

Recenti applicazioni della luminescenza in campo biomedico, ambientale e tossicologico

di Aldo Roda, Massimo Guardigli, Patrizia Pasini, Mara Mirasoli, Elisa Michelini

Le tecniche di luminescenza, in particolare la bio- e chemiluminescenza, rappresentano uno strumento versatile, utilizzato in svariati settori, quali biologia molecolare, biotecnologie, farmacologia, chimica clinica ed ambientale. Questo articolo descrive alcune applicazioni analitiche di queste tecniche, comprendendo quelle più recenti ed innovative basate su processi di trasferimento di energia (Bret, Bioluminescence Resonance Energy Transfer) e su microrganismi geneticamente modificati.

Il fenomeno della luminescenza, cioè l'emissione di luce da parte di una molecola, ha affascinato l'umanità fin dall'antichità. Già 2.300 anni fa Aristotele osservava che molte creature (luciole) producevano "fuoco" solo in certi periodi dell'anno in funzione del vento, e che il "fuoco del mare" era prodotto da organismi viventi.

I primi studi sui processi luminescenti effettuati con un certo rigore scientifico risalgono all'inizio del Seicento, all'epoca in cui gli alchimisti erano alla ricerca della cosiddetta "Pietra Filosofale", in grado di trasformare i metalli vili in oro. Nel 1602 a Bologna, Vincenzo Casciarolo, un calzolaio ed alchimista dilettante, descrisse per primo un metodo per ottenere la cosiddetta "Pietra Bolognese", che possedeva la proprietà "magica" di "accumulare luce" quando esposta al sole e rimetterla al buio. Alla stessa epoca risalgono anche le prime osservazioni sul fenomeno della bioluminescenza: nel 1605 il filosofo inglese Francis Bacon scriveva: "...la caratteristica di produrre luce non è prerogativa solo del fuoco... le gocce di acqua (di mare) spruzzate quando un remo colpisce l'acqua appaiono scintillanti e luminose...". Alcuni anni dopo, nel 1637, il filosofo francese René Descartes osservava: "...quando viene agitata l'acqua produce scintille simili a quelle emesse da un frammento di pietra focaia". Il fenomeno della bioluminescenza ha affascinato anche famosi scrittori, come Giulio Verne: "...Il mare appariva come illuminato da sotto la superficie dell'acqua, ma non era un semplice fenomeno di fosforescenza: su questo non ci si poteva sbagliare. Era il mostro che, immerso per qualche metro, proiettava quel chiarore intenso e inspiegabile di cui parlavano i rapporti di tanti comandanti di navi e che solo un organo di eccezionale potenza poteva emettere. La luminescenza disegnava sul mare un grande ovale al cui centro sembrava bruciare un falò che andava gradatamente attenuandosi verso le estre-

A. Roda, M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna. aldo.roda@unibo.it

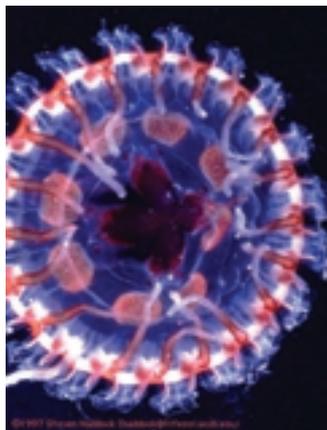


Figura 1 - Quando viene disturbata, la medusa *Atolla vanhoeffeni* (diametro approssimativo 3 cm) produce un'intensa bioluminescenza. Questa medusa si può trovare a grande profondità in molti mari del mondo. Riprodotto su autorizzazione dal riferimento bibliografico [2]

mità. - Può essere un agglomerato di piccoli animali marini fosforescenti - osservò un ufficiale..." (20000 Leghe sotto i mari). Oggi sappiamo che la "Pietra Bolognese" è costituita da barite (solfato di bario) e che il fenomeno osservato da Vincenzo Casciarolo era una fosforescenza di tipo inorganico, mentre Francis Bacon e René Descartes hanno descritto la bioluminescenza di certi microrganismi marini. Comunque, il fatto di conoscere l'origine di questi fenomeni non diminuisce certo il loro fascino.

Reazioni bio- e chemiluminescenti

La forma più nota di luminescenza è certamente quella conseguente all'assorbimento di luce (fotoluminescenza), della quale la fluorescenza è l'esempio più comune. Meno conosciuta è la chemiluminescenza (CL), cioè la luminescenza derivante da un processo chimico esoergonico che porta alla formazione di un prodotto in uno stato elettronicamente eccitato, il quale decade allo stato fondamentale emettendo fotoni. All'interno della chemiluminescenza, la bioluminescenza (BL) è sempre causata da un processo chimico ma avviene in organismi viventi e coinvolge enzimi o fotoproteine.

Il fenomeno della bioluminescenza è ampiamente diffuso in natura, sia in organismi marini quali batteri, alghe, meduse (Figura 1), crostacei e pesci, sia in organismi terrestri come le luciole ed alcune specie di vermi e funghi [1, 2]. Negli anni recenti sono stati effettuati studi approfonditi sul processo della bioluminescenza, che hanno permesso di acquisire importanti conoscenze sia sui meccanismi della bioluminescenza e sulle specie chimiche in essa coinvolte sia sulla sua funzione negli organismi viventi. Essa coinvolge in genere almeno due specie: un enzima (luciferasi) che catalizza la reazione bioluminescente ed un opportuno substrato enzimatico, genericamente indicato come luciferina (Figura 2). La luciferasi catalizza la reazione responsabile del processo di bioluminescenza.

za in modo da ottenere preferenzialmente un prodotto in uno stato elettronicamente eccitato; inoltre, il sito attivo dell'enzima determina un microambiente in grado di favorire il decadimento radiativo dello stato eccitato. Come risultato del controllo operato dall'enzima sul decorso della reazione, le rese quantiche di emissione delle reazioni bioluminescenti sono in genere molto più alte di quelle delle reazioni chemiluminescenti, raggiungendo talvolta valori vicini all'unità.

La bioluminescenza può presentarsi in un ampio intervallo di colori, che spesso sono determinati dalle caratteristiche dell'ambiente: negli organismi marini la bioluminescenza è prevalentemente di colore blu, poiché le radiazioni di questa lunghezza d'onda si propagano a maggiori distanze nell'acqua. Gli organismi viventi ricorrono a metodi ingegnosi per modificare la lunghezza d'onda della radiazione emessa, ed alcuni sono in grado di emettere contemporaneamente bioluminescenza di due differenti colori. Ad esempio, il verme *Phrixothrix hirtus* possiede organi luminosi distinti caratterizzati da bioluminescenze di colore rosso e verde. Il colore della bioluminescenza è spesso determinato dalla struttura delle luciferasi coinvolte nel processo: piccole variazioni strutturali di tali proteine sono in grado di determinare differenze significative nella lunghezza d'onda di emissione. In altri casi il colore della bioluminescenza viene modificato attraverso l'uso di proteine fluorescenti accessorie, che permettono di aumentare la lunghezza d'onda della bioluminescenza a seguito di un processo di trasferimento di energia, o mediante l'uso di filtri interni che assorbono selettivamente alcune lunghezze d'onda [3].

La luminescenza in chimica analitica

Dal punto di vista chimico-analitico la luminescenza rappresenta uno strumento fondamentale e molto versatile per lo sviluppo di metodologie analitiche sensibili e specifiche, con ampie applicazioni in biomedicina, biotecnologia, biologia molecolare, farmacologia e in chimica ambientale e agroalimentare [4, 5]. I sistemi basati su principi di chemiluminescenza (Figura 2) hanno, ad esempio, quasi completamente rimpiazzato i radioisotopi, quali ³H e ¹²⁵I, largamente utilizzati per oltre trent'anni in chimica clinica per la marcatura e preparazione di traccianti. Storicamente la fotoluminescenza, ed in particolare la fluorescenza, ha rappresentato il primo esempio di metodologia analitica con elevata rivelabilità. Molti fluorofori sono stati sviluppati ed applicati in svariati settori della chimica analitica; basti ricordare il vasto utilizzo della fluorescina e di suoi ana-

loghi in campo immunoistochimico e come traccianti ed il suo ruolo trainante per la ricerca di traccianti sempre più efficienti e selettivi. Sono ormai disponibili nella routine bioanalitica sistemi "microarray" su chip per screening ad elevata produttività analitica in biologia molecolare e genetica. L'accoppiamento della specificità della reazione di ibridazione degli acidi nucleici con l'uso di "probe" fluorescenti con emissione a diverse lunghezze d'onda, e quindi con diversi colori, ha permesso di sviluppare "microarray" di piccole dimensioni basati su una serie di sonde geniche immobilizzate e su "imaging" del segnale fluorescente mediante videocamere Ccd (Charge-coupled device) ad alta sensibilità. Un altro, e forse più ancora importante, avanzamento tecnologico della fluorescenza, è stato la scoperta e la definizione del meccanismo della fluorescenza di proteine, ed in particolare della "Green fluorescent protein" (Gfp) estratta dalla medusa *Aequorea victoria* (Figura 3). Oggi si conosce tutto sulla Gfp, dalla sua sequen-

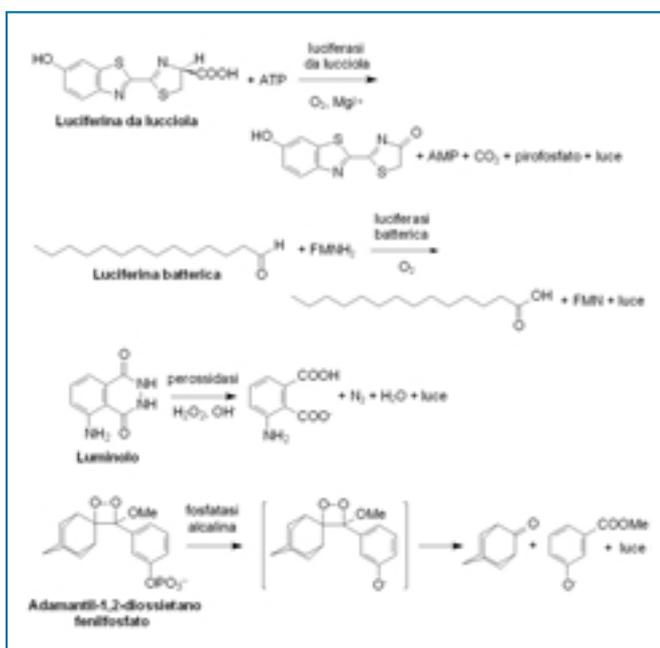


Figura 2 - Rappresentazione schematica di alcune delle più comuni reazioni bio- e chemiluminescenti utilizzate in chimica analitica. Dall'alto in basso: le reazioni responsabili della bioluminescenza delle lucciole e di alcuni batteri marini, l'ossidazione del luminolo catalizzata dall'enzima perossidasi, la reazione di decomposizione di un substrato chemiluminescente (1,2-diossietano arilfosfato) catalizzata dall'enzima fosfatasi alcalina



Figura 3 - La medusa *Aequorea victoria* è probabilmente il più famoso organismo marino bioluminescente. Lo studio di questa medusa ha condotto alla scoperta della Gfp e della fotoproteina equorina. Riprodotto su autorizzazione dal riferimento bibliografico [2]

za amminoacidica alla struttura del sito attivo, e questa proteina è stata clonata ed utilizzata in moltissimi settori della biochimica. È ad esempio possibile mediante tecniche di ingegneria genetica ottenere proteine di fusione contenenti la Gfp e specifiche proteine organo- o organello-specifiche, accoppiando il gene della Gfp ai geni che codificano per le proteine di interesse. La capacità di queste proteine di localizzarsi all'interno di determinati organi od organelli permette di rendere fluorescenti specifici elementi sub-cellulari e di sviluppare affascinanti tecniche istochimiche fluorescenti per lo studio dell'architettura cellulare. La conoscenza della struttura della Gfp ha poi permesso di ottenere forme mutanti della proteina che emettono luce ad altre lunghezze d'onda (giallo, rosso) permettendo lo sviluppo di metodi per lo studio di più analiti o

funzioni biologiche simultaneamente. La principale limitazione per lo sviluppo di metodi fotoluminescenti ultrasensibili è legata al fatto che la fotoeccitazione non è selettiva: molte altre molecole presenti nel campione o nella matrice biologica vengono anch'esse eccitate, dando luogo a processi di autofluorescenza, con conseguente drastica riduzione del segnale analitico "pulito". Sono stati effettuati numerosi tentativi per aumentare la selettività del segnale fluorescente, sviluppando per esempio traccianti con un elevato assorbimento molare e caratterizzati da un elevato spostamento di Stokes, in modo da ottenere un'emissione nel rosso, una zona spettrale dove poche molecole organiche naturali emettono. Tra queste, le più studiate sono le porfirine e le ficobiliproteine: per esempio la ficoeritrina presenta un coefficiente di estinzione molare di $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Tuttavia, la parziale sovrapposizione delle bande degli spettri di eccitazione ed emissione non permette di ottenere la selettività necessaria per abbassare i limiti di rivelazione a valori inferiori a 10^{-15} moli, necessari per la determinazione di molecole di interesse diagnostico o presenti in tracce, quali farmaci e inquinanti ambientali.

Le migliori prestazioni analitiche in termini di rivelabilità dei metodi fotoluminescenti sono state però ottenute sfruttando una originale e interessante proprietà fotofisica di alcuni complessi di metalli di transizione, in particolare i lantanidi. La sorprendente peculiarità di questi complessi consiste nella capacità di assorbire flash di luce ultravioletta di breve durata (ad esempio $\sim 10^{-6}$ sec) e di riemettere la radiazione assorbita ad una lunghezza d'onda nel visibile in un tempo molto più lungo ($\sim 10^{-6}$ - 10^{-3} sec) rispetto a quello caratteristico della fluorescenza delle comuni molecole organiche ($\sim 10^{-9}$ sec).

La misura dell'emissione con un ritardo rispetto all'eccitazione permette quindi di rilevare soltanto la fluorescenza derivante dal complesso dello ione lantanide, con conseguente aumento di selettività rispetto ad una misura in fotoeccitazione costante. Tale tecnica di misura della fluorescenza, definita di fluorescenza risolta nel tempo, ha avuto e continua ad avere notevoli applicazioni nell'ambito della bioanalitica: l'uso di chelati di ioni lantanidi come traccianti per metodi biospecifici di tipo immunologico o genico ha permesso di raggiungere limiti di rivelazione dell'ordine di 10^{-15} - 10^{-18} moli, eguagliando o superando le prestazioni dei metodi basati sull'uso di radiotraccianti.

Va ricordata inoltre un'interessante applicazione della fluorescenza riguardante lo sviluppo di metodi immunologici basati su misure di fluorescenza polarizzata. È noto che una luce

polarizzata eccita solo le molecole che hanno i dipoli paralleli al piano di polarizzazione della luce eccitatrice. La radiazione di fluorescenza emessa dalla molecola eccitata è polarizzata nella stessa direzione, ma se nel tempo intercorso fra l'assorbimento e l'emissione di radiazione la molecola ha ruotato su se stessa la polarizzazione della radiazione emessa non coinciderà più con quella della radiazione di eccitazione. Il grado di polarizzazione della radiazione emessa dipenderà quindi dal tempo di emivita dello stato eccitato e dal movimento rotatorio della molecola. Una molecola di grosse dimensioni (ad esempio un anticorpo o un recettore) ha un tempo di rotazione di ~ 10 - 100 ns, mentre una molecola di piccole dimensioni ruota su se stessa in $\sim 0,1$ - 1 ns. Una piccola molecola marcata con un fluoroforo (ad esempio fluorescina) non sarà quindi in grado di mantenere la polarizzazione della luce emessa; se invece essa è legata ad un anticorpo il suo movimento viene rallentato e la fluorescenza sarà parzialmente polarizzata.

Mediante tale principio è stato possibile mettere a punto una vasta serie di metodi immunologici omogenei per la determinazione di farmaci, ormoni steroidei e droghe d'abuso. Grazie alla loro semplicità, rapidità e facilità di automazione, i metodi omogenei basati su misure di fluorescenza polarizzata hanno avuto un'ampia diffusione e sono attualmente tra i più utilizzati a livello mondiale nei laboratori di chimica clinica. Le tecniche basate su misure di bio-chemiluminescenza offrono potenzialmente un mezzo per ottenere una migliore rivelabilità rispetto alle tecniche basate sulla fotoluminescenza. Esse presentano infatti un più elevato rapporto segnale/rumore in quanto l'emissione di

fotoni deriva da un processo "buio" e l'unico tipo di rumore presente è quello strumentale. Al contrario, le tecniche fotoluminescenti risentono dell'emissione aspecifica da parte del campione e dello scattering della radiazione di eccitazione, e presentano inoltre problemi strumentali legati a fenomeni di "drift" della sorgente e del rivelatore. Un altro importante vantaggio della bio-chemiluminescenza è che l'emissione di fotoni deriva da un processo chimico altamente specifico che avviene a carico dell'analita ed è quindi meno influenzata dai costituenti della matrice. L'emissione è comunque meno intensa rispetto a quella derivante da fenomeni di fotoluminescenza, la cui intensità è ovviamente funzione della potenza della sorgente di eccitazione. Il segnale bio-chemiluminescente può comunque essere amplificato chimicamente sfruttando reazioni consecutive e cicliche. In appropriate condizioni sperimentali il segnale analitico, cioè l'emissione di fotoni, è

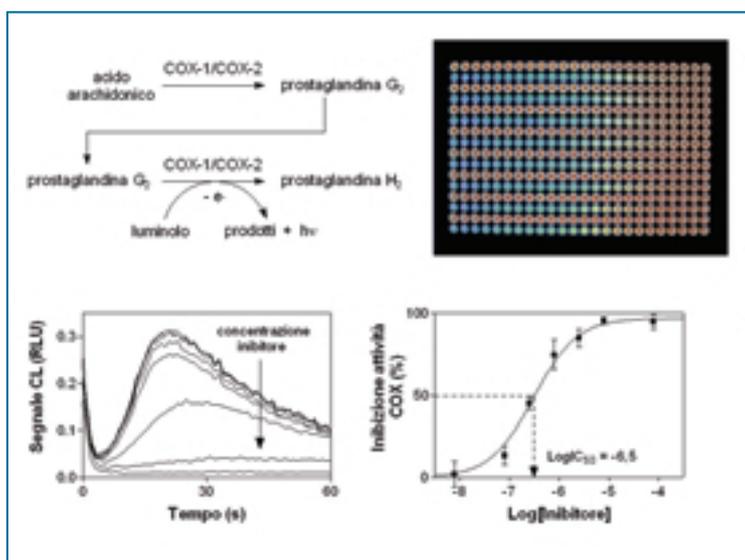


Figura 4 - Determinazione dell'attività di inibitori della ciclossigenasi mediante chemiluminescenza. Da sinistra a destra e dall'alto in basso: principio del metodo che permette di misurare l'attività dell'enzima mediante chemiluminescenza; immagine in pseudocolori del segnale chemiluminescente ottenuto in una piastra microtiter a 384 pozzetti; profili cinetici del segnale chemiluminescente ottenuti in presenza di concentrazioni crescenti di inibitore; curva di inibizione, derivata dall'analisi dei profili cinetici, che mostra l'efficacia dell'inibitore in esame

strettamente legato alla concentrazione di analita nel campione, permettendo così lo sviluppo di metodi quantitativi precisi ed ultrasensibili caratterizzati da ampi ambiti di linearità, che possono raggiungere anche 5 decadi di concentrazione. I sistemi chemiluminescenti più interessanti sono quelli caratterizzati da una cinetica dell'emissione di tipo "steady-state", cioè con un segnale analitico che raggiunge rapidamente il valore ottimale e si mantiene stabile per alcuni minuti, il che semplifica la strumentazione richiesta ed in genere tutte le fasi del processo analitico.

Misura di substrati ed attività enzimatiche

L'accoppiamento di reazioni enzimatiche che utilizzano ATP o NAD(P)/NAD(P)H come cofattore (quali quelle catalizzate dagli enzimi chinasi o deidrogenasi) con sistemi bioluminescenti, come la reazione luciferina/ATP/luciferasi o quella della luciferasi batterica NAD(P)/NAD(P)H-dipendente [1], ha permesso di sviluppare metodi ultrasensibili per la determinazione di molti substrati, quali alcool, lattosio, acidi biliari. Anche il sistema chemiluminescente luminolo/H₂O₂/perossidasi è stato accoppiato a molte ossidasi che coinvolgono H₂O₂, quali la glucosio ossidasi, la colesterolo ossidasi o la colina ossidasi, per l'analisi di glucosio, colesterolo e fosfolipidi. I metodi bio-chemiluminescenti permettono anche di misurare direttamente l'attività di enzimi, e possono

quindi essere impiegati per la valutazione dell'efficacia di inibitori enzimatici. Ad esempio, il luminolo può agire come cosubstrato riducente dell'enzima ciclossigenasi offrendo (COX) un modo semplice e veloce per determinare l'attività delle due isoforme (COX-1 e COX-2) di questo enzima mediante misure di chemiluminescenza [6]. Questo metodo è stato utilizzato per effettuare lo screening di potenziali inibitori enzimatici allo scopo di valutare la loro selettività nei confronti dell'isoforma COX-2, la più importante dal punto di vista farmacologico (Figura 4). Esiste poi una vastissima letteratura scientifica su sistemi a flusso tipo Fia (Flow injection analysis) con rivelazione chemiluminescente per la determinazione rapida, sensibile ed automatizzata di analiti in molti fluidi biologici e in matrici agro-alimentari. La selettività di questi sistemi di analisi è spesso determinata dall'uso di reazioni enzimatiche (semplici o accoppiate) in grado di produrre chemiluminescenza in presenza dell'analita, catalizzate da enzimi immobilizzati in opportuni reattori a flusso.

"Imaging" in bio- e chemiluminescenza

Le tecniche di "imaging" (cioè basate sulla determinazione della distribuzione spaziale del segnale) rappresentano un

altro importante settore di applicazione della bio-chemiluminescenza, ed in letteratura è riportata una vasta gamma di applicazioni, sia su campioni macroscopici sia microscopici, in campo biomedico e diagnostico e per lo sviluppo di nuovi farmaci [5, 7-9]. L'utilizzo di sistemi chemiluminescenti basati su reazioni enzimatiche semplici od accoppiate permette di valutare la localizzazione di analiti e enzimi in tessuti e cellule in modo estremamente più sensibile rispetto all'utilizzo di substrati cromogenici o fluorescenti. I sistemi di rivelazione chemiluminescenti sono stati anche utilizzati in tecniche di immunocistochemica (Ihc) e di ibridazione *in situ* (Ish) per la localizzazione di antigeni specifici e acidi nucleici in singole cellule e in tessuti. Tali tecniche presentano una sensibilità maggiore rispetto ai metodi di rivelazione convenzionali (basati principalmente su colorimetria e fluorescenza) e presentano il vantaggio di fornire informazioni quantitative sulla distribuzione spaziale di patogeni, antigeni ecc. Anche le già menzionate tecniche di fluorescenza risolte nel tempo sono

state applicate in questo settore (Figura 5). Le tecniche di "imaging" in chemiluminescenza permettono anche lo studio dei processi fisiopatologici sia determinano emissione di luce. La chemiluminescenza è stata ampiamente utilizzata per analizzare la formazione di specie reattive dell'ossigeno (Ros) sia in colture cellulari che in organi isolati. Ad esempio, mediante misure di "imaging" in chemiluminescenza è stato possibile valutare in modo quantitativo la

formazione di Ros in fegati di ratto isolati e perfusi sottoposti ad ischemia e riperfusione [10]. Un modello di questo tipo potrebbe permettere di effettuare studi sulla fisiopatogenesi dei processi di stress ossidativo, ma anche di studiare composti ad attività antiossidante e valutare l'efficacia delle procedure di conservazione degli organi per trapianti.

Un'altra recente applicazione delle tecniche di "imaging" in chemiluminescenza consiste nella visualizzazione in tempo reale del processo di frazionamento degli analiti in tecniche di frazionamento in campo-flusso (Field-flow fractionation, Fff). Le tecniche Fff sono una famiglia di tecniche separative, affini alle tecniche cromatografiche, nelle quali il frazionamento degli analiti è determinato, piuttosto che dall'interazione degli analiti con una fase stazionaria, dall'azione di un campo esterno di varia natura (gravitazionale, elettrico, termico...) perpendicolare al flusso della fase mobile. Queste tecniche possono essere utilizzate per la caratterizzazione, sulla base di proprietà quali dimensioni, densità o caratteristiche superficiali, di analiti di varia natura, da piccole molecole a cellule [11]. Una camera Ccd ultrasensibile è stata utilizzata per visualizzare il segnale CL proveniente dall'elemento di frazionamento del sistema Fff durante la separazione di campioni costituiti da sfere di polistirene rivestite con l'enzima perossidasi. L'aggiunta dei substrati chemiluminescenti dell'enzima

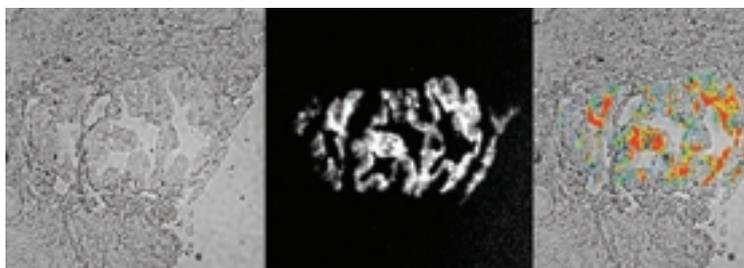


Figura 5 - Localizzazione immunoistochimica di un antigene (Psa) in sezioni di prostata mediante una tecnica di "imaging" in fluorescenza risolta nel tempo. L'antigene è stato localizzato utilizzando un anticorpo primario biotinilato anti-Psa ed un sistema di rivelazione amplificato che sfrutta la reazione biotina-streptavidina, basato su di un polimero marcato con un chelato di europio. Da sinistra a destra sono mostrate l'immagine in luce trasmessa, il segnale di fluorescenza risolto nel tempo e la loro sovrapposizione dopo conversione in pseudocolori del segnale di fluorescenza

alla fase mobile ha permesso di ottenere un'emissione CL stazionaria durante tutto il processo di eluizione [12]. L'analisi quantitativa delle immagini chemiluminescenti ha permesso di ricostruire i profili delle bande cromatografiche, ottenendo informazioni sulle caratteristiche del processo di frazionamento che potranno essere utili per la sua ottimizzazione.

Metodi immunologici e genici

Una delle più importanti applicazioni dei metodi chemiluminescenti è però lo sviluppo di metodi immunologici e genici [13]. I metodi immunologici basati su traccianti bio- e chemiluminescenti sono da anni utilizzati in campo clinico, dove hanno quasi completamente rimpiazzato quelli basati su radioisotopi, e si stanno rapidamente diffondendo anche in altri settori, quali quello ambientale ed agro-alimentare. Essi possiedono sensibilità comparabili, od addirittura superiori, a quelle dei metodi radioimmunologici senza gli svantaggi legati all'uso di materiali radioattivi.

La marcatura di anticorpi od antigeni può essere effettuata direttamente con molecole chemiluminescenti (ad esempio analoghi del luminolo o N-sulfonil-acridinio-9-carbossamidi) oppure utilizzando traccianti enzimatici (perossidasi, fosfatasi alcalina, β -galattosidasi), che vengono poi rivelati mediante substrati chemiluminescenti. Il principale vantaggio dei marcatori enzimatici è l'amplificazione del segnale dovuta al fatto che la reazione chemiluminescente è catalizzata dall'enzima. Grazie a ciò è possibile ottenere limiti di rivelazione estremamente bassi: il record di rivelabilità dei metodi chemiluminescenti è di 10^{-20} moli di fosfatasi alcalina, corrispondenti a poche migliaia di molecole di enzima [14]. Metodi di rivelazione chemiluminescenti sono anche ampiamente utilizzati in analisi basate sulla reazione di ibridazione di acidi nucleici. Le sonde geniche utilizzate per ricercare la presenza nel campione di sequenze complementari vengono marcate con enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina) oppure con apteni (ad esempio digossigenina) e quindi rivelate, dopo la reazione di ibridazione, con substrati chemiluminescenti oppure con anticorpi anti-digossigenina marcati con un enzima ed un substrato chemiluminescente. Il segnale chemiluminescente può essere ulteriormente amplificato mediante il sistema biotina-streptavidina, nel quale una sonda biotinilata viene rivelata mediante un complesso costituito da una molecola di streptavidina legata a tre molecole di perossidasi biotinilata, arrivando alla determinazione di pochi femtogrammi di Dna omologo.

BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)

Sono stati sviluppati sistemi basati su processi di trasferimento non radiativo di energia ad un accettore fluorescente da parte di un donatore fluorescente (Fret, Fluorescence resonance energy transfer) o bioluminescente (Bret, Bioluminescence resonance energy transfer). Processi di questo tipo, in particolare la Bret, sono comuni in organismi bioluminescenti: ad esempio, nel celenterato *Renilla reniformis* il donatore luciferasi (che emetterebbe una bioluminescenza blu) trasferisce energia ad una proteina fluorescente (Gfp) determinando un'emissione nella zona verde dello spettro. Poiché l'efficienza del trasferimento di energia non radiativo dipende fortemente dalla distanza tra il donatore e l'accettore, questi sistemi sono particolarmente adatti per lo studio di interazioni molecolari a corto raggio (10-100 Å), quali interazioni proteina-proteina e ligando-recettore, o per studi di modificazione conformazionale di proteine ed enzimi. Per studiare l'interazione fra due proteine mediante una tecnica Bret ad una delle proteine viene legata una luciferasi mentre all'altra viene legato un accettore fluorescente, ad esempio la Gfp. Quando le due proteine interagiscono donatore ed accettore si trovano ad una distanza minore di 10 Å ed in conseguenza del processo di trasferimento di energia si ottiene l'emissione di colore verde della Gfp invece di quella blu caratteristica della luciferasi (Figura 6). Poiché l'efficienza del trasferimento di energia viene misurata dal rapporto tra l'emissione dell'accettore e quella del donatore, questi metodi presentano il vantaggio, rispetto

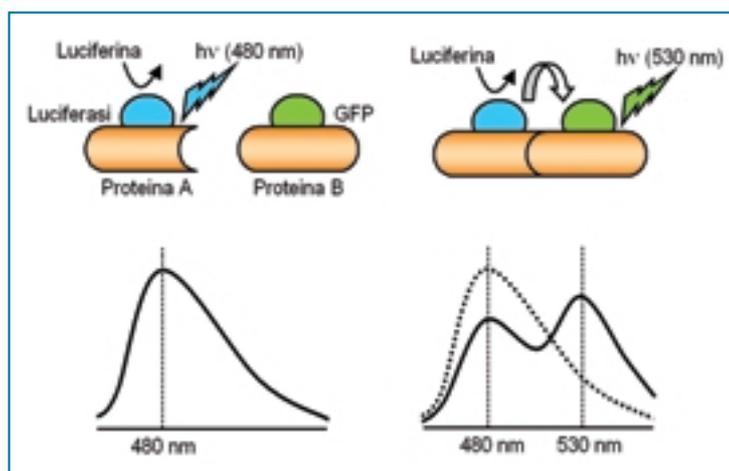


Figura 6 - Studio dell'interazione fra due proteine mediante Bret. Ad una delle proteine viene legato un donatore bioluminescente (in questo caso una luciferasi), mentre la seconda porta un accettore fluorescente (Gfp). L'aggiunta del substrato per la luciferasi determina l'emissione di bioluminescenza: in assenza di interazione proteina-proteina (a sinistra) si osserva soltanto l'emissione della luciferasi con un massimo a 480 nm; in presenza di interazione fra le due proteine (a destra) si osserva anche l'emissione della Gfp a 530 nm dovuta al processo di trasferimento di energia

a quelli basati sulla semplice misura dell'intensità di segnali fluorescenti o bio-chemiluminescenti, di ridurre la variabilità dovuta a cambiamenti del numero di cellule e dei parametri sperimentali in genere. Inoltre, poiché a differenza della Fret le tecniche Bret non necessitano di un'eccitazione radiativa, esse permettono di effettuare misure anche in cellule fotosensibili (ad esempio quelle della retina) o che presentano un'elevata autofluorescenza. La Fret e, più recentemente, la Bret sono state estesamente applicate allo studio di interazioni proteiche, attivazione di recettori, screening di nuovi farmaci e studio dei processi di "signaling" intra- ed intercellulare [15-20]. Queste metodologie presentano comunque anche alcuni svantaggi. Siccome il processo di trasferimento di energia non radiativo richiede un'adatta orientazione dei dipoli delle molecole del donatore e dell'accettore, è possibile che anche in presenza di interazione non si osservi trasferimento di energia a causa di una geometria non adeguata

oppure, nel caso della Bret, una bassa intensità del segnale può essere dovuta ad una scarsa permeabilità delle cellule al substrato dell'enzima bioluminescente.

Biosensori cellulari luminescenti

Una delle applicazioni analitiche più innovative ed affascinanti della luminescenza è certamente quella rappresentata dai biosensori cellulari luminescenti. Grazie ai grandi progressi delle tecniche di biologia molecolare verificatisi negli ultimi anni, è stato possibile produrre batteri, lieviti o cellule di mammifero in grado di rispondere ad uno specifico analita. Questi sistemi sono ottenuti mediante l'inserimento all'interno del microrganismo di un gene "reporter", che codifica per una proteina rivelabile mediante tecniche di luminescenza, sotto il controllo di una specifica sequenza che induce la sua espressione solo in presenza dell'analita (Figura 7). In questo modo

la proteina "reporter" viene prodotta in modo proporzionale alla concentrazione dell'analita. Il numero di possibili proteine "reporter" è relativamente ampio, poiché è possibile utilizzare sia proteine fotoluminescenti, quali la Gfp e le sue forme mutanti, sia proteine bioluminescenti come la luciferasi da lucciola e quella batterica. La luciferasi batterica, in particolare, presenta il non trascurabile vantaggio di permettere la costruzione di un biosensore cellulare bioluminescente nel quale la produzione del segnale non richiede l'aggiunta di alcun substrato. Le cellule possono infatti essere trasformate utilizzando la "cassetta" genica *luxCDABE*, che contiene i geni che codificano sia per la luciferasi sia per gli enzimi che sintetizzano il suo substrato (un'aldeide a catena lunga). È inoltre possibile utilizzare come proteine "reporter" anche enzimi solitamente rivelati per via spettrofotometrica, ma per i quali esistono anche substrati chemiluminescenti (fosfatasi alcalina, β -galattosidasi). Un'opportuna scelta della sequenza che controlla l'espressione del gene "reporter" permette di sviluppare biosensori che rispondono ad un'ampia gamma di analiti.

Alcuni microrganismi che vivono in ambienti contaminati hanno sviluppato la capacità di sintetizzare proteine in grado di conferire loro una resistenza ai metalli pesanti o di utilizzare inquinanti organici come fonti di carbonio. Utilizzando sequenze geniche di controllo ottenute da questi microrganismi sono stati sviluppati numerosi biosensori cellulari luminescenti per la determinazione di metalli pesanti (arsenico/antimonio, cadmio/piombo, cromo, rame, mercurio, zinco, stagno, nichel, cobalto) e composti organici di varia natura (alcani, benzene e derivati, fenoli, composti clorurati) [21, 22]. Sono inoltre disponibili biosensori cellulari non specifici in grado di misurare la tossicità generica e di rivelare composti genotossici o ossidanti [21, 23]. Oltre all'elevata rivelabilità, questi

sistemi presentano il vantaggio di fornire direttamente informazioni sulla biodisponibilità dell'analita, quindi sull'effettiva tossicità del campione, in quanto la risposta del biosensore dipende soltanto dalla frazione di analita in grado di entrare effettivamente nella cellula. Una delle principali limitazioni dei biosensori cellulari è la loro sensibilità alle variazioni nelle condizioni sperimentali o ad interferenze dovute ai componenti della matrice. Per correggere la risposta analitica del biosensore è stato sviluppato un biosensore batterico fluorescente dotato di un sistema di correzione della risposta [24]. La cellula contiene due differenti geni "reporter", che codificano per due forme mutanti di Gfp che emettono a differenti lunghezze d'onda. Una delle proteine "reporter" viene espressa in risposta ad un analita, mentre la seconda, espressa ad un livello costante, funge da controllo interno: utilizzando come segnale analitico il rapporto fra le emissioni della proteina "reporter" analitica e di riferimento è possibile tenere conto delle interferenze dovute ai componenti della matrice.

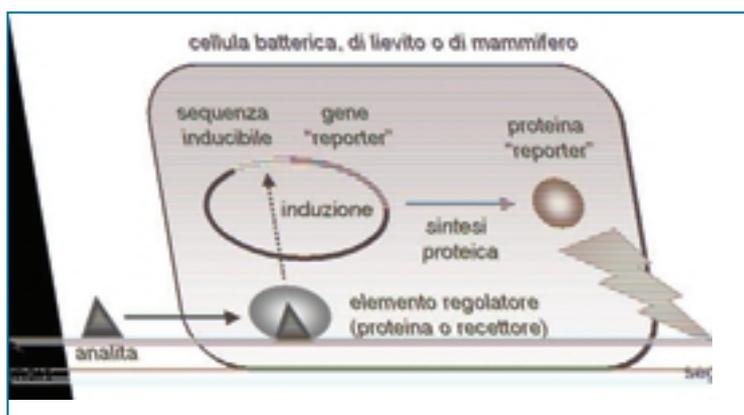


Figura 7 - Rappresentazione dei processi che determinano la produzione della proteina "reporter" in risposta alla presenza dell'analita in un biosensore cellulare luminescente

Bibliografia

- [1] A.K. Campbell, *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1988.
- [2] S.H.D. Haddock *et al.*, *The Bioluminescence Web Page*, <http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/>, 2000.
- [3] V.R. Viviani, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 1833.
- [4] A.M. Garcia Campana *et al.*, *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 2001.
- [5] K. Van Dyke *et al.*, *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 2002.
- [6] F. Forghani *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1998, **264**, 216.
- [7] A. Roda *et al.*, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 1073.
- [8] A. Roda *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1998, **257**, 53.
- [9] A. Roda *et al.*, *Methods Enzymol.*, 2000, **305**, 120.
- [10] A. Gasbarrini *et al.*, *Free Rad. Biol. Med.*, 1998, **24**, 211.
- [11] M.E. Schimpf *et al.*, *Field-flow Fractionation Handbook*, Wiley-Interscience, New York, 2000.
- [12] D. Melucci *et al.*, *Talanta*, 2003, **60**, 303.
- [13] L.J. Kricka, *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, 2nd Ed., Academic Press, San Diego, 1995.
- [14] I. Bronstein *et al.*, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1989, **4**, 99.
- [15] K. Yoshioka *et al.*, *FEBS Lett.*, 2002, **523**, 147.
- [16] A.A. Jensen *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**, 5076.
- [17] G.J. Babcock *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 3378.
- [18] Y. Xu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 151.
- [19] Z.J. Cheng *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 48040.
- [20] N. Boute *et al.*, *Mol. Pharm.*, 2001, **60**, 640.
- [21] S. Daunert *et al.*, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2705.
- [22] A. Keane *et al.*, *J. Microbiol. Meth.*, 2002, **49**, 103.
- [23] L.R. Ptitsyn *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 4377.
- [24] M. Mirasoli *et al.*, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 5948.