

Relazione su invito al
"66^o Congresso SIF",
Bari, Ottobre 1980

ISTITUTO NAZIONALE DI FISICA NUCLEARE
Laboratori Nazionali di Frascati

LNF-80/60(P)
5 Novembre 1980

L. Palladino, A. Reale e A. Scafati: RICERCHE DI TIPO
BIOFISICO MEDIANTE LA RADIAZIONE DI SINCROTRONE
A FRASCATI E ALTROVE.

L. Palladino, A. Reale e A. Scafati^(x): RICERCHE DI TIPO BIOFISICO MEDIANTE LA RADIAZIONE DI SINCROTRONE A FRASCATI E ALTROVE^(o)

1. - INTRODUZIONE.

In quest'ultimo decennio la radiazione di sincrotrone è diventata uno strumento prezioso per lo sviluppo di indirizzi nuovi, verso orizzonti più avanzati, di molte discipline: Fisica dello Stato Solido, Fisica Molecolare, Biofisica, Biologia Molecolare.

Parliamo qui particolarmente delle applicazioni in campo biofisico.

Dov'è il segreto del grande successo della radiazione di sincrotrone? Esso si trova essenzialmente nelle caratteristiche della sorgente, se confrontata con quelle tradizionali, e nel parallelo sviluppo di nuovi rivelatori. Questo ha reso possibile lo studio di cinetiche veloci, cioè il passaggio da una visione statica delle diverse fasi dei processi biologici, ad una visione dinamica, nella quale si registrano i cambiamenti di conformazione e le reazioni di associazione, dissociazione, demolizione o sintesi, mentre essi avvengono. Prima infatti le informazioni sui vari stadi di un processo enzimatico venivano ottenute indirettamente, arrestando l'azione dell'enzima prima che esso avesse completato la sua funzione.

Gli studi cinetici con la radiazione di sincrotrone sono tuttavia, ancora, in una fase di promettente sviluppo, mentre le prime applicazioni in ordine di tempo sono state com'è naturale quelle basate su metodologie già note, come l'assorbimento, la diffusione e la diffrazione, dove la grande intensità, la continuità spettrale, le caratteristiche geometriche dei fasci, hanno consentito di raggiungere un'efficienza di indagine, quale prima non era pensabile.

1.1. -La radiazione di sincrotrone^(1, 2).

Caratteristiche :

- Intensità alta e stabile ($10^9 - 10^{10}$ f/sec x mr x GeV x mA x 0.1%);
- Ampia distribuzione spettrale (infrarosso \rightarrow 0.1 Å) (Figg. 1 e 2);
- Collimazione verticale ($\sim 10^{-4}$ rad);
- Piccole dimensioni trasverse del fascio ($\sim \text{mm}^2$);

(x) Laboratorio delle Radiazioni dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, e Sezione Sanità dell'INFN, Roma.

(o) Questo lavoro costituisce un ampliamento della relazione su invito presentata al Congresso Nazionale della SIF, Bari, 16-21 Ottobre 1980.

- Alto grado di polarizzazione lineare ($\sim 100\%$);
- Struttura temporale pulsata ($\tau \leq 0.1$ ns, $f \geq 1$ MHz).

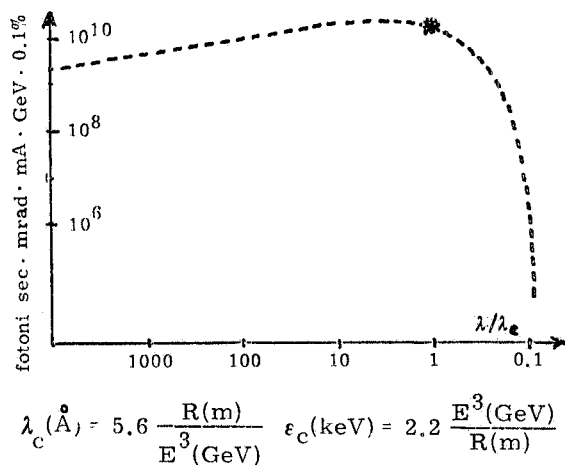


FIG. 1 - Curva "universale" dello spettro della radiazione di sincrotrone in funzione della lunghezza d'onda espressa in unità di λ_c .

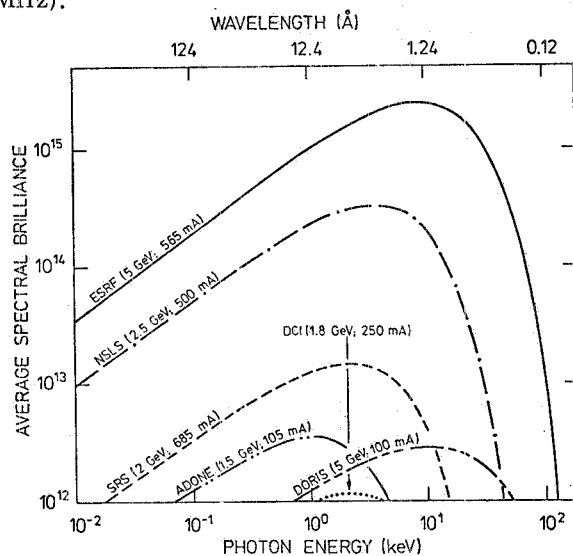


FIG. 2 - Brillanza spettrale ($f/\text{sec} \times \text{mm}^2 \times \text{x mrad}^2 \times 0.1\%$) media della radiazione di sincrotrone per diverse macchine acceleratrici (1).

In particolare, si ha per Adone:

	senza Wiggler	con Wiggler
E	1.5 GeV	1.5 GeV
Potenza	9 KW	12 KW
ϵ_c	1.55 keV	2.76 keV

1. 2. - Campi di utilizzazione in Biologia Molecolare e Biologia Cellulare.

- Spettroscopia di assorbimento X;
- Spettroscopia di fluorescenza X;
- Diffrazione su cristalli di proteine;
- Diffusione a piccolo angolo;
- Studi cinetici;
- Microscopia a raggi X;
- Radiologia;
- Spettroscopia UV (assorbimento fotoacustico, fluorescenza, dicroismo);
- Fotochimica;
- Fotobiologia cellulare.

In questa sede limiteremo per ovvi motivi di tempo il nostro discorso al solo campo dei raggi X e alle loro applicazioni, come metodo d'indagine, a livello molecolare.

2. - MISURE DI ASSORBIMENTO.

2.1. - L'EXAFS come metodo.

Lo studio dello spettro di assorbimento è stato una delle prime applicazioni della radiazione di sincrotrone e particolarmente dei raggi X all'indagine sulla struttura dei materiali biologici.

Particolarmente l'analisi fine della struttura della soglia di assorbimento caratteristica (XANES)⁽³⁾ e dello spettro, fino ad un migliaio di elettroni sopra la soglia (EXAFS), consente di analizzare⁽⁴⁾ il sito locale di legame di un atomo pesante che è legato ad una proteina o altra macromolecola, per esempio un acido nucleico.

E' noto infatti che l'improvvisa salita o soglia che si verifica in uno spettro di assorbimento X in corrispondenza alla estrazione di un fotoelettrone dai livelli interni K, L, ... dell'atomo, presenta sia una struttura di picchi irregolari proprio in corrispondenza all'energia di soglia, che una serie di piccole oscillazioni periodiche che vanno man mano smorzandosi ma che possono essere studiate da circa 50 eV fino a circa 500-1000 eV (EXAFS) sopra la soglia (v. Fig. 3).

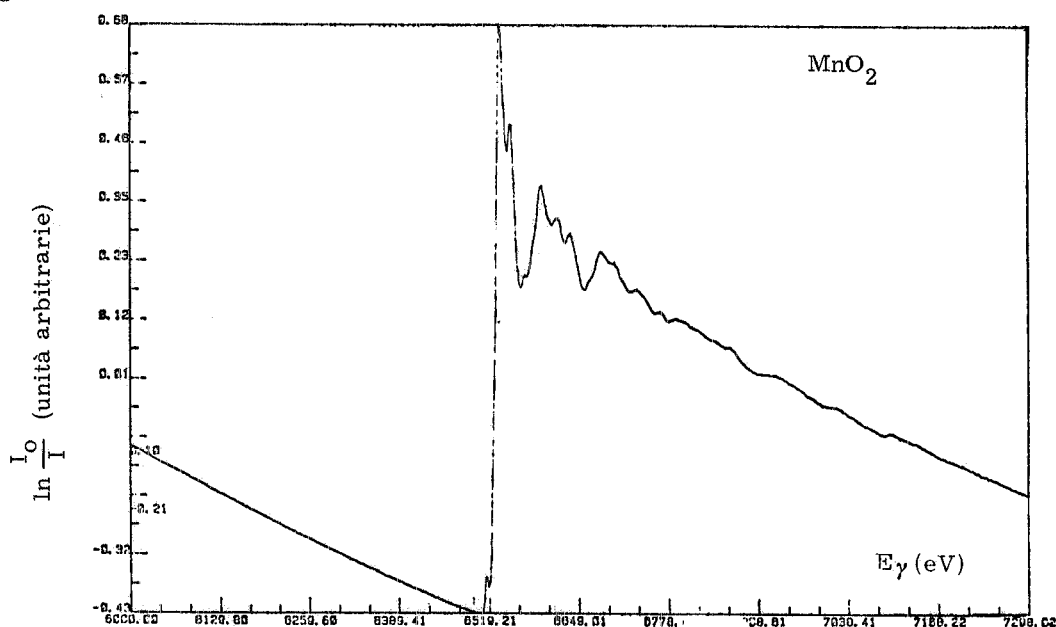


FIG. 3 - Spettro sperimentale del biossido di manganese, MnO_2 , La scala dell'energia va corretta per un fattore di taratura poco diverso dall'unità⁽⁴⁾.

Questo fenomeno è noto ed interpretato sin dal 1930⁽⁵⁾. Il fotoelettrone emesso infatti può essere considerato come una onda sferica che esce dall'atomo e che viene parzialmente riflessa dalle nubi elettroniche degli atomi circostanti; la risultante interferenza dà luogo alle oscillazioni EXAFS (v. Fig. 4).

La modulazione del coefficiente di assorbimento μ per $E_\gamma \gtrsim 50$ eV sopra l'energia di soglia E_s può essere scritta come:

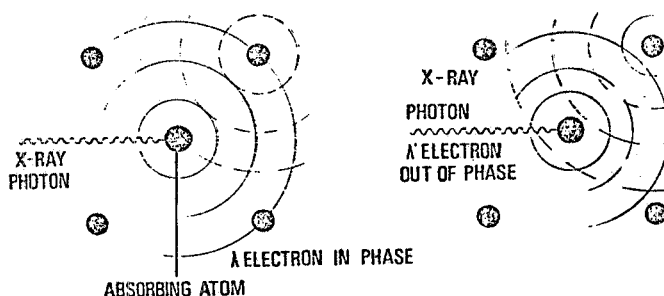


FIG. 4 - Modello schematico del fotoelettrone come onda sferica uscente dall'atomo che ha assorbito il fotone X incidente e degli effetti di interferenza dovuti all'onda riflessa da un atomo vicino.

$$\frac{\mu - \mu_0}{\mu_0} = \chi(K) = \sum_{j=1}^N \frac{N_j F_j}{K R_j^2} e^{-2\sigma_j^2 K^2} D_j \sin [2K R_j + \phi_j(K)],$$

dove:

$K = 1/\lambda$;

N_j è il numero di atomi nella shell j ;

R_j è la distanza dall'atomo assorbitore ;

F_j è l'ampiezza di backscattering degli atomi circostanti ;

σ_j è il fattore di Debye-Waller ;

D_j è un fattore di attenuazione dovuto a processi anelastici di assorbimento ;

ϕ_j è lo sfasamento determinato dal potenziale dell'atomo emettitore e degli atomi della shell j -esima .

Per estrarre le singole armoniche si opera attraverso la trasformata di Fourier (TF) della $K\chi(K)$. Se in prima approssimazione si pone $\phi_j(K) = a_j + b_j K$ segue :

$$TF [K\chi(K)] \sim e^{-\left[R - \left(R_j + \frac{b_j}{2}\right)\right]^2 / 2\sigma_j^2}$$

dove R è la variabile coniugata di K .

La Fig. 5 per esempio rappresenta la trasformata di Fourier dello spettro riportato in Fig. 4, una volta sottratta la parte continua⁽³⁾.

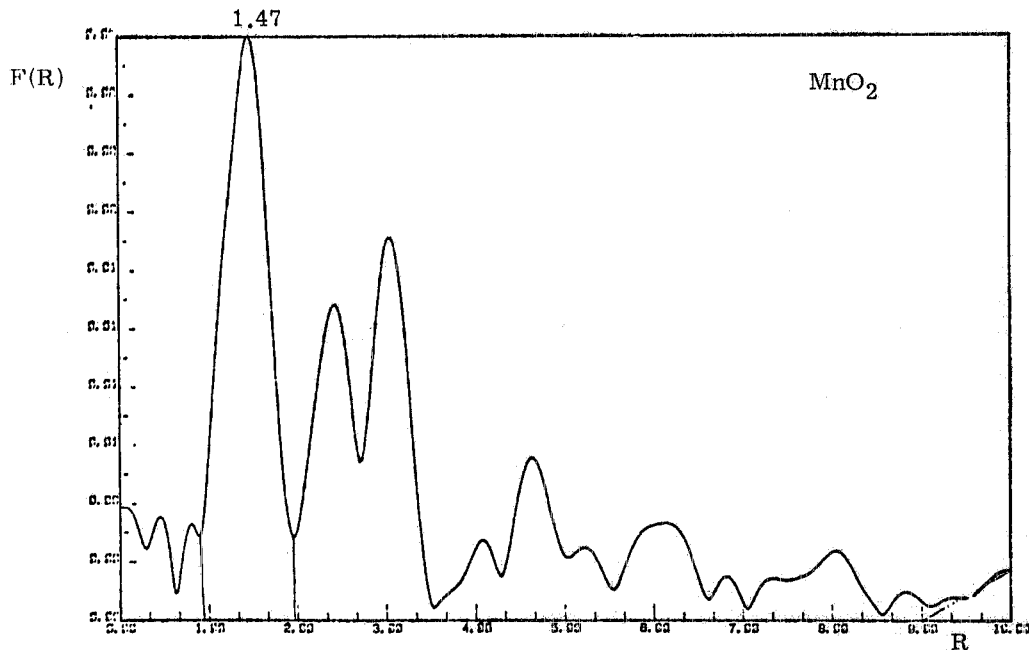


FIG. 5 - Trasformata di Fourier della parte oscillante ~ 50 eV sopra la soglia dello spettro del MnO_2 mostrato in Fig. 3⁽⁴⁾.

Un'analisi completa è riportata come sequenza di tre grafici in Fig. 6⁽⁶⁾ :

- a) lo spettro sperimentale ;
- b) la trasformata di Fourier della $\chi(K)$;
- c) l'antitrasformata che dà la frequenza del picco isolato in b) con una "finestra" gaussiana.

A che cosa si presta bene l'EXAFS? Alla determinazione del tipo di atomi vicini, del loro numero, della loro distanza, e, attraverso il fattore di Debye-Waller, alla conoscenza del disordine strutturale e di agitazione termica.

In confronto con l'analisi diffrattometrica, che dà informazioni sull'ordine a lungo range, si ha qui una immagine localizzata dell'intorno di un particolare atomo che in interessa, ma, in questa visione più limitata, si ottiene una precisione assai maggiore (dell'ordine di $\sim 0.01 \text{ \AA}$ anziché 0.1 \AA nella misura delle distanze interatomiche più vicine). Si possono determinare le prime 3-4 shell intorno all'atomo che interessa, fino a circa 7 \AA di distanza.

E' interessante osservare che non è raro il caso in cui i dati cristallografici esistenti hanno dovuto essere corretti sulla base dei dati EXAFS.

Per l'analisi EXAFS non è neanche necessario che esista un ordine a lungo range, e cioè una struttura cristallina, ma, anzi tale metodo è adatto a studiare sistemi biologici in soluzione, o materiali amorfi. Il fattore di Debye-Waller dà informazioni sul grado di disordine, su eventuali correlazioni nel moto delle molecole, e così via.

2.2. - Applicazioni biologiche.

L'indagine EXAFS è stata applicata estesamente a diversi esempi di metallo-proteine, quali l'emoglobina (ione Fe), la emocianina (ione Cu) ed inoltre molti altri metalloenzimi (citocromo, nitrogenasi, ecc.).

Alcuni ioni metallici invece hanno un ruolo meno specifico, ma ugualmente determinante per la struttura e la funzione sia di proteine che di acidi nucleici. Tali ioni sono ad esempio il K, il Na, il Ca, il Mn, mentre le particolarità dei siti di legame anche in tal caso non sono ancora ben note.

Generalmente l'intervallo di energie dei raggi X che può essere studiato con gli attuali monocromatori è da 2-3 keV a $\sim 25 \text{ keV}$, cosichè gli ioni metallici biologicamente più interessanti che possono essere studiati, in relazione alle loro soglie K, sono:

	Z	$\lambda_s (\text{\AA})$	$E_s (\text{keV})$
O	8	23	0.54
Mg	12	9.51	1.30
Ca	20	3.07	4.04
Mn	25	1.90	6.5
Fe	26	1.74	7.1
Cu	29	1.38	8.9
Mo	42	0.6	20

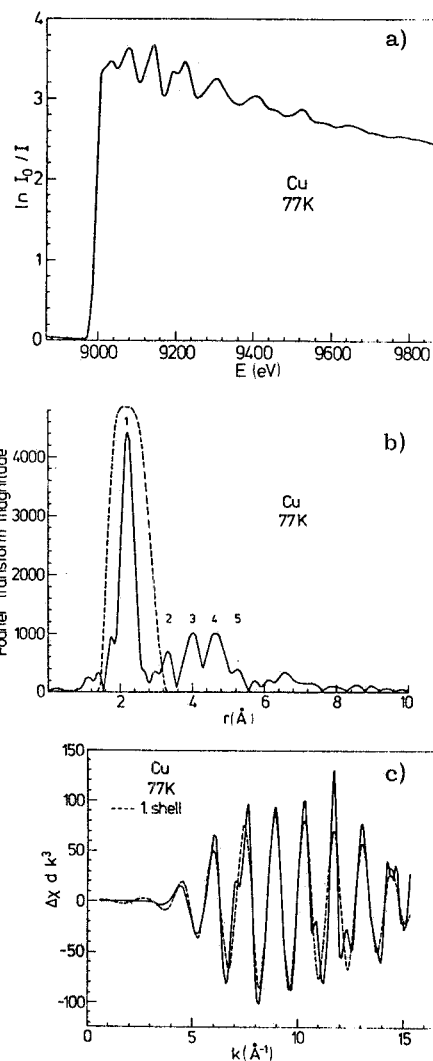


FIG. 6 - L'analisi EXAFS a partire dallo spettro sperimentale del Cu (a); la trasformata di Fourier e la finestra gaussiana con cui è analizzato il picco 1 (b); la corrispondente anti trasformazione con il tipico involuppo è mostrata in c).

Il problema principale che deve essere risolto nell'applicazione della tecnica EXAFS è quello dato dalla forte diluizione dell'atomo che interessa, generalmente circondato da un gran numero di atomi più leggeri (H, C, O, N, P), i quali contribuiscono all'assorbimento con un fondo più o meno continuo, rispetto al quale il segnale si riduce tal volta ad essere una piccola frazione. Il limite di concentrazione è sperimentalmente dell'ordine di un atomo su 10.000.

In questo senso è vantaggioso l'impiego di una variante alle misure di assorbimento che con-

siste nell'eseguire invece misure di fluorescenza, analizzando la luce di fluorescenza emessa dagli atomi che l'effetto fotoelettrico ha lasciato in uno stato eccitato. Le informazioni che si ottengono sono le stesse, e il limite di concentrazione si abbassa per un fattore dell'ordine di 10.

E' facile dimostrare che se si indica con μ_B il coefficiente di assorbimento dovuto agli atomi di "background" e con μ_o quello (medio) dovuto agli atomi che interessano, il rapporto segnale/fondo risulta, in trasmissione,

$$\left(\frac{S}{F}\right)_t \approx \sqrt{\frac{4I_o}{e^2}} \frac{\mu_o}{\mu_o + \mu_B} \chi$$

in condizioni ottimali, cioè per

$$(\mu_o + \mu_B) \times d = 2, \quad \text{dove } d \text{ è lo spessore del campione.}$$

Analogamente in fluorescenza

$$\left(\frac{S}{F}\right)_{Fl} = \sqrt{\frac{I_o \varepsilon \frac{\Delta\Omega}{4\pi} \mu_o \chi}{\mu_o + \mu_B}}$$

dove ε è il rendimento di fluorescenza.

Queste due espressioni si equivalgono al lorchè il numero di atomi che interessa è dell'ordine di 10^{18} at/cm³, per valori ragionevoli di μ_B , ε e $\Delta\Omega$, diciamo

$$\mu_B \approx 10 \text{ cm}^{-1}, \quad \frac{\Delta\Omega}{4\pi} = 1\%, \quad \varepsilon \approx 30\%.$$

Tale limite corrisponde a concentrazioni dell'ordine di 2 mM. Per concentrazioni inferiori a questo limite risulta

$$\left(\frac{S}{F}\right)_{Fl} > \left(\frac{S}{F}\right)_t$$

donde la convenienza di lavorare in fluorescenza anzichè in trasmissione.

Questo è mostrato per la rubredoxina⁽⁷⁾ nella Fig. 7 che riporta un confronto tra misure di trasmissione e misure di fluorescenza.

2.3. - Esempi di applicazione.

Tra i problemi sui quali l'EXAFS è riuscita a far luce, ne citiamo solo alcuni.

Per esempio, Eisenberger et al.⁽⁸⁾ hanno studiato sin dal 1976 la distanza Fe-N nell'emoglobina, nelle sue forme ossi- e deossi ed hanno dimostrato che la lunghezza del legame non varia molto nel processo di ossidazione (distanza Fe-N = 2.05 ± 0.01 Å nell'ossiemoglobina e 1.98 ± 0.01 Å nella deossiemoglobina) (v. Fig. 8).

Questo risultato è importante perchè esiste un modello di Perutz e Hoard, secondo il quale il ferro, nella forma deossi-, si trova in una posizione deformata rispetto alla normale distanza di legame che è quella che assume nella forma ossidata; il legame nella forma deossi ha quindi immagazzinato energia di deformazione che contribuisce alla differenza (di 3 Kcal) di energia di legame del Fe con l'ossigeno.

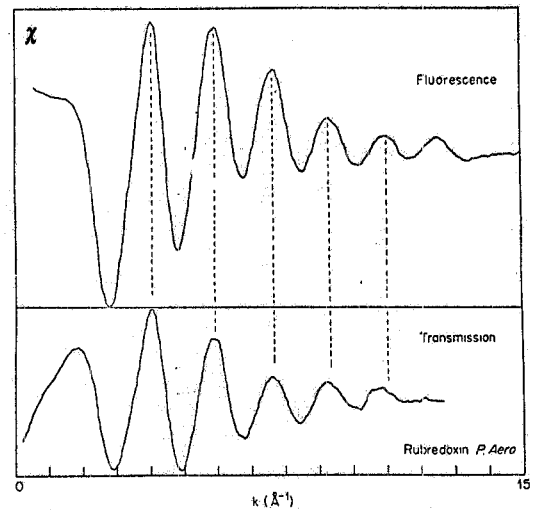


FIG. 7 - Confronto dell'intensità delle oscillazioni EXAFS osservate in trasmissione e in fluorescenza per una metallo-proteina, la rubredoxina⁽⁷⁾.

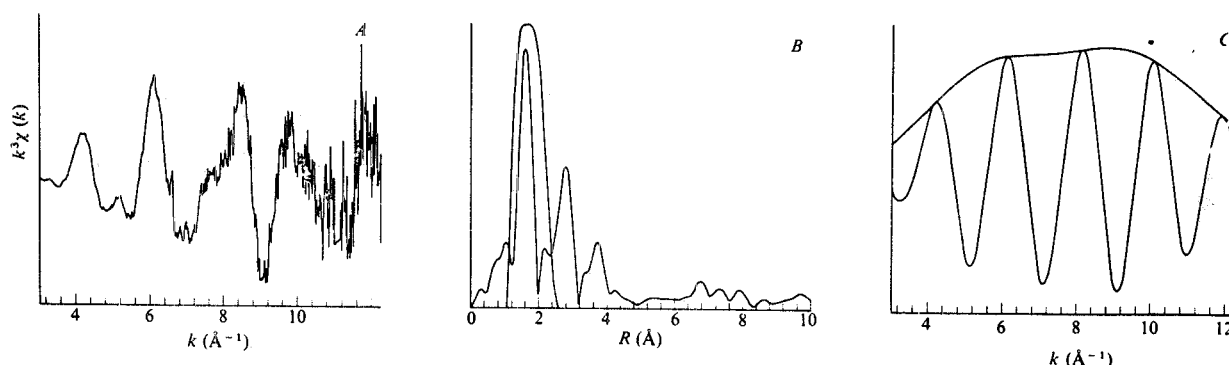


FIG. 8 - Spettro EXAFS del Fe nella deossiemoglobina⁽⁸⁾.

Le misure di EXAFS hanno smentito questo modello e per confronto della distanza Fe-N nella emoglobina e in altre porfirine, hanno dimostrato che la globina non induce deformazioni nel legame Fe-N nell'eme.

Simile è il caso della rubredoxina (v. Fig. 7), una piccola molecola dove il ferro è legato a 4 atomi di zolfo. Sembrava che 3 di questi 4 atomi fossero legati ad una distanza di 2.30 Å, e il quarto a 2.05 Å, valore così breve da far supporre anche qui una deformazione rispetto alla normale distanza di legame e corrispondentemente una energia che avrebbe alterato il potenziale di ossido-riduzione della rubredoxina. Misure di EXAFS in fluorescenza hanno dimostrato che la dispersione nei legami Fe-S è $\Delta R = 0.05 \pm 0.05$ Å, cioè nulla.

Un altro esempio è quello della nitrogenasi, una proteina di peso molecolare 220.000 che contiene ferro (24-32 atomi per proteina), e molibdeno (2 atomi). In questo caso era oscuro il ruolo del molibdeno anche se si sospettava che avesse a che fare con il sito attivo.

Le misure di EXAFS sul molibdeno⁽⁹⁾ hanno innanzitutto mostrato un battimento in corrispondenza ad una differenza di 0.5 Å nella distanza dal molibdeno di due forti scatteratori.

Con metodi di best fit si è potuto identificare il primo vicino che è un atomo di zolfo, a 2.35 Å dal molibdeno, e il secondo vicino che è un ferro, a 2.72 Å (fu trovato anche un secondo S a 2.49 Å). Confrontando poi l'EXAFS della proteina con quella del solo co-fattore, una parte a basso peso molecolare che può essere dissociata dalla proteina (come l'eme della globina) si è visto che gli spettri sono identici.

In questo caso l'EXAFS è servita ad avere una prima idea su questo enzima che non era stato studiato prima con metodi di diffrazione perchè non cristallizzabile. Si è così scoperto che la struttura e la disposizione degli atomi nell'enzima corrisponde a quella indicata in Fig. 9 e questo complesso si è ritrovato in composti inorganici⁽¹⁰⁾.

Comparativamente meno frequenti sono le applicazioni dell'EXAFS agli acidi nucleici, in particolare alle interazioni di questi con vari metalli che ne determinano o ne alterano la struttura, e che hanno un ruolo biologico.

Possiamo citare solo uno studio di Teo e Lipard⁽¹¹⁾ sulla formazione di complessi Pt-DNA, che hanno un interesse nel campo della terapia dei tumori. Citiamo inoltre un nostro studio sulle interazioni di metalli bivalenti (in particolare Mn) con i nucleotidi e gli acidi nucleici^(3, 4).

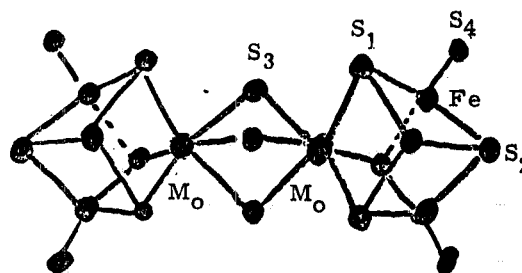


FIG. 9 - Sito di legame dei due atomi di molibdeno nella nitrogenasi.

Citiamo inoltre un nostro studio sulle interazioni di metalli bivalenti (in particolare Mn) con i nucleotidi e gli acidi nucleici^(3, 4).

2.4. - Analisi delle soglie.

Studiando la regione della soglia a grande risoluzione (~ 0.1 eV) si possono dedurre le seguenti informazioni: l'energia della soglia può variare di qualche eV a seconda dello stato di ossidazione dell'elemento e del grado di covalenza del legame chimico in cui esso è coinvolto (chemical shift); inoltre le varie discontinuità che la soglia presenta danno informazioni sulla struttura elettronica, anche se l'analisi teorica non è ancora completa.

La Fig. 10 mostra le soglie di alcuni composti inorganici del manganese, confrontate con quelle dei complessi biologici e dello ione Mn in soluzione⁽³⁾.

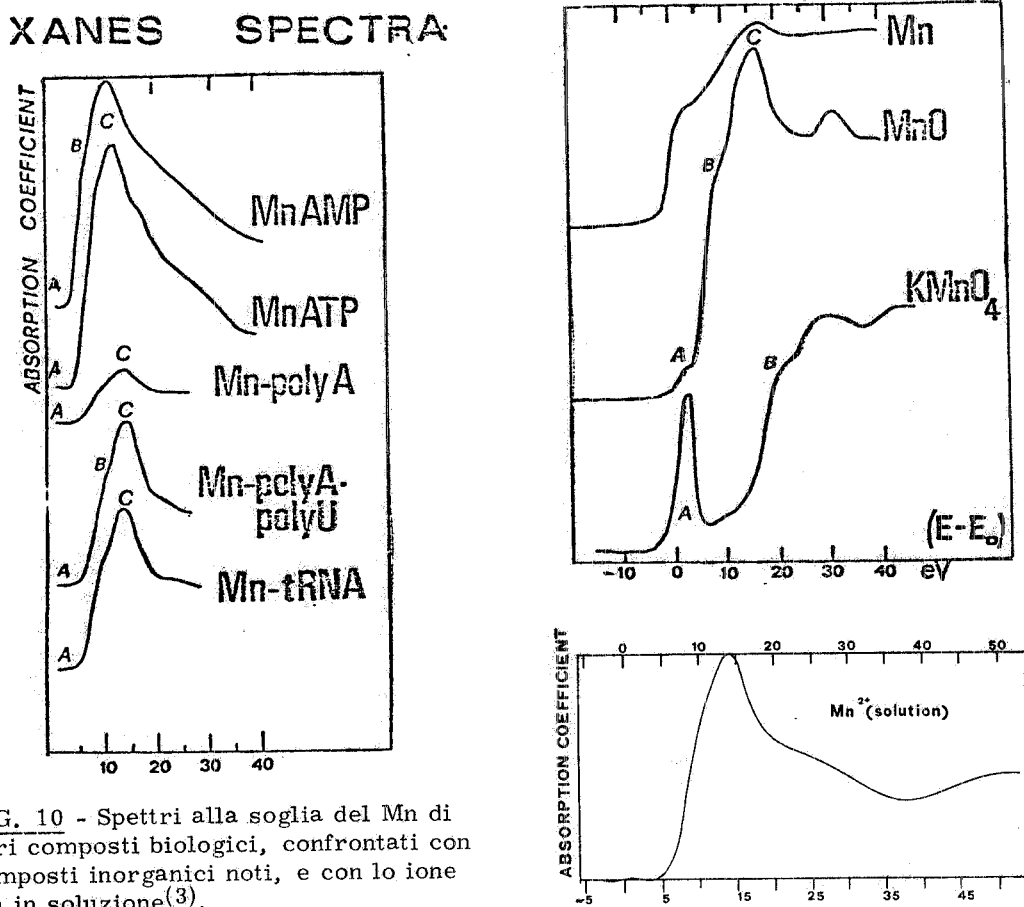


FIG. 10 - Spettri alla soglia del Mn di vari composti biologici, confrontati con composti inorganici noti, e con lo ione Mn in soluzione⁽³⁾.

Si può vedere che le soglie dei complessi biologici sono molto simili a quelle dell'ossido di manganese e del Mn in soluzione, cioè fanno pensare ad una simmetria ottaedrica con 6 atomi di ossigeno intorno allo ione Mn, così come avviene per la soluzione. Per confronto si osservi il picco indicato con A nel KMnO₄, a simmetria tetraedrica.

Uno studio interessante mediante analisi delle soglie ed EXAFS, svolto a Frascati⁽¹²⁾ è quello del sito di legame del Ca in alcune proteine (troponina C, calmodulina S100) che intervengono nella contrazione muscolare e nel sistema nervoso. Gli spettri XANES danno informazioni uniche su questi sistemi che non si possono studiare direttamente con altre spettroscopie EPR, NMR. La distanza Ca-O è stata determinata dagli spettri EXAFS. Sono stati identificati due tipi di siti con struttura diversa in due classi di proteine malgrado la sequenza di aminoacidi sia molto simile. I siti diversi della troponina C sono stati identificati sostituendo Tb³⁺. In Fig. 11b sono riportate le derivate degli spettri di soglia. Nella Fig. 11a è riportata, come altro esempio, la soglia K del ferro nell'emoglobina⁽¹²⁾ e nella Fig. 11b la soglia K del ferro nella transferrina umana⁽¹²⁾ e in alcuni composti del Fe con numeri di coordinazione e simmetria locale diversi.

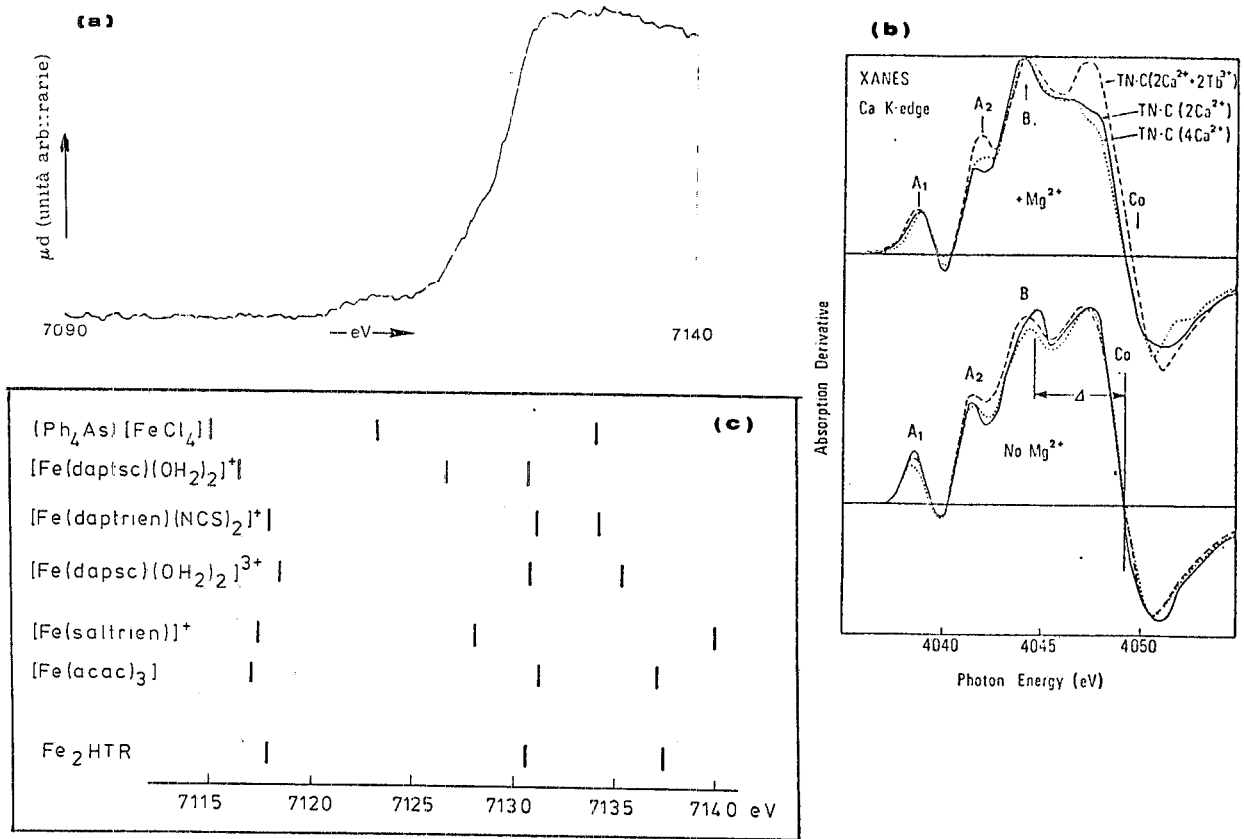


FIG. 11 - Spettro alla soglia del Fe dell'emoglobina (a), e derivata della soglia Ca nella troponina C (b). La figura (c) riporta le energie delle strutture della soglia in diversi composti del Fe e quelle del Fe nella transferrina umana⁽¹²⁾.

Il confronto della posizione delle soglie nella transferrina e nei complessi permette di concludere a favore di alcune simmetrie.

X X X X X X X X

Riportiamo qui di seguito un elenco degli esperimenti in corso presso Adone insieme alle più recenti proposte di esperienze, sul canale a raggi X, nel campo dell'analisi degli spettri EXAFS e delle soglie.

Esperienze in corso (aprile 1980):

- Sito del Ca nelle proteine: protrombina, parvalbumina, troponina C, calmodulina
A. Bianconi, L. Castellani (Istituto di Fisica, Roma);
C. Natoli, S. Mobilio, F. Comin (PULS).
- Ruolo degli ioni bivalenti nell'acido ribonucleico (RIBEX)
A. Reale (LNF);
M. Belli, F. Notargiacomo, A. Scafati (Istituto Superiore di Sanità);
A. Bianconi (Istituto di Fisica, Roma);
S. Mobilio (PULS).
- Studio di cuproproteine naturali e sostituite con altri metalli
L. Calabrese (Chimica Biologica, Roma);
F. Comin (PULS);
A. Desideri (Istituto di Fisica, Cosenza);

- B. Mondovì (Biochimica Applicata, Roma);
L. Morpurgo, G. Rotilio (Chimica Biologica, Roma).
- Sito attivo della ferritrasferrina
A. A. G. Tomlison, L. Alagna (CNR, Montelibretti);
A. Bianconi (Istituto di Fisica, Roma);
A. Desideri (Istituto di Fisica, Cosenza).
 - Studio EXAFS del Calcio nelle neuroproteine S-100
P. Fasella, S. Biocca, L. Castellani (Chimica Biologica, Roma)
P. Calissano (Lab. Biologia Cellulare CNR);
A. Bianconi (Istituto di Fisica, Roma);
S. Mobilio (PULS).
 - Studi strutturali di metallo proteine da microrganismi mutanti e di complessi di ioni metallici mediante leganti biofunzionali
A. Vecchi, P. Cavatorta, P. R. Crippa (Istituto di Fisica, Parma);
G. Casnati, A. Dossena, R. Marchelli (Istituto Chimica Organica, Parma);
I. Ferraro Fortunati, P. Puglisi (Istituto di Genetica, Parma);
G. Colombetti, F. Lenci (Lab. Lafbic CNR, Pisa).
 - Stato elettronico del sito e EXAFS del ferro in emoglobine
A. Vaciago (Istituto di Fisica, Roma);
M. Brunori, G. M. Giacometti (Chimica, Facoltà di Medicina, Roma);
M. Cerdonio, S. Morante, S. Vitale (Istituto di Fisica, Trento);
L. Incochia (PULS).
 - Determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche dei siti attivi nella citocromo ossidasi
A. Colosimo, M. Brunori, E. Antonini (Chimica, Facoltà di Medicina, Roma);
F. Andreasi Bassi (Istituto di Fisica dell'Università Cattolica S. Cuore, Roma);
A. Bianconi (Istituto di Fisica, Roma).

Nuove proposte di esperienze (aprile 1980):

- Sostituti del calcio in proteine che legano calcio
A. Bianconi, I. Davoli, P. Fasella, J. Krebs, B. Oesch.
- Studio EXAFS del metalloenzima
I. Bertini, I. Davoli, A. Dei, D. Gatteschi, C. Luchinat, S. Stizza.
- EXAFS ottica di proteine
A. Bianconi, I. Davoli, S. Stizza.
- Studio del sito del Cu nella uridina nucleosidasi del lievito
S. Stizza, A. Bianconi, I. Davoli, G. Magni, S. Ruggeri, P. Natalini, I. Santarelli, A. Vita.
- Influenza del pH sul Fe emnico del citocromo c nativo e carbossimetilato.

3. - MISURE DI DIFFRAZIONE.

3.1. - Introduzione.

Come è noto, si possono ricavare informazioni sulla struttura della materia mediante i raggi X, misurando l'intensità diffusa da un campione a diversi angoli.

Le informazioni che si ottengono dipendono dal grado di ordine del sistema studiato. Se si tratta infatti di una struttura cristallina è in generale possibile risalire dalla figura di diffrazione completa alla natura e alla disposizione dei singoli atomi nel reticolo e alle dimensioni della cella elementare.

Se invece il campione è un gas di molecole indipendenti o una sospensione di particelle in un solvente praticamente trasparente, la misura della radiazione diffusa ai diversi angoli

può darci solo delle informazioni globali sulla geometria e la massa dei centri diffondenti.

Vi sono poi delle situazioni intermedie in cui esiste soltanto un ordine parziale, in una sola dimensione (fibre) o in due dimensioni (membrane).

Vediamo qual'è la situazione se il materiale che si vuole studiare è di tipo biologico, si tratta cioè ad esempio di proteine.

3.2. - Cristallografia delle proteine.

Ricordiamo che le proteine sono grosse molecole costituite da catene lineari di amminoacidi, avvolte variamente su se stesse in modo da assumere generalmente un aspetto globulare più o meno allungato e di peso molecolare variabile tra qualche migliaio e il milione. Applicare i metodi di analisi cristallografica a molecole così complesse presenta diversi problemi, alla cui soluzione l'impiego come sorgente della radiazione di sincrotrone può contribuire vantaggiosamente.

Prima di tutto osserviamo che non è sempre facile ottenere dei cristalli singoli di proteine che siano sufficientemente estesi e sufficientemente perfetti. Anzi, non tutte le proteine danno cristalli, e spesso, anche nel caso positivo, si hanno dei cristalli molto piccoli, ovvero disordinati.

Ne segue che la qualità dei dati cristallografici dipende in modo critico da due fattori; la collimazione e l'intensità del fascio. I tubi a raggi X convenzionali si trovano in difficoltà e solo l'alta brillantezza di una macchina acceleratrice può consentire di studiare cristalli non più grandi di 20μ in ciascuna dimensione, valore da confrontare con i $100-400 \mu$ richiesti dai sistemi convenzionali.

Un altro fattore importante nello studio della diffrazione delle proteine o altre macromolecole è la grande dimensione della cella unitaria. Con i fasci attuali si può arrivare non senza difficoltà fino a circa 400 \AA , a causa delle dimensioni finite delle singole macchie di diffrazione che tendono a sovrapporsi.

Con la luce di sincrotrone si possono ridurre notevolmente le dimensioni del fascio, e quindi ottenere una migliore risoluzione anche per celle di grandi dimensioni. Si può prevedere di arrivare a interpretare celle unitarie fino a 1000 \AA .

La riduzione dei tempi di esposizione resa possibile dall'impiego della luce di sincrotrone, riduce anche notevolmente la possibilità di deterioramento del campione, spesso per sua stessa natura abbastanza instabile, e soggetto anche ad un danno di irraggiamento, che è minore per più brevi esposizioni.

Nella Fig. 12 è riportata la figura di diffrazione di un cristallo di un'enzima, la glicogeno-fosforilasi b ($M_w = 97.500$, cella di dimensioni $128 \times 128 \times 116 \text{ \AA}$). In questo caso è facile ottenere dei cristalli abbastanza grandi, ma il vantaggio di ricorrere alla luce di sincrotrone si vede ugualmente: la figura di diffrazione a sinistra, molto più ricca di dati e priva di fondo, è stata ottenuta al LURE con un'esposizione di $6 \text{ min}^{(13)}$; quella a destra ha richiesto 12 ore con un tubo a raggi X ad anodo rotante.

Un altro caso da citare come esempio è quello dell'enzima tirosil t-RNA sintetasi; la cella unitaria ha due assi uguali di 64.6 \AA , e un asse più lungo pari a 238.8 \AA . E' evidente la difficoltà di analizzare tale cristallo, se si pensa che le massime dimensioni di cristalli ottenibili sono $\sim (400 \mu) \times 200 \mu$. Con simili spessori si ottiene appena risolta la distanza reticolare di $238.8 \text{ \AA}^{(14)}$.

Occorre tuttavia osservare che l'elaborazione dei dati cristallografici è sempre molto lunga e chiaramente la luce di sincrotrone non porta in ciò nessun vantaggio. Molti dei dati finora raccolti nei vari laboratori del mondo sono ancora in via di elaborazione.

3.3. - Diffrazione su fibre.

Quanto più grande è la spaziatura tra piani reticolari, tanto più piccolo è l'angolo tra la direzione incidente e la direzione alla quale si trova un massimo di diffrazione (secondo la relazione di Bragg $\sin \theta = n\lambda / 2d_{hkl}$). Quando dunque la cella unitaria è molto grande, cioè esi-

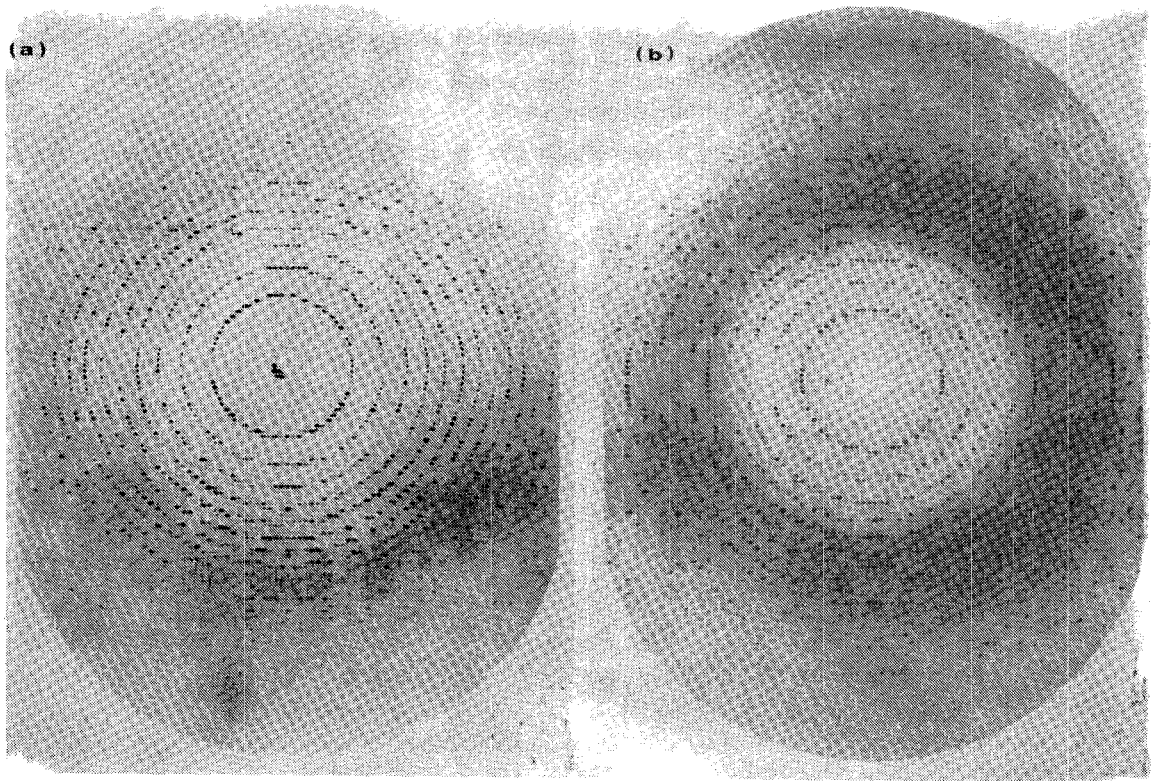


FIG. 12 - Figura di diffrazione dell'enzima glicogeno fosforilasi b: eseguita al LURE con 6 minuti di esposizione (a) e con un tubo a raggi X tradizionale con 12 ore di esposizione (b)(13).

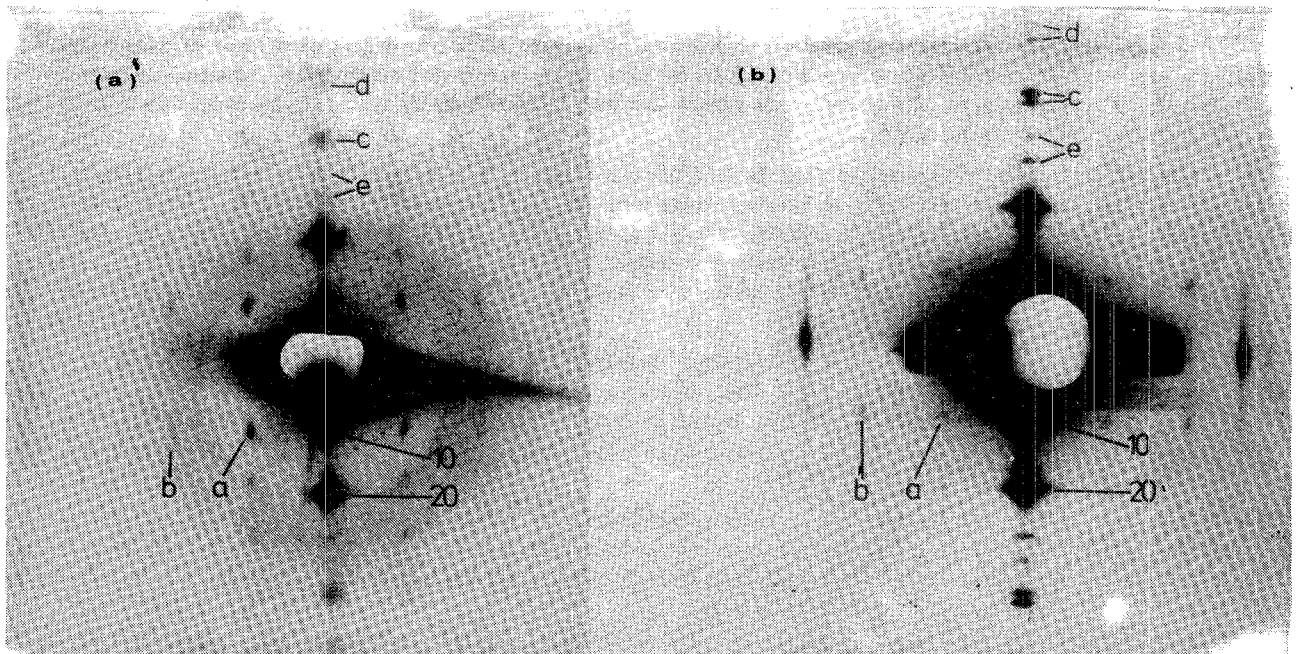


FIG. 13 - Figura di diffrazione a piccolo angolo di fibre muscolari: con tubo a raggi X (a); con radiazione di sincrotrone (DESY). La linea verticale centrale corrisponde alle riflessioni dovute alle periodicità del reticolo esagonale di filamenti spessi e sottili nel piano ortogonale alle fibrille. La linea orizzontale centrale alle periodicità lungo le fibrille (cross bridges ripetuti)(15).

stono periodicità a lungo range, occorre fare misure di diffrazione a piccolo angolo.

In particolare in alcuni casi solo le riflessioni a piccolo angolo sono sufficientemente intense da essere osservabili, anche se aumentare l'intensità ed i tempi di esposizione consente di estendere l'angolo di osservazione. Questo avviene ad esempio nel caso di fibre di proteine, in cui esiste una periodicità soltanto in una direzione, e si è quindi costretti a rinunciare alla osservazione di periodicità a più corti range, dato che darebbero luogo a riflessioni troppo poco intense.

Come esempio riportiamo alcune misure eseguite a DESY su fibre muscolari sia a riposo che sottoposte a stress dinamico⁽¹⁵⁾. La Fig. 13a mostra una figura di diffrazione a piccolo angolo ottenuta su fibre muscolari di un insetto mediante l'uso di un tubo a raggi X tradizionale, e per confronto la figura di diffrazione ottenuta a DESY sullo stesso preparato è riportata in Fig. 13b. Si vede che in questo secondo caso si ha una risoluzione molto maggiore.

Da queste figure (tempi di esposizione 1 ora per DESY e 14 ore con il tubo a raggi X) si possono già dedurre molte informazioni sulle distanze caratteristiche dei filamenti spessi e sottili delle fibre muscolari, che in fotografia al microscopio elettronico si presentano come è mostrato in Fig. 14, in due sezioni rispettivamente trasversali e longitudinali alle fibre stesse.

Si può dire che le riflessioni sulle linea verticale centrale provengono dalla disposizione esagonale dei filamenti spessi e sottili; la riflessione indicata con 10 è data dai piani dei filamenti spessi (miosina) distanziati di 450 Å, mentre la riflessione 20 è data dalla distanza tra filamento spesso e filamento sottile (actina). Le riflessioni sulla retta orizzontale sono date dalla ripetizione (a 145 Å) dei cosiddetti cross-bridges, visibili nella Fig. 14b.

3.4. - Membrane.

Tutte le considerazioni relative ai vantaggi della luce di sincrotrone rispetto alle sorgenti tradizionali si applicano anche al caso dello studio di proteine che formano strati bidimensionali o membrane.

La Fig. 15 ad esempio riporta il confronto tra la figura di diffrazione a piccolo angolo ottenuta con un tubo a raggi X e quella ottenuta a SPEAR, su un campione di mielina del nervo sciatico, per lo stesso tempo di esposizione⁽¹⁶⁾.

4. - DIFFUSIONE A PICCOLO ANGOLO.

Recentemente grande sviluppo ha avuto questa tecnica, con la quale si possono studiare macromolecole o particelle in sospensione in un solvente.

I suoi vantaggi sono:

- a) la possibilità di osservare macromolecole non cristallizzabili;
- b) la possibilità di confrontare i dati ottenuti mediante la diffrazione nello stato cristallino, con la configurazione assunta dalla macromolecola in condizioni più vicine allo stato fisiologico;
- c) la minor complessità dell'elaborazione dei dati;
- d) la possibilità di studiare transizioni conformazionali in soluzione (associazione, dissociazione, cambiamenti di forma e dimensioni) collegate alle funzioni biologiche.

Ricordiamo che le informazioni che si ricavano da questa tecnica sono essenzialmente globali; si rinuncia cioè generalmente ad analizzare la struttura interna, per lo meno a livello atomico. L'unica informazione che si può avere sulla struttura interna riguarda, nel caso di centri diffondenti sferici, la distribuzione radiale della densità di carica.

La situazione che si ha infatti per lo scattering a piccolo angolo è la seguente:

- non c'è in generale interferenza costruttiva, ma la intensità diffusa è concentrata in una piccola regione intorno al fascio incidente;

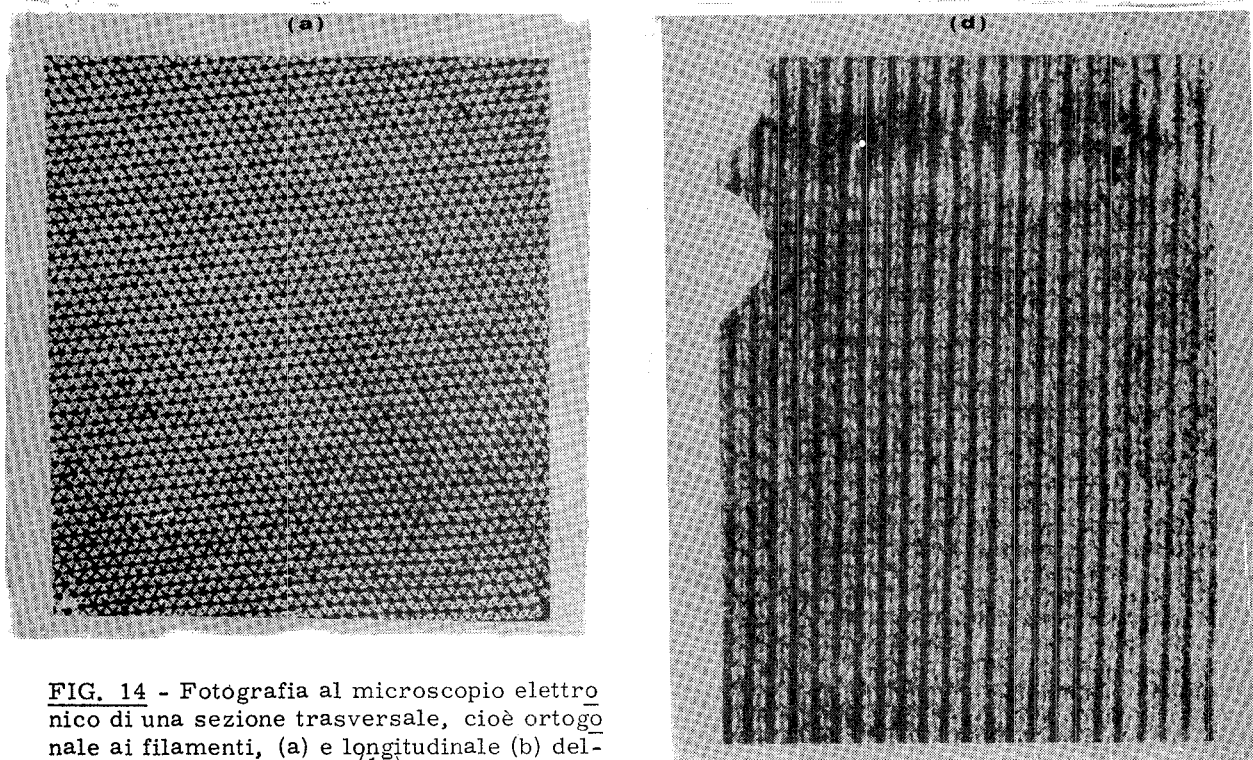


FIG. 14 - Fotografia al microscopio elettronico di una sezione trasversale, cioè ortogonale ai filamenti, (a) e longitudinale (b) delle fibre di cui in Fig. 13⁽¹⁵⁾.

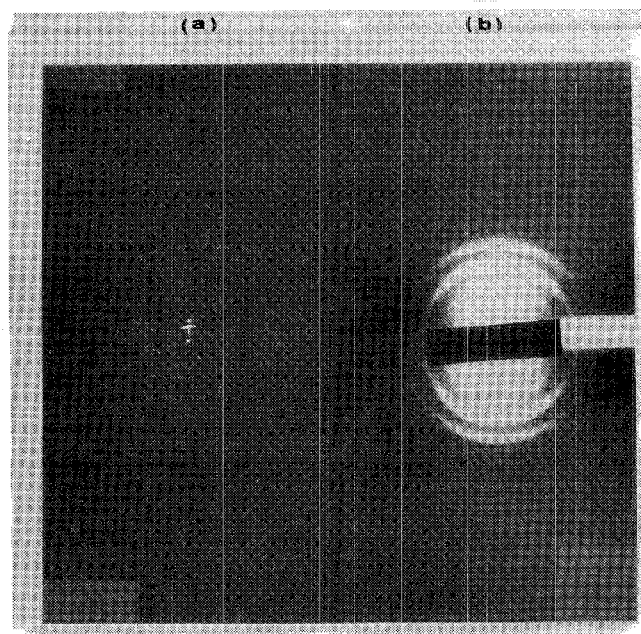


FIG. 15 - Figura di diffrazione a piccolo angolo della mielina: (a) ottenuta con un tubo a raggi X; (b) ottenuta a SPEAR con radiazione di sincrotrone⁽¹⁶⁾.

- esistono tuttavia delle strutture nell'intensità diffusa determinate dalle disomogeneità interne della distribuzione di carica elettronica, cosicché l'intensità diffusa $i(s)$ (in funzione dell'angolo θ o meglio di un parametro $s = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$) e la corrispondente distribuzione radiale di carica $p(r)$ entro la particella (in funzione del raggio r) possono essere schematizzate(17) come nella Fig. 16.

Si vede che la zona marginale A' della figura di diffusione presenta dei picchi, corrispondenti a strutture interne della particella della regione A, mentre l'andamento dell'intensità nella zona B' porta a ricavare informazioni sulla forma esterna della particella la stessa (regione B). R_{\max} poi corrisponde al diametro massimo oltre il quale non ci sono elettroni della particella.

E' interessante notare che i flussi elevati di fotoni disponibili con la luce di sincrotrone consentono l'applicazione di una tecnica un pò più raffinata per misurare la luce diffusa, studiando le fluttuazioni nella correlazioni spazio-temporali dell'intensità dei fotoni diffusi, ciò che aumenta la potenzialità del metodo.

Da queste misure si possono ricavare(18):

a) Il raggio di girazione R_g ,

che si deduce per esempio dalla pendenza t della curva

$$\ln i(\theta)/2\theta^2 \quad \text{per} \quad \theta \rightarrow 0, \quad t = -KRg^2 \quad \text{con} \quad K = \frac{4\pi^2}{3\lambda}$$

(ovvero i raggi di girazione nelle tre dimensioni che si possono ricavare costruendo dei modelli spaziali e confrontando la curva sperimentale con previsioni teoriche).

b) Il peso molecolare M ,

purchè si conosca il volume parziale specifico della specie molecolare che si considera nel solvente usato.

c) Il volume V ,

che si ricava dall'integrale della curva

$$\int_0^{\infty} I(2\theta^2) d(2\theta^2); \quad \text{se le particelle sono omogenee ed il solvente è pure omogeneo.}$$

Si noti che, poichè la sfera di idratazione di una proteina ha praticamente la stessa densità del solvente e quindi non è vista dai raggi X, quello che si misura è il volume proprio della proteina. Nel caso di acidi nucleici questo è meno vero perchè ioni relativamente pesanti (es. K , Mg) possono trovarsi nella sfera di idratazione e influenzare le misure.

d) La forma della macromolecola,

che può essere dedotta come anisotropia dal confronto dei valori trovati per R e V e dal confronto delle curve sperimentali con le curve teoriche di scattering da sfere, ellissoidi, sbarrette rigide, piastrine, etc.

Il modello che dà il miglior fit è quello che più si avvicina alla molecola studiata. A volte le curve sperimentali non si accordano con quelle teoriche di nessun corpo semplice. Allora può

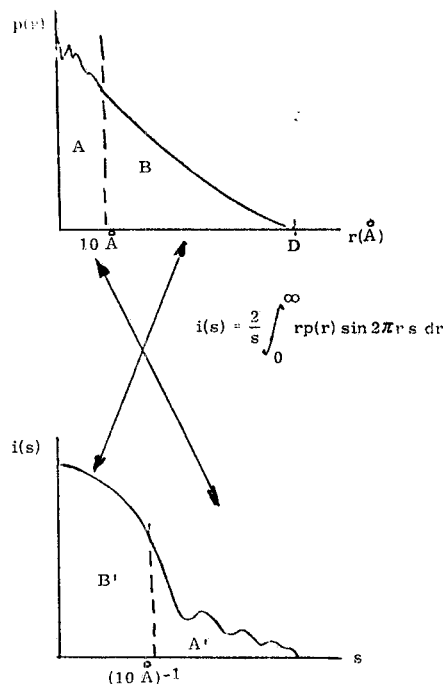


FIG. 16 - Schema dello spettro di diffusione di raggi X a piccolo angolo e della corrispondente distribuzione spaziale della carica elettronica(17).

essere necessario costruire dei modelli fatti di più corpi singoli giustapposti. E' il caso, ad esempio, del tRNA (v. Fig. 17)(18).

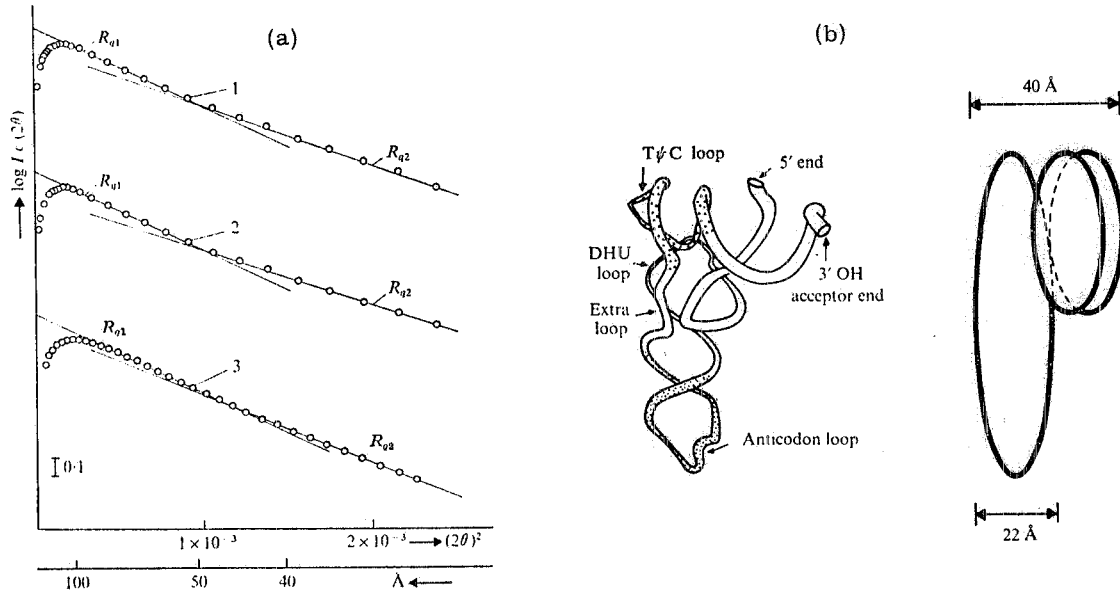


FIG. 17 - Struttura del tRNA^{Phe} ricavato da misure di diffusione a piccolo angolo (a); corrispondente ricostruzione della struttura ottenuta confrontata con quella vera (b)(18).

Come altro esempio vediamo la Fig. 18 nella quale è riportata la densità radiale di carica che si può ricavare dalla distribuzione dei dati sperimentali per la proteina α -cristallina (dell'occhio del vitello, Mw \sim 840.000).

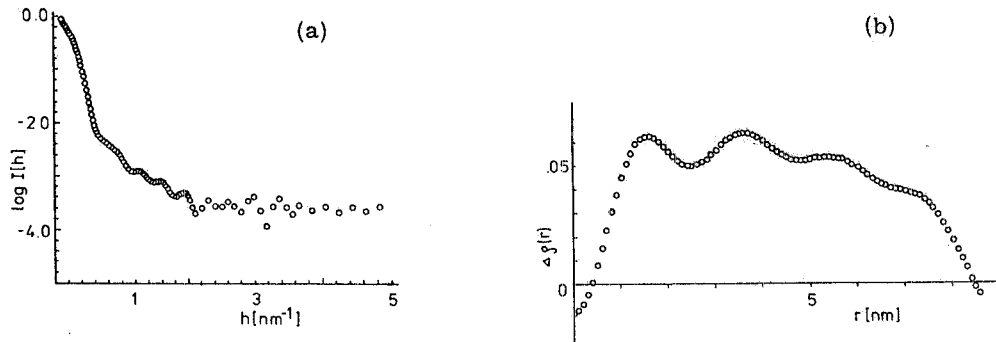


FIG. 18 - Densità radiale di carica determinata per la proteina α -cristallina da misure a piccolo angolo. (a) spettro sperimentale; (b) densità di carica in funzione del raggio (19).

Come si vede la figura che si ottiene per questa proteina, abbastanza grossa almeno come peso molecolare, presenta qualche picco di diffrazione, in corrispondenza agli angoli più alti.

Terminiamo questa discussione sugli esperimenti di diffusione a piccolo angolo, riportando le proposte di esperienze in questo campo approvate a Frascati:

- Rivelatore spaziale bidimensionale utilizzato ad Adone per misure di diffrazione e scattering a piccolo angolo di raggi X (M. Iannuzzi, A. La Monaca);
- Small angle scattering in liquid crystals (S. K. Ghosh, P. Picozzi, S. Ravarino, S. Santucci, A. La Monaca).

5. - STUDI CINETICI.

Un caso in cui i vantaggi della radiazione di sincrotrone si sfruttano ancora meglio, come abbiamo accennato all'inizio, è quello degli studi diffrattometrici cinetici: lo studio delle modificazioni strutturali indotte per esempio in un enzima da modificazioni ambientali, ad esempio cambiamenti da uno stato ad un altro indotti da variazioni di temperatura (T jumps).

L'impiego della radiazione di sincrotrone consente meglio lo studio di transizioni conformazionali, dato che bastano tempi di esposizione brevi (anche dell'ordine di ~ 1 msec); si ha così modo di seguire le velocità di reazione e le modificazioni strutturali che hanno costanti di tempo di quest'ordine.

Anche qui è essenziale sviluppare dei rivelatori posizionali veloci, che consentano di sfruttare per studi cinetici la struttura pulsata della radiazione di sincrotrone.

La cinetica della contrazione muscolare è stata studiata a DESY, da diversi gruppi. La fibra muscolare subisce dei cambiamenti strutturali considerevoli nei cosiddetti cross-bridges, che cambiano ciclicamente inclinazione durante il movimento con un periodo di 10 msec.

Un esperimento⁽²⁰⁾ studia la contrazione muscolare di muscoli striati (muscolo Sartorio di rana) analizzando a tempi successivi, dopo un breve stimolo elettrico, l'intensità delle riflessioni lungo una delle linee verticali laterali della figura di diffrazione, che corrisponde alla periodicità dei cross-bridges (vedi Fig. 13b). Lo stimolo elettrico veniva dato al tempo 0 e la linea verticale veniva esplorata con un rivelatore ad intervalli di 10 msec per il tempo successivo; l'intero ciclo veniva ripetuto ogni 30 sec, e la Fig. 19 riporta i risultati integrati su 50 di tali cicli.

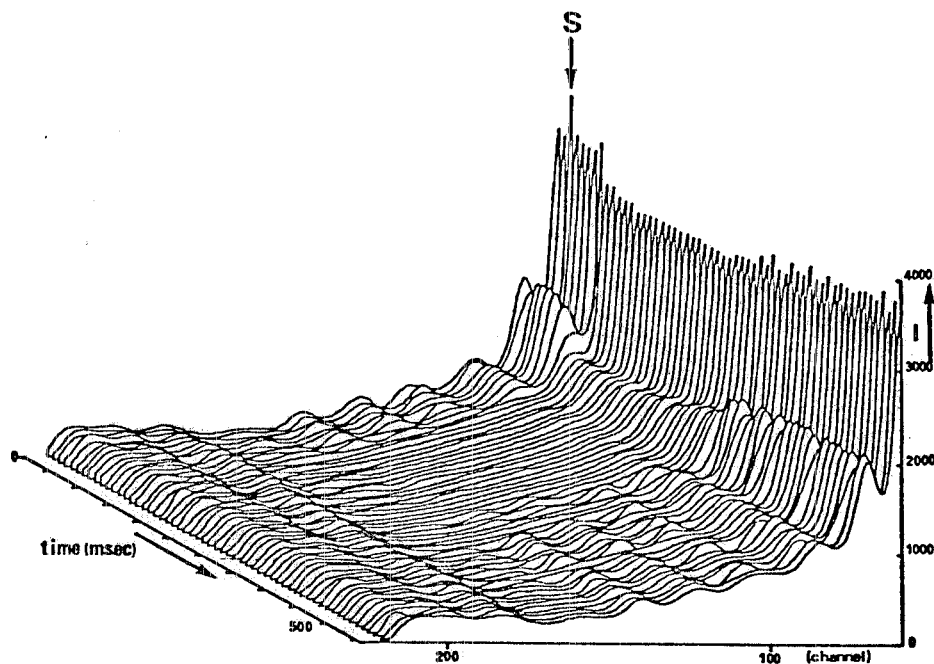


FIG. 19 - Distribuzione dell'intensità delle riflessioni in funzione del tempo e del punto su una delle righe verticali della figura di diffrazione ottenuta da fibre muscolari striate (DESY) come in Fig. 13.

Un'altro studio interessante in corso a DESY⁽²¹⁾ è quello sulla cinetica di associazione delle sub-unità della tubulina, una proteina di peso molecolare ~ 55.000 , che forma sotto determinate condizioni delle strutture ad anello. Se si porta la temperatura a 37° e si aggiunge GTP (Guanosintrifosfato), questi microanelli polimerizzano in microtubuli, dei tubicini di ~ 130 Å di diametro interno, ~ 250 Å di diametro esterno, e lunghezza dell'ordine del micron. La Fig. 20 mostra il diagramma dinamico ottenuto dopo un salto di temperatura (T-jump) eseguito al tempo 0, ripetuti ciclicamente con la tecnica già illustrata. Si è potuto met

tere in evidenza che esiste una fase intermedia in cui gli anelli spariscono, e poi si formano i microtubuli. I profili ottenuti inizialmente, indicati con R in Fig. 20, sono caratteristici di strutture ad anello, mentre i profili finali (MT) sono tipici dei microtubuli. Si vede il calo dell'intensità in corrispondenza alla sparizione degli anelli (regione indicata con (?)).

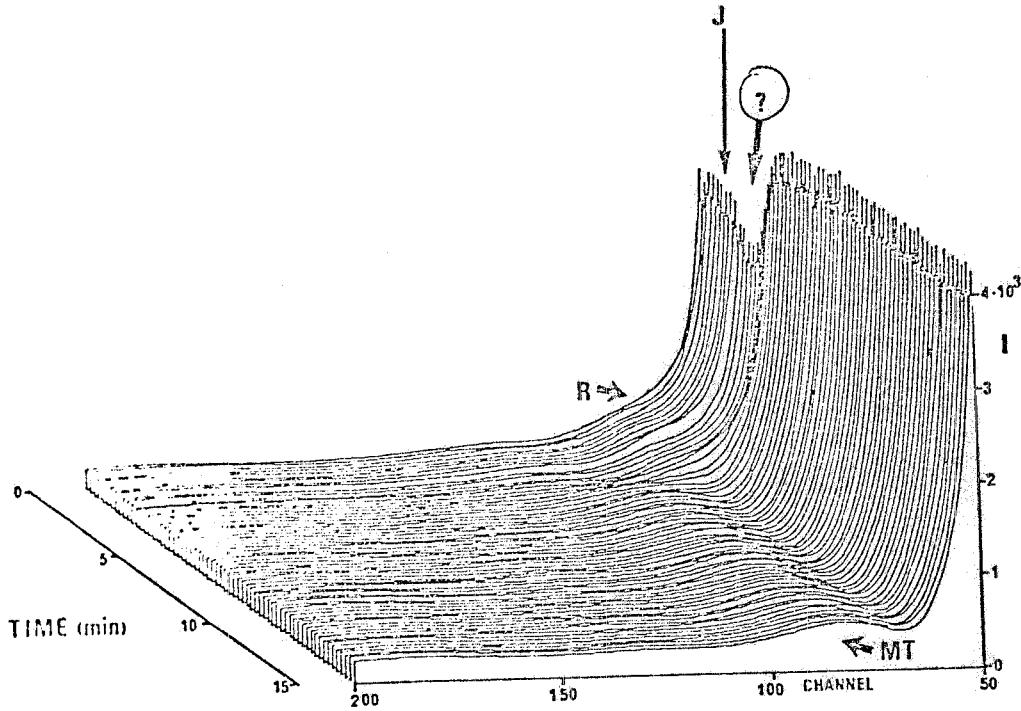


FIG. 20 - Distribuzione dell'intensità delle riflessioni nella figura di diffrazione della tubulina in funzione del tempo e del punto (DESY).

Infine un'altra cinetica studiata riguarda la dinamica delle proteine, ossia la possibilità di spostamenti di parti della molecola relativamente al resto; ad esempio il moto rotazionale dei residui triptofano nella azzurrina. Il triptofano è posto all'interno della molecola, e risulta animato da un moto angolare di ampiezza massima 34° , con un tempo caratteristico di 0.51 nsec, e può essere messo in relazione con un qualche significato funzionale ancora non chiaro (azione catalitica, regolazione, segnalazione, trasformazione di energia).

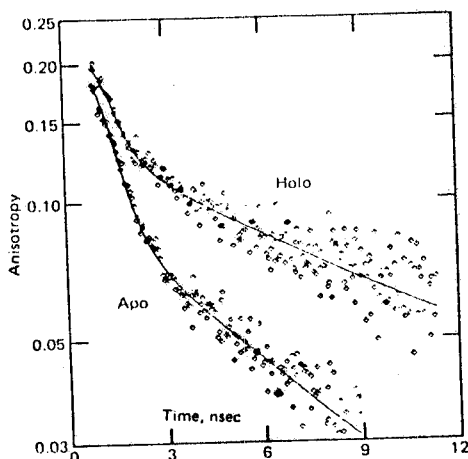


FIG. 21 - Andamento temporale dell'anisotropia della luce di fluorescenza del triptofano nella azzurrina, in due forme diverse.

Di queste fluttuazioni interne rapide nelle proteine, si sta cominciando a parlare negli ultimi 10 anni. I. Munro et al.(22), hanno studiato l'andamento temporale dell'anisotropia della fluorescenza del triptofano in diverse proteine, sulla base di esperimenti precedenti.

Per l'interesse e la curiosità della cosa facciamo eccezione ai limiti che ci siamo posti e descriviamo brevemente questo esperimento, anche se usa la regione UV della radiazione di sincrotrone.

Irraggiando il campione con impulsi di luce polarizzata, che sono gli impulsi singoli della radiazione di sincrotrone, la luce di fluorescenza viene emessa dal triptofano in modo anisotropo; tuttavia il moto browniano dei radicali triptofano

stesso riduce progressivamente nel tempo questa anisotropia. Misurando la costante di decadimento della anisotropia, si risale alla costante di tempo del moto browniano stesso, e si possono ricavare il coefficiente di diffusione rotazionale e l'ampiezza della rotazione; la Fig. 21 illustra alcuni risultati di questo esperimento.

Il tipo di studio che si fa in questo caso è dunque su cinetiche molto veloci, e su fenomeni il cui studio prima della radiazione di sincrotrone non sarebbe stato possibile.

Desideriamo ringraziare il Prof. G. Moschini dei Laboratori Nazionali di Legnaro, che col suo interessamento ci ha indotto a parlare alla SIF di questi problemi. Ci è altresì gradito riconoscere l'aiuto del Prof. F. Sgarlata dell'Istituto di Mineralogia dell'Università di Roma nella discussione di alcuni risultati di diffrazione su cristalli.

Infine riconosciamo con piacere il profitto che in generale abbiamo tratto spesso dalle osservazioni dei nostri colleghi M. Belli, A. Bianconi, E. Burattini, S. Mobilio, C. Natoli nel nostro lavoro comune di ricerca, nonché F. Antonageli, F. Comin, L. Incoccia, A. La Monaca e A. Savoia che molta parte hanno nell'attività di luce di sincrotrone nei Laboratori Nazionali di Frascati.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) - Y. Farge and P. J. Duke, ESFR - The Scientific Case (ESF, Strasbourg, 1979).
- (2) - A. Savoia, in 'Convegno sulle attività in corso presso i Laboratori Nazionali di Frascati', ed. da S. Stipcich (Laboratori Nazionali di Frascati, 1979), pag. 160; E. Burattini, ibidem, pag. 181.
- (3) - M. Belli, A. Bianconi, E. Burattini, S. Mobilio, L. Palladino, A. Reale and A. Scafati, Solid State Comm. 35, 355 (1980).
- (4) - M. Belli, A. Bianconi, S. Mobilio, C. Natoli, L. Palladino, A. Reale and A. Scafati, in corso di pubblicazione.
- (5) - E. Sayers, E. A. Stern and F. W. Lytle, Phys. Rev. Letters 27, 1204 (1971).
- (6) - B. Lengeler and P. Eisenberger, Phys. Rev. B21, 4507 (1980).
- (7) - R. G. Shulman, P. Eisenberger, B. K. Teo, B. M. Kinkaid and G. S. Brown, J. Mol. Biol. 124, 305 (1978).
- (8) - P. Eisenberger, R. G. Shulman, B. M. Kinkaid, G. S. Brown and S. Owaga, Nature 274, 30 (1978).
- (9) - S. P. Kramer and K. O. Hodgson, Progress in Inorganic Chemistry, ed. by S. J. Lippard 25, 255 (1978).
- (10) - T. E. Wolf, J. M. Berg, C. Warrick, R. H. Holm, K. O. Hodgson and R. B. Frankel, J. Am. Chem. Soc. 100, 4630 (1978).
- (11) - B. K. Teo, P. Eisenberger, J. Reed, J. K. Barton and S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. 100, 3225 (1978).
- (12) - A. Bianconi, B. Oesch, S. Alemà, L. Castellani, I. Davoli, P. Fasella and S. Mobilio, in 'Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease', ed. by F. Sigel (Plenum Press, 1980); in 'Attività dei Laboratori Nazionali di Frascati - 1979', pag. 36; L. Alagna, A. Bianconi, A. Desideri and A. A. G. Tomlinson, Italian J. of Biochemistry (in press).
- (13) - E. A. Stura, D. L. Wild, J. A. Jenkins, K. S. Wilson, L. N. Johnson and R. Fourme, LURE Rapport d'activité 1979, pag. 39.
- (14) - D. M. Blow, C. Monteilhat and R. Fourme, LURE Rapport d'activité 1979, pag. 38.
- (15) - J. Barrington Leigh and G. Rosenbaum, Ann. Rev. of Biophys. and Bioengin. 5, 239 (1976).
- (16) - N. G. Webb, S. Samson, R. M. Stroud, R. C. Gamble and J. D. Baldeschwieler, J. Appl. Cryst. 10, 104 (1977).
- (17) - M. H. J. Koch, Vienna Summer School on X-ray Scattering with Synchrotron Radiation, (1980).
- (18) - O. Kratky and I. Pilz, Quart. Rev. of Biophys. 11, 39 (1978).
- (19) - J. Berger and R. J. Siezen, J. Appl. Cryst. 11, 477 (1978).
- (20) - H. E. Huxley, A. R. Faruqui, J. Bordas, M. H. J. Koch and J. Milch, Nature (in press).
- (21) - E. Mandelkow, A. Harmsen, E. E. Mandelkow and J. Bordas, Nature (in press).
- (22) - I. Munro, I. Pecht and L. Stryer, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 56 (1979).