

Difracción de Rayos X de Proteínas

1. Introducción.
2. Simetría.
→ Producción de rayos X .
3. Cristales y su obtención.
4. Difracción de Rayos X.
→ Generadores de rayos X:
 - Anodo rotatorio.
 - Sincrotrón.
5. Aspectos experimentales: equipos de difracción y procesamiento de datos.
6. El Problema de la Fase: métodos de resolución estructural.
→ Detectores de rayos X.
7. Refinamiento, modelado y validación estructural.
→ Montaje experimental.
8. Aplicación: relaciones estructura-función.
→ Procesado de datos de difracción.

Sincrotrón.

- Policromático.
- Sintonización de la λ .
- Brillo altísimo.

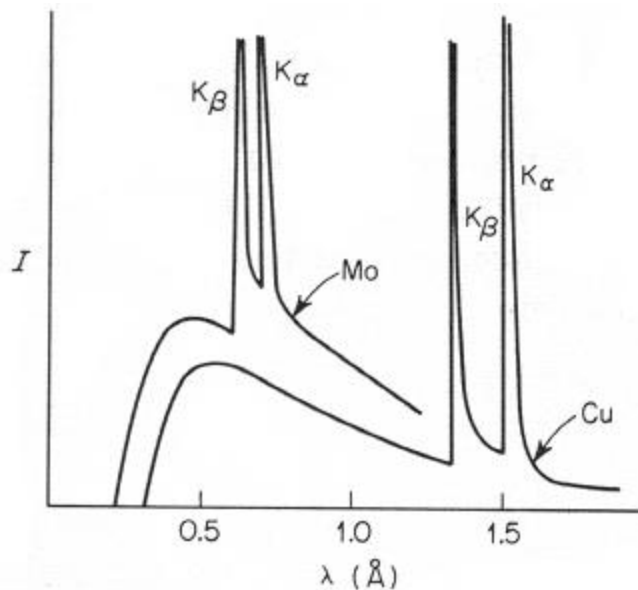
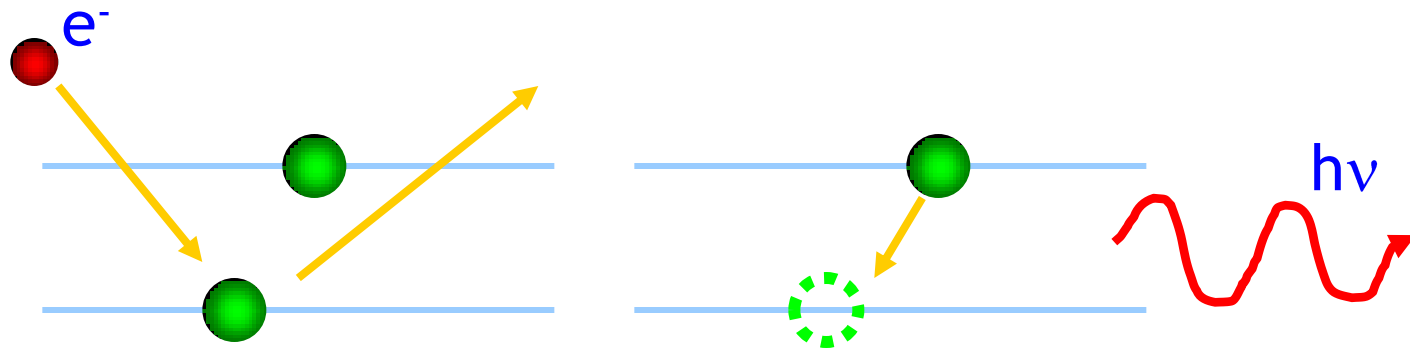


Ánodo rotatorio.

- Monocromático.
- $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$
- Brillo moderado.

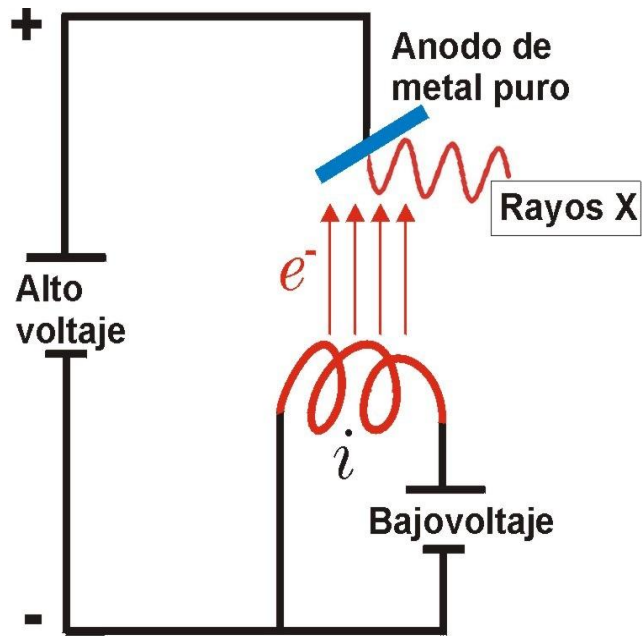


Producción de los Rayos X.



Distribución de longitudes de onda de los rayos X que se producen en tubos convencionales de rayos X con ánodo de cobre (Cu), o molibdeno (Mo). Sobre espectro continuo aparecen las líneas características K-alpha y K-beta.

Anodo Rotatorio.

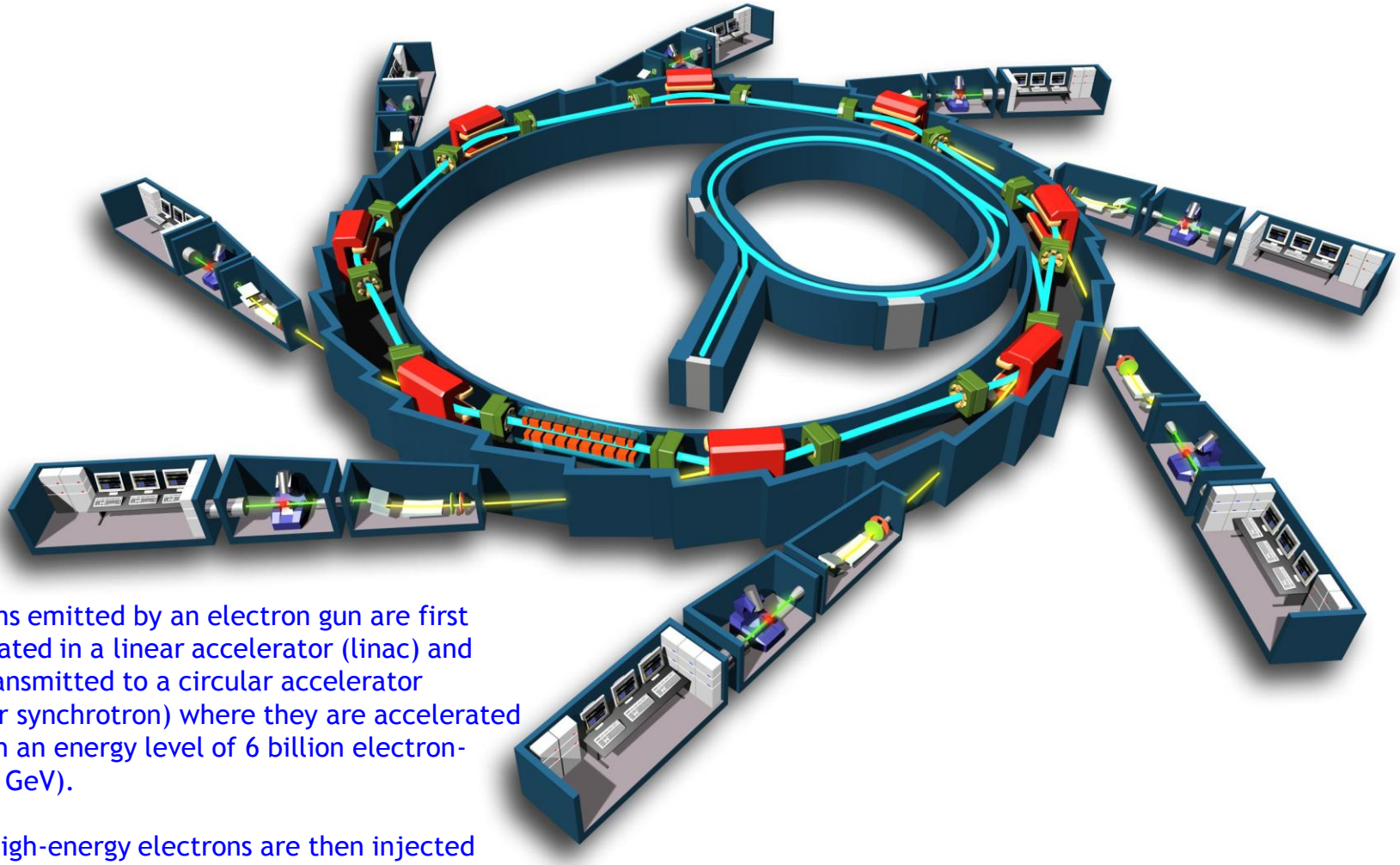


a)



- Monocromático ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).
- Intensidad moderada.

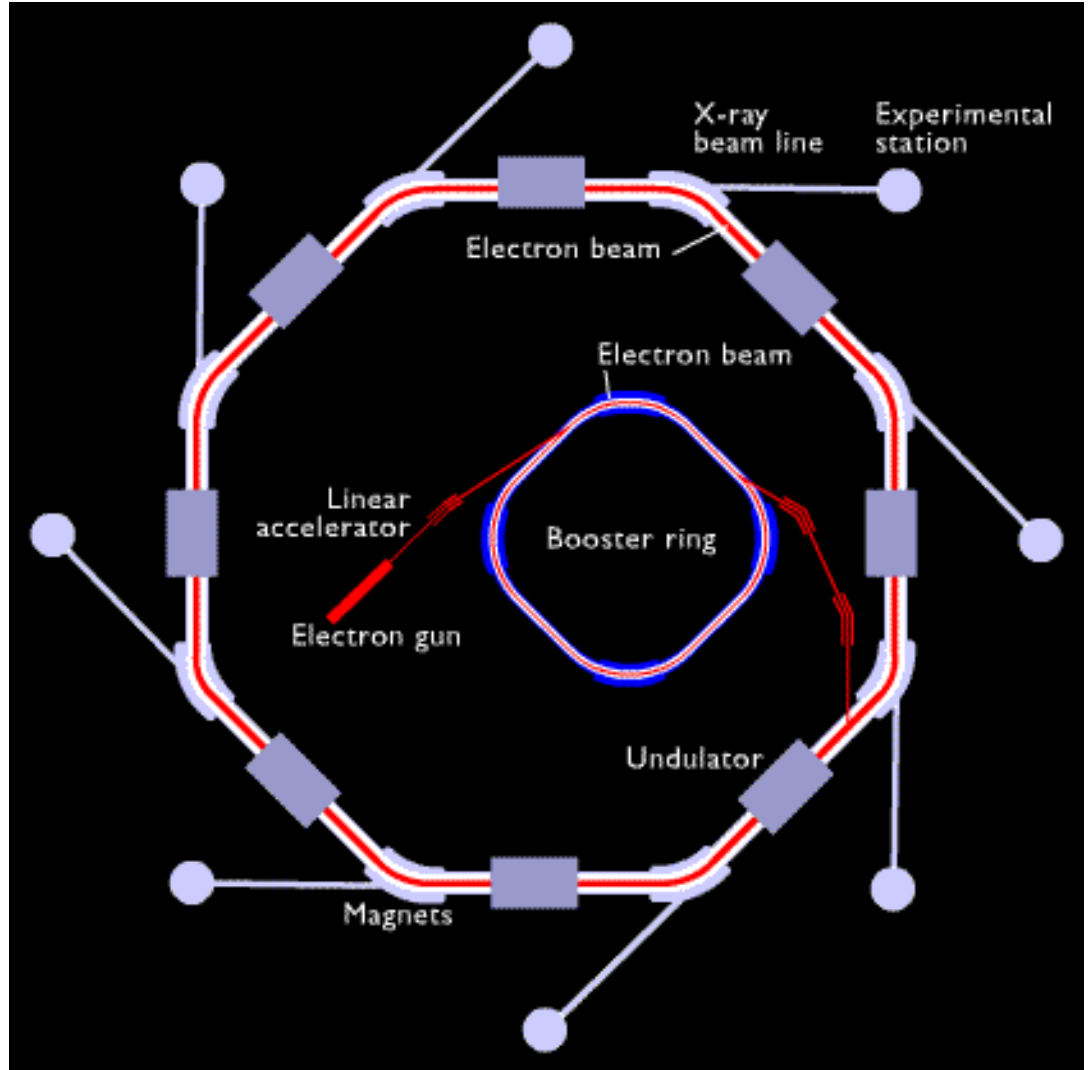
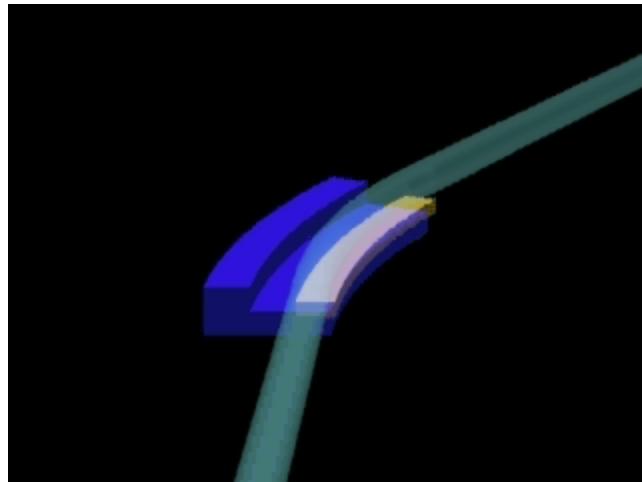
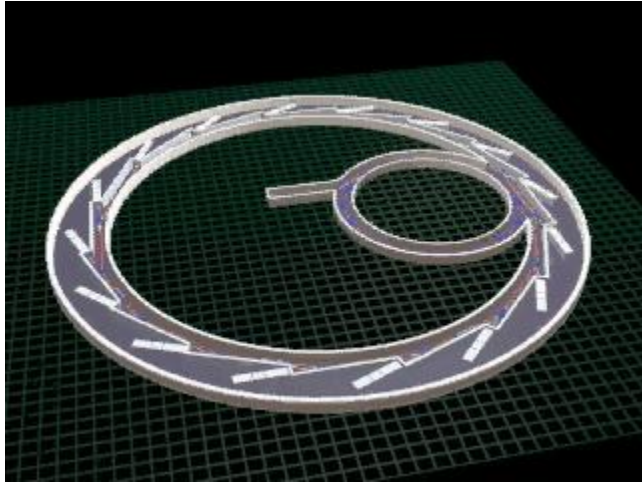
SINCROTRÓN



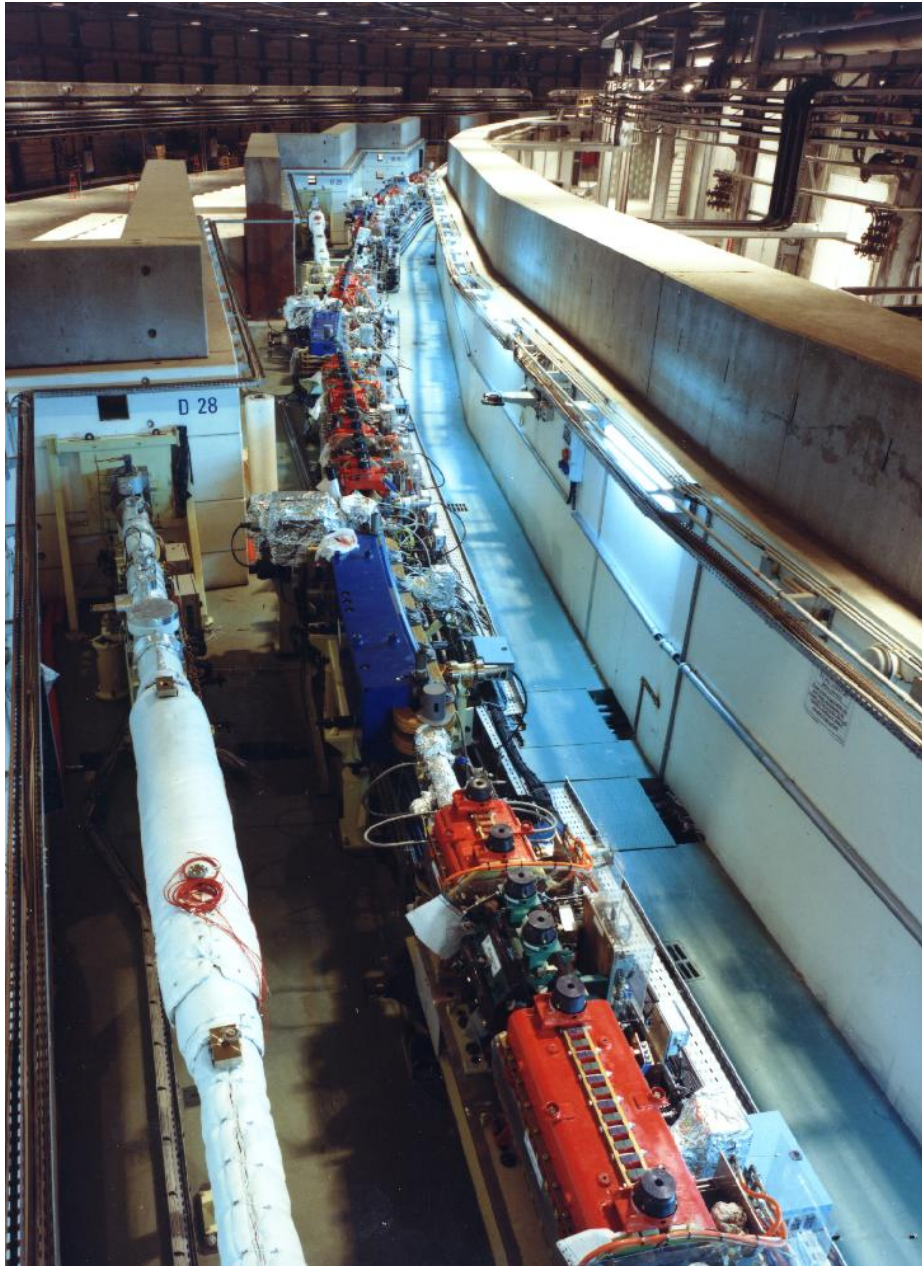
Electrons emitted by an electron gun are first accelerated in a linear accelerator (linac) and then transmitted to a circular accelerator (booster synchrotron) where they are accelerated to reach an energy level of 6 billion electron-volts (6 GeV).

These high-energy electrons are then injected into a large storage ring --844 metres in circumference --where they circulate in a vacuum environment, at a constant energy, for many hours.

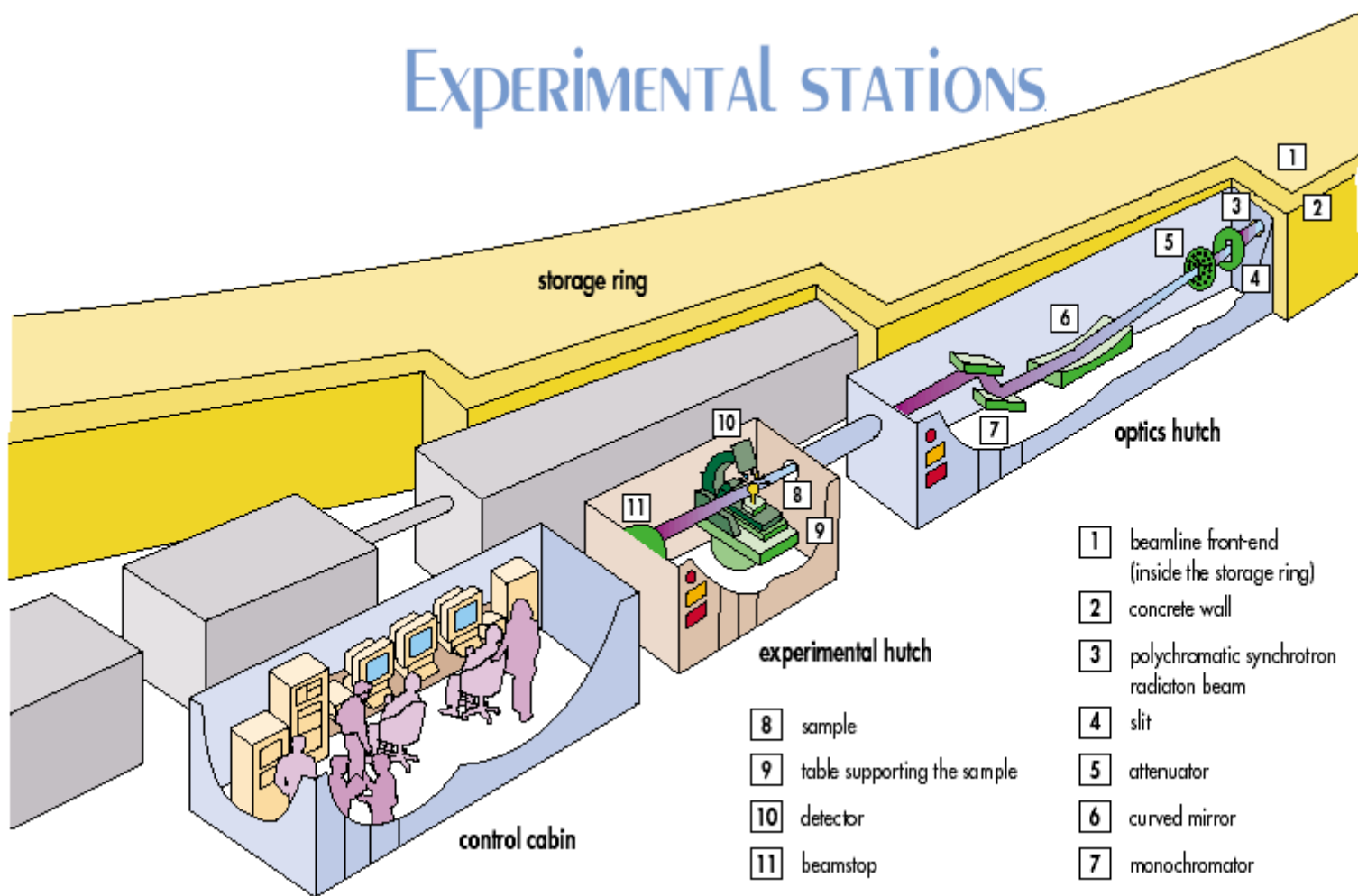
SINCROTRÓN



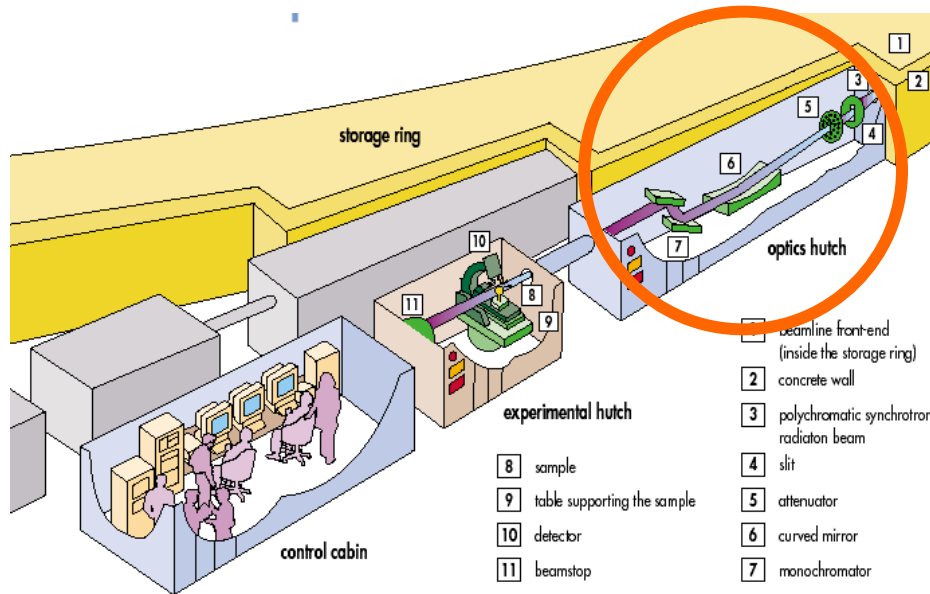




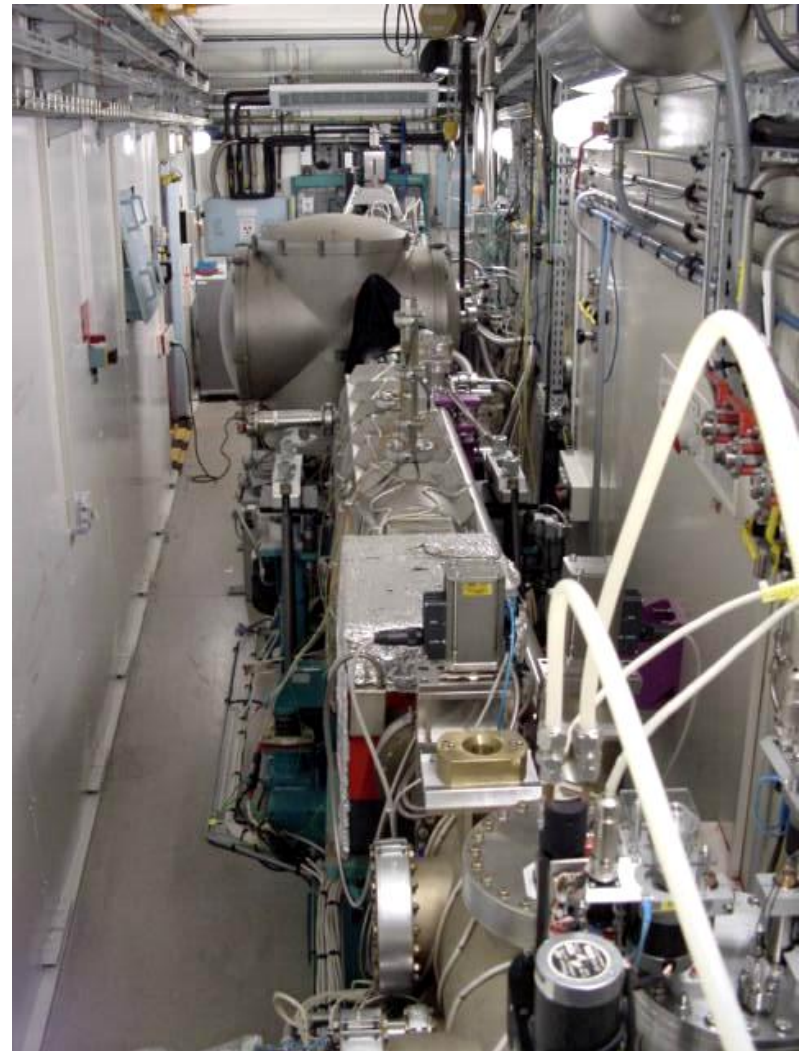
EXPERIMENTAL STATIONS



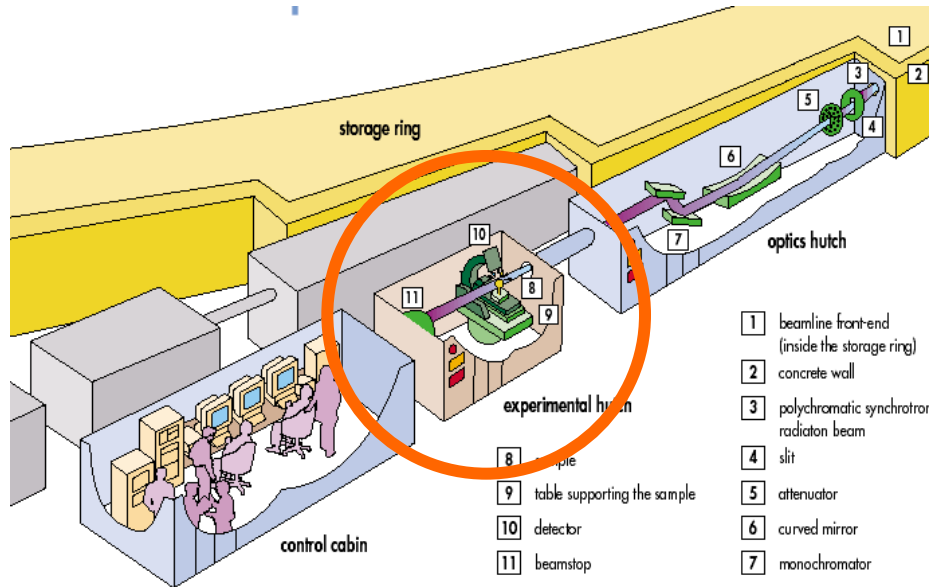
LA LINEA DE RADIACIÓN SINCROTRON



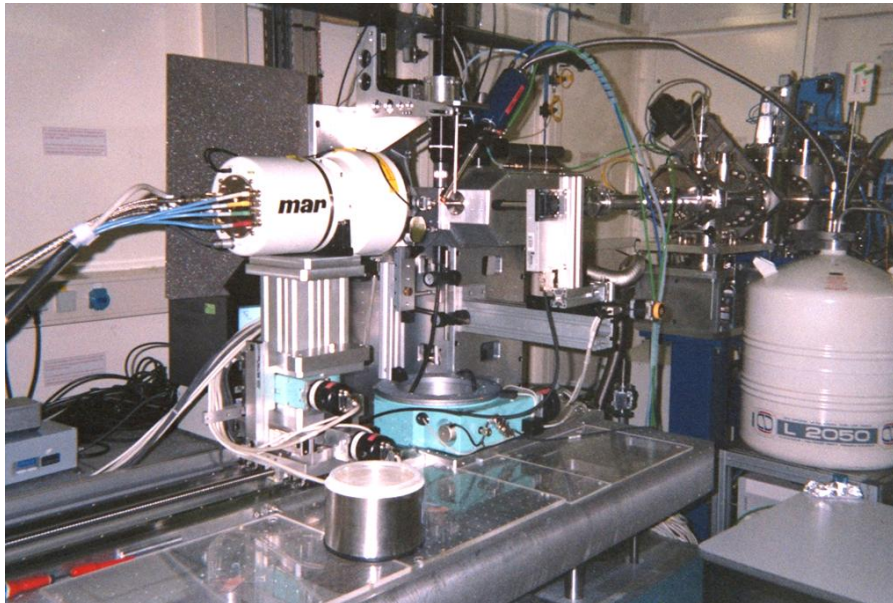
Cabaña Óptica



LA LINEA DE RADIACIÓN SINCROTRON



Cabaña Experimental



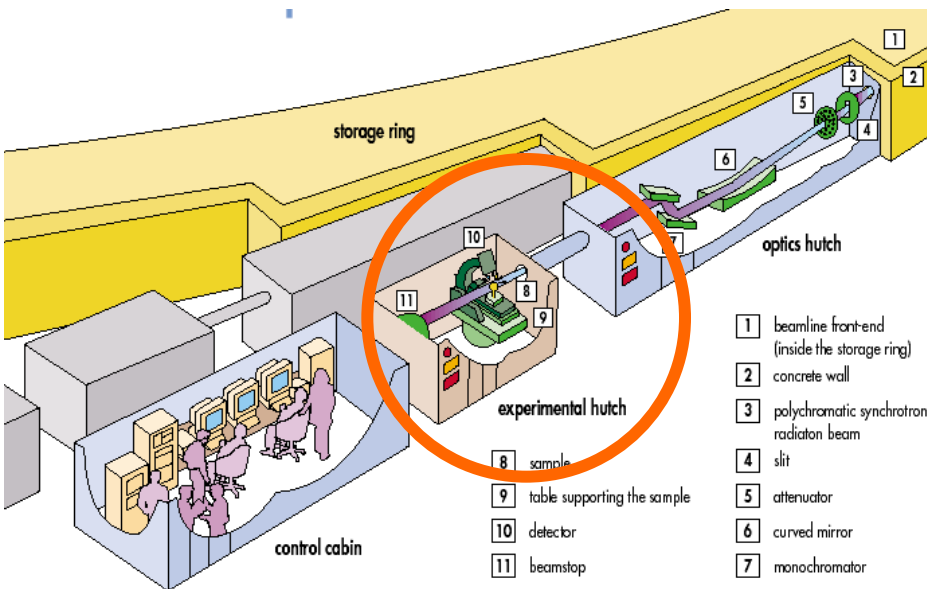
LA LINEA DE RADIACIÓN SINCROTRON



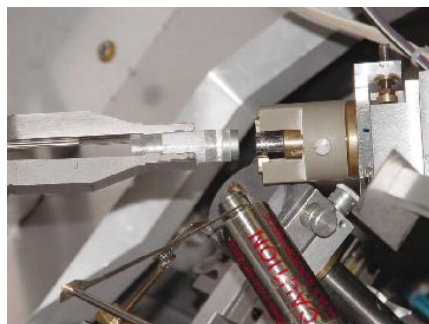
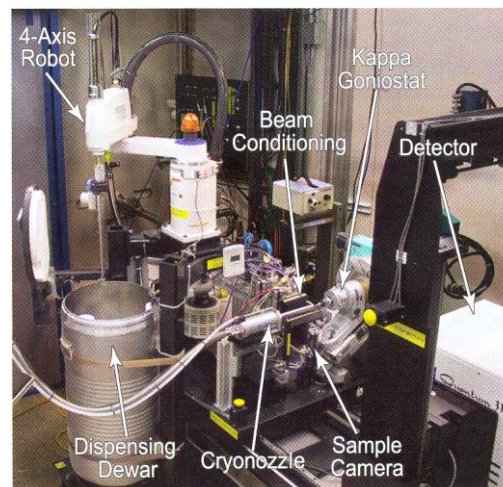
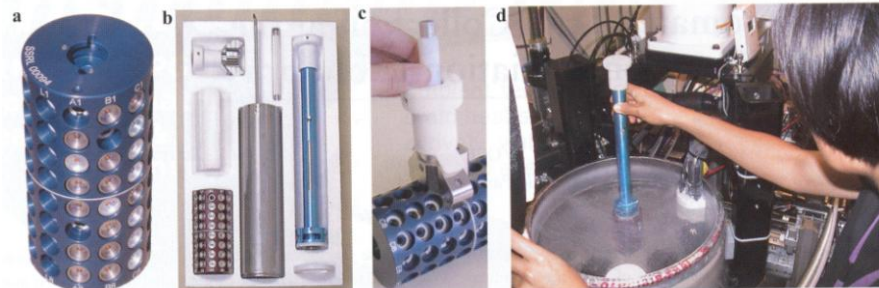
Cabaña Experimental

Montaje automático de cristales en Sincrotrón.

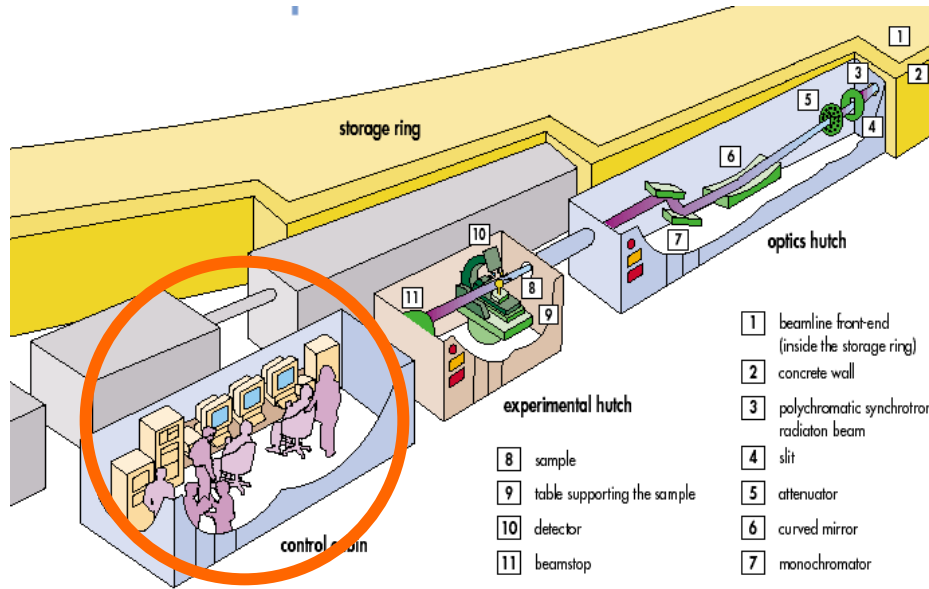
SSRL



BM30A-ESRF

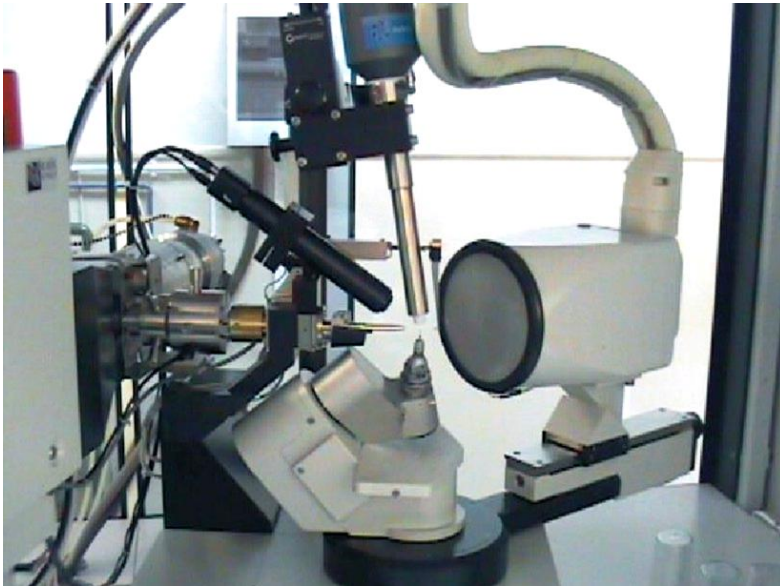


LA LINEA DE RADIACIÓN SINCROTRON



Cabina de Control





CCD

- Área de detección pequeña.
- Tiempos de impresión y lectura cortos.
- goniómetro con varios grados de libertad.



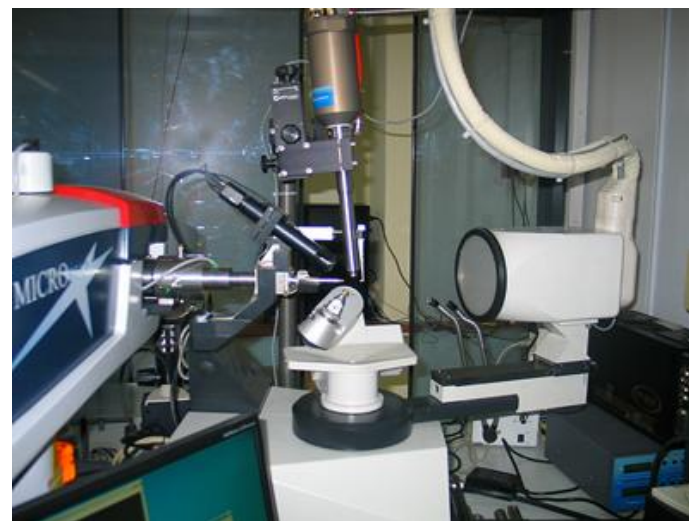
Image Plate

- Área de detección grande.
- Tiempos de impresión y lectura largos.
- goniómetro con un único grado de libertad.

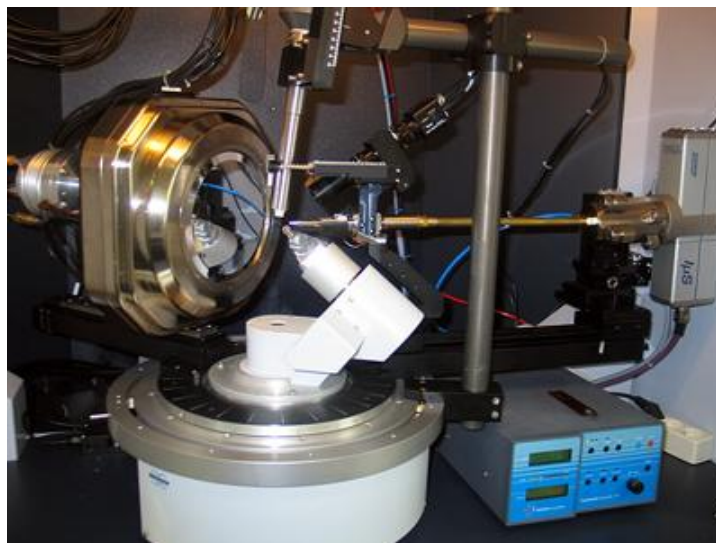
SISTEMAS DE DETECCION DE RAYOS X



ImagePlate

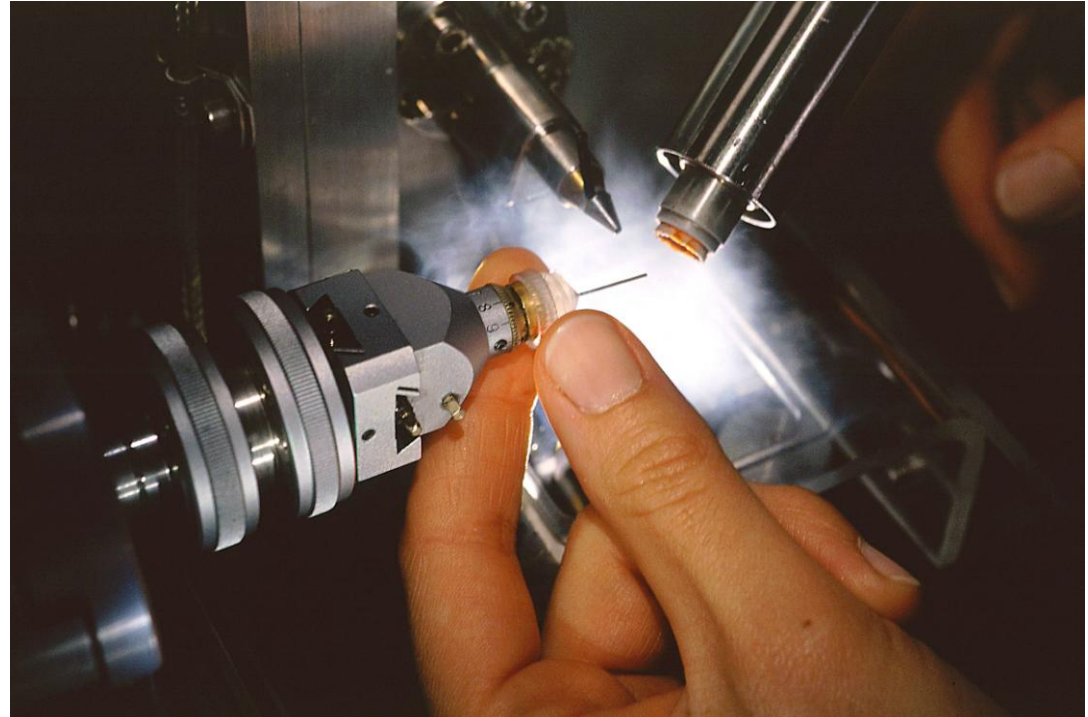
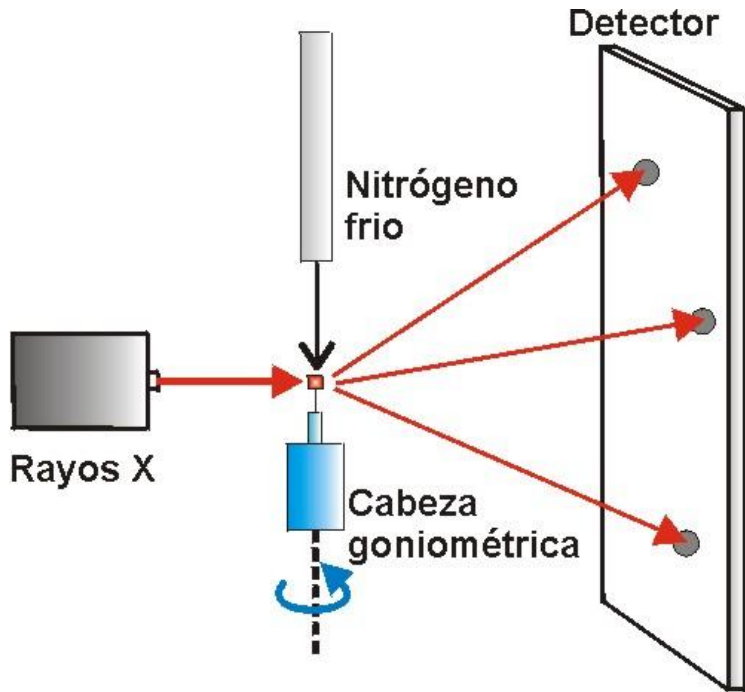


CCD



Axiom

MONTAJE EXPERIMENTAL DE CRISTALES DE PROTEINAS



Método oscilatorio

Las etapas fundamentales del análisis de datos

1. Indexación.

Inspección visual de las imágenes de difracción.

Auto indexado.

Determinación de los parámetros del cristal: celda unitaria, grupo de Laue probable, orientación del cristal, estimación de la mosaicidad.

Refinamiento de la geometría de la difracción.

2. Integración.

Integración de los picos de difracción, refinando simultáneamente la orientación del cristal, su mosaicidad y los parámetros del detector.

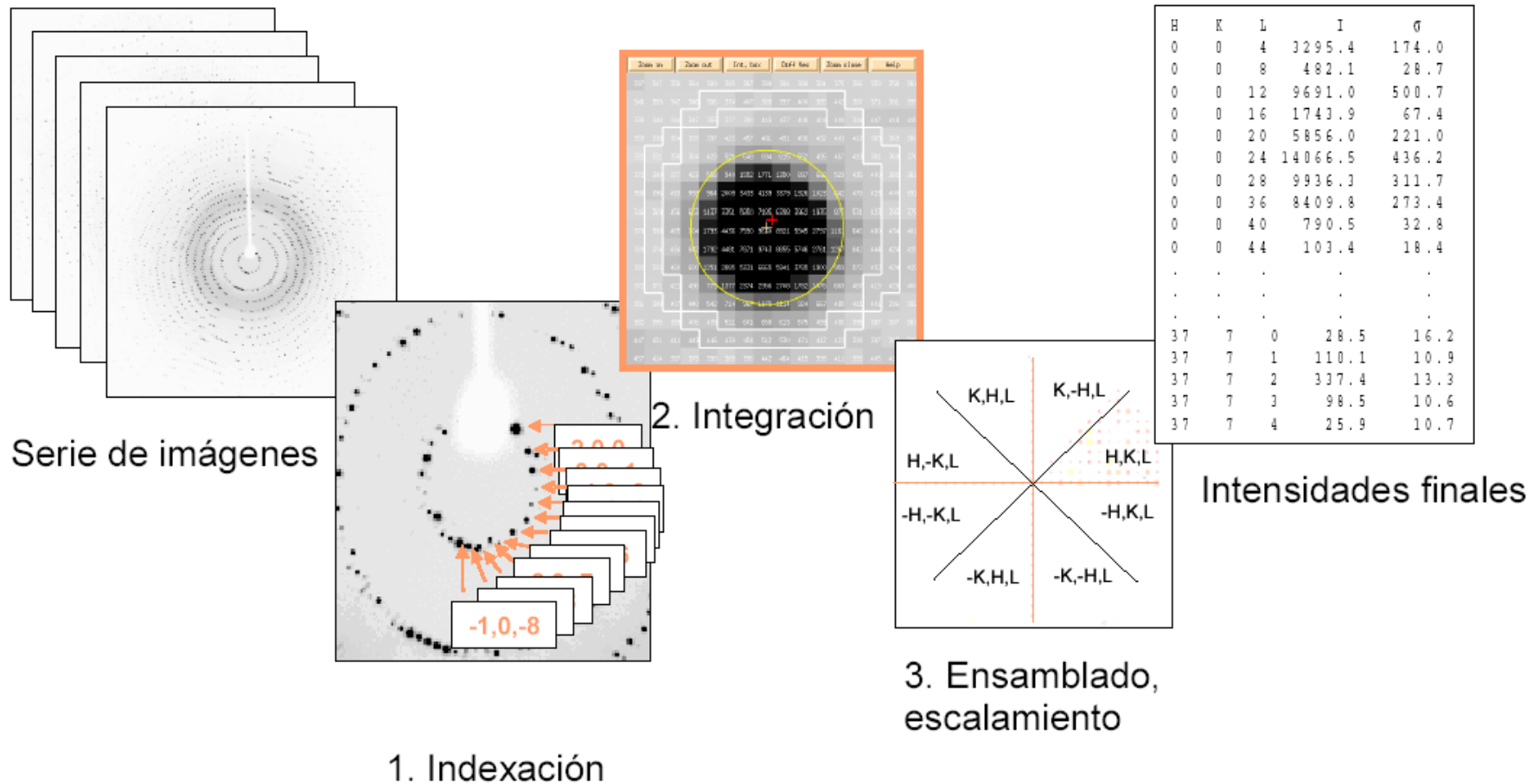
3. Ensamblado y escalamiento.

Conversión de los datos a una escala común.

Determinación de la simetría y ensamblado de las reflexiones relacionadas por simetría.

Sumatoria estadística y estimación de los errores.

Tres etapas



Programas para el procesamiento de datos

1 y 2. Indexación e integración

En dos dimensiones: **MOSFLM** (paquete CCP4) <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/mosflm/>
Denzo (paquete HKL) <http://www.hkl-xray.com/>

En tres dimensiones: d*TREK <http://www.rigaku.com/software/dtrek.html>
XDS <http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/~kabsch/xds/>

3. Escalamiento

Scala (paquete CCP4) <http://www.ccp4.ac.uk/html/scala.html>
Scalepack (paquete HKL)

PROCESADO DE DATOS DE DIFRACCIÓN



Select item

Main menu

- Read image
- Find spots
- Edit spots
- Clear spots
- Select images
- Autoindex
- Estimate mosaicity
- Predict
- Clear prediction
- Adjust
- Refine cell
- Integrate
- Strategy
- Keyword input
- Find hkl
- Pick
- Measure cell
- Circles
- Beam / backstop
- Save/Exit

MOSFLM Image Display

Edits allowed

Processing params

```

a          : 0.00
b          : 0.00
c          : 0.00
alpha     : 0.00
beta      : 0.00
gamma     : 0.00
PsiX      : 0.00
PsiY      : 0.00
PsiZ      : 0.00
Mosaic    : 0.000
Divh      : 0.000
Divv      : 0.000
Lambda    : 1.542
Distance  : 120.00
Beam X    : 90.00
          Y    : 90.00
CCOMEGA   : 0.000
ROFF      : 0.00
TOFF      : 0.00
YSCAL     : 1.0000
Pick area: X: 11
          Y: 11
Int threshold: 20
Vector scale 1
Two theta  : 0.00
Resolution  : 0.00
*SPOT SEARCH*
Threshold    : 5.00
Rmin         : 9.00
Rmax         : 81.00
X offset     : 0.00
Y offset     : 0.00
Min X size   : 0.50
Max X size   : 2.00
Min Y size   : 0.50
Max Y size   : 2.00
Min no of pix 6
X splitting  : 0.30
Y splitting  : 0.30
*AUTOINDEXING*
Min I/sig(I) : 20

Prompts      :  On
Update display:
After refinement:  No
After integration:  No
Timeout mode  :  Off
                
```

Select item

Main menu

- Read image
- Find spots
- Edit spots
- Clear spots
- Select images
- Autoindex
- Estimate mosaicity
- Predict
- Clear prediction
- Adjust
- Refine cell
- Integrate
- Strategy
- Keyword input
- Find hkl
- Pick
- Measure cell
- Circles
- Beam / backstop
- Save/Exit

cpl1-1_001.mar1800

Min 1 Max 700 Cursor position

Overlay on Contrast

Colour Black on white Mag x4

Waiting for input

Output

```

Pixel X,Y 1801 0
XC,YC mm 180.0 0.0
Resolution 0.00
Indices 0 0 0
F Phi 0.00 width 0.00
Intensity 0
Sigma 0

Spacing A 0.000
Average 0.0
Rms 0.0
Number 0
Zoomfactor 0
Circle resolution A
0.0 0.0 0.0 0.0
Phi 0.00 0.75
Missets ThetaX,Y,Z
0.00 0.00 0.00
                
```

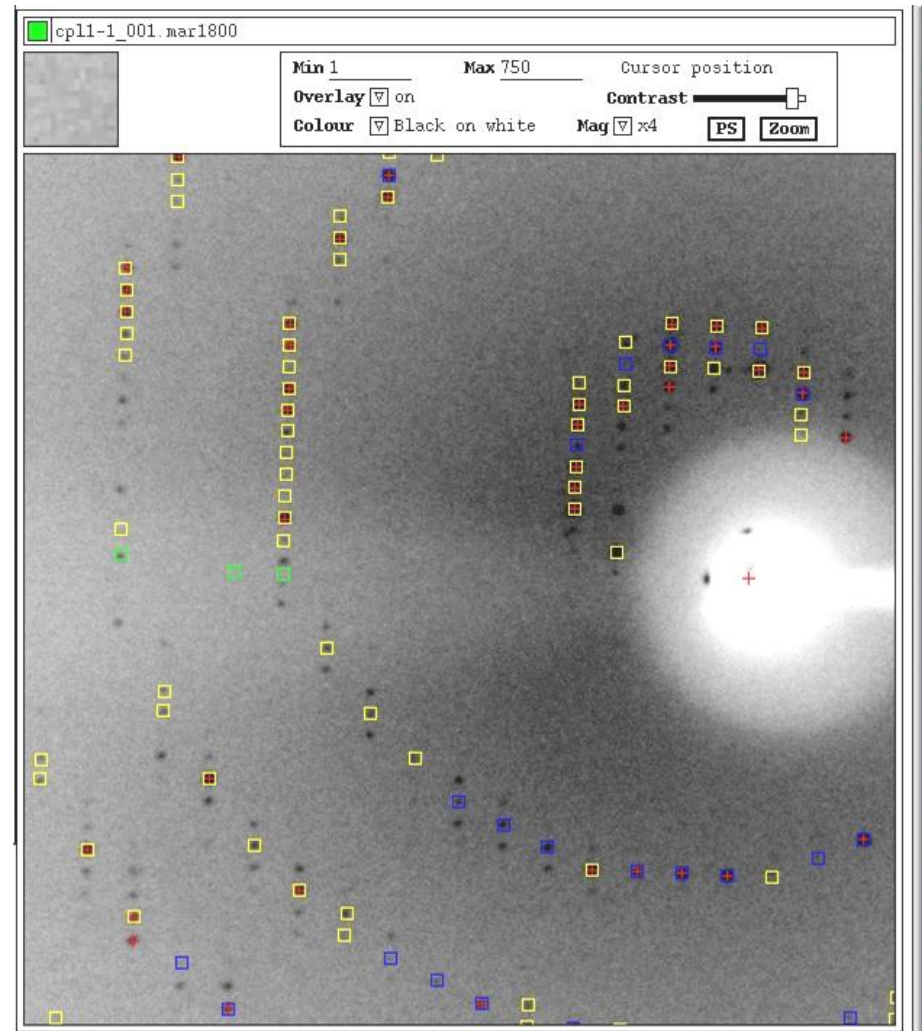
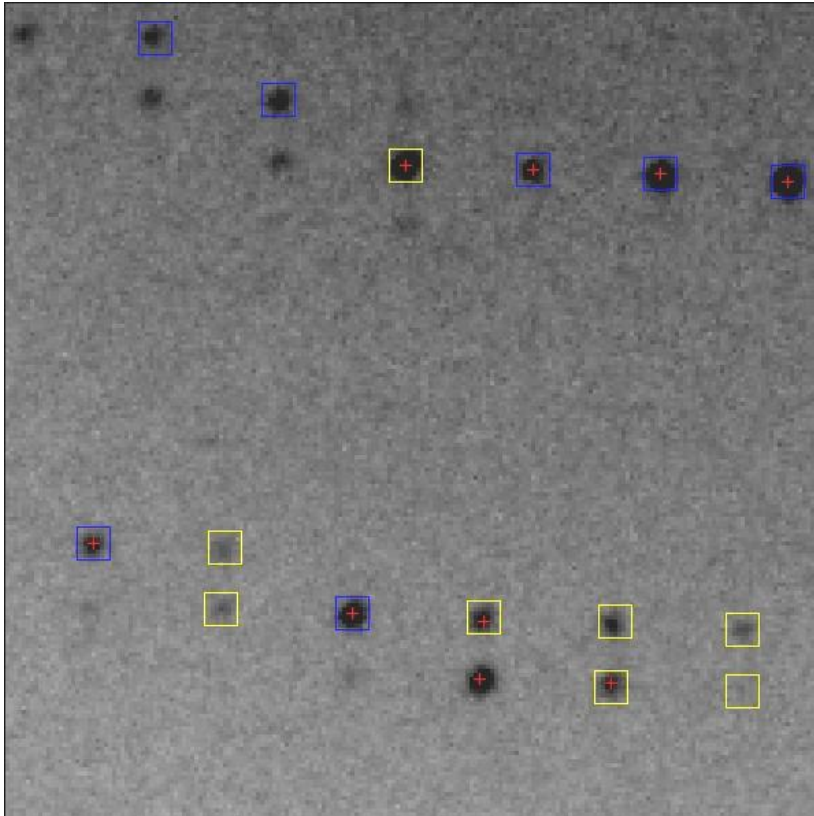
Blue: fulls, Yellow: partials, Red: overlaps
Green: too wide in phi

PROCESADO DE DATOS DE DIFRACCIÓN



```
xdl_io_window
 Input reply
List of possible Laue groups, sorted on penalty index.
The lower the PENALTY, the better
Only solutions with PENALTY less than 200 are listed, a complete list is given in the terminal window
No PENALTY LAIT a b c alpha beta gamma Possible spacegroups
20 190 oC 61.80 265.83 61.83 87.3 101.9 103.3 C222, C2221
19 190 mC 265.83 61.80 61.83 101.9 92.7 76.7 C2
18 190 oC 61.80 265.83 61.83 87.3 101.9 103.3 C222, C2221
17 189 mC 265.83 61.80 61.83 101.9 92.7 76.7 C2
16 189 mC 61.80 265.83 61.83 92.7 101.9 76.7 C2
15 189 mC 61.83 265.90 61.80 92.7 101.9 76.6 C2
14 94 oC 61.80 126.31 129.33 90.0 90.1 106.7 C222, C2221
13 94 hP 61.80 61.83 129.33 90.0 90.1 101.9 P3, P31, P32, P312, P321, P3112, P3121, P3212, P3221
P6, P61, P65, P62, P64, P63, P622, P6122, P6522, P6222, P6422, P6322
12 93 mC 61.80 126.31 129.33 90.0 90.1 73.3 C2
11 93 mC 126.31 61.80 129.33 90.1 90.0 73.3 C2
10 34 tP 61.80 61.83 129.33 90.0 90.1 101.9 P4, P41, P42, P43, P422, P4212, P4122, P41212, P4222, P42212 P4322, P43212
9 34 oP 61.80 61.83 129.33 90.0 90.1 101.9 P222, P2221, P21212, P212121
8 33 mP 61.80 61.83 129.33 90.0 90.1 101.9 P2, P21
7 33 mP 61.80 61.83 129.33 90.0 90.1 101.9 P2, P21
6 1 mC 96.03 77.87 129.33 90.0 90.1 90.0 C2
5 1 oC 77.87 96.03 129.33 89.9 90.0 90.0 C222, C2221
4 1 mC 77.87 96.03 129.33 89.9 90.0 90.0 C2
3 1 mP 61.80 129.33 61.83 90.0 101.9 90.1 P2, P21
2 0 aP 61.80 61.83 129.33 90.0 89.9 78.1 P1
1 0 aP 61.80 61.83 129.33 90.0 90.1 101.9 P1
Select a solution AND a spacegroup from list above (eg 3 p42) or 0 to abandon or T to change min I/sig(I):_
```

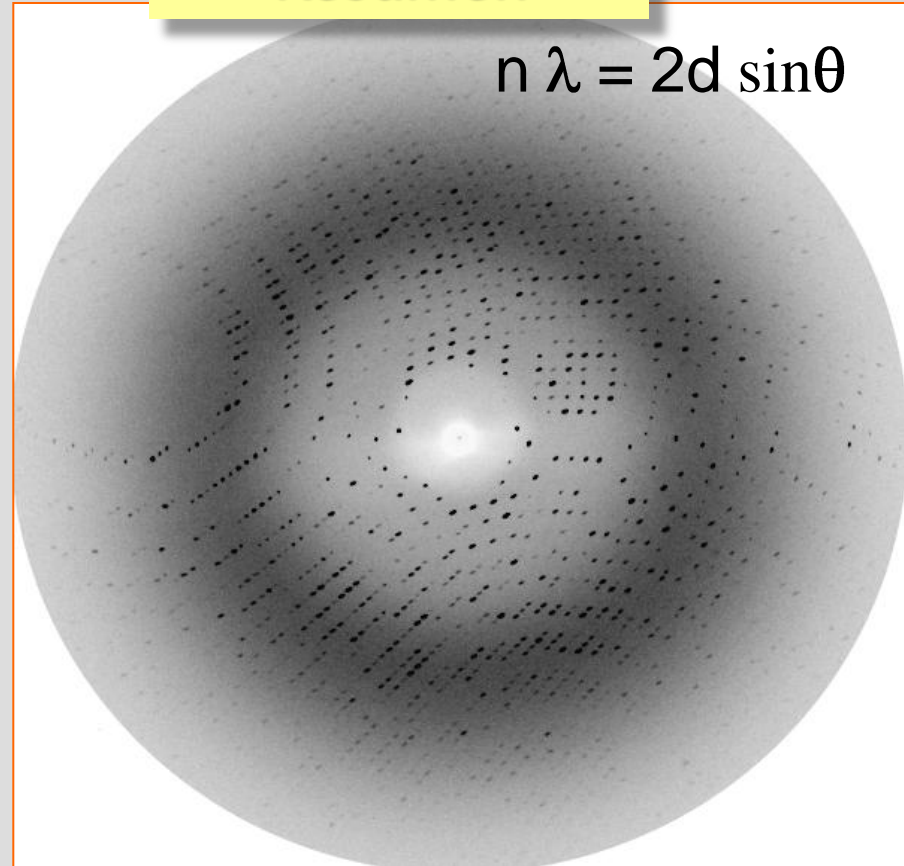
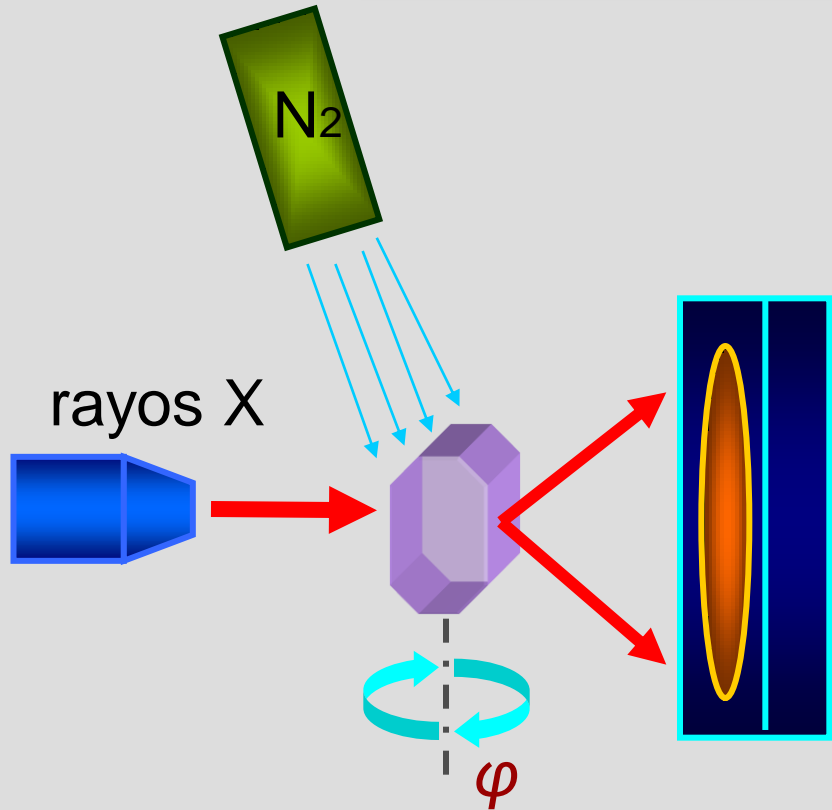
PROCESADO DE DATOS DE DIFRACCIÓN



DATOS DE DIFRACCIÓN



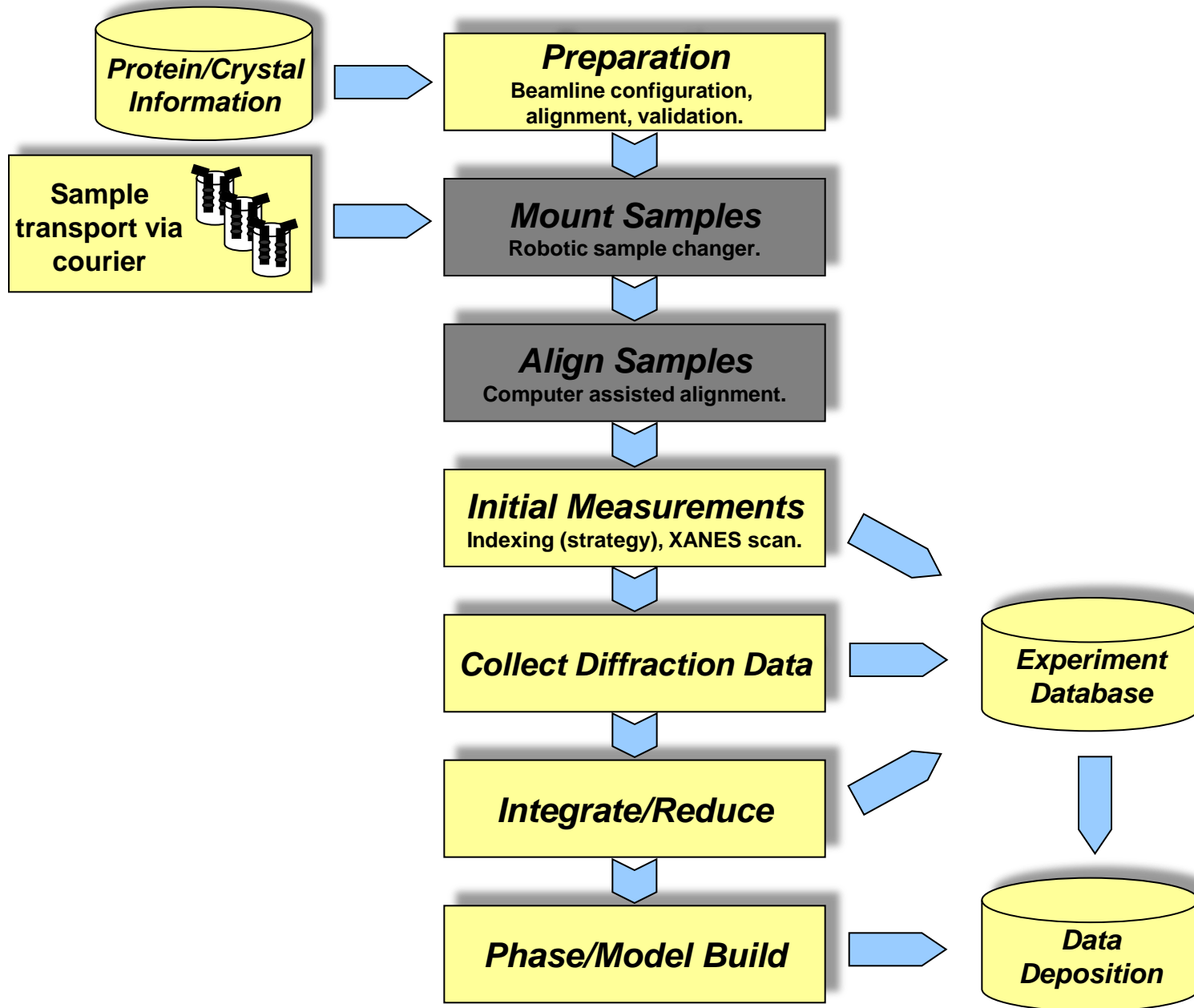
Resumen



$[hkl]$ + $| F |$
Posiciones Amplitudes

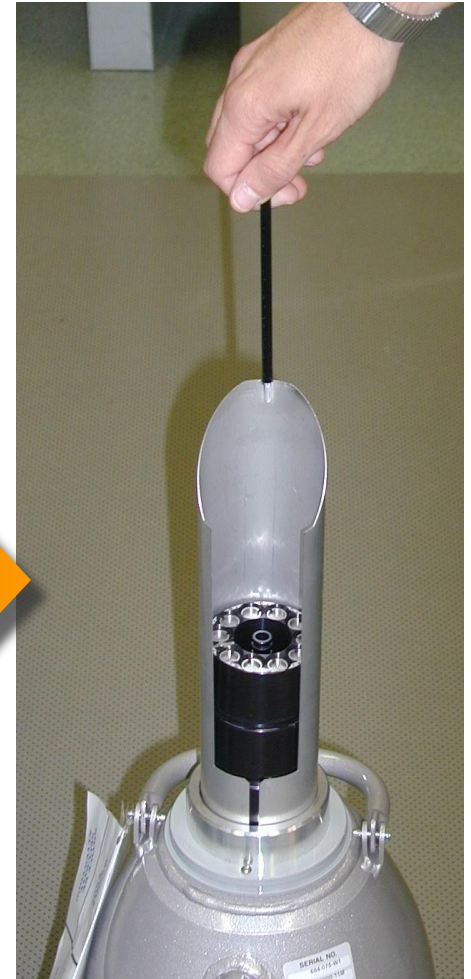
Procesado

Biocristalografía: el futuro YA está aquí



Biocristalografía: el futuro YA está aquí

1. Montaje y Transporte de cristales de proteína



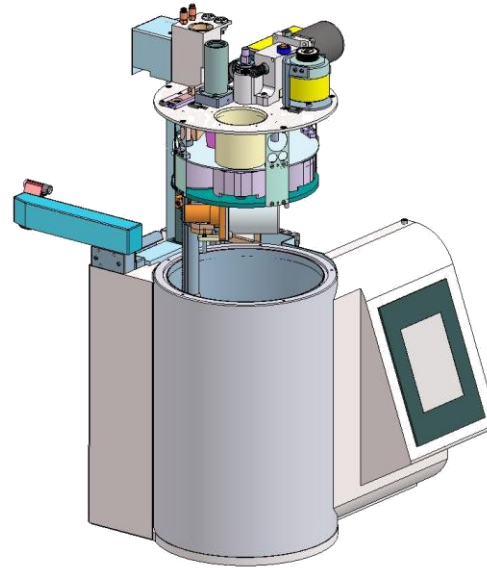
Biocristalografía: el futuro YA está aquí

2. Cargador de muestras:

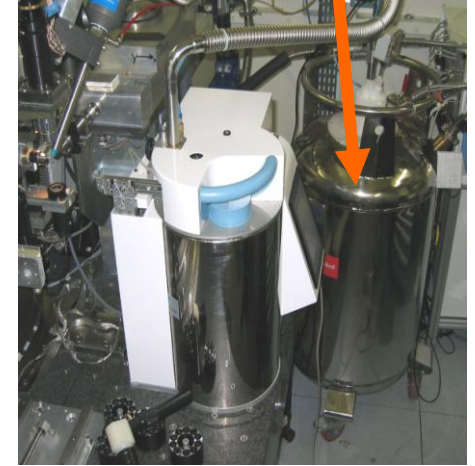
Basket
Loading Path



Touch Screen



LN2 Tank and
Pump



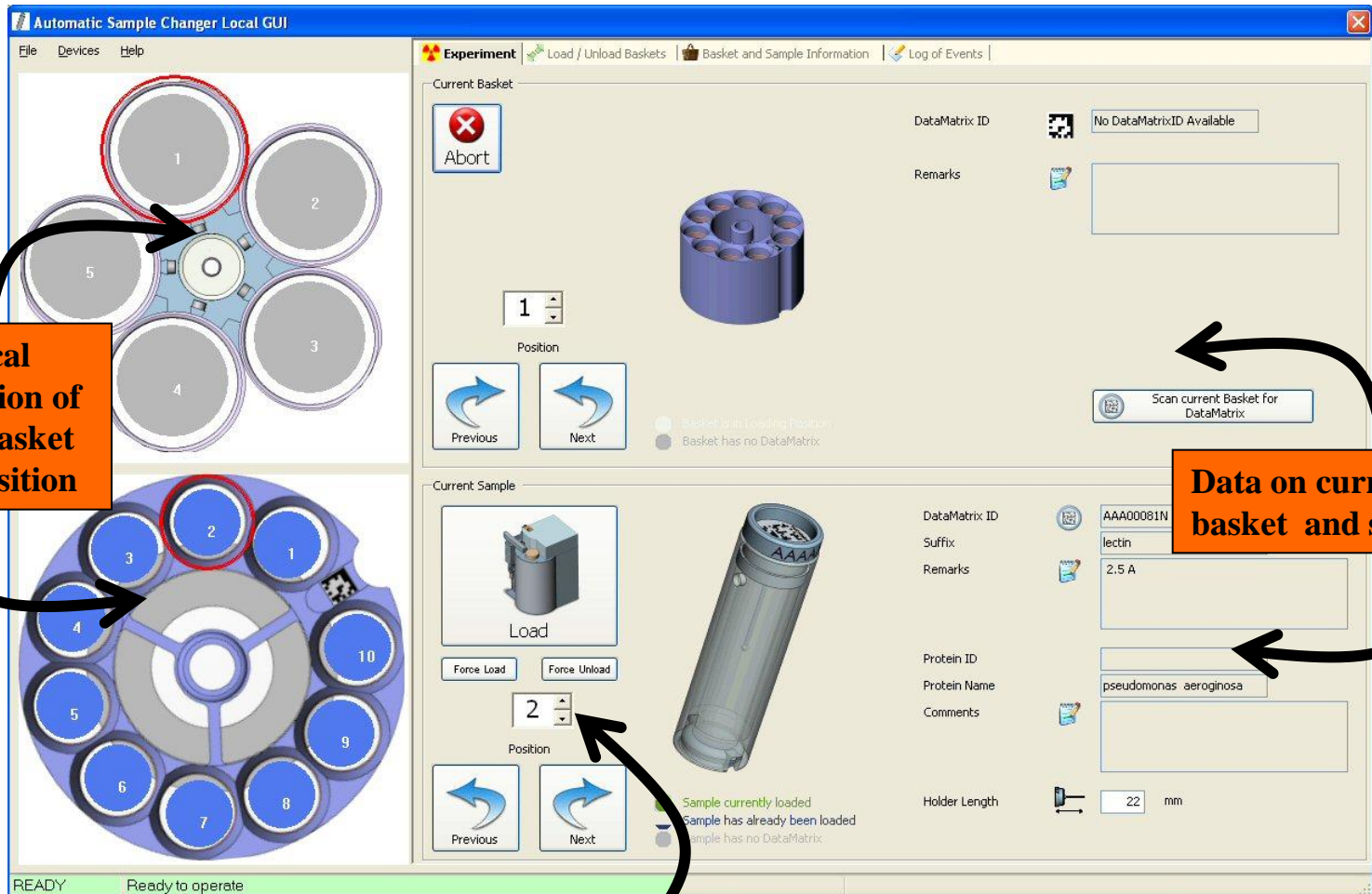
- Holds up to 50 samples stored in 5 baskets of 10 samples each
- **MUST** be used in conjunction with **SPINE** sample holder
- Integrated data matrix reader for sample tracking

Biocristalografía: el futuro YA está aquí

SAMPLE CHANGER
4 baskets prototype

Biocristalografía: el futuro YA está aquí

2. Cargador de muestras: Interface gráfica



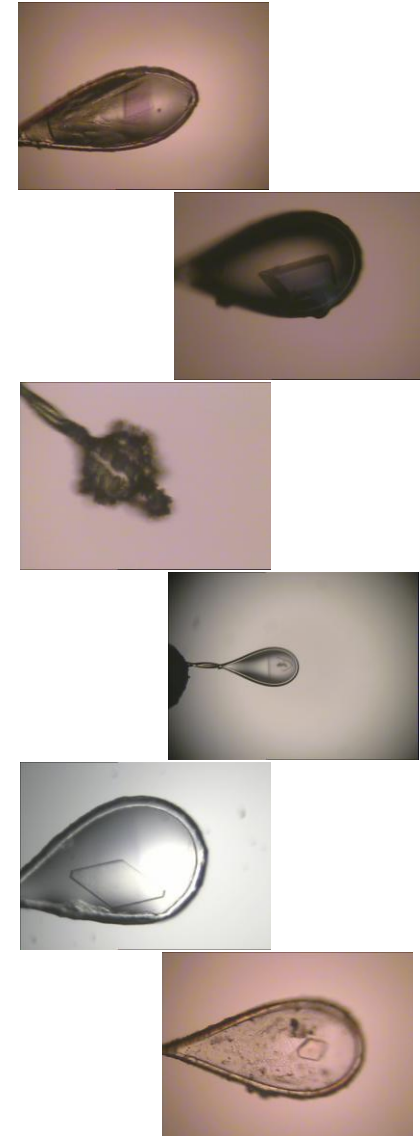
Graphical representation of Basket + Basket Selector position

Data on current basket and sample

Change current position

Biocristalografía: el futuro YA está aquí

3. Visualización de la muestra y centrado



- Assisted “3 Clicks” : Rapid and accurate!
- Automated crystal centering (~80% successful)

Exes (ID23) / EXP

Out Cam Light Cryo Fidget Machine

Out out in out

Set In

EXES: Diffractometer control

Zoom: Zoom 1

px/mm (Y): 185.15
px/mm (Z): 182.55

sample more

px1: 1200.9794
px2: 111.8130
px3: 226.7464

INFO 04-28-2004 10:46:55 Got reply from Spec version H4232wh1, ID 296
INFO 04-29-2004 15:11:17 SpecCommand toggle launch command 'ratio 0'
INFO 04-28-2004 15:11:17 Got reply from Spec version H4232wh1, ID 291

ProDC Beamline Control ProDC V2.0

View Comments Database

Instrument(s) Control

Motor Position Control: Current Destination Relative

Motor Det det 1.35 0.0 0.0

Phi 50 0.0 0.0

Theta Stage 2.0 0.0 0.0

Wavelength 0.0 0.0 0.0

Energy 0.0 0.0 0.0

Detector Detector (deg) 0.10
Data Detector any

ProDC: Data collection

Collection mode: Single Run

Frame number to start
Oscillation Start (deg)
Oscillation Range (deg)
Overlap between frames (deg)
Exposure time per frame (sec)
No. of passes per frame
No. of frames to collect

Start data collection

Director Information (exp): 0.10
File Directory: /data/beamline/beamline/any

09:42:25 AM Frame 2 : 90.0 to 91.0 degrees

Collection Worker_09:42:25 AM

Result of auto focus:
Spot group: 013
CIE: p=188.76, b=188.76, c=188.76, alpha=90.00, beta=90.00, gamma=90.00
Optical 0 beam=23.61, X beam=21.00
Reflection spot=1331, reflection=53
Spot deviation (DMS): 0.100

Automatic Sample Changer Local GUI

Current Basket: 1

Position: 1

Load

Unload

Sample changer control

Sample ID: 123456789

Sample Name: 123456789

Sample Length: 22 mm

ProDC Beamline Control ProDC V2.0

ProDC V2.0

User: [Name] Experimental Sessions Map Doc Logout

px/mm: 185.15

Sample changer for beamline control: 05 Feb 04

Sample changer: Full Data
Sample changer: Full Data
Sample changer: Full Data
Sample changer: Full Data

Sample changer: Full Data
Sample changer: Full Data
Sample changer: Full Data
Sample changer: Full Data

PXWeb (ISpyB): Beamline Database

ID23 - Exes Control Panel

Beamline control

Zoom: Zoom 1

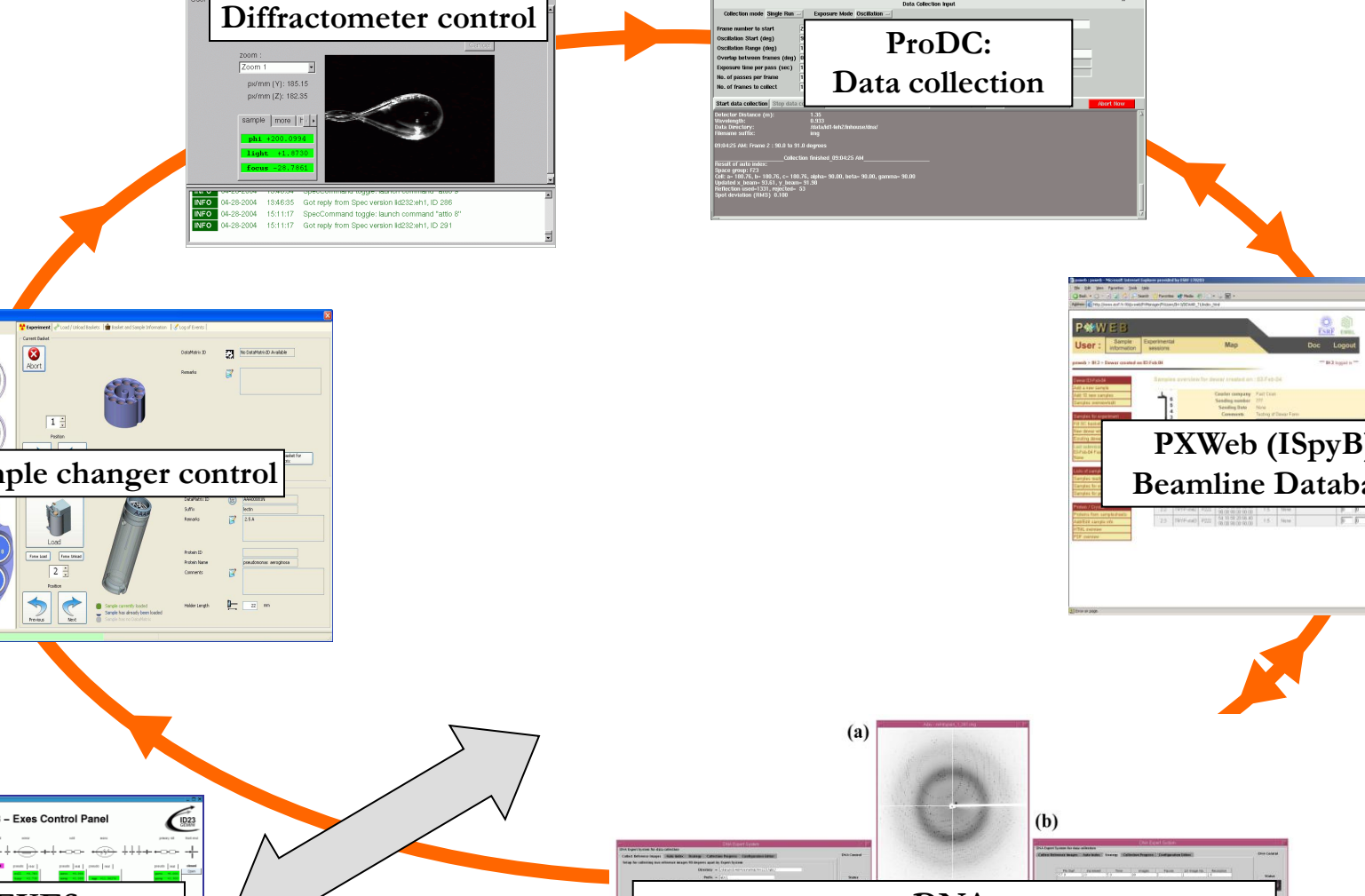
px/mm (Y): 185.15
px/mm (Z): 182.55

sample more

px1: 1200.9794
px2: 111.8130
px3: 226.7464

(a) (b)

DNA: Automated data processing and collection



En un futuro muy muy cercano....

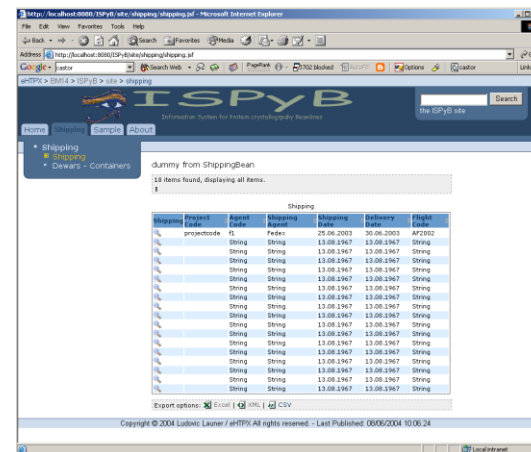
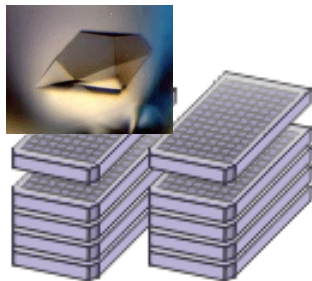
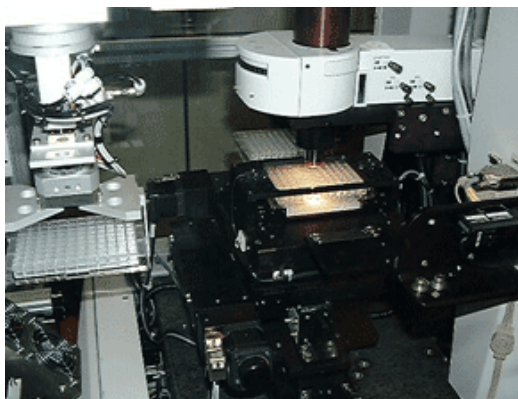
The Missing Link : ISPyB Pocket Sample

Links the Crystallization information system to the data collection information system

Crystal unique identifier: UUID
Tray location
Crystallization conditions
Protein information
...



Crystal unique identifier: UUID
Sample information
Crystal information
...



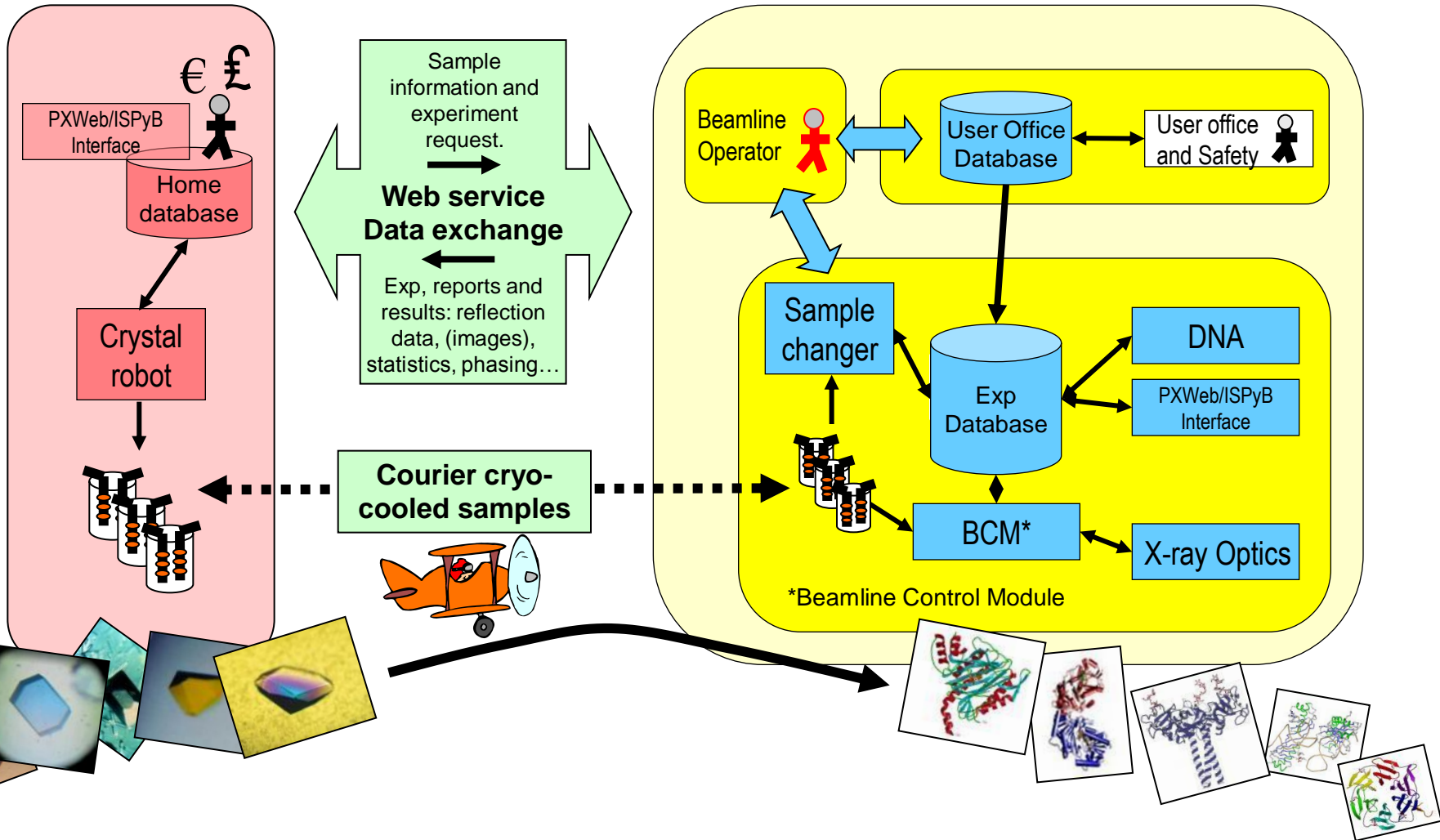
The Missing Link: ISD, P, Pocket Sample

Crystal fishing
the ~~missing~~ link






Biocristalografía: El experimento en el futuro?

User Home Laboratory

Synchrotron



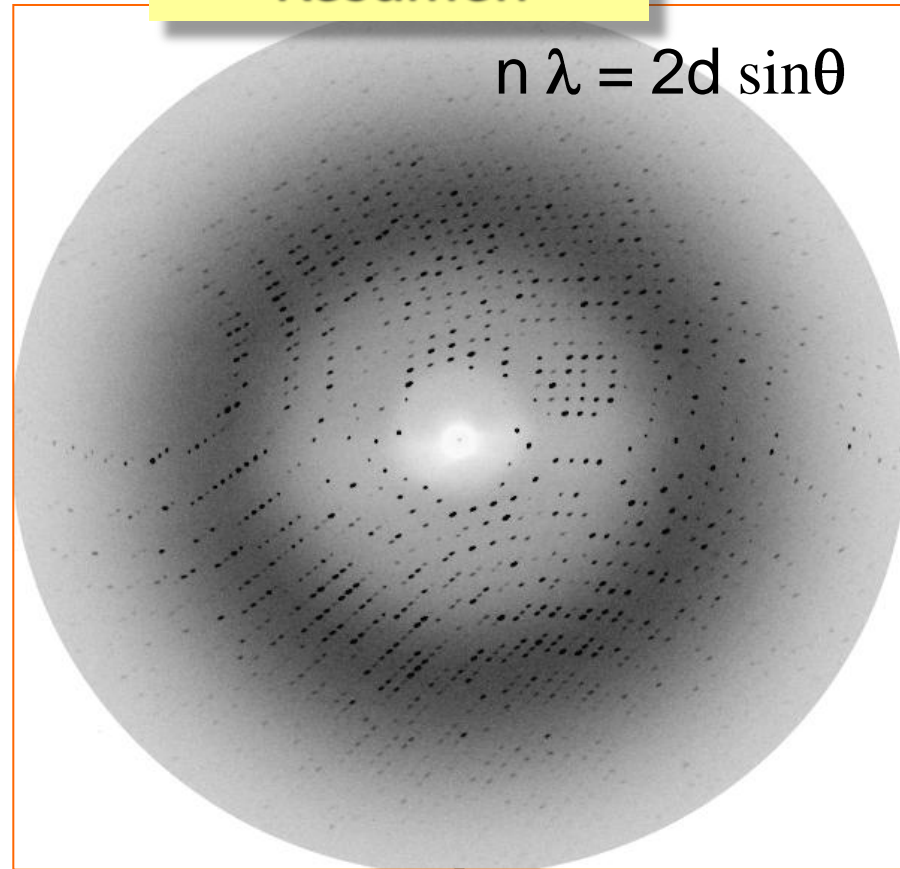
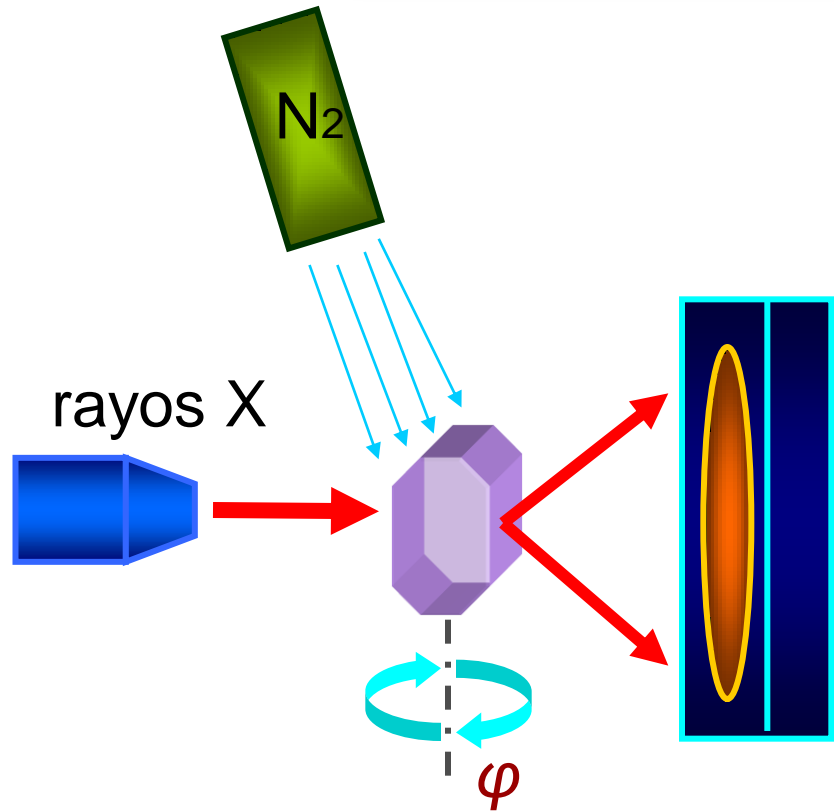
Difracción de Rayos X de Proteínas

16. **El Problema de la Fase: métodos de resolución estructural.**
2. Simetría.
3.  El problema de la fase.
Cristales y su obtención.
4. Difracción de Rayos X.
 La función de Patterson.
5. Aspectos experimentales: equipos de difracción y procesamiento de datos.
 Reemplazamiento múltiple isomorfo (MIR).
6. **El Problema de la Fase: métodos de resolución estructural.**
 El método MAD.
7. Refinamiento, modelado y validación estructural.
 Reemplazamiento molecular.
8. Aplicación: relaciones estructura-función.

DATOS DE DIFRACCIÓN



Resumen



$[hkl]$ + $| F |$
Posiciones Amplitudes

Procesado

EL PROBLEMA DE LA FASE....



Espacio real: cristal

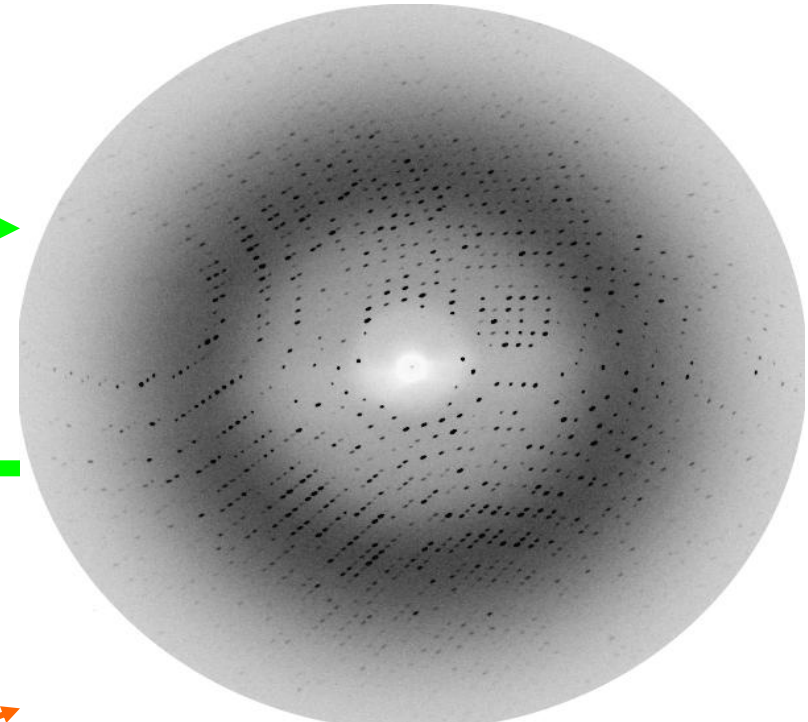
Espacio recíproco: espectro



Siempre →

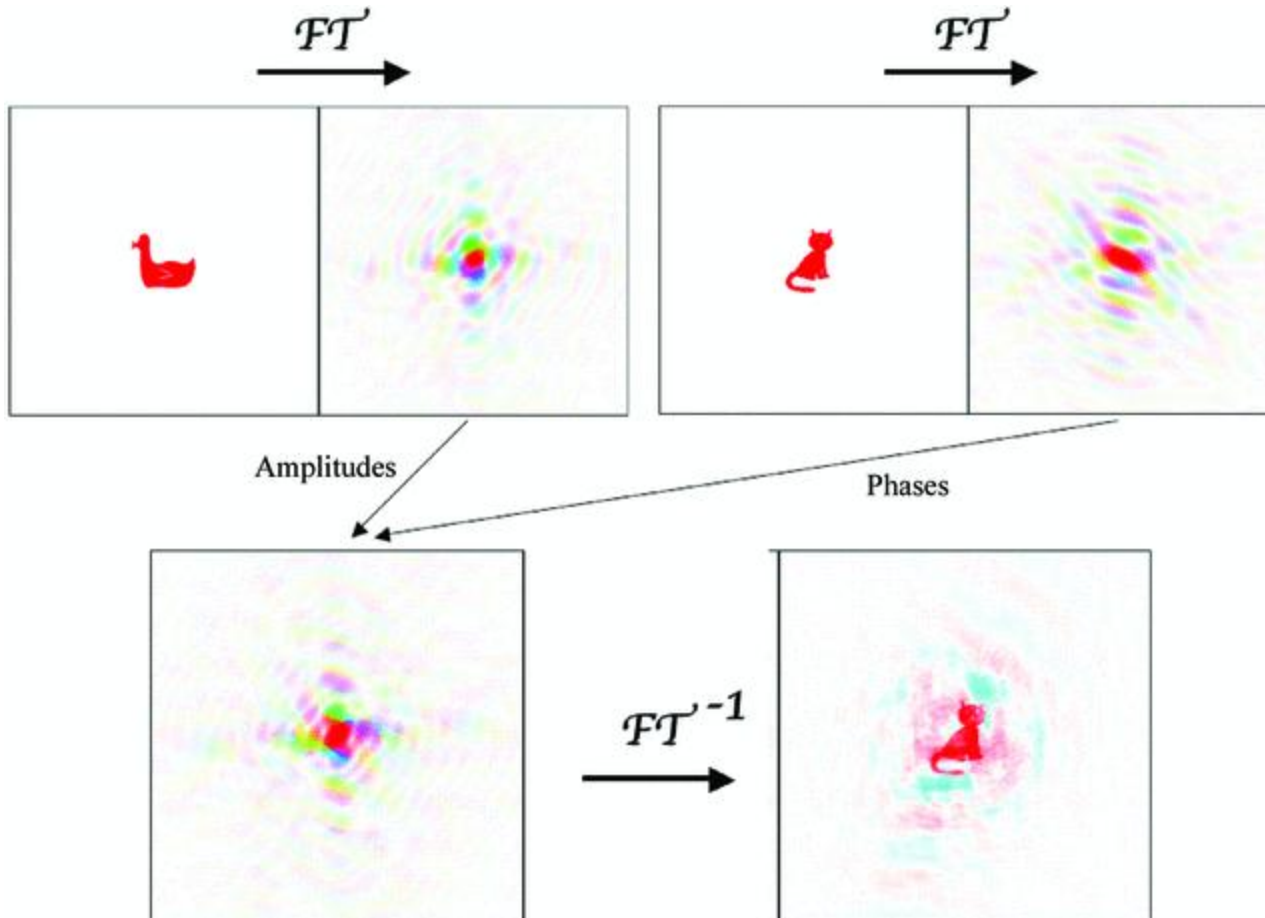
← ???

TF ↔



$$\rho(x y z) = 1/V \sum |F(h k l)| \exp \{-2 \pi i (hx+ky+lz) + i \Phi(h k l)\}$$

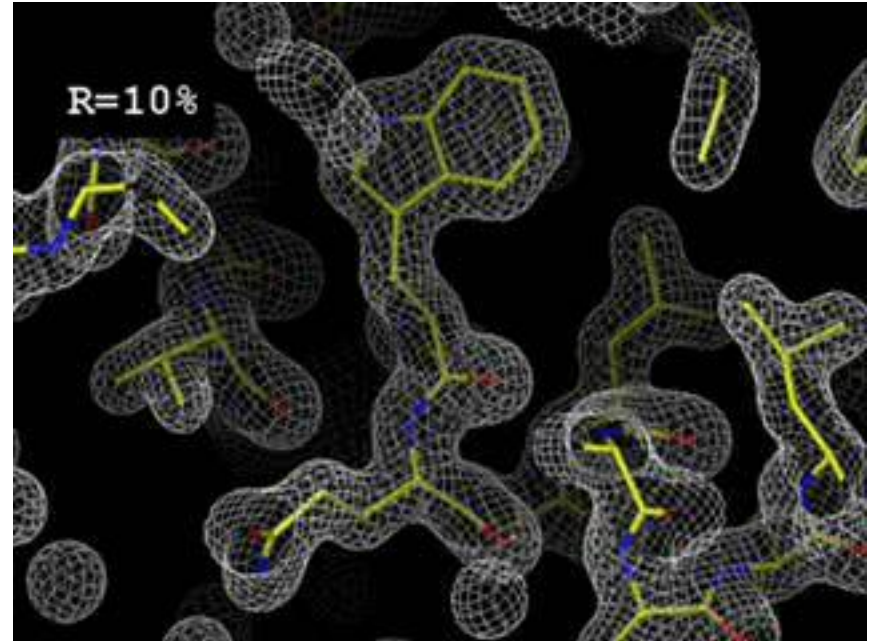
IMPORTANCIA DE LA FASES....



Efecto de las amplitudes de difracción

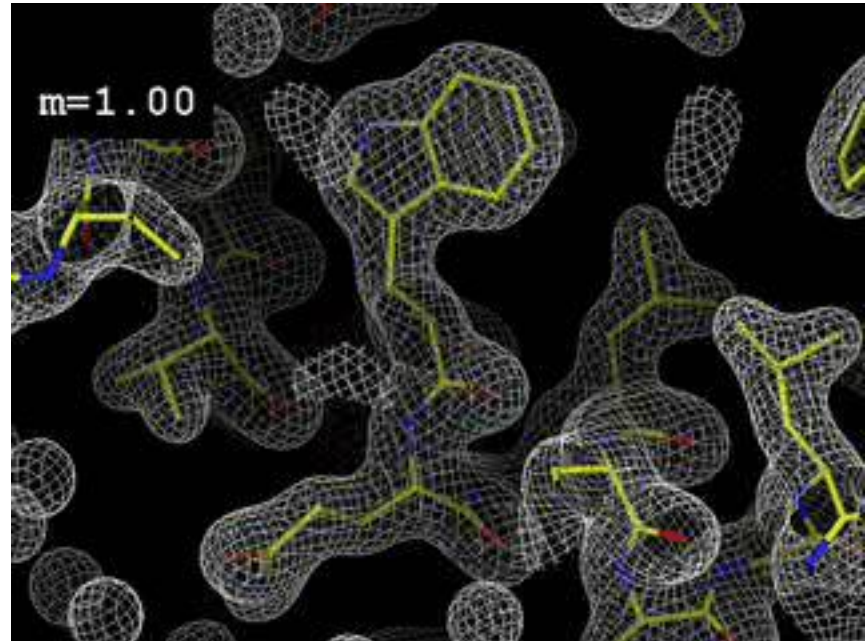
- *La película muestra el efecto (casi imperceptible) de calcular un mapa de densidad electrónica con amplitudes (intensidades de difracción) erróneas, es decir, muy mal medidas.*

Las imágenes de esta película representan el cambio gradual de las amplitudes (desde valores razonables de desacuerdo con las teóricas, $R=10\%$, hasta valores aleatorios, $R=75\%$). Es interesante darse cuenta de que si las fases son correctas (tal como es el caso) el mapa apenas cambia hasta llegar a valores de $R=30\%$ y que es todavía interpretable hasta valores próximos a $R=50\%$.



Efecto de las fases

La película de la derecha muestra el efecto del cálculo de un mapa de densidad electrónica con fases mal estimadas. La "figura de mérito" de las fases (el coseno del error de la fase) se muestra como "m". Obsérvese la fuerte dependencia existente entre la bondad de las fases y la apariencia del mapa para poder reconocer la localización de los átomos.



EL PROBLEMA DE LA FASE.... ¿¿¿CÓMO RESOLVERLO???



Métodos de Faseado

Métodos directos

$\rho \geq 0$, átomos discretos

Remplazamiento Molecular

Modelo homólogo

Remplazamiento Isomorfo

Subestructura de átomos pesados

Dispersión Anómala

Subestructura de átomos anómalos

**Modificación de Densidad
(mejora de las fases)**

Aplanamiento de solvente

Histogram matching

Promediado simetría no-cristalográfica

Estructura Parcial

Extensión de fases

LA FUNCIÓN DE PATTERSON



Arthur L. Patterson(1902-1966)

Históricamente hablando, la primera solución al problema de las fases vino de la mano de Arthur Lindo Patterson. Basándose en la imposibilidad de resolver de un modo directo la función de la densidad electrónica, y tras su aprendizaje sobre convolución de transformadas de Fourier con el matemático Norbert Wiener, en 1934 Patterson introdujo una nueva función P(uvw). Esta nueva función, que define en un nuevo espacio (espacio de Patterson), puede considerarse sin exageración como el desarrollo singular más importante para la Cristalografía, tras el propio descubrimiento de los rayos X por Röntgen en 1895. Su elegante fórmula, conocida como la función de Patterson, supone una simplificación de la información contenida en la función de densidad electrónica, ya que suprime la información de las fases, y los módulos de los factores de estructura se sustituyen por sus cuadrados. Es, pues, una función que puede calcularse de inmediato a partir de la información experimental de que se dispone (las intensidades, que a su vez se derivan de los módulos de los factores de estructura)

$$\rho(xyz) = (1/V) \sum \sum \sum [F(hkl)] \cos 2\pi (hx + ky + lz - \Phi(hkl))$$

electrónica

Función de densidad

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

Función de Patterson

LA FUNCIÓN DE PATTERSON



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

Reemplazando $[F_{hkl}]$ y ϕ_{hkl} -----> $[F_{hkl}]^2$ se obtiene una función

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

Función de densidad elec.

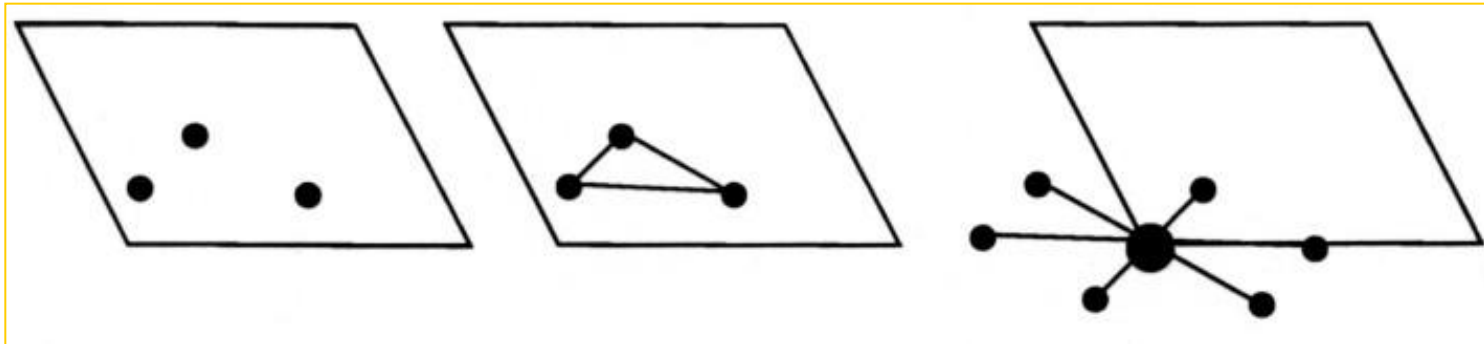


Función de Patterson

$$u = x_1 - x_2$$

$$v = y_1 - y_2$$

$$w = z_1 - z_2$$



Cristal

Cristal

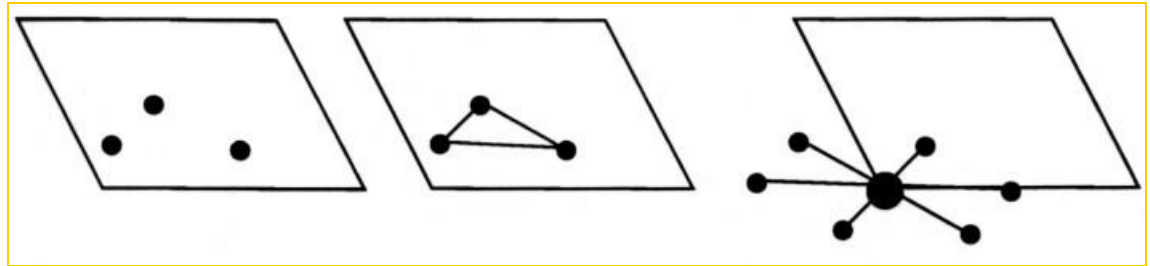
Patterson

LA FUNCIÓN DE PATTERSON- PROPIEDADES



- El número de máximos es elevado:

N átomos \rightarrow N^2 máximos \rightarrow (N^2-N) vectores

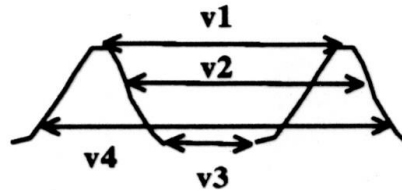


Cristal (3 átomos)

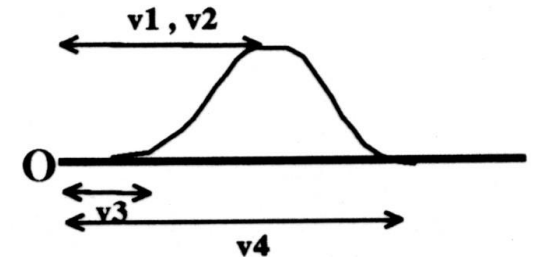
Patterson $(3^2-3) = 6$ vectores

Alta densidad

- Los máximos son anchos, hay solapamiento:



Cristal



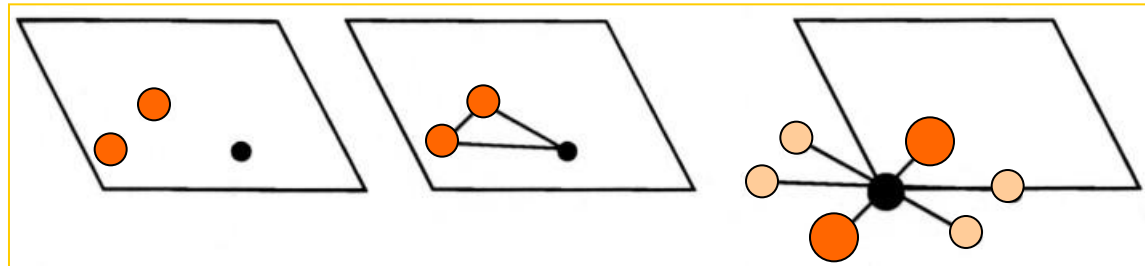
Patterson

LA FUNCIÓN DE PATTERSON PROPIEDADES



**Altura de los
máximos**

- La altura de los máximos es proporcional al producto de los números atómicos implicados:



$Z_i Z_j$ \longrightarrow facilidad para detectar átomos pesados

LA FUNCIÓN DE PATTERSON PROPIEDADES



**Simetría
de la
función**

Simetría del cristal



230 Grupos espaciales

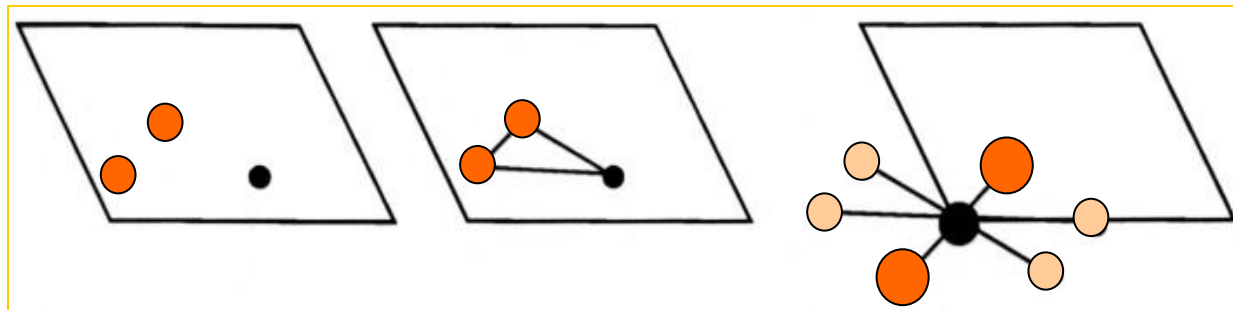
Simetría de Patterson



24 Grupos espaciales

La simplificación es consecuencia de la pérdida de información que ocurre al pasar de:

(F, ϕ) F^2

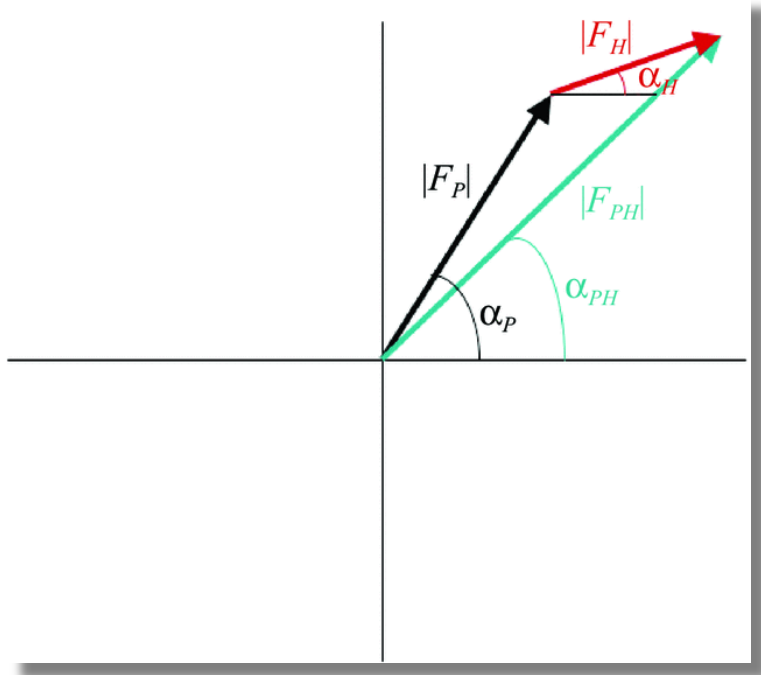


Cristal sin centro de simetría

Patterson siempre con
centro de simetría

$UVW + \overline{UVW}$

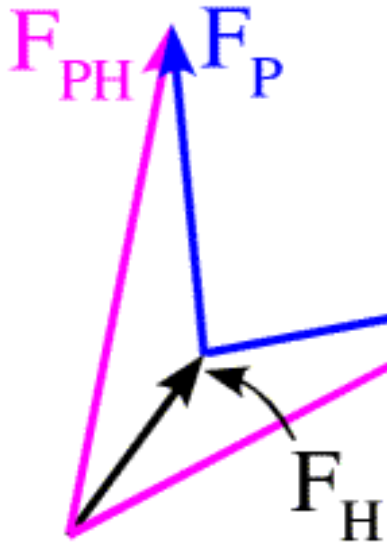
REEMPLAZAMIENTO ISOMORFO



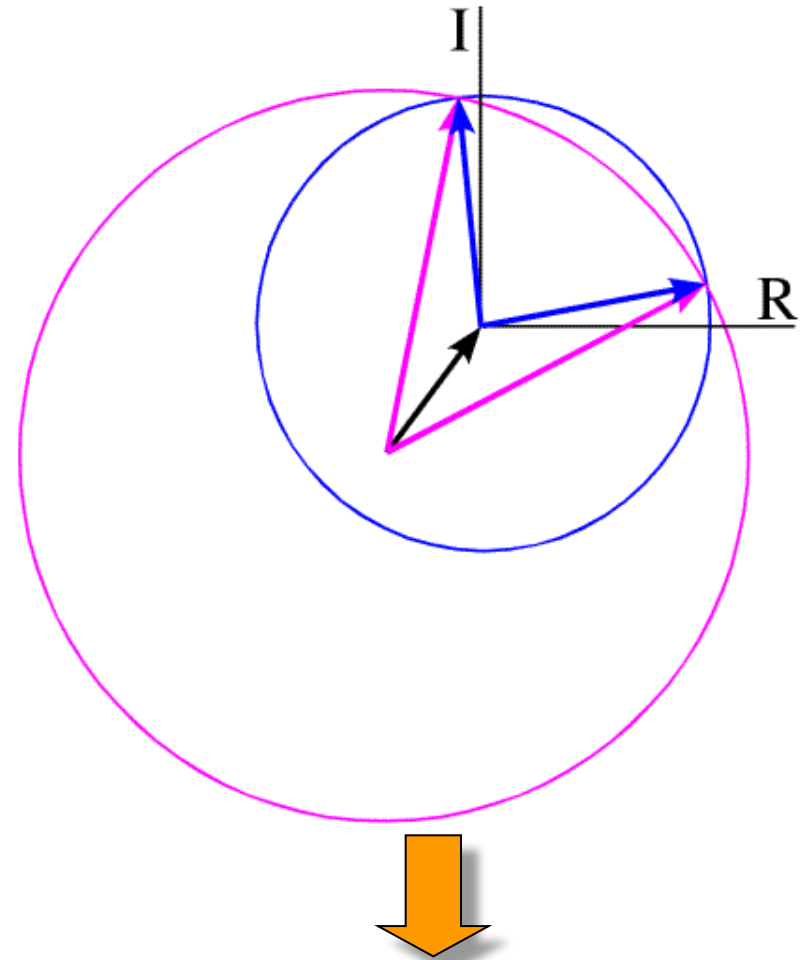
- $|F_p|$ Amplitudes cristal nativo
- $|F_{PH}|$ Amplitudes cristal con derivado
- $|F_H|$ Amplitudes átomo pesado

$$|F_H| \approx |F_{PH}| - |F_p| \xrightarrow{\text{Patterson}} (x, y, z)_H \xrightarrow{\text{Fourier}} \alpha_H$$

REEMPLAZAMIENTO ISOMORFO, SIR



$|F_P|$ cristal nativo
 $|F_{PH}|$ cristal con derivado
 $|F_H|$ átomo pesado



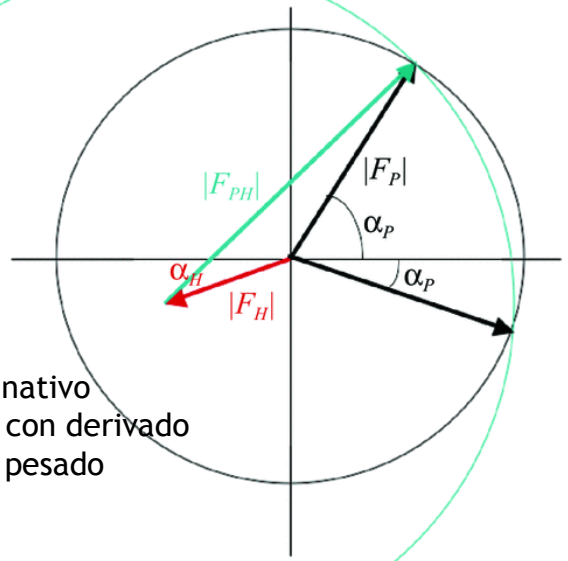
Dos valores posibles para α_p

La fase α_p tiene una ambigüedad

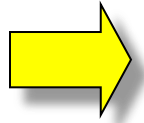
REEMPLAZAMIENTO ISOMORFO, MIR



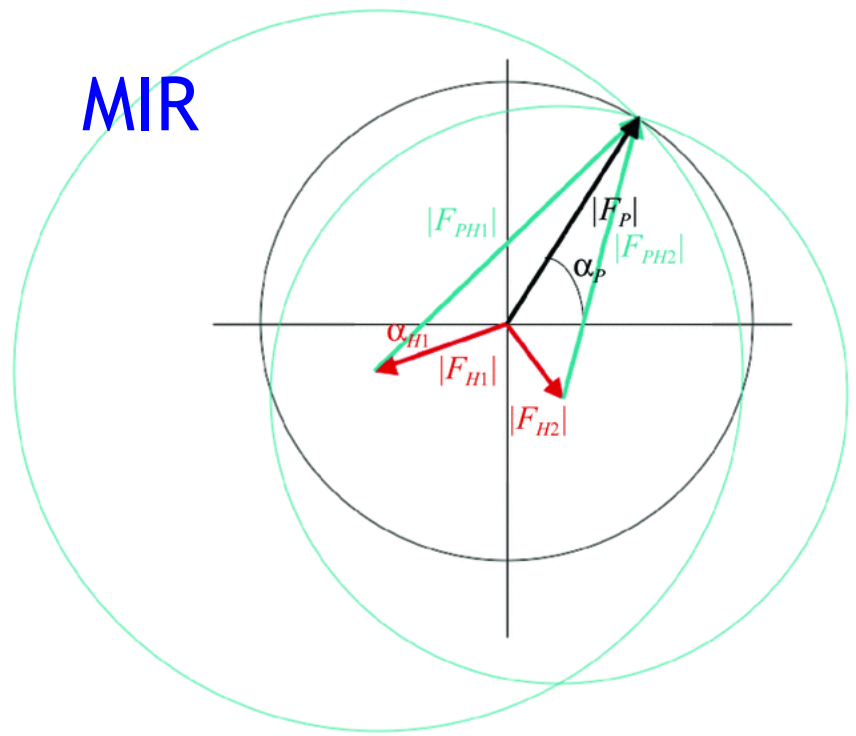
SIR



- $|F_P|$ cristal nativo
- $|F_{PH}|$ cristal con derivado
- $|F_H|$ átomo pesado

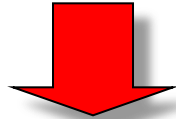


MIR



La adición de un segundo derivado elimina la ambigüedad

→ Incluir átomos pesados en el cristal nativo que queden en posiciones fijas de la molécula sin deformar ni la celdilla ni la conformación de la proteína.

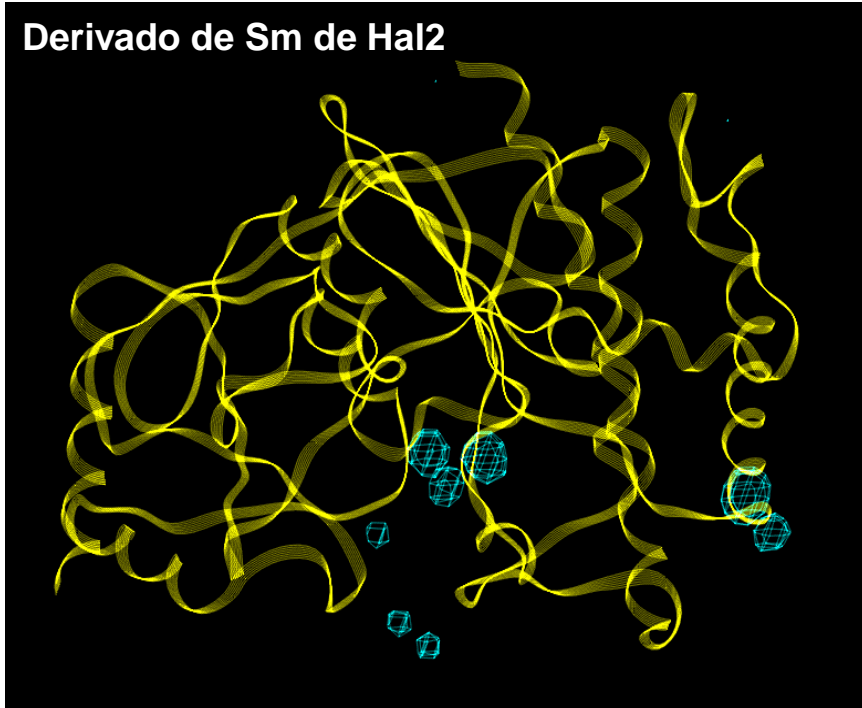


¡¡ LAS DIFERENCIAS EN INTENSIDADES DEBEN SER EXCLUSIVAMENTE DEBIDAS A LOS ATOMOS PESADOS !!

→ **MÉTODO:**

1. Preparación de, al menos, un derivado (Hg, Au, Pt, U, Sm...Xe, Kr...Br, I).
2. Toma de datos de difracción para nativa y derivados.
3. Aplicación de función de Patterson y obtención coordenadas del metal.
4. Refinamiento parámetros átomo pesado y cálculo ángulos de fase.
5. Cálculo de mapas de densidad electrónica de la proteína.

Derivado de Sm de Hal2



INCONVENIENTES:

1. Errores en $|F_{PH}|$ y $|F_P|$.
2. No isomorfismo ($4\% < d_{\min}$).
3. Desorden en sitios minoritarios.
4. Escalado.

DISPERSIÓN ANÓMALA

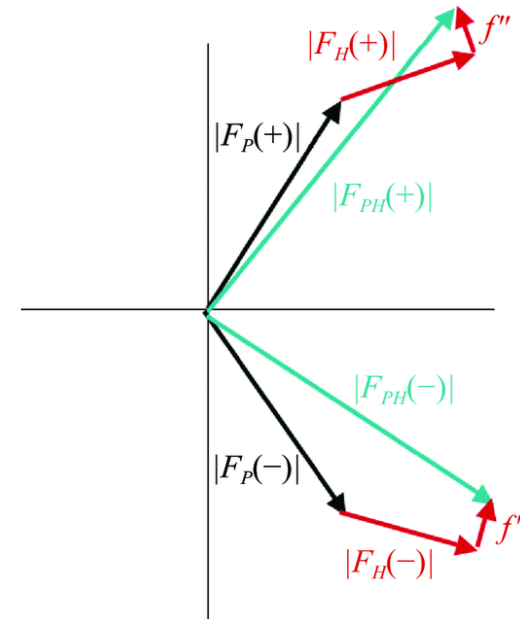
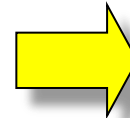
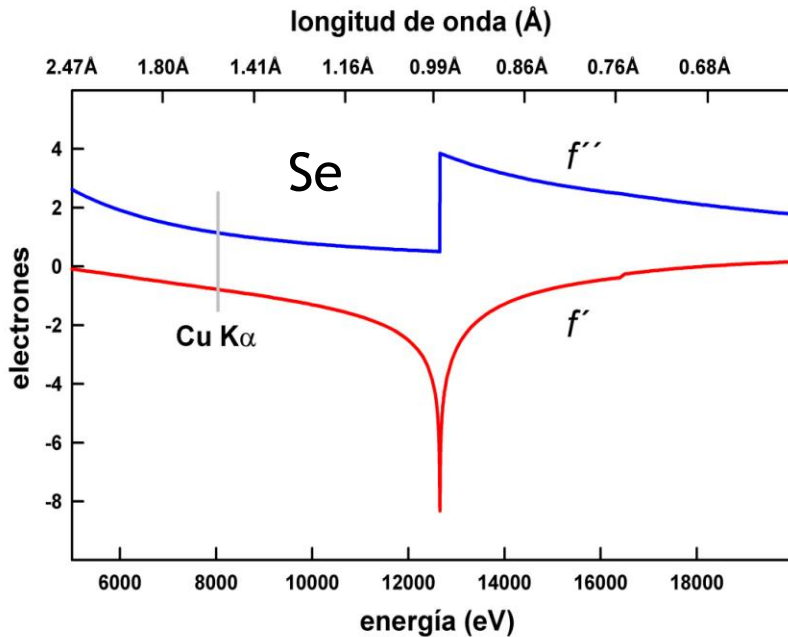


$$f(\theta, \lambda) = f_o(\theta) + f'(\lambda) + i f''(\lambda)$$

Factor de scattering atómico

Término dispersivo

Término absorción

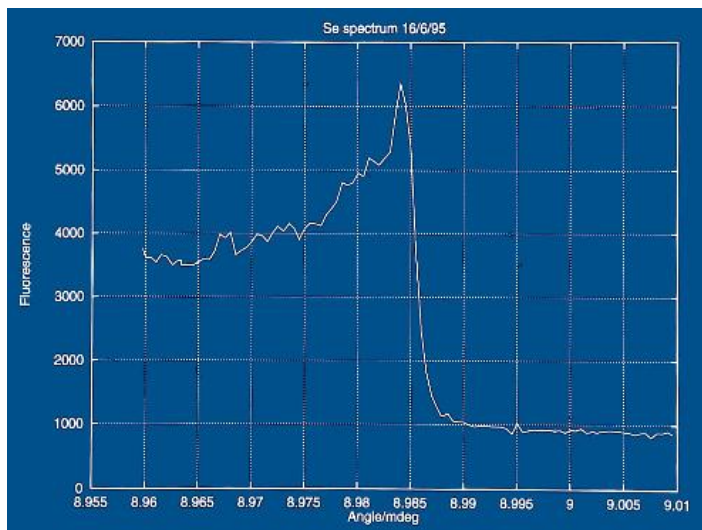


$$F(h k l) \neq F(-h, -k, -l)$$

→ VENTAJAS:

1. No hay problemas de isomorfismo.
2. Da mejores resultados a alta resolución

→ DISPERSIÓN ANÓMALA:



Espectro de fluorescencia de un cristal de proteína con Se-Met.

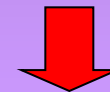
Para determinadas E del haz de Rayos X se produce un fenómeno de **absorción y resonancia** de electrones de capas internas.



Modificación de la contribución del átomo pesado a cada spot de difracción (**efecto anómalo**).



$$F(h\ k\ l) \neq F(-h, -k, -l)$$



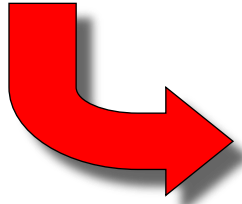
$$(\Delta |F|_{\text{anom}})^2 \longrightarrow (x, y, z)_{\text{anom}}$$

DISPERSIÓN ANÓMALA



→ MÉTODO:

1. Inclusión de dispersores anómalos en la estructura.



2. Medida del espectro de absorción.

3. Toma de datos de difracción de rayos X a diferentes longitudes de onda.

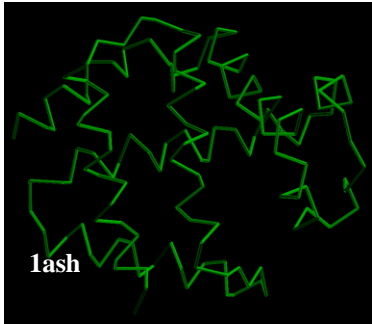
4. Medida de los pares de Friedel
{ (h k l), (-h, -k -l) }

Categoría	Dispersor Anómalo
<i>Metaloproteínas</i>	
metales de transición	Fe, Cu, Zn, Mn
otros metales	Ca, Mo
<i>Reemplazamiento de metales</i>	
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ por Lantánidos	Tb, Ho, Yb
Zn por Mercurio	Hg
<i>Complejos con átomos pesados</i>	
derivados comunes	Pt, Au, Hg, Pb, W, U
Compuestos con “cluster”	Ta, W
<i>Proteínas modificadas</i>	
Selenometionina o selenocisteína	Se
Telurometionina	Te
nucleótidos Bromados o Iodados	Br, I
<i>Crioprotectores con haluros</i>	
Selenometionina o selenocisteína	Br, I

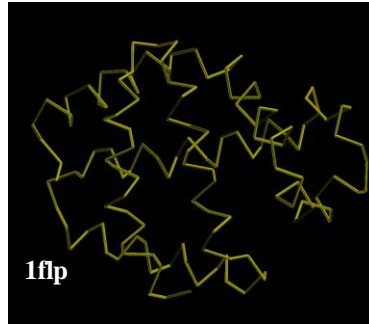
REEMPLAZAMIENTO MOLECULAR



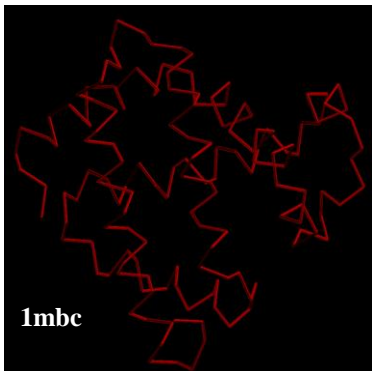
Familia Estructural



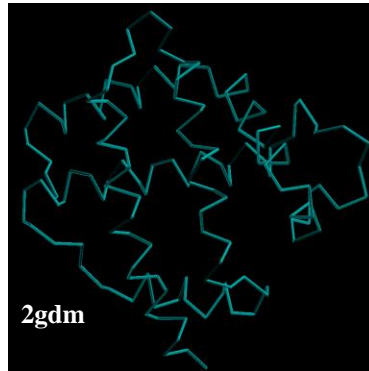
Hemoglobin (*ascaris suum*)



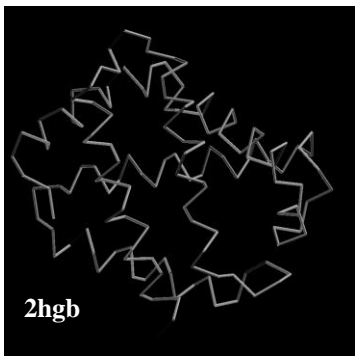
Hemoglobin (*lucina pectinata*)



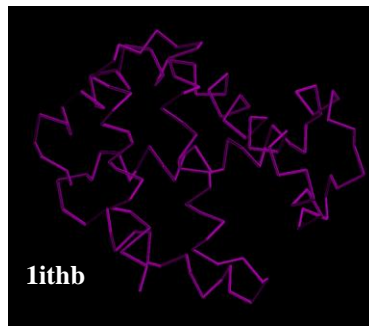
Myoglobin (*sperm whale*)



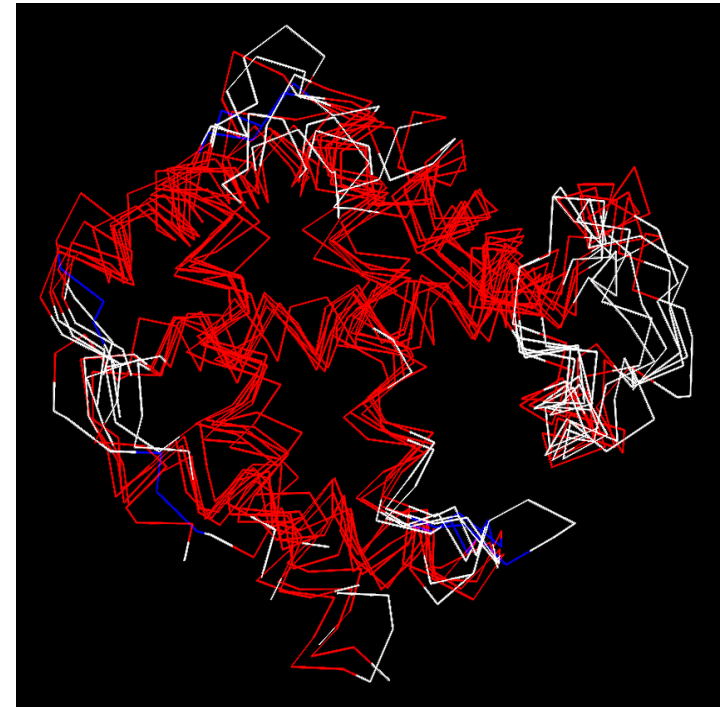
Leghemoglobin (*lupinus luteus*)



Hemoglobin (*glycera dibranchiata*)



Hemoglobin (*urechis caupo*)



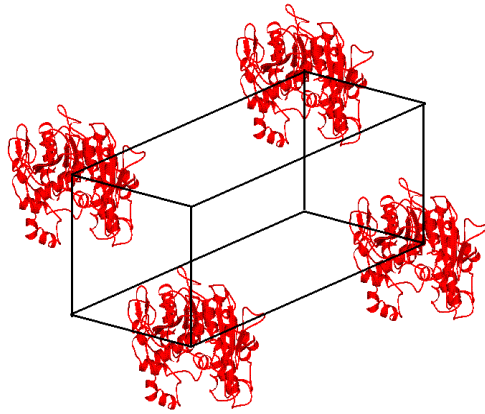
Percentage identity matrix

1flp	100				
1ithb	22.8	100			
2gdm	21.2	18.0	100		
1mbc	18.5	15.1	17.0	100	
2hbg	24.4	23.1	19.9	22.1	100
1ash	13.3	10.1	15.8	15.9	14.6

REEMPLAZAMIENTO MOLECULAR



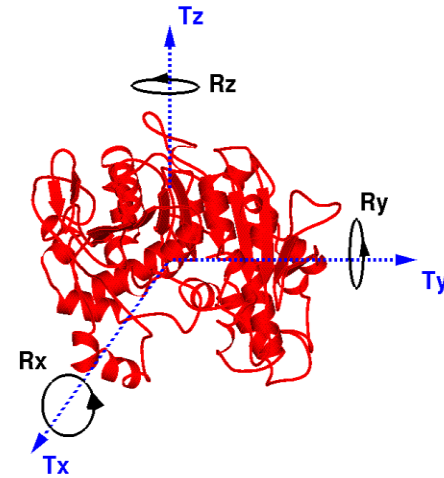
→ Determinar las posiciones de las moléculas dentro de la celdilla cristalina??



Modelo → Cuerpo Rígido

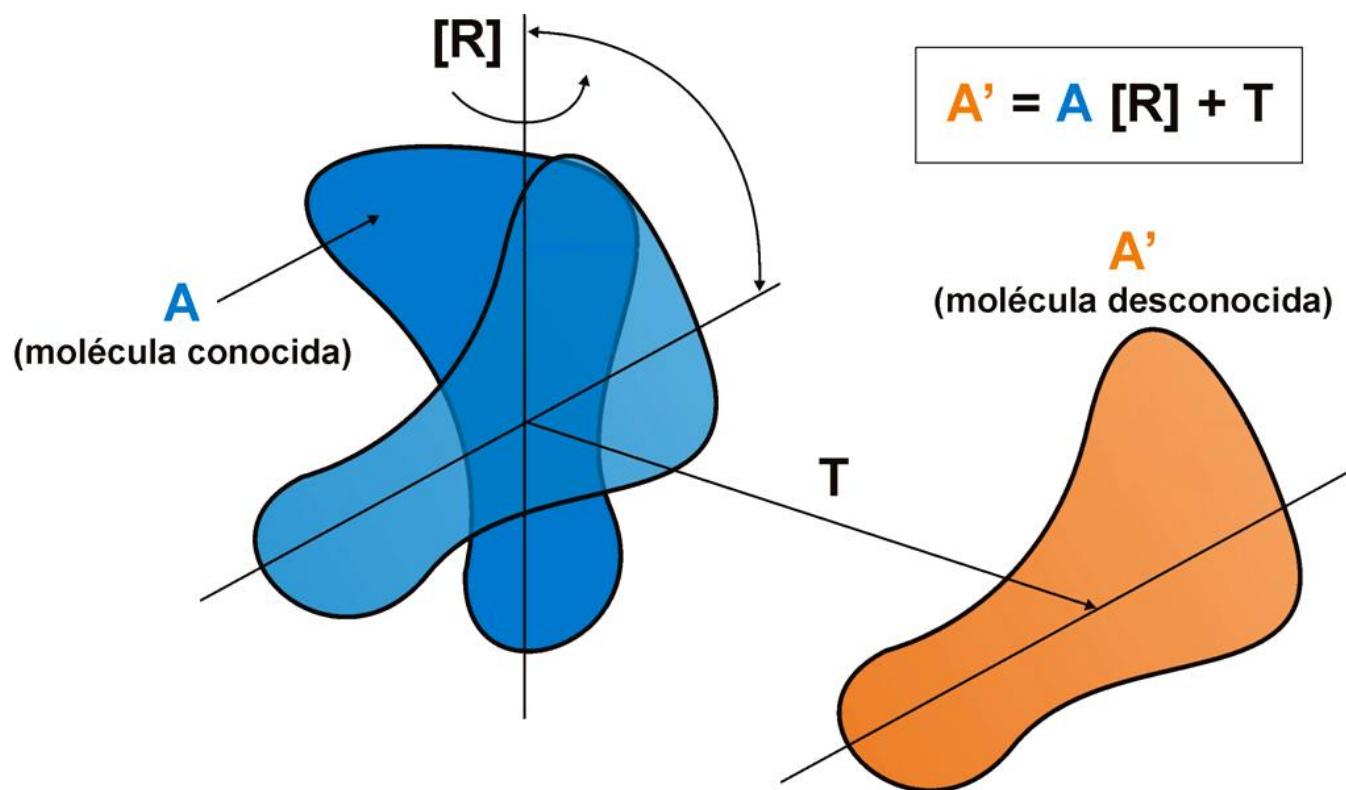
Función de Rotación

Función de Translación



→ Parámetros:

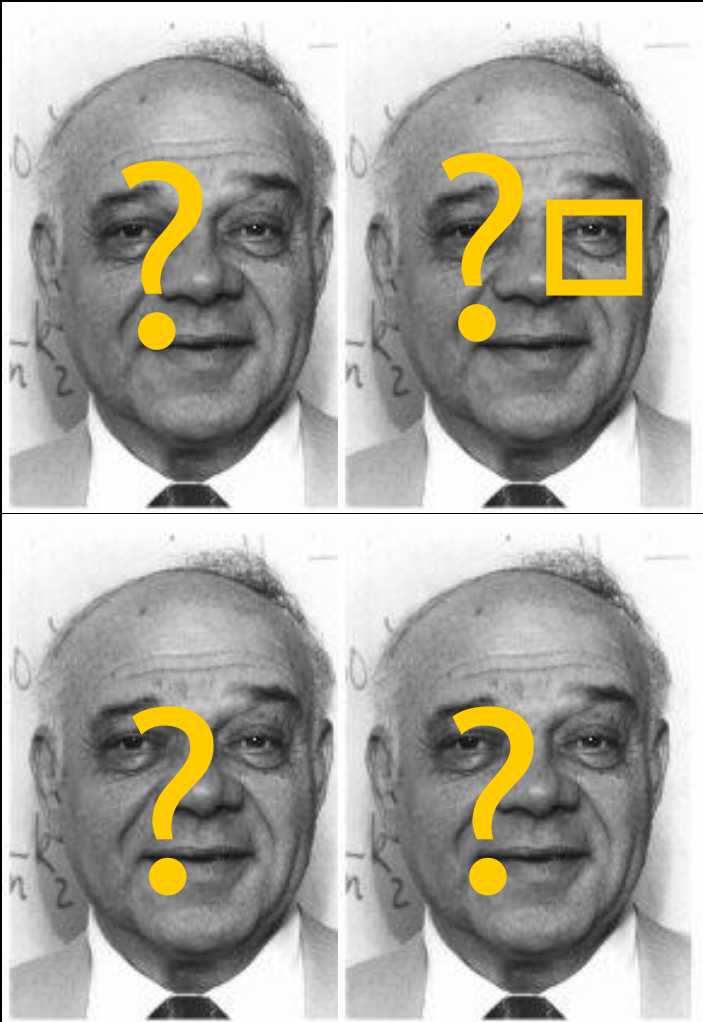
- Completitud y calidad de los datos.
- Homología entre el modelo molecular y las moléculas reales que constituyen el cristal (> 30%).
- Tamaño del modelo molecular respecto al contenido de la celdilla.



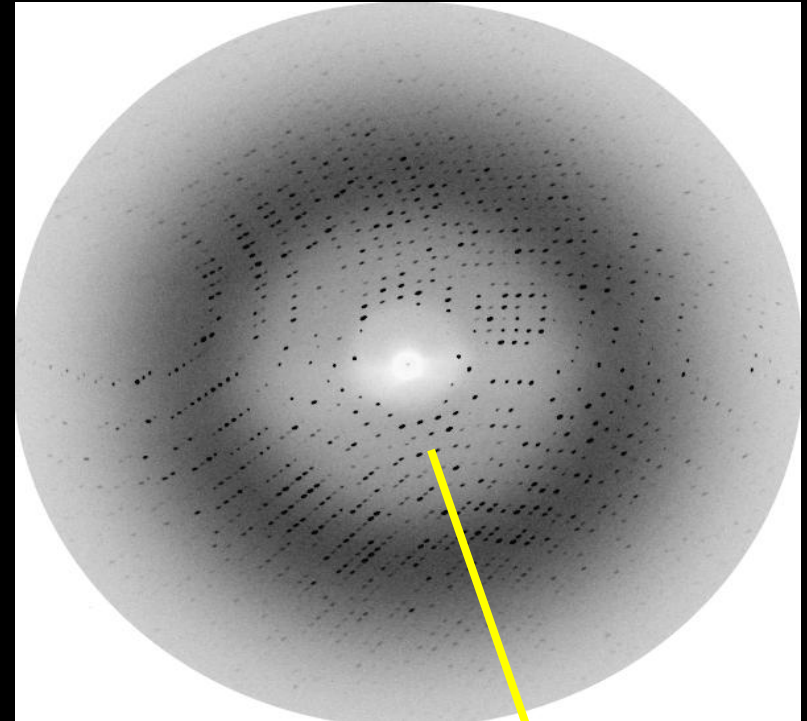
Función de Rotación

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int \phi_1(u) \times P_2(u_r) du$$

Obtención del modelo inicial

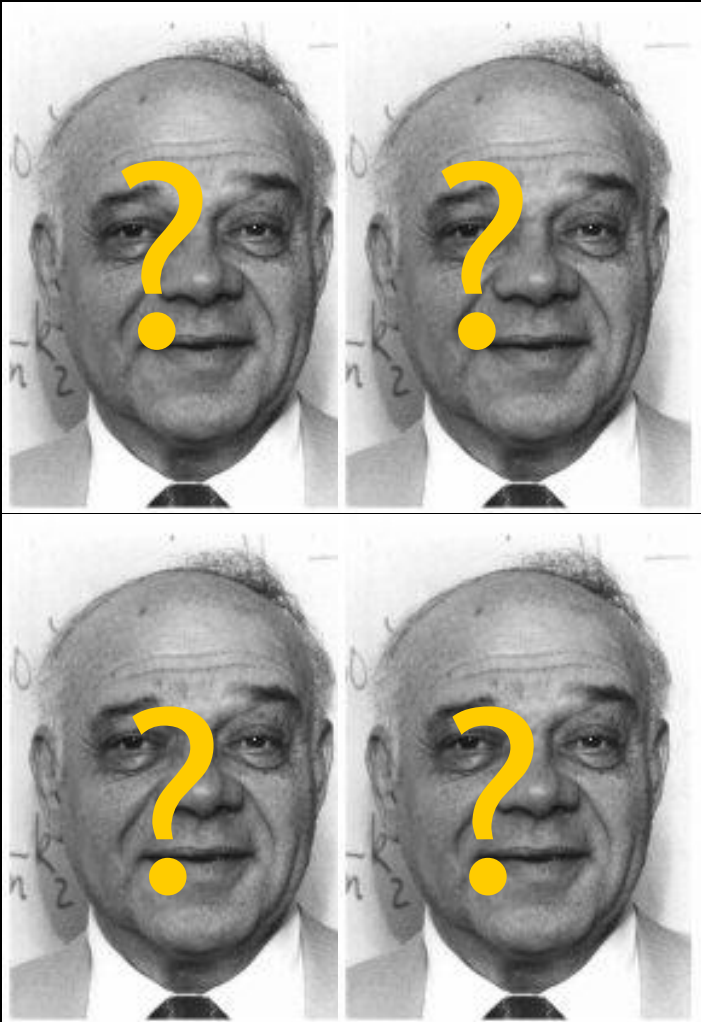


El problema de las fases



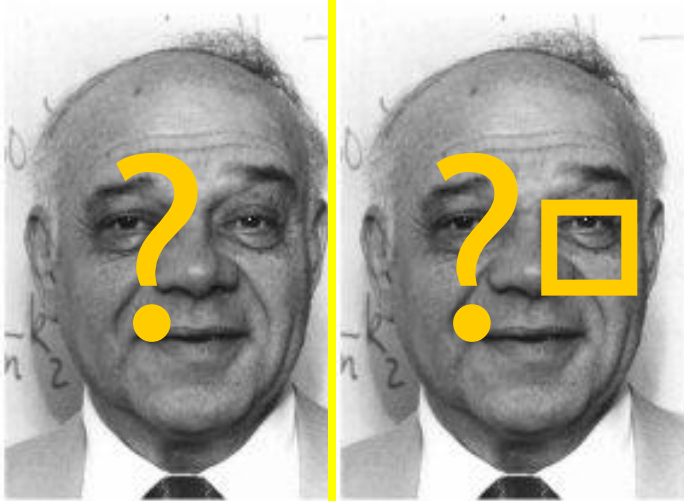
$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



$$\rho(x, y, z) = f(\mathbf{I}_{\text{exp}}, \phi)$$

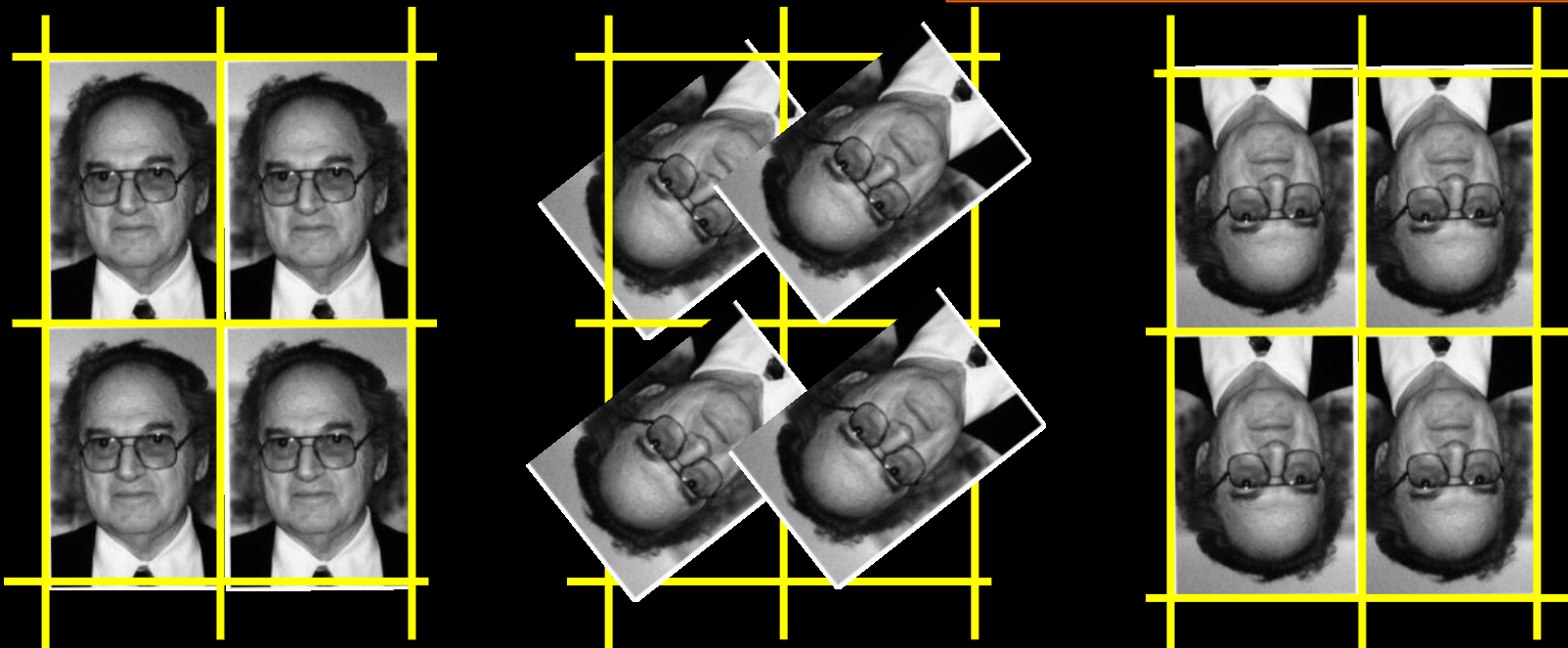
El problema de las fases



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

$$\rho(x, y, z) = f(\mathbf{I}_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



siempre



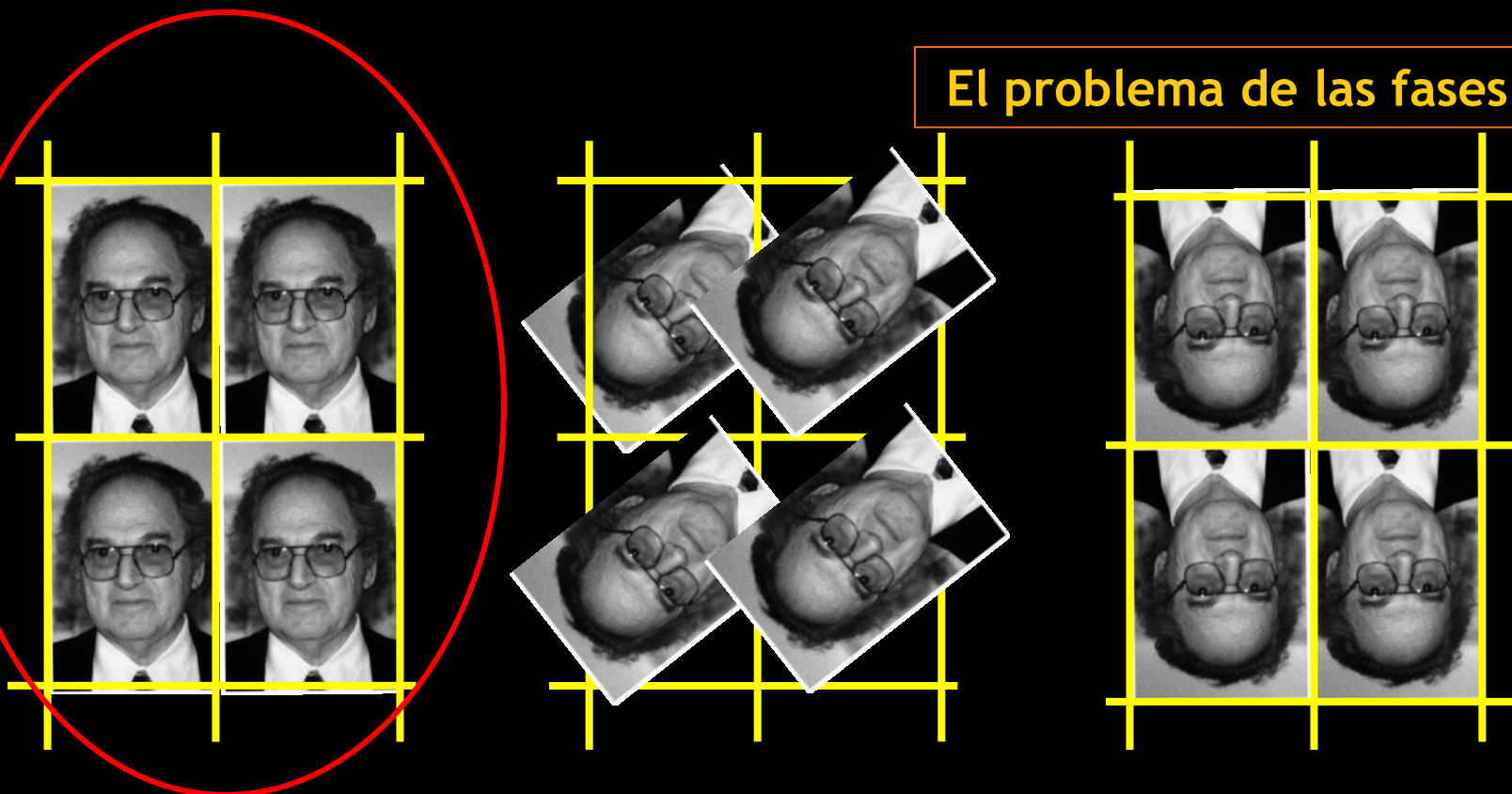
$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

Diferencia mínima

$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

Para cada posible modelo

El problema de las fases



siempre



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

Diferencia mínima

$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

Para cada posible modelo

El problema de las fases



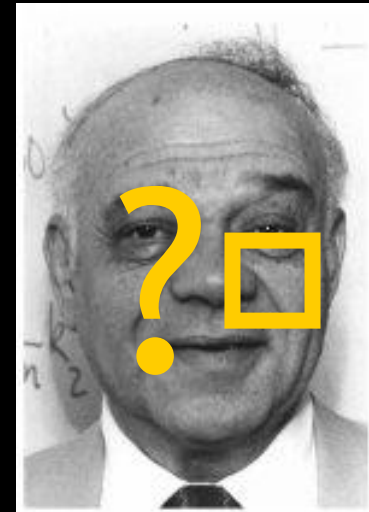
siempre



$$\rho(x y z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

$$\rho(x y z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



siempre



$$\rho(x y z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

$$\rho(x y z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



siempre



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



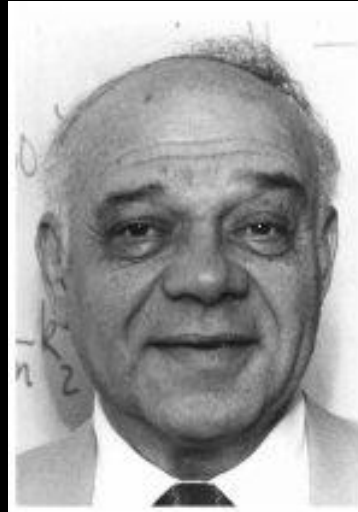
siempre



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



siempre



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

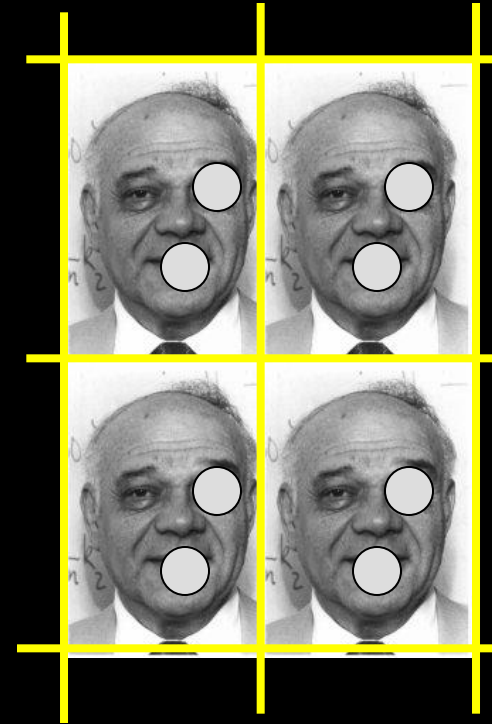
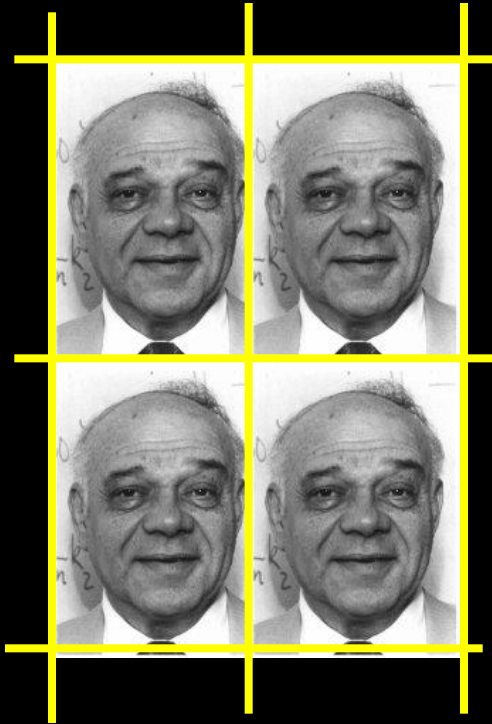
$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

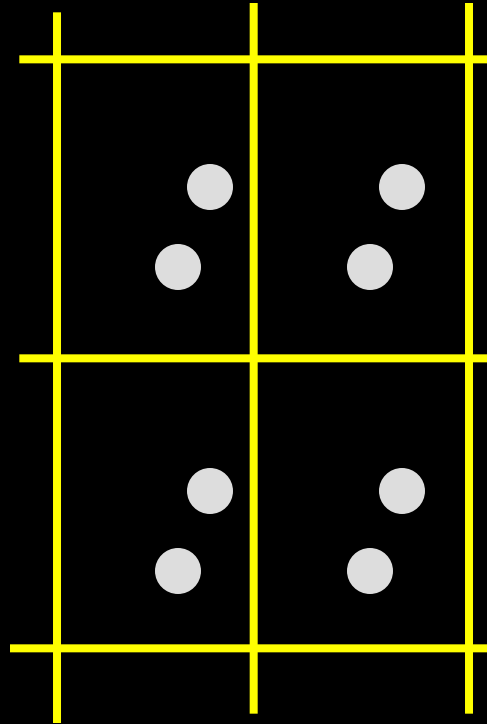
El problema de las fases



$$\rho(x, y, z) = f(I1_{\text{exp}}, \phi)$$

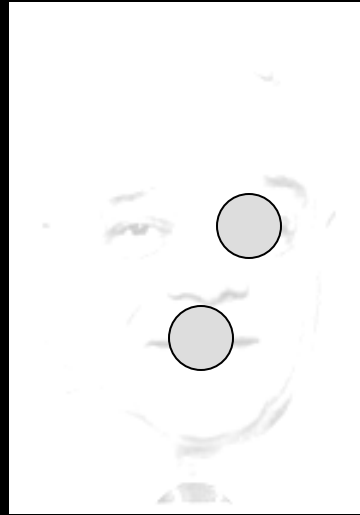
$$\rho(x, y, z) = f(I2_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



$$\rho(x, y, z) = f(I1_{\text{exp}} - I2_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



siempre



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



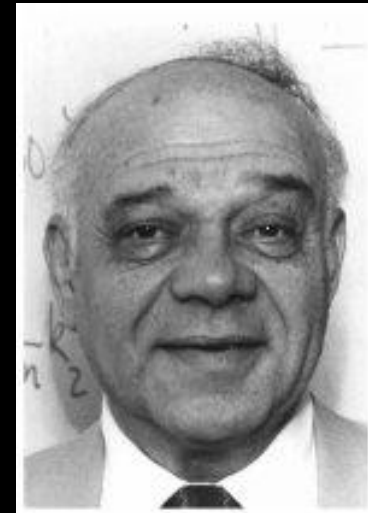
siempre



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$

El problema de las fases



siempre



$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}})$$

$$\rho(x, y, z) = f(I_{\text{exp}}, \phi)$$