



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“ESTUDIO DE LA CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS
REDOX BAJO UN CAMPO ELÉCTRICO INTERNO”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

YOBANA PÉREZ CERVERA



TUTOR: DR. BERNARDO A. FRONTANA URIBE 2009.



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.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

“Por mi raza hablará el espíritu” estoy orgullosa de haber estado en tus aulas, espero cumplirte como profesional y persona, gracias por abrirme tus puertas.

Al Dr. Bernardo A. Frontana Uribe

Por el espacio y apoyo que me brindo en su grupo de investigación, por sus innumerables consejos.

A B.Sc. Virginia Gómez Vidales

Por los estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): por la beca número 212846.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT (DGAPA): por el financiamiento de este proyecto registrado con el número IN-212207-3.

Al Honorable Jurado

Dra. Martha Aguilar, Dr. Luis A. Godínez, Dr. Roberto Arreguín, Dr. Adela Rodríguez, Dr. Pedro Roquero, por sus valiosos aportes para mejorar y enriquecer el contenido de esta tesis.

A Mis Amigos

Nancy Fiscal, Marisol Vásquez, Mayeline Luna, Diego A. Quiroga, Andrés F. Henao: Por el apoyo brindado durante mi estancia en México.

Dra. Cecilia Aguilar de Plata: Un libro abierto de experiencias, no escatima su generosidad, mi ejemplo de tenacidad, compromiso y calidad humana.

Dr. Edgar Zenteno Galindo: Por su apoyo incondicional, me ha enseñado a saltar la murallas que yo misma construyo, a soñar y a creer que si se puede.

Mis amigos en México: Paty, Pau, Laura, Dra. Paulina, Liliana, Eliuth, Olguita, Ileana, Irisol, John Maldonado, Ricardo, Joaquín, Jerry, Javier, Esther, Vanessa, Raúl, Andrea, Diana, Alberto, Arleth, Fernando, Alejandra y Eddy.



DEDICATORIA

A mis padres, Lucero y Edgar y mi hermano Jefferson

*Por cada momento que he dejado de compartir con ustedes, yo sé que no ha sido fácil sobrevivir a la
distancia.*

LOS AMO



Los resultados presentados en esta tesis se obtuvieron con experimentos realizados entre febrero de 2007 y septiembre del 2008 en el laboratorio de Electroquímica y Electrosíntesis y el de Bioquímica III del Instituto de Química, bajo la dirección del Dr. Bernardo A. Frontana Uribe y Dr. Abel Moreno, respectivamente.

Parte de la investigación fue publicada como (ver Anexo 1):

Yobana Pérez, Désir Eid, Francisco Acosta, Liliana Marín-García, Jean Jaconcic, Vivian Stojanoff, Bernardo A. Frontana-Urbe and Abel Moreno, "Electrochemically Assisted Protein Crystallization of Commercial Cytochrome c without Previous Purification". *Crystal Growth & Design*, **2008**. Vol 8, No.7. Pág. 2493-2496.

Parte de la investigación se presentó en:

SIMPOSIO INTERNO 2008, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM, MÉXICO

D. F., 4-8 de abril de 2008.

**12th INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE CRYSTALLIZATION OF BIOLOGICAL
MACROMOLECULES, CANCUN, MÉXICO**, 6-9 mayo de 2008

RESUMEN

El conocimiento de la estructura tridimensional de proteínas es una condición *sine qua non* para avanzar en diferentes líneas de investigación como la biología estructural, diagnóstico de enfermedades y el diseño de medicamentos. Actualmente la mayoría de los trabajos estructurales involucran la determinación de las estructuras 3D a través de la difracción de rayos X, técnica que requiere de un cristal de tamaño y calidad adecuados. Esto convierte al proceso de obtención del cristal en la clave de todo el estudio, pero también en una limitación. La búsqueda de nuevos métodos para mejorar la calidad de cristales de proteínas siempre ha sido un reto; la cristalización de proteínas bajo un campo eléctrico interno es un claro ejemplo de esta búsqueda.

En este trabajo se presentan las investigaciones realizadas sobre el efecto que tiene un campo eléctrico interno en la cristalización de proteínas redox (catalasa y citocromo c) utilizando una nueva celda que contiene una microestructura interdigital de platino. Se realizaron barridos de corriente de 0.5 μA hasta 5.0 μA , el fenómeno de cristalización fue monitoreado mediante la adaptación de una celda de dispersión dinámica de luz. Posteriormente se estudió la cristalización en macroceldas con ángulos de electrodos a 90° y 180°. Finalmente y con el objetivo de determinar cualquier cambio en el estado de oxidación de los metales del grupo hemo de las metaloenzimas se llevaron a cabo experimentos por Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) del depósito de proteínas sobre los electrodos de platino.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
DDL	Dispersión dinámica de luz
dH	Diámetro Hidrodinámico
E	Vector campo eléctrico
FSLI	Femto-Second Laser Radiation
IHP	Plano Interno del Helmholtz
ME	Microscopia Electrónica
MFA	Microscopia de Fuerza Atómica
OHP	Plano Externo de Helmholtz
pI	Punto isoelectrico
PVC	Cloruro de Polivinilo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
Sine qua non	Condición sin la cual no
TFA	Ácido Trifluoroacético

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Cristalogénesis biológica	4
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo General.....	11
3.2 Objetivos Específicos	11
4. ANTECEDENTES	13
4.1 La cristalización	13
4.1.1 Pasos para la obtención de cristales.....	14
4.1.2 Métodos de cristalización.....	17
4.2 Nuevas Tendencias en el Estudios del Crecimiento de Cristales	19
4.3 Dispersión Dinámica de Luz (DDL)	25
4.4 Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)	27
4.5 Proteínas de Estudio: Catalasa y Citocromo c	30
4.5.1 Catalasa de Hígado de Bovino	31
4.5.2 Citocromo c de Mitocondrias Bovinas.....	31
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
5.1 Instrumentos.....	35
5.2 Reactivos y Materiales	36

<u>5.3</u>	<u>Adecuación de Condiciones de Cristalización</u>	36
<u>5.3.1</u>	<u>Estudios de Dispersión Dinámica de Luz (DDL)</u>	36
<u>5.3.2</u>	<u>Análisis de Estabilidad de Catalasa a Diferentes Temperaturas</u>	36
<u>5.3.3</u>	<u>Pruebas de Cristalización en Microbatch</u>	37
<u>5.3.4</u>	<u>Medición del Grosor del Depósito de Pt en la Microestructura Interdigital por MFA</u>	37
<u>5.4</u>	<u>Construcción de las Celdas de Cristalización</u>	38
<u>5.4.1</u>	<u>Construcción de Celdas con Microestructura interdigital de Platino</u>	38
<u>5.4.2</u>	<u>Celdas de Cristalización con Ángulos de Electrodo a 90 y 180°</u>	40
<u>5.5</u>	<u>Cristalización Bajo un Campo Eléctrico Interno</u>	41
<u>5.5.2</u>	<u>Cristalización en celdas de 180° y 90°</u>	43
<u>5.5.3</u>	<u>Seguimiento por DDL del Proceso de Cristalización</u>	44
<u>5.5.4</u>	<u>Procedimientos de los Estudios de Cristalización</u>	45
<u>5.5.5</u>	<u>Análisis de Citocromo c por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)</u>	46
<u>5.5.6</u>	<u>Análisis por Resonancia Paramagnética Electrónica</u>	47
6.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	49
<u>6.1</u>	<u>Adecuación de Condiciones de Cristalización de Catalasa</u>	49
<u>6.2</u>	<u>Análisis de Homogeneidad y Estabilidad de la Catalasa</u>	49
<u>6.3</u>	<u>Cristalización de Catalasa en Microestructuras Interdigitales</u>	54

<u>6.4</u>	<u>Monitoreo de Cristalización Mediante Dispersión Dinámica de Luz</u>	58
<u>6.5</u>	<u>Cristalización de Catalasa en Celdas con Electrodo de Platino a 90° y 180°</u>	68
<u>6.6</u>	<u>Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica del Depósito de Proteínas Redox sobre Electrodo de Platino</u>	72
<u>6.6.1</u>	<u>Estudio del Depósito de Catalasa</u>	73
<u>6.7</u>	<u>Estudio de la Cristalización de Citocromo c Comercial</u>	79
<u>6.7.1</u>	<u>Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica de Citocromo c</u>	88
<u>7.</u>	<u>CONCLUSIONES</u>	96
<u>8.</u>	<u>PERSPECTIVAS</u>	99
<u>9.</u>	<u>ANEXO I</u>	101
<u>10.</u>	<u>REFERENCIAS</u>	106

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cristalogénesis biológica

Es una ciencia multidisciplinaria que busca describir y entender el crecimiento de cristales de macromoléculas biológicas. Esta ciencia ha emergido junto con la moderna biotecnología y particularmente la ingeniería macromolecular. Su desarrollo ha sido impulsado por la necesidad del conocimiento estructural de las biomoléculas y sus complejos, no sólo para la investigación biológica sino también para el entendimiento de los problemas biotecnológicos.¹

Dada la gran dificultad que presenta entender el proceso de crecimiento de cristales de moléculas tan complejas como las proteínas, en los últimos años se ha incrementado el número de científicos interesados en el crecimiento de cristales para la cristalografía de rayos X. Estos han abordado el problema desde diferentes puntos de vista, como por ejemplo, el electroenfoque, la alta presión hidrostática, campos magnéticos y campos eléctricos.²

Los avances en genómica y proteómica, han expuesto miles de nuevas proteínas para su estudio en proyectos de biología estructural y diseño de blancos de medicamentos. La secuenciación completa del genoma de organismos vertebrados e invertebrados,³ ha aumentado los esfuerzos a nivel internacional para desarrollar métodos y tecnologías que permitan la rápida elucidación de la estructura tridimensional (3D) de las proteínas.⁴

Hasta ahora, la cristalografía de difracción por rayos X de monocristales es la técnica por excelencia para proporcionar datos estructurales con resolución atómica con el propósito antes mencionado; sin embargo, para utilizar esta técnica es necesario contar con

cristales de tamaño y calidad adecuados, que permitan coleccionar datos precisos, obteniendo así una estructura 3D de alta resolución. Esto convierte a los cristales en la clave de todo el proceso, pero también en el cuello de botella.⁵

Uno de los inconvenientes en la obtención de cristales de alta calidad es el fenómeno de convección que se da en cada uno de los experimentos realizados bajo el campo de gravedad de la tierra. Esto demuestra que se deben tener en cuenta los problemas involucrados en los fenómenos de transporte durante el proceso de cristalización, lo cual debe ser cuidadosamente estudiado al diseñar un método de crecimiento de cristales. Este tipo de características sumado al deficiente entendimiento de muchas de las propiedades fisicoquímicas de este fenómeno constituyen las razones por las que el proceso de cristalización es difícil.

Hasta ahora, se han estudiado diferentes parámetros fisicoquímicos que controlan el fenómeno de nucleación; entre estos parámetros se encuentran el electroenfoque, la presión hidrostática, campos magnéticos y campos eléctricos.⁶

Las macromoléculas biológicas, como las proteínas, contienen diferentes grupos iónicos y polares. De manera inherente poseen una carga significativa⁷ dependiendo del pH de la solución. El medio en el que se encuentran las moléculas y sus agregados puede ser perturbado cuando se aplica un campo eléctrico y la interacción de moléculas cargadas con un campo eléctrico puede alterar su distribución dentro de la solución y permitir una nucleación local. Los experimentos de cristalización de proteínas inducida por campos eléctricos, puede ser clasificada en dos categorías principales, dependiendo si los electrodos están en contacto directo con la solución de proteína (llamado campo eléctrico interno) o si la solución se encuentra separada de los electrodos (llamado

campo eléctrico externo).⁸ En este último caso, el campo eléctrico es aplicado sin que haya contacto entre la solución y los electrodos y consecuentemente sin la corriente a través de la solución.

En esta investigación se estudió el proceso de cristalización de proteínas redox como citocromo c y catalasa bajo un campo eléctrico interno. La función del citocromo c de mitocondrias bovinas es la de transferir electrones desde el complejo III al complejo IV del espacio intermembranal de las mitocondrias, gracias a la presencia del grupo redox hemo.⁹ La catalasa es capaz de reducir peróxidos usando donadores de electrones,¹⁰ estas propiedades tanto del citocromo c como de la catalasa, se dan gracias a la presencia del grupo redox hemo. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron diferentes técnicas, entre ellas: Dispersión Dinámica de Luz, Resonancia Paramagnética Electrónica y Cromatografía Líquida de Alta Resolución. De esta manera se pudo entender, aún más, el fascinante y complejo proceso de cristalización de las proteínas.

-
-
- ¹ Giegé, R, Lorber, B and Dietrich, A. Crystallogenesi s of Biological Macromolecules: Facts and Perspectives. *Acta Cryst.* (1994). D50, 339-350.
- ² Al-haq, Muhammad Imran; Lebrasseur, Eric; Tsuchiya, Hidenori¹; Torii, Toru. Protein crystallization under an electric field. *Crystallography Reviews*, Volume 13, Number 1, January (2007). pp. 29-64 (36).
- ³ Roses, D. Genome-based Pharmacogenetics and the Pharmaceutical Industry, *Nat. Rev. Drug Discovery.* (2002). 1, 541-549.
- ⁴ Kuhn, P.; Wilson, K.; Patch, M. G.; Stevens, R. C. The genesis of high-throughput structure-based drug discovery using protein crystallography, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2002) 6, 704-710.
- ⁵ McPherson, A. Macromolecular crystallization in the structural genomics era, *J. Struct. Biol.* (2003).142, 1-2.
- ⁶ Protein crystallization under an electric field. Muhammad Imran Al-haq a; Eric Lebrasseur b; Hidenori Tsuchiya a; Toru Torii aba Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa city, Chiba Prefecture, Japan. Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Tokyo, Japan. (2007). vol.13, No. 1, 29-64.
- ⁷ Loustyuk, P.G. Grozdinsky, D.M., Zima, V.P, Magura, E.P, Shuba, M.F, Biophysics, Visha-Shkola, Kiev, (1988).
- ⁸ Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Capelle, B.; Aubry, A. Crystallization of proteins under an external electric field, *J. Cryst. Growth.* (1999). 200, 575-582.

⁹ Scott, R.; Mauk, G. Cytochrome c: A multidisciplinary Approach; University Sciences books: Sausalito, CA, (1996).

¹⁰ McPherson, A. Jr & Rich, A. Arch. Biochem. Biophys. 157. (1973). 23-27.

HIPÓTESIS

1. HIPÓTESIS

Si la aplicación de un campo eléctrico interno, en la mayoría de los casos, afecta el proceso de cristalización de proteínas no redox, acelerando la cinética del crecimiento del cristal y favoreciendo la adsorción de los mismos en los electrodos, se pretende que se obtendrá el mismo comportamiento al intentar cristalizar proteínas con propiedades redox bajo un campo eléctrico interno.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar el crecimiento de monocristales de proteínas redox en un campo eléctrico interno, empleando diferentes celdas.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Diseñar y construir un nuevo modelo de celda que permita estudiar el comportamiento de proteínas redox bajo la influencia de un campo eléctrico interno.

- ✓ Monitorear el proceso de agregación y de cristalización de proteínas redox por medio de la técnica de dispersión dinámica de luz, con una celda de DDL modificada para electroquímica.

- ✓ Determinar mediante resonancia paramagnética electrónica si existe cambio en el estado de oxidación en el metal del centro metálico de las proteínas redox cuando se adsorben sobre el electrodo de platino, al imponer una corriente eléctrica.

ANTECEDENTES

4. ANTECEDENTES

4.1 La cristalización

Es una de las ciencias más antiguas y para moléculas de origen biológico este campo se empezó a desarrollar hace más de un siglo, tanto en el campo de la fisicoquímica como a nivel biológico. Durante la década 1847-1857, Louis Pasteur estableció en Strasbourg las reglas de la estereoquímica cuando estudió los cristales de ácido tartárico.¹ Independientemente, con los primeros acontecimientos exitosos que datan desde 1840, químicos fisiológicos cristalizaron varias proteínas, aunque en ese momento era desconocida su naturaleza macromolecular.² A comienzos del siglo pasado cientos de varias especies de hemoglobinas fueron cristalizadas.³ En esa época, la cristalización, era únicamente, una herramienta para la purificación de proteínas.

Se conoce que las primeras moléculas cristalizadas por bioquímicos (por ejemplo, proteínas de almacenamiento de plantas, globinas, proteasas, nucleasas y partículas simétricas de virus) fueron moléculas estables con estructuras compactas. Por ejemplo, en 1934, Dorothy Hodgkin, utilizó por primera vez, cristales de proteínas para estudios de rayos X, obteniendo el primer patrón de difracción de un cristal de pepsina⁴.

Mientras se desarrollaba el método de los rayos X, el problema de la cristalización de proteínas no fue realmente crucial y de ninguna manera representó el cuello de botella para la cristalografía de rayos X. La situación cambió cuando los métodos para resolver estructuras mejoraron y cuando la biología molecular tuvo acceso a moléculas más complejas.

La cristalización de proteínas se ha convertido en el punto clave de los estudios de biología molecular, medicina, física y de la química de las proteínas e incluso para obtener parámetros cinéticos. Esto debido a que dichos estudios requieren de las estructuras tridimensionales de las proteínas, las cuales han sido determinadas en un 80% por la difracción de rayos X gracias a la obtención de cristales de alta calidad.⁵

Sin embargo, obtener los cristales de proteína no es una tarea sencilla, ya que se requiere unir las técnicas clásicas de cristalización para moléculas pequeñas, con las ventajas actuales de la biología molecular. Esta unión ha provocado el surgimiento de una nueva ciencia llamada cristalogénesis, la cual se encarga de estudiar la fisicoquímica del crecimiento de cristales de moléculas de alto peso molecular y de la búsqueda de mejores condiciones para su cristalización.

4.1.1 Pasos para la obtención de cristales

1. La formación del núcleo: implica el ordenamiento y agrupamiento en centros discretos de las partículas estructurales como átomos, iones, moléculas o macromoléculas que sirven de “semilla” para la formación del cristal. Esta etapa se da cuando se alcanza la sobresaturación, punto B, **figura 1** y puede llevarse a cabo sobre partículas de su misma especie (nucleación homogénea) o sobre una partícula de impureza o una superficie que actúe como centro de nucleación (nucleación heterogénea).

2. El crecimiento del núcleo: Esta es la etapa de transición en la cual el núcleo aumenta su tamaño para formar el cristal, debe llevarse a cabo a una velocidad constante y a una temperatura controlada para obtener un cristal de alta calidad.

Durante esta trayectoria se pasa de la sobresaturación al equilibrio, trayectoria del punto B al punto C, **figura 1**.

1. La obtención del cristal: En esta etapa el cristal llega a su tamaño final (punto C, **figura 1**). Si el proceso de cristalización se llevó a cabo adecuadamente se obtienen cristales de buena calidad, aptos para caracterizar su estructura tridimensional por difracción de rayos X. Un cristal de buena calidad, además de ser de buen tamaño, debe tener sus moléculas igualmente orientadas respecto al rayo incidente y debe resistir la radiación. Esto quiere decir que la estructura interna del cristal debe tener el menor número de defectos o impurezas; así las moléculas son capaces de difractar los rayos X y proporcionan patrones de difracción con alta resolución que pueden caracterizarse.

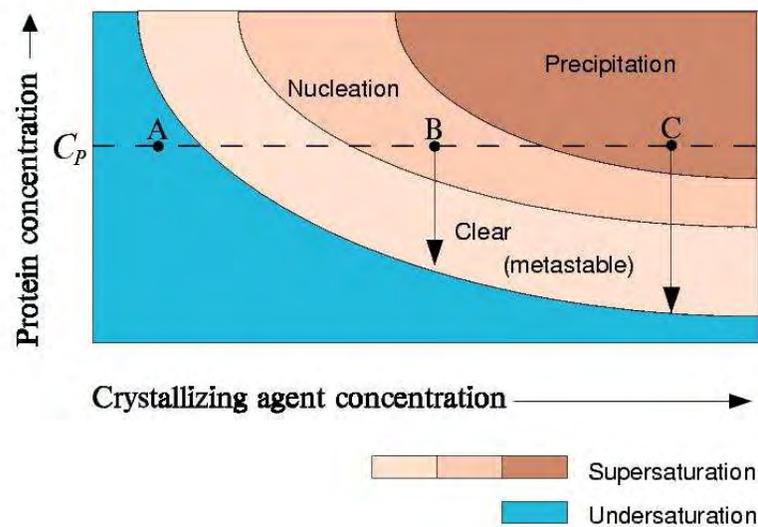


Figura 1: Gráfico de Ostwald-Miers: ⁶ este gráfico muestra el camino de la cristalización de una macromolécula biológica, comenzando en una concentración de subsaturación (punto A) para posteriormente alcanzar una sobresaturación (punto B) donde se produce la nucleación, y finalmente se tiende al equilibrio en donde se obtienen los cristales (punto C).

En general el crecimiento de un cristal debe llevarse a cabo lentamente, de tal manera que un arreglo regular de iones, moléculas o macromoléculas permita la obtención de un cristal de excelente calidad. En el ordenamiento de la estructura periódica tridimensional, dos son los procesos más importantes. El primero de ellos es el transporte de las moléculas hacia las caras del cristal por difusión o convección, y el segundo es la incorporación de esas moléculas a aquellas posiciones sobre la superficie del cristal que mejor se adaptan al orden periódico tridimensional. Si queremos crear una estructura periódica perfecta necesitamos suministrar las unidades de crecimiento a una velocidad igual o menor a la necesaria para que éstas se coloquen en la posición correcta. Para asegurar que el transporte de las moléculas hacia el cristal sea lo más lento posible, es conveniente utilizar medios puramente difusivos. La difusión es el medio de transporte de masa más lento y consiste en un flujo direccional que se produce a escala microscópica por o como consecuencia de un gradiente de concentración. Gradiente generado por la incorporación de macromoléculas al cristal.

Para hacer que los procesos difusivos dominen el transporte de masa de tal forma que se limite lo más posible el transporte convectivo, mucho más rápido y caótico, existen dos posibilidades:

1. Minimizar el efecto de las fuerzas gravitatorias, incrementando la intensidad de otro tipo de fuerzas que no direccionen la cristalización en un sólo sentido, por ejemplo las fuerzas capilares, para lo cual se confina la disolución en volúmenes pequeños dentro de:

-
- a. Capilares: se ha descrito el uso de celdas de microdiálisis, formadas por tubos capilares sellados con tapones de gel (poliacrilamida) para reducir la convección en soluciones de cristalización y obtener mejores cristales.⁷
 - b. Geles: puesto que el entramado sólido de un gel, que encierra un sistema poroso relleno de un fluido, permite la difusión de reactivos a la vez que reduce enormemente el efecto de las fuerzas gravitacionales sobre la disolución.⁸
2. Crecer los cristales en microgravedad (en el espacio), una tecnología costosa que aún tiene un cierto número de problemas a resolver, pero que obviamente es el escenario ideal para realizar experimentos en medios difusivos tridimensionales.

En conclusión, la búsqueda de las condiciones óptimas para un experimento de cristalización, es un trabajo complicado y requiere la realización de cientos de experimentos, dependiendo de la técnica realizada.

4.1.2 Métodos de cristalización

Para poder obtener los cristales se utilizan diferentes métodos de cristalización, entre ellos se tienen el crecimiento de cristales a partir de disoluciones, fundidos, en fase de vapor o en estado sólido. De éstos, los métodos de cristalización en solución han sido los más utilizados en la cristalización de proteínas, debido a que estas macromoléculas son muy sensibles y no todas son termoestables.

Los métodos de cristalización en disolución pueden ser microdiálisis o macrodiálisis. En ambos métodos se utiliza una membrana capaz de generar la sobresaturación necesaria para la cristalización. La membrana impide que la proteína salga,

permitiendo la entrada del agente precipitante, generando así las condiciones de sobresaturación necesarias.

Los métodos de difusión en fase vapor son conocidos como métodos clásicos. En dichos métodos la sobresaturación se alcanza por evaporación o concentración de una gota mediante un agente precipitante. Dependiendo de cómo es colocada la gota que contiene la proteína, se clasifican en: método de la gota colgante, método de la gota sedente y método de la gota en sándwich.

Los métodos de cristalización convencionales son ilustrados en la **figura 2**.

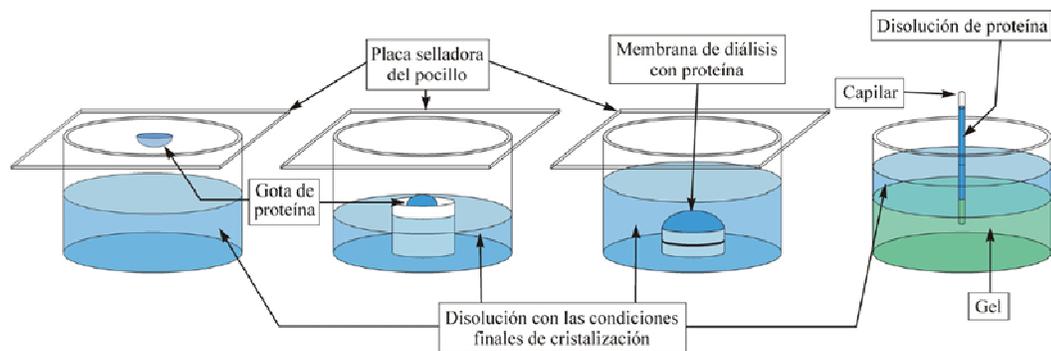


Figura 2. Ilustración de los métodos de cristalización a) método de la gota colgante b) método de la gota sedente c) método de diálisis d) método de difusión en gel.

Finalmente el método más sencillo para cristalizar una proteína y que se utilizará en este trabajo de investigación es el método batch que consiste en mezclar todos los componentes de la cristalización (la proteína, el agente precipitante y el disolvente) en

condiciones de metaestabilidad, para posteriormente dejarlos reposar y obtener los cristales.

A pesar de contar con métodos ya bien establecidos, para obtener cristales de proteína con alta calidad es necesario desarrollar nuevos métodos de crecimiento. En estos se deberá eficientar el tiempo y el tamaño del cristal, sin disminuir la calidad del mismo.

4.2 Nuevas Tendencias en el Estudios del Crecimiento de Cristales

Hoy en día, gracias al conocimiento de la estructura tridimensional de blancos biológicos específicos, se están desarrollando varios proyectos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades; la limitación ha sido la obtención de biocristales de alta calidad para ser investigados por difracción de rayos X. Sin embargo se han estudiado nuevos procedimientos como el uso de campos de ultrasonido,⁹ magnéticos,¹⁰ eléctricos internos^{26,27,28} y externos;**Error! Marcador no definido.**^{9,11,12,13} la aplicación de altas presiones¹⁴ y el uso de radiación laser,¹⁵ como el método de FSLI¹⁶(Femto-Second Laser Radiation). La innovación en el campo de la biocristalogénesis ha llegado incluso al crecimiento de cristales en vuelos parabólicos, en cohetes sondas, en lanzaderas espaciales y en estaciones orbitales, en condiciones de microgravedad,^{17,18} proyectos que a pesar de los excelentes resultados que arrojan se han visto disminuidos en los últimos años, debido al costo y a otras desventajas como baja reproducibilidad y confiabilidad.

En los estudios realizados con la aplicación de un campo eléctrico interno para la cristalización de proteínas, se han obtenido resultados relacionados con la aceleración

cinética del crecimiento de cristal²⁶, observando que la cristalización es favorecida cerca o sobre los electrodos.²⁷ El proceso de migración y adsorción de los cristales en los electrodos²⁹ ha demostrado generar cristales de excelente calidad, que son adecuados para los estudios por rayos X. El objetivo de este estudio está relacionado con la localización del sistema en el área de nucleación en la curva de solubilidad y dar energía al mismo para que inicie el proceso espontáneo de la primera nucleación. Para separar el fenómeno de nucleación y el proceso de crecimiento de cristal, es necesario buscar una técnica precisa para investigar los límites de estos dos procesos. En este sentido, el método de dispersión dinámica de luz ayuda a definir las áreas donde ocurre la nucleación.^{19,20,21} Mientras que la microscopía de fuerza atómica²² o video-microscopía es apropiada para investigar mecanismos de crecimiento de cristales.

4.2.1.1 Cristalización de Proteínas usando Campos Eléctricos

Dos aproximaciones diferentes se han usado para cristalizar proteínas bajo campos eléctricos generados por corriente directa: a) campo eléctrico interno y b) campo eléctrico externo, **figura 3.;****Error! Marcador no definido.**

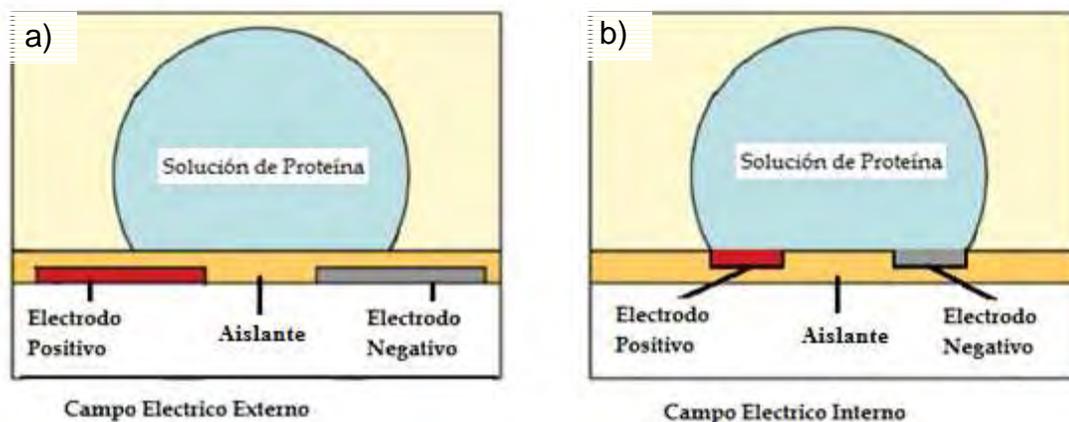


Figura 3. Representación de una celda de cristalización utilizando un campo eléctrico a) externo e b) interno.

Los experimentos con campo eléctrico externo requieren altos campos por encima de 7.5 kV/cm ,^{23,24,25} como consecuencia los dispositivos eléctricos que llevan a cabo estos experimentos no están del todo disponibles en un laboratorio de bioquímica. En esta técnica, los electrodos (generalmente placas paralelas o electrodos impresos en un material inerte) no están en contacto con la solución que contiene la proteína y el campo eléctrico afecta la solución de cristalización sin que ocurran reacciones electroquímicas sobre los electrodos. El principal efecto observado en estos experimentos es una orientación inducida de los cristales y la limitación del número de núcleos observados. Estas observaciones han sido explicadas sugiriendo gradientes de concentraciones de proteínas grandes dentro del líquido madre, provocado por el campo eléctrico externo, dando lugar a una región de sobresaturación local en la solución de cristalización.

A diferencia del campo eléctrico externo, el campo eléctrico interno requiere que los electrodos estén en contacto con la solución de cristalización. Esta metodología requiere de una aplicación precisa y controlada de corriente o potencial, debido a la posibilidad de que ocurran reacciones electroquímicas sobre los electrodos. Por lo tanto, estas variables deben estar en límites apropiados para producir sólo corriente capacitiva. La corriente capacitiva es asociada con la migración de iones que cargan la doble capa eléctrica de los electrodos con iones de polaridad opuesta. Esta corriente puede ser observada por medio de una voltamperometría cíclica como una gran meseta de corriente, localizada justo antes que la corriente asociada con las

reacciones electroquímicas (corriente Faradaica) se vuelvan dominantes en el sistema, **figura 4.**

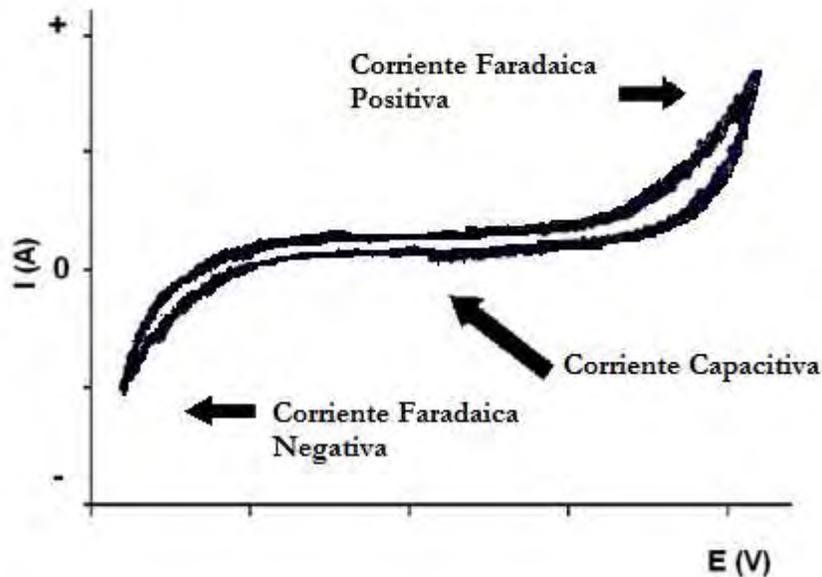


Figura 4. Voltamperograma cíclico mostrando la corriente faradaica y la región de corriente capacitiva.

Los valores de corriente y potencial usados están en el rango de $1-20 \mu\text{A}$ y $\pm 1 \text{ V}$.^{26,27,28,29}

Es en la doble capa eléctrica donde ocurre la transferencia de carga de los procesos electroquímicos, de ahí la importancia de su estudio. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos éstos se polarizan, acumulando carga en su superficie, adicionalmente con la influencia del campo eléctrico, los iones de carga opuesta a la del electrodo polarizado son atraídos hacia éste formando una primera capa, conocida con el nombre de plano interno del Helmholtz (IHP), mientras que los iones de carga opuesta son repelidos formando el plano externo de Helmholtz (OHP) **figura 5.**³⁰ El fenómeno de la doble capa eléctrica puede explicar los resultados de

algunos trabajos recientes de cristalización de proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico interno, que muestran que cristales de lisozima, proteína con carga neta positiva al pH de trabajo se orientan hacia el cátodo.²⁷ Esto se explica porque los procesos de adsorción se llevan a cabo en el plano interno de Helmholtz.

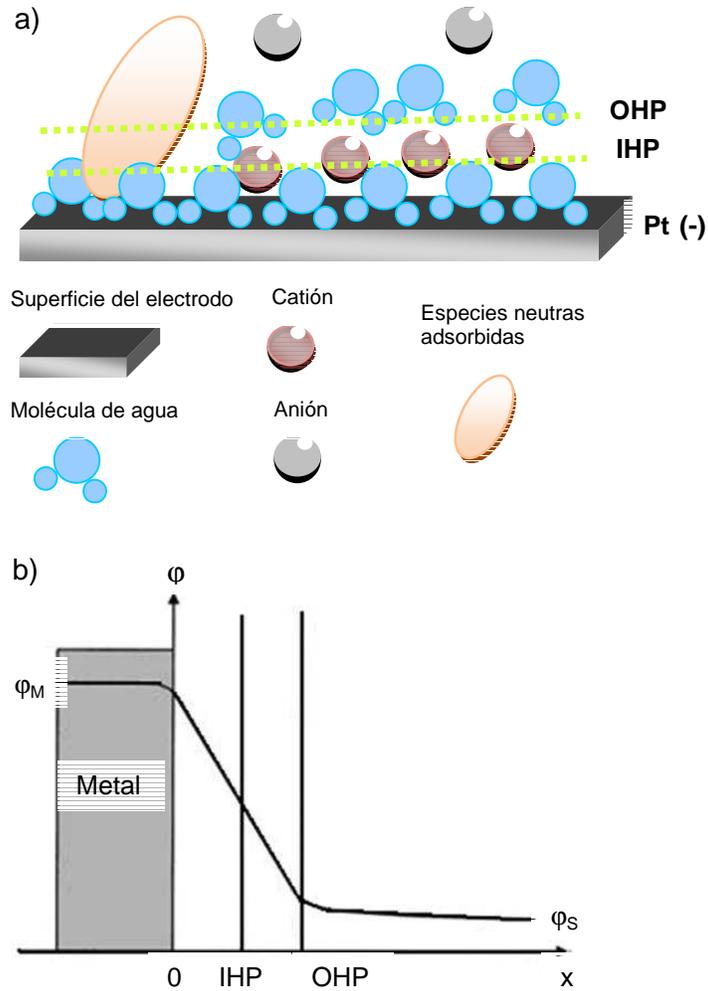


Figura 5. a) Representación general de la doble capa eléctrica formada en la interfase electrolito-metal b) perfil de potencial formado sobre un electrodo metálico cargado negativamente.

El fenómeno de transporte de iones provoca un flujo controlado de masa directa hacia los electrodos. En el caso de la solución de proteínas, estas macromoléculas pueden ser vistas como iones gigantes, debido a la carga neta que tienen en el pH de la cristalización, **figura 6.**³¹

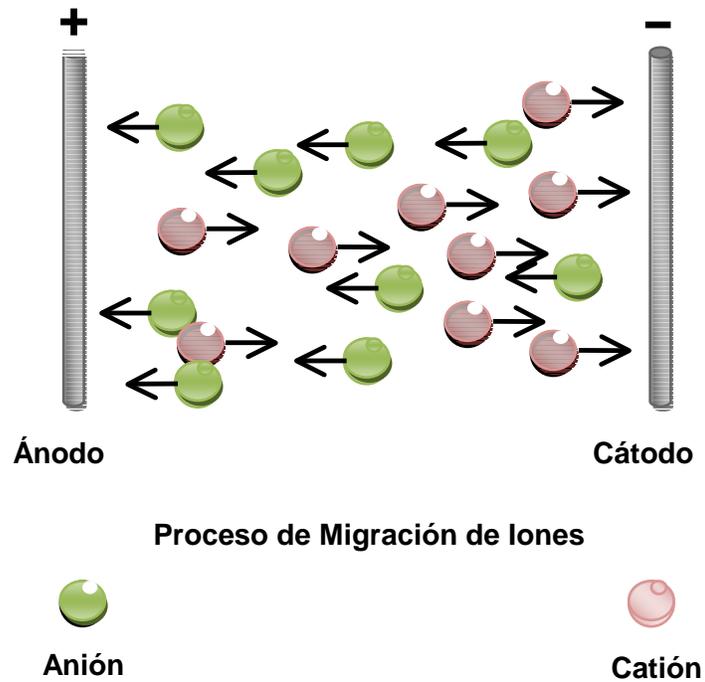


Figura 6. Esquema del proceso de migración de iones promovido por un campo eléctrico interno.

La migración es el proceso en virtud de la cual, se mueven los iones bajo la influencia de un campo eléctrico. Este proceso es la causa primaria de transferencia de masa en el seno de una disolución en una celda. En general, la velocidad a la que migran los iones hacia o desde la superficie del electrodo aumenta a medida que incrementa el potencial del electrodo. Este movimiento de cargas constituye una corriente, que también aumenta con el potencial. Cuanto mayor es el número de especies de iones

en una disolución dada, menor es la fracción de la carga total que es transportada por una especie en particular.³²

4.3 Dispersión Dinámica de Luz (DDL)

Es de gran ayuda optimizar las condiciones experimentales, tales como los componentes del amortiguador y la temperatura para incrementar las probabilidades de la cristalización. Para esta optimización de parámetros, es necesario analizar el estado de agregación y la estabilidad de la muestra macromolecular. Existen muchos métodos que pueden ser usados para medir el tamaño o el estado de agregación, por ejemplo, sedimentación al equilibrio, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis de gel nativo y DDL. De estos métodos, DDL, es el implemento más práctico, rápido de ejecutar, y no destructivo de la muestra.³³ Esta es una técnica empleada en el crecimiento de cristales de biomoléculas, para estudiar las condiciones de pre-nucleación y nucleación, así como la solubilidad y la agregación de la proteína, es decir, las interacciones proteína – proteína y disolvente – proteína en diferentes condiciones.²⁰ En esta técnica, un equipo de DDL irradia una solución de moléculas de proteína con un haz monocromático de luz y analiza las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por las proteínas en solución (analito) en función del tiempo; de esta manera la DDL proporciona información acerca del diámetro hidrodinámico de la proteína, pudiéndose observar la monodispersidad de la muestra (esto es, que existan en solución partículas de tamaño uniforme) o la formación de agregados de proteína.¹⁹ El equipo también permite analizar la estabilidad del analito en función de la temperatura, **figura 7**.

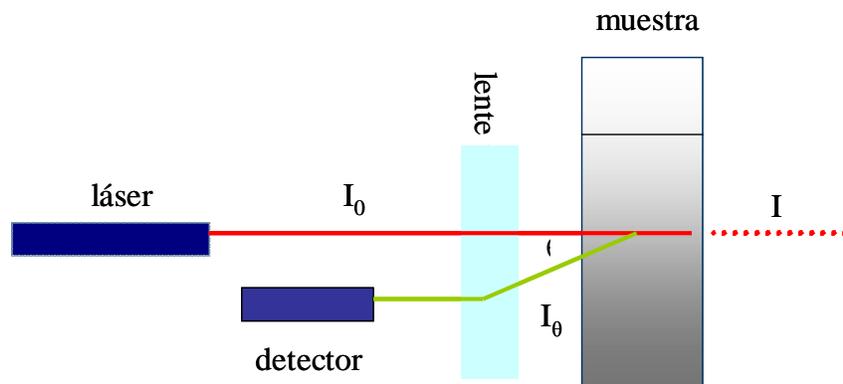


Figura 7. Esquema simplificado del experimento de dispersión dinámica de luz. Parte de la Intensidad del rayo incidente sobre la muestra es dispersado por las partículas en solución y es monitoreado en el ángulo θ por un detector.

Las variaciones en el campo eléctrico total de dispersión se deben al movimiento browniano y a la difusión traslacional de las proteínas dispersantes en solución, que a su vez depende de parámetros como el disolvente y la temperatura del sistema involucrado en el estudio. De esta manera se correlacionan los distintos campos eléctricos dispersados por las proteínas en solución en una escala de tiempo y se construye una función de correlación.

Debido al movimiento Browniano, la velocidad de decaimiento de la función de correlación está relacionada con el tamaño de la partícula, así, la velocidad de decaimiento es mucho mayor para partículas pequeñas que para partículas grandes porque las partículas pequeñas se mueven más rápido que las grandes, **figura 8.**

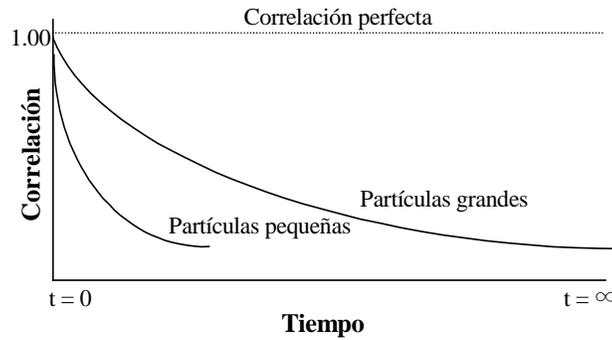


Figura 8. Función de correlación para partículas grandes y pequeñas en una medición de DDL.

Después de que la función de correlación se mide, los algoritmos del software calculan el coeficiente de difusión traslacional (D) de la proteína (o agregados de proteína). De esta manera, el diámetro hidrodinámico (d_H) de la proteína puede ser calculado por medio de la ecuación de Stokes-Einstein, ecuación 1.

$$\text{Ecuación 1. } d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D_T}$$

En donde:

- d_H : Diámetro hidrodinámico
- k : Constante de Boltzmann
- η : Viscosidad del solvente
- T : Temperatura absoluta

4.4 Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)

Las técnicas físicas han sido usadas ampliamente en el estudio de la relación estructura-función de las proteínas. Entre ellas, RPE para las especies paramagnety las técnicas relacionadas han mostrado ser herramientas útiles para el análisis de metaloproteínas involucradas en procesos redox. Estas técnicas dan información acerca de la estructura electrónica de los metales presentes en las proteínas, como

también del ambiente en que se encuentran, lo cual es relevante en el conocimiento de la función de éstas. Por su carácter no destructivo y su alta versatilidad es el complemento ideal de otros métodos de análisis, permitiendo obtener valiosa información estructural y dinámica.

El paramagnetismo electrónico o simplemente paramagnetismo, es la propiedad de ciertas sustancias a magnetizarse en la dirección y sentido de un campo magnético exterior, en magnitud proporcional a éste, **figura 9**.

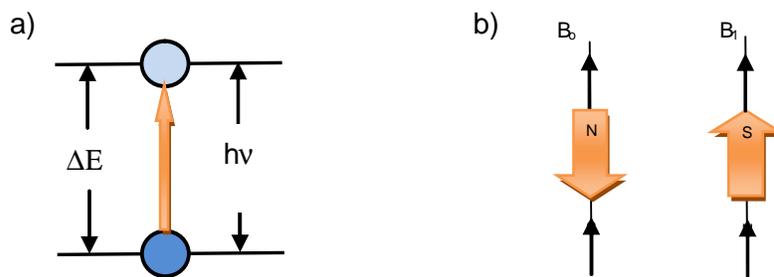


Figura 9. a. Transición asociada con la absorción de la energía electromagnética, b. Energía de orientación mínima y máxima de μ con respecto al campo magnético B_0

El paramagnetismo electrónico de una sustancia se debe a que contiene electrones cuyos momentos magnéticos no están cancelados. Puesto que la cancelación implica la existencia de pares de electrones de espín opuesto, los átomos, iones o moléculas que contengan un número impar de electrones, presentan paramagnetismo. En principio, la posesión de un momento neto de espín electrónico es la única condición necesaria (y suficiente) que debe cumplir un material para poder ser estudiado por RPE. Son numerosos los sistemas que satisfacen esta condición: a) radicales libres, en estado sólido, líquido o gaseoso b) la mayoría de los metales de transición y tierras raras c) defectos en los cristales iónicos d) electrones de conducción en los semiconductores e) biradicales, sistemas en estado triplete. ³⁴

El campo magnético B_0 requerido para la resonancia paramagnética electrónica es directamente proporcional a la frecuencia ν del espectrómetro y por tanto la condición de resonancia que se escribe experimentalmente como:

$$\text{Ecuación 2. } h\nu = g\mu_B B_0$$

Donde a g se le conoce como factor g y es característico de la muestra y debe determinarse experimentalmente, μ_B es el magnetón de Bohr y ν la constante de Planck.

La RPE de proteínas redox es una técnica adecuada para obtener conocimiento de la estructura electrónica del sitio activo e indicar los posibles mecanismos de la transferencia de electrones. La información intrínseca de los datos de relajación proporciona información adecuada para el entendimiento de la estructura electrónica que no se obtiene por otras técnicas espectroscópicas.³⁵

Un ejemplo, es el caso del ion Fe^{3+} , que puede presentar configuraciones de alto espín, de bajo espín, o incluso de espín intermedio, dependiendo de los ligandos que coordinen al hierro en la proteína. En cada uno de estos casos, tanto la forma del espectro como las propiedades de relajación de la señal son totalmente distintas. El espectro de la **figura 10** corresponde a la metmioglobina, una hemoproteína de alto espín ($S=5/2$) en la que el hierro está coordinado a los 4 nitrógenos de la porfirina, a un nitrógeno axial proveniente de un residuo de histidina y a una molécula de agua. Este tipo de espectro es marcadamente axial, donde el eje es el determinado por la perpendicular al plano del hemo, **figura 10.b**. Las proteínas férricas no hemínicas de alto espín suelen presentar un espectro distinto, como el que se presenta en la **figura 10.a**. Este espectro refleja un alta rombicidad en el entorno del hierro. El ion Fe^{3+}

también puede presentar bajo espín, $S=1/2$, **figura 10.c**, tal es el caso de las hemoproteínas en las que los dos ligandos axiales son fuertes (histidina, cisteína, metionina, OH^- ...). También se han observado casos de espín intermedio, **figura 10.d**, en hemoproteínas en las que el entorno del hierro tiene grandes distorsiones axial y rómbica. Así pues, la RPE proporciona información sobre la naturaleza de los ligandos y sobre la simetría del sitio que ocupa el centro metálico.

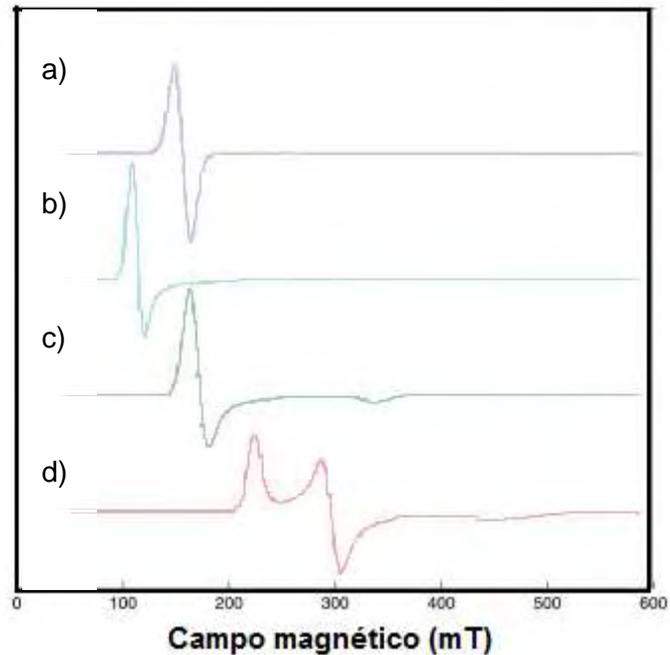


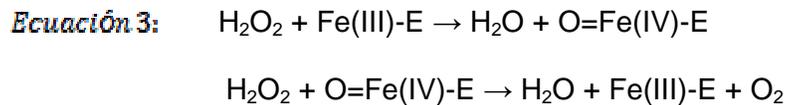
Figura 10. Estados de espín del ion Fe^{3+} a) y b) Fe^{3+} de alto espín en simetrías rómbicas y axial respectivamente c) Fe^{3+} de espín intermedio en simetría axial d) Fe^{3+} de bajo espín.

4.5 Proteínas de Estudio: Catalasa y Citocromo c

Las proteínas, catalasa de hígado de bovino y citocromo c de corazón de bovino, pueden ser obtenidas comercialmente en forma pura y pueden ser usadas inmediatamente para los experimentos de cristalización.

4.5.1 Catalasa de Hígado de Bovino

La catalasa es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades de 60000 Da cada uno; cada subunidad tiene un grupo hemo. La proteína tiene un total de 506 aminoácidos.³⁶ La catalasa posee actividad peroxidásica, es decir puede reducir peróxidos usando donadores de electrones. Además es capaz de usar una molécula de H₂O₂ como sustrato donador de electrones y otra molécula de H₂O₂ como oxidante o aceptor de electrones. En la mayor parte de las condiciones in vivo, la actividad peroxidásica de la catalasa parece ser favorecida. El mecanismo completo de la catalasa no se conoce, aun así la reacción química se produce en dos etapas, ecuación 3:



La catalasa se encuentra en sangre, médula ósea, mucosa, riñón e hígado. Su función es la destrucción del peróxido de hidrógeno formado por la acción de las deshidrogenasas. Los microcuerpos o peroxisomas se encuentran en numerosos tejidos incluyendo el hígado. En ellos abundan las oxidasas y catalasas, lo cual sugiere que puede haber alguna ventaja biológica al agrupar a las enzimas que producen H₂O₂ con la enzima que lo destruye³⁷.

4.5.2 Citocromo c de Mitocondrias Bovinas

Es una proteína globular de 104 aminoácidos y su peso molecular es de 12000 Da. Se encuentra en el espacio intermembranal de las mitocondrias. Su función es la de transferir electrones desde el complejo III al complejo IV, **figura 11**, gracias a la

presencia del grupo hemo el cual se encuentra covalentemente unido a la cys 14 y cys 17.

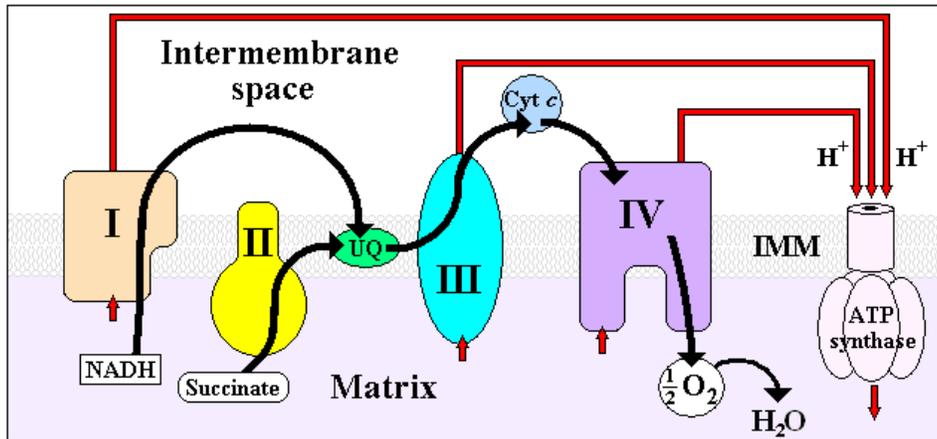


Figura 11. Cadena de transporte de electrones.

Diversas isoformas de esta proteína han sido reportadas,³⁸ las cuales son generadas por desamidación no enzimática en el momento de la purificación.³⁹ Existen 4 isoformas reportadas, Cy I es la isoforma nativa, mientras que Cy II, Cy III y Cy IV han cambiado uno, dos o tres grupos amida de Asparagina o Glutamina por Ácido aspártico o Ácido glutámico, respectivamente. Esta liberación de NH_3 , por uno, dos o tres aminoácidos es la responsable de que las mezclas tengan diversos pI, * siendo la forma nativa la más básica, con un pI 10.78, Cy II pI 10.58 y Cy III 10.36.⁴⁰

* pI: pH en el cual la molécula de proteína no lleva carga neta.

-
-
- ¹ Pasteur, L. Recherches sur la Dissymétrie Moléculaire. (1860-1883). edited by C. BOURGEOIS. Paris, France. (1986).
- ² McPherson, A. J. Cryst. Growth. (1991). 110, 1-10.
- ³ Reichert, E. T & Brown, A.P. (1909). He Differentiation and specificity of Corresponding Proteins and Other Viral Substances in Relation to Biological Classification and Evolution: the crystallization of Hemoglobins. Washington, DC: Carnegie Institution.
- ⁴ Bernal, J. D. & Crowfoot, D. Nature (London), (1934). 133, 794-795.
- ⁵ Protein Data Bank, <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/>
- ⁶ A. Moreno, V. Bolaños, J. Mas, De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas, Edit. JGH Editores, S. A. de C.V., México D.F., (2000). Pág. 1-39.
- ⁷ Zeppezauer, M. Eklund, H. & Zeppezauer E. S., Arch. Biochem. Biophys. 126. (1968) 564.
- ⁸ Garcia-Ruiz, J.M. Key Engineering Materials. 58. (1991).87-196.
- ⁹ Nanev C. N., Penkova A., "Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields". J. Cryst. Growth. (2001). 232, 285 – 293.
- ¹⁰ Sazaki G., Moreno A., Nakajima K., "Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on protein crystallization", J. Cryst. Growth. (2004). 262, 499 – 502.
- ¹¹ Taleb M., Didierjean D., Jelsch C., Mangeot J.P., Aubry A., "Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field", J. Cryst. Growth. (2004). 232, 250 – 255.

-
-
- ¹² Penkova A., Pan W., Hodjaoglu F., Vekilov P., “Nucleation of protein crystals under the influence of solution shear flow”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (2006). 1077, 214 – 231.
- ¹³ Al-Haq M.I., Lebrasseur E., Choi W.K., Tsuchiya H., Torii T., Yamazaki H. y Shinohara E., “An apparatus for electric – field – induced protein crystallization”, *Applied Crystallography*, (2007). 40, 199 – 201.
- ¹⁴ Suzuki Y., Miyashita S., Sazaki G., Nakada T., Sawada T., Komatsu H., “Effects of pressure on growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals”, *J. Cryst. Growth*. (2000). 208, 638 – 644.
- ¹⁵ Bancel P., Cajipe V., Rodier F., “Manipulating crystals with light”, *J. Cryst. Growth*. (1999). 196, 685 – 690.
- ¹⁶ Mori Y., Takano K., Adachi H, Inoue S, Murakami H, Matsumura H., Sazaki T., “Protein crystallization using femto-second laser radiation and solution-stirring”, Presentado en 11th edición del ICCBM, Quebec, Canadá. (2006).
- ¹⁷ De Lucas L.J., Bugg C.E., “New directions in protein crystal growth”, *Trends Biotechnol.* (1987). 5, 188 – 193
- ¹⁸ Bugg C. E., “The future of crystal growth” *J. Cryst. Growth*. (1986). 76, 535 – 544.
- ¹⁹ Wilson, W. Monitoring crystallization experiments using dynamic light scattering: assaying and monitoring protein crystallization in solution. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. (1990). 1, 110-117.

-
- ²⁰ Wilson, W. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth: A practical approach. *J. Struct. Biol.* (2003). 142, 56- 65.
- ²¹ Chayen, N.; Dieckmann, M.; Dierks, K; Fromme, P. Size and shape determination of proteins in solution by a noninvasive depolarized dynamic light scattering instrument. *Ann. N.Y. acad. Sci.* (2004). 1027, 20-27.
- ²² Yau, S.T; Vekilov, P. Quasipolar nucleus structure in apoferritin crystallization. (2000). *Nature*, 494-497.
- ²³ Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Capelle, B.;Aubry, A. Crystallization of proteins under an external electric field. *J. Cryst. Growth.* (1999). 200, 575–582.
- ²⁴ Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Aubry, A. Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field. *J. Cryst. Growth.* (2001). 232, 250–255.
- ²⁵ Nanev, C.; Penkova, A. Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields. *J. Cryst. Growth.* (2001). 232, 285–293.
- ²⁶ Mirkin, N.; Frontana-Uribe, B. A.; Rodriguez-Romero, A.; Hernandez-Santoyo, A.; Moreno, A. The influence of an internal electric field upon protein crystallization using the gel-acupuncture method *Acta Crystallogr D.* (2003). D59, 1533-1538.
- ²⁷ Nieto-Mendoza, E.; Frontana-Uribe, B. A.; Sasaki, G.; Moreno, A. Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes, effect of the potential control, *J. Cryst. Growth.* (2005). 275 1443-1452.

-
- ²⁸ Moreno, A.; Sasaki, G. The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme. *J. Cryst. Growth.* (2004). 264, 438–444.
- ²⁹ Hammadi, Z.; Astier, J.-P.; Morin, R.; Veessler, S. Protein Crystallization Induced by a Localized Voltage, *Cryst. Growth & Design.* (2007). 7, 1472-1475.
- ³⁰ Bockris, John O'M., Reddy, Amulya K.N., Gamboa-Aldeco, Maria E. *Modern Electrochemistry 2A*; Plenum Press: New York, (1998); Vol. 1, pp 421 – 476.
- ³¹ Bockris, J. O'M.; Reedy, A. K. N. *Modern Electrochemistry*, 2nd ed.; Plenum Press: New York, (1998). Vol. 1, pp 421-476.
- ³² Skoog, D., West, D., Holler, J., Crouch, S. *Fundamentos de Química Analítica*. Edición octava. Thomson. (2005).
- ³³ Borgstahl, G. How to use Dynamic Light Scattering to improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals: *Methods in Molecular Biology*, vol. 363.
- ³⁴ Abragan, A; Bleaney, B; *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. Oxford University Press. (1970). Oxford.
- ³⁵ M. Ubbink, J. A. R. Worrall, G.W. Canters, E. J. J. Groenen, and M. Huber, *Paramagnetic Resonance of Biological Metal Centers*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2002). 31:393–422.
- ³⁶ <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=4BLC>

³⁷ Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes P. A.; Rodwell, V. W.; Bioquímica de Harper. Edit. El Moderno S. A. de C.V., XIII edición, México D.F., (1994). Pág. 90.

³⁸ Flatmark, T. Acta Chem. Scand. 18. (1964). 1656-1666.

³⁹ Brautigan, D. L., Ferguson-Miller, S and Margoliash, E. Methods in Enzymology. 53. (1978). 128.

⁴⁰ Flatmark, T. Acta Chem Scand. (1966). 20, 1476-1503).

DISEÑO EXPERIMENTAL

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la **figura 12** se muestra el esquema de desarrollo experimental que se llevó a cabo para el cumplimiento de los objetivos:

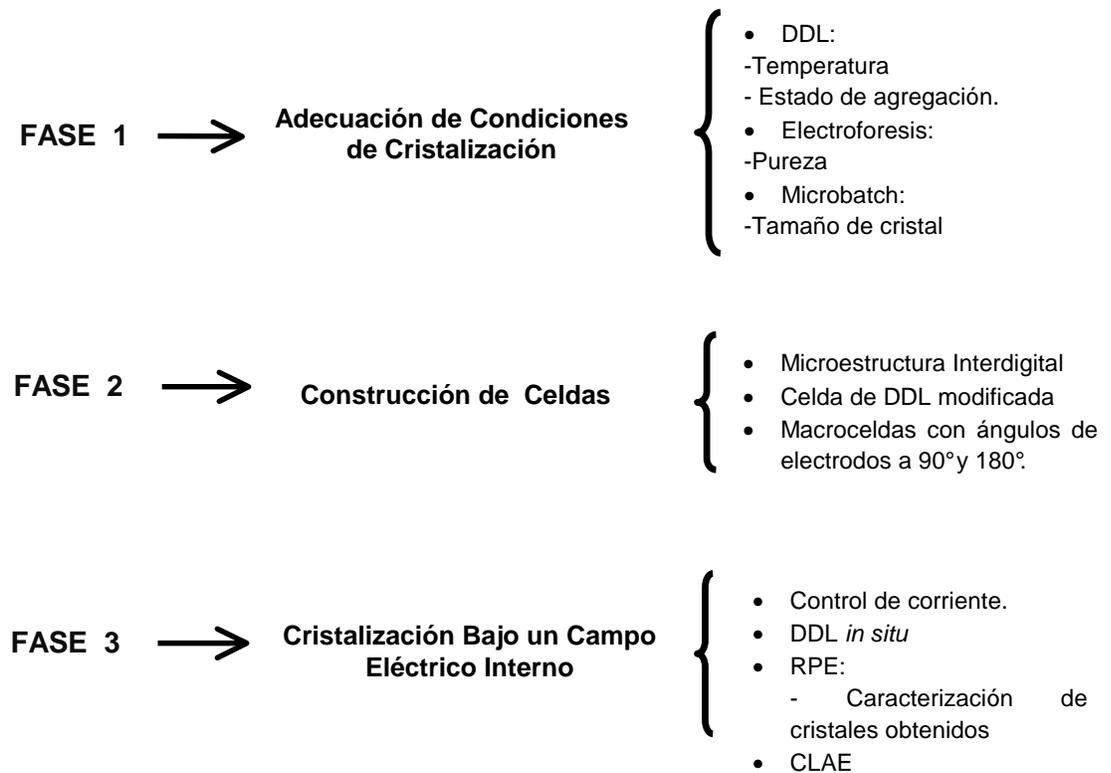


Figura 12. Esquema de la metodología

5.1 Instrumentos

Tabla 1. Instrumentos

Equipo	Modelo	Características
Galvanostato VIMAR	FCC-17	Los experimentos de corriente controlada (electrólisis) se realizaron en un galvanostato, el cual puede imponer corriente directa dentro de un intervalo de 0.0002 μ A a 10 mA.
Placa Hueca de Metal	Construida ad hoc	Placa hueca metálica, mantiene la temperatura constante, mediante la circulación de disolución refrigerante, proveniente de un recirculador.
Recirculador	Cole Parmer - Polystat	
Microscopio Estereoscópico	Zeiss Stemi SV11	Las fotografías se obtuvieron mediante el acoplamiento del microscopio y la cámara digital, usando el programa de Zeiss Co.
Cámara Digital	Axion Vision	
DDL	Malvern Nano S	Seguimiento del proceso de agregación, a distintas temperaturas, gracias a que tiene un peltier interno.
Resonancia Paramagnética Electrónica	Jeol, JES-TE300	En onda continua en banda X con una cavidad cilíndrica del modo TE ₀₁₁ .

5.2 Reactivos y Materiales

Tabla 2. Reactivos y Materiales

Descripción	Marca
Catalasa de hígado de bovino dos veces recristalizada	Sigma C-3155
Citocromo c de corazón de bovino	Sigma 9007-43-6
Citrato de sodio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	Sigma S-4641
Polietilenglicol (PEG-1000)	Sigma 81189
Tris- HCl	Sigma T3253-250G
NaOH	Sigma S8045
NaH_2PO_4	Mallinckrodt -7892
Platino 99% de pureza, 0.2mm de diámetro	Alfa AESAR

5.3 Adecuación de Condiciones de Cristalización

5.3.1 Estudios de Dispersión Dinámica de Luz (DDL)

Se realizaron estudios de DDL, en un equipo Malvern Nano S con tecnología láser NIBS, el cual cuenta con un controlador interno de temperatura (peltier).

5.3.2 Análisis de Estabilidad de Catalasa a Diferentes Temperaturas

Se filtró una solución de catalasa a una concentración de 10.0 mg/mL en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a través de un filtro con tamaño de poro de 0.02 μ m, para remover partículas de polvo u otras impurezas. Esta solución se introdujo inmediatamente al equipo de DDL, el cual cuenta con un diodo láser de longitud de onda de 633 nm. Una vez introducida la muestra se realizó un barrido de temperatura

entre 3-30°C. Al encontrar la temperatura de mayor homogeneidad, se hizo un seguimiento para comprobar la estabilidad a estas condiciones, para esto se colocó una mezcla de solución batch de catalasa en la celda modificada de DDL y se monitoreó durante tres días.

5.3.3 Pruebas de Cristalización en Microbatch

Para las pruebas de cristalización de catalasa en microbatch se utilizaron placas de poliestireno con 72 pozos (Hampton Research), como los que se muestran en la **figura 13**. En cada uno de los pozos con capacidad para 11 μL se colocó una mezcla de proteína y agente precipitante en diferentes proporciones, después se recubrió con una gota de aceite mineral ligero con una densidad de 0.84 g/mL, para evitar evaporación. La temperatura se mantuvo fija a 15°C empleando un cuarto a temperatura constante.

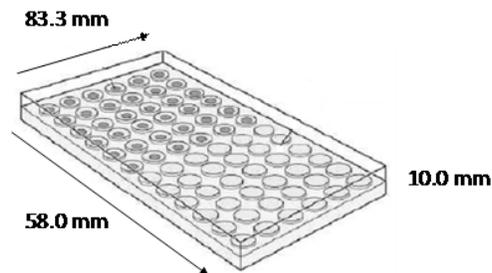


Figura 13. Placa de cristalización microbatch con 72 pozos

5.3.4 Medición del Grosor del Depósito de Pt en la Microestructura Interdigital por MFA

Una punta de escala nanométrica unida a un soporte llamado cantilever, barrió la superficie de la celda. La interacción de la punta con la superficie provoca ciertas perturbaciones en el cantilever (con una fuerza que va de pN a nN), lo cual es detectado por medio de la deflexión de un láser que incide sobre él. Un circuito

fotoeléctrico convirtió estas desviaciones en información sobre la superficie de la celda, permitiendo obtener una imagen de la superficie.

Para medir el grosor del depósito de platino en la microestructura interdigital se utilizó un equipo Multimodal Nanoscope IIIa de Veeco (Digital Instruments, Santa Barbara EUA) **figura 14**. Se utilizaron cantilevers de nitruro de silicio Si_3N_4 , con una constante de fuerza de resorte de 0.06 N/m, con puntas integradas (NP-20, SPM Digital Instruments, Co.). Las imágenes de MFA fueron analizadas con el software Nanoscope IIIa v. 5.22.r4.

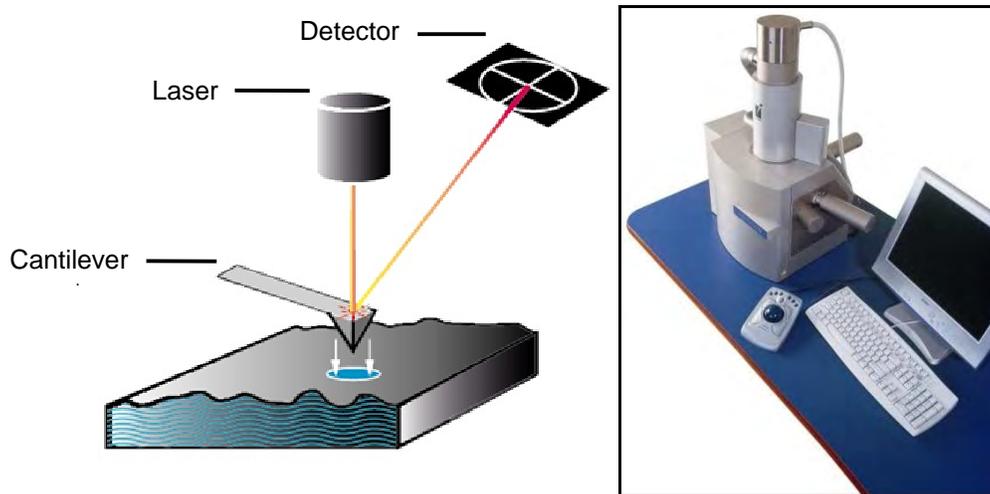


Figura 14. a) Esquema del Microscopio de Fuerza Atómica b) Instalación completa MFA y computador.

5.4 Construcción de las Celdas de Cristalización

5.4.1 Construcción de Celdas con Microestructura interdigital de Platino

Para determinar el comportamiento de cristalización de las proteínas bajo diferentes campos eléctricos paralelos, se utilizó una microestructura interdigital con

recubrimiento de platino y base de cuarzo, lo que permitió el uso de una menor cantidad de muestra.

En la **figura 15**, se observa una descripción más detallada de la microestructura. Este arreglo de electrodo interdigital tiene 216 dígitos de $3\ \mu\text{m}$ de ancho y $3\ \mu\text{m}$ de espacio entre los electrodos adyacentes. La apertura entre los electrodos es 2.4 mm y la longitud total de los electrodos es de 30 mm.

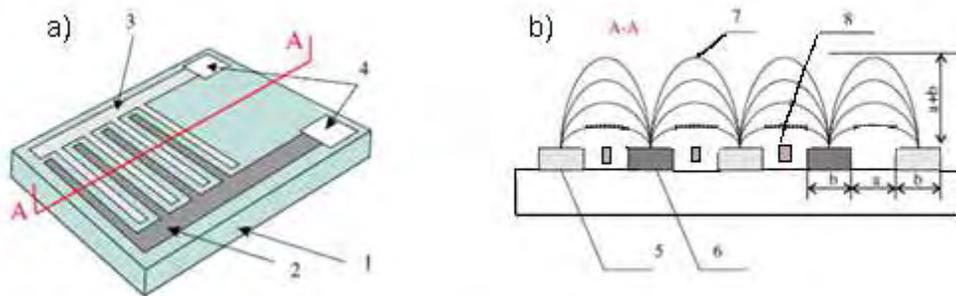


Figura 15. a) Arreglo planar del electrodo interdigital b) corte de la sección transversal tridimensional 1, cuarzo; 2,3, barras de electrodos colectores; 4, contactos; 5,6 electrodos interdigitales; 7 líneas de campos eléctricos; 8, cristales depositados.¹

Este prototipo de celda rectangular de 1.5 cm x 0.5 cm, fue soportada sobre la base de la celda que la contiene, mediante el uso de silicona. La celda exterior fue construida totalmente de poliestireno, de un grosor de 1 mm aproximadamente. Para realizar el contacto con la microestructura interdigital se utilizó un alambre de acero inoxidable, el cual atravesó la pared de poliestireno, previa perforación con un alambre a alta temperatura, el contacto se hizo por presión sobre la estructura interdigital, **figura 16**.

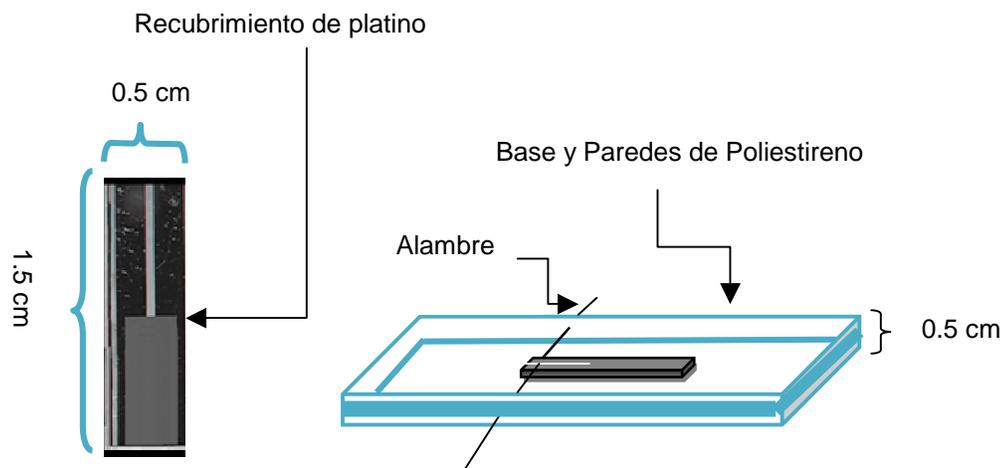


Figura 16. a) Microestructura interdigital de platino b) Esquema de la celda de cristalización utilizando la microestructura interdigital como arreglo de electrodos.

5.4.1.1 Limpieza de la Microestructura Interdigital

Antes de realizar la cristalización sobre la celda con la microestructura interdigital, esta fue lavada con solución piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$, 3:7) durante 30 minutos, posteriormente lavada 3 veces con agua Milli Q, sometida a sonicación durante 20 minutos. (Precaución: la solución piraña se debe manejar con extremo cuidado debido a su extrema capacidad oxidante y corrosiva).

5.4.2 Celdas de Cristalización con Ángulos de Electrodo a 90 y 180°

Basados en el modelo de celdas ad hoc descritas previamente por Nieto-Mendoza,² se construyeron celdas de cristalización con portaobjetos de vidrio separados por una base de PVC triangular y/o rectangular selladas con resinas epóxicas, **figura 17**.

Los electrodos utilizados fueron de alambre de platino (0.2mm de diámetro Alfa AESAR), para introducir los electrodos de platino se perforó el plástico con alambre

caliente y posteriormente se pegaron con resina epóxica, con ángulos de 90° y 180°, según el experimento

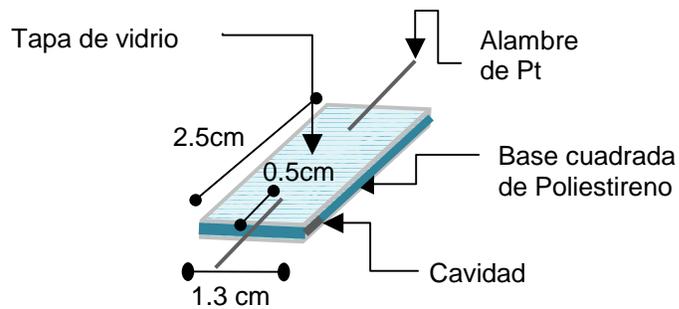


Figura 17. Esquema de celda de cristalización con electrodos a 180°.

5.5 Cristalización Bajo un Campo Eléctrico Interno

Todas las cristalizaciones se realizaron siguiendo el método batch, en el cual, se mezclan todos los componentes en una sola disolución y posteriormente se deja reposar hasta observar la nucleación y finalmente el crecimiento de los cristales. En el caso de las dos proteínas cristalizadas en la presente tesis, las condiciones para realizar la cristalización, ya han sido descritas, pero sin el uso de un campo eléctrico, **¡Error! Marcador no definido. tabla 3.** Los procedimientos que se mencionan a continuación fueron los que se utilizaron para explorar el efecto de la variable eléctrica.

Tabla 3. Condiciones de cristalización de proteínas empleadas; **Error! Marcador no definido.**

Proteína (mg/mL)	Peso Molecular (Da)	Fuente	Amortiguador	Agente precipitante
Catalasa (20) ^a	250,000	Hígado de Bovino	Tris-HCl 0.1 M pH 8.5	Citrato de Sodio 8%
Citocromo c (60) ^b	12,000	Corazón de Bovino	Fosfato de sodio 50mM,pH 7.0	Polietilenglicol (PEG-1000) 60%

a. Batch Catalasa: se combinó en proporciones iguales (1:1) catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5.

b. Batch Citocromo c: se mezcló en proporciones iguales (1:1) citocromo c (62 mg/mL y PEG-1000 (60%) ambos preparados en Amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0.

5.5.1 Cristalización en Celda con Microestructura Interdigital:

La mezcla de proteína y agente precipitante se realizó sobre la microestructura interdigital, a un volumen final de 5 μ L, **figura 18. a.** y posteriormente se cubrió con aceite de baja densidad para evitar la evaporación, **figura 18. b.** a una temperatura de 15°C (mejor condición encontrada) para catalasa y 10°C para citocromo c.³ Posteriormente se hicieron experimentos mediante la aplicación de diferentes valores de corriente (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 μ A).

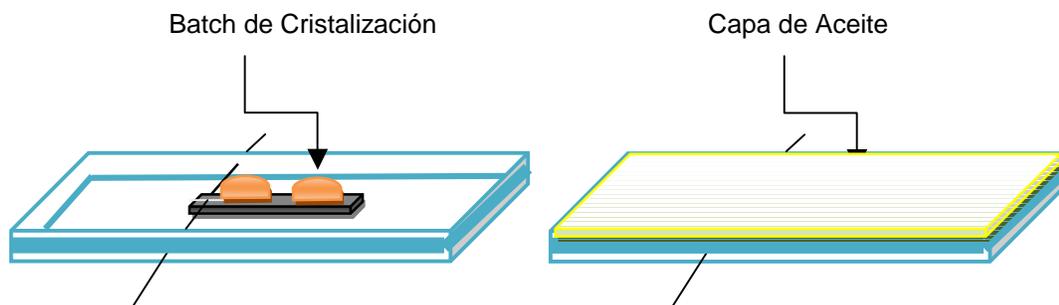


Figura 18. a) Batch de proteína y agente precipitante sobre la microestructura interdigital b) capa de aceite que cubre la solución batch de proteína para evitar evaporación.

5.5.2 Cristalización en celdas de 180° y 90°

Conservando las proporciones antes mencionadas por el método batch de cada proteína, se realizaron las mezclas en las celdas, **figura 17**. El volumen final en estas celdas fue 250 μL . Las celdas se sellaron con silicona luego de introducir la solución batch.

Para el uso de las celdas de cristalización diferentes, a las del DDL, se utilizó un montaje como el mostrado en la **figura 19**. Para el control de la temperatura se utilizó una placa termostataada conectada a un recirculador. Para la aplicación de corriente las celdas fueron conectadas a través de caimanes al galvanostato.

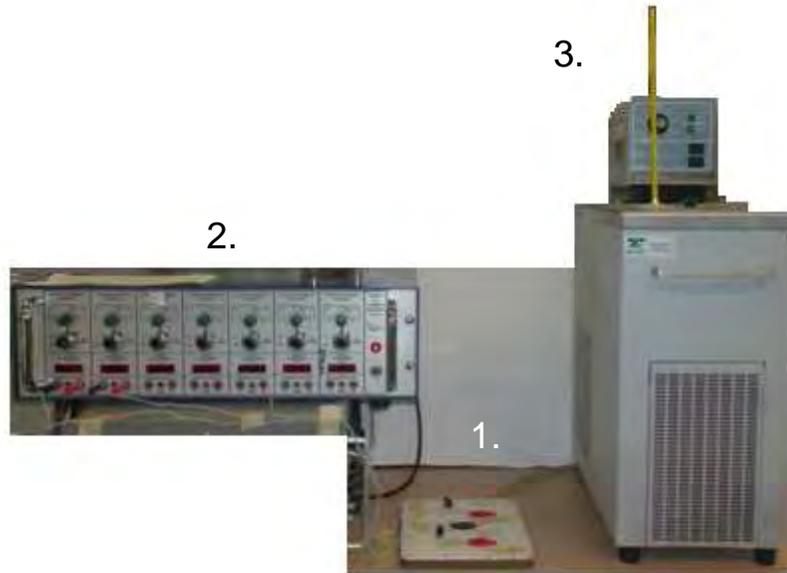


Figura 19. Montaje del equipo empleado en la imposición de corriente en las celdas de cristalización. 1. Placa metálica termostatada en donde se colocan las celdas de cristalización, 2. Galvanostato VIMAR, los cables están conectados a los electrodos de la celda de cristalización con caimanos 3. Recirculador Cole Palmer, envía el agua y mantiene la placa a una temperatura constante.

5.5.3 Seguimiento por DDL del Proceso de Cristalización

Para realizar el seguimiento del proceso de agregación y cristalización, se utilizó una celda de DDL modificada como se muestra en la **figura 20**.

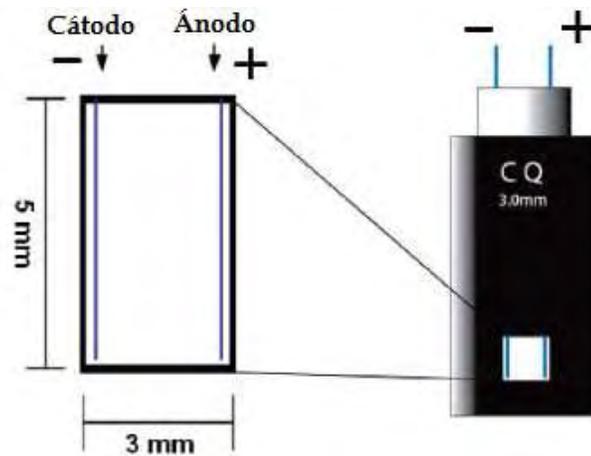


Figura 20. Celda de DDL modificada para los experimentos de cristalización asistida por corriente.

Las soluciones batch de cada proteína, según el caso, fueron mezcladas dentro de la celda, de manera suave, para evitar precipitación. El volumen final de la solución batch fue de 50 μL . Posteriormente se introdujeron los electrodos de platino que están a su vez conectados al galvanostato. Se evaluaron diferentes valores de corriente (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 μA).

5.5.4 Procedimientos de los Estudios de Cristalización

En todos los experimentos se fabricó una celda control con la misma disolución y los electrodos en la misma geometría, pero sin aplicar corriente eléctrica. Una vez concluido el experimento se toman las fotografías correspondientes y se analizan los resultados.

5.5.5 Análisis de Citocromo c por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

El citocromo c comercial fue purificado por CLAE usando una columna de fase reversa C-18 Júpiter 300 A, 5 μm (Phenomenex), en un equipo de CLAE (HP, serie 1100) para separar las isoformas. La columna fue equilibrada con agua Milli Q + 0.1 % TFA. La elución se realizó en forma de gradiente lineal, con 100% ACN + 0.12% TFA, bajo un flujo constante de 1 mL/min.

El gradiente aplicado fue, **tabla 4**:

Tabla 4. Gradiente de Fase móvil utilizado en CLAE-FR

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

Se inyectaron muestras de 500 μg de citocromo c oxidado con $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ [10 mg/mL] (Cit c : $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1:30). Se leyó la absorbancia a 215, 360 y 410 nm a través del tiempo.

El análisis de los cristales crecidos bajo el campo eléctrico interno se realizó por CLAE. Los cristales fueron manipulados usando un cryoloop y lavados, primero con agente precipitante (PEG-1000 30%) y luego con agua Milli Q, finalmente se secaron al aire. Posteriormente se disolvieron en solución de $K_3Fe(CN)_6$ y la solución resultante se inyectó al CLAE a través del gradiente anteriormente mencionado.

5.5.6 Análisis por Resonancia Paramagnética Electrónica

Las muestras de proteína sólida, en solución acuosa y los depósitos de proteínas obtenidos mediante corriente eléctrica, fueron colocados en tubos de cuarzo para realizar las mediciones por resonancia paramagnética electrónica. Las mediciones fueron realizadas a 77 K, con nitrógeno líquido (Infra). Cuando fue necesario se hizo burbujeo a las muestras con nitrógeno gaseoso para evitar la posible oxidación de las especies estudiadas (Praxair, 5.0 ultra alta pureza) durante 10 minutos.

Las mediciones se realizaron en una frecuencia de microondas de 9.43 GHz a una frecuencia de modulación de 100 kHz y 1.01 mW de potencia de microondas. La corrección del campo magnético se realizó con un gaussmetro de precisión modelo ES-FC5. El espectro fue analizado utilizando el software ESPRIT-382 VO1.916.

¹ Brato, A.; Abramova, N.; Ramón-Azcón, J.; Merlos, A.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.; Domínguez, C.; Characterization of the interdigitated electrode array with tantalum silicide electrodes separated by insulating barriers. *Electrochemistry Communications*, Volume 10, Issue 10, October (2008). Pages 1621-1624.

² Nieto-Mendoza, E.; Frontana-Urbe, B. A.; Sasaki, G.; Moreno, A. J. *Cryst. Growth* (2005). 275, 1437–1446.

³ Acosta, F. Informe de Investigación para obtener el título de Ingeniero Químico: De los Cristales de Citocromo c a un Dispositivo Transferente de Electrones en Estado Sólido. (2008). Facultad de Química-UNAM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Adecuación de Condiciones de Cristalización de Catalasa

Para llevar a cabo la cristalización de una proteína en un disolvente, es necesario llevar al sistema a un grado de sobresaturación adecuado. Esto se logra por medio de variaciones pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, temperatura, presión o bien variaciones de la relación de concentraciones de agentes precipitantes y proteína. Por esta razón antes de iniciar los experimentos de cristalización bajo el campo eléctrico interno, se establecieron las condiciones ideales para la cristalización, mediante el método batch.

5.2 Análisis de Homogeneidad y Estabilidad de la Catalasa

Mediante esta técnica se pudo determinar la temperatura de mayor estabilidad en la que la catalasa se presenta de forma monomérica. Aunque se ha descrito que se obtienen mejores cristales si las proteínas están monodispersas, **¡Error! Marcador no definido.**¹ algunos estudios mencionan que no es una condición necesaria.²

Al analizar el comportamiento de la catalasa (10 mg/mL) en amortiguador Tris-HCl, pH 8.5, a diferentes temperaturas mediante DDL, se encontró que alrededor de los 15°C existe una especie con un diámetro de 11.2 nm; Este tamaño corresponde adecuadamente a la forma monomérica de la catalasa, **figura 21**.

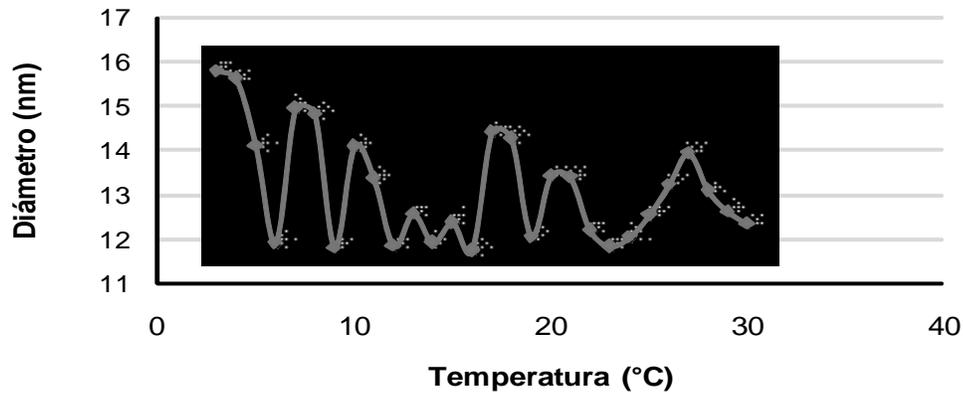


Figura 21. Estudio de DDL de la especie principal presente en la solución de catalasa (10.0 mg/mL) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 en un rango de 3-30°C.

Se encontró, también en menor proporción la presencia de una segunda especie, que varía su diámetro entre 500 - 4500 nm, que permiten identificarlo como agregado, sin embargo, estos agregados corresponden a menos del 3% del total de la proteína, **figura 22.**

El aumento de temperatura, al menos en el rango estudiado, no favorece de manera significativa una mayor solubilidad. A temperaturas mayores a 15°C (22-24°C) también se encontró un diámetro de partícula de 11.2 nm en altas proporciones, sin embargo, una menor temperatura permite que el fenómeno de difusión sea más lento y por ende que el proceso de cristalización pudiera ser más eficiente mejorando el crecimiento del cristal, por esta razón se seleccionó 15 °C como la temperatura adecuada para realizar los experimentos de cristalización.

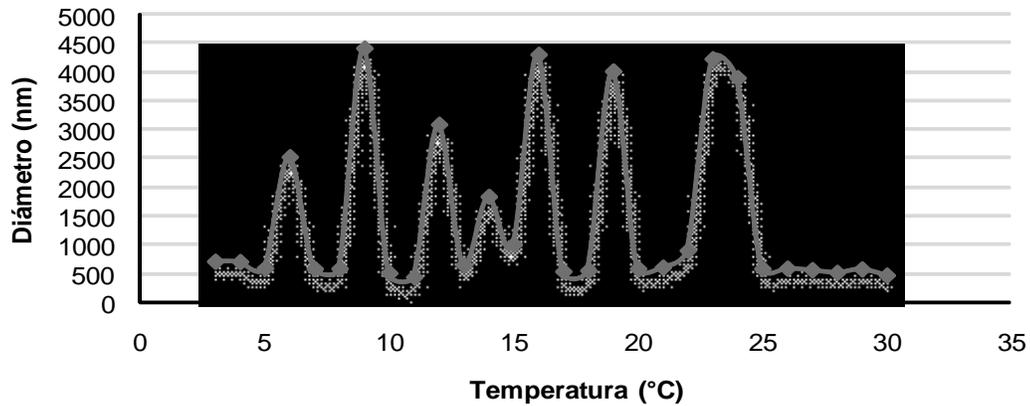


Figura 22. Estudio de DDL de la especie 2 presente en la solución de catalasa (10.0 mg/mL) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 en un rango de 3-30°C de temperatura.

Posteriormente se realizó un estudio de estabilidad de catalasa en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a la temperatura de 15°C. En la **figura 23** se puede observar que existe una tendencia de la catalasa a conservar el diámetro de 11.0 nm. Este estudio se realizó durante 3 días, lo que indica una gran estabilidad en estado monomérico de la catalasa a 15°C. También se puede ver la señal de una segunda especie, **figura 24**, su tamaño permanece casi constante (4000 nm) durante todo el estudio.

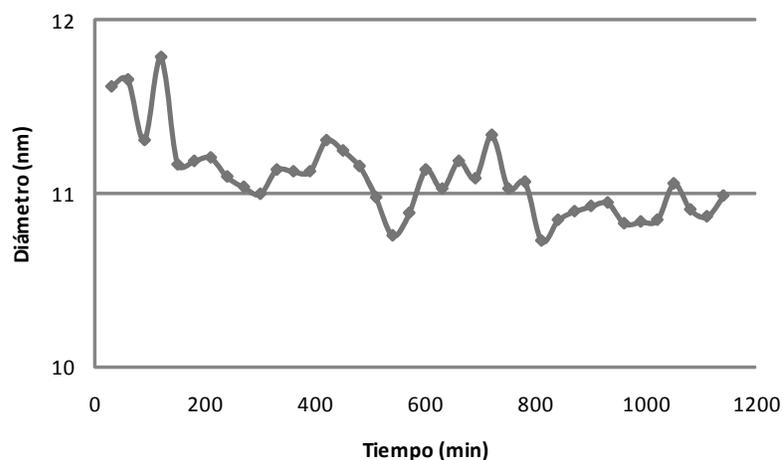


Figura 23. Comportamiento observado por DDL de la especie 1 (≈ 11.0 m) presente en la solución de catalasa (10.0 mg/mL) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C.

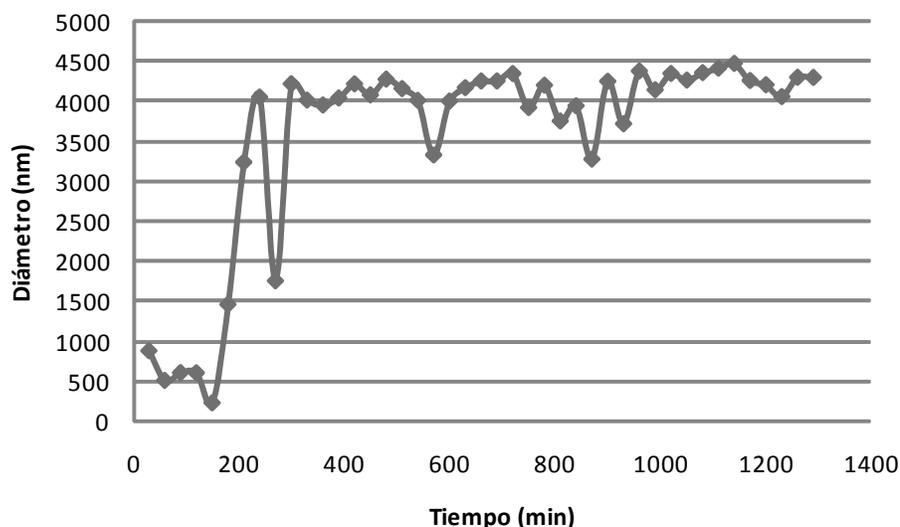


Figura 24. Comportamiento observado por DDL de la especie 2 (4000 nm) presente en la solución de catalasa (10.0 mg/mL) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C.

Antes de iniciar los experimentos de cristalización de catalasa bajo un campo eléctrico interno, se optimizaron las condiciones de concentración de proteína - agente precipitante, para lo cual se hicieron diferentes pruebas por el método microbatch, partiendo de una solución de catalasa de 19.9 mg/mL y una solución de citrato de sodio al 8%. La relación de catalasa-citrato de sodio, que proporcionó una mejor calidad de cristales, con respecto a número y forma, fue la correspondiente a la relación 1.5 – 1 respectivamente, igual a las concentraciones finales de 11.9 mg/mL de catalasa y 3.2% de citrato de sodio, los cristales se observan en la **figura 25 e**. De esta manera se redujo el número de cristales al final del experimento, reduciendo la sobresaturación y disminuyendo la concentración de citrato de sodio. Los cristales obtenidos tienen la forma ortorrómbica particular de la catalasa de color café y un tamaño de 500 μm .

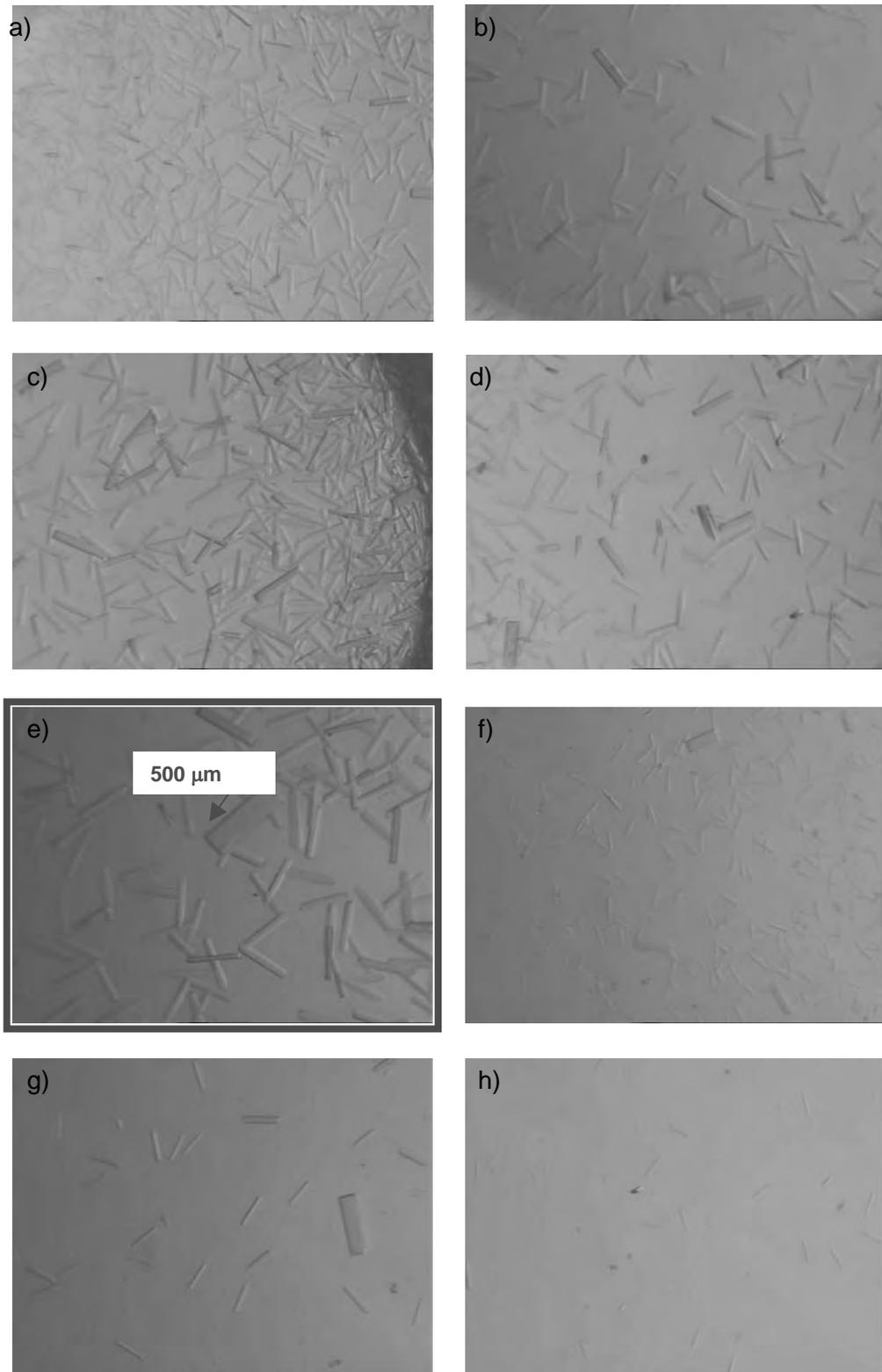


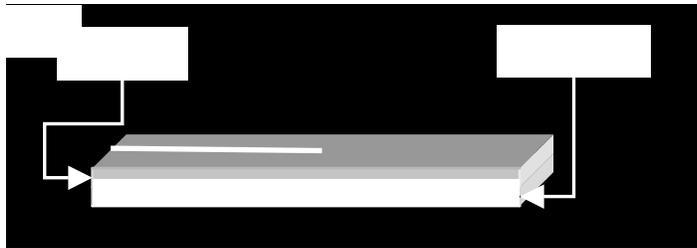
Figura 25. Fotos de cristales de catalasa a diferentes condiciones de cristalización por método microbatch, relación catalasa (19.9 mg/mL) - citrato de sodio (8%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C. a) 1 - 1 b) 1 - 2 c) 2 - 1 d) 1 - 1.5 e) 1.5 - 1 f) 1 - 4 g) 4 - 1 h) 1 - 3.

El medio de cristalización en el que se encuentran las moléculas de catalasa y sus agregados puede cambiar cuando se aplica un campo eléctrico interno. La interacción de moléculas cargadas con un campo eléctrico interno podría alterar la distribución de la concentración dentro de la solución y dirigir una nucleación local. Es posible imaginar que el campo eléctrico interno pueda influenciar la cristalización de proteínas y que promueva posiblemente la formación de cristales con buena calidad y tamaño.

En la siguiente sección se propone estudiar los efectos de un campo eléctrico interno sobre la cristalización de catalasa utilizando una celda con electrodos dispuestos en una microestructura interdigital.

5.3 Cristalización de Catalasa en Microestructuras Interdigitales

La microestructura interdigital utilizada, es una celda de cuarzo recubierta de platino. Para medir la altura del depósito de platino sobre el cuarzo, se utilizó la técnica de microscopia de fuerza atómica. El recubrimiento de platino tiene una altura de 420.4 nm, **figura 26**.



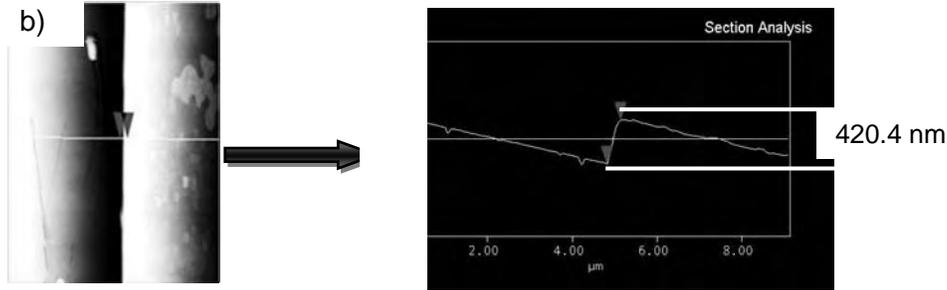


Figura 26. Caracterización de la microestructura interdigital de platino mediante AFM a) microestructura interdigital b) distancia del depósito de platino c) sección analizada.

El campo eléctrico, se impuso empleando un equipo diseñado especialmente para generar una corriente eléctrica constante; el rango de corriente utilizado varió desde $0.5 \mu\text{A}$ hasta $5 \mu\text{A}$. Para controlar la temperatura de 15°C , se utilizó una placa conectada a un equipo de recirculación que permitió tener control sobre la temperatura.

Se establece una diferencia de potencial entre los electrodos para mantener una corriente constante sobre el sistema, esto provoca un efecto de migración sobre las proteínas que poseen una carga eléctrica. Este efecto se caracteriza por un crecimiento preferencial de cristales en la cercanía del ánodo. En los experimentos realizados con aplicación de corriente en estas celdas, siempre se observó el fenómeno de migración; sin embargo, el tamaño de los cristales al aumentar la corriente nunca alcanzó el de los experimentos en el control, **figura 27**.

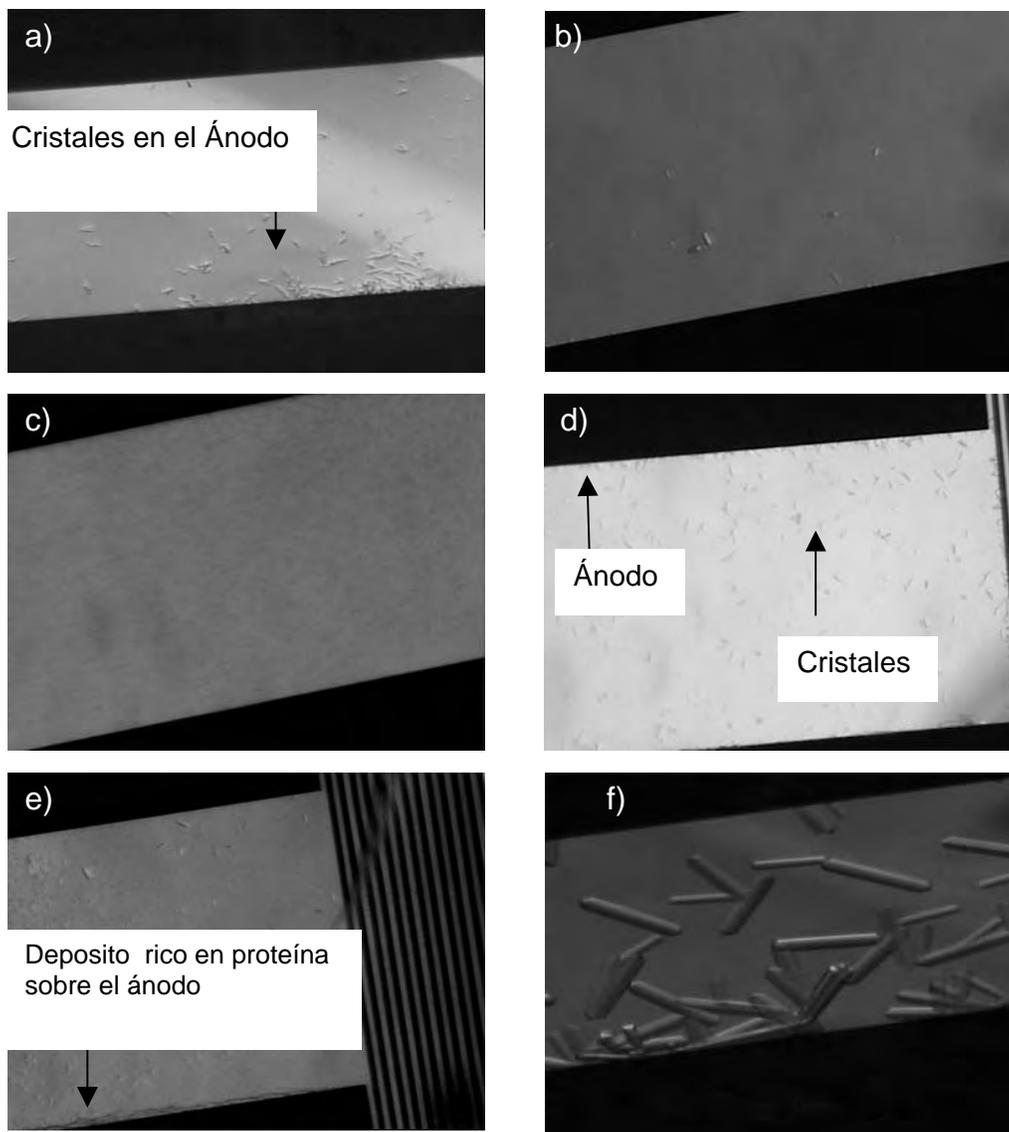


Figura 27. Cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C, sobre microestructuras interdigitales bajo un campo eléctrico interno. a) 1 μ A b) 2 μ A c) 3 μ A d) 4 μ A e) 5 μ A f) control sin corriente.

Los cristales que crecieron en la celda control sin corriente, lo hicieron de manera aleatoria, sin embargo se puede observar el efecto de migración hacia el ánodo al aplicar corrientes tan pequeñas como 0.5 μ A. Este fenómeno de direccionalidad hacia el ánodo es probablemente favorecido también por el cambio conformacional que sufre la catalasa al pH del medio de cristalización (8.5). El punto isoelectrico de la proteína

es alrededor de 5.4, por lo tanto la catalasa mantiene su conformación nativa en el rango de pH de 4.4 – 6.4. El incremento del pH da lugar a una desnaturalización parcial de la catalasa que incrementa la actividad de los grupos sulfhidrilos libres en la proteína. Esto juega un papel importante en la adsorción de la proteína sobre el platino, tal como se ha visto en otras proteínas.³ Al aumentar la corriente hasta 4 μA se observó un depósito de proteína de aspecto coloidal sobre el ánodo (cargado positivamente); este depósito en forma de gel sobre el electrodo es una fase rica en proteína como lo han descrito otros autores;**Error! Marcador no definido.** ellos proponen que esta capa es una fase de separación líquido-líquido que contiene una gran cantidad de proteína, generada por el campo eléctrico. Es notable también el aumento en la cantidad de cristales formados al aplicar corriente, en comparación a la menor cantidad de cristales que se forman en el control, lo que indica que en presencia del campo eléctrico se favorece la nucleación más no el crecimiento del cristal. Con respecto al tiempo de nucleación, se observaron cristales tanto en el control como en el experimental a partir de las 12 horas, en general el proceso de cristalización se completó a las 24 horas.

Todos los cristales generados bajo la imposición del campo eléctrico mantuvieron la morfología típica del sistema ortorrómbico de la catalasa.

El potencial generado entre los electrodos fue monitoreado durante los experimentos, mostrando un aumento paulatino de 0.02 V por minuto estabilizándose en 1 hora aproximadamente.

5.4 Monitoreo de Cristalización Mediante Dispersión Dinámica de Luz

Para llevar a cabo el estudio de la evolución de la cristalización asistida por corriente, se utilizó *in situ* la técnica de dispersión dinámica de luz. Para esto se modificó una celda de un volumen de 45 μL , a la cual se le adicionaron 2 electrodos de platino, como se indicó en la parte experimental. Para la aplicación del campo eléctrico, se utilizó el mismo equipo que para la cristalización en las microestructuras interdigitales e igualmente se impuso corriente de 0.5 μA a 5 μA , a 15 $^{\circ}\text{C}$.

En la **figura 28**, se pueden observar las graficas correspondientes a las señales presentes durante el seguimiento de la agregación. Es notable que al incrementar la corriente aplicada aumenta el porcentaje de intensidad de agregados formados, **figura 28 e-f**. La gráfica del control sin corriente muestra la presencia aleatoria de agregados de diferente diámetro, comparado con los agregados formados con corriente eléctrica donde siempre fueron mucho más definidos, con un diámetro de alrededor de 100 y 1000 nm. También se observó que el proceso de agregación se favorece por la imposición de corriente por arriba de 2 μA ya que por debajo de estos valores no hay cambio alguno en la gráfica.

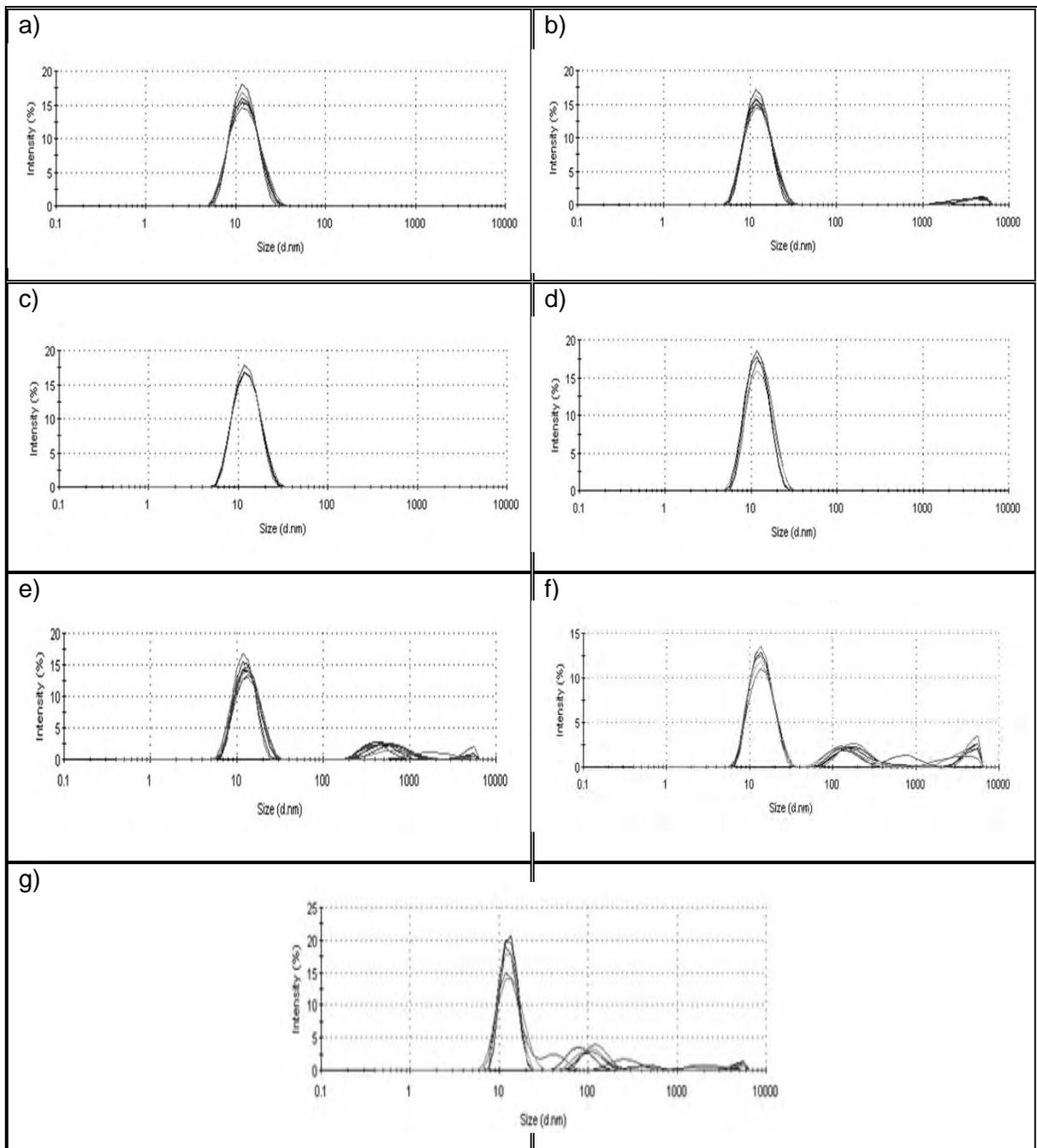


Figura 28. Monitoreo por DDL de cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C a diferentes corrientes. a) 0.5 μ A b) 1.0 μ A c) 2.0 μ A d) 2.8 μ A e) 4.0 μ A f) 5.0 μ A g) control sin corriente.

Para ver de una manera detallada el comportamiento de la solución, en las **figuras 29** y **30**, se enseña el incremento paulatino del diámetro de las especies 1 y 2 bajo la imposición de una corriente de $4.0 \mu\text{A}$.

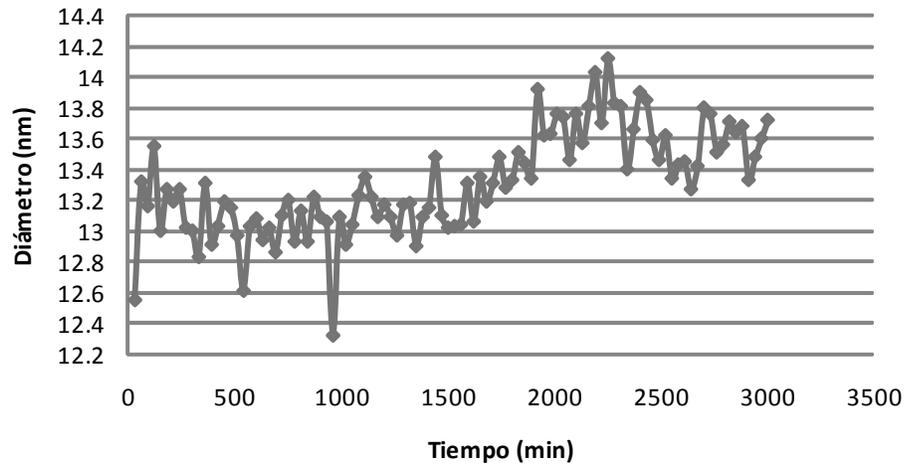


Figura 29. Seguimiento por DDL del comportamiento de la especie 1 en el batch de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C a una corriente de $4 \mu\text{A}$.

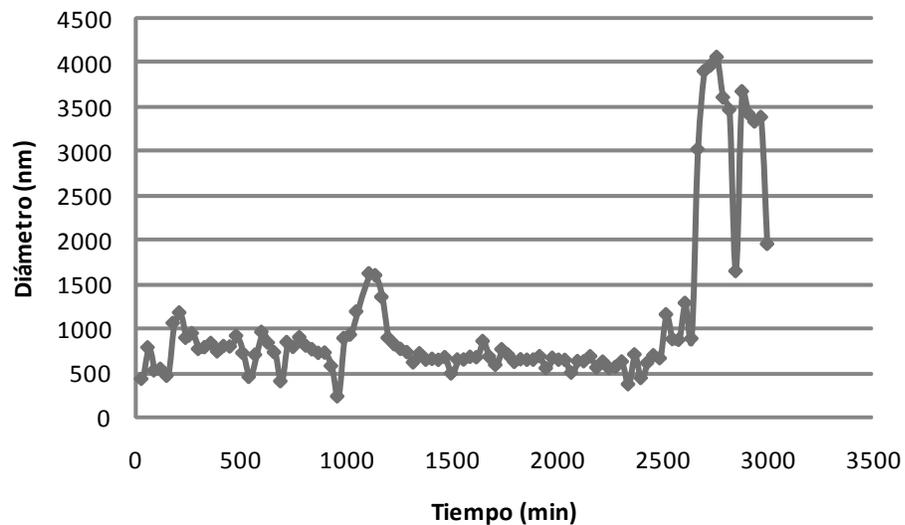


Figura 30. Seguimiento por DDL del comportamiento de la especie 2 en el batch de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C a una corriente de $4 \mu\text{A}$.

En las **figuras 31, 32 y 33**, se puede ver el comportamiento de las especies presentes cuando se implementa el método batch de catalasa en la celda de DDL modificada con electrodos de platino sin corriente. Al comparar el comportamiento de las especies con corriente ($4 \mu\text{A}$) y sin corriente, se encuentra que, con respecto a la especie 1 de aproximadamente 12 nm con corriente aparece en el control sin corriente con un diámetro mayor, alrededor de 14 nm . Al parecer, el campo está modificando muy ligeramente la esfera de hidratación de la proteína en su forma monomérica. En la celda con corriente ($4 \mu\text{A}$), la especie 2 aparece con un diámetro alrededor de 760 nm en la mayor parte del tiempo y que incrementa a las 40 horas de iniciado el experimento, hasta alcanzar diámetros de 3500 nm . Por el contrario, en el experimento sin corriente, esta especie presenta un diámetro que oscila, de manera aleatoria y sin control alguno, desde los 50 hasta los 300 nm . El campo eléctrico está favoreciendo la presencia de una especie agregada del doble de diámetro que los que se observan sin corriente eléctrica. Algo diferente en el control sin corriente es que se tiene también la presencia aleatoria de la especie 3, la cual alcanza diámetros de hasta 5000 nm , pero cabe recordar que sólo corresponde un 1% del total de la señal, esta señal no se observa en el experimento con corriente.

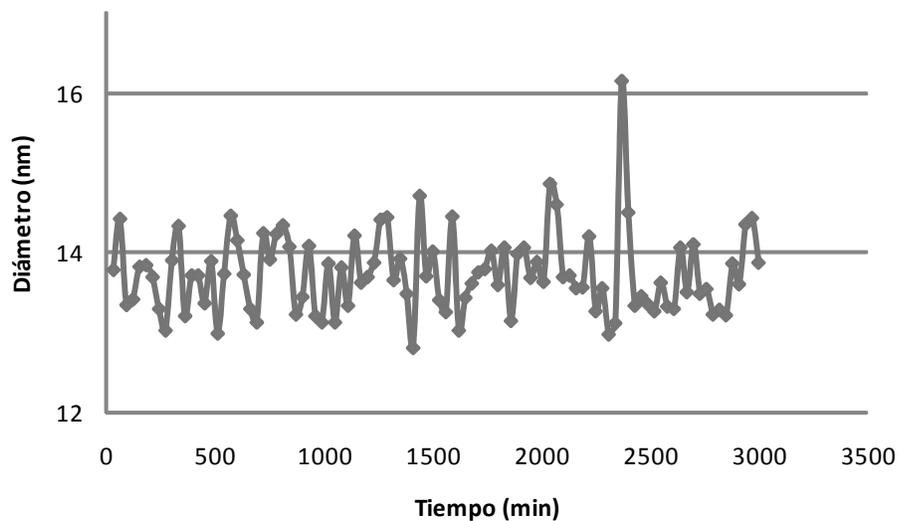


Figura 31. Seguimiento por DDL de la especie 1 en el control de cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C sin corriente.

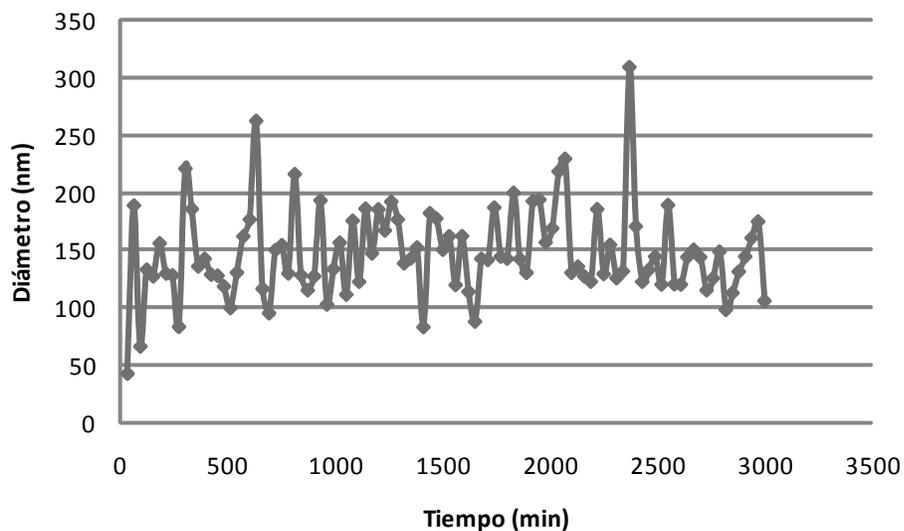


Figura 32. Seguimiento por DDL de la especie 2 en el control de cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C sin corriente.

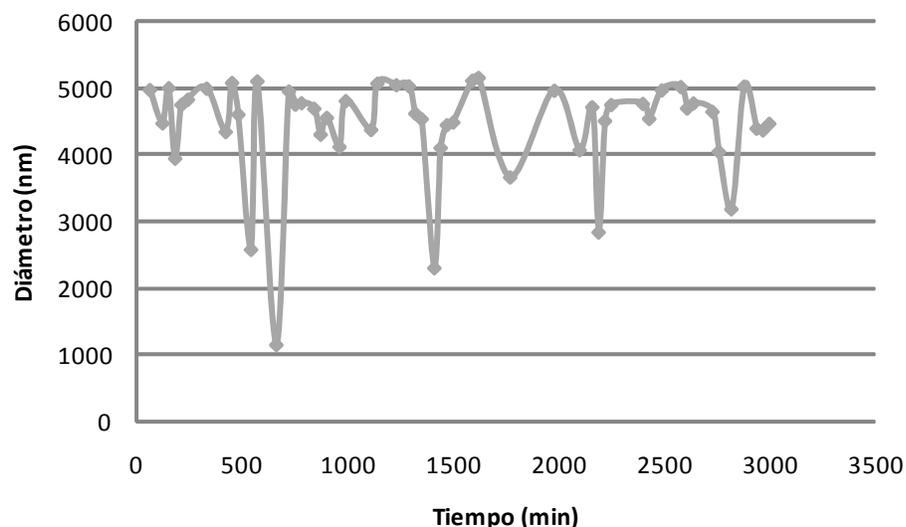


Figura 33. Seguimiento por DDL de la especie 3 en el control de cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C sin corriente. Se eliminaron los puntos correspondientes a la ausencia del agregado.

El hecho de que en presencia del campo eléctrico no se hayan observado agregados de alto peso molecular, es una evidencia de que el campo eléctrico favorece su depósito sobre los electrodos y por esta razón no aparecen en solución. En las **figuras 34 y 35** se hace una comparación de la intensidad de la especie 1 presente tanto en el batch de catalasa con corriente de 0.4 μA como en el control sin corriente. Se puede observar que la intensidad de la especie 1 alcanza hasta un 20% y no disminuye menos del 13% en el control, mientras que en el experimento con corriente, esta especie solo alcanza una intensidad del 16% y disminuye casi hasta el 11%.

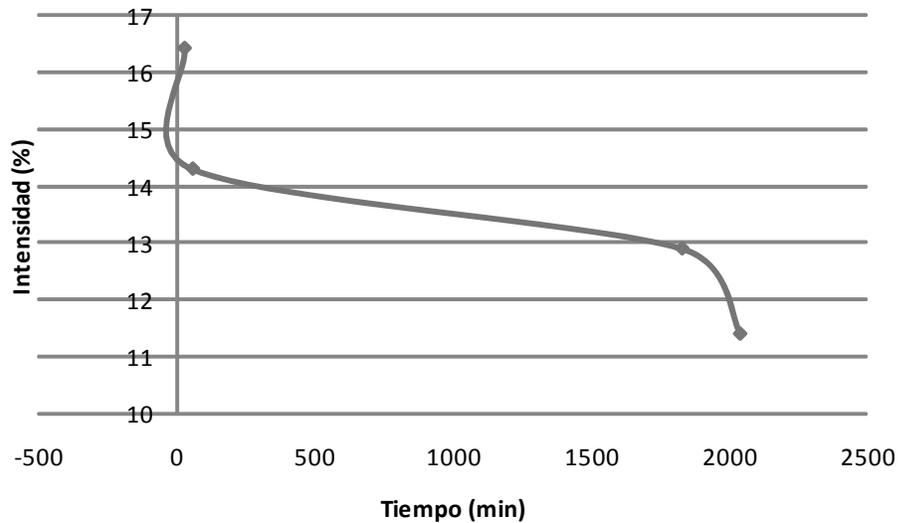


Figura 34. Porcentaje de intensidad de la luz dispersada por las especies presentes en la de cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C, a 4 μ A.

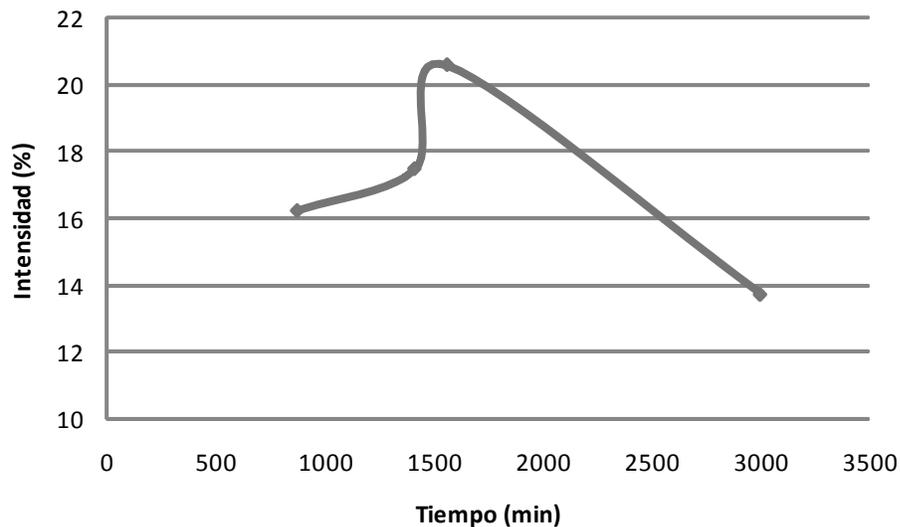


Figura 35. Porcentaje de intensidad de la luz dispersada por las especies presentes en la de cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C, sin corriente.

En cuanto al depósito sobre los electrodos, se observó el mismo comportamiento en las celdas de DDL, **figura 36**, que en las celdas con microestructuras interdigitales, **figura 27**, es decir, un crecimiento aleatorio de cristales de mayor tamaño en la celda

control sin corriente, frente a unos cristales más pequeños pero dirigidos hacia el ánodo cuando se aplica corriente. No se observa ningún depósito de proteína sobre los electrodos de platino en la celda control.

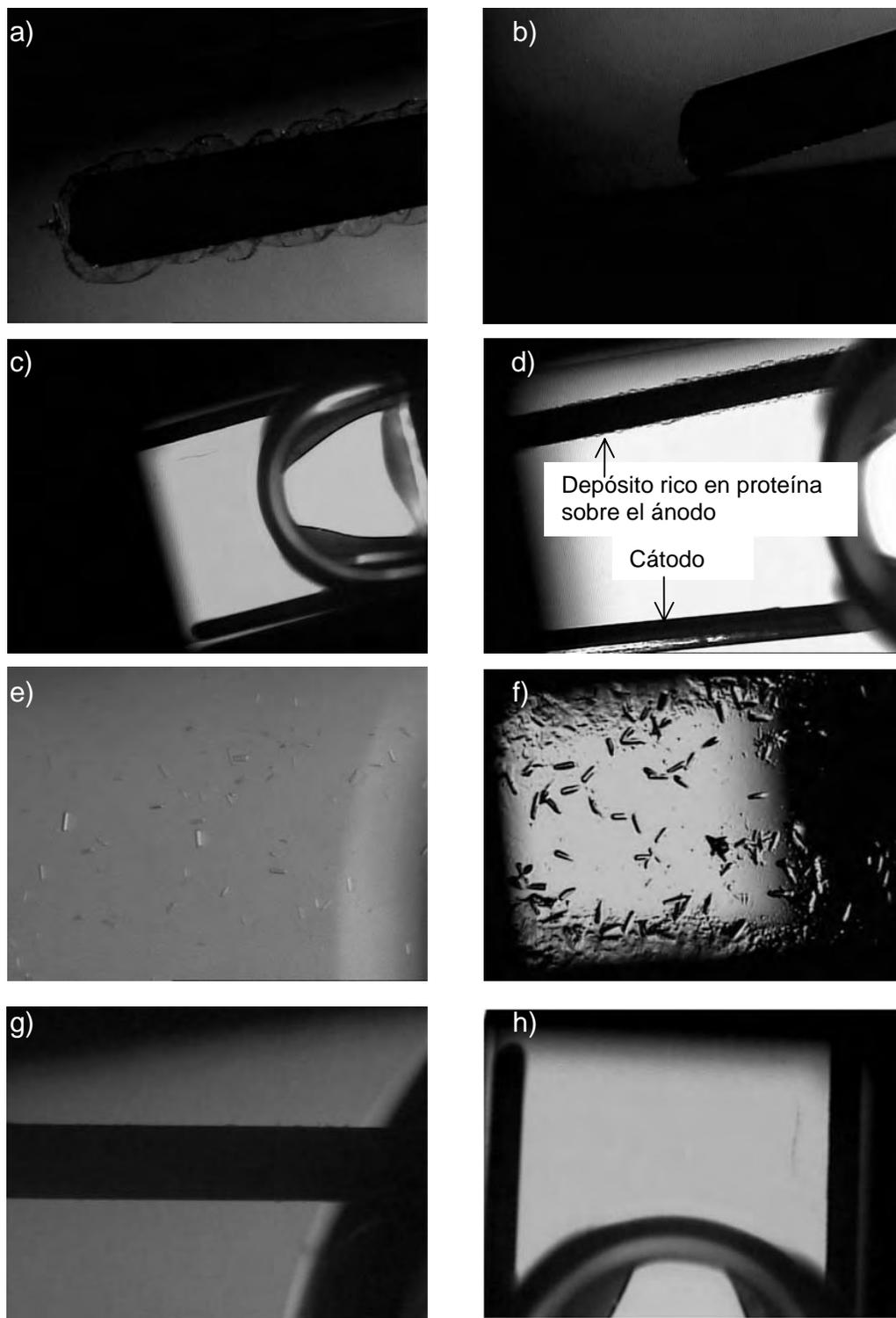


Figura 36. Electrodo de platino en solución batch de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C. a) 1 μ A ánodo b) 1 μ A cátodo c) 2 μ A y d) 2.8 μ A e). Cristales de catalasa en las paredes de la celda con corriente f) sin corriente g) cátodo h) electrodos sin corriente.

En la **figura 37** se puede observar que el recubrimiento de proteína alcanza un grosor de 40 – 50 μA a 3 días de iniciado el experimento con una corriente de 4 μA . La proteína de aspecto coloidal depositada sobre el ánodo; en el cátodo no se observa ninguna señal de catalasa.

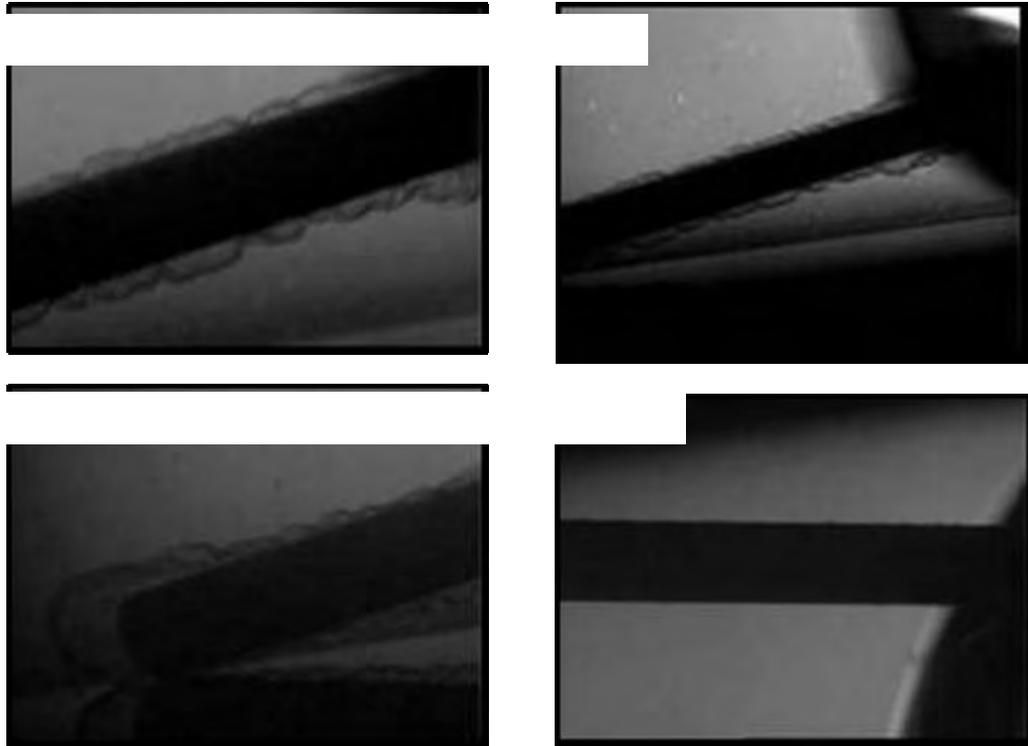


Figura 37. Recubrimiento de catalasa en electrodos de platino a 4 μA . a), b) y c) diferentes ángulos del ánodo d) cátodo.

Debido a que no fue posible obtener macrocristales en las dos celdas mencionadas hasta el momento, se decidió trabajar con macroceldas de mayor capacidad de volumen y diferentes ángulos de electrodos.

5.5 Cristalización de Catalasa en Celdas con Electrodo de Platino a 90° y 180 °

Para ver la influencia del ángulo de los electrodos, se construyeron las celdas que permitían modificar la posición de los mismos. Se colocó en las celdas un volumen final de 250 μL de solución batch de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a una temperatura de 15°C y una corriente de 4 μA , ya que fue la corriente en donde se vio más claramente la formación de cristales bajo corriente eléctrica y donde en DDL existió un efecto en la formación de agregados. En estas celdas se observó el mismo fenómeno de electromigración hacia el ánodo, como en las celdas anteriores y una mayor nucleación al imponer corriente. No se observó ningún depósito de catalasa en el cátodo ni en los electrodos de la celda control, **figura 38**.

Cuando se hizo la aplicación de la corriente eléctrica aumentó el número de cristales formados (nucleación) en comparación con la celda control, aunque el tamaño de estos no alcanzó el del control. Con respecto al tiempo de nucleación, se observaron cristales tanto en el control como en el experimental a partir de las 12 horas. Todos los cristales generados bajo la imposición del campo eléctrico mantuvieron la morfología típica del sistema ortorrómbico de la catalasa al igual que el control.

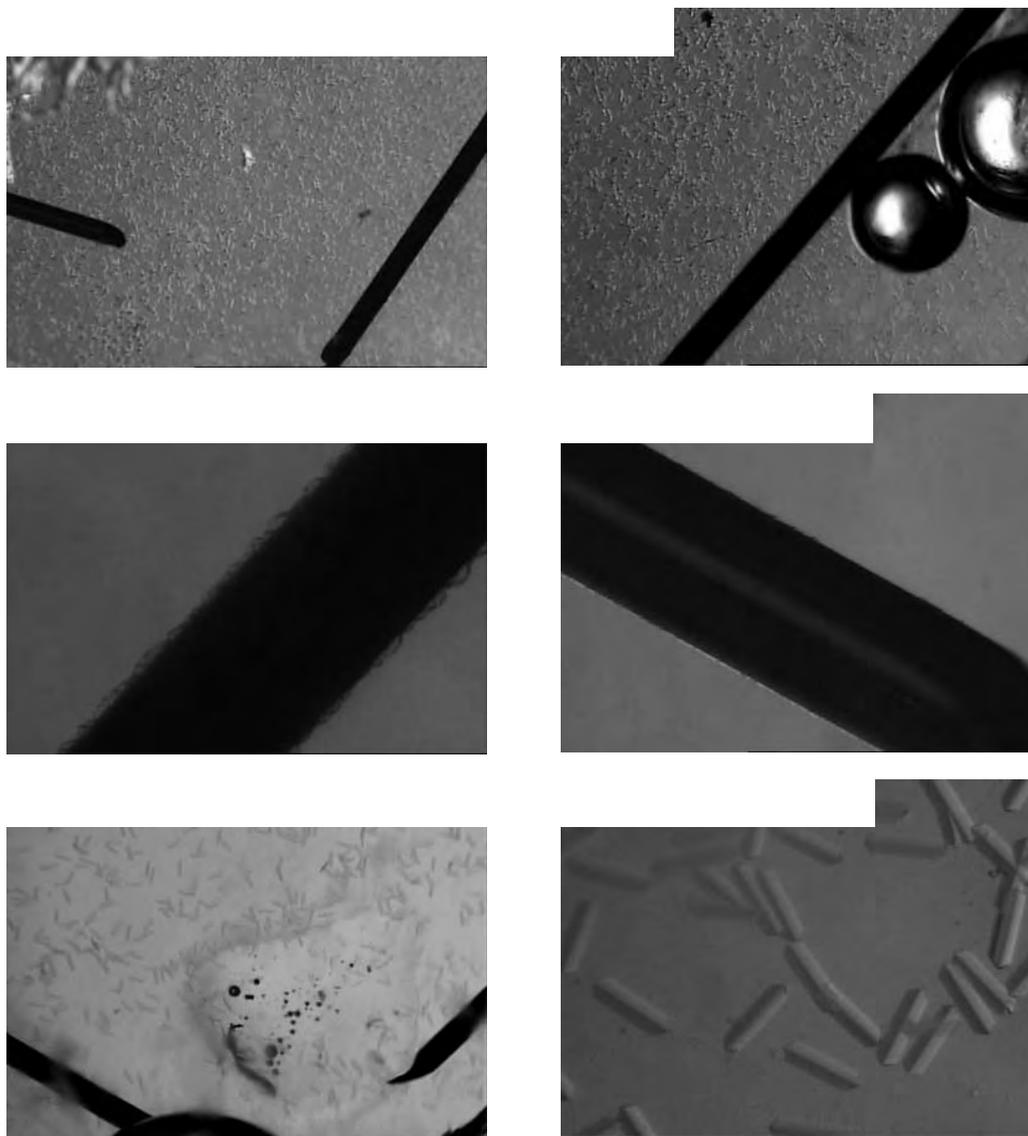


Figura 38. Cristalización de catalasa (11.9 mg/mL) - citrato de sodio (3.2%) en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 a 15°C en celdas con electrodos de platino a 90° con corriente de 4 μ A. a) electrodos b) formación de burbujas c) ánodo y d) cátodo e) y f) celda control sin corriente.

La nucleación ocurre al alcanzar un máximo de sobresaturación; el posterior equilibrio del sistema hacia la región de metaestabilidad provoca el crecimiento del cristal, **figura 39 a**. Se ha visto que la aplicación de un campo eléctrico externo influencia la concentración de proteína generando un gradiente de concentración entre los electrodos.⁴

Es probable que como en la aplicación del campo eléctrico externo, al imponer un campo eléctrico interno se esté generando dentro de la celda de cristalización, condiciones de sobresaturación diferentes a los que se tiene sin corriente eléctrica. Dado que la catalasa se encuentra cargada negativamente y bajo la presencia del campo eléctrico que hace que las moléculas se concentren rápidamente hacia el ánodo, incrementando de esta manera la sobresaturación, **figura 39 b**, los núcleos crecen en esta región de sobresaturación y nunca alcanzan a llegar a la región de metaestabilidad para dar lugar al crecimiento del cristal, en lugar de esto se observa una polinucleación.

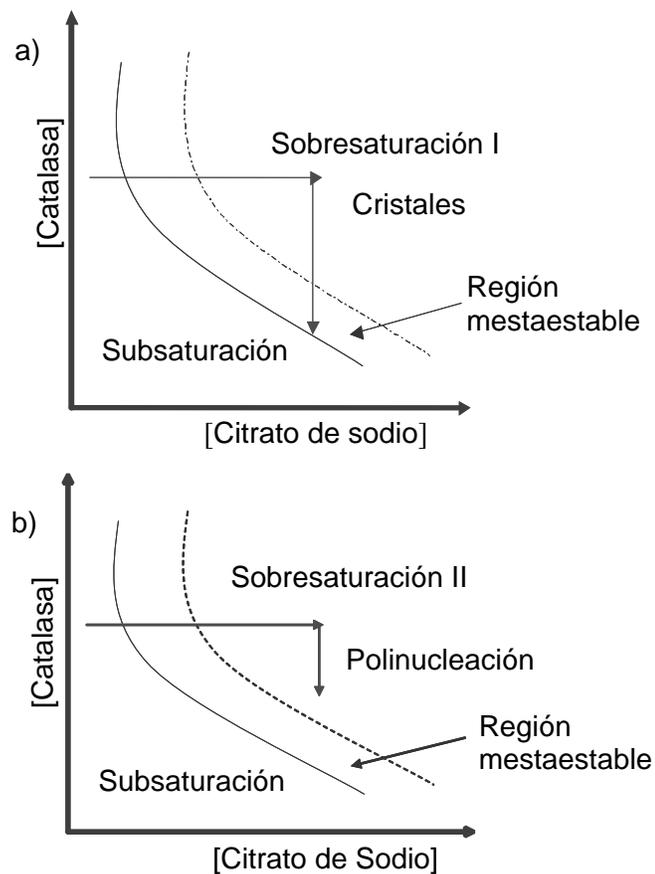


Figura 39. a) Diagrama teórico del control de cristalización sin corriente. b) Diagrama teórico de cristalización de catalasa con corriente.

En solución, las moléculas solvatadas están rodeadas por una esfera de hidratación. Esta capa de hidratación limita la interacción entre las moléculas de proteína al actuar como un escudo y dieléctrico respecto a la atracción electrostática. La cristalización puede ocurrir por la remoción de estas capas de hidratación en soluciones sobresaturadas de proteínas.⁵ Se ha visto que esta remoción puede ser llevada a cabo por evaporación o por un campo eléctrico externo causando un cambio de conformación nativa de la proteína y provocando una formación en forma de gel rica en proteína y limitando la formación del cristal.⁶ Es posible que el efecto del campo eléctrico interno sobre las moléculas de catalasa esté dando lugar al mismo fenómeno descrito previamente.

Alternativamente y como se ha descrito en trabajos previos,⁵ la solución puede entrar a la región de descomposición espinodal (transformación continua sin barrera de nucleación). Este efecto se debe probablemente a la presencia del movimiento convectivo de los iones presentes, o bien a la presencia de reacciones no controladas en esta región de corriente, ocurriendo, la nucleación espontánea y masiva. Por tal razón se requiere conseguir un balance de las condiciones de cristalización para controlar la gelificación y favorecer la cristalización espontánea. La prolongada exposición al campo produjo una gelificación irreversible, lo que sugiere un incremento en la barrera de activación entre el gel y el cristal. Esta fase rica en proteína ha sido descrita previamente en otras investigaciones, **¡Error! Marcador no definido.** en donde se demuestra que al invertir el potencial de un electrodo recubierto con gel de proteína éste puede pasar de manera reversible a la solución.

La habilidad de la superficie de un cristal para capturar unidades de crecimiento e integrarlas en el entramado, es dependiente de la fuerza y el número de interacciones

que se forman entre la superficie y la unidad de crecimiento. Esta se ve afectada por la imposición del campo eléctrico interno, que cambia la esfera de hidratación de la proteína y también causa perturbaciones y cambios de conformación, posiblemente es debido al cambio de estado de oxidación de los complejos metálicos dentro de las proteínas, estas nuevas condiciones no favorecen el crecimiento del cristal.

5.6 Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica del Depósito de Proteínas Redox sobre Electrodo de Platino

Una de las aplicaciones de la Resonancia Paramagnética Electrónica es el estudio de metaloproteínas. Para comprender la función de las proteínas es necesario conocer no sólo su estructura (mediante técnicas de difracción de rayos X o Resonancia Magnética Nuclear), sino tener información específica sobre los centros activos de las mismas. Se debe considerar que las propiedades electrónicas están fuertemente influenciadas por el entorno que rodea a la entidad paramagnética. Por tanto, es impredecible el comportamiento de una especie cuando se modifica el medio en que se encuentra inmersa, lo cual es fuente de una gran riqueza de situaciones y suministra una amplia información de tipo analítico, estructural, dinámico y electrónico.

Por esta razón se decidió ver la influencia que pudiera tener el campo eléctrico interno sobre los centros metálicos de las proteínas depositadas sobre los electrodos a través de la técnica de RPE.

5.6.1 Estudio del Depósito de Catalasa

La catalasa de hígado de bovino es una hemoproteína férrica; su estructura por rayos X (2.5\AA) revela que el sitio activo consiste del grupo prostético hierro – protoporfirina IX, con un ligando axial tiroxinato.⁷ Esta enzima muestra una distorsión rómbica en el grupo prostético hemo, como se ilustra en la **figura 40**, el hierro se encuentra pentacoordinado.

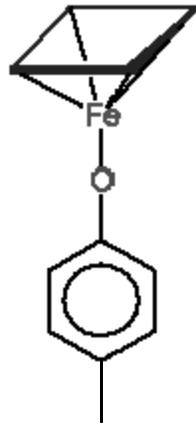


Figura 40. Grupo prostético de la catalasa en los estados de spin Fe^{II} ($S=2$) y Fe^{III} ($S=5/2$).

En la **figura 41** se encuentra el espectro de la catalasa comercial. Bajo las condiciones experimentales se observa la señal de la especie a spin alto ($5/2$) con valores de factor g iguales a 5.73857, 4.16037 y 1.98034 señales debidas a la distorsión rómbica. Los valores de g experimentales son el reflejo directo del estado electrónico del átomo de hierro que es paramagnético.

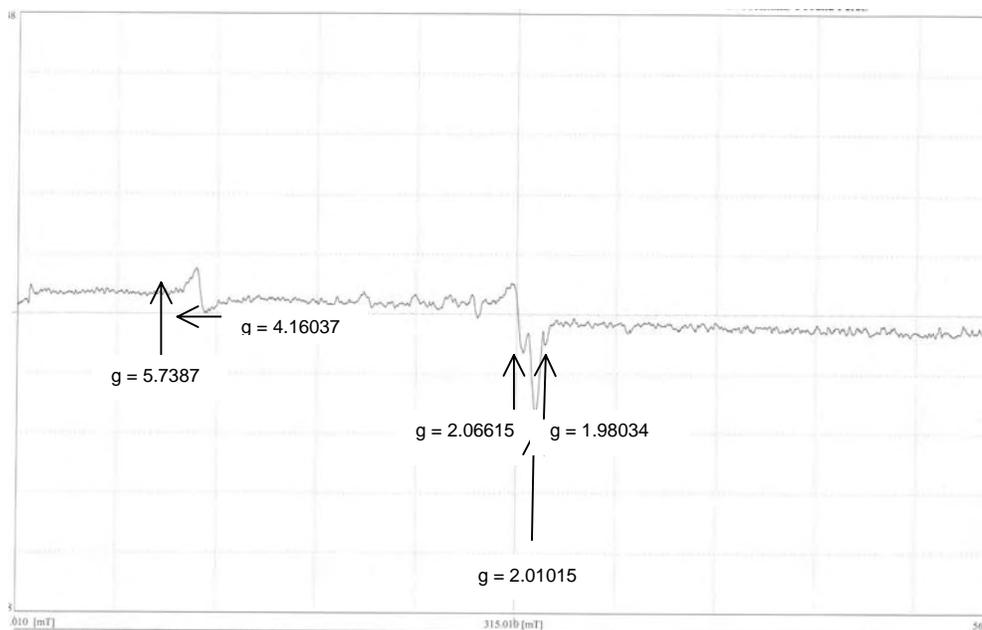


Figura 41. Espectro de RPE de catalasa de hígado de bovino Sigma (C-3155) en amortiguador Tris-HCl (0.1 M, pH 8.5) a 77 K. Frecuencia de microondas=9.123610 GHz.

En la figura 42, se puede ver el espectro de RPE de la proteína depositada sobre el electrodo de platino; en este no se observan las señales de spin alto, lo que puede interpretarse como un cambio en el estado de oxidación del átomo de hierro en el grupo prostético de la catalasa debido a la influencia del campo eléctrico interno.

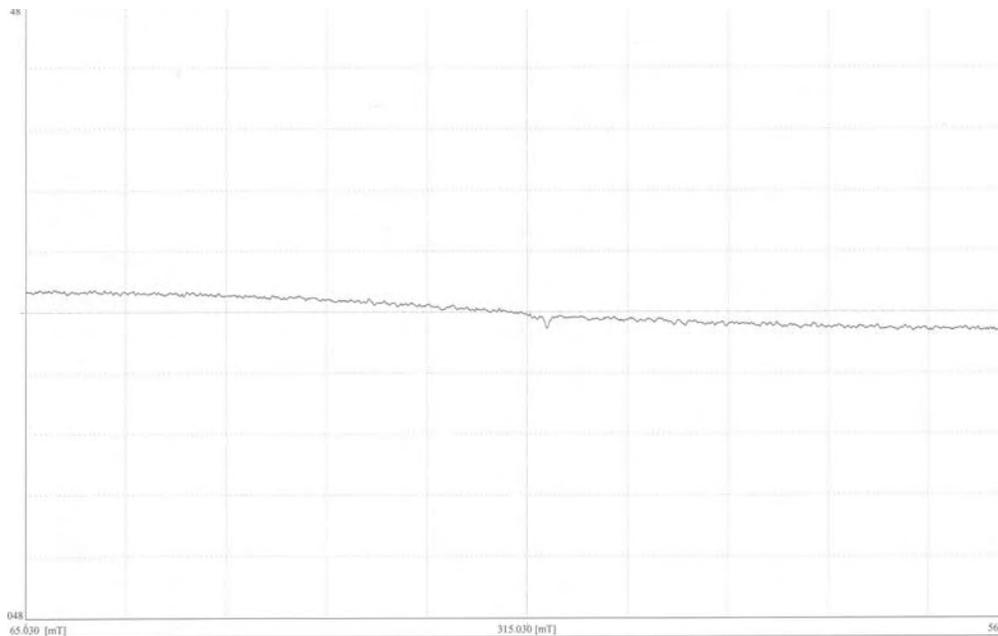


Figura 42. Espectro de RPE de electrodo recubierto de catalasa de hígado de bovino Sigma (C-3155) en amortiguador Tris-HCl (0.1 M, pH 8.5) a 77 K. Frecuencia de microondas = 9.133150 GHz.

En la **figura 43**, se encuentra el espectro del platino sólo, en el cual no se observa ninguna señal y por ende no interfiere en la señal de la catalasa.

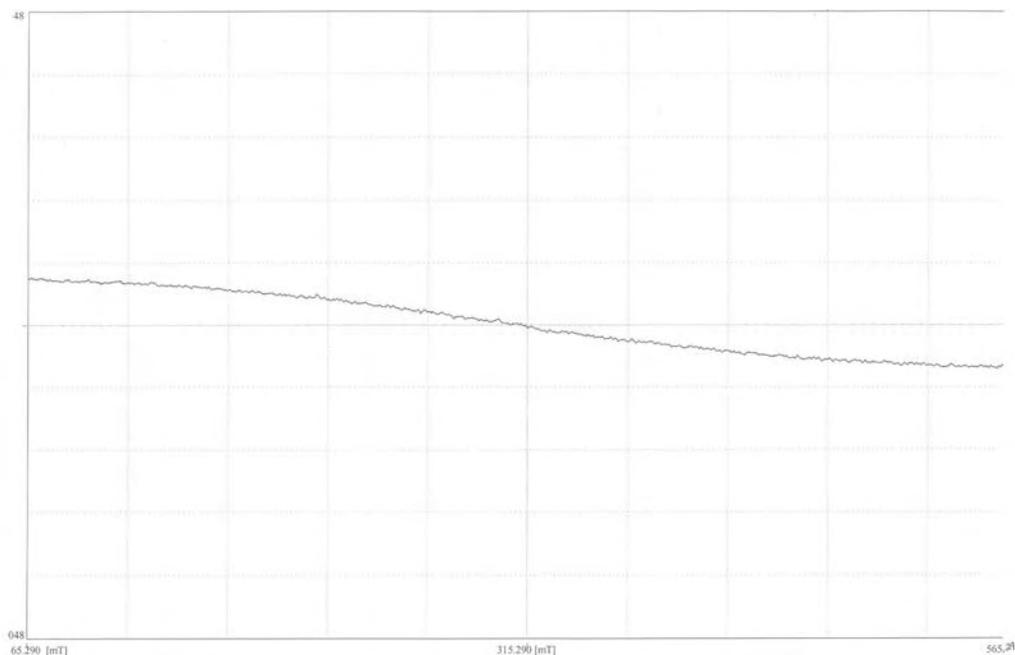


Figura 43. Espectro de electrodo platino (ALFA AESAR) a 77 K. Frecuencia de microondas = 9.123610 GHz.

Se puede deducir mediante la señal de RPE que la proteína depositada, enzima redox, experimenta reacciones electroquímicas al depositarse sobre el ánodo. Una explicación plausible a este fenómeno se puede ver en **la figura 44**. La catalasa presenta una carga neta negativa en el seno de la solución, esto hace que a través del proceso de migración se deposité sobre el ánodo (cargado positivamente). Nuestra propuesta inicial es que el hierro del grupo hemo inicialmente con una carga de III, pierda una carga negativa y se convierta en Fe^{IV} .

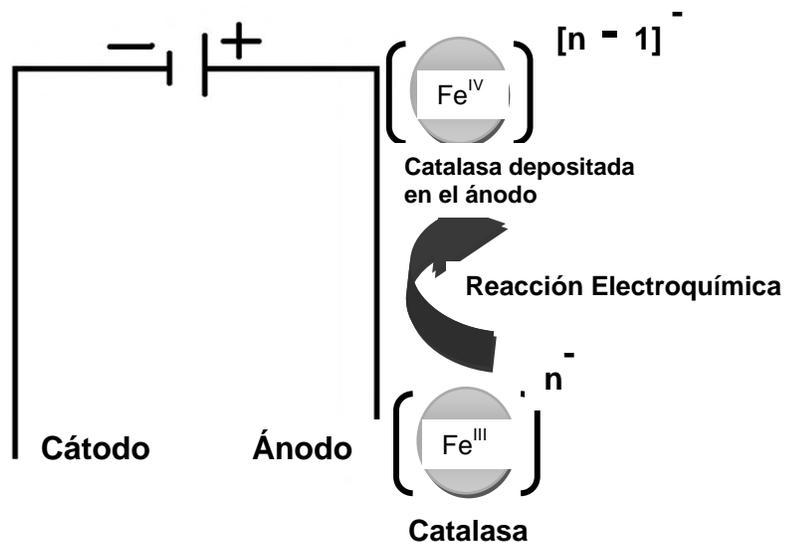


Figura 44. Esquema de representación de oxidación de la catalasa sobre el ánodo.

El ciclo biológico de reacción de la catalasa, **figura 45**, comienza con hierro en estado de alto espín (Fe^{III}) el cual reacciona con la molécula de peróxido para formar el compuesto intermediario **I**, una porfirina catión radical π que contiene Fe^{IV} . Posteriormente, mediante la oxidación de un donador de electrones regresa al compuesto **I**, al estado nativo (Fe^{III}).^{8,9}

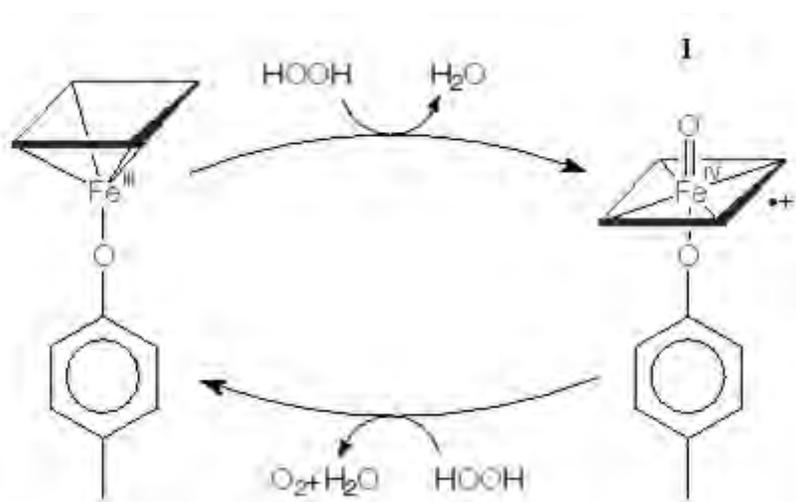
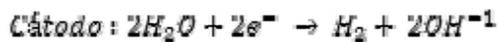
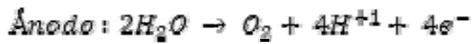


Figura 45. Ciclo biológico de oxidación de catalasa en la catálisis de peróxido de hidrógeno.

Al imponer una corriente eléctrica, se produce una diferencia de potencial entre los electrodos, provocando la migración de la proteína, los cambios redox en ella, y la electrólisis del agua que produce $O_2(g)$, ecuación 4.

Ecuación 4:



Dado que cada átomo de oxígeno tiene un electrón impar para su órbita externa, lo que le confiere la condición de radical libre y la molécula de oxígeno tiene 2 electrones impares, o sea, es un birradical libre, es posible pensar que la catalasa reacciona con el oxígeno producido *in situ* dentro de la celda para formar el estado intermediario I que se deposita en el electrodo, **figura 46**.

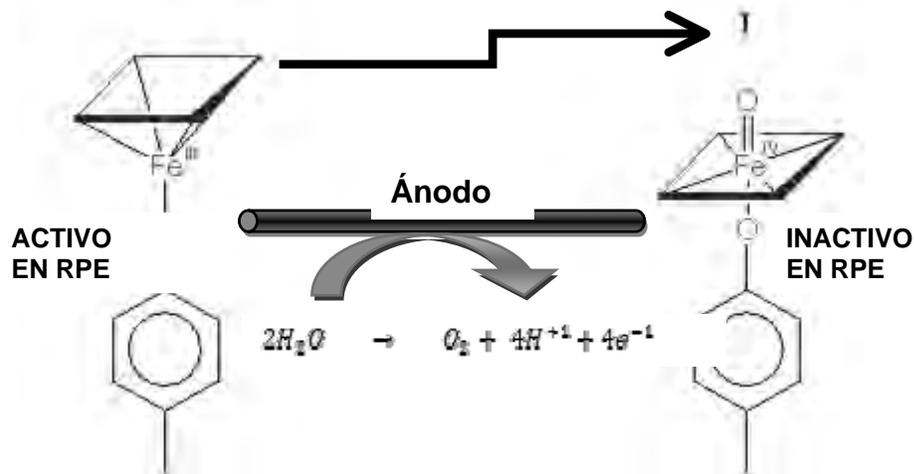


Figura 46. Reacción de oxidación de catalasa depositada en el ánodo con el oxígeno producido *in situ*.

5.7 Estudio de la Cristalización de Citocromo c Comercial

Muchas de las proteínas de origen comercial requieren una fase inicial de purificación antes de intentar la cristalización. El Citocromo c de mitocondrias de corazón de bovino es un ejemplo clásico de esta necesidad de purificación/cristalización; la existencia de isoformas deamidadas en el citocromo c comercial **¡Error! Marcador no definido.¡Error! Marcador no definido.¡Error! Marcador no definido.** hace difícil su cristalización requiriendo pasos extra de purificación.¹⁰ Recientemente fue publicada la cristalización de una isoforma pura de citocromo c de corazón de bovino mediante las técnicas de gota colgante combinado con microseeding (microsembrado) **figura 47.**¹⁵

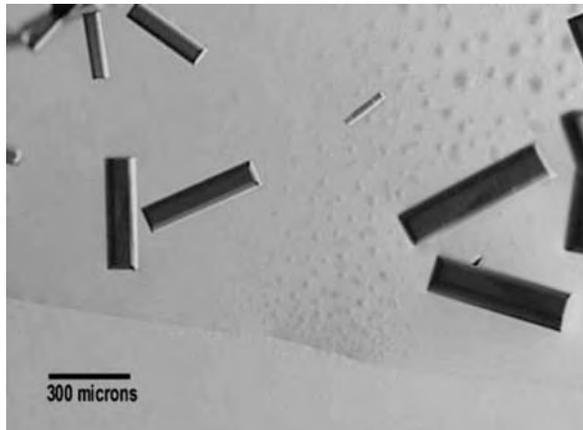


Figura 47. Cristales de una isoforma de citocromo c de corazón de bovino ¹⁵

Utilizando la celda de DDL adaptada con electrodos, **figura 20**, como la usada para la catalasa, pero conteniendo una solución batch de citocromo c, para lograr su cristalización, fue posible seguir el proceso de nucleación y crecimiento de agregados de citocromo c durante la cristalización electroquímicamente asistida.¹² En la presencia del agente precipitante y sin corriente eléctrica se observó un incremento continuo en el peso molecular, **figura 48 a**. Un comportamiento equivalente se observó cuando la

solución fue sometida al efecto de un campo eléctrico interno generado por un flujo de corriente directa de $0.9 \mu\text{A}$, **figura 48 b**.

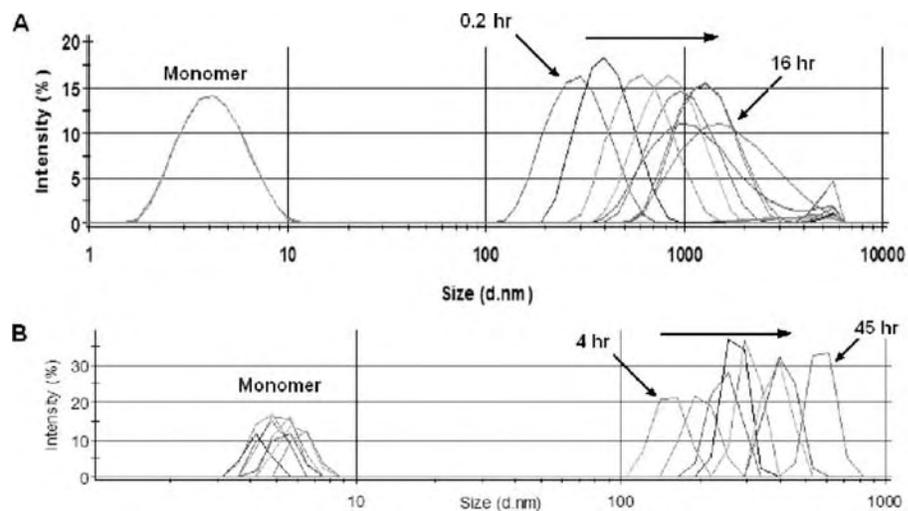


Figura 48. Experimentos de DDL utilizando $50 \mu\text{L}$ de una mezcla de solución de citocromo c (60 mg/mL) y PEG 1000 (50-60%), ambos disueltos en amortiguador fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 100 mM , pH 7.0 a) sin corriente eléctrica y b) en la presencia de $0.9 \mu\text{A}$,¹² a diferentes tiempos.

Mediante este procedimiento se pudieron obtener cristales de citocromo c sin realizar una separación previa de isoformas. Los cristales en forma de agujas largas y de color rojo, crecieron sobre el cátodo, **figura 49a.**^{11,12}

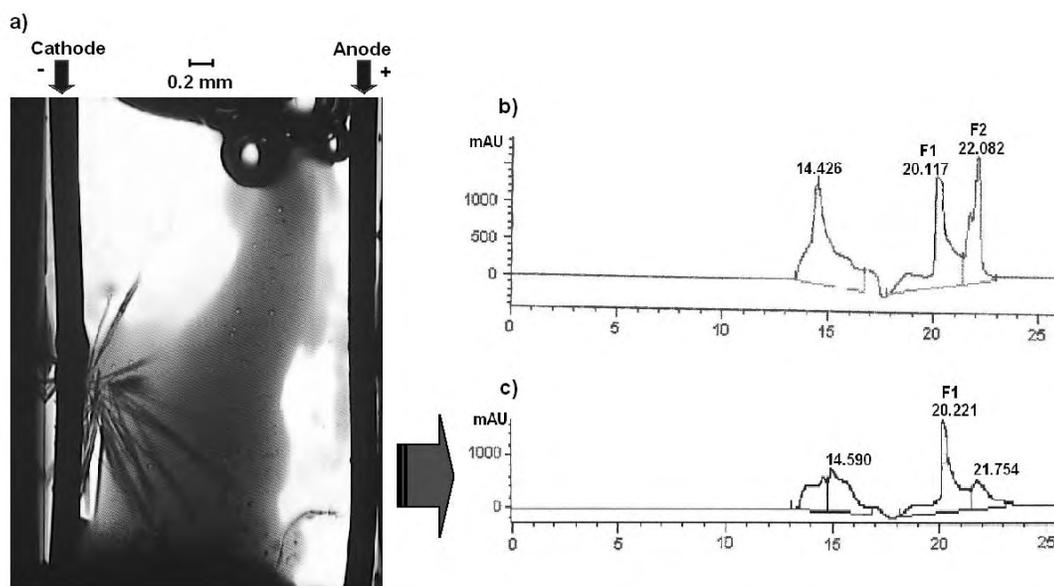


Figura 49. a) Cristalización de citocromo c a 10°C bajo un campo eléctrico interno en una celda de DDL modificada a) 5 días de cristalización b) cromatograma (215 nm) de citocromo c de corazón de bovino comercial en solución de $K_3Fe(CN)_6$, la señal a 14.5 min corresponde a la matriz c) cromatograma de cristales de citocromo c disueltos en solución de $K_3Fe(CN)_6$, bajo el campo eléctrico, la señal a 20.2 corresponde a la isoforma 1.¹²

La explicación de este fenómeno se atribuye a la electromigración de proteínas.^{13,14} Al pH 7.0 del experimento el citocromo c está cargado positivamente y presenta una atracción electrostática hacia el cátodo. Esta misma atracción quizá hizo que el crecimiento del cristal se orientara de una manera diferente, y por esa razón se obtuvieron cristales en forma de aguja y no rectangulares como se obtiene por la técnica tradicional.

Los cristales contenidos en la celda fueron mantenidos a 18°C hasta que se llevó a cabo el análisis mediante técnicas de radiación sincrotrón. La estructura cristalina fue comparada con la obtenida mediante técnicas tradicionales sin corriente eléctrica,¹⁵ tabla 5.

Tabla 5. Caracterización por Radiación Sincrotrón de Cristales de Citocromo c Obtenidos Bajo un Campo Eléctrico Interno y por Microseeding		
	CRISTAL 2	CRISTAL 3
	(Campo Eléctrico)	(Microseeding)¹⁵
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parámetros de la celda	36.76, 54.57,	36.84, 54.48,
unidad (Å) (a, b, c)	57.02	55.33
Limites de Resolución (Å)	1.01 – 1.00	1.5
Reflexiones totales	382292	
Reflexiones únicas	60854 (2718)	
I/σ(I)	44.2 (2.1)	17.5
R merge (%)	3.9 (60.7)	
Promedio de Mosaicidad	0.45	N.R
Integridad (%)	97.3	93.3

N.R: No reportado

La calidad del cristal en ambas técnicas fue excelente siendo ligeramente mejor para la técnica con corriente eléctrica (1.5 Å por microseeding vs 1 Å bajo campo eléctrico interno). También, las colectas para los dos cristales alcanzaron una alta integridad, siendo mayor para el cristal obtenido bajo el campo eléctrico, esto garantiza una mayor cantidad de datos que generan un buen modelo final. La mosaicidad es un parámetro que mide la calidad del cristal, mientras su valor se aproxima a cero el cristal es de

mayor calidad; en este caso se encontró un promedio de mosaicidad muy bajo. Este resultado permite proponer que la aplicación del campo eléctrico interno ayuda a establecer una mejor organización en las moléculas de proteínas dentro del cristal y no solo la participación en el proceso acelerando el transporte de ellas hacia el electrodo.

El análisis por CLAE de los cristales de citocromo c obtenidos bajo un campo eléctrico interno, demostró que los cristales pertenecían a la isoforma F1, la cual corresponde al pico cromatográfico observado en el tiempo de retención más bajo (20 min) **figura 49 b-c**. El resultado obtenido concordó con la isoforma cristalizada previamente reportada mediante la técnica de microseeding;¹⁵ en donde la mezcla de las formas deamidada y nativa no pudieron ser cristalizadas, al parecer el efecto de la deamidación en el citocromo c tiene grandes consecuencias para su cristalización, probablemente la isoforma 2, que es la más deamidada no cristaliza por esta razón.

La principal ventaja de este método es que en un tiempo más corto se han podido obtener cristales de citocromo c, este fenómeno puede ser asociado con un mayor transporte de masa, desde la solución hasta la región cercana a uno de los electrodos, donde la cristalización es favorecida. Este proceso es bien conocido en electroquímica y corresponde al proceso de difusión simulado por corriente constante que genera la migración de especies cargadas (proteínas en este caso) hacia el electrodo.¹⁶ Al aplicar un campo eléctrico sobre una mezcla de isoformas, se pudo separar una isoforma de la otra, lo que indica que el sistema propuesto tiene la capacidad de discriminar entre las especies cargadas, de tal manera que las atracciones electrostáticas o las repulsiones pueden afectar negativa o positivamente las distancias entre los aminoácidos y prevenir o favorecer la formación del cristal.

Po otro lado, al adicionar un campo eléctrico se estaría afectando la cinética de la cristalización, ya que a la difusión de iones debe sumarse el proceso de migración de los mismos influenciados por el campo eléctrico.

En este trabajo se postula que la fuerza conductora de la cristalización está compuesta por el potencial químico (μ) y el potencial eléctrico (ϕ), por lo que la resultante de estos dos potenciales será quien dictamina si es posible o no la cristalización de proteínas en presencia del campo. $\Delta\mu_{total} = \Delta\mu_{químico} + \text{potencial eléctrico} = -k_{\beta} T \ln \beta + z F \Delta\phi$ donde k_{β} es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, β es la sobresaturación definida como la relación entre la concentración inicial de la proteína (C) respecto a la concentración de equilibrio o solubilidad (C_{eq}). Z es la carga de la especie iónica, F la constante de Faraday y $\Delta\phi$ es la diferencia de potencial eléctrico. La presencia del campo eléctrico interno tiene un efecto sobre los iones, generando un mayor movimiento de los mismos debido al fenómeno de la migración. Además, se genera una separación de cargas, en respuesta a la diferencia de potencial resultante. Todos estos cambios, respecto al método control, ¿pueden afectar ya de manera positiva o negativa el crecimiento de cristales de proteínas? Como se ha reportado en otro trabajo, **Error! Marcador no definido.** en donde se cristalizó taumatina y lisozima bajo un campo eléctrico interno, éstas presentaron el mismo grupo espacial que el control sin corriente. Los parámetros de la celda unidad no se vieron alterados por la imposición del campo eléctrico. Esto concuerda con lo encontrado en esta investigación al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con citocromo c. También, es notable la considerable disminución en el tiempo de aparición y crecimiento de cristales. Para dar una explicación a este fenómeno, es necesario retomar la teoría clásica de la nucleación cristalina, en donde, la formación del núcleo

crítico (r^*) y por lo tanto el valor de energía libre crítico (ΔG^*) están en función del valor del potencial químico ($\Delta\mu$) de la solución.

$$\Delta G^* = r^* \Delta\mu / 2$$

La presencia de un campo eléctrico en el batch de cristalización en donde las moléculas que son parte de la nucleación se encuentran cargadas, la energía libre debe ser expresada en términos de una diferencia de potencial electroquímico: $\Delta\tilde{\mu}$

$$\Delta G^* = r^* \Delta\tilde{\mu} / 2$$

En donde el potencial químico está dado por:

$$\Delta\tilde{\mu} = \Delta\mu + zF\Delta\phi$$

La carga de las especies iónicas es z , F es la constante de Faraday y $\Delta\phi$ es la diferencia de potencial.

Lo que se puede observar en la disminución del tiempo de cristalización es una contribución negativa del segundo miembro de la ecuación, que está disminuyendo el valor de la barrera energética y por lo tanto aumenta la rapidez de nucleación, **figura**

50.

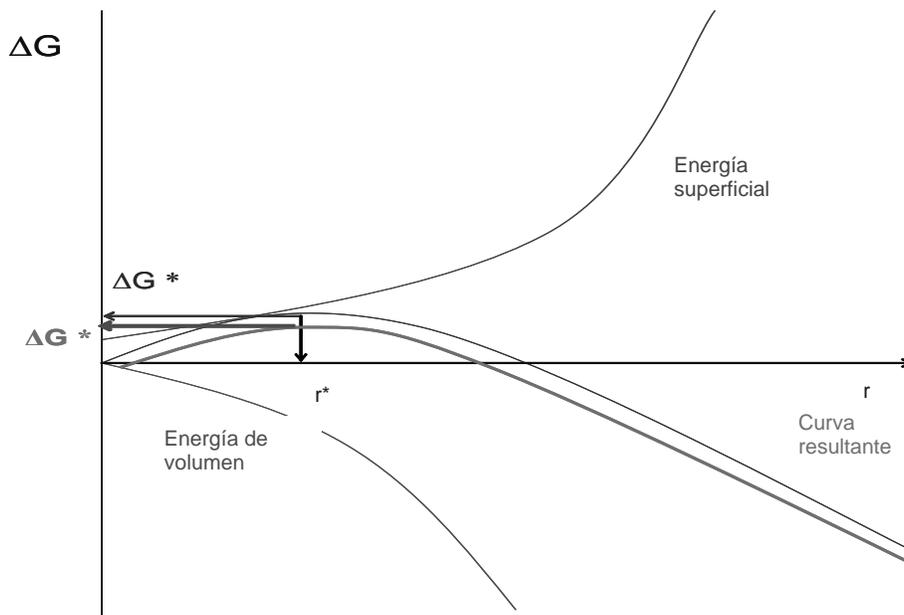


Figura 50. Disminución en la barrera energética de nucleación debido a la presencia de un campo eléctrico en contacto con la solución.

El campo eléctrico interno provoca una aceleración en el proceso de cristalización. Inicialmente se podría pensar que esta aceleración estaba relacionada con una direccionalidad impuesta por el campo eléctrico sobre las proteínas cargadas, las cuales se comportan como macro-iones en estas condiciones. Así, el efecto del campo interno se reflejaría al permitir una velocidad de depósito de las moléculas sobre las caras de crecimiento más rápida que lo esperado para una situación sin **E**. En general los cristales que crecen más rápido lo hacen sacrificando el ordenamiento interno. Si estos cristales son para estudios estructurales, el patrón de difracción será de baja resolución.¹⁷

En los cristales analizados no se encontraron grandes diferencias en la calidad cristalina del citocromo c cuando crecieron bajo el efecto del campo eléctrico. Más aún, casi todos los cristales formados bajo un campo **E** presentaron mejores señales de intensidad difractada en todo el rango de resolución. La diferencia de calidad entre

cristales formados en presencia o ausencia del campo eléctrico se explica aplicando la dinámica de crecimiento de régimen mixto. La misma sostiene que el crecimiento de cristales está afectada por el equilibrio entre la velocidad de transporte de nutrientes desde el seno de la solución a la superficie del cristal y la velocidad con que se incorporan estos nutrientes a la cara en crecimiento. Cuando los cristales crecen bajo regímenes totalmente difusivos (velocidad de crecimiento controlada por el transporte de nutrientes) o un sistema con control cinético (es decir, la concentración de nutrientes en el entorno del cristal (C_s) tiende a ser igual a la del seno (C_∞) y la velocidad depende de la incorporación de los nutrientes a la red cristalina), las perturbaciones en el crecimiento decaen y el sistema se vuelve más estable, con lo que se obtienen cristales de mayor calidad, **figura 51**.

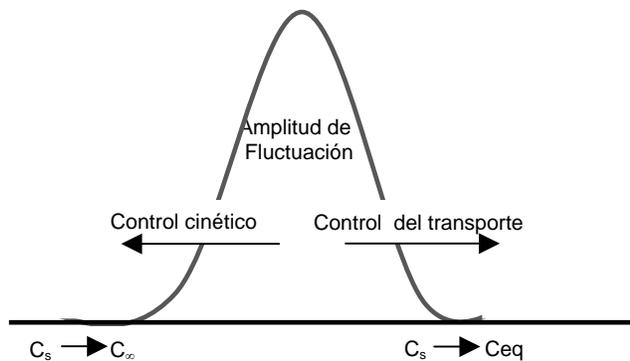


Figura 51. Representación esquemática de la dependencia de la variación en la amplitud de fluctuación al acoplarse procesos de transporte e interfaciales.¹⁸ Bajo un control puramente cinético o de transporte de nutrientes, la concentración interfacial (C_s) tiende a la concentración del seno (C_∞) o la concentración de equilibrio (C_{eq}), respectivamente y la perturbación decae.

Es posible pensar que si se lograra desplazar el sistema a un mayor control cinético (por imposición de un flujo adecuado) se lograría obtener cristales de mayor calidad

cristalina. Y esto es lo que se observó al imponer un campo eléctrico interno. Gracias al efecto migratorio de las partículas cargadas y la difusión, el transporte de nutrientes hasta las caras en crecimiento no es un paso limitante y en consecuencia se observa una alta calidad cristalina. Los cristales de citocromo c formados bajo la influencia del campo **E** necesitan un menor tiempo de nucleación. Los cristales aparecen antes que en los experimentos control. El campo eléctrico favorece la migración de los iones del agente precipitante, provocando una agregación de las proteínas en un menor tiempo, respecto a un sistema control (en ausencia de **E**). De esta forma, las moléculas cargadas pueden agregarse y estabilizarse en presencia de un campo eléctrico gracias a la polarización que sufren y el enmascaramiento de las cargas a cargo de los contraiones. Para el citocromo c, se observó una mayor calidad cristalina ante la presencia del campo eléctrico, ya que existe un control cinético del crecimiento. El citocromo c se ve favorecido por la presencia de especies adecuadas para su incorporación mientras que en la catalasa el efecto es el opuesto.

5.7.1 Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica de Citocromo c

El sitio activo del citocromo c es un grupo prostético de porfirina - hierro (hemo) que está covalentemente unido a la proteína en la cisteína 14 y cisteína 17 a través de enlaces tioéter (hemo c) **figura 52**. El hierro se encuentra en el plano del anillo porfirínico, las dos posiciones axiales del hierro están ocupadas por el azufre de la metionina 80 y el nitrógeno de la histidina 18.¹⁹

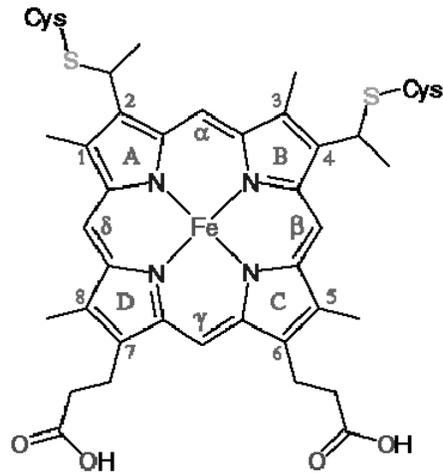


Figura 52. Ilustración del grupo hemo, coordinación del hierro en el Citocromo c.

En hemoproteínas se ha encontrado que, generalmente, los aminoácidos histidina, metionina, cisteína y lisina, y los grupos CO, CN⁻ y N₃ dan lugar a configuraciones de bajo espín, y que los ligandos H₂O, OH⁻, glutamato, aspartato y tirosina dan lugar a configuraciones de alto espín.^{20,21} Los ligandos más comunes en citocromos son la histidina y la metionina, específicamente en el citocromo c de corazón de bovino existe una interacción con los ligandos axiales histidina 18 y metionina 80;¹⁵ por lo que, en el citocromo c comercial estudiado se encontrará un hierro en configuración de bajo espín, diamagnética, **figura 53**.

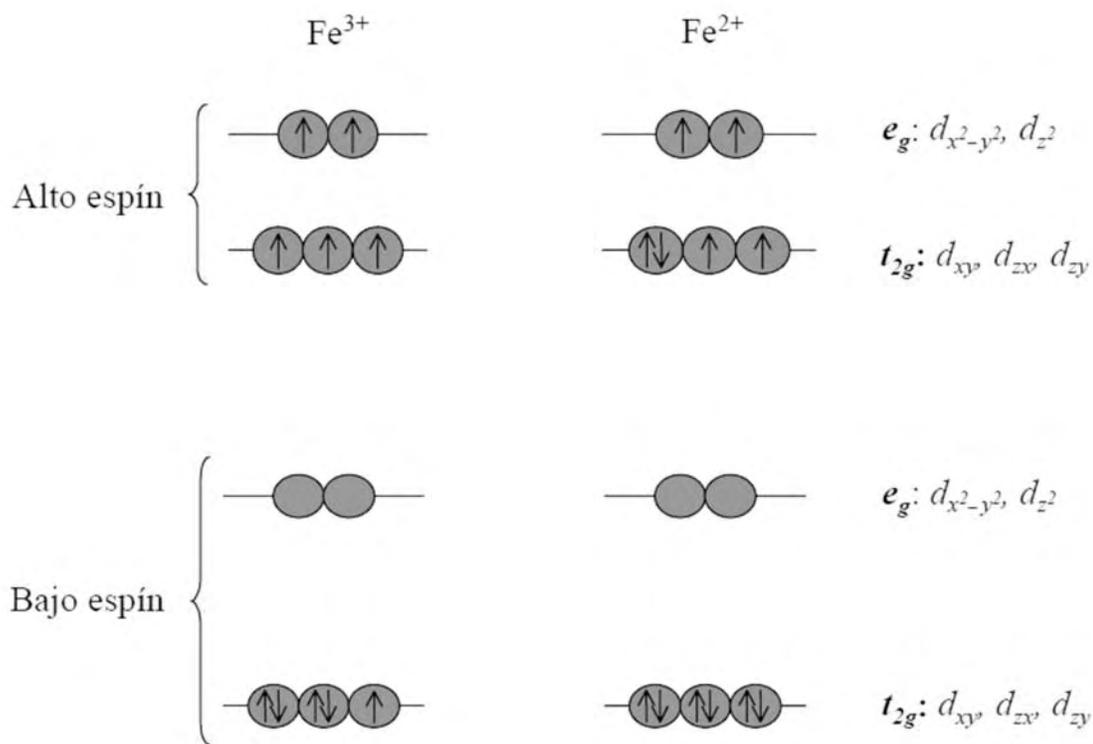


Figura 53. Niveles de energía de los electrones $3d$ en un campo cristalino octaédrico. Configuraciones de alto y bajo espín para los iones Fe^{3+} y Fe^{2+} .

En la **figura 54**, se puede ver el espectro del citocromo c sólido comercial, en el cual no se encuentra ninguna señal, por lo que se puede deducir que éste se encuentra en su estado diamagnético de bajo spin Fe^{II} .

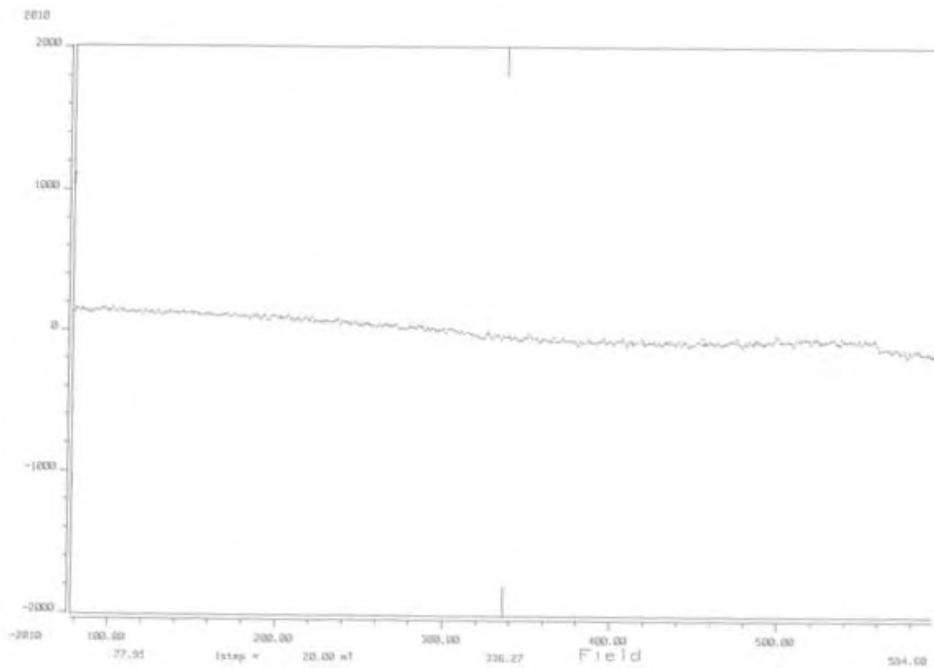


Figura 54. Espectro de RPE de Citocromo c de corazón de bovino (Sigma 9007-43-6) en estado sólido a 77 K. Frecuencia de microondas=9.104160 GHz.

Sin embargo, al analizar el espectro de la **figura 55** que corresponde a la solución acuosa de citocromo c, se observa una señal con un valor de g de 3.9160 la cual pertenece a la señal de Fe^{III} de bajo spin al pH neutro.²² Lo que indica que al poner el citocromo c sólido en solución acuosa, sin desoxigenar, sufre un proceso de oxidación, posiblemente por el oxígeno disuelto en el medio.

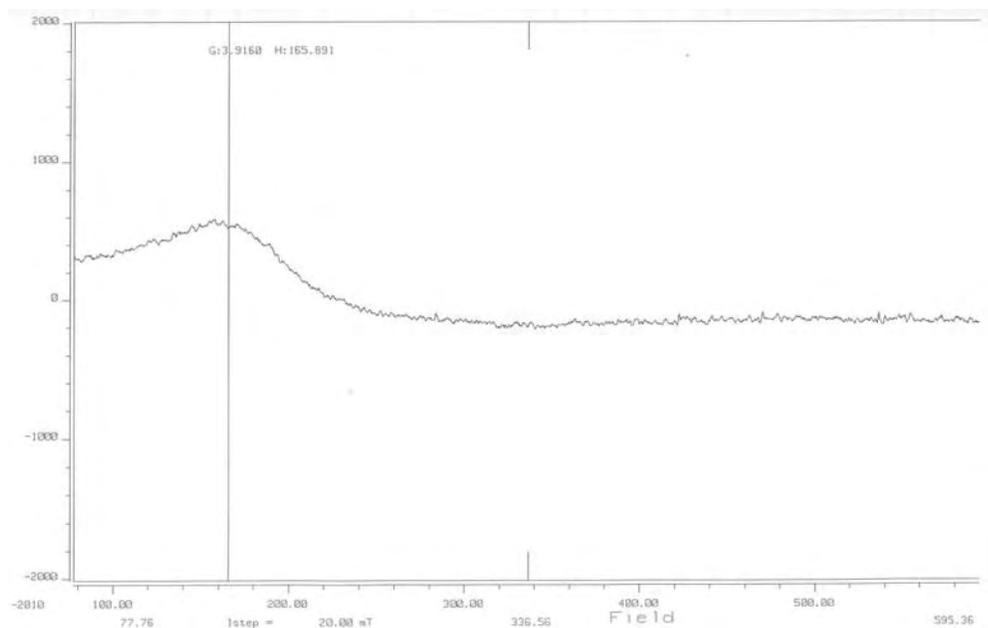


Figura 55 Espectro de RPE de Citocromo c de corazón de bovino (Sigma 9007-43-6) en solución acuosa (amortiguador fosfatos, pH 7.0) a 77 K. Frecuencia de microondas = 9.092810 GHz.

Por otra parte, al analizar el espectro de la **figura 56**, correspondiente a los cristales depositados sobre el cátodo, no se observó ninguna señal.

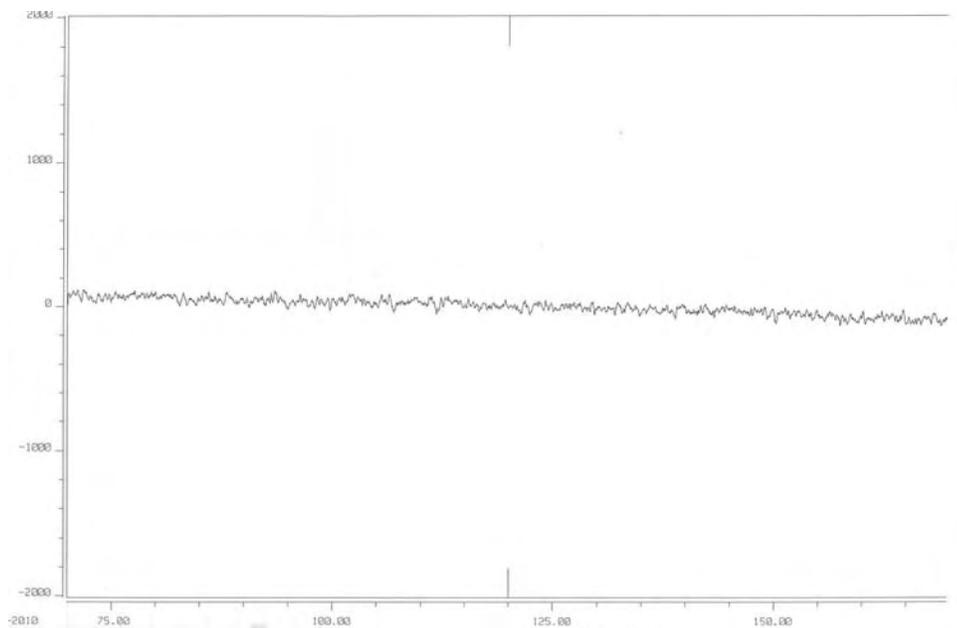


Figura 56. Espectro de RPE de cristales de Citocromo c de corazón de bovino (Sigma 9007-43-6) depositados sobre el cátodo, a 77 K. Frecuencia de microondas = 9.135370 GHz.

Esto puede indicar que el proceso de cristalización asistida electroquímicamente provoca, al igual que con la catalasa de hígado de bovino, reacciones redox que da lugar a un depósito cristalino de bajo espín diamagnético de Fe^{II} . El fenómeno que ocurre se puede ilustrar mediante la **figura 57**.

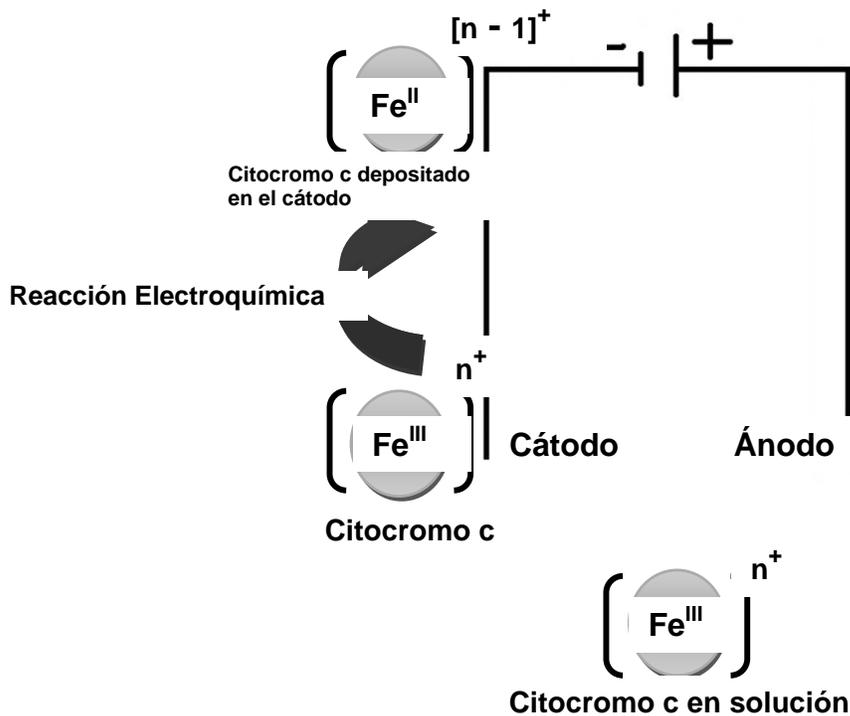


Figura 57. Esquema de representación de la reducción del Citocromo c sobre el cátodo.

La cristalización de macromoléculas es un paradigma que va a la par con el plegamiento de las proteínas, teniendo en cuenta el gran número de conformaciones que cada monómero puede presentar en un momento dado y que están por encima de las mínimas requeridas para obtener cristales perfectos.²³

Las razones detrás de la gran variabilidad en la cristalización de macromoléculas son múltiples e incluyen: 1) el alto grado de movilidad de las macromoléculas sobre la superficie, 2) la naturaleza electrostática (la composición aleatoria de los grupos cargados), 3) la relativamente alta inestabilidad química y física de macromoléculas (desplegamiento, requerimientos de hidratación, sensibilidad a la temperatura y 4) factores específicos de la molécula (como grupos prostéticos y ligandos).

Estos factores contribuyen en gran medida a la dificultad en los actuales intentos de predecir el comportamiento de cristalización *do novo*, incluso hasta para las pequeñas y relativamente estables proteínas como la lisozima.²³

-
- ¹ Veessler, S.; Marcq, S.; Lafont, S.; Astier, J.; Boistelle, R. *Acta Crystallogra.* 1994, D50, 356-360.
- ² Dierks, K.; Meyer A.; Einspahr H.; Betzel, C.; *Dynamic Light Scattering in Protein Crystallization Droplets: Adaptations for Analysis and Optimization of Crystallization Processes.* *Cryst. Growth Des.* (2008). 8 (5), pp 1628–1634.
- ³ Chunhai, F.; Xiaofang, H.; Genxi, L.; Jianqin, Z.; Dexu, Z.; *Adsorptive Behavior of Hemoglobin at a Platinum Electrode and Its Application to the Determination of Proteins.* *Analytical Sciences.* (2000). Vol 16, 463 – 465.
- ⁴ Taleb, M, Didierjean, C.; Jelsch, C. Mangeot, JP. *J. Cryst. Growth.* (2001) 232, 250.
- ⁵ Hou, D.; Chang, H.C.; *ac field enhanced protein crystallization.* *Applied Physics Letters* 92, 223902. (2008).
- ⁶ Dixit, N. M.; Zukoski, C.F.; *Phy. Rev. E*, 67, 061501 (2003).
- ⁷ Fita, I.; Silva, A.M; Murthy, M.R.N; Rossman, M.G. *Acta Crystallogra. Sect, B: Struct. Sci.* (1986). 42, 497-515.
- ⁸ <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/CATALASE.html>
- ⁹ Ivancich, A.; Jouve, H.; Gaillard, J.; *RPE Evidence for a Tyrosyl Radical Intermediate in Bovine Liver Catalase.* *J. Am. Chem. Soc.* (1996). 118, 12852-12853.
- ¹⁰ R. G. Sanishvili, E. Margoliash, M. L. Westbrook, E. M. Westbrook and K. W. Volz. *Crystallization of wild-type and mutant ferricytochromes c at low ionic strength: seeding technique and X-ray diffraction analysis.* *Acta Cryst.* (1994). D50, 687-694.

-
- ¹¹ Acosta, F.; Eid, D.; Marín-García, L.; Frontana-Urbe, B.; Moreno, A.; "From Cytochrome C Crystals to a Solid-State Electron-Transfer Device". *Crystal Growth and Design* 7. (2007). 7. 2187-2191.
- ¹² Pérez, Y.; Eid, D.; Acosta, F.; Marín-García, L.; Jakoncic, J.; Stojanoff, V.; Frontana-Urbe, B. A.; Moreno A. Electrochemically Assisted Protein Crystallization of Commercial Cytochrome c without Previous Purification *Cryst. Growth & Design*. (2008). 8, 2493-2496.
- ¹³ Zoubida Hammadi, Jean-Pierre Astier, Roger Morin, and Stéphane Veessler. Protein Crystallization Induced by a Localized Voltage. *Crystal Growth & Design*. (2007). 7 (8). 1472 - 1475.
- ¹⁴ Frontana-Urbe, B.; Moreno, A.. On Electrochemically Assisted Protein Crystallization and Related Methods. *Cryst. Growth & Design*. (2008). 8. 12, 4194–4199.
- ¹⁵ Mirkin, N.; Jaconcik, J.; Stojanoff, V.; Moreno, A. "High resolution X-ray crystallographic structure of cytochrome c from bovine heart and its application to the design of an electron transfer biosensor". *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 70, (2008). 83-92.
- ¹⁶ Bockris, J. .O. Reedy, A. K. N. *Modern Electrochemistry*, 2nd. Plenum Press: New York. (1998); pp 386 -405; Vol 1.
- ¹⁷ Vekilov, P.G., Alexander J.J.D. Rosenberger, F. (1996) *Phys. Rev. E* 54, 6650.
- ¹⁸ Allégre C.J., Provost, A., Jaupart C. (1981) *Nature* 294, 223.
- ¹⁹ Wollenberger, U; Spricigo, R; Leimkühler, S; Schroder, k. Protein electrodes with Direct Electrochemical Communication. *Adv Biochem engine/Biotechnol* (2008). 109:19-64.

²⁰ Losada, Losada, M; Vargas, MA; de la Rosa, MA; Florencio, FJ. "Los Elementos y Moléculas de la Vida. Introducción a la Química Biológica y Biología Molecular". Editorial Rueda, S.L. Madrid.(1998).

²¹ Moore, 1990. Moore, GR; Pettigrew GW "Cytochromes c: Evolutionary, Structural and physicochemical Aspects", Springer-Verlag, Heidelberg. (1990).

²² Brautigan, D; Feinberg, B; Hoffman, B; Margoliash, E. Multiple Low Spin Forms of the Cytochrome c Ferrihemochrome. The Journal of Biological Chemistry. (1977). Vol. 252, No. 2. Pp 574-582.

²³ Feher G, Kam Z. Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays. Methods Enzymol. 1985;114:77-112.

5. CONCLUSIONES

- ✓ Se construyó un nuevo modelo de celda con una microestructura interdigital de platino que permitió realizar experimentos de cristalización de proteínas redox con aplicación de diferentes corrientes (0.5 μA - 5 μA). Se pudo observar un aumento en el número de núcleos formados, pero no en el tamaño del cristal. Se observó el fenómeno de migración hacia el electrodo de carga contraria a la proteína, con la formación de un depósito sobre el electrodo de platino.

- ✓ Fue posible monitorear el proceso de agregación durante la cristalización de catalasa bajo un campo eléctrico interno, utilizando una celda de DDL modificada con electrodos de platino. Se observó que con la aplicación de corriente por encima de 2 μA , los agregados que se van formando tienen un diámetro definido entre 100 nm y 1000 nm correspondiente a agregados moleculares de 10 y 100 moléculas de proteína, diferentes a los que se encuentran cuando no se aplica corriente eléctrica, los cuales presentan valores aleatorios sin ningún patrón de comportamiento, esto debido posiblemente a que la corriente eléctrica favorece la organización de los monómeros en cantidades discretas.

- ✓ En los experimentos de cristalización bajo un campo eléctrico (0.9 μA), realizados con citocromo c de corazón de bovino, se pudieron obtener cristales en forma de aguja de la isoforma 1, sobre el cátodo. El tiempo de

obtención de los cristales se redujo de 45 a 5 días y presentan mejor resolución al analizarlos por difracción con rayos X.

- ✓ Se estudiaron los depósitos de proteínas sobre los electrodos de platino, utilizando la técnica de RPE. Este estudio preliminar permitió proponer un cambio de oxidación en los átomos de hierro presente en el grupo hemo tanto de la catalasa como del citocromo c, indicando que estas proteínas están siendo afectadas por la diferencia de potencial entre los electrodos.
- ✓ Es diferente la influencia que ejerce el campo eléctrico sobre las especies redox estudiadas. En el caso del citocromo c, el cual sin una previa separación de isoformas, se favoreció la cristalización de la isoforma 1, lo que representa un ejemplo de la autodiscriminación del sistema sobre las especies presentes. Lo que no contribuyó de una manera positiva al crecimiento de los cristales de catalasa en el rango de corriente estudiado.
- ✓ Estos resultados serán útiles para encontrar un nuevo método experimental que puede ser usado para estudiar los efectos del campo eléctrico sobre la cristalización de proteínas y establecer unas bases teóricas que pueden explicar lo que sucede durante la nucleación y el crecimiento del cristal.

PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Estudiar el fenómeno de cristalización de proteínas redox con electrodos de otro material (Au, Ag, grafito, etc.) con el fin de mejorar las condiciones experimentales eliminando la afinidad de las proteínas por el platino.

- ✓ Para estudiar si el campo eléctrico está modificando la esfera de hidratación de la proteína se podrían realizar estudios de calorimetría diferencial de barrido o fluorescencia intrínseca unido a la técnica de DDL para el seguimiento del proceso de agregación.

- ✓ Se pueden realizar estudios de dicroísmo circular después de realizar los experimentos de DDL para ver si ocurren cambios en la estructura secundaria de las proteínas.

ANEXOS

5. ANEXO I

Electrochemically Assisted Protein Crystallization of Commercial Cytochrome *c* without Previous Purification

Yohana Pérez,¹ Désir Eid,¹ Francisco Acosta,¹ Lifana Marín-García,¹ Jean Jakocić,² Vivian Stojanoff,² Bernardo A. Frontana-Unbe,^{1,*} and Abel Moreno^{1,*}

Archivos de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, C.U. 04510, México City, México, and Brookhaven National Laboratory, NSLS, Upton, New York 11973-5000

Received February 4, 2008; Revised Manuscript Received March 25, 2008

ABSTRACT: The electrochemically assisted crystallization of nonpurified (commercial purity) cytochrome *c* was successfully achieved inside of small cell of a dynamic light scattering (DLS) apparatus. The method combined batch crystallization conditions and an internal electrical field to favor the nucleation stage. This methodology crystallizes commercial cytochrome *c* without previous isoforms separation, decreasing costs and experimental time to obtain crystals. The effect of the electric field on the aggregation time and on the protein nucleation was observed in real time by means of DLS. The results showed a marked decrease of the crystallization time (from 45 days to 5 days) highly improving the previously reported method of crystallization. The HPLC analysis of redissolved crystals showed that the protein corresponds to the same isoform previously crystallized by microseeding. The excellent quality of the cytochrome *c* crystals obtained in the presence of electrical current was revealed by X-ray crystallography; the diffraction reached 1 Å of resolution.

1. Introduction

Nowadays more than 80% of the structures that are elucidated for proteins are determined by X-ray diffraction investigations thanks to the availability of single crystals.¹ However, obtaining suitable crystals of high quality is not easy, and has turned into the key limiting step for studies that require the knowledge of the 3D structure.² In order to obtain protein crystals of high quality, it is needed to develop new crystal growth methods, which improve the induction time and the size of crystals without diminishing their quality.³ In an effort to reach this goal, researchers have investigated the effects of magnetic^{4,5} and electric fields,^{6–8} using high-throughput methods,^{9,10} and have applied high pressure in the experiments.¹¹ The application of a small electric current to a protein solution in the crystallization cell, which generates an internal electric field, has been also investigated.^{12–15} The later investigations led to a significant reduction in the induction time for protein crystallization and the preference to crystallize near one of the electrodes. The crystals obtained in the presence of electrical current were in the majority of the cases excellent for structural analyses via X-ray diffraction.¹²

Obtaining diffraction quality crystals is also limited by the high purity necessary for the crystallization. Due to the proteins' biological origin, time-consuming procedures are required to obtain a suitable purity for crystallization experiments.¹⁶ Also most of the commercially available proteins demand as a compulsory rule an initial purification step before crystallization can be attempted. Cytochrome *c* (cyt-*c*) from bovine-heart mitochondria is a classical example of this purity/crystallization problem. Cytochrome *c* is one of the most studied proteins due to its electron-transfer properties involved in aerobic as well as in anaerobic respiration.¹⁷ The existence of deamidated isoforms in commercial cyt-*c*^{18–20} hampered its crystallization and requires extra purification steps.²¹ It has been reported that the

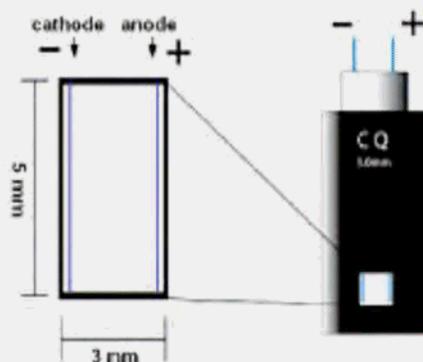


Figure 1. DLS modified cell with platinum electrodes fitted in parafilm for electrochemical experiments.

use of the commercial protein does not generate crystals. To successfully crystallize cyt-*c* (45 days of experiment, using microseeding) it is necessary to use one of the isolated isoforms present from the commercial protein.²² However, when an internal electric field was used to favor crystallization of the purified protein using the gel acupuncture method,¹² crystals appeared in only 2 weeks, but they were very small and unsuitable for structural investigations.²² The interesting cyt-*c* electrochemical properties in solution^{23–26} and of cyt-*c* single crystals²⁷ inspired us to improve the methodology already published. The optimization consisted of using a batch crystallization technique, combined with an internal electrical field provided by parallel Pt electrodes inside the crystallization cell. These experiments using the nonpurified commercial protein resulted in a remarkable reduction of the crystallization time, occurring exclusively on one electrode.

2. Experimental Section

2.1. Materials. The electrodes used for these experiments were of platinum wire (99.99 Alfa-Aesar, 0.25 mm diameter). All solutions were

* Corresponding authors. E-mail: bfrontana@servidor.unam.mx and amoreno@servidor.unam.mx.

¹ Universidad Nacional Autónoma de México.

² Brookhaven National Laboratory.

Table 1. Synchrotron X-ray Characterization, Data Collection Parameters, and Statistics of a Cytochrome *c* Crystal Obtained by Applying an Internal Electric Field

	crystal 1	crystal 2
Data Collection Parameters		
wavelength (λ /energy (keV))	0.9793/12.66	0.8551/14.5
detector-sample distance (mm)	120	90
number of frames	180	360
exposure time per frame (s)	6	25
oscillation range per frame ($^{\circ}$)	1	0.5
Data Collection Statistics		
space group	P2 ₁ C ₂	P2 ₁ C ₂
unit cell (\AA) (a, b, c)	38.72, 34.58, 58.85	36.76, 34.57, 57.02
resolution limits (\AA)	30.00–1.32 (1.34–1.32)	10.06–1.00 (1.01–1.00)
completeness (%)	97.6 (78.8)	97.3 (88.3)
R_{int}	43.2 (3.4)	44.2 (2.1)
R_{σ} merge (%)	3.5 (36.7)	3.9 (61.7)
average mosaicity	0.45	0.45
total reflections	19332	38202
unique reflections	26865 (1067)	60854 (2718)
multiplicity	5.9 (4.0)	6.3 (3.9)

prepared using deionized water from a Milli-Q system (Waters). Cytochrome *c* from bovine heart mitochondria was used without prior purification (Sigma code C-3131). All chemicals were purchased from Aldrich Co.

2.2. Electrochemical Cell. The electrochemical cell was constructed of a 45 μL quartz cell that is used in dynamic light scattering (DLS) experiments. The electrodes were fitted in parallel using platinum wires (Figure 1). The electrodes were inserted through a plastic cap, and the cell was sealed with silicon glue. The direct electric current applied for the electrochemically assisted crystallization experiments was supplied by a Galvanostat VIMAR (FCC-17).

2.3. Crystallization Procedure. The modified DLS cell for the electrochemically assisted crystallization (Figure 1) was initially filled with 1:1 mixture of cytochrome *c* solution (62 mg/mL) and PEG 1000 (50–60% w/w), both dissolved in buffer phosphate solution ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 100 mM, pH 7.0. This mix should not be initially homogenized; both proteins and precipitants must be added by the cell walls and they counterdiffuse each other when crystallizing. The electrodes were fitted in the cell and connected to the galvanostat (direct current) applying an electrical current of 0.9 μA . The temperature during the crystallization was maintained at 10 $^{\circ}\text{C}$ (this was the best condition found). The cell was DLS monitored every 2 h for 5 days. After the fifth day crystals were observed on the cathode and the cell was disconnected from the power supply and stored at 18 $^{\circ}\text{C}$. After one week the small needle-like crystals reached their maximal size.

2.4. Cytochrome *c* HPLC Analysis. Commercial cytochrome *c* was purified and analyzed by high performance liquid chromatog-

raphy (HPLC) using a reverse phase chromatography column (C18 Jupiter 300 \AA , 5 μm , Phenomenex) in an HP 1100 chromatograph in order to separate the isoforms. The column was equilibrated and eluted with aqueous solution of 0.1% (w/v) trifluoroacetic acid (TFA). The station was performed applying a linear gradient with acetonitrile containing 0.12% (w/v) TFA at a flow rate of 1 mL/min. A solution of 500 μg of cytochrome *c* dissolved in water was oxidized with $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (cyt-*c*: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1:30) before injection. The station profile was followed at three different wavelengths: 215 nm (for peptide bonds) and 360 and 410 nm (both for oxidized heme group). The analysis of crystals grown under the influence of the internal electric field was carried out by HPLC. The selected crystals were manipulated using a cryoloop and washed with, first, precipitating agent (PEG 1000 30% w/v) and then deionized water and finally air-dried. They were dissolved in the $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution, and it was injected to the HPLC chromatograph, and analyzed using the same elution mixture/gradient.

2.5. Dynamic Light Scattering. A Malvern Nano S apparatus with NBS laser technology was used for these dynamic light scattering experiments. The analysis of the hydrodynamic radius, diffusion coefficient, and molecular weight determination were performed by the TLS method (total intensity light scattering). All these parameters were obtained and processed by using the software DTS (Nano S from Malvern, Ltd.). Solutions of cytochrome *c* (1.0 mg/mL) were prepared in distilled water as well as sodium phosphate buffer solution pH 7.0 for analyzing the homogeneity conditions. Afterward, this solution of cytochrome *c* (31 mg/mL, final concentration) was analyzed in the presence of the precipitating agent (30% PEG 1000, final concentration) and in a different experiment applying a constant current of 0.9 μA , both over the course of 3 days.

2.6. X-ray Diffraction Experiments. X-ray data up to 1.0 \AA resolution were collected on the X6A beam line at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY. Six crystals were analyzed obtaining high resolution ranging from 1 to 1.3 \AA . Two selected full data sets (1.3 and 1.0 \AA resolution) of 180 and 360 oscillation images were collected with an ADSC Quantum Detector 210 respectively. The X-ray data were integrated and scaled with the HKL 2000 package. The data collection was performed under a flux of nitrogen (ranging between -160 and -165 $^{\circ}\text{C}$), and as cryoprotector was used for this data collection, because the PEG-1000 used as crystallizing agent was working as a cryoprotector. The statistics of the data collection and characterization of cell parameters of cytochrome *c* (obtained by this electrochemically assisted crystallization method) are shown in Table 1. It is worth mentioning that cell parameters as well as the space group were the same in all cases as that crystal structure of cytochrome *c* already published elsewhere (ref 22).

3. Results and Discussion

Using the crystallization cell (Figure 1) and the batch crystallization conditions previously described, DLS methods

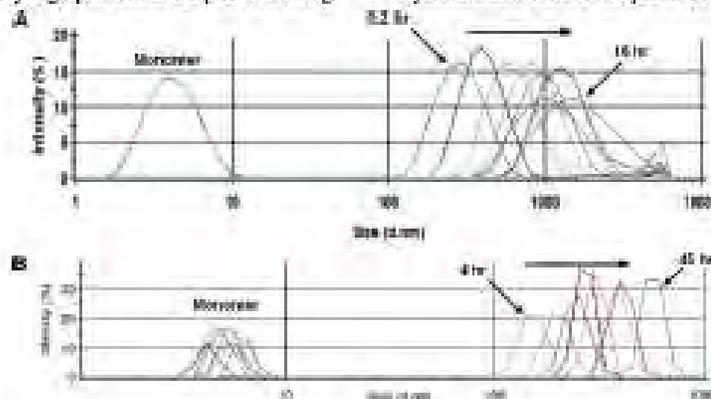


Figure 2. DLS experiments using 50 μL of a 1:1 mixture of cytochrome *c* solution (62 mg/mL) and PEG 1000 (50–60% w/w), both dissolved in buffer phosphate solution ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 100 mM, pH 7.0: (A) without electrical current and (B) in the presence of an electrical current. Colors do not correspond to the same time analysis.

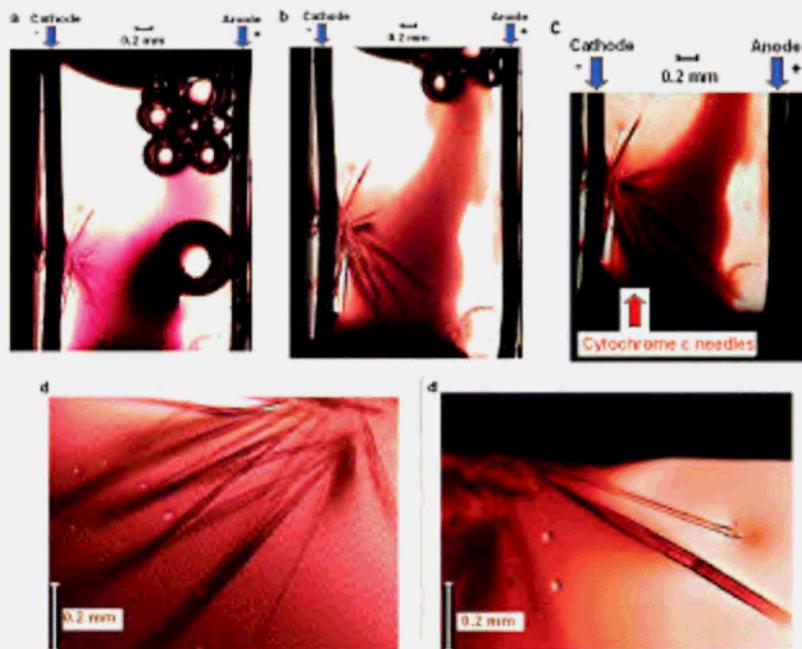


Figure 3. Electrochemically assisted crystallization of cytochrome *c* in a DLS modified cell at 10 °C. (a) After 3 days of experiment. (b) After 5 days of crystal growth. (c) Cytochrome *c* needlelike crystals after 8 days of experiment. (d) Close-up of the needles shown in (c).

permitted us to follow the nucleation and growth of aggregates of cyt-*c* solutions. In the presence of precipitating agent without electrical current, a continuous increment of molecular weight was clearly observed. (Figure 2A). An equivalent behavior was observed when the solution was submitted to the effect of an internal electric field generated by a small flux of direct current of 0.9 μ A (Figure 2B). These results are consistent with a faster protein nucleation that favors crystallization under the effect of electrical field.

After five days of continuous application of current to the electrodes, long and sharp red needles grew on the cathode (Figure 3). These needles were ca. 1–2.5 mm long and 0.2 mm large. The explanation for this phenomenon has been attributed to protein electromigration.^{14,15} At the pH of the experiment the protein is positively charged ($pI = 10.73^{23}$) and an electrostatic attraction toward the cathode occurs. These needle-like crystals kept growing for 5 more days, until they reached their final size shown in Figure 3c. After crystallization, the cell containing the crystals was maintained at 18 °C until the X-ray analyses were carried out.

The needles were very sensitive to the temperature and only grew below 20 °C; above this temperature dissolution was observed. The hydrodynamic radius of the protein between 10 and 35 °C is about 2.3 nm, which clearly indicates the presence of monomeric (homogeneous) size distribution.²⁷ In spite of this large range of stability of the monomer, the best crystallization condition under electric current was at 10 °C. Probably at this temperature the protein solubility decreases favoring the crystallization process.²⁸ The resulting crystals/needles were analyzed by synchrotron X-ray irradiation showing the same space group and unit cell parameters as those published elsewhere²² (Table 1). Particularly, the crystal/needles obtained by the electro-

chemically assisted technique presented a very high resolution of 1.0 Å, which is higher than previously obtained without an electrical field. This result showed for the first time a successful crystallization of cyt-*c* without prior isoforms separation, obtaining useful high quality crystals for X-ray crystallography. The reproducibility of the method was checked five times, by keeping the temperature during the crystallization step at 10 °C.

Because the isoform separation is not necessary and the presence of the internal electrical field concentrates the protein around the negative electrode, the crystallization process occurred in only 5 days from the time the protein was taken from the commercial glass bottle. This novel cyt-*c* crystallization methodology, compared with that previously described (microseeding) that took 45 days,²² does not require purification of cyt-*c*. The crystal quality in both techniques was excellent for X-ray analyses (1.5 Å for microseeding vs 1 Å for electrochemically assisted).

The analysis by HPLC of some dissolved crystals/needles obtained under the presence of an internal electric field demonstrated that the cyt-*c* crystals are from the isoform F1 which corresponds to the chromatographic peak observed at the lower retention time (ca. 20 min, Figure 4). This result is in agreement with the previously reported crystallization of cyt-*c*, where the crystals were obtained with the purified F1 isoform.²² Based on these results, it is clear that the isoform F1 is the most stable and suitable for cyt-*c* crystallization.

4. Conclusions

This new procedure to obtain cytochrome *c* crystals in the presence of a small direct current (electric field) opens the

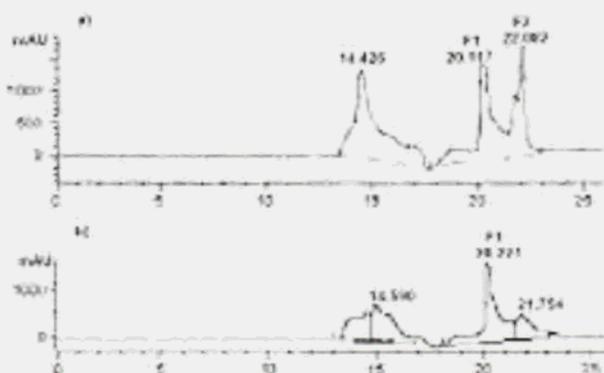


Figure 4. Chromatogram (215 nm) of cyt-*c* from bovine heart using a C-18 reverse phase column applying a linear gradient from 0% (v/v) to 100% acetonitrile and at a flow rate of 1 mL/min. (a) Commercial cyt-*c* in the $K_3Fe(CN)_6$ solution; peak at 14.5 min corresponds to the matrix of the sample. (b) Cyt-*c* from crystals obtained by isothermal electric field dissolved in the same matrix.

possibility of more rapidly producing larger quantities of high quality cyt-*c* crystals without previous isoform separation, thereby decreasing costs and experimental time. The electron-transfer function of cyt-*c* is maintained in the crystal;²⁷ therefore suitable applications like solid-state biosensors using as sensing element a protein crystal could be envisaged.

Acknowledgment. The financial support from the DGAPA-UNAM through Projects IN214506 and IN212207-3 is gratefully acknowledged. We thank M.Sc. Carmen Márquez, Q. Eréndica García, for HPLC analyses. Y.P. thanks CONACYT for her scholarship. X-ray experiments were carried out at the X6A beam line at the National Synchrotron Light Source supported by the NIGMS and DOE under contract GM-0030 and DE-AC02-08CH10886. We acknowledge the professional grammar and style English revision done by Antonia Sánchez-Marín.

References

- (1) Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> in PDB statistics, December 2007.
- (2) McPherson, A. *Crystallization of Biological Macromolecules*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1999; Woodbury, NY.
- (3) Mirkia, N.; Moreno, A. *J. Mex. Chem. Soc.* 2005, 49, 30–52.
- (4) Sasaki, G.; Yoshida, E.; Komatsu, H.; Nakada, T.; Miyashita, S.; Watanabe, K. *J. Cryst. Growth* 1997, 173, 231–234.
- (5) Asaka, M.; Kashi, E.; Wakayama, N. I. *J. Cryst. Growth* 1997, 173, 502–506.
- (6) Nasev, C. N.; Perlova, A. *J. Cryst. Growth* 2001, 232, 285–293.
- (7) Taleh, M.; Didierjean, V.; Alsch, C.; Mangest, J. P.; Aubry, A. *J. Cryst. Growth* 2001, 232, 250–255.
- (8) Al-Haq, M. I.; Lebmasser, E.; Choi, W. K.; Tsuchiya, H.; Torii, T.; Yamazaki, H.; Shinohara, E. *J. Appl. Crystallogr.* 2007, 40, 199–201.
- (9) Hai, R.; Edwards, A. *J. Struct. Biol.* 2003, 142, 154–161.
- (10) Juárez-Martínez, G.; Seitzman, P.; Roszak, A. W.; Isaacs, N. W.; Cooper, J. M. *Anal. Chem.* 2002, 74, 3505–3510.
- (11) Kadri, A.; Lorber, B.; Charon, C.; Roben, M.-C.; Capelle, B.; Durrak, M.; Jenner, G.; Giegé, R. *Acta Crystallogr., Sect. D* 2005, 61, 784–788.
- (12) Mirkia, N.; Frutos-Urbe, B. A.; Rodríguez-Romero, A.; Hernández-Santoyo, A.; Moreno, A. *Acta Crystallogr., D* 2003, 9, 1533–1538.
- (13) Moreno, A.; Sasaki, G. *J. Cryst. Growth* 2004, 264, 438–444.
- (14) Nieto-Mendoza, E.; Frutos-Urbe, B. A.; Sasaki, G.; Moreno, A. *J. Cryst. Growth* 2005, 275, 1437–1446.
- (15) Hamzadi, Z.; Antier, J.-P.; Maria, R.; Voeller, S. *Cryst. Growth Des.* 2007, 7, 1472–1475.
- (16) Janson, J. C.; Rydén, L. *Protein Purification*, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 1998.
- (17) Scott, R.; Mauk, G. *Cytochrome c: A multidisciplinary Approach*; University Sciences books: Sausalito, CA, 1996.
- (18) Fluzmark, T. *Nature* 1963, 200, 1112–1113.
- (19) Fluzmark, T. *Acta Chem. Scand.* 1966, 20, 1487–1496.
- (20) Braunig, D. L.; Ferguson-Miller, S.; Margoliash, E. *Methods Enzymol.* 1978, 53, 128–164.
- (21) Szeisler, R. G.; Margoliash, E.; Westbrook, M. L.; Westbrook, E. M.; Voltz, K. W. *Acta Crystallogr., D* 1994, 50, 687–694.
- (22) Mirkia, N.; Jaczovic, J.; Seitzman, V.; Moreno, A. *Protein Struct. Funct. Bioinf.* 2008, 70, 83–92.
- (23) Moore, G. R.; Denigrew, G. W. *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*; Springer-Verlag: Berlin, 1991.
- (24) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1977, 771–772.
- (25) Bazianzi, G.; Borzari, M.; Sola, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2001, 2889–2904.
- (26) (a) Murphy, L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006, 10, 177–184. (b) Wang, J. *Anal. Chem. Acta* 1999, 399, 21–27.
- (27) Acosta, F.; Eid, D.; Martín-García, L.; Frutos-Urbe, B. A.; Moreno, A. *Cryst. Growth Des.* 2007, 7, 2187–2191.
- (28) Fluzmark, T. *Acta Chem. Scand.* 1966, 20, 1476–1486.
- (29) Riés-Kautz, M.; Drenth, A. In *Crystallization of nucleic acids and proteins*, 2nd ed.; Drenth, A., Giegé, R., Eds.; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1999; p 302.

REFERENCIAS

10. REFERENCIAS

1. * Giegé, R, Lorber, B and Dietrich, A. Crystallogenesis of Biological Macromolecules: Facts and Perspectives. *Acta Cryst.* (1994). D50, 339-350.
2. * Al-haq, Muhammad Imran; Lebrasseur, Eric; Tsuchiya, Hidenori¹; Torii, Toru. Protein crystallization under an electric field. [Crystallography Reviews](#), Volume 13, Number 1, January (2007). pp. 29-64 (36).
3. * Roses, D. Genome-based Pharmacogenetics and the Pharmaceutical Industry, *Nat. Rev. Drug Discovery.* (2002). 1, 541-549.
4. * Kuhn, P.; Wilson, K.; Patch, M. G.; Stevens, R. C. The genesis of high-throughput structure-based drug discovery using protein crystallography, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2002) 6, 704-710.
5. * McPherson, A. Macromolecular crystallization in the structural genomics era, *J. Struct. Biol.* (2003).142, 1-2.
6. * Protein crystallization under an electric field. Muhammad Imran Al-haq ^a; Eric Lebrasseur ^b; Hidenori Tsuchiya ^a; Toru Torii ^{aba} Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa city, Chiba Prefecture, Japan. Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Tokyo, Japan. (2007). vol.13, No. 1, 29-64.
7. * Loustyuk, P.G. Grozdinsky, D.M., Zima, V.P, Magura, E.P, Shuba, M.F, Biophysics, Visha-Shkola, Kiev, (1988).
8. * Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Capelle, B.; Aubry, A. Crystallization of proteins under an external electric field, *J. Cryst. Growth.* (1999). 200, 575-582.

-
9. * Scott, R.; Mauk, G. Cytochrome c: A multidisciplinary Approach; University Sciences books: Sausalito, CA, (1996).
 10. * McPherson, A. Jr & Rich, A. Arch. Biochem. Biophys. 157. (1973). 23-27.
 11. * Pasteur, L. Recherches sur la Dissymétrie Moléculaire. (1860-1883). edited by C. BOURGEOIS. Paris, France. (1986).
 12. * McPherson, A. J. Cryst. Growth. (1991). 110, 1-10.
 13. * Reichert, E. T & Brown, A.P. (1909). The Differentiation and specificity of Corresponding Proteins and Other Viral Substances in Relation to Biological Classification and Evolution: the crystallization of Hemoglobins. Washington, DC: Carnegie Institution.
 14. * Bernal, J. D. & Crowfoot, D. Nature (London), (1934). 133, 794-795.
 15. * Protein Data Bank, <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/>
 16. * A. Moreno, V. Bolaños, J. Mas, De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas, Edit. JGH Editores, S. A. de C.V., México D.F., (2000). Pág. 1-39.
 17. * Zeppezauer, M. Eklund, H. & Zeppezauer E. S., Arch. Biochem. Biophys. 126. (1968) 564.
 18. * Garcia-Ruiz, J.M. Key Engineering Materials. 58. (1991).87-196.
 19. * Nanev C. N., Penkova A., "Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields". J. Cryst. Growth. (2001). 232, 285 – 293.

-
20. * Sazaki G., Moreno A., Nakajima K., "Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on protein crystallization", *J. Cryst. Growth.* (2004). 262, 499 – 502.
 21. * Taleb M., Didierjean D., Jelsch C., Mangeot J.P., Aubry A., "Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field", *J. Cryst. Growth.* (2004). 232, 250 – 255.
 22. * Penkova A., Pan W., Hodjaoglu F., Vekilov P., "Nucleation of protein crystals under the influence of solution shear flow", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (2006). 1077, 214 – 231.
 23. * Al-Haq M.I., Lebrasseur E., Choi W.K., Tsuchiya H., Torii T., Yamazaki H. y Shinohara E., "An apparatus for electric – field – induced protein crystallization", *Applied Crystallography*, (2007). 40, 199 – 201.
 24. * Suzuki Y., Miyashita S., Sazaki G., Nakada T., Sawada T., Komatsu H., "Effects of pressure on growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals", *J. Cryst. Growth.* (2000). 208, 638 – 644.
 25. * Bancel P., Cajipe V., Rodier F., "Manipulating crystals with light", *J. Cryst. Growth.* (1999). 196, 685 – 690.
 26. * Mori Y., Takano K., Adachi H, Inoue S, Murakami H, Matsumura H., Sazaki T., "Protein crystallization using femto-second laser radiation and solution-stirring", Presentado en 11th edición del ICCBM, Quebec, Canadá. (2006).
 27. * De Lucas L.J., Bugg C.E., "New directions in protein crystal growth", *Trends Biotechnol.* (1987). 5, 188 – 193
 28. * Bugg C. E., "The future of crystal growth" *J. Cryst. Growth.* (1986). 76, 535 – 544.

-
29. * Wilson, W. Monitoring crystallization experiments using dynamic light scattering: assaying and monitoring protein crystallization in solution. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. (1990). 1, 110-117.
 30. * Wilson, W. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth: A practical approach. *J. Struct. Biol.* (2003). 142, 56- 65.
 31. * Chayen, N.; Dieckmann, M.; Dierks, K; Fromme, P. Size and shape determination of proteins in solution by a noninvasive depolarized dynamic light scattering instrument. *Ann. N.Y. acad. Sci.* (2004). 1027, 20-27.
 32. * Yau, S.T; Vekilov, P. Quasiplanar nucleus structure in apoferritin crystallization. (2000). *Nature*, 494-497.
 33. * Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Capelle, B.;Aubry, A. Crystallization of proteins under an external electric field. *J. Cryst. Growth*. (1999). 200, 575–582.
 34. * Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Aubry, A. Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field. *J. Cryst. Growth*. (2001). 232, 250–255.
 35. * Nanev, C.; Penkova, A. Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields. *J. Cryst. Growth*. (2001). 232, 285–293.
 36. * Mirkin, N.; Frontana-Uribe, B. A.; Rodriguez-Romero, A.; Hernandez-Santoyo, A.; Moreno, A. The influence of an internal electric field upon protein crystallization using the gel-acupuncture method *Acta Crystallogr D*. (2003). D59, 1533-1538.

-
37. * Nieto-Mendoza, E.; Frontana-Uribe, B. A.; Sasaki, G.; Moreno, A. Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes, effect of the potential control, *J. Cryst. Growth.* (2005). 275 1443-1452.
 38. * Moreno, A.; Sasaki, G. The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme. *J. Cryst. Growth.* (2004). 264, 438–444.
 39. * Hammadi, Z.; Astier, J.-P.; Morin, R.; Veessler, S. Protein Crystallization Induced by a Localized Voltage, *Cryst. Growth & Design.* (2007). 7, 1472-1475.
 40. * Bockris, John O'M., Reddy, Amulya K.N., Gamboa-Aldeco, Maria E. *Modern Electrochemistry 2A*; Plenum Press: New York, (1998); Vol. 1, pp 421 – 476.
 41. * Bockris, J. O'M.; Reedy, A. K. N. *Modern Electrochemistry*, 2nd ed.; Plenum Press: New York, (1998). Vol. 1, pp 421-476.
 42. * Skoog, D., West, D., Holler, J., Crouch, S. *Fundamentos de Química Analítica*. Edición octava. Thomson. (2005).
 43. * Borgstahl, G. How to use Dynamic Light Scattering to improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals: *Methods in Molecular Biology*, vol. 363.
 44. * Abragan, A; Bleaney, B; *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. Oxford University Press. (1970). Oxford.
 45. * M. Ubbink, J. A. R.Worrall, G.W. Canters,E. J. J. Groenen, and M. Huber, *Paramagnetic Resonance of Biological Metal Centers*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2002). 31:393–422.

-
46. * <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=4BLC>
47. * Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes P. A.; Rodwell, V. W.; Bioquímica de Harper. Edit. El Moderno S. A. de C.V., XIII edición, México D.F., (1994). Pág. 90.
48. * Flatmark, T. Acta Chem. Scand. 18. (1964). 1656-1666.
49. * Brautigan, D. L., Ferguson-Miller, S and Margoliash, E. Methods in Enzymology. 53. (1978). 128.
50. * Flatmark, T. Acta Chem Scand. (1966). 20, 1476-1503).
51. * Brato, A.; Abramova, N.; Ramón-Azcón, J.; Merlos, A.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M.; Domínguez, C.; Characterization of the interdigitated electrode array with tantalum silicide electrodes separated by insulating barriers. Electrochemistry Communications, Volume 10, Issue 10, October (2008). Pages 1621-1624.
52. * Nieto-Mendoza, E.; Frontana-Uribe, B. A.; Sazaki, G.; Moreno, A. J. Cryst. Growth (2005). 275, 1437–1446.
53. * Acosta, F. Informe de Investigación para obtener el título de Ingeniero Químico: De los Cristales de Citocromo c a un Dispositivo Transferente de Electrones en Estado Sólido. (2008). Facultad de Química-UNAM.
54. * Veessler, S.; Marcq, S.; Lafont, S.; Astier, J.; Boistelle, R. Acta Crystallogra. 1994, D50, 356-360.

-
55. * Dierks, K.; Meyer A.; Einspahr H.; Betzel, C.; Dynamic Light Scattering in Protein Crystallization Droplets: Adaptations for Analysis and Optimization of Crystallization Processes. *Cryst. Growth Des.* (2008). 8 (5), pp 1628–1634.
56. * Chunhai, F.; Xiaofang, H.; Genxi, L.; Jianqin, Z.; Dexu, Z.; Adsorptive Behavior of Hemoglobin at a Platinum Electrode and Its Application to the Determination of Proteins. *Analytical Sciences.* (2000). Vol 16, 463 – 465.
57. * Taleb, M, Didierjean, C.; Jelsch, C. Mangeot, JP. *J. Cryst. Growth.* (2001) 232, 250.
58. * Hou, D.; Chang, H.C.; ac field enhanced protein crystallization. *Applied Physics Letters* 92, 223902. (2008).
59. * Dixit, N. M.; Zukoski, C.F.; *Phy. Rev. E*, 67, 061501 (2003).
60. * Fita, I.; Silva, A.M; Murthy, M.R.N; Rossman, M.G. *Acta Crystallogra. Sect, B: Struct. Sci.* (1986). 42, 497-515.
61. * <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/CATALASE.html>
62. * Ivancich, A.; Jouve, H.; Gaillard, J.; RPE Evidence for a Tyrosyl Radical Intermediate in Bovine Liver Catalase. *J. Am. Chem. Soc.* (1996). 118, 12852-12853.
63. * R. G. Sanishvili, E. Margoliash, M. L. Westbrook, E. M. Westbrook and K. W. Volz. Crystallization of wild-type and mutant ferricytochromes c at low ionic strength: seeding technique and X-ray diffraction analysis. *Acta Cryst.* (1994). D50, 687-694.
64. * Acosta, F.; Eid, D.; Marín-García, L.; Frontana-Uribe, B.; Moreno, A.; “From Cytochrome C Crystals to a Solid-State Electron-Transfer Device”. *Crystal Growth and Design* 7. (2007). 7. 2187-2191.

-
65. * Pérez, Y.; Eid, D.; Acosta, F.; Marín-García, L.; Jakoncic, J.; Stojanoff, V.; Frontana-Uribe, B. A.; Moreno A. Electrochemically Assisted Protein Crystallization of Commercial Cytochrome c without Previous Purification *Cryst. Growth & Design*. (2008). 8, 2493-2496.
66. * Zoubida Hammadi, Jean-Pierre Astier, Roger Morin, and Stéphane Veessler. Protein Crystallization Induced by a Localized Voltage. *Crystal Growth & Design*. (2007). 7 (8). 1472 - 1475.
67. * Frontana-Uribe, B.; Moreno, A.. On Electrochemically Assisted Protein Crystallization and Related Methods. *Cryst. Growth & Design*. (2008). 8. 12, 4194–4199.
68. * Mirkin, N.; Jaconcik, J.; Stojanoff, V.; Moreno, A. "High resolution X-ray crystallographic structure of cytochrome c from bovine heart and its application to the design of an electron transfer biosensor". *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 70, (2008). 83-92.
69. * Bockris, J. .O. Reedy, A. K. N. *Modern Electrochemistry*, 2nd. Plenum Press: New York. (1998); pp 386 -405; Vol 1.
70. * Vekilov, P.G., Alexander J.J.D. Rosenberger, F. (1996) *Phys. Rev. E* 54, 6650.
71. * Allégre C.J., Provost, A., Jaupart C. (1981) *Nature* 294, 223.
72. * Wollenberger, U; Spricigo, R; Leimkühler, S; Schroder, k. Protein electrodes with Direct Electrochemical Communication. *Adv Biochem engine/Biotechnol* (2008). 109:19-64.
73. * Losada, Losada, M; Vargas, MA; de la Rosa, MA; Florencio, FJ. "Los Elementos y Moléculas de la Vida. Introducción a la Química Biológica y Biología Molecular". Editorial Rueda, S.L. Madrid.(1998).

-
74. * Moore, 1990. Moore, GR; Pettigrew GW "Cytochromes c: Evolutionary, Structural and physicochemical Aspects", Springer-Verlag, Heidelberg. (1990).
75. * Brautigan, D; Feinberg, B; Hoffman, B; Margoliash, E. Multiple Low Spin Forms of the Cytochrome c Ferrihemochrome. The Journal of Biological Chemistry. (1977). Vol. 252, No. 2. Pp 574-582.
76. * Feher G, Kam Z. Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays. Methods Enzymol. 1985; 114:77-112.