

# **Efecto del pH en la condición de cristalización sobre el daño por radiación en cristales de proteína**

Francisco Murphy Pérez

11 de junio de 2021

## Colofón

Este documento se compuso con la ayuda de: KOMA-Script (<https://sourceforge.net/projects/koma-script/>) y L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X (<https://www.latex-project.org/>), usando la plantilla denominada kaobook (<https://github.com/fmarotta/kaobook/>).

A Lucía, por supuesto.



# **Resumen**

Aquí va el resumen, normalmente esto se escribe cuando la tesis se ha terminado de escribir.



# Índice general

<b>Índice general</b>	<b>vii</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Cristalográfia de rayos X . . . . .	1
1.2 Daño por radiación . . . . .	2
Introducción . . . . .	2
Causa . . . . .	2
Clasificaciones . . . . .	3
Métricas . . . . .	4
1.3 Crioprotección . . . . .	5
1.4 Sincrotrones . . . . .	5
1.5 Radioprotectores . . . . .	6
<b>2 Antecedentes</b>	<b>7</b>
2.1 pH . . . . .	7
<b>3 Hipótesis</b>	<b>9</b>
<b>4 Objetivo</b>	<b>11</b>
4.1 Objetivos particulares . . . . .	11
<b>5 Materiales y métodos</b>	<b>13</b>
5.1 Proteínas seleccionadas . . . . .	13
Extracción de datos . . . . .	13
Limpieza de datos . . . . .	13
5.2 Cristalización de proteínas . . . . .	15
Lisozima . . . . .	15
Tripsina . . . . .	15
Amortiguadores de capacidad extendida . . . . .	15
Experimentos de cristalización . . . . .	15
Clasificación de resultados de cristalización . . . . .	16
5.3 Colecta y análisis de datos . . . . .	16
<b>6 Resultados</b>	<b>17</b>
6.1 Proteínas seleccionadas . . . . .	17
6.2 Cristalización . . . . .	17
Lisozima . . . . .	17
Tripsina . . . . .	18
6.3 Dosis de radiación . . . . .	18
6.4 Colectas de datos . . . . .	18
<b>A Proteínas más representadas</b>	<b>19</b>
<b>Referencias</b>	<b>21</b>



# Índice de figuras

1.1	Patrón de difracción . . . . .	2
1.2	Diferencia de densidad electrónica . . . . .	4
2.1	Movimiento de cargas en la cadena polipeptídica . . . . .	7

# Índice de tablas

1.1	Estructuras por método experimental . . . . .	1
6.1	Proteínas que cristalizan en un intervalo amplio de pH . . . . .	17
6.2	Condiciones de cristalización exitosas para la lisozima. AP y AS significan aceite de parafina y silicona, respectivamente. . . . .	17
A.1	Las 50 proteínas más representadas . . . . .	19



# 1

## Introducción

### 1.1 Cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X es el método experimental más común para determinar la estructura de una molécula<sup>1</sup> (Tabla 1.1). En general, los modelos estructurales de macromoléculas de interés biológico, específicamente proteínas y ácidos nucleicos, obtenidos por medio de cualquier método experimental, se depositan en el banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) [1]. El repositorio digital del PDB es de libre acceso y se encuentra en el siguiente enlace <https://www.rcsb.org/>.

1: Desde moléculas pequeñas hasta complejos multiproteicos.

Método experimental	Estructuras	Porcentaje (%)
Cristalografía de rayos X	153889	88.29
Resonancia magnética nuclear	13195	7.57
Microscopía electrónica	6754	3.88
Difracción de neutrones	177	0.10
Difracción de electrones	172	0.10
Suma	174187	99.94

[1]: Berman y col. (2000), «The protein data bank»

**Tabla 1.1:** Estructuras depositadas en el PDB por método experimental—Se listan los cinco métodos experimentales más usados en la determinación de estructuras macromoleculares. Datos actualizados al 06 de febrero del 2021. Fuente: <https://www.rcsb.org/>.

La base de esta técnica experimental consiste en incidir rayos X sobre un cristal macromolecular. La energía de los rayos X se puede transferir a los electrones de las moléculas que conforman el cristal. Si la transferencia de energía se da de manera elástica, los electrones oscilarán con la misma frecuencia que la onda de rayos X incidente. Esto, según la electrodinámica clásica, resulta en una emisión de rayos X los cuales a su vez pueden interferir entre sí, de forma destructiva o constructiva. Esta interferencia da lugar al concepto físico conocido como difracción. Si la diferencia entre las fases de las ondas de estos nuevos rayos X emitidos es exactamente igual a  $n2\pi$  radianes, donde  $n$  es un número entero, la interferencia será constructiva. Dada la naturaleza repetitiva del cristal, en general<sup>2</sup>, toda interferencia constructiva será amplificada y se podrá observar como un punto en el patrón de difracción (Figura 1.1).

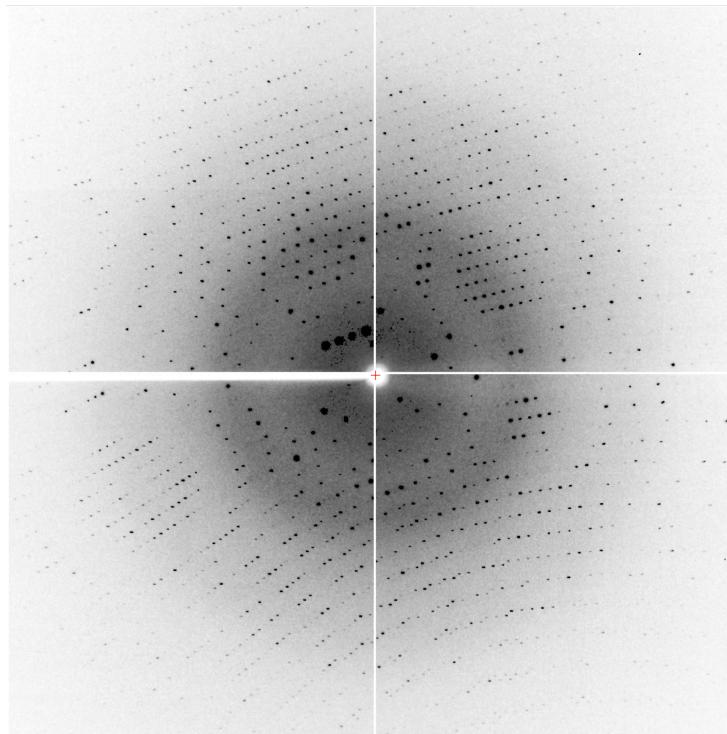
2: Existen ciertas condiciones de simetría que producen la extinción total de un punto de difracción.

El experimento de cristalografía de rayos X consiste en:

1. Incidir rayos X sobre el cristal de la macromolécula de interés.
2. Obtener el patrón de difracción.
3. Rotar el cristal en cierto eje.
4. Repetir los pasos anteriores  $n$  veces<sup>3</sup>.

3: En general,  $n$  depende de la simetría del cristal (véase la Tabla 1 de [2]).

Cabe resaltar que cada paso del experimento tiene dificultades inherentes y no es sencillo generalizar una colecta de datos porque depende de múltiples factores, entre los cuales se destacan: la configuración experimental y las propiedades fisicoquímicas del cristal macromolecular. El objetivo del experimento es obtener una colecta de datos completa, en otras palabras, obtener suficientes patrones de difracción para los pasos posteriores. La cantidad y calidad de patrones de difracción está limitada por el daño por radiación.



**Figura 1.1:** Patrón de difracción de la lisozima de clara de huevo de gallina.

## 1.2 Daño por radiación

### Introducción

El daño por radiación se da porque los rayos X usados, tienen energía suficiente para ionizar la materia. Los electrones liberados provocan una serie de reacciones químicas que *grosso modo* resultan en la pérdida del orden cristalino. Esto implica que se pierde la amplificación en el fenómeno de difracción y en consecuencia, los patrones de difracción resultantes son cada vez de menor calidad. En pocas palabras, la calidad del cristal decae bajo el haz de rayos X y por lo tanto la calidad de cada patrón de difracción resultante. En consecuencia, cada cristal macromolecular presenta un límite temporal, denominado tiempo de vida útil, bajo el haz de rayos X. El daño por radiación es la principal causa de que sea difícil, o a veces imposible, lograr el objetivo final del experimento de la cristalográfia de rayos X: la determinación de una estructura macromolecular.

### Causa

El daño por radiación se da porque los electrones de las moléculas que conforman el cristal, absorben la energía de los fotones incidentes. La absorción tiene su causa en uno de dos fenómenos físicos: el efecto fotoeléctrico o la dispersión inelástica<sup>4</sup>. El efecto fotoeléctrico consiste en la absorción total de un fotón por un electrón. En consecuencia, el electrón es expulsado de su orbital dejando una vacante electrónica, o hueco positivo ( $h^+$ ), en la molécula que lo contenía. La energía de los electrones liberados, llamados fotoelectrones, se disipa en la trayectoria que estos hayan tomado; generando cientos<sup>5</sup> de iones, radicales libres

4: La probabilidad de que se dé el efecto fotoeléctrico, es un orden de magnitud mayor que la dispersión inelástica, por lo que solo se describe el primero.

5: El promedio de la primera energía de ionización para los átomos presentes en una proteína es de 12.67 eV; la energía de un fotón con una longitud de onda de 1 Å es de 12 398.4 eV.

y eventos de excitación molecular. Los radicales son especies químicas que poseen uno o más electrones despareados, por ende su reactividad es muy alta y su tiempo de vida es particularmente corto. Una reacción en cadena de radicales libres es inminente. Si algún radical, o cualquier especie química producto de la radiación, llegase a perturbar la red de contactos cristalinos, se pierde el orden cristalino.

## Clasificaciones

El daño por radiación se puede clasificar de acuerdo a su escala temporal. El daño primario es la ionización dada por el efecto fotoeléctrico. El daño secundario es la subsecuente cascada de radicales libres, dependiente del tiempo y de la temperatura. El daño terciario se define como el daño macroscópico sobre el cristal. Esto implica que una fracción suficiente de macromoléculas dentro del cristal ha sido afectada por el daño primario y secundario [3].

El daño por radiación también se puede clasificar dependiendo del lugar de incidencia. Se denomina daño directo, si el daño primario se da en la proteína cristalizada, o daño indirecto, si la radiación es absorbida por el solvente<sup>6</sup> dentro del cristal y las especies reactivas formadas posteriormente interactúan con la proteína cristalizada [4].

El daño por radiación global y específico, es como se denominan las consecuencias del daño por radiación, en particular sobre los resultados del experimento de difracción. El primero tiene sus efectos en el espacio recíproco y el segundo en el espacio real. En el daño por radiación global se contienen los siguientes efectos: (i) la disminución de la intensidad de los puntos en el patrón de difracción, sobre todo aquellos en las fajas de alta resolución; (ii) el aumento en el factor  $B$  de Wilson; y (iii) el empeoramiento de las medidas que indican la calidad global de los datos [3]. En el daño por radiación específico, se tienen cambios químicos puntuales en la estructura de la macromolécula cristalizada. Esto conlleva un orden dado: primero ocurre la reducción de átomos metálicos; después se da la ruptura de puentes disulfuro; luego la descarboxilación de aspartatos y glutamatos; y finalmente se pierde el grupo tiometilo de las metioninas [5, 6]. Con respecto a esto último, cabe aclarar que residuos de aminoácido idénticos no son afectados de la misma manera, es decir, no todos los puentes disulfuro en un cristal de lisozima son afectados de la misma manera; sin embargo, el orden en que son afectados es el mismo. Actualmente las razones de esto no están del todo claras. Por este motivo, aunque existen ciertos principios básicos para determinar el daño específico, es difícil predecirlo y saber de antemano el grado en que afectará el modelo estructural obtenido.

La relevancia de las consecuencias del daño por radiación es inmensa, teniendo en cuenta que cerca del 90 % de nuestro conocimiento de biología estructural está dado por la cristalográfia de rayos X. Por ejemplo: un modelo estructural incorrecto de una enzima, puede dar lugar a mecanismos de reacciones enzimáticas erróneas [7]. En el peor escenario, puede ser imposible obtener una estructura macromolecular debido a la inherente susceptibilidad del cristal al daño por radiación.

[3]: Teng y col. (2000), «Primary radiation damage of protein crystals by an intense synchrotron X-ray beam»

6: En general, agua, pero podría ser cualquier molécula presente en la condición de cristalización.

[4]: O'Neill y col. (2002), «Physical and chemical considerations of damage induced in protein crystals by synchrotron radiation: A radiation chemical perspective»

[5]: Weik y col. (2000), «Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation»

[6]: Ravelli y col. (2000), «The ‘fingerprint’ that X-rays can leave on structures»

[7]: Matsui y col. (2002), «Specific damage induced by X-ray radiation and structural changes in the primary photo-reaction of bacteriorhodopsin»

## Métricas

[8]: Murray y col. (2004), «X-ray absorption by macromolecular crystals: The effects of wavelength and crystal composition on absorbed dose»

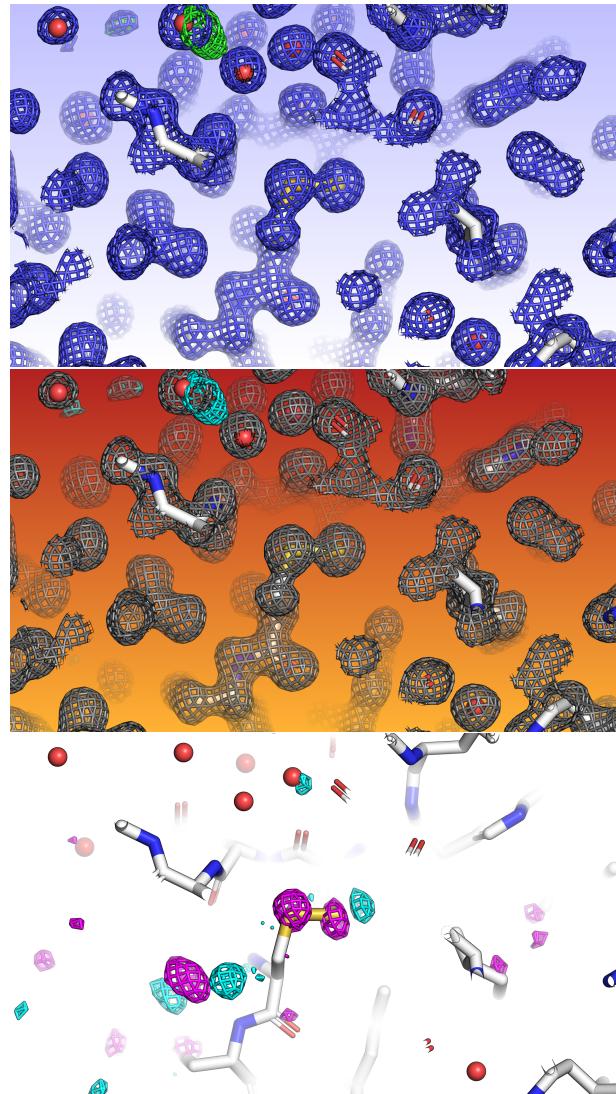
[9]: Garman (2010), «Radiation damage in macromolecular crystallography: What is it and why should we care?»

[10]: Allan y col. (2013), «To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question»

Falta añadir una sección del límite de Garman, Henderson y lo que ha salido ahora con Eugenio

La mejor manera de determinar el daño por radiación en un cristal macromolecular, es estimando la dosis de radiación absorbida por el cristal. La dosis depende a su vez de la composición atómica del cristal y de algunos parámetros experimentales referentes al haz de rayos X [8]. La dosis se mide en Gy que, según el Sistema Internacional de Unidades, es equivalente a la absorción de un Joule de energía ionizante por kilogramo de material irradiado. En experimentos de cristalográfia de rayos X, es típico encontrar valores del orden de MGy [9]. Se han propuesto varias métricas para cuantificar el daño por radiación en función de la dosis absorbida; sin embargo, se ha demostrado que el uso de distintas métricas puede dar diferentes resultados [10]. Actualmente no existe una métrica usada por unanimidad en el campo de la cristalográfia de rayos X.

Es posible visualizar el daño por radiación específico (Figura 1.2), si se realizan colectas de datos idénticas y se obtiene la diferencia de la densidad electrónica entre colectas. La colecta  $n$ , presentará cierta dosis de radiación absorbida y la colecta inicial tendrá una dosis de radiación absorbida mínima. Así, la diferencia entre colectas conlleva una diferencia en dosis de radiación absorbida.



**Figura 1.2:** Diferencia de densidad electrónica entre colectas de datos idénticas. Arriba: primer colecta de un cristal de lisozima (dosis absorbida 0.6 MGy). En medio: segunda colecta del mismo cristal (dosis absorbida 3.2 MGy). Los mapas  $2F_o - F_c$  y  $F_o - F_c$  se encuentran dibujados a  $1\sigma$  y  $\pm 3.5\sigma$ , respectivamente. Abajo: La diferencia de densidad electrónica entre colectas  $F_{o,2} - F_{o,1}$ . Donde la diferencia negativa (magenta) está a  $-3.5\sigma$  y la positiva (cian) a  $3.5\sigma$ . Nótese como prácticamente no se observa una diferencia entre los mapas  $2F_o - F_c$  (malla azul contra malla gris); sin embargo, sí existe una diferencia del modelo estructural inicial (el mismo en las tres imágenes) con respecto a la densidad electrónica de la segunda colecta. En otras palabras, para la segunda colecta, en una fracción de las proteínas cristalizadas este puente disulfuro se ha roto. Imagen realizada con PyMOL [11] y datos de [12].

## 1.3 Crioprotección

La primer estructura macromolecular determinada fue la de la mioglobina en 1958 por Kendrew y colaboradores [13]. La forma de contender con el daño por radiación en aquella época era utilizando decenas de cristales y promediar los patrones de difracción. La regla de dedo para cambiar el cristal irradiado por uno nuevo, era seguir la intensidad de algunas reflexiones y si esta llegaba a disminuir de 20 a 30 % de su valor inicial, entonces se procedía a reemplazar el cristal.

El primer estudio en el que se valoró el potencial de la crioprotección, para reducir el daño por radiación, surgió por necesidad. Sucedía que ciertos cristales de insulina con átomos pesados sufrían un rápido desgaste por la radiación, en comparación con cristales de insulina sin átomos pesados. Con base en la observación de que el daño secundario es dependiente, en parte, de la temperatura; Low *et al.* compararon, de manera cualitativa, el deterioro de los patrones de difracción colectados a 21, 0 y a -13 °C. Los resultados fueron claros: a menor temperatura, mayor el tiempo de vida útil de los cristales [14].

El problema con la reducción de temperatura en cristales macromoleculares, era la formación de hielo dentro de estos. Fue Haas quien primero usó crioprotectores para prevenir este problema. En el primer caso logró reducir la temperatura hasta -50 °C, remojando cristales de lisozima entrecruzados con glutaraldehído en una mezcla de agua con glicerol [15]. En un estudio posterior, con cristales de lactato deshidrogenasa, el proceso de entrecruzamiento destruía los cristales. En cambio, si solo eran remojados por un par de días en una solución con sacarosa, el daño por radiación era diez veces menor [16].

Es hasta 1988 que Hope describe por primera vez lo que conocemos hoy en día como criocrystalografía de rayos X, donde básicamente se añade al cristal, o a la condición de cristalización, un crioprotector y el proceso de difracción del cristal se realiza a -173 °C [17]. Una de las desventajas de esta técnica es encontrar las condiciones de crioprotección adecuadas para cada macromolécula. A pesar de este detalle, la crioprotección fue ganando adeptos de tal forma que para el año 2000 era parte de la rutina de la cristalografía de rayos X [18]. Gracias a la crioprotección, en general era suficiente un único cristal macromolecular para obtener una colección de datos completa.

## 1.4 Sincrotrones

La principal fuente de rayos X para realizar el experimento de difracción, es la radiación sincrotrón. La historia tecnológica de los sincrotrones se divide en generaciones. La primera generación de sincrotrones eran aquellos pertenecientes al campo de la física de partículas, donde los primeros estudios con respecto a la estructura de proteínas fueron realizados [19]. Para la década de 1980 se construyen los primeros sincrotrones dedicados a la biología estructural, esta es la segunda generación. Para la década de 1990 llega la tercera generación. El primer sincrotrón perteneciente a la cuarta generación empezó a operar en junio del 2016 [20].

[13]: Kendrew y col. (1958), «A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis»

[14]: Low y col. (1966), «Studies of insulin crystals at low temperatures: effects on mosaic character and radiation sensitivity»

[15]: Haas (1968), «X-ray studies on lysozyme crystals at -50°C»

[16]: Haas y col. (1970), «Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75 °C»

Falta el paper de Petsko!

[17]: Hope (1988), «Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method»

[18]: Garman (2003), «'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage.»

Datos?

[19]: Phillips y col. (1976), «Applications of synchrotron radiation to protein crystallography: Preliminary results»

[20]: Castelvecchi (2015), «Next-generation X-ray source fires up»

[21]: Willmott (2019), *An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*

7: Actualmente hay sincrotrones con líneas microfoco, donde se da la posibilidad de usar cristales con un tamaño de decenas de micrómetros.

[3]: Teng y col. (2000), «Primary radiation damage of protein crystals by an intense synchrotron X-ray beam»

[5]: Weik y col. (2000), «Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation»

[6]: Ravelli y col. (2000), «The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures»

[22]: Garman y col. (2017), «X-ray radiation damage to biological macromolecules: further insights»

Poner un historia de los radioprotectores usados?

[10]: Allan y col. (2013), «To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question»

[23]: Nowak y col. (2009), «To scavenge or not to scavenge: that is the question»

Una de las características de un sincrotrón es su brillo espectral, que se define como la distribución del flujo de fotones en el espacio y el rango angular. El flujo se establece como el número de fotones por segundo que atraviesan un área definida por un ancho de banda dado [21]. La revolución tecnológica de los sincrotrones se nota en la diferencia del orden de magnitud del brillo espectral [21]. Este aumento en brillo se ha permitido pues permite una gran ventaja: la posibilidad de utilizar cristales de menor tamaño. Esto es porque la principal limitante de la cristalografía de rayos X, es obtener cristales macromoleculares, en particular cristales de un tamaño adecuado (al menos unos cientos de micrómetros en sus tres dimensiones<sup>7</sup>).

Como se mencionó en la sección anterior, ya para el año 2000, la noción general en el campo de la criocrystalografía era que el daño por radiación era insignificante, un problema del pasado. Precisamente esta noción empieza a cambiar en ese mismo año, cuando tres estudios independientes muestran el efecto del daño por radiación en la tercera generación de sincrotrones [3, 5, 6].

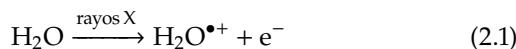
## 1.5 Radioprotectores

Al ser evidente que el daño por radiación aumentaba con el incremento en brillo espectral, fue necesario buscar estrategias, como la crioprotección, que ayudaran a mitigar el daño por radiación. En el curso de los últimos veinte años, se han investigado varias estrategias pre y posteriores a la difracción con distintos enfoques [22]. Una de las tantas estrategias, es el uso de moléculas pequeñas que interactúan con los radicales libres generados por la radiación. Estas moléculas se denominan radioprotectores. Sin embargo, en la literatura científica existen varias incongruencias con respecto a la efectividad de los radioprotectores y es, en parte, por esto que la comunidad cristalográfica no ha adoptado al cien por ciento el uso de radioprotectores de manera rutinaria [10, 23].

## 2.1 pH

Una estrategia nueva, investigada en la tesis de maestría del presente autor, fue modificar el pH dentro de los cristales macromoleculares. Esta idea se basa en la idea general de los radioprotectores y se detalla a continuación.

La radiólisis del agua produce las siguientes reacciones [24]:



Donde las especies químicas denotadas en rojo, representan los primeros radicales libres presentes en un cristal macromolecular (el radical hidroxilo, el electrón solvatado y el radical hidrógeno).

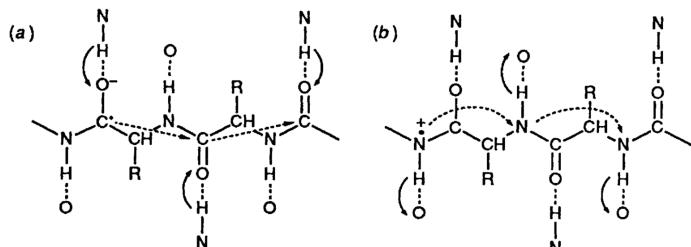
Con la criocristalográfia de rayos X, se impide la difusión del radical hidroxilo [25]. Sin embargo, el  $\text{e}_{\text{solv}}^-$  y el radical hidrógeno todavía son móviles. El electrón solvatado puede moverse del solvente a la proteína, donde es capaz de viajar a través de la cadena polipeptídica hasta hallar un centro electrofílico, como por ejemplo átomos metálicos o puentes disulfuro (Figura 2.1) [26]. Se ha propuesto que esta es la razón del orden en el que se manifiesta el daño por radiación específico, pues la captura de electrones es mucho más específica que la captura de huecos positivos [27].

[24]: Sonntag (2006), *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*

[25]: Owen y col. (2012), «Outrunning free radicals in room-temperature macromolecular crystallography»

[26]: Symons (1997), «Electron movement through proteins and DNA»

[27]: Close y col. (2019), «Comprehensive model for X-ray-induced damage in protein crystallography»



**Figura 2.1:** Movimiento de electrones (a) y huecos positivos (b), a través de la cadena polipeptídica. Fuente: [26].

Por su parte, el radical hidrógeno sigue una reacción de recombinación formando como producto final  $\text{H}_2$ , propuesto como el responsable directo del daño por radiación global [28].

La idea de ocupar al protón como radioprotector dentro del cristal macromolecular, se basa en que el electrón solvatado y el átomo de hidrógeno se encuentran en un equilibrio ácido-base; por lo que el electrón solvatado se convierte en  $\text{H}^\bullet$  en una solución ácida.

[28]: Meents y col. (2010), «Origin and temperature dependence of radiation damage in biological samples at cryogenic temperatures»



En la tesis de maestría se usó como sistema de estudio la lisozima de clara de huevo de gallina, que presenta cuatro puentes disulfuro. La idea era que el ion hidronio, también conocido como oxidonio, funcionara como radioprotector al interactuar con los electrones solvatados antes que estos interactuaran con los puentes disulfuro de esta proteína. Para esto, se comparó el daño específico sobre los puentes disulfuro en cristales de lisozima a tres niveles de pH: 3.7, 4.7 y 5.7. Los resultados obtenidos fueron opuestos a los esperados: a niveles comparables de dosis de radiación absorbida, el cristal con el pH más ácido presentó mayor daño por radiación que el cristal con el pH más básico.

[23]: Nowak y col. (2009), «To scavenge or not to scavenge: that is the question»

La variabilidad entre cristales macromoleculares, aún proveniendo de la misma condición de cristalización, puede llevar a conclusiones erróneas [23]. En la tesis de maestría no se pudo concluir si la diferencia observada era estadísticamente significativa, pues no se realizaron las repeticiones necesarias para cada condición experimental.

# 3

## Hipótesis

La alta concentración de protones, es decir, bajos niveles de pH en la condición de cristalización, permitirán mitigar el daño por radiación en cristales de proteína. En particular, (*i*), se espera que este efecto de protección se dé a una dosis de radiación absorbida baja, esto por el simple hecho de que la producción de electrones solvatados está dada por el tiempo de exposición al haz de rayos X; en cambio, la cantidad de protones dados en una cierta condición cristalina será finita. Además, (*ii*), se espera que el efecto de protección sea notable en residuos susceptibles al daño por radiación específico provocado por los  $e^-_{\text{solv}}$ .



# Objetivo

# 4

El objetivo de este proyecto es determinar el efecto del pH en la condición de cristalización de ciertas proteínas sobre el daño por radiación.

## 4.1 Objetivos particulares

Para lograr el objetivo principal de este proyecto, se plantean los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar un análisis *in silico* para determinar qué proteínas son capaces de cristalizar en un intervalo de pH amplio<sup>1</sup>.
2. Cristalizar las proteínas seleccionadas a diferentes niveles de pH.
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 series de colectas de datos idénticas y continuas hasta alcanzar el límite de Garman.
5. Procesar los patrones de difracción y afinar un modelo estructural inicial para serie de colectas de datos.
6. Mapear la diferencia de densidad electrónica entre colectas de datos al modelo inicial de cada proteína y realizar un análisis comparativo, para determinar las diferencias en daño por radiación a diferentes niveles de pH.

1: No se espera que el esto sea más de cinco o seis unidades de pH, dada la naturaleza de las proteínas



# 5

## Materiales y métodos

### 5.1 Proteínas seleccionadas

El PDB contiene información acerca de cientos de miles de proteínas cristalizadas en diferentes condiciones de cristalización. Para hallar qué proteínas pueden cristalizar en un amplio intervalo de pH se realizó un análisis *in silico*, como se explica brevemente<sup>1</sup> a continuación.

1: Con detalle en <https://github.com/murpholinox/doctordado>.

#### Extracción de datos

Se extrajo la información experimental directamente del cabezal de los archivos de las estructuras depositadas en el PDB. Para extraer la información de los cabezales se usó el programa gemmi<sup>2</sup>. La información extraída es la siguiente: el contador de la entidad macromolecular, el tipo de entidad, el código de acceso de la base de datos de referencia<sup>3</sup>, su descripción, el método experimental para crecer los cristales, el pH de la condición de cristalización, los detalles del experimento de la cristalización, la resolución final del modelo estructural, el grupo espacial en el que cristaliza la macromolécula y el identificador de objeto digital de la publicación científica correspondiente. A continuación se muestra un ejemplo de la información extraída:

#### Ejemplo 1

```
6LU7,1,polypeptide(L),P0DTD1,main protease,EVAPORATION,\n6,"2% polyethylene glycol (PEG) 6000, 3% DMSO, 1mM DTT,\n0.1M MES buffer (pH 6.0), protein concentration 5mg/ml,\nVAPOR DIFFUSION, HANGING DROP, temperature 293K",2.16,\n2.16,C 1 2 1,10.1038/s41586-020-2223-y,21728,210031\n6LU7,2,polypeptide(L),P0DTD1,main protease,EVAPORATION,\n6,"2% polyethylene glycol (PEG) 6000, 3% DMSO, 1mM DTT,\n0.1M MES buffer (pH 6.0), protein concentration 5mg/ml,\nVAPOR DIFFUSION, HANGING DROP, temperature 293K",2.16,\n2.16,C 1 2 1,10.1038/s41586-020-2223-y,21728,210031
```

El resultado final es una tabla de datos, con 226 523 observaciones, o filas, y 14 variables, o columnas. El número de observaciones es mayor que el número de estructuras depositadas en el PDB y esto es debido a que cada entrada puede tener más de una macromolécula, como se puede notar en el Ejemplo 1. La integridad de los datos se puede verificar al graficar algunas de las variables extraídas.

#### Limpieza de datos

Se aplican los siguientes filtros a los datos extraídos para eliminar observaciones que:

1. Carecen de un código de acceso.

2: Disponible en el siguiente enlace <https://github.com/project-gemmi/gemmi>.

3: La mayoría de las veces el código usado es aquél de la base de datos UniProt <https://www.uniprot.org/>.

2. Tienen una resolución peor que 2 Å.
3. Carecen del valor de pH de la condición de cristalización.
4. El número de entidades es mayor o igual a dos.

4: Desafortunadamente, la información experimental no siempre se encuentra en los archivos del PDB.

La lógica de los filtros es la siguiente: (*i* y *iii*) Remover entradas que no tengan las anotaciones correspondientes<sup>4</sup>, en este caso el código de acceso de la proteína y el pH de la condición de cristalización. Siendo la última la anotación más relevante para este proyecto y la primera, es la única manera de conocer casi inequívocamente la proteína representada en el archivo. (*ii*) La resolución final del modelo estructural es un indicador *grosso modo*, de la calidad del cristal obtenido. Este filtro garantiza que el listado de proteínas obtenidas sean fáciles de cristalizar. Además este filtro sirve para el análisis posterior, al comparar el daño por radiación específico entre proteínas/pHs, pues los resultados serán más confiables con una buena resolución. (*iv*) Como se mencionó anteriormente, un archivo puede contener múltiples macromoléculas. Este filtro ayuda a descartar proteínas cristalizadas con otras. En general, las condiciones de cristalización para combinaciones diferentes de macromoléculas serán diferentes; por lo que no tiene caso tener varias observaciones de la misma proteína, si esta cristaliza con diferentes macromoléculas.

En el apéndice se listan las 50 proteínas más representadas en el PDB, cuando cumplen los primeros cuatro filtros (Tabla A.1).

Posteriormente se aplican los siguientes dos filtros, que ayudan a eliminar las observaciones donde:

5. Su secuencia de aminoácidos sea diferente de la secuencia consenso para cada conjunto de proteínas.
6. No presenten un intervalo de pH amplio en su cristalización.

La lógica de estos dos filtros es la siguiente: (*v*) elimina entradas donde el número de mutaciones, sustituciones o delecciones, sea mayor o igual a quince. Esto elimina, por ejemplo, aquellas proteínas cristalizadas con el péptido señal (en caso de tenerlo) y, por otra parte, mantiene entradas de aquellas proteínas cristalizadas con etiquetas de purificación por afinidad (siempre y cuando la etiqueta no sea mayor de quince péptidos). Además elimina entradas donde la secuencia de la proteína, no corresponda a la secuencia consenso. En general, cada proteína tiene uno o varios identificadores UniProt. En el caso de las poliproteínas de algunos virus, el identificador de la poliproteína es el mismo para las subproteínas. A continuación se muestra un ejemplo:

### Ejemplo 2

```
6W4H_1, polypeptide(L), P0DTD1, SARS-CoV-2 NSP16, ...
6W4H_2, polypeptide(L), P0DTD1, SARS-CoV-2 NSP16, ...
6W6Y_1, polypeptide(L), P0DTD1, SARS-CoV-2 NSP3, ...
6WQD_1, polypeptide(L), P0DTD1, SARS-CoV-2 NSP7, ...
6WQD_2, polypeptide(L), P0DTD1, SARS-CoV-2 NSP7, ...
7BUY_1, polypeptide(L), 7BUY, SARS-CoV-2 virus Main protease,
```

Es claro que el código, P0DTD1, es el mismo; sin embargo, las observaciones corresponden a diferentes proteínas.

El alineamiento múltiple se realizó con el programa `mafft` [29]. La

[29]: Katoh y col. (2013), «MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability»

secuencia consenso se obtuvo con el programa `cons` de la suite de programas `emboss` [30]. Para la determinación del número de mutaciones se aplicó la función `adist`<sup>5</sup> en el lenguaje de programación R.

Y, (*vi*), es la condición experimental que nos interesa en este proyecto, proteínas que cristalicen en un amplio intervalo de pH. Este filtro se aplicó por partes. Primero se realizó un gráfico de caja para cada una de las 50 proteínas más representadas en los datos. Este tipo de gráfica da una representación visual de la distribución de la variable en cuestión. Si la distribución no cubre al menos tres unidades de pH, entonces se descarta dicha proteína, en caso contrario se mantiene. De las proteínas restantes, 25, se realiza un histograma de frecuencias para determinar de manera cuantitativa la frecuencia con la que cada proteína ha sido cristalizada en valores de pH diferentes. Si la frecuencia no es mayor a cinco para la mayoría de las barras en cada histograma, la proteína se descarta, si no se mantiene. Esto resulta en un listado de 14 proteínas, donde las diez primeras entradas se presentan en la correspondiente sección de resultados (Tabla 6.1).

[30]: Madeira y col. (2019), «The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019»

5: <https://www.rdocumentation.org/packages/utils/versions/3.6.2/topics/adist>

## 5.2 Cristalización de proteínas

### Lisozima

La lisozima de clara de huevo de gallina (*Gallus gallus*), se obtuvo de manera comercial de Sigma-Aldrich, con el número de catálogo L6876 de manera liofilizada. Según la hoja de datos tiene una pureza mayor o igual al 90 % y por lo tanto no se realizó ningún paso de purificación subsecuente.

### Tripsina

La tripsina pancreática de bovino (*Bos taurus*), también se obtuvo de manera comercial de Sigma-Aldrich, con el número de catálogo T4799 de manera liofilizada. Tampoco se realizó ningún paso de purificación subsecuente.

Cuál es la pureza?

### Amortiguadores de capacidad extendida

De los sistemas de amortiguadores de capacidad extendida desarrollados por Newman [31], se utilizó la primera condición de cristalización (denominada de ahora en adelante, S1): ácido succínico, glicina y sodio dihidrógeno fosfato monohidratado a una concentración de 250 mM.

Y posiblemente más!

### Experimentos de cristalización

Los experimentos de cristalización se realizaron con la técnica modificada de *microbatch*, propuesta por D'Arcy *et al.* [32].

En estos experimentos, se varió la concentración de la proteína (15 o 30 mg mL<sup>-1</sup>); 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 [33]. 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.

### Clasificación de resultados de cristalización

Para clasificar los resultados de cristalización, se usó un esquema de clasificación modificado a partir del esquema de Bruno *et al.* [34]. La clasificación es la siguiente: 1 (cristales), 0.5 (cristales pequeños), 0 (gota clara), -1 (precipitado) y -2 (otros). Se tomaron cuatro fotos con una cámara USB acoplada a un microscopio óptico en los días quinto, noveno, décimosexto y trigésimo octavo.

### 5.3 Colecta y análisis de datos

Los cristales obtenidos serán difractados en un sincrotrón. Para cada cristal macromolecular se tendrán que realizar series de colectas de datos de manera repetitiva. Gracias a la presencia de modelos estructurales en el PDB, se puede estimar la dosis absorbida por la proteína antes de realizar el experimento de difracción. Esto se realiza gracias al programa raddose [35]. Se resolverán las estructuras por reemplazo molecular y se crearán mapas de diferencia de densidad electrónica para analizar la diferencia en daño por radiación específico a distintos pHs al mismo nivel de dosis de radiación absorbida.

[35]: Zeldin y col. (2013), «RADDOSER 3D : time- and space-resolved modelling of dose in macromolecular crystallography»

Aquí obviamente falta poner los parámetros experimentales de las colectas de datos.

# 6

## Resultados

### 6.1 Proteínas seleccionadas

Del análisis *in silico* para determinar qué proteínas son capaces de cristalizar en un intervalo de pH amplio, se obtuvieron diez proteínas.

Número	Código	Intervalo	Nombre
1	P00918	6	Anhidrasa carbónica
2	P00698	5.5	Lisozima
3	P00760	6	Tripsina
4	P02766	5	Transtiretina
5	P42212	6	Proteína verde fluorescente
6	O60885	3.5	Proteína bromodominio 4
7	P19491	4.5	Receptor de glutamato 2
8	O26232	4	Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa
9	P00772	4.5	Elastasa
10	P00644	3	Termonucleasa

**Tabla 6.1:** Proteínas que cristalizan en un intervalo amplio de pH.

### 6.2 Cristalización

Con la variación de parámetros experimentales para la cristalización, se obtuvieron 360 experimentos (720, tomando en cuenta los duplicados), por proteína.

#### Lisozima

Esto significa que se visualizaron y clasificaron 5760 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. 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

**Tabla 6.2:** Condiciones de cristalización exitosas para la lisozima. AP y AS significan aceite de parafina y silicona, respectivamente.

## Tripsina

Para la tripsina, por lo menos al momento del día de la tercera foto, todos los resultados fueron negativos.

### 6.3 Dosis de radiación

Se escribió un programa en el lenguaje de programación bash que permite obtener la dosis de radiación absorbida, calculada por raddose [37]. 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 100 s, con la obtención de un patrón de difracción por segundo. Dicho programa muestrea un flujo de fotones de 1.0 a  $100 \times 10^{11}$  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 UNAM\* para correr dicho programa. Cabe aclarar que si bien los parámetros experimentales dados son idóneos, el fin de este programa es 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.

### 6.4 Colectas de datos

---

\* <https://biocomputo.ibt.unam.mx/>.

# A

## Proteínas más representadas

Se listan las 50 proteínas más representadas en el PDB, cuando cumplen los primeros cuatro filtros, mencionados en la sección: Limpieza de datos.

Número	Código	Entradas	No.	Código	Entradas
1	P11838	689	26	P23497	106
2	P00918	619	27	P00800	103
3	P00698	498	28	026232	102
4	P00760	310	29	P22629	97
5	Q6PJP8	296	30	P00489	96
6	Q6B0I6	269	31	P03367	96
7	P02766	258	32	P68400	95
8	095696	257	33	A0A073FPA6	84
9	Q9UIF8	227	34	P46881	79
10	P00644	216	35	P00811	78
11	P00720	215	36	Q16539	77
12	P24941	203	37	P14174	75
13	P42212	182	38	P00431	73
14	P29476	178	39	P01116	73
15	P02185	172	40	P00183	72
16	060885	170	41	P01112	72
17	P18031	152	42	Q00511	70
18	P61823	145	43	Q76353	68
19	P28720	144	44	P00282	64
20	P07900	142	45	P02883	63
21	P61626	139	46	P02945	63
22	P15121	125	47	P06873	63
23	P56817	124	48	P16113	63
24	P0DTD1	123	49	Q04609	63
25	P19491	116	50	P00772	61



# Referencias

Listado de referencias por orden de aparición.

- [1] Helen M. Berman y col. «The protein data bank». En: *Nucleic Acids Research* 28.1 (2000), págs. 235-242. doi: [10.1093/nar/28.1.235](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235) (vid. pág. 1).
- [2] Zbigniew Dauter. «Data-collection strategies». En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 55.10 (1999), págs. 1703-1717. doi: [10.1107/S0907444999008367](https://doi.org/10.1107/S0907444999008367) (vid. pág. 1).
- [3] Tsu Yi Teng y Keith Moffat. «Primary radiation damage of protein crystals by an intense synchrotron X-ray beam». En: *Journal of Synchrotron Radiation* 7.5 (2000), págs. 313-317. doi: [10.1107/S0909049500008694](https://doi.org/10.1107/S0909049500008694) (vid. págs. 3, 6).
- [4] Peter O'Neill, David L. Stevens y Elspeth F. Garman. «Physical and chemical considerations of damage induced in protein crystals by synchrotron radiation: A radiation chemical perspective». En: *Journal of Synchrotron Radiation* (2002). doi: [10.1107/S0909049502014553](https://doi.org/10.1107/S0909049502014553) (vid. pág. 3).
- [5] Martin Weik y col. «Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2000). doi: [10.1073/pnas.97.2.623](https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.623) (vid. págs. 3, 6).
- [6] Raimond B.G. Ravelli y Sean M. McSweeney. «The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures». En: *Structure* (2000). doi: [10.1016/S0969-2126\(00\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00109-X) (vid. págs. 3, 6).
- [7] Yasuhiro Matsui y col. «Specific damage induced by X-ray radiation and structural changes in the primary photoreaction of bacteriorhodopsin». En: *Journal of Molecular Biology* 324.3 (2002), págs. 469-481. doi: [10.1016/S0022-2836\(02\)01110-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01110-5) (vid. pág. 3).
- [8] James W. Murray, Elspeth F. Garman y Raimond B.G. Ravelli. «X-ray absorption by macromolecular crystals: The effects of wavelength and crystal composition on absorbed dose». En: *Journal of Applied Crystallography* 37.4 (2004), págs. 513-522. doi: [10.1107/S0021889804010660](https://doi.org/10.1107/S0021889804010660) (vid. pág. 4).
- [9] Elspeth F. Garman. «Radiation damage in macromolecular crystallography: What is it and why should we care?». En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* (2010). doi: [10.1107/S0907444910008656](https://doi.org/10.1107/S0907444910008656) (vid. pág. 4).
- [10] Elizabeth G. Allan y col. «To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question». En: *Journal of Synchrotron Radiation* (2013). doi: [10.1107/S0909049512046237](https://doi.org/10.1107/S0909049512046237) (vid. págs. 4, 6).
- [11] LLC Schrödinger. «The {PyMOL} Molecular Graphics System, version 2.4». 2015 (vid. pág. 4).
- [12] Max H. Nanao, George M. Sheldrick y Raimond B. G. Ravelli. «Improving radiation-damage substructures for RIP». En: *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 61.9 (2005), págs. 1227-1237. doi: [10.1107/S0907444905019360](https://doi.org/10.1107/S0907444905019360) (vid. pág. 4).
- [13] J. C. Kendrew y col. «A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis». En: *Nature* 181.4610 (1958), págs. 662-666. doi: [10.1038/181662a0](https://doi.org/10.1038/181662a0) (vid. pág. 5).
- [14] B. W. Low y col. «Studies of insulin crystals at low temperatures: effects on mosaic character and radiation sensitivity». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 56.6 (1966), págs. 1746-1750. doi: [10.1073/pnas.56.6.1746](https://doi.org/10.1073/pnas.56.6.1746) (vid. pág. 5).
- [15] D. J. Haas. «X-ray studies on lysozyme crystals at -50°C». En: *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 24.4 (1968), págs. 604-604. doi: [10.1107/s056774086800292x](https://doi.org/10.1107/s056774086800292x) (vid. pág. 5).
- [16] D. J. Haas y M. G. Rossmann. «Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75 °C». En: *Acta crystallographica. Section B: Structural crystallography and crystal chemistry* 26.7 (1970), págs. 998-1004. doi: [10.1107/S0567740870003485](https://doi.org/10.1107/S0567740870003485) (vid. pág. 5).

- [17] H. Hope. «Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method». En: *Acta Crystallographica Section B* 44.1 (1988), págs. 22-26. doi: [10.1107/S0108768187008632](https://doi.org/10.1107/S0108768187008632) (vid. pág. 5).
- [18] Elspeth Garman. «'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage.» En: *Current opinion in structural biology* 13.5 (2003), págs. 545-51. doi: [10.1016/j.sbi.2003.09.013](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.013) (vid. pág. 5).
- [19] J. C. Phillips y col. «Applications of synchrotron radiation to protein crystallography: Preliminary results». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1976). doi: [10.1073/pnas.73.1.128](https://doi.org/10.1073/pnas.73.1.128) (vid. pág. 5).
- [20] Davide Castelvecchi. «Next-generation X-ray source fires up». En: *Nature* 525.7567 (2015), págs. 15-16. doi: [10.1038/nature.2015.18253](https://doi.org/10.1038/nature.2015.18253) (vid. pág. 5).
- [21] Philip Willmott. *An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2019, pág. 504 (vid. pág. 6).
- [22] Elspeth F Garman y Martin Weik. «X-ray radiation damage to biological macromolecules: further insights». En: *Journal of Synchrotron Radiation* 24.1 (2017), págs. 1-6. doi: [10.1107/S160057751602018X](https://doi.org/10.1107/S160057751602018X) (vid. pág. 6).
- [23] Elzbieta Nowak y col. «To scavenge or not to scavenge: that is the question». En: *Acta Crystallographica Section D* 65.9 (2009), págs. 1004-1006. doi: [10.1107/S0907444909026821](https://doi.org/10.1107/S0907444909026821) (vid. págs. 6, 8).
- [24] Clemens von Sonntag. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*. Berlin Heidelberg: Springer, 2006 (vid. pág. 7).
- [25] Robin L. Owen y col. «Outrunning free radicals in room-temperature macromolecular crystallography». En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 68.7 (2012), págs. 810-818. doi: [10.1107/S0907444912012553](https://doi.org/10.1107/S0907444912012553) (vid. pág. 7).
- [26] Martyn C.R. Symons. «Electron movement through proteins and DNA». En: *Free Radical Biology and Medicine* 22.7 (1997), págs. 1271-1276. doi: [10.1016/S0891-5849\(96\)00548-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00548-5) (vid. pág. 7).
- [27] David M. Close y William A. Bernhard. «Comprehensive model for X-ray-induced damage in protein crystallography». En: *Journal of Synchrotron Radiation* 26.4 (2019), págs. 945-957. doi: [10.1107/S1600577519005083](https://doi.org/10.1107/S1600577519005083) (vid. pág. 7).
- [28] Alke Meents y col. «Origin and temperature dependence of radiation damage in biological samples at cryogenic temperatures». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.3 (2010), págs. 1094-1099. doi: [10.1073/pnas.0905481107](https://doi.org/10.1073/pnas.0905481107) (vid. pág. 7).
- [29] Kazutaka Katoh y Daron M. Standley. «MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability». En: *Molecular Biology and Evolution* 30.4 (2013), págs. 772-780. doi: [10.1093/molbev/mst010](https://doi.org/10.1093/molbev/mst010) (vid. pág. 14).
- [30] Fábio Madeira y col. «The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019». En: *Nucleic Acids Res.* 47.W1 (2019), W636-W641. doi: [10.1093/nar/gkz268](https://doi.org/10.1093/nar/gkz268) (vid. pág. 15).
- [31] Janet Newman. «Novel buffer systems for macromolecular crystallization». En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 60.3 (2004), págs. 610-612. doi: [10.1107/S0907444903029640](https://doi.org/10.1107/S0907444903029640) (vid. pág. 15).
- [32] A. D'Arcy y col. «A novel approach to crystallising proteins under oil». En: *Journal of Crystal Growth* 168.1-4 (1996), págs. 175-180. doi: [10.1016/0022-0248\(96\)00351-X](https://doi.org/10.1016/0022-0248(96)00351-X) (vid. pág. 15).
- [33] A. V. Svanidze, S. G. Lushnikov y L. A. Shuvalov. «Deuterated hen egg-white lysozyme crystals: Optimization of the growth conditions and morphology». En: *Crystallography Reports* 50.5 (2005), págs. 789-795. doi: [10.1134/1.2049397](https://doi.org/10.1134/1.2049397) (vid. pág. 16).
- [34] Andrew E. Bruno y col. «Classification of crystallization outcomes using deep convolutional neural networks». En: *arXiv* i (2018), págs. 1-16 (vid. pág. 16).
- [35] Oliver B. Zeldin, Markus Gerstel y Elspeth F. Garman. «RADDose-3D : time- and space-resolved modelling of dose in macromolecular crystallography». En: *Journal of Applied Crystallography* 46.4 (2013), págs. 1225-1230. doi: [10.1107/S0021889813011461](https://doi.org/10.1107/S0021889813011461) (vid. pág. 16).

- [36] Alex Bateman y col. «UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021». En: *Nucleic Acids Research* 49.D1 (2021), págs. D480-D489. doi: [10.1093/nar/gkaa1100](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100).
- [37] Charles S. Bury y col. «Estimate your dose: RADDOSE-3D». En: *Protein Science* 27.1 (2018), págs. 217-228. doi: [10.1002/pro.3302](https://doi.org/10.1002/pro.3302) (vid. pág. 18).

