

CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN MEDIOS DIFUSIVOS¹

Juan Manuel García Ruiz, Fermín Otálora Muñoz

Una técnica imprescindible para comprender el funcionamiento de las macromoléculas biológicas.

La cristalización de grandes moléculas biológicas es un problema de gran dificultad que se aborda utilizando desde las teorías clásicas de crecimiento cristalino hasta las últimas tecnologías de investigación espacial. Su importancia reside en que es el paso ineludible para desvelar la estructura íntima y para comprender el funcionamiento de estas moléculas, protagonistas indudables de la ciencia del siglo XXI.

Cristales de Proteína... ¿Para qué?

El conocimiento de la estructura molecular tridimensional de un compuesto es a menudo la condición *sine qua non* para avanzar en determinadas líneas de investigación, particularmente en ciencia de materiales, química y bioquímica. Durante este siglo, se han ido desarrollando una serie de técnicas espectroscópicas y de difracción para la determinación de la estructura a escala atómica de la materia. Desafortunadamente, conforme aumenta la complejidad de la molécula (en general el número de átomos), la cantidad de información experimental necesaria para elucidar su estructura también aumenta haciendo que, para una determinada técnica, primero se pierda precisión en el cálculo y, posteriormente, se haga imposible

determinar la estructura. Las técnicas basadas en la difracción de los rayos X por monocristales son actualmente las que con más eficacia proporcionan la información necesaria para la determinación de estructuras moleculares, permitiendo el cálculo casi rutinario de la estructura de pequeñas moléculas y siendo las únicas disponibles para abordar la estructura de las grandes macromoléculas biológicas (Figura 1). Para hacernos una idea de esto, basta con echar una ojeada al *Protein Data Bank* (la mayor base de datos de estructuras de macromoléculas biológicas, <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/>): allí hay registradas 8278 estructuras (a fecha de hoy) el 82.1% de las cuales se ha obtenido por difracción de rayos X, el 15.6% por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y el 2.3% han sido propuestas por modelos teóricos.

Hasta aquí las buenas noticias, la mala es que, a partir de un determinado compuesto, no siempre es fácil (o incluso posible) obtener un cristal del tamaño y calidad suficientes para realizar un experimento de difracción de rayos X. ¿Significa esto que hemos cambiado un problema por otro? No, aunque a primera vista así parezca. Los problemas con que tropezamos cuando intentamos cristalizar un compuesto, por descorazonadores que puedan resultar, nunca son debidos a una limitación fundamental irresoluble de la técnica, sino al

¹ http://lec.ugr.es/mundo_cientifico/texto.htm

desconocimiento o la complejidad de la fisicoquímica de las interacciones a escala molecular o al uso de técnicas de cristalización no adecuadas en cada caso concreto.

¿Por qué es tan difícil obtener cristales adecuados de determinados compuestos? Cuando se cristaliza una sustancia, lo que hacemos es favorecer que las moléculas se ordenen en un entramado periódico tridimensional. En esa ordenación juegan fundamentalmente dos procesos consecutivos en el tiempo. El primero de ellos es el transporte de las moléculas hacia las caras del cristal por difusión o convección, mientras que el segundo es la incorporación de esas moléculas a aquellas posiciones sobre la superficie del cristal que mejor se adaptan al orden periódico tridimensional. El éxito de la cristalización está pues ligado íntimamente a la velocidad relativa de los procesos de transporte de moléculas hacia el cristal y de reordenamiento de las mismas en la superficie del cristal. Tetris, un videojuego tan popular como adictivo, ilustra a la perfección este importante concepto^{2[1]}. En este juego nos enfrentamos al reto de apilar en la parte inferior de la pantalla una serie de piezas de diferentes formas que caen desde la parte superior a una velocidad creciente. En esta analogía, el apilamiento ordenado de piezas representa la estructura de un cristal, las piezas que caen corresponden a las moléculas o unidades de crecimiento (habitualmente oligómeros) en la solución, la velocidad a la que caen las piezas representa la cinética de transporte de las unidades de crecimiento hacia el cristal y la pericia del jugador representa la cinética de superficie del cristal. Jugando al Tetris se puede comprobar la importancia de la relación "velocidad de transporte" / "cinética de superficie" ("velocidad de caída de fichas" / "pericia del jugador") en la calidad del cristal resultante. Si llamamos J

el número de piezas por unidad de tiempo que caen, para valores de J pequeños, el jugador, por poca habilidad que tenga, tiene tiempo de trasladarlas y/o rotarlas para que se acoplen perfectamente a las posiciones adecuadas para formar un agregado correcto. A medida que J aumenta, las piezas caen a mayor velocidad y al jugador le será dada vez más difícil colocarlas en posición correcta, por lo que empieza a aparecer cierto grado de desorden con huecos cuyo número será mayor a medida que J aumenta, es decir, el "cristal" que se obtiene es más defectuoso. En el límite, a valores de J muy altos, al jugador le resulta imposible apilar las piezas correctamente y lo que obtiene es un amontonamiento desordenado, es decir un sólido amorfo. Resumiendo, si queremos crear una estructura periódica perfecta necesitamos suministrar las unidades de crecimiento a una velocidad más lenta que la necesaria para que éstas se coloquen en la posición correcta.

La pregunta, por tanto, es ¿Cuál esta velocidad óptima? Tetris nos proporciona la respuesta correcta: si la velocidad de caída de fichas es tan alta que no podemos ordenarlas, perdemos enseguida y nos aburrirnos; en el otro extremo, si las fichas caen a una velocidad tan baja que nos sobra mucho tiempo después de rotar y desplazar la ficha, también nos aburrirnos (en Tetris hay una tecla para dejar caer una ficha que ya esta correctamente orientada; desafortunadamente con las moléculas en una solución eso no funciona). Por lo tanto, el experimento de cristalización ideal será aquel en el que las moléculas lleguen a la superficie del cristal con velocidad igual o menor a la de su reorganización en la superficie. El problema en cualquier caso es asegurar que el transporte de moléculas hacia el cristal sea lo más lento posible. Por eso, los grupos de crecimiento de cristales tratamos de utilizar medios difusivos. La difusión, el mecanismo de transporte de masa más lento, consiste en un flujo direccional que se produce, curiosamente, debido al movimiento aleatorio (no direccional) de las moléculas a escala microscópica dentro de un gradiente de

concentración. Para hacer que los procesos difusivos dominen el transporte de masa de tal forma que se limite el transporte convectivo, mucho más rápido y caótico, existen dos posibilidades:

- a) hacer que las fuerzas gravitatorias sean de menor intensidad que otras fuerzas no direccionales. En la práctica se usan fuerzas capilares confinando la solución en volúmenes pequeños dentro de
 - a1) capilares (por ejemplo capilares muy transparentes a los rayos X, que pueden utilizarse directamente para la obtención de datos estructurales).
 - a2) geles, puesto que el entramado sólido de un gel, que encierra un sistema poroso relleno de un fluido, permite la difusión de reactivos a la vez que reduce enormemente el efecto de las fuerzas gravitacionales sobre la solución.
- b) crecer los cristales en microgravedad, una tecnología costosa que aún tiene un cierto número de problemas a resolver pero que obviamente es el escenario ideal (el más "limpio") para realizar experimentos en medios difusivos tridimensionales.

Pero esto no es todo

Todas las técnicas habituales de cristalización pueden implementarse utilizando cualquiera de estas posibilidades. Asegurando un medio de transporte de masa difusivo, bastaría pues seleccionar las condiciones iniciales idóneas para alcanzar lentamente la sobresaturación adecuada para la cristalización. ¿Cuáles son esas condiciones idóneas? Este es el principal problema del crecimiento de cristales y las técnicas hoy en día utilizadas para resolverlo consisten en el mejor de los casos en un *screening* de las condiciones experimentales o simplemente en el ensayo

y error, lo que en ambos casos significa cientos o miles de experimentos hasta dar con el juego de condiciones óptimas.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado en los últimos años una técnica de crecimiento de cristales que se puede implementar tanto en capilares como en geles o en el espacio y que reduce y en algunos casos evita esa tediosa búsqueda. La técnica se basa en la contradifusión del compuesto que se quiere cristalizar y de su agente precipitante, es decir el compuesto utilizado para disminuir la solubilidad del compuesto a cristalizar. Su implementación necesita por tanto de dos recipientes, en uno de ellos se coloca una solución del compuesto a cristalizar y en el otro una solución del agente precipitante. Ambos recipientes se conectan a través de un tercero que se rellena con un líquido que no interfiera en la reacción de precipitación, por ejemplo el solvente utilizado para prepara las soluciones. El truco en esta técnica consiste en escoger unas condiciones iniciales que mantengan el sistema lejos del equilibrio, es decir justo al contrario de lo que habitualmente se hace en los experimentos de cristalización. Si conectamos ambos recipientes, las dos soluciones empezarán a difundir una contra la otra. Debemos asegurar que una de las dos (concretamente la del agente precipitante) avance más rápido de tal forma que "invada" a la otra. En el caso de la cristalización de macromoléculas, el hecho de que la constante de difusión de la macromolécula sea mucho mayor que la de su agente precipitante (habitualmente una sal) asegura este requisito. En el caso de compuestos con difusividades similares a los de su agente precipitante, el mismo efecto se consigue aumentando la concentración relativa del agente precipitante. El segundo requisito es provocar una fuerte precipitación tan pronto se encuentren ambas soluciones, de manera que se forme un precipitado amorfo. Esto se consigue simplemente utilizando una solución con una concentración muy alta del compuesto a cristalizar. Si nos aseguramos (tercer requisito) de que la cámara de proteína sea

suficientemente larga, la técnica estará lista para funcionar.

La Figura 2 muestra el funcionamiento de esta técnica. Hasta que las dos soluciones no se encuentran, tan solo existe un transporte de masa a lo largo del reactor, hacia la derecha el agente precipitante, hacia la izquierda la proteína, se produce un máximo de sobresaturación que se desplaza en la dirección en que lo hace el reactivo que difunde más rápido (en este caso la sal) (figura 2, arriba). La sobresaturación del compuesto a cristalizar dependerá de la solubilidad del compuesto en función de la concentración del agente precipitante. Tan pronto como ambas soluciones se mezclan, la sobresaturación crece rápidamente puesto que las condiciones iniciales están muy alejadas del equilibrio hasta que alcanza el valor crítico para la nucleación del compuesto produciéndose un precipitado amorfo. Esta precipitación provoca la caída local del valor de sobresaturación hasta 1 (equilibrio) al reducirse la concentración del reactivo que está precipitando. Como el agente precipitante viaja más rápido (primer requisito), un segundo máximo de sobresaturación se producirá algo más a la izquierda que la sobresaturación crítica para la nucleación más lentamente lo que provocará la formación de un precipitado algo más ordenado, un precipitado policristalino. El nuevo máximo de sobresaturación se desplazará nuevamente hacia adelante y su velocidad de avance se hace más lenta, por lo que a continuación precipitarán algunos cristales pequeños. En la iteración de este proceso hacia el equilibrio, el sistema terminará encontrando unas condiciones en las que se formarán grandes cristales aislados de óptima calidad. El efecto global es por tanto una "onda" de sobresaturación que avanza a lo largo del recipiente que contiene la solución del compuesto a cristalizar probando un cierto número de condiciones de cristalización hasta encontrar las

condiciones óptimas de sobresaturación y velocidad de avance de la sobresaturación sin tener que recurrir a tediosos experimentos de *screening*.

Usando capilares

Para implementar un sistema de contradifusión en medios capilares hemos ideado, especialmente para la cristalización de proteínas, una técnica muy sencilla. En primer lugar, se prepara un gel en un recipiente. Una vez que éste ha gelificado, se rellena un capilar de los utilizados corrientemente para rayos X con la solución de proteína, y se sella uno de sus extremos con cera de abeja o con un material plástico. A continuación se pincha el capilar en el gel de tal forma que se mantenga perpendicular a la superficie del gel y se vierte sobre ésta la solución de agente precipitante. Con esta técnica que denominamos "Método de Acupuntura en Gel" por razones obvias, se consiguen excelente resultados con capilares de diámetro menor de 0.6 mm, puesto que con mayores diámetros no es posible evitar los flujos convectivos. Con ella hemos conseguido cristales que llegan a rellenar completamente el diámetro del capilar (Figura 3). Sorprendentemente, cuando esto ocurre su crecimiento no se detiene, puesto que la estructura atómica de los cristales de proteína, con enormes poros, permite a las moléculas del agente precipitante difundir a través del cristal, que continua creciendo puesto que el cristal no tapona el acceso del agente precipitante. Así hemos logrado crecer cristales cilíndricos de numerosas proteínas de hasta 12 mm de largo. La calidad de estos cristales es la más alta conseguida hasta el momento.

Usando geles

Si queremos obtener cristales de mayor diámetro (que no longitud) se han de utilizar soluciones gelificadas, puesto que aumentar el diámetro del capilar aumentaría también la contribución del transporte convectivo. Los dos tipos de gel más utilizados son los de agarosa (un gel térmico de polimerización reversible) o

los de sílice (un gel químico irreversible). La implementación de un sistema contradifusivo es también fácil en este caso. Basta con gelificar la solución de la proteína al pH adecuado (que varía con cada proteína), se coloca entonces sobre ella una solución gelificada al mismo pH sin proteína ni agente precipitante y, finalmente, se vierte sobre este último gel la solución del agente precipitante. El gel ideal para este tipo de experimento sería un entramado poroso que no interaccionara con las moléculas de proteínas ni con la del agente precipitante. Aunque se consiguen resultados adecuados utilizando geles de sílice fabricados con tetrametoxisilano o geles de agarosa de bajo contenido en sulfato, este gel ideal no existe actualmente.

Usando microgravedad

Finalmente, la técnica de contra-difusión puede ser implementada sin usar geles y sin limitaciones de espesor si los experimentos se realizan en condiciones de gravedad reducida en aviones de vuelo parabólico, en cohetes sondas, en lanzaderas espaciales o en estaciones orbitales. En las lanzaderas espaciales, los valores de la gravedad son entre diez mil y un millón de veces más pequeños que en la superficie de la tierra, por lo que la sedimentación es prácticamente despreciable al igual que la convección que se genera por diferencias de densidad dentro de la solución. El transporte de masa es por tanto prácticamente difusivo, un escenario ideal para experimentos de cristalización. De hecho, desde hace diez años, las agencias espaciales de Europa, América, China, Japón y Canadá vienen realizando experimentos de cristalización de proteínas en condiciones de microgravedad. Los resultados han sido en general prometedores, pero aún queda mucho por comprender antes de poder explotar comercialmente la cristalización de proteínas en la Estación Internacional del Espacio (ISS) que entrará en

funcionamiento en el 2002. El efecto de la aceleración residual, la recogida de cristales, la dependencia de la calidad cristalina sobre los mecanismos específicos de crecimiento, etc., son problemas aún abiertos. Tras varios años de investigación espacial en crecimiento de cristales de macromoléculas por parte de grupos de todo el mundo, el volumen de información disponible está alcanzando un volumen crítico que permite empezar a comprender y aislar algunos puntos cruciales para el futuro de las técnicas de microgravedad.

El próximo octubre, la lanzadera espacial Discovery de la NASA en la misión STS-95, llevará a bordo una serie de experimentos de distintos grupos europeos financiados por la Agencia Espacial Europea que generarán nueva información sobre la cristalización de las proteínas en el espacio. Los experimentos se llevarán a cabo en la APCF (Advanced Protein Crystallization Facility), un instrumento diseñado y construido en Europa (ver recuadro "La APCF"). En este vuelo vamos a realizar una serie de experimentos, continuación lógica de nuestros trabajos en tierra y de un vuelo previo en 1996 (LMS, misión STS-78), encaminados a comprender los procesos de contradifusión en microgravedad y los factores que los afectan. Puesto que el objetivo de los experimentos es comprender mejor la física del proceso de crecimiento, hemos seleccionado para su realización una serie de proteínas "modelo" (lisozima, ferritina y apoferritina) con un comportamiento fisicoquímico bastante bien conocido.

Experimento 1. Gradiente de concentración alrededor del cristal

En primer lugar, es imprescindible tener una visión clara de los gradientes difusivos que se forman alrededor de los cristales en crecimiento como consecuencia del consumo de moléculas de proteína por parte del cristal. Este gradiente, así como su comportamiento durante el crecimiento son fundamentales para entender el régimen cinético en que crece el cristal, lo que a su vez condicionará las ventajas, en términos

de calidad de cristal, obtenidas al crecer el cristal en microgravedad.

STS-95 será la segunda misión en la que la APCF volará equipada con un interferómetro Mach-Zehnder para estudiar la concentración de los reactivos dentro de la cámara de proteína. El interferómetro Mach-Zehnder basa su funcionamiento en la separación de dos haces coherentes de láser con frente plano, uno de los cuales se hace pasar a través de la solución que queremos estudiar. Después de atravesar la solución, el frente de onda estará distorsionado debido a las variaciones del índice de refracción en diferentes partes de la solución con diferentes concentraciones de los reactivos y, al recombinarlo con el haz de referencia, se observa un patrón de interferencias que contiene información sobre la concentraciones de los reactivos en diferentes partes de la solución. Los resultados de interferometría que obtuvimos de la primera misión en 1996, indican el gran potencial de esta técnica, pero también hacen patentes las dificultades para interpretar los resultados en experimentos "normales" con los reactores de la APCF. En particular, el alto número de cristales que se suelen obtener, el hecho de que éstos se muevan (ver experimento 3) y su pequeño tamaño hacen difícil el análisis de datos interferométricos. Para subsanar estos problemas, realizaremos un experimento en el que un solo cristal, completamente fijo, crezca a partir de la solución. Esto será posible usando por primera vez en el espacio técnicas de inseminación (*seeding*). El principal problema de las técnicas de inseminación con cristales de proteína consiste en la estabilidad mecánica de los cristales, extremadamente plásticos y muy poco resistentes. Para solucionar esto hemos desarrollado una técnica para obtener cristales reforzados de proteína este reforzamiento se obtienen creciendo los cristales en una matriz gelificada (contradifusión en geles) a alta concentración, con lo que el entramado del

gel queda incluido dentro del cristal de proteína reforzándolo. Este cristal reforzado es recrecido dentro del reactor cuando el experimento se activa. Para evitar que la nucleación de otros cristales interfiera en las medidas, las condiciones experimentales se ajustarán de tal manera que no se produzca nucleación de nuevos cristales sino sólo crecimiento de la semilla.

Experimento 2. Movimiento de cristales.

Una vez establecido un gradiente alrededor del cristal, el crecimiento del cristal continuará en un régimen estable controlado por dicho gradiente y que condicionará la calidad del cristal. Para esto es condición indispensable que el cristal permanezca fijo con respecto a la solución, algo que intuitivamente cabría esperar de los experimentos en microgravedad. Sin embargo, como pusimos de manifiesto recientemente, a pesar de que los niveles de gravedad existentes durante los experimentos en la APCF son de entre diezmilésimas y millonésimas de g, los cristales se mueven durante el experimento. Este hecho ha sido explicado cualitativamente apelando a las pequeñas aceleraciones (residual y mareal) a que está sometido el transbordador espacial durante su órbita así como a las pequeñas aceleraciones "accidentales" a que se ve sometida la nave debido a la actividad a bordo de la misma. Ningún estudio cuantitativo ha sido realizado hasta ahora, en parte debido a la dificultad en la correlación de datos y a que las imágenes obtenidas son proyecciones bidimensionales del experimento, con lo que se pierde información sobre la trayectoria tridimensional de los cristales. Para obtener valores cuantitativos de los vectores desplazamiento, lo cual es imprescindible para intentar correlacionar correctamente los valores de aceleración con los movimientos de los cristales, es necesario tener al menos dos imágenes de la cámara de proteína obtenidas a diferente ángulo. A este fin, diseñamos un nuevo reactor APCF que, gracias a un sistema de doble periscopio, permite obtener dos imágenes del experimento desde direcciones

perpendiculares (Figura 9). Estos reactores también pueden ser usados para realizar reconstrucciones tridimensionales de cristales en crecimiento. Para la realización de este experimento es necesario disponer de un registro acelerométrico que aporte valores cuantitativos de las aceleraciones a las que se ve sometida la APCF durante el vuelo según tres direcciones perpendiculares.

En este experimento se crecerán cristales de lisozima, ferritina y apoferritina; la primera de ellas ha sido seleccionada porque ya disponemos de datos sobre movimiento de cristales de lisozima mientras que las otras dos han sido seleccionadas por tener el mismo habito cristalino pero diferentes densidades, una situación ideal para estudiar la repuesta de los cristales al mismo entorno de aceleraciones.

Experimento 3. Cámaras de crecimiento largas.

Como ya dijimos, uno de los requisitos para la realización de experimentos que exploten todas las ventajas de la contradifusión es que la cámara de crecimiento sea larga. Esto es necesario para que la "onda de sobresaturación" tenga espacio para avanzar buscando las condiciones idóneas para el crecimiento de los cristales. Uno de los resultados más sorprendentes de nuestras investigaciones previas con reactores APCF es que el tiempo necesario para la homogeneización del agente precipitante dentro del reactor es inferior (en las condiciones habitualmente utilizadas) al tiempo necesario para obtener núcleos cristalinos. Por ello, a pesar de que los reactores APCF se diseñaron para implementar técnicas difusivas de crecimiento de cristales, su funcionamiento no aprovecha las características de las técnicas de contradifusión.

Este experimento se realizará usando reactores expresamente diseñados en

nuestro laboratorio para disponer en la APCF de cámaras de crecimiento lo suficientemente largas como para mantener un gradiente de contradifusión de la proteína y el agente precipitante durante un tiempo suficientemente largo como para que la precipitación de los cristales se produzca siguiendo el patrón espaciotemporal típico en los experimentos de contradifusión. Este reactor, que ocupa el espacio de tres reactores convencionales, tiene una cámara de proteína con una longitud de 67 mm, un orden de magnitud mayor que ninguna cámara disponible para crecimiento de cristales de macromoléculas en el espacio y puede ser observado mediante vídeo e interferometría.

Observando el proceso de crecimiento de cristales en estos reactores así como los gradientes de los reactivos involucrados (mediante interferometría) y comparando estos resultados con los obtenidos en tierra usando otras implementaciones de las técnicas de contradifusión (geles y capilares) y con las simulaciones de ordenador completaremos nuestra visión de las técnicas de contradifusión y estaremos más cerca de ser capaces de adaptar las técnicas de crecimiento de cristales de macromoléculas en medios difusivos a los requerimientos cada vez más altos para la explotación tanto científica como comercial de estas técnicas.

La APCF

La Advanced Protein Crystallisation Facility (APCF) es el laboratorio en miniatura con que se ha dotado la Agencia Espacial Europea para desarrollar la cristalización de grandes moléculas biológicas en condiciones de microgravedad en Europa. Este laboratorio ha sido utilizado previamente en cuatro misiones desde 1993 por diferentes grupos de investigación para realizar experimentos a bordo del transbordador espacial de la NASA y previsiblemente continuará operando en el módulo europeo de la Estación Orbital Internacional a partir del año 2000, donde

estará acompañado por un desarrollo más reciente, la Protein Crystallisation Diagnostic Facility (PCDF) actualmente en su fase final de diseño.

La APCF, construida y mantenida por Dornier GbmH es un contenedor automatizado de unos 40 Kg que puede ser montado en el Shuttle middeck del transbordador espacial de la NASA, y el Express rack de la ISS. La agencia espacial Europea dispone de dos modelos de vuelo. En el interior de cada uno de ellos, hasta 48 experimentos (12 de ellos con observación de vídeo e interferometría) pueden ser realizados en reactores especiales contruidos para implementar las tres técnicas de crecimiento de cristales de proteínas disponibles cuando se diseñó la APCF, esto es: diálisis, difusión de interfase libre y gota colgante. Los experimentos comienzan simultáneamente con la puesta en marcha de la unidad a cargo del especialista de misión una vez en órbita, con lo que comienza la ejecución de una secuencia preprogramada de pasos que incluyen la activación de los reactores, diferentes operaciones de comprobación de condiciones experimentales, la adquisición de imágenes e interferogramas de algunos de los reactores y, finalmente, la desactivación de los reactores.

Tras el aterrizaje del transbordador, la APCF es desmontada del rack y abierta, los reactores son extraídos y enviados bajo condiciones controladas a los grupos de investigación para estudiar los cristales obtenidos. Algún tiempo después, los grupos de investigación que tenían asignados recursos de observación en vídeo o interferometría reciben un CD-ROM con las imágenes obtenidas durante el vuelo. Y este es el material de que se dispone para estudiar que pasó durante el experimento.

Para saber más:

A. Ducruix y R. Giege (eds), Protein and Nucleic Acid Crystallization. A Practical Approach; IRL Press: Oxford, 1992

A. Macpherson, Preparation and Analysis of Protein Crystals. Krieger Publ. Malabar, Florida, 1989.

J. Drenth, Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer Verlag Publ., 1994.

Nuestra página web