



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFFECTOS TERMODINÁMICOS, CINÉTICOS Y MOLECULARES DEL USO DE
LÍQUIDOS IÓNICOS COMO ADITIVOS DE CRISTALIZACIÓN DE
MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Químico OMAR ERNESTO VELÁSQUEZ GONZÁLEZ

Director de la Tesis
DOCTOR ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFFECTOS TERMODINÁMICOS, CINÉTICOS Y MOLECULARES DEL
USO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO ADITIVOS DE CRISTALIZACIÓN
DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Químico OMAR ERNESTO VELÁSQUEZ GONZÁLEZ



Ciudad de México, octubre de 2020

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por recibirme entre sus estudiantes de posgrado.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), por la formación que me ha dado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para los estudios de Maestría (No. CVU 918489).

Al Doctor Abel Moreno Cárcamo, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, su invaluable dirección, asesoría y apoyo.

El director de esta tesis (Dr. Abel Moreno Cárcamo) agradece a la DGAPA proyecto PAPIIT IG200218 y al proyecto CONACYT No. A1-S-7509 por el apoyo en consumibles, equipamiento adquirido para el desarrollo y culminación de esta tesis.

A María Alejandra Dávila Tejeda, por su apoyo, no solo como esposa, sino como par académico.

Abreviaturas

BMIM TFA	Trifluoroacetato de 1-butil-3-metilimidazolio
BTEACl	Cloruro de Benciltriethylamonio
CALB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
EANO3	Nitrato de Etilamonio
EMIM OAc	Acetato de 1-etil-3-metilimidazolio
EMIM SCN	Tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio
EMIM TFB	Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio
FPLC	Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
HAS	Albúmina Sérica Humana
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etanosulfónico
HEW	Clara de Huevo de Gallina
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IL	Líquidos Iónicos
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NOE	Efecto Nuclear de Overhauser
PDB	Base de Datos de Proteínas
PEG	Polietilenglicol
SDS - PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Dodecilsulfato
SEC	Cromatografía de Exclusión Molecular
STD	Diferencia de Saturación Transferida
TEABr	Bromuro de Tetraetilamonio
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético

Índice

Índice General

1	Resumen.....	9
2	Introducción	11
3	Marco Teórico	13
3.1	Proteínas.....	13
3.1.1	Bioquímica Estructural.....	13
3.1.2	Niveles de Estructuración de una Proteína	13
3.2	Difracción de Rayos X de Monocristal.....	19
3.2.1	Principios de Difracción de Rayos X.....	20
3.2.2	Patrón de Difracción: Espacio Recíproco y Espacio Real	23
3.2.3	Mapa de Densidad Electrónica y Elaboración de Modelo Molecular	25
3.3	Cristalogénesis Biológica.....	27
3.3.1	Definición.....	27
3.3.2	Diagrama de Solubilidad: Parámetros Termodinámicos	27
3.3.3	Nucleación, Crecimiento Cristalino, Efectos Cinéticos y Difusivos.....	30
3.3.4	Métodos de Crecimiento de Cristales.....	33
3.3.5	Aplicaciones de los Cristales en Ciencia y Tecnología.....	35
4	Antecedentes.....	37
4.1	Efectos de la Constante Dieléctrica en la Obtención de Monocristales de Proteínas 37	
4.2	Líquidos Iónicos y el efecto de Hofmeister.....	37
4.3	Efectos de los Líquidos Iónicos en el Hábito y Polimorfismo Cristalino de los Cristales de Proteína	42
4.4	Características Estructurales y de Solubilidad de las Proteínas en Estudio: Lisozima, Glucosa Isomerasa y Lipasas	43
4.4.1	Lisozima de la Clara de Huevo de Gallina.....	43
4.4.2	Glucosa Isomerasa de <i>Streptomyces rubiginosus</i>	44
4.4.3	Lipasas	44
5	Planteamiento del Problema de Estudio	45
5.1	Justificación.....	45
5.2	Objetivos	46
5.2.1	Generales.....	46
5.2.2	Específicos	46

5.3	Hipótesis	46
6	Materiales y Métodos	47
6.1	Caracterización.....	48
6.1.1	Electroforesis Desnaturalizante.....	49
6.1.2	Cuantificación.....	50
6.2	Purificación	52
6.2.1	Cromatografía de Exclusión Molecular	53
6.2.2	Cromatografía de Fase Reversa.....	53
6.2.3	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	55
6.2.4	Cromatografía de Intercambio Iónico: Intercambio Catiónico	56
6.3	Cristalización.....	57
6.3.1	Técnicas de Difusión en Fase Vapor	57
6.4	Inspección Visual.....	60
6.5	Estudios estructurales mediante Cristalografía de Rayos X.....	61
6.6	Evaluación de Interacción	61
6.6.1	Resonancia Magnética Nuclear.....	61
6.7	Efecto Precipitante de los Líquidos Iónicos	64
6.7.1	Dispersión de Luz Dinámica	64
7	Resultados y Discusión.....	68
7.1	Preparación y Caracterización de las Proteínas Usadas en El estudio	68
7.1.1	Cuantificación de las soluciones de trabajo.....	68
7.1.2	Caracterización de Pureza Mediante Electroforesis Desnaturalizante.....	71
7.2	Ensayos de Cristalización de Proteínas Modelo: Crecimiento Direccional	72
7.2.1	Lisozima.....	73
7.2.2	Glucosa Isomerasa.....	77
7.3	Caracterización Biofísica de Soluciones con Características Distintivas en Presencia de Líquidos Iónicos.....	79
7.3.1	Dispersión de Luz Dinámica	79
7.3.2	Resonancia Magnética Nuclear.....	82
8	Conclusiones.....	86
9	Perspectivas.....	88
10	Anexos	89
10.1	Purificación y Caracterización de Lipasa de <i>Candida antarctica</i> y <i>Candida rugosa</i> mediante técnicas Cromatográficas	89

10.1.1	<i>Candida antarctica</i>	91
11	Referencias	95

Índice de Figuras

Figura 1:	Quiralidad de los aminoácidos	14
Figura 2.	Aminoácidos biogénicos.....	15
Figura 3.	Combinaciones Aceptadas de Ángulos Diedros de Cadena Principal.....	16
Figura 4.	Estructuras básicas de Hélice Alfa y Hoja Plegada Beta.	17
Figura 5.	Motivo paquete de cuatro hélices.....	17
Figura 6.	Superficie de Energía Libre del Plegamiento de una Proteína.....	18
Figura 7.	Estructuras depositadas en PDB por año.....	20
Figura 8.	Celda Unitaria Modelo.....	21
Figura 9.	Dispersión de Rayos X en un Cristal.	22
Figura 10.	Ley de Bragg.....	22
Figura 11.	Patrón de Difracción Característico para una Proteína.....	23
Figura 12.	Espacio Recíproco Bidimensional.	24
Figura 13.	Esfera de Ewald	25
Figura 14.	Relación de Densidad Electrónica y Resolución.....	26
Figura 15.	Diagrama de Solubilidad de una Proteína.....	28
Figura 16.	Energética de Nucleación.....	31
Figura 17.	Vías de Crecimiento Cristalino.....	32
Figura 18.	Técnicas de Difusión de Vapor.....	34
Figura 19.	Estructuración de los Líquidos Iónicos en Agua.....	38
Figura 20.	Catión Imidazolio. Figura propia, dibujada en ChemSketch.....	39
Figura 21.	Efectos Entálpicos de Solvatación y Agregación de Líquidos Iónicos.....	40
Figura 22.	Serie de Hofmeister y Liotrópica.	41
Figura 23.	Tipos de Interacción de Líquidos Iónicos con las Proteínas.	42
Figura 24.	Configuraciones de <i>Candida rugosa</i>	44
Figura 25.	Recta de Calibrado de Método de Lowry	70
Figura 26.	Caracterización mediante SDS - PAGE de Lipasas Comerciales.....	71
Figura 27.	Lisozima Cristalizada en Ausencia de Líquidos Iónicos.....	74

Figura 28. Lisozima Cristalizada en Presencia de Líquidos Iónicos: Cambio de Hábito Cristalino.....	75
Figura 29. Modelo Molecular Lisozima Cristalizada en Presencia de BMIM TFA.....	77
Figura 30. Hábito direccionado de Glucosa Isomerasa en dos líquidos iónicos aromáticos.....	78
Figura 31. Gráfico de Debye para Lisozima y Lisozima + 2.5% BMIM TFA	80
Figura 32. Principio de la Técnica de Diferencia de Transferencia de Saturación.....	83
Figura 33. Espectros RMN - STD para Lisozima + 2.5% BMIM TFA	84
Figura 34. Comparación de Superficie Hidrofóbica de HEW - Lisozima y Lipasa Modelo..	89
Figura 35. Superficie Hidrofóbica de Conformaciones de <i>Candida rugosa</i>	90
Figura 36. Superficie Hidrofóbica de CALB	91
Figura 37. Cromatografía de Intercambio Catiónico <i>Candida antarctica</i> comercial: No retenido.....	92
Figura 38. SDS - PAGE de Fracciones Cromatografía Intercambio Catiónico de <i>Candida antarctica</i> comercial	92
Figura 39. Cromatografía de Intercambio Catiónico de Lipasa de <i>Candida antarctica</i> comercial.....	93
Figura 40. Cromatografía de Fase Reversa de <i>Candida</i> Antartica comercial	93
Figura 41. SDS - PAGE Fracciones de Cromatografía Fase Reversa Octilsilano	94
Índice de Tablas	
Tabla 1. Resolución de Estructuras Macromoleculares por Técnica.....	20
Tabla 2. Soluciones de Preparación para Cuantificación por Método de Lowry	51
Tabla 3. Información de los Líquidos Iónicos utilizados en Pruebas de Cristalización.....	58
Tabla 4. Medición de estándares para cuantificación de Proteínas.....	69
Tabla 5. Cuantificación por método de Lowry Modificado por Patterson.....	70
Tabla 6. Información General de las Lipasas Disponibles.....	72
Tabla 7. Parámetros Cristalográficos de la Lisozima en Presencia de BMIM TFA	76
Tabla 8. Estadísticos de Regresión de las Gráficas de Debye.....	81

1 Resumen

Los líquidos iónicos son sales, cuyo punto de fusión a presión atmosférica es menor a 100 °C. Presentan una diversidad de interacciones (hidrofóbicas, iónicas y apilamiento, por ejemplo) que les permite una gran versatilidad. Por estas razones son una opción única en el diseño de disolventes.

Los líquidos iónicos han sido usados con diferentes funciones en distintas investigaciones con proteínas. Básicamente se ha utilizado para mejorar la solubilidad de ciertas proteínas, como ayudantes en la separación y para aumentar la estabilidad de las proteínas bajo ciertas condiciones. También han evidenciado que modifican el hábito cristalino de los monocristales de ciertas proteínas, llegando inclusive a cambiar el polimorfo cristalino, en un rango amplio de proporciones con agua.

El uso de líquidos iónicos como aditivos de cristalización es un área de investigación atractiva, puesto que su amplia versatilidad estructural y funcional pueden permitir la utilización de agentes diseñados ad – hoc. Sin embargo, la observación experimental de la influencia en la cristalización observada aún no ha podido ser explicada de manera biofísica o molecular, por lo que es importante profundizar en este aspecto.

De esta manera, la presente investigación tiene como objetivo racionalizar el efecto que los líquidos iónicos tienen en la formación de monocristales de proteína. Para tal efecto, se realizaron experimentos de cristalización de lisozima de clara de huevo de gallina, glucosa isomerasa de *Streptomyces rubiginosus*, taumatina de *Thaumatococcus daniellii*, Xylanasa de *Bacillus subtilis*, así como Apo y Holo – transferrinas humanas, utilizando 24 líquidos iónicos de diferente naturaleza (hidrofóbicos e hidrofílicos, alifáticos y aromáticos, cosmotrópicos y caotrópicos) como aditivos. La gran mayoría de estos líquido iónicos presentó la formación de cristales similares a los experimentos de control (sin líquido iónico) por lo que no se realizaron posteriores experimentos con estos.

Sin embargo, se observó una modificación del hábito cristalino para la lisozima en presencia de Nitrato de Etilamonio (EANO₃), Bromuro de Tetraetilamonio (TEABr), Trifluoracetato de 3-butil-1-metilimidazolio (BMIM TFA) y Cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio (EMIM Cl) y de BTEA Cl Y EMIM SCN en el caso de la glucosa isomerasa.

Al resolver la estructura mediante cristalografía de rayos x de la lisozima en presencia BMIM TFA pudo constatar que el líquido iónico no se integra a la red cristalina, por lo que no se trata de un cambio en los contactos cristalográficos. Para esclarecer el tipo de influencia en la cristalización se realizó un Gráfico de Debye, mediante Dispersión de Luz Dinámica. Un análisis de los resultados de esta prueba indica que existe una modificación en la sobresaturación del sistema, lo cual también puede corroborarse con el crecimiento direccionado de una menor sobresaturación. Este resultado también da la idea de que existe una interacción muy débil.

Para contrastar las interacciones en solución se decidió utilizar la técnica de Diferencia de Saturación Transferida (la cual es una técnica de resonancia magnética nuclear), que permite en este caso, conocer las posiciones y la intensidad de interacción del catión imidazolio, en caso de existir. Se observó que existe una interacción más débil que la de un ligando, con orientación al catión imidazolio (lo que significa que es de tipo electrostática). Esto es consistente con un efecto surfactante.

Puede concluirse entonces que el efecto en la cristalización del catión del líquido iónico se debe a una menor sobresaturación local, además de una interacción débil del catión, similar a un surfactante.

2 Introducción

El estudio de la estructura tridimensional de las proteínas es una de las áreas más importantes e innovadoras en campos tan diversos como el diseño de fármacos, la comprensión de la evolución, el diseño de materiales y la descripción de la biodiversidad. Aunque actualmente existen diversas técnicas de elucidación de la estructura terciaria de proteínas y ácidos nucleicos, tales como la resonancia magnética nuclear o la microscopía electrónica, la técnica que es mayormente usada es la difracción de rayos X de monocristal. Del nombre de la técnica, es claro que para poder realizarla se necesita obtener un monocristal, y a pesar de que se utilizan muchas aproximaciones novedosas, la obtención de este sigue siendo un cuello de botella.

Un monocristal es la repetición de una unidad de volumen, llamada celda unitaria, que contiene a una o varias moléculas, de manera más o menos idéntica en todo el cristal. Para las proteínas, la obtención del monocristal es muy compleja, puesto que los contactos entre las moléculas en el cristal son considerablemente menores que para las moléculas pequeñas, y requieren condiciones sumamente específicas.

El desarrollo de un cuerpo de conocimientos que permita explicar de manera sistemática, y aún más, predecir condiciones de cristalización ha dado origen al área conocida como Cristalogénesis Biológica. Una de las piezas clave de información es el desarrollo del diagrama de solubilidad. Este es un constructo termodinámico, en el cual se pueden describir las secciones de precipitación, nucleación, sobresaturación metaestable e insaturación de la proteína, en diversas condiciones.

Parte de las condiciones que se pueden modificar para obtener cristales adecuados para difracción de rayos X son el uso de aditivos, entre los que se encuentran los líquidos iónicos. Un líquido iónico es una sal orgánica, normalmente muy asimétrica, que posee un punto de fusión menor a 100° C. Se ha demostrado que el uso de estos compuestos tiene efectos en la estabilidad y función de las proteínas, así como en la morfología y polimorfismo de los cristales.

Durante esta investigación se realizaron una serie de experimentos biofísicos y de

cristalización de proteínas en presencia de líquidos iónicos, con el fin de obtener información detallada de la manera que estos últimos interactúan con las proteínas y modifican los cristales. La comprensión de este fenómeno a nivel molecular es muy reducida, puesto que solamente se han descrito los efectos en los cristales, pero no se ha indicado las causas o sus modalidades.

El abordaje de este tema es muy importante, no solo en el caso específico de los líquidos iónicos y las proteínas, sino que también para comprender los sistemas de proteínas en solventes orgánicos (incluyendo su comportamiento de cristalización). Aunque los plegamientos de las proteínas son estables sólo marginalmente, y el plegamiento en sistemas acuosos es dirigido por la formación de un núcleo hidrofóbico enterrado dentro de la proteína, se ha reportado actividad, e inclusive aumento en la estabilidad de las proteínas en solventes apolares. Se ha indicado que esto se debe a la formación de una micela inversa (donde el solvente orgánico es la fase continúa). Así pues, los líquidos iónicos ofrecen una alternativa única para comprender y diseñar a medida estos solventes, puesto que tienen una gran versatilidad estructural y funcional.

3 Marco Teórico

3.1 Proteínas

Las proteínas son, probablemente, los biopolímeros más versátiles y extendidos desde los virus y organismos unicelulares, hasta los más complejos. Sus funciones van desde catálisis de reacciones, estructurales, de movimiento y defensa, hasta regulación, transporte y almacenamiento, además, son prácticamente ubicuas en todos los organismos[1].

Esta extensión y amplitud de funciones es una indicación de la complejidad que pueden tomar las diferentes proteínas. Formados solamente por unidades monoméricas de 20 aminoácidos comunes, el origen de dicha complejidad se encuentra en la jerarquía en diferentes niveles. Por lo anterior, es importante describir detalladamente la forma precisa en que una proteína se encuentra estructurada y cómo se obtiene esta información.

3.1.1 Bioquímica Estructural

La revista *Nature* que la Biología Estructural es el estudio de la estructura molecular y dinámica de las biomacromoléculas, particularmente de las proteínas y los ácidos nucleicos, así como las alteraciones en la estructura que afectan su función. Por tanto, incorpora los principios de la Biología Molecular, Bioquímica y Biofísica[2].

Teniendo en mente la anterior definición, se hace evidente que para describir la función de las proteínas se necesita conocer íntimamente su estructura. Aunque esto pudiera parecer un problema de química similar a los que se observan en la química de moléculas pequeñas, no lo es. Esto último se debe a la existencia de una jerarquización en su estructura, que además de la disposición de sus átomos y sus enlaces, está ligada directamente a interacciones intermoleculares, con el solvente, e interacciones supramoleculares con otras moléculas[3-5].

3.1.2 Niveles de Estructuración de una Proteína

La alta complejidad de la estructura e interacciones de una proteína hacen preguntarse acerca de su origen. Se ha observado además que los tipos de estructura, aún con un origen tan amplio y extendido, son comparativamente pocas. Esto puede explicarse directamente

por el camino evolutivo que las proteínas como tales han tenido, que subyace en las restricciones termodinámicas que prontamente obedecieron, por lo que es necesario profundizar en el tipo de estructuras que una proteína posee.

3.1.2.1 Estructura primaria

La primera jerarquía de la estructura de una proteína consiste en la más cercana a la descripción de cualquier polímero. Es decir, a la descripción de los átomos y enlaces de sus monómeros, así como su orden para formar el polímero. La estructura primaria, es entonces, justamente la descripción de la secuencia de aminoácidos que conforman la proteína[4], junto con modificaciones covalentes, como puentes disulfuro o fosforilaciones. Aunque la descripción de la secuencia pareciera ser trivial, existen algunos detalles importantes, que deben quedar completamente claros. Estos se presentan a continuación.

Los bloques de construcción elementales de una proteína son los aminoácidos. Se trata de un compuesto orgánico, formado por un ácido carboxílico, y una amina, unidos al mismo carbono, denominado carbono alfa (α). Este carbono se encuentra sustituido por un hidrógeno, y una cadena orgánica (R). A excepción de la glicina, donde esta cadena R es otro hidrógeno, todos los aminoácidos naturales presentan el carbono α sustituido por cuatro diferentes radicales, haciéndolos quirales. Todos los aminoácidos naturales son L - aminoácidos como se muestra en la **Figura 1**[4].

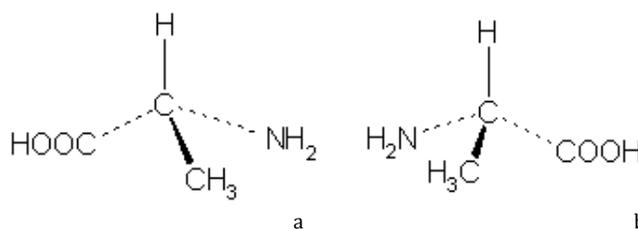


Figura 1: Quiralidad de los aminoácidos

a) D - aminoácido b) L - aminoácido. Al poseer al menos un carbono asimétrico, los aminoácidos tienen un centro quiral. Todos los aminoácidos naturales son L. **Fuente de figura:** Referencia [6].

En la **Figura 2** se presentan los 20 aminoácidos que la mayoría de los organismos utilizan para la síntesis de sus proteínas. Puede observarse características específicas debidas a la cadena lateral (la cadena R), que permiten que distintos residuos tengan características químicas polares, apolares e hidrofóbicas. Además, debido a los efectos en el entorno

electrónico, y la presencia de grupos ácido - base en las cadenas laterales, cada residuo tiene un equilibrio ácido - base a un pH definido[4].

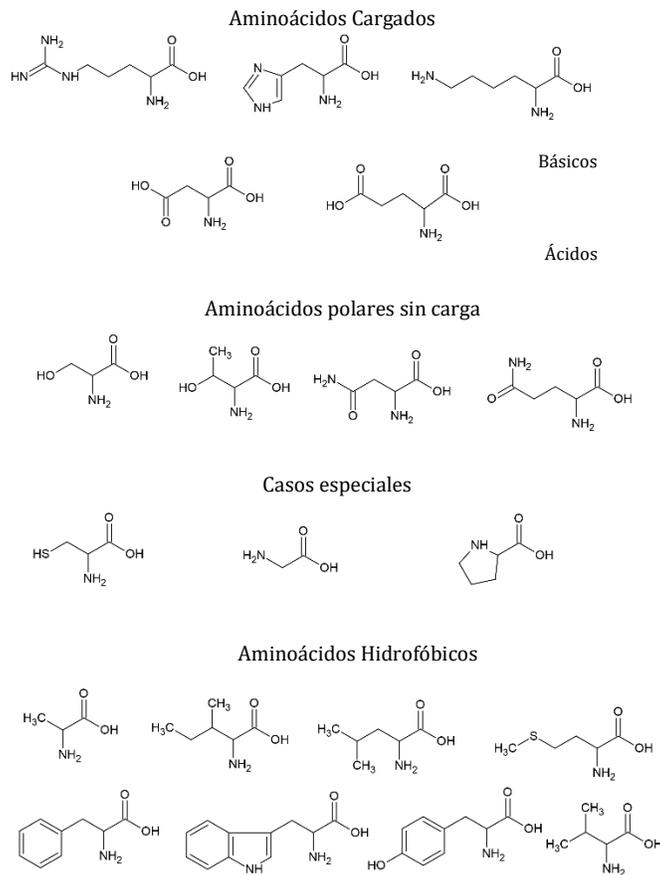


Figura 2. Aminoácidos biogénicos

Los aminoácidos biogénicos son 20. Se pueden clasificar según la cadena lateral en ácidos, básicos, neutros e hidrofóbicos. **Fuente de la Figura:** Figura propia realizada en ChemSketch.

El heterodímero básico entre dos aminoácidos, llamado péptido, es la formación de una amida, a partir del ácido carboxílico de un aminoácido, con el grupo amino de otro. A esta condensación se le conoce como enlace peptídico. Al extenderse el número de monómeros, siempre quedará un grupo carboxilo y un grupo amino libres, debido a la orientación de la condensación, conocidos como extremos carbono y amino terminal[4].

Debido a la formación del enlace peptídico en una geometría plana y rígida, se genera en la cadena principal (sin tomar en cuenta las cadenas laterales, los grupos R) dos ángulos entre los distintos planos que tienen rotación relativa entre sí, denotados como ϕ y ψ en la **Figura 3**. Estos enlaces diedros deben minimizar el impedimento estérico entre las cadenas

laterales, por lo que se permiten solamente ciertos valores de combinaciones entre ambos (a excepción de la glicina, que al no poseer cadena lateral no tiene este impedimento). Esto puede ser visto, en la sección *b* de esta misma gráfica, en donde se observan zonas preferidas (color rojo) y permitidas (color naranja). Este gráfico, conocido como gráfico de Ramachandran es muy útil para evaluar la estabilidad conformacional del modelo de proteína propuesto. Cualquier aminoácido que se encuentre fuera del gráfico, debe ser explicado detallada y cuidadosamente[4].

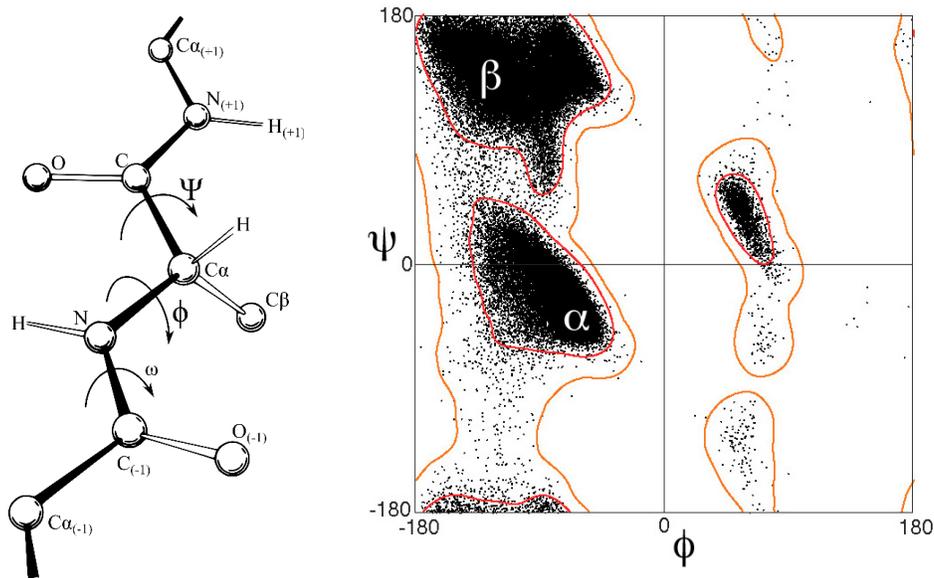


Figura 3. Combinaciones Aceptadas de Ángulos Diedros de Cadena Principal.

a) Esquemática de ángulos de torsión de un enlace peptídico b) Gráfico de Ramachandran. Debido a restricciones estéricas existen ciertos ángulos que adoptan los planos definidos por la cadena principal que un polipéptido. Estas zonas se muestran en un gráfico de Ramachandran. **Fuente de la figura:** a) Referencia [7] b) Referencia [8]

3.1.2.2 Estructura Secundaria

El conjunto de elementos de geometría regular de la cadena principal es conocido como estructura secundaria. Esta estructura generalmente es mantenida por interacciones intermoleculares, como puentes de hidrógeno, entre aminoácidos que se encuentran en las cercanías, con ángulos y orientaciones bien establecidas, que permiten establecer topologías características.

Los más comunes son las hélices alfa (α helix) y láminas u hojas plegadas beta (β sheets). Existe una relación directa entre la secuencia de la estructura primaria y la estructura

secundaria, puesto que diferentes aminoácidos son preferentes para formar un elemento de estructura, por lo que puede ser fácilmente predicha[1, 4].

Para fines ilustrativos de la jerarquía de la estructura se presentan en la **Figura 4** un esquema general de la hélice alfa y la hoja plegada beta. Como puede observarse, existen enlaces de hidrógeno que permiten fijar la estructura en formas bien definidas.

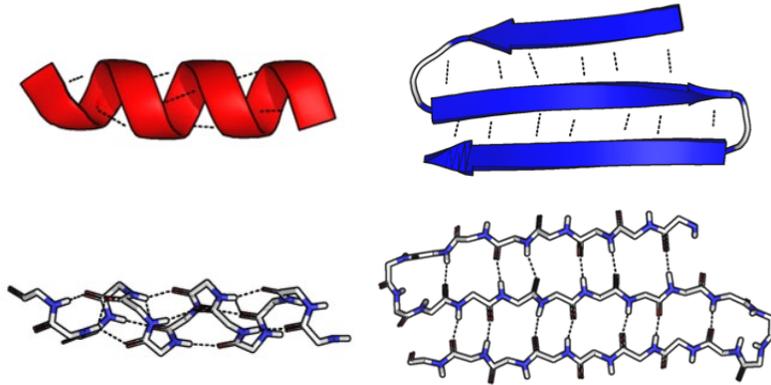


Figura 4. Estructuras básicas de Hélice Alfa y Hoja Plegada Beta.

Los motivos estructurales básicos son ensamblados por puentes de hidrógeno (en rojo) que orientan la estructura en geometrías específicas(violeta) **Fuente de la Figura:** Referencia [9]

Existen, entre la estructura secundaria y terciaria, estructuras supersecundarias, conocidas como motivos. En **Figura 5** se observa uno de estos motivos, conocido como paquete de cuatro hélices, el cual es un conjunto de cuatro hélices antiparalelos, los cuales son particularmente estables, o fácilmente estructurados[4].

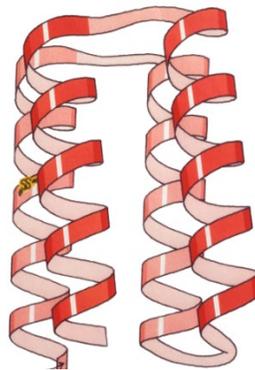


Figura 5. Motivo paquete de cuatro hélices

Ejemplo de Estructura Supersecundaria. Cuatro hélices combinadas en sentido contrario, asociadas de manera más o menos estable forman el motivo Paquete de Cuatro Hélices. **Fuente de la Figura:** Referencia [10]

3.1.2.3 Estructura Terciaria

Finalmente, la estructura terciaria es el plegamiento tridimensional completo. De cierta forma, mientras la estructura secundaria solamente incluye la cadena principal, la estructura terciaria incluye las geometrías, interacciones y estructuras también de las cadenas laterales. Normalmente, la estructura terciaria, puede dividirse en dominios. Si tiene funciones catalíticas o de reconocimiento molecular, el plegamiento permite que se genere una superficie mayormente hidrofóbica[4].

La estructura terciaria está íntimamente ligada a su función, estando más conservada esta última. Esto se debe a que los dominios que las conforman se han desarrollado de manera independiente y posteriormente se conjuntan en proteínas con funciones específicas.

Existe evidencia contundente de la conservación de dominios entre especies filogenéticamente muy separadas, pero con funciones similares. Por lo tanto, se puede suponer de manera análoga a la evolución de los organismos, una evolución de la estructura de las proteínas a través de la conservación de secciones más útiles, y posteriores modificaciones genéticas, por los mecanismos mutagénicos evolutivos conocidos, teniendo como resultado plegamientos característicos similares en prácticamente todas las estructuras de proteínas conocidas[11].

Este comportamiento similar permite definir de manera termodinámicamente el concepto de proteína (y diferenciarse, por ejemplo, de los péptidos) a través de su plegamiento. Se ha observado (ver **Figura 6**) que cualquier proteína, no importando su tamaño, presenta una ruta de plegamiento parecida, en el cual, la superficie de energía libre es rápidamente muestreada y decae a su mínimo en pocos pasos[12].

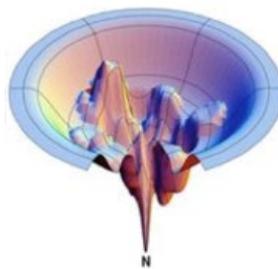


Figura 6. Superficie de Energía Libre del Plegamiento de una Proteína
Disminución del trabajo útil necesario para el plegamiento de la estructura de una proteína. Existe una disminución rápida de la misma hasta llegar a un pozo profundo. **Fuente de la Figura:** Referencia [13]

A nivel molecular, la fuerza motriz de este comportamiento es debida a la formación de un núcleo hidrofóbico. Cuando la estructura terciaria se está ensamblando en un medio acuoso, similar al de los organismos, la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos que forman parte de la secuencia establecen interacciones intermoleculares, conocidas como interacciones hidrofóbicas, que buscan ocultar estas secciones del agua, exponiendo los aminoácidos hidrofílicos o cargados al solvente acuoso. Esto se conoce como colapso hidrofóbico y juega un papel preponderante durante el plegamiento de las proteínas[14].

3.1.2.3.1 Solvatación

Del colapso hidrofóbico durante el plegamiento de una proteína surge como corolario la importancia para la estructura tridimensional de la solvatación de la proteína. Se ha observado que la capa de agua directamente en contacto con la superficie de la proteína está tan fuertemente unida a la misma (por fuerzas intermoleculares) que pueden decirse que son estructurales, sobre todo en la cercanía de un residuo cargado. La dinámica de las moléculas conforme se van alejando de esta capa parecen aumentar de manera discreta, modificándose dos o tres veces antes de llegar al solvente que no interacciona[15].

Este comportamiento es importante también en la presencia de solventes orgánicos, como pueden ser los líquidos iónicos, puesto que su presencia en la primera capa de solvatación, si interactúa con la capa hidrofóbica puede bloquear el plegamiento o desnaturalizar la misma proteína, sin embargo, en capas más alejadas, o en proteínas con secciones hidrofóbicas expuestas puede actuar como estabilizante micelar[16].

3.2 Difracción de Rayos X de Monocristal

Hasta ahora se ha discutido de manera teórica la estructura de una proteína, sin embargo, aún no se ha comentado acerca de las estrategias para conocer dichas estructuras. Como se observa en la **Figura 7**, actualmente existen alrededor de 160,000 estructuras tridimensionales, publicadas en el PDB (*Protein Data Bank*), de las cuales cerca de 11,000 pertenecen a plegamientos únicos. Puede apreciarse claramente que el crecimiento de este ha sido exponencial a partir de mediados de los años noventa, debido principalmente a la mejora de las técnicas, y al procesamiento computacional de las mismas.

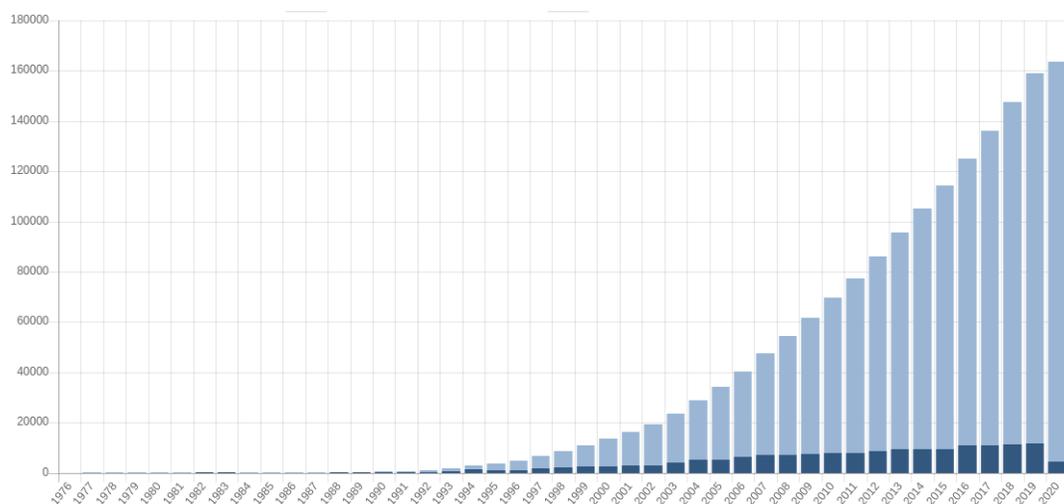


Figura 7. Estructuras depositadas en PDB por año.

Crecimiento exponencial de estructuras depositadas en el Protein Data Bank. Azul oscuro: Estructuras depositadas en el año. Celeste: Acumulado **Fuente de la Figura:** Referencia [17].

De estas técnicas, la técnica más común para resolución, con mucha diferencia, es la de Difracción de Rayos X de Monocristal (ver **Tabla 1**), siendo actualmente la técnica principal de uso rutinario en Biología Estructural, por lo cual se discutirá más detenidamente a continuación.

Tabla 1. Resolución de Estructuras Macromoleculares por Técnica.

Tipo de molécula	Rayos - X	Resonancia Magnética Nuclear	Microscopía Electrónica	Métodos Múltiples	Neutrón
<i>Proteína</i>	136148	11365	3724	156	67
<i>Proteína / Ácido Nucleico</i>	6598	264	1053	3	0
<i>Ácido Nucleico</i>	2046	1287	35	5	2
<i>Otro</i>	460	49	114	1	0
<i>Total</i>	145252	12965	4926	165	69

Fuente: Estadísticas del Sitio Web del Protein Data Bank[17].

3.2.1 Principios de Difracción de Rayos X

Para obtener la estructura de una proteína es necesario obtener un monocristal de ésta. Un cristal de este tipo es una repetición tridimensional del mismo patrón básico, hasta llegar a dimensiones de décimas de milímetro e inclusive se pueden crecer cristales en las escalas de los milímetros para uso en difracción de neutrones. En el experimento de difracción Rayos X, el patrón repetitivo del cristal permite que la señal producida por los dispersores atómicos se magnifique.

La celda unitaria (ver **Figura 8**) es un paralelepípedo (definido por tres vectores unidad y tres ángulos) que al trasladarse de manera periódica en tres dimensiones reproduce el cristal por completo. En su interior contiene las moléculas de proteína (en este caso) que forman el cristal. El contenido de la celda puede ser de una o varias moléculas, que pueden o no estar relacionadas por simetría no cristalográfica (mientras que la simetría cristalográfica se presenta cuando por medio de operaciones de simetría que permiten reproducir elementos del cristal, la no cristalográfica se presenta cuando existen repeticiones biológicas de las proteínas, por ejemplo)[18].

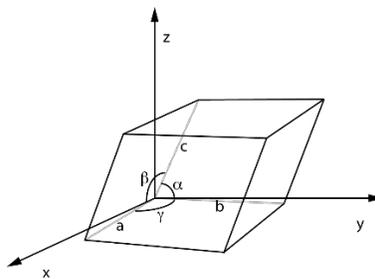


Figura 8. Celda Unitaria Modelo

Cualquier celda unitaria está definida por tres vectores de traslación y tres ángulos, que permiten representar completamente la red cristalina. **Fuente de la Figura:** Referencia [19].

Para que la interacción de un cristal de proteína con la radiación electromagnética produzca un efecto de difracción, que en realidad es un fenómeno de interferencia, es necesario que la dimensión de la radiación sea del mismo orden de magnitud que la separación de los planos cristalográficos dentro del cristal. Esto se cumple para los rayos X, cuya longitud de onda se encuentra en las dimensiones de 1 a 10 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$).

En la **Figura 9** se explica este comportamiento. Un haz de rayos X incide en un dispersor que se encuentra en una posición específica de la red cristalina. La radiación dispersada puede describirse como una onda viajera, que sale con un ángulo igual al plano de incidencia, con respecto a la normal. Este mismo fenómeno sucede con otros dispersores en diferentes posiciones. Dependiendo de la capacidad dispersiva y la distancia entre los planos en que se encuentran los dispersores, las ondas viajeras pueden interferir constructiva o destructivamente para producir un patrón de interferencia específico[18], que depende de la diferencia de fase en la onda (representada como ϕ) y el módulo de la amplitud (F).

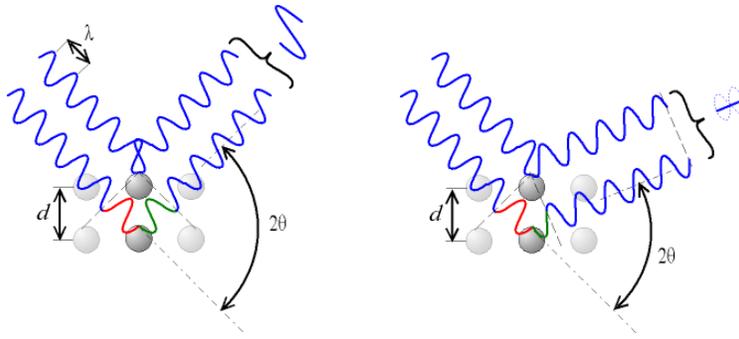


Figura 9. Dispersión de Rayos X en un Cristal.

Un haz de luz de rayos X, al chocar con un dispersor atómico se refleja. Dependiendo del ángulo, la λ y la fase, se puede dar interferencia constructiva con haces difractados por otros planos de la misma familia. Si el dispersor no se encuentra en un plano similar, al reflejarse la onda está desfasada y no produce interferencia constructiva. **Fuente de la Figura:** Referencia [20]

Lawrence Bragg dedujo la relación necesaria para que se diera interferencia constructiva entre los haces dispersados al menos dos átomos, situados en planos imaginarios separados por una distancia d (ver **Figura 10**). Si el haz incide con un ángulo θ con respecto al plano, se forman los triángulos rectángulos adyacentes entre los puntos $O - A - B - C$. Dado que los haces deben ser paralelos (estos son representados por un grupo de tres números, llamados índices de Miller, que indican en un origen cartesiano relativo, en qué lugar ocurre la intersección de los ejes por distintos planos que coinciden con algunos de los dispersores), $O - C$ y $O - A$ son perpendiculares a $B - C$ y $A - C$ respectivamente, y se obtiene que $AB = BC = d \sin \theta$. Debido a la restricción que permite que las ondas sean constructivas, se tiene que $AB + BC = n\lambda = 2d \sin \theta$: La forma en que suele representarse la ley de Bragg es $n\lambda = 2d \sin \theta$.

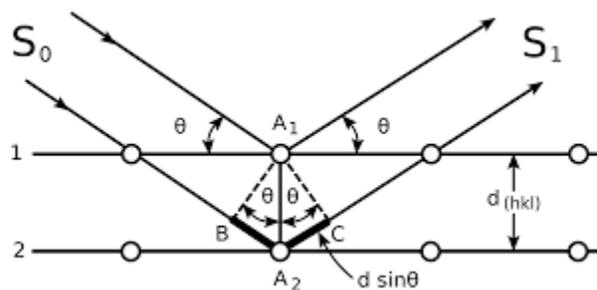


Figura 10. Ley de Bragg

Relación entre el ángulo de incidencia y la condición de interferencia constructiva: Ley de Bragg. **Fuente de la Figura:** Referencia [21]

3.2.2 Patrón de Difracción: Espacio Recíproco y Espacio Real

Es de esperarse que existan una gran cantidad de planos que cumplan con la condición de Bragg. La pregunta que se presenta es entonces la de recuperar la información estructural a partir de las combinaciones de las ondas provenientes de la difracción.

En la **Figura 11** se observa el resultado de colocar un detector de radiación a una distancia determinada del cristal que sufre difracción, o lo que es equivalente, un patrón de difracción bidimensional. En el mismo existen múltiples detalles que dan cuenta de su origen y permiten su interpretación.

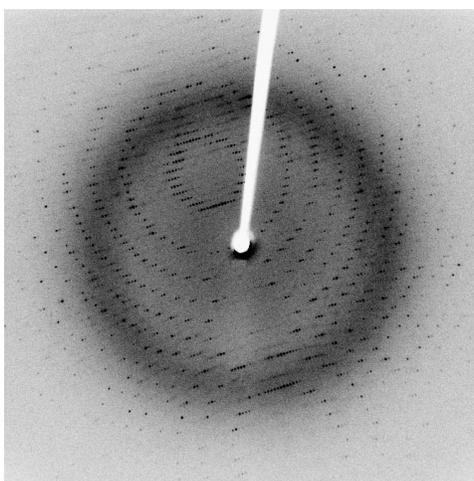


Figura 11. Patrón de Difracción Característico para una Proteína

Fuente de la figura: Referencia [22]

En primer lugar, el espaciado de los planos de la difracción es función del tamaño y simetría del cristal. Esto es, la simetría del cristal se reproduce en la simetría del patrón de difracción. Cada reflexión en el patrón de difracción representa una posición específica, que es dependiente de la familia de planos cristalinos con los mismos índices de Miller que sufren interferencia constructiva y dan origen a dicha reflexión (otorgando información de la posición de los dispersores). Por otro lado, la intensidad de las reflexiones es el resultado de la suma de las ondas reflejadas en fase, por lo que depende de las características de los dispersores (y por lo tanto da información de la naturaleza de los átomos ubicados sobre los planos, dado que dependen de la densidad electrónica de los mismos)[23].

Aunque la geometría básica del cristal, a lo que se le puede llamar espacio real, se transfiere a las reflexiones del patrón de difracción en el espacio recíproco, existe una transformación

del sistema que provoca que no sean idénticos. En la **Figura 12** se observa la manera en que cambia dicha geometría. Los cambios básicos que se observan son los siguientes:

1. Dimensiones: Las dimensiones de los vectores de posición relativa en el cristal son los recíprocos de los vectores en el espacio real.
2. Ángulos: Los ángulos en el espacio real son suplementarios a los ángulos en el espacio recíproco.

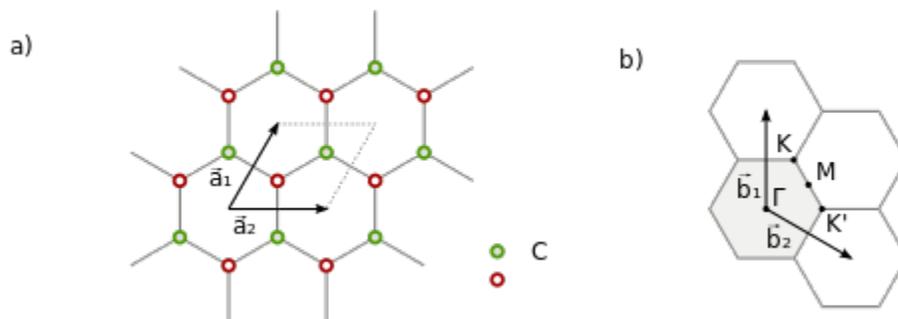


Figura 12. Espacio Recíproco Bidimensional.

Comparación de a)Espacio Real y b)Espacio Recíproco bidimensional del grafeno. Los vectores son recíprocos y los ángulos complementarios. Referencia [24]

Con base en lo expuesto, también se puede intuir que el patrón de difracción de la **Figura 11** puede ser el de una proteína, puesto que el espacio entre reflexiones es pequeño (y por lo tanto este mismo espacio en el cristal es grande)[23]. Los puntos de difracción mostrados en la **Figura 12** nos muestran el espacio recíproco y a través del mismo hay que obtener la resolución de la estructura. Esto quiere decir pasar de un patrón en dos dimensiones a una aproximación tridimensional en resolución estructural.

Las relaciones entre el espacio real y el espacio recíproco pueden ser graficadas conjuntamente utilizando la construcción de una esfera en la cual se encuentran el cristal y el espacio de difracción establecido por la ley de Bragg (representado en la **Figura 13** por la circunferencia, siendo entonces un plano de dicha esfera) y el espacio recíproco (la rejilla de la misma figura). Al encontrarse uno de los puntos de la gradilla con la esfera se produce entonces una reflexión observable[25].

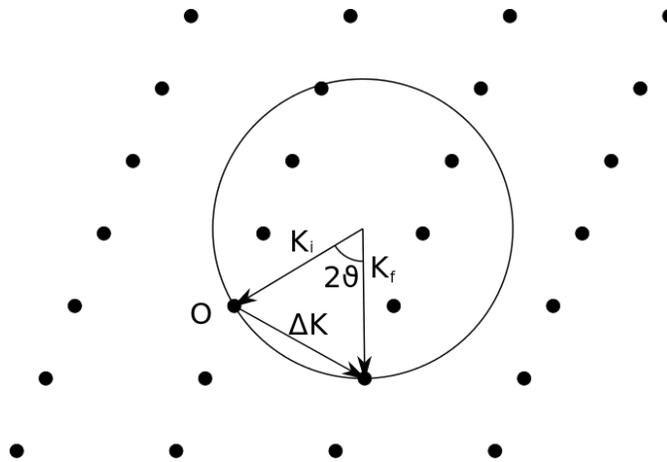


Figura 13. Esfera de Ewald.

La esfera de Ewald es un constructo en el cual se puede observar que al coincidir la red recíproca con la esfera de reflexión se da una reflexión en el patrón de difracción. O es el origen del espacio real, donde se encuentra el cristal, mientras que O' es el origen del espacio recíproco. **Fuente de la Figura:** Referencia [26]

3.2.3 Mapa de Densidad Electrónica y Elaboración de Modelo Molecular

Con base en lo discutido hasta esta sección, es evidente que es posible deducir la posición tridimensional de los dispersores a partir de la información de las reflexiones, sin embargo, como se mencionó anteriormente, dado que las reflexiones se deben a contribuciones de los planos, teóricamente en cada reflexión existe una parte aportada por cada dispersor, y cada dispersor está diseminado en todas las reflexiones.

Ecuación 1. Síntesis de Fourier.

$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz$$

Ya que la intensidad de una onda está dada por el cuadrado del módulo de su amplitud ($F(hkl)$ es el factor de estructura, siendo su valor al cuadrado igual a la intensidad), para poder separar cada contribución es necesario conocer la fase (ϕ) de la **Figura 9**, como puede describirse en la **Ecuación 1**, sin embargo, esta información de la sumatoria se pierde durante la medición, y por tanto debe ser aproximada numéricamente, utilizando medios heurísticos (a esto se le conoce como problema de la fase)[27].

En los inicios de la cristalografía de proteínas se utilizaron macromoléculas que tuvieran átomos con un número atómico alto (como por ejemplo centros metálicos), puesto que la intensidad de las reflexiones sería dominada por este dispersor. Si existieran varios átomos,

es entonces posible encontrar sus posiciones relativas y luego aproximar la fase del resto de los átomos mediante iteraciones sucesivas. Este método es conocido como del átomo pesado, y actualmente suele utilizarse en la forma de la técnica de dispersión anómala[28]. En la actualidad, es mucho más común utilizar un modelo ya publicado con secuencia similar a la proteína que se está tratando resolver, y realizar las transformaciones pertinentes, como primera aproximación a las fases[28], método conocido como Reemplazo Molecular. De la **Ecuación 1** se puede deducir que, una vez establecidos los factores de estructura, es posible conocer la densidad electrónica. Dado que en realidad solamente es posible conocer de manera discreta los factores, se obtienen descripciones discretas de la densidad electrónica. La resolución de la densidad electrónica está dada entonces por la menor distancia entre dos puntos de densidad que pueden ser resueltos. Como se puede ver en la **Figura 14** la resolución experimental tiene un efecto importante en la calidad del modelo que se pueda determinar. A alta resolución se puede observar inclusive cada átomo claramente, y definir la conectividad a partir de la distancia de enlace, permitiendo describir completamente tanto la cadena principal como la cadena lateral de la proteína, describiendo su estructura terciaria e inclusive sus interacciones.

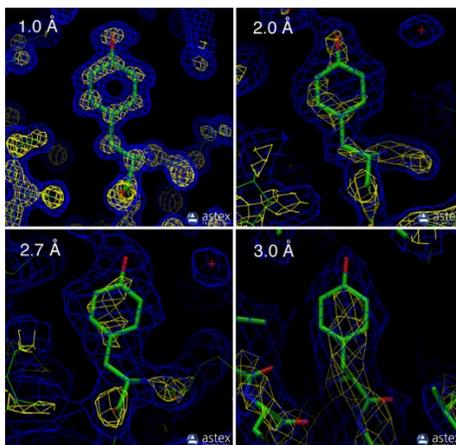


Figura 14. Relación de Densidad Electrónica y Resolución.

Al aumentar la resolución del experimento de rayos X, el mapa de densidad electrónica permite describir con mayor detalle las estructuras tridimensionales (De 1.5 y 1 Å hacia abajo la descripción es atómica). **Fuente de la Figura:** Referencia [29].

3.3 Cristalogénesis Biológica

3.3.1 Definición

Aunque la formación de un cristal es un proceso ampliamente usado en diversas áreas de las ciencias, sobre todo en la física y química, al tratar con la formación de cristales de proteína con fines de obtener información estructural, tanto los fundamentos como las técnicas y los procesos son muy característicos.

Los cristales de sustancias inorgánicas, por ejemplo, se pueden preparar a partir de un enfriamiento lento, luego de preparar una solución donde se haya disuelto la especie química a una temperatura alta (que por lo general aumenta su solubilidad), o añadiendo solventes orgánicos, para bajar la solubilidad por variaciones de constante dieléctrica. Sin embargo, en el caso de realizar este procedimiento para obtener cristales de proteína, estas proteínas sufrirían desnaturalización, haciendo imposible obtener el cristal deseado[30].

La gran cantidad de factores que encierra obtener un cristal hizo de la obtención de un monocristal de proteína un arte, sin embargo, a partir de 1980 su sistematización y la formulación de modelos ha logrado que se convierta en una ciencia acuñando el término cristalogénesis biológica.

Esta es la parte de la cristalografía que busca entender los principios fisicoquímicos básicos de los procesos de nucleación, cristalización, crecimiento de cristales y medir de manera cuantitativa los parámetros biofísicos y químicos que están involucrados en el crecimiento de un cristal[31].

3.3.2 Diagrama de Solubilidad: Parámetros Termodinámicos

La cristalización es un fenómeno de transición de fase, en el cual, una solución de proteína es llevada a sobresaturación, ya sea cambiando la concentración de precipitante, de proteína o de aditivos, pH o temperatura[32].

En la **Figura 15** se observa un diagrama de fases, conocido como diagrama de solubilidad, de una proteína. Se pueden apreciar claramente varias secciones.

1. Insaturación: En esta zona la concentración de proteína en las condiciones especificadas es menor a la necesaria para que la proteína cambie a una fase sólida.

2. Sobresaturación: En esta fase la concentración de la proteína es mayor a su solubilidad. Esto significa que una porción de la proteína saldrá de la solución y formará una especie sólida.
 - a. Zona de Precipitación: En esta zona la concentración de la proteína es tan alta que la formación del sólido es muy rápida y se forman una gran cantidad de cristales demasiado pequeños como para ser analizados por las técnicas de monocristal.
 - b. Zona de Nucleación: En esta zona se forman núcleos de cristalización, consistentes en pequeños clústeres de proteína que ya se encuentran separados de la fase continua de solución, pero que no son observables por medios ópticos.
 - c. Zona Metaestable: Una zona de baja sobresaturación, en la cual los cristales son estables y pueden crecer, pero no se forman nuevos núcleos de cristalización.

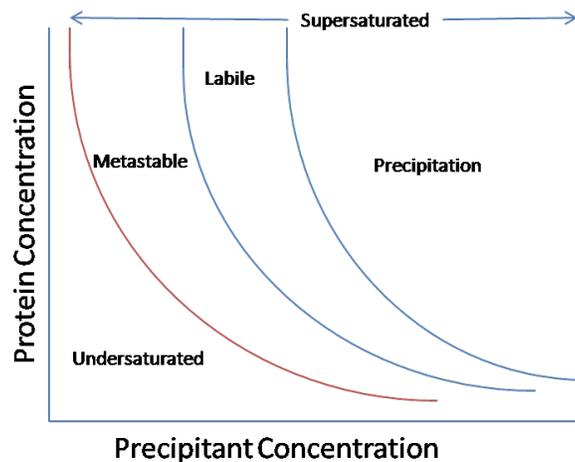


Figura 15. Diagrama de Solubilidad de una Proteína.

Secciones de diagrama de solubilidad de una proteína, para obtener un monocristal adecuado se debe alcanzar la zona de nucleación y rápidamente pasarse a la sección metaestable. **Fuente de la Figura:** Referencia [33].

Para obtener un cristal con características adecuadas con el fin de adquirir datos de alta resolución y un modelo con mucho detalle y alta calidad, es deseable que se alcance la zona de nucleación (en la zona lábil), obteniéndose una baja (pero no nula) cantidad de núcleos de cristalización, y que la solución pase rápidamente a la zona metaestable. En la zona metaestable, es preferible que la curva de solubilidad se alcance lentamente, y que la

agregación de nuevas proteínas al cristal se dé por medio exclusivamente difusivos, eliminando la convección de cualquier tipo[34].

El agente precipitante de la **Figura 15** es una especie química que compite con la proteína por el solvente. Cuando las concentraciones de proteína y de dicho agente son suficientemente altas, la proteína es separada de la solución y se asocia para formar un cristal (a este proceso se le suele llamar *Salting - out* en inglés, y precipitación ordenada o precipitación, en español)[32]. Los agentes precipitantes se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. **Sales inorgánicas:** El principal efecto de las sales, sobre todo de los aniones de estas, es formar una red con las moléculas de agua que genera que las proteínas se asocien entre sí. El efecto suele ser entálpicamente guiado, por lo que aniones poli - cargados suelen ser los más utilizados (sulfatos, fosfatos o citratos, por ejemplo). Un efecto menor, pero importante, sobre todo tratándose del catión, es de interacción específica con la proteína[32].
2. **Solventes Orgánicos Volátiles:** Estas especies (tales como alcoholes de bajo peso molecular, acetona o acetonitrilo) reducen la constante dieléctrica del medio, por lo que apantallan los campos eléctricos que median las interacciones de la macromolécula en la solución. Al aumentar la proporción de solvente orgánico, la interacción de la macromolécula con la solución disminuye, ocasionando la formación del cristal. El principal problema del uso de estos solventes es la desnaturalización de las proteínas[32].
3. **Polímeros:** El uso de polímeros, donde el polietilenglicol (PEG) es ampliamente utilizado, produce efectos de exclusión de volumen, que inducen la separación de las macromoléculas de la solución. Como su nombre lo indica, este efecto, es debido a que, al tratarse de polímeros flexibles, ocasionan que el espacio para que el solvente acuoso hidrate efectivamente a la proteína se reduce, generando dispersión y formación de agregados[32].
4. **Solventes Orgánicos no Volátiles:** El efecto molecular es similar al de los solventes orgánicos volátiles, pero se utilizan compuestos no volátiles (pueden mencionarse a

manera de ejemplo 2-metil-2,4-pentanodiol o 2,5-hexanodiol) en diseños de experimentos distintos[32].

Los líquidos iónicos también pueden ser usados como agentes precipitantes o aditivos de cristalización. Sin embargo, por ser iones orgánicos con una presión de vapor muy baja a las condiciones normales de cristalización, no se pueden clasificar fácilmente. Como cabría esperar, su comportamiento es una mezcla entre las sales inorgánicas y los solventes orgánicos no volátiles, pero también pueden existir interacciones específicas[35].

Aunque la descripción general aquí presentada indica en términos de funciones de estado el comportamiento del sistema, siendo un requisito *sine qua non*, es necesario tomar en cuenta la cinética y la dinámica de las moléculas que están formando el cristal, para obtener cristales que puedan dar resultados adecuados al realizar la difracción de rayos X (aquí se refiere a un resultado adecuado a aquel cristal que permita obtener un patrón de difracción con resolución y parámetros estadísticos tales que sean útiles al propósito de la resolución estructural).

3.3.3 Nucleación, Crecimiento Cristalino, Efectos Cinéticos y Difusivos

Para obtener un monocristal de proteína es necesario que sucedan dos eventos consecutivos de características diferentes, la nucleación, y el posterior crecimiento ordenado del núcleo cristalino[34].

La nucleación es la obtención, a partir de la solución sobresaturada de la proteína, de una fase separada microscópica con características de orden traslacional y rotacional distintos a la solución[36].

Para las proteínas se han establecido dos teorías diferentes de formación de núcleos. La primera, conocida como teoría clásica de nucleación, está descrita por la separación heterogénea de fases, descrita por Gibbs[37] en su forma general, y aplicada por Frenkel[38]. La energética básica se puede observar en la **Figura 16**.

La formación de un núcleo estable sucede cuando se alcanza un volumen crítico, en el cual la interacción entre los miembros del núcleo, supera a la interacción de los miembros del núcleo que forman parte de la superficie del mismo e interactúan con el solvente. La

interacción entre miembros del núcleo es proporcional al volumen, y con el solvente, proporcional a la superficie de este. [36].

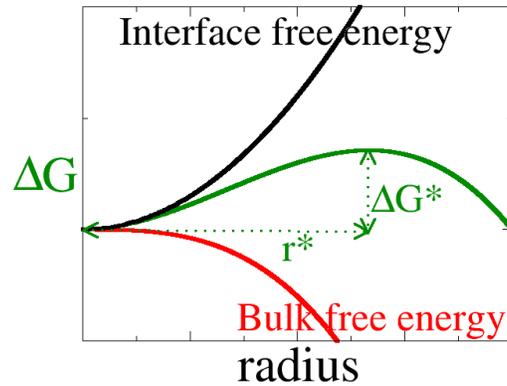


Figura 16. Energética de Nucleación.

Para obtener un núcleo estable debe alcanzarse un número mínimo de especies (reflejada en el radio crítico r^*), de manera que la energía que cohesionan el núcleo sea mayor que la que los separa. **Fuente de la Figura:** Referencia [39].

Fuera de la teoría clásica de nucleación, se ha propuesto la existencia de una nucleación multietapa. Esta teoría propone un mecanismo de autoensamblaje debido a interacción y oligomerización de las proteínas, para formar un líquido denso metaestable. Como consecuencia, el proceso de nucleación no es totalmente estocástico[40].

Una vez formado el núcleo de cristalización, y alcanzada la zona metaestable de sobresaturación, el cristal puede seguir creciendo hasta alcanzar el límite de saturación. En este aspecto, también es necesario destacar ciertas características que tiene dicho crecimiento.

En la **Figura 17** se muestra un esquema del crecimiento de una capa cristalina, luego de que se ha formado un núcleo. La primera forma de crecer es de manera tangencial, en donde se agrega la proteína a una capa existente. La segunda, es la creación de nuevos vértices, o crecimiento normal. El crecimiento tangencial es un proceso sencillo, ya que es un proceso cooperativo favorecido por la entalpía que supone una adhesión directa al vértice existente, mientras que el crecimiento normal depende de que una capa se encuentre completamente ocupada, y básicamente es un evento local de nucleación, lo que puede ocasionar una mayor cantidad de imperfecciones e impurezas en el cristal.

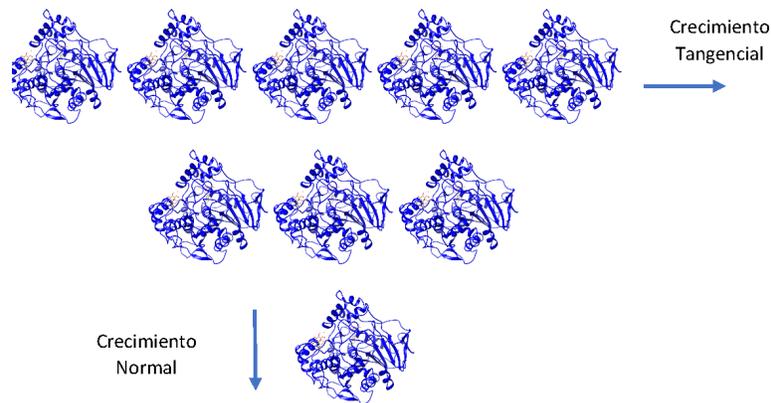


Figura 17. Vías de Crecimiento Cristalino.

Panel superior: Crecimiento tangencial, se da cuando existen espacios disponibles para que la especie se coloque e interactúe. Panel Inferior: Crecimiento normal, es muy similar a un evento nuevo de nucleación.

Fuente de la Figura: Figura propia, basada en la Referencia[41]

Existen varios mecanismos de crecimiento descrito a un detalle aceptable, que son dependientes de la sobresaturación del sistema, que a su vez dependen de una variedad de parámetros, ya mencionados anteriormente. Estos mecanismos pueden suceder al mismo tiempo, tanto en diferentes planos de crecimiento, como en el mismo plano, pero normalmente uno es mayormente favorecido.

La mayoría de virus y proteínas generan nuevas capas a través de un proceso de crecimiento bidimensional en una superficie existente. Guiadas por un sistema ordenado basal, las moléculas del cristal en crecimiento se ordenan en arreglos cristalinos consistentes con la cara en crecimiento, esto se denomina homoepitaxia. Un posterior crecimiento del mismo plano se da por un crecimiento tangencial en los espacios vacíos[41].

Se ha observado únicamente en los cristales de biomacromoléculas un crecimiento directamente en un bloque tridimensional, que se asemeja al hábito cristalino macroscópico. Cada bloque proporciona vértices para el crecimiento tangencial de la capa. El origen de este mecanismo es intrigante, sin embargo, se ha encontrado evidencia de que se debe al mecanismo no clásico de nucleación, donde se forma una gota auto - ensamblada, con características distintas a la solución, pero sin ser sólido. En este caso, esta gota que aún posee características desestructuradas, pero se encuentran hiper - saturadas, al sedimentar en la superficie de un cristal en crecimiento, funciona como sustrato epitaxial[40, 41].

En un cristal en equilibrio con una solución de proteína, se forma una capa interfacial, en la

cual esta cambia de la concentración en la solución, a la concentración del sólido (el volumen molar, más propiamente dicho). La fuerza motriz de la formación del cristal es la posibilidad de las moléculas en la solución de formar asociaciones con las moléculas que se encuentran en la superficie del cristal, compensando las secciones libres en la superficie del cristal. A la diferencia de energía se le denomina energía interfacial, y es el parámetro termodinámico más importante para caracterizar la cinética del cristal en crecimiento[42].

Los valores medidos de las soluciones de cristales de proteína son varios órdenes de magnitud menores que las presentes en soluciones de moléculas pequeñas, y evidencian que la diferencia de energía entre la solución y el cristal es pequeña. Puede suponerse que esto se debe a que la hidratación de la macromolécula no varía apreciablemente en el cristal[41]. El parámetro más importante que gobierna la cinética de crecimiento del cristal es el coeficiente cinético. Este es la medida de la cinética de incorporación de una molécula en un plano del cristal, involucrando todos los procesos: la cinética de transporte, absorción, difusión superficial, reorientación y cualquier otro componente de incorporación, en el cual el más lento de estos es el limitante de velocidad[42].

Se ha observado, gracias a los experimentos en microgravedad, que los cristales de proteínas formados en el espacio suelen tener una mayor calidad cristalográfica. Independiente de las variables bioquímicas, se ha explicado en función de una sedimentación reducida del cristal, lo cual genera zonas de flujo dirigidas por la depleción de densidad en zonas específicas alrededor del cristal. Por otro lado, la formación de una zona de depleción continua en un sistema totalmente difusivo minimiza y estabiliza la sobresaturación de la interfaz entre el cristal y la solución, haciendo constante el flujo de masa e impulsando el crecimiento cristalino, lo cual favorece el arreglo cinético de las moléculas en la superficie del cristal. Por lo tanto, las condiciones de transporte difusivo de masa son claves en la obtención de cristales de muy alta calidad[43].

3.3.4 Métodos de Crecimiento de Cristales

En vista de todas las variables existentes para obtener un cristal adecuado para realizar experimentos de Biología Estructural, existen diferentes técnicas y aproximaciones para satisfacer los criterios termodinámicos, cinéticos y difusivos. A continuación, se presentarán algunos de ellos, que se utilizaron para los experimentos de esta investigación.

3.3.4.1 Difusión en fase vapor

Las técnicas de difusión en fase vapor, en las modalidades de gota colgante y gota sedente, son las técnicas más utilizadas y exitosas para obtener cristales de proteína.

En la **Figura 18** se presenta un esquema de las estrategias básicas de las técnicas de difusión en fase vapor. Esta técnica consiste en el cambio de fase del solvente acuoso, debido a la diferencia de actividad entre las dos soluciones del experimento. La solución que contiene la proteína se encuentra en la gota que está separada del reservorio, con la solución amortiguadora y el agente precipitante a concentraciones menores que el reservorio (así como cualquier otro aditivo necesario). La solución del reservorio es similar en las especies a la de la gota, pero se encuentra en concentraciones más altas, y no está presente la proteína. Debido a la diferencia de concentraciones, existe un gradiente de potencial químico, que ocasiona que el vapor de agua de la solución diluida migre a la solución concentrada. Esto supone que el sistema está aislado[30].

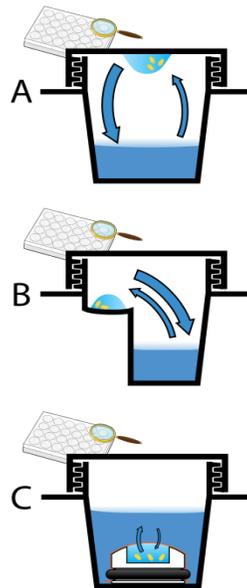


Figura 18. Técnicas de Difusión de Vapor.

A) Gota Colgante B) Gota Sedente C) Microdiálisis. La gota, que contiene a la proteína, se concentra por difusión del vapor del solvente, debido a la diferencia de concentración con el reservorio. **Fuente de la Figura:** Referencia [44].

Se puede usar la **Figura 15** para explicar el diagrama de solubilidad de cualquiera de las disposiciones de difusión en fase vapor (de la gota con la proteína). Al inicio, debe

encontrarse en una concentración menor a la de saturación. Dado que la solución del reservorio tiene una concentración mayor, tanto de la proteína como del agente precipitante, el estado termodinámico en donde alcanza el equilibrio se encuentra en la sección de nucleación (siguiendo una línea en diagonal). Al disminuir la concentración de proteína, por la formación de los núcleos, se alcanza la región metaestable, y el cristal puede crecer. Como consecuencia, esta técnica es muy utilizada cuando no se conocen las condiciones exactas de cristalización, por lo que es necesario hacer un barrido de las concentraciones de proteína y agente precipitante.

3.3.4.2 *Batch*

En el caso de la técnica de Batch, se conoce directamente las concentraciones óptimas de nucleación y crecimiento cristalino de las soluciones de cristalización. Esto es equivalente a colocar el experimento en la sección de nucleación de la **Figura 15**, por lo que el diseño del experimento es simplemente colocar una mezcla de la proteína en el amortiguador adecuado, a las concentraciones de precipitantes y aditivos. Por lo tanto, debe conocerse exactamente cuál es esta condición adecuada.

3.3.5 **Aplicaciones de los Cristales en Ciencia y Tecnología**

Además de la aplicación directa de los cristales en la obtención de información estructural de biomacromoléculas y moléculas pequeñas, los cristales son ampliamente usados en ciencia y tecnología. De hecho, muchos de los aparatos e instrumentos que se utilizan en la vida cotidiana involucran de una forma u otra el uso de cristales.

En los equipos electrónicos se utilizan semiconductores grabados a escala nanométrica. Las propiedades cristalinas de estos hacen posible su utilización. Las pantallas que se utilizan actualmente también tratan de diodos semiconductores, de naturaleza cristalina. La medición electrónica del tiempo suele estar relacionada con materiales piezoeléctricos, que dependen del uso de cristales con esta propiedad para lograr la precisión de ese reloj, que también es aprovechada para amplificar el sonido, con aplicaciones en aparatos amplificadores, e inclusive clínicas.

Una última aplicación de gran importancia tecnológica se da en el uso y diseño de láseres, y equipos de óptica no lineal, que dependen de las propiedades de los cristales. Como puede

apreciarse, el uso de los cristales es muy amplio, constituyendo un área de la ciencia muy importante e interesante.

4 Antecedentes

4.1 Efectos de la Constante Dieléctrica en la Obtención de Monocristales de Proteínas

Como se mencionó anteriormente (sección 2.3.2), algunos solventes orgánicos, así como polímeros de etilenglicol (polioles de diferente tamaño) son utilizados comúnmente para la obtención de monocristales de proteína. Los mecanismos supuestos para estos agentes precipitantes han sido explicados en la misma sección.

Sin embargo, fuera de la agregación amorfa, que por ejemplo puede sufrir la Albúmina Sérica Humana (BSA, *Bovine Serum Albumin*) en presencia de etanol, se ha publicado la posibilidad de la modulación de la agregación ordenada de Conavalina A en función de la constante dieléctrica (mediante el uso de cosolventes). El mecanismo de crecimiento de cristales de esta proteína, permite entonces suponer que este comportamiento es general[45] y que por tanto, la solvatación por compuestos orgánicos descrito anteriormente (en 2.1.2.3.1) bajo ciertas condiciones, consiste en la formación de una micela inversa (en la que la fase continua es el solvente orgánico) y se obtiene un efecto de exclusión de volumen, que puede ser adaptado a las necesidades[16].

El efecto de exclusión de volumen consiste en una disminución del espacio disponible en la solución por la presencia de un líquido inmiscible o un polímero, aunque es ampliamente utilizado en extracción (o purificación de proteínas) no ha sido tan ampliamente estudiado en cristalografía[46].

4.2 Líquidos Iónicos y el efecto de Hofmeister

Los líquidos iónicos (IL, *Ionic Liquids*) son sales cuyo punto de fusión a presión atmosférica es menor a 100°C. Esto normalmente se debe a que poseen una estructura iónica grande y asimétrica, ya sea en el anión, el catión o en ambos, ocasionando que sus contactos intermoleculares no sean sumamente intensos, sin embargo, lo suficientemente fuertes para que sean solventes muy poco volátiles y prácticamente inflamables[47].

Estos líquidos iónicos son una opción única en diseño de disolventes, puesto que exhiben una gran versatilidad de propiedades, en función de su estructura, ya que modificar las

cadenas alifáticas, ya sea en dimensión o ramificación, permite cambiar las propiedades de interacción hidrofóbica y estéricas, mientras que un ajuste de la sección iónica, la interacción electrostática. Unido a las propiedades de los contraiones, se obtienen muchos efectos conjuntos y modificables en el mismo solvente. Para esta investigación, es importante también el efecto que las modificaciones estructurales tienen en la solubilidad del líquido iónico en agua, puesto que permite modular la competición por este solvente con la proteína[48].

Según sus efectos colectivos con el agua pueden ser hidrofóbicos o hidrofílicos. Cuando se trata del segundo, se ha observado que en ciertos casos pueden ser hidratados de manera muy favorecida entálpicamente estableciendo un efecto cosmotrópico, por lo que se disgregan en la misma, teniendo un efecto de *precipitación ordenada* similar a cualquier sal. Esto suele suceder con aniones que sufren mucha polarización. Cuando se trata de cationes hidrofóbicos, estos suelen tener un comportamiento de autoensamblaje, que, dependiendo de la proporción, pueden formar micelas mediadas por interacciones hidrofóbicas como se observa en la **Figura 19**.

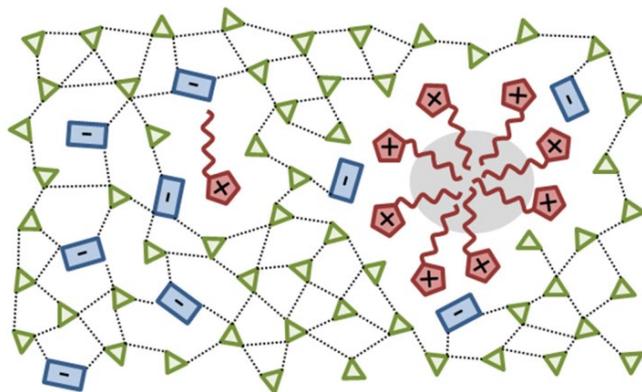


Figura 19. Estructuración de los Líquidos Iónicos en Agua.

Combinación de un anión cosmotrópico que ocasiona el efecto de *Precipitación ordenada* y un catión caotrópico que se auto - ensambla **Fuente de la Figura:** Referencia [49].

El uso de líquidos iónicos y sus propiedades como disolventes ha sido explorado desde 1914, cuando Walden diferenció las propiedades dieléctricas al nitrato de etilamonio de otras sales disueltas[50], mientras que se ha usado en investigaciones con proteínas desde prácticamente inicios del siglo XXI, reportándose actividad en la presencia de los líquidos iónicos y su uso como estabilizante de diversas proteínas, tales como α - quimiotripsina[35],

mioglobina, HSA[51], Lisozima de Clara de Huevo de Gallina(HEW, *Hen Egg-White Lysozyme*)[52] y lipasas de *Bacillus subtilis*, *Candida rugosa* [53], *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*[54] y *Candida antarctica*[55, 56].

Paradigmáticamente se han utilizado líquidos iónicos derivados del catión imidazolio (ver **Figura 20**) con HEW Lisozima y la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). En el caso de CALB, se ha observado una mayor estabilidad luego de varios ciclos de uso para catálisis enantiomérica[55], una mayor estabilidad y actividad en la catálisis[57] y en la actividad sintética[54].

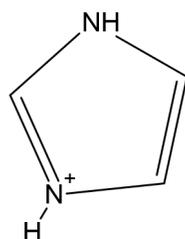


Figura 20. Cation Imidazolio. Figura propia, dibujada en ChemSketch

Aún más estudiada (probablemente por ser una proteína altamente resistente a diversas condiciones, incluyendo presencia de solventes orgánicos) es la lisozima, que ha exhibido una mayor estabilidad en el rango de pH en varias proporciones de IL - agua, encontrándose que mantiene las estructuras de hélice alfa[35], evitando la desnaturalización e inclusive favoreciendo el re - plegamiento de lisozima mal plegada o parcialmente desplegada[52]. Estos efectos han sido razonados desde la perspectiva que, de concentraciones intermedias a altas, los líquidos iónicos imidazólicos se alejan de la primera capa de hidratación[58].

Debido a lo expuesto en esta sección es evidente que las interacciones entre los líquidos iónicos y las proteínas son un balance entre distintos efectos. Una manera efectiva de orientarse en casos específicos es utilizar las propiedades termodinámicas de solvatación. La formación de pares iónicos en solución se da arriba de la línea punteada de la **Figura 21**, por debajo de esta alguna de las especies es fuertemente hidratada.

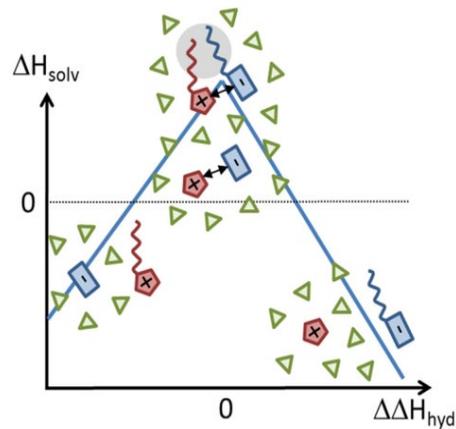


Figura 21. Efectos Entálpicos de Solvatación y Agregación de Líquidos Iónicos.

La formación de pares iónicos se favorece entálpicamente cuando se utilizan iones similares (ambos caotrópicos o cosmotrópicos). **Fuente de la Figura:** Referencia [59].

En caso de que esto último suceda, se le denomina agente cosmotrópico (por la formación de la red tridimensional con el agua), en caso contrario es llamado caotrópico. De hecho, de manera clásica, cuando alguno de los iones del agente precipitante forma esta red es el ya mencionado efecto de precipitación ordenada. Se ha demostrado que para los líquidos iónicos la mayoría de los efectos estabilizantes se dan cuando el anión es cosmotrópico y el catión caotrópico[48].

En este contexto es conocida el efecto de Hofmeister, publicada por Franz Hofmeister en 1888[60] con un listado (la serie de Hofmeister) ordenado de aniones y cationes en función de su capacidad de precipitar la albúmina de clara de huevo, de la cual se presenta una versión actualizada en la **Figura 22**. El efecto de precipitación de los iones comúnmente usados en cristalografía se clasifican también en este listado[61], como puede observarse, depende de distintos efectos termodinámicos del solvente, desde estructuración al solvente hasta cambios en la densidad de carga de la superficie de la proteína o inclusive por exclusión de volumen.

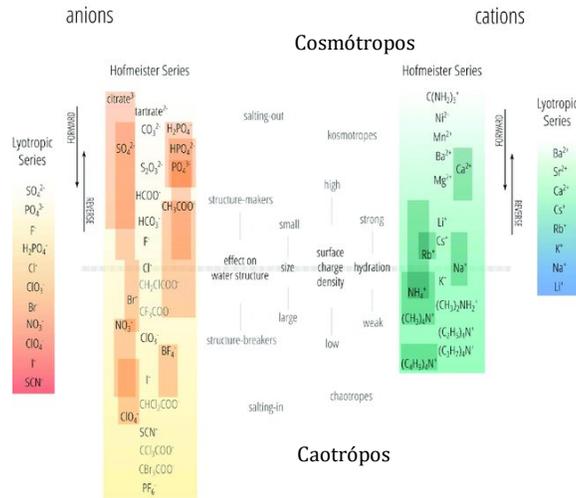


Figura 22. Serie de Hofmeister y Liotrópica.

Serie de Hofmeister. Efecto de precipitación de aniones y cationes, Puede observarse que la forma de enlistar en caotrópico y cosmotrópico depende de distintos efectos moleculares. **Fuente de la Figura:** Referencia [62].

En el caso de los líquidos iónicos, puede entenderse desde la perspectiva de interacción con las proteínas que se observa en la **Figura 23**. En la figura se esquematizan diferentes tipos de superficie expuesta al solvente, el cual depende de los aminoácidos expuestos, el pH y el punto isoeléctrico. De esta manera, cuando se trata de superficie no polar (aminoácidos con cadena lateral consistente en cadenas alifáticas o aromáticas), las secciones hidrofóbicas de los líquidos iónicos (normalmente es favorecido si es catión) suelen orientarse a esta superficie, ocasionando desplegamiento de la proteína.

En el caso de interacciones electrostáticas en general, la intensidad y temporalidad de las interacciones dependen del tipo de carga (momentánea o permanente), pero su naturaleza es similar. Si existe una interacción directa de las cargas del líquido iónico con la proteína, esta interacción ocasionará desplegamiento debido al cambio en la estructura de proteína, mientras que el uso de aniones cosmotrópicos y cationes caotrópicos en proporciones que propicien la exclusión de estos últimos de la primera esfera de solvatación propiciando efecto de Hofmeister. La estructura de los líquidos iónicos pueden utilizarse con fines de diseño (la sustitución por cadenas alifáticas en las posiciones 1 y 3 del catión imidazolio son ideales) para producir cristalización de distintas proteínas[63].

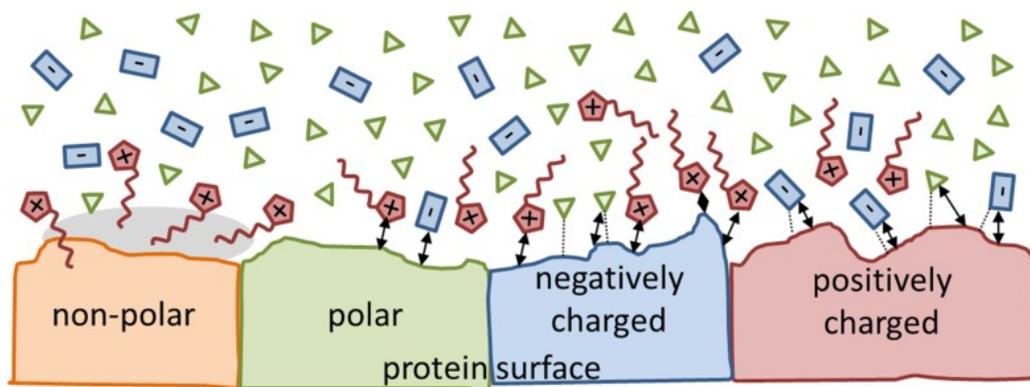


Figura 23.Tipos de Interacción de Líquidos Iónicos con las Proteínas.

Fuente de la Figura: Referencia [64].

4.3 Efectos de los Líquidos Iónicos en el Hábito y Polimorfismo Cristalino de los Cristales de Proteína

Las interacciones de los líquidos iónicos cuando se utilizan como aditivos de cristalización son muy específicas de estas moléculas. A bajas concentraciones tienen un efecto de precipitación, normalmente debido al efecto cosmotrópico de los aniones[65]. Sin embargo, a fuerzas iónicas altas producidas por ejemplo por sales inorgánicas, la sección hidrofóbica de los IL funciona como estabilizante de las secciones hidrofóbicas de las proteínas, aumentando su solubilidad .

Este comportamiento ha sido utilizado para modificar las condiciones de cristalización de distintas proteínas. Como en los ensayos de actividad y estabilidad, la lisozima ha sido utilizada para modelar el efecto de los líquidos iónicos en la cristalogénesis. El uso de aniones cosmotrópicos a baja fuerza iónica, que puede ser, por ejemplo, cuando se utiliza IL como agente precipitante, apantallan las cargas positivas de la lisozima, promoviendo la formación de los cristales. Sin embargo, cuando se utilizan como aditivos, aumentan la solubilidad de la proteína, ocasionando una baja sobresaturación y un crecimiento de tipo de punta de flecha[66].

También se ha evaluado la nucleación de la lisozima en presencia de iones imidazolio, identificando que se produce de manera lineal[67] y una disminución en la energía interfacial, disminuyendo el tiempo de inicio de dicha nucleación[68]. Se ha observado que el uso de líquidos iónicos imidazólicos como aditivos modifica el hábito cristalino de la lisozima[69], convirtiéndolo en esferulitos o con patrones dendríticos, al utilizar octanoato

carboxilato[70], cambiando inclusive la Red de Bravais[71] y produciendo menor polimorfismo y precipitación al tiempo que aumenta la velocidad de crecimiento del cristal[72]. En este tono, existen varios casos en los cuales se ha mejorado la calidad de los cristales mediante el uso de líquidos iónicos como aditivos, como es para la Nitrato Reductasa[73] y la xilanasasa[69, 74].

El uso de materiales compuestos (*composites*) es una alternativa que combina el uso de soportes funcionales que permiten crear un marco y fijar los líquidos iónicos, como es el caso del uso de una membrana de hidrogel y 1-butil-3-metilimidazolio que modifica el grupo espacial de cristalización para la Glucosa Isomerasa de *Streptomyces rubiginosus* en condiciones similares de cristalización, de un grupo I222 en los controles a $P2_12_12$ en el experimento[75]. También se ha reportado el uso de partículas de sulfato de bario modificado con cationes imidazolio modificados con cadenas alifáticas de diferente longitud, que disminuyen el tiempo de nucleación, aumentan la velocidad de crecimiento de los cristales y mejoran la morfología de estos para Rnasa A, Lisozima, Proteinasa K, Mioglobina y Hemoglobina. En este caso, el sulfato de bario sirve de núcleo heterogéneo, mientras el líquido iónico funciona como surfactante entre la partícula y la proteína[76].

4.4 Características Estructurales y de Solubilidad de las Proteínas en Estudio: Lisozima, Glucosa Isomerasa y Lipasas

4.4.1 Lisozima de la Clara de Huevo de Gallina

La Lisozima de Clara de Huevo de Gallina (HEW - Lysozyme, *Hen Egg - White Lysozyme*) es una enzima antimicrobiana y forma parte del sistema inmune innato. Formada por una única cadena de 129 aminoácidos y con una masa molar de 14.3 kDa[77], cataliza la hidrólisis de los enlaces beta 1 - 4, entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglucano bacteriano y entre los residuos de N -acetil-D-quitodextrinas, siendo por tanto activa en contra de bacterias Gram - positivas y hongos. Su punto isoeléctrico es 11.35, reteniendo actividad en pH entre 6 y 9[78].

Debido a su tamaño, estabilidad y asequibilidad, es utilizada comúnmente en investigaciones estructurales y cristalográficas. Se han obtenido cristales adecuados para resolución

estructural en el grupo espacial tetragonal $P4_32_12$, o los sistemas triclínico, monoclínico, ortorrómbico y hexagonal[79].

4.4.2 Glucosa Isomerasa de *Streptomyces rubiginosus*

La glucosa isomerasa de *Streptomyces rubiginosus* forma parte de una familia de Xilosa Isomerasas que han sido observadas ampliamente en una gran cantidad de bacterias. Es una isomerasa, específicamente, una oxidorreductasa que convierte la glucosa en fructosa, siendo un tetrámero de 176 kDa[80].

4.4.3 Lipasas

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga, siendo termoestables y tolerantes a los solventes orgánicos. En general, se trata de enzimas de entre 20 y 60 kDa con un residuo de Ser activo en el sitio activo Ser – His - Asp, pertenecientes a la familia de las α/β hidrolasas, con una lámina β central[81].

La estructura tridimensional de las lipasas A y B de *Candida antarctica*[82, 83], así como 1 y 2 de *Candida rugosa*[84, 85] han sido elucidadas a diferentes resoluciones.

Se conoce que la lipasa 1 de *Candida rugosa*(CRL) sufre un cambio conformacional cuando se encuentra en contacto con una micela, consistente en el movimiento completo de una hélice alfa como se observa en la **Figura 24**. Dado que la función natural de la proteína es realizar una hidrólisis de triacilgliceroles, esta transición es lógica.

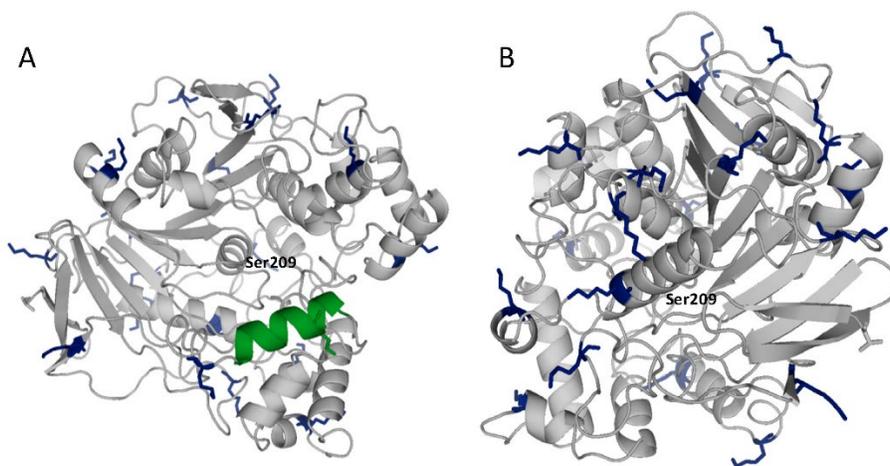


Figura 24. Configuraciones de *Candida rugosa*. Conformación abierta en naranja y cerrada en azul. **Fuente de la Figura:** Referencia [86].

5 Planteamiento del Problema de Estudio

Durante el desarrollo de la presente tesis, se realizó un estudio de la influencia de los líquidos iónicos en la formación de monocristales de proteína.

5.1 Justificación

Se conoce bien que la estructura tridimensional de una proteína está determinada por su plegamiento en el medio en que se encuentra disuelta. En términos clásicos del estudio de este plegamiento, la estructura funcional natural suele ser alcanzada rápidamente a través de una ruta hacia un pozo de potencial de la energía de Gibbs de la proteína plegada en el medio en el que se encuentra. Debido a esto, las vías de plegamiento son pocas, y las estructuras en equilibrio muy reducidas, tratándose de sistemas acuosos[12].

La fuerza motriz del plegamiento, según lo comúnmente aceptado, es que los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en el interior del núcleo de la proteína, formando lo que se conoce como núcleo hidrofóbico, de manera que se maximicen las interacciones de tipo hidrofóbicas y de Van der Waals, y exista poca o nula interacción con el agua[3]. Sin embargo, la importancia de la estabilización por puentes de hidrógeno intramoleculares, y sobre todo, la presencia de plegamientos específicos independientes en presencia de osmolitos orgánicos parece indicar que la estabilidad y la estructura de las proteínas, sobre todo en solventes no acuosos, están determinadas por una diferencia marginal en el conjunto de interacciones[5].

Diversos autores [69, 73, 87] han reportado el uso de líquidos iónicos en experimentos de cristalización, utilizándose como aditivos[88], y demostrando que su uso puede mejorar los patrones de difracción, aumentando el tamaño y calidad de los cristales obtenidos[66].

La versatilidad de los líquidos iónicos, en conjunto con la importancia de las interacciones específicas que se encuentran en las proteínas hacen necesario expandir el conocimiento de la forma en que estos solventes orgánicos afectan la estructura y la formación de monocristales aptos para difracción de rayos X. Esta información va más allá de la obtención de un modelo cristalográfico solamente, dado que al conocer profundamente las interacciones específicas y generales que el líquido iónico confiere a la mezcla, es posible modificar de manera controlada la solubilidad de la proteína en solución, cambiando el

diagrama de solubilidad de manera diseñada, además de controlar la velocidad y el transporte de la proteína al formar el núcleo cristalino o durante el crecimiento cristalino.

5.2 Objetivos

5.2.1 Generales

- I. Racionalizar el efecto que el uso de líquidos iónicos tiene en la formación de monocristales de proteína.

5.2.2 Específicos

- I. Identificar los líquidos iónicos que tienen efectos en la formación de cristales de proteínas modelo de estudio.
- II. Obtener un modelo cristalográfico de las proteínas cuyos cristales se ven afectados por la presencia de líquidos iónicos.
- III. Evaluar las interacciones intermoleculares de los líquidos iónicos y las proteínas en estudio.

5.3 Hipótesis

- I. La presencia de líquidos iónicos en la solución precipitante modificará el hábito cristalino o el polimorfo cristalino de los cristales de proteína.

6 Materiales y Métodos

Aunque se conoce que los líquidos iónicos poseen efectos directos en la morfología y calidad de los monocristales de proteína, no se ha determinado de manera específica a que se deben estos efectos, aún más, no se ha logrado identificar si es posible evaluar de manera general la forma en que estos líquidos pueden interactuar y dirigir molecularmente los procesos de nucleación y crecimiento cristalino. Dado lo anterior, una estrategia adecuada para aclarar este mecanismo es la siguiente:

- i. Realizar pruebas de cristalización de proteínas modelo puras en presencia de un conjunto de líquidos iónicos, buscando cambios morfológicos evidentes.
- ii. Identificar si el cambio es simplemente morfológico, o también existe diferencia en la red cristalina o en el grupo espacial.
- iii. Generar el modelo molecular cristalográfico de las estructuras obtenidas de manera que pueda evidenciarse la presencia o ausencia de los líquidos iónicos en el cristal.
- iv. Comparar el comportamiento de agregación de las proteínas en presencia y ausencia del líquido iónico.
- v. Identificar interacciones específicas entre la proteína y el líquido iónico en la solución de cristalización.

Se utilizaron las siguientes proteínas:

1. **Lisozima** Se utilizó Lisozima de Clara de Huevo de Gallina, grado cristalización, proveniente del kit de lisozima de Hampton Research (HR7-102). La misma fue disuelta en 500 μL de solución amortiguadora 200 μmolar de Acetato de Sodio, pH 4.50, de manera que se obtuviera una concentración de 30 mg/mL, según test de Lowry.
2. **Glucosa Isomerasa** La Glucosa Isomerasa, de *Streptomyces rubiginosus* fue obtenida de Hampton Research. Posteriormente fue dializada a una solución 10 μM de HEPES pH 7.00 y 1 μM de MgCl_2 en membrana de celulosa reconstituida con un corte de 10 kDa. Esta proteína se encuentra a una concentración de 25 mg/mL.

3. **Lipasa B de *Candida antarctica*** La lipasa de *Candida antarctica* obtenida por sobreexpresión mediante fermentación en *Aspergillus oryzae* fue obtenida de Sigma-Aldrich, con una actividad ≥ 1.0 U/mg. Una solución de concentración de 20 mg/mL fue preparada al disolver el sólido en Buffer de 50 mM de fosfatos a pH 7.00.
4. **Lipasa de *Candida rugosa* y Lipasa (mezcla compleja) de *Candida antarctica*** La Lipasa de *Candida rugosa*, tipo VII, ≥ 700 U/mg sólido fue comprada a Sigma-Aldrich. Se suspendieron 0.5g de la proteína comercial en 10 mL de amortiguador de fosfatos a pH 7.00 a 4 °C. Se mantuvo con agitación mecánica durante 30 minutos, y posteriormente se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos en un equipo Biofuge Primo R, Thermo Scientific, con un rotor Heraus modelo 7593 (máximo 17000 rpm). El material del sobrenadante posee la proteína solubilizada.

Con base en la estrategia indicada, la metodología que se utilizó puede dividirse en las siguientes etapas: Caracterización de las proteínas a cristalizar, ensayos de cristalización utilizando técnicas convencionales y no convencionales, evaluación de agregación de las proteínas, evaluación de interacción y elaboración de modelos moleculares. A continuación, se detallarán cada una de estas etapas.

6.1 Caracterización

Para realizar ensayos de cristalización y cristalogénesis de proteínas es necesario que esta se encuentre lo más pura y homogénea posible, puesto que la formación de la fase sólida suele ser gobernada por una diferencia marginal en la fuerza motriz, en la que los contactos cristalográficos, y por tanto, las conformaciones de la proteína, así como la presencia de otras sustancias, pueden evitar la formación del cristal.

Así que, al iniciar estos experimentos, la primera parte siempre consistirá en obtener información acerca del contenido de las preparaciones con proteína a cristalizar. De esta manera se puede saber si se encuentran otras proteínas o péptidos que puedan interferir. En el caso de esta tesis, se utilizó Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida (SDS - PAGE).

Por otro lado, también es necesario conocer las concentraciones de las proteínas obtenidas,

tanto para conocer el rendimiento de la purificación, como para estandarizar las pruebas de cristalización a la misma concentración. En esta investigación se utilizaron las técnicas de absorbancia a 280 nm, como tamizaje entre las diferentes etapas, y el método de Lowry, para encontrar una concentración reproducible, antes de hacer los ensayos de cristalización.

6.1.1 Electroforesis Desnaturalizante

La electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida es una técnica de amplio uso en los experimentos bioquímicos de proteínas. Publicado en 1970[89], consiste en el uso de una matriz de acrilamida, para formar un gel químico de diferente entrecruzamiento, para formar así poros de distinto tamaño, en donde posteriormente es cargada una cantidad de proteína previamente desnaturalizada con un surfactante y un agente reductor. Este surfactante es normalmente dodecil sulfato de sodio.

La interacción con proteínas que poseen una cantidad baja o moderada de superficie hidrofóbica naturalmente expuesta se debe primeramente a una interacción electrostática, entre los residuos cargados positivamente de la proteína y la carga negativa del surfactante. Posteriormente, el núcleo hidrofóbico de la proteína es expuesto a la solución amortiguadora, debido a la interacción de las secciones hidrofóbicas de las proteínas y el surfactante. El agente reductor permite, a su vez, la reducción de los puentes disulfuro que posea la proteína.

De esta manera, se obtiene la proteína en su estado monomérico, y con los aminoácidos completamente expuestos al solvente, de manera que al aplicar un campo eléctrico el comportamiento electroforético se deba solamente al tamaño de la proteína, que migra diferencialmente dependiendo a su retención dependiente del poro del gel. Lo último se aprovecha, dividiendo el gel en dos secciones, también con entrecruzamiento distinto.

De esta manera, en la parte superior se encuentra el gel concentrador, en el cual todas las proteínas migran juntas, por lo que, al llegar al segundo gel, el separador, inician desde la misma sección del gel. Esta última sección permite separar las proteínas en función de su masa.

Los experimentos de SDS - PAGE se realizaron en un equipo de electroforesis vertical Mini -

Protean Tetra Handcast System (Biorad). Los geles se prepararon con una mezcla 40% de acrilamida - bis acrilamida, iniciada por tetrametiletilendiamina (TMEDA) y catalizada por Persulfato de Amonio. Se utilizó dodecilsulfato de sodio como surfactante desnaturalizante. Para la corrida de la electroforesis se utilizaron placas de cristal de 0.75mm x 10cm x 7cm. Antes de cargar las muestras en el gel, se incubaron a 90°C durante 8 minutos, en presencia de un amortiguador que contiene azul de coomassie para teñir las bandas, y 2 - mercaptoetanol como agente reductor. Se utilizó un voltaje de 90 V en la corrida del gel concentrador, y de 120 V en el gel separador, con una corriente de alrededor de 25 mA, durante aproximadamente 2 horas y 40 minutos (hasta que el frente de la electroforesis llegara al borde de la placa, a temperatura ambiente).

Para revelar las bandas en el gel se procedió a fijar las proteínas con una solución de agua: metanol: ácido acético glacial (50:40:10) durante 30 minutos, luego de posteriores lavados con agua miliQ, se realizó una tinción con solución de Azul de Coomassie R - 250 marca Sigma - Aldrich (también con S - 250) al 0.5% en ácido acético: metanol: agua (10:30:60) durante 20 minutos. La decoloración se llevó a cabo con la misma mezcla utilizada como fijador, hasta que las bandas fueran reveladas de manera adecuada. Posteriormente se lavó repetidamente con agua miliQ, y se dejó secar en papel celofán.

6.1.2 Cuantificación

Las proteínas exhiben absorción en la región ultravioleta, cercana a 280 nm, debido principalmente a la absorción de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano. Esto se aprovecha para cuantificar proteínas, suponiendo que la absortividad molar es similar para todas. Debido a que en realidad la absortividad varía dependiendo del tamaño y la cantidad de aminoácidos aromáticos, la incertidumbre de esta técnica es grande, y se usa solamente de manera semicuantitativa. [90].

Por otro lado, en el ensayo de Lowry se utiliza el desarrollo de color azul, cuyo mecanismo de formación, aunque no totalmente entendido sucede mediante la formación primaria de un enlace de la amida de los enlaces peptídicos con cobre en estado de oxidación I en pH alcalino, y formas secundarias de este último con tirosina, triptófano, y en menor cantidad con residuos de cisteína e histidina[90]. Posteriormente este complejo es potenciado por la reducción del reactivo Folin - Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungstato) marca Sigma -

Aldrich.

Para los casos en los que se buscaba solamente cuantificar de manera inicial, al preparar soluciones de las proteínas comerciales se utilizó primeramente un espectrofotómetro NanoDrop Lite, usando un volumen de 2 μL (sin cubeta). En este equipo, se colocan estos micro - volúmenes directamente sobre la fibra óptica receptora, y se atrapa una gota, mantenida por tensión superficial, con una fuente consistente en un diodo emisor de luz. La lectura se realizó a 280 nm, utilizando una absorptividad molar de 0.1 UA/(mg/mL proteína). También se realizaron cuantificaciones, leyendo absorbancia a 280 nm, de las distintas muestras purificadas en diversas condiciones. En estos casos se utilizó un equipo de la Marca Thermo Scientific, Modelo BioMate 5, considerando que la absorptividad molar es igual a la del Nanodrop, se utilizó una celda de cuarzo con una capacidad de 350 μL . Luego de medir las absorbancias, se hizo el cálculo de la concentración utilizando la siguiente fórmula: Absorbancia (A)= camino óptico (b) * absorptividad molar (ϵ) * concentración (c), considerando que la absorptividad molar es igual a 1 y el camino óptico es igual a 1 cm $\frac{A}{b*\epsilon} = c$.

Finalmente, para cuantificar las proteínas que se utilizarían en los experimentos de cristalización, resonancia magnética nuclear y Dispersión de Luz Dinámica se cuantificó mediante la técnica de Lowry, con modificación de Patterson.

La curva de calibración para el método de Lowry se realizó mediante diluciones de la solución estándar de Albúmina Sérica Bovina del kit de cuantificación (la cual se reconstituyó agregando 5 mL de agua miliQ al sólido certificado del kit). Los estándares se prepararon según se indica en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Soluciones de Preparación para Cuantificación por Método de Lowry

No. Estándar	Solución estándar BSA / μL	Agua miliQ / μL	Concentración del Estándar / $\mu\text{g/mL}$
0	0	250	0
1	31.25	218.75	50
2	62.50	187.50	100
3	125.00	125.00	200
4	187.50	62.50	300

Posterior a la dilución del estándar se agregaron sucesivamente 250 μL de reactivo de Lowry del kit de cuantificación de manera que la medición en el espectrómetro Biomate 5 permitiera el desarrollo del color del complejo durante 40 minutos exactos.

La absorbancia fue medida a 618 nm, utilizando una celda de cuarzo de 300 μL de capacidad, realizando lavados con agua miliQ y etanol entre cada ensayo. Posteriormente se realizó una regresión lineal utilizando la técnica de mínimos cuadrados para el ajuste.

Para realizar la cuantificación de las proteínas de ensayo se realizó una dilución de la proteína de trabajo, de manera que la absorbancia se encontrara entre la que se obtuvo para los estándares, y se realizó una interpolación de la concentración mediante la recta de calibrado, suponiendo la misma absorptividad molar para todas las proteínas (esta práctica es utilizada de manera rutinaria en la cuantificación de proteínas, siendo válida en proteínas bien caracterizadas como las usadas en esta investigación).

6.2 Purificación

En caso de que las proteínas no se encuentren aisladas, es necesario realizar técnicas que permitan separar la proteína de interés, de otras que se encuentren en la solución. Existen varias técnicas de purificación, sin embargo, la más versátil, y utilizada en esta investigación es la cromatografía.

La cromatografía es una técnica consistente en la separación diferencial de las especies químicas de una mezcla en su recorrido a través de una fase estacionaria. La separación se debe a que la interacción de esta fase estacionaria con los distintos analitos es específica, por lo que al migrar entre la fase estacionaria y una fase móvil las diferentes especies tienen un retraso distintivo (en los casos utilizados en esta tesis, todas las fases móviles usadas fueron líquidas, dado que se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Resolución, HPLC, o Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas, FPLC)[91].

Para todos los ensayos se utilizaron solventes grado HPLC o agua miliQ, según el caso. En caso de necesitar la preparación de una fase con aditivos (como sales o ácidos) se utilizaron compuestos grado reactivo o mejores. Para ajustar el pH, en caso de ser necesario, se utilizó un potenciómetro marca Thermo Scientific, con capacidad de lectura de dos decimales. Se agregó un ácido o una base con el contraión de la sal de las soluciones amortiguadoras que

se usaron en la preparación de las fases móviles. Todas las soluciones fueron posteriormente filtradas en un equipo de filtración Millipore, utilizando filtros de celulosa reconstituida, de poro de 0.22 μm . Todas las muestras, antes de ser inyectadas, fueron filtradas a poro 0.22 μm , en filtro de jeringa. A menos que se indique otra cosa, las cromatografías se realizaron a una temperatura controlada de 25° C.

6.2.1 Cromatografía de Exclusión Molecular

La cromatografía de exclusión molecular (SEC, *Size - exclusion chromatography*) es una técnica cromatográfica basada únicamente en una separación física, en el que, en el caso ideal, no hay retención alguna de la especie química por parte de la fase estacionaria. De hecho, la migración diferencial es debida a la capacidad de ciertas especies de tener acceso a la totalidad, una parcialidad específica o ninguna parte de la red de poros que forma la fase estacionaria. Proteínas muy pequeñas pueden alcanzar la totalidad de los poros, mientras que, si son muy grandes, no ingresan en la red interna (solo en el espacio entre partículas de la fase estacionaria) y viajan en la columna a alta velocidad.

Los ensayos de cromatografía de exclusión molecular se realizaron en un equipo de HPLC marca Shimadzu, con bomba cuaternaria. Como fase estacionaria se utilizó una columna Shodex - 802.5, con tamaño de partícula de 5 μm , de longitud 8.0 x 300 mm, y un límite de exclusión de 150 kDa. La fase estacionaria se varió en función del ensayo y de la proteína, sin embargo, en general se trató de soluciones amortiguadoras de Tris entre pH 7.00 y 8.00 (preparado según instructivo de Sigma - Aldrich, utilizando sales de Trizma - HCl y Trizma - Base) y ajustado con HCl o NaOH 1 M.

6.2.2 Cromatografía de Fase Reversa

En la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es un compuesto orgánico total o parcialmente hidrofóbico, que se encuentra unido de manera química a un soporte que suele ser sílica - gel. Dado que la fase móvil debe competir con la estacionaria por la especie química con base en su adsorción hidrofóbica, la fase móvil suele iniciarse con agua, y posteriormente, se utiliza un compuesto orgánico miscible con el agua[92].

La hidrofobicidad de la fase estacionaria en una cromatografía de fase reversa suele describirse en función de la cadena que está ligada al soporte. De esta manera puede

utilizarse una columna con una cadena alifática de 18 carbonos, cuando se requiere una adsorción hidrofóbica muy fuerte, una de 8 o 12, si se desea una intermedia, o una de 4 en caso de que se busque interacciones moderadas a leves. Pueden, utilizarse también compuestos aromáticos distintos, en función de otras interacciones.

Este tipo de cromatografía es muy utilizada en la separación y cuantificación analítica de moléculas pequeñas, y aunque es capaz de separar proteínas que difieren entre sí por uno o dos residuos, o inclusive donde solamente existen isómeros conformacionales de péptidos, no se utiliza ampliamente. Esto es debido a que la recuperación es pobre, dado que la interacción de las fases lleva a cambios conformacionales del estado nativo de la proteína, e inclusive, a desnaturalización, debido a la interacción del núcleo hidrofóbico de la proteína con las fases de la cromatografía. La resistencia a dichos cambios dependerá de la estabilidad del núcleo hidrofóbico y es propia de cada proteína, finalmente es necesario mencionar que suele utilizarse un compuesto que aumente la fuerza iónica del sistema, con la intención de suprimir las interacciones no específicas de los solventes de cromatografía de fase reversa[32].

Las cromatografías se realizaron en un equipo de HPLC marca Shimadzu, con sistema de bomba cuaternaria. En todos los ensayos se realizaron las cromatografías con un gradiente de polaridad, en el cual se partió de acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA, *Trifluoroacetic acid*) a agua con 0.1% del mismo ácido. Los ensayos iniciales se realizaron siempre con un gradiente lineal, a un flujo de 0.7 ml/min , durante 60 minutos. Se realizaron también ensayos para todas las fases estacionarias con un gradiente escalonado, correspondiente a escalones a 0, 50 y 100% de agua con TFA.

Los gradientes de polaridad se prepararon a partir de la bomba cuaternaria del equipo, agregando 1 mL de ácido trifluoroacético concentrado Sigma – Aldrich y llevando a volumen con una solución de agua miliQ para la fase acuosa, y agregando 1 mL del mismo ácido trifluoroacético y llevando a volumen con acetonitrilo grado HPLC marca Sigma – Aldrich. Ambas soluciones se filtraron en poro de $0.22 \mu\text{m}$ y se desgasificaron en un equipo de sonicación durante 20 minutos.

Como fases estacionarias se probaron de polaridad alta, intermedia y baja. Para la polaridad alta se utilizó una columna Restek Ultra octadecilsilano (C18), de partícula esférica con

tamaño de 3 μm , longitud de 30 mm y poro de 100 Å, para polaridad intermedia se utilizó una columna de octilsilano (C8) marca Thermo Scientific modelo Hypersil GOLD C8, con tamaño de 3 μm y longitud de 50mm, para polaridad baja se utilizó una columna de butilsilano (C4), de tamaño de partícula de 5 μm , 300 Å de tamaño de poro, y dimensiones de 250 mm.

6.2.3 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

La técnica de Interacción Hidrofóbica es una técnica general de uso en las proteínas. La fase estacionaria es similar a la fase reversa, con un compuesto orgánico ligado a un soporte polimérico, solamente que suele poseer un espaciador entre el soporte y el ligando orgánico. Sin embargo, la fase móvil no es una mezcla de disolventes orgánicos, sino que se utiliza una sal inorgánica en un medio acuoso, haciendo que la proteína se comporte de manera similar a como lo haría en un experimento de precipitación ordenada[92].

Para entender el mecanismo de separación, se debe aclarar la diferencia entre la agregación amorfa y la precipitación. En el primer caso, existe una desnaturalización y exposición de aminoácidos que no se encuentran naturalmente en la superficie de la proteína o que no interactúan naturalmente. Debido a esto, la interacción anormal entre zonas hidrofóbicas ocasiona una aglomeración de una gran cantidad de proteínas, ocasionando un proceso que comúnmente es irreversible.

Por otro lado, en la precipitación ordenada, la estructura tridimensional de la proteína es conservada, y la sal utilizada en el experimento tiene la única función de interactuar con el disolvente (en este caso el amortiguador acuoso) de manera que termodinámicamente se favorezca la disolución de la sal inorgánica en agua, y la asociación de las unidades de proteína.

La cromatografía de interacción hidrofóbica aprovecha esta característica, usando una concentración alta de sal, de manera que las secciones hidrofóbicas de las proteínas en su estructura nativa se asocian a la fase estacionaria. Luego se va retirando la cantidad de sal, para desplazar el equilibrio a la disociación de la fase estacionaria con la proteína, a esta misma en solución. Dado que cada proteína tiene características hidrofóbicas específicas en su superficie, la separación debida a la migración diferencial puede hacerse en función de la concentración de sal[93].

Para realizar las cromatografías de interacción hidrofóbica se utilizó un equipo de FPLC Äkta pure de bomba binaria. Como fase estacionaria se utilizó una columna de marca GE Healthcare, tipo HiTrap Butyl HP. Primeramente, se utilizó un gradiente lineal iniciando con una solución amortiguadora de acetatos 50 mM a pH 6.00, y una concentración de sulfato de amonio 2 M, y cambiando a una solución amortiguadora similar, pero sin sulfato de amonio.

6.2.4 Cromatografía de Intercambio Iónico: Intercambio Catiónico

Las técnicas de cromatografía de intercambio catiónico están basadas en el hecho de que los aminoácidos que forman las proteínas son anfóteros, presentando la posibilidad de estar cargados negativa o positivamente. El equilibrio ácido - base de todos los aminoácidos de las proteínas que se desean separar dependen del pH del medio (el cual puede controlarse fácilmente por la solución amortiguadora)[92].

La fase estacionaria es una matriz orgánica inerte ionizable, químicamente ligada a un soporte, normalmente asociada a un contraión desplazable. Estos contraiones se encuentran en equilibrio químico entre la fase móvil y la fase estacionaria. Dependiendo del punto isoeléctrico de la proteína, el amortiguador se elige de manera que la carga neta de la misma sea opuesta a la fase estacionaria al mismo pH, de manera que exista una interacción electrostática directa. La separación de las especies, en principio depende de la carga neta al pH del experimento, y entre proteínas que tengan la carga adecuada para interactuar con la fase estacionaria, de la magnitud de esta, en primer lugar, y posteriormente, la accesibilidad de los grupos cargados en la misma proteína[94].

Se ha publicado que para la purificación de la lipasa B de *Candida antarctica*, se pueden obtener buenos rendimientos y una purificación casi completa en un solo paso, utilizando una técnica de intercambio catiónico. Para esto, se lleva a la proteína comercial a un pH de 3.00 con una solución amortiguadora de citratos en la cual la proteína se encuentra fuertemente ionizada positivamente, pero no pierde la integridad estructural, se eluyen las impurezas, y posteriormente se cambia el pH a 5.50 para eluirse únicamente la lipasa B.

Se preparó para cada corrida una solución de solución amortiguadora de pH 3 para lavado y una de pH 5.5 para elución, ambos 10 mM de formato de sodio, citrato de sodio y acetato de sodio. Esto se hizo pesando 0.3401 g de formato de sodio, 1.2903 g de citrato de sodio y

0.4101 g de acetato de sodio, para llevarlo a 500 mL, previamente ajustado al pH utilizando ácido acético para la solución pH 3 e hidróxido de sodio para la solución de 5.5.

En este caso, se utilizó el HPLC marca Shimadzu de bomba cuaternaria, y una columna de sulfopropilo (propilsulfato) como intercambiador catiónico, marca Supelco, modelo TSK SP - 5PW, a un flujo de 1.0 *ml/min* tamaño de partícula de 10 μm , tamaño de poro 1000 μm , límite de exclusión de 1000 kDa.

6.3 Cristalización

En la sección de planteamiento del problema (sección 4.2), el principal objetivo de esta investigación recae en el comportamiento de la cristalización de un grupo de proteínas. La fuerza motriz del proceso de cristalización es la diferencia de potencial químico entre la solución sobresaturada y su solubilidad. Esta diferencia depende, en primera instancia de la concentración de proteína y luego de otros parámetros, como son el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Como se mencionó en la sección 2.3 en un diagrama de solubilidad adecuado, se debe alcanzar la región de nucleación, para pasar rápidamente a la de sobresaturación metaestable. Las técnicas descritas a continuación logran esto de formas específicas[95].

6.3.1 Técnicas de Difusión en Fase Vapor

En las técnicas de Difusión en fase vapor, se tiene un sistema cerrado, en el cual la solución con proteína y agente precipitante se le permite llegar al equilibrio con un reservorio acuoso cuya concentración de agente precipitante es óptima para producir cristales[30].

6.3.1.1 Gota Sedente

En esta disposición del experimento de difusión de vapor, una cantidad pequeña de solución de proteína aislada es mezclada con una cantidad igual de la solución del reservorio, llevando la concentración de proteína cerca de la mitad de la requerida para la cristalización. Esta solución se encuentra en un recipiente que se encuentra en un diseño tal que pueda ser cerrado al intercambio material con el exterior, pero mantenerse en contacto con la solución de reservorio, ambos en pozos verticales propios[30].

Todos los ensayos de cristalización se realizaron en una placa de 96 pozos de gota sedente,

marca Swiss, modelo MRC 2 - well UVP a temperatura controlada de 18 °C con la siguiente disposición con las soluciones previamente filtradas a poro de 0.22 μm :

1. Solución de reservorio: 40 μL de solución de agente precipitante para la proteína respectiva.
2. Gota de cristalización: 2 μL correspondientes a
 - a. 1 μL de la proteína a ensayar
 - b. 1 μL de solución de agente precipitante con las concentraciones del reservorio mezclada con el líquido iónico correspondiente a una proporción final de 2.5% v/v de este último a partir de una solución de 50 %v/v (se realizó un ensayo por líquido iónico del kit de Hampton Research, como se indica en la **Tabla 3**).

Se sellaron los ensayos con cinta adhesiva Duck tape, evitando dejar secciones de intercambio entre la prueba de cristalización y el medio ambiente. Posteriormente se dejaron los ensayos durante 5 semanas.

Puesto que en las condiciones del ensayo la presión de vapor de cualquiera de los líquidos iónicos utilizados es despreciable, puede considerarse que dicha concentración fue constante durante la prueba. Los experimentos de control se realizaron exactamente de la misma manera, pero sin agregar líquido iónico, y completando el volumen con agente precipitante.

Tabla 3. Información de los Líquidos Iónicos utilizados en Pruebas de Cristalización

Líquido Iónico	Clasificación Cación	Abreviatura
Bromuro de Tetraetilamonio	SA	TEA Br
Cloruro de Benciltrietilamonio	SA	BTEA Cl
Formato de 2 - hidroxietil amonio	SA	HEA CO ₂ H
Nitrato de Etilamonio	SA	EANO ₃
Acetato de Colina	SA	Col OAc
Dihidrogenofosfato de Colina	SA	Col DHF
Acetato de 1 - etil - 3 - metilimidazolio	CI	EMIM OAc
Cloruro de 1 - butil - 3 - metilimidazolio	CI	BMIM Cl
Cloruro de 1 - etil - 3 - metilimidazolio	CI	EMIM Cl
Cloruro de 1 - hexil - 3 - metilimidazolio	CI	HMIM Cl
Dicianamida de 1 - butil - 3 - metilimidazolio	CI	BMIM DNA

Dimetil Fosfato de 1,3 - dimetilimidazolio	CI	MMIM DMF
Metilsulfato de 1,3 dimetilimidazolio	CI	MMIM MSO4
Metilsulfato de 1 - butil - 3 - metilimidazolio	CI	BMIM MSO4
n - octilsulfato de 1 - n - butil - 3 - metilimidazolio	CI	BMIM OSO4
Tiocianato de 1 - etil - 3 - metilimidazolio	CI	EMIM SCN
Tetrafluoroborato de 1 - butil - 2,3 - dimetilimidazolio	CI	BMMIM TFB
Tetrafluoroborato de 1 - butil - 3 - metilimidazolio	CI	BMIM TFB
Trifluoracetato de 1 - butil - 3 - metilimidazolio	CI	BMIM TFA
Trifluorometanosulfonato de 1 - etil - 3 - metilimidazolio	CI	EMIM TFMS
Bromuro de Tetrabutilfosfonio	SF	TBF Br
Tosilato de tri isobutil metil fosfonio	SF	TIBMF Tos
Cloruro de 1 - butilpiridinio	CP	BP Cl

SA: Sal de Amonio, CI: Cati3n Imidazolio, SF: Sal de Fosfonio, CP: Cati3n Piridinio
Las soluciones amortiguadoras de las prote3nas y los agentes precipitantes que fueron utilizados son los siguientes:

Lisozima

El agente precipitante utilizado fue un amortiguador de acetatos 0.2 M con 40 mg/ml de cloruro de sodio pH 4.5. Se prepar3 un volumen de 100 ml del amortiguador, para esto se pes3 1.6413g de acetato de sodio y 4 gramos de cloruro de sodio, para hacer ajustes de pH se utiliz3 3cido ac3tico glacial.

Glucosa Isomerasa

Agente precipitante 1: Se tom3 0.1 ml de la soluci3n comercial de *Hampton Research* la cual conten3a 1 M de HEPES con 100 mM de cloruro de magnesio pH 7, luego esta se llev3 a un volumen de 10 ml, obten3ndose una concentraci3n final de HEPES 10 mM con 1 mM de cloruro de magnesio, por 3ltimo, se agreg3 1.5 M de sulfato de amonio. Para esto se pes3 1.5857 g de sulfato de amonio y se agregaron directamente en los 10 ml de la soluci3n preparada.

Agente precipitante 2: Se tom3 0.1 ml de la soluci3n comercial de *Hampton Research* la cual conten3a 1 M de HEPES con 100 mM de cloruro de magnesio pH 7, luego esta

se llevó a un volumen de 10 ml, obteniéndose una concentración final de HEPES 10 mM con 1 mM de cloruro de magnesio y 2 g de PEG 3350.

Xilanasa

El agente precipitante utilizado fue un amortiguador de tricina 100 mM con 1.2M de sulfato de amonio pH 9.0. Se preparó un volumen de 100 ml del amortiguador, para esto se pesó 1.7917g de tricina y 1.4989g de sulfato de amonio, para hacer ajustes de pH se utilizó hidróxido de sodio 1M.

Apotransferrina y Holotransferrina

El agente precipitante utilizado fue un amortiguador de citratos 0.2 M pH 7.0 al cual se le añadió Polietilenglicol (PEG) 3350 al 20%. Se preparó un volumen de 10 ml, para esto se pesó 3.8448g de ácido cítrico y 2 g de PEG 3350, para hacer ajustes de pH se utilizó hidróxido de sodio 1M.

6.4 Inspección Visual

Todas las pruebas de cristalización fueron evaluadas con un microscopio óptico, en búsqueda de diferencias morfológicas evidentes y la evidencia de la presencia de monocristales que pudieran ser adecuados para la difracción de rayos X. Se utilizó para la evaluación y documentación un estéreo microscopio marca Olympus con cámara Teledyne Lumenera Infinity y software Infinity Analyze (este software es capaz de almacenar las fotos del microscopio de manera digital).

Para evaluar los ensayos de cristalización se observaron a través de un microscopio óptico con cámara integrada. En todos los ensayos de cristalización se usó un aumento de 15X, observando directamente en los lentes oculares del microscopio, puesto que con este aumento se puede observar el ensayo de cristalización completo. En aquellos ensayos que se encontraron hábitos cristalinos múltiples o diferentes al control de cristalización, se enfocaron con un aumento entre 30X y 60X según si se trataba de un solo cristal o varios de ellos, y se ajustó el tornillo micrométrico para enfocar con la cámara, utilizando el software. Se añadió la escala, y se realizó la captura de la fotografía utilizando un formato TIFF, que permite conservar la resolución máxima de la cámara.

6.5 Estudios estructurales mediante Cristalografía de Rayos X

Luego de una evaluación visual en microscopio Olympus, se eligieron los cristales de morfología y tamaño más adecuado para la colección de un conjunto de datos de difracción de rayos X. Se utilizaron como agentes crio - protectores para la Lisozima Glicerol al 25% y para la glucosa isomerasa, el agente precipitante 2.

El conjunto de datos fue tomado en un equipo casero Rigaku / MSC Micromax - 007 HF, con una fuente de ánodo rotatorio de cobre y un detector DECTRIS - PILATUS 3R/200K - A, bajo condiciones criogénicas a 100 K (enfriado en flujo de nitrógeno). La distancia del cristal al detector fue de 40 mm y el ángulo 2θ fue optimizado para obtener la mayor resolución (dentro de la estrategia de la colecta de datos el equipo es posible variar el ángulo 2θ). La estrategia de colección incluyó datos de alta redundancia. La suite HKL 3000 fue utilizada para procesar, combinar y escalar el conjunto de datos.

Las fases iniciales del reemplazo molecular para la lisozima fueron tomadas del modelo 6Q88 del Protein Data Bank, fijando la resolución a 1.74 Å en PHASER - MR. Todos los ligandos, conformaciones alternas, y moléculas de agua en el modelo de reemplazo fueron removidas. En todos los casos se realizó un afinamiento inicial de cuerpo rígido. La inspección del mapa de densidad electrónica fue realizada en COOT, ajustando manualmente la densidad electrónica mediante asignación de confórmeros y moléculas de agua. Los modelos resultantes fueron refinados con PHENIX - REFINE. Todas las aplicaciones se encuentran integradas en la suite de Phenix.

6.6 Evaluación de Interacción

Debido a que esta investigación tiene como objetivo entender molecularmente la influencia que los líquidos iónicos tienen en la formación de los monocristales de varias proteínas, para lo cual se usaron varias técnicas que se detallan a continuación.

6.6.1 Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica ampliamente utilizada para obtener información estructural y de interacción, tanto para moléculas pequeñas como para proteínas[96].

Obtener información de los núcleos por medio de esta técnica es posible, recordando que, desde un punto de vista clásico, cualquier núcleo atómico con espín impar, posee un momento magnético al ser una carga en movimiento. El vector de momento magnético está orientado hacia “arriba” o hacia “abajo” del plano de giro, con una componente en dicho plano que presenta movimiento de precesión[96].

Aunque la conversión de un estado al otro es menor a la diferencia térmica, existe un ligero exceso de uno de los estados. Al aplicar un campo magnético externo e intenso se permite que la diferencia entre los estados aumente (por efecto Zeeman) y al proporcionar la energía adecuada (en la magnitud de la radiofrecuencia) para excitación del sistema, esta es absorbida en una longitud de onda que depende de las propiedades químicas del átomo (por lo que es sensible a grupos funcionales y a interacciones con otros átomos). El uso de RMN en caracterización de proteínas es diverso. Existen distintas técnicas que pueden usarse para obtener o caracterizar la estructura, movilidad y tamaño de las proteínas, así como la interacción con ligandos. A continuación, se presentan las técnicas que se utilizaron en esta investigación.

6.6.1.1 Características del Espectro RMN de hidrógeno de una Proteína

En la resolución de la estructura tridimensional de una proteína suelen utilizarse técnicas de orientación relativa de los átomos en una molécula, como NOESY. Esto significa que se realizan espectros de ^{15}N y ^1H , usando inclusive ^{13}C [97]. A similitud de otras técnicas espectroscópicas, pueden buscarse señales específicas que se repiten o realizar deconvoluciones para encontrar alguna respuesta que se desee encontrar, en una especie de huella digital, donde suele hacerse para el espectro de ^1H [98].

6.6.1.2 Transferencia de Saturación

Cuando se desea observar la interacción de una molécula específica, como un ligando, o en este caso, el líquido iónico con la proteína en estudio, pueden utilizarse distintas técnicas. En el caso que se estudia en este documento, se utilizó una técnica denominada Diferencia de Saturación Transferida (STD, *Saturation Transfer Difference*).

Esta es una técnica basada en ligando, en la cual la información básicamente proviene del espectro RMN del ligando. Esto facilita la interpretación del espectro, y es más económico,

puesto que no requiere del enriquecimiento de la proteína con isótopos con espín diferente a cero[99].

La base de esta técnica está en la transferencia de la magnetización entre los átomos de hidrógeno de la proteína y de la molécula pequeña, permitiendo detectar las regiones del ligando en contacto directo con la proteína[99].

Un espectro estándar consiste en un experimento de resonancia en encendido, y un segundo experimento, denominado apagado. En el primer experimento, exclusivamente las frecuencias de la resonancia de la proteína son selectivamente irradiadas por un tiempo dado (tiempo de saturación). El experimento en apagado se obtiene sin esta saturación. El espectro STD es obtenido mediante la sustracción de los dos experimentos, y muestra solamente señales del ligando que han recibido transferencia desde la proteína. Dado que la transferencia depende del inverso de la sexta potencia de la distancia intermolecular, la intensidad del espectro STD da una indicación de la proximidad de la sección específica del ligando a la proteína[99].

Esta técnica ha sido utilizada con anterioridad para evaluar la interacción de líquidos iónicos con proteínas modelo. Se investigaron las interacciones de un líquido iónico basado en un ion imidazolio, con la Albúmina Sérica Bovina (BSA, *Bovin Serum Albumin*), observándose los protones involucrados directamente en la interacción del ion imidazolio[51].

Se preparó una solución de referencia para obtener el espectro del líquido iónico puro, usando una solución 5 mM de BMIM TFA, mediante la dilución de la solución de 3.52 μL al 50% v/v de Hampton Research en 700 μL de solución de agua, de los cuales 250 μL eran de agua deuterada, usado como marcador isotópico.

Para los experimentos de STD se preparó 3.5 mL de una solución de 50 μM de lisozima y 5 mM de BMIM TFA, mediante la dilución de 17.60 μL de BMIM TFA 50% v/v y 5 mg de lisozima sólida grado cristalización de Hampton Research, utilizando 175 μL de agua deuterada antes de llevar a volumen.

Los experimentos se realizaron en un equipo Varian Innova utilizando una frecuencia de operación de 500 MHz a 25 °C. La concentración de la lisozima fue de 50 μM , mientras que la de líquido iónico de 5mM con una proporción de D₂O de 5%. Para la realización del experimento de STD fue entonces hecha en un exceso molar de líquido iónico de 100 (razón

proteína: BMIM TFA, 1:100) los cuales son típicamente utilizados para amplificar la respuesta de ligandos de unión débil.

El espectro de STD – RMN fue adquirido usando 256 registros, suprimiendo la señal de protón del agua mediante modulación por gradientes. La saturación selectiva de la proteína (en el espectro encendido) fue realizado mediante la irradiación a -0.5 ppm , utilizando pulsos gaussianos de 30 ms, durante un tiempo total de saturación de 3 s.

6.7 Efecto Precipitante de los Líquidos Iónicos

La evaluación del efecto que pueda tener un líquido iónico en la cristalización de una proteína no es inmediata. Aunque existen varias técnicas que permiten evaluar la interacción, esta suele referirse a espectros moleculares en solución. Para evaluar las características y modificaciones en la cristalización se utilizó básicamente la Dispersión de Luz Dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*)

6.7.1 Dispersión de Luz Dinámica

En un experimento clásico de Dispersión de luz dinámica, la luz que es dispersada por las partículas coherentemente es detectada en cierto ángulo con respecto a la radiación incidente. Dado que las partículas se encuentran en movimiento Browniano, la intensidad de luz dispersada observada $I(t)$ fluctúa alrededor del eje de tiempo. Por lo tanto, el análisis de la función del tiempo de estas fluctuaciones en la intensidad provee la información del movimiento de partículas dispersadas[100].

El análisis de esta fluctuación del tiempo se lleva a cabo con un operador de correlación, el cual construye la función de autocorrelación del tiempo $G_2(\tau)$ de la intensidad dispersada

Ecuación 2. Función de Cumulantes.

$$G_2(\tau) = \underline{[I(t)I(t + \tau)]}$$

Esta función de correlación depende solamente de la diferencia del tiempo τ y es independiente de tiempo t , en el cual la evaluación de $G_2(\tau)$ empieza. Para una solución monodispersa, la función de autocorrelación de la intensidad de luz dispersada puede ser relacionada con la función de autocorrelación, g_τ (la función de interés), mediante

Ecuación 3. Función de autocorrelación.

$$G_2(\tau) = A(1 + B|g_1(\tau)|^2)$$

donde A es una constante independiente del tiempo, proporcional al cuadrado de la intensidad dispersada independiente del tiempo, llamado la línea de base, y B es un factor instrumental, menor a 1.

Para el caso de las partículas monodispersas, $g_1(\tau)$ es representada por una función exponencial simple

Ecuación 4. Función de autodifusión.

$$g_1(\tau) = \exp(-D_{mon}q^2\tau)$$

donde D_{mon} es el coeficiente de difusión de las partículas monodispersas que están siendo estudiadas[100].

6.7.1.1 Segundo Coeficiente del Virial

Los coeficientes del virial se originan de la corrección de la ecuación de gases ideales, al expresarla la presión como una serie de potencias de la densidad (o del volumen, si el proceso es a volumen constante), por lo que está relacionada con el factor de compresibilidad. Aunque esta definición está relacionada con los gases ideales, se puede modificar para una solución, y utilizarse en lugar de la presión del gas, la presión osmótica, y cambiando la densidad por la concentración[101].

En la expansión del virial, el segundo coeficiente B_{22} está relacionado con el potencial de dos cuerpos, que al tratarse de moléculas disueltas es la interacción electrostática, de Van der Waals o cualquier otra forma de potencial de pares que describa a la interacción del sistema. Por lo anterior, este coeficiente será negativo si la interacción es atractiva, y positiva si es repulsiva. La medición de este coeficiente no es sencilla, sin embargo, la utilización de equipos de Dispersión de Luz Dinámica que utilizan tecnología de retrodispersión permite una determinación adecuada[102].

Dado que la técnica de DLS utiliza una función de autocorrelación, cuyo tiempo de decaimiento es proporcional a la difusividad, el parámetro de interacción puede obtenerse de la pendiente del coeficiente de difusión mutuo D_m , contra la concentración, de acuerdo con la ecuación

Ecuación 5. Relación de Debye

$$D_m = D_s(1 + k_D c)$$

Donde D_s es el coeficiente de autodifusión (D_m a concentración 0), k_D es el parámetro de interacción y c es la concentración de la proteína en g/mL . Este valor de interacción es válido desde concentraciones intermedias (no dilución infinita) hasta concentraciones superiores a la sobresaturación[103].

Para la obtención del segundo coeficiente del virial se utilizó un equipo de Dispersión de Luz Dinámica Marca Malvern Panalytical, modelo Nano S, con tecnología no invasiva y corrección de fondo (NIBS, *Non Invasive Back Scattering*) que cuenta con un controlador de temperatura Peltier, manejado desde el software Zetasizer 6.20. Las soluciones se filtraron utilizando un filtro con poros de $0.22 \mu m$.

El segundo coeficiente del virial y el parámetro de interacción se calcularon a partir de la correlación existente entre el Coeficiente de Difusión Mutuo como variable dependiente, obtenido directamente del análisis de la función de autocorrelación, y la concentración de la proteína, en una solución con el agente precipitante, incluyendo el líquido iónico como aditivo, en la misma proporción que en las pruebas de cristalización, como variable independiente. Las soluciones de las proteínas, tanto de Lisozima, como Glucosa Isomerasa, fueron de 0 a $5 mg/mL$.

Luego de cuantificación de las Lisozima por la técnica de Lowry se realizaron diluciones de la proteína entre 1 y $5 mg/mL$ para obtener el Gráfico de Debye. El equipo Malvern Nanosizer utilizado tiene una capacidad mínima de $50 \mu L$, y dado que la concentración de la lisozima era de $30 mg/mL$, se utilizaron alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 de la proteína, llevándolas a los $60 \mu L$ de volumen con agente precipitante.

Para la preparación del gráfico de Debye con líquido iónico, se agregó, antes de llevar a los $60 \mu L$ una cantidad de $3 \mu L$ de la solución de BMIM TFA 50 % v/v proveniente del kit de Hampton Research.

La obtención de radio hidrodinámico aparente a partir de la concentración se realizó mediante la lectura en un equipo Malvern Nanosizer, utilizando la medición por número. Se realizaron tres repeticiones, con optimización de cantidad de lecturas por el equipo. Para

obtener el gráfico de Debye, se realizó una regresión lineal de mínimos cuadrados, usando un promedio de las repeticiones por concentración.

Para evaluar la diferencia estadística de los parámetros de regresión se utilizó una prueba de Chow, realizándola por medio del paquete estadístico R.

7 Resultados y Discusión

7.1 Preparación y Caracterización de las Proteínas Usadas en El estudio

Tanto las pruebas de cristalización como la caracterización biofísica de las proteínas requieren que las mismas se encuentren aisladas y con alta pureza. Además, es necesario conocer las concentraciones de estas en el amortiguador en el que se encuentran, con alta exactitud y precisión.

En principio esto podría ser proporcionado por el proveedor, sin embargo, dado que muchas veces las proteínas no son estables en estas condiciones, y que los experimentos suelen adaptarse a las condiciones del laboratorio, es necesario antes de iniciar los ensayos realizar una caracterización preliminar. A continuación, se detalla el proceso.

7.1.1 Cuantificación de las soluciones de trabajo

Las soluciones de las proteínas fueron preparadas como se detalla en la sección metodológica. Existen diversas metodologías para cuantificar las proteínas, con diversos alcances y usos. Como ya se ha mencionado en este documento, la más directa es la cuantificación mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm, en donde absorben los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano. Debido a sus múltiples interferentes, solamente se utiliza de manera semicuantitativa.

El seguimiento luego de los pasos de filtración y concentración se realizó mediante la cuantificación a 280 nm, puesto que solamente se requería evaluar la recuperación de estas a través del protocolo de obtención (esto es sobre todo válido para las lipasas, que no son grado cristalización).

Una vez que las proteínas se encontraron en una solución macroscópicamente homogénea se cuantificaron de manera más adecuada (dependiendo de la fase e intención de la cuantificación), con la finalidad de diseñar las estrategias de purificación, caracterización y cristalización.

Dado que la sensibilidad y especificidad de los métodos de cuantificación de proteínas mediante derivación química varía, se decidió utilizar el método de Lowry, con modificación de Patterson para realizar la cuantificación de las proteínas de trabajo. Este método se basa

en la formación de un complejo coloreado entre los grupos amida de las proteínas, y el cobre (I). Aunque este método tiene varios interferentes, estos suelen estar relacionados con la presencia de fármacos, surfactantes, ácidos nucleicos y azúcares[104], los cuales están ausentes durante la preparación de las soluciones de las proteínas utilizadas en los experimentos de este documento.

El uso de técnicas de espectrofotometría óptica para cuantificación obedece en prácticamente todos los casos la ley de Lambert - Beer, no siendo el caso de las técnicas bioquímicas de cuantificación una excepción. Según esta ley, existe una relación proporcional entre la concentración de la proteína y la absorbancia, que puede describirse mediante la ecuación de una recta. En la **Tabla 4** se colocan las concentraciones y absorbancias utilizadas para encontrar los parámetros de la regresión lineal utilizada en este trabajo.

Tabla 4. Medición de estándares para cuantificación de Proteínas.

Concentración del Estándar de Albúmina Sérica Bovina / $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia a 618 nm
50	0.236
100	0.441
200	0.752
300	1.117

En la **Figura 25** se observa la curva de regresión utilizada para la cuantificación de las proteínas de trabajo. El coeficiente de determinación de esta curva es mayor a 0.999, por lo que la relación de los datos es adecuada. Esta curva, según lo indicado por el proveedor del kit de cuantificación, fue leída en tiempos iguales, después de agregar el reactivo de Folin - Ciocalteu. En caso de que la lectura de las muestras se realizase en días diferentes, se preparó un estándar de 200 $\mu\text{g/mL}$ como testigo.

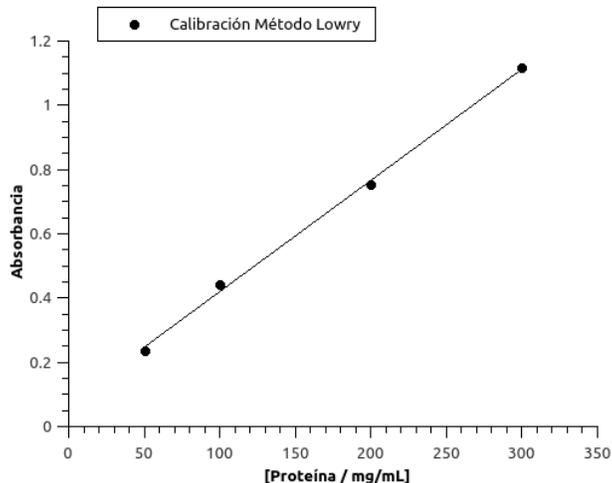


Figura 25. Recta de Calibrado de Método de Lowry
 Curva de calibración ($Absorbancia = m * [Proteína/mg/mL] + b$):
 $m = 3.46 * 10^{-3}$ y $b = 7.39 * 10^{-2}$

Finalmente, utilizando la información adquirida para la calibración del método de Lowry, se obtienen las concentraciones de las soluciones de trabajo de las proteínas. Estas se presentan en la **Tabla 5** y puede observarse que son altas por tratarse de proteínas sobre – expresadas. Esto es debido a que en el caso de la lisozima y la glucosa isomerasa, son proteínas modelo de cristalización, y fueron escogidas como tales debido a su facilidad de aislamiento y estabilidad. La lipasa es un caso distinto que se explicará de manera más amplia en una sección posterior. Puesto que la concentración necesaria para la cristalización es dos órdenes de magnitud mayor que la curva de calibración, se realizaron diluciones para que los ensayos pudieran ser interpolados.

Tabla 5. Cuantificación por método de Lowry Modificado por Patterson.

Proteína	Concentración / mg/mL
Lisozima	30.26
Glucosa Isomerasa	25.01
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	25.56

7.1.2 Caracterización de Pureza Mediante Electroforesis Desnaturalizante

La electroforesis desnaturalizante es una técnica muy utilizada en la caracterización bioquímica. El protocolo de Laemmli, en el cual se utiliza un gel de poliacrilamida (SDS - PAGE), así como diferentes agentes reductores y surfactantes, permite la caracterización de las proteínas en función de su relación *masa/carga*. Debido a los múltiples artefactos que se presentan, sirve solamente a manera de tamizaje, y debe usarse como guía de pureza, y no como una prueba fehaciente[89], ni del aislamiento ni de la pureza.

Se realizó una SDS - PAGE de las lipasas disponibles para este trabajo. Se trata de lipasas comerciales, producto de sobreexpresión de las proteínas, que han sido diseñadas como catalizadores de reacciones, por lo que las mismas no se encuentren aisladas, ni en alta concentración. Esto puede corroborarse en el gel de la **Figura 26**, donde los carriles correspondientes a *Candida antarctica* presentan varias bandas, correspondientes a distintas proteínas extraídas juntamente con las lipasas[105].

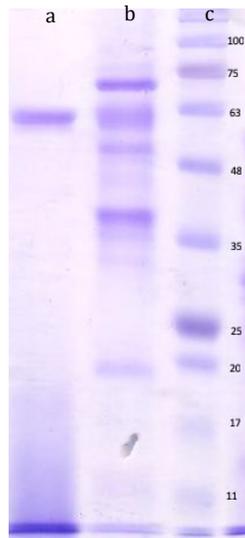


Figura 26. Caracterización mediante SDS - PAGE de Lipasas Comerciales.
a) Lipasa de *Candida rugosa* b) Lipasa de *Candida antarctica* c) Marcador de Peso Molecular /kDa

Se puede aprovechar la **Tabla 6** para describir el gel de electroforesis de la **Figura 26**. Como puede observarse, para *Candida rugosa* existe una banda cercana, pero inferior a la banda de 63 kDa[106]. Esta puede corresponder a cualquiera de las formas presentadas, puesto que la resolución de esta técnica no permite identificarlas entre sí[84]. Interesantemente, se observa una banda muy amplia desde el inicio del gel hasta casi 30 kDa, que puede corresponder a diversos productos de la sobreexpresión. Finalmente, para *Candida antarctica* se pueden identificar la presencia de las dos lipasas reportadas, la lipasa A, en la banda angosta que se encuentra entre 48 y 63 kDa, y la lipasa B, en la banda ligeramente superior a 35 kDa[107].

Tabla 6. Información General de las Lipasas Disponibles.

Especie	Proteína	Tamaño/kDa	Aminoácidos	pI
<i>Candida rugosa</i>	Lip 1	58.55	549	5.5
<i>Candida rugosa</i>	Lip 2	58.87	548	5.0
<i>Candida antarctica</i>	Lip A	49.27	462	7.5
<i>Candida antarctica</i>	Lip B	35.52	342	6.0

7.2 Ensayos de Cristalización de Proteínas Modelo: Crecimiento Direccional

El uso de proteínas grado cristalización simplifica de manera sustancial las actividades relacionadas a la caracterización de pureza, así como la misma purificación. La empresa Hampton Research comercializa varias proteínas de este tipo, con la intención de que sean usadas como proteínas modelo en experimentos de cristalización. En este caso se decidió utilizar lisozima de clara de huevo de gallina, glucosa isomerasa de *Streptomyces rubiginosus*, taumatina de *Thaumatococcus daniellii*, Xylanasa de *Bacillus subtilis*, así como Apo y Holo – transferrinas humanas.

Puesto que se han reportado diversos efectos de los líquidos iónicos en los cristales de proteínas, tanto en su polimorfismo[75], como en su hábito[69], se buscó realizar un tamizaje general de este comportamiento. Por tal razón, se decidió utilizar 24 líquidos iónicos, consistentes en sales de imidazolio, de fosfonio, piridinio y amonio(ver **Tabla 3**). De los cationes utilizados, se utilizaron tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Estos líquidos iónicos también tenían aniones cosmotrópicos y caotrópicos, de manera que los ensayos utilizados pudieran realizar un muestreo de diversos efectos, que permitieran generalizar algún comportamiento, si fuera el caso.

La combinación de los ensayos, entre proteínas y líquidos iónicos, lleva a un total de 150 experimentos, incluyendo los controles (consistentes en el mismo agente precipitante, pero sin el líquido iónico). Debido a que se conocía de antemano las condiciones de cristalización de las proteínas de estudio, durante la evaluación visual de todos los experimentos se buscó aquellas con características morfológicas evidentemente distintas al control, de manera que se pudiera estudiar el efecto a nivel molecular que tiene el líquido iónico en el ensayo de cristalización, encontrándose que Nitrato de Etilamonio (EANO₃), Bromuro de Tetraetilamonio (TEABr), Trifluoracetato de 3-butil-1-metilimidazolio (BMIM TFA) y Cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio (EMIM Cl) modificaron el crecimiento para lisozima y BTEA Cl Y EMIM SCN para Glucosa Isomerasa.

Mientras que la lisozima es una proteína pequeña (16 kDa) y suele cristalizar como monómero (se han encontrado diversos polimorfos), la glucosa isomerasa forma un tetrámero de 176 kDa [80]. Ambas presentan una superficie preferentemente hidrofílica, probablemente por su origen biológico[108]. El sistema más común de cristalización de la lisozima es el tetragonal, mientras que para la Glucosa Isomerasa es el sistema ortorrómbico.

7.2.1 Lisozima

Puesto que el efecto que poseen los líquidos iónicos en diversos tipos de proteínas, tanto en su estabilidad, como en su solubilidad y cristalinidad es conocido, se realizó un seguimiento de los efectos de estos en la cristalogénesis, mediante ensayos de cristalización en presencia de líquidos iónicos provenientes del kit de Hampton Research (ver **Tabla 3**). Para esto se utilizó la técnica de Difusión de vapor, en modalidad de gota sedente. Luego de una semana del inicio del experimento de cristalización se observan pequeños cristales en varias condiciones, que se dejaron creciendo durante un mes.

Dado que la lisozima es una proteína modelo, y que se está utilizando a los líquidos iónicos como aditivos, se espera que la mayoría de los ensayos sean positivos, en cuanto a la obtención de monocristales de proteína. Sin embargo, también se han reportado cambios morfológicos y de polimorfos, por lo que aquellos experimentos de cristalización con un cambio visible son notablemente interesantes.

7.2.1.1 Cambio de Hábito Cristalino

Diversos autores[66, 69, 70, 109] han reportado modificaciones del hábito, morfología y polimorfismo cristalino de la lisozima en presencia de líquidos iónicos. Y aunque los efectos termodinámicos y moleculares entre el solvente, el líquido iónico y las proteínas han sido explorados desde aproximaciones termodinámicas y colectivas, no se conoce cuál es el efecto en la cristalogénesis biológica[35].

La morfología tetragonal característica de la lisozima cristalizada utilizando Cloruro de Sodio (sin líquido iónico en este caso) puede observarse en la **Figura 27**.

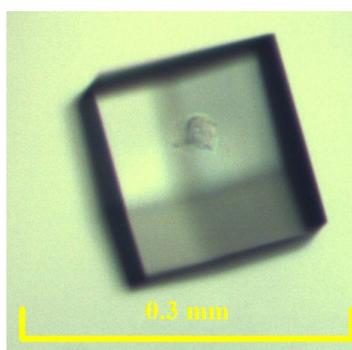


Figura 27. Lisozima Cristalizada en Ausencia de Líquidos Iónicos.

Cristalización mediante la técnica de Técnica Difusión de Vapor en modalidad gota sedente. Solución amortiguadora 200 μM Acetato de Sodio pH 4.50, agente precipitante 40 mg/mL NaCl. Solución de Proteína: 30 mg/mL .

Casos distintivos de cristalización se observan en la **Figura 28**. En la sección *a)* de dicha figura se encuentra una visión general de la prueba de cristalización en presencia de Tetrafluoroborato de 1 - etil - 3 - metilimidazolio (EMIM TFB). Puede observarse que existen múltiples morfologías cristalinas para las mismas condiciones de cristalización. Desde una tetragonal (en I), pasando por una morfología con punta de flecha o direccionados en el centro (ver II) o una morfología similar a un cubo (III). El panel *b)* de esta misma figura se pueden observar tres tipos de crecimiento (en este caso en presencia del -BMIM TFA) en una región de aproximadamente 0.16 mm^2 del experimento, observándose también la morfología tetragonal clásica (I), el crecimiento direccionado (II) y un cristal con caras incompletas (III). Este comportamiento es remarcable, puesto que muestra que en realidad se trata de un experimento con distinta sobresaturación en regiones muy cercanas[110].

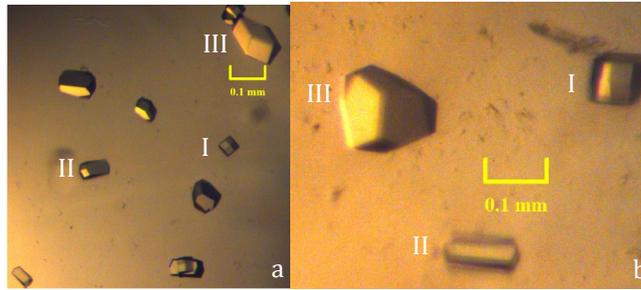


Figura 28. Lisozima Cristalizada en Presencia de Líquidos Iónicos: Cambio de Hábito Cristalino.

a) EMIM TFB b) BMIM TFA. Se observa el cambio de un hábito tetragonal a uno con dirección preferente de crecimiento.

La literatura indica que la observación de las diversas morfologías para la lisozima es indicativa de crecimiento preferencial de ciertos planos[111]. La diferencia entre la lisozima tetragonal de la direccionada consiste en que la tetragonal presenta crecimiento de los planos (101) y (110) equivalentes, mientras que en el caso de la direccionada la velocidad de crecimiento del plano (101) es mayor que el (110).

Según Liu la diferencia en la velocidad del crecimiento de las caras de la lisozima puede ser explicada en función de las condiciones de frontera de crecimiento del cristal[110]. Mientras que la unidad de crecimiento de la cara (101) es un tetrámero, la de la cara (110) es un octámero. A baja sobresaturación, el número de tetrámeros es mayor que el de octámeros, favoreciendo el crecimiento del plano (101) sobre la (110).

En el caso de los experimentos realizados en esta tesis, la observación de los hábitos distintos en la misma sección del experimento indica que la sobresaturación se modifica localmente. Puesto que la única diferencia es el uso como aditivo de los líquidos iónicos, la influencia de estos no es solamente una hidratación preferencial como los iones inorgánicos, o de apantallamiento como los solventes orgánicos, sino que puede tratarse de efectos locales de exclusión de volumen o interacciones específicas de las proteínas con líquidos iónicos.

7.2.1.2 Modelo Cristalográfico

La explicación más inmediata al cambio de velocidad de crecimiento de un plano cristalográfico por la presencia de líquidos iónicos, así como la direccionalidad de los contactos cristalográficos es que este se encuentre modificando los contactos de las

proteínas en el cristal, y sea un efecto totalmente debido a asociación molecular. Para investigar si esto es lo que está sucediendo, se realizó la difracción de rayos X de monocristal del cristal con hábito direccionado (II) en el panel *b*) de la **Figura 28**.

Tabla 7. Parámetros Cristalográficos de la Lisozima en Presencia de BMIM TFA

Parámetro	Valor
a	77.301
b	77.301
c	37.472
Grupo Espacial	$P4_32_12$
Sistema Cristalino	Tetragonal
Resolución	1.76
R_{free}	0.2128
R_{work}	0.1875

Como puede observarse en la **Tabla 7** la lisozima cristaliza en la forma más común, como es de esperarse, si el cambio morfológico se debe únicamente al cambio en la sobresaturación, y al aumento de la velocidad de crecimiento de un plano cristalográfico. Por tanto, se trata de una red tetragonal, del grupo espacial $P4_32_12$, de dimensiones estándar.

A nivel de estructura tridimensional, la lisozima aquí presentada posee una estructura similar a las lisozimas de cepa silvestre que se encuentran depositadas en el PDB, como se observa en la **Figura 29**. Esta estructura no muestra evidencia de la presencia de BMIM TFA, por lo que se puede concluir que el cambio local en la sobresaturación no se debe a la formación de una asociación intermolecular de la proteína y el líquido iónico en el cristal. Esto significa que la formación de hábitos distintos al trigonal en la **Figura 28** (en ambos paneles) obedece a una interacción no cristalográfica, lo cual será explorado más adelante en este documento.

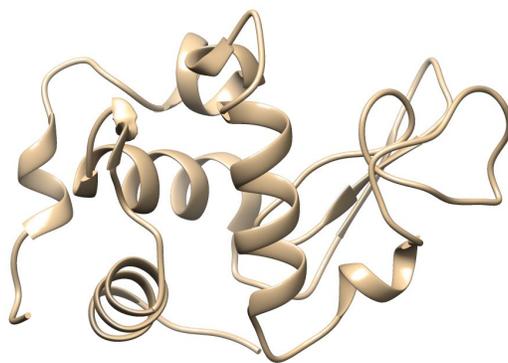


Figura 29. Modelo Molecular Lisozima Cristalizada en Presencia de BMIM TFA.

No se observa la estructura del líquido iónico en la densidad electrónica cristalográfica. Figura propia resuelta en PHINIX y dibujada en USCF Chimera.

7.2.2 Glucosa Isomerasa

Para evaluar si el cambio en la sobresaturación observado en la cristalización de la lisozima en presencia de EANO₃, TEA Br, BMIM TFA y EMIM Cl es un efecto único en esta proteína, o puede tratarse de un comportamiento general se realizaron también experimentos de cristalización de Glucosa Isomerasa de *Streptomyces rubiginosus*. Dado que se está buscando evaluar si el líquido iónico tiene un efecto de disminución en la sobresaturación, se utilizó una concentración de sulfato de amonio 1.5 M como agente precipitante, la cual es una concentración alta para estos ensayos. En condiciones de cristalización de control se observó un precipitado amorfo y denso, fruto de una alta sobresaturación (ver panel c en la **Figura 30**). Posteriormente, se prepararon ensayos de cristalización en las mismas condiciones, pero con los mismos líquidos iónicos usados para la lisozima (ver **Tabla 3**).

En el caso de la Glucosa Isomerasa, la presencia BTEA Cl Y EMIM SCN evitó la precipitación observada en el control (el resto de los líquidos iónicos eran similares al control). En la **Figura 30** se han colocado las fotografías de los experimentos en los que se obtuvieron monocristales de Glucosa Isomerasa, correspondientes a los ensayos realizados en presencia de estos líquidos iónicos.



Figura 30. Hábito direccionado de Glucosa Isomerasa en dos líquidos iónicos aromáticos.

a) EMIM SCN. b) BTEACl c) Control

Al igual que en el caso de la lisozima, uno de los planos crece preferencialmente. De hecho, mientras la lisozima presenta forma de cabeza de flecha, la Glucosa Isomerasa tiene un hábito prácticamente rectangular. También es notable que la longitud del eje mayor de crecimiento es considerablemente más grande para la Glucosa Isomerasa. Se realizaron experimentos de difracción de rayos X de cristales de ambos ensayos, obteniéndose un sistema cristalino ortorrómbico, con una alta probabilidad de un grupo espacial $P2_12_12$ (la estructura no fue resuelta, debido a que la resolución máxima era muy baja en estas condiciones).

En la literatura se menciona que cuando se utiliza sulfato de amonio como precipitante, se obtienen cristales ortorrómbicos, en los grupos espaciales $I222$ (rómico) y $P2_12_12$ (prismático), dependiente de la concentración del sulfato de amonio.

Se ha reportado que el polimorfismo tiene un efecto en la morfología del monocristal obtenido. El crecimiento sobre el plano cristalográfico (001) es más rápido en el caso del grupo $P2_12_12$, donde las otras caras se ven reducidas. El hábito es más simétrico en el caso del $I222$ [112].

Mediante estudios de crio - microscopía electrónica se ha propuesto el mecanismo de crecimiento cristalino de la Glucosa Isomerasa. El uso de concentraciones altas de sulfato de amonio genera una interacción fuertemente anisotrópica que lleva a las formaciones tubulares, altamente desordenadas, de baja cristalinidad que posteriormente se auto -

ensamblan. A bajas concentraciones de PEG o sulfato de amonio, la proteína sigue una vía de nucleación directa, llevando a cristales del grupo $I222$.

Los resultados de difracción de rayos X indicaron que el grupo espacial más probable para los cristales de la **Figura 30** es el $P2_12_12$ (no se muestran puesto que, aunque se pudo identificar el grupo espacial, la calidad de los resultados no era suficiente para resolver la estructura). Aunque el monocristal se obtuvo comparativamente a alta sobresaturación, en comparación con el control ya no se encuentra cercano a la zona de precipitación, lo que puede indicar que al igual que sucedió con la lisozima, la presencia del líquido iónico disminuyó la sobresaturación.

7.3 Caracterización Biofísica de Soluciones con Características Distintivas en Presencia de Líquidos Iónicos

Como se mencionó en la sección de hábitos cristalinos, el cambio de estos en presencia de ciertos líquidos iónicos parece indicar que las condiciones de sobresaturación, ya sea locales o de todo el ensayo, se están modificando en presencia de éstos. Esto puede deberse a un efecto colectivo o individual, y la explicación molecular del efecto debe empezarse por evaluar las condiciones de esta interacción.

En esta sección se evaluarán los ensayos de Dispersión de Luz Dinámica, que dan indicios del comportamiento de la solución y su impacto en las interacciones entre las proteínas. Además, se buscará saber encontrar si hay algún tipo de interacción directa entre la lisozima y BMIM TFA, mediante la técnica RMN de Diferencia de Saturación Transferida.

7.3.1 Dispersión de Luz Dinámica

Se ha demostrado que cuando se utiliza la Dispersión de Luz Dinámica en experimentos de regímenes semi - diluidos, como es este caso, es posible obtener el segundo coeficiente del virial para la interacción entre las proteínas involucradas.

En la **Figura 31** se muestran los gráficos de Debye para la lisozima en el agente precipitante utilizado en la cristalización de control, y en BMIM TFA 2.5% con el mismo agente precipitante. Los parámetros que mejor pueden describir el comportamiento de la solución

son la pendiente, que se relaciona con el coeficiente del virial, y la ordenada al origen, con el peso molecular (con la especie en la solución).

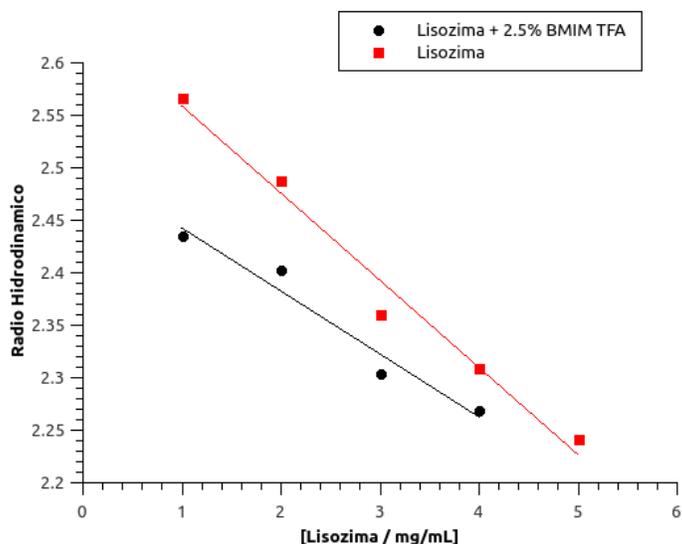


Figura 31. Gráfico de Debye para Lisozima y Lisozima + 2.5% BMIM TFA
Existe un cambio en la difusividad de la lisozima en presencia del Líquido Iónico

El coeficiente del virial es una medida de la función de distribución de pares, producto de la no idealidad de las soluciones. Por tanto, es una medida de la interacción entre las proteínas. Como en este caso son negativas, significa que la interacción es atractiva[100].

A simple vista, tanto la pendiente como la ordenada de los gráficos de Debye parecen ser distintos, sin embargo, para compararlos adecuadamente es necesario recordar que una regresión de este tipo está basada en un ajuste de mínimos cuadrados, y por tanto presenta una desviación por el uso del modelo. Una forma adecuada de realizar la comparación es mediante una prueba de hipótesis que las compare.

Un análisis estadístico adecuado para este caso es la prueba de Chow, cuya hipótesis compara si dos juegos de datos que originan dos regresiones, presentan diferencias estadísticas significativas[113] (lo cual puede resumirse en la información presentada en la **Tabla 8**). Esto permite realizar un análisis de los efectos de los líquidos iónicos en la cristalización de la lisozima. Una pendiente más negativa se asocia a una mayor concentración de agente precipitante, y, por lo tanto, a una mayor interacción entre proteínas, presumiblemente debido a los efectos cosmotrópicos[110]. Puesto que, en este

experimento, la concentración de la proteína y del agente precipitante es el mismo, esto significa que el efecto global de sobresaturación se disminuye en presencia de BMIM TFA, en concordancia con lo evaluado en la inspección de hábitos cristalinos.

Tabla 8. Estadísticos de Regresión de las Gráficas de Debye

Proteína	m	b	S_m	S_b
Lisozima	$-8.31 * 10^{-2}$	2.64	$7.12 * 10^{-3}$	$2.36 * 10^{-2}$
Lisozima + BMIM TFA 2.5%	$-6.00 * 10^{-2}$	2.50	$9.20 * 10^{-3}$	$2.52 * 10^{-2}$
Glucosa Isomerasa + BTEACl 2.5%	$-1.48 * 10^{-1}$	6.74	$8.67 * 10^{-3}$	$2.93 * 10^{-2}$

m: pendiente, **b:** ordenada al origen, S_m : Desviación estándar de m, S_b : Desviación estándar de b

Recordando que las pruebas de cristalización fueron colocadas a una concentración de 30 *mg/mL*, y que los valores del coeficiente del virial se modifican muy poco, inclusive luego de alcanzar la alta sobresaturación[110], esto significa que la mezcla es lo suficientemente heterogénea como para albergar la población de los dos tipos.

Por otro lado, la ordenada también es estadísticamente diferente. La predicción del tamaño de la proteína a partir del Radio Hidrodinámico permite establecer que la población es principalmente formada por dímeros bajo estas condiciones, dado que un dímero de la lisozima sin líquidos iónicos presenta un tamaño de 28 kDa. Sin embargo, la diferencia es pequeña, por lo que las poblaciones son ligeramente diferentes.

Es necesario recordar que la medida básica de estos experimentos es el coeficiente de difusión, por lo que el cambio en el entorno de la proteína, sobre todo si involucra las capas de solvatación cercanas, trae como consecuencia un cambio en la masa molecular estimada. Esto es consistente con las características surfactantes que se han adjudicado a los cationes de los líquidos iónicos[35].

El uso de compuestos con las propiedades de los líquidos iónicos, que son surfactantes, para el crecimiento dirigido de cristales es común en compuestos inorgánicos semi - cristalinos o cristalinos, con aplicaciones electrónicas. En estos, una especie química 'flota' (este es el efecto surfactante) sobre la superficie de ciertos planos de crecimiento, permitiendo que un plano crezca de manera preferencial[114]. Esto es consistente con el crecimiento bidimensional, debido a la pre - estructuración de las proteínas, en los mecanismos

detallados en la sección del marco teórico, por lo que puede existir una opción de diseño de cristales de proteínas.

7.3.2 Resonancia Magnética Nuclear

Dado que se ha comprobado en el desarrollo de esta tesis que hay una influencia de algunos líquidos iónicos en los cristales de lisozima, pero no se deben a efectos cristalográficos, es necesario indagar si se deben a efectos de interacción en solución, para esto se utilizará una técnica de Resonancia Magnética Nuclear, basada en ligando.

Las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear han sido utilizadas durante un largo período como técnica de resolución estructural de proteínas. Sin embargo, ha sido superada en la obtención de este objetivo por la difracción de rayos X de monocristal, y recientemente también desplazado por la crio - microscopía electrónica. Esto se debe a que las técnicas de correlación en resonancia se basan en el análisis de interacciones (espaciales en el caso de NOESY). Conforme aumentan la cantidad de átomos, se complica el análisis de datos, llegando a ser muy complejo cuando las proteínas no son pequeñas, lo cual no es limitante para las otras técnicas.

Las técnicas de resonancia, por otro lado, han gozado en los años últimos de gran crecimiento en el análisis de asociación entre macromoléculas y ligandos o moléculas pequeñas. Esto debido al desarrollo de diversas aplicaciones que permiten obtener información muy diversa de estos complejos, tanto del punto de vista de la proteína como del ligando. En continuación de esta investigación, se utilizó la técnica de Diferencia de Saturación Transferida para evaluar la interacción de la Lisozima con BMIM TFA[99].

7.3.2.1 Transferencia de Saturación

Las técnicas de resonancia utilizadas para la interacción entre una molécula pequeña y una macromolécula pueden clasificarse en: 1) basada en el ligando, y 2) basada en la macromolécula. Esta última modalidad no requiere un intercambio rápido (mayor que la latencia del pulso de resonancia), es aplicable a un rango amplio de concentraciones del ligando y provee información del modo de unión, sin embargo, tiene las desventajas de que requiere una gran cantidad de proteína soluble, no agregada, e isotópicamente marcada[99]. Por otro lado, las técnicas basadas en el ligando tienen como principio la diferencia de este,

entre su forma asociada y la disociada. Estas técnicas son particularmente útiles cuando la asociación es de mediana a débil. En esta clasificación cae la técnica de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD, *Saturation Transfer Difference*).

En la **Figura 34** se esquematiza la técnica de STD. En esta técnica se realizan dos experimentos, uno encendido y otro apagado. Se satura el espectro de resonancia de la molécula pequeña, y posteriormente se genera un pulso en la frecuencia de absorción de la proteína. En caso de estar asociada, la molécula pequeña recibe por transferencia energética un estímulo que se observa de nuevo en el espectro de resonancia, que al ser restado del espectro original solo muestra las señales del ligando. Este experimento permite no solamente saber si hay fuerzas intermoleculares entre la macromolécula y la molécula pequeña, sino obtener información de qué sección de la molécula pequeña está cerca, lejos o a mediana distancia de la interacción[115].

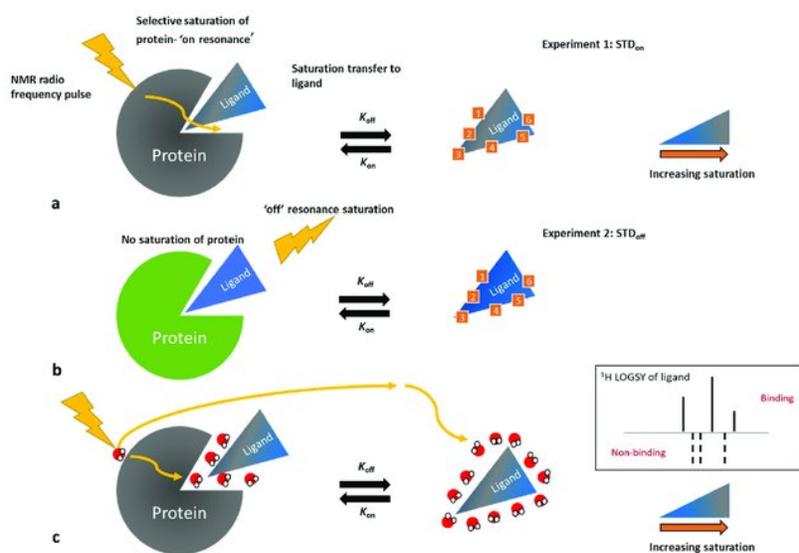


Figura 32. Principio de la Técnica de Diferencia de Transferencia de Saturación.

Principio de STD: La estimulación de la proteína es transferida al ligando. **Fuente de la Figura:** [115]

En el panel b de la **Figura 33** se muestra el espectro experimental de protón de BMIM TFA (el cual ocasionó crecimiento direccionado de los cristales de lisozima y cuya estructura obtenida en presencia de este líquido iónico se resolvió por difracción de rayos X en esta investigación), así como un recuadro con su estructura y la asignación de las señales del espectro[116], con la intención de compararlo con un experimento STD. Puesto que el

desplazamiento químico depende de la protección magnética, los desplazamientos a campo alto se deben a la presencia de cadenas alifáticas no ramificadas.

Conforme se acercan al anillo imidazólico, la desprotección de los hidrógenos aumenta, debido al efecto de atracción de electrones del anillo (al ser un catión deslocalizado), por lo que los grupos metilo y metileno vecinos a los nitrógenos se encuentran a un corrimiento cercano a los 4 ppm. Por último, los hidrógenos más desprotegidos son los que están directamente enlazados al anillo imidazólico. La diferencia entre las posiciones 4 y 5 del mismo son debidas a los efectos inductivos de la cadena lateral (la donación de los electrones por parte de una cadena más larga es ligeramente mayor), mientras que la posición se encuentra altamente desprotegida, debido a que se encuentra entre los dos nitrógenos, que mantienen mayormente la carga positiva en el híbrido de resonancia. En el panel **a** de la **Figura 33** se observa el espectro STD encendido. Según lo indicado anteriormente, las señales sensibles en este espectro dependen de los hidrógenos que poseen interacción con la proteína.

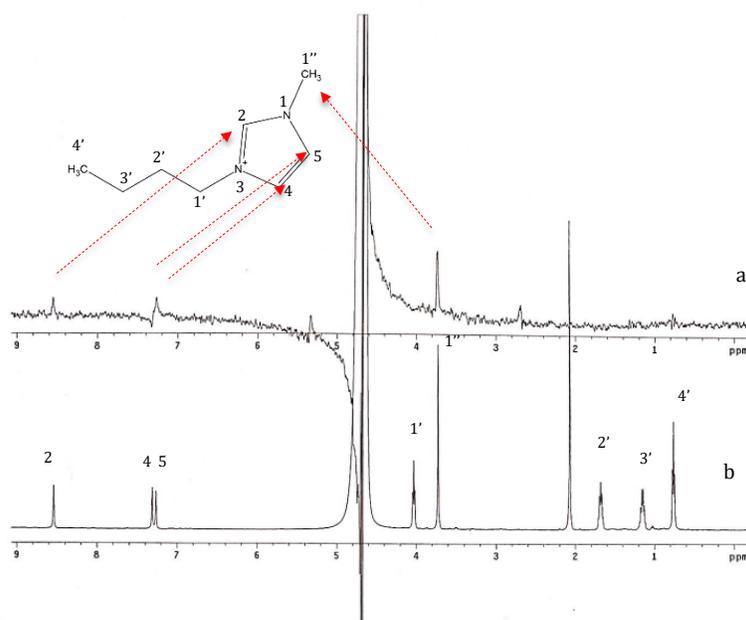


Figura 33. Espectros RMN - STD para Lisozima + 2.5% BMIM TFA

a) Lisozima - BMIM TFA encendido, indicando las posiciones involucradas en la interacción b) BMIM TFA control. Aunque hay una respuesta en el espectro a es débil, indicativo de que la asociación no es permanente. Del espectro **a** son notables dos cuestiones importantes. La primera es que las señales observables, aunque reproducibles entre repeticiones de experimentos, son mucho más

débiles que las que se observan cuando existe una interacción de tipo receptor-ligando, caracterizadas por interacciones relativamente estables.

Dado que se ha evaluado experimentalmente que no se trata de un artefacto del experimento, puesto que se realizó el experimento en las mismas condiciones sin presencia de la proteína y no se observa ninguna señal, además que se repitió el experimento encendido varias veces, se puede inferir que no se trata de una interacción con constante de asociación alta, sino que de una interacción débil, y probablemente, con una disociación rápida (recordar la relación existente entre la constante de equilibrio y las constantes de velocidad involucradas).

La segunda, es con respecto a las posiciones y naturaleza de las en las interacciones del catión imidazolio con la proteína. Las posiciones involucradas son las que se encuentran en los desplazamientos de 3.75, 7.48, 7.52 y 8.57 ppm, que corresponden a las posiciones denotadas por 1", 5, 4 y 2. La interacción procede entonces predominantemente en el anillo de imidazolio. Dado que en este anillo se encuentra deslocalizada la carga positiva, la fuerza motriz de la interacción es de naturaleza electrostática.

Una comparación útil de este experimento puede ser el realizado por Silva[51] con el mismo catión en presencia de Albúmina Sérica Humana. A diferencia del experimento realizado en esta investigación, la cadena lateral alifática de cuatro carbonos presenta una señal importante, identificando las interacciones como hidrofóbicas. También se pudo identificar que las interacciones no son específicas, puesto que existen múltiples sitios de respuesta en el experimento de STD – RMN, presentándose una correlación directa entre el nivel y la naturaleza de interacción con la estabilidad obtenida por calorimetría diferencial de barrido. En el caso de los experimentos aquí presentados, esto significa que existe una interacción electrostática, de carácter general, orientada a la sección hidrofílica del catión. Esto se correlaciona con la información molecular expuesta por Shröder[35] en cuanto a la interacción fuera de la capa de solvatación de la proteína, y con el crecimiento direccionado observado, explicado por el crecimiento normal a la superficie y a las propiedades de autoensamblaje (probablemente dirigido por la presencia de BMIM TFA) expuestas por McPherson[41], por lo que se puede pensar que el catión funciona como surfactante, con un mecanismo de tipo epitaxial.

8 Conclusiones

1. Las lipasas comerciales disponibles para este experimento se encuentran en una mezcla compleja, cuestión lógica, dado que no son para cristalización.
2. Para *Candida antarctica* se encuentran las lipasas A y B, entre otras proteínas de la mezcla.
3. Existe modificación del hábito cristalino (pero no de la red cristalina o del grupo espacial) de la lisozima en presencia de los líquidos iónicos EANO₃, TEABr, EMIMCl, EMIM TFB y BMIM TFA, en las condiciones de cristalización establecidas.
4. Las modificaciones del hábito cristalino de lisozima en presencia de líquidos iónicos parecen deberse a una disminución en la sobresaturación (según la comparación de la morfología), sin embargo, presenta zonas localizadas de diferente saturación en el mismo ensayo.
5. El líquido iónico no forma parte de la red cristalográfica de la lisozima, y no se observa en la resolución estructural por rayos X.
6. Existe modificación estructural del hábito cristalino (pero no de la red cristalina o del grupo espacial) de Glucosa Isomerasa de *Streptomyces rubiginosus* en presencia de Acetato de Colina, Dihidrógeno Fosfato de Colina, EMIM OAc, BTEACl y EMIM SCN.
7. El cambio de hábito cristalino en Glucosa Isomerasa se debe tanto a la disminución en la sobresaturación como a un efecto anisotrópico.
8. Existe una diferencia estadística significativa entre las pendientes de las Gráficas de Debye de Lisozima y Lisozima + BMIM TFA. Esto confirma que la presencia del líquido iónico está disminuyendo la sobresaturación de la proteína.
9. La diferencia significativa en la Difusión de la proteína, evidenciada en el radio hidrodinámico, indica que también se está modificando el entorno cercano de la proteína (que viaja junto con esta).

10. El experimento de Diferencia de Saturación Transferida a BMIM TFA en presencia de Lisozima indica que existe una asociación más débil que la de receptor - ligando, pero no es nula.
11. La sección del BMIM TFA involucrada en la interacción con la Lisozima es la del anillo imidazolio, en los protones de las posiciones 2, 4, 5 y en el metilo que se encuentra en la posición 1, lo cual parece indicar una interacción electrostática de carácter general.

9 Perspectivas

1. Evaluar el efecto que los líquidos iónicos tienen en la dinámica de la cristalización de las proteínas en estudio.
2. Evaluar el efecto que la presencia del líquido iónico tiene en una proteína cristalizada en campos magnéticos, usando técnicas de contradifusión en geles.
3. Realizar los mismos ensayos de cristalización en un rango de concentración de los líquidos iónicos, de manera que se evalúe la transición del hábito cristalino.
4. Realizar los ensayos biofísicos de caracterización de CALB en diferentes rangos de líquidos iónicos, evaluando los efectos de sobresaturación.
5. Realizar ensayos de cristalización de las proteínas en presencia de líquidos iónicos y geles, en presencia de campos magnéticos, de manera que se describa la influencia combinada de las técnicas no convencionales de cristalización.

10 Anexos

10.1 Purificación y Caracterización de Lipasa de *Candida antarctica* y *Candida rugosa* mediante técnicas Cromatográficas

Con las observaciones realizadas con respecto a los efectos en la cristalogénesis que presentan los cationes aromáticos, surge la inquietud de continuar la investigación con proteínas distintas al modelo que se ha presentado. Puesto que al parecer se trata de efectos electrónicos de estos anillos aromáticos, puede utilizarse como contraste proteínas con superficie hidrofóbica distinta, en este caso, lipasas.

En la **Figura 34** se observa una comparación entre una lipasa y la HEW Lisozima. Puede observarse como la superficie hidrofóbica (sección amarilla) de esta última es mucho menor, por lo que es una proteína control adecuada para comparar los efectos de cristalización que se puedan relacionar con solvatación por compuestos orgánicos.

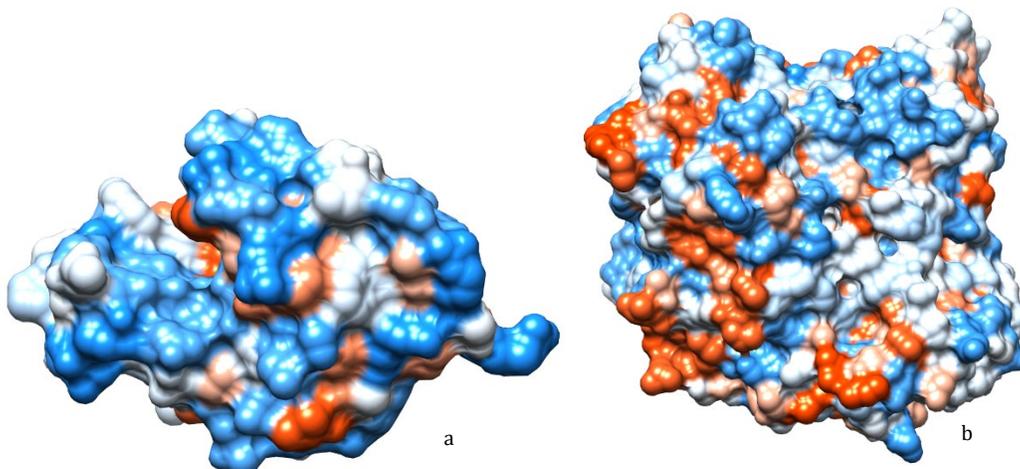


Figura 34. Comparación de Superficie Hidrofóbica de HEW - Lisozima y Lipasa Modelo
a) HEW Lisozima. b) Lipasa 1 de *Candida rugosa*. Las secciones azules son hidrofílicas y las naranjas hidrofóbicas. **Fuente de la Figura:** Superficie hidrofóbica hecha en USCF Chimera, basada en escala Kyte - Doolittle a partir de los PDB.

Al observar la superficie hidrofóbica de la Lipasa 1 de *Candida rugosa*(CRL) (**Figura 35**), esto se puede confirmar de manera visual, puesto que justamente se observa que existe una transición es la apertura de una tapa hidrofóbica de color rojo[84].

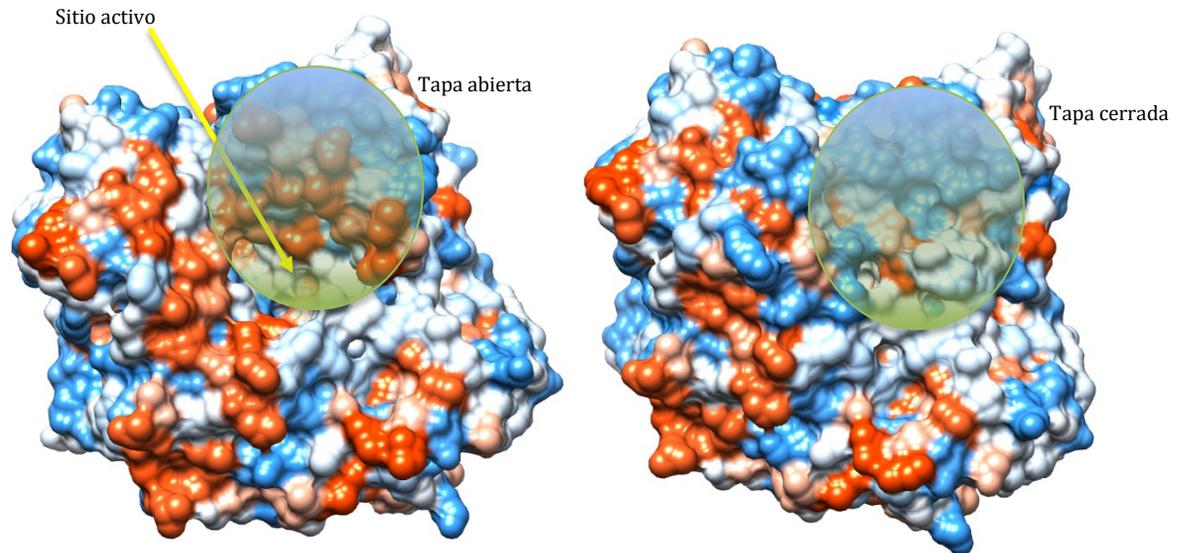


Figura 35. Superficie Hidrofóbica de Conformaciones de *Candida rugosa*
a)1crl: Conformación abierta, b)1trh: conformación cerrada. **Fuente de la Figura:** Superficie hidrofóbica hecha en USCF Chimera, basada en escala Kyte – Doolittle a partir de los PDB.

El caso de la lipasa B de *Candida antarctica*(CALB) es, por otro lado, una anomalía en este tipo de estructuras (la CRL parece ser el caso más común). CALB no presenta una tapa que sufra una transición clara al acercarse a una micela lipídica, sino que tiene varias secciones hidrofóbicas cercanas al sitio activo (coloreadas en verde, azul y rojo en el panel A en la **Figura 36**). Estas secciones hidrofóbicas sirven como anclajes de la proteína a la micela lipídica, que en el panel B se representa entre los planos. Entonces, el sitio activo se mantiene abierto permanentemente.

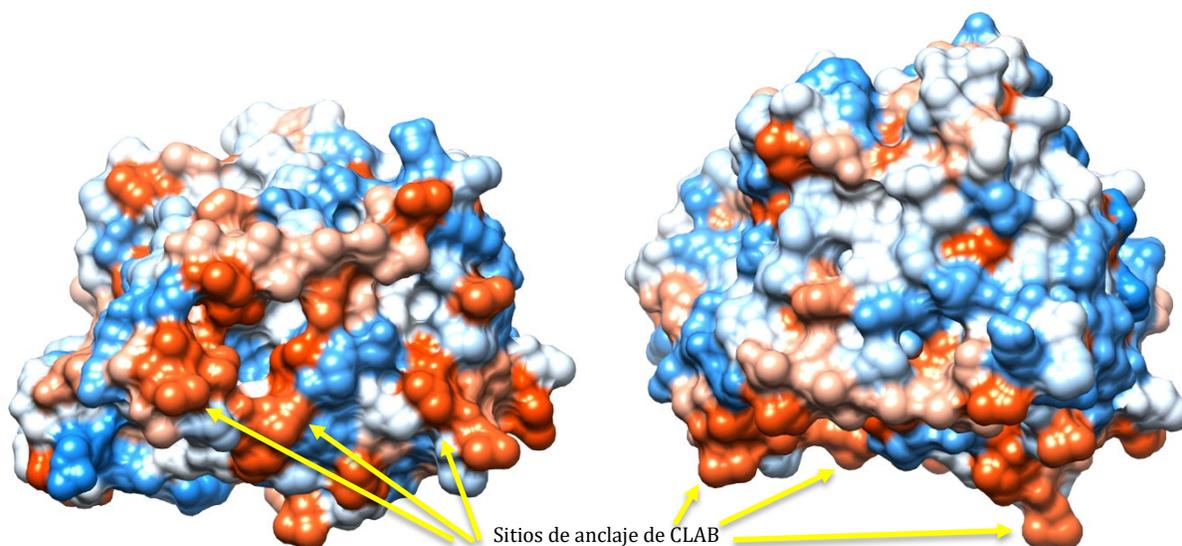


Figura 36. Superficie Hidrofóbica de CALB

CALB se ancla a la micela lipídica a través de las secciones en color (secciones hidrofóbicas), con el sitio activo abierto permanentemente en esa dirección. **Fuente de la Figura:** Superficie hidrofóbica hecha en USCF Chimera, basada en escala Kyte – Doolittle a partir de los PDB, tomando como guía la referencia [117].

10.1.1 *Candida antarctica*

La superficie hidrofóbica de la lipasa B de *Candida antarctica* presenta características muy útiles en la lógica de esta investigación ya que tiene secciones hidrofóbicas múltiples y pequeñas en su superficie que permiten usarlas como sondas de interacción hidrofóbica con distintos Líquidos Iónicos, por lo que es importante caracterizarla de manera adecuada, precisamente en el marco de sus propiedades hidrofóbicas. Esto se puede hacer de varias maneras, pero los sistemas cromatográficos, que suelen usarse para separar de manera diferencial diferentes contenidos de una mezcla compleja, pueden a la vez prestarse para caracterizar la naturaleza de las proteínas.

Como primer abordaje, se realizó la cromatografía de intercambio catiónico propuesta por Toedler[118] a una mezcla compleja de lipasa comercial de *Candida antarctica* a alta concentración, esto último, con la intención de observar el comportamiento de asociación hidrofóbica. Este ensayo consiste en la asociación con la fase estacionaria de la lipasa B a pH 3, en el cual es estable pero fuertemente cargada. A este pH las demás especies son eluidas. Un posterior cambio a pH 5.5 permite eluir la proteína. En la **Figura 37** se observa el cromatograma a pH 3.

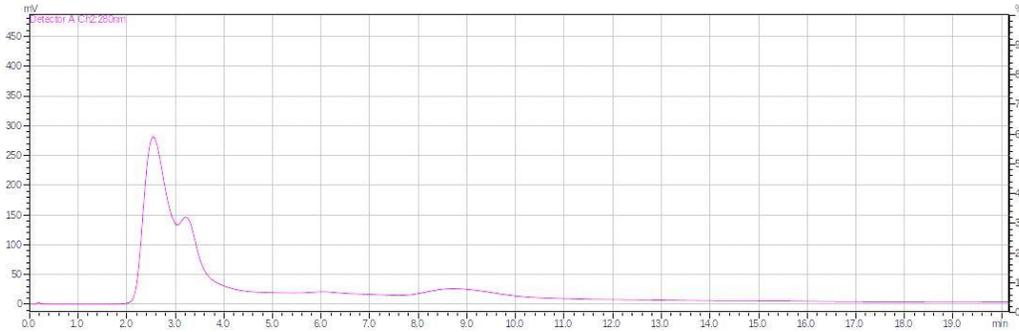


Figura 37. Cromatografía de Intercambio Catiónico *Candida antarctica* comercial: No retenido

Elución de proteína no retenida, Buffer de citrato de sodio 10 mM, acetato de sodio 10 mM y formato de sodio 10 mM, pH 3.00. Columna de Sulfopropil como Intercambiador Catiónico Fuerte, TSK SP - 5PW

En conjunto con la SDS - PAGE que se muestra en la **Figura 38** permite identificar en el carril *c* que precisamente se trata de las proteínas que no son CALB.

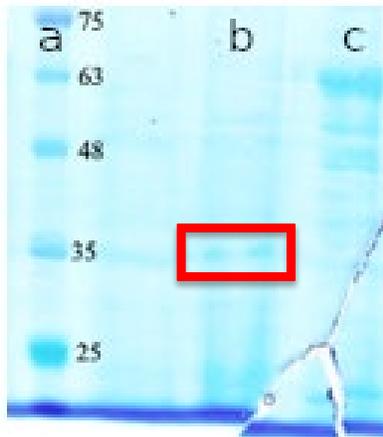


Figura 38. SDS - PAGE de Fracciones Cromatografía Intercambio Catiónico de *Candida antarctica* comercial

SDS PAGE fracciones eluidas por intercambio catiónico a b) pH 5.50 c) pH 3.00. a) es Marcador de Peso Molecular

El cromatograma a pH 5.5, presenta un pico de elución ancho y extendido(**Figura 39**). La colección de varias fracciones idénticas entre sí se muestra en el carril *b*. Como puede observarse, en este caso el perfil es distinto, y presenta una banda cercana a los 35 kDa, masa molecular de CALB (ver recuadro rojo en la figura). Posteriores experimentos, con concentraciones mayores de esta solución no mostraron bandas más intensas en el gel de

electroforesis, por lo que puede tratarse solamente de la fracción soluble no agregada en estas condiciones (recordando que se preparó CALB a alta concentración con este fin).

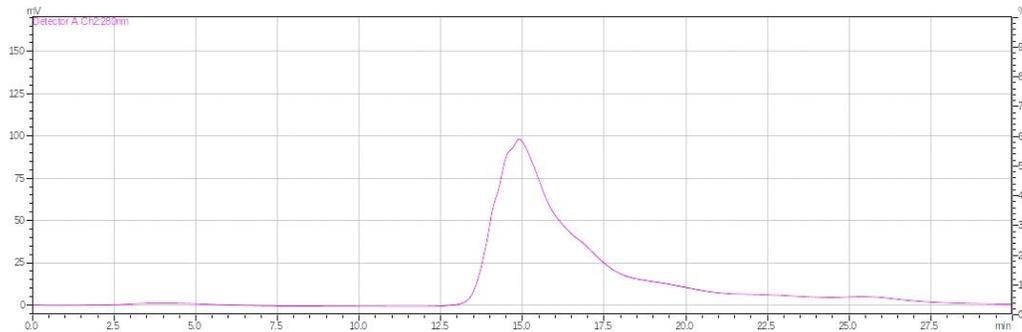


Figura 39. Cromatografía de Intercambio Catiónico de Lipasa de *Candida antarctica* comercial.

Elución de Lipasa B de *Candida antarctica*, Buffer de citrato de sodio 10 mM, acetato de sodio 10 mM y formato de sodio 10 mM, pH 5.50. Columna de Sulfopropil como Intercambiador Catiónico Fuerte, TSK SP - 5PW

Al realizar una cromatografía de fase reversa en columna de octilsilano (C8) de la misma preparación de proteína comercial, se obtiene un perfil cromatográfico totalmente distinto, como se observa en la **Figura 40**. Básicamente pueden separarse la elución en una sección altamente hidrofóbica, una segunda, medianamente hidrofóbica, donde sale la fracción mayoritaria, y la última, consistente en varias fracciones pequeñas altamente hidrofóbicas (el seguimiento de hidrofobicidad se puede inferir de la proporción de acetonitrilo necesario para eluir la proteína retenida en la fase estacionaria).

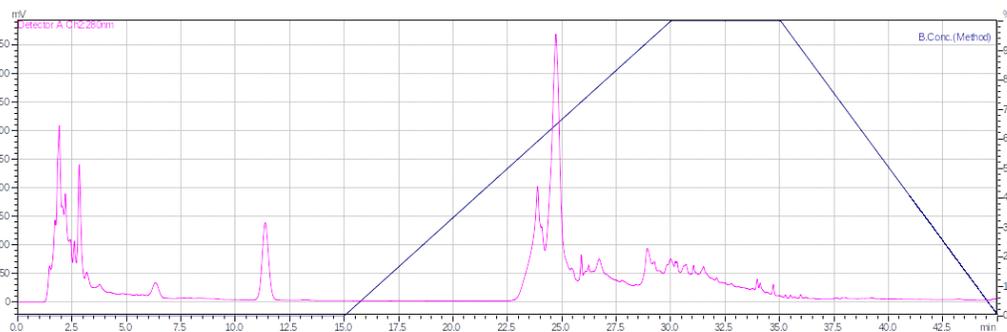


Figura 40. Cromatografía de Fase Reversa de *Candida Antarctica* comercial

Columna de octilsilano Hypersil GOLD C8 Thermo Scientific. Gradiente escalonado(acetonitrilo: agua): 0 a 15 minutos 0% acetonitrilo, 15 a 30 minutos de 0% a 100% de acetonitrilo, 30 a 35 minutos, 100% acetonitrilo

La fase mayoritaria es eluida a una proporción aproximada de 50% de acetonitrilo, por lo

que es consistente con lo que se conoce acerca de la superficie hidrofóbica de CALB . En el gel de electroforesis de la **Figura 41** puede corroborarse que la fracción mayoritaria corresponde a CALB, en el carril *a*. La explicación simple de este comportamiento está relacionada justamente con el comportamiento hidrofóbico discutido por Gruber. En este caso, por tanto, la superficie hidrofóbica de la proteína, que no está limitada a una sección de ésta, puede adherirse fuertemente a la fase estacionaria, y también entre sí a alta concentración. Esta información plantea un enfoque único para investigar la cristalogénesis de proteínas hidrofóbicas con líquidos iónicos y solventes orgánicos, toda vez que se conoce que esta proteína es altamente estable y activa en presencia de este tipo de líquidos [54].

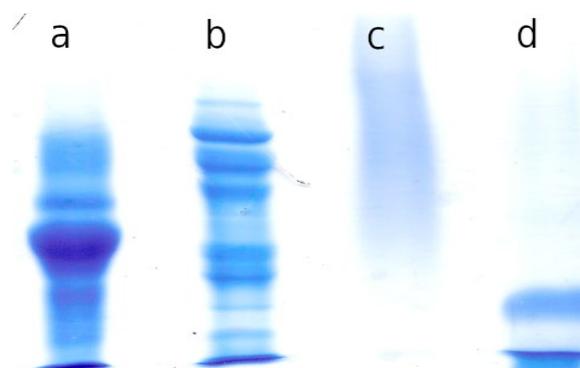


Figura 41. SDS - PAGE Fracciones de Cromatografía Fase Reversa Octilsilano
SDS - PAGE Fracciones cromatograma de la **Figura 47** Tiempo retención (t_R): a) 25 min, b) t_R :23 min, c) t_R : 2.5 min, d) t_R : 11.5 min.

El carril *b* es una mezcla de las diversas proteínas que forman el material comercial y que son similares a las observados en la **Figura 26**, el carril *c* corresponde al material no retenido, que pareciera ser una mezcla de proteínas de diverso peso molecular probablemente en agregados de las secciones hidrofóbicas (por lo que no interaccionan con la fase estacionaria), en el carril *d* finalmente se observa la presencia de una proteína de bajo peso molecular, probablemente proveniente de la proteólisis del material comercial.

11 Referencias

- [1] McKee T, McKee J, Araiza Martínez M, et al. *Bioquímica*. Third. México, 2014.
- [2] Structural Biology - Latest research and news | Nature, <https://www.nature.com/subjects/structural-biology> (2020, accessed 5 May 2020).
- [3] Berka K, Hobza P, Vondrášek J. Analysis of energy stabilization inside the hydrophobic core of rubredoxin. *ChemPhysChem* 2009; 10: 543–548.
- [4] Williamson M. *How Proteins Work*. New York: Garland Science, 2011.
- [5] Rose GD, Fleming PJ, Banavar JR, et al. A backbone-based theory of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16623–16633.
- [6] Op isomer. Dominio Público., https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Op_isomer.png (accessed 19 August 2020).
- [7] Dcrjsr, Rędzikowski A. Protein backbone dihedral angles phi, psi, and omega. Licencia bajo Creative Commons Attribution 3.0 unported., https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_backbone_PhiPsiOmega_drawing.svg (accessed 19 August 2020).
- [8] Dcrjsr. Ramachandran plot general 100K. Licencia Bajo Creative Commons Attribution 3.0 unported., https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ramachandran_plot_general_100K.jpg (accessed 19 August 2020).
- [9] Shafee T. Alpha beta structure (1). Licencia bajo Creative Commons Attribution Share - Alike 4.0 International., [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha_beta_structure_\(1\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha_beta_structure_(1).png) (accessed 19 August 2020).
- [10] Dcrjsr. Felix design model redRibbon. Licencia bajo Creative Commons Attribution 3.0 Unported., https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Felix_design_model_redRibbon.png (accessed 19 August 2020).
- [11] Yeats CA, Orengo CA. Evolution of Protein Domains. *Encycl Life Sci* 2007; 1–9.
- [12] Honda S, Akiba T, Kato YS, et al. Crystal structure of a ten-amino acid protein. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 15327–15331.
- [13] Dill KA. Adaptado de Funnel-shaped energy landscape. Licencia Creative Commons Attribution 4.0 International, https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AFunnel-shaped_energy_landscape.png.
- [14] Konieczny L, Brylinski M, Roterman I. Gauss-function-based model of hydrophobicity density in proteins. *In Silico Biol* 2006; 6: 15–22.

- [15] Bagchi B. Water dynamics in the hydration layer around proteins and micelles. *Chem Rev* 2005; 105: 3197–3219.
- [16] Gomez-Puyou A, Darzon A, Tuena de Gomez-Puyou M. *Biomolecules in Organic Solvents*. CRC Press, 1992.
- [17] Pdb Statistics, <https://www.rcsb.org/stats> (accessed 5 May 2020).
- [18] Parker MW. Protein Structure from X-Ray Diffraction. *J Biol Phys* 2003; 29: 341–362.
- [19] UnitCell. Dominio Público., <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:UnitCell.png> (accessed 19 August 2020).
- [20] Chan CDN. Loi de bragg. Licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported., https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Loi_de_bragg.png.
- [21] ARMICRON. Bragg diffraction. Dominio Público, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bragg_diffraction.svg (accessed 19 August 2020).
- [22] Dahl J. X-ray diffraction pattern 3clpro. Licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:X-ray_diffraction_pattern_3clpro.jpg (accessed 19 August 2020).
- [23] Howard GC, Brown WE. *Modern protein chemistry: practical aspects*. CRC press, 2001.
- [24] Sivek J. Real and reciprocal space unit vectors of graphene lattice. Licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Real_and_reciprocal_space_unit_vectors_of_graphene_lattice.svg (accessed 19 August 2020).
- [25] Ungar G, Chen Z, Zeng X. X-ray scattering. In: Lagerwall JPF, Scalia G (eds) *Liquid Crystals with Nano and Microparticles*. 2016, pp. 209–253.
- [26] Wiso. Ewald Sphere. Licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 3.0, https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Ewald_Sphere.svg (accessed 19 August 2020).
- [27] Drenth J. The Solution of the Phase Problem by the Isomorphous Replacement Method. In: *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer, 1999, pp. 129–179.
- [28] Rhodes G. From Diffraction Data to Electron Density. In: *Crystallography Made Crystal Clear*. 2006, pp. 91–107.
- [29] Electron Density Maps, <https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/resolution> (accessed 19 August 2020).
- [30] Rhodes G. Protein Crystals. In: *Crystallography Made Crystal Clear*. 2006, pp. 31–47.
- [31] Giegé R, Mikol V. Crystallogenesis of proteins. *Trends Biotechnol* 1989; 7: 277–282.
- [32] McPherson A. Introduction to protein crystallization. *Methods* 2004; 34: 254–265.

- [33] Sean. Protein crystallization phase diagram. Dominio Público, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_crystallization_phase_diagram.png (accessed 19 August 2020).
- [34] Chayen NE. Turning protein crystallisation from an art into a science. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 577–583.
- [35] Schröder C. Proteins in ionic liquids: current status of experiments and simulations. In: *Ionic Liquids II*. Springer, 2017, pp. 127–152.
- [36] García-Ruiz JM. Nucleation of protein crystals. *J Struct Biol* 2003; 142: 22–31.
- [37] Gibbs JW. Equilibrium of Heterogenous Substances. *Am J Sci* 1878; 16: 441–458.
- [38] Frenkel J. A general theory of heterophase fluctuations and pretransition phenomena. *J Chem Phys* 1939; 7: 538–547.
- [39] Sear R. Plot of classical nucleation theory prediction for the free energy of a nucleus as a function of radius. Licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plot_of_classical_nucleation_theory_prediction_for_the_free_energy_of_a_nucleus_as_a_function_of_radius.png (accessed 19 August 2020).
- [40] Bonn D, Shahidzadeh N. Multistep crystallization processes: How not to make perfect single crystals. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113: 13551–13553.
- [41] McPherson A, Kuznetsov YG. Mechanisms, kinetics, impurities and defects: Consequences in macromolecular crystallization. *Acta Crystallogr Sect FStructural Biol Commun* 2014; 70: 384–403.
- [42] Haas C, Drenth J. The Interface between a Protein Crystal and an Aqueous Solution and Its Effects on Nucleation and Crystal Growth. *J Phys Chem B* 2000; 104: 368–377.
- [43] Gavira JA, Otálora F, González-Ramírez LA, et al. On the quality of protein crystals grown under diffusion mass-transport controlled regime (i). *Crystals* 2020; 10: 1–13.
- [44] Adenosine. CrystalDrops, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CrystalDrops.svg> (accessed 5 May 2020).
- [45] Moreno A, Bolaños-García VM, Soriano M. The Influence of Dielectric Constant upon Protein Crystallization by Dynamic Light Scattering Investigations. *J Biomol Techniques* 1998; 9: 18–20.
- [46] Kinugasa T, Kondo A, Mouri E, et al. Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution. *Sep Purif Technol* 2003; 31: 251–259.
- [47] Earle MJ, Esperança JMSS, Gilea MA, et al. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* 2006; 439: 831–834.

- [48] Collins KD. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. *Biophys Chem* 2006; 119: 271–281.
- [49] Schröder C. Aqueous mixture of aprotic ionic liquids, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5480425/figure/Fig2/> (accessed 5 May 2020).
- [50] Walden P. Über die Molekulargrösse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzener Salze. *Bull Acad Imper Sci* 1914; 8: 405–422.
- [51] Silva M, Figueiredo AM, Cabrita EJ. Epitope mapping of imidazolium cations in ionic liquid-protein interactions unveils the balance between hydrophobicity and electrostatics towards protein destabilisation. *Phys Chem Chem Phys* 2014; 16: 23394–23403.
- [52] Lange C, Patil G, Rudolph R. Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(ω -hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides. *Protein Sci* 2005; 14: 2693–2701.
- [53] Kaar JL, Jesionowski AM, Berberich JA, et al. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 4125–4131.
- [54] De Diego T, Lozano P, Abad MA, et al. On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. *J Biotechnol* 2009; 140: 234–241.
- [55] Ha SH, Lee SH, Dang DT, et al. Enhanced stability of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Korean J Chem Eng* 2008; 25: 291–294.
- [56] Kumar A, Venkatesu P. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? *Int J Biol Macromol* 2014; 63: 244–253.
- [57] Toral AR, de los Ríos AP, Hernández FJ, et al. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids. *Enzyme Microb Technol* 2007; 40: 1095–1099.
- [58] Wijaya EC, Separovic F, Drummond CJ, et al. Stability and activity of lysozyme in stoichiometric and non-stoichiometric protic ionic liquid (PIL)-water systems. *J Chem Phys* 2018; 148: 193838.
- [59] Schröder C. Law of matching affinity, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5480425/figure/Fig4/> (accessed 5 May 2020).
- [60] Hofmeister F. Zur lehre von der wirkung der salze. *Arch für Exp Pathol und Pharmakologie* 1888; 25: 1–30.
- [61] Hyde AM, Zultanski SL, Waldman JH, et al. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Org Process Res Dev* 2017; 21: 1355–1370.
- [62] Mazzini V, Craig V. Hofmeister series, https://pubs.rsc.org/image/article/2017/sc/c7sc02691a/c7sc02691a-f1_hi-res.gif (accessed 7 September 2020).

- [63] Kobayashi T, Reid JESJ, Shimizu S, et al. The properties of residual water molecules in ionic liquids: A comparison between direct and inverse Kirkwood-Buff approaches. *Phys Chem Chem Phys* 2017; 19: 18924–18937.
- [64] Schröder C. Interactions of the Solvent Species with the Protein Surface at Higher Ion Concentrations, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5480425/figure/fig6/> (accessed 5 May 2020).
- [65] Nordwald EM, Plaks JG, Snell JR, et al. Crystallographic Investigation of Imidazolium Ionic Liquid Effects on Enzyme Structure. *ChemBioChem* 2015; 16: 2456–2459.
- [66] Kowacz M, Mukhopadhyay A, Carvalho AL, et al. Hofmeister effects of ionic liquids in protein crystallization: Direct and water-mediated interactions. *CrystEngComm* 2012; 14: 4912–4921.
- [67] Yu X, Tian N, Huang F, et al. Evaluating the role of ionic liquids (ILs) in the crystallization of lysozyme. *J Mol Liq* 2019; 296: 112018.
- [68] Wang Z, Wang Q, Dang L. Ionic liquids as selectors for controlling the crystallization nucleation of hen egg white lysozyme. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2012; 17: 1025–1030.
- [69] Judge RA, Takahashi S, Longenecker KL, et al. The Effect of Ionic Liquids on Protein Crystallization and X-ray Diffraction Resolution. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 3463–3469.
- [70] Stefan CS, Oana C, Geta C, et al. Imidazolium octanoate carboxylate as new branching agent in lysozyme crystallization. *Rev Chim* 2014; 65: 934–938.
- [71] Garlitz JA, Summers CA, Flowers RA, et al. Ethylammonium nitrate: A protein crystallization reagent. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 1999; 55: 2037–2038.
- [72] Hekmat D, Hebel D, Joswig S, et al. Advanced protein crystallization using water-soluble ionic liquids as crystallization additives. *Biotechnol Lett* 2007; 29: 1703–1711.
- [73] Coelho C, Trincão J, João Romão M. The use of ionic liquids as crystallization additives allowed to overcome nanodrop scaling up problems: A success case for producing diffraction-quality crystals of a nitrate reductase. *J Cryst Growth* 2010; 312: 714–719.
- [74] Jaeger VW, Pfaendtner J. Structure, dynamics, and activity of xylanase solvated in binary mixtures of ionic liquid and water. *ACS Chem Biol* 2013; 8: 1179–1186.
- [75] Belviso BD, Caliandro R, Salehi SM, et al. Protein Crystallization in Ionic-Liquid Hydrogel Composite Membranes. *Crystals* 2019; 9: 253.
- [76] Kowacz M, Marchel M, Juknaite L, et al. Ionic-liquid-functionalized mineral particles for protein crystallization. *Cryst Growth Des* 2015; 15: 2994–3003.
- [77] Blake C, Koenig D, Mair G, et al. The three-dimensional structure of hen eggwhite

- lysozyme. *Nature* 1965; 206: 757–761.
- [78] Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog* 2017; 13: 1–22.
- [79] Brinkmann C, Weiss MS, Weckert E. The structure of the hexagonal crystal form of hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2006; 62: 349–355.
- [80] Collyer CA, Henrick K, Blow DM. Mechanism for aldose-ketose interconversion by d-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift. *J Mol Biol* 1990; 212: 211–235.
- [81] Takeuchi S, Geraldine J, Mala S. Understanding Structural Features of Microbial Lipases—An Overview. *Anal Chem Insights* 2008; 3: 9–19.
- [82] Ericsson DJ, Kasrayan A, Johansson P, et al. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. *J Mol Biol* 2008; 376: 109–119.
- [83] Xie Y, An J, Yang G, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *J Biol Chem* 2014; 289: 7994–8006.
- [84] Grochulski P, Li Y, Schrag JD, et al. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci* 1994; 3: 82–91.
- [85] Pernas MA, Pastrana L, Fuciños P, et al. Regulation of the interfacial activation within the *Candida rugosa* lipase family. *J Phys Org Chem* 2009; 22: 508–514.
- [86] Rivero C, Palomo J. *Candida Rugosa* lid., https://www.mdpi.com/catalysts/catalysts-06-00115/article_deploy/html/images/catalysts-06-00115-g001.png (accessed 19 August 2020).
- [87] Pusey ML, Paley MS, Turner MB, et al. Protein Crystallization Using Room Temperature Ionic Liquids. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 787–793.
- [88] Hebel D, Ürdingen M, Hekmat D, et al. Development and scale up of high-yield crystallization processes of lysozyme and lipase using additives. *Cryst Growth Des* 2013; 13: 2499–2506.
- [89] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
- [90] Noble JE, Bailey MJA. Quantitation of Protein. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc., pp. 73–95.
- [91] McMurry J. *Organic chemistry with biological applications*. Belmont, CA, 2011.
- [92] Pliego-Arreaga R, Regalado C, Amaro-Reyes A, et al. Revista Mexicana de Ingeniería Química. *Rev Mex Ing Química* 2013; 12: 505–511.
- [93] Lienqueo ME, Mahn A, Salgado JC, et al. Current insights on protein behaviour in

- hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007; 849: 53–68.
- [94] Cummins P, Oonagh D, O'Connor B. on-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian Prolyl Oligopeptidase. *Protein Chromatogr Methods Protoc* 2011; 681: 215–227.
- [95] Grant ML. Effects of thermodynamic nonideality in protein crystal growth. *J Cryst Growth* 2000; 209: 130–137.
- [96] Lambert JB, Mazzola EP, Ridge CD. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods*. John Wiley & Sons, 2019.
- [97] Ni F, Scheraga HA. Use of the Transferred Nuclear Overhauser Effect To Determine the Conformations of Ligands Bound to Proteins. *Acc Chem Res* 1994; 27: 257–264.
- [98] Howard M. Protein NMR spectroscopy. *Curr Biol* 2001; 8: R331–R333.
- [99] Marchetti R, Perez S, Arda A, et al. “Rules of Engagement” of Protein–Glycoconjugate Interactions: A Molecular View Achievable by using NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *ChemistryOpen* 2016; 5: 274–296.
- [100] Wilson WW. Monitoring crystallization experiments using dynamic light scattering: Assaying and monitoring protein crystallization in solution. *Methods* 1990; 1: 110–117.
- [101] Onnes HK. Expression of the equation of state of gases and liquids by means of series. *KNAW Proc* 1902; 4: 125–147.
- [102] Saluja A, Fesinmeyer RM, Hogan S, et al. Diffusion and sedimentation interaction parameters for measuring the second virial coefficient and their utility as predictors of protein aggregation. *Biophys J* 2010; 99: 2657–2665.
- [103] Yadav S, Scherer TM, Shire SJ, et al. Use of dynamic light scattering to determine second virial coefficient in a semidilute concentration regime. *Anal Biochem* 2011; 411: 292–296.
- [104] Mann S, Heywood BR, Rajam S, et al. Structural and stereochemical relationships between langmuir monolayers and calcium carbonate nucleation. *J Phys D Appl Phys* 1991; 24: 154–164.
- [105] Capetti E, Ferretti AM, Santo VD, et al. Surfactant-controlled composition and crystal structure of manganese(II) sulfide nanocrystals prepared by solvothermal synthesis. *Beilstein J Nanotechnol* 2015; 6: 2319–2329.
- [106] Van Tilbeurgh H, Sarda L, Verger R, et al. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature* 1992; 359: 159–162.
- [107] Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida*

- antarctica. *Structure* 1994; 2: 293–308.
- [108] Liu J, Yang Q, Li C. Towards efficient chemical synthesis via engineering enzyme catalysis in biomimetic nanoreactors. *Chem Commun* 2015; 51: 13731–13739.
- [109] Hekmat D, Hebel D, Schmid H, et al. Crystallization of lysozyme: From vapor diffusion experiments to batch crystallization in agitated ml-scale vessels. *Process Biochem* 2007; 42: 1649–1654.
- [110] Liu Y, Wang X, Ching CB. Toward further understanding of lysozyme crystallization: Phase diagram, protein-protein interaction, nucleation kinetics, and growth kinetics. *Cryst Growth Des* 2010; 10: 548–558.
- [111] Liang M, Jin F, Liu R, et al. Shape evolution and thermal stability of lysozyme crystals: Effect of pH and temperature. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013; 36: 91–99.
- [112] Van Driessche AES, Van Gerven N, Bomans PHH, et al. Molecular nucleation mechanisms and control strategies for crystal polymorph selection. *Nature* 2018; 556: 89–94.
- [113] Chow G. Tests of Equality Between Sets of Coefficients in Two Linear Regressions. *Econometrica* 1960; 28: 591–605.
- [114] Qiu SR. Crystal Growth for Beginners. Fundamentals of Nucleation, Crystal Growth and Epitaxy, Edited by Ivan V Markov. World Scientific, 2017. Pp. 632. Hardback. Price GBP 123.00. ISBN 978-981-3143-42-5. *Acta Crystallogr Sect B, Struct Sci Cryst Eng Mater*; 75.
- [115] Bhunia A, Bhattacharjya S, Chatterjee S. Applications of saturation transfer difference NMR in biological systems. *Drug Discov Today* 2012; 17: 505–513.
- [116] Wolfe DM, Schreiner PR. Oxidative desulfurization of azole-2-thiones with benzoyl peroxide: Syntheses of ionic liquids and other azolium salts. *European J Org Chem* 2007; 2825–2838.
- [117] Gruber CC, Pleiss J. Lipase B from *Candida antarctica* binds to hydrophobic substrate-water interfaces via hydrophobic anchors surrounding the active site entrance. *J Mol Catal B Enzym* 2012; 84: 48–54.
- [118] Trodler P, Nieveler J, Rusnak M, et al. Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 2008; 1179: 161–167.