
ARTICULO ORIGINAL

Práctica de cristalización de proteínas por técnicas de contradifusión en geles, para estudiantes de Farmacia**Protein crystallization practice by gels counter-diffusion techniques for Pharmacy students.**

Párraga Martínez, J.¹, Delgado Calvo-Flores G.¹, Delgado Calvo-Flores R.¹, Martín García J. M.¹, and García-Ruiz J. M.².

1. Departamento de Edafología y Química Agrícola, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

2. Laboratorio de Estudios Cristalográficos. Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra. Campus de la Salud.

Granada. E-mail autor responsable: jparraga@ugr.es

RESUMEN

Se pretende con esta práctica iniciar al alumno de Farmacia que cursa la asignatura de Geología Aplicada, en las técnicas más novedosas de cristalización de macromoléculas biológicas. ¿Por qué le conviene al alumno realizar esta práctica? Porque la determinación de las estructuras de las macromoléculas biológicas y de otras muchas sustancias de interés sanitario, se realiza en la actualidad principalmente por difracción de Rayos X (DRX) y el primer paso de esta técnica es cristalizarlas, lo que es realmente difícil de realizar. Para ello empleamos los dispositivos GCB (Granada Crystallization Box) desarrollados y patentados por uno de los autores, que sirven para realizar estos experimentos de forma fácil y económica. Durante el curso 2009-2010 se han realizado por primera vez este tipo de prácticas en la Facultad de Farmacia de Granada con un rotundo éxito y queremos extrapolar nuestra experiencia a todas las Facultades de Farmacia que participen en este congreso. Se le enseña al alumno la importancia que tiene la Biocristalografía para conocer las estructuras cristalinas de antibióticos, hormonas, proteínas y principios activos de medicamentos. Muchos Premios Nóbel de Química y Medicina que han hecho avanzar disciplinas como la Biología Molecular y Estructural son cristalógrafos. La Biocristalografía es, por tanto, una ciencia básica para la investigación puntera, apoyo imprescindible para muchas asignaturas troncales. Una Facultad que no contemple estos estudios como obligatorios está descuidando la formación de sus alumnos.

ABSTRACT

The aim of this practice on Biocrystallography is to introduce pharmacy students learning Geology Applied to Pharmacy, in the latest techniques of crystallization of biological macromolecules (especially proteins). Students should improve this practice because the determination of the structures of biological macromolecules and other substances of interest in Pharmacy, are now carried out by X-ray diffraction. A first step in this technique is crystallization of these molecules, and this matter is really difficult. We use a GCB devices (Granada Crystallization Box) developed and patented by one of the authors, to perform such experiments easily and inexpensively. This practice was first performed in the period 2009-2010 obtaining a great success and we want to extrapolate our experience to all pharmacy schools participating in this conference. We teach the students the importance of Biocrystallography to know the structures of antibiotics, hormones, proteins and active

ingredients of drugs. Many Nobel Laureates in Chemistry and Medicine, with have advanced disciplines such as Molecular and Structural Biology, are crystallographers. The Biocrystallography is therefore a basic discipline to conduct first class research and is also a support for many other important subjects. A Faculty that has not granted obligatorily such studies neglects the education of their students.

PALABRAS CLAVE: ispositivo de cristalización, cristales de proteína, técnicas de contradifusión, Biocristalografía

KEYWORDS: crystallization device, protein crystals, counter-diffusion technics, Biocrystallography

INTRODUCCIÓN

De los minerales a las proteínas

A los alumnos se les enseña que tanto los minerales como el resto de los sólidos y las proteínas tienen algo en común: forman cristales. Los minerales constituyen el sustrato inorgánico de los esqueletos de la mayoría de los seres vivos y las proteínas son los ladrillos moleculares que sustentan la vida. La ciencia actual sigue investigando los procesos de cristalización para obtener nuevos materiales, mejorar y sintetizar medicamentos y entender los mecanismos de la vida.

El avance de la Bioquímica, Farmacología, Biología estructural, Química Farmacéutica, Tecnología Farmacéutica, o Genética, sería impensable sin la Cristalografía, más concretamente una rama de esta ciencia denominada Biocristalografía. Los modelos moleculares obtenidos mediante técnicas cristalográficas nos permiten revelar los mecanismos íntimos de los procesos vitales.

La investigación en este campo interdisciplinar ha supuesto la concesión de más de 30 premios Nobel directamente relacionados con la Cristalografía. A título de ejemplo (por citar casos recientes) el uso de técnicas radiocristalográficas por parte de Roger Kornberg (Cátedra de Biología estructural, Escuela de Medicina, Universidad de Stanford, Premio Nobel de Química en 2006) y Venki Ramakrishnan (Laboratorio de Investigación Médica, Universidad de Cambridge, Premio Nóbel de Química en 2009) ha marcado la diferencia con otros investigadores y ha sido fundamental en el proceso de transcripción de genes, estructura y función de los ribosomas.

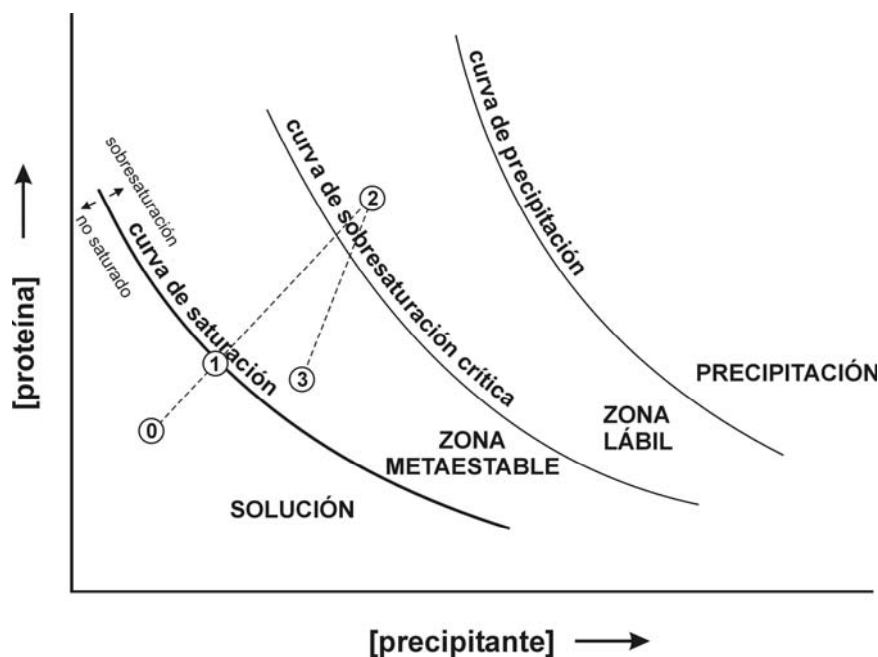
Para incorporar a la formación de los alumnos de Farmacia estos conocimientos, en la asignatura de Geología Aplicada se imparten unos contenidos de Biocristalografía de plena actualidad, enfocados a la docencia biosanitaria¹.

Formación de cristales macromoleculares de proteínas.

Para que se produzca la formación de cristales de una proteína, a partir de una disolución de la misma, la solubilidad debe disminuir de forma que dicha disolución se encuentre sobresaturada.

Si observamos la curva de solubilidad de una proteína (Figura 1), en relación con la presencia de un agente precipitante, se aprecian varias zonas en el diagrama: *metaestable*, *lábil* y finalmente la zona de *precipitación*. En la zona “metaestable” no se produce el fenómeno de la nucleación, pero si apareciese un núcleo en esa zona, crecería lentamente generando un cristal de gran perfección y tamaño. En la zona “lábil” la formación de núcleos de cristalización podría calificarse como explosiva y precisamente por ello la formación de un cristal de tamaño y perfección, adecuadas, está impedida por la rápida formación de numerosos cristales de formas irregulares y de pequeño tamaño. En la zona de “precipitación” la proteína generaría agregados amorfos.

Figura 1. Diagrama de fase esquemático que muestra la evolución de la solubilidad de una proteína en función de la concentración de un agente precipitante.



Una buena técnica para cristalizar proteínas sería aquella que partiendo de una solución no saturada (punto 0, figura 1) pasase lentamente a saturación (punto 1), desde ahí, también lentamente, atravesase la curva de sobresaturación crítica alcanzando la zona lábil donde se producen un buen número de núcleos de cristalización (punto 2) para volver posteriormente a la zona metaestable (punto 3) donde esos núcleos de cristalización crecerían dando lugar a cristales de gran tamaño y forma adecuada. Lo difícil es conseguir que esto ocurra de forma controlada y se han ideado procedimientos muy elaborados para llevarlo a cabo, cuya descripción detallada supera los objetivos de esta práctica.

La gravitación promueve la sedimentación de las macromoléculas y el movimiento convectivo de las moléculas del disolvente, se opone al anterior y tiende a la redispersión de

dichas macromoléculas. Estos movimientos perjudican la formación de cristales porque impiden que las débiles interacciones macromoleculares permitan colocar a dichas partículas en una posición fija de la red cristalina. Hay dos formas de resolver el problema del movimiento. Una consiste en cristalizar en laboratorios espaciales, donde el campo gravitatorio de la Tierra se contrarresta por la fuerza centrípeta generada por el movimiento orbital; esta solución es demasiado cara y poco asequible para muchos investigadores. Otra solución, la aplicada en esta práctica, es situar a las macromoléculas en un medio viscoso (un gel de agarosa, por ejemplo) que limite el movimiento de las macromoléculas; esta solución es barata y asequible, pero requiere técnicas muy elaboradas como las que realizaremos en estas prácticas. Pero elaboradas no significa que sean difíciles de realizar por los alumnos.

MATERIAL Y MÉTODOS

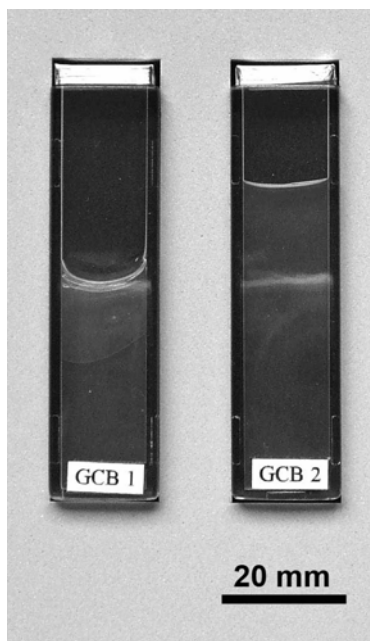
El objetivo de este seminario-práctica, es obtener cristales de una proteína (la lisozima) empleando métodos de cristalización por “contradifusión”, muy específicos para macromoléculas biológicas. La formación de cristales de Lisozima se realiza empleando un Kit Didáctico para prácticas universitarias, desarrollado en el LEC (Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Granada), que es un centro de investigación asociado a la Universidad de Granada y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, español (CSIC) y comercializados en forma de “kits de cristalización” por la empresa Triana Science & Technology (www.trianatech.com). El método empleado en estos kits se basa en la técnica de contradifusión^{2,3}.

La mayor ventaja de esta técnica es la posibilidad de explorar un gran número de condiciones de cristalización en un único experimento ya que el sistema, según evoluciona, se va aproximando al equilibrio buscando automáticamente las condiciones óptimas de cristalización.

Descripción del contenido del kit

El kit contiene dos cajas GCB. La GCB nº 1 (Figura 2) está rellena en un 50%, con proteína gelificada (lisozima 40 mg/mL en gel de agarosa al 0.5% tamponado a pH 4.5 con Acetato de Na). La GCB nº 2 (Figura 2) está rellena en un 75% con precipitante gelificado (NaCl 10% en gel de agarosa al 0.5% tamponado a pH 4.5 con Acetato de Na). También contiene otros accesorios para la realización de la práctica³

Figura 2. Cajas GCB 1 y 2 (Granada Crystallization Box) diseñadas para los experimentos de contradifusión.



El kit permite realizar dos tipos de experimentos de contradifusión: 1) *Contradifusión directa en proteína gelificada*. 2) *Método de acupuntura en precipitante gelificado*, que permite generar cristales de proteína dentro de capilares. La determinación de la estructura de las proteínas se realiza principalmente por DRX y mediante el segundo método existe incluso la posibilidad de estudiar los cristales dentro de esos capilares en el difractor de Rayos X, evitando así su manipulación. El gel utilizado en los experimentos es gel de agarosa que es un polisacárido que no interacciona químicamente con la lisozima.

RESULTADOS. REALIZACIÓN DE LA PRACTICA

Experimento n° 1: Contradifusión directa en proteína (lisozima) gelificada.

Consiste en añadir la disolución de NaCl (precipitante) a la cajita GCB 1 siguiendo las instrucciones del cuaderno de prácticas⁴.

Experimento n° 2: Método de acupuntura en precipitante gelificado (crecimiento de cristales de lisozima dentro de capilares)

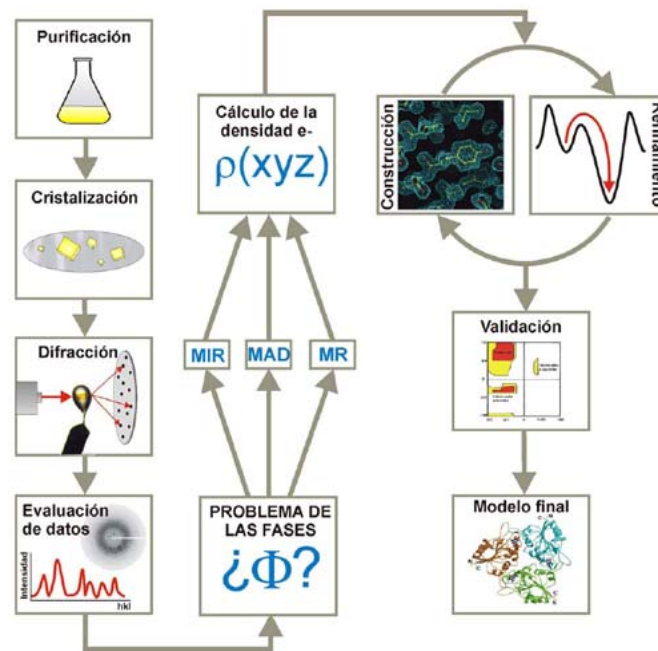
Se emplea la GCB n. 2. en la que se introduce un capilar con una disolución de lisozima. Para ampliar las condiciones del experimento es recomendable preparar diferentes concentraciones en el rango de 120 - 60 mg/mL y de esa manera se observan diferentes escenarios de cristalización.

En ambos experimentos, pasadas 24 horas se puede apreciar la formación de cristales de lisozima, cuyo hábito indica la pertenencia al sistema tetragonal, aunque dependiendo del método empleado el sistema evolucionará de forma diferente. En el experimento nº 1, la solución salina colocada sobre la lisozima gelificada difunde hacia abajo; es posible seguir el frente de difusión gracias al colorante incorporado a la solución salina. Se observa formación de cristales de lisozima en la zona gelificada donde alcanza el frente salino, ya que éste provoca la sobresaturación de la proteína. En el experimento nº 2 el agente precipitante (solución salina gelificada) se encuentra en contacto directo con el extremo del capilar lleno de solución de lisozima. Las sales difunden entonces hacia arriba en el interior del capilar y provocan la precipitación de la proteína, al generar la sobresaturación de la misma. En los capilares en los que se ha utilizado una concentración de proteína menor, hay menos cristales y tardan más en aparecer.

En los dos experimentos, se puede observar el típico patrón de la cristalización mediante técnicas de contradifusión: al principio la formación de un precipitado amorfo (desordenado), sucesivamente la formación de esferulitos policristalinos (muchos cristales pequeños y redondeados, formando agregados) y finalmente monocristales de alta calidad y mayor tamaño que se podrían utilizar para su estudio por difracción de rayos X. La interpretación de las distintas bandas de cristalización observadas debe hacerse a la luz de lo explicado en la figura 1. Una vez obtenido el cristal de proteína, se le dice al alumno que ya podríamos abordar el estudio de su estructura. En el esquema siguiente tomado de Hermoso et al⁵. (Figura 3) se exponen los distintos pasos que hay que seguir para determinar la estructura tridimensional de una macromolécula, mediante difracción de rayos X. Esquemas similares, aunque con menor detalle y nunca con información sobre cómo llevarlos a la práctica, se incluyen en los manuales modernos de Bioquímica, Biología Molecular, Bioquímica Física⁶ y otras materias del campo de las Ciencias Biomédicas, lo que constituye un nuevo argumento acerca del interés de la práctica realizada.

CONCLUSIONES

- El empleo de los kits para la cristalización de lisozima ha conducido a unos resultados muy favorables para los alumnos, ya que se les ha impartido una práctica, formativa e informativa, de alto nivel científico.

Figura 3. Distintas etapas para resolver una estructura cristalina por DRX

- Los tiempos de realización de las prácticas y de formación de cristales, se adaptan a la planificación temporal de la docencia práctica.

- Estas prácticas vienen a demostrar que un alumno de formación básica puede participar de la excelencia investigadora si se le motiva y se le imparte de una manera adecuada. Los kits desarrollados por el LEC son un buen ejemplo de esto: aúnan simplicidad y complejidad científica de una manera armoniosa.

- Los kits empleados estimulan la capacidad de observación de los alumnos como futuros investigadores, ya que la cristalización genera objetos reales, no virtuales, tangibles y medibles con ayuda de lupas y microscopios.

- Esta práctica de Biocristalografía junto a otras, desarrolladas en la docencia de Geología Aplicada a la Farmacia, está muy acoplada al programa teórico y pone de manifiesto que la asignatura ofrece a los alumnos conocimientos básicos y aplicados que ya no recibirán al haber sido segregada de la troncalidad del nuevo Plan de Estudios de Farmacia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Delgado Calvo-Flores, R., Párraga Martínez, J., Delgado Calvo-Flores, G., Gámiz Martín, E., y Martín García J.M. (2009) Principios Generales de Geología Aplicada a la Farmacia.. Materias Primas Farmacéuticas y Cosméticas de origen mineral. Report interno. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
2. García-Ruíz, J.M., Moreno,A., Otálora,F.,Viedma, C., Rondón, D. and Zautscher,F.

- (1998) Teaching Protein Crystallization by the Gel Acupuncture Method. *J. Chem. Educ.* 75, 442-446
3. García-Ruíz, J.M., González-Ramirez, L.A., Gavira, J.A., and Otálora, F. (2002). Granada Crystallization Box. A new device for protein crystallization by counter-diffusion techniques. *Acta Cryst.* D58, 1638-1642.
 4. Delgado Calvo-Flores, G, Párraga Martínez, J., Gámiz Martín, E., Martín García J.M. y Delgado Calvo-Flores, R (2009) Manual de Seminarios-Prácticas de Geología Aplicada a la Farmacia. Report interno. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
 5. Hermoso, J.A., Sanz Aparicio, J. y Albert, A. (2006). La química de la vida a escala atómica. *An. Quim.* 102 (4), 15-22.
 6. Van Holde, K. E., Curtis Johnson, W and Shing Ho, P. (2006) Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, 710pp.
-