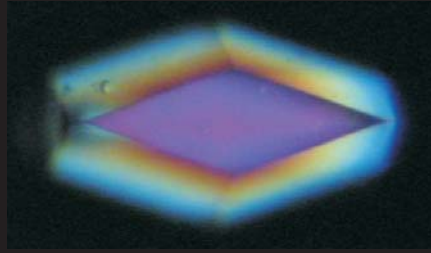
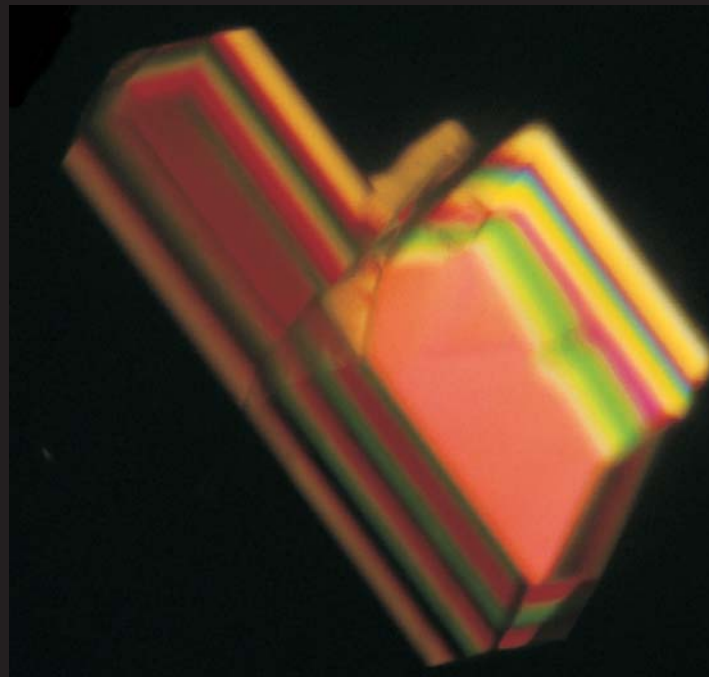


# CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES POR MÉTODOS CONTRADIFUSIVOS



JOSÉ ANTONIO GAVIRA GALLARDO



Laboratorio de Estudios Cristalográficos  
Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra  
CSIC-Universidad de Granada

GRANADA-2000



Laboratorio de Estudios Cristalográficos  
Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra  
CSIC-Universidad de Granada



Los trabajos contenidos en esta memoria que presenta el licenciado D. José Antonio Gavira Gallardo para optar al grado de Doctor en Ciencias (Químicas) han sido realizados en el Laboratorio de Estudios Cristalográficos del Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra.

Fdo. José Antonio Gavira Gallardo

Dirigida por:

Fdo. Juan Manuel García Ruiz  
Profesor de Investigación del CSIC.

GRANADA-2000



*a mis padres y  
hermanos  
a Martina*

## **AGRADECIMIENTOS**

¿Cuántos cafés (en vaso, por favor) puede haber detrás de una tesis?

Para los amantes, como yo, de este líquido elemento parecería lógico comenzar agradeciendo a Juan Valdes sus viajes a Colombia, pero el café hay que tomarlo con su mejor ingrediente, los amigos y compañeros sin los que cualquier tesis se haría interminable.

Quiero comenzar agradeciendo a JuanMa García-Ruiz la confianza que me ha tenido desde el inicio de este trabajo. Con ella y con el entusiasmo que JuanMa deposita en absolutamente todo lo que hace, cualquier tarea es posible. Le agradezco haberme permitido acceder a una formación nada al uso con la que he descubierto el mundo de la ciencia del que ahora me considero parte integrante. También le agradezco que haya compartido conmigo su saber hacer, esencial para disfrutar de una familia como el L.E.C.

A Fermín Otálora, hermano de formación, otro tanto. Le agradezco que me haya enseñado a hacer las preguntas antes de tener las posibles respuestas. Que, con gran paciencia, me haya introducido en la realidad del cristal a la vez que desentrañaba los entresijos de la difracción. Le agradezco que me enseñara la diferencia entre un Rioja y un Ribera del Duero, y por la copa “charlada”.

Le agradezco a todos los componentes del L.E.C., los que están y los que estuvieron, el soportar mis chistes y el haberme endulzado los cafés de los días crudos. En especial le agradezco a Eva, factor común de esta gran familia y que nos sufre ineludiblemente, los cuentos de verano que hacían las tardes llevaderas. En esta familia hay que incluir a Mati, nuestro ángel protector que siempre ha cuidado de nosotros y nos ha sacado de más de un apuro cuando más lo necesitábamos.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por su ayuda económica a través de la beca de FPI, y al CSIC, por las ayudas para estancias cortas en el extranjero.

A Martina le agradezco TODO y más.

A mi familia su apoyo, si hubo algo imposible ellos lo hicieron posible. Especialmente a mi madre por su clarividencia, de la que aún hoy me sorprende.

Nadie se queda en el tintero, a vosotros os agradezco y agradeceré de viva voz, uso legítimo del lenguaje que facilita la tarea de la comunicación.

**CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN**

1.1. <a href="#">INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS</a> .....	1
1.2. <a href="#">ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS</a> .....	6
1.3. <a href="#">EL PROBLEMA DE LA CRISTALOGÉNESIS DE PROTEÍNAS</a> .....	9
1.3.1 Principios generales de la cristalogénesis de proteínas.....	9
1.3.2 Nucleación.....	11
1.3.3 Crecimiento.....	16
1.3.4 Cese del crecimiento.....	18
1.4. <a href="#">TÉCNICAS CONTRADIFUSIVAS DE CRECIMIENTO DE CRISTALES</a> .....	19
1.4.1. Requerimientos y características de la contradifusión.....	20

**CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1. <a href="#">LAS PROTEÍNAS</a> .....	23
2.1.1 Lisozima.....	25
2.1.2 Ferritina.....	26
2.1.3 Thaumatina.....	27
2.2. <a href="#">LOS GELES</a> .....	28
2.2.1. Protocolo de preparación de los geles de agarosa.....	28
2.2.2. Protocolos de preparación de los geles de sílice.....	30
2.2.3. Protocolo de cristalización en <i>batch</i> de gel de agarosa.....	31
2.2.4. Protocolos de cristalización en contradifusión.....	32
2.2.4.1 Recuperación de los cristales.....	35
2.2.4.2 Montaje de cristales de proteínas para difracción.....	36
2.3. <a href="#">ANÁLISIS DE IMAGEN</a> .....	36
2.4. <a href="#">TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN</a> .....	38
2.4.1. Difracción de rayos X.....	38
2.4.2. Microscopía electrónica de barrido.....	39
2.4.3. Interferometría Mach-Zhender.....	39
2.4.4. Tratamiento de datos.....	39

**CAPITULO 3: LOS GELES COMO MEDIOS DE CRISTALIZACIÓN**

3.1. <a href="#">ANTECEDENTES</a> .....	41
3.2. <a href="#">LOS GELES COMO MEDIOS DE CRISTALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS</a> .....	43
3.3. <a href="#">GELES DE SÍLICE</a> .....	45
3.3.1. La superficie del gel de sílice.....	47
3.3.2. Resultados y discusión.....	49
3.4. <a href="#">GELES DE AGAROSA</a> .....	57
3.4.1. Propiedades químicas y físicas de los geles de agarosa.....	57
3.4.1.1. Polimerización.....	58
3.4.1.2. Tamaño de poro.....	61
3.4.2. Resultados y discusión.....	63
3.5. <a href="#">CONCLUSIONES</a> .....	70

## CAPITULO 4: LA EVOLUCIÓN DE LA SOBRESATURACIÓN EN LA TÉCNICA DE CONTRADIFUSIÓN

4.1. <a href="#">INTRODUCCIÓN</a> .....	71
4.2. <a href="#">BASES TEÓRICAS DE LA CONTRADIFUSIÓN</a> .....	72
4.2.1. El transporte de masa en sistemas difusivos.....	72
4.2.2. Precipitación y crecimiento en contradifusión.....	73
4.3. <a href="#">MÉTODOS DIRECTOS</a> .....	75
4.3.1. Seguimiento por interferometría.....	75
4.3.2 Concentración total en el tiempo.....	76
4.3.2.1. Variación de la concentración de sal.....	78
4.3.2.2. Variación de la concentración de proteína.....	83
4.4. <a href="#">MÉTODOS INDIRECTOS</a> .....	87
4.4.1. Influencia sobre la nucleación.....	87
4.4.2. Influencia sobre el hábito cristalino.....	94
4.5. <a href="#">CRECIMIENTO DE CRISTALES DE LIsoZIMA</a> .....	106
4.5.1. Mecanismos de crecimiento de los cristales de lisozima.....	106
4.5.2. Velocidad de crecimiento de los cristales de lisozima.....	110
4.6. <a href="#">MEDIDA DE LA CALIDAD CRISTALINA</a> .....	122
4.6.1. Medidas <i>ex situ</i> .....	122
4.6.2. Medidas <i>in situ</i> .....	129
4.7. <a href="#">CONCLUSIONES</a> .....	133

## CAPITULO 5: CRISTALES DE PROTEÍNA REFORZADOS

5.1. <a href="#">INTRODUCCIÓN</a> .....	135
5.2. <a href="#">CRISTALIZACIÓN EN GELES DE SÍLICE</a> .....	136
5.2.1. Interacción proteína-gel de sílice.....	137
5.2.1.1. Influencia del gel de sílice sobre la densidad de nucleación.....	139
5.2.1.2. Incorporación del gel de sílice en los cristales de proteínas.....	144
5.2.2. Caracterización termogravimétrica.....	151
5.2.3. Estabilización de lisozima en geles de sílice.....	163
5.2.4. Efectos morfológicos.....	166
5.2.5. Difracción de cristales reforzados.....	172
5.3. <a href="#">CRISTALIZACIÓN EN GELES DE AGAROSA</a> .....	181
5.3.1. Cristalización de lisozima en geles de agarosa.....	181
5.3.1.1 Influencia del gel de agarosa sobre el flujo de nucleación.....	184
5.3.1.2. Incorporación del gel de agarosa en los cristales de proteínas.....	190
5.4. <a href="#">CONCLUSIONES</a> .....	193

## CAPITULO 6: INFLUENCIA DE UN CAMPO MAGNÉTICO SOBRE LA CRISTALIZACIÓN DE LISOZIMA

6.1. <a href="#">INTRODUCCIÓN</a> .....	195
6.2 <a href="#">ANTECEDENTES</a> .....	196
6.3 <a href="#">ASPECTOS TEÓRICOS</a> .....	197
6.4 <a href="#">MATERIALES Y MÉTODOS</a> .....	199
6.5 <a href="#">RESULTADOS Y DISCUSIÓN</a> .....	201
6.5.1 Cálculo de la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética molar de la molécula de lisozima.....	202
6.5.2 Tamaño del menor cristal orientable.....	202
6.5.3 Grado de orientación.....	204
6.5.4 Influencia del campo magnético sobre el flujo de nucleación.....	207
6.5.4.1 En <i>batch</i> .....	207
6.5.4.2 En contradifusión.....	208
6.5.5 Efecto sobre la morfología final de los cristales.....	212
6.5.5.1 En <i>batch</i> .....	212
6.5.5.2 En contradifusión.....	214
6.5.6 Orientación de los cristales en el interior de los capilares.....	216
6.6 <a href="#">CONCLUSIONES</a> .....	217

## [CAPITULO 7: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO](#).....

219

### APÉNDICE

A. <a href="#">CARACTERIZACIÓN DE LISOZIMA</a> .....	223
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	225



# 1. INTRODUCCIÓN

*If you can look into  
the seeds of time  
and say which grain will  
grow and which will not,  
speak then to me ...*

*Macbeth*

## 1.1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

Hoy en día la cristalización de proteínas sigue manteniendo el estatus de arte más que el de ciencia. En la mayoría de los laboratorios dedicados a la resolución estructural se sigue aplicando el método de ensayo y error en la búsqueda del deseado cristal. La falta de un criterio racional se suple con el uso de condiciones de cristalización estadísticamente eficientes, esto es, aquellas que han permitido cristalizar un mayor número de proteínas. Cada condición se ensaya de forma puntual empleando las técnicas clásicas de gota sentada o colgada y *batch*, con las que se persigue una lenta homogeneización del sistema de forma controlada y estable. Esta forma de operar da una visión restringida del problema y una información poco útil a la hora de establecer unos criterios de cristalización.

Un grado mayor de complejidad lo presentan las técnicas contradifusivas que se caracterizan por crear sistemas no homogéneos que se desarrollan fuera del equilibrio. En este tipo de técnicas la precipitación está acoplada a un transporte de masas de tipo difusivo que controla la velocidad con la que se alcanza un determinado nivel de sobresaturación y la sobresaturación en cada momento en cada punto del reactor de precipitación [Henisch y Garcia-Ruiz, 1986]. El acoplamiento del fenómeno químico de la precipitación con la física de la difusión dificulta enormemente la interpretación de los resultados experimentales. La aparición de patrones de precipitación rítmicos, la posición del primer precipitado así como el número y tamaño de los cristales han representado incógnitas de estas técnicas durante casi un siglo [Henisch, 1970, 1988; Garcia-Ruiz, 1980]. El desarrollo en las últimas décadas de la tecnología de la computación capaz de realizar cálculos iterativos ha posibilitado la aplicación de soluciones numéricas a la resolución de las ecuaciones diferenciales que describen el transporte de masa en un medio difusivo (leyes de Fick) [Henisch y García-Ruiz, 1986]. A raíz de estos avances es posible predecir [Garcia-Ruiz, 1991] e incluso simular [Otalora, 1996, Otalora y García-Ruiz, 1996, 1997] el comportamiento espacial de un sistema de difusión-precipitación a lo largo del tiempo.

La contradifusión en geles se ha aplicado con éxito a la cristalización de sustancias inorgánicas con un bajo producto de solubilidad y difíciles de cristalizar empleando otras técnicas [Henisch, 1970], así como al aumento de la calidad de los cristales de sustancias fáciles de cristalizar [Lefaucheux, et al., 1982]. En 1991 García-Ruiz propone aplicar las técnicas de contradifusión en medios gelificados a la cristalización de macromoléculas biológicas como método alternativo para realizar un amplio barrido de condiciones experimentales en una única experiencia. Anteriormente se había comprobado que los medios difusivos: capilares [Zeppezauer et al., 1968 y 1971; Salemme, 1972] y medios gelificados [Rober y Berthou, 1987; Kalkura y Devanarayanan, 1987], favorecen la cristalización de las macromoléculas biológicas y ayudan a aumentar la calidad de los cristales que nuclean y crecen en un medio homogéneo. En 1993, García-Ruiz y colaboradores desarrollan el método de acupuntura en geles (GAME) combinando ambos medios. Este método se puede considerar una extensión del método de Salemme en el que el agente precipitante en solución se hace difundir primero a través de una cámara de gel para ingresar posteriormente en el capilar que contiene la proteína en solución. La diferencia fundamental entre ambos métodos estriba en que, mientras en el método de Salemme sólo se pretende una lenta homogeneización del sistema, el GAME se basa en la ruptura de esta homogeneidad [Otalora y Gracia-Ruiz, 1996]. Para ello las concentraciones iniciales de agente precipitante y proteína se escogen de forma que en los primeros instantes y posiciones se produzca una elevada sobresaturación que desestabiliza el sistema. Esta pérdida de estabilidad se mantiene a lo largo del tiempo consiguiendo que en cada punto de la cámara de proteína se alcancen distintos niveles de sobresaturación, lo que se traduce en un barrido de condiciones experimentales en una única experiencia. A estas ventajas hay que añadir que los cristales crecen en un medio difusivo y limpio, similar al que se disfruta en condiciones de microgravedad, lo que en la mayoría de los casos se traduce en un aumento de la calidad de los cristales. Por otra parte los cristales se obtienen directamente en un capilar que podemos emplear para la adquisición de datos de difracción evitando el estrés al que se ven sometidos los cristales durante el traspaso del medio de cristalización al capilar.

El trabajo realizado durante los últimos años en el seno de nuestro grupo ha demostrado que el método de acupuntura en geles (GAME<sup>i</sup>) se puede aplicar a un extenso número de proteínas con características físico-químicas (peso molecular, punto isoeléctrico, número de subunidades) tan variadas como: lisozima (14.3 kDa, 11.2, 1), insulina (5.8kDa, 5.35, 2), ferritina (456.0 kDa, 4.5, 24), concanavalina A (102.0 kDa, 8.1, 1), ribonucleasa A (12.6 kDa, 7.8, 1), etc. [Moreno, 1995; Moreno, et al., 1996]. Sin embargo, aún no se ha producido una generalización del empleo de este método como rutina en los laboratorios de cristalización, ya que es difícil comprender la necesidad de fijar unas elevadas concentraciones iniciales como único medio para asegurar la obtención de cristales de calidad y tamaño apropiados.

En el marco teórico la extrapolación de la teoría clásica de nucleación y crecimiento de sistemas temporalmente homogéneos ha permitido realizar grandes avances en la comprensión de la cristalogenésis de proteínas [Chernov, 1984]. En este sentido, la evaluación de la

---

<sup>i</sup> GAME del inglés *Gel Acupuncture Method*.

sobresaturación es el requisito fundamental si se quiere comprender, analizar y comparar los resultados de crecimiento cristalino obtenidos experimentalmente.

En el caso de experiencias en contradifusión, además, hay que tener en cuenta que la sobresaturación varía espacial y temporalmente y que ambas variaciones controlan la nucleación y crecimiento de los cristales. Aunque su desarrollo se ha simulado empleando algoritmos de computación, al comienzo de este trabajo no disponíamos de ninguna evidencia experimental de cómo se produce esta evolución.

En este contexto se engloba el primer objetivo de esta tesis: encontrar los indicadores directos o indirectos que permitan realizar un seguimiento de cómo se desarrolla el patrón de sobresaturación en experiencias de contradifusión y su repercusión sobre la calidad final de los cristales. Estos indicadores los buscamos tanto en solución (GAME) como en medio gelificado, asumiendo que el comportamiento de ambos sistemas es similar y que, por tanto, la información es de carácter complementario. Posteriormente comprobamos como la propia configuración experimental del GAME condiciona fuertemente la evolución de la experiencia limitando el carácter comparativo de los datos obtenidos.

Durante el desarrollo de esta investigación tuvimos la oportunidad de realizar distintas experiencias en condiciones de gravedad reducida (misión STS-95). En el transcurso de la citada misión se llevó a cabo el seguimiento espacial y temporal de una experiencia en contradifusión empleando un interferómetro de tipo Mach Zehnder. Del análisis de los interferogramas (desarrollado en otra tesis en nuestro grupo) se ha obtenido la primera evidencia real de la existencia de una onda de sobresaturación que recorre la cámara de precipitación [García-Ruiz, et al., 2000].

Por otra parte y como suele ocurrir en el transcurso de cualquier investigación, nos encontramos en nuestro camino con puntos que, sin desviarse de los objetivos iniciales, presentaban un interés adicional por su novedad y perspectivas de futuro.

La segunda meta de este trabajo nace con la idea de establecer un nexo entre las necesidades industriales y los cristales de proteínas más allá de la resolución estructural.

El desarrollo de nuevas tecnologías [Thomson, 1996], la administración controlada de fármacos [Gennaro, 1985] o la síntesis y maduración enzimáticas [Halgas, 1992] son campos en expansión. El mecanismo habitualmente empleado para disponer de una proteína activa es la inmovilización por adsorción, unión o agregación de las moléculas a una matriz inerte. La adsorción de la proteína es el paso previo al entrecruzamiento o unión física de la enzima a la matriz en la que se ha inmovilizado [Ballesteros, et al., 1998].

A raíz de esta necesidad se nos plantea la posibilidad de obtener materiales compuestos proteína-gel que participen de las características físicas y químicas de ambos. Partimos de dos evidencias experimentales: 1) la incorporación del gel de sílice en cristales de carbonato cálcico [Hensch, 1988] y 2) la posibilidad de crecer cristales de proteínas en geles de sílice [Robert y Berthou, 1987; KalKura y Devanarayanan, 1987]. A partir de estas evidencias la hipótesis de trabajo es que los cristales de proteínas son capaces de incorporar el gel durante su crecimiento. Una vez

demostrada esta hipótesis, el siguiente paso consiste en encontrar la concentración máxima de gel que pueden incorporar los cristales y estudiar cómo esta incorporación modifica la calidad del cristal.

Además del propio interés cristalográfico que puede representar la obtención de cristales reforzados de proteínas capaces de mantener su integridad estructural durante su manipulación y resistir la deshidratación, su interés académico es evidente. En los últimos años se ha dedicado un gran número de trabajos y monografías a descifrar el papel del solvente en el mantenimiento de la estructura tridimensional de las proteínas [Teeter, 1991; Gregory, 1995] y en cristalización [Frey, 1994; Jacob et al., 1998]. Habitualmente se piensa que una deshidratación de las proteínas conlleva una pérdida de la estructura nativa y, por tanto, de la capacidad enzimática. Sin embargo, las enzimas poseen plena actividad catalítica a niveles de hidratación tan bajos como 0.12-0.2h ( $h = \text{gramos}_{\text{agua}} / \text{gramos}_{\text{proteína}}$ ). Por esto pensamos que la sustitución de la mayor cantidad de agua posible en los cristales de proteína no debe afectar a su estructura y que, por tanto, mantendrá intacta su funcionalidad.

El tercer objetivo de este trabajo nace de la ambigüedad de los datos que hasta la fecha se han publicado sobre el efecto que un campo magnético ejerce sobre la cristalogénesis de proteínas. En 1997, Sazaki y colaboradores comprueban como se reduce el número de cristales de lisozima y ferritina que nuclean en presencia de un campo magnético de 10T de intensidad y que los cristales aparecen orientados en la dirección del campo magnético. En el mismo periodo, Ataka y colaboradores observan un aumento del flujo de nucleación en soluciones sobresaturadas de lisozima que nuclean bajo la acción de un campo magnético de 0.6-1.2T de intensidad. El aumento de flujo de nucleación iba acompañado de una reducción del tamaño final de los cristales [Ataka et al., 1997] Esta diferencia de resultados fue relacionada posteriormente con la homogeneidad del campo magnético aplicado, en virtud de la fuerza magnética que un gradiente de campo puede ejercer sobre cualquier sustancia magnética [Wakayama et al., 1997]

La diversidad de los resultados y las distintas conclusiones que de ellos se derivan se deben a una heterogeneidad experimental. Basándonos en esto y en nuestro conocimiento previo en cristalización de proteínas en medios gelificados, abordamos este estudio con la idea de esclarecer como influye la aplicación de un campo magnético homogéneo y constante sobre la cristalogénesis de proteínas.

Los diferentes objetivos propuestos barren ampliamente la problemática de la cristalización de proteínas desde distintos puntos de vista, pero con un nexo común: las técnicas contradifusivas. Tomando este punto como eje central de la tesis, la memoria se compone de los siguientes capítulos:

- 1.- En este capítulo se exponen los objetivos y motivaciones de este trabajo y se introduce el problema de la cristalización de proteínas y la contradifusión como una solución viable.
- 2.- En el segundo capítulo se describen de forma somera los materiales: proteínas, geles, etc. y métodos empleados en el transcurso de esta memoria, haciendo especial hincapié en los distintos protocolos de preparación de muestras y experiencias. Para que esta

información sea accesible, los protocolos se han esquematizado y simplificado, destacando los puntos de mayor relevancia. Los detalles específicos de cada experiencia se recogen en los apartados correspondientes.

3.- Puesto que los geles de sílice y agarosa son la base sobre la que se desarrolla este trabajo hemos querido recoger en este capítulo las características físicas y químicas más relevantes, así como los diversos ensayos realizados para comprender la interdependencia entre estas características y las condiciones de preparación.

4.- En este capítulo se recoge la evolución de la sobresaturación en las experiencias de contradifusión en solución libre y en medios gelificados a través de métodos directos e indirectos. Los resultados se analizan a la luz de las predicciones teóricas de la evolución de la sobresaturación en medios difusivos aplicando las leyes de transporte de masa de Fick. A partir de estos datos se establece una relación entre la calidad de los cristales y la sobresaturación a través de la velocidad de crecimiento. Se compara la eficacia de los distintos medios para obtener un transporte de masa difusivo y se establecen los criterios para elegir las condiciones iniciales que permiten obtener el mayor barrido de condiciones, independientemente del medio elegido. A partir de los datos de difracción de los cristales crecidos en medios capilares, gelificados y en microgravedad demostramos como las técnicas contradifusivas representan la mejor opción para obtener cristales de elevada calidad, independientemente del medio empleado. Esta afirmación se soporta por la comprensión de los fenómenos de transporte, nucleación y crecimiento en medios difusivos.

5.- Describimos en este capítulo como se produce el crecimiento de cristales de proteínas en medios gelificados, la interacción proteína-gel y el efecto de los distintos geles sobre la nucleación y crecimiento de los cristales de proteína. Demostramos como los cristales de proteína incorporan el gel durante su crecimiento y como en el caso de los geles de sílice su presencia a elevadas concentraciones condiciona la morfología externa de los cristales más allá de la modulación de la sobresaturación expuesta en el capítulo cuarto. Asimismo se estudia la influencia del gel sobre la calidad de los cristales y su papel en las características físicas del cristal y de la proteína.

6.- Por último, en este capítulo se estudian las bases de la orientación de los cristales de proteína expuestos a la acción de un campo magnético homogéneo y constante. Empleamos la cristalización en medios gelificados para estudiar esta influencia con una reproducibilidad elevada. Discutimos las conclusiones publicadas hasta la fecha a la luz de estos resultados y proponemos el uso de esta nueva herramienta para la obtención de grandes monocristales orientados en una determinada dirección.

7.- Aunque tanto la discusión de los datos como las conclusiones se recogen en cada capítulo, hemos querido analizar de forma global los resultados expuestos y acompañarlas de las posibles perspectivas de futuro.

## 1.2. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

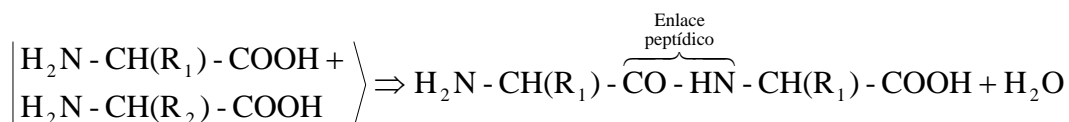
Las proteínas son sistemas complejos de organización espacial de átomos con pesos moleculares que pueden superar las centenas de kilodaltons (kDa, 1 Da=1 gr/mol). La amplia variedad de funciones que desempeñan estos polímeros (enzimática, regulatoria, estructural, etc.) está sustentada en esta organización espacial. Tanto es así, que a la estructura proteica se la considera como “**el segundo código genético**”. Un análisis detallado de su arquitectura tridimensional permite establecer cuatro niveles de organización. El primer nivel se refiere a una organización atómica que se infiere directamente del código genético y está constituido por la secuencia de aminoácidos. Existe un total de 20 aminoácidos, sillares de toda estructura proteica.

Nombre	Símbolos	Masa	S*	pK-COOH	pK-NH <sub>3</sub>	pK-R	Carácter	pI*
<b>Alanina</b>	Ala – A	71.09	16.65	2.35	9.69	-	No polar	6.02
<b>Arginina</b>	Arg – R	156.19	15	2.17	9.04	12.48	Cargado (+)	10.76
<b>Asparagina</b>	Asn – N	114.11	0.778	2.02	8.80	-	Polar sin carga	5.41
<b>Ac. Aspártico</b>	Asp – D	115.09	3.53	2.09	9.82	3.86	Polar cargado (-)	2.97
<b>Cisteína</b>	Cys – C	103.15	Alta	1.71	10.78	8.33	Polar	5.02
<b>Glutamina</b>	Gln – Q	129.12	0.864	2.17	9.13	-	Polar sin carga	5.65
<b>Ac. Glutámico</b>	Glu – E	128.14	2.5	2.19	9.67	4.25	Polar carga (-)	3.22
<b>Glicina</b>	Gly – G	57.05	24.99	2.34	9.60	-	Polar-No Polar	5.97
<b>Histidina</b>	His – H	137.14	4.19	1.82	9.17	6.00	Polar, carga (+)?	7.85
<b>Isoleucina</b>	Ile – I	113.16	4.117	2.36	9.68	-	No polar	6.02
<b>Leucina</b>	Leu – L	113.16	2.426	2.36	9.60	-	No polar	5.98
<b>Lisina</b>	Lys – K	128.17	Alta	2.18	8.95	10.53	Cargado (+)	9.74
<b>Metionina</b>	Met – M	131.19	3.381	2.28	9.21	-	No polar	5.75
<b>Fenilalanina</b>	Phe – F	147.18	2.965	1.83	9.13	-	No polar	5.98
<b>Prolina</b>	Pro – P	97.12	162.3	1.99	10.60	-	No polar	6.10
<b>Serina</b>	Ser – S	87.08	5.023	2.21	9.15	-	Polar sin carga	5.68
<b>Treonina</b>	Thr – T	101.11	Alta	2.63	10.43	-	Polar sin carga	6.53
<b>Triptofano</b>	Trp – W	186.12	1.136	2.38	9.39	-	No polar	5.88
<b>Tirosina</b>	Tyr – Y	163.18	0.0453	2.20	9.11	10.07	Polar sin carga	5.65
<b>Valina</b>	Val – V	99.14	8.85	2.32	9.62	-	No polar	5.97

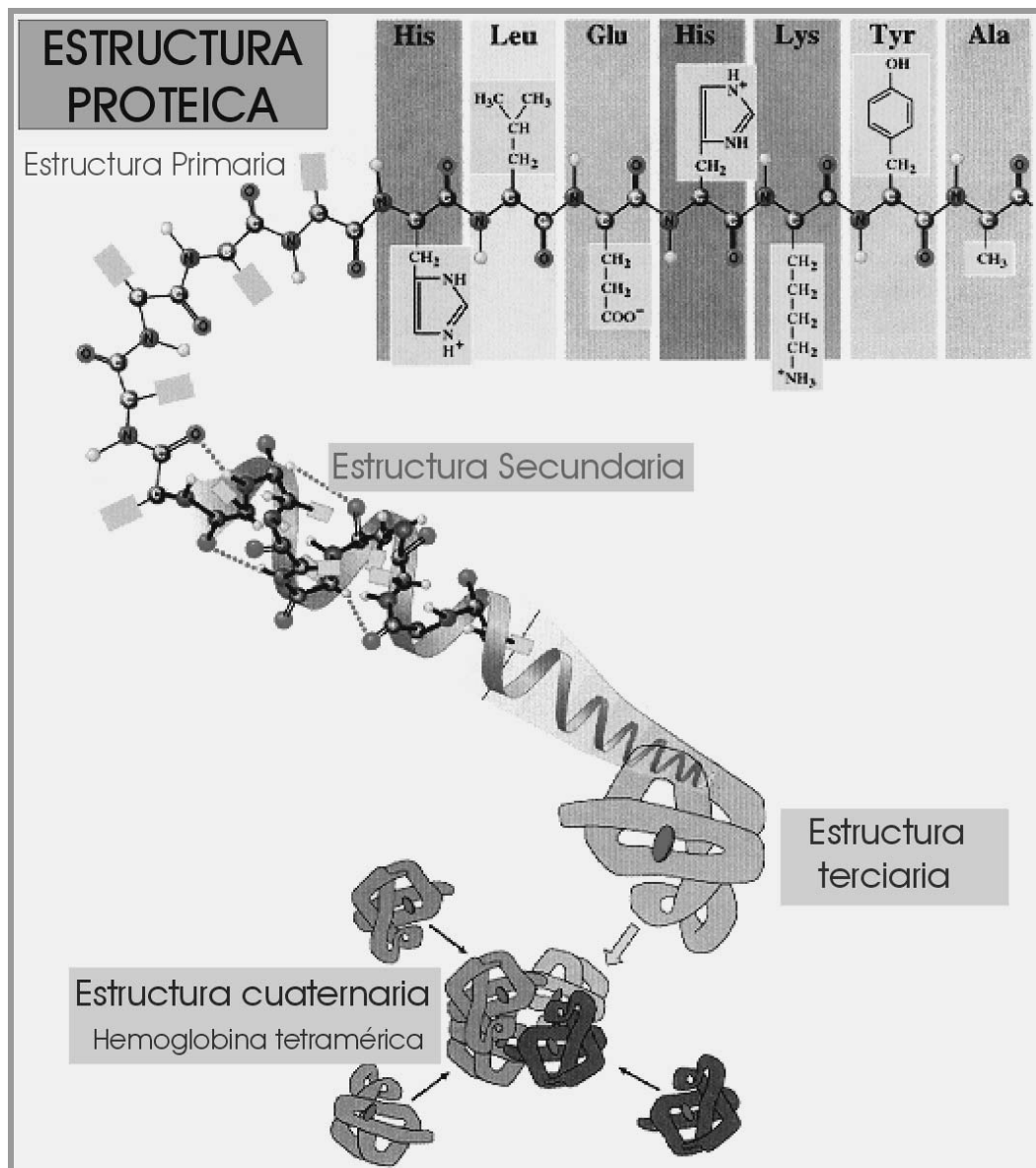
**Tabla.1.2-1** Características más relevantes de los veinte aminoácidos esenciales.

\*pI a 25°C y solubilidad (S) expresada en g/100g de agua a 25°C extraídos de: The Merck Index, Merck & Co. Inc., Nahway, N.J., 11(1989); CRC Handbook of Chem.& Phys., Cleveland, Ohio, **58** (1977).

Los aminoácidos presentan una estructura común constituida por un carbono central (C<sub>α</sub>) al que se encuentran unidos un grupo amino, uno ácido y una cadena lateral que le confiere las características físico-químicas (Tabla 1.2-1). La polimerización ocurre por la reacción entre el grupo carboxilo y el grupo amino de dos aminoácidos distintos generándose una amida secundaria (enlace peptídico) con desprendimiento de una molécula de agua.



Durante la elongación de la cadena aminoacídica se pueden establecer puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílicos y amidas de distintos aminoácidos separados en la secuencia dando lugar a la aparición de estructuras secundarias (hélices y láminas  $\beta$ ). De esta forma la cadena lineal de aminoácidos se estructura en grupos lineales unidos entre sí por codos o regiones desordenadas. El plegamiento de estas estructuras secundarias generadas a partir de una única cadena polipeptídica se denomina estructura terciaria. Cuando varias de estas estructuras terciarias con idéntica o distinta composición se asocian, generan un nivel de organización superior que denominamos estructura cuaternaria. Las fuerzas responsables de mantener esta integridad estructural son: las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones hidrófobas y los puentes disulfuros. Salvo los puentes disulfuros se trata de fuerzas no covalentes importantes por su número más que por su intensidad.



**Fig.1.2-1** Representación esquemática de los niveles de organización estructural de las proteínas tomando como ejemplo la hemoglobina, proteína transportadora de gases en sangre. Figura tomada de la red de dirección no recuperable.

De la fuerte relación entre la estructura de las proteínas y la función que realizan se deduce la necesidad de conocer esta arquitectura tridimensional para poder entender los mecanismos de acción. Las disfunciones patológicas y el diseño de fármacos en medicina (Tabla 1.2-2), los mecanismos enzimáticos en la industria (textil, alimenticia, láctea, etc.) o la propia disposición espacial en el desarrollo de nuevas tecnologías son sólo algunos ejemplos que dependen del conocimiento de la estructura proteica para su desarrollo.

PROTEÍNA - VIRUS	ENFERMEDAD	INHIBIDOR / DROGA
Hemoglobina	Anemia	Benzafibrato, ácido clofíbrico.
Dihidrofolato Reductasa	Cáncer	Metotrexato.
Timidilato Sintasa	Cáncer	Flurouracil y compuestos de la 6,7-imidazotetrahydroquinolina
Nucleosido Fosforilasa	Cáncer	9-(arilmetil) derivados de la 9-deazaguanina
Enzima convertidora de angiotensina	Hipertensión	Captopril y Enalapril
Renina	Hipertensión	Péptidos del análogo de transición
Elastasa humana de leucocitos	Enfermedad degenerativa de Lung	Análogos de cefalosporinas, fluorometil cetonas y $\alpha$ 1-antitripsina
Thrombina	Terapia anticoagulante	Hirudin y argatroban
Plasminógeno	Terapia anticoagulante	Proteína recombinante sin capacidad inhibidora
Anhidrasa carbónica	Hipertensión ocular, Glaucoma	Tienotopiran-2-sulfonamidas (MK507)
Proteasa de SIDA	SIDA	C2-Dioles simétricos basados en siete miembros del ciclo de la urea, diseño de péptidos
Transcriptasa inversa del SIDA	SIDA	AZT y nevirapina.
Rhino virus humano	Resfriado común	Productos de farmacopea.
Virus de la gripe	Gripe	Análogos modificados del ácido neuramídico

*Tabla 1.2-2 Fármacos diseñados a partir del conocimiento de la estructura proteica y enfermedades relacionadas con estas proteínas. Confeccionada por E. Mihan director del departamento de Biología Estructural en la U. de Alabama en Huntsville, Alabama.*

La difracción de rayos X de monocristales es la técnica más eficaz en la resolución de la estructura de macromoléculas biológicas. Otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) o las predicciones teóricas han aportado casi el 20% del total de estructuras resueltas. Sin embargo, hoy en día la difracción sigue siendo la técnica más empleada y a la que más medios económicos y científicos se dedican. A diferencia del RMN, la difracción no presenta ninguna limitación en cuanto al peso molecular de la proteína, pero necesita un cristal sobre el que realizar los estudios de difracción.



### 1.3. EL PROBLEMA DE LA CRISTALOGÉNESIS DE PROTEÍNAS

Los cristales de proteínas han rebasado la barrera de la resolución estructural para convertirse en materiales de interés general *per se*. Las proteínas en general y los cristales de proteínas en particular han ingresado en la última década en las industrias electrónica y tecnológica expandiendo su campo de aplicación a un gran número de nuevas disciplinas del conocimiento [Birge y Gross, 1995, Thomson, 1996]. Estas nuevas industrias dependen para su desarrollo tanto del conocimiento estructural como de la caracterización de las propiedades físico-químicas de los cristales, de ahí la necesidad de disponer de grandes cristales de elevada calidad. Sin embargo, la mayoría de los esfuerzos de la comunidad científica están focalizados en la obtención de cristales que permitan resolver la estructura de la proteína. En este ámbito las pruebas de cristalización se realizan empleando el método de ensayo y error que carece de un planteamiento racional del problema.

Para poder dar respuesta a ambas necesidades (tamaño y calidad) es necesario disponer primero del marco teórico adecuado que nos permita realizar cálculos predictivos del comportamiento del sistema. Aunque la aplicación de la teoría clásica de crecimiento cristalino a la cristalogénesis de proteínas ha permitido realizar importantes avances existen aún grandes lagunas sin resolver [Chernov, 1997].

#### 1.3.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LA CRISTALOGÉNESIS DE PROTEÍNAS

La cristalización de moléculas en solución es un fenómeno de equilibrio químico reversible cuya cinética y termodinámica están controladas por las características físicas y químicas del solvente y del soluto. Bajo ciertas condiciones el sistema segrega de la solución un precipitado que disminuye la energía libre del sistema (núcleo crítico o un agregado no específico) [Weber, 1991]. Esta disminución de energía libre es tanto mayor cuanto más ordenada sea la fase segregada.

Típicamente se considera el fenómeno de crecimiento cristalino dividido en tres fases o etapas; nucleación, crecimiento y cese del crecimiento. La formación de un núcleo proporciona al sistema de superficie para continuar creciendo. Hay tres causas que provocan que un cristal deje de crecer: el consumo de las unidades de crecimiento (se ha alcanzado una situación de equilibrio termodinámico), el incremento de la energía de superficie por acumulo de imperfecciones o la incorporación de impurezas sobre las caras del cristal [Kam, et al., 1978, Feher y Kam, 1985].

Para moléculas pequeñas y teniendo en cuenta las consideraciones físico-químicas oportunas es posible incluso predecir el comportamiento de una solución ante un cambio exterior que desplace el equilibrio hacia la formación del cristal [Boistelle y Astier, 1988, Chernov, 1993 y 1997]. La gran diferencia entre la cristalización de macromoléculas biológicas y la cristalización de compuestos inorgánicos la establecen la desigual distribución de las propiedades físico-químicas superficiales (polivalencia, forma, hidrofobicidad, etc.) y la flexibilidad de ciertas regiones que complican el establecimiento de uniones favorables en el cristal. Además, durante la cristalización

de pequeñas moléculas el solvente es excluido de la superficie en crecimiento, mientras que en el caso de las proteínas el solvente es incluido en el cristal (20-80%). Parte de estas moléculas de solvente se inmovilizan y ordenan en la celdilla unidad de la proteína rellenando los huecos que dejan las proteínas en sus contactos internos en el cristal. Esta incorporación es evidencia de las grandes cavidades que presentan los cristales de proteínas. Cabe esperar pues que las interacciones entre las moléculas de proteína que componen el cristal sean débiles y así ocurre en la mayoría de las proteínas que se han medido [Frey et al, 1988, Salemme et al, 1988].

La complejidad de la superficie es responsable del elevado número de parámetros que podemos variar para disminuir la solubilidad de una macromolécula en solución: fuerza iónica, pH, temperatura, etc. [Ducruix y Giegé, 1999; McPherson, 1999]. Para solventar esta combinatoria de posibilidades se han desarrollado métodos de barrido de condiciones que carecen de algún planteamiento racional del problema.

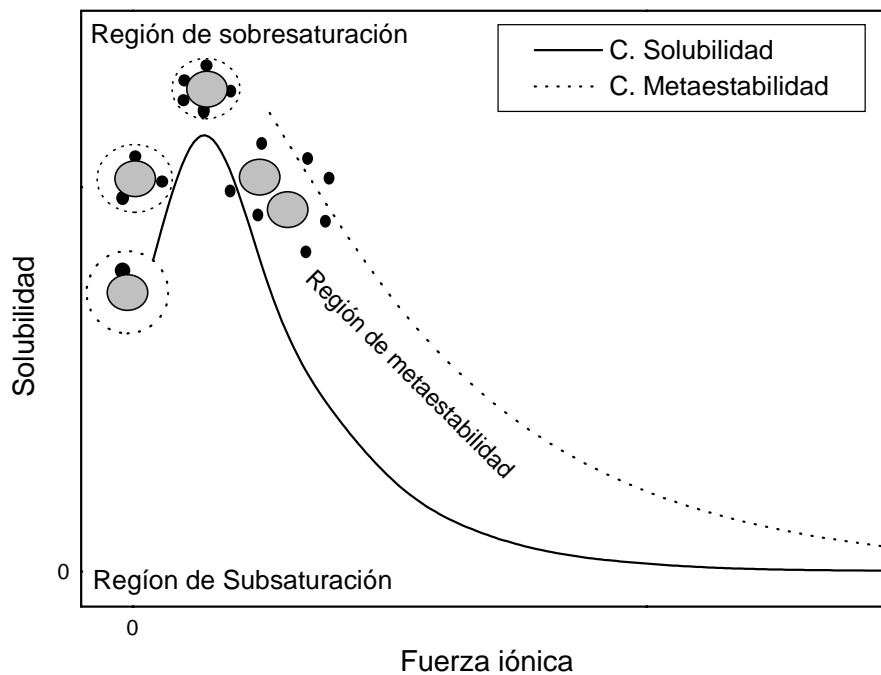
La variable habitualmente empleada para disminuir la solubilidad de una proteína es el cambio de la fuerza iónica del medio (I)<sup>i</sup> manteniendo el resto de variables constantes (Fig.1.3-1). Para entender como varía la solubilidad de una proteína con la fuerza iónica consideremos las proteínas en solución como un polielectrolito que a un determinado pH, distinto de su punto isoeléctrico (pI)<sup>ii</sup>, presenta una carga neta distinta de cero. La presencia de esta carga neta restringe la solubilidad de la proteína debido a las repulsiones entre cargas. Un leve aumento de la concentración de sal hace que estas cargas sean apantalladas y que decrezca el espacio mínimo requerido para poder mantener las proteínas en solución, lo que se traduce en un aumento de la solubilidad de la proteína o fenómeno de *salting in*. Al aumentar la concentración de sal los iones se unen al agua más fuertemente que a las cargas superficiales de la proteína ya que la constante dieléctrica de la superficie de la proteína es menor que la constante dieléctrica del agua. Esta "perdida de agua" hace que se favorezcan las interacciones entre las moléculas de proteína y promueva su precipitación. Este fenómeno se conoce como el efecto de *salting out* provocado por la adición de sal a un medio saturado. La suma de ambos efectos da lugar a la variación de la solubilidad de la proteína en función de la fuerza iónica que se expresa de forma general a través de la ecuación de Green [Green, 1932]:

$$\log(S) = \log(S_o) + k_i \cdot \sqrt{C} - k_o \cdot C \quad \text{Ec.1.3-1}$$

donde  $k_i$  y  $k_o$  son las constantes de *salting in* y *salting out*,  $S_o$  la concentración de equilibrio de la proteína en agua pura y  $C$  la concentración de sal.

<sup>i</sup> La fuerza iónica (I) depende de la concentración de soluto (c en molar) y de la carga de cada uno de los iones que componen el soluto (z):  $I = 1/2 \cdot (\sum c \cdot z^2)$ .

<sup>ii</sup> El pI (punto isoeléctrico) corresponde al valor de pH al cual la proteína presenta una carga neta nula.



**Fig.1.3-1** Representación del cambio de solubilidad de una proteína en función de la fuerza iónica.

A partir del conocimiento de la curva de solubilidad de un determinado sistema proteico podemos aplicar el tratamiento termodinámico de la teoría clásica de crecimiento cristalino.

### 1.3.2. NUCLEACIÓN

La nucleación es el proceso por el cual una fase sólida se segrega de la solución para formar agregados cristalinos termodinámicamente estables. Cuando la formación de gérmenes ocurre en el seno de una solución libre de partículas y superficies extrañas se denomina **nucleación homogénea**. La presencia de partículas extrañas puede provocar la aparición de los núcleos a unos valores de sobresaturación inferiores a los requeridos para que se produzca la nucleación homogénea (**nucleación heterogénea**). En ocasiones el desprendimiento de pequeños fragmentos de cristales procedentes de la nucleación primaria (homogénea o heterogénea) sirve de gérmenes para la aparición de nuevos cristales, en este caso se habla de **nucleación secundaria**. Los mecanismos implicados en la aparición de la nucleación secundaria no están demasiado claros.

La fuerza motriz del cambio de fase de una partícula en solución a su estado sólido a presión y temperatura constantes viene determinada por el cambio de potencial químico,

$$\Delta\mu = k \cdot T \cdot \ln \beta \quad \text{Ec.1.3-2}$$

donde  $k$  representa la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $\beta$  la sobresaturación del sistema, definida como el cociente entre la concentración actual y la concentración de equilibrio (se asume que los coeficientes de actividad idénticos en ambos casos).

El cambio de energía libre ( $\Delta G_r$ ), asociado a la formación de un agregado de volumen  $V$  y superficie  $S$  es

$$\Delta G_r = S \cdot \sigma - \frac{V}{v} \cdot k \cdot T \cdot \ln \beta \quad \text{Ec.1.3-3}$$

$\sigma$  representa la energía libre de superficie entre el agregado y la solución y  $v$  es el volumen molar. Para un agregado con geometría esférica la Ec.1.3-3 se puede escribir como:

$$\Delta G_r = 4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \sigma - \frac{4 \cdot \pi \cdot r^3}{3 \cdot v} \cdot k \cdot T \cdot \ln \beta \quad \text{Ec.1.3-4}$$

Por simplicidad se toma la tensión superficial de agregados pequeños similar a la macroscópica y se desprecia el agotamiento de las unidades de crecimiento por la formación del núcleo.

En la representación del cambio de energía libre en función de radio del agregado (Fig.1.3-2) se comprueba como existe una barrera energética ( $\Delta G^*$ ) que debe de superarse para alcanzar un tamaño de agregado estable, núcleo crítico ( $r^*$ ). El núcleo crítico corresponde al menor agregado que puede disminuir su energía libre aumentando de tamaño.

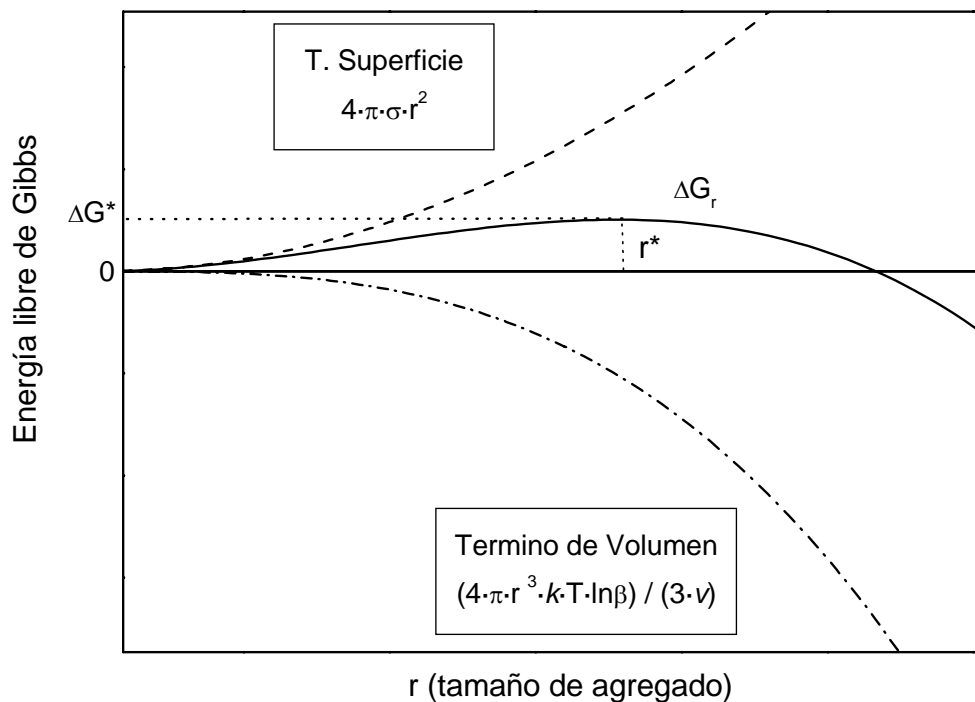
Diferenciando  $\Delta G_r$  respecto de  $r$  y teniendo en cuenta que la derivada se hace nula en el máximo, encontramos un valor para  $r^*$  (ecuación de Gibbs-Thomson)

$$r^* = \frac{2 \cdot \sigma \cdot v}{k \cdot T \cdot \ln \beta} \quad \text{Ec.1.3-5}$$

Sustituyendo el valor de  $r^*$  en la ecuación 1.3-4 obtenemos la cantidad de energía asociada a la formación del núcleo crítico

$$\Delta G_r^* = \frac{16 \cdot \pi \cdot \sigma^3 \cdot v}{3 \cdot (k \cdot T \cdot \ln \beta)^2} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \sigma \cdot r^{*2} \quad \text{Ec.1.3-6}$$

La ecuación 1.3-5 indica que al aumentar la sobresaturación del sistema, el tamaño de núcleo crítico, el número de moléculas necesarias para crear un agregado estable y la barrera energética disminuyen.



**Fig.1.3-2** Representación esquemática de la variación de la energía libre de Gibbs en función del radio del agregado. Se han representado por separado las contribuciones de volumen y superficie y la suma de ambas.

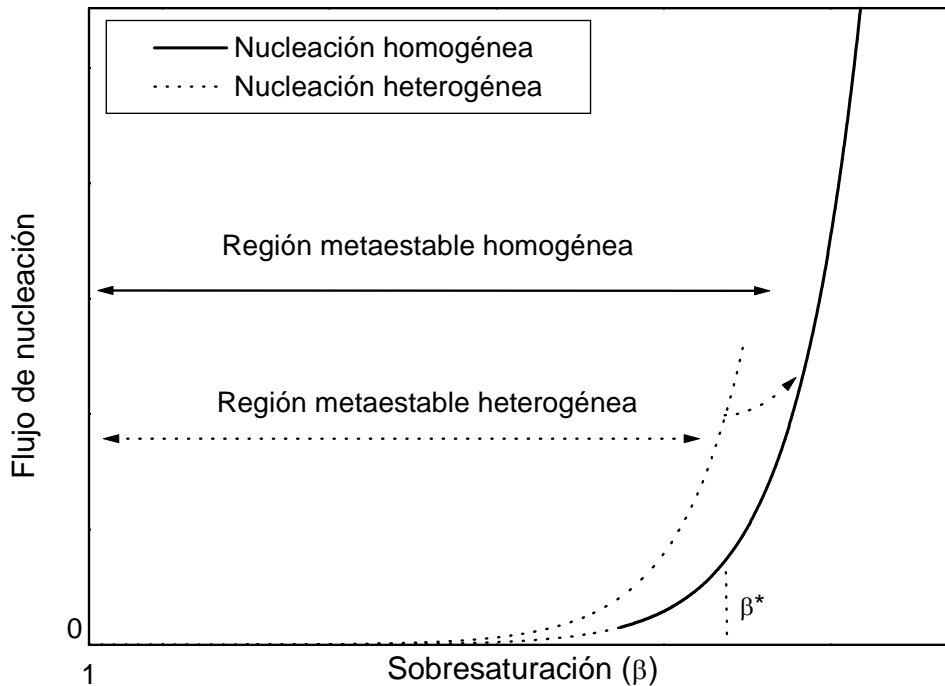
El flujo de nucleación (número de núcleos formados por unidad de volumen en la unidad de tiempo) es un problema cinético determinado por la probabilidad de sobrepasar la barrera energética  $\Delta G^*$

$$J = B \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G^*}{k \cdot T}\right)} \quad \text{Ec.1.3-7}$$

En esta expresión  $\Delta G^*$  se asemeja a la energía de activación de una reacción química, pero mientras esta última permanece constante,  $\Delta G^*$  es extremadamente sensible a los cambios de sobresaturación del sistema. El factor preexponencial  $B$  es un coeficiente cinético que depende directamente de la solubilidad de la molécula (número de moléculas por unidad de volumen) y de la frecuencia a la que un núcleo crítico supera la barrera energética de nucleación para dar lugar a un cristal. El flujo de nucleación depende fundamentalmente del término exponencial y por tanto de la sobresaturación representada en la figura 1.3-3. Existe un valor de sobresaturación crítica ( $\beta^*$ ) por debajo del cual el flujo de nucleación es extremadamente pequeño, aumentando drásticamente cuando se rebasa este valor.

En algunos casos es posible observar nucleación por debajo del valor de sobresaturación crítica - es lo que hemos denominado nucleación heterogénea. La presencia de una superficie extraña en el medio puede disminuir la energía libre interfacial cuando las moléculas de soluto

presentan cierta afinidad por la partícula extraña (paredes del recipiente, partículas en suspensión, etc.) reduciendo la energía libre total necesaria para la formación de un núcleo crítico. Este descenso de energía es función del ángulo de contacto ( $\alpha$ ) entre la partícula en crecimiento y la superficie extraña de forma que para  $\alpha=180^\circ$  la partícula no presenta ninguna afinidad por el sustrato mientras que para  $\alpha=0^\circ$  la afinidad es máxima.



**Fig.1.3-3** Representación esquemática del flujo de nucleación en función de la sobresaturación para el caso de nucleación primaria (homogénea y heterogénea). Por encima de una determinada sobresaturación crítica ( $\beta^*$ ) el flujo de nucleación aumenta rápidamente mientras que por debajo de este valor la nucleación es extremadamente pequeña. La flecha que une las curvas de nucleación homogénea y heterogénea representa un valor de sobresaturación a partir del cual el flujo de nucleación es tan elevado que sería imposible distinguir el efecto de la presencia de impurezas..

La forma habitual de estudiar el fenómeno de la nucleación es a través del tiempo de inducción ( $\tau$ ) definido como el tiempo transcurrido desde que se alcanza un determinado valor de sobresaturación hasta que se observa la aparición de los primeros núcleos. De su definición se deduce que depende de la técnica de detección empleada. Se asume que el tiempo de inducción es inversamente proporcional al flujo de nucleación de forma que representando  $\ln(\tau)$  frente a  $(\ln^2\beta)^{-1}$  se obtiene una dependencia lineal cuya pendiente es igual a  $-16 \cdot \nu \cdot \sigma^3 / 3 \cdot (k \cdot T)^3$ . Esta es la metodología habitualmente empleada para encontrar el valor de  $\sigma$  necesario para estimar el valor de  $r^*$ .

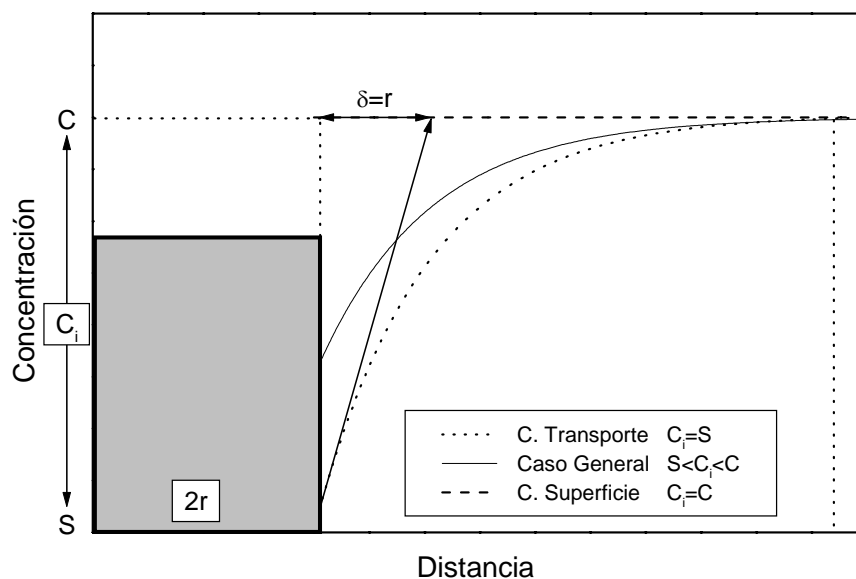
Actualmente no existe una teoría unificada del comportamiento de las soluciones sobresaturadas de macromoléculas biológicas, lo que dificulta la comprensión de cómo ocurre el fenómeno de la nucleación. La mayoría de los estudios se han realizado empleando como proteína modelo la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) y técnicas tan diversas como la dispersión de luz, resonancia magnética nuclear, calorimetría diferencial de barrido o la microscopía electrónica. En estos estudios se observa la formación de agregados de diferente tamaño en los primeros estadios de la cristalización. [Mikol et al., 1989; Ducruix et al., 1996]. El tamaño de estos agregados aumenta de dímeros a octámeros al aumentar la sobresaturación [Boué et al., 1993] de acuerdo con la teoría clásica de la nucleación. Sin embargo, la existencia de agregados estables en solución no implica necesariamente que sean las unidades de crecimiento como se ha apuntado [Pusey, 1991]. Niimura y colaboradores (1995) encuentran que el crecimiento de los núcleos se produce a partir de unidades monómeras a pesar de que existan en solución agregados de mayor tamaño. Rosenberger (1996) discrepa de la interpretación de estos resultados para el caso de lisozima y propone un análisis de los datos en términos de la teoría de coloides, más acorde con las posibles interacciones presentes en una solución de macromoléculas en la que las distancias intermoleculares son del orden o incluso inferiores a las del propio cristal. La formación de agregados (hexámeros) que constituyen las unidades de crecimiento en el caso de insulina o la ausencia de estos agregados para el caso de lisozima se pueden explicar basándose en la distribución de cargas e hidrofobicidades sobre la superficie de las moléculas. Trabajos recientes realizados empleando calorimetría diferencial de barrido apuntan en esta dirección [Igarashi, et al., 1999], aunque por otra parte Michinomae y colaboradores (1999) han detectado la presencia de agregados estables de forma esférica usando microscopía electrónica de transmisión y consideran la formación de estos como un paso intermedio de la nucleación.

La teoría de coloides propone un comportamiento de las soluciones de proteínas (caso de lisozima) que se aparta de la teoría clásica de nucleación, en la que se asume una distribución estacionaria de fluctuaciones de concentración. En esta nueva concepción del sistema, la nucleación estará precedida por una separación de fases líquido-líquido acompañada por grandes fluctuaciones de concentración que dan origen a la nucleación. Esta nueva concepción del sistema está avalada por la reproducibilidad de las medidas de los tiempos de inducción para las mismas condiciones de sobresaturación [Drenth y Haas, 1998; Haas y Drenth, 1999]. En cambio, según la teoría clásica de la nucleación (fenómeno probabilístico) los tiempos de inducción pueden presentar dispersión en idénticas condiciones.

La aplicación de la teoría de coloides da un giro a las interpretaciones de los resultados que hasta ahora se enmarcaban dentro de la teoría clásica de crecimiento cristalino.

### 1.3.3. CRECIMIENTO

El crecimiento de un cristal implica una serie de pasos que describen la migración de las moléculas desde el seno de la solución a la superficie del cristal y su posterior incorporación desplazando las moléculas de solvente. Dependiendo de cual de estos procesos sea el más lento el crecimiento estará controlado por el transporte en el seno de la solución, el transporte sobre la superficie del cristal o la cinética de incorporación (Fig.1.3-4). Teniendo en cuenta que el transporte de masa se puede considerar de tipo difusivo a distancias cortas (cercanas al cristal) incluso en ambientes convectivos y considerando el cristal real descrito por el modelo de BCF (Burton-Cabrera-Frank, 1951 y modificaciones de Benneman y Chernov), el modelo de difusión en capa (Diffusión Layer Model) describe los posibles mecanismos de crecimiento de un cristal en solución apoyándose en las ecuaciones de difusión de Fick [Nývlt et al., 1985].



**Fig.1.3-4** Representación esquemática del modelo de difusión en capa en el que se muestra como disminuye la concentración al alejarnos de la cara del cristal.  $C$ ,  $S$  y  $C_i$  representan los valores de concentración en el seno de la solución, la concentración de equilibrio y la concentración de la solución en la interfase cristal-solución. Cada una de las curvas muestra el gradiente de concentración al acercarnos a la cara del cristal cuando: el crecimiento está controlado por la difusión en el seno de la solución ( $C_i=S$ ), controlado por la difusión en la superficie del cristal ( $C_i=C$ ) ó es debido a una combinación de ambos.  $\delta$  representa el espesor considerado como capa límite cuyo valor es igual a la mitad de la longitud característica del cristal ( $2r$ ) cuando el ambiente es difusivo y menor que  $r$  cuando el transporte en el seno de la solución es convectivo.

Una amplia revisión de los posibles mecanismos implicados en el crecimiento de cristales de proteínas se puede encontrar en el trabajo de Fiddis et al. (1979). A partir de datos macroscópicos de medidas de velocidad de crecimiento (entendida como la velocidad de avance de



una dirección característica del cristal a lo largo del tiempo) de cristales de lisozima e insulina estos autores aplican las diferentes expresiones correspondientes a cada uno de los mecanismos propuestos por la teoría anteriormente descrita. Encuentran que los mejores ajustes se obtienen a partir de las expresiones que incluyen la fuerza motriz de cristalización ( $\ln(\beta)$ ), apuntando a un control de tipo cinético. Concluyen que los cristales de lisozima e insulina crecen de acuerdo con un mecanismo de nucleación (2D, crecimiento de las caras por expansión de un núcleo sobre la superficie del cristal) a sobresaturaciones ( $\beta$ ) superiores a 3 similar al encontrado para algunas sales inorgánicas. Sin embargo, la energía superficial es 100 veces menor que la de cristales inorgánicos cuando se toma en cuenta la unidad de área aunque del mismo orden en bases molares.

Durbin y Feher (1986) ampliando la zona de estudio a la región de bajas sobresaturaciones ( $1.2 \leq \beta \leq 10$ ) encuentran que, mientras a elevadas sobresaturaciones el mecanismo que mejor describe el crecimiento de los cristales de lisozima es la nucleación bidimensional (2D), a bajas sobresaturaciones los datos experimentales se ajustan a un mecanismo de crecimiento impulsado por la presencia de dislocaciones helicoidales (el cristal se desarrolla por expansión sobre la superficie del cristal y en la dirección normal a la cara del cristal). El avance de las caras de tipo  $\{110\}$  y  $\{101\}$  presentan una dependencia diferente con la sobresaturación del sistema dando lugar a cristales con hábito diferente en función de la sobresaturación. Esta diferencia es consecuencia de una diferencia en la energía superficial de área entre ambos tipos de caras ( $\sigma_{110}=2.3 \cdot kT$  y  $\sigma_{101}=1.9 \cdot kT$ ). Estos resultados son corroborados posteriormente a partir de simulaciones teóricas, *ex situ* microscopía electrónica e *in situ* microscopía de fuerza atómica [Durbin y Feher, 1990; Durbin y Feher, 1991, Durbin y Carlson, 1993]. Este último trabajo apunta un posible solapamiento de ambos mecanismos de crecimiento. Las desviaciones del comportamiento esperadas para la velocidad de propagación de los escalones de crecimiento en función de la fuerza motriz de la precipitación avalan este resultado.

A raíz de estos resultados es posible concluir que el crecimiento de cristales de proteínas sigue las mismas leyes de crecimiento que los cristales inorgánicos, si bien los primeros crecen a sobresaturaciones un orden de magnitud superior y con menores velocidades de crecimiento. La superficie y la energía de unión de las moléculas de proteína a la superficie del cristal son asimismo comparables a la de los cristales inorgánicos por lo que los elevados niveles de sobresaturación requeridos apuntan a un aumento de la barrera energética de cristalización posiblemente debido a restricciones estéricas. Aunque no es posible afirmar sin ambigüedad el mecanismo de crecimiento ni la cinética microscópica a partir de estos datos macroscópicos, todos los resultados apuntan a un control cinético del crecimiento más que del transporte.

Rosenberger en su revisión de 1996 muestra como los estudios más recientes apuntan en esta dirección. Entre estos trabajos cabe destacar las medidas de concentración realizadas sobre las caras de cristales de lisozima con un interferómetro de Michelson de alta resolución [Vekilov y Rosenberger, 1998 y referencias incluidas]. En estos trabajos se describen fluctuaciones de la

velocidad de crecimiento cuya amplitud no depende de la concentración de impurezas y que por tanto son interpretadas como el acoplamiento entre los fenómenos de transporte y superficie.

En todos estos trabajos, realizados en su mayoría con lisozima (HEWL), se asume que la unidad de crecimiento es monomérica. Sin embargo, al igual que ocurre con el fenómeno de la nucleación, se han desarrollado teorías paralelas a ésta, en las que tanto la nucleación como el crecimiento ocurre a partir de agregados multiméricos de lisozima. Aunque esta distinta concepción del sistema proteína-solución no modifica las conclusiones en cuanto a mecanismos de crecimiento, el tratamiento termodinámico y las conclusiones que de éste se derivan tendrían que ser modificadas según una nueva definición de la sobresaturación basada en la concentración de estas nuevas unidades de crecimiento [Forsythe, et al., 1999; Li et al., 1999]. Estos autores presentan asimismo un análisis de datos de microscopía de fuerza atómica que avalan su interpretación [Li, et al., 1999a; Li et al., 1999b].

#### **1.3.4. CESE DEL CRECIMIENTO**

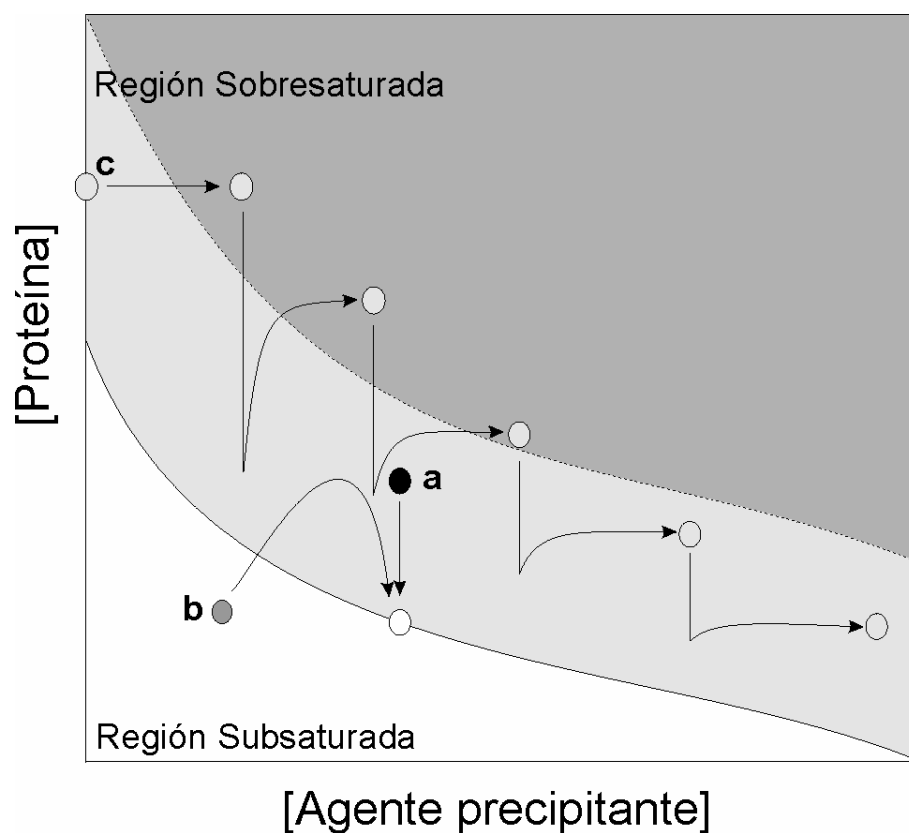
Un cristal puede dejar de crecer por diferentes razones. La más evidente es el consumo del nutriente. Podríamos recrecer el cristal añadiéndole más proteína; sin embargo, esto no funciona en el caso de los cristales de proteínas. Feher y Kam (1985) comprobaron que si partimos un cristal de lisozima en dos fragmentos y los hacemos recrecer, el tamaño final de los fragmentos es idéntico al original. Sugieren que la acumulación de tensiones de la celdilla unidad se transmiten a la superficie del cristal e impiden la incorporación de nuevas unidades de crecimiento. Según este razonamiento, los cristales que presenten una tensión en la celdilla unidad sólo podrán crecer hasta un determinado tamaño.

Un efecto similar se puede observar cuando el cristal incorpora impurezas sobre la superficie en crecimiento. La incorporación de estas impurezas aumenta la cantidad de defectos superficiales que interrumpen el crecimiento. Las impurezas (moléculas de proteína con cierta desnaturalización, fragmentos proteicos u otras proteínas) no se incorporan preferentemente, ya que el número de contactos efectivos es menor que para una molécula en estado nativo. Sin embargo, conforme el cristal crece la concentración de impurezas aumenta. Esta disminución de la razón entre proteína nativa e impurezas hace que la probabilidad de que se incorpore una impureza aumente con el tiempo, o lo que es lo mismo, con el consumo de proteína [Weber, 1991].

Recientemente Forsythe y colaboradores (1999) apuntan la posibilidad de cese de crecimiento por competencia entre fases cristalinas. Las zonas muertas de crecimiento encontradas en estudios sobre la cara (110) de lisozima pueden ser atribuibles a la competición entre los cristales con morfología tetragonal y los ortorrómbicos que coexisten a las sobresaturaciones en las que se realizaron dichos estudios (consultar referencias en Forsythe et al., 1999)

## 1.4. TÉCNICAS CONTRADIFUSIVAS DE CRECIMIENTO DE CRISTALES

Las técnicas contradifusivas, al contrario que otras técnicas de crecimiento tradicionales, están basadas en la heterogeneidad de la mezcla de los reactivos fuera del equilibrio cuando ambos difunden en sentido contrario. Esta heterogeneidad constituye la principal ventaja de este tipo de técnicas. El lento aporte de materia controlado por la difusión, hace que la sobresaturación aumente gradualmente permitiendo que la nucleación de los cristales se produzca a sobresaturaciones tan bajas como se deseen con un aporte continuo de materia. La inestabilidad del sistema no es completamente aleatoria, ya que podemos ejercer un control sobre la amplitud de su desarrollo a partir de la propia configuración experimental y/o de las concentraciones iniciales [García-Ruiz, 1991].



**Fig.1.4-1** Representación esquemática del diagrama de solubilidad en el que se han incluido la evolución temporal de la concentración para experiencias realizadas en “batch”(a), por difusión en fase vapor (b) o empleando técnicas contradifusivas (c). Mientras que las trayectorias a y b pueden representar la realidad del sistema, las trayectorias en c son solo una guía visual en la que se ha incluido la evolución espacial (de izquierda a derecha) además de la temporal. Por claridad del diagrama hemos omitido las trayectorias hacia el equilibrio de cada uno de los puntos de precipitación representados en el camino c.

Su aplicación al crecimiento de cristales de proteínas resultaba prohibitiva debido al elevado consumo en las configuraciones típicas empleadas en crecimiento de cristales inorgánicos. El desarrollo del método de acupuntura en geles [García-Ruiz et al, 1993, García-Ruiz y Moreno, 1994] que combina las características difusivas de los medios gelificados y de los medios capilares permite la incorporación de la contradifusión a la cristalización de las proteínas manteniendo las

principales características de los métodos tradicionales de cristalización; un bajo consumo, una elevada reproducibilidad y una lenta cinética de transporte. A estas características hay que añadir las propias de la contradifusión: un transporte de masa difusivo y la posibilidad de barrer un amplio rango de condiciones de cristalización en una sola experiencia para un par proteína-agente precipitante.

El crecimiento de los cristales en el interior de un capilar evita el estrés hidrodinámico y mecánico durante su crecimiento y elimina la manipulación de los cristales cuando estos se preparan para la difracción. La capacidad de los cristales de proteínas para adoptar la forma del recipiente que los contiene es una baza importante, aún sin explotar, para la realización de estudios enzimáticos o cualquier otro tipo de trabajo que requiera la difusión de pequeñas moléculas en el interior del cristal [Domínguez-Vera et al., 1996]. Sin embargo, esta es la principal limitación cuando se quiere obtener cristales de gran tamaño para caracterizar las propiedades mecánicas o para cualquier otro tipo de estudios que requiera la independencia del cristal respecto de su entorno. En estos casos y como veremos a lo largo de esta tesis las experiencias de contradifusión en medios gelificados representan la mejor alternativa.

#### **1.4.1. REQUERIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LA CONTRADIFUSIÓN**

Para poder realizar una experiencia en contradifusión debemos disponer de:

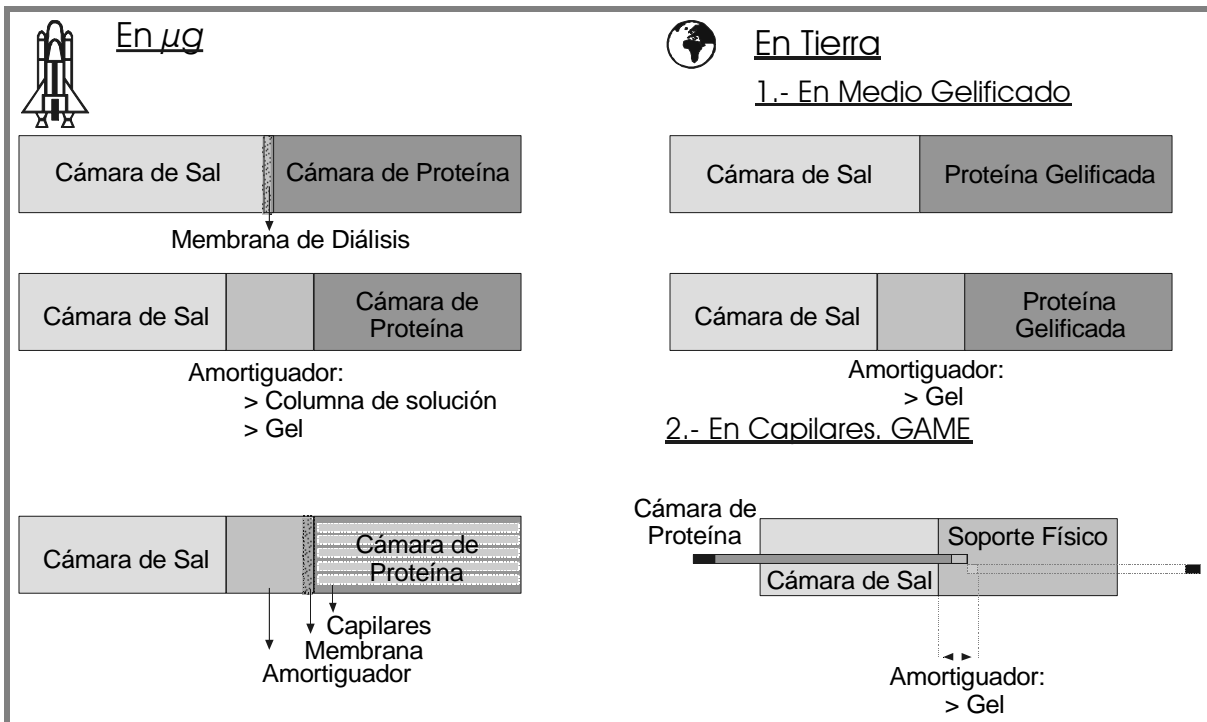
- 1.- Un medio donde el transporte de materia está controlado por la difusión.
- 2.- Unas condiciones iniciales de concentración que nos aseguran que comenzamos suficientemente alejados del equilibrio.
- 3.- Una dimensión de desarrollo.

Para conseguir un medio con transporte de masa controlado fundamentalmente por fenómenos difusivos podemos realizar las experiencias en condiciones de microgravedad, en medios gelificados o en capilares [García-Ruiz et al, 1999]. Cada uno de estos medios presenta una serie de ventajas e inconvenientes que se recogen en la tabla 1.4-1. La elección de uno u otro escenario depende fundamentalmente de las características de nuestra muestra. Por supuesto la posibilidad de crecer cristales en un entorno de gravedad reducida se sale de un esquema básico de laboratorio, pero las perspectivas de futuro son alentadoras con el desarrollo de un nuevo módulo y sistemas de cristalización que van a permitir multiplicar por cien el número de experiencias que se lleven a cabo en cada misión. Entre las posibilidades “terrenales” (bajo la influencia de la fuerza de gravedad) la elección de una u otra técnica depende del fin para el que queremos los cristales y del fácil manejo de los cristales. No podemos hablar de limitación de la cantidad de muestra, ya que es posible encontrar la configuración experimental que minimice el consumo de muestra en cualquiera de los medios señalados.

	VENTAJAS	INCONVENIENTES
$\mu$ -GRAVEDAD	<ul style="list-style-type: none"> <li>❑ Medio difusivo de transporte de masa.</li> <li>❑ Evita la sedimentación de los cristales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Coste</li> <li>➤ No evita los fenómenos de tensión superficial.</li> <li>➤ Convención y movimiento de los cristales por aceleración residual.</li> </ul>
GELES	<ul style="list-style-type: none"> <li>❑ Medio difusivo</li> <li>❑ Evita la sedimentación de los cristales</li> <li>❑ Evita la convección de Marangoni debida a fenómenos de tensión superficial.</li> <li>❑ Amortiguador de estrés mecánico, acústico y térmico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Interacción física y química con las moléculas de proteína y de sal.</li> </ul>
CAPILARES	<ul style="list-style-type: none"> <li>❑ Medio cuasi difusivo en función de la orientación respecto del vector gravedad.</li> <li>❑ Evita la manipulación de los cristales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Congelación de los cristales??</li> <li>➤ No evita la sedimentación.</li> <li>➤ Limita el tamaño de los cristales en la dimensión capilar.</li> </ul>

*Tabla 1.4-1 Ventajas e inconvenientes de los posibles escenarios para llevar a cabo una experiencia en contradifusión.*

Como en cualquier otro tipo de ensayo de cristalización es aconsejable disponer de la mayor información posible acerca de la muestra. El conocimiento de los protocolos de purificación y aislamiento empleados puede servir de gran ayuda. En la mayoría de estos protocolos se emplean sales u otros aditivos para precipitar las proteínas, para separarlas en columnas cromatográficas, etc. A partir de estos datos es posible intuir los medios (pH, fuerza iónica, etc) en los que el sistema proteico es estable y compatible o precipita, agrega o desnaturaliza. Esta información es de gran utilidad a la hora de diseñar las posibles estrategias de cristalización. Cuando se dispone de un conocimiento previo de las condiciones en las que precipita la proteína se puede comenzar directamente con las experiencias en contradifusión. Sin embargo, cuando la información es escasa conviene realizar los primeros ensayos usando cualquier técnica tradicional. Estos ensayos deben de culminar con la elección de unas determinadas condiciones de cristalización/precipitación. Escogidas éstas, las técnicas contradifusivas permiten barrer un amplio rango de condiciones experimentales en una sola experiencia. De esta manera en alguna posición a lo largo de la cámara de proteína las condiciones de crecimiento serán las adecuadas para obtener un cristal de elevada calidad. La amplitud de condiciones barridas es función de las concentraciones iniciales de sal y proteína que deben de ser suficientemente altas para comenzar alejados del equilibrio. Operando de esta forma se obtiene un precipitado inicial de baja cristalinidad que puede suponer consumo inútil de proteína. Para atenuar este efecto se suele interponer un amortiguador físico entre las cámaras de sal y la cámara de proteína. En la figura 3.1-1 se muestran las distintas posibilidades propuestas para la realización de experiencias en contradifusión en tierra y en condiciones de gravedad reducida [García-Ruiz, et al., 1999].



**Fig.1.4-1** Posibles configuraciones experimentales para la realización de una experiencia en contradifusión en medio gravitatorio o de gravedad reducida. Cualquier combinación de los elementos propuestos es posible siempre que se conserven los requerimientos mínimos. La última figura de la columna de la izquierda muestra posibles combinaciones, algunas de ellas empeladas ya en nuestro grupo durante las misiones espaciales en la que hemos participado. Adaptación de García-Ruiz et al. (1999).

Por último y puesto que los coeficientes de difusión de la proteína y la sal se diferencian en un orden de magnitud podemos asegurar que es la sal la que invade la cámara de proteína. Si no se dispone de una cámara de desarrollo suficientemente larga o los tiempos de inducción son extremadamente largos, la sal puede invadir y homogeneizar por completo la cámara de proteína. Esto provocaría la pérdida de la discriminación espacio-temporal de condiciones convirtiendo la experiencia en un *batch* [Otálora, Novella, et al., 1999].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

*Apresurémonos pues a decir que no hay  
recetas lógicas para hacer descubrimientos ...  
S. Ramon y Cajal*

### 2.1. LAS PROTEÍNAS

En trabajos en los que se pretende establecer los beneficios de una determinada metodología es necesario escoger sistemas que hayan sido ampliamente caracterizados. En cristalización de proteínas este papel lo representa fundamentalmente la enzima lisozima de clara de huevo (HEWL)<sup>i</sup>, factor común en la mayoría de los estudios de nucleación, crecimiento y determinación de la calidad cristalina. Puesto que la mayor parte de esta memoria pretende demostrar la bondad de las técnicas contradifusivas frente a las técnicas tradicionales de cristalización escogimos este sistema como elemento de comparación. Para generalizar algunas conclusiones y particularizar determinados estudios empleamos la thaumatina de *Thaumatococcus daniellii* y la ferritina de bazo de caballo en su forma mineralizada y desmineralizada (Apo). Ambas proteínas, thaumatina y ferritina, se han empleado como modelos en estudios de crecimiento cristalino en condiciones de microgravedad y para evaluar el efecto de los geles sobre calidad de los cristales [Ng, et al., 1997; Lorber, et al., 1999] y sobre la influencia de la presencia de impurezas (agregados de la proteína u otras proteínas homologas) [Thomas, et al., 1998].

En la tabla 2.1-1 se recoge un resumen de las características físicas y químicas más relevantes así como las condiciones de cristalización que hemos empleado en este trabajo. Las entradas (I.D) que aparecen en la tabla se refieren a las estructuras resueltas a partir del mejor juego de datos de difracción hasta la fecha. Esta información, junto con los grupos espaciales, estructuras, referencias, etc., se ha obtenido consultando las páginas electrónicas del banco de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) [Bernstein, et al., 1977].

---

<sup>i</sup> HEWL del ingles *Hen Egg White Lysozyme*.

PROTEÍNA	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS					
	Nº Aminoácidos	PM (Da) <sup>a</sup>	Nº Cadenas	pI <sup>b</sup>		
LISOZIMA	129	14.296	1	11.3		
THAUMATINA	207	22.203	1	12.0		
FERRITINA	174	456.000+PM <sub>Fe</sub> *N <sup>o</sup>	24	4.5		
APOFERRITINA	174	456.000 Da	24	4.3		
CRISTALIZACIÓN						
	SISTEMA	GRUPO ESPACIAL	CONDICIONES			P.D.B, I.D
			Tampón	Sal	T °C	
LISOZIMA	Tetragonal	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	AcNa 50 mM, pH 4.5	NaCl	22°	193L
	Triclínico	P1	AcNa 25 mM, pH 4.5	NaNO <sub>3</sub>	22°	3LZT
	Ortorrómbico	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	AcNa 50 mM, pH 4.5	NaCl	45°	1LZ1
THAUMATINA	Tetragonal	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	NaHPO <sub>4</sub> 0.1M, pH 7.0	KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	22°	1THW
FERRITINA	Cúbico	F432	AcNa 0.20M, pH 5.0	CdSO <sub>4</sub>	22°	1BG7
APOFERRITINA	Cúbico	F432	AcNa 0.20M, pH 5.0	CdSO <sub>4</sub>	22°	1DAT

**Tabla 2.1-1** Características físico-químicas y condiciones de cristalización más relevantes de los distintos sistemas estudiados en esta memoria. Los códigos de PDB están referidos a las estructuras resultas con los mejores datos de difracción.

<sup>a</sup> PM es el peso molecular en unidades de Daltons (1Da = 1 gr/mol).

<sup>b</sup> El punto isoeléctrico de la proteína (pI) corresponde al valor de pH al que la proteína presenta una carga neta nula.

Las muestras de proteína se preparan a partir del producto comercial por disolución en el tampón<sup>i</sup> de trabajo (lisozima y thaumatina) o por dilución de la solución comercial sobre el tampón (ferritina y apoferritina). Cuando se trata de un polvo liofilizado la disolución se realiza empleando un sistema de balanceo o giro suave, nunca con agitadores magnéticos ni mecánicos que pueden desnaturar la proteína. Conviene que la pesada se exceda en un 10-15% del peso exacto, ya que como se verá más adelante la presencia de sales y agua es de este orden. La muestra se filtra empleando filtros de 0.45µm de paso de luz y baja adsorción proteica (Millipore-Millex GV) y su concentración final se determina por espectrofotometría a 280 nm. Cuando se desconoce el coeficiente extinción molar se puede realizar una buena estimación a partir del número de triptofanos y tirosinas presentes en la secuencia aminoacídica [Pace et al., 1995].

Al tratarse de experiencias realizadas en contradifusión las concentraciones empleadas son superiores a las que se utilizan habitualmente en técnicas de cristalización tradicionales por lo que conviene preparar las soluciones madres de forma extemporánea para evitar la agregación y/o desnaturación de la proteína.

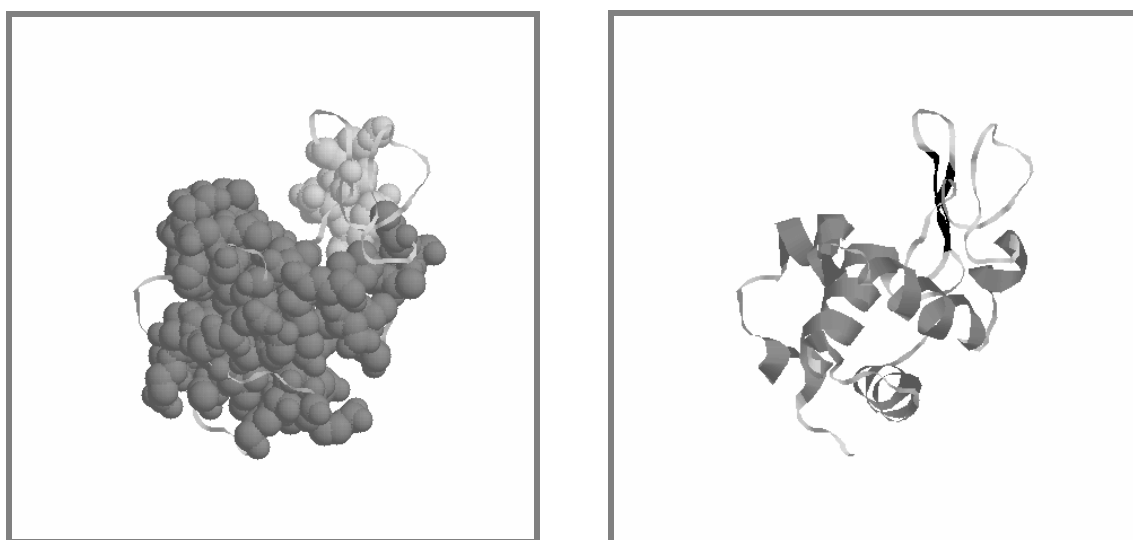
<sup>i</sup> Un tampón o regulador es un sistema químico formado por un par ácido débil/base conjugada o base débil/ácido conjugado que amortigua los cambios de pH cuando se añade un ácido o una base al medio.



### 2.1.1. LISOZIMA

Se trata de una enzima lítica que hidroliza los enlaces glicosídicos de tipo  $\beta(1-4)$  del esqueleto de polisacáridos de péptidoglicanos presentes en la pared bacteriana. El producto de la hidrólisis genera disacáridos de N-acetil-D-Glucosamina y del ácido N-acetil murámico. Aunque se puede obtener de diferentes fuentes, huevo, bacteriófagos T4 y  $\lambda$ , de leche humana, papaya, etc. la mayoría de los trabajos se han realizado con lisozima purificada de huevo de gallina (HEWL). La pureza de la proteína depende de la casa comercial e incluso del lote de proteína (apéndice A) y desempeña un importante papel en la nucleación y crecimiento de los cristales [ver referencias en: Rosenberger, 1996 y Thomas, et al., 1996].

La lisozima está compuesta por 129 aminoácidos con un peso molecular de 14.3 kD y pI 11.3. Su estructura tridimensional presenta un 30.23% de los aminoácidos implicados en estructuras en  $\alpha$ -hélices (ocho) y un 6.20% en láminas- $\beta$  (dos) (Fig.2.1-1), estabilizada por la formación de puentes disulfuros.



**Fig.2.1-1** Estructura tridimensional de lisozima HEWL tetragonal representada con RasMOL V2.7.1 a partir de las coordenadas atómicas depositadas en el PDB. En ambas representaciones se han destacado las regiones en  $\alpha$ -hélices y láminas- $\beta$ .

RasMOL V2.7.1, Copyright (C) Herbert J. Bernstein 1998-1999.

Como veremos en el transcurso de este trabajo, la lisozima ha sido y sigue siendo el material más empleado en los estudios de cristalogenésis de proteínas. En el PDB se recogen hasta 610 estructuras resueltas, en su mayoría son mutantes de las diferentes fuentes. La lisozima en su estado nativo se ha cristalizado en los sistemas tetragonal, ortorrómbico, hexagonal, triclínico y monoclinico, en diferentes condiciones de pH, temperatura y aditivos. Un buen resumen de las condiciones de cristalización se puede encontrar en las publicaciones de Ries-Kautt y Ducruix (1989) y Guilloteau (1992). Recientemente se ha relacionado el elevado número de polimorfos de esta proteína con la elevada concurrencia de arginina un 8.5% (típicamente 3% en proteínas)

involucrada en los tres contactos intermoleculares (macroenlaces) presentes en el cristal [Oki, et al., 1999]. El polimorfo tetragonal se ha resuelto a una resolución de 1.33Å [Vaney, et al., 1995] aunque la estructura a mayor resolución (0.92Å) se ha obtenido con lisozima cristalizada en el sistema triclínico [Walsh, et al., 1998] cercano a los 0.94 Å obtenido a partir de un cristal de lisozima tetragonal crecido en contradifusión en condiciones de microgravedad [García-Ruiz et al, 2000].

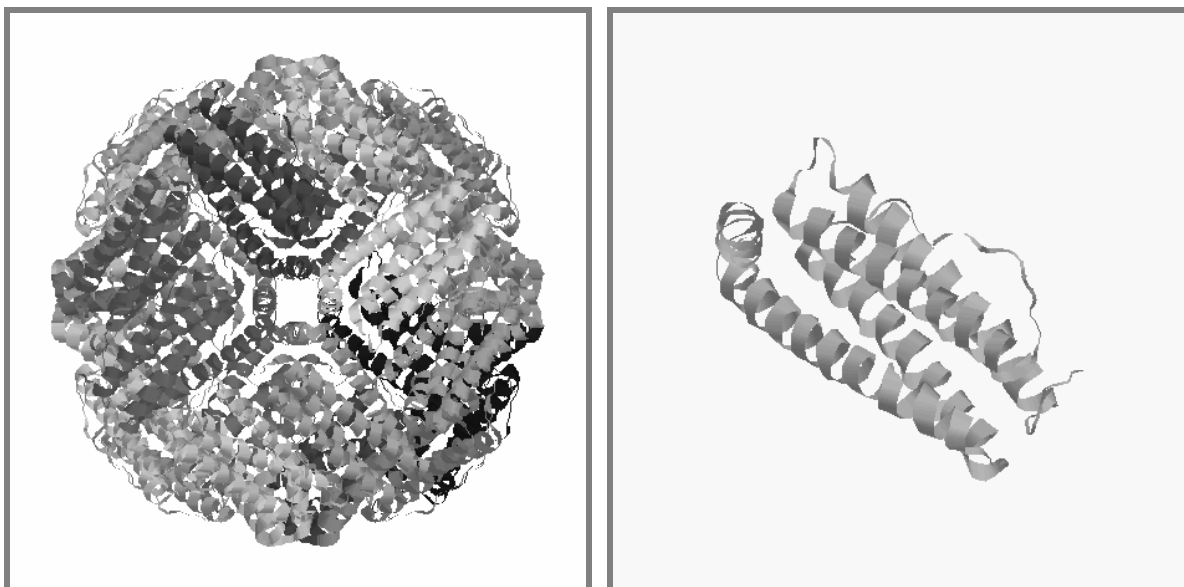
### 2.1.2. FERRITINA

La ferritina es una proteína de almacenamiento y catálisis de hierro en diferentes organismos. Consta de 24 subunidades (cadenas peptídicas de 174 aminoácidos cada una) con estructura globular de 12 nm de diámetro (576 aminoácidos básicos y 624 aminoácidos ácidos en la superficie). Cada subunidad presenta un total de 5  $\alpha$ -hélices (59.66% de los aminoácidos de la proteína). Las 24 cadenas configuran una esfera hueca de 7-8 nm de diámetro que es capaz de almacenar hasta 4500 átomos de Fe(III) por molécula, aunque normalmente sólo se encuentra saturada en un 20%. La esfera contiene 8 túneles en forma de embudo de 3-4 Å de diámetro que presenta un fuerte carácter hidrofílico debido fundamentalmente a la presencia de residuos glutamatos y aspartatos, mientras que el interior del hueco presenta un carácter fundamentalmente hidrófobo (Fig.2.1-2).

La ferritina presenta dos tipos de cadena: H (pesada) y L (ligera) con diferente afinidad por los átomos de hierro. Las cadenas tipo L tienen mayor afinidad por el hierro que las de tipo H y están habitualmente asociadas a células de reserva de hierro, mientras que las de tipo H son abundantes en células con un fuerte metabolismo de hierro. Esta proteína ha evolucionado poco y su secuencia se encuentra bien conservada en animales, plantas y bacterias aunque la proporción entre cadenas de tipo H y L varían según las especies y dentro de la misma especie dependiendo de su localización. En humanos existen más de 25 isoformas con diferentes proporción entre cadenas tipo L y H dependiendo del tejido del que proceden. La ferritina de bazo e hígado son ricas en cadenas de tipo L y constituyen los órganos de reserva de hierro junto con la médula ósea.

Las principales funciones fisiológicas que las ferritinas desempeñan en humanos son: 1) la de reserva de hierro, un elemento esencial pero fuertemente tóxico en estado libre, 2) son una fuente de hierro fácil de obtener cuando los niveles en plasma disminuyen y 3) protegen las células frente a la oxidación. Representa la principal fuente de hierro para la síntesis de hemoglobina y su deficiencia provoca la anemia deficiente de hierro, la enfermedad deficiente más común en el mundo industrializado.

Actualmente se encuentra resuelta la estructura por difracción de rayos X con un límite de resolución de 1.95 Å para la estructura nativa [Hempstead, et al., 1997] y 1.85 Å en mutantes [Takagi, et al., 1998]. Sin embargo, no es posible dar detalle de la interacción entre el mineral y los residuos aminoacídicos implicados, posiblemente debido a la dificultad de interpretación de la densidad electrónica en la región de almacenamiento del hierro. La forma desmineralizada está resuelta con un límite de resolución de 2.05 Å [Gallois, et al., 1997].



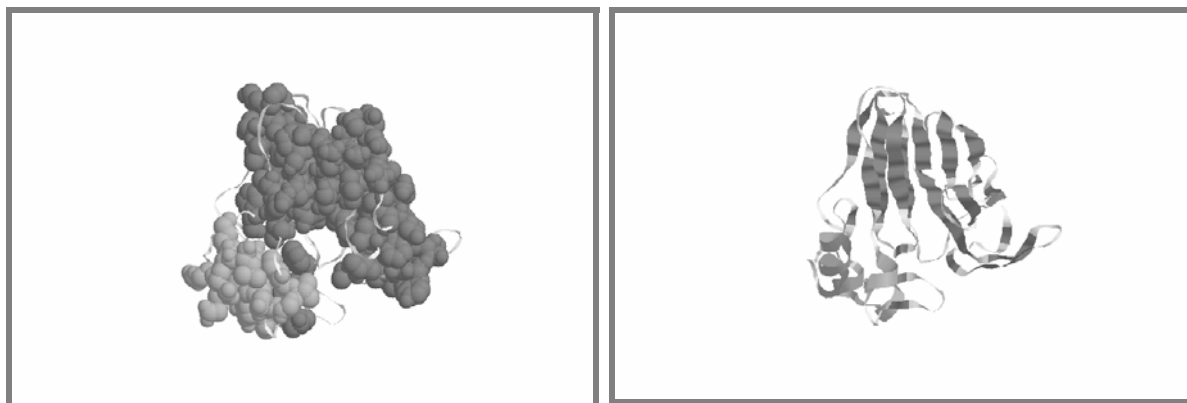
**Fig.2.1-2** A la izquierda hemos representado la molécula de ferritina (monómero de 24 cadenas) mostrando la entrada de la cavidad de reserva de hierro. A la derecha una sola cadena L por separado.

La ferritina y apoferritina se encuentran disponibles comercialmente purificadas de bazo de caballo. Ambas están libres de contaminación con otras proteínas pero presentan hasta un 45% de oligómeros (> de 24 subunidades) en forma de dímeros, trímeros, etc. que modifican fuertemente la conducta de nucleación y crecimiento de los cristales [Saeede & Boyde, 1980, Thomas, et al., 1998].

### 2.1.3. THAUMATINA

Es una proteína que se extrae de bayas africanas (*Thaumatococcus daniellii*). Se emplea como edulcorante con un poder varios miles de veces superior al de la glucosa, lo que la hace una buena candidata como edulcorante no calorífico. En la naturaleza se presenta en dos formas isomorfas (A y B) que difieren en un solo aminoácido en la posición 46, asparragina en la forma A y lisina en el isomorfo B. Está compuesta de 207 aminoácidos con un peso molecular total de ~22.0 kDa, y un punto isoeléctrico de 12.0. La estructura tridimensional se compone de cuatro  $\alpha$ -hélices (10.63%) y 13 láminas- $\beta$  (30.92%) organizadas en dos dominios estructurales estabilizados por ocho puentes disulfuros (Fig.2.1-3).

Se ha cristalizado en tres formas polimórficas, monoclinica (C2), ortorrómbica (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) y tetragonal (P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2) [Ko, et al., 1994]. Los mejores resultados de difracción los obtuvieron para las formas ortorrómbica y tetragonal (1.75Å) aunque el polimorfo tetragonal presentaba intensidad apreciable hasta 1.5 Å y fue la forma con mayor contenido de moléculas de agua 123 frente a las 105 de la forma ortorrómbica.



**Fig.2.1-3** Estructura tridimensional de *thaumatococcus* representada con el programa RASMOL. En ambas representaciones se han destacado las regiones en  $\alpha$ -hélices (gris claro) y láminas- $\beta$  (gris oscuro).

## 2.2. LOS GELES

La palabra gel recoge a un extenso número de sustancias que son capaces de polimerizar en unas determinadas condiciones. En general podemos referirnos a los geles como una malla tridimensional que compartimenta el espacio en poros y cavidades<sup>i</sup>. Cuando estas cavidades están embebidas de una solución acuosa las denominamos hidrogeles y participan de las características físicas y químicas de ambas fases.

Dependiendo del camino seguido para su obtención los hidrogeles se clasifican en geles de tipo físico o geles reversibles y geles de tipo químico o geles irreversibles. En los geles físicos (agarosa, gelatina, etc.) la polimerización tiene lugar a través de interacciones débiles de las unidades monómeras. Los geles químicos (poliacrilamida, sílice, etc.) se obtienen por reacción química de las unidades monómeras y por tanto existen verdaderos enlaces que estabilizan la estructura. Los geles de sílice son considerados a veces como un caso intermedio debido a que la polimerización tiene lugar a partir de agregados (partículas primarias) de tamaño superior a las unidades monómeras. Sin embargo, esta consideración no está de acuerdo con la dificultad para estabilizar estas partículas esféricas en solución (sol).

En este trabajo hemos usado los geles de agarosa y geles de sílice como soporte de capilares en el método de acupuntura en geles y como medio de crecimiento de los cristales.

### 2.2.1. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LOS GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa se generan por descenso térmico de un sol preparado por disolución de la muestra en agua o en la solución de trabajo. Existe una amplia variedad comercial de derivados de agarosas con distintas temperaturas de fusión y gelificación en función del grado de modificación y/o procedencia. En la tabla 2.2-1 hemos recogido las características más relevantes de los distintos productos que hemos empleado en este trabajo, así como las compañías que los suministran. Una información más amplia y detallada se ofrece en el siguiente capítulo.

<sup>i</sup> La IUPAC recomienda emplear la siguiente clasificación de los poros de un material basándose en su diámetro (d): microporos  $d < 2.0$  nm, mesoporos  $2.0$  nm  $< d < 50.0$  nm y macroporos  $d > 50$  nm.

En el protocolo I. se esquematizan los pasos a seguir para la preparación de un gel de agarosa a un 1% p/v de concentración. Es aconsejable seguir este protocolo cuando el sol se va a emplear en estudios de cristalización de proteínas, aunque es posible simplificar el esquema empleando un microondas para preparar el gel. Esta forma de preparación impide mantener una agitación continua, lo que puede dar lugar a la obtención de geles no homogéneos y afectar la reproducibilidad de los datos.

Códigos	Tipo	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> %	Fuerza		T <sub>GELIFICACIÓN</sub>		T <sub>FUSIÓN</sub> (°C)	EEO	Precio/gr. (Pts.)
			g/cm <sup>2</sup>	% p/v	(°C)	% p/v			
<b>Sigma-Aldrich</b>									
A 0701	VII-A	≤ 0.10	≥ 250	1.0	26±2	1.5	≤ 65.5	≤0.12	1500
A 4018	VII	≤ 0.10	≥ 200	1.0	26-30	1.5	≤ 65	≤0.1	2840
A 2576	XI-A	≤ 0.14	≥ 100	1.0	≤ 17	1.5	≤ 60	≤0.11	1644
A 5030	XI	≤ 0.10	≥ 75	2.0	8-17	0.8	≤ 50	≤0.05	3290
<b>Pharmacia</b>									
17-0424-02	L-Ag.	< 0.30	>1000	1.5	40-43	1.5	≤ 90	0.01-0.03	270

**Tabla 2.2-1** Características más relevantes de los geles comerciales de agarosa empleados en este trabajo.

<b>Protocolo I: Preparación de geles de agarosa (1.0% p/v)</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se toma el volumen de solución que queremos preparar y se vierte en un Erlenmeyer esférico de boca esmerilada (10ml).</li> <li>2. El matraz se introduce en un baño de agua a temperatura ambiente y se añade la pesada de agarosa (0.1gr) agitando continuamente (250rpm). Se tapa el matraz con un tapón de goma para evitar la evaporación de la solución y la consecuente concentración de los solutos.</li> <li>3. Se aumenta la temperatura hasta su temperatura de fusión (T<sub>f</sub>=90°C)* y la agitación a 750 rpm.</li> <li>4. Una vez alcanzada dicha temperatura se mantiene durante unos 20 minutos, hasta observar la solución completamente nítida.</li> <li>5. Podemos ahora bajar la temperatura 10°C por encima de la temperatura de gelificación (~50°C) y mantenerlo a dicha temperatura hasta el momento de ser empleada.</li> </ol>
<p>Cuando vamos a emplear el gel para crecer cristales de proteínas, éste debe ser fresco, recién preparado. El calentamiento reiterado a 95°C provoca la pérdida de las características físico-químicas del gel, dificultando la reproducibilidad de los resultados [Guiseley, 1970].</p>	

\* A temperaturas cercanas a los 100°C se pueden producir proyecciones de la solución si el matraz no está bien cerrado. Se recomienda emplear siempre matraces de mayor volumen (al menos el doble) para evitar que la solución salpique del matraz.

## 2.2.2. PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE GELES DE SÍLICE

El protocolo de preparación de un gel de sílice a partir de la valoración de una solución de metasilicato de sodio de 1.06 gr/ml de densidad fue descrito por Henisch y colaboradores en 1965 (Protocolo II-a). La mezcla de idénticos volúmenes de la solución de silicato con una solución 1 M de ácido permite obtener la formación de un gel después de 24-36 horas [Henisch et al., 1965]. Esta forma de operar evita la presencia de una concentración excesiva de iones que pueden causar una gelificación local prematura y la pérdida de homogeneidad del medio.

El ácido silícico y sus diferentes estados de ionización pueden reaccionar con la sílice del material de laboratorio por lo que se deben emplear recipientes de polipropileno o cualquier otro polímero plástico y extremar las precauciones con instrumentos de vidrio (electrodos, sondas, etc.).

### Protocolo II-a: Preparación del gel de sílice a partir de metasilicato de sodio.

La solución de silicato de sodio comercial que habitualmente empleamos tiene una densidad específica de 1.390 gr/ml (Aldrich Cat. No33,844-3). En primer lugar se baja la densidad del silicato a 1.06 gr/ml.

1. La disolución se realiza teniendo en cuenta que:

$$V_i = V_T \cdot \frac{(\rho_f - \rho_{H_2O})}{(\rho_i - \rho_{H_2O})}$$

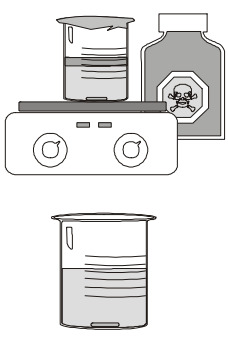
Donde los subíndices i, f y H<sub>2</sub>O representan las densidades iniciales y finales de la solución de silicato y del agua a la temperatura ambiente, V<sub>i</sub> y V<sub>T</sub> representan el volumen de la solución madre de silicato y el volumen total que deseamos preparar respectivamente.

2. La solución se agita durante un mínimo de 30 minutos. Esta solución se puede mantener durante varios meses (**Solución S**).
3. La solución S se valora con ácido acético (ó HCl) 1.0 N, agitando continuamente. El volumen de ácido empleado depende del pH final deseado (Capítulo 3). Se debe añadir el silicato sobre el ácido cuando preparamos un gel ácido y el ácido sobre el silicato cuando preparamos un gel básico. Esto evita que se alcancen localmente valores de pH 7.0 que provocan la inmediata polimerización en dicha región y la consecuente pérdida de homogeneidad.

Otra posibilidad para preparar un gel de sílice es partir de los derivados alcoholes de silicio, TMOS (Tetrametoxisilano) y TEOS (Tetraetoxisilano). La principal ventaja que presentan los geles preparados a partir de estos compuestos es que no añaden sales al medio aunque sí el alcohol como subproducto de la reacción (Capítulo 3).

Como se recoge en el protocolo II-b para obtener un gel homogéneo es necesario que la solución quede completamente transparente y no se observen separaciones de fases, indicativo de

que hemos monomerizado la solución de partida. Para un gel al 10% v/v preparado a partir de TMOS la solución se homogeneiza en unos 15 minutos, mientras que si la preparamos a partir de TEOS son necesarias más de diez horas. Los tiempos de gelificación también se amplifican cuando el sol se prepara a partir de TEOS por lo que decidimos trabajar con geles preparados a partir de TMOS ( $C_4H_{12}O_4Si$ ,  $M_r$  152.22 gr/mol). La principal desventaja del TMOS frente al TEOS es su toxicidad que requiere una manipulación cuidadosa y responsable. La solución comercial utilizada (Fluka 87680) tiene una densidad específica de 1.032 gr/cc y una pureza superior al 99%.

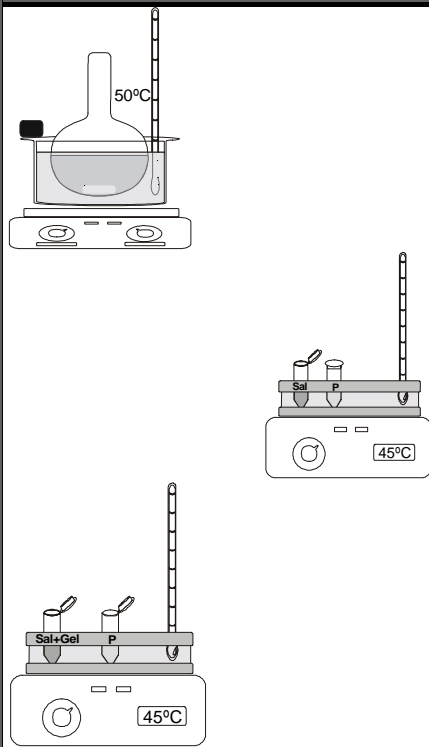
<b>Protocolo II-b: Preparación de geles de sílice (10% v/v) a partir de TMOS o TEOS</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Para preparar 10 ml de gel se toman 1 ml de la suspensión comercial y se lleva a 10 ml con el tampón de trabajo.</li> <li>2. Se agita continuamente hasta comprobar que la solución no presenta diferencia de fases, momento en que hemos monomerizado la solución.</li> <li>3. Si se deja reposar la condensación ocurrirá tras un tiempo de espera, que depende fundamentalmente del pH de nuestro tampón. Aconsejamos no mover el recipiente hasta que la polimerización haya transcurrido por completo.</li> </ol>
<p>El tetrametoxisilano (TMOS) es un producto de elevada toxicidad por lo que debe de manipularse con especial precaución. Es aconsejable emplear materiales de polipropileno, incluidas las pipetas y lavar todo el material con abundante alcohol antes de proceder al lavado con agua.</p>	

### 2.2.3. PROTOCOLO DE CRISTALIZACIÓN EN BATCH DE GEL DE AGAROSA

La obtención de una solución gelificada de lisozima se puede llevar a cabo empleando diversos protocolos descritos en la bibliografía [Ducruix y Giegé, 1999]. La diferencia fundamental entre los distintos métodos estriba en la forma en que se introduce la proteína en el seno del polímero: por difusión sobre gel o mezclándola con el sol antes de que este polimerice. En nuestro caso se escoge la segunda opción porque facilita la manipulación y reduce el tiempo de espera. Por otra parte, la temperatura de gelificación de la agarosa (Pharmacia 17-0224-02) es de 40°C por lo que el sol se ha de preparar a 45°C. A esta temperatura es posible preparar una solución de lisozima, gel y sal evitando que se formen regiones locales de alta sobresaturación que pueden precipitar la proteína. Para el caso de proteínas termosensibles o con solubilidad inversa en función de la temperatura es necesario buscar soluciones alternativas (Ej. geles de baja temperatura de gelificación).

El protocolo III. es una extensión del protocolo I. de forma que partimos de un sol de agarosa a una temperatura superior a la temperatura de gelificación preparado sobre el tampón correspondiente.

### Protocolo III: Preparación de un "batch" en gel de agarosa.



1. Se prepara en un Eppendorf la solución de sal y tampón y se ponen a calentar en un *baño María* o placa calefactora a la temperatura a la que hemos mantenido el gel. Se calienta al mismo tiempo la proteína en otro Eppendorf a esa misma temperatura.
2. Se mezclan la cantidad apropiada del gel con la solución de sal y se mantiene la temperatura.
3. Añadimos en último lugar la solución de proteína mezclando lentamente con la pipeta.
4. La solución (sol) que la debemos de mantener a 45-50°C se puede trasvasar ahora a la célula de crecimiento elegida \*.
5. Opcionalmente se puede añadir una fina capa de aceite de glicerina para evitar la nucleación en el menisco inducida por la tensión superficial y la evaporación.

Cuando la concentración del gel es mayor de 0.5% p/v, es conveniente cortar el extremo de la punta de la micropipeta, esto facilita su manipulación. Es importante tomar el sol del fondo del Erlenmeyer donde la homogeneidad de la solución es mayor.

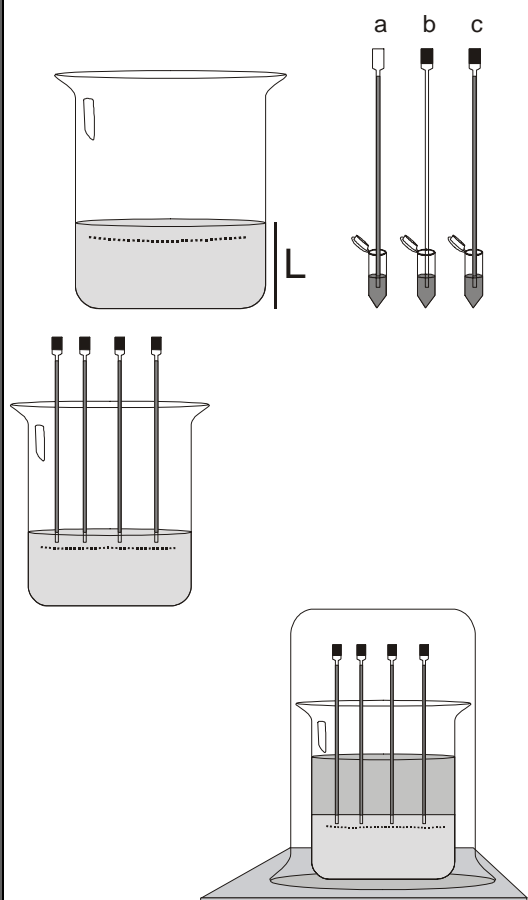
\*Habitualmente se emplean como reactores de crecimiento de los cristales placas de cultivo celular (no estériles) aunque un seguimiento cómodo se consigue manteniendo la experiencia en el tubo Eppendorf.

#### 2.2.4. PROTOCOLOS DE CRISTALIZACIÓN EN CONTRADIFUSIÓN

El método de acupuntura en geles es el primer método específicamente diseñado para el crecimiento de macromoléculas biológicas que se beneficia de las ventajas del crecimiento en sistemas contradifusivos [García-Ruiz y Moreno, 1994; García-Ruiz et al., 1993]. Este método combina los medios capilares y gelificados para obtener un transporte de masa difusivo minimizando el consumo de proteína. En el protocolo III. se esquematizan los pasos a seguir para la preparación de una experiencia de acupuntura en geles. La simplicidad del método permite realizar una experiencia con el material habitual de laboratorio aunque desarrollos más complejos se pueden llevar a cabo con fines específicos. El protocolo que aquí se recoge representa una forma general de operar y la que a nuestro juicio permite sacar mejor partido a la técnica de contradifusión [Otálora, 1996]. Como ya señalamos en el capítulo anterior es necesario partir de concentraciones de proteína y sal suficientemente alejadas del equilibrio para poder desarrollar un amplio barrido de condiciones. Un aumento de la profundidad de punteado va en detrimento del rango de sobresaturaciones pero debe ser tal que mantenga la verticalidad de los capilares.

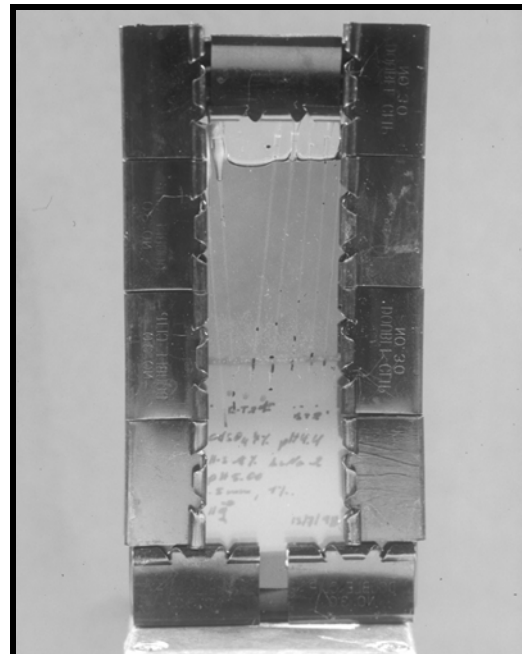
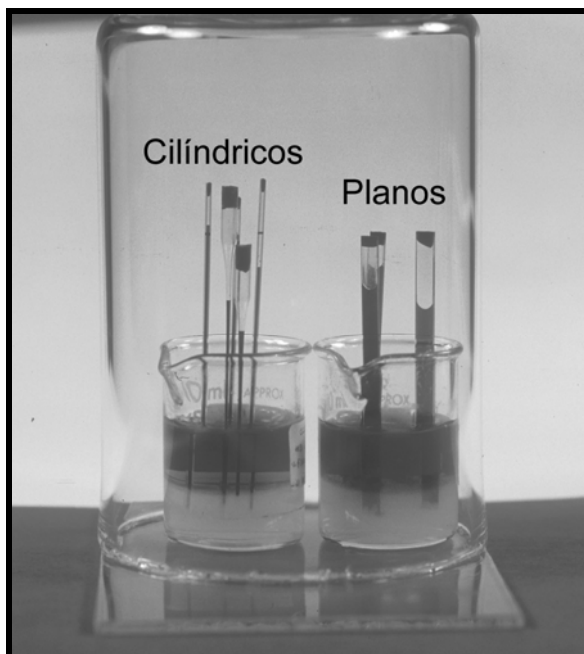


### Protocolo IV-a: Preparación de una experiencia empleando el GAME



1. Preparación del gel de sílice o agarosa en su caso. Hay que tener en cuenta que la resistencia mecánica del gel debe ser suficiente para que mantengan la verticalidad de los capilares.
2. Se vierte el sol en el contenedor escogido y se deja gelificar.
3. Se llenan los capilares con la solución de proteína y se sellan por el extremo opuesto (secuencia a-b-c). Para el sellado se puede emplear plastilina o cualquier otro material fácil de moldear y que selle herméticamente.
4. Se pinchan los capilares sobre el gel perpendicular a la superficie de este. Típicamente la profundidad de punteado es menor de 1 cm.
5. Se añade la solución de sal sobre el gel que soporta los capilares.
6. Finalmente el experimento se cubre con una campana o similar para evitar la evaporación.

\* Cuando se emplean capilares de tipo Lindeman la presión ejercida al sellar el capilar expulsa la solución de proteína pero basta introducirlo de nuevo en la solución para que esta retorne a la altura alcanzada inicialmente.

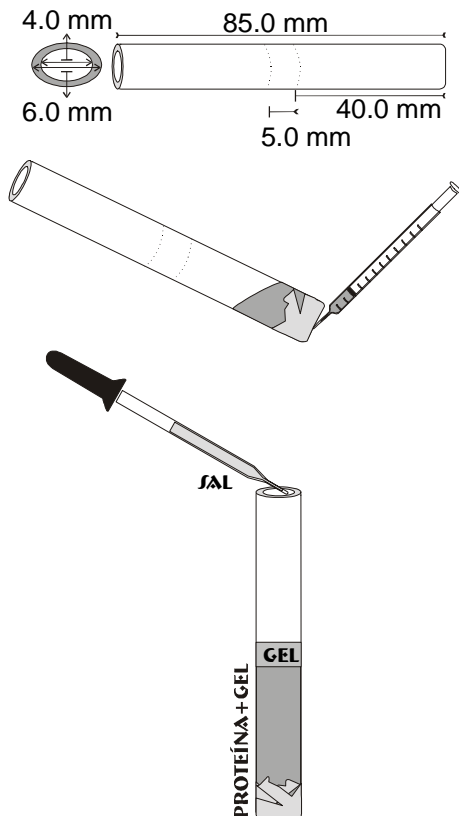


**Fig.2.2-1** Posibles configuraciones experimentales del GAME. A la izquierda en vasos de precipitado y capilares cilíndricos y planos, a la derecha en una placa con capilares cilíndricos. .

El dispositivo en placa se compone de dos vidrios de 10 cm de largo por 4 cm de ancho separados por un marco de caucho de 1 cm de lado y 4-5 mm de ancho abierto por uno de sus extremos. Para hacer el sistema estanco el marco es cubierto por una fina capa de grasa de vacío. El sistema se asegura empleando pinzas metálicas. El gel y las soluciones se añaden por el extremo abierto que finalmente se asegura cubriéndolo con una tira de cinta aislante. Este dispositivo facilita el seguimiento de la experiencia. Permite además emplear la posición respecto del vector gravedad como una variable del sistema, muy útil cuando se trabaja con proteína de elevado peso molecular.

Otra forma de obtener un medio difusivo para realizar experiencias en contradifusión es el empleo de medios gelificados. Al igual que en el método de acupuntura en geles se dispone de dos cámaras separadas entre si por una tercera cámara amortiguadora (Capítulo 1). Para su preparación basta con disponer de un cilindro de vidrio hueco. El diámetro del cilindro depende de la disponibilidad de muestra de forma que podemos emplear tubos de 4 mm o micropipetas de 0.5 mm de diámetro interno. Como se recoge en el protocolo IV es suficiente con gelificar la cámara de proteína puesto que ésta será invadida por la sal. Si por alguna razón se quiere dar estabilidad al sistema se puede gelificar también la cámara de sal. Esta forma de operar es esencialmente útil cuando la concentración de gel en la cámara de proteína es muy baja (< 0.1% p/v para agarosa o 1.0% v/v en geles de sílice).

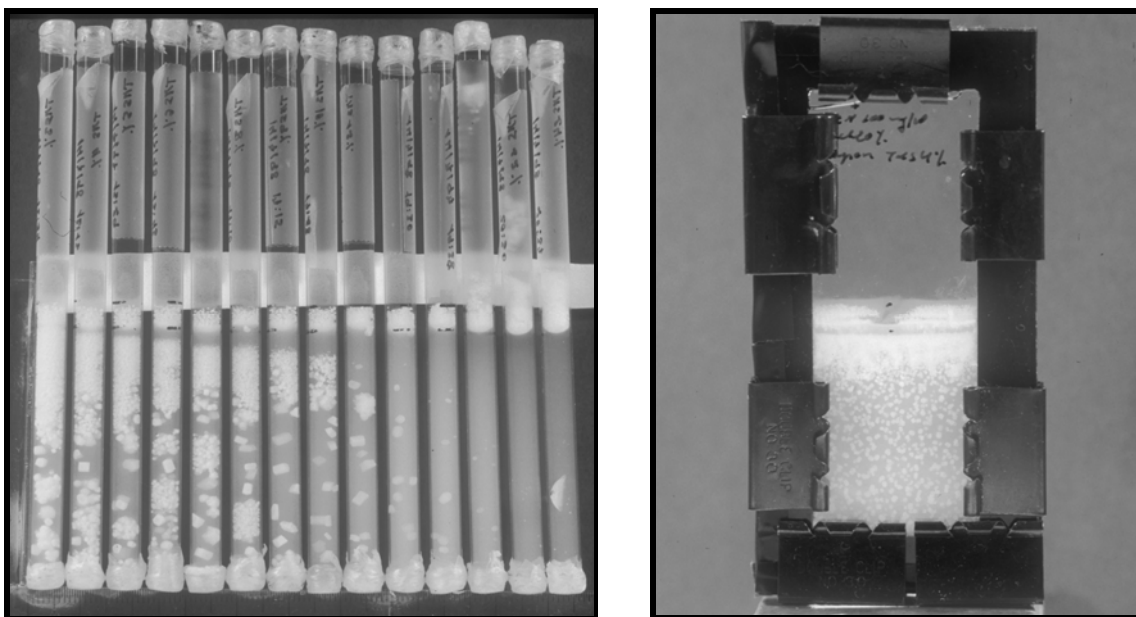
#### Protocolo IV-b: Preparación de una experiencia de contradifusión en gel.



1. Preparamos la solución de proteína al doble de la concentración final.
2. Se selecciona un tubo de diámetro y longitud deseados. Uno de los extremos lo sellamos con *parafilm*. Marcamos las longitudes hasta los que queremos llegar.
3. Se mezclan volúmenes iguales de gel y proteína hasta homogeneizar la solución.
4. Haciendo uso de una jeringa (es aconsejable emplear jeringas de insulina de un solo uso) se inyecta a través del *parafilm* que hemos colocado rodeando la boca del tubo hasta el volumen deseado.
5. Se deja gelificar y se añade el amortiguador físico: gel a una concentración determinada.
6. Se deja gelificar y se añade la sal al doble de la concentración final.

El dispositivo en placa es también especialmente útil cuando queremos seguir la evolución de la experiencia. Las dimensiones de la placa y el grosor del marco de caucho permiten controlar el consumo de proteína.

La elección del gel para la cámara de proteína debe de realizarse teniendo en cuenta la compatibilidad química entre ambas macromoléculas y las posibles interferencias con los subproductos de la reacción de polimerización (capítulo 5) [García-Ruiz, 1981].



**Fig.2.2-2** Fotografías que muestran dos posibles montajes experimentales de una experiencia de contradifusión en geles, en tubos y en placa (dispositivo “casete”). Ambas fotos muestran experiencias en geles de sílice.

### 2.2.4.1 Recuperación de los cristales

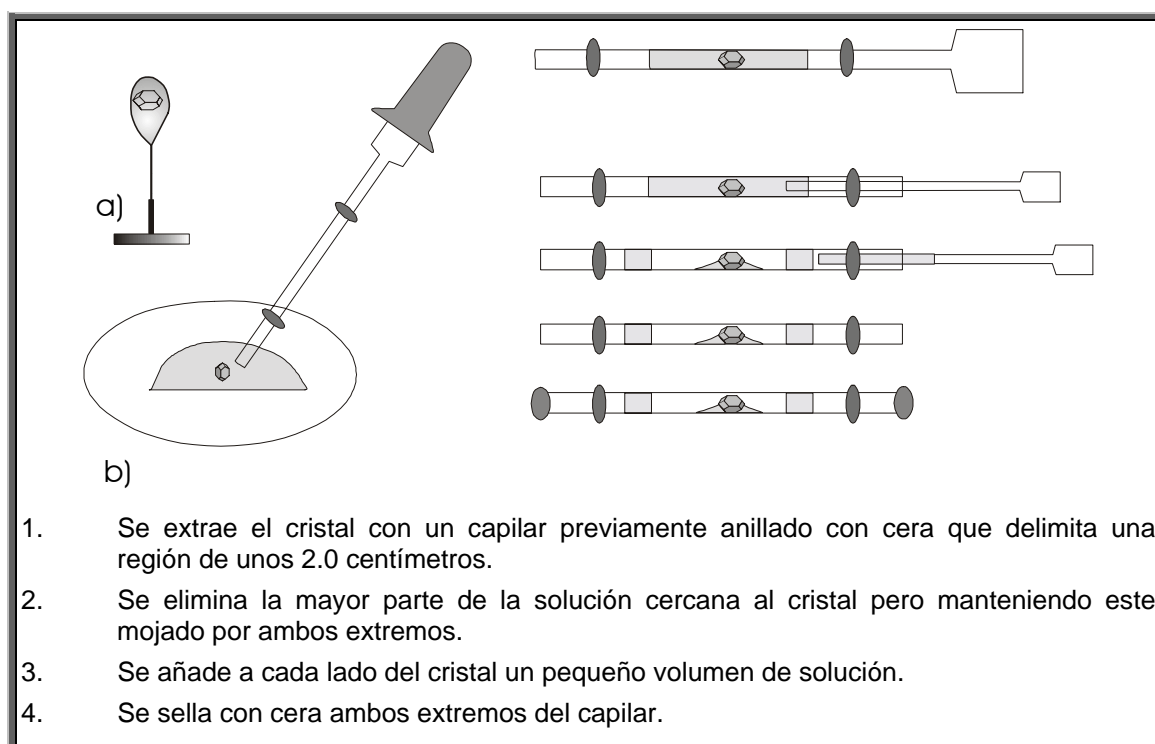
Una vez equilibrada la experiencia los cristales se pueden mantener tanto en los capilares como en el gel por largos periodos de tiempo. Los cristales crecidos por el GAME se pueden difractar directamente en el capilar en el que se han crecido. En el caso de los cristales crecidos en geles es necesario extraerlos del reactor en el que se han crecido. El primer paso es recuperar la solución de sal que emplearemos para guardar. Cuando las experiencias se llevan a cabo empleando el dispositivo en casete es suficiente con retirar uno de los vidrios. Cuando se llevan a cabo en un tubo se presiona el cilindro de gel con un bastoncito (pipeta, alambre, etc.). Los cristales se recogen sobre un vidrio de reloj. Si la rigidez del gel lo permite se pueden extraer los cristales de forma secuencial y preservar el resto en el interior del tubo añadiendo algo de solución de sal.

Los cristales se pueden separar del gel empleando un pincel para manipular el cristal. La manipulación se facilita añadiendo parte de la solución de sal de equilibrio o una solución con concentración salina levemente superior a la de equilibrio.

### 2.2.4.2 Montaje de cristales de proteínas para difracción

En ocasiones es necesario montar un cristal crecido por alguna técnica tradicional en solución o en medio gelificado para realizar la adquisición de datos de difracción. En este caso es necesario seguir un protocolo como el que se ilustra en la figura 2.2-3.B. Los cristales se montan en capilares de cuarzo o cualquier otro material transparente a los rayos x. El elevado contenido en agua de los cristales de proteína obliga a crear un entorno saturado en agua. La solución que se añade para mantener este entorno puede aumentar el ruido de fondo o incluso hacer que el cristal pierda su orientación inicial durante la adquisición. Para evitar estos artefactos experimentales el cristal se moja con la menor cantidad de líquido posible y es flanqueado por dos columnas de líquido. Entre éstas y el cristal se crea una cámara de aire saturado en vapor de agua.

Cuando la adquisición de los datos de difracción se va a realizar en condiciones de congelación los cristales se montan en pequeños lazos de la dimensión adecuada (Fig.2.2-3.A). En este protocolo los cristales son previamente equilibrados en una solución salina que contiene el crioprotector (glicerol).



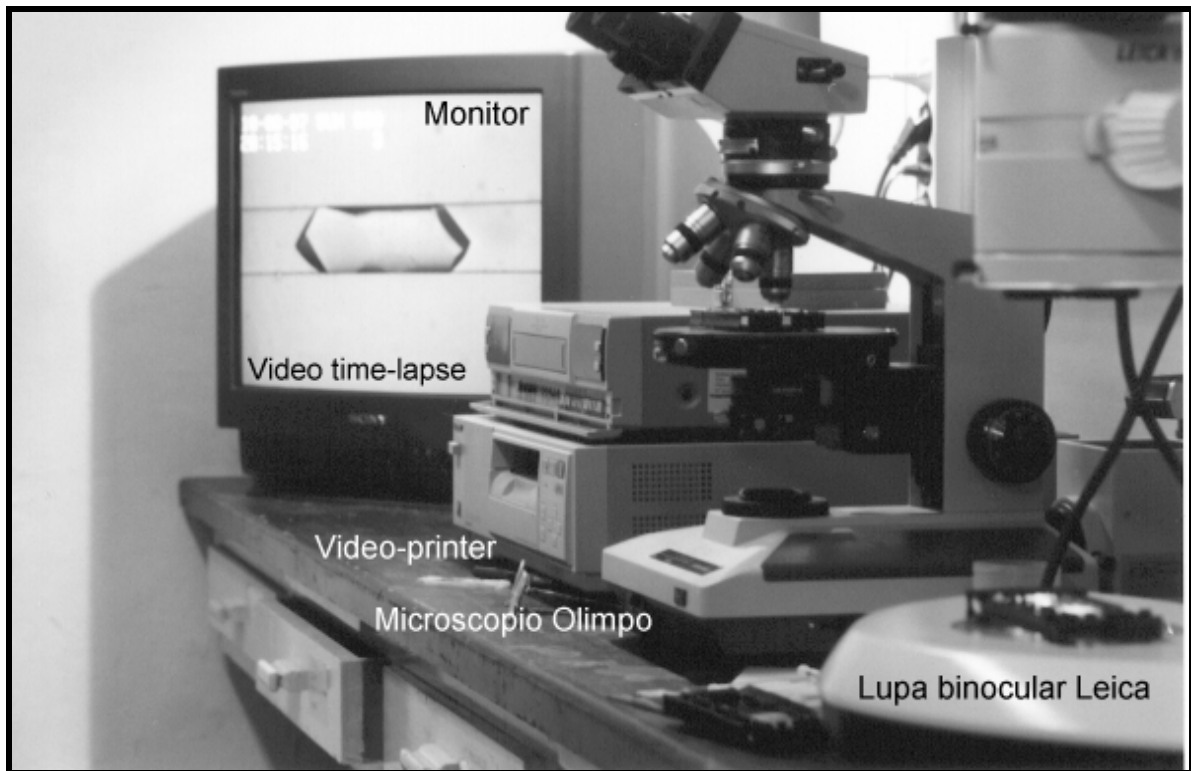
**Fig.2.2-3** La figura a) muestra el aspecto de un cristal montado en un lazo para congelar. El esquema b) recoge la secuencia a seguir para montar un cristal en un capilar de cuarzo para realizar una adquisición de datos de difracción.

## 2.3. ANÁLISIS DE IMAGEN

El seguimiento de la evolución espacial y temporal de las experiencias de crecimiento cristalino se lleva a cabo empleando un equipo de microscopía óptica de transmisión o una lupa

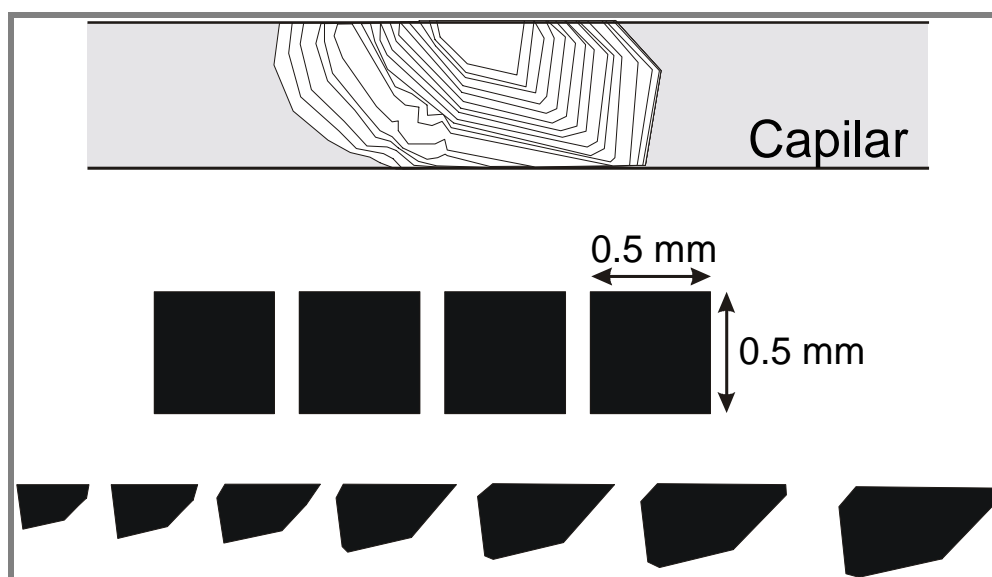
binocular equipados con una cámara (CCD) conectada a un grabador de vídeo que permite la adquisición a intervalos de tiempo variables (*time-lapse*). Las imágenes se digitalizan o en ocasiones son adquiridas directamente empleando una placa digitalizadora montada en un ordenador personal (PC).

En la figura 2.3-1 se muestran los componentes necesarios para realizar un seguimiento en continuo de una experiencia de crecimiento cristalino.



**Fig.2.3-1** Montaje experimental para el seguimiento a lo largo del tiempo de una experiencia de crecimiento cristalino.

Cada imagen por separado se importa empleando un programa de diseño gráfico (CorelDRAW 8.0) con el que se dibujan los contornos de los cristales (Fig.2.3-2). El área encerrada por cada contorno corresponde al área proyectada por el cristal sobre el plano de adquisición de la imagen. Los contornos son rellenados de color negro de forma que nos queda una imagen bicolor que puede ser ahora procesada con un programa de análisis de imagen (Image Tools 1.27). Las áreas evaluadas tienen unidades de  $\text{pixels}^2$  que se convierten a  $\text{mm}^2$  con la imagen del patrón correspondiente. El análisis de imágenes separadas se puede realizar empleando directamente el programa de análisis de imagen, aunque el protocolo descrito resulta más cómodo cuando la secuencia de imágenes es grande.



**Fig.2.3-2** Representación esquemática de los primeros pasos de evaluación del área proyectada por un cristal en crecimiento. En la parte superior se muestra como evoluciona la silueta del cristal crecido por el GAME a lo largo del tiempo. En la parte inferior se muestra el área de cuatro patrones de lado conocido y parte de la secuencia de crecimiento del cristal que emplearemos para cuantificar y convertir el área a  $\text{mm}^2$ .

## 2.4. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Índice

En el transcurso de este trabajo hemos empleado un gran número de técnicas instrumentales de caracterización estructurales y analíticas que iremos describiendo en el desarrollo de la tesis. A continuación se describen a *grosso modo* las técnicas que generalmente se emplean en estudios de cristalogénesis. Otras técnicas de carácter más particular se introducen en los capítulos correspondientes.

### 2.4.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

En la difracción de cristales de proteínas se emplea el método de cristal único. El cristal se prepara como hemos descrito en el apartado 2.2.4.2 y se monta sobre una cabeza goniométrica que imprime el giro al cristal ( $\phi$ ). El haz de rayos x se genera con una lámpara de ánodo rotatorio de cobre con filtro de níquel que permite seleccionar la radiación  $K\alpha$  del cobre ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ). El generador de alimentación del tubo opera típicamente a 50 kV y 100 mA. La mayoría de los instrumentos que hemos usado estaban equipados con un generador de la casa RIGAKU (Molecular Structure Corporation). En todas las experiencias empleamos detectores de área 18x30 de la casa Mar Research (Area Detector Systems Corporation) ó 20x20 cm R-AXIS II de la casa Rigaku.

En ocasiones los datos se adquirieron empleando radiación sincrotrón con longitudes de onda por debajo de 1  $\text{Å}$  generada en los aceleradores de partículas: LURE, ESRF y DESY.

### **2.4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Las observaciones de cristales de proteínas deshidratados (Cap.5.2) se realizó en las instalaciones de los servicios técnicos de la Universidad de Granada, donde disponemos de un instrumento ZEISS DSM 950, equipado con microanálisis EDX, LINK. El voltaje de aceleración de los electrones se optimizó para cada muestra y osciló entre 10 y 20 kv.

### **2.4.3. INTERFEROMETRÍA MACH-ZHENDER**

Durante el transcurso de esta memoria se ha empleado un instrumento tipo Mach-Zhender para realizar diferentes tipos de experiencias. De las experiencias realizadas con este instrumento se ofrece en este trabajo un punto de vista cualitativo, ya que el montaje, puesta a punto y análisis de los datos forman el cuerpo de otra tesis doctoral en curso actualmente en nuestro laboratorio.

### **2.4.4. TRATAMIENTO DE DATOS**

El procesamiento de los datos, cálculo, ajuste y representación gráfica se han llevado a cabo empleando el programa de análisis Origin versión 4.1

La mayor parte de los datos de difracción se han analizado con los programas XDISPLAY, DENZO, SCALEPACK y CCP4 que conforman el paquete HKL (Departament of Molecular Biophysics and Biochemistry. Yale University. New Haven Connecticut 06511-USA. @1993-1995 Daniel Gewirth. 4ª Ed.).





### 3. LOS GELES COMO MEDIOS DE CRISTALIZACIÓN

*History records the names of royal bastards,  
but can not tell us the origin of wheat.*

*J. Henri Fabre*

#### 3.1. ANTECEDENTES

El origen de la técnica de precipitación en geles data de 1898 cuando R.E.Liesegang realizando una sencilla experiencia de mezclado de unas gotas de nitrato de plata (10-20% p/v) sobre una lamina de gelatina impregnada de dicromato potásico (0.4% p/v) observa que el precipitado de dicromato de plata adopta una forma de anillos concéntricos con una determinada periodicidad. A raíz de estos resultados nace una serie de teorías tendentes a explicar este comportamiento rítmico (anillos de Liesegang) entre las que destacaremos la teoría de la sobresaturación de Ostwald (1899) por ser la más ampliamente aceptada. Según esta teoría la difusión del nitrato de plata a través del gel de gelatina no provoca la precipitación del dicromato de plata hasta que se alcanza el producto de solubilidad, cerca del frente de difusión. Una vez producido el precipitado, el dicromato de plata aún en solución difunde hacia los núcleos formados. Teniendo en cuenta que la formación de un precipitado actúa como sumidero de los reactivos, la combinación de este efecto con el transporte de masa difusivo es suficiente para explicar el fenómeno de precipitación periódica como consecuencia de un frente de sobresaturación que recorre la cámara de precipitación.

García Ruiz (1980) recoge los detalles más destacados de esta evolución teórica y divide el periodo en dos etapas: anterior y posterior a la amplia revisión y crítica realizada por Henisch en 1970. En estos trabajos y en la mayoría de las referencias que citan ambos autores, se emplean técnicas de difusión en geles acopladas a una reacción química. El producto de la reacción es una sustancia inorgánica con bajo producto de solubilidad y por tanto difíciles de cristalizar empleando técnicas tradicionales.

Lefauchaux y colaboradores (1982) extienden este estudio a compuestos de solubilidad alta como el difosfato potásico (KDP) y difosfato amónico (ADP). En este caso utilizan geles de sílice

(TMOS, 2-10% v/v) para obtener un medio difusivo de crecimiento y estudiar su influencia sobre la calidad final de los cristales. Algunas de las observaciones más relevantes de este trabajo las recogemos a continuación:

- 1) Los cristales incluyen el gel de sílice durante el crecimiento.
- 2) Las inclusiones son más abundantes en la parte central de los cristales y aumentan al aumentar la concentración de gel.
- 3) Estas inclusiones sirven como centros de aparición de dislocaciones, inapreciables a concentraciones inferiores a 5% v/v.
- 4) A partir de un determinado tamaño de cristal la presión de cristalización es capaz de fracturar el gel.
- 5) Las velocidades de crecimiento en geles son del mismo orden de magnitud que las publicadas para cristales crecidos en solución.

Concluyen este trabajo demostrando que los cristales crecidos en geles de TMS son de mejor calidad que los obtenidos en solución.

Posteriormente la cristalización en geles se extiende a sustancias orgánicas [Etter et al., 1986] y biopolímeros [Robert y Berthou, 1987; Kalkura y Devanarayanan, 1987]. Podemos decir que Robert y Berthou inician la andadura de la cristalización de proteína en medios gelificados. Realizan los primeros estudios de cristalización de lisozima (HEWL) en TMOS 1.2% v/v por descenso térmico. Observan que los cristales crecidos en gel de sílice son de mayor tamaño y más homogéneos que los crecidos en solución libre. Estos cristales difractan hasta 1.5 Å de resolución superando el límite inferior al que se encontraba resuelta la estructura.

A partir de las observaciones realizadas en la cristalización de sustancia inorgánicas Robert y Lefaucheu (1988) advierten del empleo de geles de sílice a concentraciones superiores al 2% v/v para cristalar proteínas ya que la energía elástica del gel supera la energía de interacción de las moléculas de proteínas en el cristal. Asumen que los cristales de proteínas (al igual que los inorgánicos) crecen desplazando las fibras de gel. En este trabajo apuntan también una clara reducción de la densidad de nucleación de los cristales de lisozima crecidos en gel de sílice en comparación con los obtenidos en solución libre. Esta inhibición se ha explicado como un efecto del confinamiento de la solución en pequeñas fracciones de volumen, lo que reduce la probabilidad de que se encuentren un número suficiente de moléculas de proteína para generar un núcleo estable [Andreazza et al., 1988]. Cudney y colaboradores (1994) trabajando sobre un gran número de proteínas y empleando diferentes técnicas de cristalización (difusión en fase vapor y difusión líquido-líquido) observan un descenso de la densidad de nucleación en experiencias realizadas en geles de sílice respecto de las realizadas en solución libre de gel. Recientes trabajos realizados con técnicas de dispersión a bajo ángulo de rayos-X (SAXS) atribuyen esta inhibición a la interacción de las proteínas con los hidroxilos de los grupos silanos [Vidal et al., 1998a].

En 1991 Provost y Robert proponen el empleo de geles de agarosa como medio alternativo al gel de sílice. Las ventajas de este tipo de geles son: que se pueden usar a concentraciones muy

bajas y que polimerizan más rápido que los geles de sílice. Ambas características facilitan su inclusión en las técnicas, gota colgada y gota sedente, habitualmente empleadas en el crecimiento de cristales de proteína. Observan que los geles de agarosa aumentan fuertemente la densidad de nucleación de lisozima (HEWL) al contrario de los que ocurre con los geles de sílice. El número de cristales totales aumenta linealmente con la concentración de gel en el rango 0.0-0.15% p/v cuya pendiente es independiente de la sobresaturación inicial. Cuando la experiencia se realiza a 30°C desaparece esta influencia debido a que a esta temperatura el gel no ha polimerizado. Estos resultados se explican como un efecto epitáxico de las paredes del gel. Posteriormente Robert et al. (1994) explican que la malla de gel evita la sedimentación de los agregados primarios que aparecen en una solución sobresaturada de lisozima cambiando las características de la solución y provocando el aumento de la densidad de nucleación. En solución libre estos agregados iniciales precipitan provocando un descenso de la sobresaturación inicial, mientras que en medio gelificado los agregados son soportados por la malla de gel. En este mismo año Thiessen comprueba que a concentraciones de gel mayores de 0.4% p/v la inducción de la nucleación de cristales de lisozima revierte independientemente de la sobresaturación [Thiessen, 1994].

Provost y Robert (1995) establecen que el aumento de la densidad de nucleación es debido al incremento de la sobresaturación provocado por la pérdida de agua durante el proceso de polimerización. Esta pérdida de agua, necesaria para estabilizar las dobles hélices de agarosa, aumenta la sobresaturación efectiva al aumentar las concentraciones de sal y proteína. Sin embargo, esta hipótesis contradice las observaciones realizadas por estos mismos autores en las que a 30°C no se observa ningún efecto del gel ya que a esta temperatura, ya están formadas las hélices de agarosa. En este mismo trabajo comparan la calidad de los cristales de lisozima crecidos en geles de sílice (1% v/v) con los crecidos en geles de agarosa (0.15% p/v) concluyendo que el número de defectos es menor en las experiencias realizadas en gel de sílice.

Recientes estudios realizados con dispersión de neutrones de bajo ángulo descartan la posibilidad de que se produzca un aumento de la sobresaturación durante la polimerización [Vidal et al., 1998b]. Estos autores no observan ningún tipo de interacción entre las moléculas de lisozima y las fibras de gel de agarosa ni con ninguno de los restos cargados (sulfatos) o hidrofóbicos (metilos) presentes en su estructura y deducen que el aumento del flujo de nucleación debe estar ligado a una reducción de la sedimentación de los agregados primarios.

### **3.2. LOS GELES COMO MEDIOS DE CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

**Índice**

El crecimiento de cristales de proteínas en medios gelificados ha demostrado ser hasta la fecha el medio más económico que la microgravedad para producir buenos cristales [Miller et al., 1992; Eposito et al., 1998]. Ha permitido avanzar en las limitaciones de tamaño y calidad de los cristales e incluso obtener cristales de proteínas inaccesibles por otras técnicas [Sica, et al., 1994].

A pesar de estas evidentes ventajas su empleo no está generalizado debido fundamentalmente a que su inclusión en un protocolo de cristalización equivale a añadir un nuevo

aditivo al sistema. Los geles de agarosa son fuertes promotores de la nucleación, mientras que los geles de sílice actúan como inhibidores de la nucleación, sin que hasta hoy se sepa cual es el mecanismo de acción o las causas que provocan estos efectos.

Desde un punto de vista de la cristalogénesis, los geles proporcionan un medio difusivo de transporte de masa similar al que se puede disfrutar en condiciones de microgravedad [Wunderlich, 1982; Robert y Lefauchaux, 1988]. Su incorporación al medio de cristalización no impide la libre difusión de las moléculas en su interior, pero la exposición de una nueva superficie con determinadas características físicas (porosidad, elasticidad, transparencia, etc.) y químicas (estabilidad, carga, hidrofílicas. etc.) pueden afectar de alguna manera a la cristalización.

	CARACTERÍSTICAS	EFECTO
<b>GENERALES</b>	Provee de un medio difusivo.	Aporte lento de las unidades de crecimiento
	Actúa como soporte de los cristales.	Reducción de la nucleación secundaria y de la convección turbulenta
	Elevada inercia térmica y acústica.	Amortigua la convección térmica y el estrés por cambios de presión
	Sirve de tamiz molecular.	Evita la aparición de nucleación heterogénea
	AGAROSA	SÍLICE
<b>VENTAJAS</b>	Elevada pureza.	Fácil manejo.
	Estable en un rango de pH 3.0-9.0.	Características superficiales susceptibles de ser modificadas.
	No hay subproductos de la polimerización.	
¿?	Inductor de la nucleación.	Inhibidor de la nucleación.
<b>DESVENTAJAS</b>	Alta temperatura de preparación o pérdida de la inercia térmica.	Precipitación de silicatos a pH básicos.
	Difícil manejo.	Genera subproductos durante su polimerización.

**Tabla 3.2-1** Características generales y particulares de los medios gelificados con sílice y agarosa.

En la tabla 3.2-1 se recogen los aspectos más relevantes de los geles de sílice y agarosa que pueden ser útiles en la elección del medio más favorable para la realización de una experiencia de cristalización de proteínas. A continuación se recogen algunos estudios puntuales que tratan de clarificar o comprobar ciertas características de estos polímeros necesarias para llevar a cabo la interpretación de los resultados de las experiencias de cristalización en geles.

### 3.3. GELES DE SÍLICE

Los geles de sílice son una forma parcialmente hidratada de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), de estructura amorfa y elevada porosidad. Se obtiene en medio acuoso mediante un proceso en dos etapas:

- en una primera etapa (hidrólisis) se obtiene el ácido silícico empleando como precursores el metasilicato de sodio (*Proceso de Patrick*), el tetrametoxisilano (TMOS, tetrametil ortosilicato) o el tetraetoxisilano (TEOS, tetraetil ortosilicato) y
- una segunda etapa en la que el ácido silícico condensa para dar lugar al gel (condensación).

Esta es una representación bastante simplificada del proceso de polimerización de los geles de sílice, ya que ambas reacciones transcurren de forma simultánea. El grado de solapamiento de ambas reacciones es función de las características del medio (composición, temperatura, pH, etc.).

#### HIDRÓLISIS

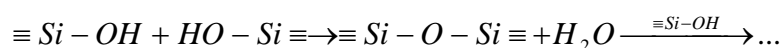
Constituye la primera etapa del proceso de polimerización en la que el producto de la reacción es el ácido silícico. La reacción global de obtención del ácido silícico a partir de las tres fuentes mencionadas se pueden expresar como:

- $\text{Na}_2\text{SiO}_3 + \text{H}_2\text{O} + 2 \cdot \text{HCl} \leftrightarrow \text{Si}(\text{OH})_4 + 2 \cdot \text{NaCl}$
- $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4 + 4 \cdot \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Si}(\text{OH})_4 + 4 \cdot \text{HOCH}_3$
- $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4 + 4 \cdot \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Si}(\text{OH})_4 + 4 \cdot \text{HOCH}_2\text{CH}_3$

En el primer caso el ácido silícico se obtiene por neutralización en medio ácido del metasilicato de sodio, mientras que en los dos casos restantes se obtiene por hidrólisis de los derivados alcoxilados. Durante la reacción se generan subproductos como el NaCl o el alcohol correspondiente que se pueden considerar o no como impurezas, dependiendo del grado de interferencia sobre nuestra experiencia de cristalización.

#### CONDENSACIÓN

La condensación ocurre a través de una reacción en la que intervienen los grupos silanos parcialmente hidrolizados aunque en general se suele representar a partir del ácido silícico completamente hidrolizado.



Durante la gelificación predomina fundamentalmente la reacción de condensación de la que dependen las características finales del gel. La condensación genera dímeros, trímeros y eventualmente polímeros que continúan creciendo hasta dar lugar a agregados esféricos de algunos ångströms ( $1\text{Å} = 10^{-10} \text{ m}$ ) de diámetro denominados partículas primarias de sílice. Esta partícula primaria continúa polimerizando hasta alcanzar un determinado tamaño. Los grupos

silanos de la superficie de las partículas primarias adyacentes condensan para dar lugar a un entramado tridimensional (transición sol → gel). Las partículas que generan el gel poseen en este punto un amplio rango de tamaños, desde algunos Å a miles de Å dependiendo de las condiciones físico-químicas de su formación (20-50 Å, a pH ácidos) [Iler, 1979].

La condensación transcurre de forma diferente en función del pH, distinguiéndose tres regiones: pH = 1-2; pH = 3-6 y pH 7-10. Para soluciones a pH inferiores al punto isoeléctrico (1.5-2.0), la condensación es catalizada por los iones H<sup>+</sup>. Para valores superiores a 2.0 las partículas se encuentran cargadas negativamente y la polimerización ocurre fácilmente. El tiempo de gelificación se minimiza para valores cercanos a pH neutro. Por encima de pH 7.0, aumenta la solubilidad de la sílice promoviendo la despolimerización seguida de una reorganización estructural y del consecuente aumento del tiempo de gelificación debido a la repulsión entre los grandes agregados con carga superficial negativa [Zerda et al., 1986, Okkerse y Boer, 1960]. Dependiendo del contenido en sales del medio las partículas de gel floculan (sin sales) o polimerizan (pH 7-10, con sales) (Fig.3.3-1).

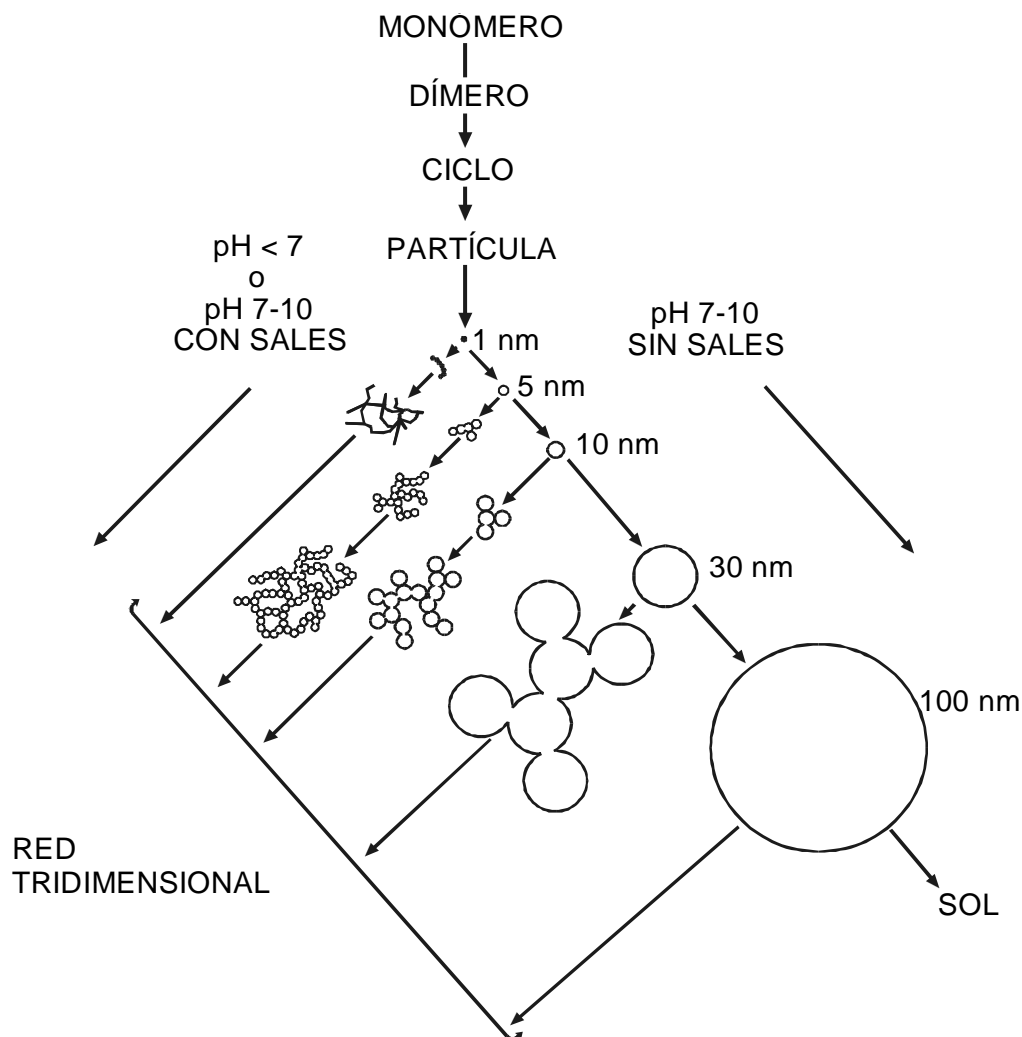


Fig.3.3-1. Polimerización del ácido silícico en función de las condiciones del medio [Iler, 1979]

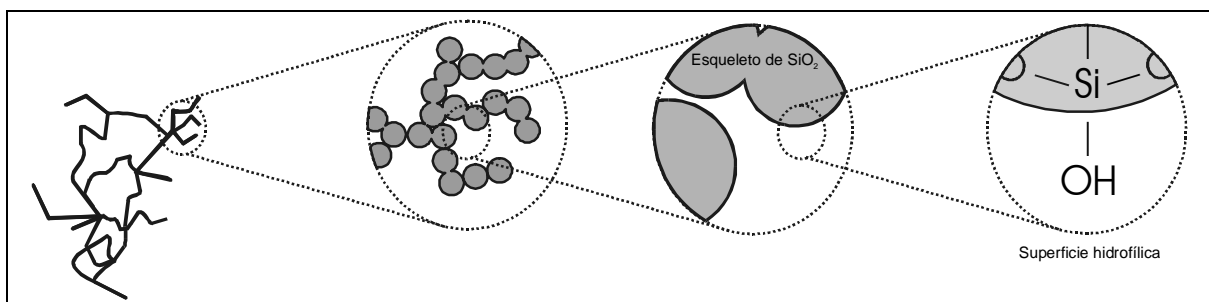
La estructura final del gel está fuertemente condicionada por el pH y la concentración de sal a través de las cinéticas hidrólisis y condensación. A valores de pH bajos la hidrólisis es muy rápida y tiende a formar agregados lineales que presentan una fuerte tendencia a la ciclación (sol) y lenta condensación (gel). A valores de pH altos, la hidrólisis transcurre de forma lenta generándose pocos centros de nucleación. La hidrólisis y condensación ocurren simultáneamente de forma que las nuevas especies hidroxiladas se unen a agregados ya existentes dando lugar a partículas de gran tamaño (Fig.3.3-1).

A valores de pH entre 1.0 y 4.0 donde el sol de ácido silícico es relativamente estable, el área superficial es elevada y constante. Si tenemos en cuenta que el área superficial es inversamente proporcional al tamaño medio de las partículas, esto indica que el tamaño de las partículas primarias se mantiene constante en este rango de pH. Por encima de pH 5.0 el área superficial aumenta considerablemente debido a un aumento del tamaño medio de las partículas. A pH mayores de 7.0 las partículas de pequeño tamaño se disuelven y pasan a formar parte de partículas mayores o uniones entre partículas. Esta disolución de pequeñas partículas (Ostwald-ripening) se debe a la diferencia de solubilidades entre superficies con diferente radio de curvatura y dan lugar a estructuras con menor área superficial y mayor tamaño de poro.

Los estudios realizados por porosimetría de mercurio y adsorción de nitrógeno muestran que a valores de pH entre 1.0 y 3.0 la estructura del gel de sílice está formada fundamentalmente por microporos (0.2-6.0 nm de diámetro) mientras que a valores superiores a 3.0 los microporos desaparecen observándose sólo mesoporos (~15nm de diámetro) [Ülkü, et al., 1993]. El tamaño promedio de las partículas de gel en el rango de pH 3.0-7.0 es de 20 a 40 Å, para un rango de concentraciones de gel de 1 a 3% p/v [Iler, 1979]. Sin embargo, no hay que perder de vista que estos datos representan el promedio de la distribución de poros y agregados de un gel en unas determinadas condiciones de preparación y que sólo se pueden extrapolar cuando las condiciones son similares a las empleadas en la caracterización [Henisch, 1988].

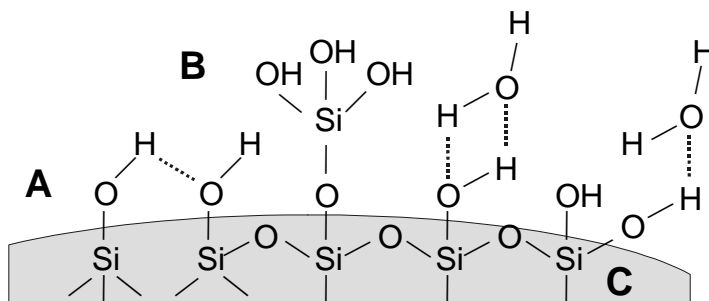
### 3.3.1. LA SUPERFICIE DEL GEL DE SÍLICE

Transcurrida la polimerización se obtiene una matriz porosa de fibras formadas por partículas esféricas de  $-\text{SiO}_2-$  cuya superficie presenta restos de grupos hidroxilos que no se han consumido durante la condensación (Fig.3.3-2) [Scoot, 1992].



*Fig.3.3-2 Representación esquemática de la estructura y superficie de un gel sílice.*

Los grupos hidroxilos pueden encontrarse de tres formas: 1) simples (Fig.3.3-3, A), 2) triples, unidos a un átomo de sílice con un solo enlace siloxano (Fig.3.3-3, B) y 3) germinales, con dos grupos hidroxilos unidos a un átomo de sílice (Fig.3.3-3, C), aunque los grupos hidroxilos simples son los más frecuentes [Sindorf y Maciel, 1983].



**Fig.3.3-3** Representación esquemática de los diferentes grupos y asociaciones que podemos encontrar en la superficie de un gel de sílice. Con las letras A,B y C se muestran las distintas formas en que podemos encontrar los grupos hidroxilos, simple, triple y germinal respectivamente. Asimismo se representan algunas de las posibilidades en que el agua se puede encontrar absorbida sobre la superficie del gel.

La adsorción de moléculas de agua sobre los grupos hidroxilos con más de un puente de hidrógeno puede generar toda una gama de interacciones con diferente energía de estabilización. Estas asociaciones de moléculas de agua se pueden transmitir a posteriores esferas de hidratación, lo que explica el elevado poder higroscópico de los geles de sílice. Estas estructuras, con mayor energía de estabilización, no han sido observadas experimentalmente y los estudios de deshidratación de gel de sílice a temperaturas superiores a los 200°C atribuían la presencia de agua a la condensación de los grupos silanos [referencia en Scott, 1992]. Posteriormente, el seguimiento en continuo de la pérdida de peso en función de la temperatura (termogravimetría) puso de manifiesto la existencia de tres pérdidas de agua claramente definidas (Fig.3.3-4): la primera entre 30°C y 130°C, la segunda entre 200°C y 450°C y la tercera a partir de 400°C. La cantidad de energía requerida para desolver cada tipo de agua se corresponde con agua unida por fuerzas de dispersión (unión física), agua unida por fuerzas polares (puentes de hidrógeno) y agua unida químicamente (producida por la condensación de los grupos silanos a síloxanos) [Scott, 1992].

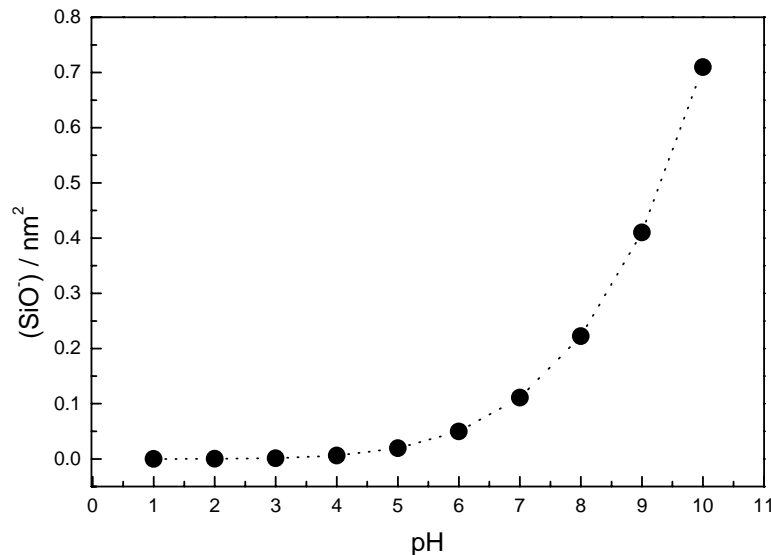
En cuanto a la carga de la superficie del gel sabemos que para valores de pH superiores a 2.0 se encuentra cargada negativamente debido a la desprotonación de los grupos hidroxilos. La extensión en la que se produce la desprotonación depende del pH del medio. Schindler y colaboradores (1975) han deducido experimentalmente la ecuación que relaciona la cantidad de grupos  $\equiv\text{SiO}^-$  por  $\text{nm}^2$  de superficie de gel con el pH (Fig.3.3-4):

$$\log(\equiv \text{SiO}^-) = 5.2 \cdot \log(\text{pH}) - 5.349 \tag{Ec.3.3-1}$$

Teniendo en cuenta que la cantidad de grupos hidroxilos es de 5.83-5.46 por  $\text{nm}^2$ , se puede estimar que aproximadamente sólo un 0.2% de estos se encuentran ionizados por lo que las



interacciones de tipo electrostáticas con otras moléculas se pueden considerar despreciables en el rango de pH de 2.0 a 6.0.



**Fig.3.3-4** Variación de la cantidad de grupos  $\equiv\text{SiO}^-$  por  $\text{nm}^2$  de superficie de gel de sílice en función del pH [Schindler, et al., 1975].

### 3.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como hemos visto existe una extensa bibliografía entorno a los geles de sílice que ofrece una visión muy general de los procesos implicados en su obtención. De ésta se deduce que las características propias de un gel (tamaño de partículas, distribución de tamaño de poros, grado de conectividad, etc.) dependen de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.), por lo que cualquier extrapolación de estos resultados debe realizarse sin perder de vista que podemos estar ante un sistema completamente distinto.

Los resultados que a continuación se exponen recogen fundamentalmente consideraciones prácticas y metodológicas de la compatibilidad de los geles de sílice con la cristalización de macromoléculas biológicas tanto en la obtención de cristales en medio gelificado como en su empleo como soporte de los capilares en el método de acupuntura en geles. Las experiencias desarrolladas se han centrado en conocer la estabilidad y la tolerancia de estos geles cuando estos se incorporan a nuestros protocolos de cristalización (capítulo 2).

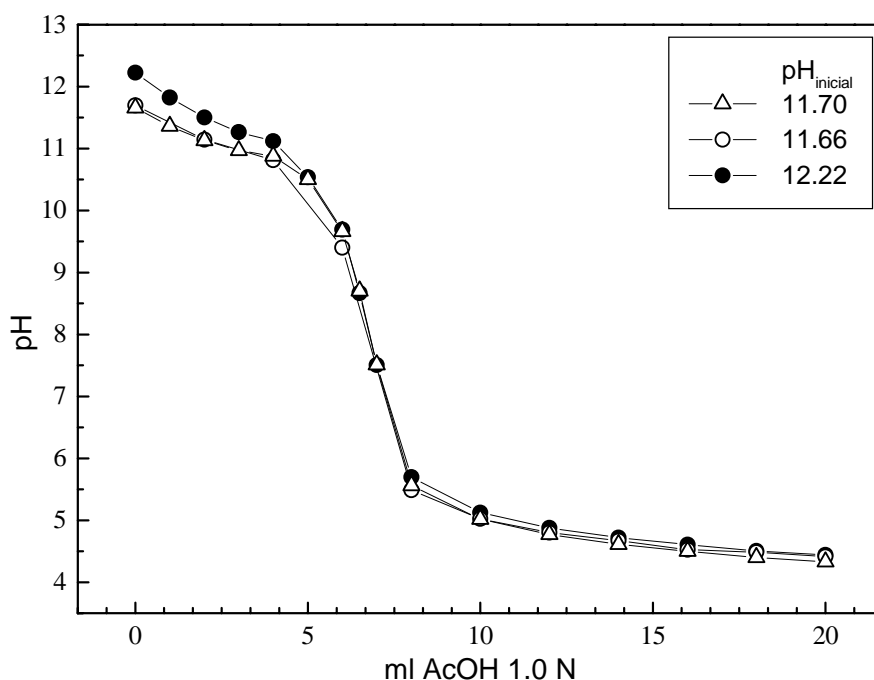
De su uso como soporte en el método de acupuntura en geles existe un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Estudios Cristalográficos empleando geles de sílice preparados a partir de silicato de sodio. Algunas de las conclusiones más relevantes las recogemos a continuación [Moreno, 1995]:

- 1.- el envejecimiento de la solución S de silicato de sodio modifica el pH final del gel,

- 2.- la preparación de los geles empleando resinas de intercambio iónico permite obtener geles libres de sodio y de elevada transparencia,
- 3.- la difusión de un tampón con un determinado pH sobre un gel de sílice permite ajustar el pH del gel al valor deseado,
- 4.- los geles de sílice, obtenidos siguiendo el protocolo II-a con un pH final de 6.5, presentan una distribución homogénea de macroporos con un diámetro superior a los 50 nm y una pequeña distribución de mesoporos con valores de diámetro en el rango 2-50 nm.

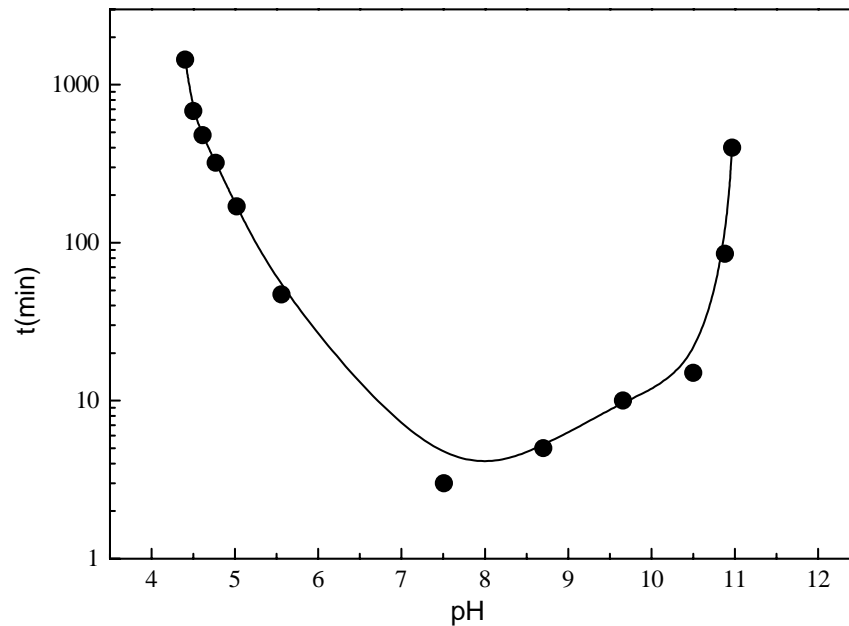
Para las experiencias de acupuntura en geles se pueden usar cualquiera de las fuentes de sílice mencionadas. Tanto el pH como la composición se controlan fácilmente ajustando la cantidad de ácido empleado en la valoración, cuando los geles se obtienen a partir de silicato sódico (Fig.3.3-5) o preparando el sol directamente sobre la solución tamponada, cuando la fuente es TMOS o TEOS. Los subproductos de la reacción de polimerización, iones sodio o alcohol, se pueden eliminar lavando o percolando el gel. El lavado o percolado del gel es la forma habitualmente empleada para modificar las características de la solución que lo embebe.

En la figura 3.3-5 hemos representado las curvas de valoración de 10 ml de silicato de sodio (Solución S) con ácido acético 1.0 N y pH 2.0. Se observa como podemos controlar el pH final del gel a partir del volumen de ácido empleado en la valoración. El pH se mide con un pH-metro con sonda de estado sólido marca Sentron.



**Fig.3.3-5** Curvas de valoración de 10 ml de silicato de sodio de 1.06 gr/ml con distinto pH inicial con ácido acético 1.0N. Los círculos negros corresponden a una solución envejecida.

La variación del pH se refleja también en el tiempo de gelificación (Fig.3.3-6). A valores cercanos a pH neutro el tiempo de gelificación se reduce, mientras que al alejarnos hacia valores de pH ácido o básico el tiempo de gelificación aumenta considerablemente. Aunque el comportamiento es similar, los mecanismos de polimerización son diferentes y se obtienen geles con características estructurales distintas.



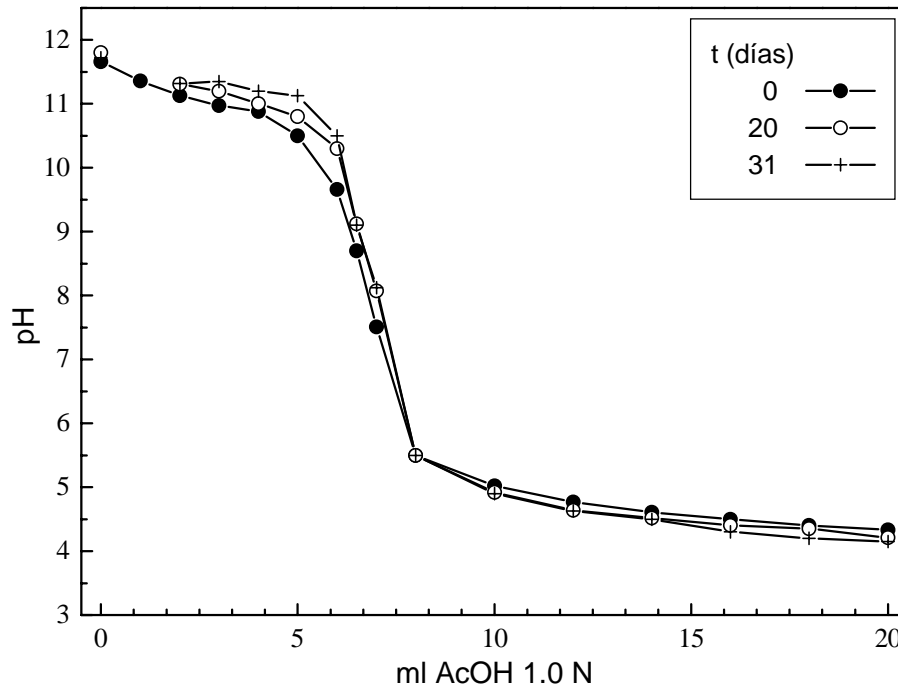
**Fig.3.3-6** Tiempo de gelificación en función del pH final de la preparación.

Tras la gelificación se produce una reorganización de las fibras de gel con lenta exudación (sinéresis). Cuando este proceso ocurre a un pH cercano al pH neutro suele ir acompañado de un aumento del pH final del gel [Plank y Drake, 1974]. Para comprobar cual era la extensión de este efecto y su dependencia con el pH, seguimos el cambio de pH de una serie de geles preparados a partir de una solución de silicato de sodio con pH inicial 11.70 (Fig.3.3-7).

Comprobamos como efectivamente por encima de pH 5.0 los geles se hacen más básicos con el transcurso del tiempo, lo que se explica por la hidrólisis provocada por los grupos  $\equiv\text{SiO}^-$  que pasan a  $\equiv\text{SiOH}$  con el consecuente aumento del pH [Plank y Drake, 1974]. Por debajo de pH 5.0 el efecto se invierte y los geles se hacen levemente más ácidos. Aunque no aparece descrito en la bibliografía es probable que la desprotonación de los hidroxilos de los grupos siloxanos sean los responsables de este efecto.

En la mayoría de las experiencias de cristalización empleamos geles de sílice a pH 5.0-6.0 por lo que decidimos seguir la estabilidad de un gel preparado en el punto medio de este rango (pH 5.5) por un periodo de tiempo mayor. Observamos como durante los tres meses que duró el ensayo

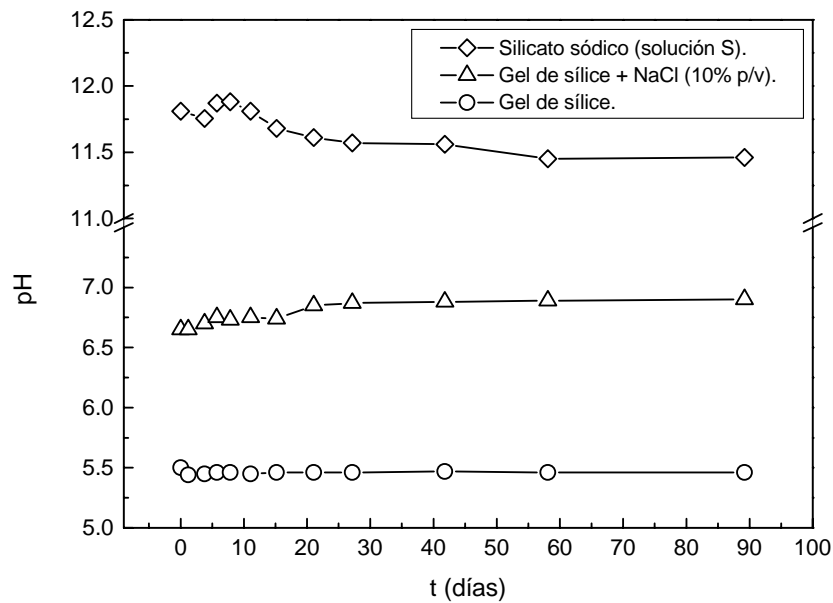
el gel mantuvo el pH estable a 5.5 (Fig.3.3-8). Este comportamiento nos asegura la estabilidad de las condiciones de cristalización al menos durante este periodo de tiempo.



**Fig.3.3-7** Estabilidad temporal de los geles de sílice preparados a distinto pH inicial.

Por otra parte y puesto que todas estas experiencias se realizan a partir de una solución madre de silicato de sodio (solución S) seguimos su estabilidad durante el mismo periodo de tiempo (Fig.3.3-8). El pH de esta solución aumenta durante los primeros diez días, volviendo a caer paulatinamente por debajo del pH inicial de la preparación. El incremento inicial del pH puede ser debido a la disociación parcial de los grupos  $\equiv\text{SiONa}$  en  $\equiv\text{SiO}^-$  y  $\text{Na}^+$  con la consecuente protonación de los grupos  $\equiv\text{SiO}^-$ . La presencia de grupos  $\text{OH}^-$  en el medio puede provocar la hidrólisis del gel por catálisis básica y la condensación en partículas de gran tamaño que se mantienen en estado sol [Buckley y Greenblatt, 1994], si bien este efecto de envejecimiento no se produce en extensión apreciable durante los tres meses que duró la experiencia. El descenso del pH por encima del décimo día se debe a la carbonatación del medio por disolución del  $\text{CO}_2$  ambiental.

La valoración de un gel de sílice en los primeros estadios del envejecimiento necesita de un mayor volumen de ácido para reducir el pH (Fig.3.3-5). Tanto la transparencia como la resistencia mecánica (presión con los dedos) de los geles obtenidos a partir de esta solución envejecida no presenta ninguna diferencia con las obtenidas a partir de una solución fresca.

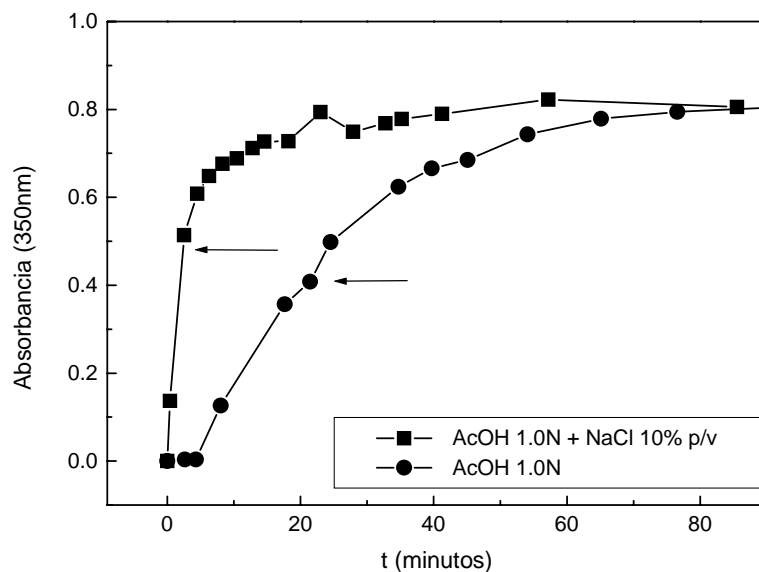


**Fig.3.3-8** Evolución del pH a lo largo del tiempo de geles de sílice preparados en presencia y ausencia de sal y de la solución S empleada para su obtención.

Por otra parte durante el transcurso de este trabajo nos encontramos con la necesidad de añadir la sal a la cámara de gel. Para poder realizar una experiencia de seguimiento *in situ* de la evolución de la calidad cristalina (Capítulo 4) necesitábamos que el gel de sílice contuviese el agente precipitante. Esto se puede llevar a cabo mezclando una solución de NaCl con el sol de sílice o añadiendo la sal a uno de los reactivos (solución S o el ácido acético).

En una experiencia de crecimiento de cristales de lisozima empleando el método de acupuntura en geles, el gel de sílice se prepara valorando 12.5 ml de la solución S con 10 ml de ácido acético 1.0N de forma que el pH final es de ~6.0. La polimerización de sol se alcanza transcurridos unos 20 minutos, momento en el que al inclinar el gel no se observa que el menisco cambie de posición, el gel permanece adherido a las paredes del recipiente [García-Ruiz, 1980]. La concentración de equilibrio del NaCl una vez que ha difundido sobre el gel de sílice es de 10% p/v.

Manteniendo el mismo protocolo, preparamos una solución de NaCl 22.5% p/v sobre ácido acético 1.0 N, el pH final fue de 1.5. Valorando los 12.5 ml de solución S con 10 ml de esta solución obtenemos un sol con concentración final de NaCl 10% p/v que polimeriza en unos dos minutos (pH 6.62). Los geles así obtenidos presentan la misma transparencia que los geles preparados siguiendo el protocolo normal (Fig.3.3-9). Sin embargo, el pH aumenta ligeramente a lo largo del tiempo (Fig.3.3-8) aunque no de forma significativa (0.1 unidad/mes) debido posiblemente a la hidrólisis producida por los iones siloxanos. A partir de estos resultados podemos decir que exceptuando la variación en el pH inicial, los geles preparados valorando el metasilicato de sodio con una solución ácida salina no se diferencian de los geles preparados a partir del ácido libre de sal.



**Fig.3.3-9** Evolución temporal de la absorbancia de geles de sílice preparados con y sin NaCl 10% p/v durante la transición sol → gel. Las flechas muestran el momento en que se puede considerar que el gel ha polimerizado y permanece adherido a las paredes del recipiente.

Hemos visto como la preparación de un gel de sílice a partir de la valoración de silicato de sodio no presenta ninguna dificultad y permite la inclusión de nuevos aditivos al sol durante su preparación. Sin embargo, éste comportamiento no se mantiene cuando añadimos una proteína.

Para incluir una proteína en el sol de sílice no podemos proceder como si se tratase de una sal. La proteína no se puede añadir directamente ni a la solución S ni a la solución de ácido acético, ya que ambas presentan unos pH extremos que podrían provocar la desnaturalización o precipitación de la proteína. La única alternativa es mezclar la proteína con el sol recién preparado.

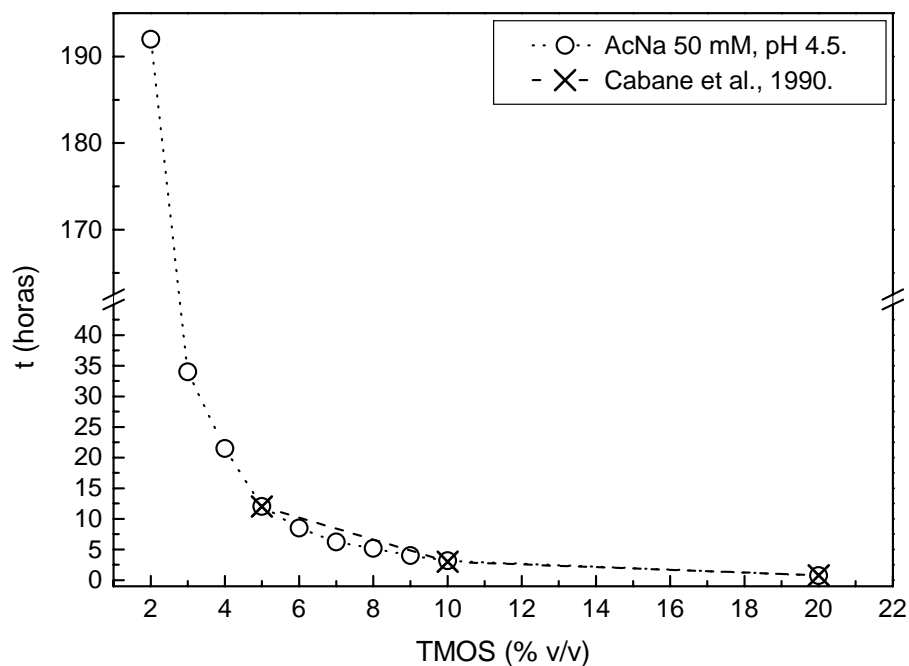
Empleando esta metodología realizamos ensayos en los que mezclamos distintos volúmenes de un sol de silicato de sodio con distintos volúmenes de lisozima a 100 mg/ml de concentración preparada en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4.5. En todos los casos estudiados (sol:solución de proteína = 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 y 1:3) se obtiene un sol viscoso y opaco que flocula con el tiempo. Para comprobar que ni el pH ni el factor de disolución juegan un papel importante, realizamos los mismos ensayos mezclando el sol con la solución tampón libre de proteína. En estos ensayos el gel polimeriza normalmente a excepción del caso en que el factor de dilución del sol es de 1/3. Por tanto, la presencia de lisozima en el medio de gelificación impide la polimerización del gel de sílice.

La segunda opción para incluir la proteína en el sol de sílice es emplear otros precursores como el TMOS o el TEOS. Como dijimos en el capítulo segundo optamos por realizar las experiencias empleando el TMOS. Los soles de TMOS se pueden mezclar directamente con la solución de proteína sin que afecte a la polimerización del gel. También comprobamos como es

posible disolver la proteína liofilizada en un sol de TMOS preparado sobre el tampón de trabajo. En ambos casos se obtienen geles homogéneos y transparentes.

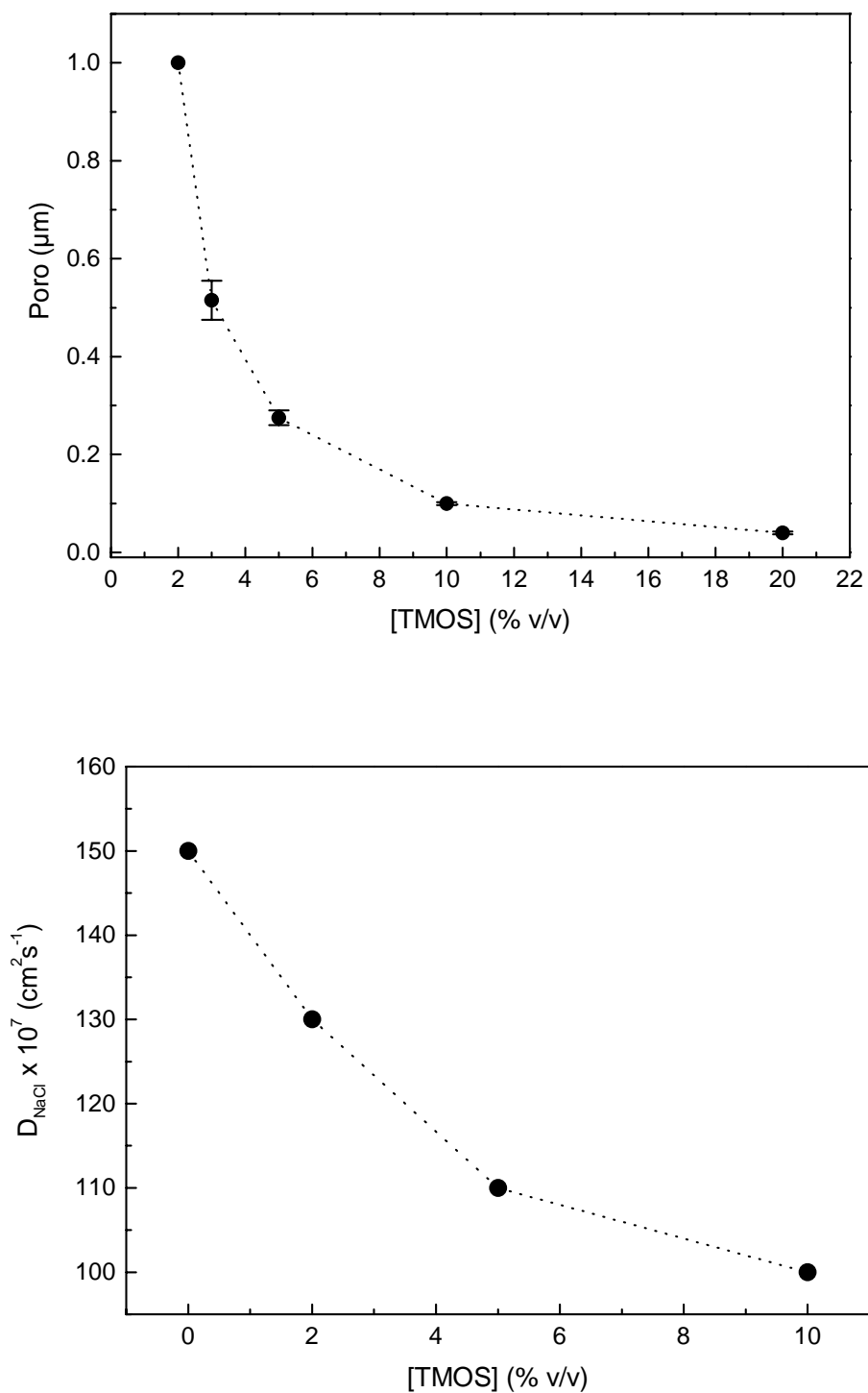
Los geles de sílice, preparados a partir de TMOS los empleamos únicamente en el crecimiento de cristales de proteínas por lo que los resultados y detalles experimentales se detallan en el capítulo 5. Sin embargo, nos ha parecido oportuno recoger aquí la dependencia entre el tiempo de gelificación y la concentración de gel.

En la figura 3.3-10 se muestran los tiempos de gelificación del TMOS en función de la concentración de gel. El sol se prepara en tampón AcNa 50 mM, pH 4.5, y el pH final de los geles fue en todos los casos 4.5. Estos datos coinciden con los publicados por Cabane y colaboradores (1990) obtenidos en un medio tamponado con AcNa 200mM pH 4.7 y muestran que el tiempo de gelificación disminuye al aumentar la concentración de gel. El tiempo de gelificación se reduce considerablemente si la polimerización se lleva a cabo a 45°C [Arend y Connelly, 1982].



**Fig.3.3-10** Tiempo de gelificación en función de la concentración para geles de TMOS preparados sobre tampón AcNa 50 mM, pH 4.5 (círculos). Los símbolos (x) se han reproducido a partir de los datos de Cabane y colaboradores (1990) obtenidos en AcNa 200mM y pH 4.7.

En la figura 3.3-11 se han reproducido los datos de tamaño de poro promedio y el coeficiente de difusión del NaCl en función de la concentración de gel obtenidos por Cabane y colaboradores (1990) y Robert y Lefauchaux (1988) respectivamente, en un medio similar al empleado en este trabajo.



**Fig.3.3-II** En la parte superior e inferior se recogen las variaciones del tamaño de poro y del coeficiente de difusión del NaCl en función de la concentración de gel obtenidos en las mismas condiciones por Cabane y colaboradores (1990) y Robert y Lefauchaux (1988) respectivamente.



### 3.4. GELES DE AGAROSA

La palabra agar recoge un extenso conjunto de polisacáridos derivados de la galactosa. Este material es parte constituyente de la matriz intercelular de diversos tipos de algas (agarofitas) y se encuentra gelificado de forma natural a temperatura ambiente. Su extracción, a partir de esta fuente, se realiza con agua caliente a temperaturas cercanas a su temperatura de fusión. Poco más se conoce de los detalles de su extracción y purificación ya que estos están bien guardados por las empresas productoras debido al elevado interés comercial que representan.

El agar purificado está compuesto de una mezcla compleja de polisacáridos que se puede separar en distintas fracciones con distinto contenido en sulfatos ~7.00% y piruvatos 0.02-0.97%. La agarosa corresponde a la fracción neutra de la purificación caracterizada por su facilidad para gelificar y su bajo contenido en sulfatos [Duckworth y Yaphe, 1971a y b].

#### 3.4.1. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LOS GELES DE AGAROSA

La agarosa es un polisacárido de la agarobiosa, un dímero de 1,3-β-D-galactopiranosil, 1,4-3,6-anhydro-α-L-galactopiranososa que puede presentar distintos tipos de sustituyentes, fundamentalmente grupos sulfatos, piruvatos y metoxilos. . El porcentaje de cada uno de estos sustituyentes determina las características propias de cada producto; punto de fusión (T<sub>f</sub>), punto de gelificación (T<sub>g</sub>), fuerza y electroendosmosis (EEO)\*.

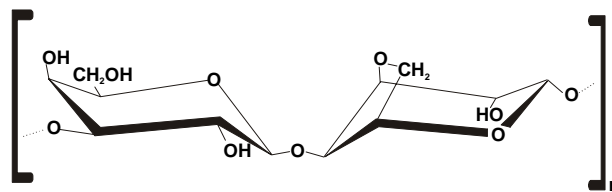


Fig.3.4-1 Dímero de agarobiosa

La determinación de su peso molecular por cromatografía de exclusión y dispersión de luz láser a bajos ángulos dan un valor de entre 80kDa y 140 kDa (260 y 460 unidades de agarobiosa respectivamente) [Rocha y Lahaye, 1989]. La dificultad para su determinación ha llevado a aceptar la relación establecida experimentalmente por Mark-Houwink entre la viscosidad y el peso molecular como una buena estimación:

$$[\eta] = 0.07 \cdot M^{1.72} \tag{Ec.3.4-1}$$

\* La electroendosmosis (EEO) es el fenómeno que ocurre cuando los dos extremos de una capa de gel son sometidos a una diferencia de potencial (electroforesis). Los cationes hidratados asociados con los grupos aniónicos fijos (sulfatos y piruvatos) migran hacia el cátodo, transportando las moléculas de agua asociadas a estos. De esta forma la migración de moléculas negativas como el ADN se retardan.

Se cuantifica midiendo la migración desde el origen de dos tipos de molécula, dextran (carga neutra) y albúmina (cargada negativamente) en una electroforesis. La cantidad EEO (-mr) se calcula dividiendo la distancia de migración del dextran (OD) por la suma de las distancias de migración para la albúmina y el dextran (OD+OA), de forma que la cantidad EEO (-mr) = OD/(OD+OA).

Donde  $\eta$  viene en mL/g y M en g/mol [Rochas y Lahaye, 1989].

Comercialmente se presenta en forma de polvo blanquecino clasificado según el porcentaje de grupos sulfatos (<0.35%), piruvatos (<0.1%) y metilos (0.4-2.5%). El grado de metilación permite controlar la temperatura de fusión y gelificación [Guiseley, 1970]. La metilación natural aumenta el punto de gelificación mientras que la artificial lo descende, no encontrándose una explicación racional para este efecto.

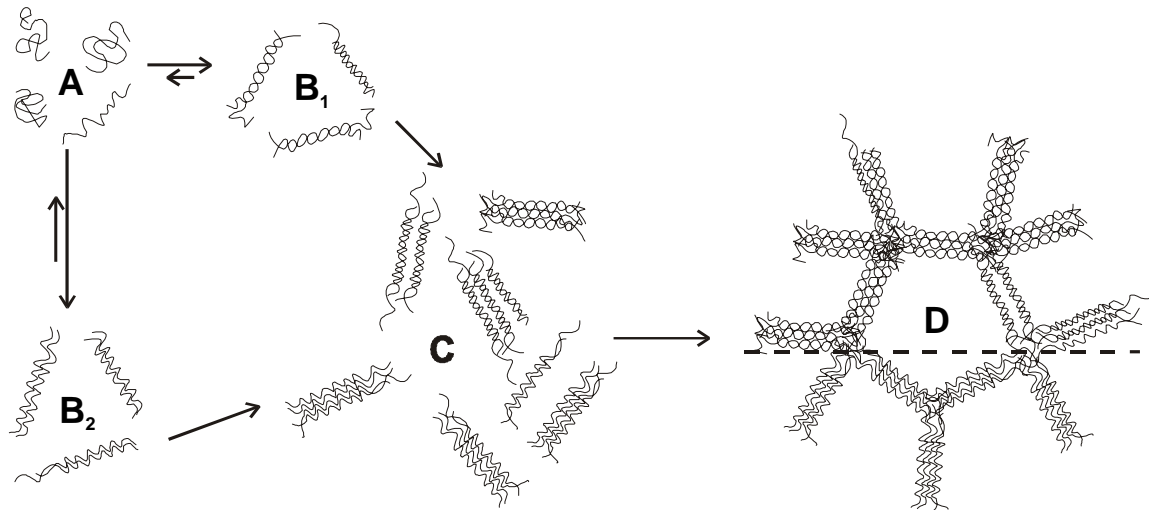
### 3.4.1.1 POLIMERIZACIÓN

La formación de un gel de agarosa se puede considerar como un caso especial de precipitación donde el soluto es una macromolécula lineal solvatada que puede segregarse de la solución como una red tridimensional extendida que atrapa las moléculas de solvente en su interior para producir un cuerpo homogéneo. Al contrario que las proteínas, estas moléculas no necesitan de ningún contraión para que se produzca su precipitación.

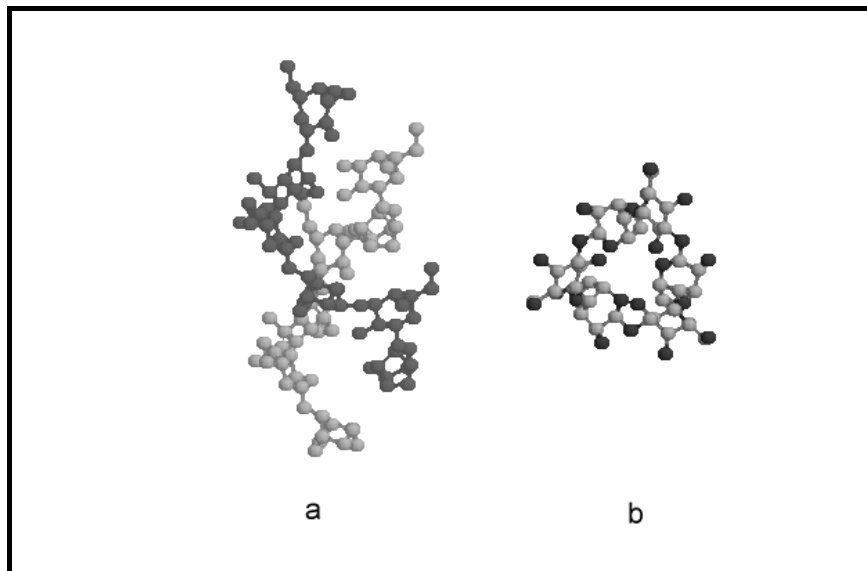
La obtención de un gel de agarosa se realiza por calentamiento de una solución de agarosa a su temperatura de fusión ( $T_f$ ) y su posterior enfriamiento por debajo de la temperatura de gelificación ( $T_g$ ) (Protocolo I). Durante el enfriamiento las fibras de agarosa se asocian para dar lugar a hélices de agarosa que agregan para formar la estructura del gel. La agregación de estas fibras se produce fundamentalmente a través de puentes de hidrógeno [Braudo et al., 1991]. El proceso de polimerización se puede invertir por calentamiento del gel (gel físico, termorreversible). Una vez gelificado, los agregados son mucho más estables que las hélices en solución de forma que para fundir un gel necesitamos temperatura superiores a la  $T_g$ . Este fenómeno se conoce como histéresis del gel.

El mecanismo de gelificación de la agarosa fue sugerido por primera vez por Rees (1972) y corroborado posteriormente por Arnott y colaboradores (1974) empleando diferentes técnicas de caracterización estructural (difracción de rayos-x, rotación óptica y métodos de modelización molecular). Este mecanismo implica dos etapas; un primer paso de una estructura fibrosa desordenada a la formación de dobles hélices (Fig.3.4-2, B<sub>1</sub>) y un segundo paso en el que las hélices se asocian para dar el entramado final del gel. Las dobles hélices tendrían un diámetro de 0.95 nm con un paso de vuelta de 0.633 nm (Fig. 3.4-3). Foords y Atkings (1989) encuentran que la asociación de las fibras durante la primera etapa (Fig. 3.4-2, B<sub>2</sub>) no genera una doble cadena helicoidal sino una asociación de cadenas helicoidales simples con un paso de vuelta más abierto (0.973-0.888nm) que varía en función de las condiciones de preparación de la muestra.

El número de dobles hélices que se asocian para dar lugar a las fibras de gel varía entre 10 a  $10^4$  en función de la concentración [Arnott et al., 1974]. Para geles de agarosa al 3.0% p/v el tamaño de agregado promedio es de 30 nm [Pernodet et al., 1997] lo que corresponde a 30 cadenas de doble hélice tomando 1nm como diámetro promedio.



**Fig.3.4-2** Mecanismos de polimerización según Res (B<sub>1</sub>) y Foords (B<sub>2</sub>). Reproducido a partir de Medin (1995).



**Fig.3.4-3** Representación esquemática de la estructura de la agarosa en conformación de doble hélice en una visión paralela (a) y perpendicular (b) al eje de la hélice [Arnot et al., 1974].

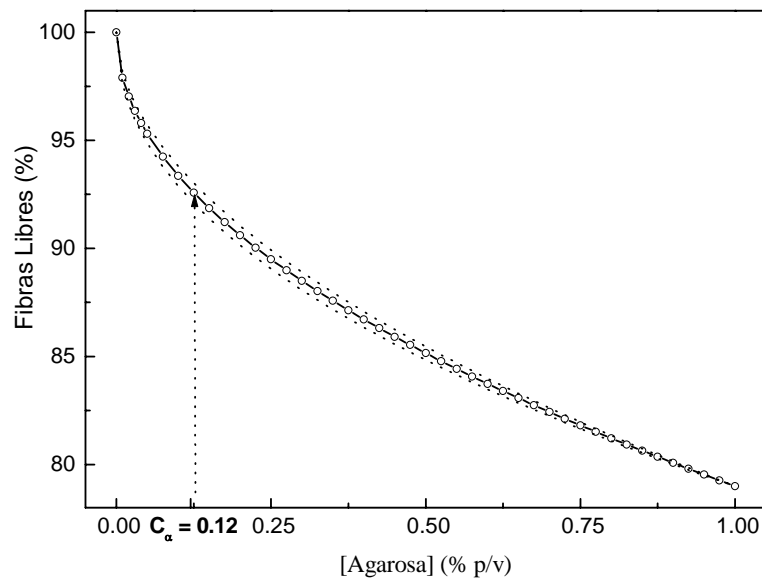
La asociación de los agregados primarios (C→D) tiene lugar a través de zonas desordenadas en los extremos de estos agregados. La existencia de estas regiones permite explicar las propiedades elásticas de los geles de agarosa incluso a concentraciones relativamente bajas (0.2-6% p/v) [Ramzi, 1996]. Pero no todos los agregado obtenidos en la primera etapa (B→C) se incorporan al entramado tridimensional del gel. A concentraciones de agarosa inferiores al 2% p/v un gran número de fibras quedan parcialmente libres. La dependencia entre la cantidad de fibras que quedan libres y la concentración de gel sigue la siguiente relación [Ramzi, 1996]:

$$X_L = 1 - 0.21 \cdot C^{0.5 \pm 0.03} \tag{Ec.3.4-2}$$

Se puede encontrar una concentración ( $C_{\alpha}=0.12\%$  p/v) por debajo de la cual el proceso de gelificación deja de ser cooperativo (concentración crítica). Esto hace que se establezca una diferencia entre soluciones de agarosa a concentraciones superior al  $0.1\%$  p/v (solución gelificada) capaces de formar geles elásticos y soluciones por debajo de esta concentración que dan lugar a geles no elásticos que no son capaces de formar un entramado de percolación en todo el volumen de contención [Hayashi et al., 1977; Letherby et al., 1981].

Una vez que se obtiene el gel se produce una lenta reorganización de las fibras acompañada de una exudación de la solución que lo embebe. A este proceso de reorganización se le denomina sinéresis y su extensión depende del inverso del número de ésteres sulfatos presentes en la muestra y del cuadrado de la concentración. La sinéresis aumenta con el tiempo alcanzando el máximo de exudación a las 144 horas [Nakahama, 1966].

Tanto la temperatura de fusión como la temperatura de gelificación dependen de la raíz cúbica de la concentración siendo más acusada esta dependencia a valores bajos de concentraciones ( $<1\%$ ). Cualquier variación de las condiciones del medio (pH, temperatura, adición de aditivos, etc.) modifica estas temperaturas características y por ende la morfología y propiedades elásticas del gel. Se distinguen dos tipos de efectores, agentes catróticos<sup>†</sup> (urea, etc.) que descienden el punto de fusión y gelificación y agentes liotrópicos (caso de la sal NaCl) que favorecen la gelificación aumentando la  $T_g$ .



**Fig.3.4-4** Gráfica de la variación del porcentaje de fibras libres respecto de la concentración de gel obtenida a partir de la ecuación 3.4-2. Las líneas discontinuas muestran la indeterminación en el exponente.

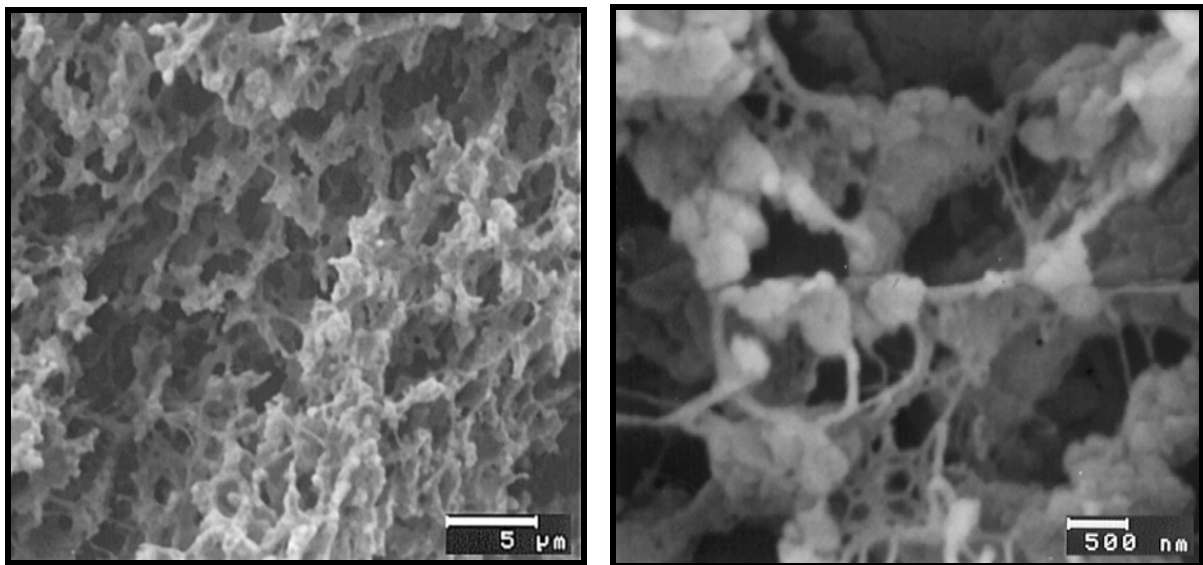
<sup>†</sup> Un agente catrótico rompe interacciones de tipo iónico o por puentes de hidrógeno mientras que un agente liotrópico favorece su formación.

### 3.4.1.2 TAMAÑO DE PORO

El tamaño promedio de poro de un gel de agarosa viene determinado fundamentalmente por la concentración de agarosa y la velocidad de enfriamiento. Otros factores como la presencia de aditivos (sales, disolventes orgánicos, etc) y pH pueden también afectar al tamaño final de los poros. Típicamente el tamaño puede oscilar entre los 300 a 1000 nm para un gel al 0.3% p/v [Griess, 1989].

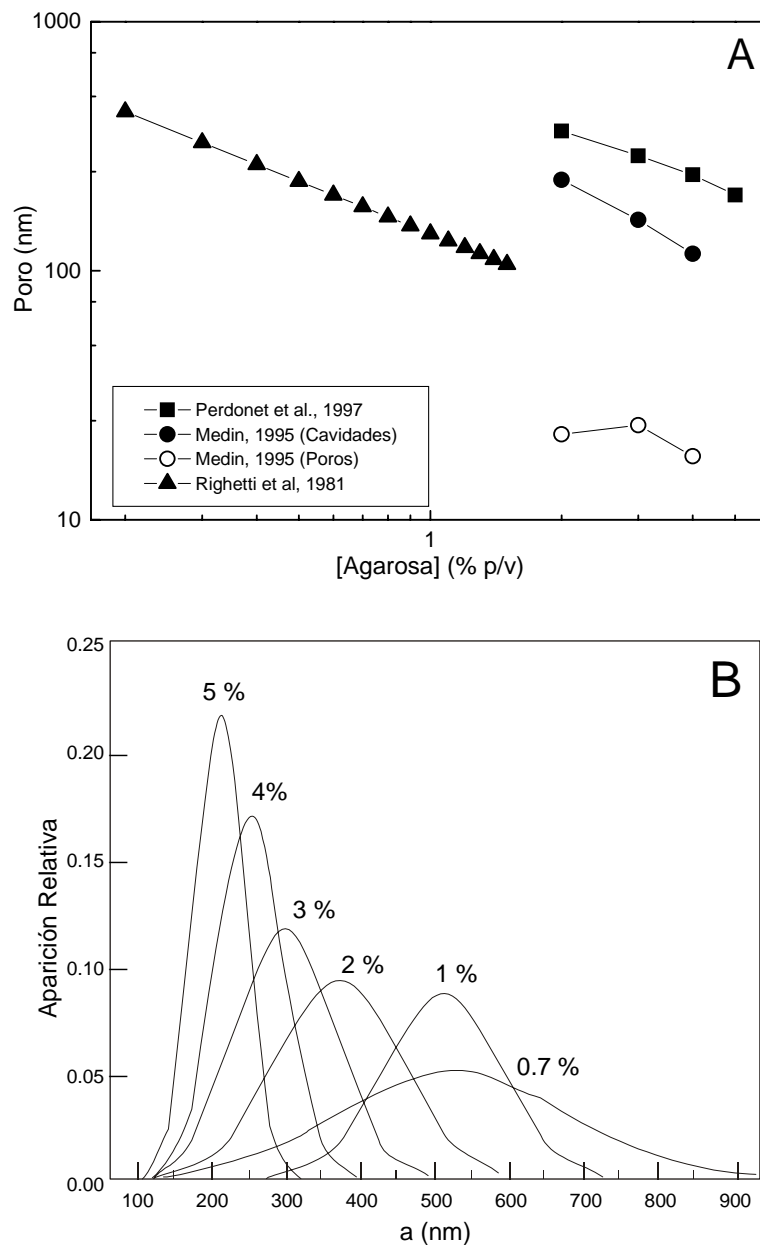
En estudios con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) sobre muestras deshidratadas, se establece una compartimentación a dos niveles, una red tridimensional de macroporos separados entre sí por una malla de pequeños poros. El tamaño de las unidades estructurales de ambas organizaciones, (15 nm para los poros y 120-230nm para los macroporos) está de acuerdo con la distribución de partículas en solución [Medin, 1995].

En la figura 3.4-5 se muestra el aspecto de un gel de agarosa al 0.5% p/v después de someterlo a una deshidratación controlada (Capítulo 5). El proceso de deshidratación ha colapsado las fibras de gel y sólo se observan cavidades del orden de 1  $\mu\text{m}$ . Aún así es posible distinguir finas fibras de unos 50 nm de diámetro.



*Fig.3.4-5 Imágenes del entramado de un gel de agarosa (0,5 % p/v) obtenidas mediante MEB. Se distinguen fundamentalmente sólo los macroporos, ya que los poros han colapsado durante el tratamiento de la muestra.*

Es posible establecer una relación directa entre el tamaño de poro promedio y la concentración de gel de la forma  $\langle a \rangle (\text{nm}) \sim C^n$ . En la literatura se encuentran diferentes valores para  $n$ , -0.75 [De Genes, 1979], -0.7 [Righetti, 1981], -0.64 [Perdonet et al., 1997], o -0.5 [Ogston, 1985] en función de la técnica empleada para su determinación (Fig.3.4-6.A). A partir de los datos de Perdonet mostrados en la figura 3.4-6.B se observa como a concentraciones inferiores a 0.7% p/v el tamaño de poro aumenta considerablemente y la distribución se hace más heterogénea.



**Fig.3.4-6** A) Gráfica logarítmica de la variación del tamaño de poro en función de la concentración de gel para diferentes autores. B) Distribución de tamaño de poro relativo para geles de agarosa a distinta concentración. Reproducido a partir de Perdonet et al. (1997).

Sin embargo, las características físico-químicas y estructurales de los geles de agarosa no sólo dependen de la concentración de trabajo, sino también de las propiedades del medio de preparación e incluso del lote de purificación al que pertenece. Estos factores han de tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados de cristalización de proteínas en geles o incluso cuando los empleamos como soporte físico (Método de Acupuntura en Geles).

### 3.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el transcurso de esta tesis hemos empleado geles de polisacáridos de distinta composición y/o características, aunque el grueso del trabajo se ha desarrollado empleando la agarosa de la casa Pharmacia y sobre ésta se centran los estudios de caracterización.

La adición de sales u otro tipo de aditivos modifica las propiedades de sistemas acuosos que contienen partículas coloidales o macromoléculas, incluso cuando estas no presentan carga neta. Experimentalmente se ha encontrado que la adición de sales al medio de gelificación modifica la  $T_g$  y  $T_f$  así como las características propias del gel (fuerza, elasticidad, transparencia) [Picullel y Nilsson, 1989, 1990]. La interacción entre las moléculas de cosolutos y las macromoléculas pueden ser de tipo electrostático o por fenómenos de interacción superficial (adsorción). En el primer caso las interacciones no dependen del tipo de ión sino de su carga, mientras que en el segundo caso la interacción depende del tipo de molécula. En las interacciones de tipo electrostático la temperatura de transición ( $T_g$  ó  $T_f$ ) varía linealmente con el logaritmo de la concentración de sal [Rochas y Rinaudo, 1980], mientras que para el caso de macromoléculas no cargadas esta dependencia es lineal con la concentración de sal [Picullel y Nilsson, 1990]:

$$T_m = T_m^0 + \mathfrak{R} \cdot C_s \quad \text{Ec.3.4-1}$$

donde  $T_m^0$  es la temperatura de transición en ausencia de sal y  $\mathfrak{R}$  la constante de proporcionalidad que puede tomar valores positivos o negativos, típicamente  $|\mathfrak{R}| \leq 10 \text{ } ^\circ\text{CM}^{-1}$ .

Habitualmente la contribución de diferentes iones al valor final de  $\mathfrak{R}$  es de tipo aditivo y sigue las llamadas series liotrópicas. Un ejemplo de estas series para el caso de aniones es (para  $\mathfrak{R}$  decreciente):  $\text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$ . Las mismas series se pueden encontrar para el caso de cationes aunque el rango de valores de  $\mathfrak{R}$  es bastante menor. Otra importante diferencia entre las series catiónicas y aniónicas es, que mientras que los cationes ejercen su efecto por ser excluidos en mayor o menor grado de la esfera de hidratación, en el caso de los aniones estos interaccionan con determinados puntos de la estructura del gel y es posible observar una competición entre diferentes aniones para una familia de sales donde la afinidad por los sitios de unión siguen una serie liotrópica del tipo:  $\text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$  [Picullel y Nilsson, 1989].

En nuestro caso nos interesa conocer la influencia sobre la temperatura de gelificación de los aditivos que íbamos a emplear en la cristalización de lisozima, esto es: acetato de sodio 50 mM, pH 4.5 y cloruro sódico a distintas concentraciones. El cloruro sódico en solución acuosa aparece como un claro agente estabilizador de la estructura del gel de agarosa, tanto por la interacción del anión cloruro con las fibras de gel como por la exclusión de los cationes sodios de la interfase de hidratación de la agarosa. Para estudiar esta interacción, realizamos una serie de experiencia en las que el gel se preparó sobre soluciones tamponadas con concentraciones de sal crecientes (7 a 10% p/v) y comparamos estos resultados con los obtenidos a partir del gel preparado sobre agua desionizada (Milli-Q,  $18.2 \text{ } \Omega\text{cm}^{-1}$ ).

Se prepararon 50 ml de agarosa al 1% p/v siguiendo el protocolo I., sobre cada una de las soluciones reseñadas en la tabla de la figura 3.4-7. De los 50 ml, 1 ml se empleó en la medida de la transmitancia a 350 nm. Con los 49 ml restantes se siguió el descenso de temperatura (Fig.3.4-7) usando un termómetro de contacto (Martin Marten 80.000 con sonda termopar tipo “k”, Cromel Alumel con una resolución de 0.1°C en un rango de temperaturas de -50°C a 200°C).

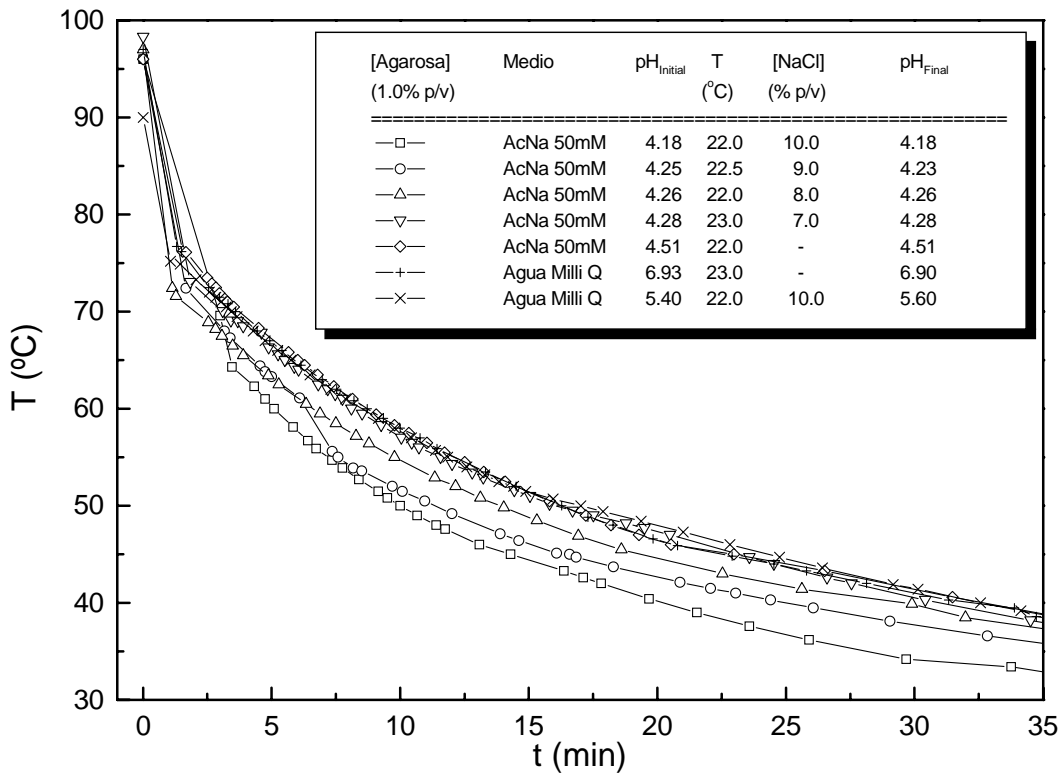


Fig.3.4-7 Curvas de enfriamiento de la agarosa (1% p/v) para distintas condiciones de pH y fuerza iónica.

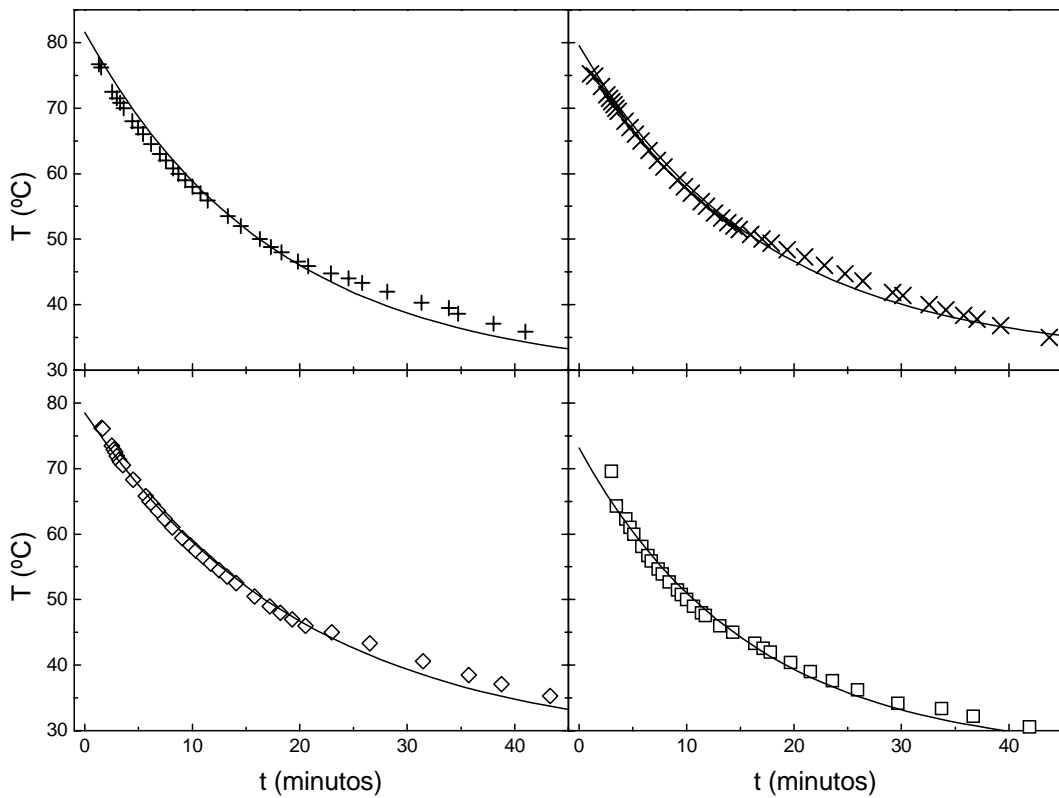
Como se observa en la gráfica 3.4-7 el descenso de la temperatura a lo largo del tiempo presenta una caída exponencial dependiente de las características de la solución. Con objeto de comprobar si estas variaciones eran aleatorias (un artefacto del método experimental) o realmente dependientes de la concentración de sal y del pH, realizamos un ajuste de los datos a la ecuación de enfriamiento de Newton que en su forma integrada se expresa como:

$$T = B + A \cdot e^{\left(-\frac{t}{k}\right)} \tag{Ec.3.4-2}$$

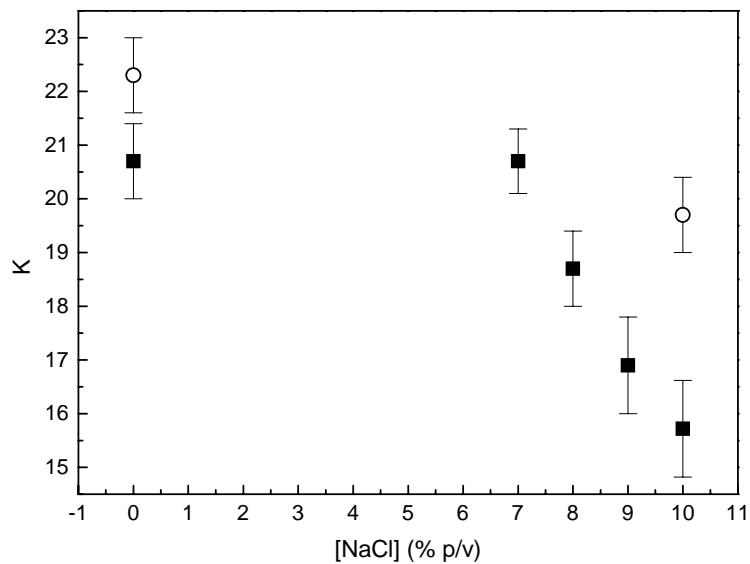
donde los valores A y B representan las constantes de integración.

Los ajustes fueron buenos en todos los casos pero presentaban una desviación sistemática a partir de los 15 minutos aproximadamente apuntando a un cambio en la velocidad de enfriamiento.





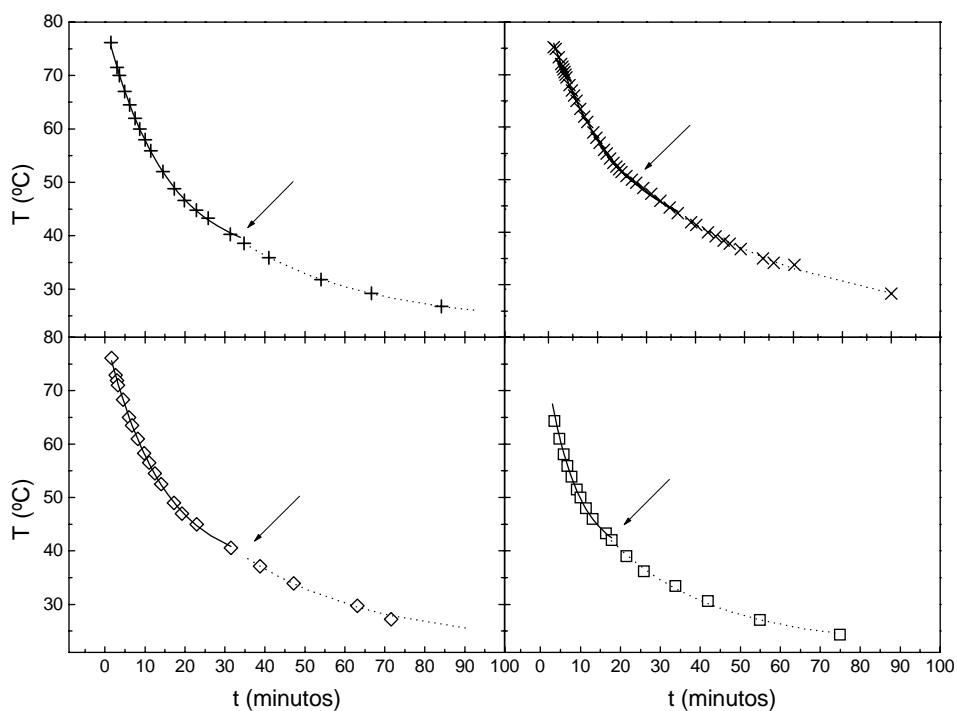
**Fig.3.4-8** Representación del enfriamiento en función del tiempo para soluciones de agarosa al 1% p/v preparadas sobre agua (a), NaCl 10% p/v (b), solución tamponada de acetato de sodio (c) y NaCl 10% p/v sobre la solución tamponada con acetato de sodio a pH 4.18. Las líneas continuas representan el mejor ajuste a los datos de la ecuación 3.4-2.



**Fig.3.4-9** Valor de la constante de enfriamiento  $k$ , en función de la concentración de sal, para experiencias realizadas en tampón acetato de sodio (cuadrados) o en agua (círculos).

Representando el valor de  $k$  frente a la concentración de sal se observa una clara dependencia lineal (Fig.3.4-9). Comprobamos que  $k$  disminuye al aumentar la fuerza iónica y que este descenso es más acusado a valores de pH ácidos apuntando a un efecto sinérgico de la sal con el pH.

En todos los ajustes encontramos que la curva obtenida infravalora los datos experimentales a partir de un determinado valor de  $t$ . Asimismo, experimentalmente observamos como este cambio de velocidad coincide bastante bien con la percepción visual, y espectrofotométricas (Fig.3.4-12) de la formación del gel. La variación de la velocidad de enfriamiento es debida a que la polimerización es un fenómeno de tipo exotérmico (-5kJ/mol). Este calor que se genera fundamentalmente durante la transición ovillo  $\rightarrow$  hélice implica la pérdida de entre 1 y 10 sitios de hidratación por unidad de disacárido incorporado a una doble hélice [Piculell y Nilsson, 1989].

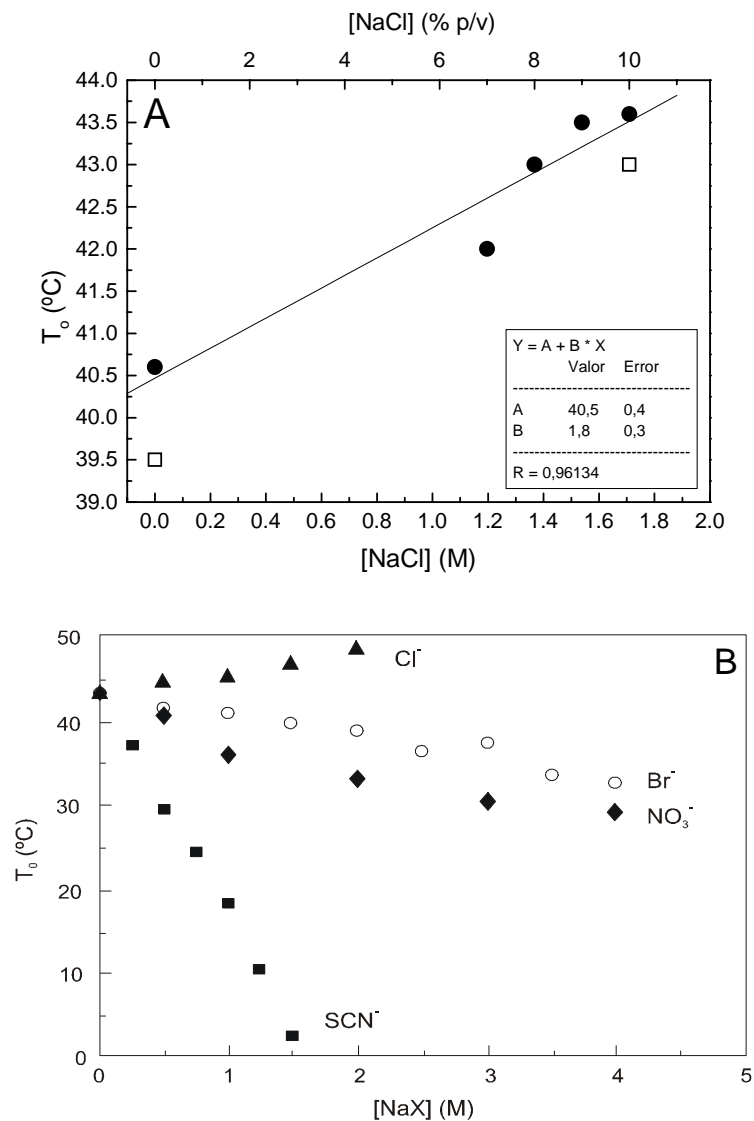


**Fig.3.4-10** Ajuste en dos tramos, de las curvas de enfriamiento de agarosa al 1% p/v en diferentes condiciones experimentales (ver Fig.2.1-6). Las flechas señalan en cada gráfica la temperatura donde se observó un cambio de comportamiento.

Para comprobar este punto realizamos un ajuste exponencial en dos tramos: tomamos la región inicial y ajustamos a la ecuación de enfriamiento añadiendo punto a punto hasta que la calidad del ajuste ( $R$ ) empezaba a descender. Operando de la misma forma con la región final, encontramos un único punto, excepto para la solución sobre agua con NaCl 10% p/v, a partir del cual los dos ajustes perdían calidad (Fig.3.4-10). Representando los valores de esta temperatura de transición frente a la concentración de sal (Fig.3.4-11) encontramos que la nube de puntos se

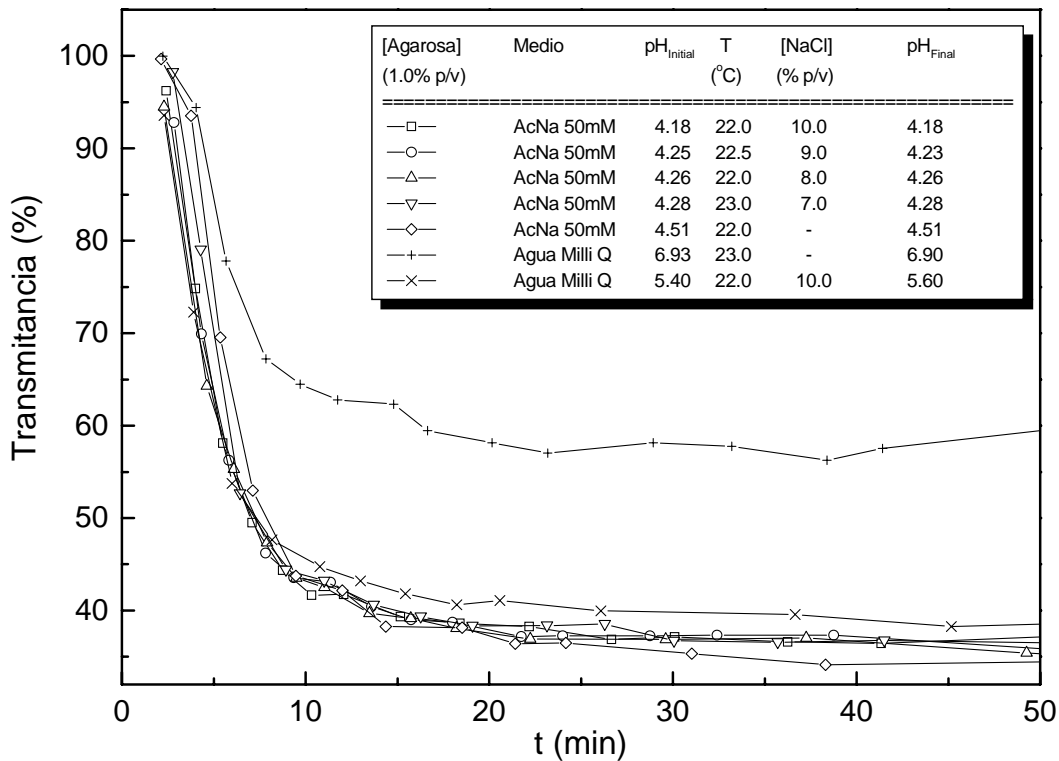
ajustaba bien a una línea recta de acuerdo con el comportamiento liotrópico del cloruro de sodio (Ec.3.4-1). La constante de proporcionalidad  $\mathfrak{R}$  toma un valor de  $1.8^{\circ}\text{C}\cdot\text{M}^{-1}$ , el doble del obtenido por Piculell y Nilsson (1989). Esta pequeña desviación puede ser debida al efecto sinérgico del pH o a la imprecisión de la determinación.

Estos datos ponen de manifiesto que la adición de NaCl aumenta la estabilidad del estado helicoidal de la agarosa como evidencia el aumento de la temperatura de gelificación. Este efecto es debido fundamentalmente a la adsorción del anión cloruro, mientras que el catión sodio es expelido de la superficie del gel. La interacción cloruro-gel no se puede considerar una interacción fuerte como demuestra el desplazamiento de este por otros iones siguiendo la serie liotrópica descrita al inicio de este apartado.



**Fig.3.4-11** A) Dependencia de la temperatura de transición ovillo  $\rightarrow$  hélice ( $T_0$ ) con la concentración de sal, obtenida en este trabajo a partir de la velocidad de enfriamiento. Los símbolos vacíos muestran los datos obtenidos en agua, no tomados en cuenta en el ajuste. B) Datos de Piculell y Nilsson (1989).

La adición de sales puede por tanto producir un efecto no sólo en la transición oville→hélice sino también en las propiedades ópticas y mecánicas del gel [Piculell y Nilsson, 1990]. Para corroborar este punto realizamos el seguimiento de la polimerización del gel de agarosa por espectrofotometría a 350 nm. Los datos de transmitancia en función del tiempo se recogen en la figura 3.4-12.

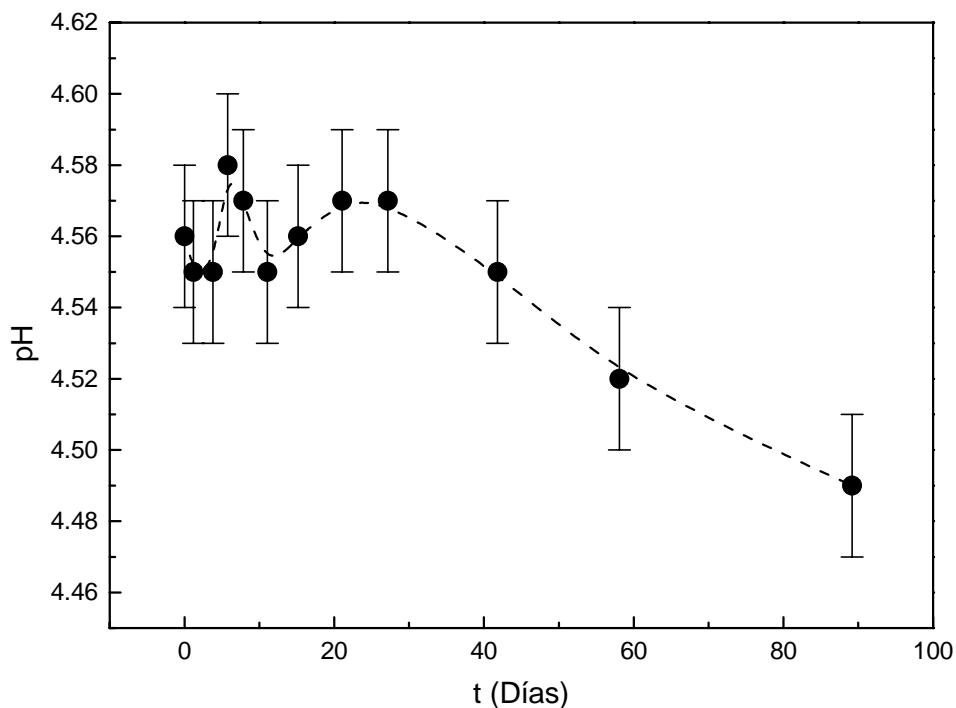


**Fig.3.4-12** Evolución de la transmitancia a lo largo del tiempo durante la polimerización de un gel de agarosa al 1% p/v preparado a diferentes concentraciones de sal y pH (tabla en la gráfica).

En esta figura comprobamos como la cantidad de luz transmitida disminuye con el tiempo y se estabiliza a los 40 minutos aproximadamente independientemente de las condiciones del medio. Observamos como la presencia de cualquier aditivo: sal o tampón, acelera el proceso de gelificación y se obtiene como resultado final un gel más opaco. El descenso de la cantidad de luz transmitida está asociado a un aumento de la cantidad de centros difusores de luz: partículas en suspensión o mayor densidad de la malla de gel. Por otra parte sabemos que la presencia de sal estabiliza las estructuras de doble hélice en solución frente a la conformación en oville. Esto explica el descenso de la cantidad de luz transmitida en los primeros 10 minutos cuando aún nos encontramos alejados de la temperatura de gelificación y el hecho de que este descenso sea mayor en las soluciones con algún aditivo frente a la preparación en agua desionizada. En todos los casos entre los 10 y 40 minutos el descenso de la transmitancia es pequeño y está asociado a la segunda

etapa de la polimerización (hélice  $\rightarrow$  gel). A partir de estos datos es imposible distinguir si el descenso de la transmitancia final del gel en las soluciones con aditivos es debido a que la malla de gel es más densa o a un aumento del número de hélices que pueden estar o no formando parte de la estructura del gel. Actualmente estamos diseñando experiencias encaminadas a distinguir cual es el efecto final sobre la estructura del gel.

Por último nos interesaba conocer la estabilidad del gel frente al pH. Para ello realizamos un seguimiento de la variación del pH a lo largo del tiempo de un gel preparado sobre tampón acetato de sodio 50 mM y pH 4.56 (Fig.3.4-13). Durante el primer mes no observamos ningún cambio significativo y las variaciones se pueden considerar dentro del error instrumental  $4.56 \pm 0.02$ . A partir del primer mes se observó un lento descenso del pH, debido posiblemente a la hidrólisis espontánea de las unidades de agarobiosa.



**Fig.3.4-13** Estabilidad del pH a lo largo del tiempo de un gel de agarosa (1.0% p/v) preparado sobre tampón AcNa 50mM, pH 4.5.

Podemos decir que los geles de agarosa mantienen su estabilidad a pH 4.5 durante un periodo de tiempo de un mes aproximadamente. A partir de ese momento el gel envejece lentamente provocando una acidificación del medio. Este dato es necesario tenerlo en cuenta cuando se quieren conservar los cristales crecidos en geles durante un largo periodo de tiempo. Experimentalmente hemos comprobado como los cristales de lisozima crecidos en geles de agarosa presentan un aspecto amarillento junto con el gel, después de más de tres meses.

### 3.5. CONCLUSIONES

Es posible preparar geles de sílice en un amplio rango de pH variando la cantidad de ácido empleado para la valoración. El volumen de ácido necesario para obtener un gel a un determinado pH depende de la vejez de la solución S (metasilicato de sodio de 1.06 gr/ml de densidad, protocolo II-a). El envejecimiento de la solución S implica la formación de partículas de sílice en suspensión que pueden modificar la estructura final del gel. La carbonatación de la solución S provoca un descenso del pH, disminuyendo la cantidad de ácido necesario para la valoración. Estas modificaciones que pueden afectar a la estructura íntima del gel no influyen en el comportamiento macroscópico. Asimismo, la incorporación de una sal al sol tampoco provoca variaciones en la transparencia del gel con respecto a un gel libre de sal. Sin embargo, el aumento de la fuerza iónica acelera el proceso de polimerización y modifica el pH final para el mismo volumen de ácido, por lo que cabe esperar una estructura de gel diferente. Por el contrario se confirma que cuando se añade una molécula de gran tamaño (macromolécula biológica), la polimerización se ve impedida y las partículas de gel floculan. Esto imposibilita el empleo de los geles de sílice a partir de metasilicato de sodio en la preparación de muestras con macromoléculas biológicas cuando la mezcla se realiza en estado sol (apartado 3.3.2).

Este problema se evita cuando los geles se preparan a partir de los derivados alcoxilados de sílice (TMOS o TEOS). En este caso es posible incluir moléculas de elevado peso molecular en estado sol obteniéndose, tras la polimerización, geles a concentraciones tan bajas como 1% v/v. Sin embargo, no es posible generalizar este comportamiento. La presencia de pequeñas cantidades de sal o las propias características de la macromolécula pueden llevar en algunos casos a la floculación de la mezcla.

En cuanto a los geles de agarosa hemos confirmado que la polimerización transcurre en dos etapas según se deduce de los datos de enfriamiento y evolución de la transmitancia con el tiempo. La primera etapa, asociada a la formación de las hélices o agregados primarios, es fuertemente dependiente de las condiciones del medio. La presencia de agentes liotrópicos (NaCl) estabiliza la formación de hélices y aumenta la temperatura de gelificación. Este efecto se ve reforzado a valores de pH ácidos. Este comportamiento se traduce en la obtención de geles con características estructurales distintas, como se infiere de los estudios espectrofotométricos (apartado 3.4.2).

La diferencia estructural por una parte y la modificación de la actividad de los iones cloruro (que interaccionan con el gel) y sodio (excluidos del gel) por otra parte, deben tenerse en cuenta a la hora de evaluar la influencia de los geles de agarosa sobre la nucleación de los cristales de proteínas.

## 4. LA EVOLUCIÓN DE LA SOBRESATURACIÓN EN LA TÉCNICA DE CONTRADIFUSIÓN

*El mundo no perecerá por falta de maravillas  
sino por falta de curiosidad.*

J.B.S. Haldane

### 4.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo primero se vio como la sobresaturación es el parámetro termodinámico que impulsa y controla la génesis y crecimiento cristalino. Su evaluación es indispensable si se quiere realizar una interpretación de los resultados sobre la base de las teorías que predicen el comportamiento de un sistema o para establecer un control sobre su desarrollo.

En sistemas temporalmente homogéneos es posible medir e incluso predecir la evolución de la sobresaturación, lo que permite su modulación y optimización en función de las necesidades. En el ámbito práctico las técnicas contradifusivas no requieren un control tan exhaustivo ya que escogidas unas condiciones iniciales adecuadas la evolución temporal de la sobresaturación, a lo largo de la dirección de desarrollo es suficiente para asegurarnos que en algún punto las condiciones serán las deseadas. Sin embargo, esta información carece de precisión a la hora de interpretar los resultados.

En este capítulo se aborda este problema de forma conjunta. Por una parte se buscan los indicadores que nos permitan evaluar la evolución de la sobresaturación y se confirma la veracidad de estos indicadores con las medidas directas obtenidas de los datos de interferometría. Por otra parte se compara la eficacia de las técnicas contradifusivas frente a las técnicas tradicionales de crecimiento cristalino, en la búsqueda de las mejores condiciones de crecimiento de cristales. Asimismo se demuestra que establecidas unas condiciones iniciales adecuadas, las técnicas contradifusivas son capaces de encontrar las condiciones idóneas para el crecimiento de cristales de elevada calidad. Este comportamiento se justifica basándose en la evolución de la sobresaturación.

## 4.2. BASES TEÓRICAS DE LA CONTRADIFUSIÓN

Los sistemas contradifusivos se caracterizan por su complejidad. El transporte de masa difusivo se encuentra acoplado a un fenómeno de precipitación por reacción química o por el cambio de la solubilidad de las moléculas que precipitan. En el primer caso los reactivos difunden en sentido contrario y la precipitación se produce cuando el producto iónico de las especies supera el producto de solubilidad por encima del valor necesario para que la probabilidad de que se forme un agregado no sea despreciable. La aplicación de las ecuaciones de Fick de la difusión y el desarrollo de distintas teorías para dar explicación a la aparición de los primeros precipitados han permitido desarrollar modelos teóricos que predicen el comportamiento espacial de un sistema de difusión-reacción a lo largo del tiempo [Hensch y García-Ruiz, 1986; García-Ruiz, 1991]. A raíz de estos resultados Otálora y García-Ruiz extrapolan este tratamiento a sistemas en los que la precipitación es provocada por un cambio de solubilidad y desarrollan algoritmos computacionales de simulación [Otálora, 1996, Otálora y García-Ruiz, 1996, 1997]. Estos resultados se han confirmado experimentalmente por primera vez con la obtención del patrón de sobresaturaciones a partir de datos de interferometría Mach-Zehnder [García-Ruiz et al, 1999; 2000].

### 4.2.1. EL TRANSPORTE DE MASA EN SISTEMAS DIFUSIVOS

Para describir la cinética del proceso de nucleación y crecimiento tenemos que tener en cuenta que nos encontramos en un medio en el que el transporte de materia es de tipo difusivo y que por tanto se puede describir a partir de la segunda ley de Fick que particularizada para una dimensión se expresa como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C}{\partial X^2} \quad \text{Ec.4.2-1}$$

C representa la concentración de la especie que difunde en función del tiempo (t) y de la posición (X) a lo largo de la cámara, D es el coeficiente de difusión. Esta ecuación puede ser fácilmente generalizada a tres dimensiones tomando la divergencia de la concentración en el espacio. A temperatura constante y considerando el coeficiente de difusión independiente de la concentración y del tiempo y para unas determinadas condiciones iniciales de concentración (fuentes inagotables) y de contorno (sistemas semi-infinitos) [García-Ruiz, 1981] la solución analítica se puede aproximar a [Crank, 1975]:

$$C = C_0 \cdot \operatorname{erfc} \frac{X}{2 \cdot \sqrt{D \cdot t}} \quad \text{Ec.4.2-2}$$

Siendo erfc el complemento de la función de error de Gauss y  $C_0$  la concentración inicial. La relación entre la distancia de difusión y la raíz cuadrada del tiempo es característica de procesos en los que el transporte está controlado por la difusión, por lo que a menudo se usa para identificar este comportamiento a partir de unos datos experimentales.



Las aproximaciones propuestas son demasiado drásticas, ya que los sistemas reales no son semi-infinitos y las fuentes se agotan a lo largo del tiempo. En condiciones reales no es posible obtener una solución analítica de la ecuación de Fick, por lo que el problema se aborda desde otros frentes.

La disponibilidad de microprocesadores capaces de realizar cálculos iterativos ha permitido desarrollar soluciones numéricas para abordar este problema cuando la dimensión sobre la que difunde es finita y la concentración de reactivo en la fuente varía con el tiempo [Henisch y García-Ruiz, 1986]:

$$C(x, t + \Delta t) = \frac{1}{6} [C \cdot (x - \Delta x, t) + 4 \cdot C \cdot (x, t) + C \cdot (x + \Delta x, t)] \quad \text{Ec.4.2-3}$$

donde  $\Delta x$  y  $\Delta t$  representan una discretización del espacio y del tiempo. La ecuación anterior se cumple si la relación entre los parámetros discretizados se mantiene como:

$$\frac{\Delta t}{(\Delta x)^2} \cdot D = \frac{1}{6} \quad \text{Ec.4.2-4}$$

condición que minimiza los errores en los cálculos iterativos sin influir en la modelización realista del transporte.

La descripción de un sistema real a partir de soluciones numéricas debe de cumplir además las condiciones de consistencia, convergencia y estabilidad. Estas aseguran que: 1) el proceso de discretización es reversible, esto es, que podemos recuperar las ecuaciones originales a partir de las algebraicas a través de una expansión en series de Taylor, 2) que la solución del sistema de ecuaciones algebraicas converge a la solución exacta del sistema de ecuaciones diferenciales cuando los elementos discretizados tienden a cero y 3) que la tendencia de los errores espontáneos de las soluciones de las ecuaciones algebraicas tiende a disminuir en sucesivas iteraciones [Otálora, 1996].

#### 4.2.2. PRECIPITACIÓN Y CRECIMIENTO EN CONTRADIFUSIÓN

Una vez simulado el transporte de materia es necesario incluir los fenómenos de precipitación y crecimiento de los cristales. Cuando la precipitación transcurre a través de una reacción química, basta con incluir el producto de solubilidad para determinar las posiciones en que aparecen los precipitados. La formación de un precipitado actúa como sumidero de los reactivos que combinado con el transporte de masa difusivo es suficiente para dar explicación al fenómeno de precipitación periódica como consecuencia de un frente de sobresaturación que recorre la cámara de precipitación [Ostwald, 1897].

En el caso de las proteínas la situación parece algo más complicada. La precipitación no se produce por reacción química sino por una reducción de la solubilidad de la proteína provocada por

la modificación de las características físico-químicas del medio (fuerza iónica, pH, temperatura, constante dieléctrica, etc.). En el transcurso de una experiencia el agente que provoca el cambio de alguna de estas propiedades no se consume durante la precipitación, o al menos no significativamente. El continuo avance del agente precipitante en la cámara de proteína provoca sucesivos episodios de precipitación que, acoplados a un transporte de masa difusivo, controlan el rango de sobresaturaciones barrido en cada experiencia. De esta forma aplicando las soluciones numéricas del transporte en medio difusivo y la dependencia de la concentración de equilibrio de la proteína con la concentración de sal (curva de solubilidad), es posible predecir el desarrollo completo de una experiencia de precipitación y crecimiento de cristales de proteínas según las ecuaciones termodinámicas descritas en el capítulo primero [Otálora, 1996].

Sin embargo, es necesario introducir algunas modificaciones en estas ecuaciones para incluir la no-homogeneidad del medio durante el desarrollo de la experiencia. Esta característica propia de los sistemas contradifusivos aparece reflejada en la dependencia del flujo de nucleación con la velocidad de sobresaturación. En sistemas temporalmente homogéneos el flujo de nucleación se representa como la probabilidad de que un núcleo pre-crítico supere la barrera energética de nucleación, a esa sobresaturación. Cuando la sobresaturación evoluciona en el espacio con el tiempo, aparece un nuevo término exponencial en la función de probabilidad de nucleación dependiente de la velocidad de sobresaturación. Cuando esto ocurre el flujo de nucleación está fundamentalmente controlado por la velocidad de sobresaturación, de forma que, a mayor velocidad de sobresaturación para alcanzar un determinado valor de sobresaturación, mayor será el flujo de nucleación.

El crecimiento de los cristales se simula admitiendo un control del crecimiento de tipo cinético que se ajusta a la ecuación general de crecimiento:

$$\frac{dM}{dt} = k \cdot A \cdot (C - C_o)^m \quad \text{Ec.4.2-5}$$

donde  $M$  es la masa del cristal,  $K$  es una constante cinética,  $A$  es la superficie del cristal,  $C$  y  $C_o$  son las concentraciones proteína en el punto discretizado y la concentración de proteína de equilibrio a la concentración de sal en el mismo punto en el momento discretizado respectivamente y  $m$  describe el mecanismo de crecimiento del cristal tomado como 1.5 (crecimiento por nucleación bidimensional) en las simulaciones. Dependiendo del valor de  $C_o$  un cristal continuará creciendo o se disolverá hasta desaparecer si el valor de la sobresaturación tomado como  $C/C_o$  desciende por debajo de uno.

A partir de estas premisas se han desarrollado en nuestro laboratorio diversos algoritmos de simulación de los fenómenos de precipitación acoplados a una reacción química o provocados por el cambio de solubilidad en sistemas contradifusivos. A lo largo de este capítulo se comparan los resultados experimentales con los obtenidos a partir de las simulaciones teóricas y se discuten las posibles variaciones o concordancias encontradas, así como futuras estrategias que nos permitan seguir avanzando en este sentido.

### 4.3. MÉTODOS DIRECTOS

La sobresaturación es el parámetro que nos indica lo alejado que nos encontramos de la situación de equilibrio. Su evaluación implica el conocimiento de las concentraciones de agente precipitante y de proteína en cada momento y cada punto. Hoy en día sólo las técnicas interferométricas permiten seguir esta evolución a través del cambio de índice de refracción. En sistemas temporalmente homogéneos la contribución al índice de refracción de la sal es conocida y constante de forma que cualquier variación corresponde sólo a la evolución de la concentración de proteína. Sin embargo, cuando esta evolución está asociada al cambio de concentración de más de un componente como ocurre en contradifusión, la información que se obtiene corresponde a la integración de la evolución de cada uno de ellos. Por otra parte el desarrollo de este tipo de experiencias requiere que las características físico-químicas del sistema no se vean alteradas por la presencia de ningún factor externo y por tanto sólo se pueden llevar a cabo en condiciones de gravedad reducida.

Una alternativa a la microgravedad la ofrece el método de acupuntura en geles, ya que es el único en el que la nucleación y el crecimiento de los cristales tienen lugar en solución. El seguimiento en continuo de la variación de la concentración de sal y proteína es prácticamente imposible con los medios de los que actualmente disponemos. Por ello optamos por realizar un seguimiento de la variación de las concentraciones promedios en el interior del capilar y comparar estos resultados con los obtenidos a partir de simulaciones realizados con el ordenador.

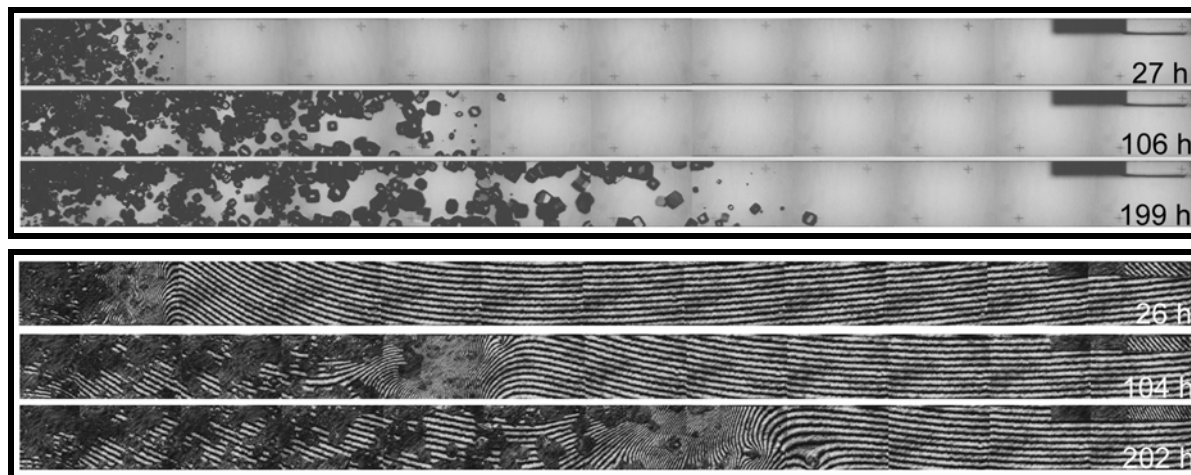
#### 4.3.1. SEGUIMIENTO POR INTERFEROMETRÍA

Para poder obtener un cuadro real de la evolución del patrón de sobresaturación es necesario disponer de un escenario "limpio" con transporte de masa difusivo y que cumpla los requerimientos mínimos. Actualmente sólo disponemos de un medio capaz de ofrecer condiciones tan asépticas, la microgravedad. La siguiente condición es disponer de una dirección de desarrollo para lo cual nuestro laboratorio propuso una modificación de los actuales reactores FID (Free Interface Diffusion) facilitados por la ESA (Agencia Espacial Europea) en los que se ampliaba la longitud de la cámara de proteína de 7 a 70 mm (reactor FID-XL).

La experiencia se llevó a cabo durante la pasada misión STS-95, a bordo del transbordador Discovery fletado por la Agencia Americana del Espacio (NASA). Las medidas experimentales se realizaron empleando un interferómetro con configuración de tipo Mach-Zehnder instalado en el módulo APCF (Advanced Protein Crystallization Facility) acomodado en la bodega de la lanzadera.

El seguimiento por vídeo de la evolución de las imágenes interferométricas y de las imágenes reales, permite determinar a partir del patrón de franjas la evolución del índice de refracción en cada punto de la cámara en cada momento y los eventos de nucleación asociados a los cambios de índice de refracción (ver Fig. 4.3-1). Dicha evolución recoge tanto la variación en la concentración de proteína como la de sal. Para calcular el valor de la sobresaturación en cada punto en cada momento es necesario separar ambas contribuciones. Esto se realiza a partir de un complicado proceso de evaluación numérica en el que se simula la variación de concentración de

sal y proteína a lo largo de toda la cámara y él resultados se compara con los datos experimentales. La iteración de estos cálculos permite obtener finalmente la variación de la sobresaturación a lo largo de la cámara de proteína en función del tiempo.



**Fig.4.3-1** Composición de las imágenes reales y de interferometría de las distintas regiones de un reactor de cámara larga (XL) adquiridas durante el desarrollo de una experiencia en condiciones de gravedad reducida.

Del análisis de los datos de interferometría (trabajo que forma parte de la tesis doctoral de M. L. Novella) se deduce que la invasión de la cámara de proteína por el agente precipitante genera un frente de sobresaturación que en los momentos iniciales provoca una fuerte nucleación o precipitación amorfa, consumiendo rápidamente la proteína en esa región. El continuo avance de la solución salina acoplado a la difusión de la proteína hacia la región deprimida genera una onda de sobresaturación que barre la cámara de proteína a lo largo del tiempo. Durante su desarrollo se siguen produciendo nuevos eventos de nucleación cada vez más distanciados en el tiempo y en el espacio lo que provoca una disminución del máximo de la onda de sobresaturación junto con un ensanchamiento espacial debido a la disminución de la velocidad de avance. Los eventos de nucleación disminuyen permitiendo a los cristales alcanzar un mayor tamaño y crecer a una velocidad inferior. El tamaño final de los cristales depende del tiempo de residencia en el interior de la onda de sobresaturación.

#### 4.3.2. CONCENTRACIÓN TOTAL EN EL TIEMPO

Como hemos visto en el apartado de introducción, el método de acupuntura en geles y en general las técnicas contradifusivas presentan distintas variables iniciales que nos permiten controlar el sistema: concentraciones iniciales, profundidad de punteado y diámetro capilar son las más relevantes. En principio bastaría con mantener todas estas constantes para poder realizar este estudio, sin embargo, decidimos introducir dos variables en nuestros ensayos: el diámetro capilar y el tipo de gel que actúa como soporte de los capilares.

En trabajos realizados anteriormente se ha puesto de manifiesto que la evolución espacial y temporal de una solución coloreada de permanganato potásico en el interior de un capilar de 0.4

mm de diámetro interno se ajustaba a un transporte de masa controlado por difusión [Moreno, 1996; García-Ruiz y Moreno 1997]. Para encontrar el punto a partir del cual el transporte de masa está controlado por la convección en el interior del capilar las experiencias se realizan en capilares de 0.5, 0.9 y 1.2 mm de diámetro interno.

Por otra parte empleamos geles sílice y agarosa con objeto de evaluar la influencia del transporte en el seno del gel respecto del transporte en el interior del capilar. Los trabajos realizados sobre la difusión de colorantes en geles de sílice, agar y acrilamida muestran diferencias en las velocidades de difusión de estos compuestos en función del gel sobre el que difunden [Wunderlich, 1982].

Por último se estudia como afecta la configuración al desarrollo experimental. Para ello se comparan experiencias montadas siguiendo el protocolo III, en las que la sal se añade en solución a una concentración doble de la concentración final, con experiencias en las que la sal se añade directamente sobre el gel. En este último caso la fuente de sal se puede considerar inagotable y de concentración constante.

En la tabla 4.3-1 se han resumido las cuatro posibles combinaciones gel-concentración de sal empleadas en los distintos ensayos. Las experiencias se agruparon en dos bloques para evitar que un error de preparación se pudiese atribuir a un determinado tipo de gel o a una forma de contradifundir la sal. Tanto la solución de sal como la de proteína (lisozima) se preparan en 50 mM de tampón acetato sódico pH 4.5.

	Exp-A (■)	Exp-B (□)	Exp-C (●)	Exp-D (○)
Tipo de gel	Sílice $\rho = 1.06$ gr/cc	Sílice $\rho = 1.06$ gr/cc	Agarosa 1.0% p/v	Agarosa 1.0% p/v
[NaCl] (% p/v)	20% en solución	+ NaCl 22.5% p/v en AcOH 1.0 N	20% en solución	en NaCl 10% p/v

**Tabla 4.3-1** Resumen de las condiciones experimentales empleadas para el seguimiento de la variación promedia de la concentración a lo largo del tiempo.

1.- En el primer bloque se usa gel de sílice (Protocolo II-a) y pH final 5.8, sobre el que se difunde la solución de cloruro sódico 20% p/v (Exp-A (■)). En la segunda experiencia de este ensayo se preparó agarosa al 1% p/v sobre una solución de NaCl 10% p/v tamponada (Exp-D (○)).

2.- En el segundo bloque experimental, los 12.5 ml de silicato de sodio (solución S) se valoran con 10 ml de NaCl 22.5% p/v preparado sobre ácido acético 1.0 N de forma que la concentración final de NaCl en el gel es 10% p/v (Exp-B (□)). En la segunda experiencia de este ensayo se difunde una solución de NaCl 20% p/v sobre un gel de agarosa 1% p/v preparado sobre el tampón de trabajo NaCl 20% p/v (Exp-C (●)).

Para cada uno de los cuatro tipos de experiencias empleamos tres cristalizadores, uno por cada diámetro capilar. En cada cristalizador se puntearon 13 capilares con la solución de lisozima y trece con agua desionizada con el mismo volumen de llenado. En las experiencias B y D, una vez insertados los capilares el gel se cubrió con aceite de glicerina para evitar la evaporación y los

posibles problemas de concentración. Asimismo se introdujo un pequeño vial con agua en el interior de la cámara de aislamiento para mantener una presión de vapor de agua constante y evitar así la evaporación en los capilares durante el transcurso de la experiencia.

A intervalos de tiempo regulares se extrajeron un capilar con agua y otro que contienen la solución de proteína de cada uno de los diámetros señalados. La extracción se llevó a cabo con cuidado de no expulsar el pequeño tapón de gel que se introduce durante el punteado de los capilares. Este tapón evita la pérdida de la solución al extraer el capilar. En el caso de los capilares con agua, la solución se recuperó por completo ayudándonos de un par de jeringas Hamilton de 10 y 25  $\mu\text{l}$  con aguja de acero de 0.3 y 0.4 mm de diámetro externo. En los capilares que contienen la proteína la presencia de cristales que cierran por completo el diámetro capilar obligó a cortar el capilar en tantas secciones como cristales tuviese. La extracción de la solución de proteína se llevó a cabo empleando las jeringas Hamilton con la ayuda de una lupa binocular (Olimpus) para estar seguros de no absorber ningún pequeño cristal.

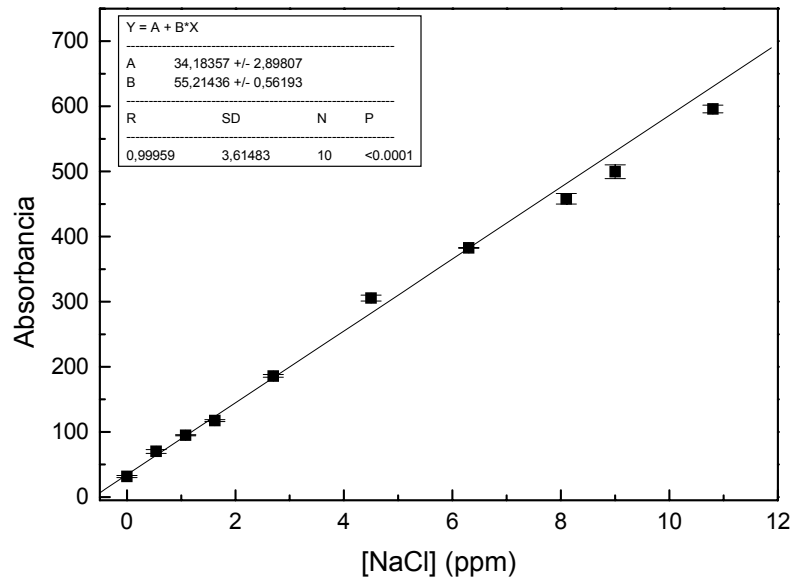
#### 4.3.2.1 VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SAL

Previa dilución, la cantidad de sal difundida en el interior del capilar fue determinada por espectrometría de absorción atómica a 589.0 nm (longitud de onda de emisión del  $\text{Na}^+$ ). Empleamos un instrumento Unicam SP1900 con mechero típico para llama aire-acetileno y una apertura de rendijas de 0.15. Los patrones de calibrado se prepararon a partir de una solución comercial de NaCl perfectamente conocida (NaCl 0.9% p/v de Sigma S-8776, Lot. 25H2321) (Fig.4.3-2). El rango de concentraciones de las soluciones patrón se escoge de forma que la mayoría de las medidas de las muestras problema diesen valores en la región central de esta curva.

En cualquiera de las experiencias cabe esperar una concentración final de equilibrio entorno al 10% p/v de NaCl, aunque se puede esperar pequeñas variaciones de la concentración debidas a: la presencia de AcNa 50mM, el cloruro de sodio generado durante la polimerización del metasilicato de sodio o al factor de disolución en los capilares (directamente proporcional al diámetro capilar).

El metasilicato de sodio comercial de 1.39 gr/cc de densidad específica tiene aproximadamente un 27%  $\text{SiO}_2$  y un 14% NaOH. Teniendo en cuenta que 12.5ml de la solución S (1.06 gr/cc) se valoran con 10ml de ácido acético 1.0N, la concentración final de iones  $\text{Na}^+$  calculada es de aproximadamente 1.23% p/v ( $\sim 0.2\text{M}$ ). En la experiencia en la que la sal se añade en solución, esta cantidad se diluye a la mitad.

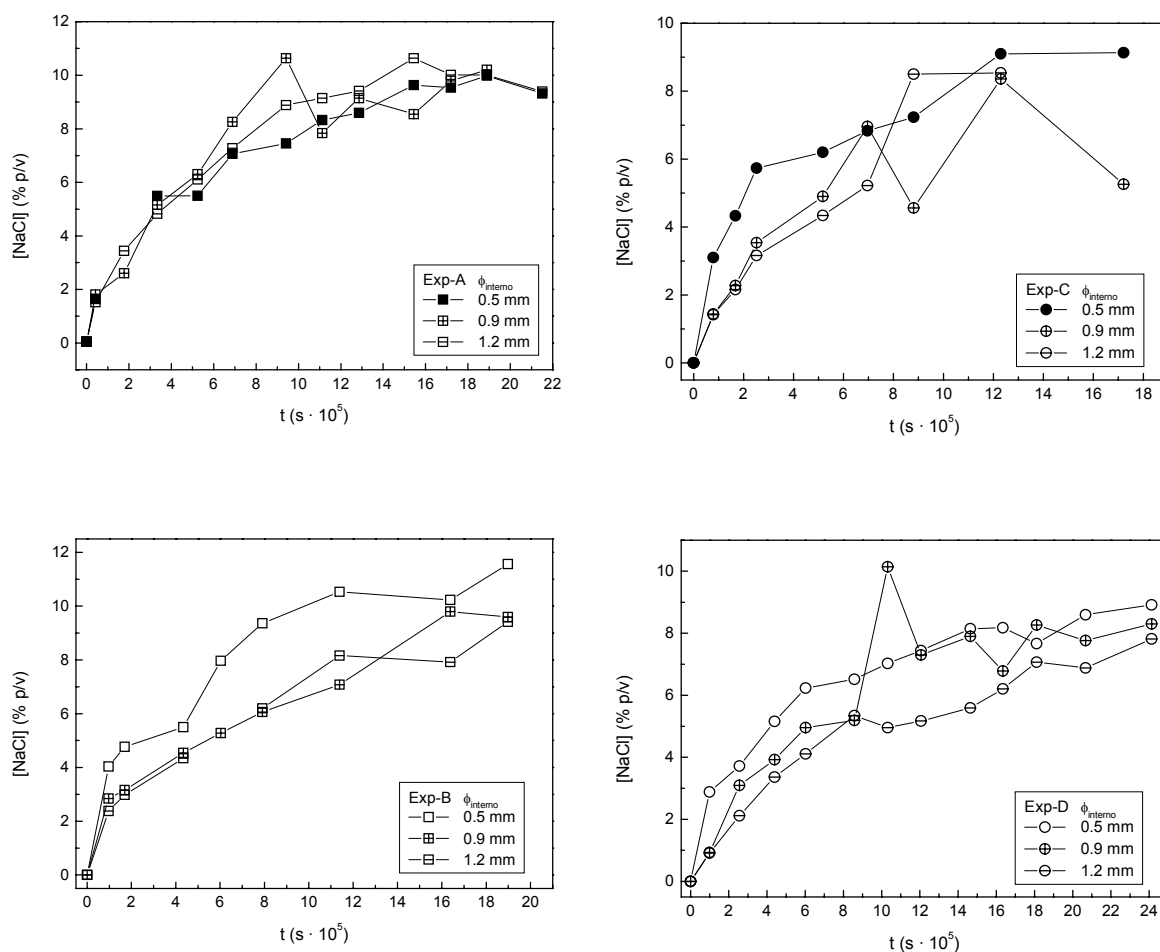
Las contribuciones debidas al sodio ligado al tampón AcNa 50 mM (0.1% p/v) y las pérdidas de la sal por adsorción sobre la superficie del gel, son despreciables en el rango de concentraciones de las experiencias.



**Fig.4.3-2** Recta de calibrado de la absorbancia a 589.0 nm en función de la concentración, obtenida a partir de disoluciones patrón de NaCl.

En la figura 4.3-3 hemos representado como varía la concentración de sodio a lo largo del tiempo en función del diámetro capilar en los cuatro tipos de experiencias (A, B, C y D). En todos los casos se observa una tendencia parabólica de las curvas como cabría esperar en medios en los que el transporte de masa es de tipo difusivo. La concentración de iones sodio que ingresan por unidad de tiempo y por unidad de área en un capilar es la misma sea cual sea el diámetro capilar, ya que esta cantidad viene determinada por la difusión de dicho ión en el gel y no por el diámetro capilar. Por tanto a igualdad de longitudes de la columna de solución la cantidad promedio de sal que ingresa en el capilar disminuye al aumentar el diámetro del mismo. Esto concuerda con las observaciones experimentales de las experiencias B, C y D. Sin embargo, en la experiencia A las tres curvas se desarrollan prácticamente paralelas sin que podamos encontrar una explicación plausible a este comportamiento. Las pequeñas variaciones de altura de la columna de solución en el interior del capilar, la cantidad de gel que ingresa en el capilar durante el punteado y los errores cometidos en la determinación de la concentración pueden dar lugar a esta desviación del comportamiento general.

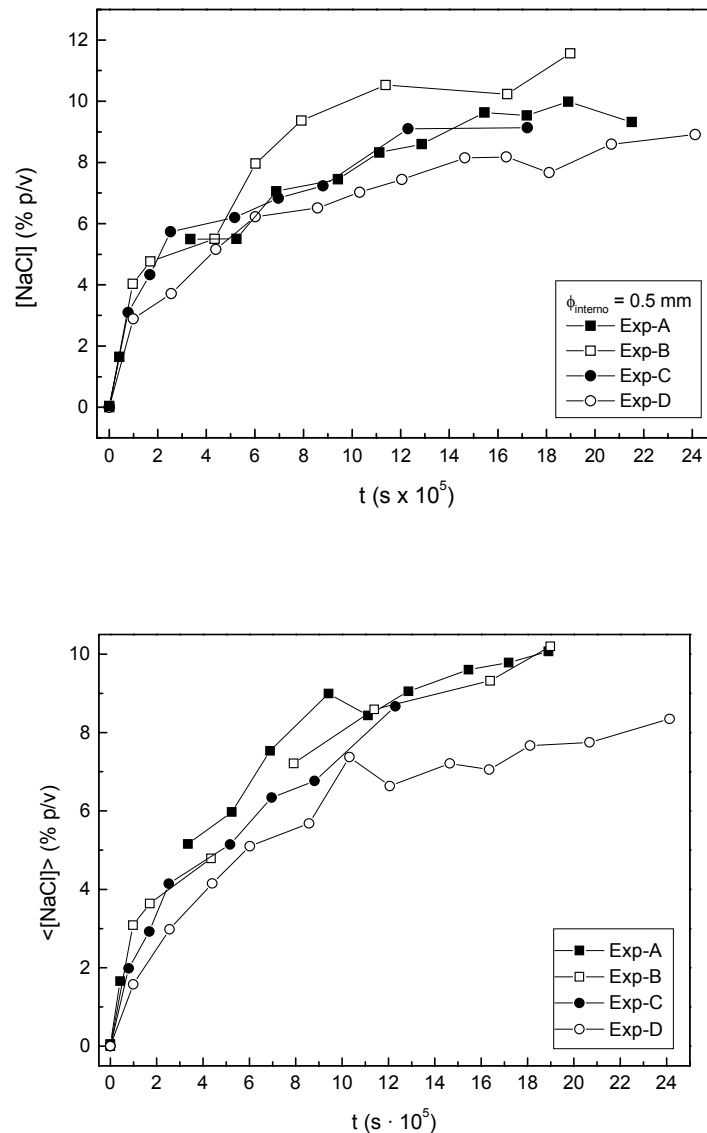
La comparación de los diferentes desarrollos experimentales se realiza a partir de las curvas obtenidas de los capilares de 0.5 mm de diámetro (Fig.4.3-4). Se observa como, en las experiencias en las que la sal se hace difundir sobre el gel, las curvas son independientes del tipo de gel. Sin embargo, cuando la sal está contenida en el gel, la curva en gel de sílice queda por encima y alcanzan una concentración de equilibrio mayor debido al aumento en la concentración total de sodio (1.2%) procedente del gel de sílice.



**Fig.4.3-3** Variación de la concentración total de cloruro de sodio a lo largo del tiempo para experiencias en las que la sal se añade en solución sobre el gel (arriba) o el gel contiene la sal (abajo), empleando geles de sílice (derecha) o geles de agarosa (izquierda).

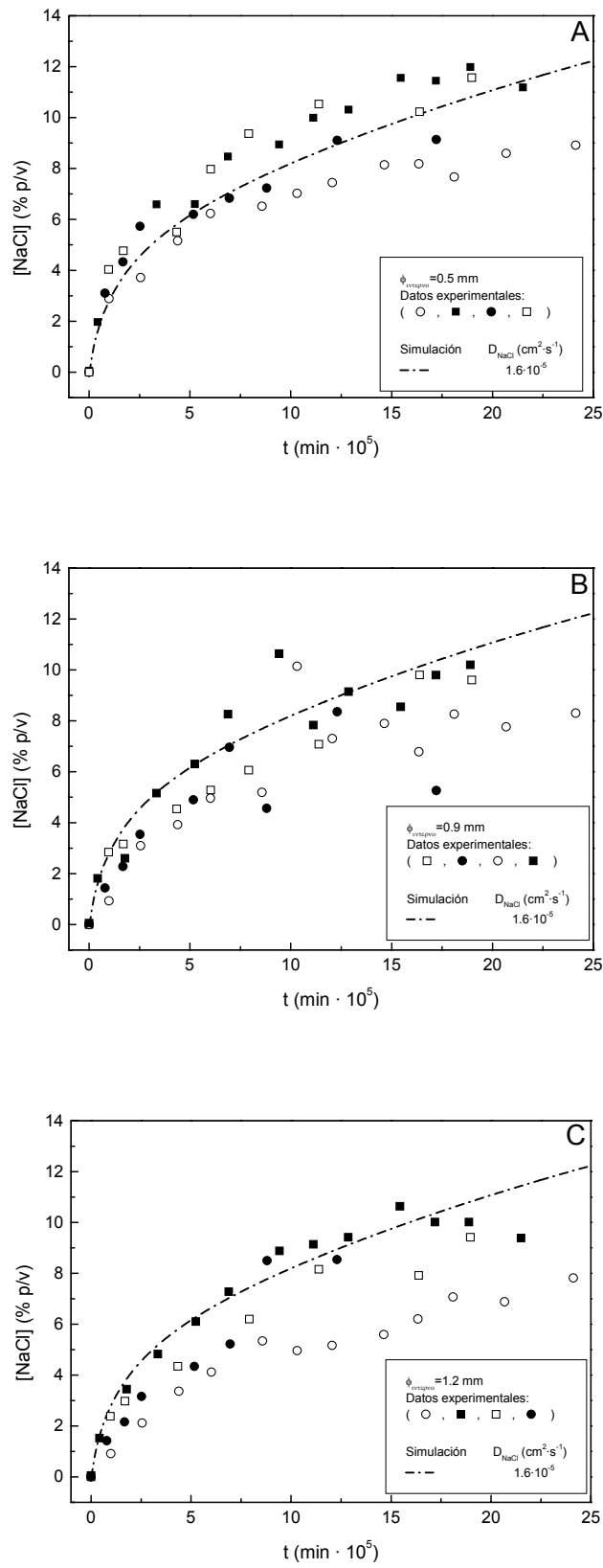
En la parte inferior de la figura Fig.4.3-4 se representa el promedio de la concentración de cloruro sódico para cada una de las experiencias. Se observa como en la experiencia D el valor final de sal es inferior al 10% esperado. Este descenso sistemático de la cantidad de sal puede estar motivado por la disolución de la sal en los capilares; lo que estaría de acuerdo con la secuencia observada en la figura 4.3-3 si la experiencia se encuentra en equilibrio, por un descenso del coeficiente de difusión de la sal; motivado por un cambio en la estructura del gel o por un error experimental. Aunque en la bibliografía aparece descrito un comportamiento distinto en la cristalización de lisozima, thaumatina y catalasa en función de la concentración de gel empleada o el pH final (ambos en relación con el tamaño de poro) [Moreno et al., 1999], es improbable que la presencia de sal reduzca el tamaño de poro de los geles de agarosa como para modificar el coeficiente de difusión de los iones sodio.





**Fig.4.3-4** Representación gráfica de la concentración promedio de cloruro sódico en función del tiempo en el interior de capilares de 0.5 de diámetro para las distintas experiencias recogidas en la tabla 4.3-1. En la parte inferior se han representado el promedio de todos los datos obtenidos en cada tipo de experiencia en función del tiempo.

En la figura 4.3-5 se compara el conjunto de datos obtenidos agrupados en función del diámetro capilar con los generados a partir de un programa de simulación diseñado *ad hoc* para evaluar el transporte de masa, la nucleación y el crecimiento de cristales de lisozima en una experiencia con configuración experimental equivalente a la del método de acupuntura en geles [Otálora y García-Ruiz, 1996]. El programa permite fijar una serie de variables de entrada como las concentraciones de sal y de proteína, los coeficientes de difusión, etc y genera un fichero de salida con tres columnas que representan la variación de la concentración promedio de sal, de proteína y el tiempo. Todas las variables representan por defecto una experiencia de cristalización típica de lisozima empleando el método de acupuntura en geles.

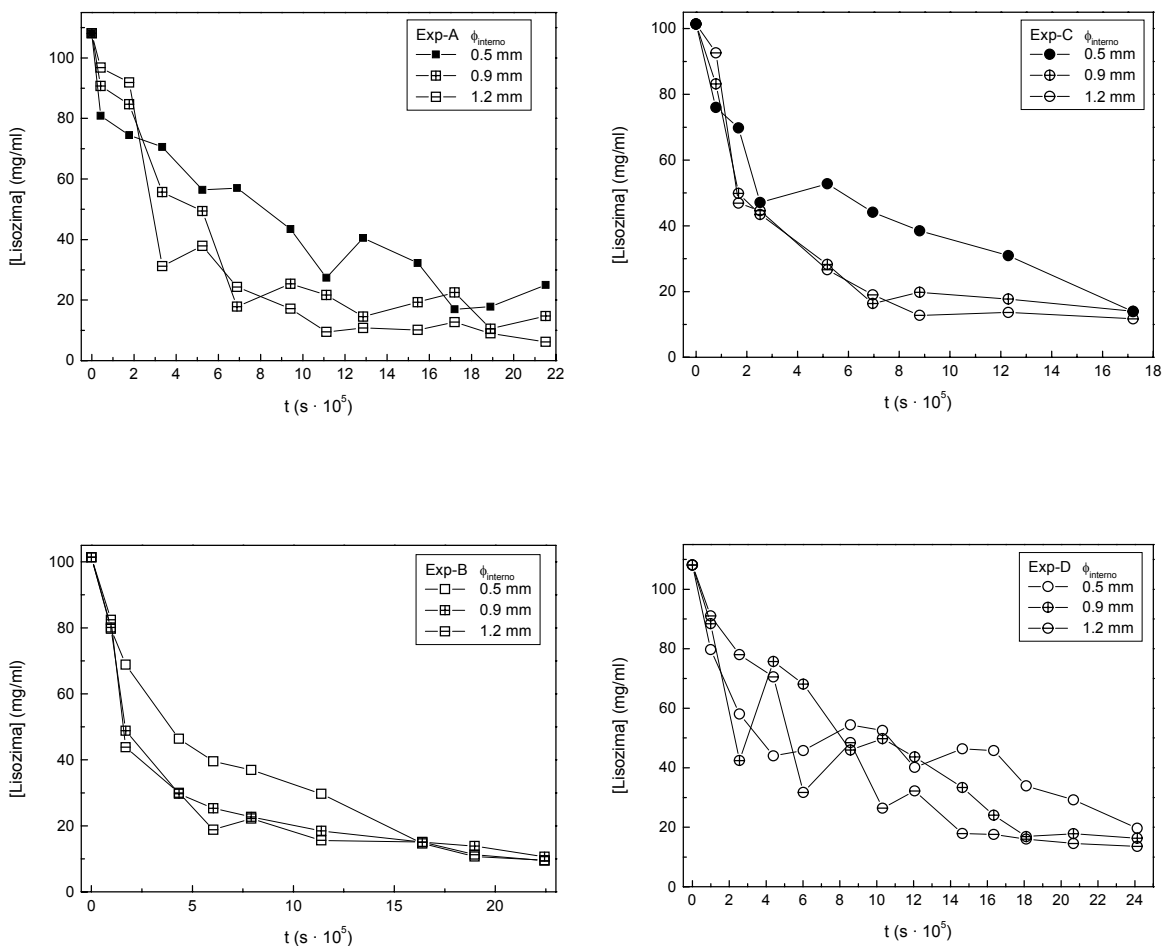


**Fig.4.3-5** Comparación de los datos promedios de concentración de sodio obtenidos en las distintas experiencias en función del diámetro capilar con los datos de la simulación.

A partir de esta comparación podemos decir que el transporte de masa en capilares de 0.5 mm de diámetro interno está controlado por la difusión independientemente de la forma de operar y del tipo del gel empleado. Al aumentar el diámetro de los capilares las curvas se alejan de la predicción teórica indicando el aumento de los fenómenos convectivos.

**4.3.2.2 VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA**

Operando como se ha descrito se extrae la proteína de cada capilar y se determina la concentración empleando un espectrofotómetro a 280 nm y tomando  $2.65 \cdot 10^{-3} \text{ (ml} \cdot \text{gr}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$  como coeficiente de adsorividad. Las medidas se realizan inmediatamente después de su extracción para evitar que posibles eventos de precipitación falseen los resultados.



**Fig.4.3-6** Variación de la concentración total de lisozima a lo largo del tiempo para experiencias en las que la sal se añade en solución sobre el gel (arriba) o el gel contiene la sal (abajo), empleando gel de sílice (derecha) o gel de agarosa (izquierda).

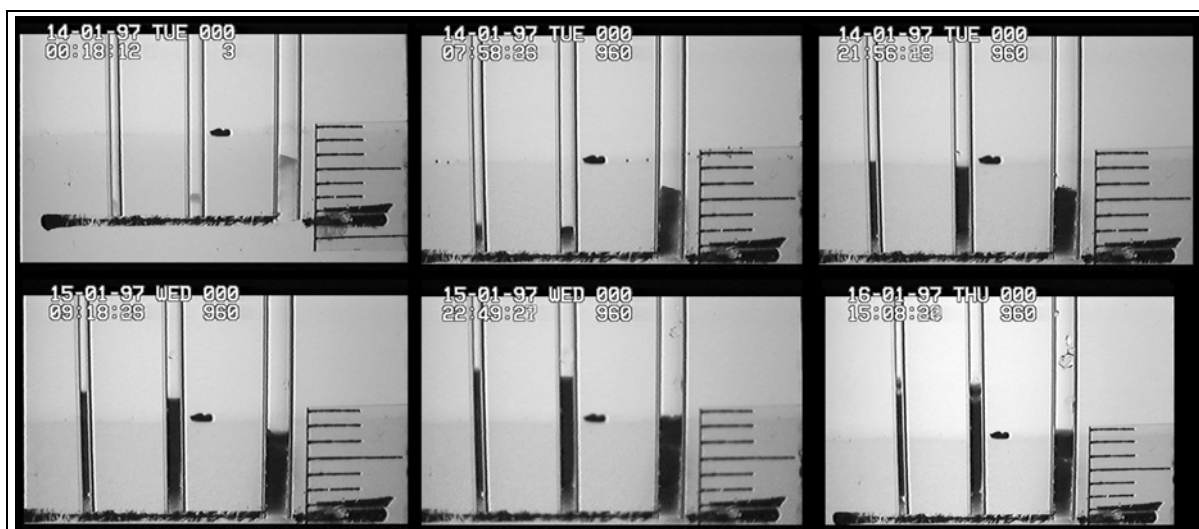
Los resultados de la variación de la concentración de proteína promedio a lo largo del tiempo se recogen en la figura 4.3-6. En todos los casos se observa como en los primeros

momentos el consumo de proteína en las experiencias realizadas en capilares de 0.5 mm es superior al consumo en los capilares de 0.9 y 1.2 mm. Posteriormente esta situación se invierte aumentando el consumo de proteína en los capilares de mayor diámetro.

La precipitación de un agregado no cristalino suele ocurrir en una escala de tiempo muy inferior a la requerida para obtener un cristal ordenado, por lo que su aparición es casi inmediata cuando se superan unos niveles de sobresaturación. De la misma forma su desaparición, disolución, también ocurre en una escala de tiempo inferior. Si tenemos en cuenta que en los capilares de mayor diámetro la sobresaturación que se alcanza inicialmente es menor debido a la homogeneización del sistema por el aumento de la convección (Fig.4.3-3) la cantidad de amorfo generado en los primeros instantes debe de ser menor. Posteriormente y superado el nivel de sobresaturación umbral, este se mantiene por más tiempo en los capilares de mayor diámetro al incorporarse la proteína de la parte superior del capilar debido al gradiente de densidad.

Experimentalmente se observa que la longitud de amorfo generado es mayor al disminuir el diámetro capilar (Fig.4.3-7). Si la permeabilidad del precipitado condiciona la difusión del agente precipitante [Lloyd Y Mokanek, 1931], una mayor longitud de la columna de amorfo se traduciría en una amplificación de este efecto. Sin embargo este punto no se puede clarificar a partir de los datos de los que disponemos.

De forma general la formación de amorfo condiciona la evolución espacial y temporal en todas las experiencias independientemente del diámetro capilar. Este efecto se reproduce también en las simulaciones (Fig.4.3-8) a pesar de que se aplican las mismas consideraciones termodinámicas de precipitación y disolución que para la obtención de un cristal ordenado (es decir no se toma en cuenta que la relación entre energía de volumen y superficie de un precipitado no cristalino es diferente y por tanto la energía libre necesaria para que se produzca la precipitación es menor). Estas consideraciones pueden explicar la gran diferencia observada entre los datos experimentales y teóricos en los primeros momentos.



**Fig.4.3-7** Secuencia(izquierda-derecha) de la evolución temporal de la cantidad de amorfo en función del diámetro interno del capilar (0.5, 0.9 y 1.2 mm) en una experiencias de acupuntura en geles.

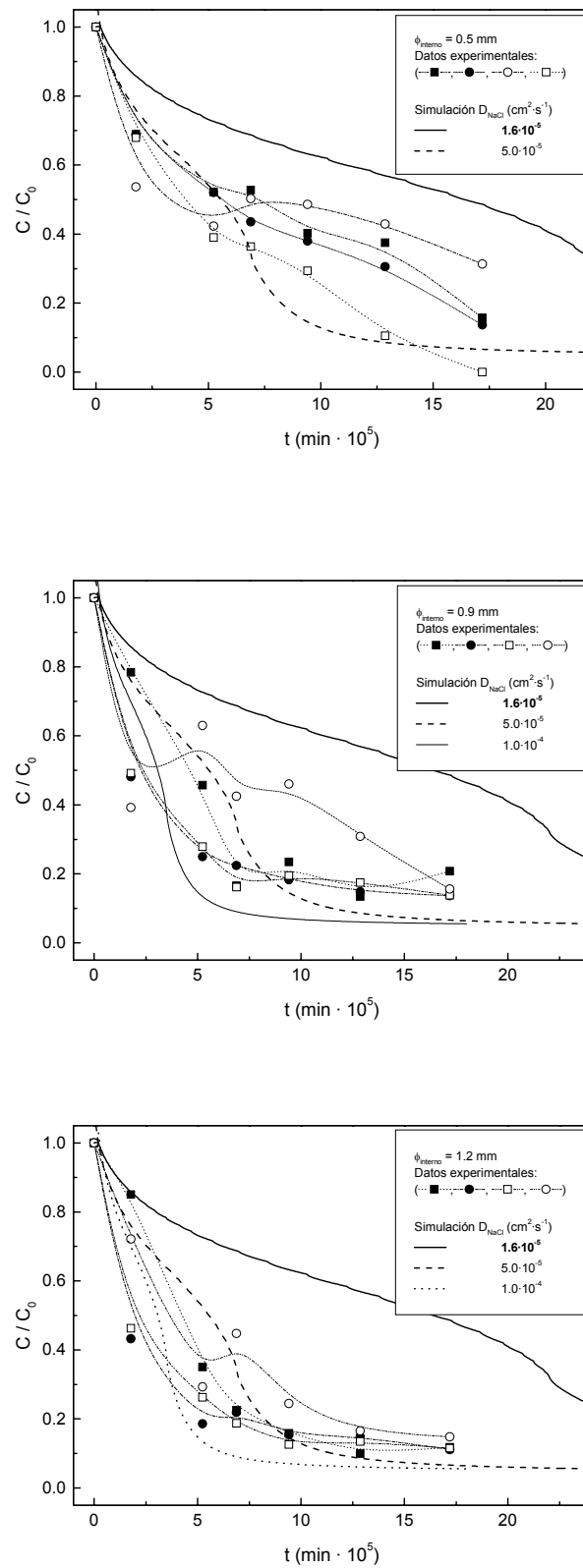
Posteriormente la situación se recupera pero en ningún momento se alcanzan los niveles de concentración predichos a partir de la simulación. La divergencia entre ambas fuentes (experimental y teórica) puede ser debida a las simplificaciones realizadas en el modelo teórico para las ecuaciones que gobiernan la precipitación (orden de la ecuación de crecimiento, Ec.4.3-5; valor del factor cinético pre-exponencial, Ec.1.2-7, etc.) o a que el transporte en el interior de los capilares presente una fuerte componente convectiva.

En los capilares de 0.9 y 1.2 mm de diámetro, el aumento de la convección es suficiente para explicar la desviación de la predicción teórica. En el caso de los capilares de 0.5 mm no es posible distinguir que causa esta desviación a partir de los datos experimentales. Sin embargo existen otras evidencias como: 1) la observación directa del gradiente de densidad provocado durante la sedimentación del amorfo (detectada también en capilares de 0.3 mm) y 2) la diferencia del comportamiento de cristalización de proteínas de elevado peso molecular como ferritina y apoferritina (30 veces superior al de lisozima) en función de la posición respecto del vector gravedad, que indican que el transporte de masa en capilares de 0.5 mm no se puede considerar completamente difusivo.

Junto a estas observaciones hay que añadir que la disolución del amorfo (Fig.4.3-7 y 4.4-1) provoca un aumento paulatino de la concentración de proteína entre la posición del mismo y el primer cristal que sella por completo el diámetro capilar. Este fenómeno, aunque beneficioso para el crecimiento de los cristales que se encuentran en esa posición, no provoca grandes variaciones de la concentración promedio en los capilares de menor diámetro. En las experiencias que se llevan a cabo en capilares de 0.5 mm de diámetro interno (hasta 0.7 mm) la aparición de los cristales que llenan el diámetro capilar ocurre en posiciones cercanas al punto de incorporación de la sal siendo estos los principales beneficiados de la disolución del amorfo.

En este punto podemos conectar con la influencia de la aparición de un cristal que sella por completo el capilar sobre la cinética del transporte a partir de dicha posición. Por encima de la posición de uno de estos cristales la sobresaturación esta controlada por la difusión de la sal a través del cristal. En este caso el cristal se comporta como una malla porosa con 10 Å de paso luz, un orden de magnitud inferior al tamaño de poro de un gel de sílice al 20% v/v, que reduce la constante de difusión del NaCl muy por debajo de  $1.0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  correspondiente a un gel de estas características (capítulo 3). Al igual que ocurre con la precipitación del amorfo, la influencia de estos cristales sobre la difusión del agente precipitante depende del tamaño alcanzado por el cristal. Este comportamiento provoca un acoplamiento entre la velocidad de crecimiento de los cristales y el propio tamaño del cristal que controla la velocidad de sobresaturación en la región en la que el cristal crece.

A partir de estos resultados podemos concluir que el transporte de masa en el GAME esta controlado fundamentalmente por la difusión cuando el diámetro de los capilares no supera los 0.5 mm. La sobresaturación y velocidad de sobresaturación están acopladas a la precipitación y crecimiento de los cristales no sólo como sumideros de masa sino además como modificadores de las características físicas del medio.



**Fig.4.3-8** Representación gráfica de la evolución de la concentración promediada de lisozima normalizada por la concentración inicial a lo largo del tiempo para experiencias en capilares de 0.5, 0.9 y 1.2 mm de diámetro interno. Las líneas muestran los datos de la simulación en función del coeficiente de difusión del NaCl. En negrita se ha resaltado el coeficiente de difusión del NaCl en solución.

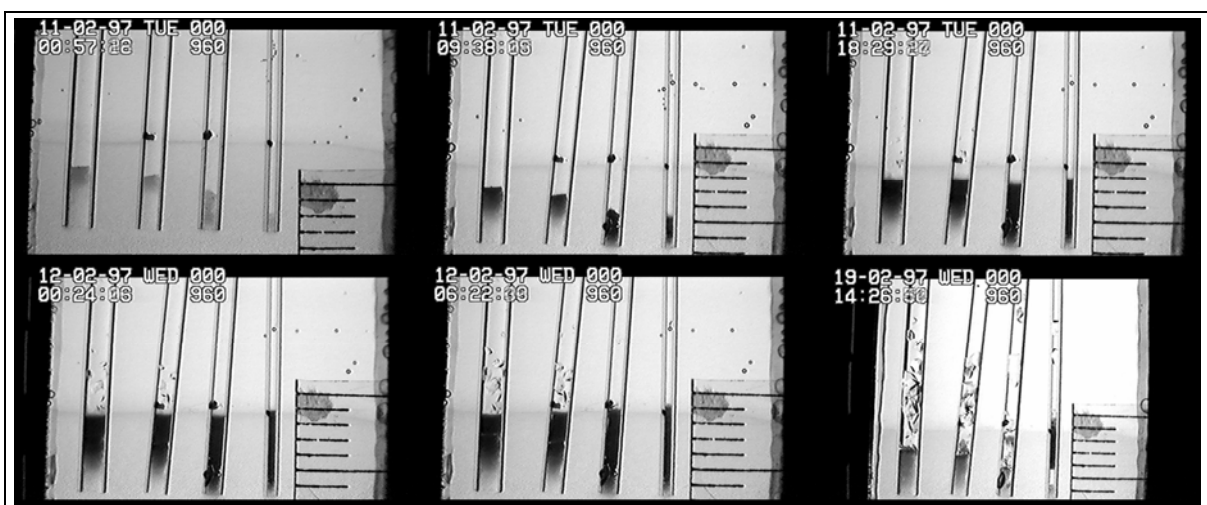
#### 4.4. MÉTODOS INDIRECTOS

En los casos en los que es imposible seguir la evolución de un sistema, el estudio de los efectos que provoca ayuda a esclarecer su desarrollo. Este tipo de análisis es el que habitualmente se emplea en la caracterización de experiencias realizadas en sistemas de difusión-reacción en las que la evolución de la onda de sobresaturación condiciona la posición y características de los precipitados. El ejemplo más claro es la formación de un precipitado en bandas periódicas (anillos de Liesegang) que informan del acoplamiento entre los procesos de difusión y precipitación. Una mayor información de la evolución de la sobresaturación se puede obtener a partir del análisis de las características propias de cada banda, anchura, número y tamaño de los cristales que la componen. La formación de bandas periódicas representan tan sólo una forma discretizada de presentación de la información y es de esperar que en sistemas en los que las condiciones de partida no sean las adecuadas para obtener este tipo de estructuras rítmicas la información aparezca de forma continua [García-Ruiz, et al., 1996]. En estos casos el análisis de cada componente (cristal) representa un dato puntual de la evolución temporal mientras que la comparación de una determinada característica de cada uno de estos componentes refleja la evolución espacial.

##### 4.4.1. INFLUENCIA SOBRE LA NUCLEACIÓN

###### A. En el método de acupuntura en geles

Como hemos visto hasta ahora, el método de acupuntura en geles representa un caso particular de sistema contradifusivo. Aunque es posible encontrar comportamientos generalizados, como el aumento de la densidad de nucleación al aumentar el diámetro capilar (Fig.4.4-1) con independencia de la proteína estudiada [Moreno et al., 1996], la historia de cada capilar está condicionada por la influencia de los precipitados sobre el transporte en el interior del mismo.



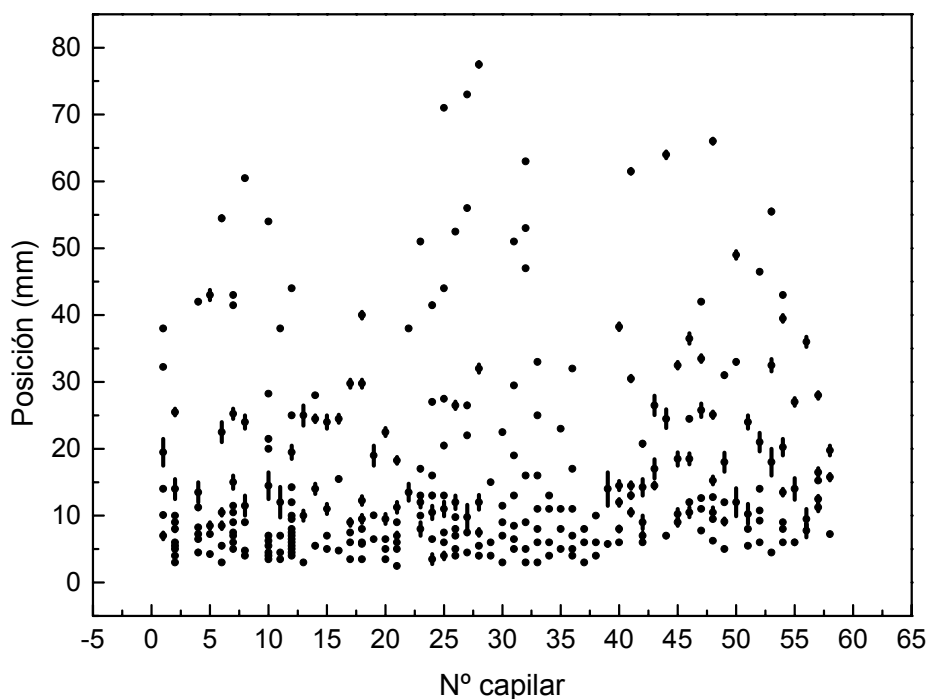
**Fig.4.4-1** La secuencia de imágenes ilustra (de izquierda a derecha y de arriba a bajo) el aumento del flujo de nucleación al aumentar el diámetro interno del capilar (1.2, 0.9, 0.7, 0.5 mm) para una experiencia llevada a cabo empelando el GAME. Se observa también como el aumento del diámetro capilar disminuye el tiempo de aparición de los cristales y la longitud final de la cantidad de amorfo.

Para comprobar si existe algún tipo de acoplamiento entre la posición y tamaño de los cristales y la evolución de la sobresaturación se llevan a cabo un gran número de experiencias en las que sólo se varía la altura de llenado del capilar. En la tabla 4.4-1 se recogen las condiciones experimentales.

Cámara de proteína		Gel		Cámara de sal
$\Phi_{\text{CAPILAR}}$	0.5 mm	Tipo	Sílice	[NaCl] 20% p/v
[Lisozima]	100 mg/ml	Punteado	6.0 mm	[AcNa] 50 mM, pH 4.5

**Tabla 4.4-1** Condiciones de cristalización.

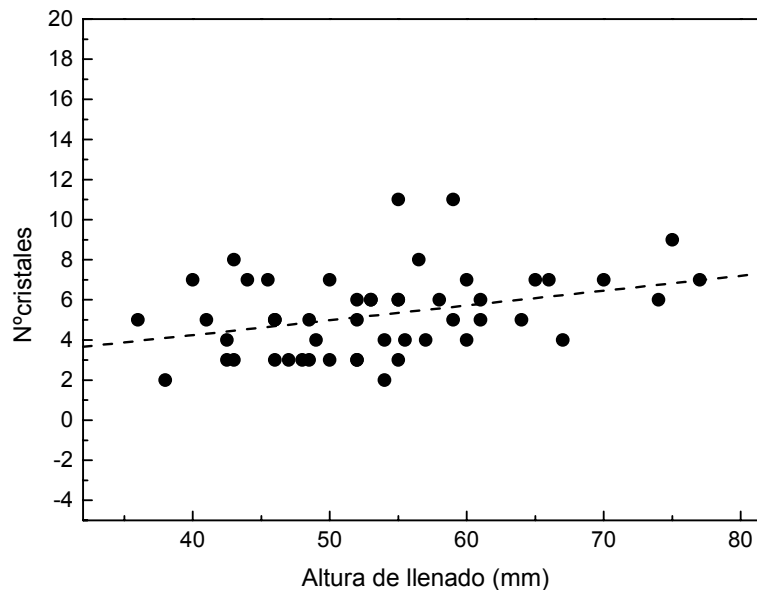
Una vez finalizada la experiencia se extraen y sellan los capilares para cuantificar el tamaño y posición de los cristales. La posición se determina con una regla transparente con divisiones de 0.25 mm que tomamos como el error en el posicionamiento de los cristales. Los cristales se miden en un microscopio con un objetivo 4x que dispone de un micrómetro en uno de los oculares (precisión de  $\pm 12.5 \mu\text{m}$ ). En la figura 4.4-2 se recoge el grueso de los datos experimentales que se analizan a continuación en la que los cristales se posicionan respecto de su centro de masa, y la longitud total se representa en forma de barra de error. Esta esquematización de los cristales se mantiene en todas las gráficas en las que se incluye.



**Fig.4.4-2** Posición y longitud (representadas como barras de error) de los cristales de lisozima que han nucleado y crecido en el seno de capilares de 0.5 mm de diámetro interno.



En condiciones normales en cualquier experiencia de contradifusión cabría esperar un aumento del número de cristales al aumentar la longitud de la cámara de desarrollo. Sin embargo, esto no ocurre en el caso de acupuntura en geles. Como se observa en la gráfica 4.4-3 no existe una gran dependencia entre el número de cristales y el volumen final de la cámara de proteína. Este comportamiento es una consecuencia inmediata del efecto del llenado capilar de los cristales sobre el transporte de masa en el interior del capilar.

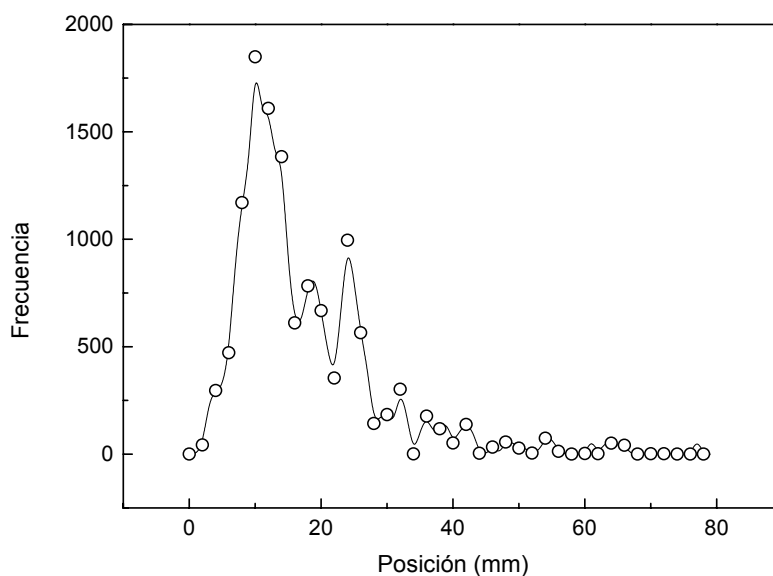


**Fig.4.4-3** Flujo de nucleación en función de la altura de llenado para experiencias realizadas empleando el GAME en capilares de 0.5mm de diámetro interno. La línea discontinua representa el ajuste de los datos a una recta con una pendiente del 7%.

Una vez que un cristal llena por completo el diámetro capilar se reduce el flujo de sal a través del mismo. Esto provoca un descenso de la sobresaturación en las inmediaciones de la cara más alejada del punto de incorporación de la sal lo que permite un crecimiento mayor del cristal en esta dirección sin interferencias por la aparición de nuevos cristales. La consecuencia final es la obtención de grandes monocristales que con frecuencia superan el milímetro de longitud.

A raíz de estos resultados se plantea la siguiente pregunta: ¿existe una posición preferente de nucleación? Si representamos sobre un eje cada cristal con su dimensión y acumulamos los datos obtenidos de todos los capilares se obtiene la frecuencia de ocupación de cada posición en función de la posición.

En la figura 4.4-4 se observa que la frecuencia de ocupación disminuye al alejarnos del punto de incorporación de la sal como consecuencia directa del descenso de la sobresaturación, pero no se detecta ninguna posición preferente de nucleación, ni ninguna relación rítmica entre las posiciones de máxima probabilidad de ocupación.

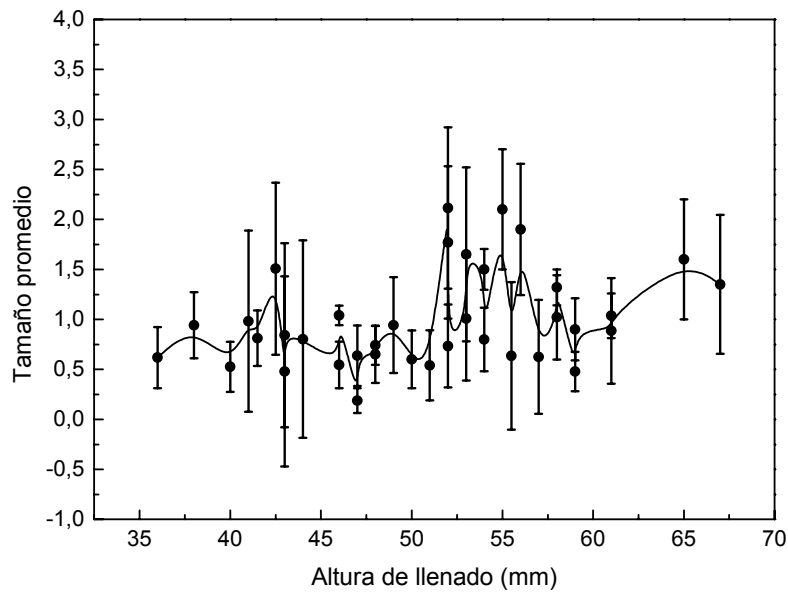


**Fig.4.4-4** En este gráfico se representa la frecuencia de ocupación de las distintas posiciones de un capilar obtenida por superposición del conjunto de datos experimentales.

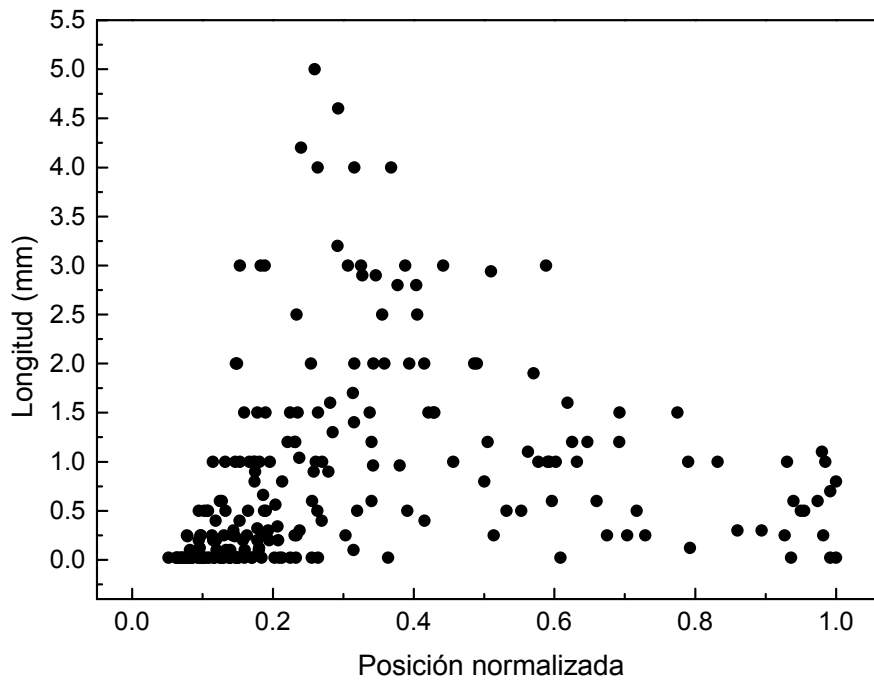
En el ámbito práctico es importante saber si el aumento de la longitud de llenado aumenta la eficiencia de nuestra experiencia, ya que implica un mayor consumo de proteína. Aunque depende del uso final para el que vayamos a emplear nuestro cristal podemos referir la eficiencia al tamaño del cristal y a la calidad del mismo. Puesto que no disponemos de información de la calidad cristalina a lo largo de toda la longitud para capilares de tamaño superior a 50 mm, nos limitaremos a comparar las longitudes de los cristales.

En una primera estimación comparamos la distribución de longitudes de los cristales en función de la altura de llenado de los capilares. En la figura 4.4-5 se ha realizado esta representación en la que se observa que existe una amplia distribución del tamaño de los cristales independientemente de la altura de llenado. De esta representación también se deduce que los cristales de mayor tamaño aparecen en capilares cuya altura de llenado oscila entre los 50 y los 60 mm de donde altura mayores pueden suponer un consumo de proteína inútil. Como se verá posteriormente esta afirmación se corrobora con la calidad de los cristales en función de la posición.

La siguiente pregunta es saber si los cristales de mayor tamaño ocupan una posición preferente en el capilar independientemente de la altura de llenado. Para responder a esta pregunta se ha representado la longitud máxima de todos los cristales obtenidos frente a la posición normalizada por la altura de llenado (Fig.4.4-6). Como era de esperar los cristales de pequeño tamaño ( $L < 25 \mu\text{m}$ ) aparecen con mayor probabilidad en la región inicial del capilar, para  $L=1 \text{ mm}$  los cristales se distribuyen por todo el capilar, entre 2 y 3 mm aparecen en la región centro del capilar y los cristales con longitud superior a 3 mm aparecen entre el final del primer tercio e inicio del segundo tercio del capilar.



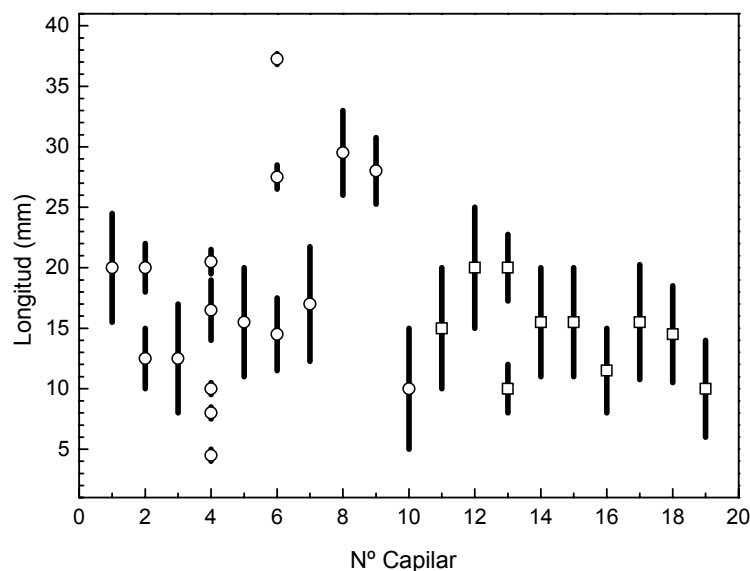
**Fig.4.4-5** Distribución del tamaño de los cristales en función de la altura de llenado de los capilares. El tamaño promedio se ha representado como barras de error en las que los valores negativos no tienen sentido físico.



**Fig.4.4-6** Representación del tamaño de los cristales una vez normalizada su posición por la altura de llenado de los capilares.

A la luz de estos resultados podemos afirmar que los capilares de 50-60 mm representan la forma más eficiente de uso de la proteína que nos asegura además la obtención de los mayores cristales en posiciones centradas en el capilar.

En ocasiones es necesario realizar las experiencias de cristalización a temperaturas superiores a la temperatura del laboratorio, como ocurre con la cristalización de la lisozima en el sistema ortorrómbico. En este caso las condiciones de cristalización son 200 mg/ml de proteína y 10% NaCl p/v en tampón acetato sódico 50 mM pH 4.5 y 45°C de temperatura.



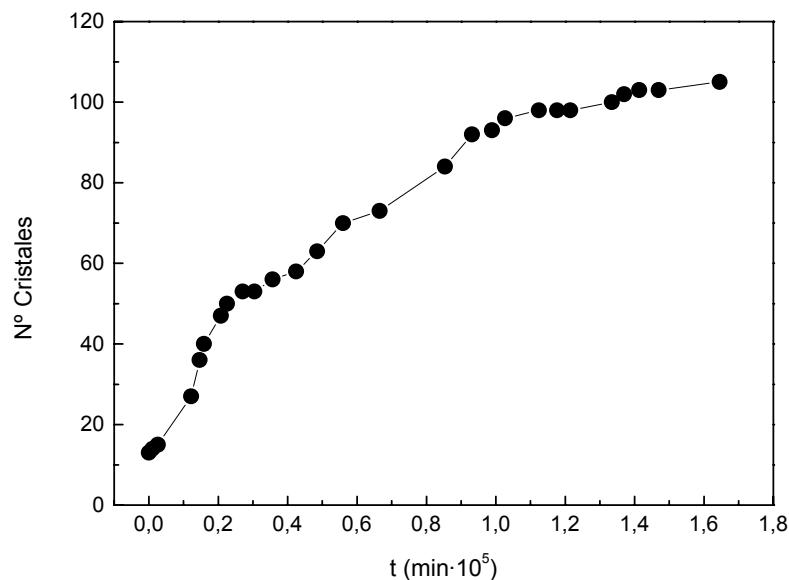
**Fig.4.4-7** Variación de la posición y tamaño (representados como barras de error) de cristales de lisozima ortorrómbica crecidos a 45°C empleando el GAME en capilares de 0.4 y 0.5 mm, (cuadrado y círculo respectivamente) de diámetro interno.

En la figura 4.4-7 se han representado dos experiencias realizadas variando el diámetro capilar. La secuencia de sucesos en el tiempo es prácticamente idéntica a la que ocurre en las experiencias realizadas a temperatura ambiente. La formación de un precipitado amorfo en la región inicial está seguida de la aparición de cristales que crecen prácticamente en solitario. La cantidad de amorfo generado es en todos los casos bastante superior a la observada en las condiciones de crecimiento de lisozima tetragonal. Esto ayuda en gran medida a que se formen pocos cristales que crecen cuantiosamente en ambas direcciones del capilar. Se observa como la densidad de nucleación es claramente inferior y el tamaño promedio de los cristales mayor cuando lo comparamos con las experiencias realizadas a temperatura ambiente. Aunque el número de experiencias no es suficientemente grande como para poder realizar estudios similares a los expuestos con lisozima tetragonal, podemos decir que parece imperar los mismos criterios. Por otra parte confirma la eficacia del método de acupuntura en geles cuando es necesario desarrollar experiencias a temperaturas por encima de la temperatura ambiente a pesar del aumento de los mecanismos convectivos de transporte de masa.

### B. En contradifusión en gel

Una visión más clara de la evolución de la nucleación en los métodos contradifusivos se puede obtener a partir de experiencias realizadas en contradifusión en geles. Para estudiar esta evolución se sigue el aumento del número de núcleos a lo largo del tiempo en experiencias realizadas en un gel de sílice al 8% v/v que contiene lisozima a 100 mg/ml y sobre el que se hace difundir una solución de NaCl 20% p/v.

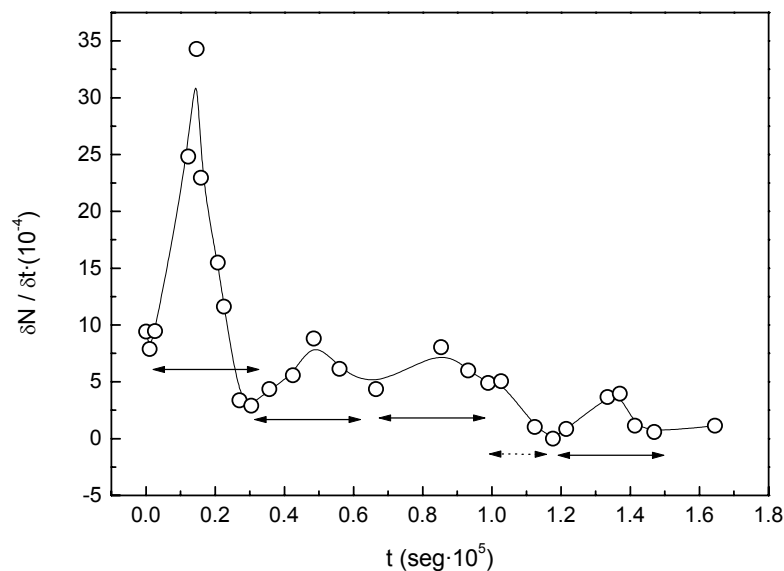
Comprobamos como el número de cristales aumenta con el tiempo siguiendo una tendencia parabólica (Fig.4.4-8) asociada a una componente oscilatoria que funciona a modo de pulsos sobre la tendencia general.



**Fig.4.4-8** Evolución del número de cristales en una experiencia realizada en contradifusión en gel de sílice al 8% p/v.

Si representamos ahora la velocidad de variación de la densidad de nucleación en función del tiempo comprobamos como esta disminuye a lo largo del tiempo de acuerdo con un descenso de la sobresaturación y de la velocidad de sobresaturación. El descenso de la velocidad de nucleación no se produce de forma monótona sino que presenta episodios de incremento de la velocidad de forma rítmica. La distancia entre los mínimos es de  $529 \pm 26$  minutos, y aunque se rompe entre el cuarto y quinto mínimo, la tendencia se recupera de nuevo. Este comportamiento es similar a los fenómenos de precipitación periódica observados durante la precipitación de compuestos inorgánicos que surgen como consecuencia del acoplamiento entre el transporte de masa en medios difusivos y la precipitación. En nuestro caso el número de oscilaciones observados es reducido debido a que sólo exploramos una región de unos 25 mm pero cabe esperar que este

comportamiento se mantenga a lo largo de toda la cámara de desarrollo aumentando la distancia entre máximos al alejarnos del punto de incorporación de la sal.



**Fig.4.4-9** Variación de la velocidad de nucleación a lo largo del tiempo de la experiencia representada en la figura 4.4-8. Las flechas continuas representan el ritmo oscilatorio que se rompe entre el 4º y 5º mínimo (flecha discontinua).

De esta forma a partir de datos indirectos y siguiendo la teoría de Ostwald (1897) este comportamiento está causado por el avance de una onda de sobresaturación que recorre la cámara de proteína coincidiendo con los resultados directos obtenidos en condiciones de gravedad reducida (4.3-1).

#### 4.4.2. INFLUENCIA SOBRE EL HÁBITO CRISTALINO

La morfología final de los cristales está determinada por la velocidad de crecimiento relativa (G) de las caras que lo componen, de forma que las caras con menor velocidad de crecimiento determinan el hábito final de los cristales. El desarrollo relativo de cada tipo de caras depende de factores internos (estructura y enlaces) y factores externos (sobresaturación y composición de la solución). La variable habitualmente estudiada es la sobresaturación ya que las distintas caras del cristal no suelen presentar el mismo comportamiento a altas y bajas sobresaturaciones. Cuando la sobresaturación es elevada las unidades de crecimiento se integran más rápidamente en aquellas caras con mayor energía superficial y la forma del cristal queda definida por aquellas caras con menor energía.

Para el caso de la lisozima tetragonal (P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2) el hábito está compuesto de caras de tipo piramidales (101) y prismáticas (110) (Fig.4.4-10). Ambos tipos de cara presentan una fuerte dependencia de la velocidad de crecimiento con la sobresaturación. A elevadas sobresaturaciones

$G_{(110)} > G_{(101)}$  mientras que a bajas sobresaturaciones esta situación se invierte debido a la diferencia de energía superficial entre ambas caras ( $\sigma_{110}=2.3 \cdot kT$  y  $\sigma_{101}=1.9 \cdot kT$ ) [Durbin y Feher, 1986, 1990 y 1991; Monaco y Roseberger, 1993]. En estos estudios se observa que la velocidad de crecimiento de ambas caras aumenta al aumentar la sobresaturación y que tanto la forma de la curva como el punto de cruce entre ambas velocidades dependen de la concentración de sal además de la sobresaturación [Durbin y Feher, 1986]. Puesto que en las experiencias en contradifusión la sobresaturación evoluciona en el espacio con el tiempo (su valor es desconocido) no se pudo determinar esta relación. Sin embargo, el hábito final de los cristales es consecuencia directa de la sobresaturación promedio a la que han estado sometidos durante su crecimiento y su variación a lo largo de la posición puede darnos idea de la evolución de la sobresaturación.

La razón de forma ( $R = h_{(110)}/h_{(101)}$  o  $R^* = h_{(101)}/h_{(110)}$ ) se cuantifica midiendo las longitudes características del cristal  $W$  y  $L$ . La relación entre las longitudes características del cristal y los vectores normales a las caras a partir de las cuales se deduce el crecimiento relativo se obtiene teniendo en cuenta que:

$$h_{(110)} = \frac{1}{2} \cdot W \quad \text{Ec.4.4-1}$$

$$h_{(101)} = \frac{1}{2} \cdot 1.084 \cdot L \quad \text{Ec.4.4-2}$$

La relación entre  $h_{(101)}$  y el parámetro característico  $L$  no se puede obtener de forma directa. Para calcularla es necesario emplear un artificio matemático por el que los vértices generados por las caras (101) y (110) se convierten en caras del cristal del tipo (121). El avance de estas caras (vértices) se deduce fácilmente a partir de la expresión Ec.4.4-3

$$h_{(121)} = \frac{1}{2} \cdot \cos \frac{\beta}{2} \cdot L \quad \text{Ec.4.4-3}$$

donde  $h_{(121)}$  es el módulo del vector director de las caras (121) y  $\beta/2 = 13.39^\circ$  (ver figura 4.4-10).

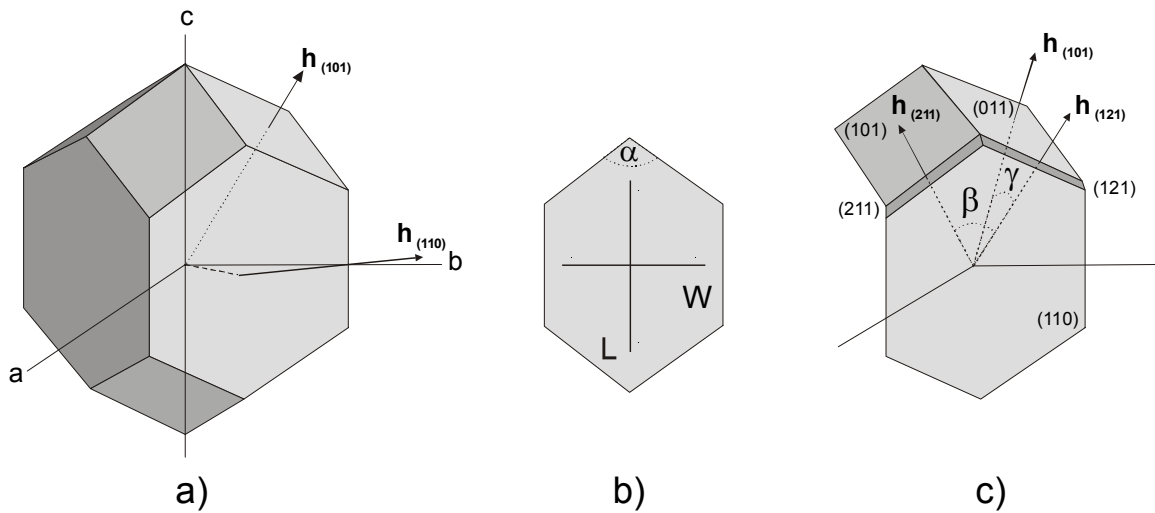
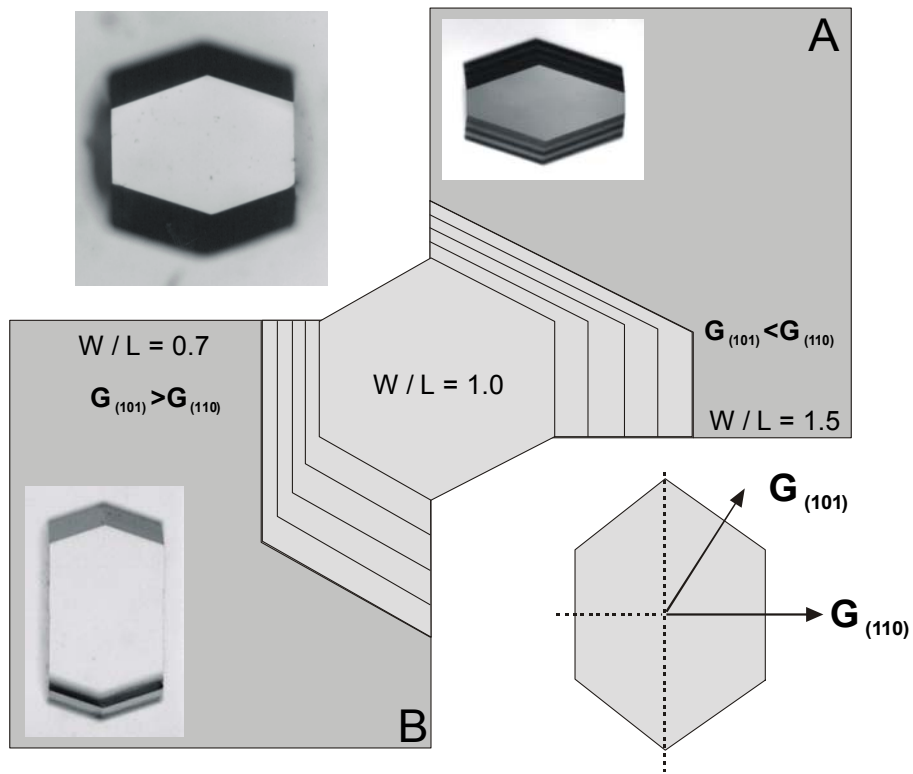
A partir de la expresión anterior y teniendo en cuenta que la relación entre las caras (101) y (121) viene determinada por el ángulo ( $\gamma = 26.16^\circ$ ) formado entre sus vectores directores se tiene que

$$h_{(101)} = \frac{h_{(121)}}{\cos \gamma} \quad \text{Ec.4.4-4}$$

A partir la Ec.4.4-4 se deduce la expresión 4.4-2 que relaciona el módulo del vector  $h_{(101)}$  con la dimensión característica  $L$ . El ángulo  $\gamma$  se obtiene empleando el programa de generación de formas cristalográficas SHAPE conociendo el grupo espacial y los valores de celdilla unidad para la molécula de lisozima tetragonal.

Para llevar a cabo este estudio empleamos la contradifusión en geles de agarosa y sílice. Una vez finalizadas las experiencias se midieron las longitudes características,  $W$  y  $L$ , empleando un microscopio óptico de transmisión de luz con un micrómetro acoplado a uno de los oculares que

permiten una precisión de  $\pm 12.5 \mu\text{m}$ . La posición se determina al mismo tiempo montando el tubo sobre una regla con divisiones de 0.25 mm.



**Fig.4.4-10** En la parte superior se representa de forma esquemática el resultados final de un cristal de lisozima que crece a partir de un hábito con factor de forma 1 cuando  $G_{(110)} > G_{(101)}$  (A) y cuando la situación es inversa (B). Los hábitos finales presentan una razón de forma de 1.5 y 0.7 respectivamente. En la parte inferior se esquematiza el cálculo de la relación entre  $h_{(hkl)}$  y las dimensiones características del cristal  $w$  y  $l$ .



### **A. En geles de agarosa**

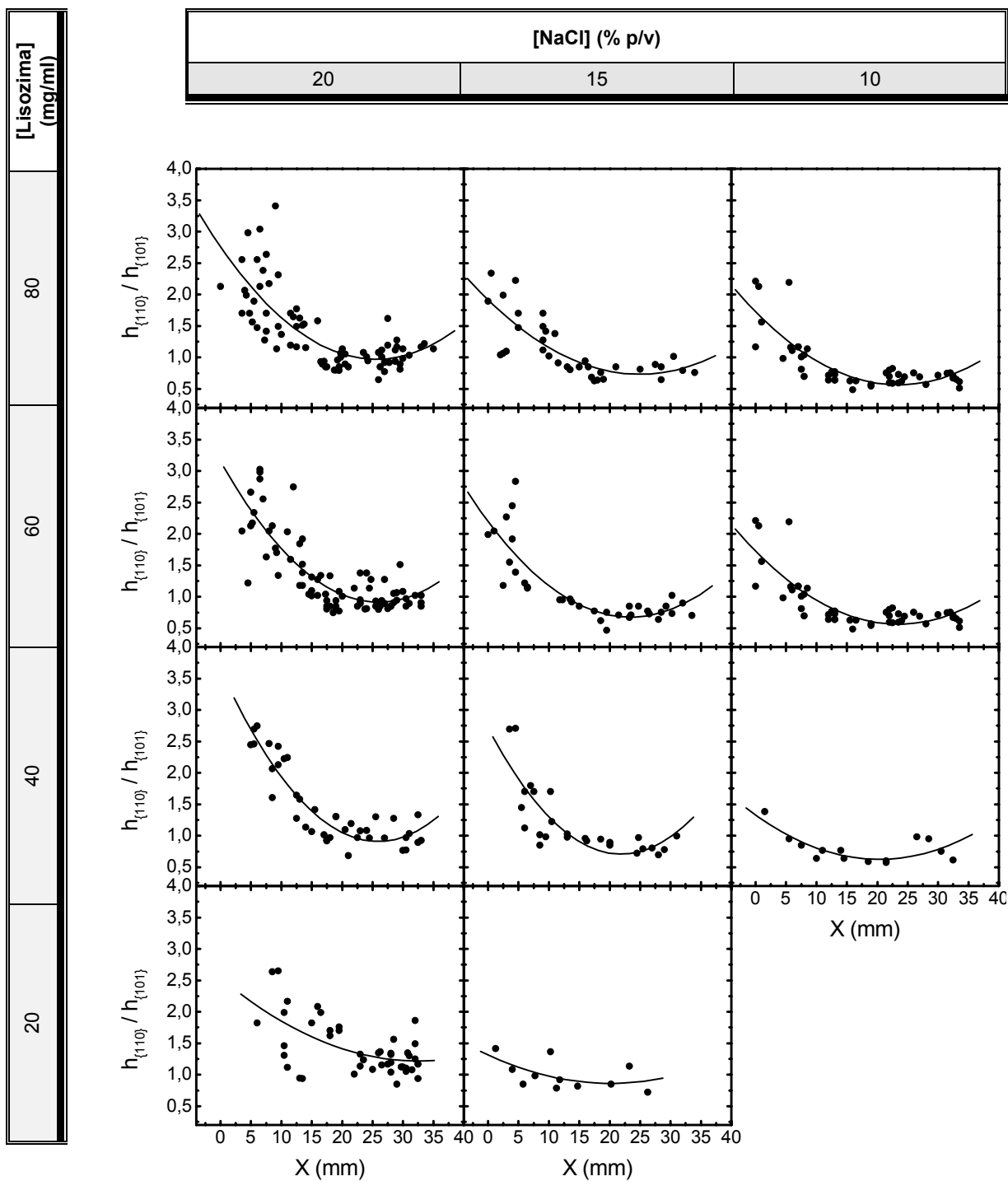
En el caso de los geles de agarosa realizamos las experiencias variando las concentraciones iniciales de sal y proteína de forma que los rangos de sobresaturaciones barridos fuesen distintos. Empleamos una configuración de tres cámaras con la sal en solución (35mm) un tapón físico de gel de agarosa 0.5% p/v que amortiguase la sobresaturación inicial (5mm) y la cámara de proteína (35mm) gelificada con agarosa 0.25% p/v. Las experiencias se llevaron a cabo en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno.

En la figura 4.4-11 se recogen las curvas de la variación de la razón de forma en función de la posición en la que nuclean y crecen los cristales. Como se esperaba  $R$  disminuye con la posición en todos los casos estudiados indicando claramente un descenso de la sobresaturación al avanzar por la cámara de proteína. Cuando las concentraciones iniciales de sal y proteína son muy bajas la experiencia pierde la principal característica de la contradifusión, su discriminación espacio-temporal de la sobresaturación y  $R$  varía de forma prácticamente lineal con la posición. En este caso la experiencia se homogeniza antes de que se produzca la nucleación, confirmándose la necesidad de partir de condiciones de elevada sobresaturación para que las técnicas contradifusivas sean capaces de desarrollar toda su potencialidad. En el resto de las experiencias los valores de razón de forma obtenidos muestran que se ha barrido un rango más o menos amplio de sobresaturaciones.

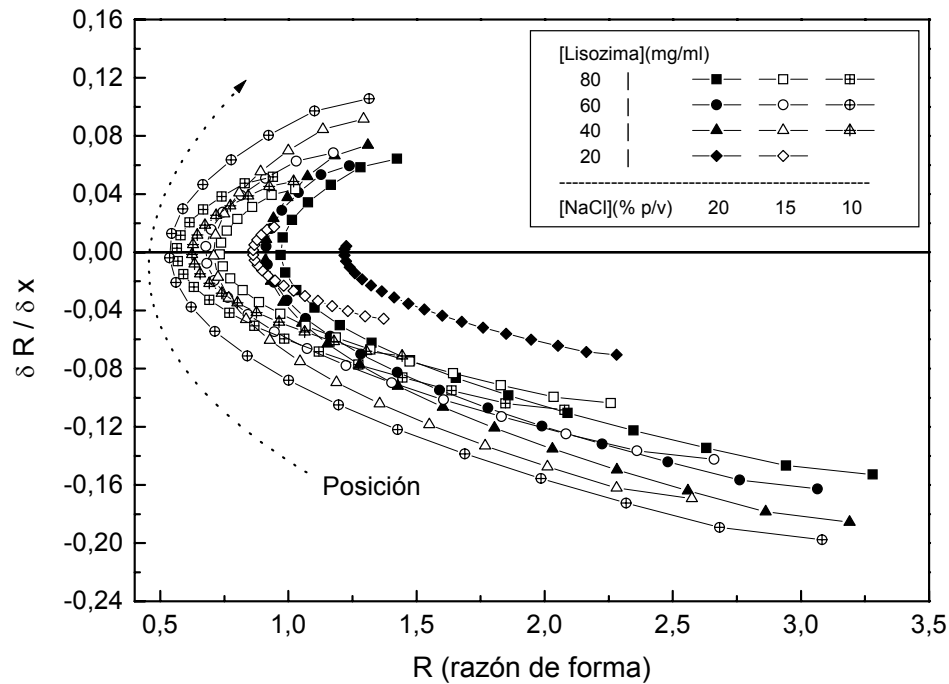
Una forma eficiente de comparar que condiciones maximizan el rango de sobresaturaciones chequeado con el mínimo consumo de proteína se consigue empleando las gráficas del tipo velocidad de sobresaturación vs. la sobresaturación [García-Ruiz et al, 1999] . Extrapolando este tipo de gráficos a la variación de la razón de forma con la posición en función de la razón de forma se comprueba que efectivamente son equivalentes a las mencionadas anteriormente (Fig.4.4-12). La igualdad de comportamiento en ambos tipos de representaciones confirma por una parte la hipótesis de partida y por otra parte valida este tipo de gráficos como un sistema útil de comparación del comportamiento de distintos sistemas contradifusivos. En estas representaciones se comparan con facilidad el rango de sobresaturaciones barrida en cada experiencia así como el valor máximo y mínimo alcanzado.

A pesar de la similitud de ambos tipos de representaciones es necesario tener en cuenta que mientras el primer caso representa la variación de la sobresaturación vs. el tiempo, las gráficas basadas en la razón de forma muestran la variación a lo largo de la posición de la sobresaturación promediada en el tiempo. Sin embargo, la pérdida de la variable tiempo no disminuye la información contenida en este tipo de gráficos con una interpretación más intuitiva desde el punto de vista del crecimiento de cristales.

Otra fuerte simplificación se introduce al realizar los cálculos sobre las curvas de ajuste y no sobre los datos reales, por lo que los resultados sólo pueden ser interpretados como las tendencias de los datos más que como una descriptiva del comportamiento real que puede llevar asociada una componente rítmica sobre la tendencia general.



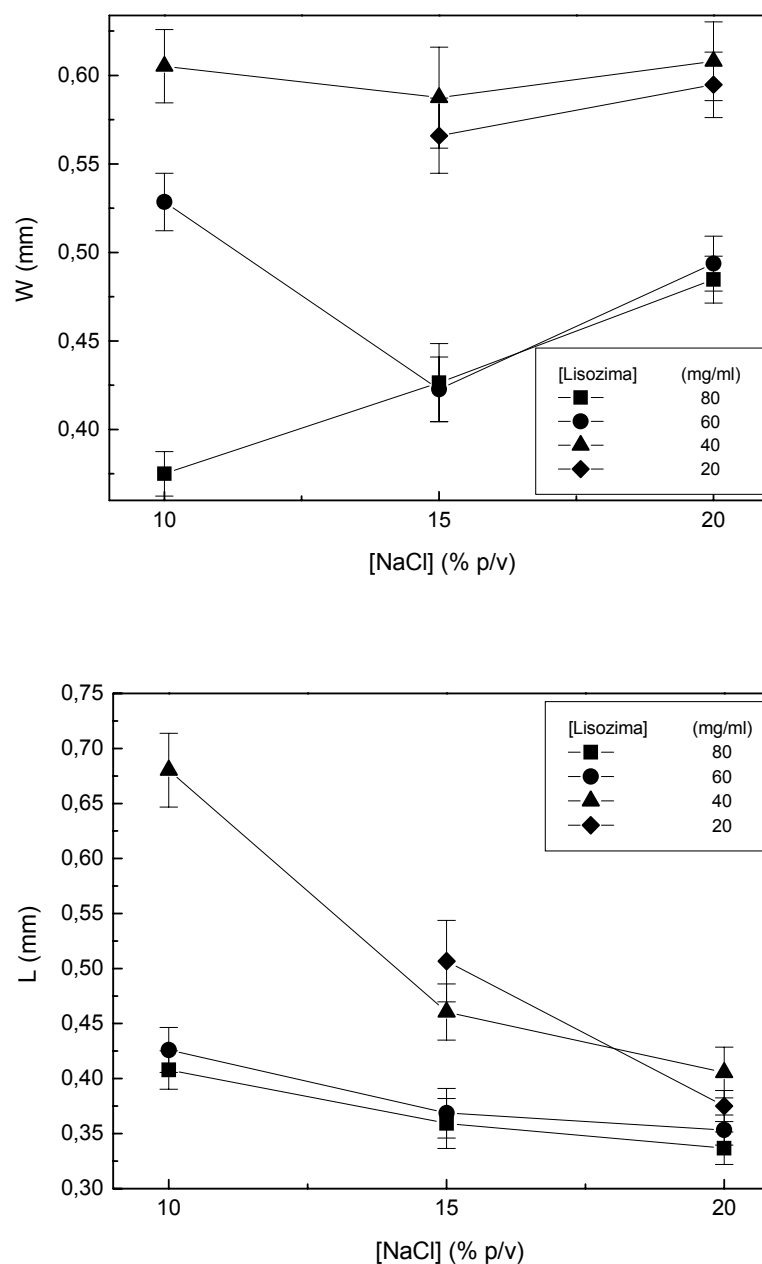
*Fig.4.4-11* Variación de la razón de forma en función de la posición para cristales de lisozima crecidos en geles de agarosa por métodos contradifusivos con distintas condiciones iniciales. La línea continua representa el mejor ajuste a un polinomio de segundo grado y muestra la tendencia de los datos.



**Fig.4.4-12** Variación de la razón de forma ( $R$ ) respecto de la posición en función de la razón de forma. Tanto la variación de la razón de forma respecto de la posición como la razón de forma han sido calculadas a partir de los polinomios de ajuste a los datos experimentales (en gráfica 4.4-11).

A partir de estos gráficos se concluye que las condiciones intermedias son capaces de rastrear un mayor rango de sobresaturaciones. Cuando las condiciones iniciales son elevadas se produce una precipitación de agregados desordenados (esferulitos y amorfo) que condicionan el desarrollo posterior de la onda de sobresaturación. Mientras que cuando las condiciones son demasiado suaves la técnica pierde su capacidad de discriminación espacio-temporal. De forma más detallada se observa como para la misma concentración de sal inicial, una reducción de la concentración de proteína amplía el rango de sobresaturaciones barrido. Los rangos máximos se obtienen cuando la concentración de proteína es de 40 mg/ml para una concentración de sal de 20 y 15% p/v y 60 mg/ml para una concentración de sal de 10% p/v. Este par 60-10 (mg/ml-% p/v) representa la mejor opción para realizar una experiencia de búsqueda de condiciones. Por encima y por debajo de estos valores el rango de sobresaturaciones barrido disminuye. En un rango similar se encuentra el par 40-15, lo que representa un ahorro del consumo de proteína de un 30% aproximadamente. Como contrapartida se pierde resolución en la región de bajas sobresaturaciones, las más interesantes desde el punto de vista de la calidad de los cristales.

Cuando se compara el tamaño de los cristales comprobamos que las condiciones que los pares de condiciones (60-10 y 40-15) más efectivos para el rastreo de condiciones generan los cristales de mayor tamaño (Fig.4.4-13).



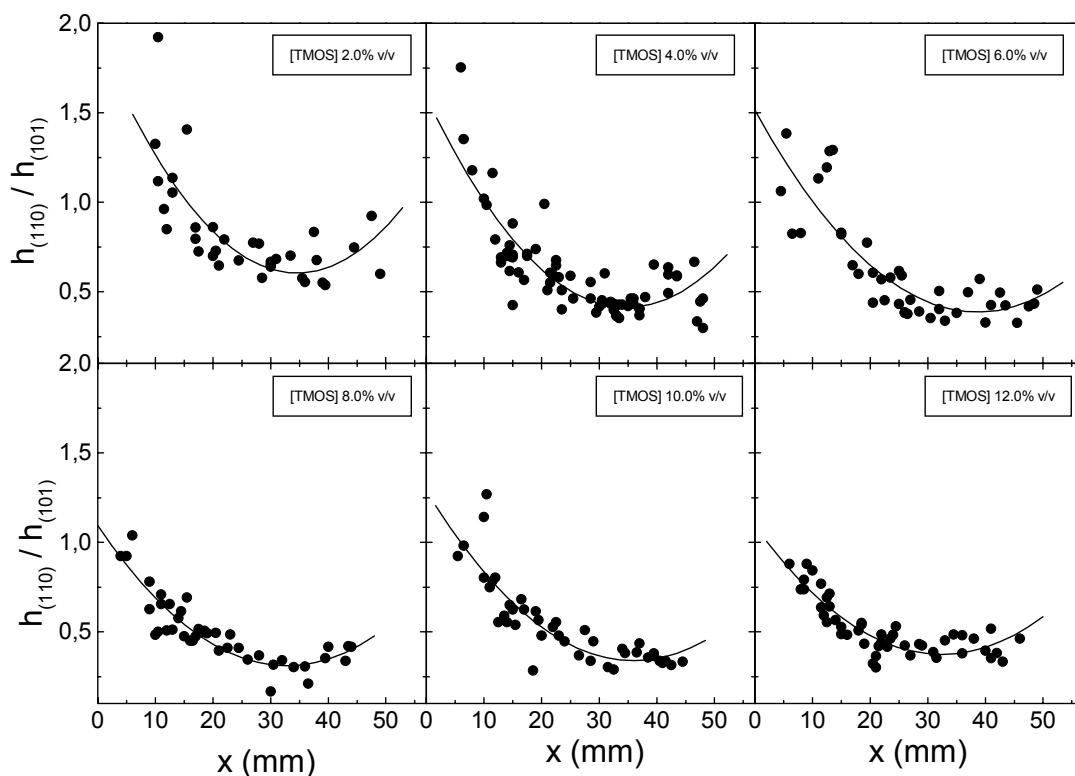
**Fig.4.4-13** Valores promedio de las longitudes características  $W$  y  $L$  de cristales de lisozima crecidos en contradifusión con distintas condiciones iniciales. Las barras de error muestran la variación de las dimensiones en un mismo tubo.

Otro aspecto importante que nos gustaría resaltar es la aparición de un mínimo en todas las curvas entorno a los  $\sim 24.0 \pm 0.4$  mm (valor promedio) indicando que en este punto los cristales han crecido a una menor sobresaturación. Su aparición es independiente de las condiciones iniciales apuntando a un efecto intrínseco del sistema. En este caso debe observarse en la misma posición relativa, independientemente de la longitud de la cámara de proteína y por supuesto de las condiciones iniciales. Como veremos a continuación en las experiencias realizadas en geles de sílice se cumplen ambas hipótesis.

### B. En geles de sílice

En las experiencias realizadas en geles de sílice (TMOS) se mantienen constantes las concentraciones de NaCl y lisozima a 20% y 100 mg/ml respectivamente y se varía la concentración de gel. La longitud de la cámara de sal y proteína fueron de 50 mm separadas por 5 mm de gel de sílice 4% v/v. Todas las soluciones se preparan sobre tampón acetato siguiendo el protocolo IV. Como reactores se usan tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno.

En la figura 4.4-14 se muestra la variación de la razón de forma en función de la posición para las distintas concentraciones de gel de sílice empleadas.



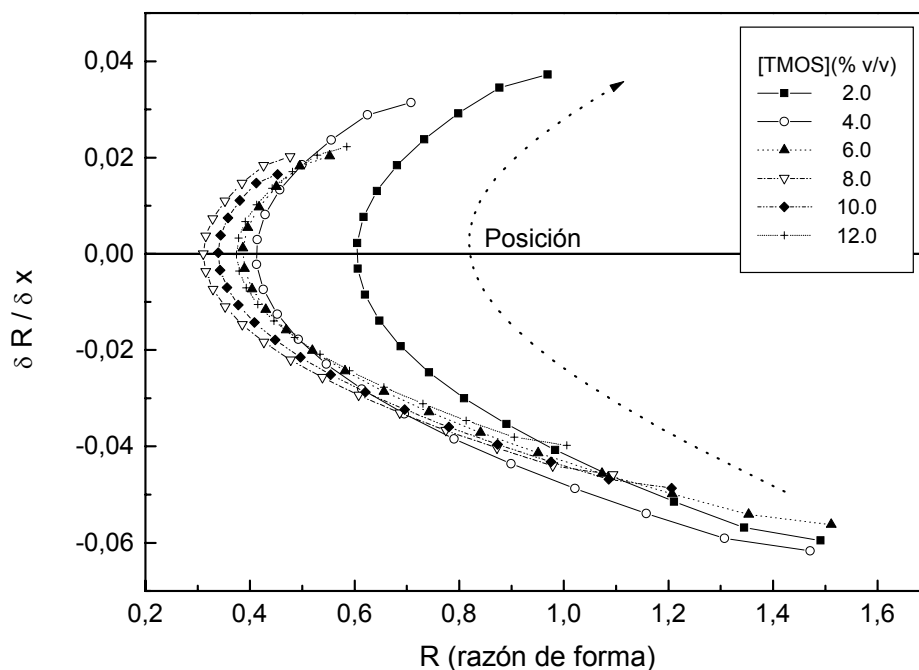
**Fig.4.4-14** Evolución de la razón de forma en función de la posición de cristales de lisozima crecidos en geles de sílice de distinta concentración empleando la técnica de contradifusión. Las líneas continuas muestran el mejor ajuste de los datos experimentales a un polinomio de segundo grado.

Se observa como el comportamiento de la razón de forma a lo largo de la posición en el tubo es similar a la obtenida en el caso de geles de agarosa. Sin embargo, en todos los casos partimos de las mismas condiciones iniciales de concentración. De nuevo hacemos uso de la representación de la variación de  $R$  respecto de la posición como una función de la posición para comparar los resultados (Fig.4.4-15).

En este gráfico se observa que un aumento de la concentración de gel incrementa el rango de sobresaturaciones barridas. Este comportamiento se invierte cuando la concentración de gel

supera el 8% y el rango barrido disminuye de nuevo. En la interpretación de estos resultados hay que tener en cuenta el efecto inhibitor de la nucleación de los geles de sílice que trataremos con más detalle en el siguiente capítulo [Vidal et al., 1999b].

La inhibición de la nucleación se puede interpretar como un descenso de la sobresaturación efectiva independiente de la concentración de sal. En este sentido el efecto es similar al conseguido cuando reducimos la concentración de proteína en los geles de agarosa. A valores inferiores de sobresaturación el rango de condiciones barrido aumenta hasta un determinado punto a partir del cual comienza a perderse el carácter discriminatorio de la contradifusión. Es posible que en el caso de los geles de sílice a concentraciones superiores al 10%, el descenso de la sobresaturación efectiva esté acoplado al efecto del gel sobre los coeficientes de difusión de la sal y de la proteína, aunque se requiere otro tipo de estudios para evaluar como afecta una disminución de los coeficientes de difusión sobre el comportamiento de la onda de sobresaturación a lo largo de la dimensión de desarrollo.



**Fig.4.4-15** Variación de la razón de forma con la posición en función de la razón de forma para experiencias realizadas en geles de sílice de distinta concentración manteniendo el resto de condiciones constantes. Las curvas se han calculado a partir de las curvas obtenidas del ajuste de los datos experimentales (Fig.4.4-14).

Al igual que observamos en las experiencias realizadas en geles de agarosa las curvas presentan un mínimo hacia el final de la cámara de proteína (Fig.4.4-14). La posición de este mínimo se sitúa a  $\sim 34.8 \pm 0.8$  mm (promedio de las experiencias realizadas) del comienzo de la cámara de proteína. La relación entre la longitud total de la cámara de proteína y la posición del

mínimo es de 1.44 prácticamente la misma que la obtenida en el caso de la agarosa 1.46. Esta concordancia de resultado indica que la posición del mínimo es consecuencia de la finitud de la cámara de desarrollo e independiente de las concentraciones iniciales y de la longitud de la cámara. La consecuencia directa de este comportamiento es que los cristales que crecen en las posiciones finales se desarrollan a mayores sobresaturaciones promedio que los cristales que nuclean en posiciones anteriores. Podemos imaginar que si la cámara de proteína fuese mayor los cristales en las posiciones finales continuarían creciendo mientras que la onda de sobresaturación pasa sobre ellos a valores decrecientes, reduciendo la razón de forma de los cristales en crecimiento. La condición de límite físico junto con la relación entre los coeficientes de difusión de la proteína y de la sal determinan la posición a la que aparece el mínimo.

Con este tipo de experiencias estudiamos el carácter amortiguador del tampón físico interpuesto entre la cámara de sal y la cámara de proteína. Hasta ahora hemos usado siempre 5 mm, lo que representa aproximadamente un 5% de la longitud total de los tubos que habitualmente empleamos. En la práctica comprobamos como estas dimensiones son suficientes para evitar una llegada abrupta del frente de sal. Cabe preguntarse si esta relación de longitudes es más eficiente.

Para comprobar este punto se realizan tres experiencias idénticas con 0, 5 y 10 mm de tampón físico (sílice 4% v/v). La proteína se prepara sobre gel de sílice 6% v/v de concentración y el resto de condiciones se mantienen idénticas a las descritas. La longitud de la cámara de sal, igual a la longitud de la cámara de proteína se ajusta para que todas las experiencias tengan la misma concentración de sal en el equilibrio.

Como se observa en la figura 4.4-16, el resultado de aumentar la longitud del tampón físico es la reducción del rango de concentraciones barridas. Sin embargo, esto no implica una menor eficacia de la experiencia, ya que este incremento se produce en la región de mayor sobresaturación (mayor razón de forma). A consecuencia de estos elevados niveles de sobresaturación los cristales son numerosos, de pequeño tamaño y han crecido a una mayor velocidad. Por otra parte, en esta región se observa posteriormente una precipitación en forma de material amorfo con el consecuente consumo de proteína. La cantidad de amorfo precipitado es de 10.0, 6.5 y 6.0 mm para los tubos con 0, 5 y 10 mm de tampón físico.

Otro dato que hay que considerar es el tamaño final de los cristales. Los mayores tamaños se obtienen cuando la longitud del tampón es distinta de cero y son equivalentes cuando la longitud del tapón es de 5 y 10 mm (Tabla 4.4-1). Si tenemos en cuenta que la razón  $W/L$  esta relacionada con la calidad de los cristales, es conveniente escoger aquella configuración con un valor de  $L$  superior (ver apartado 4.6-1).

A partir de estos datos concluimos que una longitud de 5 mm para la cámara intermedia representa la mejor opción, ya que se obtienen cristales de gran tamaño y se barre un amplio rango de sobresaturaciones. Sin embargo, es necesario comprobar que esta afirmación se cumple independientemente de las condiciones iniciales de partida.

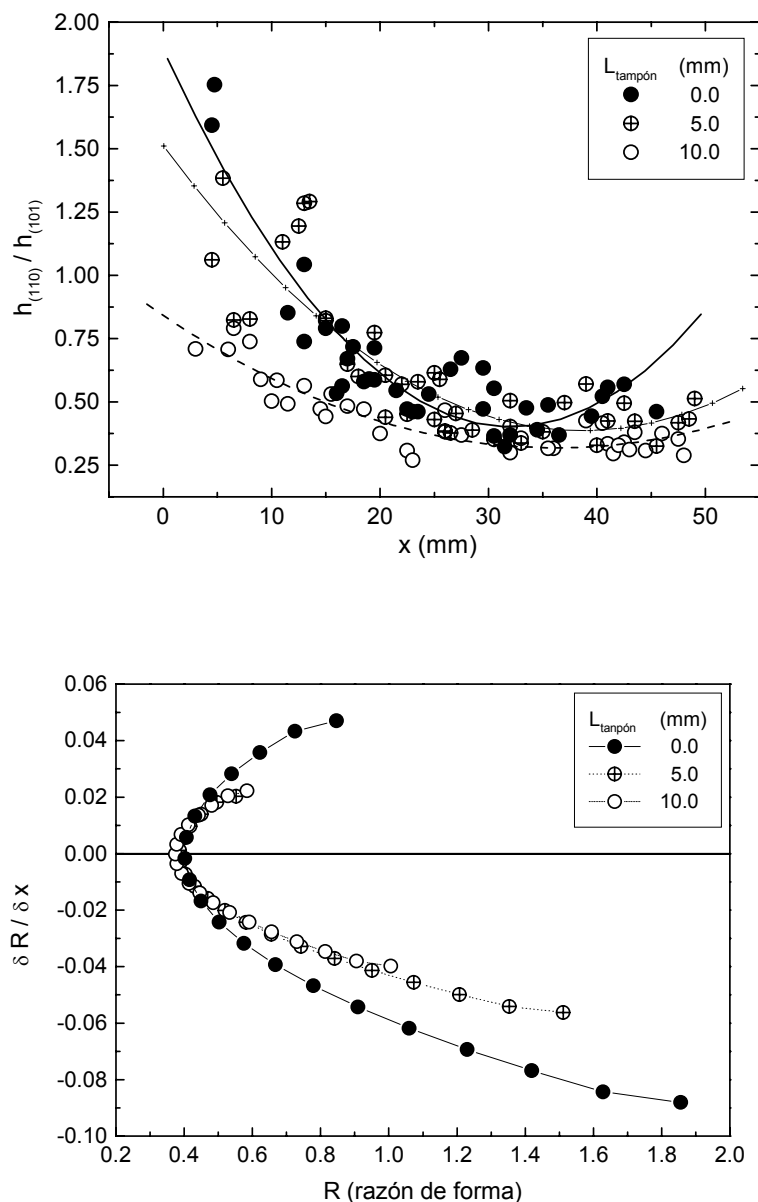


Fig.4.4-16 Variación de la razón de forma en función de la posición de cristales de lizozima crecidos por contradifusión en geles de sílice (arriba). Variación de la razón de forma con la posición en función de la razón de forma para experiencias realizadas en geles de sílice con distinta longitud del tampón físico (abajo).

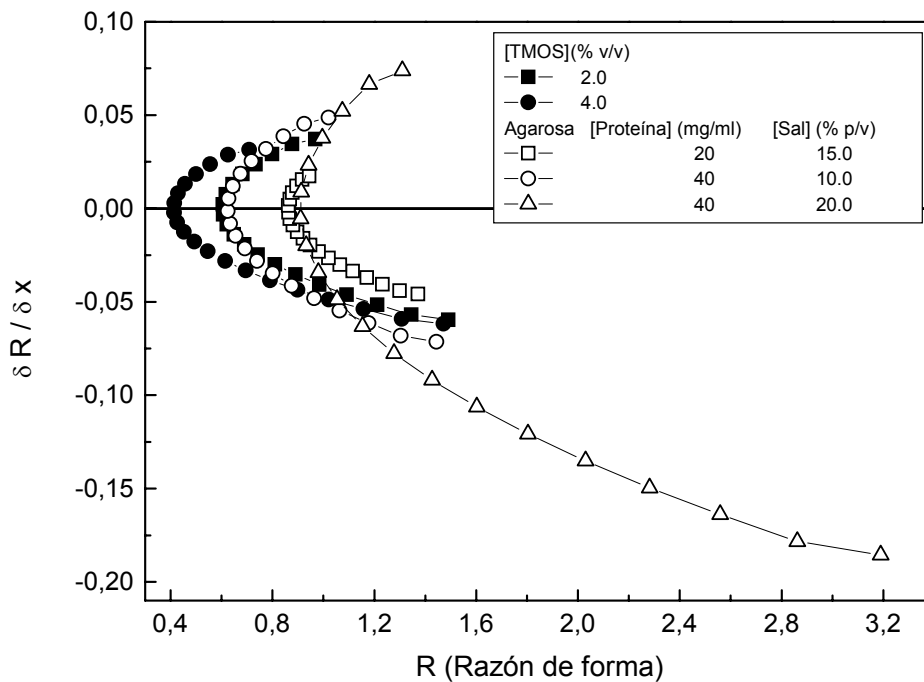
Longitud (mm)	0	5	10
L (mm)	0,954±0,055	1,055±0,060	1,394±0,079
W (mm)	0,573±0,018	0,621±0,022	0,609±0,021

Tabla 4.4-1 Dimensiones características promedio de cristales de lizozima crecidos en contradifusión en gel de sílice con distinta longitud de la cámara intermedia.

Por último vamos a comprobar la utilidad de las gráficas de variación de razón de forma con la posición en función de la razón de forma para comparar experiencias realizadas en geles de agarosa y de sílice.



En la figura 4.4-17 se observa que en las experiencias en gel de sílice los rangos de sobresaturación de barrido son menores que en el caso de las experiencias en gel de agarosa, aunque las concentraciones iniciales son mayores. Este comportamiento se debe a que los geles de agarosa son fuertes inductores de la nucleación mientras que los geles de sílice se comportan como inhibidores de la nucleación (capítulo 5). Esto provoca un aumento del rango de sobresaturación de barrido en geles de agarosa y una disminución en geles de sílice con respecto al esperado en un medio libre de interferencias. A partir de estos datos podemos deducir que los geles de agarosa son los más eficientes en la búsqueda de las mejores condiciones de precipitación en contradifusión. Los geles de sílice por su parte ofrecen la mejor alternativa para la obtención de cristales a sobresaturaciones muy bajas sin comprometer el tamaño final de los cristales. En general el tamaño de los cristales obtenidos en geles de sílice es el doble del obtenido en geles de agarosa.



**Fig.4.4-17** Comparativa de las curvas de variación de la razón con la posición en función de la razón de forma de experiencias realizadas en contradifusión en geles de sílice y geles de agarosa realizadas con distintas concentraciones iniciales.

## 4.5. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE LISOZIMA

### 4.5.1. MECANISMO DE CRECIMIENTO DE LOS CRISTALES DE LISOZIMA

Como se vio en el capítulo primero el crecimiento de los cristales de proteínas ocurre a través de dos mecanismos distintos: por dislocación helicoidal que se observa a bajos valores de sobresaturación y por nucleación bidimensional que aparece a sobresaturaciones altas, aunque ambos mecanismos pueden coexistir a valores de sobresaturaciones intermedias.

Para delimitar en que rango de sobresaturaciones dominado por cada mecanismo de crecimiento y el límite en que coexisten, se realiza el seguimiento del crecimiento de cristales de lisozima empleando un microscopio de fuerza atómica.

Las experiencias se llevaron a cabo con un instrumento Nanoscope III (Digital Instrument) equipado con microscopio óptico (Optizoom 0.8X2.0) y célula de fluido que permite mantener la muestra en un departamento estanco durante la realización de las experiencias y renovar la solución cuando esta se agota [Durbin y Carlson, 1992; Konnert et al, 1994]. El movimiento de la muestra es generado a partir de un piezoeléctrico s/n 1206D-z con rangos de movimiento máximo-mínimo 28.83-0.0256, 33.85-0.0326 y 8.99-0.0  $\mu\text{m}$  para X, Y y Z respectivamente.

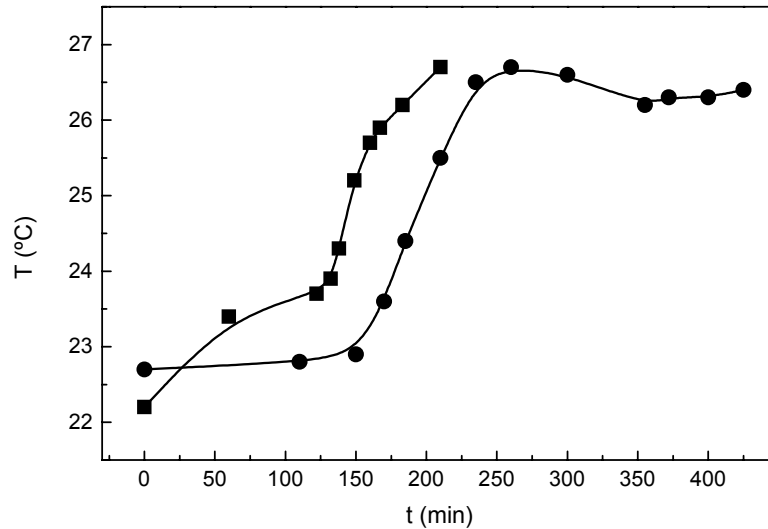
Con un día de antelación se preparan 500  $\mu\text{l}$  de una solución de lisozima 65 mg/ml y 2.5% p/v de NaCl en medio tamponado ( $\beta\cong 5.5$ ). Depositamos unos 50  $\mu\text{l}$  de esta solución sobre un vidrio (cubreobjetos) de forma que después de 24 horas aproximadamente se obtienen cristales adosados a la superficie del vidrio. Los 450  $\mu\text{l}$  restantes se filtran y se usan para eliminar del porta objetos los cristales que no están adheridos al vidrio. Esta misma solución se emplea para rellenar la célula de fluidos.

En este tipo de experiencias las primeras imágenes se suelen obtener después de unos treinta minutos, tiempo mínimo necesario para ajustar el instrumento y encontrar una posición de crecimiento estable. Observamos como transcurridas algunas horas de trabajo el cristal dejaba de crecer y comenzaba a disolverse haciendo que las imágenes perdiesen nitidez. Aunque en un principio pensamos que se trataba de un efecto de abrasión producido por el contacto entre “la punta” (*tip*) y el cristal, otros cristales de la misma muestra presentaban el mismo aspecto denotando un claro descenso de la sobresaturación inicial. Cuando en este estado se cambia la muestra por una fresca, el tiempo requerido para obtener una imagen nítida es mayor y su estabilidad se pierde antes.

A raíz de estos resultados decidimos conectar un termosenor (termopar) directamente al piezoeléctrico y seguir la evolución de la temperatura durante el transcurso de una experiencia.

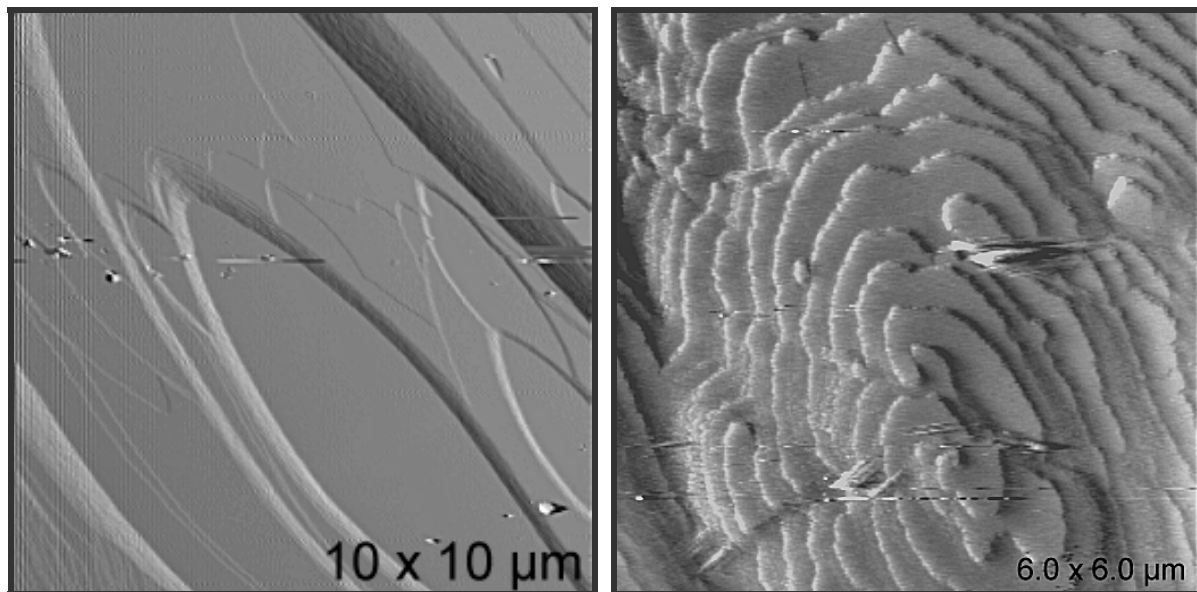
Como se observa en la figura 4.5-1, la temperatura aumenta progresivamente desde el momento en que se comienza a adquirir las imágenes de forma continua y se estabiliza a una temperatura 5 grados centígrados por encima de la temperatura ambiente. Si tenemos en cuenta que un incremento de un grado de temperatura provoca un descenso de la sobresaturación ( $\beta=C/S$ ) del

10%, en el momento en que se equilibra la temperatura se ha producido un descenso de la sobresaturación del 50% lo que da respuesta a la disolución de los cristales.



**Fig.4.5-1** Evolución de la temperatura del piezoeléctrico de un instrumento Nanoscope III a lo largo del tiempo. La temperatura aumenta rápidamente cuando se trabaja de forma continuada (cuadrados). En el segundo caso (círculos) comenzamos a adquirir imágenes de forma continua después de dos horas.

Para simplificar la forma de operar decidimos emplear como semillas cristales de lisozima crecidos en geles de TMOS 4% v/v, de esta forma nos asegurarnos que cualquier efecto quedaría reflejado sobre la superficie del cristal bajo observación. Las semillas pegadas sobre un cubreobjetos de vidrio se recrecen durante una noche a 22°C en una solución de lisozima 50 mg/ml y 2.5% p/v de NaCl. Después de montar la semilla en el microscopio se reemplaza la solución por solución fresca con la misma cantidad de sal y 60 mg/ml de proteína. Una vez uqe la temperatura del instrumento se estabiliza (26.4°C) se sigue la evolución de la cara tipo (110) del cristal. A esta temperatura la sobresaturación calculada es de 2.9 y el crecimiento de las caras ocurre por expansión sobre la cara del cristal de dislocaciones helicoidales. Estas observaciones se mantuvieron a sobresaturaciones por debajo de 3.2, mientras que en el rango 4.0-5.2 el crecimiento de las caras es por nucleación bidimensional (Fig.4.5-2). La sobresaturación ha sido recalculada en cada caso a partir de la dependencia de la solubilidad de lisozima con la temperatura [Rosenberger et al., 1993]. Teniendo en cuenta que la posición en la que seguimos el cambio de temperatura se encuentra bastante alejada del punto en el que se localiza la muestra y que las variaciones de la temperatura del piezoeléctrico es función de la frecuencia de barrido, estos datos sólo pueden ser interpretados de forma cualitativa, aunque los valores obtenidos están dentro de los rangos estimados por otros autores (ver capítulo 1).

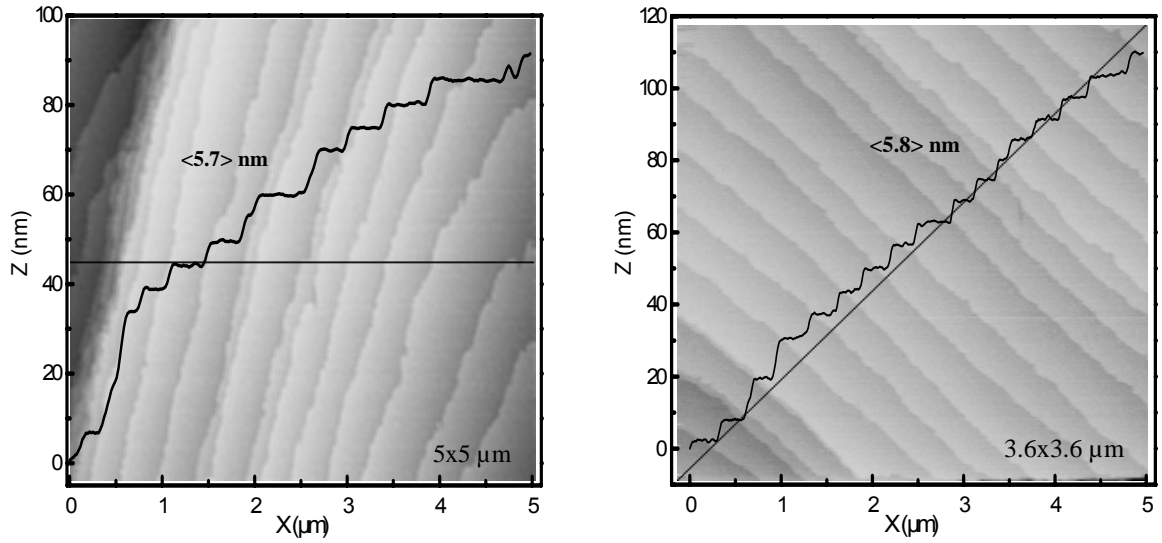


**Fig.4.5-2** Imágenes de AFM de crecimiento de un cristal de lisozima por dislocación helicoidal (Izda.) y nucleación bidimensional (2D) obtenidas a sobresaturaciones relativas aproximadas de 4.5 y 2.9 respectivamente.

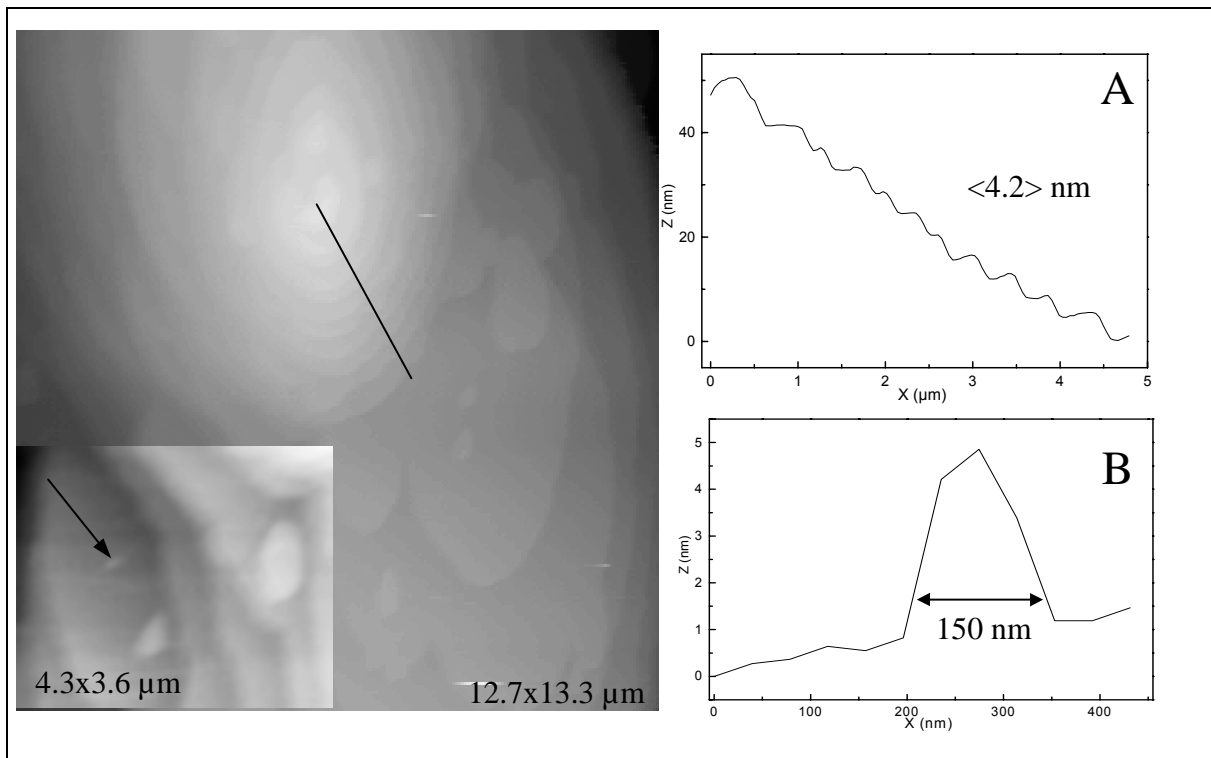
Posteriormente tuvimos la oportunidad de realizar pruebas en un prototipo de microscopio de fuerza atómica y programas de control y análisis (WSxM versión 5.13) desarrollados en el Laboratorio de Nuevas Microscopías de la Universidad Autónoma de Madrid en colaboración con los doctores Julio Gomez y Jaime Colchero. En estas experiencias se emplea el método de recrecimiento de semilla en un rango de sobresaturaciones de 2.5 a 4.0 sin que se pueda determinar el valor exacto. Un ejemplo de las imágenes obtenidas se recoge en las figuras 4.5-3 y 4.5-4.

Del análisis de los resultados obtenemos unos valores de distancias interplanares promedios de 5.7, 5.8 y 4.2 nm idénticos a los obtenidos por Li y colaboradores (1999a y b) aplicando un método de "barrido en línea". Según la interpretación de estos autores el valor de 5.8 corresponde a un dímero de proteína (5.6 nm) que representa el espesor mínimo de la unidad de crecimiento en la dirección [110], mientras que 4.2 nm es prácticamente la dimensión de la molécula de lisozima en la dirección [100]. La agregación de las moléculas se puede producir en solución o sobre la superficie del cristal. En los trabajos mencionados los autores defienden la hipótesis de agregación en el seno de la solución aunque como ellos mismos reconocen no es posible afirmarlo de forma definitiva a partir de las imágenes de microscopía de fuerza atómica.

Por último nos gustaría hacer hincapié en la medida del menor agregado o núcleo bidimensional observado en este estudio (Fig.4.5-4). Las dimensiones características de este núcleo son 150x250x3.8 nm que corresponden a 90x50x1 moléculas de lisozima, lo que indica que la unidad de crecimiento depositada sobre la cara del cristal está formado por una sola molécula en la dirección c.



**Fig.4.5-3** Imágenes de AFM de la cara tipo (110) de un cristal de lisozima en las que se pueden observar los planos individuales de crecimiento. La distancia interplanar promedio se puede calcular a partir del perfil de alturas (z) referido al plano de barrido X-Y al pie de las imágenes. El tramo sobre el que se ha calculado el perfil se representa en las imágenes con una línea negra.



**Fig.4.5-4** Imagen de AFM de la cara de tipo (101) de un cristal de lisozima en la que se observa un crecimiento por nucleación bidimensional. La distancia interplanar promedio es de 4.2 nm calculada a partir del perfil de alturas (A) indicada en la imagen como una línea negra. La foto insertada en la parte inferior corresponde a una región en la que se pueden observar distintas islas de crecimiento. Con una flecha se señala la posición de la menor isleta encontrada cuyo perfil se ha representado en la gráfica B.

#### 4.5.2. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LOS CRISTALES DE LISOZIMA

La velocidad de crecimiento de los cristales es una herramienta habitual que permite conocer o acercarnos a los mecanismos implicados en el crecimiento cristalino. La comparación de su conducta de crecimiento con los distintos modelos teóricos ayuda a esclarecer el grado en que la teoría describe y predice la dependencia entre cada variable y la velocidad de crecimiento [Nývlt et al., 1985].

La velocidad de crecimiento ( $G$ ) se puede caracterizar de diferentes formas que hacen referencia al cambio de volumen, área, masa o dimensión característica por unidad de tiempo. Esta última es la más empleada ( $G_L$ , velocidad lineal).

$$G_L = \frac{dL}{dt} \quad \text{Ec.4.5-1}$$

$L$  representa un valor ficticio (diámetro de una esfera con el mismo volumen) o la dimensión actual que caracteriza el tamaño del cristal.

En nuestro caso las medidas se realizan a partir de imágenes en las que se cuantifica el área proyectada por el cristal ( $A$ ) (ver capítulo 2) a lo largo del tiempo. Se puede demostrar que si existe una relación lineal entre  $L$  y  $t^{1/2}$ , esta relación se mantiene al representar  $A^{1/2}$  frente a  $t^{1/2}$  [García-Ruiz y Otálora, 1997]. Por tanto para evaluar el desarrollo de la dimensión característica  $L$  a lo largo del tiempo tomaremos  $L = A^{1/2}$ , siempre que se cumpla que el cristal se desarrolle en todas las direcciones de la superficie del área proyectada.

En el caso de cristales crecidos por el método de acupuntura en geles la relación anterior no se satisface cuando el cristal llena por completo el diámetro capilar. Una vez que el cristal se desarrolla en una sola dimensión el área proyectada por el cristal es proporcional a la dimensión de desarrollo ( $L$ ) y podemos calcular el valor de  $L$  teniendo en cuenta que el área proyectada por un cilindro de diámetro  $D$  en la dirección perpendicular a  $L$  es  $A = D \cdot L$ .

##### **A. En el método de acupuntura en geles**

A continuación se exponen los resultados de velocidad de crecimiento de cristales de lisozima crecidos por el método de acupuntura en geles en el interior de capilares de 0.5 mm de diámetro manteniendo el resto de variables constantes. Las condiciones experimentales se recogen al pie de cada figura.

En la primera experiencia que aparece en la figura 4.5-7 se muestra el crecimiento ( $A$ ) y la velocidad de crecimiento ( $A^*$ ) de tres cristales: dos de los cristales han crecido en el mismo capilar y un tercero en un capilar diferente, ambos capilares en la misma experiencia. En la representación de  $L (=A^{1/2})$  frente a  $t^{1/2}$  se observa que los tres cristales presentan dos regiones de crecimiento lineal. La velocidad de crecimiento del A-2 supera la del primer cristal (A-1) aunque ha nucleado más tarde.

En la segunda figura 4.5-8 (gráficas B-B\*), la aparición de un segundo cristal por encima del primero frena el crecimiento de este poco después de que el segundo selle por completo el

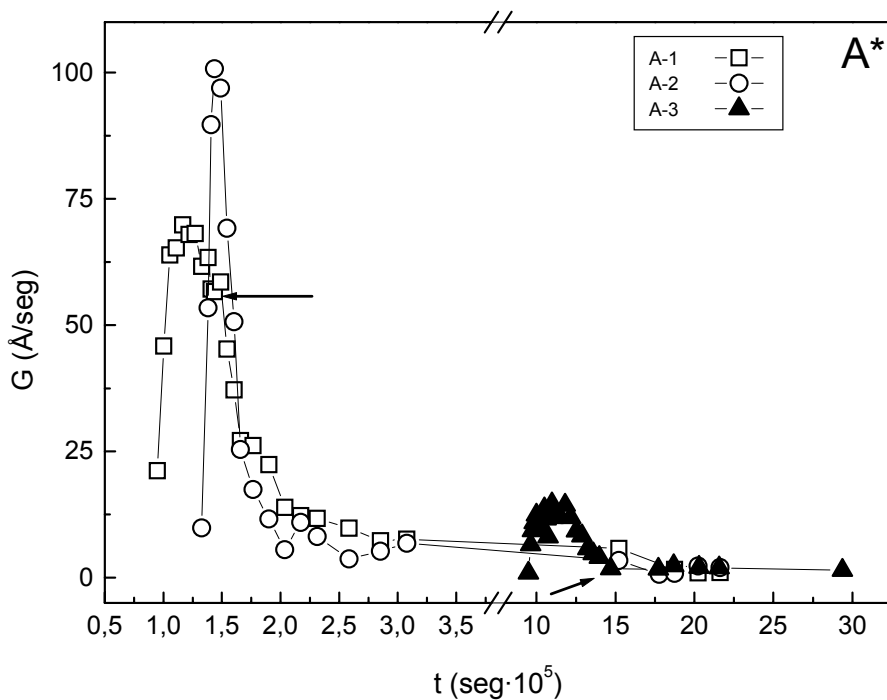
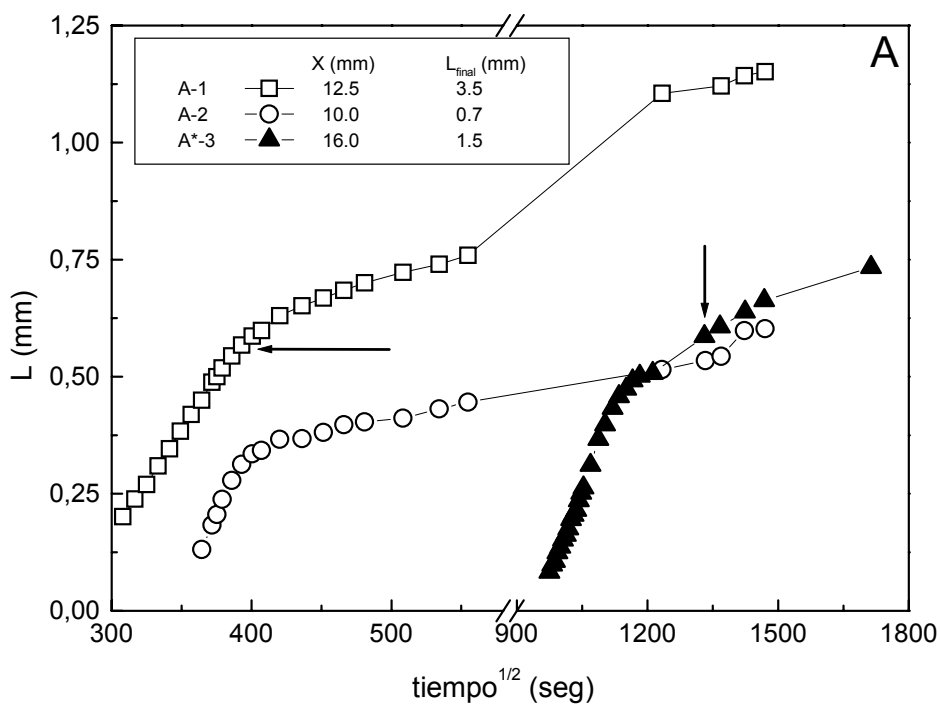
diámetro del capilar. A pesar de esto, el cristal que nucleó en primer lugar presenta la velocidad de crecimiento más alta.

En la siguiente experiencia (figura 4.5-9, gráficos C-C\*) aparecen dos cristales en posiciones muy cercanas en un breve intervalo de tiempo. El cristal en la posición más elevada se desarrolla a una mayor velocidad de crecimiento hasta cerrar el capilar, dejando exhausta la fuente de proteína y provocando un descenso de la velocidad de crecimiento. Sin embargo, posteriormente se produce la aparición de tres nuevos cristales entre estos dos, coincidiendo con un aumento de la velocidad de crecimiento del segundo cristal.

En la experiencia D fue un tanto fortuita. El cristal nuclea con las caras de tipo (110) perpendiculares a la dirección longitudinal del capilar, lo que le permite llenar el diámetro capilar en los primeros momentos (Fig.4.5-10, foto insertada en el pie de la fotografía principal) ya que estas caras evolucionan a mayor velocidad que las caras tipo (101) a altas sobresaturaciones. Con esta disposición inicial el cristal crece en solitario superando los 3.5 mm de longitud final.

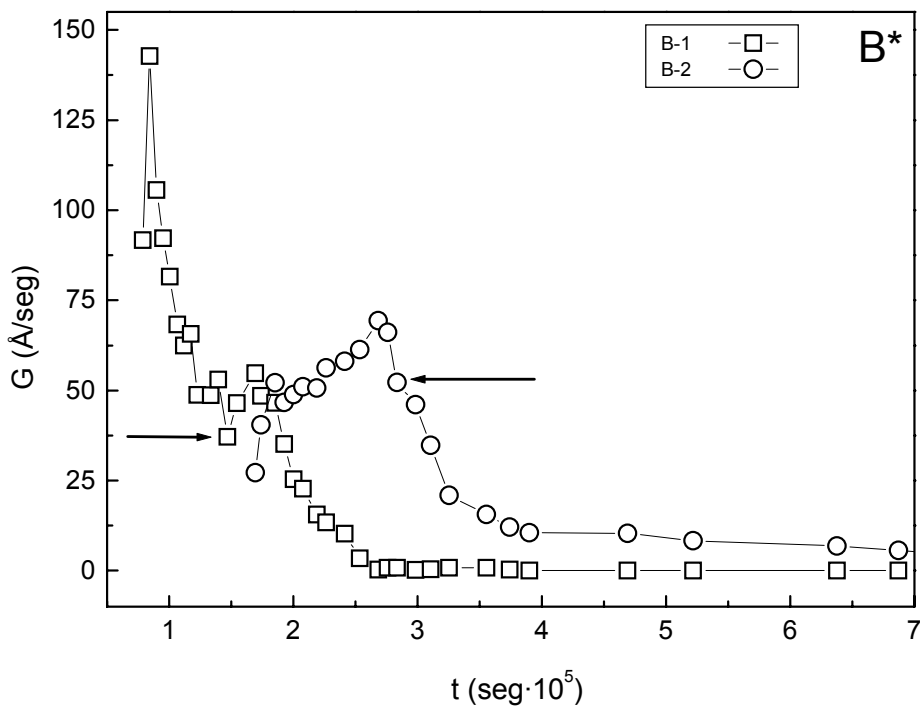
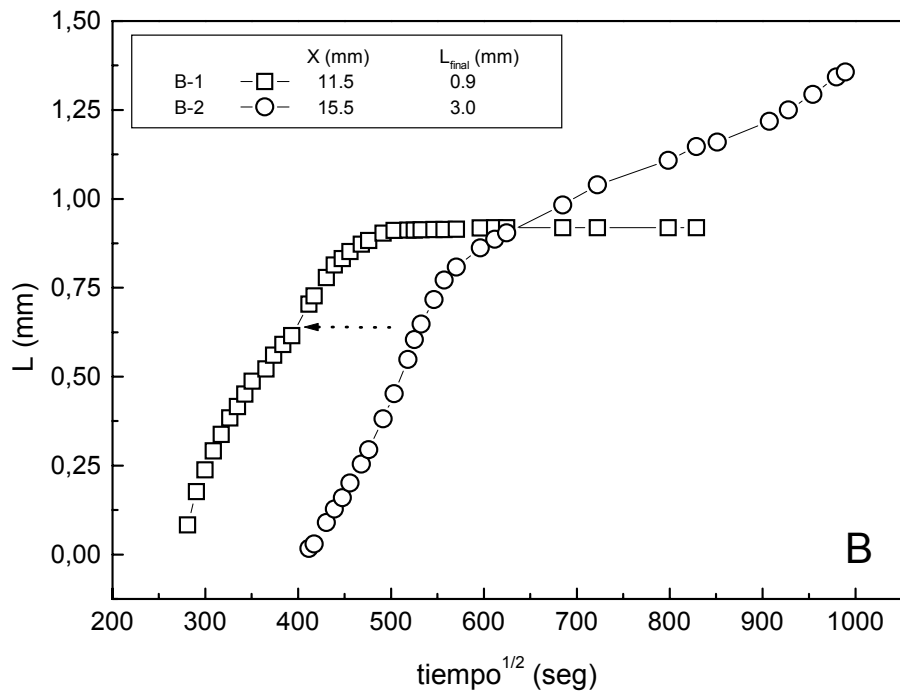
En este caso la longitud característica (L) la hemos representado como  $L^*$ , ya que corresponde directamente a la evolución en la dirección de la longitud capilar. Como se observa en la figura 4.5-10 el cristal crece de forma lineal con la raíz cuadrada del tiempo durante todo el desarrollo de la experiencia. Cuando representamos ambos extremos por separado comprobamos como sólo la parte superior, donde no se agota la fuente de proteína, mantiene esta relación.

En lo que se refiere al método de acupuntura en geles los resultados anteriormente expuestos son un buen ejemplo de la casuística que nos podemos encontrar. Por un lado hemos visto como un cristal que nuclea en una posición más cercana al punto de incorporación de la sal crece a mayor velocidad que un cristal en una posición superior aunque este último haya nucleado con anterioridad (gráfico A\*). Este aumento de la velocidad de crecimiento es consecuencia inmediata de un aumento de la sobresaturación, bien sea por un aumento de la concentración de sal o por aumento de la concentración de proteína. El aumento de la concentración de proteína está justificado por la disolución del amorfo asociado a un descenso de la concentración de sal en el interior del capilar. Un ejemplo de cómo funciona este mecanismo se puede observar en los gráficos B-B\* y C-C\*. En el primer caso comprobamos como la velocidad del cristal B-1 aumenta poco antes de que se produzca la aparición del segundo cristal en una posición más alta. En el segundo caso el aumento de la velocidad de un cristal que ya existe coincide con la aparición de tres nuevos cristales en esa misma posición donde se acumula la proteína procedente de la disolución del amorfo, ya que esta posición está cerrada por un cristal que ocupa por completo el capilar en una posición superior. El cristal D ejemplifica de forma clara como el efecto del llenado del capilar condiciona la evolución de la onda de sobresaturación. Una vez que se ha sellado el capilar el agente precipitante está obligado a difundir por los poros del cristal que continua creciendo a medida que la llegada de la sal aumenta la sobresaturación en el extremo superior. Este acoplamiento se convierte en un fenómeno de retroalimentación que prolonga cada vez más el tiempo necesario para sobresaturar el sistema y evita la aparición de nuevos cristales.

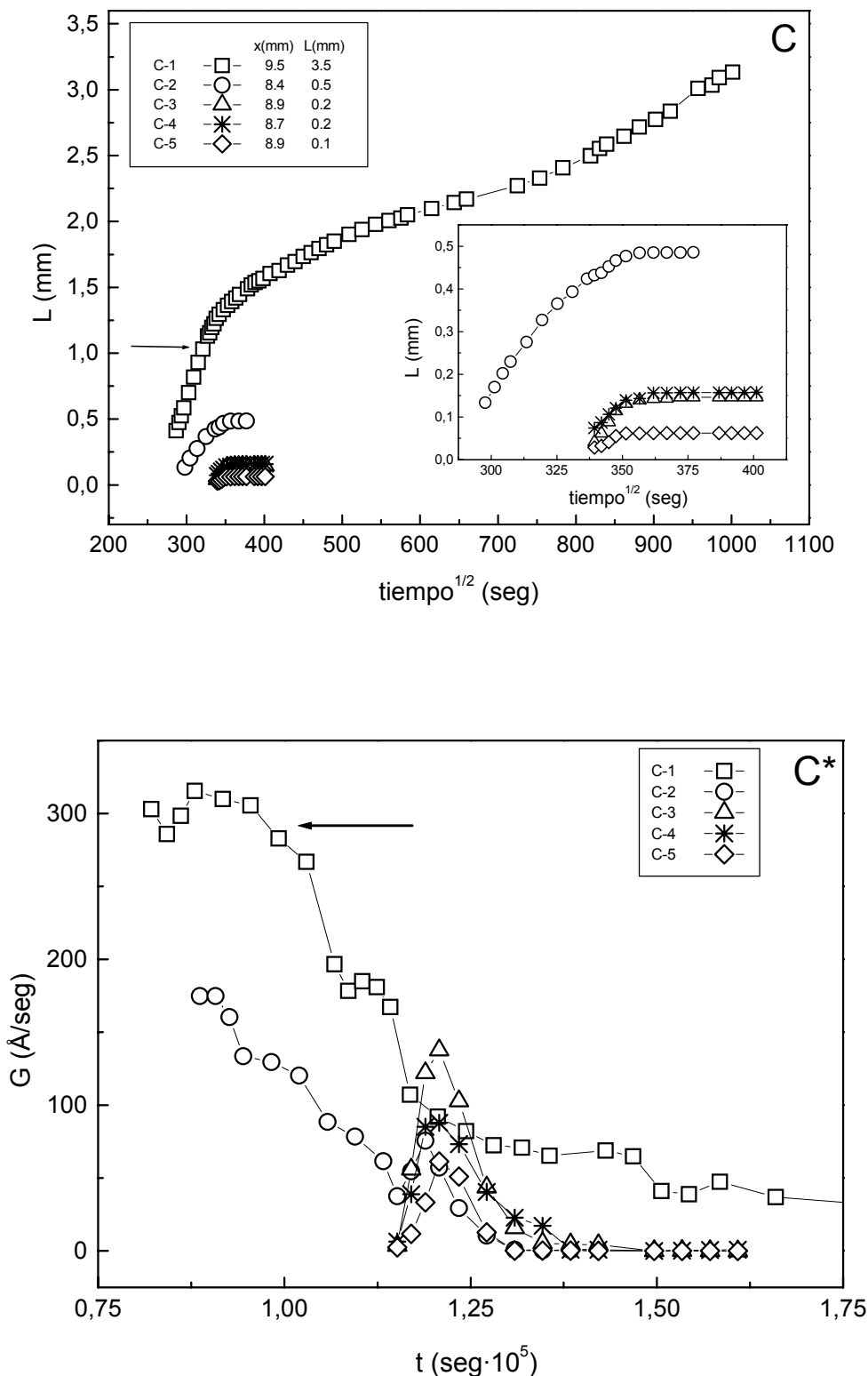


**Fig.4.5-7** Crecimiento y velocidad de crecimiento de cristales de lisozima crecidos en la misma placa en dos capilares distintos (símbolos vacíos y llenos) mismo capilar empleando el GAME. Las flechas en los gráficos muestran el momento en el que los cristales cierra por completo el diámetro capilar. Las condiciones de cristalización fueron 88 mg/ml de proteína, NaCl 20% p/v, en tampón AcNa 50 mM, pH 4.5, y profundidad de punteado ~6 mm.

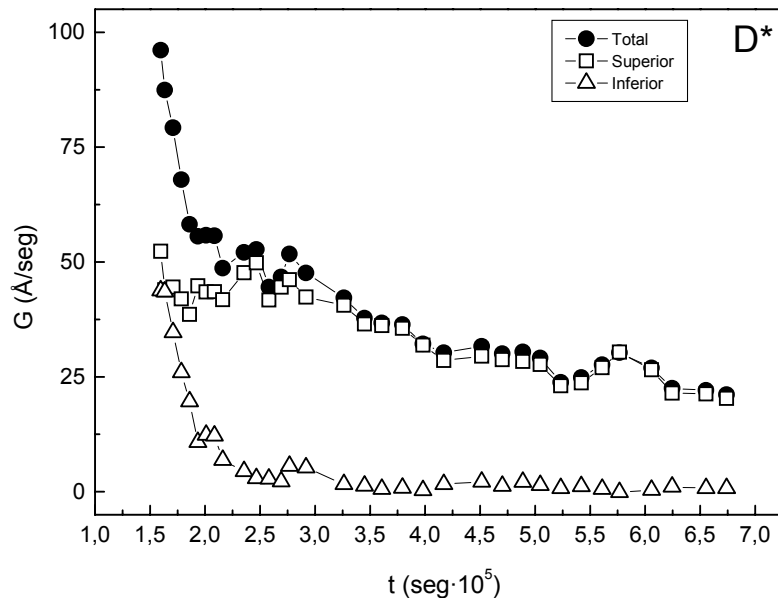
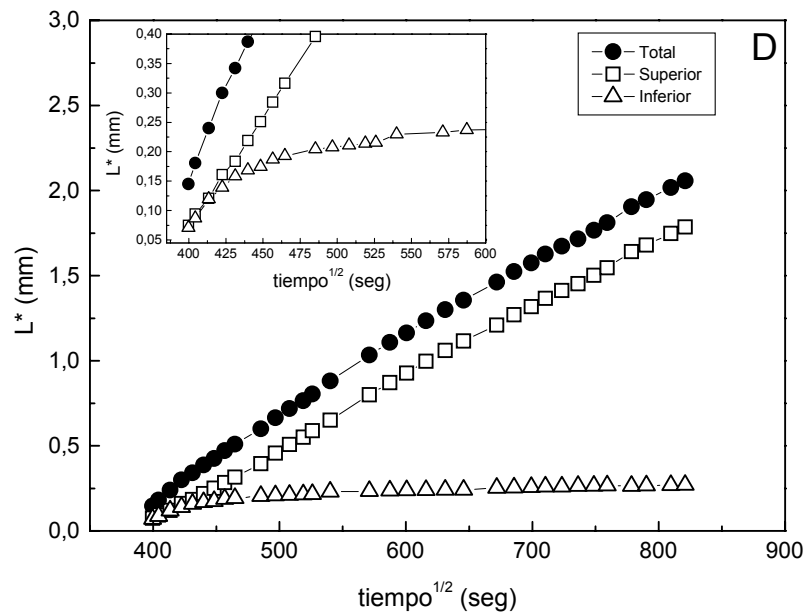
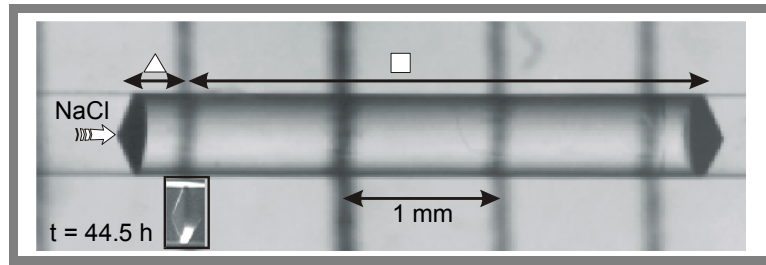




**Fig.4.5-8** Crecimiento y velocidad de crecimiento de cristales de lisozima crecidos en el mismo capilar empleando el GAME. Las flechas continuas en los gráficos muestra el momento en el que los cristales cierra por completo el diámetro capilar, la flecha discontinua en A muestra el momento en que se observa la aparición del segundo cristal. Las condiciones de cristalización fueron 100 mg/ml de proteína, NaCl 20% p/v, en tampón AcNa 50 mM, pH 4.5, y profundidad de punteado ~6 mm.



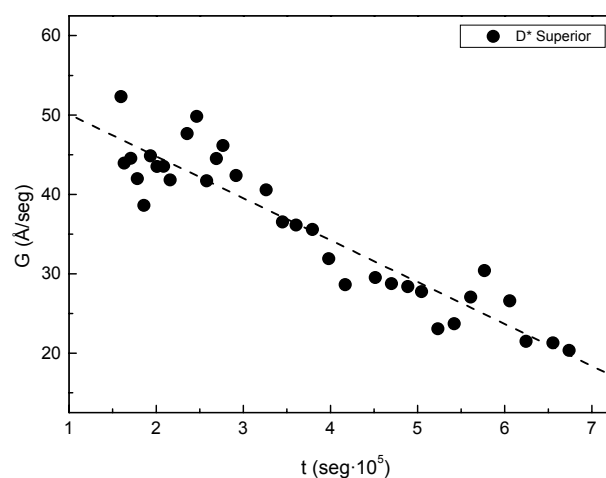
**Fig.4.5-9** Crecimiento y velocidad de crecimiento de cristales de lisozima crecidos en el mismo capilar empleando el MAG. Las flechas en los gráficos muestra el momento en que el cristal cierra por completo el diámetro capilar. Las condiciones de cristalización fueron 100 mg/ml de proteína, NaCl 20% p/v, en tampón AcNa 50 mM, pH 4.5, y profundidad de punteado ~6 mm..



**Fig.4.5-10** La fotografía en la parte superior muestra un detalle del cristal con su longitud final, sobre el que se han representado las regiones superiores e inferiores de crecimiento con los mismos símbolos que empleamos en las gráficas. En la parte inferior se muestra el crecimiento y velocidad de crecimiento de cada región y total. Las condiciones fueron 102 mg/ml y 20% p/v de lisozima y NaCl respectivamente en AcNa 50 mM pH 4.5.

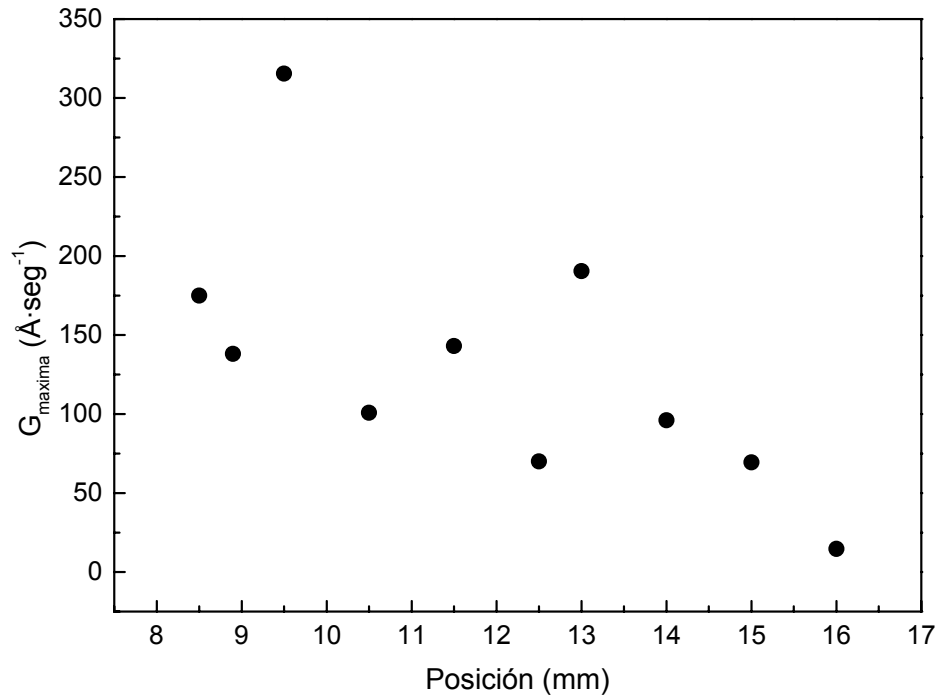
En todos los gráficos de crecimiento se observan regiones que evolucionan de forma lineal con la raíz cuadrada del tiempo. Este comportamiento podría inducir a pensar que el crecimiento de los cristales de lisozima está controlado por la cinética de transporte. Sin embargo, las mismas regiones lineales se observan cuando la representación se realiza frente al tiempo.

Los gráficos de velocidad de crecimiento nos permiten además indagar con más detalle en la evolución del cristal, ya que amplifican los pequeños cambios de pendientes que pueden pasar inadvertidos en los gráficos de crecimiento. Como hemos dicho anteriormente algunos de estos cambios están asociados directamente a la aparición de un nuevo núcleo en el entorno, a la modificación del flujo neto cuando los cristales ocupan por completo el diámetro capilar o a un aporte extra de unidades de crecimiento proveniente de la disolución del amorfo. En este sentido, incluso para el cristal D (Fig.4.5-11) que crece en solitario, se observan estas fluctuaciones con corto periodo de duración que pueden ser debidas a pequeños cambios térmicos o a oscilaciones reales de la velocidad de crecimiento [Rosenberger, 1996]. En el resto de cristales medidos es posible observar estas oscilaciones no asociadas a los cambios en el flujo neto de proteína ni a cambios térmicos, ya que no aparecen en todos los cristales de un mismo capilar simultáneamente. Estas oscilaciones pueden estar causadas por la incorporación de impurezas o por la propia cinética de crecimiento de las caras. Las impurezas en la cristalización de proteínas pueden ser consideradas como proteína desnaturizada (con una fuerte tendencia a la agregación, ya que la desnaturización expone al solvente regiones hidrófobas) o agregados de monómeros de proteínas nativas. En ambos casos el coeficiente de difusión será siempre menor que el del propio monómeros de proteína, por lo que a lo largo del tiempo la relación agregado/monómero aumenta. Consecuentemente cabría esperar un aumento de estas fluctuaciones a lo largo del tiempo, sin embargo este efecto no se observa. Según estas consideraciones, las fluctuaciones del crecimiento observadas en los cristales de lisozima son debidas a la cinética de crecimiento de las caras que controlan la velocidad de crecimiento del cristal.



*Fig.4.5-11* Velocidad de crecimiento de la parte superior del cristal D a lo largo del tiempo.

La velocidad de crecimiento de cristales de lisozima medidas por diferentes autores presentan un amplio abanico de valores que van desde 840 Å/s [Koszelack et al., 1991] a varios Å/s [Weber, 1991] dependiendo de la sobresaturación a la que se han adquirido los datos. En las experiencias realizadas en acupuntura en geles la velocidad máxima de crecimiento disminuye al desplazarnos a posiciones más altas en el capilar, coincidiendo con un descenso de la sobresaturación (Fig.4.5-12).



**Fig.4.5-12** Velocidad máxima de crecimiento en función de la posición del cristal en el capilar.

A partir de estos resultados podemos concluir que la evolución del patrón de sobresaturación en el interior de un capilar posee un grado más de dificultad. El acoplamiento entre la difusión y en el crecimiento posee un lazo de retroalimentación debido a que la presencia de cristales que sellan el capilar condiciona el transporte de sal a través de estos. De forma general la velocidad de crecimiento de los cristales disminuye al alejarnos del punto de incorporación de la sal, por lo que cabe esperar que la calidad de los cristales aumente en el mismo sentido. Para un mismo cristal la región de mayor calidad es aquella que ha crecido a menor velocidad, pero esta región no tiene por que ser el centro de masa del cristal, ya que depende de la velocidad relativa del desarrollo de cada uno de los extremos.

### **B. En contradifusión en gel**

Al igual que hemos venido haciendo en otros apartados seguimos el crecimiento de cristales de lisozima crecidos en contradifusión en geles para comparar el comportamiento con el observado en el GAME.

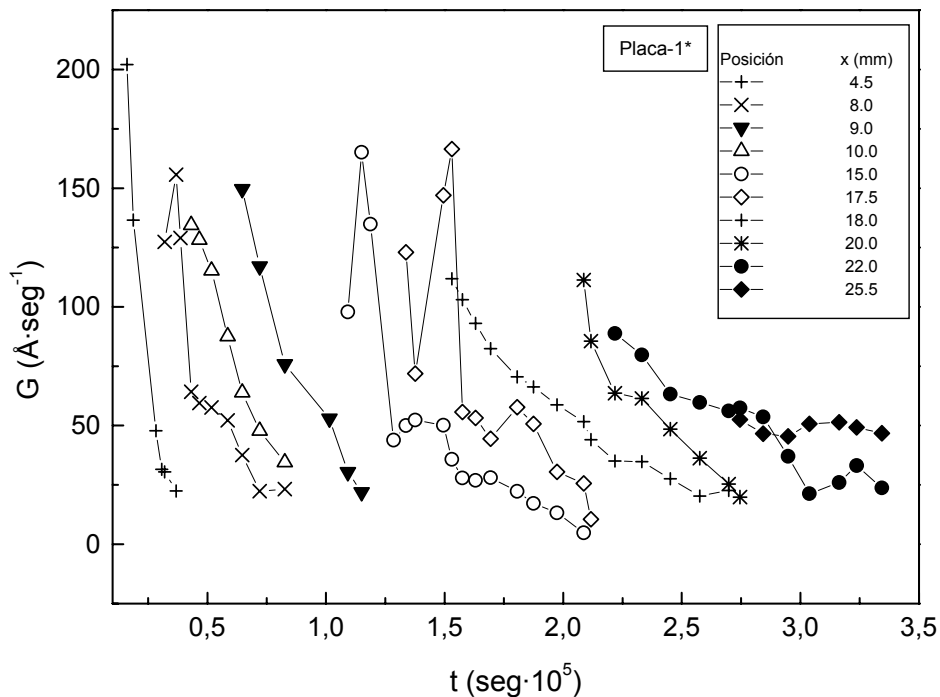
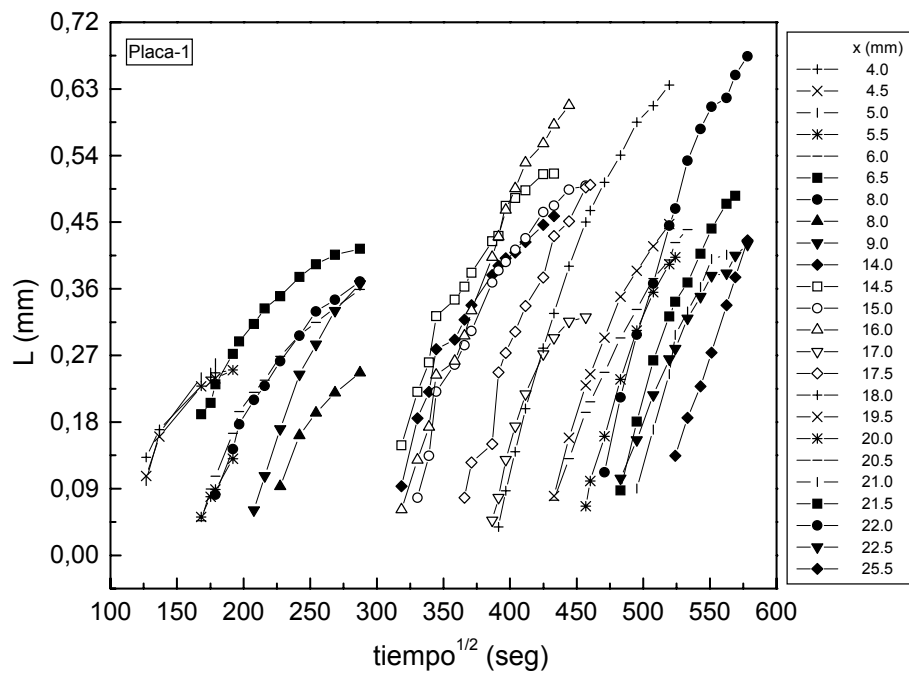
Para ello se escoge como medio el gel de sílice a una concentración en la que número y tamaño de los cristales facilita el seguimiento. La experiencia de contradifusión se monta en una placa (ver protocolo IV) con una configuración de dos cámaras de 42 mm cada una (sin amortiguador físico), para minimizar el tiempo de aparición de los cristales. La cámara de proteína esta compuesta de lisozima a 101.5 mg/ml en 8% v/v de TMOS y la cámara de sal por una solución de NaCl 20% p/v. Todas las soluciones se preparan sobre tampón acetato sódico 50 mM pH 4.5.

Como se observa en las figuras 4.5-13 la evolución del tamaño de los cristales en función del tiempo sigue las mismas pautas descritas para los cristales crecidos el método de acupuntura en geles y las obtenidas en condiciones de gravedad reducida [García-Ruiz y Otálora, 1997]; una dependencia lineal con la raíz cuadrada del tiempo que se pierde a medida que se agota la fuente de proteína. Esta dependencia se observa con más claridad en posiciones y tiempos más avanzados donde la densidad de nucleación es menor en el rango de tiempos observados. Sin embargo, cabe suponer que si seguimos la experiencia por un periodo de tiempo superior, observaríamos la misma tendencia. Por otra parte se comprueba como la presencia de otros cristales cercanos modifica la velocidad de crecimiento provocando la aparición de fluctuaciones o disminuyendo la velocidad máxima.

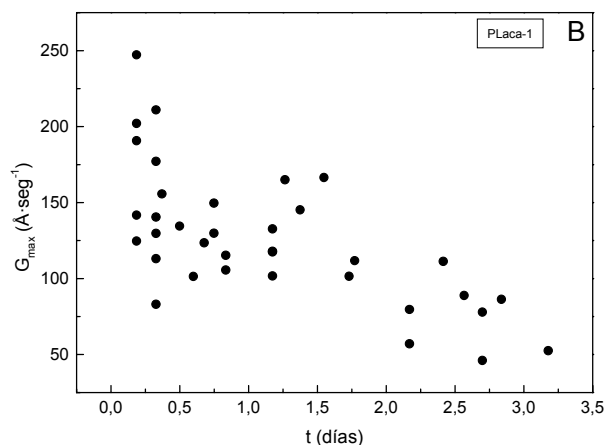
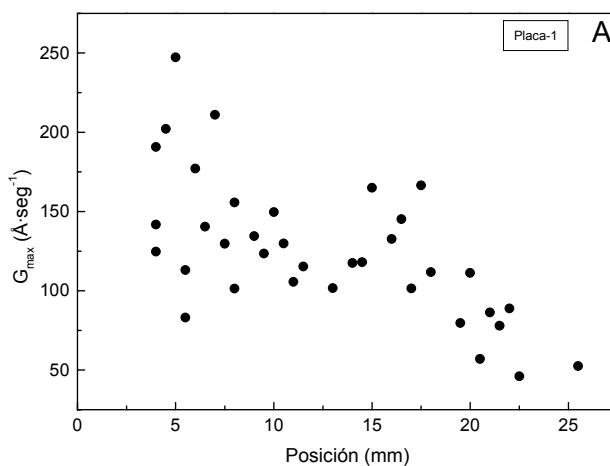
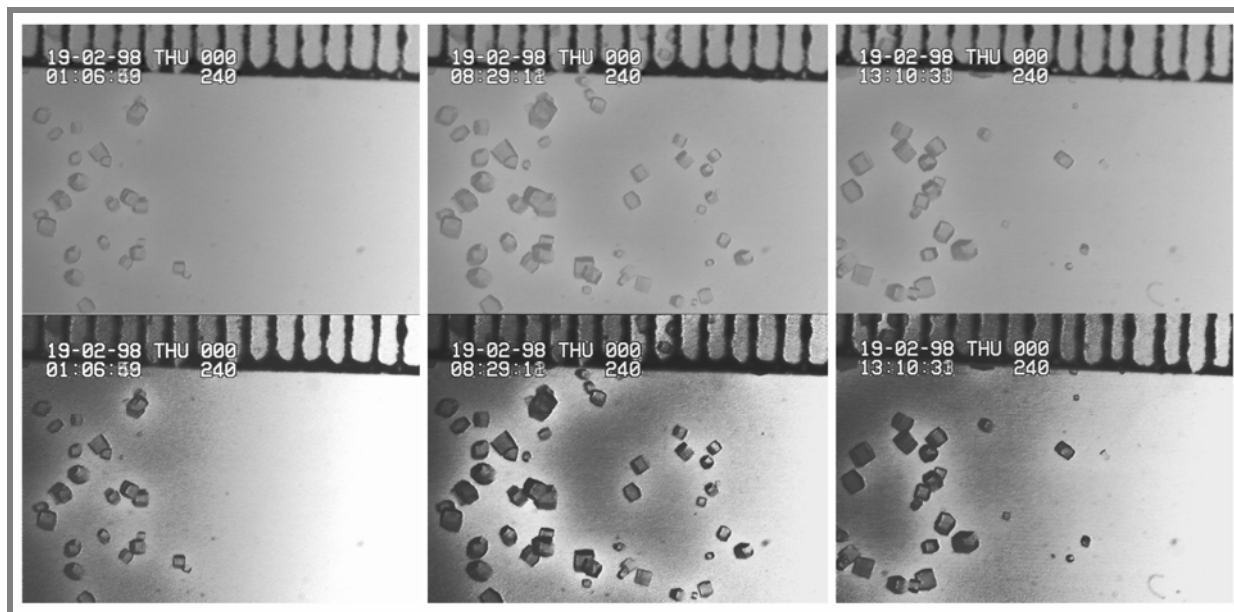
En la figura 4.5-14 comprobamos como al igual que ocurre para los cristales de lisozima crecidos en capilares, la velocidad máxima de crecimiento disminuye al alejarnos del punto de incorporación de la sal. Asimismo se observan fluctuaciones en la velocidad de crecimiento debidas fundamentalmente a que hemos tenido en cuenta todos los puntos medidos, a pesar de que algunos cristales han nucleado por detrás del frente de nucleación donde la sobresaturación es menor. Este efecto se refleja también en la pérdida de la región inicial creciente de modo que en cualquier momento el cristal crece a una velocidad que disminuye con el tiempo.

Para definir de forma más clara las curvas de crecimiento realizamos una nueva experiencia en la que nos centramos en una región de 5 mm durante todo el tiempo que duró la experiencia (Fig.4.5-15). En este ensayo añadimos un tampón físico de 5 mm de gel de TMOS 5.0% v/v preparado sobre el tampón de trabajo que como hemos visto, representa la forma más eficiente de controlar la onda de sobresaturación. La proteína se preparó sobre un gel de sílice 2.0% v/v de concentración final para aumentar el flujo de nucleación y que los efectos de simultaneidad de crecimiento se vieses más acusados.

Como era de esperar el comportamiento es prácticamente idéntico al descrito en la experiencia anterior. Las curvas de crecimiento en función de la raíz cuadrada del tiempo presentan extensas zonas que siguen un comportamiento lineal, hasta que el agotamiento de la fuente o la aparición de un nuevo cristal reduce el crecimiento.

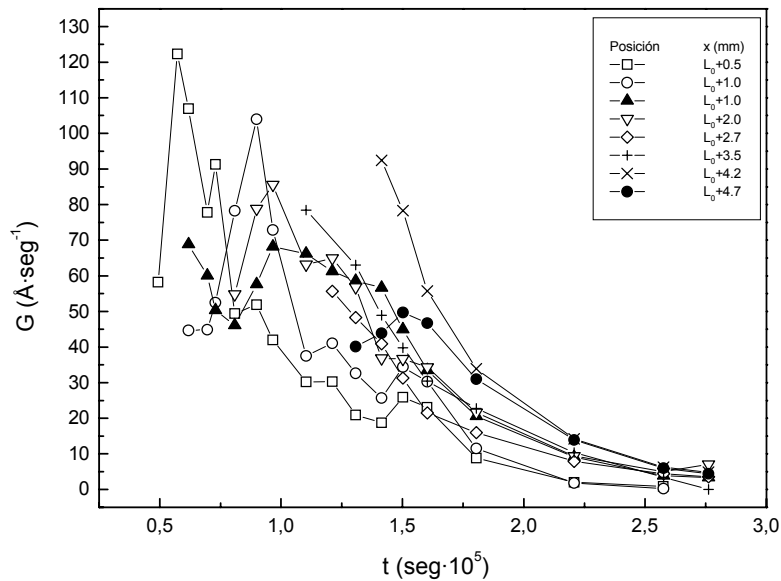
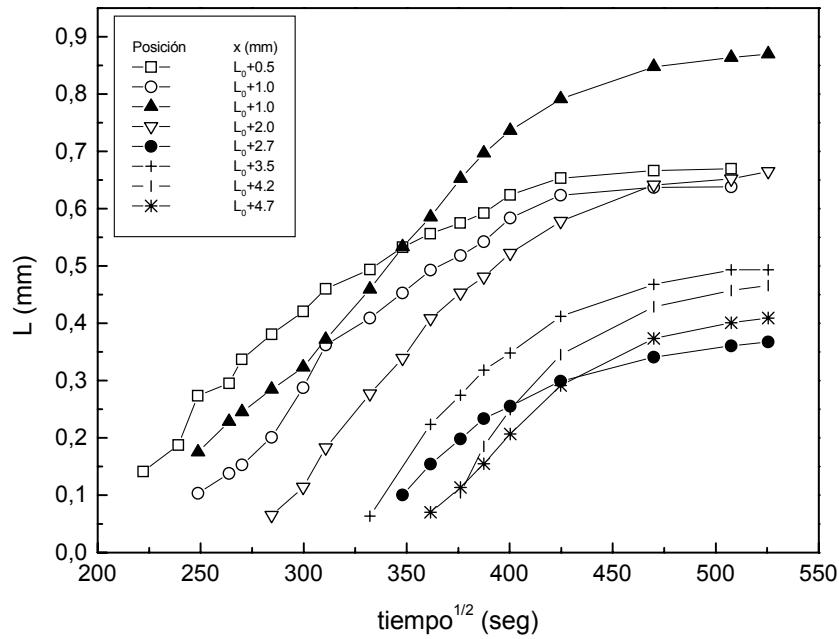


**Fig.4.5-13** Las gráficas representan la dependencia del crecimiento con la raíz cuadrada del tiempo y la velocidad de crecimiento en función del tiempo de cristales de lisozima obtenidos por la técnica de contradifusión en gel de sílice 8% v/v de concentración. Cada una de las curvas corresponde a un cristal que nuclea y crece en una determinada posición. Por claridad en los gráficos no se han representado todos los cristales.



**Fig.4.5-14** Velocidad máxima de crecimiento de cristales de lisozima crecidos por contradifusión en 8% de gel de sílice en función de la posición en la que nuclean (A) y del tiempo de inducción (B). En la parte superior se muestran tres imágenes secuenciales de la evolución de la experiencia y las mismas imágenes reforzadas para apreciar la posición del frente de sobresaturación respecto del frente de nucleación. Cada división son 0.5 mm.





**Fig.4.5-15** Crecimiento y velocidad de crecimiento de cristales de lisozima crecidos mediante la técnica de contradifusión en geles de sílice. La posición se representa como  $L_0+\Delta L$  donde  $L_0$  corresponde a 15 mm desde la posición de incorporación de la sal. Con símbolos llenos hemos destacado dos situaciones extremas: un cristal que crece durante un largo periodo sin otros cristales alrededor (triángulos), y un cristal que nuclea por detrás del frente de nucleación en un medio de menor sobresaturación (círculos llenos).

Por último cabe destacar que tal como se observa en la fotografía de la figura 4.5-14 los cristales crecen en un campo difusivo de transporte de masa en el que el frente de sobresaturación está adelantado respecto del frente de nucleación. Este retardo puede dar explicación a que la precipitación a parezca de forma continuada y no se observe una discretización en bandas.

## 4.6. MEDIDA DE LA CALIDAD CRISTALINA

El parámetro habitualmente empleado para referirnos a la calidad de un cristal es el límite de resolución, medida que nos informa de la significación estadística de la relación señal ruido (Intensidad(I)/ruido( $\sigma$ )). Esta medida práctica nos da una información experimental de gran utilidad cuando los datos se van a emplear para la resolución estructural. Sin embargo, no nos informa de la estructura interna del cristal entendida como grado de desorden, defectos o imperfecciones en la estructura. Para acceder a esta información es necesario recurrir a otras técnicas de análisis como la microscopía de alta resolución (TEM, SEM o AFM) y las técnicas de difracción de rayos X como la topografía y o los perfiles de desorientación (*rocking curve*). En las técnicas microscópicas la información que se obtiene está referida a la superficie estática (TEM y SEM) o en crecimiento continuo (AFM) y corresponde a una imagen bidimensional de la superficie, mientras que las técnicas de difracción informan de todo el volumen del cristal iluminado [Otálora, et al., 1999].

### 4.6.1. MEDIDAS “EX SITU”

La difracción de cristales de proteínas, como en la mayoría de otros compuestos, se realiza normalmente extrayendo los cristales de la solución en la que han crecido. El elevado contenido de solvente en el caso de los cristales de proteínas requiere que los cristales se encuentren en todo momento en un ambiente de elevada humedad relativa. Esto se consigue montando los cristales en el centro de un capilar de cuarzo (o cualquier otro material con baja adsorción de los rayos x) flanqueado por pequeños volúmenes de solución y sellado por ambos extremos (ver capítulo 2). Estos requisitos experimentales requieren una gran pericia del operador y es posiblemente la mayor fuente de la pérdida de calidad de los cristales.

El método de acupuntura en geles minimiza por una parte la manipulación de los cristales, ya que estos crecen directamente en el interior del capilar y por otra parte asegura la estabilidad hidrodinámica haciendo crecer los cristales en un campo difusivo que asegura una lenta cinética del transporte tanto de la sal como de la proteína. Este mismo efecto se consigue en las técnicas contradifusivas de crecimiento en geles, si bien en este caso es necesario manipular los cristales al menos durante su extracción. Está claro que podemos evitar esta manipulación cuando el medio gelificado está contenido en el interior de un capilar.

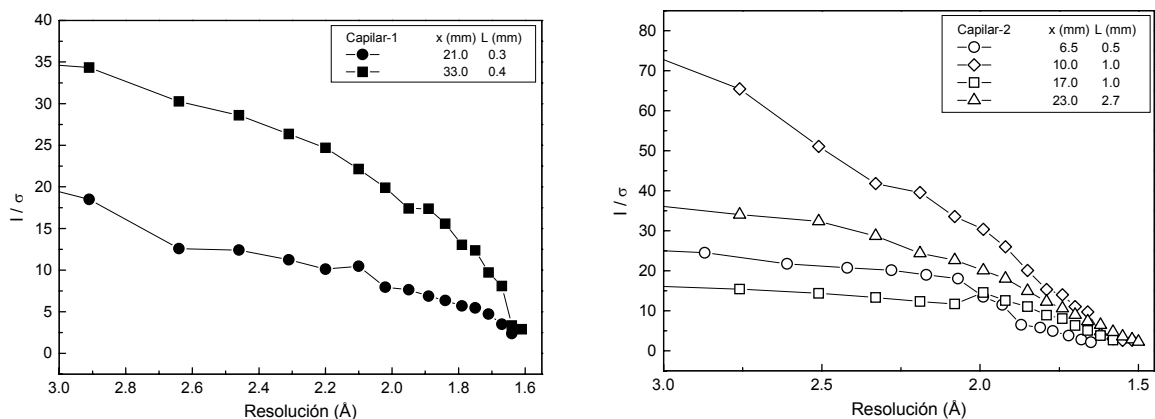
#### **A. En el método de acupuntura en geles**

En anteriores estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que para cristales de lisozima crecidos en el interior de un capilar mediante el método de acupuntura en geles, las regiones que se desarrollan a mayor velocidad de crecimiento presentan un límite de resolución inferior (2.5 Å) que las regiones crecidas a menor velocidad (1.2Å). Ambas regiones corresponden a la parte inferior (cercana al punto de incorporación de la sal) y superior del cristal respectivamente [Otálora, et al 1996]. La mayor velocidad de crecimiento de la parte inferior se explica por el continuo aporte de proteína que proviene de la disolución del amorfo. Sin embargo, es muy probable que la región de la parte inferior englobe el núcleo inicial del cristal y por tanto las regiones que han crecido a la mayor velocidad.

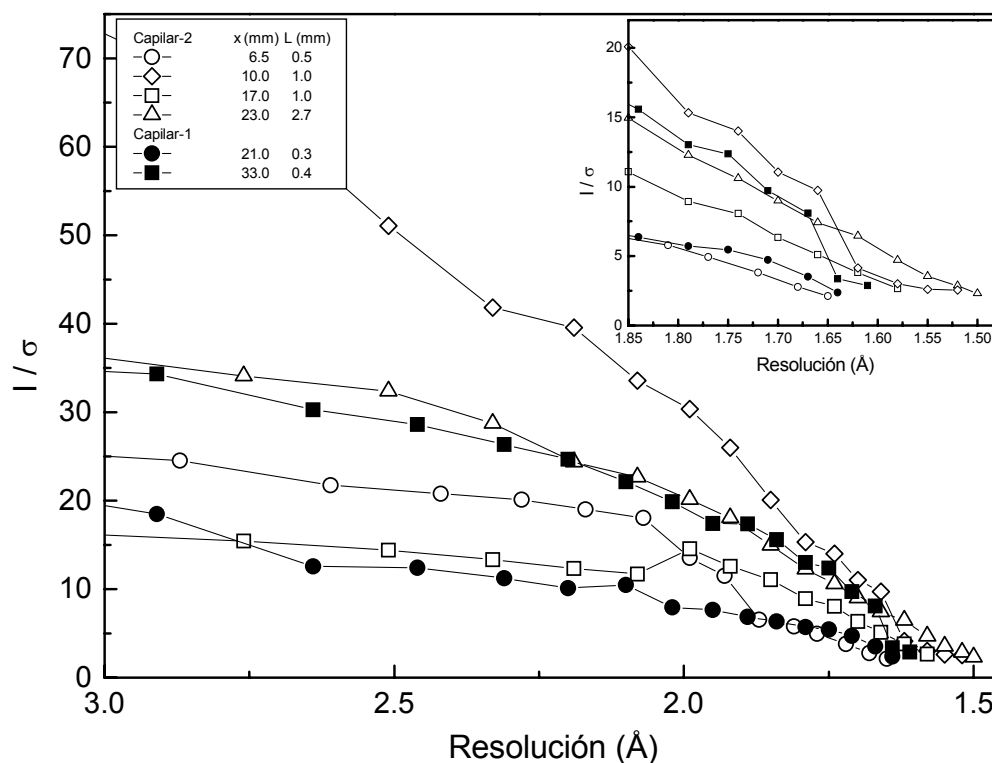
En este estudio extendemos el análisis a lo largo de todo el capilar adquiriendo juegos parciales de datos de cristales de lisozima que han crecido en distintas posiciones, a distintas alturas, de capilares de 0.3 mm de diámetro interno. La adquisición de los datos se lleva a cabo empleando un ánodo rotatorio y un detector de área.

En la figura 4.6-1 se presentan los datos de intensidad sobre ruido en función de la resolución de dos y cuatro cristales de lisozima crecidos en dos capilares diferentes durante la misma experiencia de cristalización. En el primer capilar (Capilar-1) observamos como el cristal que había crecido en una posición más alejada del punto de incorporación de la sal presentaba los mejor resultados de difracción. Estos resultados son coherentes con el hecho de que este cristal ha crecido a la menor velocidad de crecimiento durante un periodo de tiempo mayor. En el siguiente capilar (Capilar-2), sin embargo, el mejor cristal se encuentra en una posición intermedia. La estadística de este cristal es superior en todo el rango de resolución con una intensidad que duplica la intensidad de cualquiera de los otros cristales crecidos en el mismo capilar. Este comportamiento se explica si tenemos en cuenta que el cristal puede haber crecido encerrado por los otros dos cristales que lo flanquean y que por tanto haya crecido a menor velocidad que cualquiera de los otros cristales, lo que concuerda con que el cristal que ha crecido en la posición más elevada, aunque presenta una estadística inferior, difracta a mayor resolución (Fig.4.6-2).

Si comparamos ambos capilares (Fig.4.6-2) por separado comprobamos como el capilar con menor número de cristales presenta un límite de resolución peor, mientras que dos de los cuatro cristales crecidos en el capilar 2 llegan al límite de resolución del instrumento ( $1.5\text{\AA}$ ) con  $I/\sigma > 2$ . Este comportamiento puede ser casual o estar condicionado por el hecho de que todas las medidas se realizaran en el centro del cristal y no en los extremos.



**Fig.4.6-1** Variación de la relación señal ruido ( $I/\sigma$ ) en función de la resolución ( $1/d$ ) para cristales de lisozima crecidos en dos capilares de 0.3 mm de diámetro interno en distintas posiciones ( $x$ ). El tamaño final de los cristales se muestra en los datos insertados como  $L$ .



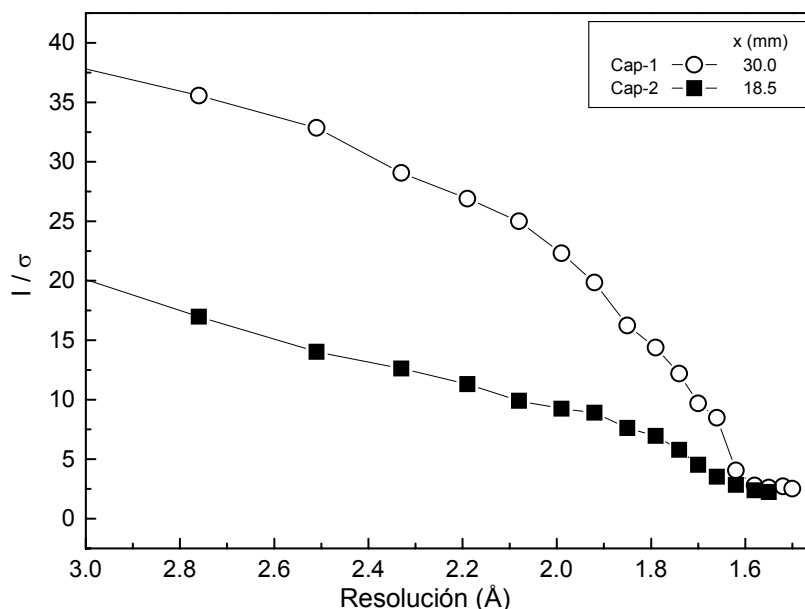
**Fig.4.6-2** Variación de la relación señal ruido ( $I/\sigma$ ) en función de la resolución ( $1/d$ ) de los cristales crecidos en los capilares 1 y 2 (Fig.4.6-1). En la gráfica insertada se muestra la región de alta resolución.

En este punto podemos concluir que como regla general la calidad de los cristales de lisozima crecidos empleando el método de acupuntura en geles se incrementa al aumentar la posición en la que han nucleado y crecido. Este comportamiento es consecuencia directa del descenso de sobresaturación que se produce a lo largo del capilar y que trae consigo un descenso de la velocidad de crecimiento. Ocasionalmente y en función de la historia concreta de cada capilar, es posible encontrar un cristal que ha nucleado en una posición más cercana al punto de incorporación de la sal pero que presenta regiones que difracten con mejor resolución.

En el caso de thaumatina disponíamos de un solo cristal que llenase por completo el diámetro capilar, por lo que la comparación se lleva a cabo entre dos cristales crecidos en diferentes capilares en una misma experiencia (Fig.4.6-3). Las observaciones no difieren de las obtenidas en el caso de lisozima; el mejor cristal ha crecido alejado del punto de incorporación de la sal, a menor sobresaturación y menor velocidad de crecimiento. La estadística de este cristal fue mejor en todo el rango de resolución con un valor de  $I/\sigma > 2$  en el límite de resolución del instrumento.

Puesto que el límite de resolución es inferior  $1.5 \text{ \AA}$ , se realiza una recogida parcial de datos en la línea W-32 de las instalaciones del LURE, equipada con un detector de área MAR-345. Este trabajo se realiza en colaboración con el doctor J. Ng. Durante la recogida se observan puntos de

difracción a 1.0 Å de resolución. Un análisis preliminar de los resultados muestra que el límite de resolución es de 1.3 Å con  $I/\sigma > 2$ .



**Fig.4.6-3** Variación de la relación intensidad/ruido en función de la resolución ( $I/d$ ) para dos cristales de thaumatina crecidos en el interior de dos capilares de 0.5 mm de diámetro obtenidos en la misma experiencia.

Mejoras similares en el límite de resolución respecto de los datos depositados en el PDB (Protein Data Bank) se han obtenido en los casos de ferritina y apoferritina aunque no se ha llevado a cabo ningún estudio comparativo de la calidad de estos cristales en función de la posición.

### **B. En contradifusión en geles y micro-gravedad**

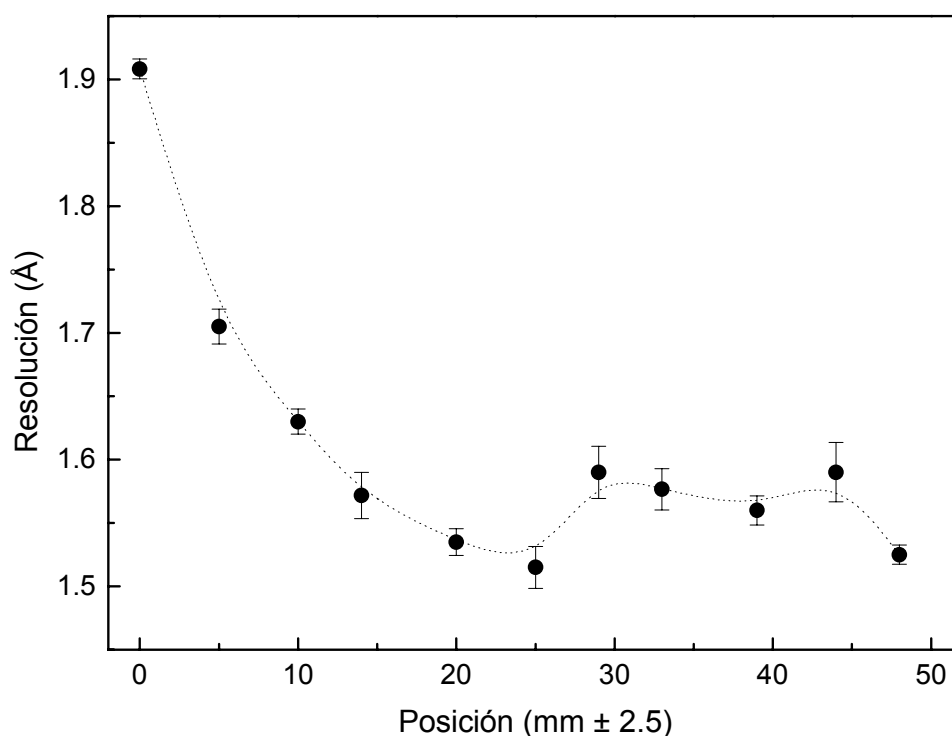
Para demostrar que la correlación posición-calidad es inherente a las técnicas contradifusivas realizamos estudios de calidad cristalina sobre cristales de lisozima crecidos en geles de agarosa y sílice.

En geles de sílice los cristales se crecen a una concentración del 8% (v/v) de modo que pudiésemos correlacionar los resultados obtenidos con la velocidad de crecimiento (apartado 4.5-2.B). Aunque se mantienen las condiciones experimentales descritas en el apartado anterior, se opta por el crecimiento en tubo vidrio en vez de en una placa. Esta configuración permite extraer fragmentos de gel del tamaño deseado (5.0mm) sin necesidad de desalojar del tubo todo el cilindro de gel que contiene los cristales.

De cada fragmento de gel se extraen al menos dos cristales que son montados en un capilar y difractados en un instrumento convencional equipado con ánodo rotatorio y detector de área. De cada cristal se toman tres imágenes consecutivas con un incremento de ángulo entre imágenes de un grado. De cada imagen se determina el límite de resolución, entendido en este

caso como aquellos picos que cumplen la relación  $l/\sigma > 2$ . Para que los datos fuesen lo más homogéneos posible todos los cristales se orientan con el eje c del cristal perpendicular al haz de rayos x y se escogen cristales de tamaño similar.

En la figura 4.6-4 se representa el promedio de todas las medidas correspondientes a una posición con el error asociado a la desviación de los resultados. Como se observa en esta figura el comportamiento es idéntico al descrito en el método de acupuntura en geles. Los cristales ganan calidad al avanzar en la posición respecto del punto de incorporación de la sal. Comprobamos como existe un mínimo del límite de resolución que prácticamente coincide con la región de menor sobresaturación según se deduce de los gráficos de la evolución de la razón de forma (apartado 4.4-2.B). Sin embargo, en aquellas representaciones hicimos hincapié sobre cierto carácter oscilatorio difícil de evaluar a partir de los ajustes pero presentes en todas las graficas de los datos experimentales. Este comportamiento da lugar a la perdida de la tendencia general con cristales que difractan peor en regiones cercanas al final del tubo.



**Fig.4.6-4** Límite de resolución de cristales de lisozima crecidos por contradifusión en gel de sílice 8% v/v en función de la posición en la que nuclean y crecen. Los cristales se extrajeron de rodajas de gel de 5.0 mm, por lo que la posición se da con una incertidumbre de 2.5 mm. De cada rodaja se miden al menos dos cristales y de cada cristal se toman 3 imágenes. Las barras de error representan la dispersión de los datos del límite de resolución de todas las imágenes correspondientes a una misma posición, entendido como los puntos de difracción cuya intensidad es al menos dos veces superior al ruido de fondo.

Un seguimiento similar de la calidad de los cristales en función de la posición se realiza con cristales de lisozima crecidos en geles de agarosa a una concentración 0.075% p/v. En experiencias preliminares se había comprobado que los cristales de lisozima crecidos por contradifusión en agarosa mostraban puntos de difracción en el límite de resolución de un instrumento convencional equipado con ánodo rotatorio (1.45 Å, a la mínima distancia del detector). Para establecer si existe una dependencia entre la calidad de los cristales y la posición en la que crecen es necesario disponer de una fuente de alto brillo, por lo que la adquisición de los datos de difracción se realizó en la línea X11 del acelerador DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) [i].

Por otra parte quisimos comprobar si la presencia del gel modificaría la calidad final de los cristales comparando los resultados con los obtenidos de cristales de lisozima crecidos en contradifusión en condiciones de gravedad reducida. Para ello se mantienen las condiciones empleadas en uno de los reactores largos (FID-XL) volados durante la misión STS-95, esto es: lisozima (Seikagaku) 99 mg/ml y NaCl 20% p/v. Para obtener un medio difusivo en tierra tanto la cámara de proteína (55 mm) como la de sal (55 mm) se gelificaron con 0.075 y 0.5% p/v de agarosa respectivamente. Entre ambas se insertó un tampón físico (5 mm) de agarosa al 0.5 % p/v (Fig.4.6-5). Todas las soluciones y geles se preparan sobre el tampón de trabajo, AcNa 50 mM y pH 4.5.

Se toman juegos parciales de datos de cuatro cristales crecidos en distintas posiciones y por tanto sometido a una distinta sobresaturación promedio (Tabla 4.6-1). La adquisición se lleva a cabo en condiciones de crio-congelación (glicerol 20%) empleando un detector MAR-400. El análisis de estos datos se realizó con el programa XDS [Kabsch, 1993] y corre a cargo del doctor J. López Jaramillo componente de nuestro grupo. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a un análisis preliminar de los datos sin ningún tipo de refinamiento, aunque cabe esperar que estos no difieran de los resultados finales.

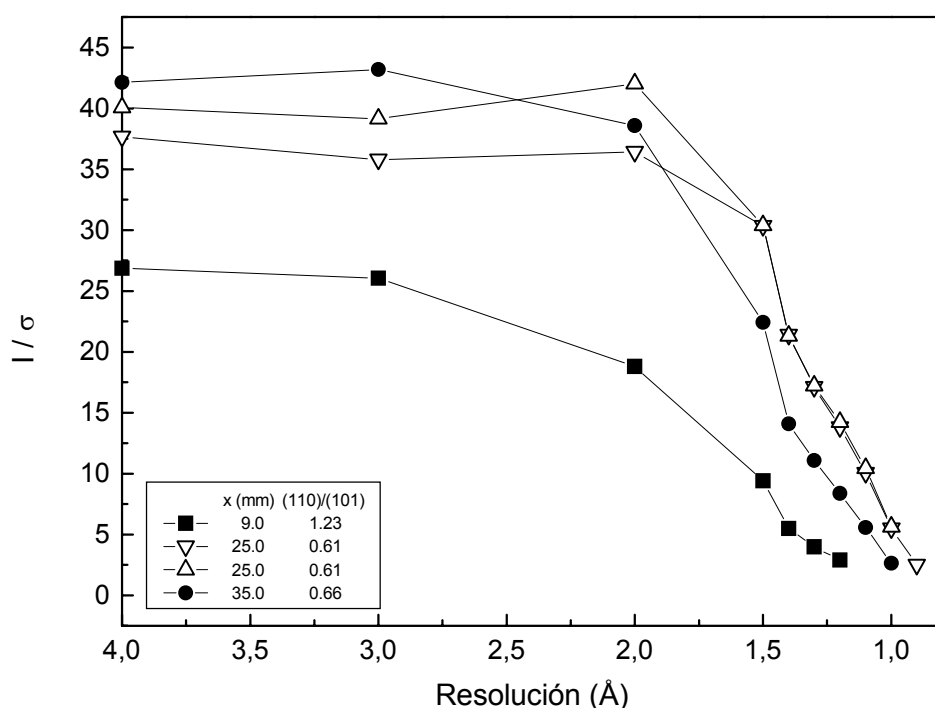
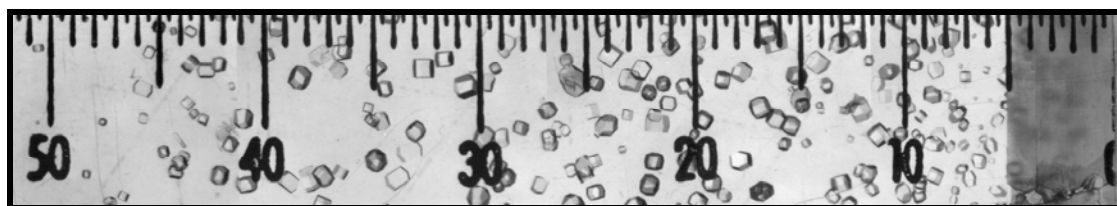
	Posición	W - L (mm / mm)	{110}/{101}
<b>Cristal-1</b>	9.0 mm	0.20 - 0.150	1,23
<b>Cristal-2a</b>	25.0 mm	0.25 - 0.375	0,62
<b>Cristal-2b</b>	25.0 mm	0.25 - 0.375	0,62
<b>Cristal-3</b>	35.0 mm	0.25 - 0.350	0,66

*Tabla 4.6-1 Posición de crecimiento, longitudes características y razón de forma de cristales de lisozima crecidos por contradifusión en gel de agarosa 0.075% p/v.*

De los datos representados en la figura 4.6-5 se deduce una clara dependencia de la calidad de los cristales con la posición en la que han nucleado y crecido. Asimismo se observa una homogeneidad de las condiciones de crecimiento para cristales que ocupan posiciones equivalentes lo que se traduce en una calidad final similar. Para poder comparar los datos hay que tener en cuenta que el volumen final de los cristales es diferente. Como se observa en la fotografía de la figura 4.6-5, el tamaño de los cristales aumenta al alejarnos del punto de incorporación de la

<sup>i</sup> <http://www.desy.de/>

sal, por lo que es conveniente realizar la comparación sobre el límite de resolución más que sobre el comportamiento generalizado.



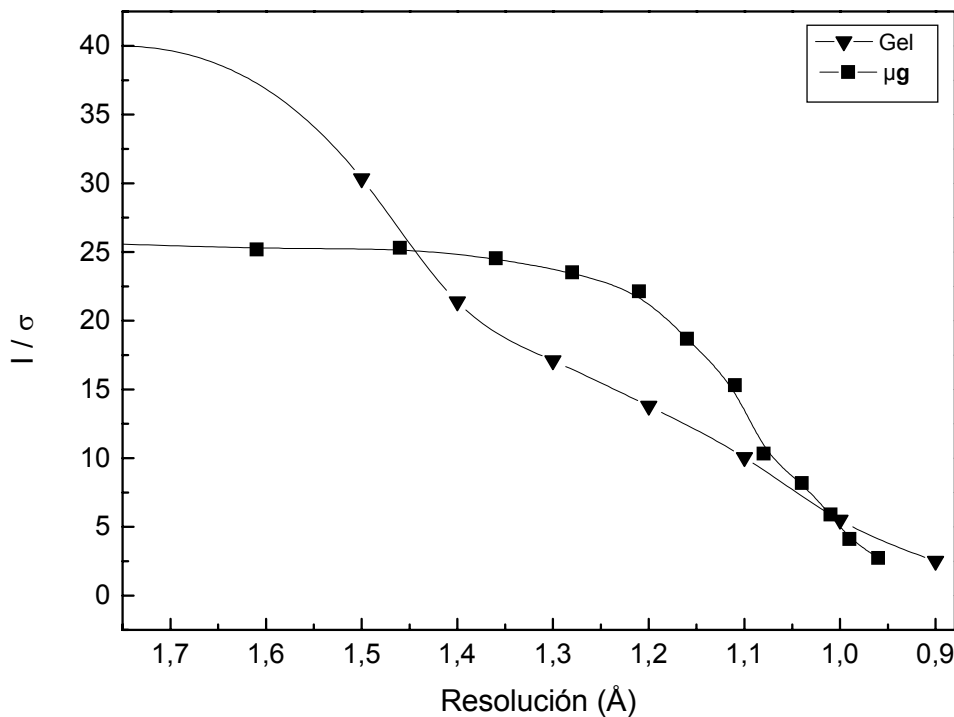
**Fig.4.6-5** La fotografía en la parte superior muestra la cámara de proteína de la placa en la que nuclean y crecen los cristales. El punto cero corresponde al punto de entrada de la sal y límite entre el tampón físico y la cámara de proteína. En la gráfica se han representado las curvas de la relación señal/ruido frente a la resolución para cuatro cristales de lisozima crecidos en distinta posición a lo largo de la cámara de proteína.

Teniendo esto en cuenta comprobamos como los cristales crecidos en la zona central de la placa presentan un límite de resolución significativamente menor que los cristales crecidos en posiciones superiores o inferiores. Para dar explicación a estas diferencias hay que tener en cuenta que los cristales que crecen cerca de la región de incorporación de la sal están sometidos a mayores sobresaturaciones. La elevada nucleación en esta región impide que los cristales crezcan suficientemente antes de que se produzca una nueva nucleación. Al avanzar en la posición sobre la cámara de proteína el flujo de nucleación se reduce y los cristales alcanzan un mayor tamaño. En el caso del cristal en la posición más alejada los resultados no deben de sorprendernos, ya que como se comprueba en la fotografía de la figura 4.6-5 y como muestran los datos de su longitud



característica, estos cristales son de menor tamaño y han crecido a una mayor sobresaturación promedio.

Comparando los valores de límite de resolución de los cristales obtenidos en condiciones de microgravedad (0.96Å) con los correspondientes a los cristales crecidos en gel de agarosa (0.90Å) podemos afirmar que no existen grandes diferencias entre ambos medios (Fig.4.6-6). Sin embargo, sí se observa una diferencia significativa en la relación  $I/\sigma$ . En el caso del cristal crecido en un entorno de baja gravedad los valores de  $I/\sigma$  se mantienen altos por más tiempo y decrecen con una mayor pendiente. Este comportamiento puede deberse a un mayor desorden interno de los cristales crecidos en geles de agarosa que puede estar provocado por la presencia de las fibras de gel. Por supuesto es necesario un mayor número de datos y un análisis topográficos y de mosaicidad que confirmen la presencia de zonas de desorden relacionadas con la presencia de las fibras de gel.



**Fig.4.6-6** Gráfica comparativa de los valores de intensidad sobre ruido frente a la resolución para dos cristales crecidos en contradifusión en gel y en condiciones de gravedad reducida.

#### 4.6.2. MEDIDAS “IN SITU”

Las técnicas de difracción *rocking curve* y topografía son actualmente las únicas capaces de dar una información de la calidad de los cristales de proteínas referidas al desorden interno o

desviaciones de la celdilla unidad. Ambas técnicas están basadas en el estudio de la información contenida en un pico de difracción.

La distribución de intensidades  $I(\theta_B \pm \theta)$  de un pico de difracción entorno a un determinado ángulo de Bragg ( $\theta_B$ ) es proporcional al volumen del cristal con un desorden interno ( $\Delta\theta$ ) y se conoce como *rocking curve*. La *rocking curve* de un determinado pico de difracción se obtiene realizando un barrido de la intensidad desde  $I(\theta_B - \theta)$  a  $I(\theta_B + \theta)$  y se caracteriza por la anchura de pico a media altura (FWHM, del inglés *full width at half maximum*) o mosaicidad, parámetro habitualmente empleado para caracterizar la calidad de un cristal. La topografía consiste en la adquisición de una imagen bidimensional del volumen del cristal en condición de difracción  $I(\theta)$  obtenida por impresión en una película fotográfica. La adquisición de una secuencia de imágenes en el intervalo  $I(\theta_B \pm \theta)$  deja ver que partes del cristal contribuyen a la intensidad del pico para cada valor de ángulo [Otálora et al, 1999].

$\Delta\theta$  recoge además todas las posibles divergencias del haz debido a que no es una fuente completamente monocromática y a la desviación espacial del haz de fotones. La radiación sincrotrón generada en aceleradores de electrones permite minimizar estas contribuciones mediante focalización y monocromatización del haz de fotones sin pérdidas importantes de intensidad. A tal efecto se dispone en estas instalaciones de líneas especialmente diseñadas, como la D25b del LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique) [ii] o la ID19 en el ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) [iii].

Es evidente que si podemos seguir la variación de la mosaicidad de un cristal durante su crecimiento dispondremos de la información necesaria para correlacionar la calidad de un cristal con la velocidad de crecimiento del mismo. Con este objetivo se diseñó un reactor basado en una modificación de método de acupuntura en geles. Las dimensiones del nuevo diseño se ajustaron de forma que el reactor se acoplara a las características de la línea D25 de las instalaciones del LURE. La principal modificación comprendía la liberación del espacio entorno a los capilares de forma que permitiera la adquisición simultánea de datos de difracción, imágenes de topografía e imágenes de vídeo de la evolución del cristal. Esta configuración obliga necesariamente a añadir el agente precipitante sobre el gel en el que se puntean los capilares, lo que no modifica sustancialmente el funcionamiento de la técnica (apartado 4.3.2-1) [Otálora et al., 1999].

Otra serie de limitaciones a tener en cuenta cuando se diseñan experiencias de este tipo son: el tiempo de disposición del haz y la temperatura de trabajo (habitualmente no se puede controlar). Para asegurarnos que obtendríamos cristales en estas condiciones los capilares se llenaron con soluciones de lisozima a 100 (un capilar), 200 (dos capilares) y 300 mg/ml (capilares) de concentración mientras que el gel (sílice) se prepara sobre una solución de NaCl en ácido acético 1.0 N para que la concentración final de sal sea del 10% p/v.

En estas condiciones se realiza el seguimiento del crecimiento de un cristal de lisozima, tomando perfiles de difracción en diferentes estadios del desarrollo del cristal (Fig.4.6-7). El

---

<sup>ii</sup> <http://www.lure.u-psud.fr/>

crecimiento del cristal no difiere de lo que hemos visto en el apartado 4.5-2; el cristal crece a partir de un núcleo que se desarrolla a una velocidad de crecimiento relativamente baja. Posteriormente el núcleo es cubierto por un volumen de cristal que crece a la máxima velocidad, momento en que el cristal llena por completo el diámetro capilar (60h) con el consecuente descenso de la velocidad de crecimiento. A partir de este momento la velocidad de crecimiento desciende paulatinamente al igual que en todos los casos estudiados.

Cerca del punto de máxima velocidad de crecimiento, a las 47.5, 53 y 70h se toman tres perfiles de difracción iluminando el cristal por completo. Cada perfil presenta unos valores de mosaicidad de 23, 53, y 41 segundos de arco respectivamente ( $1''=1^\circ/3600$ ). Estos valores se pueden correlacionar con la contribución de los volúmenes del cristal que han crecido a diferente velocidad. La importancia relativa de cada fracción de volumen a la intensidad total está representada por el área relativa de cada pico sobre la integral total del perfil. En el primer perfil (Fig.4.6-7.a) aparecen dos picos correspondientes a los dos dominios iniciales del cristal ( $21''$ ). En el perfil b el pico de la izquierda aumenta al incrementar su volumen y aparece un tercer pico que solapa con el pico a al derecha aumentando la mosaicidad ( $53''$ ). Conforme el cristal crece ambos picos se desarrollan provocando un descenso neto de la mosaicidad. Posteriormente se realizaron diversos perfiles iluminando regiones separadas del cristal y tomando topografías en estas condiciones lo que permitió identificar cada pico y relacionarlo con los dominios del cristal con distintas velocidades de crecimiento. El resultado de unos de estos análisis se recoge en la figura 4.6-7.d en la que el cristal se iluminó en una región paralela a la entrada de sal (rectángulo blanqueado en el esquema Fig.4.6-7.B). En este caso sólo aparecen los picos correspondientes a los extremos del cristal, ya que la región central no está iluminada. Cada pico por separado presenta un valor de mosaicidad de 9.2 y 12.8'' respectivamente.

Del análisis de los resultados se deduce que la mosaicidad no es una propiedad isotrópica del cristal sino que presenta distintos valores en todo el volumen del cristal. Esta distribución es una consecuencia directa de la velocidad de crecimiento de cada dominio del cristal y la contribución de cada dominio a la mosaicidad total depende del volumen ocupado por este.

Los valores de mosaicidad medidos están en general por encima de los que hemos obtenido habitualmente para cristales de lisozima crecidos por el método de acupuntura en geles ( $\sim 10''$ ) debido a que las experiencias se forzaron para obtener cristales en 36 h con 5 días en total para llevar a cabo el ensayo.

---

<sup>iii</sup> <http://www.esrf.fr/>

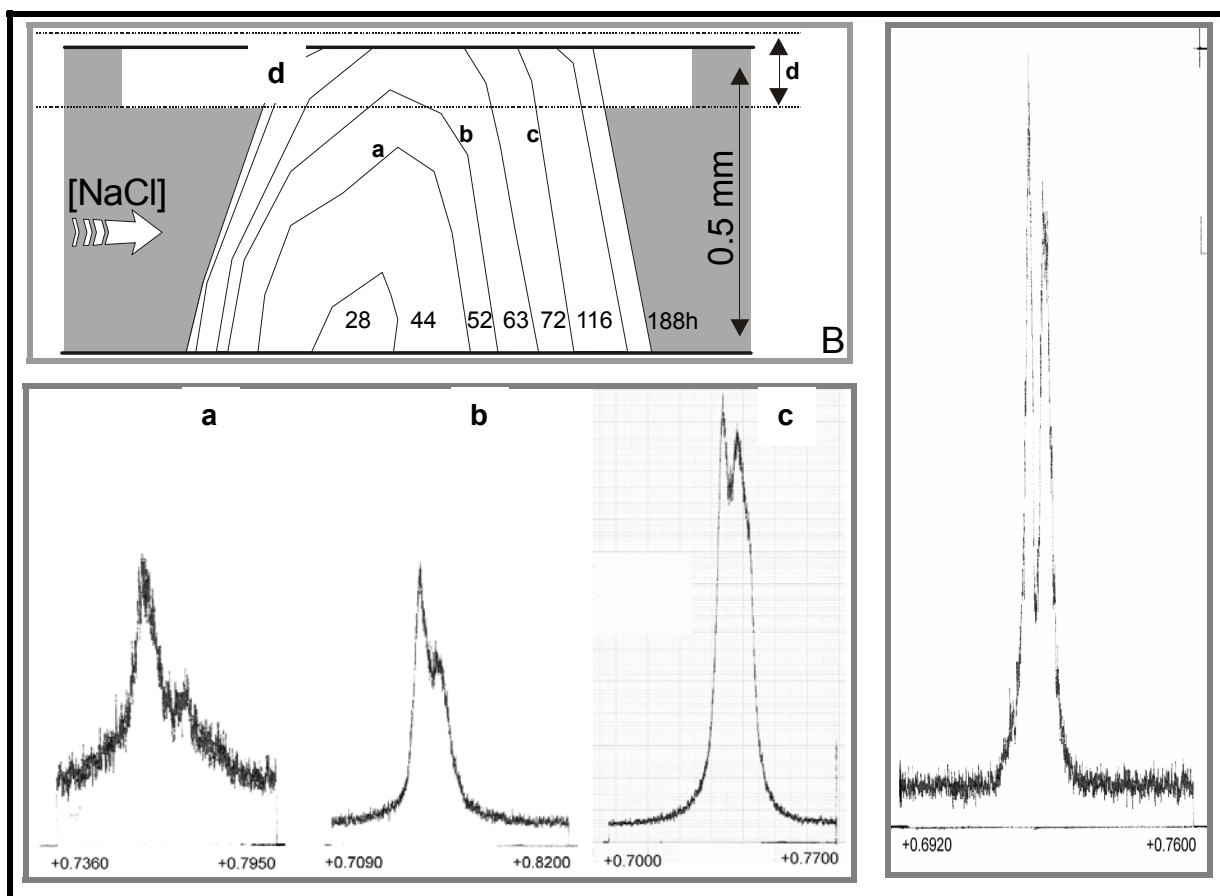
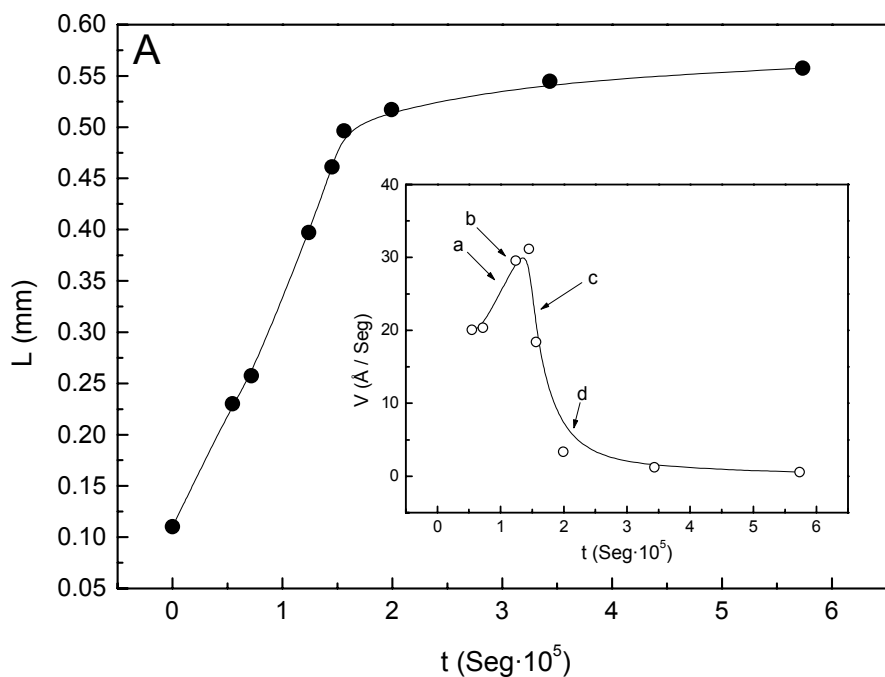


Fig.4.6-7 En el gráfico superior hemos representado el crecimiento y velocidad de crecimiento del cristal de lisozima al que corresponden las Rocking Curves a, b, c, y d tomadas 47.5, 53, 70 y 98h después de haber comenzado la experiencia. El perfil en d corresponde a un pequeño volumen del extremo del cristal compuesto por dos dominios con 9.2 y 12.8'' de mosaicidad.

## 4.7. CONCLUSIONES

Las técnicas contradifusivas de crecimiento de cristales de proteínas presentan un comportamiento generalizado independiente del medio empleado para obtener un transporte de masa controlado por difusión (microgravedad, capilares o geles). Escogidas unas condiciones iniciales adecuadas que desequilibren el sistema, esta inestabilidad se transmite a lo largo de la cámara de proteína (por ser este el componente con menor difusividad) en forma de onda. El acoplamiento del carácter difusivo del sistema con los eventos de nucleación y crecimiento de los cristales determina la evolución de dicha onda que aumenta en anchura y desciende en amplitud a lo largo del espacio en el tiempo (apartado 4.3.1).

El GAME es un caso particular de medio quasi-difusivo de crecimiento de cristales de proteínas. Mientras que la llegada del agente precipitante está controlada por la difusión sobre el gel, los fenómenos que ocurren en el interior del capilar presentan un acoplamiento entre la difusión y la convección como se deduce de la comparación entre los datos experimentales y las simulaciones de computador. El control difusivo del transporte de masa depende del diámetro capilar y de la posición de la columna de proteína con respecto al vector gravedad (apartado 4.3.2).

En el GAME la evolución del patrón de sobresaturación, la nucleación y el crecimiento de los cristales están acoplados en un lazo de retroalimentación en el que los cristales no sólo actúan como sumideros de masa sino que modifican las características físicas del sistema (efecto del llenado capilar, apartado 4.5.2). De donde la discretización de la nucleación observada en el GAME no es más que una consecuencia directa de la configuración del sistema sin ningún patrón de periodicidad (apartado 4.4.1). Cuando la nucleación y crecimiento de los cristales se produce sin modificar las características físicas del medio, la evolución de la sobresaturación es similar a la que podemos encontrar en geles o en microgravedad.

En cualquiera de estos medios la variación del desarrollo relativo de las formas cristalográficas con la posición es un indicador de la evolución de la sobresaturación promediada en el tiempo. La información contenida en este tipo de representaciones se compara fácilmente al representar esta variación en función de la razón de forma, independientemente de las condiciones iniciales de concentración y configuración (apartado 4.4.2). A partir de esta dependencia entre hábito cristalino y la sobresaturación se induce una relación entre hábito y velocidad de crecimiento que queda reflejada en la variación de la calidad de los cristales (entendida como límite de resolución) con la sobresaturación, esto es, con la posición (apartados 4.5 y 4.6.1).

Por otra parte, cada cristal en cada posición representa la evolución de la sobresaturación promediada en el tiempo como se deduce a partir de los datos de mosaicidad. Del análisis de estos resultados se deduce que la mosaicidad no es una propiedad isotrópica del cristal sino que presenta distintos valores en todo el volumen del cristal. Esta distribución de valores es una consecuencia directa de la velocidad de crecimiento de cada dominio del cristal y la contribución de cada dominio a la mosaicidad total depende del volumen ocupado por éste y de la distribución de los sectores de crecimiento (apartado 4.6.2).



## 5. CRISTALES DE PROTEÍNAS REFORZADOS

*La ciencia no tiene más recursos que fijar el orden de sucesión de los fenómenos y determinar las leyes empíricas y derivadas que las rigen.*

S. Ramon y Cajal

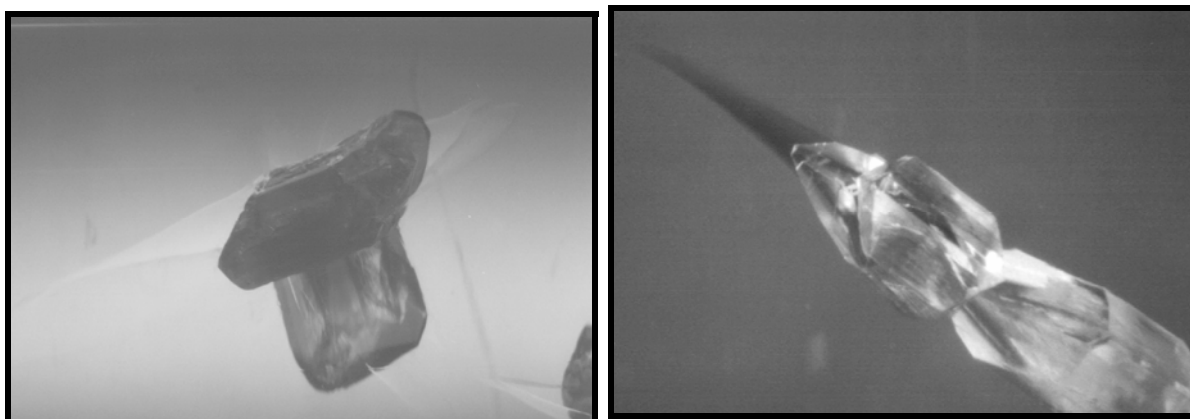
### 5.1. INTRODUCCIÓN

La cantidad de agua presente en un cristal de proteína varía entre un 30 y un 80% (v/v) dependiendo del tamaño de la molécula [Matthews, 1968]. Esto hace que los contactos directos entre las moléculas de proteína sean pocos y débiles y que la estructura del cristal se vea reforzada a través de puentes de agua. Las grandes cantidades de solvente que embeben el cristal presentan prácticamente las mismas propiedades que las de la solución en la que estos crecen [Baker, 1980]. Las principales consecuencias de estas características del estado cristalino de las proteínas son: una elevada fragilidad de los cristales, el mantenimiento de las propiedades estructurales de las proteínas en el cristal con leves modificaciones solo en las regiones de contacto y la posibilidad de libre difusión de pequeñas moléculas a través de los canales del cristal y como consecuencia el mantenimiento de su actividad enzimática. La extensión en la que estas propiedades se mantienen, depende del porcentaje de superficie expuesta al solvente y de considerar las interacciones entre las moléculas del solvente y de proteína en el cristal, idénticas a las que ocurren en solución libre [Gregory, 1995].

Aunque en este capítulo se estudian y analizan puntos de actual interés en el crecimiento de cristales de proteína en medios gelificados, el objetivo principal de este estudio ha sido encontrar la forma de obtener sistemas ordenados de proteína con bajos requerimientos hídricos y capaces de mantener sus características físicas, químicas y estructurales.

## 5.2. CRISTALIZACIÓN EN GELES DE SÍLICE

En la literatura sólo aparecen trabajos marginales de cristalización de macromoléculas biológicas empleando geles de sílice. Esta baja concurrencia se debe al elevado tiempo de gelificación a bajas concentraciones, lo que los hace poco útiles en técnicas como gota colgada y gota sentada, y a la elevada resistencia mecánica de los geles por encima de un 2% v/v de concentración.



*Fig.5.2-1 La figura muestra cristales de tartrato cálcico que han nucleado y crecido en el seno de un gel de sílice y que han roto la estructura del gel para continuar su normal crecimiento (cristales crecidos por Tania Caballero en el laboratorio de estudios cristalográficos).*

Esto último no representa ningún problema en la cristalización de compuestos inorgánicos, ya que los cristales, con una energía elástica dos ordenes de magnitud superior a la de los cristales de proteínas [i] [Holmes, et al., 1999] pueden fracturar el gel de sílice (Fig.5.2-1) incluso a concentraciones del orden del 20% v/v.

Por otra parte sabemos que los cristales inorgánicos pueden incluir pequeñas cantidades de gel del entorno en los primeros estadios de su crecimiento. Algunas especies inorgánicas como la calcita incorpora grandes cantidades de gel de sílice durante su crecimiento, entre 0.45 y 1.7% de  $\text{SiO}_2$  cuando se obtienen en geles de 1.02-1.03 g/cc de densidad. Los cristales presentan caras bien desarrolladas y lisas aunque su aspecto es opaco. La disolución del carbonato cálcico en medio ácido deja un residuo de sílice que mantiene la forma y dimensiones del cristal original. Las mismas observaciones se han realizado en cristales de calcita [Henisch, 1988].

En general la energía elástica de los cristales de proteínas no supera la resistencia mecánica de un gel de sílice al 2% v/v de concentración. Asumiendo que los cristales de proteínas crecen fracturando el gel, no podrían obtenerse cristales en geles a concentraciones iguales o superiores al 2%. Pero como veremos a lo largo de este capítulo los cristales de proteína se comportan de forma semejante a los cristales de calcita, esto es, no crecen rompiendo el gel que

<sup>i</sup> El módulo de Young para un cristal monoclinico de lisozima es  $\sim 5 \cdot 10^3 \text{ Kg/cm}^2$  ( $\sim 5 \cdot 10^9 \text{ dyn/cm}^2$ ) mientras que para cristales inorgánicos están dentro del rango  $10^5$ - $10^6 \text{ Kg/cm}^2$ .



los rodea, sino que son capaces de incorporarlo en la estructura del cristal, confirmándose esta observación tanto en geles de sílice como en geles de agarosa.

Esta afirmación implica la modificación de algunos conceptos y de la interpretación de los resultados. Por una parte los cristales crecen en un medio difusivo a lo largo de toda su historia puesto que no fracturan el gel durante su crecimiento. Por otra parte las características del cristal (calidad, propiedades mecánicas, ópticas, etc.) se modifican por la presencia del gel, obteniéndose materiales compuestos que participan de las características de ambos componentes.

### 5.2.1. INTERACCIÓN PROTEÍNA-GEL DE SÍLICE

Las interacciones de proteínas con una suspensión de partículas de sílice coloidal ocurren principalmente a través de puentes de hidrógenos entre los hidroxilos de los grupos  $-\text{SiOH}$  y átomos donores de electrones (oxígeno, nitrógeno, grupos ether y amida) en un rango de pH entre 2.0 y 6.0. Esta interacción provoca la precipitación de las proteínas y otras sustancias orgánicas al formar puentes de hidrógeno entre las partículas de sílice incluso en ausencia de sal [Iler, 1955].

Por encima de pH 7.0 la desprotonación de los grupos silanos se produce en extensión considerable y la superficie del gel aparece cargada negativamente. Si existen contraiones en el medio (NaCl, por ejemplo) dejan de apreciarse las interacciones entre las moléculas orgánicas y los hidroxilos de los grupos silanos, probablemente debido al impedimento estérico de los cationes de sodio hidratados ( $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6^+$ ) que se asocian a las cargas negativas [Iler, 1975].

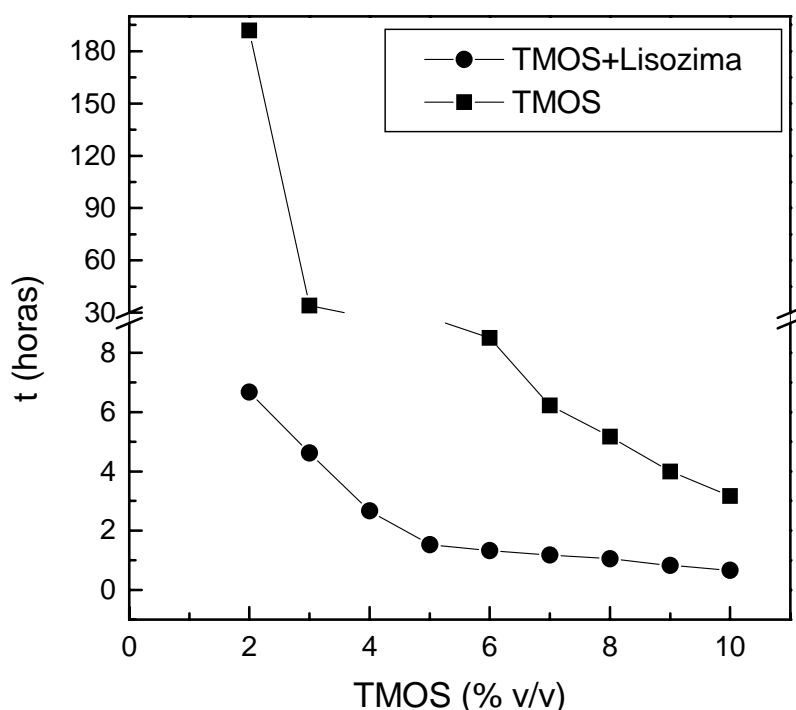
En las técnicas habitualmente empleadas en la cristalización de proteínas (*batch* y gota sentada o colgante) la solución de partida contiene cierta cantidad de sal, suficiente para provocar la precipitación de la proteína al añadir el sol de sílice. Por ello en la mayoría de los protocolos descritos en la bibliografía se opta por una preparación de las muestras en dos pasos; primero se polimeriza el gel y después se añade la proteína junto con la sal a una temperatura de subsaturación o se hacen difundir la sal y la proteína (o viceversa) en dos pasos secuenciales lo que incrementa mucho el tiempo de preparación [Ducruix y Giegé, 1999].

En nuestro caso se emplea un protocolo de mezcla directa “dos por” de volúmenes iguales de proteína y sol como se describe en el capítulo segundo. Esto implica la disolución de un volumen X, de proteína (50-250 mg/ml) con un volumen X de sol de TMOS (1-40% v/v). Con esta metodología sólo se observa la floculación del gel en experiencias realizadas con ferritina y apoferritina y nunca con thaumatina o lisozima en todo el rango de concentraciones de gel utilizado. Sin embargo, la mezcla de un sol preparado a partir de la neutralización de metasilicato de sodio con una solución de lisozima flocula a los pocos minutos, indicando que la presencia de sal en la mezcla inicial imposibilita la polimerización de la sílice [Vidal, 1998].

Thaumatina y lisozima son proteínas básicas que a los pH de trabajo 6.5 y 4.5 respectivamente, presentan una carga neta positiva, mientras que la ferritina y apoferritina presentan una carga neta negativa a pH 5.0, al que se lleva a cabo la cristalización, lo que descarta una posible interacción con los grupos sulfatos. Posteriormente se comprobó que tanto la ferritina como la apoferritina comercial (obtenida a partir de ferritina por eliminación del hierro), contienen

0.15 y 0.1M de NaCl respectivamente (añadido para evitar la agregación de la proteína). La concentración de sal en el sol final (0.45-0.3% p/v) es del orden de la cantidad de sodio que se introduce al preparar el gel a partir de metasilicato de sodio y puede explicar la precipitación observada.

La preparación de muestras de lisozima gelificada siguiendo el protocolo VI o por disolución directa de la proteína sobre el sol de TMOS (preparado sobre el tampón de trabajo) forma geles homogéneos y nítidos sin que se observen indicios de floculación, aunque con una fuerte reducción del tiempo de gelificación. Este efecto aumenta con la concentración de gel manteniendo la concentración de lisozima constante (100 mg/ml) (Fig.5.2-2).



**Fig.5.2-2** Dependencia del tiempo de gelificación con la concentración de gel para experiencias preparadas en medio tamponado (AcNa 50 mM, pH 4.5) con y sin lisozima a 100 mg/ml de concentración final.

En todos los casos el tiempo de gelificación fue siempre inferior en presencia de lisozima. Esta dependencia fue prácticamente lineal en dos tramos, de 2-4% y 5-10% con pendientes -2 y -0.17 respectivamente. A menor concentración de gel la influencia de la proteína sobre el tiempo de gelificación es mayor.

Es difícil explicar este efecto basándose en una interacción de la proteína con los monómeros parcialmente hidroxilados de sílice, ya que en tal caso se esperaría la floculación del gel. Por otra parte los grupos metilos que aún permanecen sin hidroxilar deben de impedir el acercamiento de las moléculas lisozima a los hidroxilos de la superficie, dándole tiempo a que estos

condensen. Según esto podemos pensar en las moléculas de proteína en términos de agente precipitante que inducen la polimerización de las partículas de gel. A altas concentraciones de gel la situación se complica. Por una parte la proteína actúa como agente precipitante, favoreciendo la interacción entre las partículas de sílice y por otra parte, al reducirse el volumen agua disponible, se disminuyen las distancias intermoleculares dificultando el encuentro y la condensación de los grupos hidroxilos.

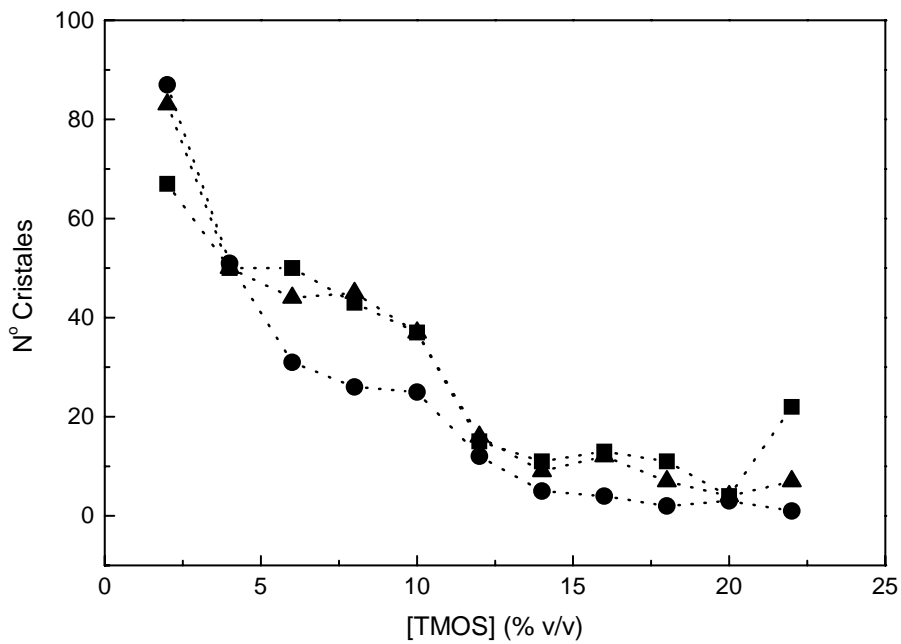
Aunque no se tienen evidencias, aplicando los mismos criterios expuestos en el capítulo segundo el aumento de la velocidad de polimerización dará como resultado un descenso del tamaño promedio de las partículas primarias generando un gel más denso compuesto de fibras de menor diámetro.

### 5.2.1.1 INFLUENCIA DEL GEL DE SÍLICE SOBRE LA DENSIDAD DE NUCLEACIÓN

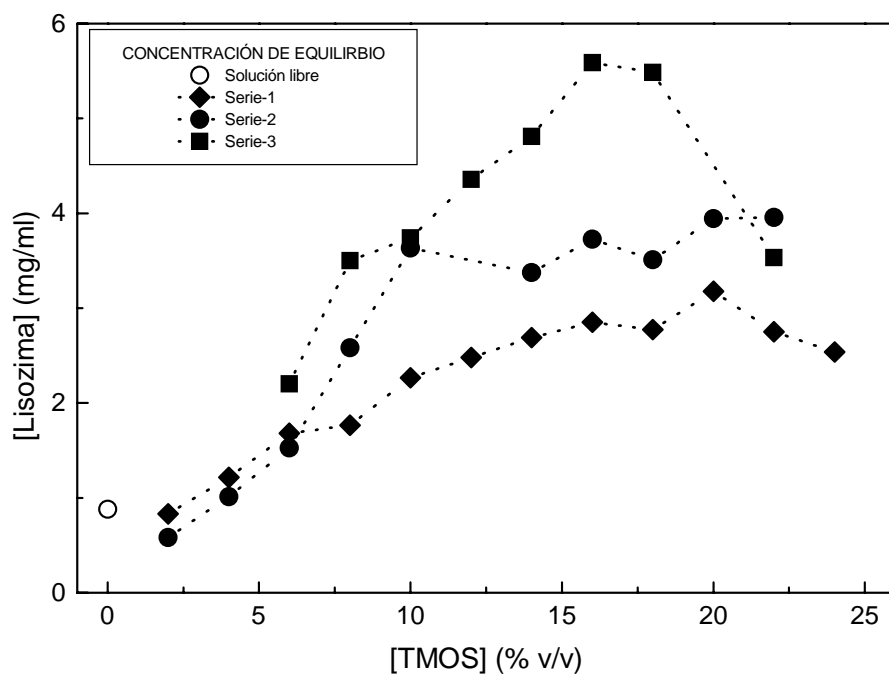
Una vez producida la condensación la superficie del gel se encuentra cubierta por grupos hidroxilos por lo que podemos asumir que las interacciones proteína-gel se producen a través de estos restos. Estas interacciones explicarían el efecto de reducción de la densidad de nucleación observado en experiencias realizadas en geles de sílice [Vidal, et al., 1998]. La interacción de la proteína con el gel provoca un descenso de la sobresaturación aparente que se refleja en un menor número de núcleos. El crecimiento de los núcleos retira proteína del medio provocando la desorción de la proteína de las paredes del gel y su incorporación a la solución que empapa los canales favoreciendo el crecimiento de los cristales.

Este efecto también se observa en experiencias llevadas a cabo en geles de sílice empleando la técnica de contradifusión. En este tipo de experiencias la densidad de nucleación es dependiente de la concentración de gel para las mismas condiciones iniciales de concentración de sal y proteína (Fig.5.2-3). El flujo de nucleación disminuye al aumentar la concentración de sílica sin una tendencia clara aunque con elevada reproducibilidad entre las tres series experimentales. En las tres la inhibición de la nucleación es del orden del 70% y presentan regiones de elevada pendiente, 1-6% y 10-14%, seguidas por dos regiones de influencia suave. Es posible que este comportamiento esté asociado a cambios en la estructura del gel, ya que la primera región coincide con el cambio de pendiente de los tiempos de polimerización.

El descenso de la densidad de nucleación está acompañado de un aumento de la concentración de la proteína en el equilibrio medida a partir de la solución en la cámara de sal (Fig.5.2-4). Este incremento de la concentración de equilibrio se puede explicar teniendo en cuenta que la polimerización de estos geles genera como subproducto metanol que aumenta la solubilidad de la proteína [Vidal, 1997]. Tomando 0.787 gr/cc como la densidad del metanol y teniendo en cuenta que se producen cuatro moles de metanol por mol de silicio, un aumento de la concentración de gel en un 1% v/v genera un 1.1% v/v de metanol que corresponde a un 0.55% v/v en el equilibrio.



**Fig.5.2-3** Número de cristales de lisozima en función de la concentración de gel sílice para tres series experimentales distintas.



**Fig.5.2-4** Concentración de equilibrio de lisozima en función de la concentración de gel para tres series experimentales distintas. El círculo vacío muestra la concentración de equilibrio de lisozima correspondiente a una concentración de sal de 9.5% p/v, equivalente a la esperada una vez alcanzado el equilibrio en las experiencias de contradifusión.

Por tanto la reducción del flujo de nucleación hay que explicarla tomando en cuenta ambos efectos, por una parte la interacción proteína gel y por otra parte el aumento de la solubilidad de la proteína al aumentar la concentración de metanol en el medio.

Para corroborar esta observación se realizan experiencias en *batch* y en contradifusión en geles de agarosa en las que el medio se contaminó con cantidades crecientes de metanol. Las experiencias en *batch* nos informarían del efecto del metanol sobre el flujo de nucleación, mientras que las experiencias realizadas en contradifusión, de interpretación no tan simple, nos permitirían evaluar la concentración de proteína en el equilibrio.

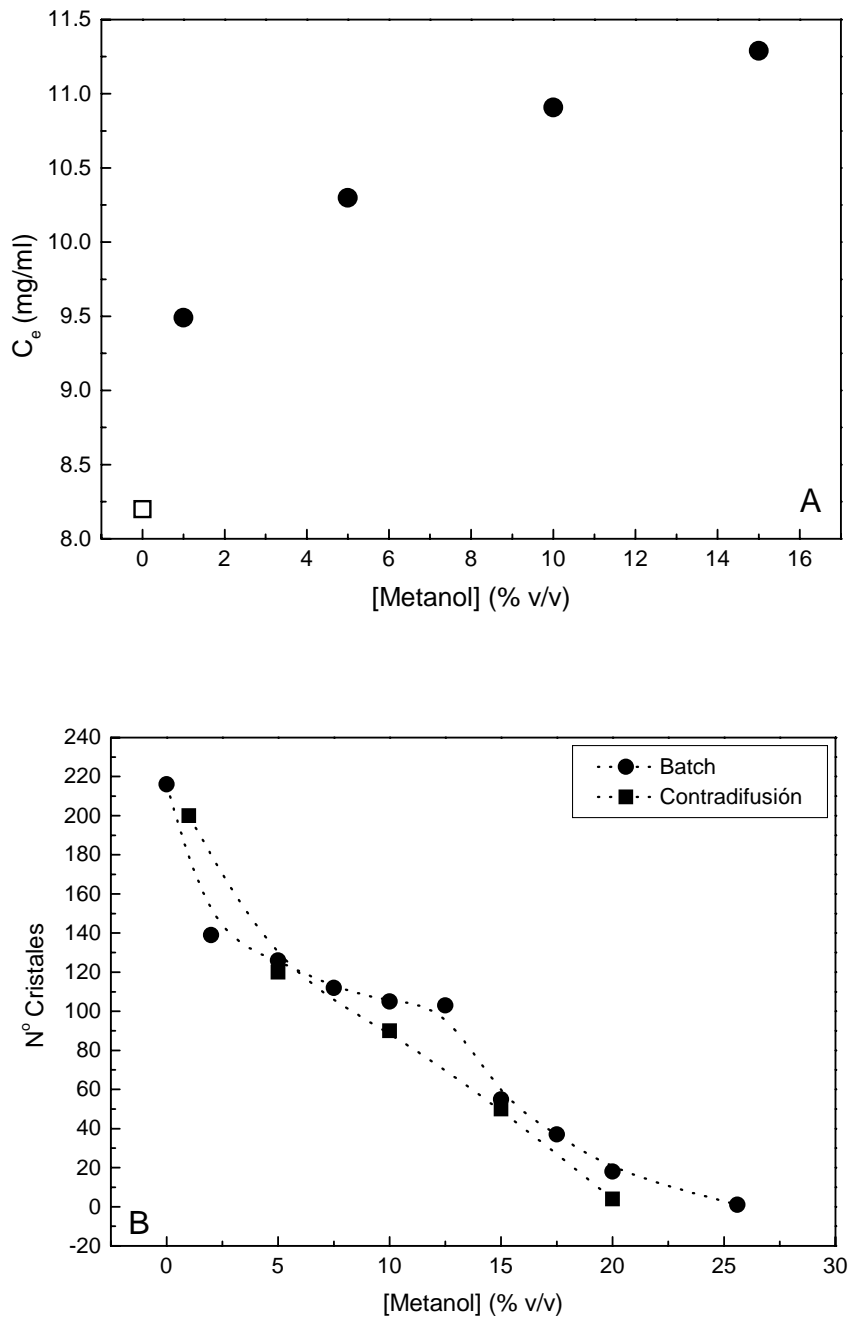
En las experiencias en *batch* se emplearon concentraciones constante de proteína, sal y gel de agarosa de 40 mg/ml, 3.5% p/v y 0.25% p/v respectivamente y cantidades crecientes de metanol. En contradifusión la cámara de proteína (45 mm) estaba compuesta de lizozima a 60 mg/ml en gel de agarosa 0.25%, el tampón físico fue agarosa 0.5% p/v preparado sobre el tampón de trabajo (5 mm) y la cámara de sal (45 mm) estaba compuesta por NaCl 8% p/v preparado sobre el tampón de trabajo y diferentes cantidades de metanol (grado HPLC) de forma que la concentración de equilibrio fuera la deseada. Las medidas de concentración de proteína se realizan sobre la solución de sal una vez alcanzado el equilibrio.

Experimentalmente se observa que la mezcla directa de proteína, sal, gel y 12.5% de metanol genera un leve precipitado blanquecido que se identifica como proteína desnaturizada por el brusco descenso del flujo de nucleación a partir de este punto.

En las experiencias con agarosa contaminadas con metanol, tanto en *batch* como en contradifusión la pauta nucleación y la concentración de equilibrio son similares a las obtenidas con geles de sílice (Fig.5.2-5) a pesar del efecto inductor de la nucleación de los geles de agarosa (apartado 5.3.). En ambos casos la densidad de nucleación cae bruscamente en la región de baja concentración de alcohol suavizándose en la región entre 2-12% para volver a caer bruscamente. La similitud del comportamiento indica que la presencia de metanol, en el caso de las experiencias en *batch*, no afecta significativamente a la estructura final del gel. Las inflexiones observadas son debidas a un aumento de la solubilidad inicial seguido de un efecto desnaturizante del alcohol. La reducción del flujo de nucleación a la máxima concentración de metanol representa un 100% frente al 70% observado en el caso de los geles de sílice, consecuencia directa de la precipitación total de la proteína. Estos resultados ponen definitivamente en duda la hipótesis de la interacción de la proteína con los grupos hidroxilos de las paredes del gel como único causante del descenso de la densidad de nucleación observado en las experiencias llevadas a cabo con lizozima.

Por otra parte en estudios realizados con mezclas de TMOS y su derivado MeTEOS (metiltrietoxisilano) se hace hincapié en el efecto de estos grupos hidrófobos sobre el aumento de la nucleación cuando la relación MeTEOS/TMOS es de 0.3. Este efecto disminuye al aumentar la concentración total de sílice lo que se explica como la consecuencia de una mayor compartimentación del gel. Sin embargo, durante este estudio no se tiene en cuenta que la cinética de polimerización de los monómeros de MeTEOS es mucho menor que la del gel de TMOS y que

estas diferencias afectan a la estructura final del gel como se deduce de los propios datos de SANS (Small Angle Neutron Scattering) en todo el rango del vector de difusión [Vidal et al., 1998].



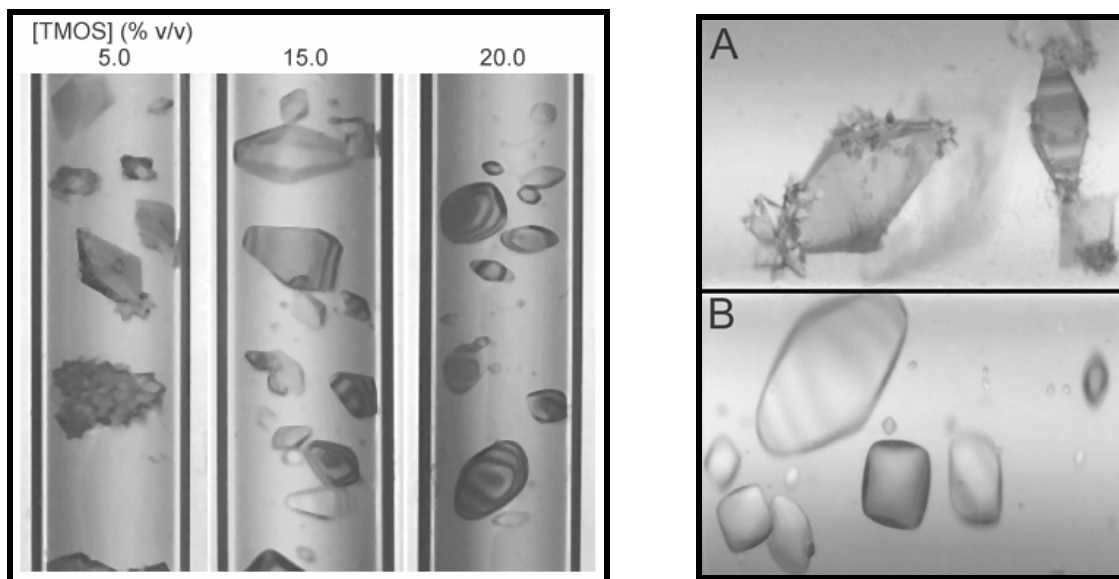
**Fig.5.2-5** A) Variación de la concentración de equilibrio de lisozima en función de la concentración de metanol final para experiencias realizadas en contradifusión en gel de agarosa 0.25% p/v y 3.8% p/v de concentración final de NaCl. El símbolo vacío representa la concentración de equilibrio de lisozima en solución libre de aditivos a la misma concentración de sal.

B) Flujo de nucleación en función de la concentración de metanol de las experiencias representadas en el gráfico A y para experiencias realizadas empleando el método batch con concentraciones de 60 mg/ml, 3.5% p/v y 2.5% p/v de lisozima, sal y agarosa respectivamente.

Paralelamente se realizaron experiencias de crecimiento de cristales de thaumatina en contradifusión en geles de sílice. Aunque el objetivo final de estas experiencias no fue la cuantificación del efecto del gel de sílice sobre la densidad de nucleación, los datos cualitativos obtenidos a partir de estos ensayos muestran como el gel de sílice no afecta apreciablemente a la densidad de nucleación.

Los ensayos se realizan en geles de TMOS a 2, 5, 10, 15 y 20% v/v de concentración final y 100 mg/ml de proteína. Como precipitante se usa tartrato de sodio-potasio 40% (p/v). Las experiencias se desarrollan en tubos de 4 mm de diámetro interno con una distribución de 42.5 mm para las cámaras de sal y proteína y 5 mm para el tampón físico (TMOS 4% v/v). Todas las soluciones se preparan en 100 mM de fosfato de sodio pH 6.5.

Como se observa en la figura 5.2-6 el aumento de la concentración de gel no modifica la densidad de nucleación de los cristales de thaumatina. Sobre la base de estos resultados podemos asegurar que la carga neta de la proteína no interviene en la interacción proteína-gel, ya que la thaumatina posee un punto isoeléctrico de 12.0 y por tanto su carga neta es positiva al pH 6.5. Asimismo tampoco observamos una influencia del cambio de constante dieléctrica provocado por el metanol.



**Fig.5.2-6** Evolución del flujo de nucleación de thaumatina para distintas concentraciones de gel de sílice (Ida.). A la derecha se muestran fotografías del efecto de una segunda nucleación sobre cristales de thaumatina crecidos en un 5% v/v de gel de sílice (A) en comparación con la ausencia de esta nucleación sobre los cristales redondeados crecidos en 20% de gel (B). Nótese en B la presencia de pequeños cristales procedentes de la segunda nucleación que han nucleado en el seno del gel.

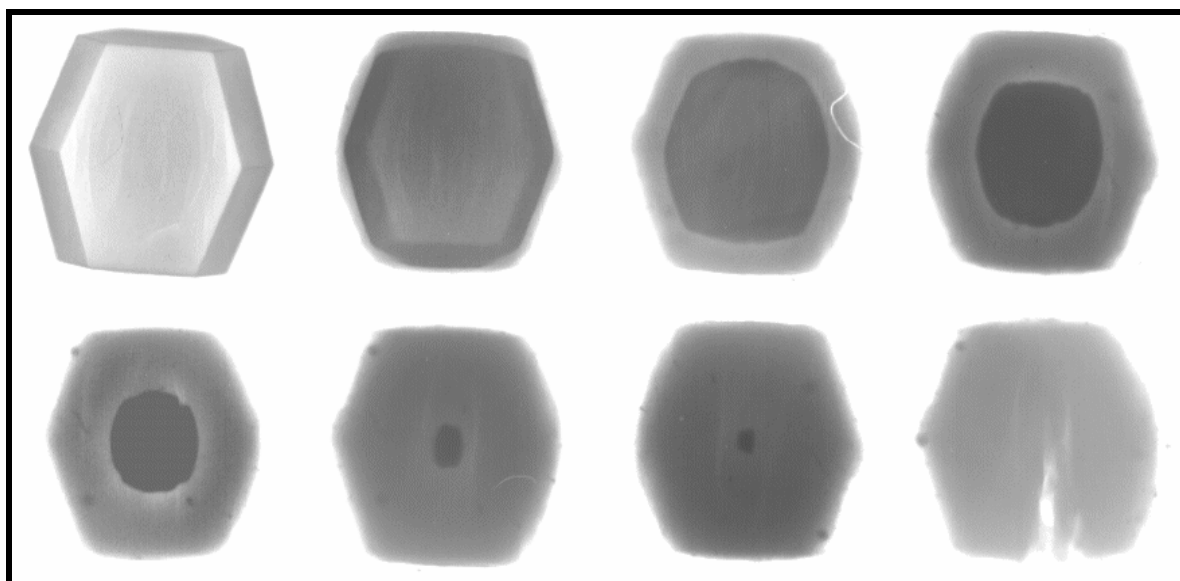
En los círculos de crecimiento cristalino es sabido, aunque no se ha publicado hasta la fecha, que durante la cristalización de proteínas como thaumatina o insulina se produce una segunda nucleación después de un tiempo de espera. Esta nucleación se suele producir sobre los vértices de las caras del cristal y con el tiempo pueden cubrir la superficie completa de la cara inutilizándolos para realizar estudios de difracción.

En las experiencias llevadas a cabo en geles de sílice la aparición de esta segunda nucleación ocurre con diez días de retraso respecto de la aparición de los primeros cristales, pero mientras que a concentraciones inferiores al 15% esta nucleación se produce sobre los vértices de los cristales que ya existentes (Fig.5.2-6.A), a concentraciones por encima del 15% la nucleación tiene lugar en el seno del gel sin afectar al resto de los cristales (Fig.5.2-6.B). La pérdida de las aristas que se produce durante el crecimiento de cristales en geles de elevada concentración inhibe la nucleación.

Admitiendo que la superficie de los cristales sobre la que se producen los fenómenos de nucleación secundaria-homogénea son superficies donde se acumulan defectos o tensiones superficiales que ayudan a la implantación de los nuevos núcleos, las superficies de los cristales de thaumatina sin aristas deben de estar libre de estos defectos.

### 5.2.1.2 INCORPORACIÓN DEL GEL DE SÍLICE EN LOS CRISTALES

La primera evidencia experimental de la presencia de gel en el interior de los cristales la encontramos al disolver un cristal de lisozima crecido en gel de sílice. Se toma un cristal de lisozima crecido en un 5% de TMOS y se le baja la sobresaturación hasta colocarnos en la región subsaturada. La paulatina disolución de la proteína deja ver una máscara de gel con la misma forma y tamaño del cristal original (Fig.5.2-7). Se realizan idénticas pruebas con cristales de lisozima, thaumatina y ferritina que han crecido en geles de sílice de distinta concentración; en todos los casos la disolución de la proteína deja ver un esqueleto de gel que mantiene la forma y volumen del cristal original. Asimismo se comprueba que la incorporación del gel no depende del protocolo de preparación ya que el esqueleto de gel se obtiene al disolver cristales de lisozima crecidos con el método 2x o cuando la proteína se añade por difusión.



*Fig.5.2-7 Imagen negativa de una secuencia de disolución de un cristal de lisozima ( $2.0 \times 2.1 \times 2.0 \text{ mm}^3$ ) crecido en un gel de TMOS 5% v/v. Obsérvese la fractura provocada sobre el gel en la última foto de la secuencia.*



Para realizar una primera estimación de la cantidad de gel incorporado se extraen varios cristales de lisozima crecidos en 10% de TMOS, se lavan levemente con solución de equilibrio y se dejan secar durante varios días a 45°C. Los cristales secos se pesan en una balanza Mettler M3 (precisión 1.0 µg.) y se lavan varias veces en agua ultra pura hasta eliminar por completo la sal y la proteína. El esqueleto de gel, se deposita sobre un crisol de aluminio previamente tarado, se deshidrata a 45°C durante un día y el residuo se pesa en la misma balanza sobre el crisol.

El porcentaje de residuo seco medido fue del 5.46% en peso referido al cristal seco. Este valor es cercano al valor teórico calculado (4.1% p/p de SiO<sub>2</sub>) teniendo en cuenta que la densidad del producto comercial es de 1.032 gr/cc y que la concentración final de gel es del 10% v/v. La diferencia del 1.17% es atribuible tanto al agua retenida físicamente (ver capítulo 2) como a los protones de los grupos hidroxilos no tomados en consideración. Este resultado apunta a una total incorporación de la malla de gel en la que crecen los cristales.

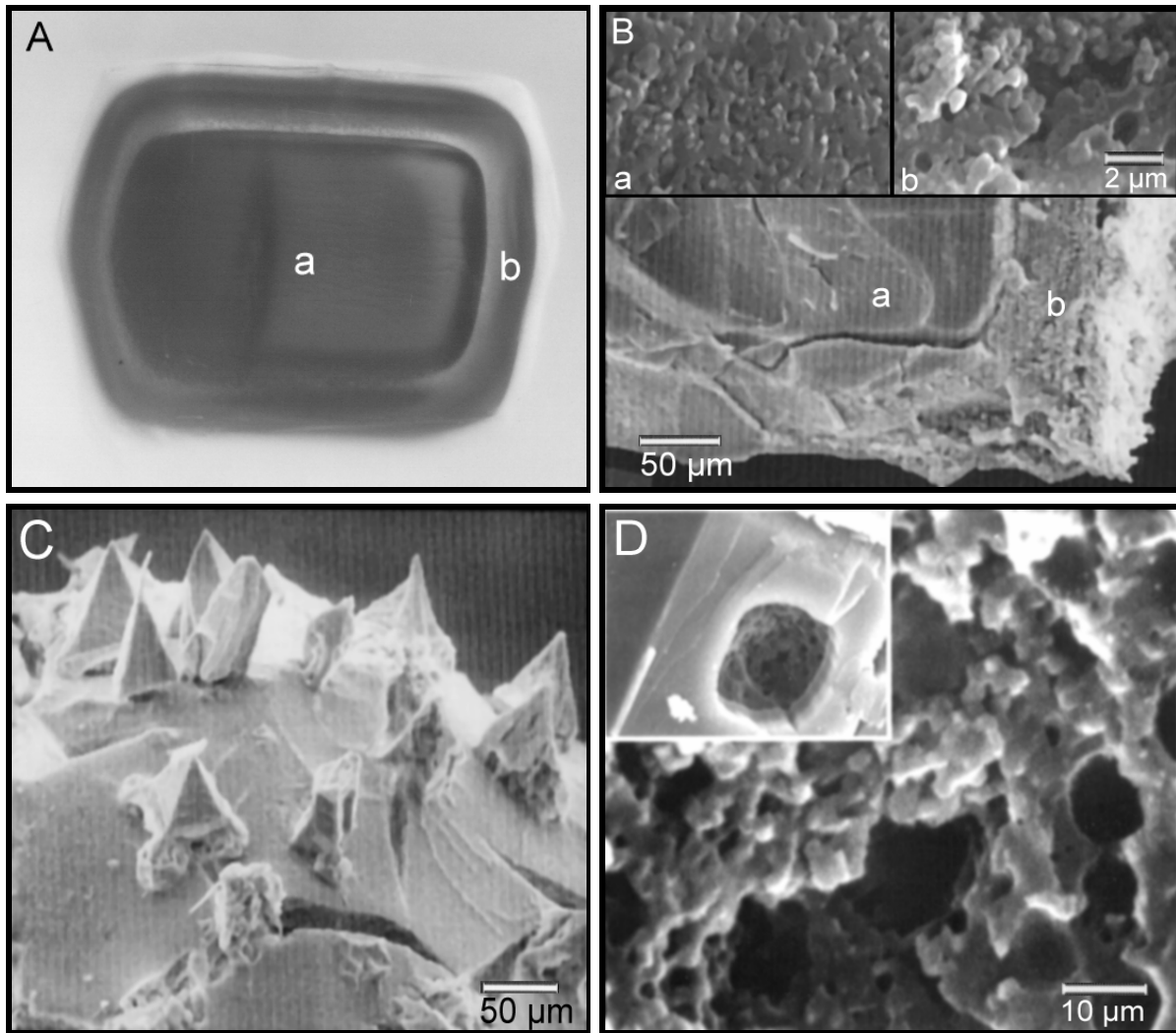
Con objeto de comprobar si las fibras de gel emergen de la superficie del cristal y de ser así, si presentan algún tipo de orden, se llevan a cabo diversos estudios de la superficie y fractura de cristales de lisozima empleando una potente técnica de análisis topográfico como es la microscopía electrónica de barrido (MEB).

De forma resumida podemos decir que la microscopía electrónica de barrido crea imágenes topográficas de superficie a partir de los electrones retrodispersados (electrones secundarios) por un elemento conductor. Por tanto el primer requerimiento es que nuestra muestra sea conductora o en su defecto hacerla conductora. Esto se consigue depositando sobre la muestra una fina capa (1-2 nm) de un elemento conductor (típicamente oro, platino o carbono). La dispersión de los átomos del conductor se realiza por deposición del metal en fase vapor de forma que se favorezca la formación de una película continua y homogénea que no oscurezca los detalles de la muestra al menos por encima del límite de resolución del instrumento. Para asegurar la homogeneidad de esta película conductora es necesario que el material esté completamente seco.

Para poder deshidratar los cristales de proteínas se ensayan distintos protocolos de deshidratación que aparecen en la bibliografía para el tratamiento de muestras biológicas [Moran y Carter, 1987].

- 1) Deshidratación por punto crítico (PC), basada en la eliminación del solvente por intercambio con CO<sub>2</sub> líquido y eliminación de éste por evaporación en su punto crítico (31.1°C). Para poder llevar a cabo un PC es necesario que el CO<sub>2</sub> sea miscible con el líquido que empapa la muestra, habitualmente se emplea acetona o metanol.

El intercambio de la solución de equilibrio por acetona es prácticamente imposible debido a que la sal es prácticamente insoluble y que la acetona es un fuerte desnaturante de proteínas. A pesar de esto se llevan a cabo varios intentos de estabilizar los cristales añadiendo cantidades crecientes de acetona. Durante los ensayos se observa que tras una rápida disolución, los cristales se estabiliza por la formación de una coraza de proteína desnaturada que se deposita sobre el gel creando una barrera física que protege el corazón del cristal (Fig.5.2-8.A). Estos cristales permanecen en este estado durante un largo periodo de tiempo (30 minutos) por los que decidimos realizar un punto crítico sobre con ellos.

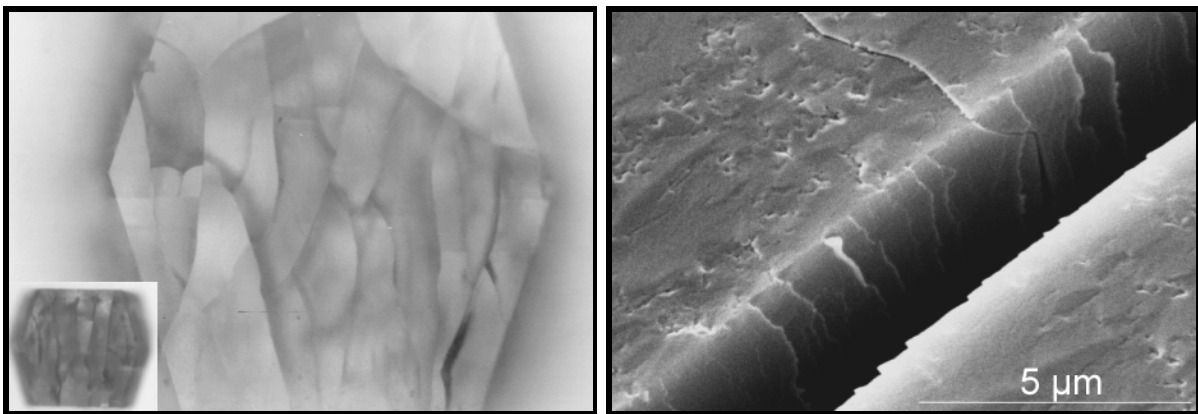


**Fig.5.2-8** Las fotos en la parte superior muestran el estado de disolución de un cristal de lisozima crecido en TMOS 4% v/v por adición de acetona antes (A) y después (B) de someterlos a deshidratación por PC. Las regiones de proteína cristalina y desnaturalizada se han marcado como a y b respectivamente. Durante la preparación de la muestras las regiones se separan dejando ver un grado diferente de compactación de la proteína. En la imagen C se observan los cristales de NaCl saliendo de la coraza de gel y proteína. Cuando uno de estos cristales se desprende se observa en el interior una estructura en forma de malla.

Tras la eliminación del solvente los cristales son metalizados y observados con SEM. En las imágenes se aprecian pequeños cristales piramidales de NaCl que muestran el parcial intercambio de solvente (Fig.5.2-8.C y D). El desprendimiento de estas pirámides cristalinas de NaCl permite comprobar que el interior del cristal de proteína está formado por un entramado tridimensional de gel de sílice. Un corte en dirección perpendicular a las caras (110) deja ver una superficie con dos regiones diferenciadas (Fig.5.2-8.B) que fácilmente se identifican con la coraza y el interior del cristal observados con el microscopio óptico (Fig.5.2-8.A). La región "a" corresponde al cristal aún sin disolver, mientras que la región "b" está formada por el gel de sílice y la proteína depositada sobre este. En ambas regiones se observa cierto grado de porosidad aunque no es posible distinguir fibras de gel aisladas. Los ensayos con metanol no dan mejores resultados.

- 2) Deshidratación por liofilización. Consiste en la eliminación del agua (en estado cristalino en este caso) por sublimación en vacío. La pérdida de calor durante la sublimación es suficiente para mantener la muestra congelada durante todo el proceso.

Aunque en principio es necesario partir de muestras previamente congeladas, liofilizamos durante 24 horas cristales congelados y cristales mantenidos a temperatura ambiente sin que observásemos diferencias aparentes. En ambos casos se obtienen cristales que presentan caras con un gran número de fisuras que dividen la superficie en regiones lisas en las que sólo se observa pequeños orificios (Fig.5.2-9). Con microscopía óptica y Nícoles cruzados se comprueba que estas regiones son perfectamente cristalinas.



**Fig.5.2-9** A la izquierda se muestra una fotografía de un cristal de lisozima crecido en gel de sílice (5% v/v). Después de liofilizarlo durante 24 horas el cristal aun refringe al observarlo con luz polarizada.. La imagen de MEB fue tomada con un instrumento Hitachi con voltaje de 6.0 kV (derecha).

Las micrografías electrónicas de estas superficies no aportan ninguna evidencia de la presencia de las fibras de gel.

- 3) Criofractura. En instrumentos de microscopía electrónica, SEM, equipados con unidad de frío (-195°C) (JEOL JSM840) es posible introducir una muestra congelada en N<sub>2</sub> líquido (-210°C), fracturarla y metalizarla en una cámara auxiliar a -150°C y posteriormente observarla en la cámara del MEB.

En ninguno de los ensayos realizados en este tipo de instrumentos se obtuvieron imágenes que aumentaran la información de la que ya disponíamos. Los cristales congelados no son frágiles y se comportan como un sólido elástico imposible de fracturar de forma limpia.

- 4) La técnica de secado en frío (Freeze-drying) consiste en la lenta sublimación en vacío de las moléculas de agua de una muestra previamente congelada a -160°C. Esta técnica se ha empleado con éxito en la deshidratación de cristales de proteínas [Durbin y Feher, 1990] y geles de agarosa [Medin, 1995] para su posterior observación en microscopía electrónica de barrido.

Puesto que la mayoría de los datos de microscopía se han obtenido a partir de muestras con este tipo de tratamiento, a continuación se detalla el protocolo de preparación.

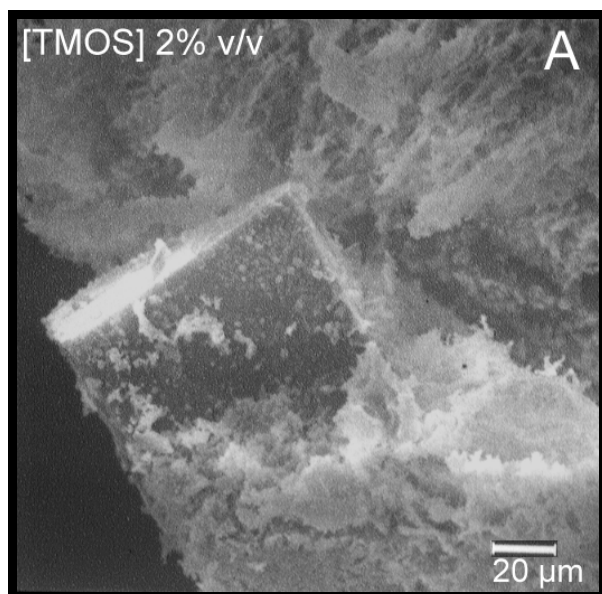
- a) Las muestras se extraen de los tubos de vidrio en los que han crecido presionando levemente con un bastoncillo protegido con algodón en el extremo.
- b) Cada cilindro de gel se secciona en fragmentos de 1 cm aproximadamente y tras lavarlos superficialmente con tampón acetato se depositaron en un portamuestras de aluminio de unos 6 cm de diámetro que es inmediatamente introducido en un baño de nitrógeno líquido (-160°C).
- c) El portamuestras es entonces transferido a la cámara de vacío a una temperatura de -80°C. Acto seguido se insufla argón gaseoso hasta observar un leve burbujeo sobre la muestra.
- d) A partir de este momento se somete la muestra a un vacío de  $10^{-6}$  atmósferas y se programa un aumento de temperatura desde -80°C a temperatura ambiente en 48 horas.

Las muestras deshidratadas presentan un aspecto esponjoso que en algunos casos colapsan dando lugar a un polvo blanquecino del que se pueden extraer los cristales. Ayudándonos de un microscopio óptico y un bisturí se fraccionan los cilindros de gel de 1 cm en piezas de menor tamaño. En las ocasiones en las que fue posible, los cristales se cortan y las caras de fractura se exponen al metalizado.

La manipulación del gel de sílice deshidratado es tediosa y hay que actuar con rapidez para no permitir que las muestras se hidraten de nuevo. A pesar de ello frecuentemente encontramos los típicos problemas de acumulación de carga estática sobre la muestra metalizada debido: por una parte a los pocos puntos de contactos con el portamuestras y por otra parte a que el metalizado no

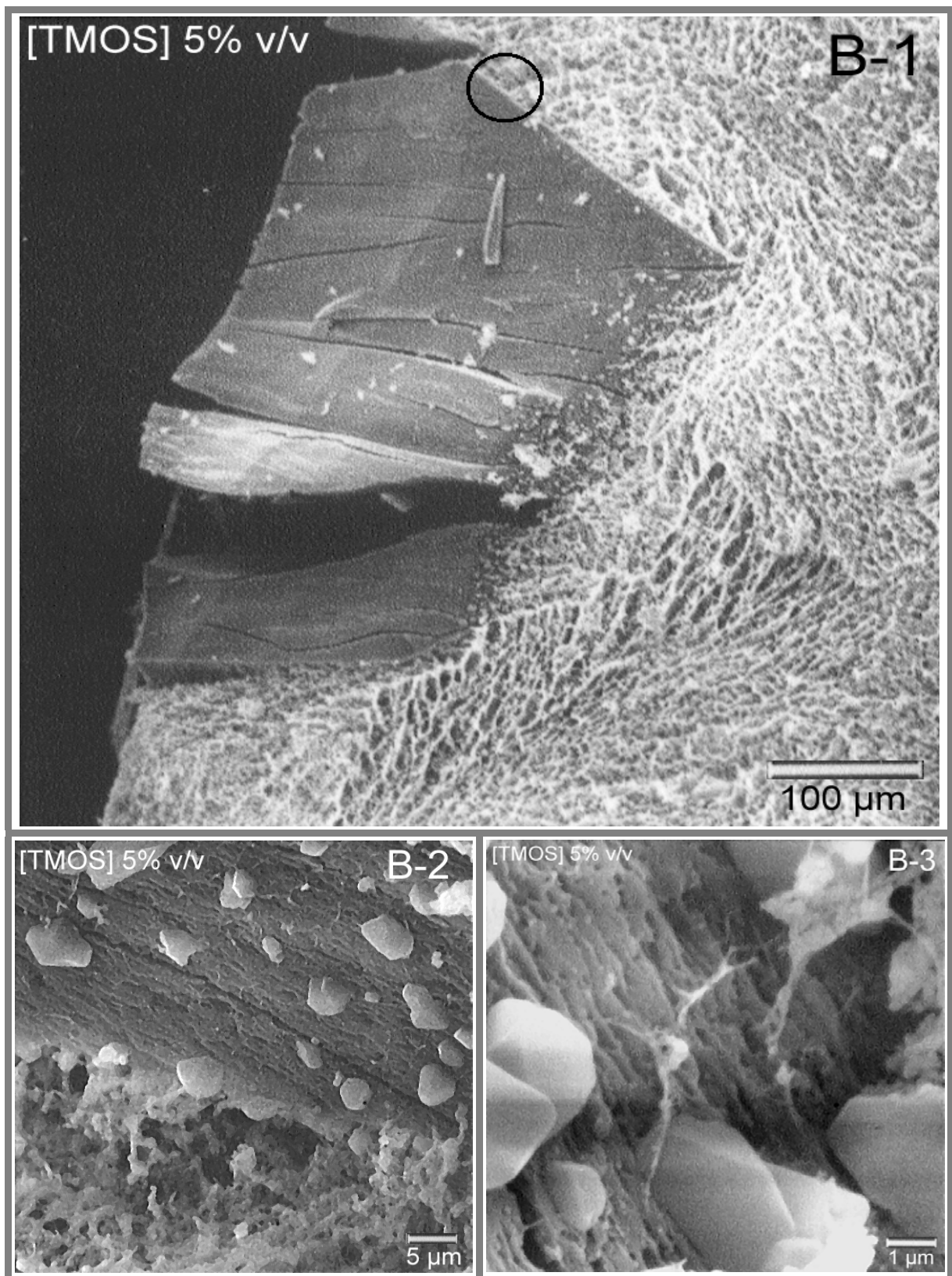
podía ser intenso (1 minuto) ya que colapsa la maya de fibras (Fig.5.2-10.A).

En la mayoría de los casos observamos continuidad entre los cristales y el gel que lo embebe. Esto demuestra que los cristales crecen sin fracturar el gel, al contrario de lo que ocurre en el caso de los cristales inorgánicos, y que por tanto el ambiente se mantiene difusivo durante el crecimiento del cristal (Fig.5.2-10 y 11). En ocasiones y debido a la manipulación de las muestras el gel se separa del cristal en el límite físico entre ambos, lo que permite observar las fibras de gel manando de la superficie del cristal (Fig.5.2-10.B-2, B-3 y C-2). Estas fibras son claramente de

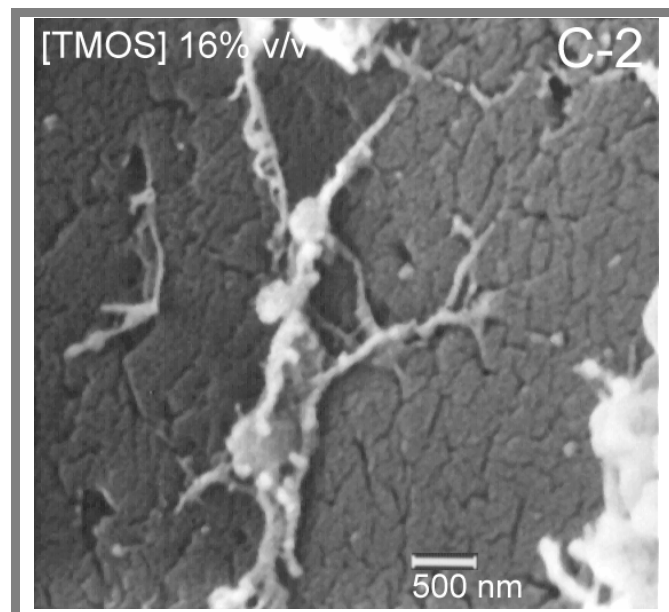
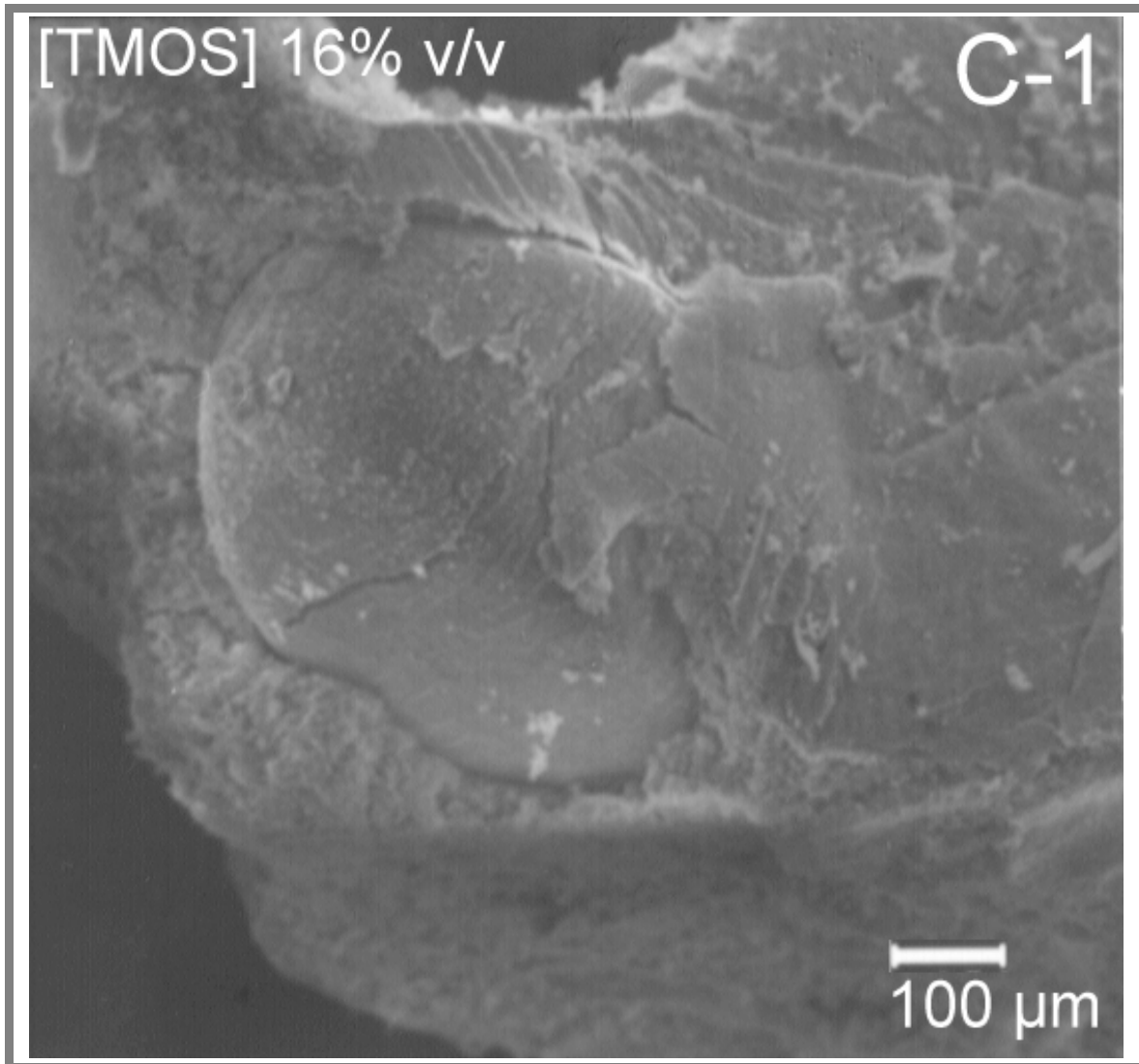


**Fig.5.2-10.A** Imagen de MEB de un cristal de lisozima crecidos en un 2% de TMOS.

menor grosor que el resto de la malla de gel que circunda el cristal posiblemente por que el colapso provocado por el tratamiento es menor. El mismo efecto ha podido ocurrir sobre las fibras en la superficie del cristal, ya que el diámetro de estas es de 100 nm aproximadamente unas 25 veces superior al tamaño de las partículas primarias de gel de sílice (ver capítulo 3).

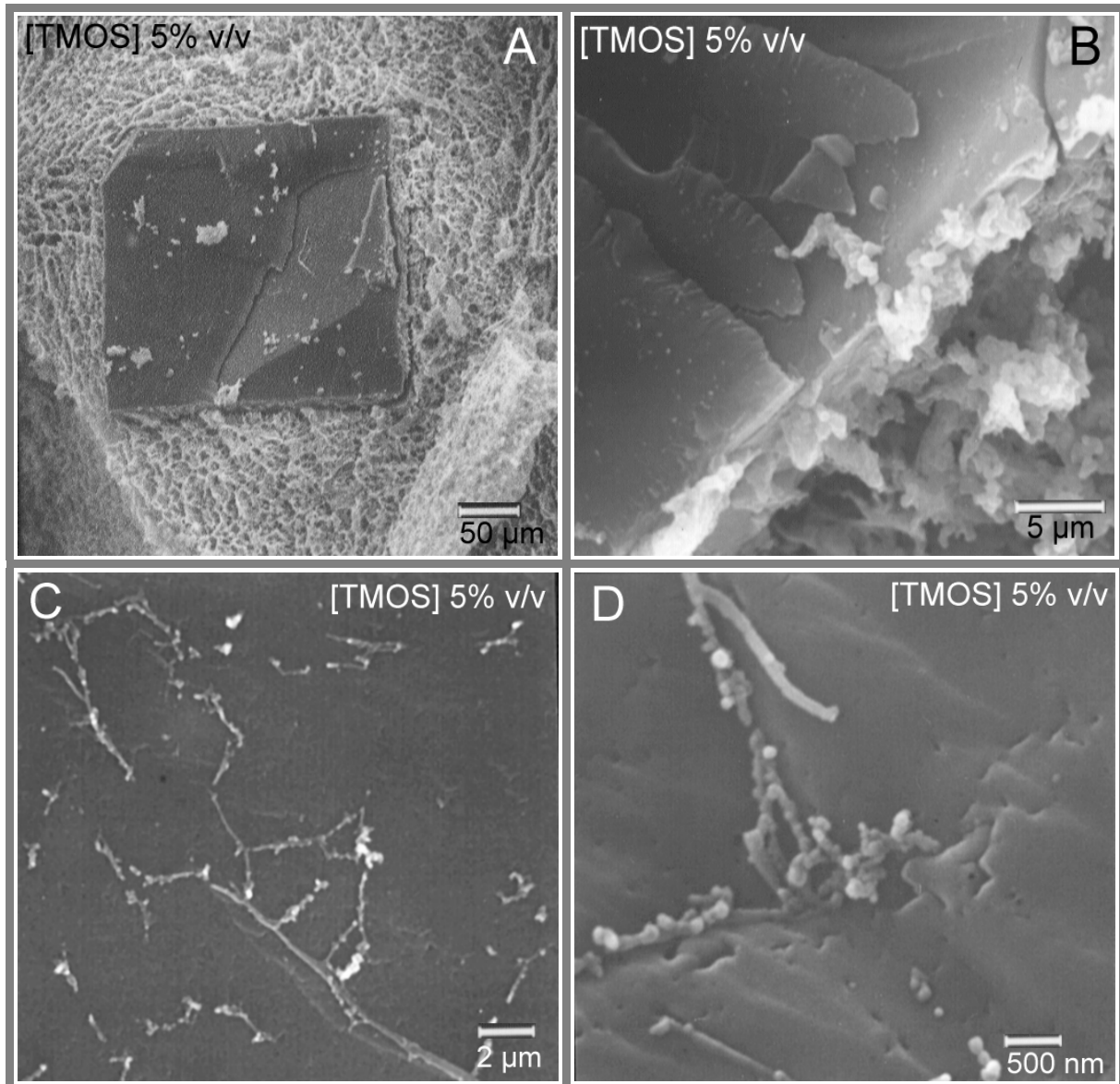


**Fig.5.2-10.B** Imágenes de MEB de un cristal de lisozima crecidos en 5% TMOS. Las imágenes B-2 y B-3 corresponden a la región de transición entre la cara del cristal y el gel de sílice señalada con un círculo en B-1. Los pequeños cristallitos de color blanco sobre la superficie de la cara son de NaCl.



En un corte perpendicular al eje c de un cristal crecido en un gel al 5% v/v observamos las fibras de gel esparcidas por todo el cristal (Fig.5.2-11). La densidad de fibras observadas sobre las caras del cristal es menor de la esperada cuando la comparamos con la densidad del gel que rodea el cristal. Esta pérdida es debida al enterramiento de las fibras cortadas a ras del cristal o por la pérdida de contraste producida por el recubrimiento de oro.

**Fig.5.2-10.C** Imágenes de MEB de un cristal de lisozima crecidos en 16% de TMOS. La imagen C-2 muestra un detalle ampliado de las fibras de sílice sobre la superficie del cristal elipsoidal en C-1.



**Fig.5.2-11** Aumento de magnificación secuencial sobre la superficie de un cristal de lisozima fraccionado en la dirección del eje *c* cristalográfico.

En muchos casos se ha observado la acumulación de cristales de cloruro sódico sobre las caras de los cristales. Sin embargo, no se aprecian indicios de estos en el interior de los cristales o su tamaño es inferior a la resolución instrumental.

### 5.2.2. CARACTERIZACIÓN TERMOGRAVIMÉTRICA

Una vez demostrada la presencia del gel en el interior de los cristales es necesario conocer en que extensión se lleva a cabo. Se emplea para ello la termogravimetría, una técnica que permite cuantificar la cantidad de residuos generados por una muestra que se descompone en el rango de temperatura 20-950°C.

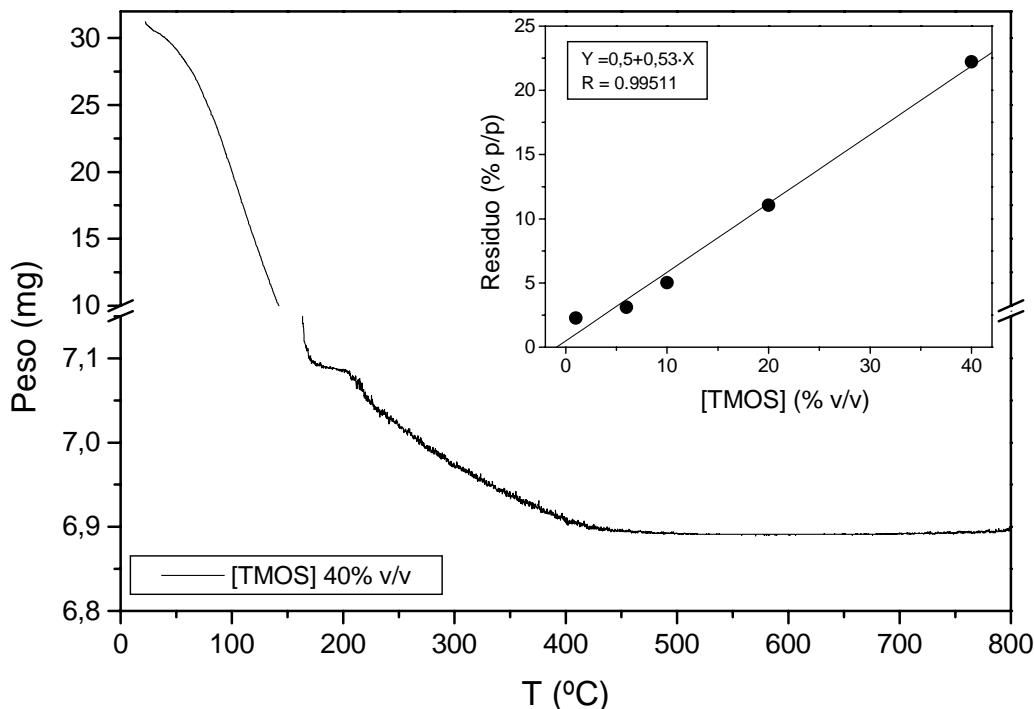
Teniendo en cuenta que la calcinación de muestras biológicas en corriente de aire no genera residuo cuando están libres de átomos metálicos, los residuos generados por la

descomposición de cristales de lisozima crecidos en geles de sílice sólo pueden provenir del propio gel o de las impurezas de las soluciones.

Este estudio se comienza cuantificando cada una de las posibles contribuciones por separado: gel, proteína y solución salina. Las experiencias se llevan a cabo empleando una balanza termogravimétrica Shimadzu TGA-50H equipada con un infrarrojo Nicolet Magna IR-550 acoplado a la salida de gases.

Para cuantificar la cantidad de residuo generado por el gel de sílice se toman geles de 6, 10, 20 y 40% v/v de concentración preparados sobre tampón acetato de sodio 50 mM y se calcinan llevando la temperatura del horno a 900°C (Fig.5.2-12).

Se comprueba como existe una relación lineal entre el porcentaje de residuo generado ( $R_C$ ) y la composición inicial del sol ( $R_C$  (% p/p) =  $0.5 \pm 0.6 + 0.53 \pm 0.03 \times [\text{TMOS}]$ ,  $r = 0.9998$ ). A partir de los datos de densidad de la muestra comercial podemos establecer que un aumento de la concentración inicial del sol en un 1% v/v se corresponde con un aumento de la masa del residuo del 0.4% p/p. La diferencia entre el valor teórico y el experimental es de 0.13% p/p. Esta variación puede ser debida a errores experimentales o a la asunción de que todo el residuo se encontrará en forma de  $\text{SiO}_2$ .

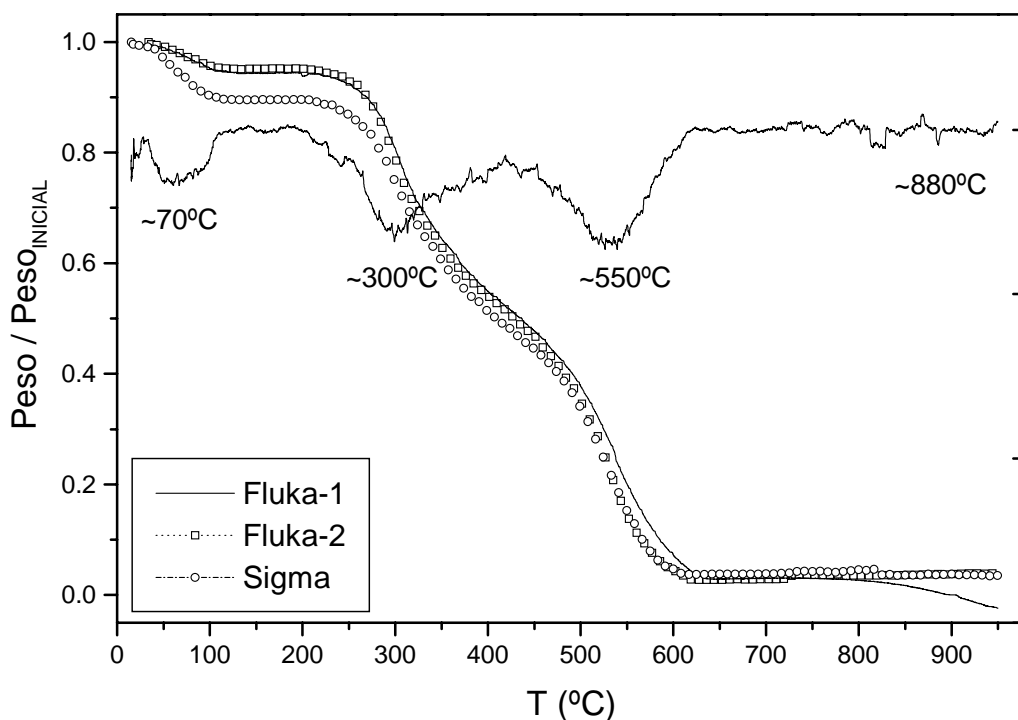


**Fig.5.2-12** Termograma de un gel de sílice preparado a partir de un sol de TMOS 40% v/v. En la gráfica insertada hemos representado el porcentaje de residuo en función de la composición inicial del sol. La línea continua representa el ajuste de los datos a la ecuación de una recta.



Por otra parte el comportamiento de la muestra durante la deshidratación fue similar al descrito por otros autores (ver capítulo 3) en el que aparecen dos pérdidas que ocurren entre 23 y 200°C la primera, que corresponde a agua de hidratación y una segunda pérdida a partir de 200°C que corresponde a agua unida por puentes de hidrógeno y agua unida químicamente.

Para estudiar las pérdidas que genera la proteína empleamos muestras procedentes de dos casas comerciales, Fluka y Sigma. En ambos casos se observaron tres pérdidas comunes mientras que en la muestra fluka-1 se observó una nueva pérdida a 850°C (Fig.5.2-13, tabla 5.2-2). Este comportamiento puede ser debido a que se produzcan reacciones fuertemente exotérmicas que enmascaran la pérdida de peso, por oxidación de metales presentes en la muestra, o cuando las pérdidas están afectadas por las cinéticas de reacción. En el primer caso, la inercia del instrumento no es capaz de recuperar el peso real y se elimina el valor del peso del residuo. Esto ocurre con la muestra Por otra parte la muestra fluka-1 que no genera residuos al contrario de lo que cabría esperar ya que la purificación de lisozima implica la precipitación de la proteína empleando sales (ver apéndice I). Sin embargo, como se verá posteriormente es posible detectar pérdidas a 850°C en los cristales de lisozima crecidos en gel sílice. Estos resultados, ambiguos en cierta medida, no modifican la interpretación de los resultados ni las conclusiones que de ellos se derivan.



**Fig.5.2-13** Termogramas de muestras comerciales de lisozima liofilizada donde se recogen las pérdidas de peso en función de la temperatura del horno. La grafica superpuesta corresponde a la derivada del termograma, sobre la que se asigna las temperaturas características de cada una de las pérdidas. Obsérvese que la pérdida a 700°C sólo aparece en la muestra fluka-1.

Tomando la primera pérdida (0-100°C) como la cantidad de agua total asociada a la proteína se calcula la hidratación asociada a cada muestra. A partir de estos datos se obtiene que las moléculas de agua por molécula de proteína son 46, 37 y 96 para fluka-1, 2 y sigma respectivamente en buen acuerdo con el valor que aparece en la bibliografía (36 mol H<sub>2</sub>O/mol proteína) [Bone y Pethig, 1982].

PÉRDIDA	FLUKA-1 (% p/p)	FLUKA-2 (% p/p)	SIGMA (% p/p)	TEMPERATURA
1 <sup>a</sup>	5.52	4.37	10.34	70
2 <sup>a</sup>	33.78	39.12	39.10	300
3 <sup>a</sup>	57.48	53.27	46.69	550
4 <sup>a</sup>	5.41	-	-	880
RESIDUO	0.00	3.24	3.88	-
RESIDUO <sub>C</sub>	-	3.39	4.32	

**Tabla 5.2-2** Porcentaje de pérdida de peso respecto del peso inicial de la muestra y temperatura característica asociada a cada una de las pérdidas. El residuo<sub>C</sub> corresponde al porcentaje de residuo respecto de la masa seca (eliminando la primera pérdida).

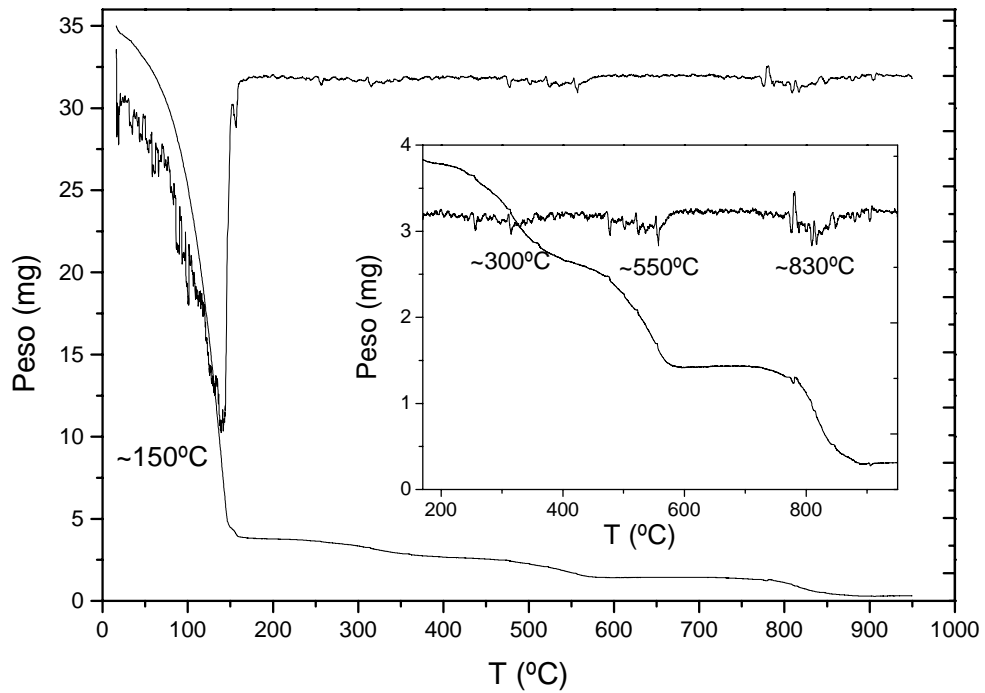
Una forma de clarificar si los resultados obtenidos a partir de las muestras liofilizadas están afectados de error es realizar el termograma de cristales de lisozima obtenidos por el método *batch* y emplear estos como blancos del análisis. Para ello se crecen cristales de lisozima (Sigma) en una solución sobresaturada con NaCl 3% p/v en 50 mM de acetato sódico pH 4.5. Se realizan dos termogramas: uno con cristales recién extraídos de la solución (Fig. 5.2-14) y el segundo con cristales que se han dejado secar durante un día (Fig. 5.2-15). Las muestras que se iban a dejar un día en espera se secaron superficialmente con un bastoncillo de papel. En ambos casos los residuos corregidos respecto de la masa de cristal eliminada la contribución del agua de hidratación son similares con una dispersión del 0.5% (Tablas 5.2-3 y 4).

Pérdida	% p/p	T (°C)
1 <sup>a</sup>	89.09	20-170
2 <sup>a</sup>	3.33	190-400
3 <sup>a</sup>	3.37	400-650
4 <sup>a</sup>	3.21	720-910
R	0.95	-
R <sub>C</sub>	<b>9.30</b>	

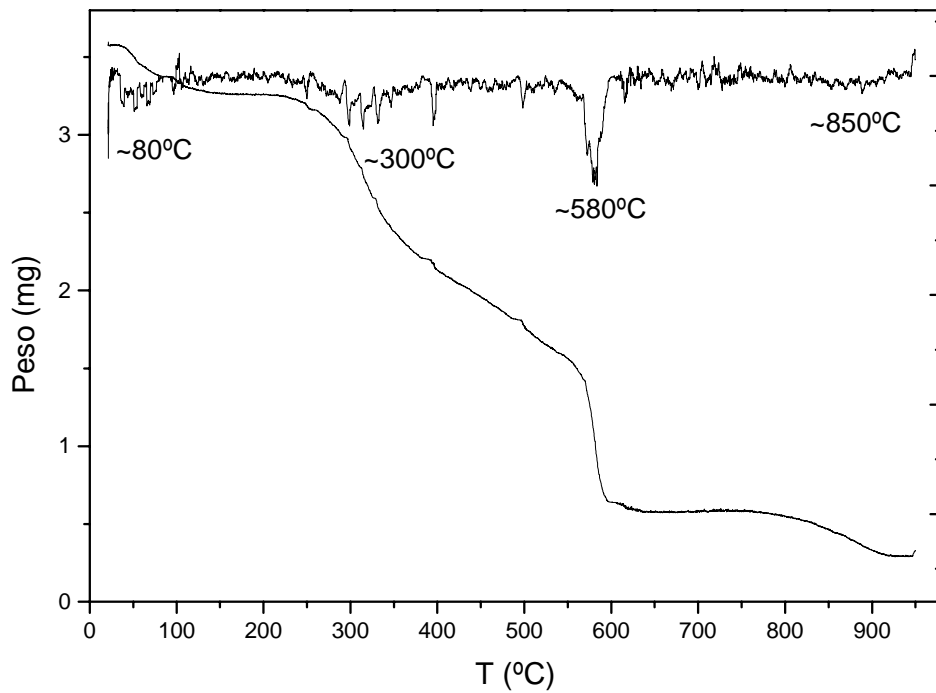
**Tabla 5.2-3** Datos obtenidos a partir del termograma y su derivada (Fig.5.2-14) de cristales recién extraídos de la solución de equilibrio.

Pérdida	% p/p	T (°C)
1 <sup>a</sup>	8.98	21-150
2 <sup>a</sup>	32.28	200-400
3 <sup>a</sup>	42.35	400-650
4 <sup>a</sup>	7.94	740-920
R	8.51	-
R <sub>C</sub>	<b>8.34</b>	

**Tabla 5.2-4** Datos obtenidos a partir del termograma y su derivada (Fig.5.2.15) de cristales de un día.



**Fig.5.2-14** Termograma y derivada del termograma de cristales de lisozima crecidos en solución por el método batch recién extraídos de la solución. La gráfica insertada es una ampliación de la región 200-950°C.



**Fig.5.2-15.** Termograma y derivada de cristales de lisozima crecidos por el método batch realizado un día después de extraerlos de la solución de crecimiento.

Para identificar cada una de las pérdidas se emplea un instrumento infrarrojo conectado a la salida de gases del horno impulsado por corriente de aire. A partir de los diagramas se obtiene que: 1) el desprendimiento de agua se produce de forma continua durante toda la experiencia, 2) la descomposición de la proteína no comienza hasta los 200 grados centígrados momento en el que aparecen los picos característicos de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Entre otros gases se identifican monóxido de carbono (CO), amonio ( $\text{NH}_3$ ), ácido isociánico (CNOH), sulfocianuro (SCNH) y óxido nítrico ( $\text{NO}_2$ ) todos procedentes de la descomposición de la proteína. Aunque este tipo de análisis se llevo a cabo para cristales de lisozima crecidos en geles de sílice la información que se obtiene no difiere de la expuesta.

Una vez estimadas por separado las posibles contribuciones a la cantidad de residuo total se llevan a cabo los ensayos termogravimétricos sobre cristales de lisozima crecidos en geles de sílice a distinta concentración.

Los cristales se crecen por contradifusión en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno según se describe al inicio de este capítulo. Los ensayos se realizan con lisozima de las casas comerciales Fluka (Serie-1) y Sigma (Serie 2 y 3). Antes de extraer los cristales de los tubos de vidrio se recupera la solución de equilibrio y sobre esta se extraen los cristales que se limpian de restos de gel ayudados de un fino pincel.

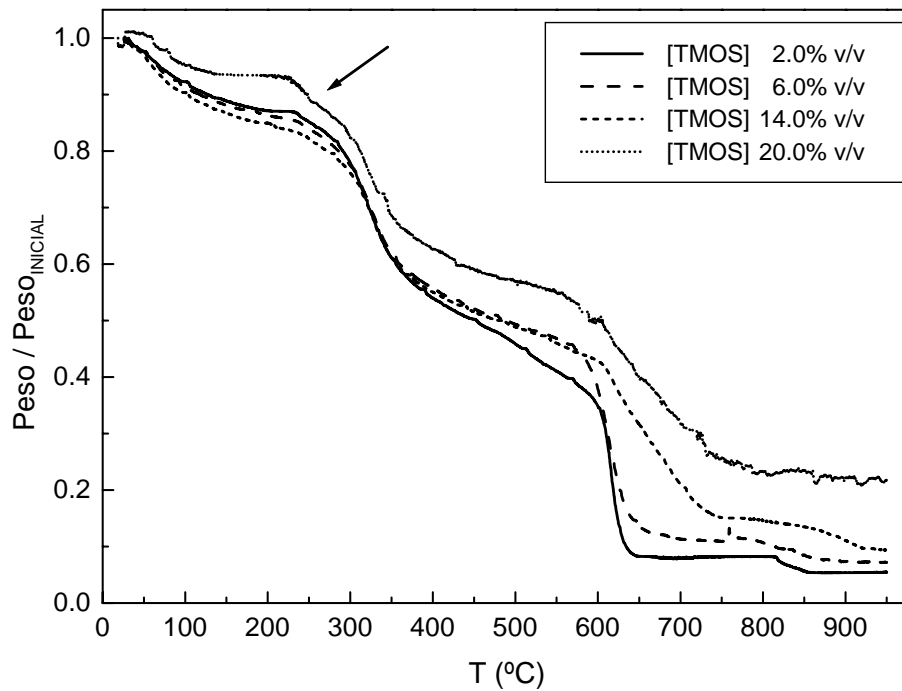
Los primeros ensayos se realizan con cristales que se han extraído de la solución tres días antes de realizar las experiencias. Los cristales se mantienen a temperatura ambiente con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua de humedad (Serie 1ª) (Fig.5.2-16).

A partir de los termogramas de cada una de las muestras se obtiene la cantidad de residuo generado ( $R_C$ ) expresado en porcentaje en peso respecto de la muestra seca (peso inicial – primera pérdida). La representación de esta cantidad en función de la concentración de gel inicial muestra una dependencia lineal en la región comprendida el 3.0 y el 10.0% v/v que se ajusta a la ecuación:  $R_C(\% \text{ p/p}) = 8.2 \pm 0.2 + 0.47 \pm 0.04 \cdot [\text{TMOS}]$  ( $R=0.988$ ) (Fig.5.2-17).

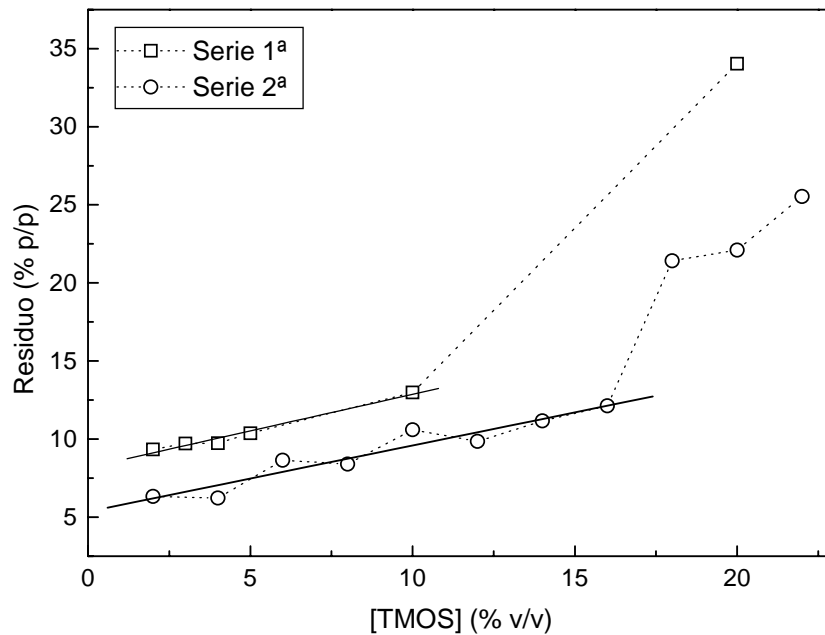
Para la segunda serie los cristales se extraen un día antes de realizar la experiencia (Serie 2ª). Al igual que en la serie anterior la variación de la cantidad de residuo con la concentración de gel se ajusta a una recta de ecuación:  $R_C(\% \text{ p/p}) = 5.4 \pm 0.5 + 0.42 \pm 0.05 \cdot [\text{TMOS}]$  ( $R=0.957$ ) en el rango de concentraciones 2.0-16.0% v/v (Fig.5.2-17).

En ambos casos el porcentaje de residuo seco por porcentaje de TMOS coincide con el valor teórico (0.4), dentro del error de la determinación. La desviación por encima del 16% son debidas al error cometido durante la limpieza de los cristales que son de tamaño muy reducido cuando se supera esta concentración de sílice.

Estos resultados demuestran que los cristales de lisozima incorporan durante su crecimiento la totalidad del gel que los rodea independientemente de la concentración inicial de la muestra y del tamaño de los cristales, confirmando los resultados obtenidos a partir de la disolución de cristales y de microscopía electrónica.



**Fig.5.2-16** La gráfica muestra los termogramas normalizados de cristales de lisozima crecidos en geles de sílice de distinta concentración extraídos un día antes de realizar los termogramas. La flecha en el termograma al 20% (v/v) de gel muestra que la pérdida de agua transcurre en dos etapas.



**Fig.5.2-17** Porcentaje de residuo en peso respecto de la masa inicial de cristales de lisozima crecidos a distintas concentraciones de gel de sílice para dos series experimentales. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos a la ecuación de una recta.

Durante la realización de los termogramas de la segunda serie se observa que la cantidad de agua eliminada durante el calentamiento es superior a la eliminada por los cristales de la primera serie posiblemente debido al carácter higroscópico de los geles de sílice.

Para estudiar el efecto del carácter higroscópico de los geles de sílice sobre la deshidratación de los cristales de lisozima se diseña una nueva tanda de experimentos. A partir de los resultados obtenidos en los termogramas de los cristales de lisozima y de los geles en solitario se establece un programa de calentamiento que nos permita resolver en aquellas regiones en las que se espera observar las distintas pérdidas de agua (Tabla 5.2-5).

V calentamiento (grd/min)	T <sub>maxima</sub> (°C)	t (minutos)
3.0	33	-
0.5	35	40
5.0	200	10
20	800	-

**Tabla 5.2-5** Secuencia de calentamiento del horno en la última serie (Serie 3) de experiencias termogravimétricas.

Se establece un protocolo de desarrollo para realizar las experiencias de forma reproducible. Antes de cada experiencia se calibra y ajusta el flujo de aire a  $80 \pm 5$  ml/min y a continuación se sigue la siguiente secuencia:

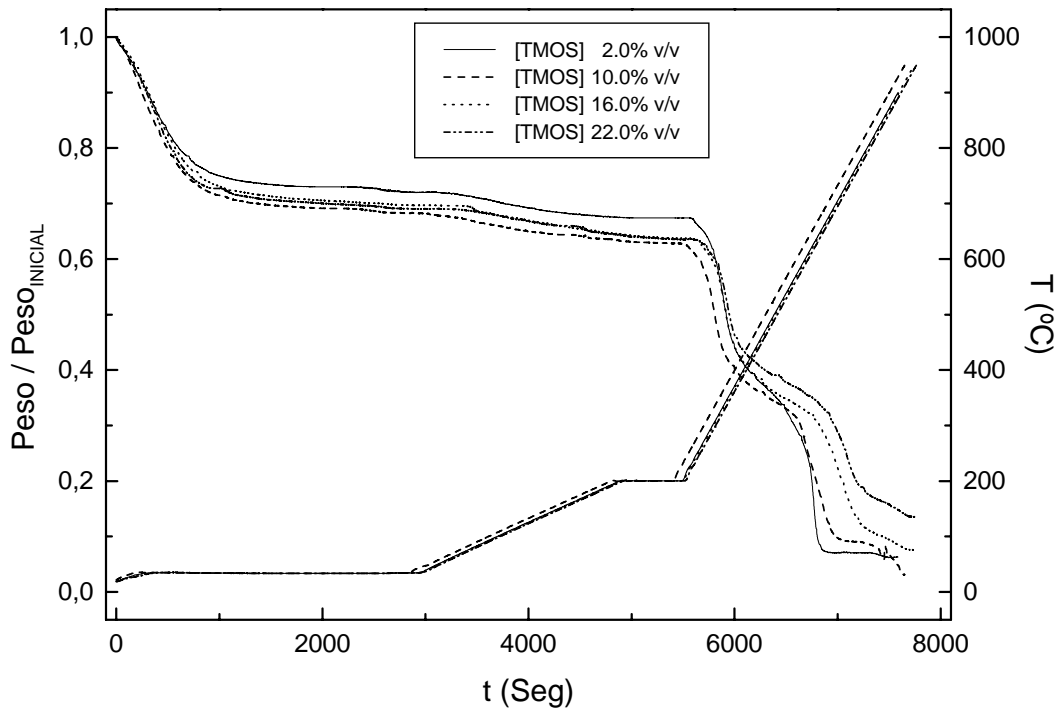
- 1) se baja la camisa del horno cuando la temperatura marca 25°C,
- 2) se extraen los cristales de la solución y se secan cuidadosamente,
- 3) se espera a que estos se equilibren en la termobalanza (inferior a 1 minuto),
- 4) se sube el horno y se comienza la rampa de calentamiento cuando este alcanza los 18°C.

En todos los ensayos se mantiene la pesada inicial de la muestra en el rango  $7.0 \pm 1.5$  mg (entre cinco y siete cristales).

En la figura 5.2-18 se han representado las pérdidas de peso y las rampas de temperaturas de temperatura en función del tiempo. Sin embargo la representación de la derivada del peso con la temperatura en función de la temperatura es más útil a la hora de detectar los puntos de inflexión en los termogramas originales (Fig.5.2-19). La primera observación que llama la atención es que se observan 5 pérdidas, una más que en las series uno y dos y que ésta nueva pérdida se encuentra entre los 100 y 200°C.

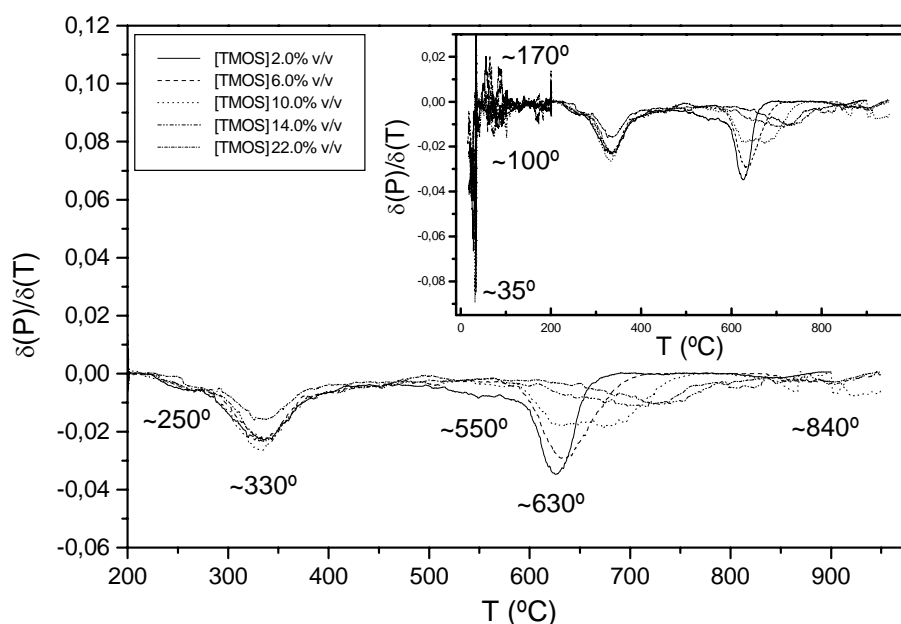
En un análisis más detallado se observa como las pérdidas de agua entre 18°C y 200°C se producen de forma escalonada con inflexiones claras no debidas a fluctuaciones térmicas a 30, 100 y 170°C en todos los termogramas. Las pérdidas a 30 y 100°C representan agua unida por fuerzas de dispersión física que corresponde a la solución que se encuentran rellenando los canales de la proteína. Su eliminación se facilita cuando la muestra alcanza los 100°C. Por encima de 100°C y hasta 200°C el agua que se pierde está unida por puentes de hidrógeno a la superficie del gel o a la

proteína. A concentraciones de TMOS superiores al 8.0% v/v esta pérdida es más evidente por lo que probablemente la mayor parte proceda del gel. Esta pérdida se observa habitualmente por encima de 200°C en geles de sílice. El descenso de esta temperatura se explica por el impedimento que puede suponer la proteína a la hora de que se establezcan las sucesivas capas de hidratación (ver capítulo 3).



**Fig.5.2-18** Pérdidas de pesos normalizadas y rampas térmicas programadas en función del tiempo de experiencias termogravimétricas llevados a cabo con cristales de lisozima crecidos en geles de sílice de distinta concentración inicial.

A 250°C se observa la aparición de un hombro que solapa con el comienzo de descomposición de la proteína (Fig.5.2-19). No es fácil identificar esta pérdida aunque es muy probable que este ligada a la proteína ya que el área cubierta se mantiene proporcional al área de la siguiente pérdida (300°C). Puesto que no esta incluida de forma cooperativa en la pérdida a 300°C podemos suponer que es agua íntimamente unida a la proteína desprendida al perder esta su configuración. Entre 300 y 600°C la proteína se descompone en sucesivas pérdidas. Por último, el pico a 630°C se desplaza hacia regiones de mayor temperatura al aumentar la concentración de gel debido al aumento de los impedimentos de tipo estéricos que dificultan la descomposición y eliminación de los gases (Fig.5.2-19).



**Fig.5.2-19** En las gráficas se han representado la derivada del peso respecto de la temperatura en función de la temperatura en el rango 200-950°C. La gráfica insertada muestra el rango completo de temperaturas.

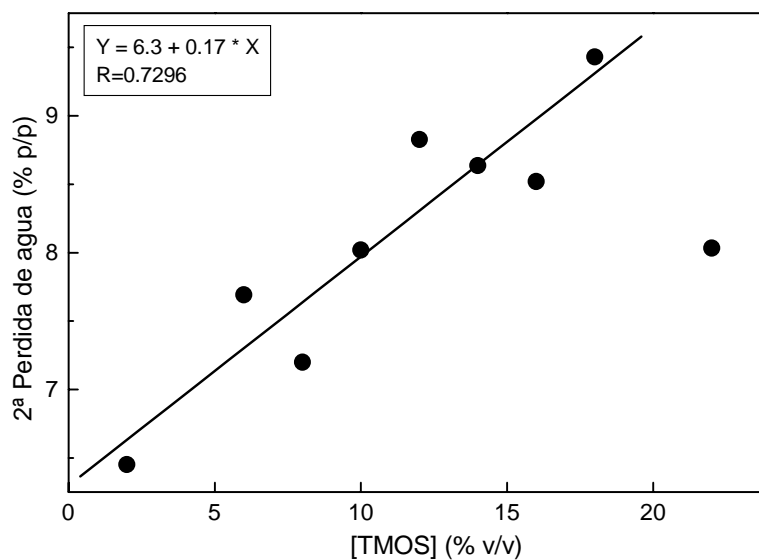
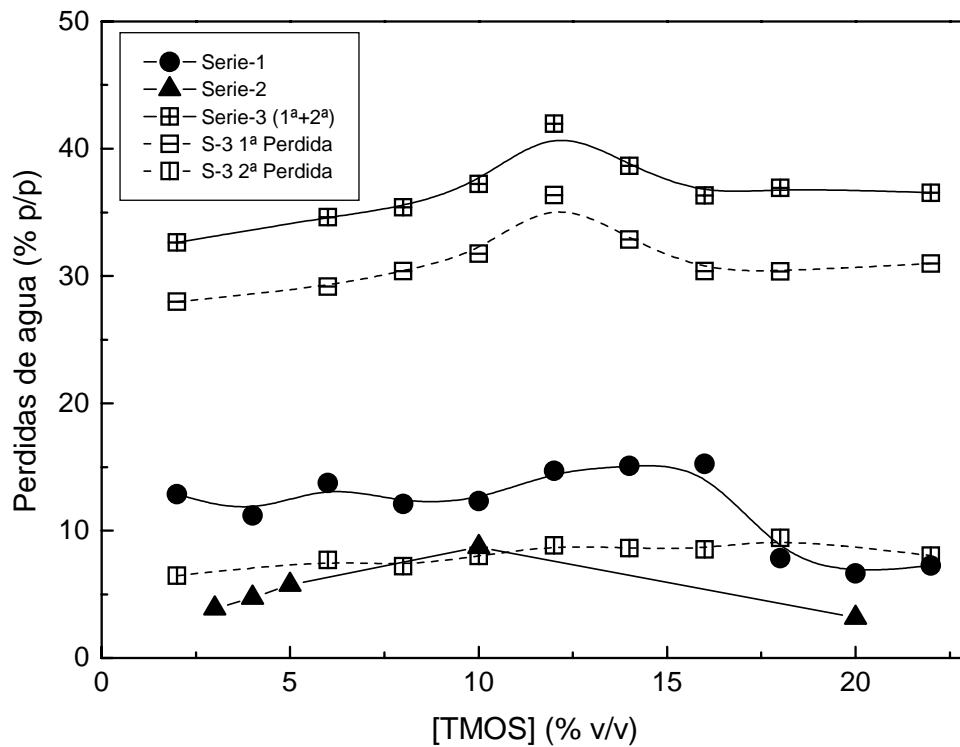
En las dos primeras series sólo se observa una pérdida de agua en el rango de temperaturas 20-200°C, mientras que en la tercera serie esta pérdida se produce en dos etapas y representa un mayor porcentaje del peso inicial de la muestra (Fig.5.2-20). Cada una de las dos pérdidas de agua tiene una diferente energía de interacción y como se vio en el capítulo tercero se identifican como agua unida físicamente por fuerzas de dispersión y agua unida por fuerzas polares (por puentes de hidrogeno). El agua unida físicamente que se pierde por debajo de 130°C aparece en los cristales de la serie segunda (con un día de secado) y tercera (primera pérdida), mientras que el agua unida por fuerzas polares se observa en las tres series.

En la serie tercera es fácil separar la contribución que corresponde a cada tipo de agua, ya que las pérdidas no solapan. Cuando se representa la cantidad de agua unida por fuerzas polares se comprueba que aumenta de forma lineal con la concentración de gel y que por tanto su mantenimiento en la estructura del cristal es consecuencia directa de la presencia del gel en el interior de los mismos. La dispersión de los datos aparece como consecuencia del solapamiento entre la primera y segunda pérdida. Por otra parte se observa una leve dependencia entre la cantidad de agua retenida físicamente y la concentración de gel de sílice con un máximo de retención entorno al 12% de concentración para volver a caer posteriormente. Este efecto puede estar asociado a la distribución del gel en el cristal más que a su carácter higroscópico.

Cuando se analiza la velocidad con la que se producen las dos pérdidas de agua no se observa ninguna dependencia con la concentración de gel. Esta observación se interpreta como que las fuerzas que mantienen estos tipos de agua en el cristal son siempre del mismo tipo, fuerzas

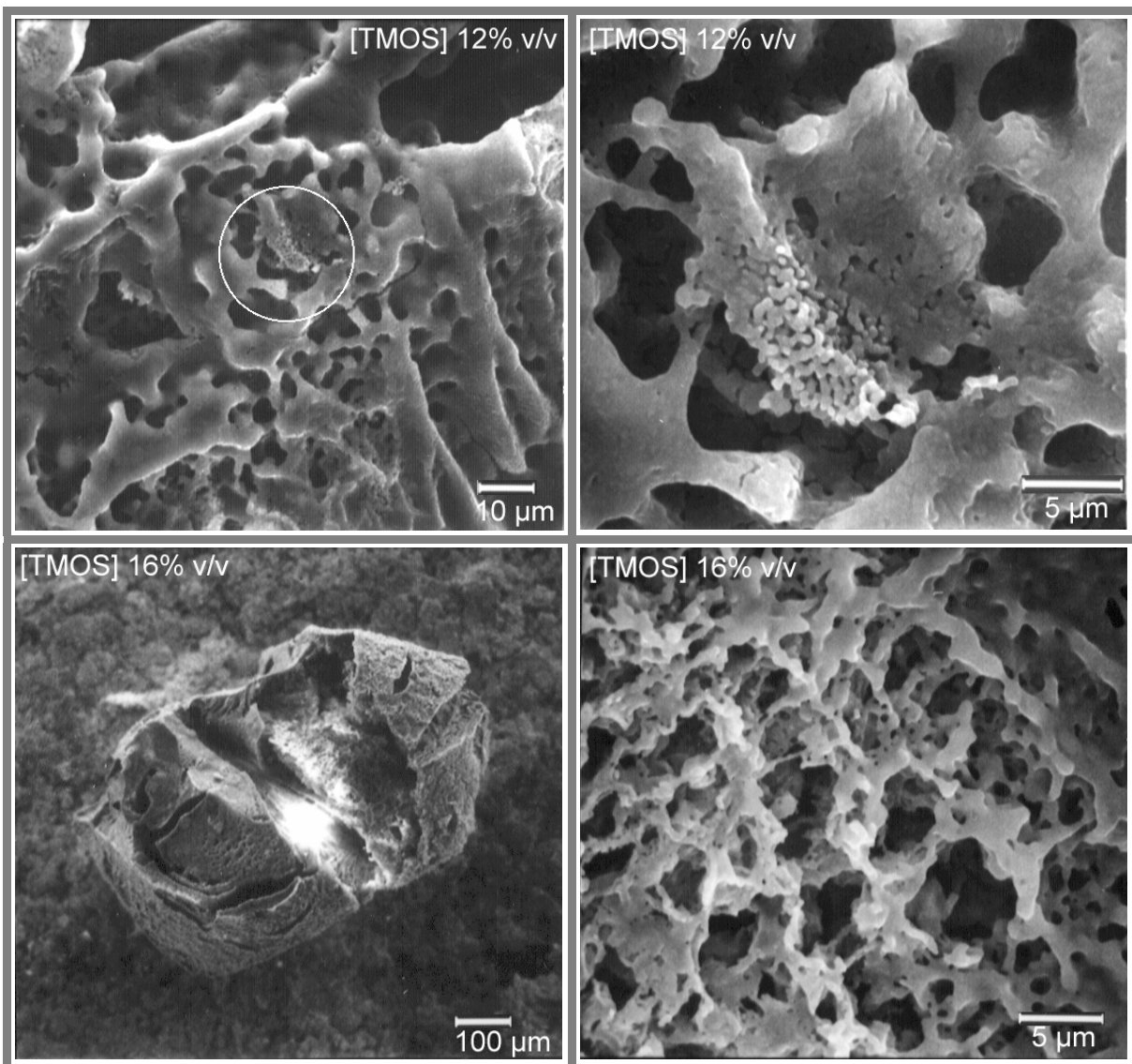


de dispersión (unión física) en el caso de la primera pérdida e interacciones polares (puentes de hidrógeno) para la segunda pérdida.



**Fig.5.2-20** La gráfica superior muestra la pérdida total de agua en las tres series analizadas. Los símbolos cuadrados con cruz y vacíos corresponden a la primera y segunda pérdida de agua de la serie 3ª. En la gráfica inferior se representa la cantidad de agua de hidratación de la segunda pérdida en función de la concentración de gel.

Los residuos obtenidos de la descomposición de cristales de lisozima se recuperan para observarlos al microscopio. La mayoría de estos presentan un aspecto esponjoso que se deforma con facilidad. Sin embargo, los residuos obtenidos de cristales crecidos en geles por encima de un 8% de concentración mantienen prácticamente el mismo volumen del cristal original. Al microscopio la superficie de estos residuos presenta un aspecto estriado rugoso. Para comprobar si persistían restos de la estructura del gel las muestras se metalizan con oro y se observan con el MEB (Fig.5.2-21). Solo las muestras con mayor concentración de gel aguantan la deposición de la película de oro sin colapsar. En residuos procedentes de cristales crecidos al 12% las fibras se han compactado, durante el calentamiento o durante el tratamiento con oro, formando grandes agregados. Los residuos con un 16% de gel presentan una mayor estructuración en forma de malla, colapsadas en menor extensión como se deduce del tamaño de las fibras.



**Fig.4.2-20** Imágenes de MEB de residuos de descomposición térmica de cristales de lisozima crecidos en geles de TMOS. En la parte inferior las fotografías muestran el interior del los residuos de 12 y 16% colapsados pero que aún muestran cierta estructura.

### 5.2.3. ESTABILIZACIÓN DE LA LISOZIMA EN GELES DE SILICE

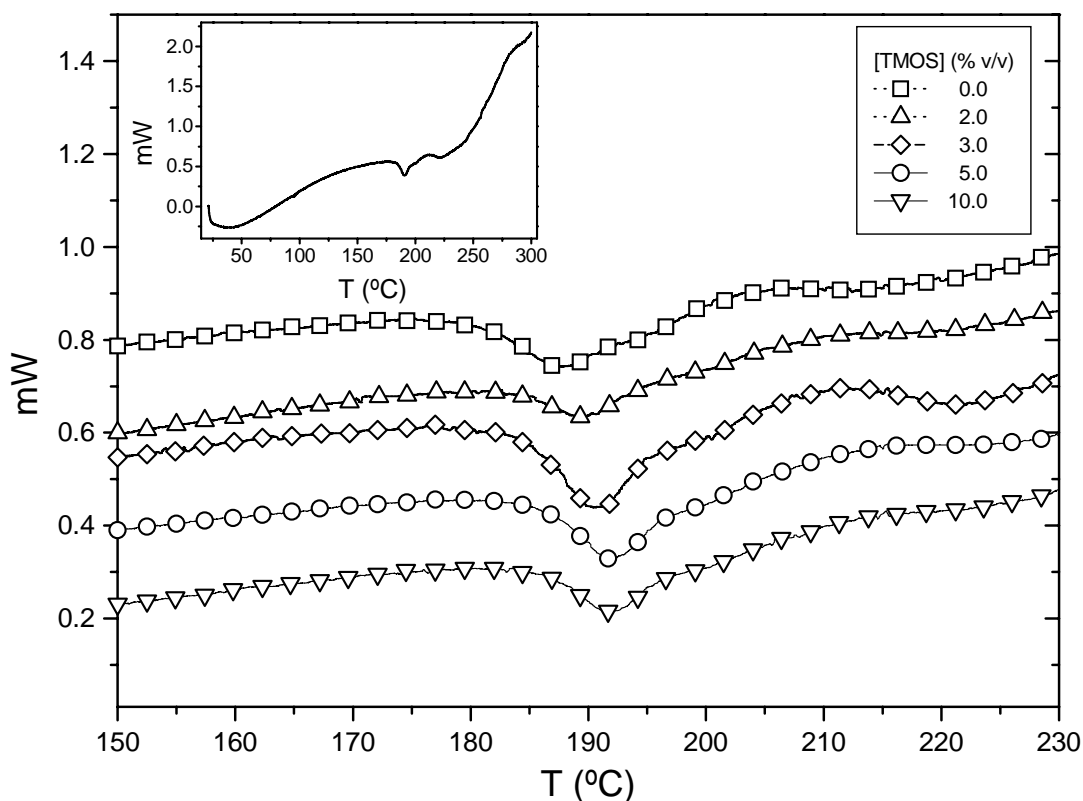
Un descenso de la cantidad de agua en las proteínas provoca una disminución de la flexibilidad (reduce el número de modos de vibración) lo que se traduce en un descenso de la capacidad calorífica ( $C_p$ ) [Berlin et al., 1972]. Se puede decir que a niveles de hidratación de entre 0.1-0.15h ( $h = g_{\text{agua}} / g_{\text{proteína}}$ ) a 298K las proteínas sufren una transición de cristal líquido pasando de sólido rígido a un estado flexible. Niveles de hidratación por debajo de 0.75h aumentan la temperatura de desnaturalización y disminuye el cambio de entalpía de desnaturalización [Fujita y Noda, 1978]. Este efecto también se observa en presencia de disolventes orgánicos.

La lisozima se usa también como proteína modelo en estudios calorimétricos de desplegamiento y estabilidad. La desnaturalización de lisozima en solución ocurre a una temperatura de  $\sim 60^\circ\text{C}$  con un cambio entálpico de aproximadamente 500 kJ/mol dependiendo del pH y la fuerza iónica del medio. En estudios realizados con cristales de lisozima tetragonales y monoclinicos estos se mantienen birefringentes a temperaturas de 353 y 368K respectivamente con formas y volúmenes intactos hasta los 453K. Estos cristales presentan puntos de difracción hasta 333K desapareciendo finalmente a 353K. Sin embargo, para proteínas como ribonucleasa A, cuyo desplegamiento es reversible, los cristales se rompen y funden a 333K. Concluyen en este trabajo que los cristales monoclinicos de lisozima estabilizan la proteína más que los tetragonales debido a una mayor eficiencia en el empaquetamiento de las moléculas [Jacob et al., 1998].

A la vista de los resultados expuestos hasta ahora cabe preguntarse si los niveles de hidratación mantenidos por el gel de sílice o el propio gel de sílice desempeñar algún papel en la estabilización-desestabilización de la estructura de la lisozima. Para comprobar este punto se realizan una serie de ensayos de calorimetría diferencial de barrido en estado sólido empleando un instrumento Shimazu DSC-50Q.

Las muestras, previamente pesadas, se introducen en el calorímetro en cápsulas de aluminio abiertas y se someten a un calentamiento de 2  $\text{grd./min}$  en un rango de temperatura de 20 a  $300^\circ\text{C}$ . Los ensayos se realizan con cristales de las series uno (tres días de secado) y tres ("húmedas") y se comparan con los datos obtenidos de cristales crecidos en *batch* con tres días de secado y recién extraídos de la solución y de la proteína liofilizada. Las pruebas realizadas con gel de sílice no presentan ninguna transición en el rango de temperaturas estudiado.

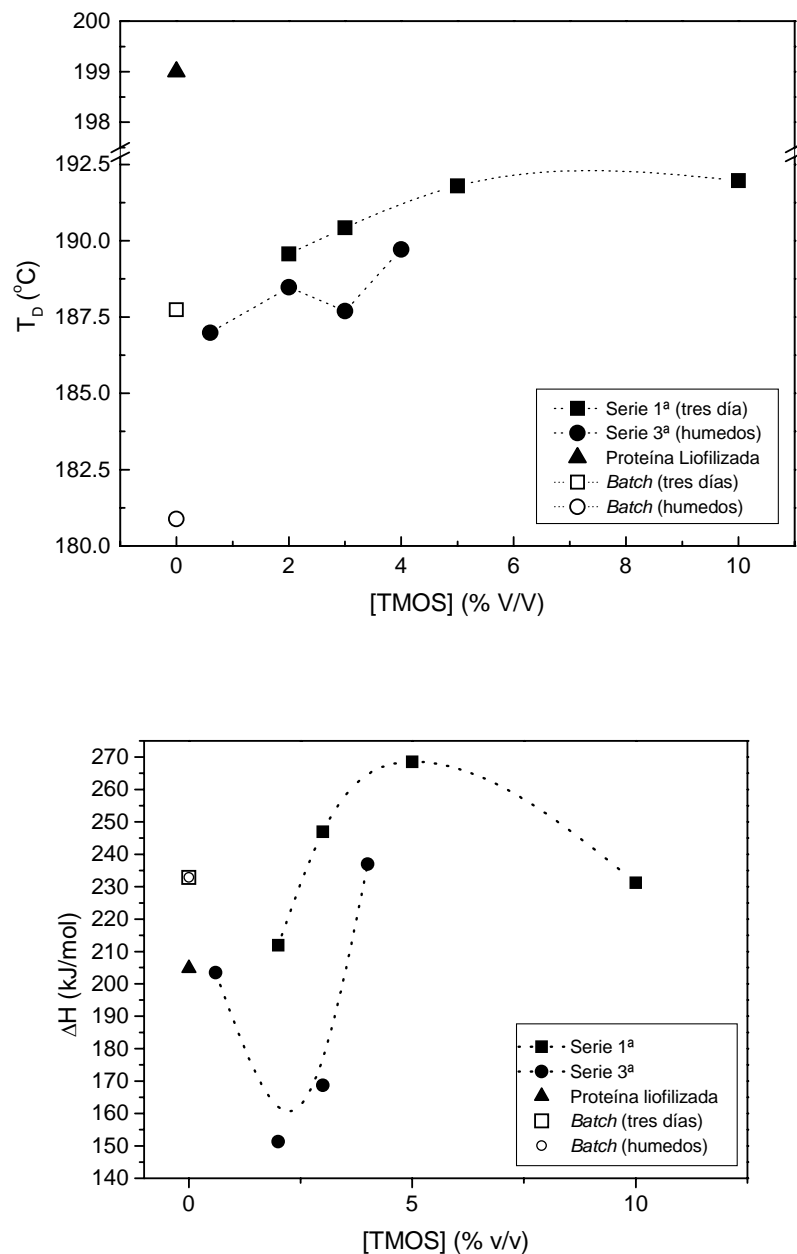
En la gráfica insertada de la figura 5.2-22 se ha representado una traza típica de cristales de lisozima. Se observa que durante el calentamiento se produce una variación de la línea base por la pérdida de agua ya que trabajamos con células abiertas. En torno a los  $200^\circ\text{C}$  aparece una transición cooperativa que no se puede asociar a una pérdida de peso (Fig.5.2-18) y que se identifica como la transición de fase que se produce durante la desnaturalización de la proteína. Esta transición aparece en todos los perfiles realizados incluyendo la proteína liofilizada. En los calorímetros en solución estas transiciones presentan su máximo a la máxima potencia ( $\mu\text{W}$ ) mientras que en calorímetros de estado sólido la transición aparece invertida, aunque ambas representan un fenómeno de tipo endotérmico.



**Fig.5.2-22** *Perfiles de desnaturalización térmica de cristales de lisozima crecidos en geles de sílice con distintas concentraciones. La gráfica insertada muestra la traza completa de la experiencia correspondiente a un 3.0% v/v de gel de sílice.*

La desnaturalización de una proteína se caracteriza por la temperatura a la que aparece el máximo de la transición ( $T_D$ ), la entalpía asociada a este cambio de estado ( $\Delta H$ ) proporcional al área encerrada por la curva y el incremento de capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ). En nuestro caso nos basta para caracterizar la transición con la temperatura de desnaturalización y el cambio de entalpía asociado ya que un análisis más exhaustivo excede las pretensiones de este trabajo. Por otra parte los resultados obtenidos en este apartado representan solo un aspecto cualitativo del problema ya que al trabajar con células abiertas el grado de hidratación de la muestra no se controla y depende sólo de la concentración de gel.

A partir de las trazas calorimétricas (Fig.5.2-22) se determina  $T_D$  y se calcula el valor  $\Delta H$  por triangulación sobre el área encerrada por la curva (Fig.5.2-23). El valor de  $\Delta H$  que genera el programa de análisis viene referido al peso inicial de la muestra. Este valor se corrige eliminando la contribución del agua y de la sílice al peso total obtenidos a partir de los datos de termogravimetría expuestos en el apartado anterior.



**Fig.5.2-23** Variación de la temperatura de desnaturalización de cristales de lisozima crecidos en geles de sílice con distinto grado de hidratación inicial en función de la concentración de gel. En la parte inferior se muestra el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) asociado a la desnaturalización.

En las dos series estudiadas se observa que la temperatura de desnaturalización de la proteína aumenta al incrementar la concentración de sílice en los cristales (Fig. 5.2-23). Desde concentraciones de gel tan bajas como 0.6% hasta 5% de gel,  $T_D$  aumenta de forma lineal, mientras que por encima de 5% este efecto se satura. Este comportamiento confirma por una parte que el agua mantenida por encima de 130°C se encuentra asociada al gel de sílice ya que de no ser así se esperaría un descenso de la temperatura de desnaturalización. Por otra parte apunta hacia un papel activo de las fibras de sílice en la estabilización de la lisozima.

Cuando comparamos estos resultados con los datos de cambio de entalpía de la desnaturalización en función de la concentración de gel se observa que: 1) en el rango 0-2%,  $\Delta H$  disminuye en concordancia con un aumento de  $T_D$  y por tanto como respuesta a un descenso en los niveles de hidratación. Por encima del 2% la situación se invierte y aunque la temperatura de desnaturalización sigue aumentando el cambio de entalpía aumenta en la misma dirección. Este aumento de  $\Delta H$  sólo puede ser debido a una estabilización de la proteína por asociación con las fibras de gel.

Estos resultados indican que existe una interacción entre las fibras de gel y la proteína y que esta interacción estabiliza la estructura nativa de la proteína.

#### 5.2.4. EFECTOS MORFOLÓGICOS

La influencia de las características físico-químicas del medio sobre la morfología final de los cristales tiene su mejor expresión en las diferentes formas o polimorfos que podemos encontrar para un mismo sistema. La obtención de uno u otro polimorfo depende de las condiciones termodinámicas del medio y sólo existe una forma de equilibrio que hace mínima la energía superficial [Sunakawa, 1987]. Para el caso de lisozima hemos visto como la sobresaturación controla la velocidad relativa de crecimiento de las caras prismáticas y piramidales dando lugar a toda una gama de hábitos con distintos factores de forma. En todos los casos mostrados hasta ahora las caras son macroscópicamente planas y lisas. Cuando esto ocurre podemos considerar las caras constituidas por capas o rodajas bidimensionales que han crecido siguiendo un mecanismo de nucleación bidimensional [Volmer, 1922; Kossel, 1927] o por crecimiento helicoidal [Burton-Cabrera-Frank, 1951]. Sin embargo, cuando las condiciones de sobresaturación son muy elevadas los planos que constituyen las caras se vuelven inestables debido al crecimiento preferencial de los bordes del cristal lo que da lugar a la formación de estructuras dendríticas. Este tipo de estructuras, morfológicamente inestables, están causadas por una distribución no homogénea de la sobresaturación sobre la superficie del cristal.

En la mayoría de las teorías de crecimiento cristalino la sobresaturación local se asume uniforme en toda la superficie de la cara. Sin embargo, esta condición no se cumple nunca en el caso de cristales poliédricos en los que la sobresaturación disminuye al acercarnos al centro de las caras [Seeger, 1953]. Esta falta de uniformidad sobre la superficie es conocida como el efecto de Berg [Berg, 1938]. Para explicar este comportamiento Frank (1974) sugiere que la superficie de los cristales crece como un agujero de sobresaturación, en la que los escalones nuclean en los bordes propagándose hacia el centro de las caras con una determinada pendiente de inclinación dependiente de la velocidad de propagación y de la densidad de aparición. De esta forma, para mantener una velocidad de crecimiento constante a lo largo de toda la cara del cristal es necesario que los centros de crecimiento sobre la superficie del cristal estén distribuidos de forma que un descenso de la sobresaturación venga compensado por un aumento de la densidad de escalones de crecimiento. Esta consideración es matemáticamente introducida a través del coeficiente cinético  $\sigma$ , con lo que la velocidad de crecimiento en cada punto del cristal,  $R = \beta \cdot \sigma$ , donde  $\beta$  representa la sobresaturación y  $\sigma$  representa la actividad local de la superficie. De esta forma a mayor densidad

de escalones de crecimiento, mayor es el valor del coeficiente cinético. Cuando la pendiente en el centro de la superficie supera un valor crítico se produce la pérdida de la anisotropía del coeficiente cinético y los cristales adquieren una estructura dendrítica [Chernov, 1974].

Otra importante fuente de pérdida de estabilidad de caras singulares es la incorporación de impurezas. Si durante los primeros estadios del crecimiento las impurezas (con menor afinidad) son repelidas de la superficie del cristal, éstas se concentran en el centro de las caras. Esta heterogeneidad de la distribución de las impurezas sobre las caras del cristal provoca un efecto termodinámico; el descenso de la sobresaturación en el centro de las caras, y cinético; la adsorción de impurezas disminuye el coeficiente cinético y por tanto la velocidad de crecimiento [Chernov, 1974]. Ambos efectos desembocan en la generación de caras inestables con estructura dendrítica dando lugar al que se conoce como efecto de Gibbs-Thomson [Enckevort et al., 1996].

Por último el modelo de crecimiento normal se diferencia de los modelos de crecimiento tangenciales (nucleación bidimensional y crecimiento helicoidal) en que el cristal crece de forma perpendicular a la interfase sólido-líquido. Este mecanismo de crecimiento tiene lugar en superficies rugosas en las que en ningún momento es necesario crear escalones de crecimiento y está limitado sólo por el ajuste de las moléculas en los sitios de incorporación. Puesto que es prácticamente isotrópico, da lugar a cristales con formas redondeadas que representan la forma más efectiva de crecimiento. No es habitual la formación de este tipo de formas aunque en la bibliografía aparecen descritas para derivados hidroxilados de aluminio [Buckley, 1952] o concanavalina A en el caso de macromoléculas biológicas. En este último caso los cristales presentan un aspecto elipsoidal.

Morfologías redondeadas también se pueden observar durante el crecimiento de cristales de ferritina empleando el método de acupuntura en geles, cuando la concentración de proteína es cinco veces superior a la habitual (5-20 mg/ml), manteniendo la concentración de sal ( $\text{CdSO}_4$ ) constante a 8% p/v.

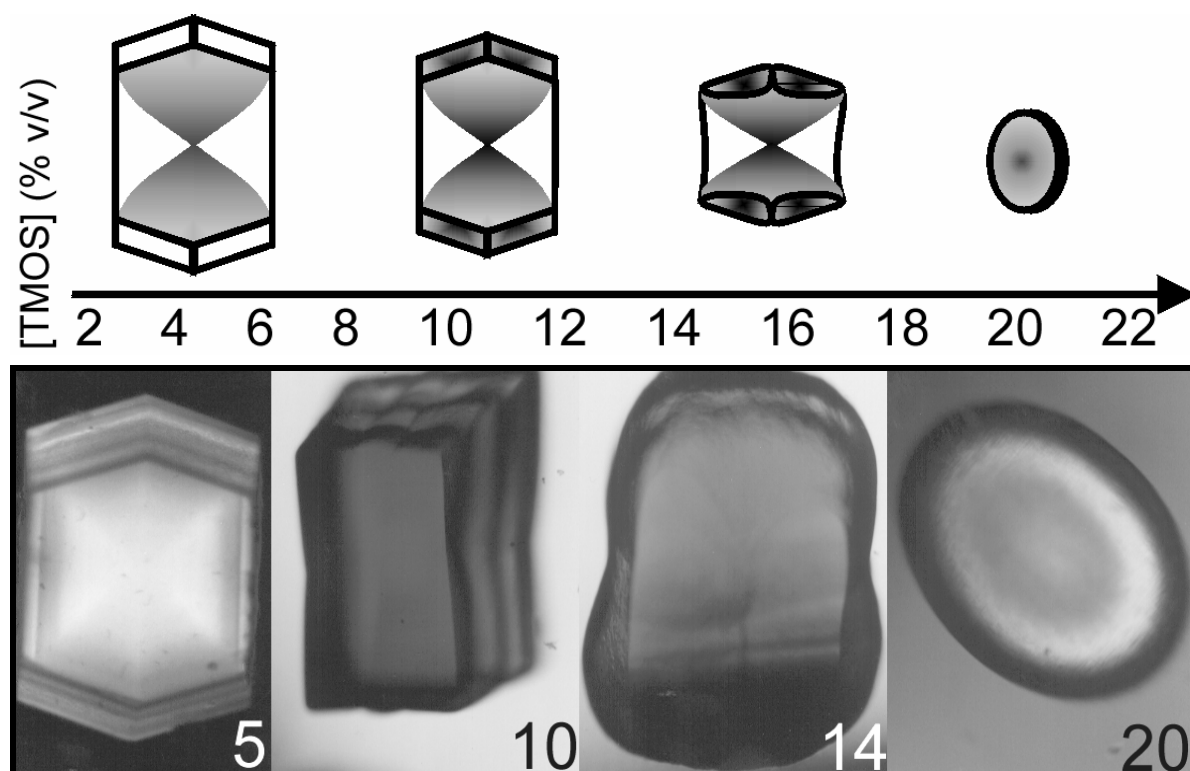
Como recogimos en el apartado de métodos indirectos, la adición de un gel al medio de crecimiento también controla el cambio morfológico de los cristales a través de la sobresaturación, consecuencia directa del transporte de masa. Pero desde el punto de vista químico (de la interacción) la presencia del gel también puede modificar la morfología final de los cristales. Este efecto se ha observado en la obtención de cristales de PbS en medios gelificados (en solución es imposible obtenerlos) en los que el ácido empleado en la neutralización de metasilicato de sodio condiciona la morfología de los cristales [García-Ruiz, 1986].

En el campo de la cristalización de proteínas no se ha descrito ningún tipo de efecto morfológico inducido por la presencia de un gel, ni en el caso de los geles de sílice ni en el de los geles de agarosa. Las bajas concentraciones de gel que habitualmente se emplean no son suficientes para provocar ningún tipo de cambio en la apariencia final de los cristales.

Durante el trabajo de obtención de cristales reforzados de lisozima (100mg/ml de proteína y 20% p/v de NaCl) y thaumatina (100 mg/ml y 45% p/v de tartrato de sodio y potasio) empleando la técnica de contradifusión en gel (en tubos de 4 mm) se constataron varios fenómenos de modificación morfológica asociados a la presencia de gel y dependiente de la concentración de

este. En ambas proteínas se observa una evolución de la morfología final de los cristales que pasan de cristales facetados a cristales completamente redondeados sin caras ni vértices pasando por formas con caras inestables (Fig.5.2-24 y 25). La morfología esferoidal se mantiene hasta que la concentración de gel (22% v/v) impide por completo la nucleación en las condiciones de trabajo.

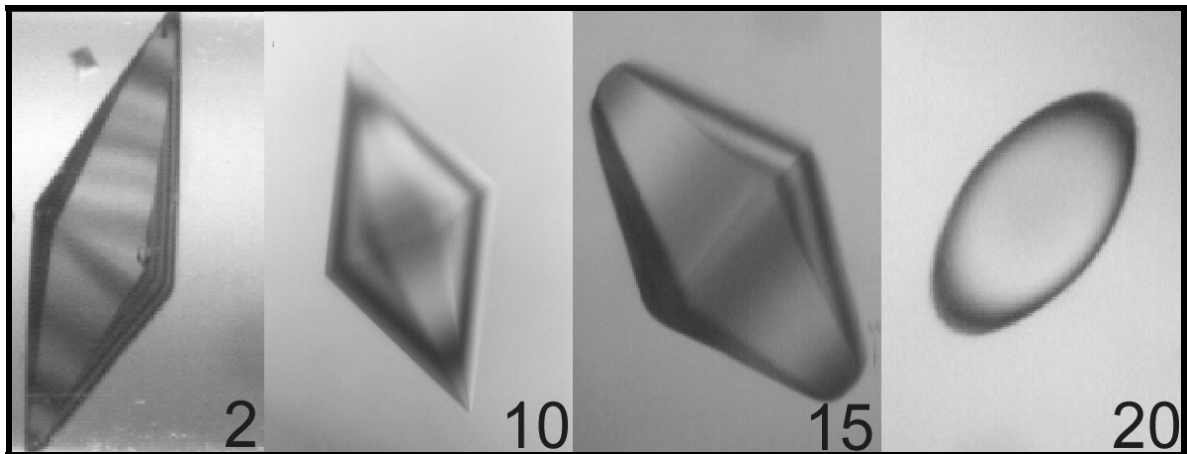
En el caso de la lisozima se observa una evolución gradual desde cristales completamente facetados a elipsoides y esferas pasando por estructuras dendríticas en las que las caras de tipo {101} son las primeras en mostrar esta inestabilidad cuando la concentración de gel de sílice supera el 6% v/v. Al aumentar la concentración de gel por encima del 8% v/v, la inestabilidad se extiende a las caras {110} (Fig.5.2-24). Esta evolución morfológica va acompañada de una reducción del tamaño de los cristales.



**Fig.5.2-24** En la parte superior se muestra el morfograma aproximado de la evolución de las caras {101} y {110} de lisozima en función de la concentración de gel de sílice. En la parte inferior la evolución morfológica de los cristales de lisozima en función de la concentración de gel (números a pie de foto en % v/v).

En el caso de los cristales de thaumatina el comportamiento es algo distinto. El cristal no comienza a mostrar la inestabilidad hasta que no se alcanza un 10% v/v de concentración de gel y por otra parte no desarrolla una estructura de tipo dendrítica sino que como se observa en la figura 5.2-25, el cristal se redondea en los vértices formado por las caras de tipo {101}, mientras que el centro de las caras sólo se curva ligeramente. Aunque esta redondez es más acusada en la dirección [001] también se observan en los cuatro vértices del plano [110].





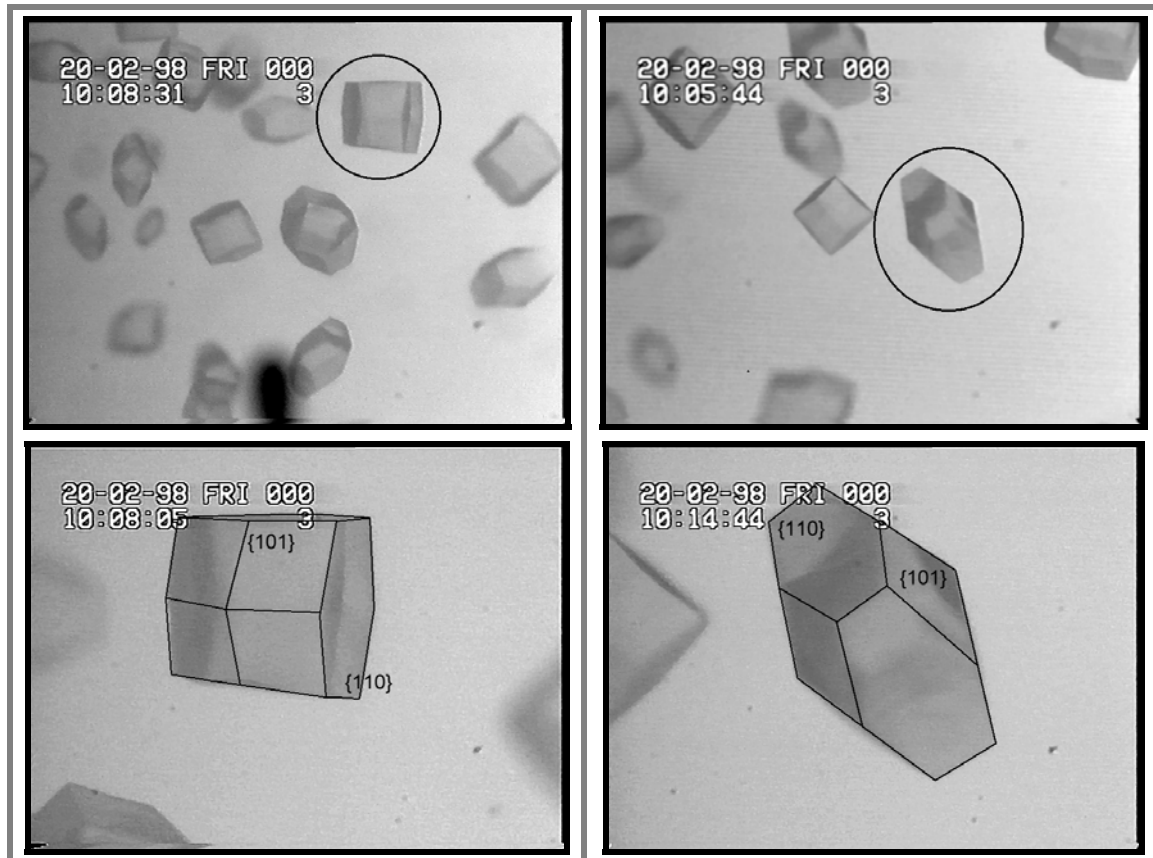
**Fig.5.2-25** Evolución morfológica de cristales de *thaumatococcus* en función de la concentración de gel (números a pie de foto en % v/v).

Comenzamos por analizar el comportamiento de los cristales de lisozima que presentan una secuencia más gradual de desarrollo. Puntualizaremos primero que no son las caras de tipo  $\{101\}$  las primeras en mostrar esta inestabilidad. La mayoría de las experiencias realizadas en contradifusión se llevan a cabo en tubos de vidrio que facilitan la manipulación y economizan el consumo de muestras. En esta configuración los primeros eventos de nucleación y crecimiento se producen en un corto periodo de tiempo y además van acompañados de la precipitación de amorfo y esferulitos en estas regiones, lo que dificultan su observación. Cuando las experiencias se montan en placa para seguir su evolución en el tiempo se comprueba como al 8% v/v de gel de sílice la inestabilidad se desarrolla solamente en las caras  $\{110\}$  de los cristales que nuclean en la región cercana al punto de incorporación de la sal, mientras que en posiciones más avanzadas de la cámara de precipitación sólo aparecen en las caras de tipo  $\{101\}$  (Fig.5.2-26). A partir de estas observaciones se deduce que la aparición de estructuras dendríticas esta asociada a la velocidad relativa del crecimiento de las caras de forma que las inestabilidades aparecen en las caras que se desarrollan a mayor velocidad. Por encima del 8% de concentración de gel tanto las caras  $\{110\}$  como las  $\{101\}$  se vuelven inestables, independientemente de la posición en la cámara de precipitación.

Para los cristales de *thaumatococcus* la inestabilidad de las caras nunca es tan acusada como en los cristales de lisozima y la transición de caras levemente cóncavas a cristales redondeados, en los que no se aprecia esta curvatura, es mucho más rápida. Como apuntamos anteriormente es necesario que la concentración de gel supere el 10% para que aparezcan las primeras modificaciones morfológicas. Estas dos observaciones apuntan hacia una mayor energía de estabilización de las caras en los cristales de *thaumatococcus* respecto de la energía de estabilización de las caras de los cristales de lisozima.

En ambos casos, lisozima y *thaumatococcus*, la aparición de caras inestables puede ser debida a: 1) que las fibras de gel actúan como impurezas, 2) a que el gel establezca algún tipo de control sobre el transporte de masa en las caras de cristal que condiciona su crecimiento o 3) que la incorporación de las fibras de gel modifique la energía de superficie del cristal

La primera posibilidad es consistente con el hecho de que las caras con mayor velocidad de crecimiento sean las que muestren la inestabilidad, sin embargo, es inconsistente con la propia teoría, ya que como hemos visto las fibras son incorporadas de forma homogénea en todo el cristal y por tanto no se pueden acumular en el centro de las caras.



**Fig.5.2-26** Inestabilidad de las caras de tipo  $\{110\}$  de cristales de lisozima tetragonal que han crecido a una sobresaturación elevada como puede deducirse de su hábito. Los cristales destacados con círculos en las fotografías superiores se muestran a mayor magnificación en la parte inferior en las que se han repasado los contornos para clarificar la morfología. Detalle de la experiencia que se muestra en la figura 4.5-14.

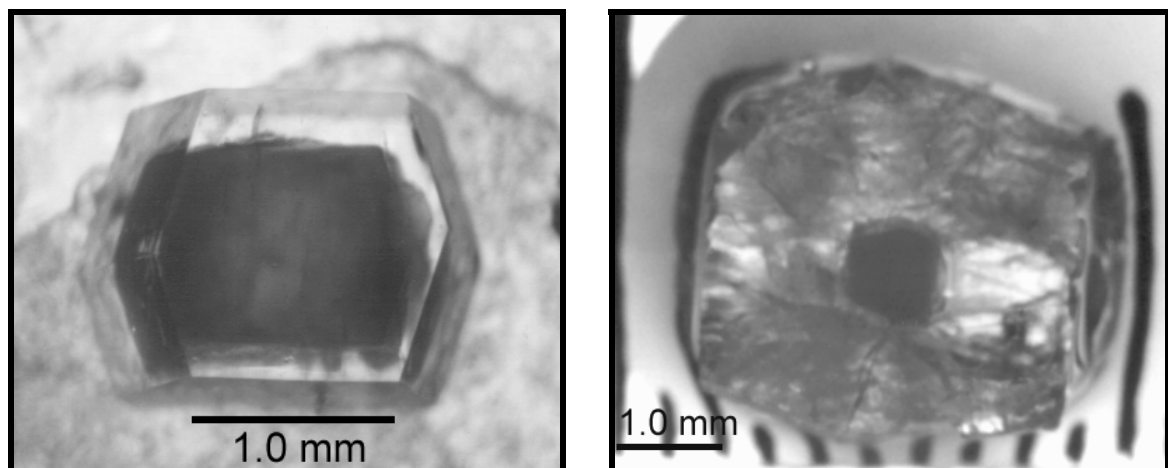
La segunda posibilidad parece acertada si pensamos que la presencia del gel crea un campo difusivo que dificulta la llegada de las moléculas de proteína a las posiciones de incorporación en el cristal. Si como hemos dicho las caras crecen desde los bordes al centro del cristal, un descenso del coeficiente de difusión de la proteína aumenta el gradiente de concentraciones entorno al cristal. Esta distribución de concentraciones se hace importante a partir de un determinado tamaño de cristal y da lugar a la pérdida de anisotropía del coeficiente cinético y por tanto al desarrollo de estructuras dendríticas. Al aumentar la concentración de gel el coeficiente de difusión de las unidades de crecimiento disminuye y el tamaño mínimo del cristal para que se observen estas estructuras también disminuye. Por otra parte este descenso del coeficiente de difusión hace que la velocidad de crecimiento necesaria para romper la anisotropía del coeficiente cinético sea menor extendiéndose la inestabilidad a todas las caras del cristal independientemente de la velocidad de crecimiento.

En esta argumentación la transición de caras cóncavas a convexas se explica atendiendo a los mecanismos de crecimiento implicados. La formación de caras cóncavas se explica cuando estas se desarrollan a través de un mecanismo de nucleación bidimensional, esto es, que los niveles de sobresaturación se mantienen por encima de un determinado valor ( $\beta^*$ ), distinto para cada tipo de caras. Sin embargo, cuando la sobresaturación no supera este valor los cristales crecen por dislocación helicoidal y las caras desarrollan una morfología convexa [Kuroda et al., 1987].

3) La tercera posibilidad, por si sola, no podría explicar el aumento gradual del cambio morfológico al aumentar la concentración de gel, aunque puede estar asociada a cambios en el transporte.

Otra posibilidad que se apunta para la obtención de cristales esféricos es que los cristales crezcan siguiendo el mecanismo de crecimiento normal, lo que implica la generación de cristales con superficie rugosa. Sin embargo, la generación de este tipo de superficies requiere valores de sobresaturación elevados, por encima del necesario para que se produzca un crecimiento bidimensional. Estos valores de sobresaturación tan elevados no están de acuerdo con el descenso del flujo de nucleación o con el cambio morfológico observado en este tipo de experiencias.

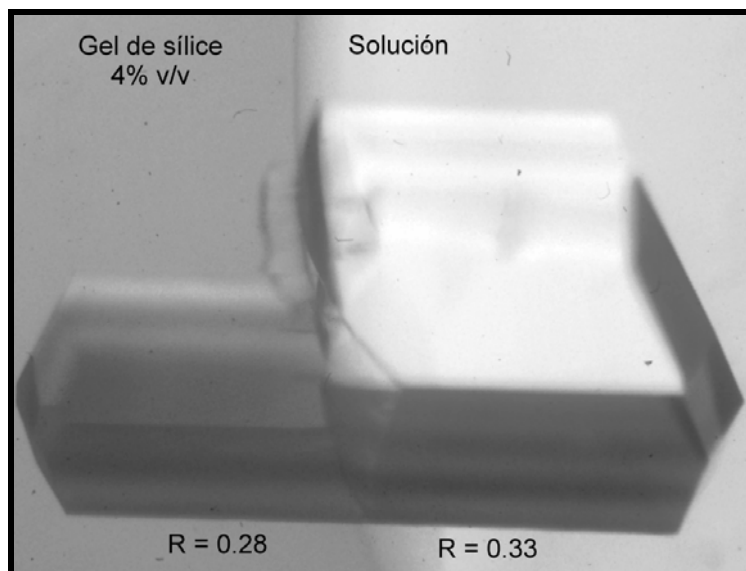
Por otra parte se asume que los cristales dejan de crecer por acumulación de defectos sobre la superficie o por agotamiento de la fuente. Ambas posibilidades pueden explicar la reducción de tamaño de los cristales de lisozima al aumentar la concentración de gel. Sin embargo, en experiencias de recrecimiento de cristales de lisozima obtenidos en geles de sílice a distintas concentraciones los cristales recrecen superando mas de seis veces su tamaño original (Fig.5.2-27).



**Fig.5.2-27** En la parte superior se muestra en recrecimiento de dos semillas (zona central oscura) de lisozima obtenidas en 4% (Izda.) y 16% (Dcha.) de TMOS. El cristal de la izquierda se fracturó al extraerlo de la solución para fotografiarlo y medirlo.

Este hecho pone de manifiesto que los cristales obtenidos a partir de geles de sílice dejan de crecer por agotamiento de la fuente y no por acumulación de tensiones en las caras del cristal. Por otra parte demuestran que es necesario un entorno difusivo o la presencia de las fibras de gel para provocar un cambio morfológico sobre las caras de los cristales.

En la figura 5.2-28 se muestra un cristal de lisozima que ha crecido en la interfase entre un gel de sílice (4% v/v) y la solución. El distinto desarrollo de las caras prismáticas pone de manifiesto el descenso de la sobresaturación que se produce en un medio gelificado con sílice.



*Fig.5.2-28 Desarrollo de un cristal de lisozima tetragonal que ha crecido en la interfase gel-solución en el que se observa el distinto grado de desarrollo de las caras prismáticas como consecuencia de un descenso de la sobresaturación.*

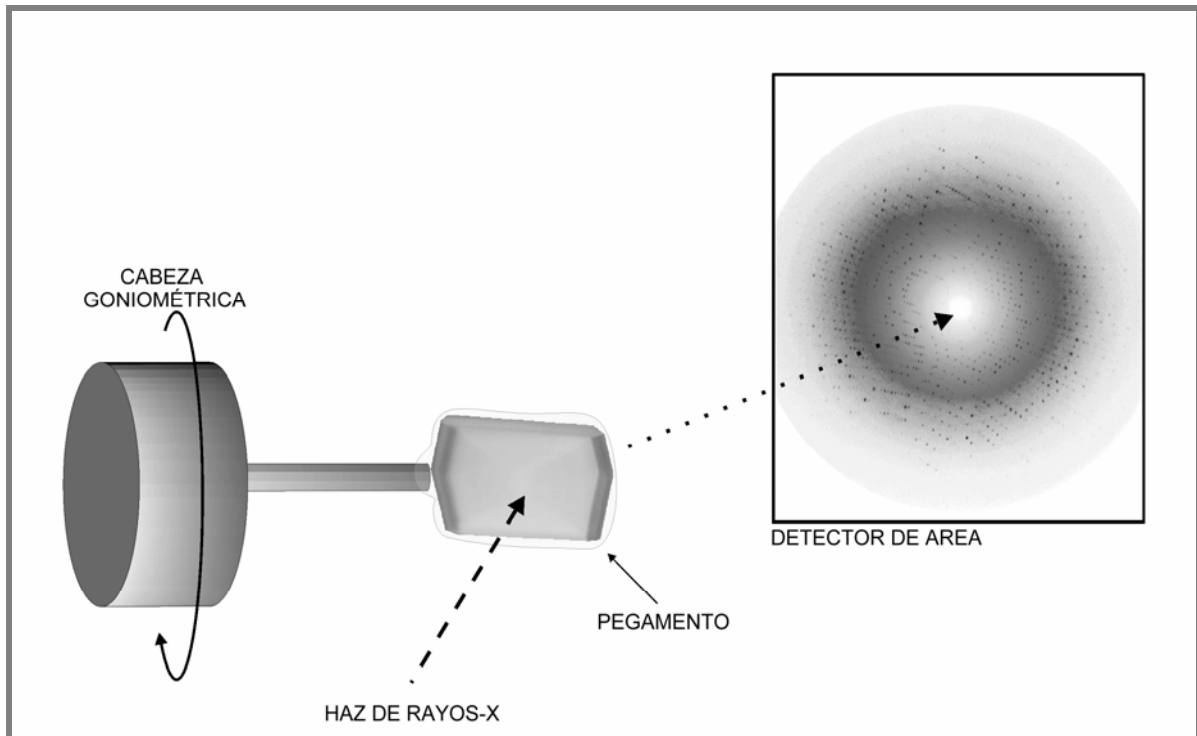
Apoyándonos en estas dos últimas observaciones la segunda hipótesis es la más aceptable, ya que explica la secuencia del cambio morfológico por variación de las características físicas del medio y sus consecuencias sobre la velocidad y mecanismos de crecimiento de los cristales.

### 5.2.5. DIFRACCIÓN DE CRISTALES REFORZADOS

La ventaja inmediata de la obtención de cristales reforzados la encontramos cuando queremos llevar a cabo estudios de difracción. La estabilidad mecánica de los cristales crecidos en geles de sílice aumenta a tal punto que es posible manipularlos con pinzas cuando la concentración sílice es superior al 5% (v/v). Otra ventaja adicional de estos cristales proviene del carácter higroscópico de los geles de sílice que aumenta la resistencia a la deshidratación de los cristales. Gracias a esta característica es posible manipular los cristales en ambientes no saturados de humedad sin que sufran procesos de desecación con la consecuente pérdida de calidad.

En la práctica esta mejora de las características de los cristales se ha demostrado adquiriendo un juego completo de datos de difracción de un cristal de lisozima crecido en un gel de sílice al 5% montado sobre una fibra de vidrio y protegido sólo por una fina película de pegamento. El cristal se difractó durante 48h en un instrumento convencional con ánodo rotatorio sin pérdida de intensidad. Un ejemplo del montaje experimental se muestra en la figura 5.2-29.

La adquisición de datos se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo del CSIC en Barcelona con la colaboración de los doctores A. Guash y T. Parraga componentes del equipo que dirige el Dr. D. M. Coll.



**Fig.5.2-29** Esquema del montaje experimental para difractar un cristal de lisozima crecido en gel de sílice a una concentración del 5% v/v. La imagen de difracción correspondiente a un giro de un grado.

A continuación se recogen una serie de experiencias en las que se analiza de forma preliminar la influencia de la incorporación de gel sobre la calidad final de los cristales. Puesto que el objetivo de estos ensayos fue establecer tendencias más que realizar un estudio exhaustivo, la adquisición de datos se programa para realizar un gran número de pruebas.

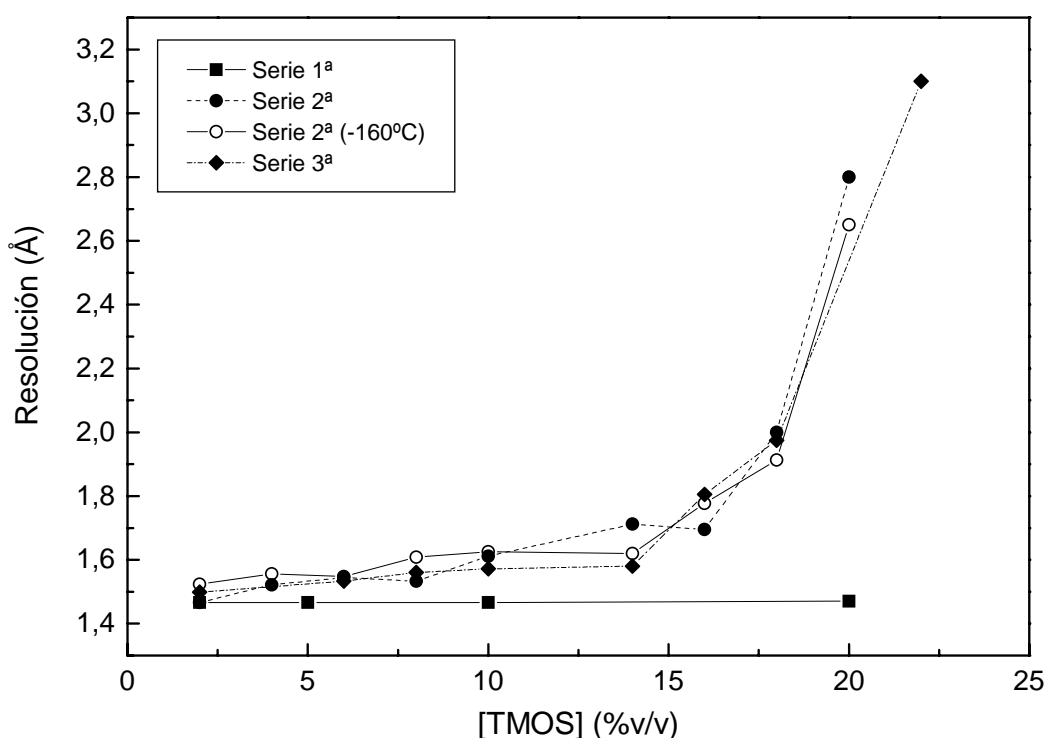
Para estudiar la influencia de la concentración de gel sobre el límite de difracción de los cristales se toman series de tres imágenes de difracción de cristales crecidos en distinta concentración de gel. Las imágenes se adquiere con un grado de rotación y 15 minutos de exposición. Para cada imagen adquirida se toma como límite de difracción aquellos puntos cuya intensidad ( $I$ ) es dos veces superior al ruido de fondo ( $\sigma$ ).

En la primera serie (S-1ª) se mide un solo cristal de las experiencias llevadas a cabo en 2%, 5%, 10% y 20% de concentración de TMOS preparadas a partir de lisozima de sigma (Lot.65H7025). En posteriores experiencias empleamos proteína de la casa comercial Fluka (62971), ya que el número de experiencias y por tanto el consumo, aumentó considerablemente al introducir un mayor número de puntos en el rango 2-22% v/v de concentración de gel.

En la figura 5.2-30 se han representado los resultados para cada una de las tres series. Hay que destacar una variación del comportamiento en función del origen de la proteína. En los ensayos

realizados con cristales crecidos con proteína de la casa Sigma, no se observa ninguna dependencia con la concentración de gel y los cristales difractan hasta el límite de resolución del instrumento, mientras que los cristales crecidos con proteína de la casa comercial Fluka la calidad de los cristales disminuye al aumentar la concentración de gel. Esta dependencia es prácticamente lineal en la región del 2% al 5% y crece de forma exponencial con la concentración de gel por encima del 5%.

Esta diferencia del comportamiento puede ser debida a un mayor grado de impurezas en la lisozima de Fluka o a una diferencia en la cantidad de las sales presentes en cada una de las remesas de proteína.



**Fig.5.2-30** Dependencia de la intensidad observable (entendida como  $I/\sigma > 2$ ) con la concentración de gel para cristales de lisozima tetragonal obtenidos por contradifusión.

Habitualmente se emplean sistemas de congelación de los cristales con el fin de aumentar su tiempo de vida o para bajar el límite de resolución. La congelación de los cristales a  $-160^{\circ}\text{C}$  disminuye la vibración de los átomos y como consecuencia puede contraer la celdilla. Este efecto se ha observado trabajando con cristales de lisozima tetragonal preparados en solución.

Para comprobar si la presencia del gel de sílice puede afectar al grado de contracción de las moléculas de lisozima en el cristal se lleva a cabo una comparación de los valores de los parámetros reticulares de cristales medidos a temperatura ambiente frente a cristales medidos a  $-160^{\circ}\text{C}$ . Los cristales medidos a  $-160^{\circ}\text{C}$  son previamente equilibrados durante 5 minutos con glicerol

30% v/v preparado sobre una solución tamponada de NaCl 10% p/v. El glicerol es un crioprotector que se usa para evitar la formación de cristales de hielo que pueden dañar el cristal.

Operando de la misma forma descrita adquirimos tres imágenes de difracción para tres cristales de cada concentración de gel. El juego de tres imágenes de un cristal de cada concentración de gel, congelados y sin congelar, se emplea para calcular los parámetros de red de cada cristal.

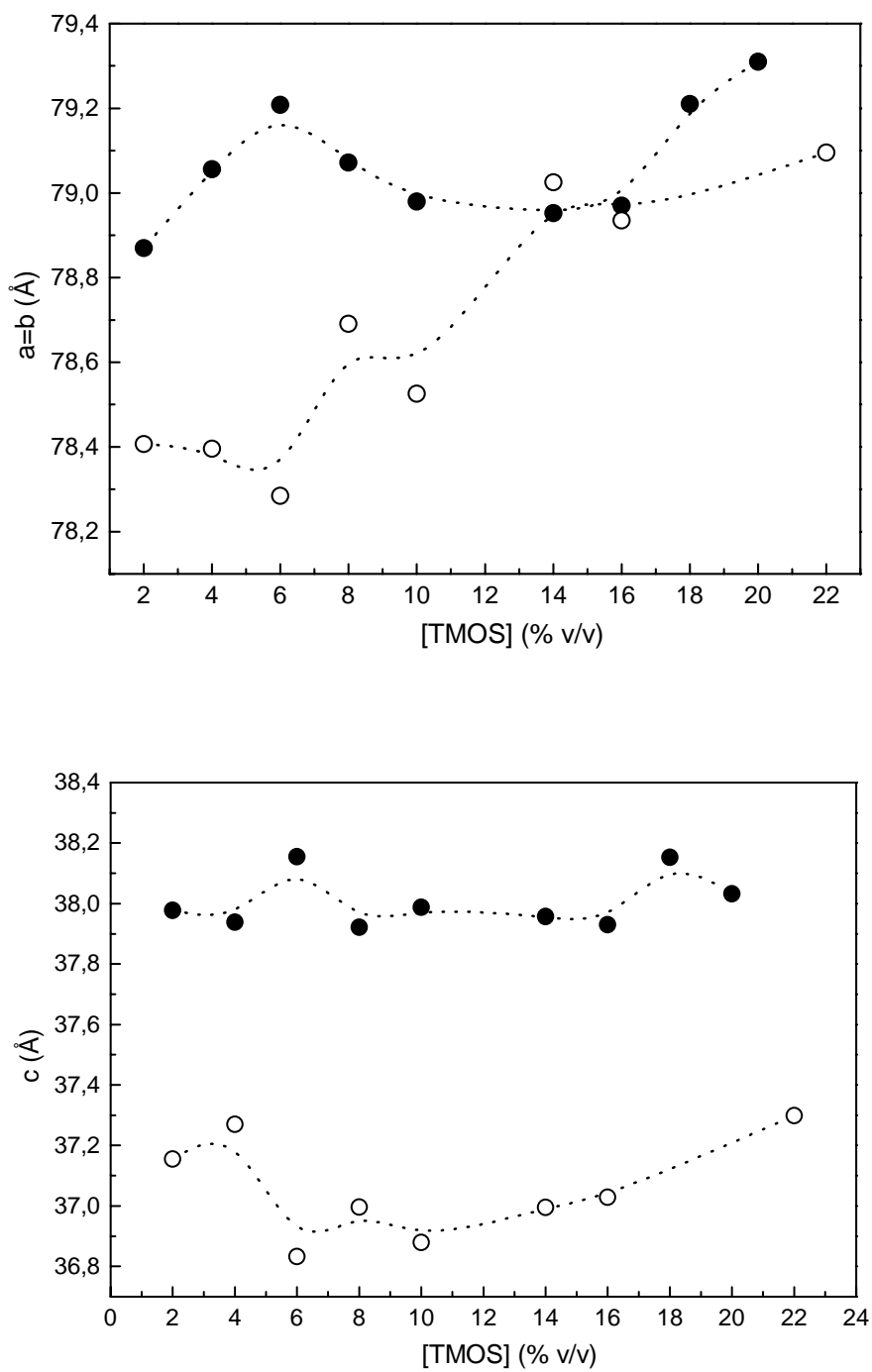
Como se observa en la figura 5.2-30 no hay diferencias de intensidad de difracción entre los cristales congelados y sin congelar. Sin embargo, el comportamiento de los parámetros de red en función de la concentración de gel muestra una clara influencia del gel. Mientras que la dimensión de  $c$  no se ve afectada por la concentración de gel, los parámetros  $a$  y  $b$  sufren una concentración menor de la esperada. Este comportamiento sigue una tendencia prácticamente lineal con la concentración de gel (Fig.5.2-31).

Para explicar este comportamiento podríamos pensar que las fibras de gel se incorporan preferentemente en los planos de tipo  $[110]$ , lo que está en desacuerdo con la distribución homogénea de los geles de sílice. La segunda posibilidad es que las interacciones entre la proteína y el gel sean más fuertes en esta dirección que en la  $[001]$ . Asimismo pensamos en una posible dependencia entre el tiempo de equilibrado con el crioprotector y la concentración de gel. Es evidente que los 5 minutos de tiempo resultan insuficientes para que el glicerol difunda en cristales que además de la proteína, están formados por una elevada concentración de gel de sílice. Sin embargo, la cantidad de crioprotector difundido no influye sobre el grado de contracción del cristal. Por otra parte en ningún caso se observa la formación de cristales de hielo o la deformación de los puntos de difracción por un aumento de la mosaicidad de los cristales.

A raíz de esta observación nos planteamos el posible papel del gel de sílice como crioprotector de los cristales de proteína.

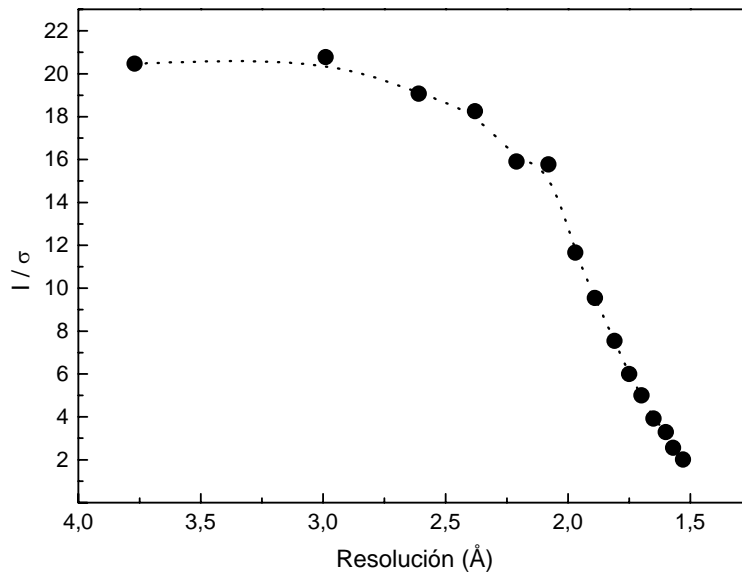
Se realizan pruebas de congelación directa de los cristales de proteína manteniendo un poco de gel como soporte para el lazo que los sostiene. Comprobamos como los cristales se congelan sin modificar el límite de la intensidad observable en todo el rango de concentraciones de gel. Por encima del 6% aparecen anillos de agua que invalidan la adquisición, al menos a baja resolución. La aparición de estos anillos se debe a que al aumentar la concentración de gel el tamaño de los cristales disminuye y la cantidad de gel necesario para soportarlos en el lazo es mayor.

La siguiente cuestión que hay que resolver es si los cristales se degradan con el tiempo. Se toman  $90^\circ$  de un cristal crecido en un 4% v/v de concentración de gel. Las condiciones de adquisición fueron un grado por imagen con 6 minutos de exposición. A partir de estos datos comprobamos como la intensidad de la difracción no decae durante toda la adquisición (Fig.5.2-32).



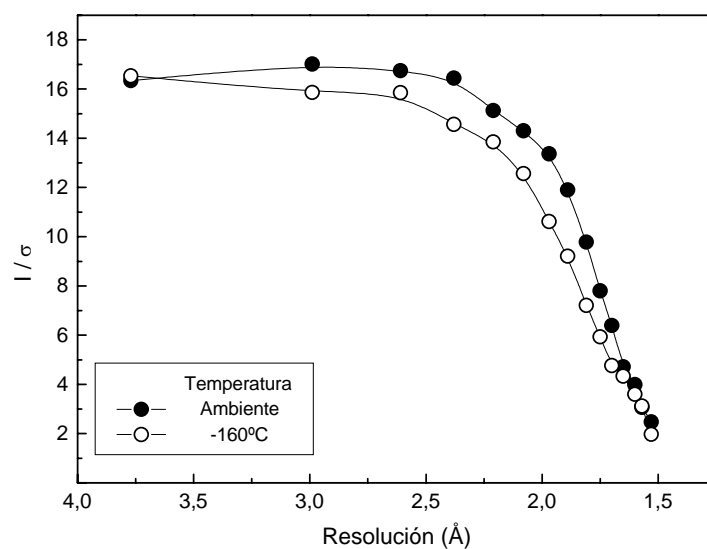
**Fig.5.2-32** Evolución de los parámetros de red “a,” “b” y “c” de cristales de lisozima en función de la concentración de gel para cristales medidos a temperatura ambiente (símbolos llenos) y a  $-160^{\circ}\text{C}$  (símbolos vacíos).





**Fig.5.2-32** Variación de la relación señal sobre ruido ( $I/\sigma$ ) en función de la resolución ( $\text{sen}^2\theta/\lambda^2$ ) para un cristal de lisozima crecido en un 4% de gel de sílice difractado a  $-160^\circ\text{C}$  sin crioprotector.

Para comparar este cristal con otro difractado a temperatura ambiente se toman 15 imágenes de cada uno de ellos con 15 minutos de exposición y un grado de rotación por imagen (Fig.5.2-33). No observamos diferencias apreciables que no puedan ser debidas a una diferente orientación inicial del cristal como se observa a partir de los datos de completitud total, 43.8 y 30.6% para el cristal a temperatura ambiente y congelado respectivamente.

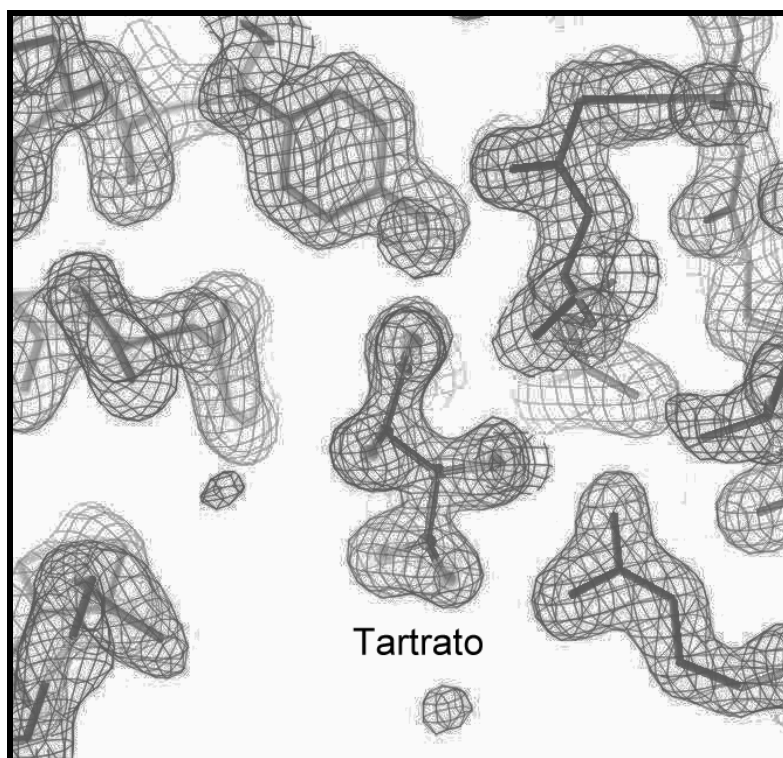


**Fig.5.2-33** Variación de la relación señal sobre ruido ( $I/\sigma$ ) en función de la resolución ( $\text{sen}^2\theta/\lambda^2$ ) para cristales de lisozima crecidos en un 4% de gel de sílice congelado y sin congelar..

A partir de estos resultados podemos concluir que el gel de sílice incorporado durante el crecimiento de los cristales: no afecta al límite de resolución y sirve como crioprotector de los cristales evitando la manipulación y el estrés al que se someten los cristales durante el proceso de equilibrado con el crioprotector. Por otra parte la incorporación en el cristal de una cantidad de gel superior al 6% impide la contracción de la red cristalina en la dirección  $a=b$  durante la congelación.

Paralelamente se realizan medidas puntuales con cristales de thaumatina (tetragonal,  $P4_22_12$ ) crecidos en geles de TMOS 10% y 20% v/v. Al igual que ocurre con lisozima es posible congelar los cristales sin crioprotector y obtener una resolución de 1.8 Å con 15 minutos de exposición. Sin embargo cuando el tiempo de exposición se aumenta a 30 minutos la intensidad observable baja hasta 1.5 Å. El mismo resultado se obtiene cuando los cristales, equilibrados durante 5 minutos en 30% v/v de glicerol, se difractan a  $-160^\circ\text{C}$ .

Para responder a la pregunta de si las fibras de gel ocupan posiciones cristalográficas en los cristales o lo que es lo mismo si existen interacciones específicas entre las fibras y las moléculas de proteínas, se resuelve la estructura de la thaumatina tetragonal a partir de un juego completo de datos de difracción de un cristal crecido en 20% v/v de TMOS. La difracción del cristal se llevó a cabo en el *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire – CNRS* en Estrasburgo. La resolución de la estructura corrió a cargo del doctor C. Sauter (Fig.5.2-34).

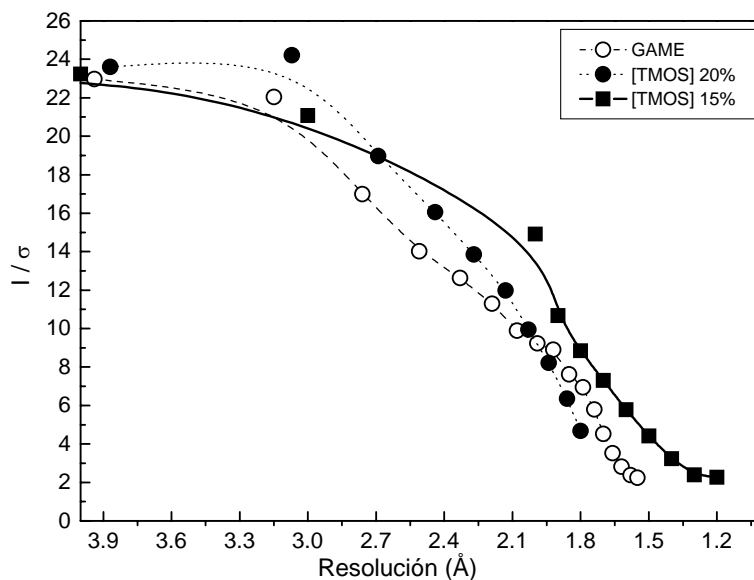


**Fig.5.2-34** Mapa de densidad electrónica ( $2F_o-F_c$ ) para un cristal de thaumatina crecido en un 20% de gel de sílice realizado con un valor de corte de densidad de  $1.4\sigma$ . La densidad electrónica de la molécula centrada se identifica como tartrato, rodeado por restos pertenecientes a tres moléculas de thaumatina.

Los cálculos se han realizado empleando el método de reemplazamiento molecular a partir de la estructura depositada en el PDB. El mapa de densidad electrónica se calcula a 1.8 Å de resolución y se presenta como 2Fo-Fc (Fo, factores de estructura observado y Fc, los calculados) con un corte de ruido de  $1.4\sigma$ . En el cálculo sólo se tienen en cuenta los átomos de proteína, lo que permite ver una densidad electrónica extra entre cada tres moléculas de thaumatina. Esta densidad electrónica adicional se identifica como tartrato ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ), la sal empleada durante la cristalización (Fig.5.2-34).

A partir de estos resultados podemos afirmar que las fibras de sílice no ocupan posiciones preferentes en el interior de los cristales de proteína y que por tanto la configuración de las fibras debe de ser similar a la del gel que rodea el cristal, amorfa.

La estadística obtenida del cristal anterior (20% TMOS) se compara con la obtenida para un cristal de thaumatina crecido al 15% de TMOS a partir de los datos de difracción adquiridos empleando radiación sincrotrón en la línea W-32 de las instalaciones del LURE<sup>ii</sup> y con la obtenida para un cristal de thaumatina crecido mediante el GAME en un instrumento convencional. En todos los casos la calidad de los cristales es similar a baja resolución. Sin embargo, el cristal crecido en un 15% de sílice presenta el menor límite de resolución, por debajo de cualquiera de las estructuras depositadas en el PDB hasta la fecha y similar al obtenido en la misma línea para un cristal de thaumatina crecido mediante el GAME (ver apartado 4.6-1.A).

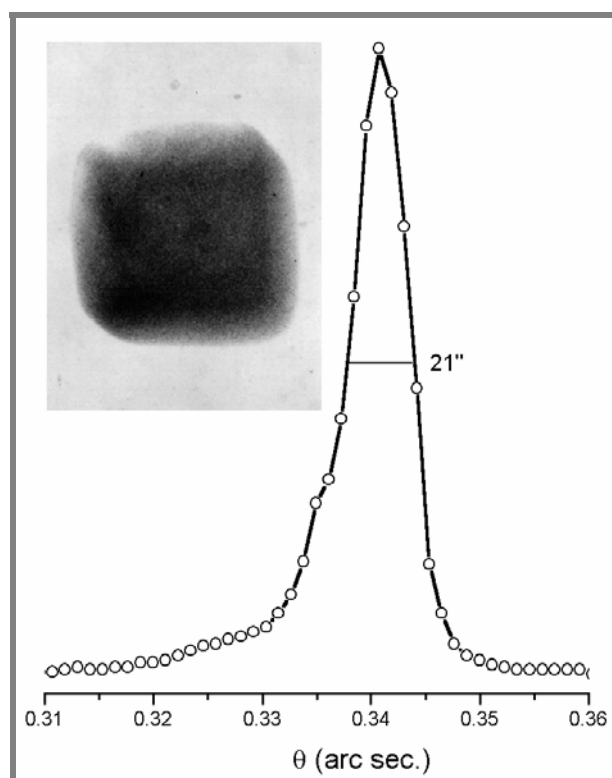


**Fig.5.2-35** Evolución de la relación señal sobre ruido ( $I/\sigma$ ) en función de la resolución ( $\text{sen}^2\theta/\lambda^2$ ) para cristales de thaumatina crecidos por contradifusión en el interior de un capilar mediante el GAME (símbolos vacíos) y en gel de sílice 20% (círculos llenos) y 15% (cuadrados) de concentración.

<sup>ii</sup> El análisis de estos datos se realizó con el programa XDS [Kabsch, 1993] y corre a cargo del doctor D. J. López Jaramillo.

Sobre un cristal de thaumatina crecido en un 20% de TMOS y un cristal de lisozima crecido en un 5% de TMOS se realizan medidas puntuales de mosaicidad. Las medidas se llevan a cabo en la línea D-25b de las instalaciones del acelerador LURE.

Para el cristal de thaumatina el valor de FWHM (anchura de pico a media altura, de las siglas en inglés) fue de 12 segundos de arco mientras que para lisozima fue de 21 segundos de arco (Fig.5.2-36). Ambos valores comparables a los publicados por Vidal y colaboradores (1998) en geles de TMOS a 1.4% v/v de concentración para lisozima tetragonal (30''-15'') o los obtenidos por Lorber y colaboradores (1999) para thaumatina crecida en geles de agarosa (18.8''-3.2'').



**Fig.5.2-36** "Rocking Curve" y topografía de un cristal de lisozima crecido en un 5% v/v de gel de sílice.

En la figura 5.2-36 se muestra la topografía de un cristal de lisozima crecido en un 5% de TMOS obtenida sobre el pico de difracción del perfil de la gráfica. Se observa que prácticamente todo el volumen del cristal se encuentra en condición de difracción y que por tanto está constituido por un solo bloque mosaico.

Podemos concluir que los cristales de proteínas son capaces de incorporar grandes cantidades de sílice sin detrimento de la calidad cristalina facilitando su manipulación y aumentando su estabilidad mecánica y frente a la deshidratación. El uso de geles de sílice en técnicas contradifusivas permite elevar la calidad de los cristales que crecen prácticamente libres de defectos y presentan los menores límites de resolución.

### 5.3. CRISTALIZACIÓN EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa son con diferencia los más empleados en la cristalización de proteínas. Son fáciles de preparar, estables en amplio rango de pH (3.0-9.0) y presentan una elevada resistencia mecánica y elasticidad a bajas concentraciones (<6% p/v). Habitualmente se usan en distintas técnicas de biología molecular (como medio de cultivo celular, electroforesis, etc.) por lo que la comunidad científica se encuentra ampliamente familiarizada con ellos y reconoce su elevada tolerancia frente a los productos biológicos.

En cristalización de proteínas los geles de agarosa proporcionan un medio difusivo del transporte de materia que favorece la obtención de cristales de elevada calidad. Son numerosos los trabajos de cristalización en los que los geles de agarosa se emplean, no sólo como medio para evitar la convección, sino también como amortiguadores del efecto de impurezas o como único camino para la obtención de cristales (ver capítulo 3).

En este apartado se buscan las condiciones de cristalización de lisozima tetragonal que permitan realizar un seguimiento estadístico de la densidad de nucleación en un amplio rango de concentración de agarosa.

Por otra parte los geles de agarosa poseen un claro efecto inductor sobre la nucleación de cristales de lisozima tetragonal. Se barajan fundamentalmente tres hipótesis: un aumento de la sobresaturación aparente por eliminación del agua del medio que entraría a formar parte de las cadenas de gel [Prostov y Robert, 1995], una estabilización mecánica de la solución en la que los agregados primarios no sedimentarían evitando un gradiente convectivo de concentración en la solución [Robert, et al., 1994; Vidal, et al 1999] y por último una estabilización de estos agregados primarios por interacción con las fibras del gel (ver capítulo 3º). Sin embargo, de los resultados de este trabajo se deduce un papel más activo del gel de agarosa, así como una dependencia de la metodología experimental sobre los resultados finales.

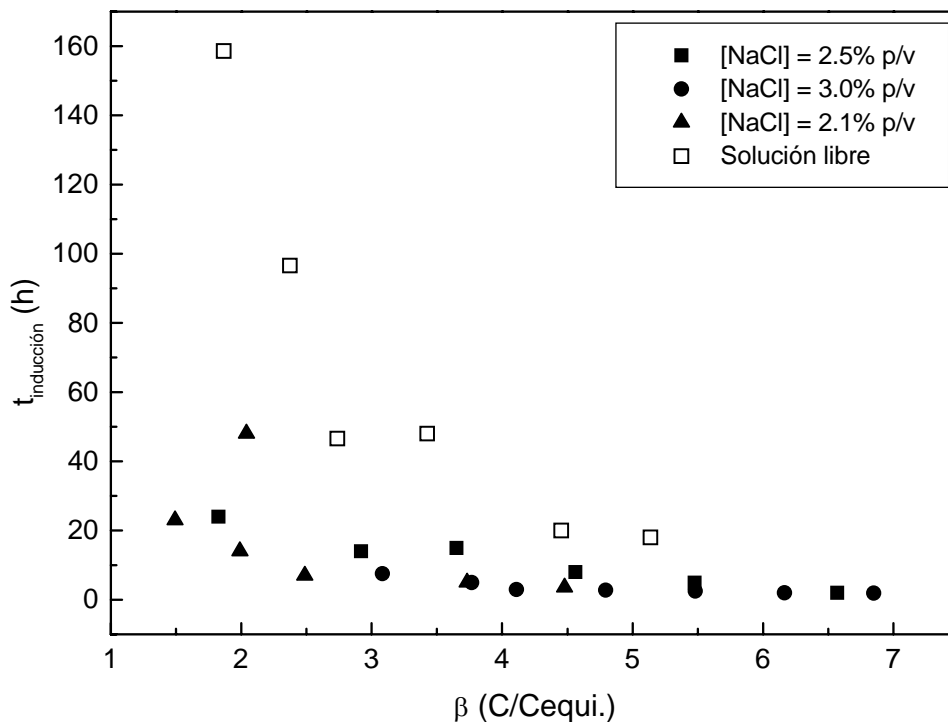
#### 5.3.1. CRISTALIZACIÓN DE LISOZIMA EN GELES DE AGAROSA

Las primeras experiencias se centran en la búsqueda de unas condiciones de sobresaturación en las que el tiempo de inducción no fuese superior a 12 horas y el número de cristales sea el adecuado para realizar estudios estadísticos, requisitos ambos para analizar la influencia de un campo magnético sobre la cristalización de lisozima (capítulo 6).

Se realizan una serie de ensayos preliminares en los que se varían las concentraciones de sal (2-3% p/v) y de lisozima (45-180 mg/ml; Sigma, L-6876, Lot. 53H7145) con el fin de obtener un amplio abanico de sobresaturaciones. El diseño del experimental se realiza a partir de las curvas de equilibrio en función de la temperatura publicadas por Rosenberger en 1993.

Siguiendo el protocolo III descrito en el capítulo segundo, las muestras se preparan por mezcla directa de los volúmenes oportunos de las soluciones madre de sal, proteína y gel. La concentración de gel se varía entre 0.05 y 0.2% p/v sin una correlación directa con al sobresaturación. En el transcurso de estas pruebas preliminares observamos que efectivamente la

presencia de gel aumentaba el flujo de nucleación y disminuía el tiempo de inducción con respecto de la proteína en solución (Fig. 5.3-1).



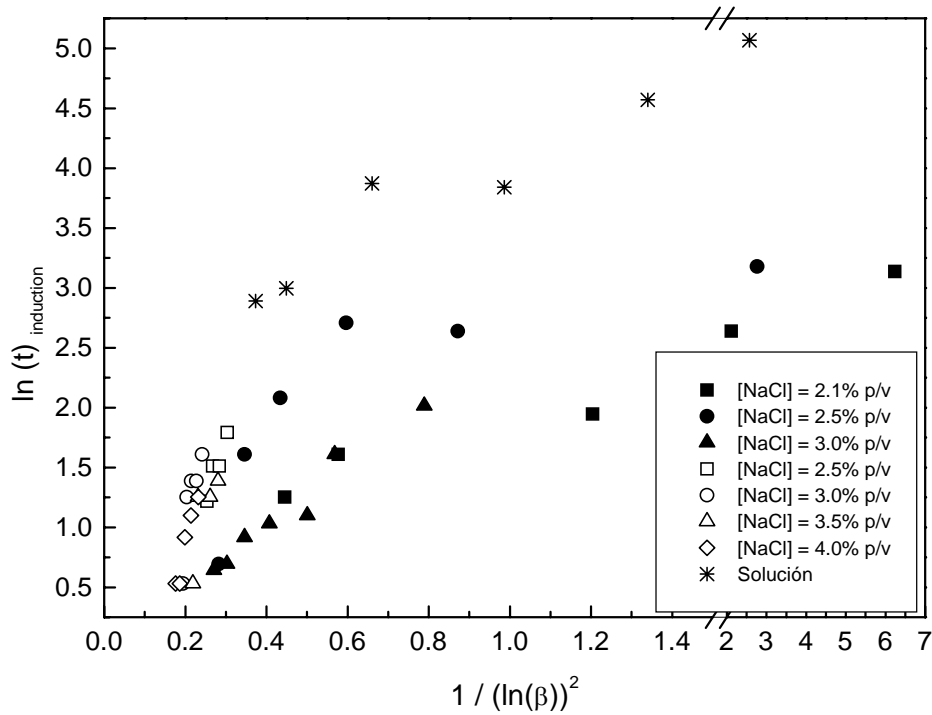
**Fig.5.3-1** Tiempo de inducción en función de la sobresaturación para experiencias realizadas en gel de agarosa a distintas concentraciones (símbolos llenos) y en solución libre (símbolos vacíos) empleando lisozima de la casa comercial Sigma Lot 53H7145.

Durante el desarrollo de estas experiencias se emplea un nuevo lote de proteína (Sigma, L-6876, Lot. 65H7025) con una mayor actividad específica (ver apéndice I). En las experiencias realizadas con el nuevo lote se observa un aumento de los tiempos de inducción respecto de los obtenidos con el antiguo lote de proteína. Este tipo de artefactos dependientes de la calidad de la proteína se ha descrito anteriormente, por lo que se decide adquirir suficiente cantidad del nuevo lote a fin de homogeneizar los resultados.

Para evitar otros posibles artefactos se acota el número de variables puestas en juego y la búsqueda de las mejores condiciones se realiza manteniendo constante la concentración de gel de agarosa a 0.1% p/v, intermedia en el rango de concentraciones de gel que nos disponíamos a barrer.

A partir de estos resultados se comprueba que efectivamente los tiempos de inducción aumentan cuando se emplea el nuevo lote de proteína. Estas diferencias se observan con más

claridad cuando se representa la dependencia termodinámica del tiempo de inducción con la sobresaturación [i] [Nývlt et al., 1985] (Fig.5.3-2).



**Fig.5.3-2** Variación del logaritmo del tiempo de inducción en función de la inversa del cuadrado del logaritmo de la sobresaturación, para experiencias llevadas a cabo en gel de agarosa al 0.1% p/v con lisozima de sigma Lot.65H7025 (símbolos vacíos) y Lot.53H7145 (símbolos llenos).

Por otra parte comprobamos como incluso manteniendo la concentración de gel constante el número y tamaño de los cristales presentan una gran dispersión sin ninguna relación con la sobresaturación. Estas variaciones deben estar moduladas de alguna forma por la concentración de proteína y/o de sal y pueden estar asociadas tanto al cambio de estructura como a la modificación de las características superficiales del gel.

<sup>i</sup> La expresión clásica del tiempo de inducción en función de la sobresaturación (β) se deduce a partir de su relación con el flujo de nucleación:

$$J = \Omega \cdot \exp(-K' / T^3 \log^2 \beta) \tag{Ec.5.3-1}$$

donde  $K' = \omega \cdot (\sigma_{12}^*)^3 \cdot v^2 / k^3$ , siendo  $\omega$ ,  $\sigma_{12}$ ,  $v$  y  $k$ , la concentración, energía específica de superficie, el volumen molecular y la constante de Boltzman respectivamente y  $\Omega$  el factor pre-exponencial. Puesto que el periodo de inducción es proporcional al flujo de nucleación ( $t_N = K/J$ , donde  $K$  es una constante de proporcionalidad) tenemos:

$$t_N = \Omega^{-1} \cdot \exp(K' / T^3 \log^2 \beta) \tag{Ec.5.3-2}$$

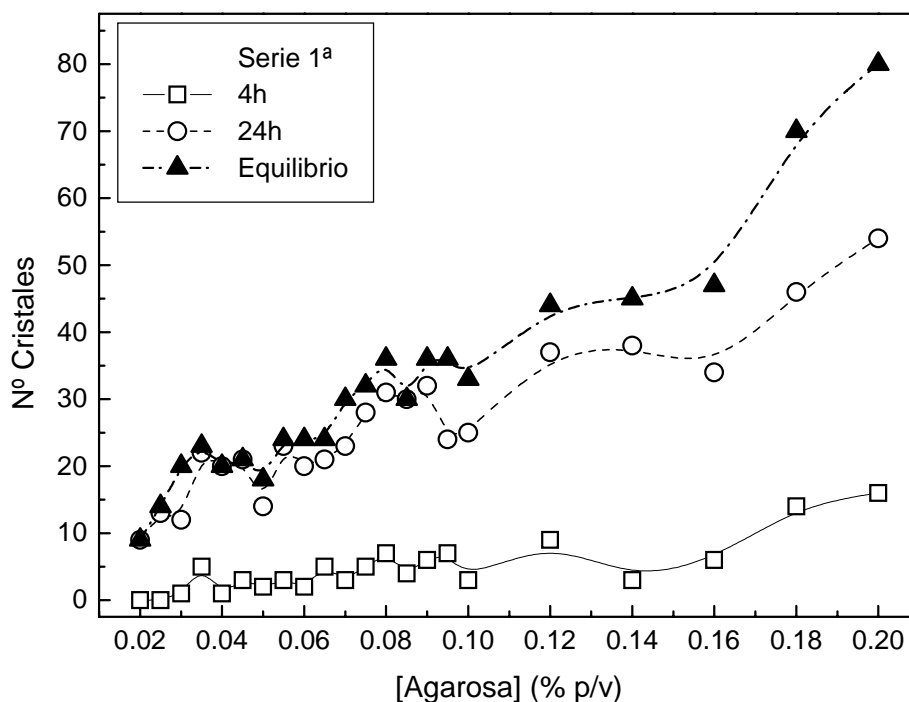
A partir de estos resultados se escoge una sobresaturación de 8.7 ( $T=22^{\circ}\text{C}$ ) obtenida a partir de NaCl 4.0% p/v y 60 mg/ml de lisozima. En estas condiciones el tiempo de inducción es aproximadamente de 3 horas. Teniendo en cuenta que estas experiencias se realizan en 0.1% (p/v) de gel de agarosa y que un descenso de la concentración de gel aumenta el tiempo de inducción, estos valores representan el mejor compromiso para continuar el estudio. Por otra parte a elevados valores de sobresaturación la dependencia entre el tiempo de inducción y la sobresaturación (ver figura 5.3-2) es lineal, lo que indica que no existe una inducción de nucleación heterogénea por parte de las fibras de agarosa.

### 5.3.1.1 INFLUENCIA DE LA AGAROSA SOBRE EL FLUJO DE NUCLEACIÓN

El siguiente paso es conocer la influencia de la concentración de gel sobre el flujo de nucleación manteniendo el resto de las condiciones constantes e idénticas a las señaladas.

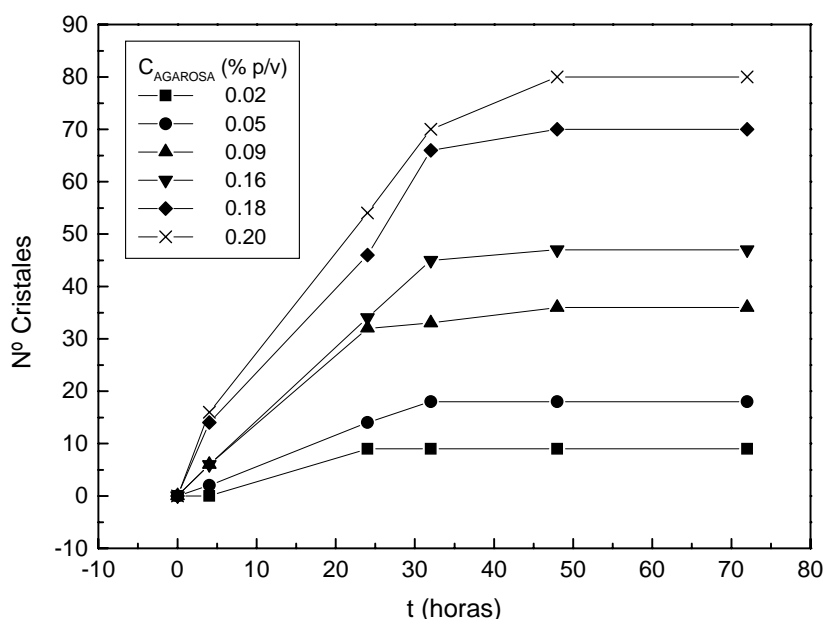
En la primera serie experimental la concentración de gel se varía dentro del rango 0.02-0.2% p/v, con un incremento del 0.005% en el rango 0.02-0.1% y del 0.02% por encima de 0.1% y hasta 0.2%.

En la figura 5.3-3 se muestra como varía la densidad de nucleación en función de la concentración de gel a lo largo del tiempo. Aunque no se lleva a cabo un seguimiento exhaustivo del tiempo de inducción, se observa que disminuye al aumentar la concentración de gel.

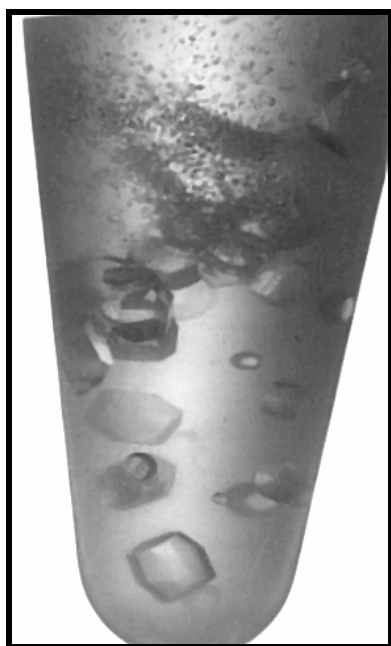


**Fig.5.3-3** Variación de la densidad de nucleación de cristales de lisozima en función de la concentración de gel de agarosa. Las diferentes curvas muestran la evolución temporal de para cada concentración de gel.





**Fig.5.3-4** Variación de la densidad de nucleación de lisozima en función del tiempo para experiencias realizadas a distinta concentración de gel de agarosa.



**Fig.5.3-5** Fotografía de un “batch” de lisozima ( $\beta=8.7$ ) en 0.035% p/v de gel de agarosa. La fotografía muestra la segunda nucleación sobre las fibras de gel provocada al sedimentar los cristales.

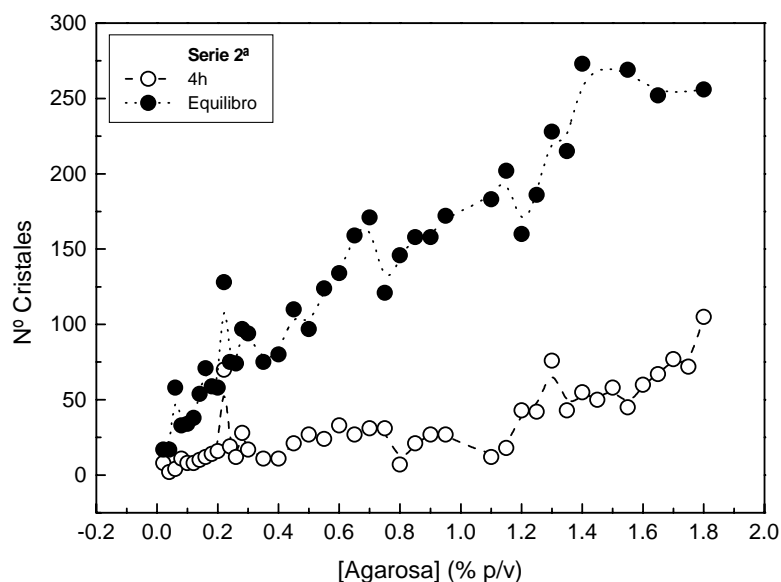
La densidad de nucleación aumenta con el tiempo hasta estabilizarse entorno a las 48 horas en la experiencia con 0.2% p/v de gel. Este tiempo de equilibrado se divide por dos cuando la concentración de gel descende un orden de magnitud (Fig.5.3-4).

Esporádicamente pueden aparecer nuevos núcleos en algunos tubos por encima del tiempo de equilibrado, pero estos no se contabilizan. Tampoco se tienen en cuenta la aparición ocasional de conglomerados de pequeños núcleos en tubos con baja concentración de gel ( $\leq 0.075\%$  p/v), provocado por inducción mecánica al invertir los tubos para su observación. Durante la manipulación los cristales de gran tamaño sedimentan desprendiendo pequeños fragmentos que sirven de centros de nucleación. Hay que destacar que estas

nubes de cristales permanecen adheridas a las fibras de gel que son arrastradas por los cristales durante la sedimentación (Fig.5.3-5).

Una hipótesis para explicar este acumulo de cristales sobre las fibras de gel es que estas fibras se encuentran adheridas a la superficie de los grandes cristales. Durante la sedimentación las fibras se desprenden rasgando la superficie del cristal y generando los centros de nucleación secundaria que en gran parte permanecen adheridos a las fibras.

Thiessen (1994) encuentra que por encima de 0.4% p/v de concentración el efecto inductor del gel de agarosa revierte, y que este comportamiento se repite a distintas concentraciones de sal manteniendo la concentración de proteína constante. Para comprobar este punto se realiza una nueva serie experimental aumentando el límite superior de concentración a 1.8% p/v. En esta serie el incremento de concentración es del 0.02% en el rango 0.02-0.3% y del 0.05% por encima de 0.3% p/v. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 5.3-6.



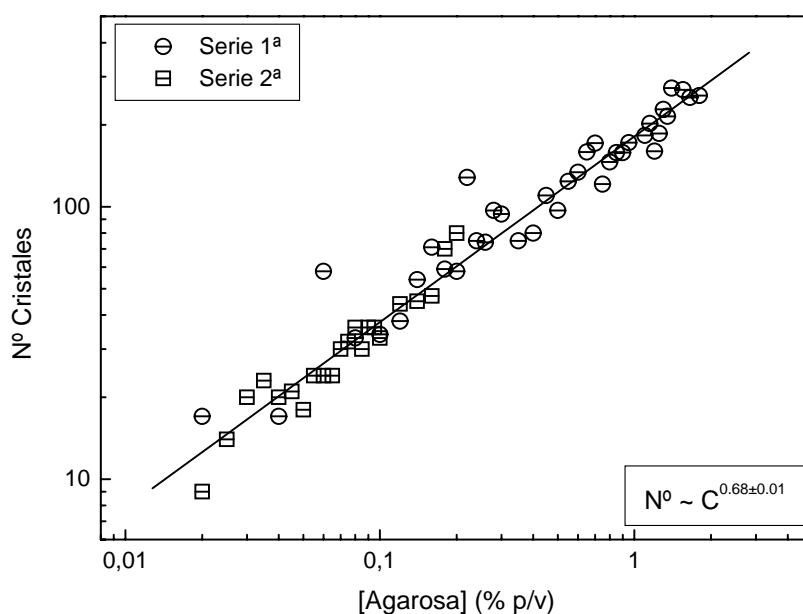
**Fig.5.3-6** Variación de flujo de nucleación en función de la concentración de gel de agarosa a lo largo del tiempo para experiencias realizadas con lisozima a una sobresaturación inicial de 8.6.

No se observan grandes diferencias con respecto a la primera serie. En ambos casos la densidad de nucleación aumenta con la concentración de gel de forma prácticamente lineal con episodios esporádicos de incremento de la densidad de nucleación en forma de dientes de sierra. Un análisis más detallado deja ver regiones con dependencia lineal seguidos de regiones con dependencia constante. En la segunda serie se observa una saturación del efecto inductor de la agarosa cuando la concentración supera el valor de 1.4% p/v (Fig.5.1-6).

Cuando se representan ambas series en una gráfica logarítmica se comprueba que existe una elevada reproducibilidad entre ambas series (Fig.5.3-7). El ajuste del conjunto de datos de las dos series a la ecuación de una recta ( $r=0.98$ ) permite deducir una relación potencial entre la densidad de nucleación y la concentración de gel:  $N^{\circ} \text{ Cristales} = 2.25 \pm 0.01 + C^{0.68 \pm 0.01}$ . Esta relación es similar a la que sigue el porcentaje de fibras libres en función de la concentración de gel

o inversamente proporcional a la relación que sigue el tamaño de poro promedio con la concentración de concentración de gel (capítulo 3). Sin embargo, la dependencia entre la densidad de nucleación y el tamaño de poro no explica el aumento de cristales a concentraciones de agarosa inferiores a 0.1% ya que las fibras no forman un entramado de percolación, no existen poros. Tampoco es posible explicar este aumento de la densidad de nucleación basándose en el aumento de la sobresaturación por eliminación de agua [Prostov y Robert, 1995].

Por tanto estos resultados parecen indicar la participación activa de las fibras de gel sobre la nucleación. Sin embargo en la bibliografía podemos encontrar que un sol de agarosa (un gel por encima de su temperatura de polimerización) no ejerce ningún efecto sobre la nucleación de la lisozima [Provost y Robert, 1991] y que no existe interacción entre las fibras de agarosa y la lisozima en solución [Vidal et al., 1999]. Por tanto de existir interacción, esta debe de ocurrir entre las fibras de agarosa en estado polimerizado y los agregados cristalinos. Aunque, por otra parte hemos señalado que no se aprecia una inducción heterogénea de la nucleación.



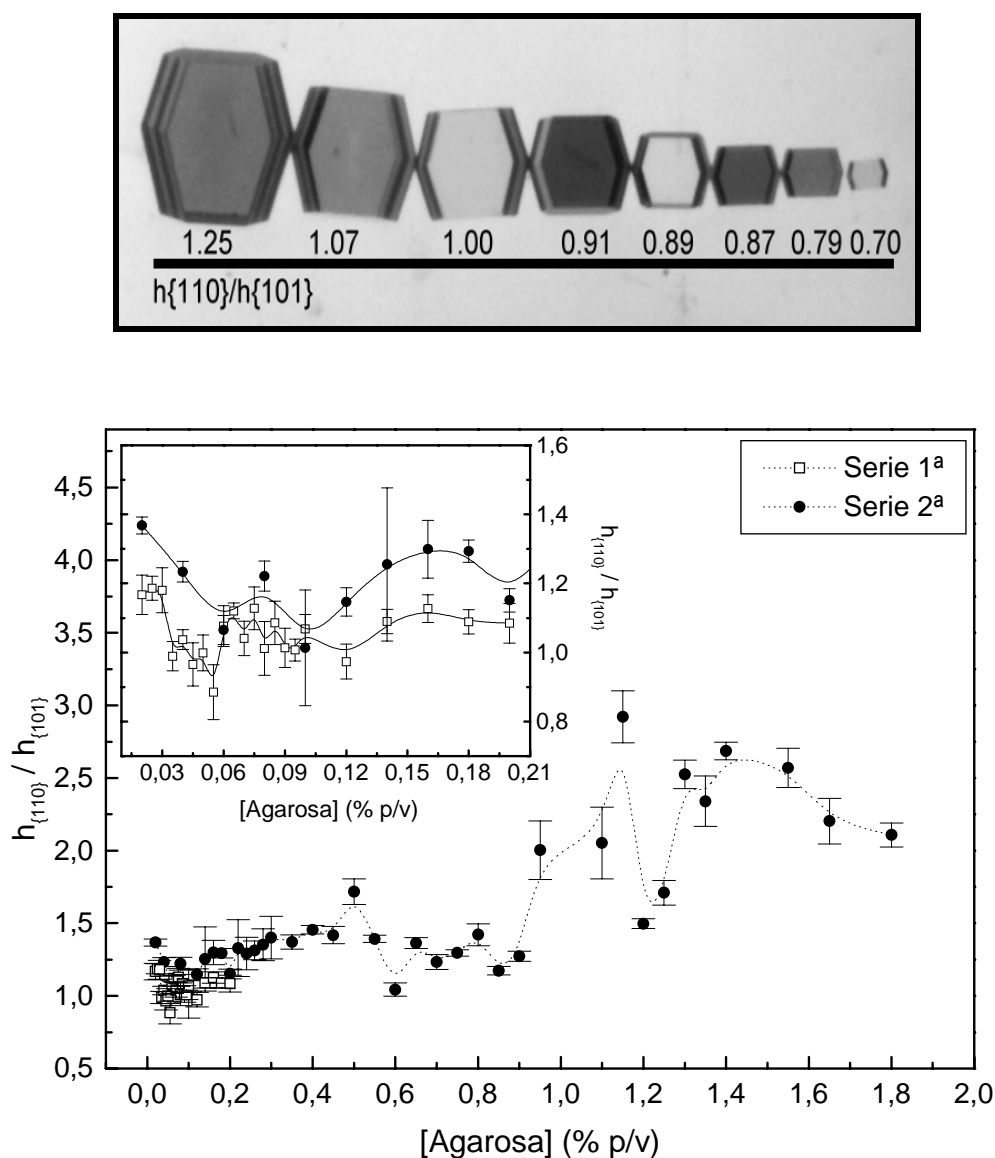
**Fig.5.1-7** Representación logarítmica de la densidad de nucleación en función de la concentración de gel.

La misma reproducibilidad ente ambas series se observa cuando representamos los valores de razón de forma promedio de los cristales (Fig.5.3-8). Las medidas se llevan a cabo tomando entre 20 y 30 cristales de cada experiencia sobre los que se determinan las dimensiones características  $W$  y  $L$ , según se describe en el apartado 4.4-2 del capítulo anterior. La dispersión de datos de la razón de forma promedio es consecuencia directa de la evolución temporal de la sobresaturación.

Esta evolución se explica teniendo en cuenta que en medios gelificados la nucleación en un determinado punto crea un gradiente de sobresaturación entorno a este punto o sumidero de

proteína. La pendiente de este gradiente de concentración de proteína es función de la concentración de gel (de cómo de difusivo sea el medio). El lento descenso de la concentración de proteína en puntos alejados de los sumideros de proteína aumenta la probabilidad de aparición de nuevos núcleos.

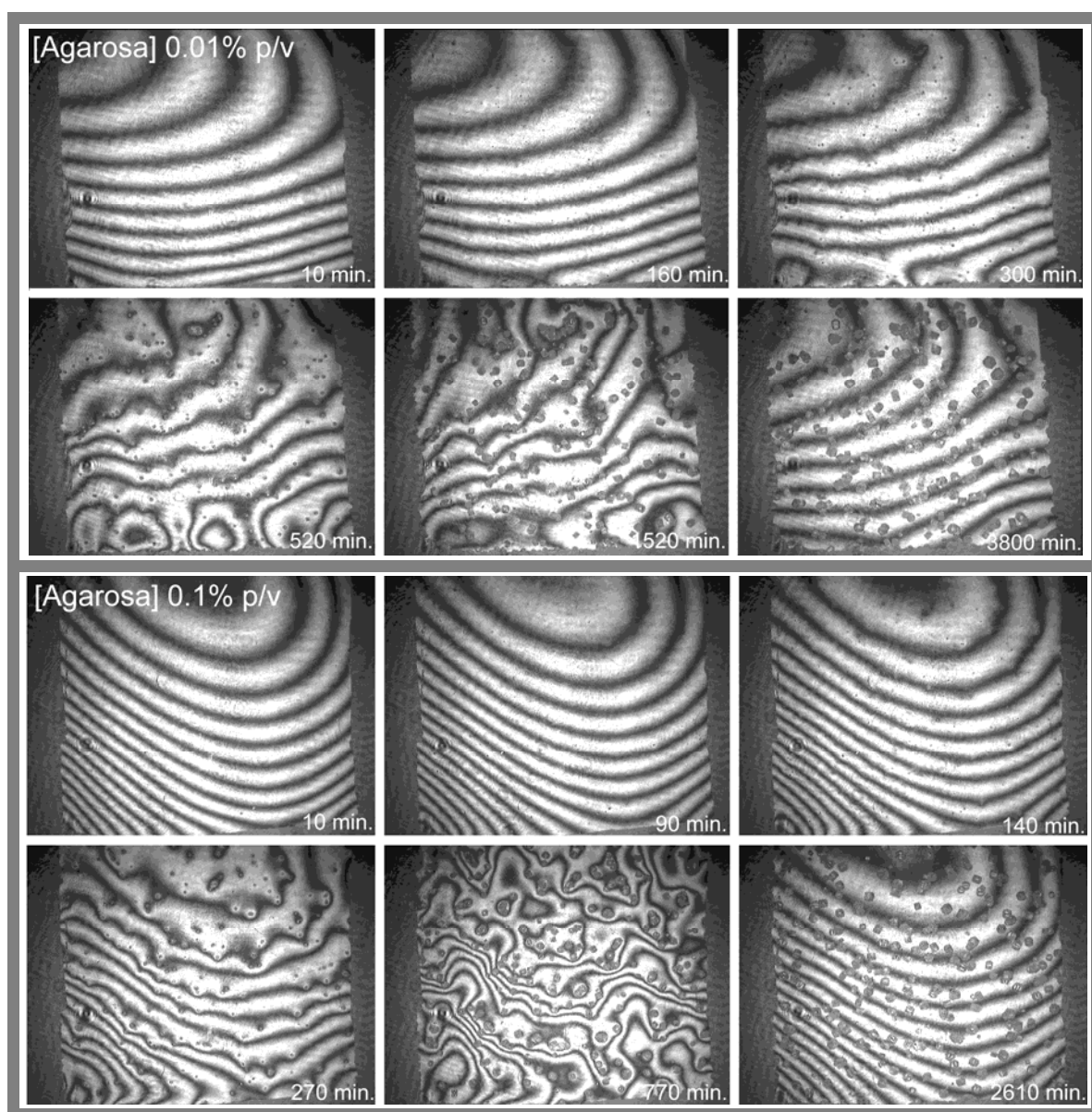
La dispersión de valores de razón de forma en cada tubo depende no sólo del descenso del coeficiente de difusión de la proteína, sino también de la propia distribución de los núcleos en el volumen de crecimiento. En la fotografía de la figura 5.3-8 se recoge un caso moderado de esta variación a 0.12% de concentración de agarosa.



**Fig.5.3-8** En la parte superior se muestra los distintos hábitos que aparecen en una experiencia realizada en gel de agarosa de 0.12% p/v. En la parte inferior se recoge la variación de la razón de forma en función de la concentración de gel para las dos series estudiadas. En la gráfica insertada se muestra la región 0.02-0.2% p/v.

Cabe destacar el aumento drástico de la razón de forma promediada cuando la concentración de gel supera el 1.0% de concentración. Este aumento puede ser debido a que los fenómenos de retención de agua en los canales de las fibras comienzan a ser importantes [Provost y Robert, 1995] o al aumento del error experimental, ya que por encima del 1.0% la viscosidad de gel dificulta la toma precisa de pequeños volúmenes.

Con objeto de encontrar la concentración mínima de gel capaz de mantener un entorno de crecimiento difusivo se realizan una serie de experiencias seguidas por interferometría Mach-Zehnder (Fig.5.3-9). En todas las experiencias se mantienen constantes las concentraciones de sal y proteína a 2.5% p/v y 60 mg/ml respectivamente y se varía la concentración de gel. Las condiciones se optimizan siguiendo una secuencia de búsqueda similar a la descrita el comienzo de este apartado y teniendo en cuenta que la temperatura de trabajo es en este caso de 18°C.



**Fig.5.3-9** Secuencias de imágenes de interferometría de la nucleación de cristales de lisozima en NaCl a 60 mg/ml y 2.5% p/v respectivamente en geles de agarosa a distinta concentración ( $T=20^{\circ}\text{C}$ ).

Los resultados preliminares se muestran en la figura 5.3-9, en la que hemos representados los dos casos extremos. De forma cualitativa se observa como a concentraciones de 0.01% p/v de agarosa aún se mantiene un cierto carácter difusivo del medio. A esta concentración de gel los cristales crean una depresión de proteína entorno a ellos. Sin embargo si nos fijamos en la parte inferior de la segunda imagen (160 minutos) comprobamos como es el primer lugar en el que aparecen perturbaciones del patrón de franjas original dando cuenta de un fenómeno de sedimentación y consecuente convección en dicha región. Si comparamos estas imágenes con las obtenidas en 0.1% p/v de agarosa comprobamos como en estas las bandas del interferograma se deforman de forma homogénea por toda la imagen como cabe esperar en un medio completamente difusivo.

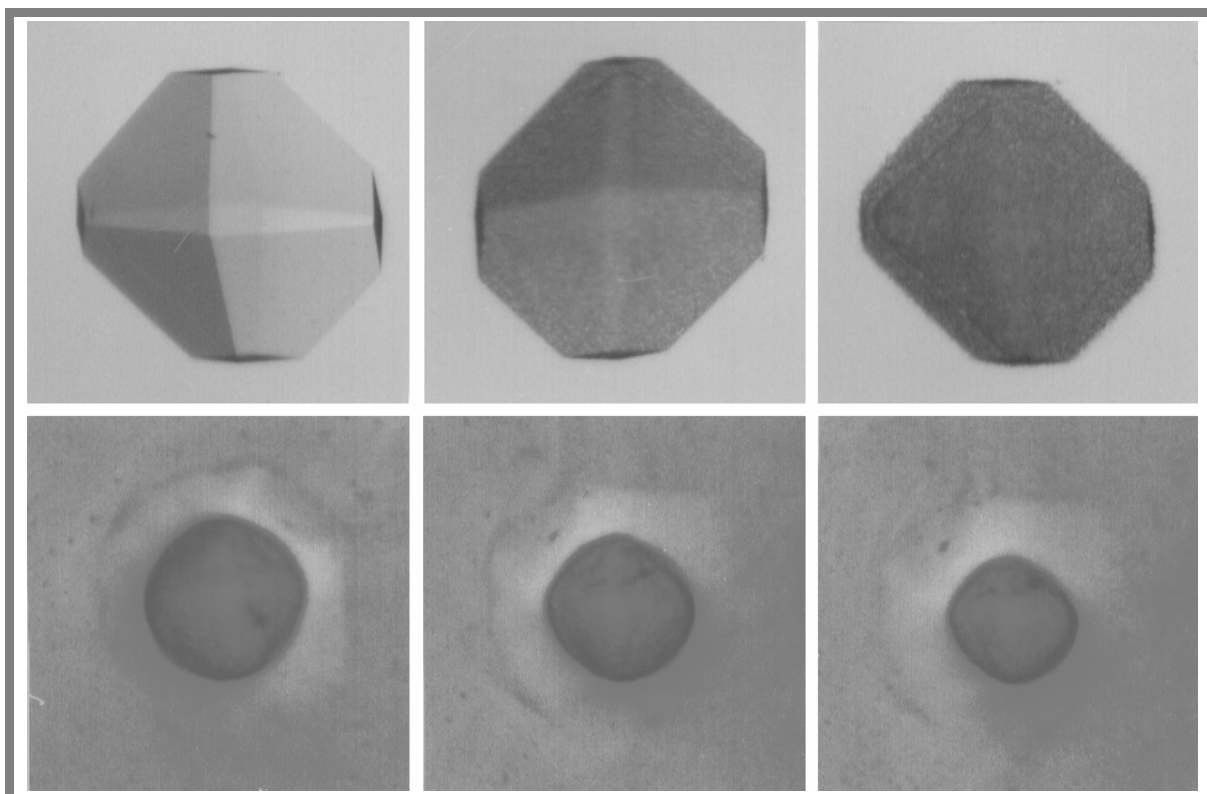
A concentraciones por encima de 0.02% los fenómenos de sedimentación se reducen visiblemente, pero esto no indica que podamos considerar la difusión como el mecanismo de transporte predominante. Es necesario llevar a cabo el análisis cuantitativo de los datos para poder establecer cuando la convección predomina el transporte de masa.

### 5.3.1.2 INCORPORACIÓN DEL GEL DE AGAROSA EN LOS CRISTALES DE PROTEÍNAS

En cuanto al crecimiento de cristales de proteína en el interior de geles de agarosa se asume, al igual que ocurre con los geles de sílice, que los cristales crecen apartando la malla de gel que los rodea durante su crecimiento, creando microcavidades entorno a ellos [Bonneté et al., 1996].

Para comprobar si los cristales de proteína se comportan frente a las fibras de agarosa al igual que frente a los geles de sílice se sigue la misma secuencia de ensayos realizados con estos (apartado 5.2.1-2).

En primer lugar se realizan experiencias de disolución de cristales de lisozima, thaumatina y ferritina crecidos en geles de agarosa a una concentración final de 0.5% p/v. En todos los casos se obtienen los restos de gel después de eliminar la proteína. En la figura 5.3-10 se muestra como la disolución de un cristal de lisozima crecido en un 0.5% p/v de agarosa deja un esqueleto de gel que conserva la misma forma y volumen del cristal original. La elevada transparencia de los geles de agarosa impide su observación con luz transmitida. Para contrastarlo se añade un colorante a la solución (tres últimas imágenes de la secuencia). La adición del colorante provoca la precipitación de la proteína, lo que en cierto modo ayuda al seguimiento de la disolución del cristal. A concentraciones inferiores de agarosa ( $\leq 0.1\%$ ) es prácticamente imposible estabilizar el sistema para fotografiarlo, aunque se observa con nitidez empleando luz reflejada.



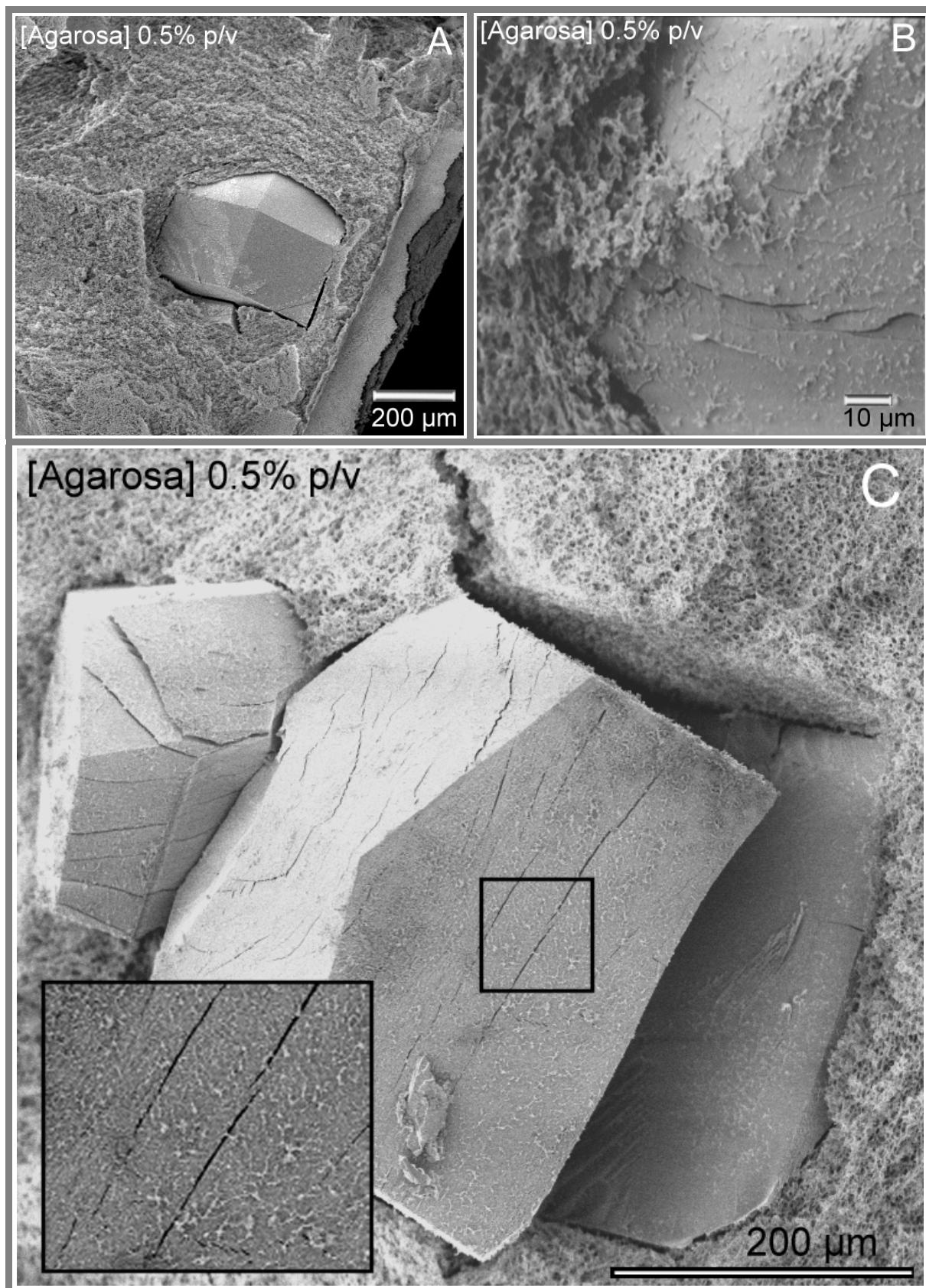
**Fig.5.3-10** Disolución de un cristal de lisozima tetragonal crecido en un 0.5% p/v de gel de agarosa que muestran la mascara de gel. Las tres fotografías de la parte inferior se contrastaron añadiendo un colorante para poder observar la presencia del gel.

El segundo paso es comprobar que los cristales crecen rodeados de gel y corroborar, al igual que se hizo con los geles de sílice, que las fibras de gel se encuentran en el interior de los cristales.

Para ello se tomaron cilindros de gel de agarosa de 4 mm de diámetro sobre los que habíamos crecido los cristales de lisozima empleando la contradifusión (ver capítulo 4). Los cilindros se trataron siguiendo el mismo protocolo de "Freeze drying" descrito en el apartado anterior para la deshidratación de geles de sílice. Los fragmentos de 5 mm deshidratados se metalizan con oro.

Las imágenes de MEB de las muestras fracturadas y metalizadas dejan ver que los cristales crecen rodeados por completo de gel (Fig.5.3-11). Por otra parte se comprueba que las fibras no solo se encuentran distribuidas por toda la superficie del cristal sino que también ocupan el plano de la fractura que se muestra en la fotografía 5.3-11.C.

En este sentido las conclusiones son idénticas a las obtenidas con los geles de sílice: los cristales crecen en todo momento en un entorno difusivo incorporando durante su crecimiento las fibras de gel que los rodean.



**Fig.5.3-10** En la fotografía A se observa las caras bipiramidales  $\{101\}$  de un cristal de lisozima en el seno de un gel de agarosa 0.5% p/v que muestra la continuidad entre los cristales y el gel, a mayor resolución en B. En C un cristal fracturado que muestra las fibras tanto en el interior del cristal como en la superficie del mismo. Obsérvese que el cristal presenta una macla a su izquierda.



## 5.4. CONCLUSIONES

El crecimiento de cristales de proteínas en un medio gelificado (sílice o agarosa) transcurre en todo momento sin pérdida de la difusividad del medio, ya que los cristales crecen incorporando el gel sin fracturarlo (ver apartados 5.2.1.2 y 5.3.1.2). La incorporación del gel en todo el volumen del cristal es homogénea y no provoca tensiones internas como se deduce de los datos de difracción. A partir de estos datos se demuestra que las interacciones entre las fibras de gel y las moléculas de proteína no son específicas. La calidad (límite de resolución y mosaicidad) de los cristales de proteínas crecidos en medios gelificados mediante técnicas de crecimiento contradifusivas es similar a la que se obtiene en condiciones de microgravedad (aptdo. 5.2.5).

Particularizando para cada tipo de gel:

1.- Los geles de sílice reducen el flujo de nucleación de lisozima tetragonal (aptdo. 5.2.1.1). El alcohol liberado durante la polimerización parece desempeñar un papel importante en esta inhibición junto con la interacción proteína-gel puesta también de manifiesto durante los estudios calorimétricos (ver apartado 5.2.3). La inducción de la nucleación no es evidente para el caso de thaumatina para la que incluso se observa una segunda nucleación. Esta segunda nucleación, que en la mayoría de los casos se produce sobre las aristas de los cristales, ocurre en el seno del gel cuando la concentración de sílice es suficientemente alta (aptdo. 5.2.1.1).

2.- El aumento de la concentración de sílice incorporada aumenta la estabilidad de los cristales de proteína frente a la deshidratación, gracias a su poder higroscópico (aptdo. 5.2.2), refuerza las características mecánicas de los cristales y actúa como crioprotector de los cristales durante la congelación (aptdo. 5.2.5).

3.- Cuando la concentración de gel supera unos determinados niveles, el desarrollo morfológico de los cristales está controlado por la presencia del gel a través del control del transporte, lo que en último término se traduce en un control sobre los mecanismos de crecimiento. Asociado a este control del transporte de masa, la interacción proteína-gel puede jugar un papel importante en la reducción de la energía de superficie del cristal (aptdo. 5.2.4).

En el caso de los geles de agarosa:

1.- La dependencia entre la densidad de nucleación de la lisozima tetragonal y la concentración de gel sigue la misma ley potencial que la variación del porcentaje de fibras libres es inversamente proporcional a la variación del tamaño de poro (aptdo. 5.3.1.1).

2.- Los geles de agarosa proporcionan un medio difusivo de crecimiento a concentraciones de gel por debajo de la concentración crítica necesaria para crear un entramado de percolación (aptdo. 5.3.1.1).



## 6. INFLUENCIA DE UN CAMPO MAGNÉTICO SOBRE LA CRISTALIZACIÓN DE LISOZIMA

*Dadme un punto de apoyo  
y moveré el mundo...  
Arquímedes*

### 6.1. INTRODUCCIÓN

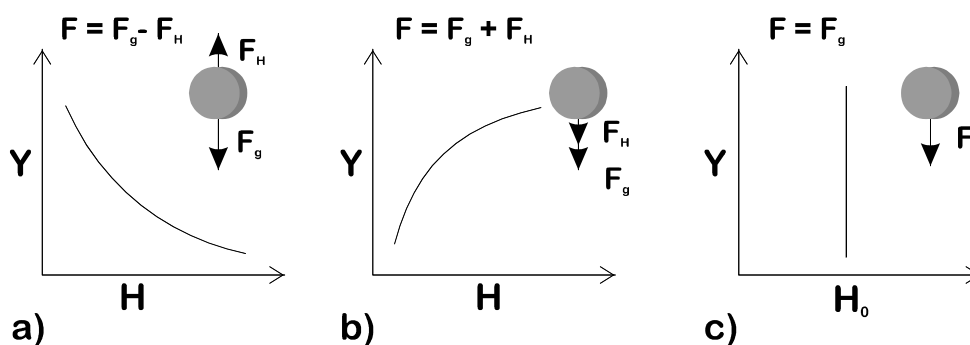
Existe una amplia bibliografía sobre los efectos que produce la aplicación de un campo magnético sobre material biológico tanto *in vivo* [Miro y Chalazonitis, 1967] como *in vitro* [Arnold, 1958]. *In vitro* la aplicación de un campo magnético fuerte es capaz de orientar diferentes tipos de moléculas, orgánulos e incluso células [Nilakatan, 1938; Cotton y Fauro, 1942; Lonsdale, 1938; Chalazonitis et al., 1970]. En los primeros estudios llevados a cabo sobre células bastón de retina de rana se comprueba como es posible rotar estas células cuando se las somete a la acción de un campo magnético. El ángulo de rotación es función de la intensidad del campo magnético aplicado [Chagneux y Chalazonitis, 1972]. Posteriormente se comprobaría que este efecto estaba provocado por la rodopsina, una proteína presente en membrana celular. El mismo comportamiento se observa posteriormente en bacterias cromóforas (*Halobacterium halobium*) causado esta vez por la proteína bacteriorodopsina [Neugebauer et al., 1977]. En estudios de orientación con cadenas de homopolipéptidos [Samulski y Berendsen, 1972; Finer y Darker, 1975] carentes de aminoácidos aromáticos se comprueba que la orientación es debida a alguna característica estructural de las proteínas.

En 1997 diversos autores comprueban de manera independiente que la aplicación de un campo magnético es capaz de orientar los cristales de proteína y modular su conducta de nucleación y crecimiento [Sazaki et al., 1997; Ataka et al., 1997; Wakayama et al., 1997]. Aunque todos coinciden en la orientabilidad de los cristales, la modulación de la densidad de nucleación es positiva o negativa dependiendo del autor y la metodología empleada (ver sección 6.2). En 1998 Wakayama realiza un amplio estudio de la influencia de la gravedad sobre la nucleación, crecimiento y orientación de cristales de lisozima bajo la influencia de un campo magnético de 1.6T. Concluye que el tiempo de aplicación del campo y la sobresaturación inicial modulan el porcentaje de orientación de los cristales.

## 6.2. ANTECEDENTES

Durante la determinación de la estructura dinámica y estática de Miglobina y su derivado de  $\text{Co}^{2+}$  "Coboglobina" por resonancia magnética nuclear, Rothgeb y Oldfield (1981) junto con Lee y Oldfield (1982), comprueban que los microcristales en suspensión aparecen orientados después de haberlos sometidos a la acción del campo magnético. En 1997 Sazaki y colaboradores estudian por primera vez como afecta la aplicación de un campo magnético a la cristalogénesis de proteínas. Durante la nucleación de cristales de lisozima y ferritina bajo la influencia de un campo magnético (H) de 10T de intensidad (1 Tesla =  $10^4$  gauss), los cristales se orientan en la dirección del campo magnético aplicado y se reduce el número de cristales respecto de las referencias. En el mismo periodo, Ataka y colaboradores (1997) observan que la densidad de nucleación de cristales de lisozima aumenta por la acción de un campo magnético de entre 0.6 a 1.2T de intensidad y disminuye el tamaño final de los cristales.

Esta diferencia de resultados fue relacionada con la homogeneidad del campo magnético aplicado, en virtud de la fuerza magnética que un gradiente de campo puede ejercer sobre cualquier sustancia magnética [Wakayama et al., 1997]. Para sustancias diamagnéticas ( $\chi < 0$ ), esta fuerza se opone o suma a la fuerza de la gravedad dependiendo de la dirección del gradiente del campo magnético aplicado (Fig.5-1). Para comprender esta argumentación les remitimos a la figura 6.4-1. En la parte derecha de esta figura se ha esquematizado como varía la intensidad del campo magnético al alejarnos por encima o por debajo de la región de intensidad constante (4 cm). Hacia regiones positivas en Y, el gradiente es negativo y la fuerza generada se opone a la fuerza de la gravedad (Fig.6.2-1a), mientras que para valores negativos de Y ambas fuerzas se suman (Fig.6.2-1b). La acción de esta fuerza modifica la sedimentación en un 7% tanto de la solución como de los cristales lo que, según estos autores, explicaría la reducción de la nucleación en el caso en que ambas fuerzas se opongan y el aumento del número de cristales cuando se suman. Si la intensidad del campo magnético es constante no debíamos de observar ningún efecto sobre la densidad de nucleación.



**Fig.6.2-1** Representación esquemática de las fuerzas que actúan sobre una partícula magnética en presencia de un campo magnético con gradiente negativo (a), positivo (b) o con intensidad constante (c) [Wakayama et al., 1997].

A partir de ese momento los trabajos se centran en la determinación del número de cristales orientados cuando se varía la sobresaturación, la morfología de la celda o la intensidad del campo aplicado [Wakayama, 1998; Astier et al., 1998, Sakurazawa et al., 1999 y Yanagiya et al., 1999] dejando de un lado el efecto sobre el flujo de nucleación y sobre la morfología final de los cristales. Estudiando esta bibliografía es evidente que la diversidad de resultado y las distintas conclusiones que de ellos se derivan, están causadas por la heterogeneidad experimental (temperatura, preparación de las muestras y fenómenos de sedimentación). Es difícil comparar estos trabajos debido a la diversa metodología empleada y a la falta de información sobre los detalles experimentales. Si se mantienen estos parámetros constantes, esta variabilidad sólo puede estar afectada por la sobresaturación a la que se lleva a cabo la experiencia y por la sedimentación de los cristales [Wakayama, 19998].

A raíz de estos resultados decidimos abordar este estudio con la idea de esclarecer como influye la aplicación de un campo magnético homogéneo y constante sobre la cristalogénesis de proteínas. Centrándonos en estos dos últimos aspectos, diseñamos experiencias en las que se evitase la sedimentación de los cristales empleando un gel de agarosa como soporte físico. Para estudiar el efecto de la sobresaturación, realizamos experiencias de contradifusión en geles de agarosa en las que la sobresaturación varía a lo largo de la cámara de proteína con el tiempo (ver capítulo 4).

El análisis de los resultados se realiza teniendo en cuenta la influencia del gel de agarosa sobre la nucleación y el posible impedimento estérico sobre la orientación de los cristales.

### 6.3. ASPECTOS TEÓRICOS

Índice

En 1971 Hong, Mauzerall y Mauro explican en términos de anisotropía diamagnética la orientación de segmentos de células bastón de retina de rana. En 1972 Chagneux y Chalazonitis basándose en los trabajos de Hong y colaboradores, demuestran que tal orientación es debida a la presencia de la proteína rodopsina, aunque no determinan su origen. Trabajos posteriores sobre clorofila y ácidos nucleicos atribuyen el origen de la anisotropía a la presencia de enlaces conjugados en el plano porfirínico, en el caso de la clorofila [Becker et al., 1973] y en el plano de las bases nucleotídicas en el caso del ADN [Maret et al., 1975] por comparación con los valores experimentales y teóricos de la anisotropía diamagnética del benceno [Krishnan, 1973]. Samulski y Berendsen en 1972, y Finer y Darker en 1975, trabajando con cadenas de homopolipéptidos (L-glutámico y L-lisina, respectivamente), libres de residuos aromáticos, demuestran que el origen de dicha anisotropía esta relacionado con la propia estructura de la cadena carbonada. En 1978 Chambre prescinde de los grupos aromáticos para determina la susceptibilidad diamagnética de la molécula de rodopsina, ya que no hay ninguna razón estructural para que dichos grupos presenten una orientación preferente.

Lonsdale (1938) había demostrado que la anisotropía diamagnética que mostraban ciertos compuestos orgánicos estaba asociada a enlaces resonantes tipo éster aunque estos perteneciesen a cadenas abiertas. La diferencia de la anisotropía diamagnética molar ( $\Delta K = (K_{//} -$

$K_{\perp}$ ) =  $8.8 \cdot 10^{-6}$  CGS) entre el campo magnético paralelo ( $K_{\parallel}$ ) y perpendicular ( $K_{\perp}$ ) al plano del grupo éster (Fig.6.3-1) es comparable a la del grupo carboxílico ( $4.5 \cdot 10^{-6}$ ) y la del benceno ( $54 \cdot 10^{-6}$ ).

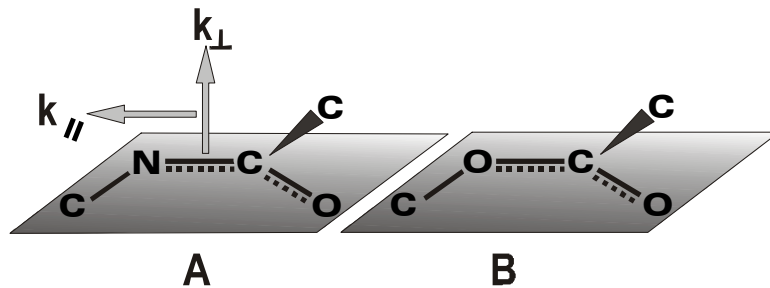


Fig.6.3-1 Enlaces resonantes tipo peptídico (A) y éster (B).

En 1978 Worcester aplica la formulación de Lonsdale para estimar el valor de la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética molar del enlace peptídico cuando este pertenece a una  $\alpha$ -hélice o una lámina- $\beta$ . La contribución de un enlace peptídico a la susceptibilidad a lo largo del eje principal de la estructura de una proteína es

$$\chi_i = \sum_j \cos^2 \theta_{ij} k_j \tag{Ec.6.3-1}$$

donde  $K_j$  es la susceptibilidad principal del enlace peptídico y  $\theta_{ij}$  es la dirección coseno de  $K_j$  con respecto a  $\chi_i$ .

Para una estructura con simetría axial es suficiente con establecer una dirección paralela ( $\chi_{\parallel}$ ) y una perpendicular ( $\chi_{\perp}$ ) (Fig.6.3-2).

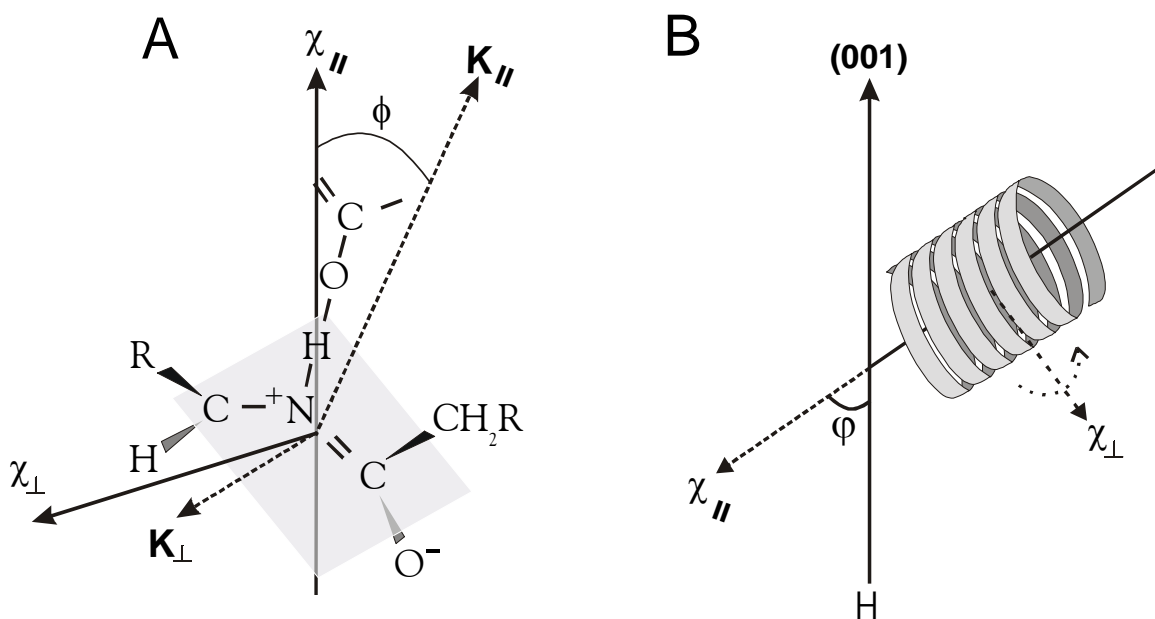


Fig.6.3-2 Representación gráfica de la distribución anisotrópica de las componentes de la susceptibilidad diamagnética.

De esta forma la susceptibilidad del enlace peptídico se puede reducir a una componente sobre el plano peptídico ( $k_{\parallel}$ ) y una fuera del plano ( $k_{\perp}$ ). La ecuación 6.3-1 se reduce a

$$\chi_{\parallel} = k_{\parallel} \cdot \cos^2 \phi + k_{\perp} \cdot \sin^2 \phi \quad \text{Ec.6.3-2}$$

$$\chi_{\perp} = (k_{\perp} \cdot \sin^2 \phi + k_{\parallel} \cdot (\cos^2 \phi + 1)) / 2 \quad \text{Ec.6.3-3}$$

donde  $\phi$  es el ángulo entre el eje de simetría y la normal al plano peptídico. Operando convenientemente se obtiene la siguiente expresión para la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética

$$\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp} = \Delta k (1 - 3 \cos^2 \phi) / 2 \quad \text{Ec.6.3-4}$$

Tomando el valor de  $\phi=90^{\circ}$  para una  $\alpha$ -hélice con  $N_{\alpha}$  residuos tenemos:

$$\Delta\chi_{\alpha} = (N_{\alpha} / 2) \cdot \Delta k = 4.4 \cdot 10^{-6} \cdot N_{\alpha} \quad \text{Ec.6.3-5}$$

y siendo  $\phi \approx 60^{\circ}$  para una lámina- $\beta$  con  $N_{\beta}$  residuos,

$$\Delta\chi_{\beta} = (N_{\beta} / 8) \cdot \Delta k = 1.1 \cdot 10^{-7} \cdot N_{\beta} \quad \text{Ec.6.3-6}$$

De esta forma conociendo la secuencia y estructura secundaria de una determinada proteína es posible calcular el valor de la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética total. La susceptibilidad es un parámetro adimensional escalado en el sistema internacional de unidades.

Posteriormente Pauling (1979), a partir del tratamiento teórico de la estructura resonante del enlace tipo éster, advierte que Lonsdale ha cometido un error en su determinación y obtiene un valor teórico de  $\Delta K$  para el enlace peptídico de  $5.36 \cdot 10^{-6}$ , similar al obtenido experimentalmente para  $\gamma$ -ethyl-L-Glutamato ( $5.2 \pm 0.4 \cdot 10^{-6}$ ). Este valor se ha introducido en las ecuaciones 6.3-5 y 6 para obtener el valor correcto de la anisotropía.

## 6.4. MATERIALES Y MÉTODOS

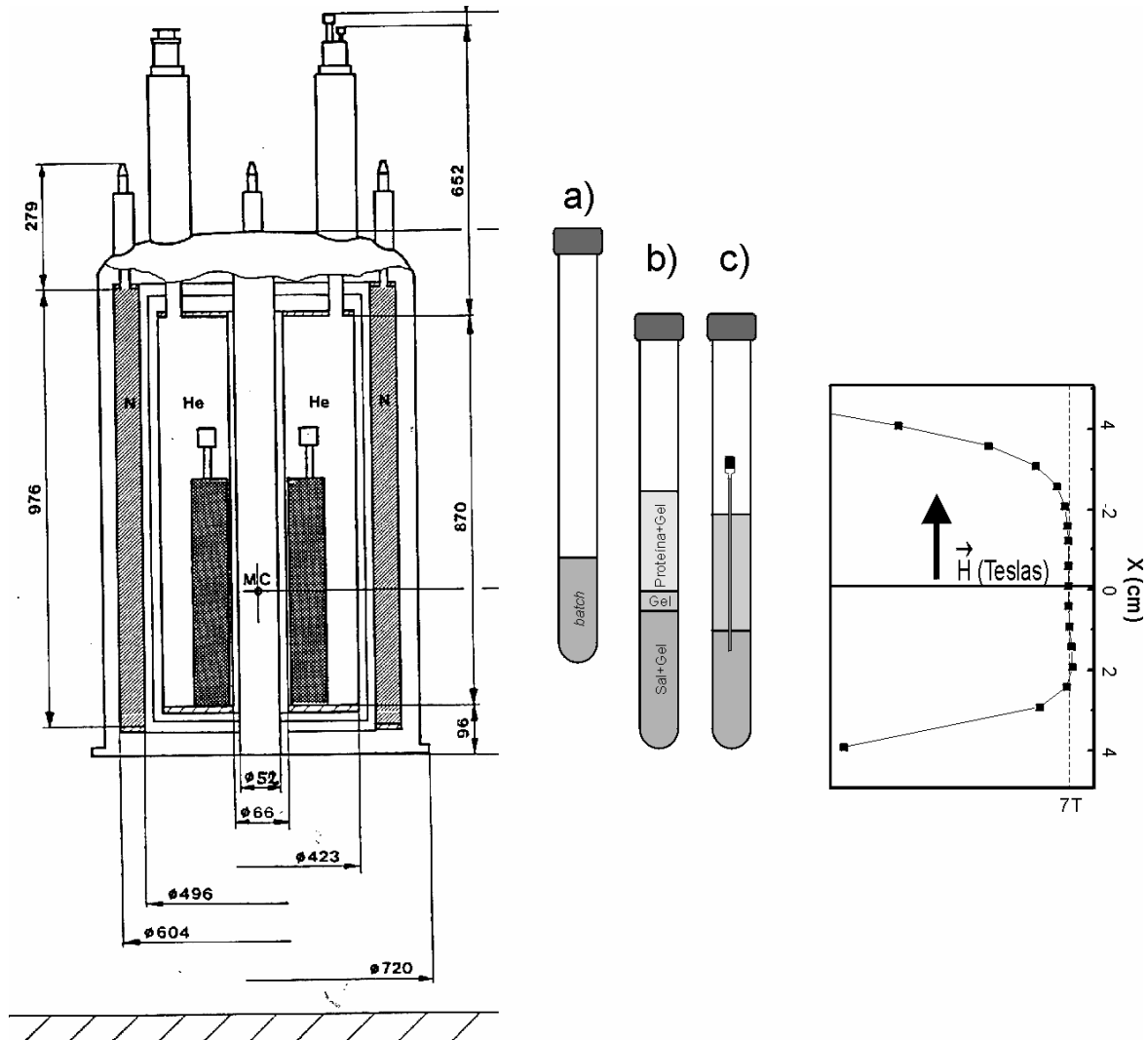
Índice

Para llevar a cabo las experiencias se disponía de un instrumento de Resonancia Magnética Nuclear (Bruker AM-300) de 7T de intensidad con una homogeneidad del campo superior al 99% (Fig.6.4-1). En este tipo de instrumentos sólo es posible utilizar tubos específicos de resonancia magnética nuclear, por lo que las experiencias se diseñaron para que se ajustasen a las características de las celdas de medida; tubos cilíndricos de 60 mm de longitud y 5 mm de diámetro interno (Wildmad, WG-5mm-Economy-7).

Se diseñan tres tipos de experiencias encaminadas a responder a las cuestiones planteadas:

- Trabajamos en *batch*, a una sobresaturación constante de 8.7 (capítulo 5) para estudiar el efecto que un campo magnético homogéneo y constante ejerce sobre el flujo de nucleación y las posibles implicaciones morfológicas. En estas experiencias se preparan 600  $\mu$ l de una solución sobresaturada de lisozima gelificada con agarosa siguiendo el protocolo III. Los 600  $\mu$ l

se reparten en dos tubos Wildmad hasta una altura de 20 mm. En el momento en que los tubos alcanzan la temperatura ambiente uno de ellos es introducido en el instrumento y se mantiene bajo la acción del campo durante 20 horas. El segundo nos sirve como referencia.



**Fig.6.4-1** Esquema de un instrumento de RMN. En el gráfico de la derecha hemos representado como varía la homogeneidad del campo al alejarnos del punto de aplicación (datos cedidos por el CIC).

- b) En experiencias en contradifusión estudiamos si la sobresaturación modifica de alguna forma la acción del campo magnético. La preparación de estas experiencias se llevó a cabo siguiendo el protocolo IV-b descrito en el capítulo segundo. Para poder trabajar con concentraciones de agarosa bajas en la cámara de proteína, la sal se añade en primer lugar gelificada en 0.5% p/v de agarosa. Una vez llena la cámara de sal, se aceleró la polimerización del sol en corriente continua de agua fría. De la misma forma operamos al añadir el tapón central. Por último se añade la proteína preparada sobre el gel de agarosa. Acto seguido se somete a la acción del campo magnético cuando la muestra alcanza la temperatura ambiente. Al igual que en las experiencias en *batch* cada ensayo se prepara por duplicado manteniendo uno de los tubos como referencia. En las primeras experiencias la cámara de proteína (al igual que la de sal) se



prepara de forma que la longitud final fuese de 30 mm y 5mm de tampón físico. En este caso son necesarios más de cuatro días para que la experiencia se desarrolle por completo, superando el tiempo de disponibilidad del instrumento. Para acortar el tiempo de desarrollo de las experiencias, se reducen las dimensiones de las cámaras a 20 mm para la sal y la proteína y 2.5 mm para el tampón físico. Con esta configuración la experiencia se completa durante el transcurso de un fin de semana (~66 horas).

- c) Por último realizamos experiencias empleando el método de acupuntura en geles para obtener grandes cristales orientados en la dirección del campo magnético aplicado. Las experiencias se preparan siguiendo el protocolo IV-a en los que empleamos como contenedor un tubo Wildmad. En los casos en los que los capilares se llenan con proteína gelificada, ésta se prepara siguiendo el protocolo III.

En todas las experiencias empleamos lisozima de la casa comercial Sigma (Lot.65H7025) y NaCl como agente precipitante. Las soluciones se preparan sobre el tampón acetato de sodio 50 mM y pH 4.5. Las condiciones experimentales de cada una de las experiencias se recogen en la tabla 6.4-1. La temperatura se mantuvo estable a  $22.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , controlada por un acondicionador térmico.

	CONTRADIFUSIÓN-GEL	GAME	BATCH
CÁMARA DE PROTEÍNA	[Lisozima] 80 mg/ml [Agarosa] 0.02-0.5% p/v	[Lisozima] 100-150 mg/ml [Agarosa] 0.025-0.03% p/v	[Lisozima] 60 mg/ml [NaCl] 4.0 %p/v [Agarosa] 0.02-0.5% p/v
TAMPÓN FÍSICO	[Agarosa] 0.5 %p/v	6-9 mm de punteado	
CÁMARA DE SAL	[NaCl] 20 %p/v [Agarosa] 0.5 %p/v	[NaCl] 20 % p/v Gel de sílice	

**Tabla 6.4-1** Condiciones experimentales de las experiencias llevadas a cabo bajo la influencia de un campo magnético.

## 6.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como hemos visto, la posibilidad de orientar cristales de proteína se debe a una distribución anisotrópica del diamagnetismo del enlace peptídico, o como en el caso de hemoglobina, catalasa, ferritina, clorofila, etc. al paramagnetismo de los átomos o grupos prostéticos que forman parte de su estructura. Sin embargo, la baja intensidad del diamagnetismo frente al paramagnetismo hace que sólo se pueda observar la anisotropía diamagnética si no existen contribuciones paramagnéticas en la molécula. Macroscópicamente el fenómeno solo se observa si existe una distribución espacial ordenada (cristal) en la que las contribuciones no se anulen unas a otras.

Índice

### 6.5.1. CALCULO DE LA ANISOTROPÍA DE LA SUSCEPTIBILIDAD DIAMAGNÉTICA MOLAR DE LA MOLÉCULA DE LISOZIMA

A partir de la estructura de la lisozima (PDB, ID. Code: 193L) podemos conocer el número de aminoácidos que se encuentran formando parte de estructuras en  $\alpha$ -hélices (55 aminoácidos) y láminas- $\beta$  (6 aminoácidos). Sustituyendo el número de aminoácido de cada estructura en las ecuaciones 6.3-5 y 6, se obtienen los valores de  $\Delta\chi_\alpha$  y  $\Delta\chi_\beta$ . Sumando ambas contribuciones obtenemos el valor de la anisotropía diamagnética molar para la molécula de lisozima,  $\Delta\chi = 1.51 \cdot 10^{-4}$  (en unidades CGS ó emu/mol).

Sin embargo este valor representa sólo un cálculo aproximado, ya que no hemos tenido en cuenta la disposición de cada estructura secundaria respecto del eje c, que se orienta paralelo a la dirección del campo. Puesto que la orientación de las moléculas se produce gracias a la contribución sobre el eje principal de la estructura secundaria ( $\chi_{//}$ ) hemos corregido la contribución total ( $\Delta\chi$ ) tomando en cuenta el ángulo ( $\varphi$ ) que el eje de cada estructura secundaria forma con el eje c cristalográfico. Este ángulo se calcula para cada elemento de estructura secundaria (8  $\alpha$ -hélices y 2 láminas- $\beta$  en la molécula de lisozima, PDB. ID: 193L) teniendo en cuenta que el eje de cada estructura está determinado por el primer y el último residuo que la compone (Fig.6.3-2).

A partir de estos valores corregidos, la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética molar para la molécula de lisozima en un cristal tetragonal es  $\Delta\chi = 8.39 \cdot 10^{-5}$ , algo menor que el calculado de forma directa.

### 6.5.2. TAMAÑO DEL MENOR CRISTAL ORIENTABLE

Para que un cristal se pueda orientar en presencia de un campo magnético es necesario que el incremento de energía interna ( $\Delta E$ ) generado por la presencia del campo magnético, iguale o supere la energía de fluctuación térmica  $k \cdot T$ , (donde  $k_{Boltzmann} = 1.38062 \cdot 10^{-16}$  erg-deg $^{-1}$  y  $T = 295.15K$ ).

Teniendo en cuenta que la contribución de cada molécula de lisozima a la energía de estabilización del cristal se puede expresar como [Sazaki, 1997]:

$$\Delta E = (1/2) \cdot \left( \frac{N}{N_A} \right) \cdot H^2 \cdot \Delta\chi \quad \text{Ec.6.5-1}$$

donde H es la intensidad del campo magnético aplicado, N el número de moléculas de lisozima que componen el cristal,  $N_A$  el número de Avogadro y  $\Delta\chi$  la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética molar para la molécula de lisozima.

Haciendo que  $\Delta E = k \cdot T$  se puede calcular el número de moléculas de lisozima ( $N_r$ ) que componen el menor núcleo orientable.

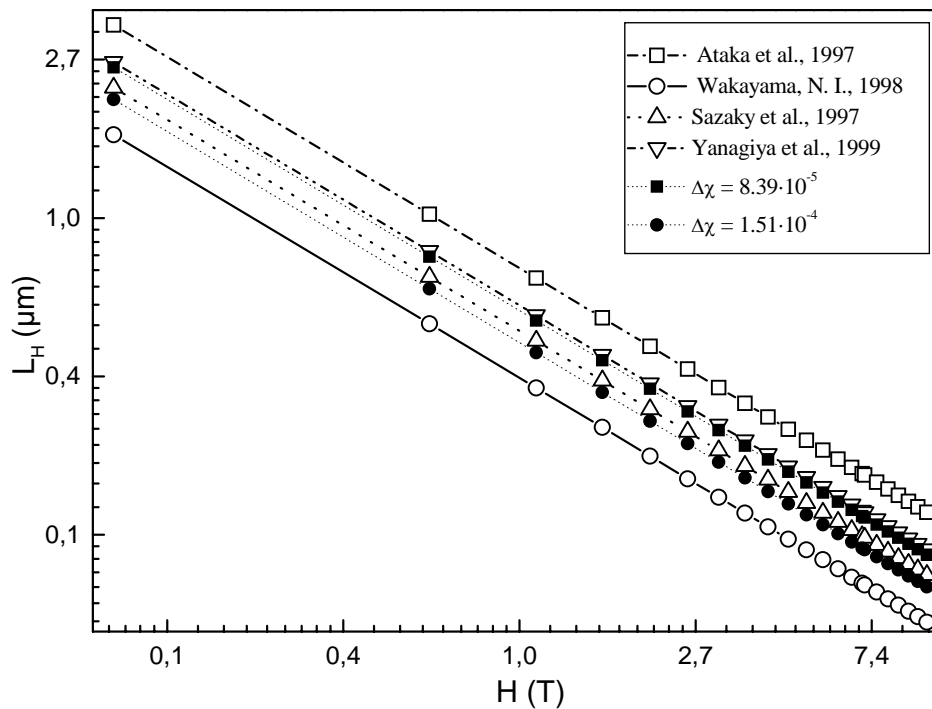
Si tenemos en cuenta que una celdilla unidad está compuesta por ocho moléculas de lisozima, el volumen del menor cristal orientable se puede expresar como:

$$V_H = \frac{a^2 \cdot c \cdot N_H}{8} \tag{Ec.6.5-2}$$

donde  $a(=b) = 78.54 \text{ \AA}$  y  $c = 37.77 \text{ \AA}$  representan los parámetros de la celdilla unidad (193L). Considerando el menor núcleo orientable como un cubo de arista  $L_H$ , podemos estimar el valor de la arista como:

$$L_H = \left( \frac{a^2 \cdot c \cdot \Delta E}{4 \cdot \Delta\chi} \cdot \frac{1}{H^2} \right)^{\frac{1}{3}} \tag{Ec.6.5-3}$$

Luego para las mismas condiciones de intensidad del campo y temperatura, el valor de  $L_H$  dependerá de la estimación de  $\Delta\chi$  que hayamos realizado. En la figura 6.5-1 se ha representado en una gráfica logarítmica la variación de  $L_H$  en función de la intensidad del campo para los distintos valores de  $\Delta\chi$  que aparecen en la bibliografía para la molécula de lisozima tetragonal, sin tener en cuenta otras posibles consideraciones que puedan aparecer en estas referencias.



**Fig.6.5-1** Representación logarítmica de la variación de  $L_H$  en función de la intensidad del campo para los distintos valores de  $\Delta\chi$  recogidos en la bibliografía y los estimados en este trabajo con (cuadrados) y sin corrección angular (círculos).

El valor promedio de la arista del menor cristal orientable ( $\langle L_H \rangle = 102 \pm 30 \text{ nm}$ ) calculado a partir de los datos de la bibliografía es muy cercano a la que obtenemos sin tomar en cuenta la corrección angular (124 nm) o incluso al obtenido tomándola en cuenta (152 nm).

Wakayama (1998) estima que para que se produzca la orientación de los cristales el valor de  $\Delta E$  debe de superar en 7.5 veces el valor de la fluctuación térmica según la relación experimental obtenida por Langevin en 1910, con lo que el tamaño del menor núcleo orientable en un campo magnético de 7T sería de 390 nm aproximadamente. En su disertación sin embargo no tiene en cuenta la puntualización de Yamagishi y colaboradores (1990 y 1992) a cerca del parámetro de orden  $\langle m \rangle$  (factor de corrección de la energía necesaria para orientar una molécula o agregado de moléculas). En estos trabajos Yamagishi apunta que cuando existe un número suficiente de moléculas orientadas en la misma dirección, basta con aplicar campos de elevada intensidad para que  $\langle m \rangle$  alcance el valor de 1.0 y la relación entre  $\Delta E$  y la energía de fluctuación térmica se mantenga. Este razonamiento justifica que tomemos  $\Delta E$  como la energía de fluctuación térmica a la temperatura de trabajo para calcular  $L_H$  ya que la intensidad del campo magnético empleado (7T) es suficiente para satisfacer la condición de Yamagishi.

### 6.5.3. GRADO DE ORIENTACIÓN

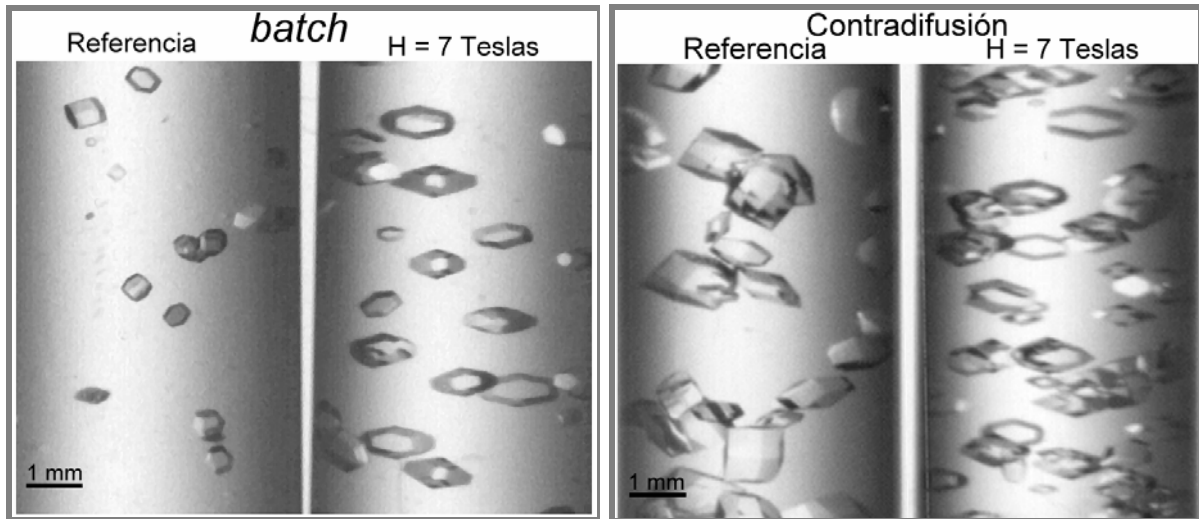
El principal problema para la cuantificar el porcentaje de cristales que se han orientado bajo la influencia del campo magnético deriva de la sedimentación de los cristales. Para abordar este problema se han seguido distintas estrategias que pasan por medir la inclinación del eje c de los cristales respecto del la dirección del campo magnético aplicado [Yanagiya et al., 1999].

En nuestro caso añadimos un gel de agarosa al medio de crecimiento de forma que actuara como un soporte físico para los cristales. La efectividad del gel depende del porcentaje de interferencia sobre el número final de cristales orientados. Para cuantificar dicha interferencia realizamos medidas de la razón de orientación ( $R = N_{\text{orientados}} / N_{\text{total}}$ ) en función de la concentración de agarosa en el rango de 0.02 a 0.5% p/v. Este estudio lo llevamos a cabo tanto en *batch* como en contradifusión. Un ejemplo del aspecto final de estas experiencias se muestra en la figura 6.5.2.

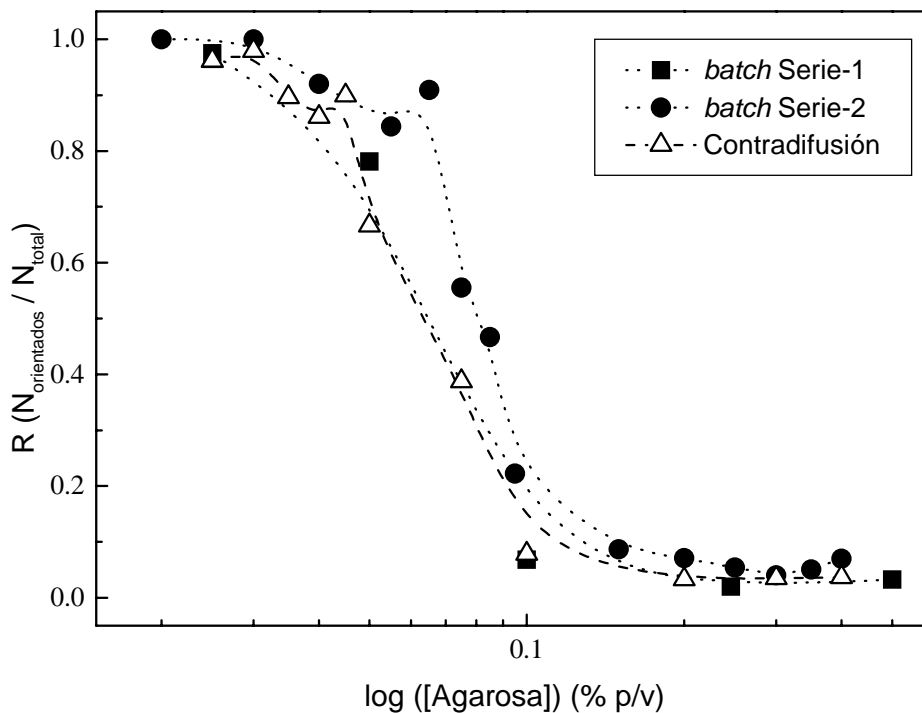
Como se observa en la figura 6.5-3, la presencia del gel modula la razón de orientación independientemente del método de cristalización empleado. En ambos casos se aprecian diferentes regiones: a) un primer régimen entre 0.02 y 0.05% p/v aproximadamente, en la que R disminuye con una pendiente suave, b) entre 0.05 y 0.1% p/v, R cae bruscamente y c) por encima de 0.1 hasta el 0.3% p/v donde R desciende de nuevo con una pendiente suave. Por encima de 0.3% R permanece constante.

Para concentraciones de agarosa entre 0.02 y 0.03% p/v, la orientación de los cristales es del 100%, indicando que en este rango se puede desprestigiar su influencia. Posteriormente el grado de interferencia se incrementa hasta reducir el porcentaje de orientación a un 10% cuando la concentración de agarosa supera el 0.1% p/v. En principio podríamos pensar que se trata de un impedimento estérico, de una competencia por el espacio entre los cristales de lisozima y las fibras del gel. Sin embargo el tamaño de poro de un gel de agarosa a una concentración de 0.1% es de 800 nm (en el caso más favorable). Este valor es aproximadamente siete veces superior al tamaño del menor cristal que podemos orientar (130 nm) con un campo magnético de 7T. Por otra parte no hay que olvidar que a concentraciones de gel inferiores a 0.1% (p/v) nos encontramos por debajo

de la concentración crítica ( $C_c \approx 0.12\% \text{ p/v}$ ), que marca la diferencia entre un gel elástico que forma un entramado tridimensional y una suspensión viscosa de fibras laxas en la que el número de cadenas libres aumenta considerablemente hasta el 93.3% (capítulo 3).



**Fig.6.5-2** Fotografías que muestran una experiencia realizada en batch y en contradifusión, en gel de agarosa a 0.055 y 0.035% p/v de concentración respectivamente.



**Fig.6.5-3** Variación del porcentaje de cristales orientados frente a la concentración de gel, para experiencias realizadas en batch y en contradifusión.

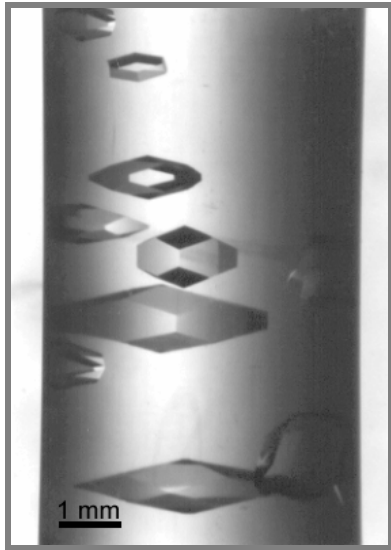


Fig.6.5-4 Batch en agarosa 0.075%.

Sin embargo, experimentalmente se observa que los cristales no se encuentran sometidos a un proceso de sedimentación en un medio viscoso. En experiencias como las mostradas en la figura 6.5-3, geles de agarosa de concentración tan baja como 0.035% son capaces de soportar cristales de más de un 1 mm, en otros casos un gel de 0.075% p/v soporta cristales del orden de los 4.0 mm (Fig.6.5-4). Los cristales sólo sedimentan si el tubo en el que han crecido se somete a estrés mecánico (si se golpean). Cuando realizamos esta sencilla prueba, todos los cristales sedimentan al mismo tiempo. Si además tenemos en cuenta que los cristales incorporan las fibras de gel durante su crecimiento, el comportamiento

descrito indica que los cristales se encuentran no se encuentran soportados sino suspendidos de las fibras de gel como si de un “movil” se tratase.

Para polímeros de polisacáridos, el módulo de Young (E) es directamente proporcional a la concentración del polímero según la relación  $E \cong K \cdot C^n$ , donde típicamente  $n \approx 2$  [Nishinari y Watase, 1983]. Si representamos ahora los datos de la figura 6.5-3 en forma logarítmica (Fig.6.5-5) comprobamos que existe una relación experimental,  $R \sim C^{-1.9 \pm 0.2}$ , entre la razón de orientación y la concentración de agarosa en la región  $0.05 < C < 0.3$ . Esta relación es idéntica a la que se mantiene entre el módulo de elasticidad y la concentración de gel.

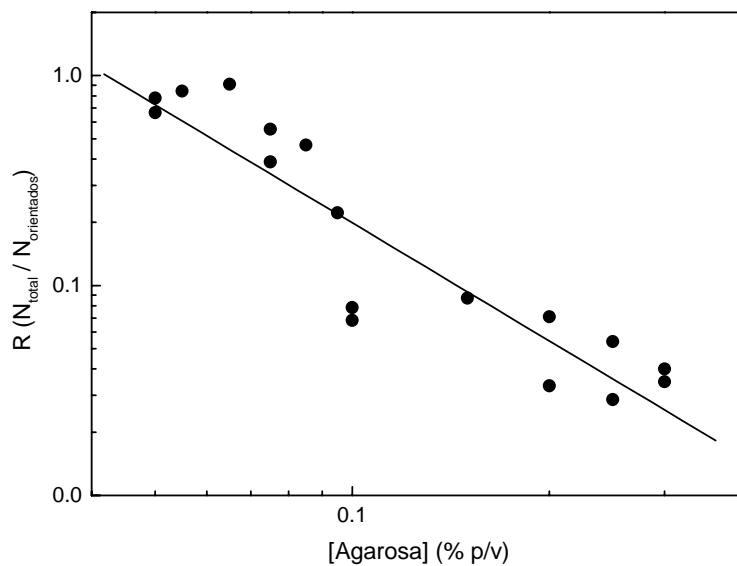


Fig. 6.5-5 Muestra el ajuste lineal en la representación logarítmica de la razón de orientación (R) en función de la concentración de agarosa en el rango 0.05-0.3% p/v para las experiencias realizadas en batch y en contradifusión (círculos).

Teniendo en cuenta que los cristales se orientan a partir de un determinado tamaño y que al menos hasta 0.1% p/v esta orientación no está limitada por el tamaño de poro del gel, podemos concluir que la dependencia observada esta directamente relacionada con la densidad de fibras que atraviesan el cristal de proteína.

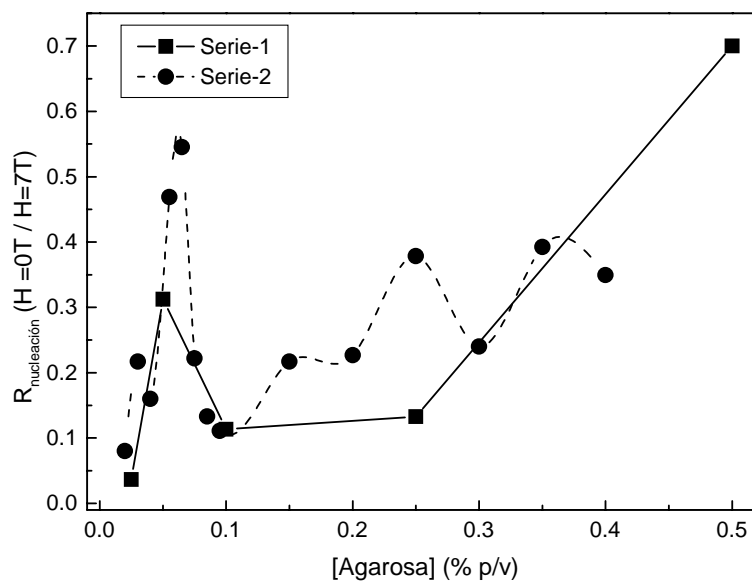
#### 6.5.4. INFLUENCIA DEL CAMPO MAGNÉTICO SOBRE EL FLUJO DE NUCLEACIÓN

En los trabajos publicados se asume que un campo homogéneo y constante no puede modificar el flujo de nucleación ya que no existe ningún gradiente de fuerzas que modifique la homogeneidad del medio de crecimiento (Fig.6.2-1). Para clarificar este punto, nuestras experiencias se llevan a cabo en el seno de un campo magnético de 7Teslas de intensidad con una homogeneidad superior al 99% en la región de aplicación de la muestra (Fig.6.4-1).

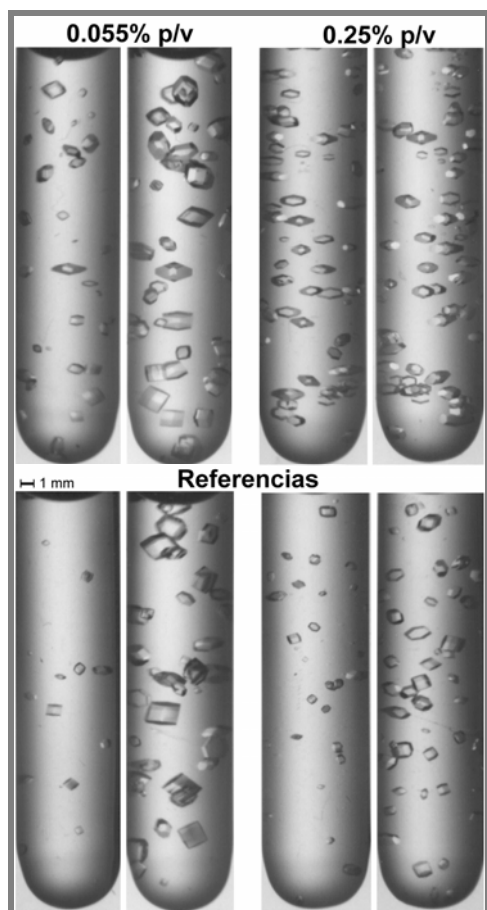
##### 6.5.4.1 EN BATCH

En todos los ensayos realizados en *batch* observamos como la densidad de nucleación es siempre mayor en aquellas experiencias sometidas a la acción del campo magnético que en la referencia (Fig.6.5-6), lo que muestra claramente que un campo magnético homogéneo y constante aumenta la densidad de nucleación para el caso de la molécula de lisozima tetragonal.

Esta inducción de la nucleación es dependiente de la concentración de agarosa y disminuye al aumentar la concentración del gel. También se observa un descenso de esta capacidad de inducción del campo magnético cuando la nucleación se produce de forma más rápida y abundante (e.j. 0.05% p/v de concentración), repitiéndose en forma de diente de sierra al aumentar la concentración de agarosa (ver capítulo 5).



**Fig. 6.5-6** Evolución de la razón de densidad de nucleación ( $N^{\circ}$ cristales en la referencia/ $N^{\circ}$ cristales para  $H=7T$ ) en función de la concentración de gel.



**Fig.6.5-7** Experiencias realizadas en 0.055 y 0.25 p/v de concentración de agarosa y su evolución a las 24 horas.

Para comprobar si el aumento de la densidad de nucleación observado bajo la acción del campo magnético es estable a lo largo del tiempo, volvimos a contar los cristales 72 horas después de extraer los tubos de la acción del campo (Fig.6.5-7). En todos los casos, la densidad de nucleación aumenta tanto en los tubos sometidos a la acción del campo como en las referencias. Sin embargo, este incremento es mayor en la referencia de forma que la razón de nucleación promedio ( $\langle R_n \rangle = N^{\circ}$  cristales en la referencia /  $N^{\circ}$  cristales en campo) del conjunto de las experiencias es ahora de  $1.0 \pm 0.1$  (Fig.6.5-6).

De la primera observación se deduce que existe una relación directa entre el tiempo de inducción (Ec.5.3-2) y la acción del campo magnético. Cuando el tiempo de inducción disminuye (aumenta el flujo de nucleación) disminuye el efecto del campo magnético. Cuando el tiempo de inducción es suficientemente alto la densidad de nucleación aumenta bajo la acción del campo. Este aumento puede ser debido a un descenso de la energía libre necesaria para

estabilizar un núcleo, lo que se traduce en un núcleo crítico de menor tamaño, y está de acuerdo con el descenso de la solubilidad de los cristales de lisozima tetragonal en presencia de un campo magnético homogéneo observado por Yanagiya y colaboradores (2000).

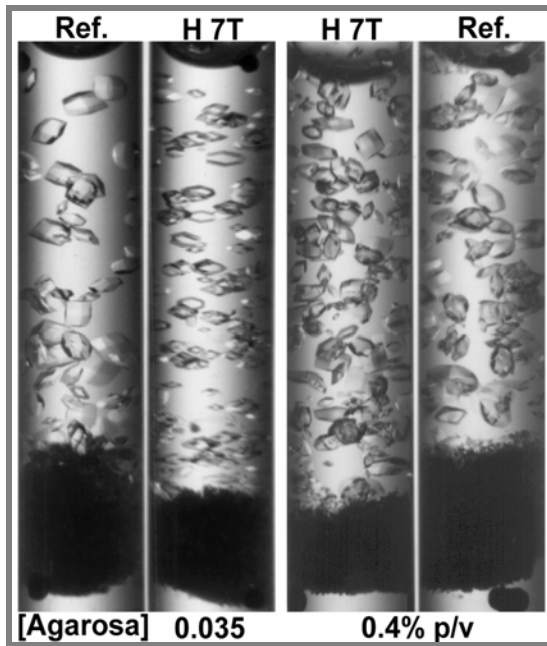
Por otra parte dicho efecto se pierde cuando los tubos dejan de exponerse a la influencia del campo; el sistema pierde la memoria de tal influencia y se iguala a las referencias.

#### 6.5.4.2 EN CONTRADIFUSIÓN

Las experiencias en contradifusión se diseñan para evaluar la dependencia de la influencia del campo magnético con la sobresaturación. Al igual que hicimos en *batch*, cada ensayo se realiza por duplicado manteniendo uno de los tubos como referencia.

Como ya describimos en el capítulo 4, el primer evento que observamos en experiencias en contradifusión es la formación de un precipitado amorfo (para determinadas condiciones iniciales). La extensión en la que esta precipitación ocurre condiciona la evolución de la sobresaturación a lo largo de la cámara de proteína. Este carácter dinámico de la contradifusión dificulta la comparación de resultados incluso entre experiencias idénticas.





*Fig.6.5-8 Resultado final de experiencias de contradifusión en gel de agarosa.*

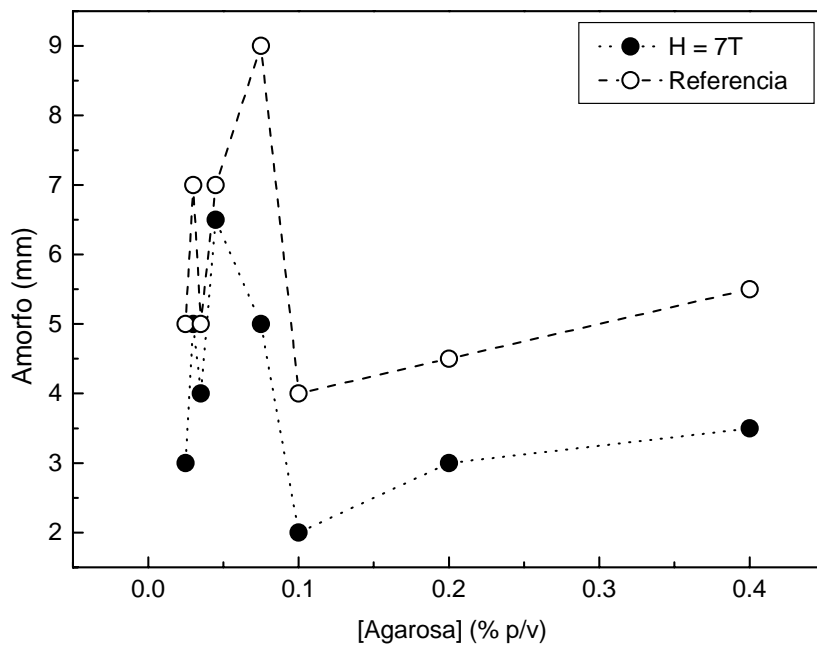
Las condiciones de cristalización empleadas en las experiencias de contradifusión en presencia de un campo magnético cumplen el requisito de comenzar suficientemente alejadas del equilibrio como para que se produzca esta precipitación de amorfo (Fig.6.5-8).

En la figura 6.5-9 se muestra la cantidad de amorfo (medida en milímetros) en función de la concentración de gel empleado. Observamos que: 1) existe una dependencia entre la cantidad de amorfo y la concentración de gel, independientemente de que la experiencia se lleve a cabo bajo la influencia del campo magnético y 2) que la cantidad de amorfo de las experiencias en campo es siempre menor que en la referencia.

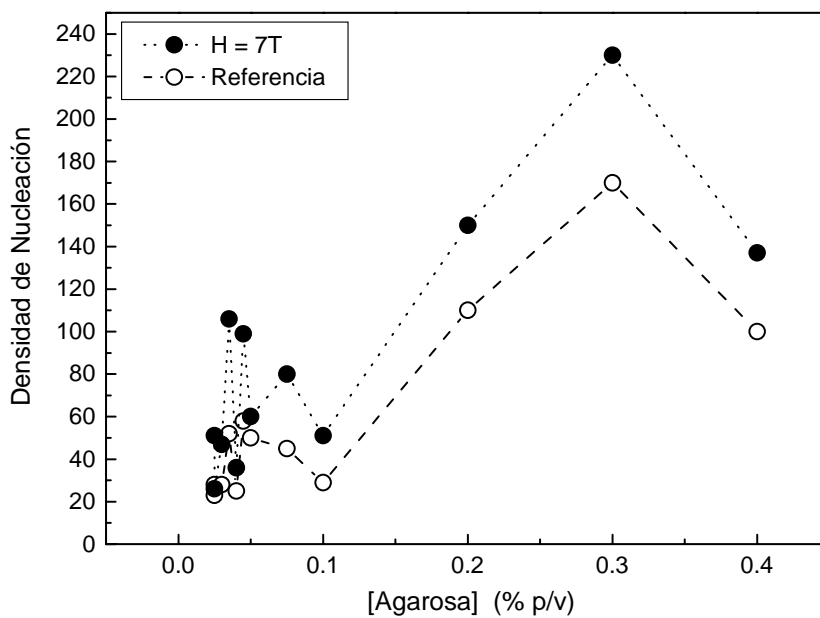
En el primer caso, el comportamiento es generalizado y las tendencias se mantienen para las experiencias en campo y las referencias. Estas variaciones se explican teniendo en cuenta que a concentraciones inferiores a 0.12% nos encontramos por debajo de la concentración crítica de gel y los fenómenos de convección y sedimentación pueden jugar un papel importante ante una precipitación brusca. Por otra parte el efecto inductor de la agarosa sobre la nucleación parece controlar también la precipitación de agregados de bajo orden, lo que explica el aumento proporcional de la cantidad de amorfo con la concentración de agarosa por encima de 0.1% p/v.

En el segundo caso, del comportamiento paralelo que siguen las experiencias en campo y las referencias deducimos que el descenso de la precipitación de amorfo en presencia del campo magnético no es debido a un error experimental ni a la influencia del gel de agarosa y que por tanto esta directamente provocado por el campo magnético aplicado. Puesto que este tipo de agregados se caracteriza por su bajo orden y elevada velocidad de formación no puede ser consecuencia directa de la orientación de las moléculas que lo forman. Según esto podemos pensar que el campo magnético modifica de alguna forma las características del transporte en la solución.

Esta diferencia en la cantidad de amorfo precipitado condiciona la evolución del sistema haciendo que cada experiencia sea distinta aunque partamos de las mismas condiciones iniciales. A raíz de los resultados no es sorprendente que la densidad de nucleación sea superior en las experiencias sometidas a la acción del campo magnético (Fig.6.5-10) y por tanto no podemos comparar estos resultados con los obtenidos en *batch*.

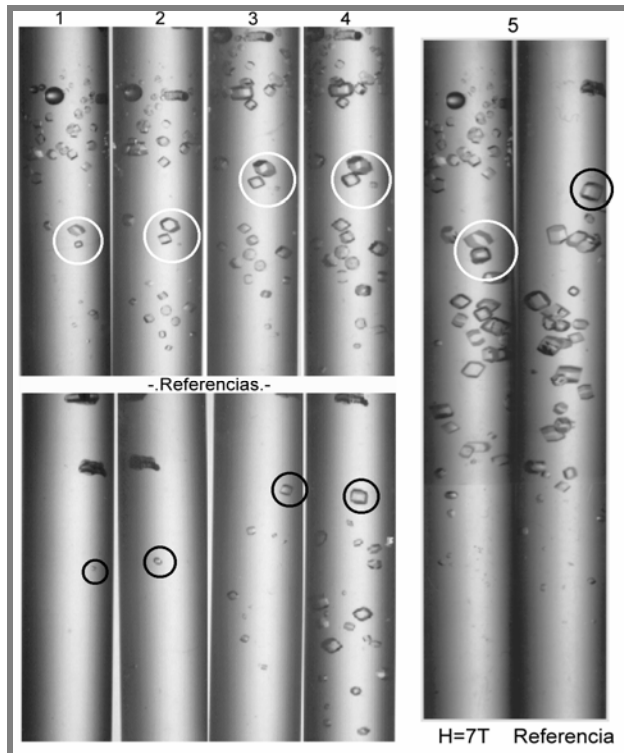


**Fig.6.5-9** En la gráfica se muestra la cantidad de amorfo en milímetros para experiencias de cristalización de lisozima en contradifusión bajo la influencia de un campo magnético de 7T (símbolos llenos) y en ausencia del campo (símbolos vacíos).



**Fig.6.5-10** La gráfica muestra la densidad de nucleación de experiencias realizadas en contradifusión bajo la influencia de un campo magnético (símbolos llenos) y las referencias, en ausencia del campo (símbolos vacíos).

Para esclarecer si la acción del campo magnético dejaba de tener efecto una vez eliminada su influencia, se diseñó un experimento puntual en él que se bajan las concentraciones de sal (10% p/v) y de proteína (50mg/ml) aumentando al mismo tiempo las longitudes de las cámaras de sal y proteína a 35 mm y el tapón físico a 5 mm. Con esta configuración los niveles de sobresaturación inicial son suficientemente bajos como para evitar la formación de amorfo y por otra parte aumentamos el tiempo de desarrollo de la experiencia.



**Fig. 6.5-11** Evolución del flujo de nucleación para una experiencia sometida a campo (arriba) y su referencia (abajo), durante 69 horas (1) y durante 24 horas más (2). Las fotografías 3, 4 y 5 muestran el desarrollo a intervalos de 24h después de eliminar la acción del campo magnético.

En la figura 6.5-11 se observa que, transcurridas 69 horas sólo se aprecian cristales en la experiencia sometida a la acción del campo. Se volvió a someter el tubo a la acción del campo durante otras 23 horas aproximadamente y se volvieron a fotografiar. Mientras que en la experiencia sometida a la acción del campo magnético se observa un aumento del número de cristales, en la referencia el único cristal aumentó de tamaño. A partir de este momento se mantienen los tubos fuera de la influencia del campo magnético y se fotografían durante las siguientes 72 horas a intervalos de 24 horas aproximadamente. Durante este periodo de tiempo se observa un progresivo aumento del número de cristales en ambos tubos, aunque mucho más abundante en la referencia. Después de 72 horas la referencia alcanza el frente

de nucleación de la experiencia que habíamos sometido a la influencia del campo magnético. A partir de este momento los dos tubos evolucionan prácticamente en paralelo.

De nuevo se observa como el campo magnético no deja una impronta en el sistema sino que una vez eliminada su influencia la experiencia sigue un curso normal.

Concluimos que la aplicación de un campo magnético homogéneo y constante aumenta la densidad de nucleación en experiencias en batch y en contradifusión. Este efecto no puede ser debido a un descenso de los fenómenos convectivos como ocurre en caso de la cristalización de semiconductores en soluciones fundidas [Witt, et al., 1970], ya que la densidad de nucleación aumenta al contrario de lo esperado si el medio fuese más difusivo. Tampoco puede ser debido a un incremento de la sobresaturación efectiva ya que no estaría de acuerdo con el aumento en la cantidad de amorfo.

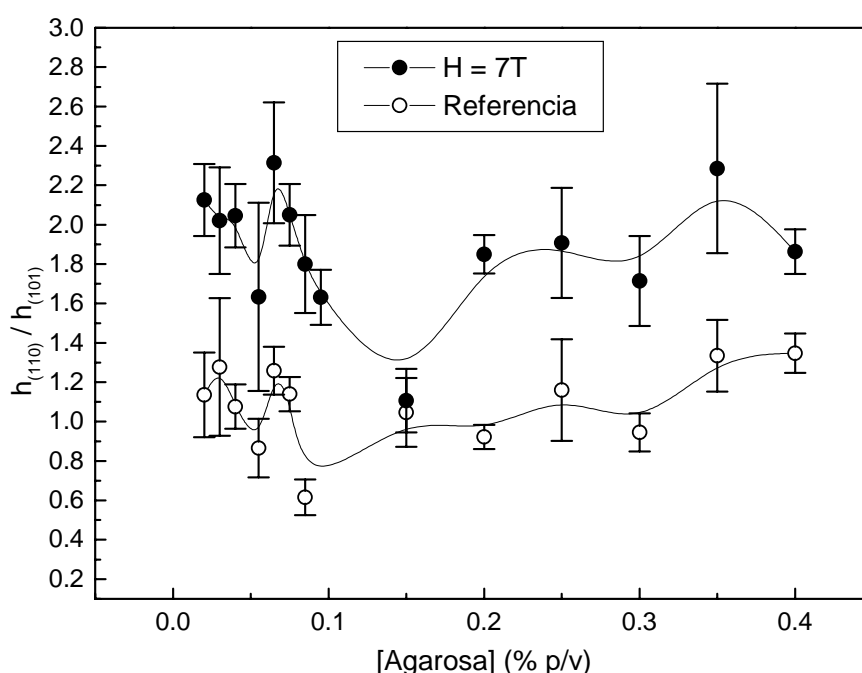
### 6.5.5. EFECTO SOBRE LA MORFOLOGÍA FINAL DE LOS CRISTALES

En este apartado se presentan los datos referentes a la variación de la razón de forma de los cristales de lisozima crecidos en presencia de un campo magnético respecto de las referencias para las experiencias realizadas en *batch* y en contradifusión.

La razón de forma ( $R=W/L$ ) se determina siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4.2. Para las experiencias realizadas empleando el método *batch* se miden el mayor número de cristales posibles, mientras que para las experiencias llevadas a cabo en contradifusión, cada medida corresponde a una posición a lo largo de la cámara de proteína.

#### 6.5.5.1 EN BATCH

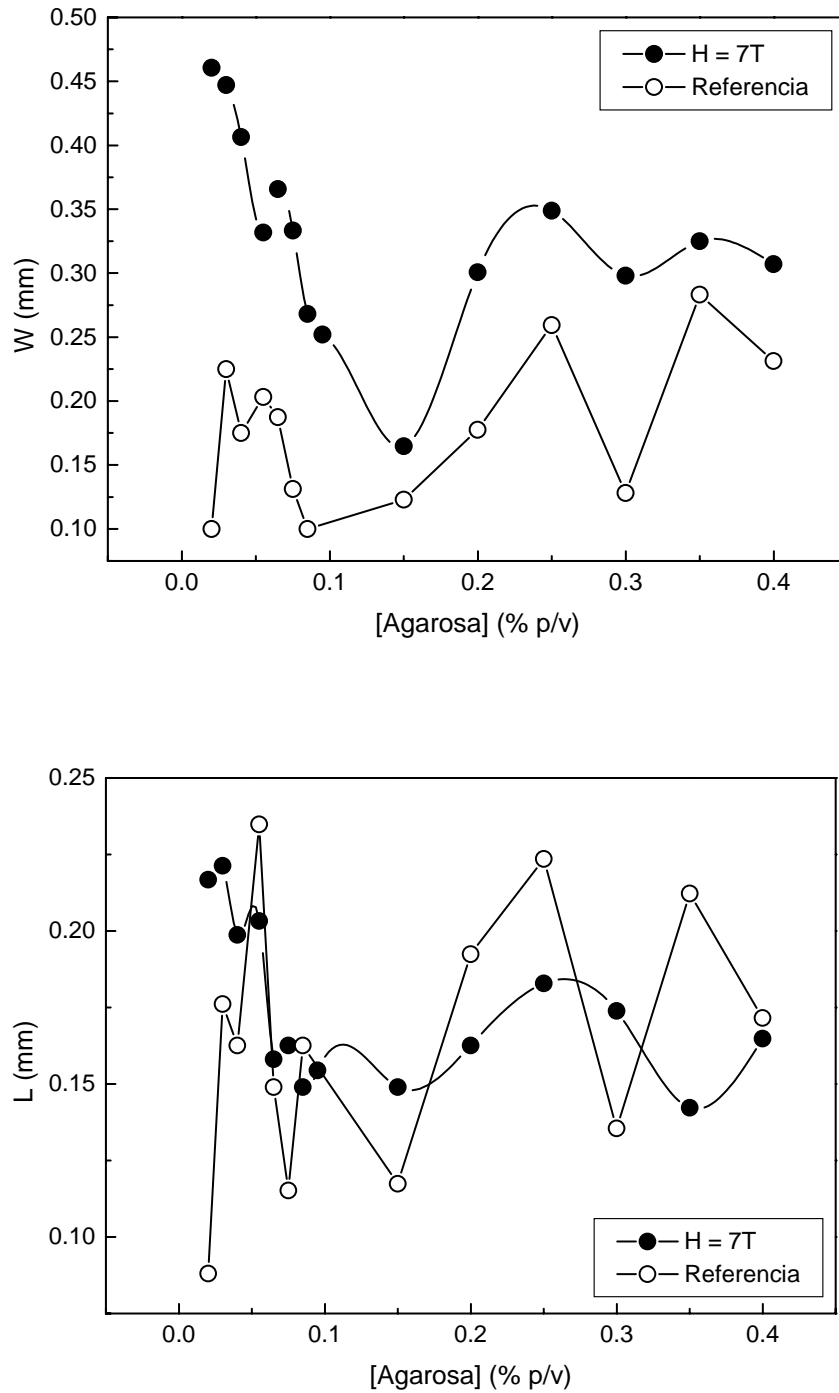
Como se observa en la figura 6.5-12, existe una clara influencia del campo magnético sobre la morfología final de los cristales. Las fluctuaciones del habito siguen la misma pauta de comportamiento que la densidad de nucleación y como se vio en el capítulo anterior dependen de la concentración de agarosa.



**Fig.6.5-12** Variación de la razón de forma promedio en función de la concentración de gel de agarosa de experiencias realizadas en batch.

En un análisis más detallado representamos la variación de las dimensiones  $W$  y  $L$  en función de la concentración de gel (Fig.6.5-13). Se observa como por debajo de 0.1% de concentración de agarosa el valor de  $W$  es mucho mayor para las experiencias en campo que para las referencias mientras que el valor de  $L$  fluctúa. Por encima de 0.1% estas diferencias se atenúan

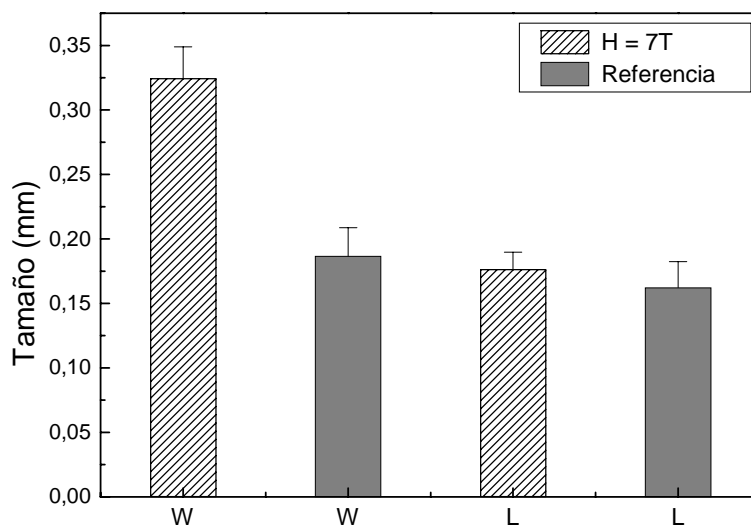
algo en el caso de W mientras que los valores de L son significativamente superiores en las referencias.



**Fig.6.5-13** Variación de las dimensiones características de los cristales de lisozima tetragonal (W y L) en función de la concentración de agarosa para experiencias realizadas en presencia y ausencia de un campo magnético.

De estos resultados se deduce que el crecimiento de las caras de tipo  $\{110\}$ , perpendiculares a la dirección del campo magnético, está favorecido en mayor o menor medida en todo el rango de concentraciones de agarosa estudiado, sin embargo, las caras de tipo  $\{101\}$  ven impedido su crecimiento fundamentalmente a altas concentraciones de agarosa bajo la acción del campo magnético.

Cuando representamos las dimensiones promedio de todas las experiencias realizadas se observa claramente que los cristales crecidos en presencia del campo magnético son de mayor tamaño, debido fundamentalmente a un mayor desarrollo de las caras  $\{110\}$  (Fig.6.5-14).



**Fig.6.5-14** Promedio de las dimensiones características,  $W$  y  $L$ , cuantificadas en todas las experiencias realizadas en batch.

Estos resultados en principio contrastan con los obtenidos por Yanagiya y colaboradores (2000) que encuentran un descenso de la velocidad de crecimiento para ambas caras. Sin embargo, en los estudios realizados por estos autores el campo aplicado se dispone perpendicular al eje  $c$  del cristal, mientras que en nuestro caso el campo magnético es paralelo.

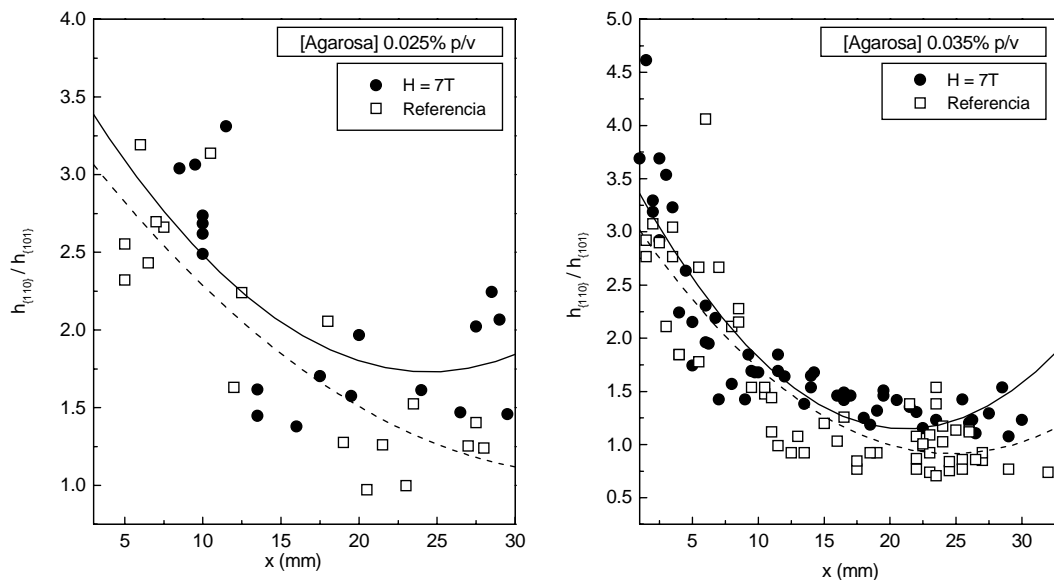
#### 6.5.5.2 EN CONTRADIFUSIÓN

Como dijimos en el apartado 6.5.4.2 las experiencias realizadas en contradifusión no evolucionan de forma paralela ya que su desarrollo está condicionado por la cantidad de amorfo precipitado en los primeros instantes.

Para poder realizar una comparación se realizan dos experiencias en las que se aumenta a 30 mm las cámaras de sal y 5 mm para el tampón físico. Con esta configuración las diferencias entre la cantidad de amorfo generado en presencia del campo y en la referencia son despreciables. En ambas experiencias la concentración de agarosa, 0.025 y 0.035% respectivamente, se escogen de forma que interfieran poco.

Como se observa en la figura 6.5-15 la razón de forma evoluciona prácticamente de forma paralela en la muestra sometida a campo y en la referencia, aunque se observa una leve diferencia entre ambos. Al avanzar por la cámara de proteína la razón de forma de las experiencias sometidas a campo magnético aumentan su valor respecto de la referencia coincidiendo con valores menores de sobresaturación y por tanto con menores velocidades de crecimiento. Por encima de los 2.0 cm se da un aumento de la razón de forma de las experiencias bajo la influencia del campo coincidiendo con la región teórica de mínima sobresaturación promedio. En posiciones superiores las diferencias continúan aumentando.

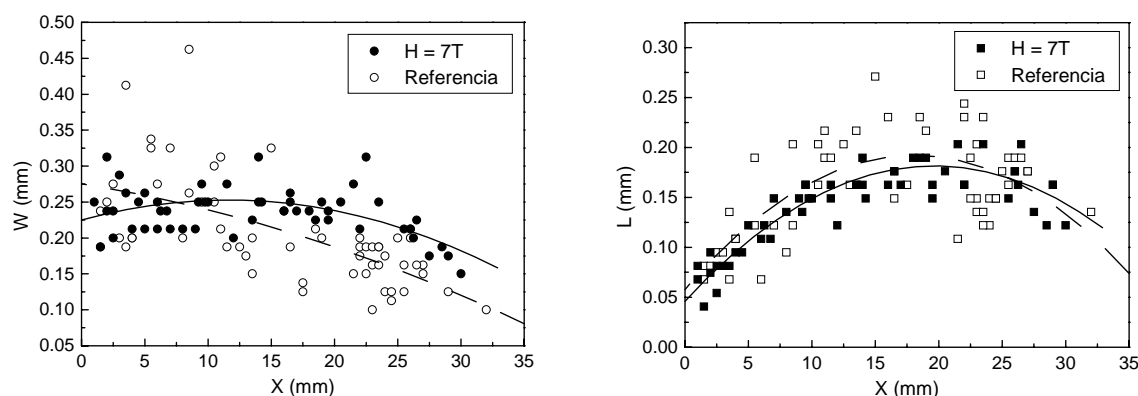
A partir de estos resultados se deduce que sólo para valores bajos de sobresaturación, donde el flujo de nucleación y la velocidad de crecimiento de los cristales son bajos, es posible detectar una variación de la razón de forma por efecto del campo magnético.



**Fig.6.5-15** Variación de la razón de forma de los cristales de proteína en función de la sobresaturación en presencia de un campo magnético. Las líneas corresponden al mejor ajuste a una ecuación de segundo orden.

Cuando se compara la evolución de cada una de las caras por separado en función de la posición (Fig.6.5-16), se observa como el incremento de la razón de forma esta ocasionado fundamentalmente por un mayor desarrollo de las caras de tipo  $\{110\}$ , coincidiendo con las observaciones realizadas en las experiencias realizadas en batch.

A partir de estos datos se deduce que la sobresaturación es una variable importante cuando se quiere evaluar la acción de un campo magnético. Las mayores modificaciones de razón de forma se obtienen cuando la velocidad de crecimiento de los cristales no es elevada, esto es, a valores de sobresaturación moderados.



**Fig.6.5-16** Desarrollo de las dimensiones características de los cristales ( $W$  y  $L$ ) en función de la posición en la cámara de proteína para una experiencia realizada en contradifusión en gel de agarosa (0.035% p/v). Los símbolos llenos para la experiencia en presencia del campo magnético y los vacíos para la referencia.

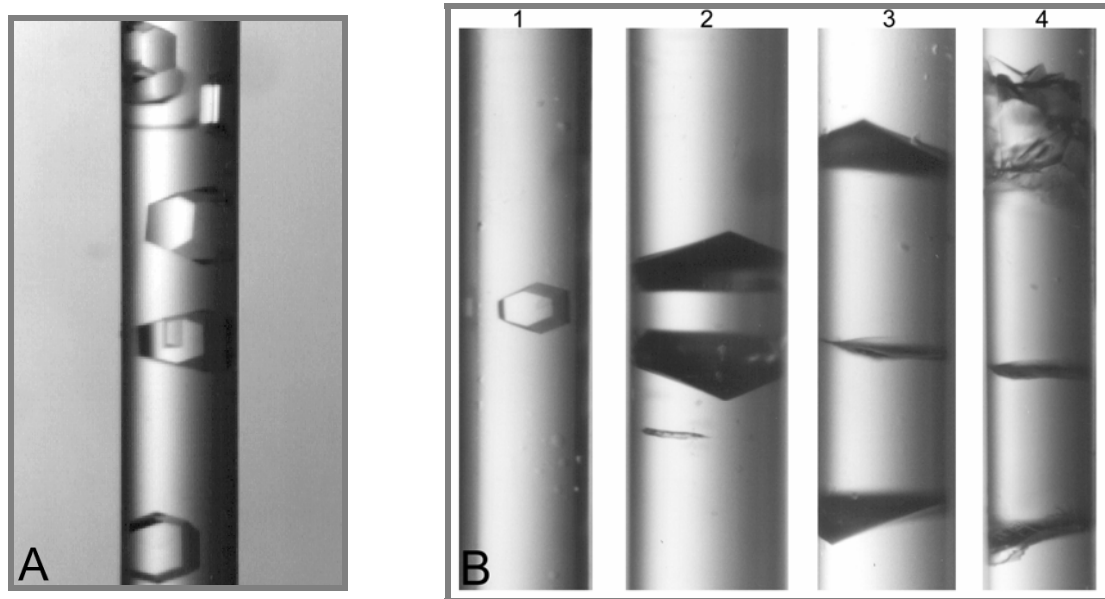
### 6.5.6. ORIENTACIÓN DE CRISTALES EN EL INTERIOR DE CAPILARES

Como aplicación práctica nos pareció interesante emplear el magnetismo a la orientación de grandes monocristales en el interior de un capilar. El objetivo de estos ensayos fue obtener cristales de lisozima en los que la mayor parte del volumen del cristal haya crecido debido a la expansión de los sectores bipiramidales. Estos cristales nos permitirían realizar distintos ensayos sobre la influencia de los distintos sectores de crecimiento sobre la calidad cristalina, aunque en este apartado sólo se recoge la puesta a punto del método de crecimiento.

Todas las experiencias se realizan empleando el GAME adaptado a los tubos de RMN de forma que los capilares quedan paralelos a la dirección del campo magnético. En las primeras experiencias realizadas con 100 mg/ml y 20% de lisozima y NaCl respectivamente sólo observamos cristales en la base del capilar. Para aumentar la densidad de nucleación se aumenta la concentración de proteína a 150 mg/ml y se añade una pequeña cantidad de gel de agarosa (0.025% p/v) de forma que actuara como un inductor de la nucleación y descendiese la probabilidad de que los cristales nucleasen adheridos a las paredes del capilar. El resultado de esta experiencia se muestra en la figura 6.5.17-A.

Una vez comprobada la eficacia de la configuración experimental y aprovechando un periodo estival de una semana, se realiza una experiencia con 100 mg/ml de lisozima y 0.03% p/v de agarosa. Después de ocho días bajo la influencia del campo magnético comprobamos como habían aparecido diferentes cristales a lo largo del capilar. En la mitad superior del capilar aparecía un pequeño cristal de buen aspecto con el eje  $c$  perfectamente alineado en la dirección del campo (Fig.6.5-17-B.1) del que seguimos su evolución a las 20 y 72 horas (Fig.6.5-17-B.2 y B.3), momento en el que consideramos que el cristal había dejado de crecer. Sorprendentemente tras 24 horas en el laboratorio el cristal presentaba un recrecimiento desordenado en su parte superior. Aún no hemos encontrado una explicación concluyente para este efecto.





**Fig.6.5-17** A la izquierda se observan cristales de lisozima en el interior de un capilar de 0.5 mm de diámetro interno crecidos mediante el GAME bajo la acción de un campo magnético. A la derecha se observa la evolución temporal de un cristal de lisozima que nuclea y crece en el seno de un campo magnético.

## 6.6. CONCLUSIONES

Índice

Hemos descrito un protocolo experimental que permite la evaluación del efecto que un campo magnético homogéneo y constante provoca sobre la nucleación y crecimiento de cristales de proteínas.

El empleo de geles de agarosa a concentraciones inferiores o igual a 0.035% p/v permite la orientación de más de un 95% de los cristales que nuclean bajo la acción de un campo magnético. Por encima de este valor de concentración se produce una reducción gradual de la razón de orientación que se hace prácticamente cero cuando la concentración de gel supera el ~0.3% p/v. Esta reducción se ha relacionado con la energía elástica de las fibras de gel que atraviesan el cristal (aptdo. 6.5.3).

La aplicación de un campo magnético homogéneo y constante de 7T de intensidad aumenta la densidad de nucleación de los cristales de lisozima. Esta influencia se reduce cuando el tiempo de inducción disminuye y desaparece cuando la experiencia deja de someterse a la acción del campo (aptdo. 6.5.4.). Asimismo, la acción del campo magnético incrementa la velocidad de crecimiento de los cristales de lisozima. Este aumento es más acusado en las caras de tipo {110} que crecen paralelas a la dirección del campo. Esta influencia desaparece a elevados valores de sobresaturación (aptdo. 6.5.5). Cuando la sobresaturación es suficientemente elevada como para que el material precipitado no sea cristalino, la cantidad de precipitado disminuye bajo la acción del campo.

Todos estos efectos apuntan a una modificación de las características del transporte en la solución a través de una disminución del coeficiente de difusión rotacional de la proteína.



## 7. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

En este capítulo se resumen las conclusiones expuestas en los diferentes capítulos de la tesis y se apuntan algunas de las posibles estrategias de futuras investigaciones, así como las posibles implicaciones de carácter práctico.

### **1. Hemos demostrado que las técnicas contradifusivas optimizan la calidad de los cristales, independientemente de su implementación técnica (capítulo 4).**

Los mecanismos que controlan el transporte de masa y la precipitación en sistemas contradifusivos pueden ser los mismos independientemente del medio empleado para su desarrollo (capilares, geles o microgravedad).

La calidad de los cristales crecidos en medios donde el transporte de masa es controlado por difusión depende de la sobresaturación.

La contradifusión es una potente técnica de barrido de condiciones. Escogido un par proteína-agente precipitante, la contradifusión asegura la optimización de las condiciones de crecimiento.

El rango de valores de sobresaturación barridos es función del medio de crecimiento empleado. En idénticas condiciones iniciales y tomando las condiciones de microgravedad como sistema de referencia, los geles de agarosa amplían dicho rango y los geles de sílice lo disminuyen. Ambos efectos se amplifican al aumentar la concentración de gel.

Los geles de agarosa son los más eficientes en la búsqueda de las mejores condiciones de precipitación en contradifusión, mientras que los geles de sílice ofrecen la mejor alternativa para la obtención de cristales a sobresaturaciones muy bajas sin comprometer el tamaño final de los cristales.

Los entornos de gravedad reducida ofrecen un medio "químicamente limpio" necesario para llevar a cabo estudios encaminados a comprender los parámetros que controlan la nucleación y el crecimiento de cristales de proteína.

*Estos resultados apoyan el uso de la técnica de contradifusión como una alternativa a las técnicas clásicas de cristalización de proteínas, no sólo para obtener de forma rápida cristales de la más alta calidad, sino también como técnicas de barrido de condiciones de cristalización. Por otra parte, se demuestra que es la mejor técnica para diseñar experimentos dirigidos a entender los fundamentos de la relación entre condiciones de crecimiento y calidad cristalina. Nuestros pioneros experimentos de caracterización in situ así lo demuestran y abren una puerta hacia el uso de esta técnica con nuevas tecnologías como los microhaces de rayos X.*

## **2. La incorporación del gel (agarosa o sílice) durante el crecimiento de los cristales de proteína da lugar a nuevos materiales que participan de las características de ambos (capítulo 5).**

La calidad (entendida como límite de resolución y mosaicidad) de los cristales de proteína no se ve afectada por la incorporación de las fibras de gel en la estructura del cristal y es independiente de la cantidad de gel incorporada.

El gel se incorpora en la estructura de los cristales sin ocupar posiciones cristalográficas, ya que no existen interacciones específicas entre las fibras de gel y las moléculas de proteína. Sin embargo, puesto que los geles son parte integrante del cristal, deben existir interacciones inespecíficas en suficiente cuantía como para no provocar tensiones que modifiquen cuantitativamente la calidad de los cristales.

En particular, los geles de sílice no sólo refuerzan los cristales tanto mecánicamente como frente a la deshidratación, sino que además estabilizan la estructura de la proteína.

Por su parte, los geles de agarosa ofrecen un camino fácil de disfrutar de un medio difusivo sin una elevada influencia sobre la nucleación a concentraciones por debajo de la concentración crítica. Esta característica lo hace un buen sustituto de la microgravedad.

La elección del tipo de gel debe realizarse teniendo en cuenta las posibles interacciones proteína-gel y la propia estabilidad del gel en las condiciones de cristalización de la macromolécula elegida.

*Este estudio abre una amplia gama de posibilidades para los cristales de proteínas:*

- ❖ *la obtención de cristales de proteicos con características hídras y mecánicas mejoradas puede jugar un importante papel en el desarrollo de nuevas tecnologías de alimentación, análisis clínicos, desarrollo de biosensores, etc.*

*y plantea una serie de problemas como:*

- ❖ *la posición de las fibras de gel en los cristales de proteína,*
- ❖ *la baja repercusión o incluso el beneficio de esta incorporación sobre la calidad de los cristales.*

**3. Hemos demostrado que la nucleación y crecimiento de cristales de lisozima pueden ser influenciados por la aplicación de un campo magnético homogéneo y constante (capítulo 6).**

Un campo magnético homogéneo y constante aumenta el flujo de nucleación.

El crecimiento de las caras de un cristal de lisozima se ve inducido cuando el eje c cristalográfico se orienta paralelo a la dirección del campo aplicado.

Esta influencia está modulada por la sobresaturación, el tiempo de exposición al campo magnético y la presencia de aditivos.

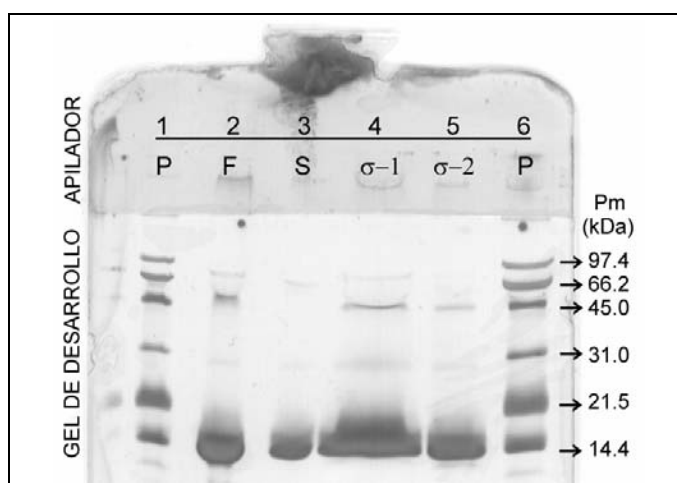
*Como se ha puesto de manifiesto en este trabajo, el uso de un campo magnético de elevada intensidad es una potente herramienta que controla el crecimiento de cristales de proteína influenciados por la acción del campo. Si, como se propone en esta memoria, el campo magnético modifica las características de la solución, su influencia puede quedar reflejada en un aumento de la calidad de los cristales.*



## APÉNDICE

### A. CARACTERIZACIÓN DE LISOZIMA

En la figura 1.3-2 mostramos una electroforesis (SDS-PAGE, 20%T) con tinción de plata, realizada en un FastSystem (Pharmacia Biotech) de las distintas lisozimas empleadas en el transcurso de esta tesis. Se observan la presencia de impurezas que han sido identificadas como ovoalbúmina (45.0 kDa) y conalbúmina (78.0 kDa), mientras que la banda cercana de 29kDa corresponde a un dímero de lisozima unido de forma covalente producido por los elevados pH empleados durante la purificación [Thomas, et al., 1996].



**Fig.1.4-2** PhastGel electroforesis en SDS-PAGE (20% T) de lisozima de diferentes casas comerciales: Fluka (F), Seikagaku (S) y dos lotes distintos de Sigma,  $\sigma$ -1 (53H7145) y  $\sigma$ -2 (65H7025). El revelado del gel se realizó con tinción de plata según adaptación de Heukeshoven y Dernick, (1985) para PhastGel.

La mayor parte del trabajo que presentamos en esta tesis se ha realizado empleando lisozima de Sigma, lote 65H7025. Este lote presenta una baja cantidad de proteína dimérica y no observamos la aparición de la banda de conalbúmina. Por otra parte la actividad especificada por el fabricante (73.000 Units./ mg de proteína) es la asociada a proteínas activas. Este parámetro no tiene por que influir en la cristalización siempre y cuando la pérdida de actividad no este motivada por cambios en algún residuo que este involucrado en los contactos en el cristal [Rosenberger, 1996a], pero si puede afectar si dicho residuo provoca algún cambio de tipo conformacional.

Casa	Lote	Actividad (Units/mg de prot.)	~% Sales	Nº Bandas
Fluka	62971	66.200	9.7±1.1 % p/p	4
Sigma	53H7145	50.000	-	4
	65H7025	73.000	5.5±1.3 % p/p	3
Seikagaku	E96302	50.600	-	3

**Tabla 1.4-2** Características más destacables de la pureza de lisozima de diferentes casas comerciales y lotes.

Puesto que uno de los pasos durante la purificación es la cristalización realizamos una estimación de la cantidad de sales presentes en dos de las muestras. Para ello realizamos seis pesadas (balanza de precisión, Mettler) de los lotes señalados y determinamos la concentración de proteína a 280 nm ( $\epsilon_{280} = 2.64 \text{ ml/mg cm}$  [Sophianopoulos et al., 1962]). Los resultados se muestran en la tabla 1.4-2.



**BIBLIOGRAFÍA****A**

- Andreazza, P., Lefaucheux, F. y Mutaftschiev, B., *J. Cryst. Growth*, **92** (1988) 415.  
 Arend, H. y Connelly J.J., *J. Cryst. Growth*, **56** (1982) 642.  
 Arnold, W., Steele, R. y Muller, H., *Proc. Natl. Acad. Sc.*, **44** (1958) 1.  
 Arnott, S., Fulmer, et al., *J. Mol. Biol.*, **90** (1974) 269.  
 Astier, J.P., Veesler, S., Boistelle, R., *Acta Cryst.*, **D54** (1998) 703.  
 Ataka, M., Katoh, E. y Wakayama, N.I., *J. Cryst. Growth*, **173** (1997) 592.

**B**

- Baker, E.N., *J. Mol. Biol.*, **141** (1980) 441.  
 Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L. y Halling, P.J., "Stability and Stabilization of Biocatalysts", Elsevier, Amsterdam, (1998).  
 Becker, J.F., Geacintov, N.E., Van Nostrand, F. y Van Matter, R., *Res. Commun*, **51** (1973) 597.  
 Berg, W.F., *Proc. Roy. Soc.*, **A164** (1938) 79.  
 Berlin, E., Kliman, P.G. y Pallansch, M.J., *Thermochim. Acta*, **4** (1972) 11.  
 Bernstein, F.C., Koetzle, et al., *J. Mol. Biol.* **112** (1977) 535.  
 Birge, R.R y Gross, R.B., "Introduction to Molecular Electronics", Edward A. Kent, UK, (1995).  
 Boistelle, R. y Astier, *J. Cryst. Growth*. **90** (1988) 14.  
 Bone, S. y Pethig, R., *J. Mol. Biol.*, **157** (1982) 571.  
 Bonneté, F., Vidal, O., Robert, M.C. y Tardieu, A., *J. Cryst. Growth*, **168** (1996) 185.  
 Boué, F., Lefaucheux, F., Robert, M.C., y Rosenman, I., *J. Cryst. Growth*, **133** (1993) 246.  
 Braudo, E., Muratalieva, I.R., Plaschina, I.G. y Tolstoguzov, V.B., *Carbohydr. Polym.* **15** (1991) 317.  
 Buckley, A.M. y Greenblatt, M., *J. Chem.Education*, **71** (1994) 599.  
 Buckley, H.E., "Crystal Growth", John Wiley & Sons, New York, (1952) 131.  
 Burton, W.K., Cabrera, N., y Frank, F.C., *Phil. Trans. Roy. Soc.*, **A243** (1951) 299.

**C**

- Cabane, B., Dubois, M., Lefaucheux, F. y Robert, M., *J. Non. Cryst. Solids*, **119** (1990) 121.  
 Chagneux, R. y Chalazonitis, N., *C. R. Acad. Sc. Paris. Ser D*, **274** (1972) 317.  
 Chalazonitis, N., Chagneux, R. y Arvanitaki, A., *C. R. Acad. Sc. Paris. Ser D*, **271** (1970) 130.  
 Chambre, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75** (1978) 5471.  
 Chernov, A.A., "Crystal Growth. Modern Crystallography", Springer Verlag, New York, (1984).  
 Chernov, A.A., *J. Cryst. Growth*, **24-25** (1974) 11.  
 Chernov, A.A., *J. Cryst. Growth*. **174** (1997) 354.  
 Chernov, A.A., *Prog. Crystal Growth and Charact.* **26** (1993) 121.  
 Cotton-Feytis, E. y Fauro-Fremiet, E., *C. R. Acad. Sc. Paris, Ser. D* **214** (1942) 996.  
 Crank, J., *The mathematics of difusión*", Claredon Presss. Oxford. (1975).  
 Cudney, B., Patel, S. y McPherson, A., *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 479.

**D**

- De Genes, P.G., *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY (1979).  
 Domínguez-Vera, J., Rondon, D., Moreno, A. y García-Ruiz, J., *J. Cryst. Growth*, **168** (1996) 138.

- Drenth, J. y Haas, C., *Acta Cryst.*, **D54** (1998) 867.  
Duckworth, M. y Yaphe, W., *Carbohydrate Research* **16** (1971a) 189.  
Duckworth, M. y Yaphe, W., *Carbohydrate Research* **16** (1971b) 446.  
Ducruix, A. y Giegé, R., "*Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*". O. U. P., New York (1999).  
Ducruix, A., Guilloteau, J.P., Ries-Kautt, M. y Tardieu, A., *J. Cryst. Growth*, **168** (1996) 28.  
Durbin, S.D. y Carlson, E.W., *J. Cryst. Growth*, **122** (1992) 71.  
Durbin, S.D. y Feher, G., *J. Cryst. Growth*, **110** (1991) 41.  
Durbin, S.D. y Feher, G., *J. Cryst. Growth*, **76** (1986) 583.  
Durbin, S.D. y Feher, G., *J. Mol. Biol.* **212** (1990) 763.

## E

- Enckevort, W.J.P., van der Berg, J.F., Kreuwel, K.B.G., Derksen, A.J. y Couto, M.S., *J. Cryst. Growth*, **166** (1996) 156.  
Eposito, L., Sica, et al., *Acta Cryst.*, **D54** (1998) 386.  
Etter, M. C., Jahn, D. A., Donahue, B. S., Johnson R. B. y Ojala, C. *J. Cryst. Growth*, **76** (1986) 645.

## F

- Feher, G. y Kam, Z., *Methods Enzymol.*, **114** (1985) 77.  
Fiddis, R.W., Longman, A.R. y Calvert, P.D., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, Sect I, **75** (1979) 2753.  
Finer, E.G y Darker, A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, Sect. I, **71** (1975) 984.  
Finer, E.G. y Darker, A., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, Sect. I **71** (1975) 984.  
Food, S.A. y Atkins, E.D.T., *Biopolymers* **28** (1989) 1345.  
Forsythe, E.L., Nadarajah, N. y Pusey, M.L., *Acta Cryst.*, **D55** (1999) 1005.  
Frank, F.C., *J. Cryst. Growth*, **24-25** (1974) 3.  
Frey, M., *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 663.  
Frey, M., Taverne, J.C.G y Fontencilla-Camps, J.C., *J. Cryst. Growth*, **90** (1988) 245.  
Fujita, Y. y Noda, Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51** (1978) 1567.

## G

- Gallois, B., et al., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2** (1997) 360.  
García-Ruiz et al., "*A supersaturation wave of protein crystallization*", enviado a *J. Cryst. Growth*. (2000)  
García-Ruiz J.M., *Key Eng. Mater.*, **58** (1991) 87.  
García-Ruiz, J.M. y Moreno, A., *J. Cryst. Growth*, **178** (1997) 393.  
García-Ruiz, J.M. y Otálora, F., *J. Cryst. Growth*, **182** (1997) 155.  
García-Ruiz, J.M., Gavira, J.A., et al., *Mater. Res. Bull.*, Vol.33, **11** (1998) 1593.  
García-Ruiz, J.M., *J. Cryst. Growth*, **75** (1986) 441.  
García-Ruiz, J.M., Moreno, A., *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 484.  
García-Ruiz, J.M., Novella, M.L. y Otálora, F., *J. Cryst. Growth*, **196** (1999) 703.  
García-Ruiz, J.M., Otálora, F., Novella, M.L., Gavira, J.A., Sauter, C. y Vidal, O., (2000) enviado a *J. Cryst. Growth*.  
García-Ruiz, J.M., Rondon, D. y Otálora, F., *J. Phys. Chem.*, **100** (1996) 8854.  
García-Ruiz, J.M., Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (1981).  
García-Ruiz, Moreno, A., Viedma, C. y Coll, M., *Mat. Res. Bull.*, **28** (1993) 541.  
García-Ruiz, J.M., Novella, M.L y Otálora, F., *J. Cryst. Growth*, **196** (1999) 703.  
Garside, J., "*Biological mineralization and demineralization*", ed. G.H. Nancollas, (1982) 23.

- Gennaro, A.R., *Ed. Remington Pharmaceutical Sciences*, **17** (1985) 975.  
Green, A.A., *J. Biol. Chem.*, **95** (1932) 47.  
Gregory, R.B., "Protein-Solvent Interaction", Marcel Dekker, Inc. (1995).  
Griess, G.A., *Biopolymers*, **28** (1989) 1475.  
Guilloteau, J.P., Ries-Kautt, M.M. y Ducruix, A.F., *J. Cryst. Growth*, **122** (1992) 223.  
Guiseley, K.B., *Carbohydrate Research*, **13** (1970) 247.

## H

- Haas, C y Drenth, J., *J. Cryst. Growth*, **196** (1999) 388.  
Halgas, J., "Biocatalysis in Organic Synthesis", Elsevier, Amsterdam, (1992).  
Hayashi, A., Kinoshita, K and Kuwano, M., *Polymer Journal*, **9** (1977) 219.  
Hayashi, A., Kinoshita, K. y Kuwano, M., *Polymer Journal*, **9** (1977) 219.  
Hempstead, P. D., Yewdall, S. J. et al., *J.Mol.Biol.*, **268** (1997) 424.  
Henisch, H. K. "Crystal Growth in Gels", Pen. State University Press, Univ. Park, PA, (1970).  
Henisch, H. K. "Crystals in gels and Liesegang rings", Cambridge U. Press, Cambridge, USA (1988).  
Henisch, H.K., Janoka, J.I. y Dennis, J., *J. Electrochem. Soc.*, **112** (1965) 627.  
Henish, H.K. y García-Ruiz, J.M., *J. Cryst. Growth*, **75** (1986) 195 y 203.  
Heukeshoven, J. y Dernick, R., *Electrophoresis*, **6** (1985) 103.  
Holmes, A., Witherow, W., Pusey, M., Snell, E. y Chernov, A., Annual Meeting of ACA and AACG, Buffalo, New York (1999).  
Hong, F.T., Mauzerall, D. y Mauro, A., *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **64**, (1971) 1283.

## I

- Igarashi, K., Azuma, M., Kato, J. y Ooshima, H., *J. Cryst. Growth*, **204** (1999) 191.  
Iler, R.K., "The Chemistry of Silica", John Wiley, New York (1979).  
Iler, R.K., "The Colloid Chemistry of Silica and Silicates", Cornell U. Press, Ithaca, New York (1955).  
Iler, R.K., *J. Colloid Interface Sci.* **55** (1975) 25.

## J

- Jacob, J., Krafft, C., Welfle, K., Welfle, H. y Saenger, W., *Acta Cryst.*, **D54** (1998) 74.

## K

- Kabsch, W., *J. Appl. Cryst.*, **26** (1993) 795.  
Kalkura, S.N. y Devanarayanan, S., *J. Cryst. Growth*, **83** (1987) 446.  
Kam, Z., Shore, H.B. y Feher, G., *J. Mol. Biol.*, **123** (1978) 539.  
Ko, T.P., Day, J., Greenwood, A. y McPherson, A., *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 813.  
Konnert, J.H., D'Antonio, P. y Ward, K.B., *Acta Cryst.* **D50** (1994) 603.  
Kozselack., S., Martin, D., Ng, J. y McPherson, A., *J. Cryst. Growth*, **110** (1991) 177.  
Krishnan, K.S., Guha, B.C. y Banerjee, S., *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser A*, **231** (1933) 235.  
Kuroda, T., Irisawa, T. Y Ookawa, A., "Morphology of Crystals", TERRAPUB, Tokio, (1987) 589.

## L

- Lefauchaux, F., Robert M. C. and Manghi, E. *J. Cryst. Growth*, **56** (1982) 141.  
Lee R. W. y Oldfield E., *J. Biol. Chem*, **257(9)** (1982) 5023.  
Letherby, M.R. y Young, D.A., *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **77** (1981) 1953.  
Li. M., Nadarajah, N. y Pusey, M.L., *Acta Cryst.*, **D55** (1999) 1012.  
Li. M., Nadarajah, N. y Pusey, M.L., *Acta Cryst.*, **D55** (1999b) 1036.

- Li, M., Perozzo, M.A., Konnert, J.H., Nadarajah, N. y Pusey, M.L., *Acta Cryst.*, **D55** (1999a) 1023.  
Liesegang, R.E., *Chemische reaktionen in gallerten*. Dusseldorf.  
Lloyd y Mokanek., *J. Phys. Chem.* **35** (1931) 1512.  
Lorber, B., Sauter, C., et al., *J. Cryst. Growth*, **204** (1999) 357.  
Lonsdale, K., *J. Chem. Soc.*, (1938) 364.

## M

- Maret, G., *Physica, B*, **164** (1990) 205.  
Maret, G., Schickfus, J.M., Mayer, A. y Dransfeld, K., *Physc. Rev. Lett.* **35** (1975) 397.  
Matthews, B.W., *J. Mol. Biol.*, **33** (1968) 491.  
McPherson, A., "*Cristallization of Biological Macromolecules*", Cold Spring Harbor, New York, (1999).  
Medin, A.S., Tesis Doctoral, U. UPPSALA-Suiza (1995) 25.  
Michinomae, M., Mochizuki, M. y Ataka, M., *J. Cryst. Growth*, **197** (1999) 257.  
Mikol, V., Hirsch, E. y Giege, R., *FEBS Lett.*, **258** (1989) 63.  
Miller, T.Y., He, X.M. y Carter, D.C., *J. Cryst. Growth*, **122** (1992) 306.  
Miro, L. y Chalazonitis, N., *C. R. Soc. Biol.*, **161** (1967) 1100.  
Monaco, L.A. y Rosenberger, F., *J. Cryst. Growth*, **129** (1993) 465.  
Moran, D.T. y Carter, J., "*Biological Specimen Preparation for correlative Light and Electron Microscopy*", Romley. Acad. Press Inc. (1987).  
Moreno, A. Tesis Doctoral, U. de Granada, Granada (1995).  
Moreno, A., Juaréz-Martínez, et al., *J. Cryst. Growth*, **205** (1999) 375.  
Moreno, A., Rondón, D. y García-Ruiz, J. M., *J. Cryst. Growth*, **166** (1996) 919.

## N

- Nakahama, N., *J. Home Economics, Japan*, **17** (1966) 197.  
Neugebauer, D.Ch., Blaurock, A.E. y Worcester, D.L., *FEBS Lett.*, **78** (1977) 31.  
Ng, J.D., Lorber, B., et al., *Acta Cryst.* **D53** (1997) 724.  
Niimura, N., Minezaki, Y., Ataka, M., y Katsura, T., *J. Cryst. Growth*, **154** (1995) 136.  
Niimura, N., Minezaki, Y., Tanaka, I., Fujiwara, S. y Ataka, M., *J. of Cryst. Growth*, **200** (1999) 265.  
Nilakantan, P., *Proc. Indian Acad. Sc. Sect. A* **7** (1938) 38.  
Nilakatan, P., *Proc. Indian Acad. Sci. A-7* (1938) 38.  
Nishinari, K. y Watase, M., *Carbohydr. Polym.*, **3** (1983) 53.  
Nývlt, J., Söhnel, O., Matuchová, M. Y Broul, M., "*The kinetics of industrial crystallization*", Elsevier, Tokio (1985).

## O

- Ogston, A.G., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **54** (1985) 1754.  
Oki, H., Matsuura, Y., Komatsu, H. y Chernov, A.A., *Acta Cryst.* **D55** (1999) 114.  
Okkerse, C. y Boer, H., J.H., *Chim. Phys.*, **57** (1960) 534.  
Ostwald, W., "*Lehrb. D. allgem. Chem.*" Leizgzig 2<sup>nd</sup>. Ed., (1899) 778.  
Ostwald, W., *Z. Phys. Chem.*, **23** (1897) 365.  
Otálora, F. y García-Ruiz, J.M., *J. Cryst. Growth*, **169** (1996) 361.  
Otálora, F. y García-Ruiz, J.M., *J. Cryst. Growth*, **182** (1997) 141-154.  
Otálora, F., García-Ruiz, J.M. y Moreno, A., *J. Cryst. Growth*, **168** (1996) 93.  
Otálora, F., Gavira, J.A., Capelle, B. y García-Ruiz, J.M., *Acta Cryst.* **D55** (1999) 650.  
Otálora, F., Novella, M.L., Rondon, D. Y García-Ruiz, J.M., *J. Cryst. Growth*, **196** (1999) 649.

Ótalora, F., Tesis Doctoral, U. De Granada, Granada (1996).

## P

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. Y Gray, T., *Protein Science*, **4** (1995) 2411.

Pauling, L., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76** (1979) 2293.

Pernodet, N., Maaloum, M. y Tinland, B., *Electrophoresis* **18** (1997) 55.

Piculell, L. y Nilsson, S., *J. Phys. Chem.*, **93** (1989) 5596.

Piculell, L. y Nilsson, S., *Progr. Colloid Polym Sci.*, **82** (1990) 198.

Piculell, L. y Nilsson, S., *J. Phys. Chem.*, **93** (1989) 5602.

Plank, C.J. y Drake, L.C., *J. Colloid. Sci.*, **2** (1974) 413.

Provost, K. Y Robert, M.C., *J. Cryst. Growth*, **110** (1991) 258.

Provost, K. Y Robert, M.C., *J. Cryst. Growth*, **156** (1995) 112.

Pusey, M.L., *J. Cryst. Growth*, **110** (1991) 60.

## R

Ramzi, M., Tesis Doctoral, U. Luis Pasteur-Strasburgo, Francia (1996).

Rees, D.A., *J. Biochem.* **126** (1972) 257.

Ries-Kautt, M.M. y Ducruix, A.F., *J. Biol. Chem.*, **264** (1989) 745.

Righetti, P.G., Frost, B.C.W. y Snyder, S.R., *Biochem. Biophys. Methos*, **4** (1981) 347.

Robert, M.C. y Berthou, J., *C. R. Acad. Sci. Paris*, **305**, II, (1987) 847.

Robert, M.C. y Lefaucheux, F., *J. Cryst. Growth*, **90** (1988) 358.

Robert, M.C., Bernard, Y. y Lefaucheux, F., *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 496.

Rochas, C y Lahaye, M., *Carbohydrate Polymers*, **10** (1989) 289.

Rochas, C. y Rinaudo, M., *Biopolymers*, **19** (1980) 1675.

Rosenberger, F., Howard, S.B., Sowers, J.W. y Nyce, T.A., *J. Cryst. Growth.*, **129** (1993) 1.

Rosenberger, F., *J. Cryst. Growth*, **166** (1996) 40.

Rothgeb T. M y Oldfield E., *J. Biol. Chem*, **256(3)** (1981) 1432.

## S

Saeed, S.A. & Boyde, T.R.C., *FEBS Letters*, **123** (1980) 111.

Sakurazawa, S., Kubota, T., Ataka, M., *J. Cryst. Growth*, **196** (1999) 325.

Salemme, F.R., Genieser, L., et al., *J. Cryst. Growth*, **90** (1988) 273.

Salemne, F.R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **151** (1972) 533.

Samulski, E.T. y Berendsen, J.C., *J. Chem. Phys.*, **56** (1972) 3920.

Samulski, E.T. y Berendsen, J.C., *J. Chem. Phys.*, **56** (1972) 3920.

Sazaki, G., Yoshida, E., et al., *J. Cryst. Growth*, **173** (1997) 231.

Schindler, P.W., Fürst, B., Dick, R. y Wolf, P.U., *J. Colloid Interface Sci.*, **55** (1975) 469.

Scout, R.P.W., "Silica Gel and Bonded Phase", John Wiley and Sons, Chichester England (1992).

Seeger, A., *Phil. Mag.*, **44** (1953) 1.

Sica, F., Demasi, D., et al., *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 508.

Sindorf, D.W. & Maciel, G.E., *J. Phys. Chem.*, **87** (1983) 5516.

Sophianopoulos, A.J., et al., *J. Biol. Chem.*, **237** (1962) 1107.

Sunakawa, I., "Morphology of Crystals", TERRAPUB, Tokio, (1987) 509.

## T

Takagi, H., Shi, D., Ha, Y., Allewell, N. M., Theil, E. C., *J.Biol.Chem.*, **18685** (1998) 273.

- Teeter, M.M., *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20** (1991) 577.  
Thiessen, K. J., *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 491.  
Thomas, B.T., Carter, D. y Rosenberger, F., *J. Cryst. Growth*, **187** (1998) 499.  
Thomas, B.T., Vekilov, P.G. y Rosenberger, F., *Acta Cryst.* **D52** (1996) 776.  
Thomas, B.T., Vekilov, P.G. y Rosenberger, F., *Acta Cryst.* **D54** (1998) 226.  
Thomson, T., *BYTE*, Abril (1996) 79.

## U

- Ülkü, S., Balköse, D. y Baltacıoğlu, H., *Colloid & Polym. Sci.*, **271** (1993) 709.

## V

- Vaney, M. C., Maignan, S., Ries-Kautt, M., Ducruix, A., *Acta Cryst.* **D52** (1996) 505.  
Vekilov, P. y Rosenberger, F., *J. Cryst. Growth*, **186** (1998) 251.  
Vidal, O., Robert, M.C. y Boué, F., *J. Cryst. Growth*, **192** (1998a) 271 y 275.  
Vidal, O., Robert, M.C. y Boué, F., *J. Cryst. Growth*, **192** (1998b) 257.

## W

- Wakayama, N.I., Ataka, M. y Abe, H., *J. Cryst. Growth*, **178** (1997) 653.  
Wakayama, N.I., *J. Cryst. Growth*, **191** (1998) 199.  
Walsh, M. A., Schneider, T., et al., *Acta Cryst.*, **D 54** (1998) 522.  
Weber, P. C., *Adv. Prot. Chem.* **41** (1991) 1.  
Witt, A.F., Herman, C.J. y Gatos, H.G., *J. Mater. Sci.*, **5** (1970) 822.  
Worcester, D.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, (1978) 5475  
Wunderlich, W., *Cryst. Res. & Technol.*, **17**, 8 (1982) 987.

## Y

- Yamagishi, A., Takeuchi T., Higashi, T. y Date, M., *Physica B*, **177** (1992) 523.  
Yamagishi, A., Takeuchi, T., Higashi, T. y Date, M., *Physica B*, **164** (1990) 222.  
Yanagiya, S., et al., *J. Cryst. Growth*, **196** (1999) 319.  
Yanagiya, S., et al., *J. Cryst. Growth*, **208** (2000) 645.

## Z

- Zeppezauer, M. y Jacoby, W.B., *Methods in Enzymology*, **22** (1971) 253.  
Zeepezauer, M.E.H. y Zeppezauer, E.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **19** (1968) 564.  
Zerda, T.W., *J. Non Cryst. Solids*, **81** (1986) 365.