

Has dut mai unes ulleres atòmiques?
2014, Any Internacional de la Cristal·lografia

Xavi Carpena
UCE_2014
Prades



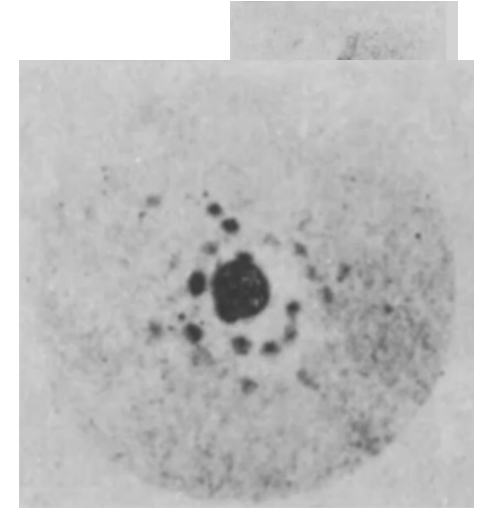
Max
von Laue



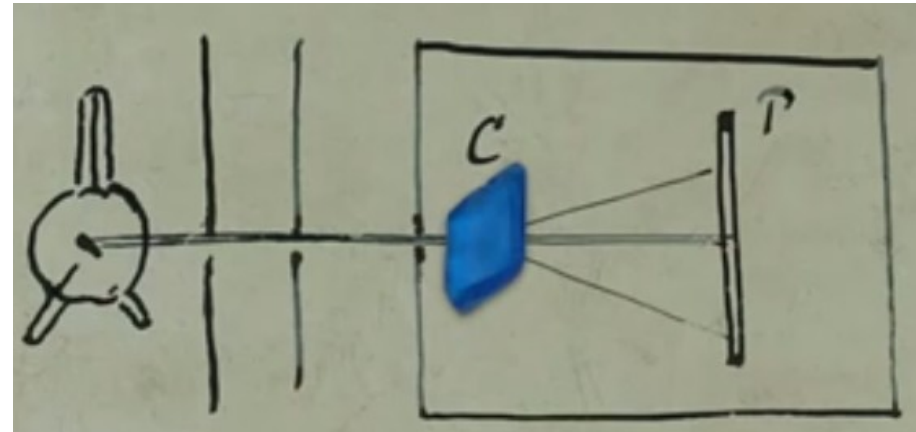
Walter
Friedrich



Paul
Knipping



- Coneguts des de l'antiguitat.
- Ja es suposava que tindria interiorment una estructura repetitiva.
- Von Laue va creure que: $\lambda_{R-X} \approx d_{CuSO_4}$





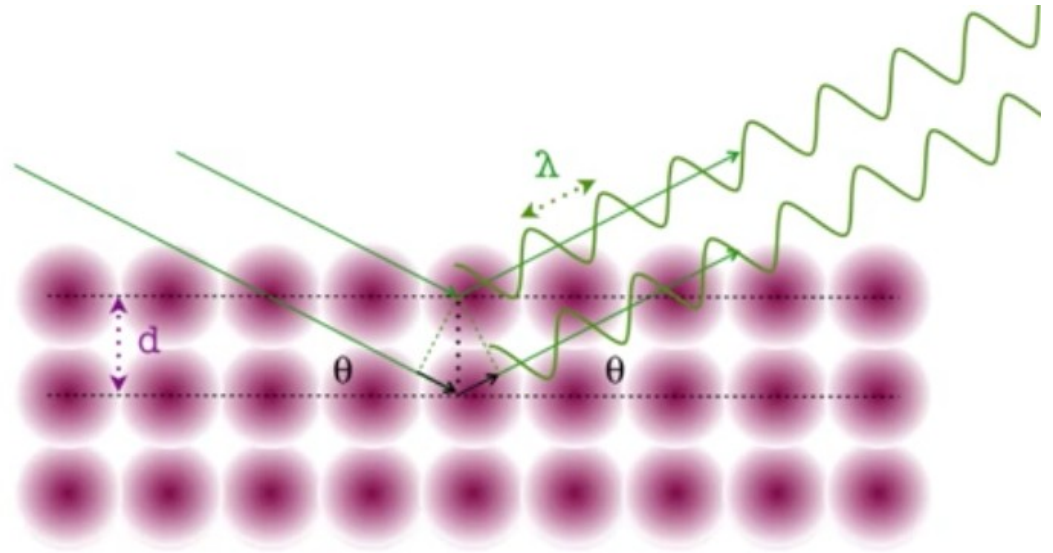
William Henry
Bragg



William Lawrence
Bragg

-Laue proporcionà gentilmente una foto a W.H. Bragg.

-Fou W.L. Bragg qui va resoldre el problema de la interpretació.

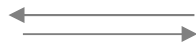


-Diferència de recorregut: $2d \sin \theta$ → →

-Difracció **intensa** quan: $2d \sin \theta = n\lambda$

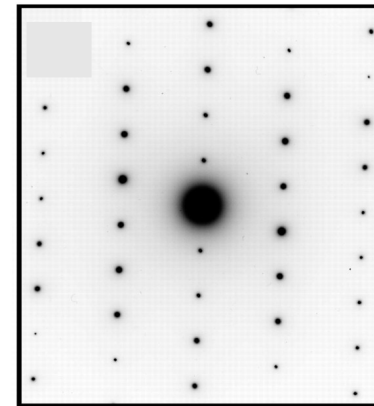
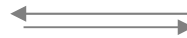
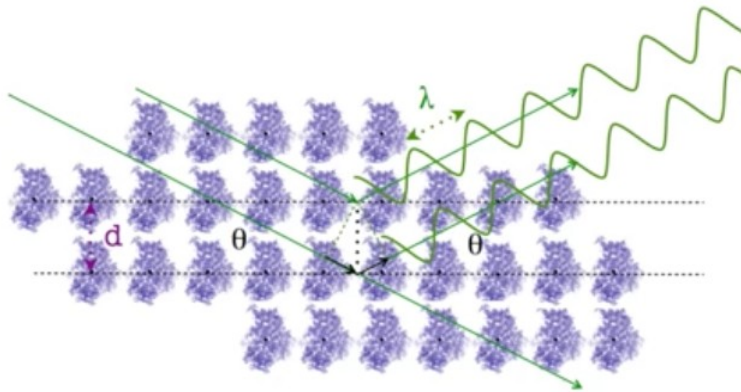
-Aquesta equació matemàtica, es correspon amb la que va desenvolupar Joseph Fourier el s. XVIII i s'anomena **Transformada de Fourier**.

$$f(S) = \iiint \rho(r) e^{i2\pi r \cdot S} dx dy dz$$

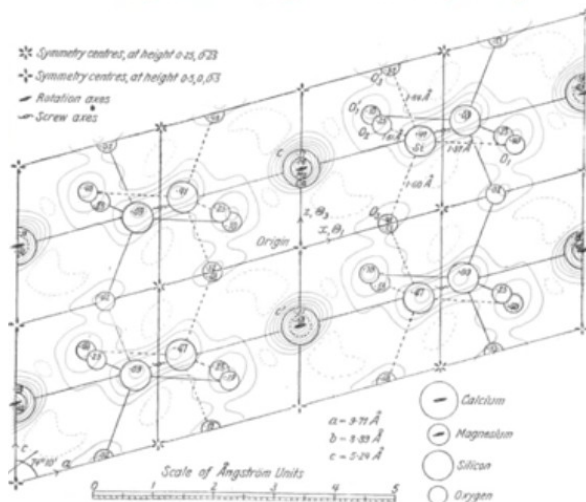


$$\rho(r) = \iiint f(S) e^{-i2\pi r \cdot S} dS$$

Transformada de Fourier Inversa

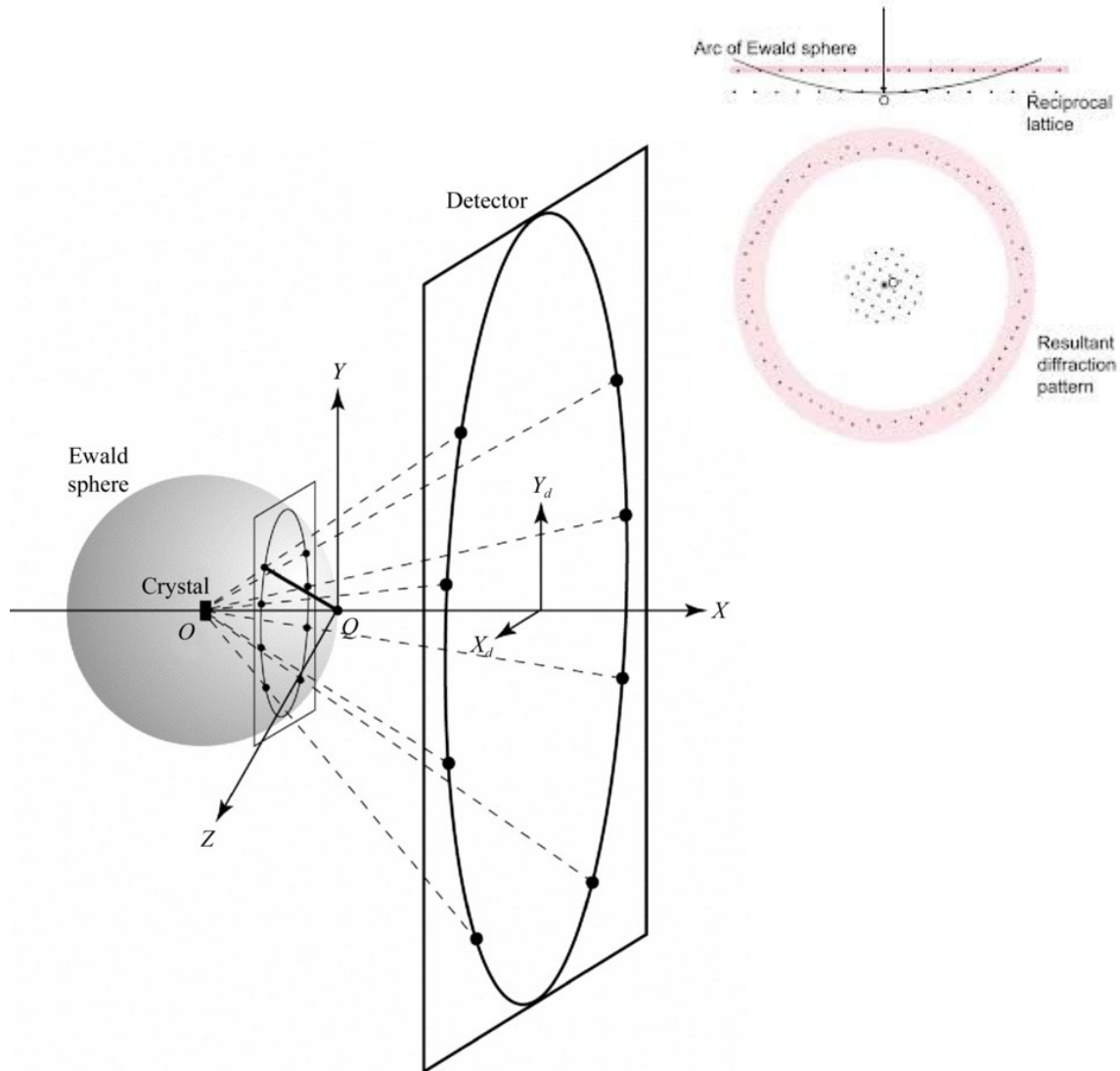


Jean-B. Joseph Fourier



Diopside,
W.L. Bragg, 1929

-L'esfera d'Ewald és una representació geomètrica de la Llei de Bragg i ens diu quines reflexions es produiran



Peter
Ewald



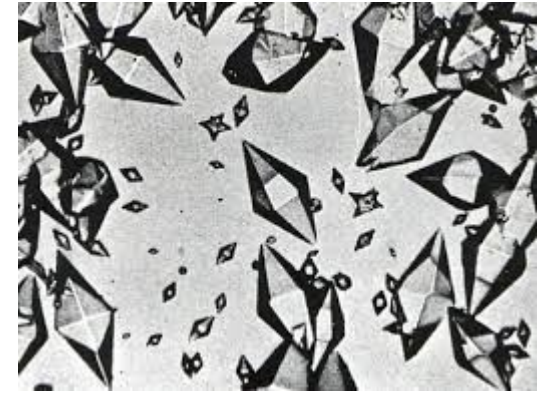
William Astbury &
Florence Bell



John Desmond
Bernal



Dorothy
Crowfoot H.



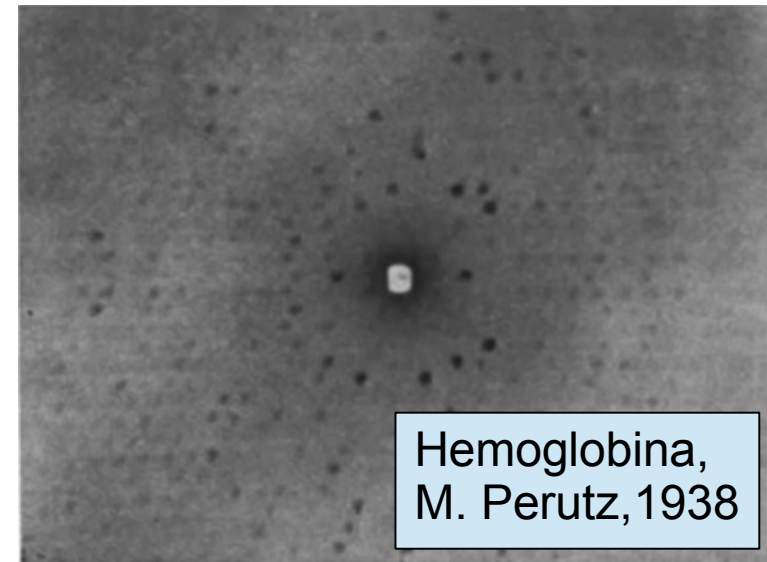
Cristalls de
pepsina, Uppsala



1^{era} difracció d'un cristall
de proteïna, 1934



1^{era} difracció de l'ADN
~ 1938



Hemoglobina,
M. Perutz, 1938



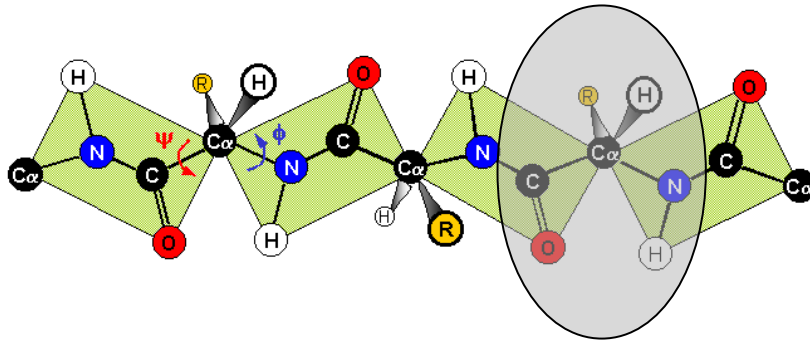
Premis Nobel 1962:

- Estructura de l'ADN

- Estructura de les primeres proteïnes

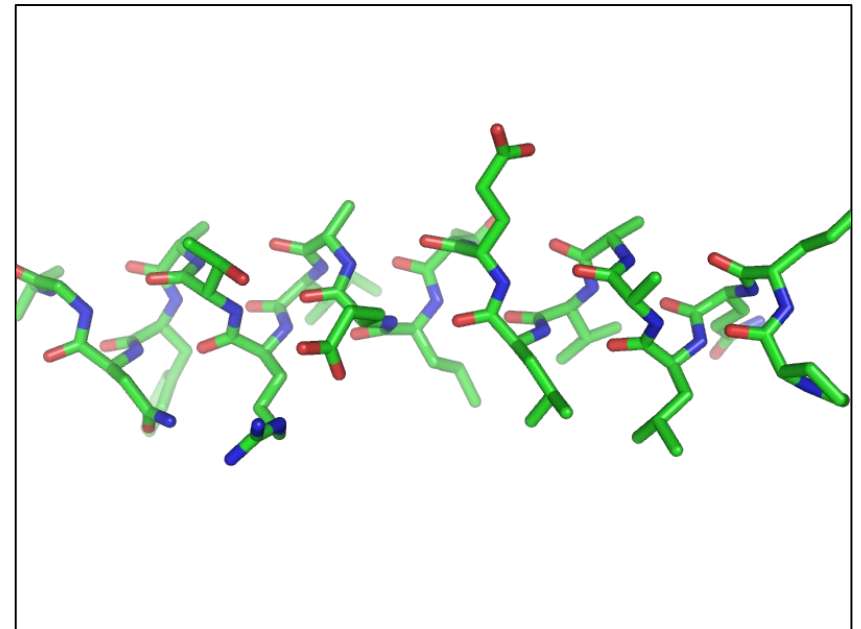
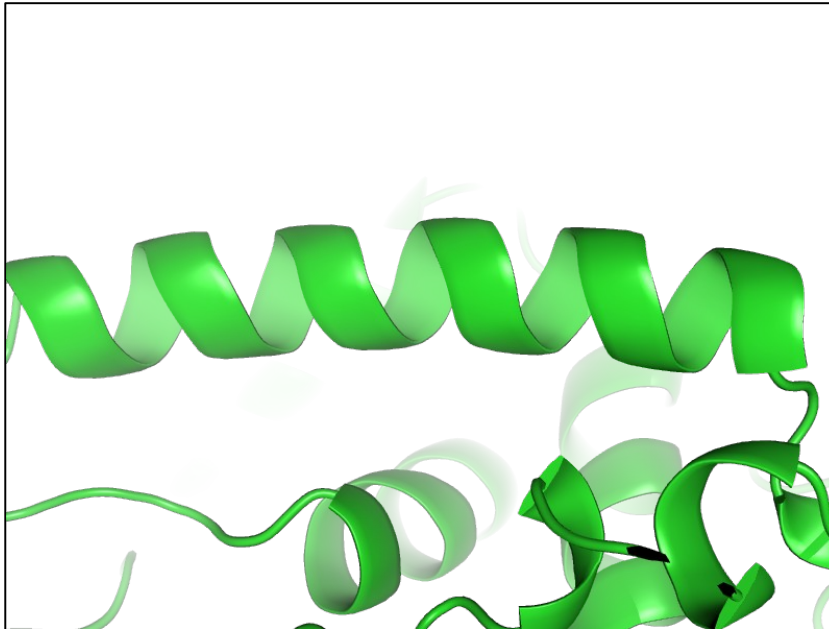
The Cavendish Laboratory, Cambridge
(dir.: W. Lawrence Bragg)

1aria



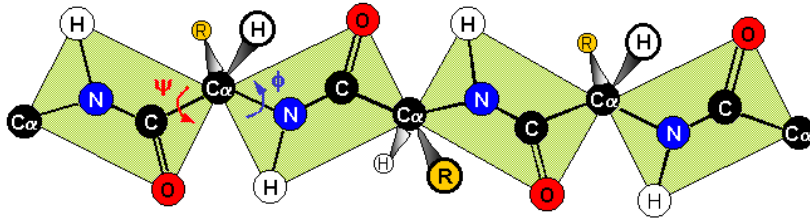
Una proteïna és un polímer d'aminoàcids o una “cadena d'aminoàcids”

2aria



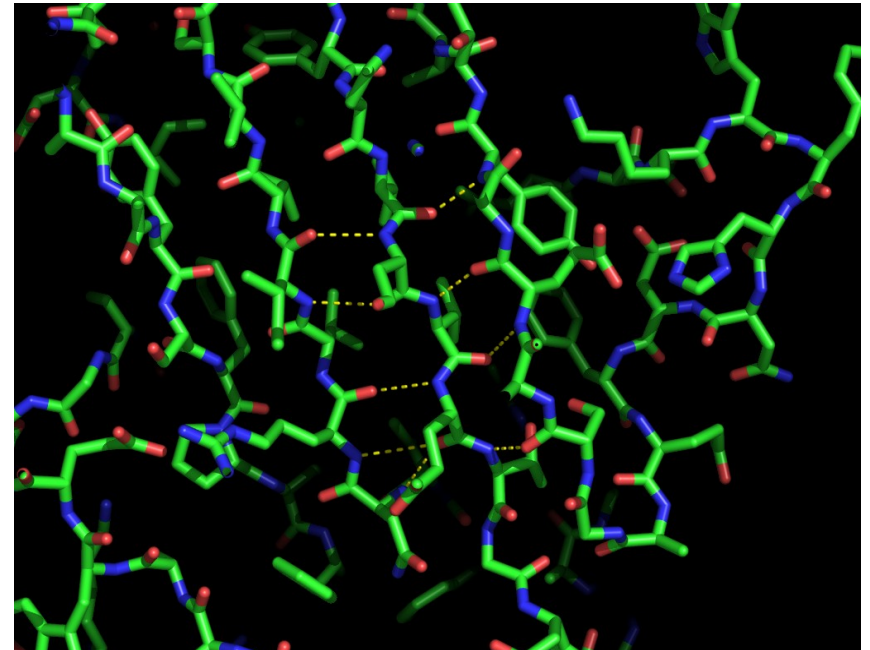
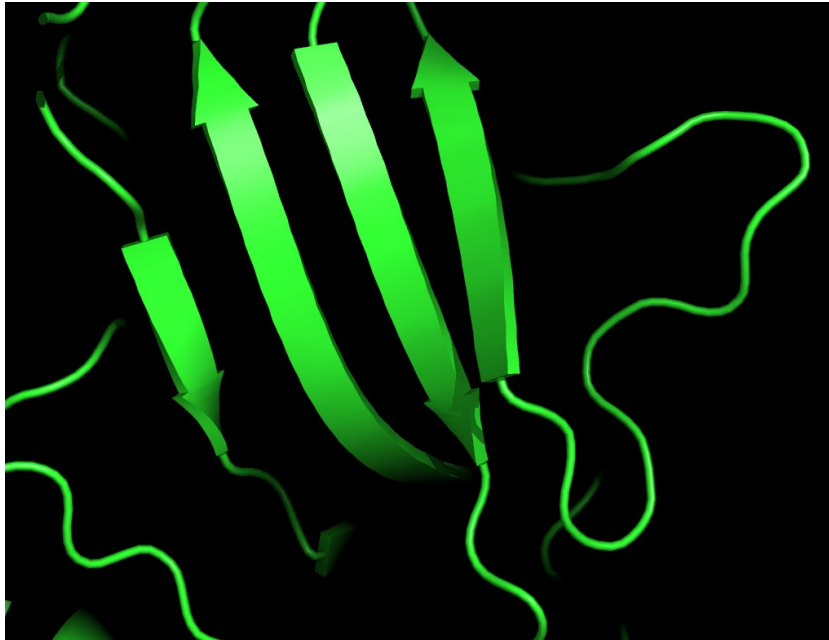
Pot adoptar dues estructures bàsiques:
plegament Helix Alfa

1ària



Una proteïna és un polímer d'aminoàcids o una “cadena d'aminoàcids”

2ària



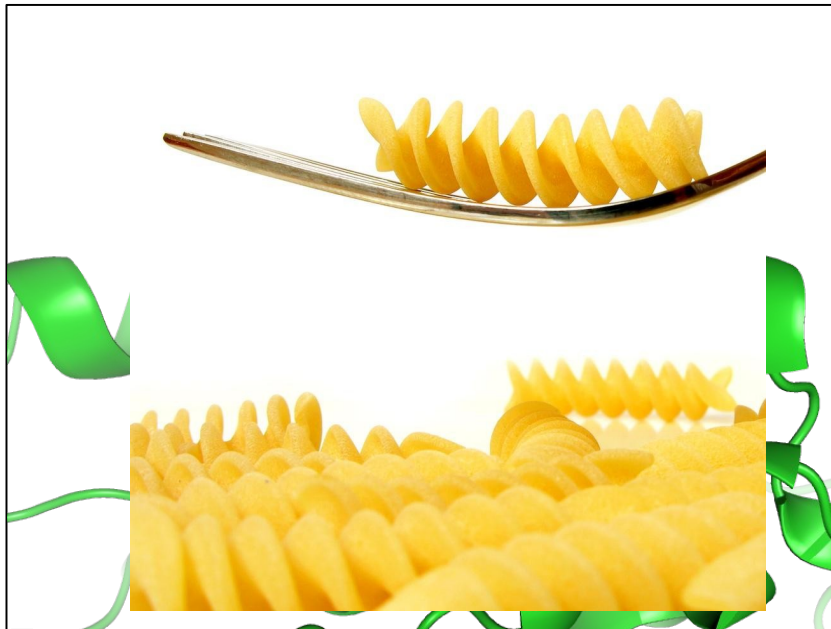
Pot adoptar dues estructures bàsiques:
plegament Full Beta

1ªria



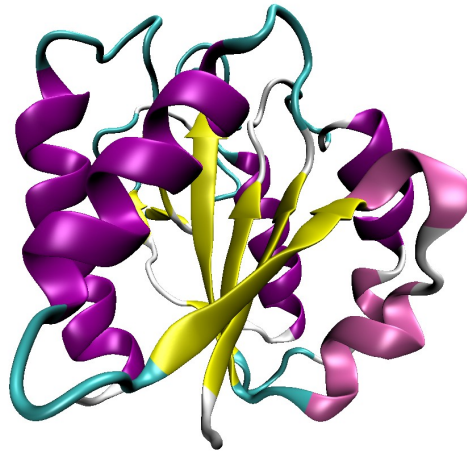
Una proteïna és un polímer d'aminoàcids o una “cadena d'aminoàcids”

2ªria

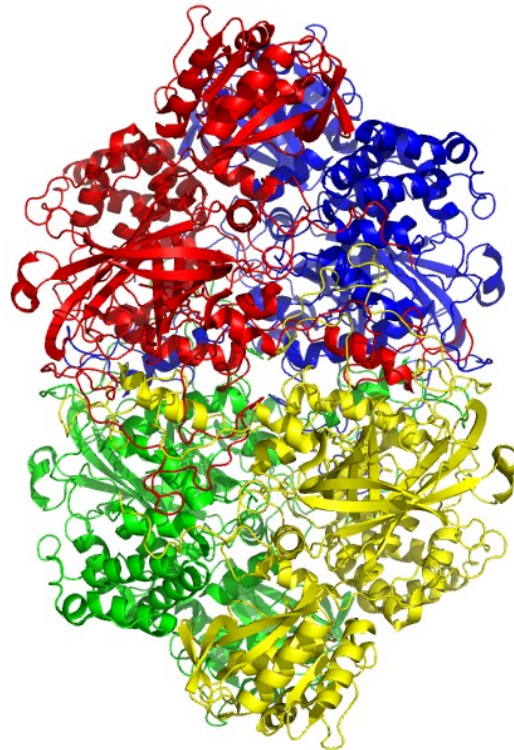


Pot adoptar dues estructures bàsiques:
plegament Helix Alfa / Full Beta

3aria



4aria



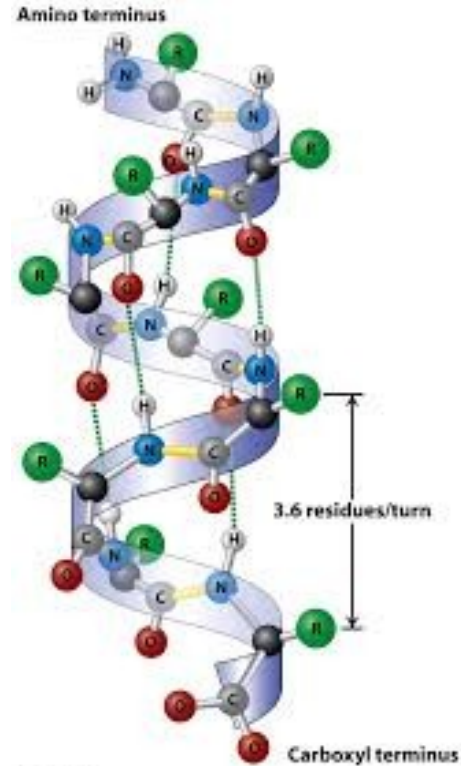
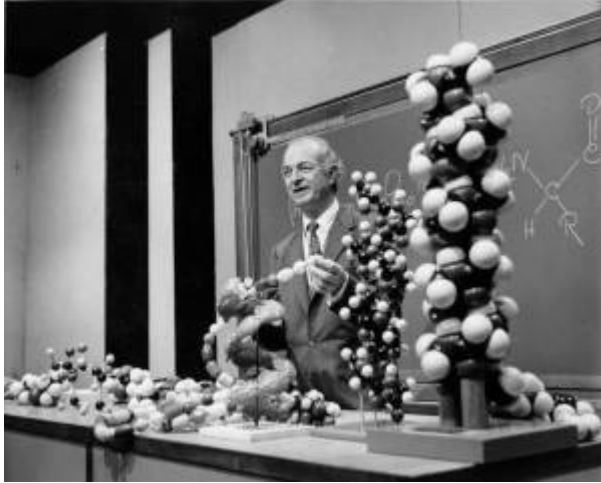
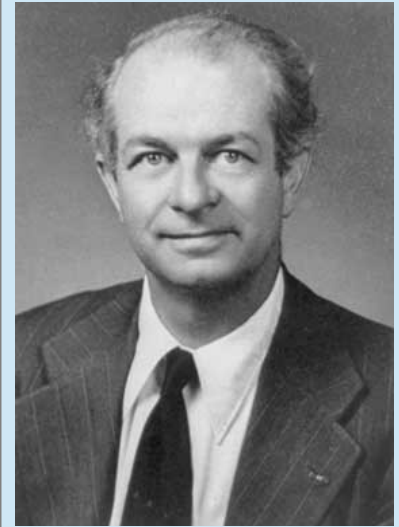


Figure 3-4
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2006 W. H. Freeman and Company



Linus C.
Pauling



L. Pauling va corregir la distància entre voltes ($5.4 \text{ \AA}$) i va trencar la idea d'un nombre sencer d'aminoàcids per volta (3.6). Cada aminoàcid gira 100°



TANT DE BO...

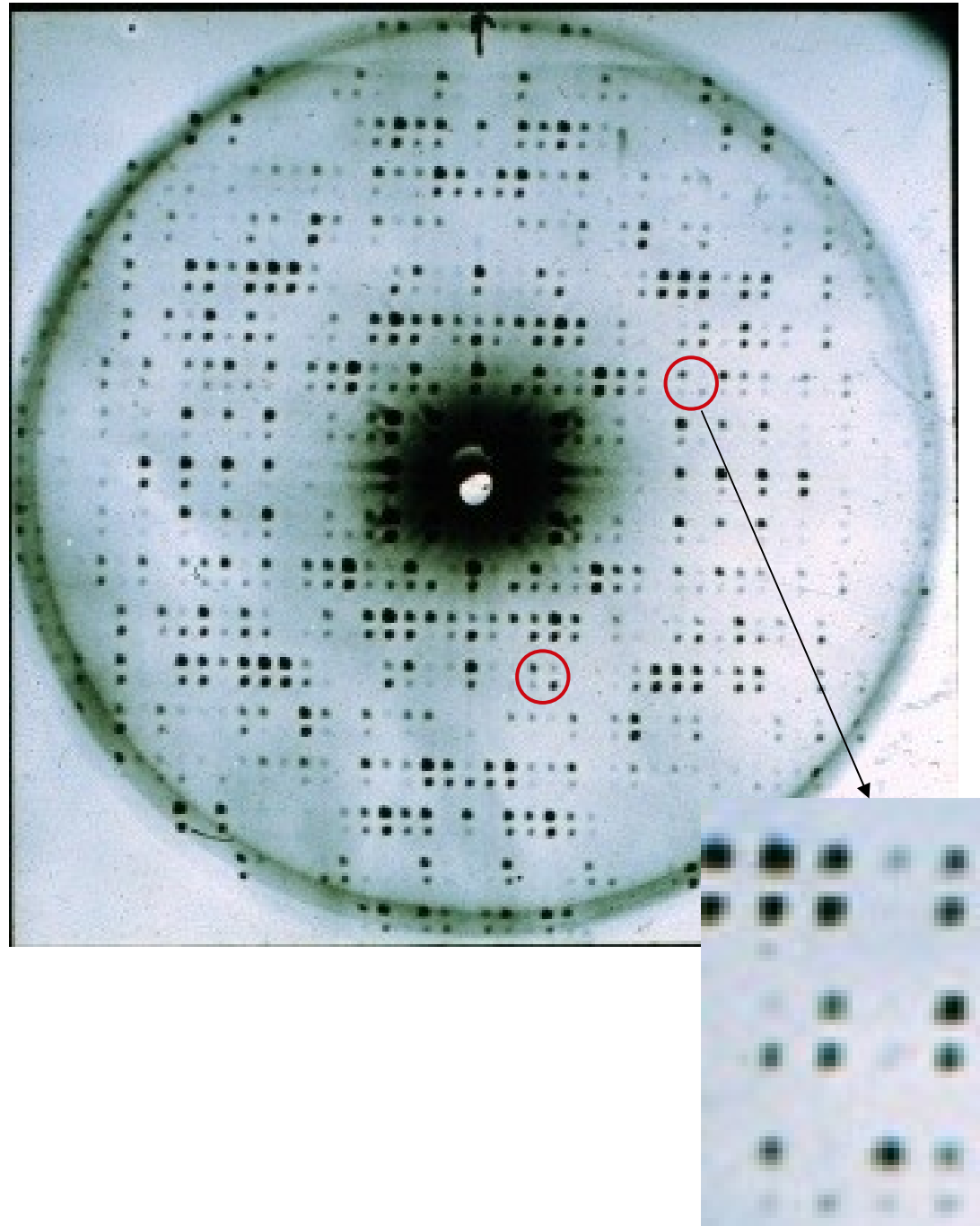
Quan vaig veure l'hèlix alfa i vaig veure com n'era d'elegant i bonica.. em vaig quedar glaçat i em vaig enfadar amb mi mateix per no haver-la construït jo mateix.. per una altra banda em preguntava, és realment correcte?

Així que vaig tornar a casa meva per dinar, tan amoinat amb tot això al cap, que no vaig respondre a res. Aleshores vaig tenir una idea, així que vaig tornar al laboratori. Em va venir al cap que tenia un cabell de cavall al calaix. Vaig encendre la càmera de R-X i el vaig exposar durant dues hores. A la cambra fosca, vaig revelar la pel·lícula i allí estava.. una reflexió a 1.5 Å que corroborava que l'única estructura possible era la de l'hèlix alfa. Així que el dilluns vaig entrar com un raig a l'oficina de Bragg i li ho vaig ensenyar.

Bragg: "Què t'ha dut a fer aquest experiment?"

Perutz: "Doncs la rabia de no haver sabut trobar jo mateix aquesta bonica estructura!"

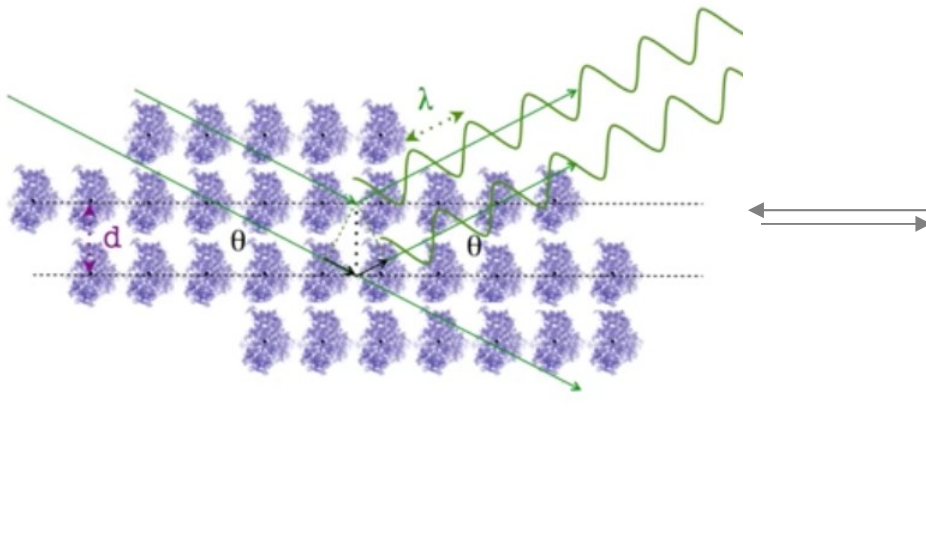
Bragg: "Tant de bo t'haguès fet enfadar abans.."



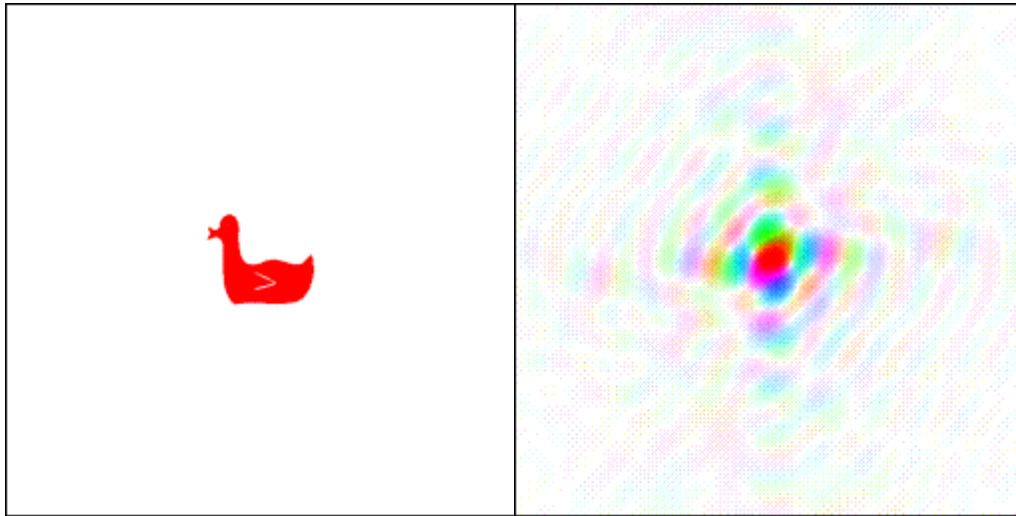
-Aquesta equació matemàtica, es correspon amb la que va desenvolupar Joseph Fourier el s. XVIII i s'anomena **Transformada de Fourier**.

$$f(S) = \iiint \rho(r) e^{i2\pi r \cdot S} dx dy dz \quad \longleftrightarrow \quad \rho(r) = \iiint f(S) e^{-i2\pi r \cdot S} dS$$

Transformada de Fourier Inversa

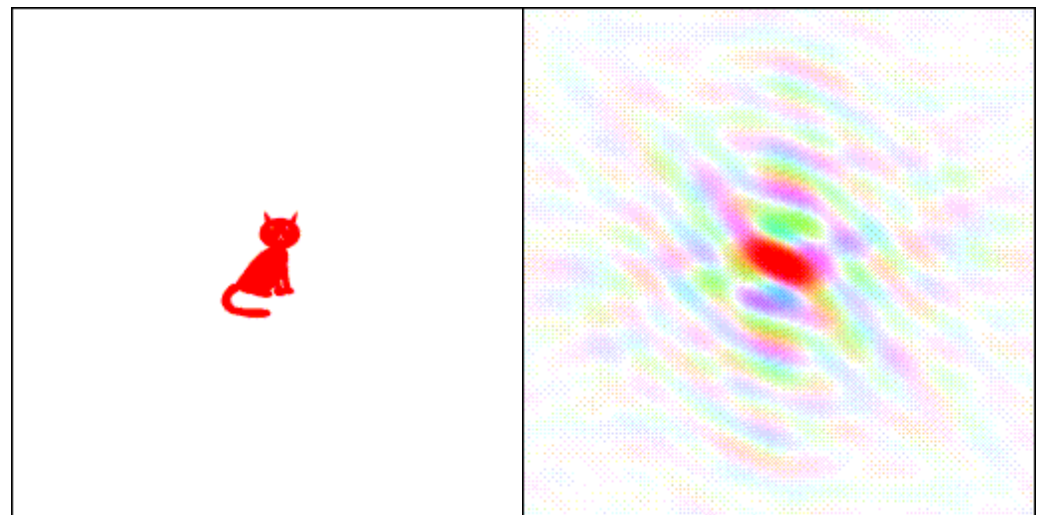


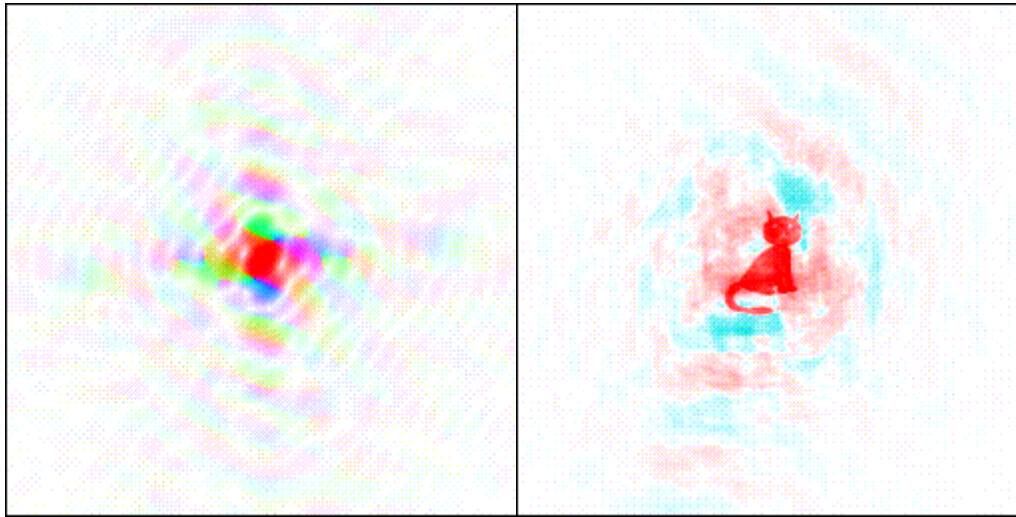
Jean-B. Joseph
Fourier



L'ANEGUET

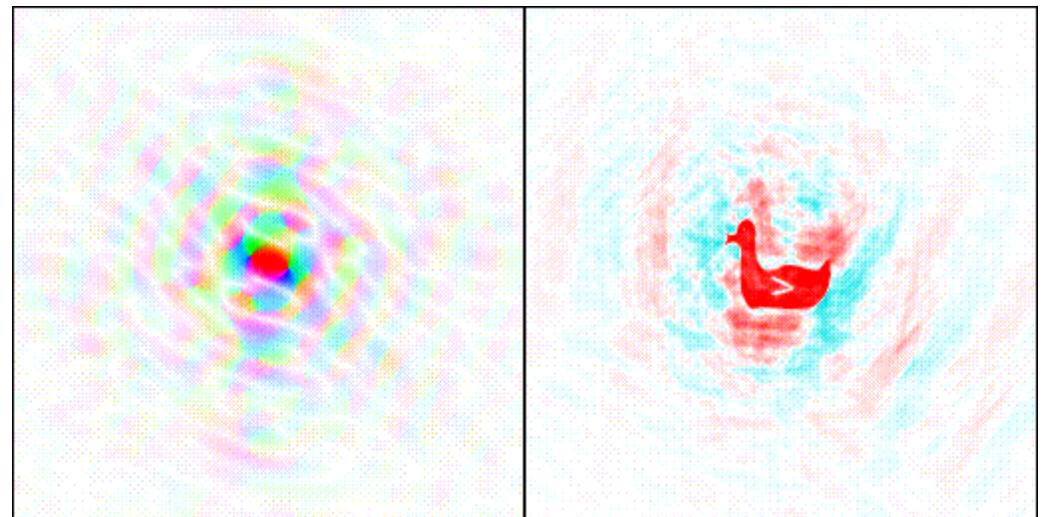
EL GAT

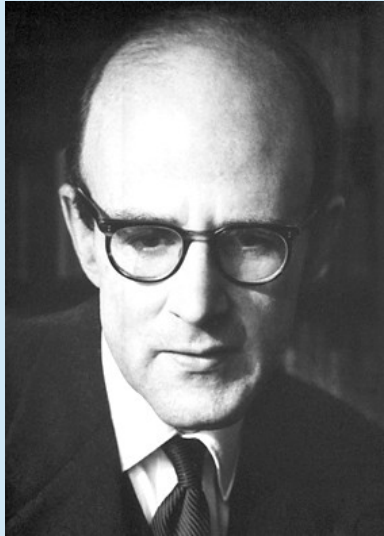




F_i: L'ANEGUET
Φ_i: EL GAT

F_i: EL GAT
Φ_i: L'ANEGUET





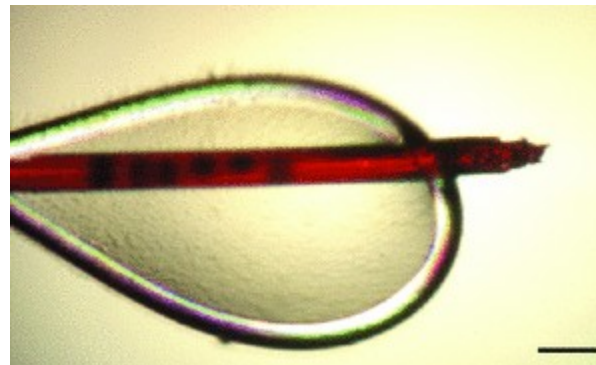
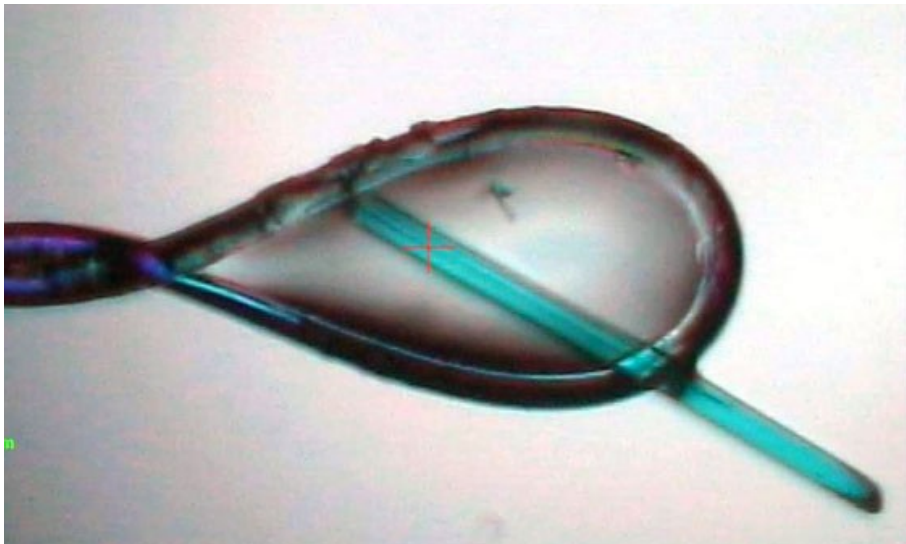
Max
Perutz

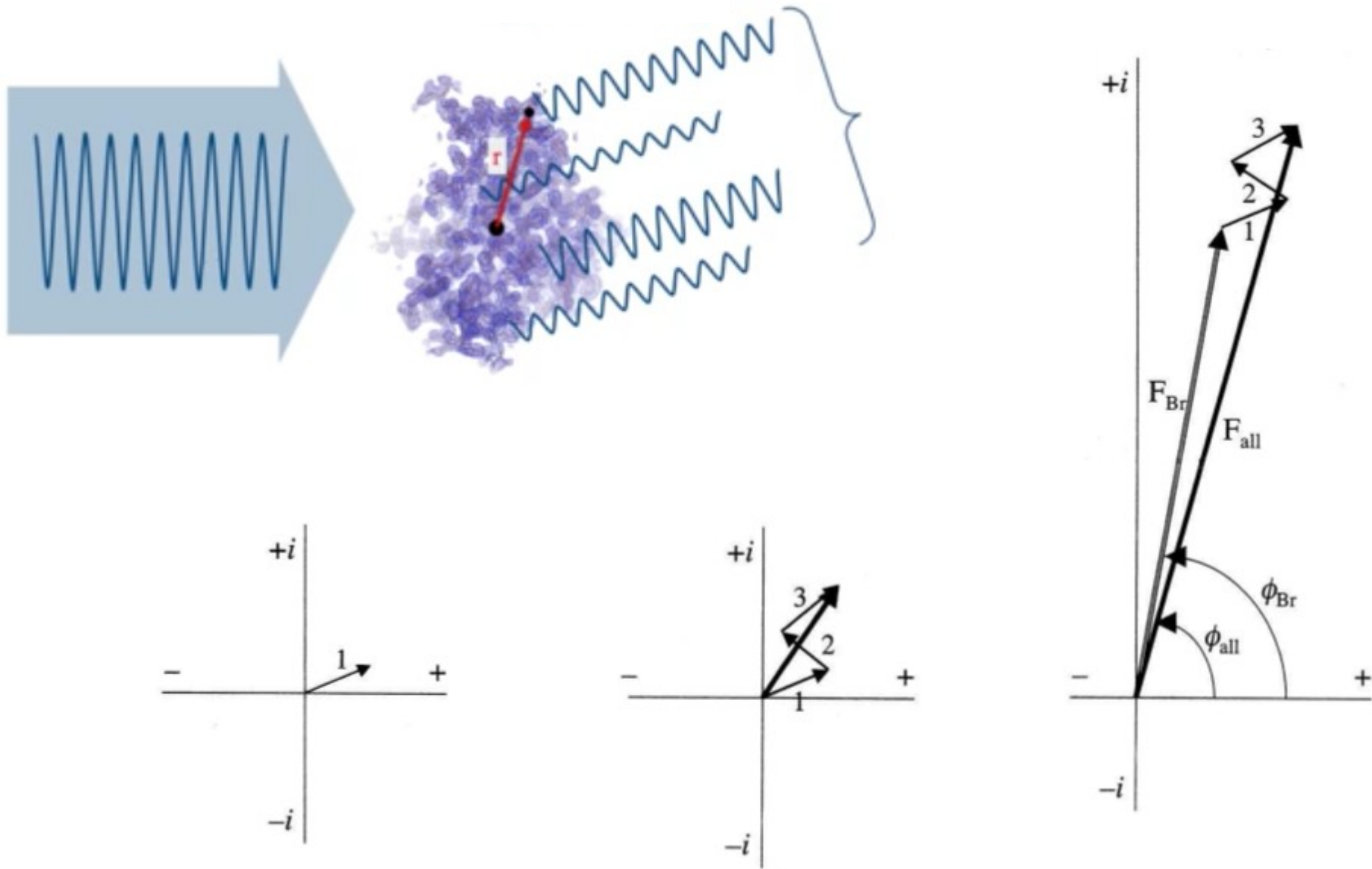
"As I developed my first X-ray photograph of mercury hemoglobin my mood altered between sanguine hopes of immediate success and desperate forebodings of all possible causes of failure.

I was jubilant when the diffraction spots appeared in exactly the same positions as in the mercury-free protein, but with slightly altered intensity, exactly as I had hoped".

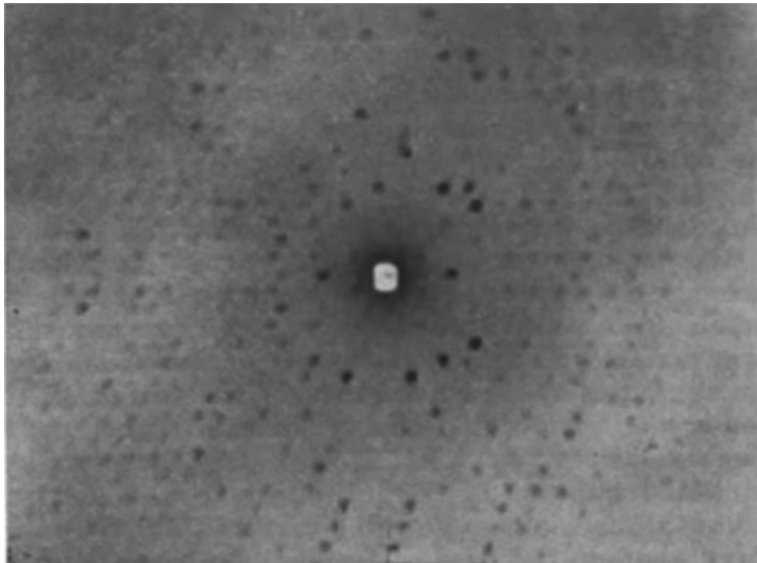
Soaking amb metalls. ja era conegut per a compostos petits

En un grup de Harvard s'havia comprovat que l'activitat de l'Hemoglobina no canviava amb mercuri.

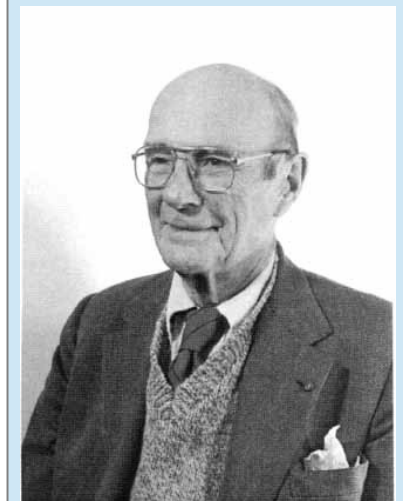
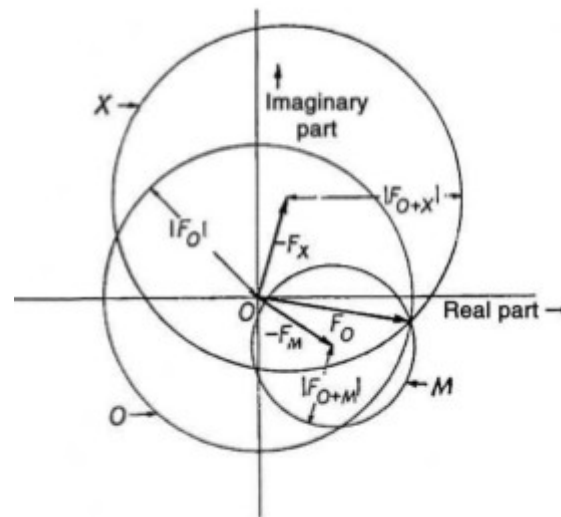
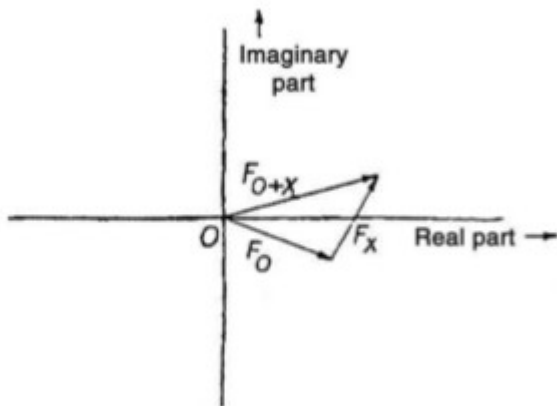




La fase d'un compost de pocs electrons amb un metall s'apropa a la del metall sol
(Mètode d'obtenció de fases clàssic)



Hemoglobina $\rightarrow 34.000 \text{ \AA}$
 Hg $\rightarrow 80 \text{ \AA}$



David
Harker

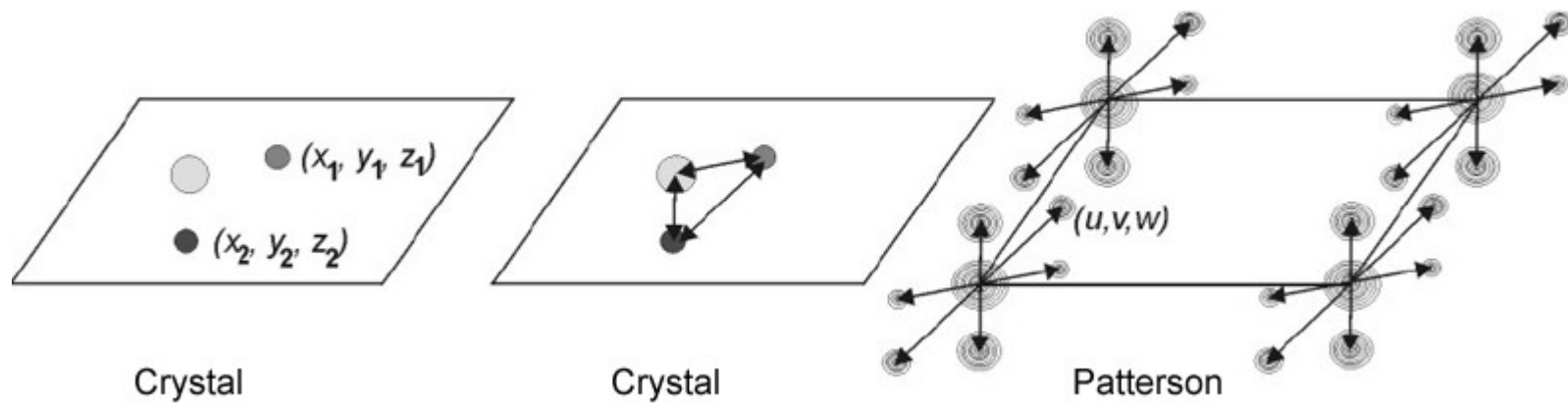
D. Harker aportà la metodologia per l'anàlisi de la fase per Reemplaçament Isomorf (MIR)



Arthur Lindo
Patterson

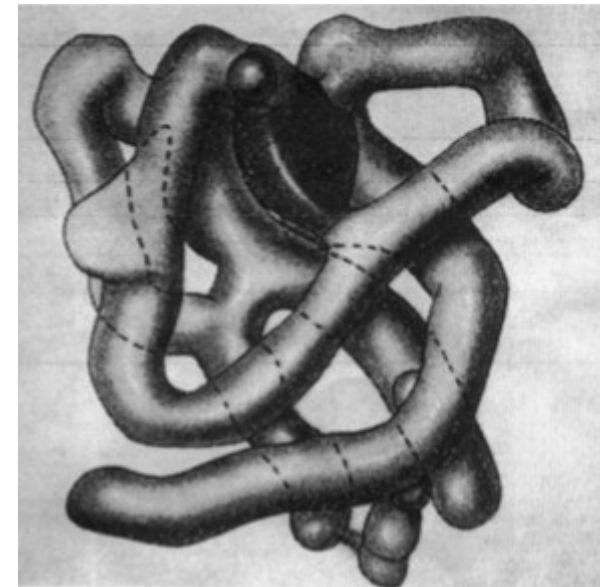
Durant una estada (1933-1946) al laboratori de Bertram E. Warren (MIT), va publicar la seva famosa funció.

$$P(u, v, w) = \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu + kv + lw)}.$$

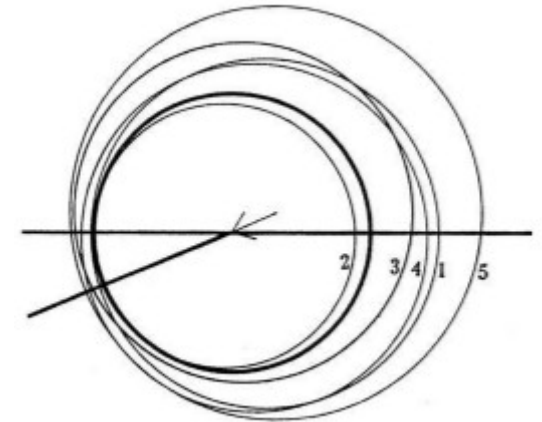
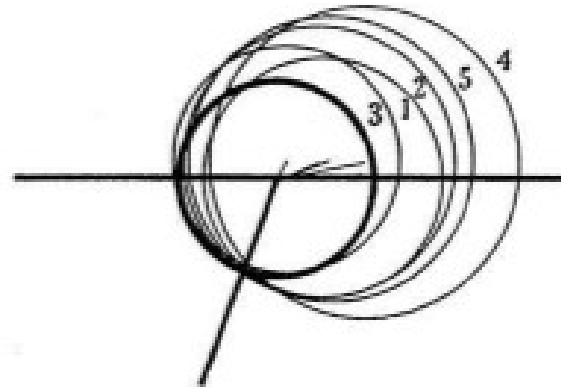
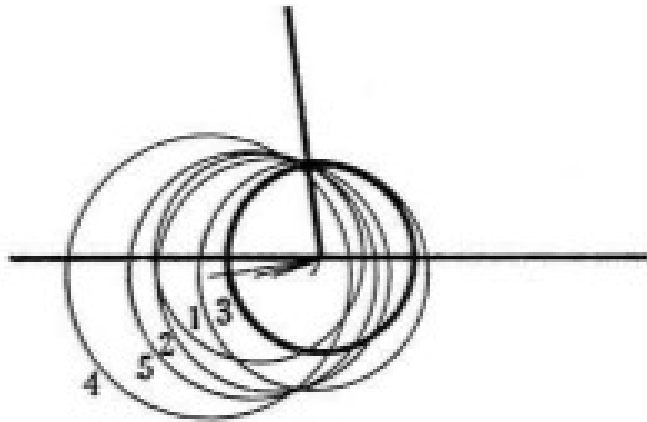




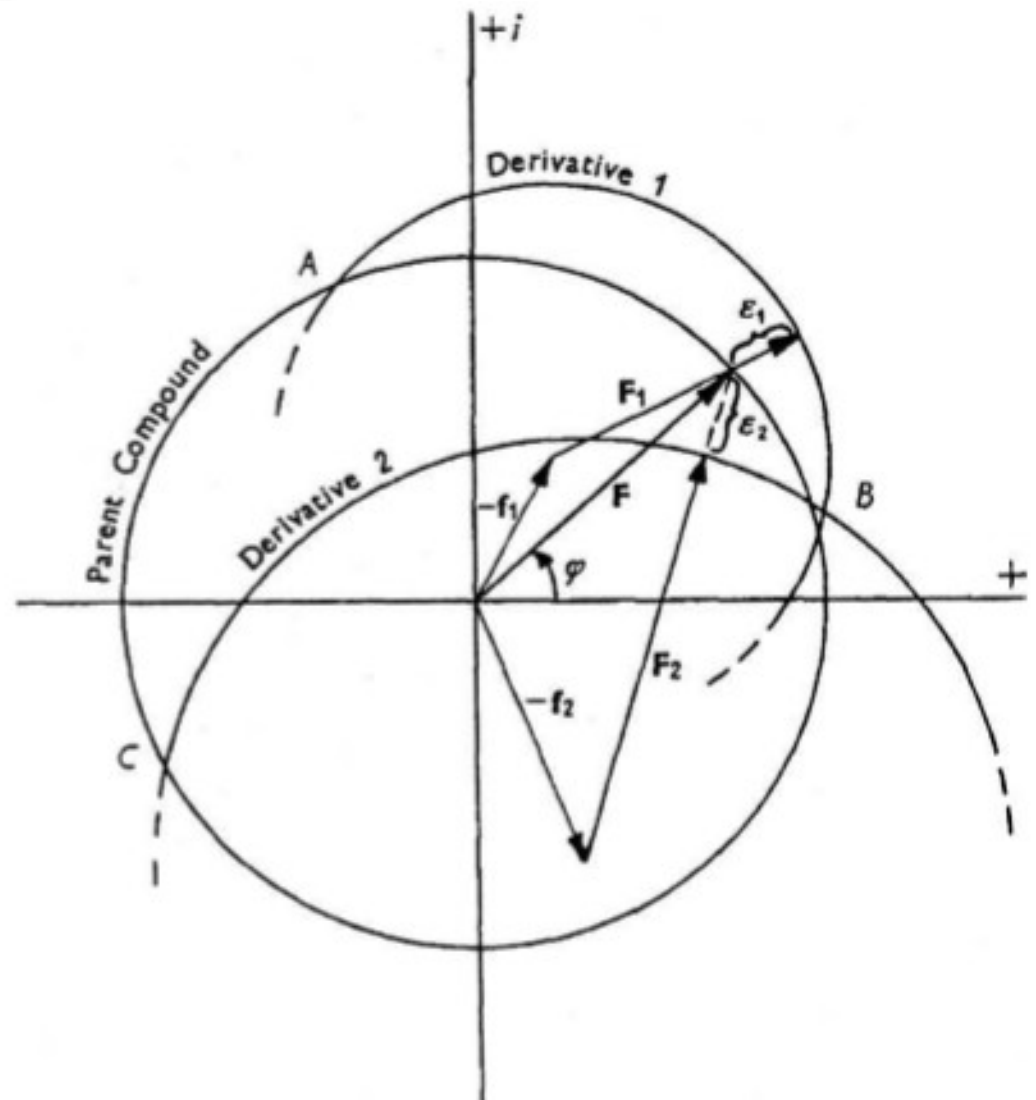
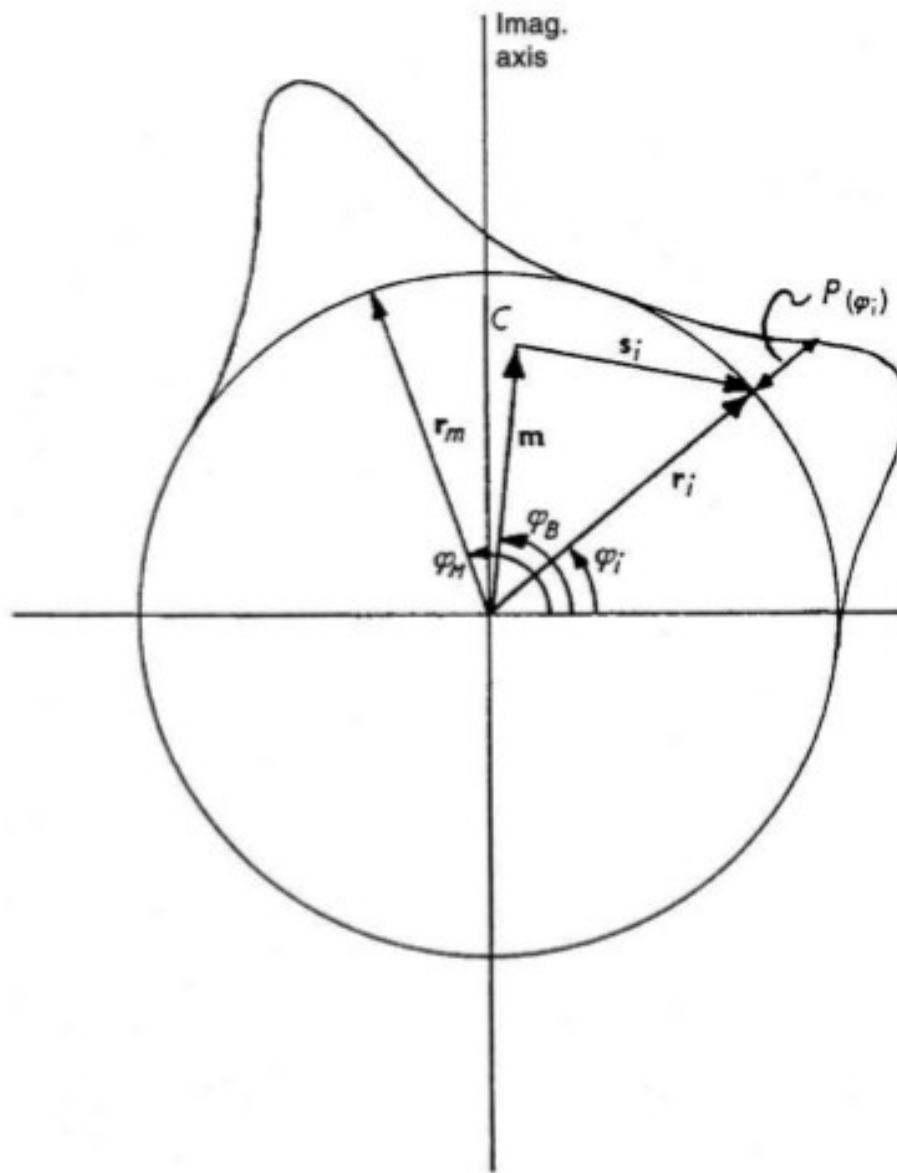
John
Kendrew



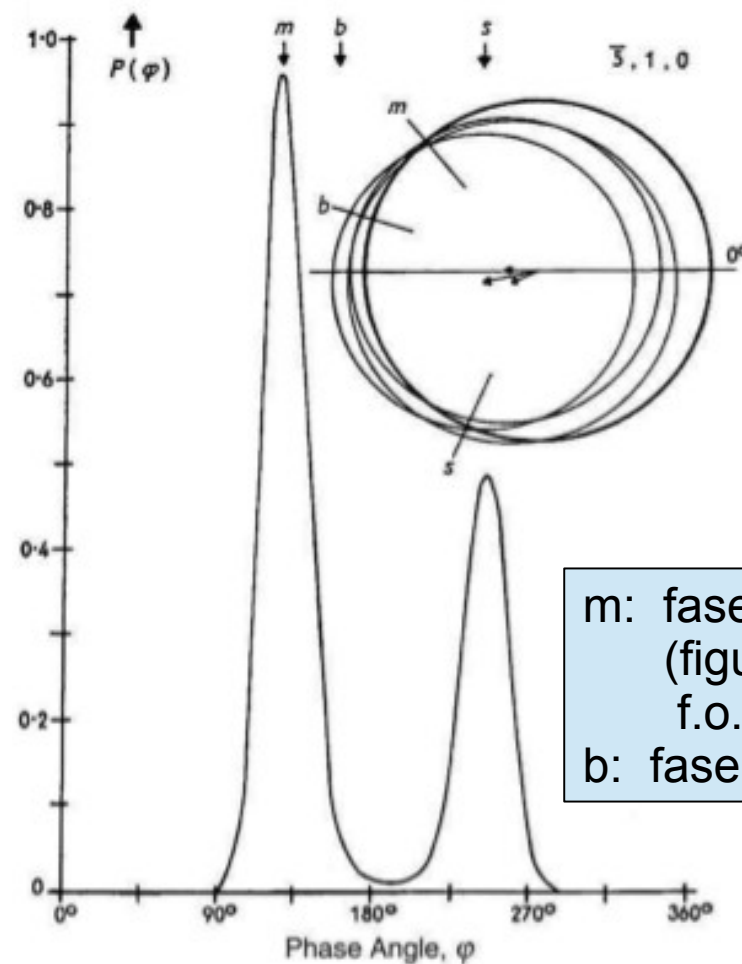
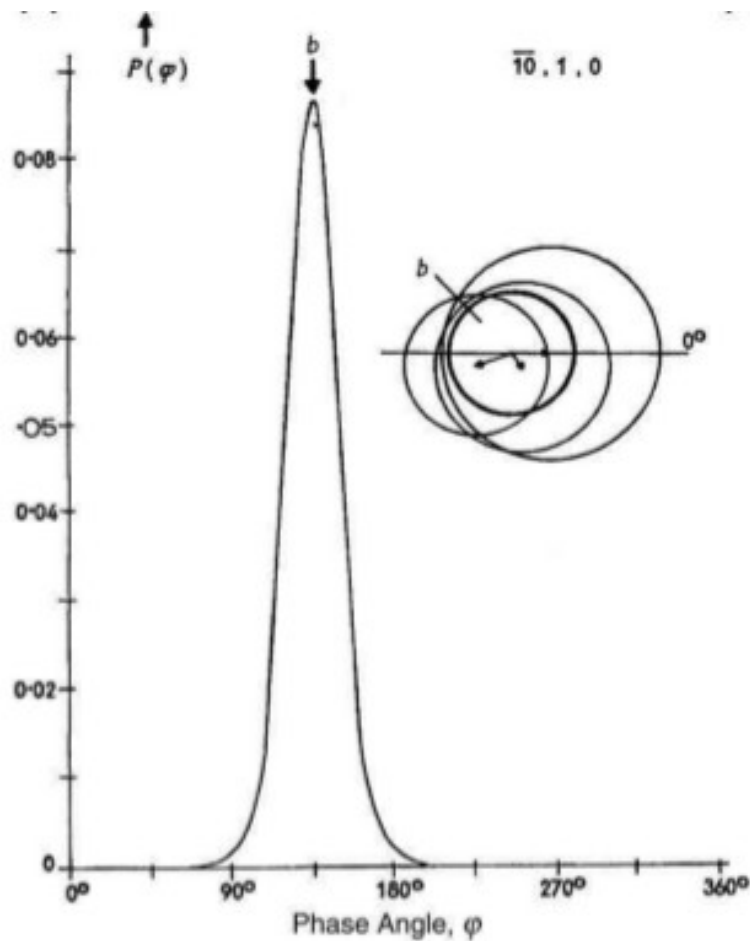
Ja que la mioglobina era una proteïna més petita,
es va poder resoldre primer, a 6 Å de resolució



Les imprecisions en la mesura, impossibilitaven la resolució amb dades més complexes (mioglobina a alta resolució o l'hemoglobina)

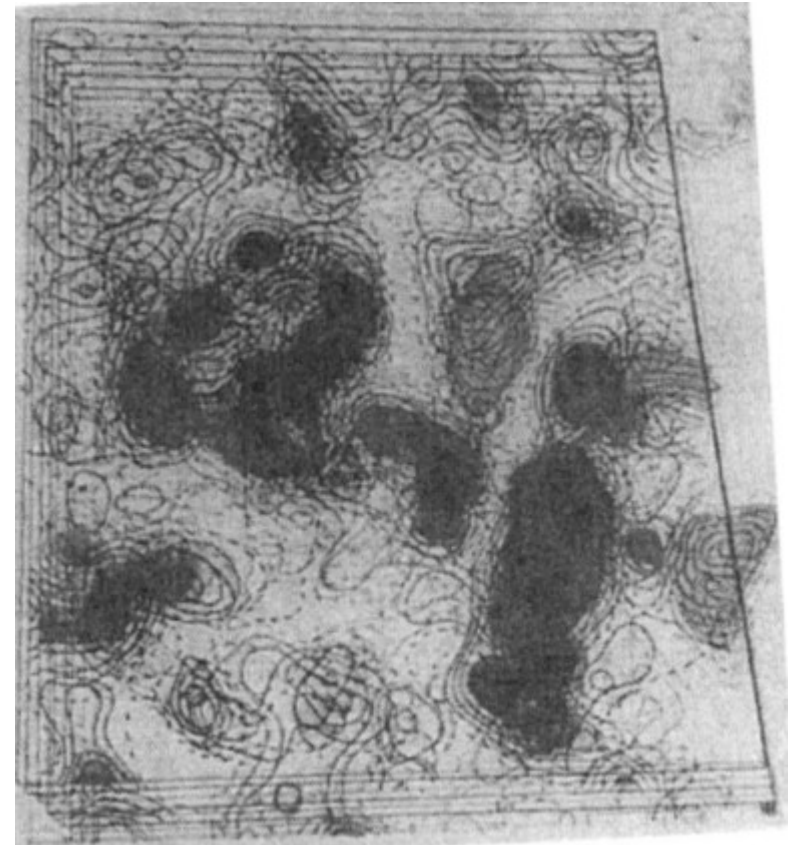


D. Blow and F. Crick trobaren a partir de l'ús de probabilitats la sol·lució òptima al problema

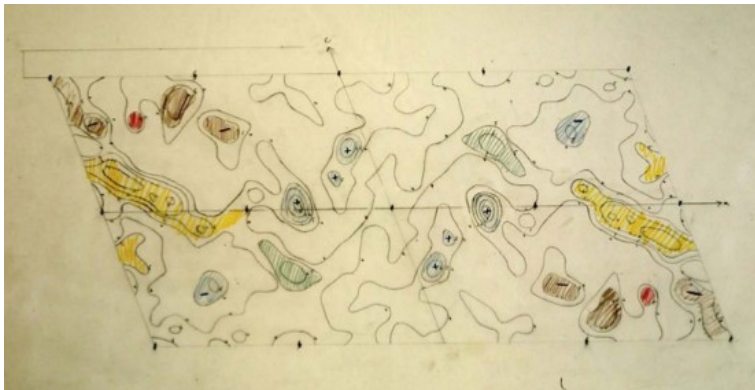
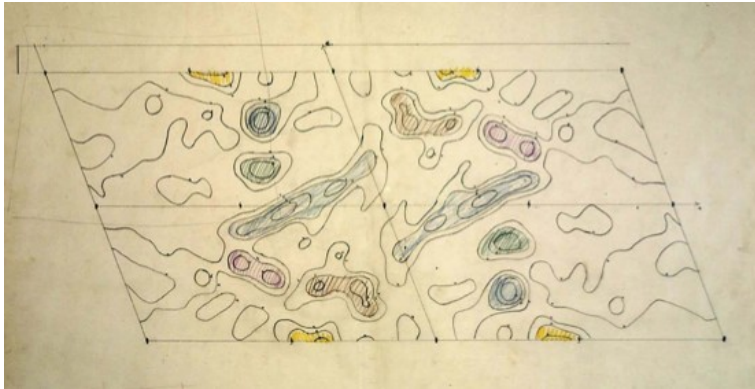


m: fase més probable
(figura de mèrit,
f.o.m)
b: fase òptima

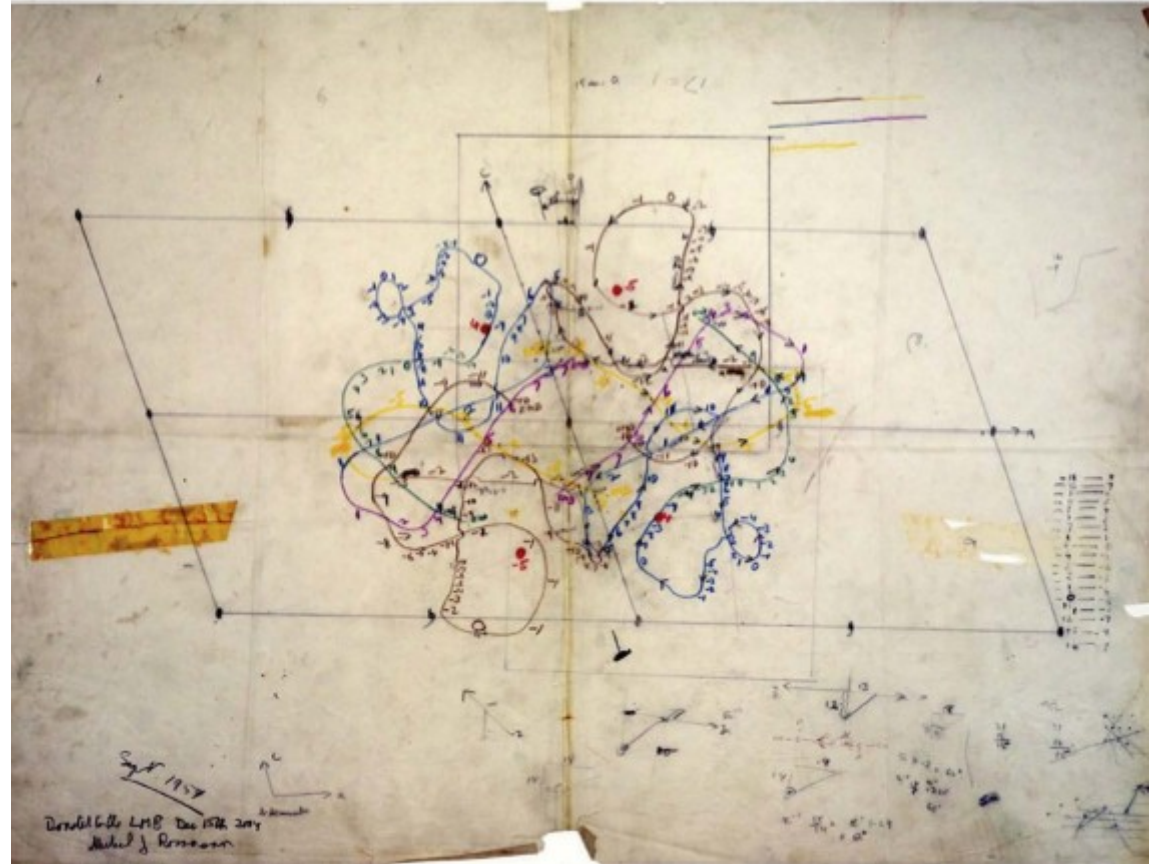
La f.o.m promig de totes les reflexions, ens dóna una idea de la qualitat del "fasejat"



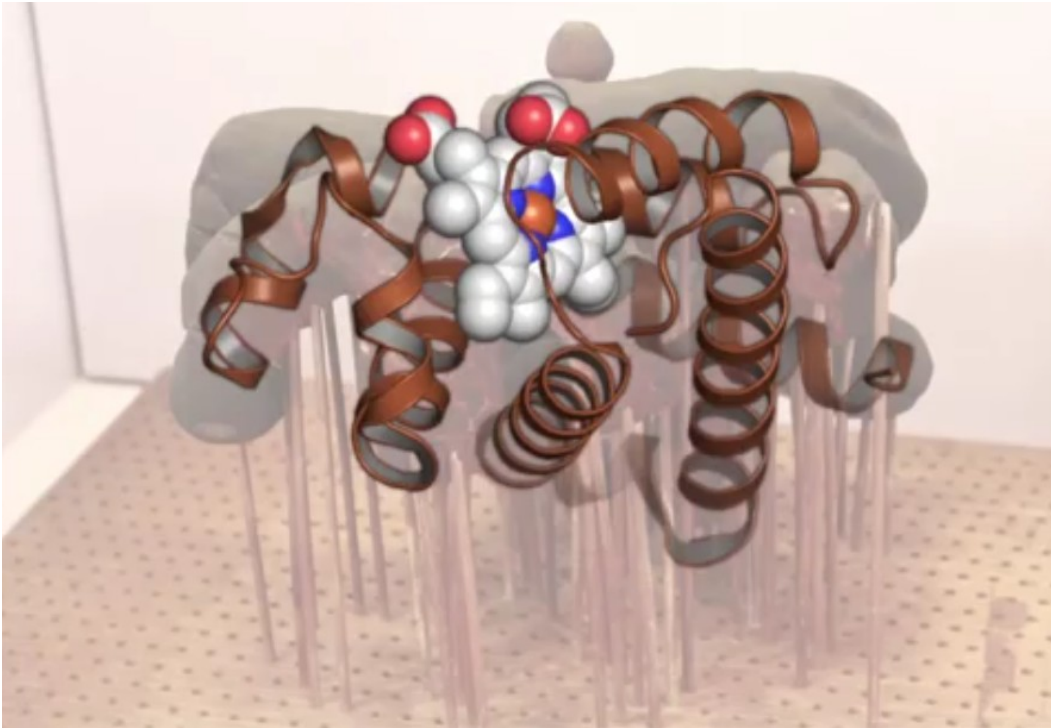
Mapa de densitat electrònica a alta resolució (2Å) de la mioglobina



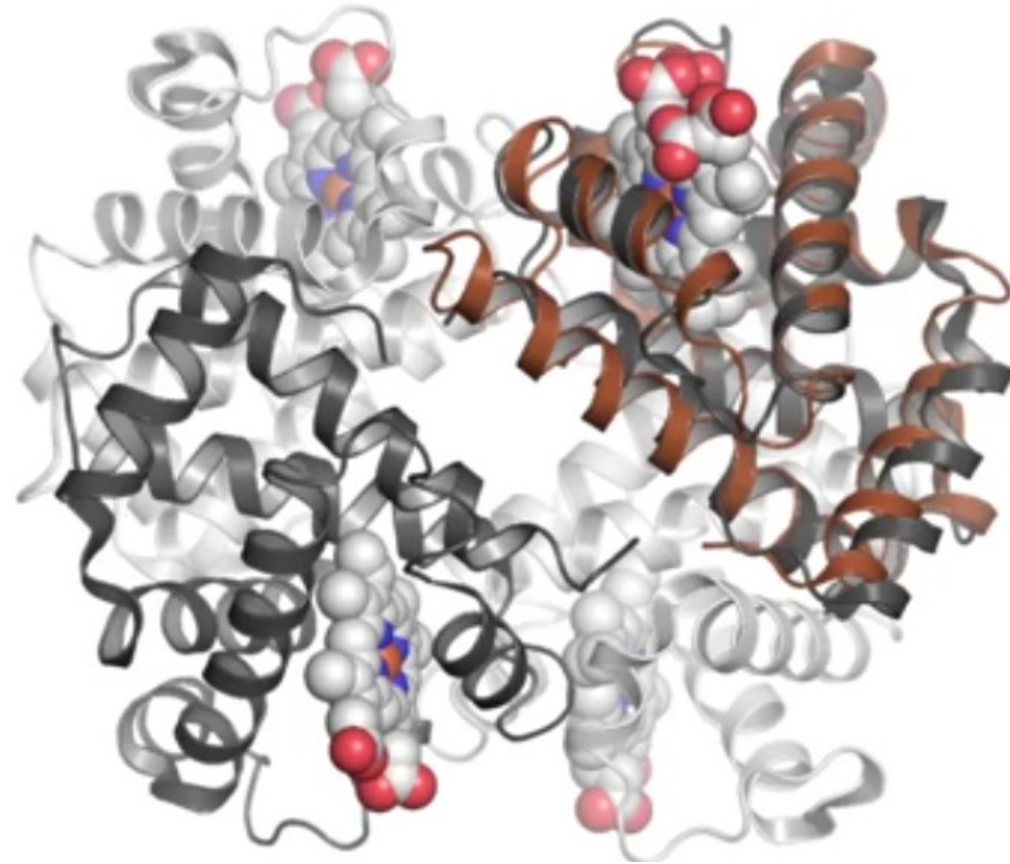
Seccions de densitat electrònica de la hemoglobina $\alpha 5$



Esquema "nocturn" traçat per en M. Rossmann



Mioglobina (balena), John Kendrew *et. al*



Hemoglobina (cavall), Max Perutz *et. al*

- Confirmació hipòtesis (estructura globular proteïnes, hèlix alfa, *laevo* aminoacids, etc..)
- Confirmació teoria de l'evolució de Darwin des de l'estructura

"Hi havia tres coses que feien especial tant el laboratori com la gent que allí hi treballava:

1) Tothom estava disposat a sol·lucionar qualsevol problema en qualsevol moment. Incloent-hi, naturalment, els líders dels grups com en John i en Max.

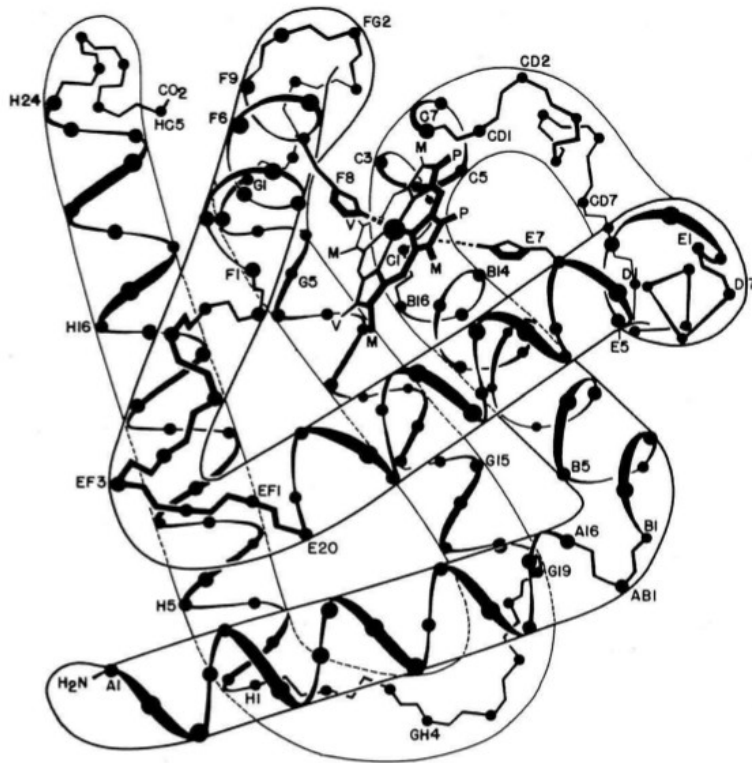
2) L'equipament era d'elevada gama per aquell moment. Generadors de R-X amb ànode rotatori (fets per l'enginyer T. Broad); un microdensitòmetre per mesurar un ingent nombre de reflexions, i la computadora EDSAC-II en el laboratori de Matemàtiques -a tocar- (probablement la computadora més veloç d'aquell moment a nivell mundial) varen contribuir enormement a fer aquell treball possible.

3) Finalment, els molts distinguits visitants varen estimular-nos i ens feren sentir que treballavem en problemes molt rellevants."

Bror Strandberg, 2009



'The Hut', Cavendish Lab, MRC, Cambridge, 1958

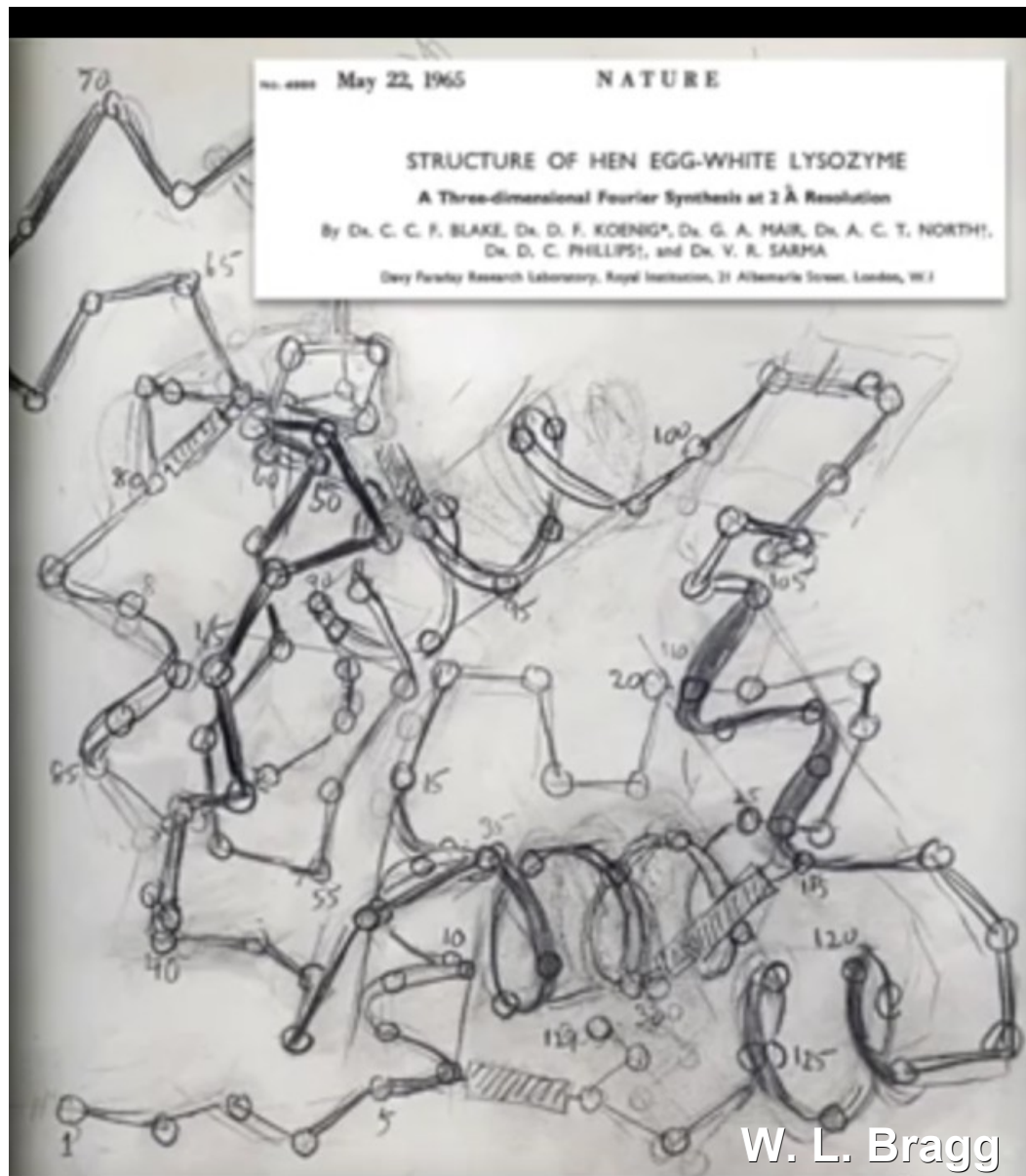




Premis Nobel 1962:

- Estructura de l'ADN
- Estructura de les primeres proteïnes

The Cavendish Laboratory, Cambridge
(dir.: W. Lawrence Bragg)



-El primer enzim (1965)

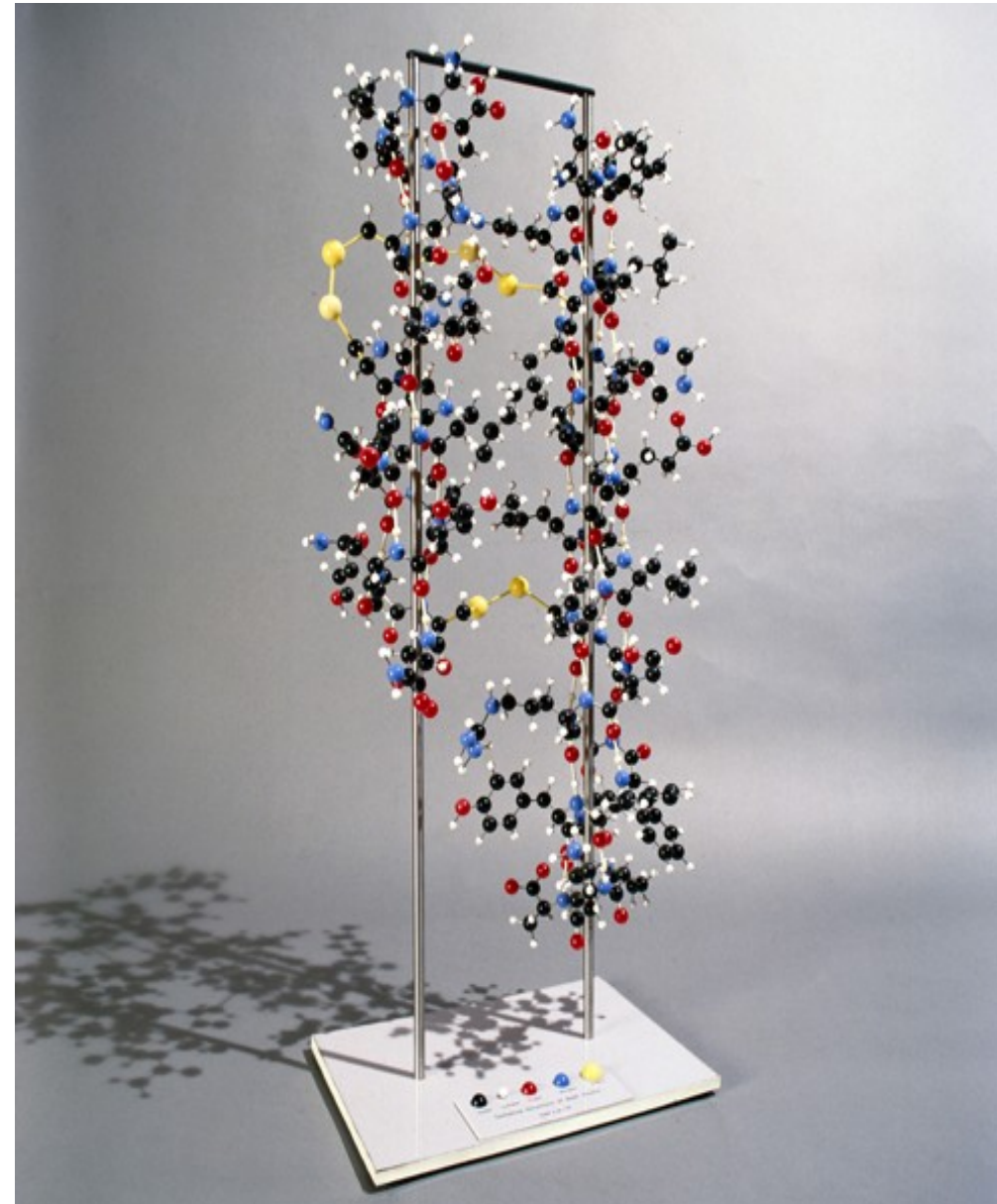
-El primer complexe enzim-substracte (1967), demostrà l'unió, residus catalítics i proposa un mecanisme.

- Carboxipeptidasa (1967)
- Quimiotripsina (1967)
- Ribonucleasa (1967)
- Papaïna (1968)
- Insulina (1969)



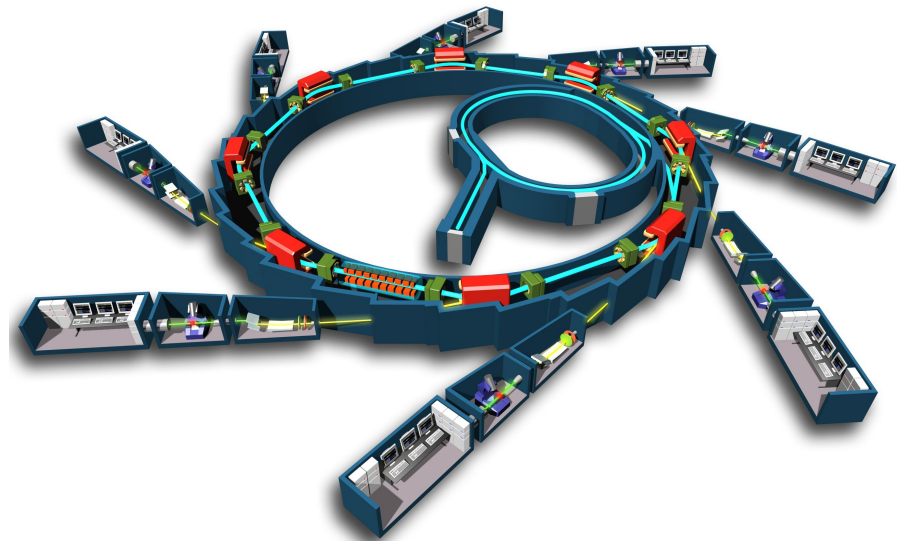
Dorothy
Crowfoot H.

Nova estructura → nou avenç
(ex. errors en la seqüenciació papaïna)

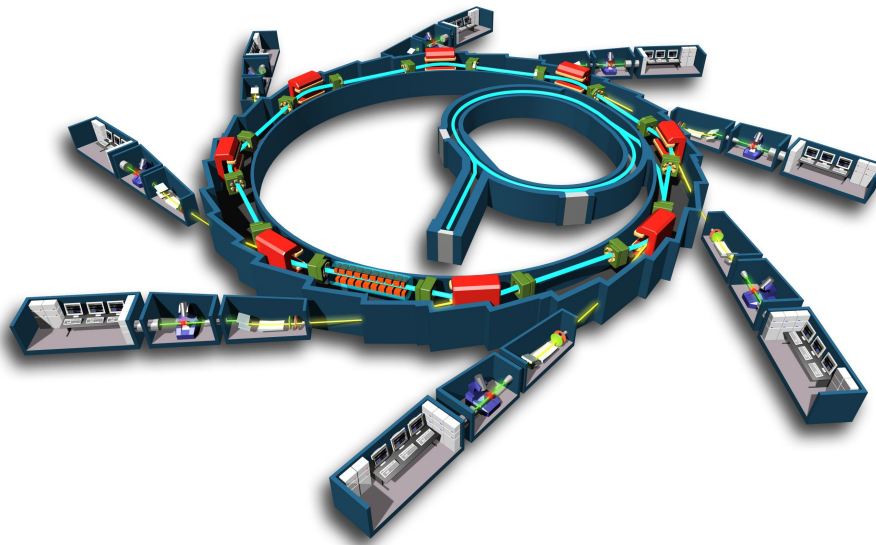




- Lactat deshidrogenasa (1970)
- Citocrom C (1971)
- ARNt (1973, 1974)
- Primer virus esfèric, TBSV (1978)



- Primera utilització radiació sincrotró:
- Desy, Alemanya
 - Stanford, CA, EUA)



How a Synchrotron Works

4. Storage Ring

The booster ring feeds electrons into the storage ring, a many-sided donut-shaped tube. The tube is maintained under vacuum, as free as possible of air or other stray atoms that could deflect the electron beam. Computer-controlled magnets keep the beam absolutely true.

Synchrotron light is produced when the bending magnets deflect the electron beam; each set of bending magnets is connected to an experimental station or beamline. Machines filter, intensify, or otherwise manipulate the light at each beamline to get the right characteristics for experiments.

5. Focusing the Beam

Keeping the electron beam absolutely true is vital when the material you're studying is measured in billionths of a metre. This precise control is accomplished with computer-controlled quadrupole (four pole) and sextupole (six pole) magnets. Small adjustments with these magnets act to focus the electron beam.



3. An Energy Boost

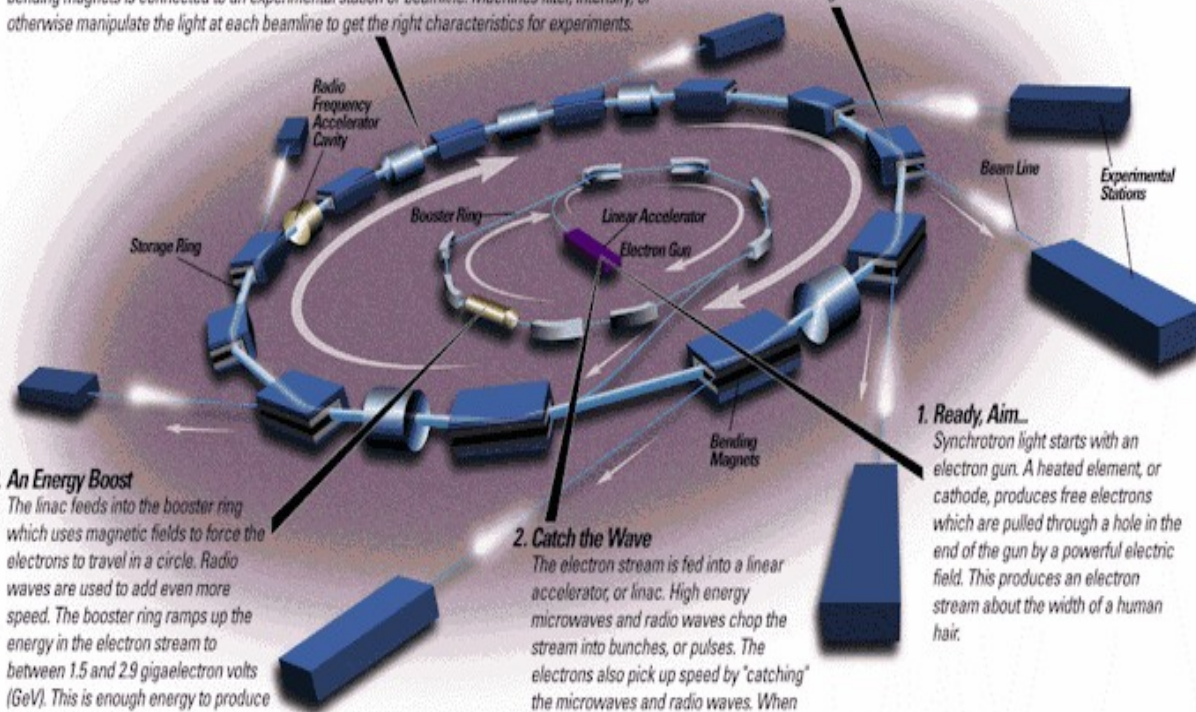
The linac feeds into the booster ring which uses magnetic fields to force the electrons to travel in a circle. Radio waves are used to add even more speed. The booster ring ramps up the energy in the electron stream to between 1.5 and 2.9 gigaelectron volts (GeV). This is enough energy to produce synchrotron light in the infrared to hard X-ray range.

2. Catch the Wave

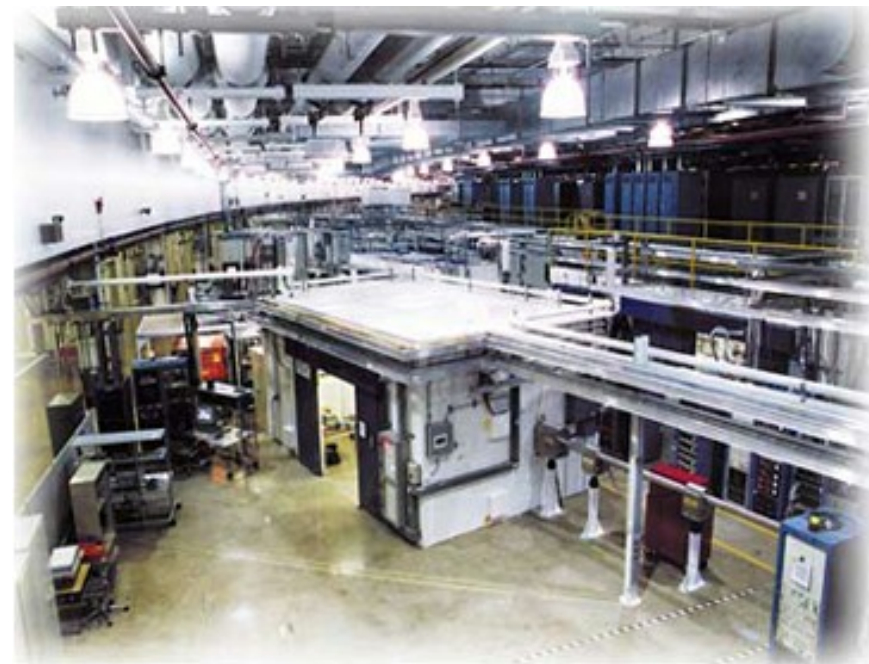
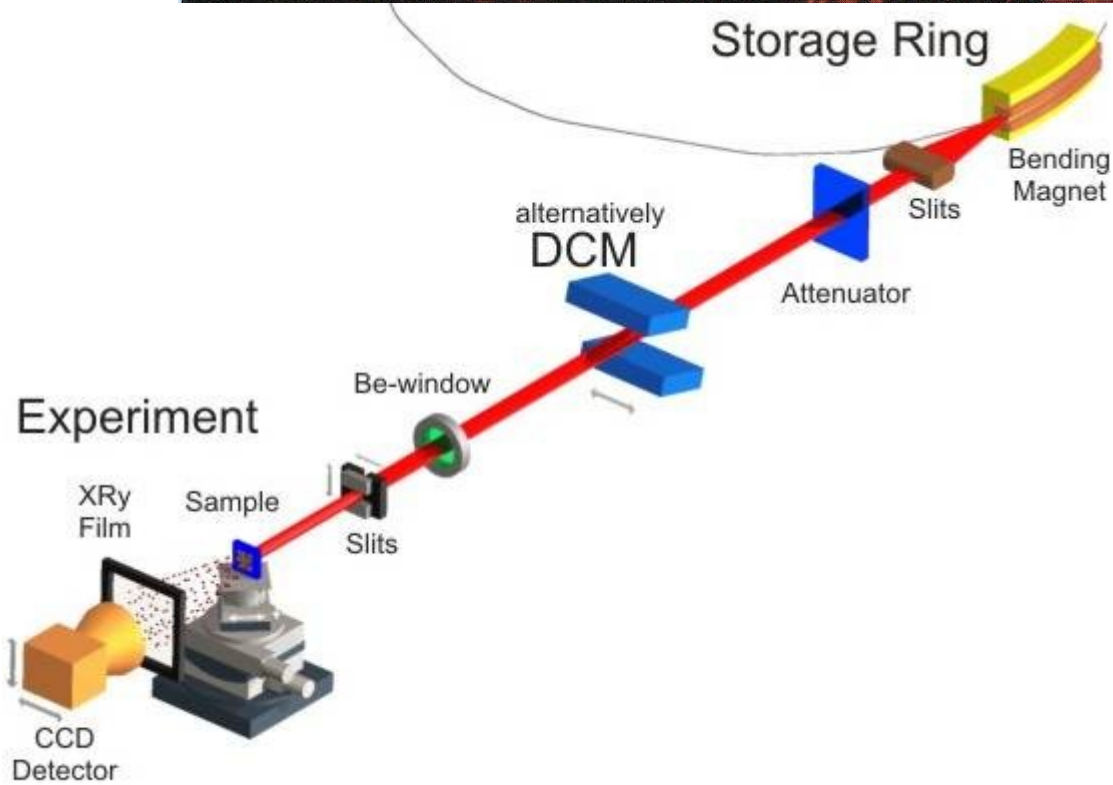
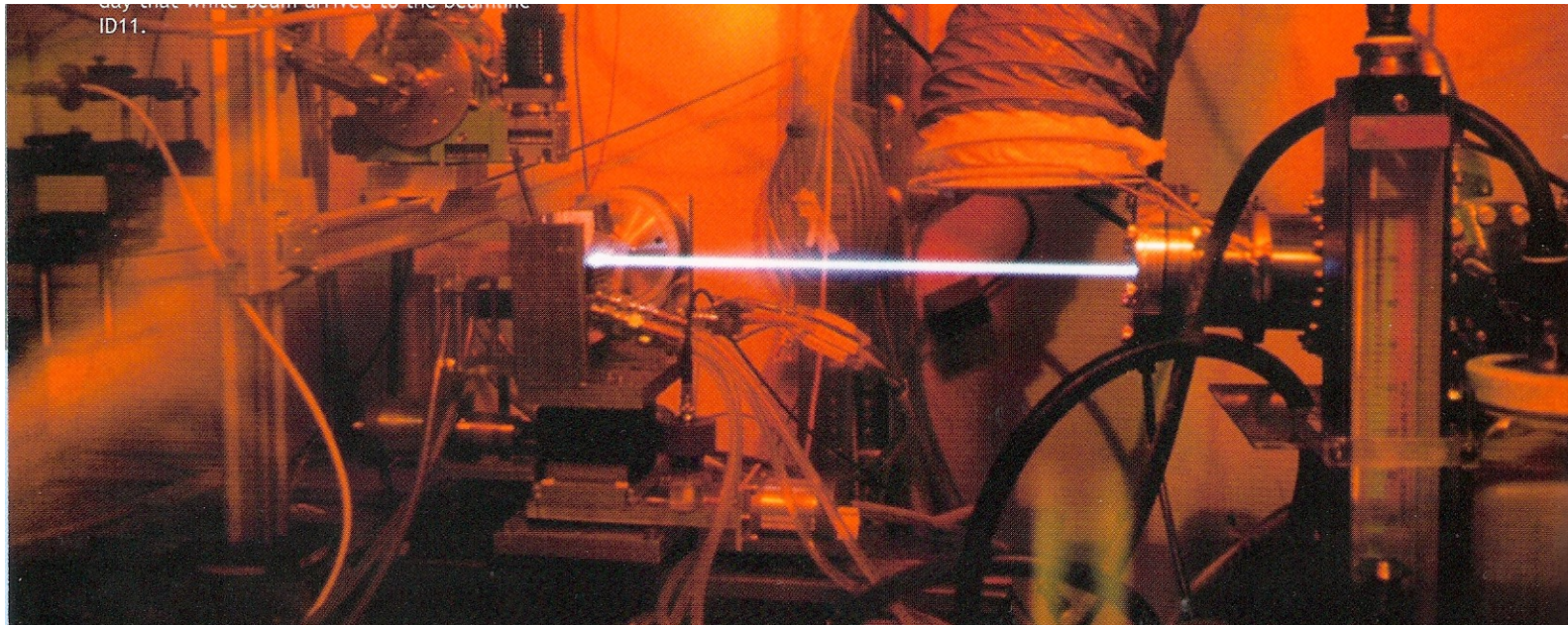
The electron stream is fed into a linear accelerator, or linac. High energy microwaves and radio waves chop the stream into bunches, or pulses. The electrons also pick up speed by "catching" the microwaves and radio waves. When they exit the linac, the electrons are travelling at 99.99986 per cent of the speed of light and carry about 300 million electron

1. Ready, Aim...

Synchrotron light starts with an electron gun. A heated element, or cathode, produces free electrons which are pulled through a hole in the end of the gun by a powerful electric field. This produces an electron stream about the width of a human hair.

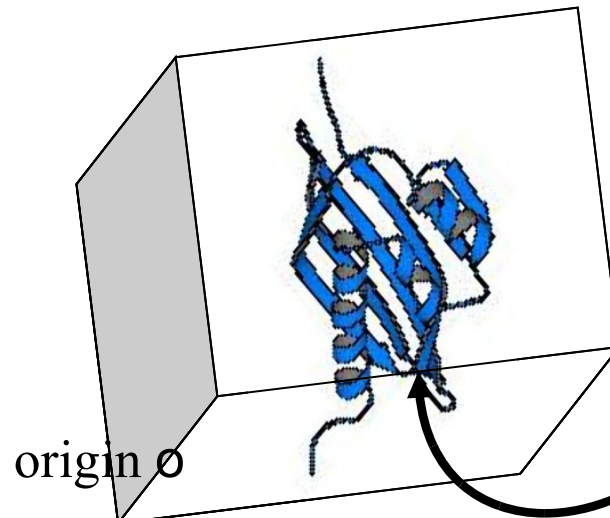


Source: University of Saskatchewan / Paradigm Media Group Inc.



Estructura a resoldre

MGDKPIWEQIGSSFIQHYYQLFDNDRTQLGAIY
 IDASCLTWEGQQFQGKAAIVEKLSSLFPQKIQH
 SITAQDHQPTPDSCIISMVVGQLKADEDPIMGF
 HQMFLLNINDAWVCTNDMFRLALHNFG

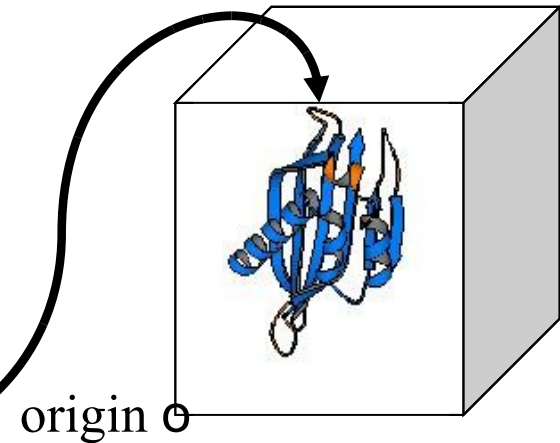


H	K	L	F	ϕ
0	0	1	2.5	30
0	0	2	72.1	85
0	0	3	26.9	310

etc...

Estructura ja resolta
(similar)

PSPLLVGREFVRQYYTLLNKAPEYLHRFYGRNSSY
 VHGGVDASGKPQEAVYGQNDIHHKVLSLNFSECHT
 KIRHVDAHATLSDGVVVQVMGLLSNSGQPERKFMQ
 TFVLAPEGSVPNKFYVHNDMFRIEDE



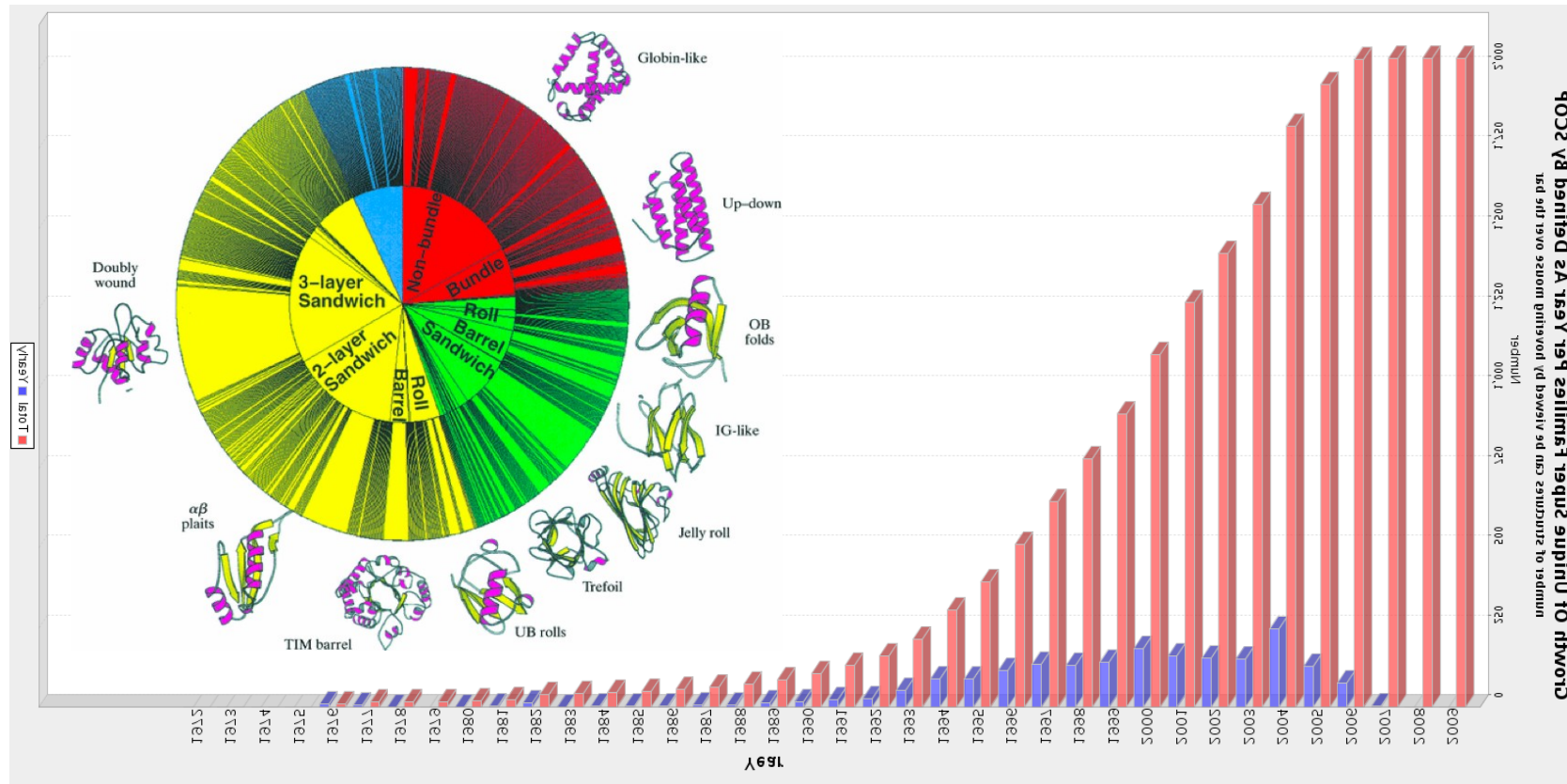
H	K	L	F	ϕ
0	0	1	10.4	120
0	0	2	3.1	10
0	0	3	52.2	280

etc...



Michael G.
Rossmann

Per a qualsevols dos objectes similars,
 colcats a l'atzar un respecte l'altre,
 podem trobar una rotació + una traslació
 que els superposi.



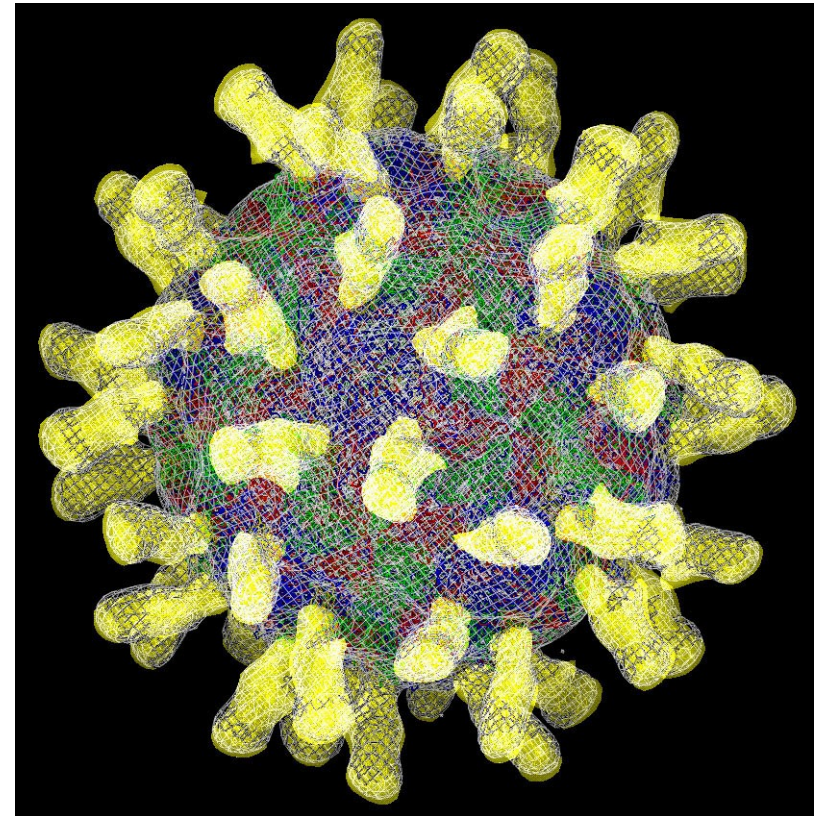
Del total d'estructures al PDB, es creu que hi ha unes 1500 famílies de plegaments. Es creu que al menys hi ha un representant d'un 80% d'aquestes famílies.



R.M. és la tècnica més emprada en la resolució d'estructures.



Virus del refredat, serotip 14
HRV14 (1985)

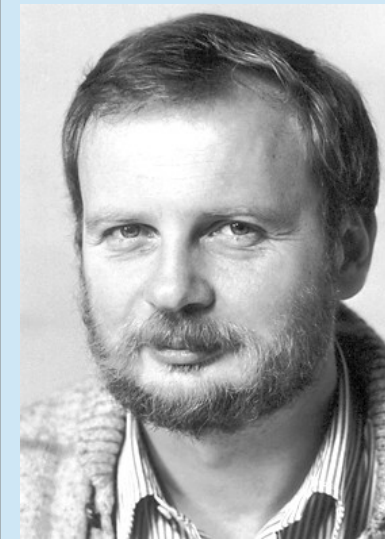




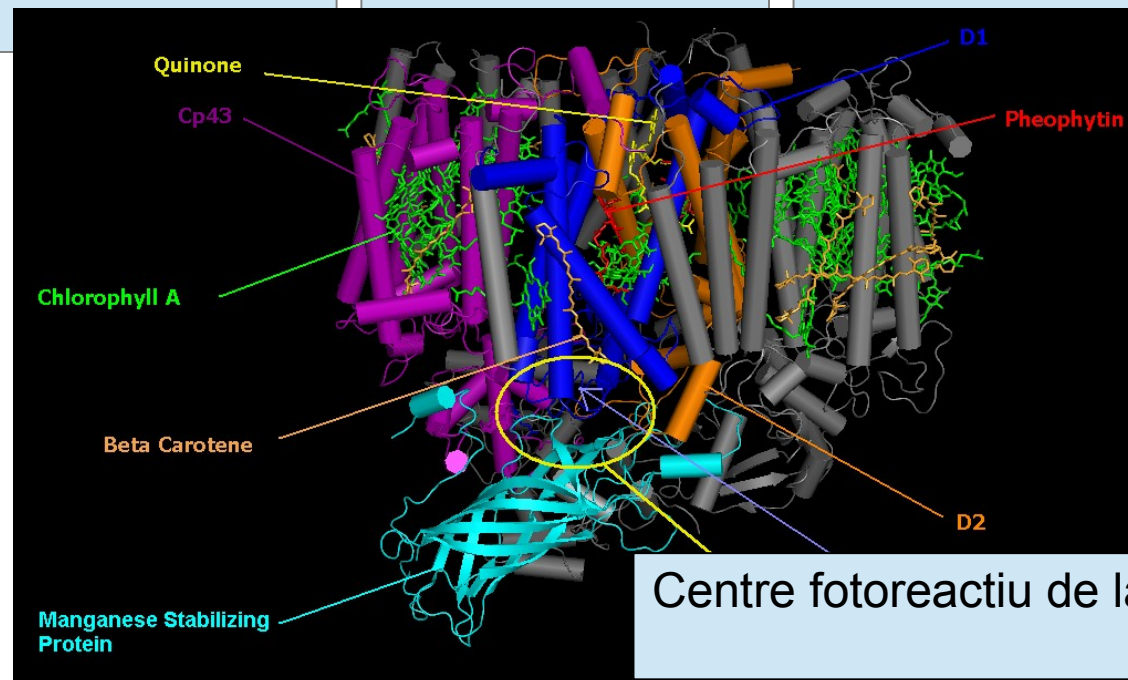
Robert
Huber



Johann
Deisenhofer



Hartmut
Michel



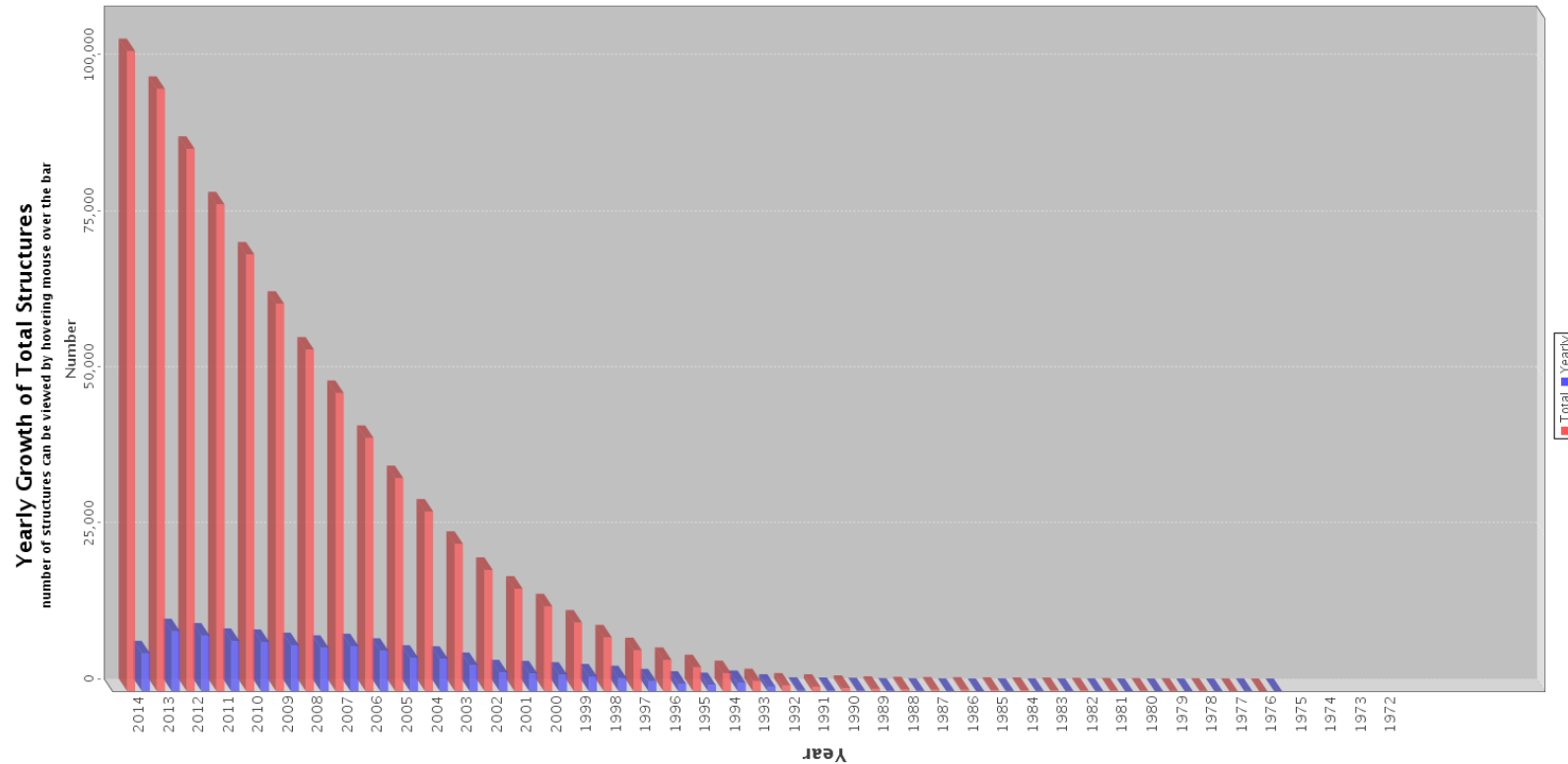
Centre fotoreactiu de la fotosíntesi (1986)



Ada
Yonath



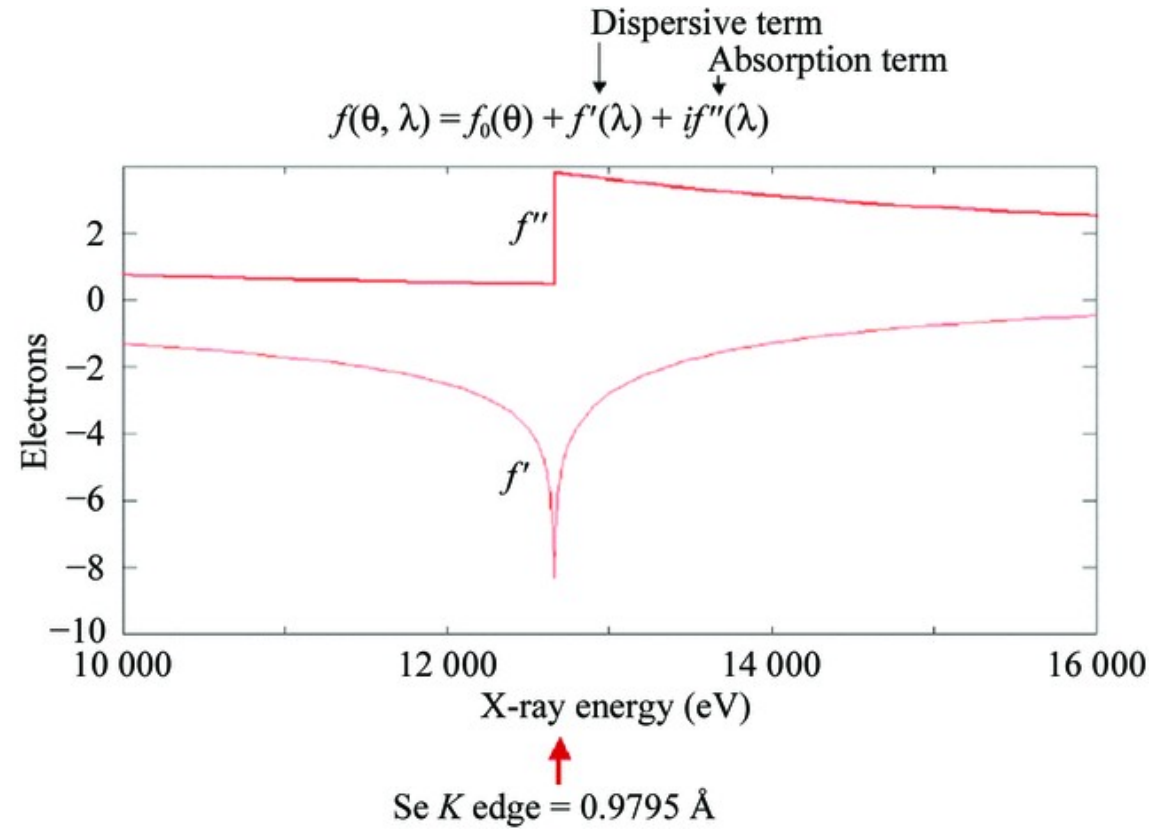
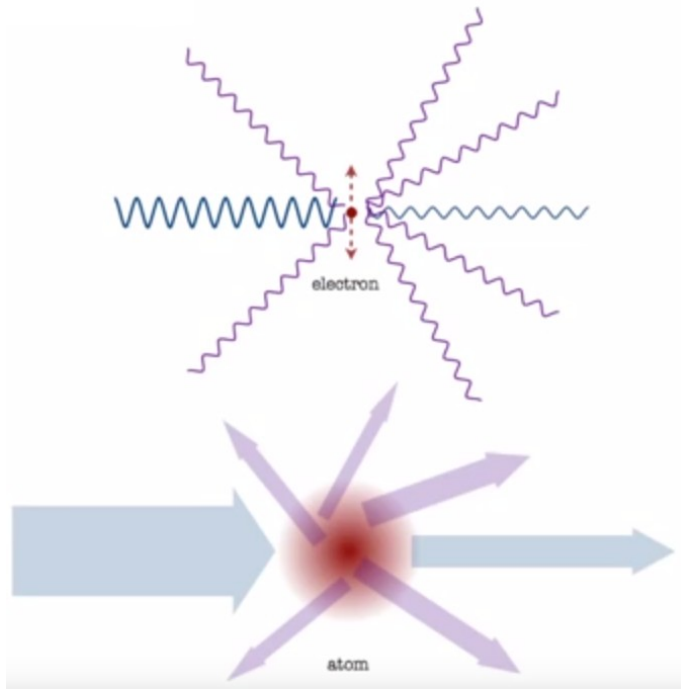
Primers cristalls del ribosoma: vitrificació a -80C per evitar dany degut a la radiació.



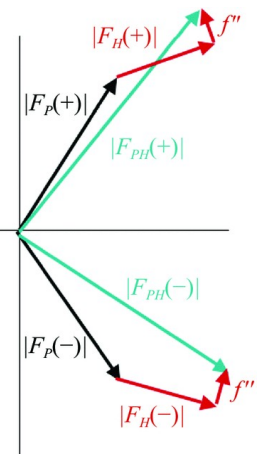
Els grans avenços en el camp fa que hi hagi un increment notable de l'obtenció d'estructures de proteïnes més o menys rellevants.

Ús difracció anòmala per 'phasing'

Avenços en software especialitzat



Noves tècniques (SAD / MAD /..),
desevolupades per fer-les en sincrotrons



'PHASING':

Molecular Replacement): J. Navaza
(AmoRe), A. Vaguin (MOLREP)

MANIPULACIÓ MAPES:

G. Bricogne (DM), K. Cowtan (DM)

REFINAMENT D'ESTRUCTURES:

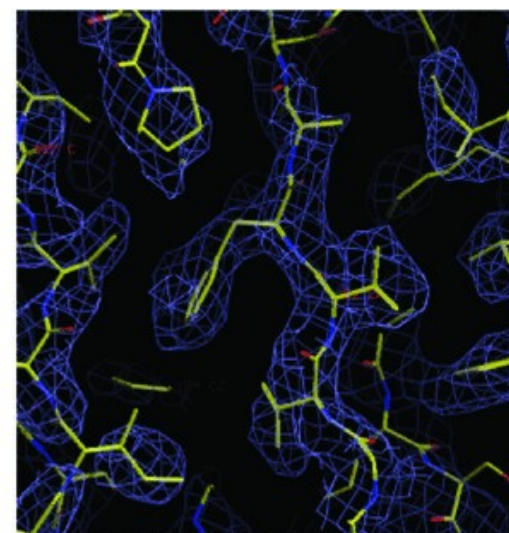
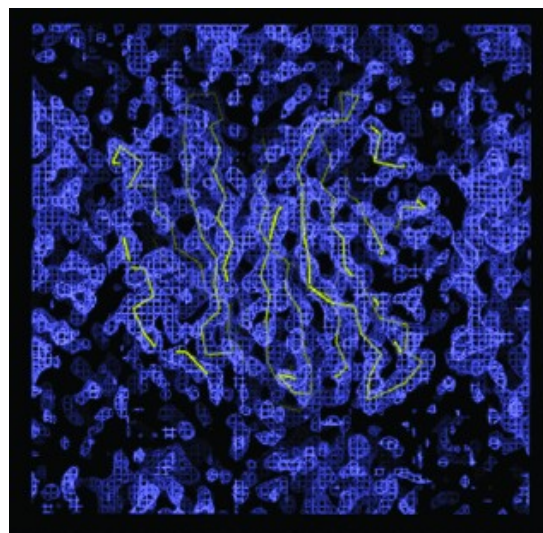
R. Sheldrick (SHELX), G. Murshudov
(REFMAC)



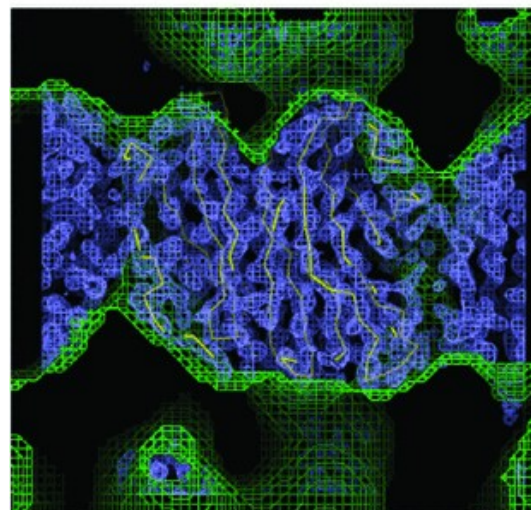
Jorge
Navaza



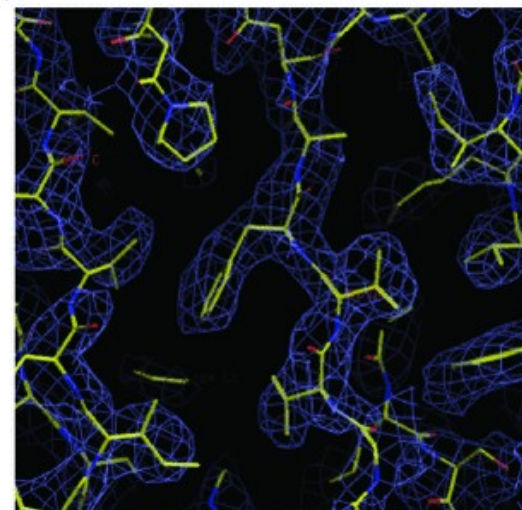
Garib
Murshudov

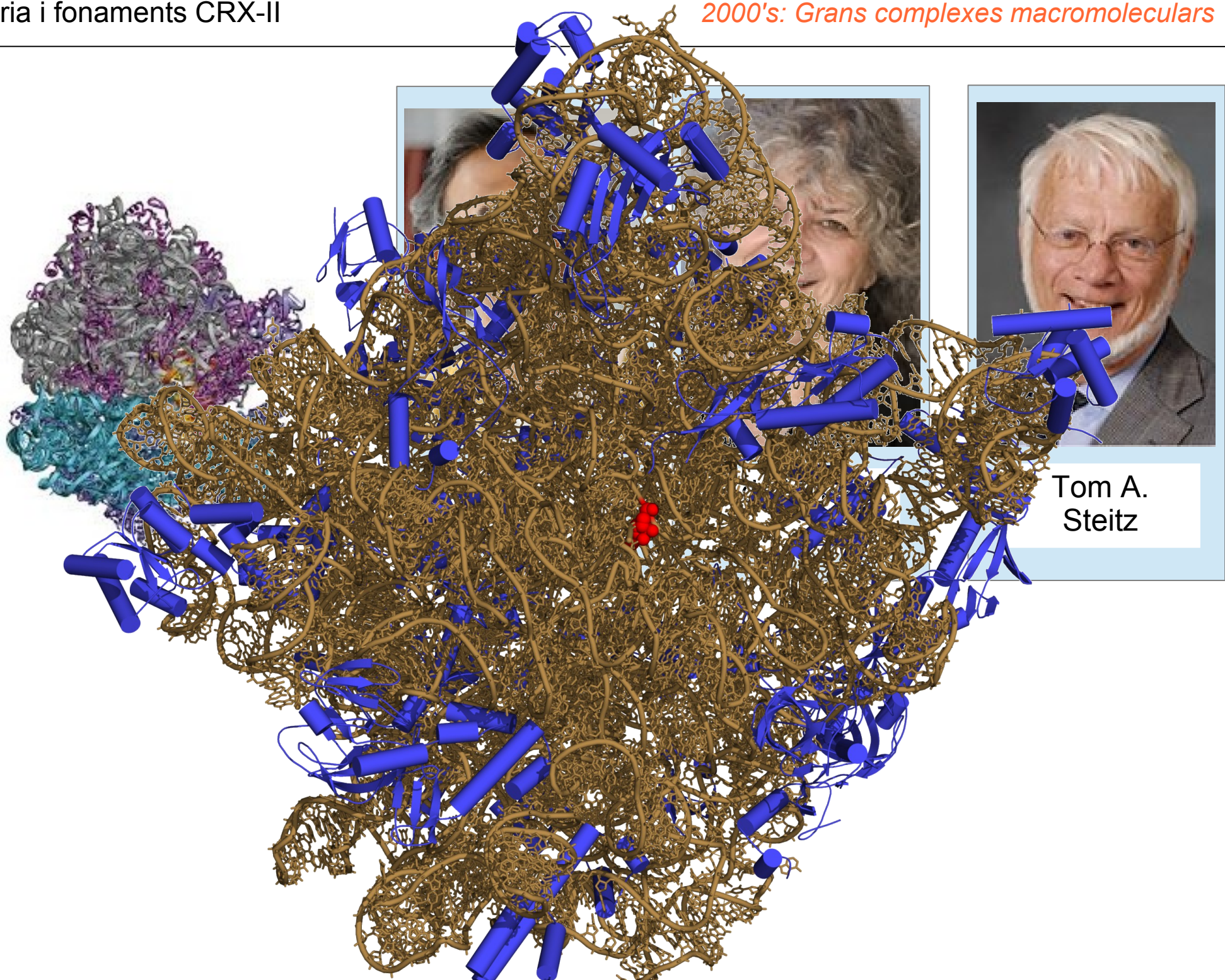


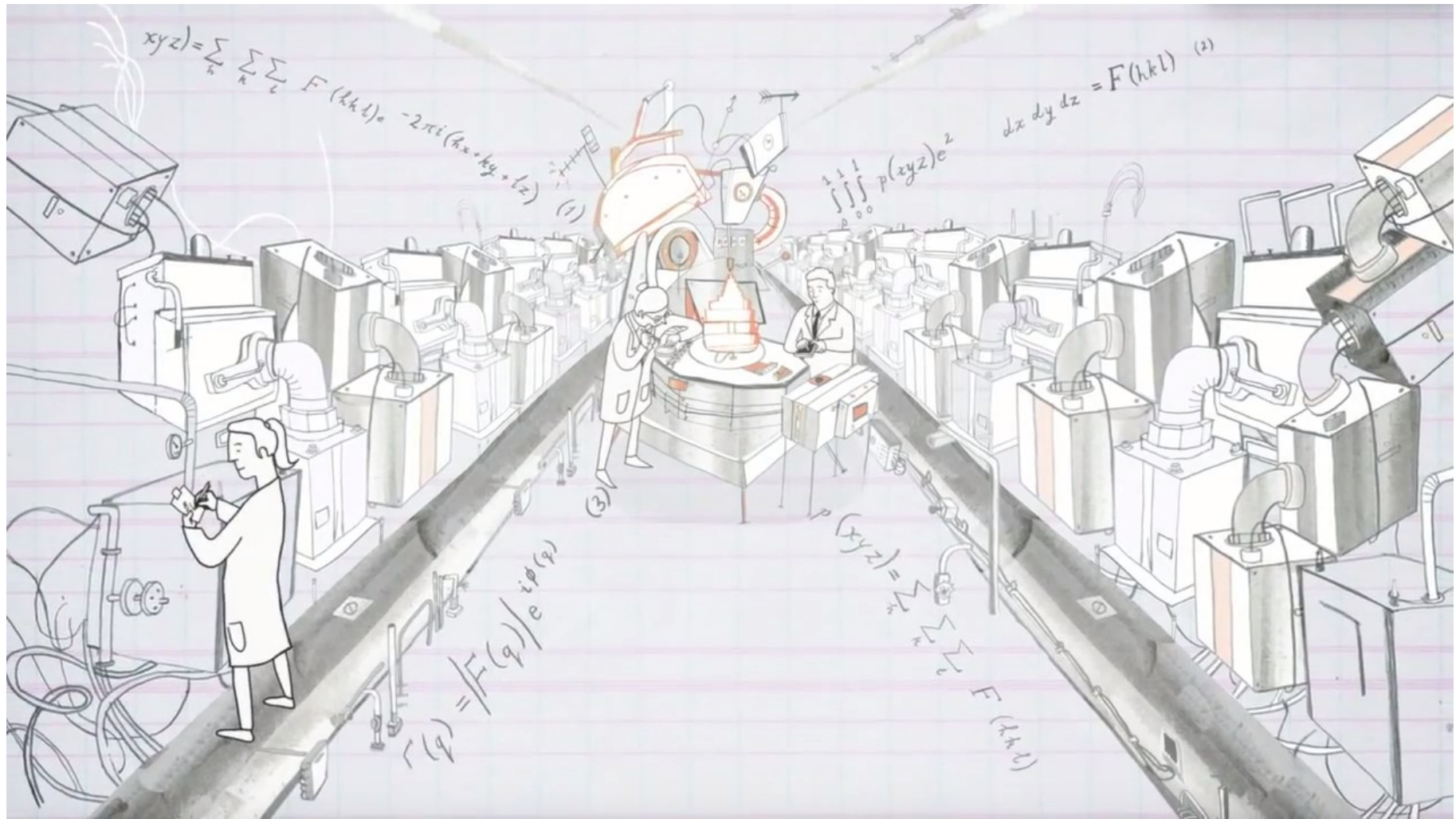
(a)



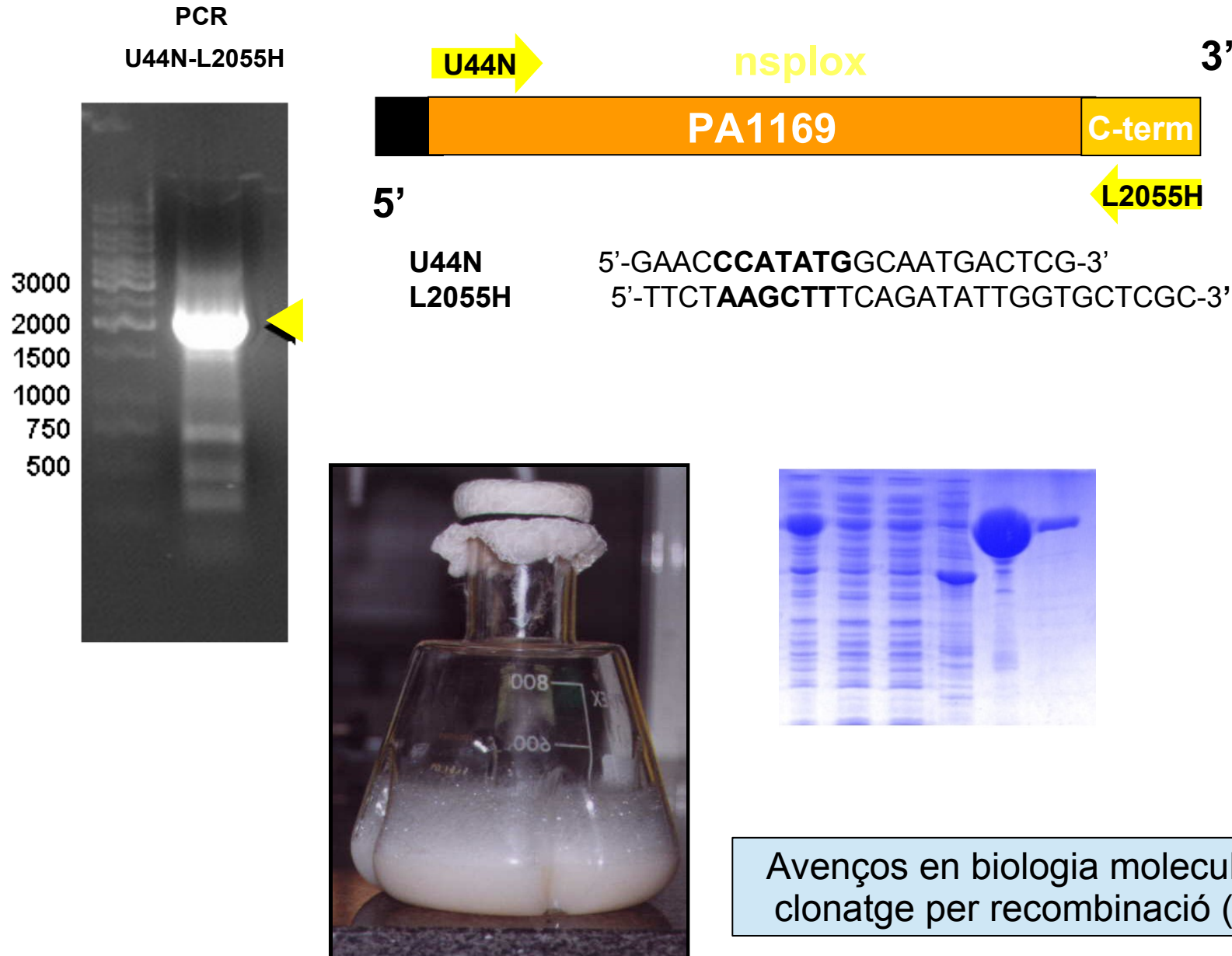
(b)

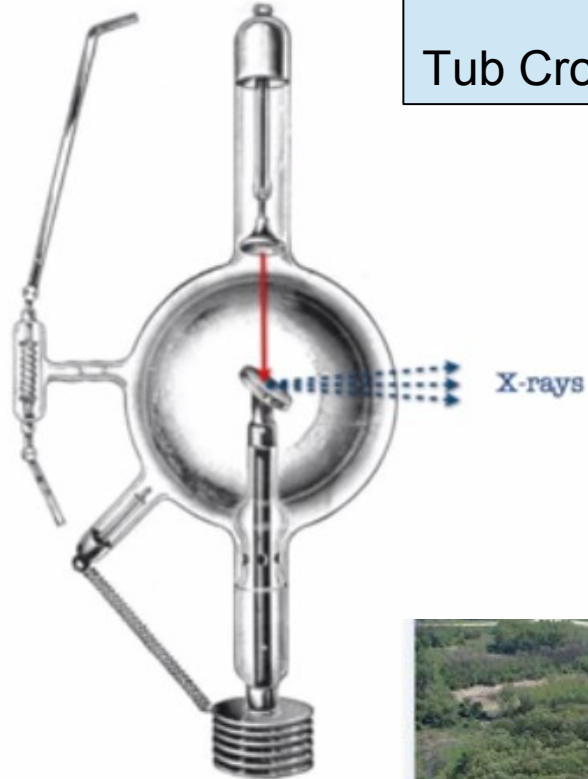




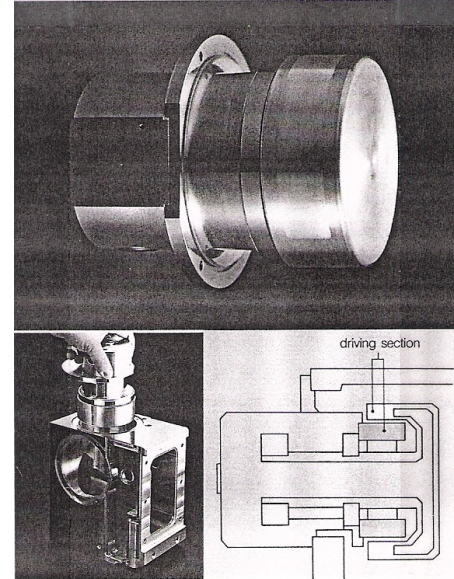


L'automatització de moltes de les etapes del procés de resolució estructural per cristal·lografia de R-X ha dut a intentar resoldre exhaustivament totes les proteïnes vinculades amb un centre d'interès determinat (per ex. genòmica estructural de l'HIV, de M. tuberculosis, ..)





Tub Crookes (1910)

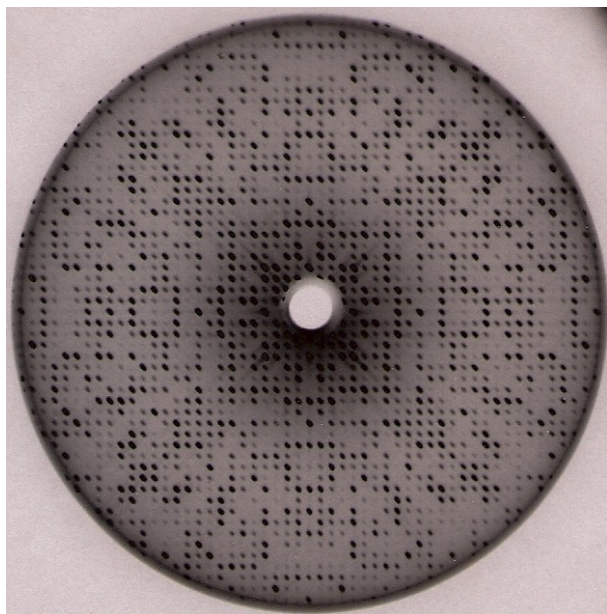


Ànode Rotatori (1930)



Sincrotró (1970)

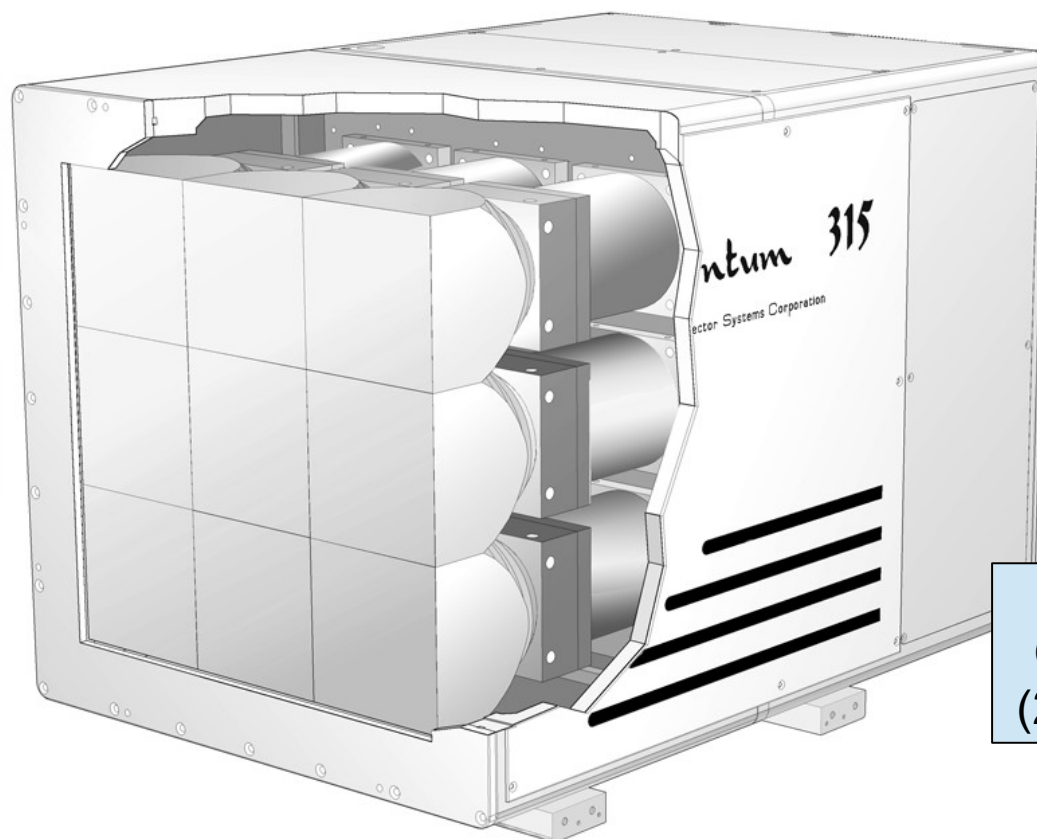
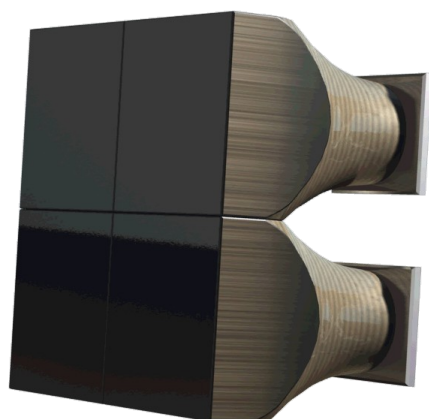




Pel·lícula
(1930)

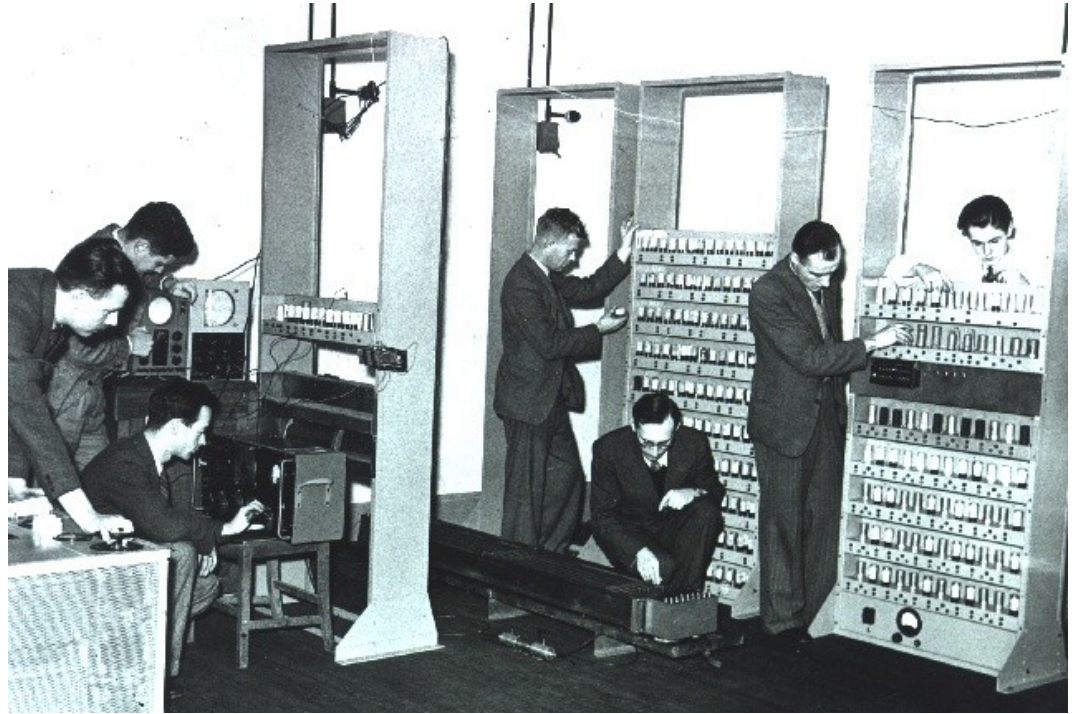


"Image Plate"
(1990)

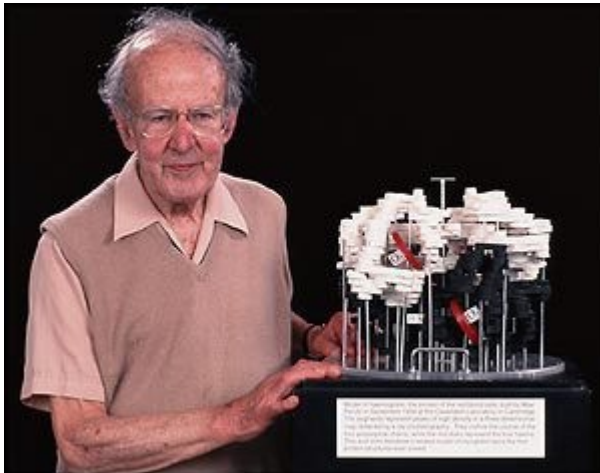


CCD
(2000)

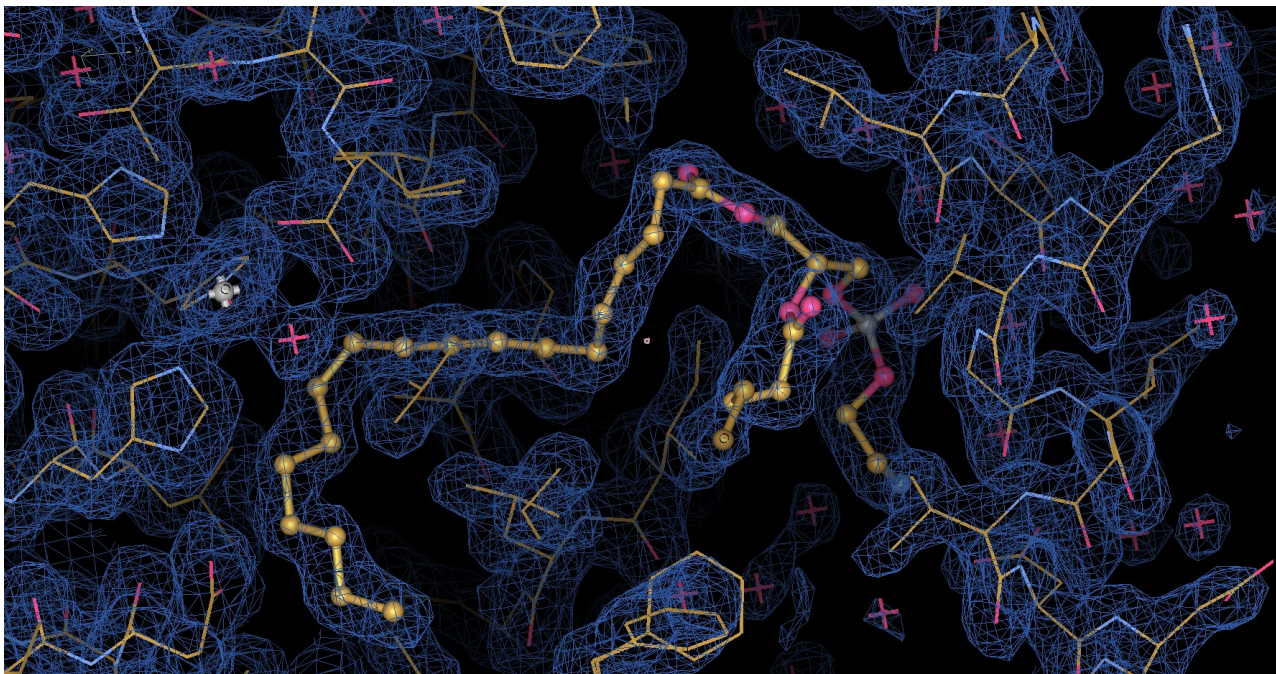
Primers ordinadors (1950)



EDSAC-I



EDSAC-II



Actualitat (2014)



'Es fa necessari l'estudi de l'estructura de seqüències específiques d'ADN amb significació genètica i la seva interacció amb proteïnes mitjançant la difracció de R-X (..) A Espanya no existeix cap grup de treball que treballi en aquest tema, ni existeix cap difractòmetre apte per aquest treball (..) a la reunió sobre tendències actuals en Química (..) es va recomanar que algun grup espanyol adoptés aquesta línia d'investigació'.

J. A. Subirana
(Sol·licitud PN de la primavera de 1986)



ETSEIB, UPC, Barcelona



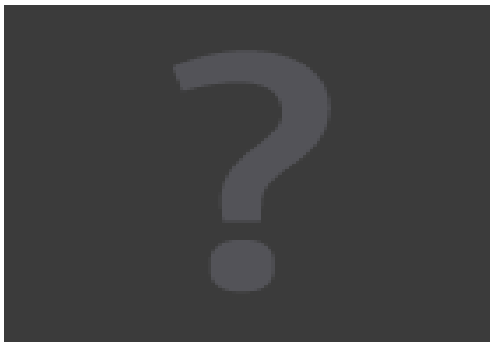
IQF Rocasolano – CSIC, Madrid

Primers ànodes rotatoris (R-X), 1988



Structure of d(CACGTG), a Z-DNA hexamer containing AT base pairs. *Nucleic Acid Res* (1988).

Coll M, Fita I, Lloveras J, Subirana JA, et al.



~ 30 grups: (1/2 Països Catalans + 1/2 Espanya)

CSIC (Barcelona, Madrid, València, Salamanca, Granada, ..)

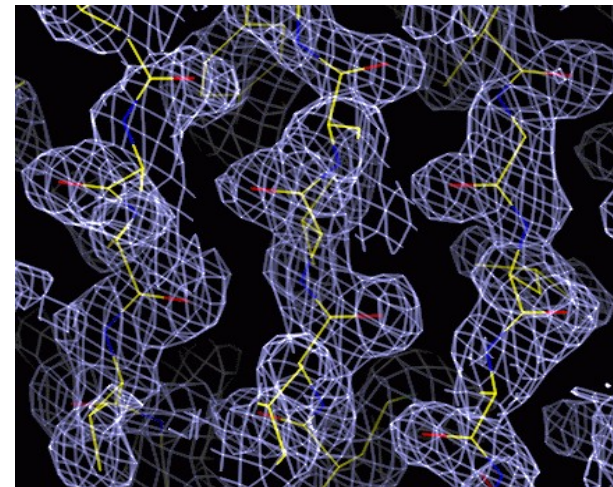
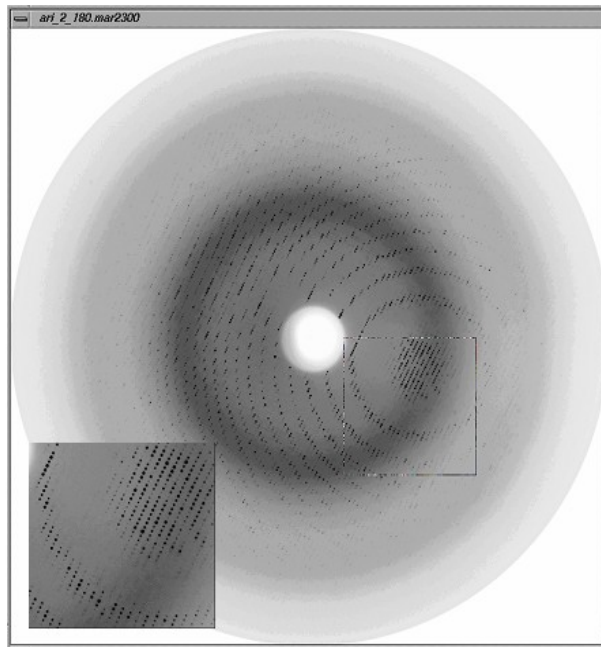
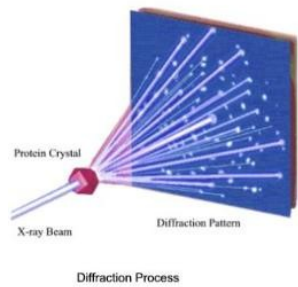
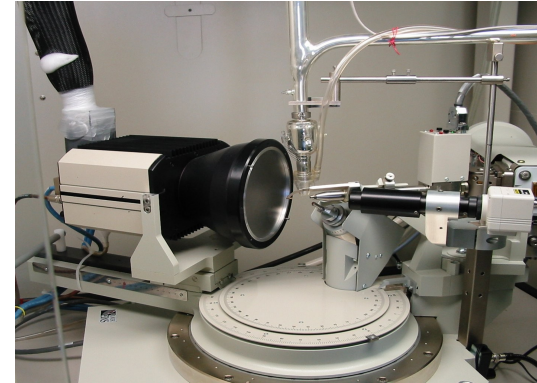
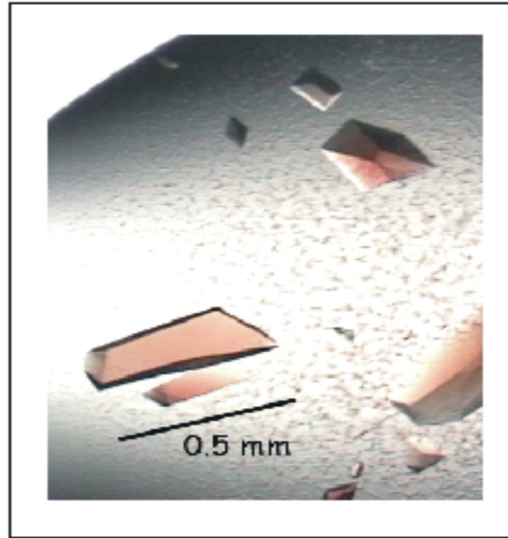
IRB, CNIO, CIC bioGUNE

UPC, UAB

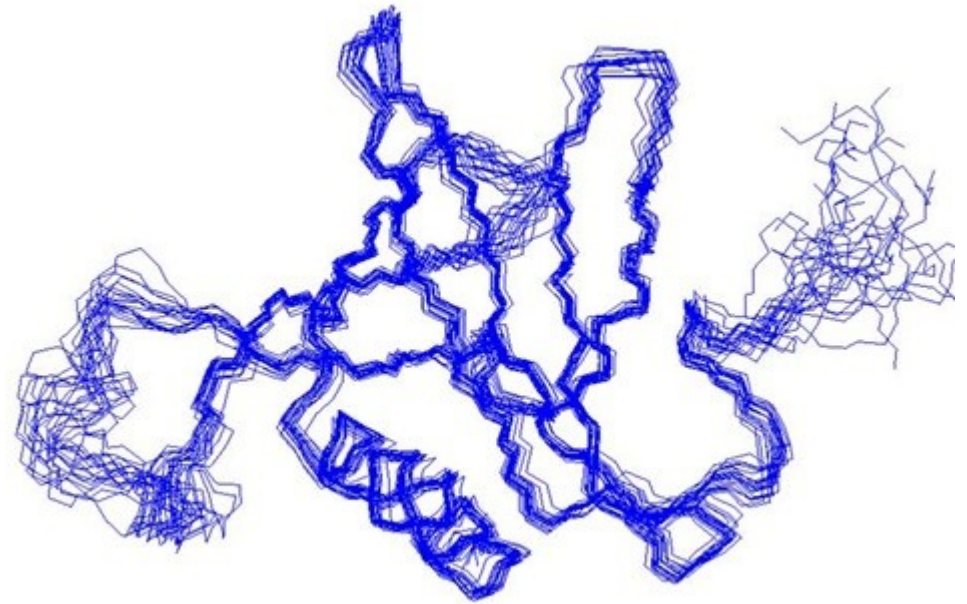
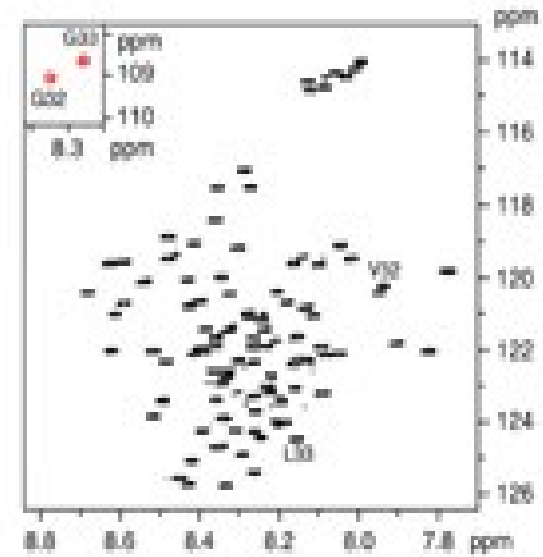


ALBA, Cerdanyola del Vallès

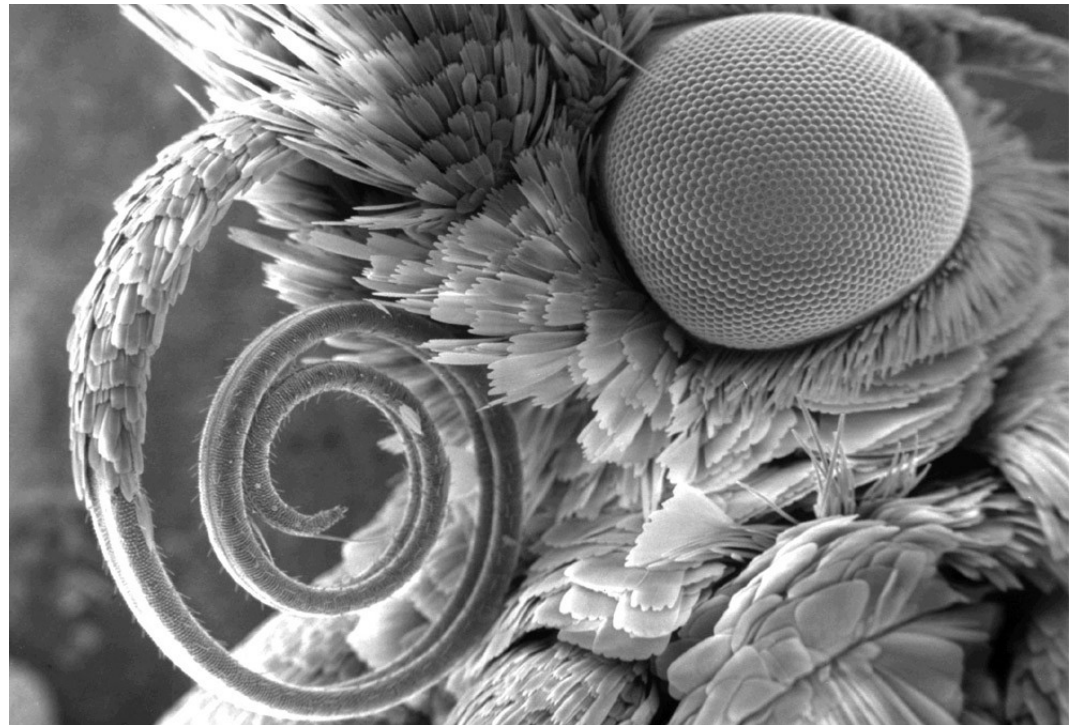




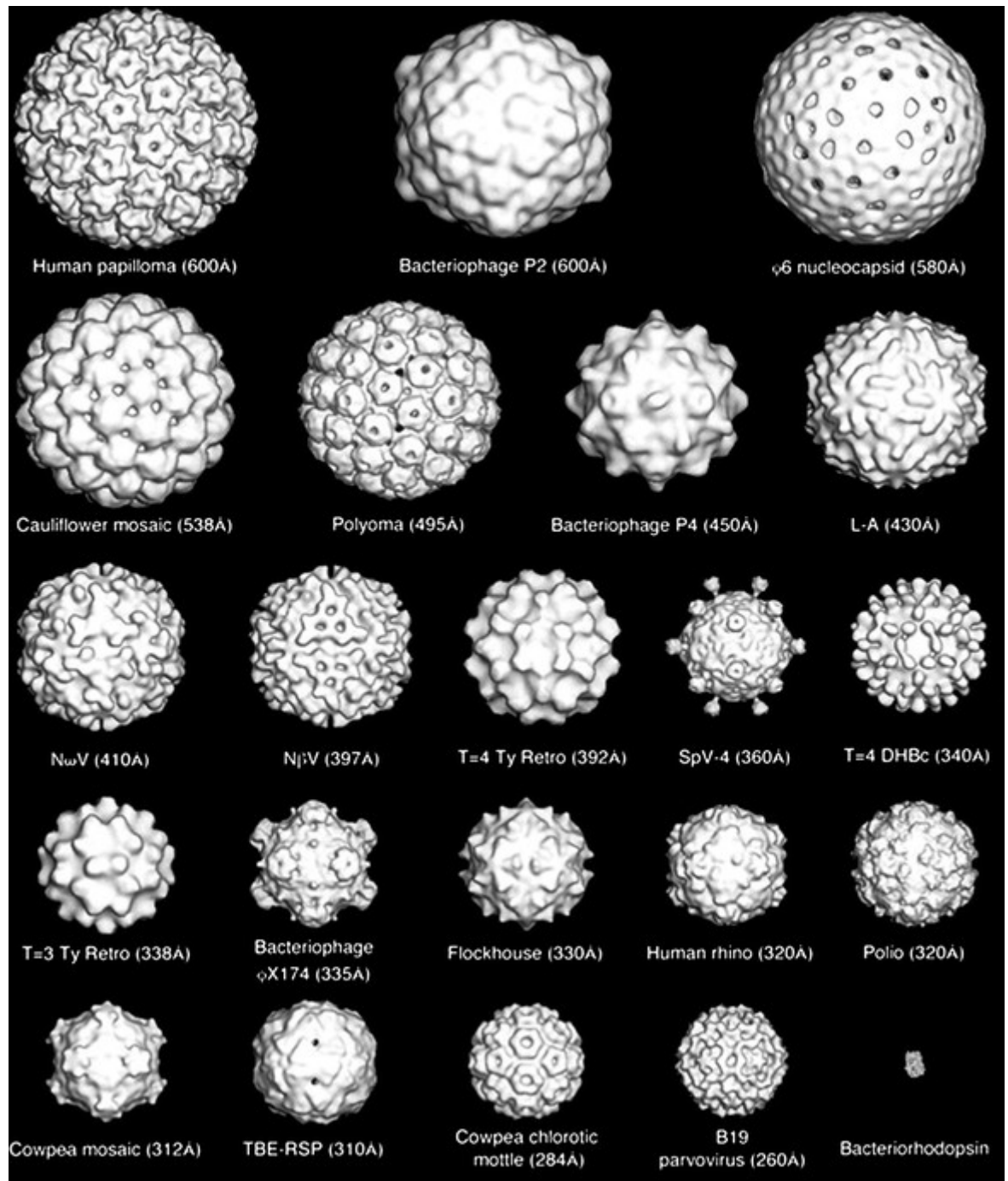
Tècniques alternatives: Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)



Tècniques alternatives:
Microscopia Electrònica (ME)



Tècniques alternatives:
Crio-microscopia (Crio-ME)



Tècniques alternatives: XFEL

