

Proteine ricombinanti per studi
strutturali.

Caratterizzazione biofisica:
Analisi dello stato di aggregazione

Analisi dello stato di aggregazione:

Aggregazione

Cause:

INTRINSECHE

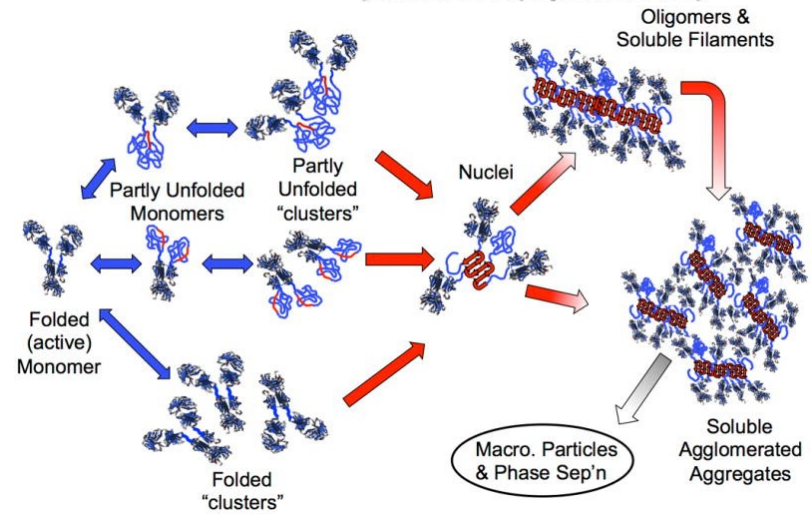
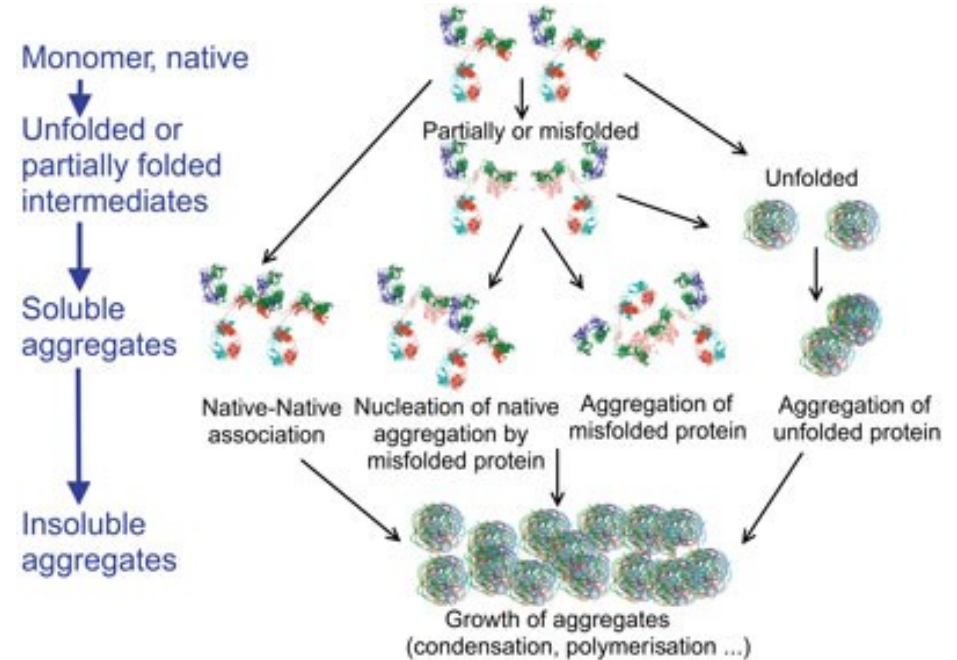
- pI
- Idrofobicità
- contenuto di strutture secondarie

STRESS FISICO

- T
- pH
- forza ionica
- []

STRESS CHIMICO

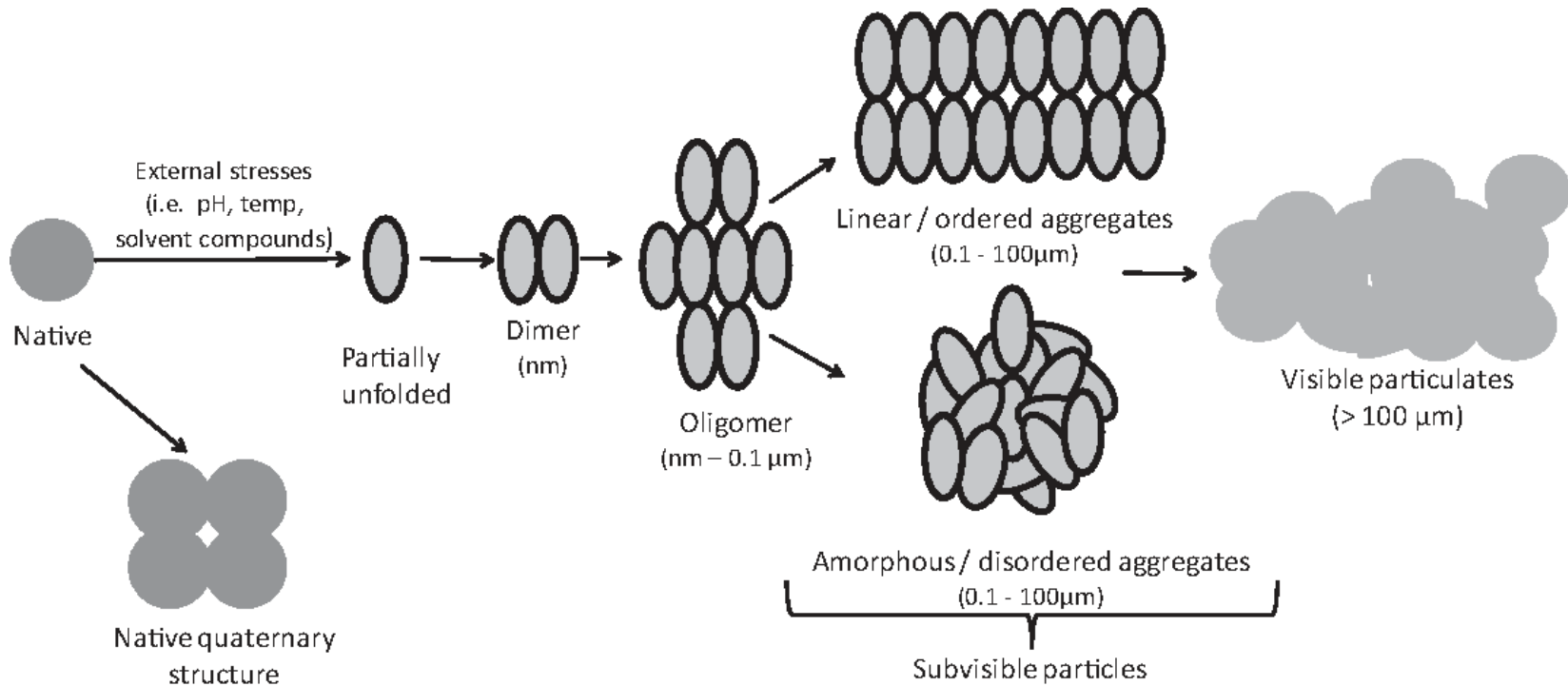
- congelamento/scongelo
- danno chimico



Analisi dello stato di aggregazione :

Aggregazione

Diversi Tipi di aggregati



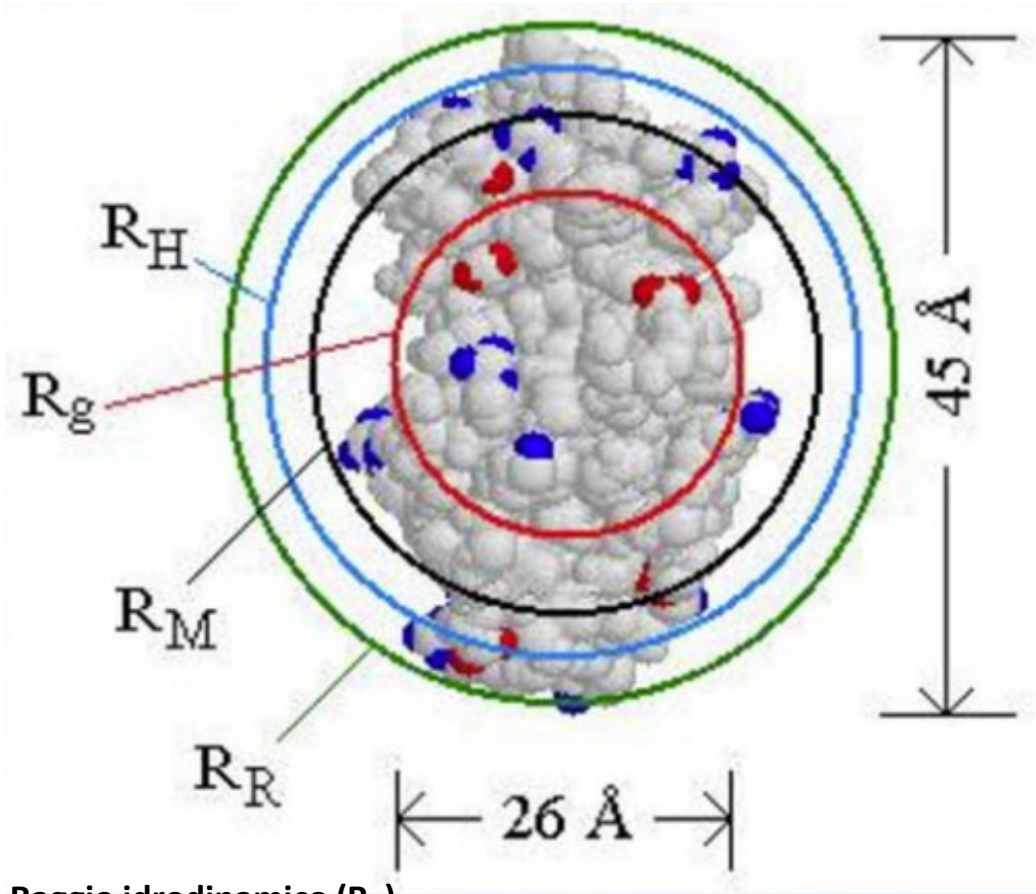
≠ emivita

≠ stabilità (da ms a giorni)

La misurazione ne può alterare il contenuto.

Analisi dello stato di aggregazione :

DEFINIZIONI di R

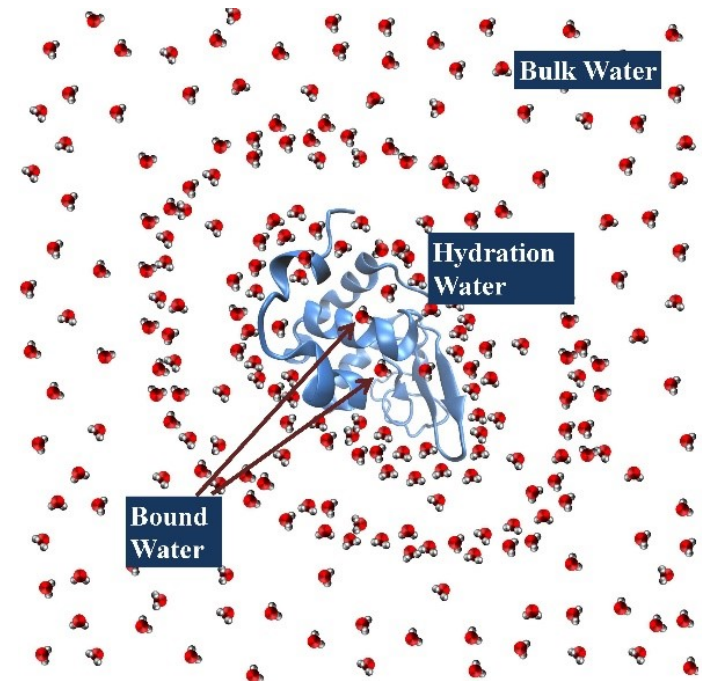


Raggio idrodinamico (R_H)

Raggio di girazione (R_g)

Raggio di rotazione (R_R)

Raggio di massa (R_M)



Analisi dello stato di aggregazione :

Metodi per l'analisi dello stato di aggregazione:

SEC

F4 (flow field flow fractionation)

AUC (analytical ultracentrifugation)

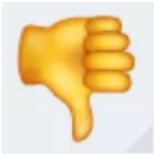
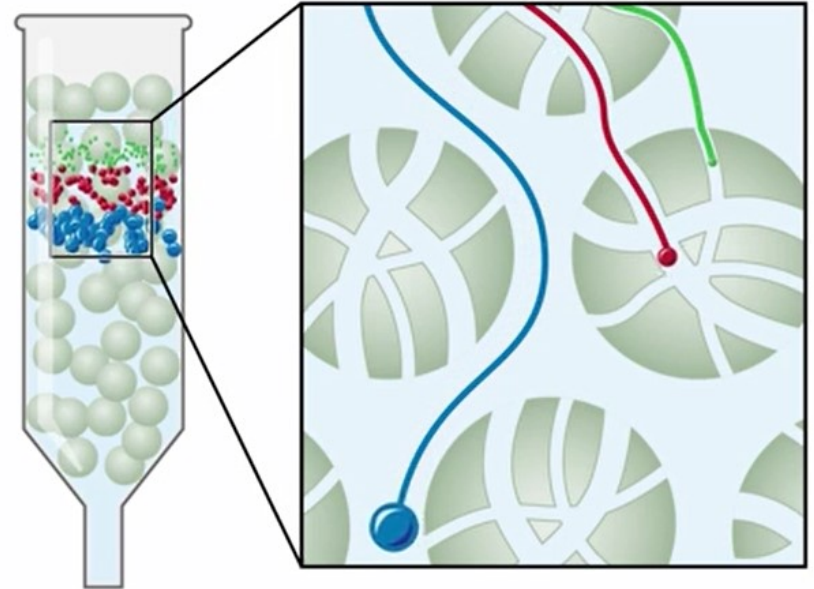
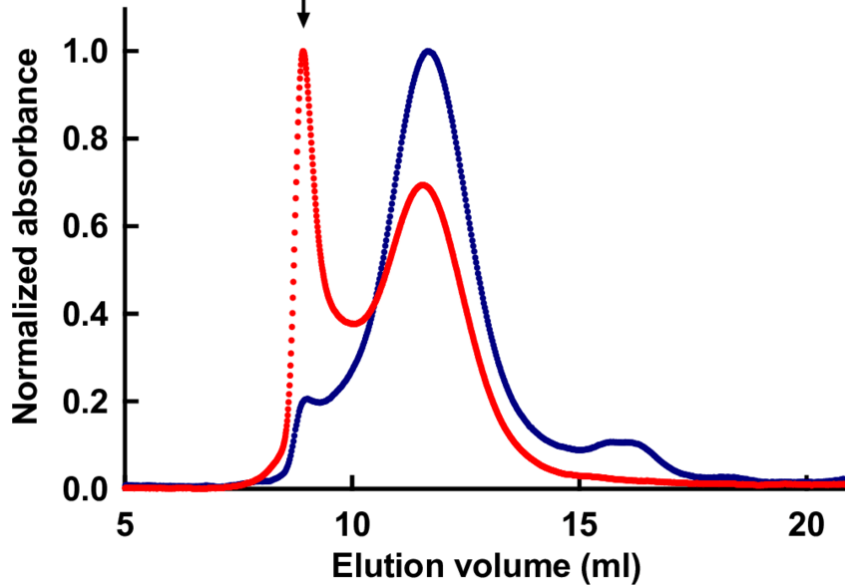
LS (light scattering)

Analisi dello stato di aggregazione :

SEC

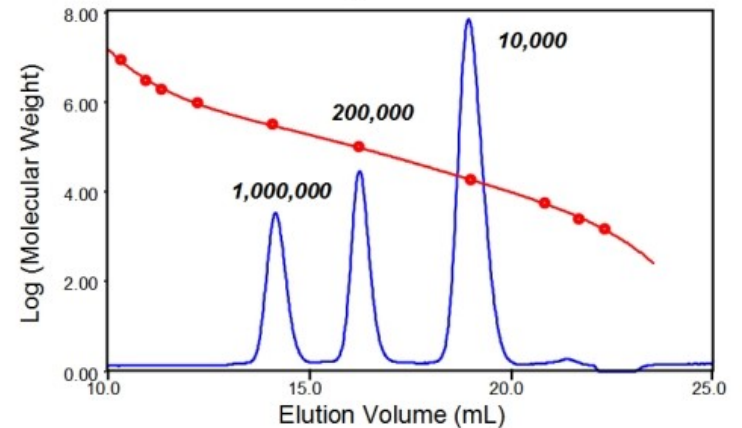
Metodo principale

void volume



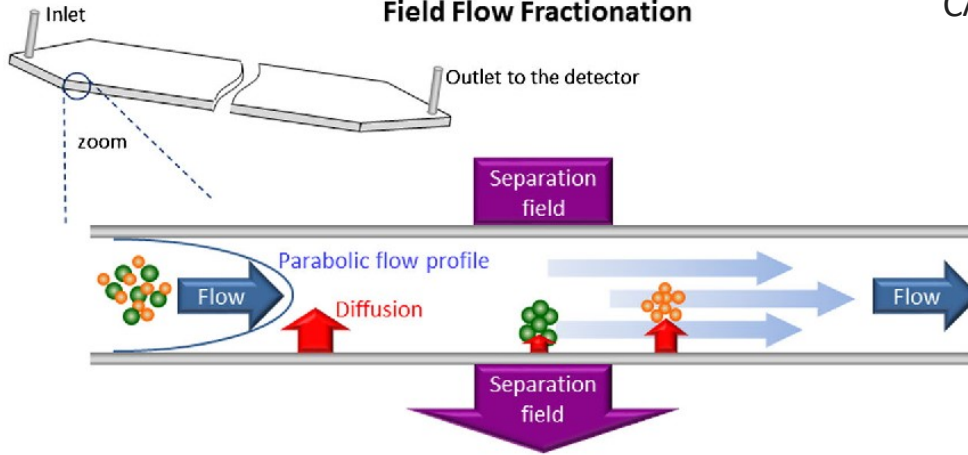
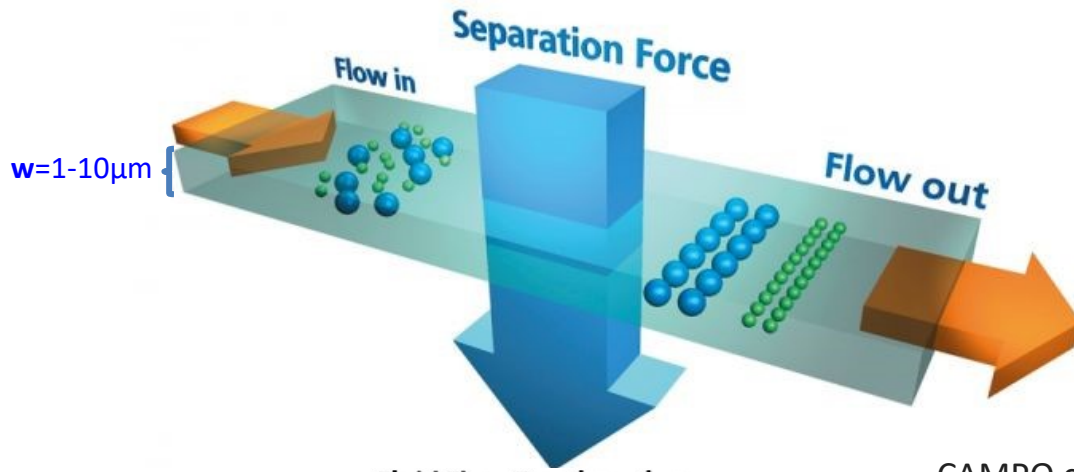
- perturba la distribuzione degli aggregati
- Non rileva associazioni non covalenti rapide e reversibili
- Bassa sensibilità ($\geq 0.1\%$)

Molecular Weight vs. Retention Volume



Analisi dello stato di aggregazione :

F3 (flow field fractionation)

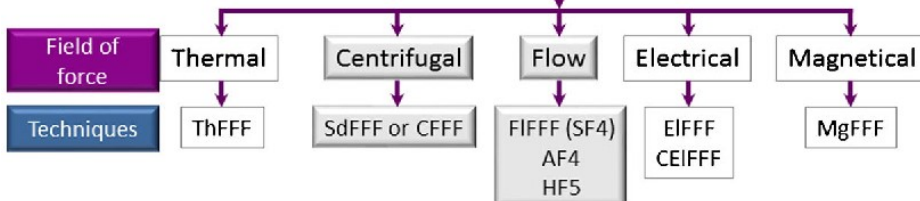


CAMPO comprime le molecole in strati di diverso spessore λ

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

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

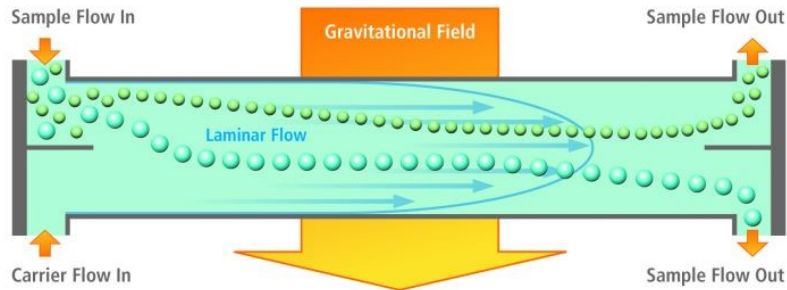
$$r = \frac{6RT}{Fw}$$



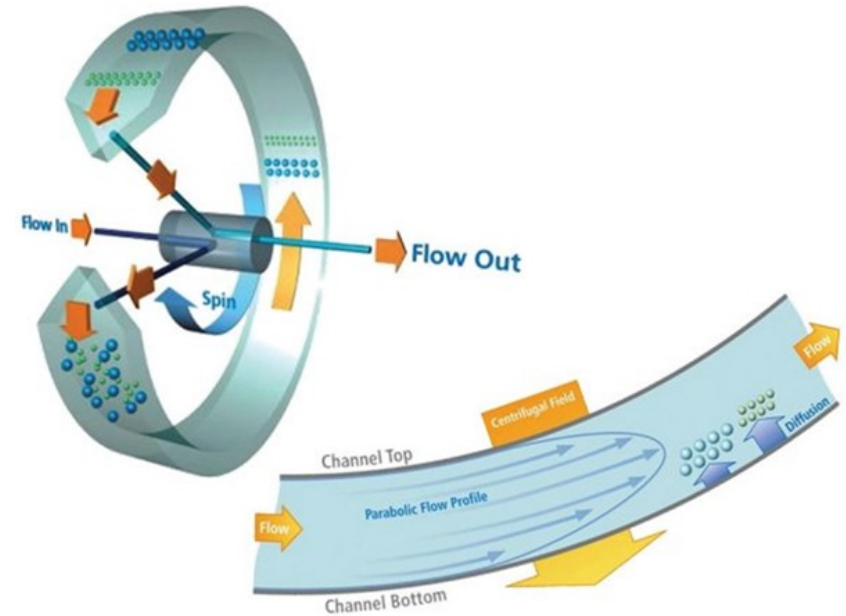
Analisi dello stato di aggregazione :

F3 (flow field fractionation)

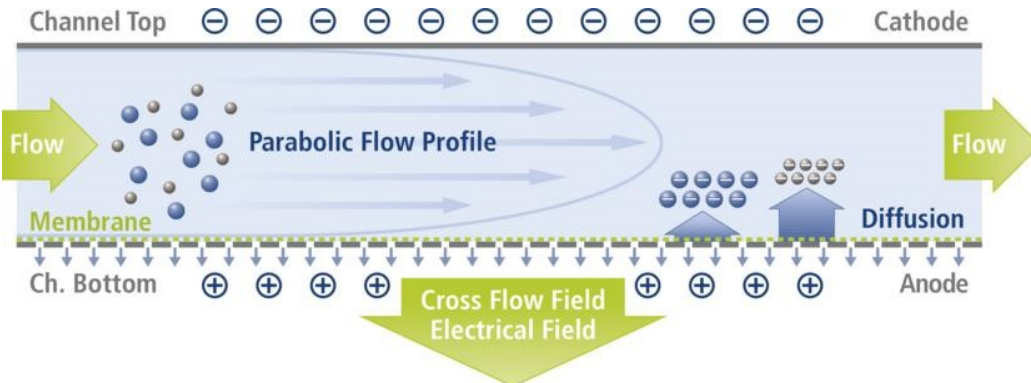
Gravitational FFF



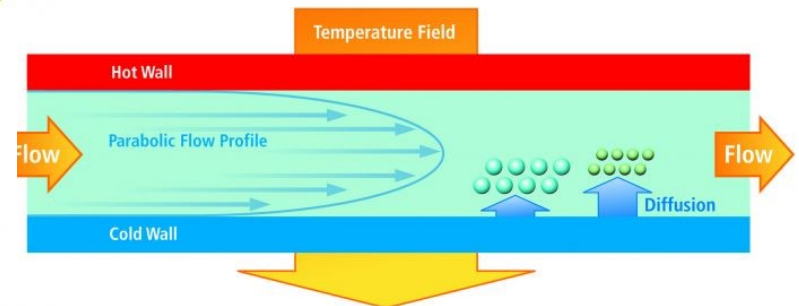
Sedimentation FFF



Electrical FFF

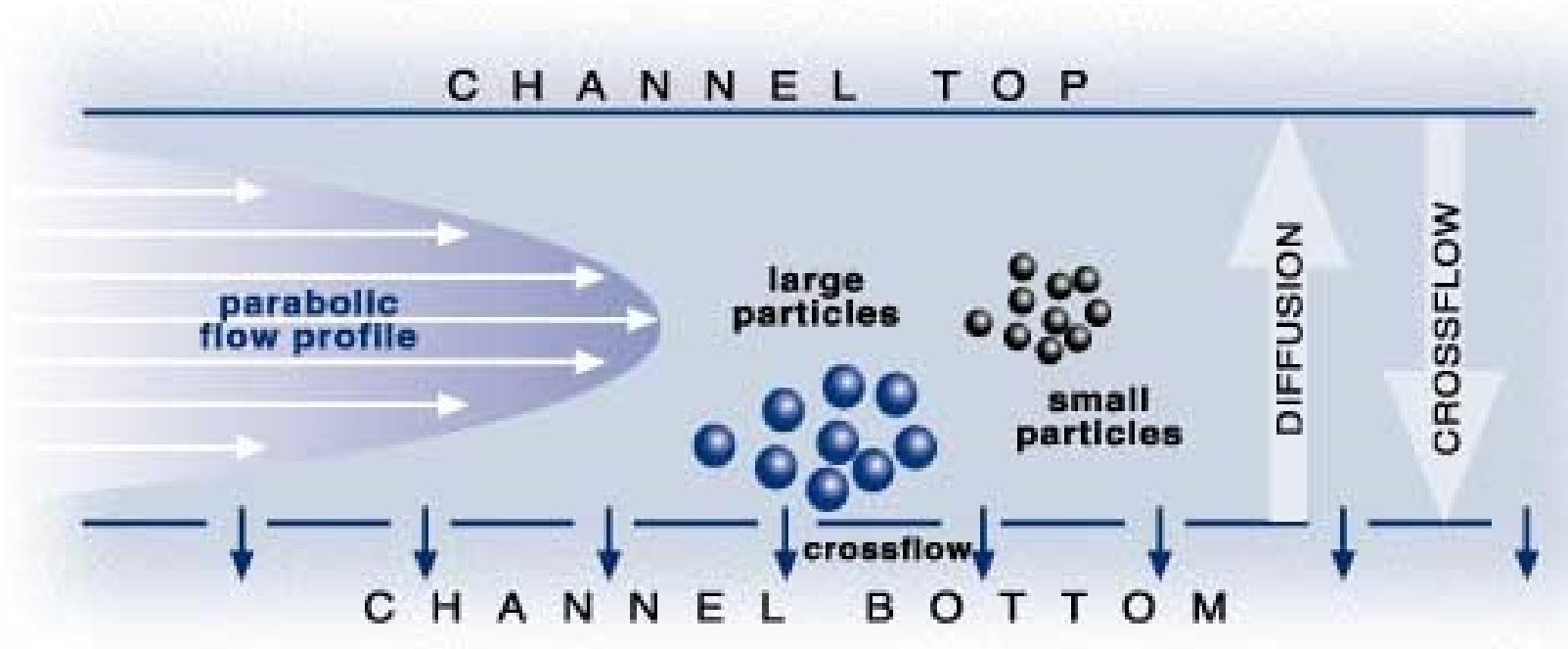


Thermal FFF

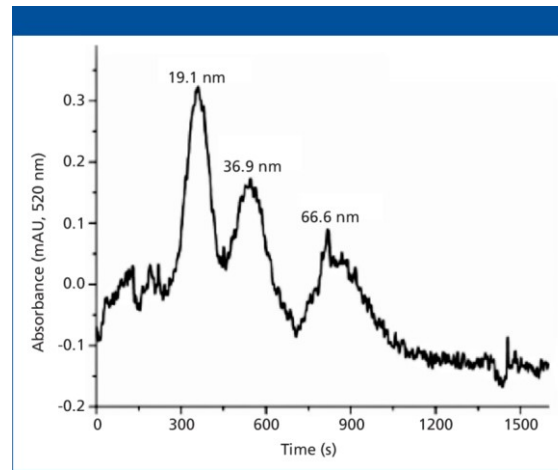


Analisi dello stato di aggregazione :

F4 (flow field flow fractionation)



FRACTOGRAM

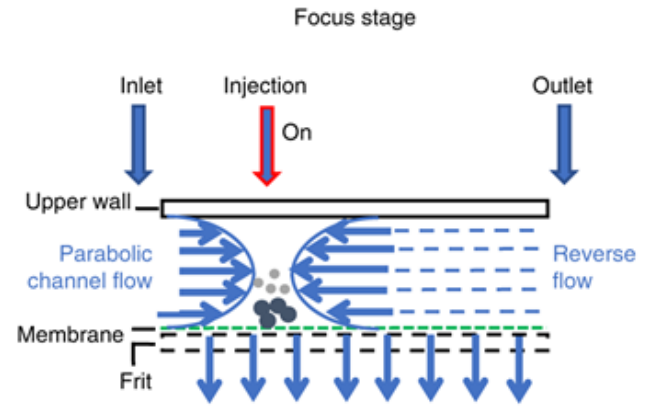
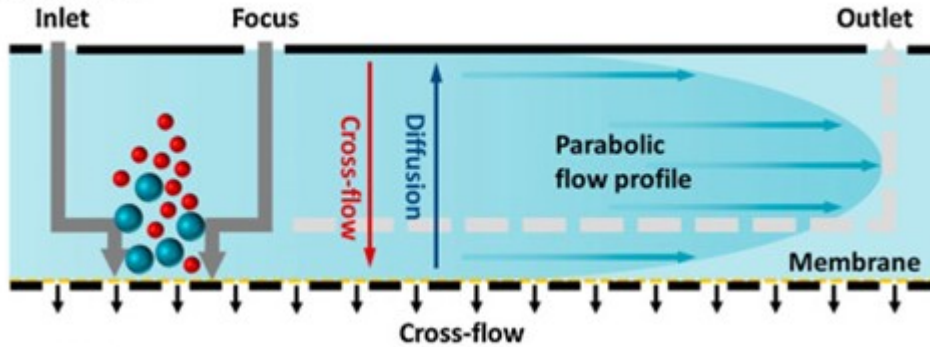


Analisi dello stato di aggregazione :

F4 (flow field flow fractionation)

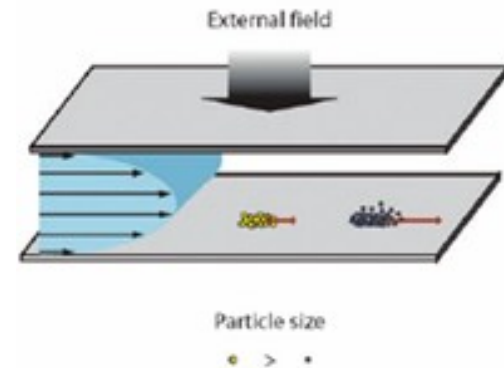
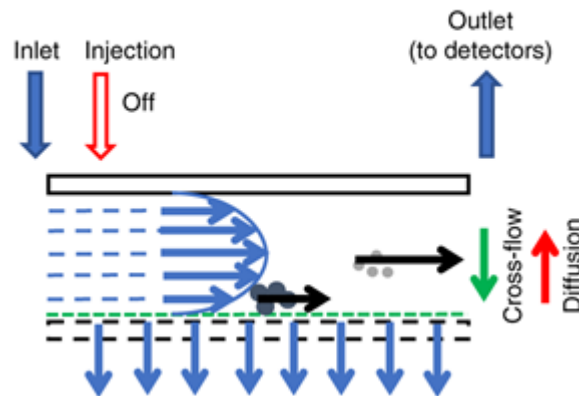
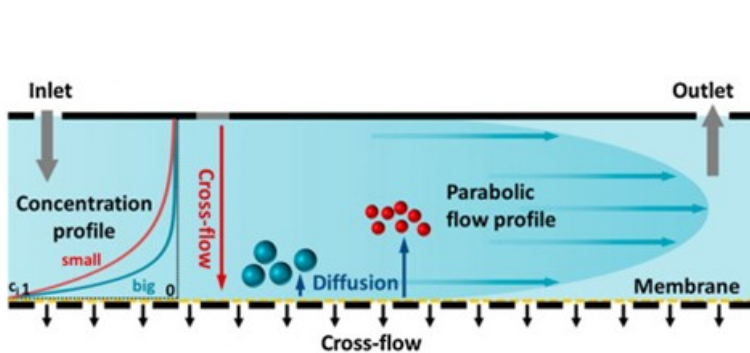
1 step: FOCUS

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 :

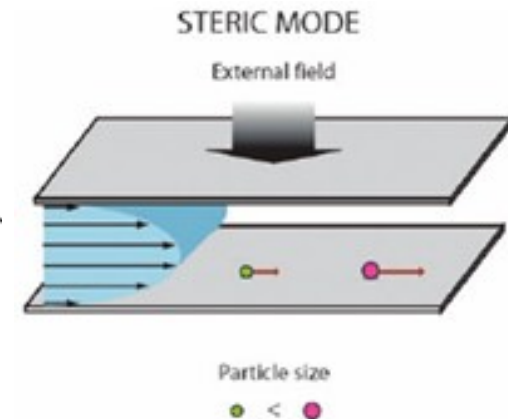
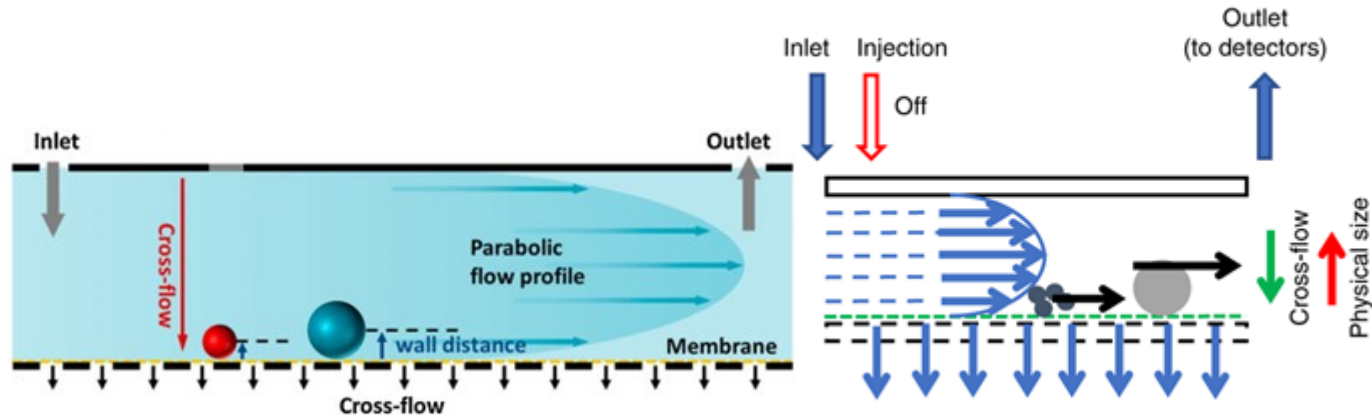
F4 (flow field flow fractionation)

Analisi dello stato di aggregazione :

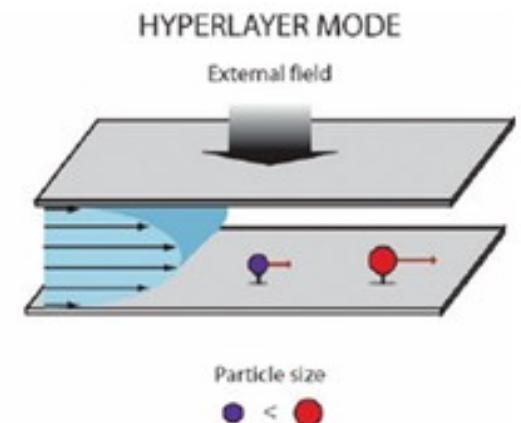
F4 (flow field flow fractionation)

b) Reversed modes

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



2. Lift-hyperlayer Mode: $\geq 10\text{mm}$ (dipende dalle dimensioni, forma e deformabilità)

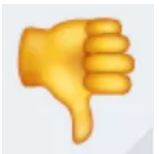


Analisi dello stato di aggregazione :

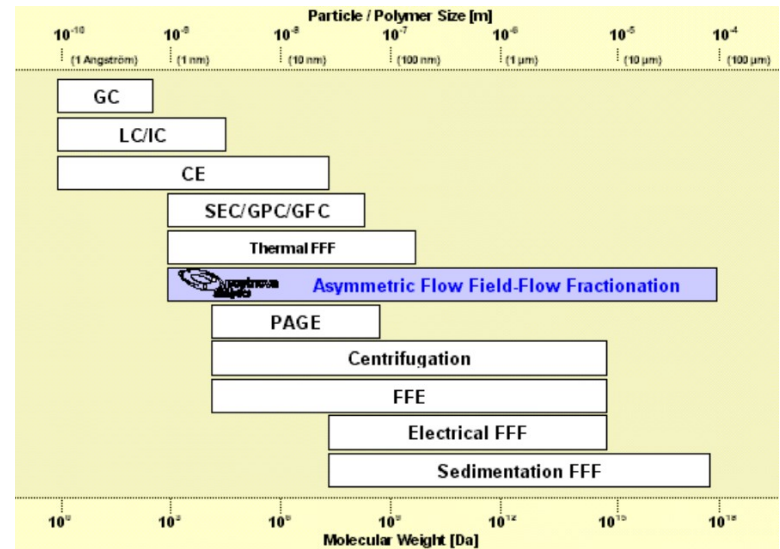
F4 (flow field flow fractionation)



- In soluzione /nativa/non distruttiva
- Elevata risoluzione/versatilità/ selettività
- [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 :

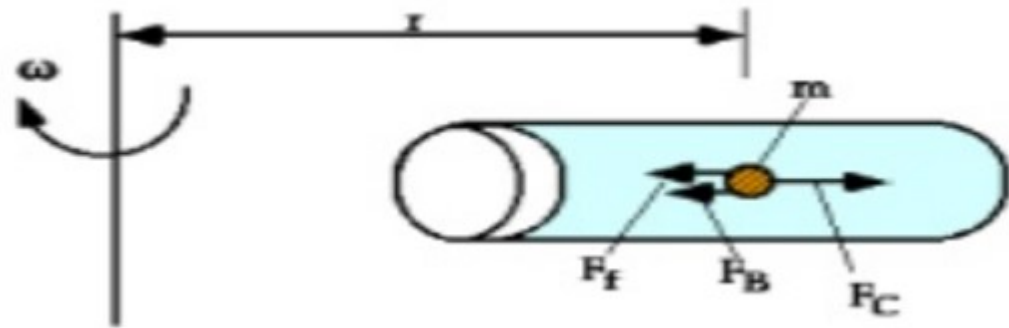
AUC: basi

$$\text{Relative centrifugal force} = \text{RCF} = 1.1118 \times 10^{-5} \times r \times \text{RPM}^2$$

elevata velocità angolare (120.000-150.000 RPM) impone elevate forze centrifughe su particelle in soluzione (<10 μ m)
separa in base a Δ MW

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

$$\omega = 2\pi (\text{RPM})/60$$



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

$$s = \frac{dr}{dt} (1/\omega^2 r)$$

Equazione di Svedberg (1923)

Analisi dello stato di aggregazione :

AUC: strumentazione

Rotore a T controllata: celle

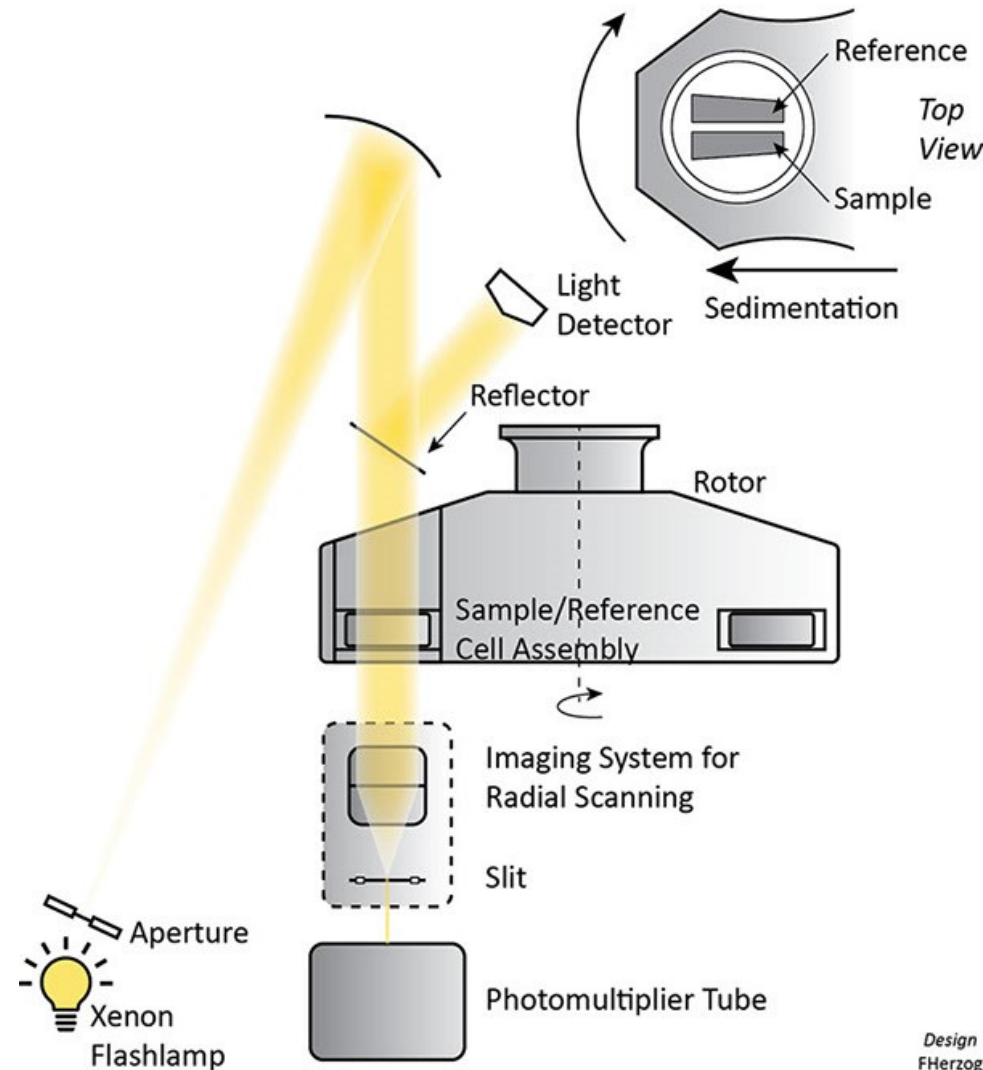
analitica
bilanciamento

Detector:

1. Assorbimento (UV-VIS 190-800 nm)
2. Indice di rifrazione (laser 660nm)
3. Fluorescenza

TIPI:

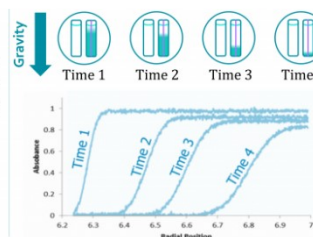
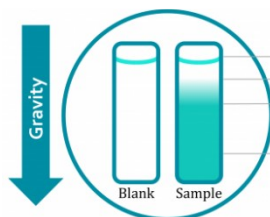
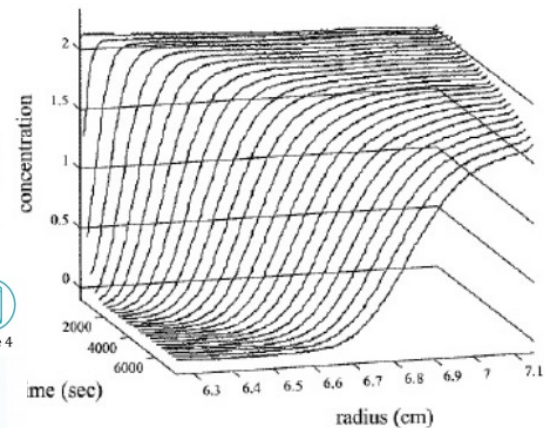
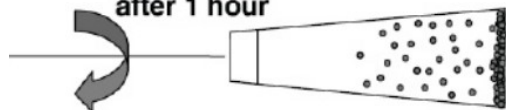
**Analitica
Preparativa**



Analisi dello stato di aggregazione :

AUC: setup

A: Sedimentation Velocity
after 1 hour



1. Velocità di sedimentazione (SV):

tecnica idrodinamica

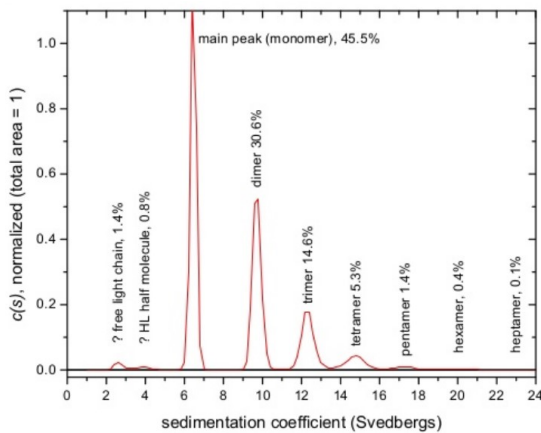
Elevata ω (40000-60000 RPM)

→ fronte unico per ogni molecola

che si muove con V caratteristica

-> coefficiente di sedimentazione (S)

-> coefficiente di diffusione (D)



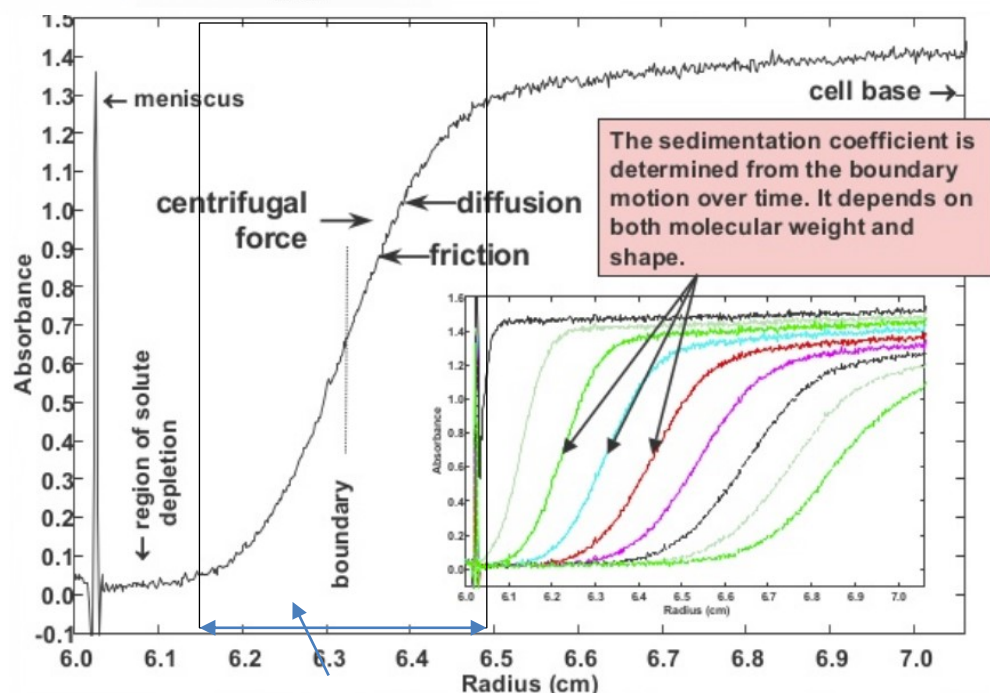
picco con Area ([])

Forma (omogeneità/purezza)

→ FORMA e MASSA

→ Δ CONFORMAZIONALI

→ ASSEMBLY/AGGREGAZIONE



Ampiezza dipende da D

Analisi dello stato di aggregazione :

AUC: setup

2. Equilibrio di sedimentazione (SE):

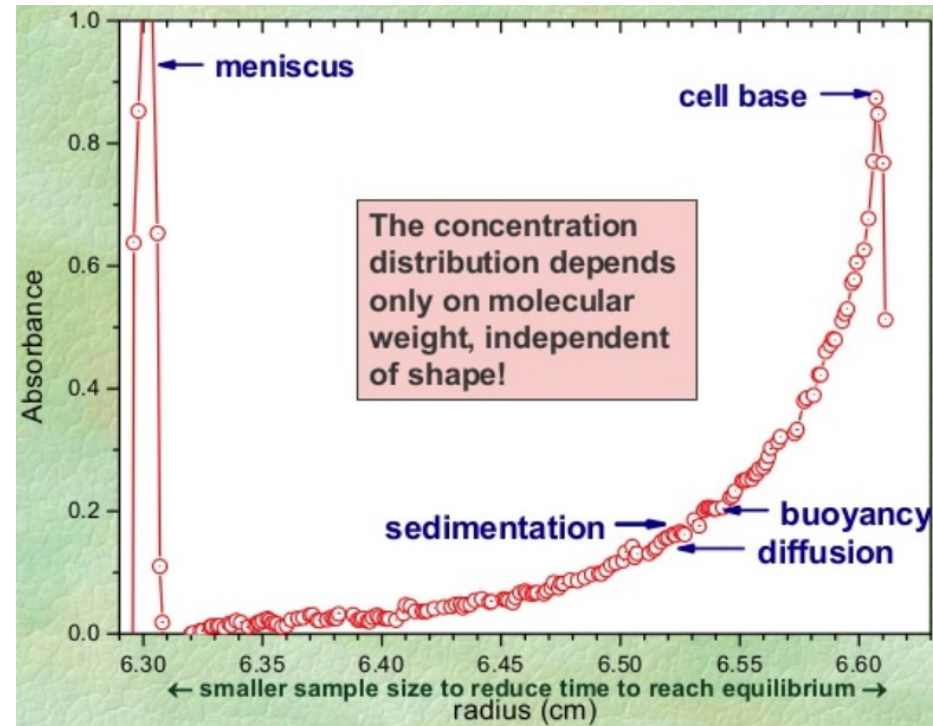
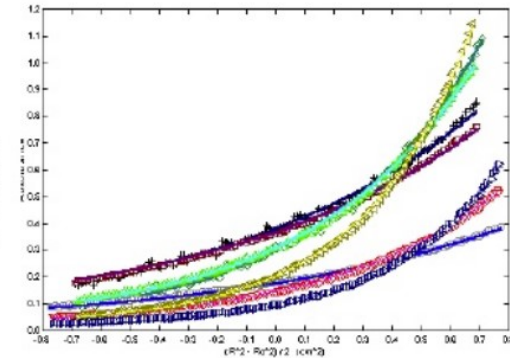
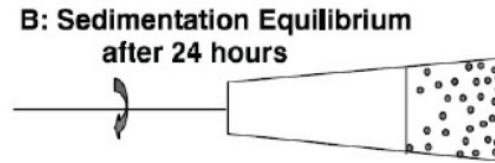
la sedimentazione è bilanciata dalla diffusione
 → gradiente esponenziale delle []

Tecnica termodinamica

→ 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/DIS-ASSEMBLY/OLIGOMERIZZAZIONE

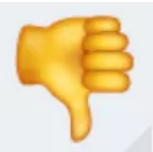


Analisi dello stato di aggregazione :

AUC



- FIRST PRINCIPLE
- In soluzione /nativa /non distruttiva
- Risoluzione
- [dimensioni]
- Complementare a SEC



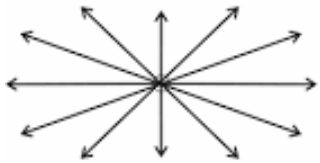
- Difficile quantificare aggregati irreversibili
- Costo
- Scarsa diffusione
- LT

Analisi dello stato di aggregazione :

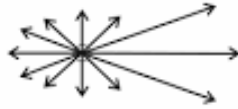
LS (Ligth Scattering)

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

Direction of Incident Radiation



Raleigh Scattering
 $r \ll \lambda$



Mie Scattering
 $r \gg \lambda$

MIE ratio

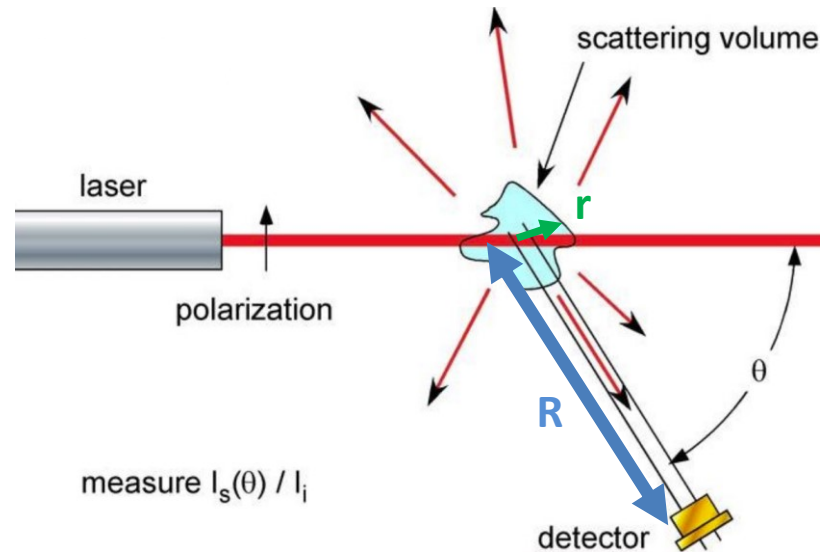
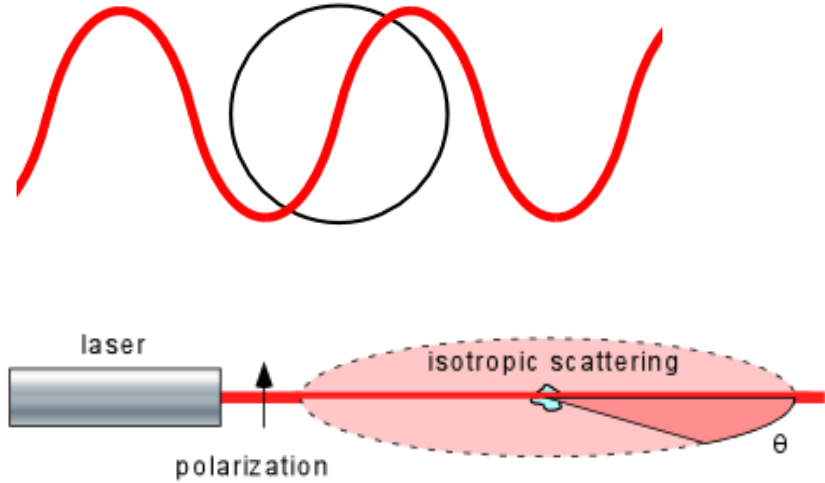
$$X_M = 2\pi r/\lambda \ll 1$$

scattering isotropico: intensità

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

R= distanza dal detector

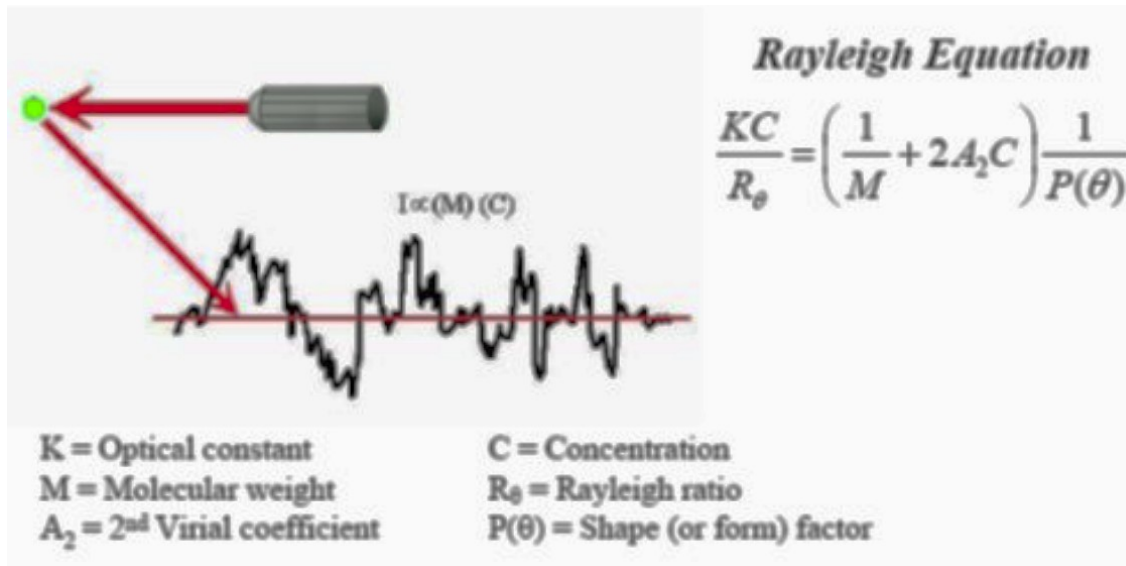
α = volume di polarizzazione



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 :

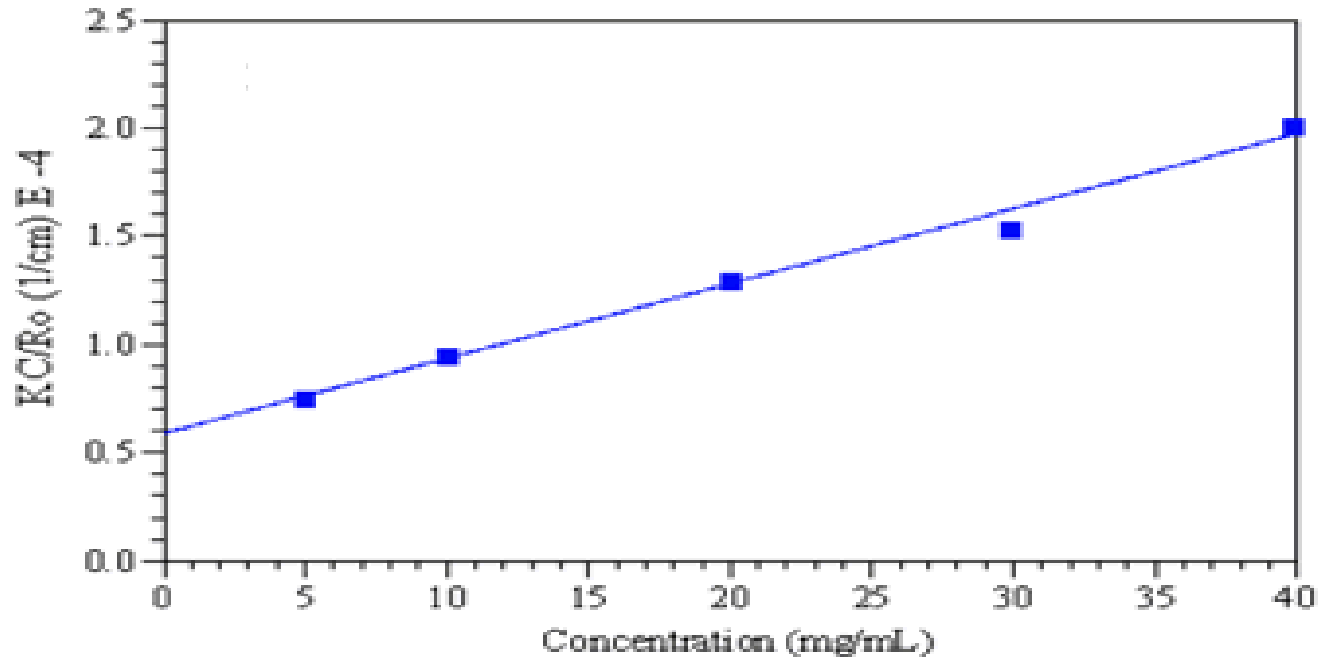
SLS (Static Light Scattering)

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

$P(\theta) = 1$

DEBYE PLOT

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

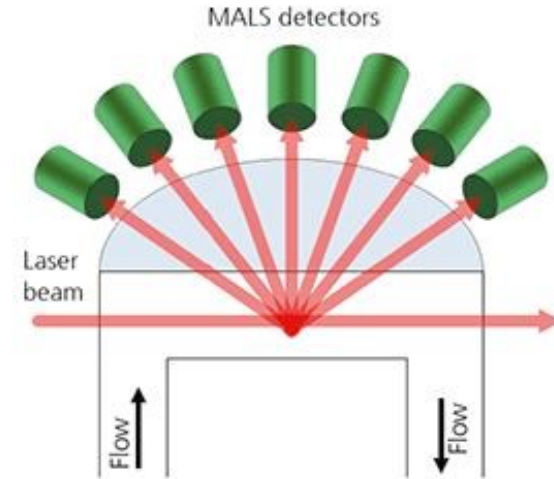
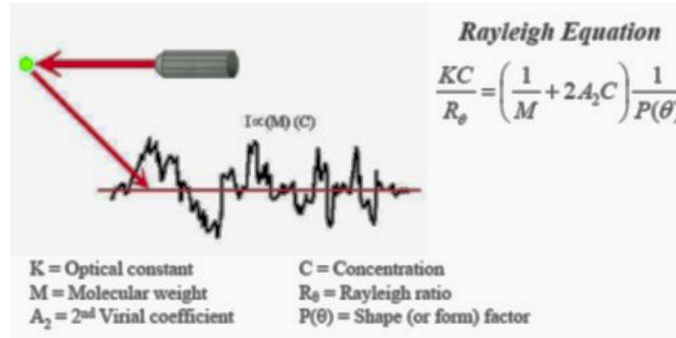


Analisi dello stato di aggregazione :

MALS (Multi Angle Light Scattering)

In caso di scattering non isotropico

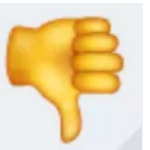
Sensibile, veloce e accurato
 media dei MW
 indipendente dalla forma



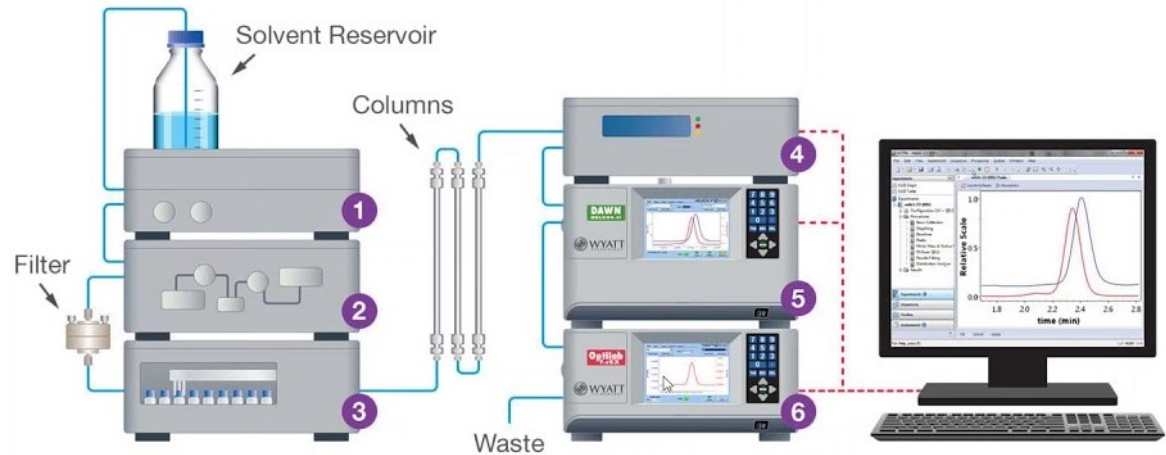
SEC/MALS



First principle
 MW assoluti
 rileva/quantifica popolazioni
 HT



svantaggi della SEC
 Sensibilità dipende dal detector
 Basso segnale/rumore



- 1 Degasser
- 2 Pump
- 3 Autosampler or Manual Injector
- 4 UV Detector
- 5 Multi-Angle Light Scattering Detector
- 6 Differential Refractive Index Detector

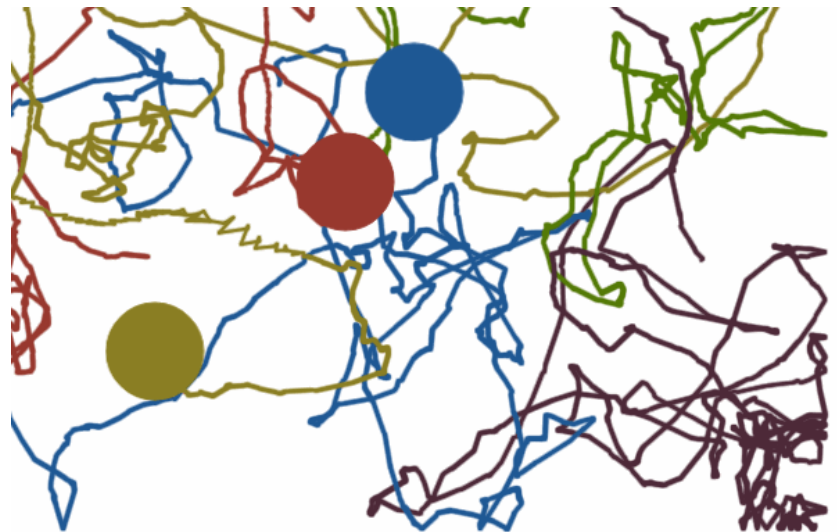
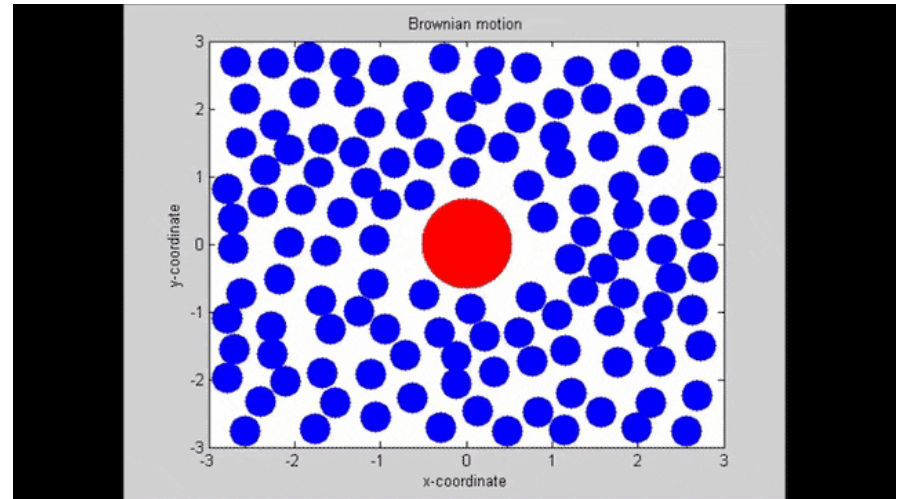
Analisi dello stato di aggregazione : DLS (Dynamic Light Scattering): basi

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

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

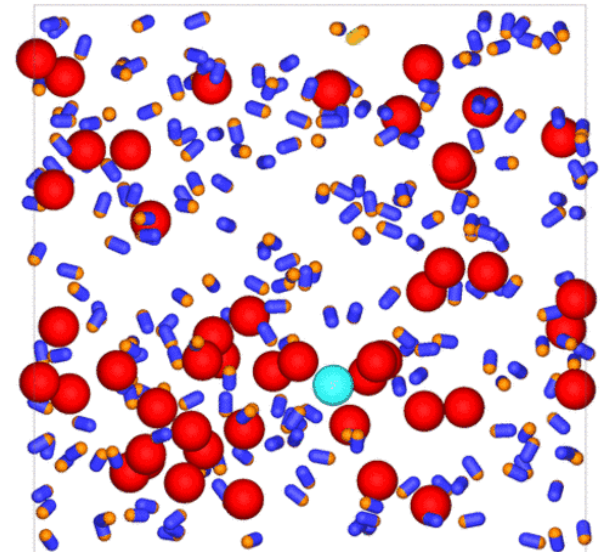
$D_T \propto 1/\eta$
Viscous solvent slows it down.
...and if concentration too high, 'viscosity effects'

$D_T \propto T$
High temperature speeds it up

idratazione

Sedimentazione → moto non casuale → limite di dimensione superiore

segnale/rumore → limite di dimensione inferiore



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

$\Gamma = q^2 D$

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

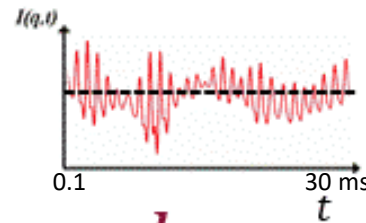
$n = IR$

$\theta =$ angolo di scattering

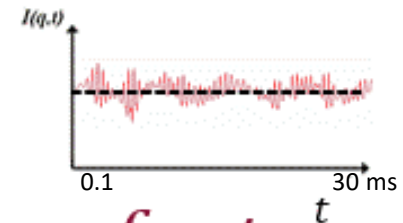
large d_h



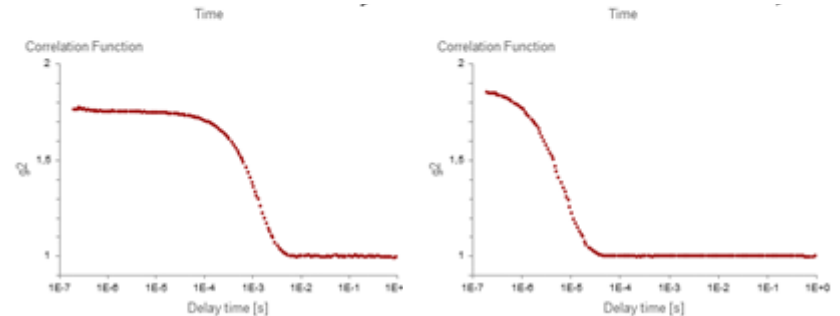
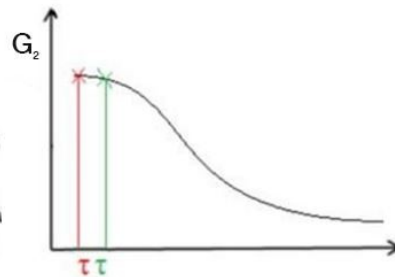
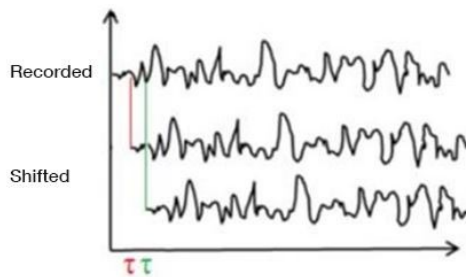
small d_h



slow



fast



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 :

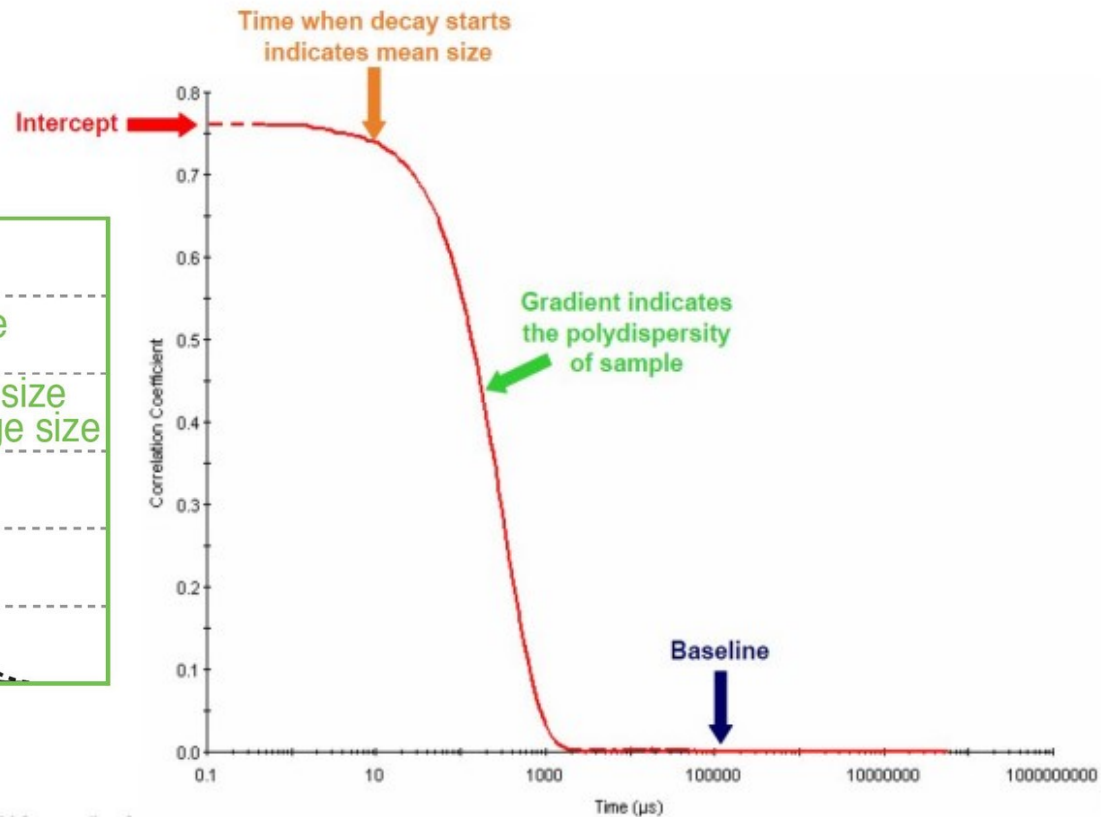
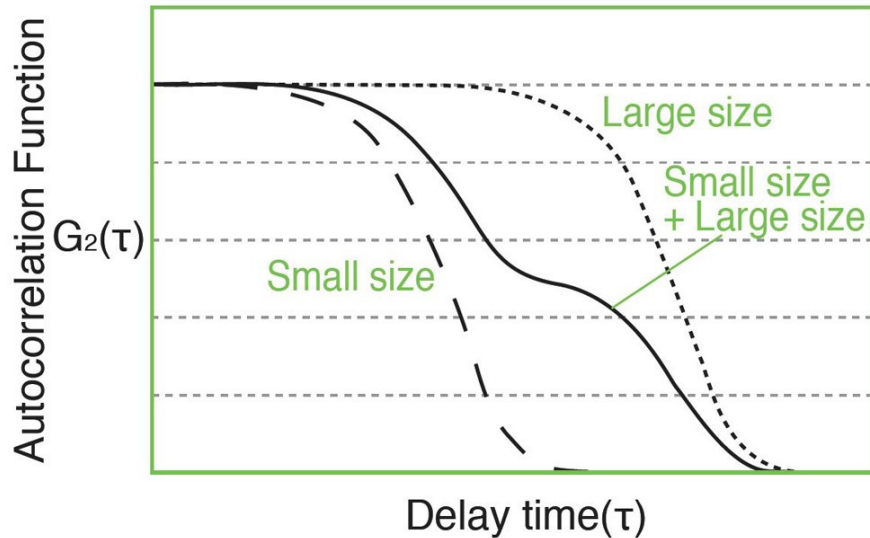
DLS (Dynamic Light Scattering): basi

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

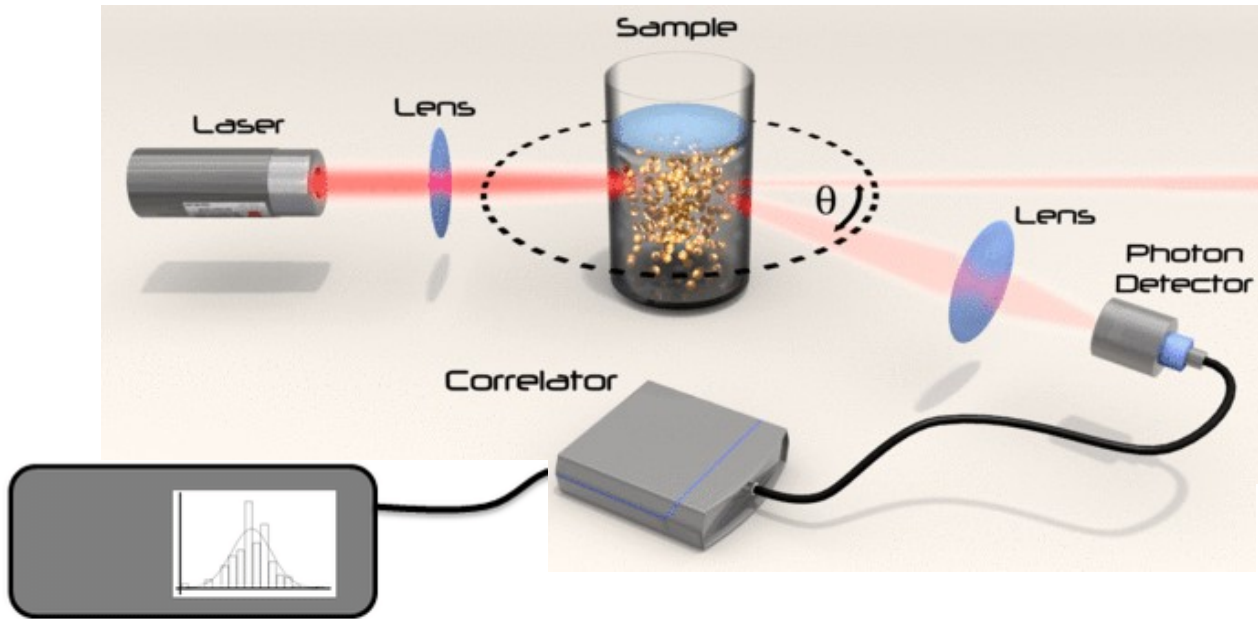
$$G(\tau)^2 = I(t) \times I(t + \tau) / (I_{\text{mean}})^2$$

CORRELOGRAMMA

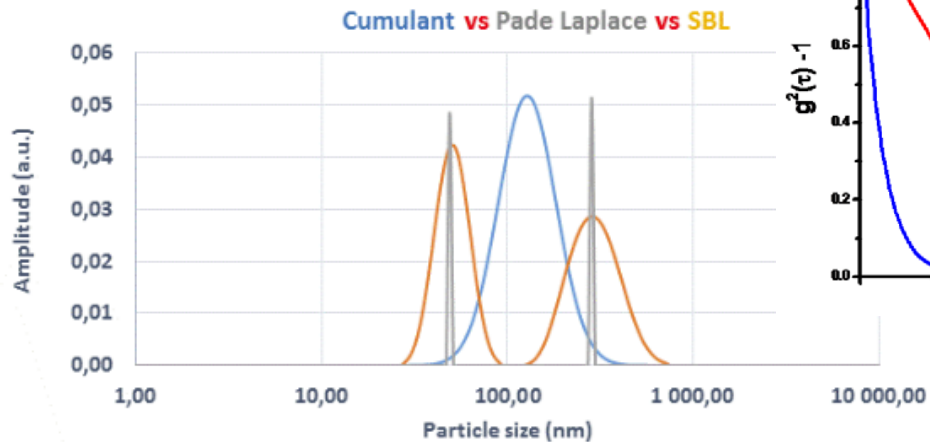
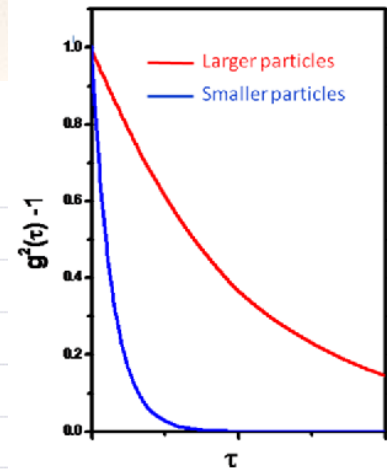
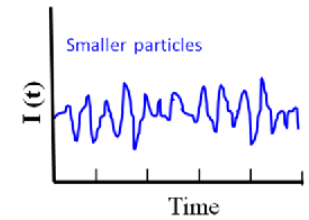
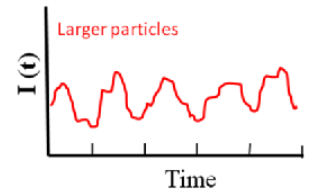


Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering): setup



Computer



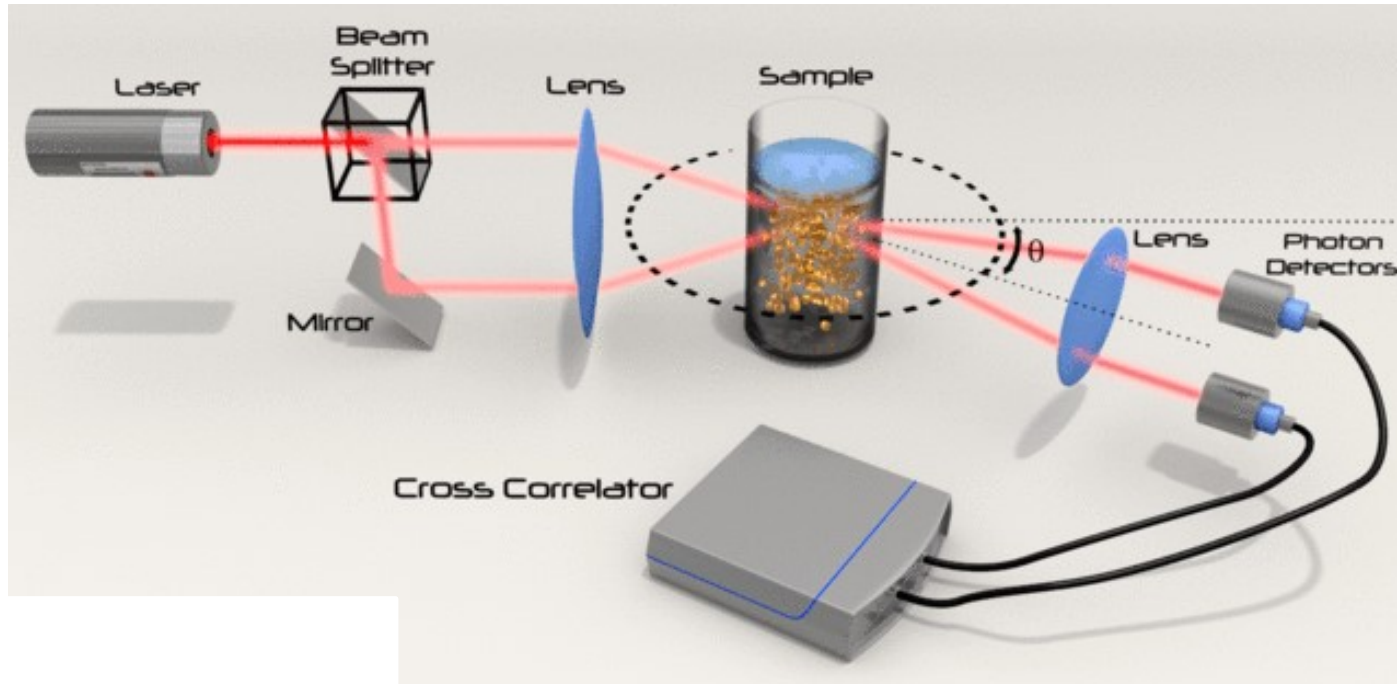
Legge di Einstein_Stokes
+ tre algoritmi matematici

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

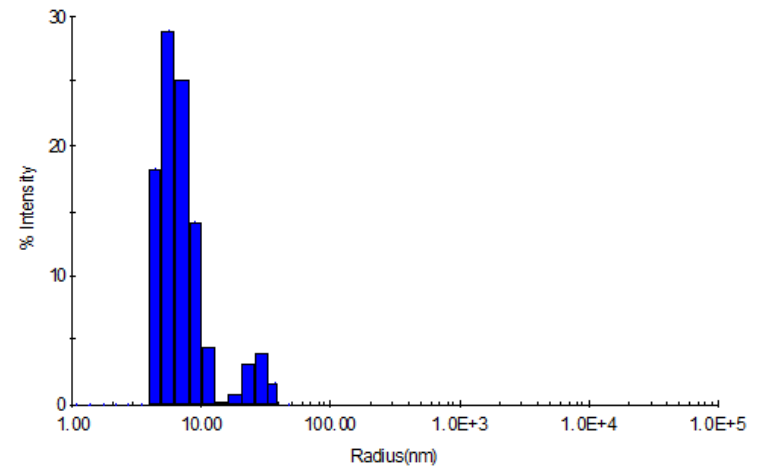
Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering): setup

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

Distribuzione di dimensioni:

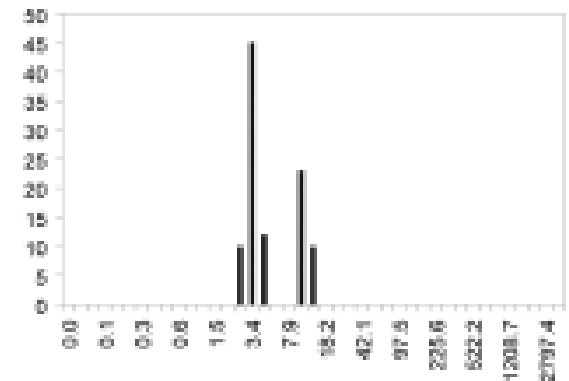
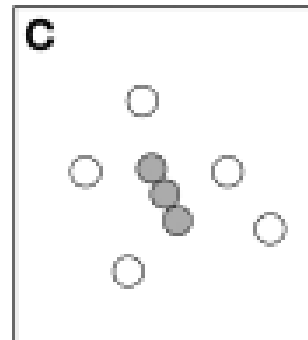
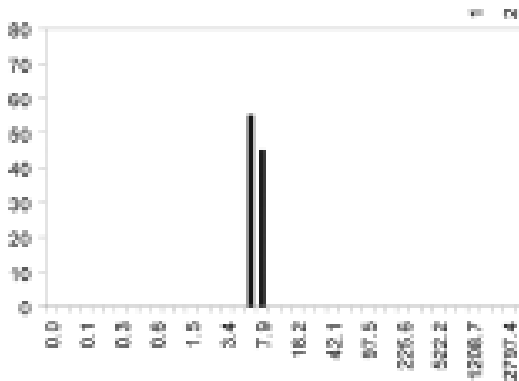
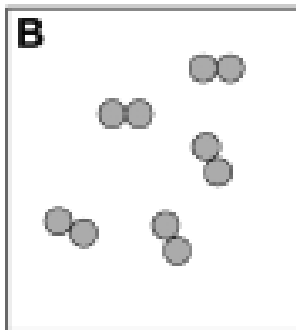
- Valore medio = R_H
- Larghezza = **POLIDISPERSIONE**



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

α Dipende dalla densità della particella

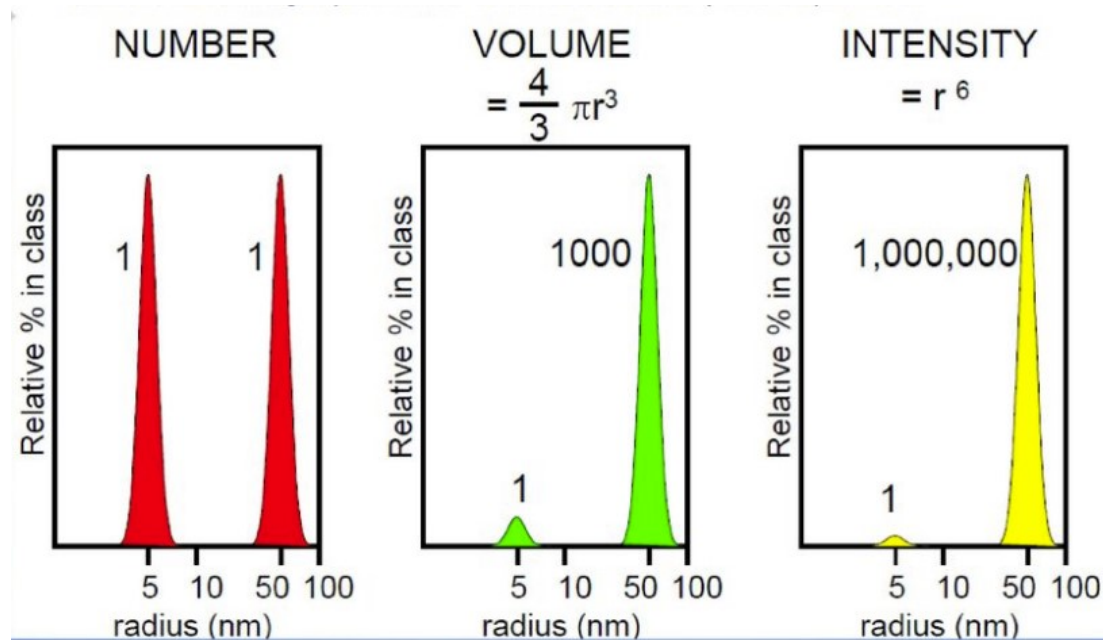
β Fattore di correzione dello strumento



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 :

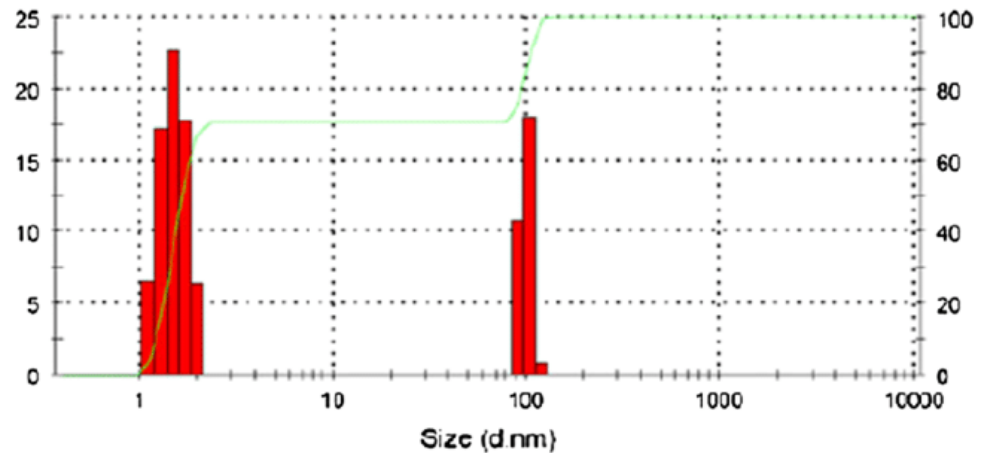
DLS (Dynamic Light Scattering): POLIDISPERSIONE

indice di purezza conformazionale:

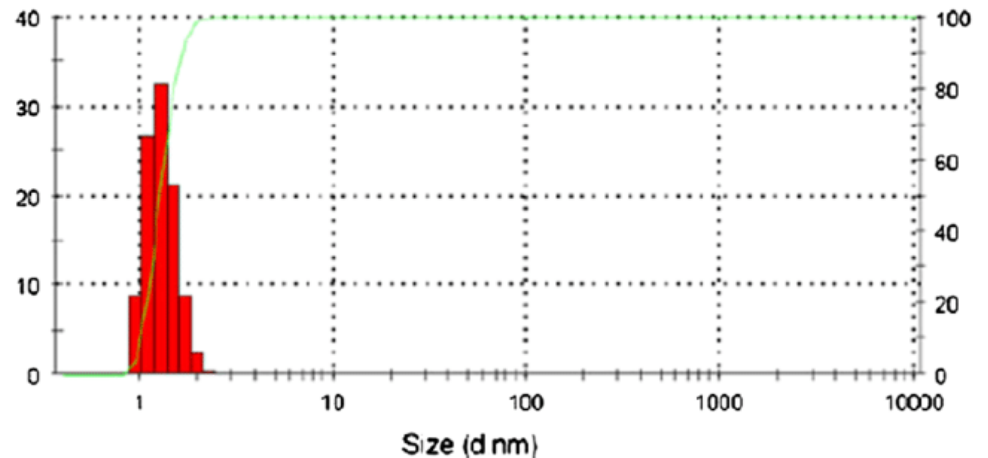
In teoria $g(\tau)$ dipende dallo scattering di una singola specie dominante

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

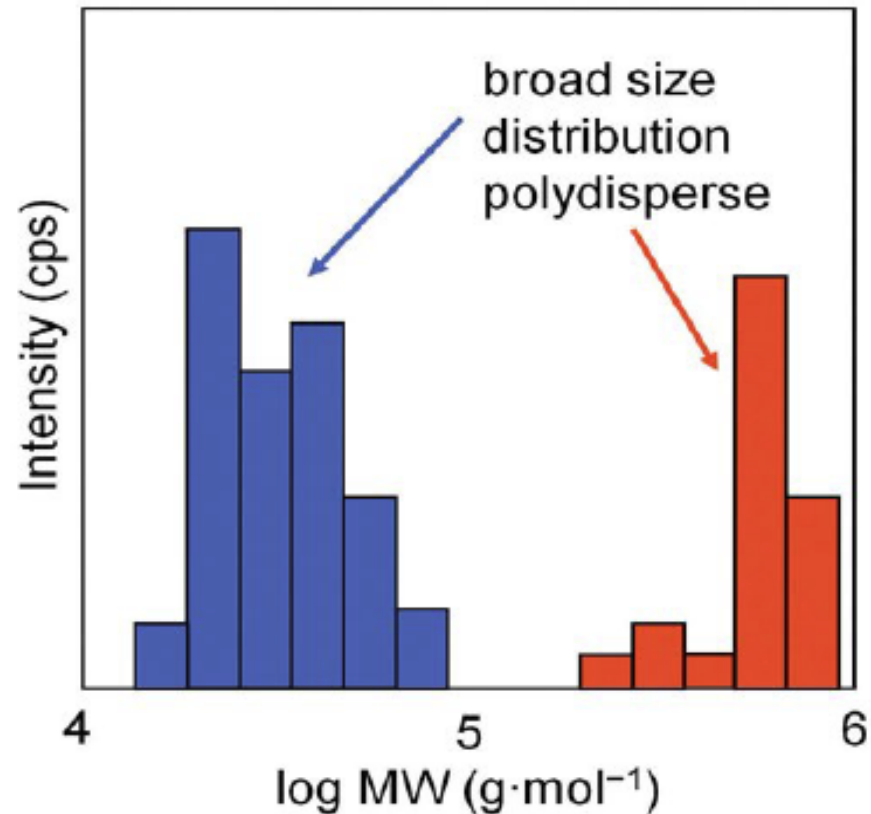
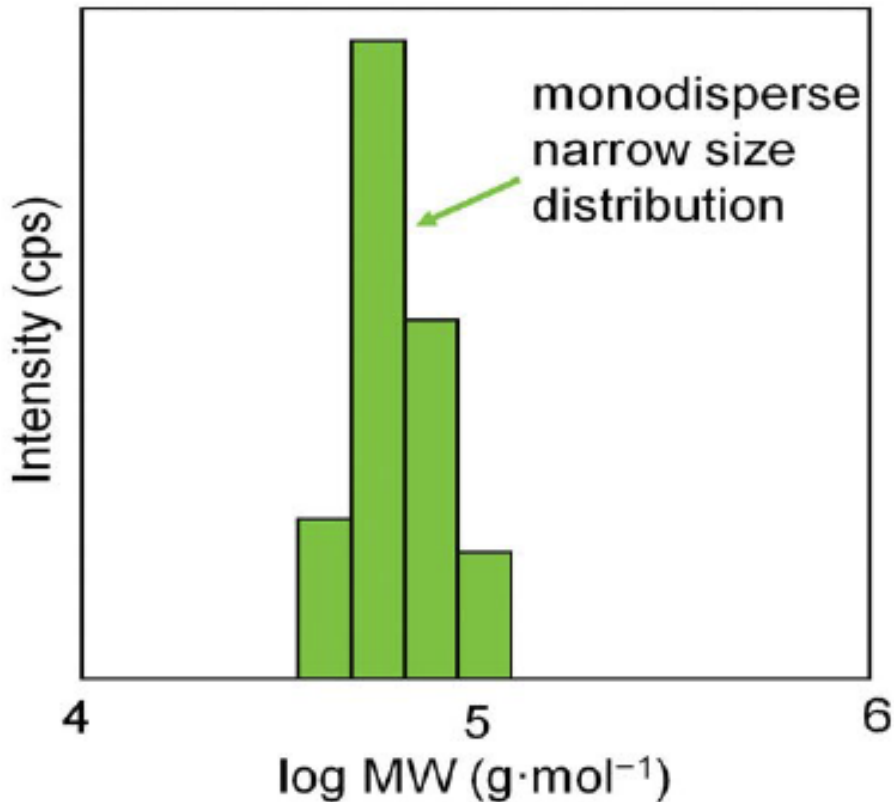
correlato con il successo di cristallizzazione:

polidispersione <15%

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

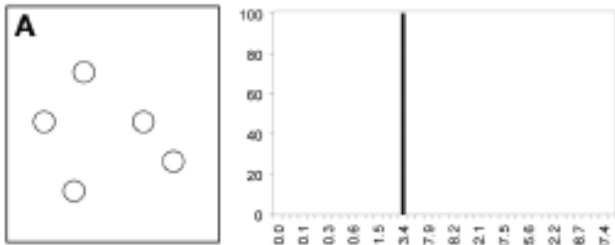
polidispersione >30%

- 8% probabilità di successo

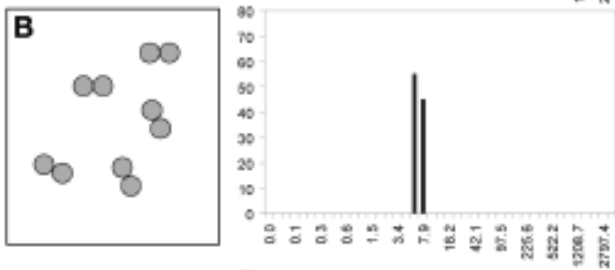


Analisi dello stato di aggregazione :

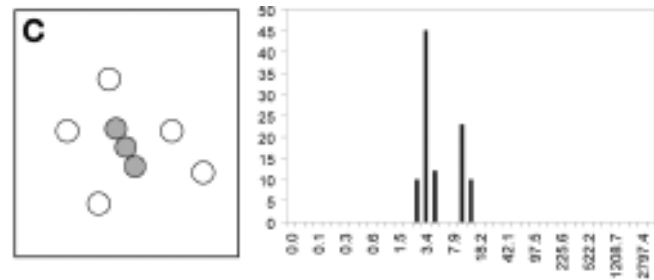
DLS (Dynamic Light Scattering): POLIDISPERSIONE



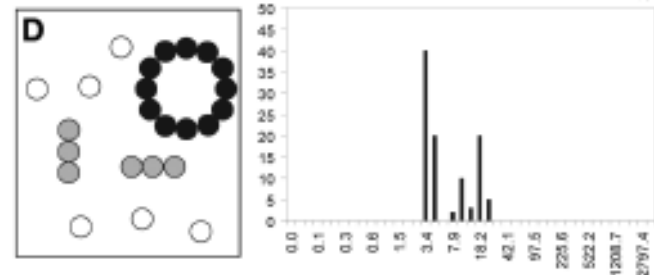
(A)
 R_H medio 3.4nm, polidispersione 10%
Elevata probabilità di cristallizzare



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



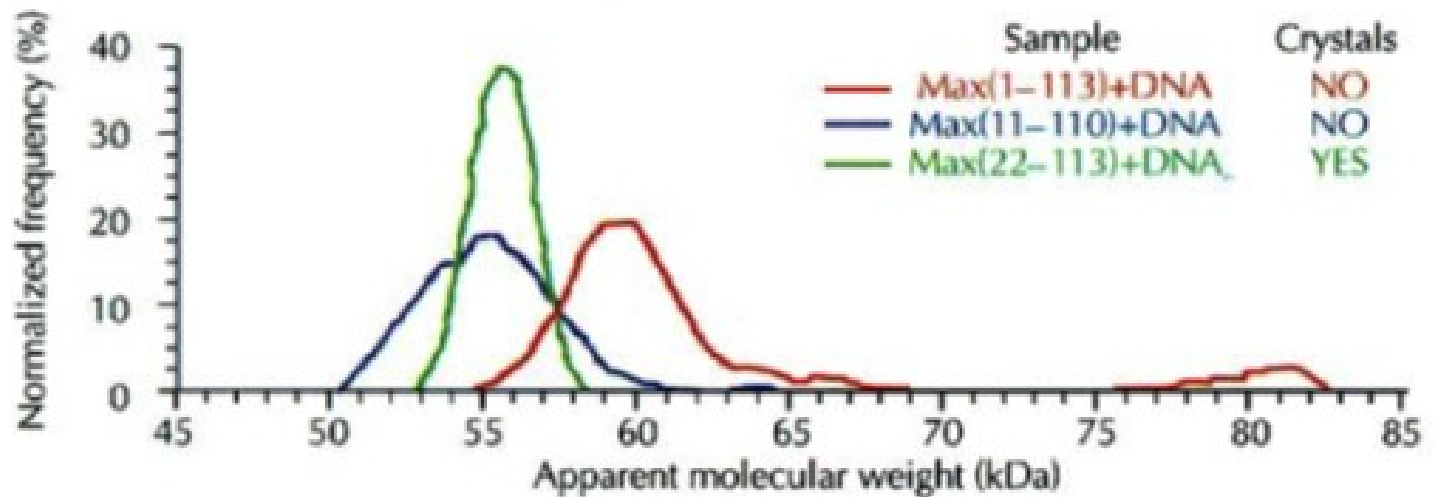
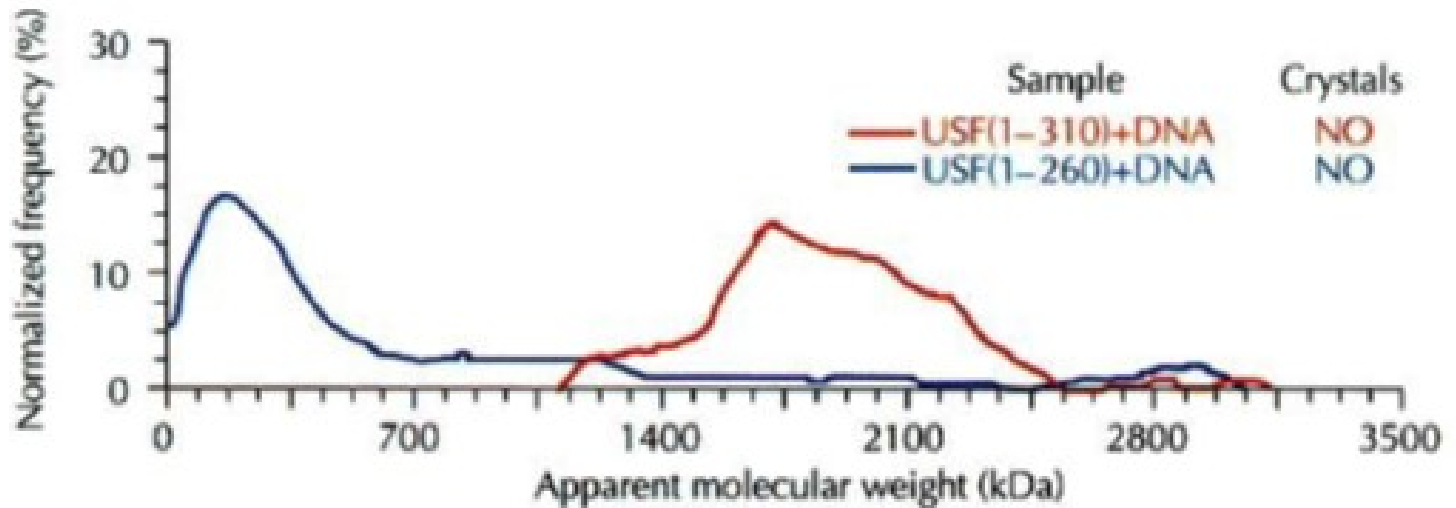
(C) R_H medio 3.4 e 10.2nm
Minore probabilità di cristallizzare



(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)

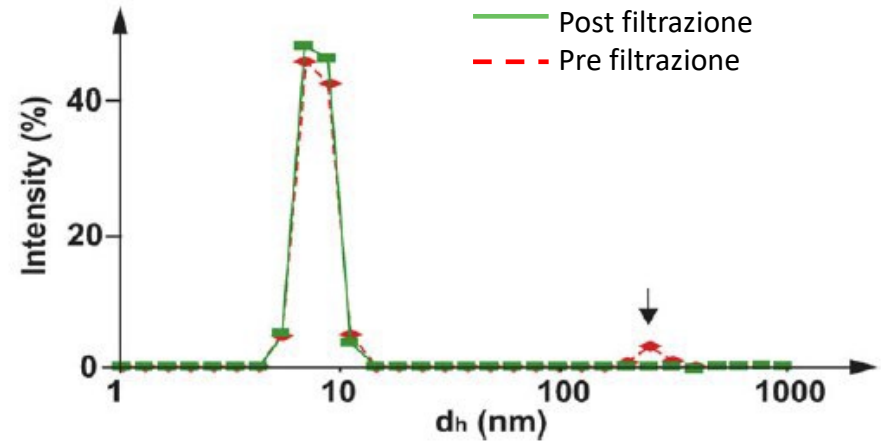
Effetto della filtrazione:

BSA (2mg/mL)

Aggregati rimossi

$R_H 7.4 \pm 1.0 \text{ nm}$ a 20°C

la polidispersione (12%) non viene modificata



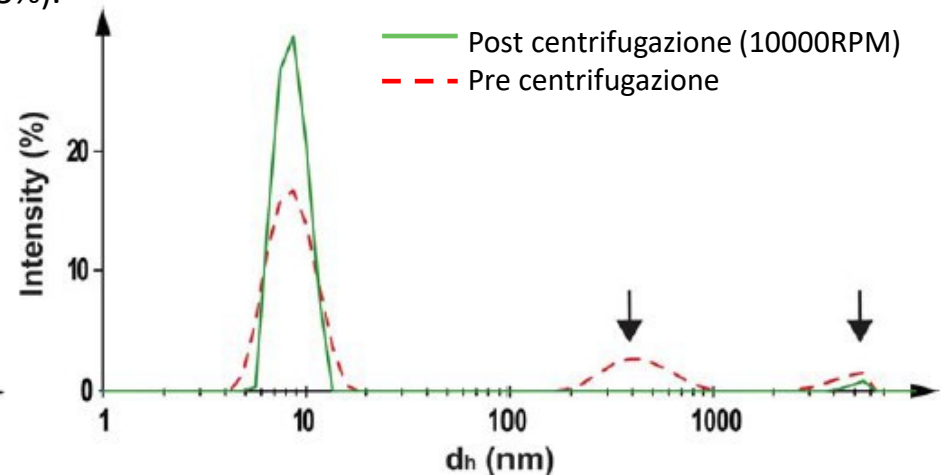
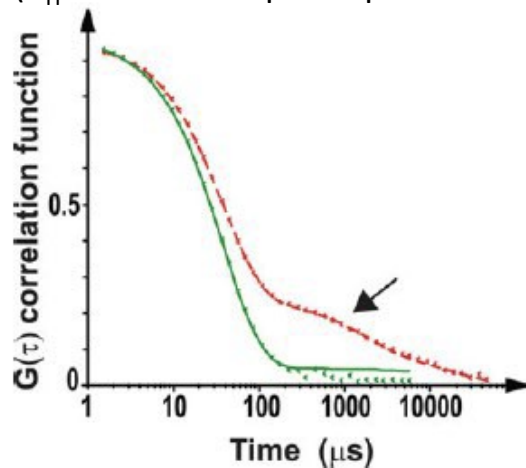
Effetto della centrifugazione:

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 :

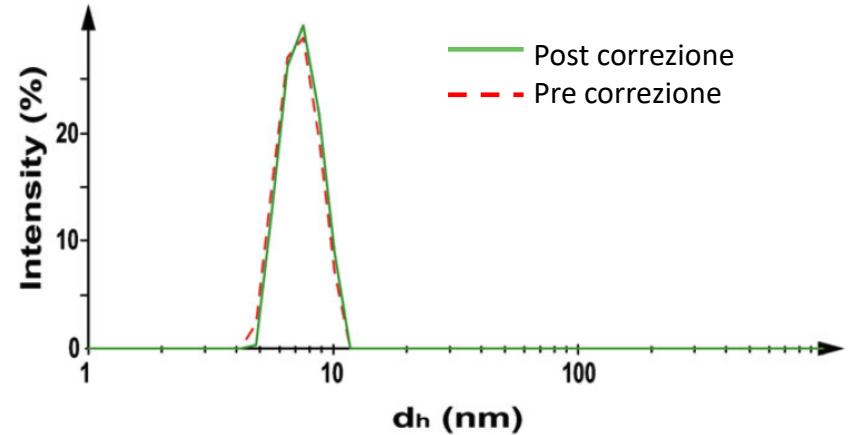
DLS (Dynamic Light Scattering):

Effetto della viscosità:

hpERS-2 (1 mg/mL) a 20°C

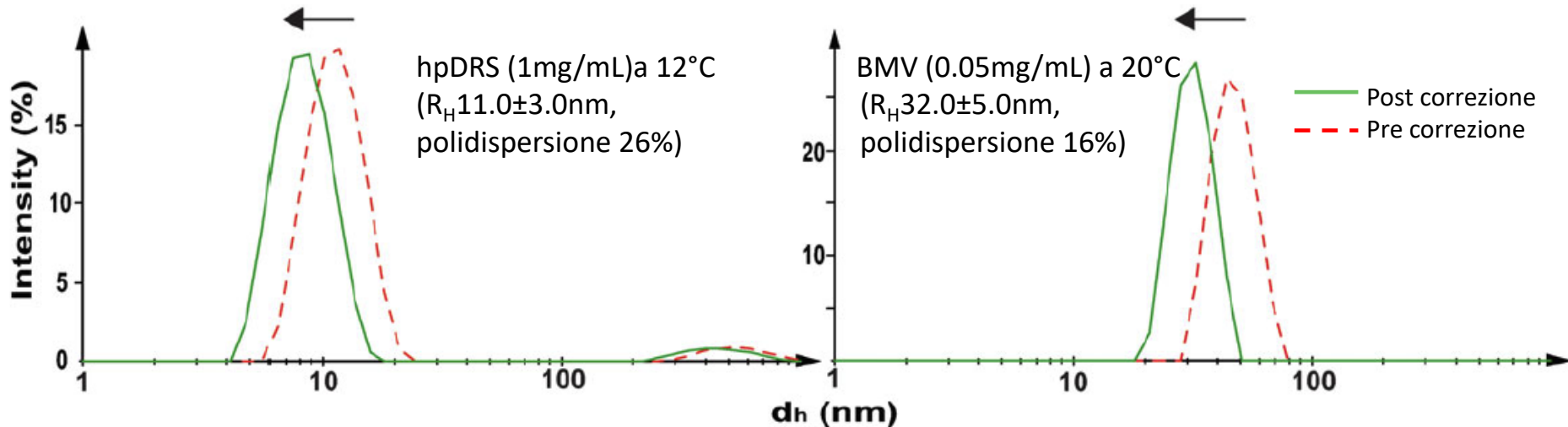
(R_H 7.0±1.0nm a 20°C, polidispersione 14%)

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

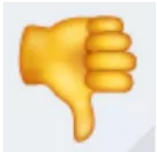


Analisi dello stato di aggregazione :

DLS (Dynamic Light Scattering):



- [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