

Resumen

En este proyecto se han realizado estudios estructurales de oligonucleótidos de 10 pares de bases, todos ellos ricos en adenina (A) y timina (T). Estas secuencias de ADN son representativas de grandes zonas del genoma que no codifican proteínas y de las cuales no se conoce su función biológica.

El objetivo ha sido formar complejos con diferentes fármacos que pudieran interactuar con el ADN y resolver su estructura.

Esto se ha hecho mediante la técnica de difracción de rayos X de monocristal. Esta técnica es muy precisa y puede llegar a escalas atómicas ya que utiliza longitudes de onda comparables a las distancias interatómicas, aunque como inconvenientes tiene que es muy cara, lenta y laboriosa.

Concretamente hemos trabajado con las siguientes secuencias de ADN:

- d(ATATATATAT)₂ abreviado: (AT)₅.
- d(AATATATATT)₂ abreviado: A(AT)₄T.
- d(TATATATATA)₂ abreviado: (TA)₅.
- d(CATATATATG)₂ abreviado: C(AT)₄G.

Se han hecho estudios de cristalización de todos ellos en presencia de fármacos que interactúan en el surco estrecho del DNA como son el Berenil, la Pentamidina y el DAPI.

De esta manera se han obtenido varios cristales, los cuales se han analizado por difracción de rayos X en el sincrotrón de Grenoble (ESRF).

De todos ellos tan solo hemos podido resolver la estructura del oligonucleótido (AT)₅ en presencia de Pentamidina ya que todos los demás cristales obtenidos no tuvieron suficiente resolución.

Analizando la estructura resuelta hemos podido ver como la Pentamidina se aloja en el surco estrecho del oligonucleótido y sus extremos cargados interactúan con los fosfatos de nucleótidos vecinos, ejerciendo así una función de entrecruzamiento y dando más estabilidad al cristal. Ésta es una interacción fármaco-ADN nunca vista hasta el momento.





Sumario

RESUMEN	1
SUMARIO	3
1. GLOSARIO	7
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Origen del proyecto	9
2.2. Motivación	10
2.3. Objetivos del proyecto.....	10
2.4. Alcance del proyecto.....	10
3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA	11
3.1. El ADN.....	11
3.1.1. Estructura secundaria del ADN.....	12
3.1.2. Ángulos de torsión	14
3.1.3. Hidratación del ADN	17
3.1.4. Interacción del ADN con iones.....	18
3.1.5. Interacción del ADN con fármacos	19
3.1.6. Papel de las regiones ricas en ATs	20
3.2. El material cristalino.....	21
3.2.1. Índices de Miller	24
3.3. Difracción de rayos X.....	25
3.3.1. Espacio recíproco	26
3.3.2. Generación de rayos X.....	28
3.3.3. Métodos de resolución de la estructura cristalina.....	30
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	33
4.1. Obtención de cristales	33
4.1.1. Difusión de vapor	33
4.1.2. Metodología de gota colgante	34
4.1.3. Condiciones de cristalización.....	35
4.1.4. Variables de cristalización	36
4.1.5. Oligonucleótidos utilizados	39
4.1.6. Fármacos utilizados	41
4.1.7. Pesca de cristales.....	43



4.2. Difracción de los cristales. Recogida de datos.....	44
4.2.1. Métodos de recolección de datos.....	47
4.2.2. Variables del método de oscilación.....	48
4.3. Resolución de la estructura.....	49
4.3.1. Indexado.....	49
4.3.2. Procesado y escalado.....	51
4.3.3. Aplicación del reemplazo molecular.....	52
4.3.4. Afinado.....	54
4.3.5. Cálculo de los mapas de densidad.....	57
4.3.6. Validación de la estructura.....	59
4.3.7. Listado de programas utilizados.....	59
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1. Estudios de cristalización de la secuencia d(AATATATATT) ₂ / A(AT) ₄ T en presencia de fármacos.....	63
5.1.1. Resultados con las diferentes drogas.....	63
5.1.2. Cristales obtenidos.....	64
5.1.3. Recogida de datos y procesado.....	65
5.2. Estudios de cristalización de la secuencia d(CATATATATG) ₂ / C(AT) ₄ G sola y en presencia de fármacos.....	67
5.2.1. Resultados con los diferentes fármacos.....	67
5.3. Estudios de cristalización de la secuencia d(TATATATATA) / (TA) ₅ en presencia de PNT y BRN.....	68
5.3.1. Resultados obtenidos.....	69
5.4. Estudios de cristalización de la secuencia d(ATATATATAT) ₂ / (AT) ₅ en presencia de fármacos.....	69
5.4.1. Resultados con la Pentamidina.....	70
5.4.2. Resultados con el Berenil.....	71
5.4.3. Resultados con el DAPI.....	72
5.4.4. Cristales obtenidos.....	72
5.5. Resolución de la estructura del oligonucleótido d(ATATATATAT) ₂ / (AT) ₅ en presencia de PNT.....	74
5.5.1. Recogida de los datos y procesado.....	74
5.5.2. Afinado de la estructura.....	76
5.5.3. Descripción de la estructura.....	79
5.5.4. Discusión.....	87



6. EVALUACIÓN ECONÓMICA	89
7. IMPACTO AMBIENTAL	93
CONCLUSIONES	95
AGRADECIMIENTOS	97
BIBLIOGRAFÍA	99
Referencias bibliográficas	99
Bibliografía complementaria. (libros, tesis, proyectos, webs, manuales)	101
ANEXO : GOTAS REALIZADAS	103
I. Placa TM-1. [(AT) ₅ + PNT]	103
II. Placa TM-2. [(AT) ₅ + PNT y BRN].....	107
III. Placa TM-3. [(AT) ₅ con Berenil]	111
IV. Placa TM-4. [C(AT) ₄ G solo y con PNT]	118
V. Placa TM-5 [(TA) ₅ con BRN y PNT].....	126
VI. Placa TM-6. [(AT) ₅ - DAPI].....	134
VII. Placa TM-Milhausen. [C(AT) ₄ G con BRN y DAPI].....	140
VIII. Cápsulas.	147





1. GLOSARIO

ADN, DNA	Ácido desoxiribonucleico
Oligo	Oligonucleótido
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facilities</i>
PNT	Pentamidina [1,5-bis(4-amidinofenoxi) pentano]
BRN	Berenil (diminazeno aceturato)
DAPI	4',6- diaminodino-2- fenilindol
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
NaCac	Cacodilato de sodio
MPD	2-metil-2,4 pentanodiol
mM	Milimolar (milimol/ litro)
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
PEG	Polietilenglicol
UV	Ultravioleta
WC	Watson – Crick





2. INTRODUCCIÓN

El ADN es una de las moléculas más importantes y estudiadas de nuestro tiempo al intervenir en la transcripción, expresión y conservación de la información genética de todos los seres vivos del planeta. Por ello su estudio es de vital importancia para comprender aspectos desde cómo funcionamos, o cómo podemos actuar para frenar enfermedades como el cáncer, hasta aspectos de la evolución de los seres vivos, que han quedado marcados en esta molécula. Por ejemplo el hecho de que todos los organismos conocidos tengan el mismo código genético, que es la manera en que se “lee” el ADN para formar proteínas, ha confirmado que todos ellos provienen de un antepasado común.

Desde que se descubrió su estructura por Watson y Crick (1953), se pensaba que ésta no podía presentar muchos cambios, pero con el tiempo se ha visto que esto no es así. La molécula de ADN presenta varias conformaciones y además la manera con la que se aparean sus bases nitrogenadas tampoco es única.

Una de las cosas que influyen en que el ADN presente una u otra conformación es por ejemplo la presencia de agua en el medio, o de ciertos iones, así como también la secuencia del mismo.

La presencia de ciertos fármacos puede afectar también a las propiedades y a la estructura del ADN, cosa que se puede utilizar en ámbitos médicos como por ejemplo en la mejora de las propiedades de los fármacos anticancerígenos, antibióticos, etc.

2.1. Origen del proyecto

Se conoce que una gran zona del genoma es rica en adenina (A) y timina (T). Estas regiones se denominan *non coding DNA* ya que no codifican ninguna proteína y su función biológica es desconocida. Por este motivo es muy interesante conocer la estructura de secuencias representativas de estas regiones.

Además, en las secuencias alternantes se ha encontrado un apareamiento Hoogsteen entre los pares de bases (Abrescia *et al.*, 2002), en vez del apareamiento Watson-Crick, que es el más común. Por lo tanto también resulta interesante determinar las condiciones que favorecen este tipo de apareamiento.



2.2. Motivación

Aunque la enseñanza de ingeniería química es interdisciplinaria, la cristalografía de macromoléculas es un campo desconocido para un ingeniero. Aún así todos los conocimientos matemáticos, físicos y químicos adquiridos durante la carrera hacen que la adaptación sea rápida.

La realización de un proyecto de estas características supone un enriquecimiento muy grande de conocimientos, ya que la cristalografía de macromoléculas es un campo que tiene detrás una base teórica muy compleja. Además, para la resolución final de la estructura hay que conocer toda una serie de programas informáticos para el tratamiento de los datos. También tiene una parte experimental muy laboriosa y lenta, en la cual uno adquiere experiencia y se familiariza con las técnicas y los métodos de trabajo de un laboratorio de investigación.

2.3. Objetivos del proyecto

Los objetivos del proyecto son la determinación de la estructura de los oligonucleótidos utilizados en presencia de los fármacos que interaccionan con el ADN, y ver si estos estabilizan una determinada estructura secundaria o un tipo de apareamiento concreto entre las bases nitrogenadas.

La técnica que utilizaremos para determinar todo esto será la difracción de rayos X de monocristal.

2.4. Alcance del proyecto

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

- Estudios de cristalización de cada secuencia con cada fármaco, buscando aquéllas que sean óptimas para la obtención de cristales.
- Recogida de datos en el sincrotrón de Grenoble, Francia, (ESRF).
- Análisis de los diagramas de difracción para la resolución de la estructura, empleando los métodos de reemplazo molecular, con su posterior validación.



3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

En este apartado se detallan brevemente los aspectos teóricos más importantes para la comprensión del proyecto.

3.1. EL ADN

El ácido desoxiribonucleico es un biopolímero constituido por una unidad estructural llamada nucleótido. Cada nucleótido está constituido por un fosfato, un azúcar de cinco carbonos, la β -D-2-desoxiribosa, y por una base nitrogenada.

En el ADN hay cuatro tipos de nucleótidos que se diferencian únicamente por la base nitrogenada que llevan enlazada. Así tenemos 4 bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina. Estructuralmente, la base nitrogenada puede ser derivada de una purina, como es el caso de la adenina y la guanina, o de una pirimidina, como en la timina y la citosina.

Los nucleótidos se unen entre ellos mediante un enlace fosfodiéster (figura 3.1) entre el carbono 3' del azúcar de uno y el carbono 5' del azúcar del siguiente definiendo la orientación de la cadena.

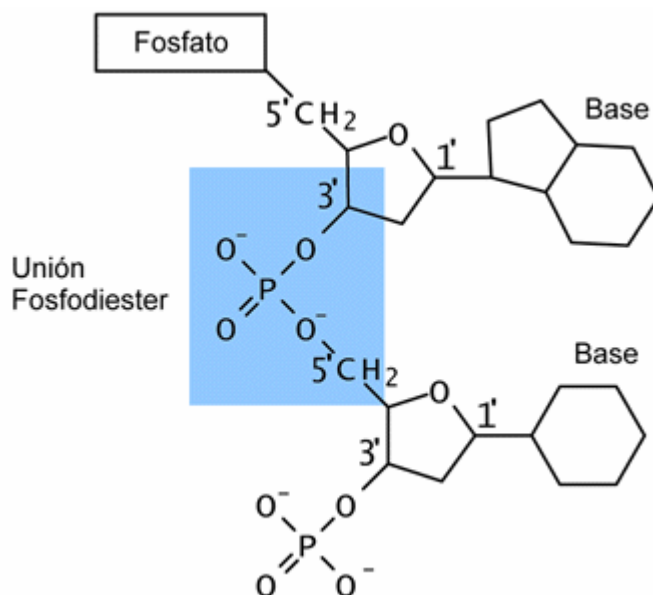


Figura 3.1: Detalle del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos. Notar que el fosfato establece el enlace entre el carbono C3' de uno y el C5' del siguiente. Podemos observar también que cada nucleótido está formado por una base nitrogenada, un azúcar y un fosfato.



3.1.1. Estructura secundaria del ADN

La molécula se estructura de manera que dos cadenas se disponen de forma antiparalela (una con orientación 5'→ 3' y la otra 3'→ 5') con sus bases nitrogenadas enfrentadas y estableciendo entre ellas puentes de hidrógeno.

Decimos que las dos cadenas son complementarias. Si conocemos la secuencia de una podemos determinar fácilmente la de la otra ya que una determinada purina siempre queda enfrentada con una pirimidina concreta y a la inversa. Concretamente la adenina sólo se une a la timina y la citosina a la guanina.

La doble cadena o dúplex se enrolla en forma de doble hélice dextrógira con un surco mayor y otro menor, tal y como se ve en la figura 3.2. La diferencia en los parámetros de hélice da lugar a las diferentes formas de ADN que conocemos (A, B, C, D y Z). La llamada forma B, es la más importante biológicamente ya que es la que se encuentra mayoritariamente en nuestras células. Tiene una media de 10 pares de bases por vuelta, un paso de hélice de 33.8 Å y un diámetro de aproximadamente 20 Å. Por lo tanto la separación entre pares de bases consecutivos o stacking es de 3.38 Å aproximadamente.

La adopción de una determinada forma por el ADN viene determinada por las condiciones del medio en el que éste se encuentra (presencia de agua, de ciertos iones o fármacos), así como de la secuencia del mismo.



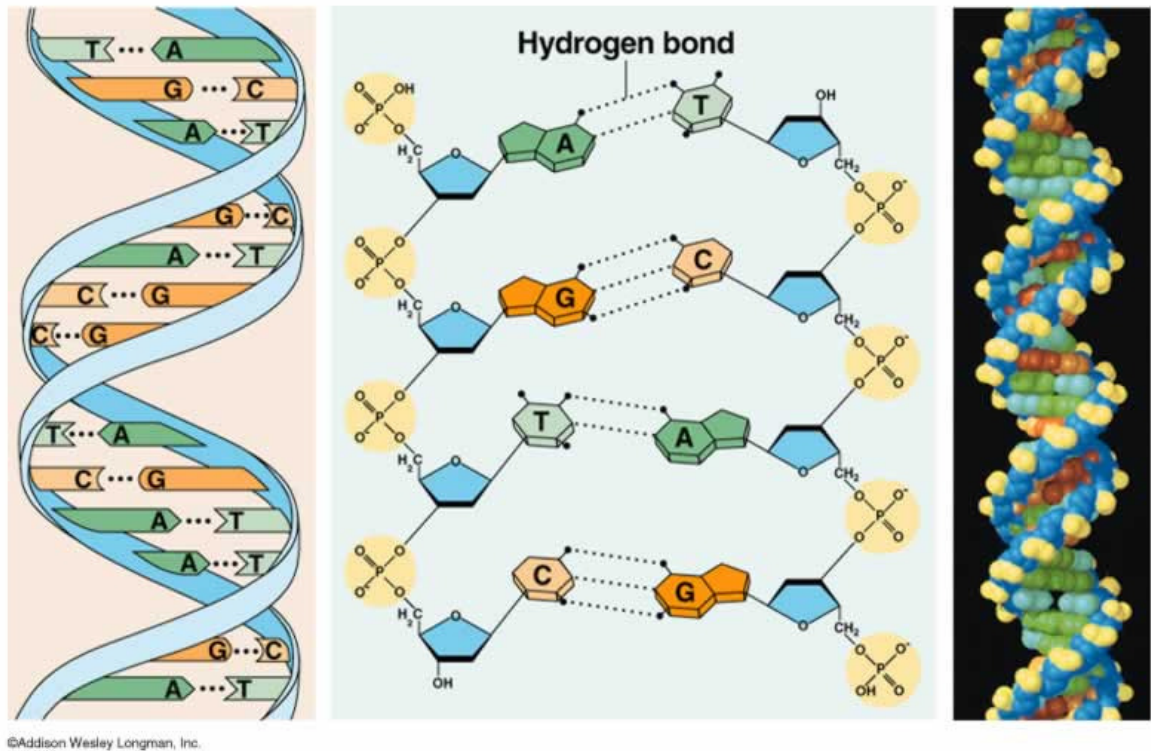


Figura 3.2: Estructura secundaria del ADN. En la imagen central podemos ver en detalle como se emparejan las bases. Vemos que entre G y C se forman 3 puentes de hidrógeno, mientras que entre T y A sólo dos.

Por lo que se refiere al apareamiento entre pares de bases tampoco es único. El más común es el Watson-Crick, pero, por ejemplo, también tenemos el Hoogsteen, que se obtiene girando 180° la purina respecto al enlace glucosídico (aquél que une al azúcar con la base nitrogenada) y dejando la pirimidina igual. De esta manera, los enlaces por puentes de hidrógeno que se forman son diferentes que en el caso de un apareamiento Watson-Crick.

Existen además unos parámetros de rotación y traslación de un par de bases o de dos pares de bases consecutivos. Los más importantes de estos son el twist (giro) y el rise (ascensión), que se presentan en la figura 3.3. El primero es un parámetro de rotación y el segundo de traslación.



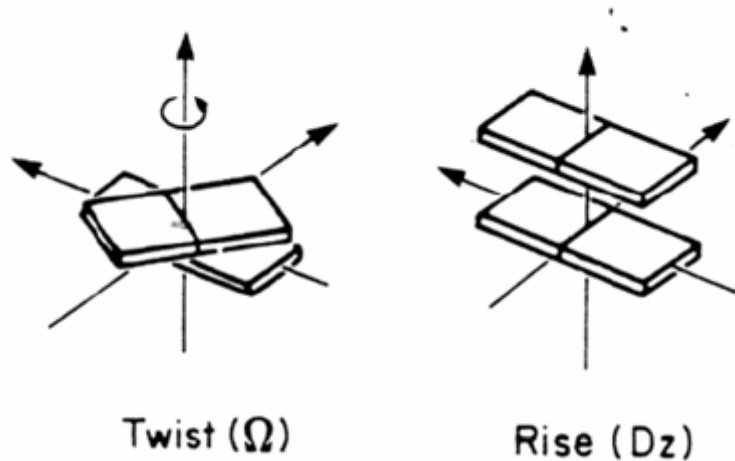


Figura 3.3: Representación del parámetro de rotación twist (o giro) y del parámetro de translación rise (o ascensión) para dos pares de bases consecutivos (Dickerson, 1989).

La estabilidad de la doble hélice se consigue por una serie de factores:

- El apantallamiento de las cargas negativas de los fosfatos por cationes presentes en el medio.
- El apilamiento entre las bases a través de fuerzas hidrofóbicas y de Van der Waals.
- Los puentes de hidrogeno entre las bases de diferentes cadenas.
- La humedad relativa.

3.1.2. Ángulos de torsión

Los ácidos nucleicos presentan una gran flexibilidad debido a los ángulos de torsión permitidos en su esqueleto de azúcares y fosfatos (figura 3.4). Estos ángulos son $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ siguiendo los átomos $P \rightarrow O5' \rightarrow C5' \rightarrow C4' \rightarrow C3' \rightarrow O3' \rightarrow P$. Los ángulos de torsión del azúcar son $\nu_0 - \nu_4$, y el ángulo χ es el giro a través del enlace glucosídico y determina la posición de la base nitrogenada respecto al azúcar.



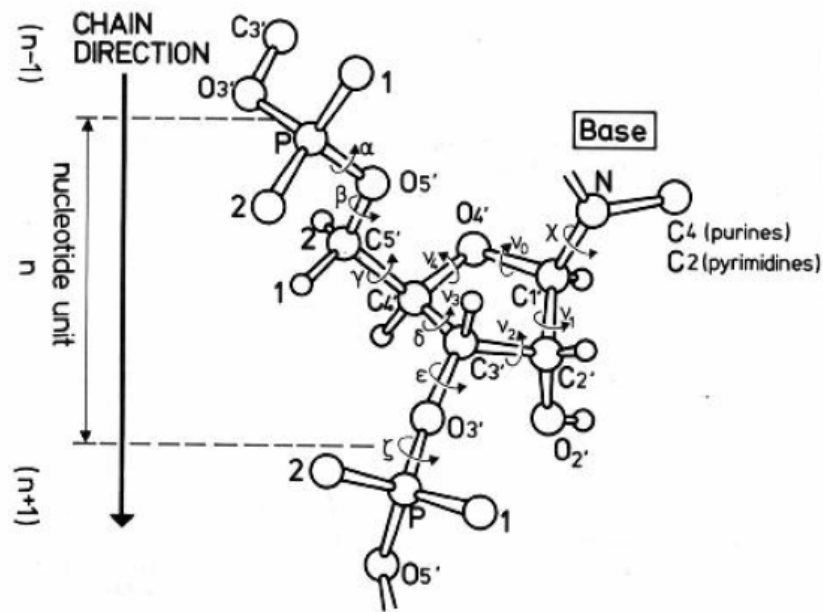


Figura 3.4: Ángulos de torsión en el esqueleto del ADN.

Ya que los átomos del azúcar forman un anillo, los ángulos de torsión intracíclicos, ν_0 - ν_4 , dependen los unos de los otros. Las conformaciones que puede adoptar el azúcar son muchas, pero las más importantes son las conformaciones *exo* y *endo*, de las cuales hay dos tipos según el átomo afectado. Se muestran en la figura 3.5.a

Por lo que respecta a la base nitrogenada, puede presentar dos conformaciones al girar a través del enlace glucosídico, la *syn* y la *anti*. En la conformación *syn*, la parte más voluminosa del anillo se sitúa en dirección hacia el azúcar, y en la *anti* se sitúa en dirección contraria. Podemos ver unas representaciones de ambas en la figura 3.5.b



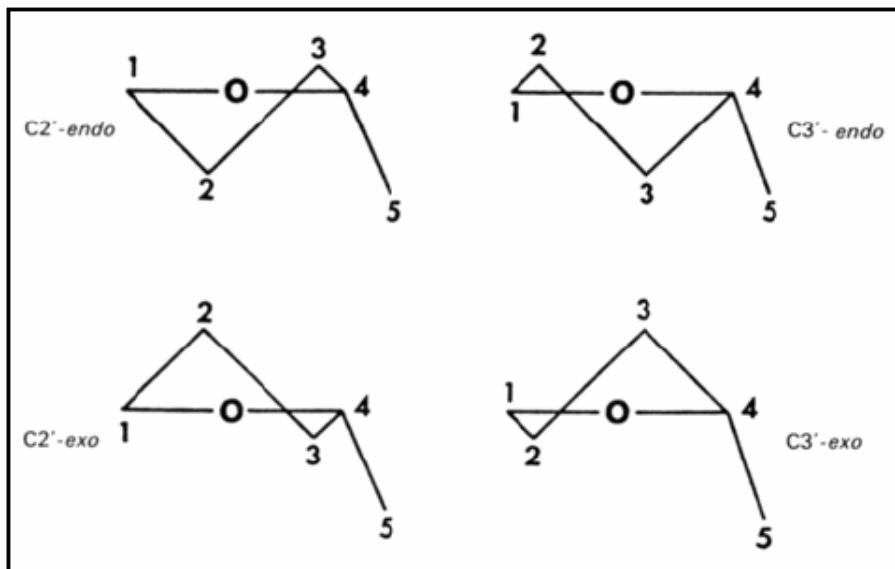


Figura 3.5(a): Las cuatro principales conformaciones que presenta el azúcar en el ADN. (Subirana, 1985)

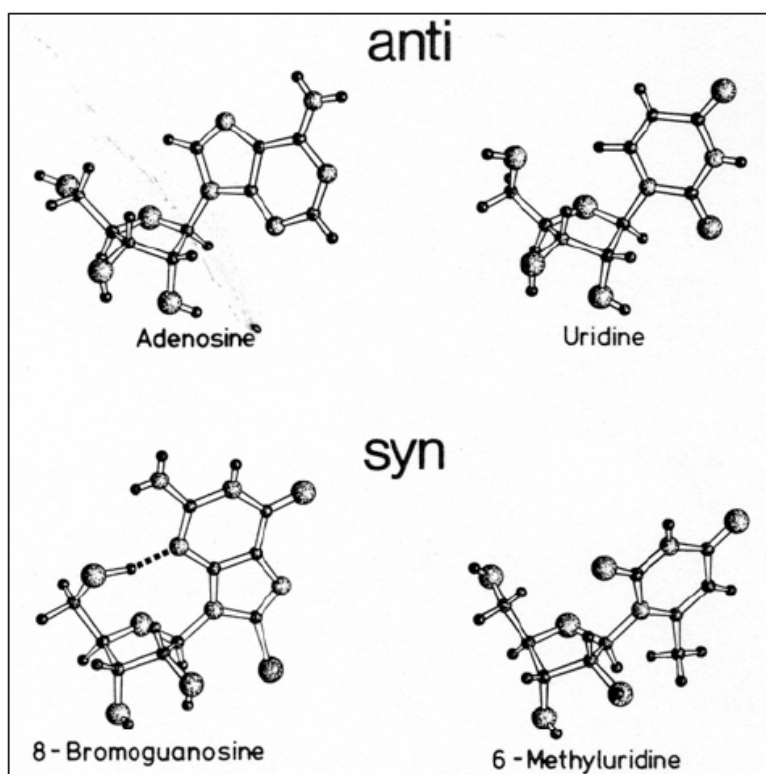


Figura 3.5(b): Conformaciones syn y anti para varios nucleósidos (azúcar y base) (Saenger, 1984).



3.1.3. Hidratación del ADN

El agua tiene un papel muy importante en la estabilización de la estructura del ADN, ya que sus moléculas interactúan con los fosfatos cargados negativamente de su esqueleto, disminuyendo así las repulsiones electrostáticas entre estos.

Por ejemplo la forma B del DNA, aquella que predomina en los seres vivos, se obtiene en ambientes de alta humedad (como sería el medio celular). En cambio si deshidratamos la molécula obtenemos las otras formas A, C, D o Z, según los iones que haya presentes en el medio y la secuencia del oligonucleótido.

Con el objetivo de determinar de qué manera interactuaban las moléculas de agua con el ADN, Falk *et al.* (1963) hicieron un estudio del espectro infrarrojo del ácido nucleico variando la humedad. Se vio que el agua interactúa primero con los fosfatos, seguidamente con los azúcares, y por último con las bases.

A través de otros estudios también se pudo comprobar la presencia de una capa estática de aguas en la superficie del ADN. Pero no fue hasta la utilización de la técnica de difracción de rayos X, que se pudo llegar a distancias atómicas y poder localizar las moléculas de agua en el ADN.

A partir del estudio de cristales de oligonucleótidos, se diferenció la parte de moléculas de agua ordenadas en una capa primaria y otra secundaria (Tunis i Hearst, 1968). La capa primaria de aguas se diferencia claramente de las moléculas desordenadas de disolvente. Está formada por 11-12 aguas por nucleótido unidas con fuerza decreciente a los fosfatos, azúcares y bases. La segunda capa de aguas, en cambio, no está tan ordenada y es más difícil de diferenciar de la parte desordenada de disolvente.

Con los estudios realizados por Schneider y Berman (1995), para poder predecir el esqueleto de aguas presente en una cadena de ADN con la forma B, se descubrió que las bases purínicas (adenina y guanina) tienen una hidratación muy parecida, y lo mismo pasa con las pirimidínicas (timina y citosina). También se vio que la hidratación de las bases en el oligonucleótido es muy parecida a la hidratación de las bases solas.

Otro aspecto a destacar es la diferente accesibilidad de las moléculas de agua según el par de bases. Así, el par de bases AT, se puede hidratar con una o dos moléculas más de agua que el par de bases CG.



También se ha detectado un esqueleto de aguas característico y constante en el surco estrecho de la región AATT de muchos oligonucleótidos. Esta región está presente en el dodecámero de Dickerson $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ muy utilizado en cristalografía de ácidos nucleicos.

3.1.4. Interacción del ADN con iones

Los iones también tienen un papel importante en la estabilización de la estructura del ADN, así como en la función de algunas enzimas y en procesos celulares como la replicación, la transcripción y la traducción (Eichhorn, 1973).

Pueden interactuar de dos maneras con el ADN: de una manera difusa, por apantallamiento de cargas, o bien mediante una unión específica. La primera forma de interacción no depende de la secuencia del ADN, mientras que la segunda sí. Normalmente, los iones interactúan con el ADN a través de moléculas de agua. Aún así, también se conocen uniones ión-ADN, como en el caso de los iones Co^{2+} y Ni^{2+} con el N7 de la guanina.

Los sitios concretos de un nucleótido con los que puede interactuar un determinado ión (figura 3.6) son: los fosfatos, los grupos hidroxilo del azúcar, los nitrógenos de los anillos de las bases nitrogenadas y los grupos ceto de las bases. Después, cada ión tiene sus propias características e interactúa de una manera diferente con el ADN.

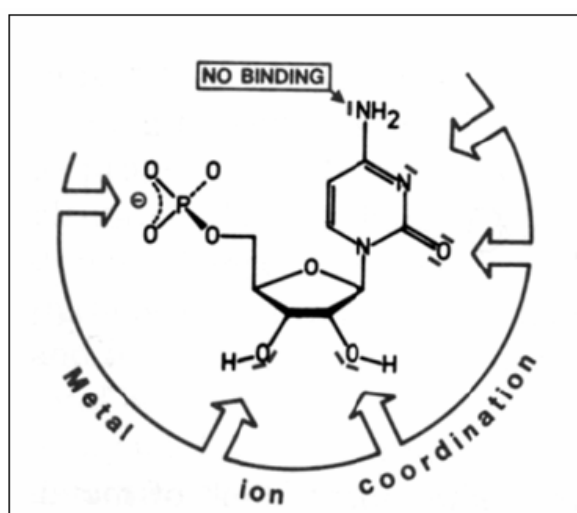


Figura 3.6: Posibles sitios de interacción de un ión con el ADN (Saenger et al., 1984).



En el caso de la cristalografía de oligonucleótidos, la presencia de ciertos iones a concentraciones adecuadas puede ser determinante en la estabilización del cristal, y por lo tanto en su obtención.

Como ya se ha dicho, los iones pueden favorecer una cierta forma del ADN y producir cambios en los parámetros de hélice (Soumpasis, 1985).

Hay que tener en cuenta que, por lo general, todos los iones están hidratados, se puedan detectar sus aguas de coordinación o no.

3.1.5. Interacción del ADN con fármacos

Los fármacos interaccionan con el DNA pudiendo interferir en procesos importantes como son la transcripción y la replicación del material genético.

Se pueden dividir en tres grupos:

- Los fármacos que interaccionan covalentemente, como sería el caso del cis-Platino.
- Los fármacos que se intercalan entre los pares de bases.
- Los fármacos que se posicionan en los surcos del ADN.

En este proyecto, todas las drogas que utilizamos son de este último grupo, y en concreto, interaccionan todas ellas con el surco estrecho del ADN.

Hay muchos fármacos que se sabe que interaccionan con el surco estrecho (Zimmer y Wähnert, 1986) y que tienen diversas aplicaciones terapéuticas. Normalmente son moléculas alargadas, para poder seguir el curso del surco estrecho, y con anillos aromáticos que se acomodan por fuerzas hidrofóbicas en el mismo.

Se ha visto también que muchos de ellos se sitúan específicamente en regiones ricas en ATs, como es el caso del Berenil en la figura 3.7, que se sitúa en el surco estrecho central donde la secuencia es AATT.



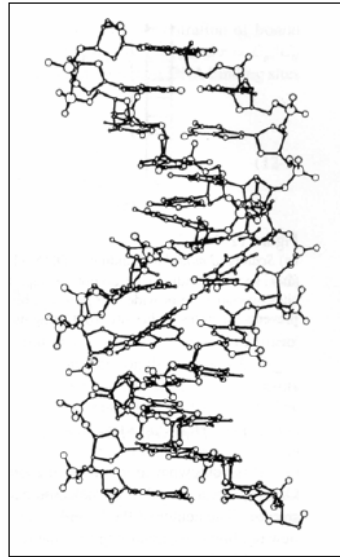


Figura 3.7: Modelo obtenido con RMN del oligonucleótido $d(CGCGAATTCGCG)_2$ que interacciona en su surco estrecho central con el Berenil (Lane *et al.*, 1991).

3.1.6. Papel de las regiones ricas en ATs

Aunque se saben los mecanismos a través de los cuales el material genético se “lee” para después formar proteínas que jugarán papeles diversos en el organismo, ni mucho menos se conoce la función de todo el genoma.

En el genoma humano, y en general en todos los eucariotas, entre un 90 y un 97% del material genético está formado por secuencias más o menos repetitivas que no son traducidas a proteínas. Y entre todo este *ADN no codificante* abundan las secuencias ricas en pares de bases ATs (Field y Wills, 1996; Tóth *et al.*, 2000; Katti *et al.*, 2001). Un caso muy representativo es el de la ameba *Dictyostelium discoideum*, que tiene un contenido de ATs de un 78% en su genoma (Eichinger *et al.*, 2005).

Es por este motivo que es interesante el estudio de qué estructura pueden presentar estas zonas del genoma (Campos *et al.*, 2006), para comprender mejor que función desempeñan. Hasta el momento se ha visto que estas secuencias presentan un elevado polimorfismo (Leslie *et al.*, 1980; Zuo *et al.*, 1990).



También se ha descubierto que secuencias ricas en ATs pueden presentar un emparejamiento de las bases tipo Hoogsteen (figura 3.8) en una estructura en doble hélice antiparalela (Abrescia *et al.*, 2002).

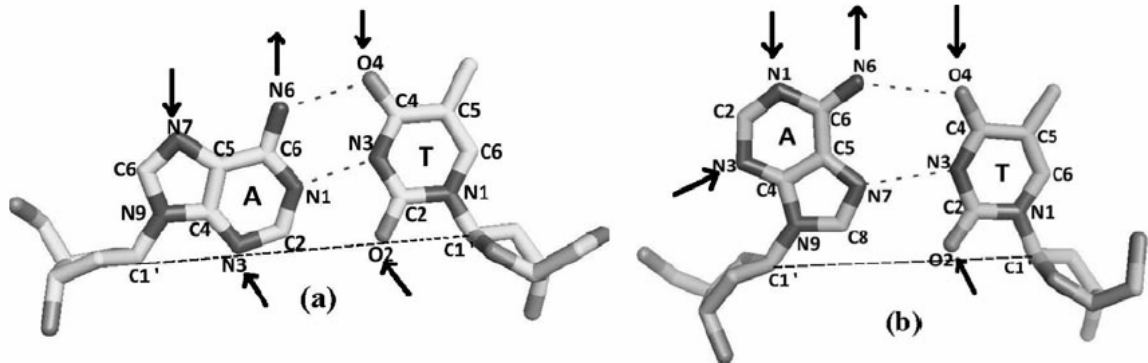


Figura 3.8: Comparación entre un emparejamiento Watson-Crick (a) y uno Hoogsteen (b) entre la adenina y la timina en un dúplex. Los aceptores y donadores de puentes de hidrógeno están indicados con flechas. En las dos imágenes el surco estrecho pasa por abajo. Podemos observar como en el caso Hoogsteen éste es más estrecho, así como la distancia C1'-C1'. Además en el surco estrecho del par WC hay un aceptor más de puentes de hidrógeno (N3), que se encuentra en el surco ancho. Por lo que respecta a la conformación de las bases, es *syn* para la adenina Hoogsteen y *anti* para todas las demás.

3.2. El material cristalino

Los cristales se caracterizan por ser materiales muy ordenados en el espacio. En el caso de la cristalografía de rayos X, los cristales deben ser especialmente ordenados, evitando cualquier tipo de impureza en el medio donde se forman. De esta manera los espectros de difracción que se obtendrán después serán de más calidad (resolución), y así podremos “ver” con más detalle la estructura que queremos estudiar.

La unidad estructural que se va repitiendo a lo largo de las tres direcciones del espacio en material cristalino se llama celdilla unitaria (figura 3.9a). Se caracteriza según los valores de las aristas a , b , c y de los ángulos α , β , γ .



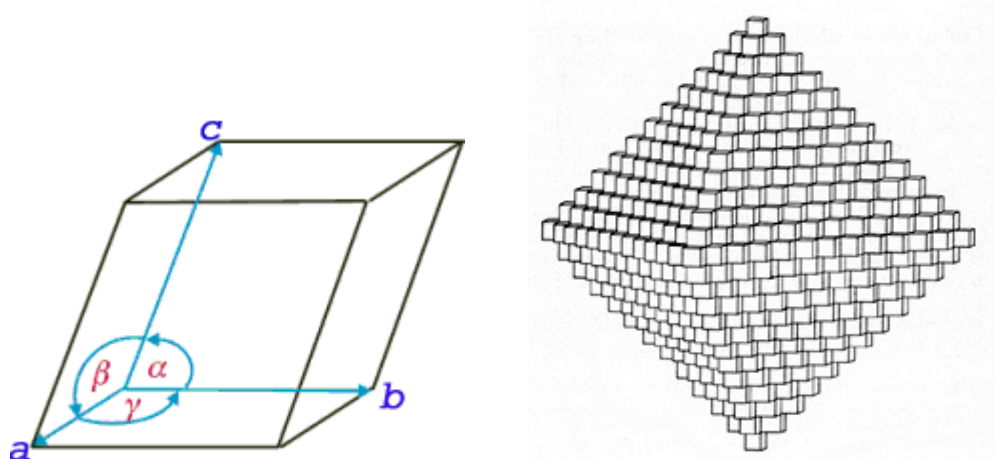


Figura 3.9 (a): A la izquierda podemos observar una celda unitaria con sus aristas a , b , c y sus ángulos α , β , γ . A la derecha vemos la repetición en el espacio de la celda para formar un cristal octaédrico.

En los materiales inorgánicos, la unidad estructural que se repite, está formada por átomos o iones que están enlazados entre sí, formando un *crystal iónico*. En el caso de los materiales orgánicos, en cambio, lo que tenemos son *crisales moleculares*, muchos más blandos e inestables. Esto es debido a que están formados por moléculas ordenadas aisladas (como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, etc...) que interaccionan entre ellas débilmente. En la figura 3.9 *b* podemos ver como se organizan en el espacio estos dos tipos de cristales.

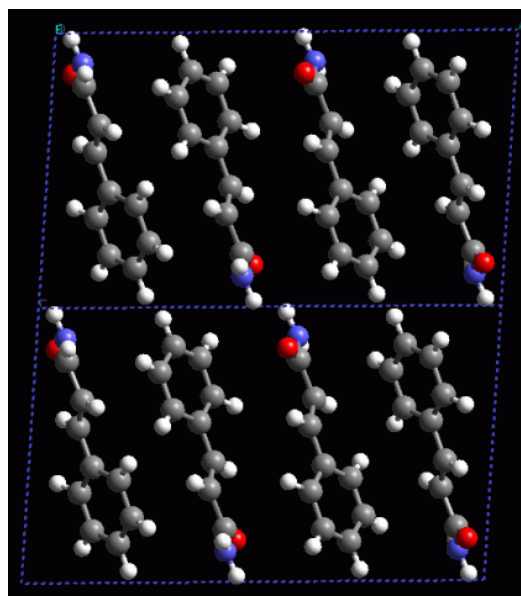
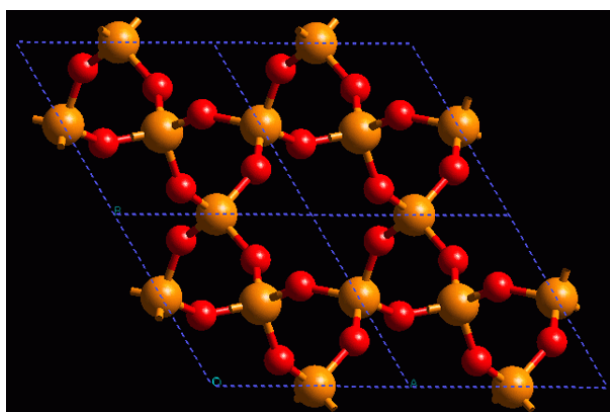


Figura 3.9 (b): A la izquierda, un ejemplo de cristal iónico, donde todos los átomos están enlazados entre ellos dando así más estabilidad al cristal. A la derecha, en cambio, vemos un ejemplo de cristal molecular más inestable, ya que está formado por moléculas aisladas que interaccionan entre ellas por fuerzas de Van der Waals.



Todo aquello que está contenido en la celdilla unitaria, y que recibe el nombre de **unidad asimétrica** o **motivo**, lo podemos representar con un punto imaginario llamado **punto reticular**, obteniendo de esta manera una red de puntos reticulares. Como podemos observar en la figura 3.10, para una misma red de puntos reticulares, podemos establecer más de una celdilla unitaria, por lo tanto no es única (pero sí que hay una que tiene el mínimo volumen).

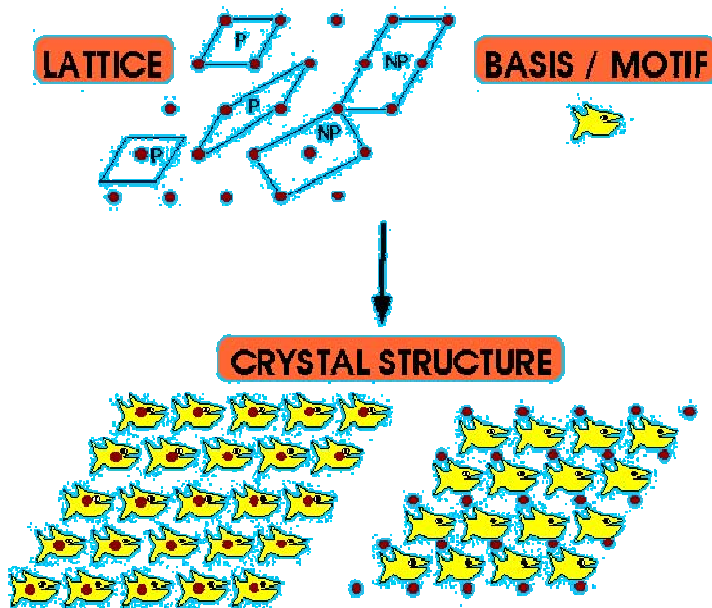


Figura 3.10: Combinación de la red de puntos reticulares con el motivo para formar la estructura del cristal. Notar que para una misma red de puntos reticulares podemos tener más de una celdilla unitaria.

El hecho de que los cristales sean materiales formados por una repetición en el espacio de una celdilla unitaria, hace que estén dotados de una cierta simetría que variará dependiendo de cual sea la naturaleza de dicha celdilla unitaria.

La simetría en el caso de los cristales no es igual que en el caso de un grupo puntual, ya que tiene que ser compatible con la periodicidad en el espacio de éstos. Por ejemplo, no encontramos ejes de simetría de orden 5 en los sistemas cristalinos.

Así, al final, en los sistemas cristalinos tan solo encontramos 32 grupos de simetría que se llaman **clases cristalinas**. A su vez, tan solo encontramos 14 tipos de redes de traslación que son compatibles con estas clases de simetría, son las **redes de Bravais** (figura 3.11).



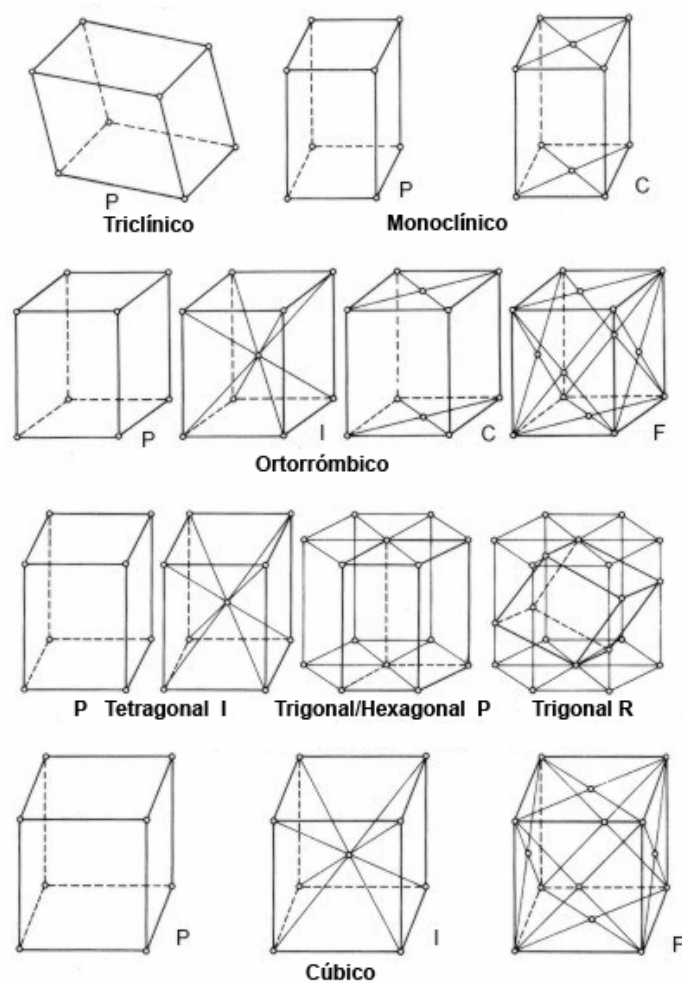


Figura 3.11: Las 14 redes de Bravais.

Finalmente, si combinamos las 32 clases cristalinas existentes con las 14 redes de Bravais posibles, obtenemos las 230 maneras en que podemos disponer un objeto finito (motivo) en el espacio. Son los 230 **grupos espaciales** que se estudian en cristalografía (International union of crystallography, 1969). Pero sólo 65 son posibles para moléculas quirales.

3.2.1. Índices de Miller

Los índices de Miller nos sirven para describir las coordenadas de una familia de planos en el cristal siempre respecto a un punto de referencia que elegimos nosotros. Así podemos describir un plano, con tres parámetros: h, k, l , donde:



$$h = \frac{a}{x} \quad k = \frac{b}{y} \quad l = \frac{c}{z}$$

x , y , z , son los puntos donde el plano corta los tres ejes del espacio.

a , b , c , son las aristas de la celdilla unitaria.

En la figura 3.12 podemos ver una familia de planos cada uno de los cuales tiene los mismos parámetros h , k , l , y que se pueden deducir fácilmente viendo en cuántas partes cortan cada uno de los ejes cristalográficos.

Cada grupo espacial tiene un conjunto de planos cristalinos característicos. Por lo tanto después de analizar la difracción de rayos X de un cristal y deducir sus planos h , k , l , podemos saber a qué grupo espacial pertenece.

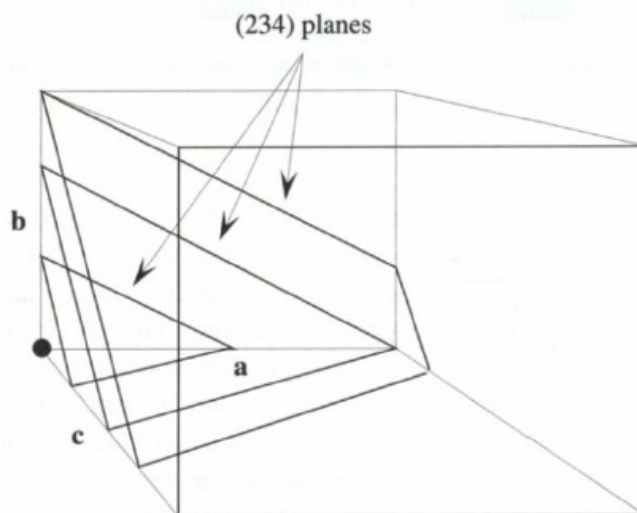


Figura 3.12: Intersección de tres planos de la familia (234) con una celdilla unitaria. Obsérvese que cortan el eje "a" en dos partes iguales, el "b" en tres y el "c" en cuatro.

3.3. Difracción de rayos X

Los rayos X son una parte del espectro electromagnético, con longitudes de onda comprendidas entre 1 y 100 Å, quedando así situados entre la radiación ultravioleta y los rayos gamma.

El descubrimiento de cómo los rayos X interaccionaban con la materia revolucionó el campo de la cristalografía, que hasta el momento sólo se ocupaba de la morfología de los minerales, y permitió poder resolver la estructura interna de los cristales. Gracias a las



aportaciones de Von Laue (1912) y Bragg (1913) sabemos que cuando interaccionan con estructuras de este tipo difractan según unas direcciones determinadas siguiendo la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta_{hkl} \quad (\text{Ec.3.1})$$

Donde n = orden de difracción, λ = longitud de onda, d_{hkl} = distancia entre planos de difracción, y θ = ángulo de incidencia de la radiación.

Esta ley se basa en que los rayos difractados se comportan como si se reflejaran los incidentes sobre los planos del cristal (figura 3.13), es por esto que los rayos difractados se llaman reflexiones.

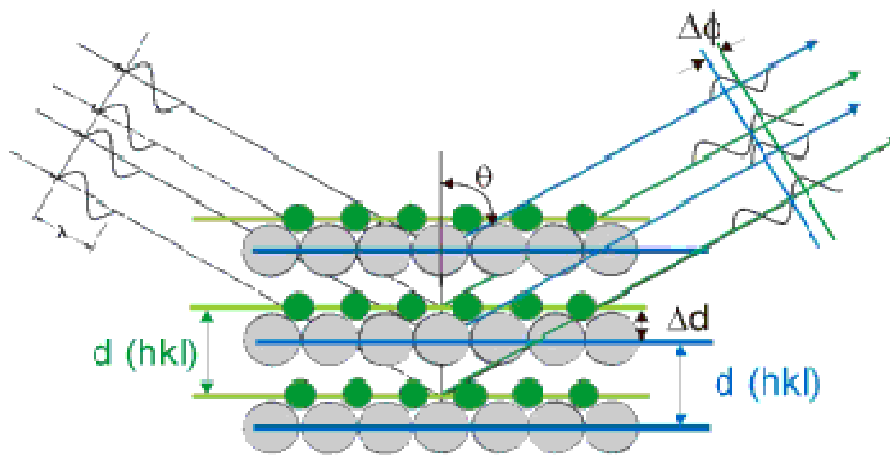


Figura 3.13: Rayos X reflejados sobre los planos de un cristal siguiendo la ley de Bragg.

3.3.1. Espacio recíproco

Además del retículo del cristal en el espacio real, también tenemos un retículo en el espacio de difracción llamado retículo recíproco. De esta manera, la red donde se obtienen todas las reflexiones se llama espacio recíproco. Se llama de esta manera porque tiene la peculiaridad de que las distancias medidas en él tienen un valor inverso en el espacio real. Cada uno de los puntos en este espacio recíproco proviene de una familia de planos de difracción del cristal con unos únicos índices de Miller hkl concretos (figura 3.14).



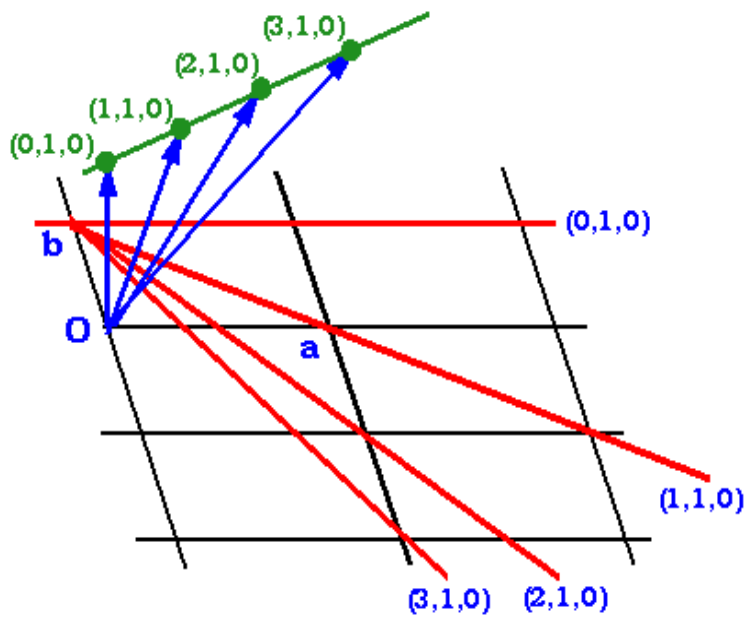


Figura 3.14: En verde, puntos del espacio recíproco que provienen de reflexiones (azul) de planos del espacio real del cristal (negro y rojo).

La esfera de Ewald es una construcción que ideó Ewald en 1921 y que es de mucha utilidad para comprender mejor la relación entre la ley de Bragg, el espacio recíproco y las reflexiones. Esta esfera tiene un radio $1/\lambda$ y cualquier punto del espacio recíproco que corte con la esfera cumplirá la ley de Bragg y por lo tanto será una difracción que podremos observar en el espectro (figura 3.15).



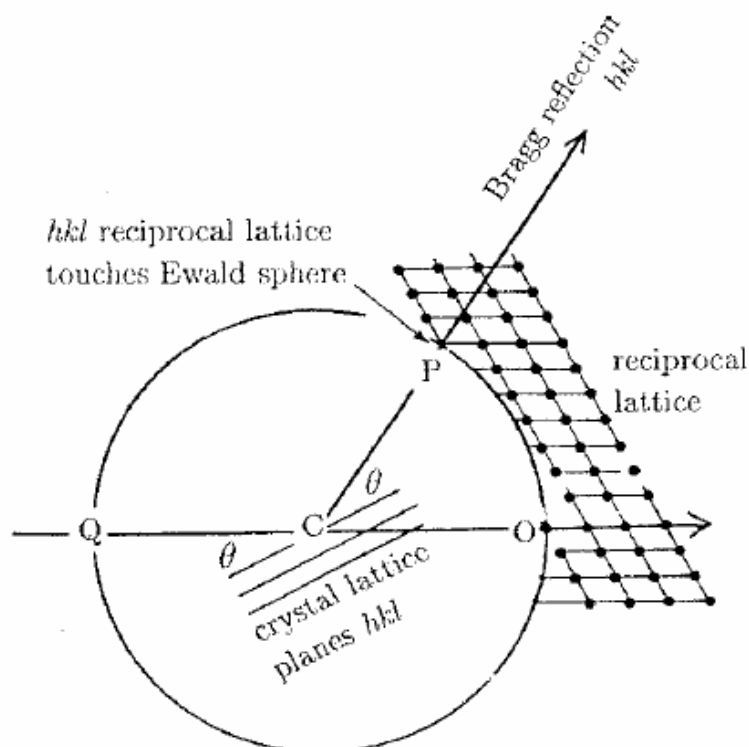


Figura 3.15: Esfera de Ewald. Orientación del espacio recíproco con origen en O (Glusker, 1994).

3.3.2. Generación de rayos X

Los rayos X que interesan en cristalografía son aquéllos que tienen una longitud de onda alrededor de 1 Å, que es la escala atómica. Se denominan rayos X “duros” y se producen con unas lámparas especiales en los laboratorios de cristalografía, o bien en las grandes instalaciones de sincrotrón. En nuestro caso, hicimos la difracción de nuestros cristales en el sincrotrón de Grenoble (Francia), del cual se puede ver en la figura 3.16 un esquema de todas sus líneas.



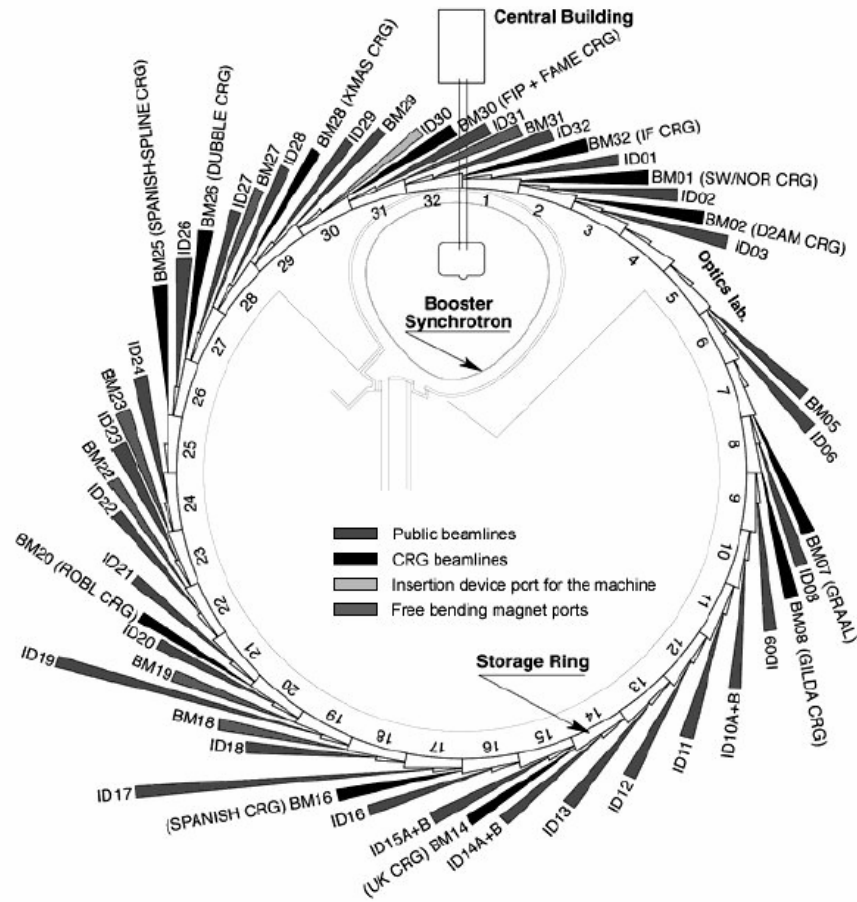


Figura 3.16: Esquema del sincrotrón ESRF de Grenoble, Francia. Abajo puede verse la línea española BM-16, dónde se hizo la difracción de los cristales.

Las instalaciones sincrotrón son grandes anillos (del orden de kilómetros) por los cuales circulan partículas cargadas eléctricamente (negativamente en el caso de electrones y positivamente cuando se trata de positrones) por canales rectilíneos que se quiebran cada cierta distancia para adaptarse a la curvatura del anillo. A las partículas cargadas se les hace cambiar de un canal usando campos magnéticos de gran energía. Es en este momento cuando las partículas, al cambiar de dirección, emiten una radiación muy energética llamada *radiación sincrotrónica* (figura 3.17). Las longitudes de onda que comprende esta radiación van desde las microondas hasta los rayos X “duros”. Después, esta radiación emitida se hace pasar por monocromadores que nos permiten seleccionar la longitud de onda que nos interesa para nuestros experimentos obteniendo una radiación que podríamos considerar monocromática. Ésta es una de las grandes ventajas de la utilización de instalaciones sincrotrón respecto a las fuentes convencionales de rayos X, el



hecho de poder modular con mucha precisión la longitud de onda que queremos. Otra ventaja es que su intensidad es un billón de veces superior (10^{12}) a los rayos X generados en los laboratorios de cristalografía.

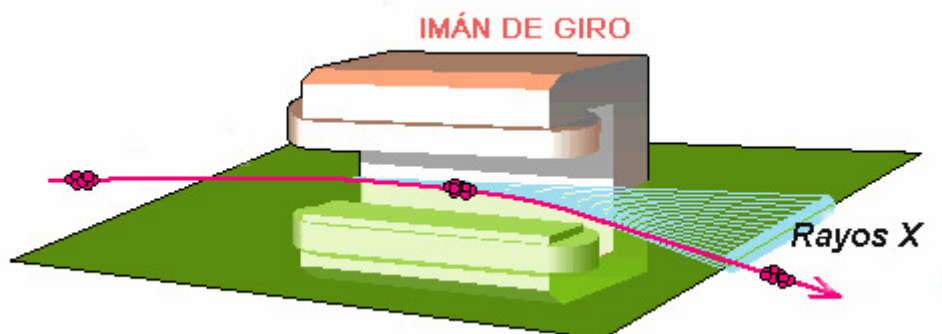


Figura 3.17: Esquema de cómo se producen los rayos X en el sincrotrón, al cambiar de dirección los electrones.

3.3.3. Métodos de resolución de la estructura cristalina

Las radiaciones difractadas por el cristal son ondas, que interfieren constructivamente cuando se cumple la ley de Bragg, pero en cambio lo hacen destructivamente en todos los otros casos, dando intensidades de 0. Las reflexiones tienen diferentes intensidades, pero esto no lo explica la ley de Bragg, sino que depende de la estructura atómica del cristal.

Así, una vez recogidos todos los diagramas de difracción de una muestra cristalina que esté muy bien ordenada, con la posición e intensidad de cada mancha en el espectro podemos determinar la posición de los átomos dentro de la red cristalina.

Una vez desarrolladas las ecuaciones de difracción desde un punto cualquiera obtenemos la ecuación que nos indica la densidad electrónica para cualquier punto del espacio:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} [|F_{hkl}| \cdot \cos(2\pi \cdot (\bar{x} \cdot \bar{h}) + \varphi_{hkl})] \quad (\text{Ec. 3.2.})$$

Donde: - V es el volumen del cristal



- $|F_{hkl}|$ es el módulo del factor de estructura de cada difracción (suma de todas las radiaciones difractadas).

- \bar{x} es el vector de posición (x,y,z)

- h es el vector director del plano de índices hkl.

- φ_{hkl} es la fase del factor estructura.

De todas las variables presentes en la ecuación, la única que no podemos determinar es la fase de cada difracción, que debemos estimar por métodos indirectos. Esto se conoce en cristalografía como el *problema de las fases* y se soluciona mediante la técnica del reemplazo molecular o bien por dispersión anómala (MAD).

Reemplazo molecular

Es el método que utilizamos en este proyecto y se basa en que las moléculas orgánicas similares presentan estructuras cristalinas similares. Lo que se hace es, a partir de un modelo de partida similar a nuestra molécula, aplicar modificaciones que lo hagan concordar con los datos experimentales recogidos.

En el caso del ADN esta técnica va muy bien, ya que las diferentes moléculas tienen diferencias muy pequeñas entre ellas.

Dispersión anómala

Esta técnica se basa en que los átomos con números atómicos elevados producen una radiación difractada diferente a la normal (dispersión elástica). Concretamente, el desfase de la radiación dispersa respecto a la radiación incidente es de 90° en este caso y normalmente es de 180° .

Esta dispersión anómala además no cumple la ley de Friedel, según la cual los factores de estructura de las familias hkl y $-h-k-l$ deben ser iguales.



Sabiendo esto, se utilizan moléculas con átomos pesados en posiciones que nosotros conocemos previamente (por ejemplo podemos sustituir una timina por un bromo-uracilo). Una vez hecha la difracción podemos localizar fácilmente el átomo pesado en el cristal. Después, a partir de este átomo podemos resolver la estructura completa de la molécula.



4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El proyecto se divide claramente en tres partes experimentales muy diferenciadas que son las siguientes:

- Cristalización de los nucleótidos en presencia de fármacos y obtención de cristales.
- Difracción de rayos X de dichos cristales.
- Tratamiento informático de los datos de difracción obtenidos.

4.1. Obtención de cristales

La obtención de cristales es la parte más laboriosa, ya que llegar a obtener las condiciones en las que podemos obtener un buen cristal conlleva muchas pruebas, y el crecimiento de los cristales suele ser muy lento.

Además esta parte es esencial, ya que los cristales son la materia prima para hacer posible el estudio de la estructura de los nucleótidos.

4.1.1. Difusión de vapor

El método de cristalización que hemos utilizado en este proyecto es el de difusión de vapor, que es el más utilizado en la cristalización de macromoléculas.

Consiste en un pequeño volumen cerrado en el cual se establece un equilibrio entre una gota (donde se encuentra el nucleótido además de otros componentes como el fármaco, sales, precipitante, tampón.) y un pozo de mucho más volumen donde se encuentra el precipitante.

La concentración de precipitante en el pozo siempre tiene que ser mayor que en la gota. Esto hace que se establezca un equilibrio a través de la difusión de vapor hasta que se igualan las dos concentraciones. Se llega a este equilibrio a través de la evaporación de moléculas de agua de la gota ya que es más volátil que los precipitantes utilizados, que son el MPD y el PEG. En el caso de la utilización de precipitantes más volátiles que el agua como el etanol o el isopropanol se llegaría a este equilibrio por la evaporación del propio precipitante.



Dentro de la técnica de difusión de vapor encontramos dos metodologías, la de gota sentada y la de gota colgante, de las cuales tan solo hemos utilizado esta última.

4.1.2. Metodología de gota colgante

Los experimentos los hemos realizado en placas *Linbro*, que tienen 24 pozos en cada uno de los cuales podemos poner una gota. Sobre cada pozo colocamos un cubreobjetos ya con la gota y sellamos el compartimiento con silicona para evitar el intercambio de gases con el ambiente y la evaporación de la gota.

Para esta metodología tenemos que hacer un tratamiento especial a los cubreobjetos, que consiste en darles un baño de silano (limpiándolos después con baños de agua y finalmente con etanol para secarlos) para que la superficie de éstos sea hidrofóbica. De esta manera conseguimos que la gota no se esparza demasiado en el cubre y que se quede colgada una vez puesto el cubre sobre el pozo.

Para la metodología de gota sentada se pueden utilizar las mismas placas también, lo único que cambia es que la gota en vez de estar colgada boca abajo está montada sobre un puente. En la figura 4.1 se puede observar un esquema de cómo quedan las gotas en las placas *Linbro*.

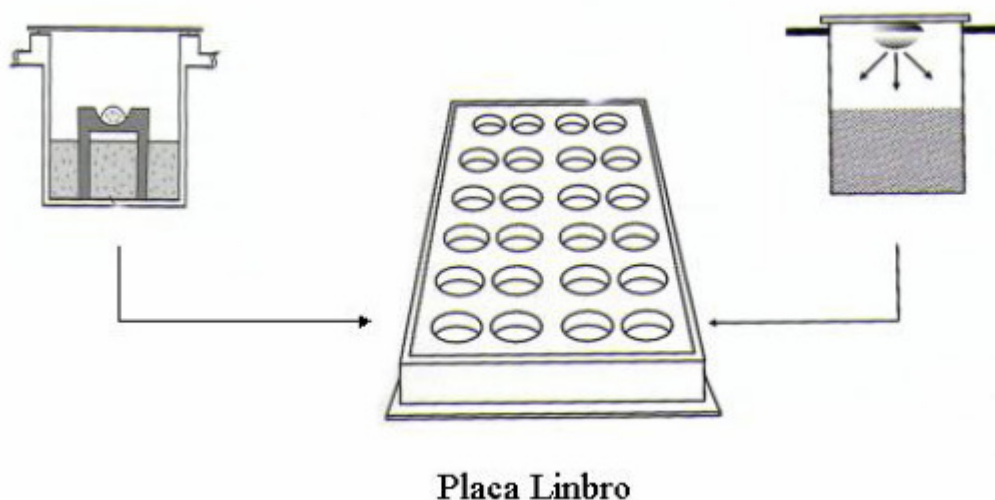


Figura 4.1: Detalle de dos pozos de una placa *Linbro*, uno de ellos aplicando el método de la difusión de vapor con gota sentada (izquierda), y el otro con gota colgante (derecha), (Mc Pherson, 1999).



Para preparar una gota, en el caso del método de gota colgante, se ponen las cantidades previamente calculadas de cada componente (tampón, precipitante, sales, oligonucleótido, fármaco, espermina) sobre el cubreobjetos. Una vez hecho esto se gira y se coloca sobre uno de los pozos en los que hemos puesto un volumen de 800 μl de solución de precipitante. Finalmente se sella el sistema con silicona y queda completamente cerrado, evitado así el intercambio de gases con el ambiente.

El volumen final de la gota no debe sobrepasar los 10 μl ya que al girarla caería fácilmente por su propio peso. En nuestro caso, todas las gotas las hemos hecho de 6 μl .

4.1.3. Condiciones de cristalización

En primer lugar hay que determinar las condiciones de cristalización adecuadas para cada oligonucleótido con cada fármaco. Para saber las proporciones que teníamos que añadir de fármaco respecto al oligonucleótido consultamos publicaciones donde se utilizaron y de esta manera ya tuvimos un dato orientativo.

Para llegar a obtener cristales tenemos que llevar a la disolución de la gota a unas condiciones de sobresaturación. Es decir, tenemos que llevar la concentración de soluto por encima de su límite de solubilidad. En esta situación de no equilibrio, empezarán a formarse núcleos que después podrán crecer y formar cristales ordenados.

La solubilidad de los compuestos químicos varía en función de muchos factores como su concentración, la temperatura del sistema, el pH, la fuerza iónica, etc... La realización de diagramas de fases nos ayuda mucho a saber en qué estado nos encontramos y como podemos contribuir a llevar al sistema a un estado propenso a la formación de cristales. Como podemos observar en el diagrama de fases de la figura 4.2, que representa la concentración de soluto respecto a la concentración de precipitante, en una disolución altamente supersaturada hay más probabilidad de que se produzca la nucleación.



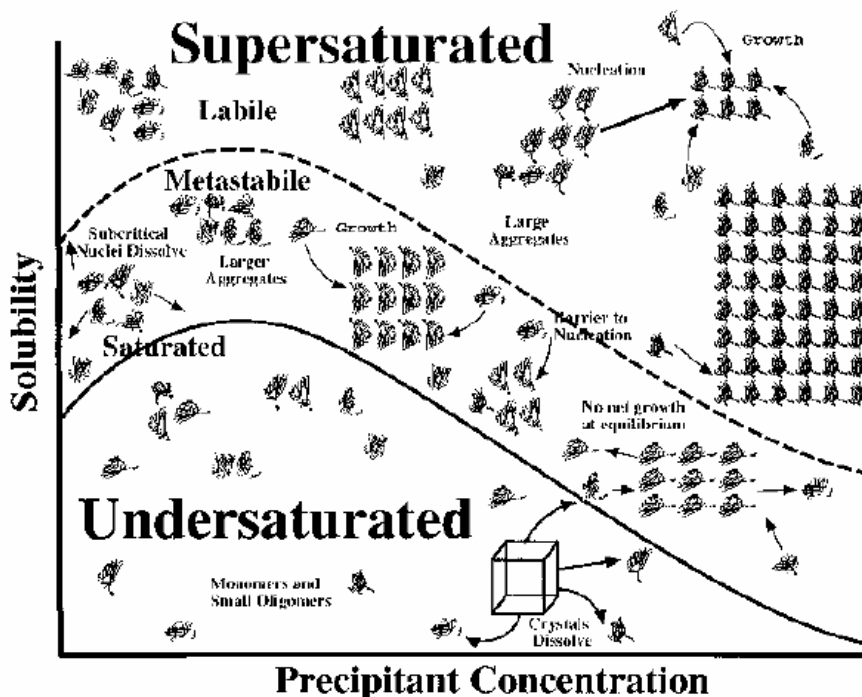


Figura 4.2: Diagrama de fases que representa la solubilidad respecto a la concentración de precipitante. (Mc Pherson, 1999).

La estrategia a seguir es ir disminuyendo lentamente la solubilidad del sistema a cristalizar cambiando condiciones como la concentración de precipitante.

Otra cosa muy importante para obtener cristales es la pureza de todas las disoluciones que utilizamos para hacer la gota, ya que cualquier impureza que haya interviene en la ordenación de las moléculas en la disolución y hace que sea más difícil obtener cristales o que éstos no sean de alta calidad.

Hay que tener en cuenta también la influencia de los fármacos intercalantes utilizados en la cristalización. Al unirse el fármaco con el oligonucleótido disminuye su solubilidad, por lo tanto, nos será más fácil llegar a las condiciones de supersaturación.

4.1.4. Variables de cristalización

Hay muchas variables que podemos cambiar para lograr conseguir un cristal de calidad. Las más importantes son las siguientes:



- **Temperatura:**

La temperatura es un factor que influye mucho en la cristalización de oligonucleótidos. Además, cada nucleótido tiene un rango de temperaturas donde acostumbra a cristalizar más fácilmente (por ejemplo, hemos podido ver en nuestros experimentos que el oligo (AT)₅ cristaliza muy bien a 5°C). En general, a menor temperatura se favorece la nucleación y la formación de cristales. No obstante si bajamos excesivamente la temperatura lo que ocurre es que crecen muchos cristales pequeños, debido a un enfriamiento rápido, que no nos sirven.

Para realizar los experimentos se dispone de dos salas aclimatadas a 20°C y 4°C, además de dos neveras a 16 y 11°C. De esta manera, podemos ir cambiando las gotas de temperatura según la evolución que éstas presenten, partiendo siempre de 20°C cuando se preparan inicialmente.

También utilizamos cambios bruscos de temperatura cuando queremos fundir cristales que no son buenos. De esta manera se puede volver a empezar todo el proceso para intentar obtener cristales de mejor calidad.

- **Precipitante:**

El principal precipitante que se ha utilizado es el MPD, ampliamente utilizado en la cristalización de oligonucleótidos. En menor medida se ha utilizado el PEG 400 y el isopropanol, este último siempre en conjunción con el MPD y en una concentración máxima del 5%, ya que es altamente volátil y cuando se procede a la pesca de los cristales, se pierde muy rápido y éstos se pueden estropear.

La concentración óptima de precipitante varía según la secuencia del oligonucleótido, la cantidad de pares de bases y las condiciones de la gota.

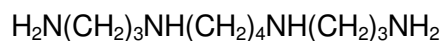
- **Espermina:**

La espermina es una poliamina lineal y simétrica muy utilizada en la cristalización tanto de ADN como de ARN ya que actúa como contraión de las cargas negativas de los fosfatos,



así como de precipitante, ayudando a la cristalización (Subirana y Vives, 1981). Aún así su presencia no es imprescindible para obtener cristales.

Su estructura es la siguiente:



En los valores de pH a los que se trabaja (entre 6 y 7,5) todos los grupos amino están cargados positivamente y por este motivo puede actuar de contraión.

- **Sales:**

La sal utilizada también influye mucho en la cristalización ya que hay iones que interaccionan de manera especial con los nucleótidos y proporcionan la estabilidad necesaria para que se formen cristales. Se pueden utilizar tanto iones monovalentes como divalentes e incluso mezclas de ambos. Las sales más utilizadas son: MgCl_2 , CaCl_2 , BaCl_2 , NaCl , KCl , NiCl_2 , CoCl_2 y Acetato de Mg.

Aún así, en este proyecto tan solo se ha utilizado la sal MgCl_2 , que es la que ha dado hasta ahora más buenos resultados.

- **Tampón:**

El que se ha utilizado más es el cacodilato sódico tamponado a un pH de entre 6 y 7. Este tampón es ampliamente utilizado en cristalografía ya que contiene arsénico y evita la proliferación de cualquier microorganismo manteniendo limpio el medio donde deben crecer los cristales.

También se han utilizado tampones ya preparados de la casa Hampton Research que han dado muy buenos resultados. Concretamente los tampones Natrix (HR2-116) -7, 15, 22.

No parece que el pH ni el contraión del tampón tengan un efecto significativo en la cristalización (Ducruix Giegé, 1992), aunque pequeños ajustes en el pH pueden ayudar a mejorar la calidad de los cristales.

En general, a mayor concentración de tampón en la gota, mayor concentración de precipitante necesitaremos para conseguir la formación de cristales.



- **Oligonucleótido:**

Al aumentar la concentración de oligonucleótido la concentración de precipitante necesaria disminuye y al revés.

En este proyecto se ha utilizado una concentración de entre 0,2 y 0,4 mM.

- **Fármaco:**

Como ya se ha dicho, el fármaco interacciona con el ADN, bajando su solubilidad y haciendo que la concentración de precipitante necesaria sea menor. Para cada fármaco se ha probado un rango de concentraciones para determinar cuál es el rango de concentraciones más adecuado.

4.1.5. Oligonucleótidos utilizados

En el proyecto se han utilizado nucleótidos ricos en A y T, todos ellos decámeros:

- d(ATATATATAT)₂ que abreviamos (AT)₅.
- d(AATATATATT)₂ que abreviamos A(AT)₄T.
- d(TATATATATA)₂ que abreviamos (TA)₅.
- d(CATATATATG)₂ que abreviamos C(AT)₄G.

Todos estos oligonucleótidos han sido sintetizados y suministrados por el departamento de química orgánica del Instituto Pasteur de París.

El ADN se recibe en forma de polvo blanco, que se tiene que disolver en agua muy pura y posteriormente determinar su concentración exacta, ya que viene estabilizado por sales y no la podemos determinar directamente por su peso.

Determinamos su concentración mediante la medida de la absorbancia de la disolución en un espectrofotómetro UV-visible. Podemos utilizar esta técnica ya que las bases nitrogenadas presentan sistemas aromáticos conjugados que absorben en la zona del espectro UV, con una absorción máxima para una longitud de onda de 260 nm.



Para poder aplicar la ley de Lambert-Beer y determinar la concentración de la muestra necesitamos calcular el coeficiente de extinción molar a esta longitud de onda. Lo hacemos con la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{260} = \epsilon_{DpEpFpGp\dots KpL} = \left[2(\epsilon_{DpE} + \epsilon_{EpF} + \dots + \epsilon_{KpL}) - \epsilon_{pE} - \epsilon_{pF} - \epsilon_{pG} - \dots - \epsilon_{pK} \right] \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Este coeficiente varía para cada secuencia y se calcula con la ayuda de los valores de la tabla 4.1.

Finalmente aplicamos la ley de Lambert-Beer para calcular la concentración de la muestra teniendo en cuenta la dilución que hemos hecho

$$A_{260} = \epsilon_{260} \cdot l \cdot c \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Dónde “l” es el ancho de muestra atravesado, que en nuestro caso es 1 cm, “A₂₆₀” es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de 260 nm, y “c” es la concentración de la muestra.



DNA	ϵ_{260}	DNA	ϵ_{260}
pdA	15,4	dCpdG	9,0
pdC	7,4	dCpdT	7,6
pdG	11,5	dGpdA	12,6
pdT	8,7	dGpdC	8,8
dApdA	13,7	dGpdG	10,8
dApdC	10,6	dGpdT	10,0
dApdG	12,5	dTpdA	11,7
dApdT	11,4	dTpdC	8,1
dCpdA	10,6	dTpdG	9,5
dCpdC	7,3	dTpdT	8,4

Tabla 4.1: Coeficientes de extinción molar a 260 nm, 25°C y pH neutro por cadena sencilla de DNA (1/mmol cm) (Cantor et al., 1970).

4.1.6. Fármacos utilizados

Se han utilizado 3 fármacos en este proyecto, la Pentamidina, el Berenil y el DAPI, todos ellos interaccionan con el ADN alojándose en el surco estrecho.

Sus estructuras se pueden ver en las figuras 4.3, 4.4 y 4.5.



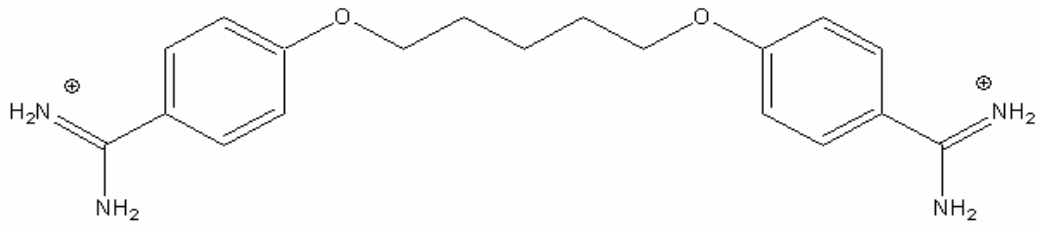


Figura 4.3: Estructura molecular de la Pentamidina.

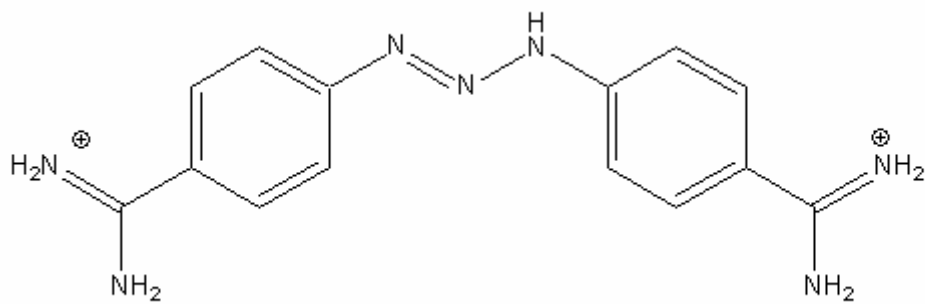


Figura 4.4: Estructura molecular del Berenil.

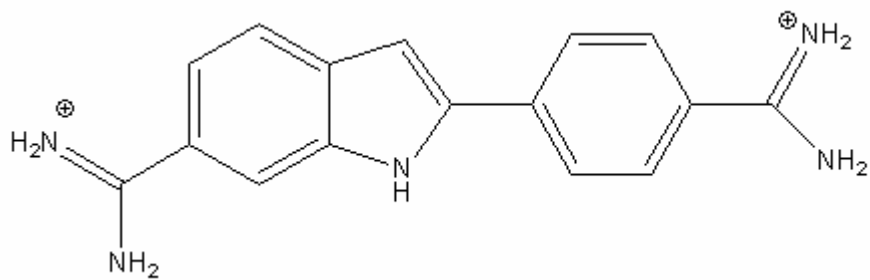


Figura 4.5: Estructura molecular del DAPI.

Podemos ver que tienen rasgos comunes como son los grupos amidina de los extremos o la presencia de anillos aromáticos.



Los grupos de los extremos, están cargados positivamente a los pH que trabajaremos, con la carga repartida entre los dos nitrógenos. Interaccionan sobretodo con los grupos fosfato del esqueleto del ADN por razones electroestáticas, ya que estos últimos están cargados negativamente, y con las bases nitrogenadas.

Los grupos aromáticos a su vez se alojan en el surco estrecho paralelos al esqueleto de azucares y fosfatos gracias a fuerzas hidrofóbicas.

Estos fármacos presentan preferencia por las zonas de pares de bases AT, ya que el surco que se forma es más estrecho que en el caso de los pares de bases CG, y de esta manera se encajan mejor.

4.1.7. Pesca de cristales

Una vez que el cristal ha crecido lo suficiente en una gota, tenemos que “pescarlo” y conservarlo para su posterior análisis por difracción de rayos X.

Esto lo hacemos mediante un crioloop (figura 4.6), que es un pequeño aro de nylon que ajustaremos según las medidas que tenga el cristal que queremos pescar y que está unido a su vez a una varilla metálica. Es muy importante que el loop no tenga ninguna impureza que pueda contaminar la gota y estropearla.



Figura 4.6: Detalle de un crioloop con el que se ha pescado un cristal, que se mantiene pegado por las fuerzas de tensión superficial del disolvente.



Para la conservación del cristal, el método más utilizado actualmente en macromoléculas es la criogenia, que consiste en sumergir el cristal inmediatamente después de ser pescado de la gota en nitrógeno líquido, donde queda congelado al instante y se conservará por largo tiempo (Rudman, 1976).

Esta técnica va muy bien, ya que deja el cristal invariable hasta el momento de la difracción. De otra manera, tendríamos que conservar el cristal en la misma gota y éste podría estropearse con el tiempo. Otras ventajas son que se minimizan los daños por radiación, se reduce la dispersión y hasta se puede mejorar la resolución.

Un inconveniente al utilizar esta técnica es que al congelarse la muestra, se forma también una cierta cantidad de hielo que después hace que el espectro de difracción sea de una calidad menor. Para evitar esto se puede utilizar crioprotectores como el MPD, el glicerol o el polietilenglicol (PEG). De esta manera, como en ácidos nucleicos ya utilizamos MPD como precipitante, el cristal queda protegido siempre que la concentración de MPD sea mayor o igual al 20%.

La mayoría de cristales se obtienen en condiciones superiores al 20% de MPD, pero si no es así, se somete al cristal a una serie de baños de concentración de MPD cada vez mayor, hasta que se llega a la deseada y se puede hacer la difracción del cristal sin que aparezca hielo en el espectro.

4.2. Difracción de los cristales. Recogida de datos.

La obtención de los datos es muy importante para la posterior resolución de la estructura cristalina, que es el objetivo final. Dentro de las posibilidades del cristal debemos obtener los mejores espectros de difracción.

En nuestro caso la difracción de los cristales se hizo en la línea española BM-16 de la estación ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble (figura 4.7) en abril del 2008.





Figura 4.7: Vista aérea del sincrotrón de Grenoble.

Los cristales son transportados hasta allí congelados en nitrógeno. Una vez en la línea, se deben extraer con cuidado y sobretodo procurar que no se descongelen en ningún momento, ya que se estropearían. Por este motivo, se transportan hasta el difractor con un criotrón, que es una especie de pinza que se congela con nitrógeno líquido y que tiene un habitáculo dónde todavía queda almacenado una pequeña cantidad de nitrógeno líquido que asegura la conservación del cristal en el corto trayecto hasta colocarlo en el goniómetro del difractor.

Una vez el loop esta colocado en el difractor, hay un chorro de nitrógeno líquido constante que asegura la conservación de la muestra durante toda la recogida de datos.

Justamente después de esto hay que centrar el cristal a la trayectoria de los rayos X, y también procurar que al rotar el cristal los rayos sigan incidiendo sobre él. Todo esto lo hacemos con la ayuda del goniómetro (figura 4.8) y es de vital importancia, ya que en la cristalografía de macromoléculas no basta con una sola foto de difracción para resolver la estructura, sino que necesitamos espectros de difracción para diferentes ángulos de incidencia. El goniómetro es el instrumento que se encarga de ir haciendo una oscilación precisa y periódica de un cierto ángulo que nosotros elegimos según las características del cristal.

Después de atravesar el cristal y antes de llegar al detector, los rayos incidentes se encuentran con el *beam stop*, que se encarga de detener esta radiación que no es difractada y que nos saturaría el espectro debido a su alta intensidad. Podemos ver un esquema de todo el montaje en la figura 4.9.



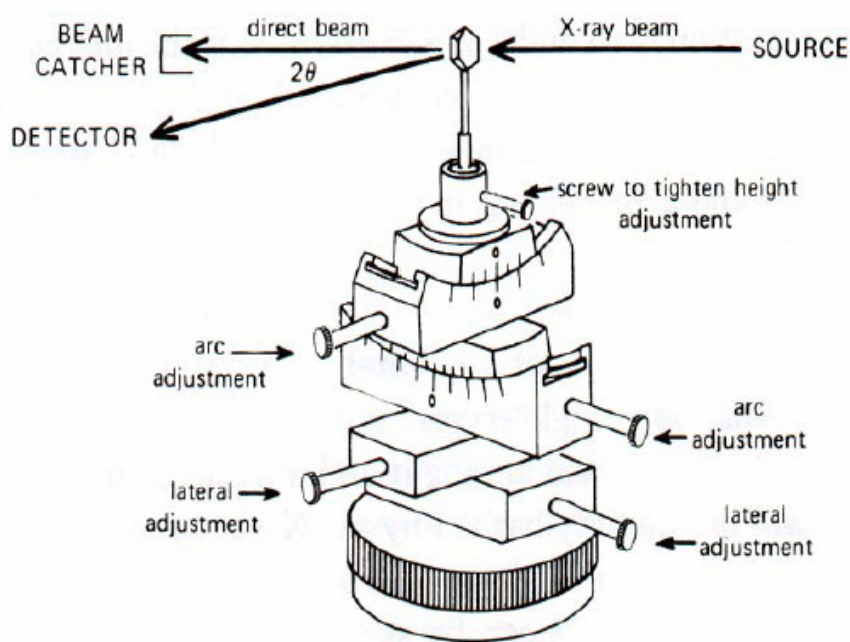


Figura 4.8: Goniómetro. Se pueden ver los ajustes que se pueden realizar para colocar el cristal en el haz de rayos X. Los ajustes del arco nos permiten orientar los ejes cristalográficos en la dirección deseada (Glusker, 1985).

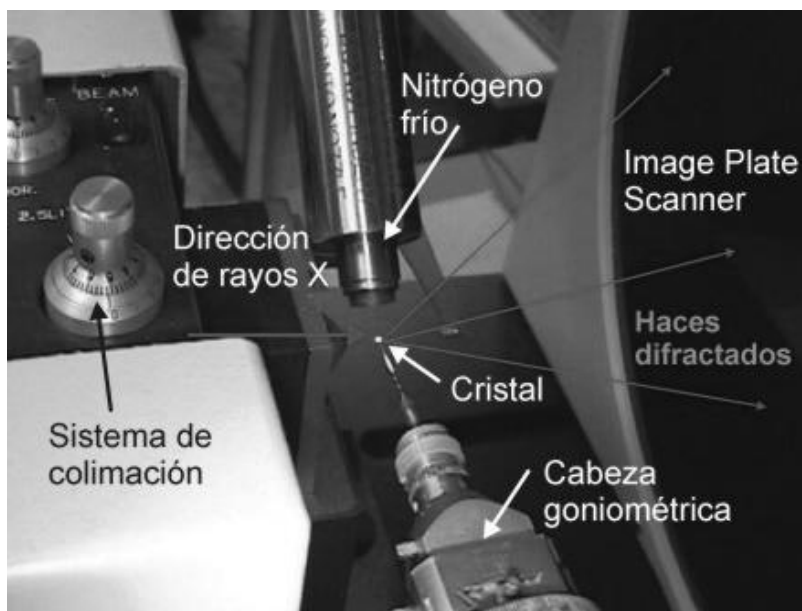


Figura 4.9: Difractómetro. Sus partes más importantes se han indicado con flechas.



4.2.1. Métodos de recolección de datos

Hay diferentes métodos para la recolección de los diagramas de difracción de un cristal, que han ido evolucionando y según el caso en el que nos encontremos o la información que deseemos utilizaremos uno u otro:

- *El método de Laue.*

Este método consiste en registrar las difracciones para todas las longitudes de onda posibles (radiación continua) sin mover el cristal. De esta manera, las difracciones son de distancia interplanar y de geometría constante, pero de longitud de onda y nivel variable. Se obtiene así una proyección estereográfica de los planos del cristal.

- *El método de Weissenberg.*

En este método se utiliza un cilindro metálico que contiene en su interior el cristal, colocado sobre el eje longitudinal, y es irradiado desde una rendija. Las paredes del cilindro están recubiertas de una película fotográfica sensible a los rayos X.

Lo novedoso de esta técnica es que el cristal se hace girar mientras se ésta irradiando y así conseguimos girar también el espacio recíproco, haciendo que algunos puntos recíprocos, correspondientes a familias de planos, corten la esfera de Ewald.

Si el eje del cristal coincide con el del cilindro, las difracciones quedan marcadas en la película fotográfica formando estratos perpendiculares a la dirección longitudinal. Además el hecho de ir girando el cilindro hace que haya una redundancia de difracciones y la precisión de la medida de las intensidades aumenta. Eso sí, para evitar que se solapen, durante la recogida se va moviendo longitudinalmente el cilindro. Con esto conseguimos el diagrama de difracción completo, pero hay un inconveniente, y es que el espectro queda un poco distorsionado.

- *El método de precesión.*

Este método fue ideado por Buerger en 1940 para solucionar el problema de la distorsión que aparece con el método de Weissenberg. Para ello, en vez de rotar el cristal, se hace un movimiento de precesión, que es como el movimiento que hace el planeta Tierra de oscilación sobre su eje, describiendo así un doble cono.



De esta manera obtenemos una difracción completa en la que no se solapan las señales y no quedan distorsionadas. El inconveniente por eso es que no se explora un ángulo muy grande y el cristal tiene que estar orientado de manera que uno de sus ejes coincida con la dirección de la radiación incidente.

- *El método de oscilación.*

Es el más utilizado en la difracción de macromoléculas para la resolución de su estructura y es también el que se utilizó en la difracción de nuestros cristales. Ha sustituido a los otros por la gran disminución de los tiempos de recogida. Lo que se hace es recoger una imagen cada vez que hacemos una pequeña oscilación del cristal en vez de abarcar todo el ángulo posible.

4.2.2. Variables del método de oscilación

Hay varios parámetros que podemos variar y debemos tener en cuenta durante la recogida de los diagramas de difracción. Son los siguientes:

- *Ángulo de oscilación:*

El ángulo oscilado entre cada fotografía recogida y el ángulo total girado dependen sobretodo de las dimensiones de la celdilla del cristal y de su mosaicidad, así como el grado de completeness (relación entre las reflexiones que se observan y las que se podrían observar) que queramos obtener. Obtenemos dos tipos de reflexiones al hacer una oscilación: las totales, que se quedan dentro de la oscilación, y las parciales, que se quedan a medias entre dos oscilaciones.

- *Distancia al detector:*

Está relacionada con la resolución obtenida en la difracción. Si esta distancia es grande, la resolución será baja, ya que encontraremos solo las manchas centrales, que son las que corresponden en el espacio recíproco a distancias grandes en la red cristalina. Al colocarlo más cerca, irán apareciendo más manchas, todas ellas de mayor resolución, hasta que haya un momento que no aparezca ninguna. Este límite viene dado por la calidad de ordenación de nuestro cristal. Por lo tanto cuanto mayor sea el orden, mayor resolución tendremos y más detallada podremos ver nuestra estructura.



- *Tiempo de exposición:*

Tiene que ser consecuente con la velocidad a la que gira el goniómetro. Va muy relacionado con la distancia al detector, ya que no todas las señales tienen la misma intensidad y por lo tanto necesitan tiempos de exposición diferentes. Esto es un problema, ya que las manchas de alta resolución tardan mucho en quedarse registradas y en ese tiempo las manchas centrales de baja resolución quedan saturadas. Para solucionarlo, lo que se hace es tomar fotografías a una distancia grande con un tiempo de exposición corto para registrar las señales de baja resolución y después las mismas pero a una distancia menor y con un tiempo de exposición más grande para poder registrar las señales de alta resolución. Posteriormente se pueden juntar todas las fotografías y utilizar todos los datos a la vez.

4.3. Resolución de la estructura

El tratamiento de los diagramas de difracción está totalmente informatizado debido al gran número de cálculos que se tienen que hacer. Se divide en los siguientes pasos:

- Indexado.
- Procesado y escalado.
- Aplicación del reemplazo molecular o de la técnica MAD (según el caso).
- Afinado y obtención de los mapas de densidad electrónica.
- Validación de la estructura.

4.3.1. Indexado

El objetivo de este primer paso es determinar a partir de los espectros de difracción las dimensiones de la celdilla unitaria del cristal, su simetría y el grupo espacial al cual pertenece.

Para ello primero utilizamos el programa DENZO (Otwinoski i Minor, 1997), pero debido a que no daba buenos resultados acabamos utilizando una actualización del mismo llamado HKL-2000. Estos programas realizan un autoindexado de todas las reflexiones presentes,



que hay que retocar manualmente ya que hay señales que no son difracciones. Así se le asigna a cada señal un hkl y después se determina la red de Bravais, decidiendo el sistema cristalino (triclínico, monoclínico, ortorrómbico, trigonal, tetragonal, hexagonal o cúbico) y si la celdilla es primitiva (P) o está centrada en las caras (F) o en el cuerpo (I). Simultáneamente el programa (una vez calculado esto), determina los parámetros de celdilla “a, b, c” y “ α , β , γ ”, el grupo de simetría del cristal en el espacio recíproco, es decir, el grupo de Laue, y se analizan las ausencias sistemáticas de reflexiones. Finalmente se obtiene la celdilla unitaria y el grupo espacial al que pertenece el cristal.

Aunque el funcionamiento del programa es bastante automático, hay que ir variando algunos parámetros para no obtener resultados erróneos, como son: mosaicidad, la medida y forma de la mancha, la distancia al detector, ajustando lo mejor posible la matriz de orientación del cristal.

Nuestro problema con el programa DENZO es que iba variando la distancia al detector y nos falseaba de esta manera los datos, ya que esta distancia tiene un valor constante durante todo el proceso de difracción.

Es muy importante obtener una buena predicción de las posiciones de las reflexiones para su posterior integración. Por este motivo, se asigna un perfil Gaussiano a las manchas, el radio del cual se evalúa a partir de datos experimentales. Para ello se aplica un ajuste del perfil o “profile fitting”, que consta de dos pasos:

- Se hace una predicción del perfil basada en el perfil de otras reflexiones en un radio determinado.
- La información de este perfil predicho y del actual se combinan.

Entonces se calcula un perfil observado (M_i) como la suma de los picos de Bragg, del sonido de fondo (background) y un perfil estimado (P_i), que se expresa como:

$$P_i = B_i + k \cdot p_i \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Donde B_i es el valor estimado de “background” y p_i el perfil estimado.

Posteriormente se minimiza por mínimos cuadrados la siguiente suma:



$$\sum_i \frac{(M_i - p_i)}{V_i} \quad (\text{Ec.4.4})$$

Siendo V_i la variancia (σ^2) de M_i .

4.3.2. Procesado y escalado

Después de determinar los parámetros de celdilla y el grupo espacial, se procesa la información de todas las fotografías recogidas. Si los programas informáticos lo permiten, se hace la integración automática, de lo contrario, hay que procesar cada foto por separado.

Cuando tenemos las intensidades de todas las reflexiones para cada espectro de difracción hay que hacer lo que se llama escalado, que consiste en hacer una estadística que nos dará una idea de la calidad de los que tenemos, y un posterior reafinamiento de los parámetros de celdilla y de la matriz de orientación, que tienen que ser muy similares para todas las imágenes.

Se comparan las intensidades de reflexiones equivalentes. Estas nunca resultan ser iguales debido a fluctuaciones en el rayo o imperfecciones en el cristal. De esta manera se consiguen datos más fiables, ya que se aplica la misma escala a cada reflexión y se calcula la media de intensidades.

Durante el escalado se obtienen también la completitud de los datos (completeness), que es la proporción de reflexiones únicas que se observan respecto a las que se deberían observar, así como la redundancia con la que éstas aparecen.

Los parámetros estadísticos calculados son los siguientes:

- Media de las intensidades de las reflexiones, $\bar{I}(hkl)$
- La desviación estándar de las intensidades, $\sigma(I)$
- R_{merge} , que se expresa como:



$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i (\bar{I}(hkl) - I(hkl)_i)}{\sum_{hkl} \sum_i (I(hkl)_i)} \quad (\text{Ec. 4.5})$$

Éste no es un parámetro lo suficientemente fiable debido a que no tiene presente la redundancia de los datos. Es por esto que se utiliza el cociente $\langle I \rangle / \sigma(\langle I \rangle)$, que es mucho más adecuado para saber por ejemplo hasta qué resolución son aceptables nuestros datos. Si el resultado de este cociente es inferior a 2, las reflexiones no se consideran.

- χ^2 , que se expresa de la siguiente manera:

$$\chi^2 = \sum k \frac{(I - \bar{I})^2}{N\varepsilon^2} \quad (\text{Ec. 4.6})$$

Donde ε es el valor del error estimado, que podemos variar durante el escalado para obtener valores de χ^2 cercanos a 1, que es el valor óptimo para esta parámetro.

Como último paso, se obtiene del SCALEPACK (contenido en el paquete del programa HKL-2000) un fichero que contiene todas las reflexiones únicas. Son éstas las que utilizaremos en todos los pasos posteriores, por eso nos tenemos que asegurar de que sean datos fiables. Todo este proceso se llama *reducción de datos*.

Para poder seguir trabajando con los datos de difracción, hemos de convertir las intensidades de las señales en amplitudes de los factores de escala correspondientes $[F(h,k,l)]$. Utilizamos también el paquete CCP4, para hacer la conversión:

$$I = |F(hkl)|^2 \quad (\text{Ec. 4.7})$$

4.3.3. Aplicación del reemplazo molecular

Una vez llegados a este punto, debemos obtener las posiciones exactas de nuestra molécula comparandola con un modelo y obteniendo posteriormente un mapa de densidades electrónicas ajustado a nuestro modelo. Para poder hacer esto debemos hacer una suma de Fourier tridimensional, ya que, tal y como apareció anteriormente, la fórmula que expresa la densidad electrónica en cualquier punto del espacio x, y, z es la siguiente:



$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} [|F_{hkl}| \cdot \cos(2\pi \cdot (\bar{x} \cdot \bar{h}) + \varphi_{hkl})] \quad (\text{Ec. 4.8})$$

siendo:

V = volumen de la celda.

$|F_{hkl}|$ = amplitud del factor de escala para los índices hkl.

φ_{hkl} = ángulo de fase.

Para resolver esta ecuación nos encontramos con el llamado **problema de las fases**, y consiste en que así como podemos determinar la intensidad de cada difracción no podemos hacer lo mismo con su ángulo de fase. Debemos entonces aplicar algún método indirecto para estimarlo y poder resolver la estructura.

Como ya dijimos en la introducción teórica, los dos métodos más utilizados para resolver el problema de las fases son el reemplazo molecular y la dispersión anómala (MAD). En este proyecto se ha utilizado el primero de estos métodos.

La limitación de este método es que necesitamos tener un modelo muy parecido al que queremos resolver, es decir, hemos de tener una estructura las fases de la cual ya se conozcan y que a su vez sea similar a nuestra molécula. En general, para resolver estructuras de ADN esto no supone un gran problema ya que hay una base de datos donde se pueden encontrar muy diversas estructuras ya resueltas.

Esta técnica tiene dos operaciones básicas, que son la **rotación** y la **translación** de la molécula que tenemos como modelo, para poder llevarla de su cristal al de nuestro caso en particular.

Cuando la molécula del modelo ya está más o menos bien orientada, se calculan unos parámetros que nos indicarán cómo de bien se adecúan los datos del modelo con los datos experimentales procedentes de la difracción:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \| |F(obs)| - k|F(calc)| \|}{\sum_{hkl} |F(obs)|} \quad (\text{Ec. 4.9})$$



$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F(obs)|^2 - |\overline{F(obs)}|^2) \times (|F(calc)|^2 - |\overline{F(calc)}|^2)}{\left[\sum_{hkl} (|F(obs)|^2 - |\overline{F(obs)}|^2)^2 + \sum_{hkl} (|F(calc)|^2 - |\overline{F(calc)}|^2)^2 \right]^{1/2}} \quad (\text{Ec.4.10})$$

dónde $F(calc)$ es el factor de estructura de las difracciones calculado a partir del modelo y $F(obs)$ a partir de las difracciones.

El parámetro R nos indica el error que hay entre el modelo y la difracción. A medida que vamos haciendo ciclos de superposición de modelo y datos este factor tiene que ir descendiendo y de esta manera sabremos que vamos por el buen camino. En macromoléculas se acepta como bueno un valor de R que este entre el 15 y el 25%, ya que nunca llegaremos a un valor de $R = 0$.

El parámetro C es el coeficiente de correlación, que nos muestra la adecuación entre los datos del modelo y los experimentales. Por lo tanto, nos interesa que sea cuanto más alto mejor.

4.3.4. Afinado

Una vez que ya tenemos una solución de la estructura que se aproxima bastante a los datos empezamos a hacer el afinado, que consiste en mover la posición de cada uno de los átomos presentes. Durante el reemplazo molecular en cambio, movemos toda la estructura como un bloque. También es el momento de añadir otras moléculas presentes, como iones, aguas, fármacos, etc... y mejorar así la solución final.

A lo largo de todo el proceso se sigue mirando la concordancia de los datos obtenidos con el modelo y los datos experimentales con el parámetro R, que nos indicará si vamos por buen camino disminuyendo su valor. En macromoléculas se suelen obtener unos valores finales de R de entre 0,15 y 0,25.

Hay cuatro parámetros que se afinan para cada átomo, los tres posicionales (x, y, z) y el factor de temperatura isotrópico (B). Este factor B nos indica la incertidumbre posicional de los átomos en nuestra estructura debido al movimiento térmico.



La información estereoquímica (distancias y ángulos de enlace) obtenida con mucha precisión para moléculas pequeñas se puede utilizar durante el afinado del modelo de dos formas posibles:

- Con un ***constrained refinement***, que consiste en hacer un tratamiento rígido, dejando solamente que se muevan los ángulos diédricos. Conseguimos así que se reduzca mucho el número de parámetros pero resulta muy difícil mover pequeñas partes de la estructura.
- Haciendo un ***restrained refinement***, que consiste en dejar variar todos los parámetros alrededor de un valor estándar que está controlado por un término energético. Aunque los átomos pueden moverse libremente (sus coordenadas son variables), quedan restringidos los cambios en ángulos de enlace, distancias de enlace, ángulos de torsión y distancias de Van der Waals. De esta manera, podemos mover pequeñas partes de la estructura, pero nos resulta más difícil moverla entera.

Hay que tener en cuenta también que toda la cantidad de disolvente presente entre las macromoléculas está desordenada y tiene que aparecer en los mapas de densidad como una zona plana. Esto es una condición que se impone normalmente en estos mapas y es conocido como *solvent flattening*. Los átomos de hidrogeno a su vez, al tener solamente un electrón, influyen muy poco en la difracción y no podemos apreciarlos en el mapa de densidades a no ser que tengamos una resolución muy buena.

Durante el afinado se calcula un nuevo parámetro llamado R_{free} (Brünger, 1992), que se utiliza para asegurarse de que la mejora del parámetro R viene dada por una mejora del modelo y no por una cuestión matemática. Lo que se hace es coger un conjunto de reflexiones (normalmente entre el 5 y el 10 %) a las que no se les somete a ninguna minimización, y, después de cada ciclo de afinado se calcula el factor R de estas reflexiones obteniendo así R_{free} . Para ir bien R_{free} tiene que bajar cuando R lo hace, y contra más cercanos estén sus valores más fiable será el modelo.

Para minimizar el valor de R hay dos métodos generales:



- Afinamiento por **mínimos cuadrados**.

En este método se suponen todas las observaciones como valores fijos y se van variando los parámetros para que los valores calculados se aproximen cada vez más a los observados. Es un proceso iterativo y en cada ciclo se va calculando R para ver como evoluciona el afinado. Se minimiza la siguiente función:

$$Q = \sum_{hkl} w(hkl) (|F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|)^2 \quad (\text{Ec. 4.11})$$

donde w es el peso que se le da a cada señal.

Un aspecto importante en el tratamiento por mínimos cuadrados es que asume que cada una de las señales sigue una distribución Gaussiana.

- Afinamiento por máxima probabilidad (**maximum likelihood refinement**).

Se basa en que la manera de conseguir el mejor modelo es encontrar aquél que sea más consistente con los datos experimentales. Para saber cuan consistente es cada modelo se hace un cálculo estadístico que consiste en calcular la probabilidad que tiene un modelo de dar las señales observadas experimentalmente en el espectro (o un conjunto de ellas consideradas las más relevantes). Si consideramos cada una de las señales de difracción como independiente, entonces la función de probabilidad es el producto de probabilidades de cada una:

$$L = \prod_{hkl} P(F_{obs} | F_{calc}) \quad (\text{Ec. 4.12})$$

Normalmente se trabaja con el logaritmo de esta función, para que quede un sumatorio y sea más cómodo de calcular.

El método de máxima probabilidad no asume una distribución Gaussiana de las observaciones, ya que esto no siempre es cierto. En vez de esto hace una estimación de la distribución condicional de los datos experimentales cuando se conoce el modelo.

Aparte de estas dos opciones más generales de afinamiento, también tenemos otras más específicas que permiten realizar un afinamiento más dirigido:



- ***Rigit body refinement.***

En este afinamiento se le asigna una geometría rígida a algunas partes de la estructura o a toda ella de manera que sólo se afinan los parámetros de dichas partes y no los de los átomos que los componen. Haciendo esto se reduce considerablemente la relación entre el número de reflexiones y los parámetros a determinar, por ello es especialmente útil cuando tenemos una resolución baja.

Al principio del afinamiento se suele utilizar este tipo de afinamiento con toda la estructura para acabar de posicionar y orientar dentro de la celdilla unidad.

- ***Afinamiento del factor de temperatura B.***

En este afinamiento se tiene en cuenta el movimiento térmico de los átomos. Puede ser isotrópico o anisotrópico, según si el factor de temperatura es el mismo para cualquier dirección de difracción o no.

- ***Simulated annealing.***

Este afinamiento consiste en simular un calentamiento muy alto de la estructura para que los átomos vibren mucho y un posterior enfriamiento muy lento para alcanzar un mínimo de energía. Normalmente lo que hace es destrozar la molécula, pero en algunos casos es muy útil ya que permite al modelo moverse con gran libertad y llegar a posiciones donde los otros métodos no convergerían.

4.3.5. Cálculo de los mapas de densidad

Cuando hemos conseguido un modelo con unos valores de R suficientemente buenos, podemos pasar a calcular los mapas de densidad electrónica para hacer el afinado final.

Utilizando la fórmula para el cálculo de la densidad electrónica en un punto del espacio determinado creamos dos mapas:

- ***Mapa de densidad $2Fo - Fc$:*** este mapa ha de sobreponerse al modelo (figura 4.10). Se calcula de la siguiente manera:

$$|F(hkl)| = 2 \cdot |F(obs)| - |F(calc)|$$



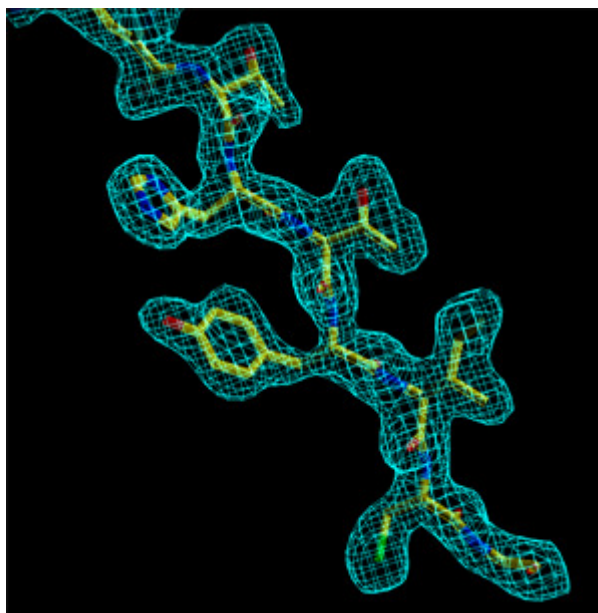


Figura 4.10: Mapa de densidad electrónica. Podemos ver cómo en este caso el mapa encaja muy bien con el modelo molecular.

- **Mapa de diferencias $F_o - F_c$:** este mapa nos ha de indicar allí donde faltan o sobran electrones. Se calcula de la siguiente manera:

$$|F(hkl)| = |F(obs)| - |F(calc)|$$

Como se puede observar, si el modelo que tenemos fuera exactamente igual al real, este mapa sería nulo, no observaríamos nada.

Aquellas zonas en las que el valor de la función es positivo son zonas donde faltan electrones y aparecen de color verde en la pantalla. En cambio, si el valor de la función es negativo, quiere decir que sobran electrones y aparece de color rojo en la pantalla.

Combinando los dos mapas podemos determinar la posición de contraiones, fármacos, aguas, etc... Así como detectar errores en el modelo.



4.3.6. Validación de la estructura

Es el último paso a dar para la resolución de la estructura, y se realiza cuando ya hemos dado por terminado el afinado (hemos conseguido los valores de R más bajos posibles) y los mapas de densidad concuerdan bien con el modelo y el mapa de diferencias es mínimo.

En la validación de la estructura se aplican criterios químicos y físicos que deben ser coherentes, como distancias de enlace, ángulos, etc. En el caso del ADN, se tienen también en cuenta parámetros helicoidales y conformacionales.

4.3.7. Listado de programas utilizados

En la siguiente lista (tabla 4.2) se detallan todos los programas utilizados durante la resolución de la estructura y en que etapa se han empleado:

Etapa	Programa	Referencia
Recogida de datos	Strategy	Ravelli et al., 1997
Procesado	DENZO y HKL-2000	Otwinoski y Minor, 1997
Escalado	SCALEPACK	Otwinoski y Minor, 1997
Obtención de los factores de escala $ F(hkl) $	Truncate	French y Wilson, 1978
Reemplazo molecular	AMoRe	Navaza y Saludjian, 1997
Afinado	REFMAC5	Murshudov <i>et al.</i> , 1997
Visualización de mapas	Coot 4.1	Emsley y Cortan, 2004
Representación gráfica	PyMOL	Delano, 2003
Realización de modelos y figuras	Cerius2	Molecular Simulations, Inc.
Validación estructura	3DNA	Lu <i>et. al.</i> , 2003
Paquetes integrados	CCP4suite	Collaborative Computational Project, number 4, 1994

Tabla 4.2: Listado de programas informáticos utilizados durante la resolución de la estructura.





5. Resultados y discusión

En este apartado se detallan todas las condiciones probadas en los ensayos de cristalización para los diferentes nucleótidos estudiados y se presentan los resultados observados. Se muestran también los espectros de difracción de algunos de los cristales obtenidos y en el único caso en el que nos ha sido posible, debido a la buena resolución de los espectros de difracción, se ha resuelto la estructura del cristal.

Consideraciones generales

Todas las concentraciones de ADN que aparecen son para cadena duplex y en todas las gotas se ha utilizado el método de difusión de vapor de gota colgante, ya explicado en el apartado de procedimiento experimental. Inicialmente todas las gotas tenían un volumen de 6 μ l y se mantenían en equilibrio con un pozo de 800 μ l.

Al estudiar un oligonucleótido con un cierto fármaco, primero hacíamos en una placa linbro unas cuantas gotas que abarcaran un rango grande de concentraciones para cada parámetro, y así ver el comportamiento general del oligo con aquel fármaco en concreto. Después se utilizaron cápsulas individuales para cada gota, variando las concentraciones entorno a los valores óptimos estimados anteriormente. Las estimaciones de la relación de concentraciones entre el oligo y el fármaco para cada caso, las hacíamos en base a las publicaciones que ya se han hecho con otros oligonucleótidos.

Además de fabricar nuestras propias gotas “caseras”, con todos los componentes añadidos uno a uno, también se han utilizado kits de cristalización de la casa Hampton Research, que consisten en un preparado de tampón, sal y precipitante al que tan solo hay que añadirle el oligonucleótido y el fármaco. Las composiciones de los tres preparados utilizados se muestran en la Tabla 5.1.

Hay que destacar también que las secuencias ricas en bases A y T son difíciles de cristalizar, según se ha visto experimentalmente. Además la resolución de los cristales que se obtienen siempre es baja en comparación con los que se obtienen con otros oligonucleótidos que tienen citosinas y guaninas en su secuencia.



Preparado	Natrix-7	Natrix-15	Natrix-22
Sal	MgCl ₂ 20 mM	MgCl ₂ 40 mM	MgAc 80 mM
Tampón	MES 50 mM pH = 6,0	NaCac 50 mM pH = 6,0	NaCac 50 mM pH = 6,5
Precipitante	Isopropanol 15%	MPD 5%	PEG-400 15%

Tabla 5.1: Composición de los preparados Natrix 7, 15 y 22 de la casa Hampton Research.

Antes de empezar la cristalización de oligonucleótidos, se hicieron, para coger práctica, unas cuantas gotas con la proteína lisozima, que en cuestión de días se ordena dando cristales muy bonitos como los de la figura 5.1.

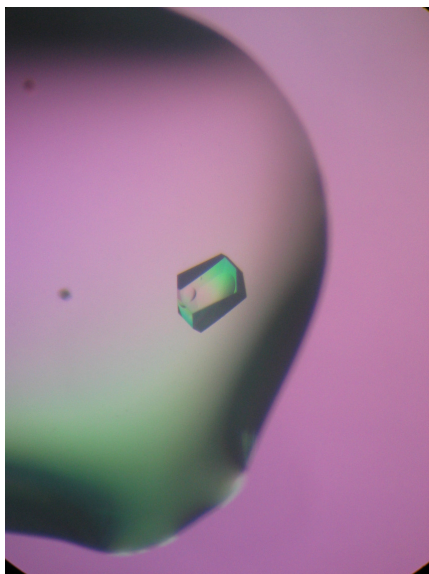


Figura 5.1: Cristal de lisozima tras 4 días de crecimiento en la placa TM-1.



5.1. Estudios de cristalización de la secuencia d(AATATATATT)₂ / A(AT)₄T en presencia de fármacos

Esta secuencia ha estado cristalizada en otras ocasiones en el laboratorio pero la estructura de este decámero no ha sido publicada hasta al momento, ni solo, ni en presencia de algún fármaco.

Las condiciones que se probaron en los estudios de cristalización fueron las siguientes:

Condiciones de la gota:

Relación oligo/fármaco: PNT→ 1/2 1/2,5 1/3 1/4 1/5 1/6

BRN→ 1/3 1/4 1/5 1/6 1/9

DAPI→ 1/0.5 1/0.75 1/1

Sal: MgCl₂→ 5, 10, 20 mM

Tampón: Cacodilato de sodio 30 mM; pH = 6,5

Preparados: Natrx-7, 15 y 22.

Espermina: 0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1 mM

Condiciones del pozo:

Precipitante: MPD, isopropanol (Natrx-7), PEG-400 (Natrx-22).

5.1.1. Resultados con las diferentes drogas

Con esta secuencia aparecieron motivos cristalinos con los tres fármacos. En su mayoría eran varitas alargadas que se formaban a una temperatura de 11°C o en la cámara de 5°C. Estas varitas normalmente no presentaban las puntas definidas y se tuvieron que hacer varias replicas e ir jugando con la temperatura y la concentración de precipitante, hasta obtener cristales buenos para difractar. En las figuras 5.2 (a) y (b) podemos ver dos ejemplos de las varitas que se obtenían.



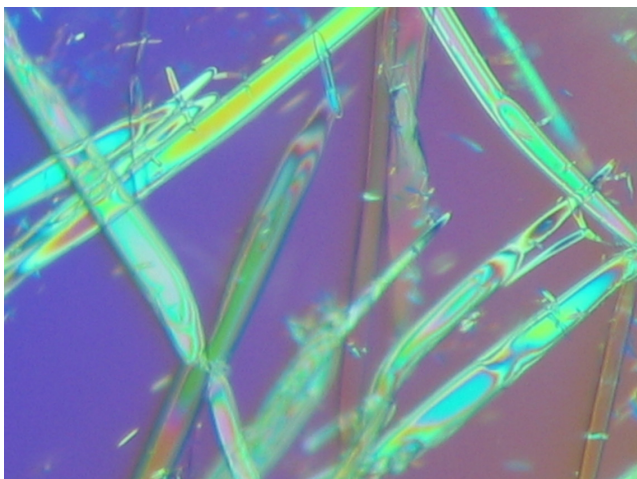
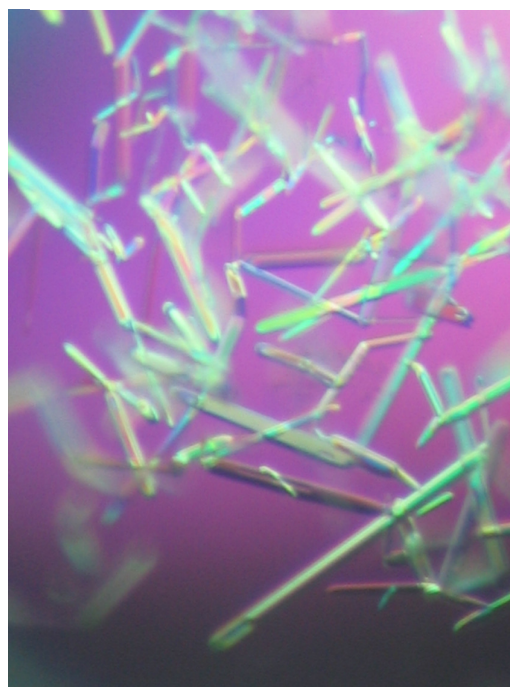


Figura.5.2(a): Cristales alargados obtenidos en la cápsula 61, con el oligonucleótido $A(AT)_4T$ y el fármaco Berenil. Cogimos una de las varitas y se hizo la difracción, pero sin buenos resultados.

Figura.5.2(b): Varitas estrechas y alargadas obtenidas con el oligonucleótido $A(AT)_4T$ en presencia de DAPI (cápsula 88). Se puede apreciar que son muy rectas pero sus puntas todavía no están bien definidas. Se hizo la difracción de una de ellas pudiéndose determinar el grupo espacial.



5.1.2. Cristales obtenidos

Obtuvimos cristales con las tres drogas (PNT, BRN y DAPI). En total fueron 7, procedentes de 6 gotas diferentes (cápsulas 38, 39, 61, 74, 88 y 109). Por desgracia, ninguno de ellos dió un espectro de difracción con resolución suficiente como para poder resolver su estructura.



El cristal que dió mejores resultados fue el de la cápsula 88, del que pudimos determinar el grupo espacial al que pertenecía. Las condiciones en las que se obtuvo fueron las siguientes:

Oligo: A(AT) ₄ T 0,2 mM
Droga: DAPI 0,1 mM
Tampón: NaCac 30 mM; pH = 6,5
Sal: MgCl ₂ 5 mM
Espermina: 0,2 mM
Condiciones pozo: 31% MPD
Temperatura: 5°C

5.1.3. Recogida de datos y procesado

La difracción del cristal se hizo en la línea española BM-16 del sincrotrón de Grenoble (ESRF), con una longitud de onda $\lambda = 0,9795 \text{ \AA}$ y una temperatura de 104 K. Sólo se hizo una recogida a una distancia del detector de 280 mm y se llegó a una resolución máxima de $R = 3,3 \text{ \AA}$. El espectro de difracción se presenta en la figura 5.3.

Los datos se procesaron con el programa HKL-2000 dando un grupo espacial y unos parámetros de celdilla unitaria que se detallan en la tabla 5.2.



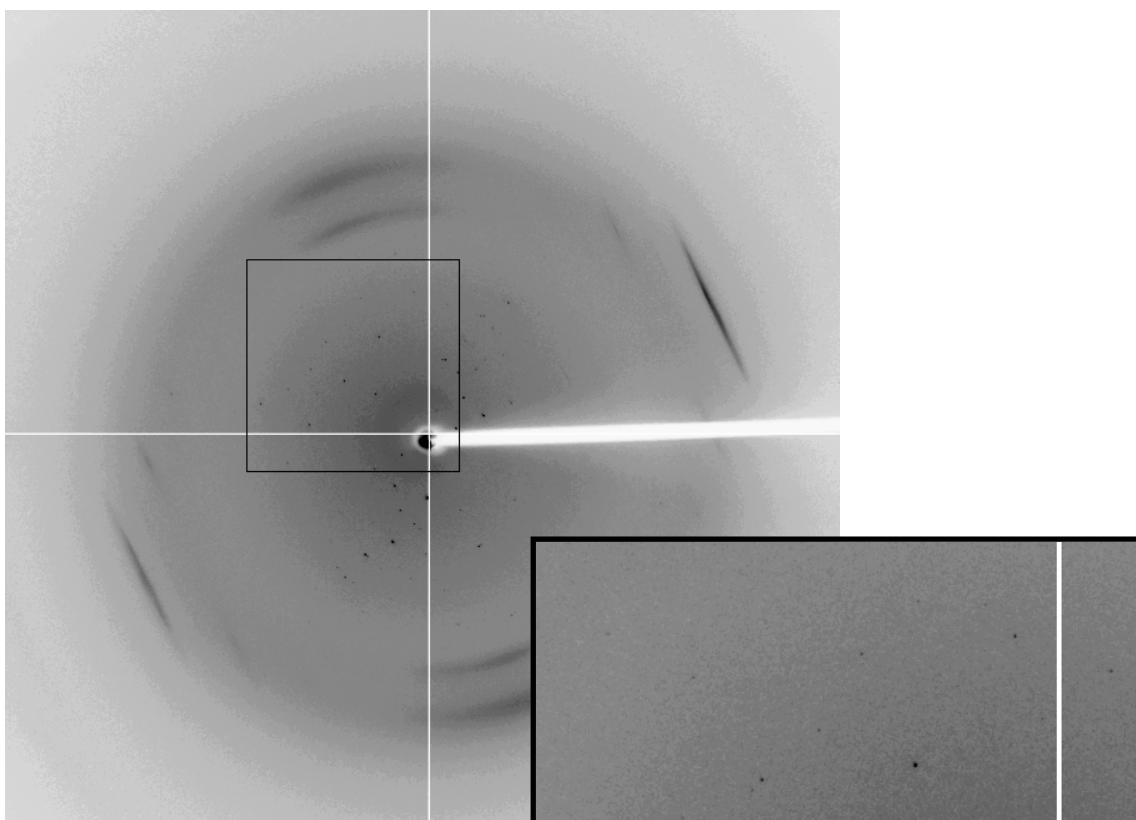


Figura 5.3: Espectro de difracción de un cristal de la cápsula 88. A la derecha hay una ampliación de una zona donde se ven reflexiones. En el espectro también se puede apreciar el stacking de las bases así como unos arcos concéntricos debidos al ordenamiento del hilo de nylon.

Grupo espacial	R3
Dimensiones celdilla (Å)	a = 45,568; b = 45,568; c = 198,675
Ángulos	$\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Volumen celdilla	357.268 Å ³

Tabla 5.2: Parámetros de celdilla y grupo espacial obtenidos para el cristal de la cápsula 88 después del indexado con el programa HKL-2000.



5.2. Estudios de cristalización de la secuencia d(CATATATG)₂ / C(AT)₄G sola y en presencia de fármacos

Con esta secuencia se intentó cristalizar en presencia de los fármacos y también sola, ya que su estructura no ha sido obtenida hasta el momento.

De sales utilizamos Ni²⁺, además de Mg²⁺ ya que interactúa con la guanina haciendo de puente y estabilizando la estructura (Abrescia et al., 1999).

En las gotas realizadas se ha trabajado con las siguientes variables:

Condiciones de la gota:

Relación oligo / fármaco (varía para cada fármaco): PNT: 1/4, 1/3, 1/7.

BRN: 1/4, 1/5, 1/3.

DAPI: 1/1, 1/1,5.

Tampón: Cacodilato de sodio 30mM pH=6,5.

También se han utilizado los preparados Natrix-7,15 y 22.

Sal: MgCl₂: 5, 15 mM

NiCl₂: 1, 5, 15 mM

(En algunas gotas también se han utilizado las dos sales a la vez).

Espermina: 0, 0.3, 0.5, 0.6, 0.9, 1.5 mM.

Precipitante: 0, 5% MPD

Condiciones del reservorio:

Precipitante: MPD (en la gran mayoría), isopropanol (Natrix-7), PEG-400 (Natrix-22).

5.2.1. Resultados con los diferentes fármacos

Se obtuvo un único cristal con este oligo, aunque en teoría debía formarlos más fácilmente, ya que en los extremos están las bases nitrogenadas citosina y guanina que se emparejan



más fácilmente y con más fuerza que el par de bases A / T, y por lo tanto se produce así un efecto de “cremallera” por así llamarlo.

En las gotas en las que el oligonucleótido se encontraba solo observamos algunas varitas muy finas y precipitado cristalino. Se pudo observar, como ya se esperaba, una cristalización mejor del oligo cuando en el medio hay iones Ni^{2+} .

Por lo que respecta a las gotas de esta secuencia con las drogas, se obtuvo precipitado amorfo en la gran mayoría de ellas. El único cristal, se recolectó en presencia de DAPI y al cabo de mucho tiempo después de ir al sincrotrón, por lo que está pendiente de hacer la difracción de rayos X.

5.3. Estudios de cristalización de la secuencia d(TATATATA) / (TA)₅ en presencia de PNT y BRN

En el caso de esta secuencia se hicieron gotas tanto con el nucleótido solo como en presencia de fármacos, ya que la estructura de este decámero todavía no ha estado determinada en ninguna ocasión. Esto es debido a la dificultad, constatada experimentalmente, de esta secuencia para formar cristales buenos para difractar.

Tan solo se hizo una placa Linbro con 24 gotas. Las variables que se fueron variando en cada gota fueron las siguientes:

Condiciones de la gota:

Relación oligo / fármaco: PNT: 1/1, 1/2.5, 1/5.

BRN: 1/5, 1/10

Tampón: Cacodilato de sodio 30mM pH=6,5

Sales: MgCl₂: 5 y 15 mM

Espermina: 0 y 0,5 mM

Precipitante: 5% MPD



Condiciones del reservorio:

Precipitante: MPD

5.3.1. Resultados obtenidos

Como ya sabíamos de antemano que obtener cristales de esta secuencia en concreto era complicado, y por falta de tiempo, se centraron los esfuerzos sobre las otras secuencias que daban mejores resultados.

Lo mejor que llegamos a obtener fueron algunas esferulitas y precipitado cristalino. En las otras gotas, en el momento que la concentración de precipitante subía, se formaba precipitado amorfo.

5.4. Estudios de cristalización de la secuencia d(ATATATATAT)₂ / (AT)₅ en presencia de fármacos

La secuencia d(ATATATATAT)₂ (AT)₅ ha sido cristalizada, sin fármaco, como coiled coil en nuestro laboratorio y los resultados están en estudio. No podemos tener ninguna referencia de cómo cristaliza con fármaco. Aun así, sí que han sido cristalizadas las secuencias d(ATATAT) (Abrescia et al., 2002) y d(ATATATATATAT) (Campos *et al.*, 2005). Por lo tanto sí que nos podemos hacer una idea de cómo será su estructura, ya que toda esta familia de oligonucleótidos presentan unos rasgos comunes, como es la formación de coiled-coils y del apareamiento tipo Hoogsteen entre sus bases.

En cambio, sí que se ha cristalizado previamente un oligonucleótido en presencia de pentamidina. En concreto, con el dodecámero de Dickerson (CGCGAATTCGCG).

Con la secuencia (AT)₅ es con la que se hicieron más cantidad de gotas y con la que se obtuvieron mejores resultados.

Las variables de cristalización fueron las siguientes:



Condiciones de la gota:

Relación oligo/droga: PNT→ 1/1, 1/2.5, 1/4, 1/5, 1/6.

BRN→ 1/3, 1/4, 1/5, 1/9, 1/12.

DAPI→ 1/0.5, 1/1, 1/1.5, 1/2.

Sal: MgCl₂→ 5, 10, 15, 20 mM

Tampón: Cacodilato de sodio 30 mM pH=6,5

Preparados: Natrix- 7, 15 y 22.

Espermina: 0, 0.2, 0.5, 1 mM

Precipitante: 0, 5 % MPD

Condiciones del pozo:

Precipitante: MPD, isopropanol (Natrix-7), PEG-400 (Natrix-22)

5.4.1. Resultados con la Pentamidina

Se empezó manteniendo las gotas en la habitación de 20°C, sin resultados muy buenos. A lo más, precipitado cristalino, y cristales pequeños en algún caso. Después se fueron cambiando de temperatura a las neveras de 16 y 11°C para ver cómo evolucionaban, y de esta manera fue como obtuvimos el primer cristal bueno (cápsula 81), una columna hexagonal muy grande, bien definida por una parte (figura 5.4).

Al cambiar las gotas a la cámara de 5°C fue cuando obtuvimos los mejores resultados viendo claro un mejor comportamiento del oligonucleótido a bajas temperaturas, ya que aparecieron con el tiempo cristales bonitos de formas regulares y que mostraron alta birrefringencia en más de una gota.



Figura 5.4: Primer cristal obtenido con $(AT)_5$ en presencia de Pentamidina (cápsula 81) con forma de columna hexagonal a una temperatura de 11°C . Se puede apreciar que unos de los lados del cristal todavía no está formándose, así como una brecha que atraviesa el cristal.

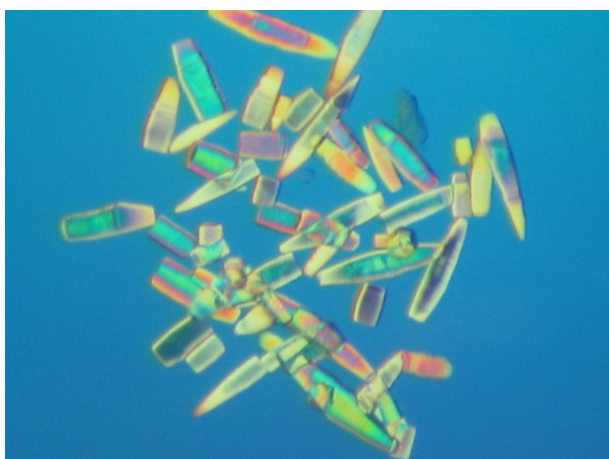
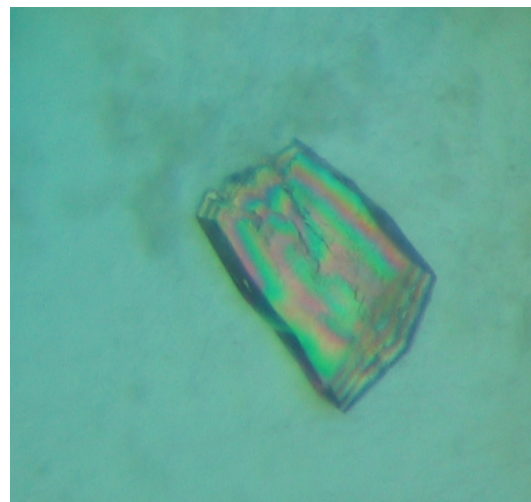


Figura 5.5: Cristales del oligonucleótido $(AT)_5$ en presencia de Pentamidina (cápsula 42) en la cámara de 5°C . Sus formas son regulares y presentan una alta birrefringencia. Se hizo la difracción de varios de ellos, obteniendo buenos resultados y pudiendo resolver su estructura.

5.4.2. Resultados con el Berenil

De la misma manera que con la Pentamidina, con el Berenil se empezaron a hacer los estudios cristalográficos a la temperatura de 20°C . Se vió que las condiciones óptimas de cristalización eran con una relación entre el oligo y el fármaco de 1/9 aproximadamente. En muchos casos aparecieron erizos cristalinos, o separación de fases (figura 5.6) que no evolucionaba a cristales por mucho que se subiera la concentración de precipitante del pozo.

Al bajar la temperatura no obtuvimos mejores resultados. Al contrario, aparecía precipitado amorfo al poco tiempo.



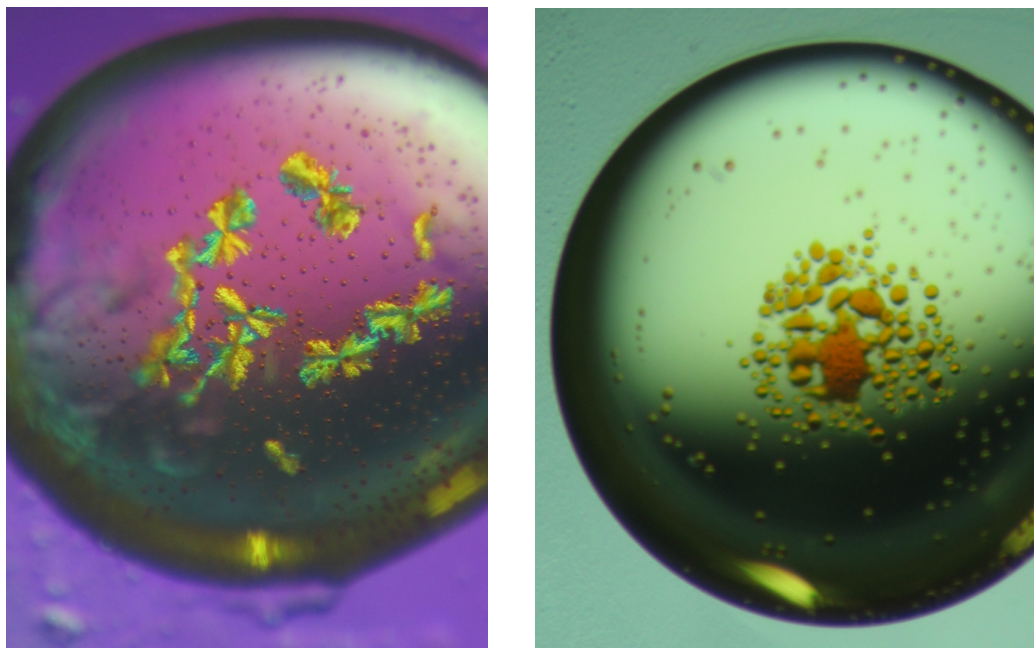


Figura 5.6: Erizos cristalinos obtenidos con el oligonucleótidos $(AT)_5$ en presencia de Berenil (izquierda). Los colores que presentan son debidos a que se les esta aplicando luz polarizada y éstos, al tener un cierto orden interno, la desvían. En otras palabras, presentan birrefringencia. A la derecha en cambio, podemos ver varias gotas de separación de fases que aparecieron en muchas gotas con $(AT)_5$ y BRN.

5.4.3. Resultados con el DAPI

En el caso del DAPI no se dedicaron los mismos esfuerzos que con la Pentamidina o el Berenil, ya que se empezaron a hacer las gotas más tarde. Por este motivo muchas gotas todavía estaban limpias, es decir, no habían llegado todavía a la situación de sobresaturación, y no sabemos si se podría haber obtenido algún cristal bueno para hacer la difracción.

Aún así, en alguna gota aparecieron cristales pequeños, con una concentración de fármaco entre igual y el doble que la del oligo.

5.4.4. Cristales obtenidos

Se obtuvieron un total de 15 cristales de 5 gotas diferentes (cápsulas 41, 42, 43, 75, 81), todos ellos en presencia de Pentamidina. Las formas de todos ellos eran bastante



parecidas, cristales alargados que se hacen estrechos en los extremos y con las caras hexagonales o cuadradas (figura 5.5).

El cristal que dió el mejor espectro de difracción pertenecía a la cápsula 42, las condiciones en las cuales se obtuvo son las siguientes:

Oligo: (AT) ₅ 0,4 mM
Droga: PNT 1,6 mM
Tampón: MES 17 mM ; pH 6,0
Sal: MgCl ₂ 7 mM
Condiciones pozo: 37% MPD; 5% isopropanol
Temperatura: 5°C

Una cosa importante a señalar es que la difracción de los cristales de las cápsulas 43 y 75 aún no se ha podido hacer, ya que se recolectaron más tarde de ir al sincrotrón, y estamos a la espera de saber si tienen una mejor resolución. Además en el caso de la cápsula 43, la concentración de PNT es mayor y podremos ver también como esto influye en la estructura resultante.



5.5. Resolución de la estructura del oligonucleótido $d(ATATATATAT)_2 / (AT)_5$ en presencia de PNT

5.5.1. Recogida de los datos y procesado

La difracción de rayos X del cristal se hizo en la línea española BM-16 del sincrotrón de Grenoble (ESRF), a una longitud de onda de 0,9795 Å y una temperatura de 104 K. El detector utilizado fue el ADSC Quantum-210.

Se hicieron un total de 90 imágenes de difracción del cristal, con una variación en el ángulo de oscilación de 2° para cada imagen en el intervalo de 0 a 180°. Se obtuvo una resolución máxima de 2,53 Å. En las figuras 5.7 y 5.8, se pueden ver dos de los diagramas de difracción realizados y una zona ampliada de cada uno.

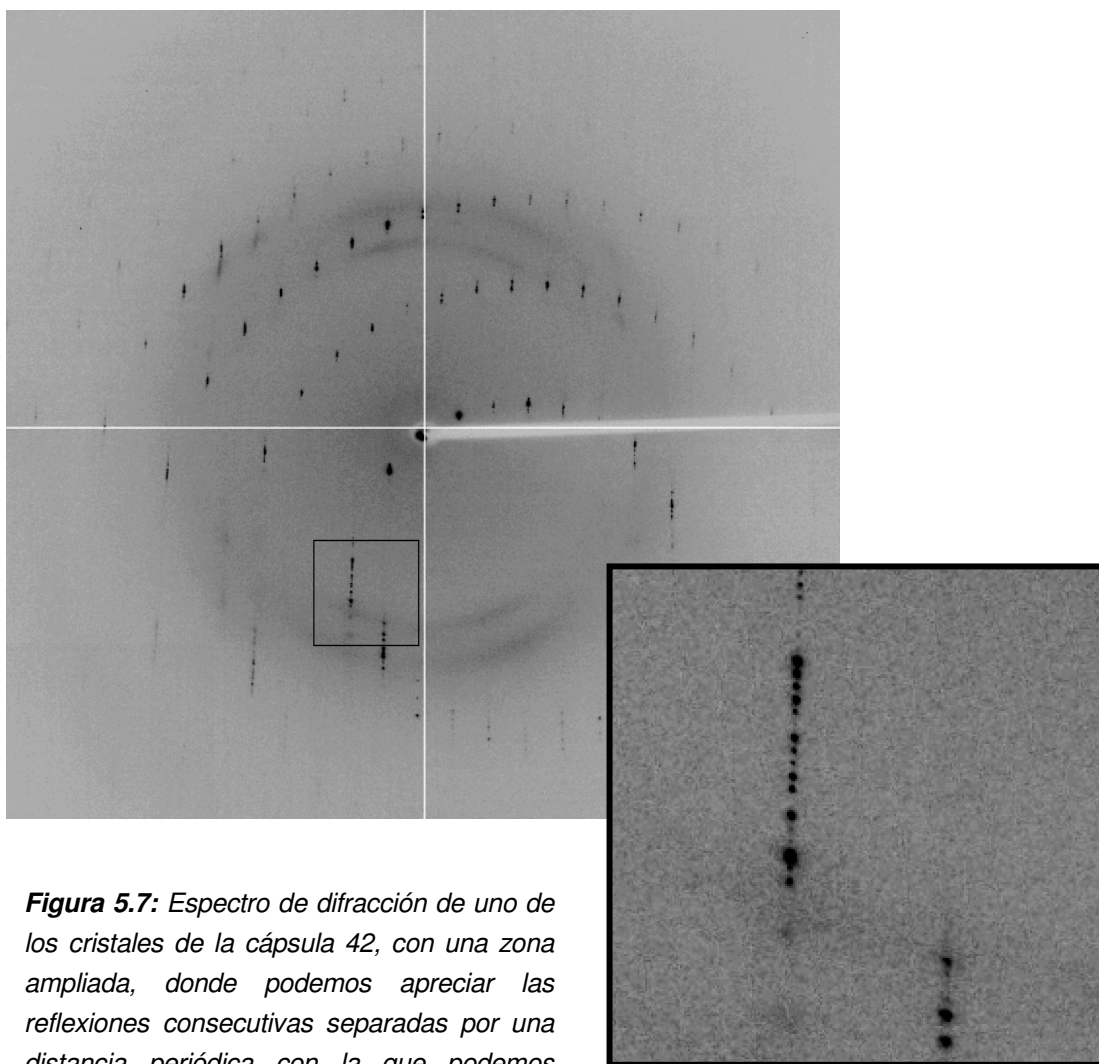


Figura 5.7: Espectro de difracción de uno de los cristales de la cápsula 42, con una zona ampliada, donde podemos apreciar las reflexiones consecutivas separadas por una distancia periódica con la que podemos calcular el parámetro de celdilla "c".



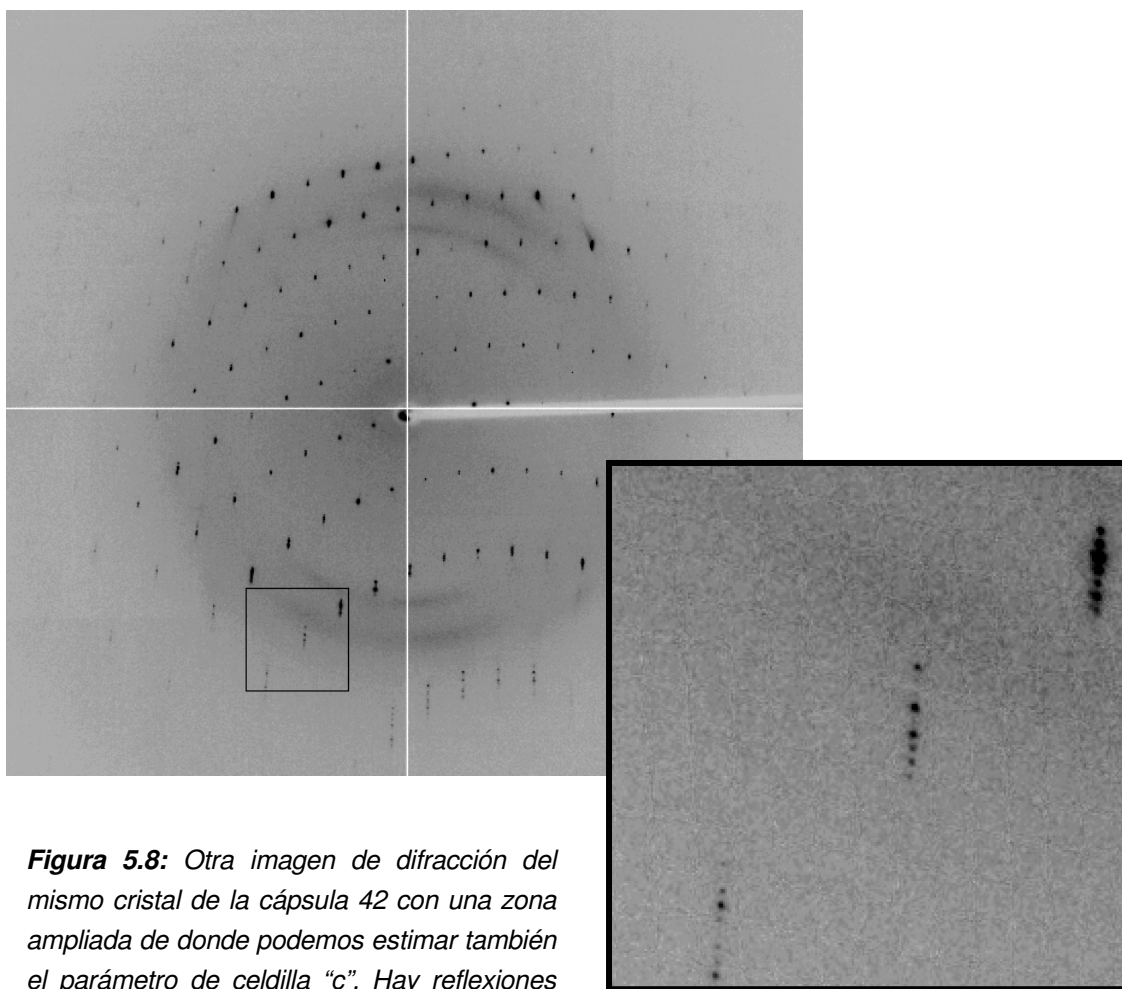


Figura 5.8: Otra imagen de difracción del mismo cristal de la cápsula 42 con una zona ampliada de donde podemos estimar también el parámetro de celdilla "c". Hay reflexiones hasta una resolución 2,53 Å.

Se empezó a hacer el tratamiento de los datos con el programa DENZO, pero tras varios intentos sin éxito, probamos con el programa HKL-2000, una versión más nueva del mismo programa, que procesó los datos fácilmente. Seguidamente se hizo el escalado con el programa SCALEPACK, integrado en el HKL-2000. Los resultados obtenidos tras aplicar estas operaciones se encuentran en la tabla 5.3:



Grupo espacial	P6 ₅ 22
Dimensiones de la celdilla	a = b = 27,789 Å c = 311,95 Å $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$
Rango de resolución	50 – 2,52 (2,56 – 2,52)
Reflexiones únicas	2899 (128)
Completeness (%)	94,7 (100,0)
Redundancia	15,8
R_{merge}	0,098 (0,212)

Tabla 5.3: Resultados obtenidos tras el indexado y el escalado de los datos de difracción del cristal de la cápsula 42. Los datos entre paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

5.5.2. Afinado de la estructura

La resolución de la estructura se llevó a cabo con la técnica del reemplazo molecular (explicada anteriormente) con el programa AMoRe. Para el refinado utilizamos el programa REFMAC, del paquete CCP4, haciendo un afinado anisotrópico con un 5% de reflexiones para calcular el parámetro R_{free} , y finalmente la validación de la estructura se hizo con el programa 3DNA.

Como referencia se utilizó un modelo teórico WC, y para el tipo Hoogsteen una estructura ya resuelta del oligonucleótido CG(AT)₅ (De Luchi et al., 2006), pero quitándole los dos primeros pares de bases. Las primeras pruebas las hicimos cogiendo como modelo el Hoogsteen, ya que se había encontrado en trabajos anteriores (Abrescia et al., 2002) con oligonucleótidos con secuencias alternantes AT.

En nuestro caso en cambio, al comenzar a hacer los primeros ciclos de refinado con el programa REFMAC, se pudo ver claramente que el modelo con el apareamiento tipo WC se ajustaba mejor a nuestros datos.

A partir de aquí, ya empezamos a mirar los mapas de densidad electrónica ($F_o - F_c$) y ($2F_o - F_c$), donde vimos una zona de densidad electrónica extra en la parte central del surco



estrecho del dúplex. Colocamos la molécula de Pentamidina ahí, y al aplicar ciclos de refinado la droga encajó perfectamente, como se puede ver en la figura 5.9, y se redujeron también los parámetros R_{work} y R_{free} .

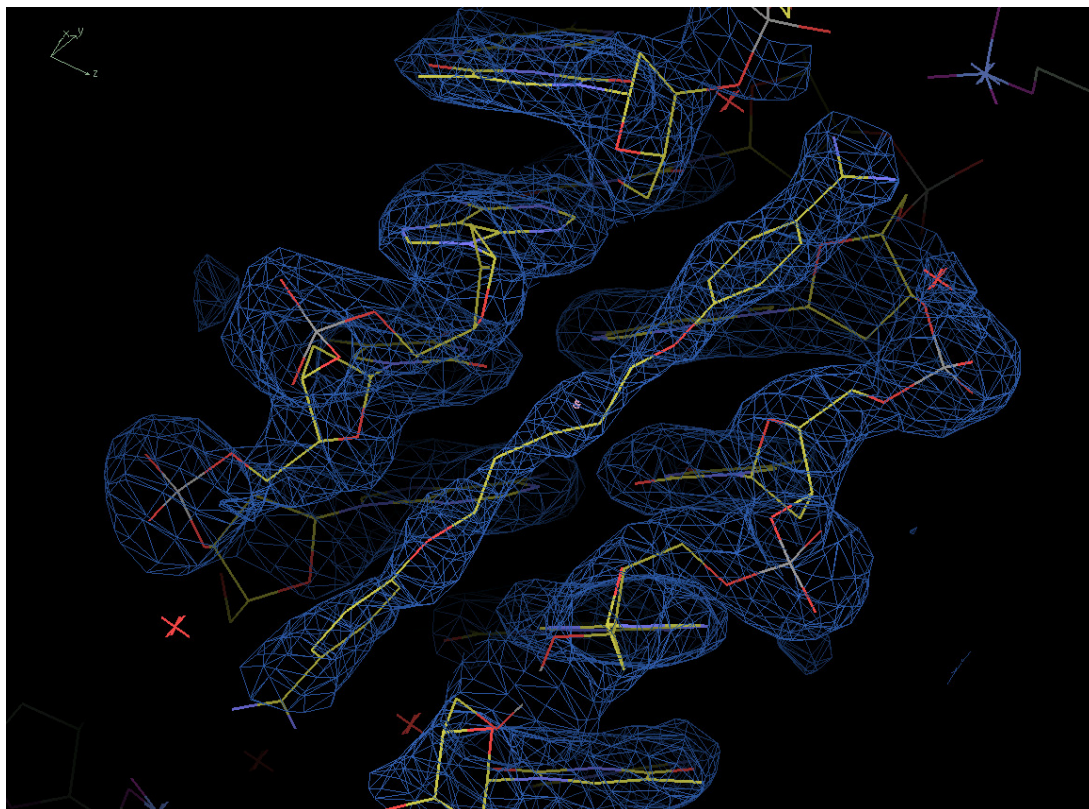


Figura 5.9: Detalle del mapa de densidad electrónica de la zona donde la Pentamidina se encaja en el surco estrecho, colocándose paralela a las cadenas de azúcares y fosfatos. Se puede observar como el modelo molecular está dentro de la densidad electrónica calculada a partir de los datos experimentales.

Seguidamente se colocó un ión Magnesio $2+$ en una zona de densidad electrónica extra que se encontraba también en el surco estrecho, pero en uno de los extremos del oligo. Lo aceptó sin problemas, pero lo que resultó más difícil, fue rodearlo de sus aguas de coordinación, cosa también normal a esta resolución. Finalmente pudimos rodearlo con 5 aguas de coordinación de las 6 con las que en teoría debería estar coordinada, ya que este ión presenta una geometría octaédrica de coordinación.

Hecho esto, sólo nos quedaba solucionar una cosa para poder acabar de bajar los parámetros R_{work} / R_{free} y así poder dar la estructura por resuelta: los dos últimos pares de bases del dúplex no coincidían bien con los mapas de densidad.



El último par de bases se puso en su sitio tras varios ciclos después de cambiar el apareamiento a tipo Hoogsteen, con una mejora significativa de los parámetros R.

Con el penúltimo par de bases, en cambio, tuvimos más problemas y, aunque mejoró, no lo llegamos a modelar perfectamente. Los intentos fueron encaminados en asignar una ocupación para cada tipo de apareamiento entre bases (Hoogsteen y WC) en la estructura final del cristal. Probamos varios porcentajes, pero ninguno de ellos tuvo éxito.

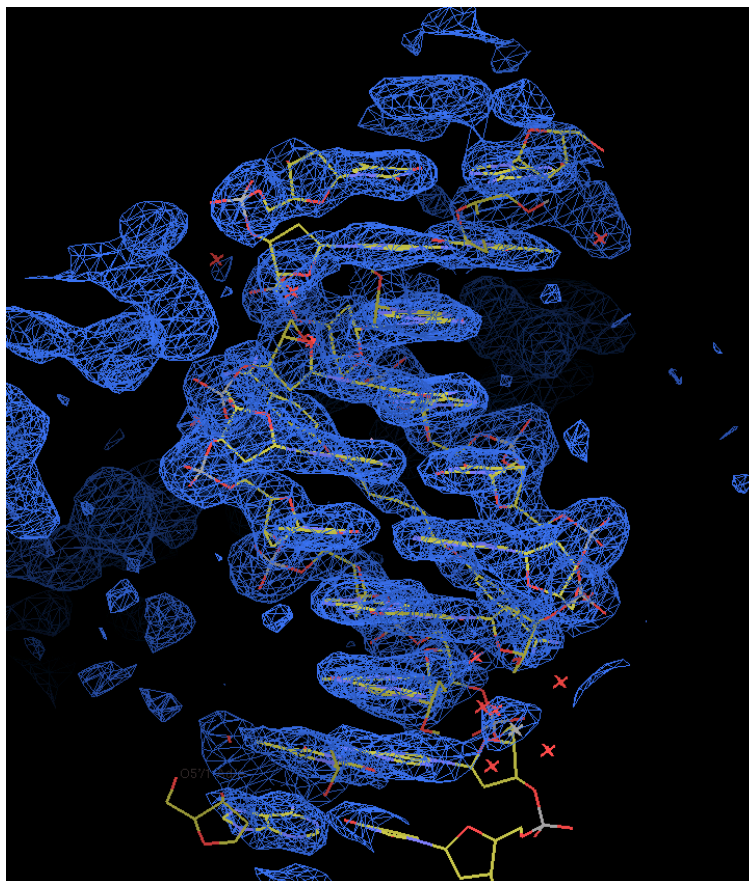


Figura 5.10: Mapa de densidad electrónica $2F_o-F_c$ de la estructura resuelta.

Para finalizar se añadieron las moléculas de agua que faltaban y se veían más claras y, así, en la figura 5.10 podemos ver el mapa de densidad ($2F_o - F_c$) de la estructura resuelta. Los resultados del afinado se presentan a continuación en la tabla 5.4.

Los parámetros conformacionales de la estructura se calcularon con el programa 3DNA.



Contenido de la unidad asimétrica	1 dúplex de DNA 1 Pentamidina / 1 Mg ²⁺ 51 Aguas
Z*	12
Rango de resolución	50 – 2,52
Reflexiones únicas	2899
R _{work}	0,216
R _{free}	0,277
B factor medio (Å ²)	43,5

Tabla 5.4: Resultados después del afinado de la estructura del oligonucleótido (AT)₅ en presencia de Pentamidina. (*) Este parámetro indica el número de oligonucleótidos que están relacionados por simetría con el que se encuentra en la unidad asimétrica.

5.5.3. Descripción de la estructura

La unidad asimétrica contiene un dúplex de la secuencia d(ATATATATAT)₂, una molécula de Pentamidina y un ión Magnesio, además de las aguas.

El papel de la Pentamidina

La Pentamidina, como ya se ha visto con anterioridad en otros trabajos (Edwards et al., 1992), se coloca en el surco estrecho del DNA, encajándose la cadena metilénica y los anillos benzénicos en esta región hidrofóbica. También en nuestro caso se coloca en el surco estrecho de la parte central del oligonucleótido, como se puede observar en la figura 5.11a, pero con una diferencia notoria. Y es que los extremos de la droga cargados positivamente, correspondientes a los grupos amidina, en vez de interactuar con bases nitrogenadas dentro del mismo oligo y seguir así el curso del surco estrecho, salen un poco hacia fuera de éste, interactuando electrostáticamente con grupos fosfatos de los oligonucleótidos vecinos, y dando de esta manera una estabilidad extra al cristal. Esta función de la droga como “puente” entre oligonucleótidos vecinos, no ha sido observada



todavía ni con la Pentamidina, ni con otros fármacos. La podemos observar en la figura 5.11b. En la figura 5.12, en cambio, se muestra la diferencia estructural entre la pentamidina cristalizada con el dodecámero de Dickerson $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$, y la que se presenta en este trabajo. Puede verse claramente, como en nuestro caso, la droga está mucho más extendida para poder así interactuar con los fosfatos de los oligonucleótidos vecinos.

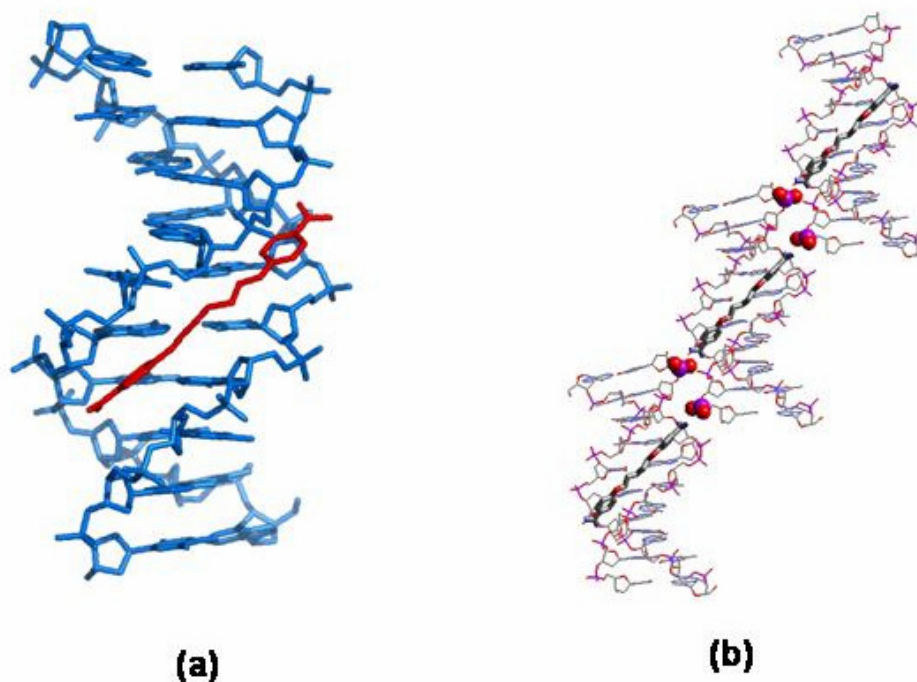


Figura 5.11: Estructura molecular resuelta del oligonucleótido $(\text{AT})_5$ (a) en la que podemos ver la Pentamidina (rojo) en el surco estrecho central. En la figura (b) podemos ver como la droga interactúa por sus extremos con los fosfatos de oligonucleótidos vecinos haciendo de cross-linker.



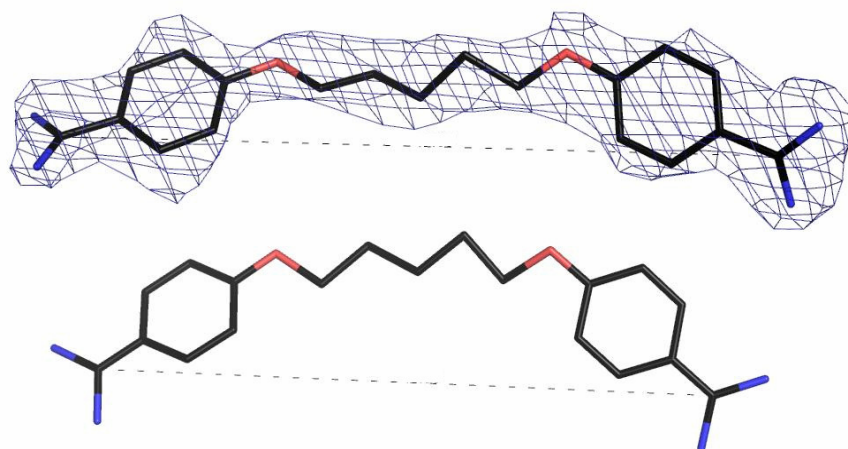


Figura 5.12: Estructura de la Pentamidina con su densidad electrónica en nuestro cristal (arriba). Comparándola con la estructura que presenta el mismo fármaco con el oligonucleótido $d(CGCGAATTCGCG)_2$ (abajo), se puede ver que en nuestro caso, la droga está más extendida (17,60Å frente a 15,66 Å de distancia entre los carbonos de las puntas), lo que le permite salirse del surco estrecho e interactuar con los grupos fosfato de oligonucleótidos vecinos.

El ión Mg^{2+}

Por su parte, el ión Magnesio también está alojado en el surco estrecho del decámero, pero en uno de sus extremos. Tiene 5 aguas de coordinación a su alrededor (la sexta que le correspondería a su coordinación octaédrica está demasiado desordenada para verse a esta resolución), las cuales interactúan a su vez mediante puentes de hidrogeno con las bases nitrogenadas del extremo del oligonucleótido y también con la Pentamidina. En la figura 5.13, se ve muy bien cómo el surco estrecho está ocupado por la droga y el ión Magnesio, así como por las aguas de coordinación de este último y también por las aguas que forman el llamado “esqueleto de aguas”, que se ha encontrado ya en muchas estructuras resueltas anteriores (Schneider y Berman, 1995). En la figura 5.14, podemos ver una visión general del surco estrecho del oligonucleótido, donde podemos apreciar este esqueleto de aguas que acabamos de comentar, aunque en nuestro caso faltarían unas pocas que han sido desplazadas por la Pentamidina.



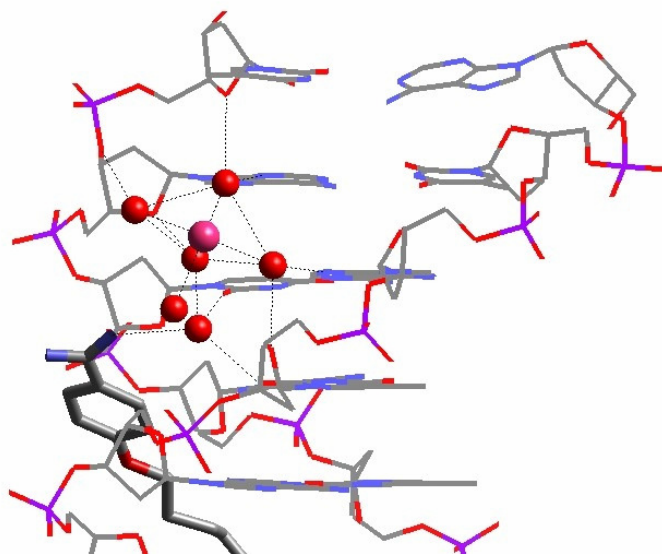


Figura 5.13: Situación del ión Magnesio (bola lila) en la estructura. Puede verse como tiene cinco aguas de coordinación que interaccionan por puentes de hidrógeno con la pentamidina y las bases nitrogenadas.

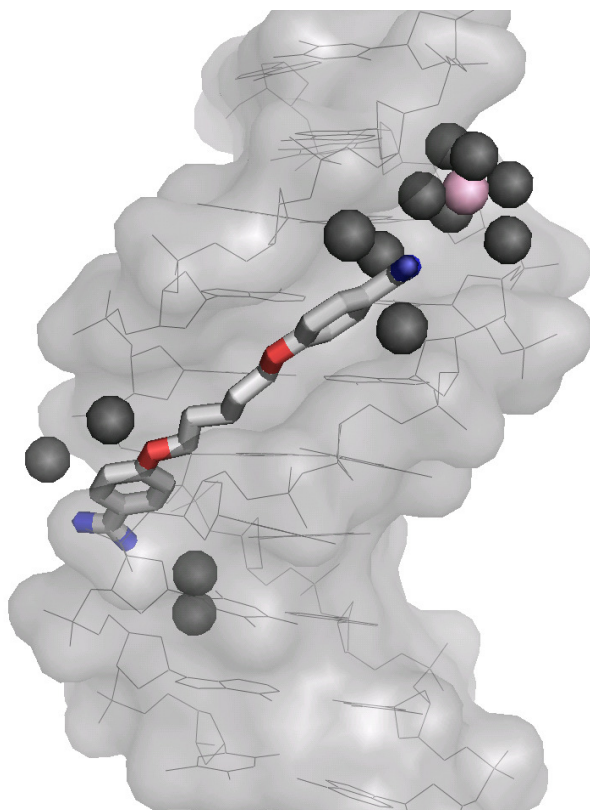


Figura 5.14: Vista general del surco estrecho del oligonucleótido (AT)₅, ocupado por la droga, el ión Magnesio hidratado y varias moléculas de agua pertenecientes al llamado "esqueleto de aguas".



Apareamiento entre bases

Viendo la estructura del dúplex, a primera vista, con la droga muy bien centrada, puede parecer que éste es simétrico, pero no es así. Presenta en cambio dos extremos diferenciados, uno con un tipo de apareamiento WC entre sus bases nitrogenadas (el mismo extremo donde se encuentra el Magnesio), y el otro de tipo Hoogsteen. La zona central, donde se encuentra el fármaco extendido, tiene todas las bases con una interacción del tipo WC. Pero el par de bases que se encuentra entre el extremo Hoogsteen del oligonucleótido y uno de los extremos de la droga, presenta una estructura inusual, debido a su papel como par de bases de transición. Es el que nos ha costado más esfuerzos de modelar y que, aún así, no hemos conseguido que encaje totalmente en la densidad electrónica.

La distancia C1'-C1' entre los azúcares de este par de bases anómalo es de 9.8 Å, algo menor que en el caso de un WC (10,5 Å) y algo mayor que para uno de tipo Hoogsteen (8,4 Å). Además parece tener un puente de hidrógeno extra entre el oxígeno O2 de la timina y el carbono C2 de la adenina, teniendo así 3 puentes de hidrógeno, cuando el apareamiento WC de estas dos bases nitrogenadas siempre se ha observado hasta el momento con solamente dos interacciones por puentes de hidrógeno.

En la figura 5.15, podemos ver los dos tipos de apareamiento presentes en la estructura, así como también el par de bases anómalo del cuál hemos hablado.



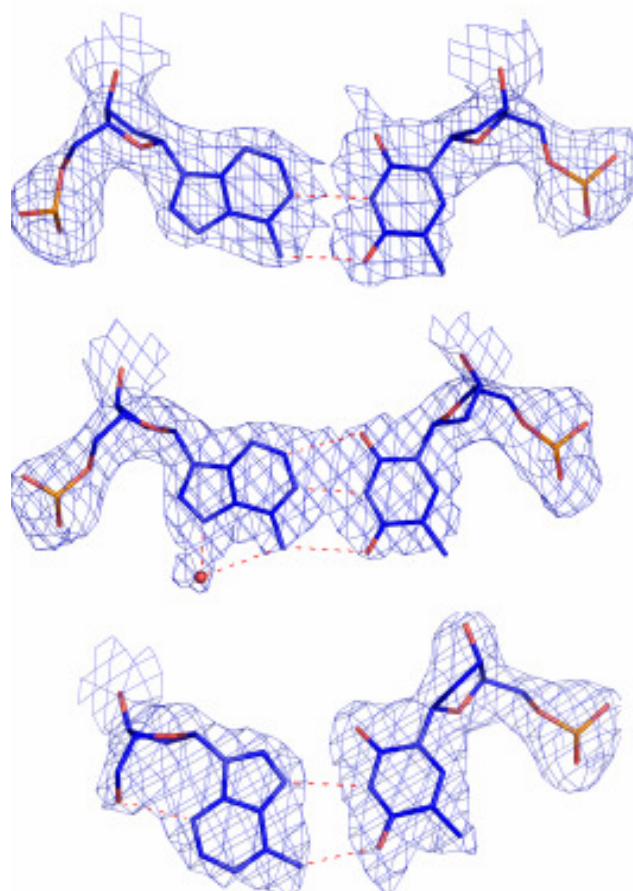


Figura 5.15: Arriba, el antepenúltimo par de bases de la estructura, con un apareamiento WC, que encaja perfectamente en la densidad electrónica. También lo hace el último par de bases del oligonucleótido (abajo), que tiene un emparejamiento Hoogsteen. En el centro, vemos el par de bases anómalo. Notar como las densidades electrónicas de las dos bases se funden, al tener más desorden, y también los tres puentes de hidrógeno (líneas rojas discontinuas).

El coiled-coil

Si observamos el camino que van describiendo los oligonucleótidos consecutivos, podremos ver que describen una superhélice (también llamada coiled-coil), donde el eje de cada dúplex está girado un cierto ángulo respecto al eje de esta hélice mayor. Este tipo de estructura ya se ha encontrado en trabajos anteriores (Campos *et al.*, 2005).

En nuestro caso, la superhélice es levógira, tiene 12 oligonucleótidos por vuelta y un diámetro de 85 Å. Ocupa una extensión de 4×4 celdillas unidad como podemos ver en la figura 5.16. Cada coiled-coil está rodeado en el cristal por 6 coiled-coils idénticos, que



forman un empaquetamiento compacto, estabilizado a su vez por el hecho de que la Pentamidina los une a todos ellos a través de enlaces iónicos pentamidina-fosfato, como ya se ha descrito anteriormente.

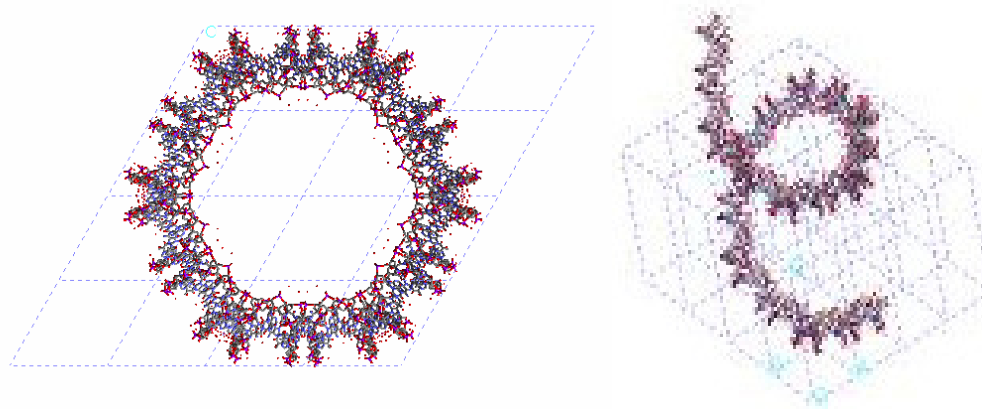


Figura 5.16: A la izquierda, vista desde arriba de la superhélice, dónde se puede apreciar el espacio que ocupa de 4x4 celdillas unitarias, representadas con líneas discontinuas. A la derecha vista en perspectiva del coiled-coil.

Como hemos visto, en nuestro caso, el oligonucleótido presenta dos extremos diferenciados. La superhélice se forma por interacciones cabeza-cabeza cola-cola, es decir, que a un extremo con un apareamiento entre sus bases Hoogsteen, le sigue otro extremo de las mismas características perteneciente al dúplex siguiente, y a la inversa.

Así pues, tenemos dos tipos de transiciones entre oligonucleótidos presentes en el coiled-coil, tal y como se puede observar en la figura 5.17. En la transición con extremos Hoogsteen, los ejes de los dos oligonucleótidos son casi paralelos, pero un poco desplazados. Los dos pares de bases están bastante separados (9 Å), y se produce un stacking parcial entre las adeninas y las timinas de ambos (figura 5.18). El ángulo twist del paso TA virtual es de 47°.

En la transición entre extremos WC, en cambio, los ejes de cada nucleótido difieren en un ángulo de 37,1°, y es el que determina la formación de la superhélice. Los pares de bases están un poco desplazados y esto favorece que haya un buen stacking entre adeninas. Las timinas a su vez se apilan con los azúcares. En ángulo de twist para el paso TA virtual, es en este caso de -7°.

El apilamiento entre bases para los dos tipos de finales se presenta en la figura 5.18 en vista estereoscópica.



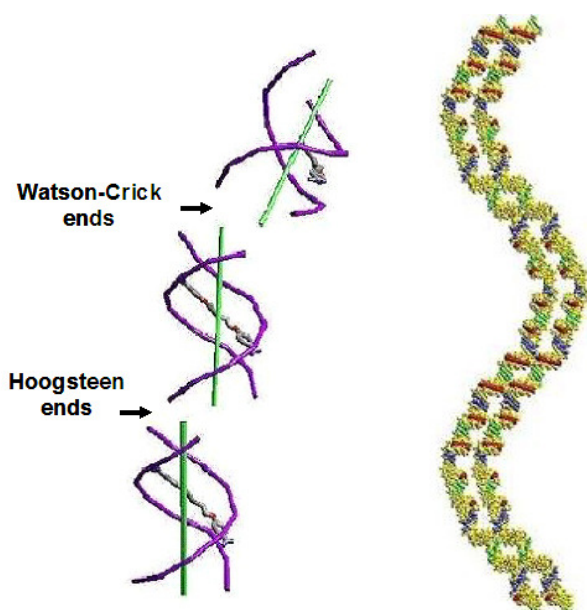


Figura 5.17: Interacciones cabeza-cabeza cola-cola entre los oligonucleótidos de la superhélice (izquierda). Notar como el giro se realiza mayoritariamente en las transiciones WC, mientras que los ejes de los oligonucleótidos se mantienen casi paralelos en las transiciones Hoogsteen. A la derecha podemos observar dos coiled-coils vecinos.

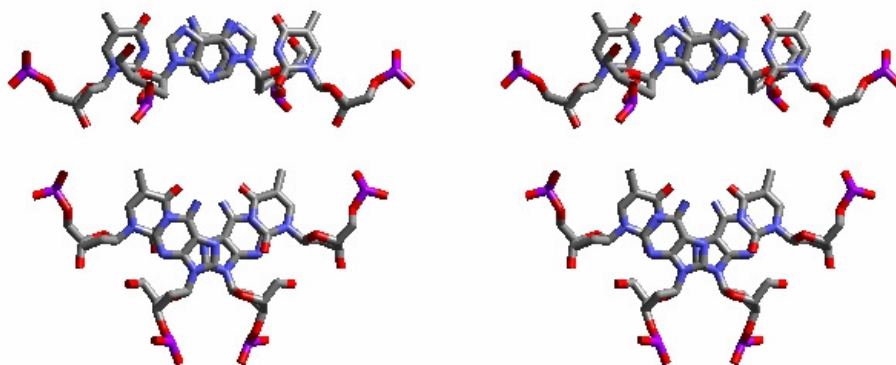


Figura 5.18: Vista estereoscópica del apilamiento entre las bases de los extremos WC (arriba) y Hoogsteen (abajo) de oligonucleótidos consecutivos. Observar cómo en el caso de los extremos WC se produce un buen stacking entre las adeninas, mientras que en los Hoogsteen se produce un stacking parcial entre las adeninas y las timinas.



5.5.4. Discusión

En la estructura aquí descrita, se presenta un nuevo tipo de interacción entre fármaco y ADN, ya que la droga, en nuestro caso la Pentamidina, establece enlaces iónicos entre sus dos extremos y los fosfatos de oligonucleótidos vecinos. Y este es el hecho a remarcar, ya que hasta el momento sólo se habían observado interacciones con el mismo dúplex. Este hecho, hace que los cristales sean mucho más estables (con el tiempo han aparecido muchos más cristales en gotas con condiciones similares) y tengan también una mejor resolución, debido a esta función de “cemento” que desempeña la droga.

No sabemos las implicaciones que puede tener esta interacción droga-oligonucleótido en sistemas biológicos, pero viendo estos resultados y sabiendo que hay grandes zonas del genoma ricas en pares de bases AT, quizás podría jugar un papel importante, entrelazando diferentes partes del ADN.

Por otra parte, la presencia del fármaco no ha inducido o favorecido un apareamiento Hoogsteen entre pares de bases, como se había ya observado con la secuencia d(ATATAT) (Abrescia et al., 2002). Más bien al contrario, en toda la zona donde se encuentra la Pentamidina el apareamiento es de tipo WC. Pero sí que hemos podido comprobar que estas secuencias ricas en AT tienen cierta facilidad para formar apareamientos de tipo Hoogsteen, como sucede en uno de los extremos.

Quizás, el hecho de que esté tan desordenada la penúltima base, se deba a que es el par de bases de transición entre un apareamiento WC y un Hoogsteen o también puede ser que sea debido a una ocupación parcial de cada tipo de apareamiento, aunque no hayamos obtenido buenos resultados en nuestros intentos. Un hecho a destacar es la distancia inusual C1-C1' para este par de bases, que es de 9,8 Å, un valor que está entre los valores medios para un par de bases WC (10,5 Å) y uno Hoogsteen (8,4 Å). De todas maneras, para acabar de modelar este par de bases, necesitamos obtener unos datos de difracción con un poco más de resolución. Y quizás, uno de los cristales con condiciones similares que tenemos por difractar, con un poco de suerte, nos los proporcione.





6. Evaluación económica

Para hacer una estimación del coste total del proyecto lo hemos dividido en varios factores que detallamos a continuación:

- Coste de las **substancias químicas** utilizadas para la realización de las gotas así como de otros procedimientos. A cada producto se le ha aplicado también un factor de utilización para ser más exactos, ya que en algunos casos no se gastaba todo el lote (por ejemplo en el caso de los fármacos, que se utilizaban en cantidades muy pequeñas). Este coste se detalla en la tabla 6.1.

Producto	Cantidad lote	Precio lote (€)	Factor de utilización	Coste (€)
Pentamidina	1 g	90,10	0,3	27,03
Berenil				0,00*
DAPI	10 mg	64,50	0,7	45,15
Oligo (AT) ₅	5 mg	200	0,75	150
Oligo A(AT) ₄ T	5 mg	200	0,5	100
Oligo (TA) ₅	5 mg	200	0,2	40
Oligo C(AT) ₄ G	5 mg	200	0,3	60
MPD	500 ml	38,4	2	76,8
PEG-400	1000 ml	30,74	0,1	3,07
Isopropanol	1000 ml	19,9	0,05	1
Nitrógeno líquido	1000 ml	0,72	20	14,40



Preparados Natrix H2-116	0,5 ml/ tampón	140	0,05	7
Sales	-	1	1	1
TOTAL				525,45 €

Tabla 6.1: Coste detallado de los productos utilizados. (*) El Berenil nos lo suministró amablemente el Doctor José Portugal (Parc Científic de Barcelona).

- Coste de los **materiales** utilizados, como son las placas Linbro, cápsulas, parafilm, etc..., detallado en la tabla 6.2.

Material	Precio unidad (€)	Número unidades	Coste (€)
Placas Linbro	6,61	6	39,66
Cápsulas	0,12	110	13,2
Crioloops	7,5	15	112,5
Cubreobjetos	0,05	144	7,2
Puntas pipeta azules	21,66 (bolsa)	4	86,64
Puntas pipeta amarillas	13,68 (bolsa)	1	13,68
Puntas pipeta blancas	11,8 (bolsa)	3	35,4
Parafilm	20	1	20
Otros materiales	15	1	15
TOTAL			343,28 €

Tabla 6.2: Coste detallado de materiales utilizados en el proyecto.



- Coste de los **equipos**, como micropipetas, lupas, neveras, etc... que nos han permitido llevar a cabo el proyecto (tabla 6.3). Hemos estimado un tiempo de amortización para los equipos de unos 5 años y hemos tenido en cuenta la duración de este proyecto (12 meses). También hemos dividido el coste entre las personas del laboratorio que los han utilizado.

Equipo	Precio (€)	Amortización (años)	Número personas	Coste (€)
Espectrofotómetro-UV	40000	5	20	711,11
Autoclave	2850	5	5	50,67
Congelador -20°C	600	5	5	10,67
Mini-centrífuga	160	5	5	2,84
Micropipetas	1356	5	5	24,11
Microscopio óptico	20000	5	15	355,56
Balanza de precisión	1300	5	15	23,11
Nevera 13°C	500	5	15	8,89
Material para congelación	250	5	10	4,44
Cámara digital microscopio	400	5	10	7,11
Sincrotrón	-	-	-	390
TOTAL				1.588,51 €

Tabla 6.3: Coste detallado de equipos.



- Coste del **personal**, incluyendo tanto el investigador como el director del proyecto. Para el sueldo de cada uno, se ha tomado como referencia el que se aplica para una empresa de investigación privada. Esto es 30€/h para el investigador y 45€/h para el director del proyecto. El coste se detalla en la tabla 6.4

Personal	Precio (€) / hora	Horas	Coste (€)
Investigador	30	1000	30.000
Director proyecto	45	90	4.050
TOTAL			34.050 €

Tabla 6.4: Coste de personal detallado

- Finalmente se ha estimado un coste de **gastos generales** de un 10% de la suma de todos los otros. Este coste incluye energía eléctrica, agua, material básico de laboratorio, material de oficina, etc..

Así pues el coste total estimado para este proyecto es de **40.158 €**.



7. Impacto ambiental

En este apartado se detallan los posibles impactos sobre el ambiente que se pueden producir en las diferentes partes de este proyecto. Básicamente, son debidos a las sustancias químicas que se utilizan y que pueden incluso tener un impacto sobre nuestra salud, ya que muchas de ellas son tóxicas. Por este motivo, durante el trabajo en el laboratorio se han utilizado guantes, para evitar el contacto directo con la piel de estos productos. El uso de guantes, de paso, nos garantiza una menor contaminación de las gotas al manipularlas.

Los productos están todos ellos almacenados en atmósferas libre de fuentes de calor y bien ventiladas. A continuación se detallan los procesos que tienen un cierto impacto sobre el medio ambiente así como sobre nuestra salud:

- **Siliconado de cubreobjetos:** durante este proceso, que se efectúa para hacer hidrofóbica la superficie de los cubreobjetos, se producen vapores de la solución de silanización, que contienen cloro y etanol. Estos son aspirados por una campana extractora, y expulsados al ambiente. Pero su impacto es mínimo, ya que se evaporan menos de 0,5 ml por cada contenedor de 250 ml de disolución, y además esta operación sólo se ha realizado una vez en todo el proyecto.
- **Estudios de cristalización:** en la realización de gotas se utilizan algunos productos tóxicos, como fármacos. Pero se usan en concentraciones tan pequeñas (milimolar), que sólo tendremos en cuenta el impacto que pueden producir los precipitantes MPD y PEG, aunque éste tampoco es mucho. Ambos precipitantes son polialcoholes y se vierten en el contenedor de disolventes orgánicos no clorados.
- **Congelación de cristales y difracción de rayos X:** en ambos procesos se utiliza nitrógeno líquido para la conservación del cristal. Este, al evaporarse, puede llevar a condiciones de asfixia al disminuir la concentración de oxígeno en el aire. Por este motivo, se debe poner un extractor en la sala donde se congelan los cristales. En la cámara de difracción hay un dispositivo que se encarga de medir la concentración de oxígeno en todo momento para evitar este problema.





Conclusiones

Después de hacer los estudios de cristalización con las secuencias $(AT)_5$, $A(AT)_4T$, $(TA)_5$ y $C(AT)_4G$, hemos obtenido varios cristales de las dos primeras y tan solo de la $(AT)_5$, se pudo resolver su estructura.

Hemos podido observar que la secuencia $(AT)_5$ presenta una cristalización mucho mejor a una temperatura de 5°C y la secuencia $A(AT)_4T$ tiene un mejor comportamiento también a temperaturas bajas, como 11 y 5°C .

Con uno de los cristales del oligonucleótido $(AT)_5$ hemos obtenido una resolución de $2,53 \text{ \AA}$ y hemos podido resolver su estructura. Con el oligonucleótido $A(AT)_4T$, en cambio, la resolución del mejor cristal ha sido de $3,3 \text{ \AA}$. En este caso hemos podido determinar el grupo espacial en el que cristaliza, pero no resolver su estructura.

El oligonucleótido $A(AT)_4T$ cristaliza en presencia del fármaco DAPI en el grupo espacial R3 ($a=45,568 \text{ \AA}$; $b=45,568 \text{ \AA}$; $c=198,675 \text{ \AA}$; $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$).

El oligonucleótido $(AT)_5$ cristaliza en el grupo espacial $P6_522$ a una resolución de 2.53 \AA ($a=27,789 \text{ \AA}$; $b=27,789 \text{ \AA}$; $c=311,95 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$) en presencia de Pentamidina. En la unidad asimétrica encontramos un dúplex, un ión magnesio y una molécula de Pentamidina.

Hemos podido observar como la Pentamidina se coloca en el surco estrecho del oligonucleótido $d(ATATATATAT)_2$ interaccionando a través de sus extremos cargados con los fosfatos de oligonucleótidos vecinos, estableciendo así una interacción droga-ADN nunca vista hasta el momento. Además, esta función de entrecruzamiento que realiza el fármaco, proporciona más estabilidad a los cristales obtenidos.

En el dúplex encontramos dos tipos de emparejamiento entre las bases, tipo WC en ocho de ellas y tipo Hoogsteen en uno de los extremos. Podemos constatar así la gran variedad de formas que pueden adoptar las secuencias ricas en ATs. El par de bases de transición entre los dos tipos de emparejamiento, presenta una estructura anómala y no lo hemos podido modelar satisfactoriamente debido a que no está bien ordenado.



Los oligonucleótidos (AT)₅ consecutivos, a su vez, se empaquetan en el cristal formando una superhélice (o coiled-coil) con 12 dúplex por vuelta y un diámetro de 85 Å, y que esta rodeado por 6 coiled-coils iguales. Entre ellos están estabilizados por moléculas de Pentamidina.

Después de difractar los primeros cristales con Pentamidina en el sincrotrón hemos seguido obteniendo otros en condiciones similares y siempre a 5°C. Estamos a la espera de poder hacer la difracción de éstos para por ver si podemos acabar de modelar el par de bases anómalo y también ver que estructura resulta en un medio con más Pentamidina (ya que hay cristales con un 50% más de Pentamidina).



Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Lourdes Campos por darme la oportunidad de entrar en el grupo de química macromolecular; por su amabilidad, su disponibilidad y su eterna paciencia.

También quiero agradecer al Dr. Juan Antonio Subirana, por su asesoramiento a lo largo del proyecto y su sinceridad.

Al Dr. Joan Pous y a mi compañero Hans Millonig por su gran ayuda con los programas de tratamiento de datos.

A toda la gente del departamento de Ingeniería Química Macromolecular por contribuir a un buen ambiente de trabajo.

En especial quiero dedicarle este trabajo a mis padres, porque sin su apoyo, en todos los sentidos, habría sido imposible realizarlo.

I per tots els xais! Bistek, Cuervo, Vicente, Martini, Vila (calvo), Milhausen (gordo), Bisteka, Jota, Lluís (jamedee), Melenchón, Sánchez, Narva Senarva, Isarn (Isbarn), Lllili, Fitó (Firbó), Lluisma, Carlos (barrabás), Reiritz (flanagan), Lluranç, Xosa, Mickytets, Soto, Berga, Núria C, Laura, David Serrano, ... reenviad un mail con los que me dejo!

E per i miei conquillini italiani Simo, Paul, Maria, Silvia e Viola e i miei amici erasmus che mi hanno apoggiato Mariano, Alberto, MariMeri, Ahinara, Inés, Joseba, Marc, Miguel, Fede.





Bibliografía

Referencias bibliográficas

ABRESCIA, N.G.A.; MALININA, L.; FERNANDEZ, L.G.; HUYNH-DINH, T.; NEIDLE, S. y SUBIRANA, J.A. *Nucleic Acid Research* **27**, 1593-1599 (1999).

ABRESCIA, N.G.A.; THOMPSON, A.; HUYNH-DINH, T.; SUBIRANA, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2806-2811 (2002).

BRÜNGER, A. T. *Nature* **355**, 472-475 (1992).

DICKERSON, R.E., BANSAL, M., CALLADINE, C.R., DIEKMAN, S., HUNTER, W.N., KENNARD, O., LAVERY, R., NELSON, H.C., OLSON, W.K., SAENGER, W., SKLENAR, H., SOUMPASIS, D.M., TUNG, C.S., VON KITZING, E., WANG, A.H. y ZHURKIN, V.B. *J. Mol. Biol.* **205**, 787 (1989).

CAMPOS, J.L.; URPÍ, L.; SANMARTÍN, T.; GOUYETTE, C. & SUBIRANA, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3663-3666 (2005).

CAMPOS, L.; VALLS, N., URPÍ, L.; GOUYETTE, C.; SANMARTIN, T.; RICHTER, M.; ALECHAGA, E.; SANTAOLALLA, A.; BALDINI, R.; CREIXELL, M.; CIURANS, R.; SKOKAN, P.; POUS, J. & SUBIRANA, J.A. *Biophys. J.* **91**, p. 892-903, (2006).

CANTOR, C.R.; WARSHAW, M.M. y SHAPIRO, H. *Biopolymers* **9**, 1059-1077 (1970).

DE LUCHI, D.; TERESHKO, V.; GOUYETTE, C.; SUBIRANA, J.A. *ChemBioChem* **7**, 585-587 (2006).

DELANO, W.L. *The PyMol molecular graphic system. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA* (2003).

DUCRUIX, A. y GIEGÉ, R. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A practical approach. IRL Press, Oxford* (1992).

EDWARDS, K.J.; JENKINS, T.C.; NEIDLE, S. *Biochemistry* **31**, pp. 7104-7109, (1992).

EICHHORN, G.L. (Ed) *Inorganic Biochemistry. Elsevier, Amsterdam* (1973).

EICHINGER, L., [et al.] *Nature* **435**, p. 43-46, (2005).



EMSLEY, P.; COWTAN, K. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**, p. 2126-2132, (2004).

FALK, M.; HARTMAN, K.A. y LORD, R.C. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 387-391 (1963).

FIELD, D. y WILLS, C. *Proc. R. Soc. Lond. B* **263**, p. 209-215, (1996).

FRENCH, G.S. y WILSON, K.S. *Acta Cryst.* **A34**, 417 (1978).

GLUSKER, J. *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists. VCH Publishers, Inc.* (1994).

GLUSKER, J. *Crystal Structure Analysis. A primer. Oxford University Press* (1985).

INTERNATIONAL UNION OF CRYSTALLOGRAPHY. *International Tables for X-Ray Crystallography, Volume 1, 3rd Edition, Kynoch Press, Birmingham England*, (1969).

KATTI, M., [et al.] *Genome Res.* **10**, p. 1161-1167, (2001).

LANE, A.N.; JENKINS, T.C.; BROWN, T. y NEIDLE, S. *Biochemistry* **30**, 1372-1385 (1991).

LESLIE, A.G.W., [et al.] *J. Mol. Biol.* **143**, p. 49-72, (1980).

LU, X.J.; SHAKKED, Z. y OLSON, W.K. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5108-5121 (2003).

MCPHERSON, A. *Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York* (1999).

MURSHUDOV, G.N.; VAGIN, A.A. y DODSON, E.J. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255 (1997).

NAVAZA, J. y SALUDJIAN, P. *Methods Enzymol.* **276**, 581-594 (1997).

OTWINOSKI, Z. y MINOR, W. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326 (1997).

RAVELLI, R.G.B.; SWEET, R.M.; SKINNER, J.M.; DUISENBERG, A.J.M. y KROON, J. *J Appl. Cryst.* **30**, 551-554 (1997).

RUDMAN, R. *Low temperature X-ray diffraction. Plenum Press, New York* (1976).

SAENGER, W. *Principles of Nucleic Acid Structures. Springer-Verlag, New York* (1984).

SCHNEIDER, B. y BERMAN, H.M. *Biophys. J.* **69**, 2661-2669 (1995).

SOUMPASIS, D.M. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3**, 1-10 (1985).



- SUBIRANA, J.A. Estructura del ADN. *Alhambra, Madrid* (1985).
- SUBIRANA, J.A. y VIVES, J.L. *Biopolymers* **20**, 2281-2283 (1981).
- TÓTH, G., [et al.] *Genome Res.* **10**, p. 967-981, (2000).
- TUNIS, M.J. y HEARST, J.E. *Biopolymers* **6**, 1345-1353 (1968).
- WATSON, J., CRICK, F. *Nature.* **171** (1953), p. 964-967.
- ZIMMER, C. y WÄHNERT, U. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **47**, 31-112 (1986).
- ZUO, E.T., [et al.] *Biochemistry* **29**, p. 4446-4456, (1990).

Bibliografía complementaria. (libros, tesis, proyectos, webs, manuales)

- ALECHAGA, E. *Determinación de la estructura de secuencias de ADN del tipo A(AT)nT* Barcelona, ETSEIB, 2007.
- CIURANS, R. *Estudis estructurals sobre fragments de DNA de composició 100% AT* Barcelona, ETSEIB, (2007).
- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC). *Cristalografía de Rayos X*. [<http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/index.html>, setembre 2008]
- DE LUCHI, D. (Tesis doctoral) *Crystallographic study on oligonucleotide coiled-coils*, Barcelona, ETSEIB, (2008).
- DELANO, W. L. *The PyMol molecular graphic system*. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. 2003
- EMSLEY, P., COWTAN K. *Coot: model-building tools for molecular graphics Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**, 2004, p. 2126-2132, Part 12 Sp. Iss.
- EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY. [<http://www.esrf.eu/>, setembre 2008]
- GAY, P. *Introducción al estado cristalino*. Ed. Eunibar, 1997.



McPHERSON, A. *Introduction to macromolecular crystallography*. Wiley-Liss. New Jersey, 2003.

NAVAZA, J. *AMoRe: an automated package for molecular replacement*. *Acta Cryst.*, A50, 1994, p.157-163.

OTWINOWSKI, Z., MINOR, W. *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, Methods in Enzymology, Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A*, 1997, p. 307-326.

SÁNCHEZ, R. *Expressió, purificació i cristallització de la proteïna HMGA1a*, Barcelona, ETSEIB, (2009).

SUBIRANA, J.A. *Estructura del ADN*. Alhambra. Madrid, 1985.

VAGIN, A.A. [et al.]. *REFMAC5 dictionary: "Organization of Prior Chemical Knowledge and Guidelines for its Use"* *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 60, 2004, p. 2184-2195, Part 12 Sp. Iss.

VALLS, N. (Tesis doctoral) *Estudi estructural d'oligonucleòtids en presència de fàrmacs intercalants i metalls de transició*, Barcelona, ETSEIB, (2004).



Anexo : Gotas realizadas

I. Placa TM-1. [(AT)₅ + PNT]

La mitad de la placa se destinó a hacer prácticas de cristalización con la proteína Lisozima, de la cual se obtuvieron varios cristales al poco tiempo. La otra mitad se aprovechó para comenzar los estudios cristalográficos con (AT)₅ y Pentamidina:

Posición : A-4		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	45% MPD
Observaciones	Separación de fases pequeña. Se seca y la tiramos		

Posición : A-5		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Agregados cristalinos que al final se convierten en precipitado amórfico.		



Posición : A-6		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	48% MPD
Observaciones	Separación de fases.		

Posición : B-4		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	54% MPD
Observaciones	Separación de fases		

Posición : B-5		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Agregados cristalinos que acaban siendo precipitado amorfo.		



Posición : B-6		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	45% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo y un poco de cristalino		

Posición : C-4		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	48% MPD
Observaciones	Separación de fases		

Posición : C-5		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	54% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo y también como unos hilos.		



Posición : C-6		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino		

Posición : D-4		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	42% MPD
Observaciones	Agujas y muchos cristales pequeños.		

Posición : D-5		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	54% MPD
Observaciones	Separación de fases y microcristales.		



Posición : D-6		Fecha : 31 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	45% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		

II. Placa TM-2. [(AT)₅ + PNT y BRN]

Posición : A-1		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	50% MPD
Observaciones	Separación de fases.		

Posición : A-2		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	48% MPD
Observaciones	Separación de fases y un poco de precipitado amorfo.		



Posición : A-3		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	40% MPD
Observaciones	Se seca completamente.		

Posición : A-4		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	50% MPD
Observaciones	Al subir aparece precipitado amorfo.		

Posición : A-5		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo desde el principio que con el tiempo se ordena y se hace cristalino.		



Posición : A-6		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	40% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		

Posición : B-1		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	54% MPD
Observaciones	Separación de fases y un poco de precipitado amorfo.		

Posición : B-2		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	55% MPD
Observaciones	Separación de fases.		



Posición : B-3		Fecha : 30 octubre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	47% MPD
Observaciones	Separación de fases, pequeño cristal.		

Posición : D-1		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo abundante		

Posición : D-2		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino + precipitado amorfo.		



Posición : D-3		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo abundante.		

III. Placa TM-3. [(AT)₅ con Berenil]

Posición : A-1		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	42% MPD
Observaciones	Separación de fases y algún pequeño cristal.		

Posición : A-2		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	43% MPD
Observaciones	Separación de fases.		



Posición : A-3		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	46% MPD
Observaciones	Gotas pequeñas de separación de fases.		

Posición : A-4		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	43% MPD
Observaciones	Separación de fases muy dispersa.		

Posición : A-5		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	32% MPD
Observaciones	Erizos cristalinos con gotitas de separación de fases.		



Posición : A-6		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	43% MPD
Observaciones	Separación de fases		

Posición : B-1		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo abundante. Una parte se ordena y se hace cristalino con el tiempo.		

Posición : B-2		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	31% MPD
Observaciones	Erizos cristalinos.		



Posición : B-3		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Erizos cristalinos.		

Posición : B-4		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	41% MPD
Observaciones	Separación de fases.		

Posición : B-5		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	40% MPD
Observaciones	Separación de fases dispersa		



Posición : B-6		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Microcristales y separación de fases.		

Posición : C-1		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	33% MPD
Observaciones	Erizos cristalinos con bolas de separación de fases.		

Posición : C-2		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	Agregados cristalinos. Se me rompe el cubre y la pierdo.		



Posición : C-3		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Erizos y agregados cristalinos.		

Posición : C-4		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	31% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino abundante.		

Posición : C-5		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	36% MPD
Observaciones	Agregados cristalinos		



Posición : C-6		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	31% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino y cristales muy pequeños.		

Posición : D-1		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	Separación de fases. Se me rompe el cubre y la pierdo.		

Posición : D-2		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		



Posición : D-3		Fecha : 9 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→16→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	36% MPD
Observaciones	Separación de fases dispersa.		

IV. Placa TM-4. [C(AT)₄G solo y con PNT]

Posición : A-1		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia. Una pequeña fibra		

Posición : A-2		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Un par de porquerias		



Posición : A-3		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	22% MPD
Observaciones	Láminas brillantes por toda la gota.		

Posición : A-4		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : A-5		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : A-6		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	NiCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-1		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	19% MPD
Observaciones	Muchas agujas pequeñas y láminas.		

Posición : B-2		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	No
Sal	NiCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1,5 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	19% MPD
Observaciones	Muchas agujas y láminas grandes.		



Posición : B-3		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-4		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-5		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	23% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : B-6		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	23% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-1		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	23% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-2		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	20% MPD
Observaciones	Un poco de precipitado amorfo.		



Posición : C-3		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-4		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	23% MPD
Observaciones	Un poco de precipitado amorfa		

Posición : C-5		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	24% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : C-6		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	NiCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	24% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		

Posición : D-1		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : D-2		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1mM
Sal	NiCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	22% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo y cristales muy pequeños.		



Posición : D-3		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	20% MPD
Observaciones	Separación de fases dispersa. Precipitado amorfo.		

Posición : D-4		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	NiCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	20% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo abundante		

Posición : D-5		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	20% MPD
Observaciones	Separación de fases muy dispersa y precipitado amorfo.		



Posición : D-6		Fecha : 19 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	NiCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,9 mM	Temperaturas	20→11→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	20% MPD
Observaciones	Cristales pasados debido a controlar tarde la gota.		

V. Placa TM-5 [(TA)₅ con BRN y PNT]

Posición : A-1		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : A-2		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Esferulitas al cabo de mucho tiempo.		



Posición : A-3		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Muchas esferulitas.		

Posición : A-4		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	33% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		

Posición : A-5		Fecha: 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino/ esferulitas por toda la gota.		



Posición : A-6		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Agregados cristalinos.		

Posición : B-1		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	39% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-2		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo / separación de fases muy dispersa.		



Posición : B-3		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Esferulitas.		

Posición : B-4		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Cristal pequeño arriba de la gota. También precipitado amorfo.		

Posición : B-5		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo y separación de fases muy dispersa.		



Posición : B-6		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	33% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino abundante.		

Posición : C-1		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-2		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		



Posición : C-3		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-4		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-5		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		



Posición : C-6		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		

Posición : D-1		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : D-2		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Esferulitas.		



Posición : D-3		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia		

Posición : D-4		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,5 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : D-5		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : D-6		Fecha : 31 enero 2008	
Oligo	(TA) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0 mM	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	36% MPD
Observaciones	Limpia.		

VI. Placa TM-6. [(AT)₅- DAPI]

Posición : B-1		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-2		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : B-3		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-4		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-5		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Muchos cristales muy pequeños.		



Posición : B-6		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Porquería central.		

Posición : C-1		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-2		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Separación de fases.		



Posición : C-3		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-4		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	33% MPD
Observaciones	Un poco de separación de fases.		

Posición : C-5		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Cristales pequeñitos por toda la gota.		



Posición : C-6		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : D-1		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,4 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : D-2		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,4 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	33% MPD
Observaciones	Algo de separación de fases.		



Posición : D-3		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,4 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : D-4		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,4 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : D-5		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,4 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Cristales pequeñitos por toda la gota.		



Posición : D-6		Fecha : 8 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,2 mM	Droga	DAPI 0,4 mM
Sal	MgCl ₂ 15 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Fibra pequeña desde el inicio. Por lo demás limpia.		

VII. Placa TM-Milhausen. [C(AT)₄G con BRN y DAPI]

Posición : A-1		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 0,9 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : A-2		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 0,9 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : A-3		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 0,9 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : A-4		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 0,9 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	22% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : A-5		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : A-6		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	23% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : B-1		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-2		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	24% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-3		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : B-4		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : B-5		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : B-6		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-1		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,47 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-2		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,47 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,3 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		



Posición : C-3		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,47 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		

Posición : C-4		Fecha : 28 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,47 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM NiCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,6 mM	Temperaturas	20→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Limpia.		



VIII. Cápsulas.

Cápsula 1		Fecha : 6 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	32% MPD
Observaciones	.Agregados cristalinos. Esferulitas. Separación de fases.		

Cápsula 2		Fecha : 6 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	36% MPD
Observaciones	Cristales pequeños, esferulitas, agregados cristalinos.		

Cápsula 3		Fecha : 6 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	39% MPD
Observaciones	Agregados cristalinos, cristales pequeños y esferulitas.		



Cápsula 4		Fecha : 7 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	32% MPD
Observaciones	Separación de fases y bola grande central de precipitado.		

Cápsula 5		Fecha : 7 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	62% MPD
Observaciones	Bola central de precipitado y separación de fases.		

Cápsula 6		Fecha : 7 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 3 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	56% MPD
Observaciones	Separación de fases y algún cristal pequeño.		



Cápsula 7		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,8 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	48% MPD
Observaciones	Separación de fases. Microcristales.		

Cápsula 8		Fecha : 1 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	22% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino.		

Cápsula 9		Fecha : 1 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	33% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo y separación de fases. Agujas finas a 11°C.		



Cápsula 10		Fecha : 1 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	39% MPD
Observaciones	Cristales feos.		

Cápsula 11		Fecha : 1 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	40% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino y precipitado amorfo.		

Cápsula 12		Fecha : 1 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	40% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		



Cápsula 13		Fecha : 1 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 3 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	No	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo en forma de alga.		

Cápsula 14		Fecha : 1 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 0,8 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	41% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo y algún agregado cristalino.		

Cápsula 16		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	Cristales pequeños que al crecer se hacen feos.		



Cápsula 17		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo y algún cristal pequeñito que no crece más.		

Cápsula 18		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino abundante.		

Cápsula 19		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino abundante.		



Cápsula 20		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino abundante		

Cápsula 21		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	32% MPD
Observaciones	Cristales muy pequeños por toda la gota.		

Cápsula 22		Fecha : 19 noviembre 2007	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	40% MPD	Pozo final	42% MPD
Observaciones	Precipitado amorfo.		



Cápsula 23		Fecha : 23 enero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→28→20→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	20% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino que intentamos fundir. Con el tiempo se organiza en pequeños cristales.		

Cápsula 24		Fecha : 23 enero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→24→20°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	22% MPD
Observaciones	Erizos.		

Cápsula 25		Fecha : 23 enero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→24→20°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	20% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino abundante.		



Cápsula 26		Fecha : 23 enero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→17→11°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	27% MPD
Observaciones	Cristales pequeños.		

Cápsula 27		Fecha : 23 enero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	21% MPD
Observaciones	Erizos.		

Cápsula 28		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20→5°C
Pozo inicial	10% MPD	Pozo final	10% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino + precipitado amorfo.		



Cápsula 29		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	10% MPD	Pozo final	15% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino.		

Cápsula 30		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	10% MPD	Pozo final	10% MPD
Observaciones	Precipitado cristalino. Muchas agujas pequeñas también.		

Cápsula 31		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→5°C
Pozo inicial	10% MPD	Pozo final	15% MPD
Observaciones	Erizos.		



Cápsula 32		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	1 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	10% MPD	Pozo final	15% MPD
Observaciones	Precipitado inicial que se disuelve.		

Cápsula 33		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	10% MPD	Pozo final	50% MPD
Observaciones	Cristalitos muy pequeños.		

Cápsula 34		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	20→16°C
Pozo inicial	10% MPD	Pozo final	31% MPD
Observaciones	Cristales pequeños feos.		



Cápsula 35		Fecha : 10 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 2,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,4 mM	Temperaturas	11→5→20→16°C
Pozo inicial	25% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Cristales alargados, de los cuales no llego a cogerse ninguno porque no se acabaron de definir.		

Cápsula 36		Fecha : 10 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 2,5 mM
Sal	MgCl ₂ 20 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,8 mM	Temperaturas	11→5→20→16°C
Pozo inicial	25% MPD	Pozo final	33% MPD
Observaciones	Cristales alargados que no se llegan a definir bien por las puntas		

Cápsula 37		Fecha : 10 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,4 mM	Temperaturas	11°C
Pozo inicial	25% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	Esferulitas y rectángulos alargados. También agujas.		



Cápsula 38		Fecha : 6 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 3,5 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,8 mM	Temperaturas	20°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	25% MPD
Observaciones	Muchos cristales alargados. Cogemos una de estas varitas.		

Cápsula 39		Fecha : 10 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,4 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	25% MPD	Pozo final	41% MPD
Observaciones	Cristales alargados y bien definidos. Cogemos 2		

Cápsula 39b		Fecha : 15 abril 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,4 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	30% MPD	Pozo final	31% MPD
Observaciones	Cristales muy bonitos pero pequeños. Estas condiciones son buenas!		



Cápsula 40		Fecha : 10 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 1 mM
Sal	MgCl ₂ 10 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,8 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	25% MPD	Pozo final	31% MPD
Observaciones	Agujas y cristales pequeños con formas regulares.		

Cápsula 41		Fecha : 18 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	37% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Aparecen cristales con forma de columna hexagonal. En total cogemos 4 cristales.		

Cápsula 42		Fecha : 18 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido 1/3)
Espermina	No	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 5% isopropanol	Pozo final	37% MPD 5% isopropanol
Observaciones	Aparecen muchos cristales con forma de columna hexagonal. Cogemos 3 cristales.		



Cápsula 43		Fecha : 18 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 2,4 mM
Sal	(incluida en Natrrix)	Tampón	Natrrix-7 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	40% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Aparecen muchos cristales con buen aspecto. Cogemos 4.		

Cápsula 45		Fecha : 18 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrrix)	Tampón	Natrrix-7 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	39% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Algún cristal pequeño.		



Cápsula 46		Fecha : 18 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido 1/3)
Espermina	0,77 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 5% isopropanol	Pozo final	34% MPD 5% isopropanol
Observaciones	Cristales alargados que se funden fácilmente.		

Cápsula 57		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido 1/2)
Espermina	0,8 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	28% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Lámina larga brillante. Precipitado amorfo.		

Cápsula 59		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 1,6 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	21% MPD
Observaciones	Erizos y precipitado cristalino.		



Cápsula 61		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 2,35 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido ½)
Espermina	0,77 mM	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	29% MPD
Observaciones	Varitas alargadas. Cogemos una.		

Cápsula 63		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	29% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Cristales alargados. Delicados y se doblan.		

Cápsula 73		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	41% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Limpia.		



Cápsula 74		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	25% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	33% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Varitas bien definidas. Cogemos una.		

Cápsula 75		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	0,8 mM	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	46% MPD
Observaciones	Cristales grandes con forma de barril. Congelamos tres.		

Cápsula 76		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	0,77 mM	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	Cristales pequeños debidos a un enfriamiento rápido.		



Cápsula 77		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	38% MPD
Observaciones	Limpia.		

Cápsula 78		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	0,38 mM	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	40% MPD
Observaciones	Cristales líquidos como gusanos.		

Cápsula 79		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	53% MPD
Observaciones	Separación de fases.		



Cápsula 80		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	aparecieron cristales, pero los vimos cuando estaban pasados.		

Cápsula 81		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	33% PEG-400
Observaciones	Cristal grande hexagonal. Lo cogemos		

Cápsula 82		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 1,6 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	0,38	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	32% PEG-400
Observaciones	Donuts grandes que no acaban de definirse.		



Cápsula 83		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	30% PEG-400
Observaciones	Precipitado abundante.		

Cápsula 84		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	37% PEG-400
Observaciones	Esferulitas y cristales pequeños		

Cápsula 85		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	(AT) ₅ 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	16→11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	35% PEG-400
Observaciones	Separación de fases.		



Cápsula 86		Fecha : 27 febrero 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	16→11°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	24% PEG-400
Observaciones	Limpia.		

Cápsula 87		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,2 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,1 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	35% MPD
Observaciones	Cristales alargados con formas buenas.		

Cápsula 88		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,2 mM	Droga	DAPI 0,1 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Varitas alargadas. Cogemos una.		



Cápsula 89		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,1 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	34% MPD
Observaciones	Cristales pegados unos con otros.		

Cápsula 90		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,2 mM	Droga	DAPI 0,2 mM
Sal	MgCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,2 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	37% MPD
Observaciones	Cristales líquidos ovalados.		

Cápsula 91		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-7 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	41% MPD
	7,5% isopropanol		7,5% isopropanol
Observaciones	Precipitado amorfo.		



Cápsula 92		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-7 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	35% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Precipitado amorfo.		

Cápsula 93		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-7 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	35% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Limpia.		

Cápsula 94		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1,2 mM
Sal	(incluida Natrx)	Tampón	Natrix-15 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	43% MPD
Observaciones	Laminas cristalinas y precipitado amorfo central.		



Cápsula 95		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	43% MPD
Observaciones	Aparecen cristales pequeños. Precipitado también.		

Cápsula 96		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-15 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% MPD 7,5% isopropanol	Pozo final	45% MPD 7,5% isopropanol
Observaciones	Cristales. Cogemos uno.		

Cápsula 97		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	40% PEG-400
Observaciones	Precipitado amorfo		



Cápsula 98		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,2 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	50% PEG-400
Observaciones	Precipitado amorfo		

Cápsula 99		Fecha : 7 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	39% PEG-400
Observaciones	Precipitado amorfo.		

Cápsula 100		Fecha : 10 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 0,9 mM
Sal	NiCl ₂ 1 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD 5% isopropanol	Pozo final	34% MPD 5% isopropanol
Observaciones	Cristales pequeños.		



Cápsula 101		Fecha : 10 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	PNT 0,9 mM
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	31% MPD
Observaciones	Cristales muy pequeños.		

Cápsula 102		Fecha : 10 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,5 mM
Sal	NiCl ₂ 1 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	28% MPD
Observaciones	Cristales grandes como con láminas. Estan pasados.		

Cápsula 103		Fecha : 10 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	BRN 1,5 mM
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,5 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	30% MPD
Observaciones	Precipitado y pequeños núcleos que brillan.		



Cápsula 104		Fecha : 10 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	NiCl ₂ 1 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,1 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	15% MPD	Pozo final	43% MPD
Observaciones	Precipitado como pastoso en la periferia.		

Cápsula 105		Fecha : 10 marzo 2008	
Oligo	C(AT) ₄ G 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	NiCl ₂ 5 mM	Tampón	NaCac 30 mM
Espermina	0,1 mM	Temperaturas	20→11→5°C
Pozo inicial	20% MPD	Pozo final	43% MPD
Observaciones	Un poco de precipitado raro.		

Cápsula 106		Fecha : 14 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,3 mM	Droga	DAPI 0,3 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido 1/2)
Espermina	No	Temperaturas	11→5→11°C
Pozo inicial	15% PEG-400	Pozo final	28% PEG-400
Observaciones	Cristales con no muy buen aspecto.		



Cápsula 107		Fecha : 14 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 2,4 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	33% PEG-400
Observaciones	Salen esferulitas y donuts. Algún cristal bien formado también.		

Cápsula 108		Fecha : 14 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,4 mM	Droga	PNT 0,8 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	0,38 mM	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	27% PEG-400
Observaciones	Cubos y varitas con formas buenas		

Cápsula 109		Fecha : 14 marzo 2008	
Oligo	A(AT) ₄ T 0,3 mM	Droga	BRN 1,6 mM
Sal	(incluida Natrix)	Tampón	Natrix-22 (diluido ½)
Espermina	No	Temperaturas	11→5°C
Pozo inicial	20% PEG-400	Pozo final	29% PEG-400
Observaciones	Esferulitas y cristales alargados. Cogemos una varita.		



