

La Cristalización y difracción de rayos X

Álvaro San Hipólito Luengo

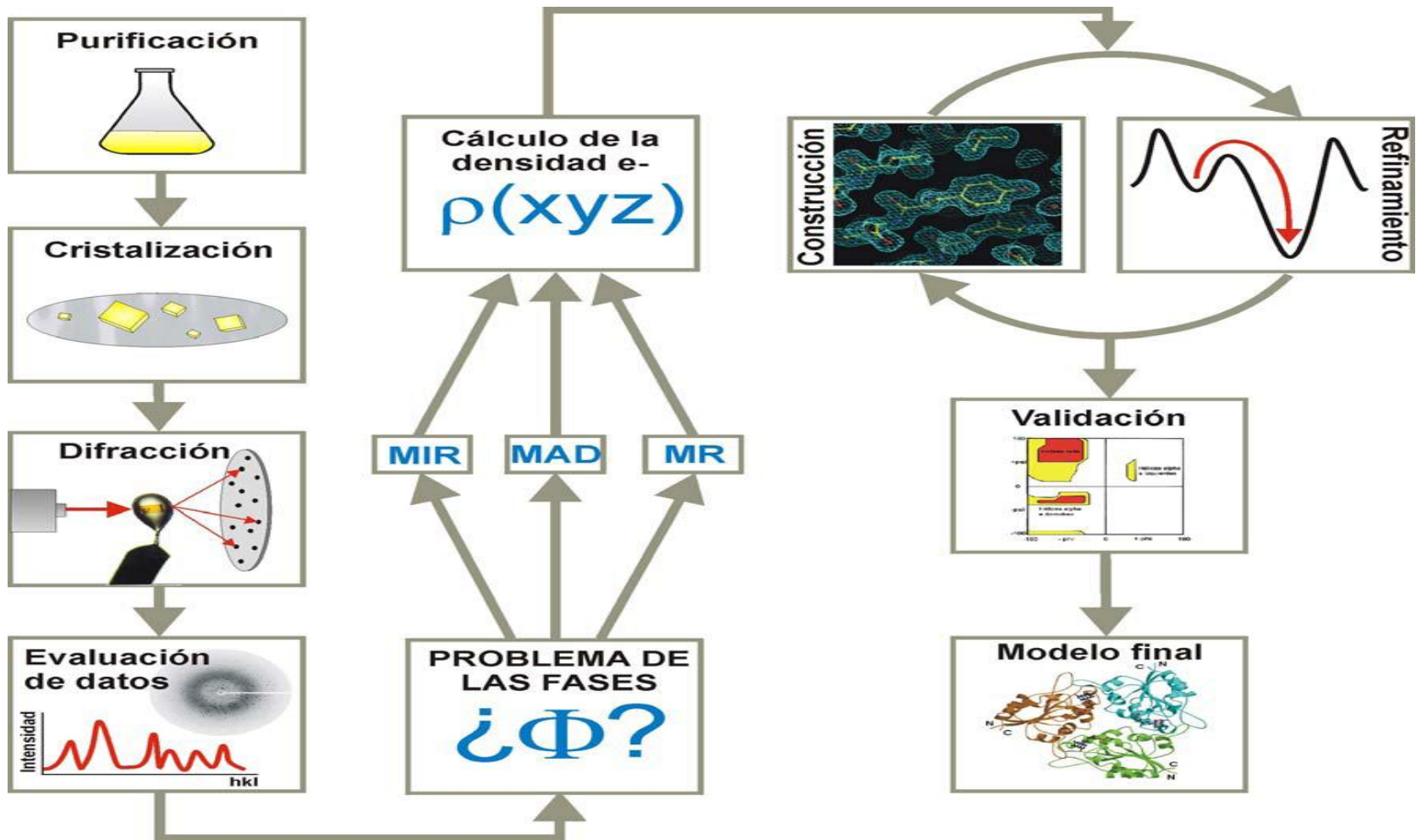
3º Grado en Biotecnología

Universidad Europea de Madrid

Introducción.

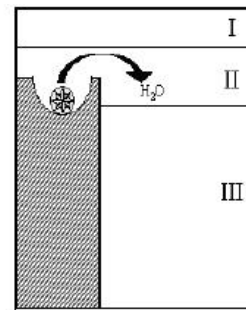
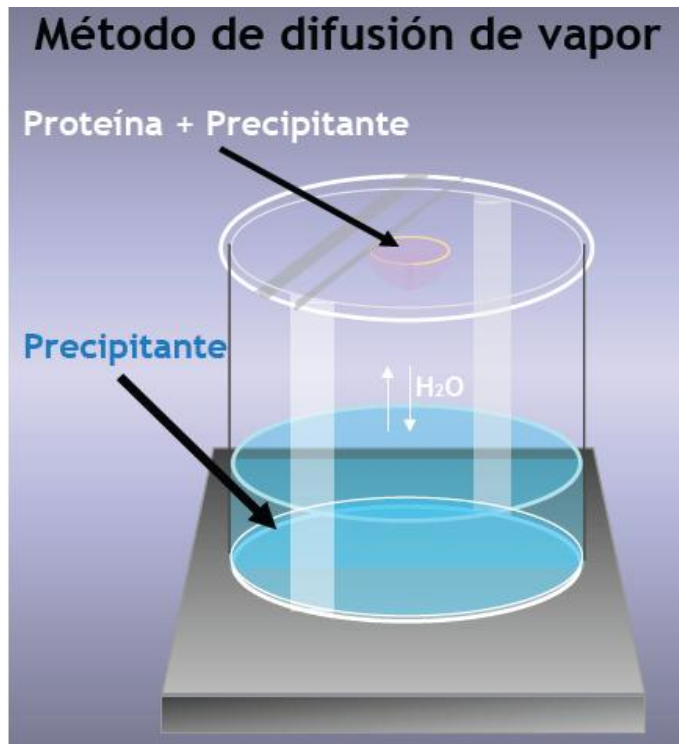
- La cristalografía de rayos X es una técnica muy potente para resolver estructuras moleculares.
- Grandes ventajas, ya que proporciona una fotografía tridimensional, a escala atómica del material cristalizado.
- En el caso de las proteínas se obtiene la estructura tridimensional, incluyendo plegamiento y detalles fisicoquímicos (distancias y ángulos de enlace, empaquetamiento cristalino, etc. Clave para entender su función biológica.

Etapas del estudio por cristalografía de rayos X

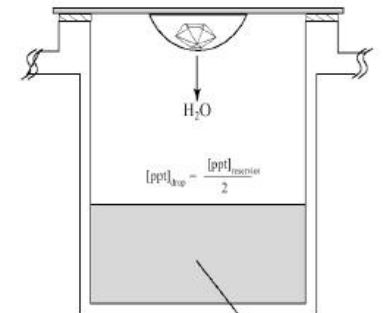


Purificación y cristalización

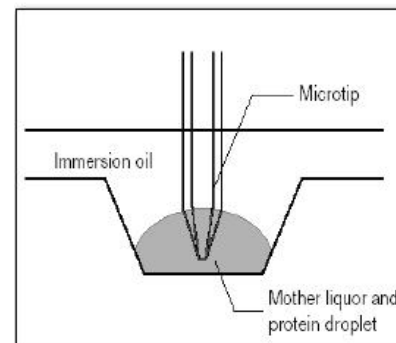
Una vez purificada la proteína de interés el paso crucial de esta técnica es conseguir cristalizarla, para ello se emplean diferentes condiciones (concentración, temperatura, solvente...) y diferentes métodos.



Sitting Drop

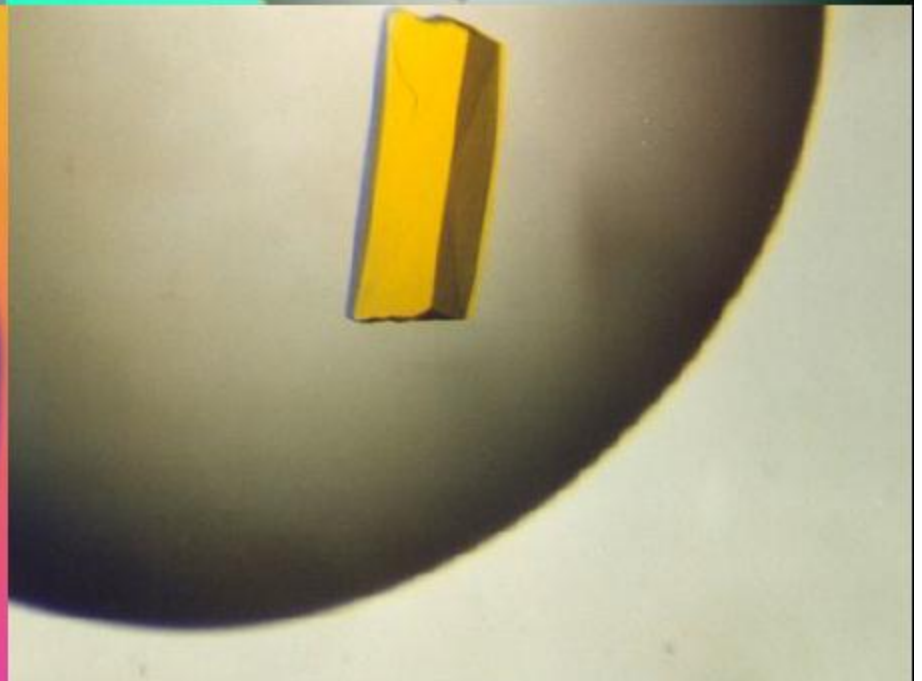
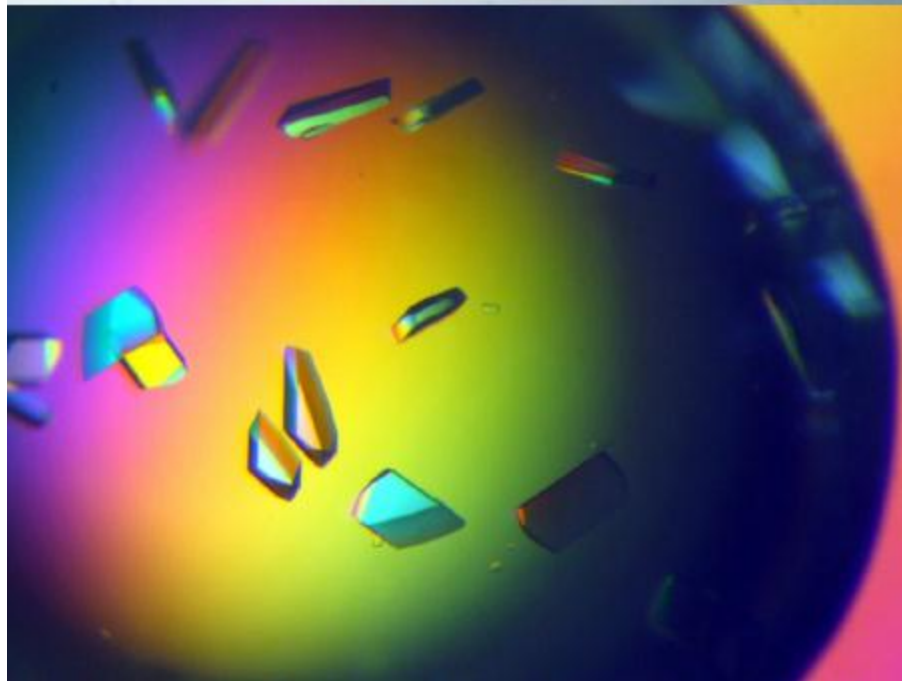
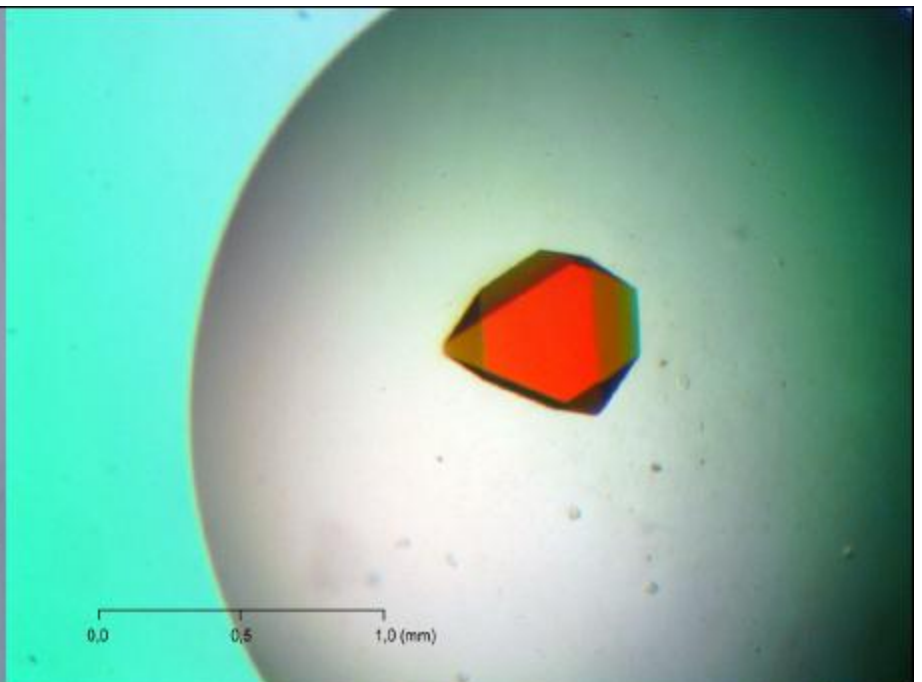
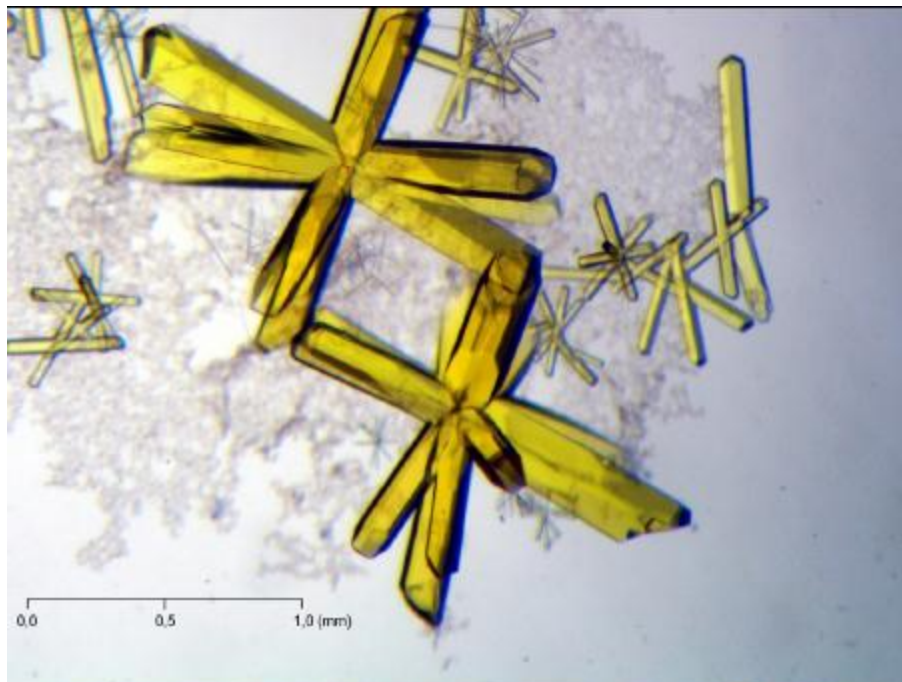


Hanging Drop



Oil immersion





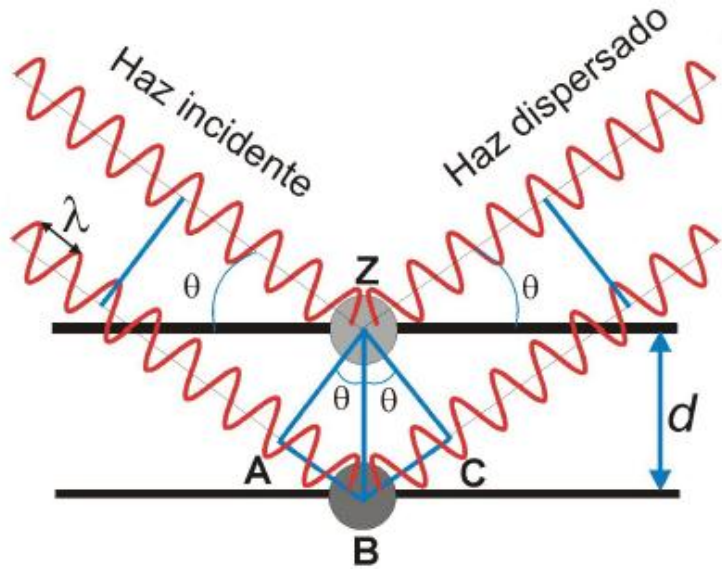
Difracción

Cuando un haz de rayos X incide sobre un cristal, éste interacciona con los electrones de los átomos que componen el cristal, haciéndolos vibrar. Los electrones oscilantes se convierten en focos de nueva radiación X que se emite en forma esférica, fenómeno denominado dispersión.

Los rayos X dispersados por los electrones interfieren entre sí, de manera que se combinan y refuerzan produciendo la difracción.

Difracción

- La λ 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 mas débil.
- La geometría de los puntos de difracción, esta relacionada con la geometría de la red.
- La resultante de la difracción se denomina Factor de Estructura. Es una onda y se expresa como una amplitud y una fase.



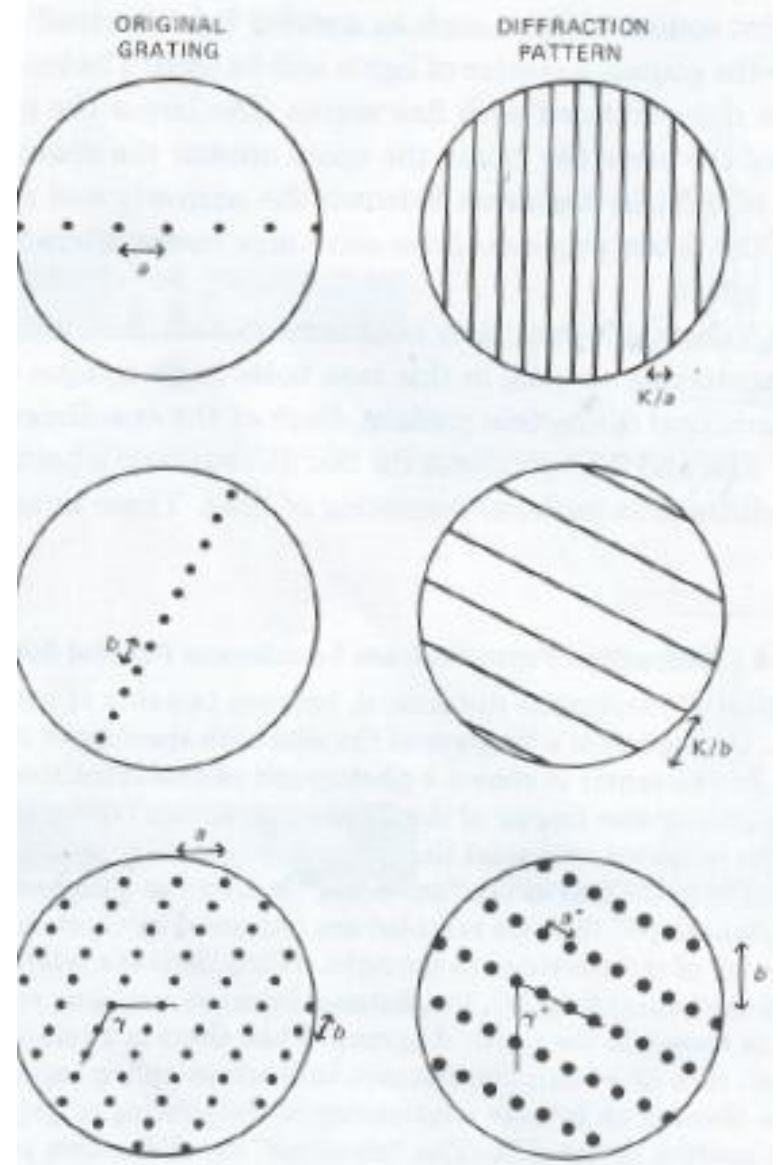
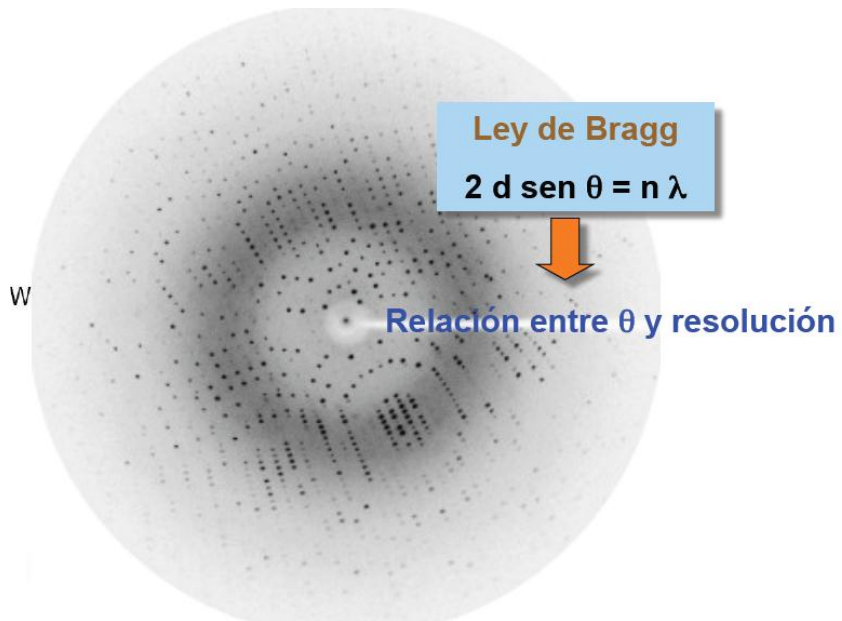
$$AB + BC = n\lambda$$

$$2 AB = n\lambda$$

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

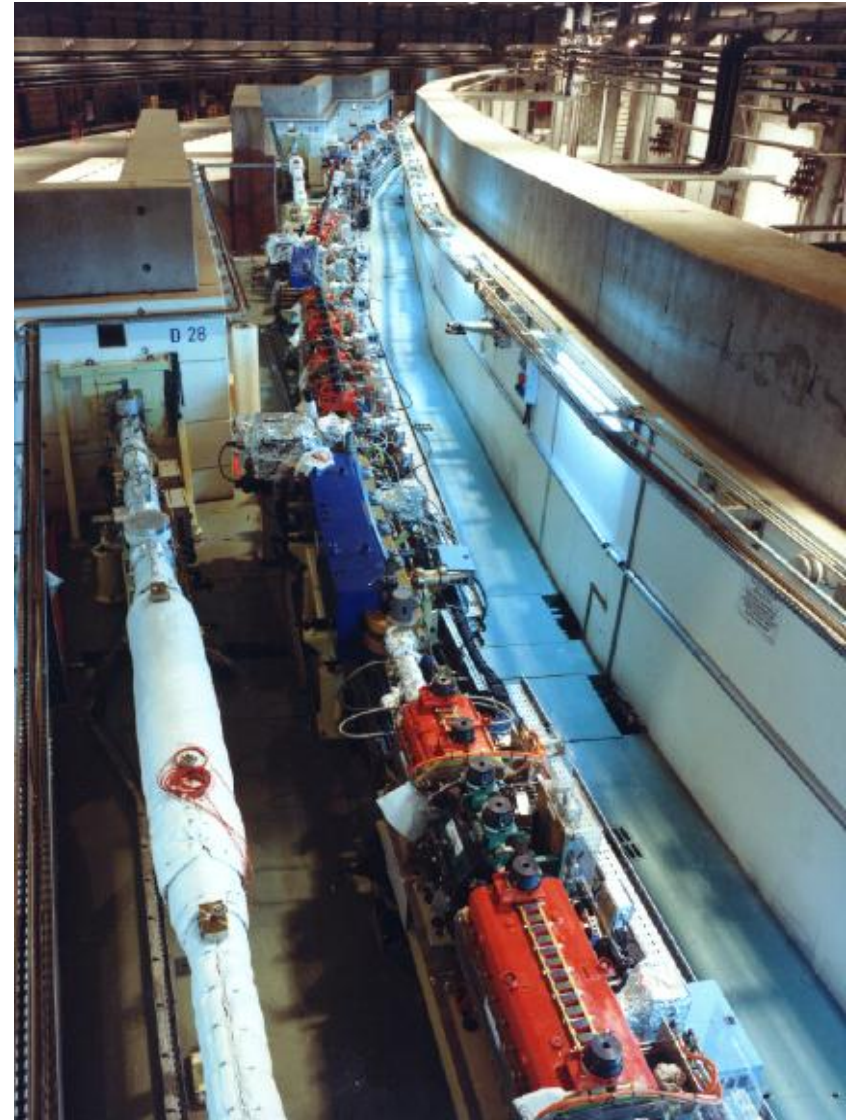
$$AB = BC$$

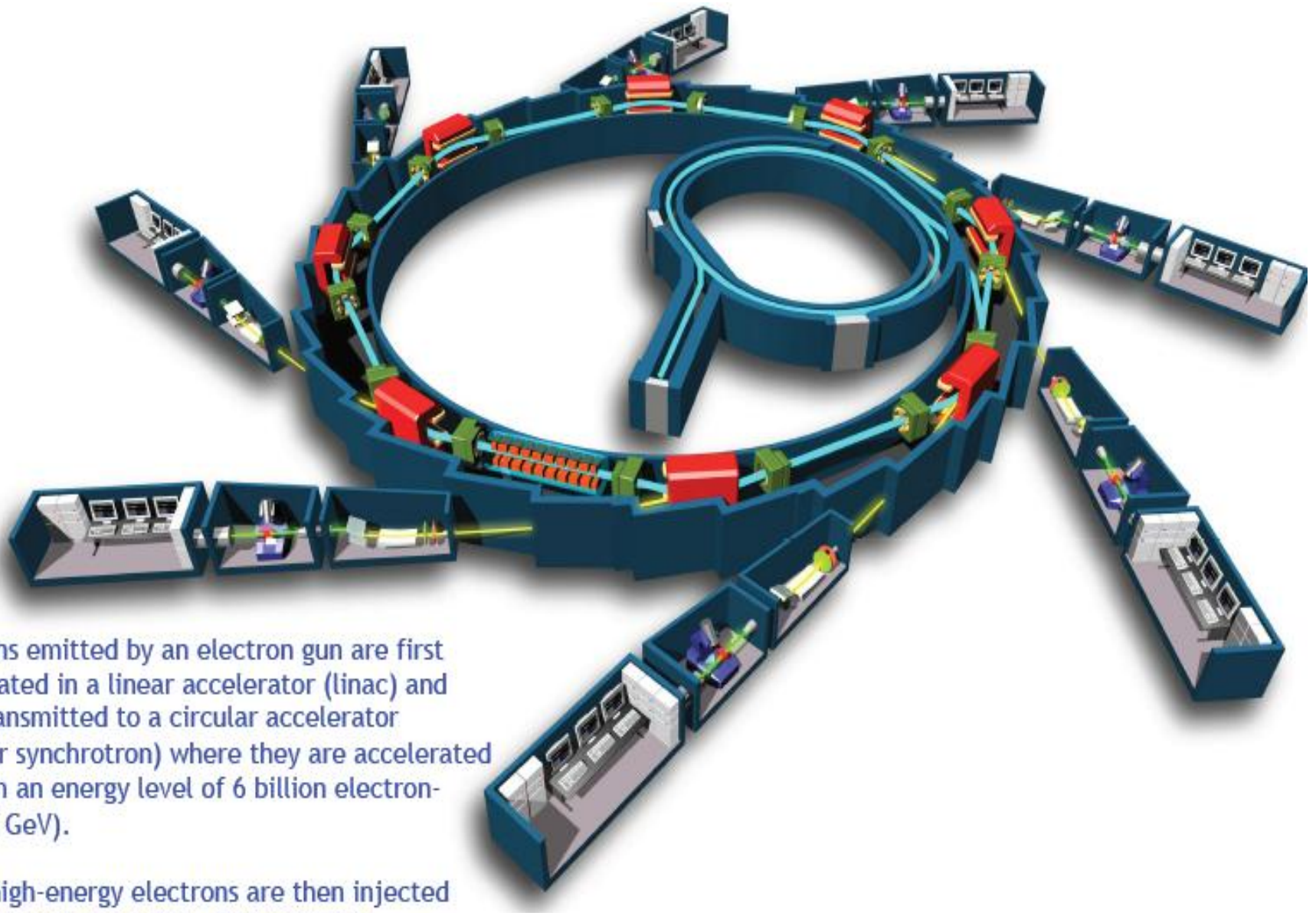
$$\text{sen } \theta = AB / d$$



Fuentes de rayos X

- Sincrotrón.
 - Policromático
 - Sintonización de la λ
 - Brillo muy alto.



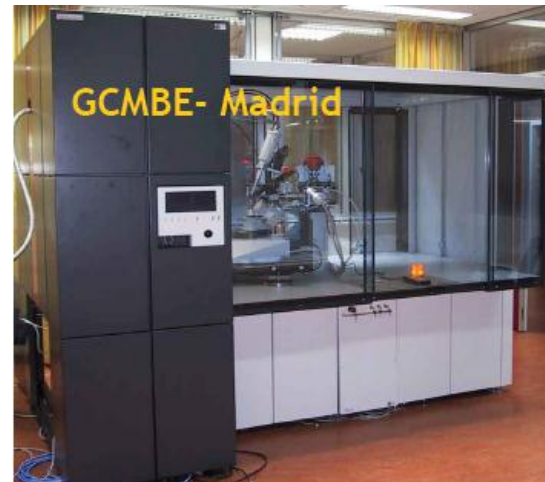
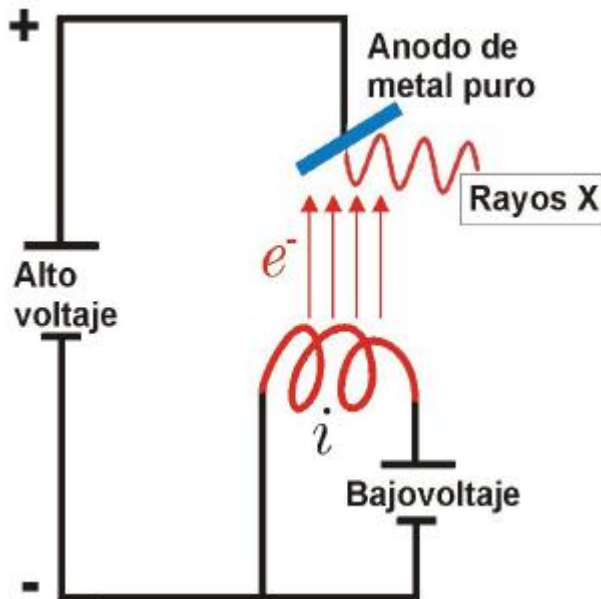


Electrons emitted by an electron gun are first accelerated in a linear accelerator (linac) and then transmitted to a circular accelerator (booster synchrotron) where they are accelerated to reach an energy level of 6 billion electron-volts (6 GeV).

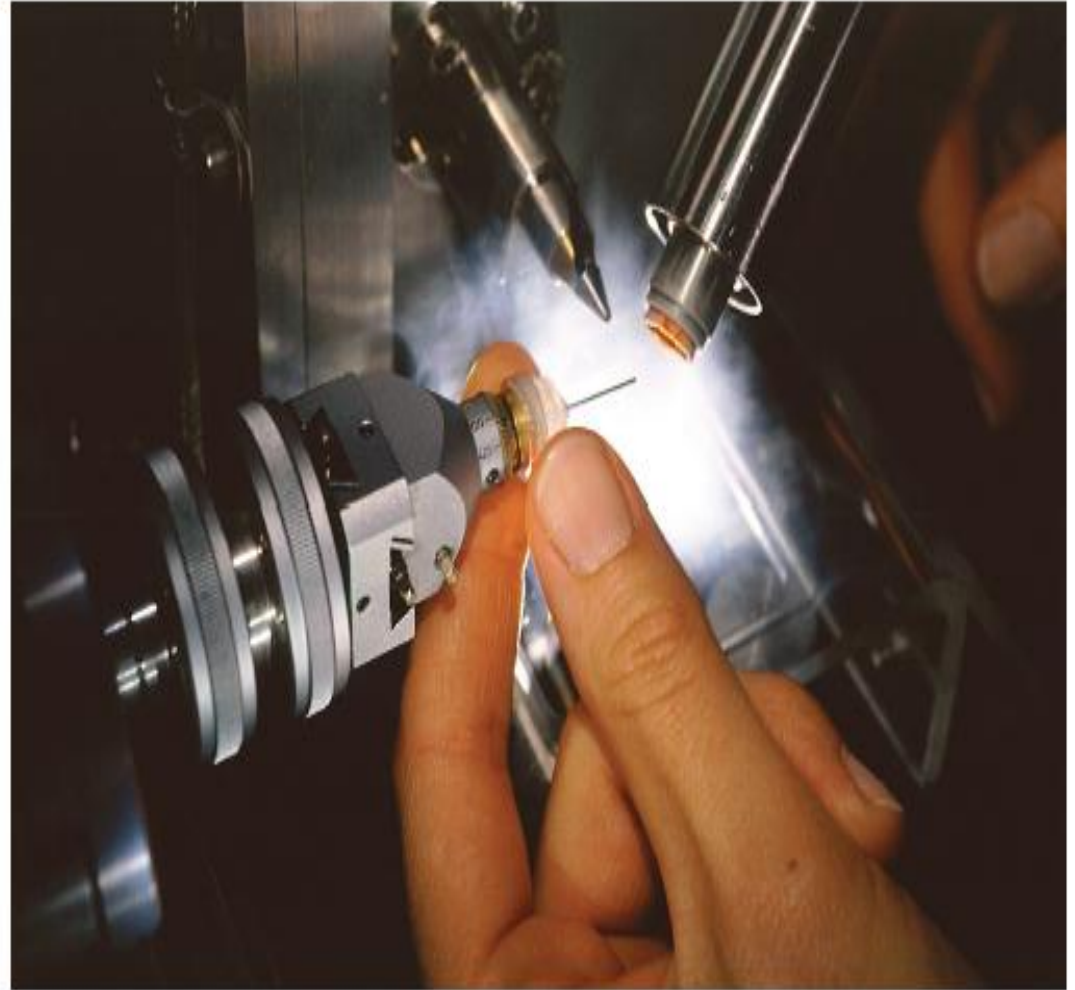
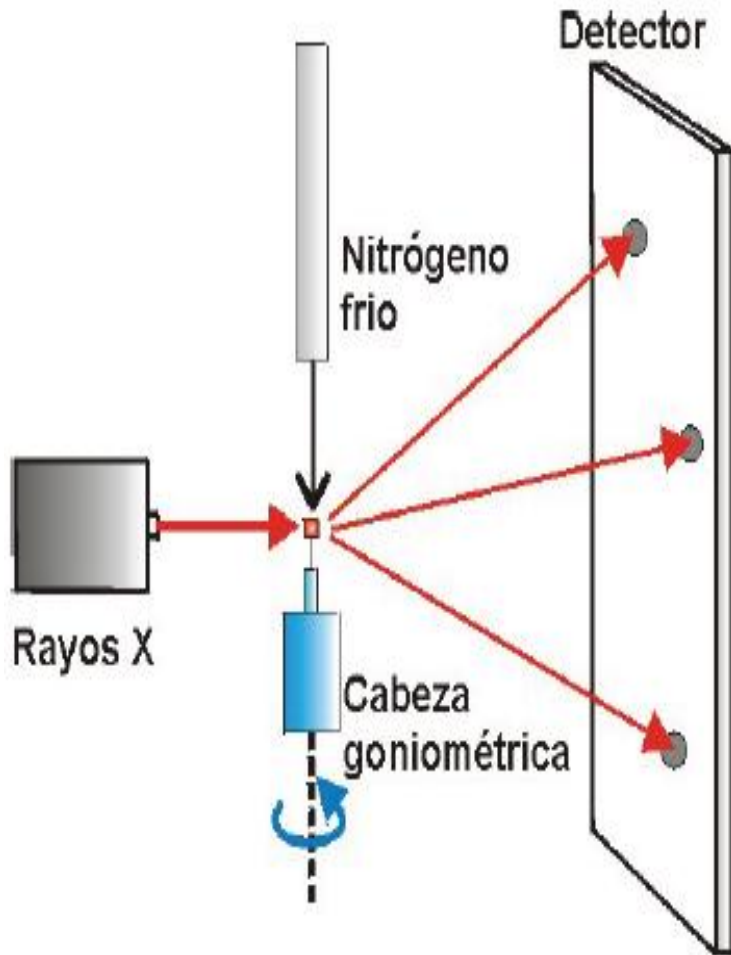
These high-energy electrons are then injected into a large storage ring --844 metres in circumference --where they circulate in a vacuum environment, at a constant energy, for many hours.

Fuentes de rayos X

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

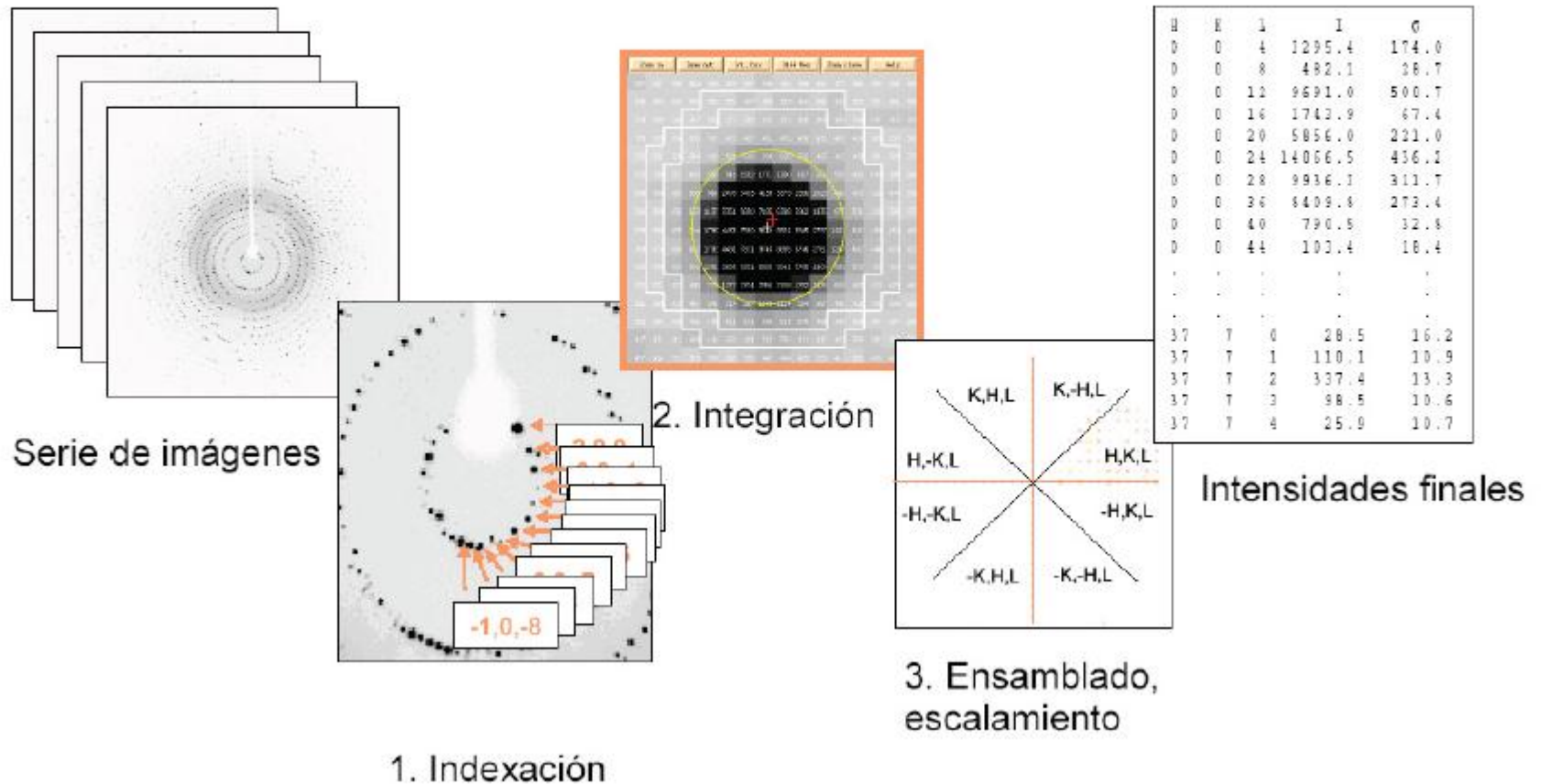


Montaje experimental de cristales



Procesado de datos

Tres etapas



1. Indexado: Inspección visual de las imágenes de difracción, y determinación de los parámetros del cristal. Refinamiento de la geometría de la difracción.
2. Integración de los picos de difracción, refinado simultáneo de 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, sumatoria estadística y estimación de los errores.
4. Determinación de la función de densidad electrónica: solventando el problema de fase, mediante complejos programas informáticos y diferentes técnicas (Remplazo molecular, MIR...).

Procesado de datos

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
Divx 0.000
Divy 0.000
Lambda 1.542
Distance 100.000
Beam X 90.000
Beam Y 90.000
GOMEGA 0.000
HGFF 0.000
TGFF 0.000
VSCALE 1.00000
Pick area: X 11
 Y 11
Dat threshold 20
Vector scale 1
Two theta 0.00
Resolution 0.00
SPOT SEARCH
Threshold 5.00
Rmin 9.00
Rmax 81.00
H offset 0.00
V 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
K splitting 0.30
V splitting 0.30
AUTOINDEXING
Max L/obj(I) 20
Prompts On
Update display No
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

cp11-1_001.nor1800

Min 1 Max 700 Cursor position

Overlay on Contrast

Colour Black on white Mag x4 PS Zoom

Waiting for input

Output

Pixel X, Y 1801 0
DC, YC aa 180 0 0.0
Resolution 0.00
Indices 0 0 0
Psi Phi 0.00 width 0.00
Intensity 0
Signs 0

Spacing A 0.000
Average 0.0
Eao 0.0
Number 0
Deconfactor 0
Circle resolution A
0.0 0.0 0.0 0.0
Phi 0.00 0.75
Miscote ThetaX, Y, Z
0.00 0.00 0.00

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

cp11-1_001.nor1800

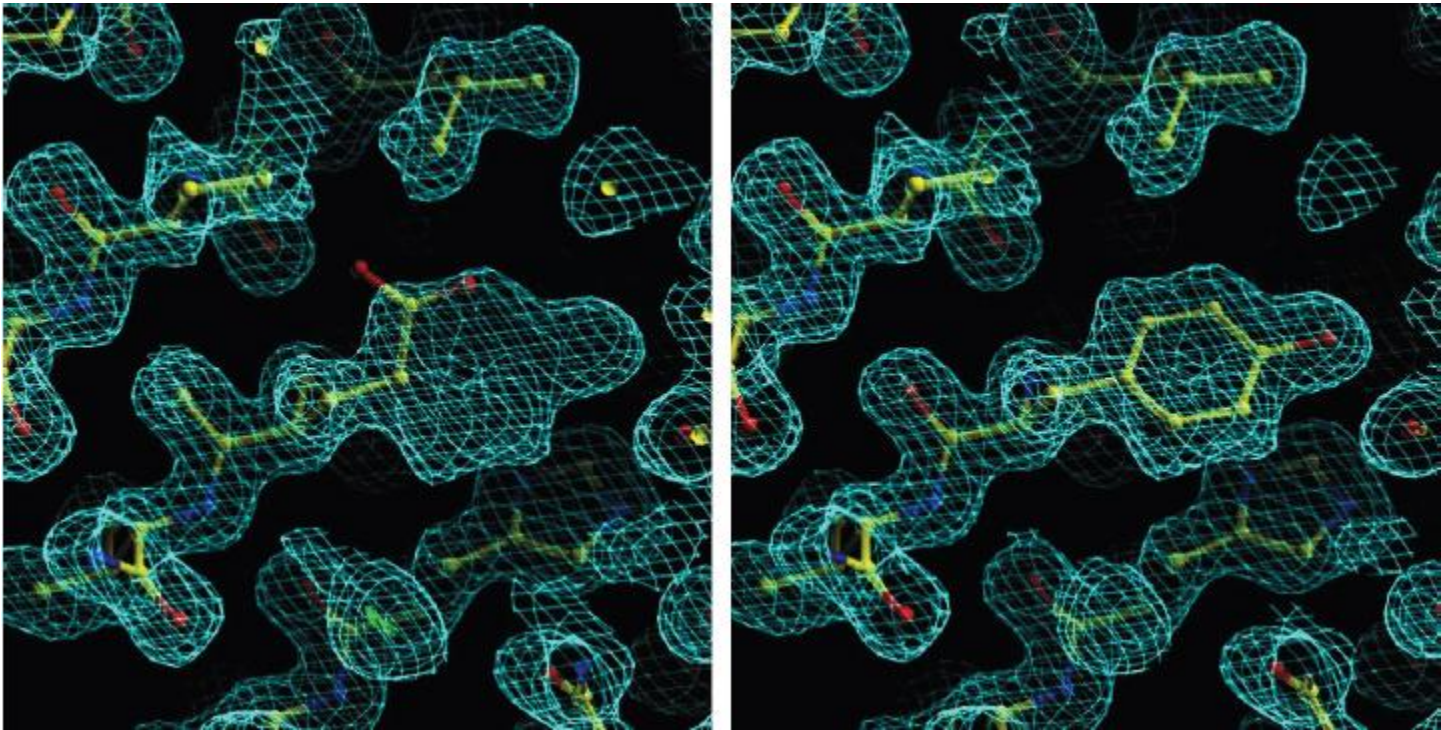
Min 1 Max 750 Cursor position

Overlay on Contrast

Colour Black on white Mag x4 PS Zoom

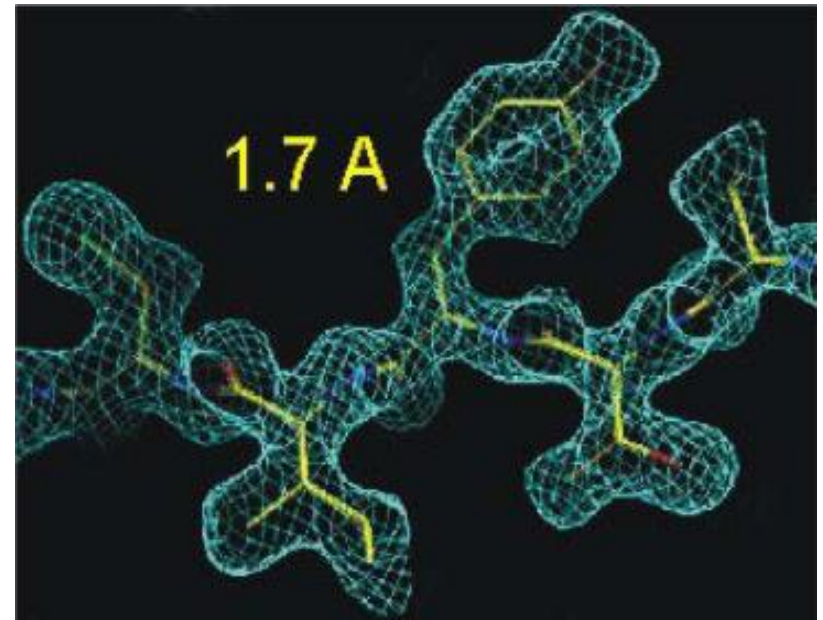
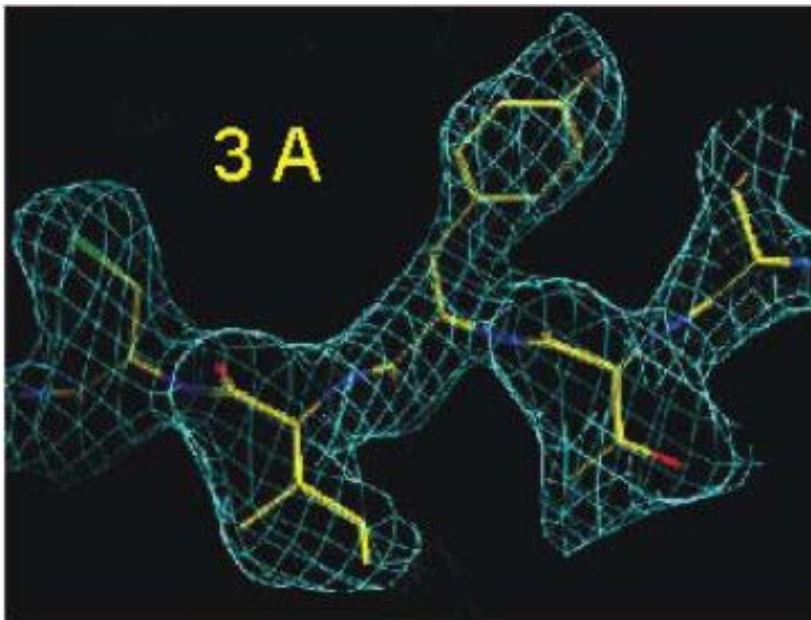
Trazado de la cadena polipeptídica y refinamiento

Los mapas mostraran zonas con densidad electrónica positiva, sobre las cuales deberá acoplarse la cadena polipeptídica.

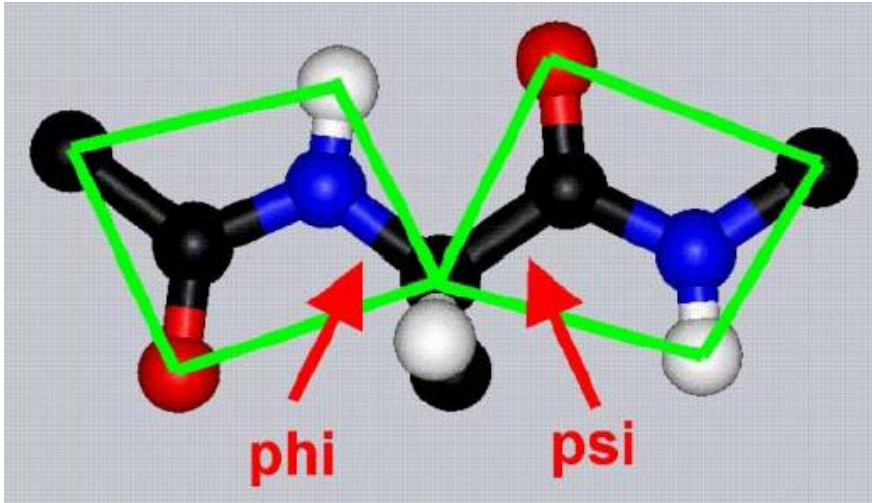


Trazado de la cadena polipeptídica y refinamiento

La calidad de los mapas de densidad electrónica, y como consecuencia el éxito del trazado de la cadena polipeptídica, depende de la exactitud de los datos de difracción, y en especial de la resolución de los mismos

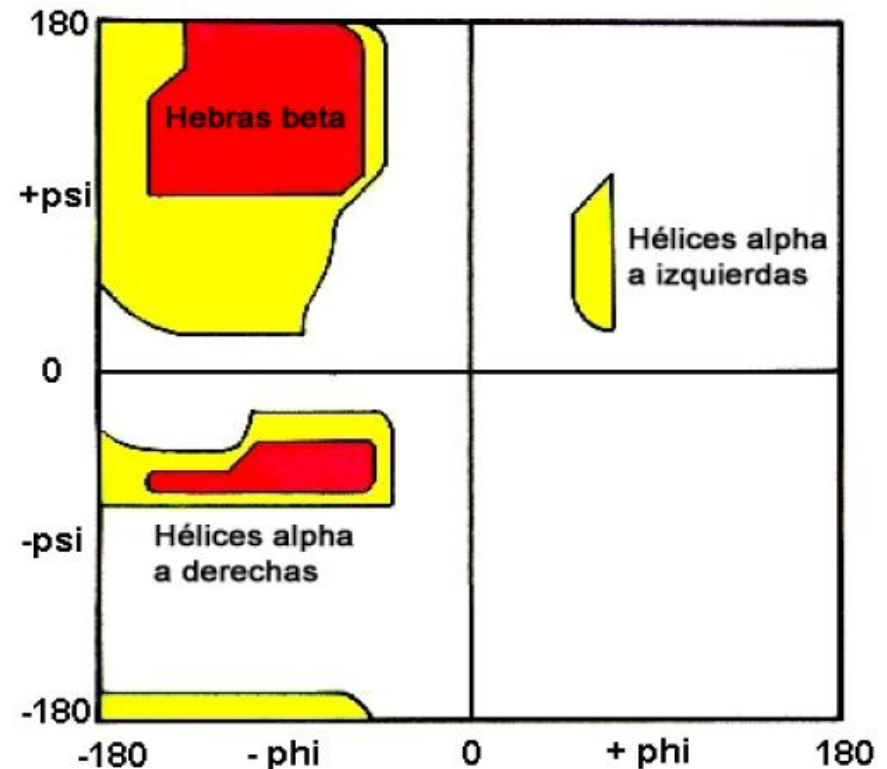


Validación del modelo estructural

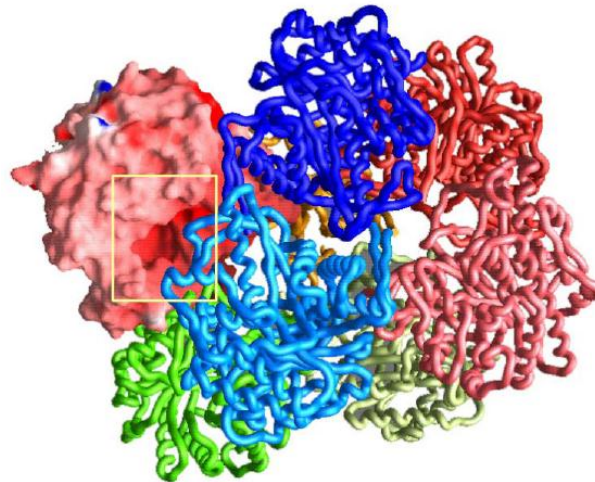
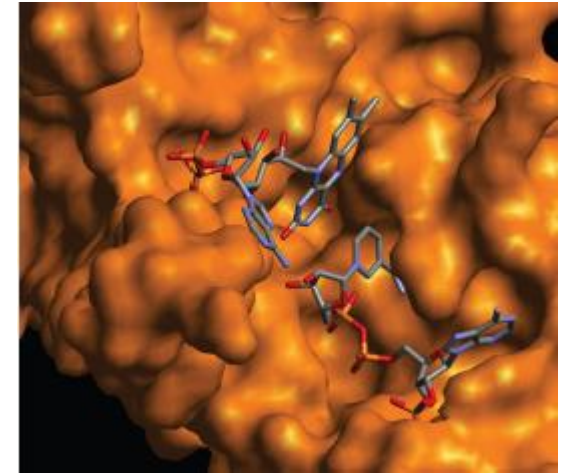
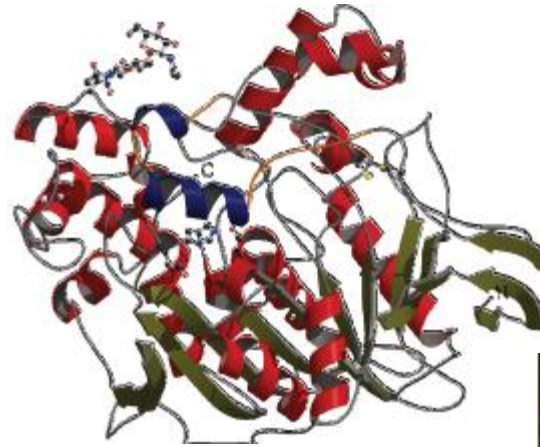
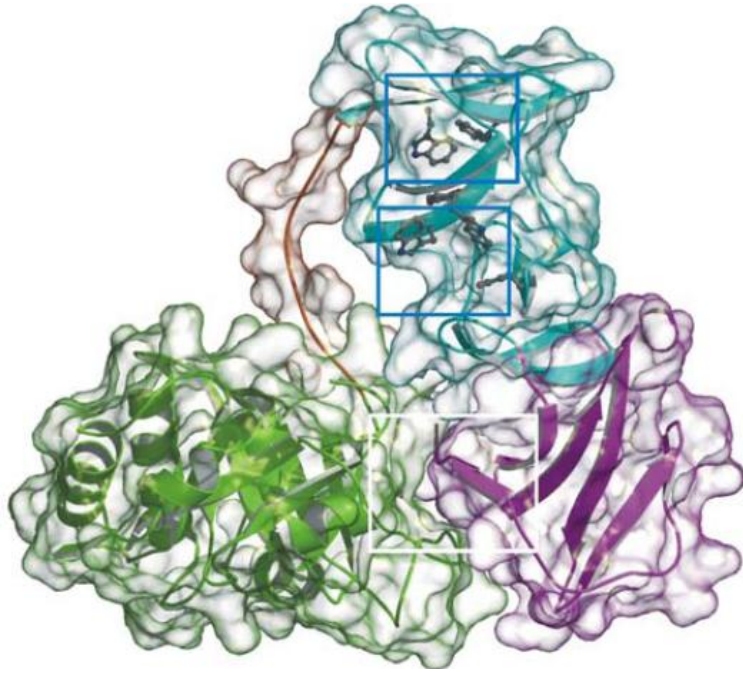


Todos los valores posibles para ϕ y ψ vienen representados en una grafica denominada Diagrama de Ramachandram. Si nuestro modelo se encuentra dentro de las zonas permitidas del diagrama será valido.

Ángulos de torsión del enlace peptídico. El ángulo ϕ se define como el ángulo de torsión alrededor del enlace N-C α , y ψ alrededor del enlace C α -C



Modos de representación estructural



Aplicaciones Biomédicas de Cristalización y difracción de rayos X

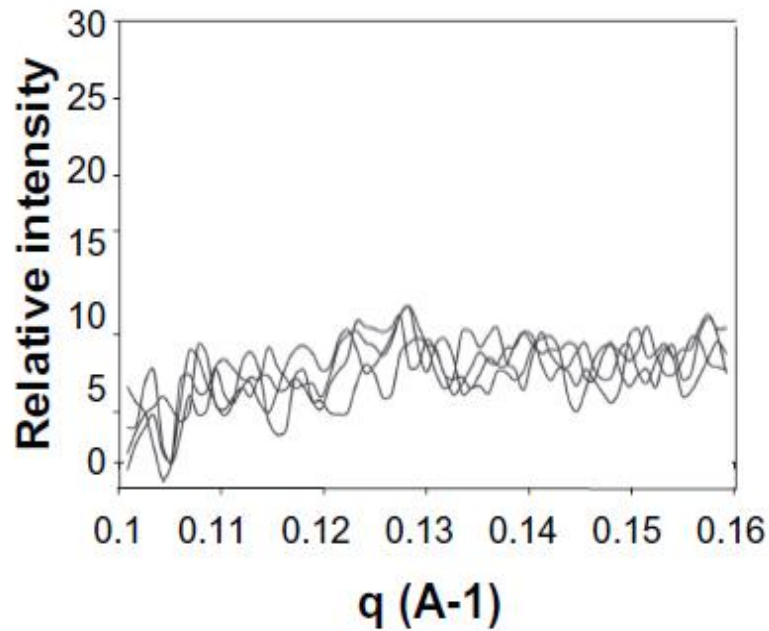
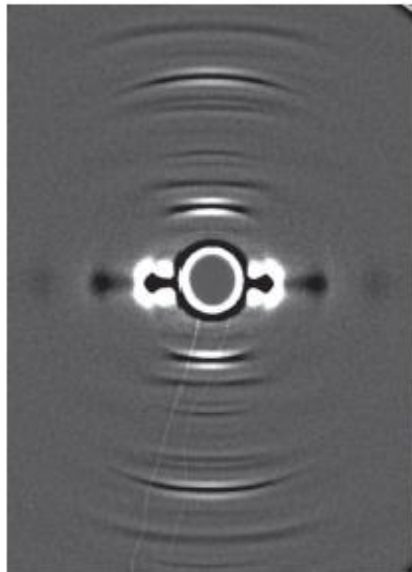
Difracción de rayos X

Investigación en Cáncer

Caracterización de un test de cáncer de pecho invasivo usando difracción de rayos X del cabello

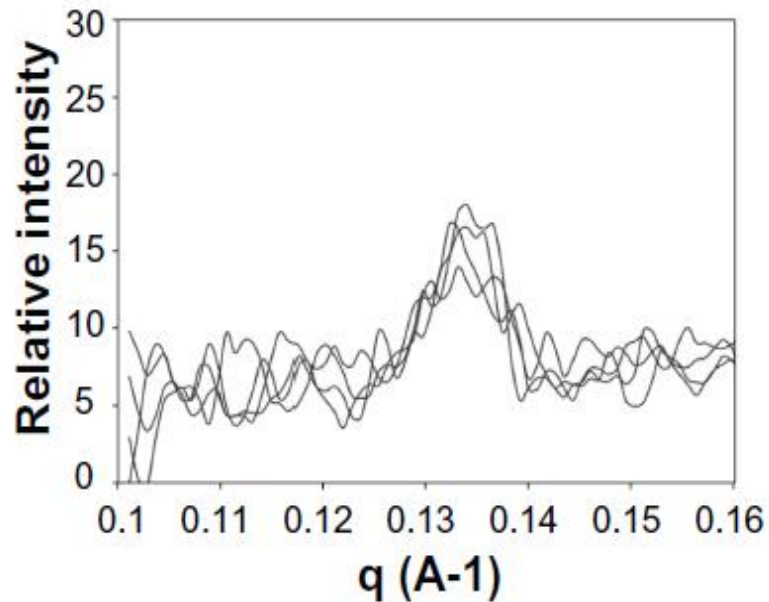
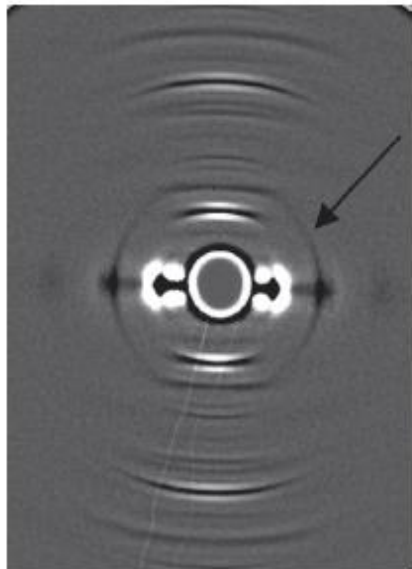
- El objetivo fue determinar la exactitud (sensibilidad y especificidad) del análisis del cabello usando rayos X derivados de sincrotrón para detectar la presencia de cáncer de pecho invasivo.

A



A. Patrón negativo de la fibra del pelo, no se aprecia patrón circular. Presencia de arcos intensos, en especial en el plano ecuatorial característicos de la α -keratina.

B



B. Patrón positivo, de una fibra de pelo de una mujer con cáncer de pecho, en el que se puede apreciar el patrón circular y que se presenta en el espacio q de $1,32\text{nm}^{-1}$

Table 2. Overall results.

	Patients with breast cancer confirmed by biopsy	Patients without breast cancer		Total
		Confirmed by biopsy	Negative by imaging	
Ring	25 (64%)	24 (15%)	370 (23%)	419 (23%)
No ring	14 (36%)	134 (85%)	1229 (77%)	1377 (77%)
Total	39	158	1599	1796

La capacidad para detectar el cáncer, mediante difracción de rayos X descendió significativamente en pacientes de más de 69 años

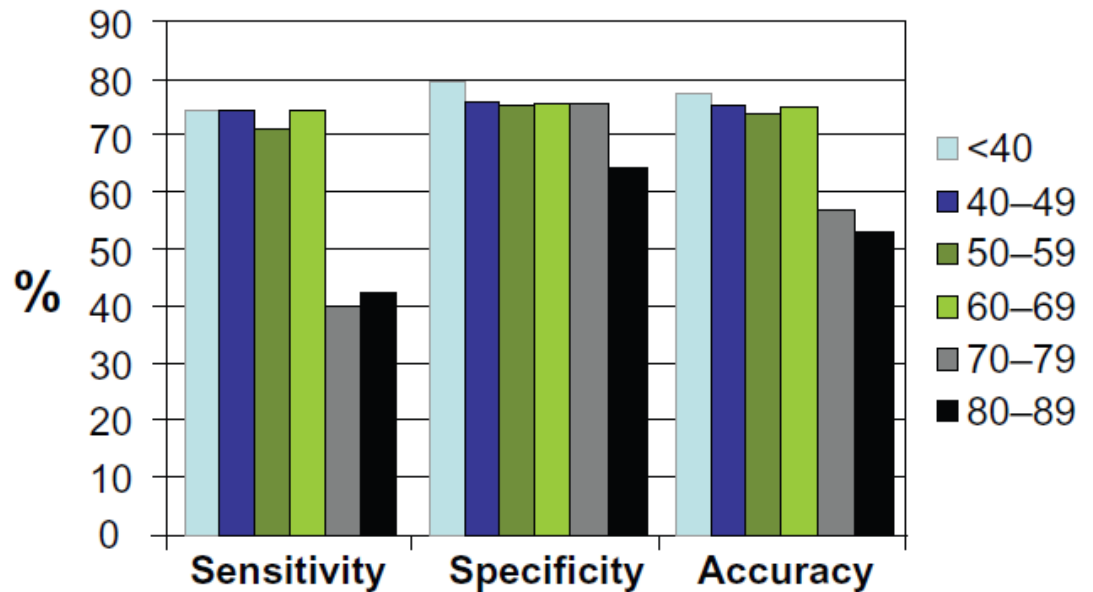


Figure 2. Analysis of the effect of age on the sensitivity, specificity and accuracy of using X-ray diffraction of hair to detect the presence of breast cancer.

Table 4. Effect of combining mammography and X-ray diffraction on detection of breast cancer.

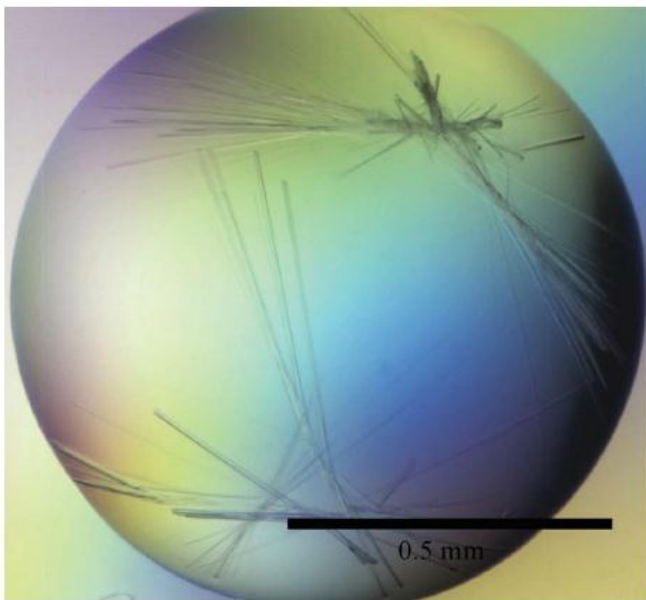
	Cancers detected	Sensitivity
Mammography alone	22	61%
XRD alone	25	64%
Mammography and/or XRD	33	85%

Este estudio, demuestra que el test del cabello puede representar una herramienta importante ayudando a la diagnosis del cáncer de pecho, pero no puede reemplazar los procedimientos estándares actuales. Serán necesarios estudios sobre el mecanismo molecular que otorga el patrón característico al cabello para perfeccionarlo.

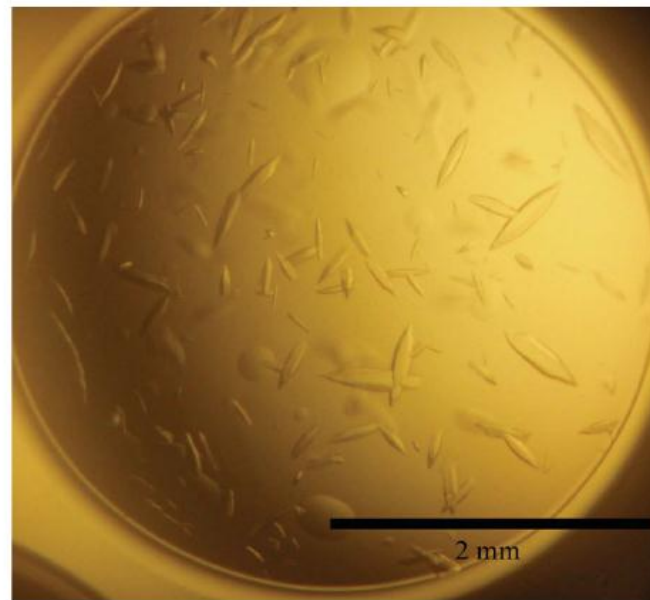
Cristalización y análisis por difracción de rayos X del dominio de dimerización del supresor de tumores ING4

La proteína ING4, pertenece a la familia de supresores de tumores ING e interviene en la remodelación de la cromatina, la inhibición del crecimiento y coopera con la p53 en senescencia y apoptosis.

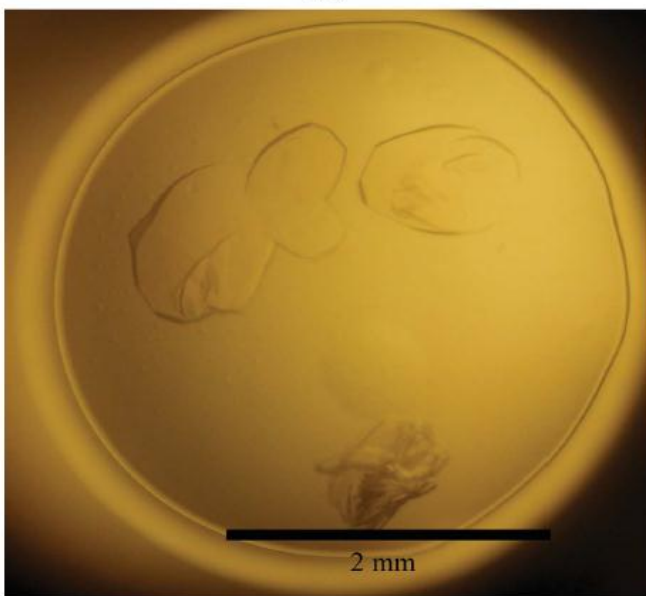
Este estudio se basa en el análisis de esta proteína mediante cristalización y difracción de rayos X.



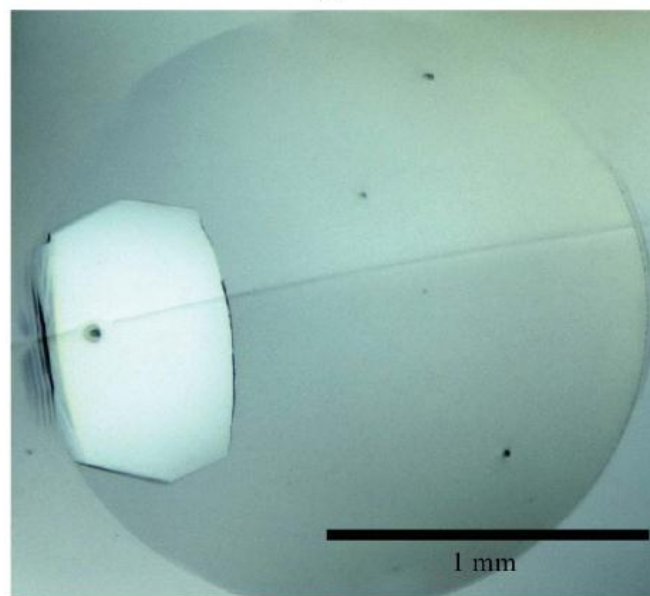
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 1
ING4(1-105) crystal optimization: (a) starting hits, (b) crystals after optimization of pH and PEG 3350 concentration, (c) crystals optimized with Optisalt solution and (d) final crystals obtained using Silver Bullet condition No. A3. The crystals are generally large plates with hexagonal shape and occasionally measured up to 2 mm in their longest dimension.

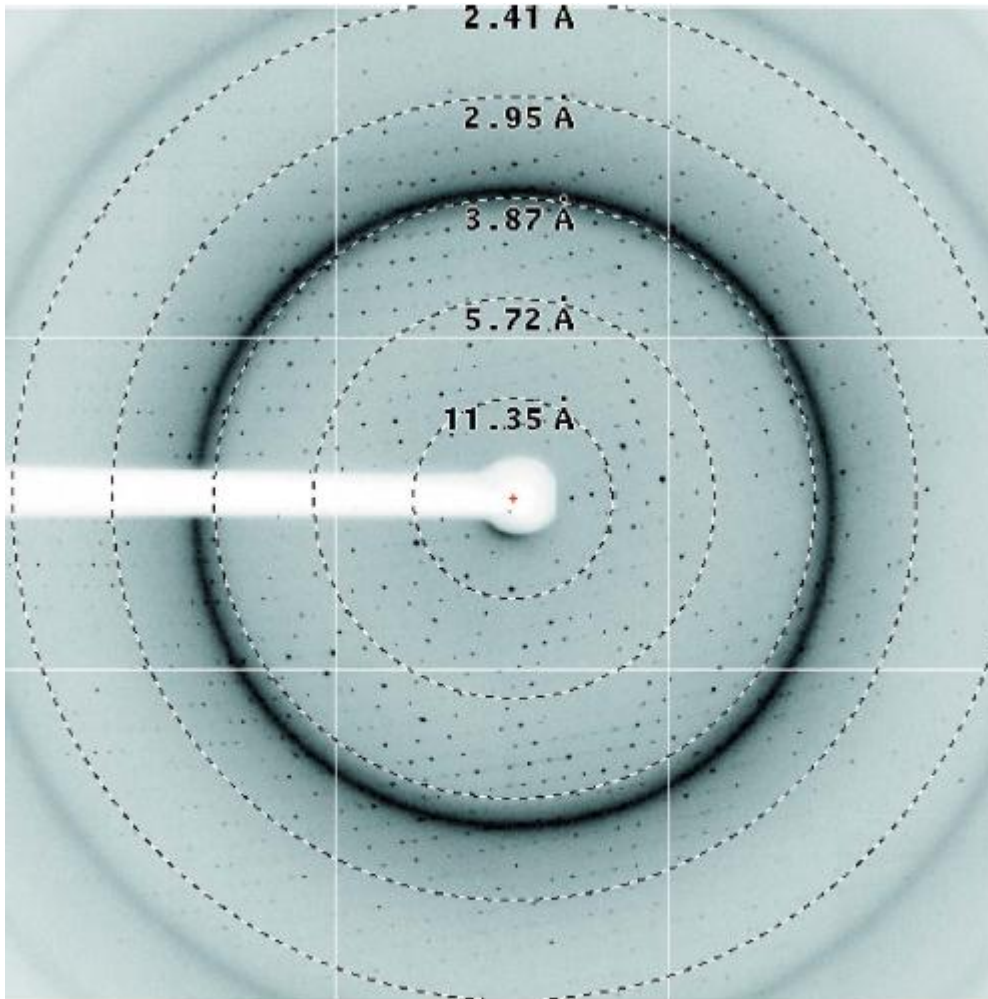


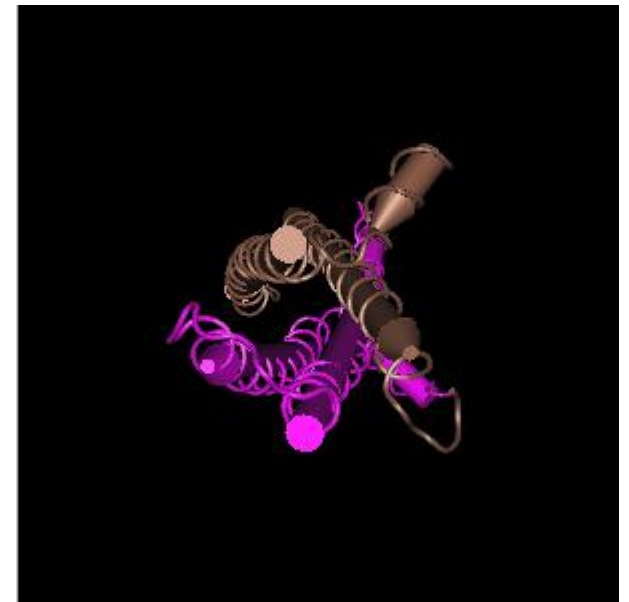
Figure 2

Diffraction pattern obtained from the native crystals using synchrotron radiation on the ID23-1 beamline at ESRF, Grenoble.

Estos son los primeros cristales documentados del dominio N-terminal de la ING4.

La estructura de este dominio ayudará a conocer el mecanismo molecular de la oligomerización de la ING4

Y por consiguiente conocer más acerca de la actividad reguladora de la ING4 al remodelar la cromatina.

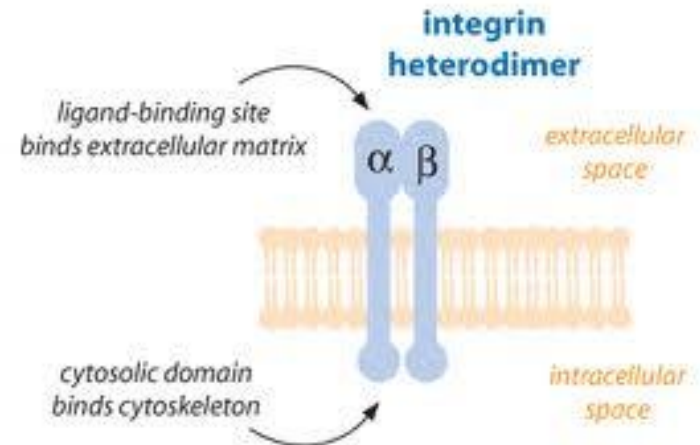


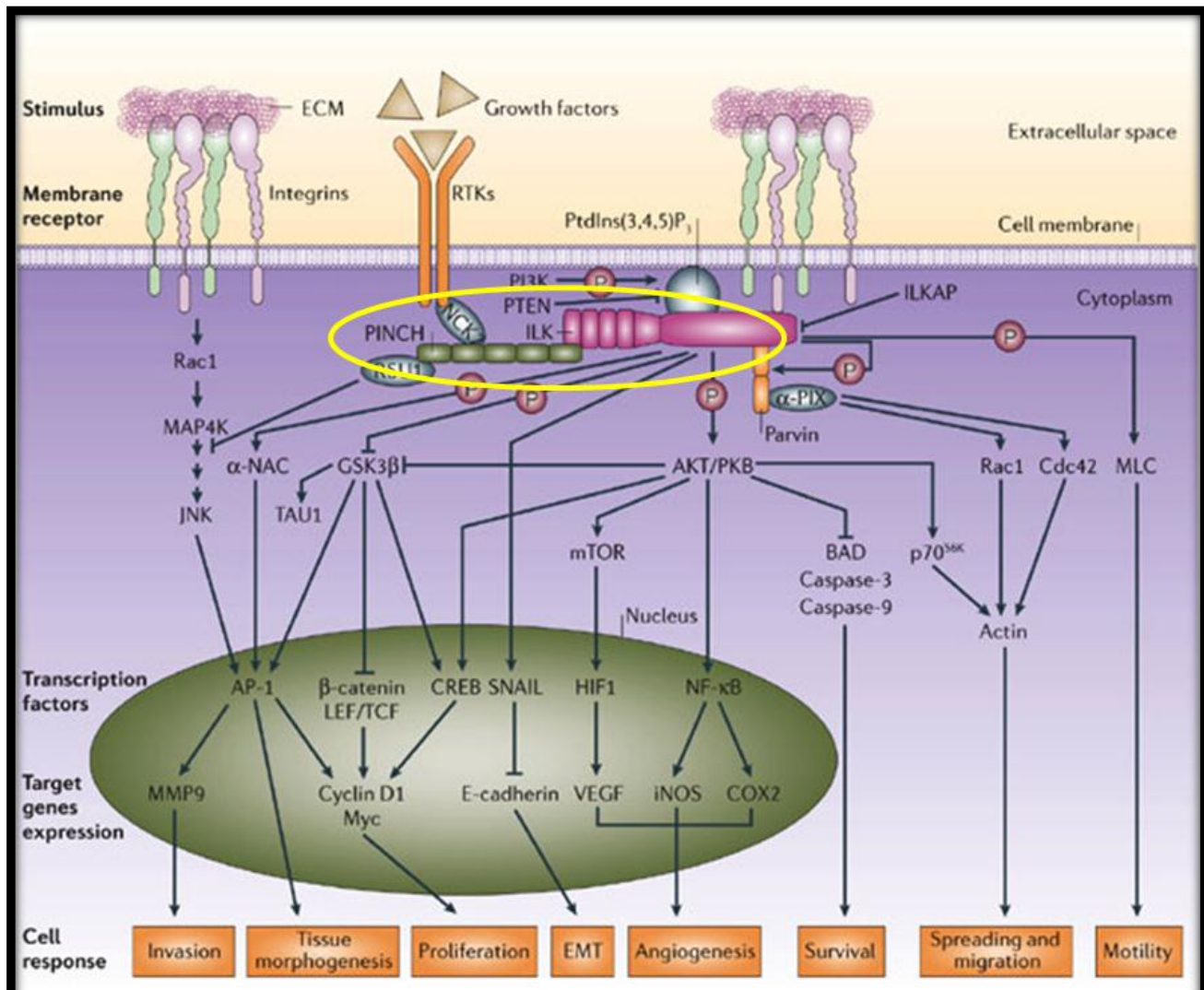
Difracción de rayos X

Investigación en vías de señalización
celular.

Bases estructurales del complejo ILK-PINCH

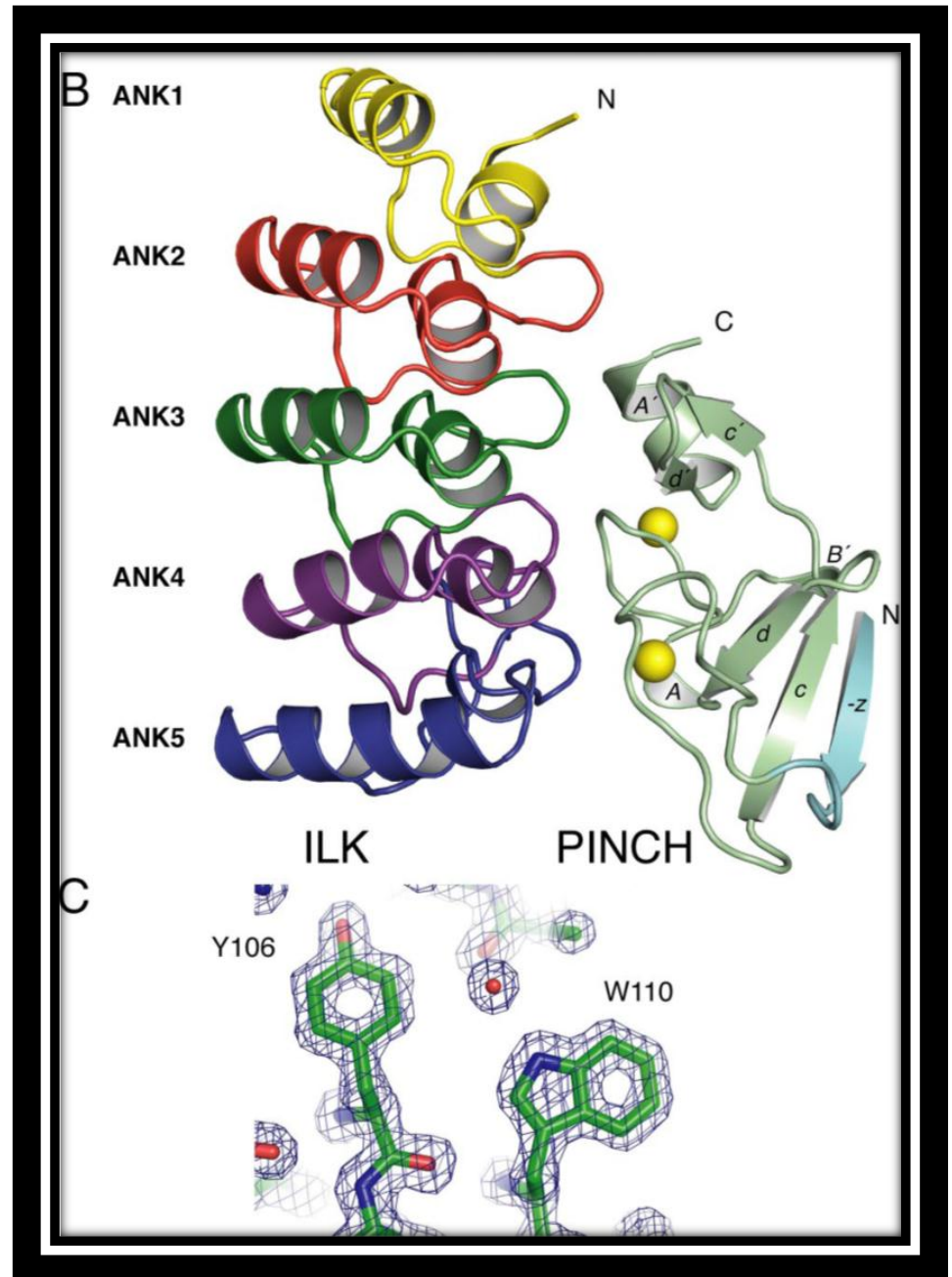
- Las integrinas son una familia heterodimérica de glicoproteínas, con un rol importante en varios procesos biológicos:
 - Agregación plaquetaria
 - Inflamación
 - Función inmune
 - Reparación de tejidos
 - Crecimiento celular
 - Metástasis celular
 - Migración de tejidos durante la embriogénesis...



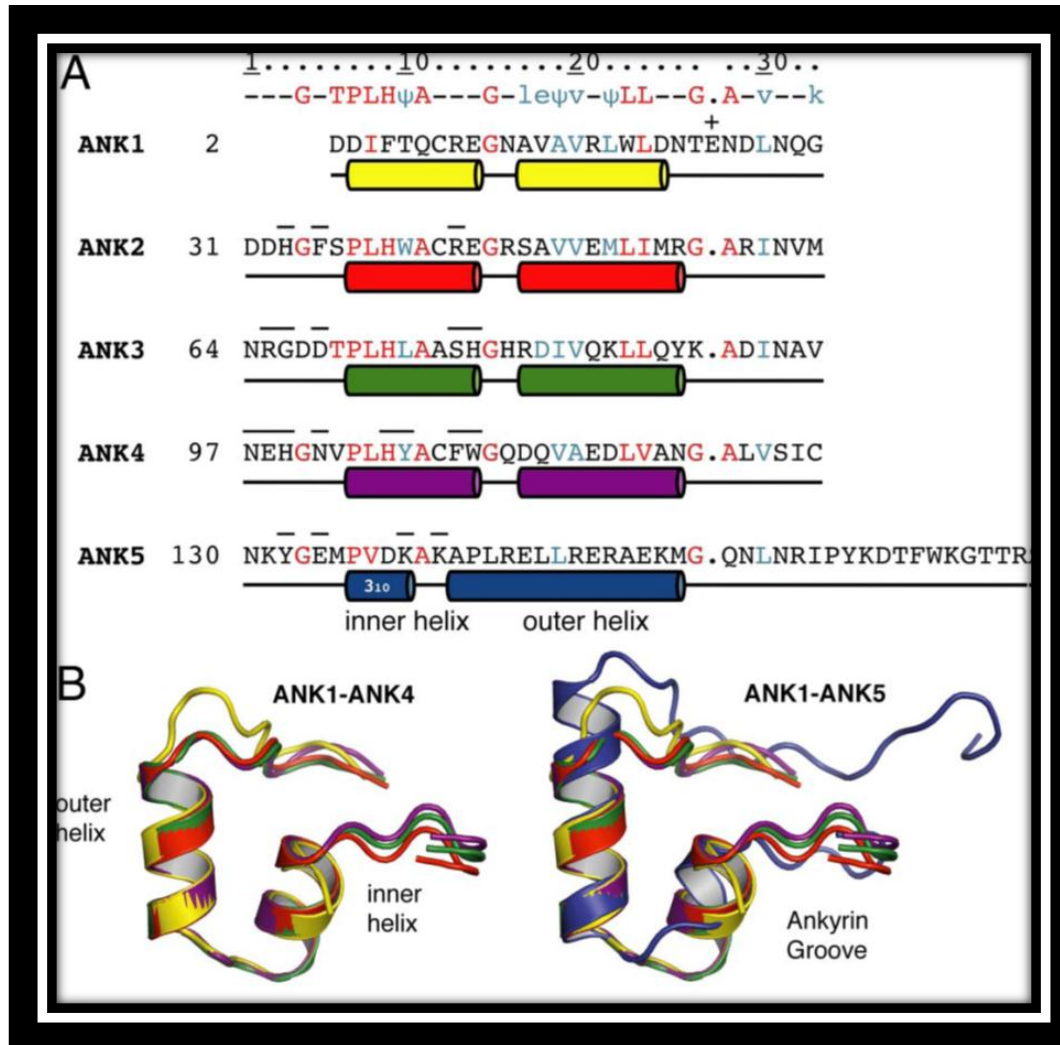


Resultado de la Cristalografía

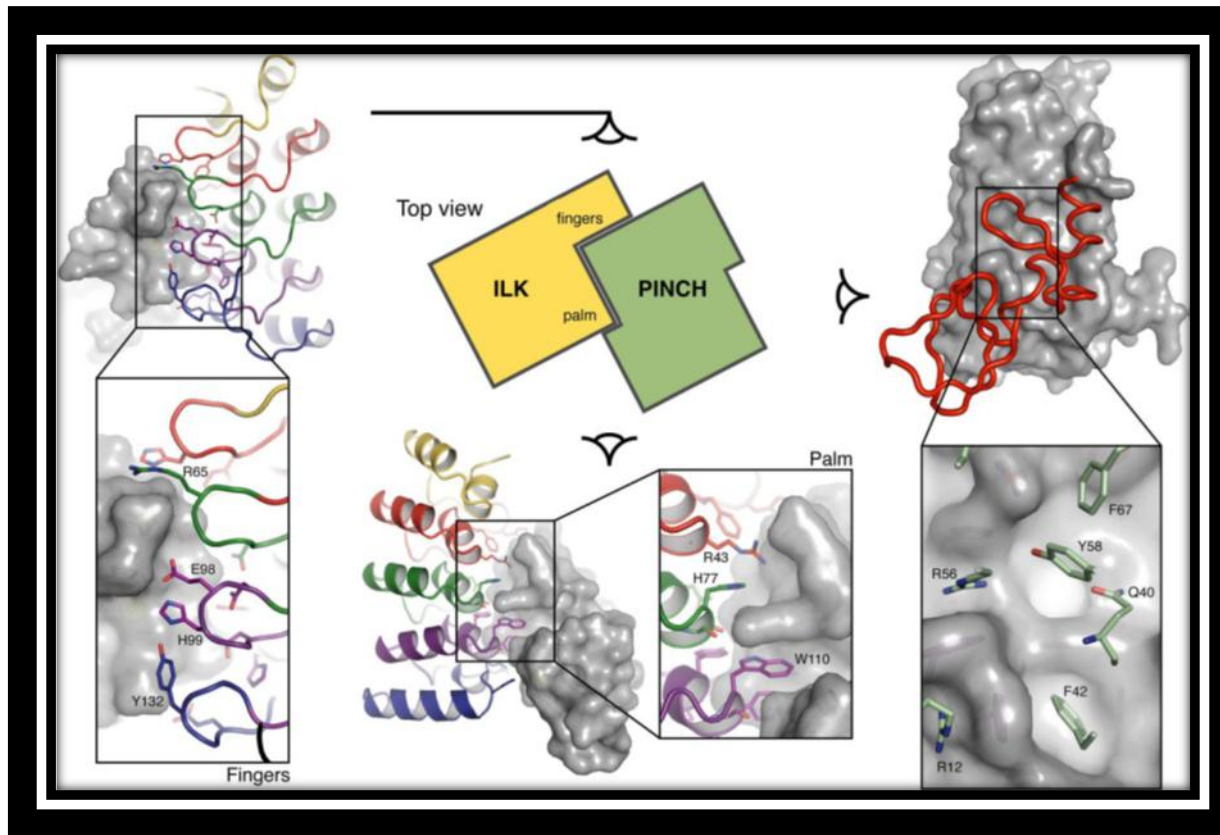
- El resultado del estudio fue la cristalización y determinación de la estructura atómica del complejo ILK-PINCH con una resolución de 1.8 Å.



Dominios conservados ANK de la ILK.



Resolución de la estructura del complejo.

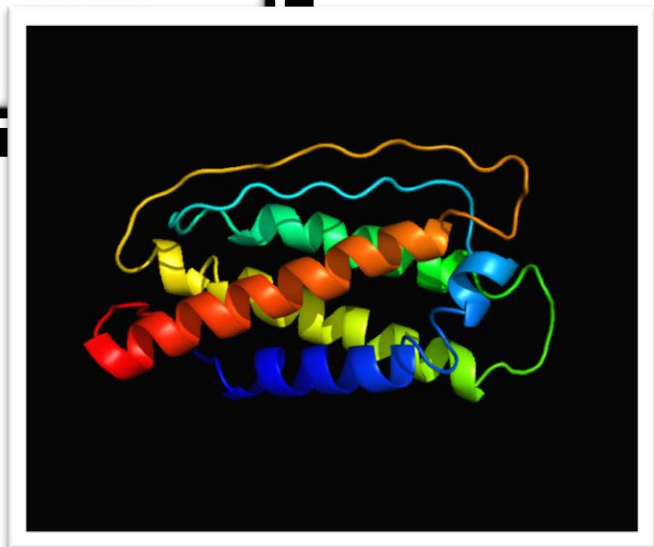
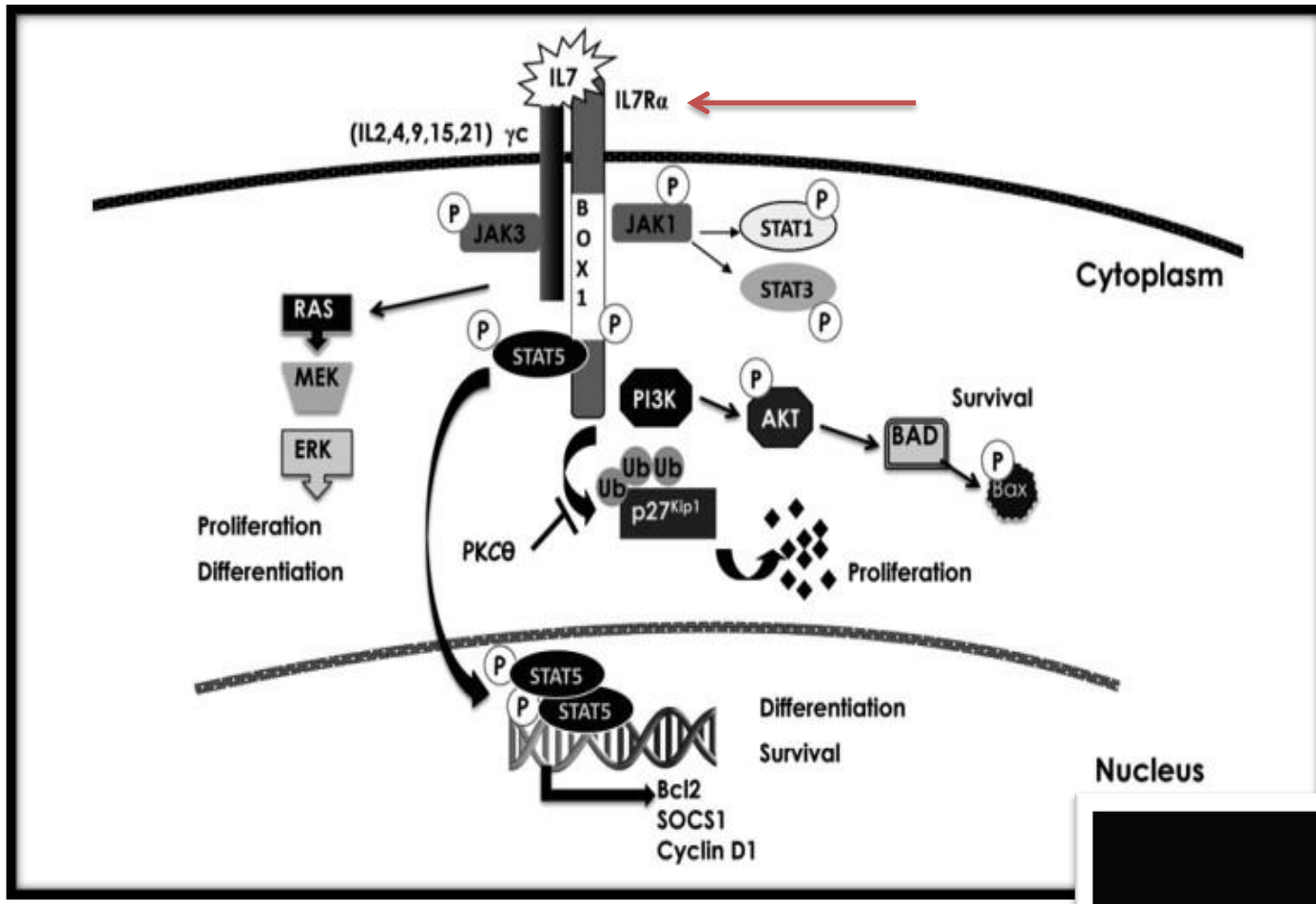


Conclusión

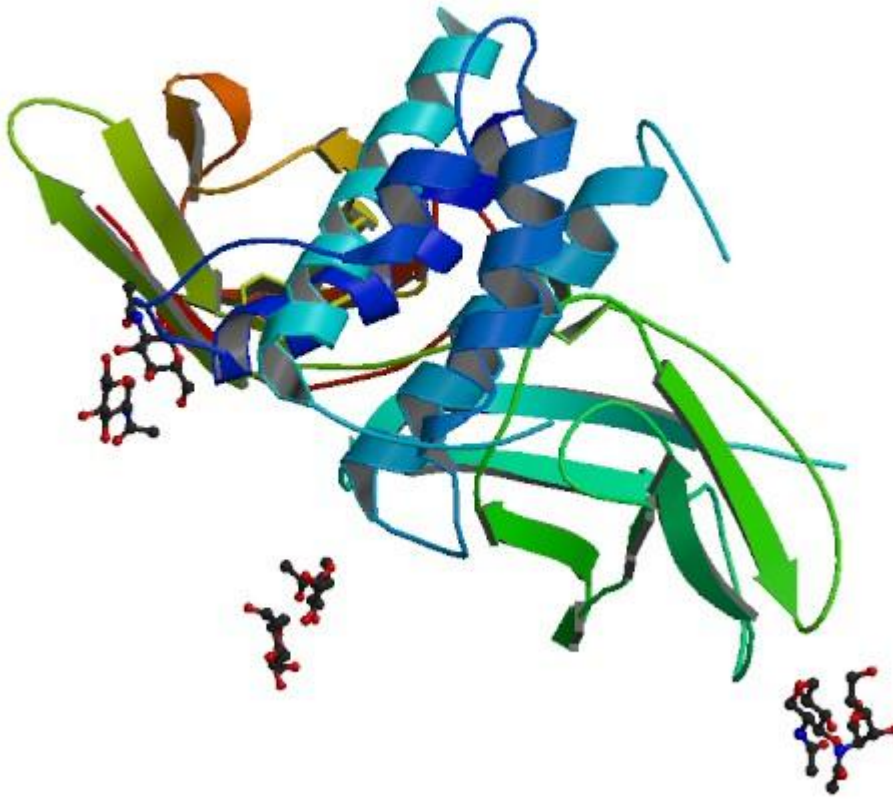
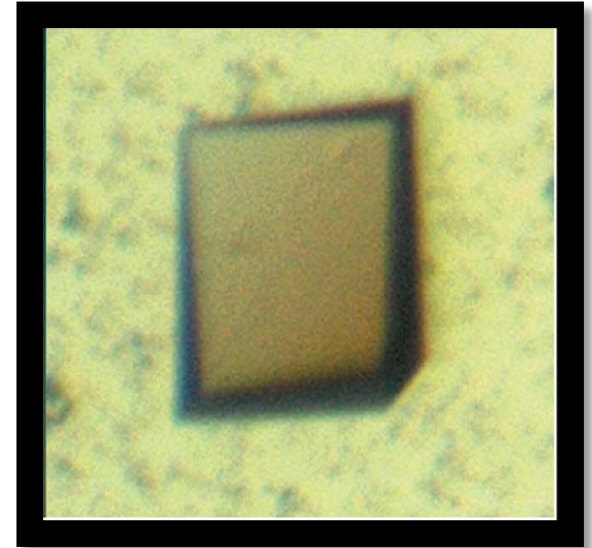
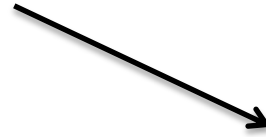
- El complejo ILK-PINCH juega un papel sumamente importante como paso intermedio y clave para la transducción de señales.
- Esta transducción de señales se traduce en procesos metabólicos de gran importancia como factores de crecimiento, morfología y comportamiento celular.
- La principal aplicación de la cristalización y resolución de la estructura del complejo descrito fue su posterior estudio mediante mutación dirigida para ver si los efectos pueden verse relacionados con patologías como el cáncer.

Cristalización y difracción de IL-7 unida IL-7R α glicosilado y no glicosilado.

- La vía de señalización dependiente de IL-7 es fundamental para el desarrollo y la homeostasis linfocitaria.
- En humanos es un elemento clave para la proliferación de población de linfocitos T.
- Fallos en la regulación de esta vía de señalización se relacionan con numerosos trastornos:
 - SCID
 - Autoinmunidad
 - Cáncer



Cristal del complejo IL- 7
IL-7r alfa glicosilado

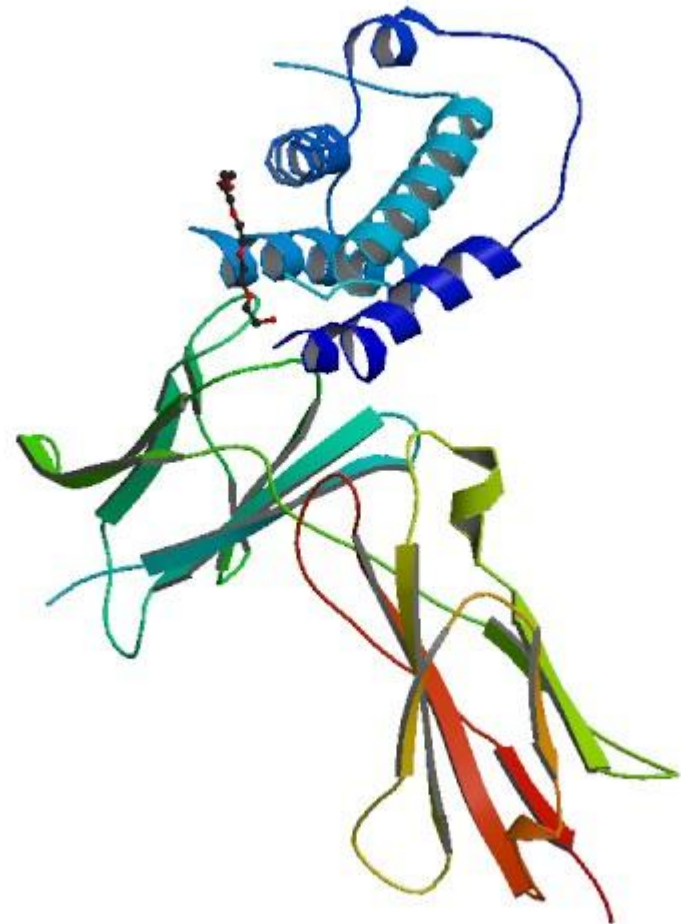


La unión de Interleucina 7 a su receptor glicosilado presenta mucho mayor afinidad y se genera un complejo unido de manera mucho más afín. Se producirá una expresión más acusada de la vía de señalización.



Pequeños cristales del complejo
IL7 unido a IL7r no glicosilado.

Estructura tridimensional del
complejo. La interleucina 7
presenta una unión menos
estrecha con su receptor cuando
éste no está glicosilado,
traduciéndose en una expresión
moderada de la vía de
señalización.



Difracción de rayos X

Investigación vírica

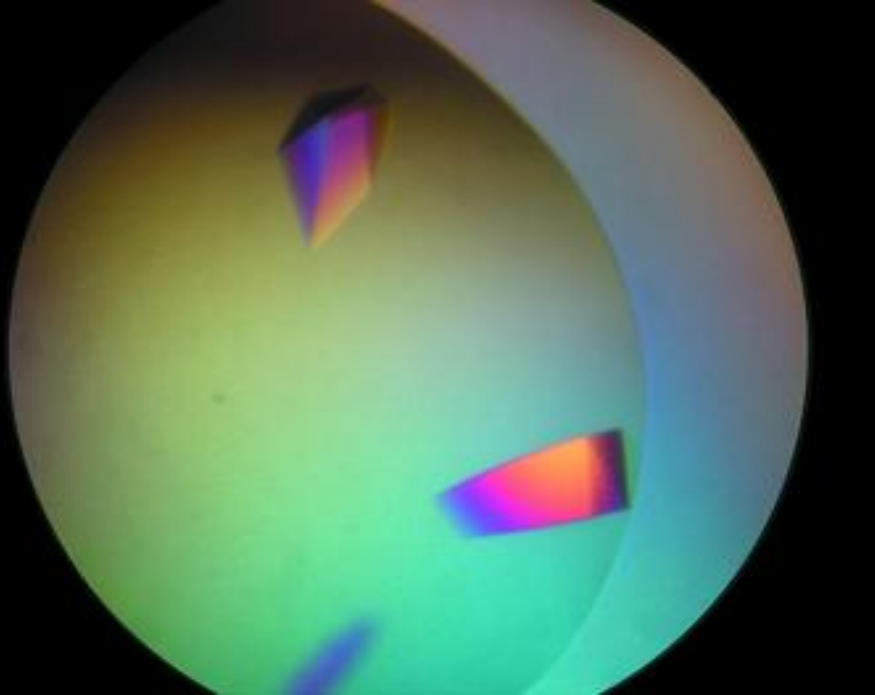
***Cristalización del complejo NS2B- NS3
del virus del dengue y del Nilo
Occidental***

Virus dengue y Virus del Nilo occidental

- Familia Flaviviridae
- Mosquitos *Aedes aegypti* y *A. albopictus*
- *NS3: proteasa necesaria para el procesamiento de sus poliproteinas*
- *NS2B es un cofactor esencial para la actividad catalítica de la proteasa NS3*
- *¡El complejo NS2B- NS3 diana terapéutica interesante!*

Cristalización

Virus dengue



- Condiciones:
(0.1 M acetic acid pH 4.6, 40% PEG 200)
(0.1 M MES pH 6.5, 40% PEG 200)
- Muy puro
- **1.5 Å**

Virus Nilo Occidental

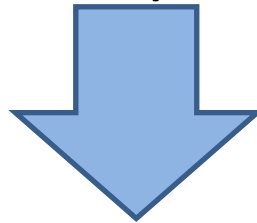


- Se consiguió solo en una condición (25% PEG 3350, 100 mM Bis- Trip pH 6.5)
- Extraña morfología
- **2.3 Å.**

***Cristalización y difracción de rayos X
del Adenovirus humano***

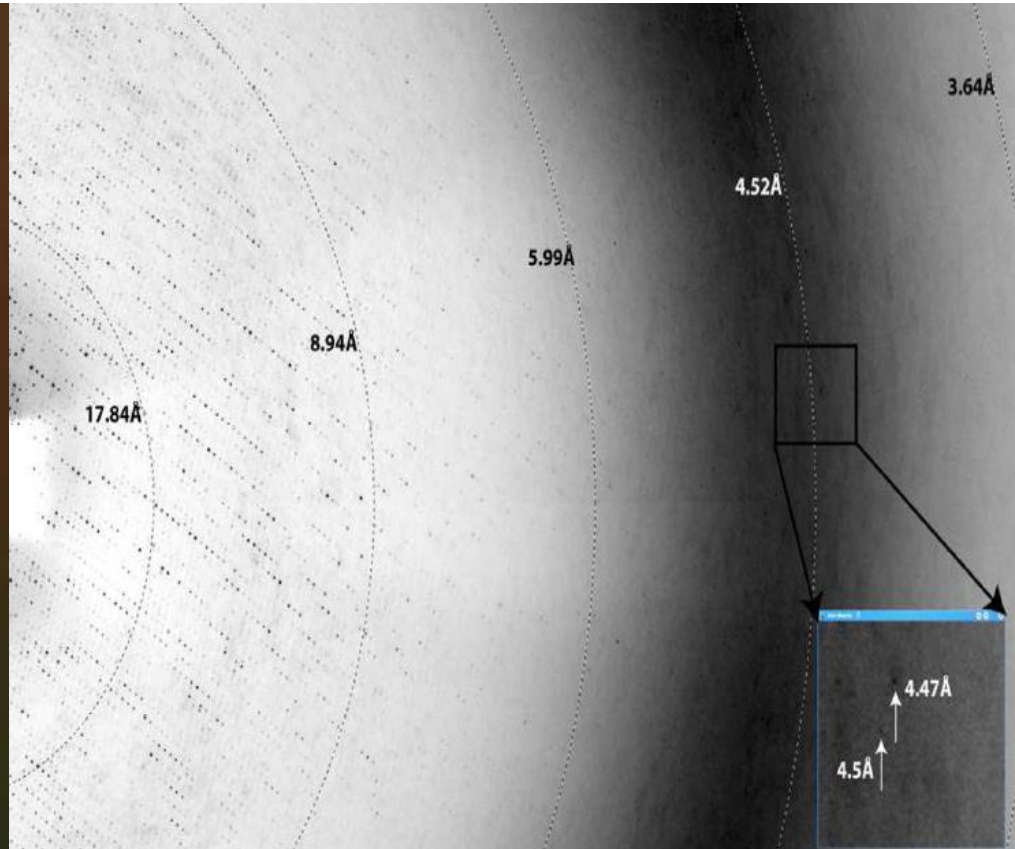
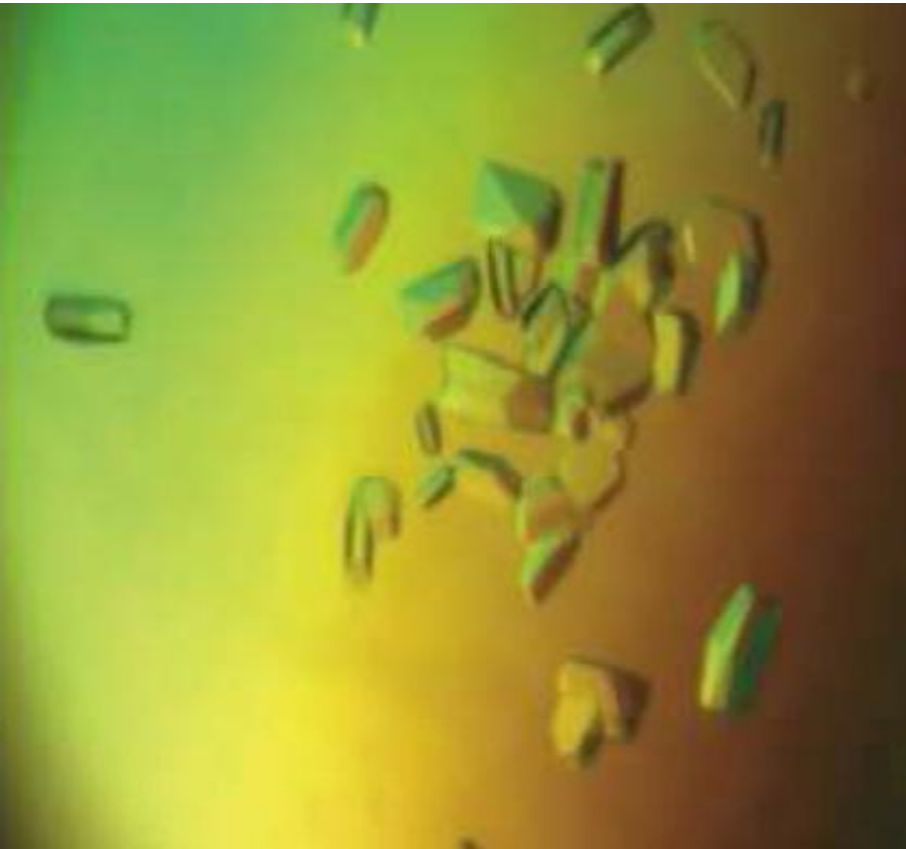
Adenovirus

- Estructura icosaédrica
- Gran tamaño
- Sin envoltura
- dsDNA
- Enfermedades respiratorias, oculares e intestinales.
- Uso en vacunas y terapia génica → Pese a los avances hay una importante respuesta inmune innata



**Análisis estructural
por difracción de
rayos X**

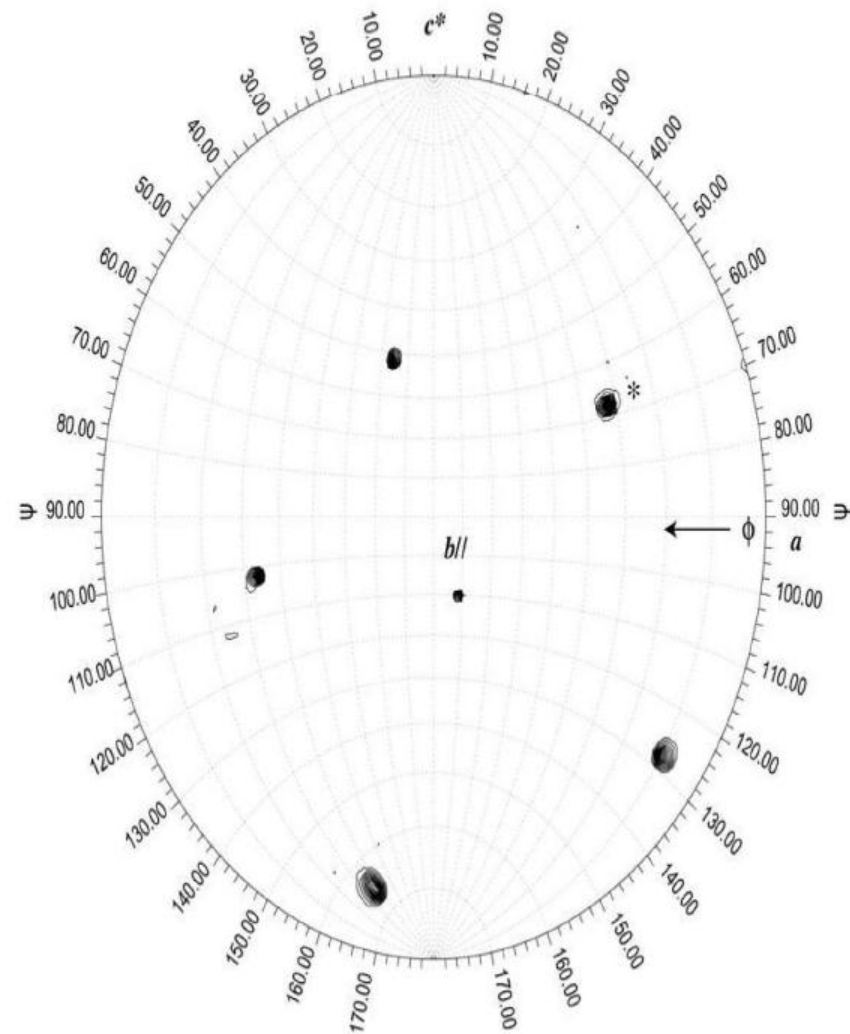
Cristalización y difracción



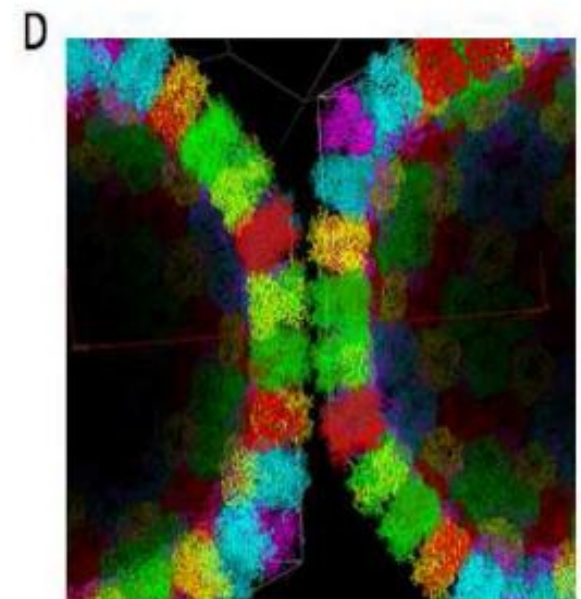
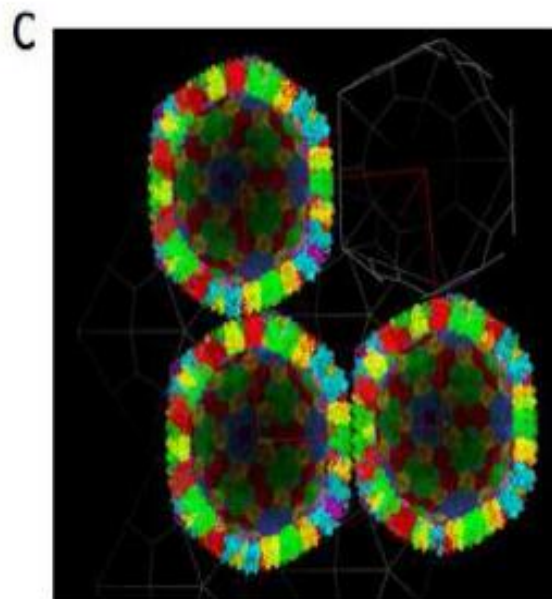
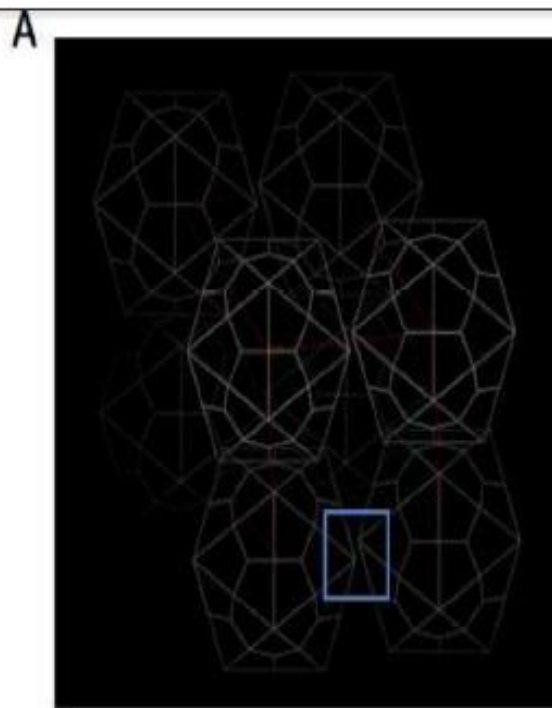
150- 280 μm

- 4.5 Å
- Se obtuvieron 10 imágenes de cada cristal
- Las imágenes de cada cristal se escalaron, fusionaron y analizaron por separado

- Análisis de las imágenes de los cristales individuales para determinar la orientación de las partículas
- Celda unidad \rightarrow un único virión
- Análisis de rotación \rightarrow partículas de cada celda unidad tenían estructura icosaédrica



Tras recoger todos los datos se pudo obtener la disposición de las partículas del virus en la red cristalina, generando así un mapa preliminar que sugieren datos importantes de la cápside del adenovirus, así como los mecanismos celulares de entrada.



BIBLIOGRAFÍA

- Ducruix, A. and Giegé, R., Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach, Oxford, New York: IRL Press at Oxford University Press, 1992.
- Blundell, T.L. and Johnson, L.N., Protein crystallography, New York: Academic Press, 1976.
- Drenth, J., Principles of protein X-ray crystallography, New York: Springer-Verlag, 1994.
- Fanchon, E. et al., Structure and dynamics of biomolecules: neutron and synchrotron radiation for condensed matter studies, Oxford, New York: Oxford University Press, 2000.
- Juan A. Hermoso Domínguez y Martín Martínez-Ripoll, Estructura de proteínas por Cristalografía de rayos X. GCMBE, Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural. Departamento de Cristalografía. Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC. Madrid

BIBLIOGRAFÍA

- Corino GL, French PW, Lee M, Ajaj MM, Haklani J, Mistry DAH, et al. Characterization of a Test for Invasive Breast Cancer Using X-ray Diffraction of Hair-Results of a Clinical Trial. *Breast Cancer (Auckl)* 2009 11/10;3:83-90.
- Culurgioni S, Muñoz I,G., Palacios A, Redondo P, Blanco FJ, Montoya G. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the dimerization domain of the tumour suppressor ING4. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2010 05/01;66:567-570.
- Chiswell BP, Zhang R, Murphy JW, Boggon TJ, Calderwood DA. The structural basis of integrin-linked kinase-PINCH interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 12/30;105(52):20677-20682.
- Wickham J,Jr, Walsh STR. Crystallization and preliminary X-ray diffraction of human interleukin-7 bound to unglycosylated and glycosylated forms of its alpha-receptor. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2007 10/01;63:865-869.