



La cristallografia a raggi x

LA TECNICA DI CUI FU GRANDE ESPERTA ROSALIND FRANKLIN

Di cosa si tratta?

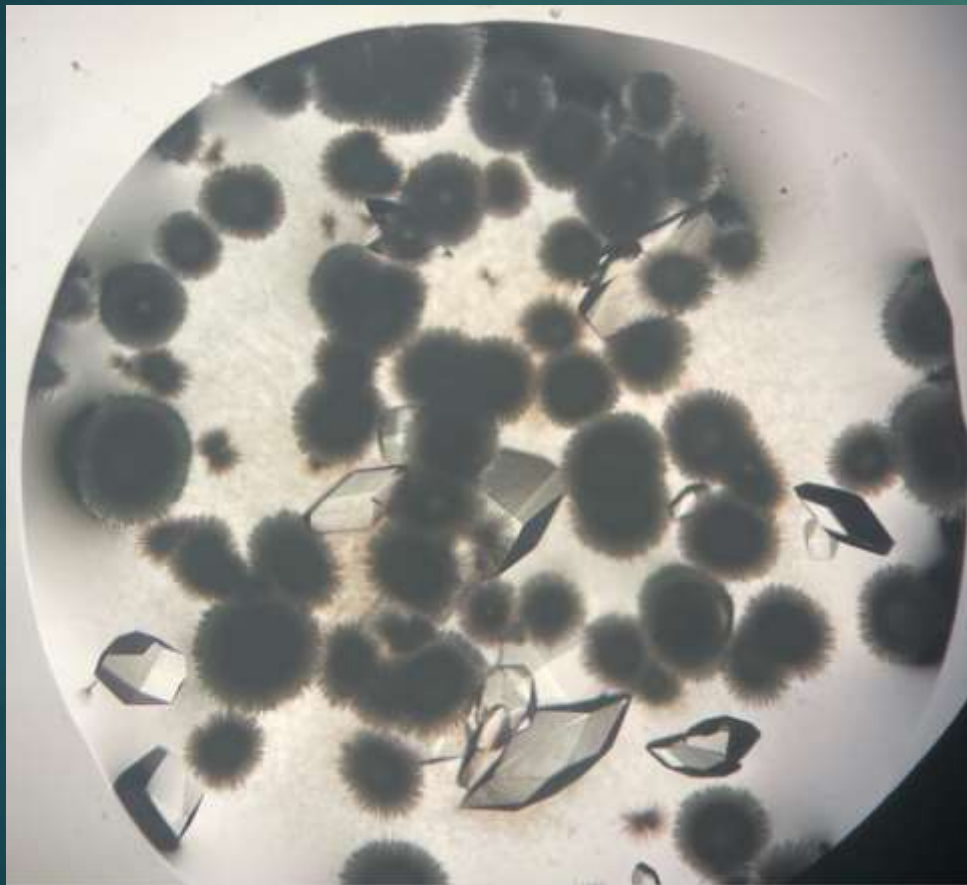
- ▶ Si tratta di una tecnica che consente di esplorare la struttura delle molecole, in particolare DNA, enzimi e proteine a livello atomico

Come si fa?

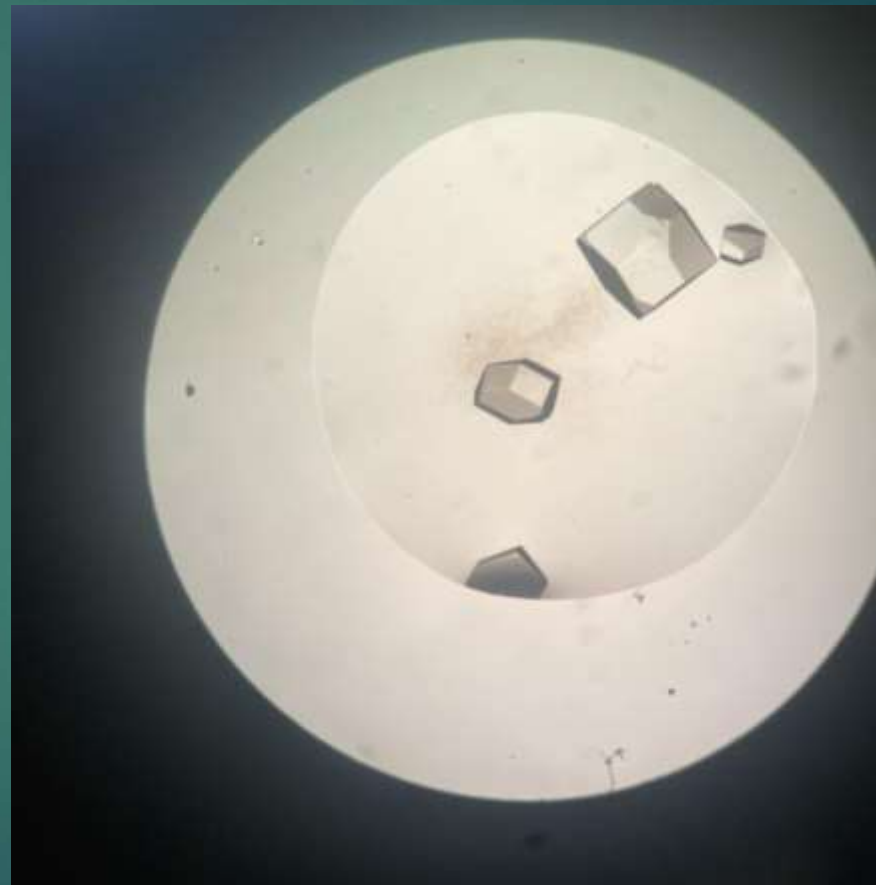
Bisogna procedere per 5 step fondamentali, che sono:

1. LA CREAZIONE DI UN CRISTALLO
2. COLPIRE IL CRISTALLO DA NOI CREATO CON I RAGGI X
3. LA REGISTRAZIONE DEL PATTERN DI DIFFRAZIONE
4. TRASFORMATATA DI FOURIER
5. INTERPRETAZIONE FINALE

MATERIALE AMORFO NEL CASO IN CUI
LA TECNICA DELLA CRISTALLOGRAFIA
NON VIENE USATA CORRETTAMENTE



CRISTALLI DI LIZOSOMA OTTENUTI
CON LA TECNICA DELLA
CRISTALLOGRAFIA IN LABORATORIO



LA CREAZIONE DI UN CRISTALLO

- ▶ Il cristallo è una struttura simmetrica ed ordinata. I concetti di simmetria geometrica sono molto importanti nella cristallografia: in particolare si deve sapere che una parte della struttura può essere trasformata in un'altra tramite operazioni geometriche senza cambiare l'aspetto complessivo del cristallo.
- ▶ In realtà il cristallo è fondamentale per la cristallografia classica con proteine mentre nel caso più specifico del DNA non è necessario in quanto il DNA ha una struttura molto difficile da cristallizzare perché è una lunga catena elicoidale, flessibile e asimmetrica.
- ▶ Si può creare un fascio di fibre mettendo tante molecole di DNA allineate vicine tra loro nello stesso orientamento: si tratta proprio dello stesso approccio usato da Rosalind Franklin

COLPIRE IL CRISTALLO CON I RAGGI X

- ▶ La tecnica è comparabile a una fotocamera che permette di vedere come sono organizzati gli atomi. Per funzionare non usa la luce normale ma i raggi x. Infatti gli atomi sono distanti tra loro meno di un milionesimo di metro: per vedere questa distanza serve una luce che abbia lunghezza d'onda piccolissima, compatibile con quella distanza, ovvero quella dei raggi x.
- ▶ Quando si lancia un raggio x sul cristallo una parte di raggi viene assorbita mentre l'altra viene riflessa dagli atomi
- ▶ Ogni atomo assorbe diversamente in base al suo numero atomico: gli atomi con n° atomico più grande devono assorbire più energia dai raggi x
- ▶ La parte riflessa si chiama scattering o diffrazione e viene fatto dagli elettroni degli atomi in base a fenomeni fisici microscopici

LA REGISTRAZIONE DEL PATTERN DI DIFFRAZIONE

- ▶ Le onde riflesse si sommano o si annullano tra loro producendo un pattern, un disegno o uno schema regolare ripetuto. Sullo schermo del rivelatore quello che si vede è un disegno di puntini luminosi. All'epoca di Rosalind si usava una lastra fotografica mentre oggi si usa un rivelatore elettronico. Questo disegno è una mappa in codice che contiene tutte le informazioni per scoprire la struttura ma codificata.
- ▶ Osservando i punti della mappa possiamo ricondurci alla geometria della struttura. In base alla posizione dei puntini si può capire come sono orientate tutte le strutture nei quadratini e come sono ripetute.
- ▶ I raggi diffratti si sommano o si annullano a vicenda in base a leggi fisiche. Quindi ci saranno delle zone nere senza niente: queste sono zone dove i punti in cui i raggi si sono annullati. Ci saranno poi dei punti più luminosi in base alla quantità di elettroni presenti in quella zona che quindi hanno restituito i raggi x.
- ▶ I responsabili della diffrazione sono gli elettroni: ogni atomo ha un n° diverso di elettroni e quindi ogni atomo diffonde i raggi x in modo diverso. Ha quindi un diverso fattore di scattering.

TRASFORMATA DI FOURIER

- ▶ Le onde elettromagnetiche si considerano come vettori, in modo da poter descrivere in modo accurato l'interazione onda-campione con il moto armonico e quindi le funzioni trigonometriche associate all'onda in modo da semplificare la trattazione matematica.
- ▶ Si ha un segnale del rilevatore generato dal contributo dei singoli atomi che diffrangono i raggi x incidenti alla stessa lunghezza d'onda. Una volta ottenuto ciò si deve scomporre questo segnale e ricondurlo al singolo atomo.
- ▶ Per questo viene usata la trasformata di Fourier: un operatore matematico che consente di scomporre una funzione periodica complessa in una più semplice. Da questa operazione si ottiene una mappa di densità elettronica: ora si può sapere la posizione degli atomi (è una specie di griglia 3D che dice dove è più probabile trovare gli elettroni nella molecola).

INTERPRETAZIONE

- ▶ A questo punto dalle informazioni della mappa di densità si possono inserire i modelli degli atomi. Si usano qui dei software per simulare la struttura di una molecola e per confermare se il modello ipotizzato prima sia fattibile o meno.
- ▶ Per es. se si hanno 6 elettroni nella mappa elettronica, si può dedurre che l'unico atomo ipotizzabile sia quello del carbonio: si inserisce così l'ipotesi di struttura sul software e si rifà questo procedimento per tutti i segnali che si riescono a distinguere.
- ▶ Quando si vuole individuare la struttura di una molecola non si usa mai una singola tecnica, ma una combinazione di tecniche della strutturistica biomolecolare. Si cerca quindi di individuare la struttura più corretta tramite un processo iterativo che giunge al termine nel momento in cui la simulazione del pattern di diffrazione coincide con quello sperimentale.

NEL CASO SPECIFICO DI ROSALIND FRANKLIN...

- ▶ Rosalind Franklin ha usato fibre di DNA idratato in modo da mantenere inalterata la struttura naturale del DNA. Le fibre erano ordinate lungo una stessa direzione, requisito fondamentale per dedurre la struttura ad elica.
- ▶ Scopri anche che il grado di idratazione faceva sì che il DNA assumesse forme diverse
- ▶ Non costruì il modello a doppia elica ma i suoi dati mostravano chiaramente che l'orientamento dell'elica è destrorso, che il diametro della molecola fosse costante e che le basi azotate dovevano trovarsi all'interno dell'elica.
- ▶ Le sue evidenze sperimentali permisero di escludere altre possibili conformazioni che erano state ideate. Senza queste informazioni Watson e Crick non avrebbero potuto né confermare né convalidare il loro modello.

A COSA SERVE NEL CONCRETO LA STRUTTURA DEL DNA?

- ▶ Conoscere la struttura del DNA serve per comprenderne la funzione, i meccanismi in cui è coinvolta una molecola e i processi patologici
- ▶ ESEMPIO CONCRETO: questa conoscenza sta alla base delle moderne tecniche di biologia molecolare. Una di queste può essere il PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION), che consente di amplificare i campioni: si replica in modo estremamente selettivo un tratto definito di DNA del quale si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali, partendo da una soluzione di DNA. È una tecnica importante in particolare nelle scene del crimine dove le prove biologiche possono essere scarse.