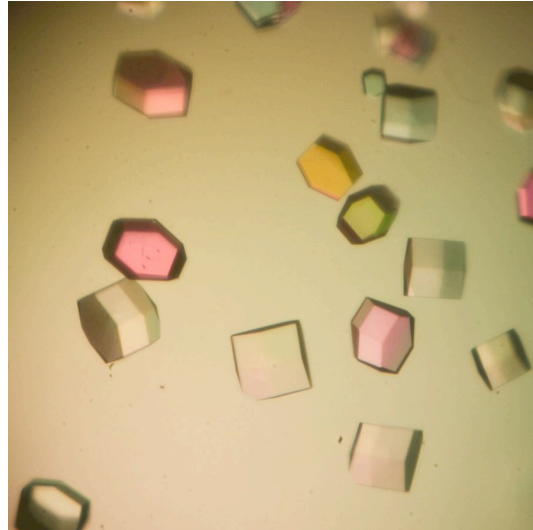


Cristallizzazione di Macromolecole Biologiche

I Colori vengono dalla birifrangenza:

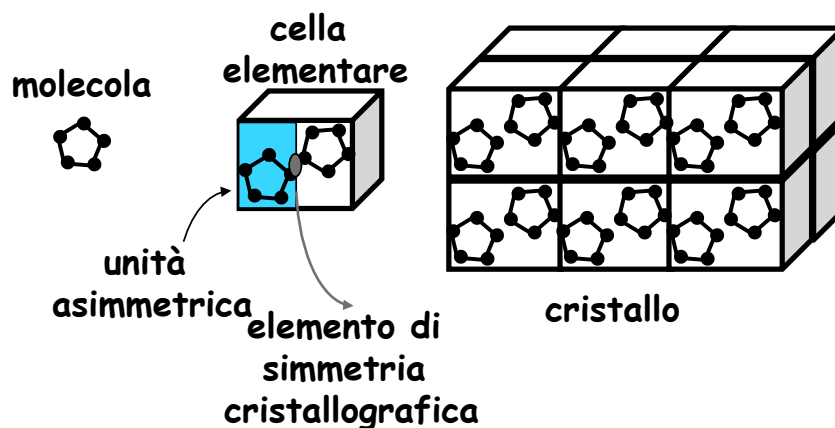
Birefringence is the optical property of a material having a refractive index that depends on the polarization and propagation direction of light. Crystals with asymmetric (chirality) structures are often birefringent



- ◆ Esprimere e purificare la proteina
- ◆ Scelta di un buffer in cui la proteina e' solubile e stabile (DLS, Termofluorimetria)
- ◆ Portare la proteina in uno stato di *supersaturazione* (ridurre la solubilità)
- ◆ Inizio della crescita di cristalli

1

Cristalli proteici:



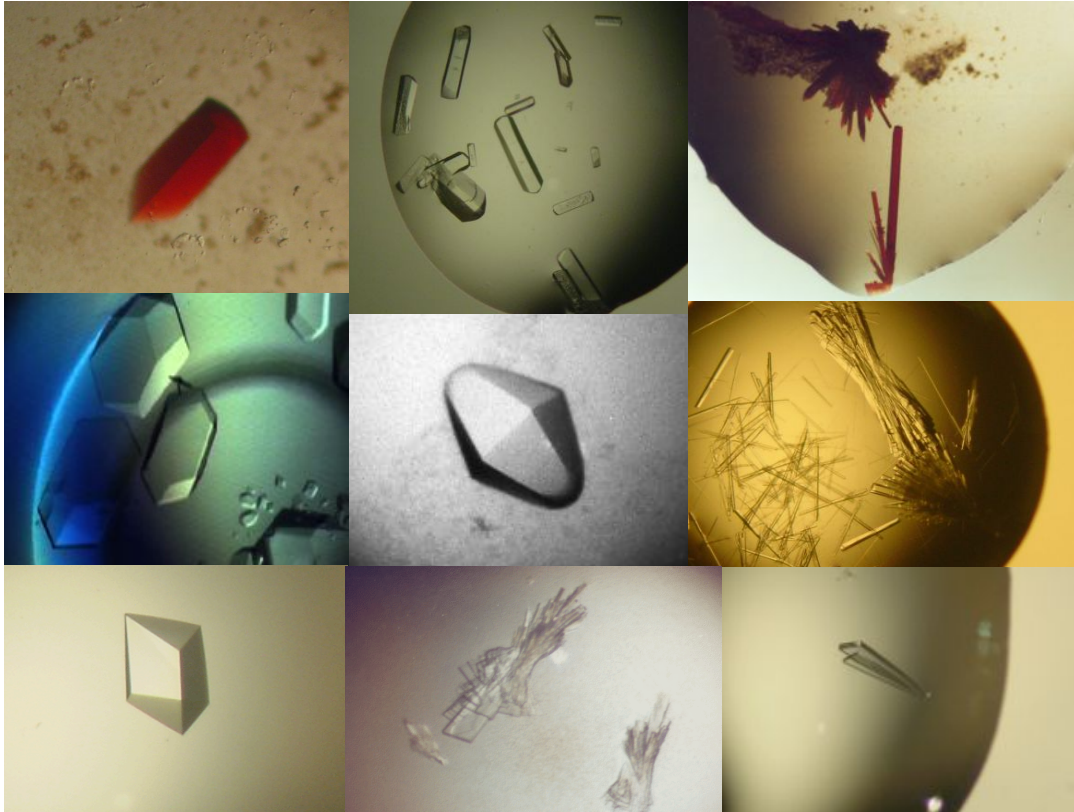
volume $< 0.01 \text{ mm}^3$

periodicità del reticolo cristallino $\approx 100 \text{ \AA}$

contenuto solvente 30% - 80% v/v

bassa stabilità meccanica ($E_{\text{stab.}} < 10 \text{ kcal/mol}$)

2



3

Metodi fisico-chimici per la crescita di cristalli

Cristallizzazione: procedura empirica in cui si riduce *lentamente* la solubilità di una proteina: essa tende dunque a "precipitare" formando eventualmente una struttura cristallina (non amorfa)

- interazioni intermolecolari di superficie
- purezza ed omogeneità del campione
- diminuzione della solubilità della proteina

Variabili chimico-fisiche più importanti:

- purezza della proteina
- forza ionica
- pH
- temperatura
- concentrazione proteina / concentrazione reagenti
- costante dielettrica del solvente
- condizioni iniziali ($V_{in} \dots$)

4

Purezza e omogeneità della proteina:

Cause di eterogeneità (differenti da contaminanti):

- Partial proteolysis products
- Oxidation of cysteines
- Deamidation of Asn and Gln to Asp and Glu
- Post-translational modifications
- Oligomerization
- Isoforms
- Misfolded population
- Structural flexibility

Precipitanti

Salts

Ammonium sulfate, Sodium chloride
Potassium phosphate
(...)

Organic reagents

MPD, Isopropanol
(...)

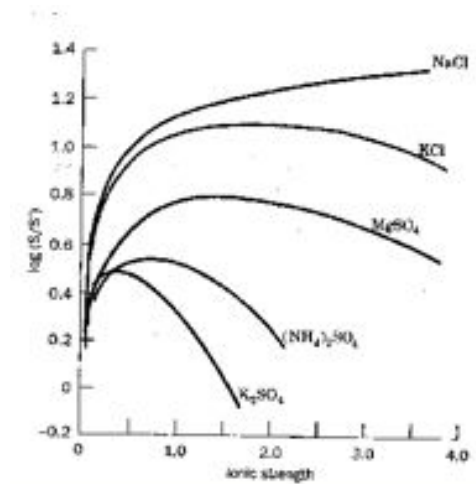
Polyethylene glycol

PEG 400, PEG 4000
PEG 8000 (...)

5

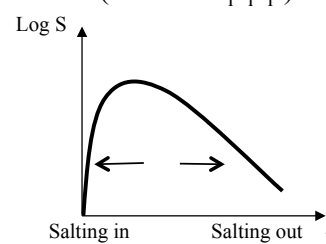
Variazione della forza ionica

- aumento graduale della concentrazione del sale \Rightarrow **Salting out**
- competizione fra ioni e proteina per il solvente \Rightarrow interazioni proteina-proteina
- interazione ioni-residui cariche superficiali
- interazione con siti di legame proteici



S = solubilità proteina

I = forza ionica sale
($I = 1/2 \sum c_i z_i^2$)



6

variazione del pH

- modificazione della distribuzione di carica superficiale della proteina (pK_a)

variazione della temperatura

- la solubilità proteica varia in funzione della temperatura:

a bassa forza ionica \Rightarrow solitamente la solubilità **augmenta** all'aumentare di T
(es: PEG, MPD)

ad alta forza ionica \Rightarrow solitamente la solubilità **diminuisce** all'aumentare di T

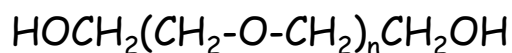
variazione della costante dielettrica

- aggiunta di solventi organici

es: PEG, glicerolo ($\epsilon=42.5$), glicole etilenico ($\epsilon=37.7$), metanolo ($\epsilon=32.8$),
etanolo ($\epsilon=24.3$) (ϵ =cost. dielettrica)

7

Uso di PEGs (molecola parzialmente polare)



- competizione con le proteine per il legame del solvente =
aumenta la concentrazione effettiva della proteina
- diminuzione della costante dielettrica
- effetto di "volume escluso" = concentrazione della proteina

8

Cristallizzazione: diagramma di fase

nucleazione (N):

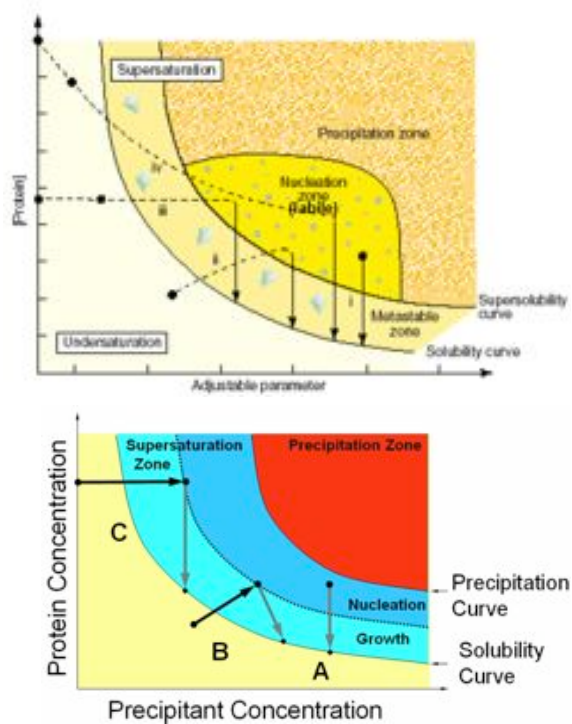
la soluzione è portata in condizione di supersaturazione

crescita (C):

il grado di saturazione diminuisce (sovrasaturazione)

cessazione della crescita:

raggiungimento della curva di solubilità (equilibrio cristalli-soluzione)

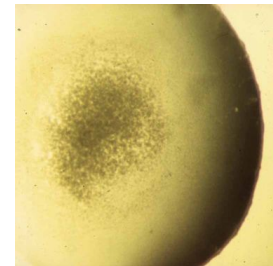
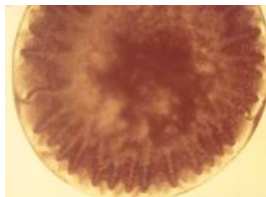


9

Nucleation

Common difficulties:

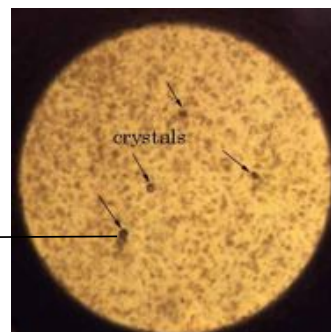
1. If supersaturation is **too high**, too many nuclei form, hence an overabundance of **tiny crystals**



2. In supersaturated solutions that don't experience spontaneous nucleation, crystal growth often only occurs in the presence of added nuclei or "**seeds**".

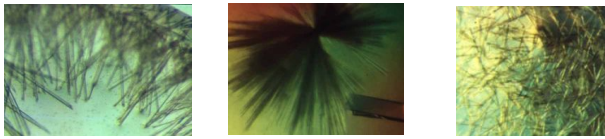


seeding



10

Crescita e ottimizzazione



Cristalli ad ago, 1D



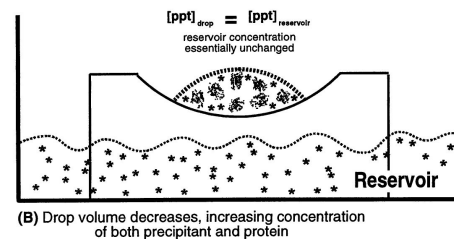
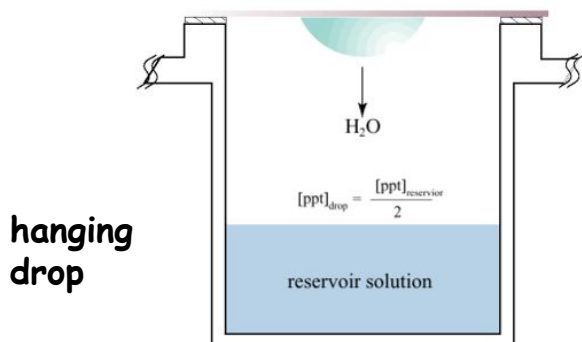
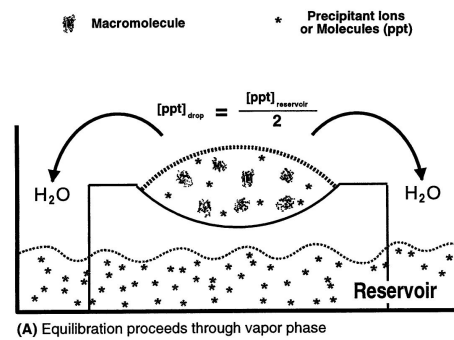
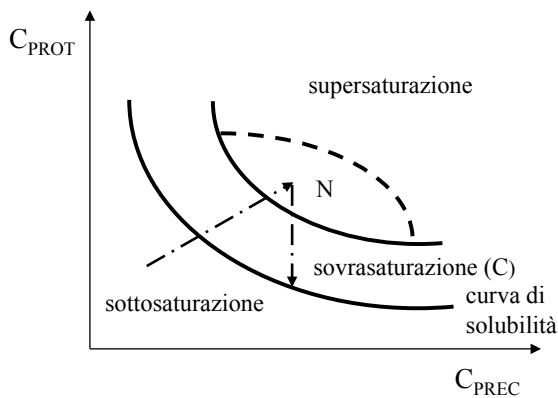
Cristalli piatti, 2D



Cristalli, 3D

11

Metodo della diffusione di vapore

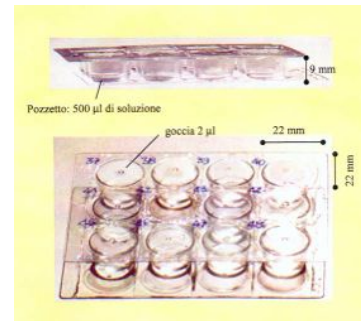
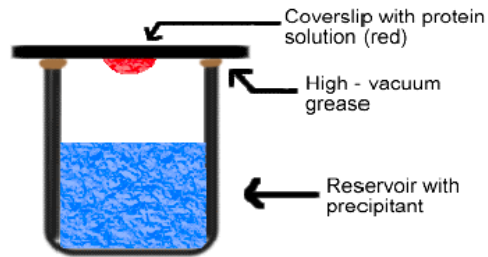


sitting drop

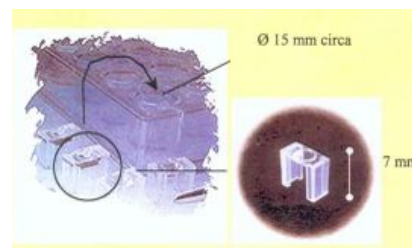
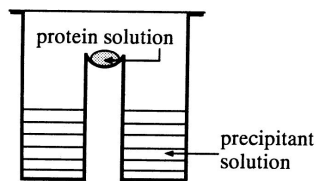
12

Metodo della diffusione di vapore

- hanging drop

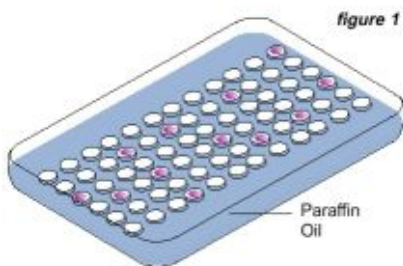


- sitting drop

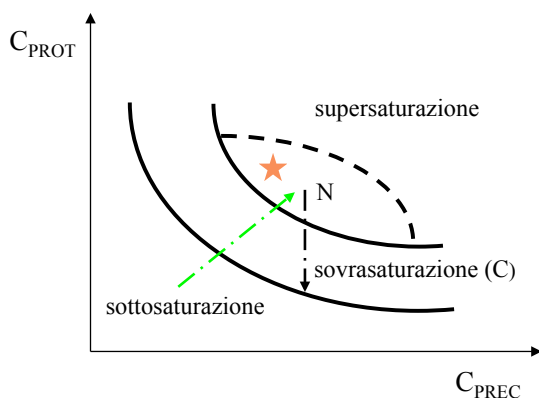


13

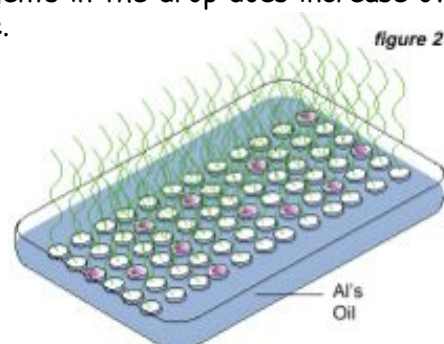
Metodo micro-batch



Paraffin oil allows for little to no diffusion of water through the oil. This is a true batch experiment because all the reagents are present at a specific and relatively unchanging concentration.

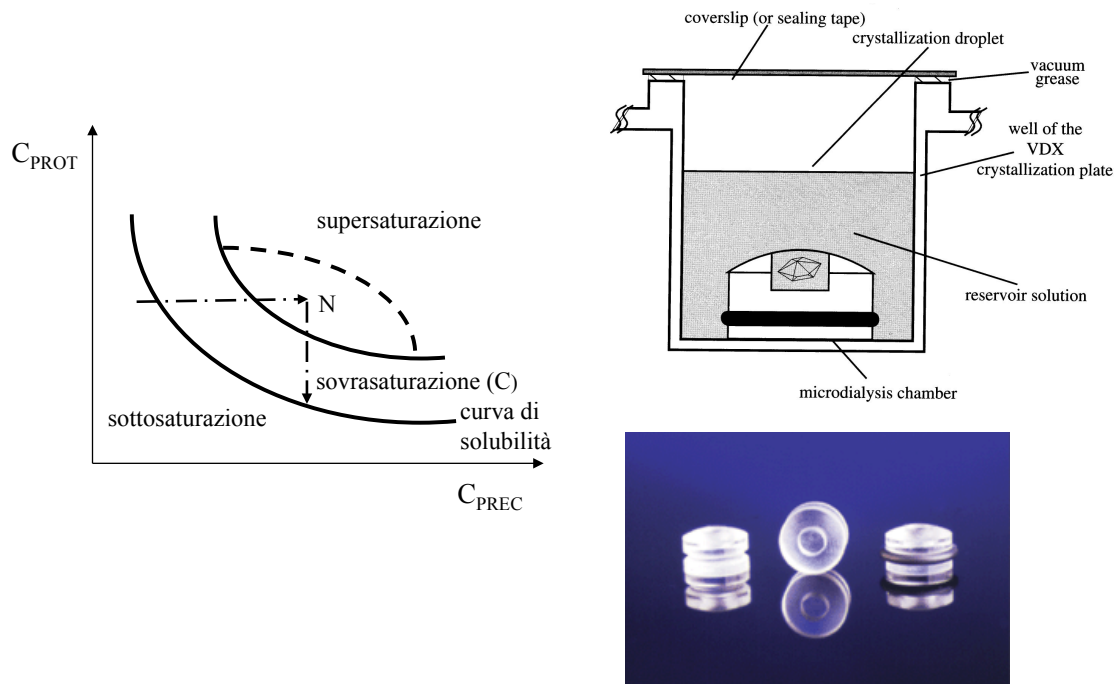


Al's oil is a 1:1 mixture of silicon oil and paraffin oil which allows for evaporation through slow diffusion through the oil. This is an evaporation method, and the concentration of the protein and reagents in the drop does increase over time.



14

Metodo della dialisi



15

Crystallization robot



16