

RESUMEN.

El ADN es una molécula de importancia vital en los organismos vivos, ya que están directamente relacionados con el material genético de las células. Está formado por una cadena de nucleótidos: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Conocer a fondo las posibles estructuras químicas que puede tener el ADN puede ayudar a descubrir su mecanismo de funcionamiento. Este proyecto se centra únicamente en aquellas secuencias de ADN de la forma A(AT)_nT, con n igual a 3, 4 y 5; puesto que apenas hay información sobre la estructura de secuencias que contienen únicamente A y T.

Para conocer la estructura a nivel atómico de una molécula es preciso utilizar una radiación de longitud de onda comparable a las distancias interatómicas, por lo que la difracción de rayos X es una de las técnicas que permiten un estudio más detallado de la estructura de una molécula. Al interaccionar con los electrones de los átomos dan lugar a diagramas de difracción que, cuando la muestra es un cristal, están formados por manchas más o menos redondas y dispuestas regularmente sobre la imagen.

Los diagramas de difracción son analizados mediante programas informáticos (HKL – Denzo y Scalepack) para saber:

- celdilla del cristal, grupo espacial y simetría
- intensidad de cada difracción

Y utilizando un modelo similar y la información anteriormente citada, puede emplearse la metodología del reemplazo molecular para obtener la estructura del cristal. Si la secuencia contiene átomos pesados, puede usarse la técnica MAD para hallar la solución.

Se han obtenido múltiples cristales para la secuencia A(AT)₄T, pero la resolución de los datos no llegaba para poder conseguir un modelo exacto a través del reemplazo molecular. No obstante, se ha encontrado la celdilla del cristal (44,7x44,7x197,7 Å, 90° 90° 120°) y el empaquetamiento de los dúplex en columnas. El grupo espacial con el que mejores resultados se han obtenido es P3₂21. Para intentar resolver la secuencia A(AT)₄T por MAD, se cristalizó la misma secuencia pero cambiando una T por un bromo-uracilo, ya que tienen un volumen similar, pero el procesado de dichos cristales no ha podido utilizarse por el momento.

De las secuencias A(AT)₃T y A(AT)₅T se han obtenido cristales ya analizados, pero la resolución no era suficiente como para intentar resolver la estructura. Así, se ha calculado la celdilla de cada cristal, dato que servirá para un estudio posterior de patrones de cristalización en secuencias ricas en A-T y debido a similitudes con la secuencia anterior, es posible que también tengan una estructura en columnas.





SUMARIO.

RESUMEN.	1
SUMARIO.	3
1.- INTRODUCCIÓN.	5
1.1.- Origen del proyecto.	5
1.2.- Motivación.....	5
1.3.- Objetivos del proyecto.	5
1.4.- Alcance del proyecto.	5
2.- INTRODUCCIÓN TEÓRICA.	7
2.1.- El ADN.	7
2.1.1.- Estructura secundaria del ADN.	7
2.2.- Elección de las secuencias de trabajo.	8
2.3.- Cristalografía de rayos X.	9
2.3.1.- Difracción de rayos X.	9
2.3.2.- Reemplazo molecular.	10
2.3.3.- Dispersión anómala.	10
3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	11
3.1.- Estudios de cristalización.	11
3.1.1.- Difusión de vapor.	11
3.1.2.- Preparación de disoluciones madre.	12
3.1.3.- Preparación de los cubreobjetos.	18
3.1.4.- Preparación de las gotas.	19
3.1.5.- Condiciones de cristalización.	19
3.1.6.- Montaje de los cristales.	21
3.2.- Difracción de los cristales.	21
3.2.1.- Metodologías de recolección de datos.	22
3.2.2.- Variables del método de oscilación.	23
3.3.- Análisis de los datos.	25
3.3.1.- Indexado, procesado y escalado de los datos.	25
3.3.2.- Resolución de la estructura.	29
3.3.3.- Afinado.	30
3.3.4.- Cálculo de los mapas de densidad.	32
3.3.5.- Validación de la estructura.	33
3.4.- Listado de programas.	33
4.- RESULTADOS.	35



4.1.- Estudios de cristalización.....	35
4.1.1.- Secuencia A(AT) ₃ T.....	35
4.1.2.- Secuencia A(AT) ₄ T.....	40
4.1.3.- Secuencia A(AT) ₅ T.....	48
4.1.4.- Secuencia AAU ^{Br} (AT) ₃ T.....	51
4.2.- Procesado de los diagramas de difracción.....	55
4.2.1.- Secuencia A(AT) ₄ T.....	55
4.2.2.- Secuencia A(AT) ₃ T.....	60
4.2.3.- Secuencia A(AT) ₅ T.....	62
4.2.4.- Secuencia AAU ^{Br} (AT) ₃ T.....	65
4.3.- Resolución de la estructura.....	67
4.3.1.- Secuencia A(AT) ₄ T.....	67
4.3.2.- Secuencia A(AT) ₃ T.....	71
4.3.3.- Secuencia A(AT) ₅ T.....	71
4.4.- La hidratación de los cristales.....	72
4.5.- Estructuras <i>HASO</i>	73
5.- EVALUACIÓN ECONÓMICA. _____	75
5.1.- Coste de materiales y productos.....	75
5.2.- Coste de equipos.....	76
5.3.- Coste de personal.....	77
5.4.- Coste total del proyecto.....	77
6.- IMPACTO AMBIENTAL. _____	79
6.1.- Trabajo en el laboratorio.....	79
6.2.- Equipos y material diverso.....	80
6.3.- Servicios generales.....	80
7.- CONCLUSIONES. _____	81
7.1.- Secuencia A(AT) ₄ T.....	81
7.2.- Secuencia A(AT) ₃ T.....	81
7.3.- Secuencia A(AT) ₅ T.....	82
7.4.- Secuencia AAU ^{Br} (AT) ₃ T.....	82
7.5.- Similitudes entre las secuencias.....	82
AGRADECIMIENTOS. _____	83
BIBLIOGRAFÍA. _____	85



1.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- Origen del proyecto.

Se ha observado que las zonas de ADN que no codifican proteínas, de las cuales no conocemos su función biológica, son ricas en adenina (A) y timina (T). Por otro lado, de todas las secuencias de ADN resueltas únicamente dos tienen sólo bases A-T. Además, muestran características muy especiales en lo que respecta a su organización. Por ello, es importante determinar la estructura a nivel atómico de secuencias ricas en A-T.

1.2.- Motivación.

La formación de un Ingeniero Químico no incluye campos tan específicos como la cristalografía de macromoléculas, dentro del cual se encuentra este proyecto. No obstante, los conocimientos matemáticos y físicos que se adquieren durante la carrera permiten desempeñar estudios sobre la estructura del ADN al mismo nivel que estudiantes de otras carreras universitarias como Biología o Química.

En el aspecto personal, la realización de un proyecto de contenido tan experimental supone un reto, por la dificultad teórica y práctica de los métodos empleados. Pero también dota de una mayor soltura en el laboratorio y de experiencias que de otra forma no se hubiesen vivido, como por ejemplo la recogida de datos en la línea española BM16 del Sincrotrón Europeo de Grenoble.

1.3.- Objetivos del proyecto.

El objetivo de este proyecto es encontrar la estructura atómica de tres secuencias de ADN de la forma $A(AT)_nT$, con n igual a 3, 4 y 5, utilizando para ello la metodología de la difracción de rayos X de monocristales.

1.4.- Alcance del proyecto.

El proyecto abarca los pasos que son necesarios para la cristalografía por difracción de rayos X:

- Estudios de cristalización de cada secuencia, para conseguir las mejores condiciones de cristalización posibles.
- Análisis de los diagramas de difracción, empleando los métodos de reemplazo molecular o MAD para resolver cada estructura.





2.- INTRODUCCIÓN TEÓRICA.

En este capítulo se comentan brevemente los aspectos teóricos más importantes de este proyecto. Una explicación más completa de la teoría correspondiente puede hallarse en el anexo B.

2.1.- EI ADN.

El ADN es una cadena lineal de nucleótidos enlazados entre sí. Cada nucleótido se compone de una base nitrogenada, derivada de la purina (guanina o adenina) o de la pirimidina (citosina o timina); un azúcar de cinco carbonos (β -D-2-desoxirribosa); y un fosfato. Los nucleótidos se unen entre ellos por un enlace fosfodiéster entre el carbono 3' del azúcar de uno y el carbono 5' del azúcar del otro (ver fig. 2.1). De esta forma se conocen dos extremos de la cadena de ADN que definen su orientación, el 5' (que acaba en un fosfato) y el 3' (que acaba en el OH de un azúcar).

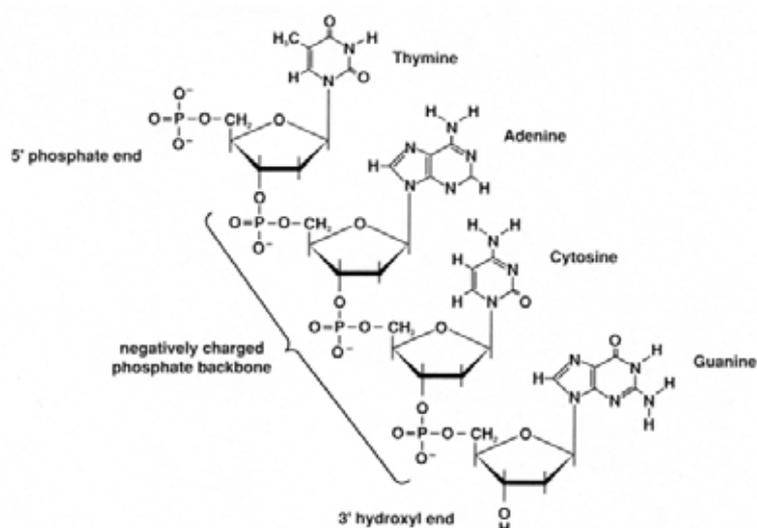


Fig. 2.1. Cadena formada por la unión de Timina, Adenina, Citosina y Guanina. Los nucleótidos se suelen denominar como la base nitrogenada que contienen (Sinden, 1994).

2.1.1.- Estructura secundaria del ADN.

Dos cadenas de ADN se disponen antiparalelamente (orientando sus extremos 5' al revés) y con las bases nitrogenadas enfrentadas. Así pueden unirse las bases por puentes de hidrógeno, adenina con timina y citosina con guanina. La doble cadena o dúplex se enrolla en forma de doble hélice, tal y como se muestra en la figura 2.2.



Las diferencias entre los parámetros de la doble hélice dan lugar a las distintas formas encontradas para el ADN. La más común, la forma B, tiene una media de 10 pares de bases por vuelta y un paso de hélice de 33,8 Å, lo que equivale a una separación entre pares de bases consecutivos de 3,38 Å. Además de la forma de la doble hélice, también puede haber distintos tipos enlaces entre los pares de bases, destacando los enlaces del tipo Watson-Crick o el Hoogsteen.

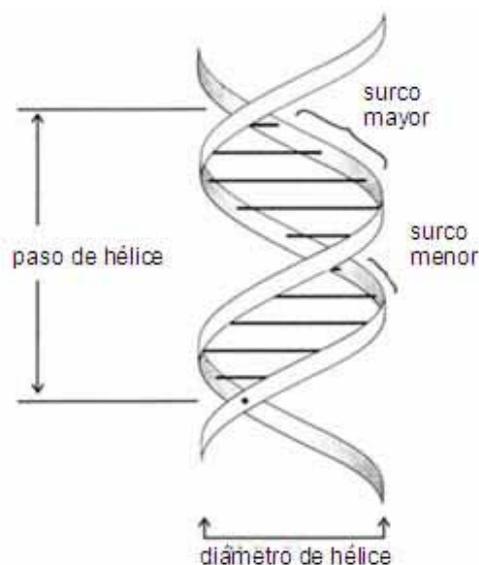


Fig. 2.2. Algunos parámetros de la doble hélice (Sinden, 1994).

La estabilidad del conjunto se consigue de distintas formas, entre las que destacan:

- Apantallamiento de las cargas negativas de los fosfatos, mediante la unión de cationes o de moléculas del propio disolvente.
- Fuerzas de Van der Waals debidas a los anillos aromáticos de las bases.
- Los puentes de hidrógenos entre bases.

2.2.- Elección de las secuencias de trabajo.

La elección de secuencias que sólo contienen pares A-T viene de la poca información disponible y la variedad de estructuras a que han dado lugar los escasos antecedentes (ver anexo B). Dentro de todas ellas, se ha escogido la familia $A(AT)_nT$, con n igual a 3, 4 y 5; y se ha buscado encontrar la estructura a nivel atómico de la doble hélice, así como su empaquetamiento dentro de un cristal, la disposición de sus enlaces por puentes de hidrógeno, su interacción con iones, agua, etc.



2.3.- Cristalografía de rayos X.

Los rayos X son una radiación electromagnética con una longitud de onda de entre 0,1 y 150 Å, que los hace idóneos para el estudio de moléculas orgánicas o inorgánicas, al ser de magnitud comparable a las distancias interatómicas.

2.3.1.- Difracción de rayos X.

Al irradiar una muestra con rayos X, se consigue que los electrones de los átomos oscilen a una frecuencia similar a la de la radiación incidente y emiten radiación de la misma longitud de onda en todas direcciones. Este fenómeno se conoce como dispersión elástica y puede considerarse como si los rayos X fueran directamente difractados por los electrones. Tratando la radiación como una onda cualquiera, los rayos X difractados interactúan unos con otros produciéndose una serie de interferencias. Si la muestra está convenientemente ordenada, se producen interferencias destructivas (las ondas se anulan mutuamente) salvo en puntos particulares, definidos según la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (\text{Ec. 2.1})$$

siendo:

- n: un número natural
- λ : la longitud de onda
- d_{hkl} : la distancia interplanar de una familia de planos de índices hkl.
- θ : el ángulo incidente (igual al de difracción), llamado ángulo de Bragg.

La utilidad de la ley de Bragg se entiende mejor a través de la esfera de Ewald (fig. 2.3), una construcción según la cual los puntos del espacio recíproco que cortan una esfera de radio $1/\lambda$ cumplen la ley de Bragg y por lo tanto producen difracción visible.

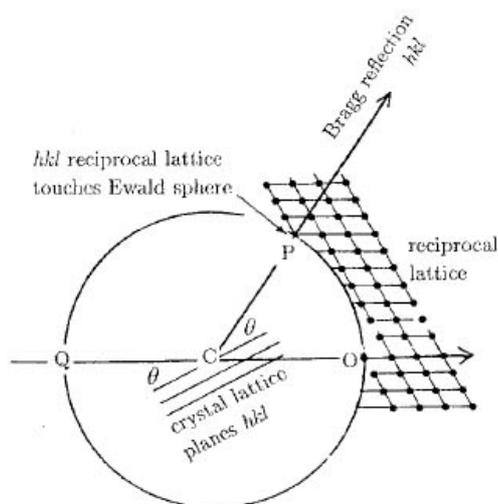


Fig. 4.10. Representación geométrica de la esfera de Ewald. (Glusker, 1994).



Así, si se recogen los diagramas de difracción de una muestra cristalina (bien ordenada), la posición e intensidad de las difracciones que se observan determinan la posición de los átomos dentro del cristal. Desarrollando matemáticamente (ver anexo B) las ecuaciones de la difracción desde un punto cualquiera, se obtiene una fórmula para la densidad electrónica para cualquier punto del espacio:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} \left[\overline{F}_{hkl} \cdot \cos(2\pi \cdot (\vec{x} \cdot \vec{h}) + \varphi_{hkl}) \right] \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Donde:

- V es el volumen del cristal.
- $\left| \overline{F}_{hkl} \right|$ es el módulo del factor de estructura de cada difracción (suma de las radiaciones difractadas).
- \vec{x} es el vector de posición (x, y, z)
- \vec{h} es el vector director del plano de índices hkl.
- φ_{hkl} es la fase del factor de estructura.

De la ecuación 2.2, podemos encontrar todos los valores salvo la fase de cada difracción, φ_{hkl} , que debe ser estimada por otros métodos indirectos. Dentro de estos métodos destacan dos: el reemplazo molecular y la dispersión anómala.

2.3.2.- Reemplazo molecular.

Partiendo de la base de que moléculas orgánicas similares tienen estructuras similares, puede emplearse como modelo de partida el de una molécula parecida y modificarlo de forma que concuerde con los datos experimentales. Esto es especialmente cierto en el caso del ADN, ya que la mayoría de formas tienen diferencias muy pequeñas entre ellas.

2.3.3.- Dispersión anómala.

Normalmente se supone que la interacción entre la radiación incidente y los átomos se corresponde a la dispersión elástica. Pero esto no es del todo cierto, especialmente para elementos con número atómico elevado. En esos casos, los electrones pueden entrar en resonancia y emitir la radiación con un desfase de 90°. El efecto de la dispersión anómala se observa en el incumplimiento de la ley de Friedel, que dice que los factores de estructura de las familias hkl y -h-k-l deben ser iguales.

En la dispersión anómala se emplean moléculas con átomos pesados situados en posiciones específicas, como por ejemplo sustituyendo una timina por un bromo-uracilo. La diferencia entre los factores de estructura de la ley Friedel permite localizar el átomo pesado en el cristal y a partir de él, desentrañar la estructura completa de la molécula.



3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El procedimiento experimental llevado a cabo para la realización de este proyecto se puede dividir en tres fases:

- Ensayos de cristalización.
- Difracción de los cristales obtenidos.
- Análisis de los datos mediante software informático.

3.1.- Estudios de cristalización.

El objetivo de este paso es conseguir cristales de una calidad suficiente para los experimentos de difracción. Estos cristales se obtienen en disoluciones donde además de un oligonucleótido y un precipitante, normalmente hay un tampón, espermina y alguna sal. Se conocen varios métodos de cristalización, los más importantes son:

- diálisis, donde el oligonucleótido se separa del solvente por la acción de una membrana semipermeable,
- difusión de vapor, donde la disolución de ADN se va concentrando al evaporarse parte del solvente,
- *batch*, derivado del anterior, donde se parte ya de la supersaturación,
- *seeding*, donde se favorece el crecimiento de un núcleo cristalino depositado sobre la disolución de oligonucleótido.

3.1.1.- Difusión de vapor.

En la realización de este proyecto se utilizó únicamente el método de difusión de vapor para obtener cristales. Éste se basa en la utilización de un volumen cerrado dentro de la cual se hallan un depósito o pozo y una gota, de volumen mucho menor. En la gota se añade la disolución a cristalizar además de otros componentes, mientras que en el pozo no debe haber ADN y la concentración del precipitante ha de ser mayor.

La variación de la concentración del precipitante entre la gota y el pozo hace que la presión de vapor sea distinta. El sistema tiende a equilibrarse pasando agua de la gota al pozo o, si el precipitante es más volátil que el agua, pasando precipitante del pozo a la gota. En nuestro caso, al usar MPD o PEG, el efecto conseguido es la disminución del volumen de la gota por evaporación del agua, con lo que la concentración de ADN va subiendo lentamente hasta conseguir llegar a la supersaturación para obtener precipitado.



Dentro de la difusión de vapor, existen tres estrategias posibles, dentro de las cuales se utilizaron dos (fig. 3.1) en este proyecto. Ambas se realizaron sobre placas *linbro*, como la de la figura 3.1 o en cápsulas redondas, para pruebas más específicas:

- gota colgante,
- gota sentada.

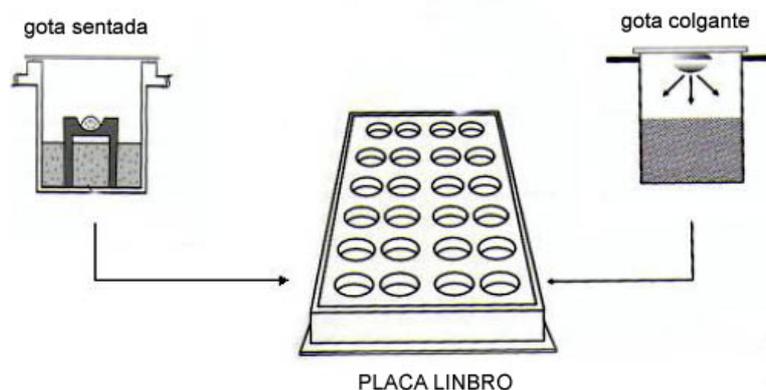


Fig. 3.1. Esquema de la gota sentada y la gota colgante, para una placa linbro (McPherson, 1990).

En la gota colgante, como se aprecia en la figura 3.1, la gota se mantiene sobre un cubreobjetos tratado con silano, para conseguir una superficie hidrofóbica, y colocado hacia abajo sobre el pozo. En la gota sentada, en cambio, la gota se mantiene dentro de un puente colocado en el pozo, por encima del nivel de líquido. En ambos casos, el sistema debe estar convenientemente sellado con silicona para evitar que se sequen tanto la gota como el pozo.

3.1.2.- Preparación de disoluciones madre.

Para realizar las gotas y obtener los cristales hay que preparar unas disoluciones madre de forma muy cuidadosa. Es importante que la concentración sea exacta y que la disolución madre salga limpia, puesto que la presencia de impurezas en la gota puede generar cristales de mala calidad.

3.1.2.1.- Tampón.

Los tampones empleados en los estudios de cristalización son de cacodilato sódico y potásico (fig. 3.2), tamponados a pH 6, 6.5, 7 y 7.5. Primero se realizan las disoluciones de ácido cacodílico, cacodilato sódico y hidróxido potásico, disueltos en agua filtrada. Después se tampona la disolución de ácido con cacodilato sódico (para hacer el tampón sódico) y



con hidróxido potásico (para hacer el tampón potásico), y se filtran con microfiltros de celulosa de 0,22 µm. Por último, se realizan las alícuotas a 100 mM para las gotas.

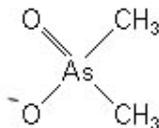


Fig. 3.2. Estructura del cacodilato.

3.1.2.2.- Sales.

En este proyecto se han utilizado las siguientes sales: LiCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, MnCl₂, (CH₃COO)₂Mg y (CH₃COO)₂Zn. Ninguna tiene un carácter ácido o básico marcado que interfiera con el tampón, por lo que se han disuelto directamente en agua filtrada. Para evitar la presencia de precipitados, polvo o fibras, se han filtrado con microfiltros de celulosa de 0,22 µm de poro, antes de hacer las alícuotas necesarias.

La concentración de las alícuotas que se prepararon es de:

- LiCl: 2 M, 500 mM y 400 mM.
- KCl: 1 M y 200 mM.
- MgCl₂: 1 M, 200 mM, 100 mM y 10 mM.
- CaCl₂: 500 mM y 200 mM.
- BaCl₂: 500 mM, 200 mM, 100 mM, 20 mM y 5 mM.
- MnCl₂: 500 mM, 200 mM, 100 mM.
- (CH₃COO)₂Mg: 200 mM y 20 mM.
- (CH₃COO)₂Zn: 25 mM.

3.1.2.3.- Espermina.

La espermina es una poliamina lineal de cuatro cargas positivas, con la estructura siguiente:



Es la molécula más empleada en la cristalización del ADN y ARN porque es simétrica y sirve tanto de contraión (con los cuatro grupos amino) como de precipitante [Subirana y Vives, 1981] pese a que su presencia no es imprescindible.

La preparación de esta sustancia es la misma que la de las sales: se disuelve una cantidad cuidadosamente pesada en agua filtrada y después se procede al filtrado con microfiltro de



celulosa de 0,22 μm de poro. Aunque el carácter básico de las aminas hace que el pH no sea neutro, la cantidad de espermina que se añade a una gota es tan pequeño que no afecta al tampón. Las alícuotas de la disolución madre que se prepararon fueron de 10 y 20 mM.

3.1.2.4.- Precipitante.

El precipitante es la sustancia que disminuye la constante dieléctrica del agua para producir la precipitación. En este proyecto se ha trabajado con dos precipitantes distintos, ambos polialcoholes de gran densidad:

- 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD).
- Polietilenglicol 3350 (PEG) (producto disuelto al 50% (v/v) en agua).

En el caso de los precipitantes, es necesaria la preparación de dos disoluciones madre distintas: uno de menor volumen y microfiltrado destinado a la gota y otro de mayor volumen destinado al pozo:

Para la gota, se realizaron alícuotas del 50% y 70% (v/v) para el MPD y del 50% (v/v) para el PEG. En ambos casos se filtraron con microfiltros de celulosa de 0,22 μm . Para los pozos, se prepararon alícuotas a intervalos crecientes de 5%, empezando desde 15% y hasta el 70% (v/v) en el caso del MPD y de 20, 25, 30 y 50% (v/v) para el PEG.

3.1.2.5.- Secuencias de ADN.

Las secuencias de ADN utilizadas en este proyecto son relativamente cortas, de 8 a 12 bases, por lo que se denominan oligonucleótidos u oligos, simplemente. Se ha trabajado con cuatro oligos:

- AATATATT, referenciado en adelante como A(AT)₃T.
- AATATATATT, referenciado en adelante como A(AT)₄T.
- AATATATATATT, referenciado en adelante como A(AT)₅T.
- AAU^{Br}ATATATT, referenciado en adelante como AAU^{Br}(AT)₃T. Equivale a A(AT)₄T pero con la primera timina substituida por un bromo-uracilo, para poder realizar el análisis MAD (*multiwavelenght anomalous dispersion*).

Estas secuencias son sintéticas y se pueden obtener de dos formas distintas: químicamente por reacción en fase sólida, o *in vitro* enzimáticamente. En cualquiera de los dos casos, el ADN obtenido se purifica por electroforesis de gel desnaturizante o por HPLC (*high pressure liquid cromatography*) y se conserva estabilizado con sales y a pH



ligeramente ácido para ser congelado para su transporte. Las secuencias utilizadas en este proyecto fueron sintetizadas en el Institut Pasteur.

Los oligos se reciben congelados y en forma de un polvo blanco extremadamente volátil. Por ello, la preparación de la disolución madre resulta muy complicada y se ha de realizar de forma muy cuidadosa. Primero se disuelve en agua y se deja reposando para asegurarnos de que todo el oligo se ha disuelto. Después es necesario medir la concentración real de ADN, ya que como se ha mencionado antes viene estabilizado con sales. La medida de la concentración se hace por espectrofotometría de UV, primero realizando un espectro de absorción desde 220 a 320 nm y después midiendo la absorción máxima, localizada en 260 nm.

Una vez se tiene el oligo en una dilución suficiente como para medir la absorbancia (normalmente, para una concentración inicial estimada de 4 a 8 mM, se trabaja con una dilución de 800 µl de agua por 1µl de disolución de oligo), se realiza el espectro de absorción del oligo y se mide el máximo de absorbancia a 260 nm. Posteriormente, mediante la ecuación [Cantor *et al.*, 1970] siguiente:

$$\frac{\text{Abs}(260)}{\epsilon_{260}} \cdot f_D = [\text{oligo}] \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde:

- Abs(260) es el valor de la absorbancia a 260 nm.
- f_D es el factor de dilución aplicado.
- [oligo] es la concentración del oligo.
- ϵ_{260} es el valor del coeficiente de extinción calculado según la ecuación siguiente (suponiendo que sólo haya bases A y T):

$$\epsilon_{260} = \left[2 \cdot (\epsilon_{A_pA} + \epsilon_{A_pT} + \epsilon_{T_pA} + \epsilon_{T_pT}) - \epsilon_A - \epsilon_T \right] \quad (\text{Ec. 3.2})$$

El valor de ϵ_{260} se obtiene analizando cada secuencia. Se cuenta el número de cada tipo de enlace entre dos bases (en este caso A-A, A-T, T-A, y T-T) y el número de bases que se han contado en dos uniones (en este caso A y T). Luego se sustituye el valor de ϵ_j (donde j es el tipo de unión) por el de la tabla 3.1, multiplicándose por el número de veces que se repite ese tipo de unión y se calcula el valor final.



Tipo de unión	ϵ_i (coeficiente de extinción)
ϵ_{AdA}	13,7
ϵ_{AdT}	11,4
ϵ_{TAd}	11,7
ϵ_{TdT}	8,4
ϵ_A	15,4
ϵ_T	8,7

Tabla 3.1. Valores de los coeficientes de extinción a 260 nm, 25°C, pH neutro y cadena sencilla de ADN (1mmol/cm). Se han listado únicamente los valores correspondientes a las bases A y T, dado que son las únicas utilizadas en este proyecto (Cantor et al., 1970).

A continuación se muestran las figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6, con los espectros de absorción de cada secuencia utilizada y la tabla 3.2, donde se resumen los cálculos realizados para hallar la concentración de cada disolución madre.

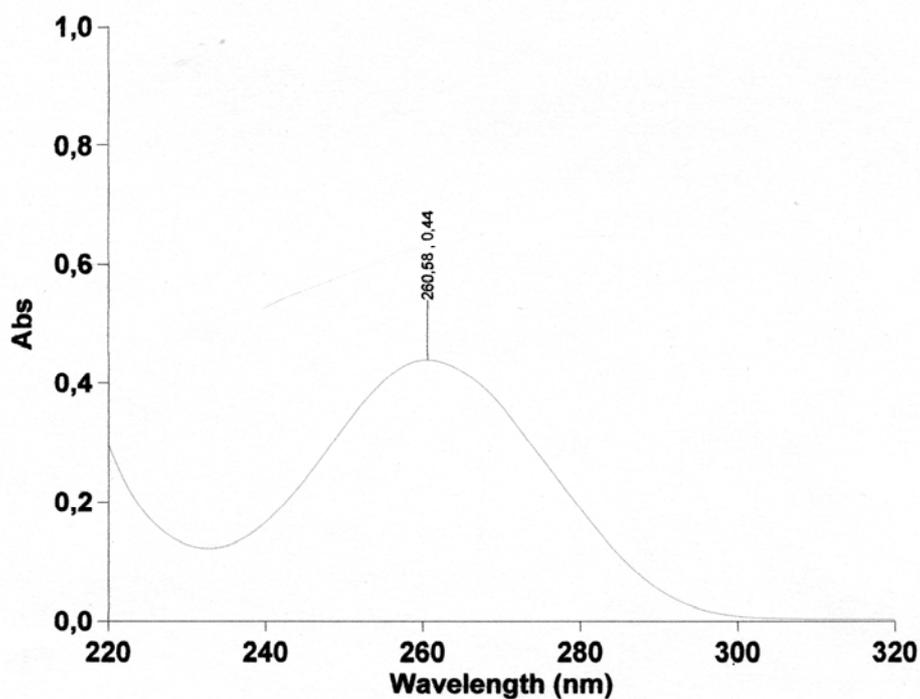


Fig. 3.3. Espectro de absorción de $A(AT)_3T$. El máximo está situado en 260,58 nm, correspondiendo a una absorbancia de 0,44.



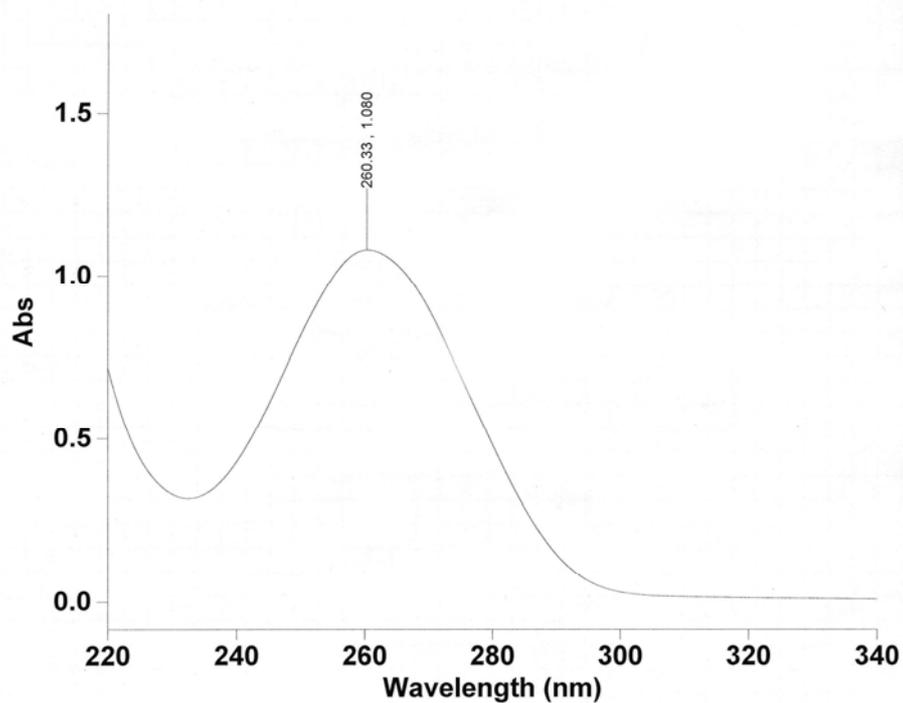


Fig. 3.4. Espectro de absorción de A(AT)₄T. El máximo está situado en 260,33 nm, correspondiendo a una absorbancia de 1,080.

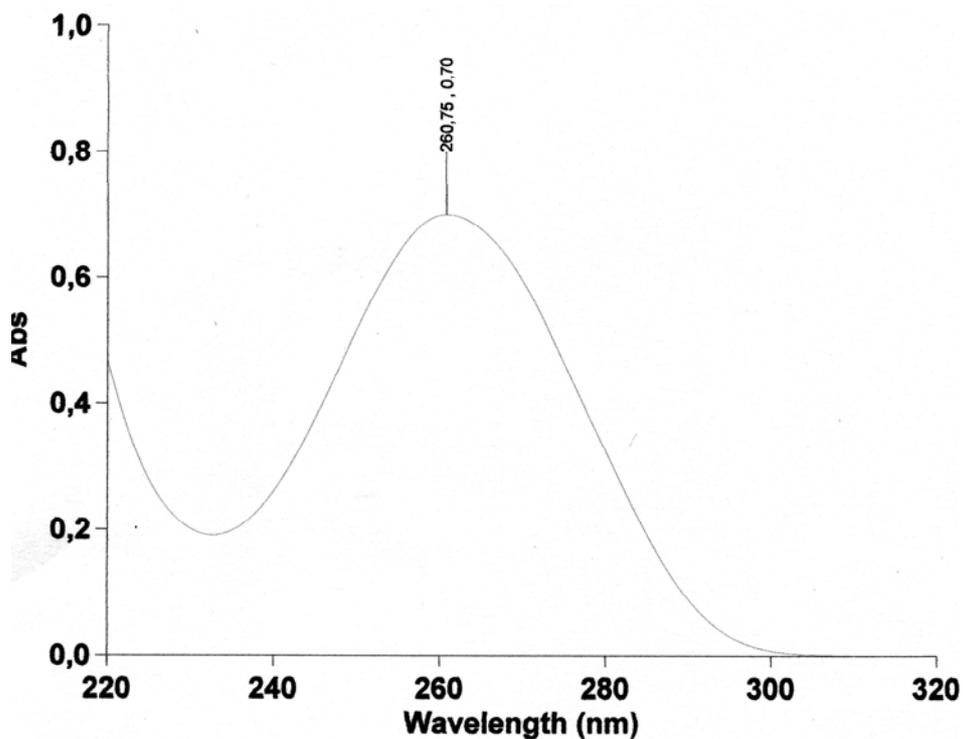


Fig. 3.5. Espectro de absorción de A(AT)₅T. El máximo está situado en 260,75 nm, correspondiendo a una absorbancia de 0,70.



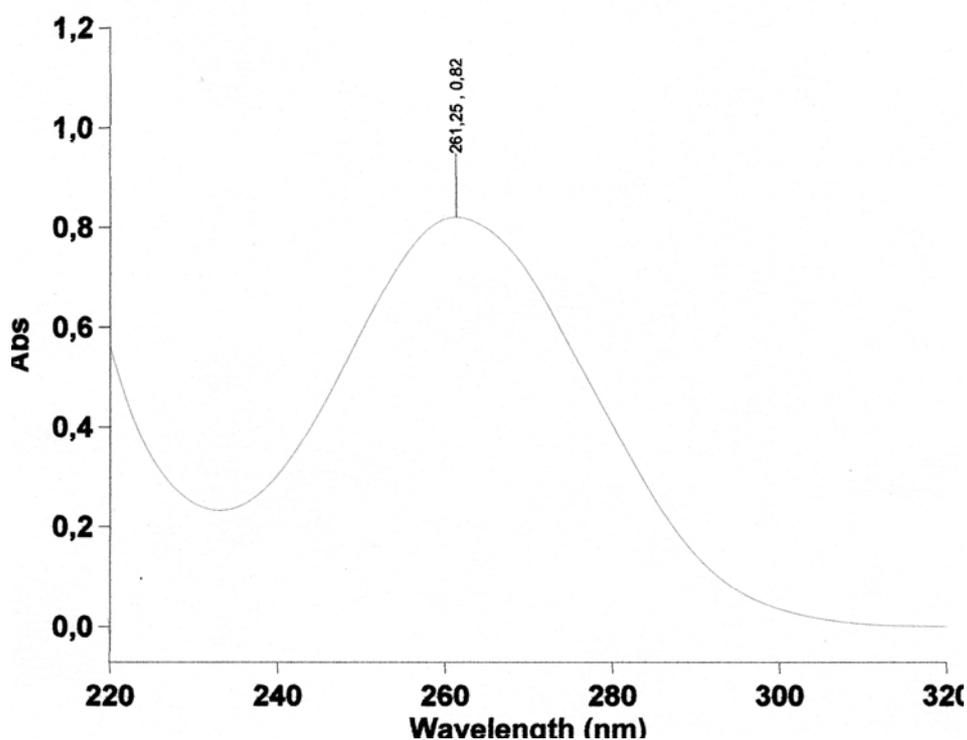


Fig. 3.6. Espectro de absorción de $AAU^{Br}(AT)_3T$. El máximo está situado en 260,25 nm, correspondiendo a una absorbancia de 0,82.

Secuencia	Abs ₂₆₀ (ou)	ϵ_{260} (ou/mmol)	[oligo] (mM)
A(AT) ₃ T	0,424	87,1	2,44
A(AT) ₄ T	1,080	109,2	3,96
A(AT) ₅ T	0,698	131,3	2,66
$AAU^{Br}(AT)_3T$	0,816	109,2	3,75

Tabla 3.2. Resumen del cálculo de las concentraciones por espectrofotometría de UV. La concentración de oligo se corresponde con la del dúplex y no la cadena simple. Se ha supuesto que el bromo-uracilo tiene el mismo coeficiente que la timina.

3.1.3.- Preparación de los cubreobjetos.

Para conseguir que las gotas se mantengan en los cubreobjetos cuando se utiliza el sistema de la gota colgante, se realiza un tratamiento a base de silano. Primero se disponen los cubreobjetos normales en unas gradillas para que haya una separación entre ellos. Después se sumergen en una disolución de silanización y se dejan secar por espacio de una hora. Transcurrido este tiempo, se lavan en agua y en etanol y se dejan secar hasta el día siguiente.



Es importante protegerse adecuadamente durante el proceso, ya que el silano es muy tóxico. Por tanto, la silanización debe llevarse a cabo dentro de una campana extractora y usando guantes y mascarilla como protección.

3.1.4.- Preparación de las gotas.

La presencia de suciedad o polvo en las gotas puede inducir la aparición de cristales junto a partículas extrañas, por lo que luego no serían utilizables al estar contaminados. Por este motivo, la preparación de las disoluciones madre y las gotas debe realizarse de forma rápida y lo más limpiamente posible. El volumen de la gota suele estar entre los 7 y los 10 μ l, siendo el del pozo 100 veces mayor para mantener su presión de vapor constante.

Para preparar una gota, se van añadiendo los distintos componentes en un cubreobjetos tratado y limpio. El orden de la adición es preferiblemente de volúmenes mayores a menores, pero los últimos tres componentes siempre han de ser: oligonucleótido, espermina y precipitante. La razón de esto es que, al ser la espermina un precipitante también, puede que el ADN precipite al añadirse, en cuyo caso ya no se necesita más. Por lo tanto, se suelen añadir los compuestos en el siguiente orden: tampón, sal, agua (para acabar de completar el volumen final), oligonucleótido, espermina y precipitante.

Una vez se tiene hecha la gota, con el pozo ya lleno, se coloca el cubreobjeto boca abajo sobre el pozo, sellando la unión con silicona. Si la gota es sentada, se traslada al puente colocado previamente en el pozo y se sella de igual forma con silicona.

3.1.5.- Condiciones de cristalización.

El objetivo de un estudio de cristalización es obtener un cristal único y de un tamaño suficiente como para que produzca difracción adecuada. Este proceso es complicado, ya que no se sabe *a priori* qué condiciones darán mejores resultados, así que suele comportar un alto número de experimentos. El proceso se divide en dos partes:

- *screening* de un conjunto de condiciones de cristalización (método de matriz dispersa o *sparse matrix*).
- Optimización de las condiciones de la fase anterior que han dado mejores resultados.

El anexo A recoge las condiciones de todas las gotas que se realizaron para cada secuencia, así como el tipo de cristales que se formaron en cada una.



3.1.5.1.- Variables de cristalización.

La obtención de los cristales depende de las condiciones en las que se haya realizado los experimentos. Las variables que se pueden modular para mirar de conseguir muestras mejores y más ordenadas son:

- relación oligonucleótido-espermina.

Los grupos amino de la espermina se unen por puentes de hidrógeno a los fosfatos del ADN, apantallando sus cargas y ayudando a la precipitación del oligonucleótido. Además también disminuye la constante dieléctrica del agua, actuando como precipitante.

Al aumentar la concentración de espermina respecto a la de ADN, se consigue precipitar el ADN de forma más rápida y con menor concentración de precipitante. Por lo general se suelen obtener cristales más pequeños y en mayor número.

- tampón (pH, tipo y concentración).

El cacodilato contiene arsénico, que al ser tóxico evita la proliferación de bacterias o mohos que podrían degradar el ADN. En principio, el tipo de cacodilato, sódico o potásico, no parece tener mucha influencia [Ducruix y Giegé, 1992]. Se suele utilizar pH 6 - 6,5 - 7, ya que el pH 7,5 ya es demasiado básico. Si se aumenta la concentración de tampón, la concentración necesaria para producir la precipitación del ADN es mayor.

- sal (tipo y concentración).

Los cationes de las sales ayudan a estabilizar las cargas negativas de los fosfatos, por lo que influyen mucho en la cristalización. Las más utilizadas son los cloruros y acetatos de cationes divalentes y monovalentes, ya sean solas o combinadas.

- precipitante (tipo y concentración).

La acción del precipitante varía según la secuencia estudiada y el resto de condiciones de la gota. Si la concentración de tampón es alta, suele ser necesario más precipitante, mientras que si la concentración de oligonucleótido es elevada, hará falta menos precipitante para obtener cristales.

- temperatura.

El efecto de la temperatura es muy notable en la cristalización y depende mucho tanto de la longitud como del tipo de la secuencia. A temperaturas más bajas se favorece la aparición de sólido y a temperaturas elevadas pueden llegar a redisolverse cristales ya formados.



Así, podemos deshacer cristales antiguos que no sean válidos elevando la temperatura, y luego volver a disminuirla para que se formen de nuevo. Algunas veces, si el cambio es brusco, puede aparecer separación de fases o precipitado amorfo en la gota.

3.1.6.- Montaje de los cristales.

Una vez obtenidos, los cristales han de conservarse congelados en nitrógeno líquido hasta el momento de realizar la difracción. Para ello, es necesario extraer los cristales de la gota, con la ayuda de un crioloop: un lazo de nylon sujeto a una varilla metálica. Este proceso de “pesca” se conoce como montaje (ver fig. 3.7).



Fig. 3.7. Detalle de un crioloop con un cristal en su interior.

Adaptando el tamaño del lazo al del cristal se consigue que el cristal quede sujeto y no se pierda al sumergirlo en nitrógeno líquido. Además, el hecho de congelar la muestra hace que el daño al irradiarlo sea mucho menor.

Por el contrario, con la humedad pueden aparecer cristales de hielo al lado del cristal de ADN. El hielo produce unos anillos de difracción a resoluciones relativamente altas (sobre los 3 Å) que pueden entorpecer los resultados de la difracción del ADN. Por este motivo, se utilizan crioprotectores que evitan la aparición del hielo. El 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) es un crioprotector además de precipitante, así que si aseguramos una concentración del pozo superior al 20% (v/v) en el momento de montar el cristal podemos esperar que no aparezca hielo en la muestra.

3.2.- Difracción de los cristales.

El siguiente paso del procedimiento experimental es obtener los diagramas de difracción de los cristales conseguidos. Al venir las muestras congeladas para su conservación es



importante asegurar que en ningún momento llegue a descongelarse, porque se estropearía. Por este motivo, los cristales son transportados hasta el difractor con la ayuda de un criotrón, un tipo de pinza que al congelarse con nitrógeno líquido asegura que el cristal no sufra deterioro. Dentro del difractor, una manguera incorporada permite que un chorro continuo de nitrógeno guarde la muestra del ambiente.

El esquema de un difractor puede observarse en la figura 3.8:



Fig. 3.8. Imagen del difractor de la línea BM16 del Sincrotrón de Grenoble (ESRF).

3.2.1.- Metodologías de recolección de datos.

Se conocen varios métodos para recoger los diagramas de difracción de rayos X de un cristal, entre los cuales destacan:

- El método de Laue.

Se irradia con todas las longitudes de onda posibles (radiación continua) un cristal estacionario. De esta forma, las difracciones eran de distancia interplanar y geometría constante, pero de longitud de onda y nivel variable. Se obtenía así una proyección estereográfica de los planos del cristal.

- El método de Weissenberg.

Consiste en un cilindro metálico que contiene en su interior una placa fotográfica sensible a los rayos X. El cristal se coloca en el eje longitudinal del cilindro y se hace girar mientras es irradiado a través de una rendija del cilindro. Al rotar el cristal, conseguimos rotar también el



espacio recíproco, haciendo que diferentes puntos recíprocos (correspondientes a familias de planos) corten la esfera de Ewald [Jong & Bouman, 1938].

Las difracciones quedan marcadas en la película fotográfica formando estratos de puntos perpendiculares a la dirección longitudinal, siempre que el eje de rotación del cristal coincida con el eje del cilindro. Además el movimiento de rotación permite conseguir una redundancia de difracciones, incrementando la precisión de las medidas de las intensidades.

Para evitar que las manchas de las difracciones queden solapadas se mueve el cilindro longitudinalmente durante la recogida. Así se consigue obtener un diagrama de difracción completo aunque distorsionado.

- El método de precesión.

Fue desarrollado por Buerger a principios de 1940 para solventar la distorsión que aparecía utilizando el método anterior. El sistema es similar sólo que el movimiento del cristal no es de rotación sino de precesión sobre su eje. Un movimiento de precesión es el que observamos en nuestro planeta: por efecto de la gravedad, el eje terrestre tiene un movimiento muy lento de oscilación de su eje, describiendo un doble cono con centro en el centro de la Tierra. El método de precesión extrae su nombre de este movimiento que, además de afectar al cristal, también afecta a la película fotográfica (esta vez plana) al girar solidariamente con el cristal.

Los diagramas obtenidos son completos, porque no presentan solapamientos de las manchas y no están distorsionados. En cambio, el ángulo explorado es pequeño y el cristal tiene que estar orientado de forma que un eje directo coincida con la dirección de la radiación incidente.

- El método de oscilación.

Este método ha sustituido a todos los anteriores al acortar los tiempos de recogida de forma espectacular. En lugar de recoger todo el ángulo posible, hace imágenes de pequeñas oscilaciones del cristal, obteniendo varios niveles recíprocos en cada posición.

3.2.2.- Variables del método de oscilación.

Los parámetros que debemos tener en cuenta durante la recogida de datos son principalmente cinco:

- El ángulo de oscilación, o ángulo que gira el goniómetro durante la captura de cada imagen. Este ángulo debe ser pequeño.



- El ángulo total girado por el goniómetro durante la recogida. Interesa que sea de 360° , aunque normalmente se utiliza 180° ó 270° por cuestiones de tiempo.
- La distancia focal, o distancia al detector.
- El tiempo de exposición para cada imagen.
- La longitud de onda, en caso de que se pueda regular.

3.2.2.1.- Ángulo de oscilación.

El ángulo de oscilación del goniómetro y el ángulo total girado dependen de las características del cristal (dimensiones de la celdilla, mosaicidad,...) y de la completitud (*completeness*) que queramos tener, es decir, el tanto por ciento de reflexiones que observamos respecto del total que deberíamos observar. Se consiguen dos tipos de reflexiones: las *totales*, que quedan dentro de la oscilación, y las *parciales*, que quedan a medias entre dos oscilaciones sucesivas.

3.2.2.2.- Distancia focal.

Con la distancia focal controlamos la resolución que conseguimos, es decir, la distancia mínima que podemos detectar. Atendiendo a la resolución podemos hablar de dos tipos de experimentos:

- Experimentos a baja resolución: las difracciones de baja resolución, correspondientes a distancias grandes, aparecen cerca del centro de la imagen, ya que el espacio recíproco es en cierto modo inverso al real.
- Experimentos a alta resolución: se centran en las difracciones correspondientes a distancias pequeñas (intermoleculares e interatómicas), que aparecen en los extremos de la imagen.

La distancia más pequeña que produce difracción (resolución máxima) depende del cristal que se use, de forma que cuanto mejor sea un cristal más resolución se podrá conseguir.

3.2.2.3.- Tiempo de exposición.

El tiempo de exposición se regula en función de varios factores. En primer lugar, la velocidad máxima de giro del goniómetro y el ángulo de oscilación, que tienen que ser consecuentes con el tiempo de exposición. Por último, la distancia al detector, ya que las manchas de baja resolución son muy fuertes y se saturan muy pronto. Para evitar que las manchas de alta resolución queden muy débiles, se pueden hacer dos recogidas, una con el detector cerca y más tiempo para captar las de alta resolución y otra con el detector lejos y poca exposición, para captar bien las de baja resolución. Posteriormente pueden juntarse ambas recogidas para usar todos los datos a la vez.



3.3.- Análisis de los datos.

El análisis de los diagramas de difracción se divide en las siguientes fases:

- Indexado, procesado y escalado.
- Resolución de la estructura.
- Afinado y obtención de mapas de densidad.
- Validación.

3.3.1.- *Indexado, procesado y escalado de los datos.*

Esta operación puede realizarse de dos formas, manual o informáticamente. Antiguamente, todo el trabajo se hacía de forma manual, pero la posibilidad de realizar un gran número de cálculos matemáticos complejos en poco tiempo ha causado que se lleve a cabo todo el trabajo en equipos informáticos.

3.3.1.1.- Procesado manual.

Este tipo de análisis sirve para encontrar el tipo de cristal, la red de Bravais a la que pertenece, las dimensiones de la celdilla y su simetría, pero no es suficiente como para determinar la estructura de la molécula. Los pasos a seguir son los siguientes:

1) Dibujar los ejes de la red recíproca.

Sobre una imagen de difracción se escogen los tres espacios máximos con los cuales, trazando paralelas a los ejes separadas por esos espacios se incluyen todas las reflexiones. Estos ejes serán los vectores directores de la red recíproca.

2) Indexar las reflexiones.

Se procede a asignar a cada reflexión sus coordenadas hkl como números enteros, siguiendo los ejes hallados anteriormente. Cada punto (spot) representará a la familia de planos que tiene índices de Miller iguales a las coordenadas recíprocas.

3) Hallar el tipo de cristal.

Según los ángulos que forman los ejes entre sí podremos determinar el tipo de cristal, según:

- todos distintos de 90°: triclinico
- dos ángulos de 90°, el otro distinto: monoclinico



- dos ángulos de 90° el otro 120°: trigonal o hexagonal
- todos los ángulos de 90°: ortogonal. Si los espacios entre reflexiones perpendiculares son iguales, el cristal pertenece al sistema tetragonal o al cúbico. Si por el contrario son diferentes, el cristal es ortorrómbico.

Para saber si la red es primitiva (P), centrada en caras (F, C) o cuerpo (I), hay que fijarse en la forma del diagrama. Si éste recuerda a un tablero de ajedrez, esto es, si más de la mitad de las reflexiones no aparecen, es posible que sea centrada. Si no, es primitiva. Para determinar con mayor exactitud el tipo de red hay que fijarse en las ausencias sistemáticas que produce cada sistema, enunciadas en las *International Tables for X-Ray Crystallography*.

4) Hallar la celdilla.

Se utilizará para ello la fórmula de Buerger (1944) gracias a la cual encontramos los valores de la celdilla a partir de las distancias entre reflexiones en cada dirección de los ejes recíprocos:

$$d_{\text{real}} = \frac{\lambda \cdot F}{d_{\text{recipr}}} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

donde:

- d_{real} , es la distancia equivalente en la red real, es decir, el parámetro de la celdilla que queremos calcular (en Å).
- d_{recipr} es la distancia en la red recíproca, medida directamente del diagrama de difracción (en mm).
- F es la distancia focal, o distancia del detector (en mm).
- λ es la longitud de onda (en Å).

Los ángulos de la celdilla directa se calculan directamente como los suplementarios de los de la celdilla recíproca:

$$\beta = 180 - \beta^* \quad (\text{Ec. 3.4})$$

5) Hallar la simetría.

Hay que tener en cuenta toda una serie de factores:

- La ley de Friedel: según ella, los espacios recíprocos tienen un centro de simetría que sumada a la simetría de la celdilla original genera un grupo espacial para la celdilla recíproca de mayor simetría de la que debería.



- Las simetrías con componentes traslacionales aparecen como rotacionales puras. Para determinar si hay traslación debe hacerse con la observación de las ausencias sistemáticas.
- Se necesita por lo menos la información de dos planos bidimensionales a la vez.
- No se puede escoger, usando los diagramas de difracción, entre grupos enantiomórficos (P6₁ y P6₅, por ejemplo).
- A veces la simetría de la propia molécula produce el empaquetamiento.

Una vez determinada la simetría de la celdilla recíproca, restándole la simetría debida a la ley de Friedel, tendremos el grupo espacial del cristal. A través de él y usando las *International Tables for X-Ray Crystallography*, podremos determinar la unidad asimétrica y el número de moléculas que hay en la celdilla original.

3.3.1.2.- Procesado informatizado.

Este tipo de procesado permite la integración de todo un sistema informático para llegar hasta la determinación final del mapa de densidad electrónica, encontrando el modelo que se ajusta perfectamente a él. Además de ser más rápido, calcula toda una serie de parámetros estadísticos que dan a conocer la calidad de los datos usados. Consta de diversos pasos: indexado, integración, procesado, escalado y reducción de datos.

En el indexado, se asigna un hkl a cada reflexión que aparece en la imagen, se determina la red de Bravais y el grupo de Laue del espacio recíproco, a través de un análisis de las ausencias sistemáticas. También se calcula la celdilla unitaria y la matriz de orientación del cristal. Por último, se afinan los parámetros de orientación de cristal.

El siguiente paso es la integración, donde para calcular mejor la posición del máximo de intensidad se asigna un perfil Gaussiano a las manchas, el radio del cual se evalúa a partir de datos experimentales. Para ello es necesario aplicar un ajuste del perfil o “*profile fitting*”, que se realiza en dos pasos:

- 1) Predicción del perfil, basándose en el perfil de otras reflexiones encontradas dentro de un radio determinado por el usuario,
- 2) Combinación de la información obtenida de 1) y de la actual.

Así, se procede a calcular un perfil observado (M_i) como la suma de los picos de Bragg y el sonido de fondo, y un perfil estimado (P_i), usando la fórmula:

$$P_i = B_i + \text{cte}(p_i) \quad (\text{Ec. 3.5})$$

donde;



- B_i es el sonido de fondo estimado,
- p_i es el valor estimado para el perfil

Posteriormente se minimiza por mínimos cuadrados la siguiente suma:

$$\sum_i \frac{(M_i - p_i)}{V_i} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde V_i es la varianza del perfil observado M_i . Posteriormente, durante el procesado, se utilizan estos perfiles para extraer la información de todas las imágenes, preferiblemente de forma continuada. En el escalado y en la reducción de datos se analizan las intensidades de las reflexiones equivalentes, que nunca son iguales por motivos experimentales (fluctuaciones del rayo, imperfecciones, etc.). Para conseguir datos más fiables, se aplica la misma escala a cada reflexión y se halla la media de las intensidades. Así, se crean los ficheros que contienen las reflexiones únicas y se realizan estadísticas que muestran la valía de los datos.

En concreto, se afinan los valores de:

- Celdilla y matriz de orientación, dando un número casi igual a todas las imágenes.
- Intensidades corregidas con sonido de fondo.
- Completitud de los datos.
- Redundancia de datos.

Y se calcula el valor de los parámetros estadísticos:

- Media de las intensidades, $\bar{l}(hkl)$
- Desviación de las intensidades, $\sigma(l)$
- R_{merge} , expresado como:

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i (\bar{l}(hkl) - l(hkl)_i)}{\sum_{hkl} \sum_i (l(hkl)_i)} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

- χ^2 , expresado como:

$$\chi^2 = \sum k \cdot \frac{(l - \bar{l})^2}{N \cdot \varepsilon^2} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

La calidad de nuestros datos vendrá dada por diversos factores, a saber:



- resolución máxima. Se considera que la resolución máxima válida es aquella para la cual el cociente de la intensidad entre la desviación de la intensidad es mayor que dos. Si el cociente es menor, el error es demasiado importante como para tener en cuenta esas reflexiones.
- R_{merge} global. Debe de ser inferior al 15% para que los datos sean suficientemente precisos. Por debajo de 10% los datos son excelentes.
- χ^2 . Permite encontrar el error observado, que se halla regulando el error estimado (ϵ) hasta que el valor de χ^2 sea igual a 1.
- Completitud o tanto por ciento de reflexiones únicas que se tienen.
- Redundancia o cantidad de veces que se repiten las reflexiones.

Por último, se convierten las intensidades a factores de estructura, según la fórmula:

$$I = |F(hkl)|^2 \quad (\text{Ec. 3.9})$$

En realidad la ecuación 3.9 no llega a ser cierta debido al factor de escala que se ha aplicado durante el escalado.

3.3.2.- Resolución de la estructura.

El objetivo final es conseguir un mapa de densidad electrónica que se ajuste suficientemente bien a un modelo. Así, teniendo en cuenta la ecuación 2.2 descrita en la página 10:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} [|\bar{F}_{hkl}| \cdot \cos(2\pi \cdot (\bar{x} \cdot \bar{h}) + \varphi_{hkl})] \quad (\text{Ec. 2.2})$$

y habiendo calculado los factores de estructura a partir de los diagramas de difracción, la única incógnita que queda es la fase relativa, que desgraciadamente no puede calcularse directamente. En este proyecto se llevó a cabo la resolución de la estructura mediante el reemplazo molecular, que intenta orientar un modelo preestablecido conforme los datos, usando unas funciones de rotación y traslación descritas en el anexo B.3.4.5.2, en la página 47.

Tras la orientación del modelo, se procede al cálculo de unos parámetros que muestran la adecuación del modelo a los datos:

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F(\text{obs})| - k \cdot |F(\text{calc})||}{\sum_{hkl} |F(\text{obs})|} \quad (\text{Ec. 3.10})$$



$$C = \frac{\sum_{hkl} \left[\left(|F(\text{obs})|^2 - \overline{|F(\text{obs})|^2} \right) \cdot \left(|F(\text{calc})|^2 - \overline{|F(\text{calc})|^2} \right) \right]}{\left[\sum_{hkl} \left(|F(\text{obs})|^2 - \overline{|F(\text{obs})|^2} \right)^2 \cdot \sum_{hkl} \left(|F(\text{calc})|^2 - \overline{|F(\text{calc})|^2} \right)^2 \right]^{1/2}} \quad (\text{Ec. 3.11})$$

donde:

- F(obs) es el factor de estructura observado en las difracciones.
- F(calc) es el factor de estructura calculado a partir del modelo.

R es un factor que expresa el error entre modelo y difracción. Durante cada ciclo de superposición de modelo y datos es interesante que este factor vaya descendiendo, para mostrar que se va por el buen camino. Nunca se consigue un factor $R = 0$, y para macromoléculas se acepta como bueno un error de entre el 15 y el 25% al final del afinado. El factor C es un coeficiente de correlación que muestra la adecuación entre modelo y datos observados, por lo que nos interesa que sea cuanto más alto mejor.

3.3.3.- Afinado.

Una vez tenemos un modelo que se aproxima bastante a la difracción recogida podemos pasar al afinado. En este paso, se ajustan mejor las posiciones de los átomos de la estructura, ya que durante la resolución se trataba el modelo como un bloque. Además, también se pueden añadir partes que faltasen en el modelo: contraiones, precipitantes, etc.

La comparación entre modelo afinado y datos experimentales se sigue llevando a cabo con los factores de estructura y también se calculan los mismos parámetros R y C para comprobar la mejora de la solución. Las variables que se afinan son cuatro: la posición del átomo (x, y, z) y el factor de temperatura B. La información estereoquímica contenida en el modelo puede aplicarse de dos formas posibles:

- Rígidamente, variando solamente los ángulos diédricos. Este afinado se llama *constrained refinement*.
- Dejando variar los parámetros alrededor de un valor estándar, controlados por un término energético. Este afinado se denomina *restrained refinement* y aunque permite variar las coordenadas de los átomos, restringe el cambio de los ángulos y distancias de enlace, de los ángulos de torsión y de las distancias de Van der Waals.

También se ha de tener en cuenta la presencia de disolvente en el cristal, que dado que se encuentra en forma desordenada aparecería como una región plana en el mapa de densidades. La imposición de este hecho en los mapas se conoce como aplanamiento del disolvente o *solvent flattening*. Por otro lado, las moléculas de hidrógeno, al tener un solo



electrón, carecen prácticamente de influencia en la difracción. Además no se suele tener suficiente resolución como para apreciar estos átomos.

El afinado de la solución se puede llevar a cabo de distintas formas:

- Por mínimos cuadrados.

La función a minimizar es la siguiente:

$$Q = \sum_{hkl} w(hkl) \cdot [|F_{\text{obs}}(hkl)| - |F_{\text{calc}}(hkl)|]^2 \quad (\text{Ec. 3.12})$$

donde $w(hkl)$ es el peso de cada reflexión, calculado como el inverso del error de la reflexión.

La minimización se lleva a cabo igualando a cero los diferenciales de Q respecto a cada parámetro a refinar (posición x, y, z y factor de temperatura B).

- Por máxima probabilidad (maximum likelihood refinement).

Se basa en el concepto de que el mejor modelo es el que es más consistente con las observaciones. La consistencia se mide estadísticamente, mediante la probabilidad con que se darían las observaciones dado el modelo. Así, la probabilidad de que una serie de observaciones se dé, si todas las observaciones son independientes, es el productorio de las probabilidades de cada observación. Considerando las difracciones observadas y calculadas, la fórmula quedaría del siguiente modo:

$$L = \prod_{hkl} \text{Pr ob}(|F_{\text{obs}}(hkl)|, |F_{\text{calc}}(hkl)|) \quad (\text{Ec. 3.13})$$

Dado que es más sencillo trabajar con sumas que con productos, al final se utiliza el logaritmo de L , resultando una fórmula análoga a la de mínimos cuadrados.

- Por dominios rígidos (*rigid body refinement*)

Se designan unos dominios rígidos que se afinan como bloques. Es especialmente útil cuando las resoluciones son bajas.



- Por *simulated annealing* [Brünger et al., 1987].

Se trabaja simulando una elevación de la temperatura del modelo, para conseguir que las moléculas vibren mucho y luego enfriando lentamente hasta un mínimo energético. De esta forma, si el modelo estaba demasiado lejos de su posición correcta, el resto de operaciones de minimización matemática no llegarían a converger, pero dando más libertad de movimiento se puede conseguir la convergencia.

Para asegurarnos de que la estructura mejora realmente con cada ciclo de afinado y que el descenso del factor R no se debe a motivos matemáticos, se descartan un porcentaje bajo de reflexiones (del 5% normalmente) que no se afinan. En cada ciclo se calcula el factor R que corresponde a estas reflexiones (R_{free}) y se compara con el factor R normal. Ambos deben disminuir de forma similar y acabar con un valor cercano [Brünger, 1992].

3.3.4.- Cálculo de los mapas de densidad.

Una vez se ha obtenido un modelo suficientemente aproximado, con estadísticas aceptables, se puede proceder a calcular el mapa de densidad del cristal. Usando la ecuación 3.17 descrita anteriormente se calculan dos tipos de mapas:

- mapa de densidad (2FoFc). Se calcula utilizando que:

$$|F(hkl)| = 2 \cdot |F(obs)| - |F(calc)| \quad (Ec. 3.14)$$

Obteniéndose un mapa que debe superponerse a la estructura del modelo.

- mapa de diferencias (FoFc). Se calcula utilizando que:

$$|F(hkl)| = |F(obs)| - |F(calc)| \quad (Ec. 3.15)$$

Si el modelo fuera correcto, entonces los factores de estructura observados y calculados serían idénticos y este mapa tendría valor nulo.

En caso de que el mapa de diferencias tenga valor positivo, faltarán electrones, por lo que en esa zona se señalará la falta de átomos. Si por el contrario tiene valor negativo, sobrarán electrones, destacando que en esa zona no debería haber átomos o tendrían que ser de menor tamaño. De la unión de la información de los dos mapas pueden localizarse errores en la posición de los átomos, ausencia de contraiones, precipitante, etc.



3.3.5.- Validación de la estructura.

El último paso en la resolución de un cristal es validar el modelo obtenido. Tras el afinado, debe comprobarse que los mapas de densidad se ajustan suficientemente bien al modelo y que no haya zonas donde el mapa de diferencias sea distinto de cero. Por otro lado, también existen criterios químicos que deben cumplirse, como por ejemplo las distancias de enlace consecuentes, ángulos de torsión adecuados, etc.

3.4.- Listado de programas.

A continuación se muestra en la tabla 3.3 el listado de programas informáticos utilizados para cada parte del procesado:

Etapas del proceso	Programa	Referencia
Recogida de datos	Strategy	Ravelli <i>et al.</i> , 1997.
Visualización diagramas	Xdisp	Otwinoski y Minor, 1997.
Procesado	Denzo	Otwinoski y Minor, 1997.
Escalado	Scalepack	Otwinoski y Minor, 1997.
Reemplazo molecular	MolRep	Vagin y Teplyakov, 1997.
Afinado	Refmac5	Murshudov <i>et al.</i> , 1997.
Visualización mapas	Turbo-Frodo	Roussel <i>et al.</i> , 1998.
Realización estructuras y figuras	Cerius ²	Molecular Simulations, Inc.
Paquetes integrados	CCP4suite	Collaborative Computational Project, number 4, 1994.

Tabla 3.3. Listado de programas utilizados.





4.- RESULTADOS.

En este capítulo se exponen los resultados que se derivan del trabajo experimental. Las referencias a las gotas se hacen por el siguiente código: un número identificativo de la placa *linbro*, una letra correspondiente a la fila y un número correspondiente a la columna. Cada placa *linbro* tiene cuatro filas (A, B, C y D) y seis columnas (1, 2, 3, 4, 5 y 6). Si la gota proviene de una cápsula, se identifica simplemente por el número de cápsula. En el anexo A pueden consultarse las condiciones de todas las gotas realizadas.

4.1.- Estudios de cristalización.

Se han realizado pruebas con todas las sales citadas en el tema 4, utilizando diversas concentraciones de tampón, ADN, espermina y sal. También se han probado distintas temperaturas de trabajo y precipitantes, con el propósito de obtener cristales de la mejor calidad posible. A continuación se citan los resultados de los estudios por secuencias.

4.1.1.- Secuencia A(AT)₃T.

El comportamiento general que presenta esta secuencia se recoge para las distintas variables de cristalización: precipitante, sal, tampón, espermina, temperatura y tiempo. Después se especifican las condiciones de las gotas que dieron cristales y la calidad de los mismos.

4.1.1.1.- Comportamiento según precipitante usado.

El cambio de precipitante resulta muy evidente. Utilizando MPD se consiguen todo tipo de cristales: varitas, agujas, láminas, etc. dependiendo de la sal utilizada, relación entre oligonucleótido y espermina o la temperatura. En cambio, utilizando PEG se han obtenido siempre una especie de mosaicos formados por una finísima lámina que ocupa toda la gota, además de otros tipos de precipitados en el centro de la gota. Por ejemplo, en la figura 4.1 puede verse la diferencia entre ambos precipitantes:



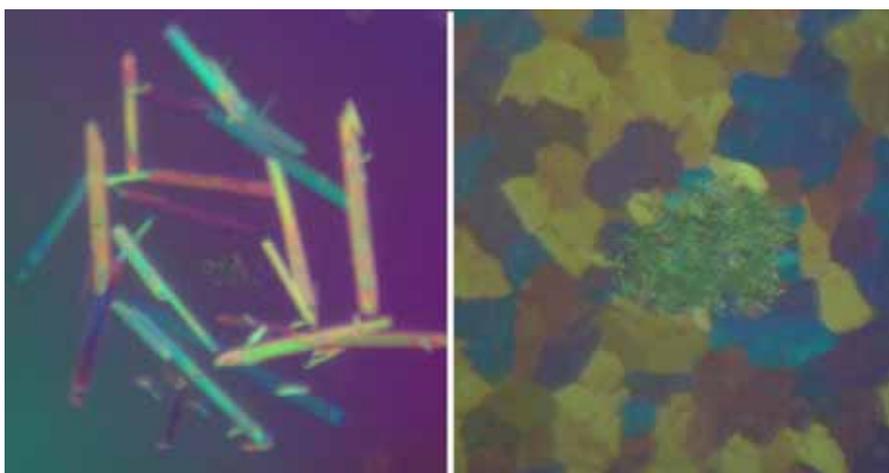


Fig. 4.1. Efecto del precipitante. A la izquierda, varitas grandes ya degradadas, como se puede observar por la luz polarizada. La gota es de la placa 2-A5 y tenía 200 mM de $BaCl_2$ y el pozo una concentración del 35% v/v de MPD. A la derecha, especie de mosaico con algo de precipitado en el centro. La gota es de la placa 5-A4 y lleva acetato de zinc 25 mM y una concentración del 25% v/v de PEG en el pozo.

4.1.1.2.- Comportamiento general ante las sales.

Esta secuencia parece ser muy afín a las sales pues sin ellas no se han logrado varitas. Se ha probado un abanico de concentraciones altas (entre 300 y 100 mM), medias (entre 60 y 20 mM) y bajas (entre 10 y 0,5 mM). En concreto, y según cada sal, los resultados han sido:

- LiCl: malos resultados. A concentraciones bajas no parece tener mucho efecto. A concentraciones altas obliga a subir mucho el precipitante haciendo que se produzca una separación de fases o que precipite el tampón.
- KCl: no se han hecho pruebas.
- $MgCl_2$: se consiguen agujas y varitas planas a concentraciones medias (20-50 mM) o bajas (0,5-10 mM) pero sin gran valor.
- $(CH_3COO)_2Mg$: a concentraciones bajas da varitas planas y láminas pero que se degradan rápidamente.
- $CaCl_2$: a concentraciones elevadas o medias, requiere mucho precipitante en el pozo y da lugar a separación de fases en la gota.
- $BaCl_2$: los mejores resultados. A concentraciones altas aparecieron láminas grandes y regulares, que luego resultaron ser sal. También hay varitas, utilizando más espermina. A concentraciones medias y bajas se obtienen agujas y varitas de buen tamaño.
- $MnCl_2$: no se han obtenido cristales en gotas que tuvieran esta sal.
- $(CH_3COO)_2Zn$: sólo se han conseguido láminas con forma de mosaico, pero probablemente debido al precipitante PEG (ver fig. 4.1).



- Sin sal: sólo se han dado láminas o varitas planas, sin mucho valor.

4.1.1.3.- Comportamiento ante el tampón.

No se han apreciado cambios notables entre el uso del cacodilato de sodio o potasio, aunque la mayoría de los cristales válidos se han conseguido con potasio. Pero esto es debido seguramente a que la mayoría de las pruebas se han realizado con ese tampón.

En lo referente al pH, los cristales buenos aparecen en gotas a pH más ácidos (pH 6 principalmente y alguna a pH 6,5). Y sobre la concentración, parece ser mejor usar concentraciones bajas (20 mM), aunque a 30 mM se obtienen algunos cristales. A concentraciones más elevadas la necesidad de precipitante es mayor y suele conllevar que las gotas precipiten o tengan separaciones de fase.

4.1.1.4.- Relación oligonucleótido/espermina.

La relación más favorable es 1:3 y es la que mejores resultados ha dado. Con relaciones 1:1 y 1:2 aparece precipitado o varitas muy pequeñas y con relaciones 1:4 se necesita añadir sales concentradas, lo cual no favorece mucho. También se han hecho algunas gotas sin espermina, que han dado lugar a cristales que se degradan muy rápidamente, con lo cual se demuestra el efecto beneficioso de la espermina.

4.1.1.5.- Temperatura de trabajo.

Se ha experimentado con un amplio abanico de temperaturas, siendo los resultados los siguientes:

- 4°C, la cristalización es demasiado rápida y da lugar a un gran número de cristales pero de pequeño tamaño, por lo tanto, inservibles.
- 8°C, por algún motivo que se desconoce, las gotas crecían mucho de volumen en poco tiempo (en lugar de secarse, absorbían agua).
- 13°C, a esta temperatura el crecimiento es óptimo.
- 16°C, no se ha conseguido cristalizar.

4.1.1.6.- Evolución con el tiempo.

Todas las secuencias de este proyecto muestran un comportamiento ante el paso del tiempo muy similar. Al principio no aparecen cristales válidos, porque no hay nada, son de muy pequeño tamaño o porque son laminares y frágiles. No obstante, al cabo de unos meses, han aparecido cristales mejores, con volumen y resistentes.



4.1.1.7.- Resumen de cristales conseguidos.

De un total de 63 gotas, se congelaron nueve cristales considerados válidos. De esos nueve, se probaron ocho en el Sincrotrón de Grenoble, de los cuales seis fueron sal, uno no difractó bien y el restante difractó aunque con poca resolución. Cuando un cristal difractado es de una sal y no de ADN en el diagrama de difracción se aprecian muy pocos puntos, extremadamente intensos y muy separados. Los cristales inorgánicos tienen una separación entre átomos muy pequeña y eso se traduce en una celdilla recíproca muy grande.

En las tablas 4.1 y 4.2 se recogen las condiciones de las gotas que dieron lugar a cristales de sal inorgánicos. Asimismo, puede verse una fotografía de ambas gotas en la figura 4.2.

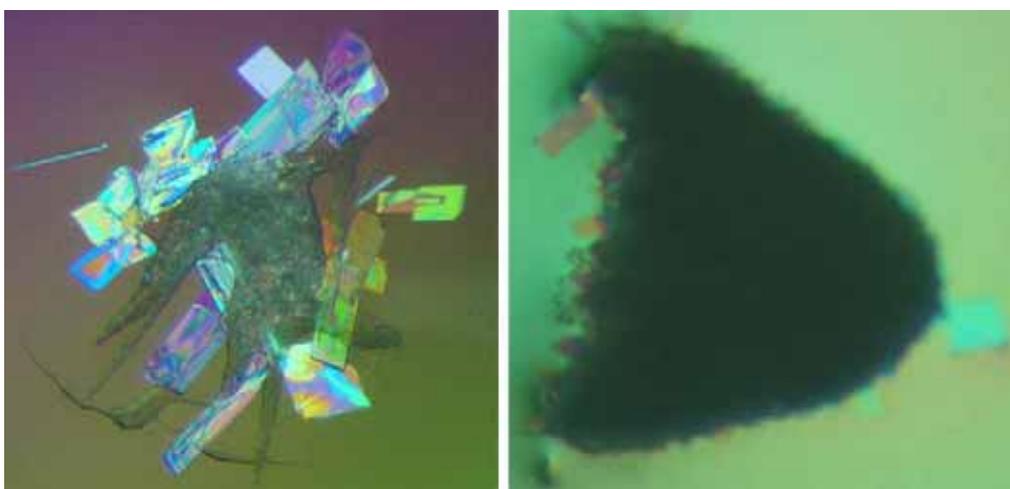


Fig. 4.2. A la izquierda, la gota C5 (cápsula 5), de la que se congelaron 3 láminas (las más brillantes) y la varita de la izquierda. En el centro se observa precipitado cristalino. A la derecha, la gota P2A1 (placa 2 gota A1), de la que se congelaron las dos láminas mayores. En el centro se observa precipitado amorfo.

C5	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₃ T 1,0 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato potásico (pH 6) 20 mM
<i>Sal</i>	MgCl ₂ 1 mM
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	---
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	25 - 28% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.1. Condiciones de la gota C5.



P2A1	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₃ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato potásico (pH 6) 20 mM
<i>Sal</i>	BaCl ₂ 120 mM
<i>Espermina</i>	0,6 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	45 - 65% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.2. Condiciones de la gota P2A1.

Los otros dos cristales, uno que no difractó bien y otro que sí, provienen de la misma gota, la P4A2, cuyas condiciones se muestran en la tabla 4.3. Se trata de dos varitas de tamaño medio (200 μm), muy regulares. No se dispone de ninguna imagen de estos cristales, por desgracia. El más pequeño, de unas 150 μm , no difractó bien, mostrando un gran desorden. Esto se deduce porque las manchas no eran redondas y regulares sino que parecían más bien líneas. El otro, de 200 μm aproximadamente, sí difractó aunque con poca resolución.

P4A2	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₃ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato potásico (pH 6) 20 mM
<i>Sal</i>	BaCl ₂ 10 mM
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	25 - 33% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.3. Condiciones de la gota P4A2.

El cristal que aún no ha sido probado es una aguja muy larga y fina, de aproximadamente 500 μm de largo, de la que tampoco se tiene fotografía. Se mantiene congelado hasta que se pueda llevar a difractar. Las condiciones de la gota de la que proviene se muestran en la tabla 4.4.



P4B5	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₃ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato potásico (pH 6,5) 20 mM
<i>Sal</i>	BaCl ₂ 50 mM
<i>Espermina</i>	2,0 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	25 - 46% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.4. Condiciones de la gota P4B5.

4.1.2.- Secuencia A(AT)₄T.

El comportamiento de la cristalización de esta secuencia se acerca bastante al de la secuencia anterior. No obstante, hay algunas diferencias, sobre todo en lo que respecta a sales, que debemos tener en consideración.

4.1.2.1.- Comportamiento según precipitante usado.

Al igual que con el A(AT)₃T, aparecen muchos tipos de formas cristalinas con MPD, ya sean varitas, láminas o agujas y por lo general bien definidas y regulares. En cambio, con PEG sólo aparece la aglomeración de láminas con forma de mosaico que ya vimos para la anterior secuencia. Queda patente en la figura 4.3 donde se compara una gota con MPD (izquierda) y otra con PEG (derecha).

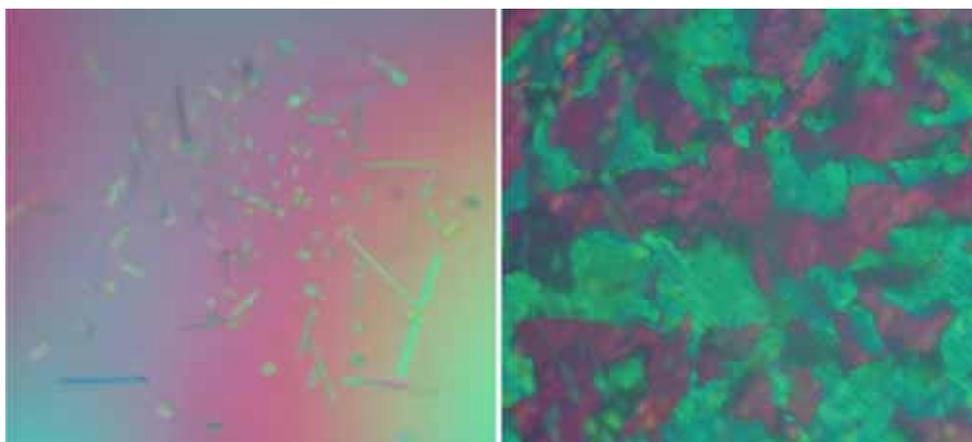


Fig. 4.3. Efecto del precipitante. A la izquierda, la gota P3C3, con 25% v/v de MPD en el pozo y sin sal. A la derecha, la gota P5B5, con 10 mM de acetato de magnesio y 25% v/v de PEG en el pozo. Con MPD se obtienen diferentes tipologías de cristales mientras que con PEG sólo se consiguen agregados laminares irregulares, con parecido a mosaicos.



4.1.2.2.- Comportamiento general ante las sales.

Aparentemente, la presencia de sales en la gota no ayuda a la cristalización de esta secuencia, ya que los mejores cristales se han obtenido sólo utilizando tampón. Se ha probado un abanico de concentraciones altas (entre 300 y 100 mM), medias (entre 60 y 20 mM) y bajas (entre 10 y 0,5 mM). En concreto, y según cada sal, los resultados han sido:

- LiCl: malos resultados. No se han conseguido cristales en la mayoría de casos a concentraciones altas. Aumentando la espermina se produce precipitación en la gota, porque se requiere mucho precipitante en el pozo.
- KCl: aparecen varitas con concentraciones medias - bajas (20 y 10 mM), pero que no han difractado lo suficiente como para procesar los datos.
- MgCl₂: las gotas dan varitas sin valor y agregados cristalinos a concentraciones bajas. Los cristales suelen aparecer muy degradados, por lo que son inservibles.
- (CH₃COO)₂Mg: sólo se han hecho pruebas con el precipitante PEG, logrando mosaicos de láminas, como el de la figura 4.3 derecha.
- BaCl₂: parece ser la sal que da mejores resultados. Se ha probado a concentraciones bajas, consiguiendo a 2,5 mM varitas buenas y a 5 mM agujas.
- CaCl₂: con 10 mM y PEG aparecen agregados laminares pero debido al precipitante, ya que utilizando MPD no se consigue ningún tipo de precipitado.
- MnCl₂: no se han hecho pruebas con esta sal.
- (CH₃COO)₂Zn: sólo se han conseguido láminas con forma de mosaico, pero probablemente debido al precipitante PEG.
- Sin sal: en estas gotas, donde el único contraión era la espermina y el propio tampón, han aparecido los mejores cristales.

4.1.2.3.- Comportamiento ante el tampón.

No se han apreciado cambios notables entre el uso del cacodilato de sodio o potasio, aunque las mejores condiciones conseguidas han sido con tampón de sodio. Sin embargo, repitiendo estas condiciones variando únicamente el tipo de tampón (potásico), han dado lugar al mismo tipo de cristales.

En lo referente al pH, los cristales buenos aparecen en gotas a pH neutros-básicos (pH 6,5 mayoritariamente y algunos a pH 7). Y sobre la concentración, parece ser mejor usar concentraciones de 30 mM. Concentraciones más elevadas dan lugar a cristales de peor calidad y precipitados, ya que requieren más precipitante en el pozo.



4.1.2.4.- Relación oligonucleótido/espermina.

De nuevo, la relación más favorable es 1:3, con la que se han conseguido la mayoría de cristales. Con relación 1:2 se tienen cristales bonitos, que después no han difractado bien y con relaciones 1:4 y 1:5 aparece sólo precipitados o cristales de muy mala calidad. Además, con relaciones tan altas de espermina, se requiere muy poco precipitante en el pozo, por lo que después puede haber problemas con anillos de hielo en los diagramas de difracción.

4.1.2.5.- Temperatura de trabajo.

Se ha experimentado con un amplio abanico de temperaturas, siendo los resultados los siguientes:

- 4°C, la cristalización es demasiado rápida y da lugar a un gran número de cristales pero de pequeño tamaño, por lo tanto, inservibles.
- 8°C, por algún motivo que se desconoce, las gotas crecían mucho de volumen en poco tiempo (en lugar de secarse, absorbían agua).
- 13°C, a esta temperatura el crecimiento es óptimo.
- 16°C, no se ha conseguido cristalizar.

4.1.2.6.- Evolución con el tiempo.

Para esta secuencia se repite el patrón de comportamiento frente al paso del tiempo. Al principio no aparecen cristales válidos, porque no hay nada, son de muy pequeño tamaño o porque son laminares y frágiles. No obstante, al cabo de unos meses, y a veces redisolviendo cristales degradados o no muy adecuados, han aparecido cristales mejores, con volumen y resistentes.

4.1.2.7.- Resumen de cristales conseguidos.

En total se realizaron 49 gotas, de las cuales se congelaron 27 cristales. Uno de los primeros en difractarse resultó ser bueno, con una resolución relativamente alta que podría permitir resolver la estructura. Por tal motivo, pese a que subsiguientes cristales difractaron bien, sólo se hicieron recogidas de aquéllos que pudiesen tener igual o más resolución, o tener celdilla distinta. Así, se tienen seis recogidas más de cristales distintos, que no parecen tener mejor resolución, pero que certifican la celdilla conseguida del primer cristal.

Del resto de cristales, seis aún no han sido probados y el resto no llegaba a una resolución mínima como para hacer recogida, además de no dar información sobre otras posibles formas cristalinas.



- Gota P26C1.

Es el mejor cristal conseguido de entre todas las secuencias, pero su resolución no ha sido suficiente como para definir unívocamente la estructura de esta secuencia. Es una varita hexagonal de buen tamaño, y las condiciones de la gota se resumen en la tabla 4.5. Existe otro cristal de esta misma gota pero difractó con menor resolución y sólo se recogió a baja resolución.

P26C1	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato potásico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	25% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.5. Condiciones de la gota P26C1.

- Gota P3A3.

De la gota P3A3 se consiguieron varios cristales, con forma de varita hexagonal, aunque solamente difractó bien uno de ellos. Éste era una varita más larga y fina que el resto y parecía algo frágil en el momento de montarla en el crioloop. No obstante, se consiguieron unos diagramas de difracción que hicieron pensar que pese a una resolución no muy alta se podría lograr resolver la estructura. La gota tenía las condiciones se recogen en la tabla 4.6.

P3A3	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 7) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 26% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.6. Condiciones de la gota P3A3.



- Gota P3A4.

El cristal congelado de esta gota no difractó. Era una varita redondeada, por lo que ya podría estar algo degradada, que fue separada de un bloque de precipitado presente en la gota. El tamaño era muy pequeño (50 μm) y era muy frágil al tacto, como un cristal líquido. Las condiciones se recogen en la tabla 4.7.

P3A4	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	2,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	---
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	10 - 15% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.7. Condiciones de la gota P3A4.

Como se puede ver en la tabla 4.7 el volumen de precipitante final del pozo era inferior al 20% con lo que el contenido de agua del cristal sería muy elevado. Esto explica el desorden del cristal, su fragilidad y que no difractara.

- Gota P3A5.

Ninguno de los tres cristales que se congelaron dieron buenos resultados de difracción. Todos eran varitas de buen tamaño (350, 250 y 100 μm) y muy rectas, pero al probarlos resultó que tenían un gran desorden. Las condiciones son las de la tabla 4.8.

P3A5	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 25% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.8. Condiciones de la gota P3A5. Esta gota es una réplica de P26C1, de donde se congeló el mejor cristal.



- Gota P3A6.

De esta gota es de la que se ha logrado un mayor número de cristales, ya que se han cogido 10 y de buena calidad. Por lo general son varitas hexagonales cortas y bastante anchas, muy regulares y ordenadas, pese a que también se han congelado cristales cúbicos. La gota se ha dejado redisolverse dos veces, consiguiendo los cristales en dos tandas. Las condiciones se recogen en la tabla 4.9 y en la figura 4.4 se puede observar una fotografía de la gota.

P3A6	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 37% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.9. Condiciones de la gota P3A6. Puede comprobarse que es una réplica de la gota P3A5, cuyas condiciones se muestran en la tabla 4.8.

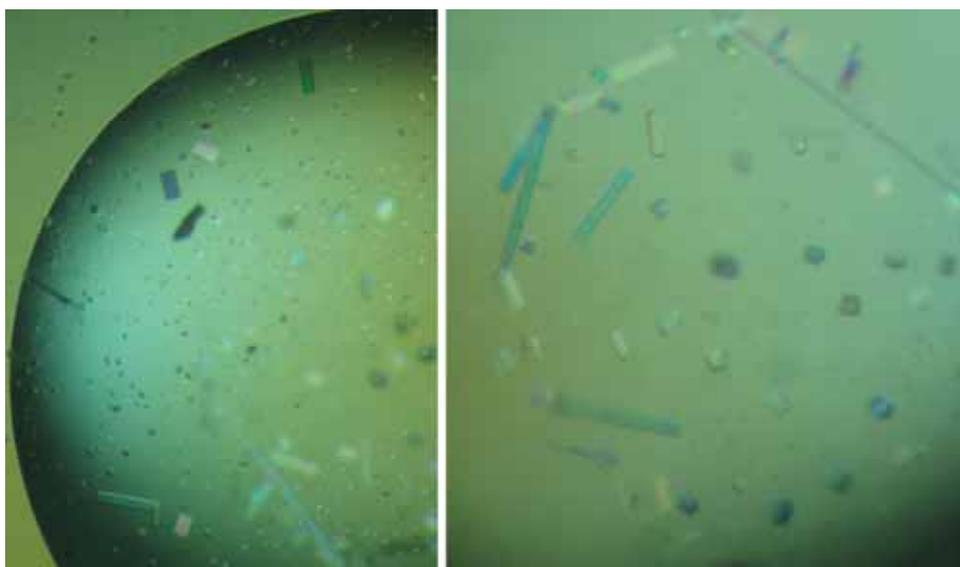


Fig. 4.4. Imagen de la gota P3A6. A la izquierda se ha enfocado la parte de la gota que toca al cubreobjetos y a la derecha el fondo de la gota. Se observan varitas hexagonales de distintos tamaños en ambas imágenes, y en la de la derecha alguna aguja larga y cubos más pequeños.



Cuatro de estos cristales aún no han sido probados y del resto, ninguno mejora la resolución hasta ahora conseguida con el cristal P26C1. Aún así, se guardó una recogida de un cristal de forma cúbica, por mostrar un diagrama de difracción distinto al obtenido hasta el momento por esta secuencia.

- Gota P3B1.

De esta gota salieron tres varitas hexagonales pequeñas y un cubo, todos de pequeño tamaño (50 μm). Dos varitas aún no han sido probadas y los cristales restantes no difractaron bien, ya fuera por el tamaño insuficiente o por un gran desorden, como en el caso del cubo. En la tabla 4.10 se pueden consultar las condiciones de la gota.

P3B1	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 50 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,0 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 45% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.10. Condiciones de la gota P3B1.

- Gota P3B3.

Se montó una varita mediana, de 150 μm de largo, de esta gota, pero no difractó adecuadamente. El hecho destacable de esta gota es que, a diferencia de las vistas hasta ahora, esta lleva sal además del tampón, como puede verse en sus condiciones (tabla 4.11).

P3B3	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	KCl 20 mM
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 28% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.11. Condiciones de la gota P3B3.



- Gota P3C2.

Dos cristales se congelaron de esta gota, de dimensiones aproximadas 50x50x300 μm . De igual modo que el cristal P3B3, difieren respecto al resto de cristales en las condiciones de la gota, ya que lleva sal además del propio tampón. Sus condiciones se muestran en la tabla 4.12.

P3C2	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	BaCl ₂ 2,5 mM
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 27% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.12. Condiciones de la gota P3C2.

De los dos cristales, sólo el más pequeño difractó, aunque previsiblemente sin cambiar la celdilla ni mejorar la resolución de P26C1. Aún así, se guardó una recogida para comprobar que no hubiese variaciones en el tamaño de la celdilla.

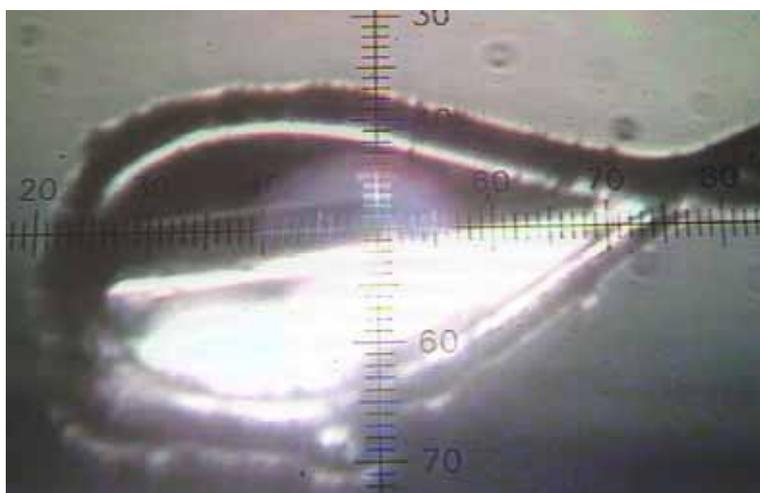


Fig. 4.5. Imagen del cristal de P3C2 que difractó montado en un crioloop. El tamaño del lazo es de 300 μm .

- Gota P3C3.

Las varitas que cristalizaron en esta gota eran muy largas y finas y parecían bastante frágiles al tacto. Se pudo montar una, separándola de las demás, pero no difractó bien. La diferencia con otros cristales de condiciones similares reside en el tampón, que es potásico en lugar de sódico, y en que estas varitas salieron al poco tiempo de hacerse la gota. Otros cristales con



mejores resultados han sido obtenidos tras meses o incluso años. Las condiciones de la gota son las de la tabla 4.13.

P3C3	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₄ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato potásico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	10% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 25% v/v
<i>Temperatura</i>	8 - 13°C

Tabla 4.13. Condiciones de la gota P3C3.

4.1.3.- Secuencia A(AT)₅T.

En general ha sido bastante complicado cristalizar esta secuencia ya que la mayoría de gotas han dado lugar a láminas. Es posible que esta secuencia requiera mucho tiempo para cristalizar, dado que las gotas con este oligonucleótido se han realizado muy al final del proyecto.

4.1.3.1.- Comportamiento según precipitante usado.

Esta secuencia sigue el comportamiento del resto en lo que concierne al tipo de precipitante. El MPD da lugar a distintas formas cristalinas mientras que el PEG únicamente forma agregados laminares con forma de mosaico. Al igual que con las secuencias anteriores, en la figura 4.6 se muestra la diferencia entre una gota con MPD (derecha) y otra con PEG (izquierda).

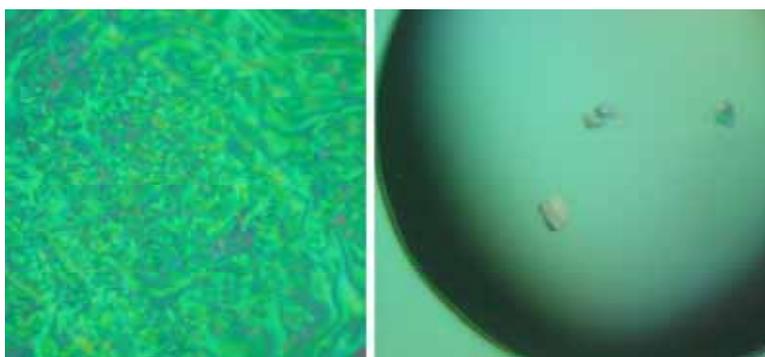


Fig. 4.6. Efecto del precipitante. A la derecha, la gota P8C1, con 30% v/v de MPD en el pozo y sin sal. A la izquierda, la gota P5C5, con 10 mM de acetato de magnesio y 25% v/v de PEG en el pozo. La gota con MPD muestra cristales algo degradados mientras que la gota con PEG da mosaicos laminares.



4.1.3.2.- Comportamiento general ante las sales.

Generalmente, la presencia de sales en la gota da como resultado la aparición de láminas y varitas planas. No obstante, se ha congelado un cristal con volumen de una gota con sal. Se ha probado un abanico de concentraciones altas (entre 300 y 100 mM), medias (entre 60 y 20 mM) y bajas (entre 10 y 0,5 mM). En concreto, y según cada sal, los resultados han sido:

- LiCl: malos resultados. No se ha conseguido ningún tipo de cristal en gotas con esta sal a concentraciones elevadas (200 mM). Ni siquiera aumentando la concentración de espermina en la gota y de MPD en el pozo.
- KCl: no se han hecho pruebas.
- MgCl₂: no se han hecho pruebas.
- (CH₃COO)₂Mg: probada a concentraciones bajas. Con PEG, agregados como el de la figura 4.6, con MPD, varitas precipitadas.
- CaCl₂: con 10 mM en la gota ha producido precipitado cristalino.
- BaCl₂: a 2,5 mM y con MPD, da láminas que van cogiendo grosor a medida que se aumenta el precipitante del pozo. Al llegar a un límite, la gota comienza a precipitar.
- MnCl₂: no se han hecho pruebas.
- (CH₃COO)₂Zn: a concentraciones muy bajas (1,5 mM) y dejando de lado gotas con PEG, se han conseguido varitas relativamente largas.
- Sin sal: se consiguen láminas con un cierto grosor y varitas, pero tardan más tiempo en aparecer.

4.1.3.3.- Comportamiento ante el tampón.

En vista de los resultados de las secuencias anteriores frente al tampón todas las pruebas se han hecho con tampón sódico, a 30 mM y pH 6,5. Algunas gotas se han realizado a pH 7 dando en principio resultados similares al pH 6,5, y aumentando la concentración a 50 mM y con más espermina, se han conseguido láminas con algo de grosor.

4.1.3.4.- Relación oligonucleótido/espermina.

Con una relación 1:3 aparecen formas cristalinas, por lo general laminares. Aumentando esta relación hasta 1:4, 1:5 o más, las gotas precipitan fácilmente y la cristalización se hace demasiado rápido por lo que quedan formas muy poco ordenadas. Para evitarlo, es necesario aumentar la concentración del tampón o añadir sales.



4.1.3.5.- Temperatura de trabajo.

Teniendo en cuenta el comportamiento de las anteriores secuencias con la temperatura, sólo se han realizado pruebas a 13° y 16°C, viéndose que a 16°C la cristalización no tenía lugar.

4.1.3.6.- Evolución con el tiempo.

La evolución con el tiempo de esta secuencia coincide plenamente con las anteriores, ya que al poco de hacerse, las gotas no presentan nada o dan formas cristalinas laminares. Al ser éste el oligonucleótido con el que se empezaron las pruebas más tarde, los cristales de buena calidad apenas han tenido tiempo para formarse, pero ya se aprecia que en gotas que daban láminas comienzan a formarse varitas con volumen.

4.1.3.7.- Resumen de cristales conseguidos.

En total se tienen 25 gotas de esta secuencia que sólo han dado dos cristales de suficiente calidad. El primero es una varita alargada de unos 100 µm que apenas difractó y el segundo es una varita más corta pero de mayor tamaño (200 µm), que difractó mejor pero mostrando un cierto grado de desorden interno.

La tabla 4.14 recoge las condiciones de la gota P6A4 de la que salió la primera varita, mientras que la tabla 4.15 muestra las condiciones de la gota P8C4, de la que se congeló la segunda varita. Una fotografía de la varita de P8C4 se puede ver en la figura 4.7, en la que puede observarse un cierto grado de degradación de la superficie del cristal. Es posible que ese sea el motivo del desorden patente en los diagramas de difracción.

P6A4	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₅ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	(CH ₃ COO) ₂ Zn 1,5 mM
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	---
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	15 - 30% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 6.14. Condiciones de la gota P6A1.



P8C4	
<i>Oligonucleótido</i>	A(AT) ₅ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	5% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 30% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.15. Condiciones de la gota P8C4.

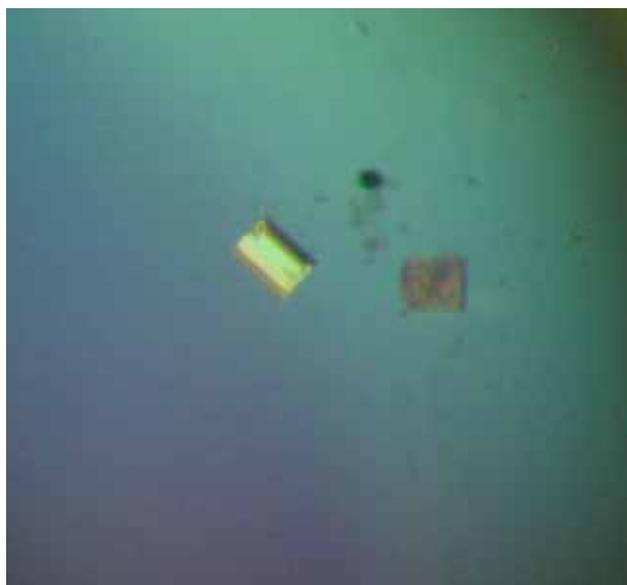


Fig. 4.7. En primer plano, el cristal de P8C4 que se congeló, una varita hexagonal de caras bien definidas, de un tamaño aproximado de 200 μ m. Puede observarse un cierto grado de degradación en los extremos de la varita.

4.1.4.- Secuencia AAU^{Br}(AT)₃T.

La finalidad de los estudios de cristalización de esta secuencia es conseguir un cristal que la misma estructura que el de la secuencia A(AT)₄T, de forma que pueda suponerse que tienen la misma estructura. Por este motivo, principalmente se hicieron pruebas con las mismas condiciones que habían dado cristales para la secuencia anterior (sin sales y con MPD como precipitante), aunque se hicieron algunas gotas más con sales como comprobación.



4.1.4.1.- Comportamiento general ante las sales.

Se hicieron algunas gotas con sales para saber qué tipo de cristales daban y si se correspondía con el comportamiento de su secuencia equivalente. En concreto, se hicieron pruebas con:

- LiCl 100 mM: no cristalizó nada.
- KCl 20 mM: aparecieron varitas planas.
- CaCl₂ 10 mM: aparecieron varitas planas y algunas varitas con grosor, pero demasiado pequeñas.
- BaCl₂ 5 mM: apareció un gran número de varitas planas.
- (CH₃COO)₂Mg 4 mM: aparecieron varitas planas.
- (CH₃COO)₂Zn 1,25 mM: aparecieron láminas muy finas.
- Sin sal: se consiguieron láminas de distinto grosor, varitas, etc.

Así pues, parece que la adición de sales hace que cristalicen láminas y varitas planas mientras que sin sal se obtienen distintos tipos de cristales.

4.1.4.2.- Comportamiento ante el tampón.

Sólo se empleó tampón de cacodilato sódico, al ser el que había dado buenos resultados anteriormente. Se realizaron algunas gotas con pH 7, pero la mayoría fueron con pH 6,5 y no se observó diferencia aparente debido al pH. La concentración empleada fue de 30 mM salvo por un caso, donde se utilizó 50 mM pero aumentando la concentración de oligonucleótido y espermina. De esa gota particular se congelaron cristales.

4.1.4.3.- Relación oligonucleótido/espermina.

Debido a los resultados del estudio de cristalización de la secuencia A(AT)₄T, la relación más empleada fue 1:3, aunque en algunas gotas que llevaban sales se incrementó hasta 1:5.

4.1.4.4.- Temperatura de trabajo.

Únicamente se trabajó a 13°C, debido a que es la temperatura que mejores resultados había dado para el resto de secuencias. Además, el bromouracilo no es muy estable y a temperaturas superiores se degradaría.



4.1.4.5.- Evolución con el tiempo.

Debido a que el bromouracilo no es del todo estable, era indispensable conseguir cristales en el menor tiempo posible. Desgraciadamente, el comportamiento de las secuencias de este proyecto muestra que los cristales, sobre todo los válidos, aparecen meses después de haber realizado la gota.

La secuencia bromada no fue una excepción. Sus gotas comenzaron dando varitas muy pequeñas, agujas y láminas, que tras meses mejoraron dando lugar a varitas de mayor tamaño. En concreto, los mejores cristales tardaron 2 meses y medio en salir.

4.1.4.6.- Resumen de cristales conseguidos.

Se tienen 16 gotas con la secuencia bromada y únicamente de tres de ellas se lograron los 11 cristales congelados. Sólo seis de los cristales fueron probados y sólo uno difractó de forma adecuada.

- Gota P7A3.

Como ya se ha mencionado en el apartado 4.1.4.2, la gota P7A3, con el tampón, el oligonucleótido y la espermina más concentrados, dio dos varitas hexagonales de pequeño tamaño (100 y 50 μm) y poco grosor. Las condiciones de la gota se recogen en la tabla 4.16, y una fotografía de la gota se muestra en la figura 4.8.

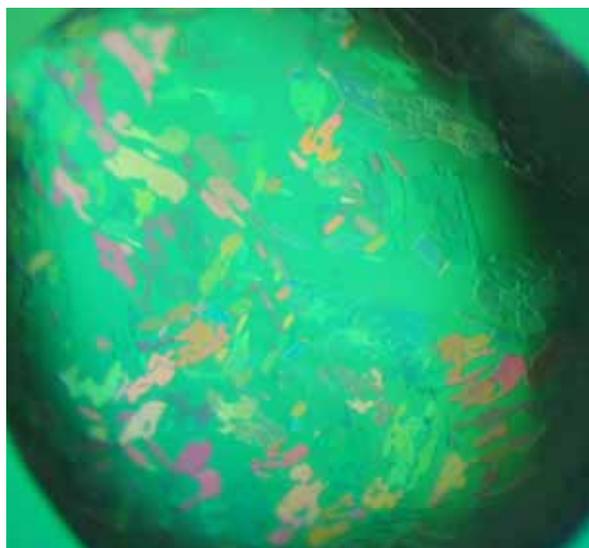


Fig. 4.8. Fotografía de la gota P7A3. Se observan láminas rotas y agujereadas con algo de grosor y varitas planas pequeñas. Dos de ellas fueron congeladas.



P7A3	
<i>Oligonucleótido</i>	AAU ^{Br} (AT) ₃ T 1,0 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 50 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	2,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	5,5% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 32% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.16. Condiciones de la gota P7A3.

- Gota P7A6.

De esta gota se congelaron 4 láminas y varitas planas de pequeño tamaño (50 - 100 μm). Las condiciones de esta gota (tabla 4.17) eran exactamente las mismas (salvo por el oligonucleótido) que las de la gota P26C1, que dio el mejor cristal de la secuencia A(AT)₄T.

P7A3	
<i>Oligonucleótido</i>	AAU ^{Br} (AT) ₃ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 6,5) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	5% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 26% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.17. Condiciones de la gota P7A3. Esta gota es una réplica de P26C1, pero con una secuencia distinta, para ver si se obtiene el mismo cristal.

- Gota C13.

En esta cápsula se probó un pH distinto del tampón (pH 7), consiguiendo unas varitas hexagonales muy rectas pero demasiado pequeñas. Con el paso del tiempo algunas llegaron a crecer lo suficiente como para congelarse. Así, se montaron diversas varitas (una de 150 μm , y dos de 50 μm), un cubo (de entre 100 y 50 μm) y una lámina de 50 μm . En la tabla 4.18 pueden verse las condiciones de la gota y en la figura 4.9 una fotografía de la misma.



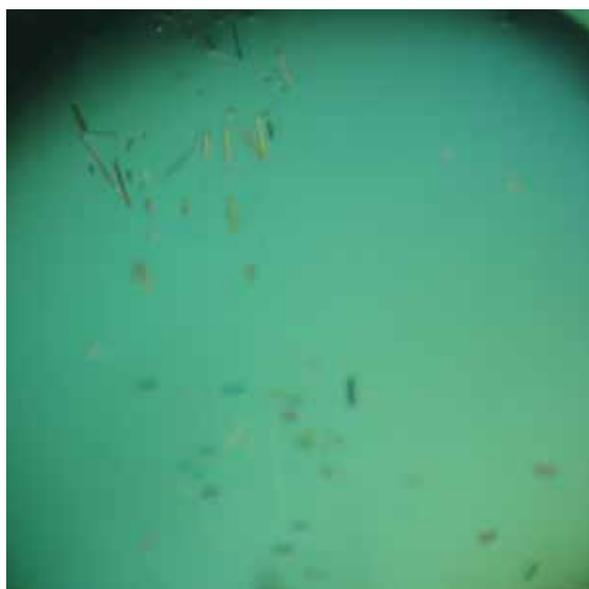


Fig. 4.9. Fotografía de la gota C13. En la parte superior pueden verse algunas varitas alargadas.

C13	
<i>Oligonucleótido</i>	AAU ^{Br} (AT) ₃ T 0,5 mM
<i>Tampón</i>	Cacodilato sódico (pH 7) 30 mM
<i>Sal</i>	---
<i>Espermina</i>	1,5 mM
<i>MPD inicial de la gota</i>	5% v/v
<i>MPD inicial y final del pozo</i>	20 - 33% v/v
<i>Temperatura</i>	13°C

Tabla 4.18. Condiciones de la gota C13.

4.2.- Procesado de los diagramas de difracción.

4.2.1.- Secuencia A(AT)₄T.

En lugar de comenzar por la secuencia con menos bases, el oligonucleótido A(AT)₃T, se exponen primero los resultados del procesado de A(AT)₄T, porque fue el primero en realizarse y porque el tipo de celdilla y grupo espacial encontrados se aplicó para el resto de secuencias, al observarse que sus diagramas de difracción se comportaban de forma similar.

De todos los cristales recogidos de esta secuencia destacan 3: el cristal de P26C1, que es el de mayor resolución, el de P3A3, que tiene diagramas de mejor calidad y un cubo de P3A6, que presenta unos diagramas ligeramente distintos al resto.



4.2.1.1.- Cristal de P26C1.

Presenta unos diagramas de difracción como el de la figura 4.10, con una resolución que llega hasta el *stacking* (3,1 - 3,2 Å), y manchas regulares. El cristal se recogió en la línea BM16 (línea española) del Sincrotrón de Grenoble (ESRF) con una longitud de onda de 0,977 Å, usando un detector CCD (marCCD). Los diagramas van de 0 a 180°, con una oscilación por fotografía de 2° y un tiempo de exposición de 10 segundos. El procesado se llevó a cabo mediante los programas informáticos Denzo y Scalepack [Otwinoski y Minor, 1997].

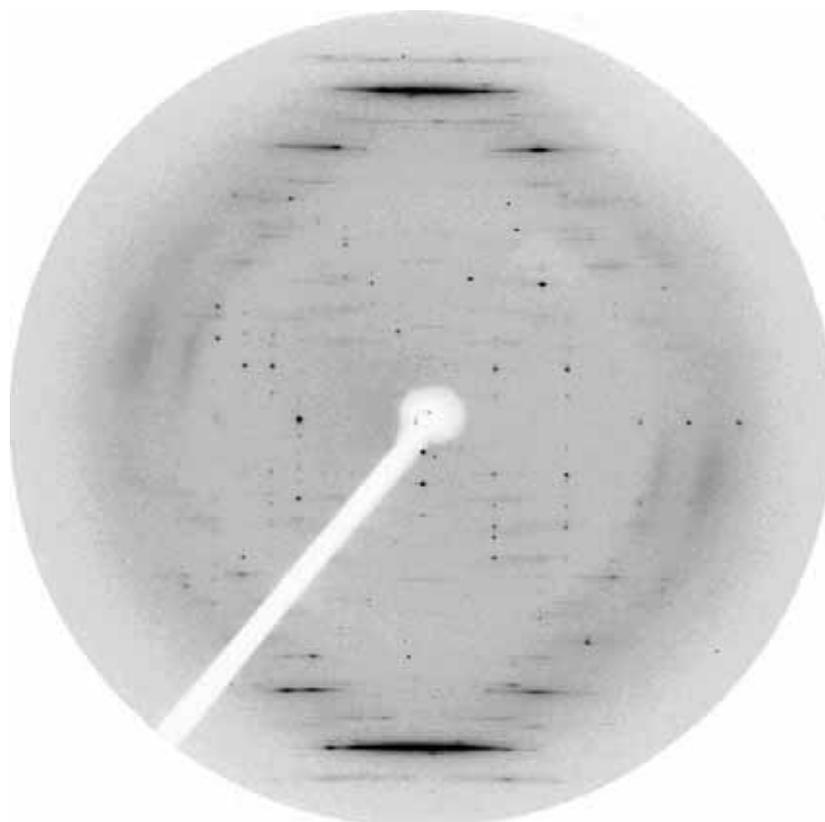


Fig. 4.10. *Diagrama de difracción del cristal P26C1. La resolución válida llega hasta el stacking, entre 3,2 y 3,1 Å. A partir de ahí, se observa una zona desordenada que da lugar a streaks en lugar de manchas. La oscilación de esta fotografía es de 2°.*

- Discusión del grupo espacial.

Después del primer indexado, el programa Denzo muestra las celdillas que corresponderían a estos datos para cada red de Bravais y un error porcentual respecto de la celdilla de menor simetría (la red triclinica, que siempre tiene error nulo). Del estudio de esas desviaciones se deduce la red que mejor concuerda con los datos, teniendo en cuenta que cuanto menor es la simetría menos error presenta.



Hubo dos redes de Bravais que presentaron un error inferior al 1%, además de las redes monoclinicas y triclinicas, que no suelen desviarse nunca. Eran las redes rómbica centrada en una cara y hexagonal primitiva, que son prácticamente equivalentes, como puede verse en la figura 4.11:

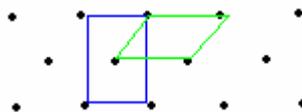


Fig. 4.11. Red cualquiera con las celdillas rómbica centrada (azul) y hexagonal primitiva (verde). Ambas son equivalentes si la orientación de los puntos reticulares es la misma.

Para toda una serie de puntos reticulares (en negro) se pueden ajustar distintas celdillas, en este caso una rómbica centrada en caras superiores (azul) y una hexagonal primitiva (verde). Visto así, ambas podrían ser igualmente válidas, pero teniendo en cuenta que los puntos reticulares no son “puntos” sino moléculas o conjuntos de ellas, si las orientaciones relativas de esos puntos son distintas, la celdilla válida será la de menor simetría, es decir, la hexagonal. *A priori* no puede saberse si las orientaciones coinciden o no, por lo que hay que ceñirse a los resultados del procesado y descartar la red de mayor error.

En este caso, la red rómbica tenía un R_{merge} de 0,167, mientras que la hexagonal daba un R_{merge} de 0,128. Por este motivo, se aceptó la red hexagonal como buena, con una celdilla de $a = b = 44,7 \text{ \AA}$; $c = 197,7 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$.

El siguiente paso es profundizar en el grupo espacial. Dentro de la red hexagonal existen dos grandes familias de grupos, la formada por P3 y la de P6, con ejes rotacionales ternarios y senarios, respectivamente. La familia P6 no puede empaquetar los oligonucleótidos de forma coherente dentro de la celdilla, por lo que quedaba descartada. Del estudio de las ausencias sistemáticas se concluyó que existía un eje binario en el eje c de la celdilla, por lo que se pensó que el grupo espacial podría ser P3₂21. El resultado final del procesado se muestra en la tabla 4.19.

P26C1	
<i>Nº imágenes</i>	90
<i>Oscilación</i>	2°
<i>Celdilla</i>	44,7 x 44,7 x 197,7 Å 90° 90° 120°
<i>Grupo espacial</i>	P3 ₂ 21
<i>Resolución</i>	3,1 Å
R_{merge}	0,092
χ^2	0,87

Tabla 4.19. Datos del procesado de P26C1.



4.2.1.2.- Cristal de P3A3.

En principio, viendo sus diagramas de difracción (fig. 4.12) se pensó que la resolución de este cristal sería mayor o igual a la del anterior. El cristal se recogió en la línea BM16 (línea española) del Sincrotrón de Grenoble (ESRF) con una longitud de onda de 0,979 Å, usando un detector CCD (marCCD). Los diagramas van de 90 a 270°, con una oscilación por fotografía de 2° y un tiempo de exposición de 7 segundos. El procesado se llevó a cabo mediante los programas informáticos Denzo y Scalepack [Otwinoski y Minor, 1997].

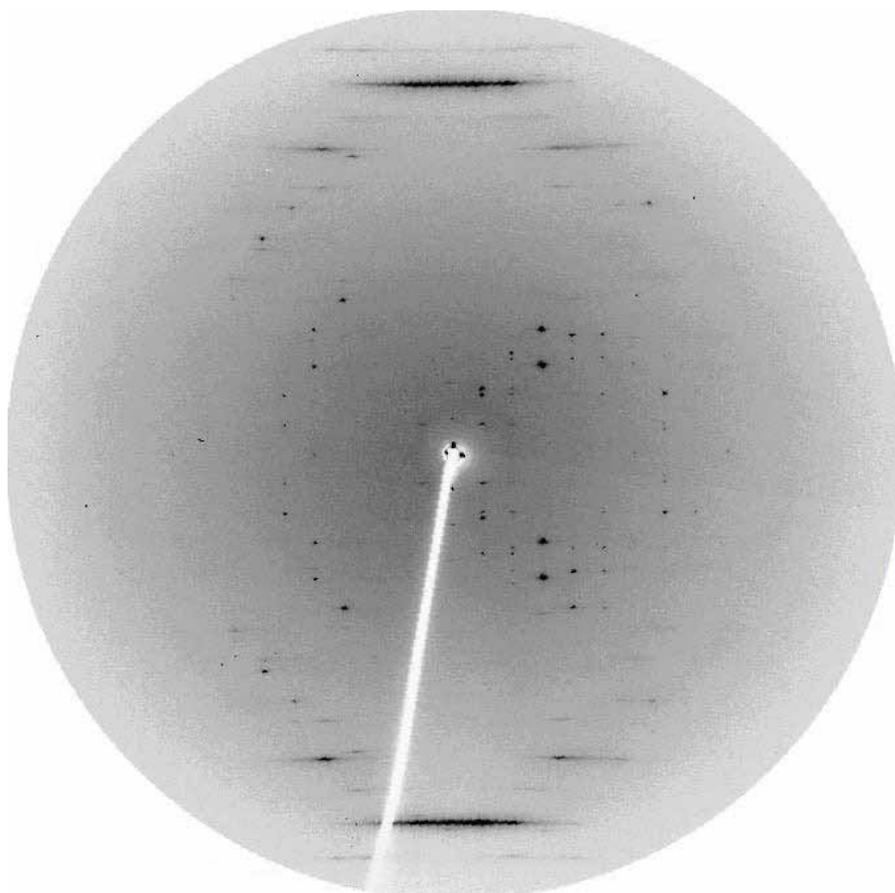


Fig. 4.12. *Diagrama de difracción del cristal P3A3. La resolución válida parece llegar hasta el stacking, al igual que el cristal anterior, pero las manchas se van más limpias y redondas. La oscilación de esta fotografía es de 2°.*

- Resolución de corte.

Con el indexado, el programa Denzo encontraba una celdilla prácticamente equivalente a la del cristal anterior, por lo que se utilizó el mismo grupo espacial final del cristal P26C1. Pero al encontrar la resolución válida, se comprobó que el cociente entre intensidad y error para cada capa de resolución era inferior a dos a partir de 3,6 Å. Así, aunque esta recogida



parecía tener mejores reflexiones, la resolución máxima aceptable es demasiado pobre como para intentar resolver la estructura. Los datos del procesado se muestran en la tabla 4.20.

P3A3	
<i>Nº imágenes</i>	90
<i>Oscilación</i>	2°
<i>Celdilla</i>	45,08 x 45,08 x 198,29 Å
	90 ° 90° 120°
<i>Grupo espacial</i>	P3 ₂ 21
<i>Resolución</i>	3,6 Å
<i>R_{merge}</i>	0,125
<i>χ²</i>	0,85

Tabla 4.20. Datos del procesado de P3A3. Las estadísticas no son muy favorables.

4.2.1.3.- Cristal de P3A6 de forma cúbica.

Los diagramas de difracción de este cristal, como el de la figura 4.13, muestran un mayor grado de desorden que los vistos anteriormente. No obstante, la resolución parece buena y la disposición de las difracciones es algo distinta al resto. Por ese motivo, se hizo una recogida de 15 fotografías con una oscilación de 12° cada una, comenzando desde 180° y con una exposición de 15 segundos. Al igual que el resto, la recogida se realizó en el Sincrotrón de Grenoble (ESRF) utilizando un detector MarCCD y una longitud de onda de 0,9203 Å.

A pesar de un cierta diferencia entre el diagrama de la figura 4.13 y diagramas anteriores, el indexado mostró de nuevo que las redes rómbica centrada en 2 caras y hexagonal primitiva eran las más adecuadas, con un error inferior al 1% (dejando de lado las redes monoclinicas y triclinica). Asimismo, la celdilla resultante del indexado es prácticamente igual a la encontrada en apartados anteriores: $a = b = 43,95 \text{ \AA}$; $c = 197,46 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$. Por lo tanto, se concluye que la diferencia en los diagramas reside en la orientación del cristal respecto a la radiación incidente.

El alto grado de desorden presente en el cristal no permite hacer la integración de todos los diagramas, por lo que no se tienen los valores estadísticos del escalado para este cristal. No obstante, se coge como buena la aproximación a la celdilla indicada en el párrafo anterior.



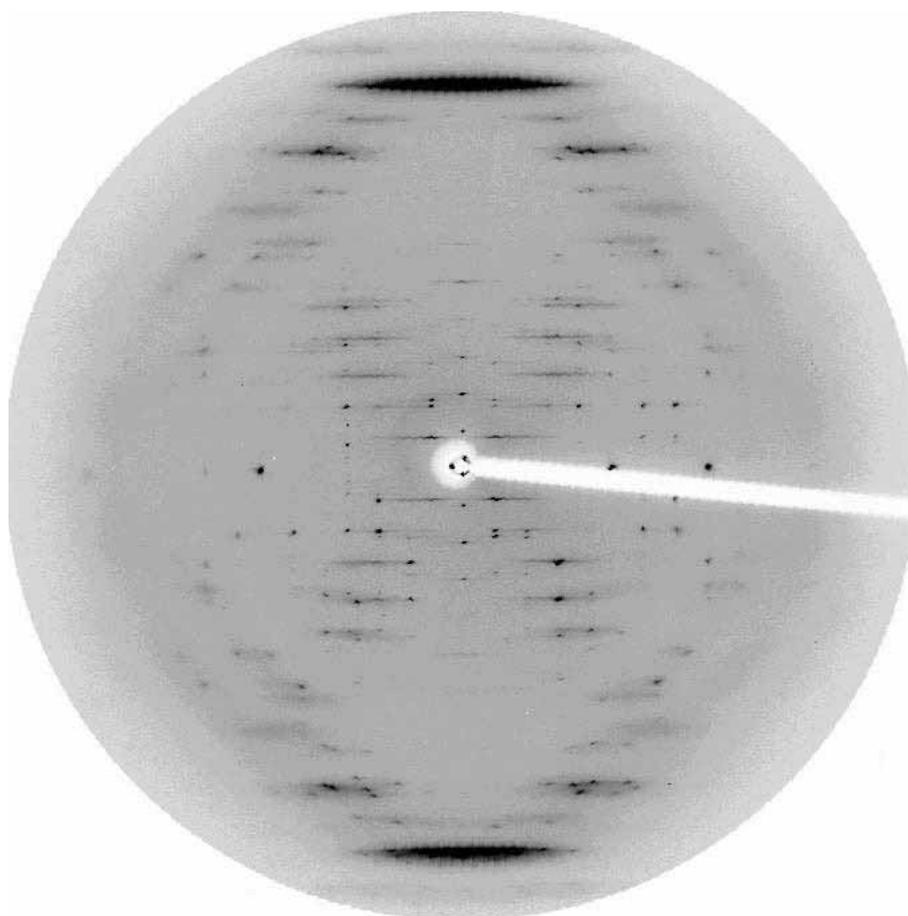


Fig. 4.13. Diagrama de difracción del cristal P3A6 cúbico. La resolución válida parece llegar hasta el stacking, pero hay un mayor grado de desorden ya que las manchas no son redondas. La oscilación de esta fotografía es de 12°.

4.2.2.- Secuencia A(AT)₃T.

De todos los cristales congelados y probados sólo uno de la gota P4A2 difractó de forma adecuada, dando unos diagramas como los de la figura 4.14. La recogida se llevó a cabo en la línea BM16 del Sincrotrón de Grenoble (ESRF) utilizando un detector MarCCD y una longitud de onda de 0,9203 Å. Consta de 15 fotografías con una oscilación de 12° cada una, comenzando desde los 0°, con una exposición de 12 segundos.



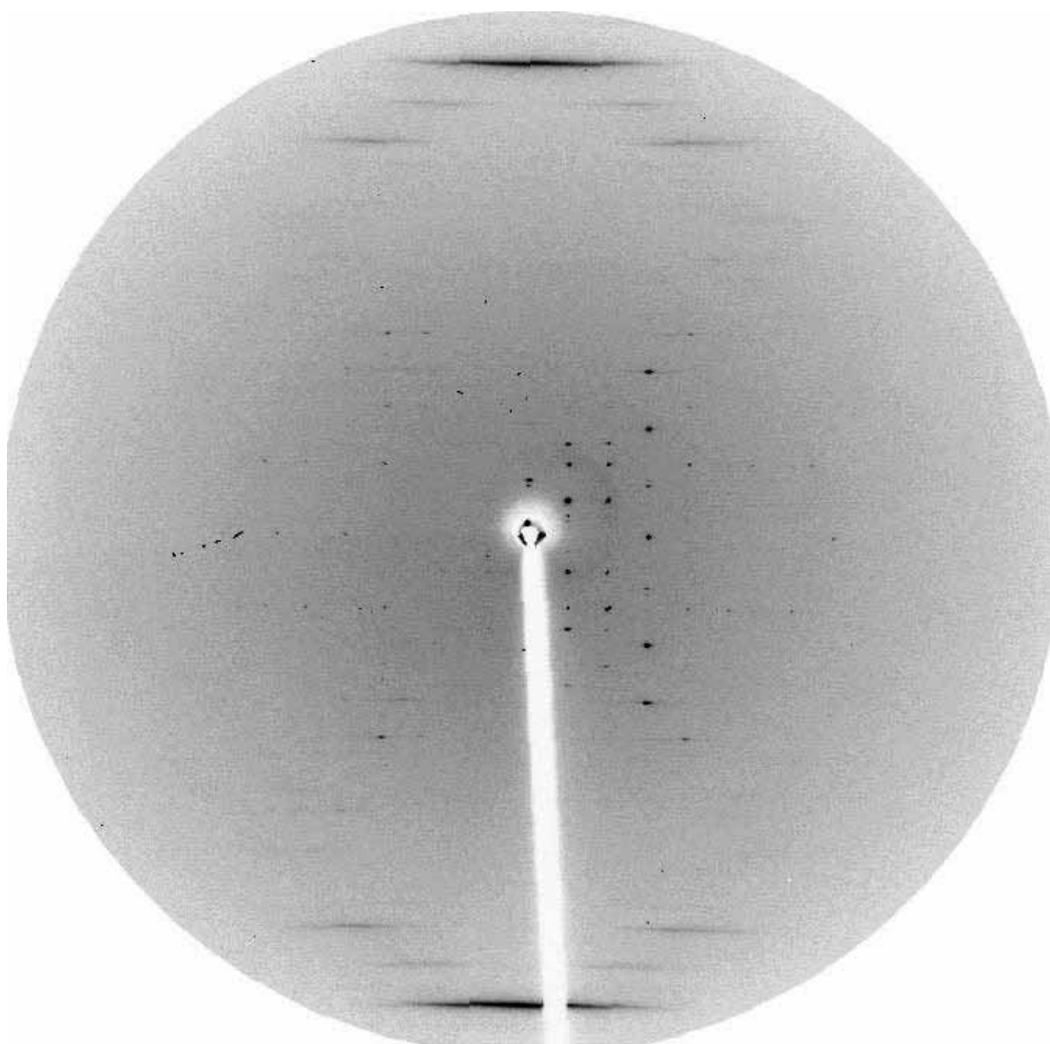


Fig. 4.14. Diagrama de difracción del cristal P4A2 grande. La resolución es pobre, pero las difracciones son muy regulares. Se observa una zona cristalina con reflexiones y una más desordenada, que da difracción de fibra (streaks). La oscilación de la fotografía es de 12°.

- La orientación de los cristales respecto a la radiación incidente.

El procesado de los mismos resultó una tarea muy complicada, puesto que al problema de la resolución se le añade la mala orientación del cristal. Como se puede ver en la figura 4.14, las dos líneas más oscuras que aparecen verticalmente (representan el *stacking* o separación de dos pares de bases consecutivos) están prácticamente alineadas con el beamstop (la línea blanca). El *stacking* queda siempre muy marcado, porque la distancia entre dos pares de bases se repite mucho durante el cristal. Si esta distancia no se mantiene constante (como pasa en este caso) no aparece como difracciones puntuales sino como líneas.



Por la propia definición del *stacking*, que quede alineado con el beamstop representa que uno de los ejes del cristal, el eje longitudinal c, está casi perpendicular al rayo durante toda la recogida. Así, sus reflexiones rara vez cumplen la ley de Bragg y no aparecen. Por lo tanto, el procesado informatizado se detiene cuando intenta integrar los diagramas, ya que uno de los parámetros de la celdilla sólo puede calcularse de unas pocas imágenes. Aún así, se ha conseguido una estimación de la celdilla, que junto con el resto de datos del procesado se recogen en la tabla 4.21.

P4A2	
<i>Nº imágenes</i>	15
<i>Oscilación</i>	12°
<i>Celdilla</i>	44,61 x 44,61 x 295,89 Å 90 ° 90° 120°
<i>Grupo espacial</i>	P3
<i>Resolución</i>	6 Å
<i>R_{merge}</i>	0,2
<i>χ²</i>	0,9

Tabla 4.21. Datos del procesado de P4A2. Los datos estadísticos R_{merge} y χ^2 no son buenos.

La solución a la orientación ineficaz de un cristal pasa por reorientarlo utilizando el goniómetro de cuatro giros, con el peligro de que al recibir un pequeño golpe o por un movimiento inadecuado, el cristal se pierda.

4.2.3.- Secuencia A(AT)₅T.

Los dos cristales que se citan en el apartado 4.1.3.7 fueron difractados en Sincrotrón de Grenoble (ESRF) en la línea española BM16. Desgraciadamente, ninguno de los dos provee de información suficiente como para siquiera conocer su celdilla.

4.2.3.1.- Cristal de P6A4.

La resolución de los diagramas obtenidos de esta varita (fig. 4.15) es extremadamente pobre y no permite realizar la integración, ni obtener un valor certero de la celdilla, no obstante, sí se consiguió una primera aproximación a este valor, que podría ser asegurado por los datos de cristales sucesivos. Se recogieron 12 diagramas con una longitud de onda de 0,9762 Å a intervalos de 15° comenzando desde 0°. El tiempo de exposición para cada fotografía fue de 15 segundos.

Como puede observarse en la figura 4.15, apenas hay difracciones visibles aun con una oscilación de 15°. Además, el cristal tiene mosaicidad alta, por lo que las difracciones aparecen alargadas y unidas entre ellas, formando líneas. Se define mosaicidad como el ángulo que puede rotarse el goniómetro manteniendo una difracción visible. Si este ángulo



es grande, la rotación hace que en lugar de tener forma puntual, la difracción muestre una forma más alargada.

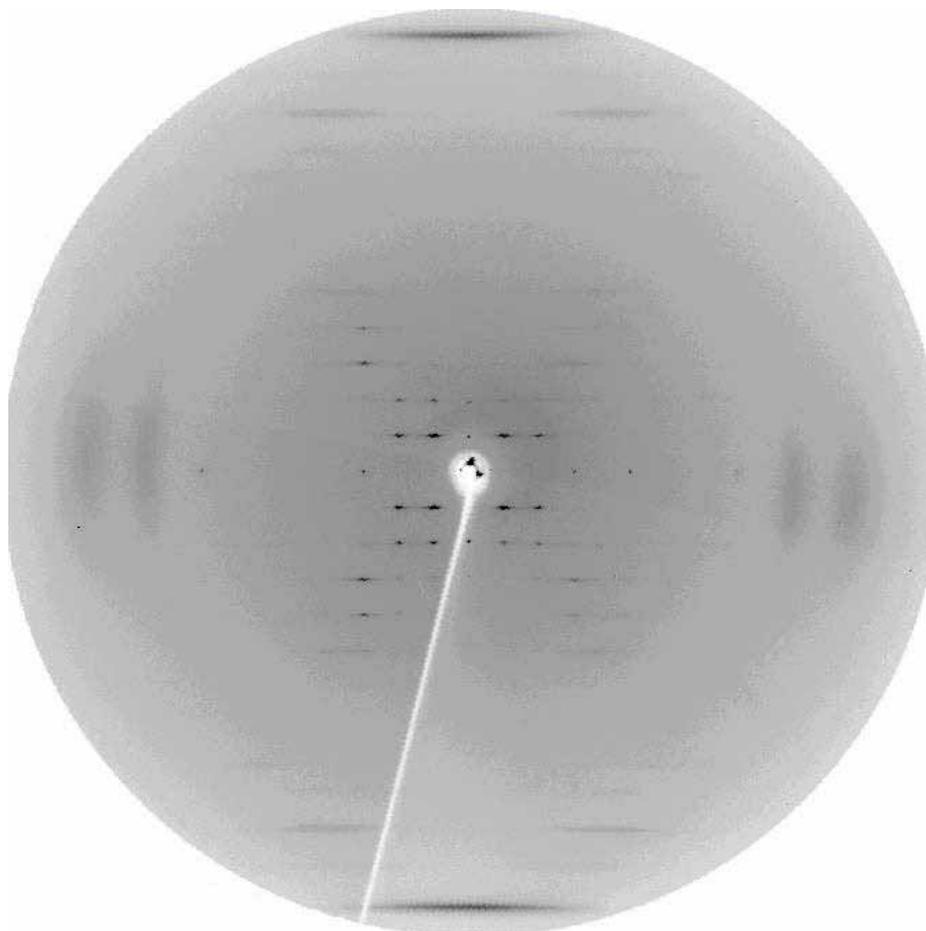


Fig. 4.15. Diagrama de difracción del cristal P6A4. La resolución es muy pobre y además el cristal tiene una mosaicidad muy alta, como se aprecia en las difracciones, que son alargadas. La oscilación de la fotografía es de 15°.

La celdilla que se obtuvo del indexado, suponiendo que se comporta como las dos secuencias anteriores (grupo espacial P3) fue la siguiente: $a = b = 45,88 \text{ \AA}$; $c = 38,55 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$. No se ha podido integrar todas las fotografías ni escalar, por lo que no se tiene el valor de los parámetros estadísticos.

4.2.3.1.- Cristal de P8C4.

Esta varita es mucho mejor que la anterior pero tampoco ha permitido encontrar el valor correcto de la celdilla. La recogida fue de 45 fotografías, a intervalos de 4° comenzando desde el ángulo 0°. La longitud de onda era 0,9203 Å y el tiempo de exposición seis segundos. Uno de los diagramas puede verse en la figura 4.16.



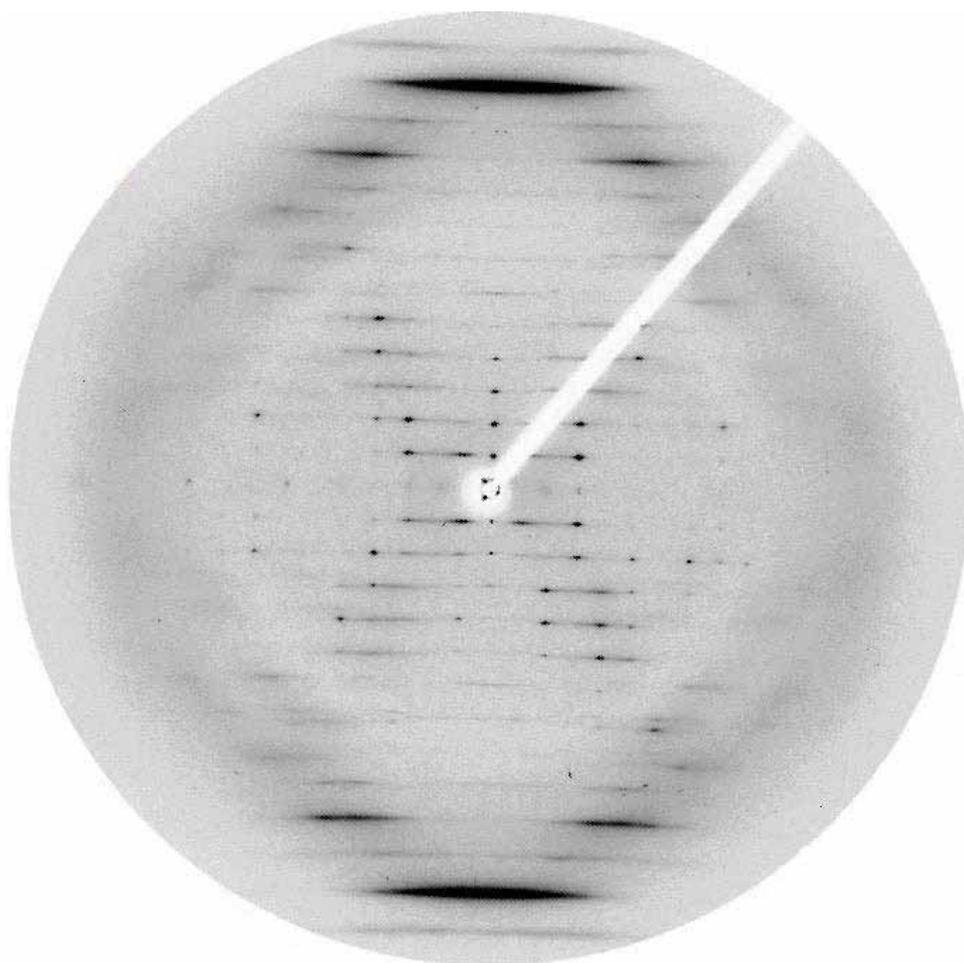


Fig. 4.16. Diagrama de difracción del cristal P8C4. La resolución ha mejorado pero sigue habiendo un gran desorden, caracterizado por difracciones irregulares y alargadas. La oscilación de la fotografía es de 4° .

Al indexar mediante Denzo los diagramas anteriores, se obtuvo una celdilla muy similar a la del apartado anterior: $a = b = 45,8 \text{ \AA}$; $c = 38,64 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$. Debido posiblemente al gran desorden, tampoco se pudo integrar todas las imágenes, pero lo más destacable es que hay ciertas reflexiones que indican que la celdilla tiene un parámetro c mucho mayor. En la figura 4.17 se muestra otra fotografía de la misma recogida, resaltando una zona próxima al centro de la imagen.

En ella puede verse como hay difracciones muy pequeñas y muy próximas en la dirección meridional (la dirección que marca el *stacking*). Midiendo la separación de estas manchas en distintas fotografías se ha estimado que el parámetro c de la celdilla mide en realidad cerca de 600 \AA . Al ser tan grande, las difracciones quedan solapadas unas con otras, formando manchas muy intensas que los programas informáticos son incapaces de distinguir. Para



encontrar el valor real del parámetro c de la celdilla para esta secuencia, será necesario conseguir un cristal mucho más ordenado y de mejor resolución.

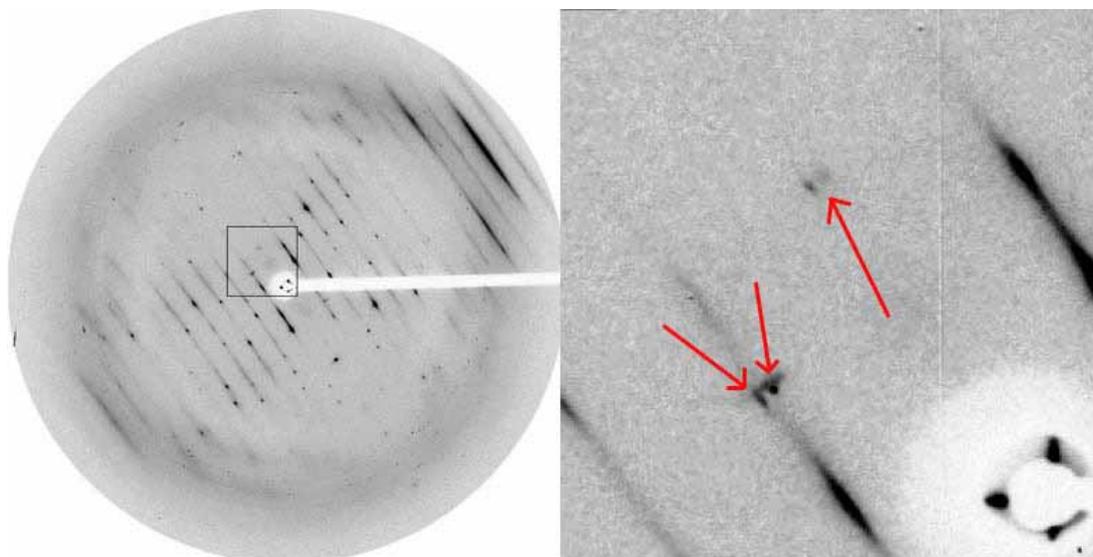


Fig. 4.17. Diagrama de difracción del cristal P8C4, con la zona central izquierda aumentada. Se resaltan mediante flechas rojas difracciones muy pequeñas que indican que el eje c es mucho mayor que 38 Å.

4.2.4.- Secuencia AAU^{Bf}(AT)₃T.

De los seis cristales probados de esta secuencia únicamente uno difractó bien. Se trata de la varita más larga de la gota C13, de 150 µm, de la que puede verse una fotografía montada en un crioloop en la figura 4.18. El cristal se probó en la línea española BM16 del Sincrotrón de Grenoble (ESRF) utilizando un detector MarCCD.

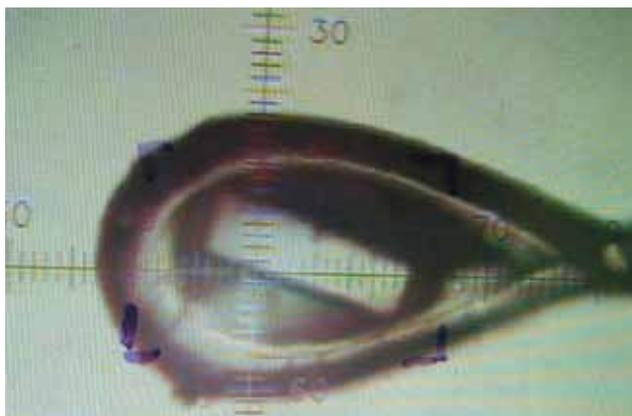


Fig. 4.18. Fotografía del cristal de C13 montado en un crioloop. El tamaño del loop es de 200 µm.

Dado que la secuencia contiene un átomo pesado, el bromo, se hizo la recogida para emplear la técnica de MAD en su resolución. Así, se recogieron tres sets de 270 imágenes, con una oscilación de 1° cada una, empezando desde el ángulo 0° y con 7 segundos de



exposición. Para determinar las longitudes de onda de cada recogida, se realizó un diagrama de absorción del propio cristal, para encontrar las energías del pico y de la inflexión del diagrama. Así, la primera recogida (equivalente al pico de absorción) se realizó con una longitud de onda de 0,9199 Å, la segunda (equivalente al punto de inflexión), a 0,9203 Å y la tercera (de control) a 0,8564 Å. Los diagramas obtenidos son como los de la figura 4.19.

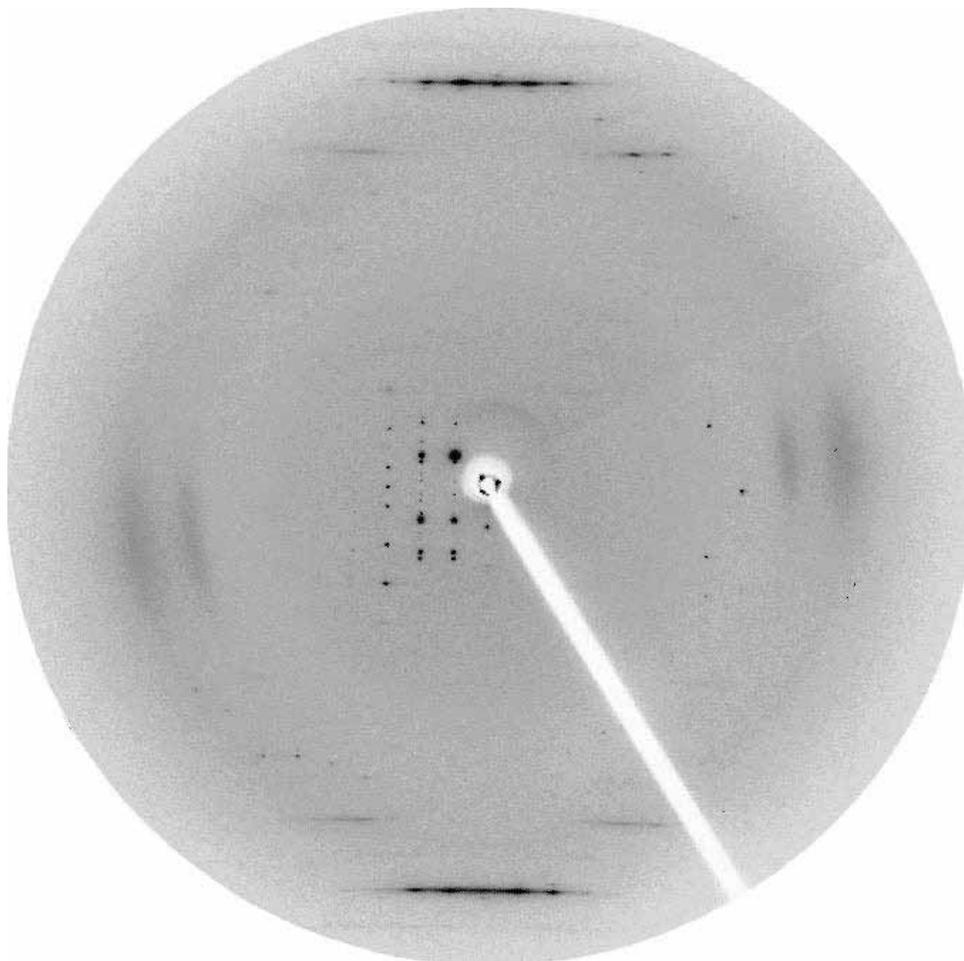


Fig. 4.19. Diagrama de difracción del cristal C13. Hay muy pocas manchas debido a que la oscilación es muy pequeña (1°). La resolución parece llegar hasta el stacking, en el que se pueden intuir difracciones.

En un principio las tres recogidas se pudieron indexar e integrar bien, pero al escalarlas los errores eran altísimos (90%) más allá de 6 Å, lo cual no concuerda con la imagen de los diagramas. Estudios posteriores mostraron que las recogidas no estaban bien procesadas, ya que aunque la celdilla era correcta, la matriz de orientación del cristal respecto de la radiación incidente no coincidía. Por este motivo, en el escalado no figuraban difracciones auténticas y los errores eran elevados.



Se intentó procesar de nuevo las imágenes pero aunque el indexado daba un resultado lógico, el programa perdía la celdilla al integrar la recogida. Este es un problema que no se ha podido resolver.

Aun no teniendo datos exhaustivos de la recogida, sí se ha comprobado que la celdilla de todas las recogidas es muy similar a la celdilla obtenida en los cristales de A(AT)₄T, por lo que ciertamente puede suponerse que la estructura es equivalente. Una aproximación a la celdilla de este cristal es la siguiente: $a = b = 45,02 \text{ \AA}$; $c = 198,64 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$.

4.3.- Resolución de la estructura.

El único procesado para todas las estructuras trabajadas que tiene resolución y calidad suficiente como para intentar resolver la estructura es el del cristal de P26C1, ya que llega hasta casi 3 Å de resolución. Del resto de secuencias se tiene una mera aproximación de la posible conformación del cristal.

4.3.1.- Secuencia A(AT)₄T.

4.3.1.1.- Reemplazo molecular.

Utilizando el programa MolRep y un modelo de ADN de la forma B ideal (construido mediante el programa Turbo-Frodo), se intentó resolver por reemplazo molecular la estructura del cristal P26C1 utilizando el grupo espacial P3₂21. Este grupo tiene tres dúplex de ADN en la unidad asimétrica, de forma que dando un modelo ideal de uno de los dúplex y el fichero con el procesado (con las intensidades, factores de estructura y errores de cada difracción encontrada), se obtiene un fichero pdb de salida con la posición de los tres dúplex de la unidad asimétrica. Aplicándole a este fichero la simetría, debe obtenerse todos los dúplex que conforman el cristal.

Para hacer el reemplazo molecular no es necesario utilizar toda la resolución, ya que estamos intentando localizar en el espacio cuerpos muy grandes (dúplex). Para disminuir los tiempos de cálculo se trabajó únicamente con las difracciones de baja resolución, hasta 4,5 Å. El programa MolRep obtuvo 10 soluciones de la función de rotación y de cada una, 10 soluciones más de la función de traslación. Fijó el modelo en la solución final que tuvo mejores estadísticas y repitió el proceso dos veces más, hasta colocar los tres dúplex de la unidad asimétrica. En cada paso, el valor del factor R y la correlación C fueron mejorando.

Se obtuvo una solución con un factor $R = 0,86$ y una correlación $C = 68\%$. Los valores estadísticos no son muy alentadores y además la solución no destacaba mucho de todas las demás, pero se comprobó mediante el programa Turbo-Frodo que el modelo era coherente y que aplicando la simetría las moléculas no se superpusieran unas con otras.



El modelo obtenido responde a un empaquetamiento hexagonal por columnas de dúplex infinitamente largas. Las columnas no tienen ninguna relación entre sí, aparte de un giro de aproximadamente -20° entre el par de bases final de un dúplex y el inicial del vecino superior. Este giro es, además, contrario al giro normal de los modelos ideales de la forma B. Dentro de la celdilla, entran tres columnas de seis dúplex cada una. Si se supone un stacking de $3,3 \text{ \AA}$, el valor del parámetro c de la celdilla ($197,7 \text{ \AA}$) concuerda con los seis dúplex:

$$3,3 \text{ \AA} \cdot 10 \text{ bases/cadena} \cdot 6 \text{ dúplex/columna} = 198 \text{ \AA} \approx 197,7 \text{ \AA} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

En la figura 4.20 parte izquierda puede observarse una visión vertical de una celdilla, con las columnas vistas desde arriba, y en la parte derecha una visión lateral de una columna cualquiera. Cada dúplex de la unidad asimétrica viene representado por un color distinto. El eje binario hace que los tres dúplex de la parte inferior generen los superiores.

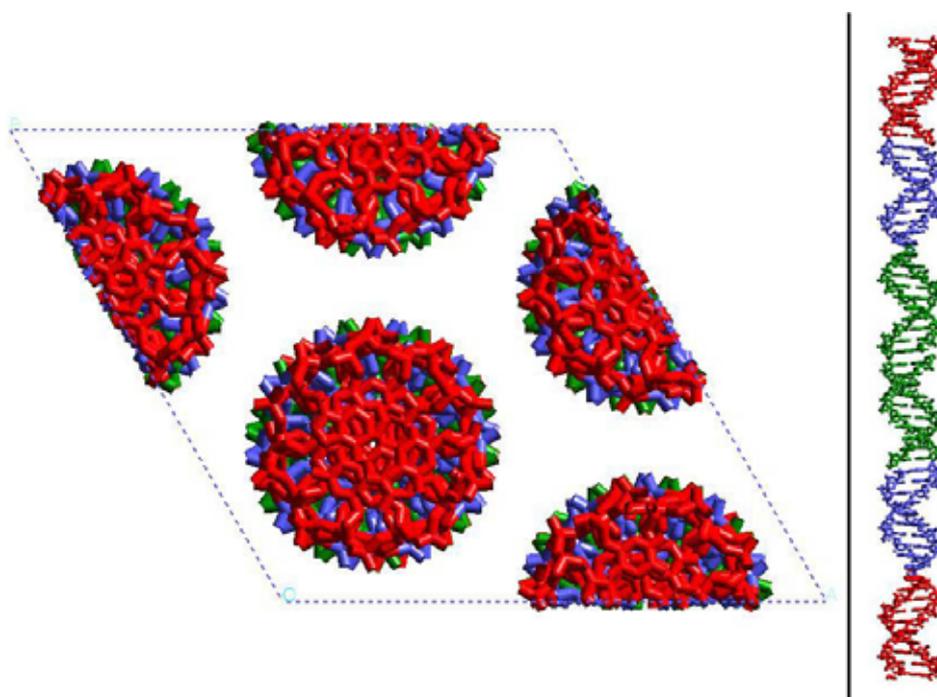


Fig. 4.20. A la izquierda, proyección en planta del empaquetamiento en el cristal. A la derecha, vista frontal de una columna, donde cada dúplex de la unidad asimétrica tiene un color distinto.

4.3.1.2.- Afinado de la solución.

Para este paso se empleó el programa Refmac5, haciendo un afinado por cuerpo rígido (*rigid body*) y un *restrained refinement* a resolución máxima ($3,1 \text{ \AA}$), dejando un 5% de las reflexiones sin afinar para calcular el R_{free} . Del segundo afinado se calcularon los mapas de densidad ($2fo-fc$) y diferencias ($fo-fc$) de la estructura. Los valores estadísticos de la solución tras 10 ciclos de afinado se recogen en la tabla 4.22.



Función estadística	Valor inicial	Valor final
Factor R	0,72	0,57
R _{free}	0,78	0,62
Figure of merit (FOM)	0,20	0,46

Tabla 4.22. Valores estadísticos de la solución afinada.

Los valores finales no son buenos, pero mediante posteriores afinados la solución no se pudo mejorar más, ya que el movimiento de los átomos era demasiado pronunciado. Al visualizar la solución con los mapas gracias al programa Turbo-Frodo, se vio que la densidad se ceñía bastante bien a las cadenas de ADN, aunque uno de los dúplex dejaba ver zonas de falta de densidad (fig. 4.21). En la unión de uno de los dúplex con su vecino superior se observó asimismo una banda extra de densidad que no se sabe a qué pertenece (fig. 4.22).

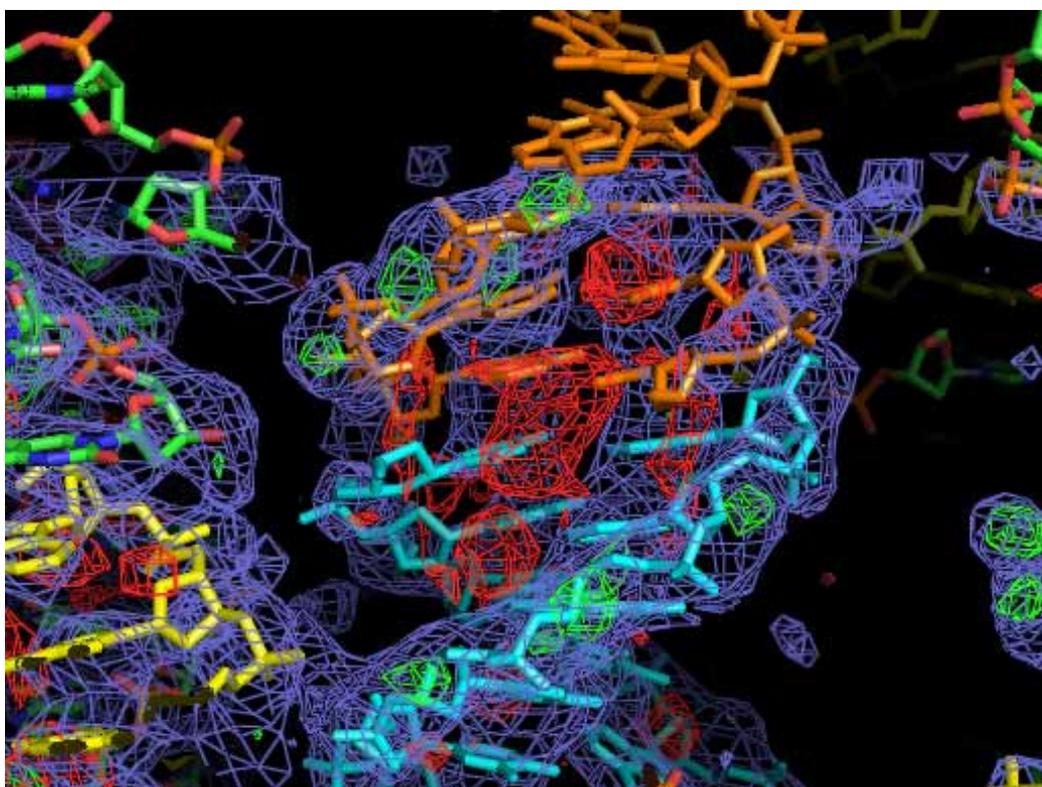


Fig. 4.21. Detalle del modelo con el mapa de densidad (azul) y el mapa de diferencias (verde cuando es positivo y rojo cuando es negativo). Se observa en uno de los dúplex una bola de densidad negativa que indica que sobran electrones. Además, la presencia de pequeñas bolas de densidad positiva en la cadena del dúplex hace pensar que los fosfatos no están bien colocados, ya que en esos puntos faltan electrones.



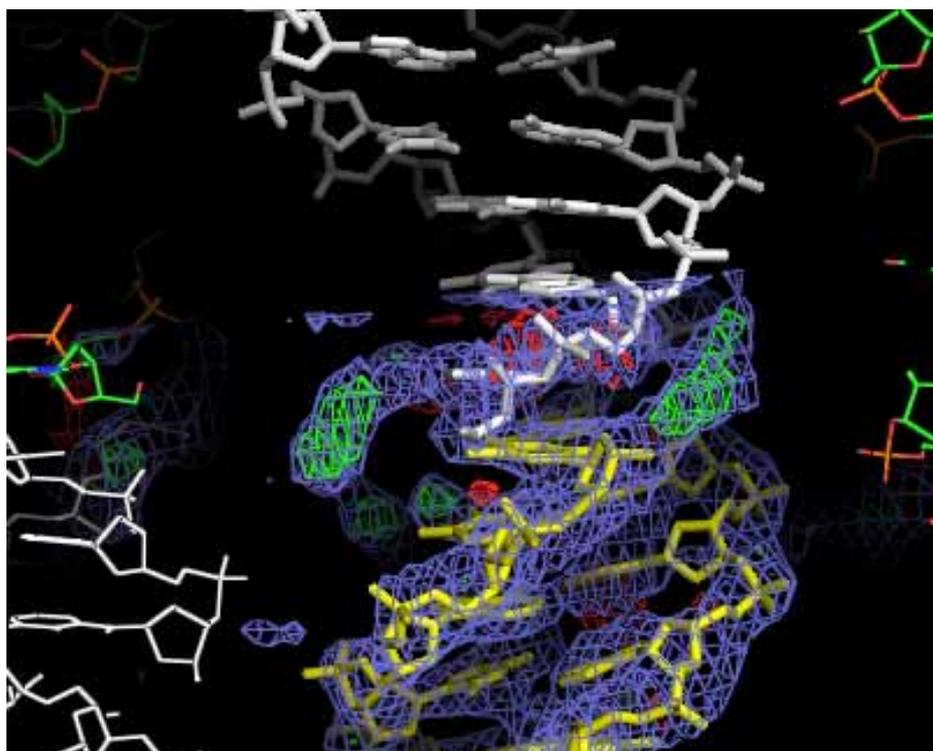


Fig. 4.22. Detalle de la unión de un dúplex (amarillo) con su vecino superior (blanco), mostrándose el mapa de densidad (azul) y el mapa de diferencias (verde cuando es positivo y rojo cuando es negativo). Destaca una banda de densidad que no tiene modelo, a izquierda y derecha de la unión, como si el dúplex fuese una triple hélice.

Para descartar que la desavenencia entre el modelo resuelto y los mapas se debiera al grupo espacial, se probaron otros grupos, como el $P6_422$, el $P32$ y el $P321$, obteniendo peores resultados estadísticos y mayor error en los mapas. La mayoría de dúplex chocaban unos con otros, seguían apareciendo las bandas de densidad sin modelo y no sólo en las uniones entre vecinos, sino por toda la estructura. También se probaron modelos con apareamiento Hoogsteen, obteniendo valores del factor R finales de entre 0,87 y 0,92, superiores a los del modelo ideal.

Del estudio se concluye que el modelo que mejor concuerda con los datos es el de la forma B ideal con grupo espacial $P3_221$ y apareamiento Watson-Crick. Viendo que la solución del reemplazo molecular no destacaba del resto y que existen discordancias entre el modelo afinado y los mapas de densidad, se deduce que la resolución no basta para localizar exactamente la posición de cada dúplex. Por este motivo, aparecen bandas de densidad extra que no se corresponden con el modelo, formando una especie de triple hélice. No obstante, sí que sirve para encontrar el empaquetamiento del cristal, representado en la figura 4.20.



4.3.2.- Secuencia $A(AT)_3T$.

Se puede comprobar, comparando los procesados, que esta secuencia y la anterior, $A(AT)_4T$, tienen una celdilla muy similar. Ambas son hexagonales, tienen dos lados aproximadamente iguales a 45 Å y el tercer eje, el c, mucho más largo. Por lo tanto, puede suponerse que el empaquetamiento dentro del cristal de esta secuencia sea similar al de la anterior: columnas infinitamente largas de dúplex sin interacción lateral, donde el par de bases final de un dúplex está girado -20° respecto al par de bases inicial del siguiente.

El eje c de la celdilla es 295,89 Å, por lo que, si se supone un *stacking* de 3,3 Å, teniendo 8 bases cada cadena, el número de dúplex que entrarían en cada columna sería:

$$\frac{295,89 \text{ Å}}{3,3 \text{ Å} \cdot 8 \text{ bases/cadena}} = 11,2 \approx 11 \text{ dúplex / columna} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Por otro lado, los diagramas de difracción de los cristales de $A(AT)_3T$ suelen indexarse con una celdilla algo más pequeña (a y b iguales, pero $c = 82 \text{ Å}$), lo cual supondría que hay 3 dúplex en cada columna. Esto puede ser debido al giro global de un dúplex respecto del siguiente (Ω).

Si $\Omega = 230^\circ$, entonces tres dúplex consecutivos tendrían un giro de 690° , que es cercano a 720° (dos vueltas completas). En cambio, 11 dúplex representarían un giro de 2530° (prácticamente siete vueltas completas). La consecuencia de que el giro de tres dúplex sea similar a 720° es la existencia de una pseudoceldilla más pequeña, que es la que tiene un eje c de 82 Å. Por este motivo, algunas difracciones se pierden, haciendo que el procesado sea muy complicado.

4.3.3.- Secuencia $A(AT)_5T$.

De nuevo la celdilla de los cristales de esta secuencia coincide con el patrón del resto: hexagonal, con parámetros a y b cercanos a 45 Å y eje c mucho más largo. Por lo tanto, es probable que el empaquetamiento por columnas infinitas sin relación lateral también sirva para esta secuencia. Además, como en el caso de $A(AT)_3T$, vuelve a haber una pseudoceldilla con eje c mucho menor, de aproximadamente 38,6 Å, que equivaldría a la altura de un solo dúplex ($3,2 \text{ Å} \cdot 12 \text{ bases} = 38,4 \text{ Å}$).

En este caso, no es posible calcular el valor del parámetro c de forma directa. Midiendo las distancias en distintos diagramas de difracciones (ver figura 4.17 en la página 65) se ha estimado que debe estar entre 500 y 600 Å, correspondiéndose con columnas de entre 14 y 16 dúplex. Con un eje c tan largo, las difracciones quedan muy juntas (recordemos que el espacio recíproco es inverso al espacio real) haciendo que en ocasiones se solapen siendo indistinguibles.



Para comprobarlo, se han realizado diagramas de difracción simulados de un cristal con un modelo ideal con la celdilla pequeña (fig. 4.23 izquierda) y otro con la celdilla grande (fig. 4.23 derecha), mediante el programa Cerius². La comparación visual de estos diagramas simulados con los diagramas reales parece indicar que realmente la celdilla tiene que ser larga correspondiendo con columnas de entre 14 y 16 dúplex.

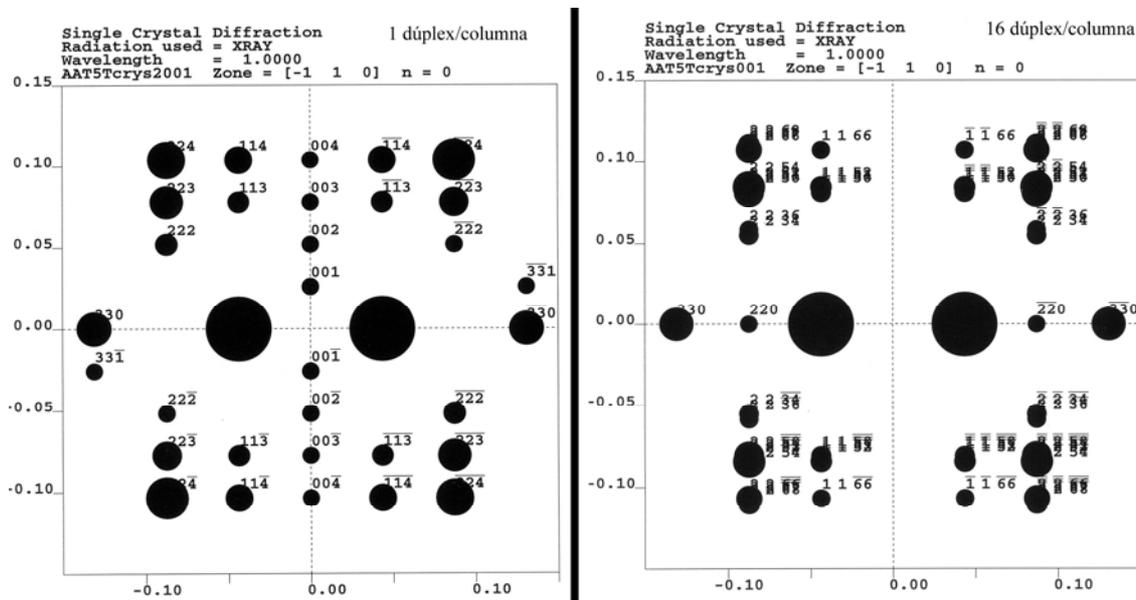


Fig. 4.23. Comparación de los diagramas de difracción simulados de un modelo ideal de A(AT)₅T utilizando columnas de un dúplex por celdilla (izquierda) y 15 dúplex por celdilla (derecha). En el diagrama correspondiente a la celdilla más grande (derecha) las manchas quedan solapadas de forma muy similar a los diagramas reales obtenidos para esta secuencia.

4.4.- La hidratación de los cristales.

Todos los cristales vistos hasta ahora tenían una resolución pobre (el máximo ronda los 3,1 Å) y un cierto nivel de desorden. Esto es debido a que la hidratación de los cristales es alta en comparación con los cristales de secuencias mixtas (con todas las bases).

Para resaltar este hecho se puede calcular la relación entre el volumen de la celdilla y el número de pares de bases presentes en ella, expresado según:

$$\frac{V}{pb} = \frac{a \cdot b \cdot c \cdot \sin 60^\circ}{n^\circ pb / celdilla} \tag{Ec. 4.3}$$

donde:

- V es el volumen de la celdilla. $V = a \cdot b \cdot c \cdot \sin 60^\circ$, para el sistema hexagonal, siendo a, b y c los ejes de la celdilla.
- pb es el número de pares de bases.



Esta relación ronda los 1.300 para un cristal de buena calidad. En el caso de nuestras secuencias, el número de pares de bases (pb) por celdilla se calcula multiplicando el número de columnas que entran en una celdilla (3) por el número de dúplex que caben verticalmente (entre 6 y 15) y por la longitud de la secuencia (8, 10 y 12 bases).

Se ha calculado el valor de esta relación para cada secuencia, mostrando los resultados en la tabla 4.23. La relación es muy superior para estos cristales, por lo que hay menos espacio ocupado por ADN y la cantidad de agua presente es mayor.

Secuencia	Longitud (pb)	Dúplex/c	V/pb (Å ³ /pb)
A(AT) ₃ T	8	11	1931
A(AT) ₄ T	10	6	1901
A(AT) ₅ T	12	16	1950

Tabla 4.23. Relación entre volumen de la celdilla y pares de bases para cada secuencia. El campo "dúplex/c" es el número de dúplex por columna que caben en la celdilla unitaria.

Según los resultados de la tabla 4.23, la secuencia A(AT)₄T cristaliza de forma más compacta (con una relación menor), por lo que su nivel de hidratación es más pequeño y los cristales son de mejor calidad. Otras secuencias con únicamente pares A-T muestran los mismos patrones de comportamiento en lo que respecta al nivel de hidratación de las celdillas [Urpí *et al.*, 2005].

4.5.- Estructuras HASO.

El término HASO se refiere a *Helical Arrangement of Stacked Oligonucleotides* y sirve para definir esta particular organización en forma de columnas independientes dentro de celdillas hexagonales y con apareamiento Watson-Crick. Este tipo de estructuras ha sido descrito recientemente [Urpí *et al.*, 2005] como uno de los dos tipos de organizaciones que presentan las secuencias ricas en pares A-T y que nunca antes se había encontrado en secuencias mixtas (con todas las bases).

Atendiendo a los resultados expuestos en este proyecto, las tres secuencias estudiadas coinciden con este tipo de organización. En el caso del A(AT)₄T, la solución del reemplazo molecular daba este empaquetamiento, mientras que para las otras dos secuencias, debido a las grandes similitudes entre las celdillas se ha supuesto un funcionamiento similar. La tabla 4.24 sirve como resumen de los parámetros de la celdilla, de la hélice HASO, de la hidratación y del grupo espacial de cada secuencia.



Secuencia	Muestra	Parámetros celdilla (Å)	Grupo espacial	V/pb	Res. (Å)	Comentarios
$A(AT)_3T$	P4A2	44,6 44,6 295,9	P3	1931	6	Pseudoceldilla con $c = 82$ Å. Columna HASO de 11 dúplex en 7 vueltas
$A(AT)_4T$	P26C1	44,7 44,7 197,7	$P3_221$	1901	3,1	Columna HASO de 6 dúplex en 1 vuelta.
$A(AT)_5T$	P8C4	45,8 45,8 618	P3	1950	4	Pseudoceldilla con $c = 38,64$ Å. Columna HASO de 16 dúplex en 15 vueltas

Tabla 4.24. Resumen de los resultados para cada secuencia. Los datos de $A(AT)_5T$ son estimados, debido a que no se ha podido calcular correctamente su celdilla. La columna "Res." muestra la resolución de los diagramas de difracción.



5.- EVALUACIÓN ECONÓMICA.

Realizar la evaluación económica de un proyecto de investigación no es tarea fácil, puesto que no hay ingresos efectivos y los gastos suelen ser cuantiosos. Por este motivo, en este capítulo se analizará el coste global de la realización del proyecto, dividiéndolo en tres grandes partidas: coste de materiales y productos, coste de equipos y coste de personal.

5.1.- Coste de materiales y productos.

Pese a que algunos productos como los oligonucleótidos tengan un precio muy elevado, la cantidad utilizada durante el proyecto es ínfima. Por esta razón, el coste de materiales y productos no influye fuertemente en el coste final. Para calcular el gasto en cada producto se utilizan los precios que aparecen en los catálogos de suministro y la cantidad por lote. Por otro lado se estima la cuantía de producto utilizada en el proyecto, y dividiéndola por el lote de compra, se obtiene un factor de uso. Al multiplicar el factor por el precio por lote se consigue el gasto empleado en cada producto. La siguiente tabla (5.1) muestra los resultados para los materiales específicos y los productos empleados.

Materiales y productos

<i>Producto</i>	<i>cantidad lote</i>	<i>precio (€)</i>	<i>factor de uso</i>	<i>coste (€)</i>
Oligonucleótido A(AT)3T	5 mg	200,00	0,56	112,00
Oligonucleótido A(AT)4T	5 mg	200,00	1,12	224,00
Oligonucleótido A(AT)5T	5 mg	200,00	0,26	52,00
Oligonucleótido AAUBr(AT)3T	5 mg	400,00	0,27	108,00
Espermina	5 g	45,70	0,006	0,27
Ácido cacodílico	10 g	20,00	0,55	11,04
Cacodilato sódico	10 g	32,00	0,96	30,82
Hidróxido potásico	100 g	48,00	0,02	1,08
Metilpentanodiol (MPD)	500 ml	32,00	0,4	12,80
Polietilenglicol 3350 (PEG)	100 ml	18,60	0,3	5,58
Solución de silanización	250 ml	85,20	1,6	136,32
Silicona	150 g	46,00	0,4	18,40
Cloruro de litio	100 g	17,40	0,017	0,30
Cloruro de potasio	1 kg	20,45	0,001	0,02
Cloruro de magnesio	1 kg	21,60	0,002	0,04
Cloruro de calcio	250 g	28,40	0,006	0,17
Cloruro de bario	100 g	11,50	0,02	0,28
Cloruro de manganeso II	500 g	9,70	0,004	0,04
Acetato de magnesio	100 g	20,00	0,02	0,43
Acetato de zinc	250 g	20,45	0,008	0,16
Silica-gel	1 kg	15,00	0,05	0,75
Nitrógeno líquido	1 l	0,72	36	25,92
<i>Material</i>		<i>precio (€)/unidad</i>	<i>uso</i>	<i>coste (€)</i>



Placa <i>linbro</i>	6,61	9	59,49
Cápsulas	0,12	13	1,56
Cubreobjetos	0,05	216	10,80
Crioloop	7,50	30	225,00
Coste total de materiales y productos			812,26

Tabla 5.1. *Desglose del coste de materiales y productos.*

5.2.- Coste de equipos.

Dentro de esta partida se encuentran los costes derivados de la utilización de equipos dedicados a la investigación. El gasto en cada aparato se calcula a partir del precio del equipo, su periodo de amortización y el tiempo durante el cual se ha utilizado (10 meses). También se dividirá entre el número de personas que durante ese periodo de tiempo lo han estado usando. Los resultados se recogen en la tabla 5.2.

Equipos				
<i>Equipo</i>	<i>Precio (€)</i>	<i>Periodo de amortización (años)</i>	<i>Nº personas</i>	<i>Coste (€)</i>
Espectrofotómetro UV	41.000,00	5	10	683,33
Microscopio óptico	5.410,00	5	15	60,11
Cámara digital del microscopio	400,00	---	10	33,33
Balanza	1.500,00	5	20	12,50
pHmetro	480,00	5	20	4,00
Sincrotrón de Grenoble	----	----	----	771,32
Coste total de equipos				1.564,60

Tabla 5.2. *Desglose del coste de equipos. El coste relativo al Sincrotrón se calcula en la tabla 5.3.*

El coste relativo al Sincrotrón de Grenoble se ha calculado de forma especial. Teniendo en cuenta el gasto realizado cada vez que se llevaron muestras (1.500 €), el número total de cristales llevados cada viaje y el número de cristales que pertenecían a este proyecto, es posible estimar el gasto que corresponde a este proyecto. En la tabla 5.3 se muestra el resultado de los cálculos.



Sincrotrón de Grenoble

<i>Viaje</i>	<i>Cristales llevados</i>	<i>Cristales propios</i>	<i>Coste (€)</i>
1	60	6	150,00
2	64	5	117,19
3	71	7	147,89
4	80	19	356,25
Coste total del Sincrotrón de Grenoble			771,32

Tabla 5.3. *Desglose del coste del Sincrotrón de Grenoble (ESRF).*

Cabe destacar que, dado que todos los experimentos se realizaron en la línea española BM16 del ESRF, la subvención estatal hace que el coste debido sea muy inferior al que correspondería. En el caso de una empresa externa, esta partida sería una de las principales responsables del coste final.

5.3.- Coste de personal.

Para el cálculo de este coste se ha dividido el proyecto en cuatro grandes fases: estudio previo, experimentación, análisis de resultados y documentación. Cada una de estas fases correspondería al trabajo de personal con un distinto nivel de formación, y por lo tanto, con un precio por hora diferente.

Sabiendo la duración de cada fase y un precio por hora de trabajo para cada fase, puede estimarse el coste derivado del personal para este proyecto. Los resultados del cálculo se recogen en la tabla 5.4.

Personal			
<i>Fase</i>	<i>Duración (horas)</i>	<i>Sueldo (€/hora)</i>	<i>Coste (€)</i>
Estudio previo	40	30	1.200,00
Experimentación	400	15	6.000,00
Análisis de resultados	120	45	5.400,00
Documentación	80	30	2.400,00
Coste total de personal			15.000,00

Tabla 5.4. *Desglose del coste de personal.***5.4.- Coste total del proyecto.**

Una vez visto el desglose de cada una de las partidas a tener en cuenta, el coste final del proyecto se calcula sumando cada coste. Por otro lado, hay que añadir dos partidas más, la primera debida a gastos generales de laboratorio (electricidad, agua, material básico de laboratorio, material de oficina, etc.) y la segunda debida al *overhead* de la UPC. El *overhead*



incluye toda una serie de gastos indirectos, como el mantenimiento de las instalaciones, alquiler, suministros,... debidos a la realización del proyecto en la UPC.

Ambas partidas se estiman como un 10% de la suma de los costes de personal, equipos y productos. En la tabla 5.5 se muestran los cálculos para el coste final.

Total del Proyecto	
<i>Partida</i>	<i>Coste (€)</i>
Coste de materiales y productos	812,26
Coste de aparatos	1.564,60
Coste de personal	15.000,00
<i>Subtotal</i>	<i>17.376,86</i>
10% gastos generales	1.737,69
10% <i>overhead</i> UPC	1.737,69
Coste total del proyecto	20.852,23

Tabla 5.5. *Desglose del coste del proyecto.*

De este modo, el coste final del proyecto, sumando todos los gastos anteriores, se calcula en **20.852 €**.



6.- IMPACTO AMBIENTAL.

La realización de un proyecto cualquiera implica un cierto impacto sobre el medio ambiente, el cual se analiza en este capítulo. Dado el carácter experimental del proyecto, el impacto del mismo se basa principalmente en el trabajo realizado en el laboratorio, los materiales y equipos empleados y el consumo de servicios generales.

6.1.- Trabajo en el laboratorio.

En este apartado se citan los impactos debidos a la preparación de disoluciones madre y gotas, montaje de cristales y conservación de los mismos. Destacan los siguientes conceptos:

- Estudios de cristalización.

En la preparación de las disoluciones madre, las gotas y durante los cambios de pozo para favorecer la cristalización se emplean una serie de reactivos químicos que generan un cierto impacto ambiental. Debido a que los volúmenes de trabajo son ínfimos, únicamente los impactos debidos a los precipitantes (MPD y PEG) son representativos. Estos polialcoholes se depositan en contenedores adecuados (disolventes orgánicos no clorados) y se entregan a empresas para recibir tratamiento adecuado.

Durante el siliconado de los cubreobjetos se emplea una campana extractora para evitar respirar los vapores que provienen de la solución de silanización. Estas emisiones de gases a la atmósfera producen impacto ambiental.

- Montaje de cristales.

Dado que las gotas se sellan con silicona para crear un recinto cerrado, no se producen emisiones de disolventes. No obstante, durante la congelación en nitrógeno líquido de los cristales, sí se producen emisiones de gases inertes, que pese a no entrañar riesgos para la salud directamente, pueden ocasionar ambientes asfixiantes si se concentran. Un extractor de gases evita la acumulación del nitrógeno en el ambiente.

- Difracción de cristales.

Durante la difracción se emplea nitrógeno líquido para evitar que el cristal probado sufra alteraciones. Por este motivo se producen emisiones de gas inerte que deben ser evacuadas de la sala de forma que no se creen ambientes asfixiantes.



6.2.- Equipos y material diverso.

Los equipos empleados en la realización de este proyecto conllevan una serie de impactos ambientales indirectos, debidos principalmente a:

- elaboración: consumo de recursos materiales y energéticos, construcción de instalaciones, explotación de las mismas, almacenamiento,...
- funcionamiento: consumo de recursos materiales y energéticos, refrigeración de los difractómetros,...
- transporte: se lleva a cabo mediante la utilización de combustibles fósiles, que tienen un impacto muy negativo por emisiones de partículas, dióxido de carbono,...
- deposición: una vez finalizada su vida útil, los equipos son depositados en vertederos tras un tratamiento previo para reducir su impacto. Los residuos de plástico o vidrio que puedan ser recuperados se depositan en contenedores específicos para posterior reciclado.

El material de oficina tiene impactos análogos al del material de laboratorio. En concreto, el papel y el plástico son depositados en contenedores adecuados para favorecer un reciclado.

6.3.- Servicios generales.

La realización de cualquier trabajo implica un gasto de servicios generales, por lo general no renovables que debe ser mencionado. Se destacan principalmente los siguientes servicios:

- Electricidad: generada en su mayoría mediante combustibles fósiles. Entraña un impacto muy grande debido a las instalaciones, a la explotación y a la distribución.
- Agua: es un recurso cada vez más valioso, empleado como disolvente, refrigerante,... Comporta una serie de impactos por las instalaciones de distribución, su tratamiento posterior, vertidos, etc.
- Aire acondicionado y calefacción: utilizados para mantener las condiciones de temperatura de los ensayos de cristalización. Conllevan pequeñas emisiones de refrigerantes y partículas, gastos de electricidad elevados, consumo de recursos, etc.



7.- CONCLUSIONES.

Tras el desarrollo del presente proyecto, se han obtenido las siguientes conclusiones sobre la estructura de secuencias de ADN:

7.1.- Secuencia A(AT)₄T.

Las mejores condiciones de cristalización de esta secuencia son con una relación de oligonucleótido-espermina 1:3, con tampón de cacodilato de sodio pH 6,5, utilizando MPD como precipitante y sin sal añadida en la gota. La temperatura más favorable es 13°C y la cristalización requiere unos meses por lo general.

Se consiguen varitas de una longitud media de 200 μm y bordes rectos, que al difractar dan como máximo 3,1 Å de resolución. Empleando el reemplazo molecular con un modelo de la forma B del ADN ideal, se ha obtenido una solución válida aunque de correlación baja (68%). Dicha solución muestra un empaquetamiento por columnas infinitamente largas de dúplex sin interacciones laterales, dentro de una celdilla hexagonal de a, b y c iguales a 44,7; 44,7 y 197,7 Å con ángulos 90°, 90° y 120°.

En la celdilla unitaria caben seis dúplex completos por columna, el grupo espacial que mejor resultado da es P3₂21 y el apareamiento entre bases es del tipo Watson-Crick (estructuras HASO). La resolución sin embargo no basta como para colocar exactamente el modelo. Prueba de ello es que los mapas de densidad muestren bandas que no corresponden con el modelo.

7.2.- Secuencia A(AT)₃T.

Las mejores condiciones de cristalización son con una relación de oligonucleótido-espermina de 1:3, con tampón de cacodilato de sodio pH 6, utilizando MPD como precipitante y con una concentración baja (10 mM) de BaCl₂. La temperatura óptima es de 13°C y la cristalización se produce tras unos meses de haber hecho la gota.

Los cristales obtenidos tienen forma de varitas finas y alargadas, que pese a difractar lo hacen con poca resolución (6 Å). Una orientación inadecuada no permite integrar correctamente los diagramas, por lo que los errores estadísticos del procesado son elevados (20%). Debido a similitudes de la celdilla encontrada con la celdilla de la secuencia anterior (hexagonal, 44,6x44,6x295,89 Å y 90°, 90°, 120°), se cree que el empaquetamiento de esta secuencia también es por columnas infinitas, aunque esta vez en cada celdilla entran 11 dúplex por columna en lugar de 6.



7.3.- Secuencia A(AT)₅T.

Las mejores condiciones de cristalización observadas son exactamente las mismas que para la secuencia A(AT)₄T, y de igual forma que con ésta, los cristales tardan meses en aparecer. Parece ser la secuencia más difícil de cristalizar.

Se consiguen varitas cortas y rectas, de características similares a las de A(AT)₄T, pero de menor tamaño, y que difractan peor. Muestran un mayor desorden interno que dificulta su procesado. En principio se obtiene una celdilla pequeña de características similares a las anteriores, con a, b y c iguales a 45,8; 45,8 y 38,64 Å y con ángulos 90°, 90° y 120°. La presencia de difracciones muy próximas en la dirección meridional deja entrever que en realidad el eje c es mucho mayor (entre 500 y 600 Å). Al tener el mismo tipo de celdilla que el resto de secuencias se piensa que el empaquetamiento también coincide, formando las columnas infinitas sin interacción lateral con entre 14 y 16 dúplex por columna dentro de la celdilla unitaria.

7.4.- Secuencia AAU^{Br}(AT)₃T.

Cristaliza en las mismas condiciones que su secuencia equivalente, A(AT)₄T, y da el mismo tipo de varitas rectas, aunque de menor tamaño. El procesado de los diagramas de difracción muestra que la celdilla es prácticamente la misma entre cristales de estas dos secuencias por lo que se puede suponer que sus estructuras serán iguales.

7.5.- Similitudes entre las secuencias.

- Todas las secuencias tienen como mejor relación oligonucleótido-spermina la relación 1:3. Al emplear PEG como precipitante sólo se consiguen agregados laminares en forma de mosaico.
- Sólo se obtienen cristales válidos a 13°C y meses después de hacer la gota.
- El BaCl₂ es la sal que da mejores resultados, aunque sólo en el caso de A(AT)₃T mejora los cristales obtenidos sin sal. El tampón utilizado no parece influir.
- Los cristales congelados tienen un contenido muy alto en disolvente, por lo que no difractan hasta resoluciones altas.
- Todas parecen empaquetarse siguiendo la estructura HASO, aunque varían el número de dúplex por columna que caben en la celdilla unitaria. La única secuencia en la que se ha comprobado este empaquetamiento es A(AT)₄T.
- Las secuencias A(AT)₃T y A(AT)₅T poseen una pseudoceldilla con longitud c menor debido al giro global de un dúplex respecto del siguiente, que dificulta mucho su procesado. En el caso de A(AT)₅T, la longitud del parámetro c es tan grande que las difracciones se solapan unas con otras haciendo imposible un procesado.



AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, debo decir que me introduje en la cristalografía de macromoléculas gracias a la concesión de una beca del MEC y gracias al Dr. Juan Antonio Subirana, que me ofreció un lugar en el departamento de Ingeniería Química y todos los consejos que necesité.

Quisiera agradecer el apoyo, los ánimos y la inyección de moral de todos los compañeros que he tenido a lo largo de mis estudios. Y muy especialmente a tres chicas que llevan mucho tiempo aguantándome: Alicia, Icíar y Guía.

También me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todo el personal del departamento en el que he tenido la suerte de trabajar. Siempre consiguen que cualquier labor se torne mucho más llevadera. Especialmente quisiera destacar a las Dras. Lourdes Campos y Núria Valls y a Trinidad Sanmartín, por haberme ayudado especialmente a realizar este proyecto.

Por último, debo citar a mi familia, y en particular a las tres personas más importantes de mi vida: mis padres y mi hermano. Todo lo que he conseguido se lo debo a ellos y por ese motivo les dedico este proyecto.



BIBLIOGRAFÍA.

- BRÜNGER A.T. *Nature*. **355**, 472-475 (1992).
- BRÜNGER A.T., KURIYAN J., KARPLUS M. *Science*. **235**, 458-460 (1987).
- BUERGER M.J. *The photography of the reciprocal lattice*. American society for X-ray and electron diffraction. Washington D.C. (1944).
- CANTOR C.R., WARSHAW M.M., SHAPIRO H., *Biopolymers*. **9**, 1059-1077 (1970).
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763 (1994).
- deJONG W.F., BOUMAN J. *Physica*. **5**, 220 (1938).
- DUCRUIX A., GIEGÉ R. *Crystallization of nucleic acids & proteins*. IRL Press. Oxford (1992).
- GLUSKER J. *Crystal structure analysis for chemists and biologists*. VCH Publishers, Inc. (1994).
- MOLECULAR SIMULATIONS Inc. *Cerius²*. Burlington. MA. [software]
- MURSHUDOV G.N., VAGIN A.A., DODSON E.S. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255 (1997).
- OTWINOSKY Z., MINOR W. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326 (1997).
- RAVELLI R.G.B., SWEET R.M., SKINNER J.M., DUISENBERG A.J.M., KROON J.J. *Appl. Cryst.* **30**, 551-554 (1997).
- READ R.J., *Maximum Likelihood in Protein Crystallography*. [http://speedy.st-and.ac.uk/~naismith/workshop/ml_notes.html, 4 de julio de 2005].
- ROUSSEL A., INISAN A.G., KNOOPS-MOUTHUY E., CABBILLAU E. *TURBO-FRODO version OpenGL.1*. University of Marseille (1998). [software]
- SUBIRANA J.A., VIVES J.L. *Biopolymers*. **20**, 2281-2283 (1981).
- URPÍ L., CAMPOS L., VALLS N., SANMARTÍN T., ALECHAGA E., BALDINI R., de LUCHI D., RICHTER M., SANTAOLALLA A., GOUYETTE C., SUBIRANA J.A., J. *Biomol. Struct. Dyn.* **22**, 847 (2005).
- VAGIN A.A., TEPLYAKOV A.J. *Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025 (1997).
- WEESTERBROOK E.M., NADAY I. *Methods Enzymol.* **276**, 244-268 (1997).



