

CRISTAL·LOGRAFIA DE PROTEÏNES

ALÍCIA GUASCH, NÚRIA VERDAGUER, F. XAVIER GOMIS-RÜTH, IGNASI FITA I MIQUEL COLL

Institut de Biologia Molecular de Barcelona. CSIC

Jordi Girona, 18. 08034 Barcelona.

SUMMARY

X-ray diffraction applied to protein crystals allows the determination of the atom positions to approximately 2 Å resolution and the observation of the polypeptide fold. In the structure resolution process there are two critical steps, the growth of protein crystals and the determination of the phases. With the help of molecular biology in the first case and new synchrotron facilities in the second, protein crystallography is a booming area of research.

RESUM

L'aplicació de la difracció de raigs X als cristalls de proteïna permet la determinació de les posicions atòmiques amb una resolució aproximada de 2 Å i l'observació del plegament de la cadena polipeptídica. Dins del procés de resolució d'una estructura, hi ha dues etapes determinants, l'obtenció de cristalls de proteïna i la determinació de les fases. Amb l'ajut de la biologia molecular en el primer cas i l'ús dels sincrotrons en el segon, la cristal·lografia de proteïnes està experimentant una explosió sense precedents

DIFRACCIÓ DE RAIGS X I BIOLOGIA

Les aplicacions dels raigs X en el camp de la biologia han avançat espectacularment des del seu començament, tot i que la gran quantitat d'objectes potencials d'estudi fa que, a hores d'ara, la immensa majoria d'aquests romanguí sense ésser caracteritzats

des del punt de vista atòmic. Durant les quatre dècades que han seguit a la determinació de les primeres estructures, com són la del DNA (Watson i Crick, 1953), la mioglobina per John Kendrew el 1958 (Kendrew *et al.*, 1960) i l'hemoglobina analitzada per Max Perutz durant quasi bé trenta anys (Perutz *et al.*, 1960), les tècniques de difracció de raigs X s'han anat aplicant a una selecció diversa de problemes interessants, lentament als inicis i de manera exponencial els darrers anys. Els resultats obtinguts han establert molts principis bàsics tant de l'estructura de macromolècules com de la bioquímica i la biofísica dels processos biològics.

El gran nombre d'estructures resoltes, cada cop més complicades, es deu sobretot a dues coses: una és la tecnologia del DNA recombinant, l'altra són els sincrotrons. La primera permet obtenir quantitats adients de qualsevol proteïna, malgrat que sigui molt minoritària a la cel·la. A més, es pot modificar la proteïna al nostre gust per tal que cristal·litzi, per exemple, expressant només un domini. També es pot modificar la proteïna amb l'objectiu que es pugui resoldre la seva estructura amb facilitat, per exemple, substituint alguns residus per altres que continguin àtoms pesants. D'altra banda, els sincrotrons, que produeixen radiació X d'altíssima intensitat i de longitud d'ona a la carta, permeten recollir dades de difracció a alta resolució de proteïnes o ensamblatges de proteïnes de gran pes molecular, inclosos els virus. Són màquines costoses, que de vegades necessiten l'esforç econòmic de molts països –com és el cas de l'ESRF, a Grenoble– però amb una demanda d'usuaris tal que no la poden cobrir. I la demanda anirà creixent.

Hi ha un altre aspecte de l'aliança entre la cristal·lografia i les tècniques del DNA recombinant que resulta d'aplicar aquestes últimes, no ja per resoldre les estructures, sinó per modificar les proteïnes un cop co-

neixem la seva estructura en detall. Així podem canviar les seves característiques i, fins i tot, la seva funció. Això, òbviament, té aplicacions biotecnològiques o industrials. En aquest terreny també hi ha el disseny de fàrmacs basat en el coneixement de l'estructura tridimensional. No és una visió de futur, s'està fent ja i amb èxit. El cas més espectacular ha estat el disseny de fàrmacs contra la proteasa aspàrtica de l'HIV, utilitzats ara en els famosos còctels contra el virus de la SIDA. Aquesta proteïna és ara mateix la més estudiada per difracció de raigs X: s'han fet prop de mil estructures de complexos amb inhibidors diferents, gairebé totes en companyies farmacèutiques, encara que l'estructura inicial de la proteasa es va resoldre en un centre públic (Wlodawer *et al.*, 1989).

Els raigs X no són l'única eina per estudiar l'estructura molecular –i en aquest llibre se'n descriuen d'altres–, però la física de la seva difracció fa que sigui la tècnica més important, ara per ara, per investigar estructures biològiques a resolució atòmica. En efecte, les estructures resoltes per raigs X tenen un gran impacte perquè poden donar una visió a la vegada global i increïblement detallada de sistemes molt complexos.

FONAMENTS DE LA DIFRACCIÓ

Els principis fonamentals de la difracció, en particular de la difracció de raigs X, estan molt ben definits (figura 1). En una situació ideal, la imatge de difracció (F) d'un objecte pot obtenir-se com la transformada de Fourier (F) de la densitat electrònica (ρ) de l'objecte

$$F(\mathbf{S}) = \mathbf{F}[\rho(\mathbf{r})]$$

on \mathbf{S} es relaciona amb la direcció de difracció i \mathbf{r} indica un punt de l'objecte. Si disposem de la imatge de difracció completa, és possible calcular la distribució de la densitat

electrònica en l'objecte mitjançant la transformada de Fourier inversa (F^{-1})

$$\rho(\mathbf{r}) = F^{-1}[F(\mathbf{S})]$$

Conèixer totalment una imatge de difracció implica conèixer la intensitat i la fase de la radiació difractada en totes les direccions. La intensitat és proporcional al nombre de fotons dispersats en cada direcció. La fase es relaciona amb la disposició relativa de les ones difractades en les diferents direccions. A la majoria dels experiments de difracció només es poden mesurar les intensitats però, en general, es perd totalment la informació relativa a les fases. Aquesta pèrdua d'informació és la principal dificultat amb què s'entrebanquen les tècniques de difracció, i es coneix com el «problema de la fase».

En les tècniques de microscòpia, el problema de la fase es resol experimentalment mitjançant la utilització de lents (òptiques o electromagnètiques segons es tracti d'aparells que treballin amb llum, com són els microscopis òptics, o bé amb electrons, com els microscopis electrònics) que realitzen físicament el procés equivalent a la transformada de Fourier inversa (figura 1). Amb tot, pel que fa als raigs X, no ha estat possible encara construir lents eficients i, per tant, no existeixen microscopis d'alta resolució de raigs X. La impossibilitat de superar experimentalment de manera directa el «problema de la fase» quan s'utilitzen raigs X ha obligat a cercar, per a cada tipus de problema, una solució concreta.

Quan l'objecte que difracta té una organització interna que es repeteix periòdicament (com és el cas dels cristalls moleculars)

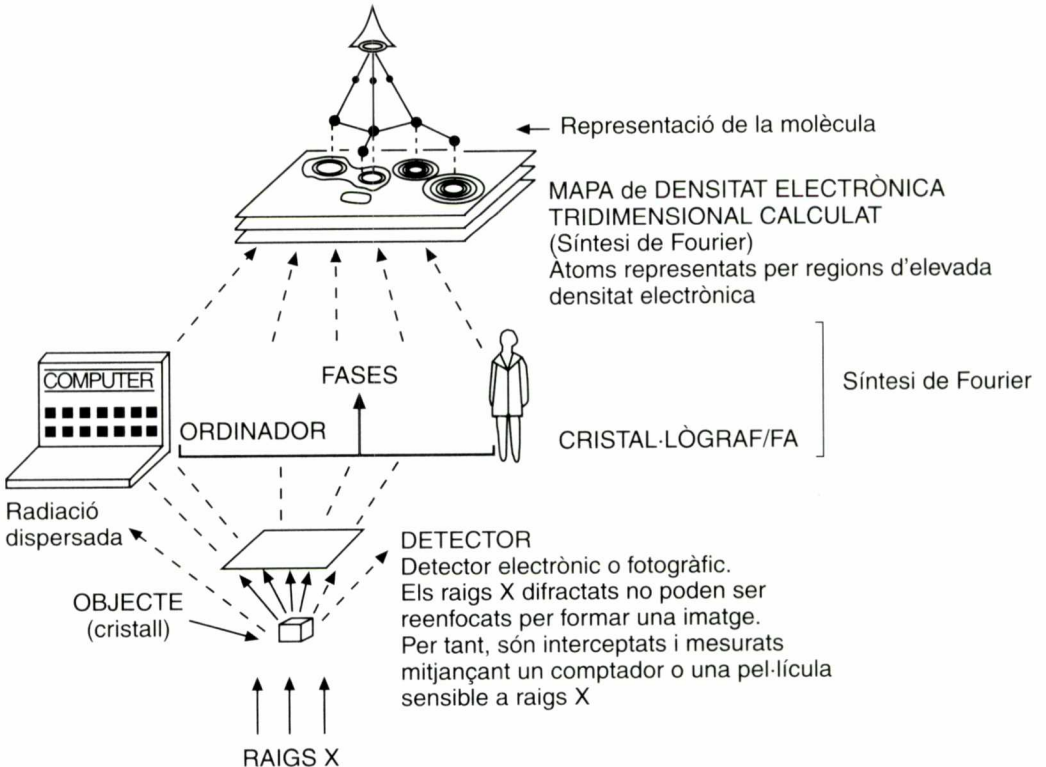


FIGURA 1. Esquema del procés de la difracció de raigs X.

la radiació difractada solament és distinta de zero en determinades direccions, anomenades reflexions (figura 2, annex 1). La separació entre reflexions contigües és inversament proporcional a la periodicitat en el cristall: les grans macromolècules tenen periodicitats de diversos centenars d'àngstroms i, per tant, la imatge de difracció pot ésser de milers o centenars de milers de reflexions molt properes entre si.

La determinació de l'estructura tridimensional d'una molècula biològica, mitjançant la cristal·lografia de proteïnes, segueix una seqüència d'etapes experimentals i analítiques molt ben establertes: *a)* obtenir cristalls de la macromolècula adequats per a estudis d'alta resolució; *b)* mesurar les intensitats de les reflexions d'aquests cristalls; *c)* determinar-ne les fases corresponents; *d)* construir un model atòmic que s'ajusti al mapa de densitat electrònica experimental; i *e)* afinar el model optimitzant l'acord amb les dades experimentals. Malgrat tots els progressos, la determinació de l'estructura d'una macromolècula presenta sovint reptes difícilment superables, principalment a les etapes de cristal·lització i determinació de les fases.

a) Cristal·lització. L'obtenció de cristalls és un procés empíric; l'experiència acumulada proporciona indicacions cada cop més útils, però continuen essent necessaris un gran nombre d'assaigs en els quals la sensibilitat de l'investigador té un paper molt important. Les tècniques de purificació i obtenció de biomacromolècules han experimentat un gran desenvolupament, la qual cosa ha facilitat o ha permès l'obtenció de mostres molt pures en les quantitats (desenes de mil·ligrams) que es requereixen per endegar els intents de cristal·lització. En l'apartat de la cristal·lització cal incloure també la preparació de cristalls isomorfs als de la proteïna nativa però en els quals s'han introduït metalls pesants, necessaris en al-

gunes de les tècniques més emprades per resoldre el problema de la fase.

b) La mesura de la intensitat difractada és força directa en molts casos; pot estar al límit de la tecnologia en casos extrems. Un problema tipus pot donar lloc a poques desenes de milers de reflexions amb una precisió tan bona com un 2-3% i, en general, no per sota d'un 6-8%. Tant els detectors com la font de radiació són importants. Pràcticament tots els detectors actualment en ús són detectors d'àrea i els més utilitzats són del tipus de placa d'imatges i els CCD. La intensa radiació de sincrotró, en particular pel que fa als sincrotrons de tercera generació, està permetent recollir dades de raigs X que abans eren impensables amb generadors convencionals.

c) La determinació de la fase és un dels aspectes que fins ara han diferenciat qualitativament la cristal·lografia de macromolècules de la de petites molècules. Les tècniques utilitzades més sovint per resoldre el problema de la fase en cristal·lografia de macromolècules són: *a)* el reemplaçament isomorf, *b)* el reemplaçament molecular i *c)* les tècniques de difracció anòmala. En el reemplaçament isomorf és necessari disposar de dades de difracció, no solament dels cristalls nadius sinó també de cristalls en els quals s'hagi introduït una petita quantitat d'àtoms pesants. Les diferències entre els espectres dels cristalls nadius i els derivats, un cop localitzats els àtoms pesants, ens donen informació sobre les fases de les diferents reflexions. Quan la molècula que s'estudia està relacionada amb una altra d'estructura ja coneguda, poden utilitzar-se les tècniques de reemplaçament molecular. Finalment, cal comentar que les tècniques de difracció anòmala són cada cop més importants gràcies a les possibilitats que està oferint la radiació de sincrotró.

d) La interpretació dels mapes de densitat electrònica per construir un model molecular depèn de la resolució disponible i de la precisió en la determinació de les intensitats

i, sobretot, de les fases. Els sistemes gràfics i els programes de modelatge sofisticats, com són els O i FRODO (Jones, 1985), faciliten molt la interpretació dels mapes i la construcció dels models inicials. El concepte de resolució és molt important. Si les fases són molt bones, la cadena polipeptídica pot seguir-se a una resolució d'aproximadament 3,5 Å. Amb una resolució d'aproximadament 1,2 Å els àtoms s'individualitzen. Les resolucions amb les quals es treballa en macromolècules oscil·len, en general, entre 2 i 3 Å.

e) En l'optimització dels models moleculars en cristal·lografia de macromolècules les principals dificultats vénen donades pel reduït nombre de reflexions respecte al nombre de paràmetres que es necessiten per descriure, en l'àmbit atòmic, una macromolècula. Per tal de superar aquesta situació existeixen dues alternatives extremes: a) reduir el nombre de paràmetres independents que s'utilitzen per descriure l'estructura, o b) augmentar el nombre de dades disponibles amb informació addicional sobre l'estructura. Altres alternatives es deriven, naturalment, de la combinació d'aquestes dues alternatives extremes. El procés d'afinament és un dels aspectes en els quals s'ha treballat més en els darrers anys, donat que: a) no s'ha assolit l'afinament total de pràcticament cap estructura molecular pel fet que el desacord obtingut entre els millors models afinats i les dades de difracció ha estat sempre superior a l'error experimental en les dades, i b) bona part de la informació que es vol obtenir en plantejar la determinació d'una estructura només apareix quan es disposa de models moleculars ben afinats.

ESTRUCTURES RELLEVANTS EN L'ÀMBIT INTERNACIONAL

En el camp dels enzims les primeres estructures cristal·logràfiques descrites a fi-

nals dels anys seixanta i començaments dels setanta del lisozim (Blake *et al.*, 1965), la ribonucleasa (Kartha *et al.*, 1967), la carboxipeptidasa A (Lipscomb *et al.*, 1968), l' α -quimotripsina (Matthews *et al.*, 1967), la papaïna (Drenth *et al.*, 1968), la subtilisina (Wright *et al.*, 1969), l'elastasa (Shotton i Watson, 1970) i la tripsina (Stroud *et al.*, 1972) van ser cabdals per entendre els seus mecanismes d'acció.

La immunologia és un altre àmbit on la cristal·lografia ha fet una contribució decisiva. Les estructures de fragments d'anticossos i els seus complexos amb antigens proteics han permès explicar moltes característiques de la defensa immunològica. Destaca especialment l'impacte dels resultats estructurals de les molècules presentadores de pèptids a la superfície cel·lular, ja que van proporcionar les bases per a la immunologia molecular (Poljak, 1975).

Els virus constitueixen l'àrea de la cristal·lografia de raigs X en què s'han analitzat les estructures més grans, ja que estan formats per un elevat nombre de còpies relacionades per simetria interna d'una mateixa entitat bàsica i més petita, asimètrica. Les primeres estructures víriques a alta resolució es van determinar a finals dels anys setanta (Champness *et al.*, 1976; Olson *et al.*, 1983). D'aquests conglomerats macromoleculars destaca el virus associat a tumors en els simis, l'SV40 (fig. 3c, annex 1), que representa l'estructura simètrica més voluminosa de les analitzades fins ara, amb 900.000 àtoms ordenats (sense tenir en compte els àtoms d'hidrogen) (Liddington *et al.*, 1991). Un altre cas paradigmàtic són les estructures de les proteïnes que constitueixen la càpsida del virus de la grip humana, ja que van demostrar com els virus poden enganyar el sistema immunitari (Rossmann *et al.*, 1985); aquest concepte es va estendre més tard en el cas del virus del refredat, que mostra com el lloc d'unió al receptor està protegit.

Una visió espectacular del mecanisme fotoquímic de conversió energètica ha estat proveïda per l'estructura del centre de reacció fotosintètic bacterià (figura 3a, annex 1, Deisenhofer *et al.*, 1985). La cristal·lització d'aquesta proteïna integral de membrana va representar una fita històrica per si mateixa, que recentment ha estat acompanyada amb la resolució d'altres proteïnes integrals de membrana, com són el citocrom C oxidasa (figura 3f; Iwata *et al.*, 1995), que és un complex multimodular que redueix l'oxigen molecular a aigua en el darrer pas del metabolisme de nutrients, i la porina (Weiss *et al.*, 1991). El centre de reacció fotosintètic va suposar fins fa poc l'estructura asimètrica més gran resolta per cristal·lografia, amb 10.288 àtoms (sense considerar els hidrògens), fins que va ésser rellevada d'aquesta posició en el podi primer per la β -galactosidasa (figura 3, annex 1), amb 1.023 aminoàcids (Jacobson *et al.*, 1994), i molt recentment pel proteosoma eucariòtic (figura 3d, annex 1), amb 2×24.444 àtoms (Groll *et al.*, 1997). Aquest és un complex proteolític intracel·lular involucrat en el processat d'antígens intracel·lulars que provoquen respostes immunològiques citolítiques.

Altres proteïnes resoltes per cristal·lografia de raigs X són les que intervenen en la unió i el reconeixement dels àcids nucleics, com les polimerases (Joyce i Steitz, 1994; Ollis *et al.*, 1985) o les aminoacil t-RNA sintetases (Cavarelli *et al.*, 1993), que conjuntament amb l'estructura del t-RNA van permetre «veure» com es «llegeix» el codi genètic en les operacions de la replicació, la transcripció i la traducció. L'estructura de la transcriptasa reversa (figura 3b, annex 1), una DNA polimerasa dependent de RNA, que és utilitzada, per exemple, pel virus de la SIDA per integrar-se en el genoma de la cèl·lula hoste, va ser molt útil per al disseny d'inhibidors destinats a millorar el tractament d'aquesta malaltia (Kohlstaedt *et al.*,

1992). En aquest camp relacionat amb malalties, també cal mencionar l'estructura dels productes gènics dels oncògens *ras* i *p53*, entre altres, associats al desenvolupament de diversos tipus de càncer (de Voss *et al.*, 1988), i el factor de transcripció NF κ B, un homodímer de 50 kDa que reacciona davant de processos de fosforilació en el citoplasma translocant-se al nucli, on activa gens (Ghosh *et al.*, 1995).

Finalment, ressaltem algunes altres estructures que han representat fites des del punt de vista metodològic i bioquímic, com són el subfragment 1 de la miosina, responsable de la generació de força en el múscul (Rayment *et al.*, 1993); la F1 ATPasa, un heteroheptàmer que té un paper central en el metabolisme energètic, i converteix gradients de protons en molècules d'ATP (Abrahams *et al.*, 1994); el complex ciclina A-CDK2, responsable de la coordinació de la divisió en el cicle cel·lular (Jeffrey *et al.*, 1995); i el nucleosoma (Luger *et al.*, 1997).

ESTRUCTURES REPRESENTATIVES RESOLTES A BARCELONA

Anticossos

La cristal·lografia de complexos d'antígens virals i anticossos està proporcionant una millor comprensió de com els virus són reconeguts pels anticossos i dels mecanismes pels quals aquests virus escapen a la pressió immune. En aquesta línia, s'ha dut a terme la cristal·lització i la determinació de l'estructura de diferents complexos entre anticossos neutralitzants dirigits contra membres de la família dels picornavirus i els pèptids sintètics que simulen els llocs antigènics d'aquests virus (Tormo *et al.*, 1994; Verdaguer *et al.*, 1996; Hewat *et al.*, 1997). La possibilitat de combinar les tècniques de cristal·lografia de raigs X i criomicroscòpia

ha permès d'obtenir informació estructural de complexos sencers virus-anticòs des del punt de vista de la resolució quasi atòmica. Aquests grans complexos macromoleculars són molt inestables i, per tant, difícilment cristal·litzables. L'aplicació d'aquestes tècniques combinades als nostres complexos ha permès d'esbrinar els mecanismes de neutralització utilitzats per aquests anticosos (figura 4a, annex 1).

Catalases

La catalasa (peròxid d'hidrogen oxidoreductasa, EC1.11.1.6) es troba en tots els organismes aerobis. Aquest enzim serveix, en part, per protegir la cèl·lula dels efectes tòxics de petits peròxids, encara que la totalitat de les seves funcions biològiques no són del tot clares. Es coneixen dos tipus diferents de catalases: les que contenen Mn^{2+} com a grup prostètic i les que contenen el grup hemo. Les catalases que contenen Mn^{2+} es presenten només en alguns organismes procariotes i són enzims hexamèrics amb un plegament en hèlix α . Les catalases que contenen el grup hemo són presents a la major part d'organismes procariotes i eucariotes i presenten una estructura d'homotetràmers amb uns pesos moleculars entre 200 i 350 kD. La catalasa hidroxiperoxidasa II (HPH) (Bravo *et al.*, 1995) d'*Escherichia coli* pertany a aquest darrer grup. Els tetràmers d'aquesta catalasa presenten una acurada simetria molecular (figura 4b, annex 1).

Glutatió S-transferasa

S'ha resolt l'estructura del glutatió S-transferasa classe Pi de fetge de ratolí, tant de la proteïna lliure modificada com de la proteïna complexada amb diferents inhibidors i anàlegs de substrat. Les GST són enzims desintoxicadors que catalitzen l'atac nucleofílic de l'àtom de sofre del glutatió al

grup electrofílic d'un ampli ventall de substrats tòxics de tipus hidrofòbic, incloent-hi els carcinogènics i altres substàncies xenobiòtiques. Endemés, aquests enzims estan implicats en el transport intracel·lular i en l'emmagatzemament de molècules hidrofòbiques del tipus haematina, sals biliars i bilirubina.

La GST classe Pi de ratolí és un dímer de 47 kD de pes molecular. El centre actiu de les GST presenta dues zones d'unió al substrat, l'anomenat subsetí G d'unió al glutatió i el subsetí H d'unió al compost hidrofòbic. S'han descrit cinc classes diferents de GST solubles de mamífer i se'n coneix l'estructura tridimensional de cadascuna, i s'observen clares diferències en el centre actiu i especialment en el subsetí hidrofòbic. La Tyr7 del centre actiu és l'únic residu que està prou a prop de l'àtom de sofre del glutatió, i per tant s'ha postulat que actuaria com a base general, encara que estudis recents ens fan pensar que això no és cert (figura 4d, annex 1).

En el grup s'han determinat diferents estructures de GST amb hexilglutatió a 2,2 Å, àcid glutatió sulfònic a 1,9 Å, s-(p-nitrobenzil)glutatió a 1,8 Å (García-Sáez *et al.*, 1994) i glutatió a 2,4 Å que han permès l'observació de les interaccions que tenen lloc en el centre actiu de l'enzim, especialment en el setí hidrofòbic.

Per raó de l'elevada afinitat de l'enzim pel glutatió i del fet que aquest es purifiqui amb columnes d'afinitat amb glutatió, és difícil l'obtenció de cristalls d'enzim lliure. Però aquests es poden obtenir modificant la Cys47. La modificació química de la Cys47 porta a la inactivació de l'enzim. En l'estructura tridimensional s'observa que la Cys47 està a 12 Å del centre actiu, situada en una zona helicoidal. En l'estructura de la GST amb la Cys47 carboxi metilada, s'observa que la zona on es troba el residu modificat està desordenada. Aquesta zona inclou resi-

des que participen en la unió del glutatió. Quan l'enzim carboxi metilat se l'uneix amb s-(p-nitrobenzil)glutatió en el centre actiu, observem una reestructuració de la zona on es troba situada la Cys-47. La unió del substrat indueix l'estructuració del centre actiu (Vega *et al.*, 1998).

Proteïnes de transducció de senyal en bacteris

Una altra de les línies d'investigació del laboratori està centrada en les proteïnes bacterianes implicades en sistemes de transducció de senyal. Aquestes proteïnes tenen una elevada homologia de seqüència en el domini fosforilable.

La CheY (figura 4c, annex 1) és una proteïna reguladora de resposta en els sistemes de transducció de senyal de la quimiotàxia bacteriana, i s'activa amb la transferència d'un grup fosfat que li proporciona la component quinasa CheA, la qual està en contacte amb els receptors de membrana. Per a la transferència d'aquest grup fosfat cal la presència del catió Mg^{2+} . S'ha suggerit que l'activació de la proteïna CheY consisteix en un canvi conformacional en punts de la seva superfície que s'ha demostrat que interaccuen amb la base del motor flagel·lar. L'estructura tridimensional de la proteïna unida al cofactor magnesi mostra canvis conformacionals en aquests punts quan es compara amb l'estructura de l'apoproteïna (Bellsolell *et al.*, 1994, 1996).

La proteïna PhoB és el component regulador d'un sistema de transducció de senyal de dos components, és activada per la quinasa PhoR i actua com un factor de transcripció que activa gens relacionats amb el transport i l'assimilació del fosfat. En el laboratori s'ha clonat, expressat, purificat, cristal·litzat i resolt l'estructura tridimensional de la proteïna PhoB, utilitzant la tècnica de MAD.

CONCLUSIÓ I PERSPECTIVA

Tot fa pensar que el creixement exponencial d'estructures resoltes per difracció de raigs X no s'aturarà en els propers anys. Els avenços en l'instrumental han estat molt grans i són responsables, en part, del boom estructural actual. També ho seran en el futur pròxim. Hem mencionat la radiació de sincrotró. Ara s'estan construint sincrotrons de tercera generació, amb multitud de línies de llum dedicades a la cristal·lografia de proteïnes. Cal també mencionar els detectors de raigs X d'àrea, que disminueixen notablement el temps necessari per a la presa de dades; les tècniques de criocristal·lografia, que s'estan generalitzant i que permeten conservar els cristalls malgrat que estiguin sotmesos a una radiació molt intensa; les estacions gràfiques i els ordinadors paral·lels cada cop més potents, que acceleren el procés de determinació i afina ment de les estructures.

Els avenços en els mètodes de determinació estructural van en paral·lel amb els avenços tecnològics. Així passa, per exemple, amb l'avenç metodològic més important dels últims anys i que està revolucionant la forma com es resolen les estructures: la difracció anòmala de longitud d'ones múltiples (MAD). Aquest mètode requereix ajustar la longitud d'ona de la radiació sincrotrònica, donat que s'ha de repetir la recollida de dades a diverses longituds d'ona. Amb onduldors insertats en el recorregut dels electrons (o positrons) en els túnels del sincrotró és possible variar la longitud d'ona sense perdre la intensitat desitjada. El mètode MAD també va lligat a la criocristal·lografia. La congelació dels cristalls fa possible recollir totes les dades, durant diversos dies, amb un sol espècimen, cosa que obvia els problemes de no-isomorfisme entre els diferents conjunts de dades.

Altres avenços metodològics, encara que

no són tan impactants com el MAD, no deixen de ser notables: les millors en els mètodes d'afinament d'estructures, en els mètodes de reemplaçament molecular i en els programes d'ajust gràfic, cada cop més automàtics.

No és previsible que als cristal·lògrafs se'ls acabi el material per estudiar en els propers anys. Més aviat al contrari. Només el projecte del genoma humà ajudarà a definir més de 100.000 gens. Els productes gènics seran motiu d'estudi funcional i estructural. Això sense comptar tota la resta d'éssers vius amb variants interessants de les mateixes proteïnes o altres de diferents.

En el terreny biotecnològic la cristal·lografia de proteïnes tindrà un paper creixent en el futur. Avui dia, les companyies químiques i farmacèutiques més importants del món tenen grups de cristal·lografia de proteïnes. De moment, a les empreses catalanes o espanyoles d'aquests sectors no n'hi ha cap –encara que sí que tenen equips de modelatge molecular–, potser a causa de la primesa dels departaments de recerca a les empreses del nostre país. Però tard o d'hora la situació haurà de canviar si es vol innovar i competir.

El futur de la cristal·lografia també ens depararà la determinació d'estructures cada cop més complexes, sobretot d'agregats moleculars. En aquest sentit interaccionarà cada cop més amb la microscòpia electrònica. Els models de criomicroscòpia electrònica poden servir com a models inicials per a la determinació d'estructures atòmiques per a raigs X. També la microscòpia electrònica dels cristalls pot permetre la localització de la partícula o molècula dins de la cel·la cristal·lina. Els grans agregats moleculars com el proteosoma (Groll *et al.*, 1997), la proteïna de plegament GroEL (Braig *et al.*, 1994) o els virus icosaèdrics (Abad-Zapatero *et al.*, 1980; Harrison *et al.*, 1980; Rossmann *et al.*, 1985) s'han pogut solucionar a alta resolució i per raigs X gràcies al fet que

posseeixen una alta simetria interna o local. Altres agregats moleculars, com per exemple el ribosoma, no tenen pas simetria interna. Ara per ara no sabem si la seva determinació per raigs X serà possible, en tot cas hi ha cristal·lògrafs que ho estan intentant.

REFERÈNCIES

- ABAD-ZAPATERO, C.; ABDEL-MEGUID, S. S.; JOHNSON, J. E.; LESLIE, A. G. W.; RAYMENT, Y.; ROSSMANN, M. G.; SUCK, D.; TSUKIHARA, T. (1980). «Structure of southern bean mosaic virus at 2.8 Å resolution». *Nature*, núm. 286, pàg. 33-39.
- ABRAHAMS, J. P.; LESLIE, A. G. W.; LUTTER, R.; WALKER, J. E. (1994). «Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria». *Nature*, núm. 370, pàg. 621-628.
- BELLSOLELL, L.; CRONET, P.; MAJOLERO, M.; SERRANO, L.; COLL, M. (1996). «The three-dimensional structure of two mutants of the signal transduction protein Che Y suggests its molecular activation mechanism». *J. Mol. Biol.*, núm. 257, pàg. 116-128.
- BELLSOLELL, L.; PRIETO, J.; SERRANO, L.; COLL, M. (1994). «Magnesium binding to the bacterial chemotaxis protein Che Y results in large conformational changes involving its functional surface». *J. Mol. Biol.*, núm. 238, pàg. 489-495.
- BLAKE, C. C.; KOENIG, D. F.; MAIR, G. A.; NORTH, A. C.; PHILLIPS, D. C.; SARMA, V. C. (1965). «Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution». *Nature*, núm. 206, pàg. 757-761.
- BRAIG, K.; OTWINOWSKI, Z.; HEDGE, R.; BOISVERT, D. C.; JOACHIMIAK, A.; HORWICH, A. L.; SIGLER, P. B. (1994). «The crystal structure of bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å». *Nature*, núm. 371, pàg. 578-586.
- BRAVO, J.; VERDAGUER, N.; TORMO, J.; BETZEL, C.; SWITALA, J.; LOEWEN, P. C.; FITA, I. (1995). «Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*». *Structure*, núm. 3, pàg. 491-502.
- CAVARELLI, J.; REES, B.; RUFF, B.; THIERRY, J.-C.; MORAS, D. (1993). «Yeast tRNA^{Asp} recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase». *Nature*, núm. 362, pàg. 181-184.
- CHAMPNESS, J. N.; BLOOMER, A. C.; BRICOGNE, G.; BUTLER, P. G.; KLUG, A. (1976). «The structure of the protein disk of tobacco mosaic virus to 5 Å resolution». *Nature*, núm. 259, pàg. 20-24.
- DE VOS, A. M.; TONG, L.; MILBURN, M. V.; MATIAS, P. M.; JANCARIK, J.; NOGUCHI, S.; NISHIMURA, S.; MIURA, K.

- OHTSUKA, E.; KIM, S.-H. (1988). «Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21». *Science*, núm. 239, pàg. 888-893.
- DEISENHOFER, J.; EPP, O.; MIKI, K.; HUBER, R.; MICHEL, H. (1985). «Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution». *Nature*, núm. 318, pàg. 618-624.
- DRENTH, J.; JANSONIUS, J. N.; KOEKOEK, R.; SWEN, H. M.; WOLTERS, B. G. (1968). «Structure of papain». *Nature*, núm. 218, pàg. 929-932.
- GARCÍA-SÁEZ, I.; PÁRRAGA, A.; PHILLIPS, M. F.; MANTLE, T. J.; COLL, M. (1994). «Molecular structure at 1.8 Å of mouse liver class Pi glutathione S-transferase complexed with S-(p-nitrobenzyl)glutathione and other inhibitors». *J. Mol. Biol.*, núm. 237, pàg. 298-314.
- GHOSH, G.; VAN DUYN, C.; GHOSH, S.; SIGLER, P. B. (1995). «Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site». *Nature*, núm. 373, pàg. 303-310.
- GROLL, M.; DITZEL, L.; LÖWE, J.; STOCK, D.; BOCHTLER, M.; BARTUNIK, H. D.; HUBER, R. (1997). «Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution». *Nature*, núm. 386, pàg. 463-471.
- HEWAT, E. A.; VERDAGUER, N.; FITA, I.; BLAKEMORE, W.; BROOKES, S.; KING, A.; NEWMAN, J.; DOMINGO, E.; MATEU, M. G.; STUART, D. (1997). «Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop». *EMBO J.*, núm. 16, pàg. 1492-1500.
- IWATA, S.; OSTERMEIER, C.; LUDWIG, B.; MICHEL, H. (1995). «Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*». *Nature*, núm. 376, pàg. 660-669.
- JACOBSON, R. H.; ZHANG, X.-J.; DUBOSE, R. F.; MATTHEWS, B. W. (1994). «Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*». *Nature*, núm. 369, pàg. 761-766.
- JEFFREY, P. D.; RUSSO, A. A.; POLYAK, K.; GIBBS, E.; HURWITZ, J.; MASSAGUÉ, J.; PAVLETICH, N. P. (1995). «Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA – CDK2 complex». *Nature*, núm. 376, pàg. 313-320.
- JONES, T. A. (1985). «Interactive computer graphics: FRODO». *Methods Enzymol.*, núm. 115, pàg. 157-171.
- JOYCE, C. M.; STEITZ, T. A.; (1994). «Function and structure relationships in DNA polymerases». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 63, pàg. 777-822.
- KARTHA, G.; BELLO, J.; HARKER, D. (1967). «Tertiary structure of ribonuclease». *Nature*, núm. 213, pàg. 862-865.
- KENDREW, J. C.; DICKERSON, R. E.; STRANDBERG, B. E.; HART, R. J.; DAVIES, D. R.; PHILLIPS, D. C.; SHORE, D. C. (1960). «Structure of myoglobin». *Nature*, núm. 185, pàg. 422-427.
- KOHLSTAEDT, L. A.; WANG, J.; FRIEDMAN, J. M.; RICE, P. A.; STEITZ, T. A. (1992). «Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor». *Science*, núm. 256, pàg. 1783-1790.
- LIDDINGTON, R. C.; YAN, Y.; MOULAI, J.; SAHLI, R.; BENJAMIN, T. L.; HARRISON, S. C. (1991). «Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution». *Nature*, núm. 354, pàg. 278-284.
- LIPSCOMB, W. N.; HARTSUCK, J. A.; REEKE, G. N. JR.; QUIOCHO, F. A.; BETHGE, P. H.; LUDWIG, M. L.; STEITZ, T. A.; MUIRHEAD, H.; COPPOLA, J. C. (1968). «The structure of carboxypeptidase A. VII. The 2.0-Å resolution studies of the enzyme and of its complex with glycyltyrosine, and mechanistic deductions». *Brookhaven Symposia in Biology*, núm. 21, pàg. 24-90.
- LUGER, K.; MÄDER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J.; (1997). «Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution». *Nature*, núm. 389, pàg. 251-260.
- MATTHEWS, B. W.; SIGLER, P. B.; HENDERSON, R.; BLOW, D. M. (1967). «Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin». *Nature*, núm. 214, pàg. 652-656.
- OLLIS, D. L.; BRICK, P.; HAMLIN, R.; XUONG, N. G.; STEITZ, T. A. (1985). «Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP». *Nature*, núm. 313, pàg. 762-766.
- OLSON, A. J.; BRICOGNE, G.; HARRISON, S. C. (1983). «Structure of tomato bushy stunt virus IV. The virus particle at 2.9 Å resolution». *J. Mol. Biol.*, núm. 171, pàg. 61-93.
- PERUTZ, M. F.; ROSSMANN, M. G.; CULLIS, A. F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G.; NORTH, A. C. T. (1960). «Structure of haemoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by x-ray analysis». *Nature*, núm. 185, pàg. 416-422.
- POLJAK, R. J. (1975). «Three-dimensional structure, function and genetic control of immunoglobulins». *Nature*, núm. 256, pàg. 373-376.
- RAYMENT, I.; RYPNIEWSKI, W. R.; SCHMIDT-BÄSE, K.; SMITH, R.; TOMCHICK, D. R.; BENNING, M. M.; WINKELMANN, D. A.; WESENBERG, G.; HOLDEN, H. M. (1993). «Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor». *Science*, núm. 261, pàg. 50-58.
- ROSSMANN, M. G.; ARNOLD, E.; ERICKSSON, J. W.; FRANKENBERGER, E. A.; GRIFFITH, J. P.; HECHT, H. J.; JOHNSON, J. E.; KAMER, G.; LUO, M.; MOSSER, A. G.; RUECKERT, R. R.; SHERRY, B.; VRIEND, G. (1985). «Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses». *Nature*, núm. 317, pàg. 145-153.
- SHOTTON, D. M.; WATSON, H. C. (1970). «Three-dimen-

- sional structure of tosyl-elastase». *Nature*, núm. 225, pàg. 811-816.
- STROUD, R. M.; KAY, L. M.; DICKERSON, R.E. (1972). «The crystal and molecular structure of DIP-inhibited bovine trypsin at 2.7 Å resolution». *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, núm. 36, pàg. 125-140.
- TORMO, J.; BLAAS, D.; PARRY, N. R.; ROWLANDS, D.; STUART, D.; FITA, I. (1994). «Crystal structure of a human rhinoviruses neutralizing antibody complexed with a peptide obtained from virial capsid protein VP2». *EMBO J.*, núm. 13, pàg. 2247-2256.
- VEGA, M. C.; WALSH, S. B.; MANTLE, T. J.; COLL, M. (1998). «The three-dimensional structure of Cys-47-modified mouse liver glutathione S-transferase P1-1». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 2844-2850.
- VERDAGUER, N.; MATEU, M. G.; ANDREU, D.; GIRALT, E.; DOMINGO, E.; FITA, I. (1995). «Crystal structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Ala-Gly-Asp motif in the interaction». *EMBO J.*, núm. 14, pàg. 1690-1696.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. (1953). «Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid.». *Nature*, núm. 171, pàg. 737-738.
- WEISS, M. S.; ABELE, U.; WECKESSER, J.; WELTE, W.; SCHILTZ, E.; SCHULZ, G. E. (1991). «Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin». *Science*, núm. 254, pàg. 1627-1630.
- WLODAWER, A.; MILLER, M.; JASKÓLSKI, M.; SATHYANARAYANA, B. K.; BALDWIN, E.; WEBER, I. T.; SELK, L. M.; CLAWSON, L.; SCHNEIDER, J.; KENT, S. B. H. (1989). «Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease». *Science*, núm. 245, pàg. 616-621.
- WRIGHT, C. S.; ALDEN, R. A.; KRAUT, J. (1969). «Structure of subtilisin BPN' at 2.5 Å resolution». *Nature*, núm. 221, pàg. 235-242.