POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Cristallizzazione in gel di silice di lisozima e proteinasi K



Relatori

Prof. Roberto Pisano

Dott.ssa Fiora Artusio

Candidato

Lorena Pasero

Marzo 2022

Indice

1. Introduzione	1
1.1 L'evoluzione della cristallizzazione di proteine: scopi e difficoltà	1
1.2 Le caratteristiche dei cristalli di proteina	2
1.3 I fondamenti teorici della cristallizzazione	3
1.3.1 La nucleazione	3
1.3.2 La crescita	7
1.3.2.1 Il trasporto attraverso il bulk	7
1.3.2.2 L'incorporazione di proteine sulla superficie del cristallo	8
1.4 Le principali tecniche di cristallizzazione	10
1.4.1 Metodi tradizionali	12
1.4.2 Metodi avanzati	14
1.5 Le strategie di controllo della cristallizzazione	17
1.5.1 La scelta delle condizioni di cristallizzazione	17
1.5.2 L'utilizzo di superfici eteronucleanti	18
1.5.3 La selezione del polimorfo di interesse	18
1.5.4 Il controllo della dimensione dei cristalli	19
1.6 Obiettivo della tesi	22
2. Materiali e metodi	23
2.1 Materiali	23
2.2 Metodi	25
2.2.1 Preparazione delle soluzioni stock	25
2.2.2 Misura della concentrazione di proteina	27
2.2.3 Tecniche di cristallizzazione	28
2.2.3.1 Microbatch	28
2.2.3.2 Hanging drop-vapor diffusion	29
2.2.3.3 Contro-diffusione in gel di silice	30

2.2.3.4 Batch in gel di silice
3. Cristallizzazione in microbatch e hanging drop-vapor diffusion
3.1 Caratterizzazione preliminare delle proteine HEWL e proteinasi K
3.2 Cristallizzazione in microbatch
3.2.1 Cristallizzazione microbatch di HEWL
3.2.2 Cristallizzazione microbatch di proteinasi K
3.3 Cristallizzazione in hanging drop-vapor diffusion (HDVD)44
3.3.1 Cristallizzazione HDVD di HEWL44
3.3.2 Cristallizzazione HDVD di proteinasi K46
3.4 Conclusioni
4. Cristallizzazione in gel di silice
4.1 Cristallizzazione in contro-diffusione di HEWL54
4.1.1 Studio dell'effetto della quantità di TMOS55
4.1.2 Studio dell'effetto degli additivi
4.1.3 Analisi dimensionale dei cristalli di HEWL60
4.2 Cristallizzazione in batch di HEWL e proteinasi K
4.2.1 Cristallizzazione di HEWL62
4.2.1.1 Studio dell'effetto della quantità di TMOS per diverse concentrazioni di proteina e precipitante
4.2.1.2 Studio dell'effetto degli additivi in rapporto variabile65
4.2.1.3 Studio dell'effetto degli additivi in rapporto costante71
4.2.2 Cristallizzazione di proteinasi K74
4.2.2.1 Cristallizzazione in assenza di additivi74
4.2.2.2 Cristallizzazione in presenza di additivi76
4.3 Conclusioni
5. Conclusioni
Elenco delle figure
Elenco delle tabelle
Lista dei simboli

Abbreviazioni	91
Bibliografia	93
Appendice	97
Ringraziamenti	

1. Introduzione

1.1 L'evoluzione della cristallizzazione di proteine: scopi e difficoltà

La cristallizzazione rappresenta una delle più antiche operazioni unitarie nell'ambito dell'ingegneria chimica; già nota in epoca romana, tale tecnica, negli anni, ha acquisito un'importanza crescente, sia in ambito farmaceutico che alimentare, come metodo di separazione liquido-solido (Schoen *et al.*, 1956; Artusio e Pisano, 2018).

Nonostante la sua rilevanza storica, essa fu applicata alle proteine per la prima volta soltanto nel 1840, anno in cui F.L. Hünefeld osservò la formazione di cristalli di emoglobina in preparati a base di sangue (Giegé, 2013; Nanev, 2018). Inizialmente la cristallizzazione venne sfruttata come processo di purificazione o come metodo di verifica della purezza di una proteina; tra il 1900 e il 1940, invece, l'attenzione fu rivolta principalmente agli enzimi, nell'ambito della catalisi enzimatica (McPherson, 2004). Solo con la nascita della cristallografia a raggi X (1934) si iniziò a promuovere tale tecnica come metodo per ottenere informazioni strutturali su scala atomica delle proteine, obiettivo ancora predominante oggigiorno (Giegé, 2013; McPherson, 2004). Uno stimolo considerevole venne dato dallo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante (1980), che permise di disporre delle macromolecole proteiche di interesse in quantità maggiore (McPherson, 2004). Questa evoluzione ha ampliato la conoscenza della struttura dettagliata delle proteine, permettendo una migliore comprensione dei sistemi biologici a livello molecolare (Durbin e Feher, 1996). I principali scopi per i quali, attualmente, si cristallizzano tali macromolecole sono:

- la determinazione della struttura tridimensionale delle proteine, sfruttando cristalli di dimensioni e qualità adeguate agli studi di diffrazione neutronica o ai raggi X;
- in ambito farmaceutico, la purificazione e la somministrazione di farmaci (Durbin e Feher, 1996; Drenth, 2002). La cristallografia proteica, infatti, permette di identificare il meccanismo di azione e la selettività di un farmaco, ottimizzandone l'interazione con il bersaglio. Oltre ai vantaggi legati alla somministrazione, quali la biodisponibilità e il rilascio controllato di agenti terapeutici, i famaci costituiti da proteine cristallizzate presentano minore

viscosità in sospensione, maggiore facilità di conservazione e stabilità nel tempo (Nanev, 2013).

Malgrado il vasto utilizzo della cristallizzazione nell'industria farmaceutica la completa comprensione e il controllo del processo rimangono questioni complicate, soprattutto se esso viene applicato a molecole ad alto peso molecolare (MW) (Artusio e Pisano, 2018; Durbin e Feher, 1996). Le ragioni sono molteplici (Durbin e Feher, 1996):

- i cristalli di proteina possiedono pochi legami inter-proteici, rispetto al loro MW, risultando perciò molto fragili e difficili da manipolare;
- le proteine sono difficili da purificare e possono esistere in diverse conformazioni, rendendo la formazione di una struttura cristallina altamente ordinata meno probabile;
- le proteine, essendo molecole complesse, sono in grado di formare contatti intermolecolari di natura varia e, perciò, variazioni contenute di pH, forza ionica, temperatura o concentrazione possono influenzare fortemente il fenomeno di cristallizzazione;
- le condizioni di processo ottimali sono uniche per ogni proteina;
- le proteine sono sensibili alla denaturazione;
- le proteine possono aggregare e formare precipitati;
- i livelli di sovrasaturazione della soluzione richiesti sono molto elevati;
- per ottenere cristalli tutte le molecole proteiche devono avere le stesse proprietà di superficie, in particolare la stessa carica superficiale (Drenth, 2002).

A causa della complessità del fenomeno, gli studi di cristallizzazione di proteine sono ancora, principalmente, basati su approcci *trial-and-error* (Drenth, 2002).

1.2 Le caratteristiche dei cristalli di proteina

I cristalli di proteina sono costituiti almeno per il 50% da solvente e, per la restante parte, da proteina: essi possono essere comparati ad un gel ordinato, nei cui spazi interstiziali il solvente e le molecole possono diffondere. Tali strutture devono necessariamente crescere all'interno di soluzioni a loro affini, comunemente chiamate acque madri (McPherson, 2004).

Esistono molteplici differenze tra i cristalli proteici e quelli ottenuti da composti inorganici. Innanzitutto, come esposto in §1.1, i cristalli di proteina presentano un numero di legami intermolecolari significativamente inferiore rispetto ai cristalli costituiti da molecole organiche o inorganiche, il che li rende più fragili ed estremamente sensibili alla temperatura e alle radiazioni (Durbin e Feher, 1996). Non disponendo di centri di simmetria, possiedono morfologie più semplici dei cristalli convenzionali, i quali mostrano forme poliedriche o prismatiche molto complesse. Inoltre, sono caratterizzati da dimensioni più limitate, da proprietà ottiche inferiori e, di conseguenza, da una bassa capacità di diffrazione ai raggi X (McPherson, 2004; Wlodawer *et al.*, 2017). Una differenza fondamentale è rappresentata, infine, dalla probabilità di formazione dei cristalli, che dipende dalle caratteristiche di superficie delle molecole coinvolte. Quelle inorganiche, a basso MW, presentano una funzionalità di superficie omogenea e, in una soluzione sovrasatura, hanno la stessa potenzialità di formare un legame in seguito ad un urto intermolecolare. Le molecole proteiche, caratterizzate da una superficie irregolare, possono instaurare legami cristallini unicamente se orientate in modo corretto e, quindi, con probabilità minore (Ranguelov e Nanev, 2019).

1.3 I fondamenti teorici della cristallizzazione

La cristallizzazione è definita come il cambiamento di fase, da stato liquido o gassoso, in solidi cristallini, che si articola in due stadi: nucleazione e crescita (Artusio e Pisano, 2018; Gavira, 2016).

1.3.1 La nucleazione

La nucleazione rappresenta la fase chiave del processo, infatti determina la struttura finale, la forma, il numero e la dimensione dei cristalli (Artusio e Pisano, 2018). Essa dipende da fattori fisici e biochimici e consiste nella formazione del primo aggregato molecolare stabile termodinamicamente, chiamato nucleo. Per ottenerlo è necessaria una soluzione sovrasatura, cioè un sistema non all'equilibrio che tenda a cristallizzare al fine di ridurre la sovrasaturazione e raggiungere l'equilibrio. La sovrasaturazione (S), riportata nell'Equazione 1.1, è data dal rapporto tra la concentrazione di proteina in soluzione (c) e il suo valore all'equilibrio (solubilità, s), che deve essere sufficientemente elevato.

$$S = \frac{c}{s} \tag{1.1}$$

Inoltre, per aumentare *S*, si possono aggiungere alla soluzione opportuni agenti precipitanti, come sali (NaCl, NaNO₃, solfato di ammonio), polimeri (PEG), solventi organici (alcol etilico) e alcoli non volatili (metilpentandiolo, MPD) (Wlodawer *et al.*, 2017; Asherie, 2004). Questi ultimi possono agire secondo diversi meccanismi, ma, principalmente, hanno il compito di privare le proteine di acqua di solvatazione, promuovendone l'associazione (Wlodawer *et al.*, 2017; Dumetz *et al.*, 2009).

Esistono due tipologie di nucleazione, quella omogenea, in cui l'aggregazione molecolare è guidata dal moto browniano e quella eterogenea, che avviene in presenza di una superficie esterna e per livelli di sovrasaturazione inferiori. Quest'ultima consente, in aggiunta, la possibilità di limitare la casualità del fenomeno, inserendo intenzionalmente superfici esterne che promuovano la nucleazione (Artusio e Pisano, 2018).

Secondo la teoria classica di nucleazione (CNT), l'elevata sovrasaturazione è essenziale per superare la barriera energetica per la formazione del primo nucleo (ΔG). Nella nucleazione omogenea, l'energia libera richiesta, riportata nell'Equazione 1.2, è data dalla somma di due termini opposti: uno volumico associato alla formazione di materiale nel *bulk* (ΔG_v) e uno di superficie legato alla creazione di una nuova interfaccia solido-liquido (ΔG_s), dipendenti, rispettivamente, dal volume (V) e dalla superficie (A^*) dell'aggregato molecolare (Artusio e Pisano, 2018).

$$\Delta G = \Delta G_v + \Delta G_s = V \cdot \Delta g_v + A^* \cdot \Delta g_s \tag{1.2}$$

In normali condizioni di cristallizzazione, l'energia libera di un nucleo, o aggregato precristallino, aumenta con la dimensione, fino a raggiungere un massimo, dopodiché decresce, come mostrato in Figura 1.1.



→ Dimensione dell'aggregato (n^*)

Figura 1.1 L'energia libera di aggregazione come funzione della dimensione dell'aggregato. La barriera ΔG , corrispondente ad una dimensione dell'aggregato n^* , deve essere superata al fine di avere la nucleazione. Sia ΔG che n^* diminuiscono all'aumentare della concentrazione di proteina c ($c_2 > c_1$). In alcune condizioni, le strutture disordinate possono essere favorite rispetto a quelle cristalline. Figura tratta da (Durbin e Feher, 1996), con modifiche.

Il tempo richiesto per la formazione di un nucleo dipende dall'entità della barriera energetica ΔG e, quindi, dalla sovrasaturazione; infatti, il logaritmo di S è inversamente proporzionale al numero di molecole di soluto necessarie per formare un nucleo (Artusio e Pisano, 2018). Se la sovrasaturazione è troppo bassa la velocità di nucleazione è molto piccola e nessun cristallo si formerà in tempi ragionevoli, mentre se ha un valore eccessivo si possono originare strutture disordinate, come aggregati amorfi o precipitati (Durbin e Feher, 1996). Come regola principale, le interazioni proteiche devono essere abbastanza significative da promuovere la cristallizzazione, ma non così intense da provocare la precipitazione amorfa (Nanev, 2018). All'aumentare della concentrazione di proteina o precipitante, il grado di aggregazione deve rimanere contenuto fino al raggiungimento delle condizioni di cristallizzazione; un'aggregazione significativa precedente alla nucleazione conduce, infatti, alla precipitazione. Tale fenomeno può, inoltre, prevalere per ragioni cinetiche se la barriera energetica ΔG è eccessivamente alta, portando ad avere un tempo di nucleazione troppo elevato se confrontato con quello di formazione degli aggregati amorfi (Durbin e Feher, 1996).

La difficoltà risiede, quindi, nella ricerca dell'intervallo di saturazione che porti alla formazione di cristalli di buona qualità, inibendo la precipitazione incontrollata delle proteine. Per valutare quale situazione prevalga si utilizza il diagramma delle fasi, che mostra lo stato della proteina in funzione della sua concentrazione, della temperatura e delle caratteristiche del solvente: la forma più comune presenta la concentrazione di proteina rispetto ad un singolo parametro, mantenendo costanti tutti gli altri (Asherie, 2004). A titolo di esempio, la Figura 1.2 mostra un diagramma delle fasi in cui la sovrasaturazione della soluzione dipende dalla concentrazione di proteina e da quella di sale.

La curva di solubilità divide la zona sottosatura, in cui i cristalli si dissolvono, da quella sovrasatura, la quale, a sua volta, è l'unione di tre aree:

- zona metastabile, in cui i cristalli possono crescere a partire da nuclei già formati, ma non avviene la nucleazione per via del basso valore di *S*;
- zona labile, in cui *S* è sufficientemente alta da consentire la nucleazione spontanea;
- zona di precipitazione, a grado di sovrasaturazione molto elevato, in cui la
 precipitazione è più veloce della nucleazione e non si osserva la formazione di
 cristalli ma di un precipitato amorfo.

La divisione delle regioni è qualitativa, in quanto legata a fenomeni cinetici, per cui i limiti non sono ben definiti, ma fungono da guida nella ricerca delle condizioni di cristallizzazione adeguate (Asherie, 2004). Il processo di formazione dei nuclei in

funzione del grado di sovrasaturazione può essere, inoltre, studiato attraverso tecniche di *light scattering*, anisotropia della fluorescenza e microscopia elettronica (Drenth, 2002).



Figura 1.2 Diagramma delle fasi, che mostra la concentrazione di proteina in soluzione come funzione della concentrazione di sale presente. In funzione del grado di sovrasaturazione, il diagramma può essere suddiviso in quattro aree: stabile, metastabile, labile e zona di precipitazione. Figura tratta da (Wlodawer *et al.*, 2017), con modifiche.

Malgrado la vastità di studi condotti, la nucleazione dei cristalli proteici rimane un processo in parte sconosciuto. Oltre alla CNT, è stata formulata una teoria a doppio stadio, chiamata *Two-Step Nucleation Mechanism* (TSNM), secondo cui, inizialmente, si forma una fase liquida densa di soluto, dalla quale, successivamente, si genera la struttura cristallina ed esistono due barriere energetiche da superare. Al momento non è stata verificata l'esistenza di un processo di nucleazione universale (Nanev, 2018). L'unica certezza è la presenza di un meccanismo di selezione di legame, denominato *Bond Selection Mechanism* (BSM), secondo il quale le interazioni proteina-proteina, necessarie per la formazione dei nuclei, sono soggette a limiti sterici, che riducono la velocità di nucleazione dei cristalli di proteina di due o tre ordini di grandezza rispetto

a quelli inorganici, nonostante la sovrasaturazione sia più elevata (Nanev, 2018; Ranguelov e Nanev, 2019).

1.3.2 La crescita

Una volta che il cristallo ha raggiunto dimensioni maggiori del nucleo, la sua crescita diventa favorita termodinamicamente: le molecole vengono trasportate attraverso il *bulk* della soluzione verso la superficie solida, dove si possono attaccare e incorporare (Durbin e Feher, 1996). Lo stadio di crescita è fondamentale in quanto determina la quantità e la distribuzione di impurezze, i difetti strutturali, la dimensione e alcune caratteristiche di diffrazione del cristallo (Wlodawer *et al.*, 2017).

La morfologia dell'interfaccia è determinata, principalmente, dalla competizione tra i processi di trasporto e la cinetica di incorporazione superficiale (Duan *et al.*, 2002).

1.3.2.1 Il trasporto attraverso il bulk

Il trasporto di materia ricopre un ruolo fondamentale nella crescita cristallina: la sua influenza varia a seconda della tecnica di cristallizzazione utilizzata, in quanto ognuna comporta il raggiungimento della sovrasaturazione in modi diversi (García-Ruiz *et al.*, 2016). Le proteine devono essere trasportate attraverso la soluzione da meccanismi prevalentemente diffusivi; come conseguenza di tale moto la zona nell'intorno del cristallo si impoverisce di proteina e si genera un gradiente di concentrazione: ciò comporta l'inibizione della nucleazione nelle vicinanze di un cristallo che sta crescendo. Nel caso limite di crescita limitata dalla diffusione, la concentrazione alla superficie del cristallo è pari alla solubilità *s*; in queste condizioni la velocità di crescita è data dall'Equazione 1.3.

$$R = \frac{D \cdot (c-s) \cdot V_{mol}}{\delta} \tag{1.3}$$

dove *D* è il coefficiente di diffusione di materia, V_{mol} è il volume occupato da una molecola nel cristallo, *c* è la concentrazione di proteina nel *bulk* e δ rappresenta lo spessore del *boundary layer*, ovvero la distanza che una molecola deve percorrere per diffondere dal *bulk* della soluzione alla superficie cristallina. Quando la diffusione è l'unico meccanismo di trasporto presente, δ è dell'ordine del raggio del cristallo e la velocità di crescita *R* diminuisce all'aumentare delle dimensioni del cristallo (Durbin e Feher, 1996).

Un meccanismo di trasporto alternativo è la convezione, che si origina a causa di un gradiente di densità tra il *bulk* e la zona vicina al cristallo (a densità minore). Tale fenomeno si verifica principalmente per velocità di crescita elevate, ma può avvenire anche per R più contenute. L'effetto della convezione è la riduzione di δ , che porta ad un aumento di R se il trasporto nel *bulk* è limitante; siccome è un meccanismo dipendente dal tempo e dallo spazio può causare variazioni delle condizioni di sovrasaturazione in soluzione ed evidenti striature nel cristallo finale, inficiandone la qualità. Inoltre, essa introduce disordine, difetti e dislocazioni sulla superficie del cristallo (Durbin e Feher, 1996). Tali effetti possono essere molto pronunciati, come osservato attraverso il monitoraggio della crescita in *time-lapse* (Koszelak *et al.*, 1991), perciò la convezione deve essere eliminata o, almeno, minimizzata.

Generalmente, la diffusione rappresenta il meccanismo di trasporto più efficiente su scala molecolare, mentre la convezione è più veloce su scala maggiore (García-Ruiz *et al.*, 2016).

È possibile stabilire il contributo del trasporto di materia convettivo, durante un esperimento di cristallizzazione, attraverso il numero adimensionato di Grashof (Gr), che rappresenta il rapporto tra le forze di galleggiamento e quelle di trascinamento (Equazione 1.4).

$$Gr = \frac{L^3 \cdot \alpha \cdot \Delta c \cdot g}{\nu^2} \tag{1.4}$$

dove *L* è la dimensione caratteristica della cella di cristallizzazione, Δc è la differenza di concentrazione, α è il coefficiente di espansione volumica, *g* è l'accelerazione gravitazionale e ν è la viscosità cinematica (García-Ruiz *et al.*, 2016).

Minore è il numero di Grashof, minore è il moto convettivo, per cui, per limitarlo, è possibile ridurre i volumi di cristallizzazione (L), diminuire g, conducendo la cristallizzazione in condizioni di microgravità o in gel, e aumentare la viscosità cinematica (Otálora *et al.*, 2009).

1.3.2.2 L'incorporazione di proteine sulla superficie del cristallo

Il meccanismo limitante la crescita dei cristalli proteici è, solitamente, l'incorporazione di proteine sulla superficie (Durbin e Feher, 1996).

Le facce sono prevalentemente piatte, il che implica che i cristalli crescano a strati e che ogni strato in accrescimento si espanda più rapidamente di quello che, in contemporanea, si forma al di sopra di esso. Le molecole di proteina colpiscono il cristallo in ogni punto, ma hanno maggiore possibilità di attacco in alcuni siti che si trovano lungo il gradino di un bordo dello strato superficiale (B, C, D in Figura 1.3), chiamati *steps* e *kinks*, dove possono formare più legami con il cristallo rispetto ad un punto più isolato come E (Wlodawer *et al.*, 2017).

Per questa ragione, la formazione di un nuovo strato (crescita in direzione normale) è più lenta e meno probabile del completamento di uno in accrescimento per attacco di molecole in *steps* e *kinks* (crescita tangenziale). Nel caso in cui le velocità nelle due direzioni fossero comparabili si potrebbero ottenere facce arrotondate. In queste condizioni, che corrispondono ad una sovrasaturazione elevata, la crescita sarebbe limitata dal trasporto nel *bulk* e la morfologia del cristallo sarebbe dendritica, in quanto gli angoli e i bordi del cristallo tenderebbero a crescere maggiormente (Durbin e Feher, 1996).



Figura 1.3 Rappresentazione schematica di alcuni siti di attacco sulla superficie di un cristallo cubico. Una molecola che urta la superficie nel sito E può formare un solo legame con il cristallo, mentre nei punti B, C, D si ha maggiore probabilità di attacco. Figura tratta da (Durbin e Feher, 1996), con modifiche.

I cristalli di proteina subiscono meccanismi di crescita simili a quelli dei cristalli inorganici, sebbene le velocità siano inferiori (Durbin e Feher, 1996).

A livelli di sovrasaturazione elevati prevale la nucleazione 2D (Figura 1.4a): le molecole, che urtano una superficie, vi rimangono attaccate solo se si organizzano per formare parte di un aggregato bidimensionale, che può poi crescere tangenzialmente per via del continuo attacco di altre molecole.

Un secondo meccanismo è la crescita in una dislocazione a vite o in un punto del lattice cristallino che presenta un difetto importante (Figura 1.4b): siccome non richiede l'associazione ordinata di proteine libere in soluzione, questo fenomeno può procedere anche a bassa sovrasaturazione (Durbin e Feher, 1996; Wlodawer *et al.*, 2017).



Figura 1.4 Crescita di un cristallo di taumatina (a) per nucleazione 2D e (b) in una dislocazione a vite. Figura tratta da (Wlodawer *et al.*, 2017), con modifiche.

Per raggiungere *steps* e *kinks* ed essere incorporate, le molecole possono diffondere superficialmente (2D) oppure attraverso la soluzione *bulk* (3D): il primo metodo dipende dalle interazioni proteina-cristallo, mentre il secondo da quelle proteina-solvente (Durbin e Feher, 1996).

L'incorporazione di una molecola in un cristallo ben ordinato richiede che ogni molecola sia adeguatamente orientata e posizionata rispetto a quelle che le si trovano vicino. Per garantire ciò i cristalli proteici dovrebbero crescere lentamente, a bassa sovrasaturazione (nella zona metastabile), per permettere alle molecole di orientarsi correttamente; tuttavia, tale esigenza è in conflitto con la necessità di avere sovrasaturazioni sostenute per condurre la nucleazione (Durbin e Feher, 1996; Drenth, 2002).

Una possibile soluzione è la separazione della nucleazione dalla crescita, mantenendo la soluzione di interesse nelle condizioni di sovrasaturazione fino all'ottenimento dei primi nuclei e, successivamente, spostandosi nella zona ottimale per la crescita, variando la concentrazione di precipitante, la temperatura o il pH. In alternativa si può abbassare la sovrasaturazione richiesta, adottando agenti nucleanti o promuovendo la nucleazione eterogenea (Durbin e Feher, 1996; Gavira, 2016).

La crescita dei cristalli termina spontaneamente quando la concentrazione di proteina raggiunge il limite di solubilità (Durbin e Feher, 1996).

1.4 Le principali tecniche di cristallizzazione

L'approccio sistematico alla cristallizzazione di proteine consiste nell'identificazione di un *set* di condizioni, comprendenti concentrazione di precipitante, pH, temperatura,

concentrazione di proteina, che consenta il raggiungimento di una soluzione sovrasatura. Una volta ottenuti i primi cristalli si procede con l'ottimizzazione del processo (Wlodawer *et al.*, 2017).

Le principali strategie finalizzate alla creazione della sovrasaturazione sono:

- l'alterazione della temperatura in una soluzione proteina-precipitante vicina alla condizione di sovrasaturazione, in modo da ridurre la solubilità della proteina;
- l'alterazione della forza ionica, aggiungendo sali, come solfato di ammonio, che, essendo esclusi dalla superficie proteica, promuovono il *salting out* attraverso la competizione tra sale e proteina per l'acqua di solvatazione. Inoltre, il sale, instaurando legami ione, può generare repulsione o attrazione tra le macromolecole, promuovendone la cristallizzazione;
- l'alterazione del pH, che modifica la carica superficiale delle proteine e può favorirne l'associazione;
- la formazione di legami inter-proteici attraverso un ligando;
- l'alterazione della costante dielettrica del mezzo, che agevola la formazione di legami idrogeno tra le macromolecole;
- la rimozione diretta di acqua mediante evaporazione;
- l'aggiunta di un polimero, come il polietilenglicole (PEG), che, agendo attraverso il meccanismo del "volume escluso", viene preferenzialmente escluso dalla superficie proteica;
- la rimozione di un agente solubilizzante, aggiunto appositamente alla soluzione (*salting in*);
- l'addizione di un alcol non volatile o di polimeri a basso peso molecolare, la cui azione è attribuita principalmente ad effetti di volume escluso (Drenth, 2002; Wlodawer *et al.*, 2017; Dumetz *et al.*, 2009).

Tali strumenti costituiscono la base delle tecniche utilizzate per produrre cristalli proteici, le quali si suddividono in due categorie:

- metodi tradizionali: *hanging drop, sitting drop, microbatch, dialisi, free interface diffusion*;
- metodi avanzati: sotto il controllo cinetico si utilizzano campi elettrici o magnetici, induttori di nucleazione o si regola il grado di sovrasaturazione, mentre, controllando il trasporto, si sfruttano la crescita in gel o in capillari di piccola dimensione, la microgravità e i sistemi microfluidici (Wlodawer *et al.*, 2017).

Ognuna di queste tecniche si distingue per il modo in cui esplora il diagramma delle fasi, che ha un'estrema influenza sulla nucleazione, sulla crescita e, infine, sulla qualità del cristallo finale (Gavira, 2016).

1.4.1 Metodi tradizionali

L'approccio più comune è costituito dalla *vapor diffusion* (VD), a cui appartengono le tecniche *hanging drop* (HD) e *sitting drop* (SD) (Figura 1.5). In entrambi i casi, all'interno di un ambiente chiuso, una goccia costituita da soluzioni di proteina e precipitante, si equilibra rispetto ad un volume maggiore di soluzione di precipitante (*reservoir*), attraverso la perdita di acqua. Ciò determina l'aumento della concentrazione di proteina e di precipitante, fino al valore presente nel *reservoir*, generando quindi una goccia sovrasatura.

La differenza consiste nella posizione della goccia, che, nel primo caso, si trova sospesa sul *reservoir*, mentre nel secondo è appoggiata su una superficie, chiamata *microbridge* (Wlodawer *et al.*, 2017). Quest'ultima configurazione è preferibile qualora la soluzione proteica abbia una tensione superficiale bassa (Drenth, 2002).



Figura 1.5 Raffigurazione della tecnica *vapor diffusion* in configurazione (a) SD e (b) HD. Nel primo caso la "goccia di cristallizzazione" si trova appoggiata su un supporto, mentre nel secondo è sospesa sul *reservoir*.

Un'alternativa è rappresentata dal *microbatch*, in cui una goccia formata da soluzioni di proteina e precipitante, in pari volume, è inserita all'interno di un pozzetto riempito di olio, il quale ha la funzione di prevenire l'evaporazione (Figura 1.6). In contrasto alle tecniche precedentemente esposte, questa ambisce alla creazione istantanea di una goccia sovrasatura, quindi potenzialmente adatta alla formazione di cristalli (Durbin e Feher, 1996, Drenth, 2002; Wlodawer *et al.*, 2017). Per questo motivo, considerando il diagramma delle fasi, si afferma che tale strategia permette di analizzare una sola

condizione, corrispondente ad un singolo punto sul diagramma, mentre, con HDVD e SDVD, le concentrazioni variano nel tempo e, quindi, si possono esplorare molteplici punti del diagramma. Il *microbatch* permette di esercitare un discreto controllo sulle condizioni di cristallizzazione, conducendo a cristalli di maggiore qualità rispetto a HDVD (Gavira, 2016). Tuttavia, tale tecnica presenta notevoli limiti, come la bassa riproducibilità, lo scarso controllo sul numero e sulla dimensione dei cristalli e l'essiccamento delle gocce.

In generale, *microbatch* e *vapor diffusion* sono due metodi comunemente utilizzati per generare i diagrammi di fase delle proteine (Baumgartner *et al.*, 2015), ma non permettono di ottenere cristalli di qualità accettabile per gli studi strutturali. Infatti, in entrambe le tecniche la crescita dei cristalli avviene in un ambiente eterogeneo, caratterizzato da fenomeni di trasporto convettivi, che si generano a causa della sedimentazione del soluto all'interno della goccia e della sua diminuzione nell'intorno del cristallo (Otálora *et al.*, 2009).



Figura 1.6 Tecnica del *microbatch* applicata per la cristallizzazione di proteine. La "goccia di cristallizzazione" si trova all'interno di un pozzetto, dispersa in olio.

La dialisi, analogamente alla VD, mira all'aumento graduale della concentrazione di precipitante affinché la soluzione risulti sovrasatura di proteina (Wlodawer *et al.*, 2017).

La *free interface diffusion*, raffigurata in Figura 1.7, è una tecnica meno utilizzata, che consiste nel depositare una soluzione proteica leggera su una più pesante di precipitante, promuovendo una lenta diffusione all'interfaccia, che genera un gradiente di concentrazione e può indurre la nucleazione. Lo scopo è raggiungere la sovrasaturazione molto lentamente, favorendo, nel migliore dei casi, un singolo evento di cristallizzazione (Otálora *et al.*, 2009, Drenth, 2002; Wlodawer *et al.*, 2017).



Figura 1.7 Free interface diffusion di una soluzione proteica all'interno di un capillare.

1.4.2 Metodi avanzati

I metodi tradizionali vengono comunemente utilizzati come punto di partenza per effettuare un primo *screening* sulle condizioni di cristallizzazione, ma generalmente non sono adatti per ottenere cristalli idonei agli studi di diffrazione (Gavira, 2016).

Al fine di indurre la nucleazione è possibile applicare campi elettromagnetici o ultrasuoni o inserire all'interno della soluzione di proteina alcune particelle capaci di favorire la nucleazione; queste tecniche alternative consentono di raggiungere condizioni impossibili da ottenere con gli approcci classici. Ad esempio, essi permettono la separazione delle fasi di nucleazione e crescita, in modo da favorire la formazione di cristalli di buona qualità (Wlodawer *et al.*, 2017; Gavira, 2016). Ulteriori vantaggi furono scoperti da Nanev e Penkova, i quali videro che i cristalli di lisozima, una delle proteine modello più studiate, crescevano orientati in una direzione preferenziale se sottoposti a campi elettrici e che, agendo con gli ultrasuoni, si ottenevano nuclei in tempi dimezzati rispetto a quelli usuali (Nanev e Penkova, 2002). Questo miglioramento è, principalmente, dovuto al restringimento della zona metastabile del diagramma delle fasi della proteina (Mao *et al.*, 2020). Tale approccio, inoltre, può essere sfruttato sia in configurazione *batch* sia in VD per controllare i fenomeni di trasporto (Wlodawer *et al.*, 2017).

Una valida alternativa è rappresentata dai campi magnetici, che, riducendo la forza di gravità, annullano la convezione. I cristalli ricavati hanno una dimensione più controllata e adatta alla diffrazione neutronica o ai raggi X (Wlodawer *et al.*, 2017).

Sullo stesso principio si basa la cristallizzazione in microgravità, in cui il trasporto di proteine è puramente diffusivo: le molecole in soluzione diffondono molto lentamente a causa della loro dimensione e, quindi, la nucleazione si protrae nel tempo. Gli aggregati proteici, eventualmente presenti, sono trasportati con minore velocità rispetto ai monomeri e, perciò, la loro incorporazione nel cristallo viene evitata: in questo modo il livello di qualità aumenta notevolmente (Wlodawer *et al.*, 2017). Tali esperimenti sono stati condotti durante alcune missioni nello spazio: ad esempio, durante le missioni Soyuz, la proteina trioso fosfato isomerasi (TIM) è stata cristallizzata a bordo della International Space Station (Maes *et al.*, 2007).

Siccome la disponibilità di proteine è spesso limitata e il numero di esperimenti da condurre è elevato, potrebbe essere conveniente sfruttare tecnologie microfluidiche (Wlodawer *et al.*, 2017). Tale pratica utilizza, infatti, volumi di proteina estremamente ridotti, in un ambiente quasi privo di convezione; oltre che per la cristallizzazione in sé, essa rappresenta un valido strumento per la determinazione del diagramma delle fasi, per separare la nucleazione e la crescita o per studi cinetici e termodinamici (Gavira, 2016). Tuttavia, il design è molto costoso e sofisticato, per cui tale metodologia presenta ancora un utilizzo limitato (Wlodawer *et al.*, 2017).

Ad oggi, una delle tecniche avanzate più vantaggiose è la cristallizzazione in gel, che mira alla creazione di un ambiente stabile, privo di convezione, sfavorevole alla sedimentazione e alla formazione di aggregati. Tale approccio venne proposto per la prima volta nel 1988 e permette di produrre cristalli proteici uniformi, di qualità simile a quelli ottenuti in microgravità, ma a costi più contenuti (Giegé, 2013; Artusio *et al.*, 2020).

Il gel più comunemente utilizzato è a base di silice e viene preparato a partire dal tetrametossisilano (TMOS), miscelato con il buffer di cristallizzazione fino ad ottenere una dispersione omogenea, che è successivamente unita alla proteina. La gelificazione avviene attraverso la polimerizzazione dell'acido silicico, il quale è prodotto dall'idrolisi del TMOS (Vidal *et al.*, 1998). In presenza della proteina, si possono instaurare legami idrogeno tra i gruppi idrossilici del silicio (-SiOH) e gli atomi donatori di elettroni dei residui proteici. Tale interazione potrebbe provocare la precipitazione spontanea di proteina, anche in assenza di sale; tuttavia, questo comportamento è raro per un gel ottenuto dal TMOS. Il tempo necessario per la gelificazione è inversamente proporzionale alla quantità di TMOS presente: è importante, però, che la nucleazione avvenga in tempi maggiori di quelli richiesti per la gelificazione (Gavira *et al.*, 2013).

Esistono due approcci distinti di cristallizzazione in gel: *batch* e contro-diffusione (CD) (Figura 1.8). Nel primo il precipitante, il TMOS e la proteina sono uniti insieme in un'unica soluzione, mentre, nel secondo caso, la proteina e il gel sono separati dal precipitante attraverso un setto di TMOS, il cui ruolo è ritardare la diffusione iniziale ed evitare uno shock osmotico (Otálora *et al.*, 2009).



Figura 1.8 Confronto tra la configurazione (a) *batch* e (b) contro-diffusione in gel. Figura tratta da (Artusio *et al.*, 2020), con modifiche.

La contro-diffusione viene implementata in spazi ristretti, come fiale per PCR o capillari in vetro di diametro inferiore a 0.2 mm, in cui un gel contenente la proteina viene posto a contatto con un volume maggiore di precipitante. Quest'ultimo diffonde velocemente verso la fase contenente la proteina immobilizzata all'interno del gel e provoca, inizialmente, la creazione di precipitato amorfo all'interfaccia. Con il procedere della diffusione del precipitante all'interno del gel, si osserva la formazione graduale di un gradiente di sovrasaturazione, che conduce alla generazione di cristalli di qualità crescente con la distanza dall'interfaccia (Otálora *et al.*, 2009).

Un vantaggio dei gel a base di silice è costituito dal fatto che il 100% del gel è incorporato dal cristallo durante la crescita, producendo un materiale composito con maggiore stabilità e proprietà meccaniche, che mantiene buone qualità di diffrazione. Inoltre, attraverso un singolo esperimento di contro-diffusione è possibile esplorare un intervallo di condizioni di sovrasaturazione esteso, equivalente a molte prove di *microbatch* o VD (Gavira, 2016; Gavira *et al.*, 2013).

I gel di silice presentano, bensì, due limitazioni importanti:

- si osserva un effetto inibitivo, infatti la velocità di nucleazione è inferiore rispetto alle tecniche classiche;
- è difficile gelificare soluzioni ad alto contenuto proteico, in quanto la flocculazione potrebbe prevalere sulla gelificazione.

A titolo di esempio, si è visto che, nel caso del lisozima, il gel può interagire con la proteina, attraverso i suoi gruppi superficiali -SiOH, mediante interazioni elettrostatiche o legami idrogeno, che favoriscono l'adsorbimento della proteina sulla superficie del gel. Ciò causa la diminuzione della concentrazione proteica e, quindi, della velocità di nucleazione. Al fine di ridurre tali interazioni è possibile aggiungere additivi al gel, sostituendo i gruppi silanolici con quelli metilici (Vidal *et al.*, 1998).

Per ovviare a questo problema, nel 1991 Provost e Robert proposero l'utilizzo di gel a base di agarosio (Duan *et al.*, 2002); recenti studi hanno dimostrato la capacità

di tale sostanza di aumentare la densità di nucleazione dei cristalli di lisozima, in contrasto all'effetto inibitivo dei gel di silice (Artusio *et al.*, 2020; Artusio *et al.*, 2021). Questa azione è valida indipendentemente dalla natura della proteina ed è, quindi, dovuta ad interazioni fisiche piuttosto che chimiche. Utilizzando gel di agarosio è possibile ottenere cristalli più uniformi e di dimensione controllata, grazie alla prevalenza della diffusione come meccanismo di trasporto (Artusio *et al.*, 2020). Si può, quindi, osservare un effetto promotore della cristallizzazione, che può essere sfruttato per limitare la concentrazione di proteina necessaria, garantendo la nucleazione a bassi livelli di sovrasaturazione, in modo tale da ottenere cristalli di dimensione elevata (Artusio *et al.*, 2021; Vidal *et al.*, 1998).

1.5 Le strategie di controllo della cristallizzazione

La cristallizzazione è influenzata da parametri come pH, temperatura, concentrazione di sale o altri componenti in soluzione, presenza di impurezze, livello di sovrasaturazione o stress meccanici di miscelazione e vibrazione. L'estrema sensibilità del processo ha portato alla ricerca delle condizioni di lavoro più efficienti e dei metodi di controllo per l'ottenimento di cristalli di buona qualità (Durbin e Feher, 1996).

1.5.1 La scelta delle condizioni di cristallizzazione

Una prima strategia consiste nel definire le condizioni di cristallizzazione in modo da regolare le interazioni tra le singole molecole di proteina, ottenendo un'unica conformazione molecolare e riducendo la solubilità per indurre la nucleazione. Le interazioni proteiche coinvolte sono: legami idrogeno, interazioni elettrostatiche, forze di van der Waals, interazioni idrofobiche ed effetti di volume escluso. Le ultime due, in particolare, sono considerate estremamente rilevanti per il processo di cristallizzazione (Durbin e Feher, 1996).

La scelta delle condizioni di processo ambisce ad ottenere cristalli di proteina con buone qualità di diffrazione; si tratta di un problema complesso, in quanto le variabili in gioco sono connesse fra loro (McPherson e Cudney, 2014). Un ruolo fondamentale è, certamente, ricoperto dal pH, che altera le interazioni elettrostatiche controllando le cariche dei residui; in particolare, tale parametro ha influenza sulla nucleazione, ma non sulla crescita (Durbin e Feher, 1996; Drenth, 2002; Maosoongnern *et al.*, 2017). L'aggiunta di molecole organiche di piccole dimensioni abbassa la costante dielettrica del mezzo, aumentando gli effetti elettrostatici a lungo raggio (Durbin e Feher, 1996). L'utilizzo di tensioattivi può, invece, ridurre il ruolo delle interazioni idrofobiche. La presenza di sali può avere influenza sulla carica superficiale, sull'idrofobicità e sulla forza ionica, che, a sua volta, determina la solubilità. L'aggiunta di precipitanti alla soluzione comporta la loro esclusione dalle vicinanze della proteina, che, oltre a favorire la cristallizzazione, può anche avere un effetto di stabilizzazione (Durbin e Feher, 1996). Le interazioni idrofobiche sono, invece, promosse da un aumento di temperatura, che, determinando l'entità degli effetti entalpici ed entropici, influenza la solubilità della proteina stessa (Durbin e Feher, 1996; Drenth, 2002). Generalmente, un aumento della temperatura comporta la riduzione della sovrasaturazione (Maosoongnern *et al.*, 2017). La dipendenza della cristallizzazione da questa grandezza è maggiore quando la forza ionica delle acque madri è contenuta, per esempio in presenza di polimeri, alcoli o solventi organici, piuttosto che di sali.

È fondamentale che, una volta individuate le condizioni operative ottimali, queste vengano mantenute costanti durante la creazione e la conservazione dei cristalli. I prodotti devono, infatti, essere mantenuti a temperatura controllata e il campionamento periodico deve essere effettuato senza stressarli meccanicamente, in modo tale da non alterarne le proprietà, inficiandone la qualità (McPherson e Cudney, 2014).

1.5.2 L'utilizzo di superfici eteronucleanti

Le caratteristiche fisico-chimiche dei cristalli finali possono essere regolate sfruttando superfici ingegnerizzate per promuovere la nucleazione eterogenea, riducendone i tempi e permettendo di ottenere cristalli di diversa dimensione e forma, senza variare le condizioni operative (Artusio e Pisano, 2018). I potenziali benefici sono legati al maggiore controllo e riproducibilità delle proprietà fisiche dei prodotti che tale tecnologia offre. Tuttavia, si incontrano difficoltà legate alla limitata comprensione della nucleazione, delle interazioni tra soluto e superficie e all'elevato numero di esperimenti da condurre per ricavare dati statisticamente significativi. La conduzione della cristallizzazione indotta attraverso una superficie può, infine, controllare il polimorfismo e la dimensione del cristallo (Artusio e Pisano, 2018).

1.5.3 La selezione del polimorfo di interesse

In ambito farmaceutico il polimorfismo è associato alla presenza di diverse forme cristalline, amorfe, solvatate o idratate dello stesso principio attivo farmaceutico (Artusio e Pisano, 2018). Anche i cristalli proteici mostrano tale comportamento: ad esempio, nel caso del lisozima è possibile ottenere forme esagonali, tetragonali, ortorombiche, monocliniche, e tricliniche (Gavira, 2016; Heijna *et al.*, 2008). Nella biocristallografia la presenza del polimorfismo può costituire un limite, in quanto aumenta il numero di forme cristalline da ottimizzare e caratterizzare. Tuttavia, il fenomeno rappresenta un importante strumento per correlare i diversi stati conformazionali delle proteine alle relative condizioni di cristallizzazione, permettendo di individuare quelle più adatte alla formazione di cristalli di qualità adeguata agli studi strutturali (Bonnefond *et al.*, 2011).

Essendo responsabile delle proprietà fisico-chimiche del cristallo finale (quali biodisponibilità, densità, velocità di dissoluzione, punto di fusione, stabilità e colore), l'obiettivo è generare il polimorfo di interesse in modo riproducibile, modificando opportunamente l'ambiente di lavoro (Artusio e Pisano, 2018). In particolare, durante gli studi di cristallizzazione, si cerca di identificare la maggior parte dei polimorfi, per esempio lavorando a sovrasaturazioni elevate (Ranguelov e Nanev, 2019). La cristallizzazione in contro-diffusione in gel può essere utilizzata a tale scopo; infatti, essa permette di ottenere più di un polimorfo nello stesso esperimento, fenomeno decisamente improbabile con le altre tecniche di cristallizzazione (Otálora *et al.*, 2009).

Generalmente, la selezione del polimorfo di interesse viene condotta mediante procedure di *trial-and-error*, basate sull'utilizzo dei diagrammi di fase, che distinguono le diverse strutture in funzione della loro solubilità (Ranguelov e Nanev, 2019). Siccome tale fenomeno è determinato, essenzialmente, dallo stadio di nucleazione, esso dipende, a livello molecolare, da fattori sia fisici che chimici. L'approccio più comune consiste nel variare la temperatura, la sovrasaturazione o la tipologia di solvente durante la cristallizzazione. In aggiunta, è possibile sfruttare superfici ingegnerizzate, che, controllando la nucleazione, permettono di ottenere, tra quelli possibili, il polimorfo di interesse (Artusio e Pisano, 2018).

1.5.4 Il controllo della dimensione dei cristalli

In ambito farmaceutico la distribuzione dimensionale dei cristalli influenza numerose operazioni di *downstream*, come filtrazione ed essiccamento, e le proprietà del prodotto, in termini di dissoluzione e biodisponibilità (Bakar *et al.*, 2009). Per quanto riguarda i cristalli proteici, principalmente, l'aspetto dimensionale ricopre un ruolo fondamentale per ricavare informazioni in merito alla struttura macromolecolare (Drenth, 2002).

Un parametro chiave per il controllo è, certamente, la sovrasaturazione, da cui dipendono sia la nucleazione che la velocità di crescita. Se è alta, la nucleazione prevale sulla crescita e si ottengono tanti cristalli di piccole dimensioni, mentre se è bassa, si formano pochi cristalli ma di dimensioni maggiori, in quanto la nucleazione è poco promossa. Al fine di generare strutture abbastanza grandi e uniformi è possibile, quindi, ridurre la concentrazione di proteina, abbassando la sovrasaturazione fino ad ottenere, nel caso migliore, un singolo cristallo (Nanev, 2013). Tuttavia, si è dimostrato che tale assunzione non è universale. Ad esempio, non è sempre valida per lisozima e taumatina. La dimensione dei cristalli è influenzata anche dalla presenza di impurezze, che deve essere evitata (McPherson e Cudney, 2014).

Risultati promettenti sono stati osservati utilizzando tecniche di cristallizzazione in CD in gel di silice, in cui è probabile ottenere cristalli di dimensione elevata e di forma cilindrica, che riempiono completamente la sezione del capillare, in quanto nella zona a sovrasaturazione più bassa si formano pochi nuclei e, quindi, prevale la crescita (Otálora *et al.*, 2009). Queste strutture sono molto ricercate poiché adatte agli studi di Cristallografia Neutronica (NC), una tecnica utilizzata per ricavare informazioni sullo stato di protonazione dei residui amminoacidici, che necessita di disporre di cristalli di dimensioni elevate, al fine di ottenere un segnale di diffrazione misurabile (Blakeley *et al.*, 2008). La NC, interagendo direttamente con i nuclei atomici, è più affidabile della diffrazione a raggi X, che dipende dal numero di elettroni dell'atomo, nel determinare la struttura proteica (in termini di posizione degli atomi di idrogeno). Infatti, gli atomi di idrogeno altamente polarizzati non possiedono elettroni e, quindi, non possono essere rilevati ai raggi X (Zaccai e Coquelle, 2020). Tuttavia, ad oggi, solo poche proteine sono state capaci di generare cristalli di dimensioni sufficienti, tra cui emoglobina, taumatina e lisozima (Otálora *et al.*, 2009).

Inoltre, in CD, la dimensione dei cristalli è modulabile in funzione del contenuto di TMOS (Gavira *et al.*, 2013). Aumentando la concentrazione di TMOS nel gel è possibile, infatti, osservare una variazione delle caratteristiche dei cristalli ottenuti, analogamente alla riduzione della densità di nucleazione, come mostrato in Figura 1.9 per il lisozima.



TMOS % (v/v)

Figura 1.9 Riduzione della nucleazione e variazione della morfologia dei cristalli di lisozima all'aumentare della concentrazione di TMOS nel gel (da 8% (v/v) a 18% (v/v)). Figura tratta da (Gavira *et al.*, 2013), con modifiche.

Tale effetto può essere causato dall'incremento del metanolo prodotto durante la polimerizzazione del TMOS, che comporta un aumento della solubilità proteica, o dall'intrappolamento delle proteine all'interno delle particelle silicee, che ne diminuisce la concentrazione in soluzione (Gavira *et al.*, 2013). In Figura 1.9 si nota che, per concentrazioni di TMOS dall'8 al 12% (v/v), la riduzione della velocità di nucleazione è accompagnata da un aumento della dimensione dei cristalli, mentre, oltre il 12% (v/v) di TMOS, la dimensione media dei cristalli diminuisce a causa dell'aumento di solubilità e dell'intrappolamento di proteine.

All'aumentare del TMOS, inoltre, la morfologia dei cristalli subisce una mutazione, passando da una geometria a facce piane ad una forma ellissoidale (Figura 1.10), a causa della diminuzione dell'energia libera superficiale indotta dall'incorporazione di fibre silicee nelle facce del cristallo ad alte concentrazioni di gel (Gavira *et al.*, 2013).



Figura 1.10 Rappresentazione schematica dell'evoluzione morfologica di un cristallo proteico al variare della concentrazione di TMOS. Figura tratta da (Gavira *et al.*, 2013), con modifiche.

Infine, una tecnica promettente è la nucleazione indotta da superfici eteronucleanti. Recenti studi hanno analizzato la cristallizzazione di lisozima e taumatina in presenza di diversi substrati, evidenziando come tale strumento sia efficace per ottenere cristalli proteici di grandi dimensioni e con buone caratteristiche di diffrazione (Artusio e Pisano, 2018).

1.6 Obiettivo della tesi

Questo progetto di tesi è finalizzato allo studio della cristallizzazione in gel di silice di due proteine: lisozima e proteinasi K.

La tesi è suddivisa in cinque capitoli. Il primo ha la funzione di introdurre l'argomento, presentandone le applicazioni, le criticità, le tecniche maggiormente diffuse e le principali strategie di controllo. Nel secondo capitolo sono riportati i metodi, le condizioni operative e gli strumenti utilizzati a livello sperimentale. Il terzo capitolo tratta lo studio preliminare di cristallizzazione delle due proteine in *microbatch* e *hanging drop-vapor diffusion*, effettuato allo scopo di trovare le condizioni adatte alla formazione di cristalli. I risultati di questo studio sono stati utilizzati come riferimento per la fase di analisi successiva, discussa nel quarto capitolo, che ha riguardato la cristallizzazione in gel di silice, condotta nelle modalità contro-diffusione e *batch*. Per le tecniche in gel è stata, inoltre, esaminata l'azione di tre additivi, metildietossisilano, dimetildietossisilano e trimetiletossisilano. Il quinto capitolo riporta, infine, le conclusioni.

Le principali attività svolte in questo lavoro di tesi sono quindi:

- lo studio della cristallizzazione in *microbatch* di lisozima e proteinasi K, i cui risultati sono riportati nel terzo capitolo;
- lo studio della cristallizzazione in *hanging drop-vapor diffusion* di lisozima e proteinasi K i cui risultati sono riportati nel terzo capitolo;
- lo studio della cristallizzazione in contro-diffusione in gel di silice di lisozima, in presenza e in assenza di additivi, i cui risultati sono riportati nel quarto capitolo;
- lo studio della cristallizzazione in *batch* in gel di silice di lisozima e proteinasi K, in presenza e in assenza di additivi, i cui risultati sono riportati nel quarto capitolo.

2. Materiali e metodi

In questo capitolo sono riportati i materiali, i metodi e gli strumenti utilizzati per lo studio di cristallizzazione condotto in questo progetto di tesi.

2.1 Materiali

Le proteine impiegate sono il lisozima ottenuto dall'albume d'uovo di gallina (HEWL, CAS: 12650-88-3, MW = 14.3 kDa), acquistato da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e la proteinasi K (ProK, CAS: 3950-01-6, MW = 27000 g/mol) fornita da PanReac AppliChem (Darmstadt, Germania). La soluzione di HEWL è stata filtrata mediante siringhe (1 mL, GermanMed[®], Amburgo, Germania) e filtri per siringa (*cut-off* = 0.22 μ m, INCOFAR S.r.1., Modena, Italia).

La concentrazione delle soluzioni di proteina è stata misurata mediante spettrofotometria UV/visibile (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), utilizzando piastre UV-STAR[®] da 96 pozzetti (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania).

Le soluzioni buffer utilizzate sono acetato di sodio (CAS: 127-09-3, MW = 82.0343 g/mol, Carlo Erba Reagenti SpA, Milano, Italia) a pH 4.5, acido 4-2idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES, purezza \geq 99.5%, CAS: 7365-45-9, MW = 238.3012 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a pH 7 e citrato di sodio a pH 6.5, ottenuto a partire da acido citrico (purezza = 99.8%, CAS: 77-92-9, MW = 192.124 g/mol, Carlo Erba Reagenti SpA, Milano, Italia). L'aggiustamento del pH è stato effettuato mediante il pH-metro Orion Star A111 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Prima della preparazione delle soluzioni buffer, il pH-metro è stato calibrato utilizzando tre soluzioni tampone di riferimento a pH 10, 7 e 4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Lo strumento è equipaggiato con un elettrodo fornito dalla Eutech Instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Per aggiustare il pH del buffer acetato di sodio sono stati utilizzati acido acetico (purezza \geq 99.8%, CAS: 64-19-7, MW = 60.052 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e NaOH (3 M, CAS: 1310-73-2, MW = 39.997 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), mentre per tutte le altre soluzioni buffer sono stati utilizzati acido cloridrico (0.1 M, CAS: 7647-01-0, MW = 36.458 g/mol, Fluka Chemika) e NaOH (3 M, CAS: 1310-73-2, MW = 39.997 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Per condurre la cristallizzazione i precipitanti adottati sono cloruro di sodio (purezza \geq 99.5%, CAS: 7647-14-5, MW = 58.44 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), nitrato di sodio (purezza \geq 99%, CAS: 7631-99-4, MW = 84.9947 g/mol, Acros Organics, Geel, Belgio), solfato di ammonio (purezza = 99.5%, CAS: 7783-20-2, MW = 132.14 g/mol, Acros Organics, Geel, Belgio). Sia i buffer che i precipitanti sono stati filtrati mediante siringhe monouso (10 mL, Chemil S.r.l., Padova, Italia) e filtri per siringa (*cut-off* = 0.22 µm, INCOFAR S.r.l., Modena, Italia).

Per pesare i vari componenti sono state utilizzate una bilancia analitica (NewClassic MS, Mettler Toledo, Columbus, USA) e una bilancia analitica (BL 224, XS Instruments, Carpi, Italia).

Per la tecnica di cristallizzazione in *microbatch* è stato usato olio siliconico (CAS: 63148-62-9, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), piastre in polistirene da 96 pozzetti non trattate (Costar[®], Kennebunk, USA) e Parafilm[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); per *hanging drop-vapor diffusion* (HDVD), invece, piastre da 24 pozzetti (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), vetrini (diametro 20 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), *vacuum grease* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e Parafilm[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

La cristallizzazione in gel è stata effettuata all'interno di fiale PCR (0.2 mL, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania), utilizzando tetrametossisilano (TMOS, CAS: 681-84-5, MW = 152.22 g/mol, purezza = 99%, Acros Organics, Geel, Belgio), metildietossisilano (1-MDEOS, CAS: 2031-62-1, MW = 134.25 g/mol, purezza \geq 96%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), dimetildietossisilano (2-MDEOS, CAS: 78-62-6, MW = 148.28 g/mol, purezza = 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), trimetiletossisilano (3-MEOS, CAS: 1825-62-3, MW = 118.25 g/mol, purezza = 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). La tecnica è stata condotta sotto cappa chimica (modello 5003ED, Labosystem S.r.l., Rovellasca, Italia), con ventilazione massima. Nella variante in contro-diffusione, le fiale PCR sono state inserite all'interno di Eppendorf tubes[®] da 1.5 mL (Amburgo, Germania) oppure in piccoli sacchetti trasparenti sigillati (2 cm x 2 cm).

Tutte le procedure sono state implementate mediante pipette, con i relativi puntali, da 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L (Eppendorf Research[®] plus, Amburgo, Germania), disponendo di guanti in nitrile (Chemil S.r.l., Padova, Italia).

Per la miscelazione delle soluzioni e nella tecnica di cristallizzazione in gel è stato utilizzato l'agitatore magnetico MS-200 (Medline Scientific, Oxford, UK). L'osservazione dei cristalli è stata fatta mediante lo stereomicroscopio Leica M125 C (Leica Microsystems Ltd., Wetzlar, Germania) con il relativo software LAS X 3.0.6.17580 e il microscopio invertito Eclipse Ti-E (Nikon, Tokyo, Giappone).

2.2 Metodi

2.2.1 Preparazione delle soluzioni stock

Ai fini di cristallizzare HEWL e ProK sono state impiegate soluzioni tampone (buffer), precipitanti e soluzioni proteiche.

I buffer sono stati preparati come soluzioni stock, a concentrazione maggiore di quella desiderata, pesando la quantità corretta di soluto e dissolvendola in un volume di acqua distillata (DW) pari al 80% di quello finale. Dopo aver corretto il pH, sono state portate a volume mediante DW e si è effettuata nuovamente la misura. Tale verifica è stata condotta, per ogni esperimento, prima dell'utilizzo del buffer stesso.

Analogamente, i precipitanti sono stati preparati in concentrazioni stock. Tutti i composti sono stati sottoposti a filtrazione mediante filtri $0.22 \mu m$. Nelle tabelle 2.1 e 2.2 sono riportati, rispettivamente, i buffer e i sali utilizzati, con le relative condizioni di impiego.

Per gli esperimenti condotti con HEWL sono state preparate le seguenti soluzioni stock:

- buffer acetato di sodio 0.5 M in acqua distillata, a pH 4.5;
- cloruro di sodio 20% (w/w) in acqua distillata, come precipitante per le tecniche di *microbatch* e HDVD;
- cloruro di sodio 20% e 30% (w/w) in buffer acetato di sodio 50 mM, come precipitante nelle tecniche in contro-diffusione e *batch* in gel rispettivamente.

Per gli esperimenti condotti con proteinasi K, invece, sono state utilizzate le soluzioni stock:

- buffer HEPES 0.5 M, a pH 7;
- nitrato di sodio 3 M in acqua distillata, come precipitante;
- solfato di ammonio 3 M in acqua distillata, come precipitante;
- citrato di sodio 0.5 M, a pH 6.5, ottenuto miscelando acido citrico in DW e correggendo il pH con NaOH, impiegato come additivo per il nitrato di sodio in *microbatch* e HDVD.

Soluto	Solvente	Concentrazione stock	Concentrazione di utilizzo	рН	Proteina relativa
Acetato di sodio (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Acqua distillata (DW)	0.5 M	50 mM	4.5	HEWL
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Acqua distillata (DW)	0.5 M	50 mM	7	ProK
Acido citrico (C ₆ H ₈ O ₇)	Acqua distillata (DW)	0.5 M	25 mM	6.5	ProK

 Tabella 2.1 Elenco delle soluzioni tampone utilizzate.

Tabella 2.2 Elenco dei precipitanti utilizzati.

Soluto	Solvente	Concentrazione stock	Proteina relativa
Cloruro di sodio (NaCl)	Acqua distillata (DW)	20% (w/w)	HEWL
Cloruro di sodio (NaCl)	50 mM acetato di sodio	20% (w/w)	HEWL
Cloruro di sodio (NaCl)	50 mM acetato di sodio	30% (w/w)	HEWL
Nitrato di sodio (NaNO ₃)	Acqua distillata (DW)	3 M	ProK
Solfato di ammonio ((NH4) ₂ SO4)	Acqua distillata (DW)	3 M	ProK

Le soluzioni proteiche sono state preparate, in concentrazione stock, pesando la quantità desiderata di proteina e disciogliendola nel buffer appropriato. I valori stock di concentrazione, per le due macromolecole utilizzate, sono riportati in Tabella 2.3.

Proteina	Tecnica	Concentrazione, mg/mL	Buffer
HEWL	Microbatch/HDVD	90	50 mM acetato di sodio
HEWL	CD/ Batch in gel	200	50 mM acetato di sodio
ProK	Microbatch/HDVD	40	50 mM HEPES
ProK	Batch in gel	60	50 mM HEPES

Tabella 2.3 Elenco delle concentrazioni delle soluzioni stock di proteina adottate.

Terminata la dissoluzione della proteina nel buffer, la sua concentrazione effettiva è stata misurata mediante spettrofotometro, come descritto nella sezione che segue.

2.2.2 Misura della concentrazione di proteina

La concentrazione delle soluzioni proteiche è stata misurata mediante spettrofotometria UV-Visibile, utilizzando il software "SkanIt Software for Microplate Reader, Research edition" versione 6.0.2.3 (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finlandia).

Prima di ogni esperimento, oltre a misurarne la concentrazione, è stato acquisito uno spettro completo della proteina in modo tale da verificarne la corretta conformazione. Esso è stato acquisito in un intervallo di lunghezze d'onda tra 230 e 350 nm, con una risoluzione di acquisizione pari a 1 nm.

Per calcolare la concentrazione, siccome le soluzioni utilizzate sono molto concentrate, bisogna effettuare una diluizione della soluzione prima di sottoporla ad analisi spettrofotometrica, in modo che l'assorbanza sia inferiore a 1. A tal fine, sono stati preparati tre campioni diluiti, per ognuno dei quali è stata misurata l'assorbanza a 280 nm (lunghezza d'onda di assorbimento del triptofano) rispetto ad un "bianco", costituito da 200 μ L di DW. La soluzione stock proteica è stata diluita in acqua distillata, utilizzando un fattore di diluizione di circa 400 per HEWL e 200 per proteinasi K, aggiungendo, rispettivamente, 2.5 μ L e 5 μ L di proteina a 1000 μ L di DW. Per ogni campione, dopo aver pesato in una Eppendorf tube[®] le quantità indicate, 200 μ L di soluzione sono stati inseriti in un pozzetto di una piastra UV-STAR[®]. Questa procedura è stata ripetuta per quattro volte in modo tale da ottenere, in totale, 12 valori di concentrazione, la cui media aritmetica rappresenta il valore finale.

La determinazione della concentrazione di proteina è stata effettuata direttamente dal software, impostando un protocollo di calcolo che:

- valuta l'assorbanza della soluzione a 900 e 975 nm e le sottrae il valore di DW nelle stesse condizioni. In questo modo si effettua una correzione del cammino ottico, che per le piastre non è fisso a 1 cm, ma può subire leggere variazioni a seconda del volume di liquido nel pozzetto. Le misure di assorbanza nel pozzetto a 900 e 975 nm vengono, quindi, rapportate ai valori di assorbanza che avrebbero per 1 cm di cammino ottico, effettuando una calibrazione;
- 2) moltiplica il valore dell'assorbanza per il fattore di diluizione teorico D^* , ottenuto sommando la massa di DW realmente misurata (m_{DW}) con quella di proteina teorica che si utilizza $(m_P, 2.5 \text{ mg per HEWL e 5 mg per proteinasi K})$ e dividendola per quest'ultima (Equazione 2.1);

$$D^* = \frac{m_{DW} + m_P}{m_P}$$
(2.1)

 calcola la concentrazione *c* attraverso la legge di Lambert Beer (Equazione 2.2) (McKechnie *et al.*, 2018), in cui *A* corrisponde all'assorbanza, *b* è il cammino ottico (cm) e ε rappresenta il coefficiente di estinzione (detto anche coefficiente di assorbimento molare), pari a 2.65 mL·cm⁻¹·mg⁻¹ per HEWL e 1.42 mL·cm⁻¹·mg⁻¹ per la proteinasi K.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot b} \tag{2.2}$$

La concentrazione c (mg/mL) è, quindi, proporzionale all'assorbanza A, che, essendo calcolata a 280 nm, dipende dal numero di residui di triptofano presenti. Maggiore è il contenuto di tali amminoacidi, maggiore è la concentrazione di proteina c.

2.2.3 Tecniche di cristallizzazione

Come esposto in §1.4, sono numerose le tecniche implementate per l'ottenimento di cristalli proteici. In questo studio, HEWL e proteinasi K sono state cristallizzate in *microbatch*, HDVD e gel di silice, sia in contro-diffusione che in *batch*.

2.2.3.1 Microbatch

Per entrambe le proteine, tutti gli esperimenti in *microbatch* (MB) sono stati condotti in piastre da 96 pozzetti, riempiti con 200 μ L di olio siliconico. Su una striscia di Parafilm[®] sono stati miscelati 2 μ L di soluzione di proteina con 2 μ L di soluzione di precipitante, entrambi a concentrazione doppia rispetto a quella desiderata, formando una goccia che è stata, successivamente, inserita sotto il pelo libero dell'olio. Quest'ultimo è un composto polimerico, costituito da unità (Si(CH₃)₂O)_n, che, essendo siliconico, permette di aumentare la velocità di nucleazione rispetto ad uno paraffinico e serve per proteggere la goccia da evaporazione e ossidazione (D'Arcy *et al.*, 2004).

Le piastre sono state mantenute all'interno di scatole isolanti, per limitare eventuali sbalzi termici, che potrebbero alterare l'andamento della cristallizzazione. Il campionamento, durante la prima settimana, è stato effettuato ogni giorno, mentre, nel periodo seguente, con frequenza mensile. Le prove effettuate, per HEWL e ProK, sono elencate in Tabella 2.4.

Prova	Proteina	Precipitante
MB-1	HEWL	NaCl in DW
MB-2	ProK	NaNO ₃ in DW, 25 mM citrato di sodio
MB-3	ProK	(NH4)2SO4 in DW

Tabella 2.4 Prove effettuate per HEWL e ProK in microbatch.

Per ogni prova sono state analizzate diverse concentrazioni di proteina e precipitante, ottenute diluendo opportunamente le soluzioni stock. La prova MB-1 corrisponde a:

- 22.5, 30, 37.5, 45 mg/mL di HEWL diluita in acetato di sodio 50 mM;
- 1, 2, 3, 4% (w/w) di NaCl in DW.

La prova MB-2 corrisponde alle condizioni:

- 2.5, 3.5, 5, 7.5, 8.5, 10 mg/mL di ProK diluita in HEPES 50 mM;
- 0.025, 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45 M di NaNO₃, diluito in DW e addizionato con citrato di sodio 25 mM.

La prova MB-3 corrisponde alle condizioni:

- 2.5, 3.5, 5, 7.5, 8.5, 10 mg/mL di ProK diluita in HEPES 50 mM;
- 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 M di (NH₄)₂SO₄, diluito in DW.

In Tabella 2.5 sono riportate le prove di MB condotte con HEWL per le stesse condizioni analizzate in MB-1, ma in presenza di tre additivi: metildietossisilano (1-MDEOS), dimetildietossisilano (2-MDEOS) e trimetiletossisilano (3-MEOS). Tali sostanze sono state aggiunte alla soluzione di NaCl al fine di mantenere in ogni pozzetto un rapporto tra proteina e additivo pari a, rispettivamente, 12, 11.6 e 13. Per 1-MDEOS è stato studiato anche il rapporto 0.4.

Prova	Proteina	Additivo	Rapporto HEWL/additivo
MB-4	HEWL	1-MDEOS	12
MB-5	HEWL	2-MDEOS	11.6
MB-6	HEWL	3-MEOS	13
MB-7	HEWL	1-MDEOS	0.4

Tabella 2.5 Prove effettuate per HEWL in microbatch in presenza di additivi.

2.2.3.2 Hanging drop-vapor diffusion

Gli esperimenti in *hanging drop-vapor diffusion* (HDVD) sono stati effettuati all'interno di piastre da 24 pozzetti, il cui bordo è stato, dapprima, ricoperto di *vacuum grease* e, successivamente, riempito con 1 mL di precipitante. Su Parafilm[®] sono state preparate due gocce identiche di 4 μ L, miscelando 2 μ L di soluzione di proteina, a concentrazione doppia rispetto a quella desiderata, con un egual volume di sale prelevato dal *reservoir*. In questo modo la concentrazione di precipitante nella goccia è la metà di quella nel pozzetto. Le gocce sono state, in seguito, depositate su un vetrino trasparente. Quest'ultimo è stato appoggiato sullo strato di colla in modo tale che le gocce rimanessero sospese sul *reservoir* di sale, applicando una leggera pressione, al

fine di creare un ambiente sigillato rispetto all'esterno. Se così non fosse, infatti, si potrebbero ottenere dei risultati di cristallizzazione alterati. Le modalità di conservazione e campionamento delle piastre sono analoghe al MB (in §2.2.3.1).

In Tabella 2.6 sono riportate le prove condotte in HDVD per HEWL e ProK.

Prova	Proteina	Precipitante	
HDVD-1	HEWL	NaCl in DW	
HDVD-2	ProK	NaNO ₃ in DW, 25 mM citrato di sodio	
HDVD-3	ProK	(NH4)2SO4 in DW	
HDVD-4	ProK	NaNO ₃ in DW, 25 mM citrato di sodio e (NH ₄) ₂ SO ₄ in DW	

Tabella 2.6 Prove effettuate per HEWL e ProK in HDVD.

In HDVD-1 sono state studiate le stesse condizioni di MB-1 (elencate in §2.2.3.1). La prova HDVD-2 corrisponde alle condizioni:

- 5, 7.5, 10, 12.5, 15 mg/mL di ProK diluita in HEPES 50 mM;
- 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45 M di NaNO₃, diluito in DW e addizionato con citrato di sodio 25 mM.

La prova HDVD-3 corrisponde alle condizioni:

- 5, 7.5, 10, 12.5, 15 mg/mL di ProK diluita in HEPES 50 mM;
- 0.75, 1, 1.25, 1.5 M di (NH₄)₂SO₄, diluito in DW.

La prova HDVD-4 corrisponde alle condizioni:

- 10, 15 mg/mL di ProK diluita in HEPES 50 mM e 0.125 M di NaNO₃;
- 7.5, 15 mg/mL di ProK diluita in HEPES 50 mM e 0.5 M di NaNO₃;
- 10, 15 mg/mL di ProK diluita in HEPES 50 mM e 0.85 M di (NH₄)₂SO₄.

2.2.3.3 Contro-diffusione in gel di silice

Gli esperimenti in contro-diffusione (CD) sono generalmente suddivisi in tre fasi: formazione del gel di silice, aggiunta del setto e inserimento del gel nel precipitante. Tale tecnica di cristallizzazione è stata applicata unicamente a HEWL, con una concentrazione di proteina nel gel pari a 100 mg/mL.

Inizialmente è stato preparato uno stock di 3 mL di TMOS al 25% (v/v), miscelando per 20 min 300 μ L di acetato di sodio 0.5 M, 1950 μ L di DW e 750 μ L di TMOS. Successivamente la quantità desiderata è stata unita ad un opportuno volume di proteina, ottenendo una soluzione di 300 μ L, ripartita in egual misura all'interno di due fiale PCR. In questo modo, per ogni condizione analizzata, sono stati preparati almeno due campioni identici.
Trascorso il tempo di gelificazione, variabile a seconda del contenuto di TMOS, i gel sono stati lavati con acetato di sodio 50 mM al fine di rimuovere il metanolo prodotto durante la gelificazione e sono stati coperti con 75 μ L di setto, prelevato da uno stock di TMOS al 10% (v/v). Quest'ultimo è stato preparato miscelando, per 20 min, 300 μ L di acetato di sodio 0.5 M, 2400 μ L di DW e 300 μ L di TMOS. Dopo un giorno, la fiala, privata del tappo, è stata inserita all'interno di una Eppendorf tube[®] contenente NaCl al 20% (w/w) in acetato di sodio 50 mM, garantendo il continuo contatto tra il gel e il precipitante. Una configurazione alternativa prevede l'inserimento della fiala PCR all'interno di sacchetti trasparenti. In Figura 2.1 sono illustrati i *set up* di cristallizzazione adottati.



Figura 2.1 *Set up* di cristallizzazione in contro-diffusione. La fiala PCR (a) tale e quale, (b) inserita in un sacchetto trasparente e (c) in una Eppendorf tube[®] da 1.5 mL.

Tale procedura è stata, inoltre, implementata in presenza di tre additivi: metildietossisilano (1-MDEOS), dimetildietossisilano (2-MDEOS) e trimetiletossisilano (3-MEOS). Le tre varianti si differenziano unicamente per l'aggiunta dell'additivo allo stock di TMOS al 25% (v/v), in misura tale da mantenere un rapporto del 20% (v/v) tra le due sostanze.

Dopo l'inserimento nel sale, i gel sono stati mantenuti all'interno di scatole isolanti; fanno eccezione le prove CD-M2-2 e CD-M3-2, nelle quali i campioni sono stati, dapprima, immersi all'interno di un bagno termostatato a 20 °C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e, poi, conservati nelle scatole a nucleazione avvenuta. Nei mesi successivi alla formazione dei cristalli, i gel sono stati campionati con frequenza settimanale.

In Tabella 2.7 sono mostrate le prove effettuate in CD per HEWL.

Prova	Set up	Concentrazione HEWL, mg/mL	TMOS, % (v/v)	Additivo
CD-1	b	100	10	/
CD-2	с	100	5	/
CD-M1	с	100	5	1-MDEOS
CD-M2-1	с	100	5	2-MDEOS
CD-M3-1	с	100	5	3-MEOS
CD-M2-2	с	100	5	2-MDEOS
CD-M3-2	с	100	5	3-MEOS

Tabella 2.7 Prove effettuate per HEWL in CD. Per la tipologia di *set up* (b e c) si fa riferimento alla Figura 2.1.

2.2.3.4 Batch in gel di silice

La cristallizzazione in gel di silice, in modalità *batch* (BG), è stata effettuata miscelando all'interno della stessa Eppendorf tube[®] la soluzione proteica, il buffer, il TMOS e il precipitante.

La proteina, precedentemente unita al buffer in funzione della concentrazione desiderata nel gel, è stata miscelata ad un volume di TMOS al 25% (v/v) prelevato da uno stock, preparato con la stessa modalità esposta in §2.2.3.3. In seguito, è stato aggiunto il precipitante. L'ordine di addizione (mostrato in Figura 2.2), in questo caso, ha rilevanza, in quanto è necessario distanziare l'aggiunta del sale da quella di proteina al fine di limitarne la precipitazione. Infine, 150 μ L sono stati inseriti all'interno di una fiala PCR. Analogamente alla CD, da ogni singola soluzione sono stati preparati due campioni.



Figura 2.2 Ordine di addizione delle soluzioni all'interno di una Eppendorf tube[®] da 1.5 mL in un esperimento in *batch* in gel di silice.

L'elenco delle prove condotte con HEWL in assenza di additivi è riportato in Tabella 2.8. Per questa proteina è stata studiata anche l'azione degli additivi (1-MDEOS, 2-MDEOS, 3-MEOS), mantenendone costante il rapporto con il TMOS (Tabella 2.10) oppure variandolo (Tabella 2.9).

La modalità *batch* in gel di silice è stata applicata anche alla ProK, utilizzando come precipitante il solfato di ammonio. In Tabella 2.11 sono riportate le prove senza additivo, mentre in Tabella 2.12 quelle con gli additivi.

Drovo	Concentrazione HEWL,	TMOS,	NaCl in buffer,
110va	mg/mL	% (v/v)	% (w/w)
BG-1	70	5	5
BG-2	80	5	4
BG-3	50	5	7
BG-4	70	10	5
BG-5	80	10	4
BG-6	50	10	7
BG-7	70	10	4
BG-8	75	10	4
BG-9	80	10	3

Tabella 2.8 Prove effettuate per HEWL in *batch* in gel di silice, in assenza di additivi.

Tabella 2.9 Prove effettuate per HEWL in *batch* in gel di silice, in presenza di additivi con rapporto additivo/TMOS variabile.

Prova	Concentrazione HEWL, mg/mL	TMOS, % (v/v)	Rapporto tra additivo e	NaCl in buffer,	Additivo
			IMOS	%0 (W/W)	
BG-M1-1	80	10	5	4	1-MDEOS
BG-M1-2	80	10	10	4	1-MDEOS
BG-M1-3	80	10	15	4	1-MDEOS
BG-M2-1	80	10	5	4	2-MDEOS
BG-M2-2	80	10	10	4	2-MDEOS
BG-M2-3	80	10	15	4	2-MDEOS
BG-M3-1	80	10	5	4	3-MEOS
BG-M3-2	80	10	10	4	3-MEOS
BG-M3-3	80	10	15	4	3-MEOS
BG-M1-4	70	10	10	4	1-MDEOS
BG-M1-5	70	10	20	4	1-MDEOS
BG-M2-4	70	10	10	4	2-MDEOS
BG-M2-5	70	10	20	4	2-MDEOS
BG-M3-4	70	10	10	4	3-MEOS
BG-M3-5	70	10	20	4	3-MEOS

Prova	Concentrazione HEWL, mg/mL	TMOS, % (v/v)	Rapporto tra additivo e TMOS	NaCl in buffer, % (w/w)	Additivo
BG-M1-6	75	10	20	4	1-MDEOS
BG-M1-7	80	10	20	3	1-MDEOS
BG-M2-6	75	10	20	4	2-MDEOS
BG-M2-7	80	10	20	3	2-MDEOS
BG-M3-6	75	10	20	4	3-MEOS
BG-M3-7	80	10	20	3	3-MEOS

Tabella 2.10 Prove effettuate per HEWL in *batch* in gel di silice, in presenza di additivi con rapporto additivo/TMOS costante.

Tabella 2.11 Prove effettuate per ProK in *batch* in gel di silice, in assenza di additivi.

Prova	Concentrazione ProK,	TMOS,	Solfato di ammonio,
	mg/mL	% (v/v)	Μ
BGP-1	10	10	0.85
BGP-2	15	10	0.85
BGP-3	20	10	0.85
BGP-4	5	10	0.5
BGP-5	7	10	0.25
BGP-6	7	10	0.5
BGP-7	10	10	0.25
BGP-8	10	10	0.5
BGP-9	12	10	0.25
BGP-10	12	10	0.5
BGP-11	15	10	0.25
BGP-12	15	10	0.5

Tabella 2.12 Prove effettuate per ProK in *batch* in gel di silice, in presenza di additivi con rapporto additivo/TMOS costante.

Prova	Concentrazione ProK, mg/mL	TMOS, % (v/v)	Rapporto tra additivo e TMOS	Solfato di ammonio, M	Additivo
BGP-M1	10	10	20	0.25	1-MDEOS
BGP-M2	10	10	20	0.25	2-MDEOS
BGP-M3	10	10	20	0.25	3-MEOS

3. Cristallizzazione in microbatch e hanging dropvapor diffusion

In questo capitolo è riportato lo studio preliminare di cristallizzazione, condotto con HEWL e proteinasi K (ProK) utilizzando le tecniche del *microbatch* e dell'*hanging drop-vapor diffusion*. L'obiettivo è l'individuazione delle concentrazioni di proteina e precipitante per cui avviene la nucleazione, sfruttate come punto di partenza per gli esperimenti in gel.

3.1 Caratterizzazione preliminare delle proteine HEWL e proteinasi K In Figura 3.1 e 3.2, si riportano gli spettri caratteristici per le proteine prese in esame.



Figura 3.1 Spettro UV-Visibile di HEWL (curva blu). La linea rossa evidenzia il valore di assorbanza della proteina a 280 nm.



Figura 3.2 Spettro UV-Visibile di ProK (curva blu). La linea rossa evidenzia il valore di assorbanza della proteina a 280 nm.

Tali spettri sono stati acquisiti prima di ogni esperimento di cristallizzazione. I picchi di assorbimento sono dovuti, principalmente, alla presenza di residui amminoacidici di triptofano, tirosina, fenilalanina e, in misura minore, di legami S-S, che assorbono la radiazione ultravioletta, rispettivamente a 280, 275, 258 e 260 nm (Biter *et al.*, 2019; Antosiewicz e Shugar, 2016). Dalla misura dell'assorbanza a tali lunghezze d'onda è possibile ricavare informazioni sulla proteina. Eventuali variazioni dello spettro possono indicare, infatti, cambiamenti conformazionali della macromolecola dovute, ad esempio, ad una sua denaturazione (Biter *et al.*, 2019). In entrambi i casi si rileva la presenza di un picco intorno a 280 nm, il quale indica una corretta conformazione della proteina. L'eventuale denaturazione potrebbe portare ad un assorbimento a lunghezze d'onda più alte (intorno a 320 nm), non visibile negli spettri acquisiti.

3.2 Cristallizzazione in microbatch

La tecnica del *microbatch*, proposta per la prima volta da Chayen *et al.* (1992), rappresenta un valido strumento per effettuare uno *screening* iniziale di cristallizzazione, indispensabile laddove non sia disponibile un diagramma delle fasi completo della proteina. Nel seguito si riportano i risultati ottenuti per le due proteine modello, HEWL e ProK.

3.2.1 Cristallizzazione microbatch di HEWL

Il risultato di cristallizzazione della prova MB-1 (Tabella 2.4) è mostrato in Figura 3.3. Essa è avvenuta in meno di 24 ore per 3% (w/w) e 4% (w/w) di precipitante e, nel caso del 2% (w/w), solo con la concentrazione di proteina massima. Nei restanti pozzetti, con il sale al 2% (w/w) si è osservata nucleazione dopo una settimana, mentre con 1% (w/w) di precipitante dopo circa un mese. È possibile che, in tali condizioni, la presenza di cristalli sia dovuta all'eccessiva evaporazione di acqua dalla goccia attraverso l'olio, che ne può provocare l'essiccamento completo. Ciò è confermato dalla forma deteriorata delle gocce, i cui bordi non risultano più netti e le cui dimensioni appaiono inferiori. La progressiva perdita di acqua della goccia comporta l'aumento della sovrasaturazione nell'ambiente di cristallizzazione e può condurre alla nucleazione anche se le condizioni iniziali non la permetterebbero. È possibile ritardare tale fenomeno inserendo un reservoir di acqua all'interno della piastra, in modo tale da controllare la velocità di evaporazione della goccia ed evitarne l'essiccamento (Brumshtein et al., 2008). Inoltre, l'olio siliconico è particolarmente volatile, per cui tende ad evaporare nel tempo e potrebbe contribuire all'essicamento delle gocce (D'Arcy et al., 2004). In alternativa, si potrebbe utilizzare un olio paraffinico, meno volatile, o una miscela dei due (microbatch modificato), tuttavia ciò comporterebbe una riduzione della velocità di nucleazione (D'Arcy et al., 2003).



Figura 3.3 Risultati di cristallizzazione della prova MB-1 (Tabella 2.4). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la cristallizzazione è avvenuta in meno di 24 ore, in quelli grigi entro una settimana e in quelli bianchi dopo un mese.

I cristalli di HEWL ottenuti hanno, principalmente, forma tetragonale, costituita da 4 facce {110} e 8 facce {101}, la cui geometria è mostrata in Figura 3.4 (Hori *et al.*, 2007).



Figura 3.4 Geometria di un cristallo tetragonale di HEWL. Figura tratta da (Sang-Il Kwon *et al.*, 2014), con modifiche.

In Figura 3.5 sono illustrati i risultati ricavati per alcune delle concentrazioni analizzate. HEWL mostra il comportamento atteso; all'aumentare della concentrazione sia di proteina che di sale la densità di nucleazione aumenta

progressivamente e, contemporaneamente, la dimensione dei cristalli diminuisce. Ciò risulta coerente con la teoria di nucleazione classica (CNT) in quanto, aumentando le concentrazioni, si innalza la sovrasaturazione all'interno della goccia, la velocità di nucleazione cresce e, quindi, i nuclei si formano in numero elevato. In tale situazione, prevalendo la nucleazione, la crescita è limitata, per cui la distribuzione dimensionale dei cristalli è molto stretta (Lin *et al.*, 2017). All'aumentare della densità di nucleazione, inoltre, la qualità dei cristalli diminuisce, in quanto essi hanno dimensioni minori ed è più improbabile utilizzarli per studi strutturali.



Figura 3.5 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-1 (Tabella 2.4) utilizzando NaCl come precipitante, rispettivamente in concentrazioni: (a) 30 mg/mL e 3% (w/w), (b) 37.5 mg/mL e 2% (w/w), (c) 45 mg/mL e 2% (w/w), (d) 45 mg/mL e 4% (w/w).

La cristallizzazione di HEWL è stata esaminata, inoltre, in presenza di 1-MDEOS, 2-MDEOS e 3-MEOS, nelle prove MB-4, MB-5 e MB-6 (Tabella 2.5), allo scopo di evidenziare eventuali interazioni di questi additivi con la proteina, che potrebbero compromettere gli esperimenti in gel. I rapporti tra HEWL e additivo sono stati mantenuti uguali a quelli utilizzati successivamente in gel di silice, in modo tale da analizzare l'azione delle tre sostanze nelle stesse condizioni di lavoro.

Per tutti gli additivi l'andamento di cristallizzazione si è mantenuto invariato e non si rilevano differenze significative in termini di numero, forma e dimensione dei cristalli. I risultati sono, quindi, confrontabili con quelli ottenuti in assenza di additivo. Ciò indica che 1-MDEOS, 2-MDEOS e 3-MEOS, nelle quantità utilizzate, non interagiscono con HEWL. A titolo di esempio, in Figura 3.6 sono mostrati i cristalli ricavati in presenza di 1-MDEOS per alcune concentrazioni di riferimento. Le immagini relative ai restanti additivi sono riportate in Appendice (Figura A.1 e A.2) in quanto non presentano differenze rilevanti.



Figura 3.6 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-4 (Tabella 2.5) utilizzando, come precipitante, NaCl miscelato a 1-MDEOS, rispettivamente in concentrazioni: (a) 22.5 mg/mL e 2% (w/w), (b) 30 mg/mL e 2% (w/w), (c) 37.5 mg/mL e 3% (w/w), (d) 37.5 mg/mL e 4% (w/w). Il rapporto in massa tra HEWL e 1-MDEOS nella goccia è pari a 12.

Tuttavia, tali considerazioni non hanno validità generale; infatti, diminuendo il rapporto in massa tra HEWL e 1-MDEOS (prova MB-7, Tabella 2.5) si è osservata una variazione significativa dei risultati. Innanzitutto, per ogni condizione analizzata,

una parte di proteina è precipitata. Ciò potrebbe essere dovuto all'alterazione dell'ambiente di cristallizzazione (causata dall'alto quantitativo di 1-MDEOS), che non risulta più ottimale per la proteina e la conduce alla precipitazione incontrollata. Inoltre, i cristalli hanno forma tetragonale con le facce {110} più allungate, caratteristica tipica delle soluzioni a bassa sovrasaturazione (Heijna *et al.*, 2008). Effettivamente, essendo parzialmente precipitata, la concentrazione di HEWL libera di cristallizzare risulta inferiore rispetto a quella desiderata, analogamente alla sovrasaturazione nella goccia. In Figura 3.7a si evidenzia la presenza di precipitato, mentre in Figura 3.7b, 3.7c, 3.7d sono mostrati i cristalli, la cui forma, concordemente con quanto affermato in precedenza, appare meno allungata all'aumentare del grado sovrasaturazione iniziale.



Figura 3.7 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-7 (Tabella 2.5) utilizzando, come precipitante, NaCl miscelato a 1-MDEOS, rispettivamente in concentrazioni: (a) 22.5 mg/mL e 1% (w/w), (b) 45 mg/mL e 2% (w/w), (c) 37.5 mg/mL e 3% (w/w), (d) 30 mg/mL e 4% (w/w). Il rapporto in massa tra HEWL e 1-MDEOS nella goccia è pari a 0.4.

3.2.2 Cristallizzazione microbatch di proteinasi K

La cristallizzazione MB di ProK è stata effettuata utilizzando, come precipitanti, due sali diversi: nitrato di sodio (prova MB-2, Tabella 2.4) e solfato di ammonio (prova MB-3, Tabella 2.4). I risultati di cristallizzazione sono riportati in Figura 3.8 per NaNO₃ e in Figura 3.9 per (NH₄)₂SO₄. In entrambi i casi i cristalli si sono formati in un giorno e, laddove presenti, sono di dimensione più piccola rispetto a quelli ottenuti con HEWL a parità di tecnica. La ProK, infatti, mostra una tendenza a cristallizzare massivamente, soprattutto per concentrazioni di proteina elevate. Date le dimensioni contenute dei cristalli generati in MB, risulta difficile identificarne la forma, la quale non varia in funzione del tipo di sale utilizzato.

In presenza di NaNO₃ la nucleazione è avvenuta per quasi tutte le condizioni analizzate. Come previsto, la densità cristallina aumenta per concentrazioni di proteina crescenti; tuttavia, si rileva un comportamento anomalo all'aumentare della concentrazione di sale. Incrementando la quantità di NaNO₃ nella goccia, infatti, il numero di cristalli diminuisce notevolmente, contrariamente a quanto avviene per HEWL. Tale andamento non è coerente con l'azione del precipitante, il cui aumento di concentrazione dovrebbe innalzare la sovrasaturazione della goccia e promuovere la cristallizzazione inducendo il *salting out* (Dumetz *et al.*, 2009). Una potenziale causa risiede nella ridotta zona di metastabilità di ProK. Essendo stretta è possibile che, per sovrasaturazioni troppo elevate, essa venga attraversata così velocemente da non permettere alla proteina di nucleare.

In Figura 3.10 è visibile l'andamento di cristallizzazione in presenza di NaNO₃ (prova MB-2) per alcune delle condizioni studiate.

Nella prova MB-3 l'andamento di cristallizzazione, invece, risulta concorde con quanto atteso. All'aumentare della concentrazione di ProK e (NH₄)₂SO₄ i cristalli crescono in numero fino a mostrare cristallizzazione massiva per supersaturazioni elevate. Le figure relative alla prova MB-3 non sono riportate in quanto la posizione delle gocce all'interno del pozzetto non ha consentito di acquisire immagini al microscopio di qualità adeguata.



Figura 3.8 Risultati di cristallizzazione per la prova MB-2 (Tabella 2.4). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la nucleazione è avvenuta, mentre in quelli bianchi no.



Figura 3.9 Risultati di cristallizzazione per la prova MB-3 (Tabella 2.4). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la nucleazione è avvenuta, mentre in quelli bianchi no.



Figura 3.10 Cristalli di ProK ottenuti in MB-2 (Tabella 2.4), utilizzando, come precipitante, NaNO₃, rispettivamente in concentrazioni: (a) 2.5 mg/mL e 0.025 M, (b) 3.5 mg/mL e 0.025 M, (c) 5 mg/mL e 0.025 M, (d) 2.5 mg/mL e 0.05 M, (e) 3.5 mg/mL e 0.05 M, (f) 5 mg/mL e 0.05 M, (g) 2.5 mg/mL e 0.15 M, (h) 3.5 mg/mL e 0.15 M, (i) 5 mg/mL e 0.15 M, (l) 2.5 mg/mL e 0.35 M, (i) 5 mg/mL e 0.15 M, (l) 2.5 mg/mL e 0.35 M, (m) 3.5 mg/mL e 0.35 M.

3.3 Cristallizzazione in hanging drop-vapor diffusion (HDVD)

Lo studio preliminare di cristallizzazione su HEWL e ProK è proseguito utilizzando la tecnica *hanging drop-vapor diffusion* (HDVD), i cui risultati sono illustrati nel seguito.

3.3.1 Cristallizzazione HDVD di HEWL

Come mostrato in Figura 3.11, per la prova HDVD-1 (Tabella 2.6) i cristalli di HEWL si sono formati in un giorno per tutte le condizioni analizzate, ad eccezione dei casi con 1% (w/w) di sale. L'osservazione dei campioni, effettuata a distanza di un mese, ha evidenziato la presenza di cristalli anche per la condizione con 45 mg/mL di proteina e 1% (w/w) di NaCl.



Figura 3.11 Risultati di cristallizzazione per la prova HDVD-1 (Tabella 2.6). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la cristallizzazione è avvenuta in meno di 24 ore, in quelli grigi dopo un mese e in quelli bianchi non è avvenuta.

Questi risultati sono in linea con quelli ottenuti in MB-1; infatti, la densità di nucleazione è crescente con il valore delle concentrazioni di proteina e di sale. Bisogna, però, considerare che in HDVD il punto di partenza e quello finale non coincidono, in quanto le condizioni all'interno della goccia variano nel tempo. Ciò è dovuto al fatto che la goccia si pone in equilibrio rispetto al *reservoir* (a concentrazione di sale doppia), mediante la diffusione di specie volatili attraverso la fase vapore, la quale termina quando la tensione di vapore della goccia equivale a quella del *reservoir* (Kimble *et al.*, 1995). Ciò comporta l'incremento delle concentrazioni nell'ambiente di cristallizzazione, per cui in HDVD a partire da una condizione iniziale si possono esplorare molteplici punti del diagramma delle fasi. Ciò spiega perché in HDVD-1, in un giorno, si ottengono cristalli anche per 2% (w/w) di NaCl combinato con 22.5 mg/mL, 30 mg/mL e 37.5 mg/mL di HEWL, valori per cui in MB-1 erano assenti a



parità di tempo. In Figura 3.12 sono mostrati i cristalli ottenuti in HDVD per alcune concentrazioni.

Figura 3.12 Cristalli di HEWL ottenuti in HDVD-1 (Tabella 2.6) utilizzando, come precipitante, NaCl, rispettivamente in concentrazioni: (a) 22.5 mg/mL e 2% (w/w), (b) 37.5 mg/mL e 2% (w/w), (c) 30 mg/mL e 3% (w/w), (d) 45 mg/mL e 3% (w/w), (e) 22.5 mg/mL e 4% (w/w), (f) 37.5 mg/mL e 4% (w/w).

3.3.2 Cristallizzazione HDVD di proteinasi K

La cristallizzazione di ProK in HDVD è stata studiata nelle prove HDVD-2 e HDVD-3 (Tabella 2.6), i cui risultati, ottenuti in presenza di NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄, sono, rispettivamente, mostrati in Figura 3.13 e in Figura 3.14.



Figura 3.13 Risultati di cristallizzazione per la prova HDVD-2 (Tabella 2.6). La cristallizzazione è avvenuta nei pozzetti contrassegnati dal colore nero.



Figura 3.14 Risultati di cristallizzazione per la prova HDVD-3 (Tabella 2.6). La cristallizzazione è avvenuta nei pozzetti contrassegnati dal colore nero.

In entrambi i casi è stato confermato l'andamento di cristallizzazione rilevato in MB. In HDVD-2, si riscontra un aumento della densità di nucleazione per concentrazioni di proteina crescenti e una sua diminuzione incrementando la quantità di precipitante nella goccia. Tale comportamento è soprattutto visibile per concentrazioni di ProK più basse. Come si evince in Figura 3.15, per 5 mg/mL di proteina e sale 0.05 M si formano cristalli macroscopici (Figura 3.15a), dei quali la dimensione e il numero diminuiscono notevolmente fino a scomparire aumentando la quantità di NaNO₃ a 0.45 M (Figura 3.15g). Per 15 mg/mL di ProK (Figure 3.15c, 3.15f, 3.15i), seppure presente, risulta più difficile apprezzare tale fenomeno in quanto i cristalli sono troppo piccoli per essere distinti tra loro.



Figura 3.15 Cristalli di proteinasi K ottenuti in HDVD-2 (Tabella 2.6) utilizzando, come precipitante, NaNO₃, rispettivamente in concentrazioni: (a) 5 mg/mL e 0.05 M, (b) 10 mg/mL e 0.05 M, (c) 15 mg/mL e 0.05 M, (d) 5 mg/mL e 0.25 M, (e) 10 mg/mL e 0.25 M, (f) 15 mg/mL e 0.25 M, (g) 5 mg/mL e 0.45 M, (h) 10 mg/mL e 0.45 M, (i) 15 mg/mL e 0.45 M.

In HDVD-3, invece, è rispettata la tendenza di aumento del numero di cristalli a fronte dell'incremento di proteina o precipitante (Figura 3.16).



Figura 3.16 Cristalli di proteinasi K ottenuti in HDVD-3 (Tabella 2.6) utilizzando, come precipitante, (NH₄)₂SO₄, rispettivamente in concentrazioni: (a) 5 mg/mL e 0.75 M, (b) 10 mg/mL e 0.75 M, (c) 15 mg/mL e 0.75 M, (d) 5 mg/mL e 1.25 M, (e) 10 mg/mL e 1.25 M, (f) 15 mg/mL e 1.25 M.

Come in MB, anche in HDVD è possibile rilevare la propensione della ProK a cristallizzare massivamente, formando micronuclei (Figure 3.15c, 3.15f, 3.15i, 3.16c, 3.16f). Ciò rende più difficoltosa la ricerca delle condizioni adatte alla generazione di cristalli singoli macroscopici, utilizzabili negli studi strutturali. Tuttavia, in HDVD, alcune concentrazioni analizzate hanno permesso la formazione di cristalli che, seppur piccoli se confrontati con quelli di HEWL, possiedono dimensioni accettabili. Tali condizioni sono:

- in HDVD-1: 5 mg/mL e 0.05 M, 7.5 mg/mL e 0.05 M, 5 mg/mL e 0.15 M, 7.5 mg/mL e 0.15 M, 7.5 mg/mL e 0.25 M, 7.5 mg/mL e 0.35 M, 10 mg/mL e 0.35 M;
- in HDVD-2: 5 mg/mL e 0.75 M, 5 mg/mL e 1 M, 5 mg/mL e 1.25 M, 5 mg/mL e 1.5 M, 7.5 mg/mL e 0.75 M, 7.5 mg/mL e 1 M, 7.5 mg/mL e 1.25 M, 10 mg/mL e 0.75 M.

In Figura 3.17 è riportato un ingrandimento dei cristalli singoli di ProK. Essendo di dimensioni maggiori rispetto a quelli ottenuti in *microbatch*, è possibile distinguerne la forma bipiramidale, che non varia cambiando il precipitante.



Figura 3.17 Cristalli singoli di proteinasi K ottenuti in HDVD utilizzando, come precipitanti, (a, b) NaNO₃ e (c, d) (NH₄)₂SO₄, rispettivamente in concentrazioni: (a, b) 7.5 mg/mL e 0.05 M, (c, d) 7.5 mg/mL e 0.75 M.

Infine, è stato condotto uno studio di verifica, HDVD-4 (Tabella 2.6), ripetendo alcune condizioni studiate in precedenza dalla Dott.ssa Fiora Artusio, i cui risultati ottenuti sono riportati in Figura 3.18. Lo scopo di tale analisi è l'identificazione di alcune combinazioni di proteina e precipitante che mostrino i due comportamenti principali della ProK: la formazione di cristalli singoli e di microcristalli.

I risultati conseguiti sono analoghi sia agli studi della Dott.ssa Artusio sia alle prove HDVD-2 e HDVD-3, per cui queste ultime possono essere ritenute valide. Si può notare che la formazione di cristalli singoli è favorita per concentrazioni inferiori di ProK (7.5 mg/mL e 10 mg/mL) e che a 15 mg/mL prevale, invece, la cristallizzazione massiva.

Tale prova, inoltre, è stata sfruttata per l'identificazione delle condizioni di partenza da adottare per condurre gli esperimenti in gel di silice della proteinasi K.



Figura 3.18 Cristalli di proteinasi K ottenuti in HDVD-4 (Tabella 2.6) utilizzando, come precipitante, (a, b, c, d) NaNO₃ e (e, f) (NH₄)₂SO₄, rispettivamente in concentrazioni: (a) 10 mg/mL e 0.125 M, (b) 15 mg/mL e 0.125 M, (c) 7.5 mg/mL e 0.5 M, (d) 15 mg/mL e 0.5 M, (e) 10 mg/mL e 0.85 M, (f) 15 mg/mL e 0.85 M.

3.4 Conclusioni

Le tecniche *microbatch* e *hanging drop-vapor diffusion* hanno permesso di effettuare un'analisi preliminare sulla cristallizzazione di HEWL e ProK.

Per quanto riguarda HEWL, i cristalli sono stati ottenuti per intervalli di concentrazione pari a 22.5-45 mg/mL di proteina e 2-4% (w/w) di NaCl ed è stato osservato un aumento della densità di nucleazione direttamente proporzionale alle concentrazioni di HEWL e precipitante. Tale andamento risulta concorde con l'azione del sale.

ProK ha mostrato un comportamento analogo in presenza di (NH₄)₂SO₄; tuttavia, utilizzando NaNO₃, è stato rilevato un numero di cristalli crescente con la concentrazione di proteina e decrescente con quella di sale. I cristalli di ProK si sono formati per quasi tutte le condizioni studiate negli intervalli 2.5-15 mg/mL di proteina, 0.025-0.45 M NaNO₃ e 0.25-1.5 M (NH₄)₂SO₄. Per sovrasaturazioni elevate, in particolare, ProK ha mostrato la tendenza a cristallizzare massivamente, formando un numero molto elevato di microcristalli.

Tali considerazioni hanno consentito di individuare degli intervalli di concentrazione adatti alla cristallizzazione delle due proteine modello, che sono stati utilizzati come punto di partenza per le tecniche in gel di silice.

4. Cristallizzazione in gel di silice

Una volta stabilito l'intervallo di concentrazioni per cui avviene la nucleazione di HEWL e ProK, si è proceduto con lo studio della cristallizzazione in gel di silice, i cui risultati sono presentati in questo capitolo. Tale tecnica consente di eliminare la convezione e la sedimentazione, permettendo di stabilire un ambiente diffusivo e di ottenere cristalli di qualità superiore. Inoltre, utilizzando quantità di TMOS comprese tra 2 e 22% (v/v), si possono ottenere cristalli rinforzati con proprietà meccaniche migliorate (González-Ramírez *et al.*, 2008). Il gel di silice, infatti, presenta buona elasticità, resistenza alla deformazione e una porosità dipendente dalla sua composizione: all'aumentare del contenuto di TMOS la dimensione dei pori diminuisce (Lorber *et al.*, 2009). La formazione del gel, rappresentata schematicamente in Figura 4.1, coinvolge diversi stadi:

- l'idrolisi del TMOS ((CH₃O)₄Si+4H₂O → Si(OH)₄+ 4CH₃OH), da cui si sintetizza l'acido silicico (Si(OH)₄) (González-Ramírez *et al.*, 2008). Essa comporta anche la liberazione di metanolo (CH₃OH), il quale deve essere rimosso in quanto potrebbe danneggiare la proteina (Lorber *et al.*, 2009);
- la polimerizzazione dell'acido silicico, che consiste nella formazione di particelle sferiche, le quali crescono e si uniscono in catene ramificate, generando il gel (Iler, 1979). Tale processo avviene attraverso reazioni di omoed etero-condensazione, da cui si formano silossani (-Si-O-Si-) (Pietrasik e Zaborski, 2005).



Figura 4.1 Processo di formazione del gel in presenza di una proteina. Figura tratta da (Vidal *et al.*, 1998), con modifiche.

La proteina presente in soluzione interagisce con il gel, all'interno del quale essa si trova in parte libera e in parte adsorbita sulla superficie silicea, come schematizzato in Figura 4.2. Per questo motivo il gel di silice ha azione inibitiva sulla cristallizzazione. Nel caso di HEWL, ad esempio, i gruppi silanolici (-SiOH), presenti sulla superficie delle particelle silicee, a pH 4.5 si ionizzano, assumono carica negativa e interagiscono con la proteina, la quale è carica positivamente. Inoltre, tra le particelle silicee e HEWL si instaurano legami idrogeno tra i gruppi -SiOH e quelli superficiali proteici (OH, NH, CO) (Vidal *et al.*, 1998).

Negli esperimenti effettuati, partendo da una condizione che in MB e HDVD garantiva la formazione di cristalli, la concentrazione di proteina è stata incrementata per vincere l'effetto inibitivo del gel di silice (Vidal *et al.*, 1998). Sono state utilizzate due tecniche, contro-diffusione e *batch*: la prima è stata applicata unicamente a HEWL, mentre la seconda ad entrambe le proteine. Lo studio è stato condotto variando le concentrazioni di proteina, precipitante e la quantità di TMOS al fine di ricercare le condizioni ottimali di cristallizzazione. Inoltre, per entrambe le tecniche, è stata esaminata l'azione di tre additivi differenti: 1-MDEOS, 2-MDEOS e 3-MEOS.



Figura 4.2 Distribuzione di HEWL all'interno del gel di silice. Figura tratta da (Vidal *et al.*, 1998), con modifiche.

4.1 Cristallizzazione in contro-diffusione di HEWL

Prima di trattare le prove condotte in contro-diffusione (CD), viene riportato in Figura 4.3 il processo di nucleazione di HEWL, monitorato in *time-lapse* nelle 20 ore successive all'inserimento del gel nel sale.



Tempo (h) Figura 4.3 Monitoraggio in *time-lapse* della nucleazione di HEWL in CD.

In Figura 4.3 è possibile osservare, al tempo iniziale, la diffusione del sale nel gel, che prosegue rapidamente e provoca la formazione di precipitato amorfo all'interfaccia, visibile dopo 4 ore. La nucleazione avviene progressivamente con la diffusione del precipitante, che stabilisce all'interno della fiala PCR un gradiente di sovrasaturazione (Otálora *et al.*, 2009). Infatti, trascorse 8 ore, il gel è completamente a contatto con NaCl e si osservano nuclei anche nella zona più lontana dall'interfaccia. Dopo 20 ore, a cristallizzazione completamente avvenuta, si nota un minor numero di cristalli nella punta della fiala PCR: questa caratteristica è tipica degli esperimenti di CD, in cui, lontano dall'interfaccia gel-sale, si dovrebbero ottenere meno cristalli, ma più grossi e di qualità superiore. Nelle prove effettuate, tuttavia, tale proprietà non è marcata in quanto la fiala PCR utilizzata è troppo corta.

4.1.1 Studio dell'effetto della quantità di TMOS

Allo scopo di superare l'inibizione esercitata dal gel di silice è stata scelta una concentrazione di HEWL pari a 100 mg/mL, circa il doppio rispetto al valore massimo che ha dato cristalli in MB e HDVD.

La prima prova di contro-diffusione condotta con HEWL, CD-1 (Tabella 2.7), ha mostrato nucleazione dopo sette giorni dall'inserimento dei campioni in NaCl tamponato: dei sei gel identici preparati, cinque hanno cristallizzato. In Figura 4.4 sono riportati i risultati. Si rilevano alcuni cristalli sporadici di medie dimensioni e dalla forma irregolare e altri più piccoli, localizzati, principalmente, nella zona più distante dall'interfaccia tra gel e sale. Questi ultimi hanno forma più arrotondata e si sono formati a distanza di diciassette giorni dalla prima nucleazione.



Figura 4.4 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-1 (Tabella 2.7).

Nelle condizioni adottate la cristallizzazione risulta abbastanza lenta e scarsa; inoltre, i cristalli sono pochi in numero e di bassa qualità. Ciò può essere dovuto a due ragioni:

- la % (v/v) di TMOS è troppo alta e inibisce la nucleazione (Vidal *et al.*, 1998);
- il *set up* adottato non è adatto. La prova CD-1, infatti, è stata condotta utilizzando, come ambiente di cristallizzazione i sacchetti trasparenti, i quali non sono dotati di chiusura ermetica e comportano la fuoriuscita del sale. Perciò, le condizioni operative sono disuniformi nel tempo e ciò ha influenza elevata sull'andamento della cristallizzazione, la quale è estremamente sensibile agli stress. Inoltre, tale configurazione richiede manutenzione frequente, in quanto necessita della pulizia giornaliera dei campioni dalle incrostazioni saline.

A causa di tali problematiche, si è deciso di condurre la prova CD-2 (Tabella 2.7) riducendo il contenuto di TMOS, dal 10% (v/v) al 5% (v/v), al fine promuovere la nucleazione in tempi minori ed è stato scelto un *set up* di cristallizzazione diverso (Eppendorf tube[®]), allo scopo di evitare la fuoriuscita di sale durante l'esperimento. In queste condizioni, i cristalli si sono formati in un giorno e, come è possibile vedere in Figura 4.5, la densità di nucleazione è decisamente maggiore. I cristalli hanno caratteristiche più omogenee e, quindi, qualità superiore, anche se, come in CD-1, se ne rilevano alcuni di forma arrotondata e con dimensioni inferiori.



Figura 4.5 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-2 (Tabella 2.7).

Per entrambe le prove, inoltre, sono stati preparati dei gel costituiti unicamente da buffer acetato di sodio 50 mM e TMOS, rispettivamente al 10% (v/v) e 5% (v/v), in modo tale da confrontarne il tempo di gelificazione. È, infatti, necessario che questo sia ragionevole (dell'ordine di pochi giorni), in quanto il posizionamento del setto e l'inserimento del campione in NaCl possono avvenire solo dopo la completa gelificazione, affinché quest'ultima sia antecedente alla nucleazione. Si è osservato che il gel della prova CD-1 gelificava completamente in meno di 24 ore, mentre quello relativo a CD-2 in 2 giorni. In entrambi i casi, il tempo di gelificazione risulta accettabile, considerando che, in ogni esperimento di CD, si è scelto di aspettare almeno quattro giorni prima di posizionare il setto; in questo modo si è sicuri che la gelificazione sia totale. Considerando i risultati più promettenti, si è deciso di mantenere, in tutti gli esperimenti di CD successivi, la % (v/v) di TMOS e il *set up* di cristallizzazione impiegati in CD-2.

4.1.2 Studio dell'effetto degli additivi

Dopo aver verificato che la cristallizzazione in CD di HEWL avviene utilizzando 100 mg/mL di proteina, 20% (w/w) NaCl in acetato di sodio 50 mM e 5% (v/v) TMOS, sono stati aggiunti al gel i tre additivi. La loro azione è stata studiata nelle prove CD-M1 (1-MDEOS), CD-M2-1 (2-MDEOS) e CD-M3-1 (3-MEOS), elencate in Tabella 2.7, i cui risultati sono riportati, rispettivamente, in Figura 4.6, Figura 4.7 e Figura 4.8. Innanzitutto, la presenza degli additivi ha influenza sul tempo di gelificazione, che

rimane accettabile ma aumenta a 3-4 giorni, ma non sulla nucleazione, che è avvenuta in un giorno per tutti i tre casi.

Disponendo di due stock diversi per ogni additivo, uno nuovo e l'altro aperto da più tempo, si è deciso di utilizzarli entrambi per valutarne gli effetti. In Figura 4.6 è mostrato il confronto per 1-MDEOS: si nota che, in entrambi i casi, la densità di nucleazione è maggiore rispetto a CD-2, ma è possibile osservare un effetto di invecchiamento dell'additivo che comporta una riduzione del numero di cristalli ottenuti (Figura 4.6a). Tale comportamento, invece, non si è manifestato con 2-MDEOS e 3-MEOS, per i quali sono riportati solo i risultati con gli additivi più nuovi (Figura 4.7 e Figura 4.8). Le figure relative agli additivi più datati sono state inserite in Appendice, in Figura A.3.

Osservando i risultati si rileva una tendenza generale: all'aumentare del numero di gruppi metilici dell'additivo il numero di cristalli aumenta e la loro dimensione diminuisce. Ciò appare chiaro confrontando i gel senza additivo e quelli ottenuti in presenza di 1-MDEOS e 2-MDEOS, mentre, apparentemente, non si apprezzano differenze tra 2-MDEOS e 3-MEOS. Per quest'ultimi additivi, infatti, la densità di nucleazione è molto elevata e i cristalli sono talmente piccoli da non poter riconoscere in quale caso siano in numero maggiore. Inizialmente si è pensato che tale risultato fosse stato alterato dalla bassa temperatura dell'ambiente di lavoro, che potrebbe provocare la cristallizzazione massiva. Si è deciso, dunque, di condurre due prove totalmente identiche a CD-M2-1 e CD-M3-1, rispettivamente CD-M2-2 e CD-M3-2 (Tabella 2.7), facendo avvenire la nucleazione a temperatura controllata (20 °C) in un bagno termostatato. Dal momento che i gel ottenuti, presenti in Appendice in Figura A.4, sono identici a quelli riportati in Figura 4.7 e Figura 4.8, l'eventuale effetto della temperatura può essere escluso e si può concludere che la cristallizzazione massiva sia dovuta all'azione di 2-MDEOS e 3-MEOS. Inoltre, avendo dimostrato, nelle prove MB-4, MB-5 e MB-6, che nelle condizioni operative adottate gli additivi non interagiscono con HEWL, è possibile affermare che la loro azione sia esplicata unicamente in presenza del TMOS.

Gli additivi interagiscono con il gel scambiando alcuni -OH, legati a Si, con gruppi metilici. L'entità della sostituzione dipende dal numero di gruppi -CH₃ che l'additivo possiede (Vidal *et al.*, 1998). L'effetto è la riduzione delle interazioni (legami idrogeno) tra HEWL e le particelle silicee, che limita l'adsorbimento di proteina sulla superficie del gel. Per questo motivo si riscontra una densità di cristallizzazione crescente con il numero di gruppi metilici dell'additivo. In conclusione, 1-MDEOS, 2-MDEOS e 3-MEOS mitigano l'effetto inibitivo del gel di silice e potrebbero costituire un valido strumento nella cristallizzazione in contro-diffusione di HEWL qualora utilizzati per ridurre la concentrazione di proteina necessaria per ottenere i cristalli, limitando notevolmente i costi operativi.



Figura 4.6 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-M1 (Tabella 2.7). (a) e (b) sono riferite all'additivo vecchio, mentre (c) e (d) a quello nuovo.



Figura 4.7 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-M2-1 (Tabella 2.7).



Figura 4.8 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-M3-1 (Tabella 2.7).

4.1.3 Analisi dimensionale dei cristalli di HEWL

Al fine di valutare quantitativamente l'effetto degli additivi, è stata effettuata un'analisi dimensionale sui cristalli ottenuti in assenza di additivo (CD-2) e in presenza di 1-MDEOS (CD-M1), 2-MDEOS (CD-M2-1) e 3-MEOS (CD-M3-1). In Figura 4.9

è riportata la dimensione media nei quattro casi considerati, con la relativa deviazione standard. In accordo con quanto affermato in §4.1.2, si osserva una diminuzione consistente della dimensione dei cristalli in presenza di 1-MDEOS e 2-MDEOS, mentre con 3-MEOS non si rileva una variazione significativa rispetto al caso precedente.



Figura 4.9 Dimensione media dei cristalli ottenuti in CD in gel di silice in assenza di additivi (620.9 μ m), con 1-MDEOS (245.4 μ m), 2-MDEOS (87.2 μ m) e 3-MEOS (76.9 μ m). Per ciascun caso è riportato il corrispondente errore, in termini di deviazione standard.

4.2 Cristallizzazione in batch di HEWL e proteinasi K

Dopo aver terminato la sperimentazione in CD, sono state ricercate le condizioni di cristallizzazione in *batch* (BG) per HEWL e ProK. Questa variante, rispetto a CD, ha il vantaggio di richiedere meno tempo per la sua preparazione e un *set up* di cristallizzazione più semplice, per cui risulta interessante studiarla; inoltre, permette di esercitare un maggiore controllo sulla cristallizzazione stessa. Tuttavia, tale tecnica, coinvolgendo la miscelazione diretta di proteina e precipitante, comporta la formazione repentina di precipitato, che deve essere ridisciolto mediante miscelazione. Ciò implica elevati stress sulla proteina, della quale non sempre si riesce ad evitare la precipitazione incontrollata: per questo motivo il *batch* può eventualmente essere caratterizzato da una significativa variabilità.

4.2.1.1 Studio dell'effetto della quantità di TMOS per diverse concentrazioni di proteina e precipitante

Le prime prove effettuate in *batch* con HEWL hanno l'obiettivo di trovare delle condizioni adatte alla formazione di cristalli. A tale scopo, sono state selezionate tre combinazioni di proteina e precipitante, analizzate in presenza di TMOS al 5% (v/v), nelle prove BG-1, BG-2 e BG-3 (Tabella 2.8), e al 10% (v/v), nelle prove BG-4, BG-5 e BG-6 (Tabella 2.8). Come in CD, per vincere l'inibizione del gel di silice, si è partiti da concentrazioni di proteina piuttosto elevate.

I risultati dei primi tre esperimenti sono riportati in Figura 4.10: i cristalli si sono formati in BG-1 e BG-2 in un giorno e sono in numero maggiore nella prima prova (Figura 4.10a). In tutti e due i casi, però, l'aspetto del gel non è ottimale, in quanto presenta disuniformità, striature e sembra avere subito un collasso nella regione superficiale. Ciò può essere dovuto al fatto che, al 5% (v/v) di TMOS, il gel si forma in due giorni e, quindi, la nucleazione è antecedente alla gelificazione. Nel terzo caso (BG-3), invece, si rilevano pochi cristalli di dimensioni superiori (Figura 4.10c), formatisi in una settimana. L'aspetto del gel, in questa prova, è leggermente migliore e i cristalli hanno dimensioni uniformi tra loro. Tra le tre prove al 5% (v/v) di TMOS, quindi, solo BG-3 è accettabile, in quanto è l'unico caso in cui la cristallizzazione è avvenuta dopo la gelificazione.

In Figura 4.11, invece, sono mostrati i risultati ottenuti con i gel al 10% (v/v) di TMOS. La nucleazione è avvenuta dopo un giorno per BG-4 e BG-5 e, anche in questo caso, il numero di nuclei è maggiore nella prima prova, dove, accanto ai cristalli macroscopici, se ne rilevano anche alcuni di dimensioni molto contenute. In BG-5 (Figura 4.11b) i cristalli sembrano presentare una maggiore omogeneità superficiale rispetto al caso precedente e hanno dimensione che decresce spostandosi verso la punta della fiala PCR. Con una minore concentrazione di HEWL (prova BG-6) non è avvenuta nucleazione, ma sono stati rilevati sferuliti amorfi dopo 21 giorni (Figura 4.11c). Tali strutture, infatti, possono formarsi in presenza di basse concentrazioni di proteina ed elevate quantità di precipitante.

I gel e i cristalli al 10% (v/v) di TMOS, in generale, presentano un aspetto più uniforme rispetto a quelli al 5% (v/v), a conferma del fatto che, per ottenere buoni risultati, è necessario un tempo di nucleazione superiore rispetto a quello di gelificazione. Si è scelto, quindi, di ritenere inadatti i gel delle prove BG-1, BG-2, BG-3 e di condurre le prove successive con il TMOS al 10% (v/v).



Figura 4.10 Cristalli di HEWL ottenuti in: (a) BG-1, (b) BG-2 e (c) BG-3 (Tabella 2.8).



Figura 4.11 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-4, (b) BG-5 e (c) BG-6 (Tabella 2.8).

4.2.1.2 Studio dell'effetto degli additivi in rapporto variabile

Tra le condizioni al 10% (v/v) di TMOS studiate in §4.2.1.1, quelle che hanno condotto a risultati più adeguati sono:

- 70 mg/mL di HEWL e 5% (w/w) di NaCl in acetato di sodio 50 mM (BG-4);
- 80 mg/mL di HEWL e 4% (w/w) di NaCl in acetato di sodio 50 mM (BG-5).

Siccome i cristalli ottenuti in BG-5 sono in numero inferiore rispetto a quelli di BG-4, si è deciso di esaminare l'azione degli additivi nelle condizioni adottate in BG-5, al fine di poter osservare meglio l'effetto di aumento della nucleazione. Allo scopo di approfondire l'analisi sugli additivi, la cui azione era già stata osservata in CD, si è deciso di variare il loro rapporto in volume nel gel rispetto al TMOS, mantenendo le concentrazioni di proteina e sale costanti. I rapporti utilizzati sono: 5% (v/v) nelle prove BG-M1-1, BG-M2-1 e BG-M3-1, 10% (v/v) in BG-M1-2, BG-M2-2 e BG-M3-2, 15% (v/v) in BG-M1-3, BG-M2-3 e BG-M3-3 (Tabella 2.9).

I cristalli ottenuti sono mostrati in Figura 4.12 (1-MDEOS), Figura 4.13 (2-MDEOS) e Figura 4.14 (3-MEOS). Per tutti gli additivi si osserva un andamento comune e atteso; infatti, all'aumentare del loro rapporto rispetto al TMOS (a parità di additivo) la densità di nucleazione aumenta gradualmente. In particolare, per 1-MDEOS è avvenuta la cristallizzazione, mentre per i rimanenti additivi, oltre ai cristalli, è possibile osservare la presenza di precipitato, soprattutto utilizzando 3-MEOS. La formazione di precipitato amorfo, per quantità elevate di 2-MDEOS e per 3-MEOS, è una prova del fatto che questi additivi, rispetto a 1-MDEOS, elevano in misura maggiore la concentrazione di proteina libera di cristallizzare, la quale può precipitare se la sovrasaturazione nel gel è troppo alta.

Inoltre, confrontando tali risultati con l'analoga prova in assenza di additivo (BG-5), si evidenzia un netto aumento della densità di nucleazione. Coerentemente con quanto osservato in CD, infatti, la quantità di cristalli (o di precipitato) è progressivamente maggiore per un numero di gruppi metilici crescente.

Per evitare la formazione indesiderata di precipitato, è stata effettuata una serie di prove abbassando la concentrazione di proteina a 70 mg/mL. Tali esperimenti sono stati condotti sia in assenza di additivo in BG-7 (Tabella 2.8, Figura 4.15) sia in presenza di 1-MDEOS, 2-MDEOS e 3-MEOS al 10 e 20% (v/v) rispettivamente nelle prove BG-M1-4 e BG-M1-5 (Figura 4.16), BG-M2-4 e BG-M2-5 (Figura 4.17), BG-M3-4 e BG-M3-5 (Figura 4.18), elencate in Tabella 2.9. Anche in queste condizioni è rispettato l'andamento di cristallizzazione visto in CD: all'aumentare del numero di gruppi metilici e della concentrazione di additivo nel *batch*, infatti, la densità di nucleazione cresce. Come desiderato, essendo la sovrasaturazione inferiore, in questo caso non si è formato precipitato amorfo.



Figura 4.12 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M1-1, (b) BG-M1-2 e (c) BG-M1-3 (Tabella 2.9).


Figura 4.13 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M2-1, (b) BG-M2-2 e (c) BG-M2-3 (Tabella 2.9).



Figura 4.14 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M3-1, (b) BG-M3-2 e (c) BG-M3-3 (Tabella 2.9).



Figura 4.15 Cristalli di HEWL ottenuti in BG-7 (Tabella 2.8).



Figura 4.16 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M1-4, (b) BG-M1-5 (Tabella 2.9).



Figura 4.17 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M2-4, (b) BG-M2-5 (Tabella 2.9).



Figura 4.18 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M3-4, (b) BG-M3-5 (Tabella 2.9).

4.2.1.3 Studio dell'effetto degli additivi in rapporto costante

Infine, sono state analizzate due ulteriori concentrazioni di HEWL e NaCl, nell'intorno di quelle adottate nella prova BG-7, per identificare un intervallo di concentrazioni in cui si avesse il controllo sulla cristallizzazione. Anche in questi casi la nucleazione è avvenuta in assenza di additivi in BG-8 e BG-9 (Tabella 2.8) e in presenza di 1-MDEOS (BG-M1-6 e BG-M1-7), 2-MDEOS (BG-M2-6 e BG-M2-7) e 3-MEOS (BG-M3-6 e BG-M3-7) al 20% (v/v), le cui prove sono elencate in Tabella 2.10. I risultati sono riportati in Figura 4.19 e Figura 4.20, in cui si osserva che l'azione degli additivi è coerente con le prove precedenti. È possibile, dunque, affermare che, in *batch* in gel di silice, per una concentrazione di HEWL compresa tra 70 e 80 mg/mL e una di precipitante tra 3 e 4% (w/w) si ottengono risultati riproducibili e la cristallizzazione del lisozima è controllabile grazie all'utilizzo degli additivi.



Figura 4.19 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-8, (b) BG-M1-6, (c) BG-M2-6 e (d) BG-M3-6. Le tabelle di riferimento sono: (a) Tabella 2.8, (b, c, d) Tabella 2.10.



Figura 4.20 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-9, (b) BG-M1-7, (c) BG-M2-7 e (d) BG-M3-7. Le tabelle di riferimento sono: (a) Tabella 2.8, (b, c, d) Tabella 2.10.

4.2.2 Cristallizzazione di proteinasi K

4.2.2.1 Cristallizzazione in assenza di additivi

La cristallizzazione in gel di silice in modalità *batch* di ProK è stata condotta sfruttando come punto di partenza i risultati conseguiti nella prova HDVD-4, discussa in §3.3.2. Si è deciso di utilizzare come precipitante il solfato di ammonio, in quanto ha mostrato un comportamento più attendibile rispetto al nitrato di sodio. Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti in §4.2.1.1, è stato utilizzato un gel contenente il 10% (v/v) di TMOS. L'obiettivo di queste prove è la ricerca di una condizione in cui la proteinasi K cristallizzi moderatamente, al fine di potere osservare un effetto di aumento graduale del numero di cristalli in presenza degli additivi.

Per superare l'inibizione della nucleazione causata dal gel di silice si è scelto di partire da una combinazione proteina-precipitante che, in HDVD, aveva dato un consistente numero di cristalli. La prima concentrazione di sale analizzata è 0.85 M, combinata con una di proteina appartenente all'intervallo 10-20 mg/mL, in quanto in HDVD-4, per queste condizioni, sono stati ottenuti molti cristalli o, addirittura, cristallizzazione massiva. In queste prove, BGP-1, BGP-2 e BGP-3 (Tabella 2.11), si è ottenuto un numero di microcristalli decisamente elevato, motivo per cui si è deciso di abbassare la sovrasaturazione della soluzione riducendo la concentrazione di solfato di ammonio a 0.5 M e 0.25 M e analizzando concentrazioni inferiori di ProK (prove elencate in Tabella 2.11).

Per 5 mg/mL di ProK (BGP-4) non sono presenti cristalli, mentre per 7 mg/mL sono visibili alcuni nuclei molto piccoli (BGP-5 e BGP-6). Utilizzando concentrazioni di proteina pari a 10 mg/mL (BGP-7 e BGP-8), 12 mg/mL (BGP-9 e BGP-10) e 15 mg/mL (BGP-11 e BGP-12), la cristallizzazione è avvenuta e la nucleazione risulta più densa all'aumentare della concentrazione di ProK e di solfato di ammonio, coerentemente con quanto osservato in MB e HDVD in §3.2.2 e §3.3.2.

I risultati di cristallizzazione per le concentrazioni più significative sono riportati in Figura 4.21. Nonostante il quantitativo di TMOS nel gel sia pari a quello adottato per le prove in *batch* di HEWL, la gelificazione dei campioni di ProK è avvenuta completamente in un tempo minore (poche ore) grazie alla presenza dell'HEPES a pH 7: in un ambiente a pH neutro, infatti, la formazione del gel di silice procede più rapidamente. In tutti i casi analizzati i cristalli, laddove presenti, sono apparsi dopo un giorno; inoltre, come osservato in MB e HDVD, la loro dimensione è decisamente inferiore rispetto a quella di HEWL a parità di tecnica.



Figura 4.21 Cristalli di ProK ottenuti in (a) BGP-7, (b) BGP-9, (c) BGP-8, (d) BGP-10, (e) BGP-1 e (f) BGP-11 (Tabella 2.11).

Date le piccole dimensioni dei cristalli di ProK, le immagini acquisite con lo stereomicroscopio Leica M125 C (che ha ingrandimento massimo 10x) non permettono di distinguerne chiaramente la forma. Perciò, con il supporto della Dott.ssa Francesca Susa, i cristalli ottenuti in due prove di riferimento, BGP-3 e BGP-11 (Tabella 2.11), sono stati osservati con il microscopio invertito Eclipse Ti-E, che

presenta ingrandimento massimo 100x. Le immagini acquisite sono riportate in Figura 4.22.



Figura 4.22 Cristalli di ProK ottenuti in (a) BGP-3, (b) BGP-11 (Tabella 2.11). Le immagini sono state acquisite utilizzando il microscopio invertito Eclipse Ti-E, con il supporto della Dott.ssa Francesca Susa.

La forma dei cristalli varia a seconda del grado di sovrasaturazione del gel. In BGP-3, prova in cui la sovrasaturazione è massima, i cristalli hanno forma quasi sferica (Figura 4.22a), mentre in BGP-11 si rilevano strutture bipiramidali, ma con le facce più arrotondate (Figura 4.22b). L'arrotondamento delle facce nei cristalli di proteina è, solitamente, osservabile in gel densi e può essere accentuato dalle alte sovrasaturazioni. Tale fenomeno è dovuto all'incorporazione delle fibre di gel all'interno delle facce del cristallo, che ne riduce significativamente l'energia superficiale. Per questo motivo, si perde l'anisotropia di crescita delle facce e la distribuzione di energia superficiale diventa isotropa su tutto il cristallo, portandolo ad assumere forme progressivamente più arrotondate (Gavira *et al.*, 2013).

4.2.2.2 Cristallizzazione in presenza di additivi

Sulla base dei risultati esposti in §4.2.2.1, si è scelto di condurre la cristallizzazione di ProK in presenza degli additivi utilizzando 10 mg/mL di proteina e 0.25 M (NH₄)₂SO₄. I risultati di cristallizzazione delle prove BGP-M1, BGP-M2 e BGP-M3 (Tabella 2.12) sono riportati in Figura 4.23. In presenza di 1-MDEOS, si sono formate all'interno del gel numerose bolle, probabilmente a causa dell'interazione dell'additivo con l'HEPES. La cristallizzazione, in questo caso, potrebbe essere stata favorita dalla presenza del gas; in alcuni campioni, infatti, sono visibili cristalli nucleati direttamente sulla

superficie delle bolle (Figura 4.23a). Tuttavia, il numero di cristalli è superiore a quello ottenuto in assenza di additivo (BGP-7) anche nelle zone del gel prive di bolle (Figura 4.23b), per cui si può ritenere valida l'azione dell'additivo.

L'utilizzo di 2-MDEOS ha incrementato notevolmente la densità di nucleazione all'interno del gel (Figura 4.23c), mentre non si rileva un aumento del numero di cristalli con 3-MEOS (Figura 4.23d). In quest'ultimo caso, infatti, non sono visibili cristalli all'interno del gel. È possibile che tale additivo non conservi l'azione, mostrata con HEWL, in presenza di HEPES e ProK e che, in tali condizioni, la nucleazione venga inibita.



Figura 4.23 Cristalli di ProK ottenuti in (a) BGP-M1, (b) BGP-M1, (c) BGP-M2, (d) BGP-M3 (Tabella 2.12).

4.3 Conclusioni

Utilizzando come riferimento i risultati ottenuti nel terzo capitolo, HEWL e ProK sono state cristallizzate in gel di silice, nelle varianti in contro-diffusione (CD) e *batch* (BG).

Al fine di limitare l'inibizione della nucleazione causata dal gel, è stata studiata l'azione di tre additivi: metildietossisilano (1-MDEOS), dimetildietossisilano (2-MDEOS) e trimetiletossisilano (3-MEOS).

In CD, con 100 mg/mL di HEWL, 5% (v/v) di TMOS e 20% (w/w) di NaCl, (condizione sviluppata sia in assenza che in presenza di 1-MDEOS, 2-MDEOS e 3-MEOS) sono stati ottenuti risultati ottimali. Si è visto che l'aggiunta degli additivi conduceva ad un incremento della nucleazione e che maggiore era il numero di gruppi metilici dell'additivo maggiore era la densità di nucleazione e minore la dimensione dei cristalli. Tuttavia, questo effetto è risultato meno pronunciato nel passaggio da 2-MDEOS a 3-MEOS.

In BG, per HEWL, sono state confrontate varie combinazioni di concentrazioni di proteina e precipitante, delle quali le più adatte sono risultate comprese negli intervalli 70-80 mg/mL di HEWL e 3-4% (w/w) di NaCl. In queste condizioni è stato confermato l'effetto degli additivi osservato in CD; essi agiscono sostituendo alcuni gruppi -SiOH presenti sulla superficie del gel con gruppi metilici, riducendo la quantità di proteina adsorbita sul gel e, quindi, incapace di nucleare. L'aggiunta degli additivi, inoltre, ha permesso di controllare la densità di nucleazione di HEWL all'interno del gel.

ProK è stata cristallizzata in BG utilizzando unicamente (NH₄)₂SO₄ come precipitante. La nucleazione è avvenuta per concentrazioni di proteina superiori o uguali a 10 mg/mL, combinate con (NH₄)₂SO₄ 0.25 M, 0.5 M e 0.85 M. In particolare, ad elevati livelli di sovrasaturazione si sono formati microcristalli in numero molto elevato. Tra i casi analizzati, il *batch* contenente 15 mg/mL di ProK e sale 0.25 M ha condotto ai cristalli più grandi, i quali, però, rimangono significativamente più piccoli rispetto a quelli ottenuti con HEWL a parità di tecnica.

La cristallizzazione di ProK è stata condotta, in presenza degli additivi, utilizzando 10 mg/mL di proteina e 0.25 M (NH₄)₂SO₄. L'aumento di nucleazione è avvenuto impiegando 1-MDEOS e 2-MDEOS, mentre non è stato rilevato con 3-MEOS, condizione in cui non si sono formati cristalli. La presenza di 1-MDEOS, invece, ha causato la formazione di numerose bolle all'interno del gel, che, in parte, hanno favorito la nucleazione della proteina. È possibile, infatti, osservare la presenza di cristalli nucleati direttamente sulla superficie delle bolle.

5. Conclusioni

L'obiettivo di questo progetto di tesi è la cristallizzazione in gel di silice del lisozima ottenuto dall'albume d'uovo di gallina (HEWL) e della proteinasi K (ProK), due proteine modello. A tale scopo sono state utilizzate quattro tecniche differenti, tutte basate sull'aggiunta di precipitanti all'ambiente di cristallizzazione al fine di raggiungere i livelli adeguati di sovrasaturazione e promuovere la nucleazione. I sali esaminati sono: cloruro di sodio (NaCl) per HEWL, nitrato di sodio (NaNO₃) e solfato di ammonio ((NH₄)₂SO₄) per ProK.

Lo studio sperimentale è stato suddiviso in due parti: l'analisi preliminare e la cristallizzazione in gel di silice. Innanzitutto, le due proteine sono state cristallizzate utilizzando *microbatch* (MB) e *hanging drop-vapor diffusion* (HDVD), due tecniche normalmente utilizzate per generare i diagrammi di fase delle proteine. In questa fase di indagine sono stati individuati gli intervalli di concentrazione di proteina e precipitante adatti alla formazione dei cristalli, pari a:

- 22.5-45 mg/mL di HEWL e 2-4% (w/w) di NaCl;
- 2.5-15 mg/mL di ProK e 0.025-0.45 M NaNO₃ o 0.25-1.5 M (NH₄)₂SO₄.

L'azione di NaCl e (NH₄)₂SO₄ è risultata coerente con quanto atteso; all'aumentare della concentrazione di precipitante, infatti, la densità di nucleazione è apparsa crescente. In presenza di NaNO₃, invece, è stato osservato l'effetto opposto. In generale, a seconda della proteina da cui derivano, i cristalli ottenuti presentano caratteristiche differenti. Quelli di HEWL hanno forma tetragonale, mentre quelli di ProK sono bipiramidali e di dimensioni notevolmente inferiori; quest'ultima proteina, infatti, è incline a cristallizzare massivamente.

In seguito, tali risultati sono stati utilizzati per svolgere gli esperimenti in gel di silice, in contro-diffusione (CD) e in *batch* (BG). A causa dell'inibizione della nucleazione causata dall'uso del gel è stato necessario aumentare la concentrazione di proteina nell'ambiente di cristallizzazione. HEWL è stata cristallizzata, con entrambe, le tecniche, variando il contenuto di TMOS, la concentrazione di proteina e quella di sale. I risultati migliori sono stati ottenuti:

• in CD con 100 mg/mL di HEWL, 5% (v/v) di TMOS e 20% (w/w) di NaCl;

• in BG con 70-80 mg/mL di HEWL, 10% (v/v) di TMOS e 3-4% (w/w) di NaCl.

In tali condizioni è stata, inoltre, analizzata l'azione di tre additivi: metildietossisilano (1-MDEOS), dimetildietossisilano (2-MDEOS) e trimetiletossisilano (3-MEOS). È stato osservato un aumento della densità di nucleazione all'aumentare sia del numero di gruppi metilici dell'additivo sia della quantità di tale sostanza all'interno del gel. Questo effetto è dovuto alla sostituzione di alcuni gruppi -SiOH, presenti sulla superficie del gel, con gruppi metilici; in questo modo, è possibile limitare l'adsorbimento della proteina sul gel, aumentando la quantità di molecole proteiche disponibili per la nucleazione.

ProK è stata cristallizzata in BG in presenza di (NH₄)₂SO₄, variando le concentrazioni di sale e precipitante. La nucleazione è avvenuta per concentrazioni di proteina superiori o uguali a 10 mg/mL, combinate con (NH₄)₂SO₄ 0.25 M, 0.5 M e 0.85 M. I cristalli di dimensioni maggiori sono stati ottenuti combinando 15 mg/mL di ProK con sale 0.25 M, mentre per elevati valori di sovrasaturazione la densità di cristallizzazione è risultata molto elevata e si sono formati microcristalli. In presenza di additivi, la cristallizzazione di ProK ha rispettato l'andamento rilevato con HEWL con 1-MDEOS e 2-MDEOS, mentre non si sono formati cristalli con 3-MEOS. Con il primo additivo, inoltre, si è verificata la formazione di numerose bolle all'interno del gel. Lo studio della cristallizzazione in gel di silice di ProK in presenza di additivi necessita, perciò, di ulteriori approfondimenti.

In conclusione, la cristallizzazione in gel di silice costituisce una delle tecniche più vantaggiose tra quelle presenti oggigiorno. Essa permette di ottenere cristalli uniformi e di buona qualità, con caratteristiche meccaniche superiori, in un ambiente privo di convezione e con costi operativi contenuti. L'aggiunta di additivi, come 1-MDEOS, 2-MDEOS e 3-MEOS, consente di mantenere i vantaggi di questa tecnica, contrastandone i principali limiti: l'inibizione della nucleazione e la necessità di utilizzare elevate concentrazioni di proteina. Come osservato in questo studio per HEWL, l'adozione di tali sostanze rappresenta un valido strumento di controllo della nucleazione, potenzialmente applicabile per l'ottenimento di cristalli con caratteristiche uniformi e adatte alla diffrazione neutronica o ai raggi X. Inoltre, gli additivi studiati potrebbero essere utilizzati al fine di ridurre la quantità di proteina nel gel, evitandone la flocculazione e limitando ulteriormente i costi operativi.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, quindi, potrebbero essere sfruttati come punto di partenza per futuri studi sulla cristallizzazione di HEWL e ProK e per lo sviluppo della cristallizzazione in gel di silice, tecnica fondamentale per la formazione di cristalli di buona qualità e di dimensioni sufficienti per gli studi strutturali.

Elenco delle figure

Figura 1.4 Crescita di un cristallo di taumatina (a) per nucleazione 2D e (b) in una dislocazione a vite. Figura tratta da (Wlodawer *et al.*, 2017), con modifiche.....10

Figura 1.6 Tecnica del *microbatch* applicata per la cristallizzazione di proteine. La "goccia di cristallizzazione" si trova all'interno di un pozzetto, dispersa in olio......13

Figura 1.7 *Free interface diffusion* di una soluzione proteica all'interno di un capillare.

Figura 1.9 Riduzione della nucleazione e variazione della morfologia dei cristalli di lisozima all'aumentare della concentrazione di TMOS nel gel (da 8% (v/v) a 18% (v/v)). Figura tratta da (Gavira *et al.*, 2013), con modifiche.20

Figura 2.1 Set up di cristallizzazione in contro-diffusione. La fiala PCR (a) tale e quale, (b) inserita in un sacchetto trasparente e (c) in una Eppendorf tube [®] da 1.5 mL.
Figura 2.2 Ordine di addizione delle soluzioni all'interno di una Eppendorf tube [®] da 1.5 mL in un esperimento in <i>batch</i> in gel di silice
Figura 3.1 Spettro UV-Visibile di HEWL (curva blu). La linea rossa evidenzia ilvalore di assorbanza della proteina a 280 nm.35
Figura 3.2 Spettro UV-Visibile di ProK (curva blu). La linea rossa evidenzia il valoredi assorbanza della proteina a 280 nm.35
Figura 3.3 Risultati di cristallizzazione della prova MB-1 (Tabella 2.4). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la cristallizzazione è avvenuta in meno di 24 ore, in quelli grigi entro una settimana e in quelli bianchi dopo un mese
Figura 3.4 Geometria di un cristallo tetragonale di HEWL. Figura tratta da (Sang-IlKwon <i>et al.</i> , 2014), con modifiche.37
Figura 3.5 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-1 (Tabella 2.4) utilizzando NaCl come precipitante, rispettivamente in concentrazioni: (a) 30 mg/mL e 3% (w/w), (b) 37.5 mg/mL e 2% (w/w), (c) 45 mg/mL e 2% (w/w), (d) 45 mg/mL e 4% (w/w)38
Figura 3.6 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-4 (Tabella 2.5) utilizzando, come precipitante, NaCl miscelato a 1-MDEOS, rispettivamente in concentrazioni: (a) 22.5 mg/mL e 2% (w/w), (b) 30 mg/mL e 2% (w/w), (c) 37.5 mg/mL e 3% (w/w), (d) 37.5 mg/mL e 4% (w/w). Il rapporto in massa tra HEWL e 1-MDEOS nella goccia è pari a 12
Figura 3.7 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-7 (Tabella 2.5) utilizzando, come precipitante, NaCl miscelato a 1-MDEOS, rispettivamente in concentrazioni: (a) 22.5 mg/mL e 1% (w/w), (b) 45 mg/mL e 2% (w/w), (c) 37.5 mg/mL e 3% (w/w), (d) 30 mg/mL e 4% (w/w). Il rapporto in massa tra HEWL e 1-MDEOS nella goccia è pari a 0.4
Figura 3.8 Risultati di cristallizzazione per la prova MB-2 (Tabella 2.4). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la nucleazione è avvenuta, mentre in quelli bianchi no.
Figura 3.9 Risultati di cristallizzazione per la prova MB-3 (Tabella 2.4). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la nucleazione è avvenuta, mentre in quelli bianchi no.
Figura 3.10 Cristalli di ProK ottenuti in MB-2 (Tabella 2.4) utilizzando, come

Figura 3.10 Cristalli di ProK ottenuti in MB-2 (Tabella 2.4) utilizzando, come precipitante, NaNO₃, rispettivamente in concentrazioni: (a) 2.5 mg/mL e 0.025 M, (b)

Figura 3.11 Risultati di cristallizzazione per la prova HDVD-1 (Tabella 2.6). Nei pozzetti contrassegnati dal colore nero la cristallizzazione è avvenuta in meno di 24 ore, in quelli grigi dopo un mese e in quelli bianchi non è avvenuta.......44

Figura 3.12 Cristalli di HEWL ottenuti in HDVD-1 (Tabella 2.6) utilizzando, come precipitante, NaCl, rispettivamente in concentrazioni: (a) 22.5 mg/mL e 2% (w/w), (b) 37.5 mg/mL e 2% (w/w), (c) 30 mg/mL e 3% (w/w), (d) 45 mg/mL e 3% (w/w), (e) 22.5 mg/mL e 4% (w/w), (f) 37.5 mg/mL e 4% (w/w)......45

Figura 4.3 Monitoraggio in <i>time-lapse</i> della nucleazione di HEWL in CD55
Figura 4.4 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-1 (Tabella 2.7)
Figura 4.5 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-2 (Tabella 2.7)
Figura 4.6 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-M1 (Tabella 2.7). (a) e (b) sono riferite all'additivo vecchio, mentre (c) e (d) a quello nuovo
Figura 4.7 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-M2-1 (Tabella 2.7)60
Figura 4.8 Cristalli di HEWL ottenuti in CD-M3-1 (Tabella 2.7)60
Figura 4.9 Dimensione media dei cristalli ottenuti in CD in gel di silice in assenza di additivi (620.9 μ m), con 1-MDEOS (245.4 μ m), 2-MDEOS (87.2 μ m) e 3-MEOS (76.9 μ m). Per ciascun caso è riportato il corrispondente errore, in termini di deviazione standard
Figura 4.10 Cristalli di HEWL ottenuti in: (a) BG-1, (b) BG-2 e (c) BG-3 (Tabella 2.8)
Figura 4.11 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-4, (b) BG-5 e (c) BG-6 (Tabella 2.8)
Figura 4.12 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M1-1, (b) BG-M1-2 e (c) BG-M1- 3 (Tabella 2.9)
Figura 4.13 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M2-1, (b) BG-M2-2 e (c) BG-M2-3 (Tabella 2.9)
Figura 4.14 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M3-1, (b) BG-M3-2 e (c) BG-M3-3 (Tabella 2.9)
Figura 4.15 Cristalli di HEWL ottenuti in BG-7 (Tabella 2.8)
Figura 4.16 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M1-4, (b) BG-M1-5 (Tabella 2.9).
Figura 4.17 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M2-4, (b) BG-M2-5 (Tabella 2.9).
Figura 4.18 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-M3-4, (b) BG-M3-5 (Tabella 2.9).
Figura 4.19 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-8, (b) BG-M1-6, (c) BG-M2-6 e (d) BG-M3-6. Le tabelle di riferimento sono: (a) Tabella 2.8, (b, c, d) Tabella 2.1072
Figura 4.20 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) BG-9, (b) BG-M1-7, (c) BG-M2-7 e (d) BG-M3-7. Le tabelle di riferimento sono: (a) Tabella 2.8, (b, c, d) Tabella 2.1073

Figura 4.21 Cristalli di ProK ottenuti in (a) BGP-7, (b) BGP-9, (c) BGP-8, (d) BGP-
10, (e) BGP-1 e (f) BGP-11 (Tabella 2.11)
Figura 4.22 Cristalli di ProK ottenuti in (a) BGP-3, (b) BGP-11 (Tabella 2.11). Le
immagini sono state acquisite utilizzando il microscopio invertito Eclipse Ti-E, con il
supporto della Dott.ssa Francesca Susa76
Figura 4.23 Cristalli di ProK ottenuti in (a) BGP-M1, (b) BGP-M1, (c) BGP-M2, (d)
BGP-M3 (Tabella 2.12)77

Elenco delle tabelle

Tabella 2.1 Elenco delle soluzioni tampone utilizzate
Tabella 2.2 Elenco dei precipitanti utilizzati. 26
Tabella 2.3 Elenco delle concentrazioni delle soluzioni stock di proteina adottate26
Tabella 2.4 Prove effettuate per HEWL e ProK in microbatch
Tabella 2.5 Prove effettuate per HEWL in microbatch in presenza di additivi
Tabella 2.6 Prove effettuate per HEWL e ProK in HDVD
Tabella 2.7 Prove effettuate per HEWL in CD. Per la tipologia di <i>set up</i> (b e c) si fariferimento alla Figura 2.1
Tabella 2.8 Prove effettuate per HEWL in <i>batch</i> in gel di silice, in assenza di additivi.
Tabella 2.9 Prove effettuate per HEWL in <i>batch</i> in gel di silice, in presenza di additivi con rapporto additivo/TMOS variabile
Tabella 2.10 Prove effettuate per HEWL in <i>batch</i> in gel di silice, in presenza di additivi con rapporto additivo/TMOS costante.
Tabella 2.11 Prove effettuate per ProK in <i>batch</i> in gel di silice, in assenza di additivi.
Tabella 2.12 Prove effettuate per ProK in <i>batch</i> in gel di silice, in presenza di additivicon rapporto additivo/TMOS costante

Lista dei simboli

A	Assorbanza, -
A^*	Superficie di un aggregato molecolare, m ²
b	Cammino ottico, cm
С	Concentrazione, mg/mL
D	Coefficiente di diffusione di materia, m ² /s
D^*	Fattore di diluizione teorico, -
g	Accelerazione gravitazionale, m/s ²
Gr	Numero di Grashof, -
ΔG	Energia libera, J
Δg_s	Energia libera di superficie specifica, J/m ²
ΔG_s	Energia libera di superficie, J
Δg_{v}	Energia libera volumica specifica, J/m ³
ΔG_{v}	Energia libera volumica, J
L	Dimensione di una cella di cristallizzazione, m
m_{DW}	Massa di acqua distillata, mg
m_P	Massa di proteina, mg
n^*	Dimensione critica di un aggregato, m
R	Velocità di crescita di un cristallo, mg·m/s
S	Solubilità, mg/mL
S	Sovrasaturazione, -
V	Volume di un aggregato molecolare, m ³
α	Coefficiente di espansione volumica, K ⁻¹
δ	Spessore del boundary layer, m
ε	Coefficiente di estinzione, mL·cm ⁻¹ ·mg ⁻¹
ν	Viscosità cinematica, m ² /s

Abbreviazioni

1-MDEOS	Metildietossisilano
2-MDEOS	Dimetildietossisilano
3-MEOS	Trimetiletossisilano
BG	Batch in gel di silice
CD	Contro-diffusione
CNT	Teoria classica di nucleazione
DW	Acqua distillata
HD	Hanging drop
HEWL	Lisozima ottenuto dall'albume d'uovo di gallina
MB	Microbatch
MPD	Metilpentandiolo
MW	Peso molecolare, g/mol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Glicole polietilenico
ProK	Proteinasi K
SD	Sitting drop
TIM	Trioso fosfato isomerasi
TMOS	Tetrametossisilano
VD	Vapor diffusion

Bibliografia

Antosiewicz, J.M., Shugar, D., UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications, *Biophysical reviews*, 2016, **8** (2), 163-177. <u>https://doi.org/10.1007/s12551-016-0197-7</u>

Artusio, F., Castellví, A., Pisano, R., Gavira, J.A., Tuning transport phenomena in agarose gels for the control of protein nucleation density and crystal form, *Crystals*, 2021, **11** (5), 466. <u>https://doi.org/10.3390/cryst11050466</u>

Artusio, F., Castellví, A., Sacristán, A., Pisano, R., Gavira, J.A., Agarose gel as a medium for growing and tailoring protein crystals, *Crystal Growth & Design*, 2020, **20** (8), 5564-5571. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1021/acs.cgd.0c00736</u>

Artusio, F., Pisano, R., Surface-induced crystallization of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: A review, *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, **547**, 190-208. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.069</u>

Asherie, N., Protein crystallization and phase diagrams, *Methods*, 2004, **34** (3), 266-272. <u>https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.028</u>

Bakar, M.R.A., Nagy, Z.K., Saleemi, A.N., Rielly, C.D., The impact of direct nucleation control on crystal size distribution in pharmaceutical crystallization processes, *Crystal Growth & Design*, 2009, **9** (3), 1378-1384. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1021/cg800595v</u>

Baumgartner, K., Galm, L., Nötzold, J., Sigloch, H., Morgenstern, J., Schleining, K., Suhm, S., Oelmeier, S.A., Hubbuch, H., Determination of protein phase diagrams by microbatch experiments: Exploring the influence of precipitants and pH, *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, **479** (1), 28-40. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.027

Biter, A.B., Pollet, J., Chen, W., Strych, U., Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., A method to probe protein structure from UV absorbance spectra, *Analitical Biochemistry*, 2019, **587** (1), 113450. <u>https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113450</u>

Blakeley, M.P., Langan, P., Niimura, N., Podjarny, A., Neutron crystallography: opportunities, challenges, and limitations, *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, **18** (5), 593-600. <u>https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.06.009</u>

Bonnefond, L., Schellenberger, P., Basquin, J., Demangeat, G., Ritzenthaler, C., Chênevert, R., Balg, C., Frugier, M., Rudinger-Thirion, J., Giegé, R., Lorber, B., Sauter, C., Exploiting protein engineering and crystal polymorphism for successful X-ray structure determination, *Crystal Growth & Design*, 2011, **11** (10), 4334-4343. https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1021/cg101468p

Brumshtein, B., Greenblatt, H.M., Futerman, A.H., Silman, I., Sussman, J.L., Control of the rate of evaporation in protein crystallization by the 'microbatch under oil' method, *Journal of Applied Crystallography*, 2008, **41** (5), 969-971. https://doi.org/10.1107/S0021889808024667 Chayen, N.E., Shaw Stewart, P.D., Blow, D.M., Microbatch crystallization under oil – a new technique allowing many small-volume crystallization trials, *Journal of Crystal Growth*, 1992, **122** (1-4), 176-180. <u>https://doi.org/10.1016/0022-0248(92)90241-A</u>

D'Arcy, A., Mac Sweeney, A., Haber, A., Practical aspects of using the microbatch methos in screening conditions for protein crystallization, *Methods*, 2004, **34** (3), 323-328. <u>https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.023</u>

D'Arcy, A., Mac Sweeney, A., Stihle, M., Haber, A., The advantages of using a modified Microbatch method for rapid screening of protein crystallization conditions, *Acta Crystallographica Section D*, 2003, **59** (2), 396-399. https://doi.org/10.1107/S0907444902022011

Drenth, J., Principles of Protein X-Ray Crystallography, *Springer New York*, ProQuest Ebook Central, 2002, Chap. 1, pag. 1-8. <u>https://ebookcentral.proquest.com/lib/polito-ebooks/detail.action?docID=3086818</u>.

Duan, L., Kang, Q., Hu, W.R., Li, G.P., Wang, D.C., The mass transfer process and the growth rate of protein crystals, *Biophysical Chemistry*, 2002, **97** (2–3), 189-201. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00067-4

Dumetz, A.C., Chockla, A.M., Kaler, E.W., Lenhoff, A.M., Comparative effects of salt, organic, and polymer precipitants on protein phase behavior and implications for vapor diffusion, *Crystal Growth & Design*, 2009, **9** (2), 682-691. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1021/cg700956b</u>

Durbin, S.D., Feher, G., Protein Crystallization, *Annual review of Physical Chemistry*, 1996, **47**, 171-204.

García-Ruiz, J. M., Otálora, F., García-Caballero, A., The role of mass transport in protein crystallization, *Acta crystallographica Section F Structural biology communications*, 2016, **72** (Pt 2), 96–104. https://doi.org/10.1107/S2053230X16000030

Gavira, J.A., Current trends in protein crystallization, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016, **602** (1), 3-11. <u>https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.010</u>

Gavira, J.A., Van Driessche, A.E.S., Garcia-Ruiz, J., Growth of ultrastable proteinsilica composite crystals, *Crystal Growth & Design*, 2013, **13** (6), 2522-2529. https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1021/cg400231g

Giegé, R., A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day, *The FEBS Journal*, 2013, **280** (24), 6456-6497. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1111/febs.12580</u>

González-Ramírez, L.A., Caballero, A.G., García-Ruiz, J.M., Investigation of the compatibility of gels with precipitating agents and detergents in protein crystallization experiments, *Crystal Growth & Design*, 2008, **8** (12), 4291-4296. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1021/cg800749b</u>

Heijna, M.C.R., van Enckevort, W.J.P., Vlieg, E., Growth inhibition of protein crystals: a study of lysozyme polymorphs, *Crystal Growth & Design*, 2008, **8** (1), 270-274. <u>https://doi.org/10.1021/cg0703036</u>

Hori, N., Sudoh, K., Iwasaki, H., Desymmetrization of the polyedal crystal shape of tetragonal lysozyme due to face-growth rate fluctuations, *Journal of Crystal Growth*, 2007, **309** (2), 164-169. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1016/j.jcrysgro.2007.09.033</u>

Iler, R.K., Chemistry of Silica - Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry, *John Wiley & Sons*, 1979, cap. 3, pag. 172-173. <u>https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0047XQD4/chemistry-silica-solubility/front-matter</u>

Kimble, W.L., Rousseau, R.W, Sambanis, A., Lysozyme crystallization by vapor diffusion: characterization and modelling in the absence and presence of exogenous minerals, *Journal of Crystal Growth*, 1995, **147** (1-2), 165-171. https://doi.org/10.1016/0022-0248(94)00630-X

Koszelak, S., Martin, D., Joseph Ng, Alexander McPherson, Protein crystal growth rates determined by time lapse microphotography, *Journal of Crystal Growth*, 1991, **110** (1–2), 177-181. <u>https://doi.org/10.1016/0022-0248(91)90882-6</u>

Lin, C., Zhang., Y., Liu, J.J., Wang, X.Z., Study on nucleation kinetics of lysozyme crystallization, *Journal of Crystal Growth*, 2017, **469** (1), 59-64. https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2016.10.028

Lorber, B., Sauter, C., Théobald-Dietrich, A., Moreno, A., Schellenberger, P., Robert, M., Capelle, B., Sanglier, S., Potier, N., Giegé, R., Crystal growth of proteins, nucleic acids, and viruses in gels, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2009, **101** (1-3), 13-25. <u>https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.12.002</u>

Maes, D., Decanniere, K., Zegers, I., Vanhee, C., Sleutel, M., Willaert, R., Van de Weerdt, C., Martial, J., Declercq, J.P., Evrard, C., Otalora, F., García-Ruiz, J. M., Protein crystallisation under microgravity conditions: What did we learn on TIM cristallisation from the Soyuz missions?, *Microgravity Science and Technology*, 2007, **XIX** (5-6), 90-94. <u>http://hdl.handle.net/2268/62716</u>

Mao, Y., Li, F., Wang, T., Cheng, X., Li, G., Li, D., Zhang, X., Hao, H., Enhancement of lysozyme crystallization under ultrasound field, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, **63** (1), 104975. <u>https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104975</u>

Maosoongnern, S., Flood, C., Flood, A.E., Ulrich, J., Crystallization of lysozyme from lysozyme-ovalbumin mixtures: Separation potential and crystal growth kinetics, *Journal of Crystal Growth*, 2017, **469** (1), 2-7. https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2016.09.049

McKechnie, W. S., Tugcu, N., Kandula, S., Accurate and rapid protein concentration measurment of in-process, high concentration protein pools, *Biotechnology Progress*, 2018, **34** (5), 1234-1241. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1002/btpr.2695</u>

McPherson, A., Cudney, B., Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules, *Acta crystallographica Section F Structural biology communications*, 2014, **70** (Pt 11), 1445–1467. https://doi.org/10.1107/S2053230X14019670

McPherson, A., Introduction to protein crystallization, *Methods*, 2004, **34** (3), 254-265. <u>https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.019</u>

Nanev, C.N., Kinetics and intimate mechanism of protein crystal nucleation, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2013, **59** (4), 133-169. https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2013.09.001

Nanev, C.N., Peculiarities of protein crystal nucleation and growth, *Crystals*, 2018, **8** (11), 422. <u>https://doi.org/10.3390/cryst8110422</u>

Nanev, C.N., Penkova, A., Nucleation and growth of lysozyme crystals under external electric field, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, **209** (2–3), 39-145. <u>https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00175-9</u>

Otálora, F., Gavira, J.A., Ng, J.D., García-Ruiz, J.M., Counterdiffusion methods applied to protein crystallization, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2009, **101** (1–3), 26-37. <u>https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.12.004</u>

Pietrasik, J., Zaborski, M., Sol-gel process of alkoxylanes in an elastomer medium, *Polymer International*, 2005, **54** (8), 1119-1125. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1002/pi.1812</u>

Ranguelov, B., Nanev, C, 2D Monte Carlo simulation of patchy particles association and protein crystal polymorph selection, *Crystals*, 2019, **9** (10), 508. <u>https://doi.org/10.3390/cryst9100508</u>

Sang-Il Kwon, J., Nayhouse, M., Christofides, P.D., Orkoulas, G., Modeling and control of crystal shape in continuous protein crystallization, *Chemical Engineering* Science, 2014, **107** (1), 47-57. <u>https://doi-org.ezproxy.biblio.polito.it/10.1016/j.ces.2013.12.005</u>

Schoen, H.M., Grove, C.S., Palermo, J.A., The early history of crystallization, *Journal of Chemical Education*, 1956, **33** (8), 373-375. <u>http://dx.doi.org/10.1021/ed033p373</u>

Vidal, O., Robert, M.C., Boué, F., Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering: case of silica gel, a nucleation inhibitor, *Journal of Crystal Growth*, 1998, **192** (1-2), 271-281. <u>https://doi.org/10.1016/S0022-0248(98)00415-1</u>

Vidal, O., Robert, M.C., Boué, F., Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering: case of agarose gel, a nucleation promotor, *Journal of Crystal Growth*, 1998, **192** (1-2), 257-270. <u>https://doi.org/10.1016/S0022-0248(98)00416-3</u>

Wlodawer, A., Dauter, Z., Jaskolski, M., Protein Crystallography: Methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, 2017, **1607** (1), Chap. 2-3, 17-68.

Zaccai, N.R., Coquelle, N., Opportunities and challenges in neutron crystallography, *EPJ Web of Conferences*, 2020, **236** (1), 02001. https://doi.org/10.1051/epjconf/202023602001

Appendice



Figura A.1 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-5 (Tabella 2.4) nelle condizioni: (a) 22.5 mg/mL e 2% (w/w), (b) 37.5 mg/mL e 4% (w/w).



Figura A.2 Cristalli di HEWL ottenuti in MB-6 (Tabella 2.4) nelle condizioni: (a) 30 mg/mL e 2% (w/w), (b) 45 mg/mL e 4% (w/w).



Figura A.3 Cristalli di HEWL ottenuti in presenza di (a) 2-MDEOS e (b) 3-MEOS al 20% (v/v). In questi campioni sono stati utilizzati additivi datati per confrontarne l'effetto rispetto a quelli più nuovi.



Figura A.4 Cristalli di HEWL ottenuti in (a) CD-M2-2 e (b) CD-M3-2 (Tabella 2.7). In questi campioni la nucleazione è avvenuta a temperatura controllata (20 °C) all'interno di un bagno termostatato.

Ringraziamenti

Giunta al termine del mio lavoro di tesi, vorrei esprimere alcuni brevi, ma sentiti, ringraziamenti.

Innanzitutto, ringrazio i miei relatori, il Professore Roberto Pisano e la Dottoressa Fiora Artusio, che, attraverso i loro insegnamenti, mi hanno permesso di condurre questo studio di tesi. Grazie per la fiducia, la disponibilità e i preziosi consigli dispensati.

In secondo luogo, voglio ringraziare tutte le persone che, in questi cinque anni, mi sono state vicine. Grazie per il sostegno, la comprensione e, soprattutto, per la pazienza che avete avuto nei miei confronti. Un ringraziamento, in particolare, va a Michela, con la quale, più di tutti, ho condiviso le gioie e i dolori che hanno caratterizzato la vita universitaria.

Un grazie speciale va, sicuramente, alla mia famiglia. Ai miei nonni, fonte inesauribile di energia, e ai miei zii, che hanno sempre creduto in me, senza farmi mai mancare il loro affetto. Grazie a Benedetta, che con il suo sorriso ha saputo rallegrare anche le giornate più buie.

Voglio ringraziare, infine, tre persone che non ringrazio mai, ma a cui dovrei dire grazie ogni giorno: mia sorella e i miei genitori.

Francesca, grazie per aver sopportato la mia ansia e le mie paure, sostenendomi e capendomi più di chiunque altro. Sei il regalo più bello che la vita mi abbia fatto.

Papà, grazie per avermi dato l'opportunità di studiare, per i tuoi sacrifici economici e personali e, soprattutto, per avermi insegnato che il valore di una persona non si riconosce dal titolo ma dall'anima.

Mamma, ti ringrazio per la tua dedizione, la tua pazienza e il tuo infinito amore. Grazie per avermi insegnato l'importanza dello studio e del sacrificio e, soprattutto, il potere dell'onestà e della gentilezza.

A voi devo tutto.

Lorena