

70
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CRISTALOGÉNESIS DE LA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
Entamoeba histolytica

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ADRIÁN KORNHAUSER EISENBERG



DIRECTOR DE TESIS: DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO

1999

27-7-99

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Cristalogénesis de la Triosafosfato Isomerasa de Entamoeba histolytica.

realizado por Adrián Kornhauser Eisenberg

con número de cuenta 9251682-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco. *[Firma]*

Propietario Dra. Adela Rodríguez Romero. *[Firma]*

Propietario Dra. Georgina Garza Ramos. *[Firma]*

Suplente Dra. Luisa Alba Lois. *[Firma]*

Suplente Biol. María Elena Chánez Cárdenas. *[Firma]*

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

[Firma]

Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, con el apoyo de CONACyT (Proyecto 04510P-N)

A mis padres Rose y Luis.

**Por el inmenso apoyo que me han brindado siempre.
Sobretudo por tener paciencia, mientras buscaba mi camino.**

A mi hermano.

**Por las recomendaciones tan valiosas,
por sus regaños a veces necesarios y por soportar mis alaridos matinales.**

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular a las Facultades de Medicina y de Ciencias.

A los integrantes del jurado: Dr. Alejandro Fernández Velasco, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Georgina Garza Ramos, Dra. Luisa Alba Lois, y Biol. María Elena Chánez Cárdenas por la revisión del presente trabajo.

En particular al Dr. Alejandro Fernandez Velasco por haberme permitido formar parte de su equipo, por su interés, su paciencia sin límites, y por su amistad.

A Edgar, Hugo y a María Elena por haberme guiado en el extremadamente tortuoso camino de escribir una tesis, así como por aguantar, durante la escritura de la tesis, algunos berrinches, mujidos, convulsiones y expresiones de desesperación en general. Especialmente les agradezco por ser mis amigos.

A la Dra. Adela Rodríguez y al Dr. Eduardo Horjales por su colaboración y por su amplia participación, particularmente en la parte de difracción de Rayos X.

Al Dr. Ernesto Maldonado, por su ayuda invaluable en este trabajo.

Al Dr. Mario Calcagno y a los integrantes del laboratorio 6, por sus sabios consejos... y su impresora a color.

A la Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica* por haber cristalizado y al cristal por haber difractado.

A los Doctores Marieta Tuena y Armando Gomez-Puyou por ser una inspiración y un ejemplo a seguir.

A los integrantes del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Durante mis estudios de licenciatura goce de una beca otorgada por CONACyT para la realización de la presente tesis.

INDICE

INDICE	1
RESUMEN.....	3
ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCION.....	5
<i>ENTAMOEBA HISTOLYTICA</i> :	5
LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA:.....	6
LA ESTRUCTURA DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE <i>ENTAMOEBA HISTOLYTICA</i> :.....	7
DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE UNA PROTEÍNA	9
¿Como se determina la estructura de una proteína?	9
¿Que es un cristal de proteína?	10
El proceso de Cristalización de una proteína:	12
Metodología utilizada para cristalizar la TIMA:	13
CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN DE LA TIM:	17
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y METODOS.....	21
REACTIVOS:	21
PURIFICACIÓN:	21
MÉTODO DE CRISTALIZACIÓN	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
ALINEACIÓN DE SECUENCIAS:.....	24
MUESTREOS:	30
Muestreo Inicial con el juego de soluciones "Crystal Screen" de Hampton Research (parte I):	30
Muestreo con PEG1500:	31
Muestreo con precipitante PEG 1500 y aditivos (parte I):.....	35
Muestreo con el juego de soluciones "Crystal Screen" de Hampton Research (parte II):	37
Muestreo con precipitante PEG 1500 y aditivos (parte II):	39
Muestras variados:	40
SEMBRADO DE CRISTALES:	43
DIFRACCIÓN DE ALGUNOS CRISTALES:	45
CONCLUSIONES:	50

PERSPECTIVAS:	52
REFERENCIAS:	53
APENDICE A	56

RESUMEN

Conocer la estructura tridimensional de las enzimas, se ha convertido en un requerimiento esencial para permitir estudios avanzados sobre las mismas. La observación de la posición de los residuos en el espacio molecular, permite una mejor comprensión de los mecanismo de catálisis, inhibición o activación; contribuye además al diseño de nuevos experimentos para investigaciones tanto básicas como aplicadas. Por ejemplo, el resultado de experimentos que involucran mutaciones de aminoácidos, o el estudio de mecanismos de inhibición de las enzimas, están directamente vinculados con la estructura tridimensional, y los cambios que se producen sobre ésta. Por lo tanto, un análisis previo de la estructura, permite mejorar el enfoque de los experimentos, y una mejor interpretación de los resultados de los mismos.

A la fecha, el método mas común para obtener la estructura de una enzima, es la difracción de rayos-X de un cristal de la enzima en cuestión. La cristalización de proteínas es un fenómeno que aún no se conoce bien, por lo tanto, el método para obtener un cristal que difracte es un tanto empírico. En esta tesis exponemos el proceso a través del cual, encontramos condiciones bajo las cuales la TIM (Triosafosfato Isomerasa) de *Entamoeba histolytica* forma cristales.

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

2PG: Fosfoglicolato

TIM: Triosafosfato Isomerasa

TIMA: Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica*.

PGH: Fosfoglicohidroxamato

TcTIM: Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi*

TbTIM: Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei*

PEG: Polietilen Glicol

PGA: Ácido Fosfoglicólico

INTRODUCCION

***Entamoeba histolytica*:**

El protista *Entamoeba histolytica* es responsable de aproximadamente 100,000 muertes anuales y es considerado la segunda causa de mortandad a nivel mundial por enfermedades parasíticas en humanos (WHO Weekly Epidemiological Report , 1997). La transmisión del parásito se realiza por quistes a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados por heces fecales. *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la amibiasis, los quistes germinan en el intestino grueso, y los protistas crecen sobre y dentro de las células de la mucosa intestinal, causando diarrea y espasmos intestinales severos. A continuación la diarrea se convierte en disentería, caracterizada por la defecación de exudados intestinales, como sangre y mucosa. Si no es tratada adecuadamente, los trofozoitos (estado anaerobio y sin mitocondrias de *E. histolytica*) pueden migrar al hígado, pulmón y cerebro, en donde pueden formar abscesos y otros daños a los tejidos. Se han detectado curas espontáneas de la enfermedad, lo cual significa que el sistema inmune juega un papel importante en la terminación del padecimiento. Sin embargo, la reinfección es común, lo cual indica que no hay inmunidad adquirida (Madigan Martinko Parker 1987). La amibiasis puede ser tratada con drogas a base de metronidazol o cloriquina, que actúan a nivel de la vía glucolítica (Marr y Müller 1995). Estas drogas no siempre son efectivas, (Madigan Martinko Parker 1987) *E. histolytica* desarrolla resistencia al ser expuesta en dosis crecientes, a fármacos como el metronidazol (Samarawickrema N.A. et al, 1997) y la emetina. A la fecha no se ha reportado la estructura tridimensional de proteínas de *E. histolytica*.

La Triosafosfato Isomerasa:

El obtener la estructura tridimensional de las enzimas de los organismos que son patógenos para el ser humano, ha contribuido al diseño de algunas drogas (Kuntz I.D. 1994). *Entamoeba histolytica* es un organismo anaerobio y sin mitocondrias, cuya vía principal de extracción de energía es la glucólisis. Por esto último, las enzimas de esta vía son excelentes blancos para el diseño de drogas contra estos organismos. Debido a esto, varios estudios se han enfocado a obtener la estructura a alta resolución de la Triosafosfato Isomerasa (TIM) de parásitos como *Plasmodium falciparum* (Velanker *et al.* 1997) y *Trypanosoma brucei brucei* (Wierenga *et al.*, 1991). Entre los trabajos más recientes se encuentra el de Maldonado *et al.* (1998). En este último se resolvió y subsecuentemente se estudió la estructura de la TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), para comprender porqué esta enzima, es 100 veces más sensible que la TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) a la inhibición por compuestos que modifican grupos sulfhidrilos. Estos compuestos interaccionan con un residuo de cisteína localizado en la interfase entre los dos monómeros, induciendo la inhibición tanto de TcTIM como de TbTIM. Este residuo presenta un gran interés para el diseño de fármacos, ya que es un aminoácido no conservado que sólo está presente en varios parásitos como *T. cruzi*, *T. brucei*, y *E. histolytica*. Debido a esto, un fármaco que inhiba a la TIM de los parásitos a través de este mecanismo, no inhibiría a la TIM de humano.

En este trabajo estudiamos la cristalización de la Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica* (TIMA). La estructura de esta enzima es interesante por su posición en la ruta metabólica del organismo, ya que un fármaco que inhiba a esta enzima podría funcionar como un agente de control muy efectivo.

La Estructura de la Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica*:

La estructura primaria de la TIMA presenta ciertas peculiaridades con respecto a las TIMs de otros organismos, lo cual hace que la estructura tridimensional de esta enzima sea interesante por sí misma. En los organismos mesófilos, la TIM es una enzima homodimérica (Figura 1), cada monómero se pliega a lo largo de la cadena polipeptídica alternando una o dos α hélices, con una hebra β , separadas entre sí por un asa flexible. La proteína se pliega de manera que las hebras β se acomodan paralelamente en una hoja β central, formando un barril. Éste, se encuentra rodeado por α hélices como una segunda capa del barril. Por esto último, esta enzima pertenece a la familia de los barriles α/β . En los extremos del barril, encontramos el conjunto de asas que unen los dos tipos de estructura secundaria. El sitio activo, y las regiones de contacto entre los monómeros, se encuentran en las asas flexibles del extremo carboxilo terminal del barril. A la fecha se conocen las estructuras tridimensionales de la TIM de nueve especies así como varias mutantes.

A partir de la secuencia de aminoácidos de TIMA, y la alineación de ésta con otras seis secuencias de TIM, A. Landa *et al.* (1997) se localizaron catorce inserciones en la secuencia de TIMA. Al observarlas sobre el modelo tridimensional de la estructura de TIMA (obtenido por reemplazo molecular y minimización de energía), encontraron que trece inserciones se localizan en la misma región de la superficie molecular, y pertenecen a las asas que se encuentran en el extremo no catalítico del barril (Figura 1).

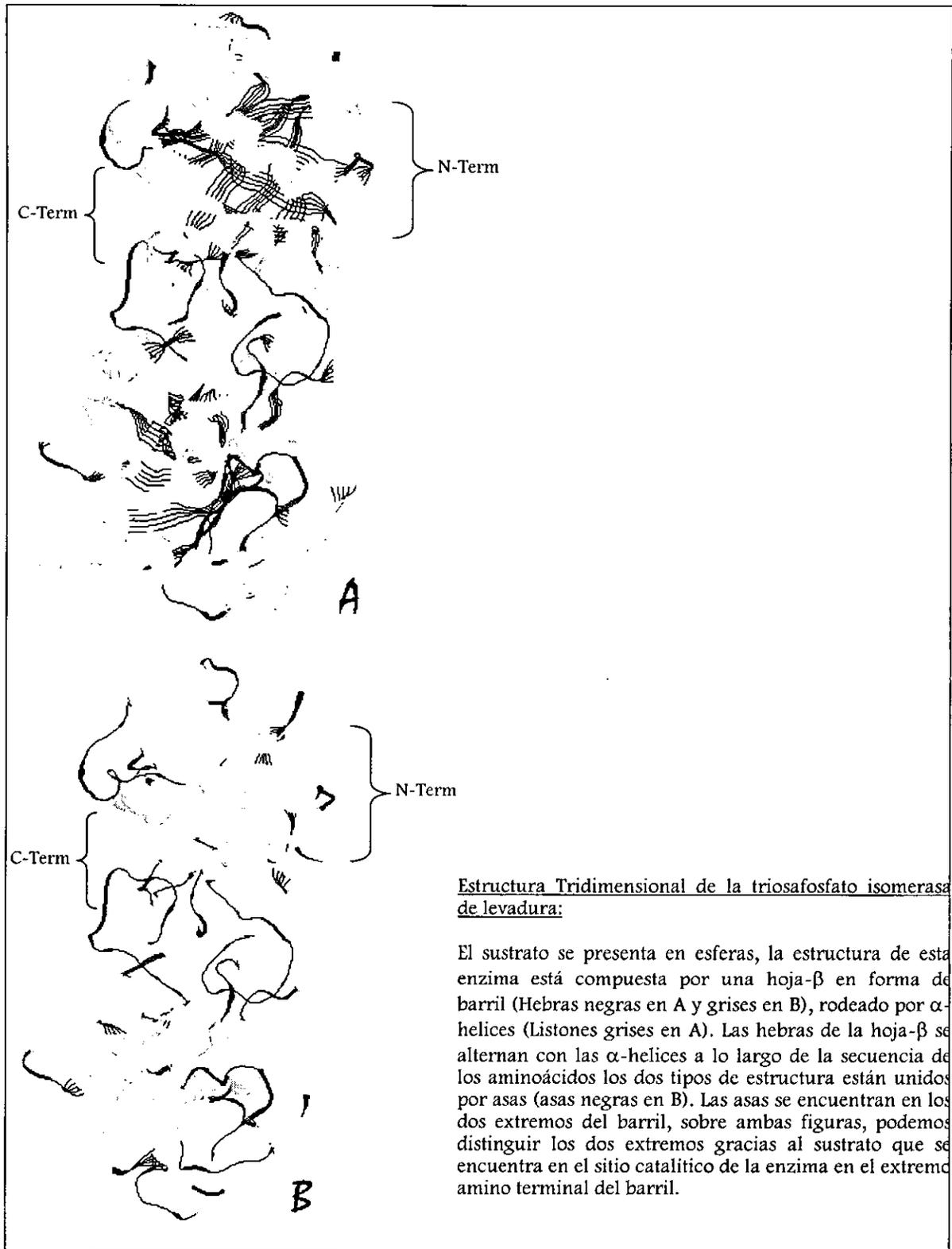


Figura 1

Determinación de la estructura tridimensional de una proteína

¿Como se determina la estructura de una proteína?

La función de una proteína está determinada principalmente por su estructura tridimensional, ésta a su vez se encuentra determinada por la secuencia de aminoácidos codificada en el ADN. Se sabe que las proteínas adoptan una conformación tridimensional predominante, que es la más estable en términos termodinámicos. Aún sabiendo esto, no han sido dilucidados los mecanismos a través de los cuales, las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos se suman hasta obtener una conformación recurrente. Ya que la segunda parte del código genético no ha sido resuelta, la secuencia de aminoácidos de una proteína no es suficiente para predecir su estructura tridimensional a detalle. Por lo tanto, para obtener la estructura tridimensional de una proteína, se utilizan principalmente la Difracción de Rayos X y la Resonancia Magnética Nuclear. Estas técnicas brindan la información necesaria, para conocer las distancias y posiciones relativas de todos los átomos de la molécula. Conocer la estructura de una proteína permite comprender su funcionamiento a escala molecular, de manera mucho más íntima. Además de que esta información es valiosa para la investigación básica, también se utiliza en el diseño de fármacos y en otras áreas. Existen bancos de datos especializados en el almacenamiento y organización de esta información, a la cual se puede tener acceso a través de Internet. De esta forma, miles de estructuras ya están disponibles para ser consultadas por investigadores, desde cualquier parte del mundo. Este trabajo representa la primera parte del proceso de obtención de la estructura de la Triosafosfato Isomerasa de la Amiba (*Entamoeba histolytica*). En este trabajo, buscamos obtener un cristal de nuestra proteína, con las características adecuadas para su uso en Difracción de Rayos X.

¿Que es un cristal de proteína?

La palabra cristal deriva de la palabra griega “krustallos” que significa “hielo claro”(Ducruix y Giege 1992, Capítulo 1). Por lo general, cualquier sustancia en su forma cristalina tiene una apariencia brillante y transparente, semejante a la del cuarzo. Esta apariencia es considerada la típica de los cristales. Por lo general, cuando una molécula está en forma pura puede ser cristalizada. Obtener el cristal de una molécula, significa tener a ésta en una fase sólida y estable, de tal forma que las partículas se encuentren razonablemente bien ordenadas. A escala molecular, los cristales son arreglos periódicos tridimensionales de átomos, iones, moléculas o arreglos de moléculas. Un cristal ideal puede ser imaginado como un arreglo infinito y perfecto, en el cual las unidades constitutivas (las unidades asimétricas) están acomodadas de acuerdo a simetrías bien definidas (formando así los 230 grupos espaciales) en celdas unitarias que se repiten en las tres dimensiones por translación(Ducruix y Giege 1992, Capítulo 1) (Figura2). Cabe mencionar que el número de grupos espaciales para proteínas es de 65 únicamente, debido a que los aminoácidos que las conforman son todas de tipo L.

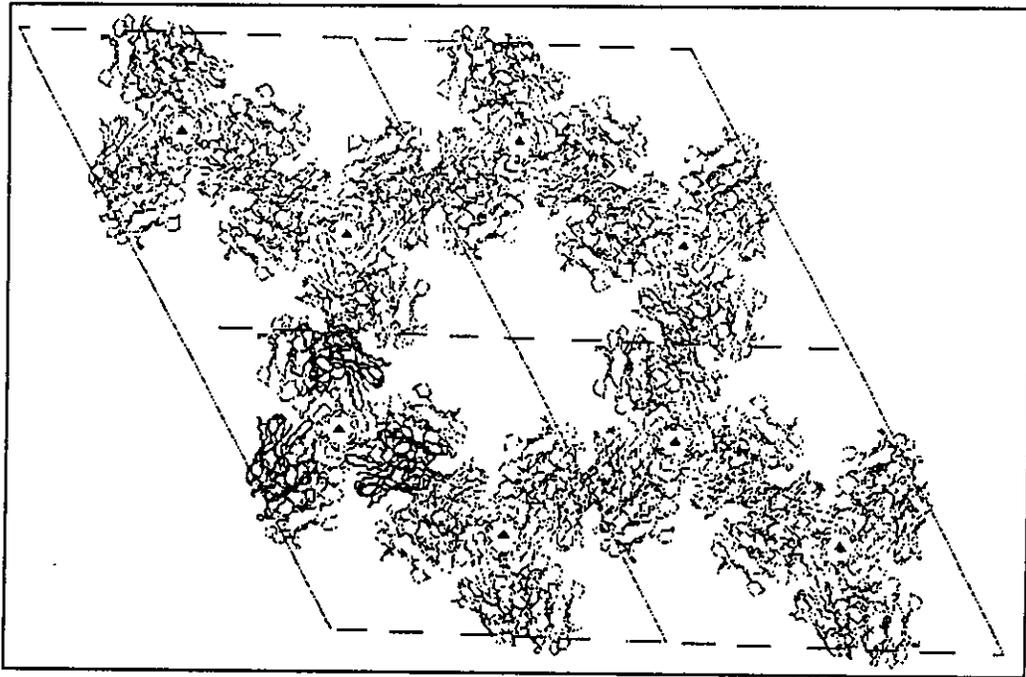


Figura 2: Estructura de un cristal de inmunoglobulina, podemos observar 4 celdas unitarias y dentro de estas las unidades asimétricas que se repiten a lo largo de la matriz del cristal.

En cristales de moléculas inorgánicas pequeñas como el cloruro de sodio, las fuerzas que unen a las moléculas son muy grandes, ya que el cristal está constituido por elementos pequeños. Por lo general la obtención de cristales a partir de estas sustancias, es bastante sencilla. En el caso del agua, se obtienen cristales simplemente bajando la temperatura del compuesto. Los cristales de macromoléculas por su parte, son generalmente pequeños y con volúmenes que rara vez exceden los 10mm^3 (Ducruix y Giege 1992, Capítulo 1). Por lo tanto, deben ser examinados bajo el microscopio estereoscópico. A diferencia de los cristales de sal o de moléculas más pequeñas, los cristales de macromoléculas son muy frágiles y sensibles a condiciones externas (temperatura, fuerza iónica, etc.). Esto se debe a su gran contenido de disolvente y a los enlaces débiles entre macromoléculas (Creighton, 1990). Estas propiedades son ventajosas: a diferencia de los cristales de sal que pueden formarse en experimentos de cristalización, los cristales de macromoléculas son frágiles, y pueden ser fácilmente identificados, ya que estos se quiebran al tocarlos

con la punta de una aguja. Por otro lado, el alto contenido de disolvente en los cristales de proteína, presenta grandes ventajas ya que los canales de solvente en la matriz del cristal, permiten la difusión de moléculas como substrato o análogos del substrato (Creighton, 1990). El hecho de que algunos cristales presenten actividad catalítica, significa que las estructuras tridimensionales derivadas de estos cristales, pueden ser consideradas como nativas (Ducruix y Giege 1992, Capítulo 1).

El proceso de Cristalización de una proteína:

El proceso de cristalización comienza con la formación de agregados de proteína, cuyas interacciones intermoleculares son similares a las de un cristal. En el momento en el que estos agregados llegan a una cierta masa crítica, y forman un centro de nucleación estable, el crecimiento del cristal se lleva a cabo gracias a la adición de proteína de forma ordenada a la matriz del cristal. Existen varios métodos para cristalizar macromoléculas biológicas, pero todos se basan en el mismo principio, que consiste en llevar la solución de macromoléculas a un estado de supersaturación. Este último está en función de la concentración de la macromolécula y los parámetros que afectan su solubilidad.

En la figura 3 podemos observar el diagrama de fase para la solubilidad de una proteína. La curva de solubilidad, divide el espacio de fase en una región de supersaturación que permite la cristalización, y una región no saturada, donde los cristales se disuelven. La curva de supersolubilidad, divide la región de supersaturación en una región de supersaturación alta o zona lábil en la cual se dan las condiciones de nucleación y crecimiento, y una zona de supersaturación baja en la cual solo se dan condiciones de crecimiento. Podemos observar que conforme aumenta la concentración de macromolécula, la supersaturación ocurre con menores valores del factor que disminuye la solubilidad de la macromolécula, como podría ser la concentración de precipitante.

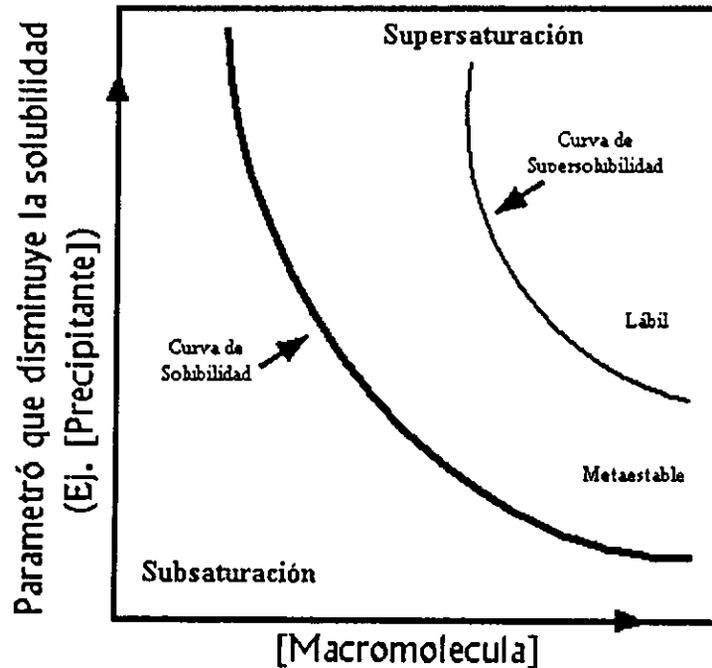


Figura 3: Diagrama de fase. Observamos como la curva de solubilidad divide el espacio de fase de en zonas de Super y Subsaturación. La zona de supersaturación está dividida en la fase lábil que favorece la nucleación y el crecimiento de cristales, y la fase metaestable que solo favorece el crecimiento.

Metodología utilizada para cristalizar la TIMA:

La cristalización de proteínas es un fenómeno poco previsible, y por esto es uno de los pasos limitantes en la determinación de la estructura de estas moléculas. Es necesario obtener un monocristal, de por lo menos 0.2 mm en su dimensión más pequeña. Los cristales de proteína pueden crecer de forma imperfecta, tales cristales no son utilizables para difracción por rayos X. Este es el caso de cristales gemelos (Figura 4), donde pueden observarse varios cristales creciendo unos sobre otros. Otro caso similar es el de crecimiento de "erizos" (Figura 5) donde se observan varios cristales en forma de aguja, que inician su crecimiento a partir de un punto común.



Figura 4: Cristales gemelos de colagenasa. (Tomado de Ducruix y Giege 1992, Capítulo 1)



Figura 5: Cristales en forma de erizo de aspartyl-tRNA synthetasa (Tomado de Ducruix y Giege 1992, Capítulo 1)

Los factores que afectan la solubilidad de la proteína, modifican el comportamiento de una proteína en su forma de cristalizar (Weber *et. al*/1997); destacan la concentración de la proteína, el precipitante utilizado y su concentración, la temperatura a la cual se mantienen las muestras durante la cristalización y el pH. Para obtener un cristal adecuado para la difracción de Rayos X, es necesario probar diferentes combinaciones de los factores antes mencionados.

El método mas utilizado para el crecimiento de cristales de proteína, consiste en diluirla en una solución acuosa que contenga precipitantes, como sulfato de amonio o polietilen glicol, a una concentración justo por debajo de la necesaria para que la proteína esté en condiciones de supersaturación. Luego se evapora el agua lentamente para llegar gradualmente a las condiciones de supersaturación en la zona lábil, y favorecer tanto la formación de núcleos cristalinos, como el crecimiento de los cristales. Al crecer el cristal, la concentración de proteína en solución disminuye, y pasa a la zona metastable del diagrama de fase, en donde el cristal crece hasta que se alcanza un equilibrio entre la

velocidad a la cual las macromoléculas se agregan a la matriz cristalina, y la velocidad a la cual el cristal se solubiliza en el medio(Weber P.C. 1997).

Una técnica muy utilizada es la difusión de vapor. Consiste en permitir, dentro de un recipiente cerrado, que una pequeña cantidad de solución con precipitante y proteína, llegue al equilibrio con un reservorio que contiene solución precipitante a una concentración óptima para producir cristales. Un ejemplo de esta técnica es el “método de la gota colgante” (Ducruix y Giege 1992, Capítulo 4) (Figura 6). Este protocolo consiste en hacer una solución compuesta de 50 % de solución de proteína, y 50 % del precipitante vaciado previamente en el pozo. Por lo general no se usan mas de 25 μ l de cada uno. La concentración de precipitante en la gota al inicio, es de aproximadamente 50% de la necesaria para la cristalización de la proteína. Esta solución se suspende como gota sobre un cubreobjetos, con el cual se sella el pozo con el precipitante, utilizando grasa de vacío. El resultado de la difusión de vapor, es la transferencia de agua de la solución de proteína en la gota, hacia el pozo lleno de precipitante. Este proceso continúa, hasta alcanzar el equilibrio, cuando la presión de vapor en ambas soluciones, gota y pozo, es la misma(Ducruix y Giege 1992, Capítulo 4). En la figura 7 podemos observar la trayectoria temporal de la gota en el diagrama de fase. Cuando la trayectoria es óptima es posible obtener cristales de la proteína. Como ya se mencionó anteriormente, a la fecha no se comprende en su totalidad el proceso de cristalización de las proteínas, por esta razón, la selección del precipitante y de las concentraciones que se utilizan inicialmente, se basan en muestreos hechos con juegos de soluciones comerciales (kits). Estos últimos, contienen diversas soluciones, que representan condiciones de cristalización seleccionadas empíricamente, a través de una revisión bibliográfica de las condiciones exitosas de cristalización (Jarmilla J. *et al.*, 1991). La selección de las condiciones en el kit, se hace con base en el método de factorial incompleto. Este permite el muestreo al azar,

de forma que las condiciones muestreadas, se distribuyan homogéneamente en el universo de condiciones previamente recopiladas.

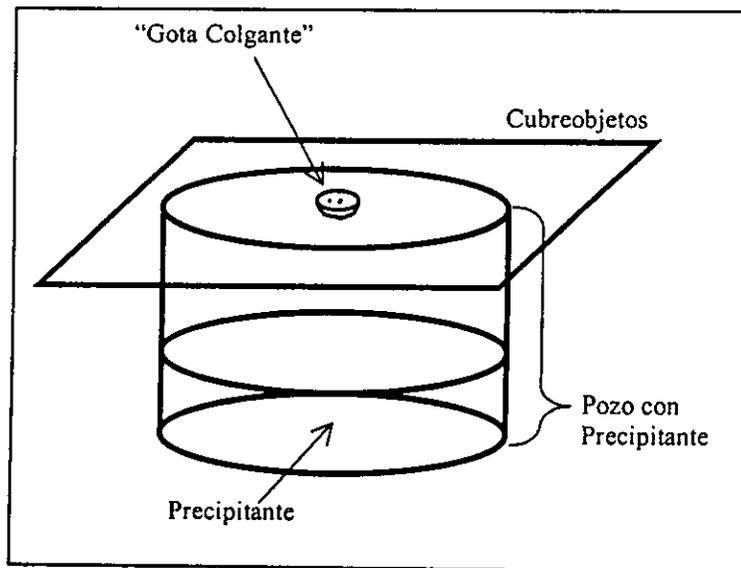


Figura 6: Esquema de un pozo con una gota de cristalización colgando de un cubreobjetos que tapa el pozo.

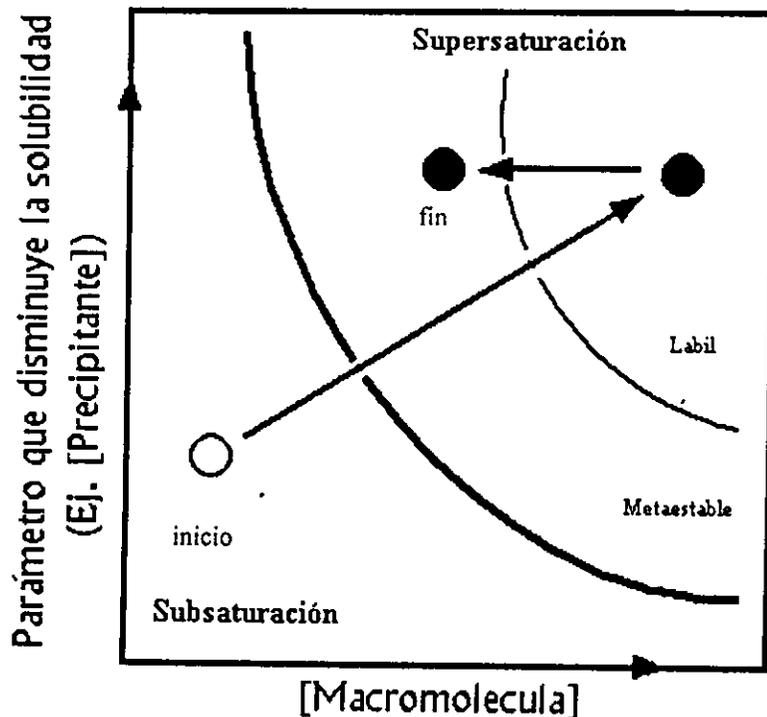


Figura 7: Diagrama de fase. Observamos como cambia la solubilidad de una proteína durante el proceso de equilibrio en una cristalización por gota colgante. La solución que se encuentra no saturada al inicio del experimento, pasa a la zona de supersaturación metastable y luego a la lábil al aumentar la concentración de precipitante y proteína por la disminución de agua en la gota. Al formarse núcleos cristalinos y luego cristales, la concentración de proteína disminuye en la solución conforme se incorpora al cristal, por lo que pasa a la zona metastable donde el cristal crece hasta que se llega a un equilibrio en el intercambio de H₂O entre solución y cristal.

A partir de los resultados de un primer muestreo de amplio rango, se refinan las condiciones de precipitación, hasta obtener un cristal adecuado para la difracción de Rayos X.

Condiciones de cristalización de la TIM:

A continuación se muestran las condiciones bajo las cuales ha cristalizado la TIM de otros organismos.

Bacillus stearothermophilus: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: 2 μ l a 4mg/mL, AMORTIGUADOR: MES 5mM pH6.5, EDTA 1mM, azida de sodio 1mM, ácido

2-fosfoglicólico 2mM, PRECIPITANTE: 2 μ l de la solución del pozo que consiste en PEG 4000 en amortiguador acetato 100mM pH 5.23m, isopropanol 8%, ditioneitol 2mM, EDTA 1mM, azida de sodio 1mM. (Delboni, L. F. *et al.*, 1995)

Escherichia coli: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: a 5mg/mL AMORTIGUADOR: Tris/HCl 25mM pH 7.6, NaCl 20mM, EDTA 1mM, DTT, NaN₃, ADICIONALES: 2PG 1mM, PRECIPITANTE: PEG 6000 22% en 2-[N-Morpholio]ethanesulfolic acid (MES) 200mM/NaOH ph 6.4 y EDTA 1mM, DTT 1mM (Noble *et al.*, 1993)

Gallus gallus: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: a 20mg/mL, ADICIONALES: PGH 1.4mM (concentración final) PRECIPITANTE: amortiguador Tris 100mM (pH8.5), PEG 8000 entre 12.5% y 21.0%, y sulfato de litio 200 mM. (Zang Z. *et al.*, 1994)

Homo sapiens sapiens: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: a 4 mg/mL AMORTIGUADOR: MES 5mM pH 6.5, EDTA 1mM, NaN₃ 1mM, DTT 1mM ADICIONALES: 2-PG 2mM PRECIPITANTE: HEPES 100 mM pH 7.5, PEG 4000 20%, 2-propanol 10%, 2mM DTT (Mande S.C. *et al.*, 1994)

Plasmodium falciparum: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: a 20mg/mL AMORTIGUADOR: HEPES pH 7.5, DTT 1mM, PRECIPITANTE: PEG 6000 24% (Velanker *et al.* 1997)

Saccharomyces cerevisiae: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: a 20mg/mL AMORTIGUADOR: Sulfato de amonio 12 %, EDTA 1mM, mercaptoetanol 1mM, Tris 50mM . PRECIPITANTE: PEG 4000 al 16%. (Lolis E. *et al.*, 1990).

Trypanosoma brucei: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: Concentración no reportada en el artículo. AMORTIGUADOR: HEPES/NaOH, EDTA 1mM, DTT 1mM, NaN₃ 1 mM, DMSO 1.4M. PRECIPITANTE: PEG 6000 15% (Kishan K. V. R. *et al.*, 1994)

Trypanosoma cruzi: Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: entre 4 y 48 mg/ml. PRECIPITANTE: Na HEPES 0.1 M pH 7.5, PEG 400 2 % (v/v) y sulfato de amonio 2.0 M. (Maldonado et al., 1997)

Vibrio marinus: (con y sin análogo de sustrato): Fue cristalizada por difusión de vapor. PROTEÍNA: a 10 mg/mL AMORTIGUADOR: trietanolamina-HCL 10mM, NaCl 25mM, dithiothreitol 1mM, EDTA 1mM , NaN_3 1mM, ADICIONALES: Se adicionó sulfato de amonio (concentración final 100mM) para el cristal de proteína sin análogo, y 2PG (concentración final 20 mM) para el cristal con análogo. PRECIPITANTE: citrato de sodio 1.26 M para el cristal sin analogo. Sulfato de amonio 2.0 M para el cristal con análogo.(Alvarez M. *et al.*, 1998)

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo, es obtener un cristal de la Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica* de buena calidad, que sea adecuado para su uso en la obtención de un patrón de difracción de rayos-X, que permita la determinación de la estructura tridimensional de esta enzima a alta resolución.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos:

Los siguientes reactivos y material se obtuvieron de las fuentes indicadas:

- Mono-Q, Sefacryl S-300 (Pharmacia Biotech)
- DTT, EDTA, TEA, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio), NaCl, G3P, NADH, PMSF, α -GDH (SIGMA Chemical Company)
- Crystal Screen, tris HCl, Additive Screen 1, cubre-objetos siliconizados, placas de reservorios VDX, azida de Na, grasa de vacío (Hampton Research)
- Hidróxido de sodio (MERCK)
- Ácido clorhídrico (EM SCIENCE)

Purificación:

La Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica* fue sobreexpresada en células de *Escherichia coli* cepa TGI, que contiene el plásmido (pRSET), con el gen que codifica para la expresión de la TIM de *Entamoeba histolytica*.

El precipitado de células fue resuspendido en amortiguador Tris/HCl, 20 mM pH 8.0, y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 0.2 mM. Las células fueron rotas con cambios de presión en prensa de French a 758 kPa. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 65000 g por una hora. El sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio al 60 % de saturación y se mantuvo en reposo por 12 horas a 4°C. Después de centrifugar la solución a 17500g por 15 min, el precipitado fue desechado y se aumentó la concentración de sulfato de amonio en el sobrenadante a 90 % de saturación, manteniéndola en reposo por 12 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 17500g, por

15 min. El precipitado resultante (60%-90% de sulfato de amonio) se disuelve en 2mL de TED¹ 10/1/1 pH 7.4 y se dializa durante seis horas contra el mismo amortiguador. La solución obtenida se pasa por una columna de Sefacryl S-300 (Pharmacia Biotech) equilibrada previamente con amortiguador TED 10/1/1 pH7.4. A las fracciones obtenidas, se les mide absorbancia a 280 nm y actividad enzimática, las fracciones con mayor actividad específica se seleccionan para el siguiente paso de purificación. Las fracciones reunidas se dividen en dos alícuotas y se pasan por una columna de intercambio iónico Mono Q 10/10 equilibrada esta vez con TED 10/1/1 mM pH 7.6. La TIM es eluida con un gradiente lineal de NaCl 0-100 mM. Las fracciones con mayor actividad específica se reúnen y dializan contra amortiguador TED 10/1/1 mM pH 8.0 sin sal. Se vuelven a pasar por la columna Mono Q equilibrada con TED 10/1/1 mM pH 8, eluyendo la TIMA con un gradiente lineal de 0 a 150 mM de NaCl. Se reúnen las fracciones con mayor actividad específica y se repite una última vez la diálisis contra amortiguador sin sal. Se vuelven a pasar por la columna de Mono Q equilibrada con TED 10/1/1 mM pH 8.0 eluyendo con el gradiente anteriormente utilizado a este pH. Las fracciones con mayor actividad específica muestran una pureza cercana al 100%, se observa una sola banda en geles de poliacrilamida en presencia de SDS teñidos con AgNO₃. Se obtuvieron 20 mg de proteína con una actividad específica de 6671 μ moles/min/mg a partir de 2 litros de cultivo. Además de este lote, se utilizó otro preparado anteriormente con el protocolo reportado por Landa *et al.* 1997.

¹ Amortiguador que contiene trietanolamina (TEA), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y ditiotretitol (DTT) en las concentraciones mencionadas en cada caso.

Método de Cristalización

Para cristalizar a la proteína se utilizó el método de Gota Colgante el cual fue descrito en detalle en la introducción de este trabajo. Este método permite través de la difusión de vapor, aumentar progresivamente la concentración de precipitante en una solución con proteína. Se busca a través de esto inducir una precipitación ordenada de la proteína para favorecer la formación de un cristal de proteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alineación de Secuencias:

Con el fin de ahondar en la comparación secuencias realizada por A. Landa *et al.*, en este trabajo, se realizó una nueva alineación utilizando las secuencias de las TIMs cuyas estructuras han sido resueltas. Por lo tanto se incluyeron cinco de las seis secuencias en la alineación del artículo de A. Landa *et al.* (1997), se omitió la secuencia de *Giardia lamblia*, ya que su estructura no ha sido resuelta, y se agregaron las secuencias de *Trypanosoma cruzi*, *Vibrio marinus*, *Gallus gallus*, *Plasmodium falciparum* y *Bacillus stearothermophilus*.

Para observar las implicaciones estructurales de este nuevo alineamiento, y sus diferencias con el de A. Landa *et al.* (1997), los aminoácidos considerados como inserciones por estos autores se subrayaron y se pusieron en negritas. Adicionalmente, coloreamos los aminoácidos de las secuencias, dependiendo de la estructura secundaria a la cual pertenecen según A. Landa *et al.* (Figura 8). En este alineamiento, detectamos dos regiones en las cuales, los espacios insertados por el programa con el cual se realizaron las alineaciones (Clustalw) no estaban en lugares óptimos sobre la alineación. Para determinar la posición de las inserciones, y asignar la estructura secundaria de cada aminoácido, consultamos varias publicaciones con alineaciones múltiples de TIMs y observamos que los criterios para definir la estructura secundaria, no están estandarizados. Un ejemplo de esto, son las discrepancias en la asignación de estructura secundaria para la secuencia de *E.coli*, en los artículos de Alvarez M. *et al.* (1998) y Noble *et al.* (1993), donde la primer α -helice de la secuencia de *E.coli* reportada en el artículo de Alvarez M., es más larga que la reportada en el artículo de Noble por cuatro aminoácidos. Nuestros ajustes fueron realizados con base en los datos estructurales

retirados del “Protein Data Bank” PDB² para las diferentes TIMs, y consultando las alineaciones de los artículos de Noble *et al.* (1993), Wierenga *et al.*(1992) y Landa A. *et al.* (1997).

Los ajustes fueron los siguientes:

En la segunda asa de la cara no catalítica marcada por el primer recuadro, observamos que, en varias secuencias, los últimos aminoácidos del asa eran similares pero no se encontraban alineados (Figura 8). Por esta razón, los espacios al final del asa fueron desplazados para mejorar la alineación de esta estructura (Figura 9).

Por otro lado, en el asa tres de la cara no catalítica y el asa tres de la cara catalítica marcadas por el segundo recuadro, observamos que un grupo de espacios insertados en las asas de la cara catalítica, de todas las secuencias, menos en la de amiba, no contribuyen de forma correcta al alineamiento (Figura 8). Al desplazar los espacios a la tercer asa de la cara no catalítica, a semejanza del alineamiento del artículo de A. Landa *et al.* (1997), observamos una mejora sustancial en la alineación de los aminoácidos (Figura 9). A raíz de este movimiento, el espaciamiento que se encontraba en la tercer asa de la cara no catalítica para la secuencia de amiba, ya no coincidió con los otros espacios que se encontraban en la misma columna (Figura 8), y fue eliminado (Figura 9).

² Archivos de estructura de las enzimas retirados del Protein Data Bank. <http://www.pdb.bnl.gov/>

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment



Figura 8: Alineación realizada a partir de las secuencias de TIMs de diversos organismos, los colores representan la estructura secundaria de la enzima. En los recuadros observamos las zonas en las cuales son necesarias modificaciones a la alineación que fueron realizados moviendo o eliminando los espacios en negritas. En negritas y subrayadas se encuentran las inserciones a la secuencia observadas por A. Landa *et al.*

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

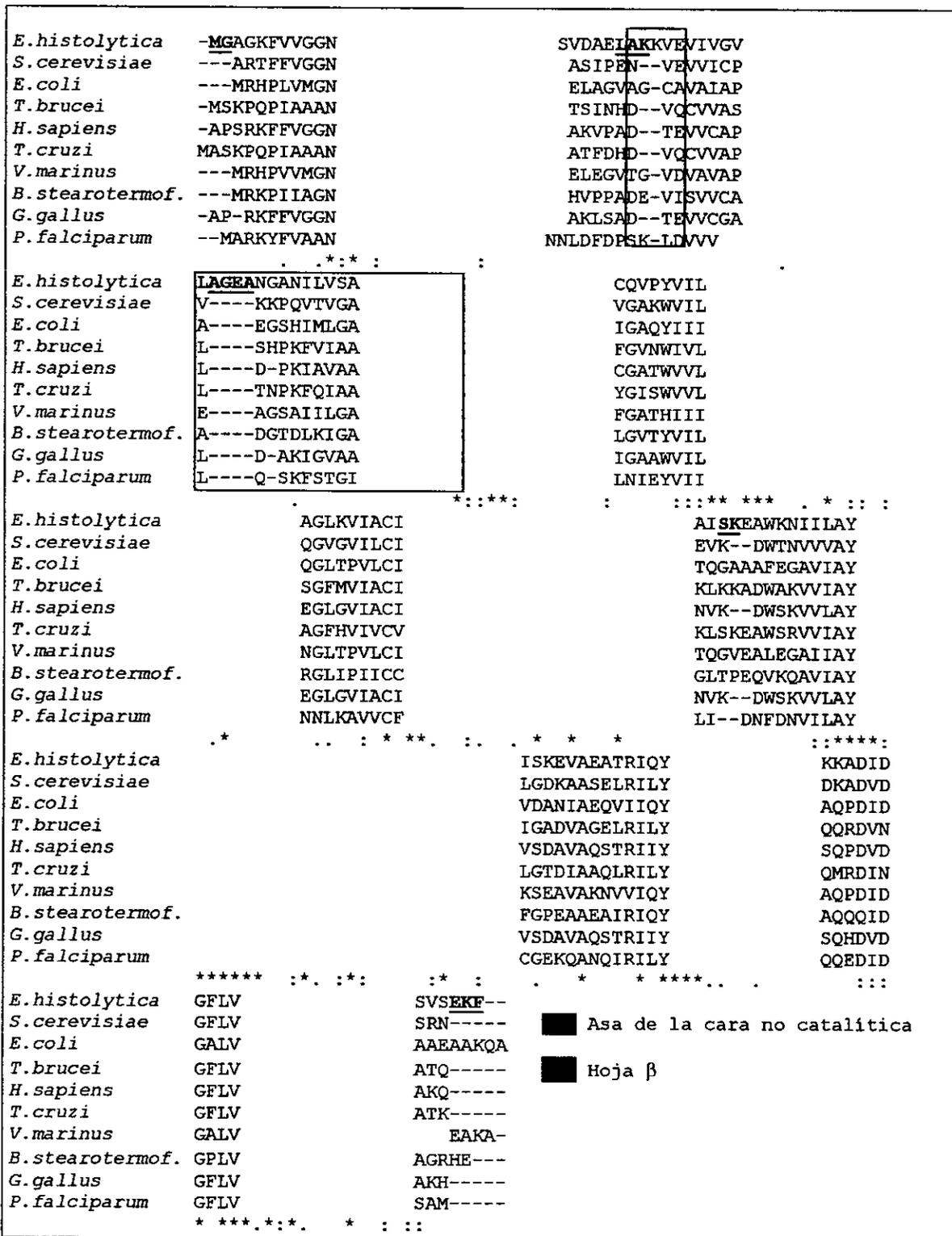


Figura 9: Esta alineación refleja los cambios hechos a la alineación de la Figura 8, descritos en el texto. Los recuadros son las zonas en las cuales se hicieron los cambios, y en negritas vemos los espacios que fueron modificados. Los colores representan la estructura secundaria. En negritas y subrayadas se encuentran las inserciones a la secuencia observadas por A. Landa et al.

Aún al adicionar cinco secuencias al alineamiento, observamos que el resultado es similar al obtenido por A.Landa *et al.* Por lo tanto es muy probable que la mayoría de las inserciones se encuentren localizadas en las asas de la cara no catalítica del barril. Con el fin de comprender las implicaciones espaciales de alineamiento (Figura 9) coloreamos el modelo de la TIMA según el número de sustituciones en cada una de las posiciones (Figura 10).

Con excepción de una de ellas, observamos que las inserciones se encuentran en una región de las asas de la cara no catalítica del barril. Por la coloración de los aminoácidos (Figura 10), observamos que esta región es no conservada. Aunque las alineaciones y el modelo propuestos, sugieren en qué región se encuentran las inserciones, su ubicación exacta y las interacciones entre estos aminoácidos solo pueden obtenerse mediante la determinación de la estructura.

El estudio de la función que desarrollan estas inserciones podría dar lugar a nuevas estrategias para desarrollar fármacos. Adicionalmente, estos estudios podrían aportar información sobre el papel que juegan las asas no catalíticas de la TPI en la estabilidad de la enzima, ya que la TIMA es menos sensible que otras TIMs a la desnaturalización por dilución de proteína (A. Landa *et al.* 1997).

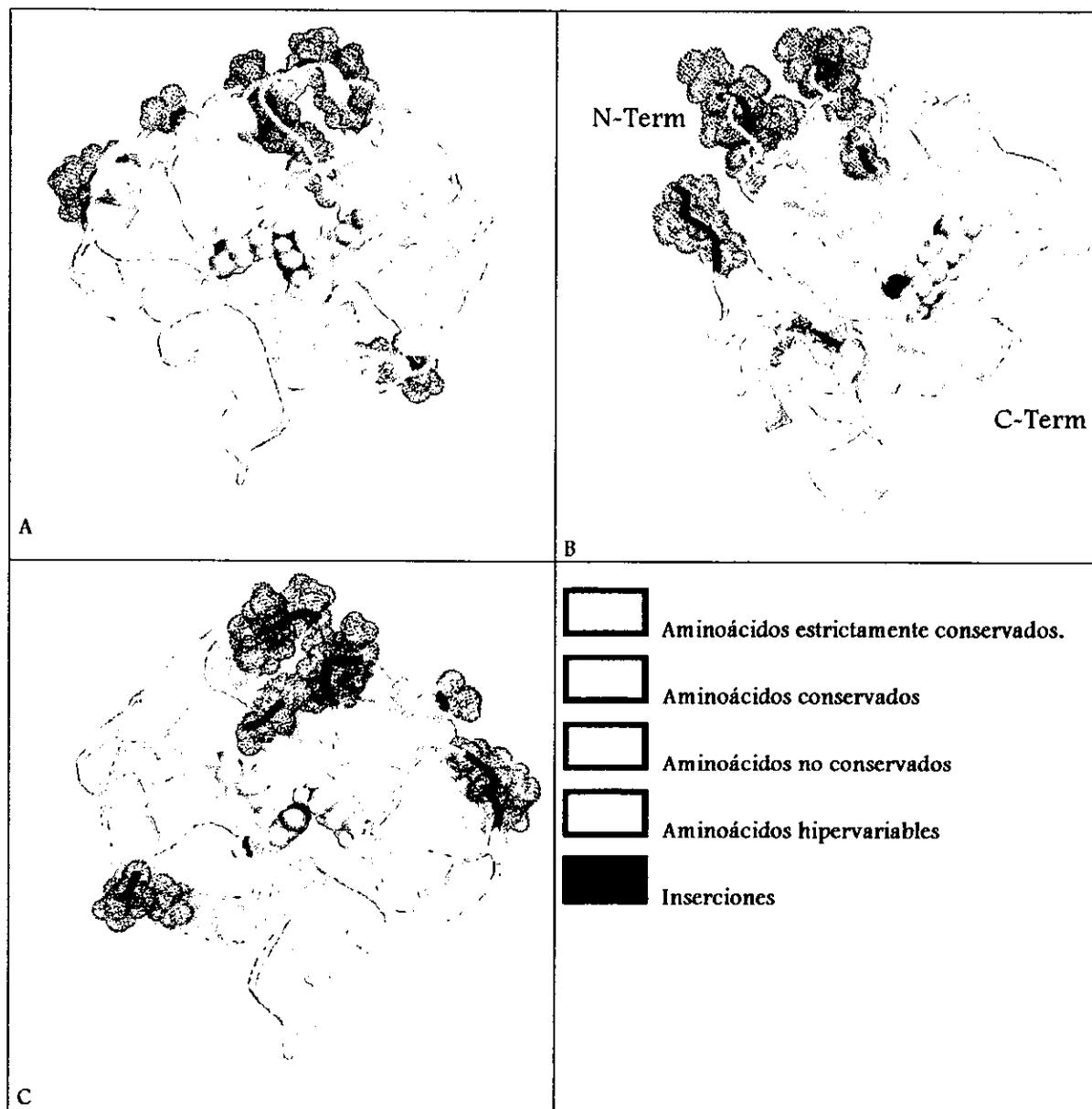


Figura 10: Modelo de la Triosafosfato Isomerasa de *E. Histolytica*.

En esta figura observamos el modelo de TIMA coloreado según el número de sustituciones en cada posición. (A) Vista frontal del barril, el sitio activo se encuentra representado en esferas y observamos que las inserciones se encuentran del lado no catalítico del barril. (B) Vista lateral de la enzima. (C) Vista dorsal del barril, observamos que las inserciones con excepción de una, están en la misma zona y que se encuentran en la cara no catalítica del barril.

En color rojo fueron representadas las posiciones del alineamiento en las cuales todas las secuencias usan el mismo aminoácido o sea las posiciones estrictamente conservadas. Hay 50 aminoácidos en este color y representan el 19.15% de los aminoácidos totales de la secuencia de TIMA. Para los demás colores se realizó la siguiente tabla:

Categoría	Color	Numero de sustituciones	Numero de aminoácidos	Porcentaje de la secuencia.
Estrictamente conservados	Rojo	1	50	19.15%
Conservados	Anaranjado	2 o 3	138	52.87%
No conservados	Amarillo	4 - 6	70	26.81%
Hipervariables	Blanco	7 en adelante	3	1.14%
Inserciones	Turquesa	Inserciones	14	5.36%

Como se vió en la introducción, el primer paso para determinar la estructura de una proteína consiste en obtener un cristal; a continuación se reportan los muestreos realizados para encontrar las condiciones adecuadas para la cristalización de TIMA.

Muestreos:

Muestreo Inicial con el juego de soluciones "Crystal Screen" de Hampton Research (parte I):

En un principio se probaron las 50 soluciones del kit "Crystal Screen" de Hampton Research (Apéndice A) con el método de la gota colgante. Se utilizó 1mL de cada uno de los precipitantes en los pozos. Las gotas se elaboraron con 5 μ l de precipitante tomado directamente del pozo y 5 μ l de proteína a una concentración de 9.564mg/mL. Estas gotas se observaron durante 49 días. En el pozo elaborado con la solución número 34 del kit antes mencionado, se formaron cristales en forma de erizo (Figura 11) después de 4 días. Este precipitante está compuesto únicamente de PEG1500 al 30%. La forma de cristalización y el tiempo que tomaron los cristales en aparecer, indicó que el proceso de agregación de proteínas a la matriz cristalina fue demasiado rápido debido a que la concentración de proteína, de precipitante, o de ambos fue elevada.

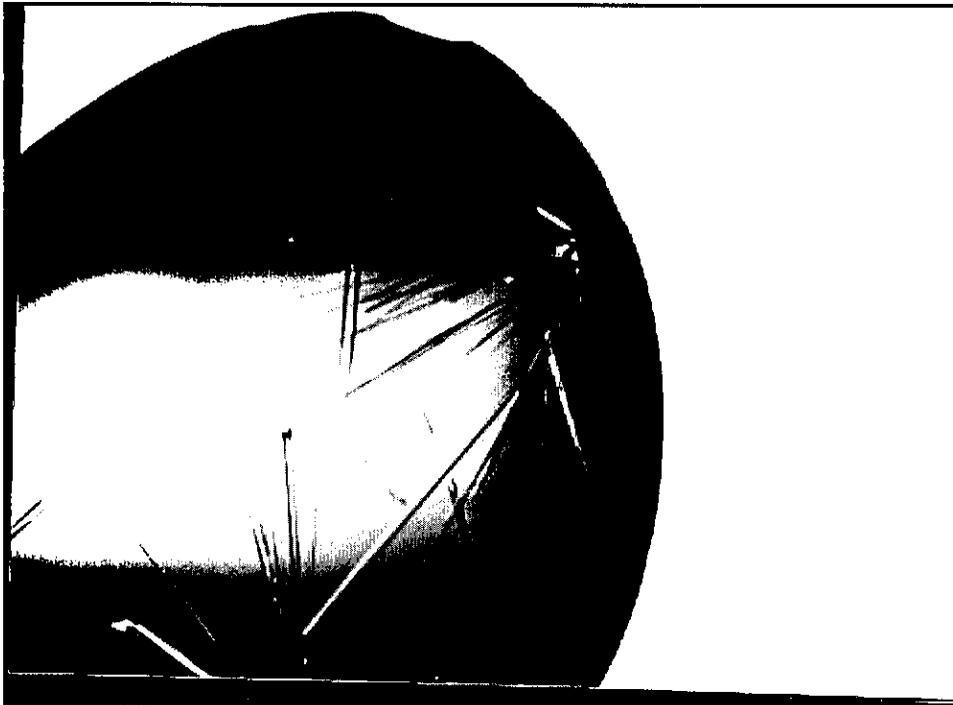


Figura 11: Crecimiento en forma de erizo logrado a partir de la solución 34 del Cristal Screen, compuesta de PEG 1500 al 30 %.

Muestreo con PEG1500:

A continuación se repitió el experimento con PEG1500 al 30% y proteína a 5,6 y 7mg/mL con el objeto de disminuir la velocidad de agregación. Con una concentración de proteína de 5 mg/mL obtuvimos un cristal con forma de erizo después de 2 días de incubación. Con 6 y 7 mg/mL de proteína se obtienen precipitados amorfos.

Buscando disminuir aun más la velocidad de agregación, se repitió el experimento utilizando proteína a 5mg/mL y variando la concentración del precipitante PEG 1500 a 27%, 24%, 21%, y 18%. De estas gotas sólo la del pozo con PEG1500 al 27% presentó de nuevo un cristal en forma de erizo. Se reutilizó el precipitante de este pozo, diluyéndolo al 26% con agua, la gota se volvió a elaborar utilizando proteína a la misma concentración y precipitante del pozo (después de diluirlo). Bajo estas condiciones obtuvimos un precipitado amorfo.

A continuación se realizó un muestreo exhaustivo probando diferentes concentraciones de PEG 1500 con proteína a 5 mg/mL (Tabla 1)

Tabla 1

PEG1500 (%)	Proteína (mg/mL)	Resultado
31	5	Erizos instantáneos.
30	5	Erizos instantáneos.
27.8	5	Erizos instantáneos.
27.4	5	Lajas gruesas a los 10 días.
27.2	5	Lajas gruesas a los 7 días.
27	5	Dos ensayos. Erizos instantáneos un ensayo, y lajas gruesas en otro.
26.5	5	Erizos instantáneos.
26	5	Lajas gruesas a los 5 días.
25.6	5	Agujas instantáneas.
25.2	5	Solo se observó una semana sin resultados.
24.8	5	No hubo precipitación visible
24.4	5	No hubo precipitación visible
27	4	Lajas gruesas a los 5 días.
27	9.564	Lajas delgadas a los 2 días.
26.5	9.564	Lajas delgadas a los 5 días.
26	9.564	Lajas a los 12 días

Se tomaron fotos de algunas de estas condiciones (Figura 12), éstas ilustran como pequeños cambios en la concentración de precipitante pueden modificar la forma de cristalización de nuestra proteína:

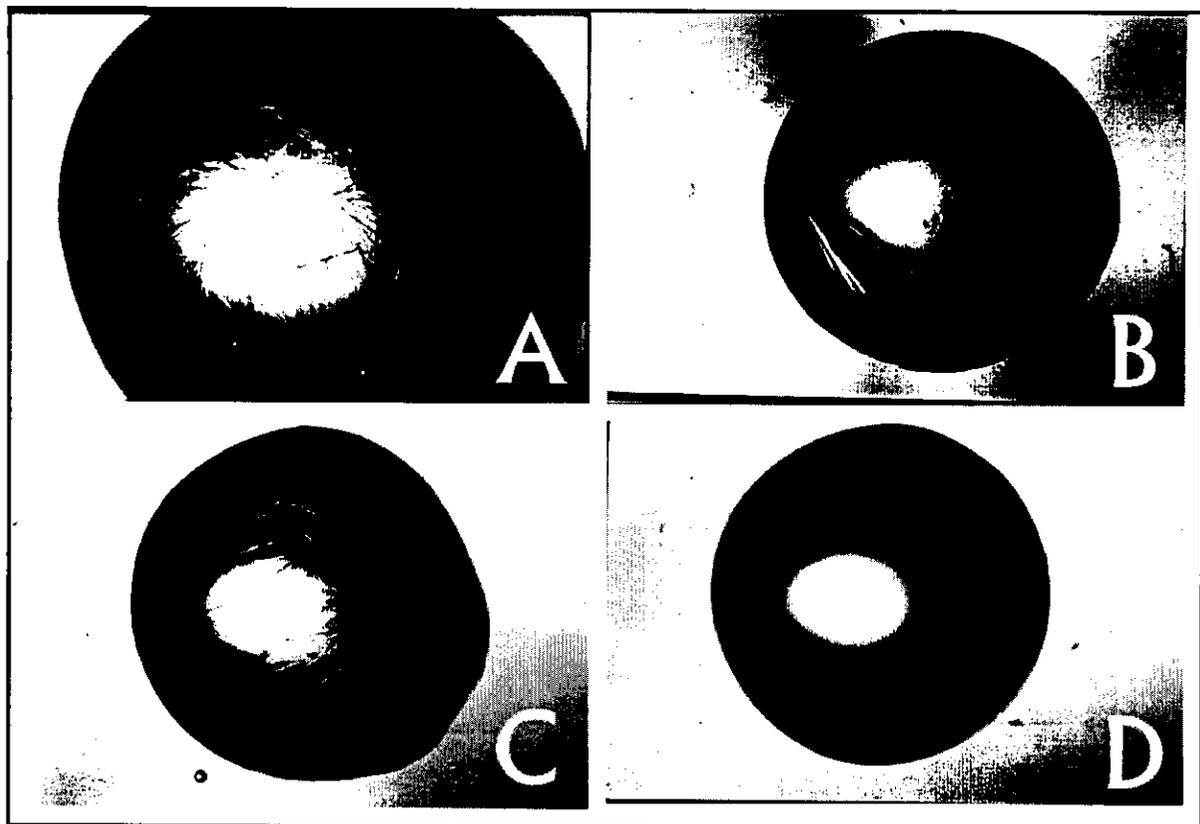


Figura 12: Esta figura ilustra como pequeñas diferencias en la concentración de precipitante, modifican el hábito de crecimiento de los cristales. Las cuatro gotas fueron elaboradas a 5 mg/mL de proteína, y a diferentes concentraciones de PEG 1500: 26.5%(A) 27%(B) 27.2%(C) 27.4%(D).

Las condiciones anteriores se realizaron con un primer lote de proteína, almacenada por 4 meses en refrigeración. Además, las gotas se incubaron en un cuarto con aire acondicionado. Éste sólo permitía disminuir la temperatura del cuarto pero no aumentarla, en caso de que fuera menor a la deseada impidiendo un verdadero control de la temperatura.

Por estas razones los experimentos subsecuentes se realizaron en cámaras de temperatura constante, y se purificó otro lote de TIMA, mejorando la pureza de la misma al agregar una columna más (Mono-Q) al protocolo de purificación.

Con el nuevo lote de proteína, se realizaron los siguientes experimentos a 18 y 4°C (Tablas 2 y 3). Estos experimentos fueron necesarios porque tanto la pureza de la proteína, como las fluctuaciones de temperatura, pueden modificar la forma de precipitar

o cristalizar de la proteína. Por lo tanto al observar los resultados de estas condiciones “calibramos” nuestros experimentos. Estos experimentos son una repetición de las mejores condiciones muestreadas previamente, y se realizan en cámaras de temperatura controlada a 4 y 18°C.

Tabla 2

PEG1500 (%)	Proteína (mg/mL)	Resultados 18°C
26	2	No precipitó después de 81 días.
26	3	Precipitado amorfo a los 55 días.
26	4	Precipitado amorfo a los 17 días.
26	5	Precipitado amorfo a los 55 días.
27	2	Precipitado amorfo a los 55 días.
27	3	Precipitado amorfo a los 55 días.
27	4	Precipitado amorfo a los 17 días.
27	5	Lajas a los 12 días.
28	2	No precipitó después de 81 días.
28	3	Lajas después de 7 días.
28	4	Precipitado amorfo después de 5 días.
28	5	Agregado de cristales a los 17 días.
28	5	Lajas a los 6 días.
28	5	Lajas a los 20 días
28	5	Lajas a los 6 días

Tabla 3

PEG1500 (%)	Proteína (mg/mL)	Resultados 4°C
26	2	Nada después de 19 días.
26	3	Nada después de 19 días.
26	4	Nada después de 19 días.
26	5	Nada después de 19 días.
27	2	Nada después de 19 días.
27	3	Nada después de 19 días.
27	4	Nada después de 19 días.
27	5	Nada después de 19 días.
28	2	Nada después de 19 días.
28	3	Nada después de 19 días.
28	4	Nada después de 19 días.
28	5	Nada después de 19 días.

Los dos experimentos anteriores, nos permiten deducir que la temperatura adecuada para crecer nuestros cristales es de 18°C, y que el PEG 1500 al 28% favorece la formación de cristales. Con este último precipitante, y con proteína a 5mg/mL obtuvimos un monocristal que rápidamente presentó crecimiento de cristales secundarios y que por lo tanto no es utilizable para difracción de rayos-X. Para favorecer la formación de un mejor cristal agregamos diversos aditivos.

Muestreo con precipitante PEG 1500 y aditivos (parte I):

Se prueban los 24 aditivos del ADDITIVE SCREEN I de Hampton Research con proteína a 5mg/mL y precipitante PEG1500 al 28% (Tabla 4).

Tabla 4

Aditivo	Resultado
1. Cloruro de Bario 0.1 M	Erizo a los 26 días.
2. Cloruro de Cadmio 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
3. Cloruro de Calcio 0.1 M	Precipitado en forma de amiba a los 3 días.
4. Cloruro de Cobalto 0.1 M	Precipitado amorfo el día 0 y agujas a los 20 días.
5. Cloruro de Cobre 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
6. Cloruro de Magnesio 0.1 M	Agujas a los 0 días y lajas a los 26 días.
7. Cloruro de Manganeso 0.1 M	Erizos pequeños a los 0 días y agujas a los 64 días.
8. Cloruro de Estroncio 0.1 M	Erizos pequeños a los 0 días y agujas a los 64 días.
9. Cloruro de Ytrio 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
10. Cloruro de Zinc 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
11. Dioxano 30%	Erizos a los 0 días
12. Etanol 30%	Agujas pequeñas a los 0 días y erizos a los 20 días
13. Etilen glicol 30%	Agujas y cristal a los 27 días.
14. Glicerol 30%	Nada a los 64 días.
15. 1, 6 hexanodiol 30%	Agujas a los 26 días.
16. Isopropanol 30%	Lajas a los 0 días erizos de lajas al primer día.
17. Metanol 30%	Erizos 0.
18. 2-methyl-2,4-pentanodiol 30%	Agujas al primer día erizos a los 26.
19. 50% PEG 400	Precipitado amorfo a los 3 días.
20. Trimethylamine HCl 0.1 M	Erizos a los 0 días, erizos de lajas al primer día, degeneran a los 20.
21. Guanidina HCl 1.0 M	Nada a los 64 días.
22. Urea 0.1 M	Erizos al primer día.
23. 1,2,3 heptanotriol 15%	Nada a los 64 días.
24. Benzamidina HCl 20%	Precipitado amorfo a los 5 días.

De estas condiciones, dos muestran resultados interesantes. En la que se utilizó el 1,6 hexanediol al 30% como aditivo, podemos observar agujas independientes (Figura 13). En la que se utilizó Cloruro de Calcio 0.1 M, obtuvimos pequeños monocristales en forma de pirámide. En ambos casos los cristales son suficientemente grandes como para ser difractados en un sincrotrón.

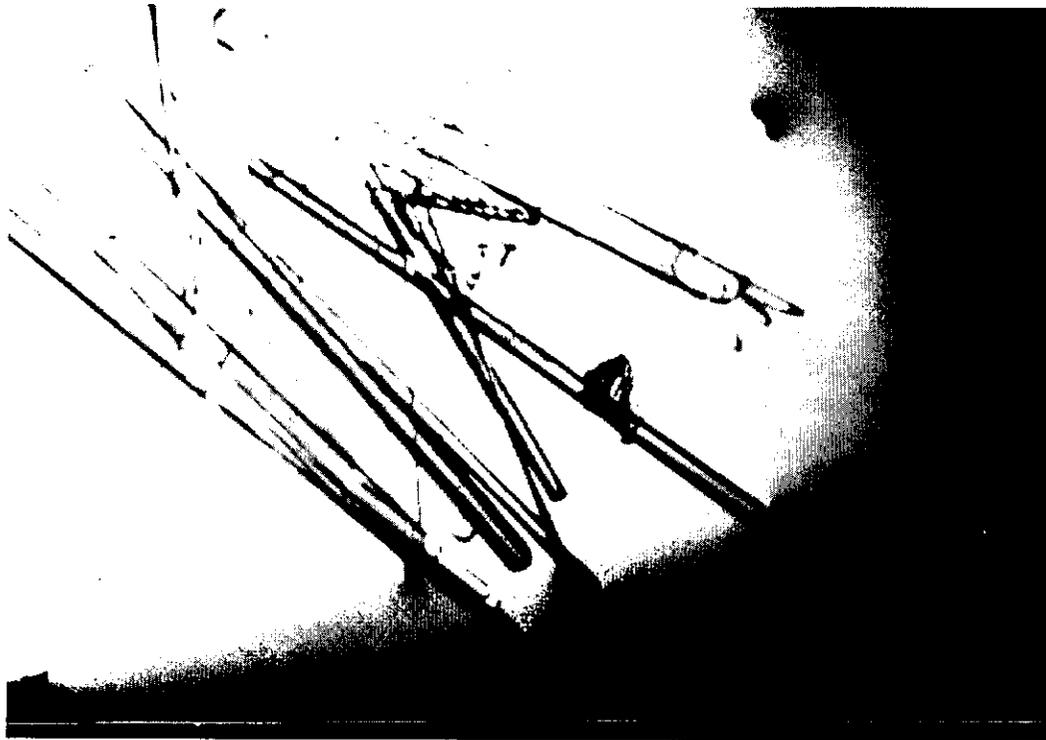


Figura 13: Estas agujas fueron obtenidas en una gota elaborada a base de 5 μ l de proteína a 5mg/ml, 5 μ l de PEG1500 al 28% y 1 μ l de 1,6 hexanediol. La gota fue equilibrada en un pozo con 1 mL de PEG 1500 al 28%.

Muestreo con el juego de soluciones "Crystal Screen" de Hampton Research (parte II):

De los resultados del primer sondeo con el Juego de soluciones del Crystal Screen Hampton, se seleccionaron las gotas que precipitaron rápidamente, y se repitieron disminuyendo la concentración de proteína a 4mg/mL. De esta forma, intentamos disminuir la velocidad de precipitación para favorecer una precipitación mas ordenada (Tabla 5).

Tabla 5

PRECIPITANTE	Resultado
1. MPD 30%, Na Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6, Cloruro Calcio 0.02 M	Precipitado amorfo a los 6 días.
2. Tartrato de Sodio y Potasio 0.4 M	Nada después de 58 días.
3. Fosfato de Amonio 0.4 M	Precipitado amorfo a los 6 días.
6. PEG 4000 30%, Hidrocloruro de Tris 0.1 M pH 8.5, Cloruro de Magnesio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
8. 2-Propanol 30%, Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Citrato de Sodio 0.2 M	Nada después de 58 días.
10. PEG 4000 30%, Acetato Sodio 0.1 M pH 4.6, Acetato de Amonio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
12. 2-Propanol 30%, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5, Cloruro de Magnesio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 2 días.
22. PEG 4000 30%, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5, Acetato de Sodio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 2 días.
24. 2-Propanol 20%, Acetato de Sodio 0.1 pH 4.6, Cloruro de Calcio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
27. 2-Propanol 20% , Hepes de Sodio 0.1 pH 7.5, Citrato de Sodio 0.2 M	Nada después de 58 días.
28. PEG 8000 30%, Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Acetato de Sodio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
30. PEG 8000 30% , Sulfato de Amonio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
31. PEG 4000 30%, Sulfato de Amonio 0.2 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
32. Sulfato de Amonio 2.0 M	Precipitado amorfo a los 2 días.
36. PEG 8000 8% , Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5	Nada después de 58 días.
38. Citrato de Sodio 1.4 M , Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5	Nada después de 58 días.
41. 2-Propanol 10% , PEG 4000 20% , Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5	Precipitado amorfo a los 0 días.
42. PEG 8000 20% , 0.05 M Fosfato de Potasio	Precipitado amorfo a los 20 días.
45. PEG 8000 18% , Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Acetato de Zinc 0.2 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
47. Sulfato de Amonio 2.0 M , Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6	Precipitado amorfo a los 2 días.
48. Fosfato de Amonio 2.0 M , Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5	Nada después de 58 días.
49. PEG 8000 2%, Sulfato de Litio 1.0 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
50. PEG 8000 15%, Sulfato de Litio 0.5 M	Precipitado amorfo a los 0 días.

No se observaron cristales en ninguna de estas condiciones.

Muestreo con precipitante PEG 1500 y aditivos (parte II):

Se probaron los 24 aditivos del ADDITIVE SCREEN I de Hampton Research con proteína a 5mg/mL y precipitante PEG1500 al 24%. Anteriormente el PEG se encontraba al 28%, con esta disminución de la concentración del precipitante (Tabla 6), se busca disminuir la velocidad de agregación de las proteínas a la matriz cristalina.

Tabla6

Aditivo	Resultado
1. Cloruro de Bario 0.1 M	Nada después de 55 días.
2. Cloruro de Cadmio 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
3. Cloruro de Calcio 0.1 M	Precipitado amorfo a los 55 días.
4. Cloruro de Cobalto 0.1 M	Precipitado amorfo a los 24 días.
5. Cloruro de Cobre 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
6. Cloruro de Magnesio 0.1 M	Lajas a los 55 días.
7. Cloruro de Manganeso 0.1 M	Agujas a los 4 días.
8. Cloruro de Estroncio 0.1 M	Nada después de 55 días.
9. Cloruro de Ytrio 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
10. Cloruro de Zinc 0.1 M	Precipitado amorfo a los 0 días.
11. Dioxano 30%	Nada después de 55 días.
12. Etanol 30%	Nada después de 55 días.
13. Etilen glicol 30%	Nada después de 55 días.
14. Glicerol 30%	Nada después de 55 días.
15. 1, 6 hexanodiol 30%	Nada después de 55 días.
16. Isopropanol 30%	Agujas a los 55 días.
17. Metanol 30%	Nada después de 55 días.
18. 2-metil-2,4-pentanodiol 30%	Nada después de 55 días.
19. 50% PEG 400	Precipitado amorfo a los 4 días.
20. Trimetylamine HCl 0.1 M	Nada después de 55 días.
21. Guanidina HCl 1.0 M	Nada después de 55 días.
22. Urea 0.1 M	Nada después de 55 días.
23. 1,2,3 heptanotriol 15%	Nada después de 55 días.
24. Benzamidina HCl 20%	Precipitado amorfo a los 0 días.

Aunque en algunas condiciones la TIMA presenta cristales, estos no tienen una calidad adecuada para la difracción de rayos-X

Muestras variados:

Como un intento para caracterizar la forma en la cual precipitaba nuestra enzima, se realizaron pruebas de solubilidad para la misma. Consistieron en observar en un microscopio óptico, en que momento precipitaba y se solubilizaba la TIMA al aumentar y disminuir la concentración de precipitante. A partir de las observaciones realizadas, se probaron las siguientes condiciones (Tabla 7).

Tabla 7

PEG1500 (%)	Proteína (mg/mL)	Resultado
12	10.55	Precipitado amorfo a los 7 días.
15	10.55	Precipitado amorfo a los 4 días.
17	10.55	Precipitado amorfo a los 4 días.
19	10.55	Precipitado amorfo a los 4 días.
22	10.55	Precipitado amorfo a los 4 días agujas a los 37 días.

Todas estas condiciones precipitan o bien presentan formas cristalinas inadecuadas.

Se probaron algunos aditivos en una gota sentada de 10 μ l de proteína a 5mg/mL y 10 μ l de PEG 1500 al 28% (Tabla 8). El pozo contiene 760 mL de precipitante, esto último para favorecer el engrosamiento de las agujas anteriormente obtenidas bajo esta condición. El PGA que es un análogo del substrato de la proteína es adicionado para “inmovilizar” el sitio activo. De esta forma esperamos favorecer una matriz más ordenada.

Tabla 8

Aditivos	Resultado
2µl de Cloruro de Estroncio 0.1 M	Nada después de 20 días.
2µl de Cloruro de Estroncio 0.1 M	Nada después de 20 días.
2µl de Cloruro de Estroncio 0.1 M 2µl de PGA 2mM	Nada después de 20 días.
2µl de Cloruro de Estroncio 0.1 M 2µl de PGA 2mM	Nada después de 20 días.

Estas gotas no presentan cambios a los 20 días.

Se elaboraron gotas con 5µl de proteína a 5mg/mL, 5µl de precipitado del pozo y 1µl de PGA 22 mM (Tabla 9). En estos pozos se varía la concentración del precipitante en gota y la cantidad de precipitante en pozo es de 1 mL. Estos experimentos se llevan a cabo para detectar si la adición del análogo, modifica significativamente la forma de precipitación de la proteína, en las condiciones observadas anteriormente.

Tabla 9

PEG1500 (%)	Resultado
12	Nada después de 20 días.
15	Nada después de 20 días.
17	Nada después de 20 días.
19	Nada después de 20 días.
22	Nada después de 20 días.
24	Nada después de 20 días.
26	Nada después de 20 días.
28	Nada después de 20 días.
30	Nada después de 20 días.

No se presentaron cristales bajo estas condiciones.

Se realizaron algunos experimentos utilizando PGA y Cloruro de Estroncio 0.1 M intentando engrosar las agujas favorecidas por este aditivo.

Gota Colgante: 1 μ l de Cloruro de Estroncio 0.1 M ; 1 μ l PGA 22mM; 5 μ l proteína 5mg/mL; 5 μ l de precipitante en pozo

Pozo: 1 mL PEG 1500 28%

Repeticiones: 1

Resultado: Nada después de 20 días

Gota Colgante: 1 μ l de Cloruro de Estroncio 0.1 M ; 5 μ l proteína 5mg/mL; 5 μ l de precipitante en pozo

Pozo: 1 mL PEG 1500 28%

Repeticiones: 2

Resultado: Nada después de 20 días

Gota Sentada: 2 μ l de Cloruro de Estroncio 0.1 M ; 10 μ l proteína 5mg/mL; 10 μ l de precipitante en pozo

Pozo: 0.76 mL PEG 1500 28%

Repeticiones: 2

Resultado: Nada después de 20 días

En la gota con PEG 1500 al 24% con proteína a 5mg/mL y 1 μ l del Aditivo Cloruro de Ytrio 0.1 M que había presentado un precipitado amorfo anteriormente (#6 de la tabla 6), se detecta la formación de un agregado de cristales de buenas dimensiones (Figura 14). Si bien este agregado no es adecuado para la difracción, esta es la formación cristalina que mejor ha crecido en las tres dimensiones. Previamente las agujas y lajas obtenidas, aún siendo monocristales, no eran suficientemente gruesas como para soportar el proceso de difracción.



Figura 14: Cluster de Cristales, detrás de este se puede observar el precipitado amorfo que se formó al elaborar la gota.

Sembrado de Cristales:

Buscando obtener cristales sencillos aptos para la difracción, se realizó la técnica de “sembrado en raya”. Consiste en tocar una sola cara del agregado de cristales con un pelo, y sembrar los núcleos cristalinos adheridos a éste, “rayando” una gota equilibrada durante algunos días con esa misma condición. Para esto se colocaron 6 gotas con 5 μ L de PEG 1500 24%, 5 μ L de proteína a 5 mg/mL, 1 μ L de Cloruro de Ytrio 0.1 M. Las 20 gotas se ponen a equilibrar en pozos con 1 mL de PEG 1500 24% a 18 °C. En este caso se obtuvieron a lo largo de la “raya”, una multitud de agregados cristalinos similares al original (Figura15) en conjunto con el precipitado amorfo que se forma inmediatamente justo después de elaborar todas las gotas.



Figura 15: Es esta figura podemos observar aproximadamente seis agregados de cristales. Aún cuando aparentan ser cristales sencillos en realidad están formados a partir de diferentes núcleos cristalinos.

Se realizó un muestreo alrededor de esa condición utilizando 1µl de Cloruro de Ytrio 0.1 M para intentar modificar la precipitación de la proteína y obtener monocristales (Tabla 10).

Tabla 10

PEG1500 (%)	Proteína (mg/mL)	Resultados
23	4	Agregados de Cristales
23	5	Nada
23	6	Agregados de Cristales
24	4	Nada
24	5	Nada (el tiempo de formación de los agregados varía entre unos cuantos días y varios meses)
24	6	Nada
25	4	Agregados de Cristales (sembrados)
25	5	Agregados de Cristales (sembrados)
25	6	Agregados de Cristales y erizos

Difracción de algunos cristales:

Se repitió la condición en 12 gotas con 5 μ L de PEG 1500 24%, 5 μ L de proteína a 5 mg/mL, 1 μ L de Cloruro de Ytrio 0.1 M. Las 20 gotas se ponen a equilibrar en pozos con 1 mL de PEG 1500 24%.

En algunas de las gotas se obtuvieron cristales de buen tamaño (Figura16) los cuales al ser colocados en la trayectoria de una haz de rayos-X, arrojaron un patrón de difracción característico de los cristales de proteína (Figura17), esta es la prueba concluyente de que los cristales son de proteína y no de sal. El patrón de difracción presentó reflexiones dobles, (Figura18) lo cual indicaba que el cristal montado era en realidad un cristal gemelo, esto significa que dos cristales crecieron uno sobre el otro, y que el patrón obtenido es una mezcla de la difracción de dos cristales.

Otro de los cristales gemelos (Figura19) fue cortado, para separar un monocristal. Este último arrojó datos suficientes (Figura 20) como para determinar el tipo de red cristalina, que es tetragonal, y las dimensiones de la celda unitaria $a=b=102\text{\AA}$, $c=146\text{\AA}$ y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ (ver figura 5). El programa utilizado para caracterizar el cristal fue BIOTEX (Molecular Structure Corporation) Las primeras imágenes presentaron una resolución de hasta 2.6 \AA , pero el cristal decayó rápidamente durante el experimento (Figura 21) y se detuvo la colección cuando las imágenes tenían una resolución máxima de 4 \AA , inadecuada para la determinación de la estructura tridimensional a alta resolución.

Recientemente, un cristal (Figura 13) crecido en una gota elaborada a base de 5 μ l de proteína a 5mg/ml, 5 μ l de PEG1500 al 28% y 1 μ l de 1,6 hexanediol y equilibrada en un pozo con 1 mL de PEG 1500 al 28% difractó a 1.5 \AA de resolución en el sincrotrón de Stanford (línea 9-1). Con estos datos se podrá resolver la estructura de la TIMA.



Figura 16: Cristal obtenido en una gota elaborada a base de 5 μ L de PEG 1500 24%, 5 μ L de proteína a 5 mg/mL y 1 μ L de Cloruro de Ytrio 0.1 M. Esta gota fue equilibrada en un pozo con 1 mL de PEG 1500 24%.

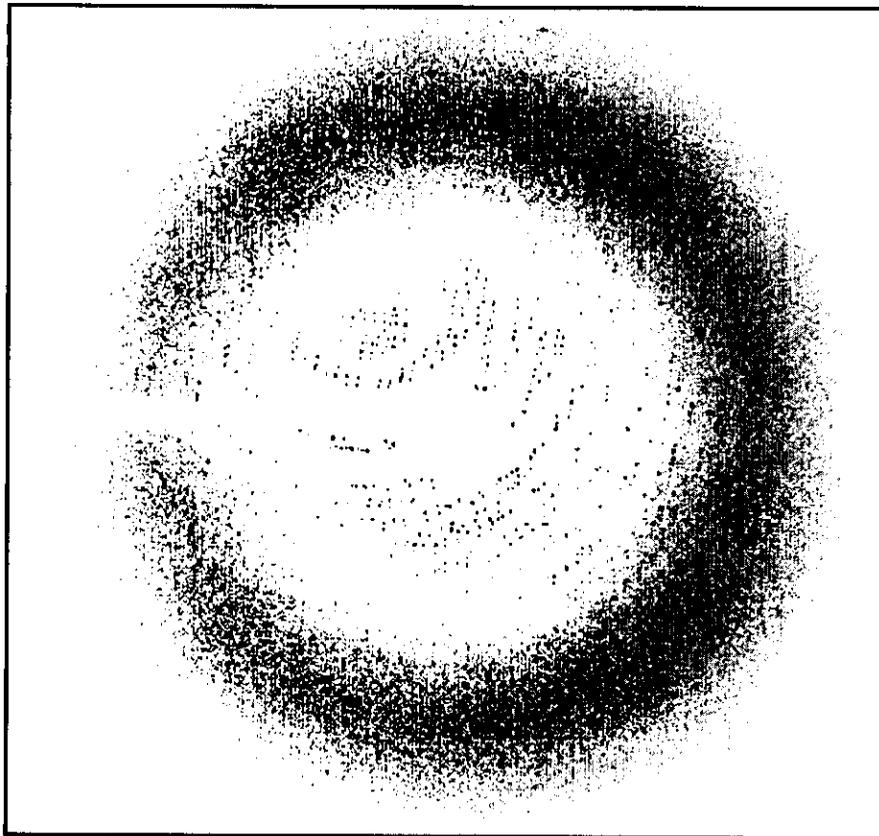


Figura 17: Patrón de difracción obtenido a partir del cristal en la figura 16.

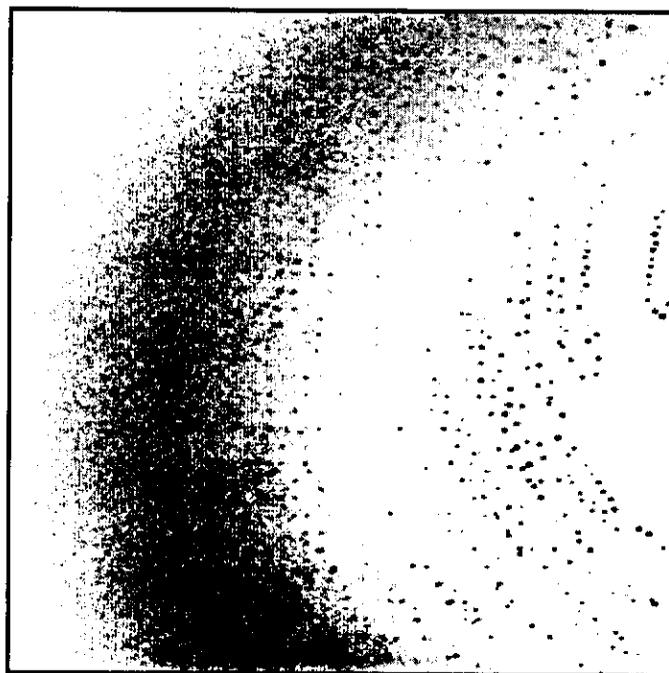


Figura 18: Acercamiento del patrón de difracción en la figura 17. Comparando este patrón con el de la figura 20, podemos apreciar la diferencia entre el patrón de difracción de un monocristal, y el de cristales gemelos.



Figura 19: Cristal obtenido en una gota elaborada a base de 5 μ L de PEG 1500 24%, 5 μ L de proteína a 5 mg/mL y 1 μ L de Cloruro de Ytrio 0.1 M. Esta gota fue equilibrada en un pozo con 1 mL de PEG 1500 24%. Este cristal fue cortado para obtener el patrón de difracción en la figura 20.

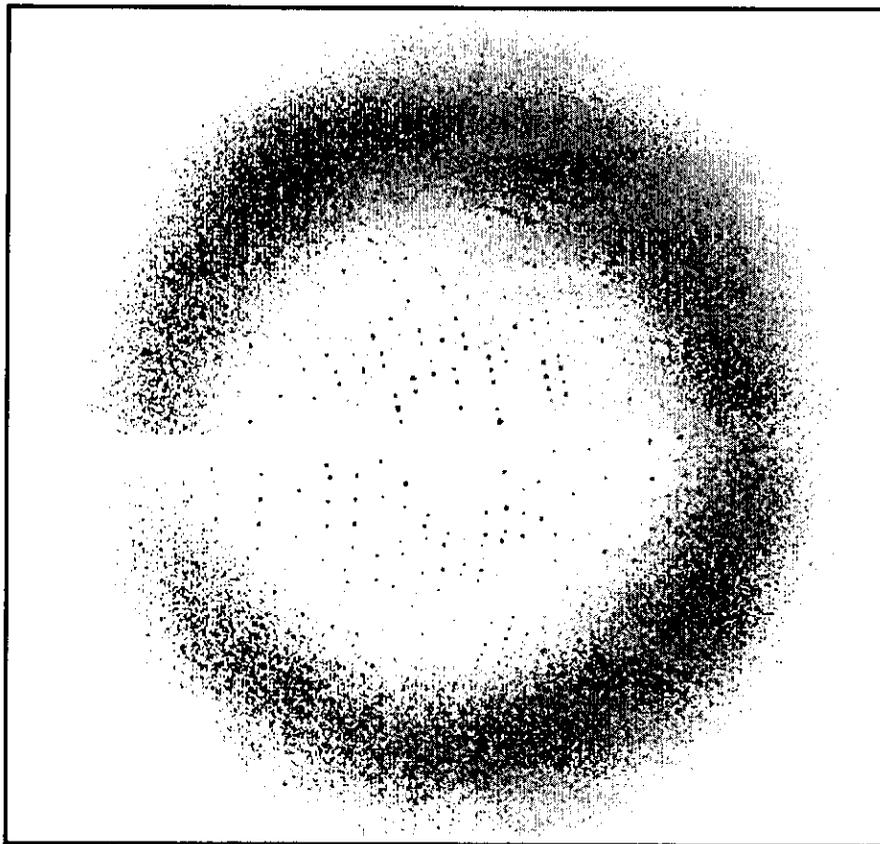


Figura 20: Patrón de difracción obtenido en los primeros momentos de la difracción a partir de uno de los cortes del cristal de la figura 19. Podemos observar reflexiones en la zona de alta resolución. Las manchas mas alejadas del centro son las reflexiones de alta resolución

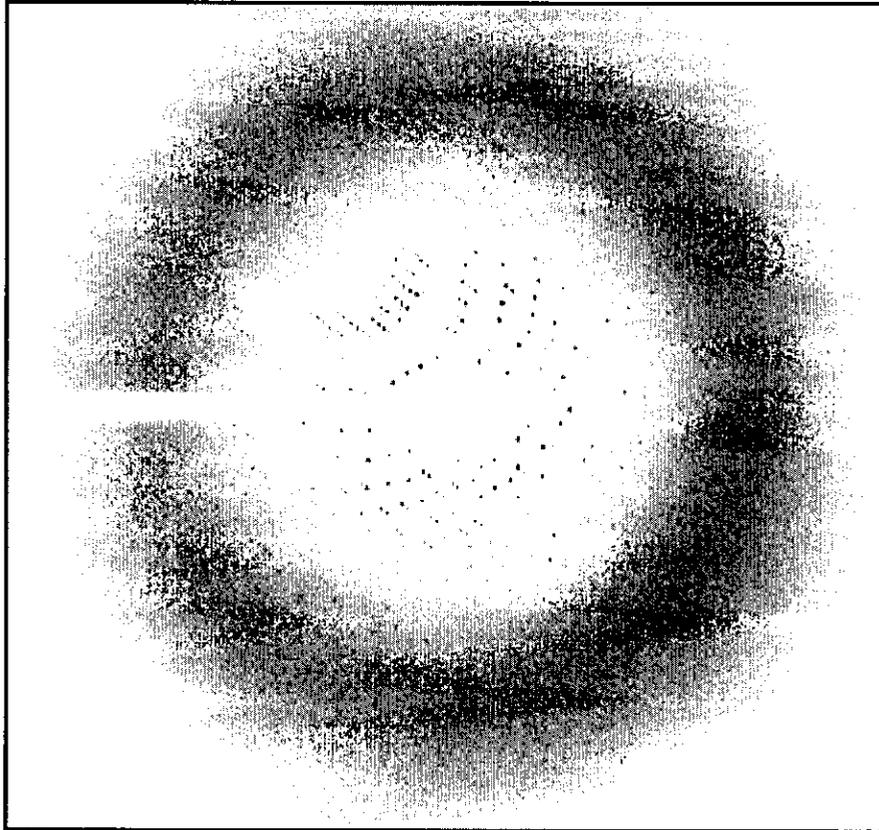


Figura 21: Patrón de difracción obtenido a partir de uno de los cortes del cristal de la figura 19 después de algunas horas de difracción. Podemos observar que ya no hay reflexiones en la zona de alta resolución. Esto último debido al decaimiento del cristal por exposición a los rayos X.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES:

Existe una gran variación en las condiciones bajo las cuales diferentes TIMs han sido cristalizadas (ver introducción).

En este caso, se probaron alrededor de 200 condiciones diferentes variando las concentraciones del precipitante y de la proteína. Observamos que el precipitante que modifica la solubilidad de la enzima para favorecer la formación de cristales, es el PEG 1500 a concentraciones entre 24% y 28%. Se verificó con difracción de rayos X que algunos de los cristales obtenidos fueran monocristales de proteína.

Se logró una modificación radical en el comportamiento de cristalización con concentraciones bajas de diferentes aditivos entre los cuales destacan: el Cloruro de Ytrio que dio lugar a agregados de cristales, el Cloruro de Estroncio que dio lugar a erizos con agujas gruesas, el Cloruro de Calcio 0.1 M que dio lugar a pequeños monocristales en forma de pirámide, y el 1, 6 hexanodiol que produce agujas sueltas que no engrosaron lo suficiente como para ser utilizadas. Esta plasticidad y la respuesta de la cristalización a la adición de aditivos son alentadoras, aún así, hay que recordar que este tipo de investigaciones siguen siendo en su mayor parte empíricas, y por lo tanto será necesario continuar haciendo muestreos alrededor de las condiciones con mejores resultados, hasta obtener un monocristal estable que soporte la exposición a los rayos-X.

Por otra parte, el decaimiento del monocristal que se obtuvo a partir del corte de los cristales gemelos, puede ser reducido utilizando la técnica de criocristalografía. Esta técnica consiste en montar el cristal en una gota de una solución crioprotectora, coleccionar la gota en un asa, y someterla a un flujo de nitrógeno líquido ($T = -160$ - 170 °C). La mayor viscosidad de la solución crioprotectora impide un rearrreglo molecular y evita la formación de cristales de agua que podrían alterar el experimento. Bajo estas condiciones es posible disminuir el decaimiento del cristal, reduciendo el daño por radiación.

Adicionalmente el orden interno del cristal aumenta al disminuir del movimiento de las moléculas, lo cual puede favorecer una mayor resolución en las imágenes colectadas.

Recientemente se obtuvieron datos a partir de la difracción de un cristal en el sincrotrón de Stanford. Estos datos resultaron ser suficientes para resolver la estructura tridimensional de la TIMA, por lo tanto podemos considerar que los objetivos de este trabajo fueron alcanzados en su totalidad.

PERSPECTIVAS:

El hecho de haber obtenido un cristal de TIMA que difractara a 1.5 Å de resolución utilizando radiación de sincrotrón, permitirá en un futuro próximo obtener la estructura de esta enzima. Cabe mencionar que ésta será la primer estructura protéica reportada para amiba y la TIM que se ha obtenido a mayor resolución.

REFERENCIAS:

- Alvarez M., Zeelen J. Ph., Mainfroid V., Retier-Delrue J. A., Wyns L., Wierenga R. K., Maes D., 1998. Triose-phosphate Isomerase (TIM) of the Psychrophilic Bacterium *Vibrio Marinus*, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273 No. 4: 2199-2206.
- Creighton, T. E., 1993. Three-Dimensional Structures by X-ray Diffraction en *Proteins Structure and Molecular Properties*.
- Delboni, L. F., S. C. Mande., F. Rentier-Delrue., V. Mainfroid., S. Turley., F. M. D. Vellieux., J. A. Martial, W. G. J. Hol., 1995. Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Science*. 4: 2594-2604.
- Ducruix, A., Giege, R., 1992. Capítulo 1: An introduction to the crystallogenesi of biological macromolecules en *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A practical Approach*, Edited by Ducruix, A., Giege, R, Oxford University Press, New York.
- Ducruix, A., Giege, R., 1992: Capítulo 4: Methods of cristallization en *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A practical Approach*, Edited by Ducruix, A., Giege, R, Oxford University Press, New York.
- Jarmika J., Sung-Hou K., 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins *J. Appl. Cryst.*, 24, 409-411.
- Kishan K V. R., Zeelen J. PH., Noble M. E. M., Brochert T. V., Wierenga R. K., 1994. Comparison of the structures and the crystal contacts of trypanosomal triosephosphate isomerase in four different crystal forms. *Protein Science*, 3, 779-787.

- Kuntz I.D., 1992, Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery, Science, Vol. 257, 1078-1082.
- Landa, A., Rojo-Domínguez, A., Jiménez, L., Fernández-Velazco, D.A., 1997. Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. Eur. J. Biochem., 247, 348-355.
- Lolis E., Alber T., Davenport R. C., Rose D., Hartman F. C., Petsko G. A., 1990. Structure of Yeast Triosephosphate Isomerase at 1.9-Å Resolution. Biochemistry, 29, 6609-6618 .
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J., 1997. *Brock* Biology of Microorganisms Eight Edition, Prentice Hall, New Jersey.
- Maldonado E., Moreno A., Panneerselvam K., Ostoa- Saloma P., Garza-Ramos G., Soriano-Garcia M., Pérez-Montfort R., Tuena M. de G.P., Gómez-Puyou A., 1997. Crystallization and preliminary X-Ray analysis of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*, Protein and Peptide Letters, Vol4 No2, 139-144
- Mande S.C., Mainfroid V., Kalk K.H., Goraj K., Martial J.A. & Hol W.G.J. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase related human genetic disorders and comparison with the tripanosomal enzyme. Prot. Sci., 3, 810-821.
- Marr, J., J., Müller, M., 1995. Biochemistry and Molecular Biology of Parasites, Academic Press Inc. San Diego California.
- Mikol V., Giegé R., 1992. The physical chemistry of protein cristallization en *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A practical Approach, Edited by Ducruix, A., Giege, R*, Oxford University Press, New York.

- Noble, M. E. M., J. P. Zeellen, J. P., R. K. Wierenga., V. Mainfroid., K. Goraj., A. C. Gohimont y J. A. Martial., 1993. Structure of triosephosphate isomerase from *E. Coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog. sect. D.* 49: 403-417.
- Samarawickrema N.A., Brown D.M., Upcroft J.A., Thammapalerd N., Upcroft P., 1997, Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobiological Chemotherapy*, 40(6):833-40.
- Velanker S. S., Ray S. S., Gokhale R. S., Suma S., Balaram H., P. Balaram, MRN Murthy, 1997. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarian drug design., *Structure* Vol. 5 No. 6 , 751-761.
- Weber P. C., 1997. Overview o Protein Crystallization Methods. *Methods in Enzymolgy*, 276: 13-22.
- WHO World Health Organisation Weekly Epidemiological Report , 1997,72 97-100 N°14 (consultado en <http://www.who.ch/wer/pdf/wer7214.pdf>)
- Wierenga, R. K., M. E. M. Noble., G.Vriend., S. Nauche y W. G. J. Hol., 1991. Refined 1.83 Å structures of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex, *Journal of Molecular Biology*, 220: 995-1015.
- Wierenga, R. K., M. E. M. Noble., Davenport R. C.,1992. Comparison of Refined Crystal Structure of Liganded and Unliganded Chicken, Yeast and Trypanosomal Triosephosphate Isomerase, *J. Mol. Biol.* 224, 1115-1126.
- Zhang Z., Shigetoshi S., Komives E. A., Liu K. D., Knowles J. R., Petsko G. A., Ringe D., 1994. Crystal Structure of Recombinant Chicken Triosephosphate Isomerase-Phosphoglycolohydroxamate Complex at 1.8-Å Resolution, *Biochemistry*, 33:2830-2837

APENDICE A

Composición de las soluciones incluidas en el Crystal Screen de Hampton:

Reactivo Nº	PRECIPITANTE
1	1. MPD 30%, Na Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6, Cloruro Calcio 0.02 M
2	2. Tartrato de Sodio y Potasio 0.4 M
3	3. Fosfato de Amonio 0.4 M
4	4. Sulfato de Amonio 2.0 M, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5
5	5. MPD 30%, Na Hepes 0.1 M pH 7.5, Citrato de Sodio 0.2 M
6	6. PEG 4000 30%, Hidrocloruro de Tris 0.1 M pH 8.5, Cloruro de Magnesio 0.2 M
7	7. Acetato de Sodio 1.4M, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5, Cloruro de Magnesio 0.2 M
8	8. 2-Propanol 30%, Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Citrato de Sodio 0.2 M
9	9. PEG 4000 30%, Citrato de Sodio 0.1 M pH 5.6, Acetato de Amonio 0.2 M
10	10. PEG 4000 30%, Acetato Sodio 0.1 M pH 4.6, Acetato de Amonio 0.2 M
11	11. Fosfato de amonio 1.0 M, Citrato de Sodio 0.1 M pH 5.6
12	12. 2-Propanol 30%, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5, Cloruro de Magnesio 0.2 M
13	13. PEG 400 30%, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5, Citrato de Sodio 0.2 M
14	14. PEG 400 28%, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5, Ca Chloride 0.2 M
15	15. PEG 8000 30%, Cacodylato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Sulfato de amonio 0.2M
16	16. Sulfato de Litio 1.5 M, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5
17	17. PEG 4000 30%, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5, Sulfato de Litio 0.2 M
18	18. PEG 8000 20%, Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Acetato de Magnesio 0.2 M
19	19. 2-Propanol 30%, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5, Acetato de Amonio 0.2 M
20	20. PEG 4000 25%, Acetato de sodio 0.1 M pH 4.6, Sulfato de Amonio 0.2 M
21	21. MPD 30%, Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5, Acetato de Magnesio 0.2 M
22	22. PEG 4000 30%, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5, Acetato de Sodio 0.2 M
23	23. PEG 400 30%, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5, Cloruro de Magnesio 0.2 M
24	24. 2-Propanol 20%, Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6, Cloruro de Calcio 0.2 M
25	25. Acetato de Sodio 1.0 M, Imidazol 0.1 M pH 6.5
26	26. MPD 30%, Citrato de Sodio 0.1 M pH 5.6, Acetato de Amonio 0.2 M
27	27. 2-Propanol 20%, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5, Citrato de Sodio 0.2 M
28	28. PEG 8000 30%, Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Acetato de Sodio 0.2 M
29	29. 0.8 M Tartrato de Sodio y Potasio, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5
30	30. PEG 8000 30%, Sulfato de Amonio 0.2 M
31	31. PEG 4000 30%, Sulfato de Amonio 0.2 M
32	32. Sulfato de Amonio 2.0 M
33	33. Sal de Sodio del Ácido Formico 0.1 M 4.0 M
34	34. Sal de Sodio del Ácido Fórmico 2.0 M, Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6
35	35. Fosfato de Sodio y Potasio 1.6 M, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5
36	36. PEG 8000 8%, Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5
37	37. PEG 4000 8%, Acetato de sodio 0.1 M pH 4.6
38	38. Citrato de Sodio 1.4 M, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5
39	39. PEG 400 2%, Sulfato de amonio 2.0 M, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5
40	40. 2-Propanol 20%, PEG 4000 20%, Citrato de Sodio 0.1 M pH 5.6
41	41. 2-Propanol 10%, PEG 4000 20%, Hepes de Sodio 0.1 M pH 7.5

42	42. PEG 8000 20% , 0.05 M Fosfato de Potasio
43	43. PEG 1500 30%
44	44. Sal de Magnesio del Ácido Fórmico 0.2 M Mg
45	45. PEG 8000 18% , Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Acetato de Zinc 0.2 M
46	46. PEG 8000 18%, Cacodilato de Sodio 0.1 M pH 6.5, Acetato de Calcio 0.2 M
47	47. Sulfato de Amonio 2.0 M , Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6
48	48. Fosfato de Amonio 2.0 M , Hidrocloruro Tris 0.1 M pH 8.5
49	49. PEG 8000 2%, Sulfato de Litio 1.0 M
50	50. PEG 8000 15%, Sulfato de Litio 0.5 M