

Avances del proyecto: Efecto del pH en la condición de cristalización sobre el daño por radiación en cristales de proteína

M. C. Francisco Murphy Pérez

25 de mayo de 2022

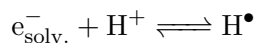
1. Introducción

La cristalografía de rayos-X es la técnica experimental más usada para obtener la estructura tridimensional de proteínas. Dicha técnica está basada en la difracción de rayos-X, por los electrones de los átomos que constituyen el cristal de proteína. Los rayos-X usados tienen la energía suficiente para ionizar los átomos que constituyen el cristal de proteína. La ionización provoca una cascada de radicales libres que a su vez provocan lo que se conoce como daño por radiación. El daño por radiación se clasifica como daño específico y daño global. El primero produce cambios químicos en la proteína y se da en el siguiente orden: la reducción de átomos metálicos, la ruptura de puentes disulfuro, la descarboxilación de aminoácidos ácidos y la pérdida del grupo tiometilo de la metionina. Por otra parte, el daño global se da por una pérdida en el orden cristalino, lo que genera varias consecuencias en los datos experimentales obtenidos [Weik *et al.*(2000)Weik, Ravelli, Kryger, McSweeney, Raves, Harel, Gros, Silman, Kroon, y Sussman, Ravelli y McSweeney(2000)]. En general, el daño por radiación es una de las limitantes de la cristalografía de rayos-X.

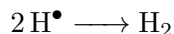
2. Antecedentes

Los efectos del daño por radiación específico se dan porque la muestra está en un estado vítreo a 100 K y las especies químicas que son móviles a dicha temperatura son los electrones, los huecos positivos (la ausencia de electrón) y los átomos de hidrógeno [Owen *et al.*(2012)Owen, Axford, Nettleship, Owens, Robinson, Morgan, Do

Por otra parte, el electrón solvatado se encuentra en un equilibrio ácido base:



El radical H^\bullet se puede recombinar:



Se ha comprobado que el H_2 es uno de los principales productos de la radiación [Meents *et al.*(2010)Meents, Gutmann, Wagner, y Schulze-Briesse].

3. Hipótesis

La alta concentración de protones, es decir, bajos niveles de pH en la condición de cristalización, permitirán mitigar el daño por radiación específico, en particular el provocado por los $e_{\text{solv.}}^-$.

4. Objetivo

El objetivo de este proyecto es determinar el efecto del pH en la condición de cristalización de ciertas proteínas sobre el daño por radiación. En particular se tiene que:

1. Realizar un análisis *in silico* para determinar qué proteínas son capaces de cristalizar en un intervalo de pH amplio.
2. Cristalizar las proteínas seleccionadas a diferentes niveles de pH usando cualquiera de los sistemas de amortiguamiento que muestrean un intervalo de pH amplio
3. Determinar los parámetros de la colecta de datos que produzcan niveles similares, o idénticos, de dosis de radiación absorbida en las diferentes proteínas cristalizadas.
4. Realizar colectas de datos idénticas y continuas para cada cristal en un sincrotrón.
5. Procesar los patrones de difracción para obtener un modelo inicial de las proteínas en estado vítreo.

6. Mapear la diferencia de densidad electrónica entre colectas de datos al modelo inicial de cada proteína y realizar un análisis comparativo, en particular sobre los residuos de aminoácido que son más susceptibles al daño por radiación, para determinar las diferencias en daño por radiación a diferentes niveles de pH.

5. Resultados

5.1. Proteínas capaces de cristalizar a diferentes valores de pH

Se rehizo el análisis *in silico* para determinar qué proteínas son capaces de cristalizar en un intervalo de pH amplio ([código en este enlace](#)).

Identificador	Grupo espacial	Intervalo de pH	Organismo	Proteína
P42212	P 21 21 21	7	<i>Aequorea victoria</i>	Green fluorescent protein
P01116	P 21 21 21	6.5	<i>Homo sapiens</i>	GTPase Kras
P00760	P 31 2 1	6.15	<i>Bos taurus</i>	Serine protease 1
P00918	P 1 21 1	5.9	<i>Homo sapiens</i>	Carbonic anhydrase 2
P00698	P 43 21 2	5.5	<i>Gallus gallus</i>	Lysozyme C
P00772	P 21 21 21	5.4	<i>Sus scrofa</i>	Chymotrypsin-like elastase
P02766	P 21 21 2	5	<i>Homo sapiens</i>	Transthyretin
P00760	P 21 21 21	4.5	<i>Bos taurus</i>	Serine protease 1

Cuadro 1: Proteínas capaces de cristalizar en un intervalo de pH amplio.

5.2. Cristalización de proteínas

Hasta el momento se han puesto pruebas de cristalización con lisozima y tripsina; ambas conseguidas de manera comercial y sin procedimientos posteriores de purificación (número de catálogo L6876 y T8003, respectivamente). También se pusieron pruebas con las proteínas ornitina descarboxilasa 1 y 2 (ODC1/2) y con la variante de la proteína verde fluorescente denominada PF17-8. Las primeras dos en colaboración con el M. C. Aldo Emmanuel Pérez Rivera y la tercera en colaboración con el Dr. Victor Rivelino Juárez González.

De los siguientes sistemas de amortiguadores de capacidad extendida, desarrollados por Newman [[Newman\(2004\)](#)], se utilizaron los siguientes:

- Sistema uno (S01); ácido succínico, glicina y sodio dihidrógeno fosfato monohidratado.

- Sistema dos (S02); ácido cítrico, HEPES y CHES.
- Sistema cuatro (S04); propionato de sodio, cacodilato de sodio trihidratado, BIS-TRIS propano.
- Sistema seis (S06); ácido L-málico, MES y TRIS.

Todos a una concentración de 250 mM (125 mM, en la gota de cristalización) y con 3 % peso/volumen de cloruro de sodio como agente precipitante.

Las pruebas de cristalización se realizaron por medio de la técnica modificada de *microbatch*, propuesta por D’Arcy *et al.* [D’Arcy *et al.*(1996)D’Arcy, Elmore, Stihle, y Johnston]. En estos experimentos, se varió la concentración de la proteína y/o la proporción entre aceites de parafina y silicona (1:0.5, 1:1 y 1:2) y el pH (10, 9.5, 9.0, ..., 4.5). Se usaron placas de cristalización de Terasaki Greiner de 72 pozos que permiten poner tres corridas de pH (triplicado), por sistema de amortiguamiento (dos por placa). Cabe destacar que en cada placa la proporción de aceites es diferente. En total, se pusieron 28 placas como se detalla en los siguientes cuadros (2-4). Finalmente, estas placas se mantuvieron a 18 °C.

Placa	Proteína	Conc. (mg mL ⁻¹)	PO:SO	Sistemas
1	tripsina	50	1:0.5	S01, S06
2	tripsina	50	1:1	S01, S06
3	tripsina	50	1:2	S01, S06
4	lisozima	30	1:0.5	S01, S06
5	lisozima	30	1:1	S01, S06
6	lisozima	30	1:2	S01, S06
7	tripsina	50	1:0.5	S02, S04
8	tripsina	50	1:1	S02, S04
9	tripsina	50	1:2	S02, S04
10	lisozima	30	1:0.5	S02, S04
11	lisozima	30	1:1	S02, S04
12	lisozima	30	1:2	S02, S04

Cuadro 2: Pruebas de cristalización de lisozima y tripsina. Gotas de 4 µL.

Además se pusieron 2 placas con más pruebas de cristalización, con la técnica conocida como gota colgante, en cajas de cristalización de 24 pozos. Las pruebas en este aspecto, tenían dos sentidos; primero, tratar de reproducir las condiciones en las que se sabe que la lisozima genera cristales en

Placa	Proteína	Conc. (mg mL ⁻¹)	PO:SO	Sistemas
13	ODC2	38	1:0.5	S01, S06
14	ODC2	38	1:0.5	S02, S04
15	ODC1	2.1	1:0.5	S01, S06
16	ODC1	2.1	1:0.5	S02, S04

Cuadro 3: Pruebas de cristalización de ODC1 y ODC2. Gotas de 4 μ L.

Placa	Proteína	Conc. (mg mL ⁻¹)	PO:SO	Sistemas
19	PF17-8	4.8	1:1	S01, S06
20	PF17-8	4.8	1:2	S02, S04
21	PF17-8	4.8	1:1	S01, S06
22	PF17-8	4.8	1:2	S02, S04
23	PF17-8	12.9	1:1	S01, S06
24	PF17-8	12.9	1:2	S02, S04
25	PF17-8	12.9	1:1	S01, S06
26	PF17-8	12.9	1:2	S02, S04
27	PF17-8	30	1:1	S02, S04
28	PF17-8	30	1:1	S01, S06
29	PF17-8	30	1:2	S02, S04
30	PF17-8	30	1:2	S01, S06

Cuadro 4: Pruebas de cristalización de PF17-8. Gotas de 4 μ L.

los valores de pH extremos y segundo, ver la diferencia en temperatura. El sistema de amortiguamiento usado fue el sistema cuatro (S04), la disposición de las condiciones de cristalización en ambas cajas fue la siguiente: cada fila contiene los siguientes valores de pH, 4, 4.5, 5, 8.5, 9 y 9.5; por otra parte, cada fila tiene una mezcla de aceites de parafina y silicona diferentes (en un intento por reproducir las condiciones de los experimentos de cristalización de las placas de *microbatch*). Una de las placas se mantuvo a 18 °C y la otra a 4 °C.

5.3. Resultados de cristalización

Se tomaron fotos con una cámara USB acoplada a un microscopio óptico cada diez días, hasta cuarenta días. Hasta el momento se han realizado 16 sesiones de fotos y restan cinco sesiones. El esquema de clasificación usado

anteriormente, se simplificó a: cristales bien definidos, posibles cristales, sin cristales.

1. Las pruebas de cristalización de tripsina han dado cristales bien definidos solo en el sistema uno y a valores bajos de pH. Hasta el momento se tienen diez cristales a un pH de: 4.5 (1), 5 (6) y 5.5 (3). La mayoría de los cristales presentan una morfología plana en forma de rombo.
2. Las pruebas de cristalización de lisozima han dado cristales bien definidos en la mayoría de los sistemas (uno, cuatro y seis); sin embargo, el sistema donde se generan más cristales, en promedio, es el sistema cuatro. En particular, hasta diez de los doce pozos pueden presentar resultados favorables. Los cristales aparecen en múltiples formas; cúbicos, hexagonales o romboides.
3. Las pruebas de cristalización de ODC1 fueron negativas en su totalidad. Con respecto a ODC2, parece haber cristales en el sistema uno a valores medios de pH. Hasta el momento se tienen cinco posibles cristales a un pH de: 6.5 (1), 7.5 (3) y 9.5 (1). El cristal a pH 6.5 es el único en el sistema seis.
4. Las pruebas de cristalización de PF17-8 han producido seis cristales: uno a pH 5 en el sistema uno; otro a pH 5 y a pH 7 en el sistema dos; finalmente, uno a pH 4.5 y dos a pH 7.5. Estos cristales no presentan una morfología tan regular, a comparación de los de lisozima, pero ya se ha comprobado que son cristales de proteína.

5.4. Afinamiento de las estructuras obtenidas

Los datos de difracción obtenidos anteriormente se volvieron a procesar. Los datos corresponden a un cristal de lisozima a pH 4.5 y otro a pH 9.5, ambos en gotas de cristalización pertenecientes al sistema uno. A manera de resumen se presenta el siguiente cuadro.

Nótese que ambos casos mejoran, pero la diferencia es mayor para los patrones de difracción del cristal a pH 4.5. En el caso de los patrones de difracción correspondientes al cristal de lisozima crecido con un pH igual a 9.5; se puede detectar presencia de anillos de hielo en las últimas capas de resolución. Esto disminuye la integridad de los datos y por lo tanto empeora las métricas del procesamiento de datos.

	4.5 (antes)	9.5 (antes)	4.5 (ahora)	9.5 (ahora)
Resolución (Å)	26.9-1.2	26.9-1.3	35.15-1.15	35-1.15
a (Å)	78.66	78.33	78.61	78.26
c (Å)	37.03	37.14	36.95	37.11
Obs. Únicas	36651 (3558)	28698 (2768)	41399 (4022)	40718 (3595)
Integridad (%)	99.18 (97.58)	98.89 (97.12)	99.26 (97.67)	98.08 (87.63)
R_{merge}	0.1343 (1.272)	0.1321 (1.174)	0.1264 (0.2694)	0.1047 (0.6847)
$CC_{1/2}$	0.983 (0.63)	0.985 (0.747)	0.985 (0.939)	0.993 (0.884)
R_{work}	15.49 (55.98)	15.84 (52.01)	0.1476 (0.1584)	0.1534 (0.2173)
R_{free}	18.97 (44.33)	19.60 (51.53)	0.1723 (0.2051)	0.1782 (0.2224)
Número de átomos	1233	1264	1229	1251

Cuadro 5: Comparación entre procesamientos de datos.

6. Extra

Por otro lado, se consiguieron células transfectadas con el plásmido de EGFP (autoría del Dr. José Ignacio Rodríguez Ochoa). Dicho plásmido se aisló a partir de células en cultivo. También se pusieron cultivos celulares para expresar y purificar la proteína EGFP. Se planea purificar y poner pruebas de cristalización de esta proteína.

7. Perspectivas

7.1. Tripsina

Será necesario poner más pruebas de cristalización para tripsina. Si bien la solución de tripsina se preparó con un inhibidor (benzamidina), este es reversible. Posiblemente será mejor cambiar la benzamidina por un inhibidor irreversible. Por cuestiones económicas, en caso de no obtener resultados favorables en las siguientes pruebas, sería bueno enfocar el trabajo en otra proteína.

7.2. Lisozima

Con respecto a lisozima, se ha identificado un sistema en el cual se obtienen cristales en la mayoría de los valores de pH muestreados. Lo único que resta es reproducir los resultados experimentales, enfocándonos en los valores extremos de pH. Actualmente se están realizando experimentos en este aspecto.

7.3. ODC1/2

Este fue un primer acercamiento para cristalizar una proteína que no estuviera en el cuadro 1. La colaboración se dio, la purificación estaba bien detallada y al menos una de las dos proteínas tenía buen rendimiento (ODC2). El porcentaje de cristales obtenidos es de un 1.7 %, suponiendo que todos los cristales obtenidos sean de proteína. No se volverá a poner pruebas de cristalización de esta enzima, pero se planea mandar los cristales obtenidos a un sincrotrón.

7.4. PF17-8 y EGFP

Se trabajó con PF17-8 en un primer acercamiento para trabajar con la GFP. Sería interesante poner las mismas pruebas de cristalización a 4 °C, pues en este aspecto se ha observado una mejora en los resultados de cristalización para la lisozima. Actualmente se planea poner pruebas de cristalización para la proteína EGFP, en cuanto sea posible.

7.5. Reprocesamiento de patrones de difracción

Parece necesario reprocesar los datos de difracción con los programas disponibles y experimentar con los mismos parámetros del procesamiento de datos de cada programa.

Referencias

- [1] Martin Weik, Raimond B. G. Ravelli, Gitay Kryger, et al. Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2):623–628, jan 2000.
- [2] Raimond Bg Ravelli and Sean M McSweeney. The fingerprint’ that X-rays can leave on structures. *Structure*, 8(3):315–328, mar 2000.
- [3] Robin L. Owen, Danny Axford, Joanne E. Nettleship, et al. Outrunning free radicals in room-temperature macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 68(7):810–818, jul 2012.
- [4] Alke Meents, Sascha Gutmann, Armin Wagner, and Clemens Schulze-Bries. Origin and temperature dependence of radiation damage in bio-

- logical samples at cryogenic temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3):1094–1099, jan 2010.
- [5] Janet Newman. Novel buffer systems for macromolecular crystallization. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(3):610–612, mar 2004.
- [6] A. D’Arcy, C Elmore, M Stihle, and J.E. Johnston. A novel approach to crystallising proteins under oil. *Journal of Crystal Growth*, 168(1-4):175–180, oct 1996.