

11281



Universidad Nacional Autónoma de México

*Cristalización de Proteínas en presencia de un
campo eléctrico interno; diseño y estudios
cristalográficos de sensores biológicos.*

Tesis

*Que para obtener el título de:
Doctora en Ciencias*

presenta

Nurit Mirkin Bril

*Director de tesis:
Dr. Abel Moreno Carcamo.*



México, D.F.

2005

0352131

2005

MIRKIN BRIL, NURIT



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Abel Moreno en el departamento de bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) contando con el apoyo de:

DGEP-UNAM Proyecto IN204702

CONACYT Proyecto 36155-E

Presupuesto del Instituto de Química, UNAM.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo resaccional.
NOMBRE: NURIT MIRKIN BRIL
FECHA: 19 de Septiembre de 2005
FIRMA: [Signature]

Dedicatoria:

Quisiera dedicar esta tesis a mis padres y hermanos que me han apoyado durante toda mi carrera, y que estando tan lejos están tan cerca. En particular, a mis padres por darme las alas para volar.

Agradecimientos:

Primero me gustaría agradecer al Dr. Abel Moreno por darme la oportunidad de realizar mi tesis de doctorado en su laboratorio, apoyarme en todo lo que necesité y respetar mis tiempos de aprendizaje. Muchas gracias de corazón.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Abel Moreno, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Jaime Mas Oliva y Dr. Bernardo Frontana Uribe por sus consejos y comentarios que me guiaron durante el trabajo de esta tesis.

A todos aquellos que con gran disposición me han ayudado en las distintas etapas de mi tesis, soportado mis mil preguntas con una sonrisa y respondido siempre: Dr. Alejandra Hernández Santoyo, Dr. Roberto Arreguin Espinoza, M.C. Deyanira Fuentes, Dr. Pablo Reyes Grajeda, Dr. David Jáuregui, Dra. Margarita Rivera.

A mis compañeros de laboratorio, que hicieron mas alegres mis días: Deyanira, Marta, Ekaterina, Eduardo.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado por la beca otorgada.

Al instituto de Química, por la beca puente que me ayudó a terminar esta tesis.

A mis amigos, la barra que me da aliento y alegrías y que hicieron mi vida en México una etapa inolvidable: Maribel (pioja), Gus y Moni, Gise, Enri, Silvina, Lisandro, Juan y Gigi.

A mi amor, Carlos.

Resumen:

En el presente trabajo se estudio la influencia de un campo eléctrico interno en la cristalización de proteínas. El método propuesto está basado en la técnica de acupuntura en geles (García Ruiz J.M. & Moreno A., 1994). Como es una técnica novedosa se debió evaluar ciertas variables particulares del dispositivo utilizado para el crecimiento, como el tipo de electrodos a usar, la polaridad de los mismos, distancias y la corriente a aplicar. El método fue validado para dos proteínas modelo, lisozima de gallinas (HEWL) y taumatina de *Thaumatococcus daniellii* y para una proteína con actividad redox, citocromo c bovino. Por último, se caracterizaron depósitos de citocromo c sobre un electrodo de óxido de indio y estaño con el fin de estudiar la conducta electroquímica de esta proteína en aras del diseño de un biosensor de monocristales.

Abstract:

In this thesis, a new set-up based on the gel acupuncture method (García-Ruiz, J.M. and Moreno, A., 1994) as well as the influence of an internal electric field upon protein crystallization have been studied. All variables related to the set-up were evaluated, such as the chemical composition of the electrodes, the polarities, the distances between electrodes, and the magnitude of the applied current. The method was validated by means of using two model proteins (hen egg white lysozyme (HEWL) and Thaumatin, from *Thaumatococcus daniellii*) and a redox protein from the bovine heart (cytochrome c). Finally, deposits of ultrapure cytochrome c on an indium tin oxide electrode (ITO) have been characterized and studied upon their electrochemical behavior as a plausible design of a biosensor for electron transfer.

Antecedentes:

Las funciones en los sistemas biológicos están gobernadas por las macromoléculas biológicas, tales como las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos cuyo papel específico está definido por su estructura tridimensional. Desde el punto de vista experimental, la estructura tridimensional se puede determinar en nuestros días a través de dos vías: la primera es la resonancia magnética nuclear (RMN), que permite hacer el estudio en solución, pero que está limitada a proteínas de bajo peso molecular (Clore, M.G. and Gronenborn, A., 1991). La otra opción es la cristalografía de rayos-X, la cual requiere cristales de adecuada calidad para llevar a cabo dicha determinación. Sin embargo, la cristalización de proteínas y de otras biomoléculas para estudios estructurales es un problema de consideración en las ciencias médicas y biológicas. Esto se debe a que se tiene un escaso conocimiento del mecanismo de crecimiento cristalino, los eventos que juegan un papel relevante en los procesos de nucleación y los parámetros cinéticos y termodinámicos que rigen las soluciones macromoleculares (McPherson, A. 1999).

Las proteínas se comportan como macroiones en solución, y como tales, responden a la presencia de potenciales eléctricos. Aún las proteínas de membrana, más hidrofóbicas, presentan orientaciones preferenciales y comportamientos electroquímicos definidos. Estas características pueden ser utilizadas para intentar un estudio sobre su comportamiento frente a la agregación de manera ordenada. Sin embargo, se necesitaron muchos años de estudio para introducir la electroquímica a las ciencias biológicas. Dos de los eventos claves fueron los de Kallmann y Pope en 1960, encontraron que ciertas sustancias, consideradas como “aislantes”, al ponerlas en contacto con ciertos sistemas redox adecuados en solución, aceptaban electrones y pasaban una corriente (Kallmann M & Pope M., 1960). El otro evento fue en 1969, cuando Rosenberg y Postow mostraron que los datos sobre conductividad electrónica en proteínas no era adecuada, ya que usaban proteínas en medios secos y no húmedos, como ocurre en la realidad biológica. Ellos determinaron de los cálculos la conductividad iónica y establecieron una relación entre la conductancia de electrónica y el grado de hidratación (Rosenberg, B. & Postow, E., 1969).

Gracias a estos hechos y muchos otros, es que podemos considerar a las proteínas sustancias semiconductoras y no aislantes como se las creía. Sumado a esto, las mismas

presentan una alta selectividad y especificidad en su funcionamiento, lo que las convierte en elementos claves de todo proceso metabólico, y de gran interés para su estudio en diferentes áreas.

Por otro lado, si tomamos en cuenta que las proteínas son moléculas que poseen una cantidad muy alta de agua, estudios en medios no líquidos pueden presentar problemas de deshidratación, con la consiguiente alteración estructural de las mismas. Con respecto a esto último, la microscopía de fuerza atómica (AFM) presenta una ventaja extraordinaria respecto a otras técnicas, ya que permite tener un estudio estructural *in situ*, de tipo atómico o molecular de la macromolécula, en medios acuosos y otros fluidos. Esto hace a las técnicas de barrido con sondas, como la microscopía de fuerza atómica y la microscopía por efecto túnel, herramientas poderosas para el estudio de los sistemas biológicos macromoleculares en condiciones cercanas a sus medios naturales y con una sonda que no es destructiva para la muestra, condiciones que son imposibles de realizar por medio de la microscopía electrónica de barrido convencional, rayos-X o RMN. Adicionalmente, la microscopía de fuerza atómica permite obtener imágenes de muestras no conductoras y conductoras sin ningún problema técnico, pudiéndose seguir procesos de agregación-disolución en el tiempo. (Cohen *et al.*, 1997). Esto permite la caracterización del mismo desde un punto de vista cinético. Existen aplicaciones combinadas como estudios de cristalización en el AFM empleando técnicas electroquímicas incluidas en dichos equipos o el desarrollo de sensores biológicos (“biosensores”) (Eggins, B.R., 1997). En un biosensor, el elemento de sensibilidad que corresponde a la sustancia que se mide es de naturaleza biológica (proteína, ácido nucleico o polisacárido). Esta tiene que ser ensamblada a un transductor de algún tipo, de tal manera que una respuesta observable debe ocurrir (señal), ésta directamente se procesa para analizar su respuesta que puede ser de tipo química o eléctrica. En general un biosensor se define como un dispositivo que incorpora un sensor biológico acoplado a un transductor.

En este trabajo se pretende emplear los conceptos de electroquímica y estudios estructurales para la cristalización de proteínas en presencia de un campo eléctrico interno, que sentarán las bases para el desarrollo de biosensores, cuyas aplicaciones sean útiles en el área de la medicina, biotecnológicas y ciencias en general.

Hipótesis:

A través de las propiedades eléctricas una macromolécula biológica es posible obtener un arreglo tridimensional ordenado (monocristal). Con ello será posible conocer la estructura y en consecuencia diseñar nuevos materiales (sensores biológicos) con importantes aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

Justificación:

La cristalización de biomoléculas es un método muy útil a la hora de realizar estudios de biología estructural. Sus aplicaciones son muy diversas, ya sea para estudios de la relación estructura función, estudios de mecanismos de interacción entre un inhibidor y una enzima, complejos de biomoléculas, en el diseño de fármacos y productos genéticamente modificados, como ejemplos.

Si bien se conocen numerosas técnicas para el crecimiento de cristales y existen en el mercado muchos kits que ayudan a encontrar las condiciones de crecimiento y optimización, el análisis racional del proceso no ha sido explorado totalmente. En los últimos años han estado floreciendo el estudio de algunos parámetros fisicoquímicos que pueden brindar mayor control de la nucleación y del crecimiento cristalino, como el efecto del campo magnético (Sazaki *et al.* 1997; Ataka *et al.* 1997; Wakayama *et al.*, 1997; Yanagiya *et al.*, 2000), el efecto del campos eléctricos externos (Taleb *et al.* 1999, 2001; Nanév & Penkova, 2001, 2002) o el estudios con altas presiones (Kadri A. *et al.* 2002).

Hasta el inicio de esta tesis, no existían trabajos realizados en presencia de un campo eléctrico interno donde las soluciones estuvieran en contacto con los electrodos. Las proteínas son moléculas cargadas que se comportan como macroiones en presencia de un campo eléctrico, orientándose y dirigiéndose a centros de atracción (especies de cargas opuestas), favoreciendo el crecimiento de cristales ordenados. Más aún, un gran numero de proteínas están involucradas en la transferencia de carga y presentan centros con actividad redox los cuales son sensibles a determinados valores de potencial eléctrico. Con la intención de aprovechar el comportamiento de las proteínas bajo un campo eléctrico en beneficio del crecimiento de cristales se realizó el estudio de la presente tesis doctoral. Se

postuló una hipótesis de cómo estaría actuando el campo eléctrico en el crecimiento de cristales, se verificó con dos proteínas modelo, lisozima de huevos de gallina y taumatina de *Thaumatococcus daniellii*, al igual que con una proteína transportadora de electrones, citocromo c bovino.

Objetivo general

Se pretende desarrollar las bases de un nuevo método para obtener cristales de proteínas, solubles, comprender los eventos involucrados en la interfase electrodo/proteína, y la transferencia de cargas entre ellas, bases para el desarrollo de sensores biológicos.

Objetivos Particulares

1. Establecer los principios para la cristalización de proteínas en presencia de un campo eléctrico interno.
2. Aplicar esta técnica de cristalización a diversas proteínas modelo, tales como: lisozima y taumatina, las cuales se conocen su estructura cristalográfica, y a una proteína no-modelo, como citocromo c bovino. Esta última no tiene sus coordenadas cristalográficas reportadas. La intención es validar el método.
3. Estudios cristalográficos para comparar la calidad cristalina del método nuevo respecto al tradicional.
4. Estudio de los procesos de transferencia de carga en sólidos de macromoléculas biológicas.

Abreviaturas:

AFM: Iniciales de su nombre en inglés Atomic Force Microscopy (microscopio de fuerza atómica).

E: vector campo eléctrico.

I: corriente eléctrica.

ITO: Iniciales de su nombre en inglés Indium Tin Oxide electrode, (electrodo de óxido de estaño dopado con In).

HAcO: ácido acético.

HEWL: iniciales de su nombre en inglés, Hen Egg White Lysozyme (lisozima de huevo de gallina)

NaAcO: Acetato de sodio.

NaCl: cloruro de sodio.

R: resistencia eléctrica.

TFA: ácido trifluoroacético.

V: potencial eléctrico.

Capítulo 1: Presentación

1.1- Introducción:

El progreso en el área de biología molecular durante el último cuarto de siglo ha sido sumamente dependiente del conocimiento estructural a nivel atómico de macromoléculas biológicas. Han surgido muchos esfuerzos, en diversas partes del mundo, para fomentar el estudio estructural de proteínas y conocer las diversas conformaciones que existen en la naturaleza. El objetivo final es entender las familias estructurales de proteínas, cuales son los plegamientos y la relación que existe entre estructura y función. Las redundancias en los motivos y elementos estructurales hallados en las estructuras proteicas reportadas hasta la fecha, sugieren que el número de conformaciones es finito y manejable. Una vez que se conozca la mayoría de ellas se podrá predecir, basados en la estructura primaria, las funciones que tienen los dominios de proteínas desconocidas.

La biología estructural también ha influido notoriamente en el campo de la ingeniería de proteínas. Mientras las técnicas de ADN recombinante son las herramientas sintéticas, la determinación de estructuras conforma la herramienta analítica, permitiendo guiar de forma inteligente e intencionada los cambios ha introducir, en oposición a las técnicas aleatorias de modificación. Los avances en la genómica han permitido expresar proteínas en sistemas vivos, estudiar sus actividades y en base a sus estructuras, modificarlas genéticamente con algún fin práctico, ya sea incrementar su estabilidad o afinidad por sustratos, inhibidores, etc. Todo esto revolucionará la vida humana en diversos aspectos: económico, salud, alimentación.

Más allá del impacto en la bioquímica y biología las estructuras tridimensionales han demostrado ser de un valor formidable en biotecnología. La biología estructural ha promovido el campo de la farmacología, a través del diseño de fármacos racional basado en la estructura, desde pequeñas y emergentes compañías así como en las grandes industrias. Esto provocará un gran impacto en la cura de diversas enfermedades humanas, problemas veterinarios o afecciones en las cosechas, en la agricultura (McPherson A, 2003).

Los avances en la genómica, y por ende en la proteómica, han producido miles de proteínas nuevas para su estudio en proyectos de biología estructural y de diseño de fármacos. La elucidación de las secuencias de genomas completos de organismos vertebrados e

invertebrados (Roses AD, 2002) ha acelerado los esfuerzos internacionales para desarrollar métodos en gran escala y tecnologías que permitan la rápida determinación de estructuras tridimensionales proteicas (Kuhn, P. *et al.* 2002). Dado que el número de proteínas nuevas continuará creciendo así como el número de investigadores que las estudiarán, surge una necesidad importante de métodos más eficientes y efectivos en la determinación de estructuras (DeLucas, J.L. *et al.* 2003). Al día de la fecha y en el futuro cercano, la única técnica que puede proveer datos estructurales de proteínas a resolución atómica para los fines comentados es la difracción de rayos x a partir de cristales únicos. Existen otras técnicas que aportan datos estructurales y datos de dinámica molecular, mas no son aplicables a los fines mencionados (McPherson A. 2003).

Para poder aplicar la cristalografía de rayos x se requieren cristales de tamaño y calidad adecuada que permitan coleccionar datos precisos, ya que la fidelidad de la estructura final depende directamente de la perfección, tamaño y propiedades físicas de los cristales. Esto los convierte en la pieza clave de todo el proceso y su producción en el cuello de botella. El problema de crecer cristales adecuados involucra diversos aspectos. Uno de los inconvenientes principales para obtener cristales de calidad se debe al efecto de la convección natural sobre las soluciones de cristalización, presente en todos los experimentos realizados en condiciones normales de gravedad terrestre.

Fenómenos de transporte y cristalización.

Los procesos de transporte, particularmente el transporte de masa, son muy importantes en el crecimiento de cristales a partir de soluciones acuosas (Chernov A.A., 1984; Sarig S., 1994; Benneman P. 1974). De hecho, los procesos de transporte de masa y calor son críticos para la calidad y características de los cristales (Hurle, D.T.J. 1994a). Muchas técnicas de cristalogénesis han sido desarrolladas explícitamente para controlar las contribuciones relativas del transporte convectivo y difusivo en el crecimiento de cristales (Hurle, D.T.J. 1994b). Durante la incorporación activa de iones o moléculas a la red se generan diferencias de densidad en la proximidad de las caras en crecimiento y surge el flujo convectivo en el entorno inmediato del cristal (Frankenheim L., 1860; Rosenberger F., 1986; Chen P.S. *et al.* 1979). El transporte de moléculas por convección compite con el transporte de difusión pura y la interacción de estos dos tipos de transporte determina el modo y la cinética de presentación de nutrientes al cristal en formación.

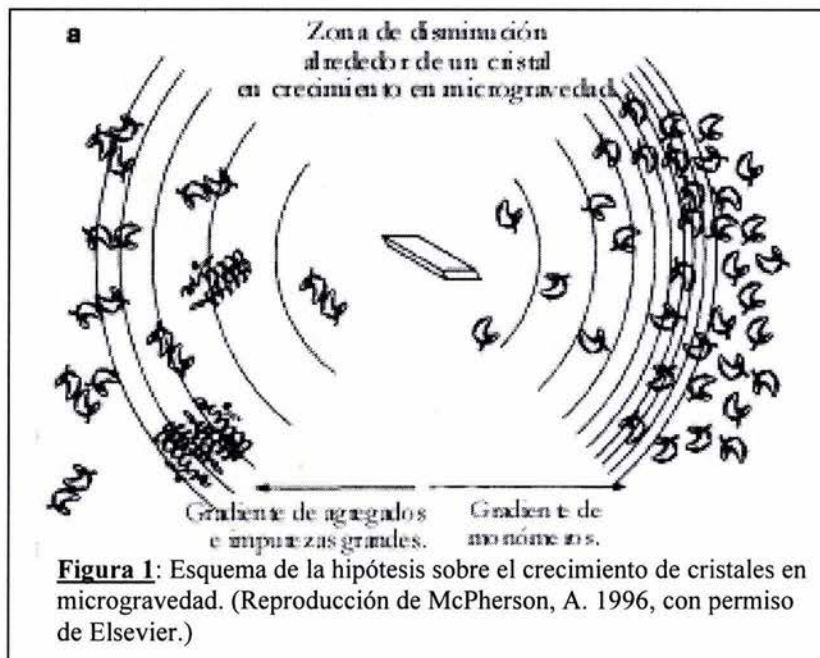
Los fenómenos de transporte no solo afectan a los nutrientes sino también a la velocidad de adsorción e incorporación de impurezas. Estas últimas alteran el tamaño, el desarrollo morfológico y la perfección del cristal (McPherson A. 1996). Por otro lado, hay que considerar que el transporte convectivo de masa ocurre solamente en presencia de gravedad. Sólo así los fluidos pesados bajarán y los fluidos ligeros subirán, surgiendo las corrientes convectivas en el seno de la solución. Existen otros tipos de convección, como la convección producida por la tensión superficial (Rosenberger, F. 1979) pero éstas son menores, casi insignificantes en la cristalización en solución.

Años de experimentación con diversos cristales confirmaron que al minimizar el transporte de masas convectivo generalmente se obtienen cristales de calidad superior, con propiedades mecánicas y ópticas mejoradas, densidad de defectos reducida y mayor tamaño.

¿Cómo es posible suprimir la convección en la cristalogénesis? Hoy en día existen diversas propuestas para anularla o al menos reducirla. Una de ellas es la cristalización de macromoléculas en el espacio, donde en ausencia de gravedad desaparece la convección. En la última década ha surgido otro enfoque que consiste en aplicar campos magnéticos, los cuales generan fuerzas que se oponen a la gravedad, reduciendo la convección natural de las soluciones (Ataka M. *et al.* 1997; Wakayama, NI. *et al.* 1997). También las técnicas de cristalización en geles son una alternativa ampliamente aceptada para eliminar la convección natural (García-Ruiz, J.M. *et al.* 2001).

Es natural pensar que la cristalización a gravedad cero, o al menos reducida, genere cristales de propiedades superiores (McPherson A. 1996). ¿Cómo ocurre esto? Observaciones y datos experimentales sostienen la hipótesis que el flujo convectivo introduce en los cristales en crecimiento un desorden estadístico, defectos y dislocaciones en su superficie (Pusey, M. *et al.* 1998; Broom, M.B.H. *et al.* 1988; Baird, J.K. *et al.* 1986). El transporte convectivo tiende a ser variable y errático, generando variaciones en los niveles de sobresaturación en el entorno de las caras en formación, exponiéndolas a concentraciones de nutrientes altas permanentes, iguales a los del seno de la solución. Por el contrario, en microgravedad donde la convección se halla suprimida, se produce una reducción de la concentración de nutrientes en la interfase del cristal (figura 1). El transporte es puramente difusivo, que para el caso de proteínas es muy lento, formándose una “zona de disminución de nutrientes” en el entorno del núcleo, y gracias a la ausencia de gravedad esta zona es cuasi-estable. Aparentemente, este es el mecanismo

principal de la mejoría en la calidad cristalina por microgravedad. Esta hipótesis no solo está sustentada por los experimentos realizados sino también existe un modelo matemático que explica el proceso de transporte (Lin H. *et al.* 1995).



Los primeros experimentos para cristalizar macromoléculas biológicas en microgravedad lo realizó un grupo alemán, bajo la dirección del profesor Walter Littke, en 1978. En esa ocasión se logró cristalizar exitosamente lisozima y beta-galactosidasa, usando el método de difusión líquido-líquido en una serie de reactores (Salemne, F.R. 1972; Littke, W. 1979; McPherson, A. 1976; McPherson A. 1982). Sin embargo, no fue hasta 1989 que se publicó en Science un artículo donde se reportaba el análisis de difracción rayos x de varios cristales crecidos en microgravedad, los cuales presentaban mayores relaciones $I/\sigma(I)$ en todo el rango de resolución y mayor R (resolución) (De Lucas J.L. *et al.* 1989). El artículo aportó una prueba concreta de que los cristales formados en microgravedad proporcionaban un mayor número de datos de mejor calidad para ser analizados y así obtener finalmente estructuras más precisas.

Según los criterios de comparación establecidos, se encontraron ciertas ventajas para el crecimiento cristalino en microgravedad (De Lucas, J.L. *et al.* 1989; Helliwell, J.R. *et al.* 1995; Snell, E.H. *et al.* 1995).

- ✓ superioridad visual de aquellos cristales crecidos en el espacio.

✓ mayor tamaño de los cristales, varios órdenes de magnitud superiores al cristal más grande obtenido en tierra (McPherson, A. 1996).

✓ mayores resoluciones al difractar.

✓ mejores señales $I/\sigma(I)$ (Wilson Plot). Al comparar la relación $I/\sigma(I)$ en todo el rango de R , se encontraron valores mayores para los cristales formados en microgravedad, aunque se desconocen las propiedades físicas responsables de esto. Aparentemente la superioridad sea reflejo de una menor densidad de defectos.

✓ los picos de las intensidades difractadas son más agudos, indicando (cuantitativamente) que los cristales formados en el espacio presentan un mayor orden interno y perfección.

✓ en ausencia de gravedad se han podido cristalizar no solo proteínas sino otras macromoléculas, las cuales eran muy difíciles de cristalizar en tierra, como ciertos virus (Satellite Tobacco Mosaic Virus), DNA, blancos farmacéuticos (transcriptasa reversa del virus HIV) o proteínas de membrana (bacteriorodopsina).

✓ en microgravedad se elimina el efecto de sedimentación. Los cristales formados en el espacio mantienen sus posiciones estables y definidas durante largos períodos de tiempo. Esto genera un entorno favorable para el crecimiento de múltiples cristales, ya que se minimizan las superposiciones de sus campos difusivos y se asegura un acceso más o menos uniforme de los nutrientes a todas las caras (Boistelle, R. *et al.* 1988). Por otro lado, se evita la incorporación de microcristales o núcleos tridimensionales por sedimentación a las caras en formación de otros cristales.

Gracias a las razones expresadas previamente y las ventajas enumeradas, el método de cristalización en microgravedad es muy conveniente, en particular para aquellas macromoléculas difíciles de cristalizar en tierra o en el caso de conocer las condiciones óptimas de cristalización, para estudiar algunos aspectos de su crecimiento. Por otro lado, entre sus desventajas podemos mencionar que es un método costoso y se requiere de mucho tiempo ya que las misiones no son diarias y las mismas tardan varios días. En particular, cuando se desean realizar experimentos consecutivos.

En tierra es posible reducir la convección natural aplicando campos magnéticos. Dependiendo si son campos magnéticos homogéneos o no homogéneos, estos actúan sobre las

muestras de diferentes maneras. Los campos magnéticos no homogéneos son responsables de reducir la gravedad efectiva que siente una solución a través de la acción de una fuerza magnetizante (Wakayama, N.I. *et al.* 1997). Al aplicar un gradiente de campo magnético en forma vertical se genera una fuerza magnetizante sobre la muestra. Si ésta fuerza es opuesta a la fuerza gravitatoria, se obtiene como resultado una reducción de la aceleración vertical (gravedad efectiva) y por lo tanto, una disminución de la convección natural.

Por simulación matemática de un sistema de cristalización bajo un gradiente de campo magnético se obtuvieron las concentraciones en el entorno de un cristal en crecimiento, verificándose que al aplicar un gradiente de $-685 \text{ T}^2/\text{m}$ la convección se reducía en un 50%, mientras que si se aplicaba un gradiente de $-1370 \text{ T}^2/\text{m}$ la convección prácticamente era anulada, generándose una condición similar a la encontrada en microgravedad (Qi, J. *et al.* 2001). Experimentalmente se obtuvieron cristales de mayor calidad cristalina y que difractaban con mayor resolución, coincidiendo con el modelo matemático (Lin, S.X. *et al.* 2000). Más aún, Wakayama y colaboradores encontraron que en presencia de la fuerza magnetizante opuesta a g se obtenían menos cristales de lisozima que con su ausencia (Wakayama, N.I. *et al.* 1997).

Por otro lado, al aplicar campos magnéticos homogéneos también se observaron cristales de mejor calidad (Sato, T. *et al.* 2000) aunque la acción del campo sea diferente. Se observó que aumentaba la viscosidad de la solución al aplicar campos magnéticos de 10 T en el entorno de un cristal en crecimiento [Sato, T. *et al.* 2000; Zhong, C.W. *et al.* 2001; Wang, L. *et al.* 2002]. El aumento de la viscosidad se traduce en una menor convección en la solución. Además, se observó un efecto orientador de los cristales formados bajo campos magnéticos elevados (Ataka M. *et al.* 1997; Wakayama, N.I. *et al.* 1997). En otro estudio más reciente se evaluó la disminución del coeficiente de difusión de lisozima en una solución de cristalización ante un campo magnético homogéneo de 6 y 10 T (Yin, D.C. *et al.* 2003). Todas estas observaciones están relacionadas entre sí, y se dan por el efecto orientador del campo magnético a nivel microscópico. En una solución sobresaturada, los núcleos proteicos se encuentran en suspensión en la solución y sedimentan al alcanzar un tamaño adecuado, el cual depende del valor del campo. Estos núcleos actuarían como bloques que impiden la libre difusión de monómeros, tornando la solución más viscosa y por ende con menor convección (Yin, D.C. *et al.* 2003).

El área de crecimiento de cristales bajo campos magnéticos es relativamente nueva, y está en etapas de estudio. Aún queda mucho por comprender sobre el efecto de los campos magnéticos homogéneos y no homogéneos sobre soluciones de macromoléculas (Wang, L. . *et al.* 2002).

Cristalización por contradifusión:

Otra forma de reducir la convección natural de las soluciones en gravedad terrestre es incorporar medios gelificados dentro de las soluciones. Ya desde 1968, Zeppezauer y colaboradores describieron el uso de celdas de microdiálisis, formadas por tubos capilares sellados con tapones de gel (poliacrilamida), para reducir la convección en soluciones de cristalización y obtener mejores cristales (Zeppezauer, M. . *et al.* 1968). En 1972, Salemne también aplicó la cristalización dentro de un tubo capilar de vidrio, poniendo en contacto una solución proteica con la solución del agente precipitante, alcanzándose el equilibrio por contradifusión (Salemne, F.R., 1972). Años después, con este mismo set-up se lograron cristalizar las subunidades ribosomales (Yonath, A. . *et al.* 1982).

Tras años de investigación, García Ruíz J.M. propuso el uso de medios gelificados para cristalizar macromoléculas por contradifusión. Esta técnica reunió el principio que reduce la convección y la ventaja de poder incluir un amplio rango de condiciones consecutivas en un solo experimento (García-Ruíz, J.M., 1991). Todos estos avances permitieron que en 1993, J.M. García-Ruíz y su equipo desarrollaran la técnica de acupuntura en geles (García-Ruíz, J.M., *et al.* 1993; García-Ruíz, J.M. *et al.* 1994). Esta técnica novedosa consiste en que la solución de agente precipitante permea un soporte de gel y suba por fuerza de capilaridad dentro de un tubo capilar relleno de solución proteica posibilitando la cristalización (García-Ruíz, J.M. & Moreno, A. 1994). Hoy en día se conoce mucho de ella, ya que se han evaluado distintos tipos de geles, capilares, aditivos y tipo de agentes precipitantes que pueden utilizarse (García-Ruíz, J.M. *et al.* 1994; Bolaños-García, V.M., 2003). A diferencia de otras técnicas, dentro del capilar se pueden tener distintos niveles de sobresaturación, tal que ocurrirá precipitación en zonas de muy altas sobresaturaciones, nucleación cuando la sobresaturación sea elevada y crecimiento de dichos núcleos al bajar la misma. Esto aumenta las probabilidades de encontrar las condiciones adecuadas de cristalización (García-Ruíz, J.M. *et al.* 2001b]. Otras ventajas son la posibilidad de cristalizar proteínas en capilares aptos para su posterior análisis estructural, evitando la posterior manipulación física de los mismos y

reduciendo el riesgo de quebraduras (Ng, J.D. *et al.* 2003) o cristalizar macromoléculas en presencia de agentes crioprotectores y/o metales pesados (Gavira, J.A. *et al.* 2002). Esto facilita su difracción directa, sin roturas al montarlos en capilares o al transportarlos hasta el sincrotrón.

Por medio de la cristalización por acupuntura en geles se han podido cristalizar diversas proteínas de diversos pesos moleculares y amplio rango de puntos isoeléctricos, virus y complejos proteínas-ácidos nucleicos (Biertümpfel, C. *et al.* 2002). Además, en demanda a los avances de la genómica estructural hoy en día se cuenta con un dispositivo que permite realizar múltiples ensayos simultáneos e independientes, apto para un screening efectivo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas (Ng, J.D. *et al.* 2003). Combina las ventajas de las múltiples condiciones dentro de un capilar, aumentando las posibilidades de encontrar las condiciones óptimas, con la posibilidad de difractar directamente los cristales obtenidos, desde el dispositivo. Esto lo convertiría en el primer sistema totalmente canalizado desde las etapas iniciales hasta la obtención de datos para el análisis estructural (Ng, J.D. *et al.* 2003).

Una variante de esta técnica es la cristalización de proteínas por acupuntura en gel en presencia de un campo eléctrico interno (Mirkin, N. *et al.* 2003). El estudio del efecto de campos eléctricos sobre soluciones de cristalización no ha sido muy explorado hasta hace poco. Estudios recientes realizados por el Dr. Aubry y colaboradores, con campos eléctricos externos a las soluciones de cristalización, demostraron que es posible reducir la nucleación de lisozima y aumentar la velocidad de crecimiento de los cristales (Taleb, M. *et al.* 1999). El mismo grupo posteriormente evaluó la cinética de crecimiento cristalino y observó un aumento de la concentración proteica en el entorno de las gotas próximas a un cátodo (Taleb, M. *et al.* 2001). Un resultado similar fue hallado por Nanev & Penkova (Nanev, Ch. *et al.* 2001) al cristalizar lisozima por el método de batch, en presencia de un campo eléctrico externo. Ellos reportaron un crecimiento cristalino de lisozima orientado hacia el cátodo.

Más recientemente, Moreno y Sasaki (2004) al igual que Nieto-Mendoza E. *et al.* 2005, coincidieron que el campo eléctrico ejerce un control en la nucleación. En estos dos trabajos se aplicó el método de crecimiento cristalino en batch, el cual parte de un sistema donde predominan núcleos de lisozima. Solamente se han evaluado proteínas modelo.

La cristalización de macromoléculas biológicas en presencia de un campo eléctrico interno utiliza un set-up similar al usado en acupuntura en gel, con la diferencia en que se introduce un electrodo inerte (Pt) dentro del capilar que contiene la solución proteica y otro colineal a éste dentro del gel. Este sistema parte de una solución proteica subsaturada y alcanza las condiciones adecuadas para la cristalización creando un gradiente de condiciones dentro del capilar. Esto en si es una ventaja ya que no se requiere un conocimiento previo de las condiciones óptimas de cristalización Esta variación de la técnica es novedosa. Solamente ha sido evaluada con proteínas modelo como lo son lisozima y taumatina y una proteína con un centro redox, citocromo c bovino.

1.2- Las proteínas involucradas:

Para este trabajo se han utilizado dos proteínas modelo, Lisozima de huevos blancos de gallina, y Taumatina, de la planta *Thaumatococcus daniellii*. Ambas proteínas se consiguen comercialmente y han sido ampliamente estudiadas. Por otro lado, se eligió al citocromo c de mitocondrias bovinas, como proteína “no modelo” para corroborar el método. A continuación, algunos datos sobre ellas.

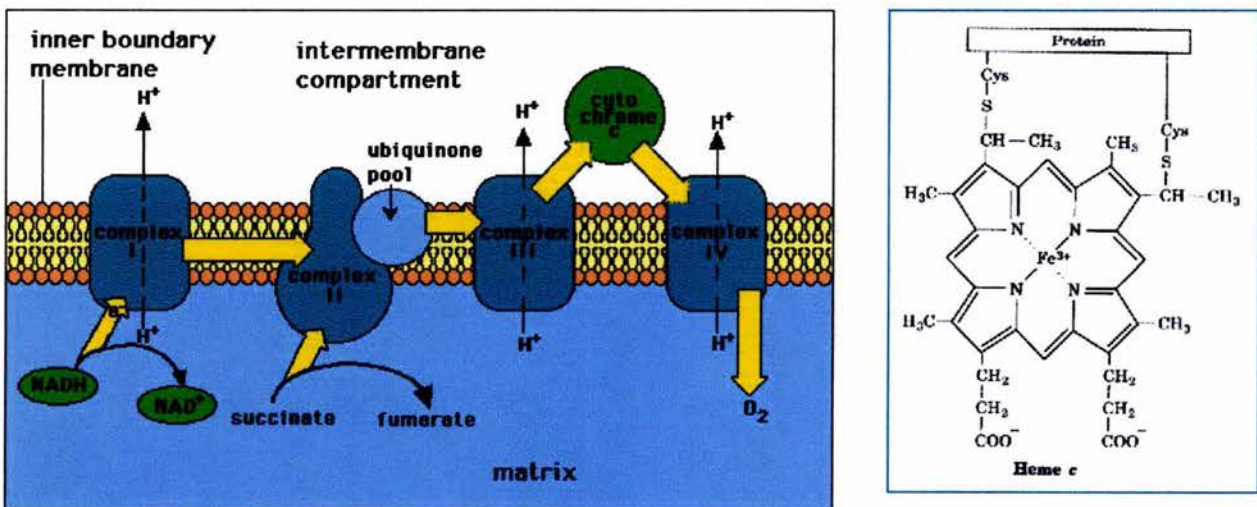
Lisozima es una proteína de 129 aminoácidos, básica (pI 11.2) con un peso molecular de 14.3 kDa. Se encuentra en diversos sitios y especies, como en la clara del huevo o en las lágrimas humanas. Cumple una función antibacteriana, ya que destruye la pared de bacterias Gram positivas, hidrolizando los enlaces N-acetilglucosamina del peptidoglicano. Su cristalización es ampliamente estudiada ya que es muy versátil. Puede cristalizar en distintos grupos espaciales (tetragonal (Joles, P *et al.* 1972), ortorrómbico (Palmer, K.J. 1947), monoclinico y triclinico (Steinrauf, L.K. 1959), si se varían los agentes precipitantes y las condiciones generales de cristalización. Además, es una proteína que cristaliza muy rápido. De aquí que se la use como un modelo de estudio del proceso de cristalización per-se.

Taumatina es una proteína globular de 207 aminoácidos, peso molecular de 22 kDa y pI de 11.7. Esta proteína genera una sensación de dulzura mil veces más intensa que la glucosa, cuando interactúa con receptores específicos de la lengua (Ko T.P. *et al.* 1994). También ha sido cristalizada en distintos grupos espaciales, ortorrómbico, monoclinico (McPherson A & Weickmann, J. 1990) y tetragonal (Ko, T.P. *et al.* 1994). Esta última condición, adaptada al

método de acupuntura en gel es la que se utilizará en esta tesis. Los cristales que se obtienen son bipirámides tetragonales de gran tamaño, que difractan a una resolución de 2 Å.

Citocromo c de mitocondrias bovinas, es una proteína globular de 104 aminoácidos y su peso molecular es de 12000 Da. Se encuentra en el espacio intermembranal de las mitocondrias (figura 2a). Su función es la de transferir electrones desde el complejo III al complejo IV, gracias a la presencia del grupo hemo (figura 2b) el cual se halla covalentemente unido a las cys 14 y cys 17. A su vez, el Fe coordina axialmente a His18 y Met 80.

Figura 2: a- esquema de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. b- grupo hemo c.



Según la clasificación de Ambler (Ambler, R.P. 1978), pertenece al tipo I ya que contiene al grupo hemo en el extremo amino de la proteína, dentro de una cavidad formada por tres hélices α llamada Core, hidrofóbica, y dejando un extremo libre, hidrofílico, expuesto al solvente. El citocromo c presenta una polarización natural, ya que tiene agrupados a varios aminoácidos cargados positivamente, a pH 7, expuestos al medio, que interactúan con la proteína Citocromo C oxidasa (la cual presenta aminoácidos cargados negativamente en esa región). Del otro extremo hay un cluster de aminoácidos cargados negativamente, formando el sitio de unión de una reductasa (complejo III).

Diversas isoformas de esta proteína han sido reportadas (Flatmark, T. 1964, 1966a), las cuales son generadas por desamidación no enzimática en el momento de la purificación (Brautigan, D.L. *et al.* 1978). Existen 4 isoformas reportadas, Cy I es la isoforma nativa,

mientras que Cy II, CyIII y Cy IV han cambiado uno, dos o tres grupos amida de Asn o Gln por Asp o Gln, respectivamente (Flatmark, T. 1966b). Esta liberación de NH₃, por uno, dos o tres aminoácidos es la responsable de que las mezclas tengan diversos pI, siendo la forma nativa la más básica, con un pI 10.78, Cy II pI 10.58 y Cy III 10.36 (Flatmark T., 1966a,c).

Todos estos datos son generalidades de citocromo c de distintas especies. Sin embargo, la estructura del citocromo c bovino no ha sido resuelta por cristalografía de rayos x ni resonancia magnética nuclear. Siendo una proteína soluble y muy estudiada desde diversos aspectos, (físico-químicos y electroquímicos), llama la atención su falta de atención desde un punto de vista estructural. Es por esta razón, sumado a otras, que se eligió esta proteína para cristalizar por el método propuesto en esta tesis.

1.3- Esquema de la tesis:

En el capítulo dos esta tesis se detallará las variables analizadas y se comentarán los resultados que avalan el método de crecimiento cristalino. A su vez, se analiza el proceso desde un enfoque microscópico, postulando una hipótesis de lo que ocurre en el proceso.

En el capítulo tres se evalúa el método como tal a través del análisis de estructuras tridimensionales de dos proteínas modelo, lisozima de huevo de gallina y taumatina de *Thaumatococcus daniellii*. Además se explora el control del campo sobre la nucleación y crecimiento de los cristales. La técnica resultó prometedora ya que permitió obtener cristales de calidad similar a la obtenida por acupuntura en gel, mas se observaron menores tiempos de inducción de la nucleación (Mirkin, N. *et al.* 2004). Esto puede resultar muy interesante desde el punto de vista biotecnológico, donde la necesidad de acortar los tiempos de producción cristalina es una característica muy deseada.

En el capítulo cuatro se presenta el caso de una proteína no modelo, citocromo c bovino. Esta proteína no tenía reportada su estructura tridimensional, por lo que fue necesario encontrar las condiciones de cristalización previamente y luego evaluar su comportamiento frente a un campo eléctrico.

Dentro del capítulo cinco se comenta el comportamiento electroquímico del citocromo c cristalizado y en solución con el fin de analizar las posibilidades de generar un biosensor basados en cristales proteicos.

Por último, en el capítulo seis se hará una conclusión general

Capítulo 2 : Bases del Método.

2.1- Introducción: La celda propuesta para el nuevo método de crecimiento de cristales en presencia de un campo eléctrico interno está basada en la celda de acupuntura en geles (García-Ruíz, J.M; Moreno A., 1994). La nueva celda se esquematiza en la figura 3.

Al inicio del trabajo de esta tesis, se consideraron las variables a analizar con el fin de conocer el sistema propuesto. Las mismas fueron: el material del electrodo, la polaridad de los mismos, la distancia entre electrodos, la corriente a usar. Se eligió la proteína modelo lisozima de huevos de gallina (HEWL) para evaluar estas variables, ya que su cristalización por acupuntura en gel es conocida (método control).

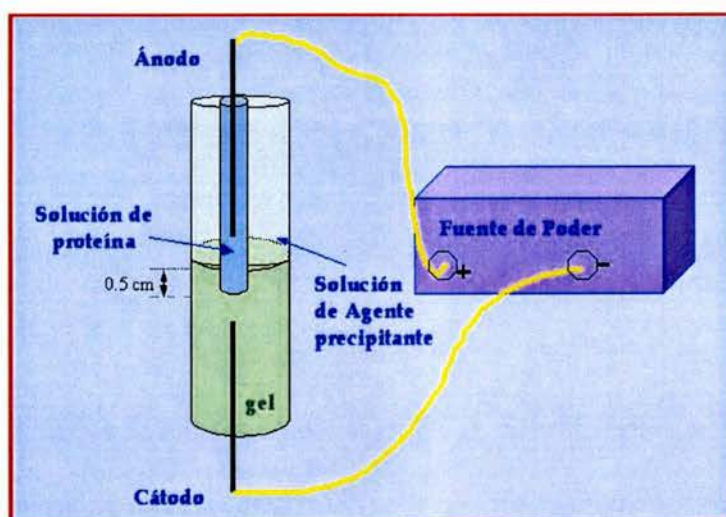
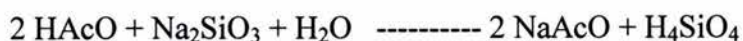


Figura 3: Esquema de la celda de cristalización de proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico interno.

2.2- Materiales y Métodos:

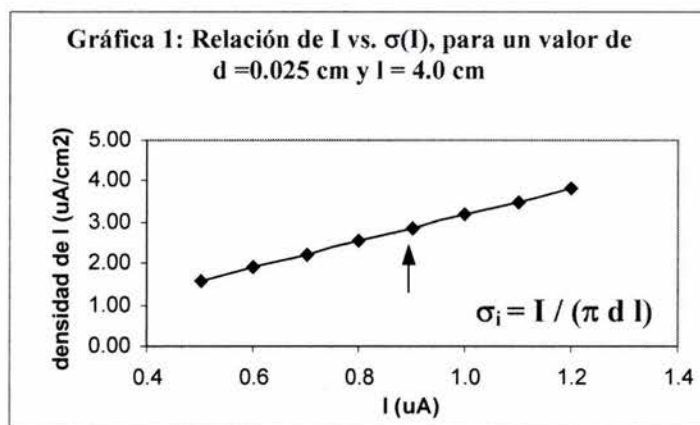
Gel de silicato: se preparan por titulación de ácido acético 1 M con una solución de metasilicato de sodio (densidad: 1.06 g/cm^3) hasta alcanzar un pH de 6.5. La reacción correspondiente es:



Armado de la celda: a la celda de acupuntura en gel (Hampton Research) se le realizan tres orificios, uno en la parte inferior y dos en la tapa, tal que quede el de abajo y el de

arriba alienados, como se ve en la figura 1. Por el extremo inferior se introduce un electrodo de Pt de 1 mm de diámetro, y se inmoviliza con silicón, tal de sellar el orificio y evitar fugas de líquidos. Luego se adiciona la solución preparada del gel y se deja gelificar a temperatura ambiente. A continuación, se introduce un capilar lleno de solución proteica por el orificio superior penetrando unos 0.5 cm dentro del gel. Se usaron capilares de vidrio de 1.3 mm de diámetro interno. El capilar fue previamente lavado por sonicación y secado con alcohol. Una vez seco, es llenado con la solución proteica de trabajo y se le introduce por un extremo un electrodo, sellándolo con plastilina. Este electrodo puede ser Pt o grafito de 0.2 o 0.5 mm de diámetro respectivamente, según la intención del experimento. Luego se incorpora la solución del agente precipitante por el segundo orificio de la tapa, y se lo sella.

Se conectan los electrodos a una fuente de poder, galvanostato (generador de corriente directa, constante). La densidad de corriente (σ_i) aplicada fue $2.86 \mu\text{A cm}^{-2}$. La densidad de corriente se define como $\sigma_i = I / (\pi d l)$ donde I es la corriente directa aplicada, d es el diámetro del electrodo, expresado en cm, l es la longitud de contacto solución proteica-electrodo, también en cm. En la grafica 1 se puede apreciar la relación entre la I y su densidad.



Cabe destacar que para esta tesis se ha utilizado un galvanostato, especialmente diseñado para satisfacer las necesidades del proyecto (galvanostato modelo FCC-17, Electrónica Vimar TM) El mismo cuenta con 7 salidas de corriente independiente, con un fino control de la corriente circulante, de $0.1 \mu\text{A}$ a 10 mA . Además, cada salida muestra la diferencia de potencial generada entre bornes, para control del comportamiento del sistema (foto 1).

Foto 1: imagen del Galvanostato Fec-17, (electrónica Vimar TM)



En el caso de los experimentos control, acupuntura en gel, se usaron las mismas celdas con los electrodos presentes, pero no se les aplicó campo eléctrico.

Condiciones de cristalización de Lisozima por la técnica de acupuntura en gel:

Lisozima (Seikagaku, código: 100940), 100 mg/ml en 50 mM buffer acetato de sodio (NaAcO), pH 4.6, El agente precipitante utilizado fue NaCl disuelto en agua, a una concentración adecuada para que al equilibrarse con el gel sea 10% en peso. Todas las soluciones son filtradas usando un filtro de 0.2 μm .

2.3- Resultados:

Determinación de la I a aplicar: la corriente adecuada para realizar los experimentos de cristalización de lisozima en presencia de un campo eléctrico interno mostraron que la densidad de corriente aplicada no es tan importante como la velocidad de difusión de los iones (movimiento de cargas). Al mantener una densidad de corriente fija, en casos en donde la longitud de contacto solución proteica-electrodo (l) es pequeña, se debe aplicar una corriente eléctrica mayor, según la ecuación (1). Dadas las condiciones del experimento, la solución presenta una resistencia natural (R) a la migración de iones, generando una diferencia de potencial entre los bornes de la celda. Al imponer una I mayor, fuerza al sistema a que los iones migren a mayor velocidad, provocando que se incremente la diferencia de potencial entre electrodos (según la ley de Ohm, $V= I \cdot R$). Esto genera un mayor grado de hidrólisis del agua, con el consecuente mayor desprendimiento de O_2 dentro del capilar y de H_2 en el gel. Esto provoca una interferencia en el proceso de cristalización bajo el diseño propuesto, por lo que es mejor usar corrientes menores (aunque sea menor la densidad de corriente sobre el electrodo). Se observó también que si se aplica

una corriente muy baja, el proceso de cristalización se volvía más lento, y se asemeja a la cristalización por acupuntura en gel (control). Se fijó una corriente óptima de $0.9 \mu\text{A}$, independientemente de la densidad de corriente resultante.

Una vez elegida la corriente adecuada, se **analizó la polaridad del electrodo** que estaba en contacto con la solución proteica. Para ello se trabajó con electrodos de Pt, tal cual se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Cuando el cátodo estaba en contacto con la solución de lisozima, se encontraron cristales adsorbidos al electrodo, bien facetados que fueron de NaCl. Además, puede apreciarse dentro del capilar que el electrodo se llena de un precipitado blanquecino. En la figura 4a-c se pueden apreciar los mismos.

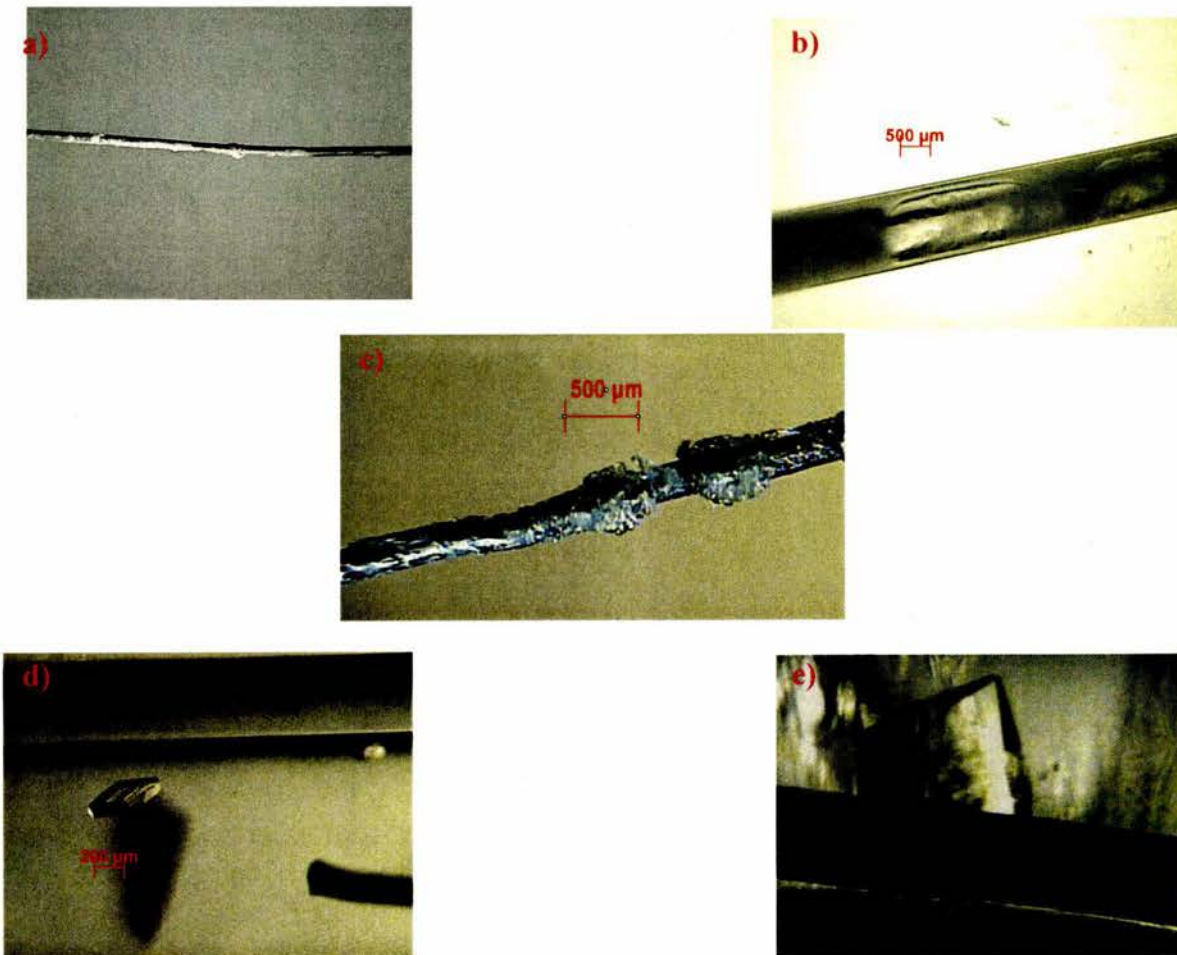


Figura 4: Estudio de la polaridad del electrodo. Imágenes de electrodos de Pt que actuaron a) cátodo al cabo de 24 h; b) cátodo al cabo de 48 h.; c) cátodo al cabo de 96 h.; d) ánodo al cabo de 24 h v e) ánodo al cabo de 48 h. de ser sometido al campo eléctrico interno.

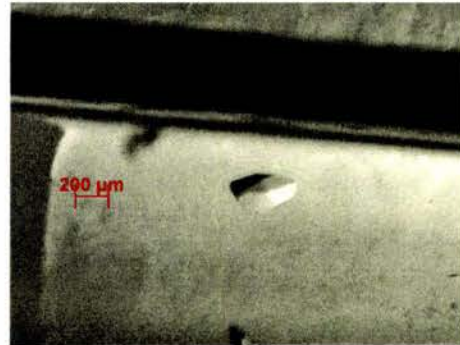
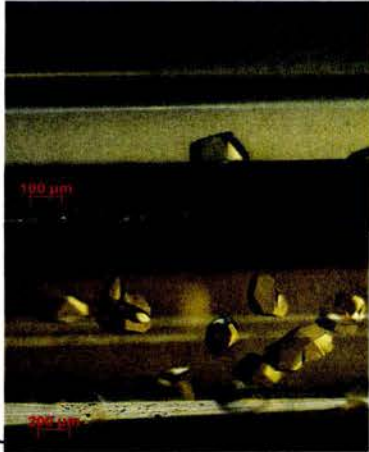
Por el contrario, cuando el Pt actúa como ánodo, se observaron cristales en solución y adsorbidos, como los de la figura 4d-e, apareciendo primero los solubles y luego los adheridos al electrodo.

Estudio del material del electrodo: se decidió evaluar el efecto que ejerce usar distintos materiales de electrodos en contacto con la solución proteica. Este estudio es importante porque antes se creía que la adsorción de proteínas a electrodos metálicos era un proceso “desfavorable”, que conllevaba la desnaturalización o la inactivación biológica de las mismas (F.A. Armstrong & G.S. Wilson 2000). Sin embargo, esto no es verdad para todos los casos. De hecho, existen muchos estudios electroquímicos de proteínas en donde se utilizan diversos electrodos metálicos. Con este fin se puso en contacto la solución de lisozima con un ánodo de grafito o de Pt. Los resultados se muestran en la figura 5. Ambos ánodos metálicos permitían la cristalización de lisozima. Primero aparecían cristales en solución y luego algunos crecían adsorbidos al electrodo.

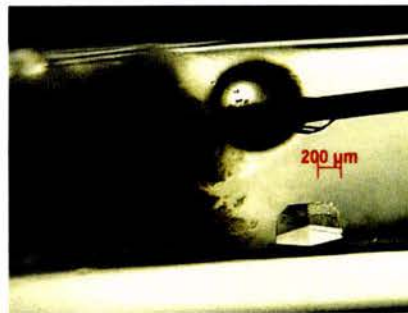
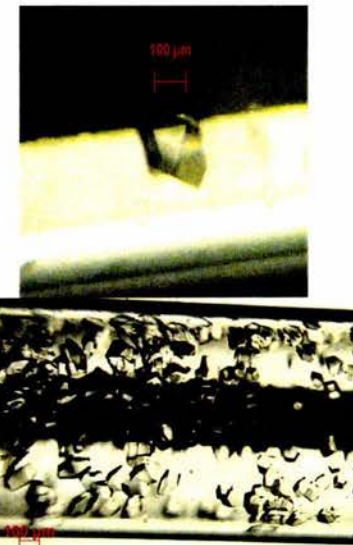
Por último se realizó un **análisis del efecto de la separación entre electrodos**. Se consideraron las siguientes separaciones 1.0 cm, 1.5 cm y 2.0 cm, con ánodos de Pt o C (grafito) en contacto con la solución y cátodos de Pt en contacto con el gel. Los resultados (figura 5) muestran igual tamaño de cristales, se forman cantidades similares en todos los casos, pero el tiempo necesario para que aparezcan aumenta conforme aumenta la distancia entre electrodos. Por otro lado, se notó que los cristales que crecían en presencia de un campo eléctrico interno (para todas las separaciones de electrodos analizadas) aparecían en un menor tiempo respecto a un experimento en donde no se aplica el campo eléctrico interno, aunque no se analiza en detalle el aspecto cinético en esta etapa.

Figura 5: Estudio del material del electrodo. cristales de lisozima obtenidos con ánodos de Grafito o Pt, a distintas distancias entre electrodos.

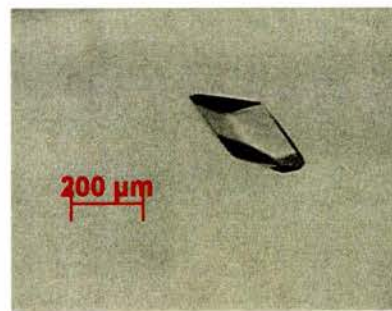
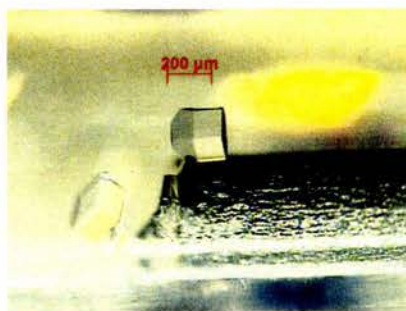
1.0 cm
entre
electrodos



1.5 cm
entre
electrodos



2.0 cm
entre
electrodos

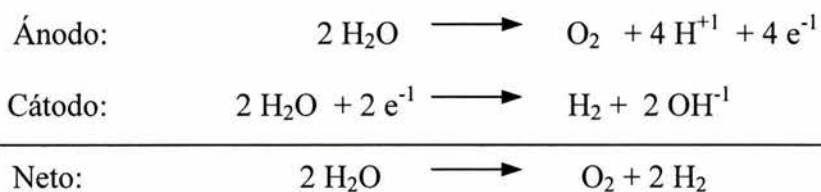


2.4- Discusión:

Los resultados encontrados demuestran que es viable la cristalización de proteínas bajo un campo eléctrico interno.

El proceso de cristalización en presencia del campo eléctrico interno lleva una secuencia de eventos similares a los encontrados en la técnica de acupuntura en gel. En ambos casos se observa que el agente precipitante permea un soporte de gel y sube por fuerza de capilaridad dentro de un tubo capilar relleno de solución proteica posibilitando la cristalización (García-Ruiz, JM. & Moreno, A. 1994). Dentro del capilar se pueden tener distintos niveles de sobresaturación, tal que ocurrirá precipitación en zonas de muy altas sobresaturaciones (extremo inferior), nucleación cuando la sobresaturación sea elevada y crecimiento de dichos núcleos al bajar la misma. Esto aumenta las probabilidades de encontrar las condiciones adecuadas de cristalización (García-Ruiz, J.M. *et al.* 2001b). Por otro lado, al adicionar un campo eléctrico se estaría afectando la cinética de la cristalización, ya que a la difusión de iones debe sumarse el proceso de migración de los mismos influenciados por el campo eléctrico. Esto se infiere en base a los resultados preliminares hallados en cuanto al efecto de la distancia entre los electrodos y se analizará en mayor detalle en el capítulo 3 de esta tesis.

La elección de la corriente a aplicar fue decisiva. Imponer una corriente alta en celdas poco conductoras como la usada, provoca una gran diferencia de potencial entre los electrodos, permitiendo la electrólisis del agua



En base a los resultados hallados en el estudio de la polaridad del electrodo, el ánodo se pone en contacto con la solución de lisozima, y ante potenciales altos, se produce O₂ (g). Este burbujeo fue observado, y provoca efectos indeseados en el proceso. Por un lado, las burbujas pueden llegar a ocupar el diámetro del capilar, interrumpiendo el flujo de

corriente. Por otro lado, el burbujeo provoca turbulencias en la solución, afectando el proceso de cristalización (la convección y la turbulencia son fenómenos de transferencia de masas que afectan negativamente la calidad cristalina). Además, la reacción anódica produce protones, cambiando la acidez del medio y por lo tanto, las condiciones de cristalización. Todos estos factores negativos, deben evitarse para poder obtener cristales de calidad para estudios estructurales, y se consiguió imponiendo una menor corriente al sistema, que se traduce en un menor campo eléctrico interno, a través de la ecuación

$$\Delta V = \int \mathbf{E} \cdot d\mathbf{l} \quad (1)$$

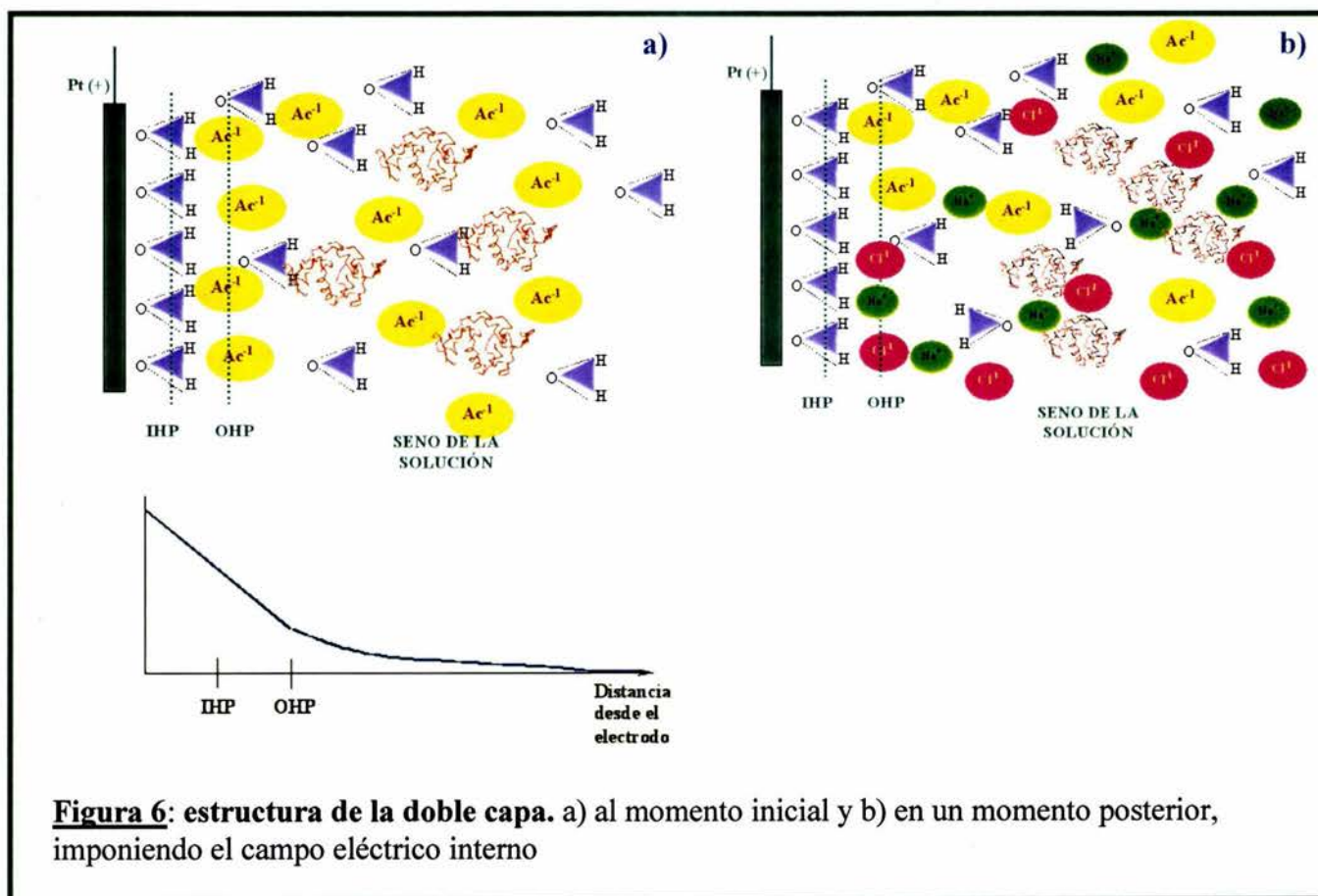
donde ΔV es la diferencia de potencial entre dos puntos y la integral es el producto escalar del vector campo eléctrico (\mathbf{E}) y del vector trayectoria ($d\mathbf{l}$).

Los electrodos de grafito y de platino no mostraron diferencias respecto al proceso de cristalización. Ambos son aptos, permitiendo la cristalización en solución y adsorbidos a ellos. No se observaron desnaturalizaciones de lisozima ni se afectó la transferencia de carga por la presencia de los cristales adsorbidos al ánodo. Desde un punto de vista práctico, los electrodos de grafito de diámetros tan pequeños tienen la desventaja de ser muy frágiles y se dificulta la manipulación de los mismos en estas celdas, por lo que será más conveniente en el futuro utilizar electrodos de Pt.

Hasta la fecha no se han realizado cristalizaciones de proteínas con sistemas que apliquen una corriente eléctrica directamente sobre la solución proteica (campo eléctrico interno), sin embargo, sí se ha intentado cristalizar proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico externo (Taleb M. *et al.* 1999). En dicho trabajo, se encontraron cristales de lisozima crecidos a pH 4.6 en gotas expuestas a un campo eléctrico externo, los cuales presentaban una orientación preferencial hacia el cátodo (electrodo de mayor potencial, usualmente indicado con el signo negativo). Como la proteína presenta una carga neta positiva al pH de trabajo, es lícito pensar que esta orientación preferencial se debía a una interacción electrostática. Por el contrario, según los resultados hallados en esta etapa de la tesis se observó que cuando la solución proteica se ponía en contacto con el cátodo, no se formaban cristales de lisozima. Tal vez la razón se deba a como se acomodan las moléculas proteicas y los iones en la doble capa eléctrica. Para ello, es importante comprender como es la estructura de la misma.

Básicamente, lo que ocurre al poner en contacto una solución acuosa y un electrodo metálico es una reorientación de los dipolos de las moléculas neutras en torno al metal y de los iones, debido a la asimetría de las interacciones intermoleculares que sienten las moléculas de la frontera. A su vez, sobre la superficie del metal también se producen reordenamientos de cargas, generándose una diferencia de potencial entre el metal y la solución. Esto se esquematiza en la figura 6a.

En la primera capa, o plano interno de Helmholtz (IHP), se ubican las moléculas de solvente polarizadas, que están fuertemente retenidas al metal por interacciones dipolares. Los iones de carga opuesta se ubican a continuación, hidratados, y muy retenidos, en el plano externo de Helmholtz (OHP)¹.



¹ Según el modelo de la doble capa eléctrica de Helmholtz. Bard & Faulkner (2001).

Los procesos de adsorción sobre el electrodo ocurren sobre este último plano. Más allá de él, los depósitos sobre el electrodo están unidos por interacciones más débiles, y se separarán del electrodo al moverlo dentro de la solución.

Los cristales que se obtienen por el sistema propuesto en este trabajo se forman en solución y algunos crecen unidos al electrodo. Esto se puede explicar al considerar que el agente precipitante ingresa al capilar por el extremo inferior y luego asciende, induciendo nucleación a su paso. Se observa primero un precipitado amorfo denso en la región más inferior del capilar. En una zona más arriba se induce la nucleación en solución que dará origen a cristales en solución y en un momento posterior, algunos núcleos crecerán adsorbidos al electrodo.

El efecto del campo eléctrico en la cristalización ha sido recientemente estudiado por algunos científicos. Moreno & Sazaki trabajando con un sistema de electrodos paralelos en contacto con una solución de lisozima y agente precipitante (batch) observaron que se formaban cristales en el entorno del cátodo (Moreno A. and Sazaki G. 2004). En este trabajo se postula que la fuerza conductora de la cristalización está compuesta por el potencial químico (μ) y el potencial eléctrico (ϕ), por lo que la resultante de estos dos potenciales será quien dictamine si es posible o no la cristalización de proteínas en presencia del campo. $\Delta\mu_{\text{total}} = \Delta\mu_{\text{químico}} + \text{potencial eléctrico} = -k_B T \ln \beta + z F \Delta\phi$

donde k_B es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta, β es la sobresaturación definida como la relación entre la concentración inicial de la proteína (C) respecto a la concentración de equilibrio (C_{eq}). Z es la carga de la especie iónica, F la constante de Faraday y $\Delta\phi$ es la diferencia de potencial eléctrico.

Si bien en el trabajo de los doctores Moreno y Sazaki se obtienen cristales adsorbidos y junto al cátodo, este resultado no está en oposición a los hallados en esta tesis. En el sistema que ellos usan predomina en solución la presencia de núcleos, debida a la incorporación conjunta de proteína y agente precipitante, la cual se distribuye en la celda de manera asimétrica, por la presencia del campo eléctrico. La alta concentración de Cl^{-1} en el entorno del ánodo provoca una excesiva sobresaturación afectando directamente al potencial químico, generando precipitados amorfos. Al contrario, se observó el crecimiento de cristales solamente en el área del cátodo. En el sistema propuesto en esta tesis,

inicialmente se halla en contacto con el electrodo (ánodo) la solución proteica, cargada positivamente. En estas condiciones no hay una atracción electrostática inicial que precipite o desnaturalice la proteína adsorbida al electrodo, ni una alta sobresaturación. Debido a la presencia del campo eléctrico, se produce la migración de iones (resultado del potencial eléctrico) sumado a la difusión (debida al potencial químico). Este efecto induce un aumento de la sobresaturación dentro del capilar, con la consiguiente agregación y nucleación de lisozima.

Analizando cualitativamente el potencial electroquímico en el entorno del ánodo, encontramos que un aumento de β provoca un valor de $\Delta\mu_{\text{químico}}$ más negativo, favoreciendo el ΔG del proceso; el ánodo es el electrodo con un potencial eléctrico más positivo desfavoreciendo el ΔG del proceso. Dado que no se conoce el valor exacto de $\phi_{\text{ánodo}}$ ni del $\phi_{\text{cátodo}}$ no es posible concluir la razón por la cual se observan cristales únicamente con el ánodo en contacto con la solución proteica, mas en función de las observaciones encontradas, para este sistema la suma de los dos potenciales estaría favoreciendo la cristalización en el entorno del ánodo.

Los núcleos que se adsorben al electrodo lo hacen firmemente, permitiéndonos suponer que existe cierta unión entre el ión Cl^{-1} de la capa externa de Helmholtz y la proteína. Por otro lado, en las condiciones de cristalización aplicadas, la lisozima cristaliza bajo el sistema tetragonal uniendo un Na^{+1} y un Cl^{-1} (Vaney, MC *et al.* 2001) Cuando una molécula de Lisozima interacciona con un Cl^{-1} de la doble capa, forma una base para que sobre ella se depositen otras moléculas de lisozima (que a su vez interaccionan con Na^{+} y Cl^{-}) y así se forman los cristales adsorbidos.

También, y apoyando a esta idea, se ve que a medida que aumenta la separación entre los electrodos el proceso de formación de cristales tarda más tiempo. Al separar los electrodos, el campo eléctrico que se forma entre ellos es mayor, y por ende, mayor será la fuerza eléctrica que sienten los iones. Sin embargo, mayor es la distancia que deben recorrer para alcanzar al electrodo y acomodarse en su entorno, desplazando a los iones Ac^{-1} . Aparentemente, estos dos factores estarían actuando en oposición, y la resultante de ellos es quien regularía el tiempo de aparición de cristales adsorbidos al electrodo. Por lo

tanto, la cristalización en solución está más favorecida que la cristalización sobre el electrodo, a mayor separación de electrodos.

Este análisis se aplicó para otra proteína modelo, Taumatina, de *Thaumatococcus daniellii*. La misma cristaliza en presencia de la sal tartrato de sodio y potasio, y también ha crecido en contacto con un ánodo (figura 7). En el siguiente capítulo se comentará el análisis respectivo para la validación del método propuesto. También se ha evaluado la cristalización por esta técnica con citocromo c, una proteína que presenta un grupo metálico, y la cual no se tenía conocimiento de su estructura tridimensional antes de esta tesis. La misma se analiza en el capítulo 4 de la tesis.

Capítulo 3 : Validación del Método

3.1- Introducción:

Un grave problema de la cristalización de proteínas en presencia de la gravedad terrestre es el efecto de la convección natural sobre las soluciones de cristalización, como se ha comentado en la introducción de la tesis (capítulo 1). Diversas técnicas se han desarrollado para contrarrestar este efecto, enfocadas desde distintos ángulos. El uso de geles ha sido empleado por muchos años para este fin, gracias a su propiedad de reducir el transporte convectivo permitiendo el transporte difusivo. A su vez, dependiendo del tamaño del poro, se obtiene un efecto de filtro selectivo, disminuyendo la presencia de impurezas y favoreciendo el crecimiento de cristales proteicos de gran calidad. Estas ventajas son aprovechadas por la técnica de acupuntura en geles, junto a la posibilidad de tener un gran rango de condiciones en un solo experimento, aumentando las probabilidades de tener un ensayo exitoso, es decir, lograr la cristalización de la proteína deseada.

En el método propuesto en esta tesis, llamado crecimiento de cristales de proteínas en presencia de un campo eléctrico interno, se adiciona otra variable al proceso de cristalización. En estudios previos, se observó que los cristales formados en presencia del campo eléctrico interno aparecían en menos días.

Cuál es el efecto que ejerce el campo eléctrico interno aplicado sobre las moléculas de proteína? ¿Qué provoca el aceleramiento del crecimiento cristalino? ¿Hay cambios estructurales en el empaquetamiento de las moléculas? Y si los hay, ¿cuáles son?

La presencia del campo eléctrico interno tiene un efecto sobre los iones, generando un mayor movimiento de los mismos debido al fenómeno de la migración. Además se genera una separación de cargas, en respuesta a la diferencia de potencial resultante. Todos estos cambios, respecto al método control, ¿afectan negativamente a los cristales obtenidos? ¿Es válido el método propuesto, desde un punto de vista práctico, para el crecimiento de cristales de proteínas? Para resolver estas preguntas se realizó un análisis de la calidad cristalina, y se resolvieron las estructuras tridimensionales de cristales de lisozima y taumatina, crecidos en presencia y ausencia del campo eléctrico interno. A su vez, se analizó el aspecto cinético del crecimiento cristalino.

3.2- Materiales y Métodos:

Soluciones proteicas y agentes precipitantes: se disolvieron 100 mg/ml de lisozima (Seikagaku, código: 100940), en buffer 100 mM acetato de sodio pH 4.6; Taumatina 100 mg/ml se preparó en agua destilada. Todas las soluciones se filtran con membranas de poros de 0.02 μm (Anotop 10 de Whatman).

Los buffers y sales empleados son de Sigma.

Crecimiento de cristales por acupuntura en geles: se realizó siguiendo los principios de la técnica. Brevemente, se llenaron capilares de 1 mm de diámetro con solución proteica (lisozima o taumatina). El capilar es sellado por un extremo y colocado por el extremo abierto sobre un gel de silicatos (preparado según se describió en la sección 2.2) a una profundidad de 0.5 cm. Sobre el gel se coloca la solución de agente precipitante (NaCl 10 % en peso disuelto en el mismo buffer acetato, para la cristalización de lisozima, mientras que se usó Tartrato de Na y K 12.5 % en peso en 100 mM buffer fosfato de sodio, pH 7 para la cristalización de taumatina.). Las celdas son selladas con grasa de vacío y parafilm y colocadas a 18 °C. Se controló la presencia de cristales bajo un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV11.

Crecimiento de cristales bajo un campo eléctrico interno. Se armó la celda tal cual se describió en la sección 2.2, con electrodos de Pt como ánodo y cátodo. Los mismos se colocan separados 2 cm. La corriente aplicada fue de 0.9 μA , constante. Todo el equipo se colocó en una cámara a 18 °C y se verificó la presencia de cristales bajo un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV11. Las proteínas se cristalizaron bajo las mismas condiciones (concentración, temperatura, buffer, agente precipitante) utilizadas en la técnica de acupuntura en gel.

Difracción de rayos x de los cristales formados: Los cristales formados en los experimentos de acupuntura en gel y bajo el campo eléctrico interno son introducidos en capilares adecuados para difracción (Hampton Research) y sometidos a un haz de rayos x generado por un equipo Rigaku R-AXIS IIC con un generador de ánodo rotatorio (operado a 50 kV, 100 mA) a 291 K, en el Laboratorio Universitario de Estructuras Proteínas (LUEP), ubicado en el Instituto de Química de esta universidad.

Los datos de difracción de taumatina fueron integrados con el programa DENZO (Ostrowski & Minor, 1997) y escalados con programas del paquete de CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). La estructura tridimensional se obtuvo por reemplazo molecular, utilizando los datos del Protein Data Bank para taumatina (código 1THW). El reemplazo molecular al igual que los ciclos de afinamiento se realizaron con programas del paquete de CNS v 1.0 (Brünger *et al.* 1998). El modelado se realizó con el programa Quanta 2000 (Molecular Simulations Inc., Burlington, MA, USA) y la estereoquímica del mismo se evaluó con el programa PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993).

Para el caso de Lisozima, se utilizó el programa d-Treck para la integración y escalamiento de los datos (Pflugrath, JW 1999) y se obtuvieron los factores de estructura con el programa Truncate (de CCP4, (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994)). La estructura tridimensional se obtuvo por reemplazo molecular, usando como modelo los datos del Protein Data Bank (código 193L). El reemplazo molecular y los ciclos de afinamiento se realizaron con programas del paquete CNS v1.1 (Brünger *et al.* 1998) mientras que el modelado se realizó con el programa Turbo-Frodo (Roussel A. and Cambillau, C. 1989). La estereoquímica se evaluó, al igual que para taumatina, con el programa PROCHECK.

Estudio de la cinética de crecimiento general.

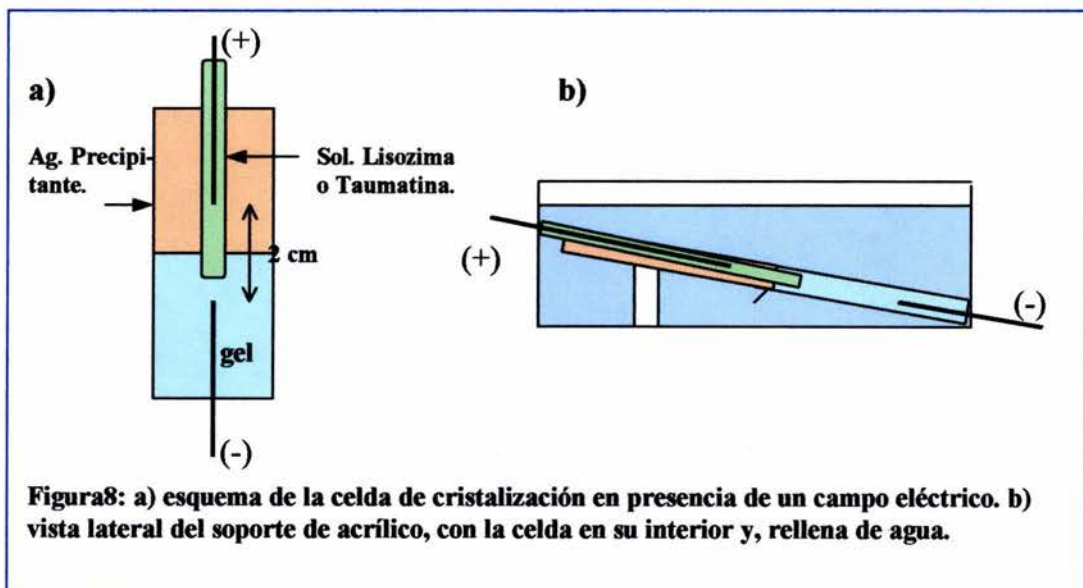
Se realizaron cristalizaciones en presencia y ausencia de un campo eléctrico interno, aplicando el set-up descrito en la sección 2.2. La corriente aplicada fue de 0.9 μA , y la separación de electrodos se mantuvo en todos los casos de 2 cm.

Para el caso de lisozima se utilizó una concentración de 50 mg ml^{-1} en 0.1 M buffer acetato de sodio, pH 4.6 (Seikagaku, code: 100940), la concentración del agente precipitante (NaCl) fue 10% en peso, disuelto en agua. Mientras que para Taumatina, la concentración usada fue de 50 mg ml^{-1} en agua destilada (Sigma, T-7638) y el agente precipitante, Tartrato de Na y K, 12.5 % en peso, disuelto en 50 mM NaH_2PO_4 pH 6.8-7.0

Para obtener un control térmico eficiente durante los experimentos se realizaron leves modificaciones. En primer lugar, la celda es sellada con grasa de vacío en las uniones y plastilina en los orificios de entrada de las soluciones. Dicha celda es colocada en una caja

de acrílico rectangular, de modo casi-horizontal, sobre una placa termostatzada dispuesta a 18 °C (figura 8). La caja de acrílico es rellena con agua, de modo de homogenizar la temperatura en su interior. Todo este dispositivo está ubicado sobre un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV11 que cuenta con una CCD cámara, conectada a un ordenador el cual permitirá almacenar las imágenes registradas y a su vez, analizarlas con el programa del microscopio (AxioVision 3.1, de Carl Zeiss.).

En el caso de experimentos en presencia a un campo eléctrico interno, los electrodos se conectan a con un galvanostato (Vimar), aplicando una corriente directa constante de 0.9 μ A. Para los experimentos control (acupuntura en gel) el set-up es el mismo, sin la conexión a la fuente de corriente.



Las imágenes tomadas se analizaron con el programa Image Tool 3.0 para MS-Windows (Wilcox D. *et al.* 1995-2000).

3.3- Resultados:

Análisis estructural.

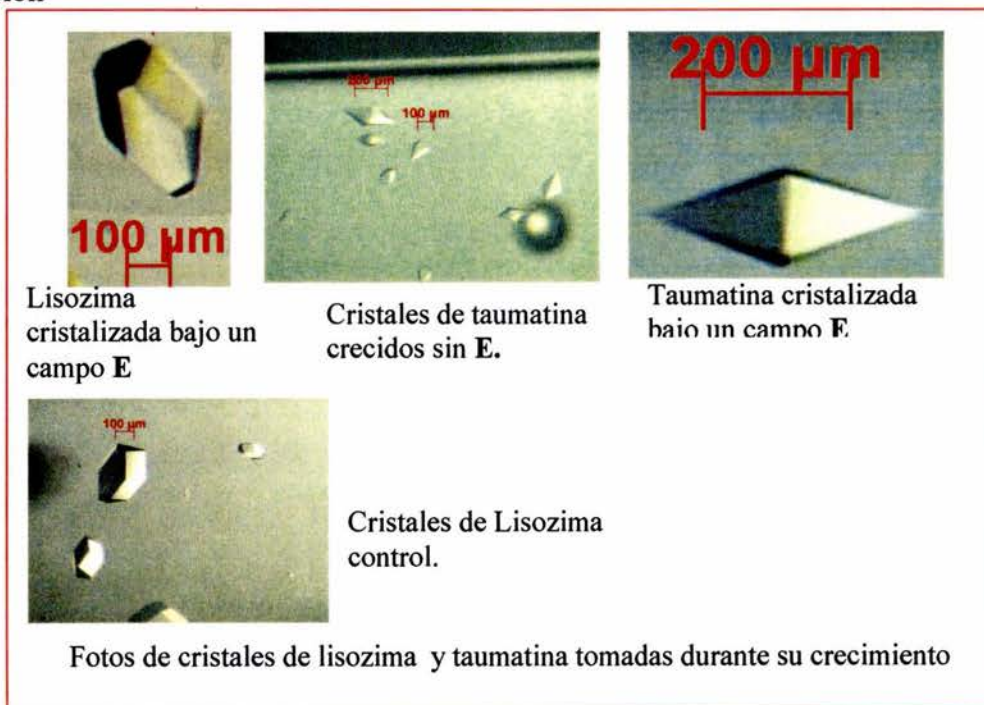
En primer lugar, se evaluó si la presencia de un electrodo de Pt en contacto con la solución proteica y en ausencia de un campo eléctrico interno, no inducía la adsorción de cristales sobre él. El resultado indicó que no hay una adsorción preferencial de los cristales

de lisozima o taumatina sobre él, ni se desnaturalizan las proteínas ante su presencia. En base a este resultado, en los experimentos control se omite incorporar un electrodo de Pt dentro del capilar.

Los cristales de lisozima y taumatina formados en presencia de un campo eléctrico interno presentaron morfologías y tamaños idénticos a los encontrados en los experimentos control. El tiempo de exposición de la solución proteica al campo eléctrico se midió desde el tiempo de conexión de los electrodos a la fuente de poder hasta la aparición de cristales de 0.2 mm de lado, en la región inferior del capilar.

En el caso de lisozima, los cristales formados en presencia de **E** aparecieron antes que los crecidos en su ausencia. En los dos casos aparecieron dentro de las 24 horas. Fue notable la diferencia en los tiempos de aparición de los cristales de taumatina. En presencia del campo se colectaron a los 7 días.

Se colectaron datos de difracción de rayos x a dos cristales de taumatina cristalizada con **E** interno (electau1 y electau2) y un cristal de taumatina control (electauf). Para lisozima, se colectaron 3 cristales formados bajo un **E** interno (liselec1, liselec2 y liselec3) y un cristal control (liscontrol). Todos ellos se montaron en capilares adecuados para difracción de rayos x y se sometieron a un haz de 1.5419 Å. En la tabla 1 se indican datos estadísticos de la colecta y su resolución. En la tabla 1 se indica datos estadísticos de la colecta y su resolución.



Ambas proteínas cristalizadas ante **E** interno presentaron el mismo grupo espacial que el control, alcanzándose buenas resoluciones para todos ellos. Los parámetros de la celda unidad tampoco se vieron alterados por la imposición del campo eléctrico. Todos los cristales difractaron a resolución de 2 Å aproximadamente, y las colectas se realizaron alcanzando una alta integridad (arriba de 90% en todos los casos) garantizando una gran cantidad de datos que generaran un buen modelo final.

Una manera de analizar la calidad cristalina, es a través del gráfico de Wilson, en donde se analiza la variación del cociente Intensidad / desvío estándar (I) en función de distintas resoluciones (Å) (French, G.S. and Wilson, K.S., 1978). Otra expresión de esta ecuación es graficar la relación del logaritmo natural de la relación de los factores de estructura vs. la inversa de la resolución, de acuerdo a la ecuación:

$$|F|^2 = K * F(\text{observado})^2 * \text{EXP}(-2B * \text{sen}^2 \theta / \lambda^2)$$

donde K es un factor de escalamiento entre las intensidades difractadas observadas y el factor de estructura F. En general, los F experimentales son menores que los f teóricos. Entonces, para una resolución dada, a mayor relación entre F^2/f^2 , mayor es la calidad del cristal obtenido. En la figura 9 se muestran las curvas de Wilson para cristales de lisozima crecidos con y sin corriente eléctrica y en la figura 10 el homólogo para cristales de taumatina. Los datos de ambas gráficas se obtuvieron con el programa Truncate, de CCP4

Los cristales de Lisozima presentaron valores cercanos al control, siendo en algunos casos hasta mejor que él. Lo mismo se observó para Taumatina. Esto sugeriría que la presencia del campo eléctrico interno no solo no afecta significativamente el ordenamiento interno, sino que en algunos casos lo favorece, resultando en cristales de mayor calidad.

Por otro lado, *elec1* mostró datos ligeramente inferiores. Esto puede deberse a que este cristal creció en alguna zona del capilar más expuesta a movimientos que alteraron su calidad. De todos modos, los valores hallados para *liselec1* no son malos.

Tabla 1: estadística de la difracción y del modelo.

	Electauref	Electau1	Electau2	Liscontrol	Liselec1	Liselec2	Liselec3
Colecta							
Grupo espacial	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Parámetros de la Celda Unidad (Å)							
a	58.664	58.647	58.633	78.91	78.9097	79.078	79.17
b	58.664	58.647	58.633	78.91	78.9097	79.078	79.17
c	151.391	151.390	151.427	37.98	37.9838	38.08	38.02
Resolución (Å)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.1	2.3
Reflex. totales	135685	134546	105150	30313	19276	22444	27723
Reflex. únicas.	18694	19702	19204	8153	5250	5414	5554
I/σ(I)	9.0	3.6	7.8	22.1	9.0	34.5	40.2
Integridad	99.2	98.8	96.5	95.6	92.2	94.3	96.7
Rmerge (%)	0.053	0.112	0.059	0.039	0.108	0.029	0.027
Afinamiento de la Estructura.							
R/Rfree	0.177/0.205	0.192/0.224	0.173/0.187	0.197/0.239	0.200/0.245	0.196/0.258	0.207/0.268
B factor promedio	23.4	24.2	22.6	20.8	22.8	20.8	19.2
Desvíos r.m.s.							
Enlaces (Å)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Ángulos de enlace (°)	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2	1.2

ángulos diedros. (°)	25.4	25.4	25.4	22.8	22.9	22.8	23
Nº de átomos (distintos de H).							
Proteína	1545	1546	1548	1009	1029	1009	1028
Ligandos o Iones	10	10	10	2	2	2	2
Aguas	93	97	98	40	31	42	33

Figura 9: Wilson Plot Lisozima

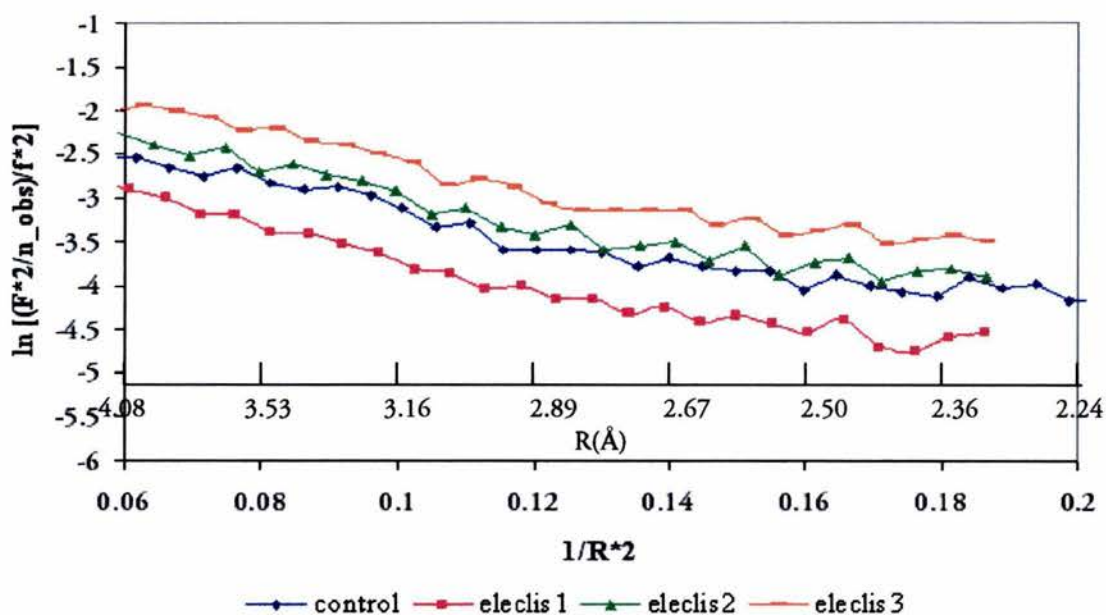
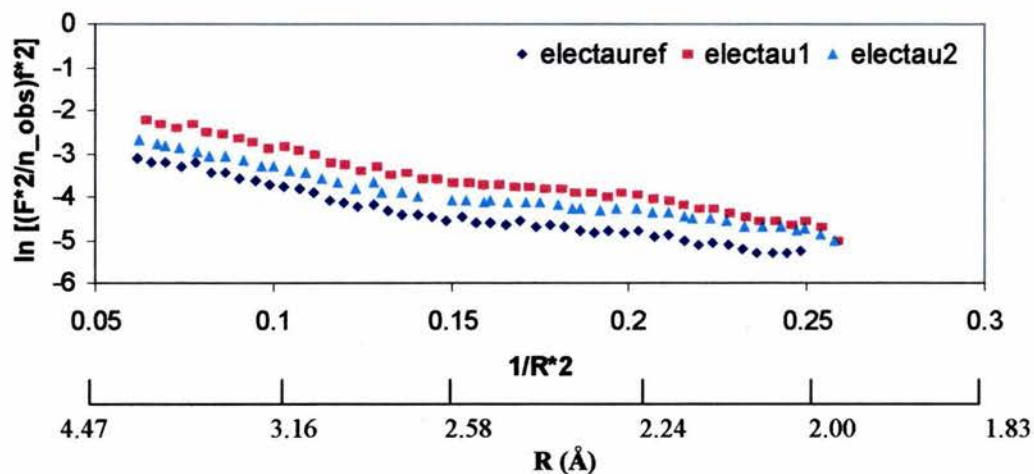


Figura 10: Wilson Plot de Taumatina.



Otro dato interesante fue que no se encontraron diferencias significativas respecto al número de aminoácidos con posiciones alternas, entre el cristal control y los obtenidos bajo la influencia de **E**, tanto para taumatina como para lisozima. Aparentemente, el hecho de que circule una corriente de iones en el sistema, impulsados por el campo no rigidiza los residuos cargados ni provoca una orientación preferencial de los mismos en el cristal. Los modelos obtenidos tiene valores de B similares (B es un parámetro que refleja los movimientos vibracionales de los átomos en la red tridimensional), y los desvíos de las distancias y ángulos de enlace están dentro de los valores normales, indicando que el efecto de la corriente eléctrica que circula por el sistema no solo no altera la calidad cristalina de estas dos proteínas modelo, sino que no afecta el empaque de las moléculas, ni las distorsiona.

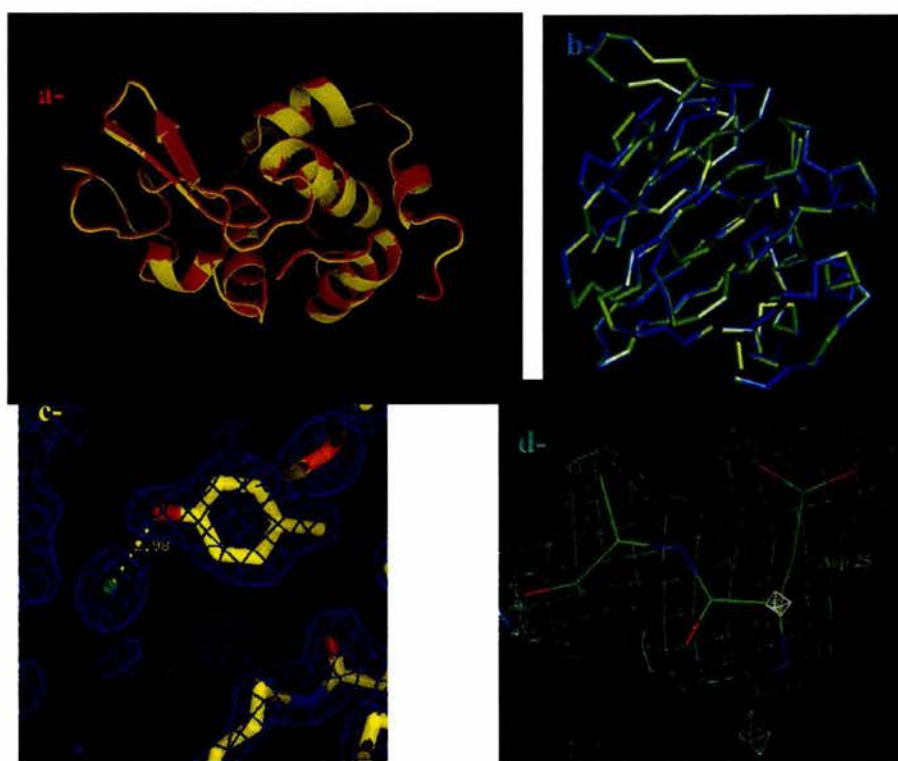
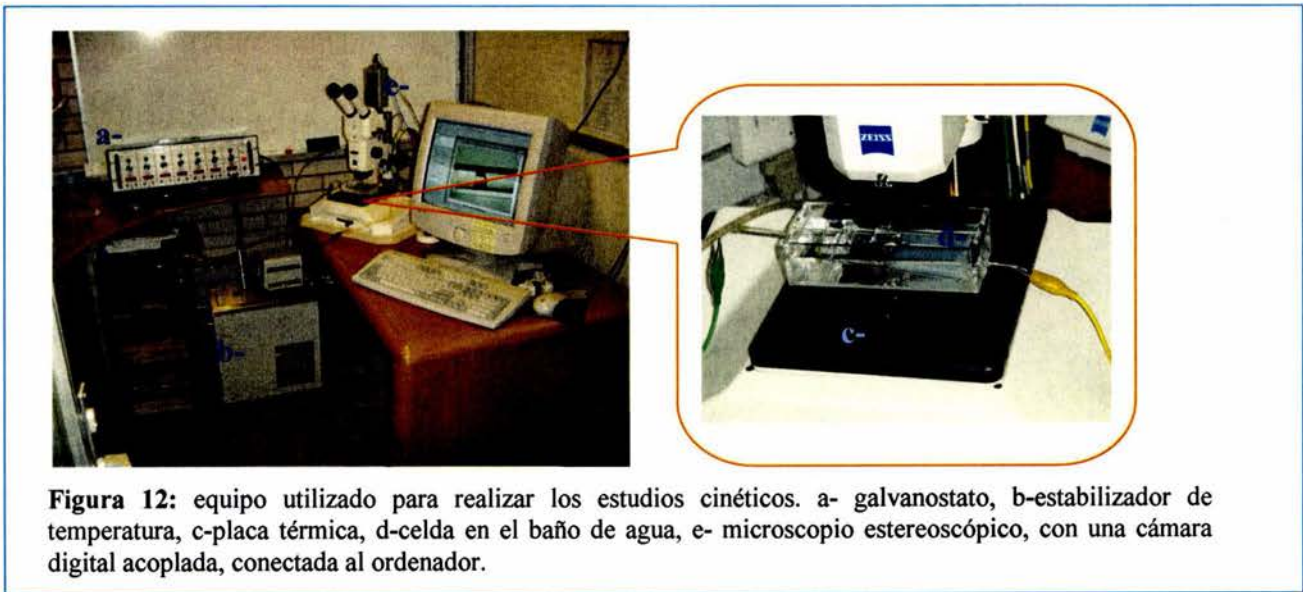


Figura 11: imágenes de los modelos de lisozima y taumatina. a- superposición de lisozima cristalizada en presencia y ausencia de un campo eléctrico. b- superposición de taumatina cristalizada en presencia y ausencia de un campo eléctrico. c- imagen de una sección del mapa de lisozima ubicando a Tyr23 dentro de su densidad e interaccionando con el Cl⁻. d- imagen de una sección del mapa de Taumatina ubicando el Asp 25 dentro de su densidad. Se observan los ángulos no permitidos reportado por otro grupo para esta proteína (Ko, TP *et al.* 1994).

Estudios cinéticos referidos a la cristalización de lisozima y taumatina, ante un campo eléctrico interno.

En ensayos previos se notó la diferencia en los tiempos necesarios para obtener cristales adecuados para difractar, ya sea de lisozima o taumatina, aplicando el método propuesto en esta tesis. En general, se obtenían cristales más rápidamente creciéndolos en presencia de un campo eléctrico. Se pensó que esta aceleración estaba relacionada con una direccionalidad impuesta por el campo eléctrico sobre las proteínas cargadas, las cuales se cree se comportan como macro-iones en estas condiciones. Así, el efecto del campo interno se reflejaría al permitir una velocidad de depósito de las moléculas sobre las caras en crecimiento (a nivel general, 3D) más rápida de lo esperado para una situación sin I. Curiosamente, no se encontraron grandes diferencias en la calidad cristalina de taumatina o lisozima cuando estos cristales se formaban bajo el efecto de dicho campo.

Los experimentos se realizaron con un mayor control térmico, siendo esta una variable muy importante en determinaciones cinéticas. Además, se mejoró el sellado de la celda, que permitió alcanzar el equilibrio interno más rápido aún que lo notado previamente, y homogenizar la temperatura de todo el sistema, sumergiendo la celda en su totalidad en un baño de agua termostatzada. Este dispositivo se montó sobre el microscopio estereoscópico tal de seguir el proceso en el tiempo, evitando movimientos indeseados que generaban fluctuaciones de temperatura y riesgos de mover los componentes del sistema (electrodos, rompimiento del gel) o cortar el proceso eléctrico (el galvanostato se instaló junto a la celda). En la figura 12 se observa el equipo utilizado.



Se siguieron diversos cristales en el tiempo, ubicados a distintas distancias del extremo abierto del capilar (extremo en contacto con el gel). Se tomaron imágenes de los mismos registrándose el tamaño y el tiempo de aparición.

Existe una relación entre un parámetro lineal (L) de la partícula esférica en crecimiento (como el radio) y la raíz cuadrada del tiempo para procesos difusivos, que surge de la ley de Fick (Henisch, H.K. 1988). En el caso de cristales facetados debe usarse el parámetro Lf, calculado normal a la cara en crecimiento. Sin embargo, obtener Lf a partir de los cristales formados espontáneamente en los capilares es muy difícil, ya que no siempre crecen con la orientación específica necesaria. García-Ruíz J.M. y Otálora F. encontraron que la relación se mantiene si se estima Lf con la raíz cuadrada del área proyectada (Ap) de un cristal en crecimiento (García-Ruíz J.M. & Otálora F. 1997). A partir de las imágenes colectadas de los cristales a distintos tiempos, se estimó el área proyectada del mismo usando el programa de software Image Tool 9.0 y se calculó $L=(A_p)^{1/2}$. La velocidad de crecimiento global del cristal se estima como L/tiempo y los valores hallados se muestran en las tablas 2 y 3 y en las figuras 13 y 14.

Tabla 2: Velocidades de crecimiento generales para cristales de Taumatina crecidos en presencia o ausencia de un campo eléctrico.			
Cristales formados ante un campo eléctrico interno		Cristales formados en ausencia del campo eléctrico.	
posición (mm) (a)	Velocidad (Å/s)	posición (mm) (a)	Velocidad (Å/s)
3.1	13.71	3.3	22.87
4.6	13.33	5.0	22.24
9.2	9.79	9.1	21.33
10.7	7.89	11.0	18.57
13.1	8.57	13.9	7.52

a- distancia desde el extremo del capilar, en el gel de silicatos hasta la ubicación del cristal.

Tabla 3: velocidades de crecimiento de cristales de lisozima formados en presencia o ausencia de un campo eléctrico interno.			
Cristales crecidos ante un campo eléctrico		Cristales formados en ausencia del campo.	
posición (mm) (a)	Velocidad (Å/s)	Posición (mm) (a)	velocidad (Å/s)
6.7	163.05	5.1	107.34
10.7	156.22	9.35	119.41
12.7	122.78	13.0	105.14
15.4	151.39	15.6	107.94

a- distancia desde el extremo del capilar, en el gel de silicatos hasta la ubicación del cristal.

velocidades de crecimiento general para cristales de lisozima

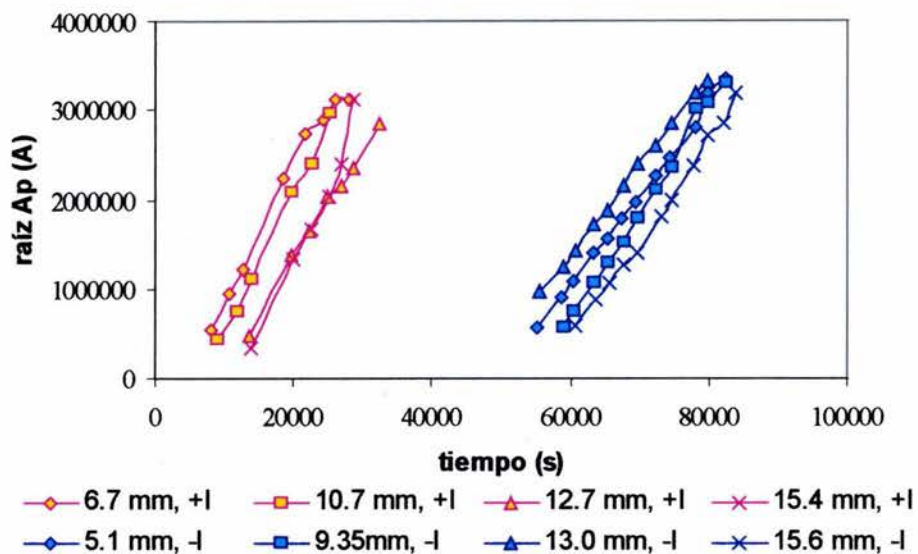


Figura 13: velocidades de crecimiento generales para cristales de lisozima formados en distintas posiciones dentro del tubo capilar. +I: en presencia de un campo eléctrico interno; -I: en ausencia del mismo.

velocidad de crecimiento general para cristales de taumatina

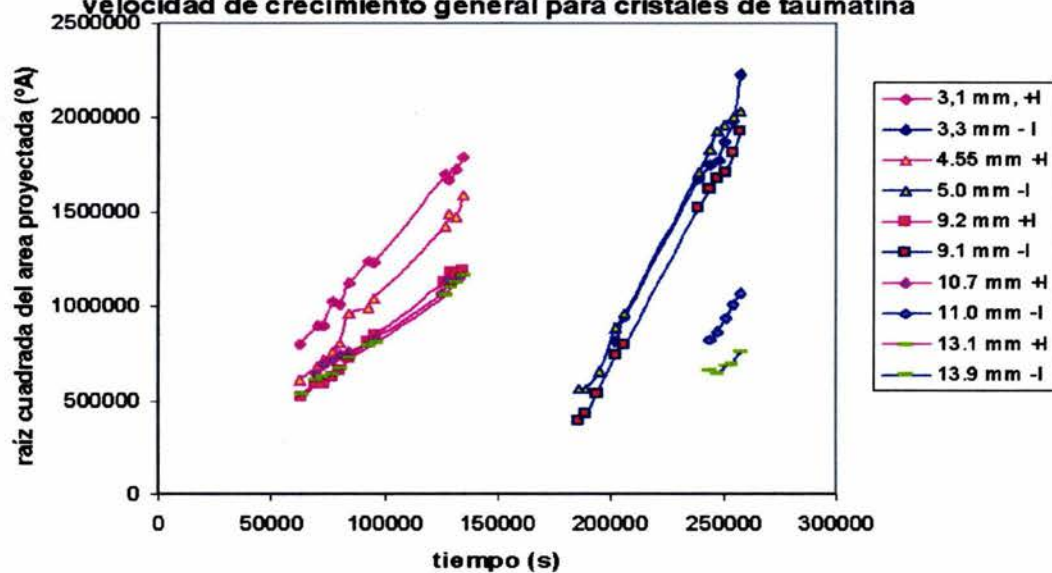


Figura 14: velocidades de crecimiento generales para cristales de taumatina formados en distintas posiciones dentro del tubo capilar. +I: en presencia de un campo eléctrico interno; -I: en ausencia del mismo.

Como puede observarse en las tablas presentadas, las velocidades de crecimiento globales para taumatina son ligeramente superiores para aquellos cristales formados por el método control, comparando cristales en posiciones similares dentro del capilar. Sin embargo, en el caso de Lisozima se observa lo opuesto.

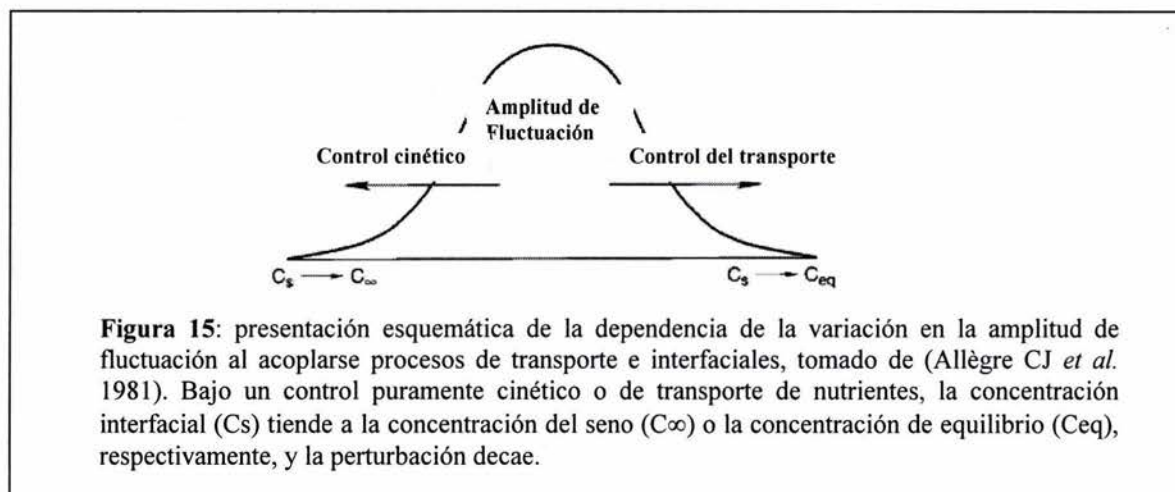
Lo que marca una notable diferencia entre ambos métodos es el tiempo que necesitan los cristales para obtener un tamaño mínimo detectable en el microscopio, siendo más rápido el tiempo de inducción para aquellos cristales formados en presencia del campo eléctrico. Para el caso de lisozima, este tiempo se acorta en 5.1 veces (promedio), y 4.35 veces más rápida la inducción para cristales de taumatina (promedio).

3.4- Discusión:

El campo eléctrico interno provoca una aceleración en el proceso de cristalización. Inicialmente se pensó que esta aceleración estaba relacionada con una direccionalidad impuesta por el campo eléctrico sobre las proteínas cargadas, las cuales se comportan como macro-iones en estas condiciones. Así, el efecto del campo interno se reflejaría al permitir una velocidad de depósito de las moléculas sobre las caras en crecimiento (a nivel general, 3D) más rápida que lo esperado para una situación sin E . En general, los cristales que crecen muy rápido, lo hacen sacrificando el ordenamiento interno. Si estos cristales son para estudios estructurales, el patrón de difracción será malo o de baja resolución (Vekilov, PG. *et al.* 1996).

Curiosamente, en los cristales analizados no se encontraron grandes diferencias en la calidad cristalina de taumatina o lisozima cuando estos cristales se formaban bajo el efecto de dicho campo. Más aún, casi todos los cristales formados bajo un campo E presentaron mejores señales de intensidad difractada en todo el rango de resolución. Una posible explicación a la diferencia de calidad entre cristales formados en presencia o ausencia del campo eléctrico se explica aplicando la dinámica de crecimiento de régimen mixto. La misma sostiene que el crecimiento de cristales está afectada por el equilibrio entre la velocidad de transporte de nutrientes desde el seno de la solución a la superficie del cristal y la velocidad con que se incorporan estos nutrientes a la cara en crecimiento. Cuando los cristales crecen bajo regímenes totalmente difusivos (velocidad de crecimiento controlada

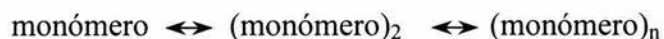
por el transporte de nutrientes) o un sistema con control cinético (es decir, la concentración de nutrientes en el entorno del cristal (C_s) tiende a ser igual a la del seno (C_∞) y la velocidad depende de la incorporación de los nutrientes a la red cristalina), las perturbaciones en el crecimiento decaen y el sistema se vuelve más estable, con lo que se obtienen cristales de mayor calidad (figura 15)



Según la bibliografía, los cristales de lisozima y taumatina crecen bajo un sistema de control dominado por la cinética interfacial (lado izquierdo de la figura 14) (Vekilov, P and Rosenberger F, 1996; Lin H. *et al.* 1995; Monaco L.A. and Rosenberger, F. 1993; Miyashita, S. *et al.* 1993 and 1994). De esta manera, es posible pensar que si se lograra desplazar el sistema a un mayor control cinético (por imposición de un flujo adecuado) se lograría obtener cristales de mayor calidad cristalina. Y esto es lo que se observó al imponer un campo eléctrico interno. Gracias al efecto migratorio de las partículas cargadas y la difusión, el transporte de nutrientes hasta las caras en crecimiento no es un paso limitante y en consecuencia se observa una alta calidad cristalina.

Por otro lado, se encontró que en todos los casos, los cristales formados bajo la influencia del campo E necesitan un menor tiempo de nucleación. Los cristales aparecen antes que en los experimentos control. Aparentemente, el campo eléctrico estaría actuando sobre la agregación de las moléculas cargadas, en la etapa inicial. ¿Por qué no se observa un crecimiento más rápido en todos los casos?

Según estudios de cinéticas de crecimiento cristalino de lisozima y taumatina, los cristales crecen por dos mecanismos diferentes, según el nivel de sobresaturación. A altas sobresaturaciones predomina la nucleación bidimensional sobre las caras en crecimiento (Malkin, AJ *et al.* 1996; Kuznetsov, Yu G. *et al.* 2001). La misma es llevada a cabo por tetrámeros en el caso de lisozima (Nadarajah and Pusey, 1996; Li, M. *et al.* 1999) y monómeros o agregados superiores de taumatina (Kuznetsov, Yu G. *et al.* 1999). Ante un **E**, la sobresaturación es alcanzada en un menor tiempo, lo que permite una nucleación más rápida. A su vez, los niveles de sobresaturación en estas condiciones son mayores que en ausencia de **E** (para una posición determinada en el capilar). En consiguiente, para lisozima, se incrementa la presencia de tetrámeros u agregados de mayor orden, probablemente polarizados por el campo, que se incorporan fácilmente a la red en crecimiento, generando una velocidad de crecimiento general mayor que la encontrada para cristales control. Por el contrario, los cristales de taumatina crecen a partir de monómeros, los cuales se encuentran en menor proporción debido a la mayor sobresaturación provocada por el campo eléctrico. En solución de cristalización, las moléculas de proteína se hallan en equilibrio entre especies agregadas de distinto orden:



La especie predominante a altas sobresaturaciones no es el monómero, por lo que la velocidad de crecimiento de cristales de taumatina se torna más lenta cuanto más alta es esta.

Resumiendo, entre las dos proteínas se observa una mayor calidad cristalina ante la presencia del campo eléctrico, ya que en ambas existe un control cinético del crecimiento. Sin embargo, el efecto de **E** sobre las velocidades de crecimiento generales para ambas proteínas es diferente. En un caso (lisozima), se ve favorecida por la presencia de especies adecuadas para su incorporación mientras que en el otro (taumatina) el efecto es el opuesto.

Capítulo 4 : Un caso particular, Citocromo C.

4.1- Introducción:

En esta etapa del trabajo, se decidió evaluar el método propuesto con una proteína diferente, que no sea una proteína modelo como lo son Lisozima o Taumatina. Se eligió la proteína citocromo c bovino por diversas características que favorecerían su cristalización. Es una proteína de 12000 Da aproximadamente, soluble en diversos buffers, globular y relativamente pequeña (diámetro de 3.4 nm). Es curioso que a pesar de ser una proteína muy estudiada desde el punto de vista electroquímico y de estar disponible comercialmente, no se ha reportado hasta la fecha su estructura tridimensional en las bases de datos de estructuras proteicas. De hecho, se conocen las estructuras cristalográficas de muy pocas proteínas homólogas, a pesar de ser ubicua en casi todos los organismos vivos. Solamente se han reportado las estructuras cristalográficas del citocromo c de caballo (oxidado y reducido) (Sanishvili RG *et al.* 1994), ferro y ferri-citocromo c de atún (Takano, T., Dickerson, R.E., 1981a,b), citocromo c de arroz (Morita Y. and Ida S., 1972) y citocromo c de bonito (Tanaka, N. *et al.* 1975). Esto no puede ser casual. Todo indica que es una proteína sencilla de cristalizar, ¿por qué no se conoce aún la estructura tridimensional del citocromo c bovino?

De los citocromos c cristalizados, dos agentes precipitantes son usados generalmente, PEG (de diversos pesos moleculares) o sulfato de amonio a altas concentraciones. Además, las cristalizaciones se deben realizar teniendo la proteína en un único estado de oxidoreducción. Se usa el $K_3Fe(CN)_6$ como agente oxidante y ácido ascórbico como agente reductor.

Se ha reportado la presencia de diversas isoformas de esta proteína (Flatmark, T. 1964, 1966a), las cuales se generan por desamidación no enzimática (Brautigan, D.L. *et al.* 1978). Existen 4 isoformas reportadas, siendo Cy I la isoforma nativa, (Flatmark, T. 1966b). Esta liberación de NH_3 , por uno, dos o tres aminoácidos es la responsable de que las mezclas tengan diversos pI, siendo la forma nativa la más básica, con un pI 10.78 (Flatmark T., 1966a,c). Esta mezcla de cargas en la solución, es un factor negativo al momento de cristalizar una proteína, como se explicará más adelante en este capítulo. A continuación se describirá el proceso de cristalización de citocromo c bovino.

4.2- Materiales y Métodos:

Proteína: Citocromo C (sigma, C-3131), de mitocondrias de corazón bovino. Purificadas sin precipitar con TCA, según informa el proveedor.

Estudios de Dispersión Dinámica de Luz (DLS): Se evaluaron soluciones de citocromo c 20 mg/ml y decrecientes, en agua destilada, buffer 40 mM fosfato de sodio, pH 7.0 y 0.1 M cacodilato de Na, pH 6.5. El equipo utilizado fue un Dyna Pro 801 TC, a 4 y 18 °C. Este equipo cuenta con un laser de diodos, cuya longitud de onda es de 760 nm. El capilar donde se coloca la muestra contiene 250 µl.

Screening de las condiciones de cristalización: Se evaluaron diversos kits para hallar las condiciones adecuadas para cristalizar citocromo c: Crystal Screen I y II (Hampton Research, HR2-110 y HR2-112), Kit de Aditivos (Hampton Research, HR2-428), Kit de Sulfato de Amonio, (HR2-211), kit clásico de Nextal de 96 condiciones(Quiagen). Estos kits se utilizan con la técnica de difusión en fase vapor para el crecimiento cristalino. Los kits se evaluaron siguiendo las recomendaciones del vendedor. Soluciones de 20 mg/ml de citocromo c oxidado, en 50 mM fosfato pH 7.0 fueron usadas en cada ensayo. Las gotas colgantes o sedentes se incubaron a 4 y 18 °C, y se verificó la presencia o ausencia de cristales regularmente, cada semana inicialmente y luego cada mes.

Purificación de Citocromo C bovino: Cromatografía de Fase Reversa.

Se realizó usando una columna C-18 Júpiter 300 A, 5 µm (Phenomenex), en un equipo de HPLC, (HP, serie 1100). La columna fue equilibrada con agua Milli Q + 0.1 % TFA. La elusión se realizó en forma de gradiente lineal, con 100% acetonitrilo + 0.12% TFA, bajo un flujo constante de 1 ml/min. El gradiente aplicado fue:

Tiempo (min)	% B (acetonitrilo 100% + 0.12% TFA)
0	0
5	40
8	40
26	46
30	100
35	100
40	0

} Gradiente: 0.33 %B min⁻¹.

Se inyectaron muestras de 500 µg citocromo c oxidado con K₃Fe(CN)₆. El perfil de elusión se siguió en el tiempo a 215 nm, 360 nm y 410 nm.

Concentración de las muestras: las muestras de citocromo c colectadas en las cromatografías se concentraron usando membranas YM-5 (millipore). YM-5 tiene la propiedad de retener en un 90% moléculas de 12kDa. Estas membranas están disponibles para diversos volúmenes y se utilizaron según las especificaciones del fabricante.

Medición de la concentración: se midió espectrofotométricamente en un equipo Biomate 3 (Thermo). Ferricitocromo c absorbe a 280 nm, 360 nm, 410 nm y 529nm, mientras que el citocromo c reducido lo hace a 280 nm, 416 nm, 520 nm y 550 nm (Índice Merck, 1996) Se realizaron curvas de Absorbancia vs. Concentración, para calcular los coeficientes de absorptividad molar. Dado que a 361 nm tiene un máximo de absorbancia el citocromo c oxidado, esta longitud de onda se utilizó para calcular la concentración de las soluciones.

Espectroscopia de Masas: Las muestras se analizaron con un equipo OMNIFLEX MALDI TOF (Bruker Daltonics), el cual cuenta con un laser de N₂ 337.1 y un voltaje de aceleración de 19 KV en el modo lineal. Se usaron 2 referencias, ubiquitina (8564.9 Da) y Lisozima (14000). Las proteínas se mezclaron con ácido sinapínico en 30 % acetonitrilo 70% agua y 0.1% TFA. Las muestras se prepararon en relación 1:5 proteína-matriz y se depositaron en los soportes de muestras donde se dejaron secar al aire.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes:

Se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (con SDS) basados en el método de Laemmli (Laemmli, U.K. 1970). Se utilizó un equipo Hoefer SE 250 y la fuente de poder fue EPS 301, ambos de Amersham Pharmacia Biotech.

Las concentraciones de acrilamida fueron: Gel separador 12.5% o 15% según el caso, gel concentrador 5%.

La corrida electroforética duró 1 h a 120V constantes.

Tinción con Coomasie: el gel se incubó con una solución de Coomasie Brilliant Blue R-250 (0.25 % en peso) 40% metanol, 10% ácido acético. Luego se pone a destañir con la solución destañidora (40% metanol, 10% ácido acético) hasta que las bandas de proteína se vean azul claras en un fondo limpio.

Tinción con Ag: se realizó de acorde al protocolo sugerido por Amersham Bioscience, el cual se basa en el de Heukeshoven, J. and Dernick, R (1985).

Cristalización por microseeding: Se realizaron ensayos en cajas de difusión en fase vapor de Nextal (codigo NCP-24-100). La condición de cristalización se basó en las reportadas por Sanishvili *et al.* 1994. Brevemente, se colocó en el reservorio 1 ml de una solución 30% PEG en 50 mM fosfato de sodio, pH 7.0. Las gotas se prepararon a 25 mg/ml de citocromo c puro con 25% PEG, ambos disueltos en 50 mM fosfato de sodio, pH 7.0 Se incubaron a 4°C durante 32 días, al cabo de los cuales se transfirieron por Streak Seeding a otras gotas pre-incubadas una semana, de concentración 22 mg/ml proteína 25% PEG en el mismo buffer utilizado. Estas gotas con los sedes (núcleos) se incuban a 4° C hasta obtenerse cristales.

Cristalización en presencia de un campo eléctrico interno: Se aplicó el método descrito en el capítulo 2, utilizando un cátodo de Pt en contacto con el gel y un ánodo de Pt dentro del capilar, en contacto con la solución de citocromo c oxidado. El agente precipitante se colocó por fuera del capilar, a una concentración final de 20 % en peso disuelto en 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.0. La concentración de citocromo c, purificado por cromatografía de fase reversa, fue de 31 mg/ml. Se aplicó una corriente directa constante de 0.8 μ A durante 15 días continuos. Toda la celda se sumergió en un baño termostatzado a 10 °C.

Resolución Estructural:

Los datos cristalográficos se colectaron en la línea X6A del sincrotrón de Brookhaven National Laboratory, NY., USA. Se colectaron 180 frames de 1° de oscilación. La longitud de onda del haz fue 1.03320 nm, y el detector utilizado fue un ADSC Quantum Detector 210. beam center: x = 106.688 mm y = 101.331 mm.

Los datos fueron indexados e integrados con el programa Denzo y escalados con el programa ScalePack, todos del paquete HKL 2000 (Z. Otwinowski and W. Minor (1997)).

Los factores de estructura obtenidos se relacionaron con las fases de una molécula modelo, citocromo c de caballo cristalizada en el mismo grupo espacial (P2₁2₁2₁). Las coordenadas de la molécula modelo se bajaron del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) bajo el código 1CRC, datos a resolución de 2.08 Å. Se crearon los correspondientes mapas de densidad electrónica y se afinaron usando los programas de

la suit CNS v. 1.1. (Brünger *et al.*, 1998). Para visualizar los mapas se utilizó el programa Turbo-Frodo (Roussel A. and Cambillau, C. 1989).

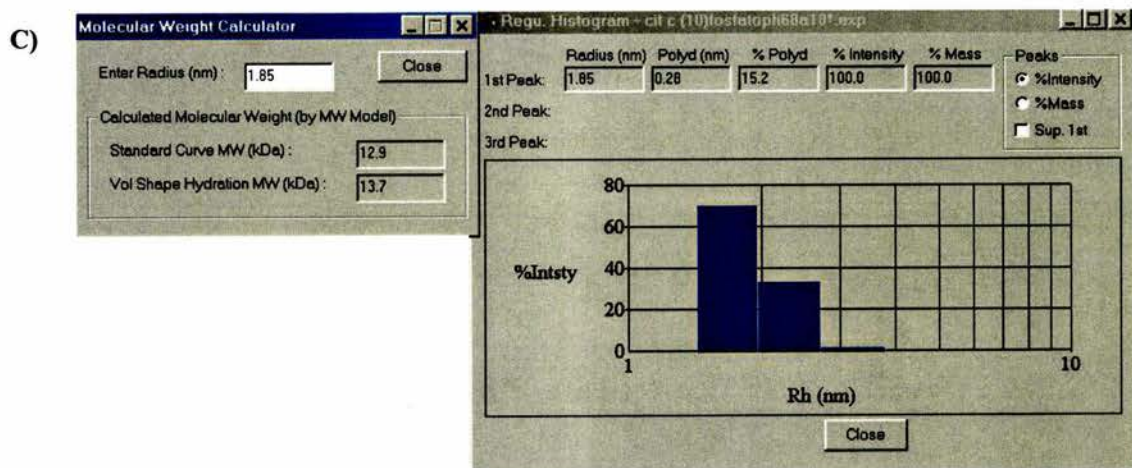
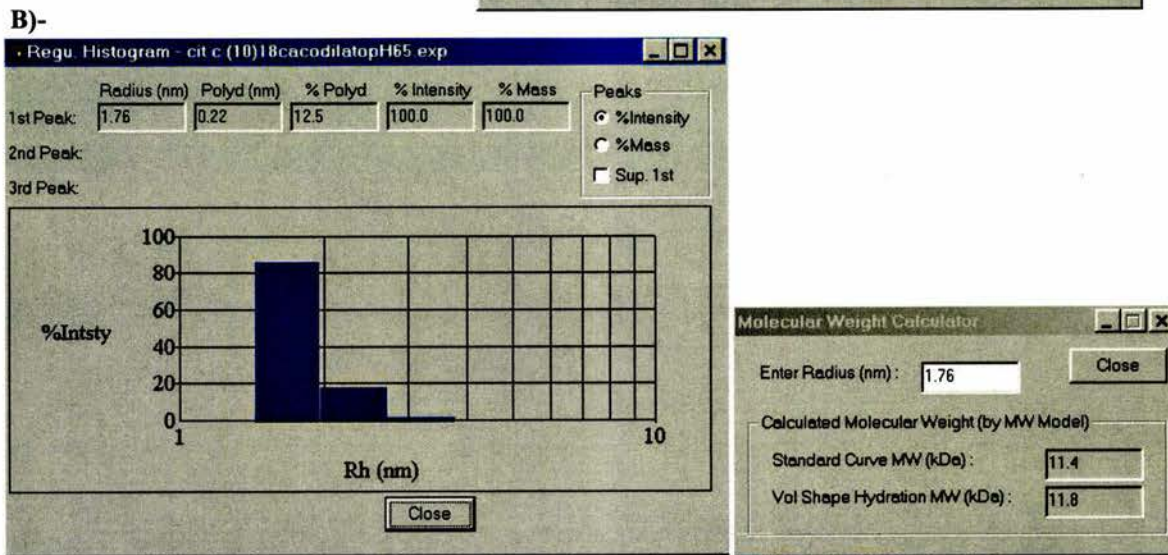
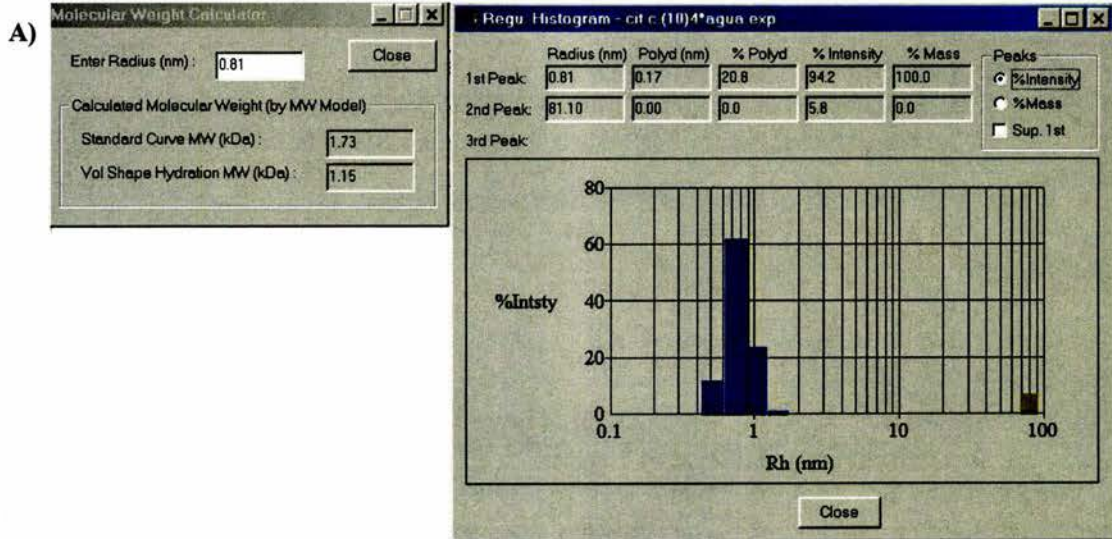
4.3- Resultados:

Estudios de Dispersión Dinámica de Luz.

Un requisito para lograr una buena cristalización es partir de soluciones proteicas monodispersas. Del análisis de dispersión dinámica de luz se obtiene el estado de agregación en función de los radios hidrodinámicos de las especies presentes. Se evaluó el estado de agregación del citocromo c a 4 y 18 °C en distintos medios: agua destilada, 100 mM cacodilato de sodio pH 6.5 y 40 mM fosfato de sodio pH 7.0. En el caso de citocromo c bovino disuelto en agua se encontró que el radio hidrodinámico era menor al esperado, correspondiente a un peso molecular estimado de 1.73 kDa, el cual no es viable para esta molécula. En la figura 16 A se observa el histograma donde se promedian las mediciones a 4 °C y el cálculo del peso molecular que hace el equipo, para el radio hidrodinámico hallado. Es probable que a baja fuerza iónica el citocromo c no se comporte como una molécula globular, y ya no sean aplicable los modelos del equipo. Como se ve en la figura 16, la muestra es monodispersa (100% de la masa corresponde al pico azul, de radio 0.81 nm). Lo que se ve como un segundo pico, puede ser alguna impureza menor. En la figura 16 B y C se observa el comportamiento del citocromo c en 100 mM cacodilato de sodio, pH 6.5 y 40 mM fosfato de sodio, pH 6.8, respectivamente. En estas condiciones el citocromo c se comporta como una solución monodispersa, con radios hidrodinámicos de 1.76 y 1.86 nm, que corresponden a 12.6 kDa y 14.4 kDa respectivamente.

Estos resultados están dentro de lo esperado para el cyt c y cualquiera de los dos medios es apto para cristalizar, siempre y cuando no interfiera con el agente precipitante. Dado que el buffer fosfato es ampliamente usado para disolver citocromo c (en la bibliografía lo utilizan normalmente), se usará buffer 50 mM fosfato de sodio pH 7.0 como medio para disolver citocromo c comercial (Cyt C), para todos los ensayos que se lo requiera a menos que se especifique lo contrario.

Figura 16: histogramas resultado del análisis de dispersión dinámica de luz, y el cálculo del peso molecular, para los radios hidrodinámicos hallados en casa caso. A) citocromo c 10 mg/ml disuelto en agua, a 4 °C. B) citocromo c 10 mg/ml disuelto en 100 mM cacodilato de sodio, pH 6.5 a 18 °C. C) cyt c 10 mg/ml disuelto en 40 mM fosfato de sodio, pH 6.8.



Screening de las condiciones de Cristalización:

Se evaluaron diversos kits para hallar alguna condición de cristalización de Cyt C. Estos kits se basan en el concepto de evaluar diversas condiciones, en forma de una amplia matriz fundamentada en aproximaciones estadísticas de diseños factoriales. De esta manera, en un mismo set de experimentos se evalúan distintos pHs, agentes precipitantes o aditivos, dependiendo de las características del kit. En base a los resultados hallados es que se acota el espectro de posibles condiciones, variando las concentraciones del agente precipitante, de la proteína, la temperatura o en el peor de los casos descartando totalmente la condición propuesta. Para el citocromo c se evaluaron diversos kits.

Del kit "Crystal Screen I", de Hampton Research, se halló una única condición donde el citocromo c se agregaba, más no como cristal, sino como esférulo. Este tipo de agregación presenta un núcleo cristalino, pero como surgen al crecer rápidamente, no se generan cristales facetados sino agregados redondeados, los cuales no sirven para difractar. Dicha condición estaba compuesta de 18 % PEG 8000 + 0.2 M acetato de zinc como agente precipitante, en buffer 0.1 M cacodilato de sodio, pH 6.5. Se realizaron varios esfuerzos para desacelerar el proceso de agregación, tal como disminuir el agente precipitante, incorporar aceites o el uso de geles en las gotas, como medios para aumentar la viscosidad. Ninguno de estos enfoques logró generar cristales adecuados.

Tampoco se obtuvieron cristales evaluando otros kits, mencionados en la sección de materiales y métodos.

Evidentemente, el tener la proteína en un único estado de oxidación no era el único factor a considerar, cuando se intentaba cristalizar el citocromo c. Algunos investigadores que han trabajado con Cyt C, ya sea en su cristalización o en estudios electroquímicos, sugieren pasos de re-purificación para separar las isoformas desamidadas (Brautigan, D.L. *et al.* 1978; Reed, D.E. and Hawkrige, F.M. 1987; Sanishvili R. *et al.* 1994 y 1995). La forma de re-purificar el citocromo c es por el método propuesto por Brautigan D.L. y colaboradores utiliza una cromatografía de intercambio catiónico suave, como la carboximetil-celulosa, y eluyen con un gradiente de fuerza iónica suave (Brautigan D.L. *et al.* 1978). Se intentó realizar esta purificación sin éxito. Luego de intentar diversas columnas de HPLC y FPLC, se lograron separar por fase reversa en un equipo de HPLC

dos picos bien definidos, que contenían al citocromo c. El perfil de elusión se muestra en la figura 17. El criterio para colectar las dos fracciones fue que la muestra absorba a las dos longitudes de onda, a 215 (enlace peptídico) y a 361 nm (característico del Cyt C oxidado). Luego de realizar varias inyecciones, se realizaron lavados en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 para intercambiar el acetonitrilo por el otro buffer, y se concentraron las dos fracciones a un valor final de 68 mg/ml para la fracción I (primer pico) y 65 mg/ml para la fracción II.

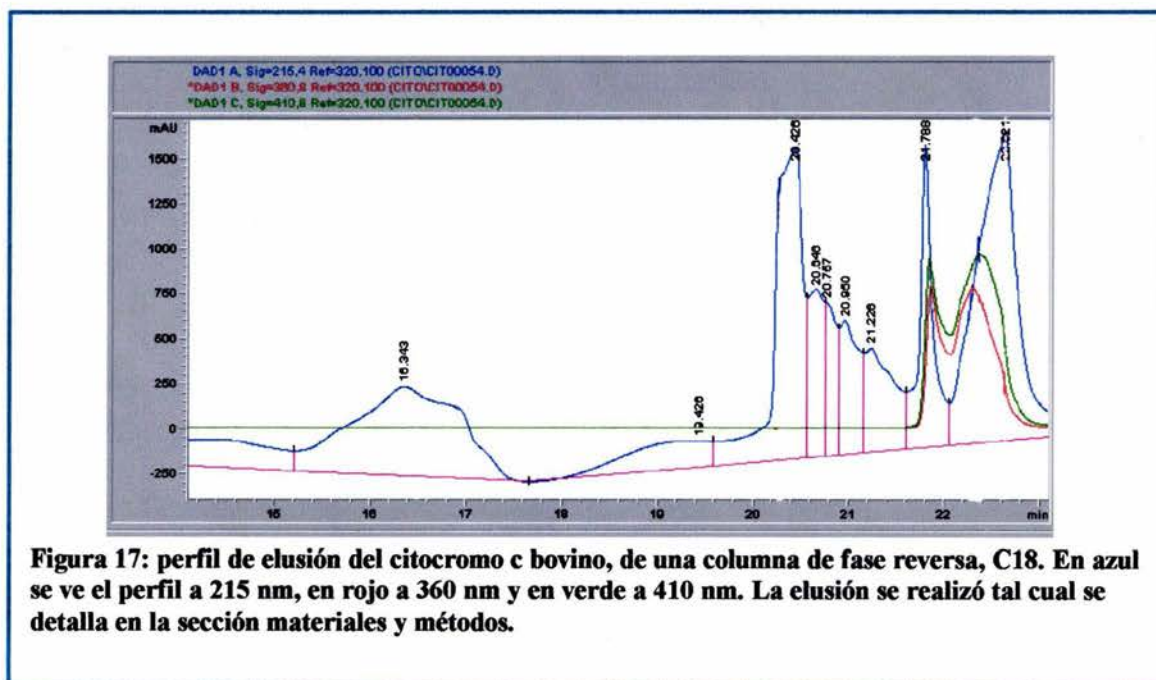


Figura 17: perfil de elusión del citocromo c bovino, de una columna de fase reversa, C18. En azul se ve el perfil a 215 nm, en rojo a 360 nm y en verde a 410 nm. La elusión se realizó tal cual se detalla en la sección materiales y métodos.

Se analizaron las dos fracciones por espectroscopía de masas para corroborar la presencia de las isoformas. Los espectros se muestran en la figura 18. La muestra de F1 presentó una especie en mayor proporción, de 12,230.436 Da, que coincide con el peso estimado del citocromo c bovino nativo. El pico de 6,113.542 Da corresponde al valor medio de la molécula, producto de la ionización (ión molecular +2). También se encuentra una impureza de mayor peso molecular en baja proporción, de 12,439.163 Da. De igual forma, la muestra F2 (segundo pico de la cromatografía en fase reversa) presenta un pico principal de peso molecular 12,232.756, el ión molecular +2 (6,114.672) y una impureza de peso molecular 12,441.685.

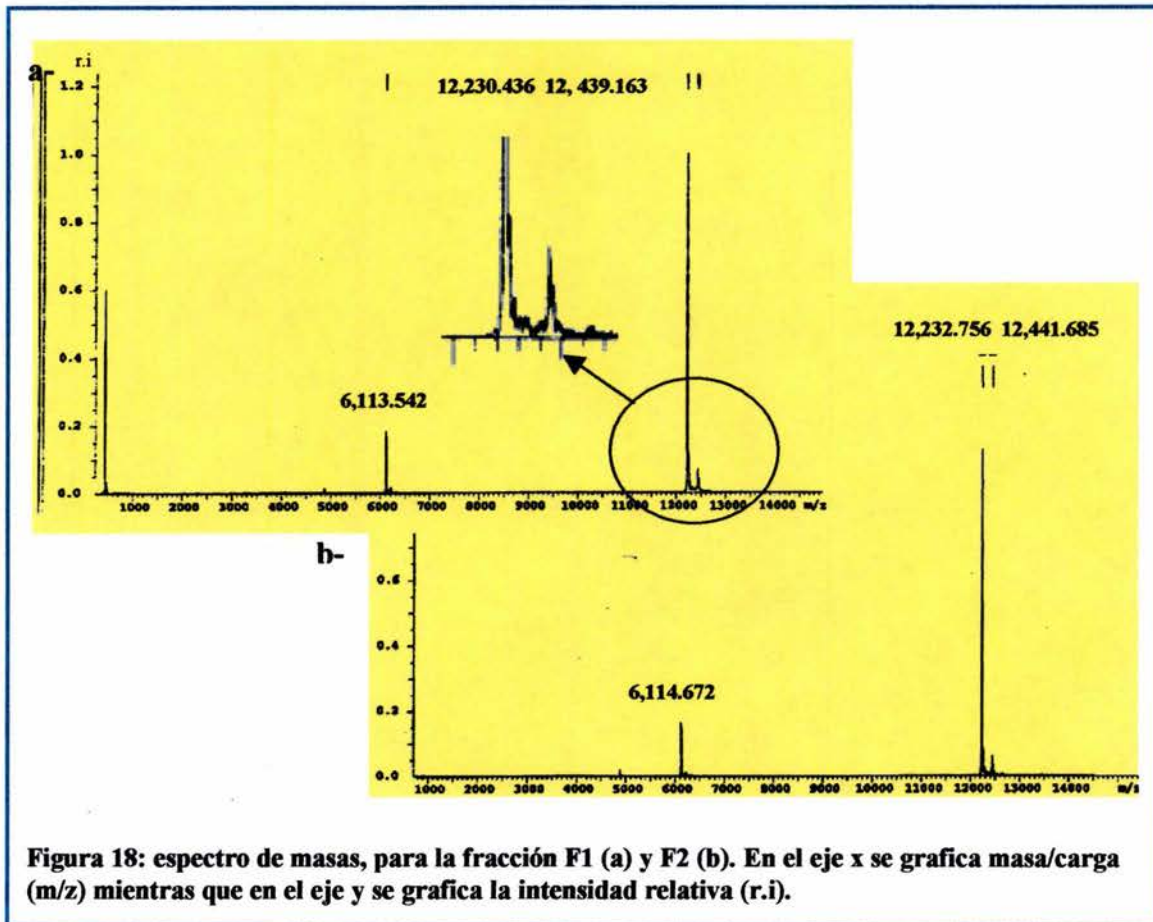


Figura 18: espectro de masas, para la fracción F1 (a) y F2 (b). En el eje x se grafica masa/carga (m/z) mientras que en el eje y se grafica la intensidad relativa (r.i).

Estos datos corroboran la presencia de la proteína nativa en F1 y la presencia de una isoforma desamidada en F2, ya que la diferencia de pesos es de 2.32 Da. Según la bibliografía, existen cuatro isoformas caracterizadas y la forma nativa (Cy I) es la de menor peso molecular (no intercambió ningún amida por carboxilo) (Flatmark T. 1964 y 1966).

Además se corroboró la pureza por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (figura 19) . Ambos geles fueron de poliacrilamida, pero donde se sembró el citocromo c comercial el gel fue de 12.5% y se tiñó con coomassie blue (19 A) y el marcador de peso molecular usado fue de BioRad, Precision Protein Standards, con los siguientes pesos: 15 kDa, 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa (banda más intensa, referencia interna), 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa y 250 kDa. El gel donde se sembró el pico 1 obtenido de la cromatografía de fase reversa fue de 15 % acrilamida y se sometió a una tinción con plata dada su mayor sensibilidad, para evaluar la presencia de mínimas impurezas. Se usó el

marcador See Blue PreStained Standard, de Invitrogen, y los correspondientes pesos son: 16 kDa, 30 kDa, 36 kDa, 50 kDa, 64 kDa, 98 kDa. y 250 kDa.

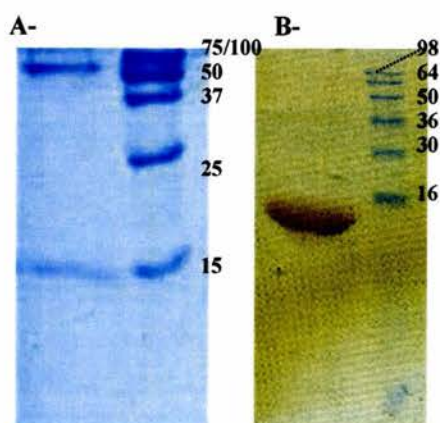


Figura 19: Geles de poliacrilamida desnaturalizantes. A- 12.5 % acrilamida, se tiñó con coomasie blue, según se detalla en la sección de materiales y métodos. Se sembró una solución de citocromo c comercial (Sigma C-3131) disuelta en buffer fosfato pH 7. B- se sembró una muestra del pico 1 (F1) colectado en la purificación por cromatografía en fase reversa, gel 15% acrilamida, teñido con Ag. Los marcadores moleculares se detallan en el texto.

Con las fracciones puras de citocromo c (F1 y F2) se pusieron ensayos para reproducir las condiciones de cristalización del citocromo c de caballo (Sanishvili R.G. *et al.* 1994, 1995) y del de citocromo c de arroz (Morita Y. and Ida S., 1972). De ellas, solamente produjo cristales la condición del citocromo c de caballo (figura 20). Se aplicó la técnica de microseeding para obtener cristales más facetados, aunque también se encontraron cristales en las gotas iniciales. No se encontraron cristales utilizando el citocromo c de la fracción F2. Evidentemente, la separación de las isoformas ha tenido un papel importante en la cristalización del citocromo c bovino.



Figura 20: Cristales de Citocromo C, obtenidos con la fracción F1, usando la condición reportada por Sanishvili, RG 1995.

Estos cristales fueron difractados a 1.4-1.5 Å de resolución en el sincrotrón de Brookhaven (Brookhaven Nacional Laboratory, NY, USA), en la línea X6A, y las estadísticas de la colecta y su resolución estructural se detallan en la tabla 4. Se colectaron 180 frames de 1° de oscilación.

Colecta				Afinamiento de la Estructura.	
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			R/Rfree	0.196/0.218
Parámetros de la Celda Unidad (Å y °)				B factor promedio	13.8
a	36.84	α	90	Desvíos r.m.s.	
b	54.48	β	90	Enlaces (Å)	0.005
c	55.33	γ	90	Ángulos de enlace (°)	1.3
Resolución (Å)	1.5			ángulos diedros. (°)	19.2
Reflex. totales	17207			N° de átomos (distintos de H).	
Reflex. únicas.	Completar			Proteína	875
I/σ(I)	17.5			Ligandos o Iones	43
Integridad	93.3 %			Aguas	161
Rmerge (%)	0.043				

En la figura 21 se muestran algunas imágenes del modelo resuelto dentro de la densidad electrónica experimental, donde puede apreciarse la alta calidad de los datos.

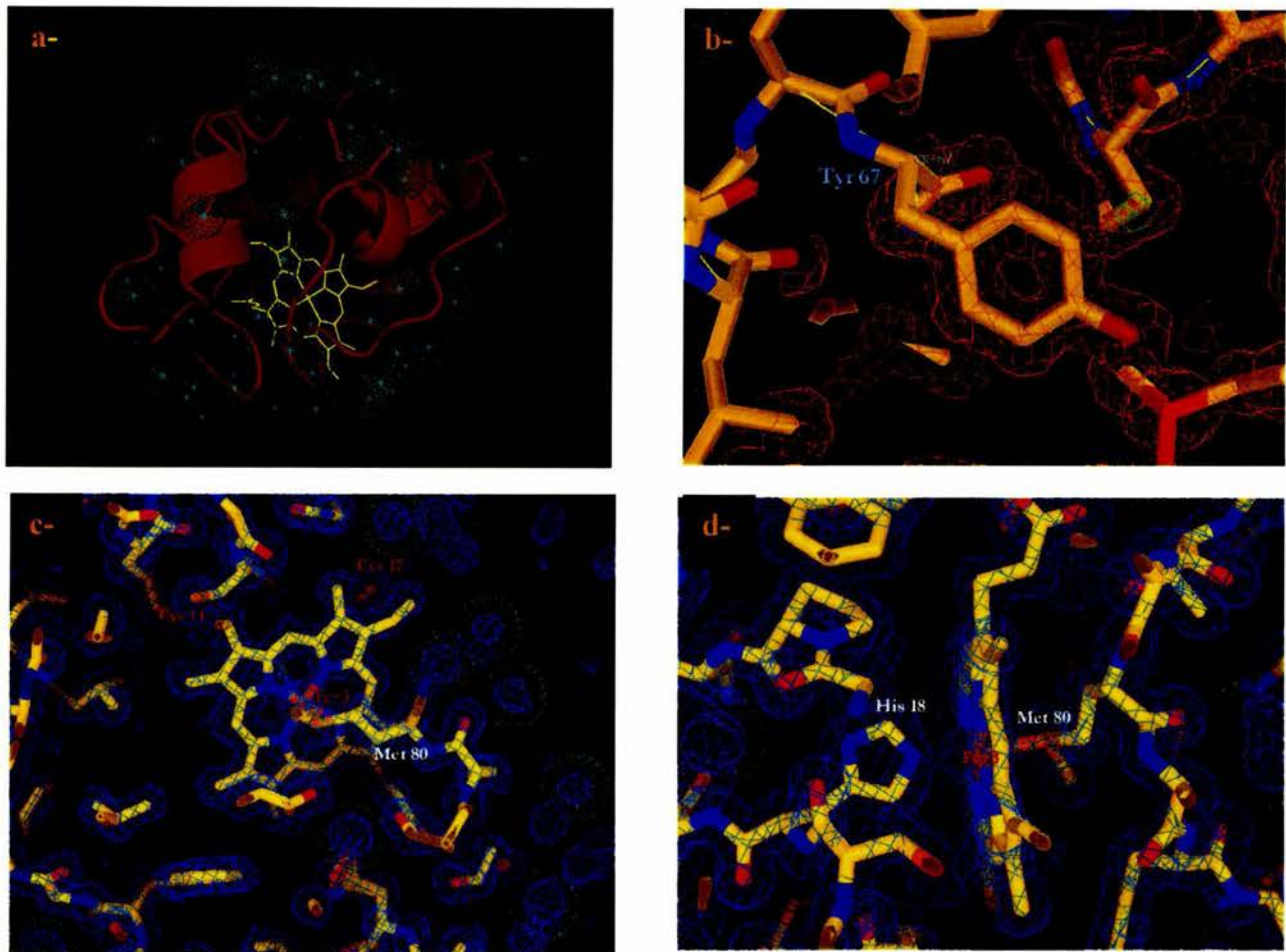
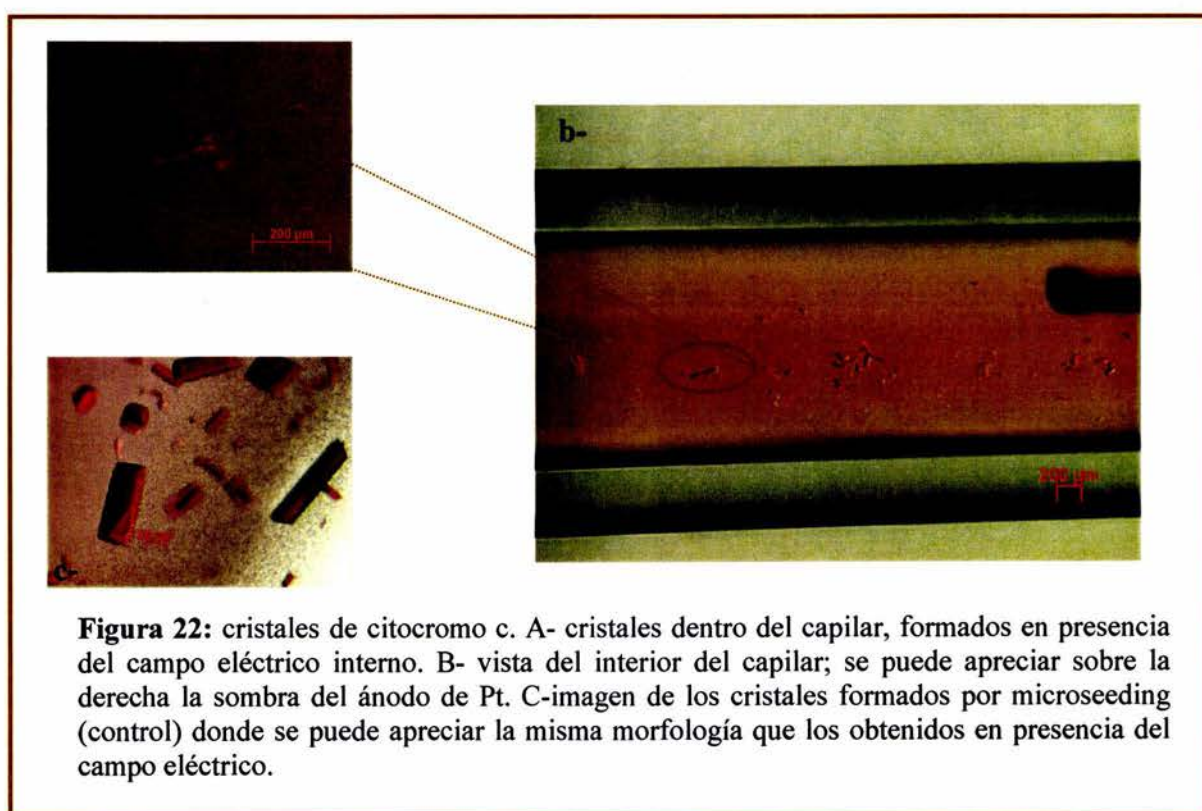


Figura 21: imágenes del modelo de citocromo c bovino. a- modelo de cintas de la molécula en rojo, con las moléculas de agua en verde claro y el grupo hemo en amarillo. b- acercamiento de la tyr67, donde se puede observar la alta calidad de los datos. c- acercamiento del grupo hemo, interaccionando axialmente con la met80. d- vista de perfil del grupo hemo, con sus dos ligandos axiales, his18 y met80, todos dentro de la densidad electrónica.

Una vez que se tuvo una condición para cristalizar el citocromo c bovino y un método control, se intentó cristalizar esta proteína por el método propuesto en esta tesis. El objetivo de esto fue corroborar que el método podía servir para una proteína diferente a las tradicionales o modelo (lisozima o taumatina). Se quería verificar la hipótesis propuesta en este trabajo.

Las condiciones de cristalización del citocromo c bovino se adaptaron para aplicarlas en la cristalización en capilares en presencia de un campo eléctrico interno. Se llenó el capilar con una solución 31 mg/ml de proteína pura, oxidada, en contacto con un ánodo de Pt. El capilar es introducido ligeramente en un gel de silicatos donde se

encontraba un cátodo de Pt, colineal al ánodo, tal cual se describió en el capítulo 2. Sobre el gel, por fuera del capilar, se adiciona la solución de agente precipitante, PEG 1000, a una concentración final de 20 % en peso. Se sumergió la celda en un baño de agua a temperatura controlada de 10 °C, para homogenizarla por toda la celda y se conectaron los electrodos al galvanostato. A los 15 días se obtuvieron cristales de citocromo c dentro del capilar, que presentaron morfologías similares a las obtenidas por el método control (gotas colgantes de microseeding). Los mismos se pueden apreciar en la figura 22. Los cristales aparecieron en la zona inferior del capilar al igual que a lo largo del electrodo, sin una región preferencial.



No se observaron precipitaciones amorfas sobre el electrodo ni cristales adsorbidos al mismo, como era de esperarse ya que la proteína se encontraba oxidada y no presenta afinidad por el electrodo. La oxidación o reducción de citocromo c con electrodos de Pt está reportada por ser bastante irreversible (Gui, Y and Kuwana T. 1987, Lewis, NS and Wrighton M.S. 1981) y de velocidad de transferencia de electrones muy lenta, excepto cuando estos últimos son modificados con grupos piridinas (Cohen, DJ *et al.* 1984). Es por

esto que la reducción observada se alcanzó al cabo de varios días de iniciado el experimento. Posiblemente si se hubiese dejado más tiempo el experimento se apreciaría la reacción reversible.

El proceso de cristalización fue similar al observado a lisozima o taumatina, con la formación inicial de un precipitado amorfo, denso, en el extremo del capilar en contacto con el gel/agente precipitante. Este precipitado es característico del “choque” que se produce por el encuentro de la proteína y la alta concentración de agente precipitante. A diferencia de lisozima y taumatina, el precipitado amorfo se fue disolviendo en el tiempo, y se observó la migración del mismo hacia fuera del capilar, hacia el cátodo, donde se redujo, tornándose el gel de incoloro a rosado, mientras que la solución en el interior del capilar se mantenía roja por la presencia de citocromo c oxidado. No se observaron cristales fuera del capilar, lo que indica que el citocromo c reducido no se alcanzó a cristalizar en los días del experimento. El campo eléctrico establecido en estas condiciones no es lo suficientemente fuerte para concentrar la proteína en un espacio grande, como lo es el volumen del gel. Se observó que el citocromo c reducido no se confinaba al entorno del cátodo sino que difundió por todo el gel, hasta disolverse un poco en la solución precipitante. El fenómeno de transporte del citocromo c reducido está regido por el potencial químico y no eléctrico, que se expresaría en sentido contrario.

Fue interesante observar que durante el proceso de agregación, el potencial entre bornes subió ligeramente 0.5 V en el transcurso de los 15 días que duró el experimento. Probablemente este aumento en la diferencia de potencial permitió la electrólisis del agua, aunque no de manera significativa, ya que no se observaron muchas burbujas en el sistema (en el capilar o en el gel).

Los cristales hallados en estas condiciones no son muy grandes, como los obtenidos por el método control, pero son de un tamaño adecuado para ser analizados por difracción de rayos x. Es posible optimizar más las condiciones de cristalización y se lograrían cristales de mayor tamaño o mejor facetados.

Discusión:

La purificación de citocromo c fue la clave para poder cristalizar el citocromo c bovino. La presencia de las isoformas, difíciles de separar por su poca diferencia de peso molecular y puntos isoeléctricos, interviene en el momento de la agregación ordenada en una red tridimensional impidiendo buenos contactos entre los monómeros. Las desamidaciones espontáneas ocurren en glutaminas y asparaginas expuestas. En el citocromo c existen tres glutaminas con mayor susceptibilidad de desamidación, Gln12, Gln16 y Gln42 (Flatmark, T. 1966). En la figura 23 se pueden apreciar la posición de estos residuos junto a la distancia del residuo más cercano en su molécula relacionada por simetría.

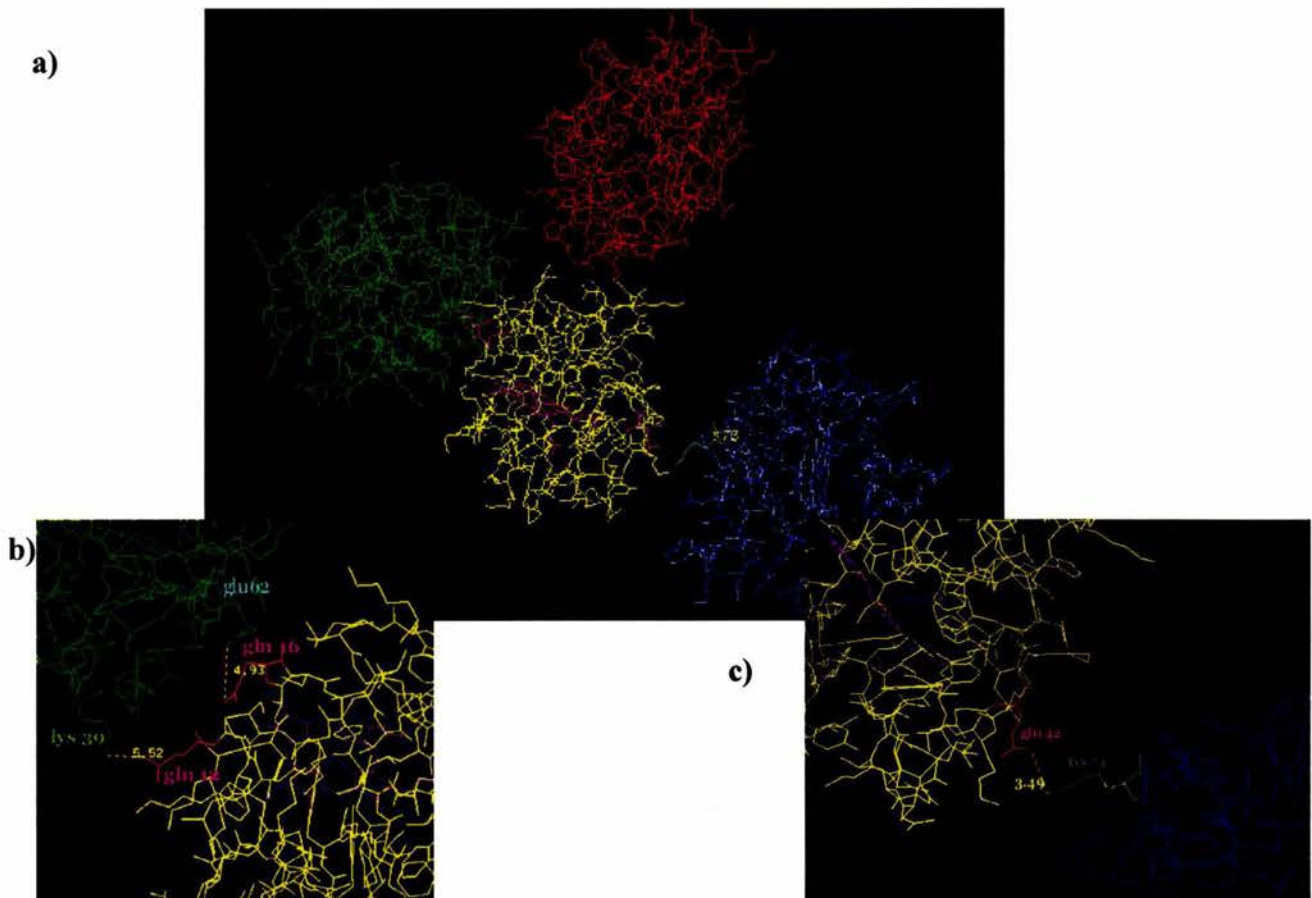


Figura 23: a- imagen de cuatro moléculas de citocromo c relacionadas por la simetría P2₁2₁2₁. b- y c- son dos acercamientos donde se observan las distancias entre las glutaminas susceptibles de desamidación y el aminoácido más cercano de su par en el cristal.

En general, los científicos que han cristalizado citocromo c de diversas especies han tenido que separar estas isoformas. El perfil de elusión de la cromatografía de fase reversa, sumado al perfil de cromatografía de masas y la alta resolución obtenida en los estudios cristalográficos han permitido asegurar que se ha cristalizado la forma nativa de la proteína.

La cristalización del citocromo c bovino en presencia de un campo eléctrico interno fue exitosa, permitiendo confirmar el potencial de la técnica para obtener cristales de proteína en cortos tiempos, comparado con el control. Para el caso del citocromo c en particular, la cristalización por esta técnica se llevó a cabo en 15 días comparados con los 40 necesarios para cristalizarla en ausencia del campo eléctrico. Además, no hubo necesidad de hacer seeding. No se han realizado experimentos de cinética con esta proteína, pero es probable que se encuentre nuevamente que el efecto del campo eléctrico esté acelerando el proceso de la nucleación. Se observó en el experimento control que se requieren alrededor de 30 días para que se obtengan micro-núcleos, los cuales al ser transferidos a gotas de menor sobresaturación, logran crecer. Por el contrario, en el capilar se consigue este gradiente de concentraciones gracias a la difusión y migración de las especies presentes. La función del PEG (agente precipitante) en la cristalización es la deshidratación de las proteínas favoreciendo la agregación ordenada. En ausencia del campo, la difusión del PEG a través del gel y su ascenso por capilaridad es extremadamente lenta, sin embargo ante un campo eléctrico puede orientarse y el encuentro con las moléculas de citocromo c se produce en un menor tiempo.

La cristalización de citocromo c en presencia de un campo eléctrico interno se realizó con el ánodo en contacto con la solución proteica, al igual que lo realizado para otras proteínas modelo, como lisozima y taumatina. Esto se realizó con la intención de evaluar el método para una tercera proteína que se encuentra cargada cuando se disuelve en un medio de pH alejado de su punto isoeléctrico. Sin embargo, cabe la posibilidad de intentar su cristalización en presencia de un cátodo, aplicando un potencial adecuado para su reducción y tal vez adsorción al electrodo. Para este estudio, debería volver a evaluarse el material del electrodo ya se necesita considerar la velocidad de transferencia de electrones para la reacción redox y evitar posibles desnaturalizaciones de la proteína, como Pt o Ag modificados, Au modificado o electrodos de óxidos como el electrodo de óxido de estaño dopado con indio. En el siguiente capítulo se estudió el comportamiento del citocromo c en

este último electrodo, en solución y cristalizado, para intentar analizar su conducta de transportador de electrones, base de un biosensor.

Capítulo 5: Propuesta de un biosensor.

5.1- Introducción:

La electroquímica biológica se ocupa de la aplicación de técnicas electroquímicas en el estudio y utilización de sistemas biológicos. Entre todas las actividades de este área se pueden mencionar estudios del mecanismo de las reacciones de transferencia de electrones, desarrollo de procesos para la síntesis de compuestos de interés comercial, detección y cuantificación de analitos y la investigación de las transformaciones redox de moléculas con importancia biológica. Algunas de las aplicaciones en el campo de la ingeniería biomédica son la inactivación de patógenos por medios electroquímicos, detección microbiana, celdas de combustión bioquímicas, fuentes de energía para marcapasos y corazones artificiales, electrodos ión-específicos y electrodos enzimáticos (Bockris, J.M. and Khan S.U.M., 1993).

La voltametría cíclica es muy utilizada para caracterizar las propiedades redox de los compuestos. Esta técnica provee información sobre la cinética de la reacción de transferencia de electrones y de cualquier reacción química asociada, además de datos termodinámicos, como el potencial redox, de las especies presentes. Además, puede ser utilizada como una técnica cualitativa para identificar especies en solución, de acuerdo a su potencial redox característico.

Los estudios de voltametría cíclica de metalo-proteínas no fue exitosa inicialmente, debido a diversos factores como procesos de adsorción y desnaturalización de las mismas sobre los electrodos, o inaccesibilidad del centro metálico. El uso de mediadores, moléculas responsables de transferir los electrones desde la proteína al electrodo, fue la solución a la imposibilidad del estudio directo. Sin embargo, se ha demostrado más recientemente que es posible este tipo de estudios en sistemas cuasi-reversibles, sin necesidad de utilizar mediadores, bajo ciertas condiciones (Armstrong, FA *et al.* 1988, Armstrong F.A. 1990). El uso de electrodos modificados ha permitido la interacción directa de una proteína con el electrodo, gracias a que acomodan adecuadamente a la misma, permitiendo la rápida transferencia de electrones. Estos grupos unidos al electrodo se llaman “promotores”, y no intervienen en la reacción electroquímica.

La respuesta electroquímica del citocromo c en electrodos de oro, platino (Lewis, N.S. and Wrighton MS, 1981), níquel (Kuznetsov B.A. *et al.* 1979) está reportada como irreversible, mientras que en electrodos de óxido de indio, ópticamente transparentes, es cuasireversible. Este fue el primer reporte que se tuvo de una respuesta voltamétrica cuasi reversible y cuantificable para el citocromo c con un electrodo sólido (Yeh, P. and Kuwana T, 1977). La pureza de las muestras de citocromo c es fundamental para obtener curvas voltamétricas reproducibles y estables en el tiempo. Aún las muestras comerciales más puras traen impurezas que alteran la cinética de transferencia de electrones heterogénea (Bowden, E.F. *et al.* 1982). Más aún, la presencia de pequeñas cantidades de proteína desnaturalizada, generadas durante el proceso de liofilización, tienden a adsorberse a la superficie del electrodo, bloqueando la transferencia de electrones (Koller, KB. and Hawkrige, FM. 1985; Reed DE and Hawkrige, FM 1987). Es por esto que debe realizarse el estudio con muestras re-purificadas.

Se ha propuesto en esta tesis de doctorado que los cristales de proteína con centros redox podrían actuar como biosensores, cuando se encuentran adsorbidos a un electrodo. Un biosensor electroquímico es un dispositivo en el cual el elemento sensor es una molécula biológica, ya sea proteínas o ácidos nucleicos, la cual se halla acoplada a un traductor eléctrico –electrodo- que convierte el evento de bio-reconocimiento específico a una señal eléctrica útil (Wang, J. 1999).

La hipótesis se basa en la alta selectividad de las proteínas sumado a que las mismas se encuentran en una altísima concentración y pureza en un cristal, red tridimensional ordenada. Se ha elegido trabajar esta posibilidad con el citocromo c bovino, ya que

- ❖ el evento redox es una transferencia de un simple electrón de la esfera externa.
- ❖ Contiene un grupo hemo, lo que facilita una rápida transferencia de electrones (Gray, H.B. *et al.* 1983).
- ❖ Al igual que muchas proteínas que realizan transferencias de electrones, presentan una estructura asimétrica respecto a su reactividad de transferencia de e^- y la distribución de cargas superficiales. Su grupo hemo no se encuentra en el centro de la molécula, sino mas bien hacia un costado, en una región rica en el aminoácido básico, lisina. Esta región se la conoce como la cara frontal. Esta región es responsable de guiar de forma electrostática al

citocromo c a interactuar con regiones cargadas negativamente de otras proteínas o electrodos.

❖ Esta proteína presenta una adsorción a electrodos de óxido de indio y estaño, sin desnaturalizarse. La inmovilización efectiva de la entidad biológica a un transductor en un biosensor es una de las características clave para la generación exitosa del mismo (Wang, J. 1999).

En 1969, Rosenberg y Postow descubrieron que la hidratación aumentaba la conductancia electrónica en proteínas. Dado que los cristales de proteínas mantienen un alto grado de solvate en su estructura es posible pensar que pueden ser excelentes conductores eléctricos.

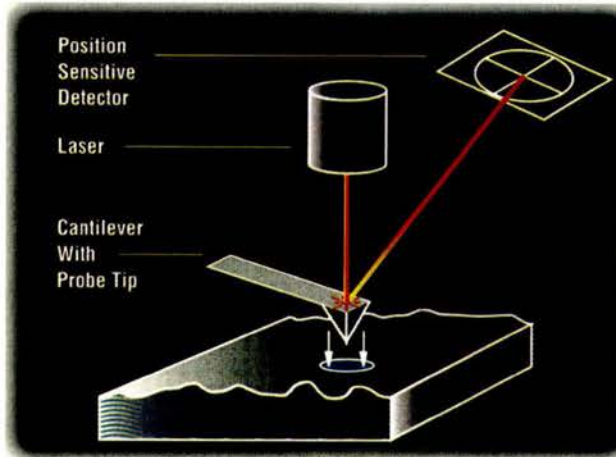
El mecanismo de transferencia de electrones es complejo (Boguslavski, L.J. 1986). Aparentemente, cuando las distancias son cortas ($< 20 \text{ \AA}$), un mecanismo de tunelamiento es suficiente (Goldstein and Bearden, 1984), pero en distancias más lejanas, debe haber algún tipo de movimiento de la proteína, cambio conformacional asociado (Bockris J. O'M and Reddy, 1970). Más aún, Willit y Bowden midieron el cambio de entropía del citocromo c al adsorberse a un electrodo de óxido de estaño. Encontraron que el ferricitocromo c presenta más cambios estructurales al adsorberse que el ferrocitocromo c (Willit y Bowden, 1991). Dependiendo de la magnitud de estos cambios, pueden ocurrir o no dentro de un cristal de proteínas, gracias al alto porcentaje de agua que contienen.

5.2- Materiales y Métodos:

Equipo de Microscopía de Fuerza Atómica, multimodal, Nanoscope IIIa, de Digital Instruments, el cual cuenta con un módulo para electroquímica (EC-AFM). El equipo opera a través del registro de las fuerzas atractivas y repulsivas entre la muestra y una sonda de nitruro de silicio. La muestra es colocada sobre un scanner el cual se puede mover en las tres dimensiones. La sonda es colocada sobre la muestra, y un laser se enfoca sobre ella. Cuando la muestra y la sonda están lo suficientemente cerca, ésta última siente atracciones y repulsiones de las nubes electrónicas, provocando movimientos oscilatorios, de acuerdo a la fuerza resultante. El haz reflejado en la sonda incide, gracias a un sistema de espejos, en

un fotodetector de posición, el cual transforma la señal luminosa en una imagen topográfica. Un esquema del funcionamiento del equipo se muestra en la figura 24.

Figura 24: esquema del funcionamiento de un equipo de microscopia de barrido con sonda.



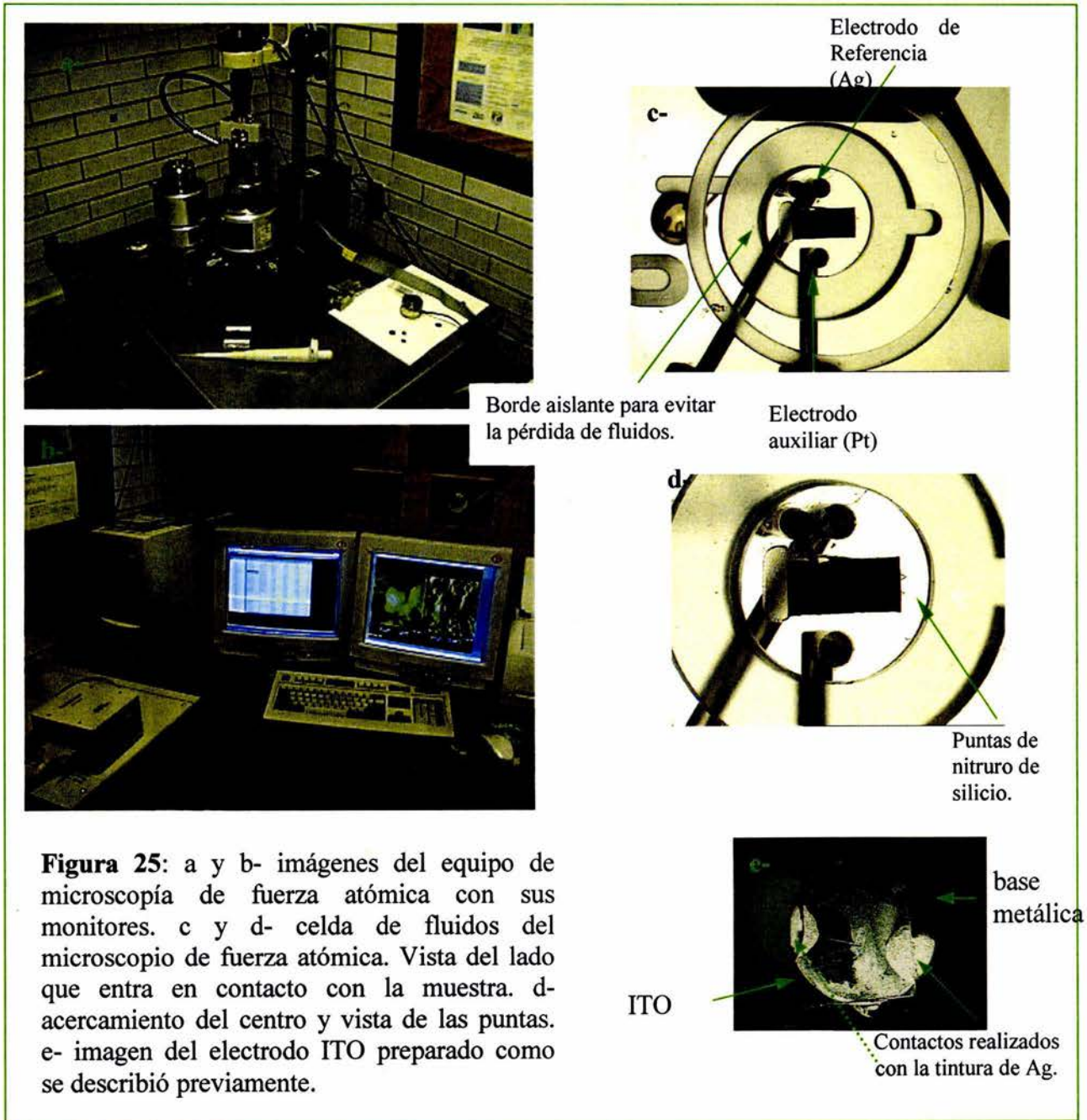
Preparación de muestras para el AFM:

Sobre una base metálica, se adhiere un electrodo de óxido de estaño dopado con Indio (ITO, del tipo CD-50 IN-S105. R: 8-12 Ω , Delta Technologies) con pegamento y tintura coloidal de plata, de alta pureza. Es muy importante verificar la conducción a través de él con un voltímetro. Sobre el mismo, se colocan 50 μ l de muestra (citocromo c bovino, 5.2 μ M, 20 μ M, 40 μ M en buffer 50 mM fosfato pH 7.0, o buffer solo, degaseados con N_2) y se incuban a 4°C en un recipiente cerrado para evitar que se seque la muestra. Al cabo de 1 hora, se coloca el electrodo con la muestra en el microscopio de fuerza atómica para su estudio electroquímico o superficial, a temperatura ambiente.

Estudio electroquímico: se realizaron ciclos de voltametría cíclica con el potenciostato del microscopio de fuerza atómica (EC-AFM).

El rango de potenciales barridos fue de -500 y 500 mV, iniciando de 0V y en sentido decreciente. Velocidad de barrido: 100mV/s.

Electrodo de referencia: alambre de Ag. Electrodo auxiliar: alambre de Pt. Electrodo de trabajo: monocapas óxido de estaño dopado con indio (ITO) con las características mencionadas previamente. La disposición de los mismos se muestra en la figura 25.



Se tomaron imágenes de los voltamogramas y de la evolución en el tiempo de la corriente y el potencial.

Todas las soluciones utilizadas fueron degaseadas pasándoles una corriente de N_2 (g) durante unos minutos.

Análisis de superficies: Este estudio se realiza en el AFM mencionado. Se usaron puntas de nitruro de silicio (NP-20, SPM tips) para este fin, las cuales se montaron en las celdas de fluidos. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Nanoscope IIIa v. 5.12.r4, de Digital Instruments. Este estudio se puede realizar en presencia de soluciones, por contar con una celda de fluidos (como la que se muestra en la figura 25) o secos. Otra ventaja es que se pueden analizar las superficies tratadas electroquímicamente en el lugar exacto de la reacción, in situ, (comparado a otras técnicas de estudios superficiales, como la microscopía electrónica).

5.3- Resultados:

En un primer paso, se analizó el efecto de las concentraciones de citocromo c sobre electrodos de ITO, con el fin de encontrar el máximo valor donde se mantiene respuesta electroquímica. 50 μ l de soluciones de citocromo c de 5.12 μ M, 20 μ M y 40 μ M se dejaron absorber durante una hora a 4 °C al cabo del cual se realizaron estudios de su superficie y de la respuesta electroquímica, en este orden. Las imágenes de las superficies se muestran en la figura 26. La incubación del buffer no mostró diferencia con el barrido del electrodo sin solución. De igual manera, no mostró respuesta electroquímica, por lo que se muestra que el buffer 50 mM fosfato pH 7.0 no presenta interacción con ITO.

Las imágenes superficiales muestran como cambia la fisonomía debida a los depósitos, como si fuera menos rugosa. En un análisis más detallado, se midieron los anchos de media altura de estos agregados, utilizando la función correspondiente del programa. Un ejemplo se muestra en la figura 27

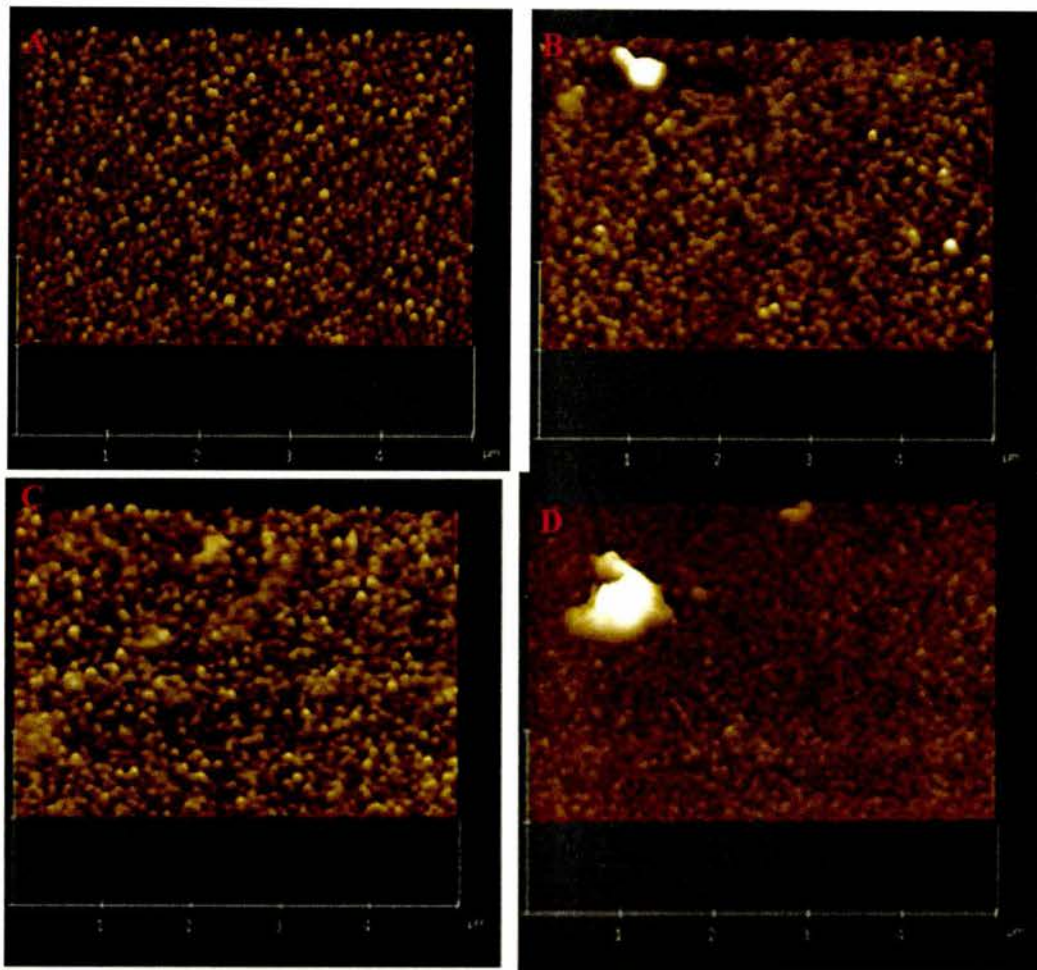


Figura 26: imágenes de microscopía de fuerza atómica de la superficie del electrodo ITO, A- expuesto al aire, B- luego de 1h de incubación con una solución 5.2 μM citocromo c bovino, C- luego de 1h de incubación con una solución 20 μM citocromo c bovino, y D- luego de 1h de incubación con una solución 40 μM citocromo c bovino. Todas las imágenes se barrieron en un área de 5 x5 μm².

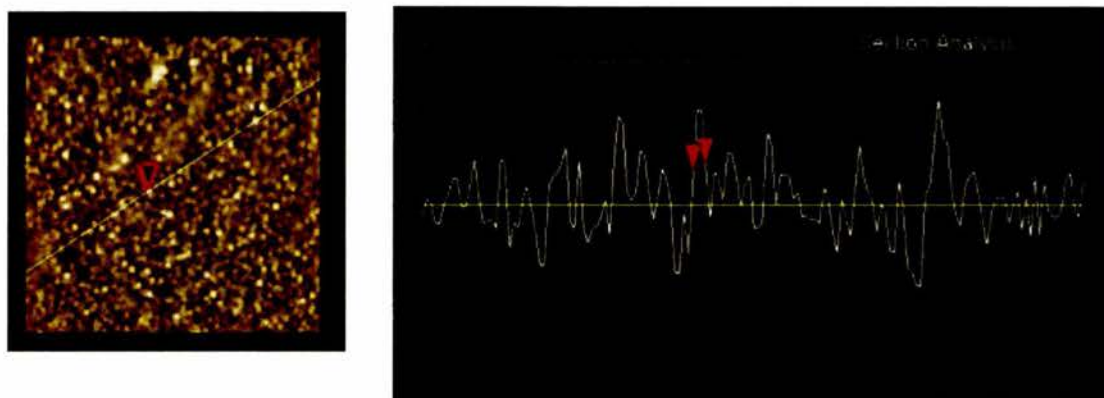


Figura 27: Imágenes del área de análisis y el perfil de los agregados a lo largo de la línea marcada. El ancho de un agregado se define entre las dos marcas rojas, a media altura del pico.

En la tabla 5 se muestran los valores y porcentajes hallados para los diámetros de agregados o cúmulos depositados (anchos medios).

Tabla 5: Porcentajes de los tamaños hallados en la superficie de las distintas muestras de ITO y citocromo c. n.d.: no detectado.

	39.060 nm	78.125 nm	97.656 nm	117.19 nm
ITO		36.51	36.51	
ITO + 5.2 μ M cit c.	3.30	36.7	n.d.	60
ITO + 20 μ M cit c.	17.5	35.09	n.d.	47.37
ITO + 40 μ M cit c.	26.03	46.57	n.d.	27.40

La superficie del electrodo es difícil de caracterizar, ya que está compuesta por un complejo ternario con un 9-10 % de óxido de estaño en óxido de indio. Su morfología y composición de la monocapa varía con la técnica de deposición y procesamiento empleadas, lo que le confiere diferentes parámetros y consecuentemente distintas propiedades como electrodo (Milliron, D.J. *et al.* 2000). En el análisis de sección transversal realizado se encontraron diversos agregados, siendo los de 78.125 y 97.656 nm los de mayor regularidad, en los porcentajes expresados.

Al depositarse citocromo c sobre el electrodo, a partir de una solución 5.2 μ M, se dejan de detectar agregados con diámetros de 97.656 nm. En su lugar, surgen los agregados de 117.19 nm de diámetro en un alto porcentaje y algunos agregados de menor tamaño (39.06 nm). Evidentemente el citocromo c tiende a interactuar con los agregados de 97.656 nm, ya que son cubiertos por la proteína y producto de esta adsorción surgen los agregados de 117.19 nm. Dado el tamaño del citocromo c y su morfología globular, diámetro de 3.4 nm, estos últimos podrían ser decámeros de citocromo c.

Al incrementarse la concentración de citocromo c se observa una disminución de las especies de 117.19 nm, y aumentan las de 39.06 nm. Esto puede explicarse por los consecutivos depósitos de citocromo c en los intersticios de los agregados presentes, generando capas de menor rugosidad. Dado que los valores hallados en las mediciones de estos agregados son múltiplos de 39.06 (78.125 son dos decámetros de citocromo c y 117.19 son tres decámetros de citocromo c) se sugiere que el citocromo c va interaccionando de esta forma con la superficie.

Otro estudio realizado con el software del equipo es analizar la altura de las partículas y la distribución de los valores de las mismas en la superficie barrida. Este estudio mostró el perfil de la figura 28, donde se grafican en el eje vertical la distancia desde la base del electrodo hacia arriba, en nm y en el eje horizontal, la frecuencia porcentual de los picos que presentaron esa altura. El rango de alturas hallados en la superficie inicial del electrodo y la del electrodo luego de ser incubado una hora con 20 μM citocromo c se ve muy similar, con un valor medio de 15.069 nm y 16.634 nm, respectivamente. Estos datos sugieren una topografía similar en los dos casos, aunque su composición no lo sea. Por el contrario, la superficie del electrodo luego de ser incubada con 5.2 μM citocromo c presentó un rango de alturas mucho mayor, y un valor medio de 46.096 nm. El electrodo incubado con 40 μM presentó un valor medio de 107.44 nm. Estos dos últimos electrodos presentaron depósitos de mayores alturas y en el caso de ITO con 5.2 μM una mayor dispersión de valores en los agregados depositados.

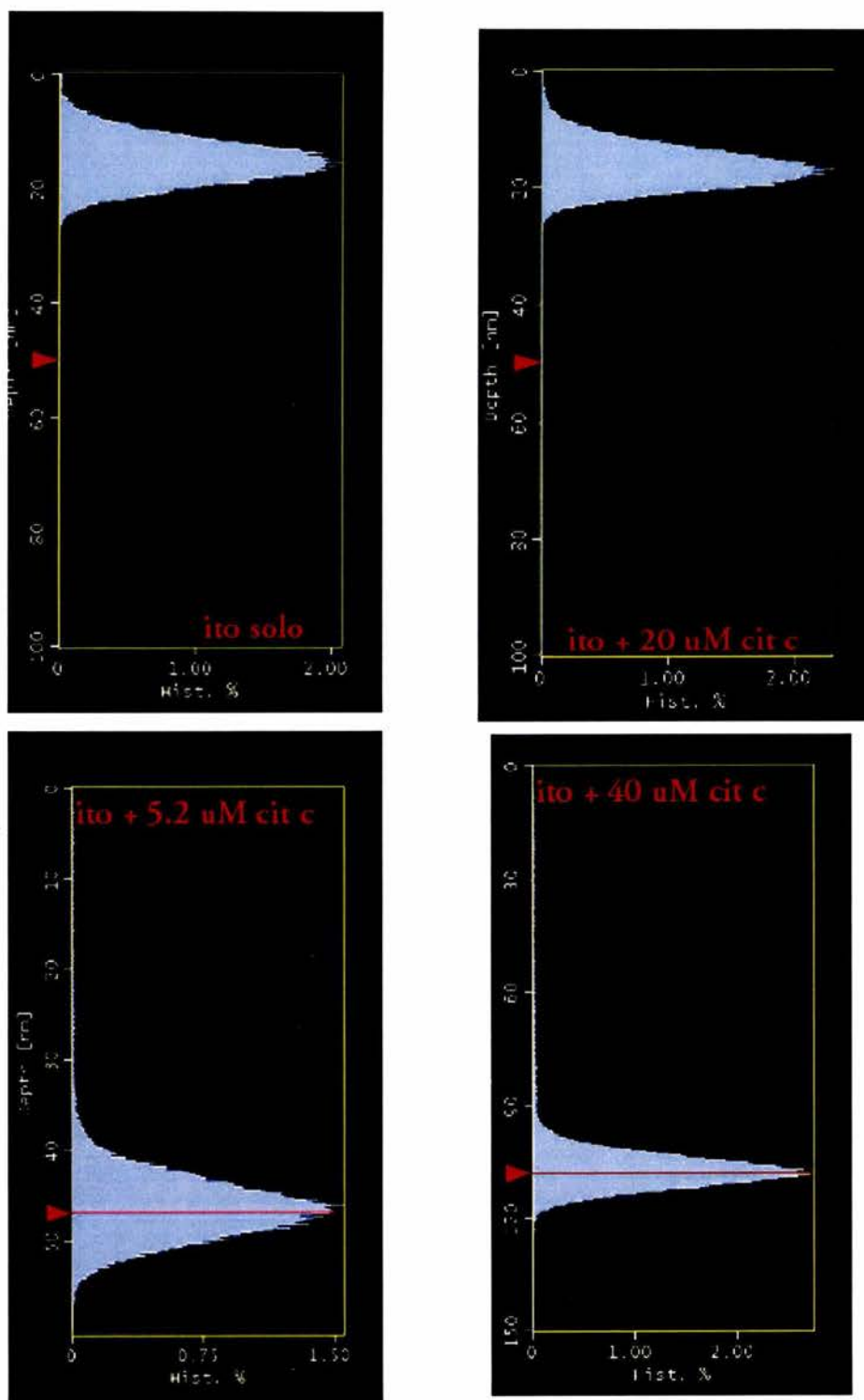


Figura 28: perfil estadístico de las partículas depositadas en los electrodos modificados. En el eje vertical se grafican las alturas encontradas de las partículas mientras que en el eje horizontal se representa el número relativo porcentual de agregados que presentan dicha altura.

En cuanto al comportamiento electroquímico de estas muestras, inicialmente ninguna de las soluciones de citocromo c presentó respuesta electroquímica cuando se aplicaron barridos de potencial de 100 mV/s , de -500 a 500 mV. Tampoco lo presentó la muestra de 5.2 μM luego de cambiar la solución de citocromo c por una de buffer. Sus depósitos no presentaron electroactividad.

Sin embargo, cuando se eliminó la solución proteica de concentración 20 μM del medio, se lavó ligeramente el electrodo de trabajo con 1ml de buffer degaseado (al igual que los electrodos y la punta presente), y se adicionó 50 μl de buffer sobre el electrodo la respuesta voltamétrica fue bien definida. La misma puede apreciarse en la figura 29. Se observó una separación de los picos de oxidación y reducción en el transcurso del tiempo que tienden a estabilizarse, así como un incremento del valor de la corriente de ambos picos. Los datos de potencial del pico y su corriente se obtienen a partir de los voltamogramas y se generó un perfil de la evolución de estos parámetros, el cual se muestra en la figura 30.

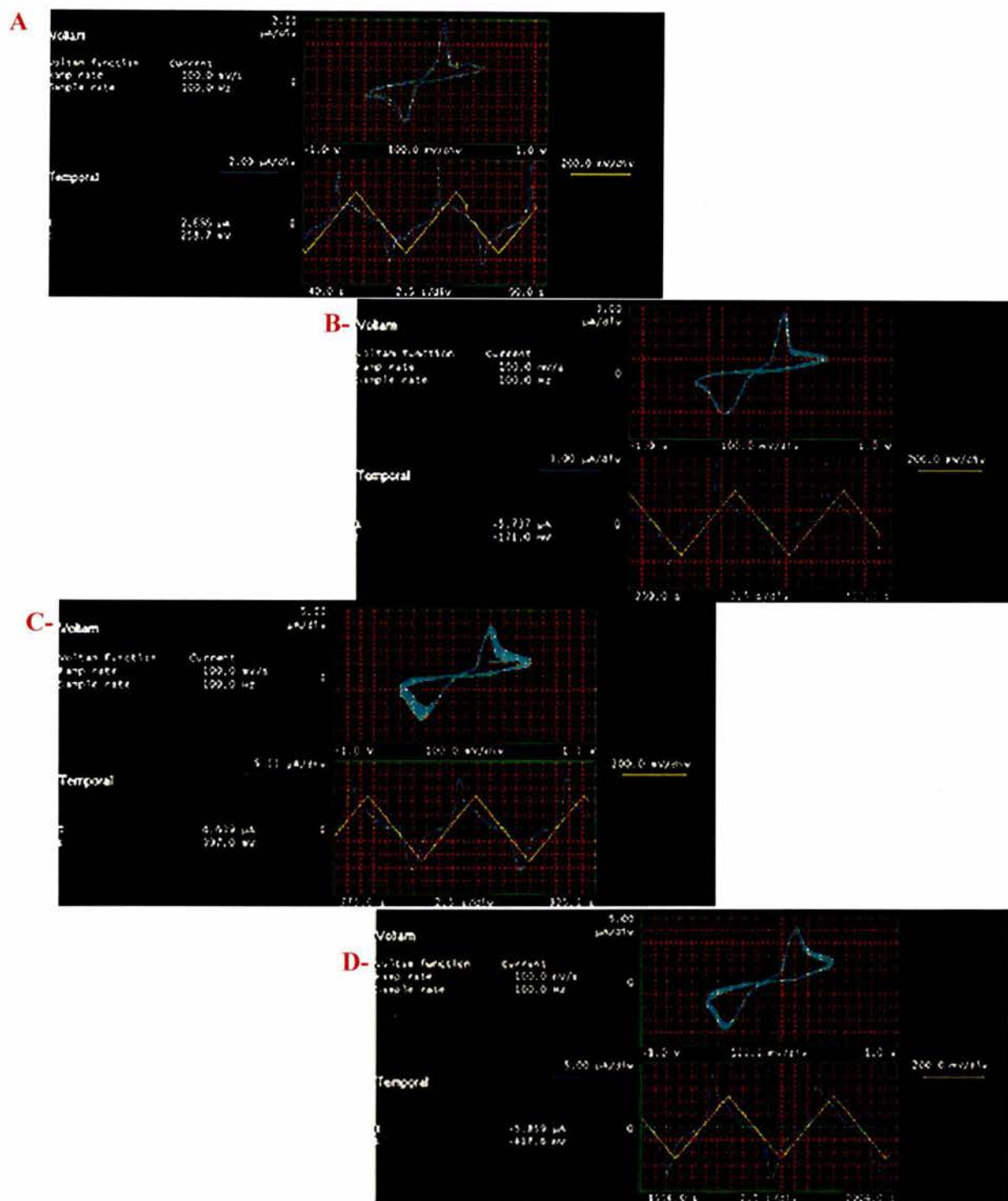
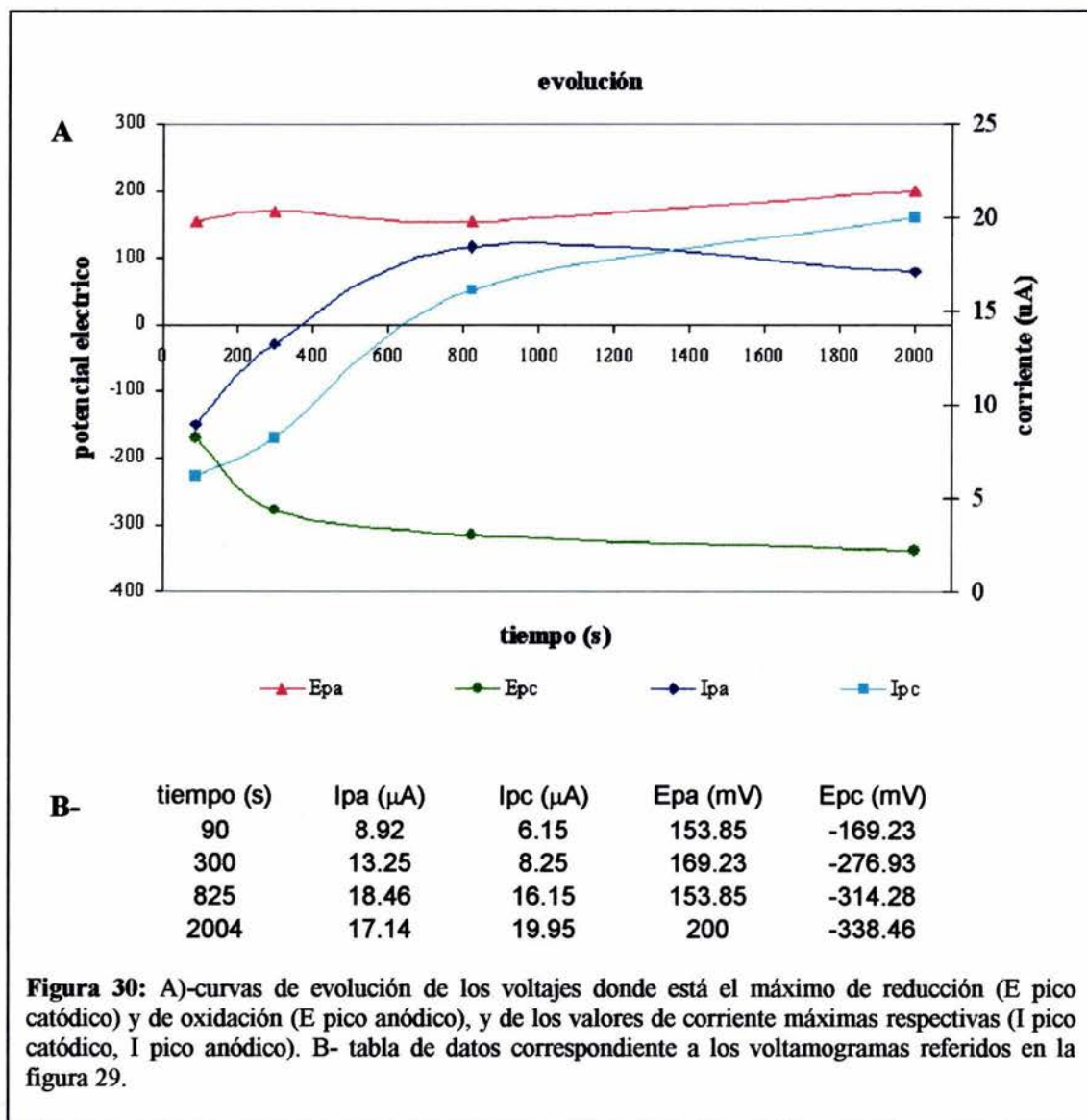


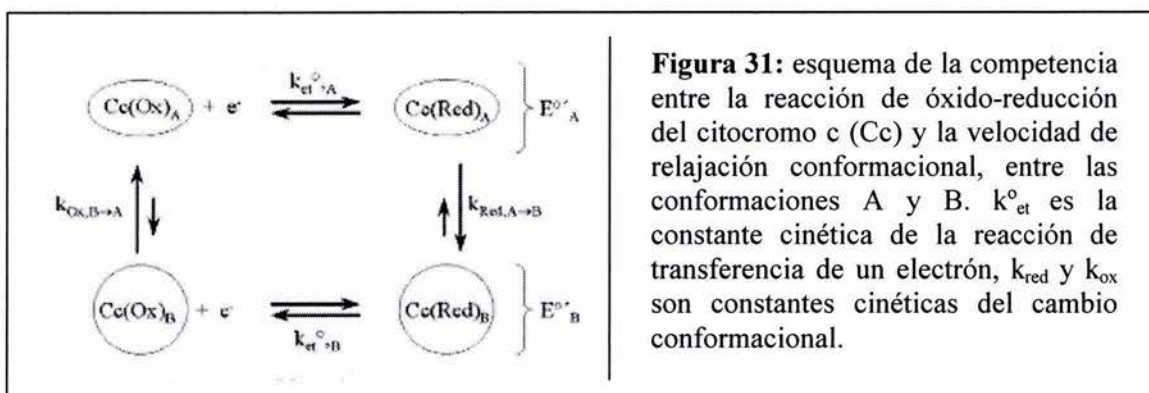
Figura 29: Imágenes de los voltamogramas y gráficos temporales de depósitos de citocromo c bovino. A- a los 90 s., B- a los 300 s., C- a los 825 s. D- a los 2004 s desde el inicio del experimento.

El aumento en la corriente puede deberse a que los depósitos de citocromo c no son ordenados, y los ciclos consecutivos de barridos de potencial van orientándolos, optimizando la transferencia de los electrones desde las capas más externas hacia el electrodo.



A los ochocientos segundos de evolución, se ven máximos de corriente en los picos catódicos y anódicos indicando que se alcanzó un ordenamiento óptimo y el máximo de especies se reducen y oxidan a esta velocidad de barrido de potenciales. En el transcurso del experimento se observó una alternancia entre los valores de corriente máxima del cátodo y ánodo dentro del rango mostrado 16-20 µA con los ciclos (datos no incluidos).

La separación entre picos puede deberse a cambios conformacionales de las moléculas de citocromo c depositadas. Se hallan reportados diversos movimientos en la estructura secundaria de citocromo c de diversas especies asociados al estado de oxidación del grupo hemo, cuando el citocromo c está en solución (Berghuis, A.M. and Brayer, G.D. 1992; Calvert, J.F. *et al.* 1997). Más recientemente, se ha propuesto que los cambios conformacionales de citocromo c existen aún cuando se encuentra adsorbido a un electrodo. (El Kasmi, A. *et al.* 2002). En este trabajo se propone la existencia de dos estados conformacionales nativos, uno que favorece al estado oxidado y el otro al estado reducido. (figura 31). La competencia entre la velocidad de transferencia de electrones (asociada a la velocidad de barrido de potenciales) y la velocidad de cambio de la estructura secundaria es quien regula la posición de los potenciales de oxidación y reducción.



Se propone en dicho trabajo que la conformación A estabiliza mejor al estado oxidado, mientras que la B lo hace con el estado reducido. De esta forma, la reducción del citocromo c en conformación A requiere de mayor energía que la reducción de la proteína en conformación B ($E^{\circ \prime}_A$ es más negativo que $E^{\circ \prime}_B$), ya que el producto $(Cc\ red)_B$ es más estable que $(Cc\ red)_A$. Cuando la velocidad de barrido es lenta respecto a la velocidad del movimiento conformacional, hay tiempo suficiente para que una conformación inestable se relaje, antes que la reacción redox opuesta vuelva a suceder. Esto provoca una mayor separación en los potenciales de oxidación-reducción. Esta es una posible explicación al corrimiento en los potenciales observados.

En los voltamogramas puede observarse un pico de oxidación muy cercano al pico del citocromo c, de potencial de oxidación más positivo. Este hombro puede deberse a alguna especie agregada del citocromo c o a algún conformero del citocromo c. No se debe a

alguna impureza ya que aumentó su valor de I máxima al igual que lo hacía el pico principal de oxidación. Este segundo pico también ha sido hallado en otros estudios de electroquímica del citocromo c con un electrodo de ITO, en estudios previos, sin encontrarse un pico reductor. En esa ocasión, el pico catódico iba disminuyendo su máximo valor de corriente al igual que el área debajo de la curva (indicador de la cantidad de especie que se reduce) mientras iba aumentando el valor de I máxima del pico secundario de oxidación.

Respecto al electrodo incubado a 4°C con 40 μM citocromo c, no presentó respuesta electroquímica en presencia de la solución de citocromo c ni en su ausencia, al tratar el electrodo con 1 ml de 50 mM NaH_2PO_4 , degaseado. Dada la gran cobertura del electrodo, producto de la adsorción del citocromo c, se cree que se pasivó el electrodo.

5.4-Discusión:

El citocromo c es una proteína transferidora de electrones, con un hemo dispuesto de forma asimétrica en su estructura tridimensional. Esto la convierte en una molécula muy atractiva para el diseño de un biosensor. Los depósitos de la misma sobre un electrodo de óxido de estaño e indio permiten obtener mono o multicapas de proteína nativa y activa. En un primer acercamiento a estos resultados se pensaría que el estudio electroquímico requiere de una concentración adecuada de proteína, ya que cuando es muy poca no hay señal detectable y cuando es demasiada se pasiva el electrodo. Sin embargo, si consideramos el análisis de las superficies, se observa que el electrodo incubado con 20 μM de citocromo c presenta una topografía similar al electrodo sin depósitos proteicos, mientras que los otros casos las alturas de los picos fueron mayores y de mayor dispersión. Tal vez en el caso del electrodo incubado con 40 μM los depósitos presentan tal altura que se dificulta la transferencia al electrodo, mientras que en el caso de 5.2 μM el amplio rango de los mismos sugiere intersticios (probablemente por la baja concentración de moléculas presentes) donde se interrumpe el flujo de carga. Esto significa que la transferencia de cargas requiere de cierta distribución de las moléculas en la superficie y no solo es importante la cantidad de estas moléculas que estén presentes.

Las moléculas adsorbidas no lo hacen de una manera específica. Más aún, se ha observado en el caso de la incubación de ITO con 20 μM citocromo c un aumento de la corriente que circula por el sistema con los ciclos de barrido de potencial, suponiendo una re-orientación de las moléculas depositadas. Este reordenamiento es posible ya que las moléculas adsorbidas retienen cierto nivel de hidratación, y los estudios se realizaron en un medio líquido. De igual forma, en un cristal de proteínas hay suficiente agua de hidratación que permite este tipo de movimientos en las moléculas. Dado este modelo (citocromo adsorbido por afinidad con el electrodo), la concentración de proteína no es un factor limitante para obtener una respuesta satisfactoria sino la distribución y ubicación de las moléculas en la superficie. Por el contrario, existe la posibilidad de utilizar cristales de proteínas, los cuales presentan un ordenamiento interno óptimo en cuanto a proximidad de las moléculas. La idea de tener capas ordenadas y no dispuestas al azar nos permite suponer que la transferencia de electrones será más eficiente, asegurando una buena detección del analito dador o aceptor de electrones, en un biosensor. Además, el método propuesto en esta tesis permite obtener los cristales bajo una orientación favorable de las moléculas en el cristal, en respuesta al campo eléctrico presente durante su crecimiento. La orientación de las moléculas optimizaría la transferencia de electrones a través de las multicapas, convirtiendo al cristal en una fuente de proteína sensora sumamente pura confinada en un espacio mínimo.

A futuro habría que experimentar esta posibilidad.

Capítulo 6: Conclusiones y Perspectivas.

6.1- Conclusiones:

❖ El método propuesto ha presentado ciertos beneficios a la hora de cristalizar proteínas. La presencia del campo eléctrico interno favorece la nucleación sin alterar la calidad estructural. Los cristales obtenidos de esta forma presentaron tiempos de inducción menores sin afectarse la velocidad de crecimiento general. En consiguiente, los cristales presentan un buen ordenamiento interno, característica muy útil no solo para el conocimiento de la estructura tridimensional de una biomolécula, a través de la obtención de datos de muy buena resolución, sino también para el campo de la bioingeniería y nanotecnología.

❖ Al comparar este método con los métodos tradicionales de gotas, encontramos las ventajas comunes con el método de acupuntura en gel, donde dentro del capilar se presentan un gradiente de condiciones, aumentando la probabilidad de realizar un ensayo exitoso, es decir, obtener cristales. Un factor negativo es la alta cantidad de materia prima, proteína, que se requiere para los ensayos, pero es posible que a futuro se pueda trabajar con capilares de menor diámetro o una disposición de electrodos diferente, tal de reducir el volumen de muestra necesario. Por otro lado, con el avance día a día de las técnicas de biología molecular es más factible que el problema de la materia prima (proteínas) deje de serlo.

❖ En relación al método de acupuntura en gel, se ha observado que debido a la nucleación más rápida, es posible disminuir la concentración inicial de proteína que debe colocarse en el capilar. El campo eléctrico actuaría “optimizando” las moléculas presentes. Tal es el caso del citocromo c, en donde se utilizó en el capilar una concentración inicial igual a la usada en el método de difusión en fase vapor, cuando usualmente la diferencia de concentración entre las dos técnicas es mucho mas grande (alrededor de 2.5 veces mayor, cuando menos). Otra posibilidad que brinda el aplicar un campo eléctrico es que el precipitado inicial que se observa en el método de acupuntura en gel, (debido a la alta sobresaturación en la zona inferior del capilar) puede utilizarse como una “reserva” de nutrientes, ya que si se invierte la polaridad o se imponen pulsos de corriente al sistema, se

observó la disolución de los mismos. Esta posibilidad debe analizarse con mayor profundidad y aplicarse en cada caso en particular, a consideración de la proteína en estudio, el pH de cristalización, las sales presentes, etc.

❖ Respecto al caso particular del citocromo c, fue evidente la necesidad de purificar la isoforma nativa de las desamidadas para su cristalización. El crecimiento cristalino es un proceso sumamente sensible a la composición de la solución proteica ya que se deben acomodar las moléculas muy próximas entre si, en un patrón regular. La presencia de ligeras variaciones de carga en la superficie de las proteínas o residuos móviles alteran este ordenamiento afectando negativamente la calidad final o impidiendo la formación del cristal. El método de purificación utilizado fue exitoso ya que en un solo paso se consiguió separar la proteína nativa de sus isoformas, lo que permitió su cristalización. Al someterla a cristalización en presencia de un campo eléctrico interno, su respuesta fue igual a las proteínas modelo. No se ha explorado la posibilidad de cristalizarla a un potencial constante, de forma de obtenerla en un estado reducido (u oxidado). Sin embargo, es factible de que ocurra y si se eligen los electrodos adecuados puede cristalizar adsorbida al mismo. Si el cristal proteico no pierde su actividad redox, se obtendría un biosensor, donde el elemento censante sería la proteína inmovilizada en el cristal, adsorbida al electrodo, elemento transductor de la señal electroquímica en eléctrica.

❖ La adsorción del citocromo c a un electrodo de óxidos de In y Sn ha sido caracterizada topográficamente. Los electrodos modificados con citocromo c mantuvieron su actividad electroquímica solamente luego de ser incubados con 20 μM de citocromo c. Con los estudios realizados, no es posible decir que siempre una solución de mayor concentración a 20 μM pasiva al electrodo, ya que en estudios preliminares sí se ha obtenido respuesta electroquímica. Dado que la adsorción es espontánea y de forma no ordenada, es probable que cuando los depósitos de citocromo c se dan de manera tal que la superficie presenta una altura mayor a 35 nm la transferencia de electrones a través de ella no es posible. Diferente sería el caso de un cristal, donde la red tridimensional presenta una regularidad optima en cuanto a las interacciones entre residuos y distancias, favoreciendo el tunelamiento de cargas.

6.2- Perspectivas:

En el futuro sería muy interesante optimizar la celda de crecimiento de cristales en presencia de un campo eléctrico interno, con el objeto de reducir el volumen de muestra requerida en los ensayos, y evaluar otros electrodos, que presenten cierta afinidad con las proteínas a cristalizar, pero que no se desnaturalicen al adsorberse. El uso de electrodos ópticamente transparentes, como ITO permiten caracterizar los depósitos por absorción de un haz de longitud de onda característica de la proteína.

Sería muy importante poder cristalizar una proteína que presente un centro redox en un estado de oxidación/reducción definido, por aplicación de un potencial controlado durante todo el crecimiento. Para ello habría que evaluar la proteína y sus condiciones de cristalización junto al sistema de electrodos a utilizar.

Otra posible extensión de este trabajo es el análisis en mayor profundidad de un biosensor empleando monocristales en vez de monocapas. Estudiar la electroquímica de cristales de citocromo c adsorbidos a ITO y observar si su poder de transferencia electrónica se magnifica en estado sólido.

Por último, la cristalización de proteínas de membranas en presencia de un campo eléctrico podría ser de gran utilidad. El uso de electrodos modificados con surfactantes (DDAB) o grupos piridinas ha resultado muy exitoso en el estudio electroquímico de proteínas transportadoras de electrones. Tal vez, los surfactantes cumplan una doble función, evitando la desnaturalización de las proteínas en contacto con los electrodos y permitiendo una estabilización de las moléculas anfipáticas (proteínas de membranas). A su vez, el campo eléctrico las orientaría y conduciría hacia la formación de un cristal.



Universidad Nacional Autónoma de México

Apéndices A y B

Referencias Bibliográficas:

- Allègre C.J., Provost, A. And Jaupart C. (1981) *Nature* **294**, 223.
- Ambler, R.P. (1978) *Eur. J. Biochem.* **83(1)** 261-275.
- Armstrong, FA., Hill H.A.O. and Walton N.J. (1988) *Acc. Chem. Res* **21**, 407.
- Armstrong, FA (1990) *Struct. Bond* **72**, 137.
- Armstrong F.A. and Wilson G.S. (2000) *Electrochimica Acta* **45**: 2623-2645.
- Ataka, M.; Katoh, E.; Wakayama, N.I. (1997) *J. Cryst. Growth*, **173**, 592-596.
- Baird J.K.; Meehan, E.J.; Xidis, A.L.; Howard, S.B. (1986) *J. Cryst. Growth*, **76**, 694-700.
- Bard A.J., Faulkner L.R. (2001) *Electrochemical Methods, fundamentals and applications*. 2nd. edition, J. Wiley & Sons, Inc.
- Benneman, P. (1974) *J. Cryst. Growth*, **24**, 76.
- Biertümpfel C., Basquin, J., Suck, D., Sauter, C.(2002) *Acta Cryst.* **D58**, 1657-1659.
- Berghuis, A.M. and Brayer, G.D. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 959.
- Bockris, J.O.M. and Reddy, A.K.N. (1970) *Modern Electrochemistry*, New York, Plenum Pub. Corp.
- Bockris, J.O.M. and Khan S.U.M (1993) In: *Surface Electrochemistry: a molecular level approach*, chapter 7, pp 663-744., New York Plenum Press.
- Boguslavsky, C.I. (1980) in: *Comprehensive Treatise of Electrochemistry* vol 1 (Bockris J. O'M., Conway, B.E. and Yeager, E. eds.) Plenum Press, NY, pp. 342.
- Boguslavsky, L.J. (1986) in: *Modern Aspects of Electrochemistry* N° 18 (White, B.E., Conway, B.E. and Bockris J. O'M. eds.) Plenum Press, NY, pp. 117-160.
- Boistelle, R.; Astier, J.P. (1988) *J. Cryst. Growth*, **90**, 14-30.
- Bolaños-García, V.M. (2003) *J. Cryst. Growth* **253**, 517-523.
- Bowden E.F., Hawkrige, F.M., Chlebowski J.F., Bancroft, EE., Thorpe, C., and Blount, H.N. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7641-7644.
- Brautigan, D.L., Ferguson-Miller, S and Margoliash, E. (1978) *Methods in Enzymol.* **53**, 128.
- Broom, M.B.H.; Witherow, W.K.; Snyder, R.S.; Carter D.C. (1988) *J. Cryst. Growth*, **90**, 130-135.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
- Calvert, J.F., Hill, J.L. and Dong A. (1997) *Arch. Biochem. and Biophys.* **346**, 287-293.
- Cheng P.S.; Shlichta, P.J.; Wilcox, W.R.; Lefever, R.A.(1979) *J. Cryst. Growth*, **47**, 43-60
- Chernov, A.A.(1984) *Modern crystallography III, Crystal growth*, Springer-Verlag eds.

- Cohen, D.J., Hawkrige F.M., Blount H.N. and Hartzell C.R. in M.J. Allen and P.N.R. Usherwood (eds). *Charge and Field Effects in Biosystems*, Abacus, Tunbridge Wells, 1984, p. 19.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760±763.
- Cotton, T.M., Schultz, S.G., Van Duyne, R.P. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7960-7962.
- De Lucas, J.L.; Smith, C.D.; Smith, H.W.; Senagdi, V.K.; Senadhi, S.E.; Ealick, S.E.; Bugg, C.E.; Carter, D. C.; Snyder, R.S.; Weber, P.C.; Salemme, F.R. Ohlendorf, D.H.; Einspahr, H.M.; Clancy, L.; Navia, M.A.; McKeever, B.; Nagabhushan, T.L.; Nelson, G.; Babu, Y.S.; McPherson, A.; Koszelak, S.; Stammers, D.; Powell, K. and Darby, G. (1989) *Science*, **246**, 651-654.
- DeLucas, J.L.; Bray, T.L.; Nagy, L.; McCombs, K.; Chernov, N.; Hamrick, D.; Cosenza, L.; Belgovskiy A.; Stoops, B.; Chait A.(2003) *J. Struct. Biol.* **142**, 188-206.
- Flatmark, T. (1964) *Acta Chem. Scand.* **18**, 1656-1666.
- Flatmark, T. (1966a) *Acta Chem. Scand.* **20**, 1476-1486.
- Flatmark, T. (1966b) *Acta Chem. Scand.* **20**, 1487-1496.
- Flatmark, T. (1966c) *Acta Chem. Scand.* **20**, 1497-1503.
- Frankenheim, L.(1860) *Ann. Physik*, , **111**, 1-60.
- French, G.S. and Wilson, K.S. (1978) *Acta Cryst.* **A34**, 517.
- García-Ruíz, J.M. (1991) *Key Eng. Mater.* **88**, 87-106.
- García-Ruíz, J.M.; Moreno, A.; Viedma, C.; Coll, M. (1993) *Mater. Res. Bull.* **28**, 541-546.
- García-Ruíz, J.M; Moreno A. (1994) *Acta Cryst.* **D50**, 484-490.
- García-Ruíz J.M. & Otálora, F. (1997) *J. Cryst. Growth* **182**, 155-167.
- García-Ruíz, J.M.; Novella, M.L.; Moreno, R.; Gavira, J.A. (2001a) *J. Cryst. Growth*, **232**, 165-172.
- García-Ruíz, J.M.; Otálora F.; Novella, M.L.; Gavira, J.A.; Sauter, C.; Vidal, O. (2001b) *J. Cryst. Growth* **232**, 149-155.
- Gavira, J.A.; Toh, D.; Lopez-Jaramillo, J.; García-Ruíz J.M.; Ng, J.D. (2002) *Acta Crystallogr. D* **58**, 1147-1154.
- Gray, H.B., Makinnen M.V., Schickmann, S.A. and Hill S.C. (1983) *Science* **222**, 929.
- Gui, Y. and Kuwana T. (1987) *J. Electroanal. Chem.* **226**, 199-209.
- Helliwell J.R.; Snell, E.; Weisgraber, S. (1995) in: *Proc. 9th European Symposium on Gravity Dependent Phenomena in Physical Sciences*. Berlin, Germany.
- Henisch, H.K. (1988) *Crystal Growth in Gels and Liesegang Rings*, Cambridge University Press, Oxford, U.K.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R (1985) *Electrophoresis* **6**, 103–112.
- Hurle, D.T.J.(1994a) *Handbook of crystal growth*. Vol **1B**, North-Holland, Amsterdam.

- Hurle, D.T.J. (1994b) *Handbook of crystal growth*. Vol **2A**, North-Holland, Amsterdam.
- Jolles, P. and Berthour, J. (1972) *FEBS Lett.* **23**, 21-23.
- Ko T.P., Day, J., Greenwood A. and McPherson, A. (1994) *Acta Cryst.* **D50** 813-825.
- Koller, K.B. and Hawkrige, F.M. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7412-7417.
- Kuhn, P.; Wilson K.; Patch, M.G.; Stevens, R.C. (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 704-710.
- Kuznetsov BA. Mestechkina N.M., Izotov, M.V., Karuzina I, Karyakin A.V., Archakov AI. (1979) *Biochemistry (Engl. Transl)* **44**, 1234-1239.
- Kuznetsov, Yu. G., Konnert, J., Malkin, J.A. and McPherson, A. (1999) *Surface Science* **440 (1-2)**, 69-80.
- Kuznetsov, Yu. G., Malkin, J.A. and McPherson, A. (2001) *J. Cryst. Growth* **232**, 114-118.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Lewis, N.S. and Wrighton M.S. (1981) *Science* **211**, 944.
- Li, M., Nadarajah, A. and Pusey, M.L. (1999) *Acta Crystallogr.* **D55**, 1012-1022.
- Lin, H.; Rosenberger, F.; Alexander, J.L.D.; Nadarajah, A. (1995) *J. Cryst. Growth*, **151**, 153-162.
- Lin S.X.; Zhou, M.; Azzi, A.; Xu, G.J.; Wakayama, N.I.; Ataka, M. (2000) *Biophys. Res. Commun.*, **275**, 274
- Littke, W. (1979) in: *17th Aerospace Science Meeting*, New Orleans, USA., January 15-17.
- Malkin, A.J., Kuznetsov, Yu.G., Glantz, W. and McPherson, A. (1996) *J. Phys. Chem.* **100**, 11736-11743.
- McPherson, A. (1976) *Methods of Biochemical Analysis*, **23**, David Glick Ed., Academic Press, N.Y., 249-345.
- McPherson, A. (1982) *The preparation and analysis of protein crystals*, John Wiley and sons Eds., New York.
- McPherson A, Weickmann, J. (1990) *J Biomol Struct Dyn.* **7(5)**,1053-60.
- McPherson, A. (1996) *Crystallography Rev.*, **6(2)**, 157-308.
- McPherson A. (2003) *J. Struct. Biol.* **142**, 1-2.
- Milliron, D.J., Hill I.G., Shen, C., Khan, A. and Schwartz, J. (2000). *J. Appl. Phys.* **87**, 572-576.
- Mirkin, N.; Frontana-Uribe B.A.; Rodriguez-Romero A.; Hernandez-Santoyo A.; Moreno A. (2003) *Acta Crystallogr D***59**, 1533-1538.
- Mirkin, N., Moreno A. (2004) in: *Proceedings of the 10th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules*. Beijing, China, 175.

- Miyashi, S., Komatsu, H. and Suzuki, Y. (1993) *Jpn. J. Appl. Phys.* **32**, 1855.
- Miyashi, S., Komatsu, H., Suzuki, Y. and Nakada T. (1994) *J. Cryst. Growth* **141**, 419.
- Monaco, L.A. and Rosenberger, F. (1993) *J. Cryst. Growth* **129**, 465.
- Moreno A. and Sazaki, G. (2004) *J. Crystal Growth* **264**, 438-444.
- Morita Y. and Ida, S. (1972) *J. Mol. Biol.* **71**, 807-807.
- Nadarajah, A. and Pusey, M.L. (1996) *Acta Crystallogr. D* **53**, 524-534.
- Nanev, Ch.; Penkova, A. (2001) *J. Cryst. Growth*, **232**, 285-293.
- Ng, J.D.; Gavira, J.A.; García-Ruiz, J.M. (2003) *J. Struct. Biol.* **142**, 218-231
- Nieto-Mendoza E., Frontana-Uribe BA., Sazaki G., Moreno A. (2005) *J. Cryst. Growth* **275**, e1437-e1446.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Palmer, K.J. (1947) *Struct. Rep.* **11**, 729.
- Pflugrath, JW (1999) *Acta Cryst. D* **55**, 1718-1725.
- Pusey, M.; Witherow, W.K.; Naumann, R. (1988) *J. Cryst. Growth*, **90**, 105-111.
- Qi, J.; Wakayama, N.I.; Ataka, M. (2001) *J. Cryst. Growth*, **232**, 132-137.
- Reed, D.E. and Hawkridge, F.M. (1987) *Anal. Chem.* **59**, 2334-2339.
- Rosenberg B. and Postow, E. (1969) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **158**, 161.
- Rosenberger, F. (1979) *Fundamentals of crystal growth I, Macroscopic equilibrium concepts*. Springer, Berlin.
- Rosenberger F. (1986) *J. Cryst. Growth*, **76**, 618-636.
- Rosenberger, F., Howard, S.B., Sowers, J.W. and Nyce, T.A. (1993) *J. Cryst. Growth* **129**, 1.
- Roses, A.D. (2002) *Nat. Rev. Drug Discovery*, **1**, 541-549
- Roussel A. and Cambillau, C. (1989) TURBO-FRODO. Silicon Graphics Geometry Partners Directory. Pp. 77-79. Silicon Graphics, Mountain View, CA.
- Salemne, F.R. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 533-539.
- Sanishvili, R.G, Margoliash, E., Westbrook, M.L., Westbrook, E.M. and Volz K.W. (1994) *Acta Cryst. D* **50**, 687-694.
- Sanishvili R.G., Volz, K.W., Westbrook, E.M. and Margoliash, E. (1995) *Structure* **3**, 707-716.
- Sarig, S. (1994) in: *Handbook of crystal growth*. Vol 2b, Hurler, D.T.J., Ed., North-Holland, Amsterdam.
- Sato, T, Yamada, Y.; Saijo, S.; Hori, T.; Hirose, R.; Tanaka, N.; Sazaki, G.; Nakajima, K.; Igarashi, N.; Tanaka, M.; Matsuura, Y. (2000) *Acta Cryst. D* **56**, 1079.
- Sazaki, G., Moreno A. and Nakajima K. (2004) *J. Cryst. Growth* **262**, 499-502.

- Snell, E.H.; Weisgerber, S.; Helliwell, J.R. (1995) *Acta Cryst.* **D51**, 1099-1102.
- Steinrauf, L.K. (1959) *Acta Crystallogr.* **12**, 77-79.
- Takano, T. and Dickerson, R.E. (1981a) *J. Mol. Biol.* **153(1)**, 79-94.
- Takano, T. and Dickerson, R.E. (1981b) *J. Mol. Biol.* **153(1)**, 95-115.
- Taleb M., Didierjean C., Jelsch C., Mangeot J.P., Capelle B., Aubry A. (1999) *J. Cryst. Growth* **200**: 575-582.
- Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Aubry, A. (2001) *J. Cryst. Growth* **232**, 250-255.
- Tanaka, N., Yamane, T., Tsukihara, T., Ashida, T. and Kakudo, M. (1975) *J. Biochem. (Tokio)* **77**, 147-162.
- Vaney, MC., Broutin I., Retailleau, P., Douangmath A., Lafont, S., Hamiaux C., Prange T, Ducruix A. and Ries-Kautt M. (2001) *Acta Crystallogr. D* **57**, 929.
- Vekilov, PG., Ataka M. and Katsura, T. (1995). *Acta Crystallogr. D* **51**, 207.
- Vekilov P.G., Alexander J.I.D. and Rosenberger, F. (1996) *Phys. Rev. E* **54(6)**, 6650-6660.
- Wakayama, N. I., Ataka, M. & Abe, H. (1997). *J. Cryst. Growth*, 178, 653±656.
- Wang, J. (1999) *Anal. Chem. Acta* **399**, 21-27.
- Wang, L.; Zhong, C.W.; Wakayama, N.I. (2002) *J. Cryst. Growth*, **237**, 312-316
- Wilcox, D., Dove, B., McDavid, D., Greer, D. Image Tool for Windows v. 3.0. University of Texas Health Science Center in San Antonio, (1995-2002).
- Willit, J.L. and Bowden E.F. (1991) *J. Phys. Chem.* **95**, 6.
- Yanagiya, S., Sasaki, G., Miyashita, S., Nakajima, K., Komatsu, H., Watanabe, K. & Motokawa, M. (2000). *J. Cryst. Growth*, 208, 645± 650.
- Yeh, P., Kuwana, T. (1977) *Chem. Lett.* 1145-1148.
- Yin, D.C.; Wakayama, N.I.; Inatomi, Y.; Huang, W.D.; Kuribayashi, K. (2003) *Adv. Space Res.* **32(2)**, 217-223.
- Yonath, A., Müssig, J.; Witlmann, H.G. (1982) *J. Cell. Biochem.*, **19**, 145-155.
- Zeppezauer, M.; Eklund H.; Zeppezauer, E.S. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **126 (2)**, 564-573.
- Zhong, C.W.; Wakayama, N.I. (2001) *J. Cryst. Growth*, **226**, 327-332.

The influence of an internal electric field upon protein crystallization using the gel-acupuncture method

N. Mirkin, B. A. Frontana-Uribe,
A. Rodríguez-Romero,
A. Hernández-Santoyo and
A. Moreno*

Instituto de Química, UNAM Circuito Exterior,
C. U. Mexico, D. F. 04510, Mexico

Correspondence e-mail:
carcamo@servidor.unam.mx

Received 9 September 2002

Accepted 11 June 2003

In this work, the influence of an internal electric field upon the crystallization of lysozyme and thaumatin is explored using a modified design of the gel-acupuncture setup. From a crystallographic point of view, the orientation of crystals that grow preferentially over different types of electrodes inside capillary tubes is also evaluated. Finally, the crystal quality and the three-dimensional structure of these proteins grown with and without the electric field influence are analyzed by means of X-ray diffraction methods.

1. Introduction

The major problem in producing suitable protein crystals for X-ray diffraction or biophysicochemical investigations lies in the limited amount of protein to be analyzed or crystallized. Nowadays, newer, more efficient and faster methods for protein overexpression using molecular biology have been proposed for high-throughput analyses in order to perform protein crystallization and consequently X-ray crystallographic investigations. However, there are some physicochemical parameters which could improve protein crystal growth or control nucleation phenomena that have not been fully explored. These parameters are the magnetic field (Sazaki *et al.*, 1997; Ataka *et al.*, 1997; Wakayama *et al.*, 1997; Yanagiya *et al.*, 2000), electrofocusing (McPherson, 1992) and the influence on the nucleation and crystal growth of biological macromolecules using an external electric field (Taleb *et al.*, 1999, 2001; Nanev & Penkova, 2001, 2002).

There are only a few recent studies in which the influence of an external electric field upon protein crystallization has been evaluated using the batch, hanging-drop and sitting-drop methods. For instance, using droplet techniques in the laboratory of Aubry and coworkers it has been proved that an external electric field suppresses HEWL crystal nucleation, resulting in an increased growth rate of lysozyme crystals in the external electric field (Taleb *et al.*, 1999). Most recently, Aubry and coworkers (Taleb *et al.*, 2001) measured the kinetics of the protein crystallization process and detected increased HEWL concentration in the solution near the cathode. On the other hand, in work published by Nanev & Penkova (2001) crystal growth was conducted using templates of organic polymers inside capillary tubes. Using the batch method, the effect on lysozyme crystallization of applying electric and ultrasonic fields was evaluated. It was also observed that the orientational growth of the crystals followed a preferential direction towards the cathode. Most recently, Nanev and coworkers have evaluated lysozyme crystals to be preferentially orientated along the *c* axis when a magnetic field is applied; the critical temperature at which the effect is

more remarkable has also been determined (Nanev & Penkova, 2002).

However, all of these publications lack crystallographic data or structural analyses for the crystals grown in the electric field. In none of them is there any indication of crystal-packing modifications. It may be useful to find a new experimental method that could be used to study the effects of electric fields upon protein crystallization and establish a theoretical basis that would explain what happens during crystal nucleation and growth.

In this work, we tried (i) to explore the influence of an internal electric field during the crystallization of lysozyme and thaumatin using a modified design of the gel-acupuncture setup (García-Ruiz *et al.*, 1993; García-Ruiz & Moreno, 1994) and (ii) to study the polarity effect of the electrodes and the current interval at which the internal electric field had the strongest influence on either the crystallization process or the nucleation phenomena. Finally, we also evaluated the crystal quality as well as the three-dimensional structure of the crystals grown in the presence or absence of the electric field.

2. Materials and methods

All these experiments were performed using an *ad hoc* modified Granada Crystallization Box (Hampton Research) commonly used for the gel-acupuncture method. In this new configuration, two electrodes and a direct current power supply (Galvanostat EG&G Princeton Applied Research, Model 173) were adapted as shown in Fig. 1. The applied current ranged from 0.9 to 1.0 μA so that the maximal current

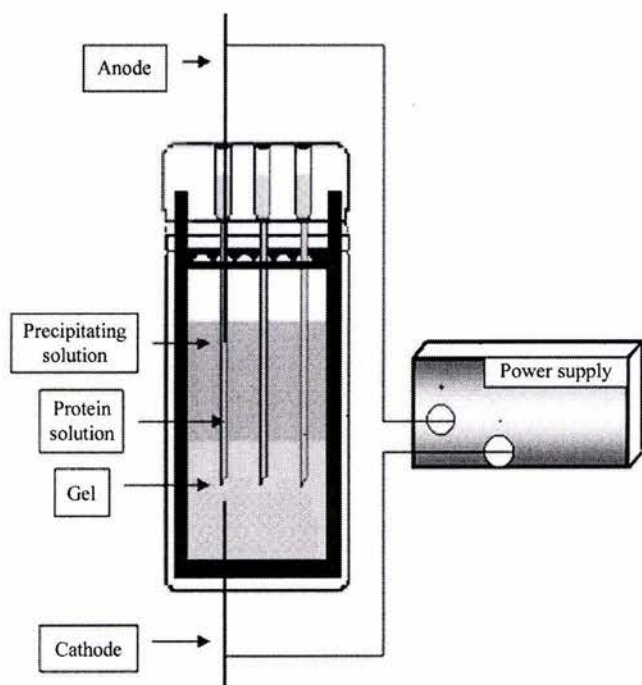


Figure 1
Experimental setup of the crystallization cell connected to a power supply (galvanostat).

density was 2.86 $\mu\text{A cm}^{-2}$ and was kept constant during the crystallization process. The electrodes used were platinum wires (0.2 mm diameter) and graphite rods (0.5 mm diameter). All experiments were carried out at constant temperature ($291 \pm 0.1 \text{ K}$), but it is worth mentioning that the temperature inside the capillary tube may be slightly different owing to the heat released by the applied current and ionic movement. A 100 mg ml^{-1} solution of lysozyme (Sigma L-6876) was prepared in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.6 and 20% (w/v) NaCl in water (as the crystallizing agent). For thaumatin (Sigma T-7638), a 100 mg ml^{-1} solution in water and 25% (w/v) sodium potassium tartrate in 100 mM buffer phosphate pH 7.0 was used as the crystallization agent.

The electrodes were introduced through two orifices in the crystallization cell. The capillary tube was first filled with protein solution and one electrode was placed inside, allowing the tip to protrude out of the capillary tube for connection to the power source. The upper part of the tube (where the electrode protrudes) was sealed with wax. The open-ended part of the capillary tube was punctured into the gel in the lower part of the crystallization cell; the other electrode was then introduced and the capillary tube sealed with the same sealant. In all the experiments carried out with the gel-acupuncture method, we kept the same penetration length of 5 mm. Once the crystallization agent was poured onto the gel, the system was connected to a direct-current power supply (galvanostat). For each experiment there was a corresponding control experiment in which the electrodes were dipped into the protein solution and the gel, but no current was applied. The protein solutions were in contact with the anode in most of the experiments used to test the influence of the internal electric field. By changing the polarity of the galvanostat, the effect of the cathode immersed into the protein solution was also examined. Initially, capillary tubes of 1.0 mm diameter were used. However, in the preliminary experiments some bubbles were formed owing to electrolysis of water. These bubbles block protein diffusion towards the electrode, interrupting the electric current. To overcome this problem, wider capillary tubes of 1.5 mm internal diameter were used. The effect of the electric field on the crystallization process was followed by taking optical images using a Zeiss Stemi SV11 stereoscopic microscope with a CCD camera adapted to our experimental setup. The program *AxioVision* provided by Zeiss Co. was used to record the digital images.

Once crystals were obtained on the electrode, at least four of them were removed, mounted in a clean capillary and X-ray data collection was performed at 291 K using a Rigaku R-AXIS IIC diffractometer with a rotating-anode generator (operated at 50 kV, 100 mA). Diffraction data were integrated using the *DENZO* program (Otwinowski & Minor, 1997) and scaled with programs from the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). The three-dimensional structure was obtained using the molecular-replacement method and data from the PDB for thaumatin (PDB code 1thw) where needed. Molecular-replacement and rigid-body refinement was accomplished using *CNS* v.1.0 (Brünger *et al.*, 1998), while model-building and correction

procedures were performed using the program *QUANTA2000* (Molecular Simulations Inc., Burlington, MA, USA). *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993) was used for analysing the stereochemistry of the model.

3. Results and discussion

3.1. Observations of the general crystal-growth behavior

The crystallization conditions used were those typically used for lysozyme and thaumatin crystallization in the gel-acupuncture method (García-Ruiz *et al.*, 1993; García-Ruiz & Moreno, 1994). For lysozyme, a precipitate appeared within a few minutes in the lower part of the capillary tube when the electrodes were connected to the galvanostat. This behavior is usually observed using the typical gel-acupuncture method; nevertheless, when the electrical current was applied the precipitate and the crystals were obtained in a shorter time. The precipitate increased in height up to the electrode tip, covering the lower area of the electrode. On the other hand, when the electrodes were very close to one another, the precipitate moved along the electrode towards its upper part. Crystals were obtained in less than 24 h, keeping a homogeneous morphology of the tetragonal system of lysozyme around the electrodes (Pt and graphite) compared with the control. In the case of thaumatin, this initial precipitate was not observed. The most remarkable result was the following: crystals of thaumatin are usually obtained in approximately 12 d using the common gel-acupuncture setup, whereas with the influence of electric current crystals were obtained in 5 d. It is worth mentioning that these crystals of thaumatin were larger than those observed for the control and the apparent mosaicity was not very different, as will be shown in §3.3.

These effects on the crystal-growth behavior led us to establish that the influence of the fields could effect (i) the kinetics of the process (related to the nucleation and the mechanisms of crystal growth) and (ii) changes in the three-dimensional crystal structure. Concerning the first point, we

evaluated the growth rate *versus* time for one of the studied proteins. Fig. 2 shows the average growth rate of lysozyme crystals grown under the influence of an electric current compared with the control. The plot shows that the crystals grown under the influence of a direct current grew faster than those grown using the classical experimental setup without current.

In relation to the preferential orientation of the crystals, we observed that for all crystals attached to the electrode there seem to be preferential faces that used the electrode as a substrate in the presence of the electric field. These faces were mostly oriented towards the *c* axis of the tetragonal crystal of lysozyme. It is very important to mention that in all cases crystals appeared on the anode. When the polarity of the electrodes was changed (with the working electrode now behaving as a cathode), we did not observe the same crystal-growth behavior. We only obtained aggregates deposited on the surface of the electrode and most of the time amorphous precipitation was observed during the crystallization experiment. Because of these results, other variables, such as the material of the electrode, the strength of the electric field or the charge density over the electrode, needed to be evaluated.

In order to understand the nucleation behavior of the protein molecule inside the capillary tube with a dipped electrode (anode), the existence of an electric double layer formed along the electrode must be considered. It is well known that when an electrode is dipped into an electrolyte solution, an electric double layer is formed around the metal owing to the asymmetric forces felt by the electrolytes.

This double layer is composed of an initial plane of water molecules with their dipoles oriented with respect to the electrode charge. There is also a second plane in which hydrated ions of opposite charge arrange around it (Bard & Faulkner, 2001). The anomalous behavior of the attachment of lysozyme (positively charged at the pH value of the buffer) to the anode (a positively charged electrode dipped in the capillary tube containing the protein solution) may arise from the interaction of lysozyme with the ions present in the electric double layer around the electrode. In Fig. 1, a reversal of the polarity of the electrodes, in which the electrode in the capillary tube is working as the cathode, is represented. This experimental setup produces a migration of the negatively charged ions towards the anode (immersed in the gel). Therefore, the capillary tube will be mainly filled with the positively charged ions (Na^+) as well as the protein molecule itself (positively charged at this pH value). This effect leads to a disturbance of the system owing to the fact that negatively charged ions (Cl^-) are needed for the protein-protein interactions in lysozyme crystallization (Vaney *et al.*, 2001). This overview explains why the crystals grew on the surface of and around the electrode when it was used as an anode. This electrochemistry-based method of crystallizing proteins is not an electrocrystallization because there is no redox reaction occurring between the protein and the electrode, but there is an electro-focusing or electro-dialysis arising from the applied current. Something similar to this occurs in the classical electrophoresis method.

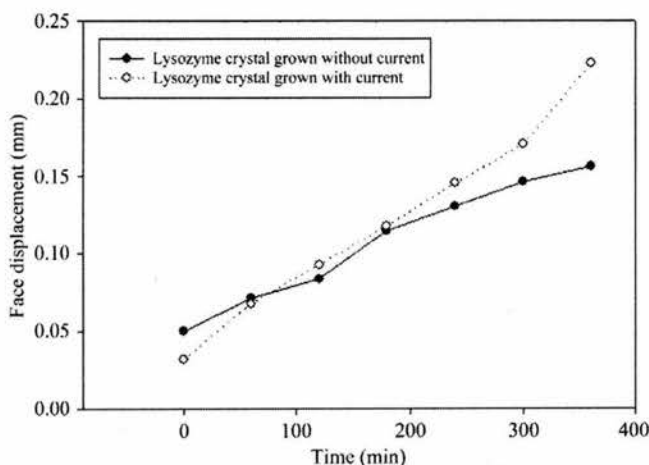


Figure 2
Plot of the average growth rate for two crystals of lysozyme: (a) control, (b) crystal grown under the influence of an electric field.

The crystals of lysozyme grew on the surface and around the anode (dipped in the capillary tube containing protein solution) instead of appearing on the cathode part. The same crystal-growth behavior was observed when thaumatin was crystallized. However, in this case the crystallization conditions were different (precipitating agent, pH of buffer solution), although the crystal-growth trend was the same as that observed for lysozyme. It is worth mentioning that thaumatin and lysozyme were prepared in different buffer solutions (pH 7 and pH 4.5, respectively). However, both proteins were positively charged in solution owing to the similar values of their isoelectric points (11.4 for lysozyme and 12 for thaumatin).

3.2. The influence of the distance and materials of the electrodes and the pH variation during the crystallization process

In order to attempt to explain the attachment of crystals to the positively charged electrode, the effect of the use of two different materials, platinum and graphite, as electrodes was examined. In order to perform this, the anode was dipped into the lysozyme solution and the cathode was immersed in the gel part. By using the graphite electrode, several crystals were obtained in the solution and a very few small well shaped protein crystals were observed adsorbed on the electrode. On the other hand, for the Pt-wire electrode the crystals were of a larger size and showed regular tetragonal morphology. Some of them were adsorbed and some were located around the electrode after 24 h (Fig. 3). Additionally, the pH variation in our experimental setup was examined using acid–base indicators. In addition to water electrolysis, it was also necessary to confirm that the pH value did not change around the electrode. We observed neither considerable variations of the pH value nor water electrolysis when low values of direct current were applied.

After finding the most appropriate electrode, platinum wire, the influence of the strength of the electric field was studied by changing the distances between the electrodes. For a constant electric current (using this experimental setup), it was established that the more we separated the electrodes, the weaker the electric field. When the distance between the electrodes was changed, it was observed that the more they were separated, the more typical were both the morphology of the

Table 1
X-ray data statistics for the thaumatin crystals.

	Control	Electhau1	Electhau2
Data collection			
Space group	$P4_12_12$	$P4_12_12$	$P4_12_12$
Unit-cell parameters (Å)			
<i>a</i>	58.664	58.647	58.633
<i>b</i>	58.664	58.647	58.6337
<i>c</i>	151.391	151.390	151.427
Resolution range (Å)	15.0–2.0	15.0–2.0	15.0–2.0
No. of reflections	135685	134546	105150
No. of unique reflections	18694	19702	19204
$I/\sigma(I)$	9.0	3.6	7.8
Completeness	99.2	98.8	96.5
R_{merge} (%)	0.053	0.112	0.059
Structure refinement			
R/R_{free}	0.177/0.205	0.192/0.224	0.173/0.187
Average <i>B</i> factor	23.4	24.2	22.6
R.m.s. deviations			
Bonds (Å)	0.005	0.005	0.005
Angles (°)	1.3	1.3	1.3
Torsions (°)	25.3	25.2	25.4
No. of non-H atoms			
Protein	1545	1546	1548
Ligand	10	10	10
Water	93	97	98

obtained lysozyme crystals compared with the control experiment and the induction time for the nucleation. When the distance between the electrodes was reduced, lysozyme crystals were obtained in a shorter time. The same effect of the distance between electrodes was observed for thaumatin: the larger the distances, the smaller the difference from the control experiment.

3.3. The analysis of the crystal quality and three-dimensional structure of thaumatin by means of X-ray diffraction methods

In order to obtain some idea of the changes in the three-dimensional structure when a direct current was applied, one of the model proteins where better X-ray data were found in our experimental X-ray measurements was chosen. A comparison was made between thaumatin crystals grown with and without the electric field. X-ray diffraction methods were used to analyze and compare the thaumatin crystal symmetry. All analyzed crystals showed the same tetragonal morphology and belonged to space group $P4_12_12$. The X-ray data statistics are shown in Table 1. From this table, the statistics for the

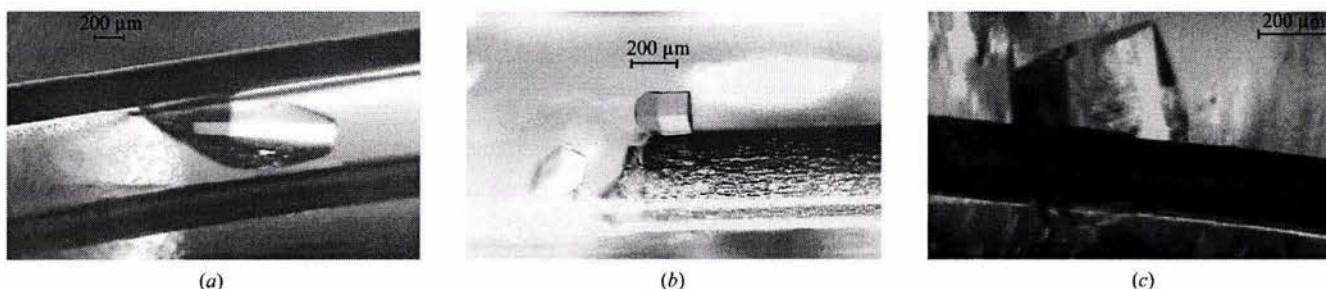


Figure 3
Lysozyme crystals grew attached to the electrode (Pt and graphite), while many others were obtained in the solution: (a) control, (b) when graphite anode was used, (c) a general view when a Pt anode was used.

crystals named electhau1 and electhau2 correspond to two crystals grown inside the capillary tube where the electrodes were separated by 2 cm. The crystals seemed to be packed in the same way independently of the applied electric current. It was also necessary to evaluate the crystal quality by using a plot of $I/\sigma(I)$ (intensity/estimated error) versus R (resolution) for each protein in order to compare them with the control. Fig. 4 shows this result for thaumatin crystals grown under the influence of an internal electric field. The other crystal was grown with dipped electrodes but without applying current (control). This plot of $I/\sigma(I)$ showed that the crystal grown in the electric field is significantly more disordered than that in the control. The increased lattice disorder associated with rapid crystal growth led to the two plots in Fig. 4. As is observed in this plot, the crystal quality (in terms of the randomness in the crystal) was slightly modified owing to the influence of the electric current. However, when the apparent mosaicity for both cases was analyzed, there was no significant difference, *i.e.* 0.20 for the control thaumatin crystal and 0.24 for the crystal of thaumatin grown in the electric field. This increased lattice disorder associated with rapid crystal growth represents an apparent disadvantage in terms of structural packing when a current is applied. Nevertheless, we have to consider that if there are no changes in the three-dimensional structure, the advantage of this method will be the shorter induction time for the nucleation phenomena and the crystal-growth stage.

In order to characterize any structural changes that occur when applying the direct current during the crystallization process of thaumatin and lysozyme, it was necessary to solve the three-dimensional structure of those protein crystals by the molecular-replacement method. From the X-ray data collection, we obtained higher quality data sets for thaumatin crystals, so that we decided to focus our structural analyses on this model protein in order to analyze the three-dimensional protein structure.

We compared the structure of two protein crystals of thaumatin, one grown under the influence of an electric

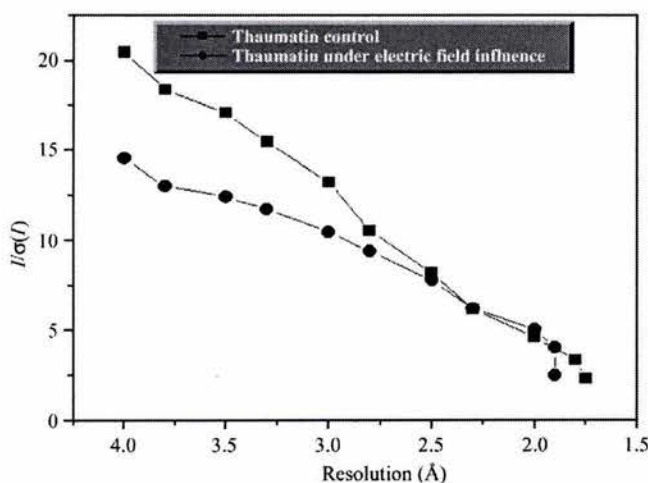


Figure 4
Plot of $I/\sigma(I)$ versus R for testing the crystal packing of thaumatin grown with and without the influence of the internal electric field.

current and the other without any electric influence. No structural differences in the polypeptide chain were observed. Comparison of the Ramachandran plots of a crystal grown under the influence of an electric field, a control crystal and data taken from the PDB (PDB code 1thw) was performed. From these plots, there was only one missing residue in the three cases, which was located in the forbidden area of the Ramachandran plot. This electron density was observed after solving and refining the three-dimensional structure for all the analyzed protein crystals (control crystal and crystals grown under the electric influence). This electron density corresponded to Asp25, which was observed in all cases to be inside the electron-density map of the polypeptide chain without any anomalous electron-density distribution along the chain. This aspartate residue was located in the loop insertion between β -strands *B* and *C* as reported by Ko *et al.* (1994). This deviation of the main-chain-main-chain dihedrals might be indicative of the functionally important regions of a protein (Asp25), as pointed out by Unger & Moulton (1993).

Based on our results, we suggest that one of the main advantages of this method of crystal growth is the shorter time required to obtain crystals compared with the typical experimental setup of the gel-acupuncture method. On the other hand, the three-dimensional structure is not affected by the current applied during the crystal-growth process, as was shown by the X-ray crystallographic analyses. Because the applied current is small, the effect is not enough to change the space group of the crystal, although it did lead to more randomness in it, slightly modifying the protein crystal quality. The most remarkable observation compared with the lysozyme and thaumatin controls was the shorter time required for the nucleation and crystal-growth stages. In order to investigate any biochemical changes in the protein structure when the electric field was applied, we collected several crystals grown under the influence of an internal electric field and compared them with the control experiments using the gel-electrophoresis method. The electrophoresis gel showed the same bands as for the controls. For the crystals (lysozyme and thaumatin) obtained under the influence of an internal electric field, there was no substantial difference between the crystals dissolved in solution. Therefore, the crystal-packing quality is only different in the solid state when the current is applied and when the nuclei are formed, but the crystal maintains its structure and symmetry (as seen from the X-ray data).

4. Conclusions

This work was a preliminary approach focused on the description of the *ad hoc* modified Granada crystallization cell using the gel-acupuncture setup to investigate the influence of an internal electric field during the crystallization process. Very interesting results concerning the induction time for the nucleation were observed as a result of the presence of this internal electric current along the capillary tube. This information will not only reopen a new area of research on the internal influences of the electric field on protein crystallization, but it will also provide new insights into the solubility

behavior of proteins, with relevance to understanding the nucleation and the crystallization process, and controlling the size of the crystals. As was shown in the X-ray diffraction experiments, the same space groups were obtained for lysozyme and thaumatin crystals after applying the internal electric field, without affecting the three-dimensional structure, even though the solubility was modified in some way (as observed by the lower number of crystals obtained). Further studies will be focused on explaining whether the decrease in the induction time for nucleation arising from the internal electric field can only be observed in these proteins or whether it is a common effect for all proteins. From the three-dimensional structure data of these analyzed crystals, it can be said that the structure of the protein is not modified but that it is possible to control either the induction time for the nucleation or the direction of the crystallization on the surfaces of the electrodes depending of their polarity.

Authors acknowledge grants from CONACYT-México projects 36155E, J34873-E, 3241E and DGAPA-UNAM project No. IN204702. This is publication number 1766 from the Instituto de Química, UNAM, México. NM acknowledges a doctoral scholarship from DGEP-UNAM and the authors are indebted to Miss Gabriela Salcedo for language correction.

References

- Ataka, M., Katoh, E. & Wakayama, N. I. (1997). *J. Cryst. Growth*, **173**, 592–596.
- Bard, A. J. & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. New York: Wiley & Sons.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 905–921.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- García-Ruiz, J. M. & Moreno, A. (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 484–490.
- García-Ruiz, J. M., Moreno, A., Viedma, C. & Coll, M. (1993). *Mater. Res. Bull.* **232**, 285–293.
- Ko, T.-P., Day, J., Greenwood, A. & McPherson, A. (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 813–825.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–291.
- McPherson, A. (1992). *J. Cryst. Growth*, **122**, 161–167.
- Nanev, Ch. & Penkova, A. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 285–293.
- Nanev, Ch. & Penkova, A. (2002). PhD thesis, Bulgarian Academy of Sciences, Bulgaria.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Sazaki, G., Yoshida, E., Komatsu, H., Nakada, T., Miyashita, S. & Watanabe, K. (1997). *J. Cryst. Growth*, **173**, 231–234.
- Taleb, M., Didierjean, C., Jelsch, C., Mangeot, J. P. & Aubry, A. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 250–255.
- Taleb, M., Didierjean, C., Jelsch, C., Mangeot, J. P., Capelle, B. & Aubry, A. (1999). *J. Cryst. Growth*, **200**, 575–582.
- Vaney, M. C., Broutin, I., Retailleau, P., Douangmath, A., Lafont, S., Hamiaux, C., Prangé, T., Ducruix, A. & Riès-Kautt, M. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 929–940.
- Unger, R. & Moulton, J. (1993). *Bull. Math. Biol.* **55**, 1183–1198.
- Wakayama, N. I., Ataka, M. & Abe, H. (1997). *J. Cryst. Growth*, **178**, 653–656.
- Yanagiya, S., Sazaki, G., Miyashita, S., Nakajima, K., Komatsu, H., Watanabe, K. & Motokawa, M. (2000). *J. Cryst. Growth*, **208**, 645–650.

Investigación

Advances in Crystal Growth Techniques of Biological Macromolecules

Nurit Mirkin & Abel Moreno*

Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria. Coyoacán 04510, México, D.F., México. Telephone: (52)(55)-5622-4467; Fax: (52)(55)-5616-2217. E-mail address: carcamo@servidor.unam.mx

Recibido el _____; aceptado el 3 de marzo del 2005

Abstract. The structural knowledge of some biological macromolecules helps to understand their mechanisms of working and their role on health sciences, food science and even their effect on the economy. In this work, some recent solutions to crystallogenesis for structural analysis (convective transport, counter-diffusion, the challenge of membrane protein crystallization, and high throughput techniques) are described. Finally, investigations on microgravity, crystal growth under magnetic and electric fields, as well as crystal growth in mesophases (lipid membranes) and microfluidics are carefully revised.

Keywords: protein crystallization, transport phenomena, crystal growth methods, proteins.

Resumen. El conocimiento estructural de muchas biomoléculas ayuda a entender sus mecanismos de acción, efectos sobre la salud, la alimentación e inclusive en la economía. En este trabajo se revisan algunas soluciones a problemas de la cristalogénesis biológica, para estudios estructurales (convección, la contra-difusión, la cristalización en masa y recientemente el reto de cristalizar proteínas de membrana). Finalmente, se revisan en detalle los trabajos hechos en microgravedad, cristalización bajo campos magnéticos o eléctricos, contra-difusión, sistemas de bicapas lipídicas y sistemas de microfluidos.

Palabras clave: cristalización de proteínas, fenómenos de transporte, métodos de crecimiento cristalino, proteínas.

Introduction

The progress in molecular biology during the last twenty-five years has been deeply dependent on the structural knowledge at atomic resolution of biological macromolecules. Many efforts have been done around the world to stimulate the structural study of proteins and of the different conformations they adopt in nature. The final aim is to understand the diversity of protein structural families, their folding and the relation that exists between structure and function. Up to date, the redundancy in the motives and structural elements found in nature suggests that the number of different conformations is finite and manageable. Once most of them will be known, it will be possible to predict the function of new unknown protein domains.

Structural biology has also influenced notoriously the field of protein-engineering. While recombinant DNA techniques are the synthetic tools, structure determination conform the analytical tool. This leads the introduction of changes in an intelligent and intentional way in opposition to random modifier techniques. The advances in genomics have allowed the expression of proteins in alive systems, study their activities and based on their structure modify them genetically for any practical purpose, like increasing their stability or affinity for a substrate, inhibitor, etc. All this will revolutionize human life in different aspects: economics, health, nutrition.

Beyond the impact of structural biology in biochemistry and biology, the three-dimensional structures of macromolecules have demonstrated to be a formidable value in biotechnology. Structural biology has promoted the pharmacology field, through the rational drug design based on the structure of target macromolecules. This will make a great impact on

such diverse problems like curing human diseases, solving veterinary problems or attacking crop affections [1].

The advances in genomics, as well as in proteomics, have produced thousands of new proteins for their study in structural biology and drug design projects. The complete sequencing of vertebrate and invertebrate genomes [2] have sped up the international efforts for developing high throughput methods and technologies that allow the fast three-dimension protein structure determination [3]. Since the number of new proteins will continue to increase, as well as the number of scientist that studies them, the necessity for new efficient and effective methods for structure determination comes up [4]. Up to date and in the near future, X-ray diffraction of unique macromolecule crystals is the only technique that can provide structural data at atomic resolution for the purposes mentioned. Other techniques that generate structural and molecular dynamic data do exist but they are not used for the purposes expressed previously [1].

Some public and private projects emerge under the name of Structural Genomics. These efforts need fast and efficient methods and techniques for three-dimensional structure elucidation. They are focused on high-throughput crystal growth for X-ray diffraction, pondering new strategies for reducing the amount of raw materials used, accelerating the work and increasing the success-rates. These efforts are multidisciplinary and they interrelate between biochemists, biophysicists, microbiologists with molecular biologists, as well as physicists and engineers for developing new strategies and equipment. Here, some of the problems that they fence and their plans for solving them will be reviewed

For X-ray crystallography to be applied crystals of adequate size and quality must be required for precise data collec-

tion, since the fidelity of the final structure depends directly on the perfection, size and physical properties of the crystals. This converts the crystals in the key of the whole process and its production in the bottleneck. The problem of growing adequate crystals involves diverse aspects and in this article some of them will be commented, in addition to some novel and ingenious approaches to solve them.

One of the inconveniences for obtaining quality crystals is due to the natural convection that exists in every experiment performed under normal earth gravity. In addition, the problems involved in membrane protein crystallization, so important in the well-functioning of all living organisms and so difficult to crystallized, will be commented. Their amphipathic nature allows them to meditate the passage of metabolites, to sense the presence or absence of nutrients, to transfer signals into and out of the cell and to produce the energy essential for life. This characteristic is at the same time the reason that makes their crystallization so difficult to us, because of our misunderstanding of many of their physicochemical properties.

Transport Phenomena and Crystallization

Transport processes, and in particular mass transport, are very important for crystal growth from aqueous solutions [5-7]. As a matter of fact, mass and heat transport processes are critical for the final quality and characteristics of the crystals [8]. Many crystallogenesis techniques have been explicitly developed for controlling the relative contributions of convective and diffusive transport in crystal growth [9]. During the active incorporation of ions or molecules to the three-dimensional lattice, density differences are generated in the proximal area of the developing faces leading to a convective flux in the surroundings of the crystal [10-12]. Convective transport of molecules competes with pure diffusive transport and the interaction between them will determine the way and the kinetics of nutrients presentation to the growing crystal.

Transport phenomena not only do affect nutrients of the crystals but also the rate of adsorption and incorporation of impurities, which affects the size, morphology development and perfection of the crystal [13]. On the other hand, convective transport only occurs in the presence of earth gravity. Only then heavier fluids can go down and lighter fluids will go up, letting convective currents to emerge in the bulk of the solution. Other types of convection do exist, as the convection due to surface tension [14] but they are not significant for the crystallization process from solutions.

Crystallization in Microgravity Environments

Many years of experimentation with diverse crystals have confirmed the notion that minimizing the convective mass transport better quality crystals can be obtained, with improved mechanical and optical properties, reduced defects density and larger sizes.

How is it possible to suppress the natural convection in crystallogenesis? Nowadays, different approaches arise for deleting or at least reducing it. One of them is the crystallization of macromolecules in space, where in the absence of gravity the convection disappears. In the last decade, a new approach that involves the use of magnetic fields has materialized. Magnetic forces opposed to gravity can reduce natural convection inside solutions [15-16]. Also, the methods for crystallizing macromolecules in gels are good and well-accepted alternatives for eliminating natural convection [17].

It's natural to think that at zero gravity, or at a reduced one, crystals with superior properties can be grown [13]. How can that happen? Observations and experimental data support the hypothesis that convective fluxes introduce statistical disorder, defects and dislocations in the growing crystal surfaces [18-20]. Convective transport tends to be variable and random, producing variations of the supersaturation levels in the environment of the developing faces, exposing them permanently to high levels of nutrients, similar to those of the bulk. On the contrary, under microgravity the convection is suppressed and the concentration of nutrients in the interface of the crystal is reduced (figure 1). The mass transport is purely diffusive, which for proteins is very slow, and a region of depletion of nutrients is established around the nucleus. Thanks to the absence of gravity, this zone is quasi-stable. On the right part of figure 1a, nutrient molecules are shown diffusing very slowly because of their size, lengthening the effect. On the left, impurity molecules diffuse more slowly than monomers do. As a consequence, the depletion zone acts as a "diffusive filter" avoiding the incorporation of impurities to the growing crystal. Apparently, this is the principal mechanism for the improvement in crystal quality under microgravity. This hypothesis is not only supported by the experimental data but also with a mathematical model that explains the mass transport process involved [21]. Figure 1b shows that up to 40% reduction of nutrient molecules near the nucleus can be achieved in the absence of gravity, related to the bulk concentration.

The problem of suppression of the convection was the inspiration of many scientists who devoted their work to develop new techniques and devices. The first serious experiment of crystallizing macromolecules under microgravity was made by a German team under the direction of Professor Walter Littke in 1978. In that occasion, lysozyme and β -galactosidase were crystallized successfully by the liquid-liquid diffusion method within a series of reactors [22-25].

The progression made in this crystal growth area was hard and slowly owing to little documentation of the experiments performed in microgravity, during the 70s and 80s. Moreover, many results were unavailable to the research community because they belong to private companies or because of the little communication between oriental and occidental scientists [13]. It was until 1989 that the first formal scientific paper was published in *Science*, in which X-ray diffraction analysis from many crystals grown in microgravity were reported. They presented higher $I/\sigma(I)$ rates through the

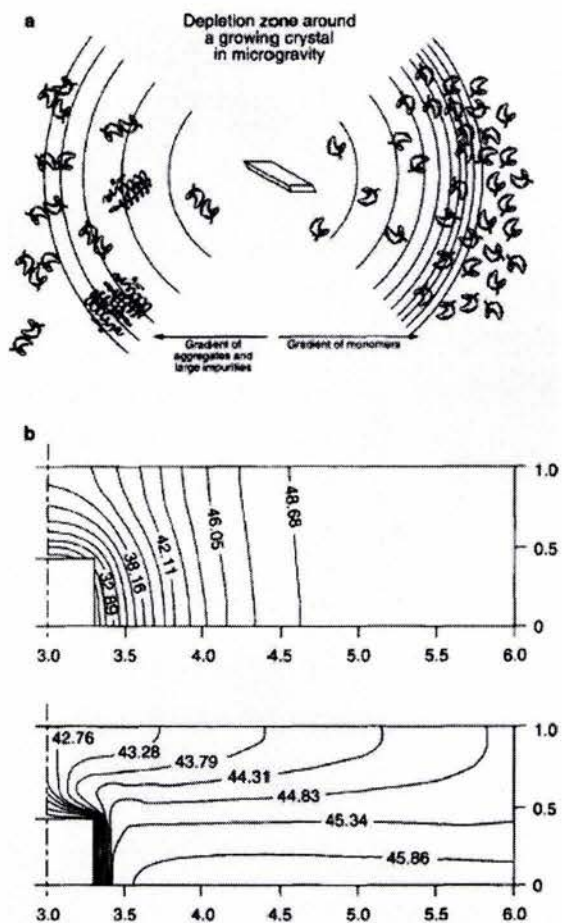


Fig. 1. a) Scheme explaining the hypothesis underlying the improvement of macromolecular crystal growth in space. b) Two mathematical models for concentration gradients formed around a growing crystal in microgravity by Rosenberger and colleagues [21] (Reprinted from [13] with permission from Elsevier).

whole range of resolution, and higher R values [26]. The article stated a tangible proof that crystals formed under microgravity environments generate more data of higher quality so as to obtain more precise structures.

How are the experiments in microgravity performed?

Nowadays many devices do exist based primarily on two techniques: vapor diffusion and liquid-liquid diffusion [27], even though the thermal-induced batch technique has also been successful in growing some large crystals that gave very high resolution [28]. The experiments are performed by governmental space agencies or private consortia, such as Payload Systems (USA), Intospace (European consortium, recently dissolved) and Bioserved (a centre for the commercial development sponsor by NASA). Each consortium has developed its own devices for its experiments [27]. Among the vapor dif-

fusion devices, VDA (vapor diffusion apparatus), designed and built by Dr. C. Bugg and collaborators from Alabama University at Birmingham, USA [29-30] is the most used device, with more than 25 missions. Nevertheless originally it was a very simple one; it was possible to crystallize many diverse proteins, like lysozyme, canavaline, bovine serum albumin, among others. Presently, newer and more complex versions exist, which offer major advantages and possibilities for experimentation.

As mentioned above, the experiments made in space do not course in the same manner as the ones performed on earth. For example, for vapor diffusion experiments made under both environments, the equilibrium kinetic is different, and this difference is more notorious for those liquid-liquid diffusion experiments. In spite of this, the superiority of the crystals grown in space respect those grown under earth gravity, is established by comparison, following 4 well set up criteria. First, a *Visual Exam* is fulfilled (this is a subjective analysis: observation of the crystal at the microscope). Then, the *sizes and the distribution* of those values in the experiment are analyzed. *Morphology* is another criterion to evaluate, as many protein crystals grow with different crystalline habits, depending if the process was on earth or in space [26]. Finally, the properties of the X-ray diffraction pattern generated by a crystal must be considered (the internal order of a crystal rely on the kinetics of growth).

Following the mentioned criteria, a number of advantages found for the microgravity crystals can be summed up [26, 31-32].

- Visual superiority.
- Larger crystals, many orders of magnitude higher than the biggest crystal grown on earth [13].
- Higher resolutions achieved in x-ray diffraction patterns.
- Better signals $I/\sigma(I)$ (Wilson Plot). In the whole range of R, higher values of $I/\sigma(I)$ for microgravity crystals were found. However, the physical properties responsible for this observation is yet unknown. Apparently, the reason is a lower defect density.
- Sharper x-ray diffraction intensity peaks, showing quantitatively the better internal order and perfection of space protein crystals.
- Not only proteins can be crystallize in the absence of gravity, but also other macromolecules, difficult to crystallize on earth, like viruses (Satellite Tobacco Mosaic Virus), DNA, pharmaceutical targets (reverse transcriptase of HIV) or membrane proteins (bacteriorhodopsin).
- Under microgravity, the sedimentation effect disappears. In space, the crystals keep their defined and stable positions over long periods of time. This is a favourable environment for multiple crystal growth, minimizing the superposition of diffusive fields and assuring a more or less uniform access of nutrients to all of the faces [33]. Besides, the incorporation of microcrystals or three-dimensional nucleus by sedimentation over the growing faces is avoided.

Thanks to the reasons previously expressed and the advantages numbered, the crystallization of macromolecules in microgravity is very convenient, particularly for those macromolecules hard to crystallize on earth, or in case of knowing the optimal crystallizing conditions it's possible to study some aspects of its growth process. On the other hand, among its disadvantages we have to mention the cost, it is an expensive method and requires much time since the missions are not daily and they last many days, specially when consecutive experiments are desired.

Crystallization using magnetic fields

It is possible to reduce natural convection on earth with the help of magnetic fields. Counting if they are homogenous or inhomogeneous, they act upon a sample in different ways. Inhomogeneous magnetic fields are responsible for reducing the effective gravity that a solution feels through the action of a magnetization force [16]. If a magnetic field gradient is applied vertically, a magnetization force will be generated. When this force opposes to gravitational force, a reduction of vertical acceleration (effective gravity) is obtained. Hence, a decrease in natural convection is accomplished.

With a mathematical model of a crystallization system under a magnetic field, the concentrations of macromolecules in the surroundings of a growing crystal were estimated (figure 2), verifying that a magnetic gradient of $-685 \text{ T}^2/\text{m}$ reduces 50% the convection, while a magnetic gradient of $-1370 \text{ T}^2/\text{m}$ practically eliminates it, producing a similar background to that of microgravity [34]. Experimentally, high-quality high-resolution crystals were obtained, in agreement with the mathematical model [35]. Moreover, Wakayama and colleagues found that in the presence of a magnetizing force opposite to g , fewer lysozyme crystals were obtained than in absence of magnetic force [16].

When a homogeneous magnetic field is applied, high quality crystals are also observed [36], even though the mechanism involved is different. An increase of viscosity near the growing crystal was observed when a magnetic field of 10 T was applied [37-38]. The increase in viscosity means a reduction of natural convection inside the solution. Furthermore, an orientation effect was observed upon the crystals formed under high magnetic fields [15-16].

More recently, in another study, the diminution of the diffusion coefficient of lysozyme inside a crystallization solution under a homogeneous magnetic field of 6 and 10 T was evaluated [39]. All these observations are interrelated and are the consequence of the orientation effect by the magnetic field at a microscopic level. In a supersaturated solution, proteinaceous nuclei are suspended in the solution bulk and sediment upon reaching the adequate size, which depends on the magnitude of magnetic field applied. These nuclei act as blocks avoiding the free diffusion of monomers, turning the solution more viscous and as a result with less convection [39].

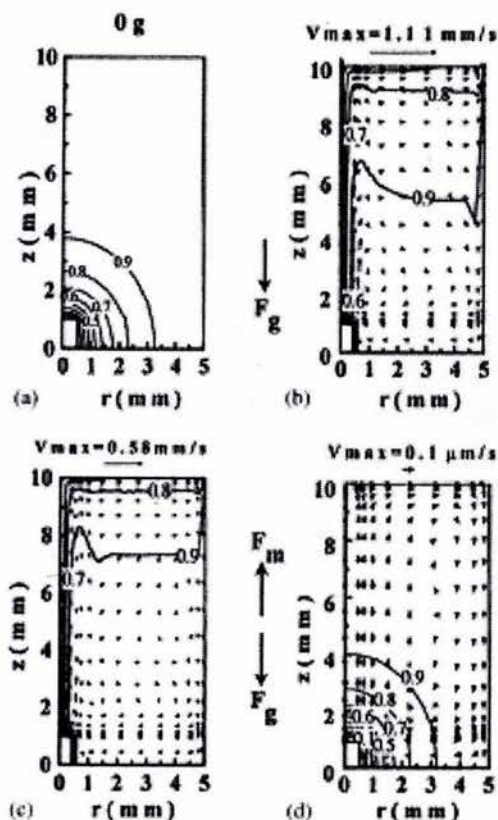


Fig. 2. Isoconcentration lines (O) for the crystal growing at the centre of the bottom under (a) microgravity, (b) normal gravity, (c) a magnetic field gradient, $\mu_0^2 H (dH/dz) = -685 \text{ T}^2/\text{m}$ and (d) $\mu_0^2 H (dH/dz) = -1370 \text{ T}^2/\text{m}$. Reprinted from [34], with permission from Elsevier.

The research area of crystal growth under magnetic fields is relatively new and needs more study. A lot of things still remain to be understood about the effects of magnetic fields (homogeneous and inhomogeneous) over macromolecular solutions. Evidently, an external strong magnetic field induces a magnetizing force, increases the viscosity of the protein solution, orients the growing crystals and affects the growing process in a complex manner. All these phenomena seem to favor the resulting crystal quality, although a more complete investigation is needed to understand the mechanism [38].

Crystallization with counter-diffusion methods

Another way to reduce the natural convection under earth gravity is to incorporate gelled media inside the solutions. In 1968, Zepezauer and coworkers described the use of microdialysis cells, made of capillary tubes sealed with gel stoppers (polyacrylamide), to reduce the convection from crystallization solutions so as to obtain better crystals [40]. Then, in 1972, Saleme also intended to crystallize proteins inside a glass capillary tube. He put into contact a protein solution with

a precipitant agent and let the system reach the equilibrium by counter-diffusion [22]. Some years later, ribosomal subunits were crystallized successfully with the same set-up [41].

After many years of investigation, Dr. García Ruíz J.M. proposed the use of gelled media for crystallizing macromolecules by counter-diffusion. This technique puts together the principle that reduces the convection and the advantage of having a wide range of conditions in a single experiment [42]. All these progress allowed Dr. J.M. García-Ruiz and colleagues in 1983 the development of a new technique called gel acupuncture [43-44]. This novel technique consists in the permeation of the precipitating agent solution through the gel and the penetration by capillary force into the capillary tube, filled with a protein solution, allowing the crystallization [44]. This technique is well known today, and different types of gels, capillary tubes, additives and precipitating agents have been evaluated for their use [44-45]. A difference with other methods is that inside the capillary tube there is not an only one supersaturation level, thus precipitation zones will be found in regions of very high supersaturation, nucleation will happen at high supersaturation levels and the growth of those nuclei will be found in regions of lower supersaturation levels. This raises the probabilities of finding the right conditions for crystallization [46]. Other advantages are the possibility of crystallizing proteins inside capillary tubes ready for direct x-ray diffraction data collection, keeping from the usual physical manipulation of the crystals, reducing the risks of breaks at the moment of mounting them or transporting to the synchrotron [47], or the use of cryoprotectors and/or heavy metals inside the crystallization solutions [48].

Through the gel acupuncture method it was possible to crystallize diverse proteins of different molecular weight and wide range of isoelectric point, viruses and protein-DNA complexes [49]. In addition, thanks to the advances in structural genomics, a new device was developed for executing multiple and independent experiments, which is proper for effective screening of crystallization conditions of biological macromolecules [47]. It combines the benefits of multiple conditions in one capillary, increasing the chances of finding the optimal ones, with the possibility of direct x-ray diffraction analysis from the device. All this converts the device into the first totally canalized system since the initial steps to data collection for structural analysis [47].

One modification of this technique is the protein crystallization by the gel acupuncture under the presence of an internal electric field [50]. The study of the effect of electric fields over crystallization solutions has not been explored till a few years ago. Recent studies performed by Dr. Aubry and co-workers, with electric fields external to the crystallization solution, showed that it is possible to reduce lysozyme nucleation and increase the crystal growth rate [51]. Then, the same group evaluated the crystal growth kinetics and found an increase in the protein concentration near the drops that were close to the cathode [52]. Nanev and Penkova [53] came up with similar results when crystallizing lysozyme by the batch method, in the presence of an external electric field. They

reported that lysozyme crystals grew with a definite orientation towards the cathode.

Biological macromolecule crystallization in the presence of an internal electric field uses a similar set-up to that used by the gel acupuncture method, except that an inert electrode (Pt) is introduced inside the capillary tube, in contact with the protein solution, and another electrode is set collinear to it, in the gel. Protein molecules are charged since the pH solution is far from the protein's isoelectric point. When a small direct and constant current is imposed to the system, a potential difference is established between the electrodes, provoking an orientation effect over the macro-ions (protein molecules). Lysozyme and thaumatin crystals were found to be firmly attached to the anode, during the crystallization process.

With the purpose of understanding what is going on when the potential difference is established, is important to comprehend how the solution structures and the effects of the electric field over it. The proposed hypothesis for the nucleation inside the capillary tube, in contact with an anode, considers the presence of an electric double layer in the surroundings of the electrode. When an electrode is put into contact with an electrolyte solution, the ions feel asymmetric forces and order themselves forming an electric double layer. The first layer is composed of water molecules with their dipoles oriented, and the second layer is composed of counter-ions [54]. Positively charged protein molecules need a negative ion for favorable protein-protein interactions (for example Cl^- for lysozyme [55], tartrate for thaumatin). The potential difference established in the cell allows the migration of anions of the precipitating agent into the capillary tube, encouraging the interactions with protein molecules in solution, at the first instance. Then the counter-ions of the electric double layer will act as support for positively charged protein molecules or nuclei, letting the crystal growth over the anode. This behavior was not found when a cathode is placed inside the capillary tube [50].

This technique is very new and was only evaluated with model proteins, like lysozyme and thaumatin). However, it seems very promising as crystals with similar quality than the ones grown with gel acupuncture method were obtained, but with shorter induction of nucleation times, without affecting the three-dimensional growth rates [50, 56]. This is very interesting from a biotechnology point of view, since the necessity for shortening the crystalline production times is desired.

The reduction of the induction time in the crystallization had also been observed by Moreno and Sasaki [57]. Lately, these scientists have studied the effect of the electric field with a different set-up, using the batch method and with parallel electrodes. Although these variations, they noticed an induction time three times shorter in the presence of an internal electric field, corroborating the results found with the gel acupuncture method plus the internal electric field. Besides, in the same work the benefit of the nucleation control is remarked, since they obtained fewer lysozyme crystals with a homogeneous size distribution.

The simultaneous effect of magnetic and electric fields is a new research field. Depending on the configuration of the

system, great advantages can be acquired, such as the homogeneity in crystal size, thanks to an apparent suppression of secondary nucleation events that permits the continuous growth of previously formed nuclei [58]. Also, an orientation effect is commented when the magnetic field is parallel to the electrodes, the same effect as described in previous works [39, 59].

Membrane Protein Crystallization

It's amazing how few membrane proteins have been crystallized and their structures have been reported, when minimally one third of the genome codes for proteins with at least one transmembrane domain. Up to the year 2004 least than 70 membrane integral proteins have been published [60].

Why do membrane proteins, in opposition to soluble proteins, represent such a challenge to crystallize? The answer can be found if we analyze the steps involved in crystal production. The difficult for obtaining high quality crystals of membrane proteins is related to our limited knowledge to manipulate proteins that have hydrophobic/amphipathic surfaces, usually covered with lipids from the membrane of origin. Moreover, proteins aggregate without a defined order during the aqueous transition from membranes to crystals, stopping us from knowing their structures and activities [61-62].

The first membrane protein structure elucidated by x-ray diffraction to atomic resolution was a photosynthetic reaction center in 1985, by Drs. Michel, Dieneshofer and Huber [63].

Even though there has been a great advance since the 80s thanks to the "in surfo" method, this has been slow and continuous, with a rate of one structure per year. The "in surfo" method is based on the use of mixed micelles made of detergent, designed to solubilized membrane proteins from native membranes. Then, this aqueous dispersion is treated like a solution of soluble proteins, whose crystallization can be achieved by vapor diffusion or microdialysis techniques. This method proved to be very useful in many cases, and several revisions about it were written [64-65], so it will no be commented in this work.

There are some situations where the "In Surfo" method is not able to crystallize some proteins and other alternatives have arisen. Six or eight years ago, two completely new methods have been developed; one based on bilayer micelles [66] and the other on lipidic mesophases [67]. Recently a new approach has emerged based on the use of lipids and detergents, called "bicelle method". Even though only bacteriorhodopsin has been crystallized, giving crystals adequate for x-ray diffraction, the method is in its initial stage [68]. All these three methods mentioned are based on the formation of extended lipid bilayers, composed of lipids, detergents and proteins.

Cubic phase method

This method is also known as "in cube" or under the more general term "in meso", since it involves the formation of a

liquid crystal or mesophase, as a support for the crystallization process. Very little is known about how and why the method works [69-70], as well as how is the phase or the microscopic structure that supply nutrients to the growing faces of the crystals.

The proposed hypothesis explains how the protein is reconstituted inside a cubic phase from the original membrane and then how the protein molecules aggregate slowly in the presence of precipitating agents and additives. Initially the protein is embedded in an aqueous micellar solution, formed by residues of the starting membrane and the solubilizing detergent (usually an alkyl glucoside). The dispersion is mixed with another lipid, in solid state, giving rise to the different phases. For example, for monoolein, a frequently used lipid, a stable cubic phase is formed by adding 40% w/v at 20° C [71].

With the first contact, water molecules will migrate from the protein solution towards the new added lipid, which can be hydrated to some extend, establishing a gradient of activity for water molecules. Throughout this gradient different phases will appear: at low hydration level a lamellar phase (liquid crystal) will be formed and with higher hydration levels the diverse cubic phases will appear (figure 3). Thanks to water

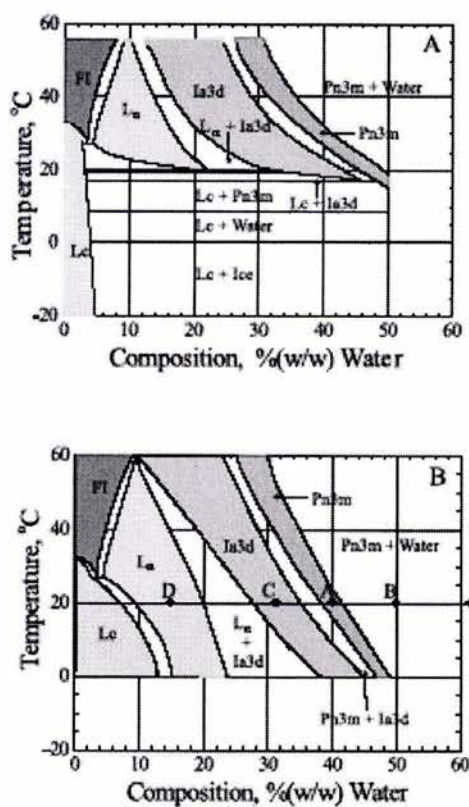


Fig. 3. Temperature-composition phase diagram for the monoolein/water system. (A) Equilibrium-phase diagram [118]. (B) Metastable-phase diagram [119]. In B, points along the 20 °C isotherm identified by capital letters are referred to in the text. Reprinted from [73], with permission from Elsevier".

displacement, protein and detergent molecules will concentrate, favoring the formation of another lamellar phase [72]: a continuous lipid bilayer will be formed where protein molecules will be reconstituted, under equilibrium conditions. Membrane protein and the detergent will be homogeneously distributed all over the phase and the membrane protein will recover some physicochemical properties of lipidic bilayer molecules, such as lateral pressure and hydrophobic matching, similar to those of native membranes. During the crystallization steps, precipitating agents are added in proper amounts to induce the formation of nuclei, which will get together in a lipidic yard, where they will associate and eventually they will be organized into a three dimensional lattice. The process is favored by the high ionic strength, masking the protein charges so as to facilitate the contact between protein molecules, their nucleation and crystal growth [73].

During mesophases formation, lipidic molecules self assemble spontaneously in the aqueous media because of their amphipathic nature. Depending on the hydration level of the lipid molecule, different cubic phases will be formed; being the less hydrated the liquid crystalline lamellar phase (L_α), where plane lipidic bilayers can be seen (figure 3).

The conventional protocol designed by Drs. Landau and Rosenbusch [67] suggests the mix of two parts of protein dispersion with three parts of lipids (usually monoolein). The cubic phase is formed almost immediately. Then, salts or precipitating agents are added and after the incubation of the mix at 20°C, crystals will appear in hours or weeks. The lipids evaluated for this technique are monoolein (C18:c9), monopalmitolein (C16:c9) [67] and monovaccenin (C18:c7) [75].

This technique has been proved for soluble and membrane proteins [67, 76] and it has been slightly modified for its application in high throughput crystallization. Among the proteins successfully crystallized we can find bacteriorhodopsin, which diffracted at 1.55 Å [77], and halorhodopsin [78].

For using this technique, some considerations must be put in mind. The choice of the detergent is very important since it will be present in the mix through all the crystallization process. Non ionic detergents are preferred, like alkyl glucosides [79]. Salts are responsible for the generation of the driving force of the nucleation and *in meso* crystal growth [80] thru the dehydration of proteins and the induction of protein-protein interactions. As a matter of fact, commercial screening solutions are very useful for triggering nucleation and crystal growth in the lipid mesophases method [81]. However, the amount used must be evaluated previously, since it can partially dissolve or alter the cubic phases [70, 74, 82-83]. Additives can also be incorporated to the crystallization mix, but their effect must be analyzed.

With respect to the other two crystallization methods that involves the use of lipid bilayers, they are in the initial stages and very little is known about their mechanism of action. The bicelle method is very new and has only been tested with bacteriorhodopsin [68]. Unlike the "*in cubo*" method, this new approach proposes the reconstitution of proteins inside plane micelles called "bicelle". The solution is easy to prepare and

consist in mixing Chapso detergent with dimiristoil phosphatidylcholine (DMPC) in water. The crystallization is held by vapor diffusion with sitting or hanging drops, in such a way as the conventional technique, but starting from a micellar solution instead of a protein one. The experiment can be kept at room temperature or at 37 °C, according to the necessities.

The second method called "vesicle fusion", has been successful only with bacteriorhodopsin (bR) and is still in its initial trials [66]. It's very simple and implicates the transference of purple membrane, where bR is found, to spherical vesicles upon the addition of a non ionic detergent (like alkyl glucoside), in presence of certain salt concentration and high temperature (32 °C). Next, these vesicles are subject to crystallization by vapor diffusion method at a lower temperature (10 °C) and with some precipitating agents. One of the major advantages of this novel method is that neither the protein needs to be completely solubilized nor the lipids from the original membrane are completely extracted. Many membrane proteins suffer denaturation upon extracting 100% of their lipids. Moreover, better crystals of bR are obtained when original lipids remains attached to it [85]. The underlying mechanism is similar to that proposed for the lipidic cubic phase's method. In both methods transient branched tubular structures are observed that allow the stacking of membranes and the establishing of protein interactions. The difference between them resides in the orientation of the 2D membranal planes. While in the lipidic cubic phase methods they pile with the same orientation [86], in the vesicle fusion method the planes are stacked in opposite directions.

High Throughput Crystallization

In the last years, genomic advances have encouraged high throughput structural biology studies in such a way that it received the name of Structural Genomics and many huge public grants were given to academic laboratories and private enterprises, like pharmaceutical industries, around the world. The projects are diverse and cover from the study of the relation structure-function of proteins, passing through the mechanisms involved in protein folding [87], to a more pragmatic approach, the rational drug design based on the structure of target molecules [88]. X-ray diffraction crystallography is critical in these studies, being the battle-horse in such initiatives. In this way, the crystallogenesis of biological macromolecules arise as vital step in the whole process, although it's the more complicate and less understood step in structural biology. In this section some aspects involved in high throughput crystal growth of biological macromolecules will be reviewed.

The growing of crystals of biological macromolecules in large quantities takes in several steps: protein production in large amounts (by heterologous expression or from its natural source), purification, crystallization trials and their corresponding inspections. Since many proteins are evaluated at the same time it's mandatory to have automated systems that accelerate the work but at the same time they should be trustable since the efficiency of each step affects the following one.

Heterologous protein production is almost completely automated for massive aims. It includes cloning, transformation and gene expression. These stages involved DNA molecules and thanks to their high stability they could be automated easily [89-90]. Nevertheless, there isn't yet a totally automated system for protein purification in large scale with applications in structural biology. Among proteins, they differ in their expression levels, solubilities and physicochemical properties, so that most scientists prefer to adopt a combination of manual techniques for obtaining pure proteins. Despite this, many biotechnological companies have developed more integral solutions for large scale purification. For example, Syrrx (San Diego, Ca., USA) uses a purification system developed in the Genomics Institute of Novartis Research Foundation, which combines the centrifugation and robotized sonication with a system of column chromatography arranged in parallel, able to purify 96-162 proteins per day [90]. Affinium Pharmaceuticals (Toronto, Canada) has also developed an integral purification system. Proteomax® covers all the steps, since the cellular extract processing till the pure, concentrated sample, ready for analysis. This equipment can clarify the lysate, perform column chromatographies, desalt and concentrate samples, giving in the best cases a pure protein, ready for structural studies. So many automated steps results in a very useful purification equipment for large scale studies [88].

Structural biology laboratories have the capability to handle more than 1000 different proteins in a month. In consequence they required the maximum possible automation of every stage, included crystallogenesis. This is not such a big problem, particularly if considering the crystallization by vapor diffusion or microbatch techniques. As a matter of fact, diverse robots that can perform those functions mentioned do exist in the market. Decode Biostructures produces ROBO-HTC, composed of a robot that prepare all different conditions (Matrix Maker) and another robot that dispense the drops. Douglas Instruments is responsible of ORIX 6, which performs vapor diffusion with sitting drops or microbatch essays. This robot can bring about 240 cells per hour. Another very used robot is Mosquito, from Molecular Dimensions. Mosquito is built by TTP LabTech, of TTP Group p.l.c. one of the most successful technology companies of the world. This robot contains a set of precision micropipettes mounted on a continuous band, which emits small volumes, from 50 nl to 1.2 µl. Moreover, the micropipettes are disposable, avoiding cross contamination problems and long time exhaustive washing. The robot dispenses drops for microbatch or vapor diffusion, hanging or sitting drops crystallization experiments. It can be used with 96, 384 o 1536 well. Also, it comes with a software system easy to use and that can be programmed.

Once the essays are set for incubation, a regular inspection is required so as to find the adequate conditions for obtaining high quality crystals. This is the most arduous part of the high throughput crystallization. For a certain protein 1000 experiments are needed, in average, for obtaining an appropriate crystal for x-ray diffraction analysis [88]. Many companies use human inspection, a very tedious and laborious

step, so the idea of designing an automated inspection system is very tempting. An ideal inspection system should have the following characteristics:

1. Identification and elimination of clear drops, with 0% of error (without risk of losing any crystal).
2. capture of kinetic data (of the growing process or precipitation vs. time)
3. Ability to distinguish crystals from precipitates and to find crystals inside precipitates most of the cases.
4. Determination of size and form of the crystal
5. Ability to improve points 3 and 4 based on an "internal learning" (data bases).

Some promissory advances in the image technology area are made by Decode BioStructures, which offers "Crystal Monitor Workstation". This equipment has a stereoscopic microscope, digital camera, voice control, a database interface and can be coupled to ROBOHTC (from the same company). There also exists "Crystal Score" by Diversified Scientific, which provides a microscope over a motorized plate. It comes with a device that count and size the crystals. RoboDesign has in the market two options, RoboMicroscope II, that can localize the drops, focus them, capture a color image and store them automatically, while CPXO can classify the drops into clear, precipitated, with crystals or other options.

Some of the advantages of automated image capture are the high frequency with which images are registered, at precise times and the possibility of being evaluated with diverse computer softwares, applying artificial intelligence. Although the equipment doesn't have human experience it can be trained for developing its own database. Anyway, there is no system that totally ignores human inspection. Crystals are very difficult to obtain and meantime an automated system with 0% of false negatives doesn't exist, the human eye will be indispensable [88].

Up to here it was mentioned in a general way the advances and problems of high throughput structural biology. However, most of the works are on soluble proteins. Membrane proteins entail other kinds of problems, previously mentioned (in the membrane crystallization section).

Which are the specific challenges of membrane proteins structural biology? Diverse stages can be mentioned, like protein production, purification and crystallogenesis. Unlike soluble proteins, where more than 90% of the new protein structures come from recombinant samples, membrane proteins obtained from molecular biology techniques are less than 50% (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html). This is in part because the strategies developed for overexpressing proteins are designed for soluble ones and they don't favor integral membrane proteins [89]. The synthesis of membrane proteins makes use of the cell's secretory system, certain directionality and the insertion of them inside the membranes [90-91]. Besides, many cells are not equipped for standing such a flux of new membrane proteins, saturating their secretory pathways and generating inclusion bodies in

the cytosol or toxic intermediates for them. So, the election of the expression system is an important issue in the production of membrane proteins.

Prokaryotic integral proteins can be expressed in prokaryotic systems with hopeful results. To date, some examples demonstrate that, like the structures of ionic channels [92] and certain proteins from the outer membrane [93] among others. On the contrary, eukaryotic membrane proteins over-expressed in prokaryotic organisms have been harder to achieve [94] since prokaryotic membranes have a different lipidic composition and can be a hostile background for heterologous proteins. Besides, post-translational modifications are necessary for the correct folding of eukaryotic proteins or their insertion into membranes, but they are absent in prokaryotic cells [95]. Despite this, some isolated successful examples do exist, such as the case of an enzyme bound to mammal membranes over-expressed in *E. coli*, when was crystallized [96] and its structure solved [97], or the over-expression of a eukaryotic receptor coupled to G-protein in *Halobacterium salinarum* [98]. On the other hand yeasts are good over-expression systems for eukaryotic proteins since they are easy to handle and powerful genetics tools [99-100]. Mammal cells are the best choice for preserving structural and functional integrity of mammal membrane proteins. However they are expensive and very complex to use, as a result they are the last choice.

With regard to purification, detergents are usually used for solubilizing membrane proteins. So, the election of the detergent is essential, especially when designing studies in large scale. Ideally a detergent should solubilize the membrane protein without forming aggregates [101]. An appropriate detergent is one that can selectively stabilize the native structure of proteins [102]. Each protein behaves in a particular way and this individuality is responsible for the need of a specific purification protocol for each one. This concept is in opposition to "a unique measure for all", motto of en masse experiments. Diverse strategies have been thought up for resolving this, like to fuse a protein, which has certain affinity for a ligand, to the extreme of a membrane protein, which is desired to over-express, so as to facilitate its purification [103-104].

Once pure, integral proteins are ready for crystallizing. Two alternative paths can be applied:

1. To crystallize the complex protein-detergent directly.
2. To incorporate once again the protein into a lipidic bilayer environment, previously to its crystallization.

Most of the structures solved by x-ray diffraction analysis come from crystals formed by the first path, by vapor diffusion or microbatch techniques. The method is similar to that used for soluble proteins just that in this occasion the solute is the complex detergent-protein [101]. The use of robots simplifies the handle of these mixtures. The other path consists on restoring the membrane proteins to a lipidic bilayer environment, before setting the crystallization experiments. This

approach has its major model in the lipidic cubic phases method, as previously explained, so that it won't be commented again [67]. Automated equipment that can use this criterion for high throughput membrane protein crystallization is under construction [84].

Finally, we can comprehend how the advances in the processes involved and the automation achieved in the last years have influenced the development of structural biology throughout the world. Many laboratories can successfully clone, express, purify and crystallize soluble proteins in an unthinkable proportion years ago. Nevertheless, there is yet much to control and predict in many different stages of the general process. Relating to integral membrane proteins, the required management of the whole process has not been achieved, even less than the one required for soluble proteins. In the near future, the problem of the amount of protein available for crystallization must be overcome by increasing the protein production levels and improving the systems of purification, specially the detergent election. All this will help to obtain more successful crystallization trials. Besides, studies of the mechanisms that rule the process will aid to its scaling up and automation. Moreover, so many crystallization experiments will enrich databases and in consequence it will be possible to extract the tendencies and crystallization patrons, been beneficial for structural genomics, particularly with the aim of crystallizing new proteins.

New tendencies in protein crystallization, microfluidic devices

In the year 2001, a rough copy of the human genome was announced [105] and approximately 30000 different proteins were estimated to exist, coded on it [106]. Many of those proteins have unknown functions and structures; furthermore, of those proteins that have reported structures, the details of their mechanism of action or function continuous to be a mystery. In many cases, to know the function of a macromolecule requires the interpretation of precise structural data, which is obtained in a reliable way from x-ray diffraction analysis [107]. Thus, thanks to the post- genomic era the need for a better understanding of the mechanisms involved and the optimization of the crystallization methods has increased significantly.

With the aim of exerting a more effective control of the process and obtaining more successful essays, diverse techniques and novel instruments have been developed that extend from mixer robots that can dispense thousands of drops in very short times to new devices for microgravity experiments or for the use under magnetic fields.

Automated production of crystals of macromolecules is a priority for proteomics, even though it's not the only problem. The availability of proteins is a crucial issue [108], so it's necessary to have systems that use very little amounts of proteins in the crystallization essay. The restriction of substrate doesn't solely involve the volume used on the trials but also to the

emission systems. The high throughput macromolecular crystallization methods depend on a very good formulation and the ability to emit solutions with a defined composition. This is easy when working with liters or milliliters, but when going down the scale 5 or 6 orders it turns to be more complicated [109].

On the other hand, the experiments in microgravity, that gave impressive results thanks to the lack of convection, have evolved and now it's possible to send experiments to space with a high density of simultaneous essays. However, for optimizing the crystallization conditions two criteria can be used. One of them consists in evaluating a wide range of conditions (although narrower than the initial screening experiments) consuming a huge quantity of raw material (macromolecules). The other criterion proposes the adjustment of the conditions found in future spatial missions. Nevertheless, the possibility of consecutive voyages can be delayed months or years, marring the acquired benefits of the method [109].

As a result, microfluidics devices arise as a potential solution, thanks to their system of encapsulated solutions and the capacity for high density experiments in a reduced space.

The development of these devices, also known as "microfluidics chips", can be achieved thanks to the experimental results of many scientists who showed the compatibility of these chips with proteins. Among the observed characteristics, the injection of very exact volumes of protein solution and a considerable reproducibility of the results can be mentioned [110]. Moreover, enzymatic reactions can be optimized thanks to the reduced space where they course [111] and to the fewer amounts of reactants used [110]. Its functioning won't be discussed in detailed here, except some of its novel traits.

First, volume must be considered. Microfluidic chips, as their name points out, are little instruments that can emit and handle very little volumes, of the picoliter order [112] thank to a system of cross-linked channels that regulate the driving forces of the fluids. Those volumes are smaller than the ones used in crystallization test in conventional laboratories (μl) or those used for automated high throughput crystallization equipments (nl) [108, 113-114].

Besides, the physical characteristics of the device can be useful for protein crystallization. On one hand, they have a small Reynolds's number, or absence of turbulence, that permits the emission of only laminar fluxes and the ultra-fast diffusive mixing, more efficient than the manual mixing [112,115]. On the other hand, microfluidics systems have a small Grashof's number, or absence of convection (due to a density gradient). This property has shown the possibility of protein crystallization with very effective kinetics [116]. In that work, 144 parallel reactions were set. Solutions were introduced in 48 wells manually or with the help of a robot. The protein solution and the precipitating agent were placed in individual chambers, separated by a barrier which is eliminated upon the crystallization essay. The total volume of both chambers was 25 nl. With this kind of device it was possible to crystallize 11 different macromolecules and at least one structure was solved by x-ray diffraction. The advantages of

this chip, mentioned by Hansen and co-workers [117] were the great precision in the measure of the solutions, the lost of viscosity effects that affects the diffusion of molecules, the ease for collecting the crystals grown, the possibility to apply the liquid-liquid diffusion method in gravity (before this it was a method used in microgravity), thanks to the absence of convection. In addition, the authors [116] observed shorter equilibration times and faster crystal growth.

Nevertheless, microfluidics chips have yet some disadvantages that must be overcome for their successful implementation in high throughput crystallization laboratories. Among those drawbacks, the permeability of the elastic connections owing to incapacity of sealing or isolating certain areas of the device when it's not under function can be mentioned. Also, it's difficult to implement for optimizing the crystallization conditions, since the equipment starts from stocks solutions. For the future, it would be advisable to include another chip that prepares the solutions and be connected in series to the other chip [109].

The design of this kind of devices has been possible thanks to the advances in engineering, although, from the point of view of costs, they are very expensive compared to the current systems. The chip's manufacture, like the integrated circuits, required a very tight control of the cleanness of the process, as micrometric lines are done on it. The associated equipment, for its control, generally is very sophisticated and expensive. All this things for only one experiment, since the chips as are known nowadays are disposable. On the contrary, in manual systems the highest cost is the scientist's labor. Robots have come to do this work. Despite the high costs, they can set up the experiments faster than humans do and give freedom to the scientist to do other activities. In consequence, the costs of microfluidics systems always will be higher than current technologies. For their general acceptance and implementation, their advantages should be reinforced, such as the experiments density, probability of success and flexibility [109].

Conclusions

- Natural convection is one of the principal problems that affect crystal quality. It allows a major adsorption of impurities and a higher defect density, generating poor diffracting crystals (high resolution). Microgravity experiments give high quality crystals due to the diffusive transport domination that allows a good arrangement of the monomers in the crystal lattice, diminishing the mosaicism and increasing the final quality (lower resolution, better $I/\sigma(I)$ data).
- Microgravity experiments use diverse equipment specially designed by the companies or organizations involved. The most used techniques are vapor diffusion and liquid-liquid diffusion.
- Crystallization experiments under high magnetic fields can also reduce natural convection on earth. Those crystals grown in this way also showed a high quality, reaching

lower resolutions in the diffraction pattern, when exposed to x-rays. A high, uniform magnetic field induces an internal organization of the crystallization solution, increasing the viscosity and decreasing the diffusion coefficients of the molecules present. On the other hand, the magnetic field gradients induce a magnetizing force opposite to the gravitational force, reducing the effective gravity around the growing nuclei and consequently annulling the natural convection. So, with both possible situations better quality crystals can be obtained.

- Gel acupuncture crystal growth experiments offer the advantage of reducing crystals manipulation, since they grow inside x-ray capillary tubes. They can even be grown in the presence of cryoprotecting agents or heavy metals, which will be helpful for the x-ray data collection or interpretation of the data, respectively. However, the material of the capillary tube and the presence of mother liquor inside it affect negatively in the resolution.
- Protein crystallization in the presence of an internal electric field doesn't affect significantly the crystal quality and offers the possibility of shortening the nucleation time giving rise to crystals of adequate sizes.
- Up to date, very few membrane proteins have reported structures and its reason is the little knowledge to manipulate them, due to their amphipathic nature. In the last decade, three new methods have been created, based on extended lipidic bilayers. Of them, the lipidic cubic phase method is the most developed, and many proteins were crystallized with it. All three methods present lamellar structures and crystallize membrane proteins in the presence of the original lipids.
- Advances in genome's sequencing of diverse organisms, encourage the structural study of proteins with practical aims such as the discovery of metabolic paths, studies of the relation structure-function of pharmaceutical targets or protein engineering. For successful large scale protein crystallization, many inconvenient in protein production and crystallization are yet to be overcome especially for membrane proteins.
- Many devices for high throughput crystallization do exist in the market, especially for screening the crystallization conditions. Of them, those that are based on sitting drops and microbatch methods are the most known. Recently a cassette for protein crystallization by the gel acupuncture method in large scale was proposed.
- Microfluidic systems, even though they are in their initial phase, offer a crystallizing system for a huge number of essays in a reduced physical media, using very little amount of substrates, and with a very good control of the emission systems. In addition, they work without convection, promising high quality crystals. Despite some actual disadvantages due to their high sophistication, in the future they will bring great benefits to pharmaceutical or structural genomics industries.

References

1. McPherson A. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 1-2.
2. Roses, A.D. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, *1*, 541-549.
3. Kuhn, P.; Wilson K.; Patch, M.G.; Stevens, R.C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 704-710.
4. DeLucas, J.L.; Bray, T.L.; Nagy, L.; McCombs, K.; Chernov, N.; Hamrick, D.; Cosenza, L.; Belgovskiy A.; Stoops, B.; Chait A. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 188-206.
5. Chernov, A.A. *Modern crystallography III, Crystal growth*, Springer-Verlag, **1984**.
6. Sarig, S., in: *Handbook of crystal growth*. Vol 2b, Hurlle, D.T.J., Ed., North-Holland, Amsterdam, **1994**.
7. Benneman, P. *J. Cryst. Growth*, **1974**, *24*, 76.
8. Hurlle, D.T.J. *Handbook of crystal growth*. Vol 1B, North-Holland, Amsterdam, **1994a**.
9. Hurlle, D.T.J. *Handbook of crystal growth*. Vol 2A, North-Holland, Amsterdam, **1994b**.
10. Frankenheim, L. *Ann. Physik*, **1860**, *111*, 1-60.
11. Rosenberger F. *J. Cryst. Growth*, **1986**, *76*, 618-636.
12. Cheng P.S.; Shlichta, P.J.; Wilcox, W.R.; Lefever, R.A. *J. Cryst. Growth*, **1979**, *47*, 43-60.
13. McPherson, A. *Crystallography Rev.*, **1996**, *6(2)*, 157-308.
14. Rosenberger, F. *Fundamentals of crystal growth I, Macroscopic equilibrium concepts*. Springer, Berlin, **1979**.
15. Ataka, M.; Katoh, E.; Wakayama, N.I. *J. Cryst. Growth*, **1997**, *173*, 592-596.
16. Wakayama, N.I.; Ataka, M.; Abe H. *J. Cryst. Growth*, **1997**, *178*, 653-656.
17. Garcia-Ruiz, J.M.; Novella, M.L.; Moreno, R.; Gavira, J.A. *J. Cryst. Growth*, **2001**, *232*, 165-172.
18. Pusey, M.; Witherow, W.K.; Naumann, R. *J. Cryst. Growth*, **1988**, *90*, 105-111.
19. Broom, M.B.H.; Witherow, W.K.; Snyder, R.S.; Carter D.C. *J. Cryst. Growth*, **1988**, *90*, 130-135.
20. Baird J.K.; Meehan, E.J.; Xidis, A.L.; Howard, S.B. *J. Cryst. Growth*, **1986**, *76*, 694-700.
21. Lin, H.; Rosenberger, F.; Alexander, J.L.D.; Nadarajah, A. *J. Cryst. Growth*, **1995**, *151*, 153-162.
22. Salemme, F.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *151*, 533-539.
23. Littke, W. *17th Aerospace Science Meeting*, New Orleans, LA., **1979**, January 15-17.
24. McPherson, A. *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 23, David Glick, Ed., Academic Press, N.Y., **1976**, 249-345.
25. McPherson, A. *The preparation and analysis of protein crystals*, John Wiley and sons, Ed., New York, **1982**.
26. De Lucas, J.L.; Smith, C.D.; Smith, H.W.; Senagdi, V.K.; Senadhi, S.E.; Ealick, S.E.; Bugg, C.E.; Carter, D. C.; Snyder, R.S.; Weber, P.C.; Salemme, F.R. Ohlendorf, D.H.; Einspahr, H.M.; Clancy, L.; Navia, M.A.; McKeever, B.; Nagabhushan, T.L.; Nelson, G.; Babu, Y.S.; McPherson, A.; Koszelak, S.; Stammers, D.; Powell, K. and Darby, G. *Science*, **1989**, *246*, 651-654.
27. Snyder, R.S.; Fuhrmann, K.; Walter H.U. *J. Cryst. Growth*, **1991**, *110*, 333-338.
28. Long, M.M. et al. In: *Proceedings of the International Symposium of Microgravity Science and Applications*, Beijing, China, May 10-13, 1993. *Microgravity Sci. Technol.*, **1994**, *7*, 196-202.
29. De Lucas, J.L.; Suddath, F.L.; Snyder, R.; Naumann, R.; Broom, M.B.; Pusey, M.; Yost, V.; Herren, B.; Carter, D.; Nelson, B.; Meehan, E.J.; McPherson, A. and Bugg, C.E. *J. Cryst. Growth*, **1986**, *76*, 681-693.
30. De Lucas, J.L.; Long, M.M.; Moore, K.M.; Rosenblum, W.M.; Bray, T.L.; Smith, C.; Carson, M.; Narayana, S.V.L.; Carter,

- D.; Clark, Jr.; A.D.; Nanni, R.G.; Ding, J.; Jacobo-Molina, A.; Kamer, G.; Hughes, S.H.; Arnold, E.; Einspahr, H.M.; Clancy, L.L.; Rao, G.S.J.; Cook, P.F.; Harris, B.G.; Munson, S.H.; Finzel, B.C.; McPherson, A.; Weber, P.C.; Lewandowski, F.; Nagabhushan, T.L.; Trotta, P.P.; Reichert, P.; Navia, M.A.; Wilson, K.P.; Thomson, J.A.; Richards, R.R.; Bowersox, K.D.; Meade, C.J.; Baker, E.S.; Bishop, S.P.; Dunbar, B.J.; Trinh, E.; Prahl, J.; Sacco, Jr. A.; Bugg, C.E. *J. Cryst. Growth*, **1994**, *135*, 183-195.
31. Helliwell J.R.; Snell, E.; Weisgraber, S. in: *Proc. 9th European Symposium on Gravity Dependent Phenomena in Physical Sciences*. Berlin, Germany, May, **1995**.
32. Snell, E.H.; Weisgerber, S.; Helliwell, J.R. *Acta Cryst. D*, **1995**, *51*, 1099-1102.
33. Boistelle, R.; Astier, J.P. *J. Cryst. Growth*, **1988**, *90*, 14-30.
34. Qi, J.; Wakayama, N.I.; Ataka, M. *J. Cryst. Growth*, **2001**, *232*, 132-137.
35. Lin S.X.; Zhou, M.; Azzi, A.; Xu, G.J.; Wakayama, N.I.; Ataka, M. *Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *275*, 274.
36. Sato, T.; Yamada, Y.; Saijo, S.; Hori, T.; Hirose, R.; Tanaka, N.; Sasaki, G.; Nakajima, K.; Igarashi, N.; Tanaka, M.; Matsuura, Y. *Acta Cryst. D*, **2000**, *56*, 1079.
37. Zhong, C.W.; Wakayama, N.I. *J. Cryst. Growth*, **2001**, *226*, 327-332.
38. Wang, L.; Zhong, C.W.; Wakayama, N.I. *J. Cryst. Growth*, **2002**, *237*, 312-316.
39. Yin, D.C.; Wakayama, N.I.; Inatomi, Y.; Huang, W.D.; Kuribayashi, K. *Adv. Space Res.*, **2003**, *32(2)*, 217-223.
40. Zeppezauer, M.; Eklund H.; Zeppezauer, E.S. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1968**, *126 (2)*, 564-573.
41. Yonath, A.; Müssig, J.; Wiltmann, H.G. *J. Cell. Biochem.*, **1982**, *19*, 145-155.
42. García-Ruiz, J.M. *Key Eng. Mater.*, **1991**, *88*, 87-106.
43. García-Ruiz, J.M.; Moreno, A.; Viedma, C.; Coll, M. *Mater. Res. Bull.*, **1993**, *28*, 541-546.
44. García-Ruiz, J.M.; Moreno A. *Acta Cryst. D*, **1994**, *50*, 484-490.
45. Bolaños-García, V.M. *J. Cryst. Growth*, **2003**, *253*, 517-523.
46. García-Ruiz, J.M.; Otálora F.; Novella, M.L.; Gavira, J.A.; Sauter, C.; Vidal, O. *J. Cryst. Growth*, **2001b**, *232*, 149-155.
47. Ng, J.D.; Gavira, J.A.; García-Ruiz, J.M. *J. Struct. Biol.*, **2003**, *142*, 218-231.
48. Gavira, J.A.; Toh, D.; Lopez-Jaramillo, J.; García-Ruiz J.M.; Ng, J.D. *Acta Crystallogr D*, **2002**, *58*, 1147-1154.
49. Biertümpfel C.; Basquin, J. Suck, D., Sauter, C. *Acta Cryst. D*, **2002**, *58*, 1657-1659.
50. Mirkin, N.; Frontana-Uribe B.A.; Rodríguez-Romero A.; Hernández-Santoyo A.; Moreno A. *Acta Crystallogr D*, **2003**, *59*, 1533-1538.
51. Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Capelle, B.; Aubry, A. *J. Cryst. Growth*, **1999**, *200*, 575-582.
52. Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Aubry, A. *J. Cryst. Growth*, **2001** *232*, 250-255.
53. Nanev, Ch.; Penkova, A. *J. Cryst. Growth*, **2001**, *232*, 285-293.
54. Bard, A.J.; Faulkner, L. R. In: *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley & Sons, Ed., New York, **2001**.
55. Vaney, M. C.; Broutin, I.; Retailleau, P.; Douangmath, A.; Lafont, S.; Hamiaux, C.; Prangé, T.; Ducruix, A.; Riès-Kautt, M. *Acta Cryst. D*, **2001**, *57*, 929-940.
56. Mirkin, N.; Moreno A. in: *Proceedings of the 10th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules*. Beijing, China, **2004**, 175.
57. Moreno, A.; Sasaki, G. *J. Cryst. Growth*, **2004**, *264*, 438-444.
58. Sasaki, G.; Moreno, A.; Nakajima, K. *J. Cryst. Growth*, **2004**, *262*, 499-502.
59. Sato T.; Yamada Y.; Saijo S.; Hori T.; Hirose R.; Tanaka N.; Sasaki G.; Nakajima K.; Igarashi N.; Tanaka M.; Matsuura Y. *J. Cryst. Growth*, **2001**, *232 (1-4)*, 229-236.
60. Iwata, So Crystallization of membrane proteins. From: *10th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules*, Beijing, China, **2004**, 80.
61. Ostermeier, C.; Michel, H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 699-701.
62. Wallin E.; von Heijne, G. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1029-1038.
63. Drenth J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. *Nature*, **1985**, *318*, 618-624.
64. Hunte C.; Michel H. In: *Membrane Protein Purification and Crystallization: A practical Guide*. Hunte, C., von Jagow, G., Schagger, H., Eds., Academic Press, **2003**, 143-160.
65. Michel H. *Trends Biochem. Sci.*, **1983**, *8*, 56-59.
66. Takeda, K.; Sato, H.; Hino, T.; Kono, M.; Fukuda, K.; Sakurai, I.; Okada, T.; Kouyama, T. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *283*, 463-474.
67. Landau E.M.; Rosenbusch, J.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 14532-14535.
68. Faham S.; Bowie J.U. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *316*, 1-6.
69. Caffrey, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, 486-497.
70. Nollert, P.; Qiu, H.; Caffrey, M.; Rosenbusch, J.P.; Landau, E.M. *FEBS lett.*, **2001**, *504*, 179-186.
71. Briggs, J.; Cheng, H.; Caffrey, M. *J. Phys. II France*, **1996**, *6*, 723-751.
72. Warr, G.; Drummond, C.; Greiser, F. *J. Phys. Chem.*, **1986**, *90*, 4581-4586.
73. Caffrey, M. *J. Struct. Biol.*, **2003**, *142*, 108-132.
74. Cherezov V.; Fersi, H.; Caffrey, M. *Biophys. J.*, **2001**, *81*, 225-242.
75. Gordeliy, V.I.; Labahn, J.; Moukhametianov, R.; Efremov, R.; Granzin, J.; Schlesinger, R.; Buldt, G.; Savopol, T.; Scheidig A.J.; Klare, J.P.; Engelhard, M. *Nature*, **2002**, *419*, 484-487.
76. Landau, E.M.; Rummel, G.; Cowan-Jacob, S.W.; Rosenbusch, J.P. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 1935-1937.
77. Luecke, H.; Schobert B.; Richter, H.T.; Cartailier, J.P.; Lanyi, J.K. *J. Mol. Biol.*, **1999**, *291*, 899-911.
78. Kolbe, M.; Besir, H.; Essen, L.O.; Oesterhelt, D. *Science*, **2000**, *288*, 1390-1396.
79. Ai, X.; Caffrey, M. *Biophys. J.*, **2000**, *79*, 394-405.
80. Caffrey, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, *12*, 471-479.
81. McPherson, A. *Crystallization of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **1999**.
82. Chung, H.; Caffrey, M. *Nature*, **1994a**, *368*, 224-226.
83. Chung, H.; Caffrey, M. *Biophys. J.*, **1994b**, *66*, 377-381.
84. Cheng, A.; Hummel, B.; Qiu, H.; Caffrey, M. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, *95*, 11-21.
85. Sato, H.; Takeda, K.; Tani, K.; Hino, T.; Okada, T.; Nakasako, M.; Kamiya, N.; Kouyama, T. *Acta Cryst. D*, **1999**, *55(7)*, 1251-1256.
86. Pebay-Peyruola, E.; Rummel, G.; Rosenbusch, J.P.; Landau, E.M. *Science*, **1997**, *277*, 1676-1680.
87. Terwillinger, T. *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, *7*, 935-939.
88. Hui, R.; Edwards, A. *J. Struct. Biol.*, **2003**, *142*, 154-161.
89. Arrowsmith, C.; Edwards, A.; Hui, R.; Marino, F.; Savchenko, A.; Yamazaki, K.; Yee, A. Producing proteins. (In press). **2003**.
90. Lesley, S.A. *Protein Expr. Purif.*, **2001**, *22*, 159-164.
91. Grishammer R.; Tate, C.G. *Q. Rev. Biophys.*, **1995**, *28*, 315-422.
92. De Gier, J.W.; Lührink J. *Mol. Microbiol.*, **2001**, *40*, 314-322. Arora, A.; Rinehart, D.; Szabo, G.; Tamm, L.K. (2000). Refolded outer membrane protein A of Escherichia coli forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **275**, 1594-1600

93. Muller, M.; Koch, H.G.; Beck, K.; Schafer, U. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **2001**, *66*, 107–157.
94. Chang, G.; Spencer, R.H.; Lee, A.T.; Barclay, M.T.; Rees, D.C. *Science*, **1998**, *282*, 2220–2226.
95. Tate, C.G. *FEBS Letts.*, **2001**, *504*, 94–98.
96. Matlack, K.E.; Mothes, W.; Rapoport, T.A. *Cell*, **1998**, *92*, 381–390.
97. Otto, J.C.; DeWitt, D.L.; Smith, W.L. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 18234–18242.
98. Patricelli, M.P.; Lashuel, H.A.; Giang, D.K.; Kelly, J.W.; Cravatt, B.F. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 15177–15187.
99. Bracey, M.H.; Hanson, M.A.; Masuda, K.R.; Stevens, R.C.; Cravatt, B.F. *Science*, **2002**, *298*, 1793–1796.
100. Turner, G.J.; Reusch, R.; Winter-Vann, A.M.; Martinez, L.; Betlach, M.C. *Protein Expr. Purif.*, **1999**, *17*, 312–323.
101. Cereghino, J.L.; Cregg, J.M. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2000**, *24*, 45–66.
102. Sreerishna, K.; Brankamp, R.G.; Kropp, K.E.; Blankenship, D.T.; Tsay, J.T.; Smith, P.L.; Wierschke, J.D.; Subramaniam, A.; Birkenberger, L.A. *Gene*, **1997**, *190*, 55–62.
103. Loll, P.J. *J. Struct. Biol.*, **2003**, *142*, 144–153.
104. Rosenbusch, J.P. *J. Struct. Biol.*, **2001**, *136*, 144–157.
105. Wiener, M.C. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2001**, *6*, 412–419.
106. Scarborough, G.A. *Acta Cryst. D*, **1994**, *50*, 643–649.
107. Venter, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A.; Gocayne, J.D.; Amanatides, P.; Ballew, R.M.; Huson, D.H.; Wortman, J.R.; Zhang, Q.; Kodira, C.D.; Zheng, X.H.; Chen, L.; Skupski, M.; Subramanian, G.; Thomas, P.D.; Zhang, J.; Gabor Miklos, G.L.; Nelson, C.; Broder, S.; Clark, A.G.; Nadeau, J.; McKusick, V.A.; Zinder, N.; Levine, A.J.; Roberts, R.J.; Simon, M.; Slayman, C.; Hunkapiller, M.; Bolanos, R.; Delcher, A.; Dew, I.; Fasulo, D.; Flanigan, M.; Florea, L.; Halpern, A.; Hannenhalli, S.; Kravitz, S.; Levy, S.; Mobarry, C.; Reinert, K.; Remington, K.; Abu-Threideh, J.; Beasley, E.; Biddick, K.; Bonazzi, V.; Brandon, R.; Cargill, M.; Chandramouliswaran, I.; Charlab, R.; Chaturvedi, K.; Deng, Z.; Di Francesco, V.; Dunn, P.; Eilbeck, K.; Evangelista, C.; Gabrielian, A.E.; Gan, W.; Ge, W.; Gong, F.; Gu, Z.; Guan, P.; Heiman, T.J.; Higgins, M.E.; Ji, R.R.; Ke, Z.; Ketchum, K.A.; Lai, Z.; Lei, Y.; Li, Z.; Li, J.; Liang, Y.; Lin, X.; Lu, F.; Merkulov, G.V.; Milshina, N.; Moore, H.M.; Naik, A.K.; Narayan, V.A.; Neelam, B.; Nusskern, D.; Rusch, D.B.; Salzberg, S.; Shao, W.; Shue, B.; Sun, J.; Wang, Z.; Wang, A.; Wang, X.; Wang, J.; Wei, M.; Wides, R.; Xiao, C.; Yan, C.; Yao, A.; Ye, J.; Zhan, M.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhao, Q.; Zheng, L.; Zhong, F.; Zhong, W.; Zhu, S.; Zhao, S.; Gilbert, D.; Baumhueter, S.; Spier, G.; Carter, C.; Cravchik, A.; Woodage, T.; Ali, F.; An, H.; Awe, A.; Baldwin, D.; Baden, H.; Barnstead, M.; Barrow, I.; Beeson, K.; Busam, D.; Carver, A.; Center, A.; Cheng, M.L.; Curry, L.; Danaher, S.; Davenport, L.; Desilets, R.; Dietz, S.; Dodson, K.; Doup, L.; Ferreira, S.; Garg, N.; Gluecksmann, A.; Hart, B.; Haynes, J.; Haynes, C.; Heiner, C.; Hladun, S.; Hostin, D.; Houck, J.; Howland, T.; Ibegwam, C.; Johnson, J.; Kalush, F.; Kline, L.; Koduru, S.; Love, A.; Mann, F.; May, D.; McCawley, S.; McIntosh, T.; McMullen, I.; Moy, M.; Moy, L.; Murphy, B.; Nelson, K.; Pfannkoch, C.; Pratt, E.; Puri, V.; Qureshi, H.; Reardon, M.; Rodriguez, R.; Rogers, Y.H.; Romblad, D.; Ruhfel, B.; Scott, R.; Sitter, C.; Smallwood, M.; Stewart, E.; Strong, R.; Suh, E.; Thomas, R.; Tint, N.N.; Tse, S.; Vech, C.; Wang, G.; Wetter, J.; Williams, S.; Williams, M.; Windsor, S.; Winn-Deen, E.; Wolfe, K.; Zaveri, J.; Zaveri, K.; Abril, J.F.; Guigo, R.; Campbell, M.J.; Sjolander, K.V.; Karlak, B.; Kejariwal, A.; Mi, H.; Lazareva, B.; Hatton, T.; Narechiana, A.; Diemer, K.; Muruganujan, A.; Guo, N.; Sato, S.; Bafna, V.; Istrail, S.; Lippert, R.; Schwartz, R.; Walenz, B.; Yooseph, S.; Allen, D.; Basu, A.; Baxendale, J.; Blick, L.; Caminha, M.; Carnes-Stine, J.; Caulk, P.; Chiang, Y.H.; Coyne, M.; Dahlke, C.; Mays, A.; Dombroski, M.; Donnelly, M.; Ely, D.; Esparham, S.; Fosler, C.; Gire, H.; Glanowski, S.; Glasser, K.; Glodek, A.; Gorokhov, M.; Graham, K.; Gropman, B.; Harris, M.; Heil, J.; Henderson, S.; Hoover, J.; Jennings, D.; Jordan, C.; Jordan, J.; Kasha, J.; Kagan, L.; Kraft, C.; Levitsky, A.; Lewis, M.; Liu, X.; Lopez, J.; Ma, D.; Majoros, W.; McDaniel, J.; Murphy, S.; Newman, M.; Nguyen, T.; Nguyen, N.; Nodell, M.; Pan, S.; Peck, J.; Peterson, M.; Rowe, W.; Sanders, R.; Scott, J.; Simpson, M.; Smith, T.; Sprague, A.; Stockwell, T.; Turner, R.; Venter, E.; Wang, M.; Wen, M.; Wu, D.; Wu, M.; Xia, A.; Zandieh, A.; Zhu, X. *Science*, **2001**, *291*, 1304–1351.
108. Lander, E.S.; Linton, L.M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M.C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; Funke, R.; Gage, D.; Harris, K.; Heaford, A.; Howland, J.; Kann, L.; Lehoczky, J.; LeVine, R.; McEwan, P.; McKernan, K.; Meldrim, J.; Mesirov, J.P.; Miranda, C.; Morris, W.; Naylor, J.; Raymond, C.; Rosetti, M.; Santos, R.; Sheridan, A.; Sougnez, C.; Stange-Thomann, N.; Stojanovic, N.; Subramanian, A.; Wyman, D.; Rogers, J.; Sulston, J.; Ainscough, R.; Beck, S.; Bentley, D.; Burton, J.; Clee, C.; Carter, N.; Coulson, A.; Deadman, R.; Deloukas, P.; Dunham, A.; Dunham, I.; Durbin, R.; French, L.; Grafham, D.; Gregory, S.; Hubbard, T.; Humphray, S.; Hunt, A.; Jones, M.; Lloyd, C.; McMurray, A.; Matthews, L.; Mercer, S.; Milne, S.; Mullikin, J.C.; Mungall, A.; Plumb, R.; Ross, M.; Shownkeen, R.; Sims, S.; Waterston, R.H.; Wilson, R.K.; Hillier, L.W.; McPherson, J.D.; Marra, M.A.; Mardis, E.R.; Fulton, L.A.; Chinwalla, A.T.; Pepin, K.H.; Gish, W.R.; Chissole, S.L.; Wendl, M.C.; Delehaunty, K.D.; Miner, T.L.; Delehaunty, A.; Kramer, J.B.; Cook, L.L.; Fulton, R.S.; Johnson, D.L.; Minx, P.J.; Clifton, S.W.; Hawkins, T.; Branscomb, E.; Predki, P.; Richardson, P.; Wenning, S.; Slezak, T.; Doggett, N.; Cheng, J.F.; Olsen, A.; Lucas, S.; Elkin, C.; Uberbacher, E.; Frazier, M.; Gibbs, R.A.; Muzny, D.M.; Scherer, S.E.; Bouck, J.B.; Sodergren, E.J.; Worley, K.C.; Rives, C.M.; Gorrell, J.H.; Metzker, M.L.; Naylor, S.L.; Kucherlapati, R.S.; Nelson, D.L.; Weinstock, G.M.; Sakaki, Y.; Fujiyama, A.; Hattori, M.; Yada, T.; Toyoda, A.; Itoh, T.; Kawagoe, C.; Watanabe, H.; Totoki, Y.; Taylor, T.; Weissenbach, J.; Heilig, R.; Saurin, W.; Artiguenave, F.; Brottier, P.; Bruls, T.; Pelletier, E.; Robert, C.; Wincker, P.; Smith, D.R.; Doucette-Stamm, L.; Rubenfeld, M.; Weinstock, K.; Lee, H.M.; Dubois, J.; Rosenthal, A.; Platzer, M.; Nyakatura, G.; Taudien, S.; Rump, A.; Yang, H.; Yu, J.; Wang, J.; Huang, G.; Gu, J.; Hood, L.; Rowen, L.; Madan, A.; Qin, S.; Davis, R.W.; Federspiel, N.A.; Abola, A.P.; Proctor, M.J.; Myers, R.M.; Schmutz, J.; Dickson, M.; Grimwood, J.; Cox, D.R.; Olson, M.V.; Kaul, R.; Shimizu, N.; Kawasaki, K.; Minoshima, S.; Evans, G.A.; Athanasiou, M.; Schultz, R.; Roe, B.A.; Chen, F.; Pan, H.; Ramser, J.; Lehrach, S.; Reinhardt, R.; McCombie, W.R.; de la Bastide, M.; Dedhia, N.; Blocker, H.; Hornischer, K.; Nordsiek, G.; Agarwala, R.; Aravind, L.; Bailey, J.A.; Bateman, A.; Batzoglou, S.; Birney, E.; Bork, P.; Brown, D.G.; Burge, C.B.; Cerutti, L.; Chen, H.C.; Church, D.; Clamp, M.; Copley, R.R.; Doerks, T.; Eddy, S.R.; Eichler, E.E.; Furey, T.S.; Galagan, J.; Gilbert, J.G.; Harmon, C.; Hayashizaki, Y.; Haussler, D.; Hermjakob, H.; Hokamp, K.; Jang, W.; Johnson, L.S.; Jones, T.A.; Kasif, S.; Kasprzyk, A.; Kennedy, S.; Kent, W.J.; Kitts, P.; Koonin, E.V.; Korf, I.; Kulp, D.; Lancet, D.; Lowe, T.M.; McLysaght, A.; Mikkelsen, T.; Moran, J.V.; Mulder, N.; Pollara, V.J.; Ponting, C.P.; Schuler, G.; Schultz, J.; Slater, G.; Smit, A.F.; Stupka, E.; Szustakowski, J.; Thierry-Mieg, D.; Thierry-Mieg, J.; Wagner, L.; Wallis, J.; Wheeler, R.; Williams, A.; Wolf, Y.I.; Wolfe, K.H.; Yang, S.P.; Yeh, R.F.; Collins, F.; Guyer, M.S.; Peterson, J.; Felsenfeld, A.

- Wetterstrand, K.A.; Patrinos, A.; Morgan, M.J.; Szustakowki, J.; de Jong, P.; Catanese, J.J.; Osoegawa, K.; Shizuya, H.; Choi, S.; Chen, Y.J. *Nature*, **2001**, 409, 860–921.
109. Shapiro, L.; Harris, T. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, 11, 31–35.
110. Rupp, B.; Segelke, B.W.; Krupka, H.I.; Lakin, T.P.; Schafer, J.; Zemla, A.; Toppani, D.; Snell, G.; Earnest, T. *Acta Cryst. D*, **2002**, 58, 1514–1518.
111. Van der Woerd, M.; Ferree, D.; Pusey M. *J. Struct. Biol.*, **2003**, 142, 180–187.
112. Hadd, A.G.; Raymond, D.E.; Halliwell, J.W.; Jacobson, S.C., Ramsey, J.M. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3407–3412.
113. Cohen, C.B.; Chin-Dixon, E.; Jeong, S.; Nikiforov, T.T. *Anal. Biochem.*, **1999**, 273, 89–97.
114. Fu, L.M.; Yang, R.J.; Lee, G.B.; Liu, H.H. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 5084–5091.
115. Krupka, H.I.; Rupp, B.; Segelke, B.W.; Lakin, T.P.; Wright, D.; Wu, H.-C.; Todd, P.; Azarani, A. *Acta Cryst. D*, 2002, 58, 1523–1526.
116. Luft, J.R.; Wolfley, J.; Jurisica, I.; Glasgow, J.; Fortier, S.; De Titta, G.T. *J. Cryst. Growth*, **2001**, 232, 591–595.
117. Hansen, C.L.; Skordalakes, E.; Berger, J.M.; Quake, S.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 16531–16536.
118. Qiu, H., Caffrey, M. *Biomaterials*, **2000**, 21, 223–234.
119. Briggs, J., Chung, H., Caffrey, M. *J. Phys. II France*, **1996**, 6, 723–751.