità della particella

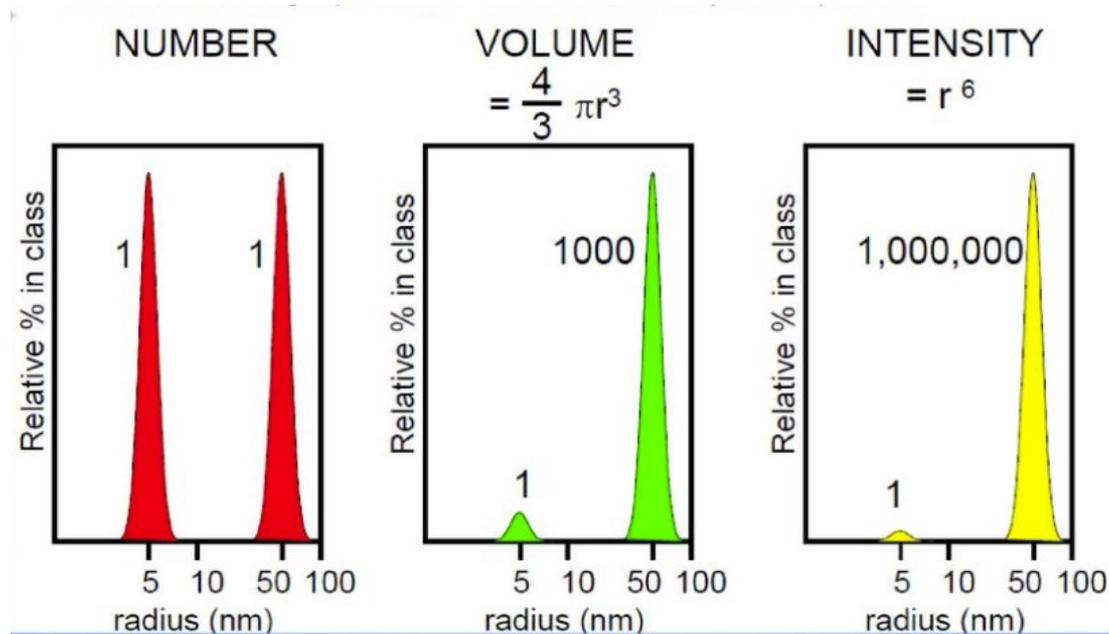
β Fattore di correzione dello strumento



Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering):

Distribuzioni delle popolazioni dipendono dall'indice utilizzato



soggetto a molti errori

Analisi dello stato di aggregazione :

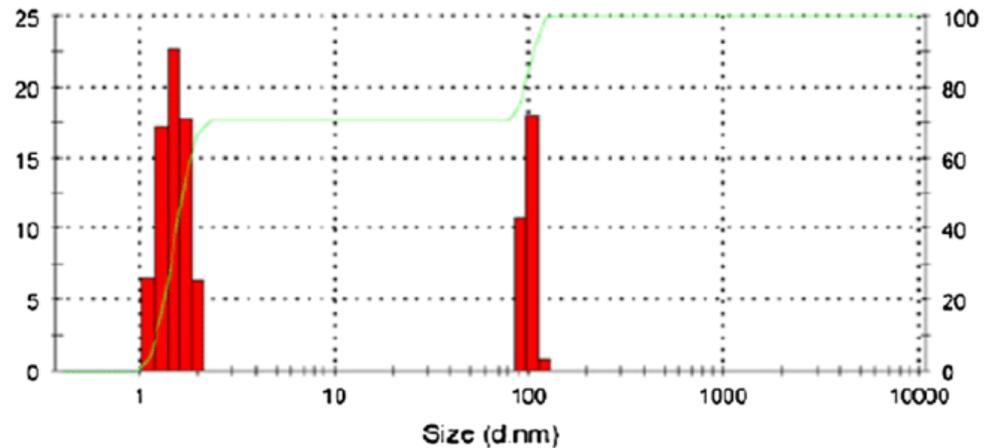
DLS (Dynamic Light Scattering): POLIDISPERSIONE

indice di purezza conformazionale:

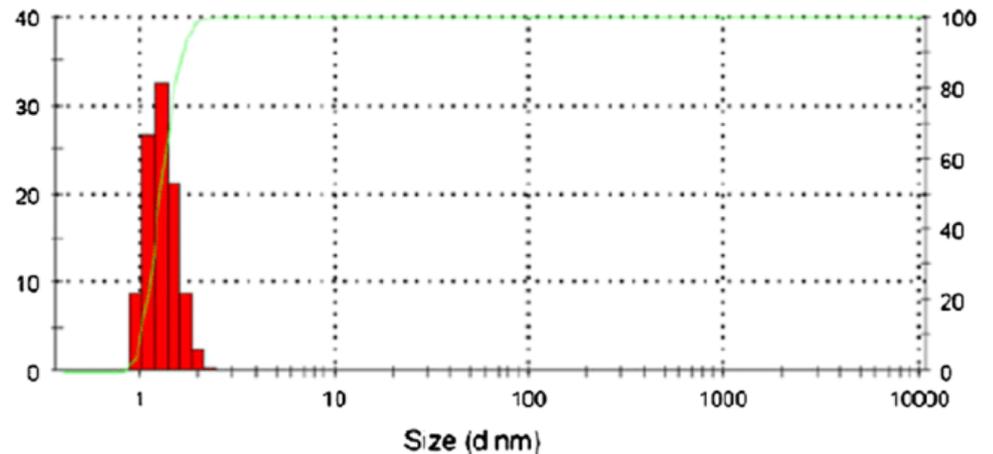
In teoria $g(\tau)$ dipende dallo scattering di una singola specie dominante

deviazioni dal profilo esponenziale teorico di $g(\tau)$ misura la polidispersione:

presenza di impurità o aggregati: picchi addizionali



presenza di altre conformazioni: picco asimmetrico



Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering): POLIDISPERSIONE

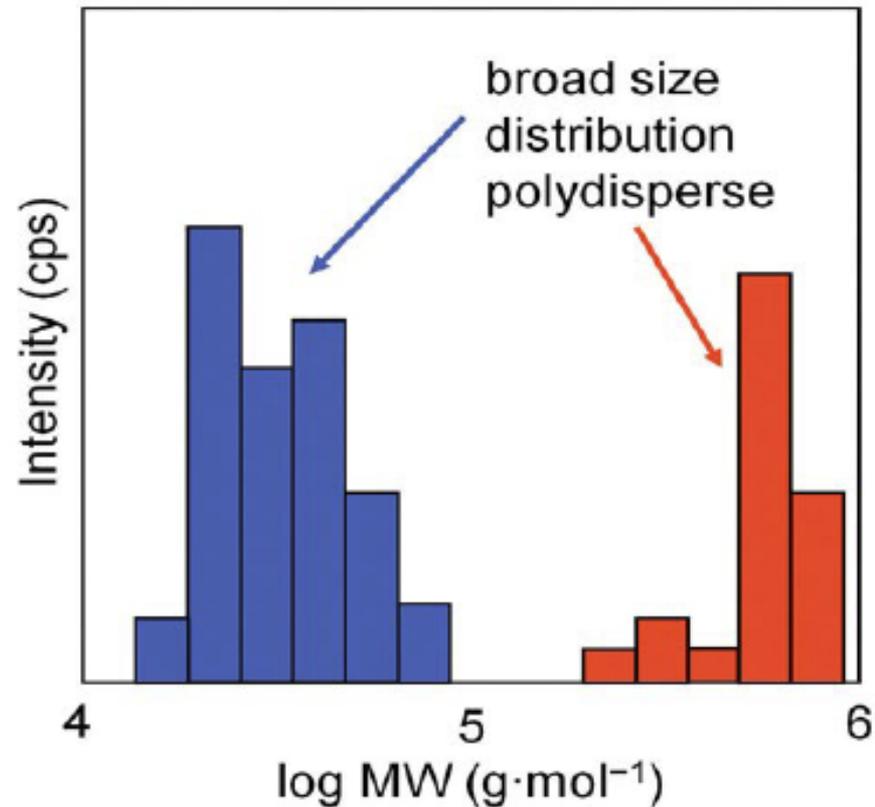
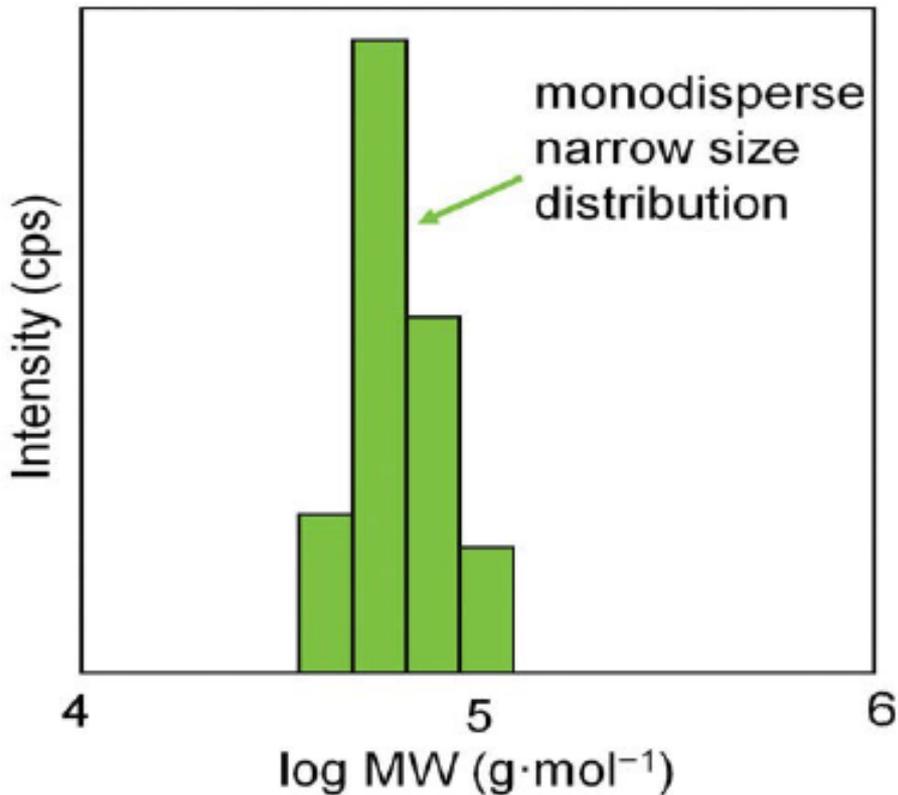
correlato con il successo di cristallizzazione:

polidispersione <15%

- distribuzione unimodale/campione monodisperso
- 70% probabilità di successo

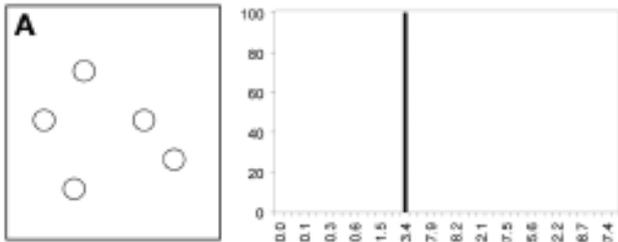
polidispersione >30%

- 8% probabilità di successo

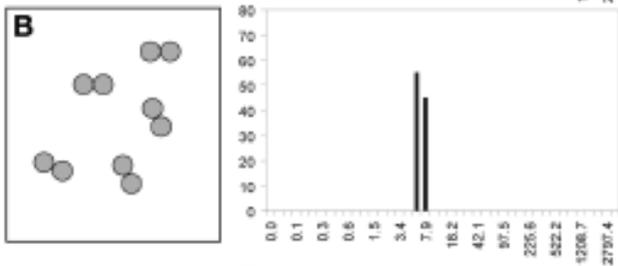


Analisi dello stato di aggregazione :

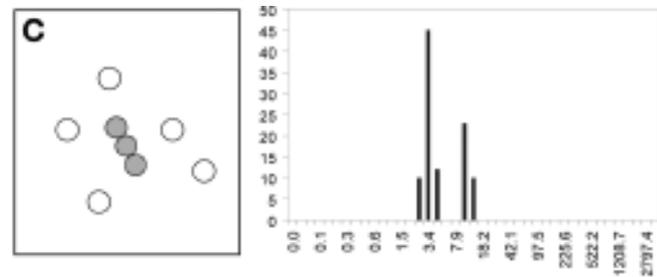
DLS (Dynamic Light Scattering): POLIDISPERSIONE



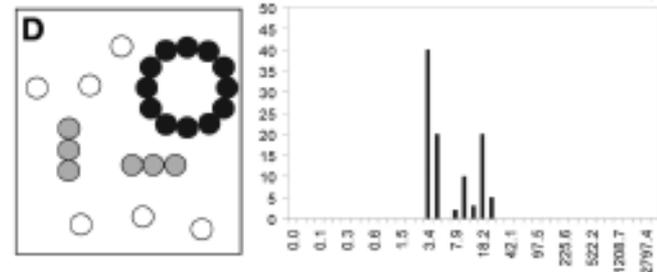
(A)
 R_H medio 3.4nm, polidispersione 10%
Elevata probabilità di cristallizzare



(B)
 R_H medio 6.8nm, polidispersione 14%
Polidispersione più alta ma ancora buona probabilità di cristallizzare



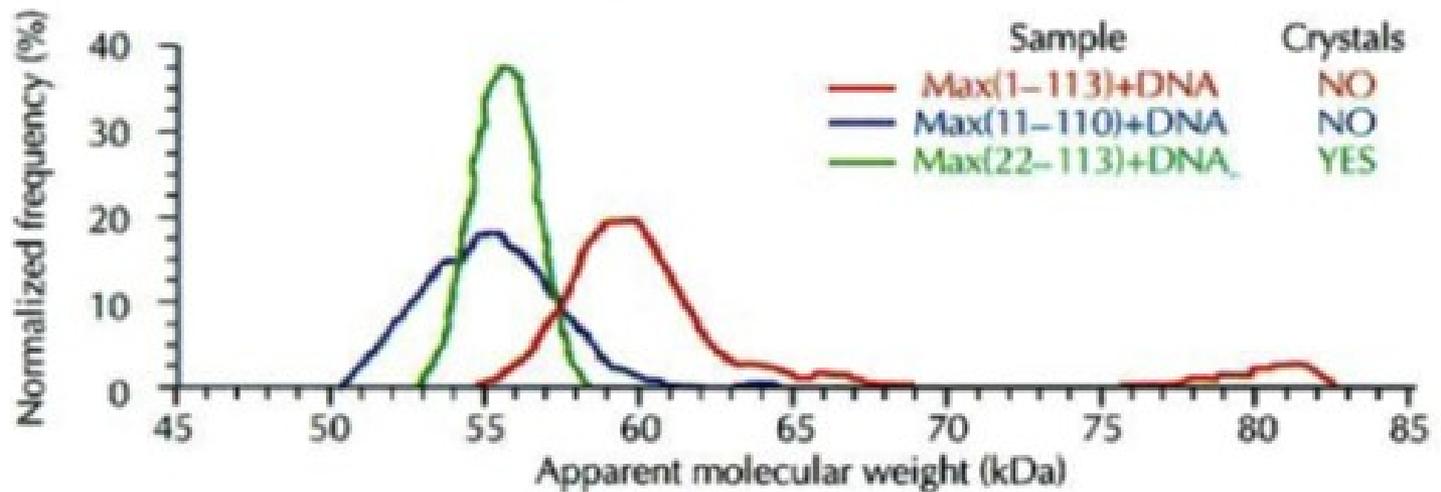
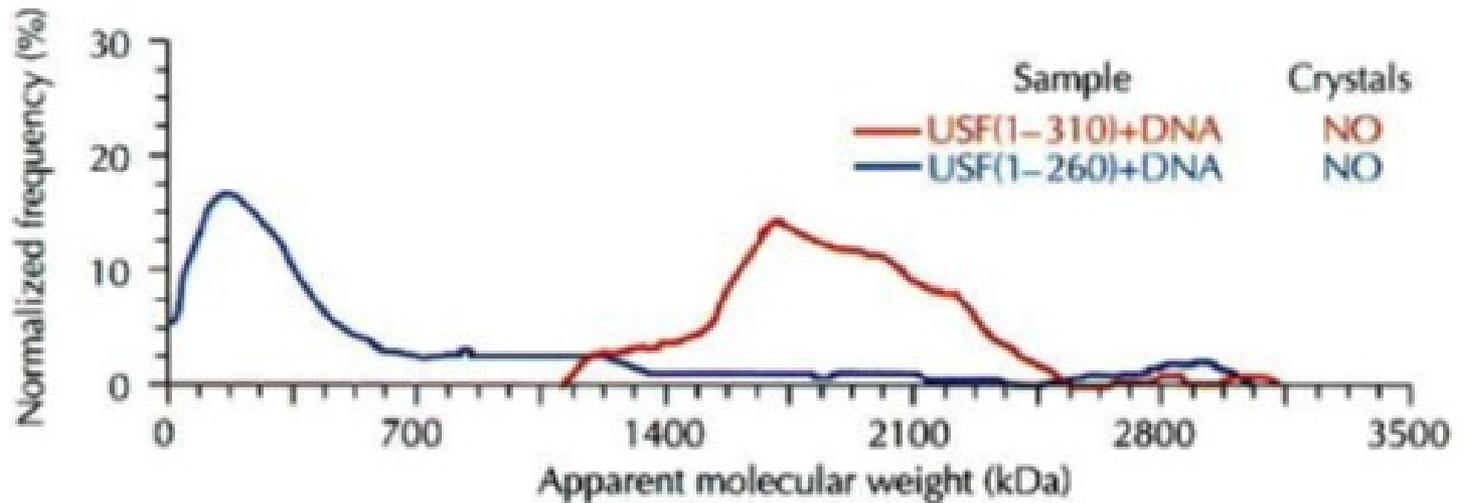
(C) R_H medio 3.4 e 10.2nm
Minore probabilità di cristallizzare



(D) R_H medio 3.4, 10.2 e 19.3nm
Bassissima probabilità di cristallizzare

Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering): POLIDISPERSIONE



Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering)

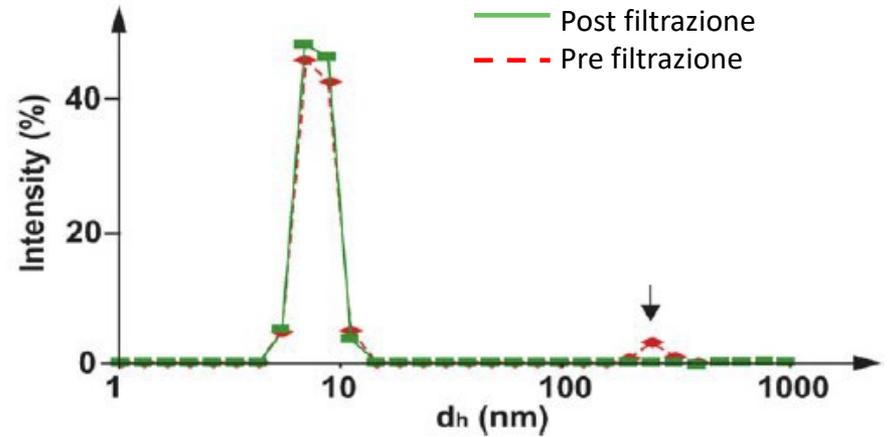
Effetto della filtrazione:

BSA (2mg/mL)

Aggregati rimossi

$R_H 7.4 \pm 1.0 \text{ nm}$ a 20°C

la polidispersione (12%) non viene modificata



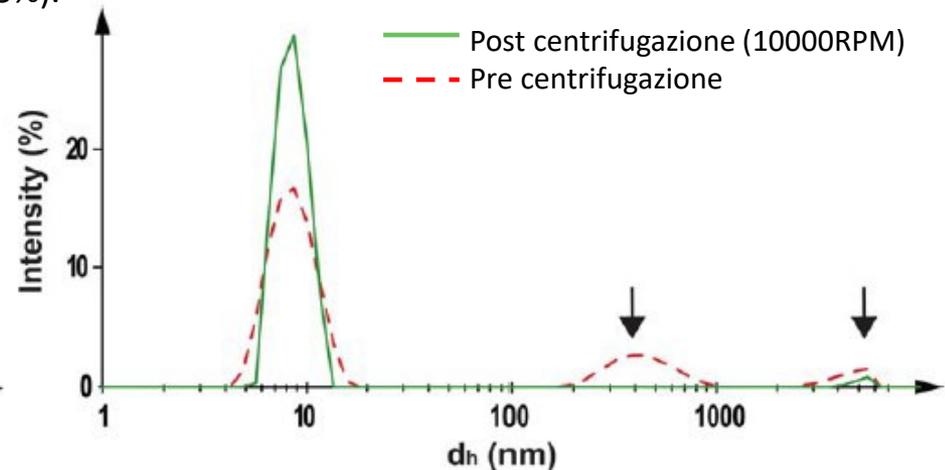
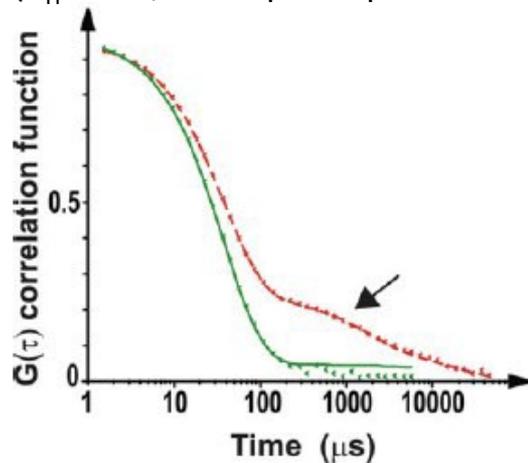
Effetto della centrifugazione:

drDRS-2 (8mg/mL)

Senza centrifugazione: aggregati: 1% in massa e 22% in I;
popolazione principale ($R_H 8.7 \pm 2.2 \text{ nm}$ e polidispersione 25%).

Dopo centrifugazione:

popolazione principale ($R_H 8.5 \pm 1,1 \text{ nm}$ e polidispersione 13%).



Analisi dello stato di aggregazione :

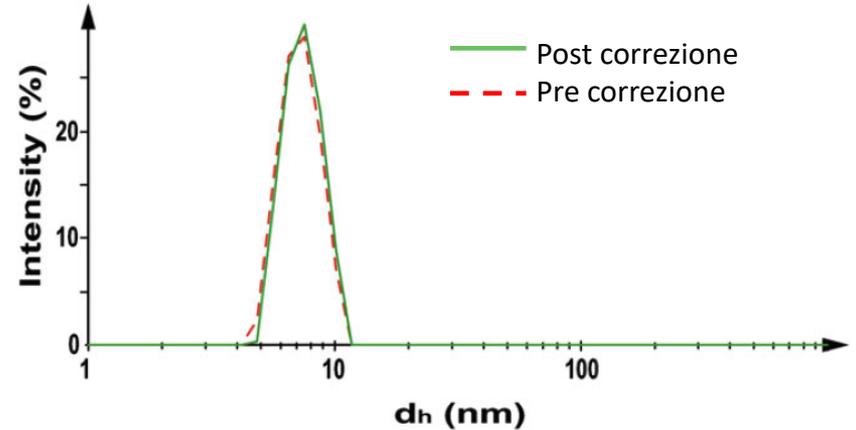
DLS (Dynamic Light Scattering):

Effetto della viscosità:

hpERS-2 (1 mg/mL) a 20°C

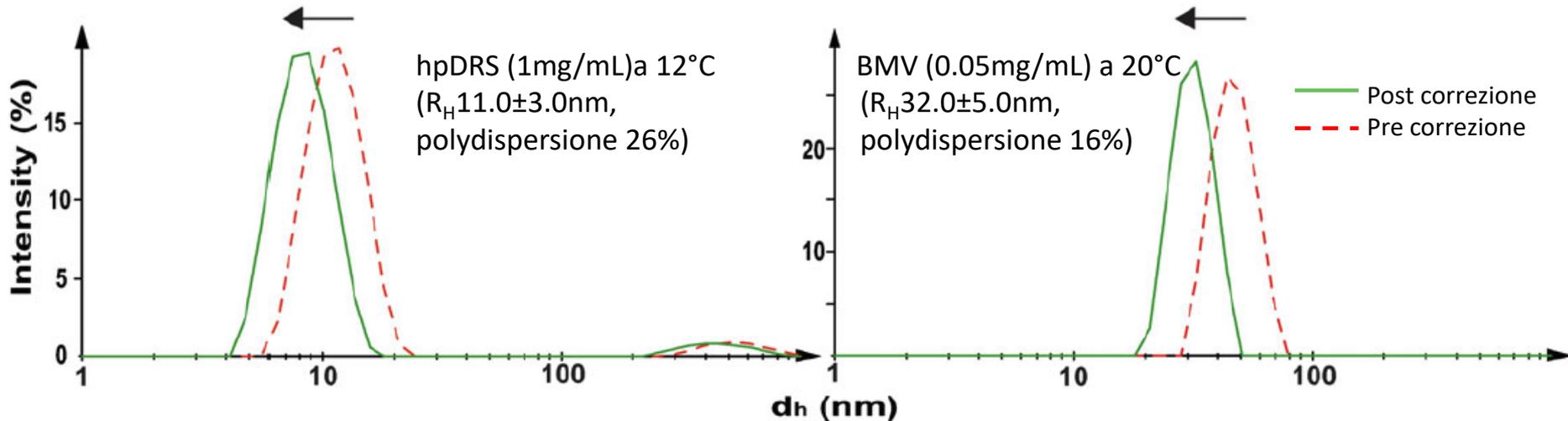
(R_H 7.0±1.0nm a 20°C, polydispersione 14%)

Non c'è effetto della correzione per le proprietà del solvente



Effetto della viscosità con la T:

la correzione per le proprietà del solvente sposta le distribuzioni verso diametri minori



Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering):



- gamma di dimensioni ($>10^9$)
- Misure all'equilibrio termodinamico e in soluzione, non distruttive
- Elevata sensibilità a grandi aggregati
- Indipendente dalla natura chimica
- Misura la polidispersione



- R_H dipende dalla forma
- Scarsa risoluzione
- forma/oligomerizzazione (va accoppiata con SEC)
- Scarsa quantificazione delle frazioni
- Aggregati molto grandi mascherano la componente principale