

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

4 de junio de 2021

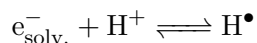
1. Introducción

La cristalografía de rayos X es la técnica experimental más usada para obtener la estructura tridimensional de macromoléculas, en particular de proteínas. Los rayos X usados tienen la capacidad de ionizar las moléculas que constituyen el cristal. La ionización provoca una cascada de radicales libres que en consecuencia provocan lo que se conoce como daño por radiación. Este último se puede clasificar 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 decarboxilación de aminoácidos ácidos y la pérdida del grupo tiometilo de la metionina. El daño global se da por una pérdida en el orden cristalino [1, 2]. Sin cristal, no puede haber *cristalografía de rayos X*; por lo que, en general, el daño por radiación es una de las limitantes de esta técnica experimental.

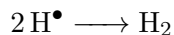
2. Antecedentes

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 [3].

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 [4].

3. Hipótesis

Partimos de la hipótesis de que 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 $\text{e}_{\text{solv.}}^-$.

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 continuas y seriales en un sincrotrón.
5. Procesar los patrones de difracción para obtener un modelo inicial de las proteínas.
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

1. Del análisis *in silico* para determinar qué proteínas son capaces de cristalizar en un intervalo de pH amplio, se obtuvieron cinco proteínas con los siguientes identificadores de uniprot [5]: P42212, P00698, P00760, P00918, P02766.
2. Con respecto a la cristalización de las proteínas seleccionadas...
 - Se han puesto condiciones de cristalización con la lisozima (P00698) y la tripsina (P00760). Ambas conseguidas de manera comercial y sin procedimientos posteriores de purificación.
 - De los sistemas de amortiguadores de capacidad extendida desarrollados por Newman [6], se utilizó la primera condición de cristalización (denominada de ahora en adelante, C1): ácido succínico, glicina y sodio dihidrógeno fosfato monohidratado a una concentración de 250 mM.
 - Se realizaron experimentos de cristalización con la técnica modificada de *microbatch*, propuesta por D'Arcy *et al.* [7]. En estos experimentos, se varió la concentración de la proteína (15 o 30 mg mL⁻¹); la proporción entre aceites de parafina y silicona (1:0, 1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:4); el pH (10, 9.5, 9.0, ..., 4.5) y finalmente, también se cambió el porcentaje de cloruro de sodio (0, 3 y 6 % p/v) en la condición de cristalización. Esto debido a que, en ciertas condiciones, se ha observado una dependencia del tamaño de los cristales de lisozima obtenidos con respecto a la concentración de cloruro de sodio [8]. Se usaron placas de cristalización de Terasaki Greiner de 72 pozos. Esto permite tres corridas de pH, con tres porcentajes de cloruro de sodio por duplicado. Cabe destacar que en cada placa la proporción de aceites es diferente. En total, se tienen 720 experimentos (1440, tomando en cuenta los duplicados). Esto último, tiene que ver con la reproducibilidad de los resultados de los experimentos de cristalización, pues no siempre son idénticos.
 - Para clasificar los resultados de cristalización, se usó un esquema de clasificación modificado a partir del esquema de Bruno *et al.* [9]. La clasificación es la siguiente: 1 (cristales), 0.5 (cristales pequeños), 0 (gota clara), -1 (precipitado) y -2 (otros). Se tomaron tres fotos con una cámara USB acoplada a un microscopio óptico en los días quinto, noveno y décimosexto. Esto significa que se

visualizaron y clasificaron 4320 fotos. Los resultados se definieron como positivos si se presentan cristales, en al menos uno de los dos experimentos, en los siguientes valores de pH 10, 9, 7.5, 5.0 y 4.5; de lo contrario, se consideran como resultados negativos. Para la tripsina, por lo menos al momento del día de la tercera foto, todos los resultados fueron negativos. Los resultados positivos para la lisozima se resumen a continuación.

Proteína	Concentración	% p/v NaCl	AP:AS
Lisozima	15	3	1:1
Lisozima	15	3	1:4
Lisozima	15	6	1:4
Lisozima	30	3	1:1
Lisozima	30	6	1:1
Lisozima	30	3	1:2
Lisozima	30	6	1:2
Lisozima	30	3	1:4
Lisozima	30	6	1:4

Cuadro 1: Condiciones de cristalización exitosas para la lisozima. AP y AS significan aceite de parafina y silicona, respectivamente.

3. Con respecto a determinar los parámetros de la colecta de datos que produzcan niveles similares, o idénticos, de dosis de radiación absorbida, se escribió un programa en el lenguaje de programación **bash** que permite obtener la dosis de radiación absorbida, calculada por **raddose** [10]. Por simplicidad, se determinó un cristal hipotético de lisozima cúbico, con un volumen de $1\,000\,000\,\text{\AA}^3$. Este presenta la misma composición atómica que la entrada **1iee** del PDB. También por simplicidad, el haz de rayos X se definió como colimado, con un corte de $100 \times 100\,\mu\text{m}$, abarcando el área completa del cristal y un tiempo total de exposición de 100s, con la obtención de un patrón de difracción por segundo. Dicho programa muestrea un flujo de fotones de 1.0 a 100×10^{11} fotones/s con un paso de 0.1 fotones/s y una energía de 10.0 a 17.2 keV con un paso de 0.2 keV. Se obtuvo acceso al clúster **groc** del grupo de genómica computacional del Instituto de Biotecnología de la UNAM¹ para correr dicho programa. Cabe aclarar que si bien los parámetros experimentales dados son idóneos, el fin de este programa es

¹<https://biocomputo.ibt.unam.mx/>.

tener un estimado de la dosis por radiación absorbida en un sincrotrón de tercera generación. Por otra parte, este primer programa sienta las bases para cualquier programa posterior en el que se necesite adaptar los parámetros experimentales a la realidad.

4. Con respecto a las colectas de datos, como primer acercamiento, se llevaron cinco² cristales de lisozima al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) del Instituto de Química (IQ) de la UNAM el 20 de mayo del presente año. En el LANEM-IQ, se tiene acceso a un generador de rayos X MicroMax-007 HF de Rigaku³. Hasta el momento, el único dato del que se tiene conocimiento es que la difracción de al menos uno de los cristales era mejor que 1.6 Å.

6. Perspectivas

6.1. Tripsina

Los resultados negativos con la tripsina podrían ser por: (i) la concentración del agente precipitante, de la proteína o de ambas es muy baja. O (ii) la nucleación y en consecuencia la formación de cristales es menor, comparada con la de la lisozima. Es necesario, tomar una última ronda de fotos de las placas de cristalización de tripsina para descartar o confirmar la segunda razón. De igual manera, para descartar o confirmar la primera razón, es necesario poner nuevas condiciones de cristalización con mayor concentración de proteína, de agente precipitante o de ambos y además utilizar los otros sistemas de amortiguadores de capacidad extendida.

6.2. Lisozima

Si bien no se tienen todos los detalles de los experimentos de difracción en el ánodo rotatorio del LANEM-IQ, lo que se sabe con certeza es que al menos unos de los cristales difractados era de buena calidad. Aunado al número de condiciones exitosas para la formación de cristales, esto implica que no es necesario muestrear más condiciones para la cristalización de esta proteína; sino replicar las condiciones que se encontraron.

²Crecidos a pH 10 (dos), 7.5 (uno) y 4.5 (dos).

³<https://www.rigaku.com/products/sources/mm007>

6.3. Dosis de radiación

Los resultados del programa para determinar la dosis de radiación en un sincrotrón de tercera generación, muestreando múltiples flujos de fotones y energías, no se han obtenido. Debido a esto, se realizó una estimación de la dosis de radiación absorbida para un cristal de lisozima hipotético⁴, bajo las condiciones del ánodo rotatorio del LANEM-IQ. Suponiendo una exposición de un segundo por cada patrón de difracción y rotando el cristal cien grados para obtener cien patrones de difracción, se obtiene una dosis promedio de radiación absorbida de 0.000 132 MGy. Si se cambia el tiempo total de exposición de 100 s a 1000 s, se obtiene como resultado un aumento en la dosis por un factor de diez. Esto significa que se necesitarían cerca de mil colectas idénticas para alcanzar una dosis promedio de 1.3 MGy o 13 MGy, dependiendo del tiempo de exposición seleccionado. Suponiendo la ausencia de tiempos muertos entre colectas, la colecta de un cristal de lisozima tardaría aproximadamente 11.5 días en el LANEM-IQ. Si queremos difractar tres cristales crecidos a tres valores de pH (10, 7.5 y 4.5), es decir, nueve experimentos, esto resulta en un tiempo de uso cerca de 100 días. Demasiado tiempo, comparado con una colecta en un sincrotrón de tercera generación.

Referencias

- [1] Martin Weik, Raimond B.G. Ravelli, Gitay Kryger, Sean McSweeney, Maria L. Raves, Michal Harel, Piet Gros, Israel Silman, Jan Kroon, and Joel L. Sussman. Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000.
- [2] Raimond B.G. Ravelli and Sean M. McSweeney. The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures. *Structure*, 2000.
- [3] Robin L. Owen, Danny Axford, Joanne E. Nettleship, Raymond J. Owens, James I. Robinson, Ann W. Morgan, Andrew S. Doré, Guillaume Lebon, Christopher G. Tate, Elizabeth E. Fry, Jingshan Ren, David I. Stuart, and Gwyndaf Evans. Outrunning free radicals in room-temperature macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(7):810–818, 2012.

⁴Con las mismas características, que el mencionado en el texto principal.

- [4] Alke Meents, Sascha Gutmann, Armin Wagner, and Clemens Schulze-Briese. Origin and temperature dependence of radiation damage in biological samples at cryogenic temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3):1094–1099, jan 2010.
- [5] Alex Bateman, Maria Jesus Martin, Sandra Orchard, Michele Magrane, Rahat Agivetova, Shadab Ahmad, Emanuele Alpi, Emily H. Bowler-Barnett, Ramona Britto, Borisas Bursteinas, Hema Bye-A-Jee, Ray Coetzee, Austra Cukura, Alan Da Silva, Paul Denny, Tunca Dogan, Thank God Ebenezer, Jun Fan, Leyla Garcia Castro, Penelope Garmiri, George Georghiou, Leonardo Gonzales, Emma Hatton-Ellis, Abdulrahman Hussein, Alexandr Ignatchenko, Giuseppe Insana, Rizwan Ishtiaq, Petteri Jokinen, Vishal Joshi, Dushyanth Jyothi, Antonia Lock, Rodrigo Lopez, Aurelien Luciani, Jie Luo, Yvonne Lussi, Alistair MacDougall, Fabio Madeira, Mahdi Mahmoudy, Manuela Menchi, Alok Mishra, Katie Moulang, Andrew Nightingale, Carla Susana Oliveira, Sangya Pundir, Guoying Qi, Shriya Raj, Daniel Rice, Milagros Rodriguez Lopez, Rabie Saidi, Joseph Sampson, Tony Sawford, Elena Speretta, Edward Turner, Nidhi Tyagi, Preethi Vasudev, Vladimir Volynkin, Kate Warner, Xavier Watkins, Rossana Zaru, Hermann Zellner, Alan Bridge, Sylvain Poux, Nicole Redaschi, Lucila Aimo, Ghislaine Argoud-Puy, Andrea Auchincloss, Kristian Axelsen, Parit Bansal, Delphine Baratin, Marie Claude Blatter, Jerven Bolleman, Emmanuel Boutet, Lionel Breuza, Cristina Casals-Casas, Edouard de Castro, Kamal Chikh Echioukh, Elisabeth Coudert, Beatrice Cuhe, Mikael Doche, Dolnide Dornevil, Anne Estreicher, Maria Livia Famiglietti, Marc Feuermann, Elisabeth Gasteiger, Sebastien Gehant, Vivienne Gerritsen, Arnaud Gos, Nadine Gruaz-Gumowski, Ursula Hinz, Chantal Hulo, Nevila Hyka-Nouspikel, Florence Jungo, Guillaume Keller, Arnaud Kerhornou, Vicente Lara, Philippe Le Mercier, Damien Lieberherr, Thierry Lombardot, Xavier Martin, Patrick Masson, Anne Morgat, Teresa Batista Neto, Salvo Paezano, Ivo Pedruzzi, Sandrine Pilbout, Lucille Pourcel, Monica Pozzato, Manuela Pruess, Catherine Rivoire, Christian Sigrist, Karin Sonesson, Andre Stutz, Shyamala Sundaram, Michael Tognolli, Laure Verbregue, Cathy H. Wu, Cecilia N. Arighi, Leslie Arminski, Chuming Chen, Yongxing Chen, John S. Garavelli, Hongzhan Huang, Kati Laiho, Peter McGarvey, Darren A. Natale, Karen Ross, C. R. Vinayaka, Qinghua Wang, Yuqi Wang, Lai Su Yeh, and Jian Zhang. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1):D480–D489, 2021.

- [6] Janet Newman. Novel buffer systems for macromolecular crystallization. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(3):610–612, 2004.
- [7] 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, 1996.
- [8] A. V. Svanidze, S. G. Lushnikov, and L. A. Shuvalov. Deuterated hen egg-white lysozyme crystals: Optimization of the growth conditions and morphology. *Crystallography Reports*, 50(5):789–795, sep 2005.
- [9] Andrew E. Bruno, Patrick Charbonneau, Janet Newman, Edward H. Snell, David R. So, Vincent Vanhoucke, Christopher J. Watkins, Shawn Williams, and Julie Wilson. Classification of crystallization outcomes using deep convolutional neural networks. *arXiv*, (i):1–16, 2018.
- [10] Charles S. Bury, Jonathan C. Brooks-Bartlett, Steven P. Walsh, and Elspeth F. Garman. Estimate your dose: RADDose-3D. *Protein Science*, 27(1):217–228, jan 2018.