



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE QUÍMICA

***ESTUDIOS BIOFÍSICOS Y ESTRUCTURALES DEL MECANISMO DE
AGREGACIÓN/DESAGREGACIÓN DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS
ASISTIDAS POR CAMPOS ELÉCTRICOS Y MAGNÉTICOS***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

Q. CLAUDIA CARINA PAREJA RIVERA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM
DRA. LOURDES ISABEL CABRERA LARA
CENTRO CONJUNTO DE INVESTIGACIÓN EN SUSTENTABLE UAEM-UNAM

CIUDAD DE MÉXICO; FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

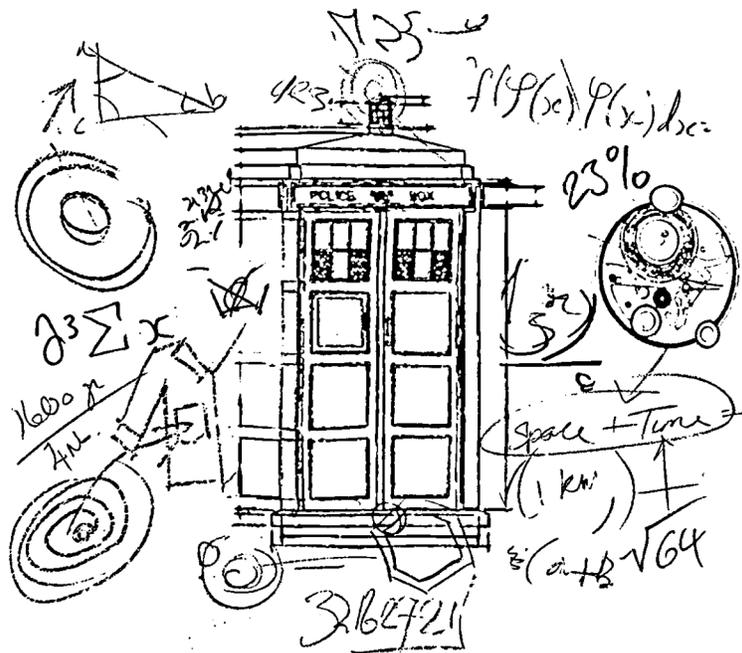
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

" I too used to believe in magic, but the Doctor has taught me about science. It is better to believe in science "

Leela, Horror of Frang Rock (1977)



JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Lauro Bucio Galindo	Instituto de Física, UNAM
Primer vocal	Dr. Abel Moreno Cárcamo	Instituto de Química, UNAM
Segundo vocal	Dra. Larissa Alexandrova	Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM
Tercer vocal	Dra. María de Jesús Rosales Hoz	Cinvestav
Secretario	Dr. Braulio Rodríguez Molina	Instituto de Química, UNAM
Tutor:	Dr. Abel Moreno Cárcamo	
Sustentante:	Q. Claudia Carina Pareja Rivera	

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica 5 del Departamento de Química de Biomacromoléculas en el Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Abel Moreno.

Partes de este trabajo se han presentado en la modalidad de póster en los siguientes eventos:

Pareja-Rivera Carina, Abel Moreno. *“Estudio del efecto de la temperatura en la cristalización de la Lipasa B de Candida antártica (CALB)”*. En el **Simposio Interno del Instituto de Química**, en el cual se obtuvo Mención Honorífica por mejor cartel de maestría. El 10 de junio de 2015, México, DF.

Pareja-Rivera Carina, Beatriz Quiroz, Nuria Esturau, Adela Rodríguez, Abel Moreno. *“Effect of the electromagnetic Fields in the structure of Glucose isomerase”*. En el **75 Aniversario del Instituto de Química**, el 8 de abril de 2016, México, DF.

Se realizó una **Estancia de Investigación** para estudiar *Influencia de los campos electromagnéticos en la estructura 3D de Proteínas* bajo la asesoría del Dr. Antonio Romero en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) del 1 de junio al 4 de agosto del 2016 en Madrid, España.

El registro de la **Patente** ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI) el *Dispositivo para la protección térmica y transporte de biomacromoléculas* de los inventores Abel Moreno Cárcamo y Claudia Carina Pareja Rivera, el cual tiene como número de expediente MX/a/2016/008614

Se publicó el **Artículo** *“Recent Advances in the Understanding of the Influence of Electric and Magnetic Fields on Protein Crystal Growth”* Carina Pareja-Rivera, Mayra Cuéllar-Cruz, Nuria Esturau-Escofet, Nicola Demitri, Maurizio Polentarutti, Vivian Stojanoff, and Abel Moreno. *Crystal Growth & Design* **2017** 17 (1), 135-145

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional y mixta otorgadas para realizar mis estudios de Maestría de la mejor manera (Número de becario 576597).

Al financiamiento del proyecto IT200215 por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM).

Al Posgrado de Ciencia e Ingeniería de Materiales por el apoyo académico recibido durante la realización de mis estudios de Maestría.

A mi mentor académico el Dr. Abel Moreno por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y enseñarme otra perspectiva de la ciencia.

Al Comité Tutor formado por la Dra. Cristina Piña Barba y la Dra. Lourdes I. Cabrera Lara por sus consejos para guiarme en el proyecto de maestría.

A los miembros del jurado por su tiempo y las valiosas correcciones.

Al Dr. Antonio Romero por abrirme las puertas de su laboratorio y la paciencia al transmitirme parte de su conocimiento, así como a mis compañeros del laboratorio B02.

A Dr. Nicola Demitri y al Dr. Maurizio Polentarutti (Elettra) por las facilidades en la colecta de datos en el laboratorio XRD1 de Elettra Synchrotron, Trieste (Italia)

A la Dra. Vivian Stojanoff por la colecta de datos en BL 14-1 del Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL), Stanford California, USA.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet y a la Dra. Beatriz Quiroz García por su apoyo en los experimentos de campos magnéticos en el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN).

A la Dra. Adela Rodríguez y a la M. en C. Georgina E. Espinosa Pérez por los experimentos realizados en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM).

DEDICATORIAS

A mis padres Carlos y Leticia, quienes con su incansable lucha por brindarme siempre lo mejor y por darme la oportunidad de acrecentar mis conocimientos al proporcionarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas y experiencia de vida.

A mi hermano Carlos, por tu amistad, comprensión y apoyo incondicional, alentándome siempre con palabras que me dan fuerza y valor para seguir adelante todos los días, recuerda que siempre estaré a tu lado.

En recuerdo de mi Tía Norma, quien me proporcionó los mejores consejos, gracias porque siempre estuviste conmigo para escucharme, darme tu apoyo incondicional y ánimo hasta el último momento, agradezco el tiempo que compartimos y eternamente te llevaré en mi corazón.

Como no sentirme afortunada, si tengo una familia llena de amor. Al igual que todos, tenemos altibajos, pero siempre los hemos superado unidos y en especial:

Gracias a mi tío Juan Manuel y a mis primos Keops, Thot, Renée y Kefren, por los inolvidables recuerdos de mi infancia y con cariño a Sofía, Saori y Dany.

A mis tíos José Luis y María del Rocío y a mis primos Luis Enrique y Rosy, por su amor, comprensión y el apoyo incondicional a lo largo de los años.

A mis mejores amigos, casi hermanos, José Luis Albiter, Luis Fernando Téllez, Abraham Colín y Fernanda Ruíz, por compartir conmigo mis mejores momentos, por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas, y ser mis mejores confidentes.

A mis amigos de maestría Elías, Amauri, Silvia, Miguel, Héctor, Antonio y Génesis, por esas tardes-noches de estudio intenso, comparando ideas para llegar a los mejores resultados y claro contando todas las farras. Espero que la ciencia siga entre nosotros muchos años más.

A mi compañera y amiga Angélica por la experiencia de vida, llena de aprendizaje y de compañerismo.

ACRÓNIMOS

[BMIM]BF ₄	Tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio
[C ₂ mim]Oac	Acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio
Abs	Absorbancia
AC	Corriente Alterna (Alternating Current)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BF	Campo Magnético (Magnetic Field)
CALB	Lipasa B Candida antarctica
CCP4	Collaborative Computational Project No. 4
Coot	Crystallographic Object-Oriented Toolkit
cm	Centímetros
cryo-EM	Criomicroscopía electrónica (Cryo-Electron Microscopy).
Da	Dalton
DC	Corriente Directa (Direct Current)
DLS	Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light scattering)
EF	Campo eléctrico (Electric Field)
EAN	Nitrato de etilamonio
GAME	Método de acupuntura en geles
GCB	Granada Crystallization Box
GI	Glucosa Isómerasa <i>Streptomyces rubiginosus</i>
h	Horas
HEWL	Lisozima de clara de huevo
HOPG	Highly Oriented Pyrolytic Graphite
Hz	Hertz
IL	Líquido Iónico (Ionic Liquid)
in	Pulgadas
IPD	Índice de polidispersidad
Ires	Número de residuo

ITO	Óxido de indio y estaño (Indium Tin Oxide)
keV	Kiloelectronvoltio
K_j	Susceptibilidad principal de un enlace peptídico
K_{\parallel}	Susceptibilidad paralela al plano del grupo éster
K_{\perp}	Susceptibilidad perpendicular al plano del grupo éster
ΔK	Diferencia de la anisotropía diamagnética molar de un grupo éster
LLDC	Cristalización por difusión líquido-líquido
LLPS	Separación de fases líquido-líquido
M	Molaridad
MC	Cadena principal (Main Chain)
mg	Miligramos
mL	Militro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N_{α}	Número de residuos en la estructura alfa
N_{β}	Número de residuos en la estructura beta
NIBS	Non-Invasive Back-Scattering
MF	Campo magnético (Magnetic Field)
nm	Nanómetros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)
$N_{\text{orientados}}$	Número de cristales orientados
ns	Nanosegundos
N_{total}	Número total de cristales
C	Celsius
PDB	Protein Data Bank
PDBe	Protein Data Bank in Europe
PISA	Proteínas, Interfaces, Estructuras y Montajes (Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies)
PEG	Polietilenglicol (Polyethylene glycol)

PET	Polietileno
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto Isoeléctrico
PM	Peso molecular
PM _R	Peso molecular reportado
R _H	Radio hidrodinámico
SC	Cadena lateral (Side Chain)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SLAC-SSRL	Stanford Synchrotron Radiation Lightsource
T	Temperatura
TEAB	Bromuro de Tetraetilamonio
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
u.a.	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Volt
V _f (%) al 1:1	Volumen final después de la mezcla 1:1
V _i	Volumen inicial
V _o	Porcentaje de volumen inicial de IL
Vol IL	Volumen de IL en μL
Vol Tc	Volumen Tacsimate
VT	Volumen total
XDS	Software del Detector de rayos-X (X-ray Detector Software)
XFEL	Laser de Electrones Libres de Rayos X (X-ray Free Electron Laser)
XRD	Difracción de rayos-X (X-ray Diffraction)
ϵ	Coefficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda (nm)
μA	Microampere
μL	Microlitros

RESUMEN

Esta propuesta utilizó métodos no convencionales que ayudaron a aumentar la tasa de éxito para el crecimiento de cristales de proteínas y el mejoramiento de su proyección estructural; la técnica para lograr este último objetivo fue la difracción de rayos X. Esta contribución presenta nuevos enfoques para la cristalización de proteínas, no sólo para el crecimiento de cristales, sino también para controlar el tamaño y orientación de los mismos. Uno de los métodos empleados en este trabajo fue el uso de campos magnéticos. La aplicación de este método resultó en la obtención de cristales ordenados. Las técnicas de rayos X de alta resolución mostraron una mejora en los mapas de densidad electrónica, lo que, ayuda a resolver la estructura de las proteínas. Esta propuesta indaga algunas ventajas, inconvenientes y realidades del papel de los campos electromagnéticos en la investigación de cristalización de proteínas y su efecto sobre los contactos cristalinos de la proteína. Además, se analiza la importancia de la temperatura ambiente y de la baja temperatura durante la colecta de datos. Por último, estudia el efecto de aplicar un fuerte campo magnético de 16.5 Tesla, en períodos de tiempo cortos y largos, el crecimiento de los cristales de proteínas sobre la estructura 3D de las dos proteínas modelo (Glucosa isomerasa y Lisozima). Un caso específico fue examinar el efecto que tienen los líquidos iónicos en la cristalización, los cuales son utilizados como aditivos que mejoran el crecimiento de los cristales.

ABSTRACT

In this contribution we use non-conventional methods that help to increase the success rate of a protein crystal growth, and consequently of structural projections using X-ray diffraction techniques such as the use of electric and magnetic fields. This contribution presents new approaches involving more sophisticated techniques of protein crystallization, not just for growing protein crystals of different sizes, but also for controlling crystal size and orientation. This latter was possible through the use of magnetic fields that allow the preparation of protein crystals suitable for both high-resolution X-ray and neutron diffraction crystallography where big crystals are required. This contribution discusses some advantages, disadvantages and realities of the role of electromagnetic fields in protein crystallization research, and their effect on protein crystal contacts. Additionally, we discuss the importance of room and low temperatures during data collection. Finally, we also discuss the effect of applying a rather strong magnetic field of 16.5 Tesla, for shorts and long periods of time, on protein crystal growth, and on the 3D structure of two model proteins (Glucose isomerase and Lysozyme). A specific case was to examine the effect of ionic liquids on crystallization, which are used as additives that improve the growth of crystals.

ÍNDICE

JURADO ASIGNADO	II
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIAS	V
ACRÓNIMOS	VI
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
ÍNDICE	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
INTRODUCCIÓN	XX
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	1
1.1 CRISTALOGÉNESIS BIOLÓGICA	2
<i>La ciencia de la cristalización de proteínas</i>	2
1.2 DIAGRAMA DE FASE DE LA CRISTALIZACIÓN	2
<i>Solubilidad frente a las curvas de supersolubilidad de un diagrama de fases</i>	3
1.3 LOS PRINCIPIOS TEÓRICOS Y METODOLÓGICOS.....	4
1.3.1 <i>Nucleación</i>	4
1.3.2 <i>Crecimiento</i>	5
1.3.3 <i>Fenómenos de transporte</i>	5
1.4 MÉTODOS Y VÍAS DE CRISTALIZACIÓN.....	5
<i>Morfología de un cristal</i>	6
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES	7
2.1 LÍQUIDOS IÓNICOS EN PROTEÍNAS	8
2.2 CRISTALIZACIÓN ELECTRO-ASISTIDA DE PROTEÍNAS	10
2.2.1 <i>Corriente Directa</i>	12
2.2.2 <i>Corriente Alterna</i>	12
2.3 EFECTO DEL CAMPO MAGNÉTICO SOBRA LA CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	13



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<i>La anisotropía de la susceptibilidad diamagnética</i>	15
3.1 OBJETIVO GENERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3.3 HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 PROTEÍNAS Y AGENTES DE CRISTALIZACIÓN Ó PRECIPITANTES	24
4.1.1 <i>Las proteínas</i>	24
4.1.1.1 Lipasa B Candida antártica.....	24
a. Agentes precipitantes de CALB	25
b. Tacsimate.....	26
4.1.1.2 Lisozima de clara de huevo	27
4.1.1.3 Glucosa Isomerasa Streptomyces rubiginosus	27
4.1.1.4 Condiciones de cristalización de las proteínas modelo	28
4.1.2 <i>Líquidos iónicos: aditivos de cristalización</i>	28
4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	29
4.2.1 <i>SDS-PAGE</i>	29
4.2.2 <i>Cuantificación de proteína en un espectrofotómetro NanoDrop</i>	30
4.2.3 <i>Ensayos de Dispersión dinámica de luz (DLS)</i>	31
4.2.4 <i>Espectrometría de masas MALDI-TOF</i>	32
4.3 MÉTODOS DE CRISTALIZACIÓN	32
4.3.1 <i>Métodos convencionales de cristalización</i>	32
4.3.1.1 Gota Colgante.....	32
4.3.1.2 Gota Sedente	33
4.3.1.3 Batch.....	33
Ensayos de cristalización a diferentes temperaturas	33
4.3.2 <i>Métodos no convencionales de cristalización</i>	34
4.3.2.1 Métodos para crecer cristales en geles	34
a. Protocolo de preparación de geles.....	35
i. Preparación de geles de agarosa (1.0%).....	35
ii. Preparación del gel de sílice a partir de metasilicato de sodio.....	35
b. El método de acupuntura en geles (GAME)	36
Preparación del sistema GAME.....	37
4.3.2.2 Cristalización electro-asistida	37
a. Celda de electrocristalización de proteínas	38
b. Electrodo plano de vidrio-ITO.....	39
i. Metodología para cortar electrodos de ITO.....	39
ii. Metodología para cortar electrodos de ITO	39

c. Tipo de corrientes aplicadas.....	40
i. Corriente Directa (DC).....	40
ii. Corriente Alterna (AC).....	40
4.3.2.3 Campos magnéticos.....	41
4.4 COLECTA DE DATOS VÍA RAYOS-X.....	42
4.4.1 <i>Crio-protección de las proteínas modelo</i>	42
4.4.2 <i>Análisis de difracción de rayos-X</i>	43
4.5 ESTUDIOS ESTRUCTURALES	44
4.5.1 <i>Procesamiento de los datos de difracción</i>	44
4.5.2 <i>Resolución estructural</i>	45
4.5.3 <i>Afinamiento de estructuras</i>	45
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
5.1 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA	47
5.1.1 <i>SDS-PAGE</i>	47
5.1.2 <i>Análisis de dispersión dinámica de luz</i>	48
5.1.3 <i>Espectrometría MALDI-TOF</i>	49
5.2 MÉTODOS CONVENCIONALES DE CRISTALIZACIÓN	51
5.2.1 <i>Cristalización de CALB en medio acuoso</i>	51
Barrido de temperatura	52
5.2.2 <i>Aplicación de los líquidos iónicos</i>	53
5.2.2.1 Agentes precipitantes para CALB.....	53
5.2.2.2 Aditivos de cristalización para CALB.....	54
Efecto térmico de los cristales de CALB.....	57
5.2.2.3 Aditivos de cristalización para la Glucosa Isomerasa.....	58
Datos de Glucosa Isomerasa en presencia de líquidos iónicos.....	61
5.2.3 <i>Dispositivo para trasladar cristales</i>	63
5.3 MÉTODOS NO CONVENCIONALES DE CRISTALIZACIÓN	66
5.3.1 <i>Método de acupuntura en geles de CALB con líquidos iónicos</i>	66
5.3.2 <i>Experimentos de cristalización electro-asistida</i>	68
5.3.2.1 Cristalización de la Glucosa Isomerasa	70
a. Efecto de la corriente directa (DC) en GI.....	70
b. Efecto de la corriente alterna (AC) en la cristalización de glucosa isomerasa (GI).....	71
5.3.2.2 Cristalización de la Lisozima en corriente alterna (AC).....	75
5.3.2.3 Comparación del efecto del campo eléctrico en el número, tamaño y calidad del cristal para cristales de Glucosa Isomerasa y la lisozima.....	75
5.3.3 <i>Efecto del campo magnético sobre la cristalización de proteínas</i>	77

5.3.3.1	Cálculo de la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética de las proteínas.....	77
5.3.3.2	Grado de orientación.....	78
5.3.3.3	Comparación del efecto del campo magnético en el número, la orientación y la calidad de los cristales de Glucosa Isomerasa y la Lisozima.....	78
	Efecto de la inducción de nucleación previa a un experimento de cristalización.....	80
5.4	EFFECTO ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS EN LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS APLICADOS.	82
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES		85
6.1	<i>Cristalización en presencia de líquidos iónicos:</i>	86
6.2	<i>Cristalización electro-asistida:</i>	86
6.3	<i>Efectos de campos magnético:</i>	87
ANEXOS.....		88
I.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	89
a.	<i>Espectroscopia UV-Vis</i>	89
	Cuantificación de proteínas.....	90
b.	<i>Dispersión Dinámica de la luz</i>	90
	Diámetro hidrodinámico	91
c.	<i>Espectroscopia Infrarroja</i>	92
d.	<i>Difracción de Rayos X (XDR)</i>	92
II.	CORRIENTE ELÉCTRICA: DIRECTA Y ALTERNA	94
	<i>Perfiles en de pulsos corriente alterna</i>	94
	i. Onda Continua:.....	95
	ii. Ondas Densas y dispersas:.....	95
	iii. Onda intermitente:.....	95
	iv. Onda Ripple:.....	95
	v. Onda de respiración.....	96
III.	REGISTRO DE PATENTE IMPI: DISEÑO PARA LA PROTECCIÓN TÉRMICA Y TRANSPORTE DE BIOMACROMOLÉCULAS	97
	<i>Campo de la invención</i>	97
	<i>Sumario de la invención</i>	97
IV.	LÍQUIDOS IÓNICOS: EFECTOS EN LOS CRISTALES DE GLUCOSA ISOMERASA.....	99
V.	SIMULACIÓN DEL HÁBITO CRISTALINO POR SIMETRÍA (MERCURY).....	101
VI.	INDICADORES DE CALIDAD DE DATOS CRISTALINOS	102
VII.	RECOPIACIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA DE REFINAMIENTO	105
	i. <i>Crecimiento de cristales de lisozima en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos</i>	105

<i>ii. Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos</i>	<i>106</i>
<i>iii. Comparación de los datos estadísticos de rayos X para la Glucosa Isomerasa colectados a temperatura ambiente.....</i>	<i>107</i>
REFERENCIAS	108
PUBLICACIÓN DERIVADA	119

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i> Desglose de los datos capturados en el PDB _____	xxi
<i>Tabla 2</i> Resolución de los datos de rayos-X en el PDB _____	xxi
<i>Tabla 3.</i> Características fisicoquímicas de la HEWL, GI y CALB. _____	24
<i>Tabla 4</i> Condiciones de cristalización de CALB con solo un monómero en la unidad asimétrica _____	25
<i>Tabla 5</i> Condiciones de cristalización de CALB sugeridas Hampton Research (HR7-099) _____	26
<i>Tabla 6</i> Composición de Tacsimate (Hampton Research) _____	26
<i>Tabla 7</i> Condiciones de Cristalización de Lisozima y Glucosa Isomerasa _____	28
<i>Tabla 8</i> ILS utilizados de Hampton Research _____	28
<i>Tabla 9</i> Proporción de agente precipitante y ILS para su uso como aditivos _____	54
<i>Tabla 10</i> Condiciones de cristalización de CALB en presencia de ILS _____	55
<i>Tabla 11</i> CALB en presencia de acetato de 1-etil-3- metil-imidazolio [C ₂ mim]OAc al 3 y 35%, con aumento de 2°C después de su cristalización _____	58
<i>Tabla 12</i> Condiciones de cristalización de GI en presencia de ILS _____	59
<i>Tabla 13</i> Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en presencia de líquidos iónicos _____	61
<i>Tabla 14</i> Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en un campo eléctrico de corriente directa (DC) por difusión de vapor _____	71
<i>Tabla 15</i> Crecimiento de cristales de Lisozima al aplicar corriente alterna _____	75
<i>Tabla 16</i> Valores de la anisotropía diamagnética molar para GI, HEWL y CALB _____	77
<i>Tabla 17</i> Grado de orientación de los cristales en presencia de un campo magnético _____	78
<i>Tabla 18</i> Estadística de los datos cristalográficos de rayos X para la Glucosa Isomerasa de tres cristales crecidos bajo la influencia del campo magnético por una semana recogidos a baja temperatura (se muestra en la Figura 42) _____	81
<i>Tabla 19</i> Simulación del hábito cristalino de la Lipasa B, Glucosa Isomerasa y Lisozima. _____	101
<i>Tabla 20</i> Crecimiento de cristales de lisozima en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos _____	105
<i>Tabla 21</i> Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos _____	106
<i>Tabla 22</i> Comparación de los datos estadísticos de rayos X para la Glucosa Isomerasa colectados a temperatura ambiente _____	107

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Imagen esquemática del diagrama de fases de la cristalización de una proteína [15]</i>	3
<i>Figura 2 Líquido iónico tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio</i>	10
<i>Figura 3 Montajes experimentales de una celda de cristalización utilizando un campo eléctrico externo (a) e interno (b), respectivamente [17].</i>	10
<i>Figura 4 Lisozima en diferentes AC durante 24 h para indicaciones de nucleación. Se observaron cristales en los cuadrados rojos y no se observaron sitios de nucleación con los diamantes azul. A, B, C y D representan la formación de geles (LLPS) [53].</i>	13
<i>Figura 5 Enlaces resonantes del enlace peptídico (derecha) y ester (izquierda).</i>	15
<i>Figura 6. Representación gráfica de la distribución anisotrópica de los componentes de la susceptibilidad diamagnética donde (a) es el enlace peptídico y (b) α-hélice .</i>	16
<i>Figura 7. Estructura tridimensional de la Lipasa B Candida Antarctica (CALB) (1TCA) representada en NGL Viewer, la cual se destacan las estructuras secundarias y su empaquetamiento en la celda unidad [77].</i>	25
<i>Figura 8. Estructura tridimensional de la HEWL (193L) representada en NGL Viewer, la cual se destacan las estructuras secundarias y su empaquetamiento en la celda unidad.</i>	27
<i>Figura 9 Estructura tridimensional de la Glucosa Isomerasa (5avh) representada en NGL Viewer, la cual se destacan las estructuras secundarias y su empaquetamiento en la celda unidad.</i>	28
<i>Figura 10 Sistema Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems para SDS-PAGE. Copyright © 2016 Bio-Rad Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.</i>	29
<i>Figura 11 Espectrómetro NanoDrop Lite. Copyright © 2013 - Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved</i>	30
<i>Figura 12 Sistema de DLS Zetasizer Nano S © Copyright 2016 - Malvern Instruments Ltd is a Spectris company</i>	31
<i>Figura 13 Representación gráfica del método de gota colgante</i>	33
<i>Figura 14 Representación gráfica del método de gota sedente</i>	33
<i>Figura 15 (a) Equipo TG40 con la forma de los insertos utilizados (b) Vista superior de los insertos (c) Vista lateral de los insertos</i>	34
<i>Figura 16 Método GAME (izquierda) y método de contra difusión en cajas de GCB (derecha).</i>	37
<i>Figura 17 Diseño experimental del dispositivo eléctrico utilizado para la cristalización de proteínas utilizando una configuración de difusión de vapor. (A) Vista frontal. (B) Vista lateral.</i>	38
<i>Figura 18 (a) Se muestran las dimensiones de la celda de crecimiento modificada. Para el método de cristalización por batch usando un campo eléctrico que puede ser aplicado a cuatro muestras al mismo tiempo en dos tipos de corriente: (b) DC o (c) AC.</i>	40
<i>Figura 19 (a) Esquema del montaje experimental para preparar la muestra y (b) NMR 700 MHz de un campo magnético de 16.5 T.</i>	41

<i>Figura 20 Gel SDS-PAGE de Lisozima, Lipasa B de SA (Sigma-Aldirch) y HR (Hampton Research) y Glucosa Isomerasa (Hampton Research)</i>	47
<i>Figura 21 Gráficas de dispersión dinámica de luz de HEWL y GI.</i>	49
<i>Figura 22 Espectro de MALDI-TOF masas de CALB y GI</i>	50
<i>Figura 23 CALB (46.25mg/mL), al 50% v/v de Tacsimate pH 4 con 0.1M de acetato de sodio trihidratado pH 4 a 22°C por 24h.</i>	51
<i>Figura 24 Efecto de la temperatura en la cristalización de CALB (46mg/mL), al 50% v/v de Tacsimate pH 4 con 0.1M de acetato de sodio trihidratado pH 4 por 24h a diferentes temperaturas (a) T = 14°C, (b) T = 16°C, (c) T = 20°C y (c) T = 22°C</i>	52
<i>Figura 25 (a) CALB (40 mg/mL) en [C₂mim]OAc a 16°C por 24h. (b) se muestra con el Prisma de Nicol.</i>	54
<i>Figura 26. Experimentos positivos de CALB en ILs a diferentes temperaturas 18°C (naranja) y 10°C (azul) en placas de 96-pozos (SWISSCI)</i>	55
<i>Figura 27 Estructura de [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄</i>	56
<i>Figura 28 Efecto de la temperatura y los ILs en la cristalización de CALB</i>	57
<i>Figura 29 Representación de placa de 96-pozos (SWISSCI). Glucosa Isomerasa en diferentes ILs (TEAB, EAN, [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄). El color rojo no se tienen cristales, naranja no cristaliza muy bien y en los verdes, son los cristales óptimos.</i>	59
<i>Figura 30 Glucosa Isomerasa con diferentes proporciones del IL [C₂mim]OAc, a 20°C por 24h.</i>	60
<i>Figura 31 Diseño del dispositivo para la protección térmica y transporte de biomacromoléculas</i>	64
<i>Figura 32 Espectro característico del polietileno, realizado en un espectrómetro FT-IR Spectrum Two (PerkinElmer)</i>	65
<i>Figura 33 Método de acupuntura en geles (GAME) de CALB en diferentes ILs.</i>	66
<i>Figura 34 (a) GAME de CALB a 35% de [BMIM]BF₄ a 18°C por 2 semanas, (b) Simulación del hábito cristalino de CALB</i>	67
<i>Figura 35 Variantes de la celda de cristalización electro-asistida</i>	68
<i>Figura 36 Esta imagen muestra: (a) La celda de crecimiento al aplicar un campo eléctrico un DC (difusión de vapor). El lado derecho (b) muestra la celda montada en el goniómetro de la línea de luz de difracción XRD1 (Elettra, Trieste) para la recopilación de datos in situ a temperatura ambiente. La tercera imagen (c) muestra cómo el cristal de la Glucosa Isomerasa se ve como en la cámara de la línea de luz. La última imagen (d) muestra una vista de cerca de los puntos de difracción recogida in situ sobre un cristal de glucosa isomerasa.</i>	69
<i>Figura 37 Gráfico de número de cristales vs experimento de GI en AC</i>	72
<i>Figura 38 Gráfico de tamaño de cristal vs experimento de GI en AC</i>	73
<i>Figura 39 Glucosa Isomerasa a 20mg/mL, T=20°C por 24h. La imagen superior es el control y la inferior es a 2Hz</i>	74

<i>Figura 40 Muestra las imágenes de los cristales de Lisozima y Glucosa Isomerasa, aplicando AC durante 24h. La barra de escala amarilla corresponde a 0.1 mm de tamaño.</i>	76
<i>Figura 41 Esta imagen muestra los resultados para la Lisozima, la Glucosa y Lipasa con sus respectivos controles en comparación con las crecidas en presencia de un fuerte campo magnético de 16.5 T al estudiar su comportamiento de crecimiento de una semana. La mayoría de los cristales analizados por difracción de rayos X se recogieron de la parte media inferior de los tubos capilares. La barra de escala en rojo corresponde a 0,2 mm de tamaño.</i>	79
<i>Figura 42 Estos cristales perfectamente orientados a la dirección del campo magnético se cultivaron durante una semana. Sin embargo, los cristales en la parte posterior de la imagen no se orientaron al campo magnético, ya que fueron inducidos deliberadamente desde el principio del experimento, en la preparación de la mezcla de la proteína y el agente precipitante.</i>	81
<i>Figura 43 Estos gráficos muestran el número de residuo (I_{res}) frente a su desviación implicado en los contactos de cristal de lisozima, afectado por el campo eléctrico (AC/DC), pero apenas por el campo magnético. Donde SC y MC representan la cadena lateral y la cadena principal, respectivamente.</i>	83
<i>Figura 44 Estos gráficos muestran el número de residuo (I_{res}) frente a su desviación implicado en los contactos de cristal de Glucosa Isomerasa afectado por el campo eléctrico (AC/DC) pero apenas se ve afectado por el campo magnético. Donde SC y MC representan la cadena lateral y la cadena principal, respectivamente.</i>	83
<i>Figura 45 (a) Descripción general del área de estructura cristalina contactos, donde se observan las superficies de contacto más importantes (b) un primer plano de los principales residuos de contactos de lisozima obtenidos con los mejores datos de rayos X para los controles.</i>	84
<i>Figura 46 (a) Descripción general del área de estructura cristalina contactos de Glucosa Isomerasa, donde se observan las superficies de contacto más importantes (b) un primer plano de los contactos principales residuos de Glucosa Isomerasa obtenidos con la mejor de rayos X los datos de los controles.</i>	84
<i>Figura 47 Difracción de los Rayos X por los planos de un cristal</i>	93
<i>Figura 48 En ordenada se representa el valor de la tensión eléctrica y la abscisa el tiempo. La gráfica muestra como una corriente alterna (azul), varia su tensión de forma cíclica a lo largo del tiempo, mientras el equivalente de corriente continua (rojo), tiene un valor estático.</i>	94
<i>Figura 49 Diagrama de pulsos: onda continua</i>	95
<i>Figura 50 Diagrama de pulsos: ondas densas y dispersas</i>	95
<i>Figura 51 Diagrama de pulsos: onda intermitente</i>	95
<i>Figura 52 Diagrama de pulsos: onda ripple</i>	96
<i>Figura 53 Diagrama de pulsos: onda de respiración</i>	96
<i>Figura 54 Las dimensiones de la celda unidad se especifican por tres redes de traslación cuyas longitudes son a, b, y c. Los ángulos entre ellos son α, β y γ. Las coordenadas x, y, z se miden a lo largo de a, b, y c, respectivamente.</i>	102

INTRODUCCIÓN

El estudio de los procesos de agregación ordenada de biomoléculas permite entender procesos de nucleación y cristalización de macromoléculas biológicas [1]. Estas investigaciones tienen diversas aplicaciones en el campo de la cristalografía: si se aplica el uso de rayos-X, se requieren monocristales de buen tamaño y de alta calidad para obtener la estructura 3D. Por otra parte, si la obtención de la estructura se lleva a cabo vía difracción de rayos-X en polvos, se requieren microcristales [2]. Si se emplea radiación sincrotrón es necesario el uso de micro- y nano-cristales (XFEL) [3]. En el caso de la obtención de estructuras de proteínas, usualmente las propuestas indagatorias se enfocan al desarrollo de nuevos fármacos [4], o bien al estudio de mecanismos de la cinética de alguna enzima (si la proteína en estudio realiza algún proceso catalítico) [5]. Sin embargo, actualmente también algunos estudios se han enfocado al desarrollo de sensores biológicos (biosensores) [6].

Es importante no sólo entender cómo se llevan a cabo estos procesos de agregación-desagregación de macromoléculas biológicas para aplicaciones biomédicas, sino también entender qué parámetros físicos-químicos (campos eléctricos, magnéticos, fenómenos de transporte, temperatura, presión, pH y sobresaturación) permiten controlar la solubilidad y la formación de fases sólidas (amorfos u ordenadas que usualmente forman cristales). Para ello utilizamos la cristalografía de rayos X, ya que es una técnica poderosa para determinar la estructura 3D de las proteínas y otras biomoléculas a alta resolución [7]. Sin embargo, la cristalografía de difracción de rayos X no es la única técnica disponible para la obtención de la estructura 3D de las macromoléculas biológicas dado que se pueden utilizar otras técnicas tales como resonancia magnética nuclear (NMR) para la obtención de la estructura 3D de las proteínas en disolución. El problema es que NMR sólo funciona con proteínas de peso molecular bajo y medio [8, 9].



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla 1 Desglose de los datos capturados en el PDB

Método Experimental	Proteínas	Ácidos nucleicos	Protein/NA Complejes	Otros	Total
Rayos-X	102721	1771	5265	4	109761
NMR	10163	1177	236	8	11584
Cryo-EM	845	30	280	0	1155
Híbrido	92	3	2	1	98
Otros	178	4	6	13	201
Total	113999	2985	5789	26	122799

La Tabla 1 cuenta con información del PDB (Protein Data Bank) donde hasta el momento se han depositado 122,799 estructuras de macromoléculas biológicas, donde 113,999 son secuencias de proteínas, de las cuales se ha obtenido el 90.11% por XRD, 8.91% NMR y 0.98% por otras técnicas, esto puede resaltar la importancia de XRD para la resolución estructural de proteínas. En la Tabla 2 se puede observar que más del 90% de las estructuras colectadas por XRD, cuentan con una resolución menor de 1.5 Å, de tal manera, que el objetivo planteado es estudiar los factores cinéticos y termodinámicos que nos ayuden a mejorar la calidad cristalina de las proteínas a estudiar [10].

Tabla 2 Resolución de los datos de rayos-X en el PDB

Resolución (Å)	Número de PDBs	Porcentaje (%)
Menos de 1.5	8,853	8.62
1.5 - 2.0	35,265	34.33
2.0 - 2.5	33,973	33.07
2.5 - 3.0	17,730	17.26
3.0 y mas	6,899	6.72

En este trabajo de investigación inicialmente se evaluaron los aspectos de solubilidad de una proteína como caso específico (Lipasa B). Ésta es muy sensible a procesos de agregación-desagregación, con respecto a la temperatura. En esta parte del proyecto se rastrearon las condiciones de su cristalización en medio acuoso, para después hacer uso de los líquidos iónicos (aditivos).

Aunado a esto, las proteínas modelo: Glucosa isomerasa y Lisozima, se utilizaron para estudiar el efecto un campo magnético (intenso y homogéneo) así como las corrientes eléctricas (directas y/o alternas). Esto implicó el desarrollo de una celda para la cristalización electro-asistida, con la finalidad de estudiar los procesos de nucleación y crecimiento de cristales (agregación ordenada) *in situ*. La celda de cristalización

electro-asistida, se monta con electrodos conductores transparentes de vidrio, que tienen una película de óxido de estaño e indio (ITO) en cada una de sus caras conductoras; lo que hace que parte de este trabajo se convierta en uno de los pioneros de este tipo de investigación. A raíz de ello, se han publicado previamente algunos artículos que muestran la viabilidad de esta propuesta [11]. La nueva celda de cristalización electro-asistida que se propone desarrollar, consistirá en superar todas las deficiencias en publicaciones previas, para estudiar estos procesos de agregación-desagregación *in situ*.

Para finalizar los estudios, se difractaron y evaluaron los datos cristalográficos, con la intención de determinar los cambios estructurales en las proteínas al aplicar los diferentes campos electromagnéticos y así poder concluir con las ventajas y desventajas de este tipo de métodos de cristalización.

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

I was captured for life by chemistry and by crystals.
— Dorothy Crowfoot Hodgkin
Oxford Dictionary of Quotations, 6th ed.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La metodología para producir cristales adecuados se ha abordado de dos maneras. La primera se basa en el ensayo y error, y el segundo en obtener una comprensión de los principios fundamentales que rigen la cristalización para diseñar metodologías experimentales enfocadas a la producción de cristales de alta calidad, en esta última parte radica el tema principal de este trabajo de investigación.

1.1 CRISTALOGÉNESIS BIOLÓGICA

Es una parte de la cristalografía dedicada a entender los aspectos fisicoquímicos relacionados con la nucleación y crecimiento de macromoléculas biológicas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos). Este enfoque metodológico usa herramientas de la física, química, biología y los aspectos relacionados con la ingeniería [12]. Su principal objetivo es entender los principios físicos y químicos del fenómeno de cristalización.

La ciencia de la cristalización de proteínas

La cristalización es un fenómeno de transiciones de fase donde los cristales crecen a partir de una disolución acuosa de proteína cuando la disolución se pone en condiciones de sobresaturación [13]. La sobresaturación se consigue variando la concentración de precipitante, proteínas, aditivos, pH, temperatura y otros parámetros.

1.2 DIAGRAMA DE FASE DE LA CRISTALIZACIÓN

El proceso de cristalización se puede ilustrar mediante un diagrama de fase que muestra qué estado (líquido, sólido cristalino, amorfo [precipitado]) es estable considerando una variedad de parámetros de cristalización. Se proporciona un medio de cuantificar la influencia de los parámetros tales como las concentraciones de proteína, agentes precipitantes, aditivos, el pH y la temperatura sobre la producción de cristales [1, 13, 14].

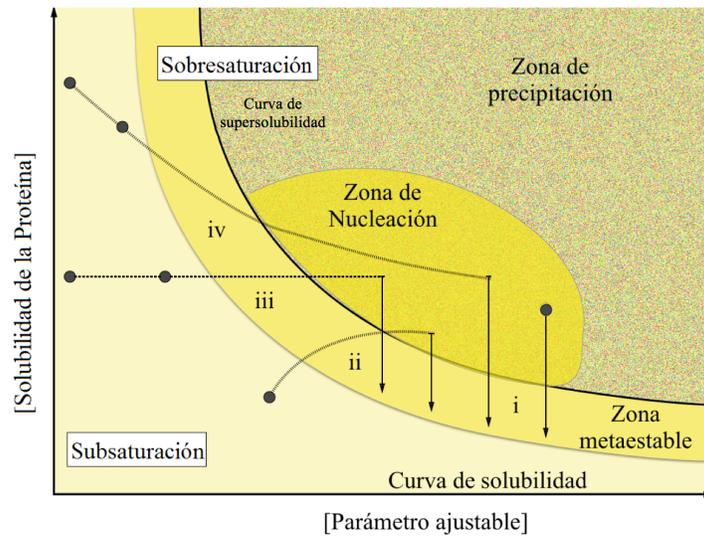


Figura 1 Imagen esquemática del diagrama de fases de la cristalización de una proteína [15]

La Figura 1 ilustra esquemáticamente cuatro zonas que representan los diferentes grados de sobresaturación:

- Zona de alta sobresaturación o precipitación, donde la proteína se precipita.
- Zona de moderada sobresaturación o nucleación, donde la nucleación espontánea se lleva a cabo.
- Zona metaestable (contiene las mejores condiciones para el crecimiento de cristales grandes y bien ordenados) es de baja sobresaturación justo debajo de la zona de nucleación, donde ocurren los procesos de formación y disolución de núcleos, aquí juegan un papel importante las fuerzas de volumen y las superficiales.
- Zona de subsaturación, donde la proteína está disuelta completamente y nunca cristalizará [14].

Solubilidad frente a las curvas de supersolubilidad de un diagrama de fases
 La solubilidad se define como la concentración de proteína en el disolvente que está en equilibrio con los cristales; alcanzar este equilibrio puede tardar varios meses porque las proteínas se difunden lentamente. La “zona metaestable” se encuentra entre las curvas de solubilidad y supersolubilidad en el diagrama de fases (Figura 1). La curva de supersolubilidad se define como la línea que separa las condiciones en las que se

produce la nucleación espontánea, de aquella donde la disolución de cristalización no deja perturbaciones [13]. La construcción de la curva supersolubilidad, se obtiene realizando ensayos de cristalización, variando al menos dos condiciones y trazar sus resultados. A un diagrama que contiene la curva supersolubilidad (y no la curva de solubilidad) se le llama "diagrama de fases de trabajo" [16].

1.3 LOS PRINCIPIOS TEÓRICOS Y METODOLÓGICOS

La biocristalización, como cualquier cristalización, es un proceso multiparamétrico, pero el número de variables que intervienen es muy superior de las que participan en el crecimiento cristalino de moléculas pequeñas. Esta complejidad es la razón principal por la que no hay investigaciones sistemáticas.

1.3.1 Nucleación

La nucleación es el paso más importante en el proceso de cristalización. Debido a la formación de núcleos y distribución de tamaños. Durante la nucleación varios eventos ocurren simultáneamente en varias escalas de tiempo; es decir, los cambios conformacionales moleculares que tienen lugar en ~ 0.01 ns, estructura de la superficie y los desplazamientos de defectos que ocurren dentro de 1.0 ns, el desplazamiento de la superficie en μ s. De igual manera, el crecimiento de una capa atómica en 1,0 ms, el transporte hidrodinámico en aproximadamente un segundo y finalmente, la nucleación homogénea que necesita no más de unos pocos minutos [17].

El fenómeno de nucleación está basado en una disolución que forma una parte sólida construyendo agregados cristalinos termodinámicamente estables. Cuando esto ocurre en disolución se le conoce como nucleación homogénea. Las partículas extrañas a valores de sobresaturación inferiores hacen que se produzca una nucleación heterogénea.

1.3.2 Crecimiento

En este proceso relaciona una secuencia de pasos para la migración de las moléculas desde el seno de la disolución a la superficie del cristal, al incorporarlo se desplazan las moléculas de hidratación¹.

1.3.3 Fenómenos de transporte

El transporte de masa es muy importante para el crecimiento de cristales a partir de disoluciones acuosas. Se puede pensar en el transporte por convección de las moléculas, el cual compite con el transporte por difusión y la interacción entre ellos determinará la forma y la cinética del crecimiento de cristales, velocidad de adsorción e incorporación de impurezas, lo que afecta el tamaño, la morfología, y la perfección del cristal [1]. Por otra parte, el transporte convectivo sólo se produce en presencia del campo gravitatorio de la tierra [18].

1.4 MÉTODOS Y VÍAS DE CRISTALIZACIÓN

En la Figura 1 se representan las cuatro principales rutas para la nucleación de los diferentes métodos de cristalización, donde el parámetro de ajuste es la concentración de agente precipitante. Los círculos negros representan las condiciones de partida. Los dos puntos de partida alternativos se muestran la cristalización por difusión líquido-líquido (LLDC, por sus siglas en inglés) [19] y diálisis debido a que la disolución de proteína insaturada puede contener proteína por sí sola o por la mezcla con una baja concentración de los agentes precipitantes. Se muestran las vías de cristalización de (i) batch, (ii) difusión de vapor, (iii) diálisis, y (iv) LLDC.

Los métodos de difusión de vapor implican el proceso de cristalización en disolución, donde la sobresaturación se lleva por el secado (concentración) de gotas a través de agentes de precipitación específicos.

¹ El crecimiento de cristales es un proceso acoplado de 5 procesos básicos:

- 1) Dinámica de fluidos
- 2) Transferencia de masa y calor
- 3) Cinética de superficie
- 4) Morfología y transiciones de fase
- 5) Reacciones químicas

Estos métodos clásicos para la cristalización de macromoléculas biológicas se clasifican de la siguiente manera:

- Método de gota colgante*
- Método de gota sedente*
- Método de gota en sándwich

*La mayoría de los cristales obtenidos en el mundo se obtiene a través de estos dos métodos, los cuales se describirán en la 4.3 Métodos de cristalización.

Morfología de un cristal

La morfología depende del medio que le rodea, ya que si el cristal tiene impedimentos físicos se impide el crecimiento sobre una cara preferencial, por lo cual no se podrá desarrollar de acuerdo a su periodicidad y la morfología se verá modificada. Por eso tenemos una clasificación de diferentes morfologías:

- En equilibrio: se prevé teóricamente a partir de criterios estructurales;
- De crecimiento: se tiene si junto a los criterios estructurales se tiene la influencia de las condiciones de crecimiento; y
- De disolución: si el en el crecimiento sufre un proceso de disolución.

CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES

It is characteristic of science that the full explanations are often seized in their essence by the percipient scientist long in advance of any possible proof.

— *Bernal, John Desmond*
The Origin of Life



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

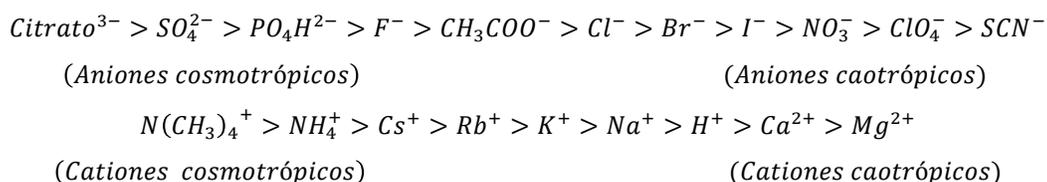
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

2.1 LÍQUIDOS IÓNICOS EN PROTEÍNAS

Los líquidos iónicos (ILs, por sus siglas en inglés) son sales que generalmente son la combinación de cationes orgánicos y un anión inorgánico con puntos de fusión por debajo de 100°C, térmicamente estables, no inflamables y demuestran presión de vapor muy baja. Estos son solubles en una gran variedad de reactivos orgánicos e inorgánicos y pueden ser altamente solubles en agua. Los ILs pueden demostrar un grado de estructuración localizada sobre cada ion en comparación de los iones disociados (disolventes moleculares), ya que estos se pueden adaptar de forma individual e independientemente [20-22]. Los ILs participan en las interacciones iónicas, hidrofóbicas y de enlace de hidrógeno. Además son a menudo caotrópicas, iones de baja simetría con deslocalización de la carga y de las interacciones intermoleculares débiles [23, 24].

En 1888, Hofmeister observó al estudiar la solubilidad de las proteínas, la cantidad de sal necesaria para hacer precipitar la proteína dependía de la naturaleza de la naturaleza de los electrolitos utilizados, ahora se conoce como la "Serie Hofmeister", que refleja una ordenación de las sales de cosmotrópico (salting-out) a caotrópico² (salting-in) [25-27].



Los líquidos iónicos son típicamente de diseño caotrópico; es decir, disminuyen los puntos de fusión como resultado de iones de baja simetría que deslocalizan la carga y teniendo solo interacciones intermoleculares débiles. Tales sales pueden hacer que los dipolos del agua³ pierdan su orientación de la capa de solvatación, la cual es formada por la combinación del agua de hidratación y las cargas de los líquidos iónicos, estos son retenidos por las cargas eléctricas de la superficie de las proteínas, promoviendo el

² Los términos 'kosmotrope' (creador de orden) y 'caotrópico' (creador de desorden) son originalmente denotados para los solutos que estabilizan o desestabilizan respectivamente, para el caso de proteínas y membranas; los agentes caotropos despliegan proteínas, desestabilizan los agregados hidrofóbicos y aumentan la solubilidad de hidrofobos, mientras que cosmotropos estabilizan las proteínas y los agregados hidrofóbicos en disolución y reducen la solubilidad de hidrofobos.

³ En disolución acuosa, los residuos hidrofóbicos de las proteínas se acumulan en el interior de la estructura, mientras que en la superficie aparecen diversos grupos con carga eléctrica, en función del pH del medio.

"salting-out" cuando las disoluciones acuosas se mezclan con disoluciones cosmotrópicas [28, 29].

Desde 1999, Garlitz y Weingärtner reportaron el uso de líquidos iónicos, para la cristalización de proteínas. Es el caso del nitrato de etilamonio (EAN, por sus siglas en inglés) para la cristalización de lisozima debido a que presenta características como el agua (puentes de hidrógeno), la formación de micelas por algunos tensoactivos, cuenta con un carácter iónico e hidrófobo contribuido por el sustituyente etilo. La combinación de estas características lo han propuesto como agente precipitante [30, 31].

En el 2007, Pusey estudió el efecto que tienen diferentes ILs en la cristalización de diferentes proteínas, variando la proporción de proteína-agente precipitante (1:1, 2:1 y 4:1), en este caso los ILs optimizó la solubilidad de ciertas proteínas [23].

Varios de los ILs son también ácidos orgánicos con carácter iónico además del comportamiento hidrófobo, que los hace únicos y disolventes útiles en la química de proteínas [32].

Posteriormente en el 2009, Judge investigó el uso de ILs como agentes precipitantes y aditivos para la cristalización de seis proteínas modelo. Los resultados indicaron que estos ILs realizaron cambios en la morfología y un aumento significativo en el tamaño del cristal en algunos casos [33]. Se continuó trabajando con ILs a base de imidazolio. A partir de esto sugirieron que los ILs están excluidos de la superficie de la proteína, que tienden a estabilizarlas y a promover la precipitación salina. Por lo tanto, la presencia de ILs también puede cambiar las interacciones intermoleculares y por lo tanto, influir en la energía libre, actividad termodinámica, la estabilidad térmica, y la biodisponibilidad [34].

Los ILs son aditivos eficientes en la cristalización de proteínas, aumentan las tasas de cristalización y el tamaño de cristal. Diversos autores reportan experimentos de cristalización utilizando ILs que generan menos polimorfismo cristalino, así como disminución de los precipitados en altas concentraciones de agente precipitante [23, 30, 33, 35].

Los ILs se han utilizado para suprimir la agregación de proteínas y aumentar significativamente los rendimientos de plegamiento de proteínas [34, 36]. También se han empleado para estabilizar la actividad de proteína y la estructura [37-39]. Por ejemplo, la inclusión del ILs tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio (Figura 2) mejoró la estabilidad térmica y la solubilidad de proteínas integrales de membrana para el estudio de proteómica [40].

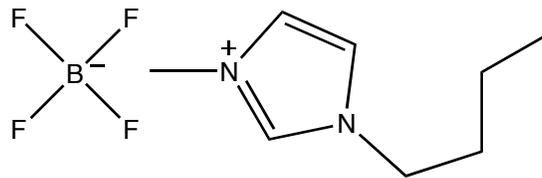


Figura 2 Líquido iónico tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio

2.2 CRISTALIZACIÓN ELECTRO-ASISTIDA DE PROTEÍNAS

En la cristalización electro-inducida en disolución se deben determinar las condiciones, para modificar la tasa de nucleación con el fin de obtener unos pocos cristales de alta calidad cerca de la zona metaestable, controlando de este modo el crecimiento. Principalmente, se tienen dos enfoques en el estudio de los campos eléctricos:

- Externos de corriente directa (DC, por sus siglas en inglés)
- Interno de corriente directa DC

Los cuales se muestran gráficamente en la Figura 3.

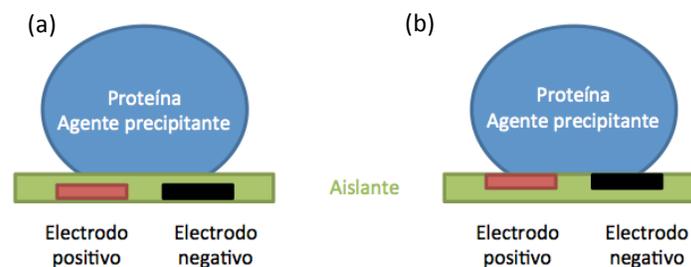


Figura 3 Montajes experimentales de una celda de cristalización utilizando un campo eléctrico externo (a) e interno (b), respectivamente [17].

El principio de cristalización en disolución se basa en que las moléculas solvatadas al estar rodeadas por una esfera de hidratación, no pueden presentar interacciones entre las moléculas de proteína, actuando como un dieléctrico y protegiendo de la atracción

electrostática entre moléculas adyacentes [41]. La cristalización puede ocurrir solamente si se remueven estas esferas de hidratación en disoluciones sobresaturadas de proteína. Si esta esfera se elimina demasiado rápido por evaporación o efecto de algún campo externo, las moléculas no alcanzan su conformación nativa y se formará un gel en su lugar [42].

La medición del efecto de un campo eléctrico sobre la cristalización de proteínas fue llevado a cabo por primera vez hacia mediados de la década de los años 70 por Chin y colaboradores aplicando éste a la cristalización de la 17 β -estradiol⁴ deshidrogenasa [43]. A finales de la década de los 90, dos contribuciones hicieron renacer este campo de investigación, con una publicación enfocada a la teoría y la parte experimental sobre el crecimiento de proteínas en presencia de campos eléctricos y efectos de la presión sobre la cristalización [44, 45]. Posteriormente, los grupos de los investigadores Aubry y colaboradores estudiaron el efecto de estos campos en la cinética de crecimiento [46, 47] y en Bulgaria Nanev y Penkova aplicaron campos eléctricos externos muy intensos (1000 volts/cm) a la cristalización de proteínas en disolución [48]. Ambos mostraron que era posible reducir el número de núcleos cristalinos⁵ y controlar la cinética del proceso aplicando estas investigaciones a la enzima Lisozima de la clara de huevo. En el 2005, Rivera-Hernández y Moreno introdujeron los primeros conceptos de electrocristalización de proteínas, empleando Ferritina, cristalizada sobre electrodos de grafito pirolítico altamente orientado⁶ (HOPG) usando el método batch (que consiste en mezclar proteína y agente precipitante, en concentraciones fijas para obtener cristales, sin que haya procesos de transporte en fase vapor) [49].

En el año 2003 surge el uso de la cristalización focalizada y asistida por bajas corrientes empleando electrodos de platino introducidos en disoluciones y medios capilares combinados también con fenómenos de transporte difusivo empleando

⁴ El estradiol (E2 o 17 β -estradiol) es una hormona esteroide sexual femenina. El estradiol es abreviado E2 ya que tiene dos grupos hidroxilos en su estructura molecular. La estrona tiene 1 (E1) y el estriol tiene 3 (E3). El estradiol es alrededor de 10 veces más potente que la estrona y alrededor de 80 veces más potente que el estriol en sus efectos estrogénicos.

⁵ Los núcleos cristalinos se pueden formar a partir de moléculas, átomos, o iones. En disoluciones acuosas pueden ser hidratados. Debido a sus rápidos movimientos, estas partículas reciben el nombre de unidades cinéticas.

⁶ Highly Oriented Pyrolytic Graphite (HOPG), es una forma altamente pura y ordenada de grafito sintético. Los cristalitas de grafito individuales se caracterizan por estar bien alineados entre sí.

hidrogeles; esto fue propuesto por primera vez por Mirkin y colaboradores, como una estrategia efectiva para elevar la calidad cristalina [50] actualmente bien establecidos con software que permite analizar en detalle, los datos de difracción y la calidad de los cristales y planear estrategias en la toma de datos de difracción [51], existen además contribuciones que han empleado la combinación de campos eléctricos, magnéticos y geles en una sola celda de crecimiento cristalino [11, 52], pulsos eléctricos en microgotas [53], pulsos de láseres para promover la nucleación [54] y técnicas basadas en dispersión de luz para seguir los procesos de nucleación y crecimiento de cristales [55].

2.2.1 Corriente Directa

En particular, los campos eléctricos de corriente directa se han utilizado para orientar los dipolos moleculares y desolvatar las moléculas de proteína. Sin embargo, cuando un campo de corriente continua se aplica a los electrodos internos en una disolución de alta conductividad, las reacciones de Faraday se producen en los electrodos. Para limitar este tipo de contaminación, los campos aplicados se limitan a bajos voltajes y corrientes bajas, no más de 1V y 10 μ A [56].

2.2.2 Corriente Alterna

Hasta la fecha sólo hay pocos documentos que estudian de la cristalización en un campo eléctrico alterno (AC, por sus siglas en inglés), probablemente porque introduce un parámetro adicional; es decir, la frecuencia de la corriente. Sin embargo una ventaja es que se limitan las reacciones farádicas en los electrodos y por lo tanto es posible trabajar a valores de campo eléctrico mayores.

En el 2008, Hou y Chang aplicaron un campo eléctrico interno alterno a Lisozima (HEWL, por sus siglas en inglés) y se observaron 3 zonas según la sus valores de frecuencia y potencial: donde no hay cristales, otra con solo algunos monocristales y la zona de la formación de un gel (debido a LLPS⁷) [57]. También afirmaron que se obtienen los mejores cristales cuando se ha nucleado y crecido a partir del gel [53].

⁷ La separación de fases líquido-líquido (LLPS), ocurre cuando una disolución de proteína homogénea se separa en una capa superior pobre y una capa inferior rica de proteína a medida que disminuye la temperatura. A menudo, este evento es reversible simplemente mediante la mezcla de las dos fases y elevando la temperatura de la disolución.

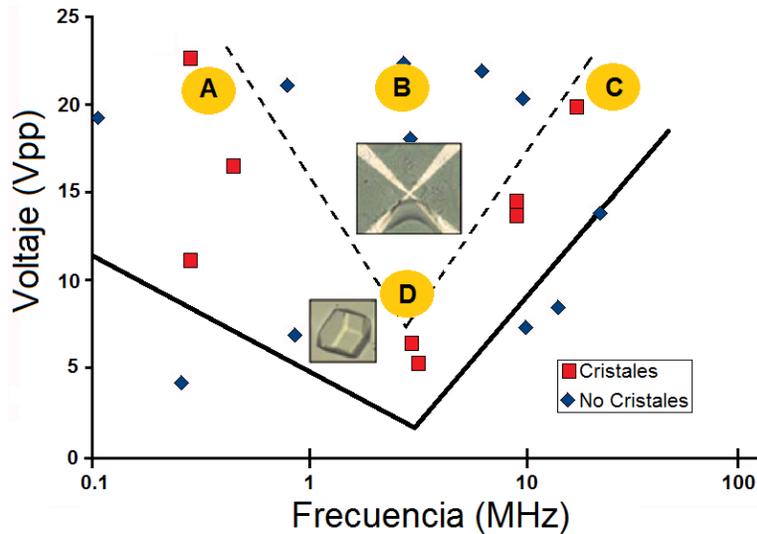


Figura 4 Lisozima en diferentes AC durante 24 h para indicaciones de nucleación. Se observaron cristales en los cuadrados rojos y no se observaron sitios de nucleación con los diamantes azul. A, B, C y D representan la formación de geles (LLPS) [53].

Por otro lado, un año después, Koizumi fue capaz de controlar el aumento o disminución de la velocidad de nucleación mediante la aplicación de un campo eléctrico externo de AC con una frecuencia apropiada. Reconsideraron el efecto termodinámico del campo eléctrico externo en el potencial químico, donde aplicaron diferentes frecuencias, para obtener una relación con la teoría. Donde la fuerza motriz, $\Delta\mu^j$, para la nucleación está generalmente relacionada con la solubilidad, C_{eq} , tal como se expresa mediante la ecuación 1 [58].

$$\Delta\mu^j = kT \ln \frac{c}{C_{eq}} \quad \text{Ec. 1}$$

2.3 EFECTO DEL CAMPO MAGNÉTICO SOBRA LA CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

En 1997, tres grupos en Japón de forma simultánea mostraron el efecto en la orientación, control de la nucleación y el incremento de la calidad cristalina en diferentes macromoléculas biológicas cuando se aplicaban campos magnéticos de intensidades altas. La principal característica de los campos magnéticos, ya sea homogéneo o no homogéneo, es que siempre actúan de manera diferente en las muestras de proteína. Los campos magnéticos no homogéneos son responsables de la reducción de las fuerzas de gravitatorias efectivas en disolución a través de la acción de la fuerza magnética [59]. Mediante la aplicación de un gradiente de campo magnético

vertical, una fuerza de magnetización se genera en la muestra. Si esta fuerza es opuesta a la fuerza de la gravedad, el resultado será una reducción de la aceleración vertical (gravedad eficaz) con la disminución posterior en la convección natural. La convección es prácticamente anulada, lo que genera una situación similar a la encontrada en las condiciones de microgravedad [60, 61].

Rothgeb y Oldfield fueron los primeros en reportar el efecto del campo magnético sobre la cristalización de mioglobina [62], encontrando que se orientaban magnéticamente en el interior del imán (8,5T, 1T = 10.000Gauss) de un equipo de NMR. Sin embargo, en ese momento, los efectos del campo magnético no recibieron mucha atención. Sobre todo porque se hizo desde el punto de vista del magnetismo del metal de coordinación en sistemas biológicos que empleaban metaloproteínas. En estos estudios se concluyó que la orientación magnética se debe a iones metálicos coordinados con las proteínas hemo [62]. En 1997 Sazaki, estudió el efecto de los campos magnéticos homogéneos fuertes (más de 10T), y encontró que se obtienen cristales de mejor calidad. No obstante, el efecto de los campos magnéticos en los cristales será diferente dependiendo del grupo espacial en el que se cristaliza la proteína. Todas estas observaciones están relacionadas entre sí y es debido al efecto de orientación del campo magnético a un nivel microscópico [63, 64].

En una disolución sobresaturada, los núcleos de proteína están en suspensión en la disolución, estos se sedimentan al alcanzar un tamaño adecuado que depende del valor del campo. Estos núcleos actuarían como bloques que impiden la difusión libre de monómeros, aumentando la viscosidad de la disolución y por lo tanto, se tiene menos convección [65, 66]. Una revisión detallada de estos efectos magnéticos fue publicada por Sazaki y colaboradores, en la que se muestra que la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética es la causante de este efecto (la cual es grande en proteínas ricas en alfa hélices); esto permitió comprobar y monitorear el incremento en la calidad cristalina a través de diferentes técnicas de microscopía *in situ* [67].

La anisotropía de la susceptibilidad diamagnética

La anisotropía magnética en materiales biológicos ha sido ampliamente estudiada. Anteriormente solo se le atribuía a la orientación de los anillos aromáticos, los cuales se encuentran frecuentemente en las cadenas laterales de los enlaces peptídicos de las proteínas [68]. Sin embargo, se realizaron estudios en biopolímeros los cuales no contenían grupos aromáticos y presentaban cierta orientación.

Lonsdale (1938) mostró que “La gran anisotropía diamagnética está asociada con la existencia de la resonancia en los enlaces, el arreglo plano de los átomos en la molécula y la tendencia a la igualación de las distancias de enlace, no sólo en anillos cerrados (tal como se predijo por la teoría), sino también en sistemas abiertos [...] la existencia de la gran anisotropía en un cristal diamagnético es por lo tanto la presunta evidencia de: (i) la conjugación molecular, (ii) el arreglo de los átomos (o la tendencia de los átomos para organizarse ellos mismos) en la dirección de mayor susceptibilidad diamagnética” [69]. Lonsdale concluye que la diferencia de la anisotropía diamagnética molar de un grupo éster es (Ec. 2):

$$\Delta K = \Delta K_{\parallel} - \Delta K_{\perp} = 8.8 \times 10^{-6} \quad \text{Ec. 2}$$

donde K_{\parallel} y K_{\perp} son la susceptibilidades paralela y perpendicular al plano del grupo éster como se muestra en la Figura 5, el cual es comparable con el valor del grupo carboxílico (4.5×10^{-6}) y del benceno (54×10^{-6}).

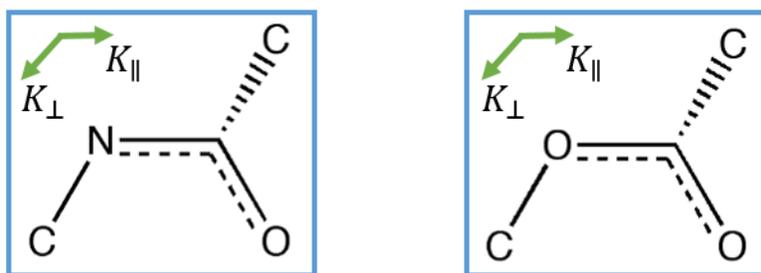


Figura 5 Enlaces resonantes del enlace peptídico (derecha) y éster (izquierda).

Tiempo después Worcester (1978) usa la notación de Lonsdale, para calcular la contribución del enlace peptídico en la susceptibilidad diamagnética a lo largo del eje principal de la estructura de una proteína (Ec. 3).

$$X_i = \sum_j \cos^2 \theta_{ij} K_j \quad \text{Ec. 3}$$

donde K_j es la susceptibilidad principal de un enlace peptídico y $\cos\theta_{ij}$ es la dirección coseno de K_j con respecto a X_i [70].

Para estructuras con simetría axial, las susceptibilidades paralelas (X_{\parallel}) y perpendiculares (X_{\perp}) del eje son suficientes (Figura 6 (a)).

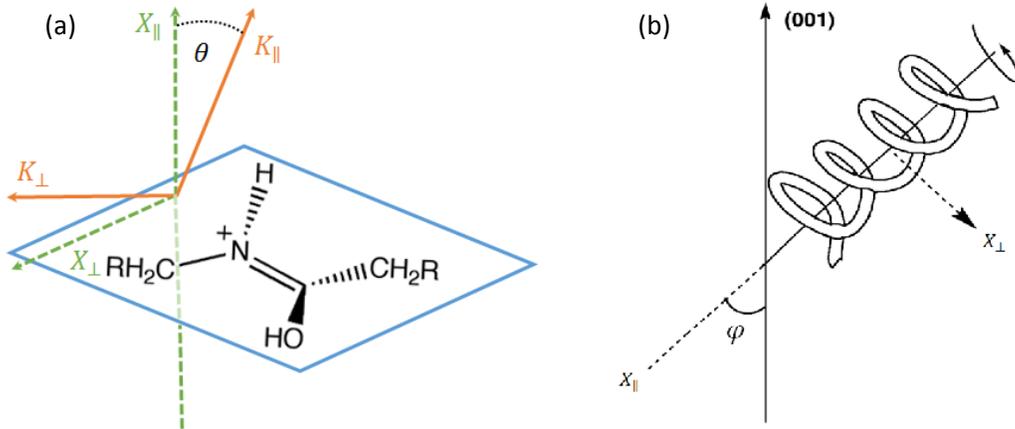


Figura 6. Representación gráfica de la distribución anisotrópica de los componentes de la susceptibilidad diamagnética donde (a) es el enlace peptídico y (b) α -hélice .

Además, la susceptibilidad del enlace peptídico puede ser reducida en un componente en el plano (K_{\parallel}) y fuera del plano (K_{\perp}). La ecuación se puede reducir en:

$$X_{\parallel} = K_{\perp} \cos^2 \varphi + K_{\parallel} \sin^2 \varphi \quad \text{Ec. 4}$$

$$X_{\perp} = [K_{\parallel} \sin^2 \varphi + K_{\perp} (\cos^2 \varphi + 1)]/2 \quad \text{Ec. 5}$$

donde φ es el ángulo entre el eje de simetría y la normal del plano peptídico, y X_{\perp} ha sido promediada la rotación alrededor del eje de simetría. La anisotropía es calculada a partir de:

$$\Delta X = \Delta X_{\parallel} - \Delta X_{\perp} = \Delta K (1 - 3 \cos^2 \varphi)/2 \quad \text{Ec. 6}$$

donde para una α - hélice, $\varphi = 90^\circ$. Para una estructura que contiene N_{α} péptidos:

$$\Delta X_{\alpha} = (N_{\alpha}/2) \Delta K = 4.4 \times 10^{-6} N_{\alpha} \quad \text{Ec. 7}$$

Para $\varphi \approx 60^\circ$ una estructura β - plegada con N_{β} residuos:

$$\Delta X_{\beta} = (N_{\beta}/8) \Delta K = 1.1 \times 10^{-6} N_{\beta} \quad \text{Ec. 8}$$

Después, Pauling (1979), concluye que Lonsdale comete un error en la determinación del ΔK , hace una corrección del valor del enlace peptídico paralelos al eje de la hélice (5.36×10^{-6}), donde cada grupo contribuye $5.36 \times 10^{-6}/2 = 2.68 \times 10^{-6}$, valor muy

similar al obtenido experimentalmente con la anisotropía de la cadena de γ – *etil* – *L* – *glutamato* con un valor $2.6 \pm 0.2 \times 10^{-6}$. El valor calculado por Pauling es el que se debe de considerar para determinar el posible valor de la anisotropía de susceptibilidad diamagnética total (conociendo la estructura y secuencia de la proteína), el cual es un parámetro adimensional en el sistema internacional [71].

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS E HIPÓTESIS

The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.

— Sir Lawrence Bragg

Quoted in Arthur Koestler and J. R. Smithies, Beyond Reductionism (1958), 115.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La importancia principal de este trabajo es estudiar los parámetros físicos (campos eléctricos y magnéticos) y químicos (concentración, fuerza iónica, pH) que se encuentran involucrados en la cristalización de proteínas. Esto para poder implementarse en diferentes métodos convencionales y no convencionales, los cuales pueden ayudar a aumentar la tasa de éxito de un crecimiento de cristales de proteína. Por, consiguiente, esto permitirá proyectarlas estructuralmente utilizando técnicas de difracción de rayos-X. Con el fin de lograr este propósito, este trabajo presenta nuevos enfoques que implican técnicas más novedosas para la cristalización de proteínas, no sólo para el crecer de cristales de proteínas, sino también para controlar el tamaño, número y orientación de los mismos. En unos años esto se verá reflejado en proporcionar diferentes métodos de cristalización, para grupos de investigación para los cuales sea importante elucidar las estructuras proteicas para sus diferentes objetivos de estudio. Además, con la implementación de los líquidos iónicos se busca plantear diferentes panoramas donde el agua no sea el disolvente principal para cristalizar diferentes tipos de proteínas.

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto que tiene en la cristalización de diferentes proteínas, la presencia de los líquidos iónicos, así como de campos eléctricos y magnéticos, y estudiar su efecto en la calidad cristalina para estudios estructurales a través de rayos-X de alta resolución.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterización por técnicas fisicoquímicas las proteínas: SDS-PAGE, UV-Vis, DLS y MALDI-TOF
- Encontrar las condiciones de cristalización de Lipasa (CALB), para concluir las mejores condiciones de cristalización

Líquidos iónicos:

- Determinar si los líquidos iónicos (TEAB, EAN, [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄) se puede utilizar como aditivos o agentes precipitantes en la cristalización de proteínas

- Cristalizar la Glucosa Isomerasa (GI, por sus siglas en inglés) y Lipasa B (CALB, por sus siglas en inglés) en presencia de diferentes líquidos iónicos por métodos convencionales y no convencionales.

Campos eléctricos:

- Desarrollar diferentes celdas de cristalización electro-asistida con electrodos de ITO-vidrio e ITO-PET.
- Analizar el efecto que tienen las corrientes eléctricas directas y alternas durante el proceso de nucleación y crecimiento cristalino.
- Comparar el efecto que tienen las corrientes eléctricas en el número, tamaño y calidad cristalina

Campos magnéticos:

- Estudiar el efecto que tiene aplicar un fuerte campo magnético al cristalizar por diferentes tiempos a las proteínas
- Determinar cómo afecta la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética en las diferentes proteínas
- Comparar el efecto que tienen los campos magnéticos en el número y tamaño en los diferentes cristales de proteína
- Analizar el efecto que tiene inducir la cristalización previa antes de iniciar una experiencia en presencia de campos magnéticos.

Procesamiento de los datos:

- Analizar los datos cristalográficos para comparar la calidad cristalina de los cristales obtenidos
- Elucidar la estructura para determinar los cambios estructurales al aplicar diferentes campos electromagnéticos

3.3 HIPÓTESIS

- Los procesos de agregación y desagregación de las proteínas, tienen que ver con aspectos de solubilidad (que dependen también de la fuerza iónica y temperatura) y con la exposición de cierto tipo de aminoácidos hidrofóbicos en sistemas acuosos.
- El inducir diferencias de potencial (campos eléctricos directos o alternos) permitirá moderar o alterar la cinética del proceso donde se verá afectada el número y tamaño de los cristales.
- Aplicar diferentes escalas de tiempo en un campo magnético fuerte y homogéneo, modificará la calidad cristalina del mismo, además sin que se presenten cambios estructurales.

CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

In a crystal we have the clear evidence of the existence of a formative life-principle, and though we cannot understand the life of a crystal, it is none the less a living being.

— Nikola Tesla

In 'The Problem of Increasing Human Energy: With Special Reference to the Harnessing of the Sun's Energy', Century Illustrated Magazine (Jun 1900), 60, No. 2, 180.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este capítulo detalla todo el proceso metodológico llevado a cabo a lo largo de esta investigación, además de algunos datos relevantes para entender la metodología propuesta. Este fue dividido en 5 temas principales:

4.1 Proteínas y agentes de cristalización ó precipitantes

Destinada a describir cada una de las proteínas y ILs, además de los disolventes y reactivos empleados para su cristalización.

4.2 Caracterización fisicoquímica

Enfocada al procedimiento de caracterización previa para comprobar la pureza y concentración de las proteínas empleadas para este estudio.

4.3 Métodos de cristalización

Enfocado de detallar las diferentes metodologías de cada uno de los experimentos de cristalización con la preparación de algunas disoluciones stock.

4.4 Colecta de datos vía rayos-X

Encargada en describir que características han sido necesarias para recolectar los diferentes datos de rayos-X, así como la implementación del dispositivo de protección térmica de los cristales.

4.5 Estudios estructurales

Sección orientada para puntualizar los diferentes programas que se utilizan para llevar a cabo en XDS, la suite CCP4, Coot y PDBe (PISA), con el objetivo de visualizar los cambios estructurales en las proteínas utilizadas.

4.1 PROTEÍNAS Y AGENTES DE CRISTALIZACIÓN Ó PRECIPITANTES

4.1.1 Las proteínas

Para estudiar las ventajas y desventajas en las modificaciones de las metodologías propuestas es indispensable tener sistemas que hayan sido ampliamente caracterizados, para evitar factores de error en el estudio. En el caso de las proteínas, son usualmente utilizadas la Glucosa Isómerasa de *Streptomyces rubiginosus*, y Lisozima de clara de huevo (HEWL⁸) a las cuales se les llama proteínas modelo. Ambas se pueden adquirir comercialmente y sirven como elementos de comparación en los estudios de crecimiento cristalino. Por otra parte, se escogió la Lipasa B *Candida antarctica*, como caso específico por la estabilidad que presenta en diferentes tipos de disolventes, los cuales posiblemente puedan ocasionar defectos en su estructura. Anteriormente se han realizado estudios de algunas proteínas en presencia de ILs, pero no han realizado investigaciones que busquen los cambios estructurales de los mismos [72, 73].

En la Tabla 3 se resume las características físicas y químicas más relevantes de las proteínas, así como las condiciones estándar de cristalización que se han empleado en este trabajo.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la HEWL, GI y CALB.

Características fisico-químicas				
Proteína	No. de Aminoácidos	PM (KDa)	No. Cadenas	pI ⁹
Lisozima	129	14.4	1	10.7
Glucosa Isomerasa	386	43	1	3
Lipasa B	317	33	1	6

Los códigos que aparecen en las proteínas son de los que se han obtenido de bancos de datos como el PDB (Protein Data Bank), los cuales se utilizan para la 4.5 Estudios estructurales (<http://www.rcsb.org/pdb>).

4.1.1.1 Lipasa B *Candida antártica*

Las lipasas son enzimas con mayor uso en biotransformaciones. Una de las lipasas más interesantes y que ha sido estudiada por su alta selectividad es la Lipasa B de *Candida antártica* (CALB, según sus siglas en inglés) [74]. Ésta fue aislada por primera vez en la Antártida cuando se examinaban enzimas activas en condiciones extremas. CALB es

⁸ HEWL del inglés Hen Egg White Lysozyme

⁹ El punto isoeléctrico, es el pH donde una proteína tiene una carga neta de cero.

ampliamente usada como biocatalizador debido a su elevada regio y enantio selectividad frente a alcoholes y aminas [75]. CALB es una proteína globular tipo α/β como se presenta en la Figura 7, tiene 7 sistemas β -plegada centrales paralelas y 10 α -helicoidal. Presenta uniones β - α - β y contiene 317 residuos de aminoácidos [76].

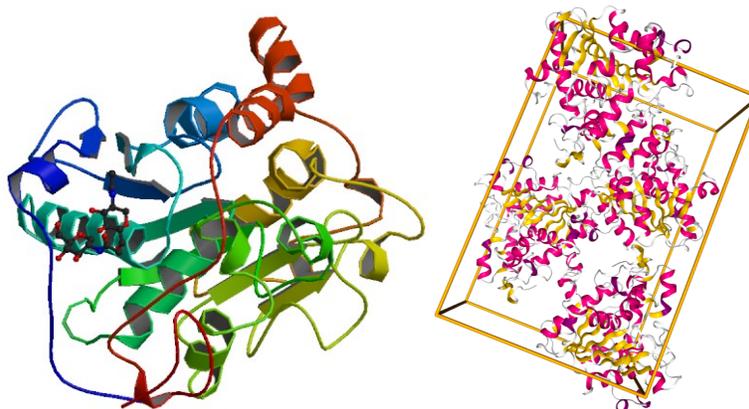


Figura 7. Estructura tridimensional de la Lipasa B Candida Antarctica (CALB) (1TCA) representada en NGL Viewer, la cual se destacan las estructuras secundarias y su empaquetamiento en la celda unidad [77].

a. Agentes precipitantes de CALB

En la Tabla 4 se muestra las diferentes condiciones de cristalización reportadas en la literatura para CALB cuando solo se tiene un monómero en la unidad asimétrica. El método de cristalización empleado es difusión en fase vapor (gota colgante). En la tabla se destacan los diferentes sistemas cristalinos, grupo espacial, resolución, las condiciones de cristalización y temperatura en la cual se obtuvieron los cristales.

Tabla 4 Condiciones de cristalización de CALB con solo un monómero en la unidad asimétrica

Condiciones de cristalización						
PDB	Sistema cristalino	Grupo espacial	Resolución (Å)	Concentración	Agente precipitante	T (°C)
4ZV7 [78]	Hexagonal	P6 ₃ 22	2.00	10mg/mL en agua Mili-Q	24% (w/v) PEG 3,350, 0.1M ácido cítrico, 0.1M AcNa pH=5.5	21
1TCA [76]	Ortorrómico	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.55	10mg/mL, 0.6% n-Octil- β -D-tioglucopiranos a	20% PEG 4,000, 50mM AcNa pH=3.6, 10%isopropanol	20
3ICW [79]	Trigonal	P3 ₂ 21	1.69	10mg/mL, 1.4M de fosfato de sodio-potasio pH=6.9	20% (v/v) PEG 3,350, 0.2M Fosfato de sodio monobásico pH 4.5	16
4K5Q [80]	Ortorrómico	C222 ₁	1.60	10mg/mL en agua Mili-Q	25% PEG 3,350, 0.2M AcNa, 0.1M Bis-Tris pH 6.5	14

Además de las condiciones de cristalización existentes, se muestra los agentes precipitantes propuestos para la cristalización de CALB por Hampton Research (HR7-099, Tabla 5). Estos sugieren un pH de 4-6, así como la variación de las proporciones de PEG y diferentes disoluciones tampón.

Tabla 5 Condiciones de cristalización de CALB sugeridas Hampton Research (HR7-099)

Agentes precipitantes para CALB
0.8-1.2 M Fosfato de sodio monobásico monohidratado / Fosfato de potasio dibásico pH 4-6
1-1.3 M Sulfato de Amonio, 0.1 M Ácido cítrico o Acetato de sodio trihidratado pH 4-6, 10% v/v N,N-dimetilformamida o Dioxano o 2-Propanol, 2% w/v o 10mM n-Octil-β-D-tiglucopiranosa
10-20% v/v 2-Propanol, 10-20% w/v PEG 3,350, 0.1 M Ácido cítrico o Acetato de sodio trihidratado pH 4-6
20-40% w/v PEG 3,350-8,000, 0.1 M Ácido cítrico o Acetato de sodio trihidratado pH 4-6
40-60% v/v Tacsimate pH 4-6

b. Tacsimate

Tacsimate fue desarrollado por Hampton Research, a partir de la investigación del Prof. Alexander McPherson en el 2001, en este se describe el diseño de un experimento para evaluar la eficacia de una serie de combinaciones de pequeñas moléculas en un solo reactivo de cristalización. Por ejemplo, una mezcla de siete sales reduce el número de disoluciones, número de placas de cristalización y mejora la eficiencia [81]. Debido a los tiempos de adquisición de compra al extranjero resulta en una limitante para este trabajo, por lo que se buscó la composición de la disolución de Tacsimate que distribuye Hampton Research, los que se muestra en la Tabla 6, la disolución se preparó con agua mili-Q y se filtró con una membrana de Nylon de 0.45µm (Merck Millipore, PRO04041).

Tabla 6 Composición de Tacsimate (Hampton Research)

Tacsimate	
Reactivo	Código
Ácido malónico 1.8305M	Sigma-Aldrich, M1296
Citrato tribásico de amonio 0.25 M	Sigma, A1332
Ácido succínico 0.12M	Sigma-Aldrich, S3674
Ácido DL-málico 0.3M	Aldrich, 240176
Acetato trihidrato de sodio 0,4M	Sigma-Aldrich, S7670
Formiato de sodio 0.5M	Sigma, 71539
Tartrato dibásico de amonio 0.16M	Sigma-Aldrich, 09985
Hidróxido de sodio	Fluka, 221465
Se ajusta el pH (4, 5, 6, 7, 8, 9) de la mezcla con una disolución 1M de hidróxido de sodio	

4.1.1.2 *Lisozima de clara de huevo.*

HEWL es una proteína de 129 residuos de aminoácidos¹⁰ (14.4 kDa); es una proteína muy catiónica con un elevado punto isoeléctrico (pI= 10.7), con 19 aminoácidos en su secuencia cargados positivamente; posee cuatro puentes disulfuro que le confieren una alta estabilidad, en ellos se encuentran las ocho cisteínas presentes en la molécula. Se encuentra en diversos sitios y especies, como en la clara del huevo o en las lágrimas humanas. Cumple una función antibacteriana, ya que hidroliza las uniones *beta* 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano. Cristaliza con un grupo espacial tetragonal P4₃2₁2.

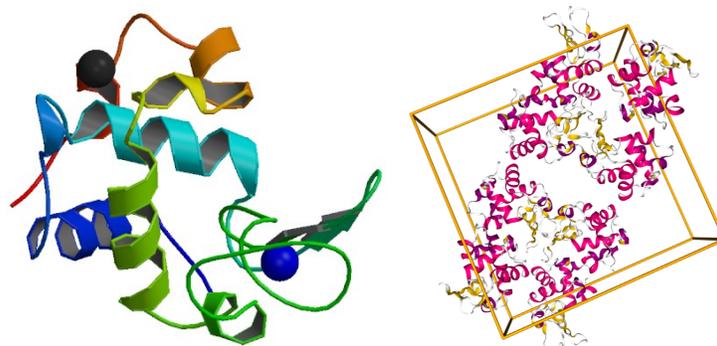


Figura 8 . Estructura tridimensional de la HEWL (193L) representada en NGL Viewer, la cual se destacan las estructuras secundarias y su empaquetamiento en la celda unidad.

4.1.1.3 *Glucosa Isomerasa Streptomyces rubiginosus*

La Glucosa Isomerasa, es una enzima que cataliza la reacción de isomeración de la glucosa en fructuosa, contiene 390 residuos de aminoácidos (43 kDa), el 52% es α y el 14% β . Esta enzima tiene dos dominios estructurales, la primera consiste en un tubo de 8 $[\alpha/\beta]$ con un núcleo de ocho β -hebras separadas por α -hélices, y el dominio C-terminal que comprende un pequeño bucle de 65 residuos que abarca el primer dominio¹¹ de otra subunidad en el dímero. Cristaliza fácilmente en varias condiciones. La enzima *Streptomyces rubiginosus* distribuida por Hampton Research cristaliza con dos grupos espaciales principalmente, I222 y P2₁2₁2 [82].

¹⁰ Cuando los aminoácidos se combinan en una reacción de condensación, liberando agua y formando una amida que se denomina enlace peptídico; estos se les conoce como "residuos" de aminoácidos.

¹¹ Un dominio proteico es la zona de la proteína donde se halla mayor densidad, es decir, donde hay más plegamientos. Una cadena polipeptídica puede tener uno o más dominios. Si una proteína está formada por más de una cadena polipeptídica, los dominios de cada cadena de polipéptidos son sus dominios.

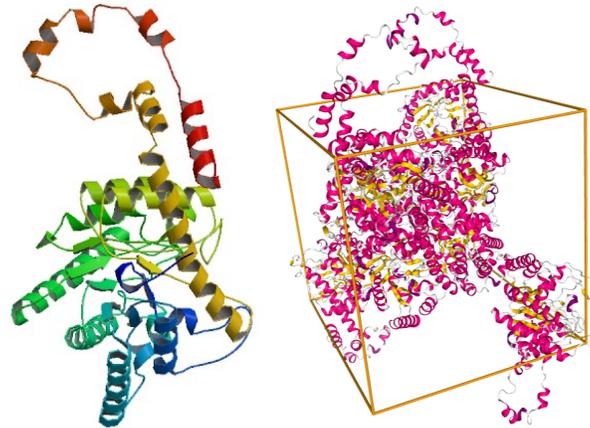


Figura 9 Estructura tridimensional de la Glucosa Isomerasa (5avh) representada en NGL Viewer, la cual se destacan las estructuras secundarias y su empaquetamiento en la celda unidad.

4.1.1.4 Condiciones de cristalización de las proteínas modelo

Las proteínas modelos propuestas ya cuentan con las condiciones de cristalización estandarizadas por el Dr. Moreno, las cuales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 Condiciones de Cristalización de Lisozima y Glucosa Isomerasa

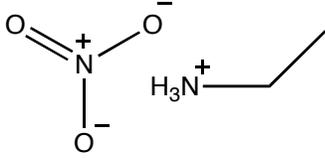
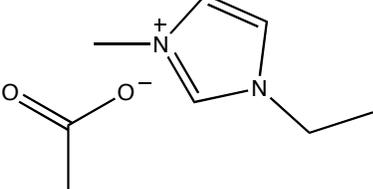
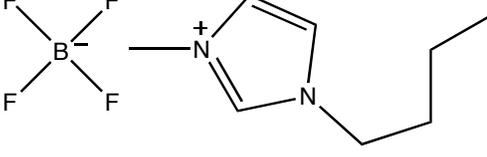
Proteína	Agentes precipitantes
Glucosa Isomerasa (Hampton Research, HR7-102) 20 mg/mL en agua Mili-Q	0.2M Buffer de acetato de amonio pH 7.0, 30% (w/v) PEG 6000
Lisozima (Seikagaku, 100940) 80 mg/mL en 0.1M Buffer acetato de sodio pH 4.5	NaCl 80 mg/mL

4.1.2 Líquidos iónicos: aditivos de cristalización.

En la Tabla 8 se muestra la propuesta de los ILs a utilizar del kit de Hampton Research (HR2-214), los cuales se espera que afecten en el proceso de cristalización de proteínas, influyendo en las interacciones entre las moléculas de proteína, modificación de su energía superficial del cristal, formando un sólido tridimensional más ordenado.

Tabla 8 ILs utilizados de Hampton Research

Líquidos iónicos utilizados en la cristalización de proteínas	
IL 1: 50% w/v Bromuro de Tetraetilamonio [TEAB]	
	CAS: 71-91-0 Pureza: 98% Mr: 210.16 g/mol Fórmula molecular: C ₈ H ₂₀ BrN Cation: Tetraetilamonio Anión: Bromuro
IL 14: 50% w/v Nitrato de etilamonio [EAN]	

	CAS: 22113-86-6 Pureza: 97% Mr: 108.0965 g/mol Fórmula molecular: C ₂ NH ₈ NO ₃ Cation: Etilamonio Anión: Nitrato
IL 17: 50% w/v Acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio [C₂mim]OAc	
	CAS: 143314-17-4 Pureza: % Mr: 170.21 g/mol Fórmula molecular: C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂ Cation: 1-etil-3-metil-imidazolio Anión: Acetato
IL 19: 50% w/v Tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio [BMIM]BF₄	
	CAS: 174501-65-6 Pureza: 99% Mr: 226.02 g/mol Fórmula molecular: C ₈ H ₁₅ BF ₄ N ₂ Cation: 1-n-butil-3-metilimidazolio Anión: Tetrafluoroborato

4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

4.2.1 SDS-PAGE

La electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) se utiliza para la identificación y monitoreo del proceso de purificación de proteínas; las proteínas se separan por su movilidad electroforética¹². Los experimentos se realizan en un equipo de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems (Biorad) el cual se muestra en la Figura 10 [83].



Figura 10 Sistema Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems para SDS-PAGE. Copyright © 2016 Bio-Rad Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Los geles de poliacrilamida se preparan por copolimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida) reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio, donde las cadenas de poliacrilamida son

¹² Movilidad electroforética, movilidad de las moléculas en un campo eléctrico. Está en función de la diferencia de peso; la longitud de la cadena (tamaño); y la forma de la proteína.

entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme.

En la técnica de SDS-PAGE se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados cargados negativamente, dado que la relación final masa/carga hacen que sean separadas en el gel poroso por sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

Los geles se montan sobre placas de cristal de tamaño 0.75mm x 10cm x 7cm. Las muestras se incuban con el tampón de solubilización sobre 10 min a 90°C. La intensidad de corriente constante debe ser 20 mA durante una hora aproximadamente a temperatura ambiente. La tinción de los geles se realiza con Azul-Coomassie R-250 al 0.5% (w/v) a temperatura ambiente en ácido acético:isopropanol:agua (1:3:6) durante 20 min. La decoloración se realiza con una disolución metanol:ácido acético:agua (2:1:10).

4.2.2 Cuantificación de proteína en un espectrofotómetro NanoDrop

Para este método se utilizó un Espectrómetro NanoDrop Lite para la cuantificación de proteínas de muestras muy pequeñas (1-2 μ L) sin cubetas, el cual se muestra en la Figura 11. Para utilizar el equipo se colocan los micro volúmenes directamente sobre la base (extremo de la fibra óptica receptora); con la tensión superficial del líquido se forma un puente conectado a una fuente de diodos emisores de luz. La longitud del estrecho paso óptico (260-280 nm) varía automáticamente con la concentración de la muestra y permite las mediciones en un amplio rango de concentraciones sin hacer diluciones, pues cuenta con una precisión de absorbancia del 3% (a 1,05 Abs a 260 nm) [84].



Figura 11 Espectrómetro NanoDrop Lite. Copyright © 2013 - Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved

4.2.3 Ensayos de Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los análisis de dispersión¹³ de luz utilizó un equipo Malvern Nano S con tecnología láser NIBS (Non-Invasive Back-Scattering) y con un controlador Peltier de temperatura manejado bajo el programa Zetasizer 6.20 (Figura 12), donde las proteínas cuentan con ciertas características:

- La intensidad de luz dispersada es proporcional a la masa molecular y concentración
- Sensibilidad a la presencia de pequeñas cantidades de agregados
- El índice de Polidispersidad (homogeneidad) es el control de calidad de cristalización de proteínas

Los análisis de dispersión se pueden analizar de diferentes maneras: intensidad promedio (estática) (SLS, Static Light Scattering) y fluctuaciones en la intensidad (dinámica) (DLS, Dynamic Light Scattering) [85], con las que se realizarán dos tipos de pruebas distintas: el análisis del tamaño de las macromoléculas suspendidas y el estudio de la agregación de partículas en función de la temperatura, ambas pruebas para las moléculas individualmente y en mezclas con su agente precipitante.



Figura 12 Sistema de DLS Zetasizer Nano S © Copyright 2016 - Malvern Instruments Ltd is a Spectris company

Para este ensayo se preparan disoluciones de las moléculas en estudio a una concentración de 1mg/ml, las cuales se centrifugaron por 10 minutos a 14000rpm, con el fin de sedimentar partículas contaminantes. Adicionalmente, se filtraron por membranas Nanotop de 0.020 micrones de poro. Las mediciones y análisis de las disoluciones en el DLS, se utiliza una cubeta de cuarzo de 20 μ L, y un equipo que cuenta

¹³ Dispersión de la luz es la separación de un rayo de luz en sus componentes debido a su diferente índice de refracción

con un diodo láser de longitud de onda de 633nm. Cada medición se mide 3 veces, en un total de 5 corridas de 10s cada una, dejando un intervalo de 5s entre cada una.

4.2.4 *Espectrometría de masas MALDI-TOF*

Los experimentos de espectrometría de masas se realizaron para determinar el peso molecular en un espectrómetro de masas Burker Esquire, utilizando la técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) la cual implica una ionización/desorción por láser inducida por una matriz. La ionización de las moléculas de las muestras se consigue tras mezclar éstas con una matriz formada por una sustancia capaz de absorber a la longitud de onda del UV. La mezcla sólida formada se irradia con un láser cuya energía es absorbida por la matriz, lo que provoca su ionización y la de la proteína. Una vez ionizadas y en estado gaseoso, las moléculas se hacen pasar por un analizador donde se produce la separación en función de la relación masa/carga. Esta técnica se usó como un criterio de pureza al no observar señales adicionales al peso molecular de las proteínas. La matriz usada fue de ácido sinapínico.

4.3 MÉTODOS DE CRISTALIZACIÓN

El experimento de cristalización de macromoléculas comienza con una disolución de la proteína relativamente concentrada (entre 2 y 50 mg/ml) y de pureza adecuada (>95%) a la cual se le añade un agente precipitante (cuya función es reducir la solubilidad de la proteína) y por lo tanto genera una precipitación controlada de la misma y ésta pueda producir precipitados amorfos o cristales.

4.3.1 *Métodos convencionales de cristalización*

4.3.1.1 *Gota Colgante*

Los métodos de cristalización se llevan a cabo en cajas de cristalización (comúnmente llamadas cajas Limbro); se colocan 2 μ L de la mezcla de la proteína y el agente precipitante en el centro de un cubre-objetos de vidrio siliconizado (para evitar que la gota se expanda) y se le añade un mL del agente precipitante en el pozo inferior (caja de cristalización), al cual previamente se le ha ajustado su pH. Este sistema es cerrado, se coloca en el borde del pozo grasa de vacío y el cubre-objetos que contiene la gota de

mezcla, se le da la vuelta y con él se tapa el pozo mencionado. Debe de tenerse en cuenta que la gota de proteína quedará suspendida en la parte interna del mismo, como se muestra en la Figura 13.

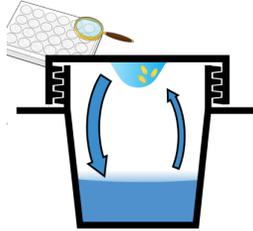


Figura 13 Representación gráfica del método de gota colgante

4.3.1.2 Gota Sedente

Esquemáticamente, el método de crecimiento que se muestra en la Figura 14. Se lleva a cabo la extracción de agua para la concentración de proteína, como en el método de gota colgante; sólo que en este método la gota se coloca en otro pozo de mucho menor dimensión, el cual está conectado por un puente donde se encuentra el agente precipitante (su volumen no cubrirá dicho puente).

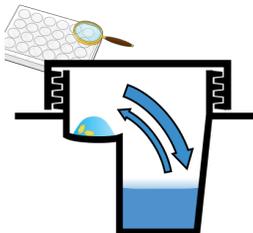


Figura 14 Representación gráfica del método de gota sedente

4.3.1.3 Batch

Batch es un tipo de método de cristalización en el que todos los componentes se combinan directamente en una disolución de proteína, sobresaturada, que luego se deja en reposo. La técnica puede ser miniaturizada mediante la combinación de las pequeñas gotas de proteína-agente precipitante en proporción 1:l [86].

Ensayos de cristalización a diferentes temperaturas

Con el fin de obtener cristales de CALB, se emplea un equipo TG40 de la compañía CENTEO (UK) de la Figura 15. Este equipo ajusta la temperatura para 8 experimentos simultáneos a 5 temperaturas diferentes (40 experimentos). Igualmente, permite

encontrar las condiciones óptimas en donde se obtienen cristales por el método de gota sedente.

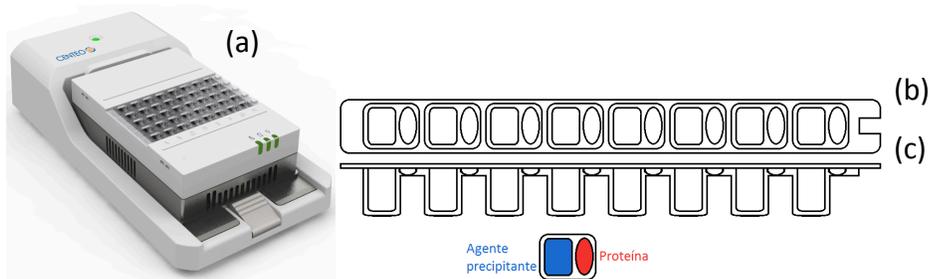


Figura 15 (a) Equipo TG40 con la forma de los insertos utilizados (b) Vista superior de los insertos (c) Vista lateral de los insertos

En este experimento se colocan 40 μ L de agente precipitante en el reservorio azul. En el de color rojo una gota de 2 μ L de una mezcla 1:1 de proteína y agente precipitante (Figura 15). A continuación, se cierra con una cinta (Duck® Brand HD Clear™, 1.88 in. x 30 yd) en la parte superior del inserto para que el sistema llegue al equilibrio y de comienzo al proceso de cristalización. El tiempo el cual se dejan crecer los cristales es de 24h, debido a que es donde se observan las tres proteínas.

4.3.2 Métodos no convencionales de cristalización

Se pueden utilizar diferentes tipos de técnicas para controlar las variables físicas o químicas que modifican el transporte de masa, los cuales influyen en la formación de los cristales de proteína. En esta sección se comentan los métodos para crecer los cristales de una forma no convencional.

4.3.2.1 Métodos para crecer cristales en geles

En el caso particular del crecimiento de cristales en disolución se han utilizado los hidrogeles¹⁴, un gel por definición es el sistema con una fase líquida que moja la fase sólida microporosa (es una red polimérica flexible). Dependiendo del medio de síntesis éstos pueden ser geles del tipo físicos (reversibles) o químicos (irreversibles). En los geles físicos (gelatina y agarosa) la polimerización tiene lugar a través de interacciones débiles entre las unidades monoméricas, consecuencia de la variación de los parámetros

¹⁴ Hidrogeles (acuosos): Red de cadenas de un polímero hidrófilo, en forma coloidal, en la que el agua es el medio de dispersión.

físicos como la temperatura y la presión. El gel preparado por métodos químicos (sílice o poliacrilamida) se debe a una reacción de condensación, la cual formaliza un enlace, volviendo la estructura estable y por lo tanto un medio irreversible.

a. Protocolo de preparación de geles

i. *Preparación de geles de agarosa (1.0%)*

Preparación de geles de agarosa (1.0%)
Se toma el volumen de la disolución a preparar (10mL) y se vierte en un vial de 20mL de capacidad.
El vial se introduce en un baño de agua a temperatura ambiente y se le añade la agarosa (0.1g) el cual se agita continuamente en una parrilla de agitación magnética. Se tapa el vial con un tapón de goma para evitar la evaporación de la disolución.
Se aumenta la temperatura hasta que se solubilice la agarosa (T=90°C) con agitación continua a 750rpm.
Alcanzada la temperatura, ésta se mantiene por 15 minutos, hasta observar la disolución completamente traslúcida.
Se baja la temperatura, quedando un poco superior a la de gelificación (24-28°C) y se mantiene a dicha temperatura hasta el momento de ser empleada
Para crecer cristales de proteínas, el gel debe de ser fresco y preparado al momento. El calentamiento continuo y superior a 95°C provoca la pérdida de las características físico-químicas del gel, dificultando la reproducibilidad de los resultados [87]

ii. *Preparación del gel de sílice a partir de metasilicato de sodio*

Los geles de sílice, se preparan a partir de una disolución de metasilicato de sodio de 1.06g/mL de densidad (Metodología de preparación gel de sílice a partir de metasilicato de sodio). Donde se mezcla en una relación 3:1 de metasilicato de sodio con una disolución 1M de ácido acético que permite la formación del gel después de 24h [88]. Una elevada cantidad de ácido acético provocaría la gelificación prematura y perdería la homogeneidad del medio.

Metodología de preparación gel de sílice a partir de metasilicato de sodio

La disolución de silicato de sodio tiene una densidad específica de 1.390 g/mL (Aldrich, 338443). Como primer paso, se baja la densidad al silicato hasta 1.06 g/mL.

La disolución se realiza teniendo en cuenta que:

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

Donde los subíndices i, f y H_2O representan las densidades iniciales y finales de la disolución de silicato y del agua a la temperatura ambiente, V_i y V_T representan el volumen de la disolución madre de silicato y el volumen total que queremos preparar.

La disolución se agita magnéticamente durante un mínimo de 20min. Ésta disolución tiene un tiempo de vida de anaquel de varios meses.

La disolución preparada se valora con ácido acético 1M, agitando continuamente con una barra magnética. El volumen de ácido empleado depende del pH final deseado. Se debe añadir el silicato sobre el ácido cuando se prepara el 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.

b. El método de acupuntura en geles (GAME)

El método de acupuntura en geles (GAME) combina las propiedades de transporte difusivo del agente precipitante en los geles con las de los medios capilares. Ésta técnica permite la obtención de monocristales de macromoléculas biológicas en pequeños capilares transparentes a los rayos-X. Este método se usa debido a que el gel sirve como membrana y soporte para el capilar. Las variables para este método se muestran en la Figura 16. El GAME tiene varias ventajas, ya que hace una búsqueda automática de las condiciones óptimas de cristalización y la posibilidad de llevar los datos de colecta a de datos de difracción sin la necesidad de la manipulación de los cristales fuera de los capilares.

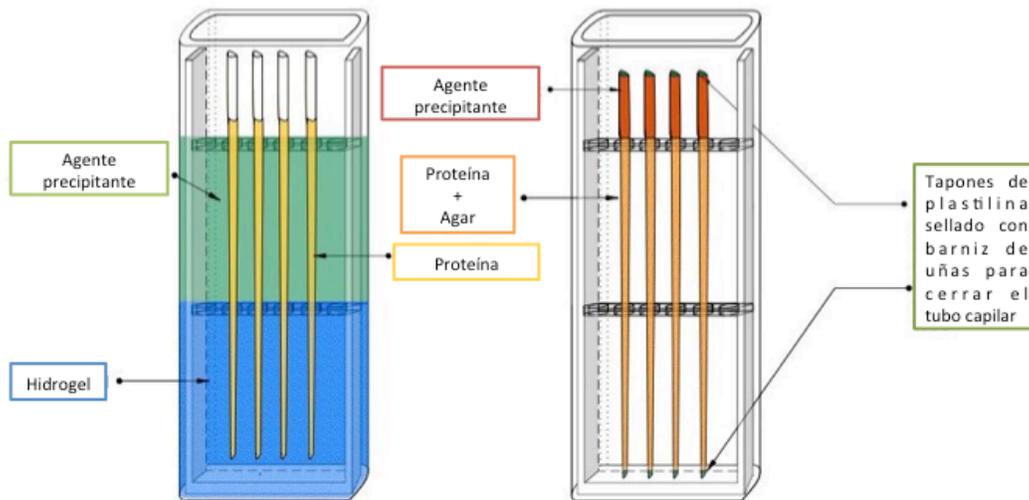


Figura 16 Método GAME (izquierda) y método de contra difusión en cajas de GCB (derecha).

Preparación del sistema GAME

Preparación del sistema GAME

La primera parte consiste en la preparación del hidrogel de metasilicato de sodio. Teniendo en cuenta la resistencia mecánica del gel, debe de ser suficiente para mantener los capilares verticales.

Se vierte el sol en una caja de GCB (Granada Crystallization Box) y se deja gelificar.

Se llenan los capilares con la disolución de proteína y se sellan por el extremo opuesto.

El sellado se realiza con arcilla para moldear (Hampton Research, HR4-326), para sellar herméticamente

Se coloca un poco del agente precipitante al gel, antes de pinchar con los capilares de manera perpendicular la superficie de este, aproximadamente 1cm.

Se añade el agente precipitante sobre el gel que soporta los capilares.

Finalmente, se cierra la GCB y se cubre con PARAFILM® para evitar la evaporación.

4.3.2.2 Cristalización electro-asistida

Se debe recordar que este método está basado en electroquímica, pero el proceso no es una electrocristalización, debido a que no hay una reacción oxido-reducción ocurriendo entre la proteína y el electrodo. El término asistida está incluido en el nombre porque las técnicas que implican campos eléctricos requieren conocer previamente las

condiciones de cristalización de proteínas. El campo eléctrico sólo tiene efecto en la electromigración, la velocidad de nucleación, el tiempo de inducción necesario para obtener estos cristales, pero no genera el proceso de cristalización.

Por lo que en este trabajo analiza la influencia de los campos eléctricos internos en la cristalización de proteínas, al aplicar diferentes tipos de corriente (alterna y directa) la cual se denota la diferencia de este tipo de corrientes en el anexo de “Corriente eléctrica: directa y alterna”.

a. Celda de electrocristalización de proteínas

Se utiliza un dispositivo de electrocristalización inspirado por el propuesto por Sánchez-Puig y colaboradores [11] donde dos electrodos (vidrio-ITO) se colocan en paralelo entre sí. La celda se prepara utilizando un marco con la configuración del método de difusión de vapor como se muestra en la Figura 17, hecho de material de caucho vulcanizado, sellado con grasa de vacío de modo que el marco de goma está perfectamente fijado al ITO para evitar alguna fuga.

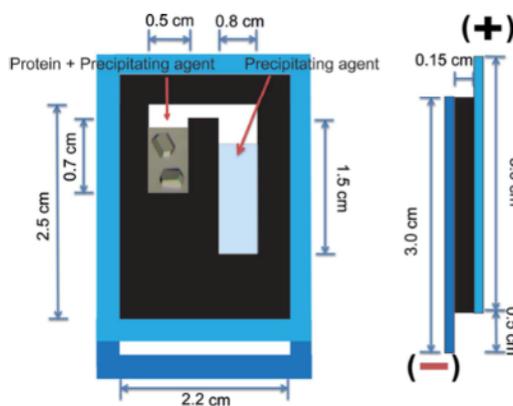


Figura 17 Diseño experimental del dispositivo eléctrico utilizado para la cristalización de proteínas utilizando una configuración de difusión de vapor. (A) Vista frontal. (B) Vista lateral.

La celda de crecimiento se puede cerrar después mediante el uso de una pistola de silicona caliente. Las superficies recubiertas con ITO son colocados hacia el interior, uno frente al otro. Cada uno de los electrodos de ITO se desplaza por 0.5cm uno del otro, con el fin de proporcionar una conexión eléctrica segura de los caimanes de los electrodos (ánodo / cátodo) cuando se aplica una corriente. Cada celda tiene capacidad de volumen de aproximadamente 100µL de agente precipitante (reservorio más grande)

y 50 μL de proteína más agente precipitante (reservorio más pequeño). Además, se utiliza un volumen de 200 μL (50 μL por pozo) para la configuración de *batch* cuando se aplica a 4 muestras al mismo tiempo (Figura 18).

b. Electrodo plano de vidrio-ITO.

Se utilizan electrodos planos, es el sustrato de vidrio con un depósito de óxido de indio estaño, ITO ($\text{In}_2\text{O}_3: \text{Sn}$), de 3.0 x 2.5 cm^2 con una resistividad de alrededor de 4-8 Ωsq^{-1} (Delta Technologies, Minnesota, USA). Para preparar algunas experiencias de menor volumen, se describen las metodologías para realizar la manipulación de ITO.

i. Metodología para cortar electrodos de ITO

Metodología para cortar electrodos de ITO

Se limpia la superficie de vidrio/ITO con acetona y con un multímetro se identifica cuál es la parte conductora del vidrio/ITO. Una vez identificada, se coloca boca abajo sobre un pedazo de Parafilm®. Para ayudar a delimitar el trazo, se coloca cinta de aislar y se adiciona un poco de aceite mineral. Se presiona la rueda cortadora sobre el vidrio y se aplica presión fija y uniforme mientras se corta a lo largo de la línea marcada. Esto crea una pequeña fisura en el vidrio. Se aplica una fuerza a lo largo de la fisura, fracturando el vidrio y creando dos piezas.

ii. Metodología para lavar electrodos de ITO

Metodología para lavar electrodos de ITO

Para retirar el exceso de aceite mineral del vidrio/ITO fracturado, se hace uso de un papel para limpiar lentes objetivos. Después, el sustrato se sonica en un baño Ultrasónico BRANSON 3510, empleando un vaso de precipitado que contendrá el disolvente requerido para la limpieza. El vidrio/ITO se sumerge y sonica en un vaso de precipitado con acetona, isopropanol, y agua desionizada durante quince minutos por cada lavado

c. Tipo de corrientes aplicadas

i. *Corriente Directa (DC)*

El sistema es conectado a un aparato de corriente directa (DC), Potenciostato/Galvanostato, VIMAR (Figura 18b), el cual suministra una corriente directa en un rango de 2-6 μ A.

ii. *Corriente Alterna (AC)*

Para la corriente alterna de un rango de 2 a 8Hz se utiliza un dispositivo KWD-808 I Multi-purpose health device (Figura 18c); su uso es recomendado para tratamiento de acupuntura.

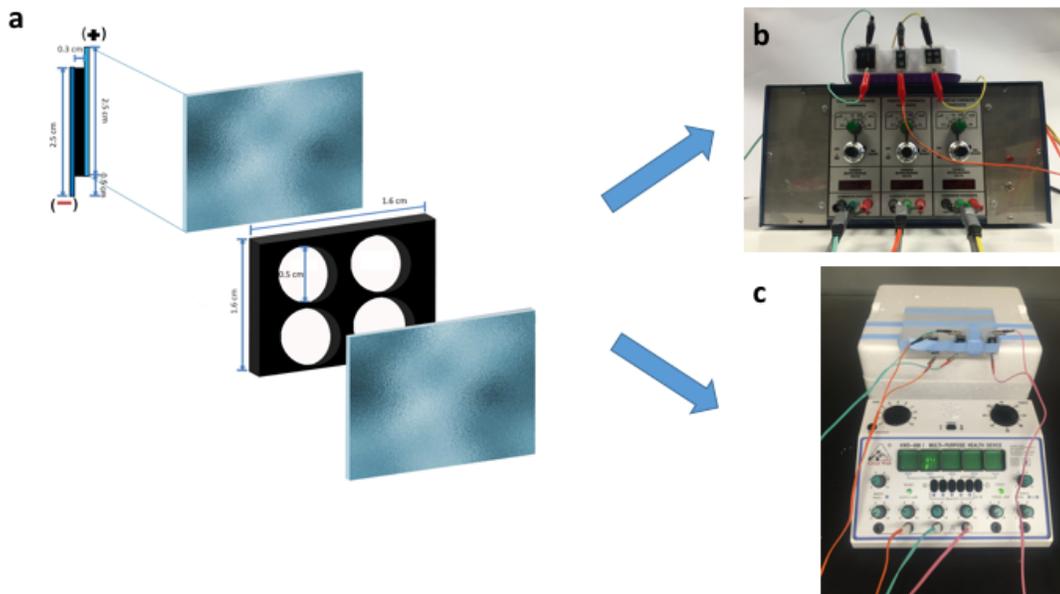


Figura 18 (a) Se muestran las dimensiones de la celda de crecimiento modificada. Para el método de cristalización por *batch* usando un campo eléctrico que puede ser aplicado a cuatro muestras al mismo tiempo en dos tipos de corriente: (b) DC o (c) AC.

Durante la nucleación del DC o AC se aplica la corriente al encender por primera vez el equipo. Después de 48 h los núcleos están fijos en la superficie de los electrodos de ITO. En la celda de crecimiento la temperatura se debe de mantener constante al durante la realización del experimento.

4.3.2.3 Campos magnéticos

Para estudiar el efecto del campo magnético en la cristalización de proteínas se coloca el montaje experimental como se muestra en la Figura 19 (a) en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de (16.5T) de Bruker, el cual contiene un magneto marca Ascend como se muestra en la Figura 19. Para este tipo de instrumentos solo es posible utilizar tubos cilíndricos de 70 mm de longitud y 5mm de diámetro interno (WG-1242-8), dentro de ellos se colocan micro capilares de 50 μ L (Sigma P1049) que contienen los experimentos.

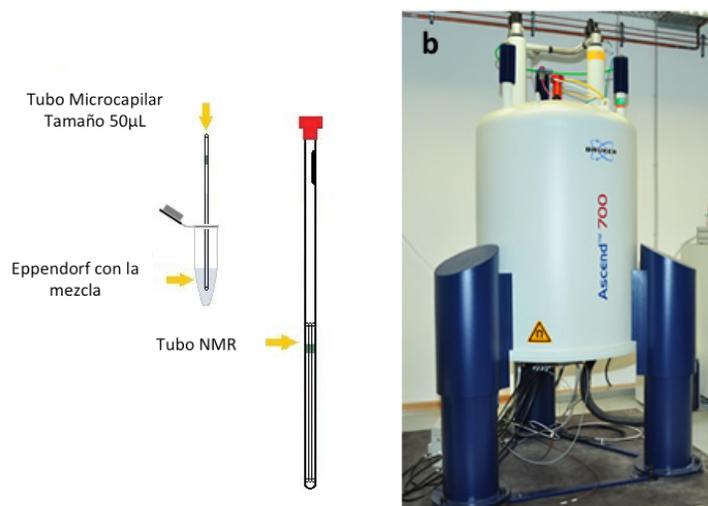


Figura 19 (a) Esquema del montaje experimental para preparar la muestra y (b) NMR 700 MHz de un campo magnético de 16.5 T.

Para la serie de experimentos se trabajan en *batch* con el fin de estudiar el efecto que tiene un campo magnético homogéneo y constante sobre la nucleación y morfología de los cristales de proteína. El experimento se realiza en un Eppendorf se hace la mezcla 1:1 de la proteína y agente precipitante, y se llenan por capilaridad¹⁵ los microcapilares. Para sellar ambos extremos se utiliza arcilla de montaje (Hampton research, HR4-326). Una vez sellados, los tubos capilares se introducen en un tubo de NMR y se dejan durante 48 horas bajo la influencia del campo magnético de equipo ($B = 16.5$ T).

Todos los experimentos en NMR son estáticos (no se hace girar la muestra), se controla la temperatura desde la unidad de control de NMR, que por lo general va desde

¹⁵ Propiedad de los líquidos que depende de su tensión superficial la cual, a su vez, depende de la cohesión del líquido y que le confiere la capacidad de subir o bajar por un tubo capilar.

291 hasta 293 K. La muestra se deja en el campo magnético durante todo el proceso de crecimiento de cristal que puede tomar dos o más días. Cuanto más largo el tiempo, mayor es el tamaño y la calidad de los cristales. Una vez que el experimento ha terminado, el tubo de RMN se recupera del imán y los capilares se extraen con mucho cuidado. Después de haber sido extraídos, los capilares se cortan en ambos extremos con el fin de recoger los cristales. Este corte se lleva a cabo con una cerámica de corte de vidrio (Hampton research, HR4-334). Una vez realizados los cortes de las pipetas capilares, se aplica una pequeña presión de aire utilizando un tubo de látex acoplada a una jeringa de plásticos de 1 ml. La pequeña presión de aire aplicada es suficiente para expulsar la disolución con los cristales y unos pocos microlitros de un licor madre o crioprotector, ya sea en una placa de vidrio de dos ó nueve pozos. Si los cristales se unen a las paredes de los capilares, se puede cortar el capilar con *Microtools* para recuperarlos.

Hay dos formas en que los datos de los cristales se pueden recoger directamente en el haz de rayos X, uno de ellos es el montaje en tubos capilares de borosilicato a temperatura ambiente, y el otro es montándolos (crio-protegidos) en los *loops*¹⁶, seguido de un enfriamiento rápido de nitrógeno.

4.4 COLECTA DE DATOS VÍA RAYOS-X

4.4.1 Crio-protección de las proteínas modelo

Para tener una mejor colecta de datos más larga, se mantiene una baja temperatura en radiación sincrotrón, se toma bajo un flujo de nitrógeno gas manteniendo la temperatura a 100K (así como en los “*loops*” convencionales de 100 a 300 micras de tamaño para capturar los cristales). El agente precipitante de la GI trabaja perfectamente como su crio-protector. Para la Lisozima, se utiliza una mezcla de 30%

¹⁶ Son lazos de nylon de diferentes micras de diámetro, unidos a microtubos huecos de acero inoxidable que se utilizan para montar, congelar y asegurar el cristal durante los procedimientos criocristalográficos y la colecta de datos de rayos X.

(v/v) PEG-1000 con licor madre¹⁷ de NaCl (agente precipitante) es usado como agente crio-protector [89].

Se ha encontrado que a altas concentraciones de PEG-1000 los cristales son poco eficientes dado que se dañan y disuelven, mientras que los anillos de hielo aparecen al utilizar concentraciones más bajas. Para los experimentos en temperatura ambiente, la colección de datos se lleva a cabo en tubos capilares [90] o directamente sobre el aparato de cristalización en el difractómetro (colecta de datos *in situ*). Es importante remarcar que a los experimentos de temperatura ambiente para la colecta de datos es posible realizarla a alta velocidad con un detector de área Pilatus 2M de píxeles [91].

4.4.2 Análisis de difracción de rayos-X

Los análisis de Difracción de rayos-X (XRD) se han llevado a cabo en el *beamline*¹⁸ (XRD1) de Elettra Sincrotron, Trieste (Italia) [92]. Se colectaron todos los *dataset*¹⁹ de los cristales crecidos bajo la presencia de un fuerte campo magnético de 16.5 T a temperatura ambiente (25°C) con una longitud de onda monocromática 0.77491 Å (16 keV) con un tamaño de spot de 100x100 μm² y un sistema detector de área de pixel-hibrido PILATUS 2M. Los cristales crecidos a temperatura ambiente se prepararon en los mismos tubos capilares de vidrio en el que crecieron. A fin de evitar la absorción de rayos X en el cristal, tiene que ser separado de las aguas madres. Esto se hace usando pequeños palillos de papel filtro que ayudan a mantener el licor madre en ambos lados del capilar, por lo que mantiene la humedad del cristal sin estar directamente en contacto con el licor madre. Un segundo experimento se lleva a cabo utilizando la celda de electrocristalización (como se muestra en la Figura 36) montado en una cabeza del goniómetro estándar con un marco a la medida. Los datos colectados a temperatura ambiente, usando una longitud de onda monocromática de 0.700 Å tiene un límite de absorción debido al vidrio-ITO. El tercer experimento, está enfocado en colectar difracciones de rayos-X de cristales de proteínas grandes los cuales han crecido en presencia de fuertes campos magnéticos. Estos permiten colectar tres o cuatro *dataset*

¹⁷ Un licor madre es una disolución concentrada a partir de la cual se obtiene el producto por evaporación y/o cristalización.

¹⁸ Camino que conduce de un acelerador cíclico a la estación experimental (en las fuentes de luz de sincrotrón).

¹⁹ Conjunto de datos que han sido colectados de un experimento.

de un solo cristal debido a su tamaño, y la explotación del pequeño haz ajustable disponible en las modernas líneas de luz de sincrotrón.

Se duplicó la colecta de datos de los cristales crecidos bajo la presencia de un fuerte campo magnético de 16.5 T, además de los experimentos de Glucosa Isomerasa en presencia de ILs en el *beamline* BL 14-1 del sincrotrón SLAC-SSRL (Stanford California, USA), con una longitud de onda monocromática de 0.95 Å (6 keV) y un tamaño de spot de 50x80 μm^2 usando un detector MARmosaic CCD 325. Los cristales se deben crioproteger adecuadamente antes, utilizando la disolución de depósito o el crioprotector, dependiendo de las necesidades. Los cristales se sumergen en nitrógeno líquido antes de la irradiación.

4.5 ESTUDIOS ESTRUCTURALES

4.5.1 Procesamiento de los datos de difracción

El procesamiento de los datos obtenidos se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid, España) bajo el asesoramiento del Dr. Antonio Romero.

El procesamiento de los datos de difracción es el paso en el cual, a partir de las imágenes de difracción se obtiene una lista de reflexiones, cada una con sus intensidades y sus desviaciones estándar. Fundamentalmente este proceso se puede dividir en tres etapas:

- i. Determinación de la orientación del cristal, los parámetros de celda y su posible grupo espacial.
- ii. Generación de un conjunto de reflexiones (*dataset*) e integración todas las imágenes, es decir, cada señal (*spot*) de cada una de las imágenes se le asigna un índice de Miller y una intensidad/desviación estándar.
- iii. Escalamiento de las reflexiones medidas en cada imagen y es promediada de las equivalentes por simetría.

El procesamiento de los datos se realiza utilizando HKL 2000 [93] o XDS [90, 94] combinado con POINTLESS, y el escalado usando SCALA [95] de la suite CCP4 v.6.1.2 (Collaborative Computational Proyecto 4, Número 4, 1994) [96].

4.5.2 Resolución estructural

El objetivo de estudio de difracción de rayos-X es determinar la densidad electrónica $\rho(x$ y $z)$ para cada punto de la celda unidad y a partir de ésta construir un modelo tridimensional. Los módulos de los factores de estructura que representan las amplitudes de los haces difractados, se obtienen directamente a partir de las intensidades medidas en el detector. En cambio, las fases no se pueden obtener experimentalmente, por lo que hay que recurrir a distintos métodos para resolver lo que se ha denominado el “problema de las fases”. Si se pudiera tener algún conocimiento *a priori* de la estructura o densidad electrónica se podría obtener un valor para las fases, este es el fundamento de todos los métodos para resolver una fase [97].

En este trabajo se utiliza el método de reemplazo molecular y puede hacer con PHASER-MR [98] en PHENIX [99], Molrep-auto MR [100] o MrBUMP [101], y el mapa de inspección se realiza con COOT [102]. Las rondas posteriores de la construcción de modelos y refinamiento se realizan con PHENIX-REFINE [103] y las imágenes se procesan en PyMOL [104] para ser publicadas.

4.5.3 Afinamiento de estructuras

El afinamiento de una estructura es el proceso por el cual se ajustan los parámetros de la estructura, es decir la coordenadas de cada átomo (x y y) y sus factores térmicos B^{20} (en los archivos PDB comúnmente son vistos como una medida de la movilidad (local) en la macromolécula) [105] para optimizar el acuerdo entre las observaciones y las predicción a partir del modelo. El refinamiento se realiza utilizando Refmac5 [106].

²⁰ El desplazamiento de los átomos de su posición media, en una estructura cristalina disminuye la intensidad de los rayos X dispersados. El desplazamiento puede ser el resultado de vibraciones atómicas dependientes de la temperatura

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A great advantage of X-ray analysis as a method of chemical structure analysis is its power to show some totally unexpected and surprising structure with, at the same time, complete certainty.

— Dorothy Crowfoot Hodgkin

'X-ray Analysis of Complicated Molecules', Nobel Lecture (1964).



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

En el presente capítulo se discutirán los resultados obtenidos más relevantes en esta investigación, los cuales se han dividido para su comprensión en cuatro temas principales:

- 5.1 Caracterización fisicoquímica
- 5.2 Métodos convencionales de cristalización
- 5.3 Métodos no convencionales de cristalización
- 5.4 Efecto estructural de las proteínas en los campos electromagnéticos aplicados

5.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

5.1.1 SDS-PAGE

Para este caso se utilizó como guía de estimación del peso molecular el marcador BLUEstain™ Protein, el cual se obtiene en el carril 1 del gel, en donde se tiene un rango amplio de pesos moleculares, desde 245 a 11kDa (Figura 20). Los carriles 2 y 3 muestran la Lisozima (negro y rojo), éstas tienen dos bandas, la principal que contiene la proteína se encuentra por encima de 11kDa, acorde con lo reportado en la literatura (14.4 kDa). La segunda banda se ve en la parte superior de la banda de 25kDa, que puede ser asociada a una impureza de menor proporción, conclusión a la que se llega por el grado de saturación de la tinción.

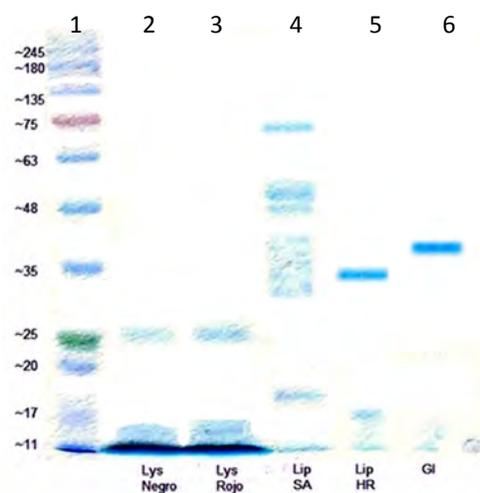


Figura 20 Gel SDS-PAGE de Lisozima, Lipasa B de SA (Sigma-Aldirch) y HR (Hampton Research) y Glucosa Isomerasa (Hampton Research)

Para el carril 4 se encuentra la proteína CALB de Sigma (65986), esta muestra contiene muchas impurezas, además que la banda de mayor intensidad se encuentra cerca de 75kDa, la cual no corresponde al peso molecular de la Lipasa (33kDa) reportado en la literatura. Si se compara el cuarto y quinto carril, se observa que CALB de Hampton Research (HR7-099) concuerda con un peso de 35kDa (la banda se ve deformada por el exceso de proteína en la muestra), esta muestra cuenta con un mínimo de impurezas, razón por la cual se utilizó en las muestras de cristalización.

Para el sexto carril podemos observar que la Glucosa Isomerasa está entre los marcadores de 48 y 35kDa (igualmente, se aprecia una saturación de la muestra) y corresponde al peso reportado en la literatura de 43kDa. Se nota un corrimiento en las bandas inferiores, pero este puede ser generado en el proceso de desnaturalización de la proteína al colocar el buffer de carga en la muestra.

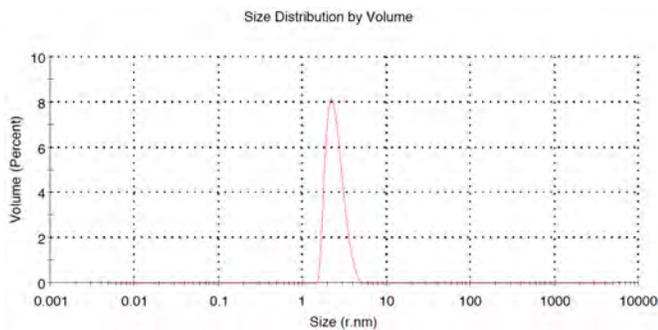
La utilidad de este tipo de caracterizaciones es saber si la muestra que se va a cristalizar está totalmente pura. Podemos considerar que se pueden trabajar con los tres tipos de proteínas, con excepción de CALB de Sigma la cual se debe de purificar para que no se tenga otros factores que intervengan negativamente en la cristalización de la misma (el proceso no se realizó en este trabajo).

5.1.2 *Análisis de dispersión dinámica de luz*

Los análisis de DLS se han utilizado para medir el radio hidrodinámico (R_H) de las proteínas y la intensidad de luz dispersada para determinar su peso molecular (PM), hasta el momento se han podido realizar para las proteínas modelo, donde la HEWL y la GI, muestran unos valores de R_H de 2.921nm y 5.36nm, respectivamente. Al procesar los datos con el software del Zetasizer version 7.10, se ha podido determinar que sus PMs corresponden a 14.2 y 42.7kDa, los cuales son muy similares a los reportados en la literatura (PM_R) como se muestra en la Figura 21.

El índice de polidispersidad (IPD) se utiliza para describir la anchura de la distribución del tamaño de partícula. Como regla general, las muestras con $IPD \leq 0.20$ se consideran

monodispersas. Comparando con los datos obtenidos las muestras son polidispersas, las cuales estan constituidas por una interacción de dos o más proteínas.



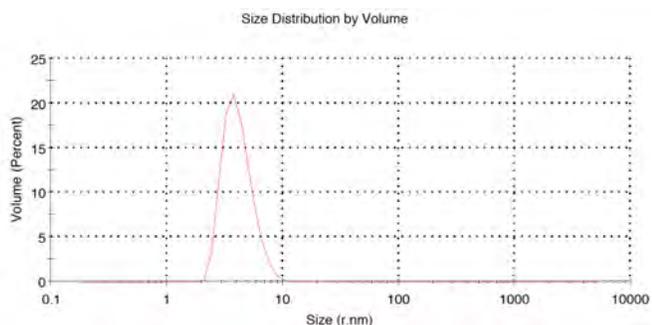
HEWL:

IPD = 0.529

$R_H = 2.921 \text{ nm}$

PM = 14.2 kDa

$PM_R = 14.2 \text{ kDa}$



GI:

IPD = 0.25

$R_H = 5.36 \text{ nm}$

PM = 42.7 kDa

$PM_R = 43 \text{ kDa}$

Figura 21 Gráficas de dispersión dinámica de luz de HEWL y GI.

5.1.3 Espectrometría MALDI-TOF

Se analizaron un par de muestras utilizadas para la cristalización con el fin de comprobar de una manera específica la pureza de las mismas. En la Figura 22 se muestran los espectros de MALDI-TOF de la GI de color azul y CALB de color negro, los cuales tienen pesos reportados de 43 y 33kDa respectivamente. Ambos espectros muestran un pico base $[M]^+$ con relaciones masa/carga de GI a 43.55kDa y CALB a 34.6kDa. El resto de los picos que pueden atribuir a los fragmentos $[M]^{2+}$ por una doble ionización, este es un caso característico en la espectrometría MALDI-TOF y la señal $2[M]^+$ se asocia a la interacción de un ión y una proteína sin ionizar dando un peso al doble del que se ve en el pico base.

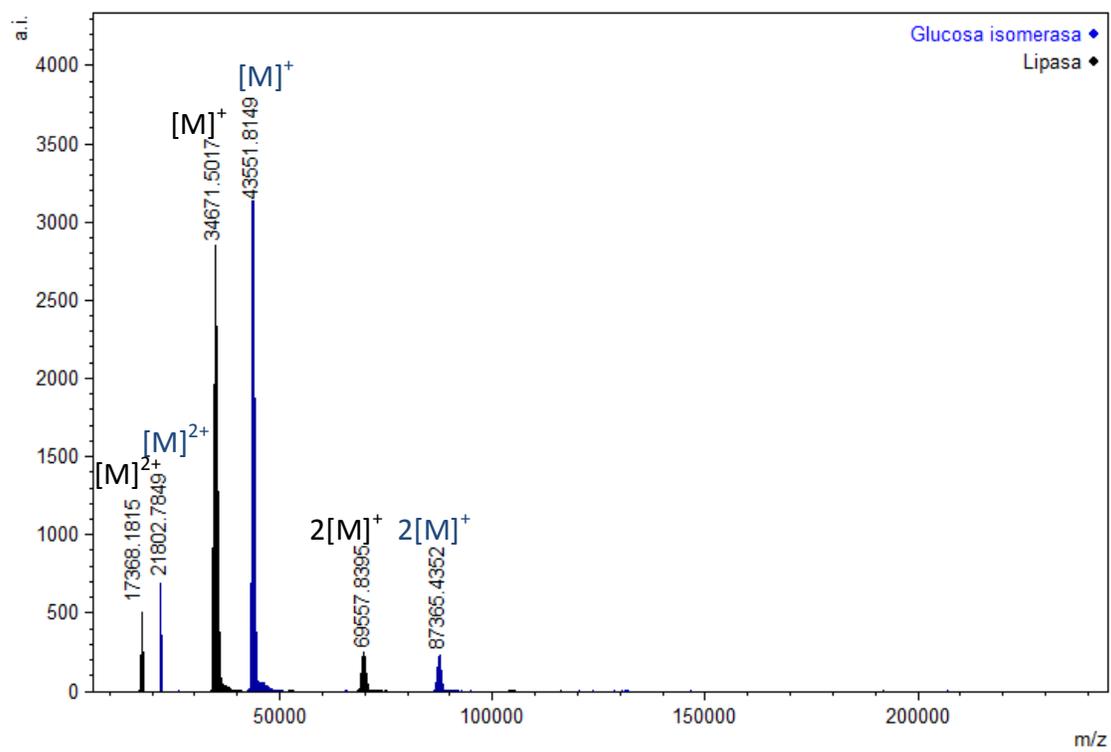


Figura 22 Espectro de MALDI-TOF masas de CALB y GI

5.2 MÉTODOS CONVENCIONALES DE CRISTALIZACIÓN

Como se mencionó anteriormente se debe de contar con las condiciones de cristalización estandarizadas de la Lipasa B, debido a que es el caso de estudio de este proyecto. Se describirán los resultados de las experiencias desarrolladas y los frutos generados en esta sección.

5.2.1 *Cristalización de CALB en medio acuoso*

Para cristalizar CALB (Hampton Research, HR7-099) sin previa purificación se utilizaron una serie de distintos agentes precipitantes, por el método de gota sedente en las placas de 96-pozos (SWISSCI). De las condiciones reportadas en la literatura, ninguna tuvo el éxito esperado, tomando en cuenta que la metodología reportada es gota colgante, y que algunos de los PDB de esta proteína muestran que ha sufrido mutaciones, incubaciones o alguna otra modificación, solo se ha podido utilizar CALB en su forma nativa. Por lo que se prosiguió a cristalizar CALB con la disolución de Tacsimate (Hampton Research), la cual está compuesta de varias sales de ácidos orgánicos, mencionado anteriormente. Se ajustó el pH con una disolución 1M de hidróxido de sodio. Se partió de una disolución stock de CALB (46.25mg/mL) para poder estudiar el efecto que tiene la variación de pH de 4-9 a 22 °C.

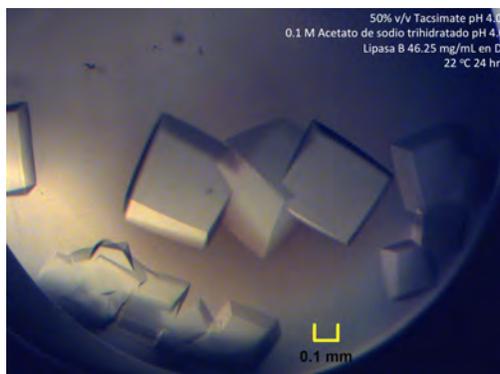


Figura 23 CALB (46.25mg/mL), al 50% v/v de Tacsimate pH 4 con 0.1M de acetato de sodio trihidratado pH 4 a 22°C por 24h.

Los mejores resultados obtenidos para los cristales de CALB (46.25mg/mL), han sido los que han utilizado como agente precipitante al 50% v/v de Tacsimate pH 4 con 0.1M de

acetato de sodio trihidratado pH 4 a 22°C por 24 horas, los cuales se muestran en la Figura 23.

Barrido de temperatura

Después de encontrar las condiciones de cristalización, se realizó una búsqueda de temperatura, la cual se varió desde 14, 16, 20 a 22°C.

Para hacer una comparación de cómo afecta la temperatura se capturaron imágenes con la misma escala (para que fueran comparables) las cuales se muestran en la Figura 24. La diferencia de crecimiento es significativa, pues para $T = 14^{\circ}\text{C}$ se tienen pocos cristales, debido a la mínima formación de núcleos, estos son los más pequeños en comparación de las otras temperaturas. En $T = 16^{\circ}\text{C}$ se cuenta con cristales más grandes en forma de placas, esta forma no es tan uniforme como los demás. Para la temperatura de 20°C se obtienen cristales de mayor tamaño y volumen. Si se compara con 22°C , esta cuenta con mayor formación de núcleos y por lo tanto se tiene mayor número de cristales, pero de menor tamaño.

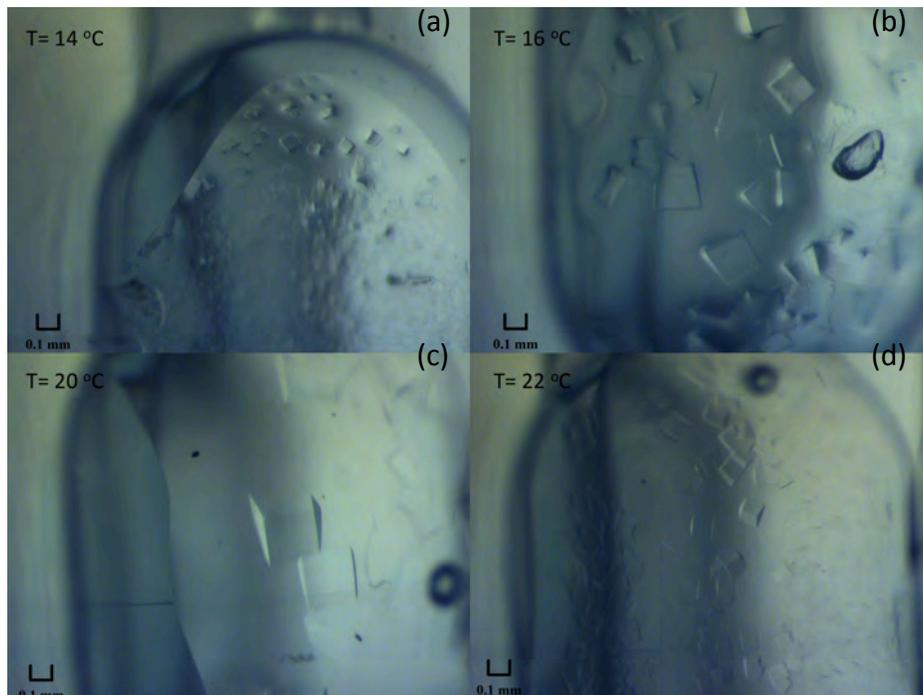


Figura 24 Efecto de la temperatura en la cristalización de CALB (46mg/mL), al 50% v/v de Tacsimate pH 4 con 0.1M de acetato de sodio trihidratado pH 4 por 24h a diferentes temperaturas (a) $T = 14^{\circ}\text{C}$, (b) $T = 16^{\circ}\text{C}$, (c) $T = 20^{\circ}\text{C}$ y (d) $T = 22^{\circ}\text{C}$

Hasta el momento se pueden realizar las siguientes conclusiones con respecto a las condiciones de cristalización de CALB:

*CALB ($\approx 46.00 \text{ mg/mL}$) se disuelve en agua mili-Q filtrada en una membrana de Nylon de $0.20 \mu\text{m}$.
Agente precipitante: 50% v/v de Tacsimate pH 4 con 0.1M de acetato de sodio trihidratado pH 4
Temperatura: 20°C
Duración: 24h
Método: Gota sedente*

En esta parte se es importante subrayar la importancia que tiene el pH y la temperatura, que modifican considerablemente la solubilidad de CALB, para su cristalización.

5.2.2 Aplicación de los líquidos iónicos.

5.2.2.1 Agentes precipitantes para CALB

En el estudio del efecto de los ILs en la cristalización de CALB ($\approx 45 \text{ mg/mL}$), se colocó una mezcla 1:1 de la proteína con los diferentes ILs a emplear (TEAB, EAN, $[\text{C}_2\text{mim}]\text{OAc}$ y $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ de Hampton Research) como agentes precipitantes²¹. Nuevamente, se utilizó la metodología de gota sedente descrita anteriormente. Igualmente, la temperatura se ajustó para cada experimento en el TG40 ($T = 12, 14, 16, 18, 20$ y 22°C).

Se observó que, en todos los experimentos realizados, la proteína precipita. Sin embargo, se encontró un indicio de la cristalización (Figura 25 (a)), la cual se confirmó con un Prisma de Nicol²² (Figura 25 (b)), ya que al girarlo noventa grados se observa el cambio de color del cristal, debido a la birrefringencia del medio. Este experimento marca la evidencia de la presencia de un cristal de CALB en $[\text{C}_2\text{mim}]\text{OAc}$. Posiblemente, la proteína necesite un cambio menos brusco de polaridad en medio acuoso, para no afectar la estructura (desnaturalizarla), y mantener las interacciones proteína-disolvente y poder disolver la proteína.

²¹ Los agentes precipitantes se definen como aquellas especies que son capaces de precipitar una proteína soluble. Las interacciones aumentan con respecto a la proteína-proteína.

²² Es un tipo de prisma óptico polarizador, es decir, crea un haz de luz polarizada a partir de un haz de luz sin polarizar. Se puede conseguir la polarización con materiales cristalinos que tienen diferentes índices de refracción en diferentes planos del cristal. Tales materiales se dice que son birrefringentes o de doble refracción.

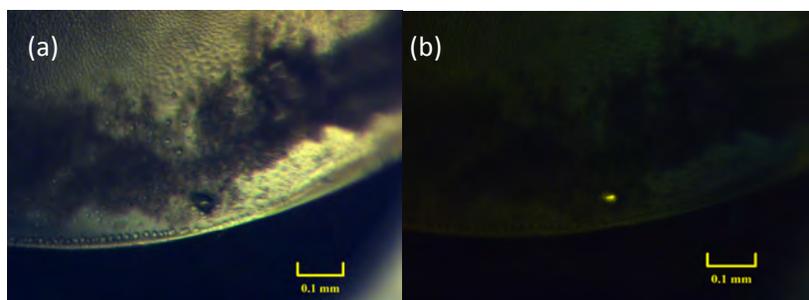


Figura 25 (a) CALB (40 mg/mL) en $[C_2mim]OAc$ a $16^\circ C$ por 24h. (b) se muestra con el Prisma de Nicol.

Para poder cristalizar CALB se requieren ILs que interaccionen con las proteínas de una manera similar al agua, es decir, que puedan disolverla, lo cual depende de la propiedad del anión de aceptar puentes de hidrógeno. Se ha reportado que CALB se disuelve en $[BMIM]^{23}$, acetato de etilo, iones lactato y citrato, que son mejores aceptores de enlaces de hidrógeno y también son ambientalmente más aceptables que los aniones fluorados [73].

5.2.2.2 Aditivos de cristalización para CALB

Se partió de CALB a una concentración de 45.4 mg/mL. Para realizar el experimento de aditivos²⁴ de cristalización, en el cual se varió el porcentaje de ILs (TEAB, EAN, $[C_2mim]OAc$ y $[BMIM]BF_4$ de Hampton Research) en el agente precipitante (Tacsimate pH=4 al 50%v/v con acetato de sodio 0.1M). Se utilizaron proporciones de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35 y 40 %, valores ajustados al volumen final.

Para preparar 20 μL de volumen final, los cálculos se han realizado al doble de concentración. Así, al mezclar la proteína con el agente precipitante (relación 1:1) la concentración queda a la mitad. De esta manera, la concentración final de proteína es de 22.7 mg/mL y los ILs están en múltiplos de 3 y 10%, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9 Proporción de agente precipitante y ILs para su uso como aditivos

V_o (%)	6	9	12	15	18	21	24	27	30	60	70	80
Vol IL (μL)	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4	9.6	10.8	12	14	16
Vol Tc (μL)	18.8	17.6	16.4	15.2	14.0	12.8	11.6	10.4	9.2	8.0	6.0	4.0
V_f (%) al 1:1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	35	40

V_o (%)= Porcentaje de volumen inicial de IL

²³ 1-butil-3-metilimidazolio

²⁴ Los aditivos son aquellos solutos añadidos que mejoran la cristalización. Se afectan las interacciones intermoleculares específicas, de modo que las formadas son más definidas y logran un estado sólido más ordenado o de mayor dimensión.

Vol IL= Volumen de IL en μL
 Vol Tc= Volumen Tacsimate
 V_f (%) al 1:1= Volumen final después de la mezcla 1:1

La Tabla 10, muestra las condiciones de cristalización utilizadas, en las columnas se tiene un aumento progresivo de aditivo y las filas se muestran los diferentes IL. El experimento que se realizó fue en placas de cristalización de gota sedente de 96-pozos (SWISSCI), a $T = 10$ y 18°C (azul y naranja, respectivamente). Se muestran la serie de experimentos positivos con color en la representación de placas de 96-pozos (SWISSCI) en la Figura 26. Los primeros cristales fueron observados al pasar 24h.

Tabla 10 Condiciones de cristalización de CALB en presencia de ILs

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-TEAB	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
C-EAN	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
E-[C₂mim]OAc	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
G-[BMIM]BF₄	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%

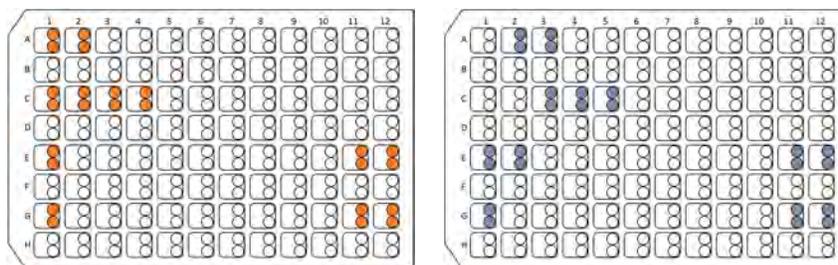
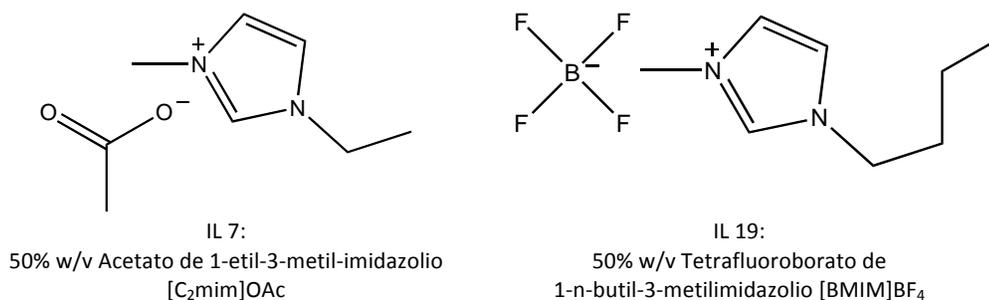


Figura 26. Experimentos positivos de CALB en ILs a diferentes temperaturas 18°C (naranja) y 10°C (azul) en placas de 96-pozos (SWISSCI)

La Figura 27 muestra las diferencias estructurales que tienen dos diferentes ILs ($[\text{C}_2\text{mim}]\text{OAc}$ y $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$) en que ha cristalizado con CALB, ambos son derivados de imidazoles, donde la diferencia principal radica en la longitud de la cadena alifática. La concentración de los ILs como aditivos de cristalización, influye en la fuerza de las interacciones intermoleculares específicas entre proteínas-IL y proteínas individuales.

Figura 27 Estructura de [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄



Los resultados indicaron que los ILs utilizados, no producen cambios en el *hábito cristalino*²⁵ (de CALB con Tacsimate), pero influyen en el aumento significativo del tamaño del cristal. El resultado se puede asociar a la formación de menor número de núcleos debido a su cercanía a la zona de meta estabilidad, en donde se propicia el crecimiento de los cristales.

Los ILs a base de imidazol, al estar excluidos de la superficie de la proteína, tienden a estabilizar a las mismas y promover la precipitación salina²⁶ (Salting-out). Por lo tanto, modificar las interacciones intermoleculares, mejora el plegamiento de proteínas y suprime la agregación.

En la Figura 28, se muestran cristales a diferentes proporciones de IL, [C₂mim]OAc al 3% y [BMIM]BF₄ al 18%. Estos casos han sido seleccionados, debido a que tienen un aumento considerable de tamaño, cuando se han crecido a menor temperatura. Esto se asocia al aumento de solubilidad de CALB a menores temperaturas, esta se ve favorecida por la presencia de ciertos ILs, aumentando las interacciones proteína-disolvente.

²⁵ El hábito cristalino describe el aspecto macroscópico que presentan los minerales. El hábito se encuentra condicionado por factores como las condiciones ambientales que había mientras se formó. La estructura cristalina también influye sobre el hábito.

²⁶ Fenómeno físico-químico basado en las interacciones electrolito-no electrolito, en el cual a altas concentraciones salinas (o alta fuerza iónica) algunos solutos como proteínas precipitan debido al aumento de las interacciones hidrofóbicas entre ellos.

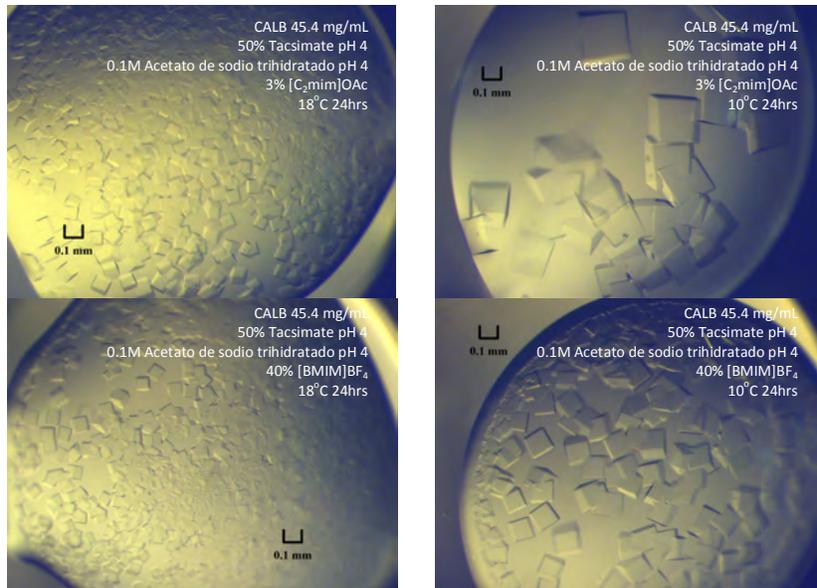


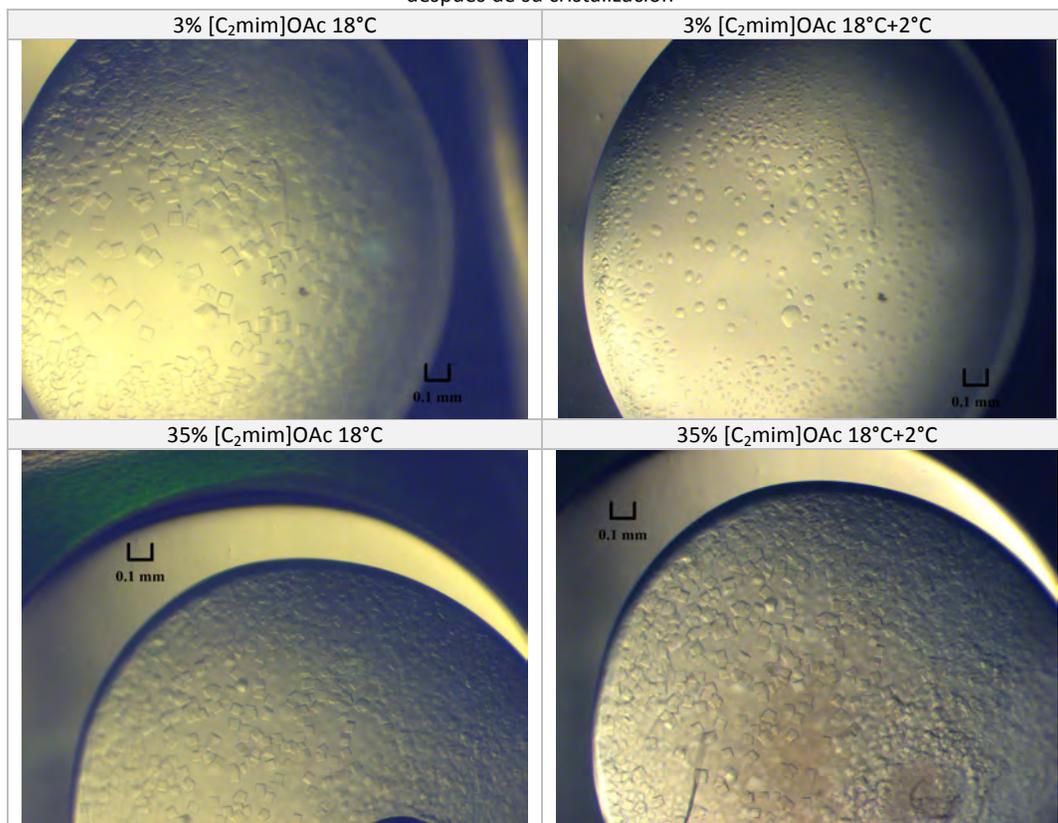
Figura 28 Efecto de la temperatura y los ILs en la cristalización de CALB

Un argumento para *la cinética* de cómo los ILs pueden afectar el proceso de cristalización sería a través de la evaporación de vapor. La adición de sales a la disolución de proteína ralentiza la transferencia de vapor de la gota proteína en el depósito. Este mecanismo permite adoptar un enfoque más lento que el régimen de nucleación y crecimiento de cristales que resulta en cristales más grandes, mientras que las disoluciones libres de ILs son rápidamente "cristalizadas", lo que resulta en la precipitación de la proteína. De manera general, los cristales han crecido en menor proporción de acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio [C₂mim]OAc [73].

Efecto térmico de los cristales de CALB

En la Tabla 11, se muestra CALB cristalizada a 3 y 35% de [C₂mim]OAc a 18°C por 24. Las imágenes del lado izquierdo son de cristales obtenidos a T=18°C. Después, los cristales se expusieron a T = 20°C durante 2h, lado derecho de la Tabla 11. A bajas concentraciones (3%) de ILs, los cristales se han disuelto completamente. Por otra parte, al tener el 35% de ILs estos no se han disuelto. De estos experimentos se puede concluir que [C₂mim]OAc no afecta el tamaño y la morfología de los cristales de CALB; pero mejora la estabilidad térmica al no disolver los mismos.

Tabla 11 CALB en presencia de acetato de 1-etil-3- metil-imidazolio [C₂mim]OAc al 3 y 35%, con aumento de 2°C después de su cristalización



El efecto de IL en el comportamiento térmico de los cristales de CALB puede atribuirse a cambios específicos de interacciones intermoleculares de CALB o ILs, mediante la mejora de los contactos de cristal y el cambio de la estabilidad conformacional molecular en disolución durante la cristalización, lo que puede influir en la nucleación de CALB y el crecimiento posterior del cristal y, finalmente, influyen su morfología [107].

5.2.2.3. Aditivos de cristalización para la Glucosa Isomerasa

Se partió de Glucosa Isomerasa a una concentración de 20 mg/mL. Para realizar el experimento se varió el porcentaje de ILs (TEAB, EAN, [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄ de Hampton Research) en agente precipitante (20mM de un buffer de acetatos a pH=7, 30% PEG 6,000), con 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 35 y 40 % (volúmenes finales). Como se puede observar en la Tabla 12.

Tabla 12 Condiciones de cristalización de GI en presencia de ILs

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-TEAB	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
B-TEAB	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
C-EAN	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
D-EAN	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
E-[C₂mim]OAc	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
F-[C₂mim]OAc	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
G-[BMIM]BF₄	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%
H-[BMIM]BF₄	3%	6%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	27%	30%	35%	40%

La Figura 29 muestra una representación una placa de 96-pozos (SWISSCI), donde el color rojo son los experimentos en los cuales no se obtuvieron cristales, los naranjas para los que se tenían cristales con algún tipo de defecto y los verdes se refieren a los mejores monocristales. Los experimentos se realizaron a 20°C, por 24h. Donde se puede observar que en los ILs [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄, contiene mayores éxitos de cristalización.

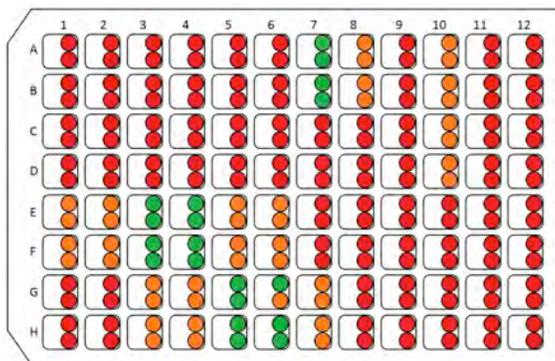


Figura 29 Representación de placa de 96-pozos (SWISSCI). Glucosa Isomerasa en diferentes ILs (TEAB, EAN, [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄). El color rojo no se tienen cristales, naranja no cristalizó muy bien y en los verdes, son los cristales óptimos.

Las presencias de ILs cambian el hábito cristalino y el tamaño de los cristales (Figura 30). En experimentos no se modificó la naturaleza del agente precipitante (20mM de un buffer de acetatos a pH=7, 30% PEG 6,000), la concentración y temperatura, solo se modifica el porcentaje de ILs. En los experimentos (se muestran en el anexo de Líquidos iónicos: Efectos en los cristales de Glucosa Isomerasa) se generan diferentes polimorfos de la misma, los cuales se han asociado a la gran concentración de sales en el medio acuoso. Incluso, en algunos casos se tienen diferentes tipos de cristales en la misma gota, debido a la diferencia de crecimiento. Los hábitos cristalinos difieren de aquellos

simulados en Mercury (software de cristalografía), lo cual posiblemente es indicio de que se modifiquen con los contactos proteína-proteína [108].

Se sabe que los ILs tienen el potencial de servir como bases o ácidos de Lewis basados en la presencia de diferentes cationes y aniones. De manera que el cambio en el tamaño también se podría asociar al cambio del pH en el licor madre. Se han investigado que los iones haluro, sulfato y sulfonato están completamente disociados, y por lo tanto no pueden afectar al pH, el amonio, fosfonio, piridinio, borato, y iones acetato causan cambios de pH significativos a concentraciones más altas que las observadas en la Figura 30 [33].

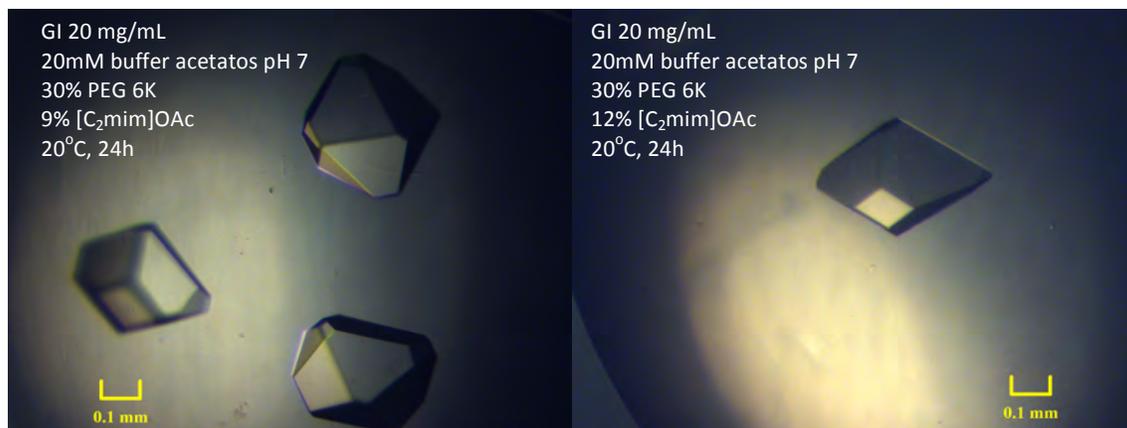


Figura 30 Glucosa Isomerasa con diferentes proporciones del IL [C₂mim]OAc, a 20°C por 24h.

Otro punto relevante, es la estructura de los ILs ([C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄) donde se tiene la presencia del grupo imidazol. El hecho de que los derivados imidazólicos tengan una estructura química básica común le da una cierta homogeneidad a la hora de comportarse en formas nativas.

Lange et al. en el trabajo con ILs a base de imidazolio sugieren que los aditivos que se excluyen de la superficie de la proteína tienden a estabilizarla y promover la precipitación salina, mientras que los aditivos que se unen preferentemente favorecen la desnaturalización de la proteína y la solubilidad. Estos autores clasifican aún más estos ILs como agentes preferentemente atados y de ligera a moderadamente caotrópicos. Para determinar si estos interactúan con la proteína, se deben realizar los análisis de rayos X de cristales crecidos usando líquidos iónicos como aditivos [34].

Datos de Glucosa Isomerasa en presencia de líquidos iónicos

Los datos de radiación sincrotrónica han sido recolectados en el SLAC National Accelerator Laboratory, Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, en el *beamline* 14-1. El cual cuenta con un detector MARmosaic 325 CCD. Los datos han sido recolectados sin crioprotección, los cuales se han asociado al grupo espacial I222

Comparando los datos de la Tabla 13, podemos observar que los experimentos con el diferente porcentaje de [C₂mim]OAc utilizado como aditivo de cristalización, este posee un límite de resolución en la última capa de 1.9Å (12%) y 1.20Å (18%). Se tiene una mejor estadística para el 18% [C₂mim]OAc, cuando se comparan los rangos de resolución, y refinamiento como la integridad de datos, los factores R, I/σ(I), entre otros. El valor con una variación más significativa es la²⁷ mosaicidad la cual es casi el doble al 12% que al 18% de [C₂mim]OAc.

Tabla 13 Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en presencia de líquidos iónicos

	[C ₂ mim]OAc-9%	[C ₂ mim]OAc-12%	[C ₂ mim]OAc-18%	[BMIM]BF ₄ -24%
Grupo espacial	I222	I222	I222	I222
Celda unidad (Å, °)	a=93.08	a=93.22	a=93.12	a=92.92
	b=97.13	b=102.62	b=97.85	b=98.95
	c=102.75	c=97.76	c=102.57	c=102.19
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$			
Reflexiones totales	1167423	202032	1274945	735505
Reflexiones únicas	156523	37097	142741	110534
Rango de resolución (Å)	40-1.15	40-1.9	40-1.20	40-1.30
	(1.19-1.17)	(1.93-1.90)	(1.22-1.20)	(1.32-1.30)
Integridad de datos (%)	95.2(53.1)	97.0(88.8)	98.4(87.0)	95.9(77.6)
R_{merge}	0.084	0.084	0.073	0.072
R_{meas}	0.09	0.093	0.077	0.078
I/σ(I)	40.11(0.96)	31.68(13.97)	40.83(1.83)	30.35(1.29)
Multiplicidad	7.5(2.9)	5.4(4.8)	8.9(7.4)	6.7(5.2)
CC_{1/2}	0.511	0.97	0.816	0.727
Mosaicidad	0.441	1.051	0.59	0.505

Los análisis principalmente se basan en conocer el límite de resolución, debido a que a mayor resolución (menor número Å), se tiene un mapa de densidades electrónicas más

²⁷ Una característica crítica en el cumplimiento de las condiciones cinemáticas es la mosaicidad, que da cuenta de que la muestra no ha de ser un monocristal perfecto, sino que ha de estar formado por bloques micro-monocristalinos distribuidos aleatoriamente, pero de forma que no estén ni muy alineados, ni muy distorsionados.

definidas. Este valor está determinado por una combinación de estadísticas relativas a la última capa.

Por otro lado, en la mosaicidad tiene una mejor estadística cuando el valor numérico es menor, esta variable relaciona el acomodo de las pequeñas celdas que forman un cristal, debido a que no se tiene un acomodo perfecto de los cristales. Comparando ahora los datos obtenidos con el 18% de [C₂mim]OAc y el de 24% [BMIM]BF₄ la mosaicidad no es el valor determinante para escoger el mejor cristal, sino que es el conjunto de las estadísticas.

Las mejores condiciones encontradas para esta sección de experimentos de Glucosa Isomerasa en presencia de ILs es:

*Glucosa Isomerasa 20 mg/mL.
Agente precipitante: 20mM buffer de acetatos a pH 7, 30% PEG 6,000
Aditivo: 18% de [C₂mim]OAc
Temperatura: 20°C
Duración: 24hrs
Método: Gota sedente*

5.2.3 Dispositivo para trasladar cristales

Debido a que los cristales de CALB presentan sensibilidad a las pequeñas variaciones de temperatura, se consideró que esto resultaría un problema si no se tiene una temperatura controlada en el sistema. Este es uno de los principales inconvenientes que enfrentan los cristales de proteínas, si se transportan a los sincrotrones que se encuentran en el extranjero. Por lo general, en la revisión personalizada en los aeropuertos, los agentes aduanales bien entrenados en el mostrador de encargo son lo suficientemente cuidadosos de no abrir los dewars²⁸ en el que los cristales de proteínas se transportan, de acuerdo los procedimientos para llevar cristales biológicos de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association, IATA). Sin embargo, en algunas ocasiones desafortunadamente, los oficiales menos experimentados, abren el Dewar, donde pueden dañarse los cristales debido al choque térmico.

Se diseñó un dispositivo hecho de un polímero patentado (poliolefina: US Patente de Estados Unidos 7.971.744), con una densidad de (0.084 g/cm^3), que podrían resistir los cambios de temperaturas de -100°C hasta 50°C sin alterar la calidad de los cristales de proteínas transportadas dentro de él. La Figura 31 muestra un esquema de este nuevo dispositivo, que consiste en un trozo rectangular de esta poliolefina porosa con algunos agujeros en ella. Con el fin de proporcionar seguridad adicional a los cristales de proteína, los tubos capilares de vidrio que contienen los cristales se introducen en el interior un tubo de RMN llenados con un hidrogel preparado por una neutralización ácida de disoluciones de metasilicato de sodio, (este hidrogel tiene alta suavidad que permite la inserción de las pipetas capilares). Las pipetas capilares de vidrio deben estar perfectamente selladas con el cristal de proteína crecido en el interior. Una vez hecho esto, los tubos de RMN que llevan las pipetas, deben ser insertados dentro de los orificios del dispositivo de poliolefina (tal como se muestra en la Figura 31). A partir de aquí, los cristales de proteínas pueden ser transportados con seguridad en cualquier aeropuerto, a través de en una maleta normal, a las instalaciones de sincrotrón. La

²⁸ Dewar es un recipiente diseñado para proporcionar aislamiento térmico, disminuir las pérdidas de calor por conducción, convección o radiación. Se utiliza para almacenar líquidos, fríos o calientes.

eficiencia de protección térmica del dispositivo, para los cristales de proteínas, se puso a prueba en los dos sincrotrones en que se realizó la colecta de datos de rayos-X.

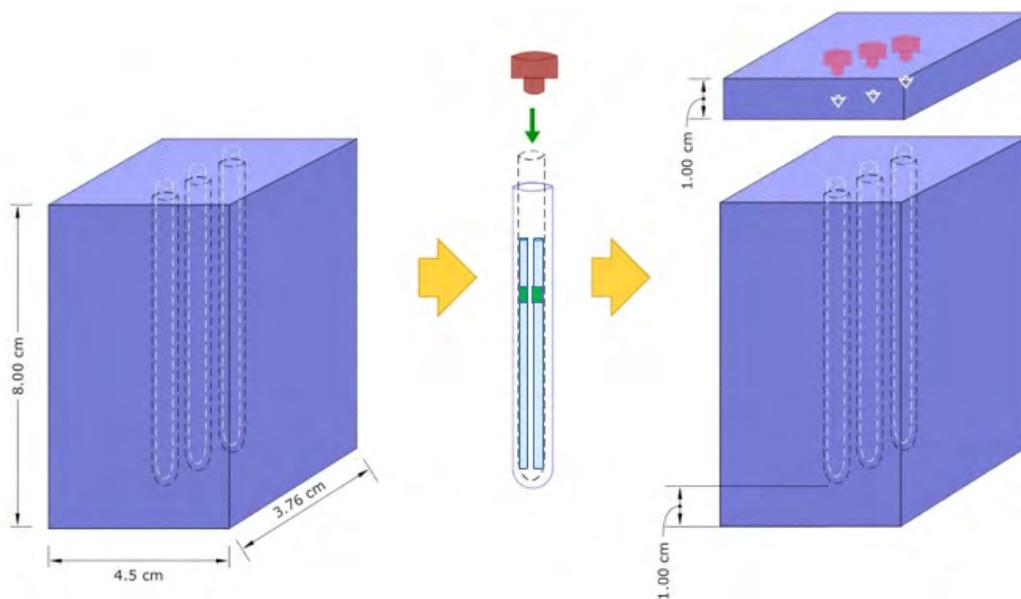


Figura 31 Diseño del dispositivo para la protección térmica y transporte de biomacromoléculas

En este caso CALB ha sido usado como termosensor para probar la eficiencia de la protección térmica del dispositivo de poliolefina, por su alta sensibilidad. Con el fin de hacer esto, hemos utilizado las instalaciones de dos sincrotrones diferentes. Uno de los sincrotrones fue Elettra en Trieste, Italia, y el otro era de SLAC-SSLS de Stanford en California, Estados Unidos. Los cristales de CALB no se disolvieron cuando se transportaron a los dos sincrotrones, donde se realizaron las colecciones de datos. Se caracterizó este polímero por un espectrómetro FT-IR Spectrum Two (PerkinElmer) en el cual se puede observar el espectro característico del Polietileno Figura 32, con las cinco vibraciones características del mismo, tanto de movimiento de estiramiento de los metilos y metilenos, abajo de $3,000\text{ cm}^{-1}$. El movimiento de reflexión del metileno a $1,467\text{ cm}^{-1}$ y el metilo $1,350\text{ cm}^{-1}$. Además del balanceo a 725 cm^{-1} .

Número de onda (cm ⁻¹)	Movimiento	
2921	-CH ₃	Estiramiento
2851	-CH ₂ -	Estiramiento
1467	-CH ₂ -	Reflexión
1350	-CH ₃	Reflexión
725	-CH ₂ -	Balaceo

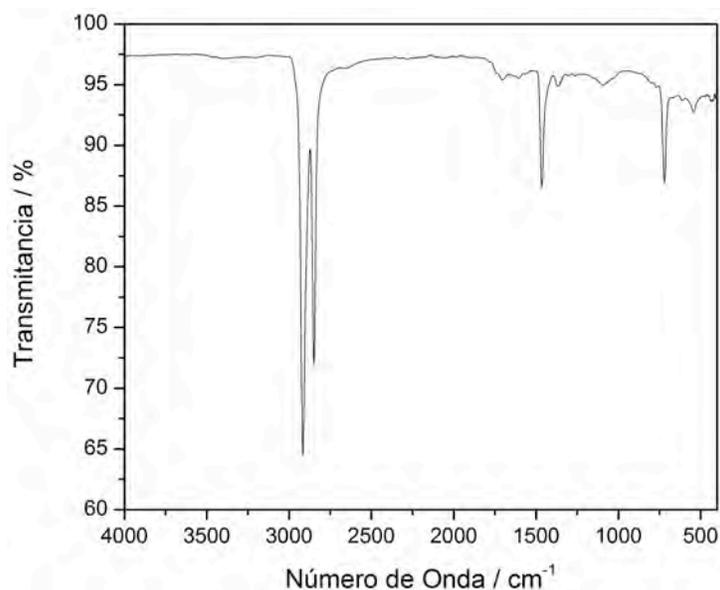


Figura 32 Espectro característico del polietileno, realizado en un espectrómetro FT-IR Spectrum Two (PerkinElmer)

Producto de esta parte de la investigación en la sección de anexos el Registro de patente IMPI: Diseño para la protección térmica y transporte de biomacromoléculas de los inventores Abel Moreno Cárcamo y Claudia Carina Pareja Rivera, el cual tiene como número de expediente MX/a/2016/008614.

5.3 MÉTODOS NO CONVENCIONALES DE CRISTALIZACIÓN

5.3.1 Método de acupuntura en geles de CALB con líquidos iónicos.

El GAME, modifica el medio difusivo con un gel de sílice o agarosa en capilares, para modificar el transporte de masa el cual se difunde a través del tiempo, minimizando el consumo de proteína. De manera general, se debe partir de concentraciones de proteína y sal fuera del equilibrio, para poder desarrollar un barrido de condiciones. Los factores a cuidar son las concentraciones y la profundidad en la que se introduce el capilar.

Como se muestra en la Figura 33, en una experiencia sobre una *Granada Crystallization Box*® (GCB), se vertió un gel de sílice (a partir de metasilicato de sodio, como se muestra en el apartado

ii. Preparación del gel de sílice a partir de metasilicato de sodio). Partiendo de las condiciones obtenidas de la CALB en presencia de ILs por el método de gota sedente, se utilizó para la técnica de acupuntura en geles (GAME). En donde utilizamos una se tiene una mezcla de 1:1 de CALB con el agente precipitante y la proporción del IL correspondiente (TEAB, EAN, [C₂mim]OAc y [BMIM]BF₄).

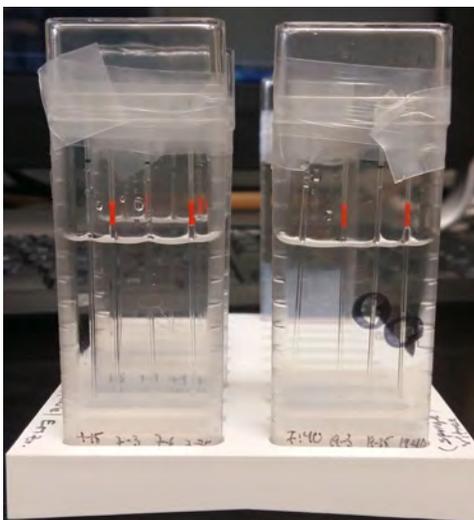
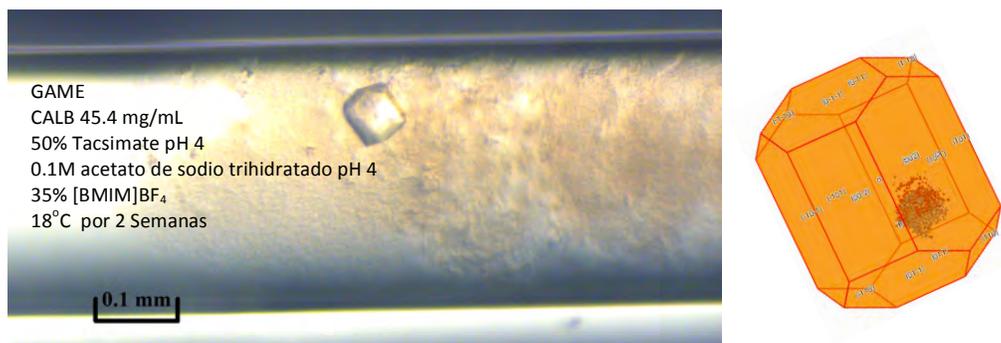


Figura 33 Método de acupuntura en geles (GAME) de CALB en diferentes ILs.

En los experimentos en los que se empleó de $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ al 35 y 45%, estos alcanzaron el equilibrio (Figura 34 a). Aunque en ambos casos se tiene menor número de cristales, se muestra el aumento de volumen con respecto a gota sedente y la turbidez en el capilar (posible tendencia a precipitar de la proteína; asociado al pH del gel). Comparado la morfología de los cristales obtenidos por gota sedente, en presencia y ausencia de los IL y el método GAME, en este último cuenta con un hábito cristalino diferente a los anteriores. Por lo que se realizó una simulación de la morfología del cristal en Mercury 3.8 [108], la cual se presenta en el anexo de Simulación del hábito cristalino por simetría (Mercury). Esta diferencia en la morfología se asocia a la velocidad la cual han crecido los cristales, ya que los anteriores experimentos son realizados a 24h, y el método GAME por dos semanas, otra ventaja de controlar el transporte difusivo por geles. La morfología la cual debe de presentar los cristales de CALB, es la que se obtuvo por el método GAME coincide con la simulación (Figura 34b).



CALB 45.4 mg/mL
Agente precipitante: 50% Tacsimate pH 4,
0.1M acetato de sodio trihidratado pH 4
Aditivo de cristalización: 35% [BMIM]BF₄
Temperatura: 18°C
Duración: 2 Semanas
Método: GAME

5.3.2 Experimentos de cristalización electro-asistida

El trabajo en el proceso de cristalización electro-asistida de las proteínas modelo, ha sido enfocado en mejorar la celda de cristalización, razón por la cual se han diseñado nuevas variantes, para aumentar el número de experimentos a realizar y disminuir el volumen que utiliza de proteína, como se muestra en la Figura 35.

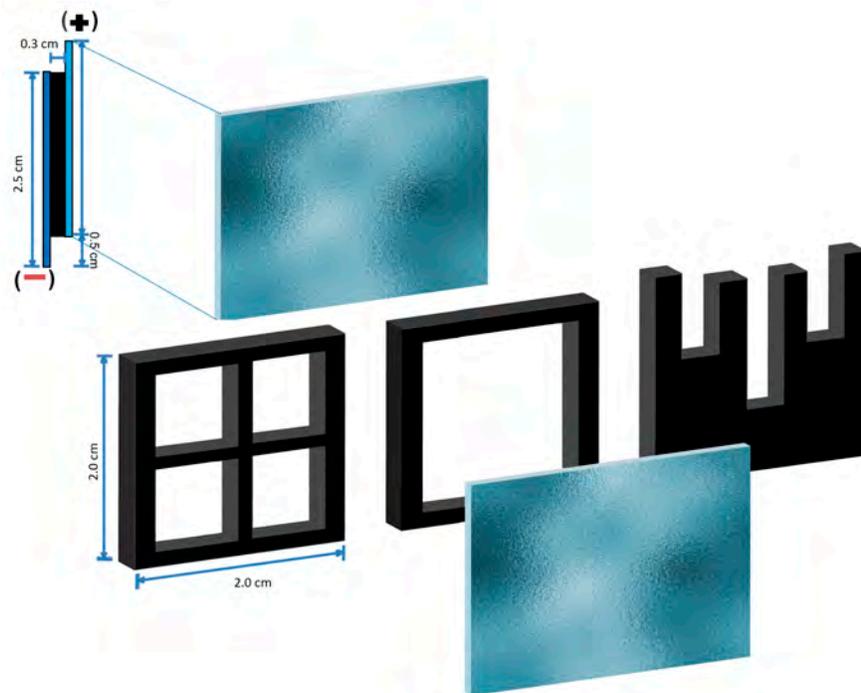


Figura 35 Variantes de la celda de cristalización electro-asistida

Las celdas de crecimiento utilizan electrodos de ITO sobre un sustrato de PET (polietileno) (Figura 36). El PET-ITO es casi transparente a las energías de rayos X de uso común (por encima de 12 keV). Por lo tanto, se puede colocar la celda directamente frente al haz de rayos X (como se muestra en la Figura 36). La colecta se lleva a cabo a temperatura ambiente. Este tipo de experimento tiene la ventaja de no manipular los cristales después de cristalizarlos, disminuyendo los posibles daños provocados.

Para la cristalización electro-asistida, se realizaron experimentos solo para la Glucosa Isomerasa, debido a que presenta mayor complejidad en comparación a la Lisozima. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de diferentes campos eléctricos directos en una celda de difusión de vapor. Los datos generados se discuten en la siguiente sección.

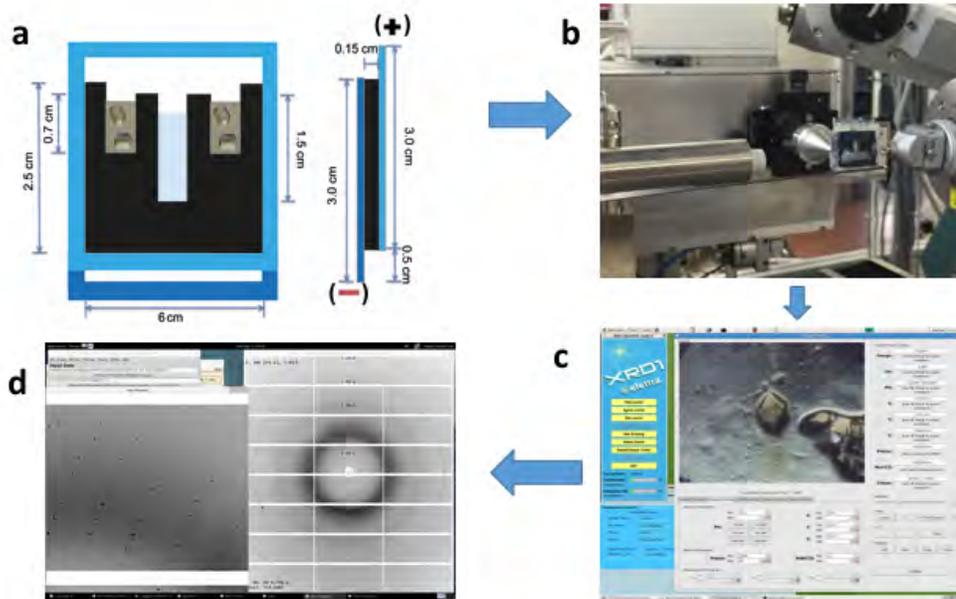


Figura 36 Esta imagen muestra: (a) La celda de crecimiento al aplicar un campo eléctrico un DC (difusión de vapor). El lado derecho (b) muestra la celda montada en el goniómetro de la línea de luz de difracción XRD1 (Elettra, Trieste) para la recopilación de datos in situ a temperatura ambiente. La tercera imagen (c) muestra cómo el cristal de la Glucosa Isomerasa se ve como en la cámara de la línea de luz. La última imagen (d) muestra una vista de cerca de los puntos de difracción recogida in situ sobre un cristal de glucosa isomerasa.

5.3.2.1 *Cristalización de la Glucosa Isomerasa*

a. Efecto de la corriente directa (DC) en GI

Para los experimentos de Glucosa Isomerasa (20 mg/mL), se usó como agente precipitante 20mM de acetato de amonio pH 7, con 30% de PEG 6000, en presencia de corriente directa, por 24h, a T = 20°C, variando la intensidad de corriente de 1, 2 y 3 μ A, en una celda de gota sedente, se combina la proteína y el agente precipitante en una relación 1:1. Se recolectaron los datos en el XRD1 *beamline* de Elettra Sincrotrone Trieste, Italia.

Estudios enfocados a celdas de cristalización asistida eléctricamente aplicado a las proteínas mediante el uso de corrientes directas (DC), reveló que los cristales crecen mejor en el cátodo (cuando la molécula de proteína se cargó positivamente), en comparación con los cristales crecidos en el ánodo (lo contrario sucede con una molécula de proteína cargada negativamente debido al buffer de cristalización de pH seleccionado). La combinación del proceso de electro migración para la fijación de los núcleos en las paredes de los electrodos de ITO, junto con el crecimiento de cristales por la configuración de difusión de vapor, permitió crecer cristales de Glucosa Isomerasa aplicando una corriente continua (Figura 36 c). Esta técnica de cristalización electroasistida ha permitido crecer cristales de proteína bajo la influencia del campo eléctrico de corriente continua.

Los mejores cristales se obtuvieron al aplicar una corriente directa a 2 μ A, se generaron cristales con un grupo espacial P 2₁ 2₁ 2, el cual es característico de la Glucosa Isomerasa (Tabla 14).

Tabla 14 Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en un campo eléctrico de corriente directa (DC) por difusión de vapor

	<i>Difusión de vapor</i>
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2
Celda unidad (Å, °)	a = 82.091
	b = 93.893
	c = 97.688
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Reflexiones totales	535276 (39520)
Reflexiones únicas	275861 (20643)
Rango de resolución (Å)	50 - 1.40
	(1.44 - 1.40)
Integridad de datos (%)	0.96 (0.97)
R_{merge}	0.061 (0.491)
R_{meas}	0.081 (0.659)
I/σ(I)	8.47 (1.75)
Multiplicidad	1.9 (1.9)
Factor B de Wilson (Å²)	17.7
CC_{1/2}	0.997 (0.669)
Mosaicidad	0.173

Se tiene el 96% de integridad de datos²⁹ el cual es medianamente aceptable. Para la relación $I/\sigma(I)$ ³⁰ se tiene un valor adecuado de 1.75 para la última capa. Hasta el momento se tienen mejores resultados al crecer cristales en *batch* que con un método de difusión de vapor. Puesto que los *dataset* obtenidos, este es el que tiene mejor resolución. Comparando los datos con la estructura reportada en el PDB (5HV), se observa que mantiene los parámetros de celda y su grupo espacial. Por otra parte, en este experimento se tuvieron tres cristales, bastante grandes, por lo cual concluimos que se puede seguir controlando el número y tamaño con la presencia de un campo eléctrico.

b. Efecto de la corriente alterna (AC) en la cristalización de glucosa isomerasa (GI).

Los datos que se muestran a continuación son de GI a 20 mg/mL, en el cual se usa como agente precipitante un 20 mM de acetato de amonio pH 7, con 30% de PEG 6000, en presencia de corriente alterna, por 24h, T = 24°C, variando la frecuencia de 2, 4, 6, 8 Hz y

²⁹ Completeness: Porcentaje de reflexiones recogidas sobre el total posible. Es necesaria un porcentaje de colección del orden de 90%-100% y al menos 80% en la capa de mayor resolución.

³⁰ $I/\sigma(I)$ promedio: representa la relación de intensidad de la señal con respecto al ruido de las reflexiones promediadas. Valores mayores de 1.5-2 son aceptables.

el blanco (experimento sin corriente), en una celda tipo *batch* donde se combinan la proteína y el agente precipitante en una relación 1:1.

La nomenclatura utilizada para las gráficas se basa; el primer número para determinar la frecuencia (2, 4, 6 y 8Hz), la segunda letra para referirnos al electrodo N (cátodo) y el R (ánodo), la última N se refiere a que son los datos promedio de toda la superficie del electrodo.

La gráfica que se muestra en la Figura 37 analiza el número de cristales en función de la frecuencia y el electrodo. En el caso específico de 2Hz se tienen 213 cristales en total, además se encuentra una ligera tendencia a crecer en el cátodo en los experimentos realizados (excepción en 2Hz). Esto puede deberse principalmente a la carga positiva de la proteína ($pI=3$) y a las variaciones del pH que cambia dependiendo del medio (ánodo o cátodo), aunque la polaridad de los electrodos se intercambia en los experimentos de CA, por eso se nota la ligera tendencia hacia el ánodo. Este tipo de experimentos no afectan totalmente la energía del sistema para cambiar el hábito del cristal.

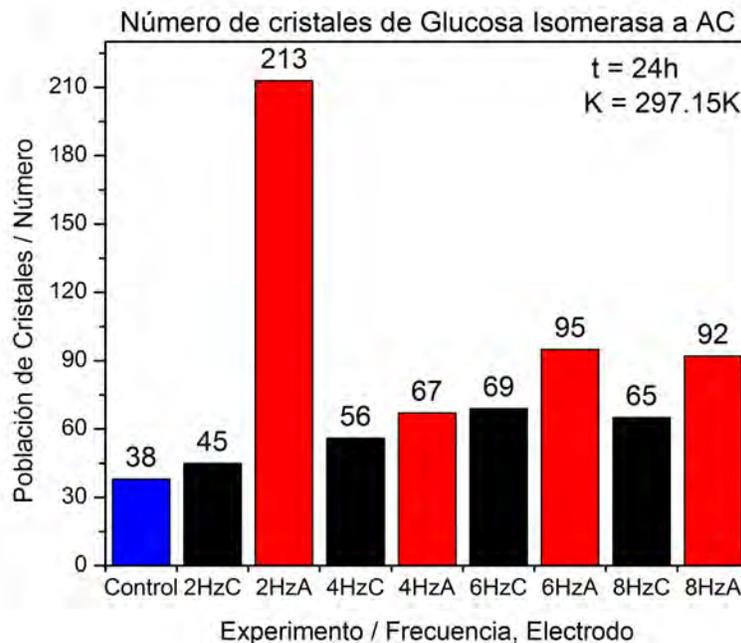


Figura 37 Gráfico de número de cristales vs experimento de GI en AC

Si se realiza una comparación con el blanco y el efecto que tiene en el tamaño de los cristales al aplicar un campo eléctrico de corriente alterna, se nota el aumento de

tamaño de los cristales. Las experiencias donde se nota un mayor efecto, fueron los de la frecuencia de 2 y 8Hz con un tamaño de 57 y 58 μm respectivamente, los cuales se pueden ver en la Figura 38. Comparando los datos de la gráfica, las frecuencias de 4 y 8Hz, no tiene un aumento considerable del tamaño de los cristales, pero se nota un menor tamaño en ánodo (R) y menor número de cristales. Conociendo que las cargas negativas tienden a moverse hacia el ánodo, podemos pensar que la Glucosa Isomerasa no tiene una carga neta negativa la mayor parte del tiempo en el proceso de cristalización electro-asistida.

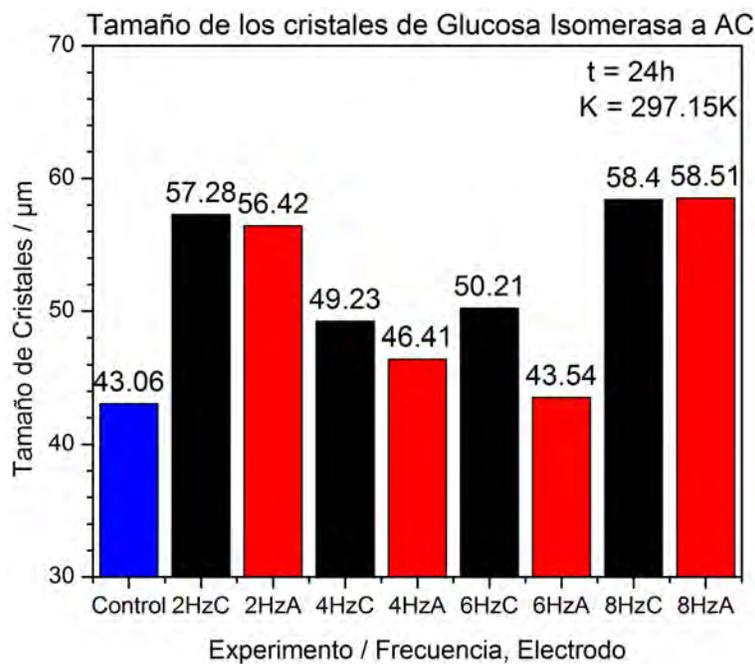


Figura 38 Gráfico de tamaño de cristal vs experimento de GI en AC

Estudios han mostrado que la corriente capacitiva se asocia con la migración de iones en la doble capa eléctrica de los iones de polaridad opuesta. Las macromoléculas podían verse como iones gigantes, debido a la carga neta que tienen en el pH de la cristalización [109].

Lo que podemos observar en la Figura 39, el efecto más significativo que tiene aplicar un campo eléctrico de corriente alterna en la GI. En ambos casos se utilizó el mismo agente precipitante, tiempo y temperatura, para que los resultados fueran comparables. En el control tenemos mayor número de cristales, estos son más pequeños. Con los pulsos

que se han inducido se trata de controlar tanto el número de cristales y por consecuencia su tamaño, esperando que su calidad cristalina no se vea afectada.

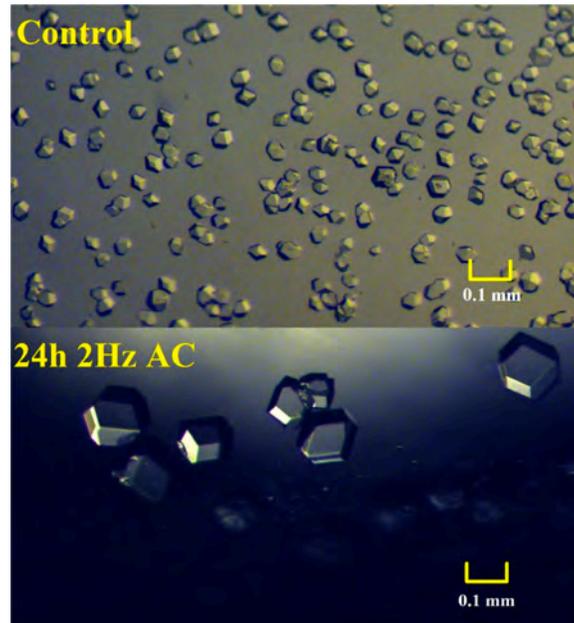


Figura 39 Glucosa Isomerasa a 20mg/mL, T=20°C por 24h. La imagen superior es el control y la inferior es a 2Hz

Utilizando esta configuración es posible seguir el proceso de cristalización usando un campo eléctrico interno. Las características más notables:

- (a) proceso de cristalización extremadamente rápido
- (b) control del tamaño y número de cristales

El campo eléctrico interno puede estar asociado a un mayor flujo de la masa de la región cercana a los electrodos, favoreciendo la cristalización. Este proceso es bien conocido en la electroquímica y corresponde a un proceso de difusión estimulada por una corriente constante que genera la migración de especies cargadas (proteínas, en este caso) hacia el electrodo.

Los efectos en el control de tamaño pueden ser de gran relevancia en los estudios de XFELs, en los cuales se utilizan cristales muy pequeños para poder difractarlos. Existe la posibilidad de poder modificar el tamaño de los mismo, con la variación correcta de pulsos, tiempo y frecuencia, al realizar un electro cristalización asistida.

5.3.2.2 Cristalización de la Lisozima en corriente alterna (AC).

En el caso de la Lisozima (80 mg/mL), se usó como agente precipitante una disolución de 80mg/mL de Cloruro de sodio, en presencia de AC, por 24 h, T = 20°C, variando la frecuencia de 2, 4, 6, 8Hz y el blanco (experimento sin corriente), en una celda tipo *batch* donde se combinan la proteína y el agente precipitante en una relación 1:1. La Tabla 15 muestra los datos de las dos frecuencias más relevantes, para la lisozima.

Tabla 15 Crecimiento de cristales de Lisozima al aplicar corriente alterna

	Ctrl	2Hz	8Hz
Longitud de onda (Å)	0.77491	0.77491	0.77491
Grupo espacial	$P 4_3 2_1 2$	$P 4_3 2_1 2$	$P 4_3 2_1 2$
Celda unidad (Å, °)	$a = b = 78.899$	$a = b = 78.306$	$a = b = 78.908$
	$c = 38.111$	$c = 36.868$	$c = 36.969$
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Reflexiones totales	126730 (9633)	72544 (5342)	86805 (5989)
Reflexiones únicas	32620 (2412)	18663 (1367)	22771 (1703)
Rango de resolución (Å)	50 - 1.56	50 - 1.85	50 - 1.74
	(1.60 - 1.56)	(1.90 - 1.85)	(1.79 - 1.74)
Integridad de datos (%)	1.00 (1.00)	1.00 (1.00)	0.99 (1.00)
R_{merge}	0.051 (0.813)	0.095 (0.824)	0.079 (0.742)
R_{meas}	0.059 (0.941)	0.111 (0.953)	0.092 (0.878)
I/σ(I)	16.64 (1.90)	11.78 (1.94)	12.47 (1.89)
Multiplicidad	3.9 (4.0)	3.9 (3.9)	3.8 (3.5)
Factor B de Wilson (Å²)	26.1	26.2	24.5
CC_{1/2}	0.999 (0.550)	0.997 (0.677)	0.998 (0.649)
Mosaicidad	0.069	0.155	0.158

Como se explicó en la sección anterior de la GI en presencia de AC, los resultados más impactantes con respecto al número de cristales y su tamaño, se dio en la frecuencia de 2 y 8Hz. En el caso de la lisozima al comparar los datos de los cristales difractados, se analiza que la calidad cristalina se ve afectada. Esto se puede apreciar al aplicar un campo eléctrico de corriente alterna, tiende a modificar negativamente el rango de resolución y aumentar la mosaicidad, aunque se tiene el 100% de integridad de datos en todos los casos.

5.3.2.3 Comparación del efecto del campo eléctrico en el número, tamaño y calidad del cristal para cristales de Glucosa Isomerasa y la lisozima.

Se ha podido determinar que la AC no sólo afecta el número de cristales, también su tamaño, en función de su frecuencia. La tendencia en el crecimiento de cristales de Lisozima y la Glucosa Isomerasa de la aplicación de un AC de 2Hz y 8Hz para el experimento de crecimiento de los cristales puede ser descrito como sigue: cuanto

mayor sea la frecuencia de AC, mayor será el número de cristales. Esta tendencia se muestra en la Figura 40.

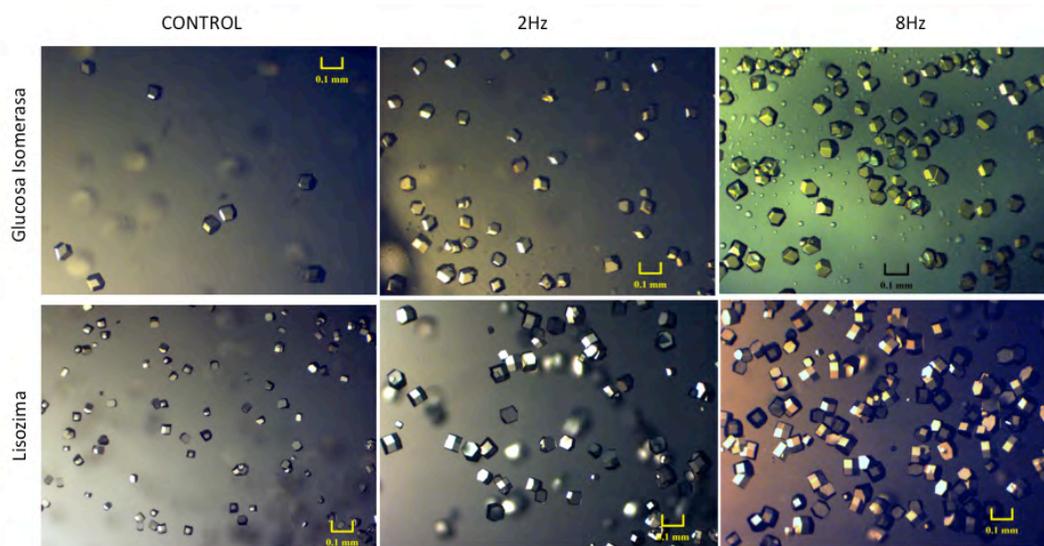


Figura 40 Muestra las imágenes de los cristales de Lisozima y Glucosa Isomerasa, aplicando AC durante 24h. La barra de escala amarilla corresponde a 0.1 mm de tamaño.

Para entender la nucleación, cuando un electrodo entra en contacto con el electrolito (proteína con el buffer), se debe de tomar en cuenta la existencia de la doble capa eléctrica formada alrededor del electrodo. Esta doble capa está compuesta por un plano inicial de moléculas de agua con sus dipolos orientados respecto a la carga del electrodo. La segunda capa, la cual las moléculas hidratadas de carga opuesta están arregladas a lo largo de ella [110] El comportamiento anómalo de la lisozima, se podría asociar al cambio de polaridad en los electrodos por la AC, produciendo la migración de los iones negativos hacia el ánodo.

Por otra parte, la estructura tridimensional no se encuentra afectada por la corriente aplicada en el proceso de crecimiento cristalino, los cuales mostraron los análisis cristalográficos de rayos-X, el efecto no fue suficiente para realizar un cambio en el grupo espacial del cristal, los cambios en la mosaicidad son mínimos. Al realizar el refinamiento, se puede observar ligeros cambios en la cadena secundaria, mas no en la principal, lo cual se observó en los gráficos de Ramachandran³¹ [111].

³¹ En él se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi) en los aminoácidos de un polipéptido, y que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas.

5.3.3 Efecto del campo magnético sobre la cristalización de proteínas

Se tiene la capacidad de orientar cristales por la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética que está asociada a los enlaces resonantes tipo éster, estos pertenecen a cadenas abiertas, en consecuencia, se relaciona con la estructura secundaria de una proteína. Razón por la cual los experimentos de las proteínas involucradas tienen un porcentaje alto de estructuras con α – *hélices*, para que interaccionen mayormente con el campo magnético. Este fenómeno solo se puede observar si se tiene una distribución ordenada (cristal) de todas estas contribuciones, en un efecto conjunto.

5.3.3.1 Cálculo de la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética de las proteínas

A partir del PDB de una estructura de proteína se puede conocer el número de aminoácidos que se encuentran formando parte de la estructura de las α – *hélices* y β – *plegadas*. Sustituyendo el número de aminoácidos en las ecuaciones mencionadas en los antecedentes, se obtienen los valores de ΔX_α y ΔX_β , se suman ambas contribuciones para calcular el valor de la anisotropía diamagnética molar para cada molécula (Tabla 16).

Tabla 16 Valores de la anisotropía diamagnética molar para GI, HEWL y CALB

Proteína	PDB	α	N_α	ΔX_α	β	N_β	ΔX_β	$\Delta X_{\alpha+\beta}$
GI	5AVH	20	191	5.12×10^{-6}	10	35	2.35×10^{-6}	7.47×10^{-6}
HEWL	4A7D	7	53	1.42×10^{-6}	4	10	6.7×10^{-6}	8.12×10^{-6}
CALB	1TCA	18	119	3.19×10^{-6}	9	39	2.61×10^{-6}	5.8×10^{-6}

De los PDB analizados podemos determinar que la anisotropía diamagnética, la cual tendrá mayor efecto en la Lisozima, seguida de la Glucosa Isomerasa y la Lipasa B. Estos datos son solo una aproximación, ya que no se tiene la orientación de la estructura secundaria respecto al eje c, el cual se orienta paralelamente a la dirección del campo magnético. Debido a que las orientaciones de las moléculas se producen por la contribución sobre el eje principal de la estructura secundaria, se deben de cambiar las coordenadas cristalográficas y moleculares para realizar los cálculos pertinentes para la realizar esta corrección.

5.3.3.2 Grado de orientación

Para cuantificar un porcentaje de cristales orientados bajo la influencia de un campo magnético, se ve la orientación que tienen los cristales en función del campo aplicado. En donde se determina la tasa de orientación en función del número de cristales orientados, respecto al total.

$$R = \frac{N_{orientados}}{N_{total}}$$

La relación de orientación, se ha realizado con las fotos de los cristales, tomadas a lo largo del trabajo experimental. En la Tabla 17, se muestra que en los controles de proteínas no se tiene una tendencia de orientación y los cristales orientados por una cuestión de probabilidad. Debido a la naturaleza de las proteínas tienen valores óptimos de la anisotropía de la susceptibilidad diamagnética, por lo cual tienden a orientarse con facilidad al aplicarles un fuerte campo magnético.

Tabla 17 Grado de orientación de los cristales en presencia de un campo magnético

	Control	48hrs	3 semanas
GI	0.15	0.84	0.75
HEWL	0.06	1	1
CALB	0.14	1	1

De aquí se puede tomar en cuenta que los valores pueden variar debido al tamaño y el número de cristales orientados, ya que se observa una disminución de los mismos, teniendo un mayor error en el cálculo.

5.3.3.3 Comparación del efecto del campo magnético en el número, la orientación y la calidad de los cristales de Glucosa Isomerasa y la Lisozima.

Se ha desarrollado un experimento usando el método de *batch*, bajo la presencia de un fuerte campo magnético de 16.5T en tubos capilares. Este experimento se ha desarrollado para obtener cristales de Lisozima y Glucosa Isomerasa, así como para la lipasa como nuestro biosensor térmico.

Se estudió el diferente comportamiento de crecimiento de cristales de las proteínas a períodos diferentes de tiempo. En el primer experimento, se estudió durante 48 h. En el segundo experimento durante una semana y en el último, durante tres semanas.

La idea fue estudiar si esta fuerza magnética afectaba el crecimiento los procesos de cristalización. Trabajos anteriores sobre la Glucosa Isomerasa mostraron la existencia de diferentes polimorfos obtenidos en diferentes temperaturas, donde se seleccionó la temperatura adecuada sólo para uno de los polimorfos [112].

Se observó que todos los cristales de proteínas se vieron significativamente afectados por su orientación y tamaño, notable en todos los experimentos, pero el efecto es mucho mayor al pasar el tiempo. Los cristales se mejoran mucho en tamaño y se reducen sustancialmente en número, en comparación con el control. En todos los casos los cristales crecidos bajo esta fuerte fuerza magnética eran 4 veces más grande que los de los controles, como se muestra en la Figura 41.

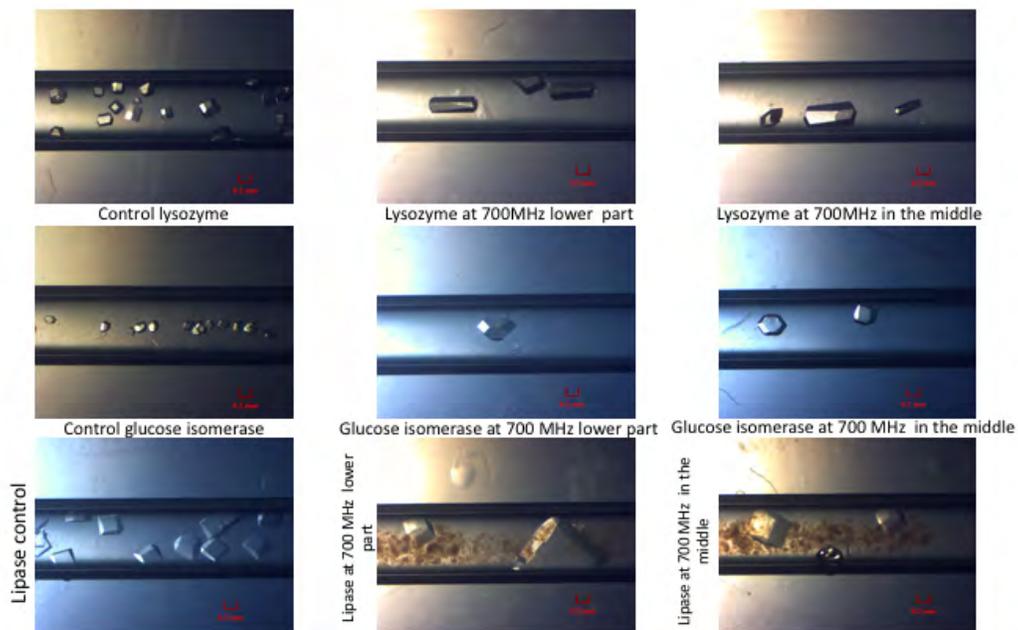


Figura 41 Esta imagen muestra los resultados para la Lisozima, la Glucosa y Lipasa con sus respectivos controles en comparación con las crecidas en presencia de un fuerte campo magnético de 16.5 T al estudiar su comportamiento de crecimiento de una semana. La mayoría de los cristales analizados por difracción de rayos X se recogieron de la parte media inferior de los tubos capilares. La barra de escala en rojo corresponde a 0,2 mm de tamaño.

Para todos estos cristales, la colecta de datos (se realizó a temperatura ambiente y a baja temperatura) y las estadísticas de refinamiento de los diferentes conjuntos de datos se resumen en las siguientes estadísticas de los datos de rayos X que se muestran

en las Tablas 20-22 del anexo de Recopilación de datos y estadística de refinamiento. Recopilación de datos y estadística de refinamiento

Efecto de la inducción de nucleación previa a un experimento de cristalización.

Un experimento adicional de GI se llevó a cabo durante una semana bajo la presencia de un fuerte campo magnético (16.5 T). En este experimento, se realizó una mezcla de proteína con el agente precipitante, se agitaron con fuerza, con el fin de inducir la nucleación adicional desde el principio. La Figura 42 muestra el efecto positivo en los cristales de GI que crecen en el interior del campo magnético (véase el plano frontal de la imagen). Sin embargo, los núcleos producidos deliberadamente al comienzo del experimento, cuando la mezcla de la proteína y el agente precipitante, no se vieron afectados por el campo magnético (ver la sombra de cristales no orientadas en el plano posterior de la imagen).

Este experimento demuestra que, si la mezcla se hace con cuidado desde el principio, el efecto del campo magnético produce grandes cristales de mayor tamaño indicio que hay una mayor orientación al campo magnético. Estos cristales de la Figura 42 se analizaron por difracción de rayos X (radiación de sincrotrón) a baja temperatura, los cuales se han tomado aleatoriamente los cristales orientados bajo el campo magnético para realizar el análisis estadístico. La mayoría de los cristales crecidos bajo la influencia del campo magnético en comparación con los controles, mostraron una mejoría en la mosaicidad, factores B y la resolución, véase la Tabla 18.

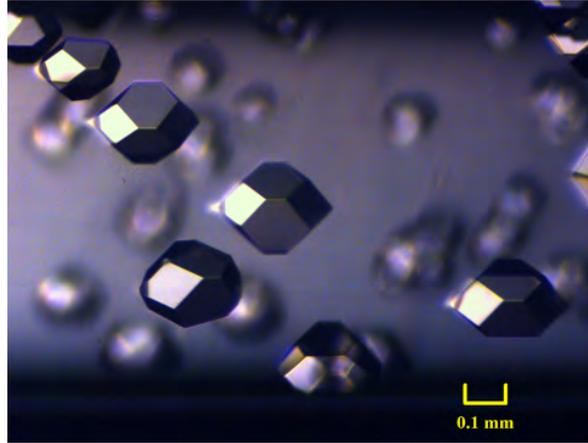


Figura 42 Estos cristales perfectamente orientados a la dirección del campo magnético se cultivaron durante una semana. Sin embargo, los cristales en la parte posterior de la imagen no se orientaron al campo magnético, ya que fueron inducidos deliberadamente desde el principio del experimento, en la preparación de la mezcla de la proteína y el agente precipitante.

Tabla 18 Estadística de los datos cristalográficos de rayos X para la Glucosa Isomerasa de tres cristales crecidos bajo la influencia del campo magnético por una semana recogidos a baja temperatura (se muestra en la Figura 42)

	Control	GI Cristal-1 16.5T	GI Cristal-2 16.5T	GI Cristal-3 16.5T
Longitud de onda (Å)	0.77491	0.77491	0.77491	0.77491
Grupo espacial	I222	I222	I222	I222
Celda unidad (Å, °)	a = 93.18	a = 93.18	a = 93.36	a = 92.75
	b = 99.96	b = 99.96	b = 98.55	b = 98.73
	c = 102.23	c = 102.23	c = 102.72	c = 102.39
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$			
Reflexiones totales	820681	1439930	1120810	2676369
Rango de resolución (Å)	40-1.60 (1.63-1.60)	40-1.25 (1.27-1.25)	40-1.18 (1.20-1.18)	40-1.15 (1.17-1.15)
Integridad de datos (%)	94.5(99.5)	96.6(72.6)	97.9(84.2)	99.1(85.2)
R_{merge}	0.139	0.076	0.071	0.069
R_{meas}	0.145	0.08	0.076	0.071
I/σ(I)	28.19(1.5)	42.4(0.63)	35.41(1.58)	54.27(1.23)
Multiplicidad	13.7(13.7)	11.5(6.1)	7.5(5.2)	16.3(5.4)
Factor B de Wilson (Å²)	22.3	13.9	11.0	10.8
CC_{1/2}	0.821	0.457	0.753	0.577
Mosaicidad	0.901	0.552	0.557	0.502

5.4 EFECTO ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS EN LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS APLICADOS

Con el fin de comprobar si los contactos cristalinos intra o inter moleculares se ven afectados en el empaquetamiento, los cuales están involucrados en la cadena principal o lateral, se calcularon todos los cambios en los residuos detectados a lo largo de la cadena principal³² (MC) y de la cadena lateral (SC) para estas proteínas modelo (PDB: 5avh para Glucosa Isomerasa y 4a7d para la Lisozima) con la ayuda de los datos cristalográficos y el software Lsqkab (superpose) de CCP4. De acuerdo con los resultados mostrados en las Figura 43 y Figura 44 la conformación de cadena lateral puede ser alterada ligeramente al aplicar una corriente eléctrica alterna en contraste con el campo magnético fuerte. El efecto causado por una frecuencia de 8 Hz a AC, produce mayor número de interacciones proteína-proteína, que aumentó sustancialmente el número de núcleos. Sin embargo, cuando la aplicación de campos magnéticos fuertes, ni el MC (cadena principal) ni la SC (cadena secundaria) se vieron afectados considerablemente. En consecuencia, se decidió comprobar cuidadosamente los cambios estructurales con radiación sincrotrón, ¿Cómo se ve afectada la calidad del cristal para estas dos proteínas modelo cuando se aplicaron los campos eléctricos (AC o DC) y el fuerte campo magnético en los procesos de crecimiento? Con el fin de evitar cualquier influencia sobre la calidad del cristal debido a la crio-protección, los datos se han recogido dos veces (datos mostrados en la sección anterior); la primera recogida de datos se llevó a cabo a temperatura ambiente en la línea de luz del sincrotrón XRD1 Elettra en Trieste (Italia). Además, con el fin de investigar más a fondo, se probaron estos cristales de proteína (como un experimento duplicado) en una segunda instalación de sincrotrón, en este caso SLAC-SSRL situado en Stanford California (EE.UU.).

³² Los aminoácidos en una cadena de polipéptidos están unidos por enlaces peptídicos. Una vez vinculados forman una cadena de proteína, a un aminoácido individual se le llama residuo, y la serie enlazada de carbono, nitrógeno y átomos de oxígeno que se conoce como la cadena principal o esqueleto de la proteína. De ella emergen las cadenas laterales o secundarias.

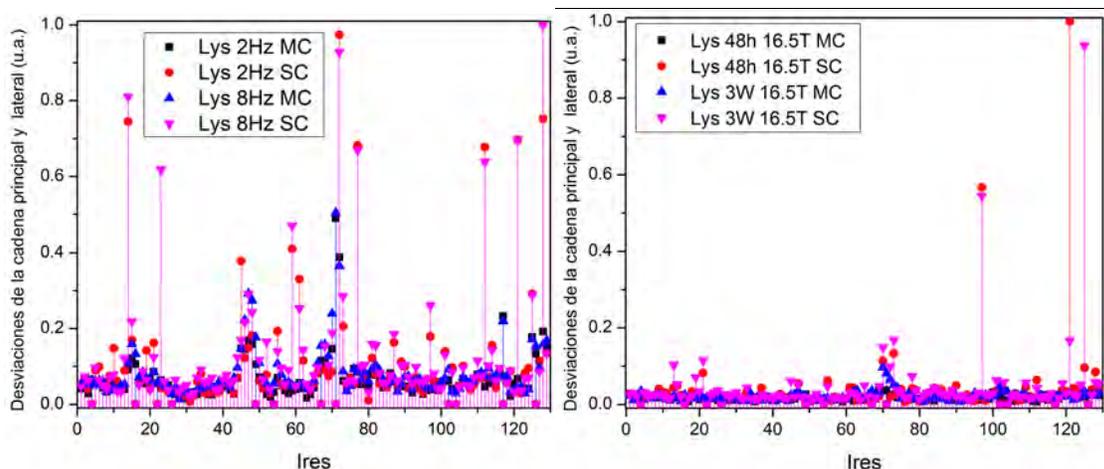


Figura 43 Estos gráficos muestran el número de residuo (I_{res}) frente a su desviación implicado en los contactos de cristal de lisozima, afectado por el campo eléctrico (AC/DC), pero apenas por el campo magnético. Donde SC y MC representan la cadena lateral y la cadena principal, respectivamente.

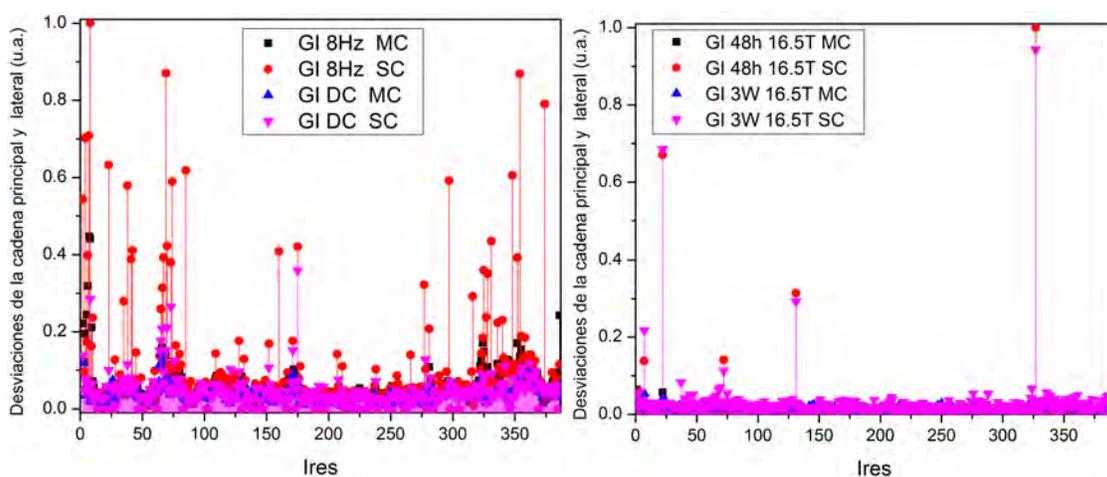


Figura 44 Estos gráficos muestran el número de residuo (I_{res}) frente a su desviación implicado en los contactos de cristal de Glucosa Isomerasa afectado por el campo eléctrico (AC/DC) pero apenas se ve afectado por el campo magnético. Donde SC y MC representan la cadena lateral y la cadena principal, respectivamente.

Las Figura 45 y Figura 46 muestran la superficie de contactos de cristal que han encontrado los datos cristalográficos, para Lisozima y Glucosa Isomerasa respectivamente. Estos contactos de superficie pueden ser afectados cuando se aplican campos eléctricos de AC. Sin embargo, la estructura cristalina se mantiene sin cambios (en términos de conformaciones de las cadenas laterales de aminoácidos) después de la aplicación de campos magnéticos fuertes. Estos contactos superficiales de cristal son

particularmente relevantes para los campos electromagnéticos mencionados en esta contribución. En el caso de la GI, la Figura 46 muestra los contactos en los residuos más importantes de la cadena principal, que son susceptibles a los cambios en función del campo electromagnético aplicado.

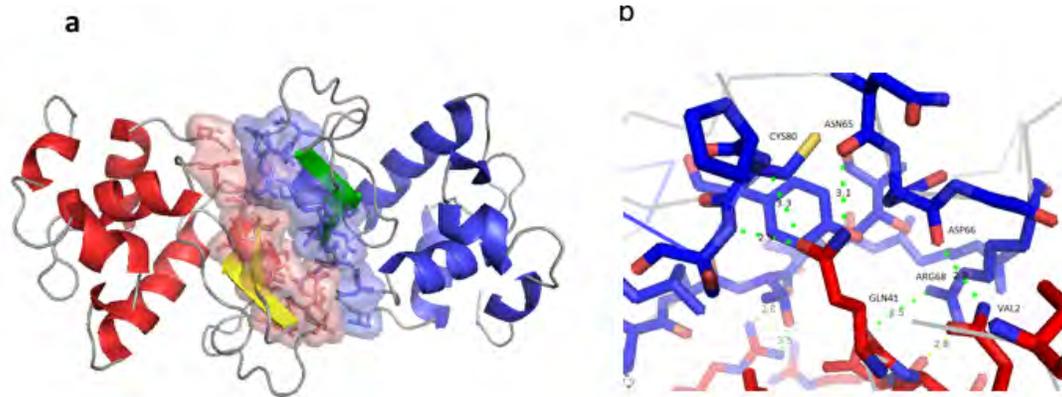


Figura 45 (a) Descripción general del área de estructura cristalina contactos, donde se observan las superficies de contacto más importantes (b) un primer plano de los principales residuos de contactos de lisozima obtenidos con los mejores datos de rayos X para los controles.

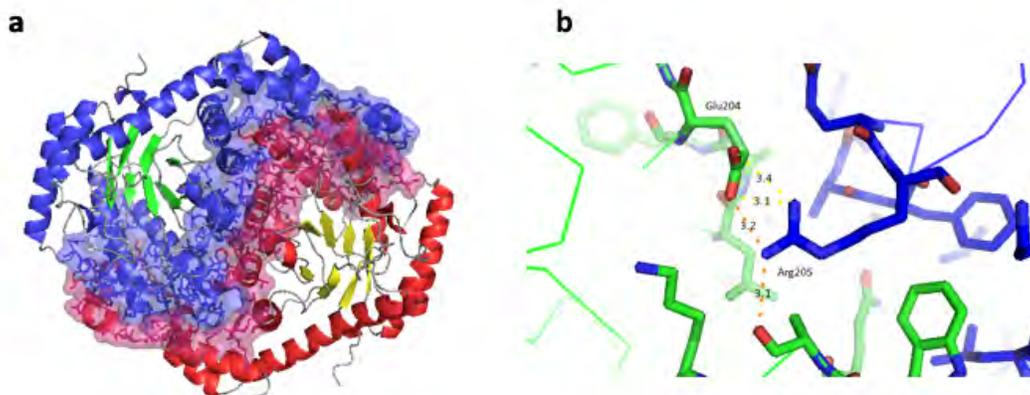


Figura 46 (a) Descripción general del área de estructura cristalina contactos de Glucosa Isomerasa, donde se observan las superficies de contacto más importantes (b) un primer plano de los contactos principales residuos de Glucosa Isomerasa obtenidos con la mejor de rayos X los datos de los controles.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

“Crystals are like people, it’s the defects in them which tend to make them interesting”

— *Colin Humphreys*

Introduction to Analytical Electron Microscopy



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La visión general de los resultados obtenidos es establecer la influencia de los parámetros fisicoquímicos los cuales afectaron el crecimiento cristalino:

6.1 *Cristalización en presencia de líquidos iónicos:*

De acuerdo a los resultados presentados, se demostró que es posible cristalizar la CALB en presencia de ILs, en donde se aumenta su estabilidad térmica, evitando su redisolución presente en variaciones de temperatura de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Con respecto a la aplicación de los líquidos iónicos a otras proteínas, la mayoría de los cristales de GI en presencia de ILs como aditivos, muestran mejorías en sus datos cristalográficos en comparación con los controles, teniendo un aumento significativo del rango de resolución de 1.60 a 1.17\AA y disminución de la mosaicidad de 0.90 a 0.44. Puede concluirse que para la glucosa isomerasa (GI) el efecto es positivo en términos de elevar la calidad cristalina con base en todos los parámetros de la estadística de rayos-X.

6.2 *Cristalización electro-asistida:*

Como tendencia general, se observó que al aplicar mayores frecuencias de AC, se tiene un aumento en el número de cristales, se tiene un tamaño homogéneo de 57.00 ± 1.00 con las frecuencias de 2 y 8Hz.

La orientación preferencial de los cristales sobre la superficie del ánodo para AC, debido por el cambio de polaridad de los electrodos. Este fenómeno se nota más para los experimentos en DC.

Se presentan cambios tridimensionales los cuales no afectan la estructura cristalina cuando se aplica un campo eléctrico de AC que van de 2 a 8 Hz, este efecto se observa al comparar las anteriores con la estructura control, donde se notan variaciones en la cadena lateral. Sin embargo, concluimos que es más recomendable usar campos eléctricos directos que alternos. No obstante, no se han explorado, en esta tesis pulsos de onda, en esta variante de campos alternos, lo que sugiere poder evaluar este efecto que tendrían los pulsos de onda en el futuro cercano en términos de tamaño y calidad de cristales de proteínas.

6.3 *Efectos de campos magnético:*

El crecimiento de cristales en presencia de campos magnéticos fuertes tiene efectos más notables sobre los resultados en términos de calidad y tamaño de los cristales, durante al menos 48 h (si más largo el experimento, mejor será el tamaño del cristal y la calidad), como un aumento en la resolución de los cristales (1.60 a 1.15Å),

Por otra parte, la estructura tridimensional no se encuentra afectada por el campo aplicado en el proceso de crecimiento cristalino, los cuales mostraron los análisis cristalográficos de rayos-X, el efecto no fue suficiente para realizar un cambio en el grupo espacial del cristal. Se concluye que el efecto de aplicar campos magnéticos intensos en el crecimiento de cristales de proteínas, sugiere un efecto positivo, que se ve reflejado en el incremento no solo de la calidad cristalina, sino en crecer cristales de buen tamaño. La tendencia es más marcada mientras más grande sea el campo magnético en su intensidad, mayor es la calidad cristalina y el tamaño de las proteínas que crecen en este régimen de crecimiento.

ANEXOS

To any action there is always an opposite and equal reaction; in other words, the actions of two bodies upon each other are always equal and always opposite in direction.

— Sir Isaac Newton

The Principia: Mathematical Principles of Natural Philosophy (1687), 3rd edition (1726), trans. I. Bernard Cohen and Anne Whitman (1999), Axioms, or Laws of Motion, Law 3, 417.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

a. *Espectroscopia UV-Vis*

La espectroscopia ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es una espectroscopia de emisión de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380nm y 780nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas [113].

La espectroscopia UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas y, además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia.

Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible, así como en el UV.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absortividad molar, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente).

Cuantificación de proteínas.

La espectrometría UV también se usa para la cuantificación de proteínas y concentración de ADN. En las proteínas se encuentran generalmente varios aminoácidos, como el triptófano, que absorben la luz en el rango de 280nm. El ADN absorbe la luz en el rango de 260nm. Por esta razón, la proporción de absorbancia 260/280nm es un buen indicador general de la pureza relativa de una solución en términos de estas dos macromoléculas.

Concretamente absorben las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos (260-290 nm), la tirosina (275 nm) y la cistina (250 nm).

b. Dispersión Dinámica de la luz

Dispersión Dinámica de la Luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), la espectroscopia de correlación de fotones o dispersión cuasielástica de luz es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión. A diferencia de la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas, la DLS no tiene en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo[114].

Al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, la luz láser se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Por norma general, en la DLS la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen. El movimiento browniano de las nanopartículas o moléculas en suspensión es aleatorio debido al choque constante con las moléculas de disolvente que las rodean. La velocidad del movimiento browniano depende de: tamaño de las nanopartículas, temperatura y la viscosidad del medio dispersante [115]. Como consecuencia del movimiento de browniano, las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, lo que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Cuando las partículas se mueven

rápidamente (partículas pequeñas), la variación de la intensidad de dispersión se acelera. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas. La medida empleando DLS debe realizarse a una temperatura conocida con exactitud, porque requiere el valor de la viscosidad (la viscosidad de un líquido está relacionada directamente con la temperatura). La temperatura también tiene que ser estable, de lo contrario las corrientes de convección en la muestra provocarían movimientos no aleatorios que arruinarían la interpretación correcta del tamaño. La velocidad del movimiento browniano se define por la propiedad conocida como el coeficiente de traslación (D).

Diámetro hidrodinámico

El tamaño de una partícula, calculado como el diámetro hidrodinámico* se estima a partir del coeficiente de difusión de traslación mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Donde:

$d(H)$: Diámetro hidrodinámico³³

D : Coeficiente de difusión traslacional

k : Constante de Boltzmann

T : temperatura absoluta

η : viscosidad

El coeficiente de difusión de traslación dependerá no sólo del tamaño de la partícula, sino también en cualquier estructura o especie que se encuentre en su superficie, así como la concentración y el tipo de iones en el medio. Los factores que afectan a la velocidad de difusión de las partículas se discuten en las anteriores secciones.

³³ El diámetro que se mide en el DLS es un valor que se refiere a cómo una partícula se difunde dentro de un fluido por lo que se conoce como un diámetro hidrodinámico. El diámetro que se obtiene mediante esta técnica es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de traslación como la partícula.

c. Espectroscopia Infrarroja

La técnica de Espectroscopía de Infrarrojo permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. Esto debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico. La región infrarroja se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés), infrarrojo medio (MIR, por sus siglas en inglés) e infrarrojo lejano (FIR, por sus siglas en inglés). El espectrómetro de IR con transformada de Fourier permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones señal/ruido (S/N) elevadas.

El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito.

Los análisis de Infrarrojo se han realizado en el Spectrum Two IR Spectrometer (PerkinElmer), el cual tiene una ventana de $8,300 - 350 \text{ cm}^{-1}$.

d. Difracción de Rayos X (XDR)

La difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) de policristal es una técnica no destructiva de análisis de caracterización estructural para muestras sólidas, proporcionando información sobre las fases cristalinas presentes en la muestra que se está analizando.

El fenómeno de XRD está basado en el proceso de dispersión elástica que tiene lugar cuando un haz de radiación electromagnética, monocromática y de longitud de onda del orden de la distancia interplanar o interatómicas (rayos X), incide sobre una muestra cristalina que se quiere estudiar. A la salida de dicha muestra, la mayor parte de las ondas dispersadas por el cristal interfieren en determinadas direcciones, y debido a la ordenación periódica de los átomos, las ondas dispersadas están en fase, interfiriendo

de forma constructiva, dando lugar a la aparición de máximos de intensidad, denominándose a este fenómeno con el nombre de difracción.

Las condiciones necesarias para que se produzca la difracción vienen determinadas por la Ley de Bragg. En las sustancias cristalinas existen distintas familias de planos paralelos y equidistantes entre sí. Consideremos una de estas familias con índices de Miller (hkl) y espaciado d_{hkl} (Figura 47). Si sobre estos planos incide un haz de rayos X monocromático con longitud de onda λ , del orden de las distancias interplanares, en una dirección que forma un ángulo θ con la superficie de los planos, solamente se producirá la difracción cuando el ángulo de incidencia, la longitud de onda de la radiación y el espaciado de la familia de planos cumplan la Ley de Bragg.

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$$

en donde λ es la longitud de onda de la radiación incidente, d_{hkl} es el espaciado de la familia de planos (hkl) y θ es el ángulo de difracción.

Al ser λ y θ parámetros conocidos, la obtención de d_{hkl} es inmediata. Como cada compuesto cristalino posee un conjunto de espaciados característicos, correspondientes a las distancias interplanares de su celda unitaria, su conocimiento permite distinguir unos compuestos de otros, puesto que no existen dos sustancias cristalinas diferentes que tengan todos sus espaciados iguales.

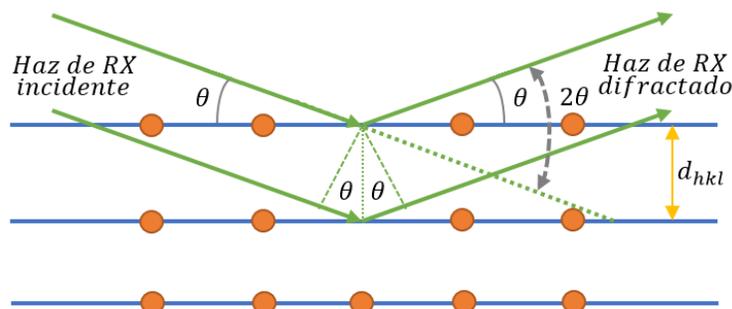


Figura 47 Difracción de los Rayos X por los planos de un cristal

II. CORRIENTE ELÉCTRICA: DIRECTA Y ALTERNA

El termino **corriente eléctrica** se utiliza para describir la rapidez de flujo de la carga por alguna región del espacio. La *intensidad de corriente*³⁴ (I), esta relacionada con la carga q que se transporta en un tiempo t :

$$I = \frac{q}{t}$$

Hay dos tipos de corrientes eléctricas que pueden atravesar alambres: corriente directa (DC) y corriente alterna (AC).

La corriente directa (DC) es el flujo continuo de carga en una sola dirección, desde el punto de mayor potencial al de menor (mantiene siempre la misma polaridad).

La corriente alterna (CA) su flujo de una carga que cambia continuamente tanto en magnitud como en dirección [116].

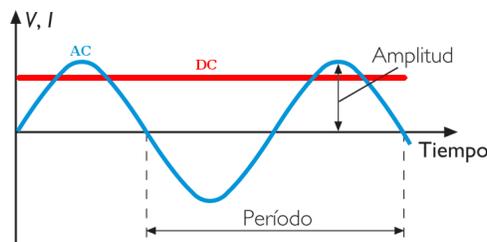


Figura 48 En ordenada se representa el valor de la tensión eléctrica y la abscisa el tiempo. La gráfica muestra como una corriente alterna (azul), varia su tensión de forma cíclica a lo largo del tiempo, mientras el equivalente de corriente continua (rojo), tiene un valor estático.

Para que se produzca una corriente eléctrica es necesario una fuerza electromotriz, es decir una fuerza que produzca movimiento sobre las cargas. Ello se logra con cualquier dispositivo construido para ello, como una pila, un generador de corriente, continua o alterna el cual establezca una diferencia de potencial en un medio material donde haya cargas susceptibles de moverse.

Perfiles en de pulsos corriente alterna

Este puede dar salida a 5 tipos diferentes de tipos de *onda de pulso*³⁵, cada una indicada por un símbolo que se ilumina cuando se selecciona, se pueden utilizar al mismo tiempo o por separado, y la salida de cada uno pueden ser regulados de forma independiente.

³⁴ La unidad de corriente en el SI es el Ampere (A), donde: $A=[C/s]$ Es decir, 1A de corriente equivale a que 1 coulomb de carga que pase a través de la superficie en 1s.

i. Onda Continua:

La duración del pulso $\tau = (0,5 \pm 0,15)$ ms; Frecuencia de impulsos repetidos: $f_1 = (1 \pm 0,5)$ Hz a (100 ± 10) Hz. y $FREQ_1$ se puede regular de forma continua. Máxima amplitud del pulso de salida: $40V \pm 10V$.



Figura 49 Diagrama de pulsos: onda continua

ii. Ondas Densas y dispersas:

Se muestran alternativamente; Frecuencia dispersan es f_1 , lo mismo con la onda de base; Frecuencia densa es de aproximadamente 100 Hz; La duración del pulso es de 0,5 ms; $FREQ_2$ regula la frecuencia f_2 de $10 (\pm 3)$ ciclos por minuto a $50 (\geq 10)$ ciclos por minuto;

Máxima amplitud del pulso de salida: $40V \pm 10V$.

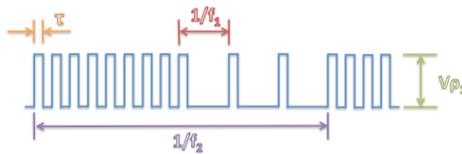


Figura 50 Diagrama de pulsos: ondas densas y dispersas

iii. Onda intermitente:

Muestra pulsos a intervalos regulares a la misma frecuencia que el anterior.

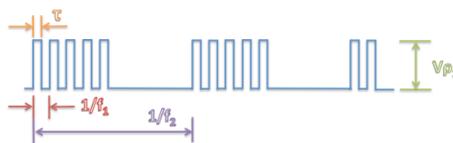


Figura 51 Diagrama de pulsos: onda intermitente

iv. Onda Ripple:

Su amplitud aumenta hasta el máximo y cae a cero lentamente, repitiendo el proceso. La frecuencia: (10 ± 3) a (50 ± 10) ciclos / min. La salida máxima más el rango de amplitud es de más de 5V a 30V.

³⁵ Tipo de forma de onda no sinusoidal que es similar a una onda cuadrada, pero no tiene la forma simétrica asociada con una onda cuadrada perfecta. La forma exacta de la onda está determinada por el ciclo de trabajo del oscilador.



Figura 52 Diagrama de pulsos: onda ripple

v. *Onda de respiración*

Tiene aumentos de amplitud primero, y luego cae rápidamente a cero, y se repite.

Donde $V_{p1} = 24V$, otros datos de pulso son los mismos que los anteriores.



Figura 53 Diagrama de pulsos: onda de respiración

III. REGISTRO DE PATENTE IMPI: DISEÑO PARA LA PROTECCIÓN TÉRMICA Y TRANSPORTE DE BIOMACROMOLÉCULAS

Campo de la invención

La presente invención se relaciona a dispositivos contenedores para la protección y transporte de materiales, como macromoléculas biológicas, sin riesgos de afectaciones por manipulación o perturbaciones externas, y sin riesgos por afectación térmica, de un sitio a otro, incluso en trayectos transcontinentales.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar dispositivos o recipientes que permitan el transporte seguro de muestras o materiales, que además de aislarlos térmicamente, evite que perturbaciones externas, como son vibraciones, agitación, golpes u oscilaciones, afecten la estabilidad termodinámica de la muestra impidiendo que ésta pierda sus propiedades, principalmente aquellas que tienen que ver con su estado sólido, como son los cristales.

En otro objeto de la invención, los materiales son, sin limitar el alcance de la invención, seleccionados de entre: macromoléculas biológicas, proteínas, proteínas cristalizadas, compuestos cristalinos, cocristales, polimorfos, polimorfos hidratados, polimorfos solvatados, sales, polvos, proteínas en polvo, y/o materiales sensibles a cambios en la temperatura. Dichos materiales se pueden encontrar preferentemente por ejemplo en estado sólido como son cristales. Los cristales pueden ser sin ser limitativos de la invención, proteínas cristalizadas.

Es otro objeto de la presente invención, un dispositivo que comprende un contenedor de material plástico, preferentemente de poliolefina.

El dispositivo de la presente invención puede ser utilizado para transportar cristales de proteínas de forma segura, fácil, sin necesidad de N₂, sin riesgos de afectaciones por manipulación o perturbaciones externas, sin riesgos por afectación térmica, y sin necesidad de cargar grandes y pesados recipientes como un Dewar. Además, su fabricación en materiales plásticos lo hace seguro y no peligroso, pudiéndose incluso transportar la muestra por vía terrestre, marítima o área sin riesgos.



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisinal de Patentes

Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud: MX/a/2016/008614
Expediente: 29/JUN/2016 Hora: 10:52:34
Folio: MX/E/2016/044548 640754



Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
2) Nacionalidad (es): MEXICANA

Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510

Población, Estado y País: COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.
4) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (clave): (55) 56 65 46 44

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): ABEL MORENO CÁRCAMO Y CLAUDIA CARINA PAREJA RIVERA
7) Nacionalidad (es): MEXICANAS.

8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: RINCONADA VOLCANES, EDIFICIO IRAZÚ DEPARTAMENTO 301, COLONIA PEDREGAL DE CARRASCO, C.P. 04700

Población, Estado y País: COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.
9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ 12) RGP-DDAJ-14782

13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 3er PISO DEL EDIFICIO "B" DE LAS OFICINAS ADMINISTRATIVAS EXTERIORES DE LA ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510.

Población, Estado y País: COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO 14) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 AL 31 15) Fax (clave): (55) 56 65 46 44

16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:
DANIEL OJESTO MARTÍNEZ PORCAYO, ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ Y RUBÉN GONZÁLEZ GALINDO

17) Denominación o Título de la Invención:
"DISPOSITIVO PARA LA PROTECCIÓN TÉRMICA Y TRANSPORTE DE BIOMACROMOLÉCULAS"

18) Fecha de divulgación previa
Día Mes Año

19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI

20) Divisinal de la solicitud
Número

21) Fecha de presentación
Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:
País Fecha de presentación No. de serie
Día Mes Año

Lista de verificación (uso Interno)

No. Hojas		No. Hojas	
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 2	Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 21	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		29	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
Se anexa hoja de descuento.

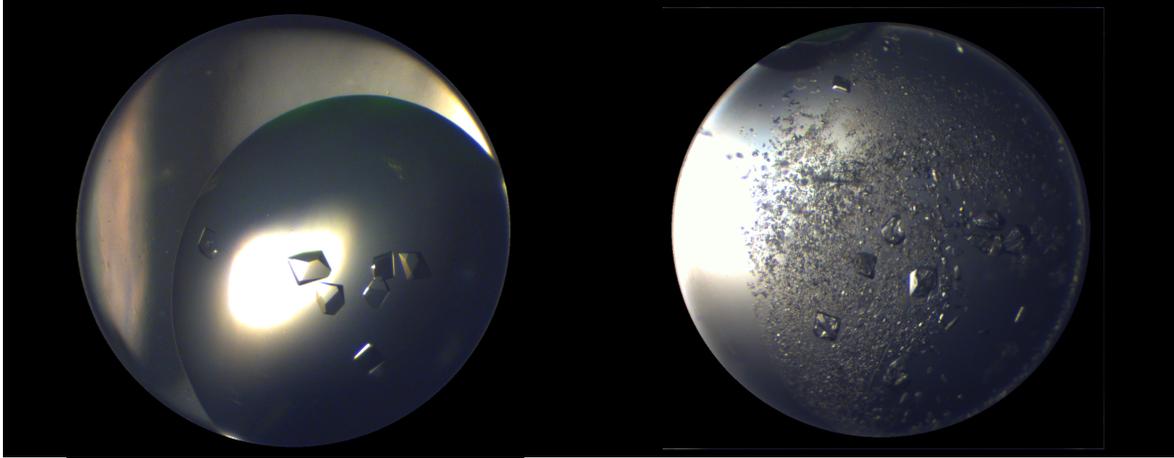
Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 27 DE JUNIO DE 2016
Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

IV. LÍQUIDOS IÓNICOS: EFECTOS EN LOS CRISTALES DE GLUCOSA ISOMERASA

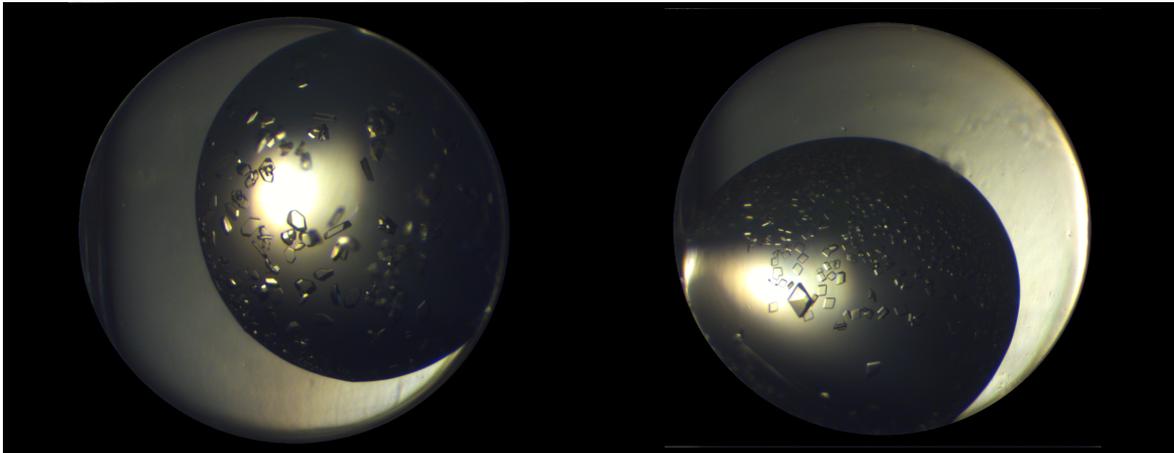
IL1-21% TEAB

IL1-30% TEAB



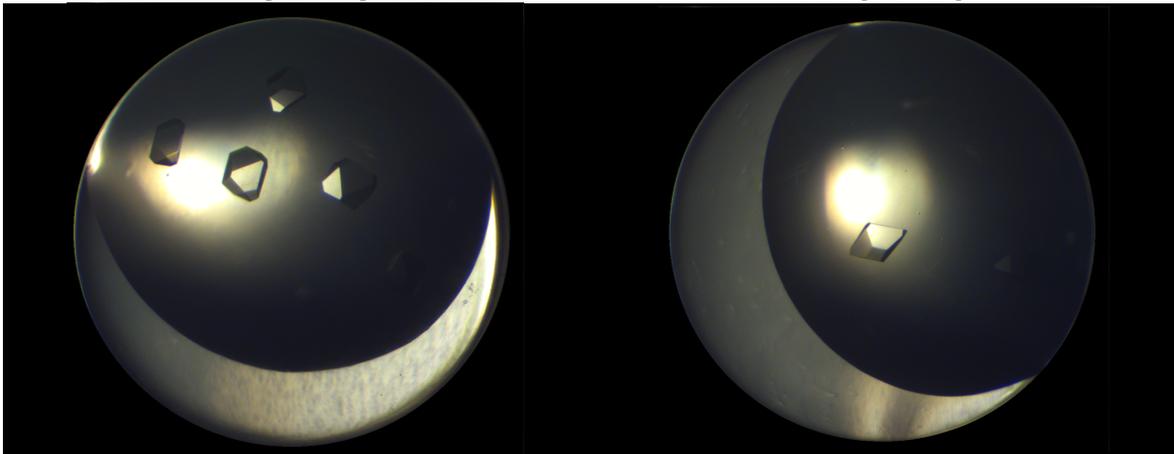
IL7-3% [C₂mim]OAc

IL7-6% [C₂mim]OAc

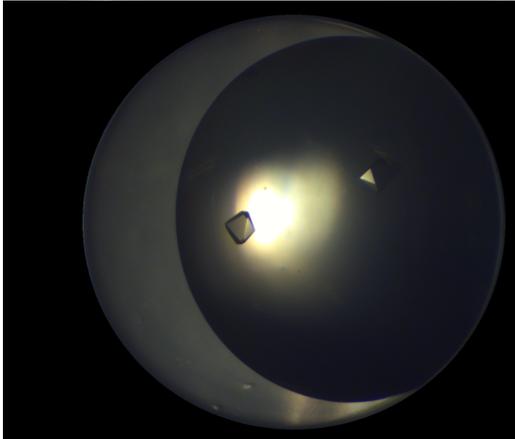


IL7-9% [C₂mim]OAc

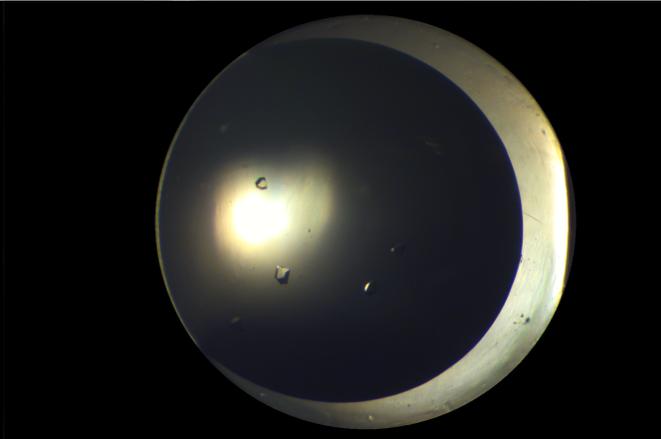
IL7-12% [C₂mim]OAc



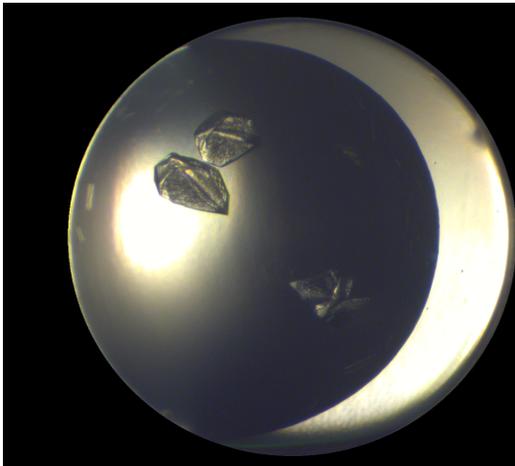
IL7-15% [C₂mim]OAc



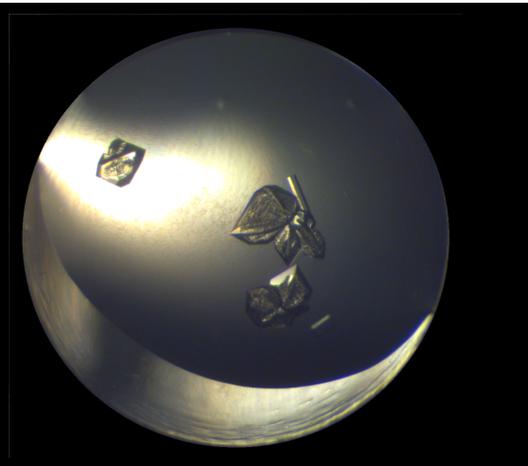
IL7-18% [C₂mim]OAc



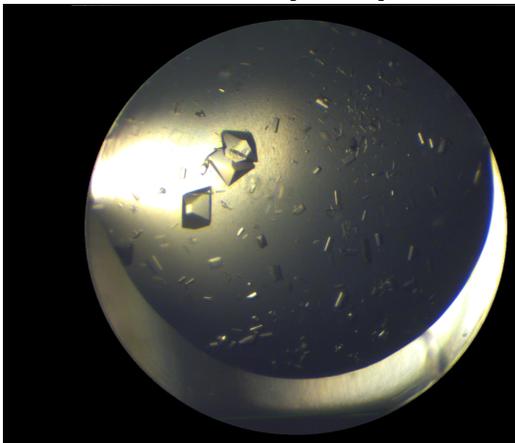
IL19-12% [BMIM]BF₄



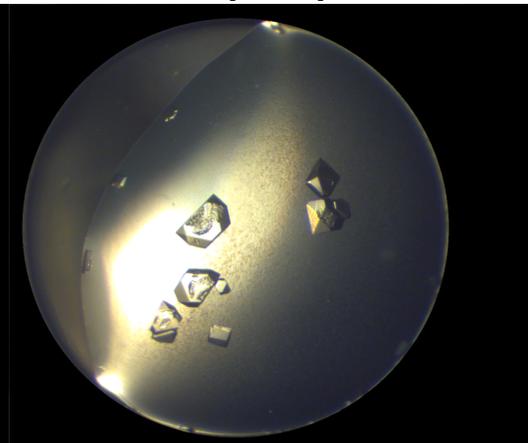
IL19-15% [BMIM]BF₄



IL19-18% [BMIM]BF₄



IL19-21% [BMIM]BF₄



VI. INDICADORES DE CALIDAD DE DATOS CRISTALINOS

Grupo espacial (Space group)

Es un grupo de operaciones de simetría que se combinan para describir la simetría de una región del espacio de 3 dimensiones. Está formado por un grupo puntual más el vector de translación.

Celda unidad (Unit cell)

Es cada bloque, de una forma y tamaño determinados (pero todos iguales). Su tamaño viene determinado por la longitud de sus tres aristas (a , b , c), y la forma por el valor de los ángulos entre dichas aristas (α , β , γ) [117].

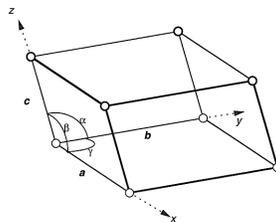


Figura 54 Las dimensiones de la celda unidad se especifican por tres redes de traslación cuyas longitudes son a , b , y c . Los ángulos entre ellos son α , β y γ . Las coordenadas x , y , z se miden a lo largo de a , b , y c , respectivamente.

Reflexiones totales (Total reflections)

El número total de reflexiones observadas en un conjunto de datos.

Reflexiones únicas (Unique reflections)

La palabra “únicas” es usada para denotar las reflexiones características requeridas para generar un conjunto completo de reflexiones por las operaciones de simetría.

Resolution range (Å)

Determinado por una combinación de estadísticas relativas a la última capa (alta resolución) del conjunto de datos.

Integridad de datos (%) (Completeness)

La integridad de datos de un conjunto de intensidades difractados se puede definir, para una resolución dada, como

$$\frac{\text{número de reflexiones únicas medidas}}{\text{número total de reflexiones únicas}}$$

Overall: Mide si se han colectadas todas las reflexiones en la unidad asimétrica.

Last Shell: El porcentaje total de las reflexiones colectadas en la última esfera a alta resolución de un conjunto de datos.

Factor R

Estadística llamada R, como "factor de fiabilidad". En esencia R mide la precisión como la relación

$$\frac{\text{diferencia media entre los valores que deberían ser los mismos}}{\text{magnitud media de los valores medidos}}$$

Si R es pequeño, los valores se determinan con precisión. El valor de R indica el error fraccional medio.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} F_{obs}(hkl)}$$

R_{merge}

Este ha sido ampliamente utilizado en el pasado para determinar la resolución de corte. Sin embargo, cuanto mayor sea la multiplicidad, mayor es su valor y esto hace R_{merge} un indicador de mala calidad

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^n |I_i(hkl) - \bar{I}(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^n I_i(hkl)}$$

R_{meas}

$$R_{meas} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n}{n-1}} \sum_{i=1}^n |I_i(hkl) - \bar{I}(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^n I_i(hkl)}$$

$I/\sigma(I)$

La razón de la intensidad media $\langle I \rangle$ con su respectiva desviación estándar promedio obtenido a partir de mediciones $\langle \sigma(I) \rangle$. Esta relación es abreviada como $I/\sigma(I)$.

Multiplicidad de las intensidades medidas (Multiplicity)

Las reflexiones relacionadas por simetría son generalmente más informativas que la medición repetida de la misma reflexión, ya que las diferentes condiciones geométricas darán una medida más realista de la precisión de la medición de la intensidad.

$$\frac{\text{número total de mediciones de intensidad}}{\text{número total de las reflexiones únicas medidas}}$$

Wilson B-factor (Å^2)

La cantidad B se refiere a menudo como el "factor de temperatura", aunque en cristales de proteínas la parte más importante de ella proviene del desorden intrínseco del cristal en lugar de vibración térmica. B en general es de alrededor de $15\text{-}20\text{Å}^2$ para buenos cristales de una proteína de tamaño promedio a temperatura ambiente, que tiende a

ser más grandes para celdas unitarias grandes y estructuras más flexibles. Para cristales perfectamente ordenados, podrá ser tan bajo como 2.5\AA^2 .

Factor $CC_{1/2}$

Parar $CC_{1/2}$ el conjunto de datos se divide aleatoriamente por la mitad y se determina el coeficiente de correlación de Pearson

$$CC^* = \sqrt{\frac{2CC_{1/2}}{1 + CC_{1/2}}}$$

Para determinar dónde cortar los datos, los resultados de la a t de Student pueden indicar dónde termina la significación estadística (el conjunto de datos son generalmente insignificantes si $CC_{1/2} < 0,15$ o inferior).

Mosaicity

Relación del ordenamiento de las celdas unitarias alineadas. El efecto sobre el patrón de difracción para valores de mosaicidad baja hace que los picos sean demasiado fuertes para medir un pequeño cristal. Una extensión del alta mosaicidad puede causar problemas.

VII. RECOPIACIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA DE REFINAMIENTO

i. Crecimiento de cristales de lisozima en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos

Tabla 20 Crecimiento de cristales de lisozima en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos

	1) Ctrl	2) Ctrl	1) 48h	2) 48h	1) 3Weeks	2) 3Weeks
Longitud de onda (Å)	0.77491	0.77491	0.77491	0.77491	0.77491	0.77491
Grupo espacial	P 4 ₃ 2 ₁ 2					
Celda unidad (Å, °)	a = b = 78.899	a = b = 78.891	a = b = 78.911	a = b = 78.961	a = b = 78.886	a = b = 78.852
	c = 38.111	c = 38.096	c = 38.108	c = 38.113	c = 38.197	c = 38.238
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$					
Reflexiones totales	126730 (9633)	97344 (7298)	149215 (11422)	149413 (11426)	182883 (12951)	125941 (9447)
Reflexiones únicas	32620 (2412)	25231 (1872)	38271 (2844)	38242 (2827)	47257 (3521)	32473 (2370)
Rango de resolución (Å)	50 - 1.56	50 - 1.70	50 - 1.48	50 - 1.48	50 - 1.38	50 - 1.70
	(1.60 - 1.56)	(1.74 - 1.70)	(1.52 - 1.48)	(1.52 - 1.48)	(1.42 - 1.38)	(1.60 - 1.56)
Integridad de datos (%)	1.00 (1.00)	1.00 (1.00)	1.00 (1.00)	1.00 (1.00)	1.00 (0.99)	0.99 (0.97)
R_{merge}	0.051 (0.813)	0.071 (0.829)	0.043 (0.760)	0.043 (0.788)	0.028 (0.770)	0.063 (0.804)
R_{meas}	0.059 (0.941)	0.083 (0.963)	0.050 (0.878)	0.050 (0.905)	0.032 (0.904)	0.073 (0.927)
I/σ(I)	16.64 (1.90)	12.81 (1.83)	19.11 (1.98)	19.23 (1.92)	25.56 (1.92)	16.72 (1.99)
Multiplicidad	3.9 (4.0)	3.9 (3.9)	3.9 (4.0)	3.9 (4.0)	3.9 (4.0)	3.9 (4.0)
Factor B de Wilson (Å²)	26.1	27	25.1	24.7	24.5	23.9
CC_{1/2}	0.999 (0.550)	0.998 (0.626)	0.999 (0.648)	0.999 (0.653)	1.000 (0.681)	0.999 (0.607)
Mosaicidad	0.069	0.064	0.076	0.076	0.127	0.089

ii. *Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos*

Tabla 21 Crecimiento de cristales de Glucosa Isomerasa en presencia de un campo magnético de 16.5 T aplicado en diferentes tiempos

	1) Ctrl	2) Ctrl	1) 48h	2) 48h	1) 3Weeks	2) 3Weeks
Longitud de onda (Å)	0.77491	0.77491	0.77491	0.77491	0.77491	0.77491
Grupo espacial	<i>I</i> 2 2 2					
Celda unidad (Å, °)	<i>a</i> = 93.820	<i>a</i> = 93.768	<i>a</i> = 93.910	<i>a</i> = 93.958	<i>a</i> = 93.980	<i>a</i> = 94.003
	<i>b</i> = 99.135	<i>b</i> = 98.960	<i>b</i> = 99.458	<i>b</i> = 99.504	<i>b</i> = 99.395	<i>b</i> = 99.492
	<i>c</i> = 103.051	<i>c</i> = 102.903	<i>c</i> = 103.131	<i>c</i> = 103.114	<i>c</i> = 103.037	<i>c</i> = 103.066
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$					
Reflexiones totales	137671 (10470)	78820 (5563)	286883 (21955)	201331 (14559)	186729 (13168)	314375 (24152)
Reflexiones únicas	69062 (5163)	40061 (2931)	141708 (10482)	100259 (7220)	90815 (6867)	154948 (11736)
Rango de resolución (Å)	50 - 1.92	50 - 2.28	50 - 1.50	50 - 1.68	50 - 1.74	50 - 1.46
	(1.97 - 1.92)	(2.34 - 2.28)	(1.54 - 1.50)	(1.72 - 1.68)	(1.79 - 1.74)	(1.50 - 1.46)
Integridad de datos (%)	0.99 (0.97)	0.95 (0.95)	0.95 (0.95)	0.94 (0.92)	0.95 (0.97)	0.96 (0.97)
R_{merge}	0.113 (0.609)	0.164 (0.591)	0.048 (0.487)	0.097 (0.593)	0.077 (0.573)	0.040 (0.541)
R_{meas}	0.151 (0.810)	0.222 (0.794)	0.065 (0.661)	0.128 (0.779)	0.098 (0.738)	0.051 (0.699)
I/σ(I)	6.74 (1.76)	4.94 (1.72)	11.25 (1.78)	8.80 (1.76)	8.91 (1.64)	14.03 (1.89)
Multiplicidad	2.0 (2.0)	2.0 (1.9)	2.0 (2.1)	2.0 (2.0)	2.1 (1.9)	2.0 (2.1)
Factor B de Wilson (Å²)	24.9	28.5	22.1	21.9	24.1	24.8
CC_{1/2}	0.988 (0.570)	0.971 (0.702)	0.998 (0.625)	0.989 (0.680)	0.996 (0.625)	0.999 (0.649)
Mosaicidad	0.113	0.255	0.1	0.075	0.068	0.077

iii. Comparación de los datos estadísticos de rayos X para la Glucosa Isomerasa colectados a temperatura ambiente

Tabla 22 Comparación de los datos estadísticos de rayos X para la Glucosa Isomerasa colectados a temperatura ambiente

	2) 3 Semanas a 16.5T	Difusión de vapor (DC)
Longitud de onda (Å)	0.77491	0.77491
Grupo espacial	<i>I</i> 2 2 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
Celda unidad (Å, °)	<i>a</i> = 94.003	<i>a</i> = 82.091
	<i>b</i> = 99.492	<i>b</i> = 93.893
	<i>c</i> = 103.066	<i>c</i> = 97.688
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Reflexiones totales	314375 (24152)	535276 (39520)
Reflexiones únicas	154948 (11736)	275861 (20643)
Rango de resolución (Å)	50 - 1.46	50 - 1.40
	(1.50 - 1.46)	(1.44 - 1.40)
Integridad de datos (%)	0.96 (0.97)	0.96 (0.97)
R_{merge}	0.040 (0.541)	0.061 (0.491)
R_{meas}	0.051 (0.699)	0.081 (0.659)
I/σ(I)	14.03 (1.89)	8.47 (1.75)
Multiplicidad	2.0 (2.1)	1.9 (1.9)
Factor B de Wilson (Å²)	24.8	17.7
CC_{1/2}	0.999 (0.649)	0.997 (0.669)
Mosaicidad	0.077	0.173

REFERENCIAS

Be less curious about people and more curious about ideas.

[Anecdotal response to a reporter's enquiry.]

— Marie Curie

*As quoted in Clifton Fadiman and André Bernard, Bartlett's Book of Anecdotes (2000),
150.*



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. McPherson, A. and A. McPherson, *Crystallization of biological macromolecules*. 1999.
2. Margiolaki, I. and J.P. Wright, *Powder crystallography on macromolecules*. Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography, 2008. **64**(1): p. 169-180.
3. Stojanoff, V., et al., *Synchrotron radiation in life sciences*. Protein and peptide letters, 2012. **19**(7): p. 761-769.
4. Deschamps, J.R., *The role of crystallography in drug design*. The AAPS journal, 2005. **7**(4): p. E813-E819.
5. Gao, J., et al., *Mechanisms and free energies of enzymatic reactions*. Chemical reviews, 2006. **106**(8): p. 3188-3209.
6. Spichiger-Keller, U.E., *Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications*. 2008: John Wiley & Sons.
7. Giegé, R. and C. Sauter, *Biocrystallography: past, present, future*. HFSP Journal, 2010. **4**(3-4): p. 109-121.
8. Hudáky, P. and A. Perczel, *Toward direct determination of conformations of protein building units from multidimensional NMR experiments VI. Chemical shift analysis of his to gain 3D structure and protonation state information*. Journal of Computational Chemistry, 2005. **26**(13): p. 1307-1317.
9. Vranken, W.F., G.W. Vuister, and A.M.J.J. Bonvin, *NMR-Based Modeling and Refinement of Protein 3D Structures*, in *Molecular Modeling of Proteins*, A. Kukol, Editor. 2015, Springer New York: New York, NY. p. 351-380.
10. Berman, H., K. Henrick, and H. Nakamura, *Announcing the worldwide protein data bank*. Nature Structural & Molecular Biology, 2003. **10**(12): p. 980-980.
11. Flores-Hernández, E., et al., *An electrically assisted device for protein crystallization in a vapor-diffusion setup*. Journal of Applied Crystallography, 2013. **46**(Pt 3): p. 832-834.
12. Giegé, R. and V. Mikol, *Crystallogenesis of proteins*. Trends in Biotechnology, 1989. **7**(10): p. 277-282.

13. Ducruix, A. and R. Giegé, *Crystallization of nucleic acids and proteins*. 1992: IRL Press at Oxford University Press.
14. Chayen, N.E., et al., *Trends and challenges in experimental macromolecular crystallography*. Quarterly reviews of biophysics, 1996. **29**(03): p. 227-278.
15. Chayen, N.E., *Turning protein crystallisation from an art into a science*. Current Opinion in Structural Biology, 2004. **14**(5): p. 577-583.
16. Saridakis, E. and N.E. Chayen, *Systematic improvement of protein crystals by determining the supersolubility curves of phase diagrams*. Biophysical journal, 2003. **84**(2): p. 1218-1222.
17. Frontana-Uribe, B.A. and A. Moreno, *On Electrochemically Assisted Protein Crystallization and Related Methods†*. Crystal Growth & Design, 2008. **8**(12): p. 4194-4199.
18. Wada, H., et al., *Application of high-field superconducting magnet to protein crystallization*. Physics Procedia, 2012. **36**: p. 953-957.
19. Adam, M., et al., *Liquid-Liquid Diffusion - Assisted Crystallization: A Fast and Versatile Approach Toward High Quality Mixed Quantum Dot - Salt Crystals*. Advanced Functional Materials, 2015. **25**(18): p. 2638-2645.
20. Hardacre, C., et al., *Structure of molten 1,3-dimethylimidazolium chloride using neutron diffraction*. The Journal of Chemical Physics, 2003. **118**(1): p. 273-278.
21. Bowron, D.T. and J.L. Finney, *Structure of a salt-amphiphile-water solution and the mechanism of salting out*. The Journal of Chemical Physics, 2003. **118**(18): p. 8357-8372.
22. Cadena, C., et al., *Molecular modeling and experimental studies of the thermodynamic and transport properties of pyridinium-based ionic liquids*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(6): p. 2821-2832.
23. Pusey, M.L., et al., *Protein crystallization using room temperature ionic liquids*. Crystal growth & design, 2007. **7**(4): p. 787-793.
24. Vollrath, F., D. Porter, and C. Holland, *There are many more lessons still to be learned from spider silks*. Soft Matter, 2011. **7**(20): p. 9595-9600.

25. Hofmeister, F., *Zur lehre von der wirkung der salze*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1888. **25**(1): p. 1-30.
26. Ball, P. and J.E. Hallsworth, *Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(13): p. 8297-8305.
27. Kumar, A. and P. Venkatesu, *Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series?* International journal of biological macromolecules, 2014. **63**: p. 244-253.
28. Gutowski, K.E., et al., *Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(22): p. 6632-6633.
29. Bridges, N.J., K.E. Gutowski, and R.D. Rogers, *Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS)*. Green Chemistry, 2007. **9**(2): p. 177-183.
30. Garlitz, J.A., et al., *Ethylammonium nitrate: a protein crystallization reagent*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 1999. **55**(12): p. 2037-2038.
31. Weingärtner, H., C. Cabrele, and C. Herrmann, *How ionic liquids can help to stabilize native proteins*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2012. **14**(2): p. 415-426.
32. Evans, D.F., et al., *Micelle formation in ethylammonium nitrate, a low-melting fused salt*. Journal of Colloid and Interface Science, 1982. **88**(1): p. 89-96.
33. Judge, R.A., et al., *The effect of ionic liquids on protein crystallization and X-ray diffraction resolution*. Crystal Growth and Design, 2009. **9**(8): p. 3463-3469.
34. Lange, C., G. Patil, and R. Rudolph, *Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(ω -hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides*. Protein Science, 2005. **14**(10): p. 2693-2701.
35. Hekmat, D., et al., *Advanced protein crystallization using water-soluble ionic liquids as crystallization additives*. Biotechnology letters, 2007. **29**(11): p. 1703-1711.

36. Summers, C.A. and R.A. Flowers, *Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate*. *Protein Science*, 2000. **9**(10): p. 2001-2008.
37. Lozano, P., et al., *Stabilization of α - chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions*. *Biotechnology and bioengineering*, 2001. **75**(5): p. 563-569.
38. Baker, S.N., et al., *Fluorescence studies of protein thermostability in ionic liquids*. *Chemical communications*, 2004(8): p. 940-941.
39. De Diego, T., et al., *Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the α - chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1 - ethyl - 3 - methylimidazolium bis [(trifluoromethyl) sulfonyl] amide*. *Biotechnology and bioengineering*, 2004. **88**(7): p. 916-924.
40. Sun, L., et al., *Ionic liquid 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate for shotgun membrane proteomics*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011. **399**(10): p. 3387-3397.
41. Pollack, G.H., *Cells, gels and the engines of life: a new, unifying approach to cell function*. 2001: Ebner & Sons Seattle, WA.
42. Pizzitutti, F., et al., *How protein surfaces induce anomalous dynamics of hydration water*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(26): p. 7584-7590.
43. Chin, C.C., J.B. Dence, and J.C. Warren, *Crystallization of human placental estradiol 17beta-dehydrogenase. A new method for crystallizing labile enzymes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1976. **251**(12): p. 3700-3705.
44. Köhler, M., J. Friedrich, and J. Fidy, *Proteins in electric fields and pressure fields: basic aspects*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998. **1386**(2): p. 255-288.
45. Fidy, J., E. Balog, and M. Köhler, *Proteins in electric fields and pressure fields: experimental results*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998. **1386**(2): p. 289-303.
46. Taleb, M., et al., *Crystallization of proteins under an external electric field*. *Journal of Crystal Growth*, 1999. **200**(3): p. 575-582.

47. Taleb, M., et al., *Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field*. Journal of Crystal Growth, 2001. **232**(1–4): p. 250-255.
48. Nanev, C.N. and A. Penkova, *Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields*. Journal of Crystal Growth, 2001. **232**(1): p. 285-293.
49. Nieto-Mendoza, E., et al., *Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes: effect of the potential control*. Journal of Crystal Growth, 2005. **275**(1): p. e1437-e1446.
50. Al-Haq, M.I., et al., *An apparatus for electric-field-induced protein crystallization*. Journal of Applied Crystallography, 2007. **40**(1): p. 199-201.
51. Otwinowski, Z. and W. Minor, *[20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. Methods in enzymology, 1997. **276**: p. 307-326.
52. Moreno, A. and G. Sazaki, *The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme*. Journal of crystal growth, 2004. **264**(1): p. 438-444.
53. Hou, D. and H.-C. Chang, *AC field enhanced protein crystallization*. Applied Physics Letters, 2008. **92**(22): p. 223902.
54. Lee, I.S., et al., *Nonphotochemical Laser Induced Nucleation of Hen Egg White Lysozyme Crystals†*. Crystal Growth and Design, 2008. **8**(12): p. 4255-4261.
55. Biertumpfel, C. and C. Sauter, *Crystallization of biological macromolecules using agarose gel*. Acta Crystallographica Section D, 2002. **58**(10 Part 1): p. 1657-1659.
56. Hammadi, Z., et al., *Protein crystallization induced by a localized voltage*. Crystal growth & design, 2007. **7**(8): p. 1472-1475.
57. Mason, B.D., et al., *Liquid-Liquid Phase Separation of a Monoclonal Antibody and Nonmonotonic Influence of Hofmeister Anions*. Biophysical Journal, 2010. **99**(11): p. 3792-3800.
58. Koizumi, H., et al., *Control of effect on the nucleation rate for hen egg white lysozyme crystals under application of an external ac electric field*. Langmuir, 2011. **27**(13): p. 8333-8338.

59. Heijna, M.C.R., et al., *Magnetically controlled gravity for protein crystal growth*. Applied physics letters, 2007. **90**(26): p. 264105.
60. Astier, J.P., S. Veessler, and R. Boistelle, *Protein crystals orientation in a magnetic field*. Acta Crystallographica Section D, 1998. **54**(4): p. 703-706.
61. Numoto, N., et al., *Observation of the orientation of membrane protein crystals grown in high magnetic force fields*. Journal of Crystal Growth, 2013. **367**: p. 53-56.
62. Rothgeb, T.M. and E. Oldfield, *Nuclear magnetic resonance of heme protein crystals. General aspects*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(3): p. 1432-1446.
63. Sazaki, G., et al., *Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals*. Journal of Crystal Growth, 1997. **173**(1): p. 231-234.
64. Ataka, M., E. Katoh, and N.I. Wakayama, *Magnetic orientation as a tool to study the initial stage of crystallization of lysozyme*. Journal of crystal growth, 1997. **173**(3): p. 592-596.
65. Yanagiya, S.-i., et al., *Effects of a magnetic field on the growth rate of tetragonal lysozyme crystals*. Journal of crystal growth, 2000. **208**(1): p. 645-650.
66. Wakayama, N.I., *Effects of a strong magnetic field on protein crystal growth*. Crystal growth & design, 2003. **3**(1): p. 17-24.
67. Sazaki, G., *Crystal quality enhancement by magnetic fields*. Progress in biophysics and molecular biology, 2009. **101**(1): p. 45-55.
68. Becker, J.F., et al., *Orientation of chlorophyll in vivo. Studies with magnetic field oriented Chlorella*. Biochemical and biophysical research communications, 1973. **51**(3): p. 597-602.
69. Lonsdale, K., *73. Diamagnetic anisotropy of conjugated compounds*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1938: p. 364-368.
70. Worcester, D.L., *Structural origins of diamagnetic anisotropy in proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(11): p. 5475-5477.
71. Pauling, L., *Diamagnetic anisotropy of the peptide group*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(5): p. 2293-2294.

72. De Diego, T., et al., *Understanding Structure–Stability Relationships of Candida antarctica Lipase B in Ionic Liquids*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(3): p. 1457-1464.
73. van Rantwijk, F., F. Secundo, and R.A. Sheldon, *Structure and activity of Candida antarctica lipase B in ionic liquids*. *Green Chemistry*, 2006. **8**(3): p. 282-286.
74. Uppenberg, J., et al., *Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from Candida antarctica*. *Journal of molecular biology*, 1994. **235**(2): p. 790-792.
75. Stauch, B., S.J. Fisher, and M. Cianci, *Open and closed states of Candida antarctica lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation*. *Journal of lipid research*, 2015. **56**(12): p. 2348-2358.
76. Uppenberg, J., et al., *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. *Structure*, 1994. **2**(4): p. 293-308.
77. Rose, A.S. and P.W. Hildebrand, *NGL Viewer: a web application for molecular visualization*. *Nucleic Acids Research*, 2015. **43**(W1): p. W576-W579.
78. Strzelczyk, P., et al., *Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase B from Candida antarctica*. *Acta Biochimica Polonica*, 2016. **63**(1): p. 103-109.
79. Qian, Z., et al., *Structural redesign of lipase B from Candida antarctica by circular permutation and incremental truncation*. *Journal of molecular biology*, 2009. **393**(1): p. 191-201.
80. Xie, Y., et al., *Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(11): p. 7994-8006.
81. McPherson, A., *A comparison of salts for the crystallization of macromolecules*. *Protein Science*, 2001. **10**(2): p. 418-422.
82. Ramagopal, U.A., M. Dauter, and Z. Dauter, *SAD manganese in two crystal forms of glucose isomerase*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2003. **59**(5): p. 868-875.
83. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *nature*, 1970. **227**: p. 680-685.

84. Desjardins, P. and D. Conklin, *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2010(45): p. e2565-e2565.
85. Doty, P. and J.T. Edsall, *Light scattering in protein solutions*. Advances in protein chemistry, 1951. **6**: p. 35-121.
86. McRee, D.E., *Practical protein crystallography*. 1999: Academic press.
87. Guiseley, K.B., *The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose*. Carbohydrate Research, 1970. **13**(2): p. 247-256.
88. Henisch, H.K., J.I. Hanoka, and J. Dennis, *Growth Rate and Defect Structure of Gel - Grown Crystals*. Journal of The Electrochemical Society, 1965. **112**(6): p. 627-629.
89. Uda, S., et al., *Crystal growth under external electric fields*. AIP Conference Proceedings, 2014. **1618**(1): p. 261-264.
90. Baba, S., et al., *Humidity control and hydrophilic glue coating applied to mounted protein crystals improves X-ray diffraction experiments*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2013. **69**(9): p. 1839-1849.
91. Yin, D.-C., *Protein crystallization in a magnetic field*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 2015. **61**(1): p. 1-26.
92. Adachi, H., et al., *Effective protein crystallization using crystal hysteresis*. Japanese journal of applied physics, 2003. **42**(4A): p. L384.
93. Otwinowski, Z. and W. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. *Macromol Crystallogr Part A* 276: 307–326. 1997.
94. Kabsch, W., *Xds*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. **66**(2): p. 125-132.
95. Evans, P., *Scaling and assessment of data quality*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2006. **62**(1): p. 72-82.
96. Winn, M.D., et al., *Overview of the CCP4 suite and current developments*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2011. **67**(4): p. 235-242.
97. Taylor, G.L., *Introduction to phasing*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. **66**(4): p. 325-338.

98. McCoy, A.J., *Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2007. **63**(1): p. 32-41.
99. Adams, P.D., et al., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. **66**(2): p. 213-221.
100. Vagin, A. and A. Teplyakov, *MOLREP: an automated program for molecular replacement*. Journal of applied crystallography, 1997. **30**(6): p. 1022-1025.
101. Keegan, R.M. and M.D. Winn, *MrBUMP: an automated pipeline for molecular replacement*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2008. **64**(1): p. 119-124.
102. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004. **60**(12): p. 2126-2132.
103. Afonine, P.V., et al., *Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2012. **68**(4): p. 352-367.
104. DeLano, W.L., *The PyMOL molecular graphics system*. 2002.
105. Trueblood, K.N., et al., *Atomic displacement parameter nomenclature. Report of a subcommittee on atomic displacement parameter nomenclature*. Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography, 1996. **52**(5): p. 770-781.
106. Murshudov, G.N., et al., *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2011. **67**(4): p. 355-367.
107. Wang, Z., et al., *Crystallization control of thermal stability and morphology of hen egg white lysozyme crystals by ionic liquids*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(9): p. 5444-5448.
108. Macrae, C.F., et al., *Mercury: visualization and analysis of crystal structures*. Journal of Applied Crystallography, 2006. **39**(3): p. 453-457.

109. Koizumi, H., et al., *Crystallization of high-quality protein crystals using an external electric field*. Journal of Applied Crystallography, 2015. **48**(5): p. 1507-1513.
110. Bard, A.J., et al., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Vol. 2. 1980: Wiley New York.
111. Ramachandran, G.N.t. and V. Sasisekharan, *Conformation of polypeptides and proteins*. Advances in protein chemistry, 1968. **23**: p. 283-437.
112. Martínez-Caballero, S., et al., *Glucose Isomerase Polymorphs Obtained Using an Ad Hoc Protein Crystallization Temperature Device and a Growth Cell Applying an Electric Field*. Crystal Growth & Design, 2016. **16**(3): p. 1679-1686.
113. Jentoft, F., *Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy*. 2004.
114. Brookhaven, S.W.T., *Photon Correlation Spectroscopy in Particle, in Instruments Corporation, Holtsville, Editor.:* NY, USA.
115. Malvern-Instruments. *Presentation: Protein sizing by light scattering, molecular weight and polydispersity*. Available from: <http://nanoparticles.org/pdf/nobbmann.pdf>.
116. Purcell, E.M., *Berkeley Physics Course, Volume 2- Electricity and Magnetism*. 2 ed. Vol. 2. U.S.A.
117. Blow, D., *Outline of crystallography for biologists*. 2002: Oxford University Press on Demand.

PUBLICACIÓN DERIVADA

The beauty of crystals lies in the planeness of their faces.

— Alfred Edwin Howard Tutton

In The Natural History of Crystals (1924), 5.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Recent Advances in the Understanding of the Influence of Electric and Magnetic Fields on Protein Crystal Growth

Carina Pareja-Rivera,[†] Mayra Cuéllar-Cruz,[‡] Nuria Esturau-Escofet,[†] Nicola Demitri,[§] Maurizio Polentarutti,[§] Vivian Stojanoff,^{||} and Abel Moreno^{*,†,||}

[†]Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Cd.Mx., México

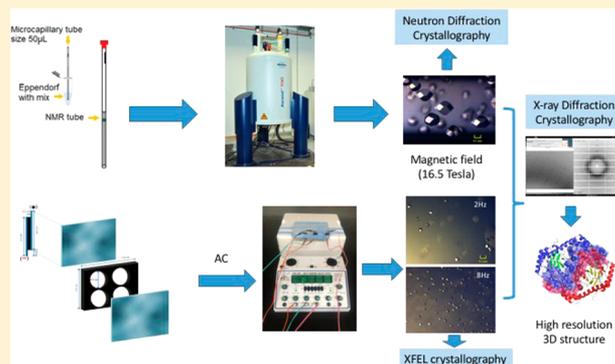
[‡]Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N. C.P. 36050 Guanajuato, Guanajuato México

[§]Elettra–Sincrotrone Trieste, S.S. 14 km 163.5 in Area Science Park, 34149 Basovizza-Trieste, Italy

^{||}NSLS- Brookhaven National Laboratory, Upton New York 11973, United States

Supporting Information

ABSTRACT: In this contribution we use nonconventional methods that help to increase the success rate of a protein crystal growth, and consequently of structural projects using X-ray diffraction techniques. In order to achieve this purpose, this contribution presents new approaches involving more sophisticated techniques of protein crystallization, not just for growing protein crystals of different sizes by using electric fields, but also for controlling crystal size and orientation. This latter was possible through the use of magnetic fields that allow to obtain protein crystals suitable for both high-resolution X-ray and neutron diffraction crystallography where big crystals are required. This contribution discusses some pros, cons and realities of the role of electromagnetism fields in protein crystallization research, and their effect on protein crystal contacts. Additionally, we discuss the importance of room and low temperatures during data collection. Finally, we also discuss the effect of applying a rather strong magnetic field of 16.5 T, for shorts and long periods of time, on protein crystal growth, and on the 3D structure of two model proteins.



1. INTRODUCTION

X-ray crystallography is a powerful technique for determining the 3D structure of proteins and other biomolecules at high resolution.¹ Nowadays, X-ray diffraction of single crystals (by means of a rotating anode generator or synchrotron radiation facility) is still the most important technique for obtaining the 3D structure, at atomic resolution, of small and large biological macromolecules. Additionally, a technique that provides suitable structural data (not at atomic level) is small-angle X-ray scattering (SAXS), though it depends on the complexity of the protein structure. In the case of glycoproteins, for instance, the approach will be limited due to the large conformational freedom of sugars surrounding the structure and other flexible biomacromolecular complexes.^{2–4} However, X-ray diffraction crystallography is not the only technique available for obtaining the 3D structure of biological macromolecules. Other techniques, such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR), allow structural characterization of proteins in solution. This technique works well with proteins of molecular weight (MW) below 100 kDa with a high precision of the assignments of the residues.⁵ However, the recent and most sophisticated

technique, exclusively applied to large biomacromolecular complexes, is cryo-electron microscopy (cryo-EM).^{6–8} Another way of predicting the 3D structure of biomolecules is through computational approaches that allow modelling biomolecules considering their homology and similarities (either using NMR or X-ray data), though not at a very high resolution.^{9,10} We now count on a wide range of techniques (from classic to advanced methods) that focus on obtaining crystals for a variety of applications.¹¹ However, as obvious as all these methods seem for obtaining the 3D structure, they still require the production of suitable crystals for high resolution crystallographic analyses, as some molecules will not crystallize properly (we have not yet fully identified why this happens). Most of these limitations could be due either to intrinsically disordered protein sequences or to the low crystallizability propensity, possibly induced by the intrinsic physicochemical properties of the protein itself.^{3,12} Therefore, obtaining good protein crystals can

Received: September 14, 2016

Revised: November 4, 2016

Published: December 5, 2016

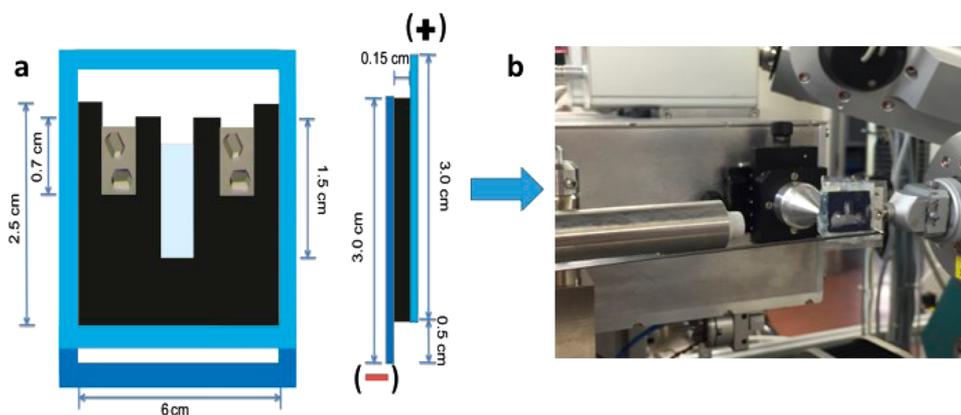


Figure 1. (a) Growth cell using an electric field applying a DC (vapor diffusion setup). The right-side (b) shows the cell mounted on the goniometer of the XRD1 diffraction beamline (Elettra, Trieste) for in situ data collection at room temperature.

be very tricky because of the multifactorial parameters involved in the crystallization process, and because of the lack of knowledge of some of the aspects involved in it, such as nucleation details. More advanced methods for obtaining very high crystal quality have been recently developed. Among these methods we find electric,^{13,14} magnetic fields,^{15–17} crystal growth in gels,¹⁸ microfluidic chips,¹⁹ and many others. Experiments carried out through these methods proved, in general, that higher crystal quality is usually obtained. Additionally, these crystals diffracted at higher resolution and were much better compared to samples obtained with standard crystallization methods.^{17,20}

The detailed enzymatic mechanisms have been studied at molecular and atomic levels via neutron crystallography, which is gaining popularity. Neutron crystallography is, in fact, a powerful complementary technique to X-ray structural studies, which explicitly determine the location and orientation of deuterium atoms in proteins.^{21–23} However, this technique requires protein crystals larger than those used for conventional X-ray crystallography, due to the low flux of neutron sources (requiring longer data collection time, varying from days to weeks). For this reason, only a few 3D structures have been deposited in the PDB (24 unique, 10 perdeuterated, and only 10 at very high resolution), where neutron diffraction has been used. Nonetheless, despite the apparent heavy restrictions on sample dimensions, recent significant advances, not only in the beamlines and the detectors technology, but also in the sample preparation (perdeuteration), allowed us to obtain high resolution structures from neutron diffraction.²³

In this work, we have used advanced techniques for protein crystallization focused on the crystal's size control through electric fields (AC/DC) and the crystal's orientation by strong magnetic fields. These techniques helped to obtain large and suitable crystals not just for high-resolution X-ray crystallography, but also for neutron diffraction crystallography. This contribution also discusses some pros, cons, and realities on the use of electromagnetic fields for protein crystal growth through studying two model proteins (lysozyme and glucose isomerase). This work also highlights the importance of room and low temperature during data collection; therefore, we show the data collected into two synchrotron facilities (Elettra in Trieste, Italy, and SLAC-SSRL in California, USA). Finally, we also discuss the effect of applying a rather strong magnetic field of 16.5 T, for short and long periods of time, on protein crystal growth, and on the 3D structure of the two model proteins.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Protein Crystallization Conditions and Cryoprotection.

One of the proteins used in these experiments was glucose isomerase (Hampton Research Corporation Cat. No. HR7-102). The crystallization conditions consisted of a typical protein concentration of 30 mg/mL and a precipitating agent consisting of a 0.2 M ammonium acetate buffer pH 7.0, 30% (w/v) PEG 6000. The second model protein was lysozyme (Seikagaku, Co. Code 100940 six times recrystallized). A stock protein solution of 80 mg/mL and 1.4 M NaCl as precipitating agent both were prepared in 0.1 M sodium acetate buffer solution pH 4.5. For batch crystallization experiments, the same volumes of both solutions, protein and precipitant, are carefully mixed, so that the final concentrations are half of the initial concentration. The data collection at low temperature by synchrotron radiation was performed under a flux of nitrogen gas kept at 100 K (as well as under conventional loops from 100 to 300 μm in size to fish the crystals). The precipitating agent of glucose isomerase perfectly worked as a cryoprotectant. For lysozyme, a mixture of 30% (v/v) PEG-1000 with mother liquor of NaCl (precipitating agent) has been used as cryoprotectant. We found that higher concentrations of PEG-1000 were not efficient, since crystals were dissolved and damaged, whereas ice rings appeared, when using lower concentrations. For experiments at room temperature, the data collection was performed mounting protein crystals in capillary tubes²⁴ or directly mounting the crystallization apparatus on the diffractometer (in situ data collection). It is important to remark that room temperature experiments for data collection were possible due to the high velocity of the Pilatus 2 M hybrid-pixel area detector (described later in the X-ray part).²⁵

2.2. Experimental Setup for Constructing a Growth Cell for Applying Electric Fields. The crystal growth cell consists of two polished float conductive ITO (indium tin oxide electrodes) glasses of $3.0 \times 2.5 \text{ cm}^2$, with a resistance ranging from 4 to 8 Ohms (Delta Technologies, Minnesota, USA). The conductive ITO-coated glass surfaces were placed inward, facing each other. Each of the ITO electrodes is displaced by 0.5 cm from one another, in order to provide safe connection of electric alligators to the electrodes (anode/cathode) when applying a direct (DC). The cell is prepared using a double well frame (for vapor diffusion set up) as shown in Figure 1a, made of elastic black rubber material, sealed with vacuum grease so the rubber frame is perfectly attached to the ITO glasses to avoid leakage. The growth cell can be closed afterward by using a gun for silicone bar melting. This was constructed following the procedure of Flores-Hernandez et al., with some modifications and improvements of the original design.¹³

The DC apparatus was a Potentiostat/Galvanostat (Vimar, Mexico) that supplied direct current ranging from 2 to 6 μA . During the nucleation, the DC applied current was first turned on, and off after 48 h for the nuclei to be fixed on the surface of the ITO electrodes. After that, the DC growth cell was left at constant temperature for the rest of the experiment, allowing the crystal to grow by the conventional

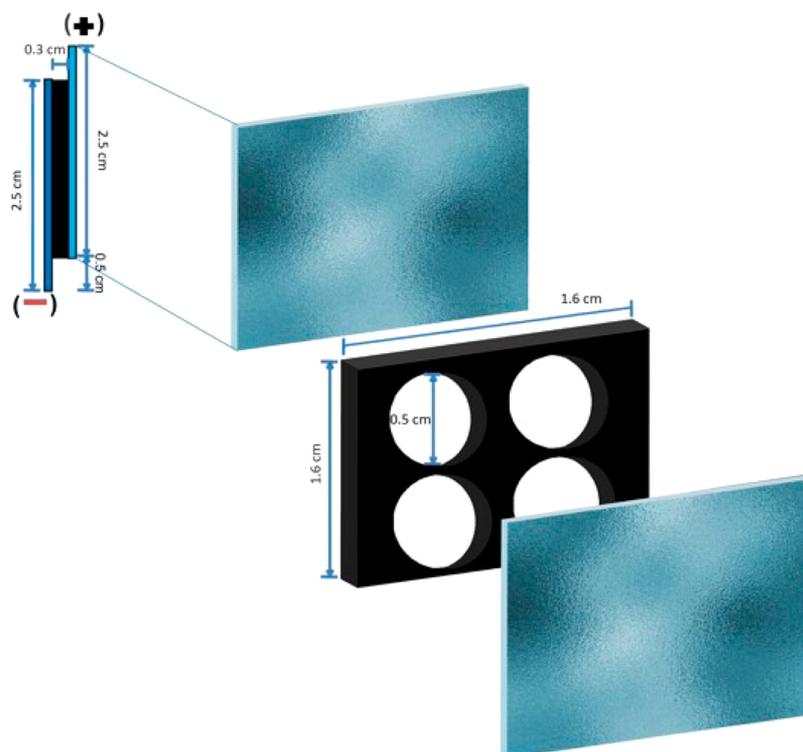


Figure 2. Growth cell for a batch crystallization experiment using an electric field that can be applied to four samples at the same time.

vapor diffusion setup (Figure 1a). Let us just point out that crystal growth cells can be put directly into the X-ray beam (as shown in Figure 1b) when collecting at room temperature only if the ITO electrodes are made on thin PET (polyethylene) layers (windows with a thickness of 0.05 mm have been used), as PET is almost transparent to the X-ray energies commonly used (above 12 keV).

For alternating current (AC) ranging from 2 to 8 Hz, a device fixed in dense-disperse wave mode (pulse wave) was used for these experiments (KWD-808 I Multipurpose health device, usually recommended for acupuncture treatment). The amplitude of these frequencies was in the range of $40 \text{ V} \pm 10 \text{ V}$. Figure 2 shows the experimental setup for this type of experiment (in AC mode), where protein and precipitating agent are carefully mixed and introduced into the cell, helped by insulin syringes. Needles are used to expel the air when introducing the mixture of protein and precipitating agent. At the beginning of the experiment, during the nucleation, the AC applied current was first turned on, and off after 48 h. The crystals grew by the classic batch crystallization process. Afterward, it was put directly into the X-ray beam, when collecting at room temperature only if the ITO electrodes are made on thin PET (polyethylene) layers as described previously.

2.3. Experimental Setup for the Crystallization of Proteins under the Influence of Magnetic Field. The mixture of protein stock plus precipitant (prepared in small Eppendorf tubes of 0.5 mL) is introduced in a disposable capillary pipet of $50 \mu\text{L}$ (Sigma-Aldrich Cod. Z-543292 of 1.0 mm inner diameter) by capillarity forces. Green mounting clay from Hampton research (Cod. HR4-326) can be used to seal both ends of the capillary pipettes (Figure 3). Once sealed, the capillary pipettes are introduced into an NMR glass tube (5 mm in diameter) and left for at least 48 h under the influence of a magnetic field of 16.5 T by using an NMR instrument of 700 MHz usually common in chemistry laboratories.

All experiments are performed at the temperature of the control unit of the NMR probe head, that usually goes from 291 to 293 K. The sample is left in the magnetic field during the whole process of the crystal growth, which may take two or more days. The longer the time, the higher the size and quality of the crystals. The lower part of the NMR magnetic tube (which is more or less 2.5 cm from the bottom of

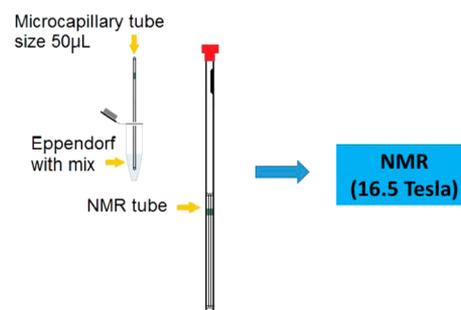


Figure 3. Experimental set up to prepare the mix, shown on the left-side of the scheme, in order to grow protein crystals under the influence of a strong magnetic force of 16.5 T.

the NMR tube) is the area where the magnetic force is homogeneous and the best crystals are obtained. Once the experiment is over, the NMR tube is recovered from the magnet and the capillary pipettes are then carefully extracted from it. After being extracted, the capillary pipettes are cut at both sides in order to harvest the crystals. This cut is performed with a glass-capillary cutting stone (Hampton Research Cod. HR4-334). Once both ends of the capillary pipettes are opened, we applied a little air pressure using either a plastic latex tubing attached to a 1 mL syringe or a pipet bulb. The little air pressure applied is enough to expel the solution with the crystals into a few microliters of a mother liquor or cryoprotectant, on either a two-well or a nine-well glass plate. If crystals would be attached to the walls of the capillary, we could then cut the capillary with microtools to recover them. There are two ways in which crystal data can be collected directly into the X-ray beam, one is mounting them in borosilicate capillary tubes at room temperature, and the other is by mounting them (previously cryo-protected) in plastics loops, followed by flash-cooling at low temperature.

2.4. Design of a Novel Device for Transportation of Protein Crystals to the Synchrotron Facilities. One of the main problems that protein crystals face when being transported to the synchrotrons is airports custom revision; if the Dewar is opened the crystals inside

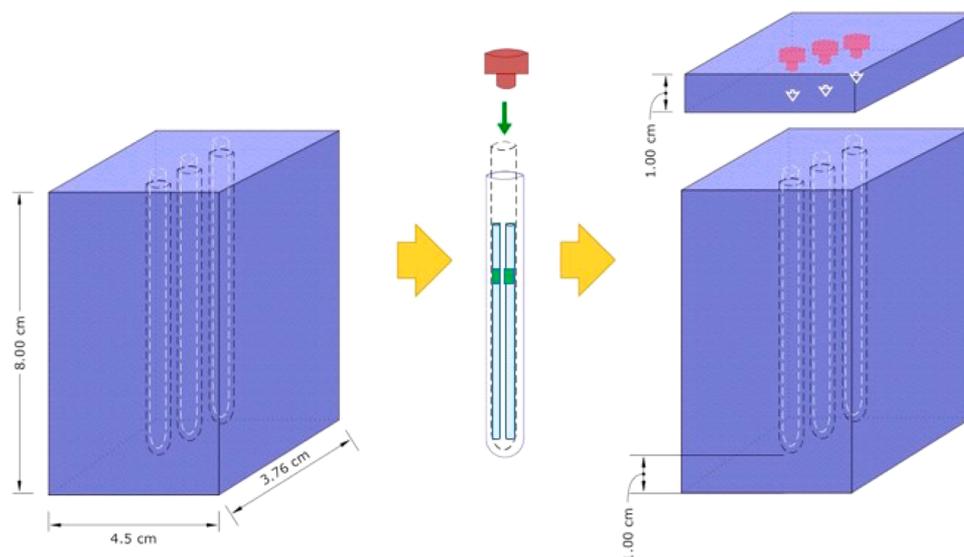


Figure 4. Device constructed in polyolefin used for thermal-safe storage and transportation of fresh room temperature grown protein crystals to the synchrotrons. Details of the composition are described in the text.

are usually damaged. As we have encountered this last situation quite a few times, we decided that it was best to design a new device made of a patented polymer (polyolefin: US patent US 7,971,744) with a density between 0.064 and 0.13 g/cm³, that could resist changes in temperature from −100 °C up to 50 °C without altering the quality of the protein crystals transported inside it. The heat transfer (heat capacity) is minimized both inside and out of the patent submitted fluid. This is because the polyolefin foam has a high density and does not allow proper heat exchange. Figure 4 shows a sketch of this new device, which consisted of a rectangular piece of this porous polyolefin with some pinholes in it. The procedure to store samples in this support is as follows: first both sides of the glass capillary pipettes, with the proteins crystal grown inside, have to be perfectly sealed. The following step is to introduce the glass capillary pipettes containing the protein crystals inside the NMR tubes, but before we do that, and in order to make the protein crystals extra safe, the NMR tubes must be filled with a hydrogel made by an acidic neutralization of sodium metasilicate solutions²⁶ (this hydrogel is both inert and also has high softness that permits the insertion of the capillary pipettes). It is after filling the NMR tubes with the hydrogel that the glass capillary pipettes are introduced inside them. Once this is done, the NMR tubes carrying the pipettes must be inserted inside the pinholes of the polyolefin device (as shown in Figure 4). From here on, the protein crystals can be safely transported even in a normal suitcase, through any airport, to synchrotron facilities. The thermal protection efficiency of the device, for protein crystals, was tested in the two synchrotrons where the X-ray data collection was performed.

The same type of experiments were carried out for lipase used as thermosensor for testing the efficiency of the thermal protection of the polyolefin device, because lipase crystals are extremely sensitive to small changes in temperature. In order to do this, we used the facilities of two different synchrotrons. One of the synchrotrons was Elettra in Trieste, Italy, and the other was SLAC-SSRL in Stanford California, United States. The lipase crystals arrived without being dissolved when transported to the two synchrotrons, where data collections were performed.

2.5. X-ray Diffraction Analyses. X-ray diffraction (XRD) analysis was performed at the X-ray diffraction beamline (XRD1) of the Elettra Synchrotron, Trieste (Italy).²⁵ All data sets of protein single crystals grown under the presence of a strong magnetic force of 16.5 T were collected at room temperature (298 K), with a monochromatic wavelength of 0.77491 Å (16 keV) and 100 × 100 μm² spot size, using a Pilatus 2 M hybrid-pixel area detector.²⁵ The crystals grown at room temperature were prepared in the same growth cell or glass capillary tubes in which they grew. In order for the crystal to undergo X-ray in a

capillary tube, crystals have to be separated from the mother liquor. This is done using small filter paper sticks that help to keep the mother liquor at both sides of the capillary, so the crystal maintains its humidity without being directly in contact with the mother liquor. A second experiment was carried out using the electrocrystallization growth cell (as shown in Figure 1 and 2) fitted on a standard goniometer head with a custom built frame. Data were collected at room temperature, using a monochromatic wavelength of 0.700 Å to limit absorption due to ITO glasses or ITO PET. The third experiment, focused on collecting X-ray diffraction of big protein crystals grown under the presence of a strong magnetic force, allowed us to directly collect three or four data sets with only one crystal due to its big size, and exploiting small tunable beam dimensions available on modern MX synchrotrons beamlines.

We duplicated the data collection of the experiment carried out for protein crystals grown in a magnetic force of 16.5 T. This was performed at the X-ray beamline BL 14-1 of the synchrotron SLAC-SSRL (Stanford California, USA), with a monochromatic wavelength of 0.95 Å (6 keV) and 50 × 80 μm² spot size using a MARmosaic CCD 325 detector. The crystals were properly cryoprotected using either the reservoir solution or the cryoprotector solution, depending on the needs. The crystals were then plunged into liquid nitrogen prior to irradiation. Data processing was performed using either HKL 2000²⁷ or XDS²⁸ combined with POINTLESS²⁹ and scaled using SCALA from the CCP4 suite v.6.1.2 (Collaborative Computational Project 4, Number 4, 1994).³⁰ The 3D structures were solved by the molecular replacement method with PHASER-MR³¹ in PHENIX,³² and map inspection was performed with COOT.³³ Subsequent rounds of model building and refinement were performed using PHENIX-REFINE.³⁴

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. Effect of the Electric Field upon the Number, Size, and Crystal Quality for Crystals of Glucose Isomerase and Lysozyme. In some previous publications from our group, and based on the first observations done by Nanev and Penkova,³⁵ we demonstrated, in some cases, that the use of this electrically assisted crystallization growth-cell applied to proteins by using DC (in the range from 2 to 4 μA) revealed that crystals grew better on the cathode (when the protein molecule was positively charged).^{13,36} The combination of the electromigration process for fixing the nuclei on the walls of the ITO electrodes, together with crystal growth by vapor diffusion

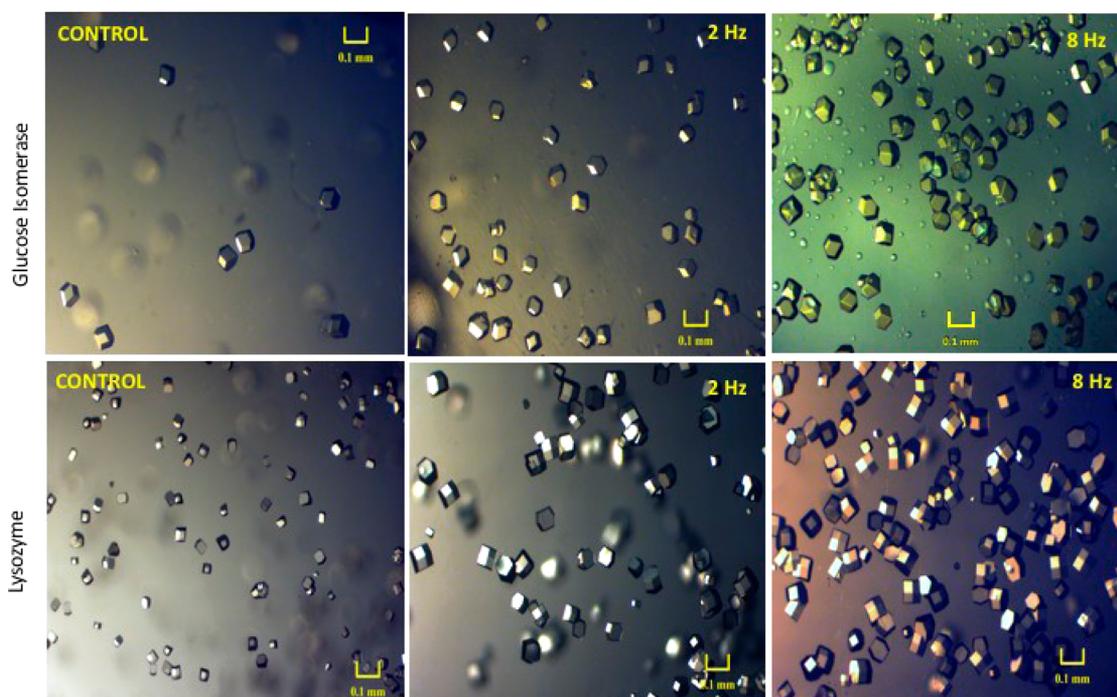


Figure 5. Effect of AC applied for 24 h on lysozyme and glucose isomerase crystals grown, shown in the presence of this alternating current compared to controls. The scale bar in yellow corresponds to 0.1 mm in size.

setup, allowed us to grow crystals of glucose isomerase applying a direct current (Figure 1a).³⁷ Even using this electroassisted crystallization technique permitted us to grow protein crystals as a function of temperature under the influence of a DC electric field. It also permitted us to isolate one of the polymorphs of glucose isomerase as published elsewhere.³⁷ However, the batch method used to grow crystals applying either DC^{38–40} or AC^{14,41–43} currents is the most widely used so far. The results on the crystal quality are shown in Tables 1S and 2S (Supporting Information), where the effect of electric, magnetic fields, and temperature of data collection are compared with the crystal quality of lysozyme and glucose isomerase. We noticed that the electric field (DC) did not affect the crystal structure. The application of this type of electric field was aimed first to nucleate lysozyme and glucose isomerase on the ITO electrodes and later to allow the crystals to grow by vapor diffusion setup as shown in our previous publications.^{13,37} However, it was interesting for us to test the effect of alternate current (AC) on the crystallization of these two proteins. According to our results, AC current could affect not only the number of crystals, but also their size, depending on its frequency. The trend in crystal growth for lysozyme and glucose isomerase applying an AC of 2 and 8 Hz to the crystal growth experiment can be described as follows: The higher the frequency (AC), the higher the number of crystals; this trend is experimentally shown in Figure 5. The amplitude of these frequencies was in the range of $40 \text{ V} \pm 10 \text{ V}$.

3.2. Effect of the Magnetic Field upon the Number, Orientation, and Quality of Crystals of Glucose Isomerase and Lysozyme. A number of new advanced methods for obtaining very high crystalline quality crystals have been developed. These methods can be applied, not only to grow crystals controlling the diffusion transport, but also to growing them in the presence of strong magnetic fields. The impact of the magnetic field on protein crystallization was found for the first time by Japanese scientists in 1997.^{44,45} The main

characteristic of magnetic fields, whether homogeneous or nonhomogeneous, is that they always act differently on protein samples. Nonhomogeneous magnetic fields are responsible for the reduction of the gravity forces on the solution through the action of the magnetic force.^{46–48} By applying a vertical magnetic field gradient, a magnetizing force is generated on the sample. If this force is opposite to the gravitational force, the result will be a reduction in the vertical acceleration (effective gravity) with the subsequent diminution in natural convection.⁴⁹ The convection is practically nullified, generating a situation similar to that found under the conditions of microgravity.⁵⁰ Experimentally, the crystals of higher quality obtained diffracted to higher resolution.⁵¹ In previous experiments, we had observed that when applying strong homogeneous magnetic fields (above 10 T), better quality crystals were obtained.¹⁵ Nonetheless, the effect of the magnetic fields on the crystals will differ depending on the crystallographic space group in which the protein is being crystallized.¹⁷ All these observations are inter-related and are due to the orienting effect of the magnetic field at a microscopic level. In a supersaturated solution, protein nuclei are in suspension in the solution, but they sediment when reaching an adequate size, which depends on the value of the field.

Bearing in mind this approach, a novel experiment using the batch method under the presence of a rather strong magnetic field of 16.5 T in capillary tubes was performed for lysozyme and glucose isomerase crystals. We studied the different crystal growth behaviors of all proteins at two different periods of time. In the first experiment, the crystal growth behavior was studied for 48 h. In the second experiment, it was studied for 3 weeks time (See Tables 2S–4S of the Supporting Information). The idea was to see whether this magnetic force was affecting the crystallization and the crystal growth processes. Our previous works on glucose isomerase showed the existence of different polymorphs obtained at different temperatures.³⁷ Based on these results, we were able to select the right temperature only

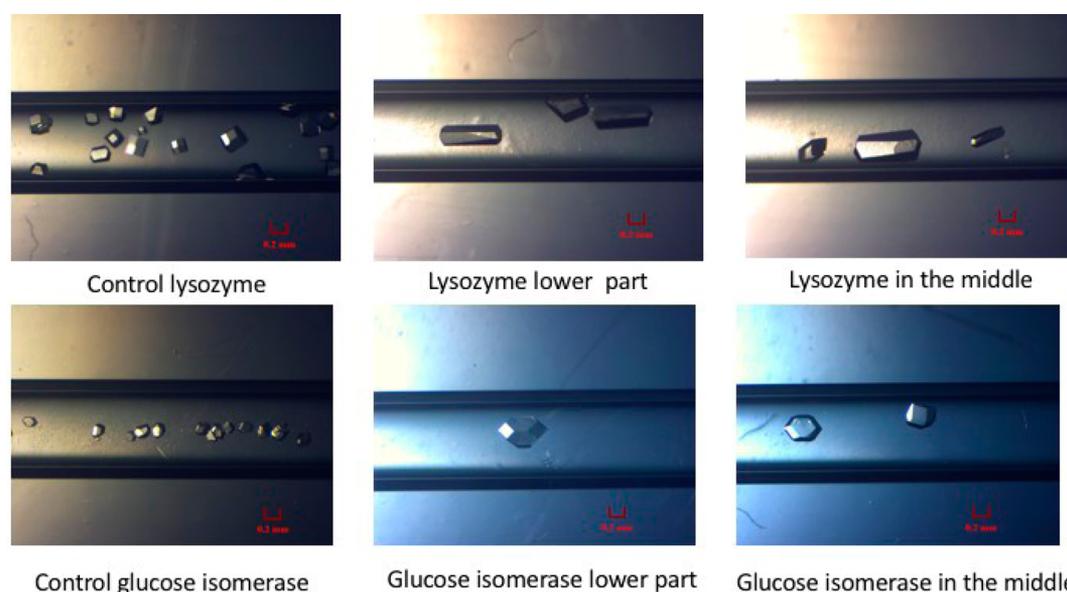


Figure 6. Crystals of lysozyme, and glucose isomerase, grown under the presence of a strong magnetic field of 16.5 T compared to the controls. The size was improved more or less 4 times, as can be seen. The scale bar in red corresponds to 0.2 mm in size.

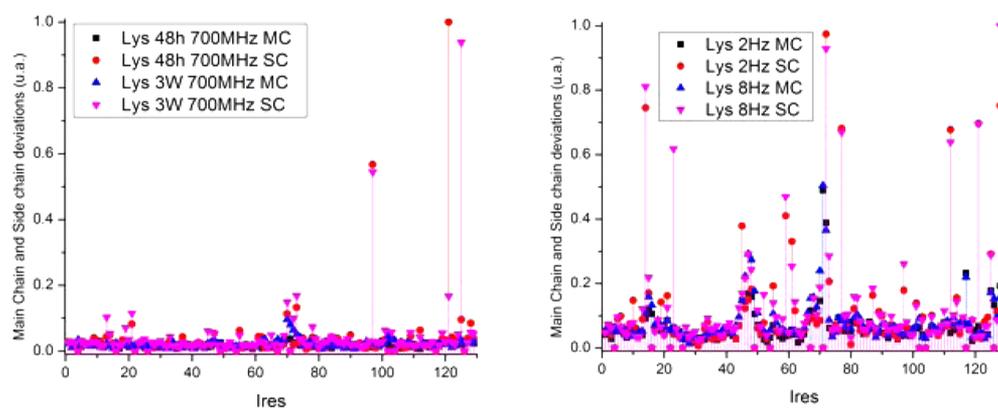


Figure 7. Residue number (I res) versus their deviation involved in the crystal contacts of lysozyme, affected by the electric field (AC/DC), but hardly by the magnetic field. Here SC and MC on the right-side plot represent the side-chain and the main-chain, respectively.

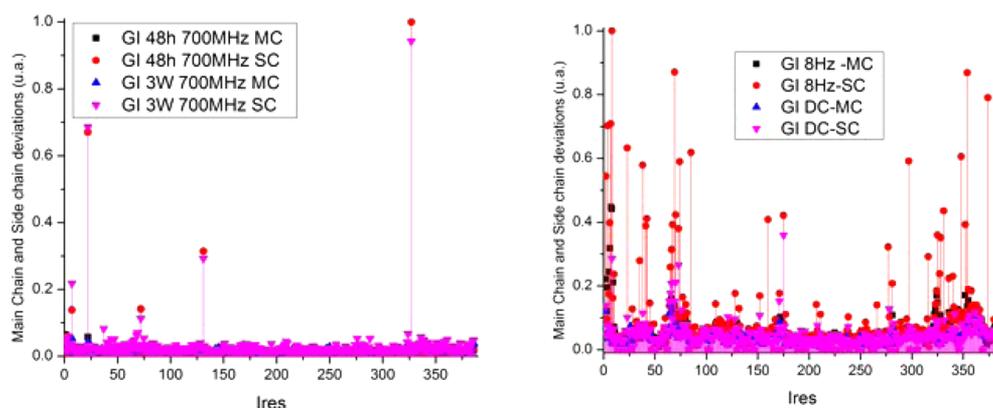


Figure 8. Residue number (I res) versus their deviation involved in the crystal contacts of glucose isomerase affected by the electric field (AC/DC), but hardly affected by the magnetic field. Here SC and MC on the right-side plot represent the side-chain and the main-chain, respectively.

for one of the polymorphs. Additionally, we had to choose the best crystallization conditions for lysozyme and glucose isomerase in order to apply a strong magnetic force of 16.5 T. For this, we used a conventional NMR apparatus commonly found in chemical laboratories. We observed that all protein

crystals were significantly affected in their orientation and size. Modifications in the orientation and size of the crystal growth behavior were noticeable in all the experiments, but the longer the experiment, the more remarkable these modifications were. The crystals were greatly improved in size and substantially

reduced in number, compared to the controls. In all cases, crystals grown under this strong magnetic force were 4 times bigger than those in the controls, as shown in Figure 6.

For all these crystals, data collection (performed at room temperature) and refinement statistics of the different data sets are summarized in the following X-ray data statistics shown in the Supporting Information in Tables 1S–4S. Most of the crystals grown under the influence of an electromagnetic field, compared to controls, showed higher crystal quality (lower mosaicity, lower B-factors, higher resolution values).

In order to check whether the intra- or intercrystal-contacts are affected in their packing, which are involved in the main or side backbone (chain), we calculated all changes in the residues detected along the main backbone (MC) and on the side backbone (SC) for these model proteins (PDBs: 5avh for glucose isomerase and 4a7d for lysozyme) with the help of the crystallographic data and the software Lsqkab (superpose) of the Suite CCP4.³⁰ According to the results shown in Figures 7 and 8, the side-chain conformations can slightly be altered when applying AC in contrast to strong magnetic fields. The effect caused by an 8 Hz AC produced a higher number of protein–protein interactions, which substantially increased the number of nuclei. However, when applying strong magnetic fields, neither the MC nor the SC were substantially affected. This means that crystals grown under these conditions by using a strong magnetic field grew within the normal ranges expected for crystallographic structural data obtained from two crystals, even when they are grown under identical conditions. Consequently, we decided to check carefully by synchrotron radiation how the crystal quality was affected for these two model proteins when the electric fields (AC or DC) and the strong magnetic field were applied in the growth processes.

An additional experiment of glucose isomerase was carried out for 1 week under the presence of this magnetic force. In this experiment, the mixture of glucose isomerase and the precipitating agent was shaken strongly, in order to induce the extra nucleation from the beginning. Figure 9 shows the

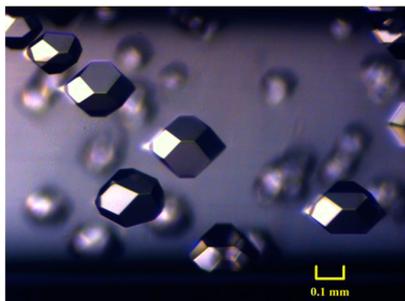


Figure 9. These crystals, perfectly orientated to the direction of the magnetic field, were grown for 1 week. However, some crystals at the back of the picture were not oriented to the magnetic field, as they were deliberately induced from the very beginning of the experiment, when shaking strongly the mixture of the protein and the precipitating agent.

positive effect on glucose isomerase crystals grown inside the magnetic field (see the front plane of the picture). However, those nuclei deliberately produced at the beginning of the experiment when mixing the protein and the precipitating agent were not affected by the magnetic field (see the shadow of nonoriented crystals in the back plane of the picture). These best crystals were easily detected when extracted and analyzed by X-ray, because they had, generally speaking, the same size. Additionally, as previously mentioned, the lower part of the capillary tube is the area with the highest magnetic intensity and where the magnetic force is much more homogeneous.

From the PDB's of the crystal structures, we calculated the anisotropy of the diamagnetic susceptibility for these two proteins. This calculation was based on the approach of Worcester⁵² and the corrections suggested by Pauling.⁵³ When replacing the amino acids of the structure of the α helices and β sheets contents, we obtained ΔX_α and ΔX_β . From the Worcester's equation: N_α and N_β represent the number of amino acids in the alpha helices and beta sheets, respectively. ΔX_α and ΔX_β are added to give the total anisotropy of the diamagnetic susceptibility per molecule, which is dimensionless in the International System of units (SI). Table 1 shows all needed values to complete these calculations.

In order to avoid any influence on the crystal quality due to the cryoprotection, data have been collected twice; the first data collection was performed at room temperature on the XRD1 beamline of the synchrotron Elettra in Trieste (Italy). Additionally, in order to further investigate this, glucose isomerase crystals were tested (as a duplicated experiment) in a second synchrotron facility: in this case SLAC-SSRL located in Stanford California (USA).

This experiment shows that if the mixture is carefully done at the very beginning, the effect of the magnetic field will produce bigger size crystals that are better oriented to the magnetic field. These crystals of Figure 9 were analyzed by X-ray diffraction (synchrotron radiation) at low temperature. Most of the crystals grown under the influence of a magnetic field compared to controls showed lower mosaicity, lower B-factors, and higher resolution values; see Table 2. This table shows the high reproducibility in obtaining high-quality single crystals when a strong magnetic force is applied during the crystallization process.

Finally, we compared the best of the best results and the statistics for crystals grown under the presence of this strong magnetic field to those crystals grown in the presence of electric fields (DC) and controls (at room and low temperature of data collection); these results are shown in Table 3. Crystal quality indicators such as $I/\sigma(I)$, resolution limits, mosaicities, and B-factors for crystals grown under the influence of this magnetic field, at larger period, were better than for those grown under the influence of DC/AC electric fields. This internal structural order (in terms of crystal contacts) was substantially improved when this magnetic field was applied for at least 48 h up to 3 weeks. It is clear that crystals of glucose isomerase collected at room temperature or at lower temperature showed a substantially improved crystal quality. However, the most

Table 1. Calculation of the Anisotropy of the Diamagnetic Susceptibility for These Two Proteins

Protein	PDB code	α	N_α	ΔX_α	β	N_β	ΔX_β	$\Delta X_{\alpha\beta}$
GI	5AVH	20	191	5.12×10^{-6}	10	35	2.35×10^{-6}	7.47×10^{-6}
HEWL	4A7D	7	53	1.42×10^{-6}	4	10	6.7×10^{-6}	8.12×10^{-6}

Table 2. Crystallographic X-ray Data Statistics for Glucose Isomerase of Three Crystals Grown (shown in Figure 9) under the Influence of the Magnetic Field of 16.5 T for 1 Week Collected at Low Temperature

Condition	Control	Glucose Isomerase Crystal-1	Glucose Isomerase Crystal-2	Glucose Isomerase Crystal-3
Wavelength (Å)	0.950	0.950	0.950	0.950
Angular step (deg)	0.25	0.25	0.25	0.25
No. of images	1440	1440	842	720
Space group	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222
Unit Cell (Å)	<i>a</i>	93.18	93.36	92.75
	<i>b</i>	99.96	98.55	98.73
	<i>c</i>	102.23	102.72	102.39
	$\alpha = \beta = \gamma$	90	90	90
Total reflections	820681	1439930	1120810	2676369
Resolution range	40–1.60(1.63–1.60)	40–1.25(1.27–1.25)	40–1.18(1.20–1.18)	40–1.15(1.17–1.15)
Completeness (%)	94.5(99.5)	96.6(72.6)	97.9(84.2)	99.1(85.2)
R_{merge}	0.139	0.076	0.071	0.069
R_{meas}	0.145	0.08	0.076	0.071
$I/\sigma(I)$	28.19(1.5)	42.4(0.63)	35.41(1.58)	54.27(1.23)
Multiplicity	13.7(13.7)	11.5(6.1)	7.5(5.2)	16.3(5.4)
Wilson B-factor (Å ²)	22.3	13.9	11.0	10.8
CC1/2 last shell	0.821	0.457	0.753	0.577
Mosaicity (deg)	0.901	0.552	0.557	0.502

Table 3. Crystallographic X-ray Data Statistics for Glucose Isomerase the Best of the Best of Crystal Grown in All These Methods Described in This Contribution

	SLACryo-control C-SSRL	Magnetic Field Elettra Synchrotron at room temperature	E-crystallization (DC) Elettra Synchrotron at room temperature	Magnetic Field SLAC-SSRL cryo-protected
Wavelength (Å)	0.950	0.77491	0.77491	0.950
Space group	<i>I</i> 2 2 2	<i>I</i> 2 2 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>I</i> 2 2 2
	<i>a</i> = 93.18	<i>a</i> = 94.003	<i>a</i> = 82.091	<i>a</i> = 92.83
	<i>b</i> = 99.96	<i>b</i> = 99.492	<i>b</i> = 93.893	<i>b</i> = 98.33
Unit cell (Å, deg)	<i>c</i> = 102.23	<i>c</i> = 103.066	<i>c</i> = 97.688	<i>c</i> = 102.63
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Total reflections	820681	314375 (24152)	535276 (39520)	2676369
Unique reflections	60107	154948 (11736)	275861 (20643)	163993
Resolution range (Å)	40–1.60	50–1.46	50–1.40	40–1.15
(1.63–1.60)	(1.50–1.46)	(1.44–1.40)	(1.17–1.15)	
Completeness (%)	94.5 (99.5)	0.96 (0.97)	0.96 (0.97)	99.1 (85.2)
R_{merge}	0.139	0.040 (0.541)	0.061 (0.491)	0.069 (0.430)
R_{meas}	0.145	0.051 (0.699)	0.081 (0.659)	0.071
$I/\sigma(I)$	28.19 (1.5)	14.03 (1.89)	8.47 (1.75)	54.27 (1.23)
Multiplicity	13.7 (13.7)	2.0 (2.1)	1.9 (1.9)	16.3 (5.4)
Wilson B-factor (Å ²)	24	24.8	17.7	16.9
CC1/2	0.821	0.999 (0.649)	0.997 (0.669)	0.577
Mosaicity	0.901	0.077	0.173	0.502

remarkable result was observed when the crystals were properly cryoprotected into the precipitating agent before being plunged into liquid nitrogen prior to irradiation. The fact that the cryoprotector of glucose isomerase was exactly the same as the one used as precipitating agent made all the difference.

Figures 10 and 11 show the most important surface of crystal contacts found by crystallographic data, for lysozyme and glucose isomerase, respectively. These surface contacts can be affected when AC electric fields are applied. However, the crystal structure remains unchanged (in terms of side-chain conformations of amino acids) after applying strong magnetic fields. These crystal surface contacts are particularly relevant to the electromagnetic fields mentioned in this contribution. In

the case of glucose isomerase, Figure 11 shows the most important residues for the crystal contacts of the main chain, which are susceptible to changes depending on the electric field applied: AC or DC. From now on, we will be focused on applying all this knowledge on more challenging biomolecules that diffract poorly to X-ray, such as membrane proteins or macromolecular complexes. It has been suggested that, in the case of membrane proteins, they should display better crystal quality when grown under the presence of strong magnetic fields. This happens because these membrane proteins have a large anisotropy of the diamagnetic susceptibility due to the high content of α helices. The higher the α helice content, the higher the anisotropy of the diamagnetic susceptibility.⁵⁴

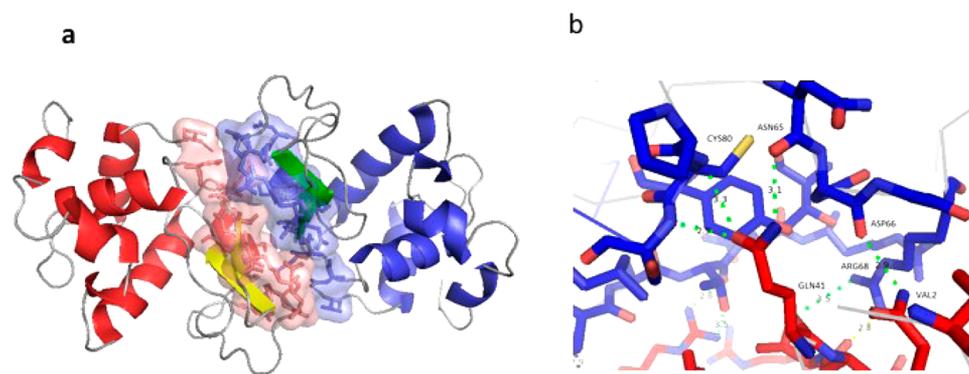


Figure 10. (a) Overview of the crystal structure contacts area, where the most important surface contacts are observed. (b) Close-up of the main residues contacts of lysozyme obtained with the best X-ray data for the controls.

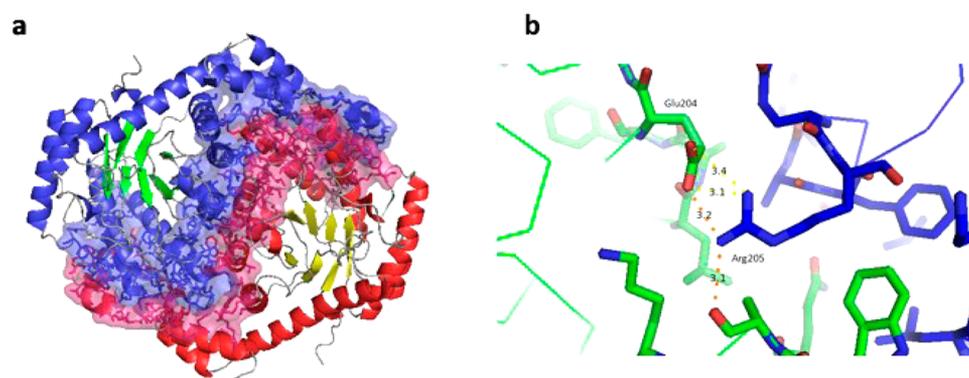


Figure 11. (a) Overview of the crystal structure contact area for glucose isomerase, where the most important surface contacts are observed. (b) Close-up of the main residues contacts of glucose isomerase obtained with the best X-ray data of the controls.

Finally, the combination of electric and magnetic fields using this experimental setup should be evaluated in the near future for soluble and membrane proteins; the preliminary investigations combining both electric and magnetic fields applied to lysozyme crystallization were done by Sasaki et al., in 2004.⁵⁵

4. CONCLUSIVE REMARKS AND PERSPECTIVES

From these results, we conclude that when growing crystals in the presence of electromagnetic fields, beneficial effects are obtained also when applying an electric field in DC configuration combined with a vapor diffusion setup. The most remarkable results in terms of crystal quality (lower mosaicity, lower B-factors, higher resolution values) were obtained when applying strong magnetic fields to the crystals for at least 48 h (the longer the experiment, the better the crystal size and quality). The crystal contacts (side chain conformational changes) are sparingly affected when applying an alternating AC field ranging from 2 to 8 Hz. The effect is basically observed on the number and on the size of the crystals grown. All this knowledge will be applied in the near future on more challenging biomolecules that diffract poorly, such as membrane proteins or biomacromolecular complexes.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.cgd.6b01362.

Table 1S. Crystallographic X-ray data statistics for lysozyme crystal growth applying an electric field (AC); Table 2S. Comparison of the X-ray statistics

data for glucose isomerase collected at room temperature using magnetic and electric fields (DC); Table 3S. Crystallographic X-ray data statistics for lysozyme crystal growth applying a magnetic field of 16.5 T at different times; Table 4S. Crystallographic X-ray data statistics for glucose isomerase crystal growth applying a magnetic field of 16.5 T at different times (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* E-mail: carcamo@unam.mx. Phone: + 52-55-56224467. Address: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Cd.Mx. 04510, México.

ORCID

Nicola Demitri: 0000-0003-0288-3233

Abel Moreno: 0000-0002-5810-078X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors (M.C.C. and A.M.) acknowledge the XRD1-Hard X-ray Diffraction Beamline and Structural Biology Laboratory of the Elettra Synchrotron, in Italy for the support and beamtime awarded to collect data from the different protein crystals at room temperature. Research reported herein was performed in part at the BL 14-1 at the SSRL and supported by NSLSII scientist under NIGMS contracts P41GM103393 and P41 GM111244-01 and DOE contracts DE-AC02-76SF00515

and DE-SC0012704. One of the authors (A.M.) acknowledges to Prof. Dr. Antonio Romero-Garrido from the CIB-C.S.I.C. Madrid (Spain) for the crystallographic support in solving the 3D structures, and data analyses during the intership of Carina Pareja-Rivera sponsored by CONACYT Mexico (Scholarship holder No. 576597). The same author (A.M.) thanks to DGAPA UNAM for the support of the project No. IT200215. The authors acknowledge to Ms. Antonia Sanchez-Marín for the English style correction of this manuscript. This study made use of UNAM's NMR lab: LURMN at IQ-UNAM, which is funded by CONACYT Mexico (Project: 0224747), and UNAM.

REFERENCES

- (1) Giege, R.; Sauter, C. *HFPJ* **2010**, *4*, 109–121.
- (2) De la Mora, E.; Flores-Hernandez, E.; Jakoncic, J.; Stojanoff, V.; Siliqi, D.; Sanchez-Puig, N.; Moreno, A. *J. Appl. Crystallogr.* **2015**, *48*, 1551–1559.
- (3) Bernado, P.; Mylonas, E.; Petoukhov, M. V.; Blackledge, M.; Svergun, D. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5656–5664.
- (4) Mertens, H. D. T.; Svergun, D. I. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*, 128–141.
- (5) Hudaky, P.; Perczel, A. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1307–1317.
- (6) Baxter, E. L.; Aguila, L.; Alonso-Mori, R.; Barnes, C. O.; Bonagura, C. A.; Brehmer, W.; Brunger, A. T.; Calero, G.; Caradoc-Davies, T. T.; Chatterjee, R.; Degrado, W. F.; Fraser, J. S.; Ibrahim, M.; Kern, J.; Kobilka, B. K.; Kruse, A. C.; Larsson, K. M.; Lemke, H. T.; Lyubimov, A. Y.; Manglik, A.; McPhillips, S. E.; Norgren, E.; Pang, S. S.; Soltis, S. M.; Song, J. H.; Thomaston, J.; Tsai, Y.; Weis, W. I.; Woldeyes, R. A.; Yachandra, V.; Yano, J.; Zouni, A.; Cohen, A. E. *Acta Crystallogr. D* **2016**, *72*, 2–11.
- (7) Boutet, S.; Lomb, L.; Williams, G. J.; Barends, T. R. M.; Aquila, A.; Doak, R. B.; Weierstall, U.; DePonte, D. P.; Steinbrener, J.; Shoeman, R. L.; Messerschmidt, M.; Barty, A.; White, T. A.; Kassemeyer, S.; Kirian, R. A.; Seibert, M. M.; Montanez, P. A.; Kenney, C.; Herbst, R.; Hart, P.; Pines, J.; Haller, G.; Gruner, S. M.; Philipp, H. T.; Tate, M. W.; Hromalik, M.; Koerner, L. J.; van Bakel, N.; Morse, J.; Ghonsalves, W.; Arnlund, D.; Bogan, M. J.; Caleman, C.; Fromme, R.; Hampton, C. Y.; Hunter, M. S.; Johansson, L. C.; Katona, G.; Kupitz, C.; Liang, M. N.; Martin, A. V.; Nass, K.; Redecke, L.; Stellato, F.; Timneanu, N.; Wang, D. J.; Zatsepin, N. A.; Schafer, D.; DeFevers, J.; Neutze, R.; Fromme, P.; Spence, J. C. H.; Chapman, H. N.; Schlichting, I. *Science* **2012**, *337*, 362–364.
- (8) Hunter, M. S.; Fromme, P. *Methods* **2011**, *55*, 387–404.
- (9) Vranken, W. F.; Vuister, G. W.; Bonvin, A. M. J. *J. Methods Mol. Biol.* **2015**, *1215*, 351–380.
- (10) Galindo-Murillo, R.; Ruiz-Azuara, L.; Moreno-Esparza, R.; Cortes-Guzman, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15539–15546.
- (11) Moreno, A. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2009**, *101*, 1–2.
- (12) Sanchez-Puig, N.; Sauter, C.; Lorber, B.; Giege, R.; Moreno, A. *Protein Pept. Lett.* **2012**, *19*, 725–731.
- (13) Flores-Hernandez, E.; Stojanoff, V.; Arreguin-Espinosa, R.; Moreno, A.; Sanchez-Puig, N. *J. Appl. Crystallogr.* **2013**, *46*, 832–834.
- (14) Koizumi, H.; Uda, S.; Fujiwara, K.; Tachibana, M.; Kojima, K.; Nozawa, J. *J. Appl. Crystallogr.* **2015**, *48*, 1507–1513.
- (15) Moreno, A.; Quiroz-Garcia, B.; Yokaichiya, F.; Stojanoff, V.; Rudolph, P. *Cryst. Res. Technol.* **2007**, *42*, 231–236.
- (16) Sasaki, G. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2009**, *101*, 45–55.
- (17) Surade, S.; Ochi, T.; Nietlispach, D.; Chirgadze, D.; Moreno, A. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 691–699.
- (18) Lorber, B.; Sauter, C.; Theobald-Dietrich, A.; Moreno, A.; Schellenberger, P.; Robert, M. C.; Capelle, B.; Sanglier, S.; Potier, N.; Giege, R. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2009**, *101*, 13–25.
- (19) Pawate, A. S.; Srayer, V.; Schieferstein, J.; Guha, S.; Henning, R.; Kosheleva, L.; Schmidt, M.; Ren, Z.; Kenis, P. J. A.; Perry, S. L. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.* **2015**, *71*, 823–830.
- (20) Yin, D. C. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2015**, *61*, 1–26.
- (21) Myles, D. A. A.; Dauvergne, F.; Blakeley, M. P.; Meilleur, F. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 686–692.
- (22) Niimura, N.; Bau, R. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 12–22.
- (23) Blakeley, M. P.; Hasnain, S. S.; Antonyuk, S. V. *IUCr* **2015**, *2*, 464–474.
- (24) Baba, S.; Hoshino, T.; Ito, L.; Kumasaka, T. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 1839–1849.
- (25) Lausi, A.; Polentarutti, M.; Onesti, S.; Plaisier, J. R.; Busetto, E.; Bais, G.; Barba, L.; Cassetta, A.; Campi, G.; Lamba, D.; Pifferi, A.; Mande, S. C.; Sarma, D. D.; Sharma, S. M.; Paolucci, G. *Eur. Phys. J. Plus* **2015**, *130*, 3.
- (26) Moreno, A.; Juarez-Martinez, G.; Hernandez-Perez, T.; Batina, N.; Mundo, M.; McPherson, A. *J. Cryst. Growth* **1999**, *205*, 375–381.
- (27) Otwinowski, Z.; Minor, W. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
- (28) Kabsch, W. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.
- (29) Evans, P. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 72–82.
- (30) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235–242.
- (31) McCoy, A. J. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 32–41.
- (32) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213–221.
- (33) Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
- (34) Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 352–367.
- (35) Nanev, C. N.; Penkova, A. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 285–293.
- (36) Pérez, Y.; Eid, D.; Acosta, F.; Marin-García, L.; Jakoncic, J.; Stojanoff, V.; Frontana-Uribe, B. A.; Moreno, A. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 2493–2496.
- (37) Martinez-Caballero, S.; Cuellar-Cruz, M.; Demitri, N.; Polentarutti, M.; Rodriguez-Romero, A.; Moreno, A. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 1679–1686.
- (38) Gil-Alvarado, G.; Ruiz-Arellano, R. R.; Owen, C.; Rodriguez-Romero, A.; Rudino-Pinera, E.; Antwi, M. K.; Stojanoff, V.; Moreno, A. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 3917–3922.
- (39) Koizumi, H.; Uda, S.; Fujiwara, K.; Nozawa, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 8333–8338.
- (40) Nieto-Mendoza, E.; Frontana-Uribe, B. A.; Sasaki, G.; Moreno, A. *J. Cryst. Growth* **2005**, *275*, e1437–e1446.
- (41) Frontana-Uribe, B. A.; Moreno, A. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 4194–4199.
- (42) Uda, S.; Koizumi, H.; Nozawa, J.; Fujiwara, K. *AIP Conf. Proc.* **2014**, *1618*, 261–264.
- (43) Koizumi, H.; Uda, S.; Fujiwara, K.; Tachibana, M.; Kojima, K.; Nozawa, J. *J. Appl. Crystallogr.* **2013**, *46*, 25–29.
- (44) Sasaki, G.; Yoshida, E.; Komatsu, H.; Nakada, T.; Miyashita, S.; Watanabe, K. *J. Cryst. Growth* **1997**, *173*, 231–234.
- (45) Ataka, M.; Katoh, E.; Wakayama, N. *J. Cryst. Growth* **1997**, *173*, 592–596.
- (46) Adachi, H.; Takano, K.; Yoshimura, M.; Mori, Y.; Sasaki, T. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, *42*, L384–L385.
- (47) Numoto, N.; Shimizu, K.-i.; Matsumoto, K.; Miki, K.; Kita, A. *J. Cryst. Growth* **2013**, *367*, 53–56.
- (48) Heijna, M. C. R.; Poedt, P. W. G.; Tsukamoto, K.; de Grip, W. J.; Christianen, P. C. M.; Maan, J. C.; Hendrix, J. L. A.; van Enckevort, W. J. P.; Vlieg, E. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 264105.

- (49) Wada, H.; Hirota, N.; Matsumoto, S.; Okada, H.; Kiyohara, M.; Ode, T.; Tanokura, M.; Nakamura, A.; Ohtsuka, J.; Kita, A.; Numoto, N.; Kashiwagi, T.; Suzuki, E.-i. *Phys. Procedia* **2012**, *36*, 953–957.
- (50) Wakayama, N. I. *Cryst. Growth Des.* **2003**, *3*, 17–24.
- (51) Yin, D.-C. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2015**, *61*, 1–26.
- (52) Worcester, D. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 5475–5477.
- (53) Cameron, E.; Pauling, L. *Proceedings of the American Philosophical Society* **1979**, *123*, 117–123.
- (54) Wakayama, N. I.; Wang, L. B.; Ataka, M. *Proc. SPIE* **2002**, *4813*, 1–11.
- (55) Sazaki, G.; Moreno, A.; Nakajima, K. *J. Cryst. Growth* **2004**, *262*, 499–502.