

Revisión

Año Internacional de la Cristalografía (International Year of Crystallography)

Por María Elena Carrizo García

ecarrizo@fcq.unc.edu.ar

Doctora en Ciencias Químicas, Profesora Adjunta, FCQ-UNC. Investigadora Adjunta, CIQUIBIC-CONICET. Departamento de Química Biológica, FCQ-UNC.

Resumen:

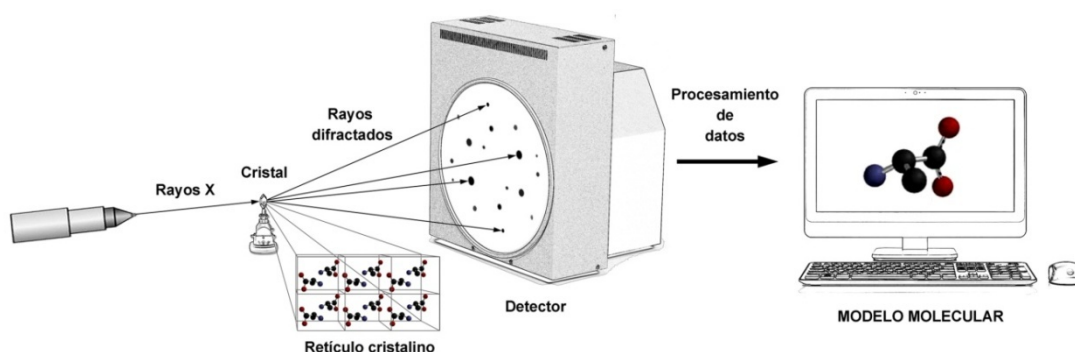
La Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó al 2014 como el Año Internacional de la Cristalografía (IYCr2014, según sus siglas en inglés) en conmemoración de los 100 años del nacimiento de la cristalografía de rayos X. La cristalografía es una técnica que permite obtener información acerca de la disposición espacial de iones, átomos o moléculas, siempre que los mismos se encuentren formando parte de un cristal. La información estructural resulta importante para comprender las propiedades y funciones de dichos compuestos. Por esto la cristalografía puede tener aplicaciones en áreas tan diversas como la medicina, el desarrollo de nuevos materiales, la energía verde, la cosmética, la alimentación y la tecnología espacial, entre otras. Dada su importancia, el objetivo del IYCr2014 es promover la cristalografía a través de diferentes iniciativas coordinadas por la Unión Internacional de Cristalografía y la UNESCO.

Palabras clave: cristalografía, rayos X, estructura

Abstract:

The General Assembly of the United Nations adopted the resolution that 2014 should be the International Year of Crystallography (IYCr2014) in commemoration of the 100th anniversary of the birth of X-ray crystallography. Crystallography is a technique that studies the spatial arrangement of ions, atoms or molecules, provided they are part of a crystal. The structural information is important for understanding the properties and functions of these compounds. Therefore crystallography may have applications in areas as diverse as medicine, new materials, green energy, cosmetics, foods and space technology. Given its importance, the aim of IYCr2014 is to promote crystallography through different initiatives coordinated by the International Union of Crystallography and UNESCO.

Keywords: crystallography, X-ray, structure



Resumen gráfico. Resolución de la estructura tridimensional de una molécula por cristalografía de rayos X.

Aunque no siempre lo notemos, estamos rodeados de cristales, desde los granos de azúcar (sacarosa) o sal (NaCl) que usamos en nuestros alimentos hasta los cristales líquidos de las pantallas de nuestros celulares. Incluso los hay en nuestro propio cuerpo, como los de hidroxiapatita, un tipo de fosfato de calcio constituyente de nuestros huesos y dientes. A algunos los admiramos por su belleza, como a los diamantes o a los imponentes cristales gigantes encontrados en algunas cuevas alrededor del mundo. A otros en cambio los apreciamos por su utilidad, tal el caso del grafeno, un nuevo material compuesto por carbono que bajo la forma de cristal bidimensional destaca por su resistencia y su capacidad de conducir la electricidad y la energía térmica.

Sin embargo, hay algo que los cristales tienen en común independientemente de su composición, y es que todos son un arreglo periódico de átomos o moléculas que resulta en un orden interno, orden del que se vale la cristalografía para develar su estructura y proveer información acerca de sus propiedades.

Que es la cristalografía

Cuando un objeto es demasiado pequeño para ser observado a simple vista, la microscopía es seguramente la metodología a la que conviene recurrir. A través de una serie de lentes, el microscopio óptico permite obtener una imagen aumentada del objeto en estudio. Sin embargo, existe un límite en el tamaño del objeto que puede ser analizado de este modo, límite que depende de la longitud de onda de la radiación utilizada, que en el caso del microscopio óptico corresponde a la de la luz visible (400 - 700 nm). Cuando el objeto es aún más pequeño, del tamaño de una molécula, la longitud de onda de la radiación a utilizar debe estar en el orden de magnitud de las distancias que separan a los átomos que componen la molécula (0,1 nm o 1 angstrom), es decir la de los rayos X. Los rayos X se hacen incidir sobre la muestra a analizar (el cristal) y al atravesarlo son difractados en direcciones específicas que dependen de las características del material que constituye el cristal (Resumen gráfico). Sin embargo, no existen lentes equivalentes a las del microscopio óptico para los rayos X, y es por esto que los cristalógrafos deben

simular la función de las lentes en una computadora empleando programas específicos que les permiten reconstruir la imagen ampliada de la molécula en el cristal (su estructura tridimensional).

Los compuestos químicos a ser estudiados pueden ser de lo más diversos. De hecho, la cristalografía de rayos X se ha empleado tanto para analizar la estructura cristalina de minerales o metales, aportando información relevante acerca de la composición química de la corteza terrestre, o la de macromoléculas como el ADN o muchas proteínas, facilitando, por ejemplo, el diseño de nuevas drogas que modifiquen su función. El conocimiento de la estructura de un determinado material permite además idear estrategias para modificarlo dándole nuevas propiedades o cambiando su comportamiento. De este modo, la cristalografía ha hecho aportes importantes en la medicina, el desarrollo de nuevos materiales, la energía verde (paneles solares, baterías), la cosmética, la alimentación y la tecnología espacial, entre otras áreas. Incluso ha sido recientemente aplicada fuera de nuestro planeta cuando el robot *Curiosity* hizo el primer estudio de este tipo en Marte.

Todos estos atributos hacen de la cristalografía una de las técnicas más poderosas para el estudio de la estructura de la materia a nivel atómico cuya aplicación impacta de manera fundamental en nuestra vida diaria.

Un poco de historia

En 1895 William Conrad Röntgen descubrió los rayos X, lo que le valió el primer premio Nobel en Física en 1901. Unos años más tarde, Max von Laue junto a sus colaboradores demostraron que los rayos X viajando a través de un cristal interaccionaban con el mismo y eran difractados en direcciones particulares dependiendo de la naturaleza del cristal (1). Por este aporte fue galardonado con el premio Nobel en Física en el año 1914. El trabajo de von Laue estaba enfocado en la naturaleza de los rayos X, pero fueron William Henry y William Lawrence Bragg, padre e hijo, quienes pensaron en aprovechar esta propiedad de los rayos X y relacionar las direcciones e intensidades de los rayos difractados con la estructura atómica de los cristales. Demostraron

entonces que los rayos X pueden ser usados para determinar la posición de los átomos dentro del cristal, es decir descifrar la estructura tridimensional del material del que está compuesto el cristal. De hecho, W. L. Bragg fue el primero en resolver una estructura cristalina, la del NaCl. La ecuación que los Bragg propusieron para traducir el resultado de la difracción en una estructura tridimensional, conocida como la Ley de Bragg de la difracción de rayos X, constituye uno de los pilares de la cristalografía (2). Por esta aplicación de los rayos X, W. H. and W. L. Bragg recibieron el premio Nobel en Física en 1915.

A partir de ese momento la cristalografía ha sido utilizada para revelar la estructura cristalina de compuestos químicos cada vez más complejos haciendo importantes contribuciones en diferentes áreas de la ciencia, tales como la química y la mineralogía. Pronto los cristalógrafos se dieron cuenta de que también podían analizar moléculas biológicas haciendo cristales con ellas. Así la cristalografía se extendió a las ciencias de la vida. Dorothy Crowfoot Hodgkin fue la primera en resolver la estructura de moléculas biológicas, entre ellas la del colesterol (1937), la penicilina (1946) y la vitamina B₁₂ (1956), recibiendo el premio Nobel en Química en 1964 (3). Una contribución fundamental para las ciencias biológicas fue el descubrimiento de la estructura del ADN llevado a cabo por James Watson y Francis Crick en 1953, en base a los experimentos de difracción de Rosalind Franklin (4). Por esto, Watson, Crick y Maurice Wilkins, un colaborador de Franklin, recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1962 (Rosalind Franklin había muerto unos años antes por lo que no recibió este reconocimiento). Luego, la metodología fue aplicada a la resolución de la estructura de proteínas, siendo la primera la mioglobina seguida más tarde por la hemoglobina (5, 6), que les valieron a John Kendrew y Max Perutz el Premio Nobel en Química en 1962. La primera estructura a nivel atómico de un virus, la de un virus que infecta al tomate (*Tomato bushy stunt virus*), fue descrita en 1978 (7), mientras que en el año 2000 se presentó la estructura del ribosoma, una de las más complejas resueltas hasta el momento, por lo que Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada

E. Yonath recibieron el premio Nobel en Química en 2009 (8, 9).

En esta historia destacan además otros hitos, como la apertura de los primeros sincrotrones, instalaciones que proveen radiación de mayor intensidad que los generadores de rayos X convencionales, lo que produjo un aumento notable en el número de las estructuras moleculares resueltas. Un efecto similar se espera con el reciente advenimiento de los láseres de electrones libres de rayos X (*XFEL, X-ray free electron laser*), capaces de producir radiación de una intensidad mucho mayor que la de los sincrotrones. También se ha ampliado la visión de la cristalografía incluyendo diferentes tipos de difracción (de electrones y neutrones, además de los rayos X) a partir de diferentes tipos de muestras (cristales, cuasicristales, fibras, materiales semicristalinos, líquidos).

Además de los nombrados, son muchos los logros revolucionarios relacionados al uso de la cristalografía, lo que se refleja en un total de 29 premios Nobel, un número importante de estructuras de moléculas orgánicas y organometálicas dentro de las más de 600.000 de la *Cambridge Structural Database*, alrededor de 90.000 estructuras de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas biológicas depositadas en el *Protein Data Bank* y más de 160.000 estructuras de compuestos inorgánicos informadas en la *Inorganic Crystal Structure Database*.

Que conmemora el Año Internacional de la Cristalografía

Siguiendo una iniciativa de Marruecos, la Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó al 2014 como el Año Internacional de la Cristalografía (IYCr2014, según sus siglas en inglés) en conmemoración del centenario del otorgamiento del Premio Nobel en Física a Max von Laue por el descubrimiento de la difracción de rayos X por los cristales y del 400 aniversario de la observación de la simetría de los cristales de hielo por Johannes Kepler, lo que dio comienzo al estudio de la simetría en los materiales. Además, en 2014 se cumplen 50 años del Premio Nobel en Química concedido a Dorothy Hodgkin por su trabajo relacionado a la vitamina B₁₂ y la penicilina.

El objetivo de su instauración persigue la intención de concientizar al público general acerca de la importancia de la cristalografía, promover la educación y la investigación en este campo, establecer programas de cristalografía en países en vías de desarrollo, impulsar el acceso a instrumental de última generación y aumentar la colaboración internacional.

Las actividades relacionadas al IYCr2014 son patrocinadas y coordinadas por la Unión Internacional de Cristalografía (*International Union of Crystallography*, IUCr) y la UNESCO. El detalle de las actividades programadas puede consultarse en la página web <http://www.iycr2014.org/>.

Cristalografía en Argentina

La Asociación Argentina de Cristalografía (<http://www.cristalografia.com.ar/>) fue fundada en el año 2004, con el objetivo de “promover y difundir la cristalografía en el país y nuclear a los grupos que trabajan en esta área del conocimiento y/o la usan como herramienta en sus investigaciones”. La cristalografía en nuestro país se encuentra en franco crecimiento y, aunque aún no son muy numerosos, los cristalógrafos argentinos se encuentran en buena parte del país y trabajan en temáticas que abarcan desde el estudio de compuestos inorgánicos hasta el de macromoléculas biológicas.

En el año 2013 la Universidad Nacional de Córdoba fue sede de la IX Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía y la I Reunión Latinoamericana de Cristalografía. Organizado por el Dr. Raúl E. Carbonio, profesor de nuestra facultad, y un grupo de colaboradores, el evento contó con la presencia de cristalógrafos de Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Cuba, México, Perú, Uruguay y Venezuela, y entre otros invitados destacados de Europa y Estados Unidos, con la del profesor Gautam R. Desiraju, presidente de la IUCr, a quien además se le entregó el doctorado *Honoris Causa* de nuestra universidad.

Esta reunión constituye un hito para la cristalografía latinoamericana puesto que en esa oportunidad se realizó la asamblea que aprobó la fundación de la Asociación Latinoamericana de Cristalografía (LACA), cuyos estatutos serán presentados ante la Asamblea General de la IUCr que se reunirá en Montreal en agosto del presente

año, como paso previo para ser reconocida como Asociación Regional de la IUCr.

Un ejemplo local de aplicación de la cristalografía de rayos X

Por años la temática del grupo de trabajo del que formo parte, ha estado relacionada a la biosíntesis del glucógeno, el polisacárido que funciona como reserva de glucosa en muchos organismos, desde bacterias a animales. Nuestro trabajo se ha enfocado principalmente en la caracterización funcional y estructural de la proteína glucogenina. Glucogenina es la autoglucosiltransferasa que inicia la polimerización de glucosa durante la biosíntesis *de novo* del glucógeno. En presencia de UDP-glucosa y Mn^{2+} la enzima cataliza la formación de una cadena de aproximadamente 12 glucosas unidas covalentemente al oxidrilo de su tirosina 194. Esta cadena es el sustrato sobre el que la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante construyen la molécula de glucógeno.

Recientemente se describió el primer caso de un desorden metabólico causado por una mutación en el gen de la glucogenina humana. Esta mutación resulta en la expresión de una proteína inactiva, en la que la treonina 82 (Thr82) ha sido reemplazada por una metionina (Met), lo que provoca que la síntesis de glucógeno sea deficiente (10). Con la intención de analizar las bases moleculares de la pérdida de actividad enzimática responsable del fenotipo de esta patología, introdujimos la mutación Thr82Met en la glucogenina de conejo (que es la más estudiada de esta familia de proteínas y presenta un 93% de identidad con la enzima humana) y la cristalizamos, al igual que a la enzima salvaje (Figura 1 A y B). Empleando estos cristales realizamos mediciones de difracción de rayos X en el Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) y resolvimos la estructura tridimensional de ambas proteínas (Figura 1 C). La comparación de dichas estructuras reveló, como diferencia más notable, la posible pérdida de un enlace puente hidrógeno entre la Thr82 y el ácido aspártico 162 (Asp162), aminoácido considerado esencial para la catálisis (Figura 1 D y E). Para estudiar esta posibilidad preparamos nuevas mutantes sustituyendo la Thr82 por serina (Ser) y

valina (Val) y medimos su actividad enzimática. Este análisis mostró que la mutante Thr82Ser, que conserva el grupo hidroxilo capaz de formar el puente de hidrógeno, es activa, mientras que la mutante Thr82Val, en la que el hidroxilo es reemplazado por un metilo, no muestra actividad. De este modo, conseguimos presentar evidencias estructurales y bioquímicas que sostienen el rol

esencial del puente de hidrógeno entre la Thr82 y el Asp162 para la actividad de la glucogenina (11).

Este es un claro ejemplo en el que la aplicación de la cristalografía de rayos X permitió aportar información fundamental para determinar las bases estructurales que explican el comportamiento de una molécula, en este caso la proteína glucogenina.

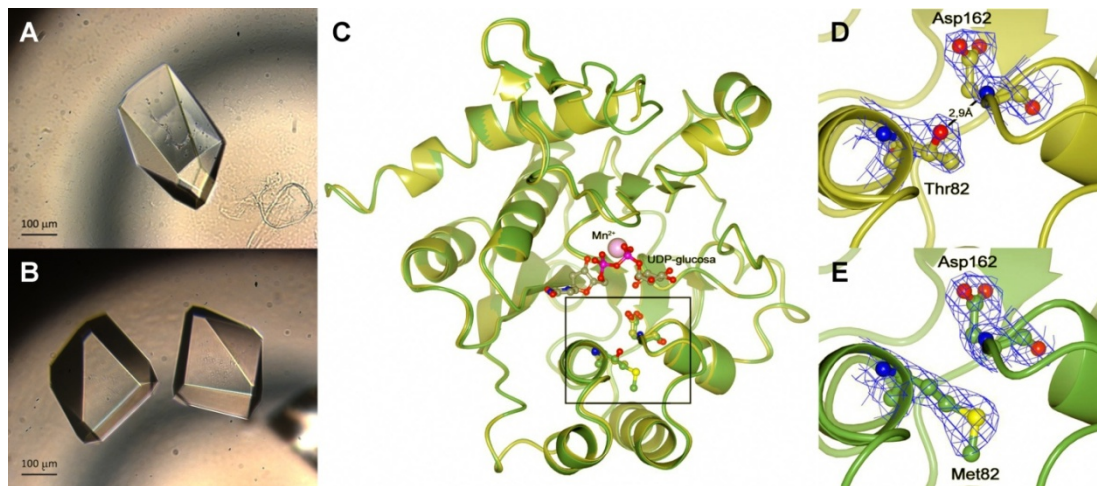


Figura 1. Estudio estructural de la glucogenina mutante responsable de una glucogenosis. Cristales de la glucogenina salvaje (A) y de la mutante Thr82Met (B). C) Superposición de las estructuras cristalinas de glucogenina salvaje (en amarillo) y mutante Thr82Met (en verde). D y E) Detalle de la región correspondiente a los aminoácidos 82 y 162 de ambas proteínas.

Referencias bibliográficas

1. Friedrich, W., Knipping, P. & Laue, M. (1912) In *Sitzungsberichte der Math. Phys. Klasse (Kgl.) Bayerische Akademie der Wissenschaften* 303–322.
2. Bragg, W.L. (1913). "The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal". *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* **17**: 43–57.
3. Hodgkin, D. C., Pickworth, J., Robertson, J. H., Trueblood, K. N., Prosen, R. J. & White, J. G. (1955). "Structure of Vitamin B₁₂: The Crystal Structure of the Hexacarboxylic Acid derived from B₁₂ and the Molecular Structure of the Vitamin". *Nature* **176**: 325–328.
4. Watson, J.D. & Crick, F.H. (1953). "A structure for deoxyribose nucleic acids". *Nature* **171**: 737–738.
5. Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H. & Phillips, D.C. (1958). "A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis". *Nature* **181**: 662–666.
6. Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G. & North, A.C.T. (1960). "Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis". *Nature* **185**: 416–422.
7. Chauvin, C., Witz, J. & Jacrot, B. (1978) "Structure of the tomato bushy stunt virus: a model for protein-RNA interaction". *J. Mol. Biol.* **124**: 641-651.
8. Clemons, W.M., Jr., May, J.L., Wimberly, B.T., McCutcheon, J.P., Capel, M.S. & Ramakrishnan, V. (1999). "Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution". *Nature* **400**: 833-840.
9. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., & Steitz, T.A. (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution". *Science* **289**: 905-920.
10. Moslemi, A-R., Lindberg, C., Nilsson, J., Tajsharghi, H., Andersson, B. & Oldfors, A. (2010). "Glycogenin-1 deficiency and inactivated priming of glycogen synthesis". *N. Engl. J. Med.* 362, 1203-1210.
11. Carrizo, M.E., Romero, J.M., Issoglio, F.M. & Curtino, J.A. (2012). "Structural and biochemical insight into glycogenin inactivation by the glycogenosis-causing T82M mutation". *FEBS Lett.* 586, 254-257.