

## *CAPÍTOL II- MATERIALS I MÈTODES*



## 1. MATERIALS

### 1.1 DNA

#### Estudis de cristal·lització

Els oligonucleòtids utilitzats per cristal·litzar juntament amb fàrmacs intercalants (després descrits) han estat subministrats pel Departament de Química Orgànica de l'Institut Pasteur (París, França) o bé pels laboratoris Oswell (Southampton, Regne Unit) i són els següents:

CGATCG<sup>2</sup>, CGTACG<sup>2</sup>, TGGCCA<sup>1</sup>, TGTACA<sup>1</sup>, GCGAATTCG<sup>1</sup>, CGCAATTGCG<sup>2</sup>, CCAGGCCTGG<sup>1</sup>, CGCGAATTCGCG<sup>2</sup>, CGCTAGCG<sup>1</sup>, AATTAATTAATT<sup>1</sup>, GAATTCG<sup>1</sup>, CAATTAATTG<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Seqüències sintetitzades al Departament de Química Orgànica de l'Institut Pasteur (París, França).

<sup>2</sup>Seqüències sintetitzades als laboratoris Oswell (Southampton, Regne Unit).

#### Estudis de footprinting

Per aquests estudis s'han utilitzat dos fragments de DNA, MS1 i MS2 que han estat dissenyats especialment perquè continguin totes les combinacions de seqüències de tetranucleòtids (C, G, T, A) (Lavesa i Fox, 2001). Aquests dos fragments han estat sintetitzats als laboratoris Oswell (Southampton, Regne Unit) i són els següents:

MS1

```
5' -GGATCCATATGCGGCAATACACATGGCAAGATTTCCTCAACTGCACTAGTCGTAGCGCGA  
TCAAGGTTAAGCTCCCGTTCTATCCTGGTATAGCAATTAGGGCGTGAAGAGTTATGTA  
AAGTACGTCCGGTGGGGTCTGTTTTGTCATCTCAGCCTCGAATGCGGATCC -3'
```

MS2

5' -GGATCCGCATTTCGAGGCTGAGATGACAAAC**C**CAGACCCACCGGACGTACTTTACATA  
ACTCTTCACGCCCTAATTGCTATAACCAGGATAGAACGGGAGCTTAACCTTGATCGCGC  
TACGACTAGTGCAGTTGGAAATCGGCCATGTGTATTGCCGCATATGGATCC

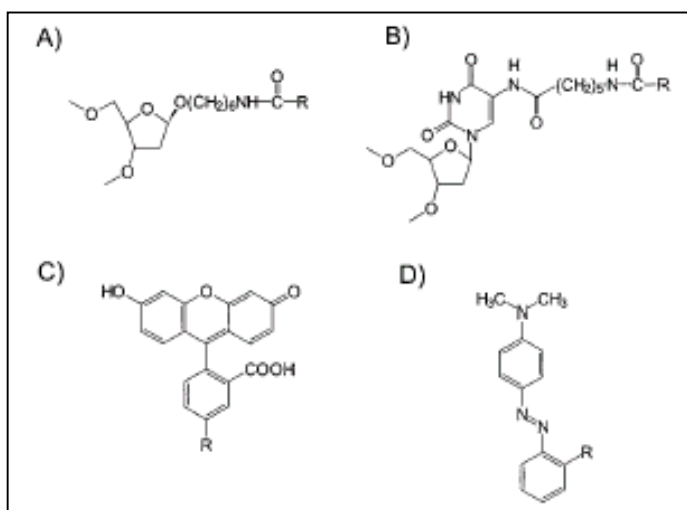
### Estudis de fluorescència

Per realitzar els assajos de fluorescència s'han utilitzat dos oligonucleòtids diferents subministrats pels laboratoris Oswell (Southampton, Regne Unit). L'oligo 1 està format per una seqüència que bàsicament alterna les bases G i A, en canvi, l'oligo 2 es caracteritza per tenir molts parells adenina-timina contigus. Els dos oligos tenen units covalentment substituents susceptibles a canvis de fluorescència com es mostra a la figura II-1.1.

**Oligo1:** 8TAGAGGAAGAGAGTCC**6**GGACTCTCTTCCTC**7**A

**Oligo2:** 9CTTTTTTCAGTCTC**6**GAGACTGAAAAAAG**8**C

sent 6=hexametilè glicol, 7=FamCap-dU, 8=MeRed dR i 9=Fam dR



**Fig. II-1.1.** Estructura química de: A) MeRed dR, R=vermell de metil i Fam dR, R=Fam B) FamCap-dU, R=Fam. C) Fam. D) vermell de metil.

## 1.2 FÀRMACS

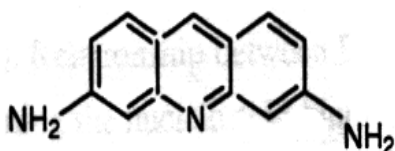
Tots els fàrmacs utilitzats són sistemes aromàtics derivats de l'acridina i de l'antraquinona que tenen units diferents substituents, en general aminoàcids. Tant l'acridina com l'antraquinona són compostos formats per tres anells aromàtics. L'acridina conté un nitrogen a l'anell central mentre que l'antraquinona té units dos oxígens també a l'anell central a través d'un doble enllaç. Degut a la planaritat i aromaticitat d'aquestes molècules, s'espera que s'intercalin entre les bases del DNA. En aquesta tesi s'han utilitzat fàrmacs derivats de l'acridina i de l'antraquinona els substituents dels quals havien d'afavorir la seva intercalació en les bases del DNA.

### Fàrmacs derivats de l'acridina:

Les acridines utilitzades es poden dividir en tres grups en funció dels substituents que contenen:

#### Grup 1:

Aquest grup està format per la proflavina, acridina que conté només dos grups amino com a substituents. Aquest és un producte comercial subministrat per *Fluka* i és el fàrmac amb uns substituents més senzills. Era interessant comparar la seva intercalació amb els altres fàrmacs.

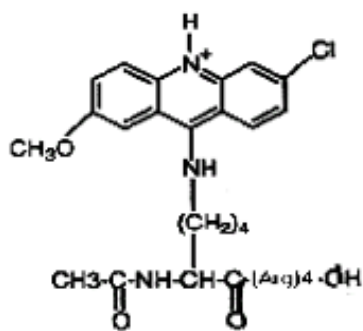


**Proflavina**

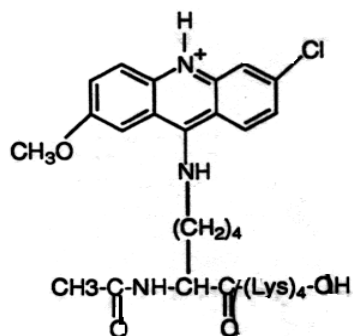
Grup 2:

En aquest grup s'hi inclouen dos fàrmacs sintetitzats al *Department of Chemical System and Engineering Kyuhu University* (Japó). Aquests tenen un grup metoxi i un clor units als anells. A més tenen com a substituent important un grup peptídic format per una lisina i quatre arginines en un cas i per cinc lisines en l'altre cas. La seva síntesi està descrita per Takenaka (1996).

Aquests fàrmacs tenen la següent estructura:



**AcrK(R)<sub>4</sub>**



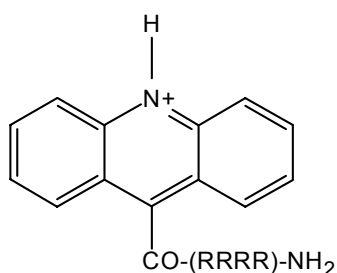
**AcrK(K)<sub>4</sub>**

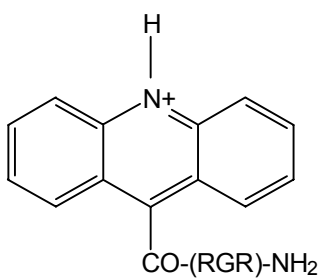
Grup 3:

Aquest grup d'acridines ha estat sintetitzat al servei de Pèptids de la Universitat de Barcelona. Totes tenen el mateix anell central però diferents aminoàcids units. La diferència principal d'aquest grup amb el grup 2 és la unió dels aminoàcids a l'anell d'acridina. En aquest cas hi intervé un grup carbonil (CO) el qual sembla important de cara a formar interaccions específiques.

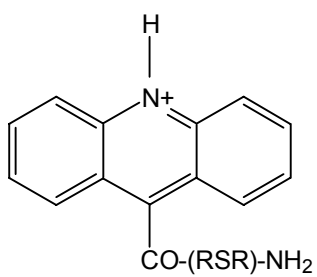
El compost Acr(RRRR) ha estat cristal·litzat amb la seqüència d(CGCGATTCGCG) (Malinina *et al.*, 2002) on es troba intercalat en un pas AA/TT. A partir d'aquesta estructura i per tal d'induir la intercalació en aquest pas AA/TT es van sintetitzar en primer lloc els derivats que contenen RGR i RSR i en segon lloc, el derivat que conté GR. Aquest últim es va fer sintetitzar després de realitzar uns breus estudis de mecànica molecular; partint de l'estructura publicada amb el dodecàmer es va estudiar el *docking* de diferents acridines d'aquest tipus amb diferents aminoàcids units. Resumidament, es va veure que els dos primers aminoàcids no interaccionen amb els fosfats mentre que si n'hi ha dos més (com en el cas de Acr(RRRR)) aquests sí que formen unions electrostàtiques amb l'oligo. D'aquests estudis es va concloure que si els dos primers aminoàcids eren G i R en aquest ordre, s'afavoria la intercalació en un pas AA/TT. Per això es va sintetitzar aquest últim lligant.

Les estructures d'aquest grup de fàrmacs així com els noms que s'utilitzaran per nombrar-los es mostren a continuació:

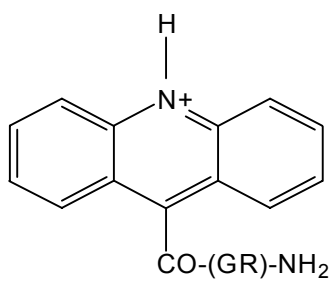
**Acr(RRRR)**



**Acr(RGR)**



**Acr(RSR)**

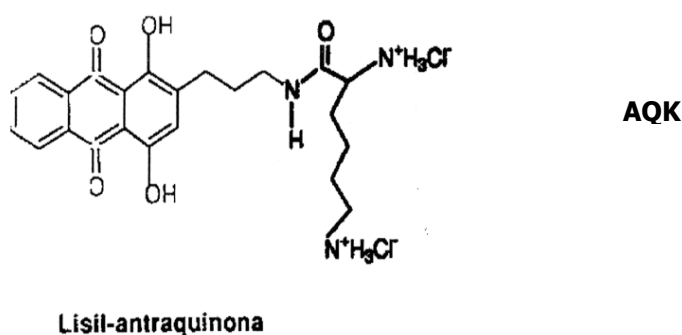


**Acr(GR)**



### Fàrmacs derivats de l'antraquinona

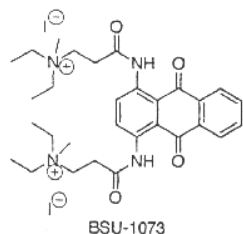
Els fàrmacs derivats d'antraquinona que s'han utilitzat es diferencien entre ells en la posició on tenen els substituents i també en la naturalesa química d'aquests. Tots aquests fàrmacs s'espera que s'intercalin entre les bases C i G com és el més habitual en els fàrmacs intercalants. A continuació es mostra l'estructura dels fàrmacs utilitzats:



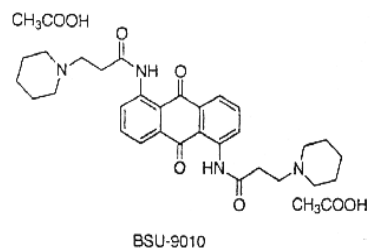
Aquest fàrmac AQK, ha estat sintetitzat al Departament de Ciències Farmacèutiques de la Universitat de Padova (Itàlia). Porta com a substituents dos grups hidroxil i una lisina.

Els fàrmacs que es mostren a continuació han estat sintetitzats al *Institut of Cancer Research* (Londres, UK) segons el protocol descrit per Perry *et al.* (1998). Tots aquests derivats tenen dos substituents en diferents posicions dels anells i van ser dissenyats per aplicacions terapèutiques com a inhibidors de l'enzim telomerasa (Perry *et al.*, 1998).

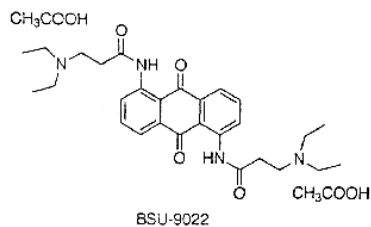
Aquests tenen les estructures següents:



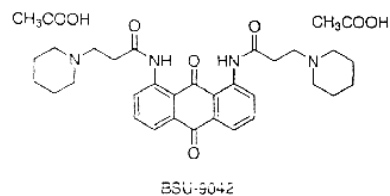
$C_{30}H_{42}N_4O_4$   
 Exact Mass: 776.13  
 Mol. Wt.: 776.49  
 C, 46.40; H, 5.45; I, 32.69; N, 7.22; O, 8.24



$C_{34}H_{44}N_4O_8$   
 Exact Mass: 636.32  
 Mol. Wt.: 636.74  
 C, 64.13; H, 6.97; N, 8.80; O, 20.10



$C_{32}H_{44}N_4O_8$   
 Exact Mass: 612.32  
 Mol. Wt.: 612.71  
 C, 62.73; H, 7.24; N, 9.14; O, 20.89

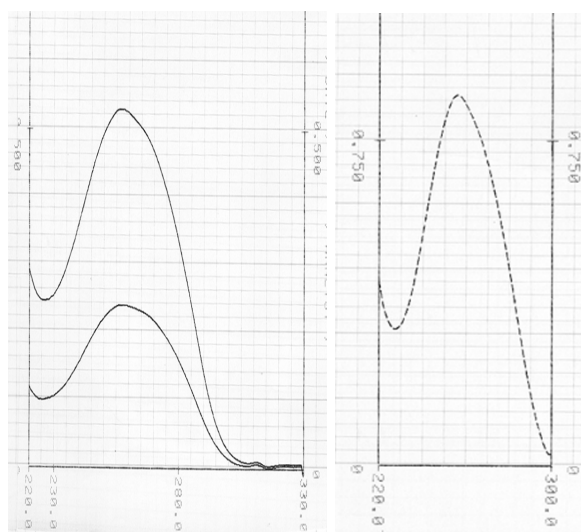


$C_{34}H_{44}N_4O_8$   
 Exact Mass: 636.32  
 Mol. Wt.: 636.74  
 C, 64.13; H, 6.97; N, 8.80; O, 20.10

## 2. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ D'OLIGONUCLEÒTID

A l'hora de cristal·litzar un oligonucleòtid, és important conèixer la seva concentració d'una manera precisa. Tot i que els oligos que s'utilitzen han estat purificats per HPLC, poden portar sals o altres impureses que farien calcular una concentració errònia si es mesura directament per pesada. S'utilitza doncs l'espectroscòpia UV per determinar la concentració d'oligos a través de mesures d'absorbància a una longitud d'ona de 260 nm (Fig. II-2.1).

Per tal de realitzar les mesures, es dissol la mostra en tampó (normalment cacodilat de sodi) i es dilueix fins a obtenir mesures d'absorbància adequades. És interessant també realitzar les mesures d'absorbància de tot el rang entre 220 i 320 nm, que és on es dona l'absorció de radiació UV dels oligonucleòtids.



**Fig. II-2.1.** *Espectre d'absorció de dos dels oligonucleòtids utilitzats: GAATTCG (dreta) i CGATCG (esquerra). En aquest últim s'han fet dues mesures a diferents concentracions.*

Un cop mesurada l'absorbància i coneixent les dilucions fetes, es pot calcular la concentració d'oligonucleòtid segons l'equació següent (Cantor *et al.*, 1970):

$$C = (DO_{260} \times \text{dilució}) / \epsilon_{260}$$

a on,

C = concentració d'oligonucleòtid en forma de cadena senzilla

DO<sub>260</sub> = absorbància mesurada a 260 nm

dilució = dilució que s'ha fet a la solució que es mesura respecte a la solució inicial

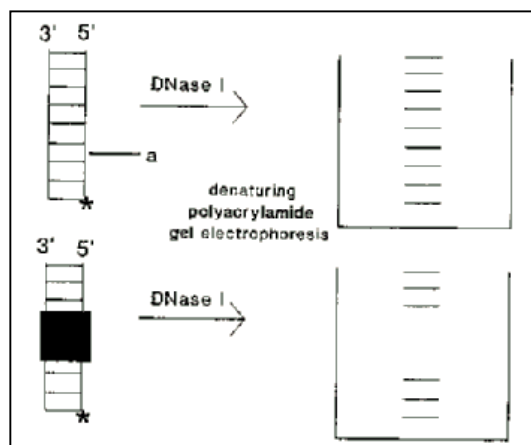
$\epsilon_{260} = \epsilon_{DpEpFpGp...KpL} = [2(\epsilon_{DpE} + \epsilon_{EpF} + \epsilon_{FpG} + \dots + \epsilon_{KpL}) - \epsilon_E - \epsilon_F - \epsilon_G \dots - \epsilon_K]$ , que s'ha de calcular per a cada oligo utilitzant els valors ja coneguts que es mostren a la taula II-2.1:

DNA	$\epsilon_{260}$	DNA	$\epsilon_{260}$
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

**Taula II-2.1.** Coeficients d'extinció a 260 nm, 25°C i pH neutre per cadena senzilla de DNA (1/mmol cm) (Cantor *et al.*, 1970)

### 3. FOOTPRINTING

Footprinting és un mètode relativament ràpid, simple i econòmic que permet estudiar l'especificitat de seqüència de diferents tipus de lligants. És un mètode de protecció en que la fragmentació del DNA és inhibida en llocs concrets degut a la unió d'un lligant. En aquesta tècnica, un fragment de DNA marcat radioactivament de seqüència i llargada conegudes, és tractat amb un agent que talla el DNA (Fox, 1997). Si el fàrmac s'uneix a una regió concreta del DNA, l'enzim no pot tallar aquestes regions i això es reflecteix en un gap en separar les bandes amb un gel desnaturant de poliacrilamida (Fig. II-3.1). L'enzim DNAasa I ha estat utilitzat amb èxit per identificar o confirmar regions preferencials de molts lligants com són l'Actinomicina (Fox i Waring, 1984), Daunomicina (Chaires *et al.*, 1990), Nogalamicina (Fox i Waring, 1986), etc. que són de característiques semblants als fàrmacs que es volen estudiar en aquesta tesi. És per això que s'ha triat aquest mètode tot i que n'hi ha d'altres com són DNAasa II, Radicals hidroxil, Permanganat de potassi, etc. (Fox i Waring, 2001).



**Fig. II-3.1.** Esquema de l'experiment de footprinting. El DNA es marca (\*) a l'extrem 3' de la cadena dreta. En presència de fàrmac (part inferior de la figura), s'obté un patró de bandes diferent (Fox, 1997).

### 3.1 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

#### Preparació del DNA

Per tal d'obtenir les seqüències de DNA, es fan créixer bacteris (amb l'ajuda de l'antibiòtic ampicilina) que contenen els fragments MS1 i MS2 i es deixa incubar a 37°C amb agitació durant tota la nit. Un cop fet això, es divideixen els cultius en tres parts i es centrifuguen. Les mostres es tracten amb les dissolucions i seguint el procediment descrit pel kit comercial Qiagen QIAprep (mètode basat en la lisi alcalina (Birnboim i Doly, 1979)).

Per separar el plàsmid dels fragments MS1 i MS2, s'utilitzen enzims de restricció: s'afegeix a cada mostra 5 µl de tampó Multi-core, 1 µl de l'enzim HIND-III i 1 µl de l'enzim SAC 1 deixant-se incubar tota la nit a 37°C.

#### Marcatge del DNA amb <sup>32</sup>P

Un cop s'obtenen els fragments de DNA es procedeix al seu marcatge. Per això, s'afegeix a la mostra 0.5 µl d'enzim Transcriptasa Inversa i 1µl de α-ATP-<sup>32</sup>P i es deixa a 37°C durant com a mínim 1 hora. Després s'afegeix 20 µl de colorant (blau de bromofenol) i es separa el fragment que interessa del plàsmid remanent amb un gel de poliacrilamida (al 8%) no-desnaturalitzant aplicant un voltatge de 800 V durant 2 hores aproximadament. Es tallen les bandes que contenen els fragments MS1 i MS2 i s'elueixen amb uns 300 µl de 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA durant tota la nit a 37°C i amb agitació. Aleshores el DNA es precipita amb 1/9 volum de NaOAc 3 M i 3 volums d'etanol absolut durant 10 minuts en neu carbònica. Es centrifuga a 4°C durant 10 minuts i a 14.000 rpm. Es neteja el sediment amb 100 µl d'etanol 70% i s'evapora totalment l'etanol amb un concentrador de buit. Finalment, es dissol el sediment en 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA fins a obtenir 10-15 cps per µl en un contador Geiger-Müller.

#### Gel de Footprinting

##### *Preparació de les mostres:*

Es mesclen 1.5 µl de DNA amb 1.5 µl de fàrmac prèviament diluït amb tampó (Tris-NaCl 10 mM) o 1.5 µl de tampó en el cas del control i es deixa equilibrar durant 1h. S'afegeix 2 µl d'enzim DNAasa I adequadament diluït i després d'un minut s'afegeixen 4 µl de dissolució A (formamida 80%, NaOH 10 mM, EDTA 10 mM, blau de bromofenol 0.1% (p/v)). Un cop fet això es fan bullir les mostres

durant 3 minuts i es posen en el gel ràpidament. Per preparar el marcador cal el següent: 1.5 µl de DNA mesclats en 20 µl d'aigua i 5 µl de dissolució A. Es bull durant 30 minuts amb els eppendorfs oberts i es refreda a 0°C amb gel. Aquests marcadors serviran per detectar les bandes corresponents a les bases G i A (marcador Maxam i Gilbert, 1980). Es fan córrer les mostres en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant durant 1.5 hores aproximadament i 1500 V. Finalment, es fixa el gel en àcid acètic al 10% durant 10 minuts i s'asseca amb buit a 90°C durant 1 h. Per revelar el gel, s'exposa a una pel·lícula de raigs X i es manté tota la nit a -80°C.

### **Anàlisi de dades**

Per tal de realitzar una anàlisi quantitativa de les dades, s'exposen els gels que han de ser analitzats en una pantalla Kodak (*phosphorimager*) durant tota la nit i s'escanreja la pantalla utilitzant un *Molecular Dynamics Storm 860 Phosphorimager*. La intensitat de les bandes és estimada utilitzant *ImageQuant software* i normalitzada respecte l'àrea corresponent del carril de control. Es representa  $I/I_0$  vs c seguint la següent equació:

$$I/I_0 = c_{50}/(c + c_{50})$$

a on,

$I/I_0$  = intensitat de banda relativa amb i sense fàrmac

c = concentració de fàrmac

$c_{50}$  = concentració de fàrmac necessària per disminuir a la meitat la intensitat de banda

## 4. FLUORESCÈNCIA

El que es pretenia amb aquests assajos era veure, mitjançant estudis de fluorescència, si algun dels fàrmacs dels que es disposen estabilitzaven especialment unes seqüències de DNA (dúplexs). Els oligos a utilitzar porten un acceptor i un donador de fluorescència units covalentment als dos extrems 3' i 5'. En dissolució, l'oligo està en forma de cadena senzilla i aquests dos grups estan separats. En formar-se el dúplex (l'oligo es plega), els dos grups sensibles a la fluorescència s'aproximen i això es tradueix en una disminució d'aquesta. En canvi, quan l'oligo fon, els grups es separen donant un augment de fluorescència. A partir d'aquests canvis de fluorescència, es vol estudiar l'efecte dels fàrmacs sobre el punt de fusió dels dúplexs. Si el punt de fusió augmenta voldrà dir que el dúplex s'ha estabilitzat. Així doncs, es calcularan els punts de fusió mesurant canvis de fluorescència en funció de la temperatura.

### 4.1 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

Per dur a terme aquests experiments, es dissol l'oligo en tampó NaP, 10 mM, pH 7.4 fins a una concentració de 0.5  $\mu$ M. Es mesclen 10  $\mu$ l d'aquest amb 10  $\mu$ l de tampó pel control o fàrmac per les altres mostres. La concentració final d'oligo és de 0.25  $\mu$ M per a tots els experiments i la concentració de fàrmac varia segons la mostra. El fàrmac també està dissolt amb el mateix tampó. Es posen les mostres en uns capil·lars de vidre i es centrifuga per assegurar-se que la mostra ha entrat dins dels capil·lars. Un cop fet això, es posen els capil·lars al *Light Cycler* tapats i s'analitza: es desnaturalitzen les mostres augmentant la temperatura fins a 95°C durant 5 minuts, s'aplica un descens de temperatura de 95 a 25°C (*annealing*) i després un ascens de 25 a 95°C (fusió) i es mesuren els canvis de fluorescència. A partir de les corbes de fusió obtingudes, es fa la primera derivada i d'aquí es troben les temperatures de fusió ( $T_f$ ) per a cada mostra.



## 5. MESURES DE VISCOSITAT

Una altra de les tècniques que pot donar informació sobre la interacció del DNA amb fàrmacs és la mesura de la viscositat del DNA en presència i sense de fàrmac. Un increment de la viscositat en unir un fàrmac amb el DNA indica que el fàrmac s'intercala entre les bases d'aquest (Lerman, 1961, Eisenberg, 1966, Eisenberg, 1969).

La viscositat és un paràmetre relativament ràpid, fàcil i econòmic de mesurar. És bàsicament una mesura de la mida i extensió en l'espai de les molècules de polímer (DNA en aquest cas) i està directament relacionada amb el pes molecular de la mostra. Les mesures es fan normalment per comparació del temps que tarda en baixar per un tub capil·lar una solució de DNA ( $t$ ) i el temps que tarda el dissolvent ( $t_0$ ). De  $t$ ,  $t_0$  i la concentració de solut es defineixen una sèrie d'equacions de la viscositat:

Viscositat relativa:  $\eta_r = \eta / \eta_0 \approx t / t_0$

Viscositat específica:  $\eta_{sp} = \eta_r - 1 = (\eta - \eta_0) / \eta_0 \approx (t - t_0) / t_0$

Viscositat intrínseca:  $[\eta] = (\eta_{sp} / c)_{c=0} = [(\ln \eta_r) / c]_{c=0}$

### 5.1 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

Per fer mesures de viscositat cal una mostra de DNA de pes molecular suficientment gran. Per tant, s'ha utilitzat DNA natiu, concretament d'*Arbacia Lixula*. Es prepara una solució de DNA de 0.2-0.15 mg/ml amb tampó Cacodilat de sodi i es dialitza amb SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M citrat de sodi, pH=7.5).

En primer lloc es troba la viscositat intrínseca del DNA fent mesures a diferents concentracions. Cal sempre realitzar una mesura del dissolvent sol, en aquest cas el SSC. Amb aquestes mesures es pot extrapolar la viscositat intrínseca del DNA quan la concentració d'aquest és 0.

Un cop fet això, es tria una concentració de DNA adequada i es fa una mesura de viscositat afegint-hi fàrmac. Ara el  $t_0$  serà el temps que tarda el DNA en passar pel

viscosímetre a la concentració escollida. El fàrmac es dissol en el mateix SSC i la seva concentració s'haurà d'optimitzar per a cada cas.

S'han fet proves amb tres dels fàrmacs descrits anteriorment: la proflavina, l'acridina Acr(RRRR) i l'antraquinona BSU-1043.

El mètode efectivament dona alguna informació: tant en el cas de la proflavina com l'acridina Acr(RRRR) es detecta un augment de la viscositat del DNA en presència d'aquests fàrmacs. El problema del mètode és que no s'obté una reproduïbilitat en les mesures i que els fàrmacs precipiten fàcilment en unir-los amb el DNA. També sembla que pot precipitar el complex DNA-fàrmac ja que s'han obtingut mesures de viscositats més baixes que amb el DNA sol. Degut a aquests inconvenients i també a la possibilitat d'estudiar la intercalació per footprinting, es va decidir no continuar amb aquests assajos.

## 6. CRISTAL·LITZACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS

### 6.1 MÈTODES DE CRISTAL·LITZACIÓ

Per tal de poder utilitzar la difracció de raigs X per determinar una estructura, cal primer obtenir la matèria a estudiar en forma de cristall únic. Aquest procés de cristal·lització no és sempre senzill, concretament la cristal·lització d'àcids nucleics sovint necessita un elevat nombre d'assajos per tal de poder obtenir un cristall únic i suficientment bo per poder ser analitzat. És per això important tenir alguns conceptes clars a l'hora de dissenyar els experiments (Mc. Phearson, 1999):

Es defineix el **límit de solubilitat** d'un solut en un dissolvent concret quan es troben en **equilibri** la fase sòlida i dissolta d'aquest, és a dir, hi ha un balanç entre les molècules que es dissolen i les que passen a sòlid. Quan això passa es diu que el sistema es troba **saturat**. Si la concentració de solut està per sota del límit de solubilitat, estem es una situació de no equilibri i com tots els sistemes químics i físics, es tendirà a restablir aquest. En canvi, quan una solució sobrepassa el límit de solubilitat es diu que està **supersaturada**, està també en una situació de no equilibri i tendirà a l'equilibri passant molècules en solució a estat sòlid. És en una situació com aquesta, de supersaturació, en que poden créixer els cristalls. Com és possible que tinguin lloc aquesta situació de supersaturació? Perquè les molècules no precipiten o cristal·litzen immediatament un cop passat el límit de solubilitat? Això és degut a que es necessita una certa energia d'activació per iniciar la formació de l'estat sòlid sense la qual s'aconsegueix aquesta supersaturació.

La solubilitat dels compostos químics depèn de moltes variables com poden ser la temperatura, pH, força iònica, concentració de precipitant, etc. A través dels **diagrames de fase** (Malinina *et al.*, 1987), es plasmen els diferent estats d'una solució i com passar d'un estat a l'altre variant la concentració del que s'estigui estudiant. Per exemple representant concentració de solut (proteïna, àcid nucleic, etc.) vs. concentració de precipitant s'obtenen els processos físics amb més probabilitat de donar-se en cada zona del diagrama de fases. Com es veu en el diagrama de fases de la figura II-6.1, en una solució altament supersaturada hi ha més probabilitat que es produeixi la nucleació. Aquesta zona s'anomena regió làbil mentre que en la zona metaestable de supersaturació la probabilitat de que apareguin nuclis és molt baixa.

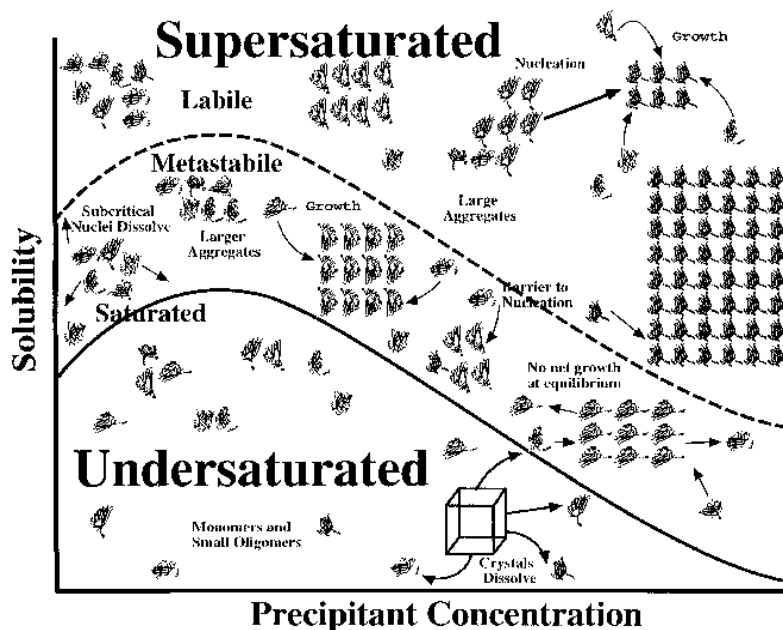


Fig. II-6.1. Diagrama de fases. Solubilitat vs. Concentració de precipitant (Mc Pherson, 1999).

Per tal d'obtenir un cristall es tracta doncs d'assolir aquesta situació de supersaturació. L'estratègia normalment passa per disminuir lentament la solubilitat del sistema a cristal·litzar canviant condicions com pot ser la concentració de precipitant. A continuació es descriuen els mètodes que s'han utilitzat amb aquest propòsit:

### Difusió de vapor

Un dels mètodes de cristal·lització més utilitzats en macromolècules és la difusió de vapor. Dues maneres molt comuns de portar a terme aquest mètode és la difusió de vapor en **gota asseguda** o en **gota penjant**. En els dos casos es disposa d'un sistema tancat en el qual hi ha un reservori (que conté el precipitant) i una gota (de volum molt menor que el reservori) en el que hi ha la mostra a cristal·litzar juntament amb altres components com poden ser sals, tampó, espermina, fàrmacs, etc. La gota conté sempre menys precipitant que el reservori, i com que es troba en un sistema tancat, aquest tendeix a equilibrar les concentracions de

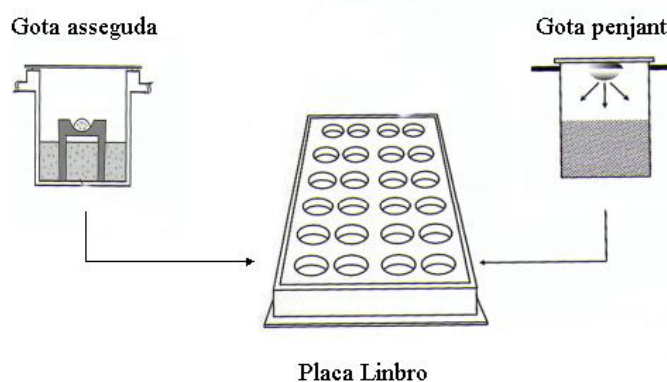
precipitant a través de la difusió de vapor. Aquesta té lloc mitjançant l'evaporació d'aigua de la gota en el cas de precipitants no volàtils com el MPD o el PEG o bé a través de la difusió del propi precipitant en el cas de precipitants volàtils com poden ser l'etanol o isopropanol.

#### Gota penjant

Per utilitzar aquesta tècnica cal primer tractar els cobraobjectes on s'hi posaran les gotes: es submergeixen en un bany de silà (netejan després amb banys d'aigua i finalment amb etanol per assecar) per tal de que tinguin una superfície hidrofòbica i la gota s'hi pugui quedar penjada.

Els experiments es poden fer en plaques *Linbro* que disposen de 24 pous, és a dir, s'hi poden fer 24 gotes. Les gotes tenen un volum entre 6 i 10  $\mu\text{l}$ , normalment 8  $\mu\text{l}$ . Es mesclen els components de la gota sobre del cobraobjectes, es gira i es col·loca sobre dels pous on prèviament s'hi ha posat la solució precipitant (1 ml aproximadament). Es sella el cobraobjectes amb l'ajuda de silicona, i el sistema queda tancat.

A la figura II-6.2 es mostra l'esquema de la difusió de vapor en plaques *Linbro*:



**Fig. II-6.2.** Difusió de vapor en gota penjant (dreta) i gota assegurada (esquerra) (Mc. Pherson, 1999).

### Gota assegurada

Per preparar experiments de gota assegurada, es poden també utilitzar les mateixes plaques *Linbro* que en gota penjant però ara, la gota va muntada a sobre d'un pont com es mostra a la figura II-6.2. El sistema es tanca també amb un cobraobjectes i amb l'ajuda de silicona.

### **Batch**

És un mètode molt senzill d'utilitzar. En aquest cas es prepara una solució que contingui la mostra i s'afegeix a la mateixa solució el precipitant (a una concentració igual a la del reservori). L'objectiu és que la solució arribi ràpidament a les condicions de supersaturació. Si les condicions són les adequades, s'arribarà a l'estat sòlid en forma de cristall. És doncs un mètode ràpid i senzill d'utilitzar però en els casos en que cal un equilibri lent per obtenir un bon cristall (com és sovint el cas del DNA) pot ser més convenient utilitzar la difusió de vapor.

### **Sembrat i microseminat**

Per emprar aquestes tècniques cal obtenir un cristall previ que s'hagi de millorar.

En el cas del **seminat** o macroseminat es necessita un cristall suficientment gran per poder-lo veure en un microscopi òptic, poder-lo manipular i transferir a una altra solució mare final que permeti augmentar la mida del cristall. Primerament es transfereix el cristall inicial a una solució que no contingui la molècula a cristal·litzar, el DNA en aquest cas. El cristall es comença a dissoldre. Es poden fer més banys amb diferents condicions i finalment es retorna el cristall a una solució que contingui DNA. Idealment, aquesta solució s'ha de trobar en condicions de supersaturació, concretament a la zona metaestable per evitar la nucleació espontània. El cristall mig dissolt hauria de continuar el seu creixement i millorar respecte el cristall de partida.

En canvi, en el cas del **microseminat** es parteix d'una solució inicial de microcristalls: es prepara una suspensió d'aquests en una solució nova sense DNA i es van fent dilucions d'aquesta. El propòsit és agafar una alíquota de l'última solució i afegir-la a una nova gota que sí que contindrà DNA esperant obtenir pocs cristalls i suficientment grans.

## 6.2 VARIABLES DE CRISTAL·LITZACIÓ

Hi ha moltes variables a tenir presents a l'hora d'intentar obtenir un bon cristall de DNA. Les més habituals són:

Precipitant: el més àmpliament utilitzat en la cristal·lització d'àcids nucleics és el MPD però també han donat bons resultats altres com són el PEG, sulfat d'amoni o etanol. La concentració de precipitant necessària varia segons la seqüència, el nombre de bases d'aquesta i les condicions de la gota.

Concentració d'oligo: el més habitual és utilitzar una concentració entre 0.5 i 1 mM de dúplex. S'ha de tenir present que en augmentar la concentració d'oligonucleòtid, la concentració de precipitant necessària disminueix i viceversa.

Tampó: s'utilitza sobretot el cacodilat en un rang de pH entre 6 i 7. No sembla que el pH tingui una gran influència en la cristal·lització d'àcids nucleics (Ducreix y Giegé, 1992) però sí que petits ajustos del pH poden ajudar a millorar considerablement la qualitat dels cristalls.

Sals: és una de les variables que influeix més a l'hora de cristal·litzar àcids nucleics. Es poden utilitzar sals amb cations monovalents o divalents o mesclades d'ambdós. Les sals més comuns són:  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $BaCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $CoCl_2$ .

Espermina: aquesta poliamina ajuda sovint a cristal·litzar o a millorar els cristalls d'oligonucleòtids (Wahl *et al.*, 1996). Actua com a contraió dels fosfats del DNA que tenen càrrega negativa. S'ha de tenir present a l'hora de dissenyar les condicions de la gota, que l'espermina actua també com a precipitant (Subirana i Vives, 1981).

Temperatura: pot influir molt en la cristal·lització d'oligonucleòtids. La majoria d'assajos s'han realitzat a una temperatura constant de 20°C però en el cas de la seqüència (AATT)<sub>3</sub>, s'han emprat també temperatures més baixes ja que hi ha precedents d'oligos rics en adenina i timina cristal·litzats a temperatures més baixes (Abrescia *et al.*, 2002). Canvis de temperatura s'utilitzen també per redissoldre cristalls que no són bons (escalfant) i intentar induir el seu creixement tornant a refredar lentament.

### 6.3 CRISTAL·LITZACIÓ DE COMPLEXOS DNA-FÀRMAC INTERCALANT

L'objectiu d'aquests estudis de cristal·lització no era només estudiar estructures d'oligonucleòtids, sinó que es pretenia unir aquestes seqüències amb fàrmacs que presumiblement s'intercalen entre les bases del DNA. En quant a la cristal·lització d'aquests complexos, cal tenir present, a part de l'efecte de totes les variables comentades anteriorment, la influència del fàrmac. Per exemple, a l'unir-se al DNA, el fàrmac disminueix la solubilitat d'aquest i per tant, es necessitarà menys precipitant per arribar a l'estat de supersaturació. Per altra banda, està descrit que cations divalents com el  $Mg^{2+}$  (Lyons i Kotin, 1965) competeixen amb els fàrmacs intercalant-se entre les bases, per tant, en aquests assajos, la concentració de sals amb cations divalents acostuma a ser menor que quan es cristal·litzen oligos sols. La naturalesa del fàrmac també influeix molt, alguns dels compostos utilitzats són molt poc solubles en aigua, el que dificulta la seva manipulació.

### 6.4 MUNTATGE DE CRISTALLS

La tendència actual de la cristal·lografia de macromolècules és la utilització de la criogènia sempre que sigui possible. Així doncs, un cop s'obté un cristall de mides suficients, es congela amb nitrogen líquid. Per això s'utilitza un criollaç (o *cryoloop*) que és un aro de niló subjectat a una vareta metàl·lica. Hi ha llaços de mides diferents que s'utilitzaran en funció de la mida del cristall. Es pesca el cristall amb el criollaç i es congela immediatament en nitrogen líquid, el cristall queda congelat instantàniament (Rudman, 1976).

Els avantatges de realitzar l'experiment a baixes temperatures són molts: en primer lloc, permet guardar el cristall congelat tan de temps com faci falta mentre que si no es congela es pot fer malbé abans de ser analitzat. Altres avantatges són que es minimitzen els danys de la radiació, es redueix la dispersió, i es pot fins i tot millorar la resolució.

Algun dels inconvenients de la criogènia és l'aparició de gel en els espectres de difracció. Per evitar això, es poden utilitzar crioprotectors com el MPD o el glicerol. Com que el MPD és un precipitant molt utilitzat en àcids nucleics, sovint no cal fer cap pas extra, només cal tenir el cristall a una concentració suficient de MPD (aproximadament del 20%). Si no és així, s'ha de passar el cristall a diferents banys amb concentracions cada cop més altes de MPD fins a arribar a la desitjada.



Degut a que els cristalls de DNA sovint són molt fràgils, qualsevol manipulació els posa en perill, per això qualsevol pas que es faci pot ser molt determinant i s'ha de realitzar amb la màxima precaució possible.

## 7. DIFRACCIÓ DE RAIGS X

### 7.1 INTRODUCCIÓ

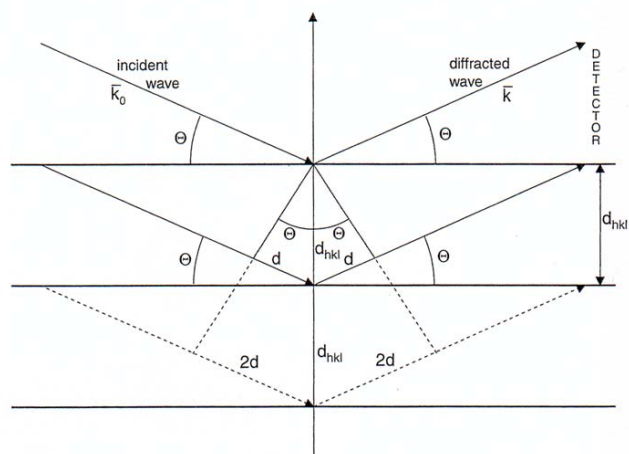
#### Llei de Bragg i esfera d'Ewald

Per tal d'estudiar detalladament l'estructura d'una molècula, un microscopi òptic no és adequat ja que no té una resolució suficient per arribar a veure els àtoms. Per veure àtoms amb una separació en les molècules de l'ordre de  $10^{-8}$  cm, és necessari utilitzar una radiació de longitud d'ona comparable o més petita que les dimensions dels àtoms. Aquesta radiació són els raigs X, d'una longitud d'ona entre 0.1 i 100 Å. Els raigs X poden ser difractats pels electrons: quan els raigs X xoquen amb un àtom, el camp elèctric de la radiació posa els electrons de l'àtom en oscil·lació amb el seu nucli. Aquesta oscil·lació té la mateixa freqüència que la radiació incident. Joseph John Thompson va demostrar que quan la radiació és dispersada pels electrons, hi ha un desfasament de  $180^\circ$  a la radiació. Aquest desfasament és el mateix per a tots els àtoms del cristall en absència d'altres efectes menys habituals com la dispersió anòmala (descrita en apartats posteriors).

L'any 1912, Von Laue juntament amb Friedrich i Knipping, van descobrir la difracció de raigs X dels cristalls demostrant la naturalesa ondulatoria dels raigs X. Per altra banda, W. L. Bragg va ser el primer en utilitzar aquesta tècnica per resoldre la primera estructura cristal·lina. Bragg va demostrar amb els seus estudis, que la distribució angular de la radiació dispersada es podia entendre considerant que els raigs difractats es comportaven com si fossin reflexats per plans, passant per punts de la xarxa cristal·lina (Fig. II-7.1). L'angle d'incidència de la radiació és igual a l'angle de reflexió. D'aquí es deriva la coneguda **Llei de Bragg**:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta_{hkl} \quad [\text{eq. 7.1}]$$

sent  $n$  = ordre de difracció,  $\lambda$  = longitud d'ona de la radiació incident,  $d_{hkl}$  = espaiat entre plans de difracció i  $\theta_{hkl}$  = angle d'incidència de la radiació.

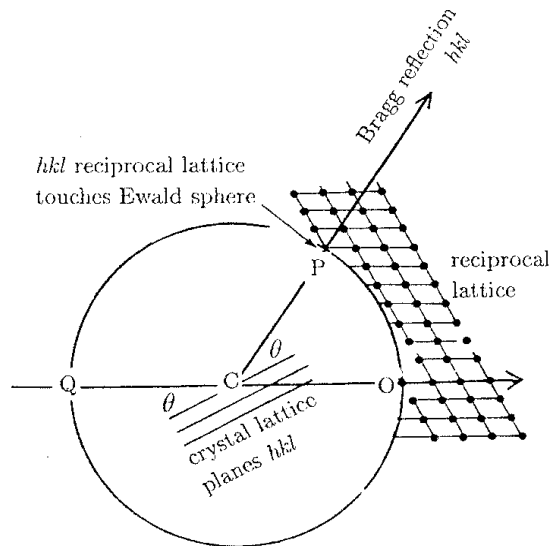


**Fig II-7.1.** Llei de Bragg. Difracció d'una família de plans amb índex de Miller  $hkl$  i espai inerplanar  $d_{hkl}$ .  $K_0$  és la direcció de l'ona incident i  $K$  és la direcció difractada (McPherson, 2003).

La reflexió doncs té lloc gràcies als plans, per això els raigs difractats són el que s'anomenen les reflexions. Per tant, si una radiació monocromàtica de raigs X s'incideix en un cristall únic, s'observarà difracció només en angles d'incidència concrets, no per a qualsevol valor d'aquest.

A part del reticle del cristall en l'espai real, hi ha un altre reticle en l'espai de difracció anomenat reticle recíproc. Per tant, la xarxa on s'obtenen les reflexions és el que s'anomena reticle recíproc. Cada punt del reticle recíproc o intensitat de difracció ve d'un pla de difracció específic amb uns únics índexs de Miller ( $hkl$ ).

Per entendre una mica més la relació entre la llei de Bragg, l'espai recíproc, les reflexions i en definitiva el cristall físic, que és el que tenim, Ewald, l'any 1921, va desenvolupar la següent construcció coneguda com l'**esfera d'Ewald** i que es mostra a la figura II-7.2:



**Fig II-7.2.** Esfera d'Ewald. Orientació del reticle recíproc amb l'origen a O (Glusker, 1994).

L'esfera d'Ewald permet saber quines reflexions de Bragg s'observaran coneixent l'orientació del cristall respecte el raig incident. Quan el cristall es fa rotar, el seu reticle cristal·lí i reticle recíproc roten també. Si durant aquesta rotació un punt del reticle recíproc toca la circumferència de l'esfera d'Ewald, es satisfà la llei de Bragg.

La radiació difractada està formada per ones. Aquestes interfereixen d'una manera constructiva quan es compleix la llei de Bragg i ho fan d'una manera destructiva en totes les altres situacions, sumant en aquests casos una intensitat 0. Les reflexions tenen diferent intensitat. Això no ho explica la llei de Bragg, sinó que s'ha de recórrer a l'estructura atòmica que compon la macromolècula dels cristall. El patró de difracció és en realitat la transformada de Fourier del cristall, expressió matemàtica que relaciona les ones difractades amb la distribució dels àtoms en el cristall.

## Simetria

Un cristall conté ordre en les tres dimensions. Aquest ordre està governat per unes propietats de simetria a partir de les quals es construeix el cristall. Aquest es forma a partir de la unitat asimètrica, aplicant-hi una simetria donada pel grup espacial i una translació, donant així la cel·la unitat.

S'entén doncs per **unitat asimètrica** al conjunt d'àtoms de la molècula a estudiar a partir dels quals es pot construir tot el cristall aplicant les operacions de simetria. Per tant, cap part d'aquest conjunt d'àtoms no estarà relacionada amb cap altra part a través de simetria cristal·logràfica. El conjunt d'operacions de simetria que calen per generar el cristall vénen definides pel **grup espacial**. La combinació de tots els elements de simetria dóna lloc a 230 grups espacials possibles. Existeixen set sistemes cristal·lins: triclínic, monoclínic, ortoròmbic, trigonal, tetragonal, hexagonal i cúbic. En funció de com està centrada la cel·la (P primitiva, A, B, C centrades a les cares, F centrada a totes les cares i I centrada al cos) s'obtenen els 14 reticles de Bravais. Finalment, aplicant els elements de simetria del grup espacial a la unitat asimètrica s'obté la **cel·la unitat**, el paral·lelopíped més petit que defineix els paràmetres de la cel·la  $a$ ,  $b$  i  $c$  (eixos) i  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (angles). La repetició de la cel·la unitat en l'espai dóna lloc al cristall.

La simetria del patró de difracció representa d'alguna manera la simetria de la unitat asimètrica del cristall. Els espaiats entre les reflexions, el patró de difracció, indiquen el tipus de cel·la que es té i les dimensions d'aquesta. Per tant, la distribució de les reflexions i les seves intensitats donen tota la informació que es necessita del cristall.

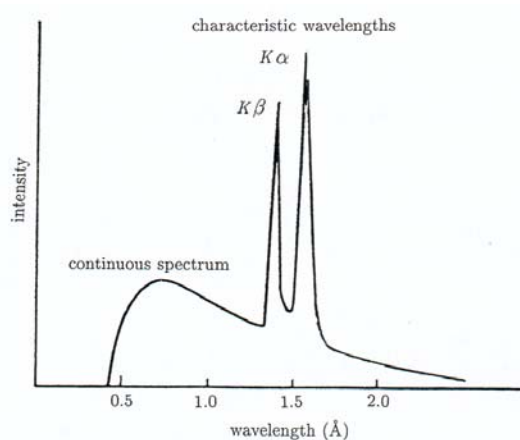
Les peces més importants necessàries per recollir dades de difracció de raigs X són les fonts de raigs X i els detectors:

### Fonts de raigs X

Fonts de raigs X convencionals: n'hi ha de dos tipus:

1. *tubs de raigs X*: consten d'un càtode que emet electrons i d'un ànode. Es fa el buit al sistema, i com que el càtode està a un potencial negatiu elevat respecte l'ànode, els electrons són accelerats arribant a l'ànode amb una velocitat alta. En difracció de macromolècules l'ànode és normalment el Cu on es focalitza el raig d'electrons. La major part de l'energia d'aquests electrons es perd en forma de calor, per això cal refrigerar l'ànode

normalment amb aigua. Una petita part de l'energia, s'emet en forma de raigs X de dues maneres: formant un espectre continu en funció de la longitud d'ona i donant pics d'intensitat a longitud d'ones concretes (Fig. II-7.3). Aquests pics són deguts a transicions electròniques entre els orbitals dels àtoms de l'ànode i és l'energia que s'utilitza per incidir el cristall. S'utilitza l'energia provinent de  $K\alpha$  ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ) que és en realitat el valor resultant de  $K\alpha_1$  ( $1.54051 \text{ \AA}$ ) i  $K\alpha_2$  ( $1.54433 \text{ \AA}$ ) tenint present que  $K\alpha_1$  és el doble de  $K\alpha_2$ .



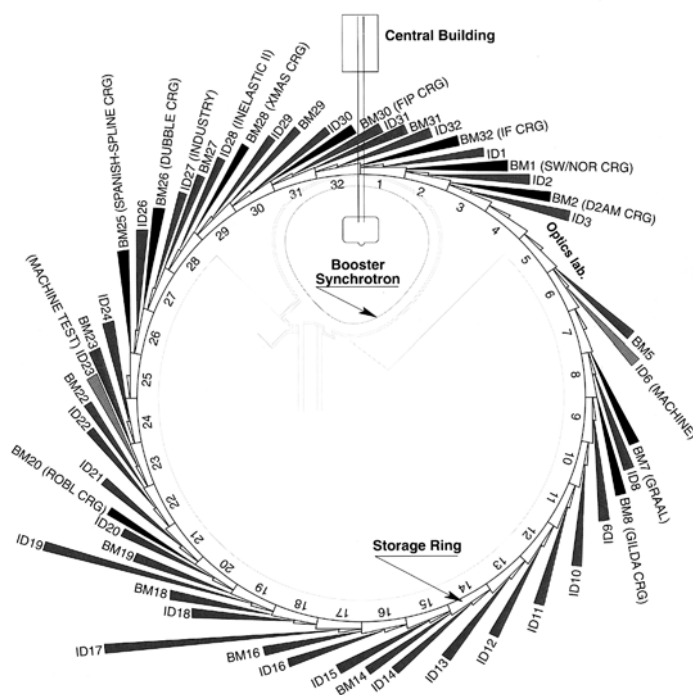
**Fig. II-7.3.** Espectre de raigs X característic del Cu (Glusker, 1994).

2. *tubs d'ànode rotatori*: tot i refrigerant l'ànode, l'escalfament d'aquest degut al raig d'electrons és el que limita la capacitat màxima d'aquest. Es pot millorar el sistema si l'ànode és un tub rotatori en comptes d'una peça fixa. Amb un disseny adequat, els raigs X generats romanen a una posició fixa mentre que l'ànode es mou i dissipa la calor. Aquests sistemes poden aconseguir una radiació d'intensitat fins a 10 cops superior als descrits anteriorment.

En el laboratori es disposa d'un generador de raigs X *GX21 Enraf Nonius* d'ànode rotatori. L'ànode és de Cu i es disposa d'un monocromador de grafit per seleccionar  $K\alpha$  del Cu. El generador proporciona entre 60 i 80 mA i entre 35 i 40 KV.

**Radiació sincrotró:**

Els avenços de la tecnologia han permès crear uns grans acceleradors de partícules anomenats sincrotrons. Aquests són sistemes circulars on s'injecten partícules carregades elèctricament (electrons negatius o positrons positius) que circulen amb una velocitat propera a la de la llum. Una conseqüència d'aquesta acceleració és l'emissió de radiació sincrotró.



**Fig. II-7.4.** Esquema del sincrotró de Grenoble (ESRF). La majoria de recollides s'han fet a la línia BM14, antiga línia espanyola.

Quan el raig de partícules canvia de direcció, els electrons o positrons són accelerats cap al centre de l'anell i emeten radiació electromagnètica perdent per tant, energia. L'anell d'un sincrotró pot tenir un diàmetre entre 10 metres fins a uns centenars. La trajectòria de les partícules ve determinada per la seva energia i

pel camp magnètic que provoca el canvi de direcció de les partícules carregades. Hi ha quatre tipus de dispositius magnètics:

- *bending magnets*: necessaris per guiar els electrons a la seva òrbita.
- *wavelength shifter*: amb un camp magnètic local més fort i una curvatura més acusada.
- *wiggler*: provoquen corbes extremes a la trajectòria dels electrons.
- *undulator*: semblants als *wigglers* però degut a efectes d'interferència, emeten radiació a longitud d'ones més específiques.

Per seleccionar la longitud d'ona adequada, s'utilitzen monocromadors. La possibilitat d'ajustar la longitud d'ona en fer un experiment és un dels avantatges més importants de la radiació sincrotró respecte les fonts convencionals. S'utilitzen normalment longituds d'ona d'1 Å o fins i tot més curtes. Això augmenta la sensibilitat d'alguns detectors i en disminueix l'absorció. Un altre avantatge d'aquest tipus de radiació és la seva alta intensitat (podent arribar a ser dos ordres de magnitud més forta que una font convencional) així com una divergència del raig més baixa. També es disminueix la durada de l'experiment i es té una radiació altament polaritzada.

S'han analitzat cristalls al sincrotró de Grenoble (ESRF) i d'Hamburg (DESY).

### **Detectors**

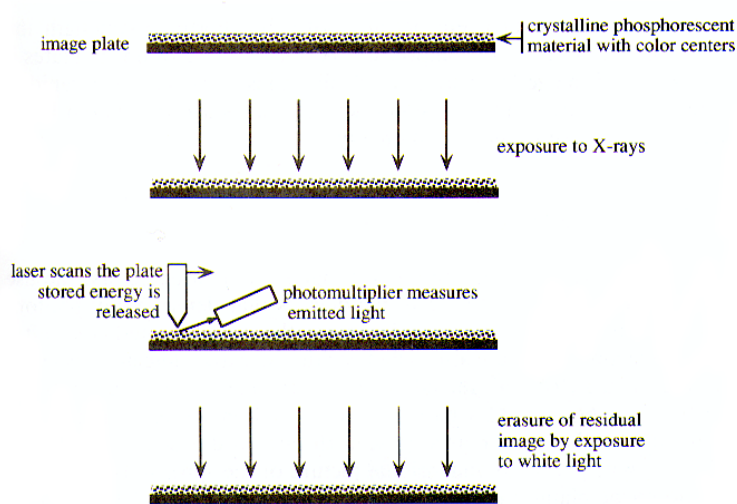
Per tal de determinar l'estructura d'un cristall, cal mesurar les intensitats de tots els raigs difractats. Per fer això, cal rotar el cristall per portar els punts del reticle recíproc a les condicions de difracció. Per tant, hi ha dues parts molt importants en un instrument de difracció: una part mecànica per rotar el cristall i un detector per mesurar la posició i la intensitat del raig difractat. Cal tenir present que aquesta intensitat és sempre el resultat de dues mesures: la intensitat total en la direcció del raig i el soroll de fons dispersat en aquesta mateixa direcció. A continuació es descriuen els detectors utilitzats:

#### Image Plate (IP)

Aquest tipus de detectors estan reemplaçant en molts laboratoris les pel·lícules de raigs X convencionals. Els *Image Plates* estan formats per una pantalla de fòsfor que emmagatzema temporalment la imatge de raigs X i per un escàner que converteix aquesta imatge de raigs X en un senyal digital (Fig. II-7.5). Els raigs X



exciten els electrons del material de fòsfor a nivells d'energia més elevats. Part d'aquesta energia s'emet ràpidament en forma de llum fluorescent a la zona del visible. En canvi, una part apreciable de l'energia es queda retinguda en el material en forma de centres F (o centres de color) i es dissipa lentament. Els electrons atrapats en els centres de colors són alliberats amb la llum. A la pràctica, s'utilitza làser vermell per escanear i s'emet llum blava. La llum vermella es separa amb un filtre i es mesura la llum blava amb un fotomultiplicador. La llum emesa és proporcional al nombre de fotons exposats. Després de cada exposició, s'exposa la pantalla a llum visible per esborrar la imatge residual.



**Fig. II-7.5.** Esquema d'un detector Image Plate (Drenth, 1994).

Els *Image Plates* són molt més sensibles que les pel·lícules de raigs X i són molt sensibles a longituds d'ona curtes com les que es poden utilitzar als sincrotrons. Per altra banda, l'inconvenient d'aquest tipus de detectors és que continuen requerint diversos passos durant tot el procés i a més, la imatge emmagatzemada desapareix gradualment.

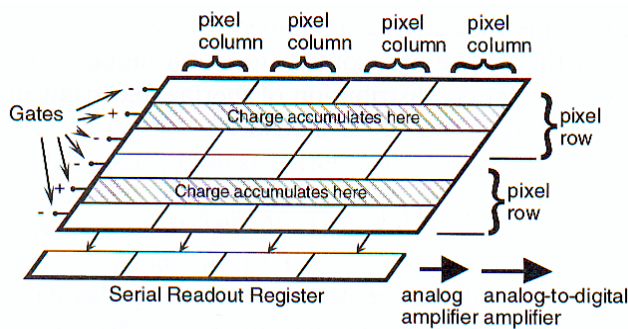
En el laboratori es disposa d'un *Image Plate Mar Research* amb un plat de 180 mm de diàmetre.

CCD (charged-coupled devices)

Durant els últims anys, els anomenats CCD s'han anat implementant als sincrotrons (Fig. II-7.6). L'obtenció d'una imatge amb un CCD passa per dues etapes: 1. generació i acumulació de la càrrega, i 2. transferència de la càrrega i detecció (Westbrook i Naday, 1997).

1. *generació i acumulació de la càrrega*: la llum capturada en un CCD genera parells electró-forat ( $e-h$ ) degut a l'efecte fotoelèctric. El silici té un gap energètic entre la seva banda de valència i de conducció de 1.1 eV. Els fotons d'energia per sota de 1.1 eV no superen aquest gap, per tant, el silici és transparent a fotons de baixa energia. Els fotons d'energia entre 1.1 i 5 eV exciten l'electró de valència a la banda de conducció i els fotons d'energia superior a 5 eV poden provocar múltiples parells  $e-h$ .

Els CCD estan formats per arranjaments d'elèctrodes anomenats ponts (*gates*). Tres ponts continus constitueixen un pixel cada un dels quals és capaç d'acumular electrons lliures generats durant exposició de llum. Dos ponts de cada pixel són portats a potencial negatiu i el tercer a potencial positiu per tal d'atraure els electrons acumulats. Els electrons negatius formen una barrera de potencial per carregar moviment entre pixels d'una fila, mentre que les columnes s'aïllen elèctricament entre elles. Si un pixel queda saturat no es podrà llegir bé la imatge.



**Fig. II-7.6.** Esquema d'un detector CCD (Amemiya, 1997).

2. *Transferència i detecció de la càrrega*: després de l'exposició de raigs X, es tanca l'obturador i es llegeix el CCD per sèries, pixel a pixel. Totes les files del registre paral·lel baixen una fila completa. L'última fila de pixels es baixa a un registre de sèrie. Les càrregues d'aquest es desplacen cap al costat i la càrrega terminal del pixel es mesura quantitativament amb un circuit electrònic. Després de mesurar tots els pixels del registre de sèrie, el registre paral·lel baixa una altra fila i tot el procés comença de nou fins que s'han llegit tots els registres paral·lels. La càrrega es desplaça cap al circuit de lectura canviant el voltatge i es processa amb un amplificador analògic i amb un traductor analògic-digital (ADC), capaç de detectar la càrrega amb una precisió que ve determinada per la seva manufactura.

L'avantatge més important d'aquest tipus de detectors és que el temps que passa entre imatge i imatge és més curt que per exemple el cas del *Image Plates*, i això pot reduir el soroll de fons a més de disminuir la durada de l'experiment.

#### **Estratègia:**

Un cop es té un cristall suficientment bo, hi ha diverses etapes que cal superar fins a obtenir finalment l'estructura de la mostra cristal·litzada:

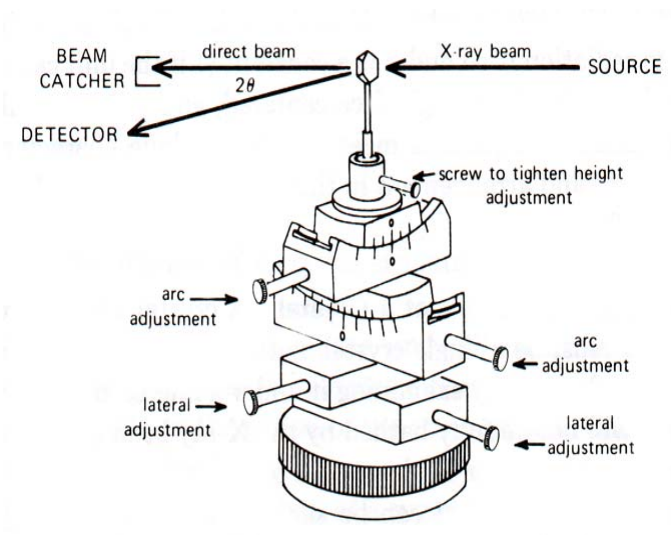
- Recollida de dades
- Indexat, processat i escalat
- Problema de les fases; Resolució de l'estructura
- Afiat de la solució
- Validació de l'estructura final

## 7.2 RECOLLIDA DE DADES

És molt important i fins i tot crític en etapes posteriors, obtenir les millors dades dins, és clar, de les possibilitats del cristall. A continuació s'anomenen els paràmetres que cal tenir presents abans de fer una recollida:

### Orientació del cristall:

Normalment es té el cristall en un llaç de niló i s'ha de situar centrat en el feix de raigs X incident. Per això s'utilitza un goniòmetre (Fig. II-7.7).



**Fig. II-7.7.** Goniòmetre. Es mostren els ajustaments que es poden fer per centrar el cristall en el feix. Els ajustaments d'arc ens permeten orientar els eixos cristal·logràfics en la direcció desitjada (Glusker, 1985).

Un goniòmetre pot tenir dos arcs mitjançant els quals s'ha d'aconseguir que rotant el cristall quedi sempre centrat en el feix de raigs X. És molt important aconseguir això ja que en macromolècules no n'hi ha prou en obtenir una sola foto de difracció, sinó que per obtenir tota la informació necessària per resoldre l'estructura, cal recollir tot un ventall d'espectres a diferents angles d'incidència del raig.

Per obtenir la millor informació cal saber de quin a quin grau s'ha de recollir. Hi ha algun programa com el *strategy* (Ravelli *et al.*, 1997) que prediu el rang a recollir, directament dependent de la simetria del cristall. En una estructura altament simètrica, cal recollir menys graus per obtenir el 100% de la informació que en una de baixa simetria. De totes maneres, sempre que es pugui es recolliran més graus dels mínims necessaris per tal de tenir una redundància a les dades. Poder mesurar més d'un cop cada reflexió única, augmentarà la precisió de la recollida.

**Angle d'oscil·lació:** cada foto recollida fa també una oscil·lació que serà més gran o més petita en funció sobretot de les dimensions de la cel·la i de la mosaicitat del cristall. Alguns cristalls presenten mosaicitat anisotròpica i el seu valor depèn de l'orientació del cristall.

**Distància al detector i temps d'exposició:** la distància del cristall al detector està directament relacionada amb la resolució de l'espectre que s'obté. Així, si el cristall està més a prop del detector es podran detectar aquelles reflexions de major resolució. Per altra banda, si la distància augmenta, millora la relació senyal/soroll de fons (Dauter, 1997). Cal doncs veure fins a quina resolució difracta el cristall i adequar la distància en conseqüència. Un paràmetre molt relacionat és el temps d'exposició en que es recull cada foto. Cal tenir present que la intensitat de les reflexions no és igual per totes, les de baixa resolució són molt més intenses que les d'alta resolució, les quals necessitaran un temps d'exposició més alt per ser detectades. Això pot provocar a vegades, que per poder veure les taques més febles d'alta resolució, les taques més intenses quedin saturades, siguin massa intenses per després poder-les utilitzar. Per evitar aquest problema es poden fer dues (o més, si cal) recollides del mateix cristall: una recollida a una distància llunyana del detector i un temps d'exposició curt per recollir bé la baixa resolució i una altra recollida més a prop del detector i amb un temps d'exposició més llarg per obtenir les taques d'alta resolució.

### 7.3 INDEXAT, PROCESSAT, ESCALAT I REDUCCIÓ DE DADES

#### Indexat

L'objectiu d'aquest primer pas és determinar utilitzant una o varies fotos, la simetria del cristall, les dimensions de la cel·la i el grup espacial. Hi ha diferents programes que prediuen automàticament la simetria, en aquesta tesi s'ha utilitzat el programa DENZO (Otwinoski i Minor, 1997). Encara que d'una manera força automàtica, el mecanisme de funcionament és el següent: en primer lloc es determina el reticle de Bravais, decidint el sistema cristal·lí o classe de cristall (triclínic, monoclínic, ortoròmbic, trigonal, tetragonal, hexagonal o cúbic) i com està centrada la cel·la (P, A, B, C, F, I). Un cop sabent això es calculen les dimensions de la cel·la  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , es detecta el grup de simetria del cristall a l'espai recíproc, és a dir, el grup de Laue a que pertany el cristall, i s'analitzen també les absències sistemàtiques. Tota aquesta anàlisi ha de portar a determinar la cel·la i grup espacial del cristall.

#### Autoindexat i afinat dels paràmetres del cristall i del detector

Per realitzar l'autoindexat, el primer que s'ha de fer és una cerca dels pics de l'espectre de difracció que s'utilitzaran (es pot fer automàticament o manual). El programa DENZO intenta assignar a tots els pics observats els índexs que els corresponen. Encara que el funcionament del programa és força automàtic, cal optimitzar alguns paràmetres del cristall i del detector per no obtenir una cel·la o grup espacial erronis. Aquest són: mosaicitat, mida i forma de la taca, distància del detector, matriu d'orientació del cristall, etc.

#### Integració del màxim de difracció

Obtenir una predicció acurada de la posició de les taques de difracció és molt important a l'hora d'aconseguir una integració precisa dels pics de Bragg. Per això s'aplica l'*ajust del perfil* (o *profile fitting*). Aquest és un procés que consta de dos passos: primer, es fa una predicció del perfil basada en el perfil d'altres reflexions en un radi determinat. En segon lloc, la informació d'aquest perfil predit i l'actual es combina de la següent manera:

El perfil observat  $M_i$  és una suma dels pics de Bragg i del soroll de fons. El valor estimat  $P_i$  s'expressa com:

$$P_i = B_i + \text{constant } (p_i) \quad [\text{eq. 7.2}]$$

on  $B_i$  és el valor estimat del soroll de fons i  $p_i$  és el valor estimat del perfil. L'ajust del perfil minimitza l'equació:

$$\sum_i \frac{(M_i - P_i)^2}{V_i} \quad [\text{eq.7.3}]$$

sent  $V_i$  la variància ( $\sigma^2$ ) de  $M_i$

### Processat i escalat

Un cop s'ha determinat la simetria i la cel·la del cristall i s'ha optimitzat els paràmetres citats anteriorment, s'ha d'obtenir la informació de totes les fotos recollides. Si les dades ho permeten es pot fer la integració automàticament amb l'ajuda de programes com és el DENZO que és el que s'ha utilitzat per tots els cristalls que es presentaran en aquesta tesi. Si les dades donen problemes, s'haurà de processar cada foto per separat. Del processat s'obtenen les intensitats de cada foto.

Amb totes aquestes intensitats es fa el que s'anomena l'escalat. En aquest cas s'ha utilitzat sempre el programa SCALEPACK (Otwinoski i Minor, 1997): es recullen tots els hkl i s'obtenen unes estadístiques que donaran una idea de la qualitat de les dades així com uns valors tornats a afinar dels paràmetres del cristall i del detector (es coneix com post-afinament). El programa corregeix el valor de les intensitats tenint present el soroll de fons, així com el factor de Lorentz, factor de polarització, absorció i la possible malmesa del cristall.

Un dels indicadors de la qualitat de les dades és  $R_{\text{merge}}$ :

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - I(hkl)_i|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)_i} \quad [\text{eq. 7.4}]$$

Però  $R_{\text{merge}}$  no és un paràmetre del tot fiable ja que no té present la redundància de les dades. El quocient  $\langle I \rangle / \sigma(\langle I \rangle)$  és molt més adequat per saber per exemple, fins a quina resolució les nostres dades són acceptables. Es recomana que aquest quocient sigui  $\geq 2$ .

Un altre factor més fiable que s'obté és:

$$\chi^2 = \sum k \frac{(I - \bar{I})^2}{N\epsilon^2} \quad [\text{eq. 7.5}]$$

a on  $\epsilon$  és un paràmetre que es pot modificar durant l'escalat per tal d'obtenir valors de  $\chi^2$  propers a 1 que seria el valor òptim.

També s'obté la completitud de les dades així com la seva redundància.

Finalment, s'obté de SCALEPACK un fitxer amb totes les reflexions úniques que és el que s'utilitzarà en les etapes posteriors sempre i quan es donin per bones les dades. Tot el procés és el que s'anomena **reducció de dades**.

Les intensitats obtingudes en l'escalat ( $I$ ) s'han de convertir en amplituds dels factors d'estructura ( $F(hkl)$ ), que és el que s'utilitzarà en les següents etapes. S'ha utilitzat el programa *truncate* (French i Wilson, 1978) de CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) per fer la següent conversió:

$$I = |F(hkl)|^2 \quad [\text{eq. 7.6}]$$



## 7.4 PROBLEMA DE LES FASES; RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA

### El problema de les fases

Per obtenir la distribució electrònica tridimensional del conjunt d'àtoms que formen el cristall (objectiu de l'experiment), cal realitzar una suma de Fourier tridimensional. El nombre d'electrons per unitat de volum o densitat electrònica a qualsevol punt  $x, y, z$  ve representat per  $\rho(xyz)$  i té la següent equació:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)] \quad [\text{eq. 7.7}]$$

sent:

$V$  = volum de la cel·la unitat

$|F(hkl)|$  = amplitud del factor d'estructura pels índexs  $hkl$

$\alpha(hkl)$  = angle de fase

Les reflexions individuals dels patrons de difracció són la suma d'interferències d'ones dispersades per tots els àtoms del cristall en una direcció concreta. Com que són ones, no tenen només un únic valor resultant sinó que també tenen un angle de fase associat a cada una, depenent també de la distribució dels àtoms, de la seva posició. L'angle de fase és una part essencial de la segona part de l'equació de densitat electrònica descrita anteriorment. Malauradament, l'angle de fase d'una reflexió no pot ser mesurat de la mateixa manera que mesurem la intensitat. El problema de trobar l'angle de fase o estimacions d'aquest és sovint el pas més determinant i complicat del cristal·lògraf.

Hi ha diversos mètodes que permeten afrontar el problema de les fases, en aquesta tesi s'han utilitzat el reemplaç molecular i MAD (*Multiple-Wavelength Anomalous Dispersion*).

### Reemplaç molecular

El reemplaç molecular és àmpliament utilitzat en macromolècules. La limitació més important del mètode és que es necessita partir d'un model semblant al que es vol resoldre, és a dir, cal tenir una estructura les fases de les quals ja es coneixin i que sigui similar a l'estructura problema. Això sovint no és un problema, concretament en DNA es disposa ja d'un gran nombre d'estructures resoltes que ens poden ser de gran servei.

L'objectiu del mètode és portar l'estructura coneguda que s'utilitzarà com a model, del seu cristall al cristall de l'estructura problema. La manera d'aconseguir això és el reemplaç molecular descrit per primer cop per Rossmann i Blow (1962). El procés implica dues etapes: una *rotació* a on es determina l'orientació espacial de la molècula coneguda respecte la desconeguda, i una *translació* a on la molècula correctament orientada es superposa a l'altra. El reemplaç molecular també es pot utilitzar amb un altre objectiu: quan un cristall té més d'una molècula per unitat asimètrica, es pot determinar la seva posició relativa utilitzant la simetria no cristal·logràfica.

Per entendre el reemplaç molecular, s'ha d'entendre el que s'anomena funció de Patterson de l'estructura cristal·lina. El mapa de Patterson és un mapa de vectors: vectors entre àtoms en l'estructura real vénen donats com a vectors des de l'origen fins al màxim en un mapa de Patterson. És un mapa que indica totes les possibles relacions entre àtoms en una estructura cristal·lina i ve representat per una síntesi de Fourier:

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad [\text{eq. 7.8}]$$

o el que és equivalent:

$$P(u) = \frac{1}{V} \sum_S |F(S)|^2 \cos[2\pi u \cdot S] \quad [\text{eq. 7.9}]$$

a on  $u, v, w$  són les coordenades relatives a la cel·la unitat.

#### La funció de rotació:

L'objectiu doncs, és trobar la relació angular entre molècules (o unitats) idèntiques en una unitat asimètrica (funció d'auto-rotació o *self-rotation*) o entre molècules semblants en dues formes cristal·lines diferents (funció de rotació creuada o *cross-rotation*) a través de les dades experimentals de raigs X.

L'objectiu és obtenir el màxim solapament entre els mapes de Patterson del model i de l'estructura problema mitjançant la rotació d'un dels mapes. Es descriu la funció de rotació com :

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P(u) \times P_r(u_r) du \quad [\text{eq. 7.10}]$$

sent  $U$  el volum d'integració en el mapa de Patterson i  $P_r(u_r)$  la funció de Patterson rotada.

L'any 1972, Crowther va introduir la funció de rotació ràpida (*fast rotation function*) que es basa en el càlcul de la funció de rotació a través d'un Patterson definit a l'interior d'un volum esfèric utilitzant harmònics esfèrics.

Funció de rotació bloquejada (*locked*): si l'estructura presenta simetria no cristal·logràfica i els seus operadors de simetria es coneixen a través de la funció d'auto-rotació, es pot calcular la funció de rotació bloquejada. Aquesta és la mitja de  $n$  funcions de rotació independents i per tant, millora el senyal pic/soroll. Així, si es detecta simetria no cristal·logràfica ens pot ser de gran ajuda per determinar la rotació.

En la rotació és important utilitzar totes les reflexions fortes ja que el càlcul de la funció de rotació depèn bàsicament de la rotació d'un mapa de Patterson. La baixa resolució es pot eliminar ja que no és molt sensible a la rotació i s'acostuma a tallar l'alta resolució a valors entre 5 i 3 Å per disminuir el temps de càlcul.

A vegades el model utilitzat no funciona i cal modificar-lo una mica traient per exemple, algunes parts que puguin donar problemes. Si es continua sense trobar una solució, caldrà recórrer a altres models.

### La funció de translació

Després de trobar l'orientació correcta de la molècula, cal determinar la translació que es necessita per superposar una molècula amb l'altra en l'espai real. La molècula coneguda es mou a través de la cel·la unitat i es calculen els factors d'estructura ( $F_{calc}$ ). Aquests es comparen amb el valor dels factors d'estructura observats ( $F_{obs}$ ) calculant un factor R o el coeficient de correlació C:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F(obs)| - |F(calc)| \right|}{\sum_{hkl} |F(obs)|} \quad [\text{eq. 7.11}]$$

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

[eq. 7.12]

Per simplificar el problema de la translació s'han descrit unes equacions que descriuen el moviment de translació que cal aplicar per realitzar la cerca de la solució.

Crowther i Blow (1967) van definir la funció de translació com:

$$T(t) = \int_V P_{1,2}(u, t) \times P(u) du \quad [\text{eq. 7.13}]$$

sent  $P_{1,2}(u, t)$  la funció de Patterson creuada (*cross-Patterson function*) entre dues molècules relacionades per simetria cristal·logràfica,  $P(u)$  la funció de Patterson observada i  $t$  el vector intermolecular. Quan  $t$  és igual al vector  $t$  real, la funció  $T(t)$  assoleix un valor màxim.

Els programes que s'han utilitzats per realitzar el reemplaç molecular són: EPMR (Kissinger *et al.*, 1999), MolRep (Vagin i Teplyakov., 1997) i AMoRe (Navaza i Saludjian, 1997).

### **MAD (multiple-wavelength anomalous dispersion)**

Aquest mètode utilitza la propietat d'alguns àtoms de poder donar dispersió anòmala. En realitat, són els electrons els que provoquen aquest efecte: hi ha una absorció i remissió de raigs X per part dels electrons, d'una energia propera a la seva pròpia energia d'unió nuclear. Quan la freqüència d'oscil·lació dels raigs X és propera a la freqüència d'oscil·lació de l'electró, es produeix un fenomen de ressonància, té lloc el que s'anomena dispersió anòmala i s'expressa de la següent manera:

$$f = f_0 + \Delta f' + if'' = f' + if'' \quad [\text{eq. 7.14}]$$

on  $f_0$  és el factor de dispersió atòmica en absència de dispersió anòmala,  $\Delta f'$  i  $f''$  són les correccions disperses real i imaginària.

Aquest efecte és negligible per àtoms poc pesats, amb electrons units feblement, però per àtoms de major nombre atòmic pot ser considerable. Aquest efecte provoca que  $F_{hkl}$  i  $F_{-h-k-l}$  no coincideixin, per tant, es produeix una violació de la llei de Friedel. La component  $f''$  de l'equació 7.14 apareixerà en donar-se la violació de la llei de Friedel.

La variació de  $\Delta f'$  i  $f''$  amb la longitud d'ona implica que el factor d'estructura total d'una molècula és dependent de la longitud d'ona.

En els últims anys, avenços tècnics han fet possible maximitzar el senyal anòmal així com aconseguir una mesura més precisa. Això ha estat possible gràcies a la utilització de la llum sincrotró i a més, gràcies al fet de poder canviar la longitud d'ona del raig incident. La possibilitat de poder irradiar el cristall a la longitud d'ona de l'eix d'absorció de cada àtom anòmal augmenta l'eficàcia del mètode i permet així adequar l'experiment depenent de l'àtom pesat o anòmal que es tingui. Per tant, abans d'iniciar un experiment de MAD, cal determinar amb molta precisió l'eix d'absorció de l'àtom anòmal. Això es fa normalment mesurant un espectre d'absorció del mateix cristall.

En un experiment de MAD s'utilitzen normalment entre 3 i 5 longituds d'ona diferents amb l'objectiu de maximitzar les diferències de *Bijovet*:

$${}^{\lambda} \Delta_{ano} = \left| {}^{\lambda} F^{+} \right| - \left| {}^{\lambda} F^{-} \right| \quad [\text{eq. 7.15}]$$

i la diferència dispersiva:

$$\Delta^{\lambda} \bar{F} = \left| {}^{\lambda_i} \bar{F} - {}^{\lambda_j} \bar{F} \right| \quad \text{sent} \quad {}^{\lambda} \bar{F} = \left( \left| {}^{\lambda} F^{+} \right| + \left| {}^{\lambda} F^{-} \right| \right) / 2 \quad [\text{eq. 7.16}]$$

Si només hi ha un tipus d'àtom pesat, n'hi ha prou amb tres longituds d'ona: una es selecciona per maximitzar  $f''$  (i per tant,  $\Delta_{ano}$ ), una altra correspon al mínim de  $\Delta f$  i una tercera lluny de l'eix que s'utilitza com a control.

Les tècniques de MAD actuals solucionen el problema de les fases amb equacions lineals a on la dispersió normal d'una estructura és separada de l'anòmala. (Mitchell, 1957 i Corby i Black 1973, i Black i Corby 1975).

L'estructura resolta per MAD que es presentarà en aquesta tesi utilitza l'àtom de  $\text{Ni}^{2+}$  com a àtom pesat i les recollides del cristall es van fer a les longituds d'ones:  $\lambda_1 = 1.48475 \text{ \AA}$ ,  $\lambda_2 = 1.48563 \text{ \AA}$ ,  $\lambda_3 = 1.31155 \text{ \AA}$ .

Els programes que s'han utilitzat per determinar les fases amb aquest mètode són: shelxd (Sheldrick et al., 2001) i shelxe (Sheldrick, 2002).

Una variant d'aquest mètode és la utilització de només una longitud d'ona per determinar el senyal anòmal de l'àtom pesat. Aquest mètode es coneix com a **SAD** (single-wavelength anomalous dispersion) i pot ser útil quan per algun motiu (el cristall es fa malbé, falta de temps a la línia de raigs X, etc.) no s'ha pogut recollir dades a les tres longituds d'ona necessàries per MAD.

## 7.5 AFINAT DE LA SOLUCIÓ

Un cop es té la posició aproximada de tots o la majoria dels àtoms de l'estructura, es porta a terme l'afinament d'aquesta. Això vol dir acabar d'ajustar les posicions dels àtoms, afegir les parts que falten de l'estructura i en definitiva millorar la solució obtinguda en els passos anteriors. Durant tot el procés d'afinat es compararan els valors de  $F_{\text{calc}}(\text{hkl})$  i  $F_{\text{obs}}(\text{hkl})$ : el primer s'obté a partir de la solució obtinguda (ara serà el model), així, coneixent la posició dels àtoms, podem calcular  $F(\text{hkl})$  per a cada reflexió.  $F_{\text{obs}}(\text{hkl})$ , són els factors d'estructura que s'han trobat experimentalment a través de les intensitats mesurades del cristall. La mesura del grau de concordància entre els valors observats i els calculats és el que s'anomena R residual o més freqüentment **factor R** (equació 7.11 anteriorment descrita).

Si el model és del tot correcte R seria igual a 0 però això mai és així, i en macromolècules s'acostumen a tenir uns valors de R compresos entre 0.15 i 0.25. Durant l'afinament, R és un indicador de si es va per bon camí, i s'ha de minimitzar al màxim ajustant els paràmetres que defineixen tots els àtoms de l'estructura, excepte els hidrògens. Com que els àtoms d'hidrogen tenen només un electró, la seva influència en la dispersió de raigs X és baixa i normalment es desprecien a no ser que es disposi de dades amb resolució atòmica.

Hi ha quatre paràmetres per cada àtom que s'han d'afinar: tres de posicionals (x, y i z) i el factor de temperatura isotròpic (B). Sovint la relació entre número de reflexions úniques observades i paràmetres a determinar és baixa, per això, s'intenten incorporar tantes *observacions* com sigui possible durant el procés d'afinament:

En primer lloc, es pot utilitzar la informació estereoquímica (distàncies d'enllaç i angles d'enllaç) obtinguda amb molta precisió per molècules petites. Aquesta informació estereoquímica es pot aplicar de dues maneres:

1. tractant-se rígidament i només deixant variar els angles dièdrics en el cas de geometria i afinament constrictiu (*constrained*). Així es redueixen el nombre de paràmetres però és difícil moure petites parts de l'estructura.
2. si aquests paràmetres estereoquímics es deixen variar al voltant d'un valor estàndard controlats per un terme energètic, es tracta d'un afinament restrictiu (*restrained*). Les coordenades atòmiques són les variables i les restriccions (o *restraints*) estan en els angles d'enllaç, distàncies d'enllaç,

angles de torsió i contactes de Van der Waals. Així es permet moure petites parts de la molècula però serà difícil moure tota l'estructura.

En segon lloc, la massa de dissolvent que omple els canals entre les macromolècules no està ordenada i hauria d'aparèixer com una regió plana en els mapes de densitat. Això es pot imposar en els mapes i es coneix com a aplanament del dissolvent (*solvent flattening*).

Finalment es pot fer ús de la simetria no cristal·logràfica (si existeix) imposant que parts relacionades per simetria no cristal·logràfica (NCS, *non crystallographic symmetry*) siguin iguals.

Per assegurar-se que el factor R disminueix perquè el model realment millora i no com a artefacte de l'afinament, s'utilitza el que s'anomena  $R_{\text{free}}$  (Brünger, 1992): un conjunt de reflexions, normalment entre el 5 i el 10%, no es sotmeten a cap minimització. Després de cada cicle realitzat, es calcula el factor R d'aquestes reflexions obtenint així el  $R_{\text{free}}$ .

Hi ha dos mètodes generals per tal de minimitzar el valor del factor R:

### **Afinament per mínims quadrats**

En l'afinament per mínims quadrats, s'assumeix que les observacions tenen valors fixes i es varien els paràmetres de tal manera que els valors calculats s'aproximin tant com sigui possible als observats. S'assumeix també, que les observacions tenen una distribució Gaussiana. L'afinament per mínims quadrats és un procés iteratiu, en cada cicle, els paràmetres que s'afinen canvien aproximant-se al seu valor final. Quan les variacions són molt petites vol dir que el mètode ha convergit. En cada etapa es pot calcular el factor R per comprovar que s'avança correctament.

El que es minimitza és la funció següent:

$$Q = \sum_{hkl} w(hkl) (|F_{\text{obs}}(hkl)| - |F_{\text{calc}}(hkl)|)^2 \quad [\text{eq. 7.17}]$$

a on  $w$  és el pes que es dona a una observació.



El mínim valor de  $Q$  es troba variant els paràmetres atòmics  $u_j$  ( $j = 1 \dots n$ ) que determinen  $|F_{\text{calc}}(\text{hkl})|$ . Així es fan els diferencials de  $Q$  respecte tots els  $u_j$  igual a 0:

$$\frac{\partial Q}{\partial u_j} = 0 \quad [\text{eq. 7.18}]$$

### Afinament per la màxima probabilitat (*maximum likelihood refinement*)

El principi del mètode de la màxima probabilitat assumeix que la qualitat d'un model ve donada per la seva consistència amb les dades observades. Un model és consistent quan si aquest model és correcte hi ha una probabilitat alta de trobar una observació en aquest valor. Utilitzant les observacions rellevants com un conjunt, la probabilitat de determinar tot el conjunt d'observacions és una mesura molt bona de la qualitat del model. Si s'assumeix que les observacions són independents, la probabilitat conjunta és el producte de les probabilitats de cada observació independent. Aquesta probabilitat conjunta és la *funció de probabilitat*  $L$ :

$$L = \prod_{\text{hkl}} P(|F_{\text{obs}}|; |F_{\text{calc}}|) \quad [\text{eq. 7.19}]$$

Com que és més convenient treballar amb sumatoris que amb productes, normalment es treballa amb el logaritme de la funció de probabilitat. A més, el problema de maximització es pot canviar a minimització multiplicant per  $-1$ . Així es defineix:

$$l = -\log(L) \quad [\text{eq. 7.20}]$$

Per afinament cristal·logràfic no és del tot cert que les observacions de difracció siguin independents, però s'ha demostrat que s'obtenen bons resultats fent aquesta suposició (Pannu i Read, 1996).

Per aplicar el mètode de màxima probabilitat es parteix de la probabilitat de fer una mesura, donat un model, dels seus errors i de la mesura d'aquests.

El mètode dels mínims quadrats assumeix una distribució Gaussiana dels observables però s'ha demostrat que no sempre és cert. La màxima probabilitat sembla una alternativa millor per optimitzar la concordància entre el que s'observa i el que es calcula. El mètode de màxima probabilitat no assumeix una distribució Gaussiana sinó que fa una estimació de la distribució condicional de les dades experimentals quan es coneix el model.

**Altres opcions d'afinament:**

Dins dels programes d'afinament, hi ha també funcions específiques que permeten fer un afinament més dirigit:

Afinament per cos rígid: s'assigna una geometria rígida a algunes parts de la molècula o a la molècula sencera i s'afinen els paràmetres d'aquestes parts rígides en comptes dels paràmetres de cada àtom individual. És habitual tractar tota la molècula com a cos rígid al principi de l'afinament afinant així la seva posició i orientació a la cel·la unitat. Amb aquesta opció es redueix considerablement la relació entre el número de reflexions i paràmetres a determinar i és molt útil quan la resolució de les dades és baixa.

Afinament del terme energètic (EREF): amb aquesta opció el terme corresponent als raigs X es minimitza juntament amb una funció d'energia potencial incloent termes com les interaccions de Van der Waals, potencials de torsió, etc.

Afinament del factor de temperatura: es té present el moviment tèrmic dels àtoms. Es pot afinar un factor de temperatura isotròpic o anisotròpic.

Simulated Annealing: si la distància entre els àtoms del model i de l'estructura real és massa llarga, l'afinament utilitzant els mètodes descrits anteriorment pot ser que no convergeixi o que quedi atrapat en un mínim local, no l'absolut. Per intentar superar això es pot utilitzar la dinàmica molecular (Brünger *et al.*, 1987). La idea del *Simulated Annealing* és simular a l'estructura un increment de la temperatura suficientment gran perquè els àtoms superin les barreres energètiques i després refredar lentament per assolir el mínim energètic.

Per afinar les estructures s'ha utilitzat bàsicament el programa REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) utilitzant l'opció d'afinament per màxima probabilitat. En alguns casos però, s'ha emprat també el programa CNS (Brünger *et al.*, 1998).

### Mapes de densitat electrònica

Sigui quin sigui el mètode que s'utilitzi per afinar, es calculen sempre els mapes de densitat electrònica per saber què és el que s'ha de fer per tal de millorar el model. Els mapes de densitat electrònica són periòdics d'una cel·la unitat a una altra, per tant, es poden representar com la Transformada de Fourier descrita anteriorment a l'equació 7.7 i que es recorda a continuació :

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

a on  $|F(hkl)|$  es pot modificar per donar lloc a diferents tipus de mapes. En cristal·lografia de macromolècules s'utilitzen normalment dos tipus de mapes:

$$2F_o - F_c$$

$$\text{a on } |F(hkl)| = 2|F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|$$

Aquest tipus de mapes permeten veure tot el perfil de l'estructura que s'està determinant comparant el que s'observa amb el calculat. Si els dos són semblants, és a dir, es té un model bo de l'estructura, el perfil dels mapes coincidirà amb les coordenades del model i viceversa, si el model conté molt error, es veuran uns mapes de densitat discontinus i que no concorden amb les coordenades.

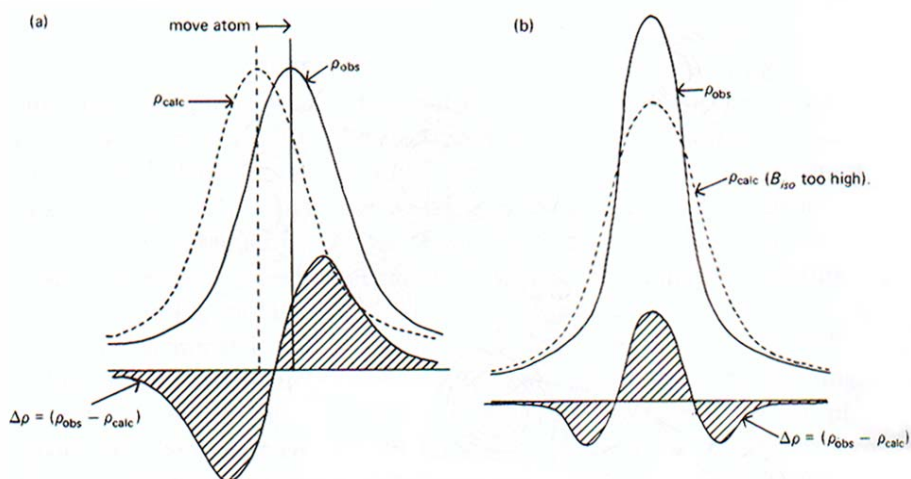
$$F_o - F_c$$

$$\text{a on } |F(hkl)| = |F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|$$

A part del mapa  $2F_o - F_c$ , és molt útil calcular el mapa de diferències  $F_o - F_c$  per tal de trobar el que falta o el que sobra en el model, és a dir, es troben les diferències entre l'observat i el calculat. En el mapa no es veuen els àtoms que ja es coneixen, que ja es tenen determinats, per tant, si es veuen pics de densitat positiva indicarà que en aquella zona s'hi ha d'afegir més electrons (més àtoms) i si es troben pics de densitat negativa voldrà dir que sobren electrons en aquella zona. També

permeten detectar desordre en els àtoms, així com errors en la seva posició, ocupància o factor de temperatura. Per exemple, si un àtom està en una posició incorrecta però propera a la real, apareixerà un pic de densitat negativa a la posició incorrecta (indicant excés d'electrons) i un pic de densitat positiva a la posició correcta (indicant falta d'electrons). Es tracta doncs de moure els àtoms cap on indiqui el mapa i tornar a sotmetre el model a més cicles d'afinament (Fig. II-7.8). Amb aquesta idea es van completant i netejant els mapes obtinguts fins a obtenir-ne un de satisfactori.

Una variant d'aquests mapes que pot ser útil són els anomenats **omit map**. Es tracta d'eliminar part de l'estructura que sigui dubtosa i calcular el mapa de diferències. Això permetrà veure si realment apareix densitat positiva en aquella zona indicant la part de l'estructura que hi falta.



**Fig. II-7.8.** Afinement utilitzant mapes de diferències. (a) Error en la posició d'un àtom. (b) Error en el factor de temperatura d'un àtom (Glusker, 1985).

Els mateixos programes d'afinament permeten calcular els mapes de densitat i la visualització gràfica d'aquests s'ha realitzat amb els següents programes: TURBO-FRODO (Roussel *et al.*, 1998), QUANTA (Accelrys Inc. ) i XtalView (McRee, 1999).

## **7.6 VALIDACIÓ DE L'ESTRUCTURA FINAL**

A part del factor R com a indicador que la solució és correcta, hi ha altres criteris més químics i físics que cal tenir presents abans de donar per bona i acabada una estructura. Aquest procés s'anomena validació de l'estructura (Eisenberg *et al.*, 1997) i té presents paràmetres com distàncies d'enllaç, angles, etc.

En el cas del DNA hi ha diferents programes que serveixen per validar l'estructura com per exemple el 3DNA (Lu *et al.*, 2003), que és el que s'ha utilitzat per totes les estructures que es descriuran. El programa calcula els paràmetres helicoidals i conformacionals de l'estructura permetent jutjar si aquests són coherents i per tant, si l'estructura és correcta.

## 7.7 RESUM DELS PROGRAMES UTILITZATS

Durant les etapes necessàries per obtenir una estructura a partir d'un cristall, s'han emprat diferents programes que ja s'han anat citant anteriorment i que es recullen a continuació:

Etapa	Programa	Referència
Recollida de dades	Strategy	Ravelli <i>et al.</i> , 1997
Processat	DENZO	Otwinoski i Minor, 1997
Escalat	SCALEPACK	Otwinoski i Minor, 1997
Obtenció de $ F(hkl) $	Truncate	French i Wilson, 1978
Reemplaç molecular	EPMR	Kissinger <i>et al.</i> , 1999
	MolRep	Vagin i Teplyakov, 1997
	AMoRe	Navaza i Saludjian, 1997
MAD	Shelxd	Sheldrick <i>et al.</i> , 2001
	Shelxe	Sheldrick, 2002
Afinat	REFMAC5	Murshudov <i>et al.</i> , 1997
	CNS	Brünger <i>et al.</i> , 1998
Visualització mapes	TURBO-FRODO	Roussel <i>et al.</i> , 1998
	XtalView	McRee, 1999
	QUANTA	Accelrys Inc.
Validació estructures	3DNA	Lu <i>et al.</i> , 2003
Realització figures	SETOR	Evans, 1993
	Cerius 2	Molecular Simulations, Inc.