



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PURIFICACIÓN, CRISTALIZACIÓN Y ESTUDIOS  
ESTRUCTURALES A TRAVÉS DE RAYOS X DE APO  
Y HOLO TRANSFERRINAS HUMANAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**CAMILA CAMPOS ESCAMILLA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. ABEL MORENO CÁRCAMO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2018**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. Mireya Rodríguez Penagos

**VOCAL:** Dr. José Antonio Arcos Casarrubias

**SECRETARIO:** Dr. Abel Moreno Cárcamo

**SUPLENTE 1:** Dr. Milton Thadeu García Medeiros de Oliveira

**SUPLENTE 2:** Dra. Xelhua Elihut Marcos Benítez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Instituto de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Abel Moreno Cárcamo**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Camila Campos Escamilla**

\_\_\_\_\_

# AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo como ayudante de investigador nivel III del Sistema Nacional de Investigadores (Exp. ayudante 15206).

Se agradece a la DGAPA-UNAM proyecto PAPIIT No. IG200218 por el apoyo en la compra de consumibles para llevar a cabo esta tesis.

Se agradece al Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM) del Instituto de Química de la UNAM por el apoyo en la caracterización preliminar de los cristales.

Se agradece a la REDTULS-CONACYT por el apoyo en el viaje al Sincrotrón BNL en los Estados Unidos.

Se agradece a la línea NSLS-II del sincrotrón del Laboratorio Nacional de Brookhaven por el apoyo con la colecta de datos de alta resolución.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
1.2. OBJETIVOS .....	2
1.2.1. <i>Objetivo general</i> .....	2
1.2.2. <i>Objetivos particulares</i> .....	2
1.3. HIPÓTESIS .....	3
<b>2. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)</b> .....	<b>4</b>
2.1. FUNCIÓN Y TRANSPORTE DE HIERRO EN EL SNC .....	4
2.2. FAMILIA DE LAS TRANSFERRINAS .....	5
2.2.1. <i>Apo- y holo-transferrinas</i> .....	6
2.3. RELACIÓN ENTRE EL HIERRO Y LA AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS .....	7
2.4. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA TRANSFERRINA .....	10
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1. PROTEÍNAS Y CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN .....	14
3.2. PURIFICACIÓN .....	14
3.2.1. <i>Cromatografía de exclusión molecular del fibrinógeno</i> .....	14
3.2.2. <i>Cromatografía de intercambio aniónico de las transferrinas</i> .....	15
3.2.3. <i>Electroforesis SDS-PAGE</i> .....	17
3.2.4. <i>Espectrometría de masas (MALDI-TOF)</i> .....	18
3.3. CRISTALIZACIÓN DE APO- Y HOLO-TRANSFERRINAS .....	18
3.3.1. <i>Transporte de proteínas al sincrotrón para toma de datos de alta resolución</i> .....	18
3.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LOS CRISTALES DE APO-TRANSFERRINA .....	20
3.4.1. <i>Difracción de rayos X empleando radiación sincrotrón</i> .....	20
3.5. INDUCCIÓN DE AGREGADOS FIBRILARES CON TFE .....	20
3.5.1. <i>Observación por microscopía de barrido electrónico (SEM)</i> .....	22
3.5.2. <i>Turbidimetría y Dispersión de luz dinámica (DLS)</i> .....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
4.1. PURIFICACIÓN DEL FIBRINÓGENO .....	23

4.1.1.	<i>Cromatografía de exclusión molecular</i> .....	23
4.1.2.	<i>Electroforesis SDS-PAGE del fibrinógeno</i> .....	24
4.2.	PURIFICACIÓN DE LAS TRANSFERRINAS.....	25
4.2.1.	<i>Cromatografía de intercambio aniónico</i> .....	25
4.2.2.	<i>Electroforesis SDS-PAGE de la transferrina</i> .....	26
4.2.3.	<i>Espectrometría de masas (MALDI-TOF)</i> .....	27
4.3.	INDUCCIÓN DE AGREGADOS FIBRILARES CON TFE.....	28
4.3.1.	<i>Observación por Microscopía de Barrido Electrónico (SEM)</i> .....	28
4.3.2.	<i>Turbidimetría y Dispersión de Luz Dinámica (DLS)</i> .....	30
4.4.	CRISTALIZACIÓN DE APO- Y HOLO-TRANSFERRINAS .....	34
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>43</b>
<b>8.</b>	<b>APÉNDICE</b> .....	<b>47</b>
8.1.	SOLUCIONES .....	47
□	<i>Solución amortiguadora 20 mM de fosfatos y 154 mM NaCl pH 7</i> .....	47
□	<i>Solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl y 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 8.0 (buffer A)</i> 47	
□	<i>Solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl, 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 150 mM NaCl pH 8.0 (buffer B)</i> .....	47
□	<i>Solución amortiguadora 20 mM Tris-HCl, 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 200 mM NaCl pH 8.0 (diálisis)</i> .....	47
□	<i>Solución 1.0 M NaCl</i> .....	47
□	<i>Solución 20% etanol</i> .....	47
8.2.	ARTÍCULO PUBLICADO .....	48

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.2.1.</b> Ciclo de la transferrina.....	7
<b>Figura 2.3.</b> Posibles etapas precursoras de los agregados amiloides .....	8
<b>Figura 2.4.1.</b> Diagrama de solubilidad para la cristalización de proteínas en general.....	11
<b>Figura 2.4.2.</b> Ilustración de la estructura cristalográfica de la apo-Tf .....	12
<b>Figura 2.4.3.</b> Enlace de coordinación entre la transferrina y el ion metálico.....	13
<b>Figura 4.1.1.</b> Cromatograma de exclusión molecular de fibrinógeno.....	23
<b>Figura 4.1.2.</b> Gel de electroforesis SDS-PAGE del fibrinógeno.....	24
<b>Figura 4.2.1.</b> Cromatogramas de intercambio aniónico de apo-Tf y holo-Tf.....	25
<b>Figura 4.2.2.</b> Gel de electroforesis SDS-PAGE de la holo-Tf.....	26
<b>Figura 4.2.3.</b> Espectros de masas MALDI-TOF de apo-Tf y holo-Tf.....	27
<b>Figura 4.3.1.1.</b> Agregación de fibrinógeno inducida con TFE vista por SEM .....	28
<b>Figura 4.3.1.2.</b> Agregados de apo-Tf y de holo-Tf vistos por SEM.....	29
<b>Figura 4.3.2.1.</b> Turbidez de la solución en función de la concentración de TFE tras incubar durante 48 h a temperatura ambiente.....	31
<b>Figura 4.3.2.2.</b> Mediciones en DLS para apo-Tf.....	32
<b>Figura 4.3.2.3.</b> Mediciones en DLS para holo-Tf.....	33
<b>Figura 4.4.1.</b> Cristales de apo-Tf a concentración de proteína de $13 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ obtenidos mediante difusión en fase vapor por gota sedente a 291 K.....	34
<b>Figura 4.4.2.</b> Imágenes de los cristales de apo-Tf (a, b, c) y de holo-Tf (d, e, f) capturadas tras una semana de crecimiento.....	35
<b>Figura 5.1.</b> Modelo de la estructura 3D de la apo-Tf obtenido tras el procesamiento de datos.....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.5.1.</b> Esquema de preparación de muestras de fibrinógeno.....	21
<b>Tabla 3.5.2.</b> Esquema de preparación de muestras de apo-Tf y holo-Tf.....	21
<b>Tabla 4.3.2.</b> Valores de absorbancia a 350 nm en UV-Vis de apo-Tf y holo-Tf tras 48 h de incubación con TFE a diferentes concentraciones.....	30
<b>Tabla 5.1.</b> Estadísticas de la colecta de datos y del afinamiento de la apo-Tf.....	38
<b>Tabla 5.2.</b> Valores de Rwork y Rfree antes y después del afinamiento.....	39
<b>Tabla 5.3.</b> Comparación de las estadísticas de la colecta de datos de difracción de rayos X de la apo-Tf realizada de manera local y en un sincrotrón.....	41



## ABREVIATURAS

apo-Tf	apo-Transferrina
cm	Centímetros
2,5-DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
DLS	Dynamic Light Scattering
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
h	Horas
holo-Tf	holo-Transferrina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K	Kelvin
kDa	KiloDalton
M	Molaridad
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
R <sub>H</sub>	Radio hidrodinámico

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Scanning Electron Microscopy
SNC	Sistema Nervioso Central
Tf	Transferrina
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
UV-Vis	Ultravioleta-visible
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro

# RESUMEN

El presente trabajo está enfocado en la resolución de la estructura cristalográfica de la transferrina, proteína presente en el suero humano, que realiza el transporte de hierro hacia el cerebro. Se obtuvieron cristales de sus isoformas, apo-transferrina y holo-transferrina, tras su purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico. Los cristales de apo-transferrina difractaron hasta una resolución de 3.5 Å, y los datos colectados proporcionaron la información necesaria para resolver y analizar su estructura. Además, se colectaron datos de difracción de rayos X de mayor resolución empleando radiación sincrotrón, cuyas estadísticas demostraron que esta fuente de radiación es una posibilidad para obtener la estructura de alta resolución en un futuro.

Adicionalmente, se estudió el patrón de agregación de estas proteínas para indagar sobre el papel que juegan en enfermedades neurodegenerativas. Esta agregación fue inducida con trifluoroetanol y medida con técnicas de dispersión de luz dinámica y espectrofotometría UV-Vis. El patrón de agregación que se observó fue progresivo y demostró que incluso proteínas solubles como las transferrinas tienden a agregarse por alteraciones en su medio. La estructura de una proteína es determinante para su función, por lo que la agregación de la transferrina y el transporte irregular de hierro podrían provocar repercusiones a nivel neurológico.

## ABSTRACT

This work is focused on the resolution of the crystallographic structure of human serum transferrin, the protein that transports iron to the brain. Crystals of its isoforms, apo-transferrin and holo-transferrin, were obtained after their purification by anion-exchange chromatography. Apo-transferrin crystals diffracted to a resolution of 3.5 Å, and the data collected contained the necessary information to resolve and analyze its structure. Also, higher resolution X-ray data was collected using synchrotron radiation; the statistics demonstrated that this radiation source is a possibility towards obtaining the high-resolution structure in the near future.

Additionally, the aggregation pattern of these proteins was studied in order to inquire their role within neurodegenerative diseases. This aggregation was induced with trifluoroethanol and measured with dynamic light scattering and UV-Vis spectrophotometry techniques. The aggregation pattern observed was progressive, and showed that even soluble proteins such as transferrins tend to aggregate due to alterations in their milieu. A protein's structure is fundamental for its function; thus, the aggregation of transferrin and an irregular iron transport could lead to repercussions at neurological level.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El control en la distribución de hierro en el cerebro es crucial para su correcto funcionamiento. En humanos, la transferrina realiza el transporte de hierro hacia el cerebro desde el hígado, lugar donde se sintetiza en su isoforma apo-transferrina (apo-Tf), a través del plasma donde se encuentra unida al hierro en su isoforma holo-transferrina (holo-Tf).

El presente trabajo se enfoca en el estudio estructural de estas dos isoformas, miembros de la familia glicoproteica de las transferrinas, debido a reportes previos que presumen su participación en desórdenes neurológicos; se ha propuesto que el transporte anormal de hierro está relacionado con la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas (Amani y Naeem, 2014; Belaidi y Bush, 2016; Hare et al, 2015; Ward et al, 2014).

Las estructuras nativas completas de apo-Tf y holo-Tf no se han reportado a alta resolución que permitan detallar un mecanismo de acción con alta precisión; actualmente, la mayoría de las estructuras reportadas en el *Protein Data Bank* (PDB) son parciales o presentan modificaciones puntuales en la cadena de aminoácidos. Esto se debe a que la transferrina posee gran flexibilidad en su estructura secundaria, dificultando la obtención de cristales adecuados para su

difracción. Considerando la importancia biológica, particularmente en el Sistema Nervioso Central (SNC), de ambas isoformas de esta proteína, se justifica la importancia de llevar a cabo en esta tesis la resolución estructural de las apo-Tf y holo-Tf.

## **1.2. OBJETIVOS**

### 1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Creer cristales de transferrina en sus isoformas apo- y holo- que proporcionen datos de difracción de rayos X de alta calidad para su resolución estructural y comparar la formación de agregados fibrilares de la Tf utilizando el fibrinógeno como control.

### 1.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Obtener muestras de alta pureza de apo-Tf y holo-Tf mediante técnicas cromatográficas.
- b) Estandarizar condiciones de cristalización para apo-Tf y holo-Tf.
- c) Obtener cristales que proporcionen datos de difracción de rayos X para su resolución estructural.
- d) Elaborar un esquema de inducción de agregados fibrilares.
- e) Analizar y comparar la morfología de los agregados de fibrinógeno, apo-Tf y holo-Tf.

### **1.3. HIPÓTESIS**

Si se obtienen cristales de apo-transferrina y holo-transferrina en condiciones estandarizadas, se podrá llevar a cabo su resolución estructural, y la inducción de la agregación de estas proteínas permitirá indagar sobre su participación en enfermedades neurodegenerativas.

## 2. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)

### 2.1. FUNCIÓN Y TRANSPORTE DE HIERRO EN EL SNC

En los seres vivos, el hierro juega un papel importante en múltiples funciones biológicas gracias a su potencial de óxido-reducción, con el cual participa en reacciones en las cuales interviene la transferencia de electrones. Aunado a lo anterior, el hierro es un importante cofactor para varias proteínas involucradas en funciones esenciales para el SNC. Entre estas funciones se encuentran el mantenimiento de los requerimientos metabólicos del tejido cerebral así como la síntesis de mielina y de neurotransmisores (Belaidi y Bush, 2016).

Si bien el hierro es importante para funciones fisiológicas, también puede estar involucrado en procesos nocivos para el organismo, como el estrés oxidativo ocasionado por radicales libres producidos a través de la reacción de Fenton:



La saturación de estas especies reactivas de oxígeno puede interrumpir la síntesis de mielina, una de las principales funciones del hierro en el cerebro previamente mencionada. (Apostolakis y Kypraiou, 2017).

Dada la reactividad del hierro en el organismo, éste se encuentra unido a metaloproteínas como la hemoglobina, la mioglobina, la ferritina y la transferrina; la incorporación del hierro por las proteínas le permite llegar a su sitio de acción.



## 2.2. FAMILIA DE LAS TRANSFERRINAS

Las transferrinas son proteínas encargadas de la unión, la captación y el transporte de hierro (III) en vertebrados, con una proporción de dos iones  $\text{Fe}^{3+}$  unidos por cada molécula de transferrina. Esta unión es fuerte pero reversible y depende de la unión a la proteína de dos iones  $\text{CO}_3^{2-}$ . Asimismo, las transferrinas pueden unirse a otros metales de manera reversible, así como a células (Baker, 1994).

Las principales diferencias entre las proteínas de la familia radican en su secuencia, ubicación en el organismo, función, abundancia y modificaciones post-traduccionales (Baker, 1994).

Dentro de esta familia se encuentran: la lactoferrina, presente en leucocitos y secreciones como leche, lágrimas y saliva; la ovotransferrina, encontrada en la clara de los huevos de distintas aves, y la melanotransferrina, expresada en la membrana de células de melanoma. Sin embargo, dentro de la familia de las transferrinas las principales en el humano son las serotransferrinas, proteínas presentes en el suero sanguíneo, cuya principal función es el transporte de hierro desde sitios de su absorción hacia lugares de almacenamiento y utilización (Baker, 1994; Mizutani, Toyoda y Mikami, 2012).

### 2.2.1. APO- Y HOLO-TRANSFERRINAS

La transferrina humana existe en las isoformas apo- y holo-transferrina, cuya diferencia radica en que la última está enlazada con el ion férrico, y realiza el transporte del hierro hacia el cerebro de manera controlada por un receptor específico en la barrera hematoencefálica. Este transporte es eficiente ya que tiene gran afinidad por el hierro libre del medio extracelular, uniendo y transportando cerca del 99% de éste (Belaidi y Bush, 2016).

El mecanismo por el cual el hierro es unido y liberado de la transferrina es mediante un cambio conformacional en el cual la transferrina realiza un movimiento tipo bisagra dependiente de pH. La holo-transferrina extracelular se une al receptor específico de transferrina expresado en la membrana luminal del endotelio para dar lugar al complejo transferrina-receptor. Éste es endocitado hacia vesículas con un pH más ácido que el extracelular. La acidificación del medio induce la protonación de los residuos básicos del sitio donde se encuentra el hierro, por lo que éste es liberado de la proteína (Mizutani et al., 2012; Wally et al., 2006). El hierro es entonces transportado hacia el citoplasma, mientras que la transferrina, ahora en su isoforma apo-Tf, es transportada dentro del endosoma hacia la superficie celular donde es liberada al medio extracelular para volver a captar hierro (Mizutani et al., 2012). Este proceso se resume en la siguiente imagen.

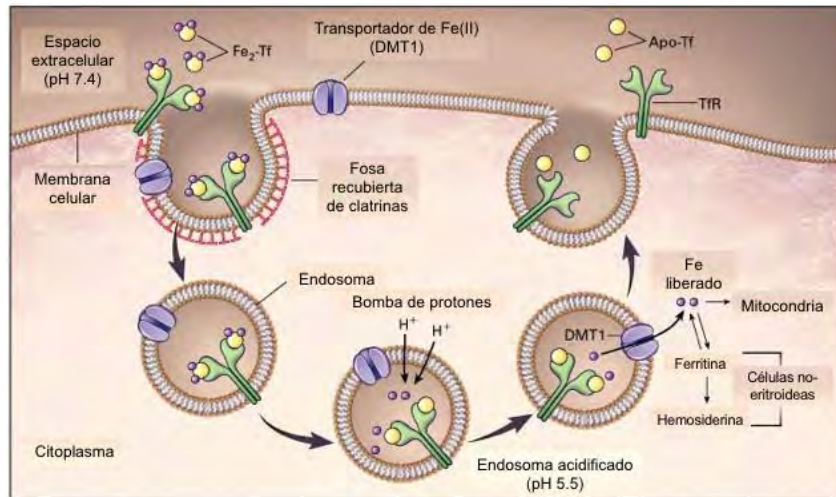


Figura 2.2.1. Ciclo de la transferrina. Obtenido de (Andrews, 1999).

## 2.3. RELACIÓN ENTRE EL HIERRO Y LA AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En la actualidad, las enfermedades neurodegenerativas han aumentado su incidencia en la población humana, pero su etiología y su tratamiento siguen sin conocerse por completo. Diversos estudios han demostrado que la agregación de proteínas que forman depósitos en el cerebro está asociada al padecimiento de enfermedades neurodegenerativas. Entre las proteínas más estudiadas en estas patologías figuran la beta amiloide ( $A\beta$ ), tau ( $\tau$ ) y  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn). Éstas forman placas amiloides y nudos neurofibrilares (Spire-Jones, Attems y Thal, 2017).

Existe la hipótesis de que los agregados precursores de las placas amiloides que se han hallado en cortes histológicos de cerebros de pacientes pueden a su vez estar implicados en la fisiopatología de estas enfermedades. Cabe recalcar que la

agregación de proteínas es un proceso complejo y multifactorial, por lo que pueden existir diversos intermediarios de los agregados fibrilares o amorfos. Ross y Poirier (2004) proponen la secuencia hipotética de la progresión de los diferentes intermediarios para proteínas potencialmente amiloidogénicas, ilustrada en la siguiente figura:

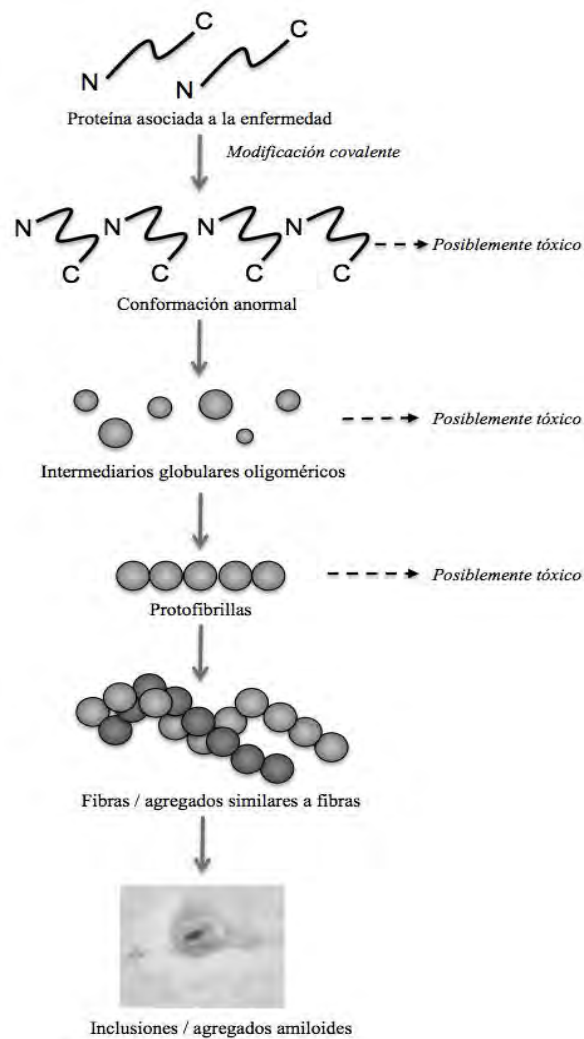


Figura 2.3. Posibles etapas precursoras de los agregados amiloides. Obtenido y adaptado de (Ross y Poirier, 2004).

Se ha reportado que ciertos elementos traza pueden inducir la agregación anormal de proteínas, entre ellos, el hierro. (Apostolakis y Kypraiou, 2017). Esto se debe a que se han medido altas concentraciones de hierro en las placas amiloides insolubles y en los nudos neurofibrilares característicos de la enfermedad de Alzheimer (Ward, Zucca, Duyn, Crichton y Zecca, 2014). Asimismo, se ha visto en estudios *post-mortem* una acumulación excesiva de hierro en varias regiones del cerebro en pacientes con Enfermedad de Alzheimer y Enfermedad de Parkinson (Belaidi y Bush, 2016; Hare et al., 2015).

Una proteína que forma fibras como una de sus principales funciones en el organismo es el fibrinógeno. El fibrinógeno es una glicoproteína hidrofílica de aproximadamente 340 kDa constituida por tres pares de cadenas polipeptídicas, designadas  $A\alpha$ , de peso molecular de 66.5 kDa;  $B\beta$ , de 52.0 kDa, y  $\gamma$ , de 46.5 kDa. Su estructura es  $\alpha$ -helicoidal con dominios globulares en cada extremo (Weisel, 2005). En condiciones fisiológicas, cuando el fibrinógeno es convertido a fibrina por medio de la interacción con la trombina, esta última remueve pequeños péptidos localizados en el amino terminal de las cadenas  $\beta$ , exponiendo una especie de 'nudo' que encaja en espacios presentes en las moléculas vecinas para formar así oligómeros conocidos como protofibrillas (Kollman, Pandi, Sawaya, Riley, Doolittle, 2009).

El fibrinógeno es una molécula control para el análisis de la agregación, utilizando TFE como agente inductor de agregados fibrilares, como reportan Naeem, Bhat, Iram y Khan (2016). Asimismo, Amani y Naeem (2014) utilizaron TFE para estudiar

la formación de protofibrillas *in vitro* de manera reproducible en otras proteínas, como en el caso de la transferrina humana. Estos estudios permiten suponer que la distribución anormal de hierro en enfermedades neurodegenerativas está relacionada con la agregación de su proteína transportadora, la transferrina, y que esta agregación puede ser inducida para su análisis *in vitro*.

## **2.4. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA TRANSFERRINA**

El modelo de la estructura cristalográfica de una proteína aporta información valiosa que permite comprender su función y los parámetros ambientales que pueden tener un impacto en la misma. Los factores clave para llevar a cabo la cristalización de una proteína son su pureza y su estado de agregación (Moreno, 2008).

La cristalización de las proteínas involucra dos etapas principales: la nucleación y el crecimiento. El crecimiento del cristal implica la transición de fase, desde la sobresaturación hacia la zona metaestable, alrededor del punto de equilibrio termodinámico. Para ello, la solubilidad de la proteína debe disminuir gradual y constantemente. La cristalización ocurre entonces en proporción al aumento de densidad de la proteína y la disminución gradual de la solución; los cristales crecen mientras se mantenga el equilibrio entre estas densidades (Flores-Ibarra, 2017). Las etapas de la cristalización de proteínas se ilustran en el diagrama de fases siguiente:

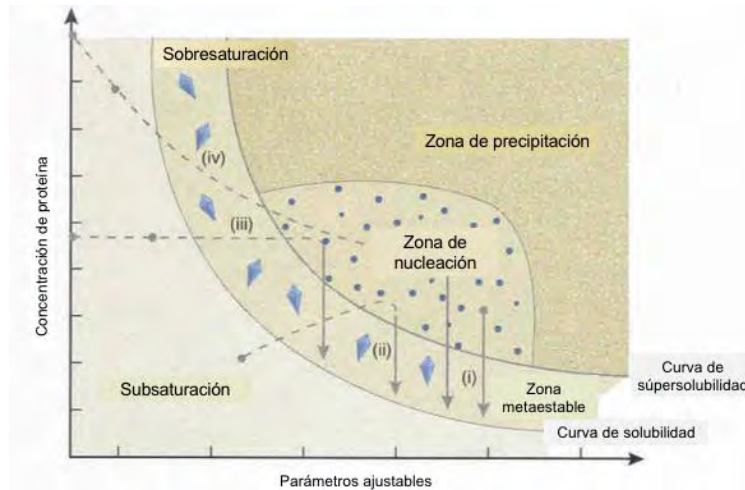


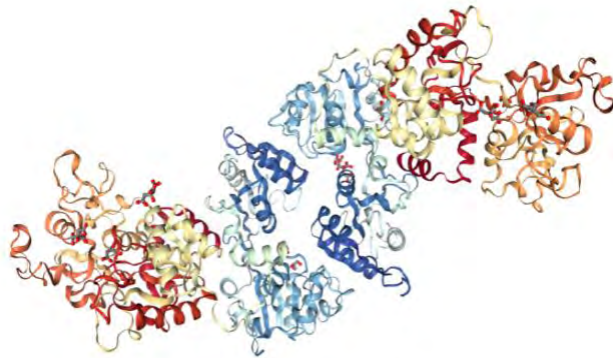
Figura 2.4.1. Diagrama de solubilidad para la cristalización de proteínas en general. El crecimiento de los cristales de proteína ocurre en la zona metaestable, tras alcanzar la sobresaturación. **Nota:** los parámetros ajustables pueden corresponder a condiciones de temperatura, presión o concentración de agente precipitante. Obtenido de (Pellegrino, 2012).

La zona metaestable entonces implica las condiciones adecuadas de sobresaturación para el crecimiento de los cristales, principalmente la concentración de la proteína, la cual depende de parámetros ajustables como la temperatura, la concentración de agente precipitante, entre otros. Un desequilibrio en el sistema conlleva ya sea a precipitación amorfa, por exceso de sobresaturación, o a la disolución de los cristales, por subsaturación (Moreno, 2017).

La actual estructura de la apo-Tf humana, resuelta mediante difracción de rayos X, está reportada con una resolución de 2.7-2.9 Å, un grupo espacial ortorrómbico  $P2_12_12_1$ , y dos moléculas por unidad asimétrica (Wally et al., 2006).

La apo-Tf es una proteína monomérica, con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa y una secuencia de 679 aminoácidos (Mizutani et al., 2012; Wally et al.,

2006). Su estructura está conformada por dos lóbulos homólogos denominados N y C, cada uno dividido en dos subdominios, N1 y N2, y C1 y C2, respectivamente, y en los dominios N-terminal y C-terminal posee dos sitios similares de unión a metales. El lóbulo N-terminal está conformado por los residuos 1-331, mientras que los residuos 339-679 conforman el lóbulo C-terminal. Ambos lóbulos están unidos entre sí por los residuos 332-338 en conformación extendida, es decir, sin estructura secundaria (Mizutani et al., 2012; Wally et al., 2006).



*Figura 2.4.2. Ilustración de la estructura cristalográfica de la apo-Tf. Obtenida de RCSB PDB, 2018.*

Estos estudios explican la flexibilidad de la molécula, sobre todo debida a la región tipo bisagra que une ambos lóbulos. Además, se presume que esta flexibilidad es necesaria para que la transferrina lleve a cabo su función de unir y liberar hierro (Wally et al., 2006).

El hierro se enlaza mediante un enlace de coordinación con un residuo de ácido aspártico, dos tirosinas y una histidina. Para completar la esfera de coordinación octaédrica, se une sinérgicamente un anión carbonato que actúa como ligando



bidentado (Wally et al., 2006; Quarles, Brumaghim, Marcus, 2010). Este enlace se ilustra en la figura siguiente:

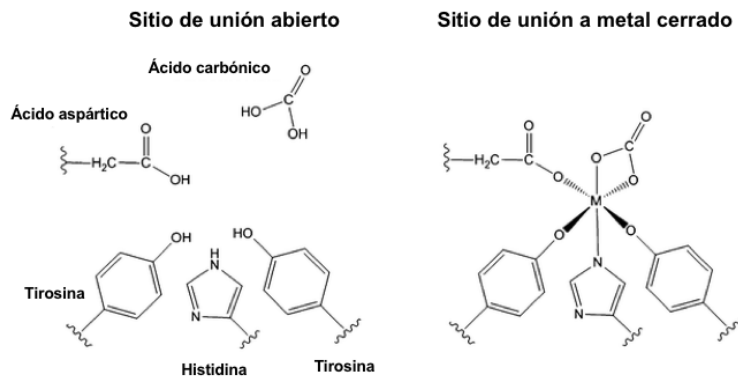


Figura 2.4.3. Enlace de coordinación entre la transferrina y el ion metálico. Se ilustran los residuos del sitio de unión a metal de la transferrina, el anión carbonato y el ion metálico. Obtenida de (Quarles et al., 2010).

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. PROTEÍNAS Y CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN**

Para los experimentos realizados se utilizaron las siguientes proteínas:

Fibrinógeno de plasma humano obtenido comercialmente de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, San Luis, Misuri, Estados Unidos), número de catálogo F3879.

Apo-transferrina de suero humano obtenido comercialmente de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, San Luis, Misuri, Estados Unidos), 95%, número de catálogo T2252.

Holo-transferrina de suero humano obtenido comercialmente de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, San Luis, Misuri, Estados Unidos), 98%, número de catálogo T4132.

Se utilizaron las siguientes condiciones de cristalización:

Solución PEG/Ion Screen #48 de Hampton Research (Aliso Viejo, California, Estados Unidos) compuesta por 0.2 M citrato de amonio dibásico y 20% p/v polietilenglicol 3,350 ajustado a pH 7 con NaOH, como agente precipitante.

Solución 50% p/v de trehalosa de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, San Luis, Misuri, Estados Unidos), como agente crioprotector.

### **3.2. PURIFICACIÓN**

#### **3.2.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DEL FIBRINÓGENO**

La cromatografía de exclusión molecular se basa en la separación de los componentes de una muestra de acuerdo con su tamaño; esto ocurre cuando la muestra se hace pasar por una matriz que excluye a las moléculas más grandes

pero retiene a las moléculas más pequeñas. Esta técnica se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de líquidos ultra rápida (UFLC) Shimadzu (Kioto, Prefectura de Kioto, Japón) DGU-20A5, empleando como volumen de inyección 250  $\mu\text{L}$  de una preparación de fibrinógeno en buffer 20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 154 mM NaCl pH 7, la cual se filtró a través de un filtro Advantec (Toyo Roshi Kaisha, Japón) Dismic-25JP con poro de 0.20  $\mu\text{m}$ . La fase móvil fue el mismo buffer en el cual se preparó la muestra, con un flujo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se empleó una columna Shodex (Showa Denko America, Nueva York, Estados Unidos) protein KW-802.5 con un límite de exclusión de 150,000 kDa.

### 3.2.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO DE LAS TRANSFERRINAS

La cromatografía de intercambio aniónico se basa en la separación de los componentes de una muestra de acuerdo con su carga eléctrica, haciendo pasar a la muestra por una columna con carga positiva. De esta manera, las moléculas con carga negativa se retienen en la columna por atracción electrostática y eventualmente son eluidas con una sal a determinada concentración cuya fuerza iónica logre separar a la proteína de la matriz utilizada en la columna.

Se resuspendieron 30 mg de apo-transferrina y 30 mg de holo-transferrina en solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl y 20 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 8.0 para obtener una concentración de aproximadamente 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en cada caso. Se llevó a cabo la purificación de ambas proteínas en un equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas FPLC System de Pharmacia (Pfizer, Nueva Jersey, Estados Unidos)

empleando una columna HiTrap Q HP de GE Healthcare Life Sciences (Chicago, Illinois, Estados Unidos) de 5 mL empacada con una resina Q Sepharose de intercambio aniónico. Se trabajó a flujo de  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  a una presión de no más de 0.5 MPa. La fase móvil consistió en una solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl y 20 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 8.0 (*buffer A*) y se llevó a cabo la elución de cada proteína independientemente con un gradiente lineal de NaCl 0-100% con una solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 150 mM NaCl pH 8.0 (*buffer B*) en 4 volúmenes de columna. Entre cada corrida se regeneró la columna de intercambio aniónico con una solución 1.0 M NaCl y se volvió a equilibrar con *buffer A*. Se colectaron las fracciones correspondientes al pico de proteína obtenido en el cromatograma en cada caso.

Posteriormente, cada proteína se dializó durante 12 h en una solución amortiguadora 20 mM Tris-HCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 200 mM NaCl pH 8.0 empleando una membrana Spectra/Por (Repligen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) de 6-8 kDa. Finalmente, se concentró cada proteína por separado mediante centrifugación en frío en una centrífuga DuPont (Wilmington, Delaware, Estados Unidos) a 5,000 rpm en tubos Amicon Ultra-15 Ultracel-5k de Millipore (Burlington, Massachusetts, Estados Unidos). Las concentraciones finales fueron de  $56.379 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  para la apo-transferrina y de  $58.095 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  para la holo-transferrina, determinadas con un equipo NanoDrop Lite de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

### 3.2.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Esta técnica de caracterización bioquímica se basa en la separación de proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética, la cual depende de varios parámetros. Uno de ellos es la desnaturalización de las proteínas con un detergente (SDS) para eliminar sus estructuras secundarias y terciarias y conferirles una carga negativa uniforme. Esto permite separarlas en función de su peso molecular al hacerlas migrar hacia el ánodo de la cámara de electroforesis con una corriente eléctrica. La separación ocurre cuando las moléculas atraviesan la red porosa del gel separador formada por la polimerización de la acrilamida, la cual limita el paso de las moléculas dependiendo de su tamaño. Esta red es más compacta mientras mayor sea la concentración de acrilamida utilizada, la cual se selecciona de acuerdo con el intervalo de peso molecular de las proteínas de interés. Inicialmente, las proteínas se colocan y alinean en un gel concentrador cuyo poro es de mayor tamaño al ser preparado con una concentración menor de acrilamida, lo cual produce una red laxa. Posteriormente, las moléculas atraviesan el gel separador, cuya red es más compacta, dependiendo de su tamaño.

Tanto para fibrinógeno como para transferrina, se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida al 12% v/v de acuerdo con la formulación propuesta por Laemmli (1970), utilizando un marcador de peso molecular C1992-1VL ColorBurst Electrophoresis Marker Sigma Lot SLBS7705 mol wt 8,000 - 220,000 Da de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

#### 3.2.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)

Se analizaron la apo-Tf y holo-Tf por espectrometría de masas MALDI-TOF para evaluar su pureza y corroborar los pesos moleculares reportados. Se analizó una muestra de cada una resuspendida en una solución amortiguadora de 50 mM Tris-HCl y 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 8.0 empleando como matriz una mezcla de ácido sinapínico con 2,5-DHB.

### 3.3. CRISTALIZACIÓN DE APO- Y HOLO-TRANSFERRINAS

Se empleó el método de difusión en fase vapor, el cual se basa en el equilibrio que se alcanza a temperatura constante entre un volumen pequeño de solución proteica y uno mayor de agente precipitante (Moreno, 2008). Para ello se llenaron placas de 96 pocillos para gota sedente, depositando 40 µL del agente precipitante (sección 3.1) en el pozo grande y 1 µL de la proteína junto con 1 µL del agente precipitante en el pozo pequeño. Se incubaron a temperatura constante de 291 K. Adicionalmente, se empleó el equipo TG40 de Ceteo (Blacktrace Holdings Ltd, Anglian Business Park, Orchard Road, Royston Herts, UK) para probar la cristalización a diferentes temperaturas en intervalos encontrados entre 287 y 293 K.

#### 3.3.1. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL SINCROTRÓN PARA TOMA DE DATOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Los cristales de proteínas, particularmente de apo-Tf y de holo-Tf, son muy

sensibles a los cambios de temperatura, lo cual representa un reto para su conservación. Normalmente, para mantener los cristales de proteínas a temperatura estable durante el transporte hacia las instalaciones de luz sincrotrón, éstos se crioprotegen, se congelan y se transportan en Dewars secos, los cuales tienen que atravesar los procedimientos de seguridad para muestras biológicas impuestos por la asociación de transporte aéreo internacional (IATA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, en ocasiones, quienes realizan estos procedimientos en las aduanas tienen poco cuidado y abren los Dewars, dañando a los cristales por el choque térmico.

Por lo tanto, se han diseñado dispositivos novedosos basados en un polímero patentado (poliolefina: patente US 7,971,744), el cual resiste cambios de temperatura en un intervalo de 113.15 K – 323.15 K sin que se altere la calidad de los cristales de proteína transportados en su interior. Estos dispositivos fueron evaluados inicialmente con algunas proteínas modelo y, una vez establecidas las condiciones de cristalización y crioprotección, se evaluaron con la apo-Tf como sensor térmico (Flores-Ibarra et al., 2018). Los cristales de apo-Tf se protegieron con la solución crioprotectora de trehalosa (sección 3.1), en relación 1:1 con el licor madre, y se colocaron dentro de estos dispositivos para ser transportados a las instalaciones de la línea NSLS-II del sincrotrón del Laboratorio Nacional de Brookhaven en Nueva York, Estados Unidos. En la sección 8.2 (apéndice) de esta tesis se incluye el artículo publicado que utilizó esta aproximación experimental.

### **3.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LOS CRISTALES DE APO-TRANSFERRINA**

Los cristales se protegieron con la solución crioprotectora de trehalosa (sección 3.1), en relación 1:1 con el licor madre, y se congelaron *in situ* para la colecta de datos de difracción de rayos X de ánodo rotatorio en el LANEM-IQ, UNAM.

#### **3.4.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EMPLEANDO RADIACIÓN SINCROTRÓN**

Se llevó a cabo la difracción de rayos X con radiación sincrotrón para obtener datos de alta resolución. Un sincrotrón es una máquina circular que acelera electrones a velocidades cercanas a la de la luz para emitir luz de sincrotrón, una radiación de alta intensidad que cubre todo el espectro electromagnético. Esto permite alcanzar resultados de alta calidad en muy poco tiempo, haciendo al sincrotrón la herramienta más poderosa y eficiente para la investigación en diversas áreas del conocimiento. Las aplicaciones que tiene son muchas y muy variadas; en este caso permitió estudiar la estructura molecular de la apo-transferrina superando el problema de daño por radiación que usualmente se presenta con equipos convencionales de difracción de rayos X, pues el tiempo de exposición a la radiación es muy corto (INCYTU, 2018).

### **3.5. INDUCCIÓN DE AGREGADOS FIBRILARES CON TFE**

Se siguió el esquema siguiente para la preparación de las muestras de fibrinógeno y posteriormente se incubaron a 310 K durante 24 h.



Tabla 3.5.1. Esquema de preparación de muestras de fibrinógeno

<b>% TFE</b>	<b>μL TFE</b>	<b>μL Fibrinógeno [Fib]= 0.7 mg·mL<sup>-1</sup></b>	<b>μL Buffer fosfatos pH 7 + NaCl 154 mM</b>	<b>Volumen final (μL)</b>
Blanco	0	10	20	30
30	9	10	11	30
40	12	10	8	30
50	15	10	5	30

Las muestras de apo-Tf y holo-Tf se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema y se incubaron a temperatura ambiente (298 K).

Tabla 3.5.2. Esquema de preparación de muestras de apo-Tf y holo-Tf

<b>% TFE</b>	<b>μL TFE</b>	<b>μL Transferrina [Tf]= 2.5 mg·mL<sup>-1</sup></b>	<b>μL Buffer</b>	<b>Volumen final (μL)</b>
Blanco	0	100	100	200
5	10	100	90	200
10	20	100	80	200
15	30	100	70	200
20	40	100	60	200
25	50	100	50	200
30	60	100	40	200
35	70	100	30	200
40	80	100	20	200
45	90	100	10	200
50	100	100	0	200

### 3.5.1. OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)

Las muestras obtenidas tras la inducción se recubrieron con oro con un equipo SPI-Module Sputter Coater (Structure Probe Inc, West Chester, Pensilvania, Estados Unidos) para ser observadas en el microscopio de barrido electrónico (SEM) con el programa Tescan Vega 3 (Brno, República Checa).

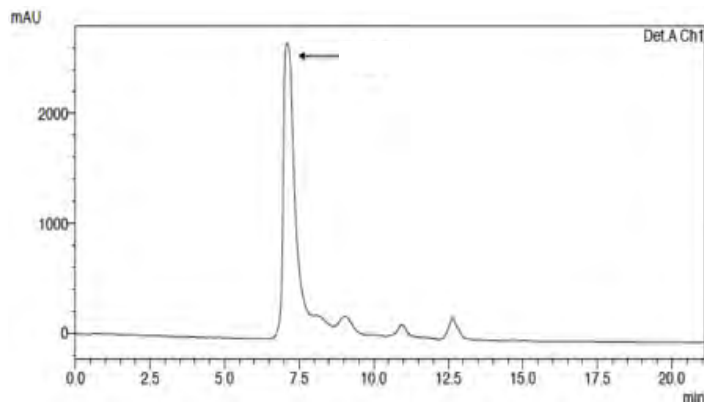
### 3.5.2. TURBIDIMETRÍA Y DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Las muestras de apo-Tf y holo-Tf preparadas en las condiciones indicadas en la tabla 3.5.2 se midieron después de 48 h de incubación a temperatura ambiente, mediante turbidimetría a 350 nm con un espectrofotómetro UV-Vis Synergy HT microplate reader de BioTek (Lionheart Technologies, Inc., Vermont, Estados Unidos). Adicionalmente, se analizó el tamaño de los agregados por DLS en un equipo Zetasizer Nano S de Malvern Instruments (Spectris, Malvern, Reino Unido).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PURIFICACIÓN DEL FIBRINÓGENO

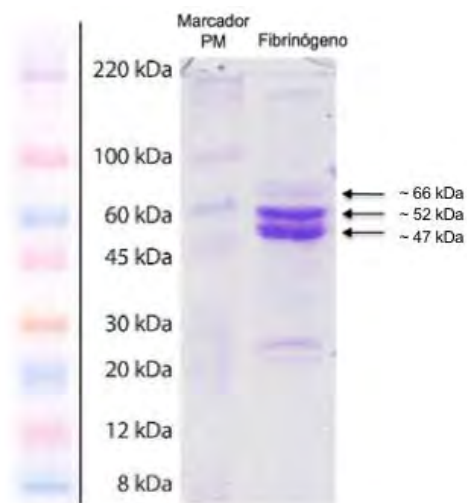
#### 4.1.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR



*Figura 4.1.1. Cromatograma de exclusión molecular de fibrinógeno. En el eje horizontal se midió el tiempo de retención en minutos, mientras que en el eje vertical se midió la intensidad de la señal del detector en unidades de absorbancia a  $\lambda=220$  nm. El pico de mayor intensidad indicado con una flecha se registró al minuto 7 y corresponde a la molécula completa de fibrinógeno.*

Se empleó la técnica de cromatografía de exclusión molecular para purificar al fibrinógeno; al ser una molécula relativamente grande, de 340 kDa de peso molecular, la primera señal (pico) en el minuto 7 (figura 4.1.1) corresponde con esta proteína. Esto fue confirmado al analizar la fracción correspondiente mediante electroforesis SDS-PAGE (sección 4.1.2); por lo tanto, la fracción colectada al minuto 7 es la que se empleó para los experimentos subsecuentes. Además se observaron otros picos de menor intensidad en los minutos 9, 11 y 13, los cuales se asociaron con otras moléculas de menor tamaño que no corresponden a la proteína de interés, considerando que el contenido de fibrinógeno era de 50%-70% en la muestra comercial inicial.

#### 4.1.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DEL FIBRINÓGENO



*Figura 4.1.2. Gel de electroforesis SDS-PAGE del fibrinógeno. Se cargaron 20  $\mu\text{L}$  de fibrinógeno a 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en un gel a 12% v/v de acrilamida y se observaron bandas correspondientes a los pesos moleculares de las tres cadenas que conforman al fibrinógeno. Se presenta la imagen correspondiente al marcador de peso molecular comercial (izq.) para facilitar la visualización en el gel.*

Se confirmó la pureza del fibrinógeno con el cual se trabajó con el gel de electroforesis SDS-PAGE (figura 4.1.2). En éste se observaron tres bandas correspondientes a las subunidades de esta proteína, cuyos pesos moleculares son de 66, 52 y 47 kDa, aproximadamente, y por lo tanto coincidieron con los de las tres cadenas polipeptídicas que lo conforman, mencionadas en la sección 2.3 (ver página 8).

## 4.2. PURIFICACIÓN DE LAS TRANSFERRINAS

### 4.2.1. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

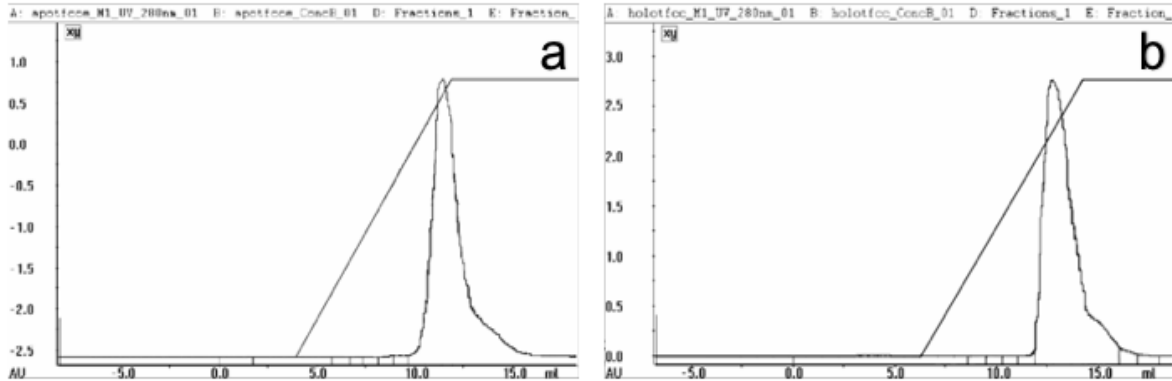
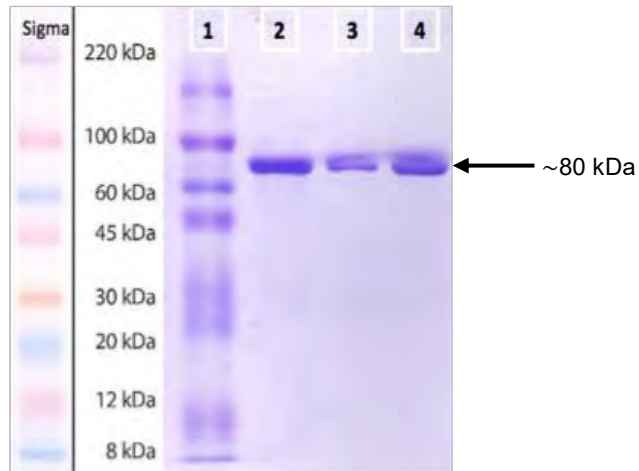


Figura 4.2.1. Cromatogramas de intercambio aniónico de apo-Tf (a) y holo-Tf (b). En el eje horizontal se midió el tiempo de retención en relación al flujo de volumen de fase móvil en mL; se empleó un flujo de 2 mL·min<sup>-1</sup>. En el eje vertical se midió la intensidad de la señal del detector en unidades de absorbancia a  $\lambda=280$  nm. Se ilustra el gradiente de NaCl que se empleó para la elución de las transferrinas..

Los cromatogramas obtenidos para la apo-Tf y la holo-Tf mostraron un patrón muy similar entre ellos, con un tiempo de retención muy cercano; no obstante se observó una diferencia posiblemente debido al radio hidrodinámico diferente de ambas isoformas. En cada caso, al observarse solo un pico, éste corresponde con la proteína y por lo tanto la fracción correspondiente fue la que se colectó y utilizó para los experimentos subsecuentes.

#### 4.2.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LA TRANSFERRINA



*Figura 4.2.2. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la holo-Tf. Se cargaron 20  $\mu\text{L}$  de holo-Tf a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en un gel a 12% v/v de acrilamida, en los carriles 2, 3 y 4. Se observó en todos una sola banda correspondiente al peso molecular de la transferrina. Se incluye la imagen de referencia para los pesos moleculares del marcador comercial (izquierda.)*

En las tres repeticiones se observó una sola banda ubicada aproximadamente en 80 kDa, lo cual corresponde con el peso molecular de la holo-Tf y por ende demostró su pureza. Esto se corroboró con el espectro de masas MALDI-TOF mostrado a continuación.

### 4.2.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)

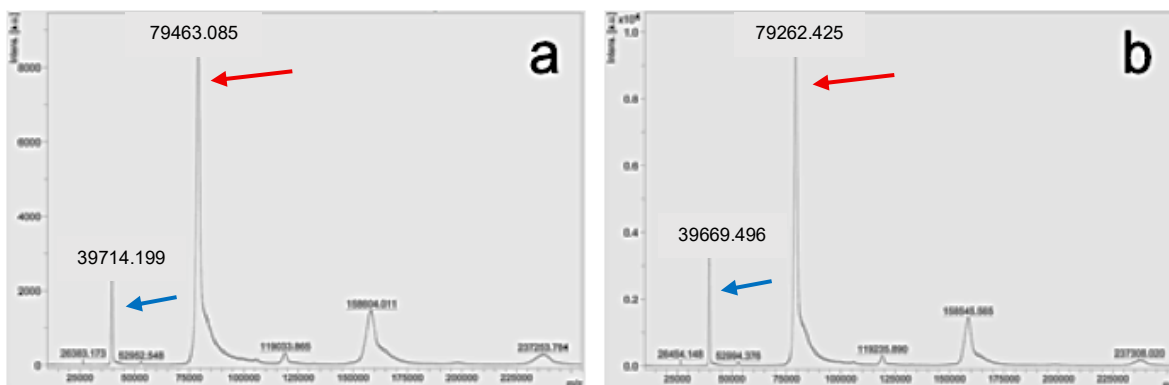


Figura 4.2.3. Espectros de masas MALDI-TOF de apo-Tf (a) y holo-Tf (b). Las flechas rojas indican los picos de señal de  $m/z$  correspondientes al peso molecular de la transferrina, y las flechas azules indican los picos de señal de  $m/z$  correspondientes al ion molecular. **Nota:** los números del pico de masas, se reescribieron por lo difuminado que tenía el espectro original, respetando el valor obtenido en la medición analítica.

En los espectros de MALDI-TOF arriba mostrados se observa un comportamiento similar dado que la apo-Tf y la holo-Tf son isoformas, lo que significa que poseen el mismo peso molecular. Las señales de  $m/z$  de mayor intensidad coincidieron con el peso molecular aproximado de 80 kDa, así como con el ion molecular de aproximadamente 40 kDa (figura 4.2.3). Las demás señales que pudieron cuantificarse correspondieron a asociaciones entre las dos especies predominantes, pues sus valores coincidieron con la suma de éstas. La intensidad de las señales en ambos espectros permitieron evaluar el éxito de la purificación de ambas proteínas tras la cromatografía; a pesar de haber otras señales en el espectro, éstas no son lo suficientemente intensas para considerarlas significativas.

### 4.3. INDUCCIÓN DE AGREGADOS FIBRILARES CON TFE

#### 4.3.1. OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)

La proteína empleada como un sistema control de la fibrilación, el fibrinógeno, presentó morfología semejante a los agregados fibrilares propuestos por Ross y Poirier (2004) cuando se indujo su agregación con TFE. La agregación del fibrinógeno fue inducida con TFE debido a que al modificar la polaridad del medio, éste altera la conformación de las proteínas al modificar las interacciones en su estructura terciaria (Amani y Naeem, 2014). Las imágenes obtenidas (figura 4.3.1.1) muestran una progresión en la complejidad de los agregados de manera proporcional con la concentración de TFE utilizada.

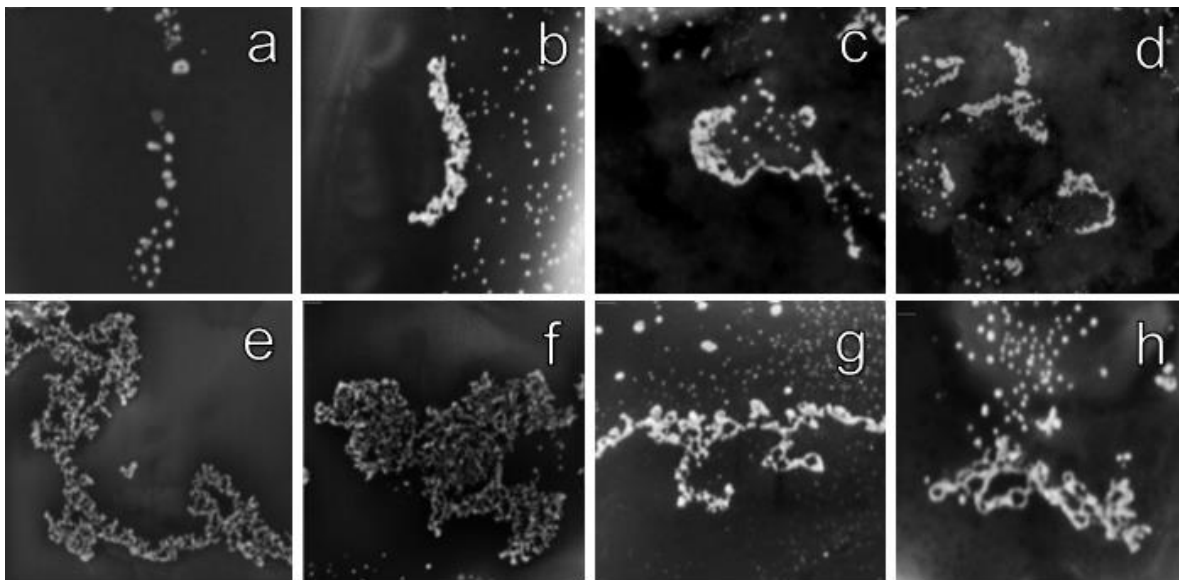
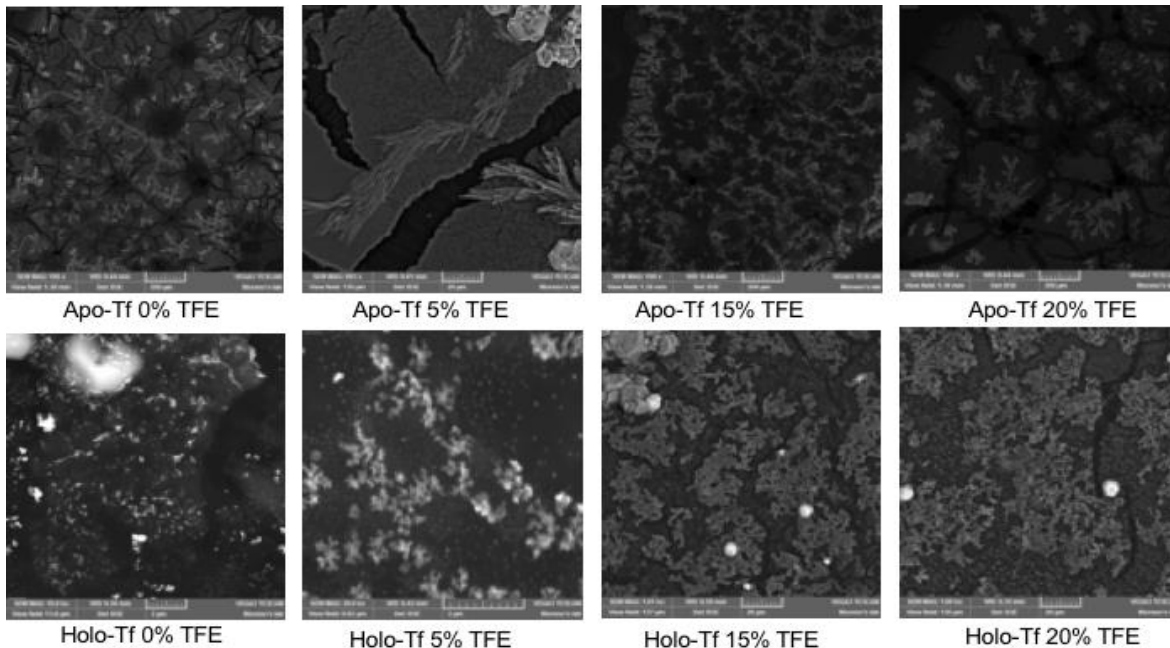


Figura 4.3.1.1. Agregación del fibrinógeno inducida con TFE vista por SEM. a) Control sin TFE, escala: 1  $\mu\text{m}$ . b) 30% TFE, escala: 1  $\mu\text{m}$ . c) 40% TFE, escala: 1  $\mu\text{m}$ . d) 40% TFE, escala: 2  $\mu\text{m}$ . e, f) 50% TFE, escala: 5  $\mu\text{m}$ . g, h) 50% TFE, escala: 1  $\mu\text{m}$ .



Por otro lado, las imágenes que se obtuvieron mediante microscopía de barrido electrónico para apo-Tf y holo-Tf (figura 4.3.1.2) muestran patrones irregulares que no podrían considerarse como agregados fibrilares y que no muestran similitud con lo observado en el caso del fibrinógeno.



*Figura 4.3.1.2. Agregados de apo-Tf y de holo-Tf vistos por SEM. Escala: 200  $\mu\text{m}$  para apo-Tf 0%, 15% y 20% TFE y 20  $\mu\text{m}$  para 5% TFE. 2  $\mu\text{m}$  para holo-Tf 0% y 5% TFE, 20  $\mu\text{m}$  para holo-Tf 15% y 20% TFE. Nota: en el caso de las transferrinas, no se ilustran los resultados obtenidos a concentraciones mayores de TFE debido a que no se observaron imágenes representativas.*

Es importante recordar que el fibrinógeno y las transferrinas son proteínas completamente diferentes en todos los sentidos, por lo que realmente no se esperaba ver la misma morfología, sino el mismo patrón de agregación directamente proporcional a la concentración de TFE ya que ambas se sometieron a un esquema de inducción con el mismo agente inductor. Por otra parte, la presencia de sales del

medio en el que se encontraban las proteínas para mantenerse estables pudo haber interferido con la inducción de los agregados. Además, los depósitos de sales del medio dificultaron la visualización de los agregados al causar ruido en la imagen, como se observa en el caso de la holo-Tf al 0% de TFE en la figura 4.3.1.2. Por lo tanto, como perspectiva a futuro, se sugiere modificar el esquema de inducción empleando un medio diferente para tratar a las proteínas, en el cual se reduzca la interferencia por sales de la solución amortiguadora.

#### 4.3.2. TURBIDIMETRÍA Y DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Al no lograr observar los resultados esperados de la inducción con TFE morfológicamente en el caso de las transferrinas, se recurrió a otras técnicas que permitieron observar el efecto que produjo la adición de TFE. Éstas fueron turbidimetría mediante espectrofotometría UV-Vis y Dispersión de Luz Dinámica.

Las lecturas realizadas en UV-Vis mostraron el patrón progresivo directamente proporcional a la concentración de TFE que se esperaba obtener tomando como base lo observado con el fibrinógeno y los estudios reportados por Amani y Naeem (2014) para la transferrina. Estos resultados se presentan en la página siguiente.

Tabla 4.3.2. Valores de absorbancia a 350 nm en UV-Vis de apo-Tf y holo-Tf tras 48 h de incubación con TFE a diferentes concentraciones.

Apo-Tf 48 h											
% v/v TFE	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
1	0.000	-0.005	0.033	0.403	1.054	1.689	1.750	1.709	1.322	0.895	-0.008
2	0.000	0.002	0.100	0.429	0.917	1.787	1.744	1.763	1.416	1.260	0.006
3	0.000	-0.001	0.044	0.351	1.048	1.822	1.739	1.795	1.518	0.936	0.007
<b>MEDIA</b>	<b>0.000</b>	<b>-0.001</b>	<b>0.059</b>	<b>0.394</b>	<b>1.006</b>	<b>1.766</b>	<b>1.744</b>	<b>1.756</b>	<b>1.419</b>	<b>1.030</b>	<b>0.002</b>
Holo-Tf 48 h											
% v/v TFE	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
1	0.000	-0.009	0.143	0.151	0.276	1.551	1.662	1.609	1.466	1.490	-0.032
2	0.000	0.000	0.121	0.120	0.254	1.572	1.691	1.559	1.132	0.502	-0.039
3	0.000	-0.025	0.075	0.120	0.263	1.594	1.631	1.350	1.197	0.795	-0.043
<b>MEDIA</b>	<b>0.000</b>	<b>-0.011</b>	<b>0.113</b>	<b>0.130</b>	<b>0.264</b>	<b>1.572</b>	<b>1.661</b>	<b>1.506</b>	<b>1.265</b>	<b>0.929</b>	<b>-0.038</b>

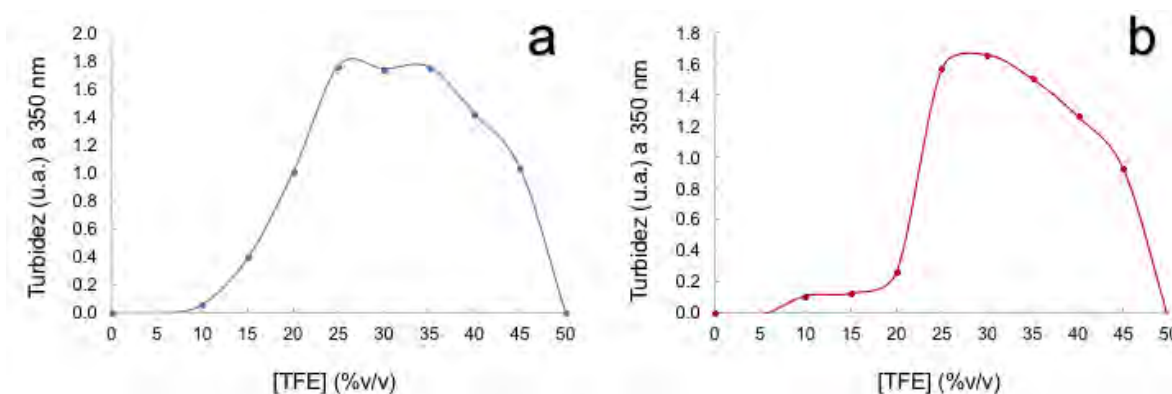


Figura 4.3.2.1. Turbidez de la solución en función de la concentración de TFE tras incubar en el medio con TFE durante 48 h a temperatura ambiente. a) apo-Tf. b) holo-Tf.

Para permitir que se estabilizara el sistema, se realizaron las mediciones después de transcurridas 48 h de incubación de la transferrina con el TFE. Esto produjo mayor agregación de las proteínas en 25% TFE para apo-Tf y en 30% TFE para holo-Tf, comparado con la proteína en su estado nativo (0% TFE). El descenso de absorbancia que rompe con la progresión directamente proporcional fue provocado por el desplegamiento de la proteína a causa de la saturación de TFE en el medio;

es decir, existe un límite de concentración a la cual se observa el comportamiento anterior (Amani y Naeem, 2014).

Los experimentos realizados por DLS complementaron los resultados obtenidos con UV-Vis. Se analizaron solo algunas muestras representativas de acuerdo con el comportamiento ilustrado en la figura 4.3.2, eligiendo las concentraciones de 0%, 5%, 15% y 20% TFE ya que describen el patrón progresivo de agregación de manera muy similar en ambas isoformas de la transferrina.

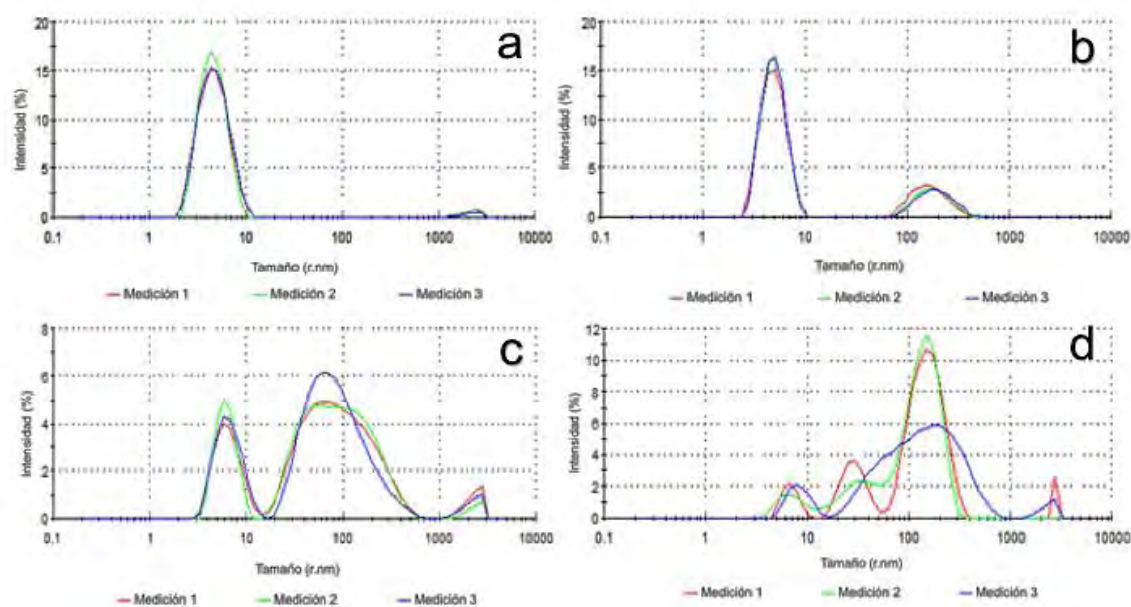


Figura 4.3.2.2. Mediciones en DLS para apo-Tf. Distribución de tamaño en radio hidrodinámico (nm) en términos de intensidad (%) tras 48 h de incubación con TFE a temperatura ambiente. a) Sin TFE. b) 5% TFE. c) 15% TFE. d) 20% TFE.

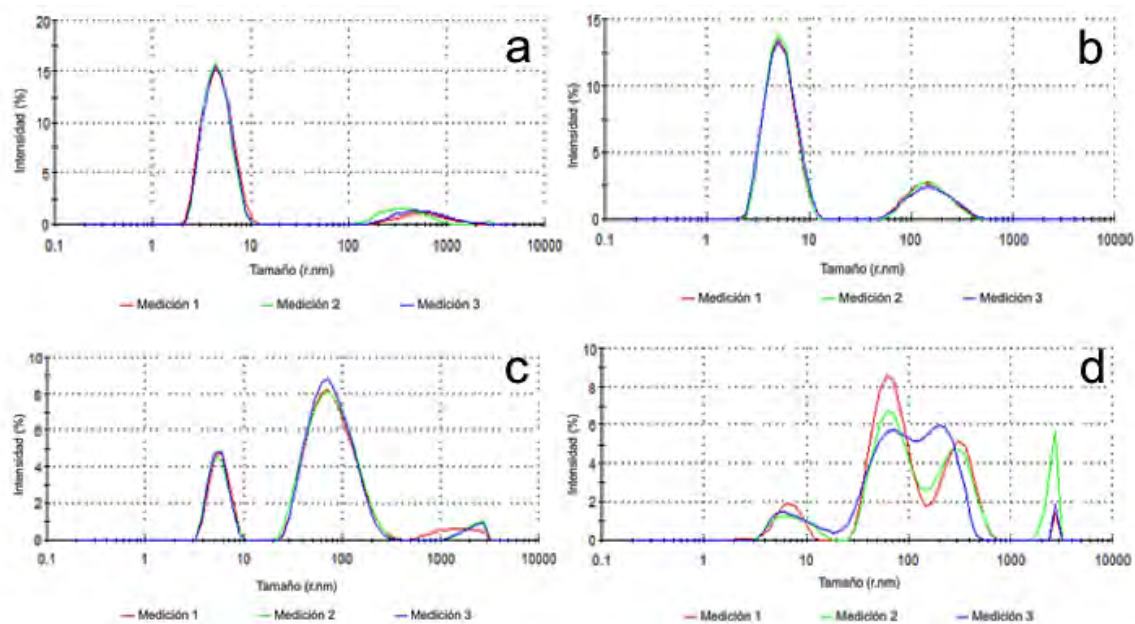
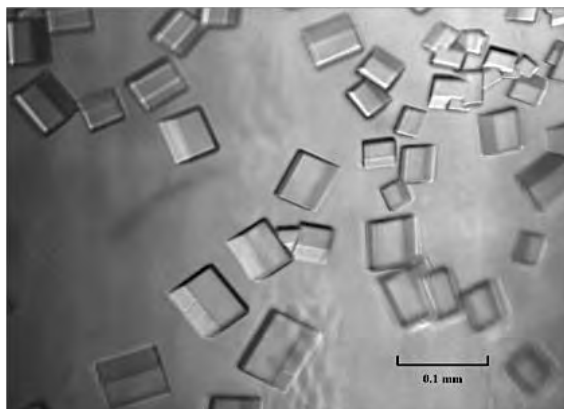


Figura 4.3.2.3. Mediciones en DLS para holo-Tf. Distribución de tamaño en radio hidrodinámico (nm) en términos de intensidad (%) tras 48 h de incubación con TFE a temperatura ambiente. a) Sin TFE. b) 5% TFE. c) 15% TFE. d) 20% TFE.

En las 4 muestras de apo-Tf y holo-Tf se observó el mismo pico en aproximadamente 7 nm (figuras 4.3.2.2 y 4.3.2.3) pero su intensidad disminuyó conforme aumentó la concentración de TFE y al mismo tiempo aumentó la intensidad de la señal que corresponde con especies de mayor tamaño. Por lo tanto, este comportamiento pudo interpretarse como la agregación de las especies presentes en la muestra, mostrando el efecto que tuvo el TFE como inductor de agregación en las transferrinas.

#### 4.4. CRISTALIZACIÓN DE APO- Y HOLO-TRANSFERRINAS

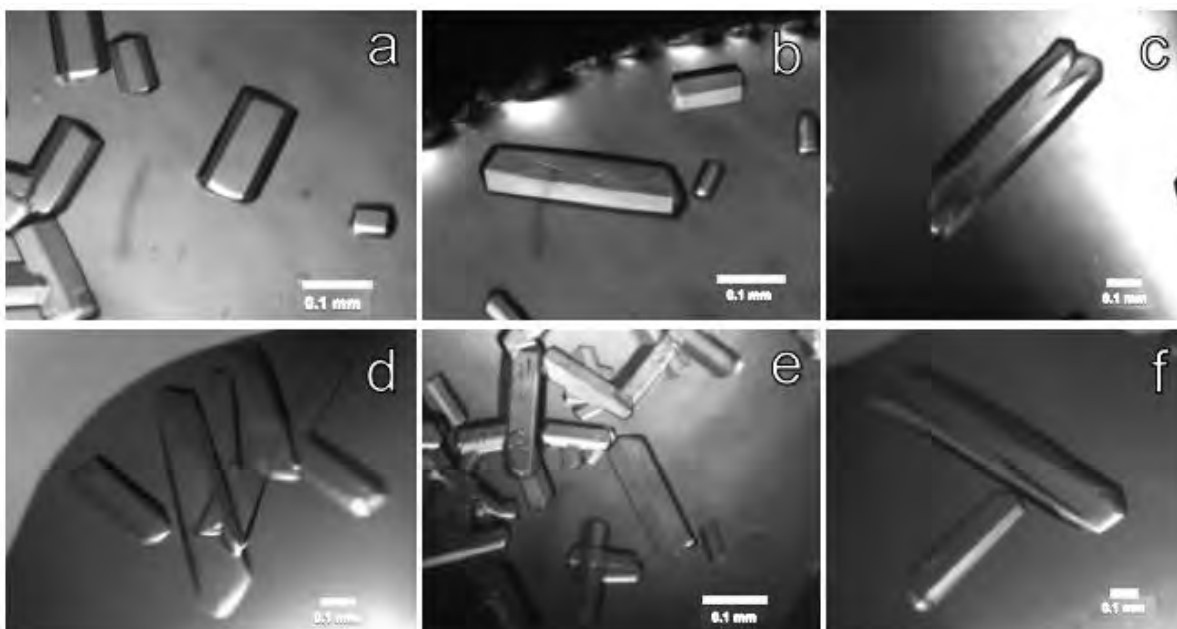


*Figura 4.4.1. Cristales de apo-Tf a concentración de proteína de  $13 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  obtenidos mediante difusión en fase vapor por gota sedente a 291 K*

La pureza de ambas proteínas fue confirmada al cristalizarlas exitosamente. En un primer experimento para probar las condiciones de cristalización, se obtuvieron cristales de apo-Tf a una concentración de proteína de  $13 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  con morfología y tamaño uniformes (figura 4.4.1). A pesar de la morfología aceptable de estos cristales, su tamaño no resultó adecuado para la difracción de rayos X y por ende no se obtuvieron datos para su posterior estudio. Por otra parte, presentaron poca estabilidad ya que se degradaron en pocos días. Ambos problemas pudieron haberse debido a una concentración inadecuada de proteína, pues resultó insuficiente para mantenerse en la zona metaestable discutido en la sección 2.4 (ver páginas 9 y 10).

Considerando lo anterior, se repitió la metodología con una nueva solución de proteína más concentrada tras su purificación, empleando las mismas condiciones

de cristalización en términos de concentración del agente precipitante y temperatura. Los cristales que crecieron en este nuevo experimento se ilustran en la figura siguiente:



*Figura 4.4.2. Imágenes de los cristales de apo-Tf (a, b, c) y de holo-Tf (d, e, f) capturadas tras una semana de crecimiento. Nota: las escalas, todas a 0.1 mm, se reescribieron por lo difuminado que tenían en la imagen original, para mejorar su visualización.*

Los cristales crecidos a una concentración de proteína de  $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , mayor que la anteriormente probada, se mantuvieron estables por mucho más tiempo bajo las mismas condiciones de cristalización. Estos cristales resultaron adecuados para la difracción de rayos X de manera local y por lo tanto se protegieron en los dispositivos de poliolefina descritos en la sección para su traslado a las instalaciones de radiación sincrotrón.

## 5. DISCUSIÓN

De acuerdo con Naeem et al. (2016), la agregación del fibrinógeno sigue una cinética de primer orden y es intrínsecamente desordenada, lo que explica el patrón de agregación. No se observó una morfología amiloide ya que esta proteína no figura entre aquellas halladas en las inclusiones características de las enfermedades neurodegenerativas; no obstante, la morfología que adoptó al interactuar con el TFE simula los precursores de los agregados fibrilares propuestos por Ross y Poirier (2004). Por lo tanto, fue válido considerar la morfología del fibrinógeno en presencia de TFE como un marco de referencia para comparar la agregación inducida por TFE en las transferrinas bajo las mismas condiciones. La agregación de las transferrinas no tuvo la misma morfología que el fibrinógeno ni mostró una morfología amiloide. Sin embargo, sí se observó, a través de turbidimetría y DLS, un cambio comparable con lo realizado con el fibrinógeno, ya que se observó el patrón de agregación progresivo y proporcional a la concentración de TFE en las primeras concentraciones de este agente inductor. Los estudios previamente realizados por Amani y Naeem (2014) respaldan lo obtenido en este trabajo, así que se comprobó que la metodología es reproducible. Asimismo, se abre paso para indagar sobre las consecuencias en el transporte de hierro al SNC que implica la agregación de la transferrina, y se recalca la importancia de conocer su estructura completa para analizar los eventos patológicos en los que puede estar involucrada.

La resolución estructural de la apo-transferrina fue llevada a cabo mediante



diferentes programas de cristalografía que se citan a continuación. El método utilizado para calcular las fases de los datos de difracción de rayos X fue el de reemplazamiento molecular automatizado empleando el programa Phenix (Adams et al., 2010), dado que se contaba con una estructura similar ya reportada (RCSB PDB, 2018). Este método comparó los datos experimentales de los cristales obtenidos con los reportados en el PDB superponiendo ambos modelos moleculares. Para ello, a partir de la rotación en tres dimensiones y la traslación en cada orientación del modelo conocido, se calcularon los factores estructurales. Este cálculo fue comparado con los valores experimentales obtenidos con la difracción. Así, se identificó la orientación de la molécula reportada que mejor coincidiera con la molécula en el cristal. De igual manera, se probó el modelo en todas las posiciones posibles dentro de la celda unidad y se calculó la concordancia entre los factores estructurales nuevamente (Flores-Ibarra, 2017).

Posterior al reemplazamiento molecular, se realizó el afinamiento cristalográfico automatizado, el cual consiste en el mejoramiento del mapa de densidad electrónica calculado a partir de las fases estimadas previamente. Para ello, se repitieron varios ciclos en los cuales se eliminó el ruido ocasionado por el solvente, agudizando las propiedades de la región proteica.

Posteriormente, se visualizó el resultado preliminar del mapa de densidad electrónica alrededor de la cadena aminoacídica y se realizaron las correcciones manualmente mediante el programa Coot (Emsley, Lohkamp, Scott, Cowtan, 2010). Además, con éste se calcularon parámetros estereoquímicos para validar el modelo, tales como los valores de Ramachandran (Ramachandran y Sasisekharan, 1968) para los ángulos de los residuos (Flores-Ibarra, 2017).

Finalmente, se llevó a cabo otra serie de ciclos de afinamiento automatizado en Phenix y se obtuvieron las estadísticas finales de calidad del cristal.

*Tabla 5.1. Estadísticas de la colecta de datos y del afinamiento de la apo-Tf*

<b>Longitud de onda (Å)</b>	1.54
<b>Intervalo de resolución</b>	41.57 - 3.508 (3.633 - 3.508)
<b>Grupo espacial</b>	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Celda unidad</b>	84.99 101.418 200.327 90 90 90
<b>Multiplicidad</b>	9.9
<b>Compleitud (%)</b>	99.50 (98.63)
<b>Promedio I/sigma(I)</b>	1.9
<b>Factor B de Wilson</b>	67.74
<b>CC<sub>1/2</sub></b>	69.6
<b>Rwork</b>	0.2305 (0.4512)
<b>Rfree</b>	0.3069 (0.5518)
<b>Ramachandran favorecidos (%)</b>	86.28
<b>Ramachandran permitidos (%)</b>	12.39
<b>Ramachandran atípicos (%)</b>	1.34

Tal como describe la tabla 5.1, la mayor resolución obtenida para la apo-Tf fue de 3.5 Å, un valor aceptable para lograr visualizar la estructura cristalográfica de esta proteína, considerando la dificultad para obtener cristales que difracten a alta resolución (1.2 Å). El valor de I/sigma(I) está relacionado con el empaquetamiento

interno del cristal; por lo tanto un valor alto implica mayor calidad. En este caso el valor fue bajo, pero cabe recalcar que es un parámetro relacionado con la resolución y por lo tanto es un valor coherente. El factor B de Wilson es un indicador de calidad cristalina de proteínas ya que mide el desplazamiento térmico, es decir, el desorden a nivel molecular de los átomos dentro del cristal; por ende, su valor generalmente se espera que sea lo menor posible. En el presente caso este valor fue relativamente elevado dada la resolución obtenida. El valor con el que se evalúa la calidad del afinamiento de los datos se conoce como *R-factor* y determina la diferencia relativa entre los factores estructurales observados y los calculados para el modelo teórico. Éste se clasifica en los valores de  $R_{free}$  y  $R_{work}$ , los cuales evalúan una muestra representativa de datos del modelo y al conjunto total de datos, respectivamente. Un modelo de mayor calidad posee valores bajos de estos parámetros, lo más cercano posible a 0, y la diferencia entre ambos es lo menor posible. Para el caso particular de las proteínas, valores cercanos a 0.2 son aceptables. Los valores de  $R_{free}$  y  $R_{work}$  tras el afinamiento disminuyeron considerablemente (tabla 5.2) y demostraron que se produjo una mejoría en el modelo estructural.

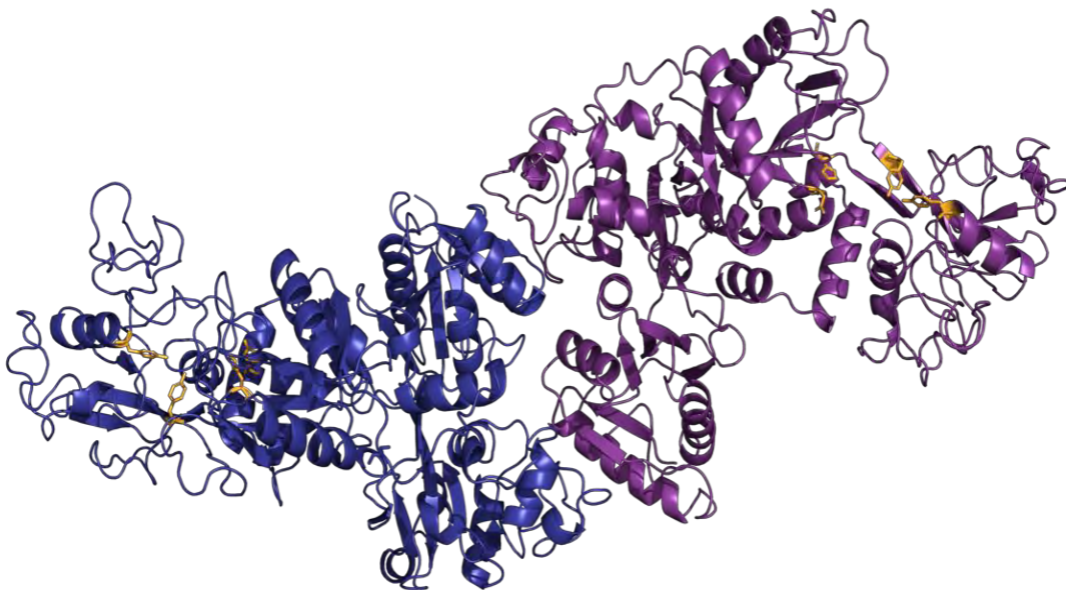
Tabla 5.2. Valores de  $R_{work}$  y  $R_{free}$  antes y después del afinamiento.

	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>
<b>Rwork</b>	0.2669	0.2305
<b>Rfree</b>	0.3075	0.3069

El parámetro  $CC_{1/2}$  refleja la fidelidad de los datos colectados al discernir entre la señal efectiva y las señales de ruido; entonces, su valor es proporcional a la calidad

de los datos. Un valor de 50% es suficiente para considerarse adecuado, así que el valor de 69.6% que se obtuvo es aceptable (Diederichs, 2014). Los valores de Ramachandran obtenidos demostraron que el afinamiento manual mejoró la calidad del modelo en términos de los ángulos de los residuos, pues a pesar de haber obtenido un porcentaje de atípicos, éste fue bajo.

Finalmente, se hizo uso del programa PyMOL (DeLano, 2002), herramienta útil para editar la estética de la estructura tridimensional obtenida. Con ésta, se colorearon por separado las dos cadenas que conforman a la apo-Tf, así como los aminoácidos implicados en la coordinación con el hierro en el caso de encontrarse en la isoforma holo-Tf.



*Figura 5.1. Modelo de la estructura 3D de la apo-Tf obtenido tras el procesamiento de datos. En color naranja se resaltan los aminoácidos que se coordinan con el ion férrico.*

A continuación, se presenta la tabla de estadísticas de los datos que fueron colectados en las instalaciones de radiación sincrotrón del Laboratorio Nacional de Brookhaven, en contraste con los datos colectados de manera local en el LANEM.

*Tabla 5.3. Comparación de las estadísticas de la colecta de datos de difracción de rayos X de la apo-Tf realizada de manera local y en un sincrotrón. La interpretación de los parámetros comparados se encuentra en párrafos anteriores.*

	<b>Fuente de rayos X local</b>	<b>Instalaciones sincrotrón</b>
<b>Longitud de onda (Å)</b>	1.5418	0.9184
<b>Intervalo de resolución (Å)</b>	41.57-3.51 (3.63-3.51)	29.60 - 2.91 (2.99 – 2.91)
<b>Grupo espacial</b>	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$
<b>Celda unidad (Å)</b>	$a=84.99, b=101.41, c=200.327$	85.40 101.60 199.60
<b>Reflexiones totales</b>	221910	253338 (13314)
<b>Reflexiones únicas</b>	22370	37976 (2411)
<b>Multiplicidad</b>	9.9	6.7 (5.5)
<b>Compleitud (%)</b>	99.9	98.8 (86.6)
<b>Promedio I/sigma(I)</b>	1.9	12.20 (1.30)
<b>R-merge</b>	16.3	0.100 (0.728)
<b>CC<sub>1/2</sub></b>	69.6	99.8 (81.3)

Esta información demuestra que un sincrotrón tiene una fuente más poderosa de radiación con la cual pueden colectarse datos de mayor resolución, ya que con ella se obtuvo un valor de resolución de 2.9 Å. Esto representa una posibilidad para obtener datos de mayor calidad en un futuro.

## 6. CONCLUSIONES

El patrón de agregación que se observó demostró que incluso proteínas solubles como las transferrinas tienden a agregarse por alteraciones en su medio. Por lo tanto, este fenómeno no es exclusivo de las proteínas estudiadas en enfermedades neurodegenerativas, sino que diferentes proteínas pueden comportarse de manera similar bajo el efecto de agentes que modifican su estructura.

La agregación de la transferrina puede tener como consecuencia un transporte anormal de hierro hacia el SNC, lo cual deberá analizarse en estudios posteriores para corroborar su relación con enfermedades neurodegenerativas.

El modelo tridimensional de la estructura cristalográfica de la apo-Tf que se obtuvo concuerda con el reportado en el PDB, demostrando que los datos colectados de difracción de rayos X proporcionaron la información necesaria para resolver y analizar la estructura de esta proteína.

La radiación sincrotrón es una fuente poderosa que provee datos de difracción de rayos X de mayor resolución, con los cuales se puede llevar a cabo la resolución estructural de las proteínas con una mayor calidad.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica D*, 66, 213-221.

Amani, S. y Naeem, A. (2014) Transition of transferrin from native to fibrillar state: An implication for amyloid-linked diseases. *Biochemical Engineering Journal*, 91,120-128.

Andrews, N. C. (1999) Disorders of Iron Metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 341,1986-1995.

Baker, E. N. (1994) Structure and reactivity of transferrins. *Advances in Inorganic Chemistry*, 41, 389-463.

Belaidi, A. y Bush, A. I. (2016) Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *Journal of Neurochemistry*, 139,179-197.

DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC. Disponible en: <https://pymol.org/>

Diederichs, K. (2014) Data quality indicators. CCP4. (En línea). Disponible en: [https://www.ccp4.ac.uk/schools/DLS-2014/course\\_material/day05/Kay\\_Diederichs\\_Data\\_quality\\_indicators.pdf](https://www.ccp4.ac.uk/schools/DLS-2014/course_material/day05/Kay_Diederichs_Data_quality_indicators.pdf). Último acceso: 01 agosto 2018.

Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallographica*, 66, 486-501.

Flores-Ibarra, A. (2017) Structural characterization of Galectin-3 and Galectin-Related Protein by X-ray crystallography. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid, 36-38.

Hare, D. J.; Doecke, J. D.; Faux, N. G.; Rembach, A.; Volitakis, I.; Fowler, C. J.; Grimm, R.; Doble, P. A.; Cherny, R. A.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Roberts, B. R. (2015) Decreased Plasma Iron in Alzheimer's Disease Is Due to Transferrin Desaturation. *ACS Chemical Neuroscience*, 6, 398-402.

Kollman, J. M.; Pandi, L.; Sawaya, M. R.; Riley, M.; Doolittle, R. F. (2009) Crystal Structure of Human Fibrinogen. *Biochemistry*, 48, 3877-3886.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Mizutani, K.; Toyoda, M.; Mikami, B. (2012) X-ray structures of transferrins and related proteins. *Biochimica et biophysica Acta*, 1820, 203-211.

Moreno, A. (2017) Advanced Methods of Protein Crystallization. *Methods in Molecular Biology*, 1607, Ch. 3, 51-76.

Moreno, A. Protein crystallogenesis and crystallochemistry. *Advances in Protein Physical Chemistry*, Kerala, Transworld Research Network, 2008.



Naeem, A.; Bhat, S. A.; Iram, A.; Khan, R. H. (2016) Aggregation of intrinsically disordered fibrinogen as the influence of backbone conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 603, 38-47.

Oficina de Información Científica y Tecnológica para el Congreso de la Unión. (2018) Fuente de luz Sincrotrón. *INCYTU*, 003, 1-6.

Pellegrino, S. (2012) Figure A2. ResearchGate. (en línea) Disponible en: [https://www.researchgate.net/figure/Figure-A2-The-crystallization-process-can-be-explained-by-the-following-phase-diagram\\_fig58\\_280046956](https://www.researchgate.net/figure/Figure-A2-The-crystallization-process-can-be-explained-by-the-following-phase-diagram_fig58_280046956) Último acceso: 02 agosto 2018.

Quarles, Jr., C. D.; Brumaghim, J. L.; Marcus, R. K. (2010) Simultaneous multiple element detection by particle beam/hollow cathode-optical emission spectroscopy as a tool for metallomic studies: Determinations of metal binding with apo-transferrin. *Metallomics*, 2, 154-161.

Ramachandran, G. N. y Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 23, 283-438.

RCSB Protein Data Bank. 2HAV. (en línea) Disponible en <http://www.rcsb.org/3d-view/2HAV>. Último acceso: 16 julio 2018.

Ross, C. A. y Poirier, M. A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10, S10-S17.

Spires-Jones, T. L.; Attems, J.; Thal, D. R. (2017) Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 134, 187-205.

Wally, J.; Halbrooks, P. J.; Vonrhein, C.; Rould, M. A.; Everse, S. J.; Mason, A. B.; Buchanan, S. K. (2006) The Crystal Structure of Iron-free Human Serum Transferrin Provides Insight into Inter-lobe Communication and Receptor Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 24934-24944.

Ward, R. J.; Zucca, F. A.; Duyn, J. H.; Crichton, R. R.; Zecca, L. (2014) The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurology*, 13, 1045-1060.

Weisel, J. W. (2005) Fibrinogen and fibrin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 247-299

## 8. APÉNDICE

### 8.1. SOLUCIONES

- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA 20 MM DE FOSFATOS Y 154 MM NaCl PH 7

Se preparó con fosfato de potasio dibásico anhidro ( $K_2HPO_4$ , Sigma-Aldrich PharmaGrade USP), fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ , Sigma-Aldrich 99.988%) y cloruro de sodio (NaCl, Sigma-Aldrich  $\geq 99\%$ ) en agua desionizada (Milli-Q).

- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA 50 MM TRIS-HCL Y 20 MM  $Na_2CO_3$  PH 8.0 (*BUFFER A*)

Se preparó con trizma base ( $C_4H_{11}NO_3$ , Sigma-Aldrich  $\geq 99.9\%$ ), trizma hydrochloride ( $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ , Sigma-Aldrich SigmaUltra), carbonato de sodio anhidro ( $Na_2CO_3$ , Sigma-Aldrich 99.9%) en agua desionizada (Milli-Q), empleando HCl (Sigma-Aldrich) para ajustar el pH.

- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA 50 MM TRIS-HCL, 20 MM  $Na_2CO_3$  Y 150 MM NaCl PH 8.0 (*BUFFER B*)

Se preparó de igual manera que *buffer A*, adicionando cloruro de sodio (NaCl, Sigma-Aldrich  $\geq 99\%$ ) en agua desionizada (Milli-Q).

- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA 20 MM TRIS-HCL, 20 MM  $Na_2CO_3$  + 200 MM NaCl PH 8.0 (*DIÁLISIS*)

- SOLUCIÓN 1.0 M NaCl

- SOLUCIÓN 20% ETANOL

Se preparó con etanol ( $C_2H_6O$ , Sigma-Aldrich  $\geq 99.5\%$ ) en agua desionizada (Milli-Q).

## **8.2. ARTÍCULO PUBLICADO**

Article

# Novel Devices for Transporting Protein Crystals to the Synchrotron Facilities and Thermal Protection of Protein Crystals

Andrea Flores-Ibarra <sup>1</sup> , Camila Campos-Escamilla <sup>1</sup>, Yasel Guerra <sup>2</sup> , Enrique Rudiño-Piñera <sup>2</sup>, Nicola Demitri <sup>3</sup>, Maurizio Polentarutti <sup>3</sup>, Mayra Cuéllar-Cruz <sup>4</sup> and Abel Moreno <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, UNAM, 04510 Ciudad de México, México; andreaifi@outlook.com (A.F.-I.); camila.cescamilla@gmail.com (C.C.-E.)

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca Morelos, Mexico; yaselg@ibt.unam.mx (Y.G.); rudino@ibt.unam.mx (E.R.-P.)

<sup>3</sup> Elettra—Sincrotrone Trieste, S.S. 14 km 163.5 in Area Science Park, 34149 Basovizza-Trieste, Italy; nicola.demitri@elettra.eu (N.D.); maurizio.polentarutti@elettra.eu (M.P.)

<sup>4</sup> Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N C.P., 36050 Guanajuato, México; cuellarmay@yahoo.com.mx

\* Correspondence: carcamo@unam.mx; Tel.: +52-55-56224467

Received: 10 August 2018; Accepted: 20 August 2018; Published: 23 August 2018



**Abstract:** In this article, we use novel and non-conventional devices, based on polyolefins that help to increase the thermal protection of protein crystals in their crystallization conditions for crystallographic applications. The present contribution deals with the application of some ad hoc devices designed for transporting protein crystals to the synchrotron facilities. These new devices help transporting proteins without cryo-cooling them, therefore replacing the conventional dry Dewars. We crystallized four model proteins, using the classic sitting-drop vapor diffusion crystallization setups. The model proteins lysozyme, glucose isomerase, xylanase, and ferritin were used to obtain suitable crystals for high-resolution X-ray crystallographic research. Additionally, we evaluated the crystallization of apo-transferrin, which is involved in neurodegenerative diseases. As apo-transferrin is extremely sensitive to the changes in the crystallization temperature, we used it as a thermal sensor to prove the efficiency of these thermal protection devices when transporting proteins to the synchrotron facilities.

**Keywords:** lysozyme; glucose isomerase; xylanase; ferritin; insulin; apo-transferrin; crystal growth in solution; gel-growth; conventional and non-conventional methods of protein crystallization

## 1. Introduction

Currently, X-ray biocrystallography is one of the most powerful tools for obtaining the three-dimensional (3D) structure of some rather special target molecules. However, well-diffracting crystals are mandatory in order to obtain the 3D structure, so they can be applied in life sciences and biomedical research [1,2]. These X-ray diffraction techniques are not the only way to obtain the 3D structure of biological macromolecules [3–11]. In spite of all the different methods available for obtaining the 3D structures, we have yet a lot to learn from the investigations based on the crystallogenes research of proteins [12,13]. The chemical properties of protein solutions such as the chemical potential (driving force in protein crystallization), ionic strength (concentrations of reactants), pH values to play with the isoelectric point of proteins [14] as well as their physical parameters like pressure and temperature are still poorly explored [14–16].

At present, we have not many investigations that deal with the role of temperature for protein crystallization [17–21], though we still find a few. Budayova-Spano et al., have developed new strategies and devices to grow big crystals for neutron diffraction [22], and for protein crystallization using buttons of dialysis [23,24]. Vessler et al., have even considered the temperature as a practical physicochemical parameter to play around the solubility diagram for growing, dissolving, and controlling the size and shape of some protein crystals [25,26]. We also find some screenings for cycling temperature strategies to improve the crystallization efficiency [27], as well as approaches based not only on controlling the temperature in small droplets (like the TG40 device developed by Juárez-Martínez et al.) [28], but also controlling the humidity when collecting X-ray data in situ [29]. However, the use of temperature to search for different polymorphs in protein crystallization research has rarely been explored [18,30,31].

On the other hand, we have apo-transferrins, which are challenging proteins biomolecules for crystallization and for obtaining high-resolution three-dimensional crystallographic structures, as they are very sensitive to temperature. Apo-transferrins also play an important role in neurodegenerative diseases and a in the transport of iron to the brain [32–35].

In this contribution, we evaluated the thermal protection of proteins by using novel polyolefin-made devices to transport model protein crystals and apo-transferrin crystals to the synchrotron facilities at room temperature. The crystal structure and the electron density maps of the best crystals showed well-defined, and distinctly separated atoms at the selected aromatic residues, as indicators of the highest X-ray protein crystal-quality. We used human transferrins, not only for their implication in neurodegenerative disorders, but also for their role as thermal sensors. Transferrins are extremely sensitive to the changes in the crystallization temperature. This contribution deals with the importance of temperature control to avoid damaging protein crystals when being transported to synchrotron facilities. These thermal protection devices are promising containers for transporting, and protecting biological macromolecules for X-ray data collection at the synchrotron facilities, substituting the conventional dry Dewars.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Protein Crystallization Conditions and Cryo-Protection

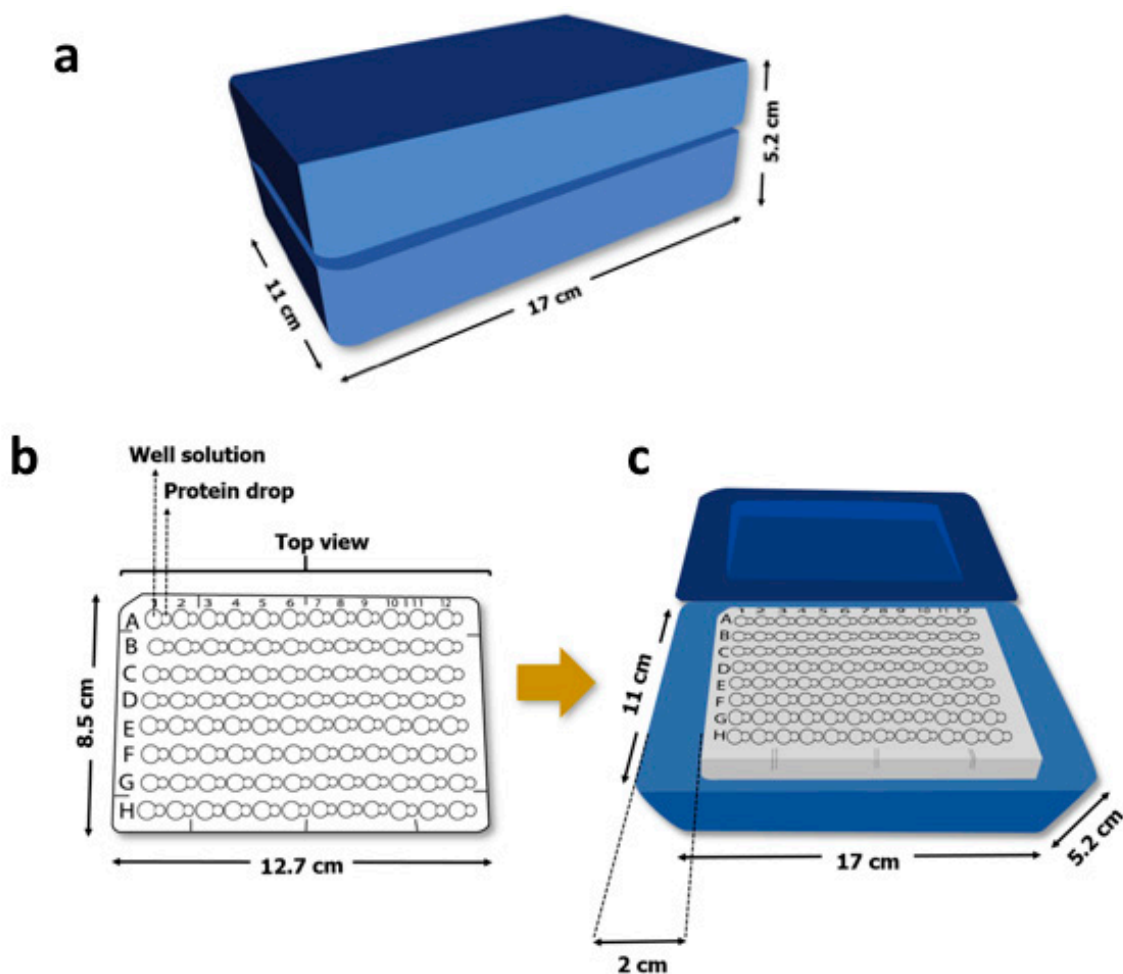
The first model protein used for these experiments was lysozyme (Seikagaku Co., Minato-ku, Tokyo.); the second was glucose isomerase (Hampton Research Corporation, Aliso Viejo, CA, USA); the third model protein was xylanase (Hampton Research Corporation Ca. No. HR7-104); and the final fourth was ferritin from horse spleen (Sigma, St. Louis, MS, USA). All these proteins were crystallized using the classical sitting drop vapor-diffusion set up, fixed at 18 °C. The droplets of 2 µL were gently mixed 1:1 protein and precipitating agent, the well of Qiagen plates was filled with 500 µL whereas the plates of 96 wells and the disposables plastic inserts of the TG40 were filled with 40 µL. For lysozyme a solution of 120 mg/mL was prepared in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.5. The precipitating agent, 60 mg/mL NaCl, was prepared using the same buffer solution. For glucose isomerase the crystallization conditions consisted of a typical protein concentration of 30 mg/mL and, as precipitating agent, we used 200 mM ammonium acetate buffer pH 7.0, 30% (*w/v*) PEG 6000. In the case of xylanase, it had to be prepared prior to crystallization by diluting the stock solution (36 mg/mL) with sterile filtered deionized water. The precipitating agent was a mixture of ammonium sulfate 1.2 M and sodium iodide 1 M. The droplets were prepared 1:1 protein and precipitating agent. We would like to remark that in ammonium sulfate the solubility of xylanase crystals increases exponentially as temperature rises [36]. Finally, the last model protein ferritin (75 mg/mL) was crystallized by mixing 1:1 protein and precipitating agent (0.8 M ammonium sulfate prepared in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 and 60 mM cadmium sulfate). In the case of lysozyme, we used as a cryoprotectant 30% (*v/v*) PEG-1000 mixed with mother liquor of NaCl (precipitating agent), however, for this particular protein, lower concentrations of its cryo-protectant (in this case NaCl/PEG-1000 and mother liquor) proved not to

be efficient since the crystals were dissolved and damaged. Consequently, ice rings were observed in lower concentrations of this cryo-protectant. In the case of glucose isomerase, the best cryo-protectant was its own precipitating agent. For the rest of the proteins the cryo-solution was prepared by mixing the precipitating agent with 30% (*v/v*) glycerol.

Particularly, apo-transferrin was purchased with a purity of 98%. Lyophilized human serum apo-transferrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reconstituted in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, and 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, at a protein concentration of 5 mg/mL. The protein was applied to a 5 mL anion exchange HiTrap Q HP column (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA), attached to a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (Pharmacia, Pfizer, NJ, USA), and equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, and 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The protein was eluted using a linear gradient from 0 to 150 mM NaCl over 4 column volumes. Peak fractions of the protein were pooled and dialyzed overnight into 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 200 mM NaCl. In order to crystallize the apo-transferrin, the protein was centrifuged at a controlled temperature in a DuPont centrifuge using an Amicon Ultra-15 Ultracel-5k tube (Millipore, Burlington, MA, USA) to a protein concentration of 30 mg/mL. Crystals were obtained by sitting-drop vapor diffusion technique with a well solution of PEG/Ion Screen #48 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) consisting of 0.2 M ammonium citrate, and 20% (*w/v*) PEG 3350, adjusted to a pH 7. In order to find the best temperature for the crystallization of apo-transferrin, we fixed 8 crystallization experiments at 5 different temperatures, ranging from 12 to 20 °C (increasing in 2 °C increments)—using a TG40 apparatus (Centeo BioSciences-Blacktrace, Royston, UK). Different temperatures were carefully tested, being the 18 °C the one yielding the best crystals. The apo-transferrin crystals were cryoprotected with 50% (*w/v*) trehalose solution (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA) mixed 1:1 with the precipitating agent.

## 2.2. Crystal Growth Devices

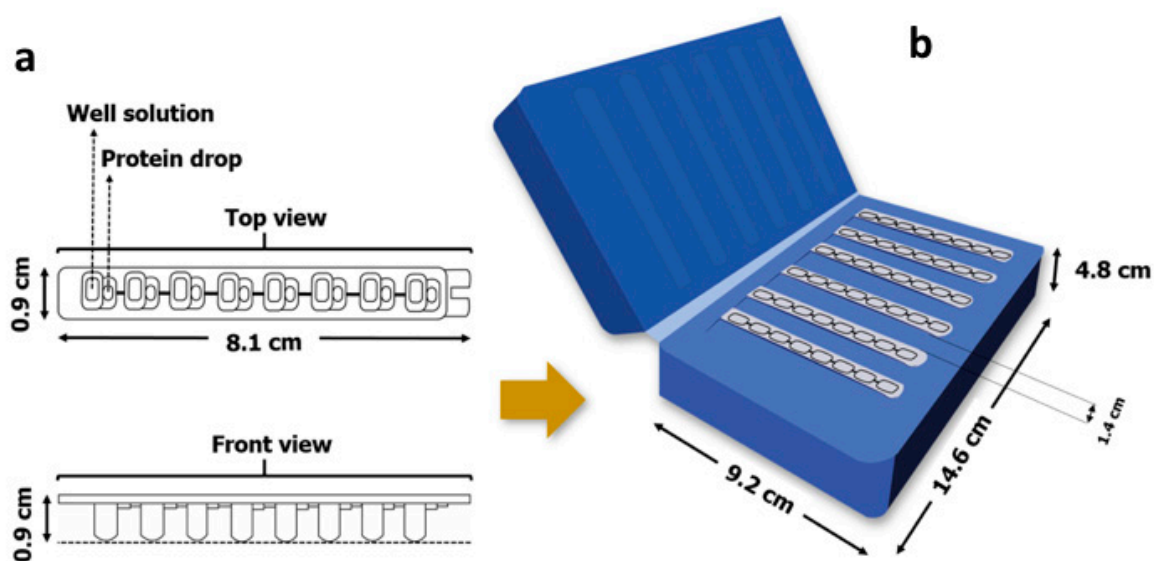
As most proteins are sensitive to changes in temperature, there is basically a specific range of very few degrees where protein crystals can keep stable and suitable for crystallization. Phase diagrams are generally very useful to improve the crystallization conditions. However, these diagrams are not always available for the majority of proteins [13–16]. This is why one of the main issues when transporting proteins to synchrotron facilities is temperature (temperature is crucial in the crystallization process). In order to keep a stable low temperature, proteins must be cryo-protected, frozen and transported in dry Dewars following the International Air Transport Association (IATA) procedures for carrying biological crystals. However, on the unfortunate occasions in which we had been revised by some poorly trained custom officers, the Dewars had been opened, and the crystal damaged due to thermal shock. The problem is obvious. In order to prevent future damage of crystals in airport revisions, we worked at designing new devices that will help us to carefully transport them to the synchrotron facilities. These are novel devices made of a patented polymer (polyolefin: US patent US 7,971,744 with a density of 32.04 kg/cm<sup>3</sup>), that can resist ranges of temperatures, from –160 °C up to 50 °C, without altering the quality of the protein crystals transported inside. Figures 1–3 show the dimensions of these new devices, which consisted of a rectangular piece of this porous polyolefin with some perforations inside adapted to the conventional and commercially available crystallization plates. The protein crystals, once inside the polymeric devices, are then suitable to be transported even in a regular suitcase without problem. We have already tested these devices by crystallizing some model proteins and transporting them to the synchrotron in terms of checking their efficiency as thermal protectors. The beamline XRD1 of ELETTRA synchrotron located in Trieste Italy, was the facility where the X-ray data collection was performed [37]. Figure 1 shows the first thermal protection device applicable to the 96 well-plates, which are commercially available.



**Figure 1.** This device can support all types of the conventional plates for vapor diffusion set up in hanging and sitting-drops techniques: (a) An overview of the device and dimensions; (b) crystallization plate (96 wells) and (c) insertion of the crystallization plate.

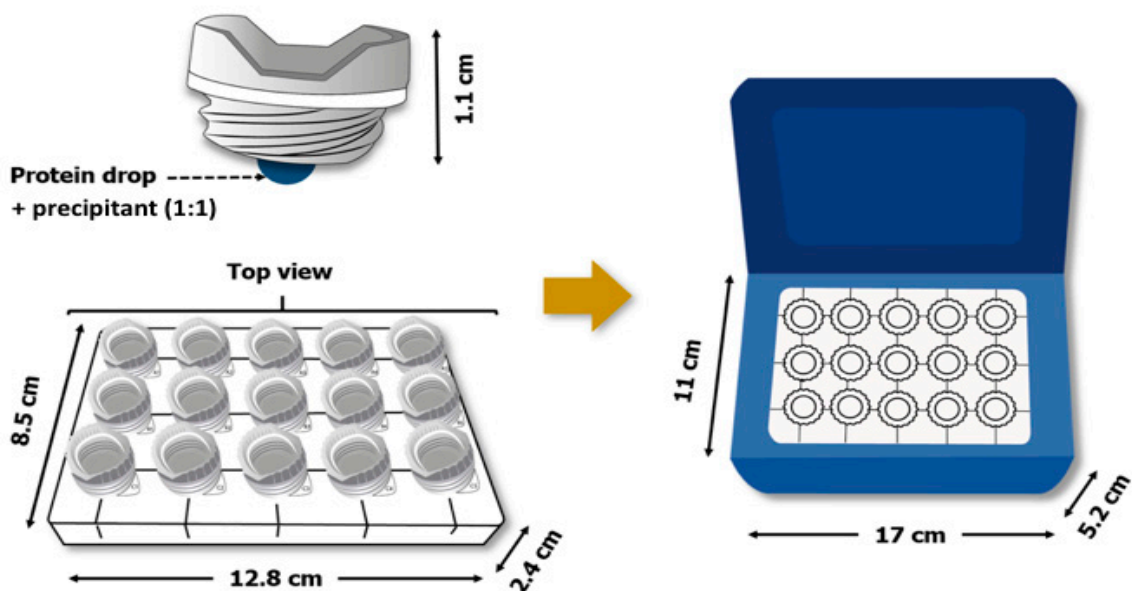
The second thermal protection device was designed for the crystallization assays, when using a TG40 temperature controller from Centeo Biosciences (Blacktrace Holdings, UK) (Figure 2). The classic vapor diffusion method in a sitting-drop set up is fixed using 40  $\mu\text{L}$  of the mother liquid and drops of 1  $\mu\text{L}$  of protein plus the same amount of precipitating agent. It is important to remark that these plastic disposables inserts are usually closed with adhesive (tape) to prevent evaporation. Basically, the TG40 temperature controller uses plastic disposable inserts that can be introduced in the empty six lanes made on the device (Figure 2). The TG40 allows to fix eight experiments of protein crystallization at five different temperatures at the same time. Once the crystallization experiment is finished the plastic disposables inserts are taken and located into the thermal protection device for transportation. We must emphasize that this device (Figure 2) must be (a) perfectly closed, and (b) transported in vertical position to the synchrotron facility, to avoid leaking of the precipitating agent into the crystallization droplet. The thermal protection devices kept the temperature of the internal part of the crystallization experiment stable during the whole trip. It is important to have stable crystals to obtain a proper X-ray diffraction as shown later on in the results part.





**Figure 2.** This shows the dimensions and experimental details of the (a) top and front view of the plastic disposable inserts used in the TG40 apparatus and (b) the general overview and dimensions of the thermal protection device.

The third type of thermal protection device is related to the use of Qiagen plates (formerly called Nextal plates), where the cover slip has a screw system to close the wells properly (Figure 3). A preliminary prototype of these devices for growing crystals in capillary tubes under the presence of strong magnetic fields based on the same polyolefin was evaluated in our previous publication [30].



**Figure 3.** This shows the design of the thermal protection device, when using the Qiagen plates for protein crystallization. On the top left hand-side the cover slip with screw system contains the protein drop mixed with precipitating agent. On the right hand-side the thermal protection device with its dimensions.

All protein crystals were prepared in the best crystallization conditions previously established in the laboratory to get high resolution crystals, except for the case of apo-transferrin, which the maximum resolution reported has been done up to 2.9 Å [32]. Then these crystals were tested at home diffractometer in order to check the maximum diffraction. Afterwards, a set of fresh crystals was prepared following the same procedure, and the samples were transported and diffracted at the synchrotron facility.

### 2.3. X-ray Data Diffraction and Data Processing

Once the protein crystals were harvested from the solution, they were cryo-protected for X-ray data collection. X-ray diffraction data sets were collected using the X-ray facilities of the synchrotron, with hybrid pixel PILATUS (Dectris, Baden-Daettwil, Switzerland) detector, under cryogenic conditions at 100 K. The crystal-to-detector distance was set to get maximum resolution. Data collection strategies included high redundancy data and each sample was rotated using 0.25° increments. The HKL3000 suite [38], and XDS [39] were used to process, merge, and scale all datasets.

Initial phases for all crystals were determined by molecular replacement with the program Phaser implemented in Phenix platform [40] using the atomic coordinates taken from previously determined data sets in the protein data bank (PDB) (153L, 1MNZ, 3AKP, 4DE6, for lysozyme, glucose isomerase, xylanase and ferritin respectively), after ligands, alternative conformations, heteroatoms and water molecules were refined up to the available resolution. Map inspection, model building, and manual refinement were done with Coot [41] and further rounds of refinement were done with Phenix [42]. Figures were produced using the program PyMol [43].

## 3. Results and Discussion

We collected the X-ray diffraction of these protein crystals (blanks) at inhouse X-ray facility (Table 1) in order to be compared with those crystals diffracted at very high resolution at the synchrotron facility. The crystals diffracted at good resolution at the inhouse facility, as seen in the statistics shown in Table 1. It is a pre-requisite to test in advance all crystals when traveling to the synchrotron facilities. We do this is to guarantee that those are protein crystals, and also to get some ideas about the resolution and the pre-characterization of the samples. Table 2 shows the data collection and refinement statistics of all model proteins diffracted at the synchrotron facility. As the table shows, these protein crystals were both perfectly thermo-protected and arrived at the synchrotron facilities without degradation.

**Table 1.** Data collection at an in-house X-ray diffraction facility and statistics of proteins (blanks) of lysozyme, glucose isomerase, xylanase and ferritin.

Data Collection Facility	Inhouse X-ray Diffraction Facility	Inhouse X-ray Diffraction Facility	Inhouse X-ray Diffraction Facility	Inhouse X-ray Diffraction Facility
Protein	Lysozyme	Glucose Isomerase	Xylanase	Ferritin
Wavelength (Å)	1.54	1.54	1.54	1.54
Space group	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	I222	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	F432
Unit cell dimensions [a, b, c (Å)]	78.14, 78.14, 37.39 90,90,90	93.05, 98.28, 102.13 90,90,90	48.91, 58.39, 69.82 90, 90, 90	182.42, 182.42, 182.42 90,90,90
Resolution (Å)	39.20–1.45	35.41–1.70	40.06–1.00	50.00–2.00
No. of unique reflections	18,837	267,071	111,185	18,108
Completeness (%)	99.82 (100)	99.8 (98.7)	99.70 (95.1)	99.7 (100)
Redundancy	12.6(13.3)	5.2(4.8)	5.7 (2.9)	11.4 (15.2)
R <sub>merge</sub> (%)	0.038 (0.71)	0.08 (0.37)	0.064 (0.871)	0.075 (0.57)
Mean ⟨I/σ(I)⟩	35.33(4.3)	11.1(3.)	33.4 (1.6)	12.0(3.1)

**Table 2.** Data collection and refinement statistics for lysozyme, glucose isomerase, xylanase and ferritin.

Data Collection Beamline	XRD1 (Elettra)	XRD1 (Elettra)	XRD1 (Elettra)	XRD1 (Elettra)
Protein	Lysozyme	Glucose Isomerase	Xylanase	Ferritin
Wavelength (Å)	0.9794	0.9794	0.9794	0.9794
Space group	<i>P</i> 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	<i>I</i> 222	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>F</i> 432
Unit cell parameters (Å)	<i>a</i> = 78.45, <i>b</i> = 78.45, <i>c</i> = 37.21	<i>a</i> = 93.03, <i>b</i> = 98.56, <i>c</i> = 102.47	<i>a</i> = 48.98, <i>b</i> = 58.62, <i>c</i> = 69.90	<i>a</i> = 181.84, <i>b</i> = 181.84, <i>c</i> = 181.84
Resolution range (Å)	39.22–0.91 (0.94–0.91)	40.08–1.102 (1.141–1.102)	37.59–1.00 (1.036–1.00)	40.66–1.75 (1.81–1.75)
No. of reflections	835,727 (10,161)	1,168,535 (105,218)	667,833 (57,308)	984,926 (100,812)
No. of unique reflections	75,009 (3210)	185,699 (17,833)	108,893 (10,737)	26,552 (2469)
Multiplicity	11.1 (2.9)	6.3 (5.8)	6.1 (5.3)	37.1 (38.7)
Completeness (%)	99.59 (39.90)	98.36 (95.58)	99.73 (99.60)	98.85 (93.97)
Mean <i>I</i> /σ ( <i>I</i> )	21.72 (0.20)	9.64 (0.70)	28.84 (4.58)	32.21 (1.86)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>1</sup>	0.0414 (4.594)	0.0759 (2.433)	0.0370 (0.3304)	0.1127 (2.305)
<i>R</i> <sub>meas</sub> <sup>2</sup>	0.0433 (5.403)	0.0827 (2.668)	0.0403 (0.3679)	0.1144 (2.336)
CC <sub>1/2</sub> <sup>3</sup>	100 (88)	99 (68)	99 (95)	88 (90)
Mosaicity (°)	1.3	1.2	0.6	2.2
Wilson B-factor (Å <sup>2</sup> )	12.68	14.3	8.79	32.04
<b>Refinement</b>				
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.1582 (0.4441)/0.1876 (0.5569)	0.2547 (0.5306)/0.2582 (0.5569)	0.1394 (0.1509)/0.1684 (0.1859)	0.2309 (0.6569)/0.2541 (0.6351)
Working reflections	74,646 (3210)	185,400 (17,825)	108,816 (10,736)	26,252 (2446)
Testing reflections	3718 (170)	9110 (856)	5462 (551)	1293 (112)
Non-H atoms	1276	3072	2042	1557
Protein	129	390	190	171
Ligands	2	10	12	3
Water molecules	262	28	523	178
<b>Mean B factors (Å<sup>2</sup>)</b>				
Protein	16.39	17.69	10.14	31.15
Ligands	14.11	17.70	16.48	67.71
Water molecules	37.85	28	35.36	41.98
rmsd bond lengths (Å)	0.009	0.008	0.006	0.007
rmsd angles (°)	1.4	1.33	1.36	1.05
<b>Ramachandran plot statistics</b>				
Favored	98.43%	97.14%	98.4%	97.63%
Outliers	0%	0.26%	0%	0.59%
Allowed	1.57%	2.60%	1.6%	1.78%

Statistics for the highest resolution shell are shown in parentheses.

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \{I(hkl)\}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad (1)$$

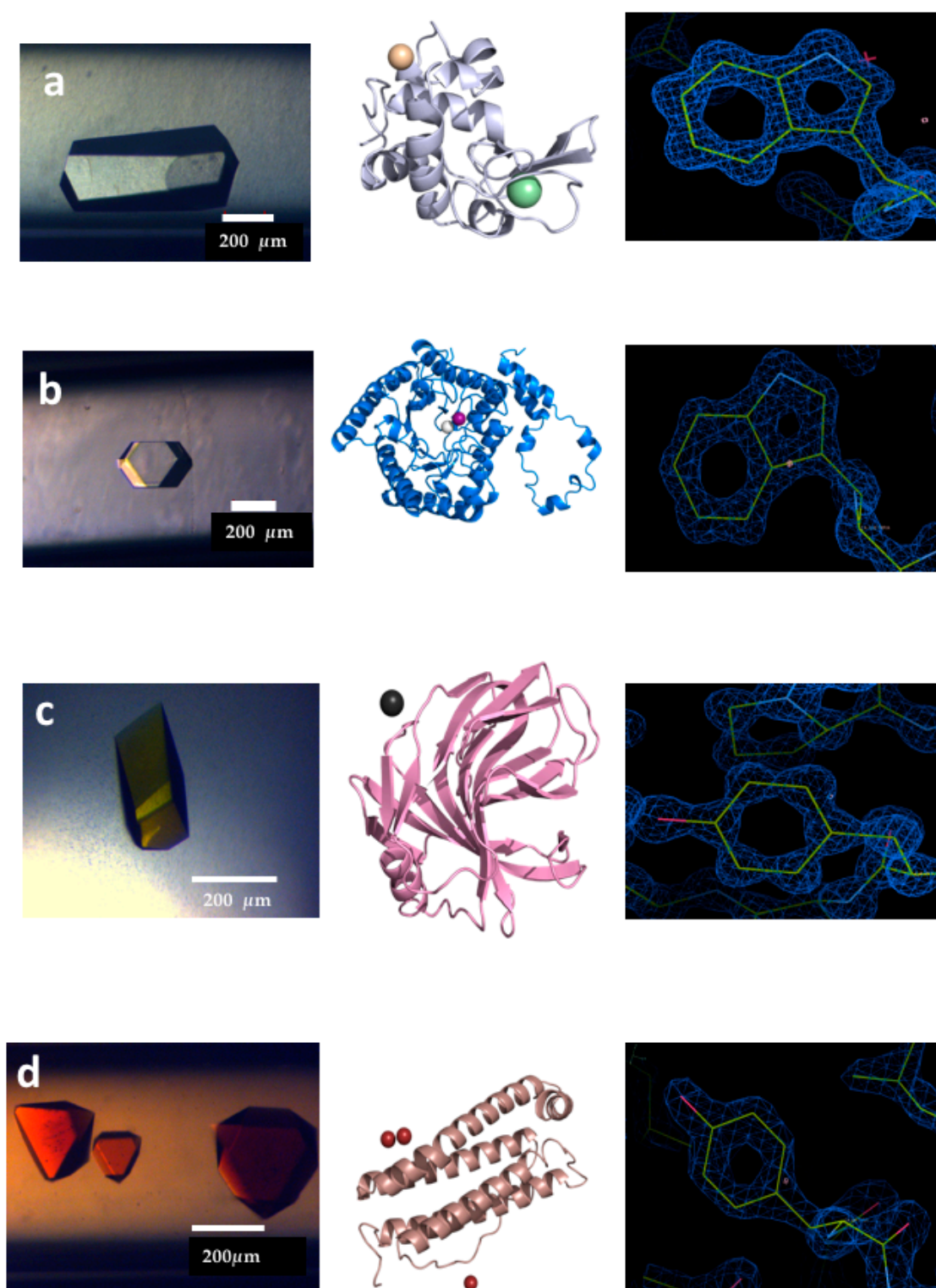
$$R_{meas} = \sum_{hkl} \frac{(N-1)^{-\frac{1}{2}} \sum_i |I_i(hkl) - \{I(hkl)\}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad (2)$$

where  $I_i(hkl)$  is the intensity measured for the  $i$ th reflection and  $\{I(hkl)\}$  is the average intensity of all reflections with indices  $hkl$ .

$$CC_{1/2} \quad (3)$$

is the correlation coefficient between two random half datasets.

The following set of pictures (Figure 4) shows the best crystallization results of the model proteins transported in the aforementioned thermal protection devices (as shown in the data collection and refinement statistics of Table 2). The high-resolution electron-density map shown for the aromatic residues proves that the crystals diffracted the X-rays at very high resolution. Additionally, it can be seen that all protein crystals arrived at the synchrotron facilities without crystal structure damage.

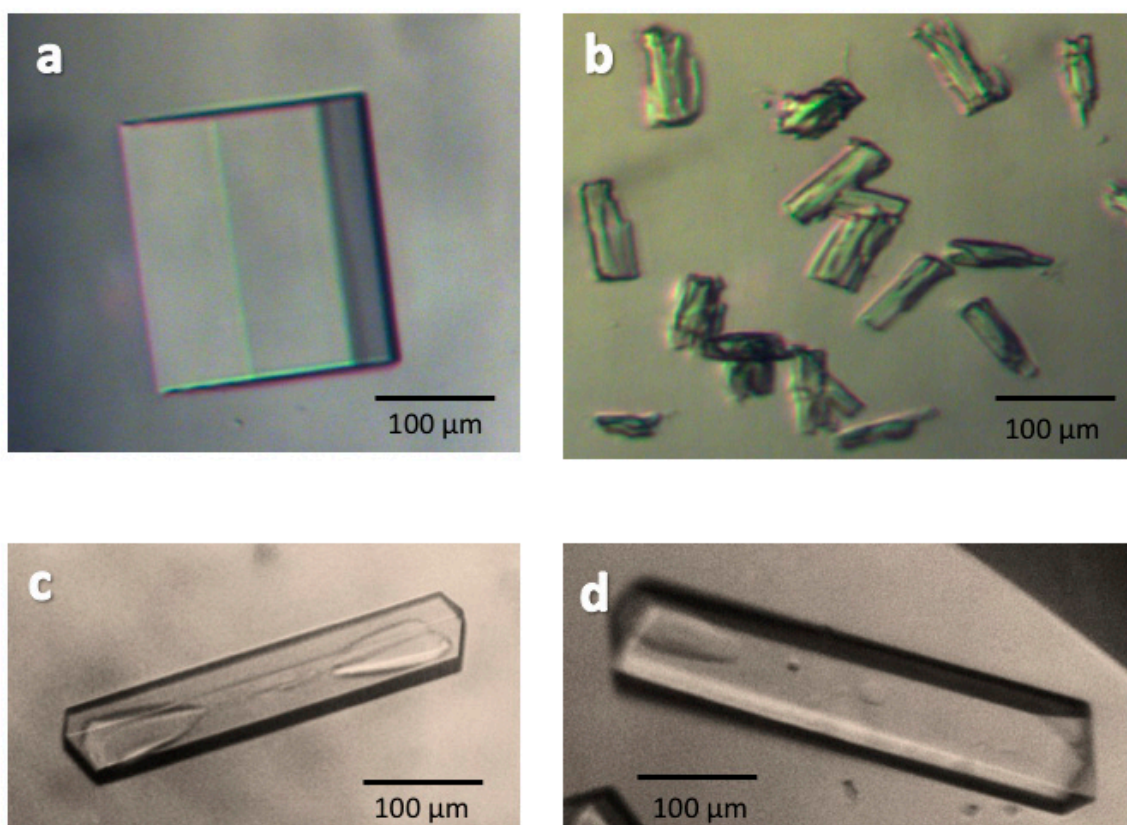


**Figure 4.** This shows the crystal shape and crystal structure as well as the high-resolution electron density map ( $2F_0 - F_c$ ) for (a) lysozyme, (b) glucose isomerase, (c) xylanase and (d) ferritin respectively. Contour level was 2.5–2.3  $\sigma$  due to the high resolution reached.

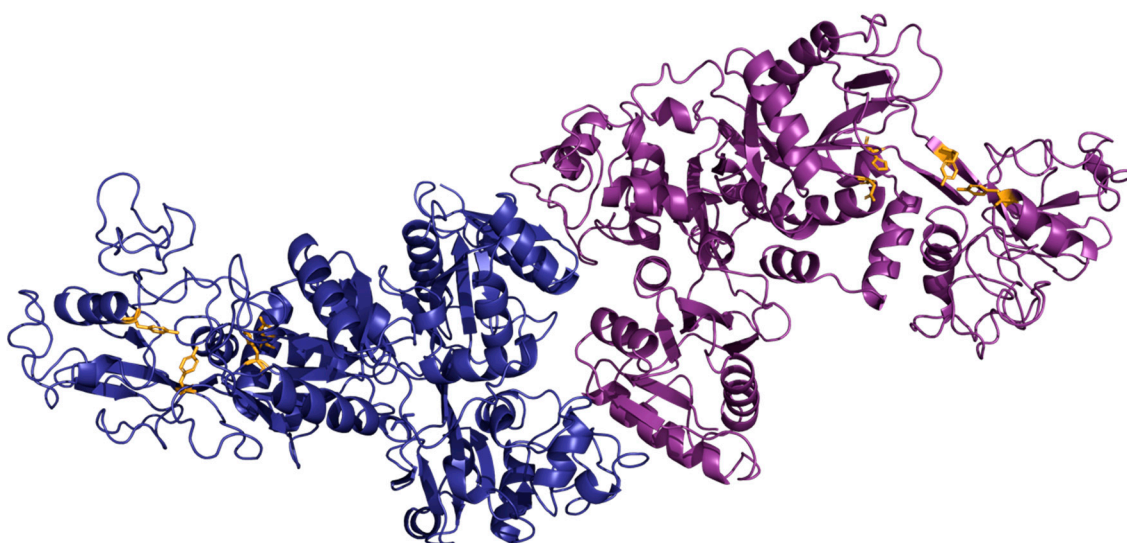
We have also evaluated the crystallization of apo-transferrin, a protein involved in neurodegenerative diseases who is extremely sensitive to even the slightest change in temperature when crystallizing. This protein was used as thermal sensor to prove the efficiency of these devices.



Initially, the influence of temperature was investigated in our laboratory fixing crystallization experiments at different temperatures ranging from 12 to 22 °C. This was performed in a TG40 apparatus apparatus (Centeo BioSciences-Blacktrace, Royston, UK). Figure 5 shows pictures where the best temperature for the crystallization conditions was determined at 18 °C (Figure 5a). Any small change around this temperature provoked crystals dissolution and damage in the crystal structure (see Figure 5b). Additionally, a study about the influence of pH on protein crystallization was also performed (results not shown). This study showed that the apo-transferrin crystallizes at very specific pH value of 7.0. Crystals obtained at 18 °C were bigger than those obtained at 19 °C. A slight changes in temperature shifted to dissolution of protein crystals modifying the overall shape and homogeneity of apo-transferrin crystals. Figure 5c,d show crystal conservation over time experiment: We got beamtime assigned at the synchrotron facilities at the beginning of the spring. The mounting robot failed during the data collection at the synchrotron facility and the data collection was stopped. Then, those apo-transferrin crystals returned to Mexico for the next round at the synchrotron planned two months and a half later (in the summer) to be diffracted at the same facility. These crystals were preserved inside the thermal protection devices during two and half months-time prior to diffraction in the synchrotron. These crystals traveled again inside the thermal protection devices and diffracted the X-ray without any damage in the crystal structure. Figure 6 shows the X-ray crystal structure of apo-transferrin obtained at the best crystallization conditions as those shown in Figure 5a. The PDB code 2HAV was used for apo-transferrin to solve the 3D X-ray crystal structure for the molecular replacement.



**Figure 5.** (a) Optimal temperature and crystallization conditions for apo-transferrin at 18 °C, (b) crystals grown at 19 °C were slightly dissolved. Crystal conservation over time: (c) Crystals grown during three days after crystallization; and (d) crystal observed after transportation (trip) to the synchrotron facility 2.5 months later. The crystals were preserved inside these devices and worked as thermal sensors.



**Figure 6.** It shows the crystal structure of apo-transferrin; crystals diffracted up to 2.9 Å at the best temperature, keeping the optimal pH and appropriate cryo-protection conditions as described in the experimental part.

Table 3 shows the statistics of these apo-transferrin crystals when comparing two types of crystals, the first crystals were grown and diffracted at inhouse X-ray facility. Then, a second set of crystals grown at the same crystallization conditions, and were transported to the synchrotron facility. Again, we see that the crystal quality was preserved inside the thermal protection device compared to that crystal grown and diffracted at inhouse facilities. The quality of the crystal obtained at the synchrotron facility was better as it is usually the case of most of crystals tested in these facilities. However, we are not trying to compare the crystal quality here, but to emphasize that all crystals were properly transported and that they (due to the characteristics of the synchrotron facilities) diffracted at least at the same resolution, or even higher, than those taken to inhouse facilities.

**Table 3.** Apo-transferrin: Data collection and X-ray statistics.

	Inhouse X-ray Diffraction Facility	Synchrotron Facility
Wavelength (Å)	1.5418	0.9184
Resolution range (Å)	41.57–3.51 (3.63–3.51)	29.60–2.91 (2.99–2.91)
Space group	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$
Unit cell (Å)	$a = 84.99, b = 101.41, c = 200.327$	$a = 85.40, b = 101.60, c = 199.60$
Total reflections	221,910	253,338 (13,314)
Unique reflections	22,370	37,976 (2411)
Multiplicity	9.9	6.7 (5.5)
Completeness (%)	99.9	98.8 (86.6)
Mean $I/\sigma(I)$	1.9	12.20 (1.30)
R-merge	0.163	0.100 (0.728)
$CC_{1/2}$	69.6	99.8 (81.3)

We definitely encourage the use of these thermal devices when traveling or transporting protein crystals which are extremely sensitive to changes in temperature, by taking them directly to the synchrotron facility—where the crystals are stabilized for a few hours before opening these devices at the temperature of crystallization conditions for cryo-protecting or mounting them. This procedure will allow the same crystals resolution as those obtained in the crystallization room at inhouse X-ray facilities. The 3D X-ray crystal structure of apo-transferrin has been already reported, however the full structure of the four domains has never been crystallized completely. In this investigation we have

proven that the transportation of crystals (whereas by conventional dry Dewar or any other system) play a major role in the obtaining of quality crystals when low temperature is involved. In the majority of laboratories, most crystals usually are grown at 4 °C or 18 °C, this is why their transportation temperature has to be kept the same in order to guaranty the proper crystallization conditions. Our devices have proven their efficiency in keeping the crystals temperature in transportation, guarantying, therefore, their thermo-stability and their quality in the data-collection process. Based on these results, a temperature insulator like the one shown in here, opens up the possibility of a proper thermo-protection of the crystal structures when traveling, bettering, therefore, the quality of the obtained crystals. As far as we know this is the first time that such an approach has been dealt with from an investigations point of view and hope that they will enhance our future investigation results.

#### 4. Conclusions

Based on these results, we can finally conclude that these three types of thermal protection devices are the most promising transportation items to the synchrotron facilities in order to preserve high protein crystal quality (as shown in the X-ray crystallographic analysis). However further experiments applying these devices to a variety of proteins extremely sensitive to changes in temperature need to be performed.

**Author Contributions:** A.F.-I., E.R., and Y.G. analyzed the crystallographic data of model proteins; A.M. and M.C.-C. performed the X-ray data collection at the synchrotron facilities; M.C.-C. and A.M. conceived and designed the experiments as well as wrote the manuscript. C.C.-E., performed the purification, crystallization experiments of apo-transferrin as well as their crystal structure resolution, she also acknowledges to SNI for the scholarship. D.N. and M.P., supported with the X-ray and analyzed the data at the synchrotron Elettra in Trieste Italy.

**Acknowledgments:** One of the authors (A.M.) acknowledges the support of DGAPA UNAM project PAPIIT No. IG200218 for this research. All authors acknowledge to the synchrotron ELETTRA for the X-ray facilities and data collection. Antonia Sanchez for the English revision of this manuscript.

**Conflicts of Interest:** “The authors declare no conflict of interest”. Additionally, we state that “The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results”.

#### References

1. Lorber, B.; Sauter, C.; Theobald-Dietrich, A.; Moreno, A.; Schellenberger, P.; Robert, M.C.; Capelle, B.; Sanglier, S.; Potier, N.; Giege, R. Crystal growth of proteins, nucleic acids, and viruses in gels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2009**, *101*, 13–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Dauter, Z.; Wlodawer, A. Progress in Protein Crystallography. *Protein Peptide Lett.* **2016**, *23*, 201–210. [[CrossRef](#)]
3. Fuertes, G.; Banterlea, N.; Ruff, K.M.; Chowdhury, A.; Mercadante, D.; Koehler, C.; Kachala, M.; Girona, G.E.; Milles, S.; Mishra, A.; et al. Decoupling of size and shape fluctuations in heteropolymeric sequences reconciles discrepancies in SAXS vs. FRET measurements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E6342–E6351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sugiki, T.; Kobayashi, N.; Fujiwara, T. Modern Technologies of Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Three-dimensional Structure Determination of Proteins Open Avenues for Life Scientists. *Comput. Struct. Biotechnol.* **2017**, *15*, 328–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kay, L.E. Nuclear magnetic resonance methods for high molecular weight proteins: A study involving a complex of maltose binding protein and beta-cyclodextrin. *Method Enzymol.* **2001**, *339*, 174–203.
6. Ovchinnikov, S.; Kim, D.E.; Wang, R.Y.R.; Liu, Y.; DiMaio, F.; Baker, D. Improved de novo structure prediction in CASP11 by incorporating coevolution information into Rosetta. *Proteins* **2016**, *84*, 67–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rambo, R.P.; Tainer, J.A. Super-resolution in solution X-ray scattering and its applications to structural systems biology. *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 415–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jolley, C.C.; Wells, S.A.; Fromme, P.; Thorpe, M.F. Fitting low-resolution Cryo-EM maps of proteins using constrained geometric simulations. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1613–1621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Stagno, J.R.; Liu, Y.; Bhandari, Y.R.; Conrad, C.E.; Panja, S.; Swain, M.; Fan, L.; Nelson, G.; Li, C.; Wendel, D.R.; et al. Structures of riboswitch RNA reaction states by mix-and-inject XFEL serial crystallography. *Nature* **2017**, *541*, 242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Liu, W.; Wacker, D.; Gati, C.; Won-Han, G.; James, D.; Wang, D.; Nelson, G.; Weierstall, U.; Katritch, V.; Barty, A.; et al. Serial Femtosecond Crystallography of G Protein-Coupled Receptors. *Science* **2013**, *342*, 1521–1524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Zander, U.; Cianci, M.; Foos, N.; Silva, C.S.; Mazzei, L.; Zubieta, C.; de Maria, A.; Nanao, M.H. Mergin of synchrotron serial crystallographic data by a genetic algorithm. *Acta Cryst.* **2016**, *D72*, 1026–1035.
12. Giege, R.; Mikol, V. Crystallogenesis of Proteins. *Trends Biotechnol.* **1989**, *7*, 277–282. [[CrossRef](#)]
13. Rosenberger, F. Protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **1996**, *166*, 40–54. [[CrossRef](#)]
14. McPherson, A. Crystallization of Proteins by Variation of Ph or Temperature. *Methods Enzymol.* **1985**, *114*, 125–127. [[PubMed](#)]
15. Moller, J.; Schroer, M.A.; Erkamp, M.; Grobelny, S.; Paulus, M.; Tiemeyer, S.; Wirkert, F.J.; Tolan, M.; Winter, R. The Effect of Ionic Strength, Temperature, and Pressure on the Interaction Potential of Dense Protein Solutions: From Nonlinear Pressure Response to Protein Crystallization. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 2641–2648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Juarez-Martinez, G.; Garza, C.; Castillo, R.; Moreno, A. A dynamic light scattering investigation of the nucleation and growth of thaumatin crystals. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 119–131. [[CrossRef](#)]
17. Rosenberger, F.; Howard, S.B.; Sowers, J.W.; Nyce, T.A. Temperature-Dependence of Protein Solubility—Determination and Application to Crystallization in X-Ray Capillaries. *J. Cryst. Growth* **1993**, *129*, 1–12. [[CrossRef](#)]
18. Martinez-Caballero, S.; Cuellar-Cruz, M.; Demitri, N.; Polentarutti, M.; Rodriguez-Romero, A.; Moreno, A. Glucose Isomerase Polymorphs Obtained Using an Ad Hoc Protein Crystallization Temperature Device and a Growth Cell Applying an Electric Field. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 1679–1686. [[CrossRef](#)]
19. Strelou, V.I.; Zakharov, B.G.; Bezbakh, I.Z.; Safronov, V.V.; Chernyshev, B.V.; Dutyshev, I.N. Implementation of Temperature-Controlled Method of Protein Crystallization in Microgravity. *Crystallogr. Rep.* **2018**, *63*, 149–153. [[CrossRef](#)]
20. Chen, R.Q.; Lu, Q.Q.; Cheng, Q.D.; Ao, L.B.; Zhang, C.Y.; Hou, H.; Liu, Y.M.; Li, D.W.; Yin, D.C. An ignored variable: Solution preparation temperature in protein crystallization. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ferreira, C.; Crespo, R.; Martins, P.M.; Gales, L.; Rocha, F.; Damas, A.M. Small temperature oscillations promote protein crystallization. *CrystEngComm* **2011**, *13*, 3051–3056. [[CrossRef](#)]
22. Budayova-Spano, M.; Dauvergne, F.; Audiffren, M.; Bactivelane, T.; Cusack, S. A methodology and an instrument for the temperature-controlled optimization of crystal growth. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 339–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Berg, M.; Urban, M.; Dillner, U.; Muhlig, P.; Mayer, G. Development and characterization of temperature-controlled microreactors for protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2002**, *58*, 1643–1648. [[CrossRef](#)]
24. Junius, N.; Oksanen, E.; Terrien, M.; Berzin, C.; Ferrer, J.L.; Budayova-Spano, M. A crystallization apparatus for temperature-controlled flow-cell dialysis with real-time visualization. *J. Appl. Crystallogr.* **2016**, *49*, 806–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Astier, J.P.; Veessler, S. Using Temperature To Crystallize Proteins: A Mini-Review. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 4215–4219. [[CrossRef](#)]
26. Snyder, R.C.; Veessler, S.; Doherty, M.F. The evolution of crystal shape during dissolution: Predictions and experiments. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1100–1101. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, C.Y.; Yin, D.C.; Lu, Q.Q.; Guo, Y.Z.; Guo, W.H.; Wang, X.K.; Li, H.S.; Lu, H.M.; Ye, Y.J. Cycling Temperature Strategy: A Method to Improve the Efficiency of Crystallization Condition Screening of Proteins. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 4227–4232. [[CrossRef](#)]
28. Juarez-Martinez, G.; Steinmann, P.; Roszak, A.W.; Isaacs, N.W.; Cooper, J.M. High-throughput screens for postgenomics: Studies of protein crystallization using microsystems technology. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3505–3510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



29. Kiefersauer, R.; Than, M.E.; Dobbek, H.; Gremer, L.; Melero, M.; Strobl, S.; Dias, J.M.; Soulimane, T.; Huber, R. A novel free-mounting system for protein crystals: Transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *J. Appl. Crystallogr.* **2000**, *33*, 1223–1230. [[CrossRef](#)]
30. Pareja-Rivera, C.; Cuellar-Cruz, M.; Esturau-Escofet, N.; Demitri, N.; Polentarutti, M.; Stojanoff, V.; Moreno, A. Recent Advances in the Understanding of the Influence of Electric and Magnetic Fields on Protein Crystal Growth. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 135–145. [[CrossRef](#)]
31. De la Mora, E.; Flores-Hernandez, E.; Jakoncic, J.; Stojanoff, V.; Siliqi, D.; Sanchez-Puig, N.; Moreno, A. SdsA polymorph isolation and improvement of their crystal quality using nonconventional crystallization techniques. *J. Appl. Crystallogr.* **2015**, *48*, 1551–1559. [[CrossRef](#)]
32. Wally, J.; Halbrooks, P.J.; Vonnrhein, C.; Rould, M.A.; Everse, S.J.; Mason, A.B.; Buchanan, S.K. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24934–24944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Belaidi, A.A.; Bush, A.I. Iron neurochemistry in Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease: Targets for therapeutics. *J. Neurochem.* **2016**, *139*, 179–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Booyjzsen, C.; Scarf, C.A.; Moreton, B.; Portman, I.; Scrivens, J.H.; Costantini, G.; Sadler, P.J. Fibrillation of transferrin. *Bba-Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 427–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Apostolakis, S.; Kypraiou, A.M. Iron in neurodegenerative disorders: Being in the wrong place at the wrong time? *Rev. Neurosci.* **2017**, *28*, 893–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Torronen, A.; Harkki, A.; Rouvinen, J. Three-dimensional structure of the endo 1,4-beta-xylanase II from *Trichodema reesei*: Two conformational states in the active site. *EMBO J.* **1994**, *13*, 2493–2501. [[PubMed](#)]
37. Lausi, A.; Polentarutti, M.; Onesti, S.; Plaisier, R.J.; Busetto, E.; Bais, G.; Barba, L.; Cassetta, A.; Campi, G.; Lamba, D.; et al. Status of the crystallography beamlines at Elettra. *Eur. Phys. J. Plus* **2015**, *130*, 1–8. [[CrossRef](#)]
38. Minor, W.; Cymborowski, M.; Otwinowski, Z.; Chruszcz, M. HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution—From diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. D* **2006**, *62*, 859–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kabsch, W. XDS. *Acta Cryst.* **2010**, *D66*, 125–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Adams, P.D.; Afonine, P.V.; Bunkoczi, G.; Chen, V.B.; Davis, I.W.; Echols, N.; Headd, J.J.; Hung, L.W.; Kapral, G.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D* **2010**, *66*, 213–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **2004**, *60*, 2126–2132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Afonine, P.V.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Chen, V.B.; Headd, J.J.; Moriarty, N.W.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P.H.; Adams, P.D. phenix.model\_vs\_data: A high-level tool for the calculation of crystallographic model and data statistics. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 669–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. De Lano, W.L. *The PyMOL Molecular Graphics System*; DeLano Scientific LLC: San Carlos, CA, USA, 2002.

