



DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE PROTEÍNAS

Juan A. Hermoso

GCMBE- Instituto "Rocasolano". CSIC. Madrid.

¿Qué es la biología estructural?

(Problema del plegamiento)

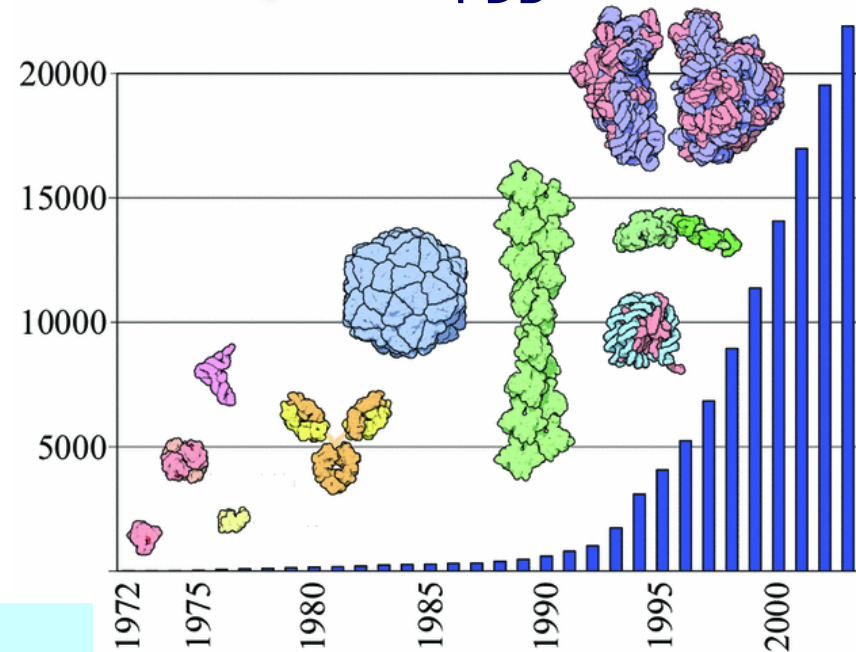
Secuencia de aminoácidos



Estructura 3D de la proteína



Bases de Datos PDB



Todas requieren una alta especialización y grandes inversiones en equipamiento, pero....

¡¡¡La información contenida en una estructura 3D es enorme!!!

¿En qué se diferencian las técnicas estructurales?

Cristalografía de Rayos X

No hay límite en el tamaño de la proteína (29.000 aminoácidos).

Se consigue resolución atómica.

Necesita ~5mg de proteína muy pura.

Hay que cristalizar la proteína.

La estructura se determina rápidamente (85% del PDB)

Estructura estática. Ligandos, complejos...

Resonancia Magnética Nuclear

Hay límite en el tamaño de la proteína (~400 aminoácidos).

Se consigue resolución atómica.

Necesita mg de proteína muy pura.

Proteína en solución. Hay que marcar la proteína.

La determinación es laboriosa (20% del PDB)

Estructura dinámica/ flexibilidad. Ligandos.

Microscopía Electrónica

Grandes agregados, virus, ribosomas, filamentos...

Resolución media/baja.

Necesita 0.5 mg de proteína.

Moléculas en solución o cristales 2D.

Determinación es laboriosa.

Maquinas macromoleculares

!!!La información obtenida por estas tres técnicas es complementaria!!!

Técnicas estructurales

Todas requieren el uso de grandes instalaciones

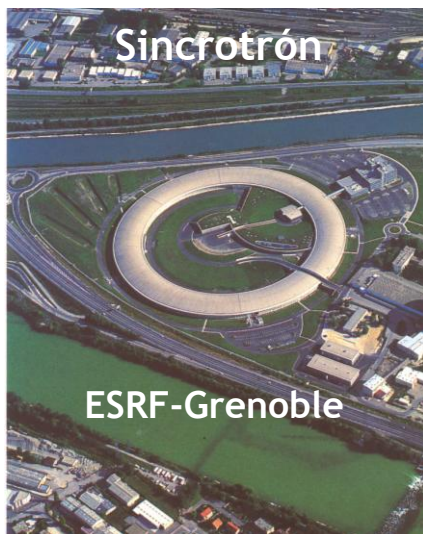
Fuentes de Rayos X



RMN. Imanes

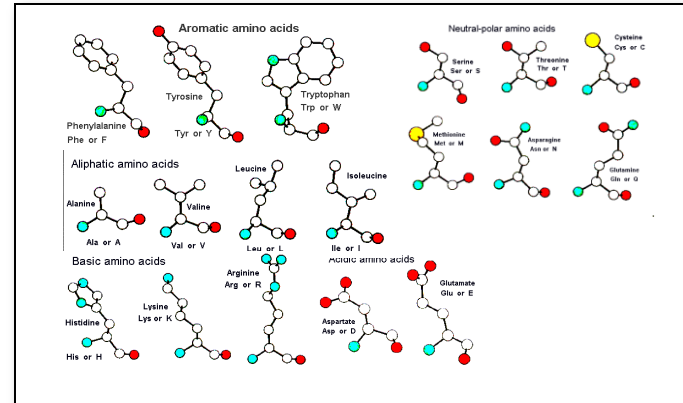


Microscopio electrónico

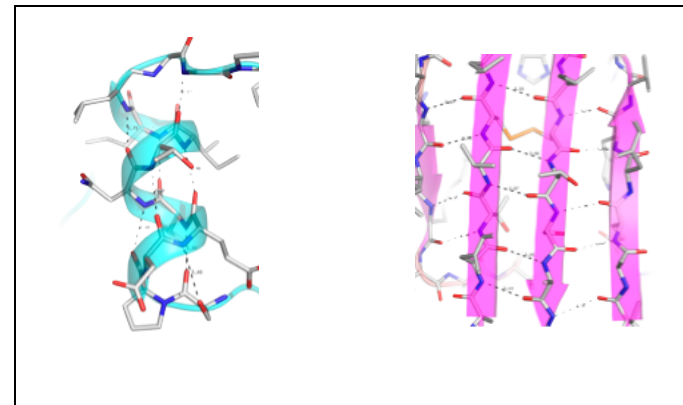


Nature and Composition of Proteins

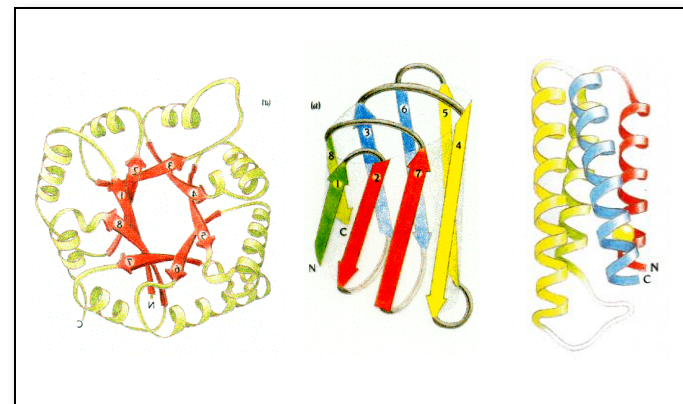
20 amino-acids



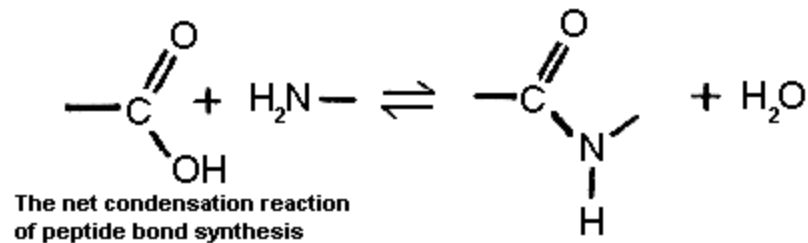
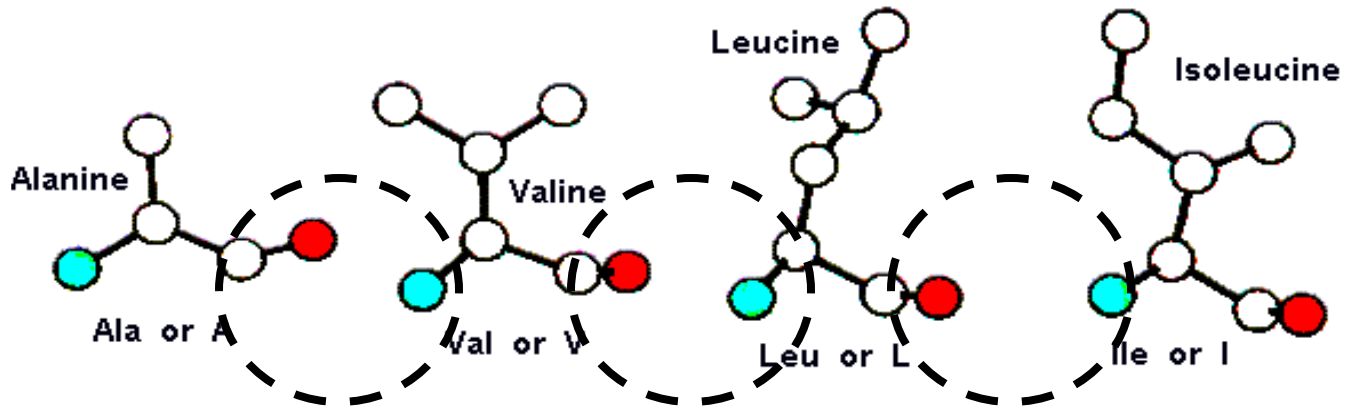
2 main types of secondary structures



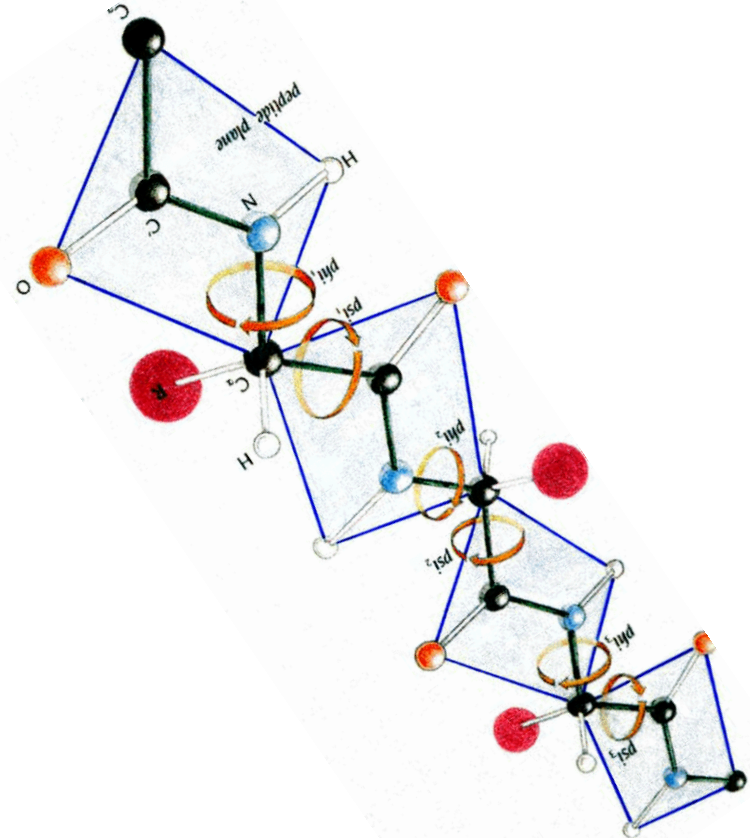
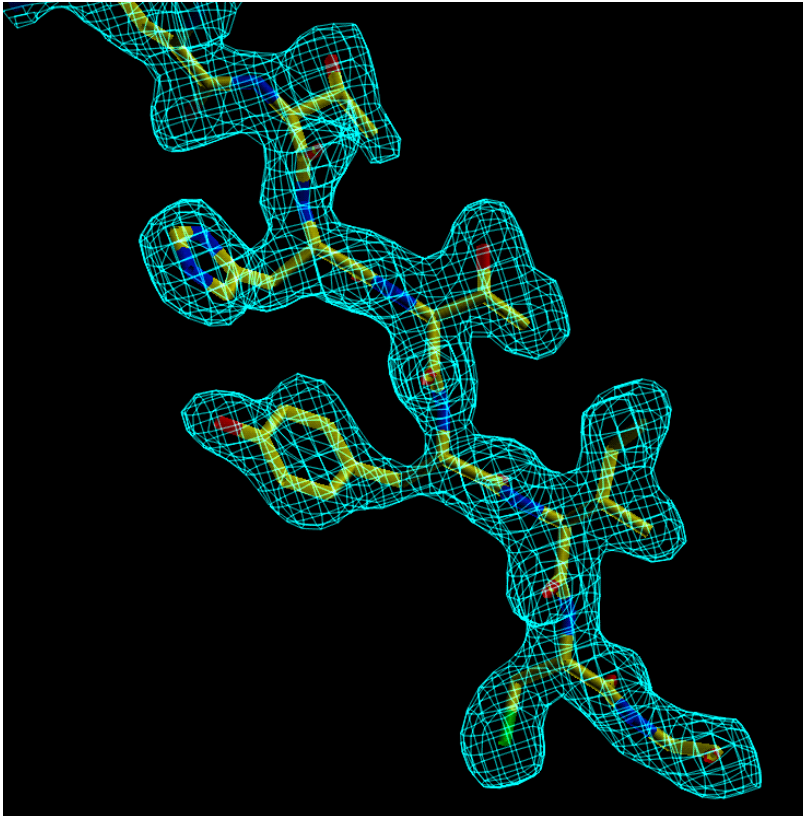
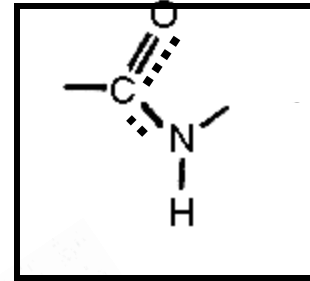
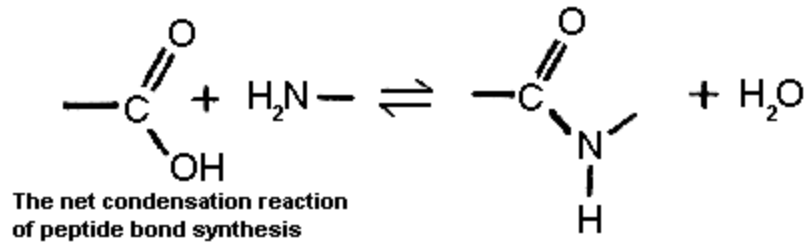
Few different folds



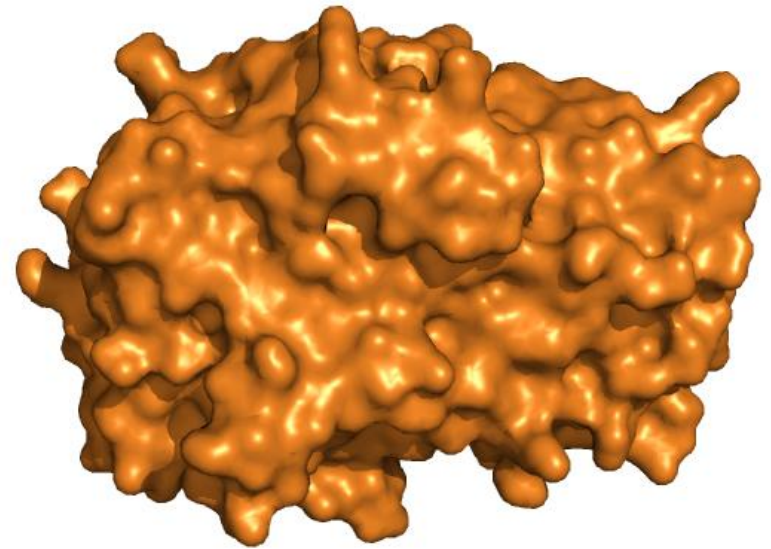
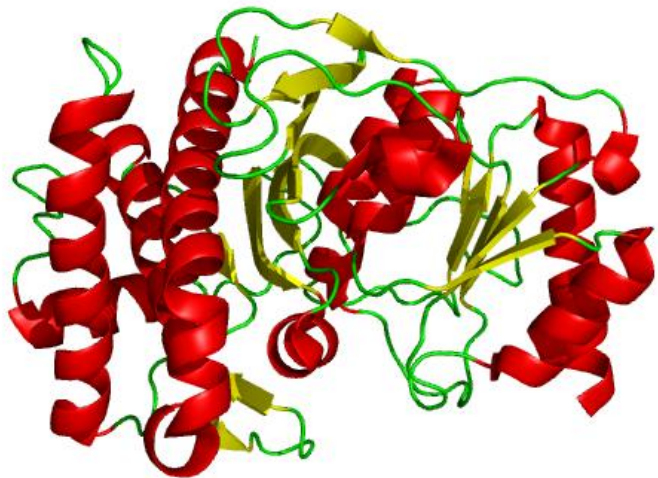
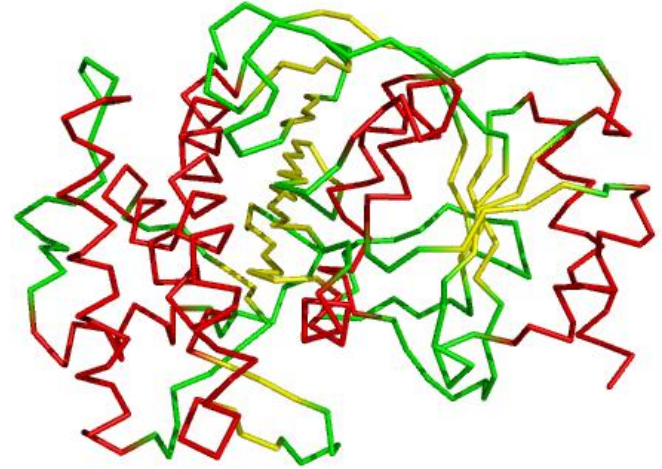
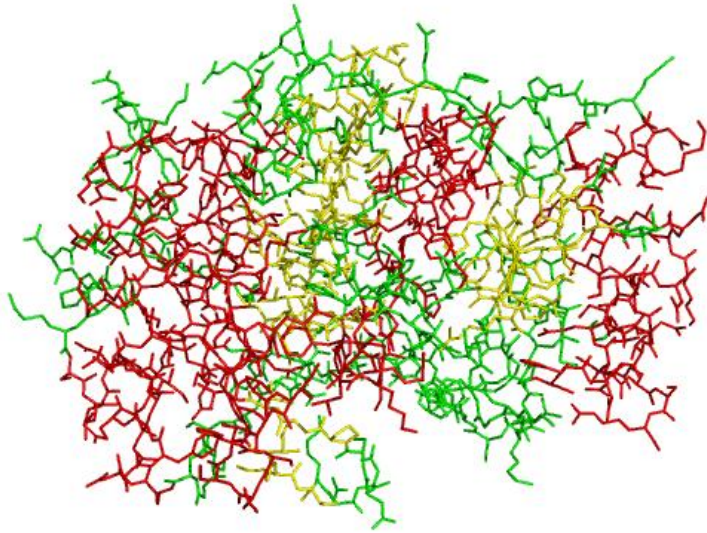
Las proteínas son polímeros compuestos por amino ácidos.



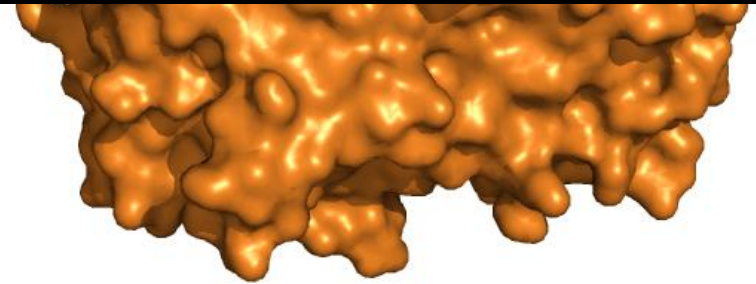
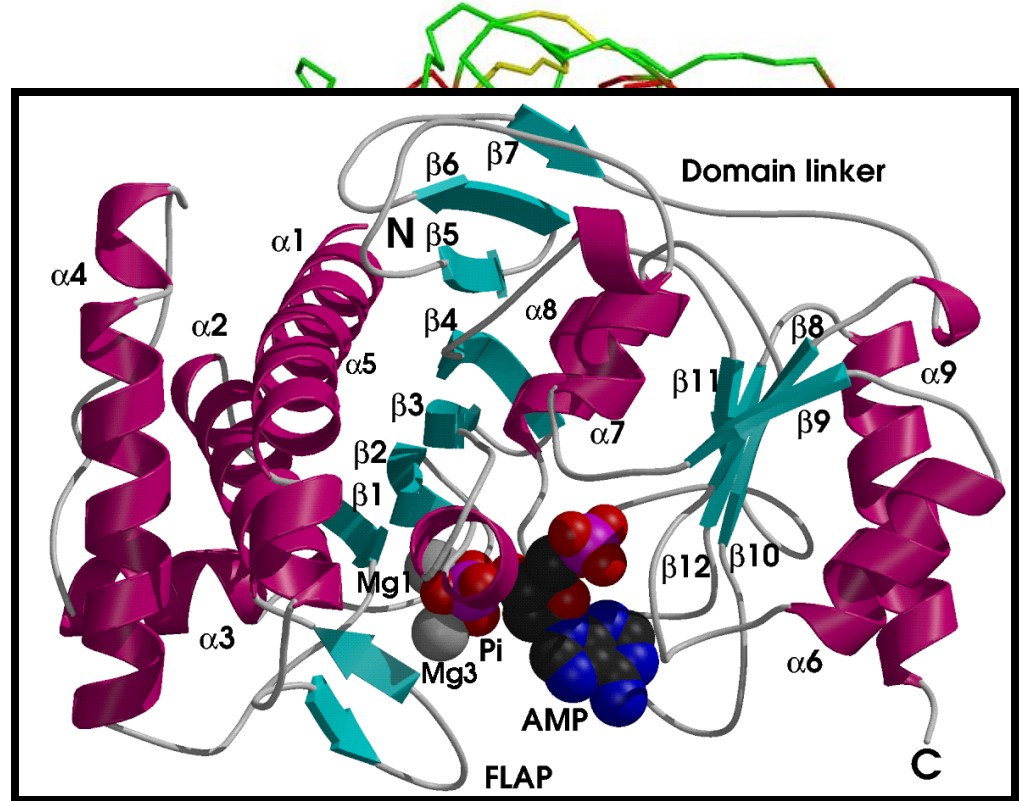
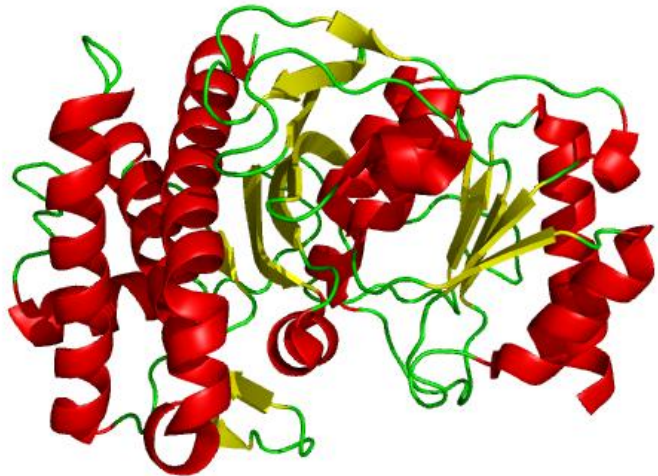
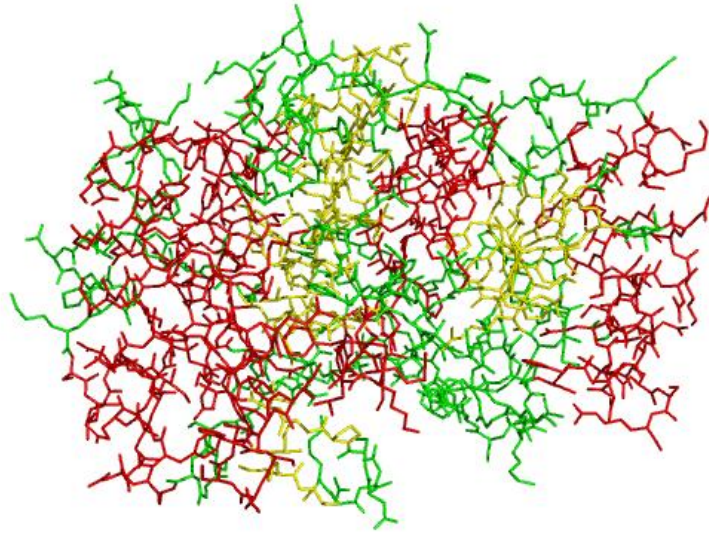
La secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional de las proteínas



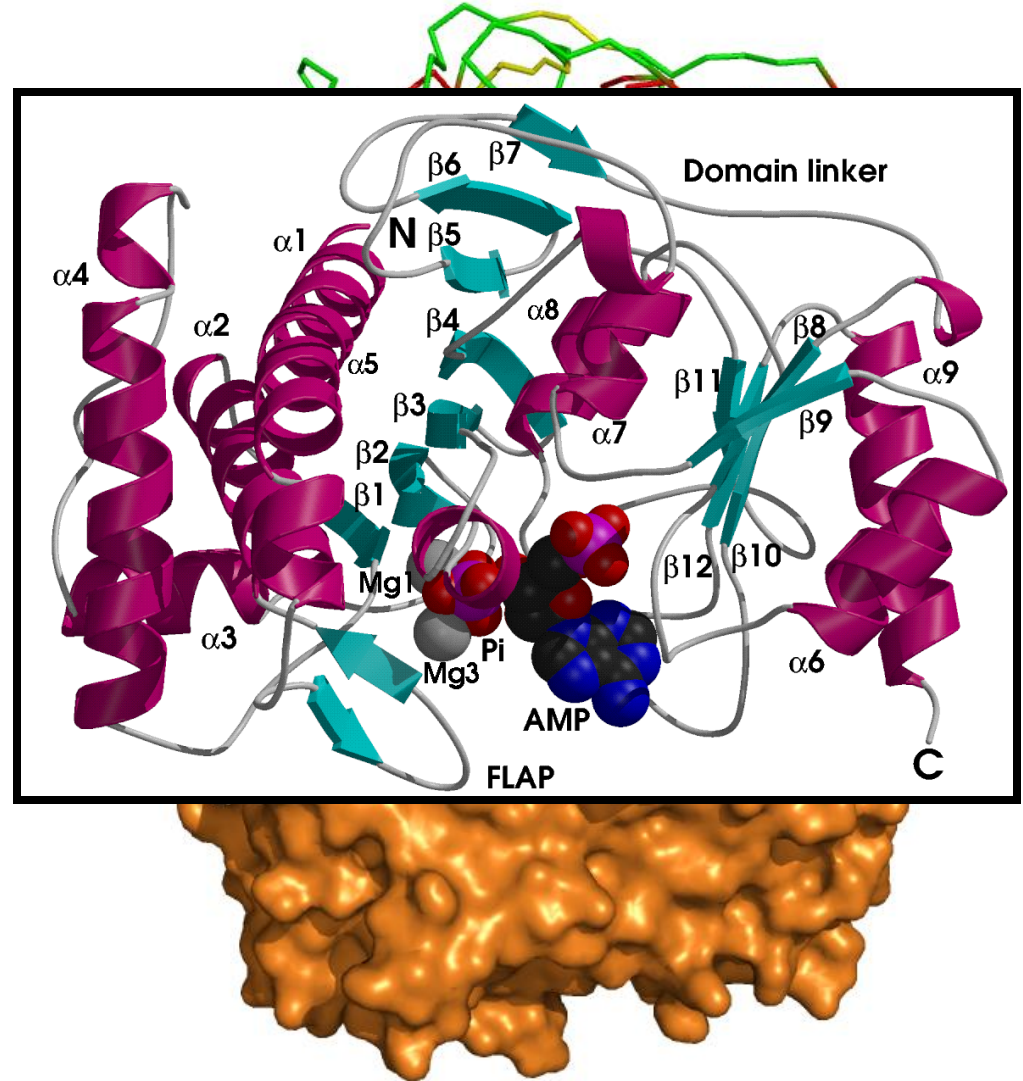
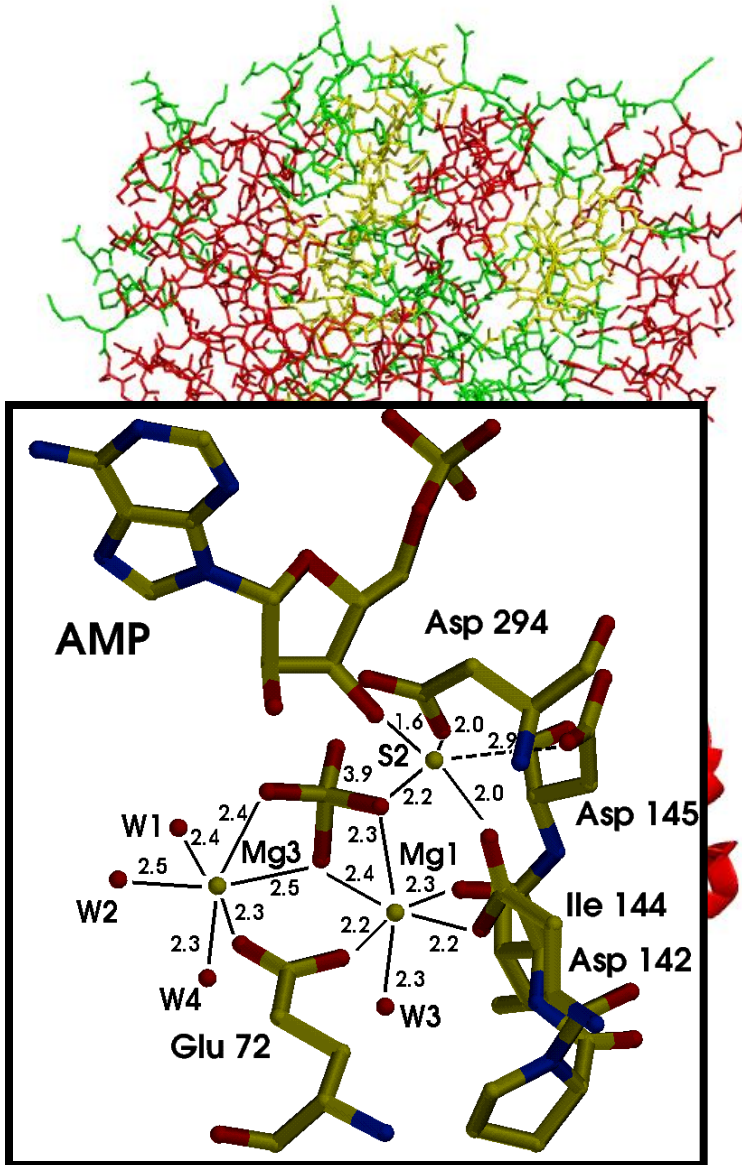
Complejidad de las Estructuras Macromoleculares



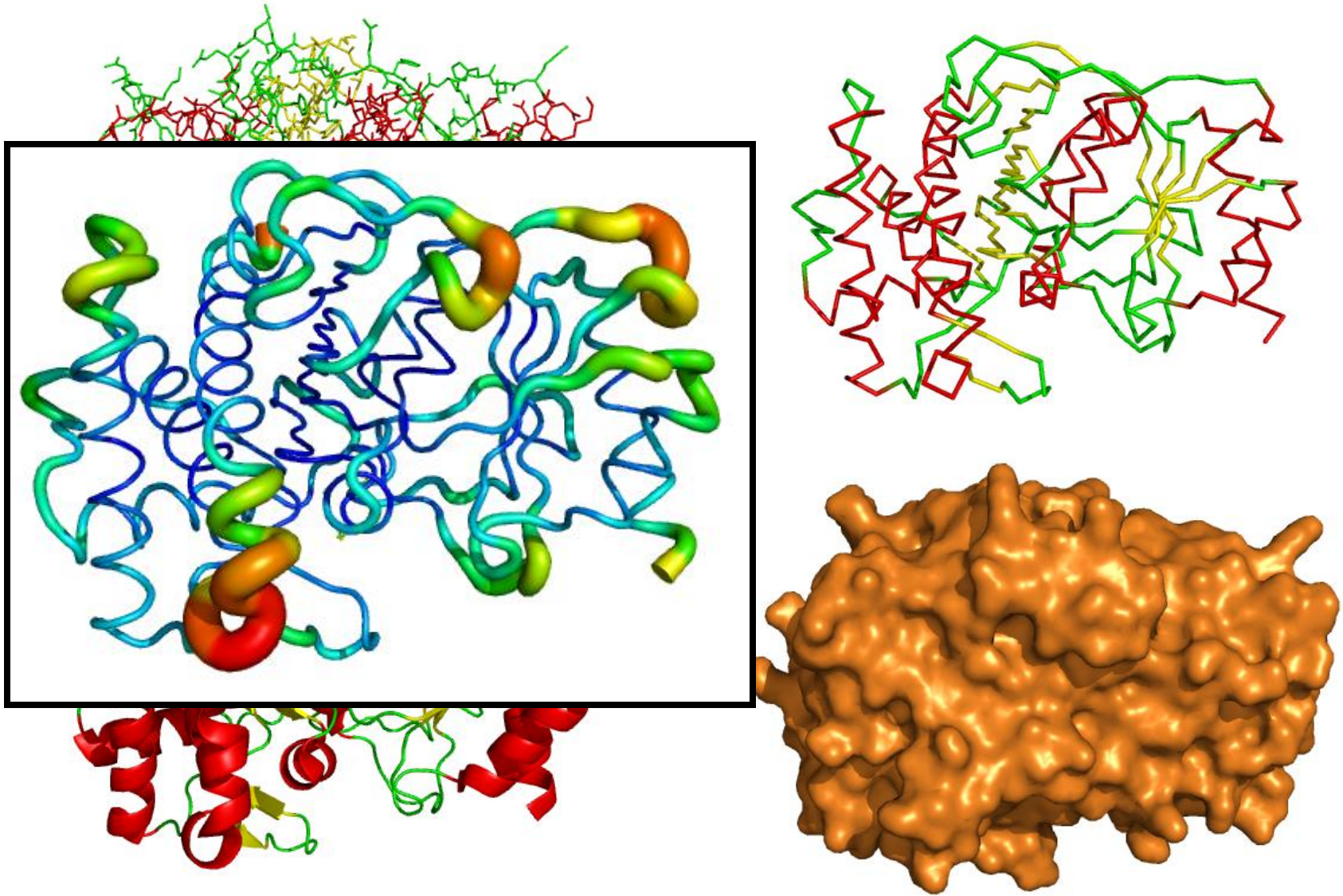
Complejidad de las Estructuras Macromoleculares



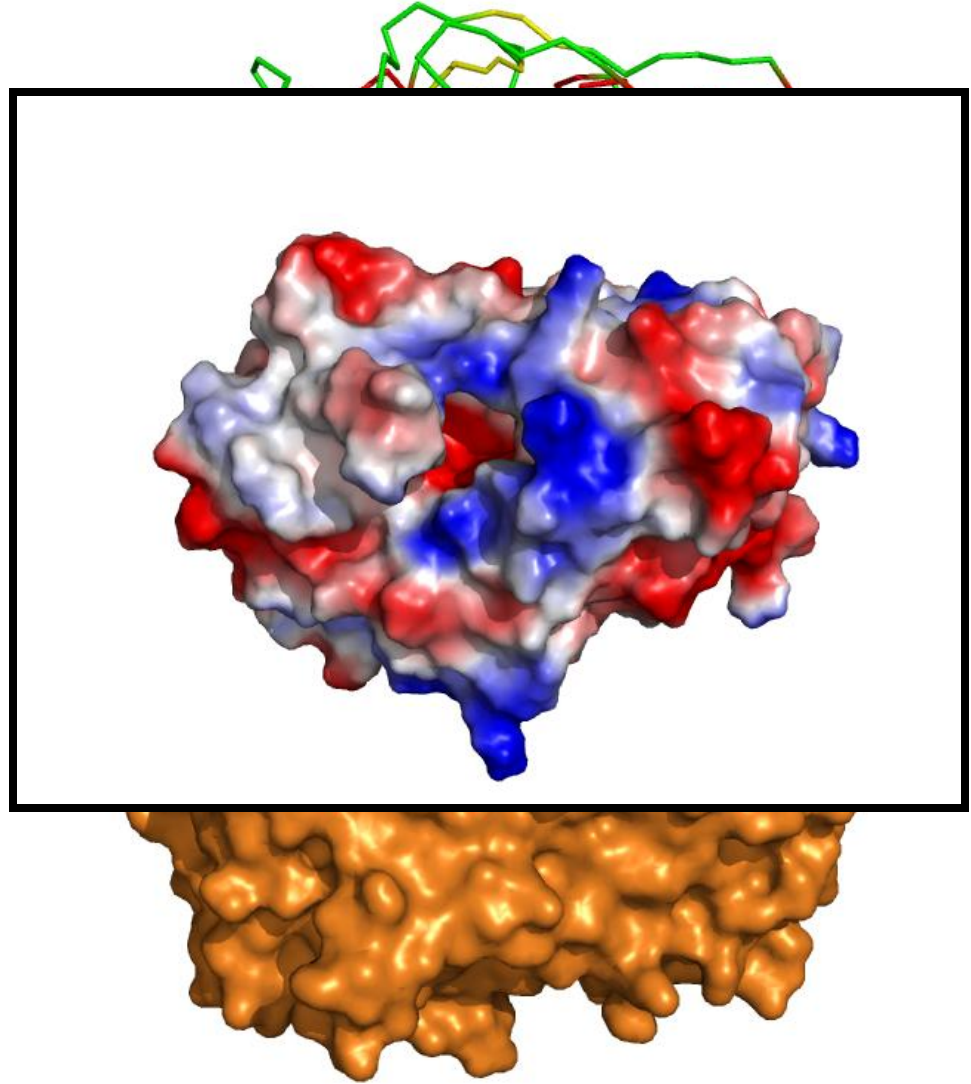
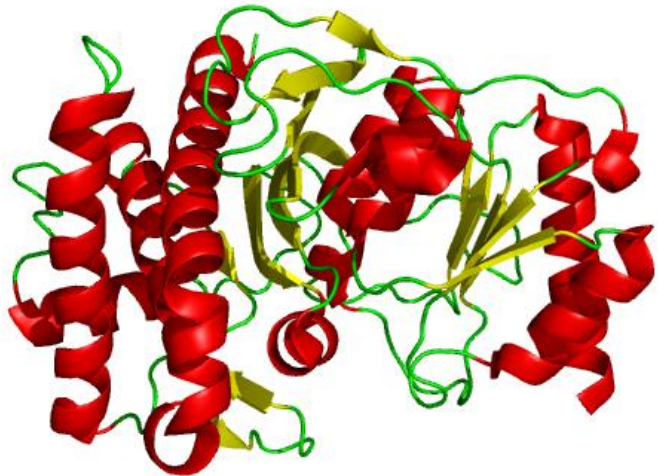
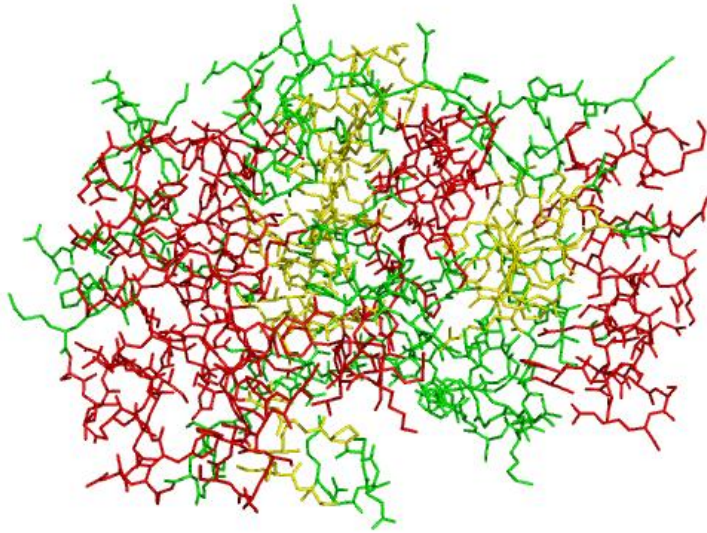
Complejidad de las Estructuras Macromoleculares



Complejidad de las Estructuras Macromoleculares



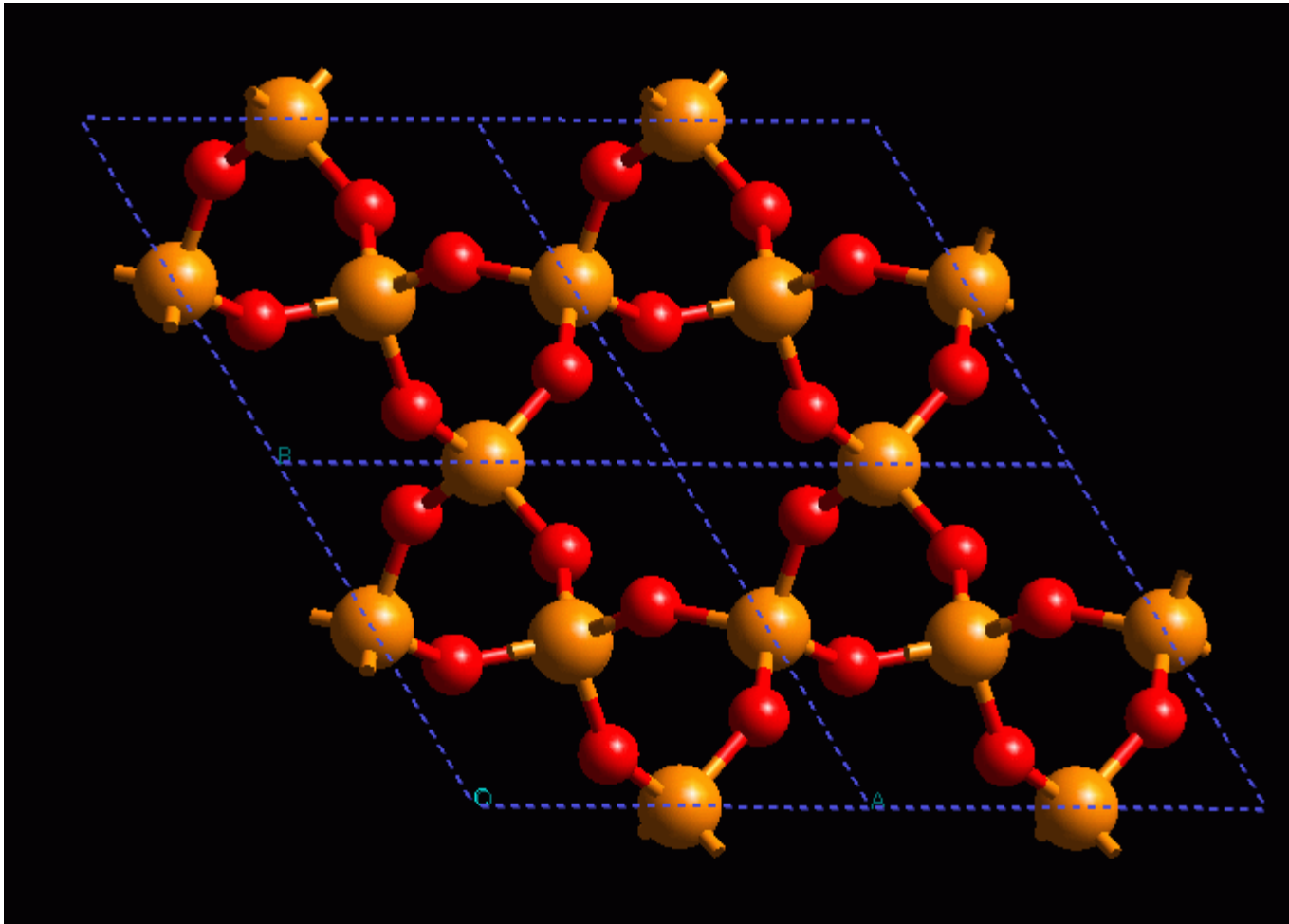
Complejidad de las Estructuras Macromoleculares



Difracción de Rayos X de Proteínas

1. **Introducción.**
2. **Simetría.**
3. **Cristales y su obtención** Características fundamentales de la Cristalografía.
4. **Difracción de Rayos X.**
5. **Aspectos experimentales: equipos de difracción y procesado de datos.** Visión global de la determinación estructural.
6. **El Problema de la Fase: métodos de resolución estructural.**
7. **Refinamiento, modelado y validación estructural.**
8. **Aplicación: relaciones estructura-función.**

El estado cristalino de la materia



El mundo inorgánico

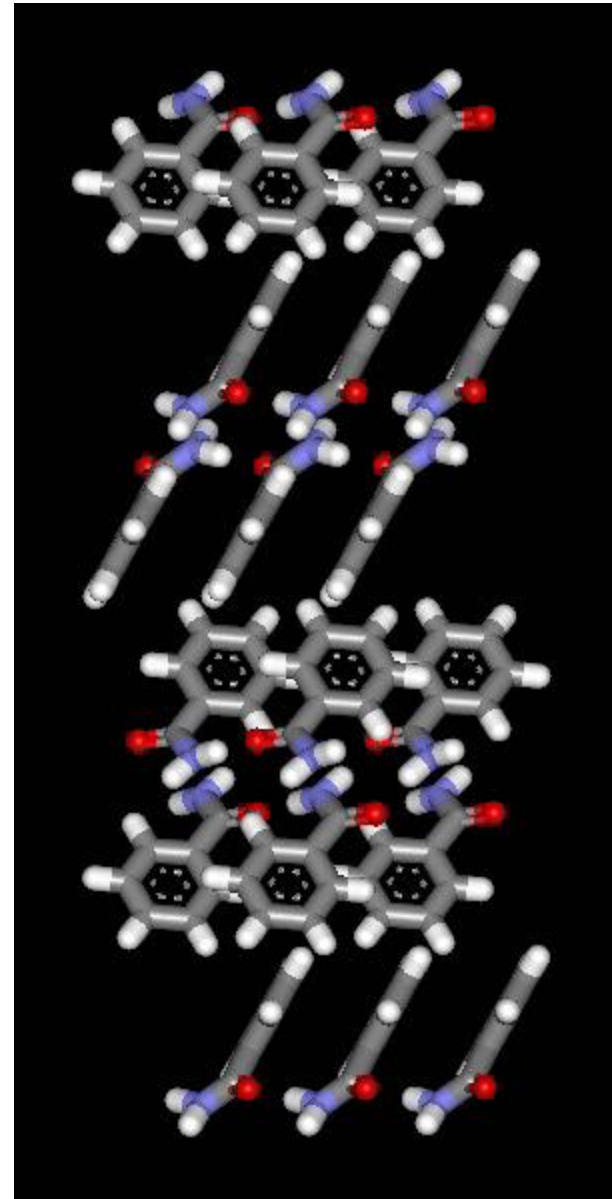
La estructura del sólido se mantiene mediante enlaces covalentes o iónicos

El estado cristalino de la materia

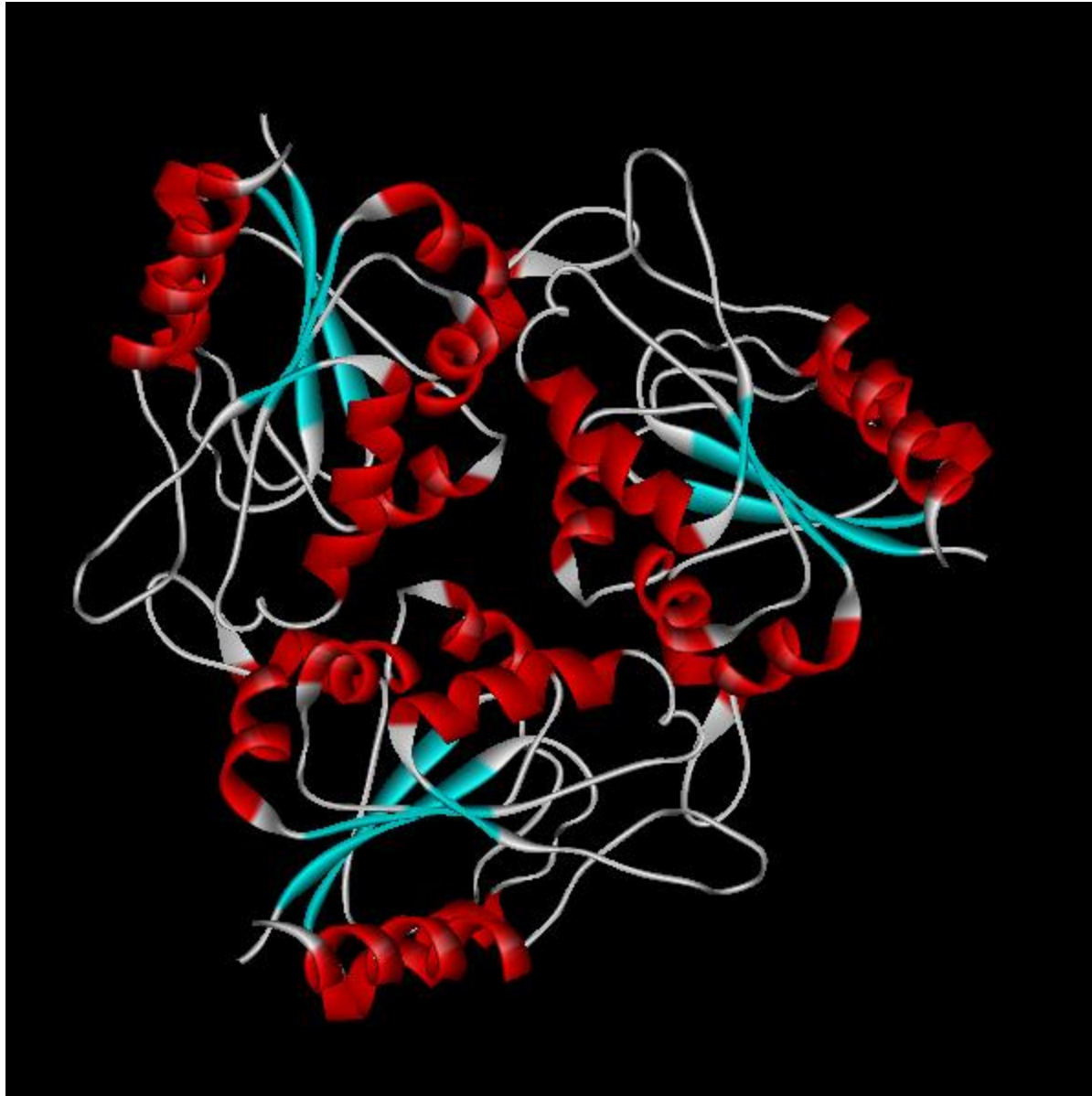


El mundo orgánico

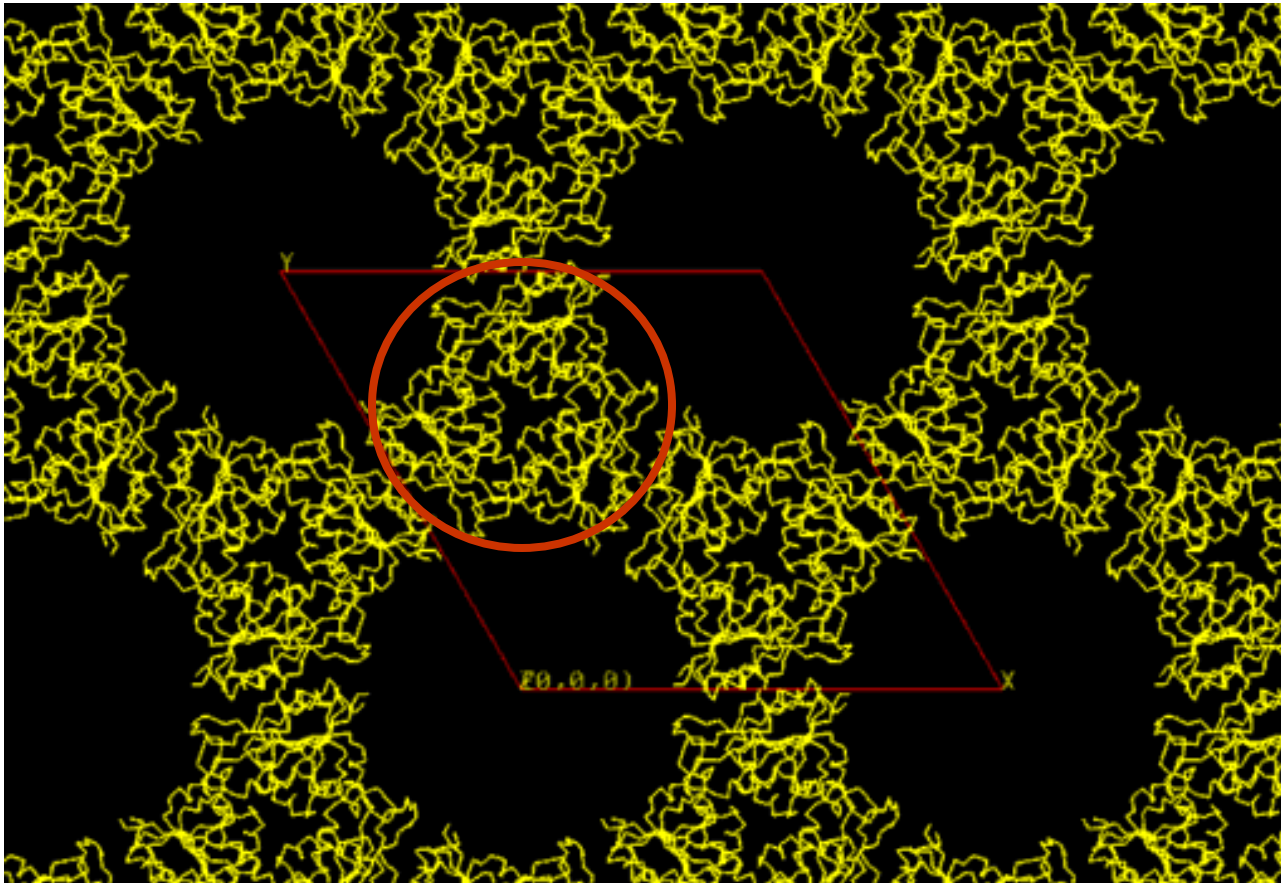
Las moléculas se reconocen y se empaquetan mediante interacciones de tipo no-covalente



El estado cristalino de la materia



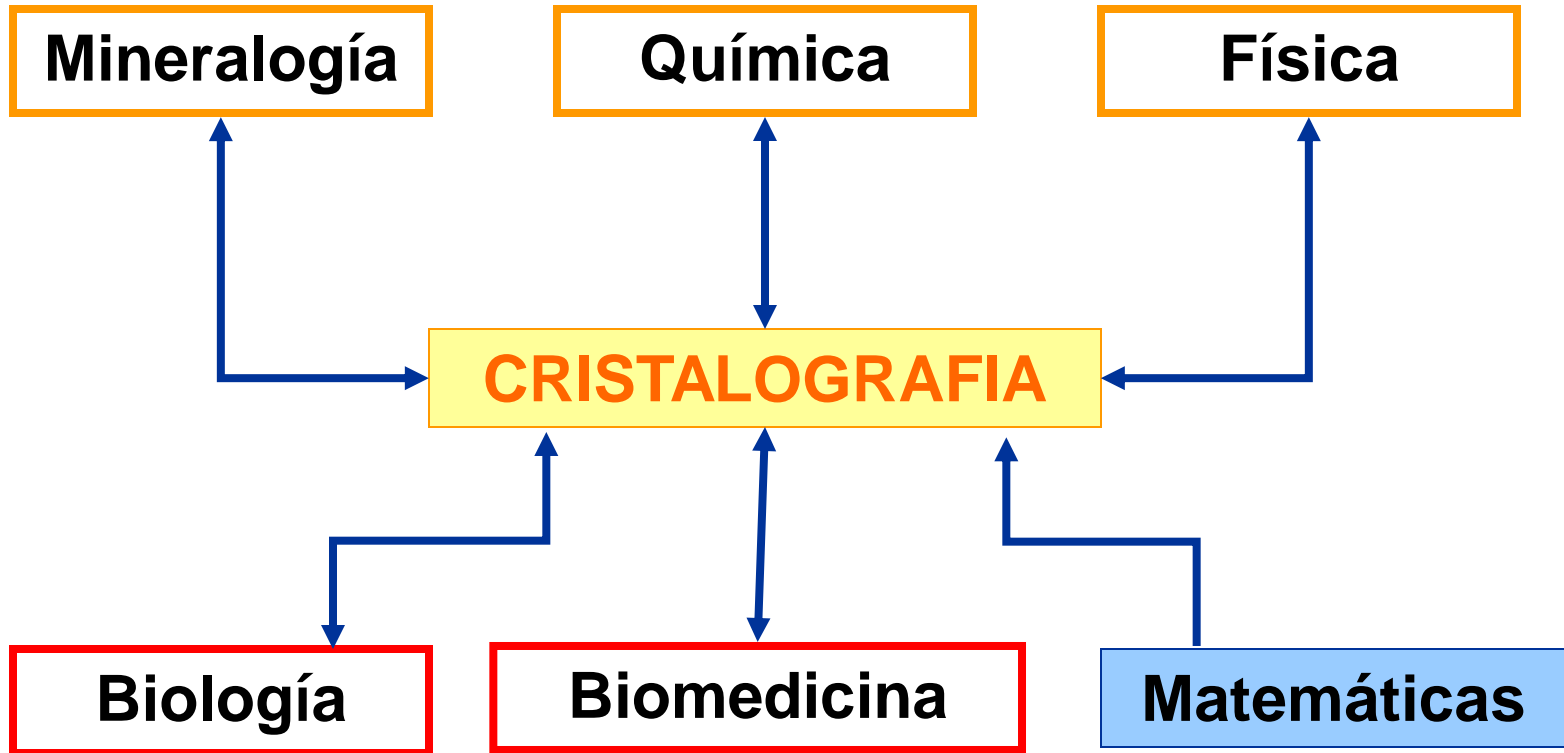
El estado cristalino de la materia



Cristalografía, es la disciplina capaz de estudiar:

- la estructura molecular y
- los modelos de reconocimiento entre moléculas

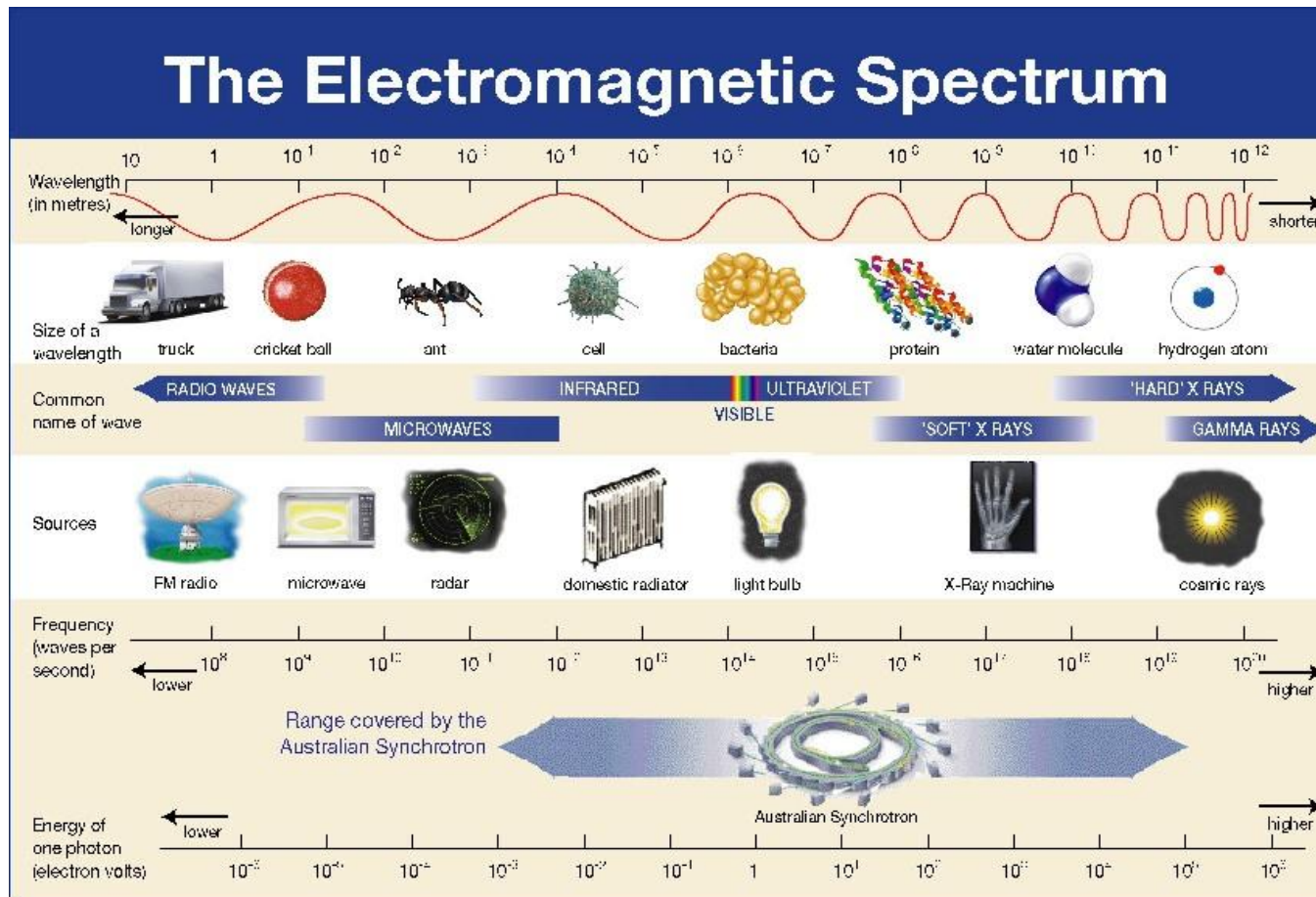
CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X



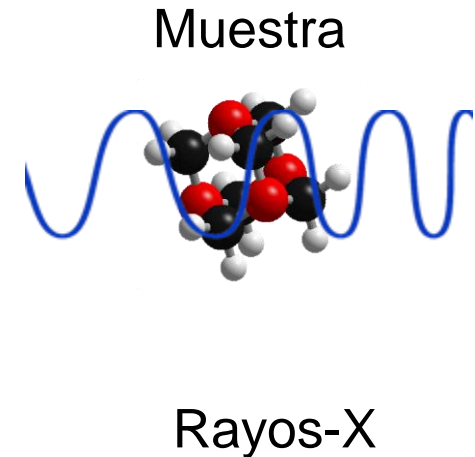
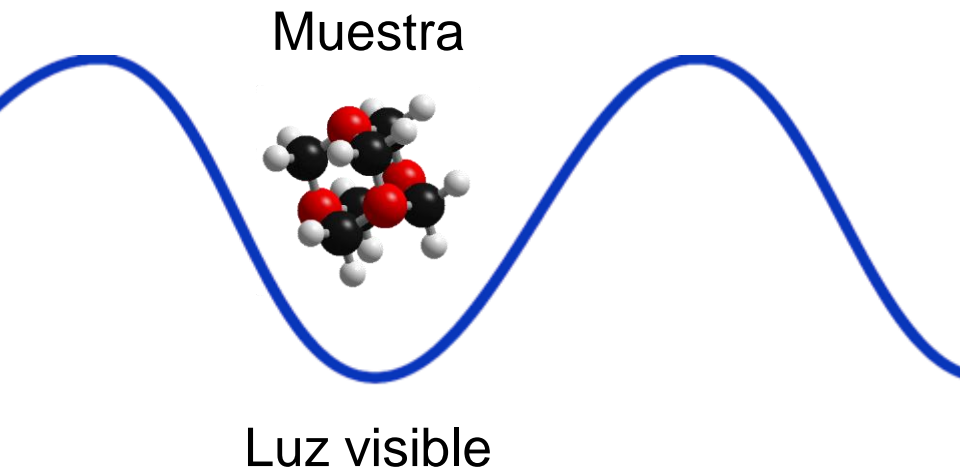
CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X



- Usa la interacción de la radiación X con la materia



¿Por qué es importante la longitud de onda?

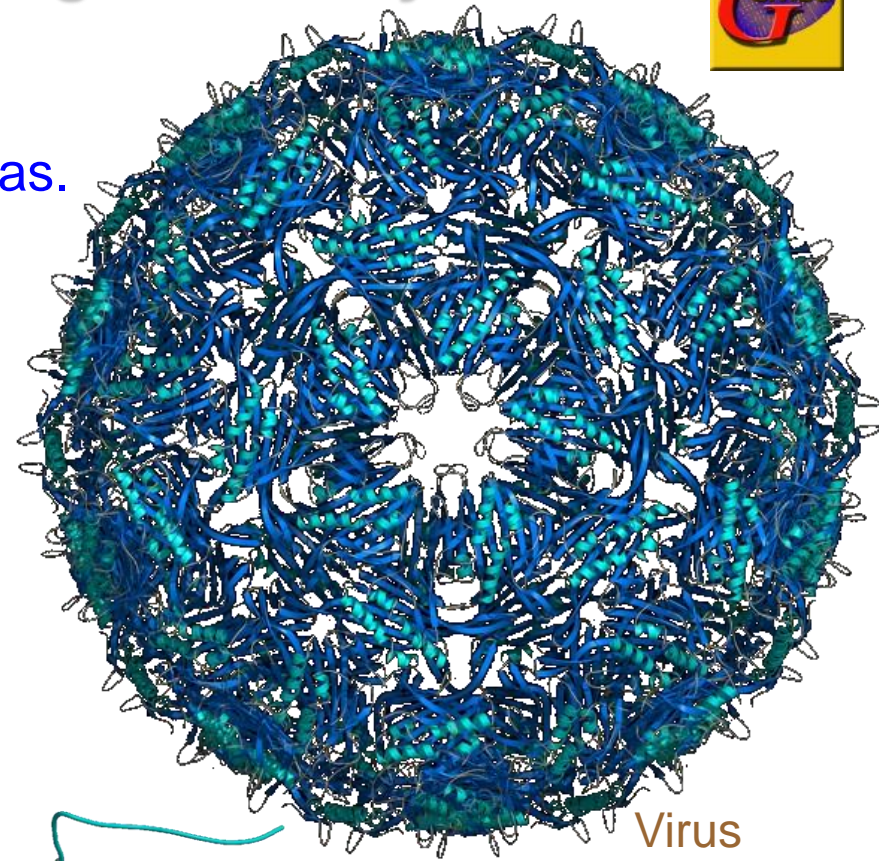


Para penetrar en la muestra se necesita una longitud de onda similar o menor al tamaño de la muestra.

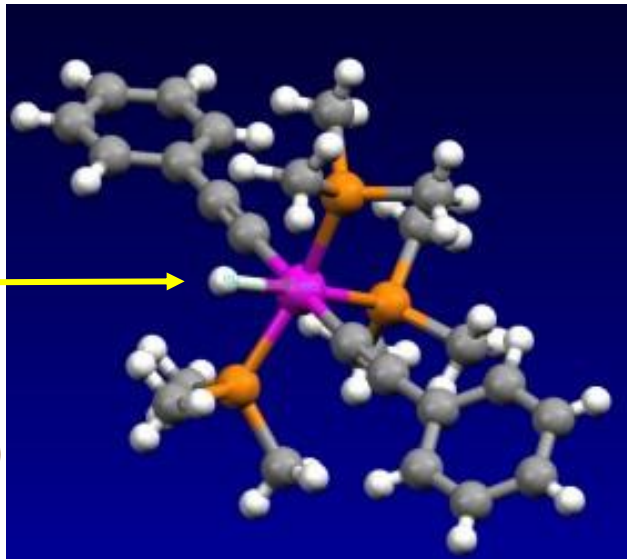
Características de la Cristalografía de rayos X



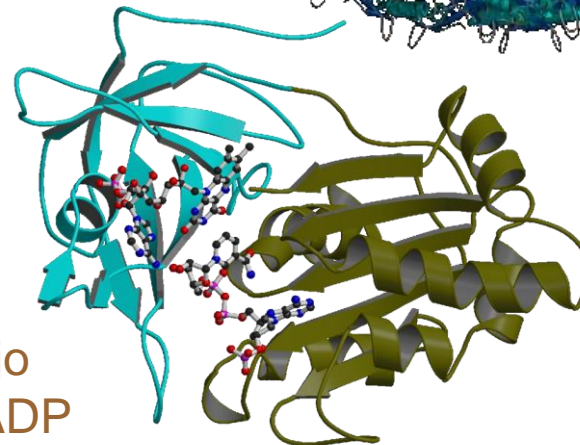
- Estructuras muy grandes y muy pequeñas.
- Resolución atómica
- Complejos proteicos, ligandos....



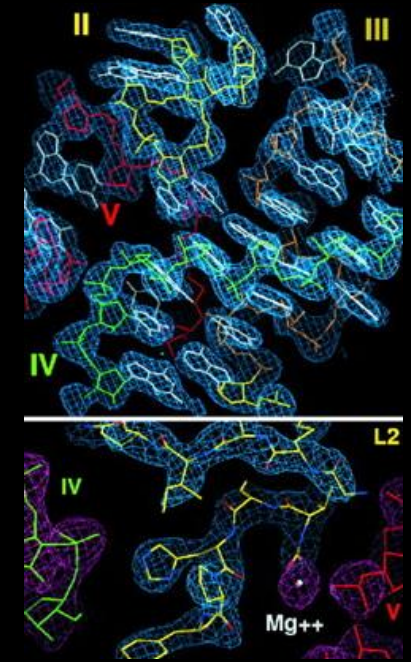
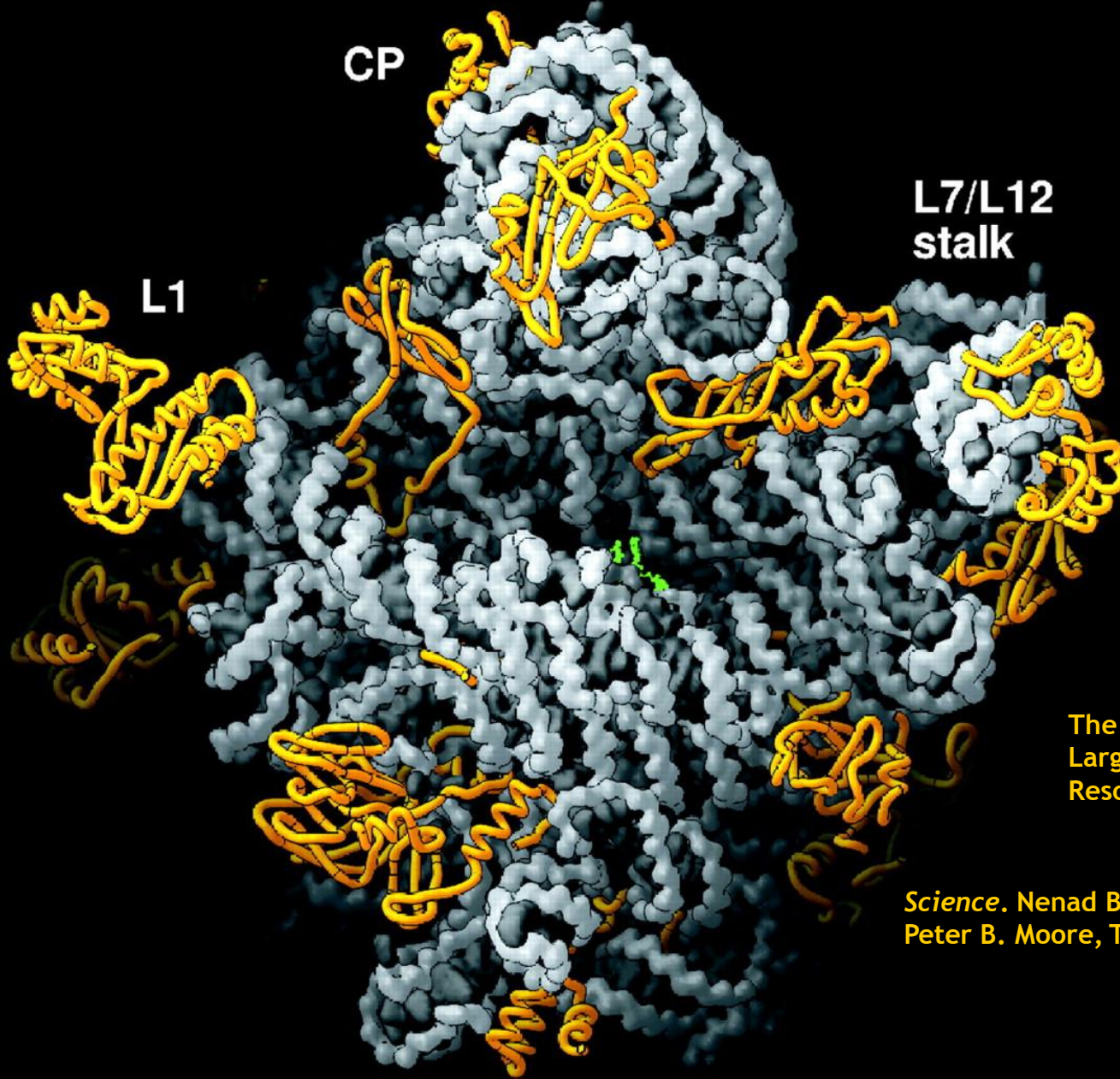
Virus



Protón
junto a un
dispersor
fuerte (Rh)



Complejo
FNR:NADP



The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution (2000)

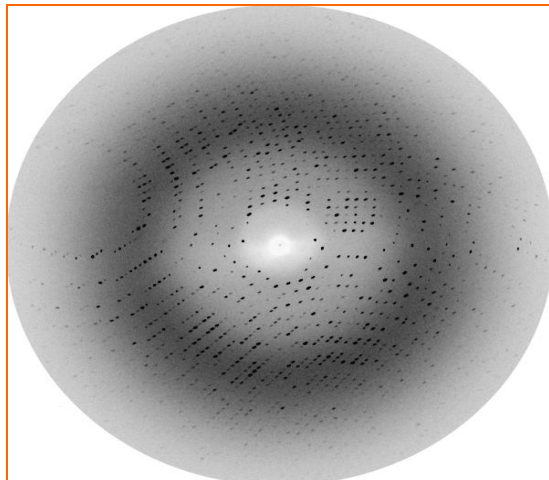
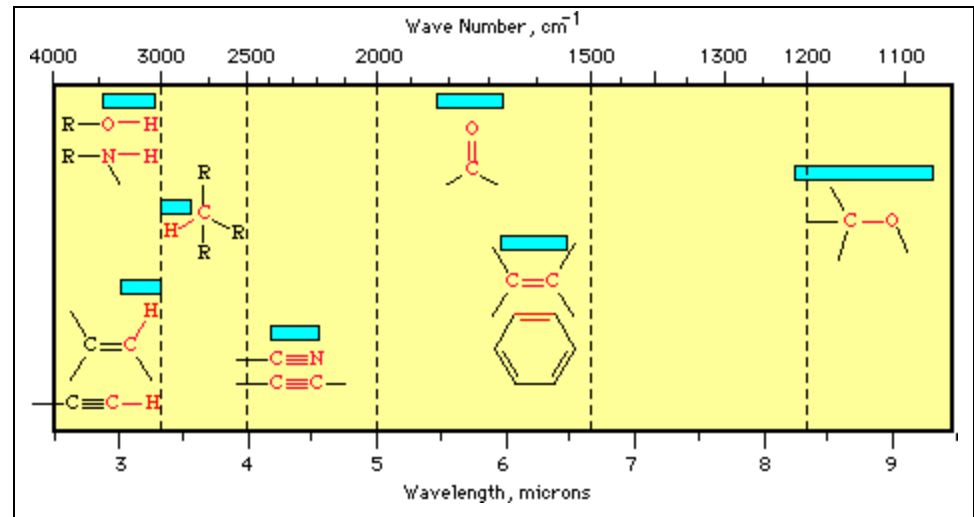
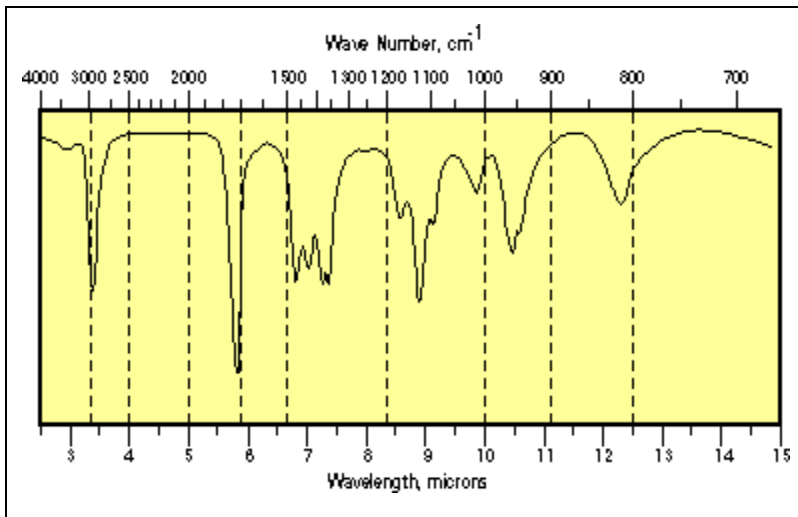
Science. Nenad Ban, Poul Nissen, Jeffrey Hansen, Peter B. Moore, Thomas A. Steitz

The largest PDB entry: 280.000 independent atoms !!!!

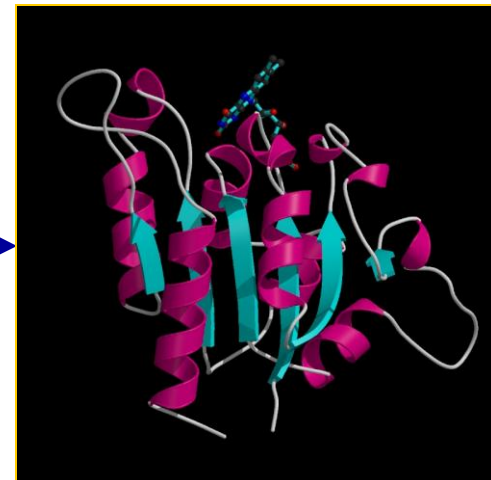
Características de la Cristalografía de rayos X



- Difiere de las espectroscopías (IR, RMN), por ser extensiva



iii Cada punto del espectro contiene información sobre toda la estructura y viceversa !!!



Características de la Cristalografía de rayos X

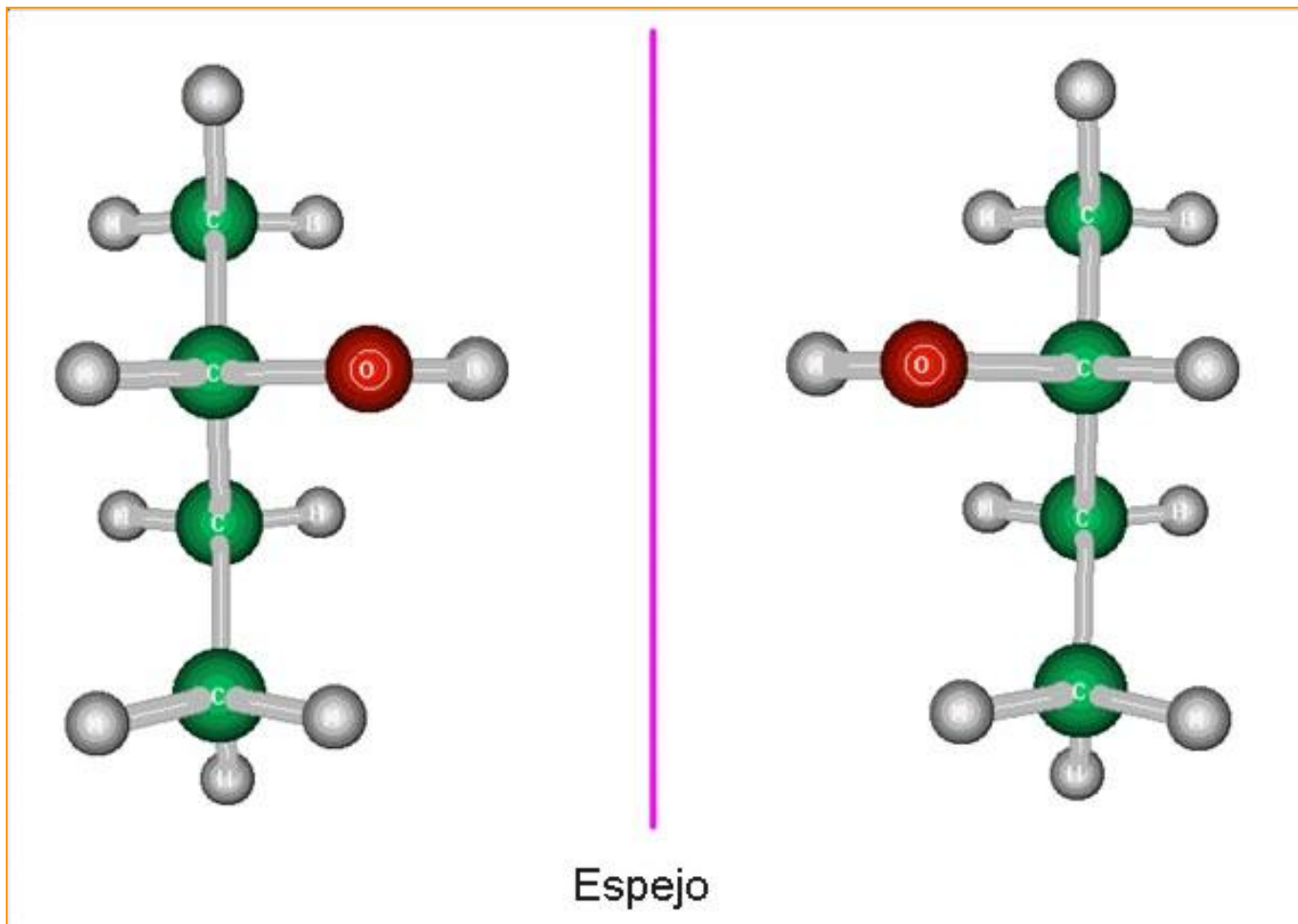


- Determina configuraciones absolutas

Decía Alicia:

Quizá la leche
del otro lado del
espejo no es
buena para
beber ... !!!

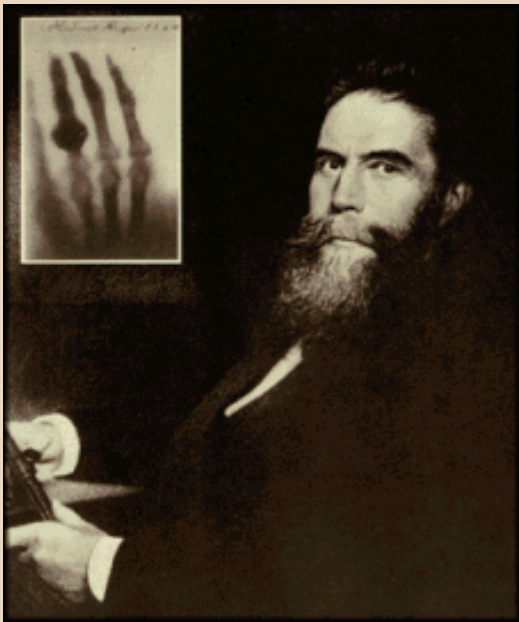
Lewis Carroll



Brief historical aspects...
The early stages...

Short historical overview

1901



Wilhelm Conrad Röntgen
and his wife's hand
(1845-1923)

Genie flog
von Schule!

Professur für
jungen Physiker

Unglaubliches
Licht!

W.C. Röntgen
Sein Höhenflug
hält an

EINE NEUE ART
VON
STRAHLEN.
VON
DR. W. RÖNTGEN,
Ö. O. PROFESSOR AN DER K. UNIVERSITÄT WÜRZBURG.
WÜRZBURG.
VERLAG UND DRUCK DER STAHELSCHEM K. HOF- UND UNIVERSITÄTS-
BUCH- UND KUNSTHANDLUNG.
Eode 1895.
60 S.

Nobelpreis

1895 discovered the X-rays
1901 Nobel Prize in Physics

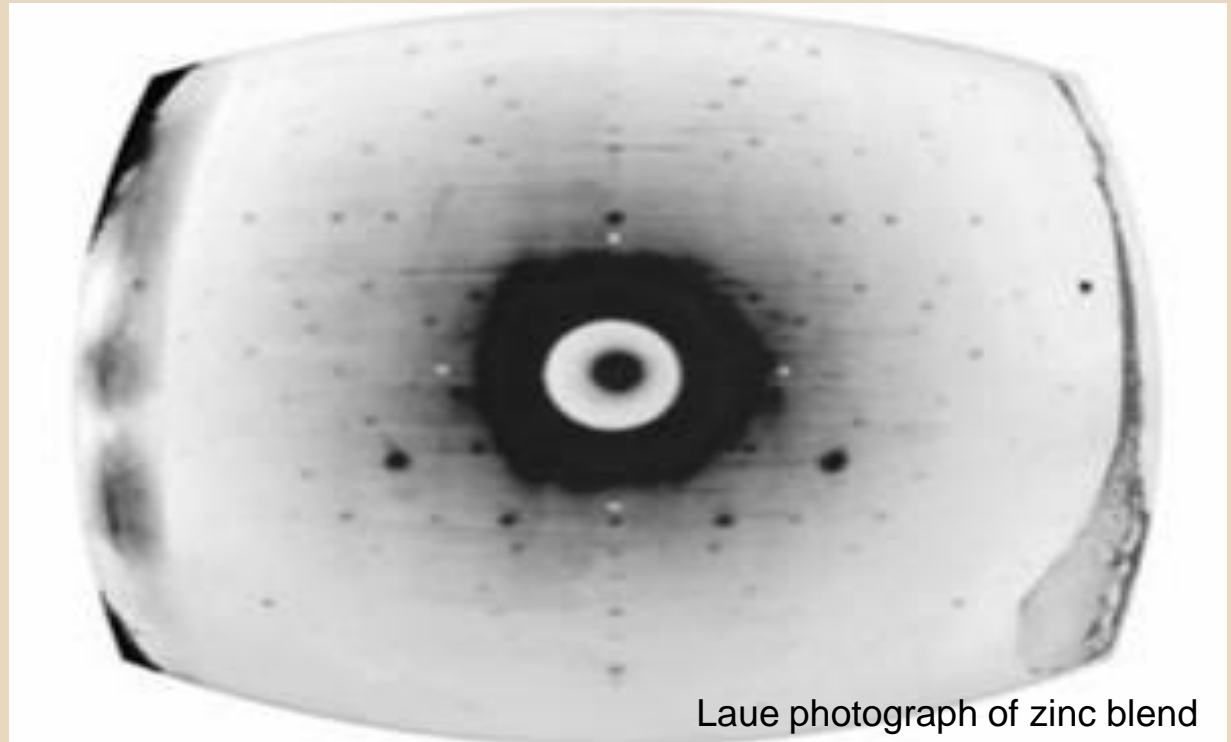
W.C. Röntgen
*23.1845 †10.2.1923

Short historical overview

1914



Max von Laue
(1879-1960)



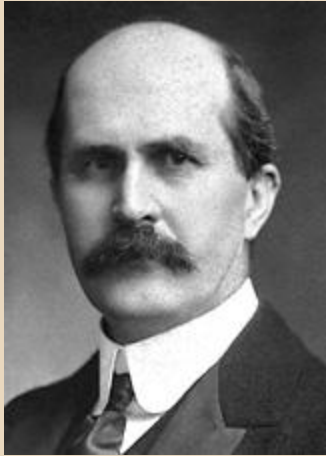
Laue photograph of zinc blend

The idea then came to him that the much shorter electromagnetic waves, which X-rays were supposed to be, would cause in an periodic arrangement some kind of dispersion or interference phenomena and that a crystal would provide such a medium.

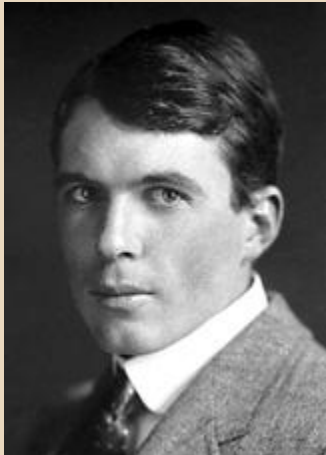
He received the Nobel Prize for Physics in 1914, for his discovery of the diffraction of X-rays on crystals.

Short historical overview

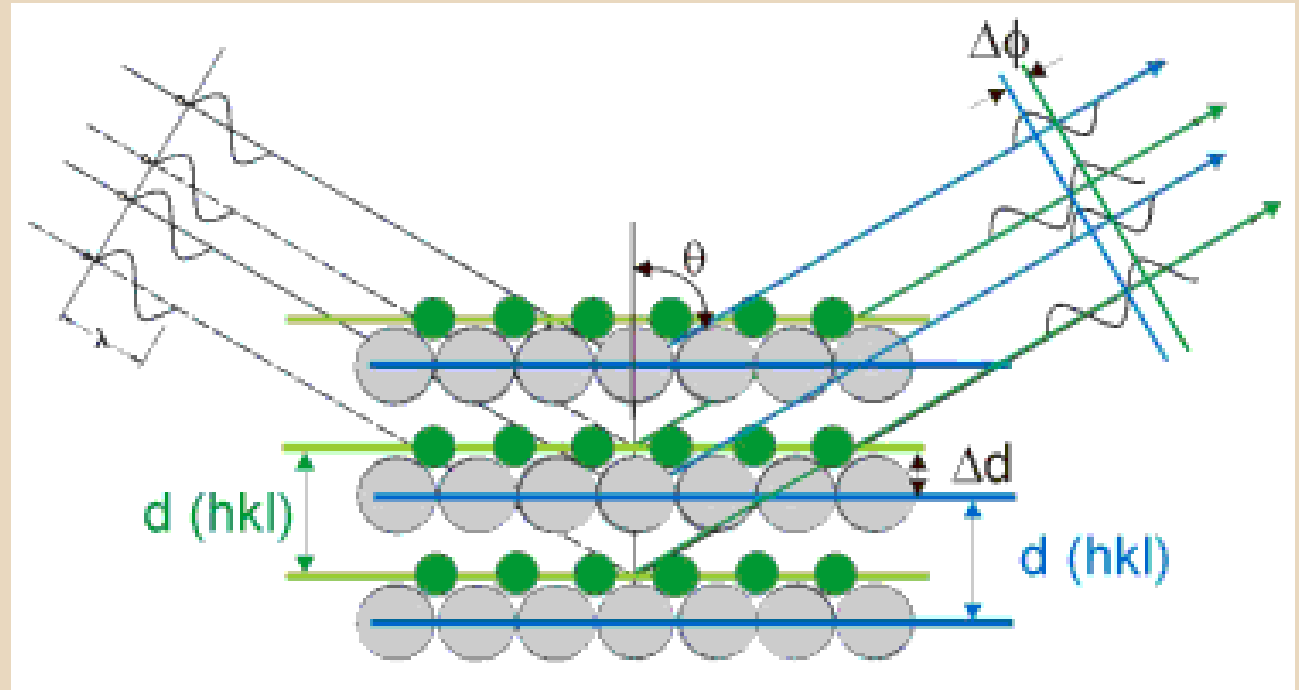
1915



William H. Bragg
(1862-1942)



William L. Bragg
(1890-1971)



The Bragg's model considered some virtual crystallographic planes that behave like mirrors, reflecting the X-rays, and combined the wavelength of the X-rays with some distances between those planes, given by the formula:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Short historical overview

The 30's

Two-year stay in W.H. Bragg's laboratory.

In 1933 went to the MIT, and learned from the mathematician Norbert Wiener about convolution of the Fourier transform.

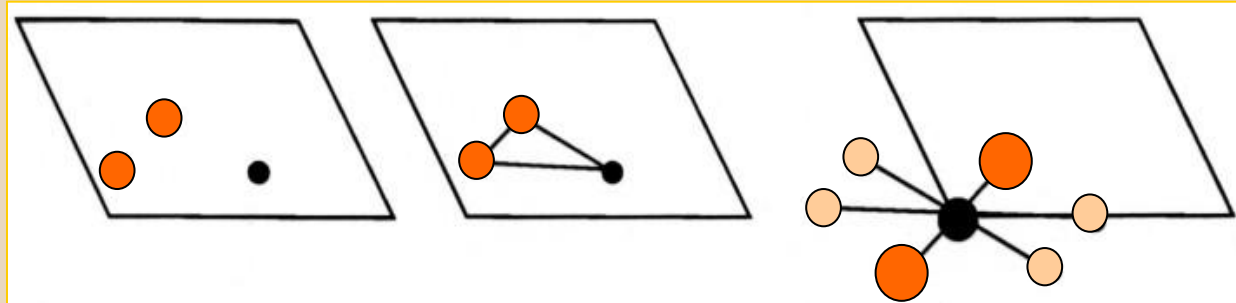
$$\rho(\mathbf{xyz}) = (1/V) \sum \sum \sum [F_{\mathbf{hkl}}] \cos 2\pi(\mathbf{hx+ky+lz-\phi_{\mathbf{hkl}}})$$

$$P(\mathbf{uvw}) = (1/V) \sum \sum \sum [F_{\mathbf{hkl}}]^2 \cos 2\pi(\mathbf{hu+kv+lw})$$

The *Patterson function* was born in 1934, representing perhaps **the most important single development in crystal-structure analysis since the discovery of X-ray diffraction itself.**



Arthur Lindo Patterson
(1902-1966)



Short historical overview

The 30's



David Harker
(1906 -1991)

Graduated in chemistry at Berkeley.

Took a job as technician in New York.

After reading a paper on the crystal structure of sodium nitrate he resolved to study crystal structures in greater depth.

In 1933 lost his job and returned to California under the supervision of Linus Pauling. There, the Patterson's function was presented in a weekly seminar ...

Short historical overview

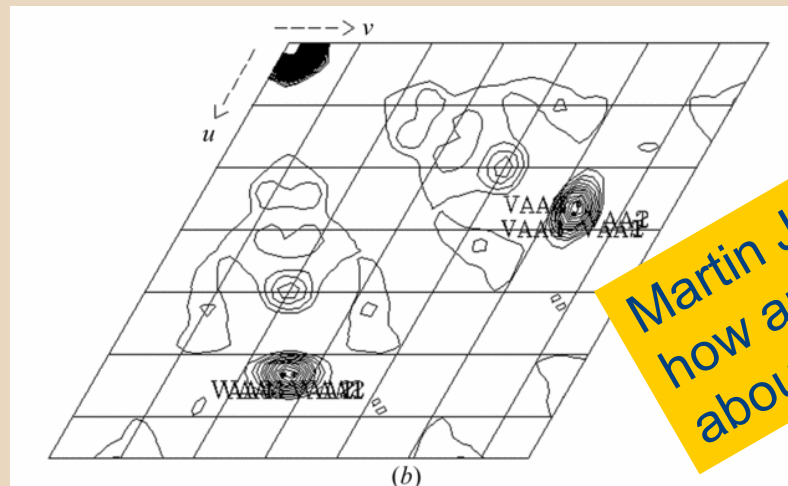
The 30's



David Harker
(1906 -1991)

What he saw was that the relationships between symmetrically related atoms would produce peaks in the Patterson function on certain planes or along certain lines determined by the known crystallographic symmetries.

And this led to an **easy interpretation of the Patterson function...**



Martin J. Buerger, related how angry was Patterson about this discovery!!!

Short historical overview

The 40's



*John D. Bernal
(1901-1971)*

The beginning of the 40's brought most of the crystallographic developments around John Bernal at the Birkbeck College (London)... The attention was put on organic and macromolecular compounds.



*Isidore Fankuchen, Dorothy Hodgkin, J. D. Bernal
and Dina Fankuchen in September, 1939.*

Short historical overview

The 50's

J. D. Bernal called her X-ray photographs of DNA, "the most beautiful X-ray photographs of any substance ever taken."

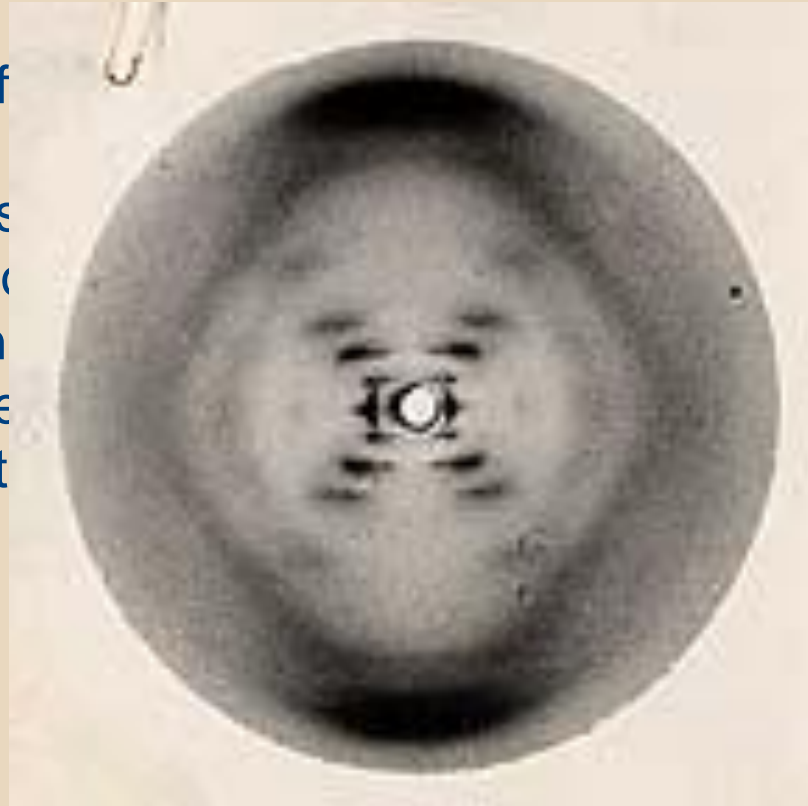
The unf

There is
much co
Rosalin
the rese
underst

st with as
work as
r much of
o the



*Rosalind Franklin
(1920-1958)*



*Rosalind Franklin's
DNA X-ray patterns*

Short historical overview

The 50's

But the DNA public actors were others...



James Watson
(1928-)



Rosalind Franklin
(1920-1958)



Francis Crick
(1916-2004)



Maurice Wilkins
(1916-2004)



Nobel Prize 1962 Physiology or Medicine
Crick, Watson, Wilkins

Short historical overview

The 50's



Started a Ph.D. in 1936 under J.D. Bernal at the Cavendish Laboratory.

In 1938 moved to the Keilin's Molteno Institute and later in 1939 appointed as research assistant to Sir L. Bragg.

In 1953 he developed the method of **isomorphous replacement** using heavy atoms to solve the phase problem.

This led to the **solution of the first protein structures**, those of **myoglobin** and **haemoglobin** together with his colleague Kendrew.

For this, Perutz and Kendrew were awarded the **1962 Nobel Prize for Chemistry**.



Max Ferdinand Perutz
(1914 - 2002)

Short historical overview

The 50's



She joined John Bernal laboratory in Cambridge.

In Oxford she continued the research that was begun with Bernal on the sterols and on **insulin**.

Her work on **penicillin** began in 1942, and on **vitamin B₁₂** in 1948.

Her research group grew slowly and had always many visitors, working principally on the X-ray analysis of natural products.

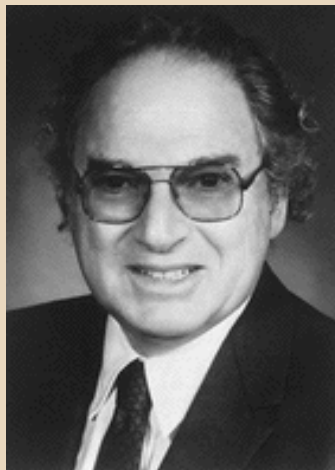
In 1964 Dorothy Hodgkin was awarded the **Nobel Prize for Chemistry**.

Dorothy Crowfoot Hodgkin
Chemist, Crystallographer, Humanitarian
(1910 - 1994)

Short historical overview

The 50's and 60's

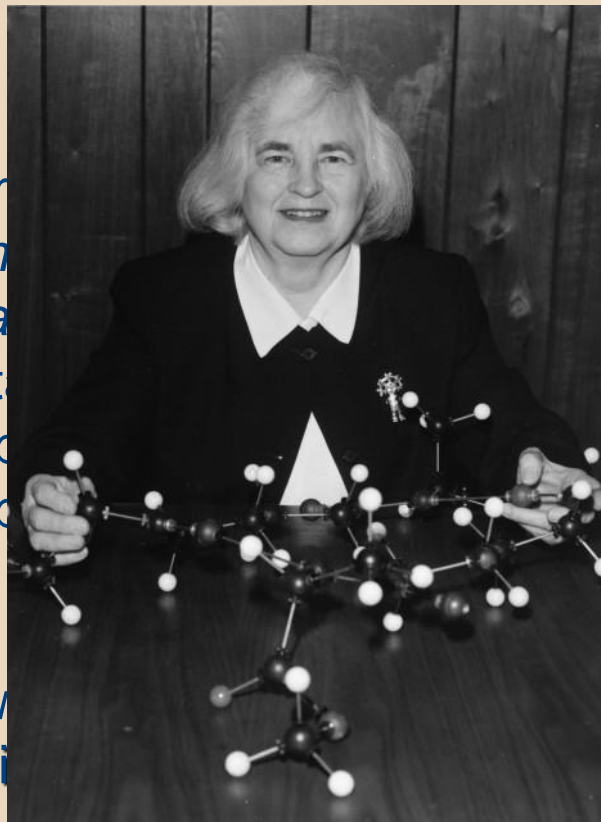
The Direct Methods



Herbert A. Hauptman
Mathematician, 1917



Jerome Karle
Crystallographer, 1918



Isabella Karle
Crystallographer, 1921

Their method, described in the *Philosophical Magazine*, was the most important contribution to the development of the direct methods, which are now the standard for the determination of crystal structures.

They were awarded the Nobel Prize in Chemistry in 1985.

In 1953, "Solution of the Structure of the Asymmetric Unit of the Crystal of α -Quartz, the most important contribution to the development of the direct methods, which are now the standard for the determination of crystal structures.

Nobel Prize in

Short historical overview

21 Nobel Laureates

- 1901 Physics **W.C.Röntgen** - Discovery of X-rays
- 1914 Physics **M. von Laue** - Diffraction of X-rays by crystals
- 1915 Physics **W.H.Bragg, W.L.Bragg** - Use of X-rays to determine crystal structure
- 1929 Physics **L-V de Broglie** - The wave nature of the electron
- 1937 Physics **C.J.Davisson, G.Thompson** - Diffraction of electrons by crystals
- 1946 Chemistry **J.B.Sumner** - Discovery that enzymes can be crystallised
- 1954 Chemistry **L.C.Pauling** - The nature of the chemical bond
- 1962 Physiology or Medicine **F.Crick, J.Watson, M.Wilkins** - Structure of DNA
- 1962 Chemistry **J.C.Kendrew, M.Perutz** - Structures of globular proteins
- 1964 Chemistry **D.Hodgkin** - Structure of many biochemical substances

Short historical overview

21 Nobel Laureates

- 1976 Chemistry **W.N.Lipscomb** - Structure of boranes
- 1982 Chemistry **A.Klug** - Development of crystallographic electron microscopy
- 1982 Physics **K.G.Wilson** - Critical phenomena in connection with phase transitions
- 1985 Chemistry **H.Hauptman, J.Karle** development of direct methods
- • 1988 Chemistry **J.Deisenhofer, R.Huber, H.Michel** - 3d structure of a photosynthetic centre
- 1991 Physics **P-G de Gennes** - Order in simple systems applied to liquid crystals
- 1992 Physics **G. Charpak** - Multi wire proportional chamber
- 1994 Physics **C.Shull, N.Brockhouse** - Neutron diffraction
- 1996 Chemistry **R.Curl, H.Kroto, R.Smalley** - Discovery of the fullerene form of carbon
- • 1997 Chemistry **P.D.Boyer, J.E.Walker, J.C.Skou** enzymatic mechanism underlying the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) and discovery of an ion-transporting enzyme
- • 2006 Chemistry **R. Kornberg** - molecular basis of eukaryotic transcription

Short Historical overview

21 Nobel Laureates
+ 3 !!!!!



The image is a promotional graphic for the Nobel Prize in Chemistry 2009. It features three portraits of the laureates: Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, and Ada E. Yonath. The text is in Swedish and English. The Swedish text at the top reads "Nobelpriset i kemi 2009" and the English text at the bottom reads "for studies of the structure and function of the ribosome". The logo of the Royal Swedish Academy of Sciences is visible in the top right corner.

Nobelpriset i kemi 2009

VENKATRAMAN RAMAKRISHNAN
MRC Laboratory of Molecular
Biology, Cambridge, UK

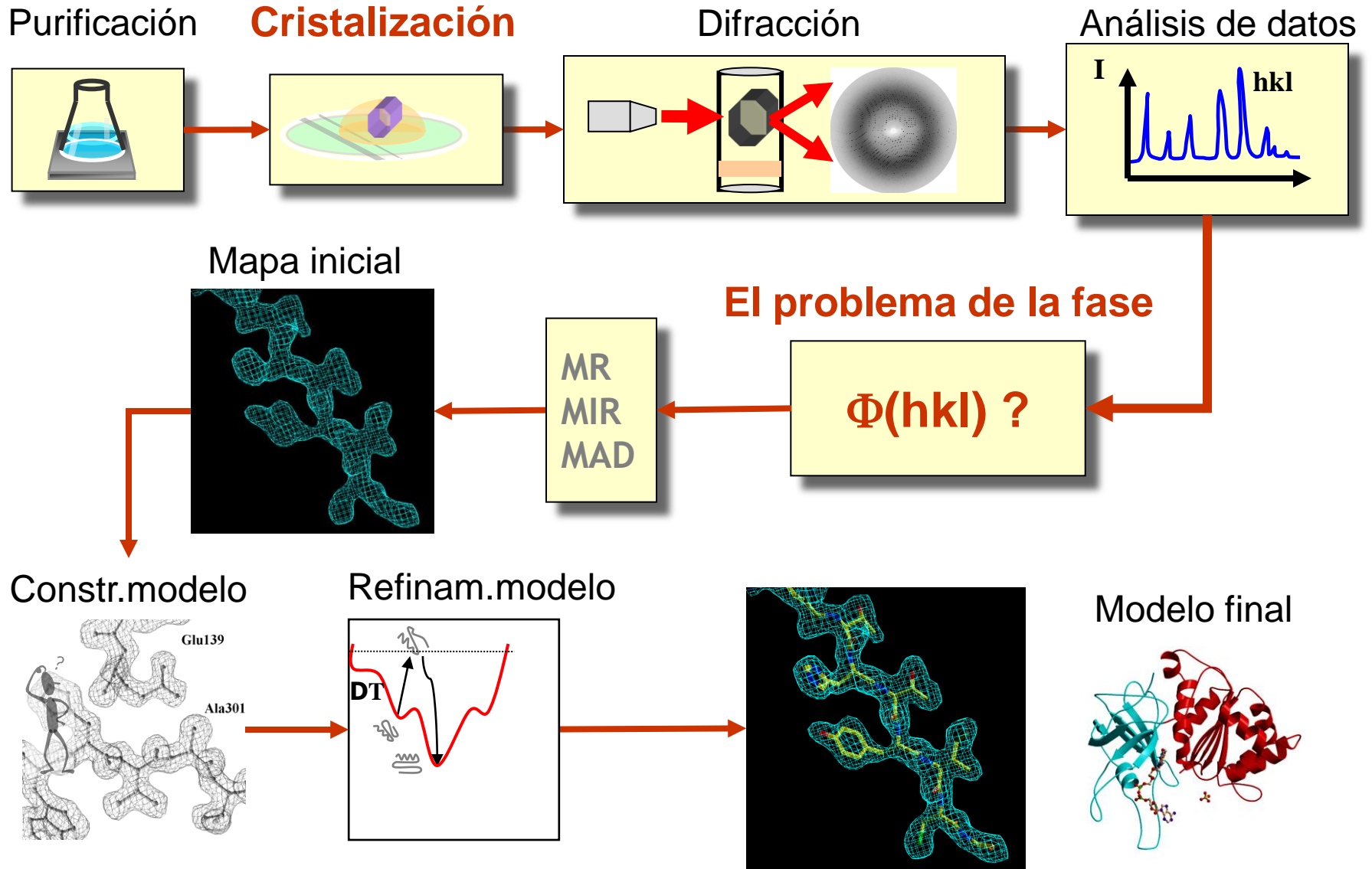
THOMAS A. STEITZ
Yale University,
New Haven, CT, USA

ADA E. YONATH
Weizmann Institute of Science,
Rehovot, Israel







"för studier av ribosomens struktur och funktion"
"for studies of the structure and function of the ribosome"

To be continued...

La metodología: una visión global



Difracción de Rayos X de Proteínas

1. **Simetría.**
2. **Simetría.**
3. **Cristales y su obtención.**
 Concepto de cristal.
4. **Difracción de Rayos X.**
 Grupos puntuales
5. **Aspectos experimentales: equipos de difracción y procesamiento de datos.**
 Clases cristalinas
6. **El Problema de la Fase: métodos de resolución estructural.**
 Redes de Bravais
7. **Refinamiento, modelado y validación estructural.**
 Grupos espaciales
8. **Aplicación: relaciones estructura-función.**
 Sistemas cristalinos.

Conceptos básicos: Simetría



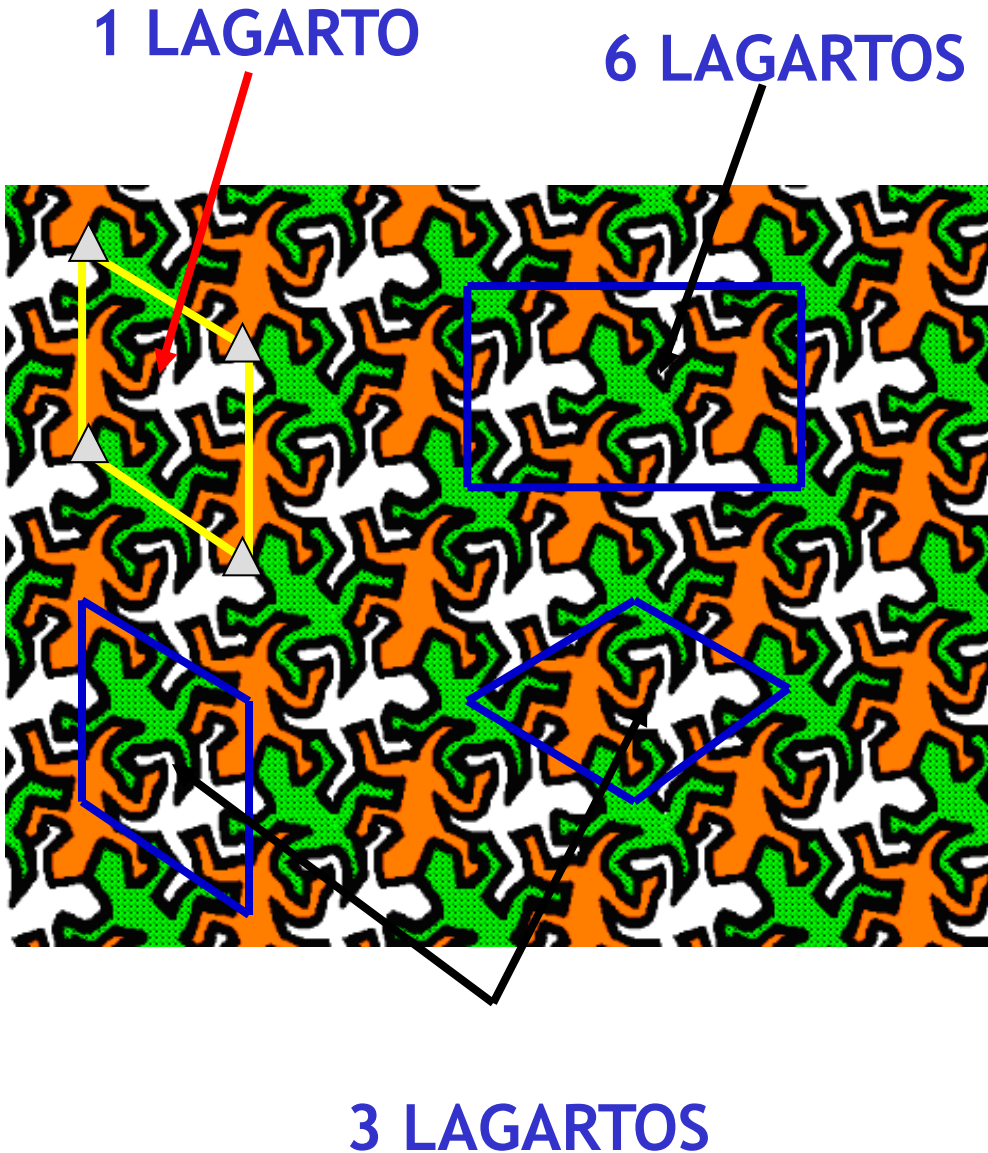
Simetría es la constancia, la repetición de algo en el espacio o en el tiempo ...



Symmetry

... y que también la encontramos en los cristales ...

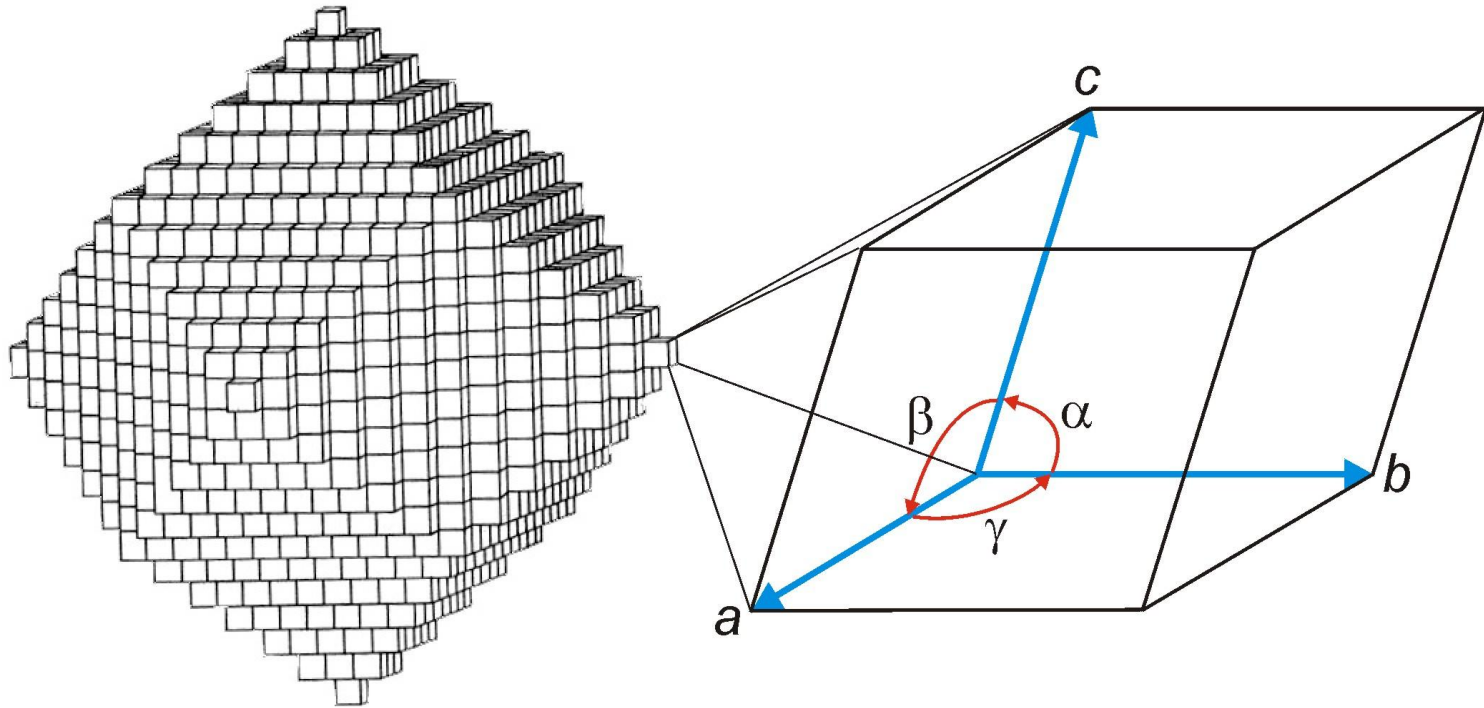
ya que las moléculas se ordenan alrededor de elementos de repetición.



Los elementos se repiten en el espacio con un cierto orden (simetría) indefinidamente.

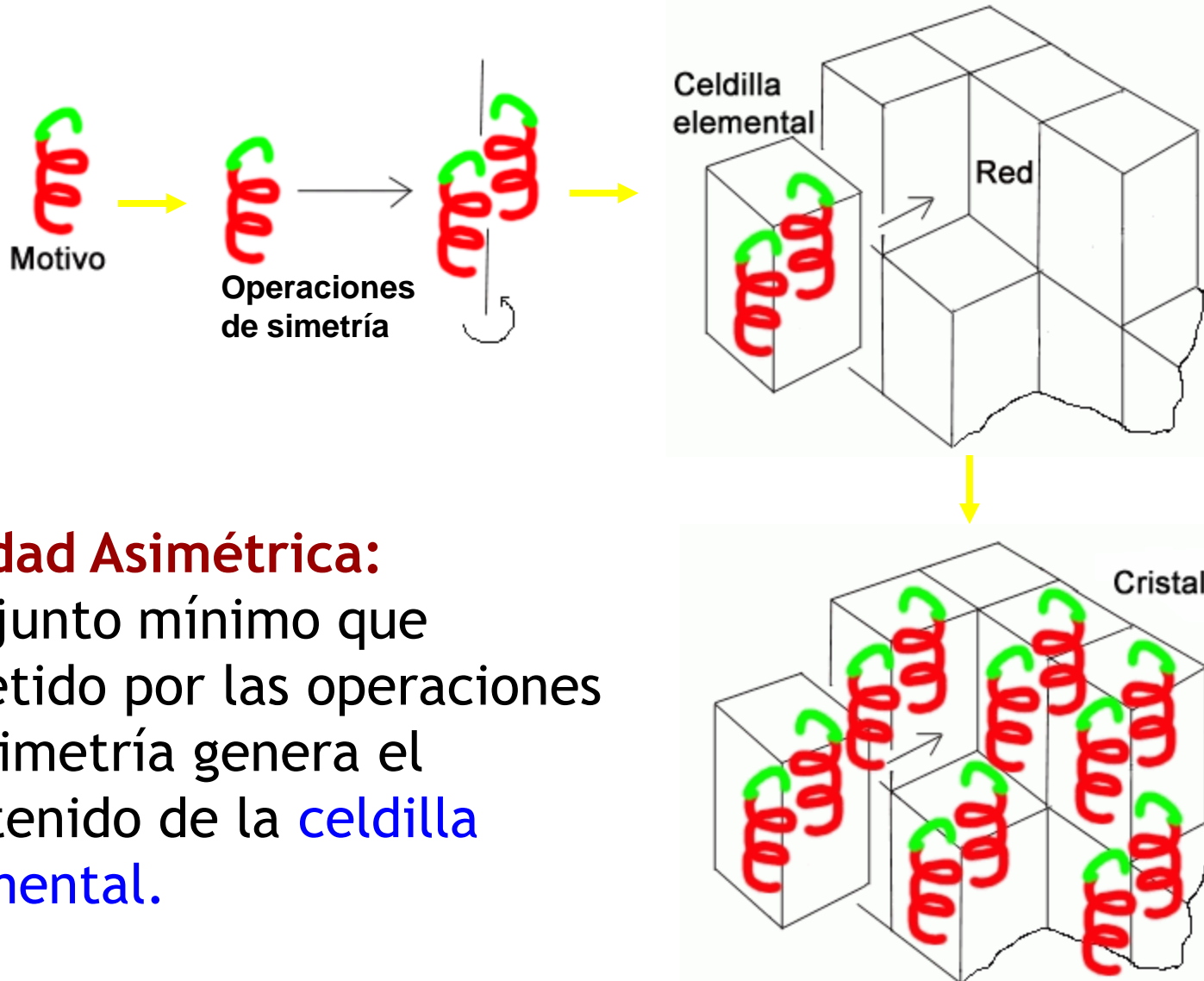
Red cristalina

Celdilla unidad



Celdilla unidad →

Conjunto mínimo que repetido en las tres direcciones genera todo el cristal.



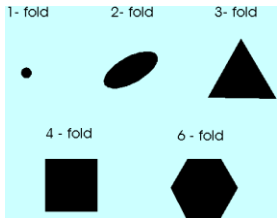
Unidad Asimétrica:

Conjunto mínimo que repetido por las operaciones de simetría genera el contenido de la **celdilla elemental**.

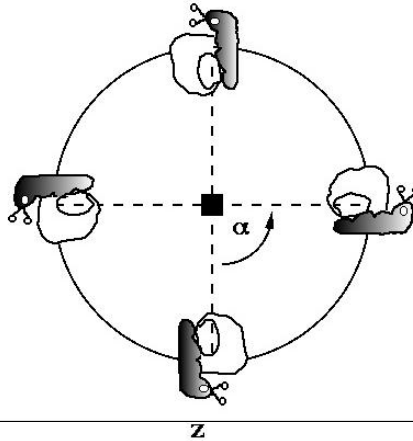
SIMETRIA: ELEMENTOS DE SIMETRIA



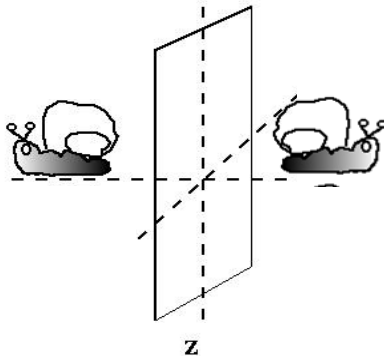
Ejes de simetría



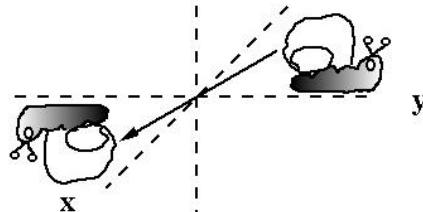
90° rotation of motif



Plano de simetría



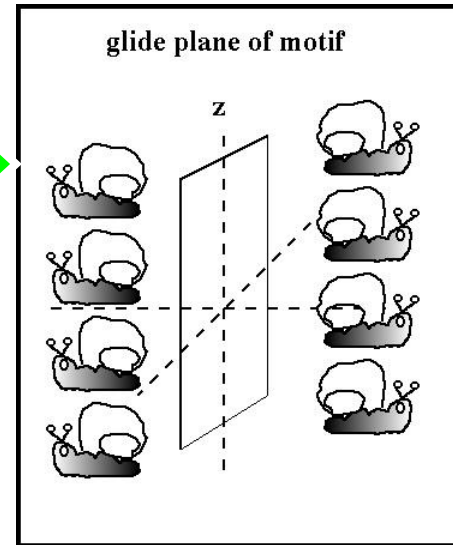
Centro de inversión



Ejes Helicoidales

Planos de deslizamiento

+
Traslaciones



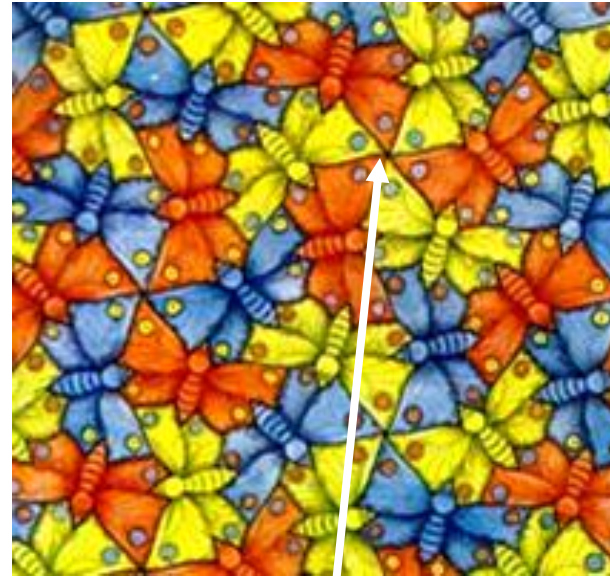
SIMETRIA: GRUPO PUNTUAL



El conjunto de elementos de simetría de un objeto finito que pasan por un punto, definen la simetría total del objeto y se denomina **grupo puntual de simetría**.

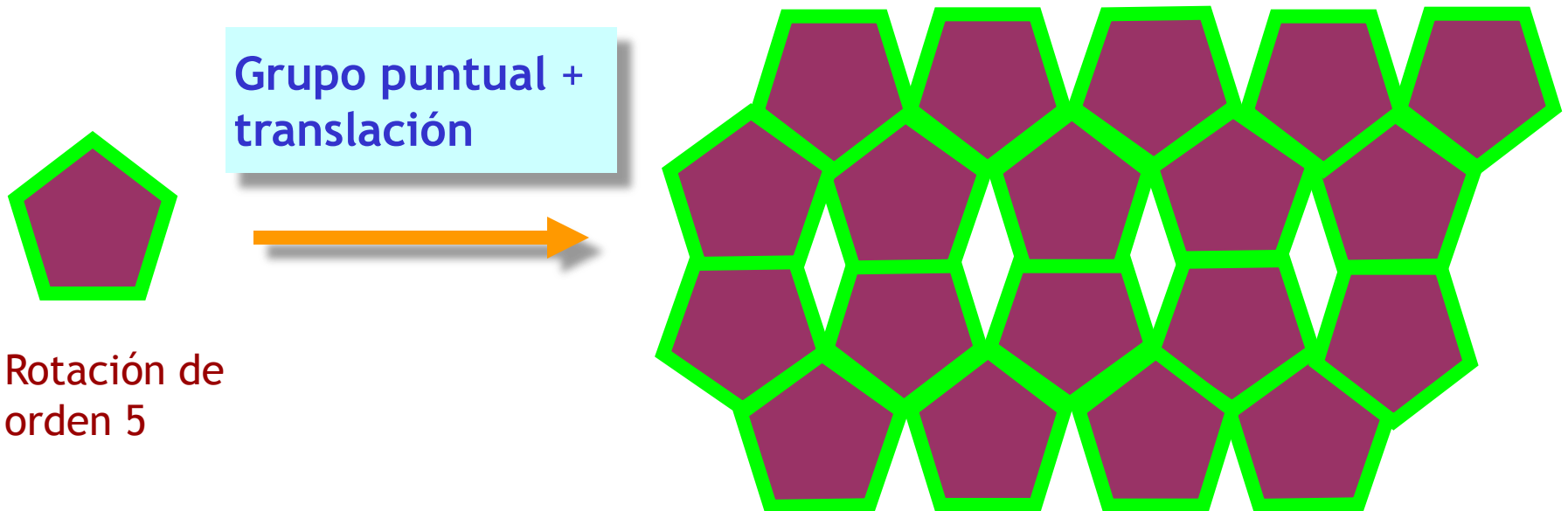


eje ternario



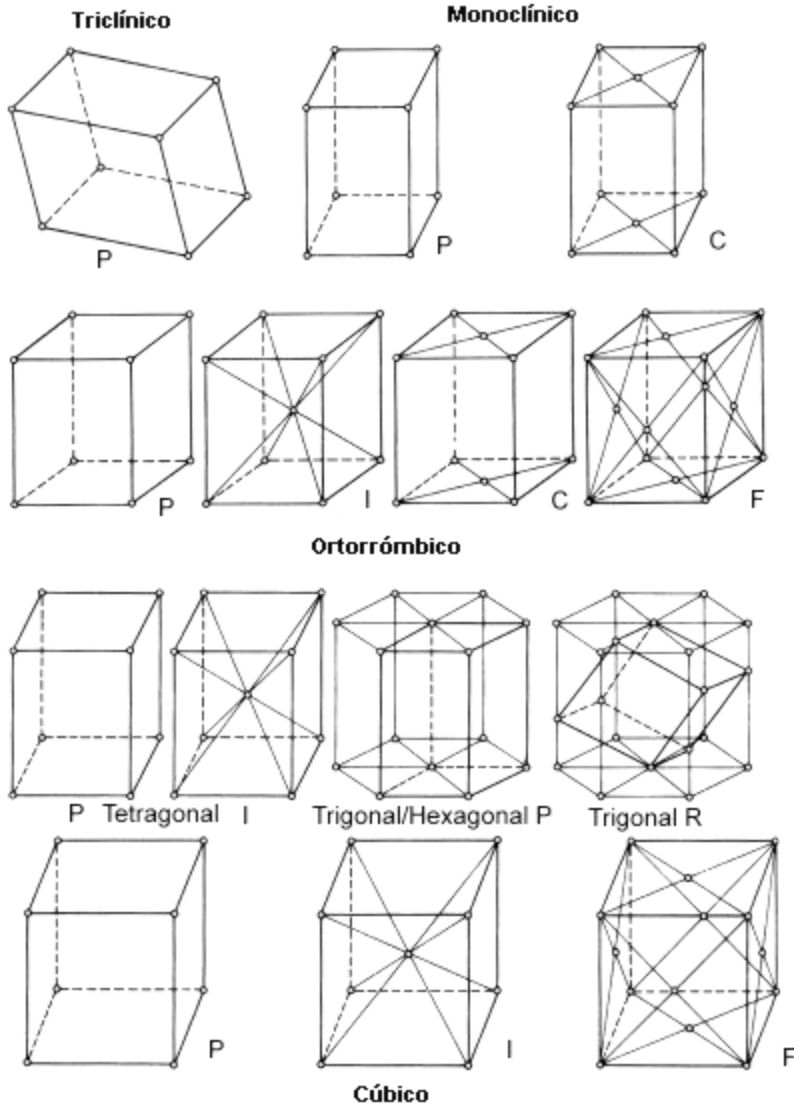
eje de orden 6

Grupos puntuales hay muchos, pero en los cristales han de ser compatibles con la periodicidad (repetitividad por traslación).



En los cristales sólo hay 32 grupos puntuales
(CLASES CRISTALINAS)

SIMETRIA: REDES DE BRAVAIS



El espacio sólo se puede llenar con motivos finitos y de forma periódica usando cualquiera de las **14 redes de Bravais**.

32 clases cristalinas + translación = 14 redes de Bravais

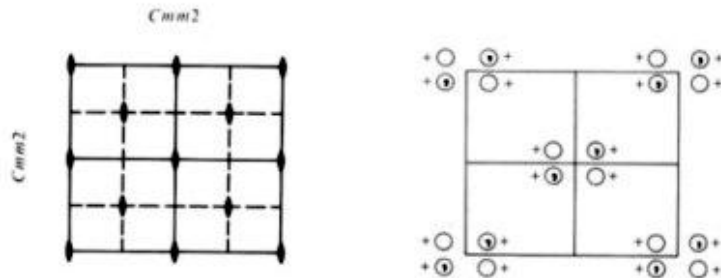
SIMETRIA: GRUPOS ESPACIALES



Al combinar los grupos puntuales de los cristales (las 32 clases cristalinas) con las 14 redes de Bravais, nos encontramos con 230 maneras posibles de repetir un objeto finito (motivo) en el espacio de 3 dimensiones.

32 clases cristalinas + 14 redes de Bravais = 230 grupos espaciales

$Cmm2$ C_{2v}^{11} $mm2$ Orthorhombic
 No. 35 $Cmm2$ Patterson symmetry $Cmmm$



Ejemplo de grupo espacial, según aparece en las *International Tables for X-ray Crystallography*

Positions

Multiplicity,
Wyckoff letter,
Site symmetry

Coordinates

(0,0,0)+ (½,½,0)+
 8 f 1 (1) x,y,z (2) \bar{x},\bar{y},z (3) x, \bar{y},z (4) \bar{x},y,z



Estas 32 clases, 14 redes y 230 grupos espaciales pueden clasificarse, según la simetría mínima que albergan, en 7 sistemas cristalinos.

La simetría mínima produce restricciones en los valores métricos (distancias y ángulos) que describen la forma y el tamaño de la red.

Triclínico:	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$
Monoclínico:	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90$ $\beta \neq 90$
Ortorrómbico:	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Tetragonal:	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Romboédrico:	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90$
Hexagonal:	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90$ $\gamma = 120$
Cúbico:	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$

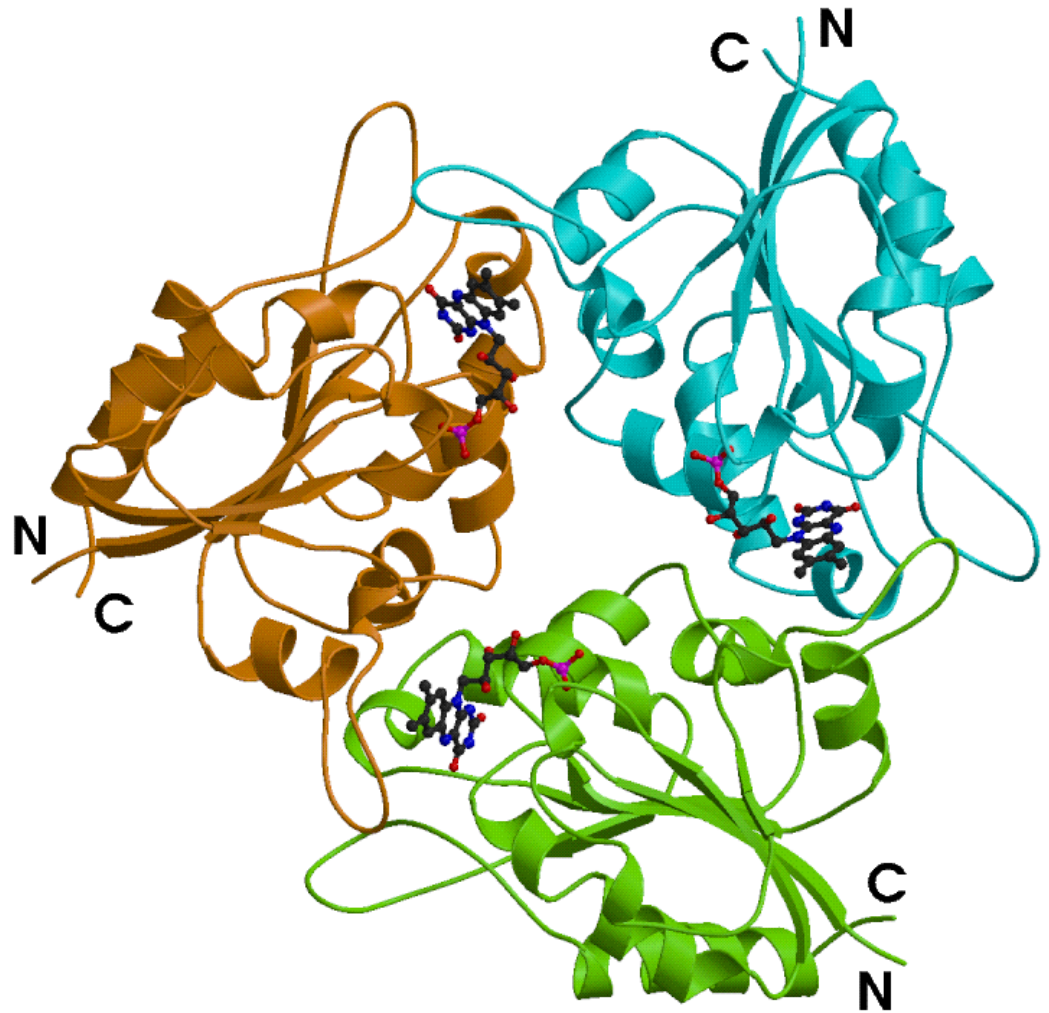
SIMETRIA CRISTALINA

<i>Clases cristalinicas (Llave con *)</i>	<i>Redes cristalinicas compatibles y su simetria</i>	<i>Número de grupos espaciales</i>	<i>Simetria mínima</i>	<i>Sistema cristalinico</i>
1 <u>1</u> *	P <u>1</u>	2	1 ó <u>1</u>	Triclínico
2 m <u>2/m</u> *	P C (I) <u>2/m</u>	13	Un 2 ó <u>2</u>	Monoclínico
222 <u>2mm mmm</u> *	P C (A,B) I F <u>mmm</u>	59	Tres 2 ó <u>2</u>	Ortorrómico
4 <u>4</u> <u>4/m</u> * 4mm <u>422</u> <u>42m</u> <u>4/mmm</u> *	P I <u>4/mmm</u>	68	Un 4 ó <u>4</u>	Tetragonal
23 <u>m3</u> * <u>432</u> <u>43m</u> <u>m3m</u> *	P I F <u>m3m</u>	36	Cuatro 3 ó <u>3</u>	Cúbico
6 <u>6</u> <u>6m</u> * 6mm <u>622</u> <u>62m</u> <u>6/mmm</u> *	P <u>6/mmm</u>	27	Un 6 ó <u>6</u>	Hexagonal
3 <u>3</u> * <u>3m</u> <u>32</u> <u>3m</u> *	P <u>3m</u> (R) <u>6/mmm</u>	25	Un 3 ó <u>3</u>	Trigonal
Total: 32, 11*	14 independientes	230		7

Difracción de Rayos X de Proteínas

1. Introducción.
2. Simetría.
3. **Cristales y su obtención.**
Cristales de proteínas: características.
4. Difracción de Rayos X.
Cristalización de proteínas.
5. Aspectos experimentales: equipos de difracción y procesado de datos.
Método de la gota colgante.
6. El Problema de la Fase: métodos de resolución estructural.
7. Refinamiento, modelado y validación estructural.
8. Aplicación: relaciones estructura-función.

CRISTALES DE PROTEÍNA





- No-centrosimétricos
 - Sólo 65 Grupos Espaciales

- Normalmente pequeños
 - Poco volumen

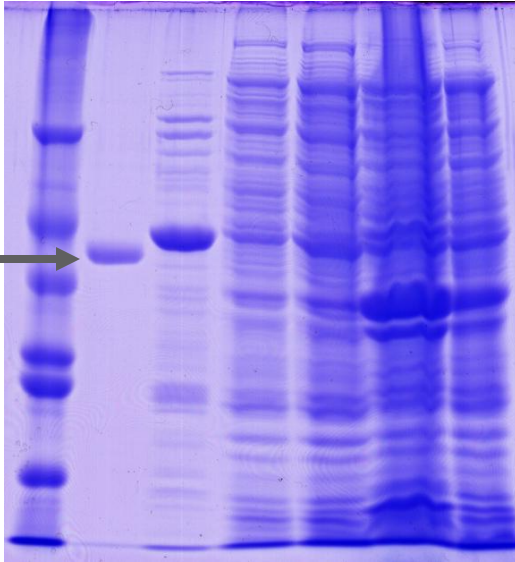
- Alto volumen cristalino

Contenidos en solvente: 20-80%

El cristal de una proteína ¿es un sólido, o es una "sopa"?

- Intensidad de reflexiones
• Intensidad del espectro
• Intensidad decrece drásticamente en el tiempo

- Frágiles y sensibles
 - Interacciones intermoleculares débiles
 - Alto contenido de solvente (20-80%)



**Varios mg de proteína 99% pura
(10 mg/ml)**

1. Libre de contaminantes

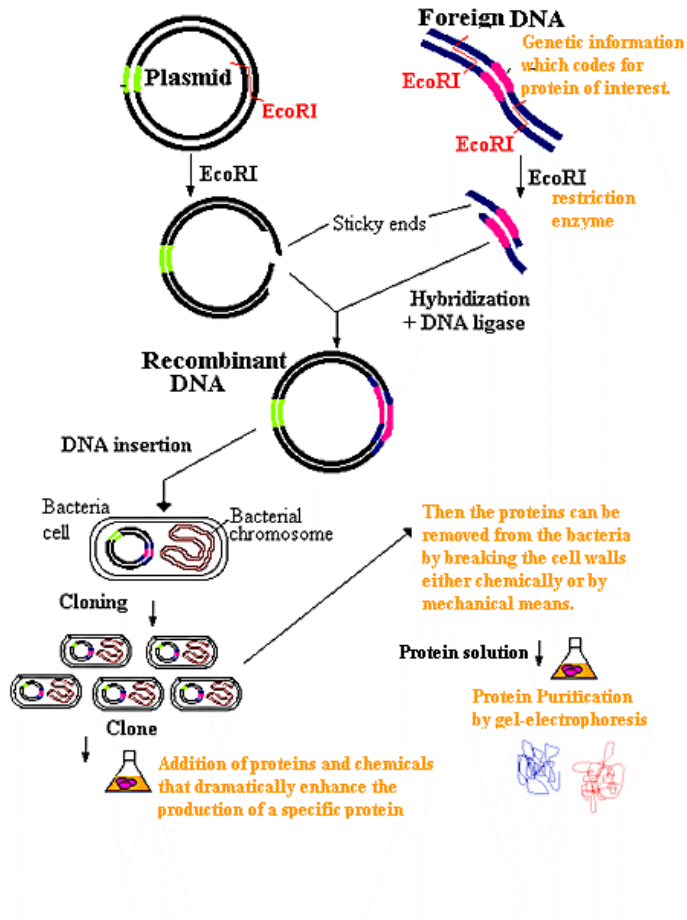
- . Macromoléculas: polisacáridos, lípidos, proteasas
- . Péptidos, carbohidratos, iones...

2. Estable y homogénea

- . Fragmentación por proteasas
- . Modificaciones post-sintéticas
- . Heterogeneidad conformacional



Orden



Proteína recombinante:

- Cantidad de muestra
- Homogeneidad
- Pureza
- Obtención de mutantes
- Formas modificadas

Laboratorio de purificación y preparación de la muestra



Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)