

SEBBM DIVULGACIÓN

LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO

Cristalografía de rayos X de macromoléculas

Jerónimo Bravo
Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC



Biografía

Jerónimo Bravo nació en Tenerife y se graduó en la Universitat Autònoma de Barcelona. Se incorporó al grupo del Dr Ignacio Fita en la Universitat Politècnica de Catalunya para realizar la tesis doctoral en el estudio molecular y estructura de catalasas. En 1996 se incorporó al laboratorio de la Dra Yvonne Jones en el "Laboratory of Molecular Biophysics, University of Oxford" para continuar con estudios estructurales en proteínas de señalización. En 1998 se trasladó a Cambridge con el Dr Roger Williams en el "Molecular Biology Laboratory" del Medical Research Council estudiando la estructura de proteínas de señalización y factores de transcripción. En 2002 regresó como jefe de grupo al CNIO, Madrid, centrándose en los mecanismos moleculares de la regulación de receptores y proteínas involucradas en metastasis. En el año 2009 se incorporó al CSIC en el Instituto de Biomedicina de Valencia donde continúa con la determinación estructural de proteínas de importancia biomédica.

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA:

http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/la-ciencia-al-alcance-de-la-mano-articulos-de-divulgacion_29

Resumen

La cristalografía de rayos X puede considerarse como una microscopía de muy alta resolución, mediante la cual podemos visualizar estructuras a nivel atómico. A menudo se desconocen los fundamentos de la técnica. Este artículo pretende dar una pincelada de manera sencilla sobre los principios que la constituyen.

Summary

X-ray crystallography can be considered a very high resolution microscopy, by which we can see atomic-level structures. We are often unaware of the basics of the technique. This article aims to simply give a touch on their principles.

La cristalografía de rayos X ha sido una herramienta fundamental en el desarrollo de muchos campos de la ciencia, y la biología no podía ser menos. Gracias a esta técnica se ha podido averiguar la estructura y el mecanismo molecular y de actuación de moléculas biológicas de origen diverso, como proteínas, ácidos nucleicos, etc. También puede utilizarse en el diseño racional de fármacos. A pesar de estas bondades, y de su importancia y utilidad, desde el mundo de la Biología la cristalografía de macromoléculas se observa a menudo con el respeto que provoca una cierta incompreensión. Este artículo pretende minimizar esta distancia

describiendo de manera sencilla los fundamentos que sientan las bases de la técnica. Se puede avanzar en la comprensión de esta disciplina atendiendo a las características de su enunciado: Difracción de rayos X de monocristal.

¿Por qué utilizamos Rayos X?

Para poder visualizar objetos que no podemos detectar a simple vista recurrimos a la utilización de fuentes de radiación electromagnética de una longitud de onda comparable al objeto de estudio que se quiere resolver. Así pues, para visualizar células eucariotas, con un tamaño medio de unos 10 µm, podemos utilizar perfectamente fotones en el espectro visible (0,40-0,75 µm) y microscopios ópticos. Sin embargo, si se trata de visualizar algo menor, como determinados orgánulos celulares como mitocondrias, de tamaño medio 0.5-1.0 µm, o partículas virales (10 a 500 nm), precisaremos de una radiación de menor longitud de onda, como la asociada a los electrones. Este es el fundamento del microscopio electrónico de transmisión, que alcanza resoluciones de hasta 0.05 nm (1 nm es una milmillonésima de metro: 10⁻⁹ m).

Resolver la estructura tridimensional a nivel atómico supone poder individualizar los átomos que la constituyen. Es decir, que en realidad queremos distinguir distancias interatómicas que están en el rango de 10⁻¹⁰ metros o un Armstrong (Å: 0.1 nm).

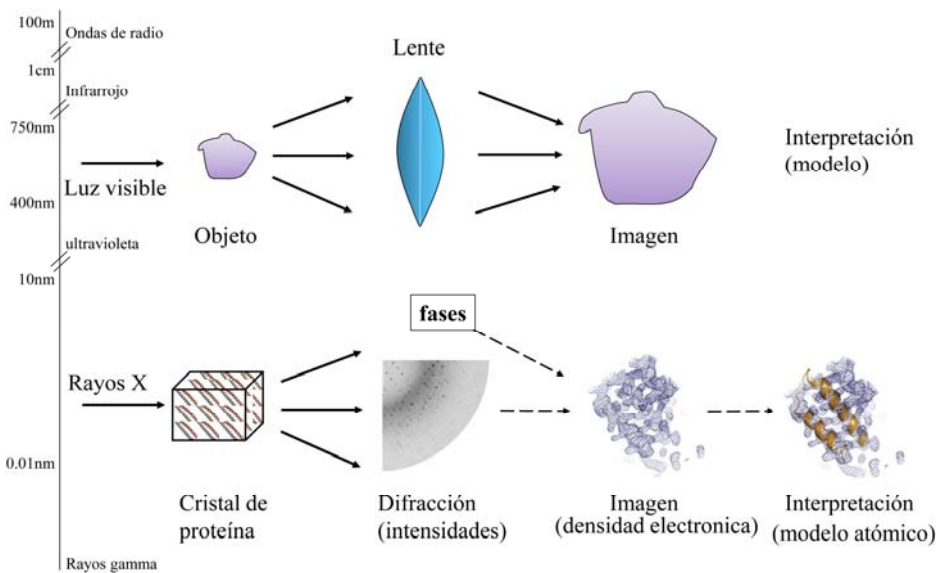


Figura- Espectro electromagnético a la izquierda. A la derecha del mismo se muestra la analogía entre la microscopía óptica y la difracción de rayos X.

Las radiaciones electromagnéticas que se encuentran en esa zona del espectro son precisamente los rayos X (ver figura). Es decir, que la utilización de los rayos X viene condicionada por el objeto de estudio, ya que pretendemos visualizar distancias interatómicas en macromoléculas. Los rayos X se generan mediante ánodos rotatorios, con longitud de onda fija, o mediante fuentes de radiación de sincrotrón, como la que se está construyendo en Barcelona (ALBA). Estos rayos son dispersados por las nubes electrónicas de los átomos que forman parte del cristal dando lugar a un determinado patrón de difracción.

¿Por qué se utiliza la difracción?

En microscopía óptica se utiliza una fuente de luz visible que incide sobre la muestra y, mediante unas lentes, se reconstituye la imagen del objeto de estudio. Dicho objeto es irradiado con luz y provoca difracción de la radiación incidente en todas las direcciones. La lente recoge, enfoca y magnifica los rayos difractados. Una lente funciona por refracción. Es decir, es capaz de modificar la trayectoria de la luz a medida que

pasa sobre ella cambiando su dirección. Ello significa que los rayos parecen proceder de un punto más próximo al que realmente se originan, lo cual supone que visualicemos los objetos que se ven a través de una lente de mayor tamaño que el original. Sin embargo, a diferencia de la luz visible, y aunque constituye un área actualmente en desarrollo, los rayos X no pueden ser focalizados con facilidad. Por ello es necesario separar en dos operaciones lo que la microscopía óptica es capaz de realizar de manera simultánea. La primera parte de esta operación consiste en realizar un experimento de difracción (ver figura).

El experimento de difracción conlleva una penalización seria: la denominada pérdida de la fase. Una onda electromagnética es una función sinusoidal que puede quedar definida de forma vectorial con un módulo, o amplitud, y una fase, o ángulo de dicho módulo. Podemos calcular el módulo, puesto que es proporcional a las intensidades de difracción que pueden medirse, pero desconocemos la fase asociada a cada una de esas intensidades. Perdemos por tanto la componente necesaria para reconstruir la imagen. Así pues, el cuello de botella para resolver la estructura cristalográfica de

macromoléculas es la recuperación de la mencionada fase. La fase puede calcularse a partir de modelos, si existe alguna estructura similar, mediante la técnica denominada *reemplazamiento molecular*. Si no, también se pueden hacer experimentos adicionales empleando átomos pesados que sirven de referencia al modificar las intensidades de difracción. Una vez calculada, al combinarla con los módulos obtenidos a partir de las intensidades recogidas en el experimento de difracción, podemos generar un mapa de densidad electrónica que conducirá a la interpretación del modelo.

¿Por que se necesitan cristales? La difracción procedente de una sola molécula es demasiado débil para que pueda medirse. Un cristal es un sólido con estructura interna ordenada de los elementos que lo componen. Todas sus moléculas muestran idéntica orientación en las tres dimensiones del espacio de manera que, al sumarse la contribución de todas ellas, actúa como amplificador de la señal. El grado de orden interno en el cristal determina el máximo ángulo de difracción de los rayos X y por tanto la máxima resolución que la difracción alcanza. Si el cristal está bien ordenado, entonces puede medirse la difracción a ángulos elevados, o alta resolución, obteniéndose una estructura más detallada.

Referencias

1. Fawaz Rhodes, G. (2006). *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide For Users Of Macromolecular Models*. Ed: Academic Press, Inc.
2. Blow, D. (2002). *Outline Of Crystallography For Biologists*. Ed: Oxford University Press
3. Drenth, J. (2007) *Principles Of Protein X-ray Crystallography*. Ed: Springer