



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL FI DE GRAU

ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DE COMPLEXES FUL·LERÈ C₆₀-PROTEÏNA

Sergi Burguera Piña

Grau de Química

Facultat de Ciències

Any Acadèmic 2019-20

ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DE COMPLEXES FUL·LERÈ C₆₀-PROTEÏNA

Sergi Burguera Piña

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2019-20

Paraules clau del treball:

Proteïna, ful·lerè C₆₀, α -sinucleïna, complexos supramoleculars.

Nom Tutor/Tutora del Treball: Miquel Adrover Estelrich

Nom Tutor/Tutora (si escau)

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	6
1.1. Aspectes generals de les proteïnes.....	6
1.2. Proteïnes d'estudi.....	7
1.2.1. α -Quimotripsina.....	7
1.2.2. α -Sinucleïna.....	8
1.2.3. Catalasa.....	8
1.2.4. Lisozim.....	9
1.2.5. Pepsina.....	9
1.3. Ful·lerè.....	10
2. ANTECEDENTS I OBJECTIUS.....	12
3. MATERIALS I MÈTODES.....	13
3.1. Materials.....	13
3.2. Preparació de les dissolucions de proteïna.....	13
3.3. Preparació dels complexos proteïna-ful·lerè C ₆₀	14
3.4. Preparació de dissolucions per a l'estudi del pH i de la concentració de sals....	14
3.5. Preparació de dissolucions per l'estudi de l'estabilitat del complex en front al temps i a l'addició de sals	15
3.6. Estudi de la formació de fibres d' α -sinucleïna.....	15
3.7. Mesures espectroscòpiques emprant l'espectroscòpia UV-Visible	16
3.8. Mesures espectroscòpiques emprant l'espectroscòpia de fluorescència	16
3.9. Mesures de Ressonància Magnètica Nuclear RMN	16
3.10. Mesures de microscòpia de forces atòmiques (AFM).....	17
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	18
4.1. Formació dels complexos proteïna-ful·lerè.....	18
4.2. Estudis a diferents pH.....	20
4.3. Estudis a diferents concentracions de NaCl.....	22
4.4. Estudi de l'estabilitat del complex en funció de la concentració de clorur sòdic	24
4.5. Estudi de l'estabilitat temporal dels complexos ful·lerè-proteïna	24
4.6. Estudi de RMN del complex amb l' α -sinucleïna	26
4.7. Estudi de l'agregació de l' α -sinucleïna en presència de ful·lerè	28
4.8. Proposta de mecanisme d'agregació dels complexos proteïna-ful·lerè	29
5. CONCLUSIONS.....	30
6. BIBLIOGRAFIA.....	30

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Aspectes generals de les proteïnes

Les proteïnes esdevenen un dels grans grups de macromolècules biològiques, essent el més heterogeni i complex degut a la diversitat dels monòmers que les formen i al seu grau d'estructuració.

Aquestes proteïnes són molècules compostes per la unió de diferents unitats monomèriques que reben el nom d'aminoàcids, els quals s'uneixen entre ells formant enllaços tipus amida, coneguts com enllaços peptídics.

Existeixen 20 aminoàcids essencials que formen les proteïnes, tot i que algunes d'elles contenen derivats d'aquests aminoàcids lleugerament modificats. L'estructura general dels aminoàcids consisteix en un àtom de carboni substituït amb un àcid carboxílic, un grup amino, un àtom d'hidrogen i una cadena lateral R- que varia d'un aminoàcid a un altre. Aquest carboni rep el nom del carboni α , i esdevé un centre quiral, excepte en el cas de la glicina, on la cadena lateral R- és un àtom d'hidrogen.

Els diferents aminoàcids es poden classificar atenent a les propietats que lis confereixen les diferents cadenes laterals que contenen. Per exemple, hi ha aminoàcids amb les seves cadenes laterals elèctricament carregades a pH fisiològic (tant positivament com negativament), ja que aquestes contenen grups ionitzables. Hi ha aminoàcids que contenen cadenes laterals hidrofòbiques o cadenes laterals apolars, i n'hi ha amb cadenes laterals polars. A la [figura 1](#) es presenta un exemple de classificació dels aminoàcids.

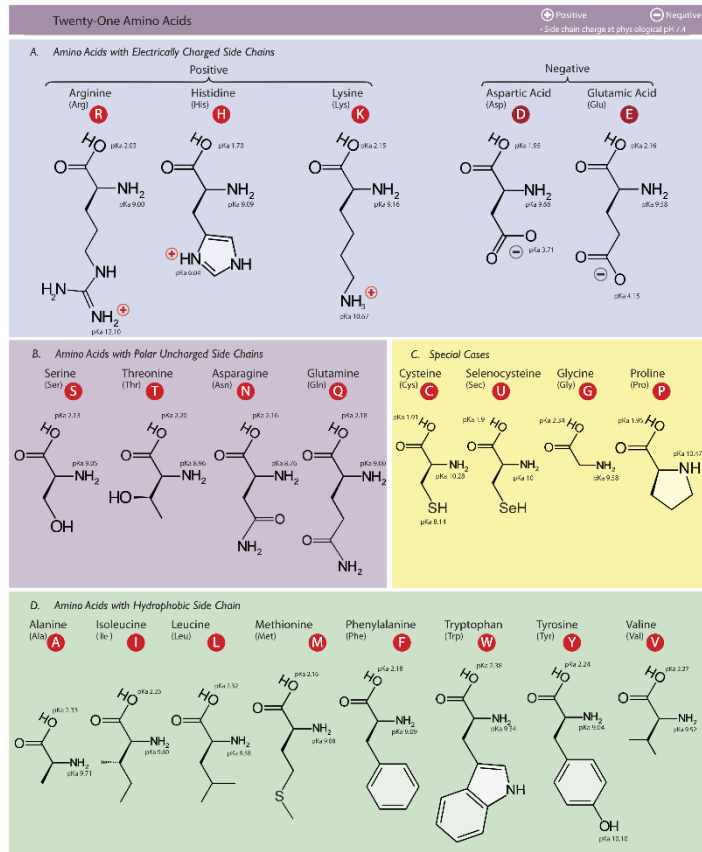


Figura 1. Classificació dels diferents tipus d'aminoàcids essencials. Els carregats estan a dins un requadre blau, els polars a dins un de lila i un de groc, i els hidrofòbics a un de verd.

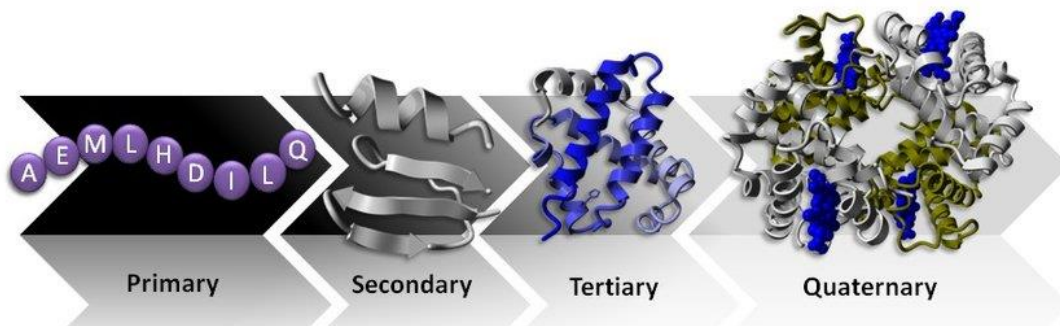


Figura 2. Nivells d'estructuració de les proteïnes.

Les proteïnes tenen un elevat grau de complexitat estructural, el qual es pot desglossar en quatre tipus de nivells d'estructuració diferents, els quals es resumeixen a la [figura 2](#).⁷⁴

- *L'estructura primària* indica l'ordre seqüencial dels aminoàcids que componen la proteïna, començant per l'aminoàcid amb el grup amino lliure (l'extrem N-terminal) i acabant per l'aminoàcid amb el grup carboxilat lliure. La majoria de proteïnes estan compostes d'entre 100-500 aminoàcids.
- *L'estructura secundària* s'estableix per les diferents interaccions d'enllaç d'hidrogen que es poden donar entre l'oxigen del carboni carbonílic d'un aminoàcid i el N-H d'un altre aminoàcid. Resultat d'aquest nivell d'estructuració, es formen diferents tipus d'ordenacions, com les que adopten forma d'hèlix (α -hèlix, π -hèlix, hèlix 3_{10} ...) i les que agafen forma de làmines β (antiparal·leles o paral·leles), les quals s'uneixen per altres tipus d'estructures com són els girs β .
- *L'estructura terciària* es dona per l'ordenament dels diferents elements d'estructura secundària, degut a interaccions no covalents entre les cadenes laterals dels aminoàcids, a excepció de l'enllaç disulfur, format entre les cadenes laterals de dues cisteïnes. Aquest nivell d'estructuració és clau per afavorir les interaccions de la proteïna amb el medi que l'envolta. Per exemple, la gran majoria de proteïnes que es troben en un medi aquós, intenten exposar al màxim els residus hidrofílics, mentre que intenten enterrar els residus hidrofòbics a l'interior de la proteïna, allunyant-los del medi que els envolta. Aquest fet, s'inverteix en el cas de les proteïnes de membrana, on el medi extern és hidrofòbic.
- *L'estructura quaternària*, encara que no totes les proteïnes la presentin, es dona a través del mateix conjunt d'interaccions que l'estructura terciària, i es basa en l'associació de distintes unitats proteïques. A partir d'aquestes interaccions, sorgeixen les proteïnes que formen dímers, trímers, tetràmers...

Aquesta enorme complexitat estructural implica que la funció de cada proteïna estigui estrictament relacionada amb la seva estructura i d'aquí, que les proteïnes puguin ser immensament selectives sobre els substrats sobre els quals poden actuar.

Podríem enumerar gran nombre de funcions proteïques, com l'estructural (el col·lagen), de transport (com la hemoglobina de la sang), l'enzimàtica (com la catalasa), de moviment (com les troponines involucrades en el bateig del cor), immunològica (com els anticossos), o de reserva (com la ovoalbúmina de l'ou)...

1.2. Proteïnes d'estudi

En aquest present treball s'han fet proves amb diferents proteïnes, cadascuna amb una estructura particular i característiques fisicoquímiques concretes, per tal d'avaluar la seva capacitat de solubilitzar i formar complexes proteïna-ligant amb el ful·lerè C_{60} . A continuació, es donaran les característiques principals de cada una d'elles.

1.2.1 α -Quimotripsina

La α -quimotripsina ([figura 3](#)) és una proteïna de 245 aminoàcids amb funció enzimàtica de tipus proteolític. Es tracta d'una peptidasa, encarregada de la digestió d'altres proteïnes. La proteïna es secreta al pàncrees i funciona gràcies a un centre de serina que actua com a nucleòfil, activat per una triada catalítica. La seva forma enzimàticament funcional és un homodímer.

Cada monòmer conté unes 13 làmines β i unes 2 α -hèlix, a més d'una sèrie d'altres petits elements estructurals, com diferents hèlix 3_{10} o girs β .

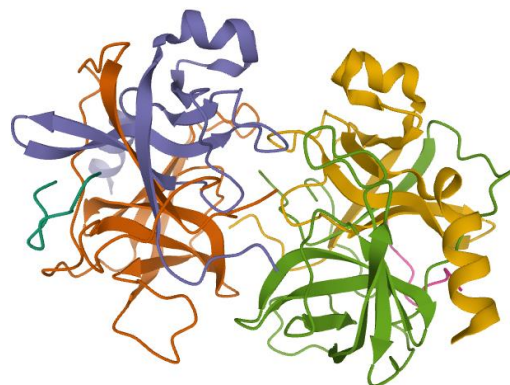


Figura 3. Representació tridimensional d'un dímer de l' α -quimotripsina de pàncrees boví¹. PDB: 4CHA

El monòmer d' α -quimotripsina presenta uns 33 aminoàcids carregats a pH fisiològic. Nou d'ells són aspartats i cinc glutamats, els quals són responsables de les càrregues negatives de la proteïna. D'altra banda, també presenta 14 lisines, 3 arginines i 2 histidines, que confereixen càrrega positiva al monòmer a pH fisiològic. Aquesta combinació de càrregues fa que la proteïna presenti un punt isoelèctric de 7,2 unitats.

1.2.2. L' α -sinucleïna

L' α -sinucleïna és la proteïna que més difereix de la resta pel que fa a la seva estructura. És una proteïna intrínsecament desordenada, ja que no té cap estructura secundària definida. Això difereix en gran mesura del típic enunciat de que una proteïna té una conformació molt definida per donar lloc a la seva funció específica.

Aquesta proteïna, era inicialment el focus d'aquest treball, ja que s'ha vist que interacciona amb el grafè³⁴ inhibint les sinucleopaties. Aquestes, són un conjunt de patologies neurològiques que entre d'altres, inclouen la malaltia de Parkinson^{3,4}. Els cossos de Lewis, els quals són els inductors de la malaltia de Parkinson, estan formats per agregats d' α -sinucleïna, fet que la implica directament amb les malalties neurodegeneratives esmentades.

Així doncs, l' α -sinucleïna i l'estudi de la seva agregació esdevenen, avui dia, temes de notable interès científic. Recentment, hi ha hagut estudis sobre l'efecte de nanopartícules de carboni a damunt el procés d'agregació de l' α -sinucleïna i, inicialment, aquest treball de fi de grau tenia com a objectiu reproduir part d'aquest treball però emprant el full·lerè C₆₀.



Figura 4. Estructures de l' α -sinucleïna lligada a micel·les (part superior) i de les fibres de α -sinucleïna (part inferior)^{7,8} (PDB: 1XQ8, 6FLT; respectivament)

L' α -sinucleïna conté uns 140 aminoàcids i es sol fer una divisió no estricta de la seva seqüència en tres regions, les quals esdevenen tres dominis diferents: l'N-terminal, el central i el C-terminal. L'N-terminal té un caràcter més amfipàtic; el central es coneix com el component no β -amiloide, el qual es sol plegar en forma de làmina β per derivar cap a les fibres amiloides que donen l'agregació de la α -sinucleïna;⁶ i la regió C-terminal que té caràcter àcid i es clau per a la formació de complexos proteïna-proteïna.

Dels seus 140 aminoàcids, la α -sinucleïna posseeix 6 aspartats i 18 glutamats que li confereixen càrregues negatives a pH fisiològic, a més de 15 lisines i 1 histidina que li confereixen, d'altra banda, càrregues positives al pH fisiològic. Així doncs, el seu punt isoelèctric és de 4.6 unitats.

Degut a la seva gran flexibilitat conformacional, no hi ha una estructura cristal·logràfica de l' α -sinucleïna com a tal. Emperò, a la figura 4 es mostra l'estructura helicoidal de l' α -sinucleïna quan es troba unida a micel·les (resolta mitjançant RMN) i l'estructura que adquireix l' α -sinucleïna quan forma fibres amiloides (resolta mitjançant Cryo-EM).

1.2.3. Catalasa

La catalasa (figura 5) és una proteïna amb funció catalítica¹⁰. Es tracta d'una oxidoreductasa (enzim que s'encarrega del transport d'electrons des d'una molècula donant a una acceptora). Concretament, actua sobre el peròxid d'hidrogen, per formar aigua i oxigen; per lo que rep el nom de peroxidasa.

La catalasa de fetge boví consisteix en un homotetràmer de 506 aminoàcids cada unitat (figura 5). Cada unitat està composta d'unes 12 α -hèlix i unes 8 làmines- β antiparal·leles, a més d'un nombrós nombre

d'altres formes d'estructura secundària com girs- β ò hèlix 3_{10} . El centre actiu de cada unitat monomèrica posseeix un grup hemo que conté un catió de Fe (III) capaç d'interaccionar amb el peròxid d'hidrogen.

Cada monòmer de catalasa conté un total de 143 aminoàcids amb càrrega a pH fisiològic. Els 39 residus d'àcid aspàrtic i els 25 residus d'àcid glutàmic són els responsables de la càrrega negativa a pH fisiològic; mentre que les 27 lisines, 31 arginines i 21 histidines són responsables de la càrrega positiva a pH fisiològic. Així mateix, el punt isoelèctric resultant de la proteïna, és de 6.1 unitats.

Com a la majoria d'enzims, l'estructura i funció de la catalasa es pot veure afectada per variacions del pH del medi, la temperatura o la força iònica del medi; el que pot modificar la seva capacitat d'interaccionar amb el seu substrat o altres possibles lligands.

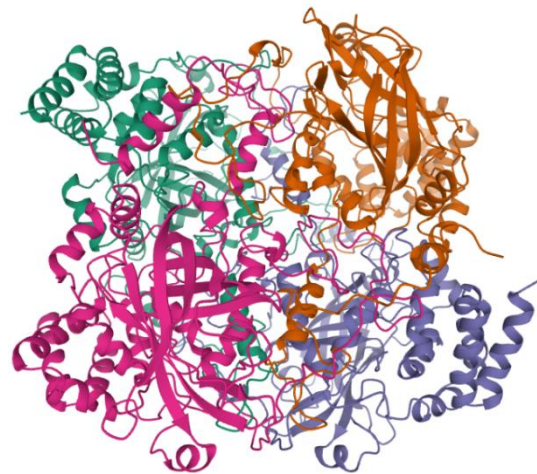


Figura 5. Tetràmer de catalasa de fetge boví ⁹ (PDB:4BLC)

1.2.4. Lisozim

El lisozim de gallina (Hen egg white lysozyme, HEWL) esdevé el punt de partida d'aquest treball de fi de grau, ja que la caracterització del seu complex amb el ful·lerè C_{60} ¹⁶ fou la base per poder obtenir i discutir els complexos amb les altres proteïnes que s'han emprat.

El lisozim és un enzim encarregat d'hidrolitzar els enllaços $\beta(1\rightarrow4)$ entre l'àcid N-acetilmuràmic i la N-acetil-D-glucosamina dels peptidoglicans de les parets bacterianes¹². Aquesta estratègia és útil com a mecanisme de defensa contra les bacteries gram-positives, ja que posseeixen una alta proporció de peptidoglicans a les seves parets cel·lulars.

Estructuralment, la HEWL és una proteïna relativament petita, ja que únicament conté 129 aminoàcids. Posseeix dos dominis, diferenciats per les dues grans regions amb tipus d'estructura secundària diferent. Es a dir, té un primer domini que compren les estructures en forma d'hèlix i un domini que compren una regió amb dues làmines- β antiparal·leles (figura 6).

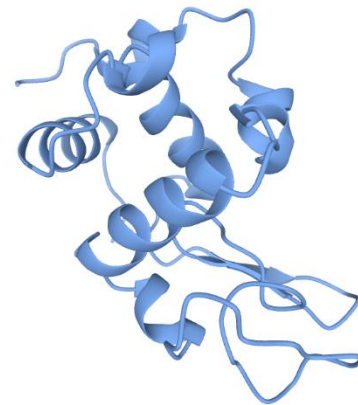


Figura 6. Estructura de la HEWL ¹¹ (PDB: 3LZT)

Dels seus 129 aminoàcids, 27 es troben carregats a pH fisiològic. Els residus amb càrrega negativa a pH fisiològic són 7 àcids aspàrtics i 2 àcids glutàmics; mentre que 6 lisines, 11 arginines i 1 histidina contenen les càrregues positives de la proteïna. En conseqüència, aquesta distribució de residus carregats fa que el punt isoelèctric de la proteïna sigui de 8.3 unitats.

El lisozim és una proteïna que, com l' α -sinucleïna, és capaç d'agregar en forma de fibres amiloides degut a canvis estructurals o arrel de l'aparició d'intermedis mal plegats. Aquests poden interaccionar amb altres proteïnes ben plegades i induir el seu desplegament i agregació, mitjança l'apilament de les regions amb estructura de làmina- β ¹³⁻¹⁵.

1.2.5. Pepsina

La pepsina és un enzim del mateix tipus que l' α -quimotripsina: és una proteasa encarregada de la lisis de l'enllaç peptídic d'altres proteïnes¹⁹.

A la mucosa gàstrica humana, es produeixen una gran quantitat de proteïnes que esdevenen precursors de la pepsina (pepsinògens). D'aquesta manera, existeix una abundant quantitat de proteïnes que tenen una estructura molt similar a la pepsina i poden realitzar la mateixa funció proteolítica. Per exemple, existeix una família A1 que compren uns 282 membres molts semblants a la pepsina.

Hi ha una gran quantitat d'estudis sobre l'estructura, la funció i l'evolució d'enzims semblants a la pepsina i també, d'altres centrats sobre la pepsina com a tal¹⁹⁻²¹.

El centre actiu d'aquestes proteases inclou un residu Asp amb funció catalítica clau, el qual està envoltat d'un entorn que l'activa i que estabilitza els intermedis que es donen durant la proteòlisi. De fet, la família A1 es caracteritza per tenir al centre actiu una estructura repetida de -Asp-Thr (ò Ser)-Gly-.



Figura 7. Estructura tridimensional de la pepsina porcina. (PDB: 5PEP¹⁷)

A diferència de la pepsina humana, la d'origen porcí està formada per un total de 326 aminoàcids. La seva seqüència difereix de la humana en alguns aminoàcids puntuals, retenint el centre actiu i la seva estructura global peculiar, tal i com es mostra a la figura 7. Gran part de la seqüència primària de la pepsina s'ordena en forma de làmines- β , les quals conformen i s'agrupen al voltant del centre actiu. Emperò, aquests fragments, es van alterant amb residus que no presenten una estructura secundària definida.

En aquest cas, la pepsina posseeix a la seva seqüència un total de 45 aminoàcids carregats a pH fisiològic, dels quals 41 contenen càrrega negativa i els altres 4, positiva. 28 residus són d'àcid aspàrtic i 13 són d'àcid glutàmic, confeccionant, així, els residus de càrrega negativa. D'altra banda, com a residus catiónics conté 1 lisina, 2 arginines i 1 histidina. Aquesta distribució de residus carregats fa que el punt isoelèctric de la proteïna sigui de 3.1 unitats.

1.3. Ful·lerè

El ful·lerè és una forma al·lotròpica del carboni, descoberta a finals del segle passat, fet que conduí a que els seus descobridors rebessin el premi Nobel de química l'any 1996^{22,23}.

La seva estructura és vertaderament peculiar: consisteix en una estructura esfèrica tancada, formada exclusivament per àtoms de carboni enllaçats entre ells mitjançant enllaços simples i dobles conjugats. A més, aquests àtoms estan units formant anells de 5 i 6 membres. A partir d'aquesta base estructural, existeixen diferents unitats de ful·lerens, basats en el diferent nombre d'àtoms de carboni que componen la molècula (C_{50} , C_{70} , C_{120} ...; figura 8). D'entre aquestes diferents unitats, l'estructura més famosa i típica és la del ful·lerè C_{60} , també conegut com Buckminsterfullerene, que serà amb la que treballarem a n'aquest treball de fi de grau.

El ful·lerè C_{60} exhibeix una àmplia gamma de propietats que li confereix un ampli ventall de possibles aplicacions,²⁴ fet que el fa molt interessant per ésser emprat com a material. Podem destacar, d'entre d'altres, les seves propietats elèctriques (atribuïda a la presència de sistemes π conjugats amb gran facilitat per perdre o guanyar electrons), la seva resistència a la calor, típica dels diferents al·lotrops del carboni; i la seva capacitat per ésser emprat com a transportador de fàrmacs. De fet, per explotar totes aquestes aplicacions, s'està estudiant avui a dia la seva introducció al món dels nanomaterials.

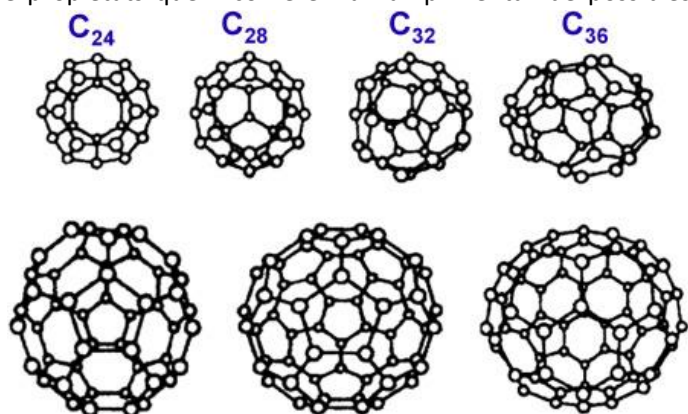


Figura 8. Diferents unitats de ful·lerens. La nomenclatura C_n expressa el nombre d'àtoms de carboni que componen l'estructura

Entrant més concretament en el món dels nanomaterials, avui a dia s'estan estudiant diverses estructures de nanopartícules que pareix que tenen un cert potencial per poder esser emprades en el camp de la biomedicina³¹⁻³⁴. Cal destacar, la interacció dels nanomaterials amb diferents tipus de macromolècules biològiques als éssers vius, fet que pot tenir una gran importància biomèdica.

Recentment, el ful·lerè i els seus derivats funcionalitzats, esdevenen objecte d'estudi en el camp de la biomedicina³⁵. S'ha vist que aquests, presenten una certa capacitat per protegir cèl·lules neuronals³⁶⁻³⁹, per actuar com a bactericida⁴⁰, per desfer dobles hèlix d'ADN⁴¹, per inhibir canals iònics de K⁺⁴², per inhibir determinats enzims mitjançant l'ocupació del centre actiu dels mateixos⁴³⁻⁴⁸ (fins i tot s'ha vist que podria inhibir la proteasa del VIH mitjançant la interacció directa amb la mateixa⁴⁵⁻⁴⁸), i per inhibir la formació d'agregats amiloides proteics.⁴⁹

Cal dir que els ful·lerens, tal i com suggereix la seva estructura molecular, són compostos completament hidrofòbics. Emperò, per tal de variar lleugerament les seves propietats, aquests han estat funcionalitzats, fet que fa que es pugui donar una nova mena d'interaccions amb els diferents substrats i augmentar la hidrofília dels ful·lerens²⁵⁻³⁰.

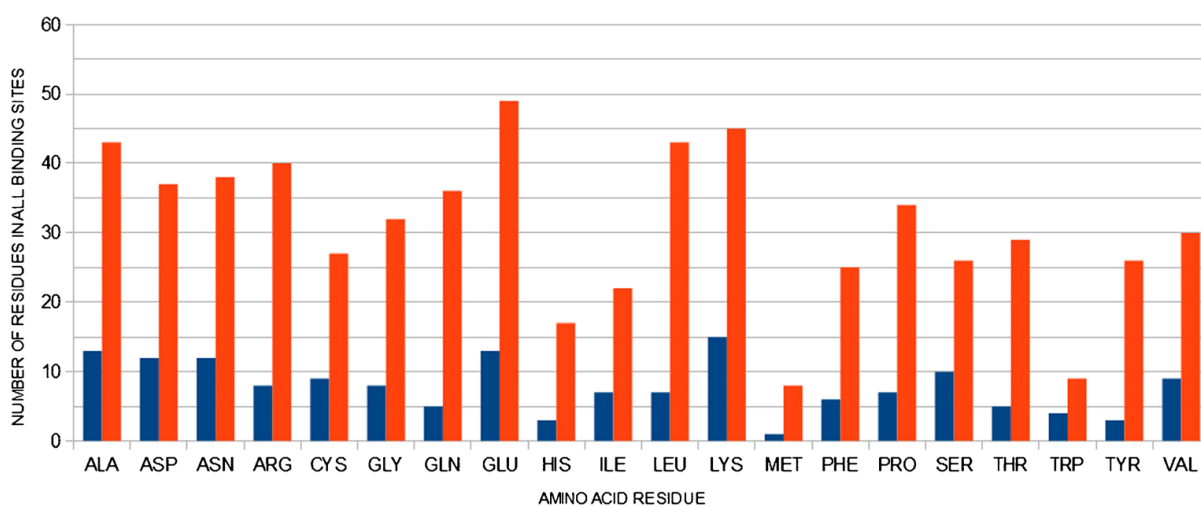


Figura 9. Gràfica de barres del nombre d'aminoàcids que participaven a la interacció ful·lerè-proteïna⁶⁰. Els dos colors de les barres expressen dos tipus de càlculs computacionals diferents que donen resultats quasi proporcionals.

Atesa la gran capacitat d'interacció que presenta el ful·lerè i l'ample varietat d'aplicacions que aquest fet li confereix, gran part de la investigació amb aquesta molècula s'ha centrat en intentar entendre la capacitat del ful·lerè per actuar com a lligand⁵⁷⁻⁶¹. A priori, un compost tan hidrofòbic, no hauria de tenir cap tendència a interaccionar amb molècules hidrofíliques (com podrien ser, les lisines o àcids glutàmics carregats que presenten les proteïnes) i hauria d'esser capaç únicament d'interaccionar amb estructures amb més caràcter hidrofòbic (com podrien ser, parlant un altre cop de les proteïnes, aminoàcids aromàtics com el triptòfan, la tirosina o la fenilalanina). Sorprenentment, estudis recents sobre la interacció de ful·lerens amb diverses proteïnes i altres molècules biològiques, mostren que els ful·lerens interaccionen lleument i de forma indiscriminada amb les zones hidrofíliques. Per exemple, la figura 9 mostra el resultat de diferents simulacions de dinàmica molecular on s'estudien els possibles llocs d'unió entre el ful·lerè i diferents proteïnes. Aquesta gràfica, fa un recompte dels aminoàcids involucrats en la interacció ful·lerè-proteïna⁶⁰. Així doncs, es pot veure que, tot i que existeixen diferències significatives entre el nombre de interaccions predites per residus hidrofòbics com el Trp, la Leu o la Ala, i residus carregats com el Glu i la Lys o la His; el ful·lerè no pareix presentar una afinitat especial per residus hidrofòbics. A més, de fet, a primera vista pot impactar el fet de veure que la Lys o el Glu (residus carregats a pH fisiològic) es troben ocupant el major percentatge estadístic de la gràfica.

Aquests estudis de caràcter computacional, conjuntament amb els resultats experimentals que s'obtenen dia rere dia, intenten aportar una mica de claredat al procés d'interacció del ful·lerè amb macromolècules biològiques. Conèixer les bases moleculars que determinen aquests fets, clarificarà el possible ús (o no) del ful·lerè dins el camp de la biomedicina.

2. ANTECEDENTS I OBJECTIUS

Inicialment, aquest treball de fi de grau, tenia l'objectiu d'estudiar el procés d'interacció del ful·lerè C₆₀ amb l'α-sinucleïna, atesa la capacitat de les nanopartícules de carboni per inhibir el processos degeneratius associats a l'agregació d'aquesta proteïna.^{32,34}

La hipòtesi inicial consistia en que les estructures químiques de les nanopartícules de carboni (GQDs) i del ful·lerè C₆₀ són molt semblants (són formes al·lotròpiques) i per això, podria ésser que l'efecte dels GQDs com inhibidors de l'agregació de l'α-sinucleïna es pogués veure reproduït emprant el ful·lerè C₆₀.

Emperò, durant el desenvolupament de la recerca plantejada sorgiren dubtes i resultats inesperats que feren variar lleugerament el disseny del treball. Aquests, juntament amb els estudis publicats que plasmaven la falta de claredat en el patró d'interacció entre el ful·lerè i les proteïnes, feu que es reajustés el focus del treball plantejat, encaminant-lo cap a l'aportació de noves dades que poguessin proveir informació addicional per posteriors estudis centrats en l'ús del ful·lerè C₆₀ en el camp de la biomedicina.

Estudis recents en els que s'analitzà la formació d'un complex ben definit i caracteritzat entre el ful·lerè C₆₀ i el lisozim^{16,62}, ens donaren la base metodològica per la síntesi del mateix complex amb altres proteïnes. A més, abans d'afrontar el desenvolupament d'aquest treball de fi de grau, analitzarem els aspectes metodològics i els resultats obtinguts a altres treballs que estudiaven la interacció del ful·lerè C₆₀ amb proteases del HIV⁴⁵⁻⁴⁸ o amb les albúmines humana i bovina^{53,54}; treballs on es descrivien anticossos específics pel ful·lerè C₆₀^{50,51}; i treballs on s'emprà el ful·lerè com inhibidor de l'acetilcolinesterasa⁵².

En base a aquesta informació, a més d'estudiar interacció entre el ful·lerè C₆₀ i l'α-sinucleïna, decidirem estudiar també la formació del complex amb altres proteïnes: la HEWL, la α-quimotripsina, la pepsina i la catalasa.

Així, aquest treball de fi de grau presenta el següents objectius:

- a) Estudiar si es formava el complex entre el ful·lerè i les proteïnes abans esmentades.
- b) Determinar l'efecte del pH sobre la formació dels complexos.
- c) Determinar l'efecte de la concentració de NaCl sobre la formació dels complexos.
- d) Determinar l'efecte de la concentració de NaCl sobre l'estabilitat dels complexos ja formats.
- e) Determinar l'estabilitat temporal dels complexos.
- f) Determinar les zones d'interacció entre l'α-sinucleïna i el ful·lerè.
- g) Conèixer l'efecte del ful·lerè sobre l'agregació de l'α-sinucleïna.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Materials

El ful·lerè C₆₀, la tioflavina T, la α -quimotripsina, el lisozim, la catalasa i la poli-lisina es varen comprar a la casa comercial "Sigma Aldrich". La pepsina i el clorur sòdic s'adquiriren de la casa comercial "FisherScientific". La α -sinucleïna humana va esser aportada pel grup de recerca de Reactivitat Molecular i Disseny de Fàrmacs de la UIB, el qual es capaç de produir-la en la seva forma recombinant.

Tots els reactius per a la preparació de les dissolucions tampó: dissolucions comercials 1 N d'àcid clorhídric i d'hidròxid sòdic, fosfat monopotàssic, bicarbonat sòdic i sulfat amònic foren adquirits de la casa comercial "Scharlau", a excepció del citrat provinent de la casa comercial "Baker Chemicals" i de l'acetat sòdic trihidratat provinent de la casa comercial "Labkem".

3.2 Preparació de les dissolucions de proteïna

Per preparar les dissolucions de lisozim de gallina, es dissolgué 1 mg dins 5 mL d'aigua Mili-Q o bé, dins 5 mL d'una dissolució de tampó fosfat 20 mM a (pH 7.4). La seva concentració (9 μ M) fou mesurada segons la seva absorbància a 280 nm, tenint en compte el coeficient d'extinció molar ($\epsilon_{280} = 36940 M^{-1} \cdot cm^{-1}$), calculat en base la seqüència primària de la proteïna, mitjançant la plataforma "Protparam":

```
KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLC  
NIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCRL
```

Per preparar les dissolucions de la catalasa de fetge boví, es dissolgueren 3 mg dins 5 mL d'aigua MiliQ o bé, dins 5 mL d'una dissolució tampó fosfat 20 mM (pH 7.4). Per mesurar les concentracions de les dissolucions preparades (2 μ M), es mesuraren les seves absorbàncies a 280 nm i aquestes, es calcularen segons el coeficient d'extinció molar ($\epsilon_{280} = 252200 M^{-1} \cdot cm^{-1}$), obtingut a partir de la seqüència primària de cada una de les 4 cadenes idèntiques que componen el tetràmer:

```
ADNRDPASDQMKHWKEQRAAQKPDVLTGGGNPVGDKLNSLTVGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDRERIPERVVHAK  
GAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDPGRFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDA  
LLFPSFIHSQKRNPQTHLKDPDMVWDFWSLRPELSHQVSLFSDRGIPDGHRHMDGYGSHTFKLVNADGEAVYCKFHY  
KTDQGIKNSVEDAARLAHEDPDYGLRDLFNAIATGNYPSWTLYIQVMTFSEAEIFPFNPFDLTKVWPHGDYPLIPVGKLV  
LNRNPVNYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEPSPDKMLQGRLEFAYPDTHRRLGPNYLQIPVNCYPYRVARVANYQRDGPMMCM  
MDNQGGAPNYYNSFSAPEHQPSALEHRTHFSGDVQRFNSANDDNVTQVRTFYLVKVLNEEQRKRLCENIAGHLKDAQL  
FIQKKA VKNFSDVHPEYGSRIQALLDKYNEEKPKN
```

Per preparar les dissolucions de la pepsina porcina, es dissolgueren 15 mg comercials en 5 mL d'aigua MiliQ o bé, dins 5 mL d'una dissolució tampó fosfat 20 mM (pH 7.4). Les seves concentracions (10 μ M) es calcularen a partir del coeficient d'extinció molar obtingut ($\epsilon_{280} = 51715 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) a partir de la seva seqüència primària:

```
IGDEPLENYLDTEYFGTIGTGAQDFTVIFDTGSSNLWVPSVYCSSLACSDHNQFNPDDSSTFEATSQELSITYGTGSMTGI  
LGYDTVQVGGISDTNQIFGLSETEPGSFLYYAPFDGILGLAYPSISASGATPVFDNLWDQGLVSDLFVYSSNDDSGSVV  
LLGGIDSSYYTGSLNWVPVSVVEGYWQITLDSITMDGETIACSGGCQAIVDTGTSLLTGPTSAIANIQSDIGASENSDGEMVI  
SCSSIASLPDIVFTINGVQYPLPSAYILQDDDSCTSGFEGMDVPTSSGELWILGDVFIRQYTVFDRANNKVLAPVA
```

Les dissolucions d' α -quimotripsina es prepararen dissolent 1 mg de proteïna dins 5 mL d'aigua MiliQ o bé, dins 5 mL d'una dissolució de tampó fosfat 20 mM a pH=7.4. Les concentracions (6 μ M) es calcularen a partir del coeficient d'extinció molar ($\epsilon_{280} = 202340 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) calculat a partir de la seqüència primària de cada una de les 4 cadenes idèntiques que componen el tetràmer:

```
CGVPAIQPVL SGLIVNGEEAVPGSWPWQVSLQDKTGFHFCGGSLINENWVVTAAHCGVTTSDVVVAGEFDQGSSEKI  
QKLIKIAKVFKN SKYNSLTINNDITLLKLSTAASFSQTVSAVCLPSASDDFAAGTTCVTTGWGLTRYANTPDR LQOASLPLLS  
NTNCKKYWGTKIKDAMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKNGAWTLVGIVSWGSSTCSTSTPGVYARVTALVNWVQQT  
LAAN
```

Inicialment, les dissolucions d' α -sinucleïna que s'obtingueren del grup d'investigació on es desenvolupà aquest treball de fi de grau, es centrifugaren a dins tubs capaços d'incrementar la seva concentració (Merck Millipore). Posteriorment, les dissolucions resultants es dialitzaren emprant aigua Mili-Q o bé, emprant una dissolució de tampó fosfat 20 mM (pH 7.4). Les concentracions finals es calcularen emprant el coeficient d'extinció molar que s'obtingué amb el programa "ProtParam" ($\epsilon_{280} = 5960 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) a partir de la seqüència primària de la proteïna:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAEAAGKTKEGVLVVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAV
AQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA

3.3 Preparació dels complexos proteïna-ful·lerè C₆₀

Un cop preparades les dissolucions proteïques, aquestes s'empraren per preparar el complex amb el ful·lerè. Per això, als 5 mL de les mateixes, s'afegí 1 mg de ful·lerè C₆₀. A continuació, la mescla s'introduí a un bany d'aigua gel i es sotmeté a ultrasons generats amb un sonicador SoniPrep150 durant 1 hora a 12 micres d'amplitud de freqüència sonora i fent cicles de 5 segons de sonicatge i 1 segon de descans. Amb el temps, la mescla resultant s'anà tornant obscura, i la suspensió resultant finalment es centrifugà a 12.500 rpm durant 10 minuts. El sobrenedant obtingut es recuperà i s'emprà per a la realització d'estudis addicionals. A la [figura 10](#) es presenten les tonalitats de les dissolucions després de tractar-les amb el ful·lerè: abans i després de centrifugar.

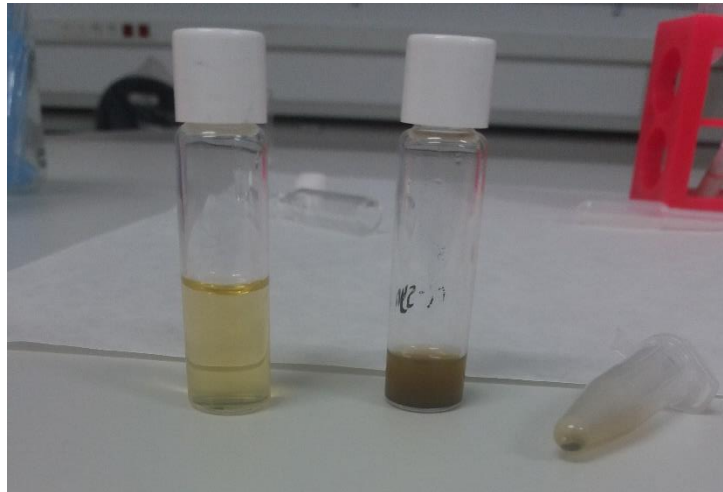


Figura 10. A l'esquerra es mostra el complex α -sinucleïna-ful·lerè C₆₀ després de centrifugar i a la dreta, abans de centrifugar

3.4 Preparació de dissolucions per a l'estudi del pH i de la concentració de sals

Amb la finalitat d'avaluar l'efecte del pH i de la concentració de NaCl sobre la formació dels complexos proteïna-ful·lerè C₆₀, s'emprà l' α -sinucleïna i la pepsina com proteïnes model. Per això, en el cas de la pepsina, es prepararen dissolucions de 5 mL pesant uns 15 mg de pepsina (10 μ M) i dissolent-la en una dissolució de tampó fosfat 20 mM a pH 7.4. A més, s'afegiren a cada una d'elles, respectivament: 3, 14, 47 i 74 mg de clorur sòdic per obtenir unes dissolucions amb una concentració de clorur sòdic de 10, 50, 150 i 250 mM. Es formà el complex amb el ful·lerè i es caracteritzà per espectroscòpia UV-Visible. En el cas de l' α -sinucleïna, es seguí el mateix procediment emperò, prenent alíquotes d'una dissolució 57 μ M de proteïna, ja preparada en tampó fosfat 20 mM a pH 7.4.

Per estudiar l'efecte del pH sobre la formació dels complexos, inicialment es prepararen 100 mL de dissolucions tampó d'àcid clorhídric (pH 1), d'àcid cítric (20 mM a pH 3.0), d'acetat sòdic (20 mM a pH 5.0), de fosfat potàssic (20 mM; pH 7.0), de bicarbonat sòdic (20 mM; pH 9.0) i de sulfat amònic (20 mM; pH 11) respectivament ajustant el pH amb dissolucions comercials 1N d'àcid clorhídric i hidròxid sòdic. Posteriorment, aquestes dissolucions tampó s'empraren per dissoldre 15 mg de pepsina (10 μ M) a dins 5 mL dels mateixos i posteriorment, procedir a la formació dels complexos. En el cas de l' α -sinucleïna, es dialitzaren alíquotes de 5 mL d'una dissolució mare emprant cada una de les dissolucions tampó anteriorment descrites. Posteriorment, es procedí a la formació de complexos.

Finalment, també s'estudià l'efecte del pH sobre la formació del complex entre una cadena de poli-lisina (de pes molecular variable entre 4000 i 15000 g/mol) i el ful·lerè. Es prepararen dissolucions que contenien

1 mg de poli-lisina dissolta a dins 5 mL dels tampons preparats a pH 5 (acètic/acetat), pH 9 (bicarbonat/carbonat) i pH 11 (amoníac/amoni). Aquestes dissolucions es tractaren posteriorment amb el ful·lerè així com s'ha explicat anteriorment per tal de formar el complex.

3.5 Preparació de dissolucions per l'estudi de l'estabilitat del complex en front al temps i a l'addició de sals

Es prepararen dissolucions de totes les proteïnes objecte d'estudi: pepsina, catalasa, lisozim, α -quimotripsina i α -sinucleïna. Totes elles es prepararen a dins 5 mL en tampó fosfat 20 mM a pH 7.4, a excepció del lisozim, que es dissolgué dins aigua Mili-Q. Per això, es pesaren, respectivament: 15, 3, 1 i 1 mg de les proteïnes esmentades (obtenint-se uns valors de concentracions 10, 2, 9 i 6 μ M, respectivament) i es dialitzà una dissolució mare de α -syn 57 μ M. Amb cada una d'aquestes dissolucions es formà el complex amb el ful·lerè de la forma ja descrita als apartats anteriors i posteriorment, aquestes dissolucions s'empraren per adquirir els seus espectres UV-Visible i de fluorescència després de diferents dies d'incubació a temperatura ambient (1, 2, 3, 4 i 10 dies després de la formació del complex). A més, es prengueren alíquotes de totes aquestes dissolucions a diferents temps d'incubació i s'analitzaren mitjançant microscòpia de força atòmica.

D'altra banda, per estudiar l'estabilitat del complex proteïna-ful·lerè en front a l'addició de sals, es preparà una dissolució d'1 mg de lisozim a dins 5 mL d'aigua Mili-Q, i es formà el complex de la forma descrita. Seguidament s'adquiriren els corresponents espectres UV-visible, després de l'addició de clorur sòdic fins assolir concentracions de 0, 0.1, 1 i 6M (màxima solubilitat del clorur sòdic en aigua a 25 °C).

3.6 Estudi de la formació de fibres d' α -sinucleïna

La tioflavina T (ThT) és una molècula que varia notablement la seva emissió fluorescent amb petites variacions del seu entorn químic. La seva longitud d'ona de màxima excitació es troba als 385 nm emperò, en presència de fibres amiloides, aquest màxim es desplaça fins als 450 nm. Aquest fet també es dona amb la longitud d'ona de màxima emissió, que passa dels 445 als 485 nm quan la ThT entra en contacte amb fibres. Es creu que aquesta variació es deguda a la interacció entre la regió altament hidrofòbica de les fibres amiloides i els anells fenílic i benzotiazòlic de la tioflavina T. Aquests dos anells estan units per un enllaç C-C simple amb gir lliure que al fixar-se amb les fibres amiloides, altera les propietats de fluorescència de la molècula⁶⁸.

Per realitzar aquest estudi, s'empraren dues mostres d' α -sinucleïna 50 μ M preparades a dins tampó fosfat (20 mM; pH 7.4), que alhora contenien 100 μ M de ThT (tioflavina T) i 150 mM de clorur sòdic. A una d'elles s'hi va afegir ful·lerè C₆₀ per tal de formar el complex corresponent, mentre que a l'altre no se n'hi va afegir. Ambdues dissolucions s'incubaren durant 100 hores (~4 dies) a 37°C i amb agitació constant. Durant aquest temps, es varen adquirir els seus espectres d'emissió de fluorescència entre els 460-600nm, emprant per a l'excitació una radiació de longitud d'ona de 440 nm. A la [figura 11](#) es mostren les dissolucions que s'empraren per realitzar l'assaig cinètic.

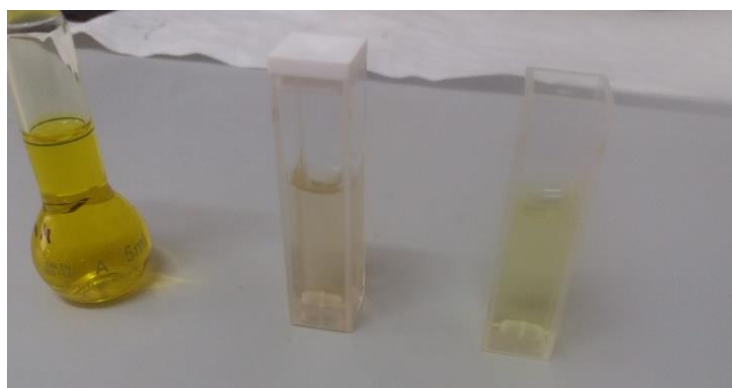


Figura 11. D'esquerra a dreta: una dissolució mare de tioflavina T; una cubeta amb el complex ful·lerè C₆₀ – α -sinucleïna; i una dissolució d' α -sinucleïna lliure (en presència de tioflavina T)

3.7 Mesures espectroscòpiques emprant l'espectroscòpia UV-Visible

L'espectroscòpia UV-visible es basa en el fenomen d'absorció de la radiació electromagnètica quan aquesta travessa una mostra. En el nostre cas emprarem aquesta tècnica per obtenir diferent informació, com l'espectre (i la concentració) de les dissolucions proteïques a emprar, avaluar la formació del complex amb el ful·lerè C₆₀, o analitzar els canvis a l'estructura tridimensional i a l'estat d'agregació de les proteïnes.

L'espectroscòpia UV-Visible s'ha emprat per adquirir els espectres d'absorció de totes les dissolucions de proteïna just abans i just després d'haver-les tractat amb el ful·lerè C₆₀. També s'ha emprat per avaluar l'estabilitat dels complexos en diferents condicions.

Els espectres de les dissolucions de proteïna-ful·lerè C₆₀ preparades en aigua Mili-Q i els espectres adquirits per avaluar els efectes del pH i de la concentració de sals quan la proteïna objecte d'estudi fou l' α -sinucleïna, foren adquirits emprant cubetes de quars d'1mm de pas òptic. Per totes les demés mesures s'empraren cubetes de quars d'1 cm de pas òptic.

Els espectres d'absorció UV-visible s'obtingueren emprant un espectrofotòmetre Shimadzu UV-2401PC de doble feix, equipat amb un equip Peltier per controlar la temperatura de les cubetes. Tots els espectres foren adquirits a 25°C.

3.8 Mesures espectroscòpiques emprant l'espectroscòpia de fluorescència

La espectroscòpia de fluorescència⁵⁵ es basa en la propietat de certes molècules per adsorbir radiació electromagnètica en el rang de l'UV-Vis, per després de la seva relaxació, emetre energia en forma de llum. Atès que la majoria de les proteïnes són fluorescents⁵⁶, s'ha emprat aquesta tècnica per estudiar la interacció del ful·lerè C₆₀ amb les proteïnes, ja que la presència de lligands o el canvi estructural de la proteïna, afecta a l'espectre d'emissió fluorescent de les mateixes. És per això, que aquesta tècnica complementa els resultats obtinguts mitjançant espectroscòpia UV-visible.

Concretament, l'espectroscòpia de fluorescència s'emprà per adquirir els espectres d'excitació i d'emissió dels complexos proteïna-ful·lerè adquirits durant l'estudi de l'estabilitat temporal dels mateixos i durant l'estudi de l'agregació en fibres de la α -sinucleïna.

Les mesures de fluorescència es prengueren d'un espectrofluorímetre monofeix Shimadzu RF-5301PC equipat amb una làmpada de Xenó, excepte en el cas de l'estudi d'agregació en fibres de la α -sinucleïna on s'emprà un espectrofluorímetre CaryEclipse. Tots els espectres (estudi d'estabilitat temporal dels complexos) foren adquirits a 25°C en excepció del estudi d'agregació en fibres de la α -sinucleïna, que s'adquiriren a 37°C.

3.9 Mesures de Ressonància Magnètica Nuclear RMN

L'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear^{63,64} és un tipus d'espectroscòpia que es basa en l'excitació del sistema energètic nuclear dels àtoms. La radiació que s'absorbeix cau en la regió de l'espectre electromagnètic de les ones de radio, i la mostra requereix d'una configuració energètica nuclear apta perquè pugi ésser excitada. La freqüència de la radiació absorbida per aquests àtoms és molt sensible al seu entorn químic. Per tant, aquesta tècnica és molt útil en el camp de les proteïnes, ja que és capaç de donar informació estructural de les mateixes.

Malgrat això, una proteïna pot tenir de centenars a milers d'àtoms d'H i gran nombre d'àtoms de carboni i nitrogen (que a més, l'abundància natural dels seus isòtops actius en RMN, no és molt elevada). Per això, s'empen tècniques de RMN bidimensionals o tridimensionals que relacionen l'excitació d'un tipus d'isòtop actiu a la RMN amb l'excitació d'un altre isòtop, disminuint així el nombre de senyals. Per exemple, pel desenvolupament d'aquest treball es va adquirir l'espectre de RMN de correlació bidimensional (HSQC) ¹H-¹⁵N per l' α -sinucleïna. Aquest espectre dona una senyal d'entrecreuament entre les freqüències dels dos àtoms esmentats sempre i quan estiguin separats únicament per un enllaç. Així, s'obté una senyal per cada grup amida de la seqüència primària de la proteïna (a excepció del residu de prolina).

Inicialment, es va preparar una dissolució d' α -sinucleïna (57 μ M) marcada isotòpicament amb N^{15} , a dins un tampó fosfat 20 mM (pH 7.4) i a una concentració de clorur sòdic 150 mM. S'adquirí el seu espectre HSQC i posteriorment, aquesta dissolució s'emprà per formar el complex amb el ful·lerè. Una vegada el complex estigué format, es va tornar a adquirir el seu espectre HSQC. L'efecte del ful·lerè sobre l'entorn químic de cada residu s'avaluà emprant l'equació 1, on $\Delta\delta^{15N}$ i $\Delta\delta^1H$ són la diferència en el desplaçament químic de les senyals espectroscòpiques de l' α -sinucleïna lliure i l' α -sinucleïna acomplexada amb el ful·lerè.

$$\Delta\delta_{avg} = \sqrt{\frac{\left(\frac{\Delta\delta^{15N}}{5}\right)^2 + (\Delta\delta^1H)^2}{2}} \quad \text{Equació (1)}$$

També es va estudiar com la formació del complex, feia variar la intensitats de les senyals de l'espectre HSQC de l' α -sinucleïna. Així, s'esperava que les senyals característiques d'aquelles regions que mostraven una interacció preferencial amb el ful·lerè, mostressin la major variació a les seves intensitats. Per fer aquest estudi, s'analitzaren els pics de tots els residus assignats, i la seva intensitat es referencià de forma interna a la intensitat d'una senyal d'una cadena lateral d'una asparagina o d'una glutamina. Una vegada analitzades les intensitats (agafant com a referència interna el pic número 159), es determinaren les diferències d'intensitats entre els quocients dels dos HSQC (l'equació 2).

$$\Delta\left(\frac{I}{I_{159}}\right) = \left(\frac{I}{I_{159}}\right)_{\alpha\text{-sinucleïna:C}_{60}} - \left(\frac{I}{I_{159}}\right)_{\alpha\text{-sinucleïna nativa}} \quad \text{Equació (2)}$$

L'adquisició dels espectres de RMN, es realitzà emprant un espectròmetre de 600 MHz del model Bruker Avance III. Les mostres preparades inclogueren un 10% d'aigua deuterada i els espectres foren adquirits a 292.53 K. L'assignament de l' α -sinucleïna nativa en absència de ful·lerè ja fou realitzat per altres membres del Grup de Reactivitat Molecular i Disseny de Fàrmacs de la UIB i depositat a la base de dades de BMRB amb el codi 27796.

3.10 Mesures per microscòpia de forces atòmiques (AFM)

La microscòpia de forces atòmiques^{66,67} és una tècnica que ens dona una resolució tridimensional d'una regió micromètrica de la superfície d'una mostra. Es basa en l'ús d'una punta d'una gruixa nanomètrica que detecta el contacte amb superfícies segons la seva rugositat (figura 12).

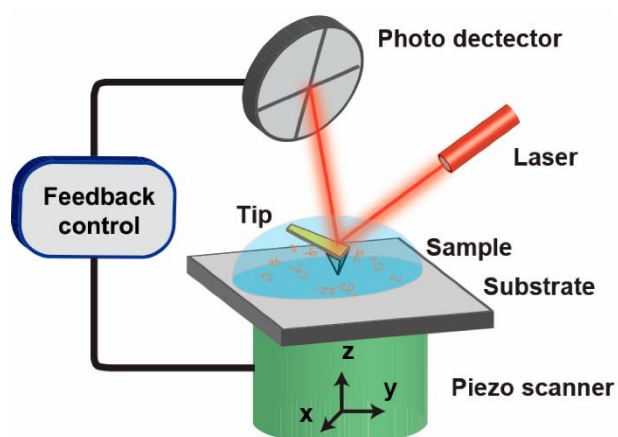


Figura 12. Esquema d'un sistema de microscòpia de força atòmica AFM

En el nostre cas, l'AFM fou emprada amb l'objectiu d'obtenir una imatge de la morfologia dels agregats que es pogueren formar en dissolució.

Així doncs, emprarem l'AFM per estudiar l'estabilitat temporal dels complexos proteïna-ful·lerè a partir dels 10 dies després d'haver-se format el complex; i per estudiar l'agregació de la α -sinucleïna.

Les mesures de AFM es realitzaren emprant un Microscopi de Força Atòmica Veeco multimode amb un control·lador NanoScope IV i emprant el software NanoScope SPM v5 per la visualització i la manipulació de les microgràfies de les mostres.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Formació dels complexos proteïna-ful·lerè

Inicialment, s'intentà formar el complex entre l' α -sinucleïna i el ful·lerè C_{60} , emprant la metodologia que possibilita la síntesis del complex ful·lerè-HEWL¹⁶, la qual consistia en sonicar el ful·lerè en una dissolució de la proteïna i aïllar el complex dissolt per centrifugació. Aquest procediment no resultà, ja que l'espectre UV-Vis obtingut fou el mateix que el de la proteïna en absència de ful·lerè. Per això, es repetí el procés emprant un bany d'ultrasons refredat amb aigua-gel. Emperò el resultat fou el mateix: no hi hagué canvis destacables a l'espectre UV-visible de la proteïna. Finalment, s'emprà un sonicador més potent (el SoniPrep 150), que enlloc d'esser un bany d'ultrasons, introduïa una punta metàl·lica a dins la dissolució. Amb aquest nou sonicador, s'observà la dispersió del ful·lerè dins la dissolució, i l'adquisició d'un color negre-marró opac. Una vegada conclòs el procés de sonicació, la suspensió es centrifugà, deixant una dissolució transparent de tonalitat beige, característica del complex format. Per tant, la potència del sonicador resultà un factor clau per afavorir la formació del complex.

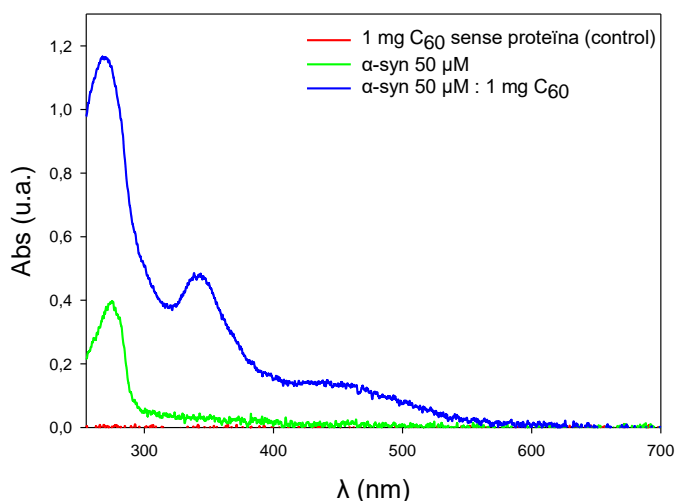


Figura 13. Espectres UV-visible del complex α -syn@ C_{60} sintetitzats

La formació del complex va ésser confirmada mitjançant l'adquisició del seu espectre UV-visible. A la [figura 13](#) es mostren els espectres UV-visible d'una dissolució d' α -sinucleïna (50 μ M), i l'espectre de la mateixa dissolució després de la sonicació amb ful·lerè C_{60} . La formació del complex queda provada amb l'augment de l'absorbància a 280 nm, i amb l'aparició de dues noves bandes, una a 340 nm, i una altre a 460 nm, responsable del color beig del complex. La sonicació d'una suspensió de ful·lerè en absència de proteïna, no induïa a la seva dissolució ni tampoc, a la aparició de cap banda activa en el rang UV-Vis.

Posteriorment, decidirem estudiar si la formació del complex α -sinucleïna-ful·lerè era possible degut a les propietats específiques i particulars de l' α -sinucleïna o bé, si d'altres proteïnes eren també capaces d'acomplexar-lo. Prenguérem doncs la pepsina, la catalasa i la α -quimotripsina, i provàrem de formar els seus complexos amb el ful·lerè C_{60} . En presència d'aquestes proteïnes, i aplicant la metodologia abans descrita per l' α -sinucleïna, s'aconseguí la síntesis del complex, tal i com demostraren els resultats espectroscòpics i el color beig de la dissolució, característic de la formació del complex ([figura 14a-d](#)).

La única proteïna que no fou capaç d'acomplexar el ful·lerè, fou el lizozim. Malgrat aquest resultat inicial, decidirem estudiar si aquest fet era degut a les propietats intrínseques de la pròpia proteïna, o hi havia condicions d'entorn que condicionaven la formació del complex. Per tal d'investigar aquest fet, variàrem lleugerament les condicions experimentals de síntesi, i a un d'aquests assaigs, es substituï la dissolució tampó 20 mM fosfat (pH 7.4) per aigua Mili-Q. La simple eliminació de les sals del dissolvent, fou suficient per induir la formació del complex.

Atès, que l'eliminació de la sal de fosfat del dissolvent afavorí la formació del complex HEWL-ful·lerè, investigàrem si la formació dels altres complexos proteïna-ful·lerè era també més favorable en absència que en presència de fosfat. A les [figura 14e,f](#) es representen els valors de la diferència (Δ Abs) entre els

espectres UV-Vis dels diferents complexos proteïna-ful·lerè i els espectres de les seves corresponents proteïnes lliures adquirits en tampó fosfat (figura 14e) i adquirits en aigua Mili-Q (figura 14f).

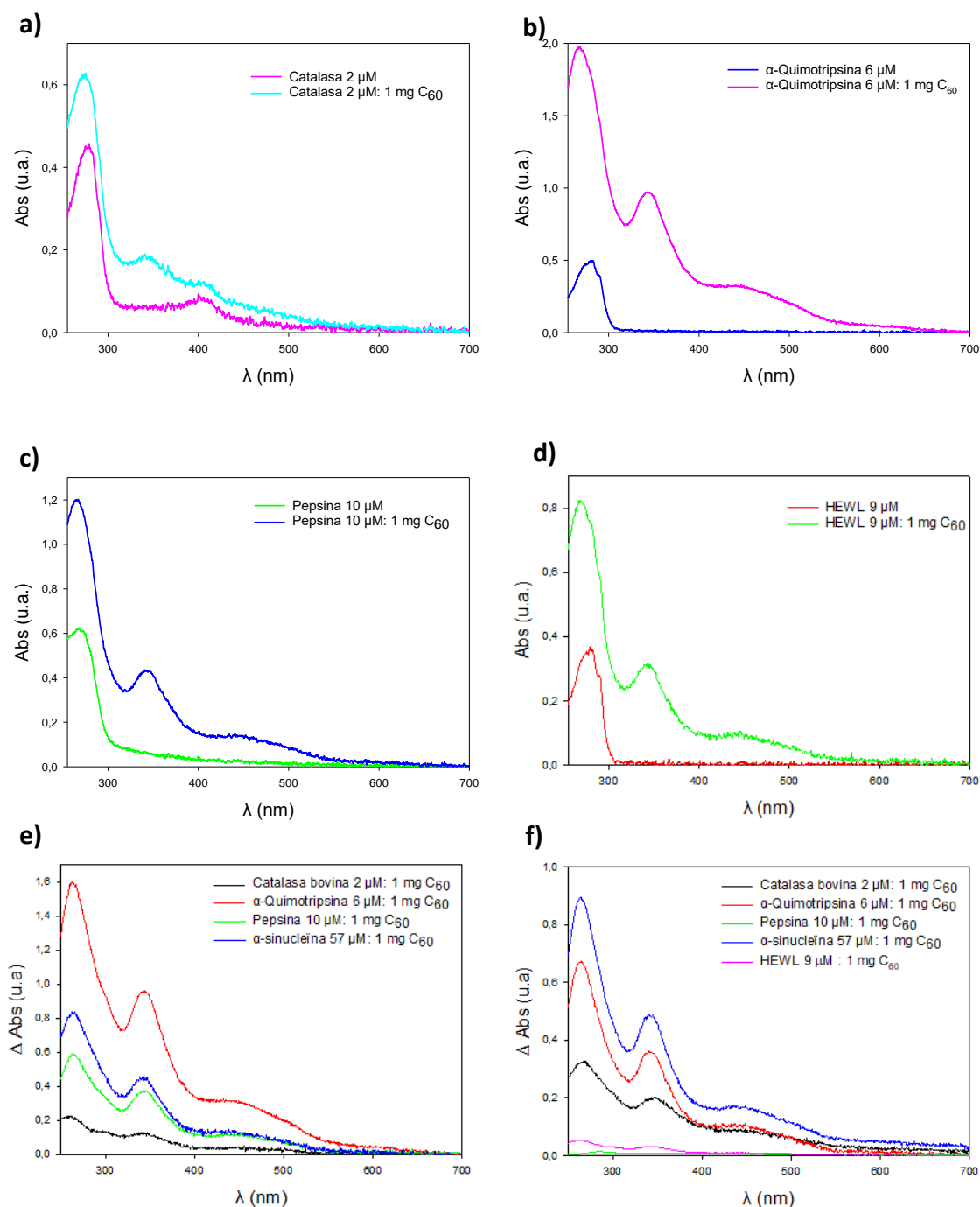


Figura 14. Espectres UV-visible de les proteïnes i el seu complex amb C_{60} : a) Catalasa; b) α -Quimotripsina; c) Pepsina; d) Lisozim (en aigua MiliQ); e) Variació d'absorbància entre els espectres dels complexos i els de les proteïnes lliures en el tampó fosfat 20 mM pH 7.4; f) en aigua MiliQ. Per aquesta darrera gràfica (f), el pas òptic de les cubetes fou de 1 mm; per les altres, fou de 1 cm.

Com es pot apreciar, en tots els casos, hi ha diferències significatives entre els espectres UV-Vis dels complexos formats en tampó i els espectres dels complexos formats en aigua Mili-Q. Aquestes diferències indiquen que el fet d'emprar aigua Mili-Q, afavoreix en gran mesura la formació del complex. Prova d'això, es que per adquirir els espectres en aigua Mili-Q dins un rang fiable d'absorbància, s'hagueren d'emprar cubetes de pas òptic 10 vegades menor (1 mm) a les emprades per adquirir els espectres en tampó fosfat (1 cm).

Hi ha estudis que demostren que el fosfat estableix una interacció electrostàtica tan forta que es podria comparar amb la fortalesa d'un enllaç covalent^{69,70}. Això podria donar pas una possible hipòtesi on la

interacció fosfat-catió podria desplaçar possibles interaccions ful·lerè-proteïna. Per exemple, en el cas de la HEWL, el lloc d'unió amb el ful·lerè inclou residus arginina que podrien unir-se al fosfat inhibint la formació del complex.¹⁶

En resum, els resultats obtinguts demostraren que totes les proteïnes estudiades son capaces de solubilitzar el ful·lerè i formar el complex amb ell. Per tant, es conclou que malgrat les diferents propietats físico-químiques d'aquestes proteïnes, totes elles presenten alguna zona estructural capaç de solubilitzar i acomplexar el ful·lerè.

Malgrat tots els espectres UV-Vis dels diferents complexos proteïna-ful·lerè mostraren les mateixes bandes, s'observaren diferències considerables entre les intensitats dels màxims de les mateixes. Això, ens dugué a investigar si hi havia cap correlació entre el nombre d'aminoàcids d'un determinat tipus que presentaven les proteïnes i la relació d'intensitat entre les bandes. Aquest estudi es va completar amb les dades bibliogràfiques disponibles;⁵⁷⁻⁶¹ emperò, aquest anàlisi no trobà un patró clau, mes allà d'evidenciar que els aminoàcids carregats poden participar. A més, la presència de sals provinents del tampó, pareix entorpir la formació del complex.

Per intentar confirmar aquests fets, realitzàrem estudis addicionals, canviant les condicions del medi: el pH o la concentració salina de la dissolució proteica abans de formar el complex.

4.2. Estudis a diferents pH

Per estudiar com afectava el pH de la dissolució a la formació dels complexos proteïna-ful·lerè, empràrem dues de les proteïnes ja estudiades com a model: la pepsina i l' α -sinucleïna, ambdues amb notables diferències estructurals i funcionals.

Inicialment, s'estudià l'efecte del pH sobre la formació del complex. Per això, s'empraren diferents dissolucions tampó preparades a diferents pHs. Variacions de pH poden modificar lleugerament o considerablement l'estructura de les proteïnes. L'estudi de l'efecte del pH es feu emprant la pepsina i l' α -sinucleïna com a proteïnes models, atès que la primera té estructura funcional a pH fisiològic (pepsina) i la segona, és intrínsecament desestructurada.

A la [figura 15](#) es mostra com variaren els espectres d'absorbància de diferents complexos pepsina-ful·lerè preparats a diferents pHs. A un pH fisiològic (7.4) s'obtingué la màxima variació d'absorbància i per tant, el màxim percentatge de formació de complex. A mesura que el pH augmentà o disminuï, pareix ésser que l'equilibri es desplaçà cap als reactius, disminuint per tant, la formació del complex.

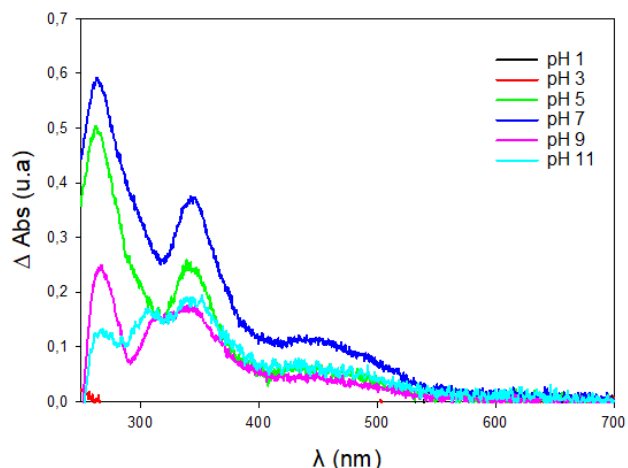


Figura 15. Diferència d'absorbància entre el complex i la pepsina lliure a diferents valors de pH.

Per analitzar la formació del complex, cal tenir en compte les tres bandes d'absorció que apareixen a l'espectre UV-Vis del complex proteïna-ful·lerè. Les bandes aparegudes als 340 nm i als 460 nm evidencien la disminució en la formació del complex fins al punt de que a pH àcids com 3 o 1, pareix que ja no es forma.

Podria ésser que la pèrdua de part de l'estructura de la proteïna induïda per una variació del pH, doni lloc a la pèrdua de l'arquitectura dels llocs d'unió al ful·lerè. Addicionalment, es podria produir un canvi en l'estat de protonació dels grups ionitzables, els quals pareixen ésser claus en la formació del complex.

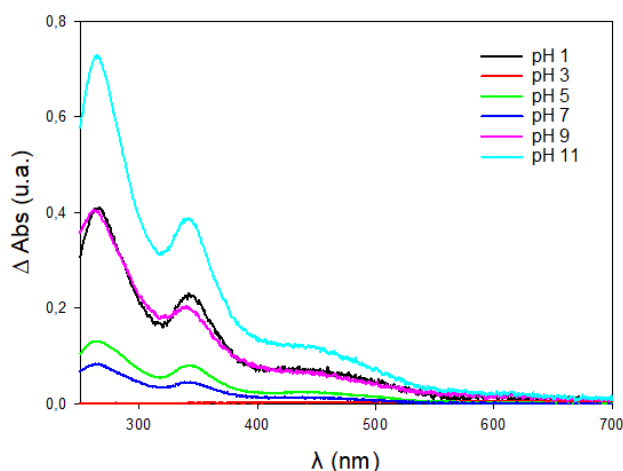


Figura 16 Diferència d'absorbància entre el complex i la α -sinucleïna lliure a diferents valors de pH

Per tal d'avaluar i d'investigar més profundament aquestes dues possibilitats, avaluarem el percentatge de formació del complex emprant l' α -sinucleïna, que no presenta cap estructura secundària definida i té una elevada flexibilitat. Aquest fet ens permet estudiar com afecten els canvis de pH a la formació del complex, avaluant-los únicament des del punt de vista del canvi en l'estat de protonació dels grups ionitzables. A la [figura 16](#) es mostra la variació de l'absorbància en funció de la longitud d'ona pel complex α -sinucleïna-ful·lerè a diferent pH. Per a la realització de les mesures d'absorbància ens trobarem amb una peculiaritat: la intensitat dels espectres d'absorbància a pHs àcids i bàsics fou molt més elevada que a pHs intermedis. Per tant, aquests espectres s'hagueren d'obtenir emprant cel·les de pas òptic d'1mm.

La tendència general observada diferia respecte a l'observada per la pepsina: com més allunyat estava el pH del fisiològic, major fou la variació de l'espectre d'absorbància i per tant, major fou el percentatge del complex format entre l' α -sinucleïna i el ful·lerè ([figura 17](#)). La formació del complex, no fou observada quan s'emprà un tampó de citrat a pH 3. A més d'això, cal destacar la gran quantitat de complex format a pH 11, però també a pHs 1 i 9. Una possible explicació a aquest fet seria que a pH àcid l' α -sinucleïna presenta gran nombre de càrregues positives, degut a un extrem N-terminal molt ric en residus bàsics, mentre que a pH basic, l' α -sinucleïna presenta gran nombre de càrregues negatives, degut a un extrem C-terminal molt ric en residus àcids. En canvi, a pHs neutres, la proteïna està globalment menys carregada tot i que té un major nombre de residus carregats, i pareix ésser que és menys susceptible a formar el complex.

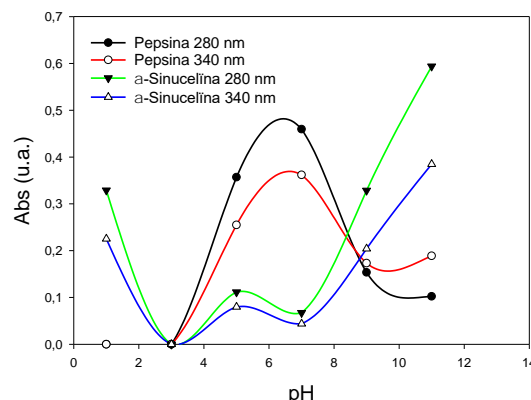


Figura 17 Efecte del pH a la absorbància dels màxims dels complexos

Per tal de confirmar inequívocament que les càrregues positives (però probablement també les negatives) esdevenen claus a la formació dels complexos proteïna-ful·lerè, utilitzarem un polipèptid desordenat compost únicament de residus lisina. Amb ell, estudiarem la formació del complex a distints pHs, on es variés l'estat de protonació de les cadenes laterals de les lisines i estiguessin: completament protonades (pH 5), parcialment protonades (pH 9) i totalment desprotonades (pH 11).

Les dades obtingudes ([figura 18](#)) demostren que la formació del complex és únicament favorable quan els grups amina estaven desprotonats. Per tant, l'estat d'ionització dels grups acomplexants del ful·lerè és clau per la formació del complex. En conseqüència, en aquest cas, la presència de càrregues positives entorpeix la formació del complex.

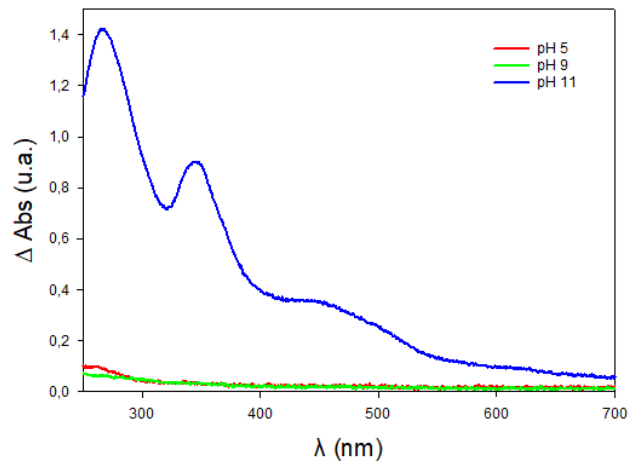


Figura 18. Espectres UV-visible dels complexos Poli-Lys-ful·lerè

4.3. Estudis a diferents concentracions de NaCl

Seguidament, s'estudià l'efecte de distinta concentració de clorur sòdic en el medi sobre la formació del complex; emprant, d'altra vegada, la pepsina i l' α -sinucleïna com proteïnes model per l'estudi.

Es sabut que l'addició de sals a les dissolucions proteïques fa que s'ocultin més els seus residus hidrofòbics i s'estableixin noves interaccions que inclús, poden modificar la seva estructura.⁷⁴

La [figura 19](#) mostra la diferència entre l'espectre d'absorbància del complex pepsina-ful·lerè i el de la pepsina lliure a diferents concentracions de clorur sòdic. Els resultats mostren clarament que l'addició del clorur sòdic prèvia a la formació del complex disminueix el percentatge de complex format. Cal destacar la disminució relativament pronunciada observada entre els espectres obtinguts emprant una concentració de 10 mM i una concentració de 50 mM de NaCl. Així doncs, pareix que la formació d'interaccions electrostàtiques entre les sals i les cadenes de la pepsina disminueix en gran mesura la capacitat de la proteïna per acomplexar el ful·lerè.

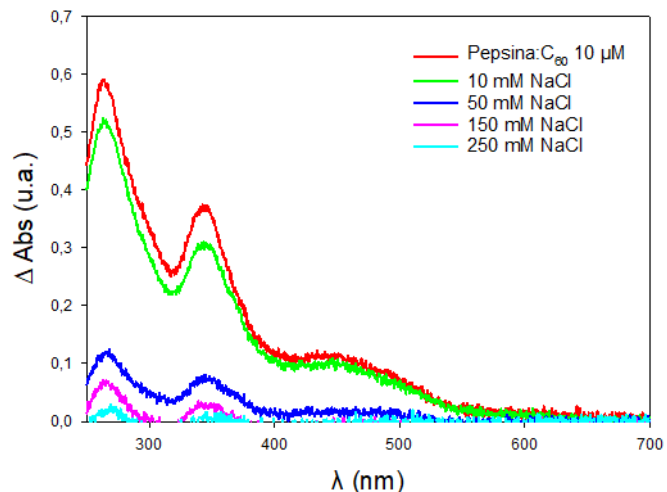


Figura 19. Diferència d'absorbància entre el complex i la pepsina lliure a diferents concentracions de clorur sòdic.

Per tal de confirmar aquesta hipòtesis, realitzarem el mateix estudi emprant l' α -sinucleïna. La [figura 20](#) mostra que la formació del complex α -sinucleïna-ful·lerè també depèn de la concentració de NaCl, de manera que el seu augment fa disminuir la formació de complex. Cal remarcar, que l'efecte no és tan marcat com en el cas de la pepsina, i fa falta el doble de concentració de NaCl per suprimir totalment la formació del complex.

Així doncs, aquests resultats pareixen indicar que la formació de parells iònics amb els residus carregats de l' α -sinucleïna entorpiren la formació del complex. A més, pareix que el tampó fosfat també té un impacte negatiu en la formació del complex, ja que la pròpia presència del fosfat en absència de NaCl també fa disminuir la formació del complex α -sinucleïna-ful·lerè (corba negra; figura 20). Cal esmentar que per aquest estudi s'emprà una dissolució mare d' α -sinucleïna que s'havia dialitzat amb aigua mili-Q a la qual s'hi varen afegir unes gotes de tampó fosfat per fixar el pH 7,4. També cal esmentar que les dades mostrades a la figura 20 fan referència la mateixa representació feta per la pepsina (figura 19) amb la diferència de que el pas òptic emprat en el cas de l' α -sinucleïna fou d'1 mm. Es a dir, per poder comparar els valors reals (i no relatius) amb la pepsina, s'hauria de considerar una absorbància deu vegades més elevada. Aquest fet demostra que la formació de complex es dispara quan fem α -sinucleïna i el dissolvent és aigua MiliQ.

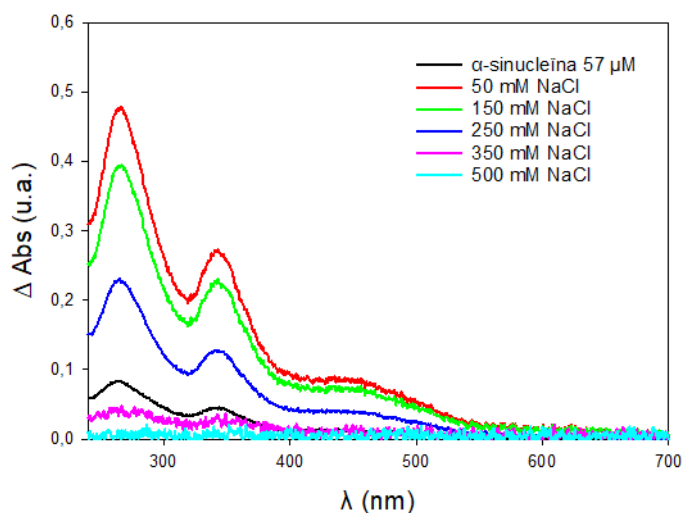


Figura 20. Diferència d'absorbància entre el complex i la α -syn lliure a diferents concentracions de clorur sòdic. El pas òptic emprat fou de 1 mm i s'emprà aigua Mili-Q com dissolvent a totes les dissolucions excepte a la corba negra, on el dissolvent era la dissolució de tampó fosfat.

La figura 21 resumeix els resultats expressats en les figures anteriors, presentant la variació dels màxims d'absorbància de les bandes dels complexos proteïna-ful·lerè en funció de les distintes condicions salines del medi extern.

Amb els resultats obtinguts en aquest estudi i els obtinguts per l'estudi de la formació del complex a diferents pH, podem intentar discutir algunes idees generals de l'efecte de les càrregues en la formació del complex.

Podria ésser que els residus carregats com la Lys o el Glu, estabilitzin la formació del complex i, a més, formin les interaccions aminoàcid-ful·lerè més estables, com argumenten alguns autors.⁶⁰

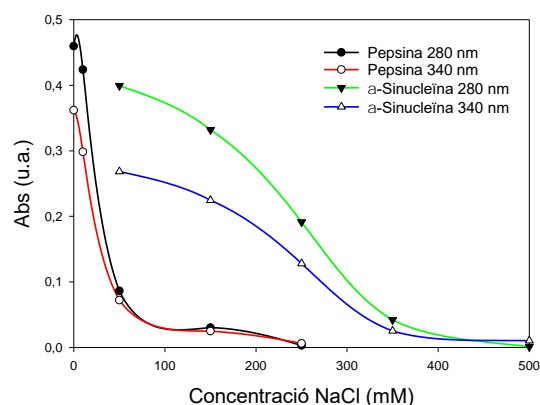


Figura 21. Efecte de la concentració de sal a la absorbància dels màxims dels complexos

Això, tal vegada s'explicaria pel tipus d'interaccions intermoleculares que poden establir: tots els aminoàcids poden interaccionar mitjançant forces de dispersió de London. Emperò, els aminoàcids carregats poden establir un tipus d'interacció addicional: les interaccions π -catiò i π -anió que podrien ser la raó, per la qual aquests aminoàcids carregats participen activament en l'establiment d'un lloc d'unió per el ful·lerè.

No obstant, si ens centrem sobre els residus carregats, aquests intentaran establir interaccions amb altres residus carregats o amb ions del medi o molècules de dissolvent per tal de maximitzar les interaccions atractives i minimitzar les repulsives. Aquesta podria ésser la raó per la qual, al modificar les condicions del medi extern, es facilitaria o dificultaria la formació del complex amb el ful·lerè.

L'addició de sal, permetria la formació d'un major nombre d'interaccions electrostàtiques entre els residus carregats de les proteïnes i els ions dificultant, així, la formació del complex. Això també es podria aplicar en el cas del canvi de pH del medi: alterant els estats de protonació dels residus ionitzables, es podrien establir un major o menor nombre d'interaccions entre aquests i el seu medi extern; dificultant o facilitant, respectivament, la formació del complex amb el ful·lerè.

4.4 Estudi de l'estabilitat del complex en funció de la concentració de clorur sòdic

Amb els estudis anteriors, demostrarem que la formació del complex proteïna-ful·lerè era dependent de la concentració de clorur de sodi. Emperò, també és important conèixer si, una vegada format el complex, aquest es pot dissociar degut a l'addició de sal. Per obtenir aquesta informació, formarem el complex del que es disposava més informació (i el que havia demostrat ser el més sensible a les condicions del medi): el complex ful·lerè-HEWL en dissolució aquosa, i hi vàrem anant afegint NaCl en diferents concentracions i adquirint els corresponents espectres UV-visible.

Com es pot apreciar a la [figura 22](#), l'addició de clorur sòdic és capaç de disgregar el complex, tot i que fins a cert límits. De fet, es necessita molta concentració de sal per poder disminuir de forma significativa la concentració de complex.

Això pareix indicar que la formació del complex és molt més sensible als canvis en el medi que la pròpia disgregació del mateix.

Es coneix que el lloc d'unió entre el ful·lerè i la HEWL es troba en el centre actiu, on el ful·lerè pot establir un gran nombre d'interaccions amb els residus de la proteïna.¹⁶

La presència de sals en el medi pot dificultar o fins i tot impossibilitar la formació del complex (com ens va ocórrer amb el tampó fosfat). Això pot ser degut a l'establiment d'interaccions més favorables entre els residus carregats de la superfície o del propi centre actiu de la HEWL, que no permetin l'entrada o l'allotjament del ful·lerè en el seu lloc d'unió.

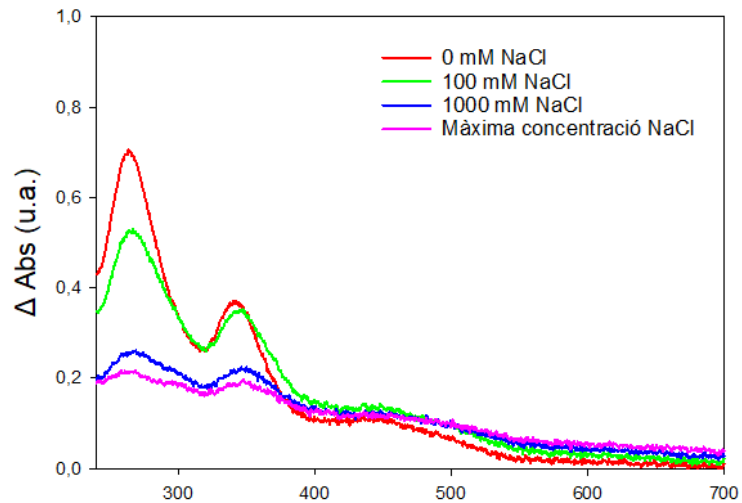


Figura 22 Diferència d'absorbància entre el complex i la HEWL lliure, variant la concentració de NaCl un cop format el complex

4.5 Estudi estabilitat temporal complexes ful·lerè-proteïna

Com a procediment rutinari, totes les dissolucions proteïna-ful·lerè que prepararem les guardarem a dins el laboratori per tal de tornar-les a emprar en cas que fos necessari. Aquest fet ens va dur a l'observació de que una vegada passats uns dies des de la seva síntesi, les dissolucions es tornaven tèrboles degut a la formació d'unes petites partícules en suspensió. Un fet, que es donava a totes les proteïnes estudiades. Aquesta observació ens va impulsar a realitzar l'estudi de l'estabilitat temporal dels complexes formats entre les diferents proteïnes i el ful·lerè.

A l'hora d'estudiar el comportament dels diferents complexes proteïna-ful·lerè, ens trobàrem amb diferents tendències que es repetien entre els distints complexes. S'estudiaren els espectres UV-visible, d'emissió i excitació fluorescent i es realitzaren micrografies d'AFM per tal d'estudiar la morfologia dels agregats presents en dissolució.

A la [figura 23](#) es mostren alguns d'aquests espectres i micrografies que representen els distints comportaments de tots els complexes estudiats.

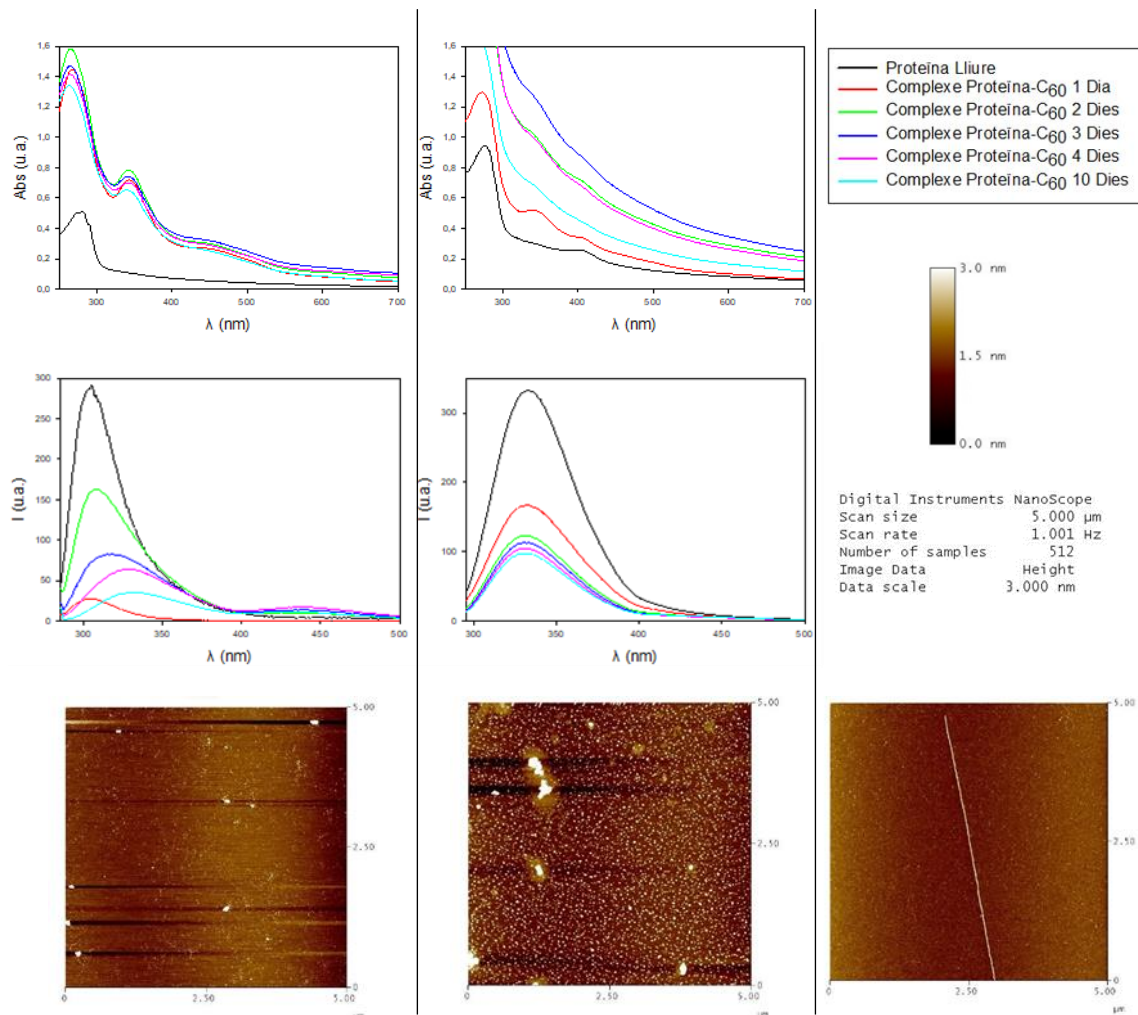


Figura 23 Evolució temporal dels complexos proteïna-ful·lerè. Columna esquerra: espectres UV-visible, d'emissió fluorescent i micrografia AFM del complex α -quimotripsina-ful·lerè; columna central, del complex catalasa-ful·lerè i columna de la dreta: micrografia AFM del complex HEWL-ful·lerè.

A les figures de l'esquerra, es presenten els espectres UV-visible, d'emissió de fluorescència i la micrografia de forces atòmiques obtinguts per el complex format entre el ful·lerè i la α -quimotripsina. La micrografia i l'espectre UV-visible, mostren com el complex es manté relativament estable i fora formar agregats. A més, l'espectre d'emissió fluorescent mostra com, amb el temps, els residus hidrofòbics que donen la senyal fluorescent, pareixen sofrir modificacions en el medi que els envolta, pel desplaçament del màxim d'intensitat de fluorescència. Això podria ser un indicatiu de que el ful·lerè es va lentament acomodant i alterant l'entorn dels residus hidrofòbics, però sense dur a la formació d'agregats. La α -quimotripsina fou la única proteïna de l'estudi que es comportà així.

A les figures centrals, es mostren els espectres UV-visible, d'emissió de fluorescència i la micrografia de forces atòmiques del complex entre el ful·lerè i la catalasa. L'espectre UV-visible i la micrografia, mostren clarament la presència d'agregats insolubles esfèrics en dissolució; comportament que ja s'havia descrit a estudis d'altres complexos proteïna-ful·lerè⁵⁹. En aquest cas, els espectres d'emissió fluorescent no presenten una desviació significativa del màxim d'emissió com passava amb la α -quimotripsina. Es pot apreciar com, progressivament, es va produint un efecte de "quenching" de la fluorescència, probablement per l'apropament del ful·lerè als residus aromàtics, disminuint la capacitat d'emissió de fluorescència pròpia d'aquests residus. Aquest comportament descrit per la catalasa, es seguia també per les altres proteïnes: α -sinucleïna, HEWL, pepsina. Cal esmentar que la pepsina presentava una quantitat molt superior d'agregats insolubles i canvis molt significatius en els seus espectres d'emissió fluorescent, probablement per la capacitat autodigestiva de la pròpia proteïna.

A la figura de la dreta, es presenta la micrografia AFM del complex entre la HEWL i el ful·lerè, el qual agregà formant fibres. Aquest darrer fet és interessant ja que la HEWL¹³⁻¹⁵ agrega d'aquesta forma després d'un període de 6-10 dies amb una incubació a temperatura de uns 60°C i a pH àcid (2-3). La formació del complex elimina la necessitat de la temperatura per formar les fibres. Això podria ésser possible si la inserció del ful·lerè enmig dels dominis alfa i beta de la HEWL, dugués al domini beta a augmentar la seva exposició i així, augmentar la tendència a agrupar-se i formar les fibres.

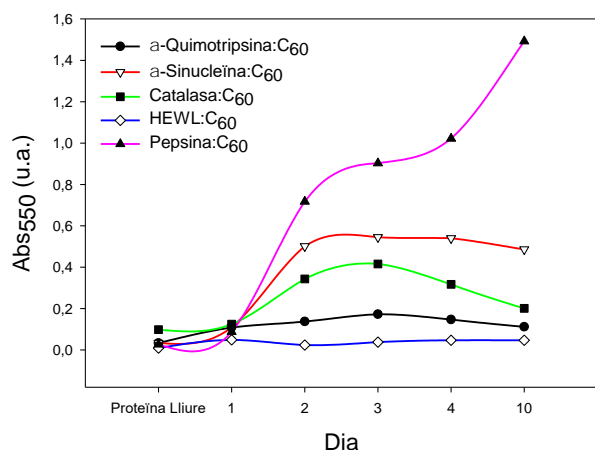


Figura 24 Evolució temporal de la absorbància als 550 nm dels complexos proteïna-ful·lerè.

des dues darreres formaven poca quantitat d'agregats en el període de temps d'estudi. Cal esmentar també, que la pepsina pareix seguir formant agregats passats els 10 dies mentre que la absorbància per als altres complexos, pareix assolir un valor estable passats els 2-3 dies indicant, tal vegada, l'aturada de la formació d'agregats insolubles o el retard en la formació dels mateixos.

A la figura 24, s'ha representat la variació de la absorbància dels complexos proteïna-ful·lerè als 550 nm, en funció del temps.

S'han escollit els 550 nm ja que és una regió on típicament les proteïnes no absorbeixen i la absorbància es pot deure a la turbidesca de la dissolució. D'aquesta forma, es pretén mostrar la capacitat dels complexos per formar agregats insolubles que dispersen la llum.

Així doncs, a la gràfica es pot observar com el complex de la pepsina és el que forma un major nombre d'agregats, seguida de la α -sinucleïna, la catalasa i, finalment, la α -quimotripsina i la HEWL que, com havíem pogut veure a les micrografies AFM, els complexos d'aquestes

4.6 Estudi de RMN del complex amb l' α -sinucleïna

Un cop confirmada la formació del complex entre l' α -sinucleïna i el ful·lerè, aplicarem la RMN per tal d'intentar mapetjar les zones d'unió sobre la seqüència de l' α -sinucleïna. Per aquest experiment, emprarem l' α -sinucleïna marcada isotòpicament amb ¹⁵N, disponible en el grup d'investigació on es va realitzar el treball de fi de grau. Es va adquirir l'espectre ¹⁵N-HSQC de l' α -sinucleïna abans i després de formar el complex. Els espectres es varen adquirir en tampó fosfat 20 mM (pH 7.4) i emprant una concentració salina de 150 mM. Malgrat aquestes condicions experimentals no eren les millors per formar el complex, es va decidir emprar-les, ja que l'assignament de RMN disponible per l' α -sinucleïna s'havia realitzat en aquestes condicions.

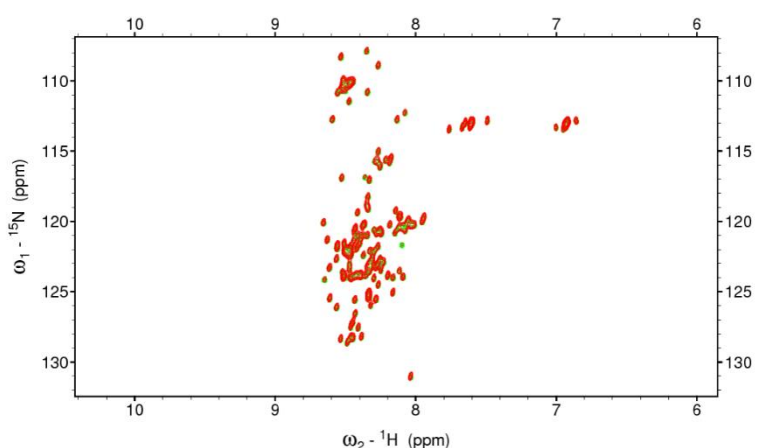


Figura 25 RMN HSQC solapat de la α -sinucleïna nativa (senyals vermelles) i el complex proteïna-ful·lerè (senyals verdes)

El solapament de l'espectre HSQC de l' α -sinucleïna nativa amb el de l' α -sinucleïna acomplexada amb el ful·lerè (figura 25), mostrà un solapament casi perfecte i a priori, no s'observaren diferències apreciables.

Aquesta comparació, i l'estudi de la pertorbació química que la complexació induïx damunt cada residu (figura 26); estudiat mitjançant l'aplicació de l'equació 1), demostraren que la complexació pràcticament no pertorba les senyals espectroscòpiques, o bé la formació del complex es tan subtil que està per davall del límit de detecció de la RMN. Amb aquests resultats no es pot definir una zona de interacció clara, predominant per la unió del ful·lerè. Per estar segurs, s'hauria de tornar a repetir l'estudi emprant aigua Mili-Q (en absència de tampó), però per qüestions de temps aquest experiment no s'ha pogut realitzar dins el context d'aquest treball de fi de grau.

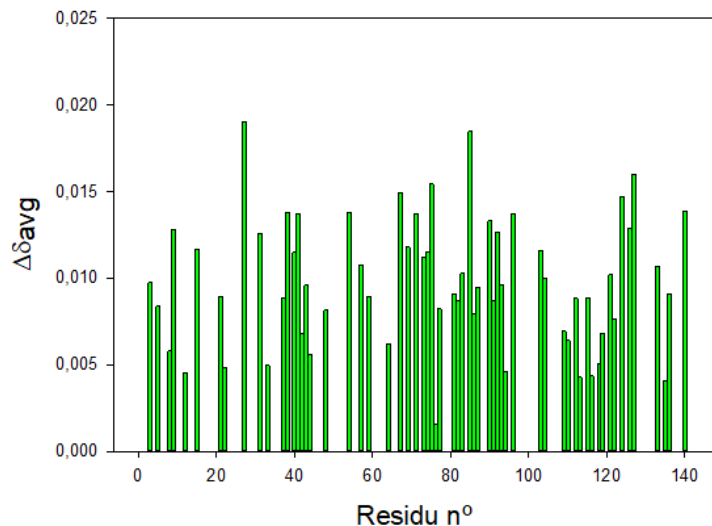
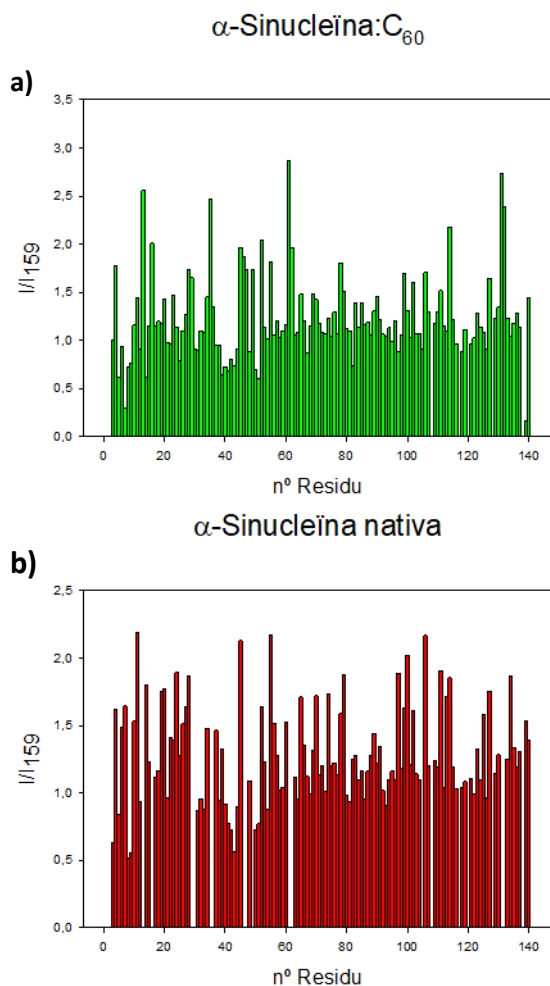


Figura 26 Desviació promig dels residus de l' α -syn amb el C₆₀



Finalment, realitzarem un darrer estudi que ens permetés detectar una zona d'interacció entre la α -sinucleïna i el ful·lerè.

Així doncs, es prengueren les intensitats dels pics assignats als espectres RMN de l' α -sinucleïna nativa i acomplexada, i es determinà el seu quocient en front a la intensitat d'una senyal de referència: la senyal 159 atribuïda a alguna de les cadenes laterals de la proteïna. Comparant les diferències entre els quocients d'intensitat del complex i el de la proteïna lliure, podríem detectar una zona d'interacció.

A la figura 27 es presenten les gràfiques del quocient per el complex i la proteïna lliure (figura 27 a,b), i la diferència entre ambdues, seguint l'equació 2 (figura 27 c). Com es pot apreciar en aquesta darrera, pareix que l'extrem N-terminal de la α -sinucleïna és el que presenta una major variació (tot i que molt lleugera) en el quocient d'intensitats i, tal vegada sigui la regió més probable d'unió amb el ful·lerè. També es pot veure com, després d'aquest, l'extrem C-terminal presenta una variació menor a certs residus puntuals i, finalment, la part central de la proteïna no pareix presentar tal variació significativa.

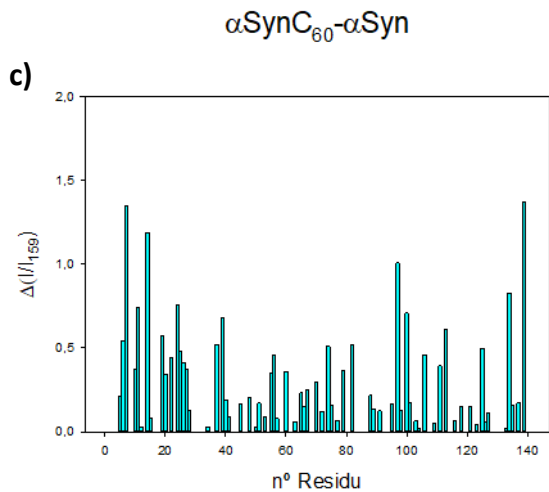


Figura 27 a) Quocient intensitat de les senyals dels residus respecte a la senyal 159 (cadena lateral) per al complex; b) per la α -sinucleïna nativa; c) diferències entre ambdós

De totes formes, com s'havia esmentat abans, caldria repetir els estudis amb condicions més favorables per la formació del complex i obtenir altres resultats per discutir que tal vegada fossin més clars.

4.7 Estudi de l'agregació de l' α -sinucleïna en presència de ful·lerè

Recentment, es publicà un estudi³⁴ on es demostrava que els Graphene Quantum Dots (GQDs) prevenien la formació dels agregats fibril·lars d' α -sinucleïna, presents en els cossos de Lewis. Un cop format el complex amb el ful·lerè, realitzarem un estudi per veure si la formació d'aquest complex, inhibia o afavoria la formació de fibres amiloides. Per això es va emprar la tioflavina T, la qual experimenta un canvi en el seu espectre d'emissió fluorescent en presència d'agregats amiloides. Per fer aquest experiment prenguérem dues mostres d' α -sinucleïna de concentració 50 μM . Amb una d'elles formarem el complex amb el ful·lerè i després, ambdues mostres foren incubades a 37°C i en agitació, en presència de tioflavina T. Els corresponents espectres d'emissió foren adquirits cada 20 minuts durant 100h. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 28. Com es pot veure, l' α -sinucleïna lliure arriba a un màxim d'intensitat de fluorescència a les 65 hores, mentre que l' α -sinucleïna complexada amb el ful·lerè, no pareix formar fibres amiloides en el període d'incubació estudiat. A més, per corroborar-ho, es prengueren alíquotes d'ambdues mostres i foren estudiades per microscòpia de forces atòmiques (figura 29).

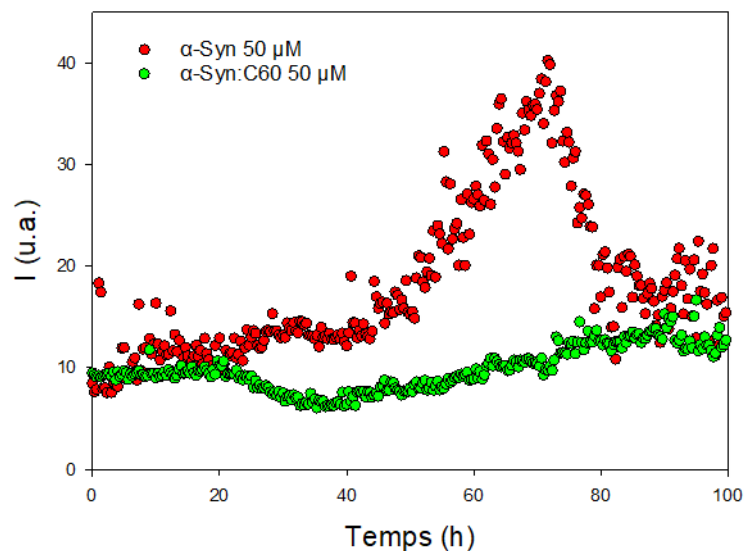


Figura 28 Representació de la intensitat de fluorescència als 485 nm en funció del temps per la α -sinucleïna lliure i complexada

A les imatges resultants, es pot veure com la proteïna lliure forma un major nombre d'agregats tot i que no s'arriba a apreciar la morfologia fibril·lar. Així doncs, tot i que les dades de l'assaig cinètic pareixen sòlides, caldria repetir-lo modificant el mètode d'agregació, aplicant una agitació de 1000 rpm per augmentar la pensió a formar les fibres i tenir resultats més sòlids.

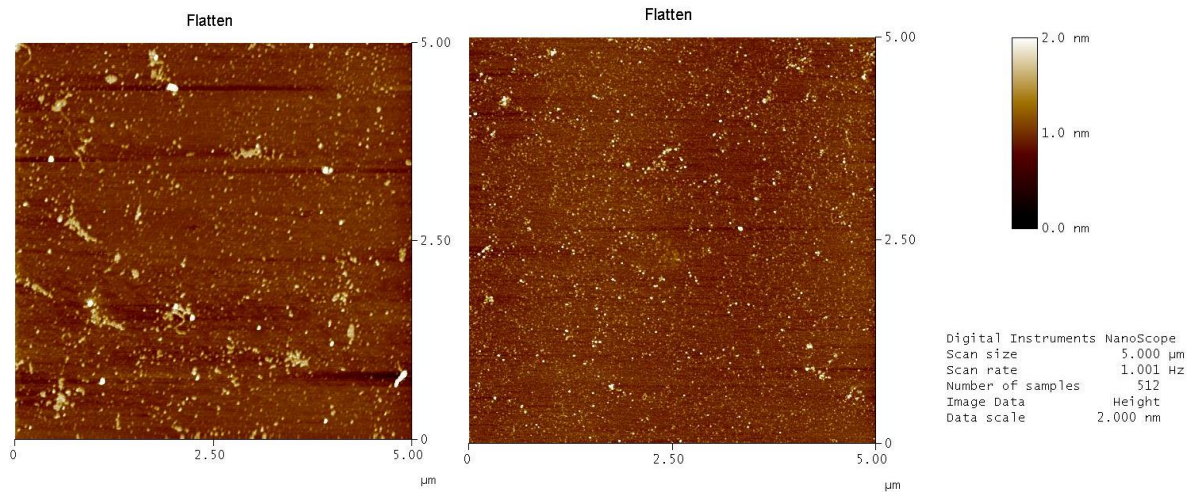


Figura 29 Esquerra, mostra d' α -sinucleïna després de l'assaig cinètic; dreta, mostra del complex α -sinucleïna – ful·lerè després de l'assaig cinètic.

4.8 Proposta de mecanisme d'agregació dels complexos proteïna-ful·lerè

Una hipòtesi que podríem plantejar per intentar donar una explicació mecànica als resultats experimentals obtinguts, seria la basada en un model d'agregació, on el ful·lerè, degut a la seva hidrofobicitat, sigui capaç d'agrupar-se i precipitar en dissolució. No obstant, el ful·lerè complexat podria retenir aquesta tendència amb altres molècules de ful·lerè lliure o complexat, resultant en agregats proteics de gran mida. Això seria molt dependent de la zona d'unió del ful·lerè a la proteïna: com més superficial, més exposat a l'exterior, més tendència a aquesta agregació; en canvi, el ful·lerè lligat a una zona interna proteica, oculta de l'exterior tindria una menor tendència (figura 30).

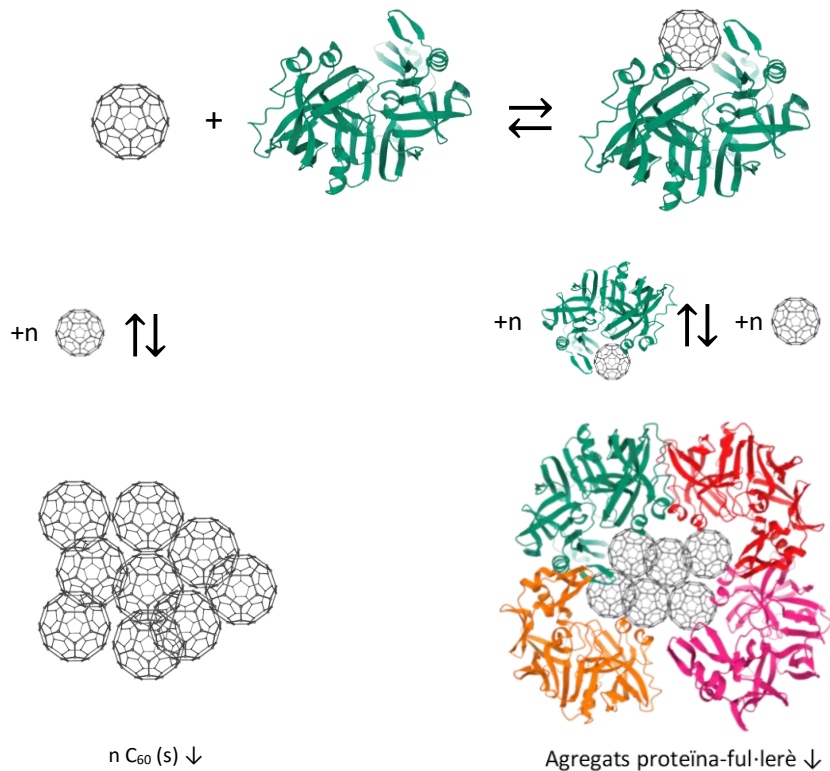


Figura 30 Esquema d'agregació d'un sistema model·lic pepsina-ful·lerè C₆₀

5. CONCLUSIONS

En aquest estudi s'ha treballat en profunditat en la capacitat del ful·lerè C_{60} per actuar com a lligand per distintes proteïnes amb diferències estructurals i funcionals significatives. S'ha vist com el ful·lerè pot unir-se a proteïnes diferents, fet que afecta a les seves característiques físico-químiques. S'ha vist també com les condicions del medi afecten considerablement a la formació del complex i gràcies a aquests estudis, hem pogut descriure també l'efecte negatiu que tenen els residus hidrofílics per la formació del mateix. És possible que aquest fet sigui a causa de la més favorable interacció dels residus carregats amb ions del medi o amb altres residus carregats que amb les possibles interaccions amb el ful·lerè. D'altra banda, podria ésser que, a més de les interaccions de dispersió que es donen a tots els sistemes aminoàcid-ful·lerè; els aminoàcids carregats disposin de interaccions π -catiò ò π -anió que estabilitzin la seva interacció. Aquesta hipòtesi explicaria el motiu pel qual, aquests aminoàcids són els preferents per formar la interacció amb el ful·lerè, en el cas de que altres interaccions més favorables no els hi siguin disponibles.

Atesa la poca estabilitat que mostren aquests complexos, la comprensió de les seves propietats biològiques necessita la realització d'estudis *in vivo* per veure el comportament de les nanopartícules de ful·lerè, dels complexos proteïna-ful·lerè que es formen i dels agregats formats arran de la seva evolució.

A certs estudis ja publicats⁷¹⁻⁷³, s'ha pogut descriure com el ful·lerè és capaç de creuar certes barreres hidrofòbiques com les membranes plasmàtiques o la barrera hematoencefàlica (B.B.B.), aspecte que li confereix un gran potencial per poder ésser aplicat en el camp de la farmacologia. Gràcies a la química que s'està desenrotllant emprant com a base el ful·lerè; aquest compost i els seus derivats, podrien tenir un gran potencial com a transportador farmacològic. El possible potencial del ful·lerè dins el camp de la biomedicina requereix un esforç d'investigació addicional que tal vegada pugui ser compensat per les seves possibles utilitats en un futur no molt distant.

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Tsukada, H.; Blow, D. M. Structure of α -Chymotrypsin Refined at 1.68 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1985**, *184* (4), 703–711. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90314-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90314-6).
- (2) Marshall, A.; Keiller, B.; Pederick, J.; Abell, A.; Bruning, J. Crystal Structure of Bovine Alpha-Chymotrypsin in Space Group P65. *Crystals* **2018**, *8* (12), 460. <https://doi.org/10.3390/cryst8120460>.
- (3) Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M. α -Synuclein in Lewy Bodies [8]. *Nature*. Nature Publishing Group 1997, pp 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>.
- (4) Dauer, W.; Przedborski, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*. Cell Press September 11, 2003, pp 889–909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3).
- (5) Davidson, W. S.; Jonas, A.; Clayton, D. F.; George, J. M. Stabilization of α -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (16), 9443–9449. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9443>.
- (6) Balupuri, A.; Choi, K. E.; Kang, N. S. Computational Insights into the Role of α -Strand/Sheet in Aggregation of α -Synuclein. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37276-1>.
- (7) Ulmer, T. S.; Bax, A.; Cole, N. B.; Nussbaum, R. L. Structure and Dynamics of Micelle-Bound Human α -Synuclein. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (10), 9595–9603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411805200>.
- (8) Guerrero-Ferreira, R.; Taylor, N. M. I.; Mona, D.; Ringler, P.; Lauer, M. E.; Riek, R.; Britschgi, M.; Stahlberg, H. Cryo-EM Structure of Alpha-Synuclein Fibrils. *Elife* **2018**, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.36402>.
- (9) Ko, T. P.; Day, J.; Malkin, A. J.; McPherson, A. Structure of Orthorhombic Crystals of Beef Liver Catalase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1999**, *55* (8), 1383–1394.

<https://doi.org/10.1107/S0907444999007052>.

- (10) BRENDA - Information on EC 1.11.1.6 - catalase <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.11.1.6#> (accessed Jul 7, 2020).
- (11) Walsh, M. A.; Schneider, T. R.; Sieker, L. C.; Dauter, Z.; Lamzin, V. S.; Wilson, K. S. Refinement of Triclinic Hen Egg-White Lysozyme at Atomic Resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1998**, *54* (4), 522–546. <https://doi.org/10.1107/S0907444997013656>.
- (12) Ar, V. R. S. *Crystallographic Studies of the Activity of Hen Egg-White Lysozyme*.
- (13) Booth, D. R.; Sundetll, M.; Bellotti, V.; Robinson+, C. V; Hutchinson, W. L.; Fraser, P. E.; Hawkins, P. N.; Dobson+, C. M.; Radford+~, S. E.; Blaket, C. C. F.; Pepys, M. B. *Instability, Unfolding and Aggregation of Human Lysozyme Variants Underlying Amyloid Fibrillogenesis*.
- (14) Frare, E.; Poverino de Laureto, P.; Zurdo, J.; Dobson, C. M.; Fontana, A. A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.056>.
- (15) Sivalingam, V.; Prasanna, N. L.; Sharma, N.; Prasad, A.; Patel, B. K. Wild-Type Hen Egg White Lysozyme Aggregation in Vitro Can Form Self-Seeding Amyloid Conformational Variants. **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.09.009>.
- (16) Calvaresi, M.; Arnesano, F.; Bonacchi, S.; Bottoni, A.; Calò, V.; Conte, S.; Falini, G.; Fermani, S.; Losacco, M.; Montalti, M.; Natile, G.; Prodi, L.; Sparla, F.; Zerbetto, F. C60@Lysozyme: Direct Observation by Nuclear Magnetic Resonance of a 1:1 Fullerene Protein Adduct. *ACS Nano* **2014**, *8* (2), 1871–1877. <https://doi.org/10.1021/nn4063374>.
- (17) Cooper, J. B.; Khan, G.; Taylor, G.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L. X-Ray Analyses of Aspartic Proteinases. II. Three-Dimensional Structure of the Hexagonal Crystal Form of Porcine Pepsin at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214* (1), 199–222. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90156-G](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90156-G).
- (18) Fujinaga, M.; Chernaia, M. M.; Mosimann, S. C.; James, M. N. G.; Tarasova, N. I. Crystal Structure of Human Pepsin and Its Complex with Pepstatin. *Protein Sci.* **2008**, *4* (5), 960–972. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040516>.
- (19) Sielecki, A. R.; Fedorov, A. A.; Boodhoo, A.; Andreeva, N. S.; James, M. N. G. Molecular and Crystal Structures of Monoclinic Porcine Pepsin Refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214* (1), 143–170. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90153-D](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90153-D).
- (20) FOLTMANN; B. Gastric Proteinases-Structure, Function, Evolution and Mechanism of Action. *Essays Biochem.* **1981**, *17*, 52–84.
- (21) Dunn, B. M. Structure and Mechanism of the Pepsin-like Family of Aspartic Peptidases. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (12), 4431–4458. <https://doi.org/10.1021/cr010167q>.
- (22) Krätschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R. Solid C60: A New Form of Carbon. *Nature* **1990**, *347* (6291), 354–358. <https://doi.org/10.1038/347354a0>.
- (23) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, *318* (6042), 162–163. <https://doi.org/10.1038/318162a0>.
- (24) Lim, C.-S.; Hong, K.; Ko, W. B. *Reactions and Properties of Fullerene (C 60)*; 2010; Vol. 45.
- (25) Tajima, Y.; Takeshi, K.; Shigemitsu, Y.; Numata, Y. Chemistry of Fullerene Epoxides: Synthesis, Structure, and Nucleophilic Substitution-Addition Reactivity. *Molecules* **2012**, *17* (6), 6395–6414. <https://doi.org/10.3390/molecules17066395>.
- (26) Nair, V.; Sethumadhavan, D.; Sheela, K. C.; Eigendorf, G. K. Cycloaddition Reactions of Carbonyl Ylides to [60] Fullerene: Synthesis of Novel C60 Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (27), 5087–5090. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)00988-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)00988-0).
- (27) Volpin, M.; ... V. R.-M.; 1996, undefined. Aminoacid and Peptid Derivatives of Fullerene-60 and Investigation of Their Properties. ... *BREACH SCI PUBL LTD C/O STBS*

- (28) V.S. Romanova, V. A. T. Y. L. Z. N. P. M. E. V. Addition of Amino Acids and Dipeptides to Fullerene C60 Giving Rise to Monoadducts. *Russ. Chem. Bull.* **1994**, *6*, 1090–1091.
- (29) Yamskova, O. V.; Kolyagin, Y. G.; Romanova, V. S.; Egorov, A. S.; Kurilov, D. V.; Yamskov, I. A.; Zubareva, N. D.; Kustov, L. M. Solid-State NMR of C60 Amino Acid Derivatives. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2019**, *93* (2), 308–310. <https://doi.org/10.1134/S0036024419020328>.
- (30) Dugan, L. L.; Turetsky, D. M.; Du, C.; Lobner, D.; Wheeler, M.; Almlı, C. R.; Shen, C. K. F.; Luh, T. Y.; Choi, D. W.; Lin, T. S. Carboxyfullerenes as Neuroprotective Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (17), 9434–9439. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9434>.
- (31) Lin, W.; Insley, T.; Tuttle, M. D.; Zhu, L.; Berthold, D. A.; Král, P.; Rienstra, C. M.; Murphy, C. J. Control of Protein Orientation on Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (36), 21035–21043. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b07701>.
- (32) Wang, M.; Sun, Y.; Cao, X.; Peng, G.; Javed, I.; Kakinen, A.; Davis, T. P.; Lin, S.; Liu, J.; Ding, F.; Ke, P. C. Graphene Quantum Dots against Human IAPP Aggregation and Toxicity: In Vivo. *Nanoscale* **2018**, *10* (42), 19995–20006. <https://doi.org/10.1039/c8nr07180b>.
- (33) Alvarez, Y. D.; Fauerbach, J. A.; Pellegrotti, J. V.; Jovin, T. M.; Jares-Erijman, E. A.; Stefani, F. D. Influence of Gold Nanoparticles on the Kinetics of Alpha-Synuclein Aggregation. *Biophys. J.* **2014**, *106* (2), 257a-258a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.1513>.
- (34) Kim, D.; Yoo, J. M.; Hwang, H.; Lee, J.; Lee, S. H.; Yun, S. P.; Park, M. J.; Lee, M. J.; Choi, S.; Kwon, S. H.; Lee, S.; Kwon, S. H.; Kim, S.; Park, Y. J.; Kinoshita, M.; Lee, Y. H.; Shin, S.; Paik, S. R.; Lee, S. J.; Lee, S.; Hong, B. H.; Ko, H. S. Graphene Quantum Dots Prevent α -Synucleinopathy in Parkinson's Disease. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13* (9), 812–818. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0179-y>.
- (35) Bosı, S.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Prato, M. Fullerene Derivatives: An Attractive Tool for Biological Applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS November 1, 2003, pp 913–923. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2003.09.005>.
- (36) Vorobyov, V.; Kaptsov, V.; Gordon, R.; Makarova, E.; Podolski, I.; Sengpiel, F. Neuroprotective Effects of Hydrated Fullerene C60: Cortical and Hippocampal EEG Interplay in an Amyloid-Infused Rat Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *45* (1), 217–233. <https://doi.org/10.3233/JAD-142469>.
- (37) Jin, H.; Chen, W. Q.; Tang, X. W.; Chiang, L. Y.; Yang, C. Y.; Schloss, J. V.; Wu, J. Y. Polyhydroxylated C60, Fullerenols, as Glutamate Receptor Antagonists and Neuroprotective Agents. *J. Neurosci. Res.* **2000**, *62* (4), 600–607. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20001115\)62:4<600::AID-JNR15>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20001115)62:4<600::AID-JNR15>3.0.CO;2-F).
- (38) Tong, J.; Zimmerman, M. C.; Li, S.; Yi, X.; Luxenhofer, R.; Jordan, R.; Kabanov, A. V. Neuronal Uptake and Intracellular Superoxide Scavenging of a Fullerene (C 60)-Poly(2-Oxazoline)s Nanoformulation. *Biomaterials* **2011**, *32* (14), 3654–3665. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.068>.
- (39) Makarova, E. G.; Gordon, R. Y.; Podolski, I. Y. Fullerene C 60 Prevents Neurotoxicity Induced by Intrahippocampal Microinjection of Amyloid- β Peptide. In *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*; J Nanosci Nanotechnol, 2012; Vol. 12, pp 119–126. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5709>.
- (40) Tsao, N.; Luh, T.-Y.; Chou, C.-K.; Chang, T.-Y.; Wu, J.-J.; Liu, C.-C.; Lei, H.-Y. In Vitro Action of Carboxyfullerene. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49* (4), 641–649. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.641>.
- (41) Tokuyama, H.; Yamago, S.; Nakamura, E.; Shiraki, T.; Sugiura, Y. Photoinduced Biochemical Activity of Fullerene Carboxylic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (17), 7918–7919. <https://doi.org/10.1021/ja00070a064>.
- (42) Ho Park, K.; Chhowalla, M.; Iqbal, Z.; Sesti, F. Single-Walled Carbon Nanotubes Are a New Class of Ion Channel Blockers*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (50), 50212–50216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310216200>.

- (43) Wolff, D. J.; Barbieri, C. M.; Richardson, C. F.; Schuster, D. I.; Wilson, S. R. Trisamine C60-Fullerene Adducts Inhibit Neuronal Nitric Oxide Synthase by Acting as Highly Potent Calmodulin Antagonists. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *399* (2), 130–141. <https://doi.org/10.1006/abbi.2002.2766>.
- (44) Mashino, T.; Okuda, K.; Hirota, T.; Hirobe, M.; Nagano, T.; Mochizuki, M. Inhibitory Effect of Fullerene Derivatives on Glutathione Reductase. *Fuller. Sci. Technol.* **2001**, *9* (2), 191–196. <https://doi.org/10.1081/FST-100102966>.
- (45) Friedman, S. H.; DeCamp, D. L.; Kenyon, G. L.; Sijbesma, R. P.; Srdanov, G.; Wudl, F. Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (15), 6506–6509. <https://doi.org/10.1021/ja00068a005>.
- (46) Luca Marcorin, G.; Da Ros, T.; Castellano, S.; Stefancich, G.; Bonin, I.; Miertus, S.; Prato, M. Design and Synthesis of Novel [60]Fullerene Derivatives as Potential HIV Aspartic Protease Inhibitors. *Org. Lett.* **2000**, *2* (25), 3955–3957. <https://doi.org/10.1021/ol000217y>.
- (47) Schuster, D. I.; Wilson, S. R.; Schinazi, R. F. Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cytotoxicity of Derivatized Buckminsterfullerenes. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (11), 1253–1256. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00210-7](https://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00210-7).
- (48) Sijbesma, R.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Castoro, J. A.; Wilkins, C.; Friedman, S. H.; DeCamp, D. L.; Kenyon, G. L. Synthesis of a Fullerene Derivative for the Inhibition of HIV Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (15), 6510–6512. <https://doi.org/10.1021/ja00068a006>.
- (49) Kim, J. E.; Lee, M. Fullerene Inhibits β -Amyloid Peptide Aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303* (2), 576–579. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00393-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00393-0).
- (50) Braden, B. C.; Goldbaum, F. A.; Chen, B. X.; Kirschner, A. N.; Wilson, S. R.; Erlanger, B. F. X-Ray Crystal Structure of an Anti-Buckminsterfullerene Antibody Fab Fragment: Biomolecular Recognition of C60. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (22), 12193–12197. <https://doi.org/10.1073/pnas.210396197>.
- (51) Chen, B.-X.; Wilson, S. R.; Das, M.; Coughlin, D. J.; Erlanger, B. F. *Antigenicity of Fullerenes: Antibodies Specific for Fullerenes and Their Characteristics*; 1998; Vol. 95.
- (52) Pastorin, G.; Marchesan, S.; Hoebeke, J.; Da Ros, T.; Ehret-Sabatier, L.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A. Design and Activity of Cationic Fullerene Derivatives as Inhibitors of Acetylcholinesterase. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (13), 2556–2562. <https://doi.org/10.1039/b604361e>.
- (53) Belgorodsky, B.; Fadeev, L.; Ittah, V.; Benyamini, H.; Zelner, S.; Huppert, D.; Kotlyar, A. B.; Gozin, M. Formation and Characterization of Stable Human Serum Albumin-Tris-Malonic Acid [C60]Fullerene Complex. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (5), 1058–1062. <https://doi.org/10.1021/bc050103c>.
- (54) Rozhkov, S. P.; Goryunov, A. S.; Sukhanova, G. A.; Borisova, A. G.; Rozhkova, N. N.; Andrievsky, G. V. Protein Interaction with Hydrated C60 Fullerene in Aqueous Solutions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303* (2), 562–566. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00392-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00392-9).
- (55) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (56) Protein Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US, 2006; pp 529–575. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_16.
- (57) Sun, Y. P.; Lawson, G. E.; Huang, W.; Wright, A. D.; Moton, D. K. Preparation and Characterization of Highly Water-Soluble Pendant Fullerene Polymers. *Macromolecules* **1999**, *32* (26), 8747–8752. <https://doi.org/10.1021/ma9906736>.
- (58) Prabha, C. R.; Patel, R.; Murthy, C. N. Studies on Protein - [60]Fullerene Interactions: The Lysozyme - [60]Fullerene Model System. *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures* **2004**, *12* (1–2), 405–412. <https://doi.org/10.1081/FST-120027199>.
- (59) Di Giosia, M.; Bomans, P. H. H.; Bottoni, A.; Cantelli, A.; Falini, G.; Franchi, P.; Guarracino, G.; Friedrich, H.; Lucarini, M.; Paolucci, F.; Rapino, S.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Soldà, A.; Valle, F.;

- Zerbetto, F.; Calvaresi, M. Proteins as Supramolecular Hosts for C60: A True Solution of C60 in Water. *Nanoscale* **2018**, *10* (21), 9908–9916. <https://doi.org/10.1039/c8nr02220h>.
- (60) Gieldoń, A.; Witt, M. M.; Gajewicz, A.; Puzyn, T. Rapid Insight into C60 Influence on Biological Functions of Proteins. *Struct. Chem.* **2017**, *28* (6), 1775–1788. <https://doi.org/10.1007/s11224-017-0957-4>.
- (61) Benyamini, H.; Shulman-Peleg, A.; Wolfson, H. J.; Belgorodsky, B.; Fadeev, L.; Gozin, M. Interaction of C60-Fullerene and Carboxyfullerene with Proteins: Docking and Binding Site Alignment. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17* (2), 378–386. <https://doi.org/10.1021/bc050299g>.
- (62) Soldà, A.; Cantelli, A.; Di Giosia, M.; Montalti, M.; Zerbetto, F.; Rapino, S.; Calvaresi, M. C60@lysozyme: A New Photosensitizing Agent for Photodynamic Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (32), 6608–6615. <https://doi.org/10.1039/c7tb00800g>.
- (63) Pradhan, S.; Rajamani, S.; Agrawal, G.; Dash, M.; Samal, S. K. NMR, FT-IR and Raman Characterization of Biomaterials. In *Characterization of Polymeric Biomaterials*; Elsevier, 2017; pp 147–173. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00007-8>.
- (64) Chirayil, C. J.; Abraham, J.; Mishra, R. K.; George, S. C.; Thomas, S. Instrumental Techniques for the Characterization of Nanoparticles. In *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*; Elsevier, 2017; Vol. 3, pp 1–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00001-3>.
- (65) Szakács, Z.; Sánta, Z. NMR Methodological Overview. In *Anthropic Awareness: The Human Aspects of Scientific Thinking in NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry*; Elsevier Inc., 2015; pp 257–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419963-7.00007-9>.
- (66) Sinha Ray, S. Structure and Morphology Characterization Techniques. In *Clay-Containing Polymer Nanocomposites*; Elsevier, 2013; pp 39–66. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59437-2.00003-x>.
- (67) Zeng, C.; Vitale-Sullivan, C.; Ma, X. In Situ Atomic Force Microscopy Studies on Nucleation and Self-Assembly of Biogenic and Bio-Inspired Materials. *Minerals*. MDPI AG September 1, 2017, p 158. <https://doi.org/10.3390/min7090158>.
- (68) Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S. Mechanism of Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils. *J. Struct. Biol.* **2005**, *151* (3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.006>.
- (69) Woods, A. S.; Ferré, S. Amazing Stability of the Arginine-Phosphate Electrostatic Interaction. *J. Proteome Res.* **2005**, *4* (4), 1397–1402. <https://doi.org/10.1021/pr050077s>.
- (70) Woods, A. S. The Mighty Arginine, the Stable Quaternary Amines, the Powerful Aromatics, and the Aggressive Phosphate: Their Role in the Noncovalent Minuet. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (3), 478–484. <https://doi.org/10.1021/pr034091l>.
- (71) Kotelnikova, R. A.; Bogdanov, G. N.; Frog, E. C.; Kotelnikov, A. I.; Shtolko, V. N.; Romanova, V. S.; Andreev, S. M.; Kushch, A. A.; Fedorova, N. E.; Medzhidova, A. A.; Miller, G. G. Nanobionics of Pharmacologically Active Derivatives of Fullerene C 60. *J. Nanoparticle Res.* **2003**, *5* (5–6), 561–566. <https://doi.org/10.1023/B:NANO.0000006070.61144.93>.
- (72) R.A. Kotelnikova, A. I. K. G. N. B. V. S. R. E. F. K. Z. N. P. M. E. V. Membranotropic Properties of Water Soluble Amino Acid and Peptide Derivatives of Fullerene C60. *FEBS Lett.* **1996**, *389*, 111–114.
- (73) Andreev, I.; Petrukhina, A.; Garmanova, A.; Babakhin, A.; Andreev, S.; Romanova, V.; Troshin, P.; Troshina, O.; DuBuske, L. Penetration of Fullerene C60 Derivatives through Biological Membranes. *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures* **2008**, *16* (2), 89–102. <https://doi.org/10.1080/15363830701885831>.
- (74) Almeida, P. *Proteins: Concepts in Biochemistry*; Almeida, P., Ed.; Garland Science: New York, 2016.