



## Principio:

- Mínimo de solubilidad
- Población única
- \* Difusión Derivados complejos
- \* Estructura Nativa

## Factores:

- {Proteína}: 5-30 mg/ml
- {Precipitante}: sales, disolventes, PEG
- pH: buffer (solubilidad mínima en el  $P_1$ )
- T: 4,20°
- Aditivos:
  - Iones M
  - Inhibidores
  - agentes reductores

## Tipos de Precipitantes:

### 1. Sales

La Fuerza iónica afecta a la solubilidad

*salting out* la solubilidad disminuye exponencialmente con el aumento de la fuerza iónica.

*Salting in* la solubilidad alcanza un mínimo a muy baja fuerza iónica.

### 2. Solventes Orgánicos

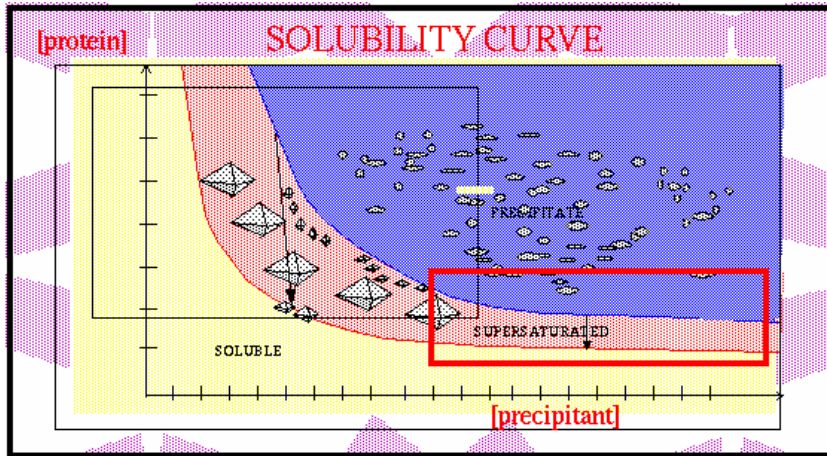
Secuestran moléculas de agua y disminuyen la cte dieléctrica del medio.

MPD  
Hexanodiol  
Etanol  
Isopropanol  
Acetona  
Dioxano

### 3. PEG

Polímero de peso molecular variable que modifica la estructura del solvente

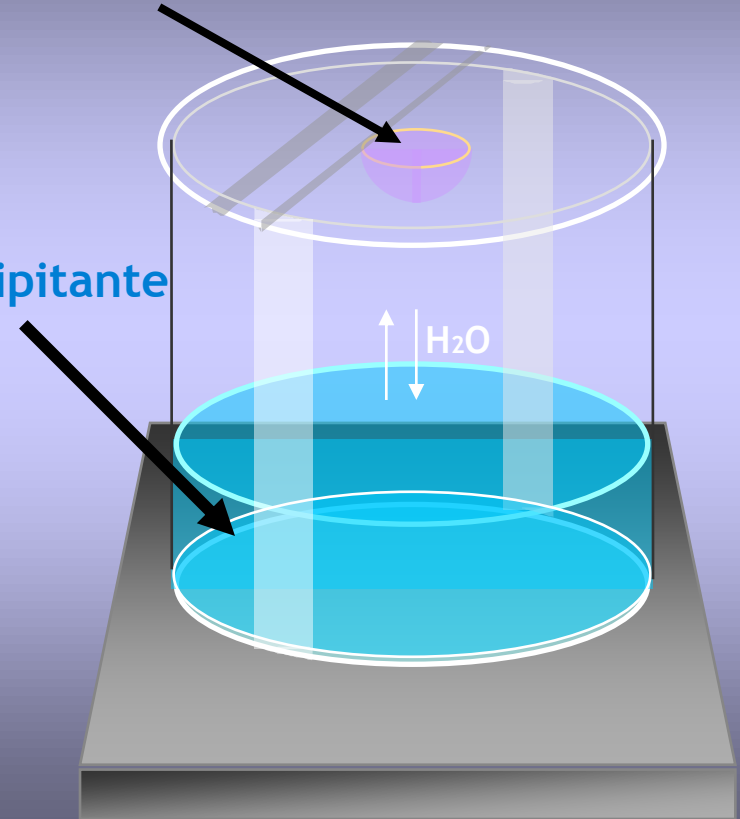
# CRISTALIZACION



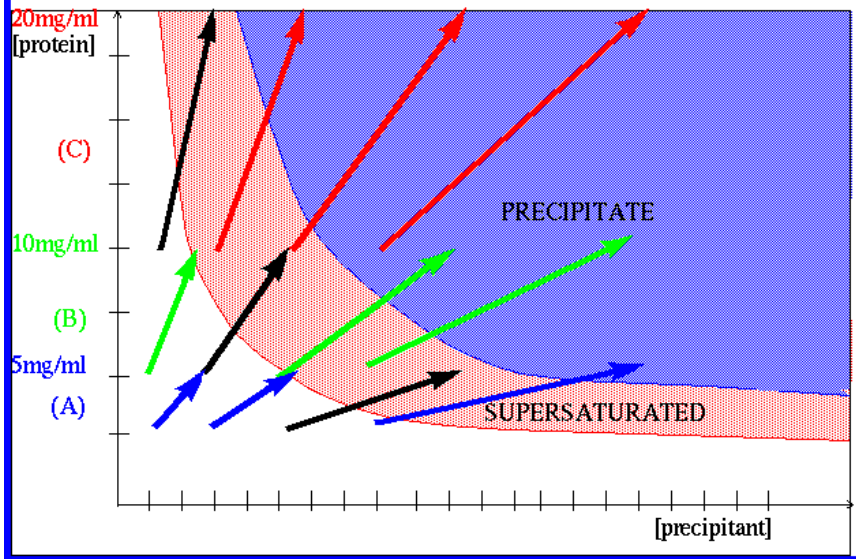
## Método de difusión de vapor

Proteína + Precipitante

Precipitante



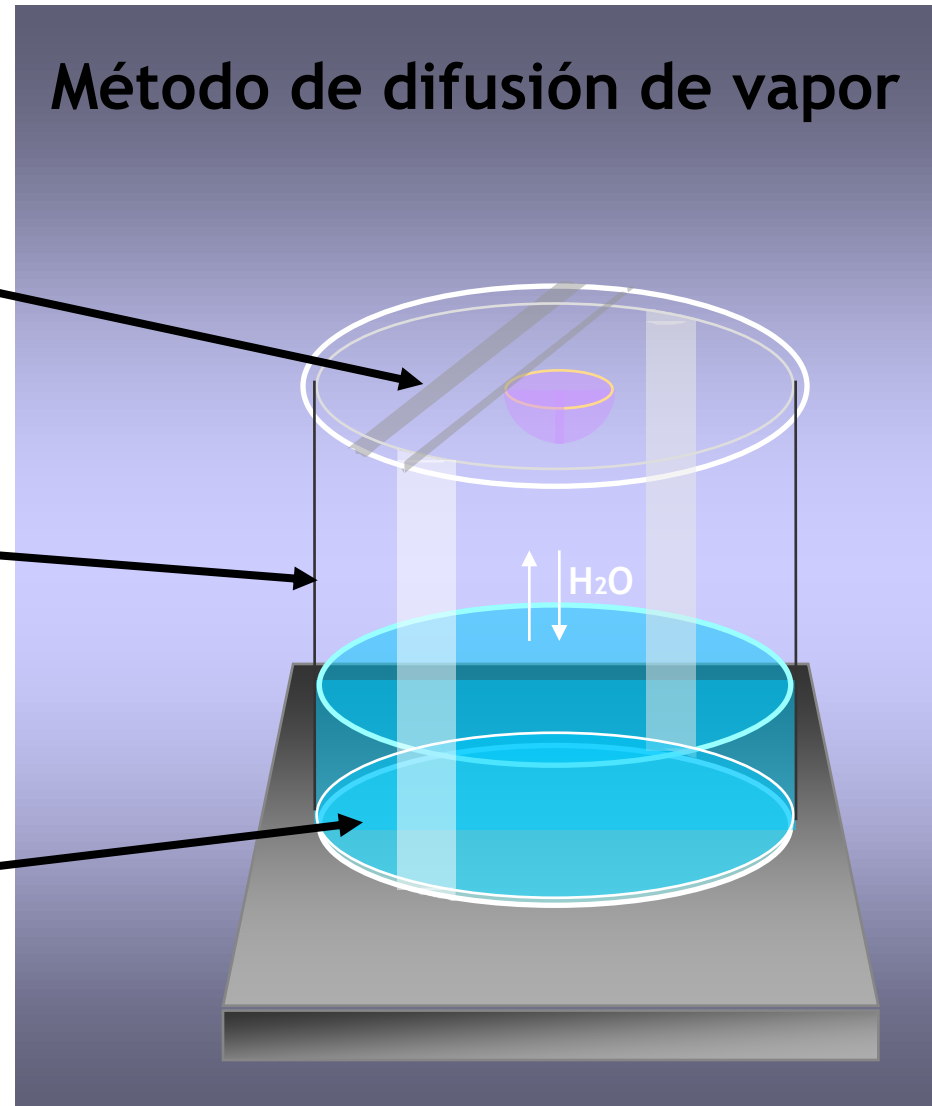
## DESIGN OF A PRECIPITANT SCREEN



# CRISTALIZACION



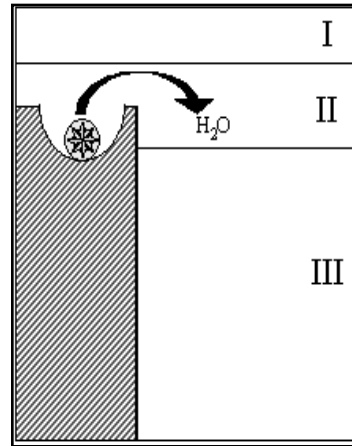
## Método de difusión de vapor



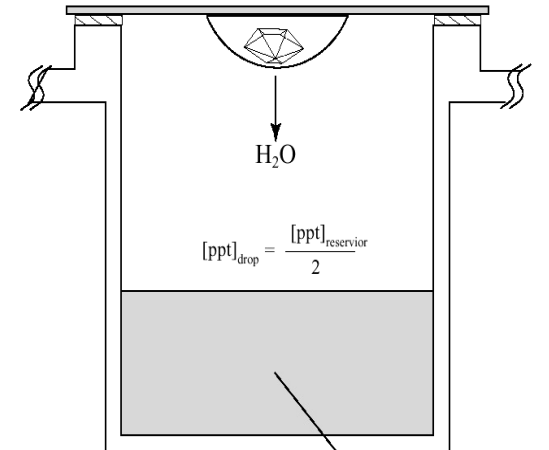


## Techniques

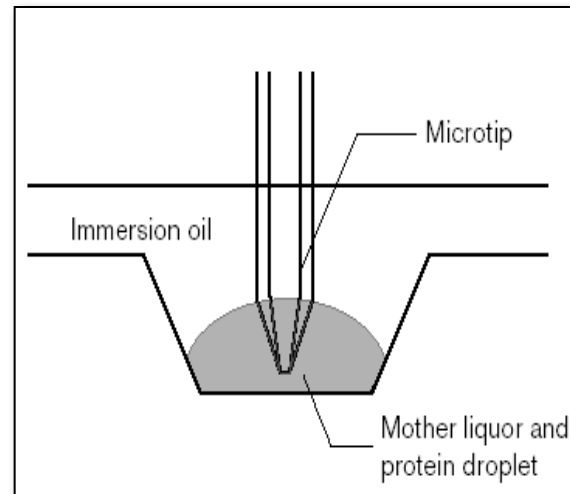
- sitting drop
- hanging drop
- sandwich-drop
- free interface diffusion
- batch
- mikro-batch
- modified mikro-batch



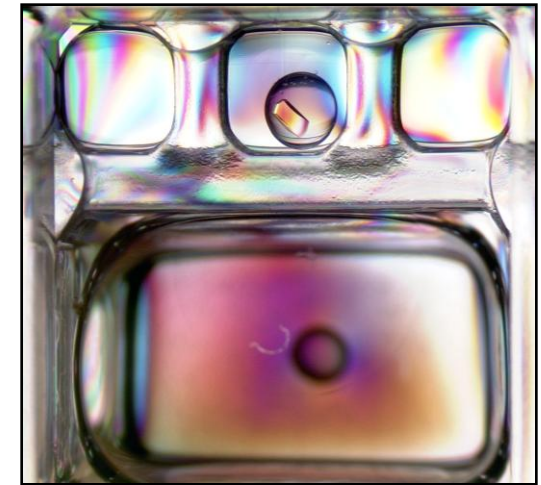
Sitting Drop



Hanging Drop

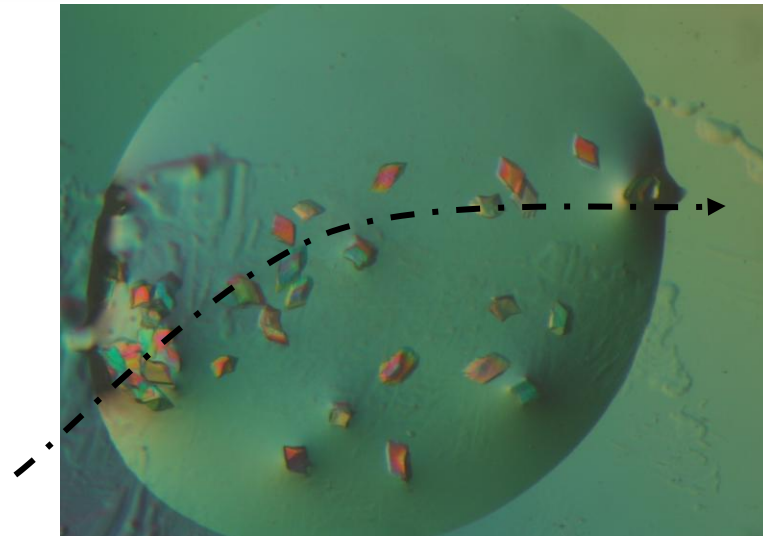
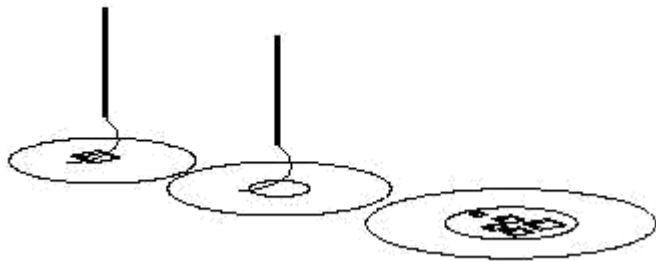


Oil immersion

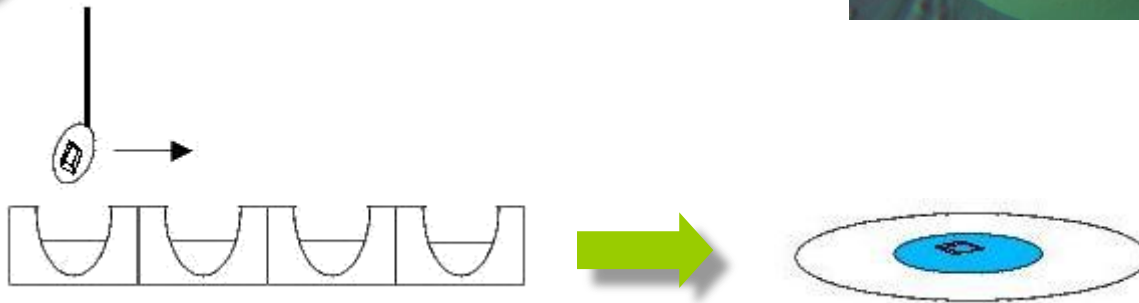


# OTRAS TÉCNICAS DE CRISTALIZACIÓN

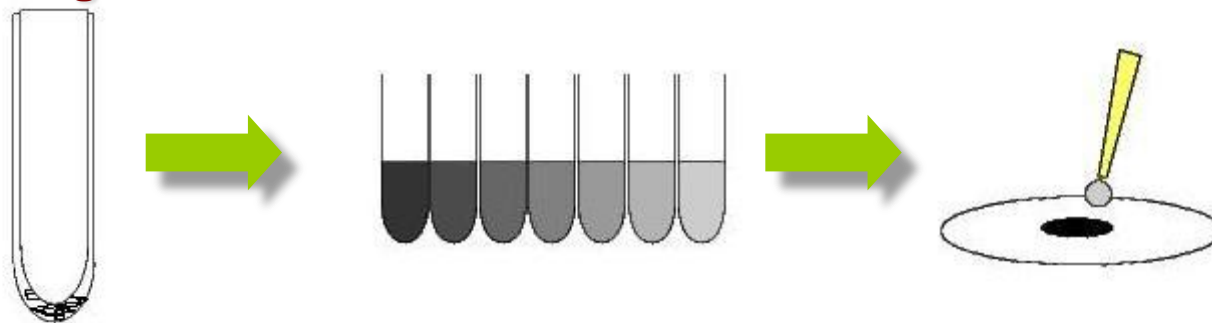
## 1 Streak Seeding



## 2 Macro Seeding



## 3 Micro Seeding

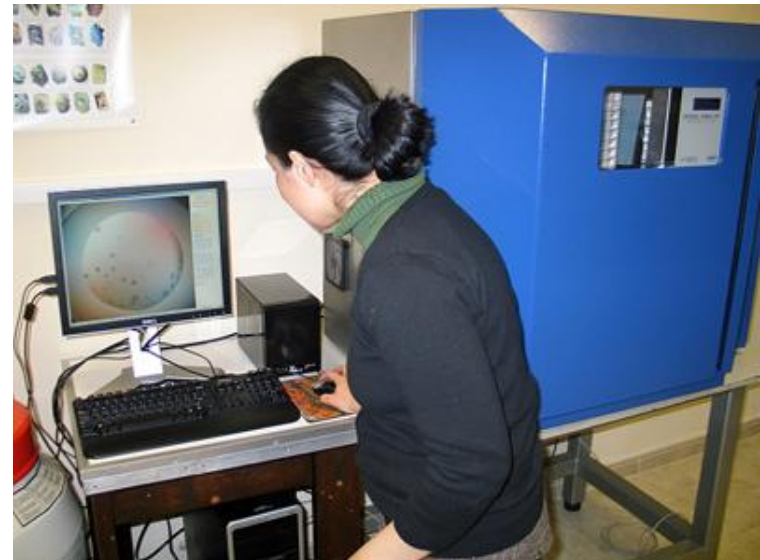
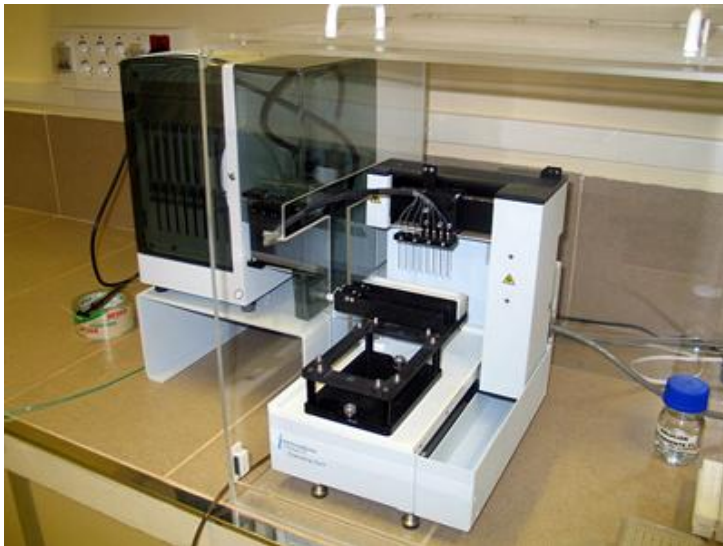


# EL LABORATORIO DE CRISTALIZACION

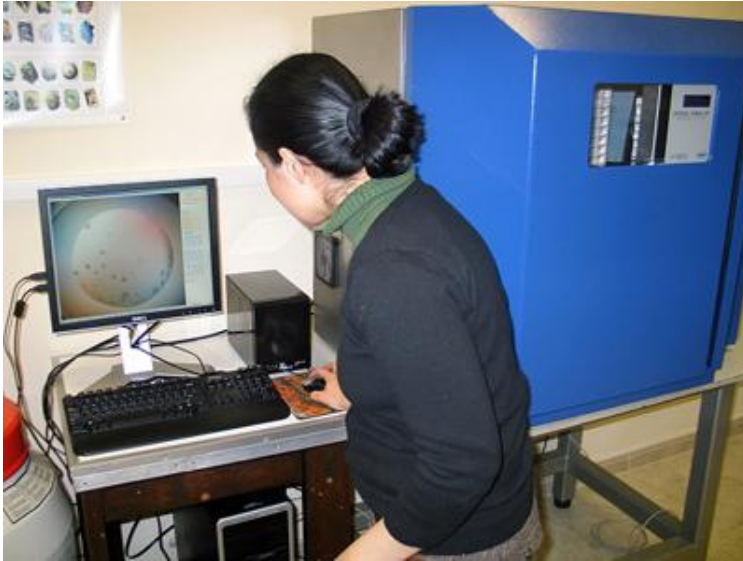




# PLATAFORMA DE ALTO RENDIMIENTO DE CRISTALIZACION

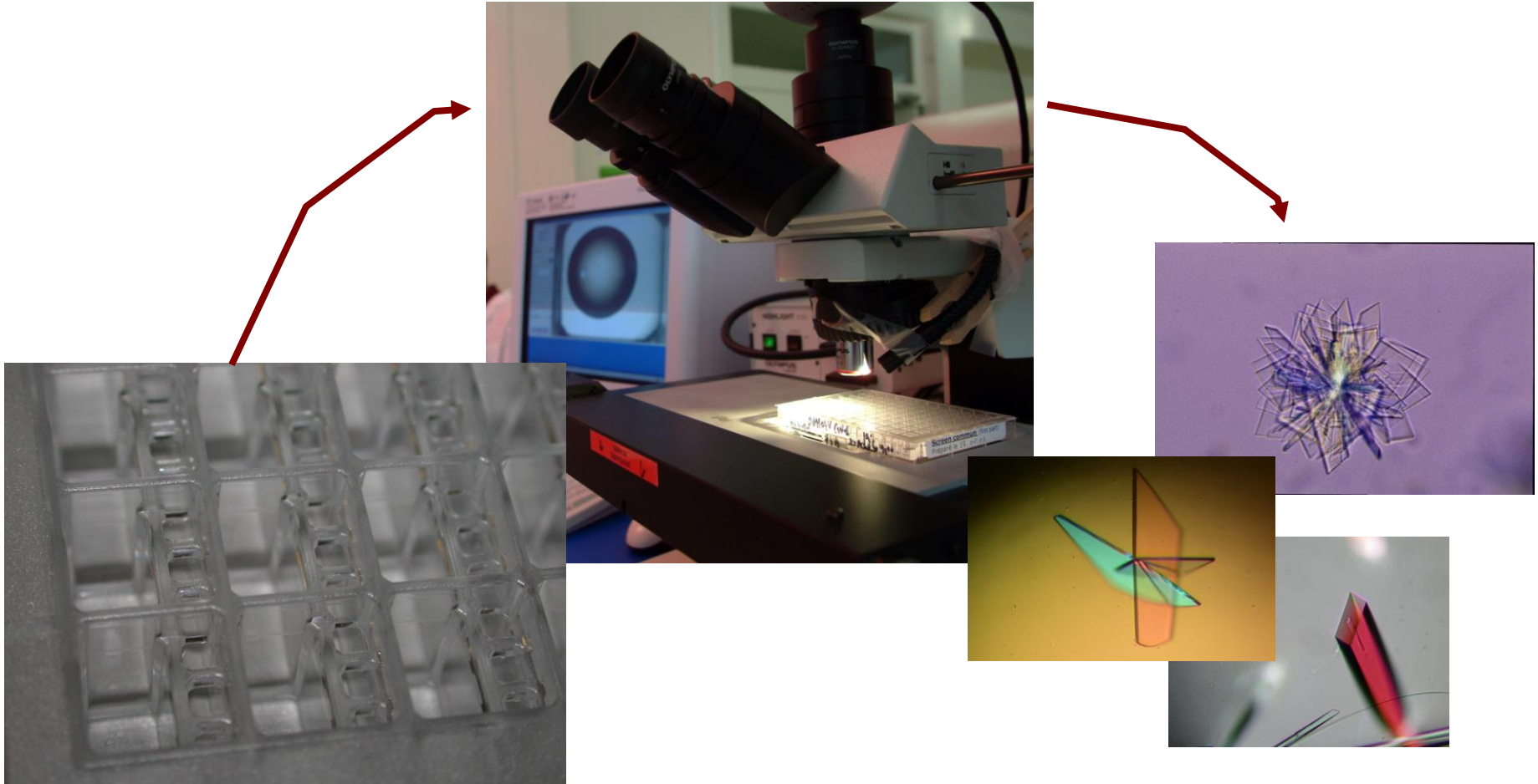


# PLATAFORMA DE ALTO RENDIMIENTO DE CRISTALIZACION



Conexión telemática a la Crystal Farm

# APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL- LA OBSERVACIÓN



## Técnicas de alto rendimiento



Dispensación de gotas de nanolitros.

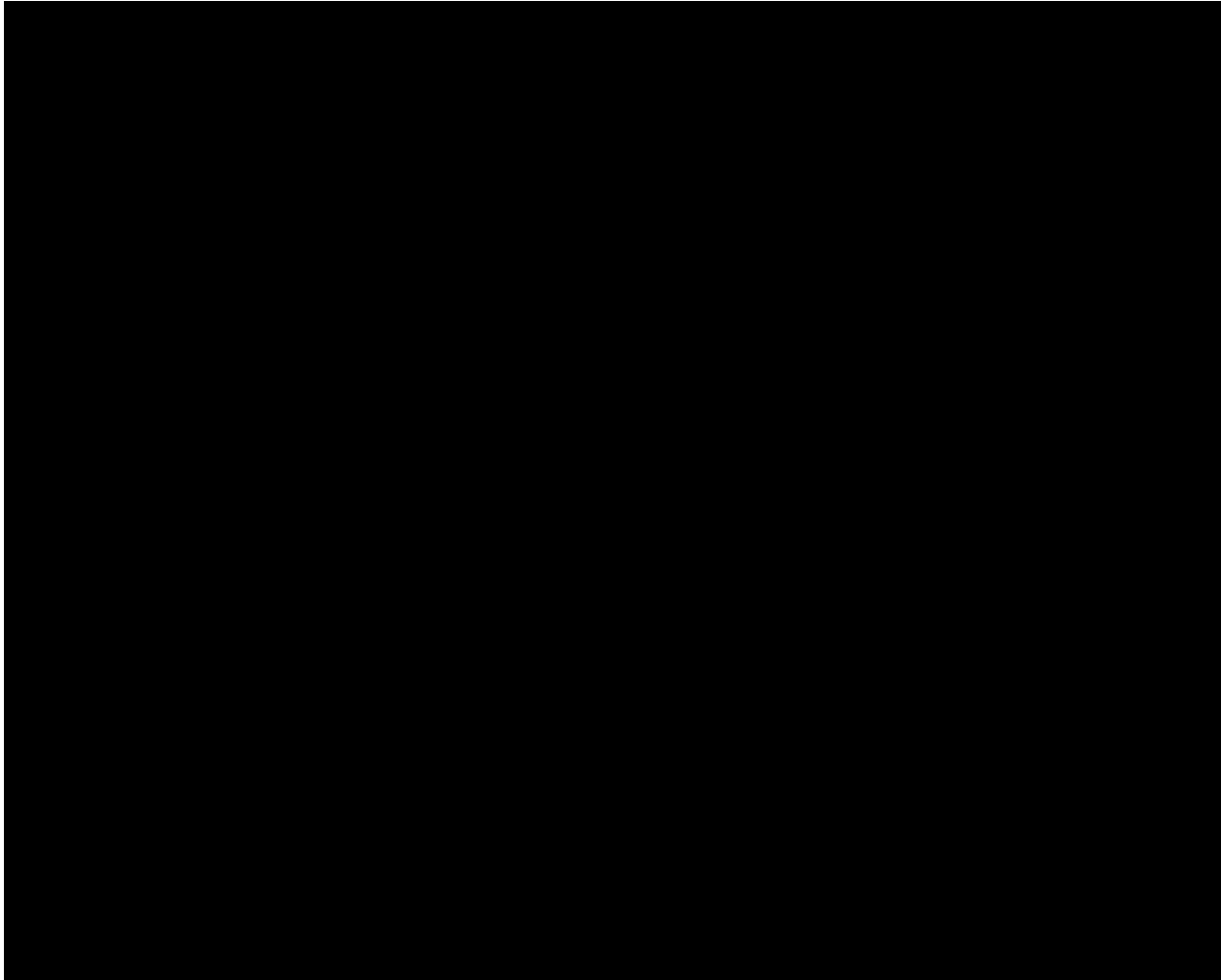
Gasto de muy poca proteína.

Producción de screenings masivos.





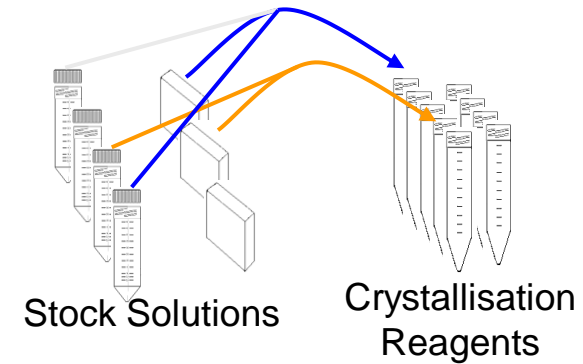
## Gota Sentada



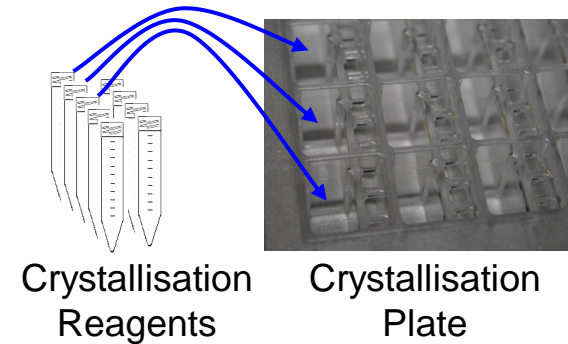


## Experimental Approach

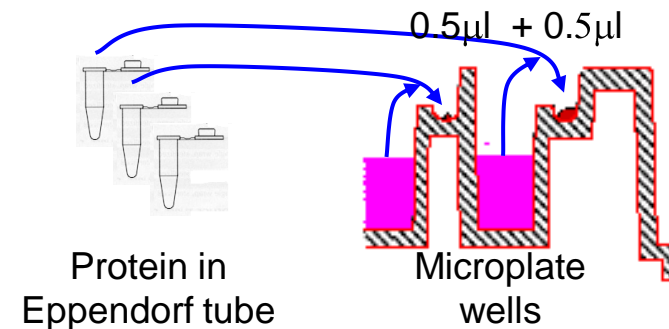
**Preparation of Screens from stock solutions**



**Filling wells of crystallization plate**



**Setting up experiment of protein drop and crystallization reagent**

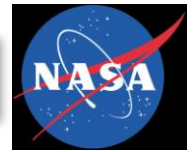


# CRISTALIZACION - GENERALIDADES



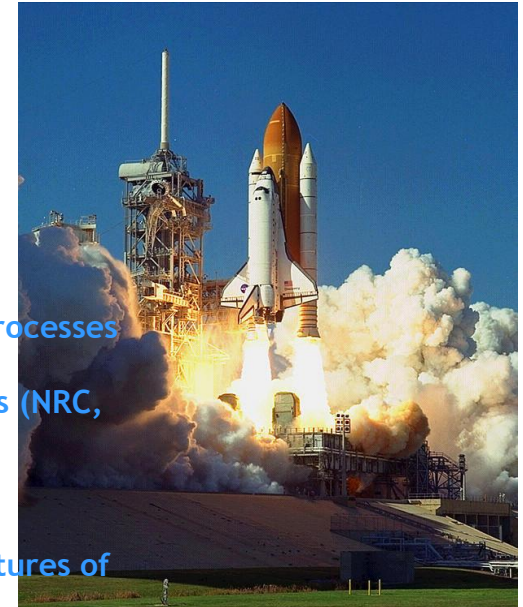
- There are at least 100'000 different proteins in a human body. Many of them in slightly different forms
- Of less than 10'000 is the structure known
- Most crystals grew at a pH between 6 and 8
- Crystallization trials are done at: 4°C, 20 or 22°C
- Most crystals were grown at 10mg/ml protein
- Hanging drop crystallization was the most successful approach (usually optimization of conditions with sitting drop and then hanging drop for the final experiment)

# CRISTALIZACION EN EL ESPACIO



□ OLD

- Quantify the role of gravity in macromolecular crystal growth processes
  - Microgravity Research Opportunities for the 1990's (NRC, 1995)



□ NEW

- Determine macromolecular structures of "hot" biological systems
  - Future Biotechnology Research on the International Space Station (NRC, 2000)



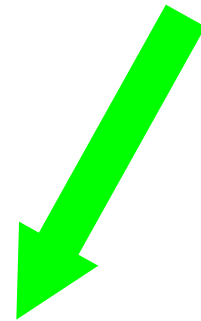
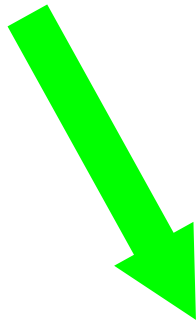
# CRISTALIZACION



Difusión de  
vapor

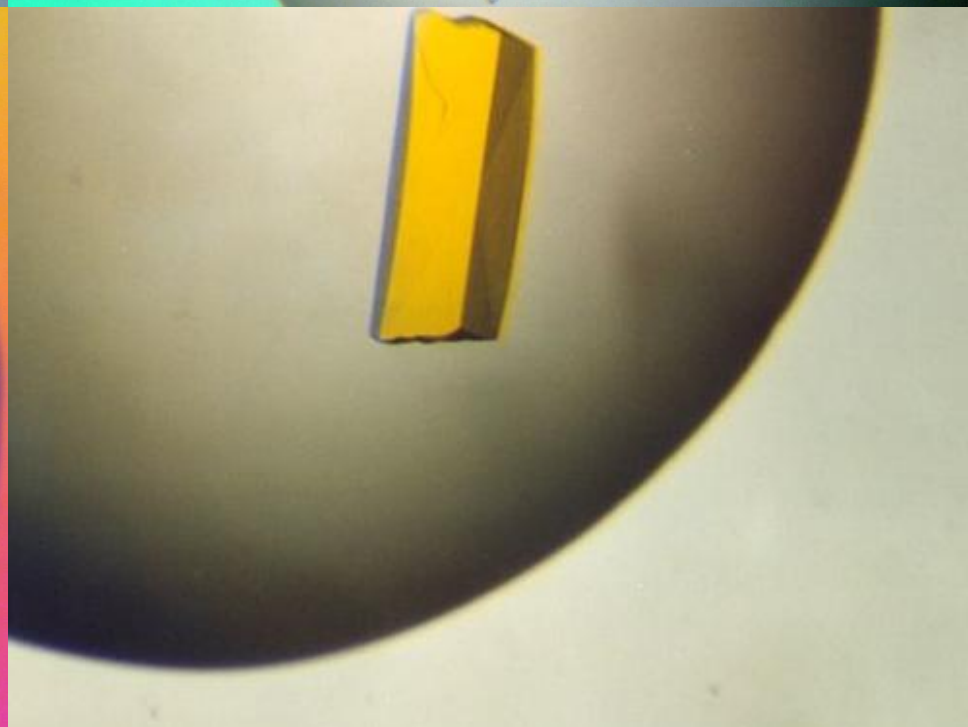
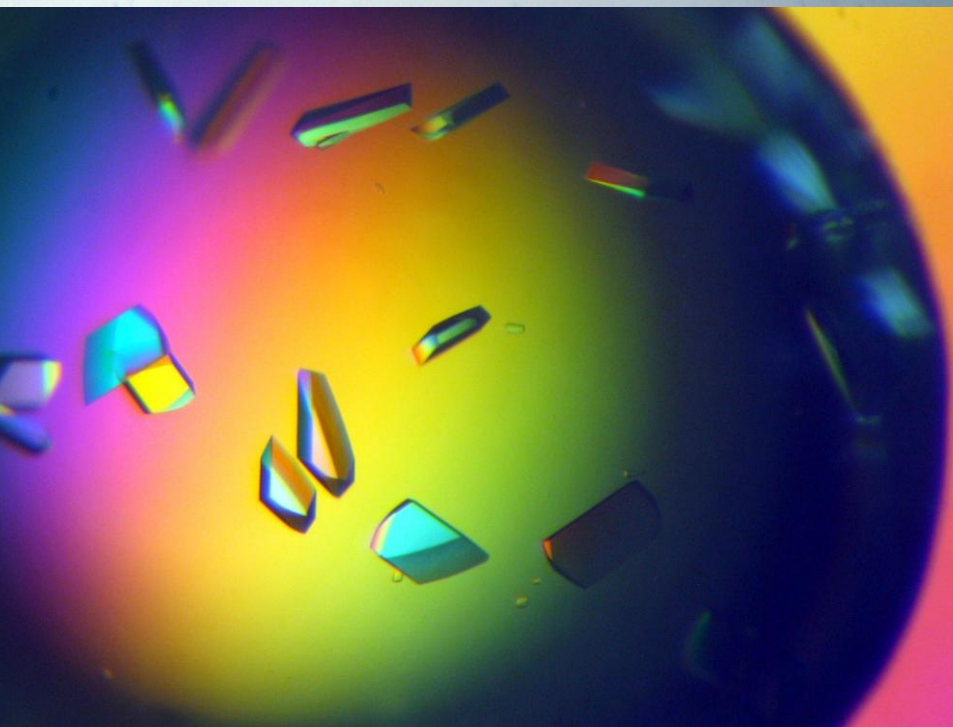
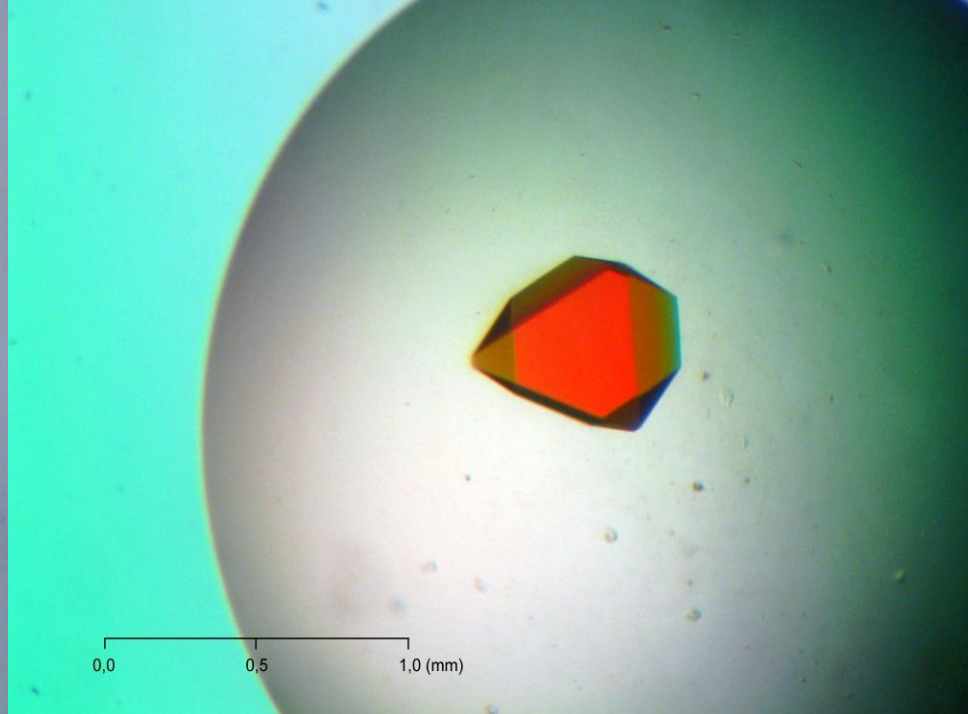
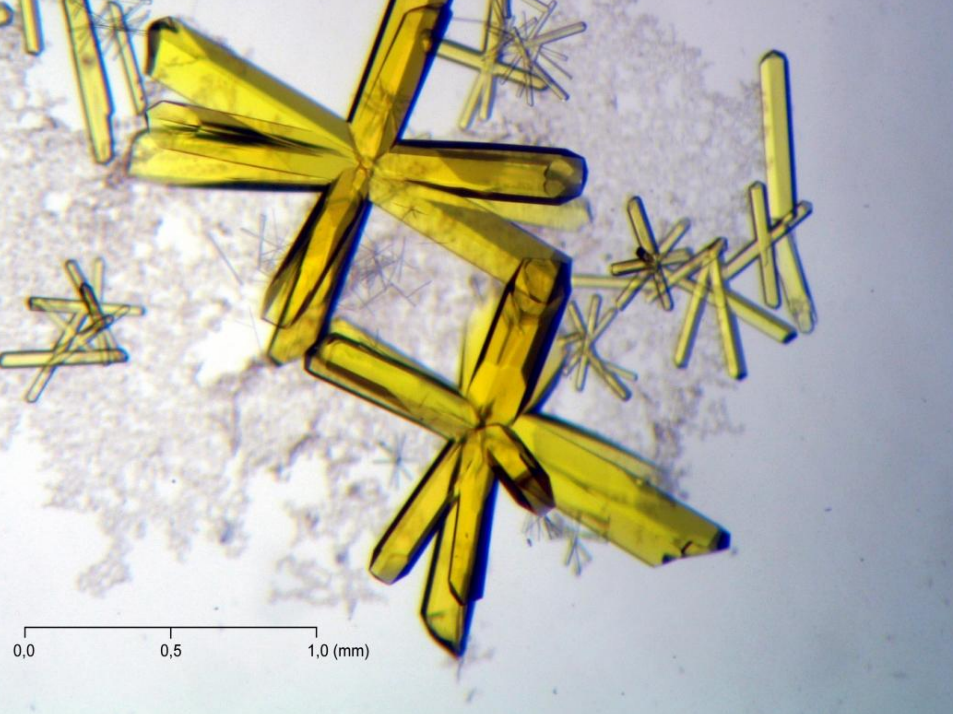
Cristalización  
con Robots

Cristalización  
en el espacio



Cristal de proteína







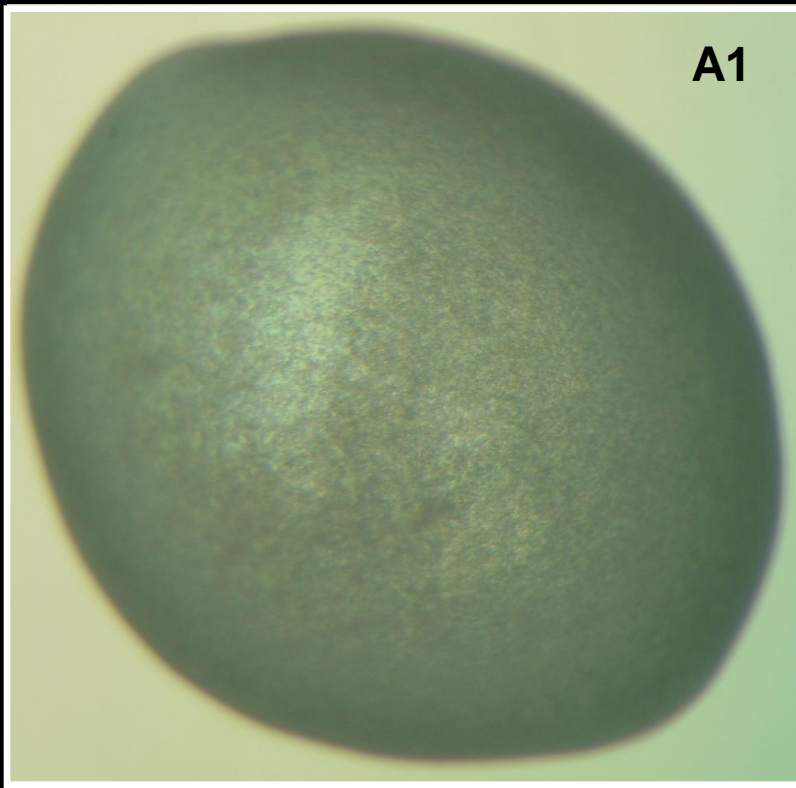
## ***ESTRATEGIAS PARA LA CRISTALIZACIÓN:***

- **Estudiar a fondo la solubilidad de nuestra proteína.**
- **Analizar su pureza.**
- **Homogeneidad: ¿existe proteólisis?**
- **¿Necesita algún aditivo? (Detergente, ligando....)**

**SOBRE TODO MUCHA PACIENCIA Y PERSEVERANCIA!!..**

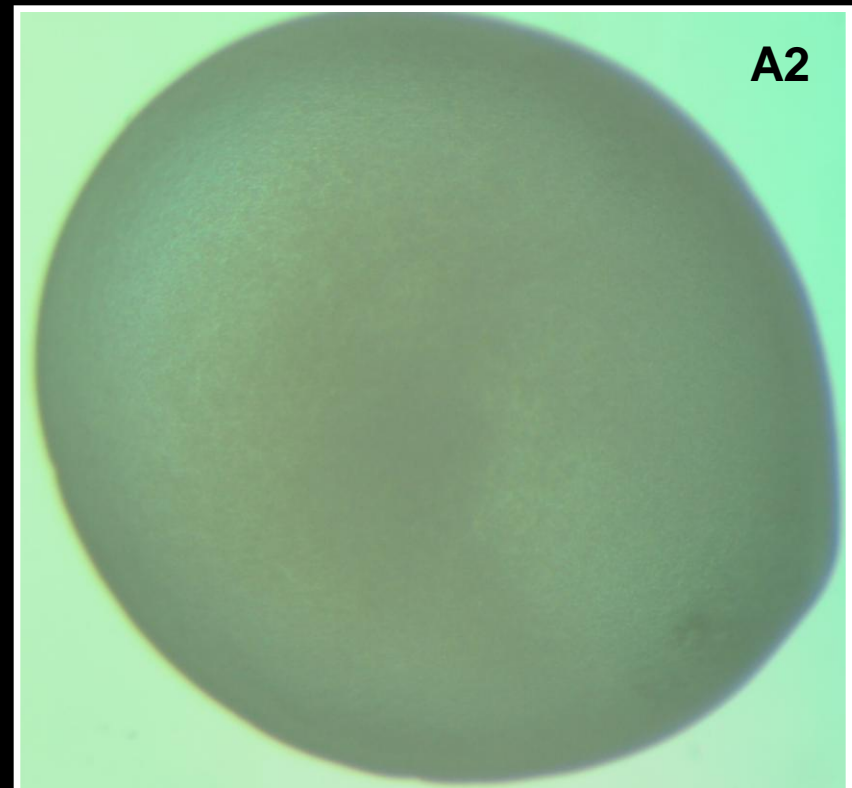
# 1- La cristalización real: *Hydralisina*

Precipitado microcristalino



0.5 M(NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.1 M citrato Na<sup>+</sup>, pH 4.5

Precipitado microcristalino

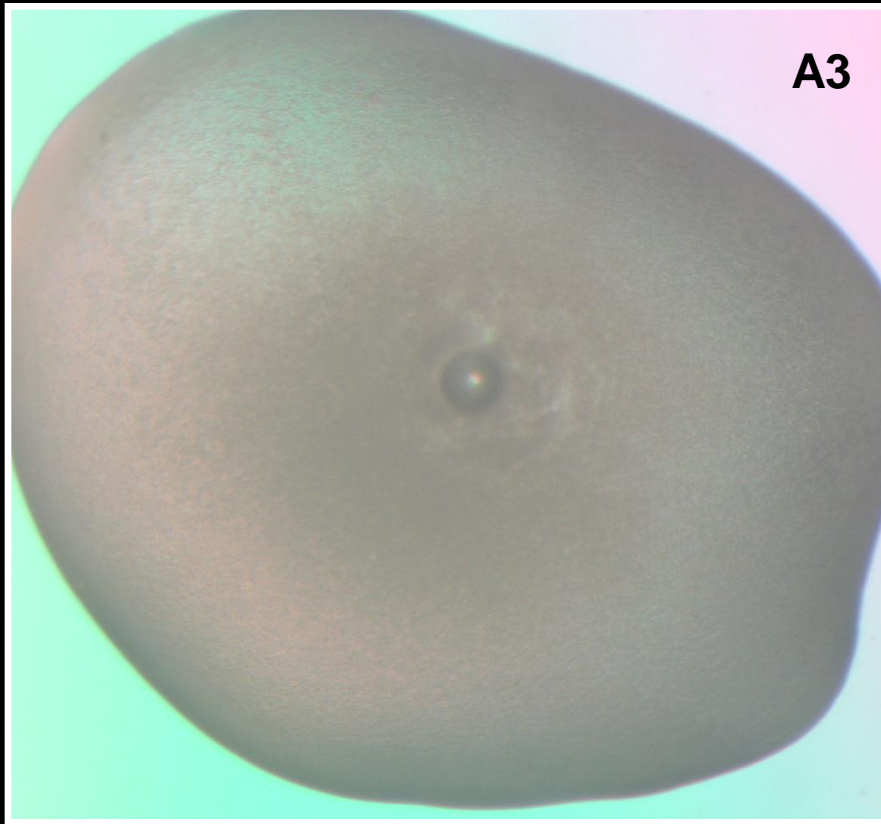


0.7 M(NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.1 M citrato Na<sup>+</sup>, pH 4.5



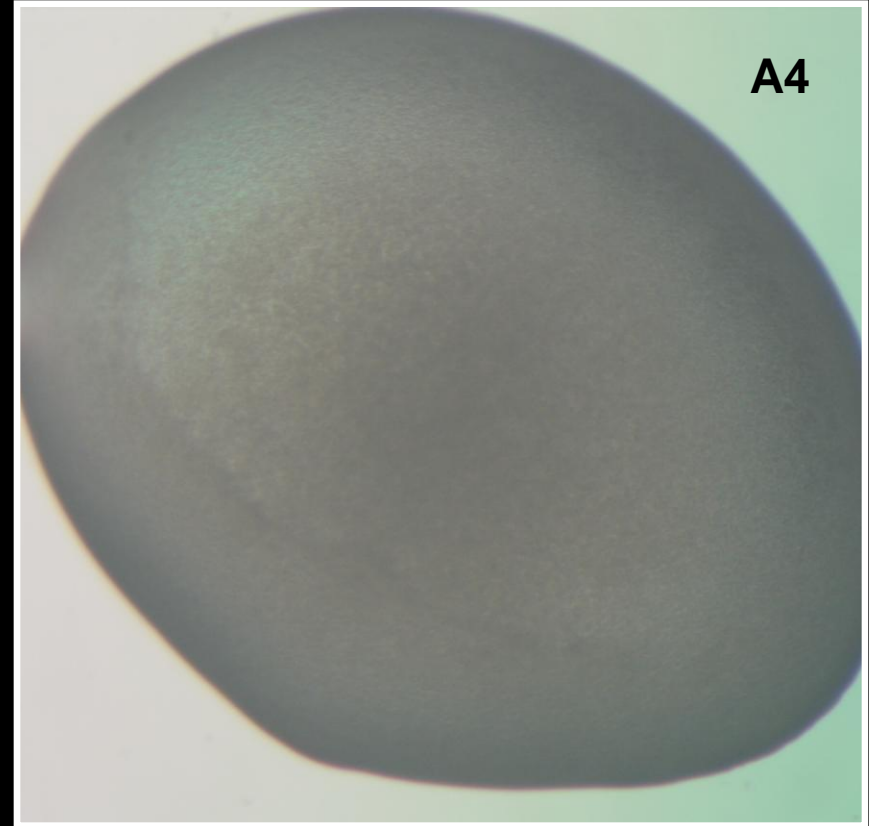
# 1- La cristalización real: *Hydralisina*

Precipitado



0.9 M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 0.1 M citrato  $\text{Na}^+$ , pH 4.5

Precipitado

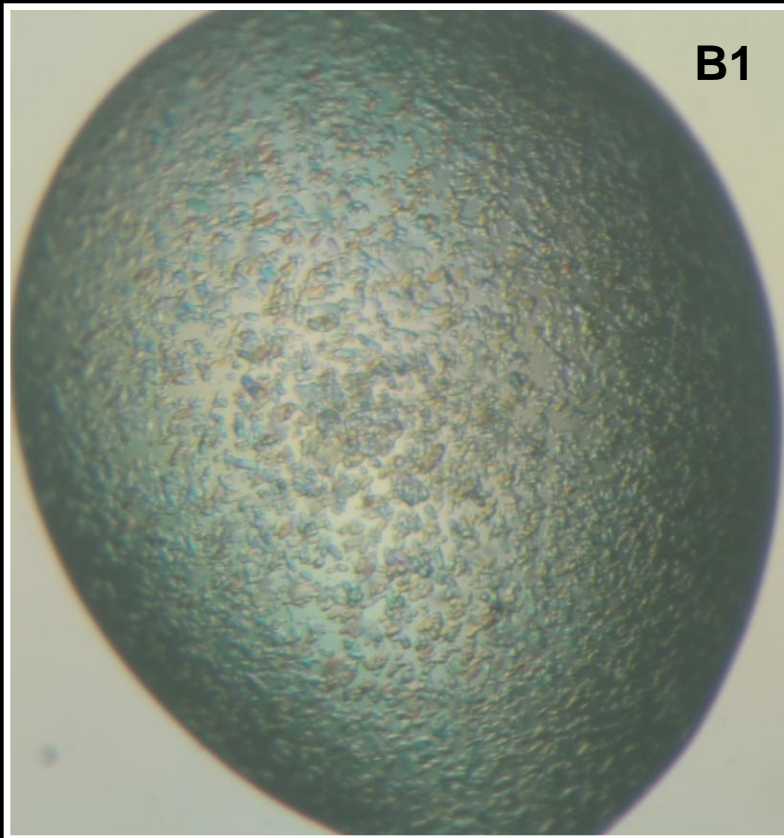


1.1 M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 0.1 M citrato  $\text{Na}^+$ , pH 4.5



# 1- La cristalización real: *Hydralisina*

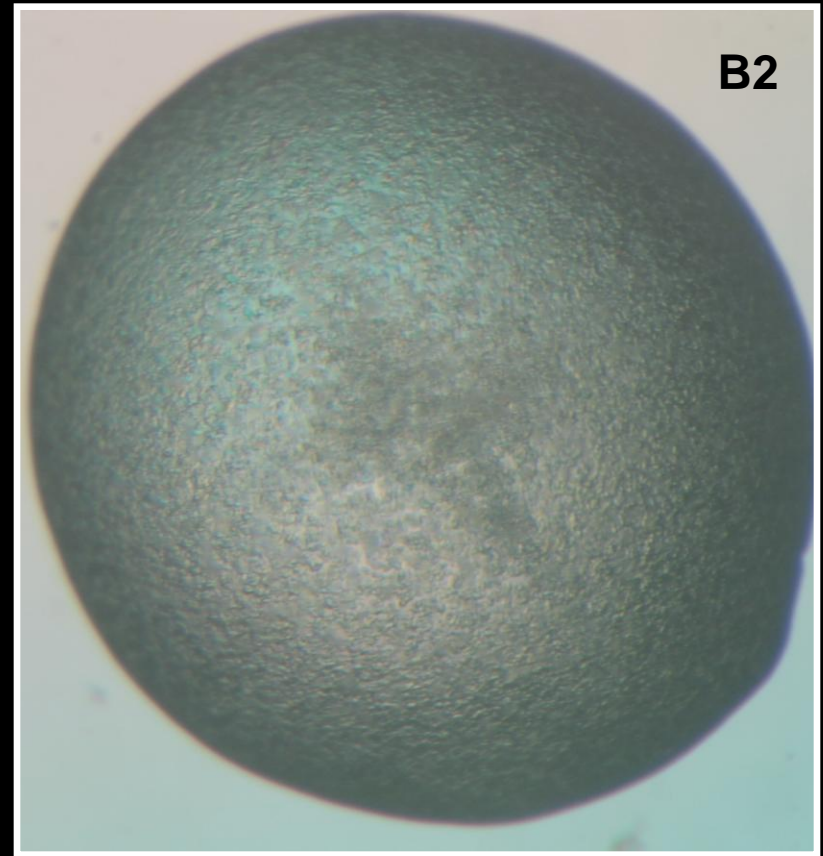
**Microcristales**



**B1**

0.5M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 0.1 M citrato  $\text{Na}^+$ , pH 5.0

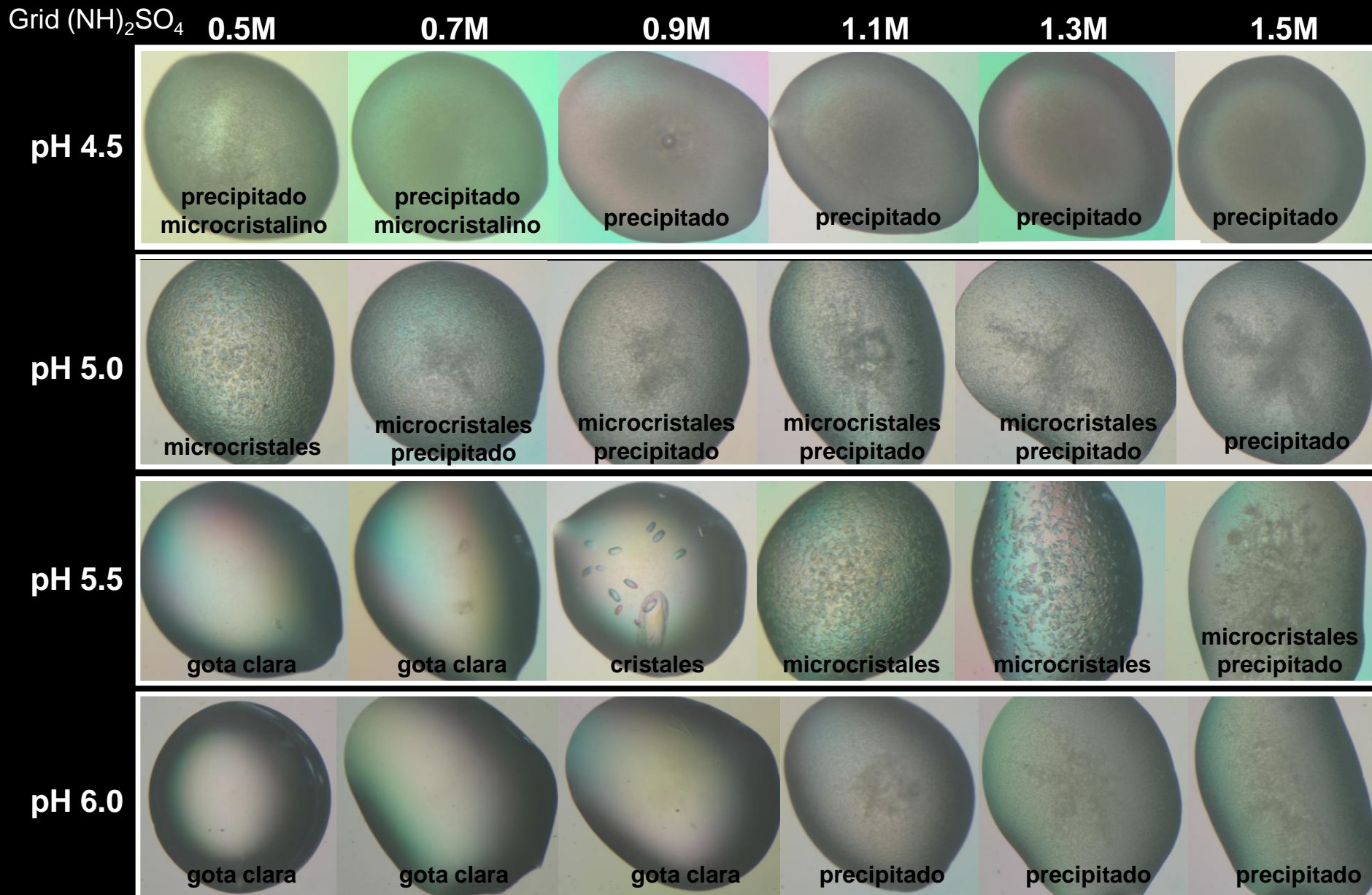
**Microcristales  
precipitado**



**B2**

0.7M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 0.1 M citrato  $\text{Na}^+$ , pH 5.0

# 1- La cristalización real: Hydrálisina



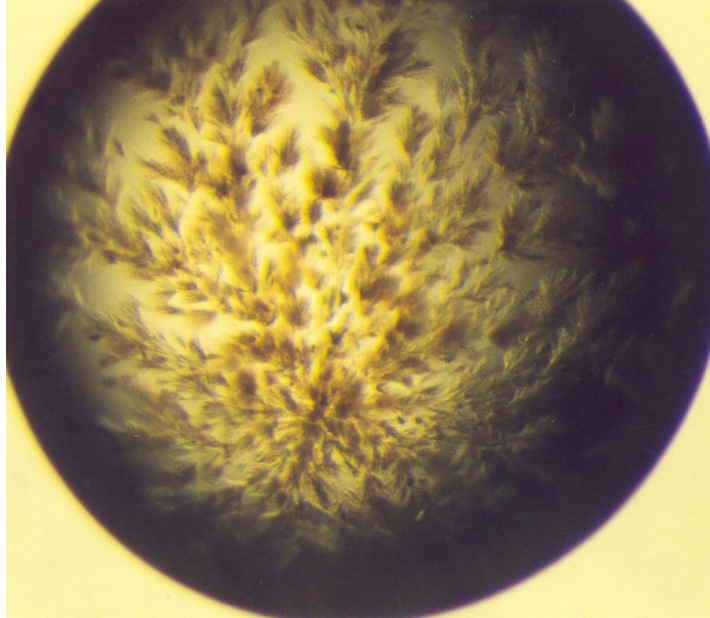
## 2- La cristalización real: Endolisina Cpl-1 (39 KDa)

Cpl1, una proteína modular muy difícil de cristalizar.....

**Con 20 mM colina**



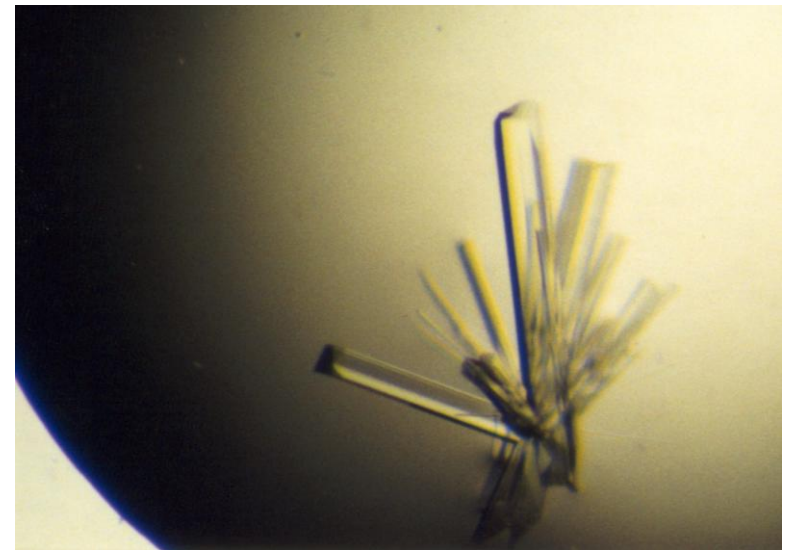
15% PEG 10K  
0.1 M Tris pH 8.0



**Sin colina**



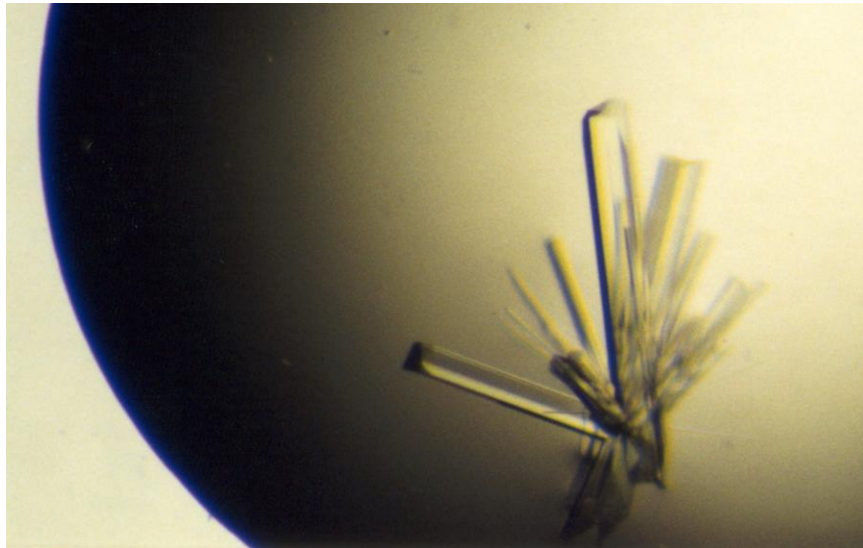
1.7 M formiato sódico  
0.1 M citrato sódico pH 6.0



**¡¡¡AÑO Y MEDIO DE TRABAJO!!!!**



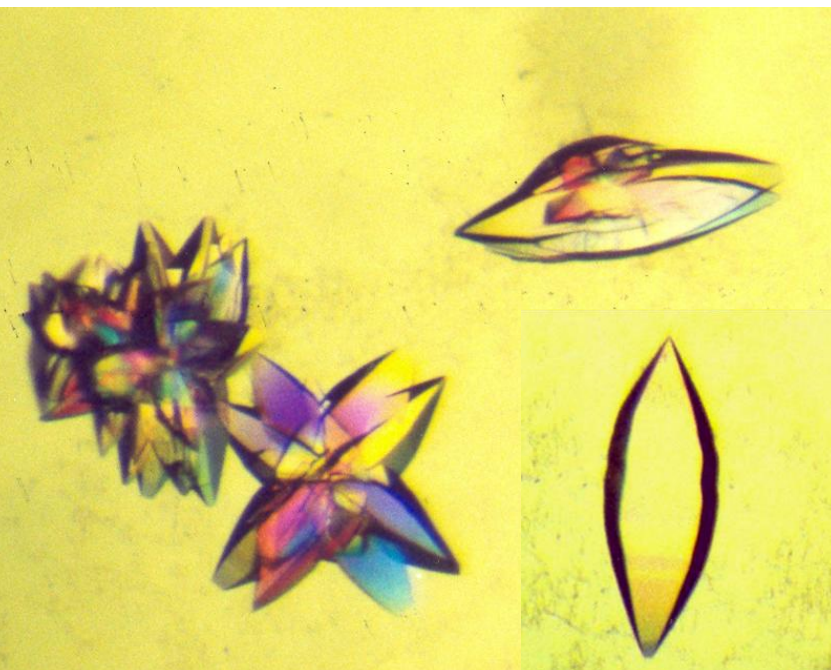
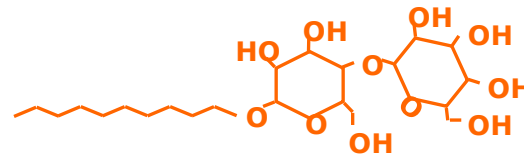
## 2- La cristalización real: Endolisina Cpl-1 (39 KDa)



1.7 M formiato sódico  
0.1 M citrato sódico ( pH 6.0 )



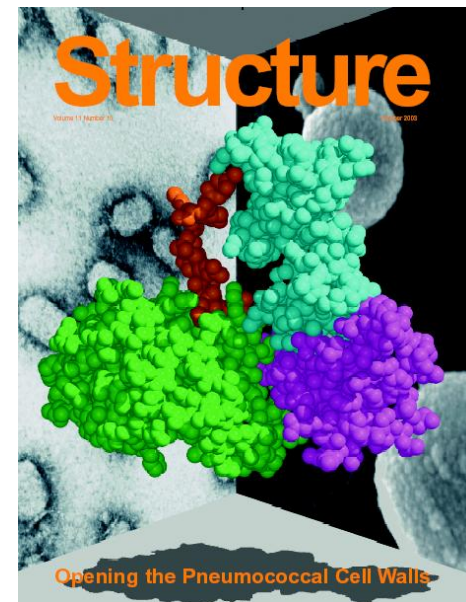
**NO DIFRACTAN!!!!!!**



1.7 M formiato sódico  
0.1 M citrato sódico ( pH 6.0 )  
**1.8 mM n-decil-β-D-maltosido**



**DIFRACCIÓN  
HASTA 2.0 Å !!!**



### 3- La cristalización real: PLRP2 (60 KDa)

PLRP2, una proteína que no cristaliza con los screens, pero ....

Al añadirle detergente cristaliza en minutos!!!!

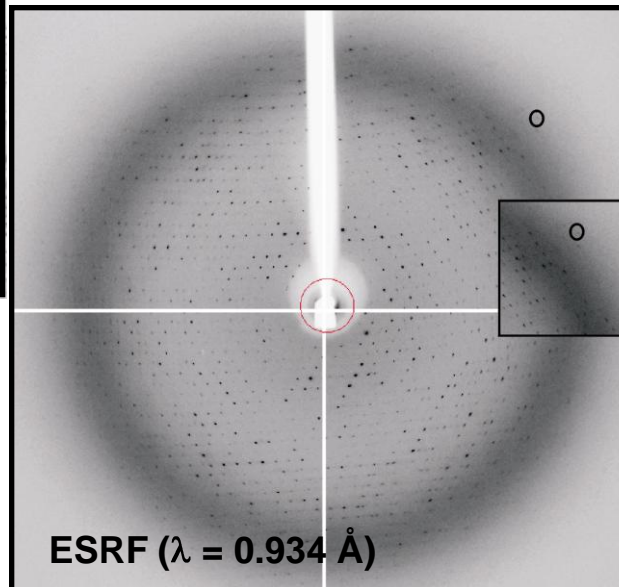
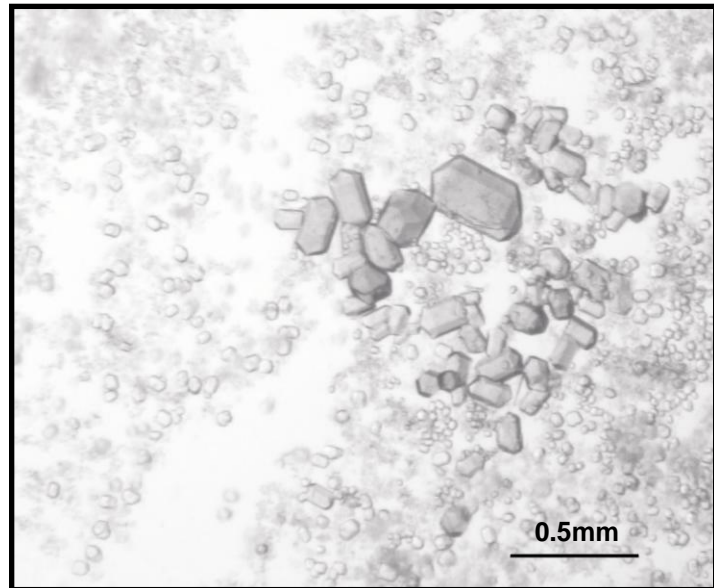
[PLRP2]: 10 mg/ml

Sol.

cristalización: PEG 6000 28% (w/v)  
Tris/Gly 0.1 M (pH 8.5)



**DDAO 20mM** (óxido de N,N-dimetil decilamina)

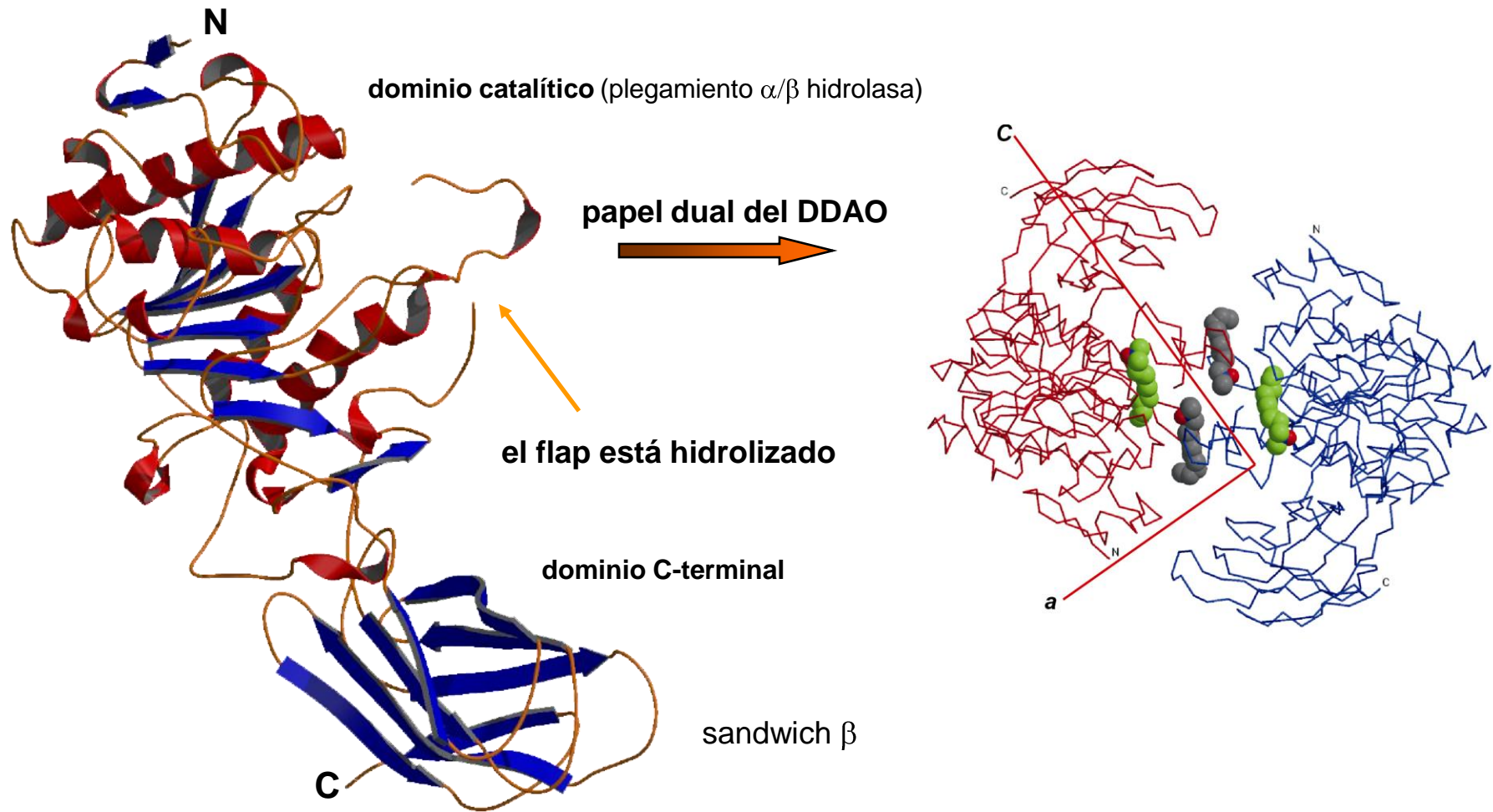


ESRF ( $\lambda = 0.934 \text{ \AA}$ )

El 95% están maclados  
(resolución 7-5  $\text{\AA}$ )

Fuente	Sincrotrón (ESRF)
G. espacial	$P3_221$
Celdilla ( $\text{\AA}$ )	128.4;128.4;85.8
Resolución	50-2.9 $\text{\AA}$
solvente(%)	70

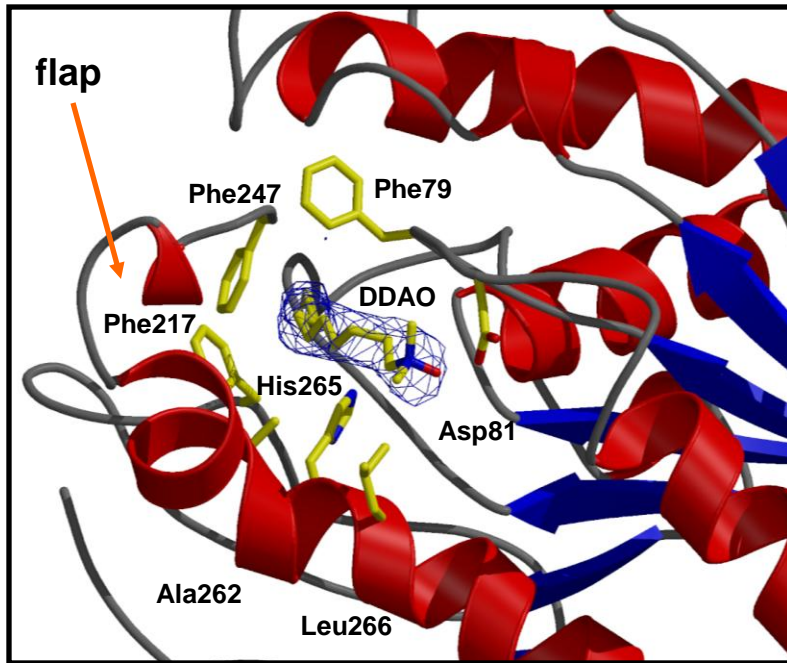
### 3- La cristalización real: PLRP2 (60 KDa)



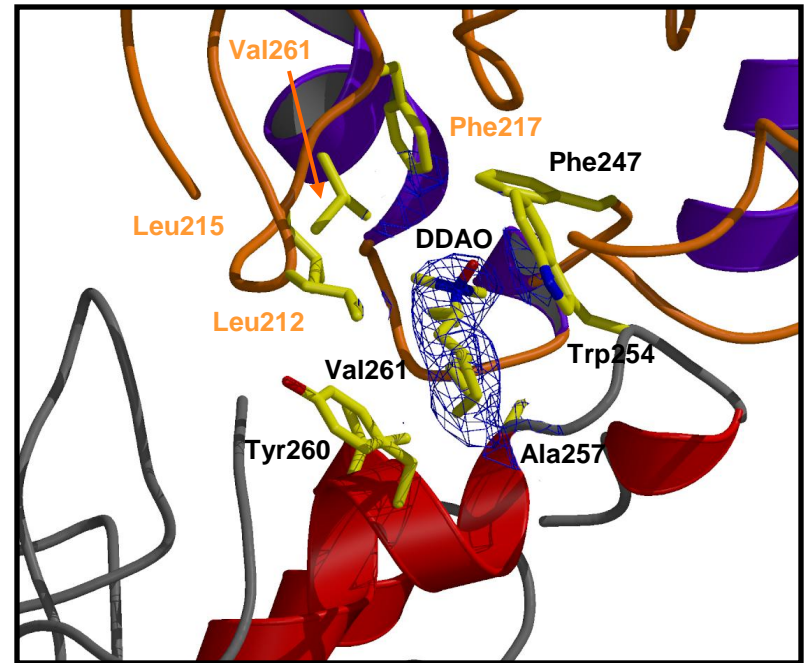


# 3- La cristalización real: PLRP2 (60 KDa)

estabilización “intramolecular”



estabilización “intermolecular”

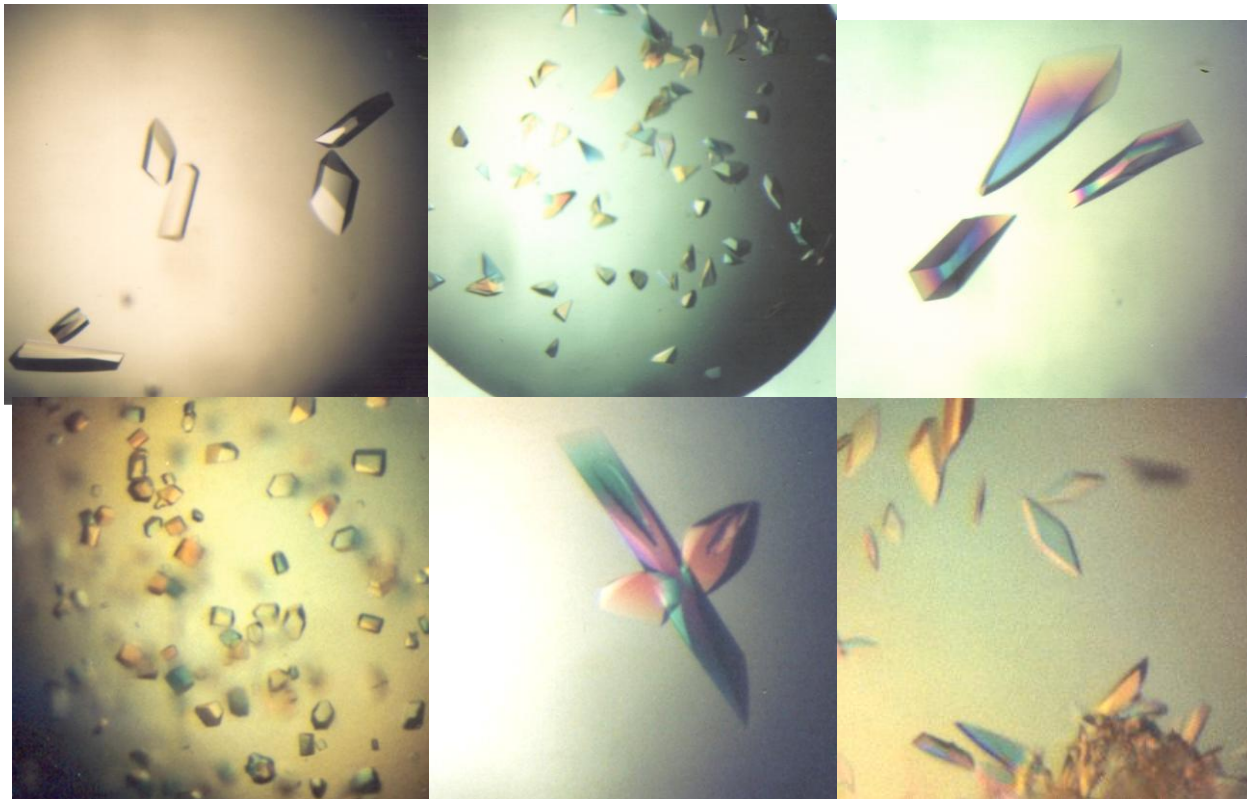


J.M. Mancheño, S. Jayne, B. Kerfelec, C. Chapus, I. Crenon y J.A. Hermoso.  
*Acta Crystallog. D.* 2004, *D60*, 2107-2109.

## 4- La cristalización real: CbpF (40 KDa)

**CbpF, una proteína muy inestable.....  
(precipitó en masa en todos los ensayos de  
cristalización)**

**!!!!!!que produce excelentes cristales!!!!!!**



**Alta concentración  
de colina (120mM)  
es imprescindible  
para estabilizar la  
CbPF**



## 4- La cristalización real: CbpF (40 KDa)

### con Sulfato Amónico

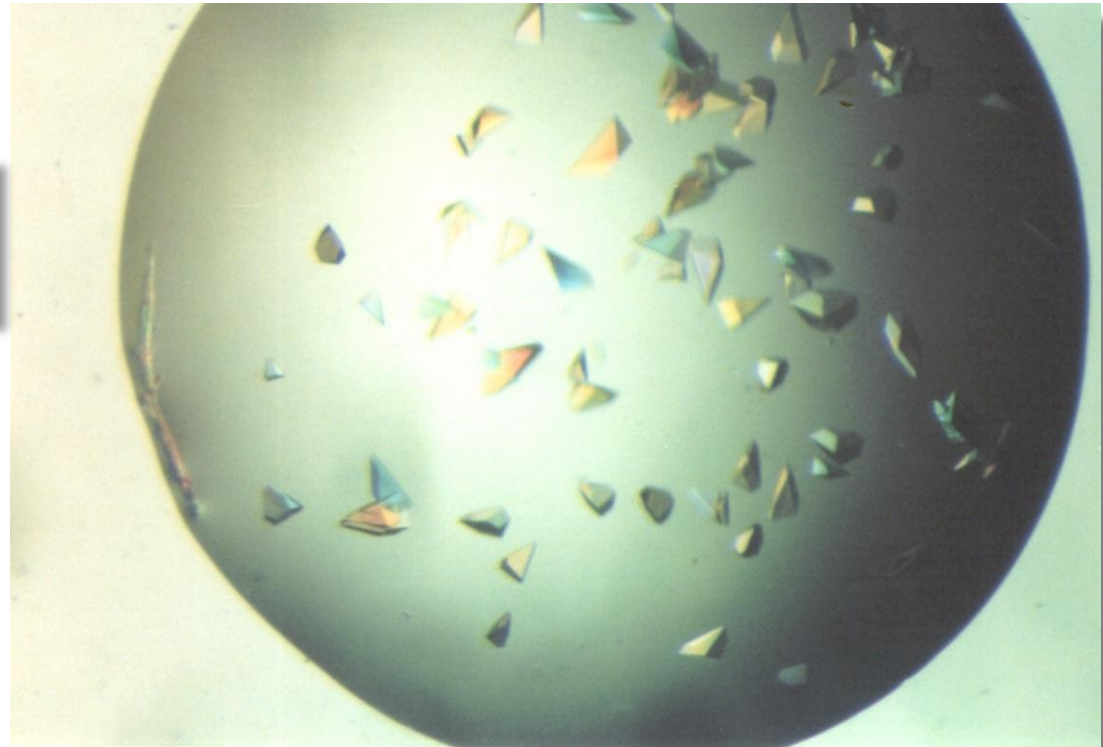
Prismas triangulares

0.1 M NaCl

0.1 M Bis-Tris pH = 6.5

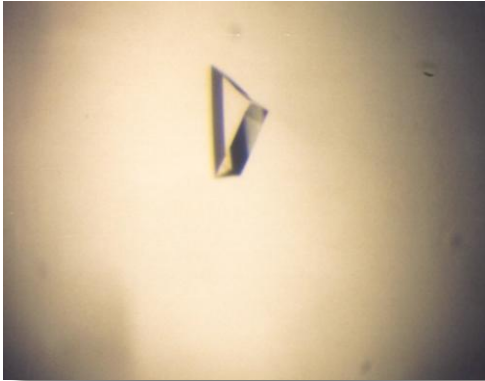
**1.5 M Sulfato Amónico**

Todas los hábitos cristalinos aparecen en 2 días!!

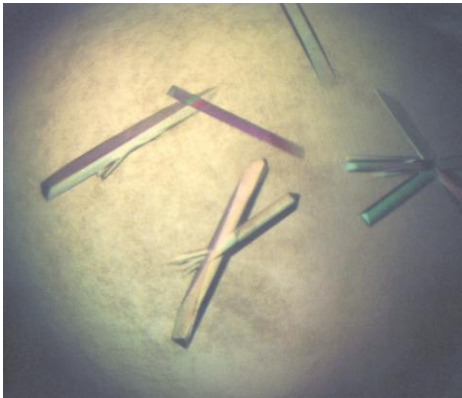


# 4- La cristalización real: CbpF (40 KDa)

0.1 M Acetato Sódico **pH = 4.5**  
25% PEG 3350

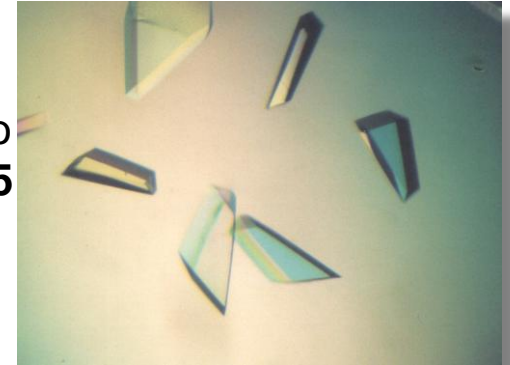


0.005M  $\text{CoCl}_2$  + 0.005 M  
 $\text{CdCl}_2$  + 0.005M  $\text{MgCl}_2$   
12% PEG 3350  
0.1 M Tris **pH = 7.5**

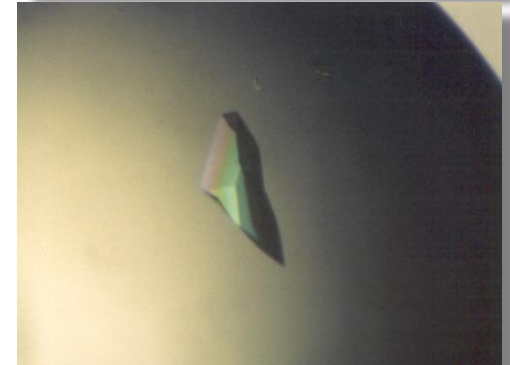


con **PEG 3350**

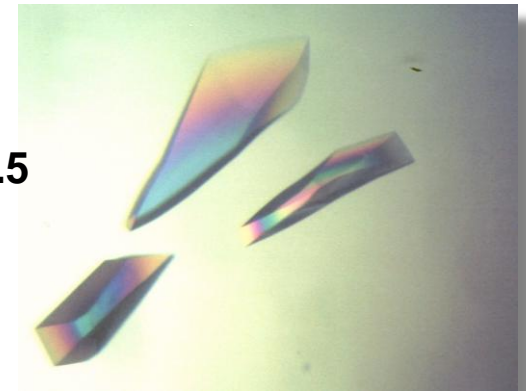
0.2 M Acetato Amónico  
0.1 M Bis-Tris **pH = 5.5**  
25% PEG 3350



0.2 M Acetato Sódico  
0.1 M Bis-Tris **pH = 5.5**  
25% PEG 3350



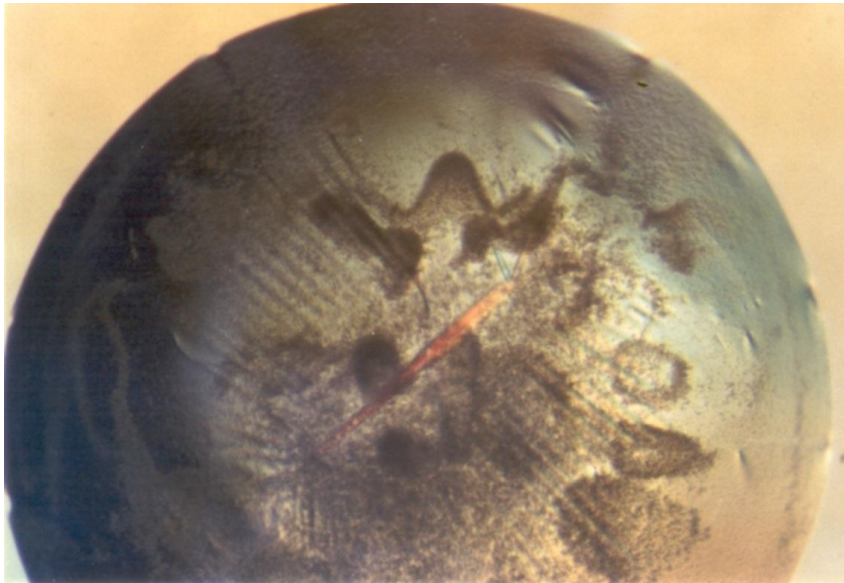
0.2 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$   
0.1 M Bis-Tris **pH = 5.5**  
25% PEG 3350



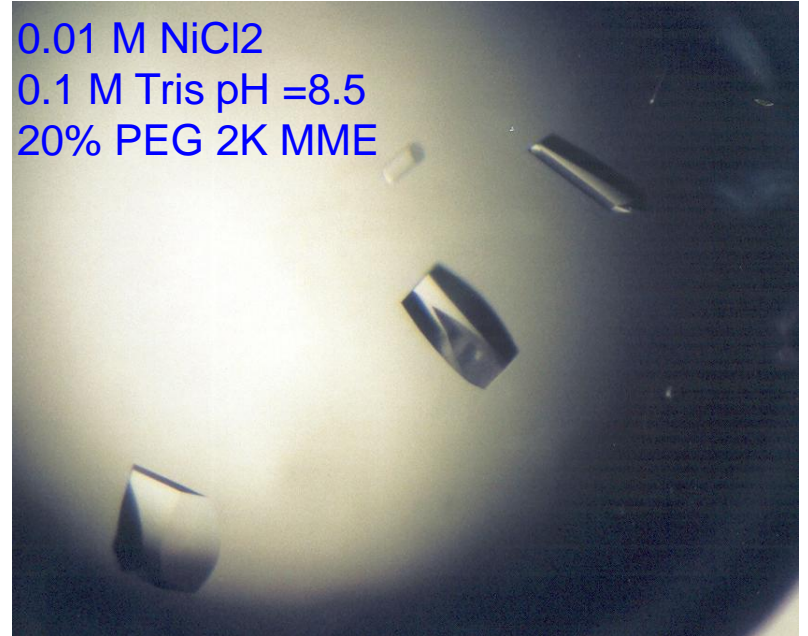
# 4- La cristalización real: CbpF (40 KDa)

0.2 M Sulfato Amónico  
0.1 M Cacod Na pH = 6.5  
**30% PEG 8K**

**con PEG MME 2000**



0.01 M NiCl<sub>2</sub>  
0.1 M Tris pH = 8.5  
20% PEG 2K MME



Grupo Espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
a (Å)	52.40
b (Å)	115.79
c (Å)	72.98

**Max. resol = 2.1 Å (A. rotatorio)**

Grupo Espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
a (Å)	49.13
b (Å)	114.94
c (Å)	75.69

**Max. resol = 1.6 Å !!!!! (A. rotatorio)**



# 5- La cristalización real: Pce (70 KDa)

**Pce, una proteína modular que cristalizó muy rápidamente con y sin colina...**

**Con 10 mM colina**



0.1 M Bis-Tris pH = 6.5  
20% PEG MME 5K

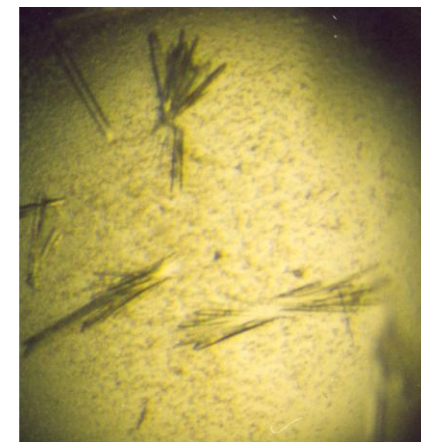
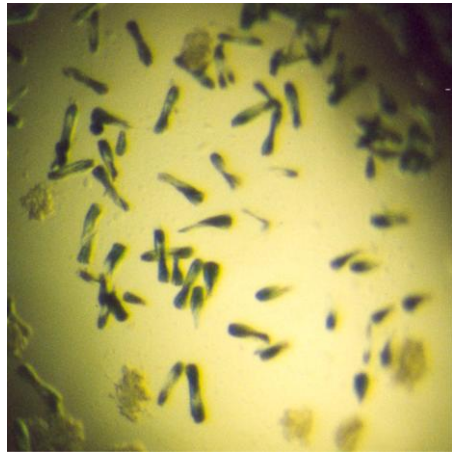
0.1 M Bis-Tris pH = 6.5  
0.2M Sulfato Litio  
25% PEG 3350

0.1 M Tris pH = 8.5  
25% PEG 3350

**Sin colina**



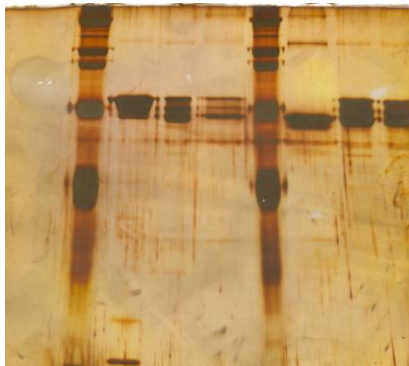
0.1 M Bis-Tris pH = 6.5  
0.1M EDTA  
20% PEG MME 5K



# 5- La cristalización real: Pce (70 KDa)



Inhomogeneidad comprobada en GEL



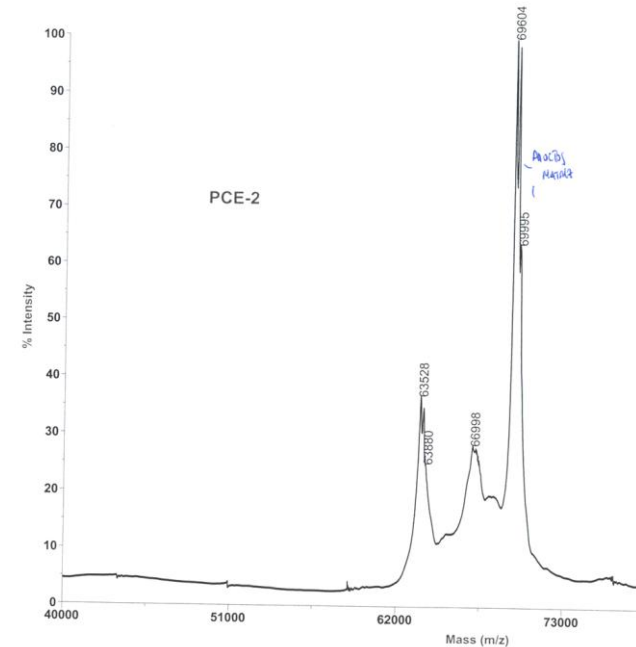
DATOS DE DIFRACCIÓN HASTA 3.0 Å



No se pueden procesar



Análisis por espectrometría de masas



Decidimos cortar la proteína!!

# 5- La cristalización real: Pce (70 KDa)

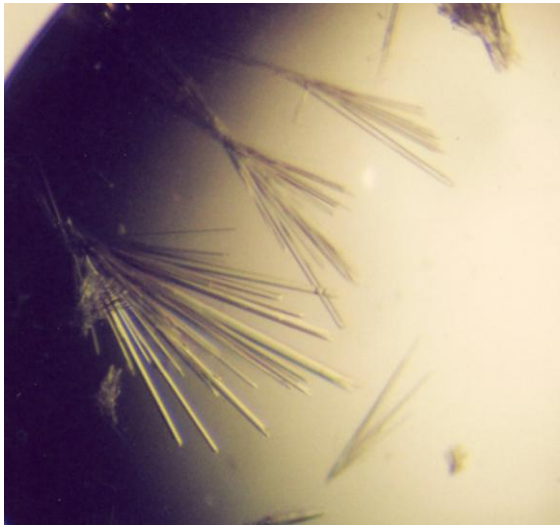
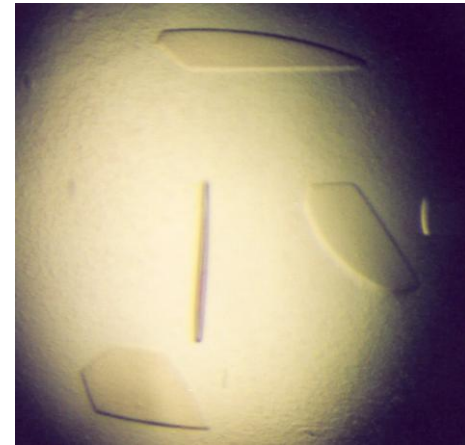
Las condiciones de cristalización se repiten...

....Y además obtenemos otras nuevas

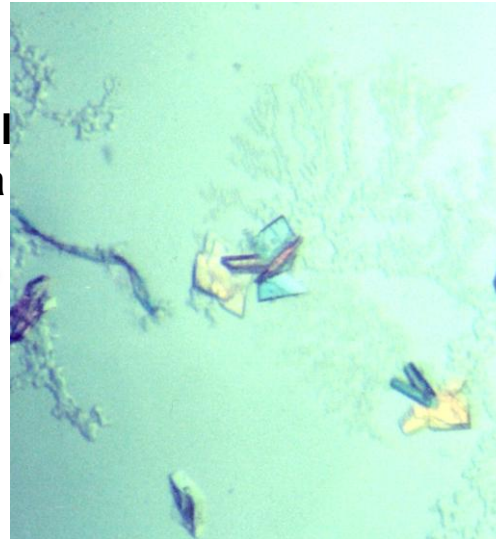
**Sin colina**



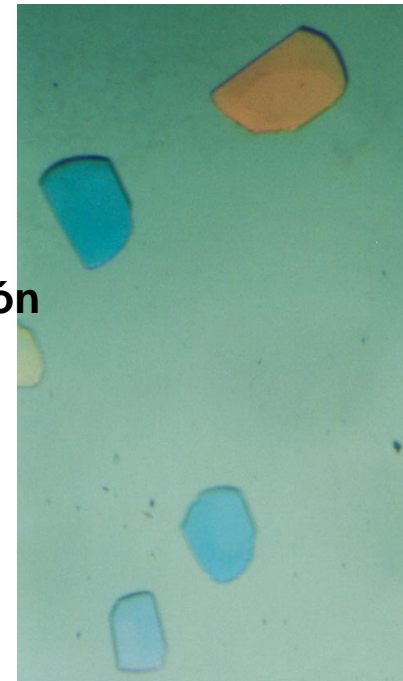
0.1 M Bis-Tris pH = 5.5  
0.1M Ac amónico  
17% PEG 10K



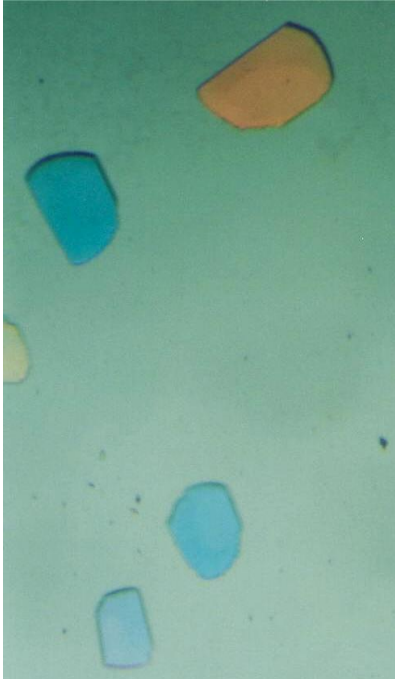
+  
N-dodecil  
foscolina



optimización



# 5- La cristalización real: Pce (70 KDa)



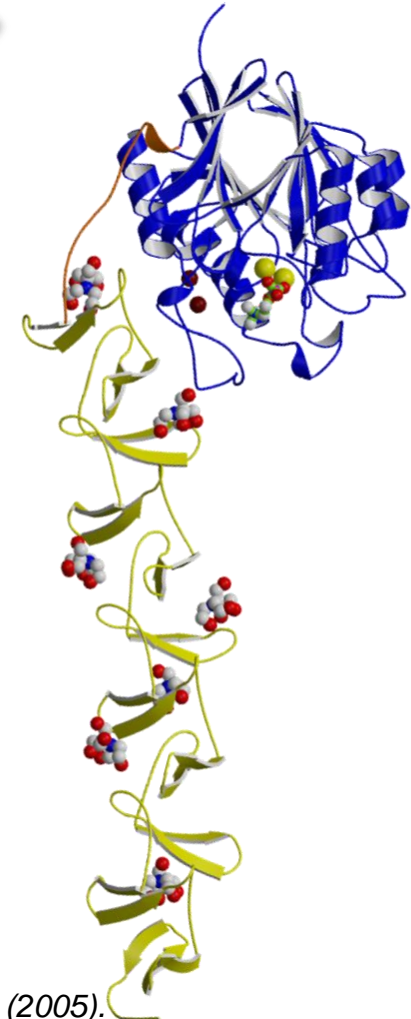
**DIFRACCIÓN  
HASTA 2.1Å  
EN ANODO  
ROTATORIO**



Datos fácilmente  
procesables



<b>Grupo Espacial</b>	<b>C2</b>
<b>a (Å)</b>	<b>173.49</b>
<b>b (Å)</b>	<b>58.12</b>
<b>c (Å)</b>	<b>68.65</b>
<b>β(°)</b>	<b>108.29</b>
<b>1 molec./ unidad asimétrica</b>	

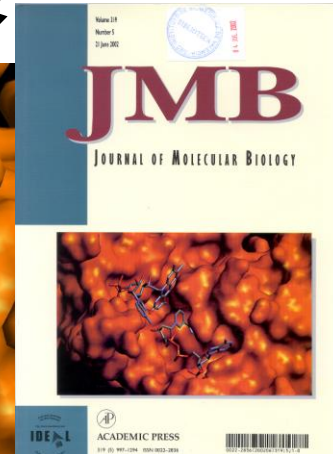
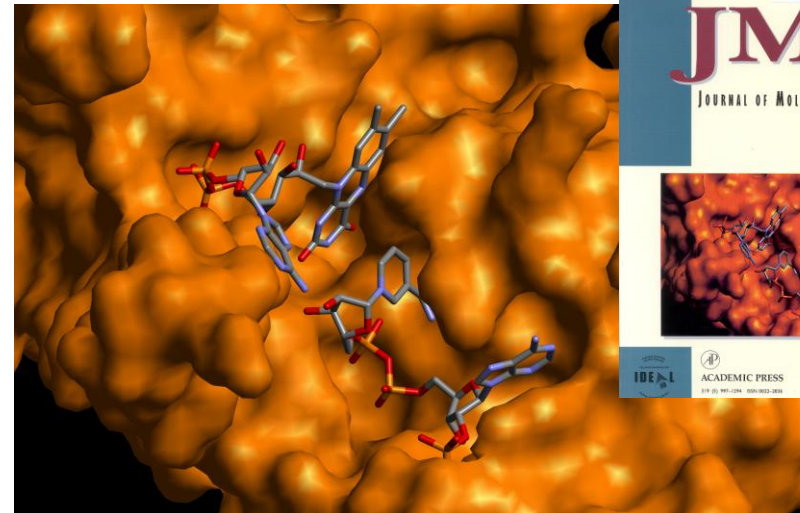
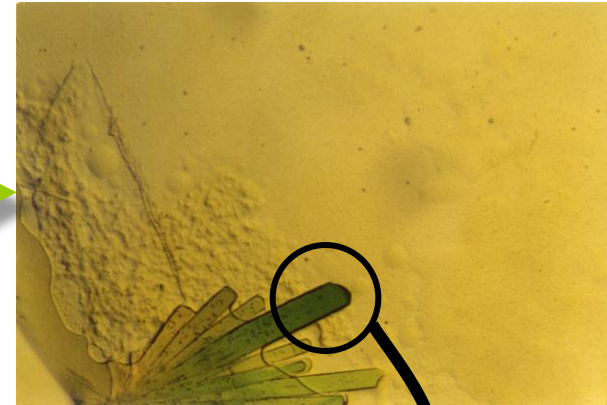




# 6- La cristalización real: Complejo FNR:NADP (34 KDa)

**Perseverar, Perseverar, Perseverar, Perseverar....**

El 99,9% de los cristales eran agujas...





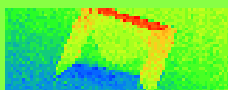
# ENLACES DE INTERES



Juan's Crystallography Working Page:  
<http://www.xtal.iqfr.csic.es/grupo/xjuan/>



Terese Bergfors' Protein Crystallization:  
<http://xray.bmc.uu.se/~terese/>



Johan Zeelen's X-tal Protocols:  
<http://www.xtal-protocols.de/xtal.html>



Enrico Stura's Crystallization Techniques:  
<http://www.chem.gla.ac.uk/protein/mirror/stura/index2.html>

HAMPTON  
RESEARCH

Hampton's Technical Bulletins:  
<http://www.hamptonresearch.com/support/>

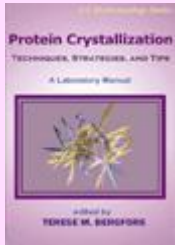


Bernard Rupp's How to Grow Protein Crystals:  
[http://www.ccp14.ac.uk/ccp/web-mirrors/lnlrupp/crystal\\_lab/cystalmake.html](http://www.ccp14.ac.uk/ccp/web-mirrors/lnlrupp/crystal_lab/cystalmake.html)



MRC (Cambridge) Protein Crystallography course:  
<http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/course.html>

# LIBROS SOBRE CRISTALIZACIÓN DE PROTEINAS



*Protein Crystallization Strategies, Techniques, and Tips. A Laboratory Manual*  
Edited by T. Bergfors









*Crystallization of Biological Macromolecules*  
Alexander McPherson, University of California, Irvine

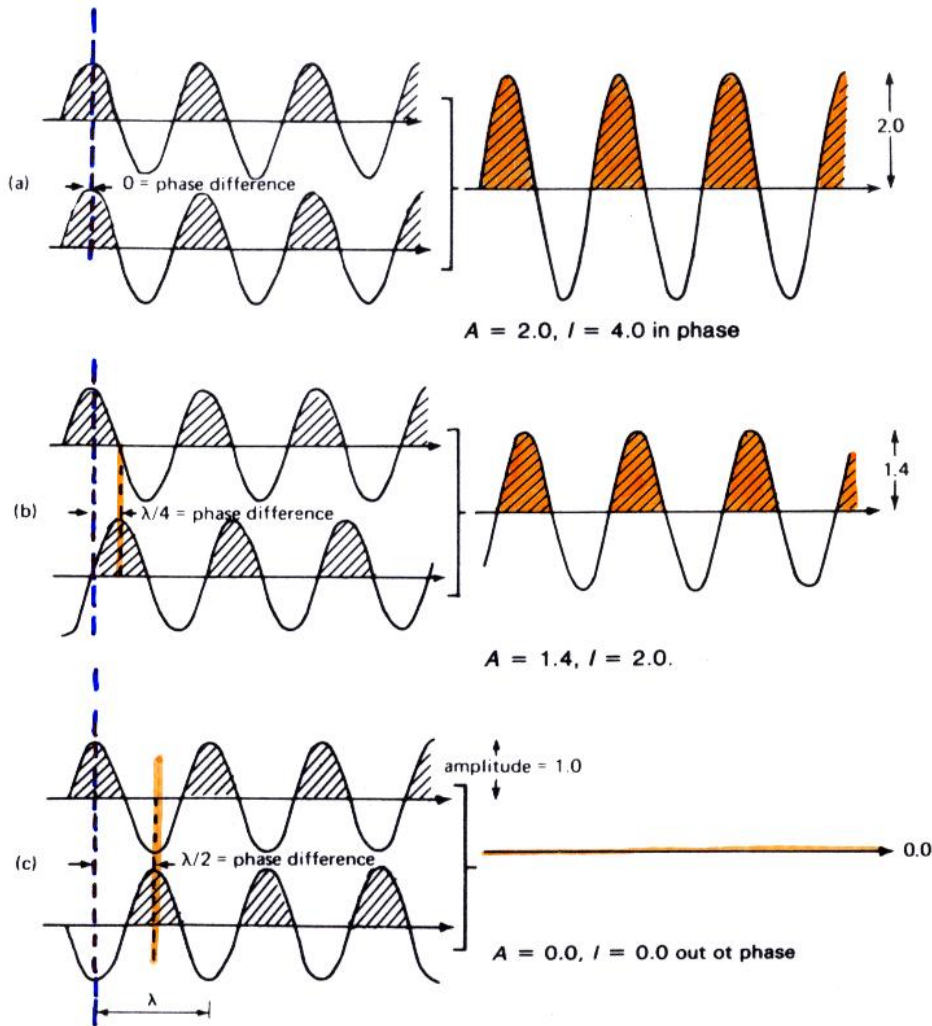


*Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach (Second Edition)*  
Edited by A. Ducruix and R. Giege.

# Difracción de Rayos X de Proteínas

1. Introducción de Rayos X.
2. Simetría.
3. Cristales y su obtención.  Fenómeno de la dispersión.
4. Difracción de Rayos X.  Interferencia de ondas.
5. Aspectos experimentales: equipos de difracción y procesamiento de datos.  Dispersión en distintos medios.
6. El Problema de la Fase: métodos de resolución estructural.  Difracción: conceptos fundamentales.
7. Refinamiento, modelado y validación estructural.  Ley de Bragg.
8. Aplicación: relaciones estructura-función.  Red recíproca y modelo de Ewald.

# Interferencia entre ondas X: difracción

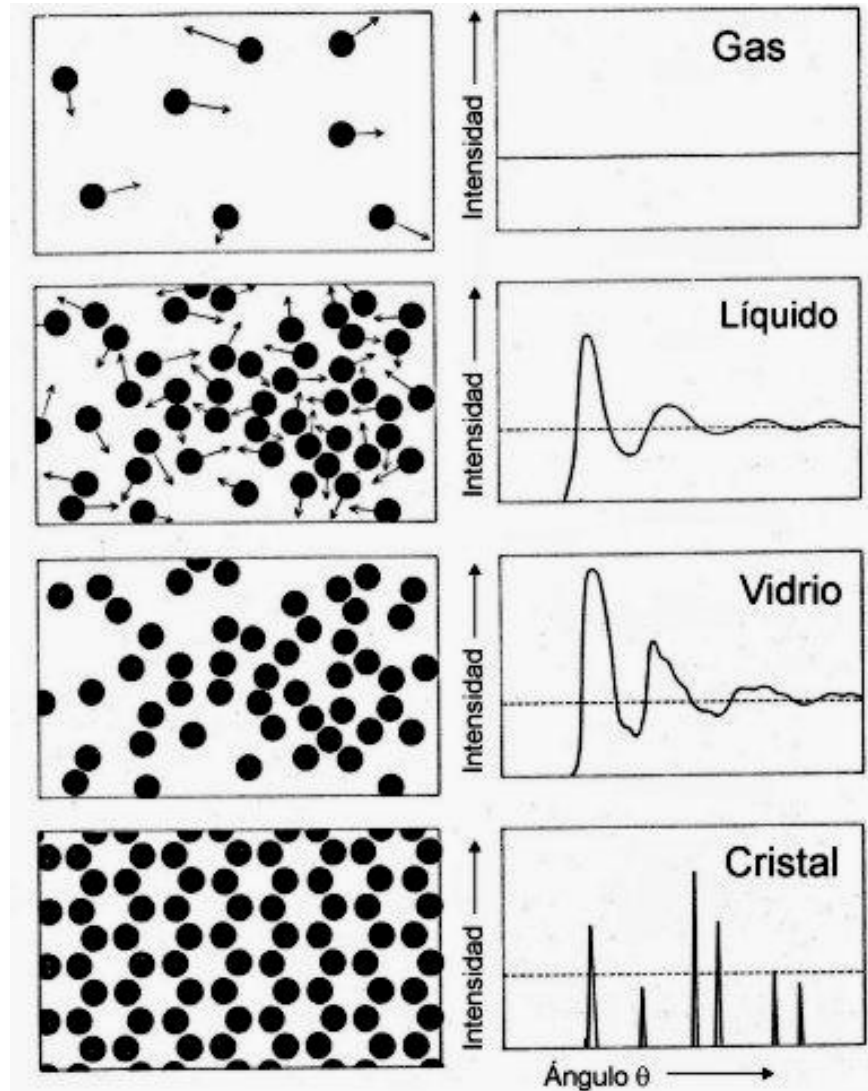


La interferencia entre ondas refuerza, disminuye o elimina la amplitud de la onda resultante.

La **interferencia cooperativa**, que se da especialmente en los cristales como consecuencia de la repetición de los centros dispersores, se llama **difracción**.

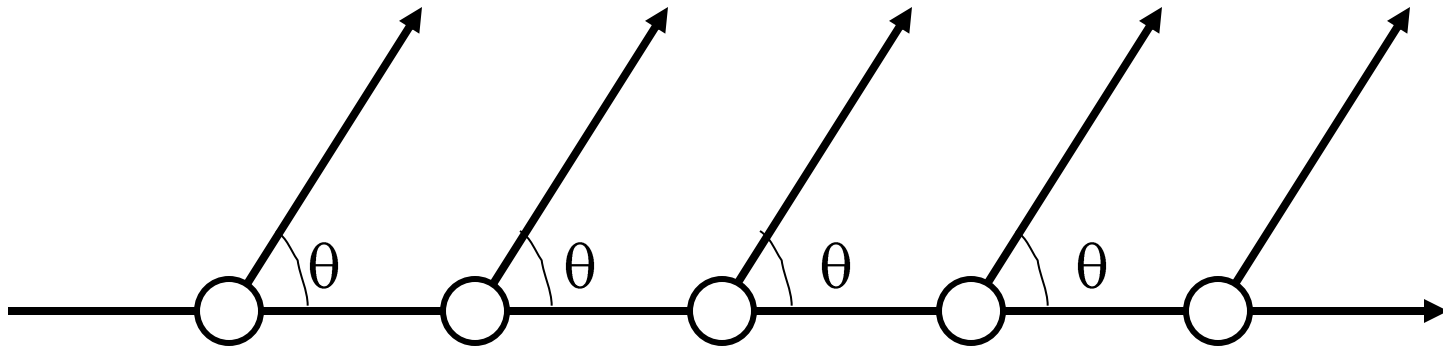
## Dispersión por distintos medios

ORDEN

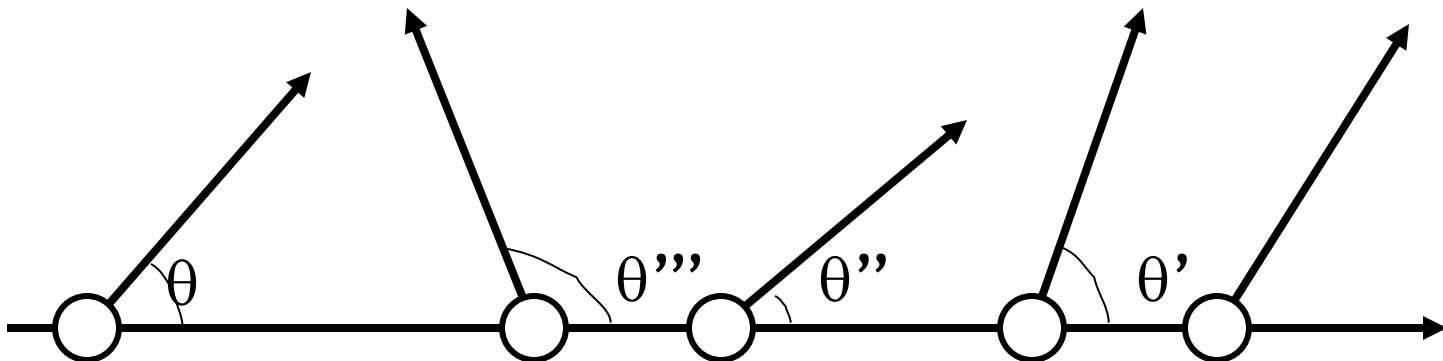




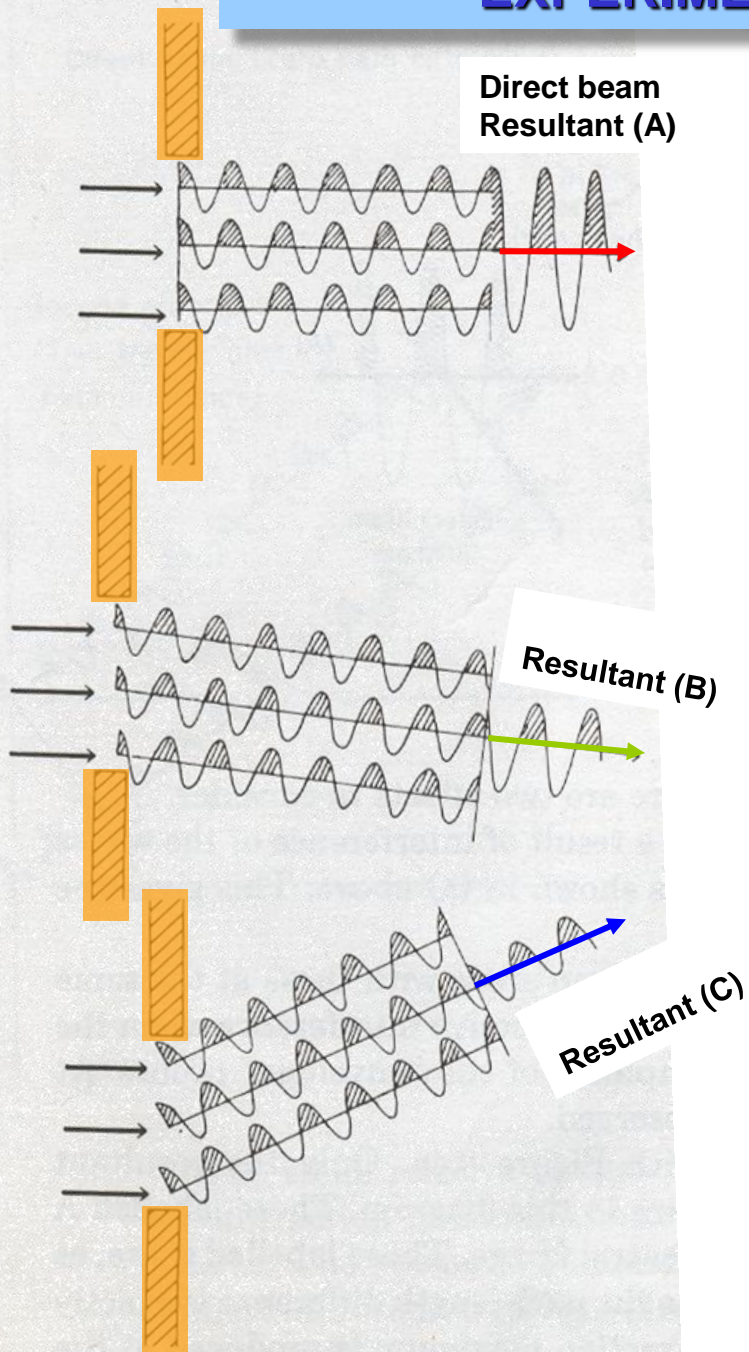
Sistema ordenado (Cristal). Dispersión cooperativa



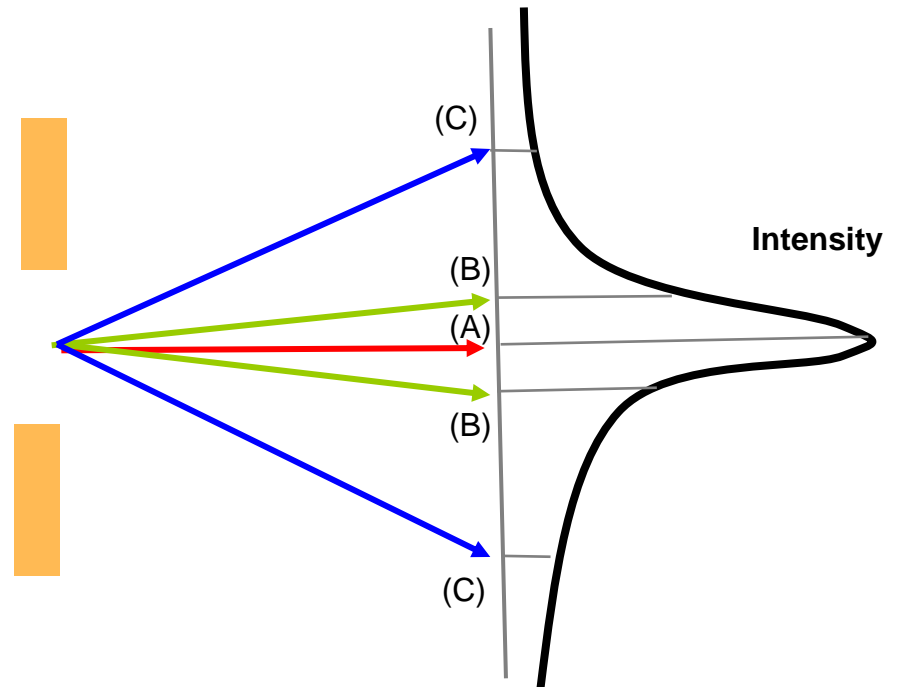
Sistema desordenado. Dispersión nula



# EXPERIMENTOS CON RENDIJAS (I)



## Difracción por una única rendija



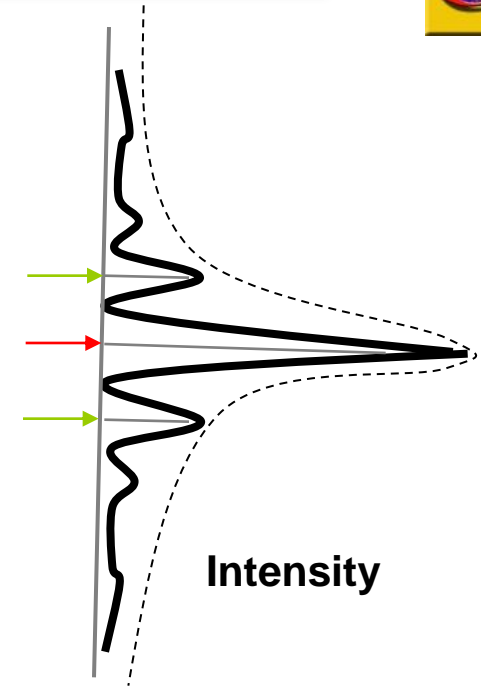
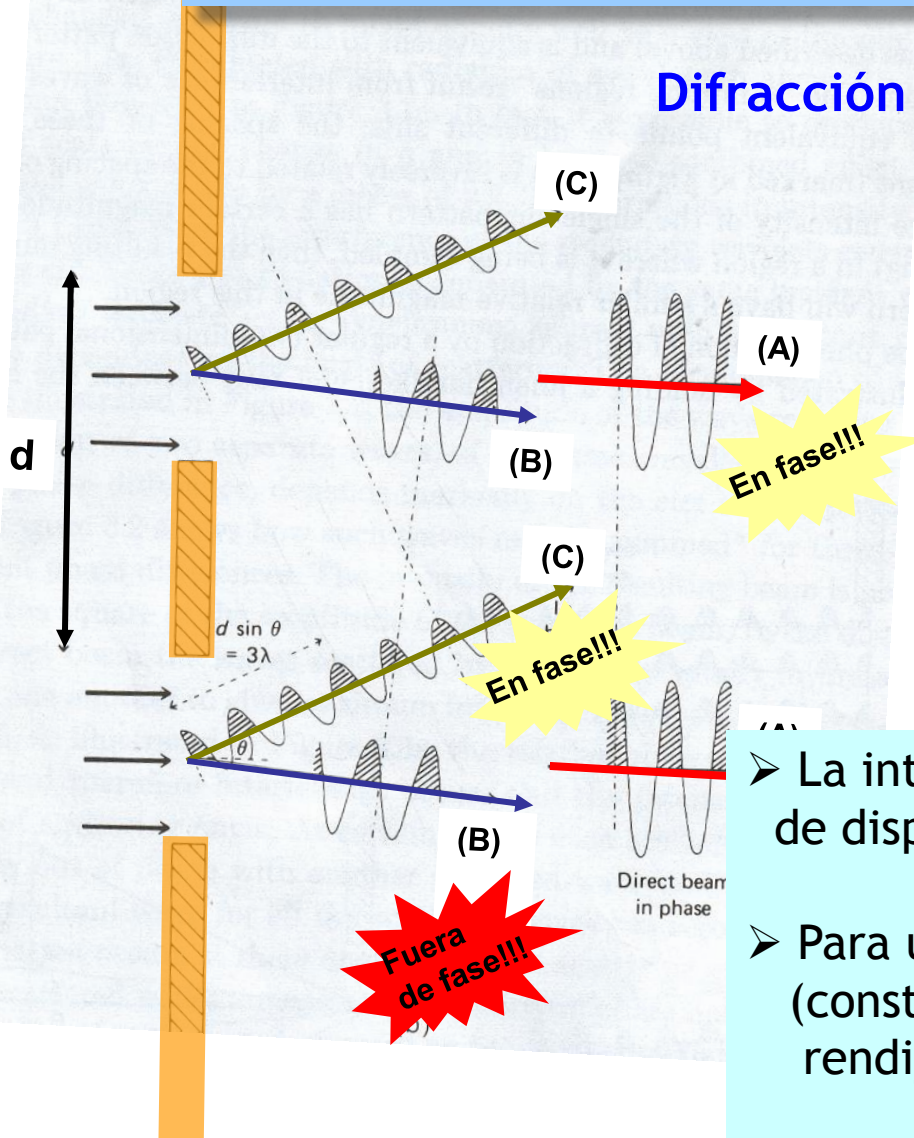
A medida que aumenta el ángulo de dispersión aumenta el desfase entre las ondas.

La intensidad resultante depende del ángulo de dispersión

# EXPERIMENTOS CON RENDIJAS (II)

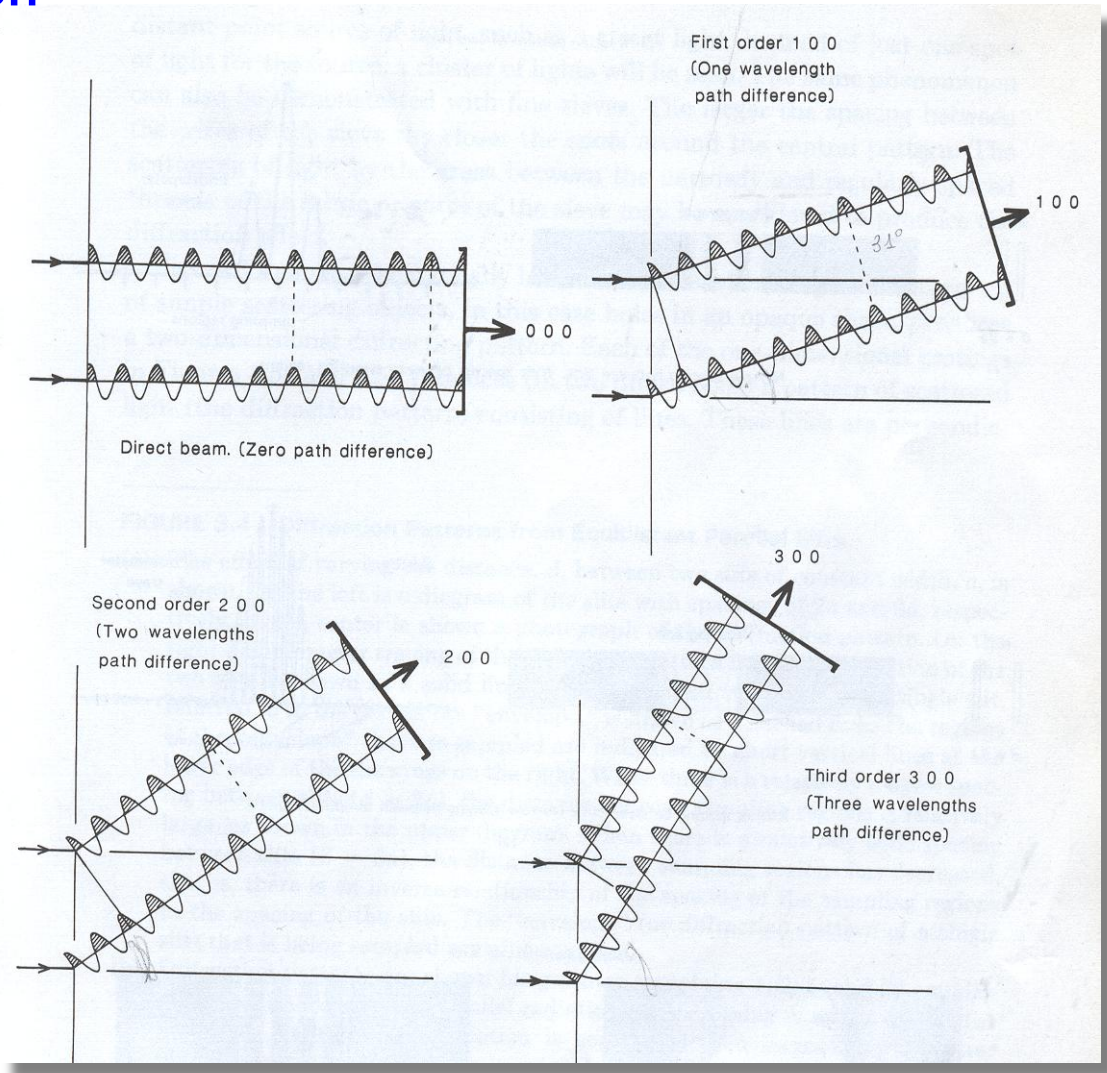


## Difracción por 2 rendijas



- La intensidad resultante depende del ángulo de dispersión.
- Para un ángulo de dispersión hay interferencia (constructiva o destructiva) entre las ondas de rendijas adyacentes.
- El mapeado de la envoltura es inversamente proporcional a la distancia entre rendijas.

## Ordenes de Difracción



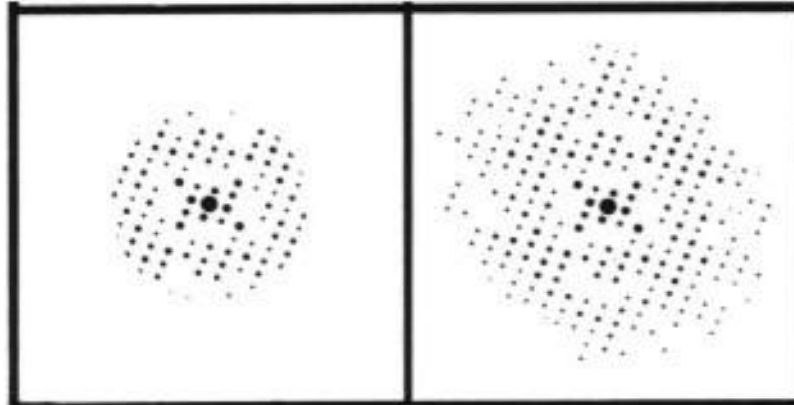


# EXPERIMENTOS CON RENDIJAS (IV)

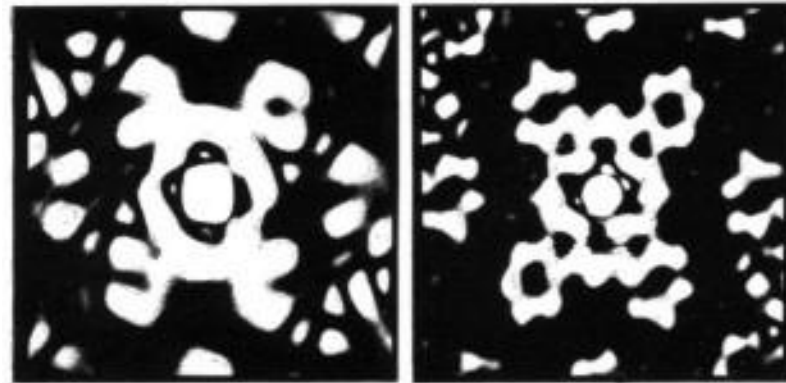


*Atlas of Optical Transforms* (G. Harburn, C.A. Taylor, T.R. Welberry; Ed. G. Bell and Sons, London 1975)

Diagramas de difracción



Imágenes ópticas obtenidas

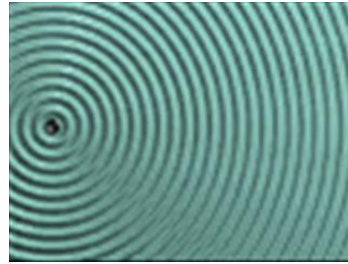
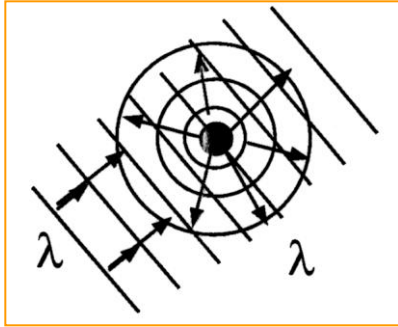


molécula rodio - ftalocianina

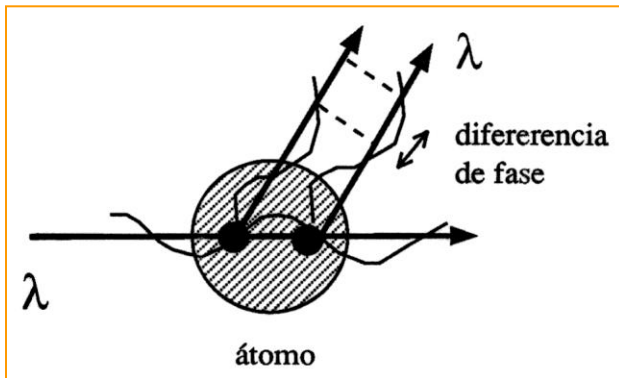
Dependiendo del tamaño del diagrama de difracción que usemos (resolución), es decir, del número de máximos empleados para formar la imagen, ésta es más o menos reconocible.



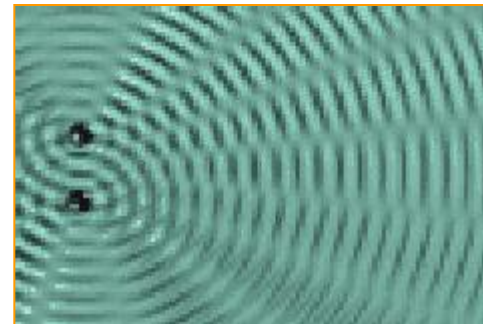
# ONDAS CONTRA PARTICULAS: DISPERSIÓN



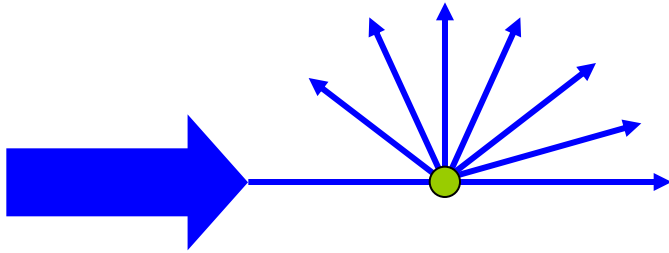
Un electrón aislado en el seno de un frente de ondas X se convierte en un foco emisor de rayos X de la misma longitud de onda ...



Cuando hay varios centros dispersores comienzan las interferencias ...



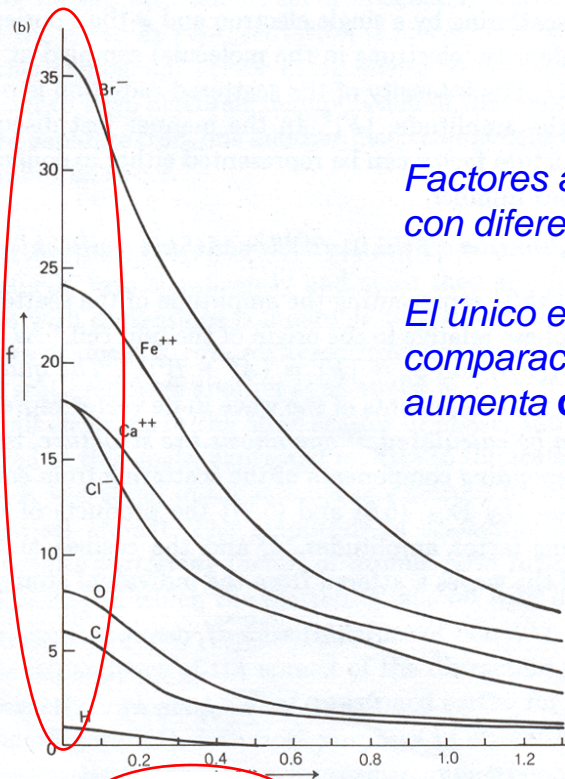
# EL FACTOR DE SCATTERING ATÓMICO



Dispersión de la luz por una partícula de tamaño pequeño frente a la longitud de onda



Dispersión de la luz por una partícula de tamaño grande frente a la longitud de onda



*Factores atómicos de dispersión calculados para átomos y iones con diferente número de electrones.*

*El único electrón del hidrógeno (H) apenas dispersa en comparación con los otros elementos, sobre todo a medida que aumenta  $q$ . El hidrógeno es, pues, difícil de "ver".*

$$\sin \theta/\lambda = 0$$



$$f = Z$$

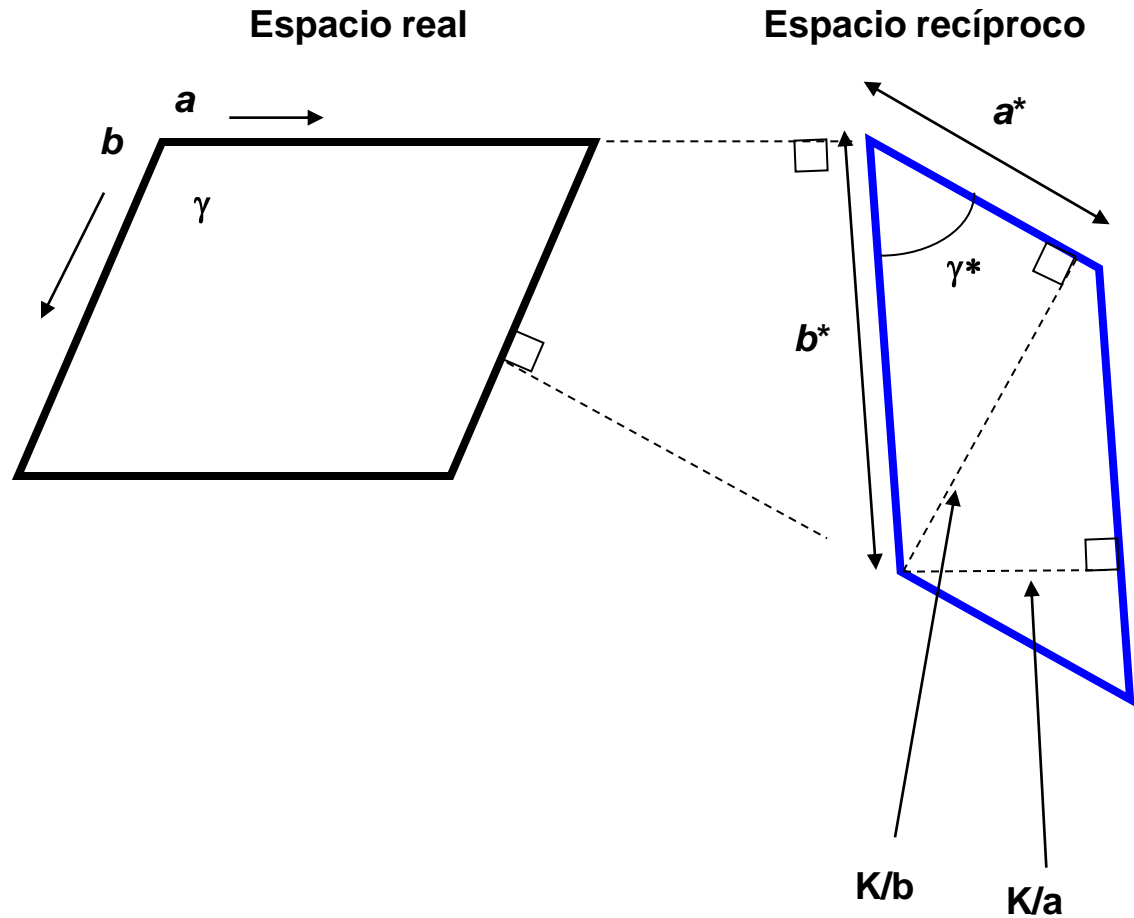
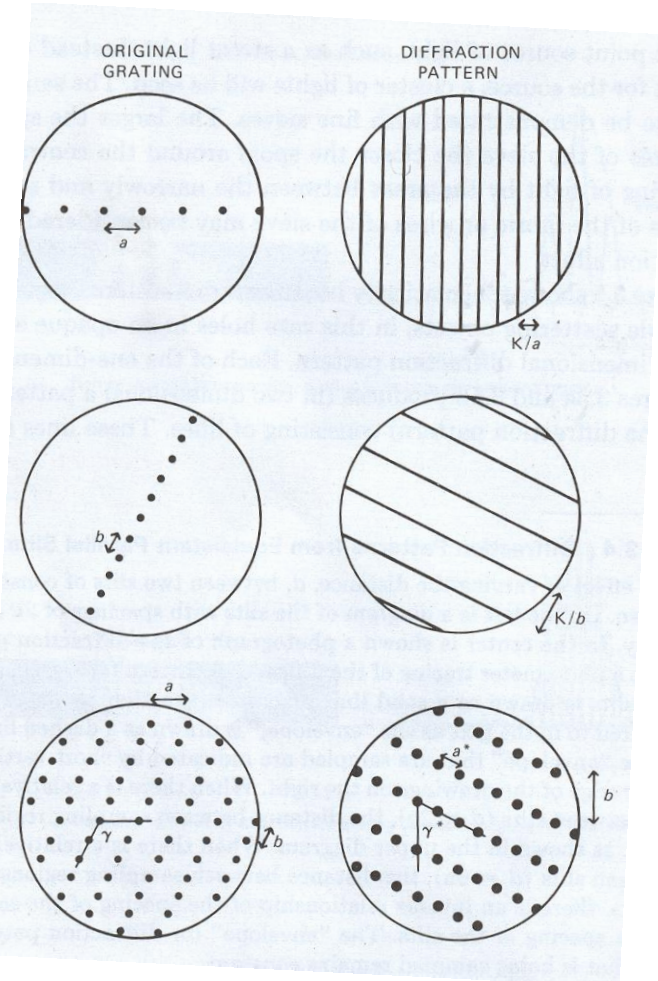
Independiente de la  $\lambda$

$$\sin \theta/\lambda$$

## Conceptos Fundamentales

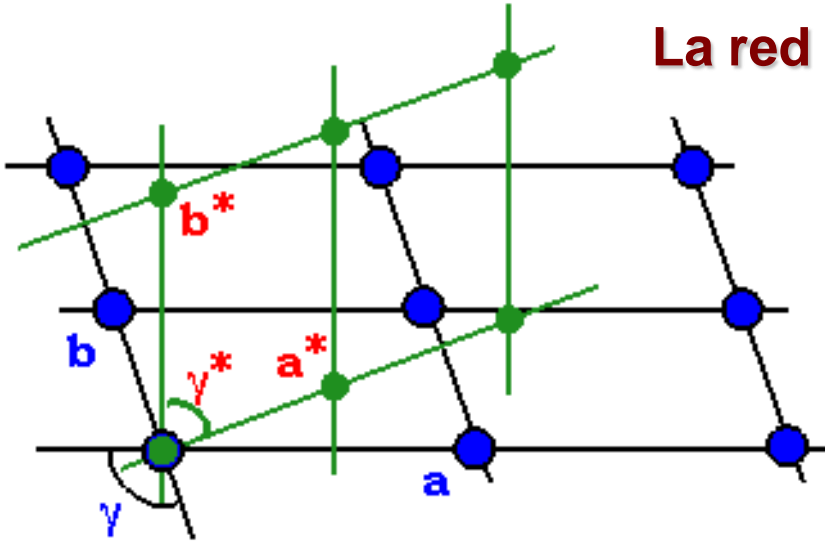
- La  $\lambda$  debe ser proporcional al tamaño del objeto.
- La distancia entre puntos es inversamente proporcional a la distancia entre nudos de la red.
- A medida que nos alejamos del centro la difracción es más débil.
- La geometría de los puntos de difracción está relacionada con la geometría de la red.
- La resultante de la difracción cooperativa se denomina **Factor de Estructura**. Es una onda y se expresa como una amplitud y una fase.

## Construcción del espacio recíproco





## La red recíproca



$$\underline{\sigma}_{hkl} = h\underline{a}^* + k\underline{b}^* + l\underline{c}^*$$

Vector de posición de cualquier punto recíproco

*Relaciones entre el espacio real y el recíproco*

$$a^* = \frac{b \times c}{V}; \quad \cos \alpha^* = \frac{\cos \beta \cos \gamma - \cos \alpha}{\sin \beta \sin \gamma} \quad a^* \text{ perpendicular a } b, c$$

$$b^* = \frac{c \times a}{V}; \quad \cos \beta^* = \frac{\cos \alpha \cos \gamma - \cos \beta}{\sin \alpha \sin \gamma} \quad b^* \text{ perpendicular a } a, c$$

$$c^* = \frac{a \times b}{V}; \quad \cos \gamma^* = \frac{\cos \alpha \cos \beta - \cos \gamma}{\sin \alpha \sin \beta} \quad c^* \text{ perpendicular a } a, b$$

# capítulo 3:

## *La difracción de rayos $x$ (I)*

### - **HÁGASE LA LUZ: INTERACCIÓN RADIACIÓN-MATERIA**

- El espectro electromagnético
- Buscando la  $\lambda$  adecuada
- Buscando la radiación adecuada
- La interacción de la radiación con los estados de la materia

### - **INTERFERENCIA DE ONDAS**

- Interferencia de 2 ondas
- Experimentos con rejillas
- Ondas contra átomos
- El factor de scattering

### - **UN EXPERIMENTO (CASERO) DE DIFRACCIÓN**

### - **MÁS ALLÁ DEL ESPACIO REAL**

- Construcción del espacio recíproco
- Relaciones entre espacio real y espacio recíproco.

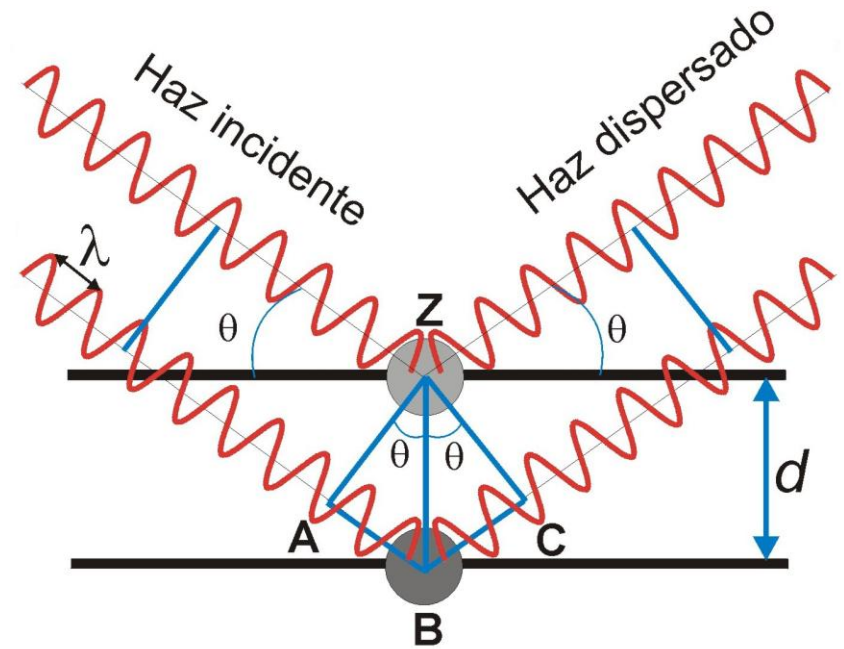
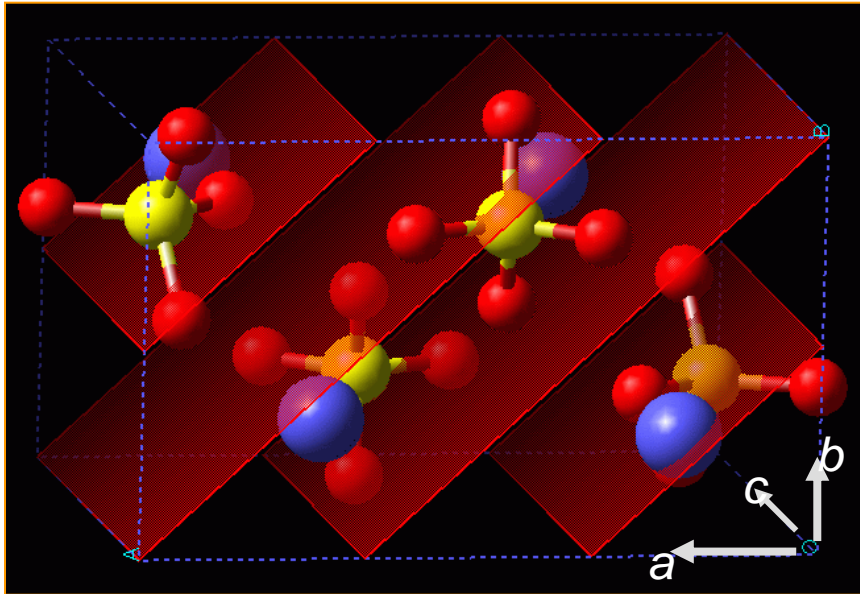
### - **¿CÓMO SE EXPLICA TODO ESTO?**

- Descripción de Bragg
- Descripción de Laue
- Equivalencia entre Bragg y Laue
- Interpretación de la ley de Bragg según Ewald
- Luz sobre el patrón de difracción por fín

### - **EN BUSCA DE LA FASE PERDIDA**

- La fase, la llave que abre los 2 mundos.
- Los problemas continúan, el problema de la fase.

# INTERPRETACIÓN DE BRAGG



Ley de Bragg

$$2 d \text{ sen } \theta = n \lambda$$

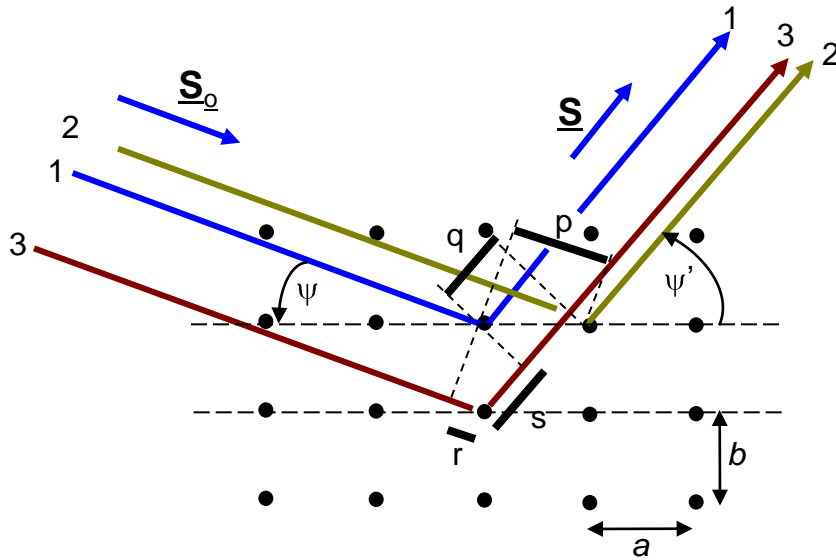
$$\begin{aligned} AB + BC &= n \lambda \\ 2 AB &= n \lambda \\ \text{sen } \theta &= n \lambda / 2d \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} AB &= BC \\ \text{sen } \theta &= AB / d \end{aligned}$$

Bragg:

Las ondas difractadas se comportan **como si se reflejaran** en planos imaginarios que pasan a través de los puntos de la red cristalina

# CONDICIÓN DE DIFRACCIÓN DE LAUE



$$PD1 = p - q = a \cos \psi - a \cos \psi' = h\lambda$$

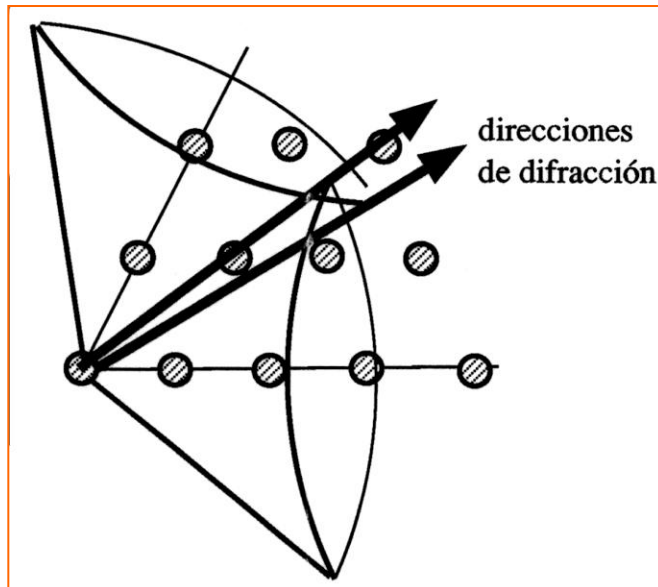
$$PD2 = r + s = b \sin \psi + b \sin \psi' = k\lambda$$

## Ecuaciones de Laue

$$PD1 = h\lambda$$

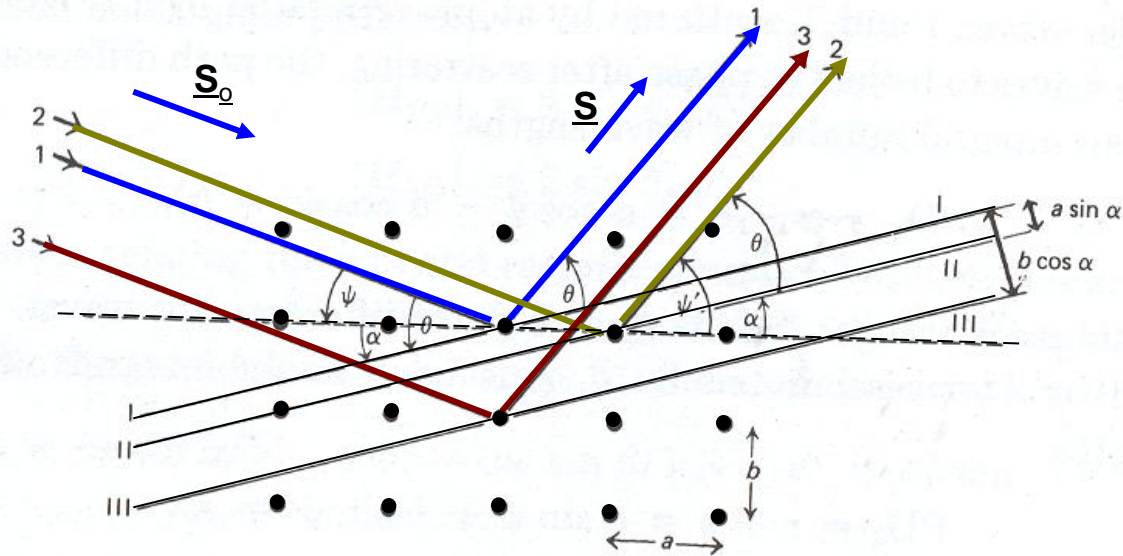
$$PD2 = k\lambda$$

$$PD3 = l\lambda$$





# EQUIVALENCIA ENTRE LAUE Y BRAGG



$$\theta = \psi + \alpha = \psi' - \alpha$$

$$PD1 = p - q = a \cos \psi - a \cos \psi' = h\lambda \quad \longrightarrow \quad 2 a \sin \alpha \sin \theta = h\lambda$$

$$PD2 = r + s = b \sin \psi + b \sin \psi' = k\lambda \quad \longrightarrow \quad 2 b \cos \alpha \sin \theta = h\lambda$$

$$2 \sin \theta / \lambda = h / a \sin \alpha = k / b \cos \alpha$$



$$2 \sin \theta / \lambda = n / d_{hkl}$$

## Modelo de Ewald

### Ley de Bragg

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

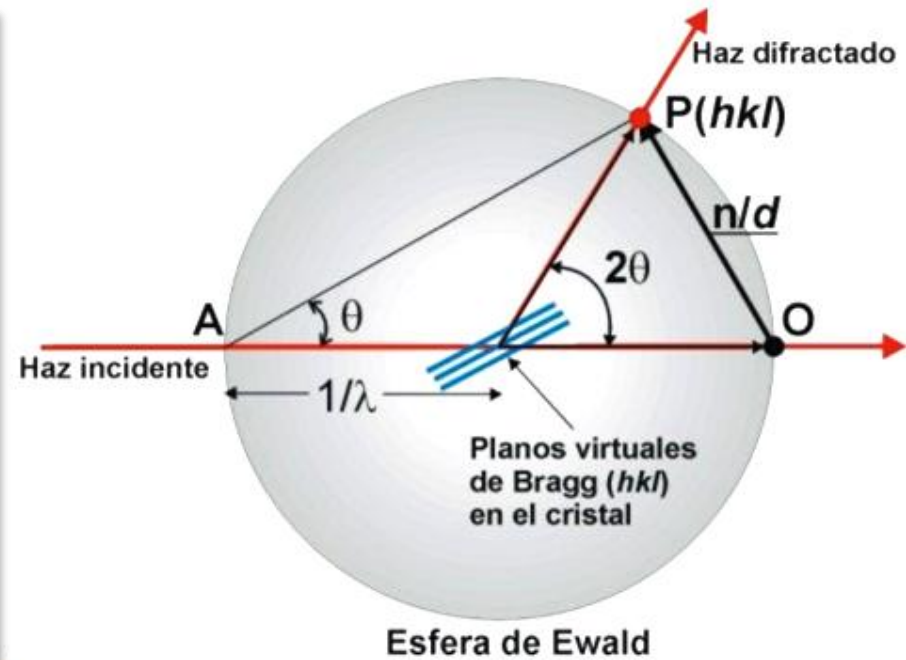
$$\rightarrow \sin \theta = \frac{\lambda / 2}{d} = \frac{1/d}{2 / \lambda}$$

-El cristal puede situarse en el centro del círculo de radio  $1/\lambda$

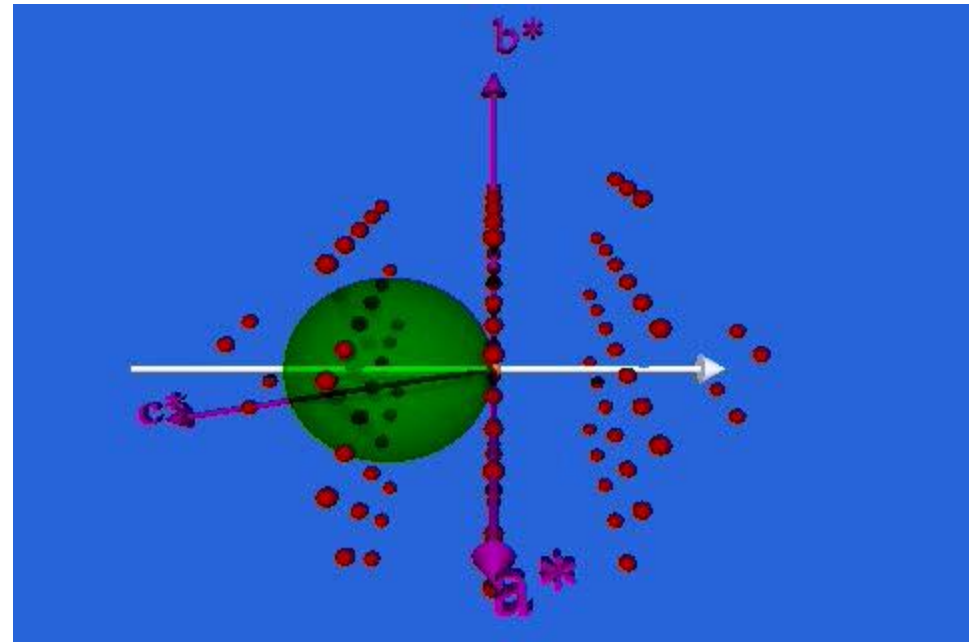
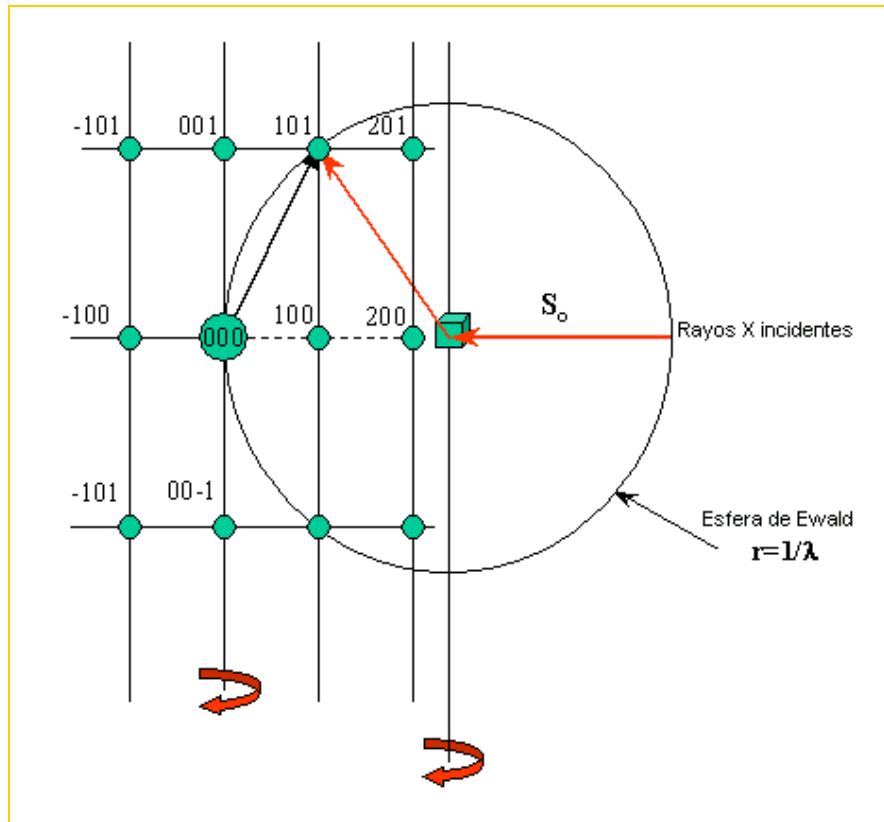
-El punto O es el origen de la red recíproca del cristal.

-Cualquier punto de la red recíproca sobre la circunferencia satisface la ley de Bragg

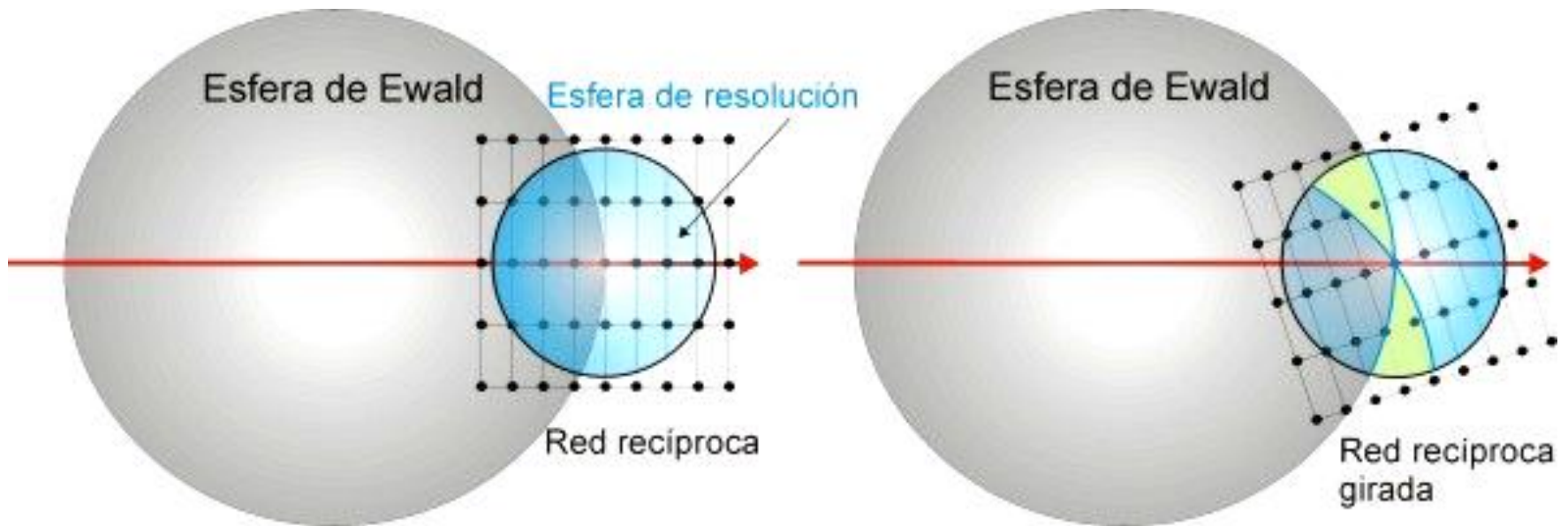
-La difracción de rayos X sólo puede ocurrir cuando un punto de la red recíproca se encuentra sobre la esfera, llamada ESFERA DE REFLEXION o ESFERA DE EWALD.



## Red Recíproca y Modelo de Ewald

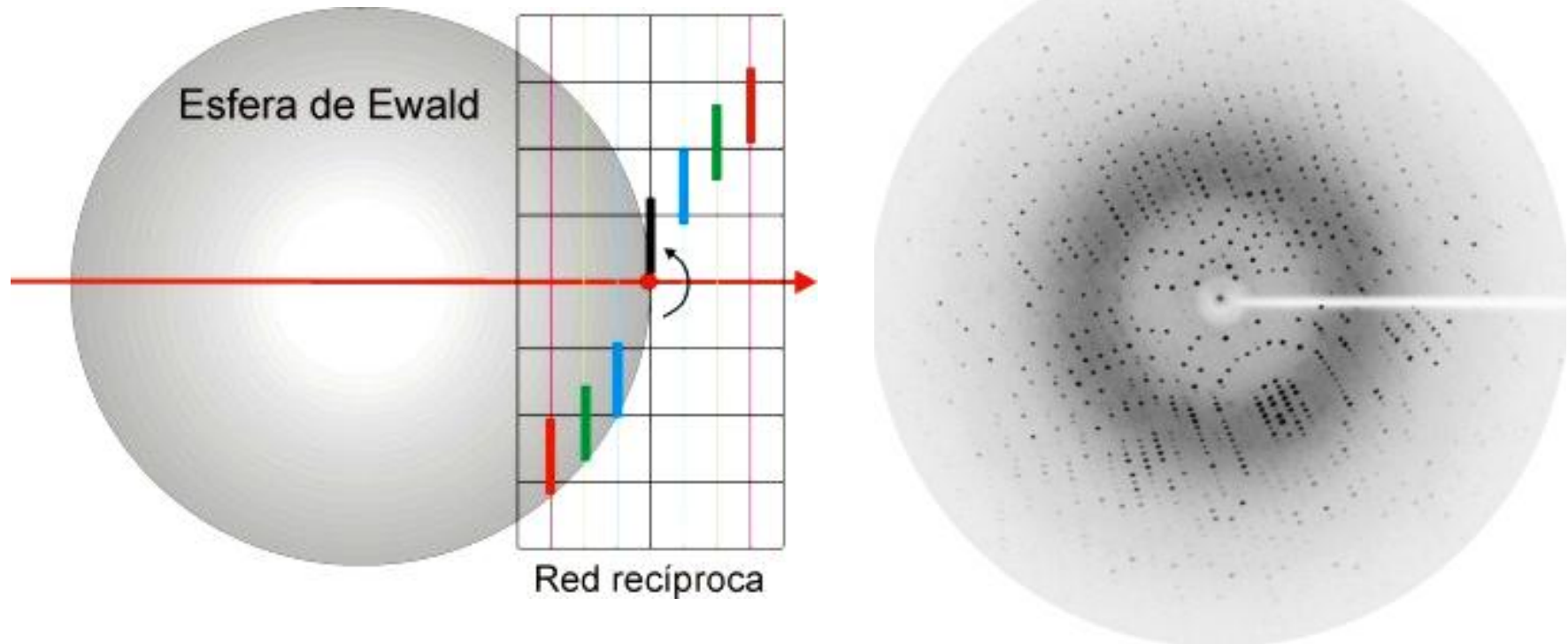


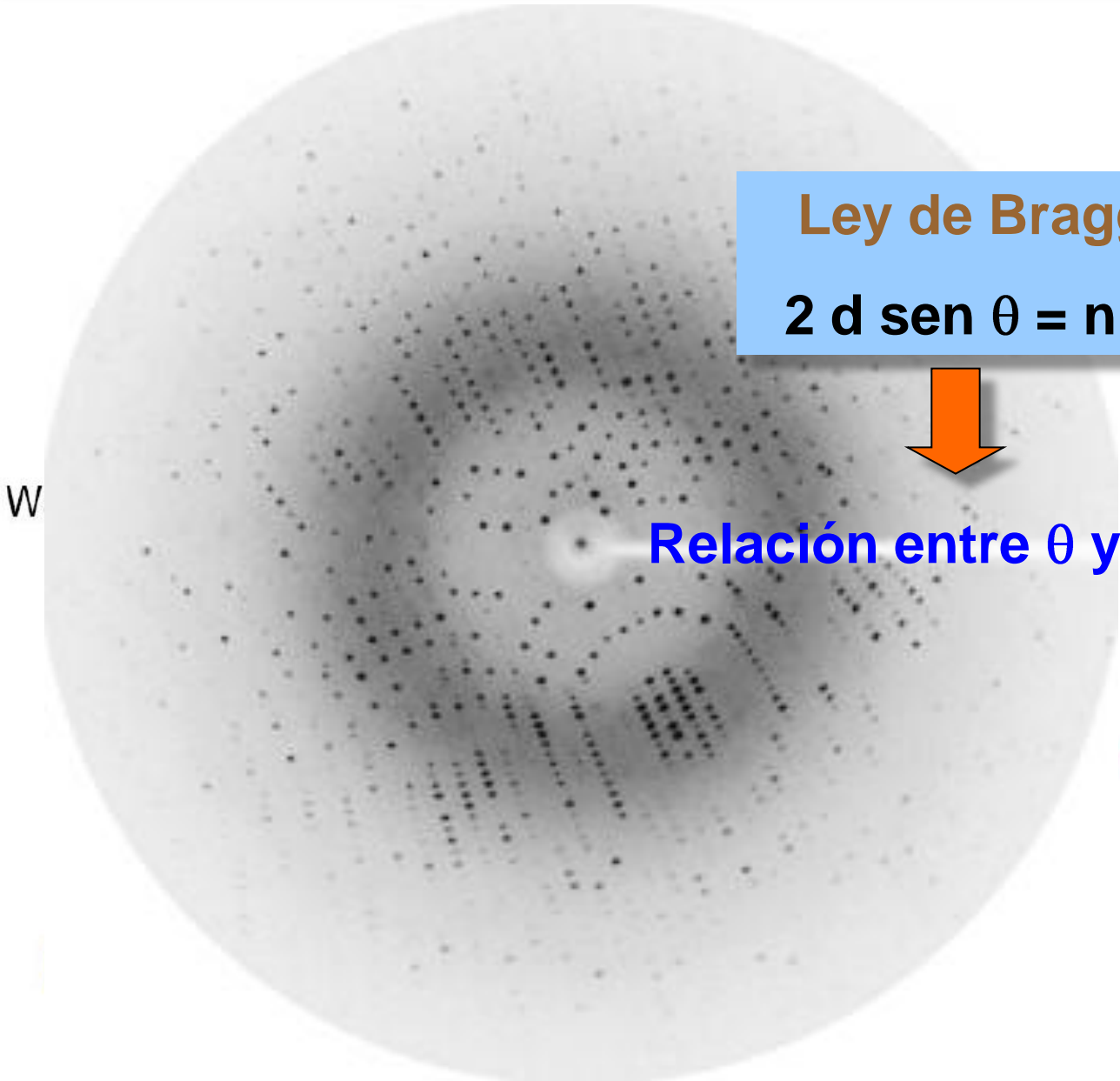
## Red Recíproca y Modelo de Ewald





## Red Recíproca y Modelo de Ewald





W

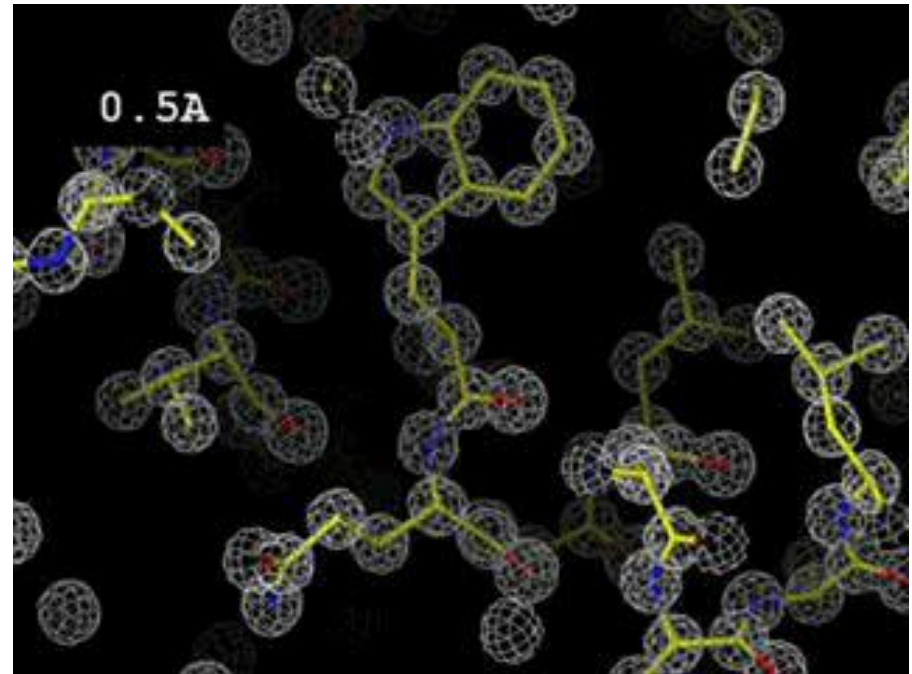
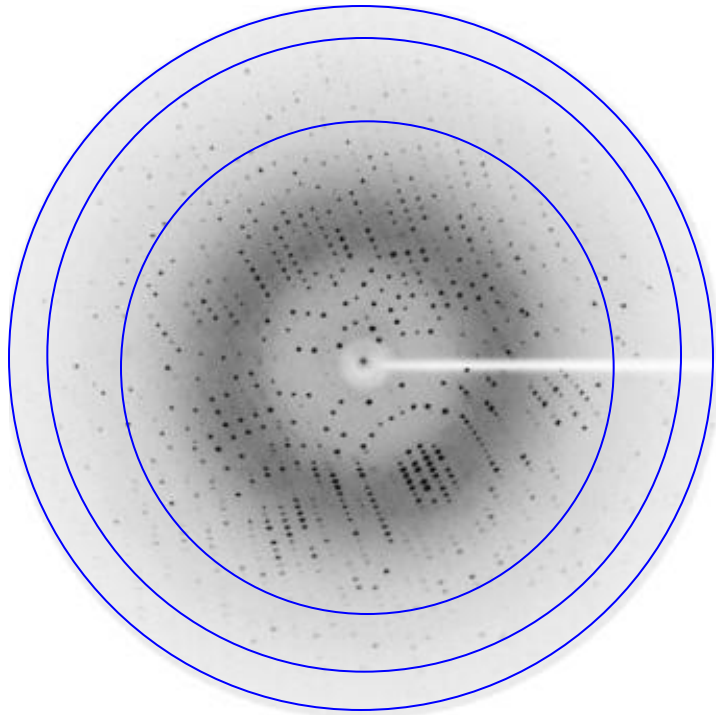
**Ley de Bragg**

$$2 d \operatorname{sen} \theta = n \lambda$$



**Relación entre  $\theta$  y resolución**

# INTERPRETACION DE BRAGG



Densidad electrónica de una macromolécula calculada en una zona de la celdilla elemental, a medida que el límite de resolución se ajusta lentamente de 0.5 a 6.0 Å.

Para este cálculo las fases están perfectamente determinadas, e igualmente el factor de acuerdo es máximo ( $R = 0,0\%$ ). Se observa que las cadenas laterales son prácticamente reconocibles hasta una resolución de 3.5 Å.