

Cristalización de macromoléculas biológicas en condiciones terrestres y de microgravedad: La técnica de contradifusión.

Luis Antonio González Ramírez

TESIS DOCTORAL
Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Luis Antonio González Ramírez
D.L.: GR 3149-2011
ISBN: 978-84-694-4438-2

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Tomás de Haro Muñoz
D.L.: En trámite
ISBN: En trámite

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Tomás de Haro Muñoz
D.L.: En trámite
ISBN: En trámite

Luis Antonio González Ramírez

lagonzal@ugr.es

LEC-IACT-CSIC-UGR

Edificio P. B. López-Neyra. P.T. Ciencias de la Salud.
18100 Armilla (Granada-España).



UGR | Universidad
de Granada



Laboratorio de Estudios Cristalográficos
Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra
C.S.I.C.-Universidad de Granada

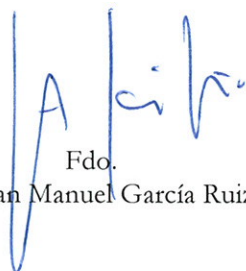
Cristalización de macromoléculas biológicas en condiciones terrestres y de microgravedad: La técnica de contradifusión.

Memoria presentada por el Licenciado en Farmacia D. Luis Antonio González Ramírez para optar al título de Doctor en el programa de Biotecnología, realizada en el Laboratorio de Estudios Cristalográficos. Director Dr. Juan Manuel García Ruiz, Director del Laboratorio de Estudios Cristalográficos y Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Granada, 2011

Director

Doctorando



Fdo.
Juan Manuel García Ruiz

Fdo.
Luis Antonio González Ramírez

A mis padres

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer al profesor Juan Manuel García Ruiz, quién me dio la oportunidad de poder hacer investigación científica. De igual forma, por proveerme del ambiente de laboratorio donde pude realizar la parte experimental del doctorado de una forma excepcional (Laboratorio de Estudios Cristalográficos). Y también, quizás más importante, por contagiarme y aprender de su inagotable entusiasmo y creatividad haciendo ciencia, lo que ha significado para mí la principal fuerza impulsora en el desarrollo de esta tesis.

Durante el desarrollo de la tesis, se tuvo oportunidad de participar en proyectos de extensión internacional como lo fueron las misiones espaciales que se describen en esta tesis, a saber, la misión Andrómeda, la misión Odissea y la misión Foton M-3. La realización de los experimentos no hubiera podido llevarse a cabo sin la ayuda de un gran número de personas involucradas; tanto científicos colaboradores como personas de apoyo encargadas de la logística de estas misiones. En primer lugar agradecer a las personas de la Agencia Europea del Espacio (ESA), Olivier Minster, Philippe DeGieter, Antonio Verga, entre otros que por espacio no es posible mencionar pero que de igual forma su participación fue imprescindible para el éxito de estos proyectos. Todas ellas encargadas de la logística y organización de las misiones desde la sede central de la ESA en ESTEC, Holanda. También un reconocimiento a las personas a cargo de la coordinación de las misiones en los países correspondientes; a Lionel Suchet del Centro Nacional de Estudios Espaciales (CNES) en Francia durante la misión Andrómeda; a Ingrid Zegers de la Vrije Universiteit Brussel (VUB-ULTR) en Bélgica durante la misión Odissea, a Dominique Maes, Klaas Decanniere también de la VUB-ULTR por su participación y soporte durante la misión Foton M-3. También a las personas involucradas por parte de la Agencia Rusa del Espacio por su ayuda y coordinación en estas misiones, sobre todo en lo que respecta a la preparación de los experimentos en Baikonur (Kazajstán), el sitio de lanzamiento de los vehículos espaciales rusos; la integración de los experimentos en las naves espaciales así como también en la recuperación de los mismos una vez terminada la misión. En el marco de estos proyectos también fueron partícipes diferentes empresas cuyo trabajo ha sido de especial importancia para el desarrollo de estas misiones, mencionar a Miquel Pastor, Joan Rosaura, Joan Manel Casalta y Jordi Carrera de NTE en Barcelona por la fabricación y cualificación de los dispositivos desarrollados para cada una de las misiones. A Martha

Santana, directora de Triana Science and Technology, y a personal de la misma empresa, por la coordinación y logística de estas misiones.

Agradecer igualmente a todos los científicos pertenecientes a diferentes laboratorios de investigación en Europa, Rusia y Japón por su participación en estos proyectos aportando macromoléculas biológicas de gran interés científico. Especialmente a Prof. William Melik-Adamyan y Dr. Albina Grebenko del Instituto of Cristalografía RAS en Moscú, Rusia; Dr. B. Yu de Tibotec-Virco en Mechelen, Bélgica; Hiroaki Tanaka de la Agencia Japonesa de Exploración Aeroespacial (JAXA); Koji Inaka de Maruwa Food Industry CO., los investigadores del Laboratorio de Estructura Molecular de la VUB-ULTR en Bélgica.

Del LEC, agradecer a Fermín Otálora por sus invaluable consejos, revisiones y sugerencias para el mejoramiento de esta tesis; así como por su tiempo y comentarios tan interesantes en esos momentos de las pausas para el café. De ese enfoque de plantear los problemas y las soluciones en el trabajo científico y en la vida personal. También quiero hacer mención de un especial agradecimiento a Alejandro Rodríguez por su valiosa ayuda en la revisión de esta tesis y por sus palabras de ánimo en todo momento.

A todos los compañeros del laboratorio, por su amistad y de alguno de ellos por su valiosa ayuda durante la misión Foton M-3.

ABSTRACT

Proteins are biological macromolecules which carry out a broad variety of key functions in living organisms. Practically every cellular activity depends on the actions of these molecules. The function that these biomacromolecules perform is intimately related to their tridimensional atomic structures. By determining this atomic structure it is possible to understand the mechanism of these functions. Up to now the most effective technique to determine a tridimensional structure of biological macromolecules is X-ray diffraction. However, the essential requirement to apply this technique is the availability of high quality single crystals from these macromolecules. The counterdiffusion technique is a crystallization technique that in comparison to the classic techniques has been shown to produce quality crystals for X-ray studies. This thesis focused mainly on the features (or characteristics) of this technique and the development of practical devices for its implementation in research laboratories.

The Granada Crystallization Box (GCB) is a new crystallization device designed to perform counter-diffusion experiments. In chapter two the device and its use for protein crystallization purposes is described. GCB allows one to explore and exploit the coupling between crystallization and diffusion. The role of viscous fluids, gels and/or microgravity can be enhanced by using capillary volumes, creating a perfect diffusive mass transport scenario, which is known to produce better ordered crystal lattices, provided the growth proceeds in the diffusion-controlled or mixed regime. The use of capillaries also reduces the consumption of macromolecules and avoids the handling of crystals for X-ray diffraction data collection.

The use of crystallization methods in which the mass transport is controlled by diffusion is one of the ways to improve the quality of crystals of biological macromolecules for structural studies. Moreover, a fluid dynamics governed by diffusion is mandatory for some crystallization techniques as well as for the counterdiffusion technique. The use of gels is extremely effective in the elimination of convection

generated by thermal and density fluctuations, in this way allowing diffusion to govern the mass and heat transport in crystallization reactors. The main drawback in the utilization of these gels is that they are chemical compounds that could interact with the biological macromolecules and with the different chemical reagents used to crystallize them. In chapter three, a study of compatibility between different types of gels (thermal and physical gels) and precipitating agents, additives and detergents commonly used for protein crystallization experiments is described. The physical and chemical stability as a function of the pH value of the different buffers used in the experiments was also investigated. Different types of gels were analyzed, namely, silica gels, agarose gels, and polyacrylamide gels. The compatibility of these compounds was studied in the presence of the components of the Crystal Screen I kit from Hampton Research under typical conditions used in crystallization experiments. For this kind of study the Detergent Screen I from the same company, which is commonly used for crystallization of membrane proteins, was also included. The results showed that all the detergents commonly used in the crystallization of membrane proteins were compatible with all the types of gels analyzed. Regarding the precipitating agents, it was observed that some of them, such as ammonium sulfate and high molecular weight polyethyleneglycoles, inhibited the formation of agarose gels. However, agarose gels were able to form in all the pH values analyzed, this not being the case for silica gels which were more sensitive to this parameter. It is showed that, in view of the obtained results, it is possible to carry out experiments of crystallization of biological macromolecules under mass transport environment controlled by diffusion through the use of gels as crystal growth media. Although some chemical reagents inhibited the formation of gels, there are still alternative combinations with other gels that did not show incompatibility.

Chapter Four details two interlinked investigations: firstly, examining the viability of carrying out experiments of crystallization of biological macromolecules in microgravity conditions; and, secondly, it was proposed to make a comparison between the quality of crystals obtained in two different diffusive environments: one in which the crystals grew on earth with gels as crystallization media and the other in outer space with a reduced gravity force environment. The results from three different space missions supported by the European Space Agency (ESA) are described, two carried out inside the International Space Station (Andromede and Odissea Missions) and one inside a Russian

space capsule (Foton M-3 Mission). For the three missions it was necessary to design and fabricate special facilities to contain the crystallization experiments during the missions — namely, the Granada Crystallization Facility (GCF) and its improved version, the GCF-2, for the Foton M-3 Mission. GCF-2 is an inexpensive and compact modular platform featuring a high experiment density (number of experiments per litre of useful volume), a temperature control system, and a complete independence from human intervention after integration, which makes GCF-2 equally suited for manned and unmanned flights. The facility can be used for commercial quality crystal production and for fundamental crystal growth studies using *ex-situ* diagnostics. The changes made to the previous version and the complementary hardware (electronics and reactors) used are described. Also included is information on the performance of the facility during the Foton-M3 mission on board the Russian unmanned Foton capsule. In all the missions described in this chapter, different proteins provided by different European laboratories and by our own laboratory were tested. The quality of the crystals was analysed through X-ray diffraction in Synchrotron facilities. The results showed that all the devices designed and fabricated ad hoc for the different missions worked in a satisfactory way. The results obtained of crystal quality did not show significant differences between the crystals grown in space and the crystals grown in gellified solutions on earth.

AGRADECIMIENTOS**ÍNDICE****CAPÍTULO 1***INTRODUCCIÓN GENERAL*

1.1. Proteínas	3
1.1.1. Descripción.	3
1.1.2. Composición	4
1.1.3. Estructura	6
1.1.3.1. <i>Enlace peptídico.</i>	6
1.1.3.2. <i>Estructura primaria.</i>	7
1.1.3.3. <i>Estructura secundaria</i>	7
1.1.3.4. <i>Estructura terciaria y cuaternaria.</i>	8
1.2. Relación estructura-función	10
1.3. Resolución estructural de macromoléculas biológicas	10
1.4. Cristalización	13
1.5. La técnica de contradifusión	16
BIBLIOGRAFÍA	19

CAPÍTULO 2

*DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO DE CRISTALIZACIÓN DE
MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE
CONTRADIFUSIÓN*

2.1. Introducción	25
2.2. Diseño y descripción	28
2.3. Implementación de la técnica de contradifusión en la GCB	29
2.3.1. Métodos adicionales	32
2.3.2. Experiencias previas	34
2.4. Difracción de Rayos-X de cristales crecidos en la GCB	36
2.5. Capacidades de la GCB para su observación, transporte y uso en microgravedad	37
Bibliografía	39

CAPÍTULO 3*INVESTIGACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD DE GELES CON AGENTES PRECIPITANTES Y DETERGENTES EN EXPERIMENTOS DE CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS*

3.1. Introducción	43
3.1.1. Agarosa	45
3.1.2. Geles de sílice	46
3.1.3. Geles de poliacrilamida	47
3.1.4. Proteínas de membrana	47
3.2. Objetivos	48
3.3. Resultados y discusión	48
3.3.1. Formación de geles a diferentes valores de pH.	48
3.3.2. Formación de geles en presencia de agentes precipitantes	52
3.3.3. Formación de geles en presencia de detergentes	58
3.4. Conclusiones	61
Bibliografía	62

CAPÍTULO 4*CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS USANDO LA GCB EN CONDICIONES DE MICROGRAVEDAD.*

4.1. Introducción	69
4.1.1. Cristalización y microgravedad	69
4.1.2. Experimentos de contradifusión en microgravedad	73
4.2. Las misiones Andrómeda y Odissea	75
4.2.1. Objetivos	75
4.2.2. El dispositivo de vuelo "Granada Crystallization Facility"	75
4.2.3. Selección de proteínas	77
4.2.4. Diseño experimental	79
4.2.5. Logística general de las misiones	80
4.2.6. Resultados	83
4.2.6.1. Misión Andrómeda	83

4.2.6.2. Misión Odissea	90
4.3. La misión Foton M-3	95
4.3.1. El dispositivo de vuelo "Granada Crystallization Facility 2"	97
4.3.2. Los nuevos reactores: GCB-domino y capilares de 3 capas.	99
4.3.3. La nave Foton	100
4.3.4. Selección de proteínas	101
4.3.5. Diseño experimental	103
4.3.6. Logística general	103
4.3.7. Resultados	105
4.3.7.1. Funcionamiento de los dispositivos de vuelo y soporte en tierra	105
4.3.7.2. Cristalización de proteínas	106
4.3.7.3. Fotosistema II de <i>Synechococcus elongatus</i> .	107
4.3.7.4. Glucosa isomerasa	107
4.3.7.5. Alfa-quimotripsinógeno A	108
4.3.7.6. Mutante C45S de peroxiredoxin 6 de <i>Arenicola Marina</i>	108
4.3.7.7. <i>Proteínas del Laboratorio de Estudios Cristalográficos</i>	109
Hemoglobinas de <i>Lucina pectinata</i>	109
Insulina	113
4.4. Conclusiones	116
Bibliografía	118

CAPÍTULO 5

ARTICULOS Y PATENTES

<i>Artículos publicados que forman parte de esta tesis</i>	125
--	-----

ARTICULO 1.

Título: Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques.

Resumen.	127
----------	-----

MANUSCRITO 2.

Título: Granada Crystallization Facility-2: A Versatile Platform for Crystallization in Space.

Resumen.	135
----------	-----

MANUSCRITO 3.

Título: Investigation of the compatibility of gels with precipitating agents and detergents in protein crystallization experiments.

Resumen. 143

MANUSCRITO 4.

Título: Structural study of the type II 3-dehydroquinase dehydratase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Resumen. 151

Lista de artículos publicados a partir de esta tesis que no se incluyen en el manuscrito. 163

Patentes. 167

CAPÍTULO 6**6.1 CONCLUSIONES**

6.1.1. Conclusiones parciales 195

6.1.2. Conclusiones generales 197

6.2. PERSPECTIVAS 199

Capítulo 1

Introducción

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 PROTEÍNAS

1.1.1 Descripción.

Las proteínas son macromoléculas biológicas que desempeñan una amplia variedad de funciones en los organismos vivos. Prácticamente cualquier actividad celular depende de una o más proteínas. La tabla 1 muestra la clasificación de proteínas en base a su función y se exponen algunos ejemplos.

Tabla 1.1 Algunas de las funciones biológicas de las proteínas y algunos ejemplos más representativos.

Clase funcional	Ejemplos
Enzimas	Ribonucleasa, tripsina, catalasa
Proteínas de regulación	Insulina, somatotropina
Proteínas de transporte	Hemoglobina, albúmina
Proteínas de almacenamiento	Ovoalbúmina, caseína, ferritina
Proteínas de contracción y movimiento	Actina, miosina, tubulina
Proteínas estructurales	α -queratina, colágeno, elastina,
Proteínas de protección	Inmunoglobulinas, trombina, fibrinógeno

1.1.2 Composición

Las proteínas son moléculas bastante complejas en cuanto a su composición y estructura para realizar sus múltiples funciones. Las proteínas son polímeros compuestos por unidades de aminoácidos. Un aminoácido es una molécula orgánica que contiene un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) unido a un mismo átomo de carbono que se denomina carbono α . A este carbono α también están unidos un átomo de hidrógeno y una cadena lateral que comúnmente se representa con la letra R. Los distintos α -aminoácidos se diferencian en sus cadenas laterales. Los genes de los organismos codifican solamente 20 aminoácidos esenciales que se incorporan a las proteínas aunque éstos no son los únicos que se encuentran en los organismos vivos, ya que muchos otros llevan a cabo otras funciones importantes en el metabolismo. Un ejemplo de estos aminoácidos sería la L-tirosina que es la hormona tiroidea. Dependiendo de los grupos químicos de las cadenas laterales de los aminoácidos y de sus propiedades fisicoquímicas, éstos se pueden agrupar en aminoácidos no polares (hidrofóbicos) que incluyen a aquellos con grupos R aromáticos y aminoácidos polares que incluyen a aquellos con grupos R que no tienen carga o que tienen carga positiva o negativa. En la figura 1.1 se muestran los 20 aminoácidos que conforman las proteínas en los organismos vivos.

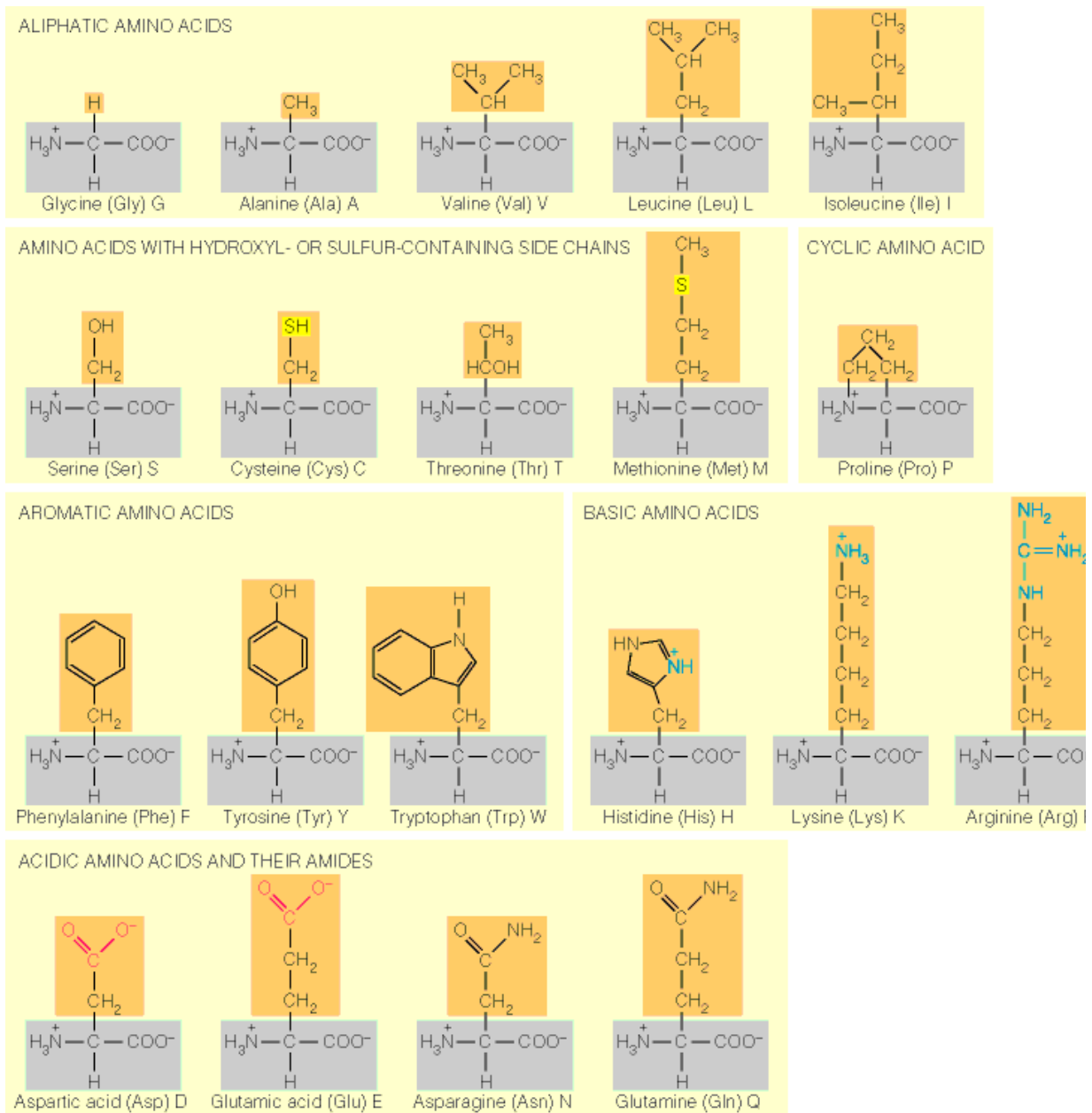


Figura 1.1 Representación de los 20 aminoácidos esenciales clasificados según las propiedades de sus cadenas laterales. Debajo de cada uno de ellos está su nombre, su abreviatura de tres letras y su abreviatura de una letra (Mathews et al. 2002).

1.1.3 Estructura

Enlace peptídico.

Los aminoácidos se pueden unir entre sí mediante la formación de un enlace amida formado por condensación, con liberación de una molécula de agua, entre el grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino de otro (Gómez-Moreno Calera y Sancho Sanz 2003). Este tipo de enlace se denomina enlace peptídico. Dos aminoácidos unidos a través de este enlace conforman un dipéptido. Las cadenas que tienen unos pocos aminoácidos se llaman oligopéptidos y las cadenas mucho más largas se denominan polipéptidos. La mayoría de los oligopéptidos y los polipéptidos conservan un grupo amino en un extremo sin reaccionar que se denomina amino terminal o N-terminal y un grupo carboxilo sin reaccionar en el otro extremo que es el carboxilo terminal o C-terminal. Todas las proteínas son polipéptidos. La figura 1.2 representa, a manera de ejemplo, la formación de un enlace peptídico entre un aminoácido de glicina y uno de alanina.

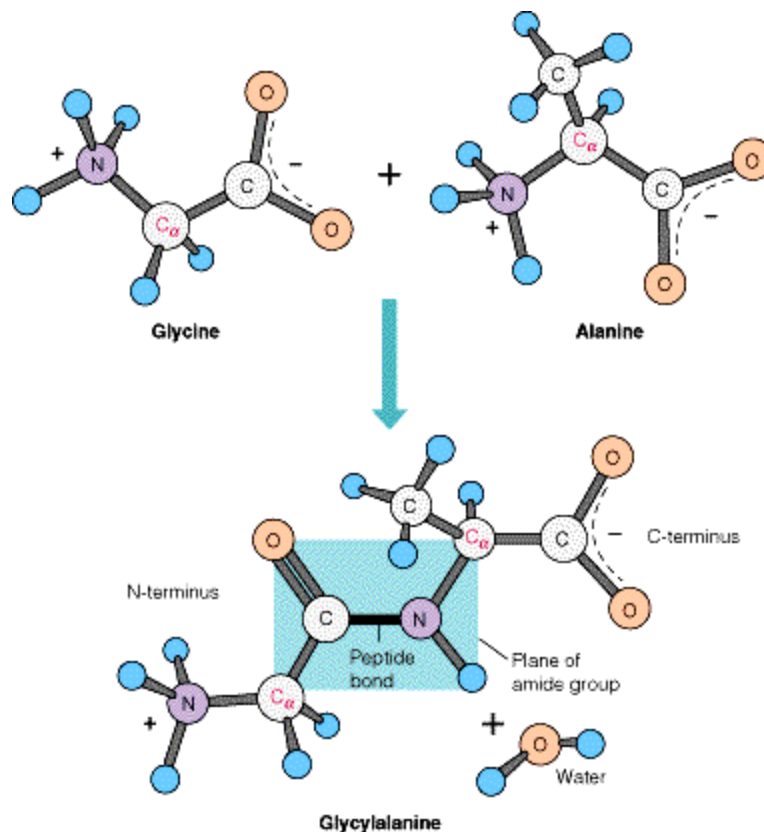


Figura 1.2 Formación de un dipéptido de glicina y alanina a través de un enlace peptídico (Mathews et al. 2002).

Estructura primaria.

Las proteínas son cadenas de polipéptidos con una secuencia definida. Esta secuencia se denomina estructura primaria de la proteína y representa el nivel fundamental de estructura. La estructura primaria de cada proteína está determinada por un gen concreto y la relación entre la secuencia de un gen de DNA con la secuencia de la proteína que expresa se denomina “código genético”. Las secuencias de DNA de los genes se transcriben a moléculas y RNA mensajero, que a su vez se traducen en proteínas. En este proceso se utilizan tripletes de nucleótidos (codones) para codificar cada aminoácido y la mayoría de los aminoácidos tienen múltiples codones para ser expresados. El código genético es casi universal, esto es, prácticamente todos los organismos utilizan los mismos codones para traducir sus genomas a proteínas. Además de la estructura primaria, las proteínas poseen tres niveles más de organización estructural: secundaria (plegado local), terciaria (plegado global) y cuaternaria (asociación de varias cadenas entre sí) que le confieren su funcionalidad final, como veremos posteriormente.

Estructura secundaria

El término de estructura secundaria se refiere a la conformación local de algún conjunto de residuos de un polipéptido, es decir, es el arreglo espacial de residuos de aminoácidos en un segmento dado de una cadena polipeptídica generando patrones estructurales recurrentes. Solamente algunos tipos de estructura secundaria son particularmente estables y aparecen ampliamente en proteínas. Las más predominantes son las conformaciones de hélice alfa y de lámina beta. La figura 1.3 muestra estas dos conformaciones cuya existencia fue predicha por Linus Pauling y colaboradores (Pauling et al. 1951), quienes a principios de los años 1950 hicieron un análisis sistemático de las posibles conformaciones regulares de la cadena polipeptídica. Algunas de ellas eran estructuras helicoidales formadas por una sola cadena y otras eran estructuras en forma de lámina formadas por cadenas adyacentes (Mathews et al. 2002; Gómez-Moreno Calera y Sancho Sanz 2003).

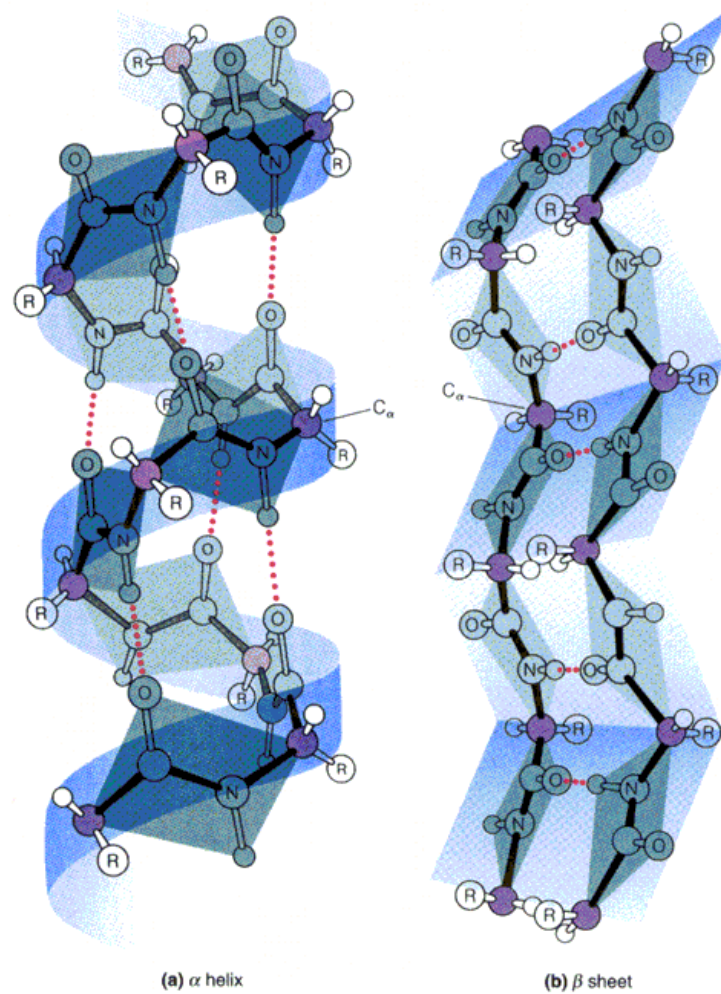


Figura 1.3. Hélice α y lámina β , las dos estructuras secundarias más importantes de los polipéptidos. (a) En la hélice los enlaces de hidrógeno se forman dentro de una única cadena polipeptídica y son casi paralelos al eje de la hélice. (b) En la lámina β los enlaces de hidrógeno se forman entre cadenas adyacentes, de las cuales en la imagen solo aparecen dos. En esta estructura los enlaces de hidrógeno son casi perpendiculares a la cadena (Mathews et al. 2002)

Estructura terciaria y cuaternaria.

Si en el apartado anterior nos referimos a la estructura secundaria como el plegamiento local de regiones específicas de la cadena polipeptídica; el arreglo tridimensional global de la proteína se denomina estructura terciaria. En esta estructura cada átomo de la proteína ocupa una situación espacial concreta y bien definida dentro de la molécula. Algunas proteínas están formadas por dos o más cadenas polipeptídicas separadas, o subunidades, que pueden ser idénticas o diferentes. El arreglo de estas subunidades de

proteínas en complejos tridimensionales es lo que constituye la estructura cuaternaria (ver figura 1.4). En base a la estructura cuaternaria las proteínas se pueden agrupar en dos grandes categorías: Proteínas fibrosas y globulares. Las primeras tienen cadenas polipeptídicas plagadas en forma de hebras o de láminas y las segundas en forma esférica o globular. Ambos grupos son distintos estructuralmente, ya que las proteínas fibrosas consisten usualmente de un único tipo de estructura secundaria mientras que las proteínas globulares contienen a menudo diversos tipos de estructuras secundarias.

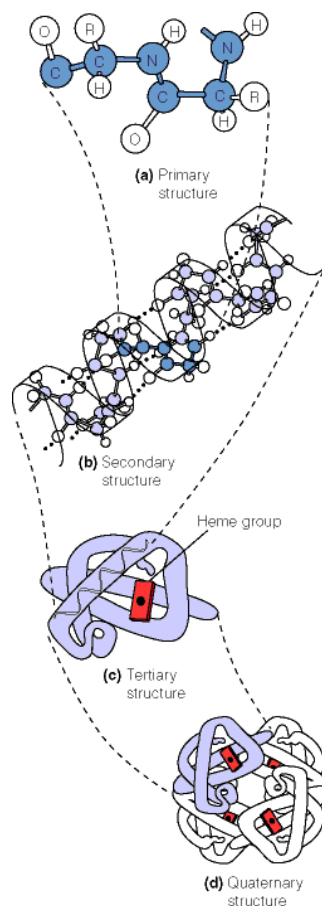


Figura 1.4. Los cuatro niveles estructurales de las proteínas utilizando como ejemplo la molécula de hemoglobina (Mathews et al. 2002).

1.2 RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN

Cada aminoácido en una proteína desempeña una función específica. Por ejemplo, unos se encuentran en el interior de la molécula plegada y son esenciales para el mantenimiento de la estructura; otros quedan expuestos a la superficie y son los que determinan las fuerzas que rigen los procesos de interacción molecular; otros participan en el mecanismo de reacción propiamente dicho, es decir, el proceso de catálisis. Así, el plegamiento de la cadena de aminoácidos es lo que provee de la diversidad estructural necesaria para que las proteínas puedan desempeñar una gran variedad de funciones biológicas. Y es precisamente la estructura tridimensional específica de cada proteína la que le permite desempeñar su función biológica concreta. Esta función tiene entonces una base estructural, es decir, sin estructura no hay función. Así, las proteínas fibrosas y globulares son distintas en cuanto a la función ya que, por ejemplo, las estructuras que proveen de soporte, forma y protección externa a vertebrados están compuestas de proteínas fibrosas; en cambio, la mayoría de las enzimas y proteínas de regulación son proteínas globulares. Se puede establecer que la relación estructura-función es biunívoca, es decir una estructura da lugar a una función específica. Por ello para que las proteínas puedan desempeñar sus funciones se requiere una amplia variedad estructural. No obstante, en los procesos fisiológicos están involucradas proteínas capaces de desempeñar más de una función dependiendo de las condiciones metabólicas. En base a las relaciones evolutivas, las proteínas se pueden agrupar en familias con grandes semejanzas estructurales pero con funciones diversas (Branden y Tooze 1999; McPherson 1999; Gómez-Moreno Calera y Sancho Sanz 2003)

1.3 RESOLUCION ESTRUCTURAL DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Como se ha descrito antes, el interés de la determinación de la estructura de proteínas radica en la relación existente entre la estructura de la macromolécula y las funciones biológicas que desempeña. El conocimiento de la estructura tridimensional de las moléculas que intervienen en los procesos biológicos, entre las que destacan las proteínas, es importante para entender el mecanismo de los mismos.

En la base de datos de estructuras de macromoléculas biológicas, el "Protein Data Bank" (PDB por sus siglas en inglés) (Berman et al. 2000), a la fecha actual se encuentran recogidas 65802 estructuras, de las cuales 56919 han sido resueltas por difracción de rayos X y 8423 por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Otras técnicas experimentales que están tradicionalmente asociadas con la biología estructural de proteínas y de ácidos nucleicos y tienen importancia en la identificación empírica de diferentes estados de conformación de éstas son, por ejemplo, el dicroísmo circular y otros métodos espectroscópicos, así como otros métodos basados en la medida de propiedades termodinámicas o hidrodinámicas. Sin embargo, los últimos métodos no pueden proveer de información suficiente para determinar estructuras tridimensionales de por sí. Estos datos confirman que la difracción de rayos X de cristales y la espectrometría RMN en disolución, son los únicos métodos disponibles en la actualidad para la determinación de la estructura biomacromolecular a nivel de resolución atómica (Guss y King 2003). Ambos métodos se basan en diferentes procesos físicos fundamentales para generar la información necesaria para determinar las estructuras tridimensionales de estas macromoléculas.

La espectroscopia de RMN fue descubierta por los físicos Felix Bloch, Edward Purcell y colaboradores en 1946 (Bloch 1946; Purcell et al. 1946). La afirmación por parte de Wolfgang Pauli en 1924 de que ciertos núcleos rotan y, por lo tanto poseen un momento magnético, condujo a la primera observación experimental de la resonancia magnética nuclear en 1945. Sin embargo, no fue hasta el advenimiento de la espectroscopia de RMN multidimensional, en los años setenta, cuando la técnica se desarrolló lo suficiente hasta poder aplicarse a sistemas macromoleculares. Esta técnica se basa en que, en un campo magnético, ciertos núcleos magnéticos tales como el ^1H , ^{13}C y el ^{15}N (presentes en las proteínas) pueden adoptar estados de spín nuclear de diferente energía y pueden ser inducidos a transiciones entre estos estados mediante la aplicación de pulsos de radiofrecuencia. El ambiente químico de un núcleo magnético, en particular dentro de una molécula, determina sus propiedades de RMN, tales como la diferencia de energía entre las diferentes orientaciones y de este modo así, la frecuencia a la cual este núcleo absorbe energía, es decir, su frecuencia de resonancia. Esta frecuencia varía con el tipo de núcleo y la fuerza del campo magnético, pero más importante, esta frecuencia es dependiente del ambiente químico del núcleo y por lo tanto puede ser utilizada para distinguir núcleos de átomos que son idénticos químicamente pero que tienen diferente entorno molecular (Guss y King 2003). Los núcleos magnéticos interactúan entre ellos mismos (núcleos cercanos), así como también se ven

afectados por el campo aplicado. Ambos efectos se dan a través de uniones químicas (acoplamiento spín-spín) y, en distancias cortas, a través del espacio (acoplamiento dipolo-dipolo) lo cual puede ser aprovechado para asignar señales de resonancia a un núcleo en particular dentro de una estructura y derivar restricciones estructurales para las distancias que separan unos de otros (Pellecchia et al. 2002; Gómez-Moreno Calera y Sancho Sanz 2003). En base a estas características fundamentales se determinan las posiciones de cada uno de los átomos que constituyen la molécula de proteína. El cálculo de la estructura tridimensional de una proteína consiste en encontrar el conjunto de estructuras cuyas coordenadas atómicas satisfagan todas las restricciones experimentales, de distancia, angulares y de orientación, proporcionadas por los parámetros de RMN. En cuanto al tamaño máximo de las proteínas susceptibles de ser investigadas por RMN éste se encuentra en torno a los 60-80 kDa aunque este límite va aumentando a medida que se producen avances en la técnica. Por ejemplo, con la introducción de una variante, la espectroscopia transversal de relajación-optimizada (TROSY), este límite se ha extendido hasta aproximadamente los 500 kDa (Wuthrich 2001).

Por otra parte, la difracción de rayos X es, esencialmente, una técnica de imagen en la cual los rayos X son dispersados por electrones de los átomos dentro de un cristal, sin pérdida de la energía (dispersión elástica). Los rayos X difractados generan un patrón de interferencia que puede ser adquirido, grabado y, subsecuentemente, transformado matemáticamente para dar una imagen del objeto original a escala de átomos, es decir, una imagen de las moléculas que conforman el cristal. Debido a que son los electrones los que difractan los rayos X, lo que se obtiene finalmente es la densidad electrónica de la muestra; y puesto que el conjunto de electrones están dispuestos alrededor del núcleo, las regiones de alta densidad electrónica corresponden a posiciones atómicas. En el caso de las macromoléculas biológicas, esta técnica permite obtener, además de la estructura tridimensional incluyendo el plegamiento, detalles importantes desde un punto de vista físico-químico (distancias y ángulos de enlace, estado térmico vibracional de los átomos, etc.) que ayudan a elucidar la función biológica. A diferencia de los métodos basados en espectrometría RMN, la aplicación de la cristalografía de rayos X no está limitada por el tamaño molecular, lo cual permite aplicarla también a estudios estructurales de virus, ácidos nucleicos y complejos proteína-proteína. Sin embargo, el requisito fundamental para poder aplicar esta técnica es disponer de cristales únicos, homogéneos y de buena calidad (Ducruix y Giege 1992; McPherson 1999; Gómez-Moreno Calera y Sancho Sanz 2003).

1.4 CRISTALIZACIÓN

En principio, la cristalización de una proteína, un ácido nucleico o un virus no es muy diferente a la cristalización de pequeñas moléculas convencionales. La cristalización requiere de la formación gradual de una disolución sobresaturada de la macromolécula, lo que desencadena la formación espontánea de centros de crecimiento cristalino y/o núcleos. La estrategia empleada es llevar al sistema proteína/disolvente hacia un estado de solubilidad reducida de forma muy lenta, mediante la modificación de las propiedades del disolvente o de las características de la macromolécula. Un metodología comúnmente empleada es incrementar la concentración de los agentes precipitantes o alterando alguna propiedad fisicoquímica del sistema tal como, por ejemplo, el pH o la temperatura y que afecte a la solubilidad de la molécula (tabla 1.2) (McPherson 1999).

Tabla 1.2 Métodos empleados para crear sobresaturación en experimentos de cristalización.

1	Mezcla directa de macromolécula con precipitante para crear de forma inmediata un estado sobresaturado (método Batch)
2	Cambio de la temperatura
3	Incremento de la concentración de sal (salting out)
4	Disminución de la concentración de sal (salting in)
5	Incremento o disminución del pH
6	Adición de ligandos que modifican la solubilidad de la macromolécula.
7	Modificación de la constante dieléctrica del medio
8	Remoción física del agua (evaporación)
9	Adición de polímeros que producen un efecto de exclusión de volumen
10	Adición de agentes de entrecruzamiento químico
11	Concentración de la macromolécula
12	Remoción de un agente solubilizante

Si un experimento de cristalización se inicia partiendo de una disolución de una macromolécula suficientemente pura, correctamente plegada y estable biológicamente, los parámetros físicos y químicos que definen el experimento serán críticos en cuanto al resultado a obtener. La cantidad y calidad de los cristales dependerá del ambiente químico de la disolución y de la técnica experimental para llevar a cabo el experimento. El método de cristalización (difusión de vapor, batch, difusión líquido-líquido, etc.) es solamente una manera de llevar la disolución de la macromolécula a un estado de sobresaturación, que permita la formación de cristales cuando el sistema vuelve al equilibrio (Ducruix y Giegé 1992; Bergfors 2009). En general, el diseño experimental para cristalizar una macromolécula

se compone de dos etapas: 1) un barrido inicial de condiciones ("screening" en inglés) y 2) una optimización de las condiciones iniciales.

Los experimentos iniciales de búsqueda de condiciones de cristalización consisten en una variación sistemática de condiciones químicas y, a veces, físicas (tipo de agente precipitante y su concentración, pH, temperatura, etc.). Idealmente estas condiciones deben muestrear un amplio abanico de diversidad química, con la menor cantidad de proteína posible (Jancarik y Kim 1991). Posteriormente, durante el proceso de optimización, las condiciones que hayan dado los resultados más prometedores (aunque no sea un cristal único sino incluso algún tipo de precipitado cristalino) son mejoradas hasta producir cristales que difracten a un resolución óptima (Bergfors 2009).

Un forma de categorizar los métodos existentes para cristalizar una macromolécula es dividirlos en base a como ajustan y varían las condiciones químicas de la disolución. Es decir, si son fijadas al inicio del experimento o varían en el curso del mismo. En base a esta consideración, la mayoría de los métodos están entre una de estas tres categorías (Bergfors 2009; McPherson 2009):

- Método de mezcla directa (batch en inglés) o estático: Los niveles de sobresaturación se ajustan al inicio del experimento y permanecen sin cambios.
- Difusión en fase vapor: Se trata de un proceso de equilibrio en fase vapor entre una disolución insaturada de proteína y una disolución deshidratante que lleva al sistema hacia a un estado sobresaturado.
- Difusión en fase líquida: La disolución de proteína está en contacto directo con el coctel de cristalización y experimenta un proceso de equilibrio en fase líquida.

La cristalización por *batch* es una técnica simple en su implementación. Consiste en la mezcla directa de una disolución insaturada de proteína, con una disolución de un agente precipitante. De esta forma, inmediatamente se alcanza un estado sobresaturado con respecto a la proteína como resultado de los cambios en la solubilidad de ésta impuestos por el efecto del agente precipitante. En consecuencia, se puede formar un precipitado cristalino si los parámetros químicos y físicos (condiciones de cristalización) son los adecuados. Para optimizar el consumo de proteína, se utiliza una variante que es el micro-batch, en la cual los volúmenes de macromolécula son del orden de nano-litros y, para evitar la evaporación, se hace uso de aceites minerales (Chayen 1997).

En la base de datos "Protein Data Bank" se destaca que la técnica de difusión de vapor ha sido la más utilizada para la obtención de cristales, en la mayoría de las estructuras resueltas por difracción de rayos X (Berman et al. 2000). Puede ser implementada en cuatro variantes, a saber, gota-colgante, gota-sedente, gota en sándwich y gota en capilar. Esta técnica se lleva a cabo mezclando disoluciones de proteína y agente precipitante en forma de una gota sobre alguna superficie sólida. Esta gota se deja equilibrar con un reservorio de agente precipitante dentro de una cámara cerrada. Conforme el agua y los componentes volátiles se van equilibrando por difusión en fase vapor, las concentraciones de proteína y agente precipitante en la gota se incrementan llevando el sistema hacia un estado sobresaturado. La diferencia entre la presión de vapor de la gota y la presión de vapor del reservorio es la fuerza impulsora para este proceso de equilibrio dinámico. Como resultado de este proceso, los cristales crecen a partir de una sola condición de cristalización, al igual que en el método por batch (es decir, a una temperatura dada, un pH y una concentración de agente precipitante).

Los métodos de cristalización por difusión líquido-líquido engloban a técnicas como la diálisis, difusión de interfase libre y la técnica de contradifusión. En este tipo de métodos existe un contacto directo entre las disoluciones de proteína y el coctel de cristalización. En el método de diálisis se utiliza una membrana semipermeable en la cual se va a encerrar a la disolución de proteína. El dispositivo con la membrana con la proteína se coloca dentro de un recipiente que va a contener el agente precipitante. De esta forma, la membrana semipermeable no va a permitir salir a la macromolécula, pero si permite que el agente precipitante difunda hacia la proteína de forma lenta provocando la cristalización. En la técnica de difusión en interfase libre o también llamada difusión líquido-líquido, las disoluciones de proteína y precipitante se colocan en contacto directo y ocurre la interdifusión de una disolución de agente precipitante hacia una disolución de proteína, a través de su interfase común líquido-líquido. Normalmente, la disolución más densa (normalmente el agente precipitante) se coloca debajo de la disolución con menor densidad (la proteína). La diferencia de densidades de las dos disoluciones evita la mezcla rápida de ambas, lo que la diferencia del método por mezcla directa (batch). Debido a que las velocidades de difusión de las macromoléculas son mucho menores que las velocidades de pequeñas moléculas de la mayoría de precipitantes, prácticamente no hay difusión de la macromolécula hacia el volumen de agente precipitante durante el curso del experimento.

1.5 LA TÉCNICA DE CONTRADIFUSIÓN

En la técnica de contradifusión, al inicio del experimento, tanto la proteína como el agente precipitante se ponen en contacto en una geometría experimental de tal forma que se favorezca un transporte de masa controlado por difusión, lo cual es un requisito intrínseco de la técnica. Se ha demostrado que un transporte de masa difusivo es benéfico para el crecimiento cristalino, ya que suprime los flujos de convección que se generan por gradientes de densidad en este tipo de procesos (Lorber et al. 2009). La supresión de la convección permite la obtención de cristales de mejor calidad.

Un experimento típico de cristalización de macromoléculas biológicas por contradifusión consiste en tener una cámara que ha sido llenada con la disolución de macromolécula, por ejemplo, una proteína. Uno de los extremos de este compartimento debe estar en contacto con otro compartimento que contiene el agente cristalizante. Durante la mezcla de estos dos componentes se debe evitar fenómenos de convección, para que el transporte de masa de las moléculas, tanto de proteína como de agente cristalizante, se lleve a cabo por solo por difusión. Una de las características de esta técnica es que la concentración inicial de agente cristalizante debe ser alta, para que se pueda aprovechar el acoplamiento entre difusión y precipitación, y que en un único experimento se generen varios eventos de cristalización a diferentes sobresaturaciones.

Una vez que se inicia el experimento, las moléculas de agente cristalizante difunden rápidamente hacia la cámara de la proteína, induciéndose la formación de una fase amorfa y/o precipitado microcristalino en la interfase de unión de ambas disoluciones. Inmediatamente, la concentración de proteína disminuye, en la vecindad del precipitado, pero las moléculas de agente cristalizante siguen difundiendo hacia delante a lo largo de la cámara de proteína. Conforme el proceso avanza, se forma un gradiente de sobresaturación (onda de sobresaturación) que permite la formación de núcleos de cristales de proteína en regiones de valores de sobresaturación cada vez más bajos. Esto hace que se formen un menor número de cristales pero de mayor tamaño. El acoplamiento entre el transporte de masa y los eventos de cristalización, durante el experimento, crea una onda de sobresaturación de amplitud decreciente que viaja a lo largo de la cámara de proteína y tiende siempre hacia el equilibrio. Esto conlleva la formación de pocos cristales de gran calidad, en aquellas zonas alejadas de la interfase de contacto inicial de la disolución de proteína y de agente cristalizante (García-Ruiz et al. 2001; García-Ruiz 2003; Otálora et al. 2009).

Las técnicas de contradifusión ya se investigaban hace más de 100 años cuando se describe por primera vez la formación de un patrón de precipitación periódico en un medio gelificado (Liesegang 1897). Liesegang observó un patrón auto-organizado en anillos concéntricos, formado por la interacción entre un proceso de difusión, una reacción química y una precipitación; fenómeno que se conoce como “anillos de Liesegang”. En relación a este proceso, Ostwald propuso que la formación de los anillos de Liesegang era producto de un acoplamiento entre una precipitación química y un fenómeno de difusión (Ostwald 1897; Ostwald 1899). Como resultado de este proceso, se crea una “onda de sobresaturación” que forma un gradiente de sobresaturación local decreciente, que conlleva a una tasa de nucleación que disminuye a lo largo del sistema.

A principios de los años 70, Zeppezauer et al (1968) y Saleme (1972) mostraron que el fenómeno de convección se puede minimizar usando como reactores de cristalización capilares de vidrio para estudios de difracción de rayos X; como resultado la calidad de los cristales mejoró significativamente (Zeppezauer et al. 1968; Saleme 1972). Dentro de los diferentes diseños experimentales que permiten que dos disoluciones se mezclen por difusión, el experimento anterior se engloba en las técnicas denominadas “difusión líquido-líquido” o “difusión de interface libre”. Estos métodos se desarrollaron con el objetivo de alcanzar una sobresaturación crítica específica de forma muy lenta, para obtener un solo núcleo cristalino (Zeppezauer et al. 1968; Weber y Goodkin 1970; Saleme 1972, 1974; Weber y Saleme 1977). Por lo tanto, los experimentos típicos de difusión de interface libre se pueden considerar como experimentos tipo *batch*, pero conducidos a una velocidad de mezcla de disoluciones muy baja. Esto permite una búsqueda de condiciones de cristalización más amplia que los experimentos típicos de *batch* o de difusión de vapor (Otálora y García-Ruiz 1997; Otálora et al. 2009).

De igual manera, con objeto de evitar un transporte de masa controlado por convección, se empezaron a utilizar medios gelificados para los experimentos de cristalización (Henisch 1970; Kalkura y Devanarayanan 1987; Robert y Lefauchaux 1988). En 1991 el Profesor García-Ruiz del Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC) propuso aplicar la técnica de contradifusión en medios gelificados a la cristalización de macromoléculas biológicas, como un método alternativo para una búsqueda amplia de condiciones de cristalización en un solo experimento (García-Ruiz 1991). Posteriormente, García-Ruiz y colaboradores desarrollaron la técnica de acupuntura en geles (García-Ruiz et al. 1993), en la cual el agente cristalizante difunde a través de un gel hacia el interior de un

capilar que contiene la disolución de proteína. Dentro de los trabajos posteriores del LEC referentes a la técnica de contradifusión, F. Otálora desarrolló su tesis doctoral realizando una simulación de crecimiento de cristales en medios difusivos (Otálora 1994). A. Moreno realizó una tesis doctoral sobre crecimiento cristalino en sistemas de difusión-reacción y su aplicación a macromoléculas y compuestos de nueva síntesis. Posteriormente, J. A. Gavira continuó este trabajo en su trabajo de tesis doctoral sobre la cristalización de proteínas en geles por métodos contradifusivos (Gavira 2000).

BIBLIOGRAFÍA

Bergfors T.E. 2009. *Protein Crystallization*. 2nd ed. International University Line, La Jolla, CA.

Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N. y Bourne P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **28**: 235.

Bloch F. 1946. Nuclear Induction. *Physical Review* **70**: 460.

Branden C. y Tooze J. 1999. *Introduction to Protein Structure*. 2nd ed. Garland Science Textbooks, New York.

Chayen N.E. 1997. The role of oil in macromolecular crystallization. *Structure* **5**: 1269.

Ducruix A. y Giegé R. 1992. *Crystallization of nucleic acids and proteins*. Oxford University Press, New York.

García-Ruiz J.M. 1991. The uses of crystal growth in gels and other diffusing-reacting systems. *Key Eng. Mater.* **58**: 87.

García-Ruiz J.M. 2003. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* **368**: 130.

García-Ruiz J.M., Moreno A., Viedma C. y Coll M. 1993. Crystal quality of lysozyme single crystals grown by the gel acupuncture method. *Mat. Res. Bull.* **28**: 541.

García-Ruiz J.M., Otálora F., Novella M.L., Gavira J.A., Sauter C. y Vidal O. 2001. A supersaturation wave of protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **232**: 149.

Gavira J.A. 2000. Cristalización de proteínas en geles por métodos contradifusivos. In *Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra. CSIC. Universidad de Granada, Granada.*

Gómez-Moreno Calera C. y Sancho Sanz J. 2003. *Estructura de proteínas*. 1a. edición ed. Editorial Ariel, S.A., Barcelona.

Guss J.M. y King G.F. 2003. Macromolecular structure determination: comparison of crystallography and NMR. In *Encyclopedia of the Human Genome* (ed. D.N. Cooper). John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, N. J .

Henisch H.K. 1970. *Crystal growth in gels*. 2nd ed. Dover Publications, Inc., New York.

Jancarik J. y Kim S.-H. 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**: 409.

Kalkura S.N. y Devanarayanan S. 1987. Fibrous crystals of cholesterol in silica gel. *J. Cryst. Growth* **83**: 446.

Liesegang R. 1897. Chemische fernwirkung. *Photographisches Arch* **800**: 305.

Lorber B., Sauter C., Théobald-Dietrich A., Moreno A., Schellenberger P., Robert M.-C., Capelle B., Sanglier S., Potier N. y Giegé R. 2009. Crystal growth of proteins, nucleic acids, and viruses in gels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **101**: 13.

Mathews C.K., van Holde K.E. y Ahern K.G. 2002. *Bioquímica*. 3a. ed. Pearson Educación S.A., Madrid.

McPherson A. 1999. *Crystallization of biological macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

McPherson A. 2009. Introduction to the Crystallization of Biological Macromolecules. In *Current Topics in Membranes* (ed. D. Larry), p. 5. Academic Press.

Ostwald W. 1899. Liesegang rings. In *Lehrbuch der Allgemeinen Chemie* 2, p. 768. Engelmann Verlag, Leipzig.

Otálora F. 1994. Simulación de Crecimiento de Cristales en medios difusivos. In *Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra. CSIC. Universidad de Granada, Granada*.

Otálora F. y García-Ruiz J.M. 1997. Crystal growth studies in microgravity with the APCF I. Computer simulation of transport dynamics. *J. Cryst. Growth* **182**: 141.

Otálora F., Gavira J.A., Ng J.D. y García-Ruiz J.M. 2009. Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **101**: 26.

Ostwald W. 1897. Besprechung der arbeit von Liesegang "A Linien". *Z. Phys. Chem* **23**: 365.

Pauling L., Corey R.B. y Branson H.R. 1951. The Structure of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **37**: 205.

Pellecchia M., Sem D.S. y Wuthrich K. 2002. Nmr in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 211.

Purcell E.M., Torrey H.C. y Pound R.V. 1946. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review* **69**: 37.

Robert M.C. y Lefauchaux F. 1988. Crystal growth in gels: Principle and applications. *J. Cryst. Growth* **90**: 358.

Salemme F.R. 1972. A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for X-ray crystallography. *Arch. Biochem. Biophys.* **151**: 533.

Salemme F.R. 1974. Preliminary crystallographic data for cytochrome c' of *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 423.

Weber B.H. y Goodkin P.E. 1970. A modified microdiffusion procedure for the growth of single protein crystals by concentration-gradient equilibrium dialysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**: 489.

Weber P. y Salemme F.R. 1977. Preliminary crystallographic data for cytochromes c' of *Rhodospseudomonas capsulata* and *Rhodospirillum molischianum*. *J. Mol. Biol.* **117**: 815.

Wuthrich K. 2001. The way to NMR structures of proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**: 923.

Zeppezauer M., Eklund H. y Zeppezauer E.S. 1968. Micro diffusion cells for the growth of single protein crystals by means of equilibrium dialysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**: 564.

Capítulo 2

GCB

La caja de Cristalización Granada

2.0 DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO DE CRISTALIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE CONTRADIFUSIÓN

2.1 INTRODUCCIÓN

Las macromoléculas biológicas se cristalizan normalmente a partir de disoluciones sobresaturadas o disoluciones sobre enfriadas (Ducruix and Giegé 1992; McPherson 1999). El método más simple de cristalización es el método de mezcla directa (o método por batch), en el cual la disolución de proteína y la de agente precipitante se mezclan directamente para obtener una disolución sobresaturada. La principal limitación de esta técnica es la falta de control sobre el desarrollo de la sobresaturación en el tiempo, ya que el valor de sobresaturación se alcanza instantáneamente, la velocidad del cambio de sobresaturación es fija y solo está controlada por el proceso del crecimiento cristalino. Esta limitación es una restricción importante para compuestos que forman núcleos de crecimiento a muy alta sobresaturación (como es el caso de la mayoría de las macromoléculas biológicas). Para estas macromoléculas, los cristales crecen (al menos durante las primeras etapas) a partir de disoluciones altamente sobresaturadas necesarias para lograr la nucleación pero que limita la calidad y el tamaño del cristal. Por esta razón, la mayoría de los protocolos de cristalización que incluyen este tipo de sustancias hacen uso de algún mecanismo activo para exceder una sobresaturación a partir de una disolución inicial sub-saturada o saturada. Estos mecanismos se basan en cambios de temperatura (métodos térmicos), evaporación del solvente (métodos de difusión de vapor), o una mezcla lenta de disoluciones, a través de una membrana (diálisis) o por una interfaz líquida libre (métodos de difusión en interfaz libre). Estos métodos, cuando son ajustados correctamente, son capaces de producir cristales que crecen a la sobresaturación más baja posible. Sin embargo, estos métodos presentan todavía tres problemas importantes: primero, la velocidad del cambio de sobresaturación debe ser ajustada para cada uno de ellos para poder trabajar en unas condiciones aceptables, ya que si la velocidad de incremento de la sobresaturación es muy lenta, se desperdicia mucho tiempo

experimental, e incluso peor, si ésta es muy rápida, los beneficios del método se pierden debido al exceso de sobresaturación acumulada durante el tiempo de inducción de la nucleación; segundo, la velocidad del incremento de la sobresaturación es dependiente de la solubilidad del compuesto, de tal manera que se requieren bastantes ensayos de barrido (búsqueda) para determinar las condiciones óptimas para el experimento; y tercero, con bastante frecuencia las cinéticas de nucleación y crecimiento cristalino están gobernadas por más de un parámetro, los cuales incrementan en gran medida el número de ensayos de búsqueda de condiciones óptimas. Para superar estas limitaciones, se han propuesto nuevas metodologías en las cuales la nucleación y el crecimiento cristalino inician lejos del equilibrio termodinámico, siendo la principal consecuencia práctica de esto la existencia de gradientes de dos o más factores que controlan la sobresaturación, tanto a través de todo el sistema como a lo largo del tiempo en el cual se desarrolla el experimento. Estos gradientes aseguran que los cristales que crecen en diferentes puntos de la celda de crecimiento lo hacen a diferentes valores de sobresaturación y a diferentes velocidades de cambio de sobresaturación, reduciendo el número (o incluso eliminando la necesidad) de ensayos para búsqueda de condiciones y el número de experimentos para optimizarlas. Esto es el caso de los métodos de contradifusión (García-Ruiz 2003).

En base a la experiencia previa en métodos de contradifusión unidimensionales (Henisch y García-Ruiz 1986; García-Ruiz 1991; García-Ruiz et al. 1993; García-Ruiz y Moreno 1994; Otálora y García-Ruiz 1996), se ha desarrollado un nuevo dispositivo para la implementación de experimentos de contradifusión (aunque no está limitado solamente a ellos). En este capítulo se describen las principales características y usos de este dispositivo llamado “Granada Crystallization Box” (GCB). La GCB fue diseñada principalmente (aunque no limitada a ello) para el crecimiento de cristales de macromoléculas biológicas, siendo esta utilidad la que será descrita en este capítulo. Las ventajas de este nuevo sistema, se describen a continuación:

1. El sistema trabaja bajo un transporte de masa controlado por difusión. Bajo estas condiciones se produce una red cristalina mucho más y mejor ordenada produciéndose el crecimiento en un régimen mixto o controlado por

difusión. La función de fluidos viscosos, geles o microgravedad se realiza utilizando volúmenes de capilares.

2. Busca de forma automática las condiciones de cristalización más óptimas. Debido a las propiedades intrínsecas de los experimentos de contradifusión, un solo capilar explora la misma zona de precipitación en el diagrama de fases de igual forma que lo harían muchas gotas de un ensayo de gota colgante (difusión de vapor). Como consecuencia, solo se necesita un capilar por cada agente precipitante probado.
3. Reduce la cantidad de muestra que se necesita. Solamente se requieren de 1 a 10 microlitros de disolución de proteína por capilar (o incluso, para la búsqueda de condiciones, volúmenes más pequeños mediante el uso de capilares de diámetro inferior a 0.1 mm). Debido a que el número de experimentos necesarios para obtener buenos cristales se reduce, también se reduce el consumo global de la muestra.
4. Se minimiza el volumen requerido para el diseño experimental. Hasta 120 capilares se pueden acomodar dentro de las 20 GCB que caben en la base (figura 2.1). El diseño es modular y fácilmente adaptable a diferentes requerimientos de almacenaje del experimento. Esto último es particularmente útil en experimentos en microgravedad, en los que se pueden apilar hasta 30 GCB en un volumen de aproximadamente de 10x10x10 cm.
5. El sistema es bastante adecuado para análisis de difracción de rayos X. La GCB permite transportar cristales a instalaciones de difracción de rayos X de forma fácil y segura. La cristalografía de rayos X *in situ* es fácil para cristales crecidos dentro de capilares para rayos X. Además debido a que no se requiere una manipulación de los cristales para su montaje, se elimina el riesgo de pérdida de cristales o la degradación de la calidad del cristal durante la manipulación y/o el montaje. Por otra parte, la GCB se puede utilizar para crio-cristalografía pues se han probado con éxito protocolos de congelado

inmediato (flash-cooling en inglés) con cristales de proteína crecidos dentro de capilares utilizando la GCB.

6. El sistema hace que sea fácil la visualización del proceso de crecimiento. Además de que el uso de capilares de vidrio transparentes son bastante adecuados para la observación microscópica. Así mismo, los capilares están contenidos en una caja transparente que hace más fácil y segura la observación bajo la lupa y/o el microscopio de los cristales.

2.2 DISEÑO Y DESCRIPCIÓN

La figura 2.1a muestra una perspectiva general del kit de la GCB incluyendo varias cajas montadas en su soporte. La GCB está compuesta de 3 piezas hechas de poliestireno: 1) la caja principal (figura 2.1b), que es una caja estrecha abierta por uno de sus lados largos, 2) una guía interna que sirva para sostener a los capilares (figura 2.1c), que encaja justo en la parte interna de la caja y 3) la tapa (figura 2.1b parte superior) que cierra la caja. La caja ha sido diseñada en un tamaño pequeño pero suficiente para almacenar y transportar experimentos y que a su vez puede contener hasta seis experimentos de cristalización diferentes. La caja es transparente y suficientemente delgada para permitir la observación de los experimentos con el microscopio. La utilidad de la guía de los capilares es la siguiente: la densidad de los experimentos debe ser la máxima posible pero sin llegar a comprometer tanto la fácil inserción, como la manipulación de los mismos, así como la capacidad de observación microscópica. En esta guía se pueden acomodar capilares desde un diámetro de 0.1 mm hasta 1.5 mm. El diseño de la guía como una parte separada del cuerpo básico de la caja se decidió por cuestiones de flexibilidad. Este diseño permite a su vez la implementación de técnicas diferentes a la de contradifusión en capilares dentro del mismo cuerpo de la caja (ver la sección 2.3.1). El poliestireno se seleccionó como material para fabricar la caja comparando los beneficios y desventajas de diferentes materiales, con respecto a la calidad óptica, estabilidad química y física y precio. También se diseñó una base de plástico para el almacenaje de las GCB en forma vertical (figura 2.1a).

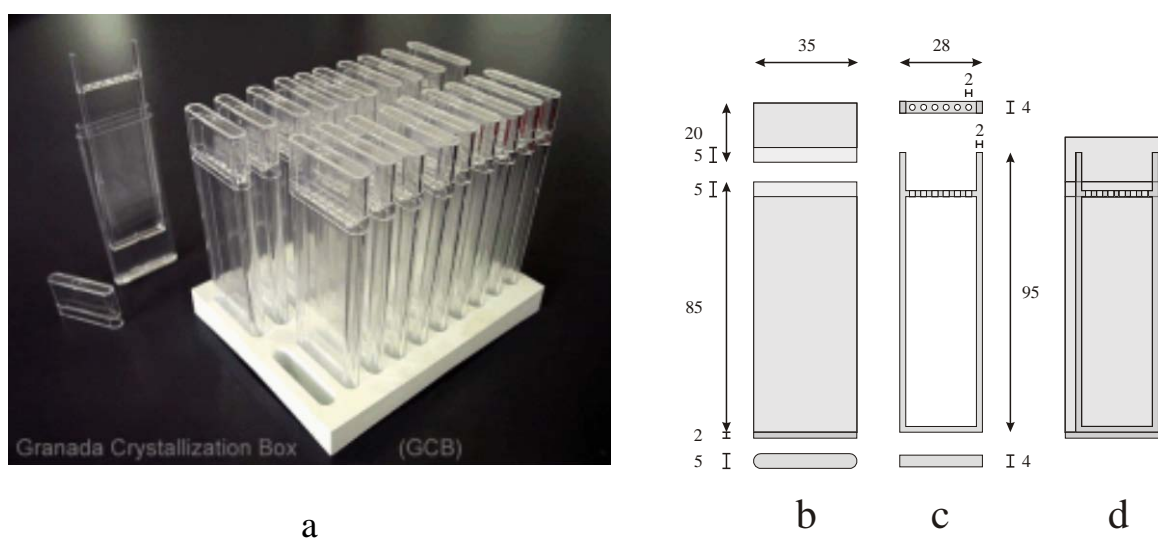


Figura 2.1. Fotografía que muestra una serie de cajas GCB (a) y un esquema de los componentes de la GCB: (b) el cuerpo de la caja, (c) la guía para los capilares y (d) la caja de sus componentes y dimensiones

2.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE CONTRADIFUSIÓN EN LA GCB

La GCB está diseñada principalmente para llevar a cabo experimentos de crecimiento cristalino por contradifusión dentro de capilares. El desarrollo de este tipo de experimentos usando la GCB es simple y se basa en el método de acupuntura en geles (GAME por sus siglas en inglés) a partir de la cual la GCB hereda muchas de sus ventajas. En particular la que se refiere a la búsqueda automática de las condiciones óptimas de cristalización y la posibilidad de llevar a cabo la colecta de datos de difracción sin la necesidad de una manipulación de los cristales fuera de los capilares.

El primer paso para la puesta a punto de este tipo de experimentos es la preparación de una disolución tamponada del precursor del gel que se va a utilizar (figura 2.2). Por razones prácticas se va a describir la preparación de los experimentos utilizando geles de agarosa debido a que forman geles reversibles y se ha demostrado que no interaccionan con las moléculas de proteína (Finet et al. 1998; Vidal et al. 1998). También es posible utilizar otros geles como el gel de sílice o el gel de poliacrilamida. Para la preparación del gel de agarosa se deben mezclar volúmenes apropiados de disolución tampón con una cantidad adecuada de agarosa bajo agitación continua, para obtener una concentración final de agarosa

de 0.5 % (p/v). Esta concentración de agarosa recomendada es suficiente para sostener los capilares dentro de la GCB así como también para evitar fracturas del gel. La mezcla de tampón y agarosa se calienta hasta ebullición para disolver completamente las fibras de agarosa obteniéndose una disolución completamente transparente. Después de mantener la disolución durante aproximadamente 10 minutos con agitación continua, se agregan 3 ml dentro de la GCB (figura 2.2c), en la cual se ha insertado previamente la guía de los capilares (figura 2.2b). La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente para alcanzar la temperatura de gelificación. Se va a producir entonces el entrecruzamiento de las fibras de agarosa para generar un gel cuya fuerza va a depender del tipo de gel utilizado. Se recomienda usar agarosa con una temperatura de gelificación alrededor de los 37 °C.

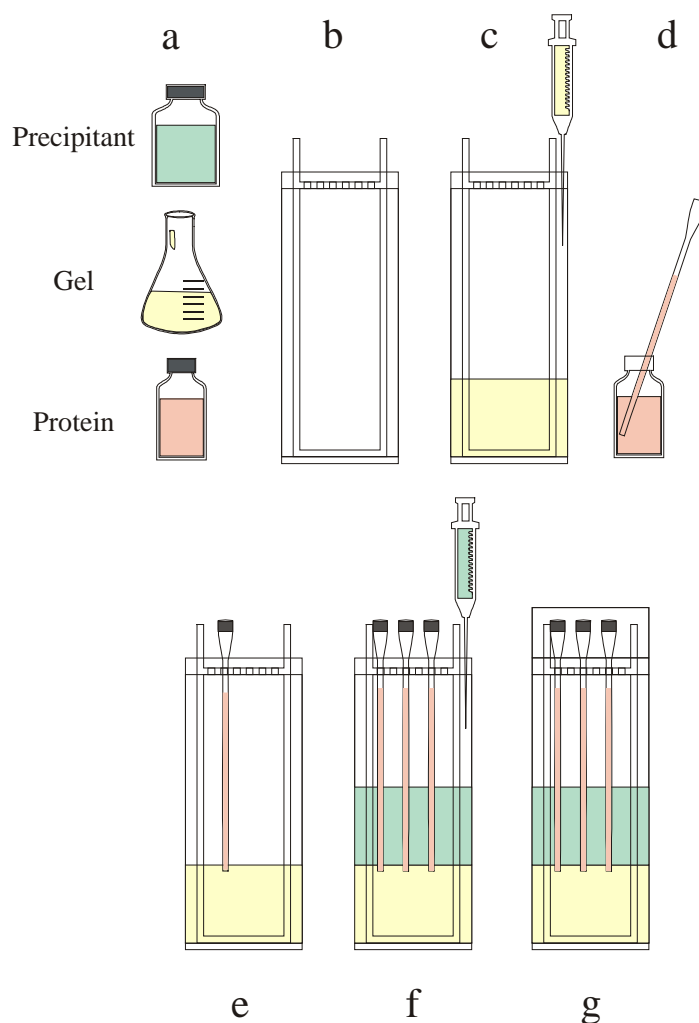


Figura 2.2. Secuencia esquemática del protocolo experimental de preparación de un experimento de cristalización en la GCB (ver el texto para más detalles).

Mientras la disolución de agarosa gelifica, se pueden llenar los capilares con la disolución de proteína tamponada. Para hacer esto, se corta el capilar hasta una longitud de 7 cm asegurándose de que los 2 extremos estén abiertos. Entonces se introduce uno de los extremos del capilar en la disolución de proteína (figura 2.2d) la cual ascenderá por capilaridad. Se puede llenar el capilar hasta la altura según queramos gastar de proteína. Se recomienda llenar hasta tener una columna de proteína de 5-6 cm, ya que esta longitud asegura tener los beneficios de la contra difusión en tiempos de experimento razonables. A continuación se sella el extremo superior del capilar con una pequeña cantidad de grasa de vacío o con el material de sellado preferido.

El siguiente paso es insertar el capilar en la capa de gel (figura 2.2e). Para hacerlo solamente hay que introducir el capilar por uno de los agujeros de la guía hasta la capa de gel e insertarlo dentro del mismo. Insertar el capilar 2-3 mm es apenas suficiente para mantenerlo vertical, sin embargo hay que considerar que la longitud de penetración es una variable más para ajustar la “ventana” de barrido y/o búsqueda de condiciones. Longitudes de penetración grandes incrementarán la barrera física del experimento de contra difusión disminuyendo la velocidad y concentración con la cual la sal invade el capilar que contiene la disolución de proteína. Hasta seis capilares por GCB se pueden colocar de esta manera.

Finalmente se agrega la disolución de agente precipitante correspondiente sobre la capa de gel (figura 2.2f). Normalmente se agrega un volumen igual al de la capa de gel, por ejemplo, se recomiendan 3 mililitros. Se debe tener en cuenta que con esta relación 1:1, la concentración final del agente precipitante después de la homogenización del experimento será la mitad de la inicial. El último paso es cerrar la GCB con su tapa (figura 2.2g) poniendo un poco de grasa de vacío en la parte interna de la tapa antes de cerrarla completamente, con objeto de evitar la evaporación. De forma opcional, una vez cerrada la GCB, para mayor estabilidad posterior al manipular la caja, se puede sellar con cinta adhesiva.

De forma alternativa, se puede utilizar una configuración diferente para preparar un experimento de contradifusión. El procedimiento es incluso más simple que el descrito con anterioridad. Consiste en agregar a la GCB 3 ml de la solución de agente precipitante preparada en el tampón de la proteína y se coloca la guía de los capilares dentro de la caja. A

continuación se prepara un gel de agarosa de la disolución de proteína con una concentración de agarosa de 0.2 % (p/v). De acuerdo a experiencias previas, esta concentración de agarosa es la mínima que se necesita para evitar la fuga de la disolución de proteína del capilar hacia la disolución de agente precipitante. El procedimiento consiste en preparar un gel de agarosa al 2 % (p/v) con el tampón de la proteína y mantenerla a 40 °C, es decir, justo unos grados por arriba de su temperatura de gelificación. Después se agrega el volumen apropiado de proteína en un tubo eppendorf y se mantiene a 37 °C simplemente sosteniéndolo entre las manos. Se agrega un volumen de agarosa igual a un décimo del volumen de proteína en el tubo eppendorf asegurándose de que haya un mezclado perfecto agitando el tubo con las manos. Seguidamente se llena el capilar y se sella como se describió antes. Finalmente se introduce el capilar a través de uno de los orificios de la guía hasta que el extremo abierto quede sumergido en la solución de agente precipitante.

Por otra parte, la cantidad de proteína que se requiere para preparar experimentos de contradifusión usando la GCB depende prácticamente del diámetro del capilar y cuanto se llena de proteína. En cualquier caso se recomienda llenar los capilares hasta una longitud de 50 o 60 mm, para analizar una zona más amplia del diagrama de solubilidad de una determinada proteína. El diámetro de capilar recomendado varía entre 0.1 mm para experimentos de búsqueda de condiciones hasta 0.5 mm para la obtención de cristales de un tamaño adecuado para difracción de rayos X. Dentro de estos límites, el volumen mínimo de proteína que se requiere para prepara un experimento de contradifusión en la GCB es de 0.39 μl por capilar para experimentos de búsqueda de condiciones y el máximo sería de 11.78 μl para obtener cristales de mayor tamaño y de unos 4 μl para obtener cristales de un tamaño adecuado para coleccionar datos de rayos X.

2.3.1 Métodos adicionales

Ya que la GCB ha sido diseñada para realizar experimentos de crecimiento cristalino por contradifusión dentro de capilares, es perfectamente adecuada para experimentos que tengan un subconjunto de requerimientos experimentales para las técnicas de contradifusión. Por ejemplo, se pueden realizar diferentes experimentos combinando el uso de disoluciones

gelificadas o no gelificadas con o sin capilares. Dos casos evidentes de lo anterior son el crecimiento cristalino dentro de capilares por el método en bloques y el crecimiento dentro de geles por contradifusión directamente en la GCB. En el primer caso, no se aprovechan las ventajas de la GCB, ya que la GCB se usa simplemente como un contenedor que provee de un soporte para los capilares, y que permite la observación microscópica y una fácil manipulación; en el segundo caso, los beneficios del uso de capilares se pierden pero se aprovechan aquellos de la técnica de contradifusión.

Un diseño experimental de la técnica por bloques usando gel en capilares (permitiendo el uso de pequeños volúmenes) se puede realizar fácilmente siguiendo el siguiente protocolo: 1) preparar la solución de agente precipitante tamponada con el buffer de la proteína y mezclarlo con agarosa a una concentración de 0.25 %; 2) llevar a ebullición por 1 minuto y enfriar hasta 40 °C; 3) mantener el sol a esta temperatura; 4) mezclar los volúmenes apropiados de solución de proteína y del sol: En otras palabras, proceder como si se preparase una gota para el método por bloques usando volúmenes pequeños; 5) en seguida, aspirar la gota dentro del capilar por capilaridad; 6) finalmente se sellan ambos extremos del capilar y 7) se coloca en el soporte de la guía de los capilares de la GCB. También se pueden usar aceites con esta técnica dentro de capilares (Moreno et al. 2002).

El crecimiento de cristales en geles mediante la técnica de contradifusión es muy simple. Este método es ideal para preparar un gran número de cristales grandes de alta calidad para fines específicos tales como por ejemplo el poder tener bastantes cristales para probar algún procedimiento experimental. Sin embargo este tipo de experimentos consumirían una cantidad de proteína mayor de lo que requieren otras técnicas comúnmente utilizadas. Para realizar el experimento, primero se tiene que preparar un sol de agarosa a una concentración de 1.2 % (p/v) calentando la mezcla unos 10 minutos aproximadamente. Preparar también la solución de proteína. Dejar enfriar el sol de agarosa hasta una temperatura de 40 °C y mantenerla a esta temperatura. Bajo agitación continua, mezclar una parte del sol de agarosa con diez partes de la solución de proteína, de tal forma que la concentración final de agarosa sea de 0.12 % (p/v) y que la de proteína sea de 9/10 de la inicial. Esta concentración de agarosa es la concentración mínima necesaria para producir un gel. Agregar la mezcla dentro de la GCB e introducir la guía de los capilares. Dejar enfriar el

sol a temperatura del laboratorio (20 °C) hasta la formación del gel. Una vez que el sol de agarosa ha gelificado, agregar la solución de agente precipitante sobre la capa de solución de proteína gelificada. En esta técnica alternativa, la guía o el soporte de los capilares no se utiliza para sostener los capilares sino para permitir la extracción del gel conteniendo los cristales al final del experimento. Por ejemplo, esta implementación puede ser utilizada para obtener cristales de proteína reforzados crecidos en geles de sílice (García-Ruiz et al. 1998). Para ello se debe preparar un sol de tetrametoxisilano (TMOS) a la concentración deseada (entre 1 y 20 % p/v) mezclando la solución tamponada de proteína con el volumen apropiado de TMOS bajo agitación continua. Agregar 3 ml de esta solución a la GCB e introducir la guía de los capilares. Esperar hasta que el gel este completamente formado, lo cual depende del pH y de la concentración de TMOS. Entonces agregar sobre el gel la solución de agente precipitante y cerrar la GCB.

2.3.2 Experiencias previas

La CCB se ha utilizado con éxito para cristalizar diferentes tipos de proteínas. Éstas moléculas abarcan un amplio rango de pesos moleculares (desde 5 hasta 1000 kDa), puntos isoeléctricos (de 3 a 12) y precipitantes (sales, polímeros, cambio de pH, etc.), como se resume en la tabla 2.1.

Proteína	Peso molecular (KDa)	pI	Precipitante	En colaboración con:
Dehydroquinasa	17.2	5.8	Sulfato de amonio	Tibotec-Virco (Mechelen Bélgica))
Saicar sintetasa	35.5	5.3	Sulfato de amonio	Institute of Crystallography (Moscow, Rusia)
Factor XIII	336	5.1	MES	Institut für Molekulare Biotechnologie (Jena, Alemania)
Citocromo C	15	4.6	Sulfato de amonio	Instituto de Tecnologia Química e Biológica (Oeiras, Portugal)
Allinasa	51.5	6.5	Sulfato de amonio	Institut für Molekulare Biotechnologie (Jena, Alemania)
Glucosa Isomerasa	173	3	Poli-etilenglicol 8000	
Lumazin sintetasa	1000	5.4	Fosfato de sodio y potasio	Technical University Munich (D-Garching, Alemania)
Lisozima	14	11	Cloruro de sodio	
Taumatina	22	12	Tartrato de sodio y potasio	
Ferritina	456+PM _{FE} *N°	4.5	Sulfato de cadmio	
Insulina	5	5.5	Fosfato de sodio	
Concanavalina A	102	5.5	Poli-etilenglicol 6000	
Catalasa	250	5.6	Sulfato de amonio	Institute of Crystallography (Moscow, Rusia)
Anticuerpo anti-lisozima de camello	27.9	8.4	Formato de sodio	Vrije Universiteit (Brussel, Bélgica)
Apoferritina	456	4.3	Sulfato de cadmio	
Xylanasa	21	9.0	Poli-etilenglicol 4000	
(Pro-Pro-Gly) ₁₀	7.6	5.2	Acetato de sodio	University of Napples (Napples, Italia)
Triosa fosfato isomerasa	28.5	5.6	Sulfato de amonio	University of Liège (Sart Tilman, Bélgica)

Tabla 2.1. Proteínas cristalizadas en capilares dentro de la GCB implementando la técnica de contradifusión. Éstas abarcan un amplio intervalo de pesos moleculares. Algunas de ellas son comerciales y otras han sido obtenidas a través de colaboraciones con diversos grupos de investigación.

A su vez, la figura 2.3 muestra varios cristales crecidos en la GCB de macromoléculas listadas en la tabla 2.1.

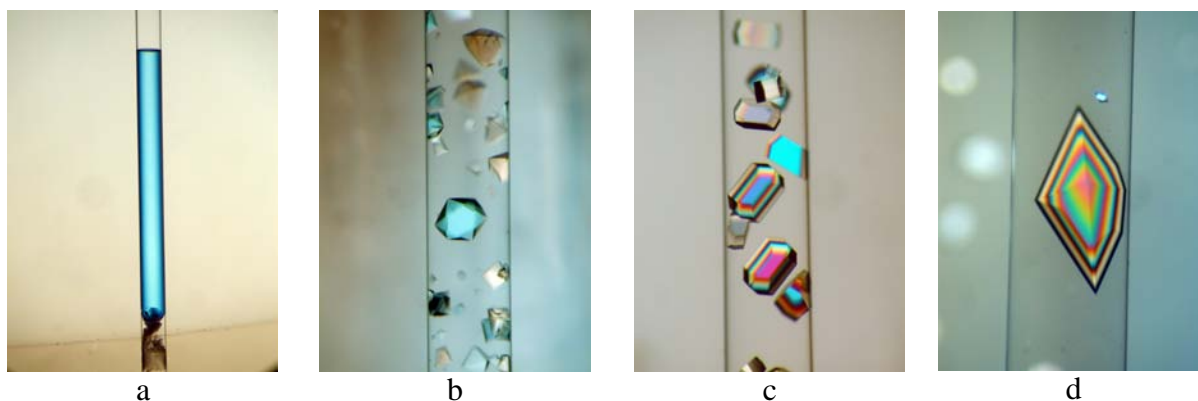


Figura 2.3. Algunos ejemplos de proteínas cristalizadas dentro de capilares por medio de la técnica de contradifusión utilizando la Granada Crystallization Box. a) Glucosa isomerasa, b) DHQ, c) Lisozima y d) Taumatina

2.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE CRISTALES CRECIDOS EN LA GCB

La recolección de datos a temperatura ambiente es mucho más fácil usando la GCB debido a que los cristales crecen directamente dentro de capilares que pueden ser capilares para difracción de rayos X. Por consiguiente, no se requiere manipulación y/o montaje de los mismos; simplemente se debe sacar el capilar de la GCB, sellar el extremo abierto con el material de sellado preferido después de secar y/o limpiar un poco ese extremo del capilar y finalmente fijarlo en la cabeza del goniómetro. Si el intervalo de desplazamiento del goniómetro a lo largo del eje central es demasiado corto para acomodar el capilar completo, se puede cortar y volver a sellar para obtener un segmento de éste más corto. Para el caso de que los cristales se muevan dentro del capilar o se tenga demasiado fondo debido al volumen de la solución interior, se puede extraer parte de ésta antes de sellar el extremo abierto, utilizando fibras de celulosa o cualquier otro material absorbente pero sin llegar a tocar los cristales.

De particular interés para la caracterización por rayos X, es la posibilidad de producir cristales facetados. Lejos del extremo abierto del capilar que se encuentra insertado en la capa de gel, los cristales nuclean a baja sobresaturación y por lo tanto, a baja densidad de nucleación, de tal forma que los cristales llegan a tener un tamaño grande y, eventualmente, son lo suficientemente grandes que llegan a ocupar todo el diámetro del capilar (figura 2.3a). Esto produce cristales cilíndricos que, además hacen que la corrección por absorción sea trivial, y que sean de mucho interés para algunas técnicas de rayos X.

En casos especiales, cuando la técnica de difracción de rayos X requiere una manipulación especial, siempre es posible extraer los cristales del capilar para hacer el tratamiento que se requiera y recolectar los datos.

2.5 CAPACIDADES DE LA GCB PARA SU OBSERVACION, TRANSPORTE Y USO EN MICROGRAVEDAD

La conveniencia para producir cristales para análisis de difracción de rayos X, no agota las capacidades de la GCB, ya que además permite la observación del crecimiento de cristales de una forma fácil y conveniente. Tanto la caja como los capilares son transparentes, y permitiendo una observación microscópica de calidad de los cristales en crecimiento (figura 2.3). Para la mayoría de las técnicas de observación al microscopio, lo estrecho de la parte interna de la caja GCB coloca fuera de foco cualquier peculiaridad de las paredes de la caja. El sólido diseño de la GCB facilita el manejo experimental de la misma, ya que los experimentos pueden ser fácilmente extraídos del sitio de almacenamiento para realizar observaciones y vueltos a guardar sin riesgo alguno. Además, el transporte de los cristales a instalaciones de radiación sincrotrón puede ser hecho directamente en la GCB.

Técnicas de observación avanzadas, como interferometría o dispersión dinámica de luz, pueden también ser aplicadas a experimentos usando la GCB dentro o fuera de capilares (Zegers et al. 2006). Otro aspecto importante es la capacidad de la GCB como reactor experimental para llevar a cabo ensayos de cristalización en condiciones de microgravedad. La utilización de la GCB como un dispositivo pasivo, ligero y económico para la

cristalización de proteínas fue evaluada en una serie de proyectos que envolvían experimentos en la Estación Espacial Internacional (ISS por sus siglas en inglés) y en capsulas espaciales orbitando la tierra. Los detalles de la realización y diseño de estos experimentos serán descritos en el capítulo cuatro.

BIBLIOGRAFÍA

Ducruix A. and Giegé R. 1992. *Crystallization of nucleic acids and proteins*. Oxford University Press, New York.

Finet S., Bonneté F., Frouin J., Provost K., and Tardieu A. 1998. Lysozyme crystal growth, as observed by small angle X-ray scattering, proceeds without crystallization intermediates. *Eur. Biophys. J.* **27**: 263.

García-Ruiz J.M. 1991. The uses of crystal growth in gels and other diffusing-reacting systems. *Key Engineering Materials* **58**: 87.

García-Ruiz J.M. 2003. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* **368**: 130.

García-Ruiz J.M., Gavira J.A., Otálora F., Guasch A., and Coll M. 1998. Reinforced protein crystals. *Mat. Res. Bull.* **33**: 1593.

García-Ruiz J.M. and Moreno A. 1994. Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method. *Acta Cryst. D* **50**: 484.

García-Ruiz J.M., Moreno A., Viedma C., and Coll M. 1993. Crystal quality of lysozyme single crystals grown by the gel acupuncture method. *Mat. Res. Bull.* **28**: 541.

Henisch H.K. and García-Ruiz J.M. 1986. Crystal growth in gels and Liesegang ring formation: II. Crystallization criteria and successive precipitation. *J. Cryst. Growth* **75**: 203.

McPherson A. 1999. *Crystallization of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Moreno A., Saridakis E., and Chayen N. 2002. Combination of oils and gels for enhancing the growth of protein crystals. *J. Appl. Cryst.* **35**: 140.

Otálora F. and García-Ruiz J.M. 1996. Computer model of the diffusion/reaction interplay in the gel acupuncture method. *J. Cryst. Growth* **169**: 361.

Vidal O., Robert M.C., and Boué F. 1998. Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering: case of agarose gel, a nucleation promotor. *J. Cryst. Growth* **192**: 257.

Zegers I., Carotenuto L., Evrard C., Garcia-Ruiz J., De Gieter P., Gonzalez-Ramirez L., Istasse E., Legros J.-C., Martial J., Minetti C., Otalora F., Queeckers P., Schockaert C., Van de Weerd C., Willaert R., Wyns I., Yourassowsky C., and Dubois F. 2006. Counterdiffusion protein crystallization in microgravityt and its observation with PROMISS (Protein Microscope for the International Space Station). *Microgravity Science and Technology* **XVIII**: 165.

Capítulo 3

Geles

Estudios de compatibilidad

3.0 INVESTIGACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD DE GELES CON AGENTES PRECIPITANTES Y DETERGENTES EN EXPERIMENTOS DE CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

3.1 INTRODUCCIÓN

El interés por los fenómenos de precipitación, cristalina o no, en medios gelificados tuvo un periodo de auge desde finales del siglo XIX y principios del XX. El interés principal en la mayor parte de este periodo se centró en un fenómeno de precipitación periódica llamado anillos de Liesegang. Este nombre le es atribuido por el químico de coloides Liesegang, que llevando a cabo estudios de reacciones en geles, descubrió que al preparar una gelatina conteniendo cromato de potasio y añadir una gota de nitrato de plata, se formaban una serie de bandas concéntricas espaciadas de forma regular correspondientes a la precipitación de cromato de plata. Las características de su precipitación discontinua, formas geométricas y origen químico atrajeron la atención de otros investigadores tanto sobre el proceso de precipitación de este tipo de sistemas, como de la naturaleza de los geles. Por ejemplo, Hatschek en 1911 [citado en (Henisch 1970)] fue el primero en llevar a cabo un estudio sistemático de la distribución del tamaño de partícula en una gran variedad de "anillos de Liesegang". También mostró que algunos de los cristales que obtenía crecían mejor en geles hechos de ácido silícico que en geles de agar o gelatina.

En los años posteriores y hasta la actualidad, los geles han sido utilizados tanto para la cristalización de pequeñas moléculas (compuestos inorgánicos y orgánicos) como para la cristalización de macromoléculas biológicas (Henisch 1970; Robert y Lefauchaux 1988; Robert *et al.* 1999). La característica principal que ha favorecido su utilización en experimentos de cristalización es que son capaces de reducir tanto la convección como la sedimentación durante el proceso de crecimiento cristalino (García-Ruiz *et al.* 2001b), permitiendo así tener un ambiente difusivo para el transporte de masa de moléculas desde el

grueso de la disolución hasta la superficie del cristal en crecimiento; con lo cual, bajo tales condiciones, se pueden obtener cristales de óptima calidad para estudios estructurales.

Por otra parte, la utilización de geles es compatible con la mayoría de las técnicas clásicas de cristalización de macromoléculas biológicas (difusión de vapor, mezcla directa y diálisis), pero también pueden ser usados en una gama amplia de técnicas nuevas tales como la cristalización por el método de contradifusión (García-Ruiz 2003).

Entre los geles más frecuentemente utilizados en ensayos de cristalización de moléculas biológicas se pueden mencionar a la agarosa y los geles de sílice como el tetrametilortosilicato (TMOS) y el silicato de sodio (Henisch 1988; Robert y Lefaucheu 1988; García-Ruiz 1991; Cudney *et al.* 1994), aunque recientemente también se han reportado trabajos de cristalización utilizando geles de poliacrilamida (García-Ruiz *et al.* 2001a).

Como se ha descrito en capítulo anterior, a través de la ecuación del número de Grashof, los geles ofrecen la posibilidad de llevar a cabo la cristalización de macromoléculas biológicas en un ambiente donde los fenómenos de convección y sedimentación se ven reducidos e incluso, eliminados. Esto se traduce en un aumento de la calidad cristalina ya que, por un lado, las moléculas de proteínas disponen del tiempo suficiente para incorporarse a la superficie del cristal y por otro, el cristal crece estático en el sitio donde se ha iniciado la nucleación, con lo cual la zona de depleción alrededor del cristal en crecimiento no se ve alterada (Chernov *et al.* 2001; Otálora *et al.* 2001). También se ha determinado que la calidad de cristales de proteínas obtenidos mediante la técnica de contradifusión en geles en ambientes terrestres es similar a la calidad de cristales obtenidos en microgravedad utilizando la misma técnica. Esto es debido por un lado a las características intrínsecas de la técnica y, por otro, al efecto de los geles de mimetizar las condiciones de transporte de masa que se tienen en condiciones extraterrestres.

La cristalización de proteínas es un proceso que está sujeto a múltiples parámetros, tanto extrínsecos a la macromolécula a ser cristalizada como intrínsecos a la misma. Entre los primeros se pueden mencionar a la temperatura, el pH, el tipo y concentración de los agentes precipitantes y aditivos utilizados, etc. Por otra parte, la heterogeneidad de la conformación estructural es un parámetro importante que forma parte de los parámetros intrínsecos. Actualmente, la estrategia general para tratar de obtener cristales de una proteína específica

consiste en probar tantas condiciones de cristalización como sea posible para incrementar las probabilidades de encontrar alguna en la cual crezcan cristales. Los kits de cristalización disponibles de forma comercial ofrecen esta posibilidad, al estar compuestos por mezclas de agentes precipitantes como sales, polímeros, aditivos, etc., las cuales están tamponadas a diferentes valores de pH. Considerando las ventajas que el uso de los geles puede dar a los ensayos para cristalizar macromoléculas biológicas para la obtención de cristales de mejor calidad y la posibilidad de utilizar diferentes técnicas y kits, se planteó el objetivo de estudiar la compatibilidad de diferentes tipos de geles en presencia de los agentes precipitantes más comúnmente empleados en los kits comerciales. Un caso especial es la cristalización de proteínas de membrana, cuya cristalización es mucho más complicada que las proteínas solubles, ya que en el medio en el cual han sido purificadas, debe mimetizar el ambiente hidrofóbico de la membrana de una célula. Para poder trabajar con este tipo de proteínas en soluciones acuosas, es necesario el uso de detergentes para hacerlas solubles. A partir de esta consideración, se incluyeron diversos detergentes en el estudio de la compatibilidad antes mencionada y que es el objeto de estudio de este trabajo. Al ser el pH un parámetro de importancia primordial en los ensayos de cristalización de macromoléculas biológicas, también se estudió el efecto que sobre el pH que podrían ejercer la presencia de distintos geles en condiciones de cristalización.

3.1.1 Agarosa

La agarosa es un polisacárido de carga neta neutral; y más específicamente, es la fracción gelificante del agar y está compuesta por unidades repetidas (agarobiosa) de grupos alternados de β -D-galactopiranosil y 3,6-anhidro- α -galactopiranosil. La apariencia física de la agarosa es un polvo que es soluble en agua por encima de una temperatura crítica, la cual depende del tipo de agarosa. Cuando la temperatura crítica de solubilidad se hace disminuir, la agarosa forma lo que se conoce como un gel físico. La temperatura a la cual se da este fenómeno se denomina temperatura de gelificación (T_g), cuyo valor es intrínseco a la composición exacta de cada tipo de agarosa en particular (Letherby y Young 1981; Vidal *et al.* 1998). Los geles de agarosa también son utilizados en procedimientos de purificación de proteínas y/o caracterización bioquímica de estas macromoléculas a través de técnicas como

electroforesis y cromatografía en columna (Laemmli 1970; Hames 1996; García-Ruiz *et al.* 2001a).

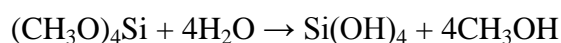
El proceso de formación del gel de agarosa generalmente se inicia a través de una transición de las fibras del polímero desde espirales aisladas a hélices dobles para terminar con la agregación de éstas y la formación de la malla tridimensional característica del gel. Las hélices dobles de las fibras de la agarosa no son solubles, por lo tanto su agregación se da inmediatamente cuando se alcanza la temperatura de transición sol-gel (Piculell y Svante 1989). La estructura del gel se mantiene mediante áreas entrecruzadas que involucran uniones cooperativas no covalentes entre las cadenas con una conformación ordenada. Una característica importante de este tipo de gel de agarosa es que sus cavidades (poros) están llenas con moléculas de agua que al mismo tiempo participan en la formación de los enlaces de hidrógeno necesarios para la estabilidad de la doble hélice (Arnott *et al.* 1974). Los diversos aditivos que son incorporados en la preparación del gel pueden tener influencia sobre la disponibilidad de las moléculas de agua necesarias para la formación del gel.

3.1.2 Geles de sílice

Los geles de sílice se obtienen a partir de la policondensación del ácido silícico, la cual ocurre tanto por neutralización de silicato de sodio:



O por hidrólisis de diferentes siloxanos, tales como TMOS o tetraetilortosilicato (TEOS):



Los geles de sílice se han utilizado para la cristalización tanto de compuestos inorgánicos como orgánicos, así como también para la cristalización de macromoléculas biológicas (Dennis y Henisch 1967; Cudney *et al.* 1994; Robert *et al.* 1999). También se ha demostrado la posibilidad de obtener cristales de proteína "reforzados" con excelentes

propiedades mecánicas y buena estabilidad a concentraciones altas de gel de sílice (2-22%) (García-Ruiz *et al.* 1998).

3.1.3 Geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización de monómeros de acrilamida en cadenas largas y un subsecuente entrecruzamiento de éstas a través de moléculas bifuncionales, tales como la N,N'-metilen-bis-acrilamida (abreviado generalmente como bis-acrilamida), las cuales reaccionan con grupos funcionales libres localizados en la cadena terminal. Este tipo de geles han sido ampliamente usados para electroforesis de proteínas, debido ya que son químicamente inertes, son estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica (Hames 1996). Se han hecho investigaciones sobre la utilización de geles de acrilamida de ensayos electroforéticos para llevar a cabo una búsqueda preliminar de condiciones de cristalización para proteínas recién purificadas (García-Ruiz *et al.* 2001a).

3.1.4 Proteínas de membrana

Un caso particular es la cristalización de proteínas de membrana, las cuales requieren la presencia de aditivos adicionales tales como detergentes. Cristales grandes de proteínas de membrana integrales se han podido obtener a partir de soluciones micelares monodispersas de estas proteínas solubilizadas en presencia de detergentes (Garavito y Picot 1990; Caffrey 2003). La selección del o los detergentes para purificar y/o cristalizar este tipo de proteínas es muy importante (Garavito y Picot 1991), ya que una proteína de membrana primero debe ser extraída de la membrana celular y subsecuentemente solubilizada como paso previo a los ensayos de cristalización. Por lo tanto, el proceso de purificación representa una etapa crucial para la cristalización; ya que no se trata solamente de obtener una proteína bastante pura sino también debe reducir la heterogeneidad molecular. Una vez que la proteína se ha preparado en un sistema adecuado, que contenga uno o más detergentes y que permita que la macromolécula permanezca estable y soluble, se puede emplear cualquier técnica clásica de cristalización para obtener cristales. Recientemente se han publicado estudios de cristalización de este tipo de proteínas en medios gelificados (Smatanová *et al.* 2006).

3.2 OBJETIVOS

En general, los geles comúnmente empleados en experimentos de cristalización de proteínas muestran un comportamiento inerte hacia estas macromoléculas biológicas. Sin embargo, este no es el caso para agentes precipitantes, reguladores de pH y detergentes, donde las interacciones que se puedan establecer con los geles pueden dar lugar a importantes efectos sobre el proceso de gelificación. Muchos otros parámetros físico-químicos, tales como el pH, la fuerza iónica, etc., pueden tener también un efecto en la formación de la malla sólida de los geles.

El objetivo de este trabajo es estudiar la compatibilidad de diversos agentes precipitantes, reguladores de pH y detergentes con compuestos que pueden formar un gel, bajo diferentes condiciones físico-químicas como por ejemplo en un intervalo amplio de pH. Este estudio incluye dos tipos de agarosa de diferentes temperaturas de gelificación. Una que se le llamó agarosa de temperatura de gelificación corporal (BGT por sus siglas en inglés, 36 °C) y otra agarosa con baja temperatura de gelificación (LGT por sus siglas en inglés, 24 °C), geles de sílice y de poliacrilamida. El planteamiento general fue que los resultados nos aportaran información práctica sobre la viabilidad de emplear geles en experimentos de cristalización de proteínas dependiendo de las propiedades químicas de las soluciones utilizadas, así como condiciones de cristalización y aplicado tanto a proteínas solubles como a proteínas de membrana.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Formación de geles a diferentes valores de pH.

En esta parte del trabajo se estudió la capacidad de GDT y LGT agarosa, TMOS y acrilamida para formar un gel a diferentes valores de pH. Una consideración importante previa a este experimento fue que el pH no debería cambiar cuando se mezclan los tampones con cada uno de los reguladores utilizados. Por esta razón se midió el pH de los tampones antes y después de la gelificación.

La tabla 3.1 muestra claramente que no hubo variación significativa de los valores de pH de los tampones originales y de las mezclas tampón/gel. Solamente en el caso del TMOS a alta concentración (10%) se observó una disminución pequeña del pH nominal de valores mayores de ocho. Esta ligera disminución debe tomarse en cuenta cuando se lleven a cabo experimentos de cristalización de proteínas debido a la sensibilidad de éstas con respecto al pH (McPherson 1999).

Tabla 3.1 Comparación de los valores iniciales de pH de los tampones y de las mezclas tampón/gel

pH teórico	pH experimental						
	tampón (0.05 M)	agarosa BGT (0.5%)	agarosa LGT (0.5%)	TMOS (2%)	TMOS (5%)	TMOS (10%)	Acrilamida* (12.5%)
4.0	4.0	4.1	4.1	4.1	4.1	4.2	4.1
4.5	4.5	4.4	4.5	4.6	4.6	4.6	4.6
5.0	5.0	5.0	4.9	5.1	5.1	5.1	5.3
5.5	5.5	5.5	5.4	5.6	5.6	5.6	5.5
6.0	6.0	6.0	5.9	6.0	6.0	5.9	6.2
6.5	6.5	6.5	6.4	6.5	6.5	6.4	6.5
7.0	7.0	6.9	6.9	7.0	7.0	6.8	7.2
7.5	7.5	7.5	7.4	7.5	7.5	7.4	7.6
8.0	7.9	7.9	7.9	7.8	7.9	7.5	8.0
8.5	8.4	8.3	8.4	8.3	8.2	7.9	8.5
9.0	8.9	8.8	8.8	8.8	8.7	8.3	8.9

* En los experimentos con acrilamida, la concentración final del tampón fue de 0.1 M

El tiempo de gelificación de los diferentes geles estudiados fue analizado en un intervalo de pH de 4 a 9 ya que es el intervalo típico para experimentos de cristalización de proteínas; esto se basa en que entre estos valores de pH se mantiene una cierta estabilidad de la macromolécula.

Se observó que los dos tipos de agarosa y el gel de poliacrilamida formaron un gel en todo el intervalo de pH estudiado. El tiempo de gelificación de ambas agarosas, aproximadamente 10 minutos, fue constante y parece ser independiente del pH. Esto se puede

explicar en base al hecho de que la agarosa es un polímero neutro (Stanley 1995), y por lo tanto, un cambio en el pH de la disolución no afectaría la carga neta del polímero.

Sin embargo, en el caso del gel de poli(acrilamida), el tiempo de gelificación varió con respecto al pH, siendo éste de 10 minutos en el intervalo de 6 a 9, 20 minutos a pH 5 y 120 minutos a pH 4 (Figura 3.1). Es interesante resaltar que por debajo de pH 5 el tiempo de gelificación de la acrilamida se incrementa considerablemente, lo cual podría ser debido a la utilización de la N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED) como iniciador de la reacción para la formación del gel. En este valor de pH, el TEMED en forma de base libre es utilizado como catalizador en la formación de los radicales libres del persulfato de amonio, los cuales a su vez catalizan la polimerización (Hames 1996). Sin embargo, en condiciones muy ácidas el TEMED podría estar protonado e inhibir así la reacción de polimerización y, por lo tanto, dando como resultado un incremento en el tiempo de gelificación (Chrambach y Rodbard 1971; Righetti 1995; Righetti y Gelfi 1996).

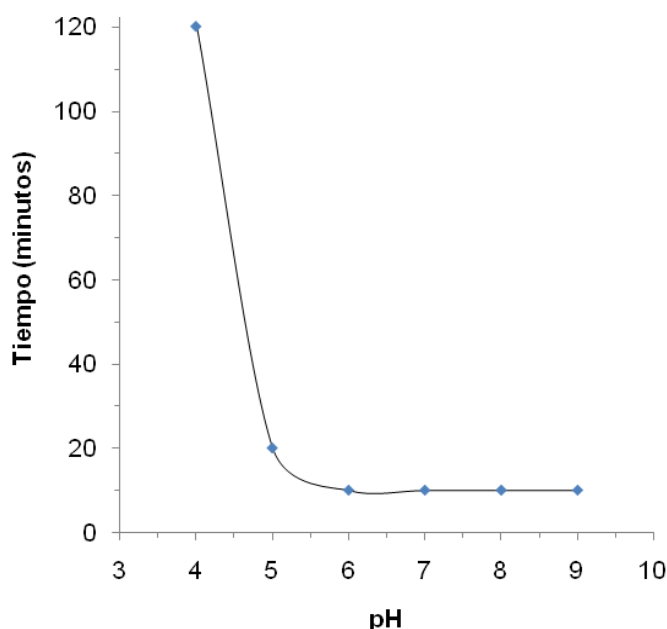


Figura 3.1 Tiempo de gelificación de acrilamida en función del pH.

En el caso del TMOS, en diversos trabajos de investigación, se muestra como el tiempo de gelificación depende de varios parámetros tales como la concentración del precursor, del tipo y concentración de las especies en disolución, del pH y temperatura (Batchelor 1938; Plank 1947). En base a esto, en este estudio se determinó el tiempo de gelificación de TMOS en función del pH a tres concentraciones diferentes y a temperatura constante (20 ± 2 °C).

Como era previsto, el tiempo de gelificación de este precursor varía con el pH y su concentración en disolución. De la figura 3.2 se puede observar que entre más alta es la concentración de TMOS, menor es el tiempo de gelificación, alcanzando un mínimo (gelificación instantánea) en el intervalo de pH de 6 a 7 (0-5 minutos); sin embargo este tiempo se incrementa exponencialmente fuera de este intervalo, y especialmente a baja concentración de TMOS, alcanzando un máximo de 50 horas a pH 8 y 2% de TMOS.

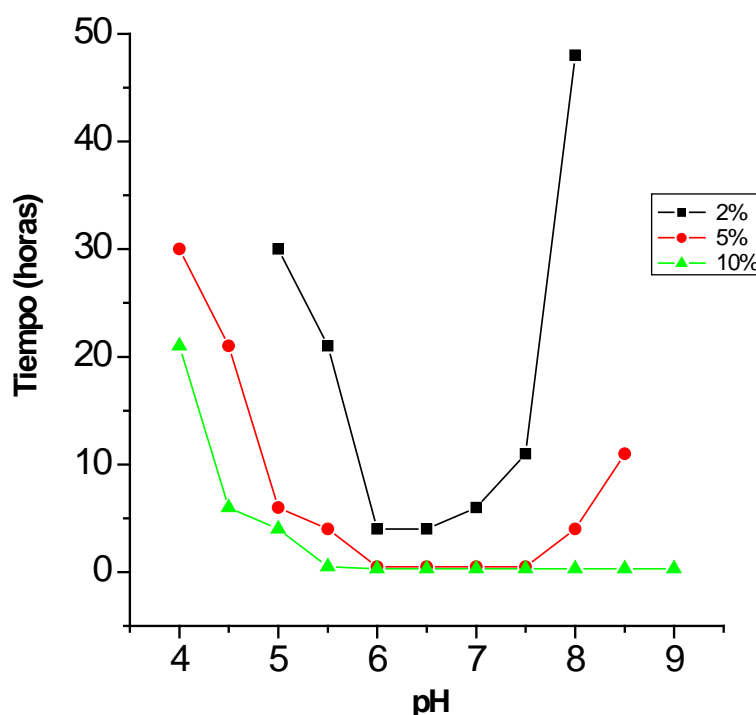


Figura 3.2 Tiempo de gelificación de TMOS en función de su concentración y del pH.

Los resultados obtenidos para el caso del gel de TMOS concuerdan cualitativamente con aquellos publicados por otros autores, los cuales muestran que la velocidad de gelificación presenta un máximo alrededor de pH neutro, donde deben existir concentraciones significativas de grupos silanol tanto en forma protonada como desprotonada (Batchelor 1938; Plank 1947; Iler 1979; Arend y Connelly 1982; Brinker 1988). El tiempo de gelificación de los geles de sílice es muy sensible al pH y está relacionado al carácter iónico de la reacción de condensación (Plank 1947; Henisch 1970; Iler 1979) y a la naturaleza de las especies del polímero y del monómero existentes en la disolución (Brinker *et al.* 1982; Brinker 1988; Margaca *et al.* 1999). Ya sea que en el proceso de gelificación estén involucrados ácidos polisilícicos o partículas grandes de sílice coloidal, el efecto del pH está generalmente relacionado a la estabilidad de los soles de sílice. El estado sol-gel tiene una estabilidad temporal máxima y tiempos de gelificación altos alrededor de pH 1.5-3 y una estabilidad mínima con una reacción de gelificación rápida alrededor de pH 5-6. Por arriba de pH 7, no se forma un gel debido a que las partículas están cargadas y existe una repulsión electrostática, en cuyo caso solamente se da el crecimiento de partículas coloidales sin poder formar la malla tridimensional propia del gel (Iler 1979).

Los resultados obtenidos experimentalmente para el TMOS podrían ser extrapolados para el caso de TEOS. Cuando se obtienen geles de sílice ya sea a partir de TMOS o TEOS la reacción involucra hidrólisis y condensación de los silicatos para formar los geles con la liberación de metanol y etanol como subproductos, respectivamente (Brinker *et al.* 1984; Robert y Lefaucheux 1988). Por lo tanto, la única diferencia relevante a experimentos encaminados a la cristalización de proteínas sería el pequeño cambio de la constante dieléctrica de la disolución que podría provocar un descenso en la solubilidad de la proteína, siendo este cambio mayor para el caso del TMOS (constante dieléctrica del metanol igual a 33) con respecto al TEOS (constante dieléctrica del metanol igual a 24).

3.3.2 Formación de geles en presencia de agentes precipitantes

En esta parte del trabajo se estudió la formación de geles a partir de agarosa BGT y LGT, TMOS y acrilamida en presencia de diversos agentes precipitantes incluido en el kit comercial de condiciones de cristalización "Crystal Screen 1" de la compañía Hampton

Research. Los resultados se presentan en las tablas 3.2 y 3.3. Considerando que en cada una de las condiciones del kit la concentración de otros aditivos tales como sales y reguladores de pH es baja (≤ 0.2 M), el efecto sobre el proceso de gelificación de los diferentes compuestos precursores se ha enfocado principalmente a las altas concentraciones de los agentes precipitantes incluidos tales como diversas sales, polímeros como polietilenglicoles y diferentes alcoholes.

En general, de los resultados obtenidos se observa que ambos tipos de agarosa estudiados presentan un comportamiento similar con respecto a su capacidad de formar un gel en presencia de los diferentes agentes (tablas 3.2 y 3.3). Ambos tipos de agarosas formaron un gel en el 50% (BGT) y el 56% (LGT) de las condiciones del kit. Por otra parte, el TMOS parece ser ligeramente más compatible ya que formó un gel en el 62% de los casos. La acrilamida formó un gel en todas las condiciones, no obstante con algunas de las condiciones el gel fue opaco (color blanco), laxo y con demasiada histéresis (líquido remanente después de completarse el proceso de gelificación).

Tabla 3.2 Condiciones del kit "Crystal Screen 1" en las cuales las agarosas BGT y LGT, el TMOS y la acrilamida formaron un gel (√) y aquellas donde no se observó la formación del gel (x).

Agente precipitante	agarosa BGT	agarosa LGT	TMOS	acrilamida
30% v/v (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol, pH 4.6	√	√	x	√
0.4 M Tartrato de sodio potasio tetrahidrato	√	√	√	√
0.4 M Fosfato de amonio monobásico	√	√	x	√
2.0 M Sulfato de amonio, pH 8.5	x	x	x	√
30% v/v (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol, pH 7.5	√	√	√	√
30% w/v PEG 4000, pH 8.5	x	x	√	√
1.4 M Acetato de sodio trihidrato, pH 6.5	√	√	√	√
30% v/v 2-Propanol, pH 6.5	√	√	√	√
30% w/v PEG 4000, pH 5.6	x	x	x	√
30% w/v PEG 4000, pH 4.6	x	x	x	√
1.0 M Fosfato de amonio monobásico, pH 5.6	√	√	√	√
30% v/v 2-Propanol, pH 7.5	√	√	√	√
30% v/v PEG 400, pH 8.5	√	√	√	√
28% v/v PEG 400, pH 7.5	√	√	√	√
30% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	x	√
1.5 M Sulfato de litio monohidrato, pH 7.5	x	x	√	√
30% w/v PEG 4000, pH 8.5	x	x	√	√
20% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	x	√
30% v/v 2-Propanol, pH 8.5	√	√	√	√
25% w/v PEG 4000, pH 4.6	x	x	x	√
30% v/v (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol, pH 6.5	√	√	√	√
30% w/v PEG 4000, pH 8.5	x	x	√	√
30% v/v PEG 400, pH 7.5	√	√	√	√
20% v/v 2-Propanol, pH 4.6	√	√	x	√
1.0 M Acetato de sodio trihidrato, pH 6.5	√	√	√	√

Tabla 3.3 Condiciones del kit "Crystal Screen 1" en las cuales las agarosas BGT y LGT, el TMOS y la acrilamida formaron un gel (√) y aquellas donde no se observó la formación del gel (x).

Agente precipitante	agarosa BGT	agarosa LGT	TMOS	Acrilamida
30% v/v (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol, pH 5.6	√	√	√	√
20% v/v 2-Propanol, pH 7.5	√	√	√	√
30% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	√	√
0.8 M Tartrato de Na/K tetrahidrato, pH 7.5	√	√	√	√
30% w/v PEG 8000	x	x	x	√
30% w/v PEG 4000	x	x	x	√
2.0 M Sulfato de amonio	x	x	√	√
4.0 M Formato de sodio	√	√	√	√
2.0 M Formato de sodio, pH 4.6	√	√	√	√
0.8 M Fosfato de sodio monobásico	√	√	√	√
0.8 M Fosfato de potasio monobásico, pH 7.5	√	√	√	√
8% w/v PEG 8000, pH 8.5	x	√	√	√
8% w/v PEG 4000, pH 4.6	√	√	x	√
1.4 M Citrato de sodio tribásico, pH 7.5	x	x	√	√
2% v/v PEG 400	x	x	x	√
2.0 M Sulfato de amonio, pH 7.5	x	x	x	√
20% v/v 2-Propanol	x	x	x	√
20% w/v PEG 4000, pH 5.6	x	x	x	√
10% v/v 2-Propanol	x	x	√	√
20% w/v PEG 4000, pH 7.5	x	x	√	√
20% w/v PEG 8000	x	x	x	√
30% w/v PEG 1500	x	√	x	√
0.2 M Formato de magnesio dihidrato	√	√	√	√
18% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	√	√
18% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	x	√
2.0 M Sulfato de amonio, pH 4.6	x	x	√	√
2.0 M Fosfato de amonio monobásico, pH 8.5	√	√	√	√
2% w/v PEG 8000	√	√	x	√
15% w/v PEG 8000	x	√	x	√

La naturaleza química del agente precipitante en conjunción con el tipo del precursor del gel y sus interacciones relativas pueden tener un gran efecto sobre el resultado exitoso del proceso de gelificación. Este fue el caso para los polietilenglicoles, los cuales son la base de un número grande de condiciones de cristalización. Según los resultados obtenidos, ambas agarosas (BGT y LGT) gelificaron en presencia de PEG 400 hasta una concentración de 30% de este precipitante y con PEG 4000 hasta una concentración de 8%, pero no formaron un gel a concentraciones por arriba del 25% de PEG 4000 y 18% de PEG 8000. Estos resultados pueden ser explicados por el efecto que se tiene al adicionar polímeros neutros a soluciones coloidales, lo cual induce un efecto de atracción por depleción (Tardieu *et al.* 2002). En soluciones que contienen macromoléculas y/o algún otro polímero, los polietilenglicoles ejercen un efecto de exclusión de volumen que induce agregación de moléculas. Adicionalmente, las moléculas de polietilenglicol están en competición con otras sales por las moléculas de agua y por ello provocan un efecto de deshidratación e igualmente compiten con los solventes orgánicos, lo que modifica las propiedades dieléctricas del medio (McPherson 1985). Por lo tanto, en las condiciones que contienen PEG y en donde la agarosa no gelificó, es probable que exista una concentración crítica por arriba de la cual las fibras de agarosa no pueden adoptar la conformación correcta. Esto podría deberse a que las moléculas de PEG estarían compitiendo por las moléculas de agua del sistema y que son a su vez fundamentales para la formación y estabilidad de las hélices dobles de agarosa (Arnott *et al.* 1974). Así, la concentración necesaria de PEG para inhibir la formación del gel depende del peso molecular del polímero; entre más alto el peso molecular, menor es la concentración del polímero que se requiere para inhibir el proceso de gelificación.

Sin embargo, se observaron algunas diferencias en la gelificación de las dos agarosas. Mientras que la agarosa BGT no gelificó cuando en el medio había más de 8% de PEG 8000, lo mismo ocurrió para el caso de agarosa LGT pero solo por encima del 18% de PEG 8000. Esto podría deberse a la mayor sensibilidad de la agarosa BGT con respecto a las moléculas de agua presentes en el medio en comparación con la agarosa LGT. En el caso de esta última, la mayoría de los grupos hidroxilo de las cadenas del polímero han sido transformados a grupos metoxi, mientras que, la agarosa BGT contiene una alta proporción de grupos hidroxilo que forman puentes de hidrógeno con el agua presente en el medio y por lo tanto una perturbación de estas interacciones tiene un efecto marcado sobre el proceso de gelificación.

Por otra parte, la presencia de sales inorgánicas y otros solutos en disolución también presentan una influencia en la formación, estabilidad y estructura del gel de agarosa pudiendo tener un efecto estabilizante o desestabilizante (Piculell y Svante 1989). Concentraciones altas de sales pueden modificar significativamente la estructura del gel y el estado de transición conformacional que se requiere para la formación del mismo, ya sea modificando la temperatura de gelificación o disolviendo las fibras de agarosa. Nuestros resultados indican que la presencia de altas concentraciones de sal no afectan la gelificación de agarosa, como se observa para el caso del tartrato de sodio (0.8 M), tartrato de potasio (0.8 M), fosfato de amonio (2 M), acetato de sodio (1 M), fosfato de amonio (2 M), formato de sodio (4 M), fosfato de sodio (0.8 M), fosfato de potasio (0.8 M) y formato de magnesio (0.2 M). Solamente tres de las sales inorgánicas presentes en el kit estudiado inhibieron la formación del gel de agarosa, principalmente por precipitación de las fibras de este polímero (sulfato de amonio, sulfato de litio y citrato de sodio). Este resultado es consistente con experiencias previas publicadas que reportan la precipitación de agarosa en presencia de sulfato de amonio por el llamado efecto de "salting out" (precipitación salinidad) (Letherby y Young 1981).

En cambio, se conoce que otro tipo de sales inorgánicas son capaces de estabilizar la formación de geles de agarosa (Piculell y Svante 1989). Aunque el kit de cristalización de Hampton Research 1 no contiene cloruro de sodio en ninguna de sus condiciones, realizamos investigaciones adicionales utilizando soluciones tamponadas con concentraciones altas de esta sal para evaluar el efecto sobre la gelificación de la agarosa y los resultados indican que su presencia no inhibe la formación del gel.

Es importante enfatizar que, una vez que el gel se ha formado, éste es inerte con respecto a la presencia de sales y/o polímeros. Esta observación adquiere especial relevancia en el caso de la cristalización de macromoléculas por la técnica de contradifusión, ya que significa que es posible diseñar y llevar a cabo experimentos de este tipo mezclando primeramente la agarosa con un regulador de pH para preparar el gel y posteriormente difundir el agente precipitante sin ninguna incompatibilidad asociada al proceso.

En resumen de esta parte del trabajo, se pudo observar que la capacidad para formar un gel rígido por parte de ambos tipos de agarosas es más sensitiva a la presencia de polímeros tales como los polietilenglicoles que a la presencia de sales inorgánicas. Otros aditivos, tales como los alcoholes a alta concentración incluso, 30% de metil-pentanodiol o

30% de iso-propanol, no afectan la gelificación ya que con ambos compuesto se obtuvo un gel sólido.

3.3.3 Formación de geles en presencia de detergentes

Para llevar a cabo el estudio de la influencia de detergentes en la formación de geles de agarosa BGT y LGT, TMOS, silicato de sodio y acrilamida, se partió de los detergentes incluidos en el kit "Detergent screen 1" de Hampton Research, los cuales fueron diluidos 10 veces de su concentración inicial para alcanzar la concentración micelar crítica (1x CMC) de cada uno de ellos y analizar su compatibilidad con los diferentes tipos de precursores. Nuestros resultados muestran que el proceso de gelificación de los diferentes precursores estudiados es totalmente compatible con todos los detergentes presentes en el kit a una concentración 1x la CMC de cada uno de ellos.

La compatibilidad total de la formación de gel de los diferentes precursores con todos los detergentes estudiados se puede explicar en base al proceso mediante el cual los geles se forman, así como a las interacciones implicadas y la naturaleza química de los detergentes. Estas interacciones involucran enlaces por puentes de hidrógeno así como enlaces de tipo covalente.

En el caso de los geles físicos como la agarosa, la transición sol-gel se obtiene por un descenso de la temperatura. La presencia en las fibras de agarosa de átomos de oxígeno y de grupos hidroxilo hace posible la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua presentes en el medio y estas interacciones son a su vez importantes para los formación de las uniones por entrecruzamiento de las fibras en la estructura final del gel (Arnott *et al.* 1974; Robert *et al.* 1999). En el caso de los geles químicos como los geles de acrilamida, la formación del gel implica uniones covalentes claramente definidas. A su vez, la formación de geles de sílice (silicato de sodio o TMOS), aunque se obtienen como resultado de una reacción química, se pueden considerar como un caso intermedio entre geles físicos y químicos. Ya que los detergentes forman micelas en medios acuosos, solamente podrían interactuar con áreas hidrofóbicas y/o apolares. Por lo tanto, los detergentes no deberían tener un efecto negativo en la formación de las uniones electrostáticas y/o covalentes necesarias para generar la estructura tridimensional durante el proceso de gelificación.

La compatibilidad entre los detergentes y geles estudiados en esta parte del trabajo tiene implicaciones significativas puesto que pueden ser utilizados de manera rutinaria en ensayos de cristalización de proteínas de membrana. Ciertamente, los detergentes son frecuentemente utilizados en experimentos de cristalización debido al hecho de que éstos son necesarios para la solubilización y estabilización de este tipo de macromoléculas en disolución (Caffrey 2003). Además, la concentración de detergente que se recomienda para hacer solubles estas proteínas (0.1-1.0%) (Garavito y Picot 1991) es lo suficientemente baja como para generar algún efecto importante sobre la formación de los geles estudiados.

También se llevaron a cabo experimentos adicionales con el objeto de analizar la influencia de la concentración de detergentes sobre la gelificación mayor que la correspondiente a sus CMC.

De la tabla 3.4 es evidente que ambas agarosas pueden gelificar con todos los detergentes estudiados a una concentración de 5 veces su CMC. En el caso de los geles de sílice, silicato de sodio y TMOS, la formación de floculados y/o precipitados en lugar de un gel denotó una incompatibilidad con cierto tipo de detergentes. De acuerdo con el proveedor del kit de los detergentes, la concentración que se recomienda para trabajar con proteínas de membrana es de 1-3x la CMC. Según los resultados de este trabajo, no obstante, en la mayoría de los casos se puede trabajar con una concentración de hasta 5x de la CMC sin ninguna incompatibilidad con el proceso de gelificación.

Tabla 3.4 Gelificación de agarosa (BGT y LGT), TMOS y silicato de sodio con los detergentes del kit "Detergent Screen 1" de Hampton Research, a una concentración para cada uno de ellos igual a 5 veces la CMC. Se especifican las condiciones en las cuales se formó un gel (√) y aquellas donde no se formó (×).

Detergente	5x CMC (mM)	agarosa BGT	agarosa LGT	TMOS	Silicato de sodio
C12E9	0.25	√	√	√	√
C12E8	0.55	√	√	√	√
n-Dodecyl-b-D-maltoside	0.85	√	√	√	√
Sucrose monolaurate	1.15	√	√	√	√
CYMAL®-6	2.80	√	√	√	√
TRITON® X-100	4.50	√	√	√	x
CTAB	5,00	√	√	√	√
Big CHAP, Deoxy	7.20	√	√	√	√
n-Decyl-b-D-maltoside	9.00	√	√	√	√
LDAO	10.00	√	√	√	x
CYMAL®-5	25.00	√	√	√	√
ZWITTERGENT® 3-12	20.00	√	√	√	x
n-Nonyl-b-D-glucoside	32.50	√	√	√	√
n-Octyl-b-D-thioglucoside	45.00	√	√	√	√
DDAO	52.00	√	√	x	x
HECAMEG®	97.50	√	√	√	√
n-Octanoylsucrose	122.00	√	√	√	√
n-Heptyl-b-D-thioglucopyranoside	150.00	√	√	√	√
n-Octyl-b-D-glucoside	100.00	√	√	√	√
CYMAL®-3	172.50	√	√	√	√
C-HEGA®-10	175.00	√	√	√	√
ZWITTERGENT® 3-10	200.00	√	√	x	x
MEGA®-8	395.00	√	√	√	√
n-Hexyl-b-D-glucopyranoside	1000.00	√	√	√	√

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados derivados de este trabajo ofrecen información práctica importante para el diseño de experimentos de cristalización, en particular, en relación a la compatibilidad entre el tipo de gel utilizado y otros factores que influyen en la cristalización tales como la presencia de aditivos (sales, agentes precipitantes, etc.) o el pH (diferentes reguladores).

Se investigó la capacidad de diferentes precursores (2 tipos de agarosa, BGT y LGT, TMOS y acrilamida) para formar un gel en función del pH. Los dos tipos de agarosa y la acrilamida forman un gel en todo el intervalo de pH analizado (4 a 9). Para el caso del TMOS se estudió el tiempo de gelificación en función del pH a 3 concentraciones diferentes (2%, 5% y 10%) a temperatura constante (20 ± 2 °C) y los resultados indican que éste depende de ambos, tanto de la concentración de TMOS en disolución y del valor del pH.

Asimismo, se estudió la gelificación de BGT y LGT agarosa, TMOS y acrilamida en presencia de diferentes agentes precipitantes. La capacidad para formar un gel rígido por parte de ambos tipos de agarosa fue más sensible a la presencia de polímeros tales como los polietilenglicoles que a la presencia de sales inorgánicas. Los polietilenglicoles a altas concentraciones actúan como fuertes inhibidores de la formación del gel. Siendo que entre más alto el peso molecular de éstos menor es la concentración necesaria para inhibir la gelificación. Por otra parte, la presencia de concentraciones altas de sales y alcoholes no afecta la gelificación de la agarosa.

Se ha probado la compatibilidad de los geles de agarosa (BGT y LGT), TMOS, silicato de sodio y acrilamida con diferentes detergentes a una concentración igual a 1x y 5 la CMC. Los geles estudiados fueron totalmente compatibles con todos los detergentes a la concentración de sus CMC. La agarosa también gelificó con todos los detergentes con una concentración 5x la CMC. Los geles de sílice, TMOS y silicato de sodio, mostraron incompatibilidad con ciertos detergentes observándose la formación de floculados y/o precipitados. Una conclusión importante en este apartado es la posibilidad de utilizar los geles en ensayos de cristalización de proteínas de membrana. Los resultados indican notablemente que es viable el llevar a cabo experimentos de cristalización de proteínas de membrana en conjunción con virtualmente cualquier tipo de gel ya que los geles y detergentes analizados en este estudio fueron totalmente compatibles en cuanto a la formación del gel.

BIBLIOGRAFÍA

Arend H. and Connelly J.J. 1982. Tetramethoxysilane as gel forming agent in crystal growth. *J. Cryst. Growth* **56**: 642.

Arnott S., Fulmer A., and Scott W.E. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.* **90**: 269.

Batchelor H.W. 1938. Studies on silica jellies. I: Gelation time and change in pH value as functions of concentration, initial pH value, and temperature. *J. Phys. Chem.* **42**: 575.

Brinker C.J. 1988. Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure. *J. Non-Cryst. Solids* **100**: 31.

Brinker C.J., Keefer K.D., Schaefer D.W., and Ashley C.S. 1982. Sol-gel transition in simple silicates. *J. Non-Cryst. Solids* **48**: 47.

Brinker C.J., Keefer K.D., Schaefer D.W., Assink R.A., Kay B.D., and Ashley C.S. 1984. Sol-gel transition in simple silicates II. *J. Non-Cryst. Solids* **63**: 45.

Caffrey M. 2003. Membrane protein crystallization. *Journal of Structural Biology* **142**: 108.

Cudney B., Patel S., and McPherson A. 1994. Crystallization of macromolecules in silica gels. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **50**: 479.

Chernov A.A., Garcia-Ruiz J.M., and Thomas B.R. 2001. Visualization of the impurity depletion zone surrounding apoferritin crystals growing in gel with holoferritin dimer impurity. *J. Cryst. Growth* **232**: 184.

Chrambach A. and Rodbard D. 1971. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science* **172**: 440.

Dennis J. and Henisch H.K. 1967. Nucleation and growth of crystals in gels. *J. Electrochemical Society* **114**: 263.

Garavito R.M. and Picot D. 1990. The art of crystallizing membrane proteins. *Methods* **1**: 57.

Garavito R.M. and Picot D. 1991. Crystallization of membrane proteins: a minireview. *J. Cryst. Growth* **110**: 89.

García-Ruiz J.M. 1991. The uses of crystal growth in gels and other diffusing-reacting systems. *Key Eng. Mater.* **58**: 87.

García-Ruiz J.M. 2003. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* **368**: 130.

García-Ruiz J.M., Gavira J.A., Otálora F., Guasch A., and Coll M. 1998. Reinforced protein crystals. *Mat. Res. Bull.* **33**: 1593.

García-Ruiz J.M., Hernández-Hernández M.A., López-Jaramillo J., and Thomas B. 2001a. Crystallization screening directly in electrophoresis gels. *J. Cryst. Growth* **232**: 596.

García-Ruiz J.M., Novella M.L., Moreno R., and Gavira J.A. 2001b. Agarose as crystallization media for proteins I: Transport processes. *J. Cryst. Growth* **232**: 165.

Hames B.D. 1996. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, 2nd ed (ed. B.D. Hames and D. Rickwood), p. 1. Oxford University Press, New York.

Henisch H.K. 1970. *Crystal growth in gels*. 2nd ed. Dover Publications, Inc., New York.

Henisch H.K. 1988. *Crystals in gels and Liesegang rings*. Cambridge University Press, Cambridge.

Iler R.K. 1979. *The Chemistry of Silica*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.

Letherby M.R. and Young D.A. 1981. The gelation of agarose. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **77**: 1953.

Margaca F.M.A., Miranda Salvado I.M., and Teixeira J. 1999. Small angle neutron scattering study of silica gels: influence of pH. *J. Non-Cryst. Solids* **258**: 70.

McPherson A. 1985. Use of polyethylene glycol in the crystallization of macromolecules. *Methods Enzymol.* **114**: 120.

McPherson A. 1999. *Crystallization of biological macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Otálora F., Novella M.L., Gavira J.A., Thomas B.R., and García-Ruiz J.M. 2001. Experimental evidence for the stability of the depletion zone around a growing protein crystal under microgravity. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **57**: 412.

Piculell L. and Svante N. 1989. Anion-specific salt effects in aqueous agarose systems. 1. Effects on the coil-helix transition and gelation of agarose. *J. Phys. Chem.* **93**: 5596.

Plank C.J. 1947. Differences between silica and silica-alumina gels II. A proposed mechanism for the gelation and syneresis of these gels. *Journal of Colloid Science* **2**: 413.

Righetti P.G. 1995. Macroporous gels: facts and misfacts. *Journal of Chromatography A* **698**: 3.

Righetti P.G. and Gelfi C. 1996. Electrophoresis gel media: the state of the art. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **699**: 63.

Robert M.C. and Lefauchaux F. 1988. Crystal growth in gels: Principle and applications. *J. Cryst. Growth* **90**: 358.

Robert M.C., Vidal O., García-Ruiz J.M., and Otálora F. 1999. Crystallization in gels and related methods. In *Crystallization of nucleic acids and proteins: A practical approach* (ed. A. Ducruix and R. Giegé), p. 149. Oxford University Press, New York.

Smatanová K.I., Gavira J., Řezáčová P., Vácha F., and García-Ruiz J.M. 2006. New techniques for membrane protein crystallization tested on photosystem II core complex of *Pisum sativum*. *Photosynth. Res.* **90**: 255.

Stanley F.N. 1995. Agars. In *Food polysaccharides and their applications (Food Science and Technology)* (ed. M.A. Stephen). Marcel Dekker Inc, New York.

Tardieu A., Bonneté F., Finet S., and Vivarès D. 2002. Understanding salt or PEG induced attractive interactions to crystallize biological macromolecules. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **58**: 1549.

Vidal O., Robert M.C., and Boué F. 1998. Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering: case of agarose gel, a nucleation promotor. *J. Cryst. Growth* **192**: 257.

Capítulo 4

GCB y GCF

Cristalización en microgravedad

4.0 CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS USANDO LA GCB EN CONDICIONES DE MICROGRAVEDAD.

4.1 Introducción

En el capítulo anterior se describió el diseño y utilización de la "Granada Crystallization Box" en experimentos de cristalización mediante la técnica de contradifusión, beneficiándose de las ventajas que ofrece la técnica para el proceso de crecimiento cristalino. En esta parte del trabajo se describe el uso de este nuevo dispositivo para llevar a cabo experimentos de cristalización por contradifusión en condiciones de microgravedad. En particular se ha estudiado la viabilidad de la GCB para su uso en el espacio, además de evaluar y comparar la calidad de los cristales obtenidos en el espacio con cristales obtenidos en experimentos control bajo las mismas condiciones pero utilizando geles para mimetizar el efecto de la microgravedad en la tierra.

4.1.1 Cristalización y microgravedad.

En un evento de cristalización existen tres procesos que desencadenan la formación de un cristal. Estos procesos son la nucleación, el crecimiento del núcleo cristalino y el cese del crecimiento del cristal (Durbin y Feher 1996). No importa que tan complejo sea un proceso de crecimiento cristalino, se dan dos etapas cinéticas importantes de forma consecutiva, a saber, un transporte de materia, desde el seno de la disolución sobresaturada hacia la superficie del cristal en crecimiento, por difusión y/o convección, y la incorporación al cristal de estas unidades elementales de crecimiento (Grases Freixedas et al. 2000; Nanev et al. 2004). En condiciones de gravedad terrestre, existe un flujo continuo por convección

generado por gradientes de densidad entre el líquido adyacente a la superficie del cristal y el seno de la disolución, lejos del núcleo cristalino; tales gradientes no solo se originan por gradientes de temperatura, sino por el mismo proceso de incorporación de las macromoléculas a la superficie del cristal en crecimiento. Conforme las moléculas de proteína son retiradas de la disolución por su incorporación a la superficie del cristal en crecimiento, se genera un gradiente de densidad desde la interfase de la superficie del cristal y la disolución que se extiende hacia el seno de la disolución, originándose una zona de depleción de concentración alrededor del núcleo cristalino. Debido a este proceso, la densidad del seno de la disolución es mayor que la de la disolución en los alrededores del cristal y al ser más densa se mueve y/o cae hacia la zona del cristal debido a la fuerza de gravedad, lo que genera el flujo de la disolución por convección. Esta convección natural generada por gradientes de densidad alrededor del cristal puede alterar el proceso de crecimiento (McPherson et al. 1999). En el proceso de fijación de una molécula a la superficie del cristal, ésta prueba varias orientaciones y sitios de unión antes de quedar anclada en su posición y orientación final. Por ello es importante que cada molécula tenga el tiempo suficiente en la zona de los sitios de unión a la superficie del cristal antes de que llegue otra molécula. La convección puede incrementar la velocidad de transporte de moléculas hacia sitios donde éstas son atrapadas en posiciones desfavorables, generándose defectos en la red cristalina que a su vez pueden inhibir un crecimiento posterior (Lee y Chernov 2002). Debido a esta mezcla de la disolución por convección, los cristales de macromoléculas que han nucleado en condiciones terrestres están expuestos continuamente a una concentración total de proteína que está presente en el seno de la disolución, de esta forma la convección mantiene en la interfase del cristal en crecimiento una sobresaturación excesiva y desfavorable de forma continua (Grant y Saville 1991; Lin et al. 1995; McPherson 1999). Por los efectos generados por la convección y la sedimentación debido a la aceleración de la gravedad en tierra, ésta juega un papel importante en el crecimiento cristalino en cuanto a que favorece la aparición de defectos y por consecuencia induce una calidad cristalina baja (Nerad y Shlichta 1986). Es por ello que las condiciones de aceleración reducida que se dan en las naves espaciales, es decir, en condiciones de microgravedad, tienen como ventaja principal, que la convección y sedimentación son suprimidas o, al menos, atenuadas a niveles mínimos (McPherson et al. 1999; Kundrot et al. 2001; Snell y Helliwell 2005). En condiciones de microgravedad no aparecen los fenómenos convectivos que se dan en

condiciones terrestres y el transporte de moléculas desde el seno de la disolución hacia el cristal está dominado enteramente por difusión. Así, conforme un cristal de una macromolécula se va formando en condiciones de microgravedad, alrededor del núcleo se establece un gradiente de concentración o zona de depleción. Debido a que el sistema es prácticamente difusivo, esta zona de depleción es estable, lo que provoca que conforme el cristal crece, se presenta una reducción de la sobresaturación local en la interfase cristal/disolución lo que equivale a situar el crecimiento en la zona metaestable de la curva de solubilidad y en la cual se espera un crecimiento más favorable (McPherson et al. 1991; McPherson et al. 1999). De esta forma se mantiene un transporte de masa controlado por difusión y por ende, la eliminación de flujos convectivos, la estabilidad de la zona de depleción y la supresión de sedimentación que son las principales diferencias entre los procesos de cristalización en tierra y en el espacio (Vergara et al. 2005).

Debido las dificultades intrínsecas en la cristalización de macromoléculas biológicas, a partir de finales del siglo pasado se generó una gran motivación por llevar a cabo experimentos de este tipo en condiciones de microgravedad a la vista de las implicaciones que podría tener sobre el crecimiento cristalino, al menos, desde un punto de vista teórico. Así, desde 1981 se han llevado a cabo experimentos de cristalización de macromoléculas biológicas en el espacio (Littke y John 1984). Entre las observaciones que se han obtenido de experimentos hechos en el espacio es la demostración de que el mecanismo de transporte (difusivo o convectivo) y la sedimentación tienen un efecto notable sobre el crecimiento de cristales de macromoléculas y sobre la calidad cristalina. Algunos otros beneficios que se han reportado de este tipo de experimentos son la mejora en la morfología, volúmenes más grandes y mejor orden interno de los cristales obtenidos en microgravedad. Otro aspecto es una mejor mosaicidad la cual viene dada por una reducción en la densidad de defectos del cristal (Vergara et al. 2003). Se ha postulado que la zona de depleción que se crea alrededor del cristal en condiciones de gravedad reducida sirve como un filtro, que actúa como una barrera difusiva, reduciendo de forma efectiva la incorporación de impurezas (filtración difusional). Estas impurezas pueden ser grandes agregados de la macromolécula y/o diferentes conformaciones estructurales de las mismas (heterogeneidad conformacional) (McPherson et al. 1999; Snell et al. 2001; Lee y Chernov 2002).

Además de los enfoques anteriores, se han hecho intentos para entender, por una parte, la mejora de la calidad de los cristales de macromoléculas crecidos en condiciones de

microgravedad y, por otra parte, ampliar nuestro conocimiento básico sobre las implicaciones de los procesos involucrados en el crecimiento de este tipo de cristales, bajo estas condiciones. En relación a los procesos fundamentales del crecimiento cristalino, se puede mencionar que dentro de los desórdenes más frecuentes dentro de una red cristalina, el desorden intramolecular (variaciones de la conformación estructural u orientaciones incorrectas de las moléculas) puede ser el factor más importante que limita la calidad cristalina y por ende uno de los más interesantes a tomar en cuenta en estudios sobre la interrelación entre calidad cristalina y microgravedad (Kirschhock et al. 2008).

Durante las dos últimas décadas, algunas iniciativas europeas se han enfocado en el estudio de la cristalización de proteínas en el espacio para entender mejor los aspectos físicos fundamentales del crecimiento cristalino. Estas iniciativas se han enfocado en dos hipótesis principales sobre aquellos procesos dependientes de la gravedad importantes en el crecimiento cristalino y que pueden tener influencia sobre la calidad de los cristales (McPherson et al. 1999; Lee y Chernov 2002; Kirschhock et al. 2008):

1. Zona de depleción y crecimiento a baja sobresaturación. Se ha mencionado en esta sección que observaciones y estudios teóricos apuntan que en esta zona de depleción que se crea en condiciones de microgravedad, la sobresaturación es más baja que en el seno de la disolución, lo cual es beneficioso para incrementar la calidad de los cristales.

2. Zona de depleción de impurezas y purificación por difusión.

En general, a partir de diversas evaluaciones, aproximadamente solo un 20% de los cristales crecidos en microgravedad han mostrado una resolución más alta, es decir, han mostrado ser de mejor calidad y más grandes que sus contrapartes terrestres. Diversos factores, tales como una reproducibilidad baja de las condiciones, ambigüedades en el significado de "mejora de la calidad" y una amplia dispersión de los resultados hacen que esta previsión de mejora sea poco fehaciente y hace ambiguas la mayoría de las reivindicaciones acerca de los beneficios de llevar a cabo experimentos de cristalización en el espacio y de las razones para la mejora de la calidad que se prevé y/o que se ha observado (Lee y Chernov 2002; Ng 2002; Kirschhock et al. 2008).

4.1.2 Experimentos de contradifusión en microgravedad

En el capítulo 2 se han descrito las ventajas y características de la técnica de contradifusión en comparación con las técnicas clásicas de cristalización de proteínas. Una de las más importantes es que en un solo experimento, el sistema barre automáticamente un espectro amplio de condiciones de cristalización lo que proporciona una alta probabilidad de encontrar aquellas más óptimas para generar cristales de macromoléculas de alta calidad. En otro aspecto, uno de los requisitos prácticos de la técnica es un ambiente libre de convección, el cual puede ser obtenido a través del uso de capilares de diámetros muy pequeños, del uso de geles o llevar a cabo el experimento en condiciones de microgravedad (García-Ruiz 2003). En relación a este último parámetro y para poder utilizar un escenario de transporte de masa químicamente puro (sin la utilización de geles, por ejemplo), el Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC) propuso realizar un experimento de contradifusión en microgravedad, el cual se llevó a cabo durante la misión STS-95 del programa de transbordadores espaciales de la Agencia Nacional de Aeronáutica y del Espacio (NASA). Otro requisito adicional para la técnica de contradifusión es la necesidad de existir una longitud suficiente en el sistema, donde se lleva a cabo el experimento, para que el patrón de precipitación típico se desarrolle en el tiempo y espacio. Para poder adecuar los reactores de cristalización utilizados en todos los dispositivos de cristalización de proteínas en microgravedad utilizados hasta la fecha (normalmente de 5 mm de longitud), se diseñó un nuevo reactor con una cámara de cristalización larga (70 mm de longitud) específicamente construido para encajar en el dispositivo denominado "Advanced Protein Crystallization Facility" (APCF) (Bosch et al. 1992).

En este experimento, un interferómetro Mach-Zehnder registró como varió la sobresaturación con el tiempo y con un microscopio, que incluía la capacidad de hacer imágenes de vídeo a diferentes tiempos, se hizo un seguimiento de la nucleación y del crecimiento de los cristales.

Como resultado del análisis de los resultados de este experimento, los autores describen la observación, por primera vez, de la existencia de una onda de sobresaturación que avanza a través de la cámara de proteína a una velocidad decreciente. Su amplitud, primero se incrementa y posteriormente decrece con el tiempo, conforme se mueve hacia el frente del compartimento de la proteína. Esto hace que se generen eventos de precipitación en

toda la longitud de la cámara, que se llevan a cabo cada vez a menor sobresaturación y menor velocidad de desarrollo de la sobresaturación; lo cual corresponde a un patrón característico del acoplamiento entre contradifusión y precipitación en la técnica de contradifusión (García-Ruiz et al. 2001).

En este contexto, se puede decir que los esfuerzos por llevar a cabo experimentos de cristalización en microgravedad se enfocan a dos diferentes tipos de problemas, los cuales incluyen muy diferentes puntos de vista, metodologías y objetivos. Por una parte, los laboratorios de bioquímica, alentados por la posibilidad de tener cristales de mejor calidad para estudios de biología estructural, llevan a cabo experimentos encaminados a obtener cristales de moléculas biológicas, que permitan obtener estructuras tridimensionales a alta resolución. Por otro lado, los laboratorios enfocados al estudio del crecimiento cristalino llevan a cabo experimentos diseñados para encarar problemas relacionados a los aspectos físicos y químicos de la cristalización en microgravedad y su relación con la calidad cristalina. Desde un punto de vista metodológico, el requerimiento para ambos tipos de experimentos son muy diferentes: a) los grupos de bioquímica estructural requieren equipos de cristalización que hayan sido probados de forma satisfactoria y que puedan implementar técnicas de crecimiento cristalino confiables y que requieran cantidades de proteína lo más pequeñas posible. b) los grupos de crecimiento cristalino requieren diseños de equipo de cristalización y dispositivos de diagnóstico avanzado flexibles y versátiles.

La APCF fue el primer instrumento de vuelo que llevó un experimento de contradifusión en un reactor fabricado ad-hoc usado durante la misión STS-95 de la NASA (García-Ruiz et al. 2001). Sin embargo, uno de los inconvenientes principales de este reactor es el gran volumen de disolución de proteína que se requiere para llenar la cámara. En este contexto, se planteó un proyecto para evaluar la viabilidad y capacidad de utilizar en el espacio la "Granada Crystallization Box" (GCB), descritas en el capítulo 2, para la implementación de la técnica de contradifusión. Este proyecto se basó, por una parte, en la facilidad de utilización de la GCB y por otra, en las ventajas intrínsecas que ofrece la técnica para el crecimiento cristalino, es decir, un transporte de masa difusivo además de requerimientos de muestra muy pequeños utilizando capilares para albergar la disolución de proteína.

Para poder albergar el mayor número posible de cajas GCB, se diseñó y fabricó un instrumento de vuelo específico para las características de las cajas de cristalización. Este

dispositivo debía cumplir los requerimientos de seguridad para la experimentación científica en el espacio. Tenía que ser lo suficientemente resistente para soportar cualquier impacto imprevisto, además de pasar las pruebas obligatorias de estanqueidad y desgasificación que todo dispositivo debe cumplir para utilizarse en la Estación Internacional del Espacio (ISS por sus siglas en inglés).

4.2 Las misiones Andrómeda y Odissea

4.2.1 Objetivos

Las tareas llevadas a cabo dentro de este trabajo fueron las siguientes:

- a) El diseño y construcción de un instrumento de vuelo pasivo para realizar experimentos de contradifusión dentro de capilares usando las cajas "Granada Crystallization Box".
- b) Llevar a cabo experimentos de cristalización en la Estación Internacional del Espacio.
- c) Análisis de los resultados de los experimentos, en relación al ambiente y cinética de cristalización, así como también la toma de datos de difracción de rayos X y la comparación de éstos con los datos estructurales de rayos X provistos por los investigadores que aporten las macromoléculas.

4.2.2 El dispositivo de vuelo "Granada Crystallization Facility"

Por razones de seguridad, las GCB no pueden ser utilizadas tal cual en el espacio, sobre todo en vuelos tripulados y dentro de la ISS. Para ello fue necesario encerrar cada GCB en bolsas de plástico y a su vez éstas colocarlas en un contenedor adecuado diseñado ad hoc. Este contenedor externo se denominó "Granada Crystallization Facility" (GCF).

La GCF se fabricó como una caja de aluminio recubierta con una capa de níquel y teflón y con unas dimensiones externas de 13.4 x 13.4 x 8.5 cm (figura 4.1). Tiene un volumen útil de 0.925 litros y un peso aproximado de 1 kilogramo cuando está totalmente llena. Estas dimensiones están condicionadas por el peso asignado al experimento en esta

misión (1.4 Kg) y a las dimensiones del sitio asignado para la GCF tanto en la ISS como en la nave de retorno a la tierra. Con este diseño, la GCF pudo acomodar hasta un máximo de 23 reactores del tipo de las cajas GCB y en cada una de las GCB se pueden insertar hasta 6 capilares con proteína. De esta forma, la GCF puede albergar en total hasta 138 experimentos de cristalización. Con la utilización de capilares se redujo el consumo de proteína a la vez que los cristales que crecieron pudieron ser difractados en una fuente de rayos X sin necesidad de ser extraídos de los mismos. Además del gran número de GCB que se pueden colocar dentro de la GCF, es posible también colocar un sensor de temperatura para llevar a cabo un seguimiento de este parámetro durante el desarrollo del experimento.

De acuerdo a los requerimientos de la ISS así como a aquellos para vuelos espaciales tripulados, se llevaron a cabo una serie de pruebas de seguridad que incluían:

- i. Un test de seguridad para los reactivos químicos utilizados en los experimentos para confirmar que cualquier mezcla de los líquidos usados dentro de las GCB no: a) producirían gases como consecuencia de una reacción química; b) fueran exo/endo térmicas y que produjeran y/o absorbieran más de 5 Kj; c) producirían disoluciones teniendo un pH fuera del intervalo entre 5 y 9; d) fueran disolventes para los diferentes tipos de polímeros plásticos utilizados.
- ii. Un análisis de seguridad de la GCF. Debido a la simplicidad de este instrumento, la identificación de los riesgos se basó en la aplicación de una lista de chequeo de riesgos genérica que incluyó: materiales peligrosos, temperatura, aristas filosas, riesgos eléctricos, baterías, valoración de la inflamabilidad, fuga de fluidos y fallos estructurales del material.
- iii. Pruebas de choque y vibración de la GCF para verificar que soportaría el ambiente de vibración esperado para el vuelo.
- iv. Pruebas de estanqueidad para asegurar que las barreras de contención de líquidos diseñados eviten el derrame, dentro de la GCF, de los líquidos utilizados en los experimentos y que estuvieran correctamente ensamblados antes del lanzamiento del experimento.

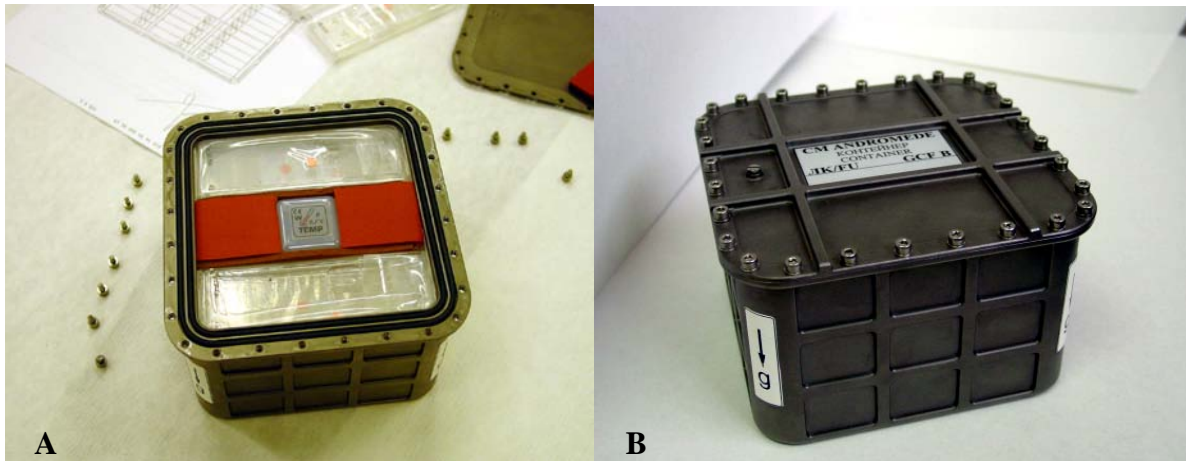


Figura 4.1 Fotografía que muestra la GCF que consiste en una caja de aluminio recubierta con una capa de níquel y teflón cuyas dimensiones son 13.4 x 13.4 x 8.5 cm. La imagen A muestra las cajas experimentales GCB integradas dentro de la GCF, la imagen B muestra la GCF en su ensamble final.

4.2.3 Selección de proteínas

Una vez diseñado y fabricado el equipo de vuelo necesario para llevar a cabo el experimento, el siguiente paso, dentro de la logística del experimento, fue hacer la selección de las macromoléculas biológicas. La capacidad disponible de 23 GCB's se ofreció a diversos laboratorios de investigación europeos y rusos. Los criterios que se usaron para seleccionar las proteínas fueron los siguientes:

- a) La proteína debía haber sido cristalizada previamente en tierra.
- b) Tener un conocimiento aproximado del comportamiento de agregación en función del pH y agentes precipitantes.
- c) Debía tener un interés biológico importante
- d) Baja dependencia de la solubilidad con respecto a la temperatura.
- e) Disponible en suficiente cantidad y pureza para experimentos de cristalización.
- f) Tanto el agente precipitante como los aditivos necesarios debían cumplir con los requerimientos de seguridad de la ISS.

Las condiciones de cristalización de las muestras preseleccionadas fueron cuidadosamente analizadas y, en caso necesario, adaptadas a la técnica de contradifusión. Las

tablas 4.1 y 4.2 muestran las proteínas que finalmente fueron seleccionadas para las misiones Andrómeda y Odissea, respectivamente.

Tabla 4.1 Proteínas seleccionadas para la misión Andrómeda.

Proteína	Grupo de investigación
Alliinasa	Institute for Molecular Biotechnology, Jena, Alemania
CabLys3*lisozima	Institute of Mol. Biol. Biotechn., Brussels, Bélgica
Caf1M	Institute of Immunological Engineering, Chekhov District, Rusia
Catalasa	A.V. Shubnikov Institute of Crystallography RAS, Moscow, Rusia
Concanavalina A	Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC), Granada, España
Citocromo C	Institute of Chemical and Biological Technology, Oeiras, Portugal
Dehidroquinasa	Tibotec-Virco, Mechelen, Bélgica
Endo VII	European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Alemania
Factor XIII	Institute for Molecular Biotechnology, Jena, Alemania
Ferritina	Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC) Granada, España
Gamma-C-crystallin	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Grenoble, Francia
Gamma-E-crystallin	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Grenoble, Francia
HEW Lisozima	Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC), Granada, España
Leg-hemoglobina	A.V. Shubnikov Institute of Crystallography RAS, Moscow, Rusia
LDL	University Hospital of Freiburg, Freiburg, Alemania
Lumazina	Technische Universitaet Muenchen, Garching, Munich, Alemania
Propeptido of Catepsina S	Institute for Molecular Biotechnology, Jena, Alemania
RNAsa II	Institute of Chemical and Biological Technology, Oeiras, Portugal
Saicar-sintetasa	A.V. Shubnikov Institute of Crystallography RAS, Moscow, Rusia
Sm-like proteina	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Heidelberg, Alemania
S-COMT	Institute of Chemical and Biological Technology, Oeiras, Portugal
<i>Thermus thermophilus</i> EF-Tu	Institute for Molecular Biotechnology, Jena, Alemania
Taumatina	Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC), Granada, España

Table 4.2 Proteínas seleccionadas para la misión Odissea.

Proteína	Grupo de investigación
(Pro-Pro-Gly) ₁₀ polypeptido	University of Naples, Naples, Italia
AFSM1/RNA	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Heidelberg, Alemania
Proteína bacteriana	Morphochem AG, Basel, Suiza
Anticuerpo de camello	VUB-ULTR, Brussels, Bélgica
Endonucleasa VII	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Heidelberg, Alemania
Gamma-C-crystallin	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Grenoble, Francia
Gamma-E-crystallin	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Grenoble, Francia
Hfq	European Molecular Biology Lab. (EMBL), Heidelberg, Alemania
Lipoproteina baja densidad	University Hospital of Freiburg, Freiburg, Alemania
Lisozima	NASDA, Tsukuba, Japón
Lisozima	Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC), Granada, España
Pike Parvalbumina	University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Bélgica
Triosa Fosfato Isomerasa	University of Liege, Liege, Bélgica
Tripsina	Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC), Granada, España
α - Amilasa	NASDA, Tsukuba, Japón

4.2.4 Diseño experimental

El experimento fue diseñado para probar la cristalización de proteínas en el espacio mediante la técnica de contradifusión incluyendo una comparación de los resultados con experimentos control idénticos preparados en tierra bajo las mismas condiciones pero utilizando un medio gelificado para las disoluciones de proteína (agarosa a una concentración baja).

Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando las cajas GCB, descritas en el capítulo 4 y aplicando la variante de la técnica de contradifusión denominada Método de Acupuntura en Geles (GAME por sus siglas en inglés) (García-Ruiz y Moreno 1994a; García-Ruiz 2003).

La parte baja de la GCB se llenó con una capa de gel de agarosa a una concentración del 1% y con un pH específico determinado por la macromolécula en estudio. Como cámara de proteína se utilizaron capilares de diferente diámetro interno desde 0.2 hasta 1.5 milímetros. Una vez que el gel estuvo solidificado, los capilares se llenaron con la disolución de proteína e insertados hasta una profundidad predeterminada. La profundidad de punteado representa la anchura efectiva de la capa de gel, es decir, la activación pasiva del experimento y fue calculada considerando el tiempo estimado entre la preparación del experimento y la llegada del mismo a la ISS. Como último paso en la preparación de cada caja de cristalización, la disolución de agente precipitante se agregó en la parte superior de la capa de gel. Un esquema del diseño del experimento se muestra en la figura 4.2.

Los capilares para los experimentos control en tierra fueron llenados con disolución de proteína mezclada con 0.1% de agarosa con el fin de reproducir las condiciones de transporte de masa difusivo en condiciones de microgravedad. Aquellos capilares de los experimentos en el espacio fueron llenados solamente con la proteína sin el gel de agarosa.

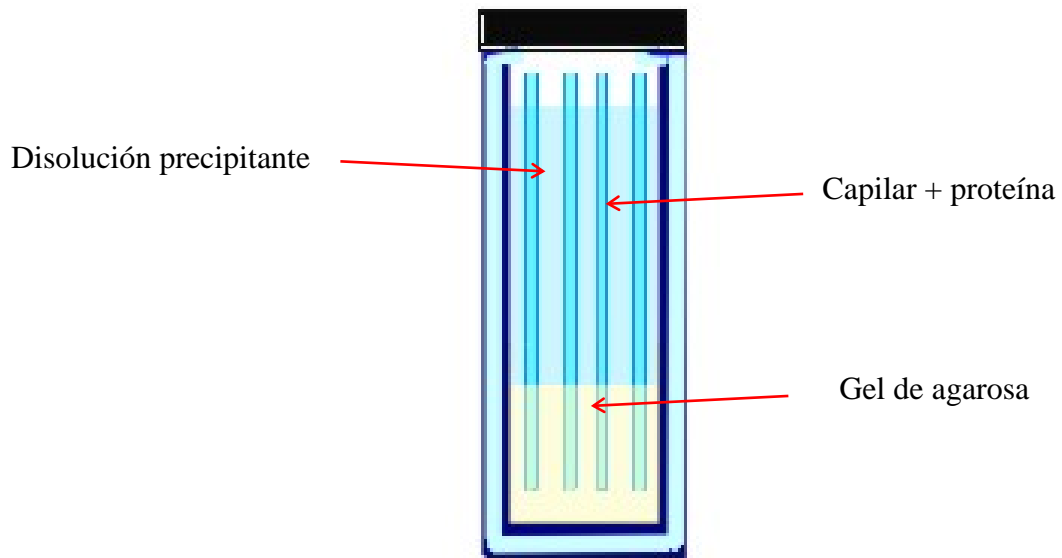


Figura 4.2 Esquema del diseño de un experimento de cristalización por contradifusión por el método de acupuntura en geles.

4.2.5 Logística general de las misiones

Una vez que se seleccionaron las proteínas y las condiciones de cristalización de éstas fueron extrapoladas y ajustadas a la técnica de contradifusión, se procedió a continuar con las etapas correspondientes en la logística de las misiones. Las tablas 4.3 y 4.4 muestran la información relacionada a cada una de las misiones Andrómeda y Odissea, respectivamente.

Tabla 4.2 Misión Andrómeda

Concepto y diseño científico	LEC (Granada, España)
Ingeniería de instrumento de vuelo	NTE (Barcelona, España)
Simulación	MARS Center (Nápoles, Italia) y LEC
Misión	Andrómeda (Francia-Rusia)
Lanzamiento	21 de agosto de 2001
Cosmódromo	Baikonur (Kazakstan)
Lanzadera	Soyuz
Vehículo orbital	Progress
Objetivo principal de la misión	Vuelo taxi a la ISS
Aterrizaje	31 de octubre de 2001
Capsula espacial	Soyuz
Instrumento de vuelo	GCF
Duración de la misión	72 días
Número de proteínas	23
Número de experimentos	105

Tabla 4.3 Misión Odissea

Concepto y diseño científico	LEC (Granada, España)
Ingeniería de instrumento de vuelo	NTE (Barcelona, España)
Simulación	MARS Center (Nápoles, Italia) y LEC
Misión	Odissea (Bélgica-Rusia)
Lanzamiento	25 de septiembre de 2002
Cosmódromo	Baikonur (Kazakstan)
Lanzadera	Soyuz
Vehículo orbital	Progress
Objetivo principal de la misión	Vuelo taxi a la ISS
Aterrizaje	7 de diciembre de 2002
Capsula espacial	Soyuz
Instrumento de vuelo	GCF
Duración de la misión	
Número de proteínas	15
Número de experimentos	126

Las etapas siguientes consistieron en preparar todo el material de laboratorio necesario para el montaje de los experimentos en el sitio de lanzamiento en Baikonur, Kazakstán. Tanto el laboratorio, las muestras biológicas y los reactivos químicos (agentes precipitantes) se enviaron al cosmódromo ruso ubicado en esta localidad. Ya en el sitio de lanzamiento se prepararon los experimentos y se integraron dentro de las capsulas espaciales que iban a viajar a la ISS. Una vez transcurrido el tiempo de la misión para cada proyecto, los experimentos regresaron a tierra y se trasladaron hasta el laboratorio para el análisis correspondiente.

4.2.6 Resultados

4.2.6.1 Misión Andrómeda

Las 23 proteínas utilizadas para los experimentos, tanto en condiciones de microgravedad como su contraparte en tierra, las proporcionaron diversos laboratorios. Dos conjuntos de experimentos se montaron en dos dispositivos de GCF diferentes: uno de ellos viajó a la ISS y el otro permaneció en tierra para efectos de comparación. Se colocaron 23 cajas GCB dentro de cada una de las GCF. Aunque en un principio estaba previsto colocar un sensor de temperatura dentro de la GCF de vuelo, esto no fue posible debido a una interpretación errónea de la información concerniente a los documentos de seguridad.

Una vez que llegaron los experimentos al laboratorio, se realizó una inspección primaria, donde se analizó la localización de los cristales dentro de los capilares y la influencia que pudo haber tenido el diámetro de los mismos, comparando estos resultados con los obtenidos en experimentos control que permanecieron en tierra. Las tablas 4.5 y 4.6 muestran los resultados de esta inspección visual de las GCB en los experimentos en tierra y en el espacio, respectivamente. En ellas se puede observar que un porcentaje amplio de las muestras cristalizaron tanto en tierra como en el espacio y corresponden a aquellas cuyas condiciones de cristalización se optimizaron adecuadamente para la técnica utilizada en el experimento.

Tabla 4.4 Experimento en Tierra

Etiqueta	Proteína	Contaminación microbiológica	Líquido en la tapa	Líquido fuera de la GCB	Líquido fuera de la bolsa de la GCB	Desplazamiento de los capilares	Rotura de la capa de gel	Cristales
GCB1-G	LDL	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB2-G	Catalasa	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB3-G	Saicar-sintetasa	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB4-G	Caf1M	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB5-G	Dehidroquinasa	No	Si	No	No	No	No	No ¹
GCB6-G	Dehidroquinasa	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB7-G	CabLys3*lisozima	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB8-G	Endo VII	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB9-G	Sm-like proteina	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB10-G	Citocromo C	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB11-G	RNAsa II	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB12-G	S-COMT	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB13-G	Gamma-E-crystallin	No	Si	Si	No	No	No	No ²
	Gamma-C-crystallin							Si ³
GCB14-G	Gamma-E-crystallin	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB15-G	Alliinasa	No	Si	No	No	No	No	No ¹
GCB16-G	-	-	-	-	-	-	-	-
GCB17-G	<i>Thermus thermophilus</i> EF-Tu	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB18-G	Factor XIII	No	Si	No	No	No	No	Si
GCB19-G	HEW Lisozima	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB20-G	Taumatina	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB21-G	Ferritina	No	Si	No	No	No	No	Si
GCB22-G	Lumazina	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB23-G	Concanavalina A	Si	Si	Si	No	No	No	Si

¹ Precipitado amorfo² Esferulitos³ Inducción de nucleación

Tabla 4.5 Experimento en el espacio

Etiqueta	Proteína	Contaminación microbiológica	Líquido en la tapa	Líquido fuera de la GCB	Líquido fuera de la bolsa de la GCB	Desplazamiento de los capilares	Rotura de la capa de gel	Cristales
GCB1-G	LDL	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB2-G	Catalasa	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB3-G	Saicar-sintetasa	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB4-G	Caf1M	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB5-G	Dehidroquinasa	No	Si	No	No	No	No	No ¹
GCB6-G	Dehidroquinasa	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB7-G	CabLys3*lisozima	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB8-G	Endo VII	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB9-G	Sm-like proteina	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB10-G	Citocromo C	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB11-G	RNAsa II	No	Si	Si	No	No	No	No
GCB12-G	S-COMT	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB13-G	Gamma-E-crystallin Gamma-C-crystallin	No	Si	Si	No	No	No	No ² Si ³
GCB14-G	Gamma-E-crystallin	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB15-G	Alliinasa	No	Si	Si	No	No	No	No ¹
GCB16-G	Leghemoglobina	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB17-G	<i>Thermus thermophilus</i> EF-Tu	No	No	No	No	No	No	No
GCB18-G	Factor XIII	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB19-G	HEW Lisozima	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB20-G	Taumatina	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB21-G	Ferritina	No	Si	No	No	No	No	Si
GCB22-G	Lumazina	No	Si	Si	No	No	No	Si
GCB23-G	Concanavalina A	Si	Si	Si	No	No	No	Si

¹ Precipitado amorfo² Esferulitos³ Inducción de nucleación.

La figura 4.3 muestra cristales obtenidos de algunas de estas proteínas. En aquellas muestran que no cristalizaron, sus condiciones no pudieron ser optimizadas del todo debido al poco tiempo disponible que hubo para este proceso dentro del calendario de la misión.

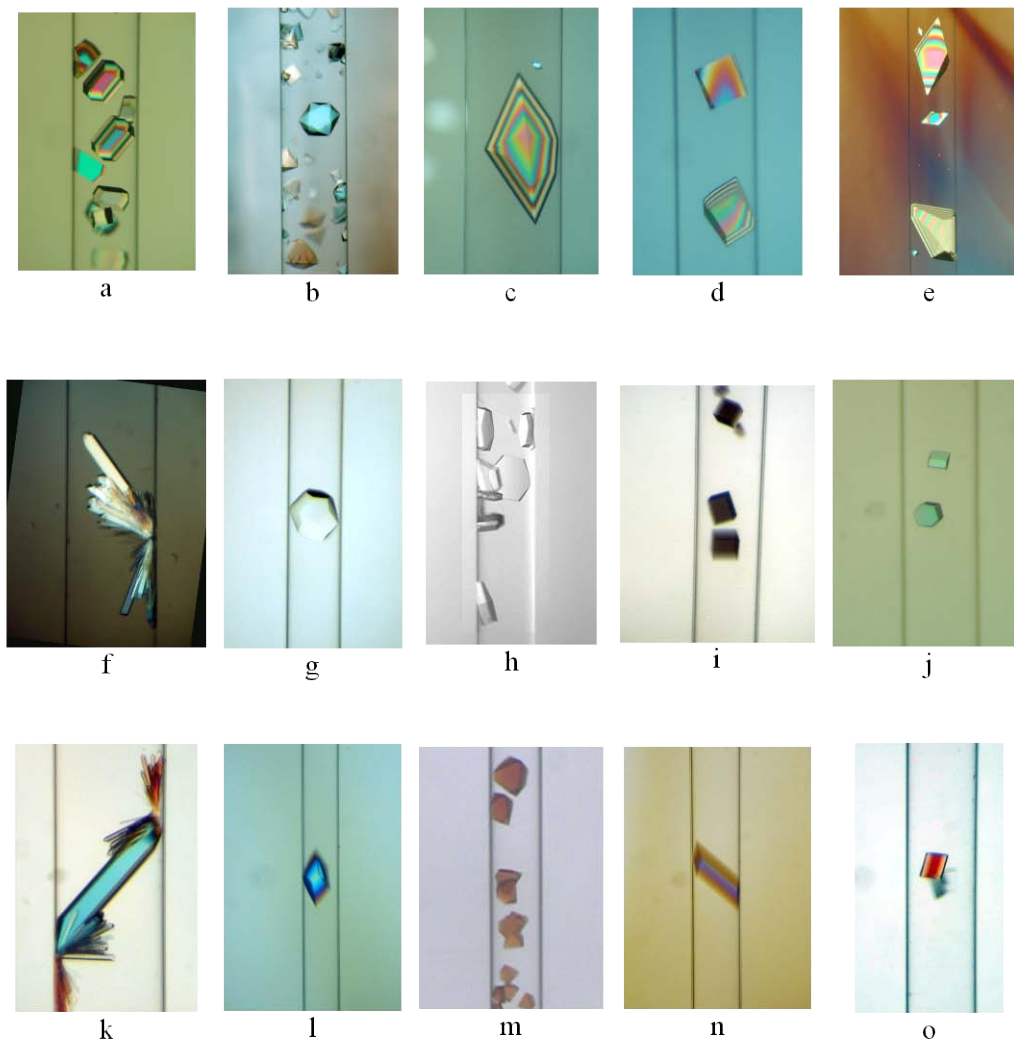


Figure 4.3 Proteínas cristalizadas en la misión Andrómeda. a) Lisozima; b) Dehidroquinasa; c,e) Taumatina; d) Concanavalina A; f,k,n) Anticuerpo anti-lisozima de camello; g) Insulina; h) Lumazina sintética; i) Catalasa; j,o) Factor XII; l) Saicaria sintética; m) Ferritina.

Los resultados obtenidos también ponen en evidencia la validación de la GCB como un dispositivo de vuelo puesto que:

- a) La GCF pasó satisfactoriamente todos los requerimientos de seguridad y pruebas relacionadas a este tema.
- b) No hubo daños en ninguna de las cajas GCB
- c) Todos los capilares permanecieron en su posición inicial
- d) No hubo daños a las capas de gel de las cajas GCB.
- e) No hubo fugas de líquido que pudieran afectar las condiciones fisicoquímicas de los experimentos
- f) Las proteínas que cristalizaron, formaron cristales tanto en tierra como en microgravedad.

Con respecto al análisis de difracción de rayos X de los cristales obtenidos en esta misión, durante la elaboración del proyecto se acordó que la evaluación de la calidad cristalina correspondería realizarla a cada laboratorio que propusieron y proveyeron cada una de las muestras. Por lo tanto, en este trabajo se muestran solamente los resultados de aquellas proteínas que se analizaron por difracción por nuestro grupo de investigación. Para ello se seleccionaron cristales crecidos en capilares con el mismo diámetro y en posiciones equivalentes y se alinearon en una orientación similar. La obtención de los datos de difracción se llevó a cabo en las líneas de haz BW7B y X13 en la estación de sincrotrón del EMBL en Hamburgo. Tanto los cristales crecidos en microgravedad como sus contrapartes crecidos en tierra fueron congelados instantáneamente a 100 K y se tomaron algunas imágenes de difracción a 90° y auto-indexadas con el programa Mosflm (Leslie 1999). Cristales grandes de taumatina (con forma de cilindro) se difractaron a temperatura ambiente sin ninguna manipulación posterior. La toma de datos se llevó a cabo en base a la mejor estrategia predicha por Mosflm. Se puso atención especial en la redundancia estimada y en el ángulo de oscilación ya que $I/\sigma(I)$ depende de ambos parámetros. Las imágenes se recogieron en los detectores Mar 345 (línea BW7B) y Mar CCD (línea de haz X13). La toma de datos se realizó con el programa XDS (Kabsch 1993).

La tabla 4.7 muestra los valores de los principales parámetros de la toma de datos de difracción de rayos X y resume los resultados preliminares. Tanto los cristales crecidos en microgravedad como los crecidos en tierra muestran valores bastante aceptables de $I/\sigma(I)$. Para el caso de las proteínas modelo, los valores son comparables a los mejores obtenidos por otras técnicas en tierra. En el caso de lisozima, los datos se obtuvieron a una resolución de 0.95 Å, pero muchos de los puntos de difracción en el borde exterior del detector tenían valores de $I/\sigma(I) > 2$ y el cristal podía difractar perfectamente más allá de 0.95 Å. Por otra

parte, el límite de resolución tanto para dehidroquinasa como para catalasa mejoraron desde 3.50 y 3.40 Å hasta 1.71 y 1.60 Å, respectivamente. Sin embargo, un análisis detallado de las pequeñas diferencias de la calidad cristalina en términos de $I/\sigma(I)$ como una función de la resolución (tabla 4.7) revela la inexistencia de un patrón claro y consistente que permita concluir cual ambiente produce los mejores cristales.

Tabla 4.7 Datos de difracción de rayos X de los cristales obtenidos en la misión Andrómeda.

	Dehydroquinase		Catalase		HEW Lysozyme		Space	Ground	Thaumatococcus		
	Space	Ground	Space	Ground	Space	Ground			Space + Gel	Space	Space+Gel
Beam Line	BW7B	BW7B	X13	X13	BW7B	BW7B	BW7B	BW7B	BW7B	BW7B	BW7B
Wave length (Å)	0.8463	0.8463	0.801	0.801	0.8463	0.8463	0.8463	0.8463	0.8463	0.8463	0.8463
Distance to detector (mm)	270	270	150 / 240	150 / 240	130	130	200	200	200	200	200
Oscillation angle	0.3	0.3	0.6	0.6	1 & 1.4	1 & 1.3	0.5	0.5	0.5	1	1
Data collect. Temp (°C)	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	Room	Room	Room	100 K	100 K
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell (Å)											
a	129.1	128.7	142.2	142.3	78.73	78.72	58.7	57.6	58.6	57.7	57.7
b	131.3	131.2	175.0	175.1	78.73	78.72	58.7	57.6	58.6	57.7	57.7
c	161.6	160.7	175.0	175.1	36.95	36.97	151.6	151.6	151.7	150.0	149.9
α β γ	90	90	90 90	90 90	90	90	90	90	90	90	90
Resolution range (Å)	10.00 – 1.71	10.00 – 1.71	15.0 – 1.6	15.0 – 1.6	1.40 – 0.95	1.40 – 0.95	15.0 – 1.0	15.0 – 1.0	15.0 – 1.0	10.0 – 1.0	10.0 – 1.0
Completeness (%)	71.5	59.5	88.2	80.2	68.3	66.6	64.1	68.6	69-33	84	84.1
Multiplicity	1.6	2.0	2.4	2.7	2.7	2.3	2.1	2.0	2.0	2.4	2.6
Rsym (%)	3.7	2.2	2.7	3.1	19.2	20.2	3.4	2.6	3.0	3.2	5.1
I/σ(I)	12.7	20.3	17.7	15.6	14.6	5.8	9.3	12.3	10.6	17.5	12.0
Outer resolution shell (Å)	1.80 – 1.71	1.80 – 1.71	1.8 – 1.6	1.8 – 1.6	1.00 – 0.95	1.00 – 0.95	1.1 – 1.0	1.1 – 1.0	1.1 – 1.0	1.1 – 1.0	1.1 – 1.0
Completeness (%)	66.2	59.4	72.2	66.9	76.9	70.1	34.7	39.6	39.9	58.9	57.2

Por otra parte, es importante enfatizar el tipo de comparación que se hace en este trabajo, entre cristales crecidos en tierra y cristales crecidos en el espacio. En la mayoría de los estudios comparativos previos de cristalización de proteínas en el espacio y en tierra, esta comparación se hace entre cristales crecidos bajo condiciones de convección y cristales crecidos en una supuesta ausencia de convección en el espacio. A diferencia de esto, en este estudio se ha comparado a) cristales crecidos bajo condiciones difusivas perfectas (ausencia de convección) en tierra mediante el uso de geles de agarosa y b) cristales crecidos en el espacio bajo condiciones difusivas. Por lo tanto, no es de sorprender la similitud de la calidad cristalina entre ambos tipos de escenarios.

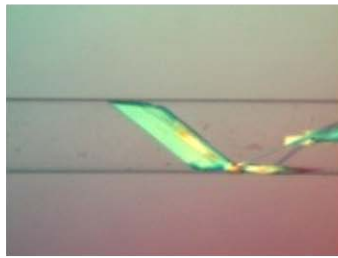
Como se ha descrito en el capítulo 2, por su naturaleza, las técnicas contradifusivas se desarrollan solamente en ambientes donde el transporte de masa está controlado por difusión. Así, uno de los objetivos de este proyecto fue por una parte comparar experimentos idénticos llevados a cabo en el espacio con disoluciones de proteína sola y por otra parte experimentos en tierra con disoluciones de proteína gelificada. De esta forma se puede evaluar las diferencias entre un ambiente puramente difusivo en tierra (alcanzado mediante la gelificación de la disolución de proteína con agarosa al 0.1% p/v) y un escenario sin agarosa provisto en la ISS donde, no obstante, los fenómenos de sedimentación y convección no son eliminados completamente, debido a la presencia de aceleraciones residuales. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, debido a cuestiones inesperadas en la logística y seguridad, no fue posible utilizar un sensor de temperatura dentro de la GCF durante su permanencia en el espacio. Por lo tanto, no fue posible conocer si el perfil de temperatura durante la misión en el experimento en el espacio y en el de tierra fue suficientemente similar para permitir una comparación aceptable de la calidad cristalina.

4.2.6.2 Misión Odisea

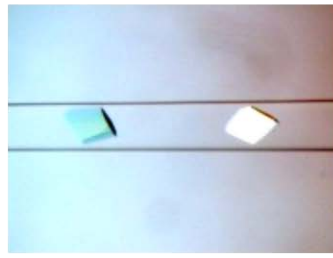
Considerando los resultados obtenidos en la misión Andrómeda, se planeó llevar a cabo un segundo vuelo de prueba en el marco de otro vuelo-taxi a la ISS, esta vez patrocinado por Bélgica, cuyo objetivo principal fue conseguir una representación estadística adecuada de los resultados. Por lo tanto, la utilización de la GCF en este vuelo se concentró nuevamente en estudiar el proceso y establecer la influencia del ambiente de microgravedad presente en la ISS sobre el fenómeno de la cristalización.

En este nuevo proyecto se siguieron las mismas directrices en cuanto a logística para la recepción de las muestras y la preparación de los experimentos. En este experimento se utilizaron 15 proteínas, proporcionadas por laboratorios europeos y japoneses, para preparar 23 cajas GCB en una GCF. Para el estudio comparativo, se preparó en paralelo una GCF adicional como experimento control en tierra. La única diferencia, como en la misión anterior, fue que los experimentos en tierra tenían 0.1% de agarosa para reproducir el ambiente libre de convección presente en microgravedad. En este experimento si fue posible registrar un perfil de temperatura durante la permanencia del experimento en la ISS. Este perfil se obtuvo mediante un sensor del tipo "Sugar cube" de la compañía Meilhaus Electronic que se incorporó dentro de la GCF.

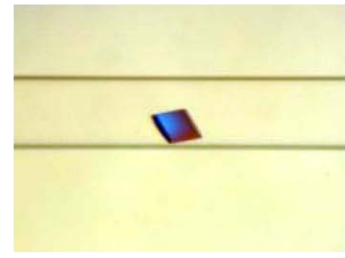
Una vez que el experimento se recibió en el laboratorio, después de su permanencia en la ISS, todas las GCB se inspeccionaron cuidadosamente, pudiéndose constatar que ninguna de ellas sufrió daño alguno. Los patrones de cristalización dentro de los capilares se registraron. Una vez que se completo esta inspección inicial en nuestro laboratorio, se devolvieron las muestras a sus propietarios junto con documentación que incluía las condiciones de cristalización finales que fueron usadas para cada muestra así como un reporte con los resultados de la revisión inicial. Las figuras 4.4 y 4.5 muestran cristales de las diferentes proteínas crecidos en el experimento en el espacio y en el de tierra, respectivamente.



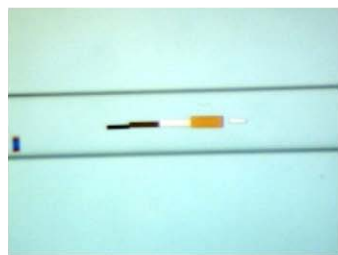
Pike parvalbumin



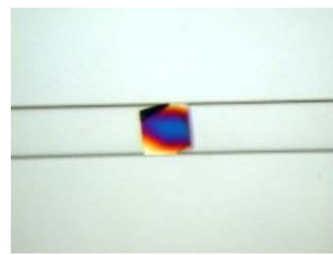
TIM



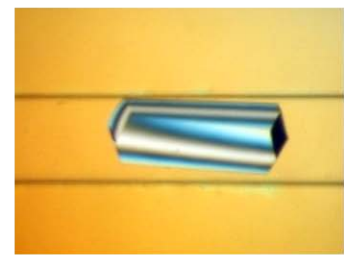
TIM



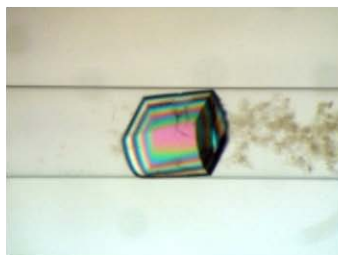
Polypeptide



Alpha amylase



HEW Lysozyme



Trypsin



HEW Lysozyme



HEW Lysozyme

Figura 4.4. Cristales de proteínas obtenidos en la estación Internacional del Espacio en la misión Odissea.

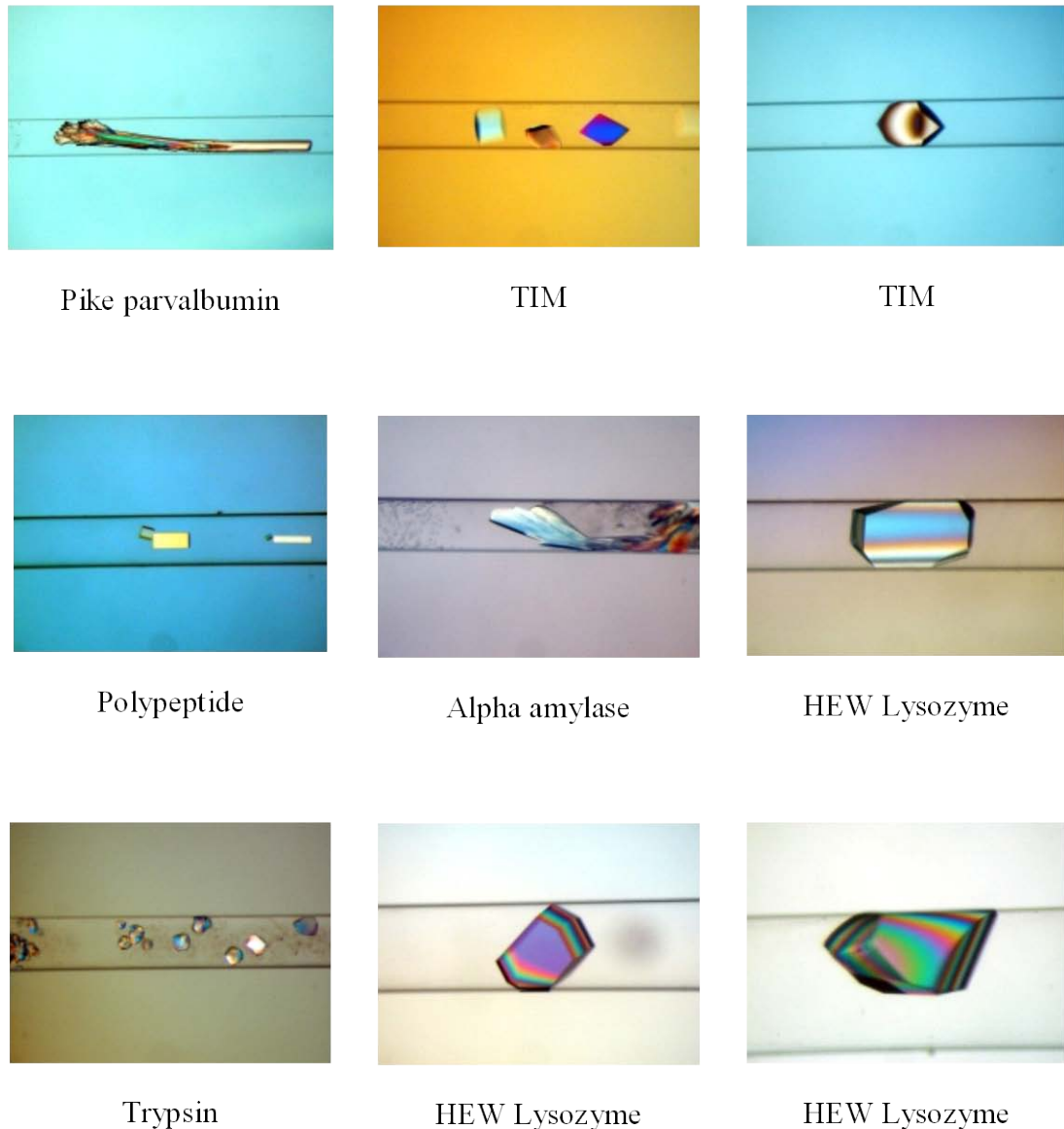


Figura 4.5. Cristales de proteínas obtenidos en tierra (experimento control) durante la misión Odissea.

La figura 4.6 muestra el perfil de temperatura registrado in situ dentro de la GCF (tanto en el espacio como en tierra) utilizando el sensor "sugar cube". Claramente se observa que la temperatura en tierra fue más estable que aquella registrada en la ISS. De hecho, los valores de temperatura en el sitio de localización de la GCF en la ISS tuvieron bastantes fluctuaciones durante la misión. Se observaron diferencias de temperaturas mínimas y máximas de hasta 8 °C (14 a 22 °C). Uno de los objetivos de este experimento era la

comparación del proceso de cristalización en tierra y en el espacio en términos de calidad cristalina, morfología cristalina y patrón de precipitación. Sin embargo, estas diferencias de temperatura ponen en duda la validez de la comparación directa entre los experimentos en el espacio y en la tierra.

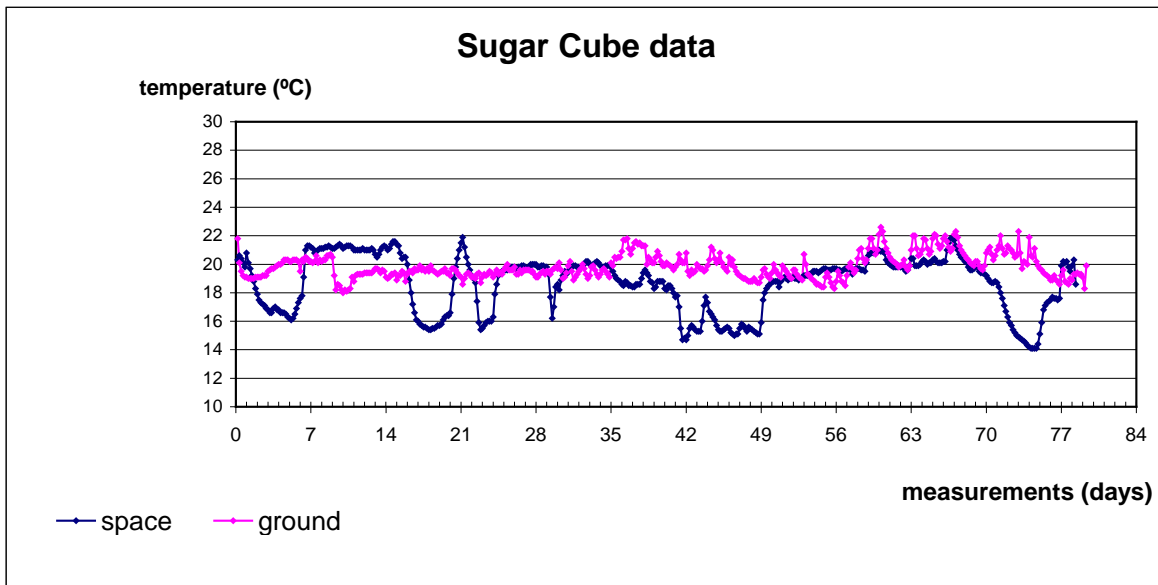


Figura 4.6 Perfil de temperatura que muestra las variaciones del ambiente térmico en el espacio como en el experimento de tierra en la misión Odissea.

Como resultado de lo anterior se confirmó que tanto las cajas GCB como la GCF son dispositivos que funcionan adecuadamente para llevar a cabo experimentos de cristalización en el espacio. Además, en esta misión se pudo comprobar la existencia de fluctuaciones significativas de la temperatura dentro de la ISS.

A la vista de estos análisis, para un siguiente experimento de cristalización en el espacio se propuso que era recomendable:

1. El uso de sensores térmicos para registrar la temperatura y de esta forma utilizarlo como un parámetro para evaluar la calidad de los experimentos.
2. la localización de la GCF dentro de la ISS en un sitio adecuado con una estabilidad térmica y mecánica.

3. Incorporar un control activo de temperatura a la GCF
4. Mejorar el aislamiento térmico de la GCF.

4.3 La misión Foton M-3

Como se describió en los trabajos anteriores, un primer objetivo de estos experimentos fue el validar el concepto y diseño de la GCB para la realización de experimentos de cristalización de macromoléculas biológicas en el espacio, como un dispositivo pasivo, compacto y con una gran densidad de experimentos. Un segundo objetivo fue la comparación de cristales crecidos bajo idénticas condiciones químicas y térmicas en el espacio, con proteínas en disoluciones líquidas y en tierra en disoluciones gelificadas, usando como parámetros comparativos la calidad cristalina, morfología cristalina y patrones de precipitaciones. El primer objetivo fue validado en base a los resultados de las misiones Andrómeda y Odissea. Sin embargo, el segundo objetivo no fue posible alcanzarlo en su totalidad. Las diferencias en los perfiles térmicos registrados en los experimentos de vuelo frente a los experimentos en tierra fueron suficientemente grandes como para descartar cualquier conclusión razonable a partir de una comparación directa de la calidad cristalina utilizando los mismos criterios.

Por otra parte, se ha descrito en la introducción a este capítulo que cuando los cristales crecen en geles, este proceso se da en un ambiente donde el transporte de masa está perfectamente controlado por difusión. Sin embargo, este régimen difusivo no se cumple totalmente en las condiciones de microgravedad presentes en la ISS, debido a la presencia de aceleraciones residuales, que varían tanto en magnitud como en dirección (conocido como g-jitter y g-residual). Fuerzas estacionarias o cuasi-estacionarias son responsables de la g-residual mientras que fuerzas dependientes del tiempo (impulsivas y periódicas) son responsables de los g-jitters. Estos fenómenos generan convección, lo que hace que el estado de referencia no sea el ideal en microgravedad, en relación a un ambiente puramente difusivo (Savino y Monti 1999). La presencia de estos dos efectos en las plataformas espaciales puede inducir movimientos relativos, entre el cristal en crecimiento y la disolución de proteína que lo rodea, lo cual puede influir negativamente el crecimiento de cristales de proteína a través de un transporte de masa no difusivo, afectándose parámetros de calidad

cristalina tales como el límite de difracción y la mosaicidad (Simic-Stefani et al. 2006). Lorber et al y Carotenuto et al, observaron este tipo de movimiento de cristales sugiriendo que esto indicaría la presencia de flujos convectivos (Lorber et al. 2000; Carotenuto et al. 2001). A su vez, Otálora et al informaron de una distorsión de las zonas de depleción de concentración alrededor de cristales de ferritina y lisozima en crecimiento (Otálora et al. 2001).

Por lo tanto, podemos considerar que con los experimentos de cristalización de proteínas llevados a cabo en la ISS en las dos misiones hemos comparado cristales crecidos en el espacio, en un escenario térmicamente inestable donde la convección y la sedimentación no han sido completamente eliminadas debido a las aceleraciones residuales y g-jitters, con cristales crecidos en tierra, en un ambiente de transporte de masa puramente difusivo conseguido con la adición de 0.15 de agarosa en el medio de crecimiento. A pesar de las peores condiciones de cristalización de los cristales crecidos en el espacio (en términos de estabilidad gravitatoria y transporte de masa) frente a los crecidos en tierra, en medios gelificados, los resultados de difracción de rayos X muestran que la calidad de los cristales crecidos en geles y en la ISS es similar. En algunos casos se encontró una ligera mejora de la calidad como en el caso de la dehidroquinasa (Maes et al. 2004), mientras otros dieron resultados contradictorios. Esta es otra razón importante por la cual se debe comparar experimentos llevados a cabo en medios gelificados y no gelificados que transcurren en ambientes puramente difusivos y con una historia térmica similar, como los de las misiones Andrómeda y Odisea, pero utilizando un escenario de microgravedad más adecuado, (por ejemplo en un vuelo espacial no tripulado).

En este contexto se propuso llevar a cabo una nueva misión en el espacio tomando en cuenta las siguientes mejoras, tanto en el diseño del dispositivo de vuelo, como en las condiciones experimentales:

1. Realizar un nuevo experimento de cristalización de proteínas en el espacio, en un vuelo no tripulado, que pueda proveer un escenario gravitacional más correcto para crecer cristales en un régimen puramente difusivo.
2. Hacer un nuevo diseño del dispositivo de vuelo GCF para incorporar un control térmico de 1 °C de precisión, desde que se prepara el experimento hasta que se llevan los cristales a las instalaciones del sincrotrón para su análisis por difracción de rayos X.
3. Producir un nuevo tipo de reactor para cristalización, que permita el uso de cualquier disolvente o aditivo (incluso volátiles) para la cristalización de proteínas.

4. Modificar un diseño de la caja GCB para adaptarla a experimentos más cortos y a la vez optimizar los volúmenes tanto de proteína como de precipitante.

4.3.1 El dispositivo de vuelo "Granada Crystallization Facility 2"

La "Granada Crystallization Facility 2" (GCF-2) es una versión mejorada de la GCF utilizada en las misiones Andrómeda y odisea. La principal característica en este nuevo diseño es la incorporación de un sistema de control de temperatura activo, capaz de mantener la temperatura controlada en el interior de la GCF-2 a un valor predeterminado y también su diseño modular. Para incorporar el control de temperatura se tuvo que modificar las dimensiones de la GCF para optimizar su conductividad térmica y así minimizar los gradientes de temperatura dentro de ella. La nueva versión se hizo de aluminio y tiene unas dimensiones externas de 18.6 x 21 x 17 cm e internas de 10 x 14.5 x 9 cm. Tiene un volumen útil de 1.31 litros y pesa aproximadamente 5 Kg con todos los experimentos. El sistema de control de temperatura así como el elemento Peltier están en una Unidad Electrónica (EU por sus siglas en inglés) en la base de la GCF-2 y en la cual se encuentran los conectores eléctricos y de interfaz (Figura 4.7 a, b y c). El control de temperatura mantiene una temperatura interna constante de 20 °C, con una variación entre los capilares de ± 1 °C y una variación sobre la superficie de un solo capilar de ± 0.5 °C. Los datos de temperatura se registran con dos dispositivos: a) una sonda calibrada del mismo sistema de control de temperatura de la GCF-2 (con 0.1 °C de resolución) y cuyas medidas se envían a tierra mediante el propio sistema de telemetría de la capsula espacial y b) un sensor de temperatura (0.5 °C de resolución) que se coloca dentro de la GCF-2.

Conviene recalcar que para la cristalización de macromoléculas biológicas es muy importante controlar la temperatura ya que la solubilidad de estas macromoléculas es muy sensible a cambios de temperatura. Por tanto, es conveniente tener el control de temperatura durante la duración del vuelo en el espacio y posteriormente. Para ello, se desarrolló una unidad denominada "Electrónica de Soporte en Tierra" (GSE por sus siglas en inglés) (figura 4.7d) con la que se mantenía la temperatura hasta su llegada al laboratorio de análisis. El GSE es un contenedor metálico que contiene baterías recargables y una unidad electrónica adicional donde se conecta la GCF-2. De esta forma, la GCF-2 se recoge de la capsula espacial en el sitio de aterrizaje y se transporta a un sitio para el análisis posterior de los

experimentos, por ejemplo a las instalaciones de radiación sincrotrón, sin alteración del ambiente térmico donde han crecido los cristales. Las baterías del GSE dan una autonomía de hasta 48 horas con un intervalo de estabilidad de ± 1 °C, pero si se conecta a una fuente de corriente constante la autonomía es indefinida.

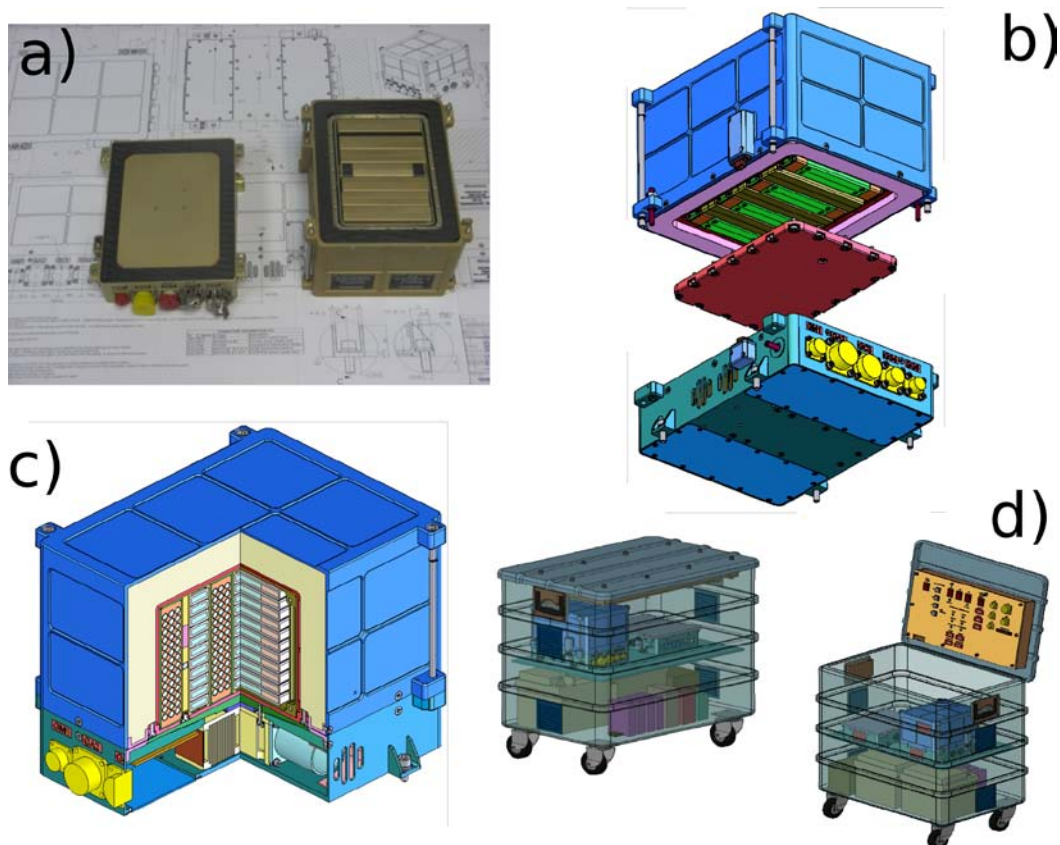


Figura 4.7 Esquema de la GCF-2. (a) Fotografía de la GCF-2 conteniendo los módulos de experimentación y la unidad electrónica (b) Esquema del ensamble de la GCF-2. (c) Esquema del diseño interno de la GCF-2 mostrando los reactores experimentales. (d) Esquema del GSE.

La incorporación del control de temperatura en la GCF hace que el funcionamiento de ésta no sea totalmente pasivo, en cuanto a consumo eléctrico como la versión anterior, no obstante éste consumo se puede considerar bastante bajo ya que representó solo menos del 1% de la cantidad total de energía disponible en la capsula durante la duración del vuelo.

4.3.2 Los nuevos reactores: GCB-domino y capilares de 3 capas.

Con el objetivo de realizar los experimentos de cristalización dentro de la GCF-2 se diseñaron dos nuevos tipos de reactores (ver figura 4.8a). Para ello se desarrolló a partir de la GCB un dispositivo mucho más compacto, la Granada Crystallization Box - Domino (GCB-D). La caja tiene como medidas exteriores 7 x 0.7 x 17 cm y puede albergar fácilmente 4 capilares para llevar a cabo experimentos de contradifusión por el método de acupuntura en gel (García-Ruiz y Moreno 1994b), para lo que solamente necesita un volumen de 1.5 a 2 ml de agente precipitante. El reactor es de plástico (poliestireno) y sus superficies son paralelas de tal forma que permiten la inspección óptica de los cristales dentro de los capilares, sin necesidad de extraerlos de los mismos y/o sin distorsionar la visualización.

Conjuntamente con las GCB-D se diseñaron unos reactores nuevos hechos completamente de vidrio y con una geometría diferente a las GCB-D. Estos reactores se denominaron capilares 3-capas (3LC por sus siglas en inglés), ya que en éstos, el experimento de cristalización se organiza de forma que la disolución de proteína y el agente precipitante se encuentran en la misma cámara, separados por un puente físico de longitud variable (ver figura 4.8b) igual que en un experimento típico de cristalización en 3 capas en geles (Hensch 1970; Hensch 1988). Esta geometría es solo una de las diferentes posibilidades, junto con la método de acupuntura en geles, en la cual se puede implementar la técnica de contradifusión (García-Ruiz 2003). La principal motivación de este diseño fue el de extender la capacidad de la GCF-2 de incluir experimentos que tuviesen disolventes orgánicos y otros agentes que pudieran interactuar químicamente y degradar el plástico de la GCB-D.

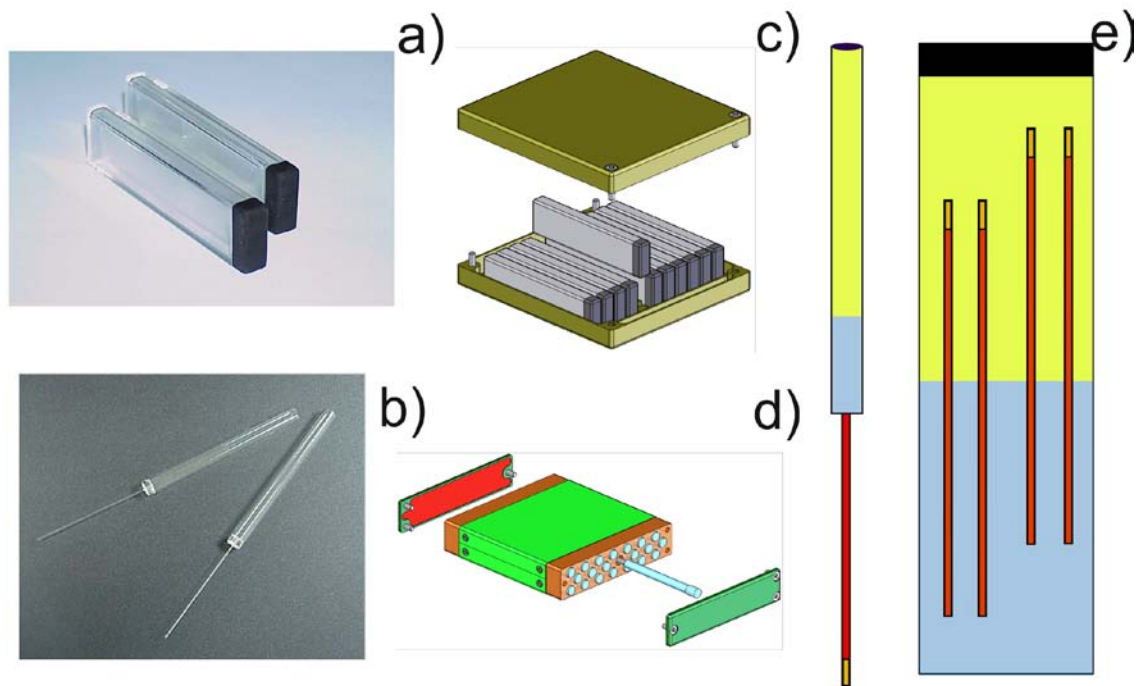


Figura 4.8 Las fotografías a y b muestran los reactores de cristalización diseñados específicamente para esta misión, la caja GCB-D y los capilares 3LC. Los esquemas c y d muestran la integración de la GCB-D y 3LC dentro de sus módulos respectivos. La figura e esquematiza el diseño experimental de contradifusión dentro de los nuevos reactores. La disolución precipitante se muestra en color amarillo, el gel en azul, la proteína en rojo la plastilina utilizada para sellar los capilares en color naranja.

4.3.3 La nave Foton

La nave Foton es una capsula espacial de fabricación rusa derivada de las naves tripuladas de la familia Vostok como la que fue utilizada por Yuri Gagarin. Este satélite se diseñó para hacer experimentos en microgravedad, sin acoplarse a la Estación Espacial Internacional, solamente orbitando alrededor de la tierra. Así los niveles de aceleración residual en esta nave varían entre valores de 10^{-4} y 10^{-6} g, que es un intervalo más adecuado para experimentos en microgravedad. Por lo tanto, ofrece un escenario ideal para comparar cristales crecidos bajo regímenes difusivos (en tierra con geles y en el espacio sin geles) y, por ende, determinar si la presencia de los geles realmente afecta a la calidad cristalina.

4.3.4 Selección de proteínas

La selección de las muestras siguió un criterio similar al utilizado en las misiones anteriores Andrómeda y Odissea (sección 4.2.3). La disponibilidad de experimentos dentro de la GCF-2 se ofreció a diversos laboratorios de investigación.

De igual forma, las condiciones de cristalización de las muestras preseleccionadas fueron cuidadosamente analizadas y, en caso necesario, adaptadas a la técnica de contradifusión. La tabla 4.8 muestra las proteínas que finalmente fueron seleccionadas para la misión.

Tabla 4.6 Proteínas utilizadas en la misión Foton M-3.

Proteína	Laboratorio	Objetivo del experimento
H95Q-SH3 -I	Universidad de Granada	Resolución estructural
N114-SH3	Universidad de Granada	Resolución estructural
Mistletoe lectin I	University of Hamburg	Análisis del crecimiento cristalino
TIM	Universite de Liege, LBMGG	Análisis del crecimiento cristalino
CFP (monomeric)	Universite de Liege, LBMGG	Resolución estructural
CFP (dimeric)	Universite de Liege, LBMGG	Resolución estructural
Peroxiredoxina	Universite Catholique de Louvain, CSTR	Análisis del crecimiento cristalino
Lumazina	Technische Universität München	Resolución estructural
Lumazina mutante	Technische Universität München	Resolución estructural
Lisozima	Tohoku University, Japan, JAXA	Análisis del crecimiento cristalino
Yadb	CNRS, IBMC	Resolución estructural
Photosystem II	Technical University Berlin	Resolución estructural
OEC PSII	Institute of Physical Biology, C.R.	Resolución estructural
Dha04	Institute of Physical Biology, C.R.	Resolución estructural
Dha14	Institute of Physical Biology, C.R.	Resolución estructural
Glucosa isomerasa	Vrije Universiteit Brussel, IMBB	Análisis del crecimiento cristalino
α -chymotrypsinogeno A	Vrije Universiteit Brussel, IMBB	Análisis del crecimiento cristalino
Lisozima	LEC. CSIC-Univ. Granada	Análisis del crecimiento cristalino
Taumatina	LEC. CSIC-U. Granada	Análisis del crecimiento cristalino
Haemoglobina II - oxy	Universidad de Puerto Rico	Resolución estructural
Haemoglobina II-III -oxy	Universidad de Puerto Rico	Resolución estructural
Haemoglobina II-III -CN	Universidad de Puerto Rico	Resolución estructural
Insulina	LEC. CSIC-Univ. Granada	Análisis del crecimiento cristalino

4.3.5 Diseño experimental

La preparación de los experimentos utilizando la GCB-D fue similar al protocolo que se aplicó para las GCB en la misiones Andrómeda y Odisea (sección 4.2.4). Para el caso de los reactores 3LC, el diseño consistió en llenar primero la parte del capilar con diámetro pequeño, con la disolución de proteína, se cerró el extremo inferior y luego se incorporó un puente físico de gel de agarosa en la parte superior y una vez que gelificó, se agregó el agente precipitante y finalmente se selló el reactor con cera (figura 4.8e).

El diseño de la GCF-2 permite una organización modular de los experimentos, es decir, se pueden utilizar indistintamente los dos tipos de reactores descritos en la sección anterior. No obstante, a diferencia de las cajas GCB que podían ser alojadas dentro de la GCF sin más protección que un contenedor de plástico, para el caso de estos nuevos reactores fue necesario hacer dos módulos especiales donde alojarlos. Estos módulos fueron fabricados en aluminio y medidas externas de 10 x 2 x 9 cm, con un peso de 215 g. Se fabricaron dos módulos diferentes para alojar 11 cajas GCB-D o 42 reactores 3LC, tal como se muestra en la figura 4.8c y d. Dentro de la GCF-2 se pueden acomodar hasta 7 módulos, pudiéndose adaptar la configuración a las necesidades y objetivos de cada misión.

4.3.6 Logística general

La tabla 4.9 muestra los datos generales de logística de la misión Foton M-3. La preparación del experimento fue similar a las misiones anteriores, con etapas similares, entre las que estaban el proceso de selección de proteínas, el ajuste y optimización de las condiciones a la técnica de contradifusión, el envío de todo el material para preparar el laboratorio en el sitio del lanzamiento, la recuperación del experimento y su transporte al sincrotrón, para el análisis por difracción de rayos X.

Tabla 4.9 Datos logísticos de la misión Foton M-3

Concepto y diseño científico	LEC (Granada, España)
Ingeniería de instrumento de vuelo	NTE (Barcelona, España)
Simulación	LEC
Misión	Foton M-3
Lanzamiento	14 de septiembre de 2007
Cosmódromo	Baikonur (Kazakstan)
Lanzadera	Soyuz
Vehículo orbital	Foton
Objetivo principal de la misión	Vuelo orbital
Aterrizaje	26 de septiembre de 2007
Capsula espacial	Foton
Instrumento de vuelo	GCF-2
Duración de la misión	12 días
Número de proteínas	19
Número de experimentos	240

4.3.7 Resultados

4.3.7.1 Funcionamiento de los dispositivos de vuelo y soporte en tierra

Para esta misión se prepararon 5 módulos que contenían 11 GCB cada uno de ellos y 1 módulo con capilares 3L. Tanto las cajas GCB, como los capilares 3L, llevaron en su interior experimentos de contradifusión estándares (ver sección 4.2.4). Un séptimo módulo sirvió para alojar 11 cajas GCB, con semillas de proteínas para estudios de crecimiento cristalino. En total, se realizaron 240 experimentos de cristalización, mediante la técnica de contradifusión, con 19 proteínas de 11 laboratorios diferentes. 33 experimentos se hicieron para estudiar el crecimiento cristalino en el espacio con semillas de cristales de proteína y 9 experimentos de prueba para estudiar la cristalización de carbonato de calcio en condiciones de microgravedad. Todos los experimentos se prepararon en el sitio del lanzamiento.

Para analizar el rendimiento y/o funcionamiento del nuevo dispositivo de vuelo (GCF-2) durante la misión y de los nuevos reactores de cristalización (GCB2 y capilares 3L), se consideraron 3 parámetros. El primero se refiere a la estanqueidad de todos los niveles de contención, es decir, los reactores GCB2 y capilares 3L, los módulos y la GCF-2 en sí misma. El segundo fue el funcionamiento del sistema de control de temperatura, que se fijó a una temperatura de 20 grados centígrados. El tercero se refiere a la estabilidad mecánica de los experimentos de contradifusión, sobre todo los capilares de vidrio para ver si no se rompían y/o se desplazaban de su posición original dentro de la capa de gel. En todos estos aspectos, el funcionamiento de la GCF se ajustó a las especificaciones establecidas.

Con respecto a la temperatura a la que se programaron los experimentos, ésta se mantuvo constante a 20 °C durante el vuelo en microgravedad. En la figura 4.9 se representan los datos obtenidos de los dos sensores que llevaba dentro la GCF-2. En ella se observa la efectividad del sistema que incorpora la nueva versión de la GCF para el control térmico, en comparación con el perfil de temperatura de la misión Odissea (ver figura 4.6). Durante la misión Odissea se tuvieron variaciones de temperatura de hasta 7 °C. Estas condiciones de inestabilidad térmica se tradujeron en una falta de control de las condiciones experimentales y en una reducción de la efectividad de los experimentos de cristalización en el espacio. Por el contrario, en esta misión la temperatura se mantuvo estable tal como lo

demuestran los valores de la sonda térmica propia del diseño de la GCF-2 y del sensor portátil incorporado dentro del dispositivo. Una vez recuperado el experimento, la temperatura también se mantuvo a 20 °C hasta su llegada al sincrotrón, mediante la utilización de las cajas de transporte "Ground Support Equipment" (GSE) diseñadas ad hoc para este propósito.

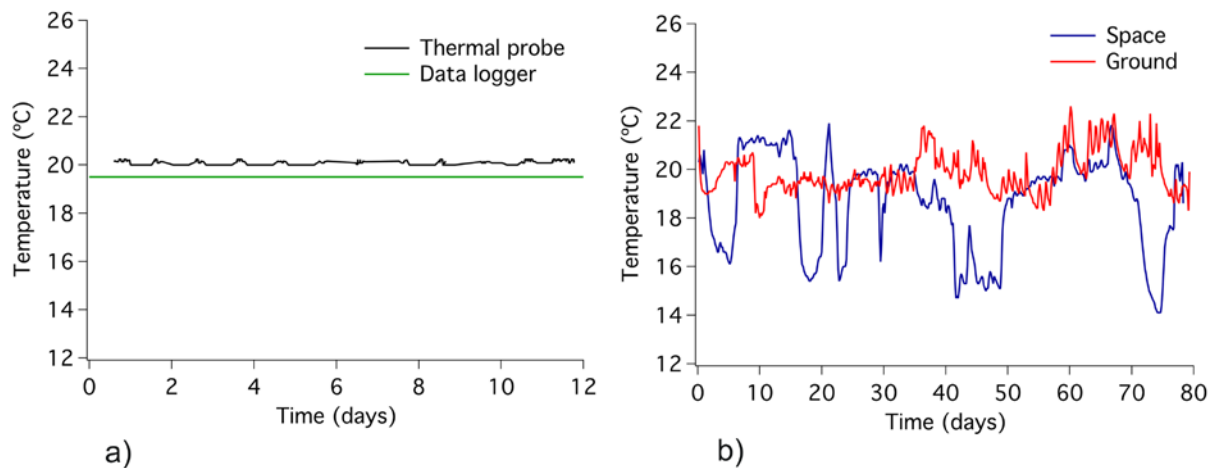


Figura 4.9 a) Perfil de temperatura obtenido durante el vuelo de la GCF-2 abordo de la capsula Foton. En negro se representan los valores obtenidos por sonda térmica utilizada por el sistema de control de temperatura de la GCF-2 que mantuvo la temperatura estable hasta una resolución de 0.1 °C. La línea verde corresponde al perfil de temperatura obtenido por el sensor portátil colocado dentro de la GCF-2, cuya resolución fue de 0.5 °C. Con el fin de hacer una comparación, en b) se muestra el perfil de temperatura de la GCF en la Estación Internacional del Espacio durante la misión Odissea así como también el perfil del experimento control en tierra. En esta misión se registraron variaciones de temperatura de hasta 7 °C para el experimento en el espacio.

4.3.7.2 Cristalización de proteínas

Los experimentos en este proyecto se realizaron con 23 proteínas proporcionadas por 11 laboratorios diferentes (tabla 4.8). También, se incluyeron 33 experimentos realizados con

semillas cristalinas crecidas con antelación al lanzamiento de los experimentos al espacio y 9 experimentos de precipitación de carbonato de calcio.

En los siguientes apartados se describen los resultados de los experimentos de cristalización con ciertas proteínas seleccionadas.

4.3.7.3 Fotosistema II de *Synechococcus elongatus*.

Uno de las reacciones fundamentales en el proceso de la fotosíntesis en plantas es la reacción de oxidación del agua mediante la luz, catalizada por el complejo fotosintético PSII (por sus siglas en inglés). PSII es un complejo proteínico de membrana compuesto por múltiples subunidades. Este complejo lo proporcionó el Max-Volmer-Laboratory de la Universidad Técnica de Berlín en donde se aisló y purificó de la cianobacteria *Synechococcus elongatus*. La cristalización y resolución estructural, la determinaron a una resolución de 3.0 Å. Sin embargo, esta resolución no fue suficiente para revelar a nivel atómico el sitio catalítico en el PSII (un grupo de cuatro átomos de manganeso y uno de calcio en donde el agua se oxida). Por ello la estructura tridimensional de este complejo necesita determinarse a una resolución más allá de 2.5 Å.

Los resultados obtenidos por este grupo sugieren una ligera mejora de la calidad cristalina de los cristales crecidos en el espacio, con respecto a los que crecieron en condiciones terrestres, al observarse una reducción significativa de la mosaicidad en los cristales crecidos en el espacio, comparado con la mosaicidad de los cristales crecidos en el experimento control en tierra. La resolución mejoró de 7.5 Å a 6.5 Å, en el caso de los cristales crecidos con PEG 400 y hasta 6 Å para el caso de aquellos crecidos en PEG 2000.

4.3.7.4 Glucosa isomerasa

Se estudiaron 24 capilares de 0.3 mm de diámetro con esta proteína. En los experimentos en el espacio, en todos los capilares se observaron cristales que en su mayoría tuvieron la forma de agujas y formando conglomerados. El tamaño de los mismos fue desde 115 x 15 x 15 µm hasta 920 x 75 x 75 µm. Los resultados de análisis por difracción de rayos X del grupo investigador de esta proteína muestran que todos estos cristales pertenecían al grupo espacial ortorrómbico primitivo, probablemente $P2_12_12$. No obstante, también se observaron cristales mostrando una morfología diferente. Estos cristales variaron en tamaño

de 130 x 130 x 60 μm hasta 320 x 300 x 90 μm . Varios capilares contenían cristales de ambas morfologías, sin embargo, éstos nunca aparecieron mezclados, es decir, cada morfología creció en una zona específica dentro del capilar. La segunda morfología se observó previamente para esta proteína en cristales crecidos en experimentos en tierra a diferentes temperaturas. Éstos pertenecen al grupo espacial I222. Todas las estructuras de glucosa isomerasa de *Streptomyces rubiginosus* reportadas en el "Protein Data Bank" pertenecen tanto al grupo espacial P2₁2₁2 como al I222, confirmándose las observaciones de los cristales crecidos en esta misión.

Con respecto a los cristales crecidos en condiciones terrestres, también se observaron cristales en todos los capilares y en este experimento solamente se observaron cristales con una morfología de agujas. El tamaño de los mismos fue de 300 x 30 x 30 μm hasta 350 x 75 x 75 μm . Se observó que la mayoría de estos cristales eran significativamente más gruesos que los cristales crecidos en microgravedad.

4.3.7.5 Alfa-quimotripsinógeno A

Esta proteína también pertenece al grupo investigador de la proteína antes descrita. En este caso también se observaron cristales en todos los capilares. En el caso de los cristales obtenidos en el espacio, las dimensiones fueron desde 230 x 25 x 25 μm hasta 270 x 40 x 40 μm . Los cristales muestran diferente morfología, lo que sugiere que pertenecen a grupos espaciales diferentes. En el caso de los cristales obtenidos en tierra, los cristales mostraron morfología de aguja y el tamaño de los mismos varió de 300 x 20 x 20 μm hasta 460 x 40 x 40 μm .

4.3.7.6 Mutante C45S de peroxiredoxin 6 de *Arenicola Marina*

Esta proteína, aportada por el grupo de investigación del departamento de Química Estructural de la Universidad de Lovaina en Bélgica, es un miembro de una familia de peroxidases, ampliamente distribuidas en organismos procariontes y eucariontes. Mediante difracción de rayos X no se observaron diferencias significativas de calidad entre los cristales crecidos en tierra y en el espacio.

4.3.7.7 Proteínas del Laboratorio de Estudios Cristalográficos

*Hemoglobinas de *Lucina pectinata**

La almeja *Lucina pectinata* habita en los sedimentos ricos en sulfuro de la costa suroeste de Puerto Rico en el mar Caribe. Esta almeja tiene unas características biológicas especiales que la hacen un excelente modelo biótico. La almeja ha desarrollado una relación simbiótica quimio-autotrófica con una bacteria que vive dentro de ella, con niveles variables de interacción, a través de mecanismos intracelulares e intercelulares, dentro de un ambiente rico en sulfuro. Uno de los mecanismos de interacción más interesantes se lleva a cabo a través de una familia de hemoproteínas hemoglobina I, Hemoglobina II y Hemoglobina III (Hb I, II y III). Estas tres proteínas y la bacteria coexisten en el tejido interno de la almeja, en la cual se lleva a cabo el intercambio de sulfuro de hidrógeno y oxígeno. La HbI, con 142 aminoácidos es responsable de proveer de sulfuro de hidrógeno a la bacteria mientras que la HbII y la HbIII con 150 y 152 aminoácidos, respectivamente, se encargan de transportar oxígeno a la almeja. El complejo proteínico HbII-III, el cual ha sido aislado del tejido interno de la almeja, también actúa como transportador de oxígeno. La selección del ligando y los mecanismos de discriminación de las proteínas y del complejo, en este escenario biótico, son procesos que no están completamente descritos.

En la misión Fotón se cristalizó de la HbII oxigenada (HbII-O₂) y el complejo HbII-III-CN (ciano-hemoglobina). En la tabla 4.9 se resumen los datos cristalográficos de cristales de HbII-O₂ obtenidos en tierra y en el espacio. Todos ellos cristalizaron en el mismo grupo espacial (P4₂2₁2) y obtuvieron una resolución de hasta 2.0 angstroms (Å).

Tabla 4.7 Datos cristalográficos obtenidos a partir de la difracción de rayos X de HbII-oxy cristalizada en formato de sodio pH 5.0

	ESPACIO			TIERRA		
	hb2_naf5_1	hb2_naf5_2	hb2_naf5_3	hb2_naf5_1	hb2_naf5_2	hb2_naf5_3
Longitud de onda (Å)	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886
Grupo espacial	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2
Parámetros de celda (Å)	a=b=74.30, c=153.63	a=b=73.97, c=153.19	a=b=73.99, c=153.15	a=b=74.30, c=154.23	a=b=74.14, c=153.85	a=b=73.98, c=153.51
Resolución (Å)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)
Reflexiones observadas	285305	309606	268187	259362	316319	340167
Reflexiones independientes	29991	29560	28943	29003	29639	29767
Complejidad (%)	99.2 (99.9)	99.9 (100.0)	99.0 (98.1)	97.8 (100.0)	99.2 (98.2)	99.2 (100.0)
R _{merge} (%)	11.8 (44.0)	13.8 (33.4)	14.8 (45.3)	11.4 (58.3)	9.2 (57.9)	8.9 (30.3)
I/σ (I) promedio	17.4 (5.7)	16.2 (8.2)	13.0 (3.6)	15.2 (3.6)	24.4 (4.3)	24.8 (9.0)
Redundancia	9.6 (8.5)	10.5 (9.5)	9.4 (7.7)	8.9 (9.2)	10.7 (10.2)	11.5 (11.8)
Mosaicidad	0.58	0.43	0.51	0.96	0.60	0.717
Factor B	30.9	28.6	29.8	38.5	34.9	30.8

A partir de los datos de difracción se observa que los indicadores de calidad (Wlodawer et al. 2008) tales como el cociente $I/\sigma(I)$ y el factor R fueron mejores para los cristales crecidos en tierra. Sin embargo, respecto a la mosaicidad y el factor B, los valores fueron mejores para los cristales crecidos en el espacio (figura 4.10).

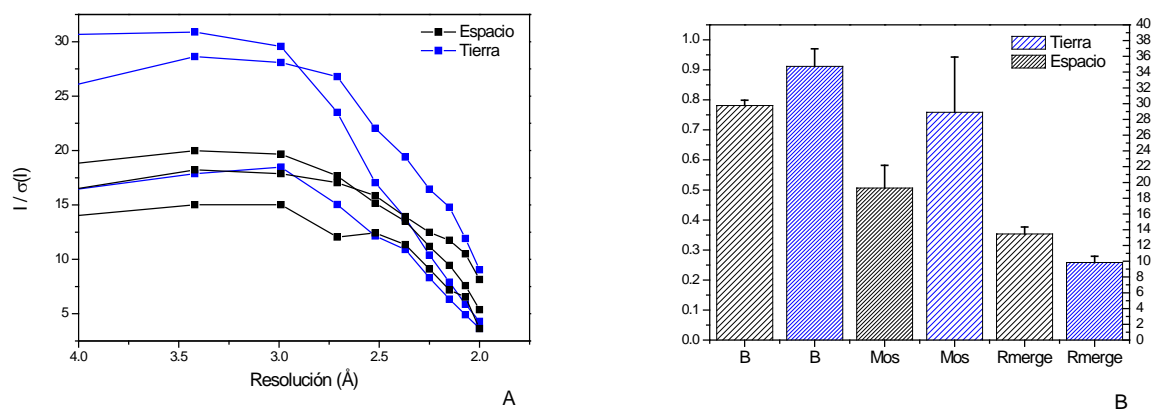


Figura 4.10. Índices de calidad de los datos de difracción de cristales de HbII oxy crecidos en tierra y en microgravedad. En A se muestra el cociente $I/\sigma(I)$ y en B se representan los valores del factor B, mosaicidad y R_{merge} .

Para el caso del complejo HbII-III CN, los datos cristalográficos indican una calidad más alta para los cristales obtenidos en tierra (tabla 4.10).

Tabla 4.8 Datos cristalográficos obtenidos a partir de la difracción de rayos X de HbII-III-CN cristalizada en formato de sodio pH 5.0

	ESPACIO			TIERRA		
	hb2_naf5_1	hb2_naf5_2	hb2_naf5_3	hb2_naf5_1	hb2_naf5_2	hb2_naf5_3
Longitud de onda (Å)	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886
Grupo espacial	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2
Parámetros de celda (Å)	a=b=74.30, c=153.63	a=b=73.97, c=153.19	a=b=73.99, c=153.15	a=b=74.30, c=154.23	a=b=74.14, c=153.85	a=b=73.98, c=153.51
Resolución (Å)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)	20.0-2.00 (2.07-2.00)
Reflexiones observadas	285305	309606	268187	259362	316319	340167
Reflexiones independientes	29991	29560	28943	29003	29639	29767
Compleitud (%)	99.2 (99.9)	99.9 (100.0)	99.0 (98.1)	97.8 (100.0)	99.2 (98.2)	99.2 (100.0)
R _{merge} (%)	11.8 (44.0)	13.8 (33.4)	14.8 (45.3)	11.4 (58.3)	9.2 (57.9)	8.9 (30.3)
I/σ (I) promedio	17.4 (5.7)	16.2 (8.2)	13.0 (3.6)	15.2 (3.6)	24.4 (4.3)	24.8 (9.0)
Redundancia	9.6 (8.5)	10.5 (9.5)	9.4 (7.7)	8.9 (9.2)	10.7 (10.2)	11.5 (11.8)
Mosaicidad	0.58	0.43	0.51	0.96	0.60	0.717
Factor B	30.9	28.6	29.8	38.5	34.9	30.8

La relación de la intensidad sobre el ruido ($I(I)$) es mejor para estos cristales como lo muestra la figura 4.11. Los valores de R_{merge} son similares pero no así el factor B y la mosaicidad, para los cuales los cristales crecidos en tierra muestran una estadística mejor (figura 4.11).

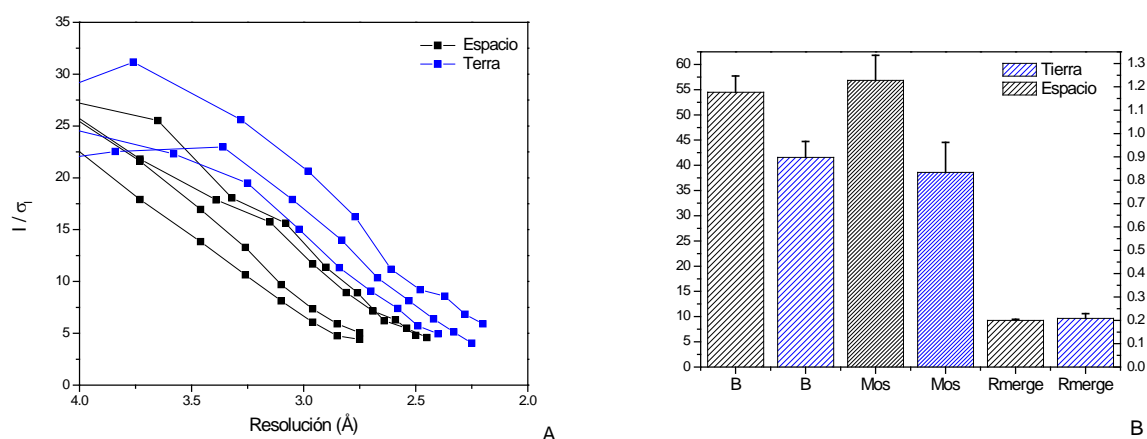


Figura 4.11. Índices de calidad de los datos de difracción de cristales de HbII-III ciano obtenidos en tierra y en microgravedad. En A se muestra el cociente $I/\sigma(I)$ y en B se representan los valores del factor B, mosaicidad y R_{merge} .

Insulina

La insulina es una hormona anabólica de origen pancreático que interviene en el metabolismo de glucosa, regulando su absorción por las células (Nelson y Cox 2008). Una disminución de la secreción de insulina, combinado a una resistencia a su acción, resulta en una diabetes de tipo 2. Incluso en ausencia de diabetes, una resistencia a la insulina se asocia a menudo a obesidad, hipertensión, dislipidemia y aterosclerosis (Saltiel y Pessin 2002). La biosíntesis de esta hormona, se lleva a cabo dentro de las células beta del páncreas a través de los precursores pre-proinsulina y proinsulina (Dunn 2005; Nelson y Cox 2008). El monómero de insulina está formado por dos cadenas, una cadena A de 21 residuos y una cadena B de 30 residuos, ambas unidas por un par de enlaces disulfuro, A7-B7 y A20-B19; y un enlace disulfuro intracadena adicional una A6 y A11. Mientras que la insulina es sintetizada y se almacena en el páncreas como hexámero, la forma activa es el monómero (Adams et al. 1969; Baker et al. 1988; Smith et al. 2003).

Las tablas 4.11 y 4.12 muestran los datos cristalográficos de cristales de insulina crecidos en tierra y en microgravedad, respectivamente. Se analizaron seis cristales de cada ambiente de crecimiento y de diferentes reactores de crecimiento.

Tabla 4.9. Datos cristalográficos de difracción de rayos X de cristales de insulina crecidos en tierra.

	Ins3lg39_1	Ins3lg39_3	Ins3lg39_4	Ins3lg39_5	Ins3lg41_3	Ins3lg41_4
Longitud de onda (Å)	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886
Grupo espacial	I2 ₁ 3	I2 ₁ 3	I2 ₁ 3	I2 ₁ 3	I2 ₁ 3	I2 ₁ 3
Parámetros de celda (Å)	a=b=c=77.85	a=b=c=77.61	a=b=c=77.63	a=b=c=77.3	a=b=c=77.81	a=b=c=77.95
Resolución (Å)	20.0-1.48 (1.53-1.48)	20.0-1.60 (1.66-1.60)	20.0-1.55 (1.61-1.55)	20.0-1.75 (1.81-1.75)	20.0-1.60 (1.66-1.60)	20.0-1.65 (1.71-1.65)
Reflexiones observadas	112775	84060	62931	38319	88833	76345
Reflexiones independientes	13058	10338	11267	7606	10436	9641
Compleitud (%)	98.5 (100.0)	99.2 (100.0)	98.4 (100.0)	95.9 (100.0)	99.2 (100.0)	99.7 (100.0)
R _{merge} (%)	8.0 (35.8)	9.5 (37.0)	11.1 (40.6)	8.5 (34.6)	14.3 (35.3)	18.4 (39.4)
I/σ (I) promedio	21.2 (6.1)	17.1 (5.7)	10.6 (3.8)	14.2 (4.3)	11.4 (5.8)	11.4 (5.8)
Redundancia	8.6 (8.7)	8.1 (8.2)	5.6 (5.6)	5.0 (5.1)	8.5 (8.6)	7.9 (8.0)
Mosaicidad	0.46	0.36	0.54	0.70	0.49	0.31
Factor B	21.1	24.8	24.2	30.7	22.2	23.2

Tabla 4.10. Datos cristalográficos de difracción de rayos X de cristales de insulina crecidos en microgravedad.

	Ins3ls41_2	Ins3ls41_3	Ins3ls41_4	Ins3ls41_4b	Ins3ls41_5	Ins3ls42_4
Longitud de onda (Å)	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886
Grupo espacial	$I2_13$	$I2_13$	$I2_13$	$I2_13$	$I2_13$	$I2_13$
Parámetros de celda (Å)	a=b=c=78.42	a=b=c=77.52	a=b=c=77.78	a=b=c=77.80	a=b=c=77.84	a=b=c=77.4
Resolución (Å)	20.0-1.55 (1.61-1.55)	20.0-1.80 (1.86-1.80)	20.0-1.50 (1.55-1.50)	20.0-1.40 (1.45-1.40)	20.0-1.45 (1.50-1.45)	20.0-1.81 (1.87-1.81)
Reflexiones observadas	98160	63466	107411	80041	121185	38110
Reflexiones independientes	11485	7347	12612	15192	13894	7098
Complejidad (%)	97.2 (100.0)	99.7 (100.0)	99.3 (100.0)	97.5 (100.0)	99.0 (100.0)	98.8 (99.9)
R_{merge} (%)	10.2 (37.1)	11.0 (39.1)	8.3 (35.3)	5.6 (46.4)	15.6 (36.0)	9.0 (43.8.)
$I/\sigma(I)$ promedio	16.4 (5.9)	15.6 (6.2)	19.44 (3.5)	22.3 (3.5)	10.1 (6.3)	14.7 (3.7)
Redundancia	8.6 (8.9)	8.6 (8.5)	8.5 (8.6)	5.3 (5.5)	8.7 (8.8)	5.4 (5.4)
Mosaicidad	0.64	0.63	0.295	0.27	0.32	0.508
Factor B	22.9	27.0	21.4	20.0	19.5	31.7

Los cristales pertenecen al grupo espacial $I2_13$. Todos los parámetros de calidad son similares para los cristales crecidos en ambos escenarios, no encontrándose diferencias significativas; tal como se puede apreciar en la figura 4.12.

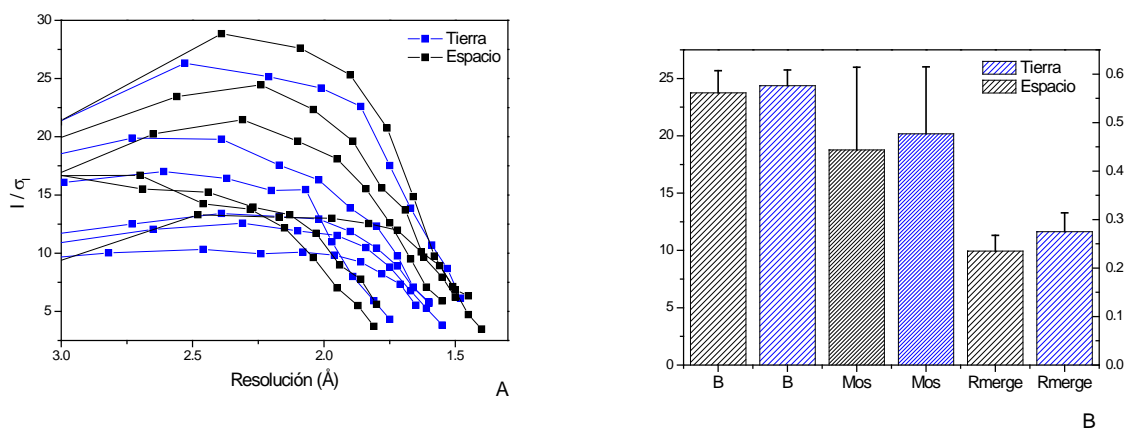


Figura 4.12. Comparación de los parámetros de calidad de los datos de difracción de cristales de insulina obtenidos en tierra y en microgravedad. En A se muestra el cociente I/σ y en B se esquematizan los valores del factor B, mosaicidad y Rmerge.

4.4 Conclusiones

Uno de los principales objetivos de este capítulo fue establecer un protocolo de uso de la técnica de contradifusión en el espacio. Para ello se han adaptado y/o diseñado reactores de cristalización (basado en las cajas GCB) para su utilización en naves espaciales y que deben de soportar las condiciones de lanzamiento y aterrizaje (p.ej., en la nave espacial Foton), así como para su instalación dentro de la ISS. Los resultados de este estudio validan los diferentes dispositivos diseñados para su uso en experimentos de cristalización de macromoléculas biológicas en condiciones de microgravedad al igual que en condiciones terrestres.

Durante la misión Odissea, se observaron fluctuaciones importantes de la temperatura dentro de la GCF durante el periodo de permanencia del dispositivo experimental en la ISS. Con el fin de mantener este parámetro constante durante todo el experimento, se llevaron a cabo nuevos experimentos en el marco de la misión Foton M-3 para la que se rediseñó el dispositivo experimental usado anteriormente utilizado en las misiones Andromeda y Odissea. El nuevo dispositivo de la GCF (denominado GCF-2) incluyó un control activo de la

temperatura en el contenedor de los reactores de cristalización (GCB-2 y capilares 3L). También se diseñó un contenedor de transporte con control térmico, que permitió mantener la temperatura a $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, desde la preparación de los experimentos en el sitio de lanzamiento hasta su recuperación y posterior transporte a la instalación de radiación Sincrotrón, para el análisis por difracción de rayos X. Para adaptar el experimento a la GCF-2 y aumentar el número de experimentos se fabricaron nuevas cajas de cristalización, GCB-2, y nuevos capilares 3L. Los resultados de esta misión mostraron que los dispositivos funcionaron sin ninguna incidencia. De igual forma se constató que el control activo de la temperatura funcionó satisfactoriamente.

Esta última misión, permitió realizar un análisis comparativo de la calidad cristalina bajo condiciones idénticas de cristalización en la tierra y en el espacio. A partir de los resultados de difracción de rayos X de proteínas cristalizadas en las tres misiones se observó, por una parte, que la calidad de los cristales obtenidos por la técnica de contradifusión (en condiciones de microgravedad o en la tierra) fue mejor que la calidad de cristales de las mismas proteínas obtenidos por otras técnicas en condiciones terrestres. Por otra parte, en relación a la calidad cristalina de los cristales crecidos en microgravedad y la de los cristales crecidos por la técnica de contradifusión en geles en los experimentos control en tierra, los resultados no mostraron diferencias significativas. En base a lo anterior se demuestra que la técnica de contradifusión en geles mimetiza de forma idónea las condiciones favorables de convección reducida, que se pueden encontrar en microgravedad. Por tanto, se pueden crecer cristales de calidad similar en ambos escenarios.

Asimismo, los resultados obtenidos para diferentes proteínas cristalizadas por la técnica de contradifusión ya sea, implementada en tierra o en el espacio, muestran que se pueden obtener diferentes polimorfos de una misma proteína, ampliándose de esta manera las posibilidades de resolución estructural.

BIBLIOGRAFIA

- Adams M.J., Blundell T.L., Dodson E.J., Dodson G.G., Vijayan M., Baker E.N., Harding M.M., Hodgkin D.C., Rimmer B. y Sheat S. 1969. Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature* **224**: 491.
- Baker E.N., Blundell T.L., Cutfield J.F., Cutfield S.M., Dodson E.J., Dodson G.G., Hodgkin D.M.C., Hubbard R.E., Isaacs N.W., Reynolds C.D., Sakabe K., Sakabe N. y Vijayan N.M. 1988. The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1.5 Å Resolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **319**: 369.
- Bosch R., Lautenschlager P., Potthast L. y Stapelmann J. 1992. Experiment equipment for protein crystallization in µg facilities. *J. Cryst. Growth* **122**: 310.
- Carotenuto L., Berisio R., Piccolo C., Vitagliano L. y Zagari A. 2001. Video observation of protein crystal growth in the advanced protein crystallization facility aboard the space shuttle mission STS-95. *J. Cryst. Growth* **232**: 481.
- Dunn M.F. 2005. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer - a review. *Bio Metals* **18**: 295.
- Durbin S.D. y Feher G. 1996. Protein crystallization. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **47**: 171.
- García-Ruiz J.M. 2003. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* **368**: 130.
- García-Ruiz J.M. y Moreno A. 1994a. Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method. *Acta Cryst. D* **50**: 484.

- García-Ruiz J.M. y Moreno A. 1994b. Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **50**: 484.
- García-Ruiz J.M., Otálora F., Novella M.L., Gavira J.A., Sauter C. y Vidal O. 2001. A supersaturation wave of protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **232**: 149.
- Grant M.L. y Saville D.A. 1991. The role of transport phenomena in protein crystal growth. *J. Cryst. Growth* **108**: 8.
- Grases Freixedas F., Costa Bauzá A. y Söhnel O. 2000. *Cristalización en disolución*. Editorial Reverté, S.A, Barcelona.
- Henisch H.K. 1970. *Crystal growth in gels*. 2nd ed. Dover Publications, Inc., New York.
- Henisch H.K. 1988. *Crystals in gels and Liesegang rings*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kabsch W. 1993. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**: 795.
- Kirschhock C.E.A., Otálora F., Piazza R. y Mazzoni S. 2008. Aggregation and crystallization in space. In *Europhysicsnews*, pp. 25. European Physical Society and EDP Sciences, Lognes, France.
- Kundrot C.E., Judge R.A., Pusey M.L. y Snell E.H. 2001. Microgravity and Macromolecular Crystallography. *Cryst. Growth Des.* **1**: 87.
- Lee C.P. y Chernov A.A. 2002. Solutal convection around growing protein crystals and diffusional purification in Space. *J. Cryst. Growth* **240**: 531.
- Leslie A. 1999. Integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallographica Section D* **55**: 1696.

- Lin H., Rosenberger F., Alexander J.I.D. y Nadarajah A. 1995. Convective-diffusive transport in protein crystal growth. *J. Cryst. Growth* **151**: 153.
- Littke W. y John C. 1984. Materials: Protein single crystal growth under microgravity. *Science* **225**: 203.
- Lorber B., Ng J.D., Lautenschlager P. y Giegé R. 2000. Growth kinetics and motion of thaumatin crystals during USML-2 and LMS microgravity missions and comparison with earth controls. *J. Cryst. Growth* **208**: 665.
- Maes D., Gonzalez-Ramirez L.A., Lopez-Jaramillo J., Yu B., De Bondt H., Zegers I., Afonina E., Garcia-Ruiz J.M. y Gulnik S. 2004. Structural study of the type II 3-dehydroquinase dehydratase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Acta Crystallographica Section D* **60**: 463.
- McPherson A. 1999. *Crystallization of biological macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- McPherson A., Greenwood A. y Day J. 1991. The effect of microgravity on protein crystal growth. *Adv. Space Res.* **11**: 343.
- McPherson A., Malkin A.J., Kuznetsov Y.G., Koszelak S., Wells M., Jenkins G., Howard J. y Lawson G. 1999. The effects of microgravity on protein crystallization: evidence for concentration gradients around growing crystals. *J. Cryst. Growth* **196**: 572.
- Nanev C., N, Penkova A. y Chayen N. 2004. Effects of Buoyancy-Driven Convection on Nucleation and Growth of Protein Crystals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1027**: 1.
- Nelson D.L. y Cox M.M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

- Nerad B.A. y Shlichta P.J. 1986. Ground-based experiments on the minimization of convection during the growth of crystals from solution. *J. Cryst. Growth* **75**: 591.
- Ng J.D. 2002. Space-grown protein crystals are more useful for structure determination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **974**: 598.
- Otálora F., Novella M.L., Gavira J.A., Thomas B.R. y García-Ruiz J.M. 2001. Experimental evidence for the stability of the depletion zone around a growing protein crystal under microgravity. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **57**: 412.
- Saltiel A.R. y Pessin J.E. 2002. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology* **12**: 65.
- Savino R. y Monti R. 1999. Convection induced by residual-g and g-jitters in diffusion experiments. *Int. J. Heat Mass Transfer* **42**: 111.
- Simic-Stefani S., Kawaji M. y Hu H.H. 2006. G-jitter-induced motion of a protein crystal under microgravity. *J. Cryst. Growth* **294**: 373.
- Smith G.D., Pangborn W.A. y Blessing R.H. 2003. The structure of T₆ human insulin at 1.0 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D* **59**: 474.
- Snell E.H. y Helliwell J.R. 2005. Macromolecular crystallization in microgravity. *Rep. Prog. Phys* **68**: 799.
- Snell E.H., Judge R.A., Crawford L., Forsythe E.L., Pusey M.L., Sportiello M., Todd P., Bellamy H., Lovelace J., Cassanto J.M. y Borgstahl G.E.O. 2001. Investigating the effect of impurities on macromolecule crystal growth in microgravity. *Cryst. Growth Des.* **1**: 151.
- Vergara A., Lorber B., Sauter C., Giegé R. y Zagari A. 2005. Lessons from crystals grown in the Advanced Protein Crystallisation Facility for conventional crystallisation applied to structural biology. *Biophys. Chem.* **118**: 102.

- Vergara A., Lorber B., Zagari A. y Giege R. 2003. Physical aspects of protein crystal growth investigated with the Advanced Protein Crystallization Facility in reduced-gravity environments. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **59**: 2.
- Wlodawer A., Minor W., Dauter Z. y Jaskolski M. 2008. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J.* **275**: 1.

Capítulo 5

Publicaciones y Patentes

ARTICULOS PUBLICADOS QUE FORMAN PARTE DE ESTA TESIS

En esta tesis se incluyen cuatro artículos publicados en revistas internacionales indexadas y en las que se recopilan los resultados más importantes de este trabajo. A continuación se muestra una lista con los artículos que se describen dentro de los capítulos 2, 3 y 4 con la referencia bibliográfica completa y un resumen.

- **ARTÍCULO 1.**

Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques. *Juan M. García-Ruiz, Luis A. González-Ramírez, José A. Gavira, Fermín Otálora.* (2002). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58**: 1638-1642.

Resumen.

En este artículo se describe el diseño, fabricación y evaluación del dispositivo de cristalización denominado Granada Crystallization Box (GCB). La GCB es un nuevo dispositivo de cristalización de macromoléculas biológicas para realizar experimentos de cristalización mediante el método de contradifusión. En este trabajo se describe como utilizarlo en experimentos de cristalización de proteínas. El dispositivo permite explorar y aprovechar las ventajas del acoplamiento entre cristalización y difusión, proceso característico de la técnica de contradifusión permitiendo crecer cristales de proteínas de calidad óptima. El funcionamiento de la técnica de contradifusión en este dispositivo, se basa en la difusión del agente precipitante y de la proteína en direcciones opuestas, de forma que durante los procesos de nucleación y crecimiento se producen gradientes elevados de concentración. Este fenómeno da lugar a una onda de sobresaturación que viaja a través de la cámara de crecimiento del dispositivo. Esta onda de sobresaturación barre diferentes condiciones de cristalización con valores de sobresaturación progresivamente más bajos mientras viaja a lo largo de la cámara de crecimiento.

Una de las posibles implementaciones prácticas de la técnica de contradifusión es el método de acupuntura en geles (gel acupuncture method or GAME, su acrónimo en inglés). En este método la disolución de proteína está confinada dentro de un capilar que se inserta en una capa de gel tamponado y el agente precipitante se coloca sobre la parte superior del gel. La GCB permite el desarrollo práctico de esta técnica de una forma sencilla pudiendo usarse en diferentes configuraciones: a) para crecer cristales de

pequeñas moléculas en medios gelificados; b) Para crecer cristales de proteínas dentro de capilares a partir de disoluciones gelificadas o no; c) Para realizar una búsqueda de condiciones de cristalización por la técnica de contradifusión. La GCB dispone de un depósito para añadir el gel, una guía para sostener los capilares, una tapa y una base para su colocación. En este trabajo se exponen las ventajas del uso de la GCB para la cristalización de proteínas y en particular se muestra: 1) las ventajas que ofrecen los líquidos viscosos, geles y/o microgravedad y que se maximizan usando capilares de diámetros muy pequeños; en los cuales se crea un escenario de transporte de masa perfectamente difusivo; 2) el volumen y consumo de proteína se reduce considerablemente con respecto a las técnicas clásicas de cristalización. 3) un solo capilar barre un número de condiciones de cristalización similar a llevar a cabo muchos ensayos por otras técnicas (por ejemplo, por difusión de vapor). 4) permite una visualización sencilla de todo el proceso de cristalización, en tiempo real; 5) evita la manipulación directa de los cristales para difracción de rayos X, permitiendo también el realizar la crioprotección para difracción a baja temperatura.

Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques

Juan Ma. Garcia-Ruiz,^{*} Luis Antonio Gonzalez-Ramirez, José Antonio Gavira[†] and Fermín Otálora

Laboratorio de Estudios Cristalográficos. IACT. Campus Fuentenueva. Facultad de Ciencias. 18002-Granada, Spain.
E-mail: jmgruiz@ugr.es

Granada Crystallisation Box (GCB) is a new crystallisation device designed to perform counter-diffusion experiments. Here we describe the device and its use for protein crystallisation purposes. GCB allows one to explore and exploit the coupling between crystallisation and diffusion. The role of viscous fluids, gels and/or microgravity can be enhanced by using capillary volumes, creating a perfect diffusive mass transport scenario. The use of capillaries also reduces the consumption of macromolecules and avoids the handling of crystals for X-ray diffraction data collection.

Keywords: crystallisation device, protein, counter-diffusion

1. Introduction

Biological macromolecules are currently crystallised from supersaturated or supercooled solutions (McPherson, 1999; Ducruix & Giegé, 1999). The simplest crystallisation method is the batch method in which the protein solution and the solution of the precipitating agent are mixed to achieve a supersaturated solution. The main recognised limitation of the batch technique is the lack of control over the development in time of supersaturation, because the supersaturation value is instantaneously achieved and the rate of change of supersaturation is fixed and controlled by the very growth process. This is a severe restriction for compounds nucleating at very high supersaturation (as is the case of most biological macromolecules), because the crystal grows (at least during the first stages) from highly supersaturated solutions required to attain nucleation, which limits the crystal quality and size. For this reason, most of the crystallisation protocols involving this kind of substances make use of some active mechanism to exceed supersaturation from an initially undersaturated or saturated solution. These mechanisms are based on temperature changes (thermal methods), evaporation of the solvent (vapour diffusion methods), or slow mixing of solutions either through a membrane (dialysis) or free liquid interface (free interface diffusion methods). These methods, when correctly adjusted, are able to produce crystals nucleated close to the lowest possible supersaturation. Three different problems are still present in these methods: first the rate of change of supersaturation must be adjusted for them to work, if the rate of increase of supersaturation is too slow, experimental time is wasted and, even worse, if it is too fast, the benefits of the method are lost due to the excess supersaturation accumulated during the nucleation induction time; second, this rate of increase of supersaturation is dependent on the solubility of the compound, so several screening experiments are needed to determine its optimum value; and third, very often the nucleation and growth kinetics are governed by more than one parameter, which severely increases the number of screening experiments required. To overcome these

limitations, new methods have been proposed in which the nucleation and crystal growth proceeds far from equilibrium, the main practical consequence of this being the existence of large gradients of two or more of the quantities controlling supersaturation both across the system and along the experimental time. These gradients ensure that crystals growing at different points of the growth cell do it under a different supersaturation values and different rate of change of supersaturation, reducing the number (or even eliminating the need) of screening and rate optimisation experiments. This is the case of the so-called counter-diffusion methods (García-Ruiz, 1981; García-Ruiz, 2002).

Based on our experience in one-dimensional counter-diffusion methods (Henisch & García-Ruiz, 1985; García-Ruiz, 1991; García-Ruiz & Moreno, 1991; García-Ruiz *et al.*, 1993; Otálora & García-Ruiz, 1996) we have developed and made commercially available a new device for implementing counter-diffusion experiments (though not limited to them). The main features and uses of this device, called "Granada Crystallisation Box" (GCB), are described in this article. GCB is primarily intended for (though not limited to) the growth of crystals of biological macromolecules, so it will be described here in this context. The capabilities of GCB in other crystal growth experiments will be published separately. The advantages of this new setup, discussed through the text, can be summarized as follows:

(i) It works under diffusion-controlled mass transport, which is known to produce better ordered crystal lattices provided the growth proceeds in the diffusion controlled or mixed regime. The role of viscous fluids, gels or microgravity is enhanced by using capillary volumes

(ii) It automatically searches for the optimal crystallisation conditions. Because of the properties of counter-diffusion experiments, one single capillary scans the same precipitation region in the phase space as do many drops. As a consequence, only one capillary is needed per precipitating agent.

(iii) It reduces the consumption of macromolecule. Just 1 to 10 μl of protein solution is needed per capillary (smaller volumes can also be used for screening purposes in capillaries smaller than 0.1 mm in diameter). As the number of experiments required to get good crystals is reduced (see above), further reductions in global sample consumption are obtained.

(iv) It minimises the volume of the experimental set-up. 120 capillaries can be stacked in the holder shown in Figure 1. The design is modular and easily adaptable to different requirements in experiment storage. This is particularly useful in microgravity science. Up to 30 GCBs can be piled in a volume of about $10 \times 10 \times 10$ cm.

(v) It is very well suited for X-ray analysis. GCB provides an easy and safe way to transport crystals to X-ray diffraction facilities. In situ X-ray crystallography is easy for crystals grown inside X-ray capillaries. No handling of crystals is required, eliminating the risk of crystal loss or quality degradation during handling and mounting. At the same time, GCB can also be used for cryo-crystallography, flash-cooling protocols have been tested successfully for GCB capillaries containing crystals as grown.

(vi) It makes easy the visualisation of the growth process. Transparent glass capillaries are very well suited for microscopic observation. The fact that they are contained themselves in a transparent box makes easier and safer the observation under the microscope.

2. Description of the GCB

Figure 1a shows a general overview of the GCB set including several boxes mounted on a rack. The GCB consist of three parts

[†] Present address: Laboratory for Structural Biology, Materials Science Building, UAH, Huntsville AL-35899, USA.

made of polystyrene: the box body (Figure 1b) consisting of a narrow box open on one side, the capillary holder (Figure 1c) that fits into the body and the cover lid (Figure 1b top) that closes the box. The box body has been designed to be small enough for experiments storage and transport yet being able to hold up to six different crystallisation experiments. The box is transparent and narrow to allow microscopic observation of the experiments. The rationale behind the design of the capillary holder is as follows: the density of experiments must be maximised but without compromising either easy insertion and handling of capillaries or the microscopic observation capabilities. The capillary holder can accommodate capillaries of diameter ranging from 0.1 mm to 1.5 mm. The construction of the holder as a separate part was decided for flexibility because this design allows the implementation of techniques other than counter-diffusion in capillaries within the same box body (see section 4). Polystyrene was used as the building material balancing the benefits and drawbacks of different materials for optical quality, chemical stability, physical stability and price. A plastic rack is available for the storage of the GCB boxes upside (see Figure 1a).

3. Counter-diffusion in the GCB

The GCB is designed mainly for counter-diffusion crystal growth experiments inside glass capillaries. Performing a counter-diffusion

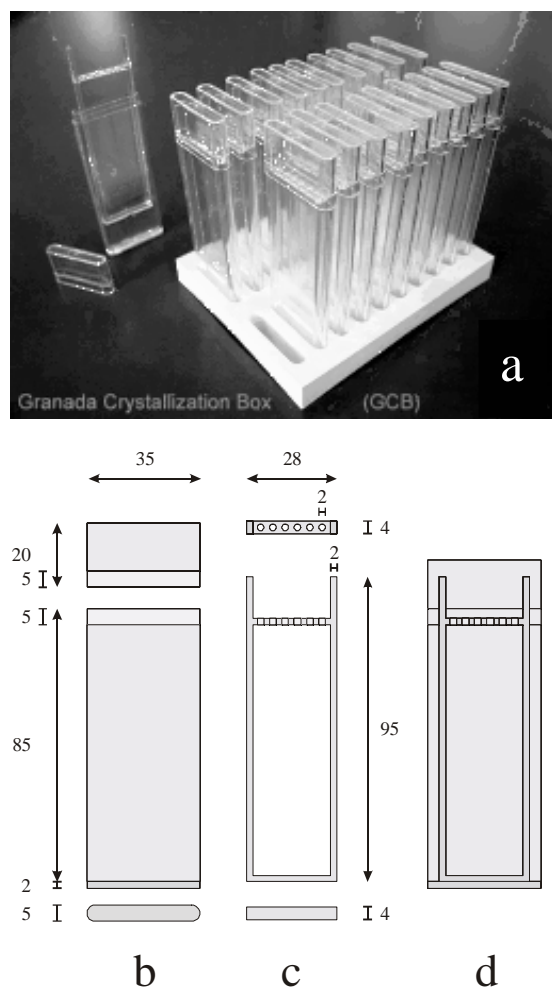


Figure 1

View of the Granada Crystallisation Box. b-d) Sketch of the GCB components showing: b) the body of the box, and c) the capillary holder. All dimensions are given in mm.

protein crystal growth experiment with the GCB is very easy using the so-called Gel Acupuncture MEthod (GAME) from which the GCB inherits many of its advantages, particularly the automatic search for optimum crystallisation conditions and the possibility of performing handling-free diffraction data collection.

The first step to implement this kind of experiment is to prepare the buffered sol of the gel precursor (Figure 2a). For simplicity we focus here only on agarose gels because they are reversible and have been demonstrated not to interact with protein molecules (Finet *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 1998). Other gels like silica or polyacrylamide can be used as well. Agarose gel preparation involves mixing the appropriate volume of buffer solution with agarose powder under continuous stirring for a final agarose concentration of 0.5 % w/v. This recommended agarose concentration is enough to maintain the capillaries and to avoid disordered fracture of the gel. The mixture is then heated to boiling in order to break the cross-links of the agarose fibres; at this point the agarose solution becomes transparent. After keeping the solution at this temperature for about two minutes under continuous stirring, pour 3 ml in the GCB box body (Figure 2c) in which the capillary holder was previously inserted (Figure 2b). The sol is then allowed to cool to room temperature, which takes few minutes. The cross-links of the agarose will be set to yield a gel with a strength that depends on the agarose type used in this study. We recommend an agarose with a gelling temperature of about 37°C.

While the gel is setting, fill the capillaries with your buffered protein solution. To do this, cut the capillary to 7 cm length ensuring that the two ends of the capillary are open and introduce the lower end of the capillary into the protein solution (Figure 2d). The

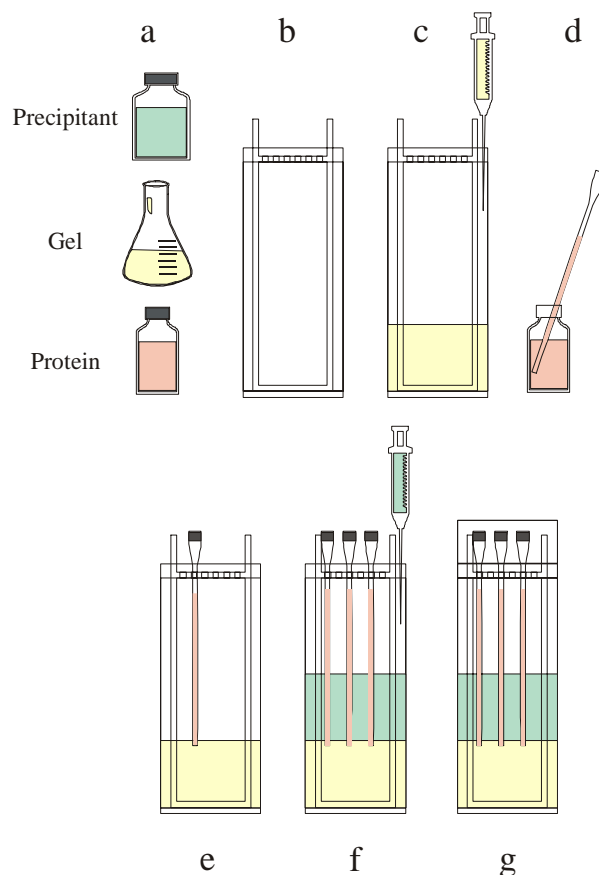


Figure 2

Schematic sequence of experimental set-up. See text for explanation.

solution enters the tube by capillarity. Fill the capillary to your convenience. Filling to a height of 5–6 cm is the common practice in our laboratory, because this length ensures the benefits of counter-diffusion for reasonable experimental times. Then seal the upper end of the capillary with a small amount of vacuum grease or your preferred sealing material.

Next step is to thrust the capillary into the gel layer (Figure 2e). To do it, introduce the capillary through one of the holes in the GCB capillary holder and insert it into the gel. Inserting the capillary 2–3 mm is just enough to keep it upside up, but note that this penetration length is a variable to tune the window of screened crystallisation conditions. Longest penetration length increases the physical buffer of the counter-diffusion arrangement lowering the rate at which the salt invades the capillary containing the protein. Up to six capillaries per GCB can be set in this way.

Finally, pour the buffered solution of your precipitating agent on top of the gel layer (Figure 2f). Typically a volume equal to the volume of the gel layer, i.e. 3 ml is recommended. Note that with this 1:1 ratio, the final precipitant concentration after homogenization of the experiment is half the initial concentration and close the box with the lid (Figure 2g) adding some vacuum grease to the body-lid joint before closing to completely avoid evaporation. Optionally, the box body and lid can be fixed covering the joint with adhesive tape for further stability while handling of the box.

Alternatively, another counter-diffusion setup can be implemented. The procedure is even simpler. Pour 3 ml of the buffered precipitating agent solution into the body of the GCB. Then, insert the capillary holder in the body of the GCB. Now, prepare an agarose sol of your buffered protein solution at an agarose concentration of 0.2 % w/v. According to our experience, this agarose concentration is the minimum to avoid the leakage from the capillary to the precipitating agent solution. To do it prepare the buffered agarose solution at a concentration of 2 % w/v and maintain the sol at 40°C, i.e., just a few degrees above the gelling temperature. Pour your protein solution into an Eppendorf tube and hold it in your hand to maintain it at a temperature of 37°C. Pour a volume of agarose sol equal to 1/10 of the volume of the protein solution into the Eppendorf and assure complete mixing by shaking the tube in your hand. Then fill and seal the capillary as above. Finally, introduce the capillary through one of the holes in the GCB capillary holder and soak its lower end into the solution of precipitating agent.

The amount of protein solution needed for these experiments depends obviously on the capillary diameter and on how much you fill the capillaries. Filling the capillaries up to a length of 50 or 60 mm is recommended in order to have a wide screening of the phase diagram. The recommended capillary diameter ranges from 0.1 mm for screening experiments to 0.5 mm for producing large crystals. Within these limits, the minimum protein solution volume required to implement GCB experiments is 0.39 μl per capillary for screening, the maximum is 11.78 μl for producing large crystals and around 4 μl for obtaining crystals of a suitable size for X-ray data collection.

4. Other methods

As GCB has been defined to implement counter-diffusion crystal growth inside capillaries, it is perfectly suited for experiments having a subset of the experimental requirements of counter-diffusion techniques. Many different experimental setups can be implemented by combining gelled or ungelled solutions with or without capillaries. Two evident examples are crystal growth inside capillaries by the batch method and inside gel by counter-diffusion directly in the body of the GCB. In the first case the benefits of

counter-diffusion are not exploited and GCB is used just as a container providing a capillary holder, microscopy observation and easy handling; in the second case the benefits of capillaries are lost but those of counter-diffusion techniques are gained.

A capillary gel microbatch setup can be implemented easily by the following protocol: Prepare your buffered precipitating agent solution and mix it with agarose at 0.25 %. Boil it for 1 minute and then cool it to 40°C. Maintain the sol at this temperature. Mix the appropriate volume of the protein solution with the appropriate volumes of the sol. In other words, proceed as to prepare a drop for microbatch. Then, suck the drop into the capillary by capillarity. Seal both ends of the capillary and hold it in the GCB capillary holder. The use of oil with microbatch technique inside capillaries can be also implemented (Moreno *et al.*, 2002).

The growth of crystals inside gels by counter-diffusion is very simple. This method is ideal to prepare many large high-quality crystals for special purposes such as having many crystals for testing some experimental procedure, but it consumes a larger amount of protein than usual techniques. Make a sol of agarose at 1.2 % w/v by boiling the mixture for a couple of minutes. Prepare the protein solution. Let the agarose sol cool down to a temperature of about 40°C. Keep the agarose sol at this temperature. Under stirring, mix one part of agarose sol with ten parts of protein solution, so that the final concentration of agarose is 0.12 % while that of protein is 9/10 of the initial one. This agarose concentration is the minimum to produce an actual gel network. Pour the mixture into the GCB and introduce the capillary holder. Allow the sol to cool to room temperature to set the gel. Once the gel is set, pour a solution of precipitating agent on top of the gelled protein solution layer. In this technique the capillary holder is not used to hold any capillary but to allow the easy extraction of the gel slice containing the crystals after the end of the growth. For instance, this implementation can be used to grow reinforced protein crystals inside silica gels (García-Ruiz *et al.*, 1998). Prepare a tetramethoxysilane (TMOS) sol at the selected concentration (between 1 and 20 % w/v) by mixing your buffered protein solution with the appropriate amount of TMOS under continuous stirring. Pour 3 ml of the solution into the GCB body and introduce the capillary holder. Wait until the gel is set, which depends on pH and TMOS concentration. Then pour onto the gel the solution of the precipitating agent and close the GCB.

5. Previous experience

Many different proteins have been crystallized successfully using GCB up to now. These molecules show a broad range of molecular weight (from 5 to 1000 kDa), isoelectric point (from 3 to 12) and precipitant (salts, polymers, pH change). This information is summarized in Table I. Currently we are working in collaboration with different groups to expand this list on how crystallisation systems displaying very different behaviour can be implemented in GCB. Figure 3 shows several typical crystals grown in GCB from molecules listed in Table 1.

6. X ray measurements using GCB

Data collection at room temperature is made sensibly easier by using GCB as the crystals grow inside capillaries that can be X-ray capillaries. Therefore, no crystal handling or mounting is required; just take your capillary, seal the open end with your favourite sealing material after drying or cleaning a little bit the capillary end and mount the capillary on the goniometer head. If the range of displacement of your goniometer along the spindle axis is too short to accommodate the whole capillary, you can cut and seal it to get shorter capillary segments. In case the crystals are moving inside the

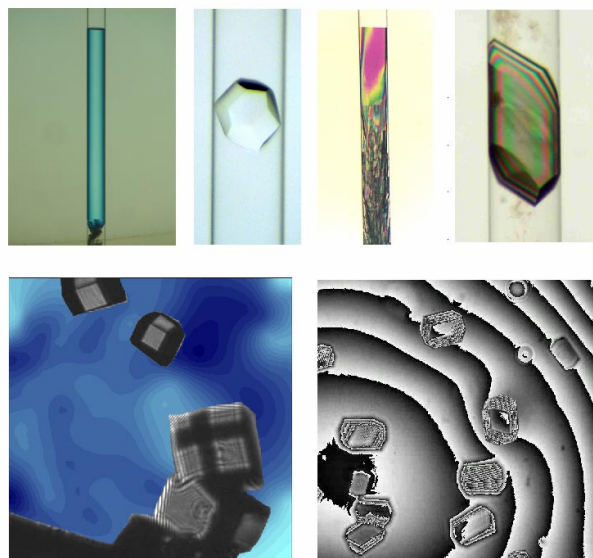


Figure 3

Some examples of proteins crystallised in the GCB. Top row from left to right: insulin, Glucose isomerase, Ferritin and Xylanase. Bottom row: phase interferometric images (Dubois & Novella, personal communication).

solution or you get too much scattering from the solution, you can extract part of the solution before sealing using cellulose fibers or any other absorber without touching the crystals.

Of particular interest for X-ray characterization is the possibility of producing shaped crystals. Far from the open end of the capillary, crystals nucleate at low supersaturation, and therefore at very low nucleation density, so the resulting crystals grow to large sizes and, eventually are large enough as to completely fill the capillary (Figure 3a). This produces cylindrical crystals that, in addition to making absorption correction trivial, are interesting for some X-ray techniques.

Cryocrystallography is possible within the capillaries used in the GCB (López-Jaramillo *et al.*, 2001). The cryoprotectant can be included from the very beginning in the protein solution or added by diffusion using the same GCB setup before taking out the capillaries. If the protein solution in the capillary has been mixed with agarose, the crystals do not move. Their quality can be tested at home and full data collection at synchrotron facilities can be later performed on previously selected crystals. An all-in-one procedure to obtain crystals into capillaries with the incorporation of anomalous scattering halides in cryogenic solutions ready for flash cooling cryocrystallography has been demonstrated (Gavira *et al.*, 2002).

In special cases, when the X-ray technique to be used requires special handling, it is always possible to extract the crystals from the capillary and to handle the crystals in the way needed for the particular X-ray data collection setup.

7. Observation capabilities, transportation and use in microgravity

In spite of their suitability for the production of crystals for X-ray analysis, this function does not exhaust the capabilities of GCB. Experiments devoted to the observation of protein crystal growth are implemented easily and conveniently using the GCB. Both the box body and the capillaries are transparent, allowing a good quality microscopic imaging of the growing crystals (see Figure 3). For most microscopic observation setups, the thickness of the GCB inner space sets out of focus any feature in the walls of the box. Experiment handling is facilitated by the solid design of GCB:

Table 1 Crystals grown using the GCB.

Protein	MW (kDa)	pI	Precipitating system	pH	In collaboration with
Dehydroquinase	17.2	5.8	Ammonium sulphate	7.4	Tibotec-Virco (Mechelen, Belgium)
Saicar synthase	35.5	5.3	Ammonium sulphate	7.5	Institute of Crystallography (Moscow, Russia)
Factor XIII	336	5.1	MES	7.0	Institut für Molekulare Biotechnologie (Jena, Germany)
Cytochrome C	15	4.6	Ammonium sulphate	7.5	Instituto de Tecnologia Química e Biológica (Oeiras, Portugal)
Alliinase	51.5	6.5	Ammonium sulphate	8.2	Institut für Molekulare Biotechnologie (Jena, Germany)
Glucose Isomerase	173	3	Polyethylene glycol 8000	7.4	
Lumazine synthase	1000	5.4	Sodium potassium phosphate	8.7	Technical University Munich (Garching, Germany)
Lysozyme	14	11	Sodium chloride	4.5	
Thaumatococcus	22	12	Sodium potassium Tartrate	6.5	
Ferritin	456+PM _{Fe}	4.5	Cadmium sulphate	5.0	
Insulin	5	5.5	Sodium phosphate	9.0	
Concanavalin A	102	5.5	Polyethylene glycol 6000	8.0	
Catalase	250	5.6	Ammonium sulphate	5.2	Institute of Crystallography (Moscow, Russia)
Anti lysozyme camel antibody	27.9	8.4	Sodium formate	5.6	Vrije Universiteit (Brussel, Belgium)
Human liver FBPase	160	6.5	Polyethylene glycol 3350	9.0	
Apo ferritin	456	4.3	Cadmium sulphate	5.0	
Xylanase	21	9.0	Polyethylene glycol 4000	7.0	
(Pro-Pro-Gly) ₁₀	7.6	5.2	Sodium acetate	5.4	University of Naples (Naples, Italy)
Triose Phosphate Isomerase	28.5	5.6	Ammonium sulphate	8.0	University of Liège (Sart Tilman, Belgium)

experiments can be handed from the storage shelf to the microscope and back without any risk. In addition, transport of crystals to synchrotron facilities can be performed using directly GCBs. A thermostated transportation box for GCB will be soon available.

Advanced observation techniques, like interferometry, can also be used on the GCB experiments inside or outside capillaries. Recently, holographic video and interferometry techniques have been successfully tested in capillaries mounted in GCB boxes (Figure 3 e-f) during the definition of a microgravity crystal growth facility (PROMISS) centred on interferometric observation of crystal growth (Zegers & Dubois, personal communication). In fact, GCB have been already used for microgravity experiments, as a passive, light and inexpensive facility for protein crystallisation. Details of the implementation and rationality of these experiments will be described elsewhere.

8. Further information

Up to date information on GCB and a collection of practical procedures and protocols are available from the LEC website (<http://lec.ugr.es>).

GCB are currently produced by Plásticos Hita (Granada, Spain). Financial support from European Space Agency, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Ministerio de Educación y

Ciencia are acknowledged. Two of the pictures shown in Figure 3 were kindly provided by Frank Dubois, Microgravity Research Center (ULB, Brussel)

References

- Ducruix, A. & Giegé, R. (1999). Editors. *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- Finet, S., Bonneté, F., Brouin, J., Provost K. & Tardieu, A. (1998) *Eur. Biophysical J.* **27**, 263–271.
- García-Ruiz, J. M. (1991). *Key Engineering Materials*, **58**, 87–106.
- García-Ruiz, J. M., Moreno, A., Viedma, C. & Coll, M. (1993). *Materials Res. Bulletin*, **28**, 541–546.
- García-Ruiz, J. M., Gavira, J. A., Otálora, F., Guasch A. & Coll, M. (1998). *Materials Res. Bulletin*, **33**, 1593–1598.
- García-Ruiz, J. M. (2002). *Methods in Enzymology*. To be published.
- Gavira, J. A., López-Jaramillo, J., Toh, D., García-Ruiz, J. M. & Ng, J. D. (2002). *Acta Cryst. D* **58**, 1147–1154.
- Henisch, H. K. & García-Ruiz, J. M. (1986). *J. Cryst. Growth*, **75**, 195–202 and 203–211.
- López-Jaramillo, F. J., García-Ruiz, J. M., Gavira, J. A. & Otálora, F. (2001). *J. Appl. Cryst.* **34**, 365–370.
- McPherson, A. (1999). *Crystallisation of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moreno, A., Saridakis, E. & Chayen, N. (2002). *Abstract book of the ICCBM9*, Jena, P-A.5.
- Otalora, F. & García-Ruiz, J.M. (1996). *J Cryst. Growth*, **169**, 361–367.
- Vidal, O., Robert, M.C., & Boué, F. (1998). *J. Cryst. Growth*, **192**, 257–270.
- Zegers, I. & Dubois, F. Personal communication.

- **ARTÍCULO 2.**

Investigation of the compatibility of gels with precipitating agents and detergents in protein crystallization experiments. *Luis A. González-Ramírez, Alfonso G. Caballero, Juan M. García-Ruiz.* (2008). *Cryst. Growth Des.* **8**: 4291-4296.

Resumen.

El uso de métodos de cristalización en los que el transporte de masa está controlado por difusión es una de las formas para mejorar la calidad de cristales de macromoléculas para estudios de resolución estructural. Además, una dinámica de fluidos gobernada por difusión es obligatoria para algunas técnicas de cristalización avanzada, tales como la técnica de contradifusión. El uso de geles es extremadamente efectivo en la eliminación de convección generada por fluctuaciones térmicas y de densidad permitiendo de esta forma que la difusión gobierne el transporte de masa y calor en reactores de cristalización. La principal desventaja en utilizar estos compuestos es que son compuestos químicos que podrían interactuar con las macromoléculas biológicas y con diferentes compuestos químicos utilizados para cristalizarlas.

En este trabajo se expone el estudio de la compatibilidad entre diferentes tipos de geles (térmicos o físicos) y agentes precipitantes, aditivos y detergentes comúnmente utilizados en experimentos de cristalización de proteínas. También se investiga la estabilidad física y química de geles en función del pH de reguladores de pH usados en estos experimentos. Se analizaron diferentes tipos de geles, a saber, a) geles de sílice que se obtienen de la acidificación de silicato de sodio o de la hidrólisis de silosano; b) geles de agarosa con dos temperaturas de gelificación diferentes; y c) geles de poliacrilamida. De igual forma, se estudia la compatibilidad del kit comercial de cristalización “Hampton Crystallization Screen” con geles de agarosa bajo condiciones típicas usadas en la cristalización de estas macromoléculas. En este trabajo se estudio también la compatibilidad de los geles estudiados con los detergentes del kit comercial “Detergent Screen I” de la compañía Hampton Research, utilizados comúnmente en la cristalización de proteínas de membrana.

Los resultados mostraron que todos los detergentes utilizados en la cristalización de proteínas de membrana son compatibles con todos los tipos de geles estudiados. Con

respecto a los agentes precipitantes, se observó que algunos, tales como el sulfato de amonio y polietilenglicoles de alto peso molecular, inhibieron la formación de geles de agarosa. Sin embargo, los geles de agarosa se formaron a todos los valores de pH estudiados no siendo el caso para los geles de sílice que fueron más sensibles a este parámetro.

Los resultados de este trabajo demuestran que es posible llevar a cabo experimentos de cristalización de macromoléculas biológicas en un entorno de transporte de masa difusivo por medio del uso geles como medios de crecimiento cristalino. Algunos compuestos químicos utilizados en estos experimentos de cristalización inhibieron, en algunos casos, la formación del gel. No obstante, existen combinaciones alternativas de agentes precipitantes y geles, al poderse utilizar alguno de los otros geles estudiados que no hayan mostrado incompatibilidad.

Investigation of the Compatibility of Gels with Precipitating Agents and Detergents in Protein Crystallization Experiments[†]

Luis A. González-Ramírez, Alfonso G. Caballero, and Juan M. García-Ruiz*

Laboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT (CSIC-UGR), Avenida del Conocimiento s/n, P.T. Ciencias de la Salud, 18100-Armilla (Granada), Spain

Received July 11, 2008; Revised Manuscript Received October 1, 2008

ABSTRACT: Different types of gels are currently used as crystallization media avoiding convective fluid motion and sedimentation of crystals, two properties that are beneficial when seeking crystals of the highest quality for structural studies. We show in this paper the compatibility of the main precipitating agents, buffers, and additives, including some detergents employed in protein crystallization with certain gels, namely, agaroses with two different gelling temperatures, polyacrylamide and silica gels such as tetramethylorthosilicate.

Introduction

Gels have been known for a long time as excellent crystal growth media.¹ Gels have been used for several years in the crystallization of small molecules (inorganic, organic molecules) and also in the crystallization of biological macromolecules.^{1–3} A highly remarkable feature that favors the use of gels is that they remove both convection and sedimentation during the crystallization process,⁴ thus enabling a diffusive environment for the mass transport of molecules from the bulk of the solution to the growing crystal surface. Under such conditions high quality crystals can be obtained. Agarose, silica, and acrylamide are the most common gels employed in crystallization experiments. Furthermore, agarose and silica gels such as tetramethylorthosilicate (TMOS) and sodium silicate are the most frequently employed gels in crystal growth experiments of biological macromolecules.^{2,5–7}

Agarose is a polysaccharide of neutral charge; more specifically, it is the gelling fraction of agar and consists of repeating units (agarobiose) of alternating β -D-galactopyranosil and 3,6-anhydro- α -L-galactopyranosil groups. Agarose appears as a powder that is soluble in water above a critical temperature, which depends on the type of agarose. When the critical solubilization temperature is lowered, agarose forms a gel. The temperature at which this phenomenon occurs is called the gelling temperature (T_g), whose value is intrinsic to the exact composition of each individual agarose gel.^{8,9} Agarose is also used for protein characterization, electrophoresis, and some chromatography columns.^{10–12}

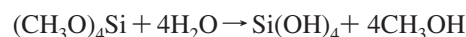
The process of formation of agarose gel is usually initiated through a transition of spirals to double helices, and then terminates with aggregation of helices. The helices of agarose are not soluble; therefore, the aggregation is formed immediately at the sol–gel transition temperature.¹³ The structure of the gel is maintained by cross-linking areas that involve noncovalent co-operative links between orderly conformed chains. An important characteristic of the gel is that the agarose cavities are filled in with the water molecules that participate in the formation of the hydrogen bonds responsible for the stability of the double helix.¹⁴ The diverse additives incorporated in the

preparation of the gel can influence the availability of the water molecules for the formation of the gel.

Silica gels are obtained from the polycondensation of silicic acid, which occurs either by neutralization of sodium silicate:



or by hydrolysis of different siloxanes, such as TMOS (or tetraethylorthosilicate, TEOS):



Silica gels have been used for the crystallization of inorganic and organic compounds as well as for the crystallization of biological macromolecules.^{3,5,15} Reinforced protein crystals with improved mechanical properties and stability have been obtained using a high concentration of silica gels (2–22%).¹⁶

Polyacrylamide gels result from the polymerization of acrylamide monomer into long chains and the cross-linking of these by bifunctional molecules such as *N,N'*-methylene bis-acrylamide (usually abbreviated as bis-acrylamide) reacting with free functional groups at chain termini. Polyacrylamide gels have been widely used to carry out protein electrophoresis because of its advantages for this technique such as being chemically inert, stable over a wide range of pH, temperature and ionic strength.¹⁷ Electrophoretic slabs of polyacrylamide gels can be used to screen preliminary crystallization conditions for freshly purified proteins.¹¹

The use of gels is compatible with most classical crystallization methods (vapor diffusion, batch, and dialysis), but can also be used with a range of new advanced techniques such as crystallization by the counter diffusion method.¹⁸

A particular case is the crystallization of membrane proteins, which requires the presence of additional additives such as detergents. Large crystals of integral membrane proteins have been grown from monodisperse micellar solutions of detergent-solubilized protein.^{19,20} The choice of detergent(s) for purification and crystallization is quite important.²¹ A membrane protein must be first extracted from the membrane and subsequently solubilized before crystallization can be attempted. Therefore, purification becomes a very crucial step for crystallization: it must not only yield pure protein, but it must also reduce molecular heterogeneity. Once a given protein has been prepared in a suitable detergent system, any “classical” method for protein crystallization can be used. Attempts to crystallize membrane proteins in gel media have been carried out recently.²²

[†] Part of the special issue (Vol 8, issue 12) on the 12th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Cancun, Mexico, May 6–9, 2008.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jmgruiz@ugr.es.

In general, the gels commonly used for the crystallization of proteins have shown an inert behavior toward the protein; however, that is not the case for precipitating agents, buffers, and detergents, where interaction with the gel may occur and can have important effects upon the gelling process. Many other physical and chemical parameters, such as pH, ionic strength, etc., play a role in the formation of the gel network as well.

The aim of this work was to investigate the compatibility of various precipitating agents, buffers, and detergents with gel forming compounds under several physical–chemical conditions such as different pH values. This study includes two types of agarose of different gelling temperatures, body gelling temperature agarose (BGT, 36 °C) and low gelling temperature agarose (LGT, 24 °C), silica and polyacrylamide gels. The results are expected to provide us with practical information about the feasibility of employing gels in crystallization experiments depending on the chemical properties of the solutions used, and particularly for the crystallization of soluble and membrane proteins.

Experimental Section

Body gelling temperature agarose (BGT, 36 °C) and low gelling temperature agarose (LGT, 24 °C) were kindly provided by Hispanagar and Triana Science & Technology. Sodium silicate and TMOS were purchased from Sigma-Aldrich. Acrylamide/bis-acrylamide solution was provided by Bio-RAD Laboratories. Crystal Screen and Detergent Screen 1 were purchased from Hampton Research. Analytical grade water was used for all the experiments (Elix system from Millipore). All reagents used for the preparation of the buffers were also analytical grade. The determination of pH values was carried out with a Sentron Titan X pH meter and a Centricom pH meter 2002. All the experiments were carried out at $T = 20 \pm 2$ °C.

The gels were prepared following standard procedures, as follows:

Agarose gels preparation involved mixing the appropriate volume of water with agarose powder under continuous stirring for a final stock solution (10 mL, 2% w/v). The resulting mixture was then heated to boiling temperature in order to break the cross-linking of the agarose fibers; at which point the agarose becomes transparent. The solution was then kept at the boiling point for about 10 min under continuous stirring aiming to achieve full dissolution. Afterward, the agarose solution was kept at 50 °C.

To obtain a silica gel made from TMOS, an aqueous stock solution of TMOS (10 mL, 20% v/v) was prepared from commercial TMOS by dilution. This solution was thoroughly mixed under vigorous stirring until complete dissolution, so that it remained homogeneous (no flocculation).

In order to obtain a silica gel made from sodium silicate (10 mL, 10% v/v), a solution of sodium silicate (1.06 g cm⁻³, pH 11.4) was mixed with acetic acid (1 M) at an appropriate volume ratio to attain a pH value of 6.²³

A stock solution of polyacrylamide gel (30 mL, 12.5% v/v) was prepared by mixing acrylamide/bis-acrylamide (12.5 mL, 30%), ammonium persulfate (1.5 mL, 1.5%), TEMED (0.015 mL), buffer stock solution (3.75 mL, pH 7.5), and distilled water (12.25 mL).¹²

In general, preparations of buffer/gel mixtures were carried out as follows. Several buffers ranging from pH 4 to 9 were prepared as stock solutions with a concentration of 0.1 M.²⁴ Each of the stock solutions of the gels (0.5 mL) were mixed with each of buffers (0.5 mL, 0.1 M) in 1:1 ratio in an eppendorf tube in order to achieve a final concentration of 50 mM for each of the buffers. The preparation of buffer/acrylamide gel mixture was slightly modified as follows: acrylamide gel volumes (5.25 mL, 12.5% v/v) were mixed with each of buffers (0.75 mL, 0.8 M) in an assay tube in order to achieve a final concentration of 0.1 M for each of the buffers.

In general, preparations of gel/detergent mixtures consisted of mixing each one of the detergents (1 μ L, 10 \times CMC) with each one of the gels (9 μ L) in order to obtain a concentration of detergent equal to the critical micellar concentration (1 \times CMC). In the case of acrylamide, the ratio gel/detergent was modified to 90:10 μ L since using less than 100 μ L of total volume, acrylamide does not gellify.²⁵

Table 1. Comparison between the Initial pH of the Buffers and the pH of Buffer/Gel Mixtures

theoretical pH	experimental pH						
	buffer (0.05 M)	BGT agarose (0.5%)	LGT agarose (0.5%)	TMOS (2%)	TMOS (5%)	TMOS (10%)	acrylamide ^a (12.5%)
4.0	4.0	4.1	4.1	4.1	4.1	4.2	4.1
4.5	4.5	4.4	4.5	4.6	4.6	4.6	4.6
5.0	5.0	5.0	4.9	5.1	5.1	5.1	5.3
5.5	5.5	5.5	5.4	5.6	5.6	5.6	5.5
6.0	6.0	6.0	5.9	6.0	6.0	5.9	6.2
6.5	6.5	6.5	6.4	6.5	6.5	6.4	6.5
7.0	7.0	6.9	6.9	7.0	7.0	6.8	7.2
7.5	7.5	7.5	7.4	7.5	7.5	7.4	7.6
8.0	7.9	7.9	7.9	7.8	7.9	7.5	8.0
8.5	8.4	8.3	8.4	8.3	8.2	7.9	8.5
9.0	8.9	8.8	8.8	8.8	8.7	8.3	8.9

^a For the acrylamide experiments, the final buffer concentration was equal to 0.1 M.

Preparations of gel/precipitating agent mixtures consisted of mixing each of the gels (0.125 mL) with the each of the conditions of the Hampton Research Crystal Screen I (0.375 mL) in an eppendorf tube at 20 °C and allow them to gellify. In the case of acrylamide, the ratio gel/precipitating agent was modified to 2:3 mL.

Results and Discussion

Two types of agarose have been selected for this work, namely, body gelling temperature agarose (BGT) and low gelling temperature agarose (LGT) due to their different gelling temperatures and potential applications such as in protein crystallization, as described in the Introduction and Experimental sections. BGT agarose is a linear polymer with a very high molecular weight, giving gel structures unlike those of traditional agaroses. Its high molecular weight coupled with its very low sulfate content ($\leq 0.12\%$) results in a strong intercatenary interaction, thus yielding a gel with very high strength and much higher exclusion limit. Moreover, the gelling temperature of the BGT agarose is 36 ± 1.5 °C with a melting point of 88 ± 1.5 °C. In contrast, the main properties of LGT agarose are its lower melting point (≤ 65.5 °C) and gelling temperatures (24–28 °C) when compared with standard agaroses.

Studying agaroses with different gelling temperatures is very important from the point of view of its applications. Such is the case of proteins that are very sensitive to temperature, and therefore, a correct selection of the agarose for its crystallization is crucial if degradation of the protein wants to be avoided.

We have also included in our study other commonly employed gels such as acrylamide and TMOS. TEOS has not been included because its properties are very similar to those of TMOS, whose main difference is the byproduct formation of methanol (dielectric constant = 33) in the case of TMOS and ethanol (dielectric constant = 24) in the case of TEOS, during the process of polycondensation.

Formation of Gels (BGT Agarose, LGT Agarose, TMOS and Acrylamide) at Different pH Values. The ability of BGT agarose, LGT agarose, TMOS and acrylamide to form a gel depending on the pH was investigated. One important consideration prior to this experiment was that the pH does not change when the buffers are mixed with the gels. For this purpose, the pH of the buffers before and after gelling was recorded (Table 1).

Table 1 clearly shows that there is not significant variation between the pH values of the original buffers and the pH values of the mixtures buffer/gel. Only in the case of high concentration of TMOS (10%) a slight diminution of nominal pH values higher

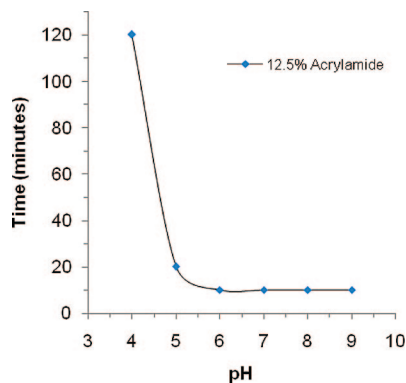


Figure 1. Gelling time of acrylamide as a function of pH.

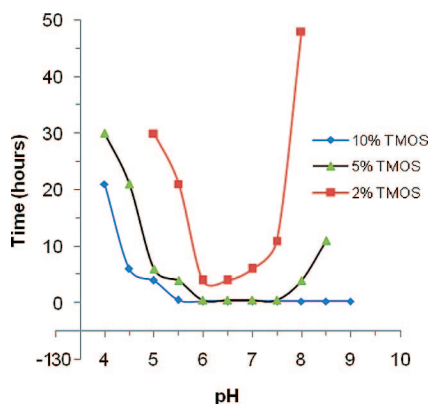


Figure 2. Gelling time of TMOS as a function of the concentration and pH.

than 8 can be observed. This slight diminution in pH can be very important when performing protein crystallization experiments.²⁶

The gelling time of BGT agarose, LGT agarose, TMOS and acrylamide was studied in the pH range 4–9 because this is the typical pH working interval for the crystallization of proteins.

BGT agarose (0.5% w/v), LGT agarose and acrylamide (12.5% v/v) were able to form a gel at all pH values analyzed (pH 4–9). The gelling time for both agaroses, approximately 10 min, is constant and appears to be independent of the pH. This can be explained by the fact that agarose is a neutral polymer,²⁷ and therefore, a change in the pH does not affect the net charge of the polymer.

However, in the case of acrylamide, the gelling time varies with the pH, being 10 min in the pH range of 6–9, 20 min at pH 5 and 120 min at pH 4 (Figure 1). It is noteworthy that below pH 5 the time of gelling for acrylamide becomes very high, which is probably due to the use of TEMED. The free base of TEMED is used as a catalyst for the formation of persulphate free radicals, which in turn catalyze polymerization.¹² However, at low pH TEMED may become protonated inhibiting the polymerization reaction and therefore resulting in an increase of the gelling time.^{28–30}

In the case of TMOS, the gelling time depends on several parameters such as concentration of gelling agent, nature and concentration of the species in solution, pH and temperature.^{31,32} The gelling time of TMOS against the pH was recorded at three different concentrations (2%, 5%, and 10%) at room temperature, as shown in Figure 2.

As expected, the gelling time of TMOS varies with both the pH and concentration of TMOS in solution (Figure 2). The

higher the concentration of TMOS, the less the gelling times, reaching a minimum (instantaneous gelling) in the pH range 6–7.5 at 5% concentration of TMOS. Generally, for all the concentration curves the gelling time tends to be at a minimum in the pH range 6–7 (0–5 min), but increases exponentially outside that pH range, especially at lower concentrations of TMOS, reaching a maximum of 50 h at pH 8 and 2% TMOS.

The results obtained for TMOS agree qualitatively with those given by other authors and show that the gelling rate is maximized near neutral pH, where significant concentrations of both protonated and deprotonated silanols exist.^{31–35} The gelling time for silica gels is very sensitive to pH and is related to the ionic character of the condensation reaction^{1,32,34} and to the nature of the monomer and polymer species involved.^{35–37} Whichever polysilicic acids or large particles of colloidal silica are involved, the effect of the pH is generally related to the stability of the silica sols. Sol gels have maximum temporary stability with longer gelling time around pH 1.5–3 and minimum stability with rapid gelling around pH 5–6. Above pH 7, no gel is formed since the particles are charged and only particle growth occurs.³⁴

The results that we have obtained experimentally for TMOS could be extrapolated for TEOS. When silica gels are obtained from TMOS or TEOS the reaction implies hydrolysis and condensation of silicates to form silica gels and the release of methanol or ethanol respectively.^{2,38} Therefore, the main difference relevant to protein crystallization is the small change of the dielectric constant of the solution that may provoke a decrease in the solubility of the protein, the change being larger for the case of TMOS (dielectric constant methanol = 33) with respect of TEOS (dielectric constant ethanol = 24).

Formation of Gels (BGT Agarose, LGT Agarose, TMOS and Acrylamide) in the Presence of Precipitating Agents. Gel formation of BGT agarose, LGT agarose, TMOS and acrylamide in the presence of precipitating agents from the Hampton Research Crystal Screen kit was studied and the results have been summarized in Table 2. Since the concentration of other additives such as salts and buffers are low (<0.2 M) in each condition of the Hampton Screen, the effect on the gelling of agarose has been mainly focused on precipitating agents such as high salt concentrations, PEG and alcohols.

In general, BGT and LGT agarose show similar behavior with respect to their capability of forming a gel in the presence of different precipitating agents (Table 2). Both types of agarose form a gel in 50% (BGT) and 56% (LGT) of the conditions of the kit. On the other hand, TMOS seems to be slightly more compatible with precipitating agents and forms a gel in 62% of the cases. Acrylamide formed a gel in all the conditions of the screen.

The nature of the precipitating agent combined with the nature of the gel and their relative interactions can have a large effect on the gelling success. That is the case for polyethylene glycols, which are the base of a high number of conditions. Both agaroses (BGT and LGT) gellified in the presence of PEG400 up to a concentration equal to 30% and also at 8% PEG 4000, but they failed to gellify at concentrations above 25% PEG 4000 and 18% PEG 8000. These results can be explained by the effect of the addition of neutral polymers to colloidal solutions, which induces an attraction by depletion.³⁹ In solutions containing macromolecules and/or polymers, polyethylene glycol exerts an effect of exclusion of volume that induces aggregation of molecules. Additionally, polyethylene glycol is in competition with other salts for the water molecules thereby provoking dehydration and also in competition with the organic solvents

Table 2. Conditions in which BGT Agarose, LGT Agarose, TMOS and Acrylamide Formed a Gel (✓) and Those Where It Did Not (x) Are Specified

precipitating agent	BGT agarose	LGT agarose	TMOS	acrylamide
30% v/v (±)-2-methyl-2,4-pentanediol, pH 4.6	✓	✓	x	✓
0.4 M potassium sodium tartrate tetrahydrate	✓	✓	✓	✓
0.4 M ammonium phosphate monobasic	✓	✓	x	✓
2.0 M ammonium sulfate, pH 8.5	x	x	x	✓
30% v/v (±)-2-methyl-2,4-pentanediol, pH 7.5	✓	✓	✓	✓
30% w/v PEG 4000, pH 8.5	x	x	✓	✓
1.4 M sodium acetate trihydrate, pH 6.5	✓	✓	✓	✓
30% v/v 2-propanol, pH 6.5	✓	✓	✓	✓
30% w/v PEG 4000, pH 5.6	x	x	x	✓
30% w/v PEG 4000, pH 4.6	x	x	x	✓
1.0 M ammonium phosphate monobasic, pH 5.6	✓	✓	✓	✓
30% v/v 2-propanol, pH 7.5	✓	✓	✓	✓
30% v/v PEG 400, pH 8.5	✓	✓	✓	✓
28% v/v PEG 400, pH 7.5	✓	✓	✓	✓
30% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	x	✓
1.5 M lithium sulfate monohydrate, pH 7.5	x	x	✓	✓
30% w/v PEG 4000, pH 8.5	x	x	✓	✓
20% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	x	✓
30% v/v 2-propanol, pH 8.5	✓	✓	✓	✓
25% w/v PEG 4000, pH 4.6	x	x	x	✓
30% v/v (±)-2-methyl-2,4-pentanediol, pH 6.5	✓	✓	✓	✓
30% w/v PEG 4000, pH 8.5	x	x	✓	✓
30% v/v PEG 400, pH 7.5	✓	✓	✓	✓
20% v/v 2-propanol, pH 4.6	✓	✓	x	✓
1.0 M sodium acetate trihydrate, pH 6.5	✓	✓	✓	✓
30% v/v (±)-2-methyl-2,4-pentanediol, pH 5.6	✓	✓	✓	✓
20% v/v 2-propanol, pH 7.5	✓	✓	✓	✓
30% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	✓	✓
0.8 M Na/K tartrate tetrahydrate, pH 7.5	✓	✓	✓	✓
30% w/v PEG 8000	x	x	x	✓
30% w/v PEG 4000	x	x	x	✓
2.0 M ammonium sulfate	x	x	✓	✓
4.0 M sodium formate	✓	✓	✓	✓
2.0 M sodium formate, pH 4.6	✓	✓	✓	✓
0.8 M Na phosphate monobasic monohydrate 0.8 M potassium phosphate monobasic, pH 7.5	✓	✓	✓	✓
8% w/v PEG 8000, pH 8.5	x	✓	✓	✓
8% w/v PEG 4000, pH 4.6	✓	✓	x	✓
1.4 M sodium citrate tribasic dihydrate, pH 7.5 2% v/v PEG 400	x	x	✓	✓
2.0 M ammonium sulfate, pH 7.5 20% v/v 2-propanol	x	x	x	✓
20% w/v PEG 4000, pH 5.6 10% v/v 2-propanol	x	x	x	✓
20% w/v PEG 4000, pH 7.5	x	x	✓	✓
20% w/v PEG 8000	x	x	x	✓
30% w/v PEG 1500	x	✓	x	✓
0.2 M magnesium formate dihydrate	✓	✓	✓	✓
18% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	✓	✓
18% w/v PEG 8000, pH 6.5	x	x	x	✓
2.0 M ammonium sulfate, pH 4.6	x	x	✓	✓
2.0 M ammonium phosphate monobasic, pH 8.5	✓	✓	✓	✓
2% w/v PEG 8000	✓	✓	x	✓
15% w/v PEG 8000	x	✓	x	✓

that modify the dielectric properties of the medium.⁴⁰ Therefore, in the conditions that contain PEG as a precipitating agent but agarose did not gellify, it is probable that there is a critical concentration above which the agarose fibers cannot adopt the right conformation because PEG molecules would be competing for the water molecules of the system that are fundamental for the formation and stability of the agarose double helices.¹⁴ Thus, the concentration of PEG necessary to inhibit the formation of gel depends on the molecular weight of the polymer; the higher the molecular weight, the less the concentration of polymer needed to inhibit gelling.

Nonetheless, some differences in the gelling between the two types of agarose were observed. Whereas BGT agarose failed to gellify above 8% PEG 8000, the same can be said for LGT agarose only above 18% PEG 8000. This is probably due to the higher sensitivity of BGT agarose toward the presence of water molecules compared to LGT agarose. In the case of LGT agarose, most of the hydroxyl groups have been derivatized to

methoxy groups, but BGT agarose contains a higher proportion of hydroxyl groups that form hydrogen bonds with the water molecules and therefore disruption of these interactions has a bigger effect.

The presence of inorganic salts and other solutes in solution can also influence the formation, stability and structure of agarose gel having either a stabilizing or a destabilizing effect.¹³ High concentration of salts can significantly modify the structure of the gel and the conformational transition state that is required for the formation of the gel, either by changing the gelling temperature or by dissolution of the agarose. Our results indicate that the presence of high concentration of salts did not affect the gelling of agarose, as it can be observed in the case of sodium tartrate (0.8 M), potassium tartrate (0.8 M), ammonium phosphate (2 M), sodium acetate (1 M), ammonium phosphate (2 M), sodium formate (4 M), sodium phosphate (0.8 M), potassium phosphate (0.8 M) and magnesium formate (0.2 M). Only three of the inorganic salts (ammonium sulfate, lithium

sulfate and sodium citrate) inhibited the formation of agarose gel, mainly due to precipitation. This outcome is consistent with previously published results that explain the precipitation of agarose in the presence of ammonium sulfate by the so-called "salting out" effect.⁸

Other inorganic salts as sodium chloride are known to stabilize the formation of agarose gels.¹³ Although the Crystal Screen 1 kit of Hampton Research does not use NaCl in any of its conditions, additional investigations using buffered solutions with high NaCl concentrations indicate that its use does not inhibit the formation of the gel. It is also very important to emphasize that, once the gel has been formed, it appears to be inert toward the content of inorganic salts. Such observation acquires special relevance in the case of crystallization by the counter diffusion technique, because it means that it is possible to carry out the crystallization experiment by first mixing the agarose gel with the buffer and subsequently diffuse the precipitating agent without any incompatibility associated to the process.

Summarizing, the capability of forming a rigid gel of both types of agarose is more sensitive to the presence of polymers such as PEGs than to the presence of inorganic salts. Other additives such as alcohols in high concentration, 30% of methylpentane-diol and 30% of *iso*-propanol respectively, do not affect the gelling process since in both cases it led to the gel being formed.

Formation of Gels (BGT Agarose, LGT Agarose, TMOS, Sodium Silicate and Acrylamide) in the Presence of Detergents. To study the influence of detergents in the formation of gels for BGT agarose, LGT agarose, TMOS, sodium silicate, and acrylamide, we diluted the detergents included in the Hampton Research Detergent Screen I kit from 10 times its critical micellar concentration (CMC) to 1× CMC and tested for compatibility. Our results show that the gelling of BGT agarose, LGT agarose, acrylamide, TMOS and sodium silicate is completely compatible with all of the detergents present in the kit at a concentration of 1× CMC of detergent.

The total compatibility of the gel formation with all the detergents studied can be explained by looking at the process by which the gels are formed as well as the interactions involved and the nature of the detergents. The interactions involving the process of formation of gels are either hydrogen bonding or covalent bonds.

In the case of physical gels such as agarose, the sol–gel transition is obtained by lowering the temperature. The presence of oxygen atoms and hydroxyl groups in these units makes possible the formation of hydrogen bonding with the molecules of water that are important for the formation of the linking areas in the resulting structure.^{3,14} In the case of chemical gels such as polyacrylamide, the formation of the gel involve clearly defined covalent bonds. The formation of silica gels (sodium silicate or TMOS), although obtained as a result of a chemical reaction, can be considered an intermediate case between chemical and physical gels. Since the detergents form micelles, they could only interact with the hydrophobic and/or apolar areas. Therefore, the detergents should not have a negative effect on the formation of the electrostatic and/or covalent bonds that are necessary to generate the three-dimensional structure during the gelling process.

The compatibility between the detergents and gels studied in this work has significant implications as they can be used concurrently in the crystallization of membrane proteins. Effectively, detergents are frequently employed in crystallization experiments involving membrane proteins due to the fact that

Table 3. Gelling of Agaroses, TMOS and Sodium Silicate with the Detergents from the Hampton Research Kit at a Concentration 5× CMC^a

detergent	5 × CMC (mM)	BGT agarose	LGT agarose	TMOS	sodium silicate
C12E9	0.25	✓	✓	✓	✓
C12E8	0.55	✓	✓	✓	✓
<i>n</i> -dodecyl- β -D-maltoside	0.85	✓	✓	✓	✓
sucrose monolaurate	1.15	✓	✓	✓	✓
CYMAL-6	2.80	✓	✓	✓	✓
TRITON X-100	4.50	✓	✓	✓	x
CTAB	5.00	✓	✓	✓	✓
big CHAP, Deoxy	7.20	✓	✓	✓	✓
<i>n</i> -decyl- β -D-maltoside	9.00	✓	✓	✓	✓
LDAO	10.00	✓	✓	✓	x
CYMAL-5	25.00	✓	✓	✓	✓
ZWITTERGENT 3–12	20.00	✓	✓	✓	x
<i>n</i> -nonyl- β -D-glucoside	32.50	✓	✓	✓	✓
<i>n</i> -octyl- β -D-thiogluconide	45.00	✓	✓	✓	✓
DDAO	52.00	✓	✓	x	x
HECAMEG	97.50	✓	✓	✓	✓
<i>n</i> -octanoylsucrose	122.00	✓	✓	✓	✓
<i>n</i> -heptyl- β -D-thiogluconopyranoside	150.00	✓	✓	✓	✓
<i>n</i> -octyl- β -D-glucoside	100.00	✓	✓	✓	✓
CYMAL-3	172.50	✓	✓	✓	✓
C-HEGA-10	175.00	✓	✓	✓	✓
ZWITTERGENT 3-10	200.00	✓	✓	x	x
MEGA-8	395.00	✓	✓	✓	✓
<i>n</i> -hexyl- β -D-gluconopyranoside	1000.00	✓	✓	✓	✓

^a Conditions in which BGT agarose, LGT agarose, TMOS and sodium silicate formed a gel (✓) and those where it did not (x) are specified.

these detergents are needed for the solubilization and stabilization membrane proteins in solution.¹⁹ Furthermore, the concentration of detergent that is recommended to solubilized membrane proteins (0.1–1.0%)²¹ is sufficiently low as to generate any important effect in the formation of the gels under study.

Further experiments were also carried out in order to check what the influence of detergent concentrations higher than its CMC would have on the success of the gelling (Table 3).

It is evident from Table 3 that both agaroses can gellify with all the detergents at a concentration of 5× CMC. In the case of silica gels, TMOS and sodium silicate, the formation of flocculates and/or precipitates instead of the expected gels denoted an incompatibility of certain detergents. The recommended detergent concentration is between 1–3× CMC according to the supplier of the kit. Nevertheless, in most cases 5× CMC can also be used without gelling incompatibility.

Conclusions

Results derived from this work offer valuable practical information for the implementation of crystallization experiments regarding the compatibility between the type of gel and other factors such as the presence of additives (salts, buffers, etc.) or even the pH.

The capability of body gelling temperature agarose (BGT, 37 °C), low gelling temperature agarose (LGT, 24 °C), TMOS and acrylamide to form a gel depending on the pH has been investigated. BGT Agarose (0.5%), LGT agarose (0.5%) and acrylamide (12.5%) were able to form a gel in all of the pH values analyzed (4–9). The gelling time of TMOS against the pH was recorded at three different concentrations (2%, 5%, and 10%) at room temperature and it has been shown to depend on both, the concentration of TMOS in solution and the pH.

BGT agarose, LGT agarose, TMOS and acrylamide gel formation has been studied in the presence of different precipitating agents. The capability of forming a rigid gel of both types of agarose is more sensitive to the presence of polymers such as PEGs than to the presence of inorganic salts. High concentration of PEGs act as strong inhibitors of gel formation, being the higher the molecular weight, the less the concentration of polymer needed to inhibit gelling. On the other hand, the presence of a high concentration of salts and alcohols did not affect the gelling of agarose. It is also important to emphasize that, once the gel is formed, it appears to be inert toward the content of inorganic salts. Such observation acquires special relevance in the case of crystallization by the counter diffusion technique, because it means that it is possible to carry out the crystallization experiment by first mixing the agarose gel with the buffer and subsequently diffuse the precipitating agent.

BGT agarose, LGT agarose, TMOS, sodium silicate and acrylamide gel formation have been tested for compatibility with several detergents at $1\times$ CMC and $5\times$ CMC, respectively. BGT agarose, LGT agarose, acrylamide, TMOS and sodium silicate were fully compatible with all of the detergents at $1\times$ CMC. Agarose can gellify with all the detergents at a concentration of $5\times$ CMC. Silica gels, TMOS and sodium silicate showed an incompatibility with certain detergents due to the formation of flocculates and/or precipitates. One important conclusion of this work is the possibility of using gels for the crystallization of membrane proteins. Results described in this paper notably show that it is feasible to carry out crystallization experiments of membrane proteins in conjunction with virtually any type of gel because the detergents and the gels under this study were fully compatible with respect to the formation of the gel.

Acknowledgment. We would like to thank “Factoría Española de Cristalización” (Programa Consolider Ingenio 2010) and Opticryst (FP6-EC contract no. LSH-2005-037793) for financial support. We are grateful to Hispanagar and Triana Science & Technology for supplying the gels and chemicals for this study.

References

- (1) Henisch, H. K. *Crystal Growth in Gels*, 2nd ed.; Dover Publications, Inc.: New York, 1970.
- (2) Robert, M. C.; Lefaucheux, F. J. *Cryst. Growth* **1988**, *90*, 358–367.
- (3) Robert, M. C.; Vidal, O.; García-Ruiz, J. M.; Otálora, F. Crystallization in gels and related methods. In *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*; Ducruix, A., Giegé, R., Eds. Oxford University Press: New York, 1999; pp 149–175.
- (4) García-Ruiz, J. M.; Novella, M. L.; Moreno, R.; Gavira, J. A. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 165–172.
- (5) Cudney, B.; Patel, S.; McPherson, A. *Acta Crystallogr. D* **1994**, *50*, 479–483.
- (6) Henisch, H. K. *Crystals in Gels and Liesegang Rings*; Cambridge University Press: Cambridge, 1988.
- (7) García-Ruiz, J. M. *Key Eng. Mater.* **1991**, *58*, 87–106.
- (8) Letherby, M. R.; Young, D. A. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1981**, *77*, 1953–1966.
- (9) Vidal, O.; Robert, M. C.; Boué, F. J. *Cryst. Growth* **1998**, *192*, 257–270.
- (10) Laemmler, U. K. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (11) García-Ruiz, J. M.; Hernández-Hernández, M. A.; López-Jaramillo, J.; Thomas, B. J. *Cryst. Growth* **2001**, *232*, 596–602.
- (12) Hames, B. D., One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 2nd ed.; Rickwood, D.; Hames, B. D., Eds.; Oxford University Press: New York, 1996; p 37.
- (13) Piculell, L.; Svante, N. J. *Phys. Chem.* **1989**, *93*, 5596–5601.
- (14) Arnott, S.; Fulmer, A.; Scott, W. E. *J. Mol. Biol.* **1974**, *90*, 269–284.
- (15) Dennis, J.; Henisch, H. K. *J. Electrochem. Soc.* **1967**, *114*, 263–265.
- (16) García-Ruiz, J. M.; Gavira, J. A.; Otálora, F.; Guasch, A.; Coll, M. *Mater. Res. Bull.* **1998**, *33*, 1593–1598.
- (17) Hames, B. D.; Rickwood, D. *Gel Electrophoresis of Proteins*, 2nd ed.; Oxford University Press: New York, 1996; p 383.
- (18) García-Ruiz, J. M. Counterdiffusion Methods for Macromolecular Crystallization. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: New York, 2003; Vol. 368, pp 130–154.
- (19) Caffrey, M. J. *Struct. Biol.* **2003**, *142*, 108–132.
- (20) Garavito, R. M.; Picot, D. *Methods* **1990**, *1*, 57–69.
- (21) Garavito, R. M.; Picot, D. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 89–95.
- (22) Smatanova, K. I.; Gavira, J. A.; Rezacova, P.; Vacha, F.; Garcia-Ruiz, J. M. *Photosynth. Res* **2006**, *90*, 255–259.
- (23) García-Ruiz, J. M.; Moreno, A.; Otálora, F.; Rondón, D.; Viedma, C.; Zauscher, F. J. *Chem. Educ.* **1998**, *75*, 442–446.
- (24) Stoll, V. S.; Blanchard, J. S. *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 24–38.
- (25) Pekcan, Ö.; Kara, S. *Polymer* **2001**, *42*, 7411–7417.
- (26) McPherson, A., *Crystallization of Biological Macromolecules*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1999.
- (27) Stanley, F. N. Agars. In *In Food Polysaccharides and Their Applications (Food Science and Technology)*; Stephen, M. A., Ed. Marcel Dekker Inc: New York, 1995; p 654.
- (28) Righetti, P. G.; Gelfi, C. *J. Chromatogr. B* **1996**, *699*, 63–75.
- (29) Righetti, P. G. *J. Chromatogr. A* **1995**, *698*, 3–17.
- (30) Chrambach, A.; Rodbard, D. *Science* **1971**, *172*, 440–451.
- (31) Batchelor, H. W. *J. Phys. Chem.* **1938**, *42*, 575–585.
- (32) Plank, C. J. *J. Colloid Sci.* **1947**, *2*, 413–427.
- (33) Arend, H.; Connelly, J. J. *J. Cryst. Growth* **1982**, *56*, 642–644.
- (34) Iler, R. K. *The Chemistry of Silica*, 2nd ed; John Wiley & Sons: New York, 1979.
- (35) Brinker, C. J. *J. Non-Cryst. Solids* **1988**, *100*, 31–50.
- (36) Brinker, C. J.; Keefer, K. D.; Schaefer, D. W.; Ashley, C. S. *J. Non-Cryst. Solids* **1982**, *48*, 47–64.
- (37) Margaca, F. M. A.; Miranda Salvado, I. M.; Teixeira, J. J. *J. Non-Cryst. Solids* **1999**, *258*, 70–77.
- (38) Brinker, C. J.; Keefer, K. D.; Schaefer, D. W.; Assink, R. A.; Kay, B. D.; Ashley, C. S. *J. Non-Cryst. Solids* **1984**, *63*, 45–59.
- (39) Tardieu, A.; Bonneté, F.; Finet, S.; Vivarès, D. *Acta Crystallogr. D* **2002**, *58*, 1549–1553.
- (40) McPherson, A. *Methods Enzymol.* **1985**, *114*, 120.

CG800749B

Artículo 3.

Granada Crystallization Facility-2: A versatile platform for crystallization in space. **Luis A. González-Ramírez**, Jordi Carrera, José A. Gavira, Emilio Melero-García, Juan M. García-Ruiz. (2008). *Cryst. Growth Des.* **8**: 4324-4329.

Resumen.

La obtención de cristales con propiedades específicas tales como el tamaño, la forma y la calidad cristalina, es un requisito importante para muchas aplicaciones en ciencia de los materiales y ciencias biológicas. Por ejemplo, en el campo de la biología estructural, así como también en el campo de las zeolitas y materiales porosos, fármacos y compuestos de nueva síntesis, la obtención de cristales de suficiente calidad para tener datos de difracción de rayos X sigue siendo aún el principal obstáculo que limita los avances en estudios estructurales y aquellos proyectos que dependen de ello.

Entre varias iniciativas actuales, el ambiente de gravedad reducida que puede encontrarse en la estación Internacional del Espacio (ISS por sus siglas en inglés) y otras plataformas espaciales, las cuales se traducen en un escenario de transporte de masa difusivo mucho más conveniente para el crecimiento cristalino, ha potenciado el desarrollo de dispositivos para llevar a cabo experimentos de cristalización en el espacio. Se ha demostrado que un que un escenario difusivo permite el crecimiento de cristales con un mejor orden interno. Entre mejor sea la la disposición interna de las moléculas dentro de la red cristalina, mejores son los detalles de la estructura molecular que pueden ser obtenidos a partir del análisis de los datos de difracción de rayos X. Además, un transporte de masa controlado por difusión minimiza los flujos de convección generados por gradientes de densidad y aparte también, elimina la sedimentación de los cristales en crecimiento.

En este trabajo se presenta el diseño, fabricación y validación experimental de un dispositivo para realizar experimentos de cristalización en el espacio denominada Granada Crystallization Facility-2 (GCF-2). La GCF-2 es una plataforma modular económica y compacta. Entre sus características principales se pueden mencionar a) provee una alta densidad experimental, es decir, número de experimentos que pueden ser

implementados en su volumen total en comparación con otras plataformas de cristalización; b) conlleva un sistema de control de temperatura activo y; c) tiene total independencia de intervención humana (astronautas) después de su integración al vehículo espacial, lo cual la hace apropiada para vuelos tripulados y no tripulados. El dispositivo puede ser utilizado para la producción comercial de cristales de calidad óptima y/o para estudios fundamentales de crecimiento cristalino usando equipos de diagnóstico ex-situ. En este artículo se describen también los cambios incorporados con respecto a la versión anterior y los nuevos accesorios complementarios (nuevos reactores de cristalización). Además, se describe el funcionamiento de la GCF-2 durante la misión Foton M-3 de la Agencia europea del espacio a bordo de la capsula espacial rusa Foton.

Granada Crystallization Facility-2: A Versatile Platform for Crystallization in Space[†]

Luis A. Gonzalez-Ramirez,[§] Jordi Carrera,[‡] Jose A. Gavira,[§] Emilio Melero-Garcia,[§] and Juan M. Garcia-Ruiz^{*,§}

Laboratorio de Estudios Cristalograficos, IACT (CSIC-UGR), Avda. del conocimiento s/n, P.T. Ciencias de la Salud, 18100 Armilla, Granada, Spain, and NTE S.A. (Werfen Group), Lliçà d'Amunt, Barcelona, Spain

Received July 20, 2008; Revised Manuscript Received October 20, 2008

Ⓜ This paper contains enhanced objects available on the Internet at <http://pubs.acs.org/crystal>.

ABSTRACT: A facility for crystallization experiments in space named Granada Crystallization Facility-2 (GCF-2) is presented. GCF-2 is an inexpensive and compact modular platform featuring a high experiment density (number of experiments per liter of useful volume), a temperature control system, and a complete independence from human intervention after integration, which makes GCF-2 equally suited for manned and unmanned flights. The facility can be used for commercial quality crystal production and for fundamental crystal growth studies using ex situ diagnostics. The changes incorporated to the previous version and the complementary hardware (electronics and reactors) used are described. Also included is information on the performance of the facility during the European Space Agency FOTON-M3 mission on board the Russian unmanned FOTON capsule.

Introduction

Obtaining crystals with tailored properties such as size, shape and quality is a requirement for many advanced materials. For instance, in the field of structural biology¹ as well as in the field of zeolites and porous materials, drugs and compounds of new synthesis, growing crystals of high enough quality to get good X-ray diffraction data remains the difficulty that limits advances in structural studies and those projects depending on them. In addition, the growth of crystals of the highest chemical homogeneity and physical quality with millimeter to centimeter size, enough to be used in high technology devices, is also a subject of increasing interest.

Among other initiatives, the reduced gravity environment found on the ISS and other space platforms, which translates into a more convenient diffusive mass transport scenario, has boosted the development of platforms to perform crystallization experiments in space. It has been demonstrated that a diffusive scenario allows the growing of better internal ordered crystals. The better the internal arrangement of the molecules in the crystal lattice the greater the molecular structure details that can be obtained from the diffraction data analysis. A diffusive controlled mass transport minimizes buoyancy-driven convective flow and eliminates sedimentation of growing crystals. An excellent way to estimate the scenarios to obtain convection-free environments is the use of the dimensionless Grashof number (Gr_N), which accounts for the relative importance of buoyancy and viscous forces in a fluid system $Gr_N = L^3 \alpha \Delta c g \nu^{-2}$, where L is the thickness of the reactor (cm), Δc is the concentration difference, α is the solutal expansivity in cm^3/mg (the ratio of change in density to change in concentration), and ν is the kinematic viscosity ($\text{cm}^2/\text{s}^{-1}$). To reduce Gr_N and therefore to establish a diffusive scenario, there are several possibilities, namely, (a) to carry out crystallization experiments

in microgravity in space (where the value of g is reduced),²⁻⁶ and (b) to use capillaries and gels (where the characteristic length of the reactor is reduced)⁷⁻¹² to perform diffusive crystallization experiments on Earth. Since the early protein crystallization space adventure back in 1981 on board the German sounding rocket TEXUS, a number of apparatus and instruments have been tested and used with the purpose of carrying out crystallization experiments in microgravity in space.¹³ The first National Aeronautics and Space Agency (NASA) experiment of macromolecular crystal growth in space was a device called Spacelab that was based on the TEXUS hardware.^{14,15} This mission was actually a joint scientific effort with the European Space Agency (ESA). It was followed in 1985 by the Vapor Diffusion Apparatus (VDA) that was based on the "Hanging Drop" vapor diffusion technique, the most used for screening of protein crystallization conditions. Each VDA unit allocated 24 syringes mounted on a plate with miniature view-ports that allowed the astronauts to take photographs of the droplets at different times.^{16,17} Large-scale temperature based protein crystallization was first performed on STS-37, April 1991 using the Protein Crystallization Facility (PCF). The PCF consisted of four cylinders containing 20–500 mL of solution each, over which a temperature gradient could be established.^{18,19} The Protein Crystallization Apparatus for Microgravity (PCAM), also based on the vapor diffusion technique but on the variant named "Sitting Drop", has been flown more than ten times since its initial voyage during the STS-62 mission (1994).²⁰ This apparatus carried up to 63 crystallization experiments in each PCAM cylinder with very low crew-time requirement. Both the VDA and the PCAM were flown together during the MLS-1 NASA mission (1997) sharing space with the Hand-Held Diffusion Test Cells (HH-DTC, 8 exp/unit), the forerunner of a more advanced Observable Protein Crystal Growth Apparatus (OPCGA).²¹ HH-DTC was based on the liquid–liquid interface diffusion technique previously investigated in 1992 during the first International Microgravity Laboratory (IML-1) using the CRYOSTAT temperature control device.²² In 1995 and 1996 NASA used two other devices based on the liquid–liquid diffusion method, the Gaseous Nitrogen-dewar (GN2/183

[†] Part of the special issue (Vol 8, issue 12) on the 12th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Cancun, Mexico, May 6–9, 2008.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (34) 958181644. Fax: (34) 958181632. E-mail: jmgruiz@ugr.es. Web: <http://laue.lec.csic.es>.

[§] Laboratorio de Estudios Cristalograficos, IACT (CSIC-UGR).

[‡] NTE S.A. (Werfen Group).

samples per unit),²³ and the Diffusion-controlled Crystallization Apparatus for Microgravity (DCAM/27 experiments per unit),²⁰ also capable of working by the dialysis method. A more detailed description of all of the aforementioned NASA instruments and others from different space agencies can be found in the review of Kundrot and co-workers published in 2001²⁴ and in that of Judge and co-workers.^{5,25}

The common factor of all these devices was the focus on maximizing the number of experiments that could be performed while minimizing the weight, power consumption and crew-time requirement. A different concept and strategy was introduced by ESA in 1993 with the instrument named Advance Protein Crystallization Facility (APCF/48 reactors per unit).^{17,26} Unlike previous instruments the APCF was conceived as a facility for in situ crystal growth studies. In this sense it favored the incorporation of as many diagnostics and crystallization techniques as possible. The instrument was fully automatic (it only required to be switched on/off) and was capable of performing protein crystallization experiments using batch (BAT), vapor diffusion (VD), free interface diffusion (FID) and dialysis (DIA) methods. The APCF was equipped with a video recorder (narrow or wide field of view) to follow the crystal growth and also with a Mach–Zehnder interferometer after the LMS mission in 1996.^{27,28}

In this historical context, the counter-diffusion technique²⁹ has only recently been implemented on reactors for space experiments. The counter-diffusion technique is a crystallization technique that relies on the mutual diffusion of the precipitant and the protein solution along the reaction chamber. This configuration allows the system automatically to screen a large range of crystallization conditions along the reaction chamber for every single experiment, in contrast to vapor diffusion techniques in which only one condition is explored in each experiment. The APCF was the first instrument flying a counter-diffusion experiment in a reactor fabricated ad hoc, the Long Protein-Chamber Free Interface Diffusion (XL-FID) used during the STS-95 Mission in 1999. The XL-FID reactor was designed with a long protein chamber that fully exploited the power of the counter-diffusion technique. The scientific success of the APCF with more than 100 scientific publications,^{25,30} and, in particular, the excellent performance and results of the XL-FID reactor,^{31,32} helped to broaden the interest in counter-diffusion for crystallization experiments in space, and had a 2-fold consequence after the last mission of the APCF in 2001. On the one hand, ESA decided to commission the construction and use of another facility for in situ fundamental crystal growth studies in space, the Protein Microscope for the International Space Station (PromISS/6 reactors), that implemented only counter-diffusion experiments.⁶ On the other hand, due to the robustness and low costs of the implementations of the technique,²⁹ our laboratory proposed the construction of another device, the Granada Crystallization Facility (GCF/138 experiments), in the line of previous crystallization platforms, that is, focusing on the optimization of the maximum number of experiments possible.

The Granada Crystallization Facility is a platform designed to conduct a large number of crystallization experiments using the counter-diffusion technique, with the side-aim of reducing the cost for crystallization in space. The GCF is a box, measuring 12.5 × 12.5 × 8.5 cm of external dimensions and 11.5 × 11.5 × 7 cm internal dimensions. It provides 0.925 L of useful volume and weighs around 1 kg when fully filled. The GCF is capable of carrying a maximum number of 23 commercial Granada Crystallization Box³³ (GCB) type reactors

each of them carrying a maximum of 6 capillaries per box (138 crystallization experiments in total). It is a completely passive instrument without any moving parts and with zero electrical consumption that, once filled and closed, does not need further human intervention during the flight in space except for its integration inside the spacecraft. The GCF was commissioned by ESA to be used in the Andromède mission (2001) and has flown in the Odissea mission as well.³⁴ The National Space Development Agency of Japan (NASDA later JAXA), has also used the GCF in six missions from 2003 to 2006.³⁵

In this work we will review the Granada Crystallization Facility-2, its concept and the motivations for its design, which incorporates an active thermal control and newly designed crystallization reactors for counter-diffusion experiments. The GCF-2 was successfully flown on board the third mission of the Russian FOTON-M capsule in 2007.

Description of GCF-2

The Granada Crystallization Facility-2 (GCF-2) is an improved version of the GCF. The main upgrade is the implementation of an active temperature-control system, capable of keeping the temperature controlled in the interior of the GCF-2 at a preset value, and its modular design. This control system made it necessary to redesign slightly the dimensions and materials of the GCF to optimize thermal conductivity and minimize temperature gradients inside the GCF-2. The new version is made of aluminum finished in anodine, being slightly larger with 18.6 × 21 × 17 cm of external dimensions and 10 × 14.5 × 9 cm of internal dimensions. It has 1.31 L of useful volume and it weighs approximately 5 kg after being filled with crystallization experiments. The temperature control hardware and the peltier element are housed in the Electronic Unit (EU), which constitutes the base of the GCF-2, where the interface sockets and the electrical plugs are also placed (see Figure 1). The objective of the temperature control system is to provide an internal temperature of 20 °C at the GCF-2 internal housing, with temperature homogeneity between capillaries better than ±1 °C, and temperature homogeneity on the surface of a single capillary better than ±0.5 °C. The target temperature is currently fixed to keep the electronics and the control system simple and robust. However, other target temperatures can be fixed and an extension of the electronics to change the target temperature via telemetry commands during flight can be easily implemented.

The temperature data can be retrieved from two devices: from the calibrated thermo probe that is used by the temperature control system (0.1 °C resolution) and which can be sent to Earth by the spacecraft telemetry, and from a data logger (0.5 °C resolution) that is fitted inside a foam spacer in the GCF-2. A temperature-controlled environment system for protein crystallization is a very desirable condition because of the extreme sensitivity of protein solubility to temperature changes. Thus, it makes little sense to provide a stable and controlled temperature only for the duration of the flight. Following this thought a so-called Ground Supporting Electronics (GSE) unit was developed (see Figure 1). This unit is a wheeled metallic container to provide protection that houses a set of rechargeable batteries and a copy of the EU to where the GCF-2 is attached. In this way, the GCF-2 can be retrieved from the spacecraft at the landing site and transported as far as necessary, to synchrotron sources for example, and for as long as necessary, without altering the temperature environment in which the crystals have grown. The temperature stability of the GCF-2 varies depending on the working scenario: unpowered, the GCF-2 guarantees a temperature stability of ±4 °C during 3



Figure 1. The GCF-2. (a) Photograph of the GCF-2 filled with modules and of the EU. (b) Schematics of the mounting of the GCF-2. (c) Schematics of the layout of the crystallization reactors inside the GCF-2. (d) Schematics of the GSE.

min with ambient temperatures from 15 to 25 °C, or during 2 min with ambient temperatures from −15 to 30 °C. When the EU is powered by the spacecraft or by a GSE plugged to the mains the thermal stability is ± 1 °C and can be held indefinitely as long as there is power. The batteries of the GSE provide autonomy of 48 h with a thermal stability of ± 1 °C.

The price to pay for the thermally controlled environment is that the GCF-2 is not totally passive with regard to the electrical consumption as the previous version was. It has nevertheless very low power consumption. At ambient temperature between 0 and 30 °C the GCF-2 never consumes more than 10 W per hour, which can be classified as low for the power budget existing in current spacecrafts. In fact, the consumption of the GCF-2 during the FOTON-M3 mission was less than 1% of the total available energy budget. Apart from the minimal energy consumption, once filled with the experiments it is as independent of human intervention, both in space or on Earth, and as moving-part free as the first GCF version.

The New Crystallization Reactors: GCB-Domino and 3-Layer Capillaries

To implement the experiments inside the GCF-2, two new types of crystallization reactors were designed (see Figure 2). The GCB concept was redefined into a much more compact device, the Granada Crystallization Box-Domino (GCB-D). Measuring only $7 \times 0.7 \times 17$ cm it can easily accommodate four capillaries to perform gel-acupuncture counter-diffusion experiments²⁹ with only 1.5–2 mL of precipitant needed. The reactor is made entirely of plastic and is engineered with flat parallel surfaces that allow the optical inspection of the crystals in the capillaries without extracting them or disturbing the experiment.

Together with the GCB-D, new crystallization reactors made entirely of glass and with a different geometry were designed. These reactors were named 3-Layer capillaries (3LC) because in them the crystallization experiment is organized with the protein solution and the precipitant separated by a gel plug of variable length (see Figure 2) as in typical 3-layer crystallization experiments in gels.³⁶ This geometry is one of the different possibilities, together with gel acupuncture, in which the counter-diffusion technique can be implemented.²⁹ The main motivation for their design was to extend the functionality of the GCF-2 to include crystallization experiments with organic solvents and other agents that could chemically interact and degrade the plastic of the GCB-D.

Preparation of experiments in the GCB-D is similar to the preparation for standard GCBs except that now there is no plastic guide for the capillaries. For the 3LC, the thin part is first filled with the protein solution by capillarity and the capillary is sealed with sealing plasticine. Second, the plug solution is poured to the needed height and left to gel. Finally, the precipitant is poured on top of the plug and the capillary is sealed with wax (see Figure 2).

The organization of the experiments inside the GCF-2 is modular. Single experiments are performed in single capillaries. In the case of GCB-D, experiments using the same precipitant can be housed (up to six) inside a single GCB-D reactor. The GCB-D and 3LC reactors, regardless of the specific characteristics of the experiments within, can be organized inside modules as depicted in Figure 2. These modules are made of aluminum finished in anodine, measure $10 \times 2 \times 9$ cm, and weigh 215 g. Two different modules were designed to accommodate either 11 GCB-D or 42 3LC, as can be seen in Figure 2. The 3LC module has the same dimensions as the one for GCB-Ds but weighs 250 g due to the plastic holder for the 3LC. The GCF-2

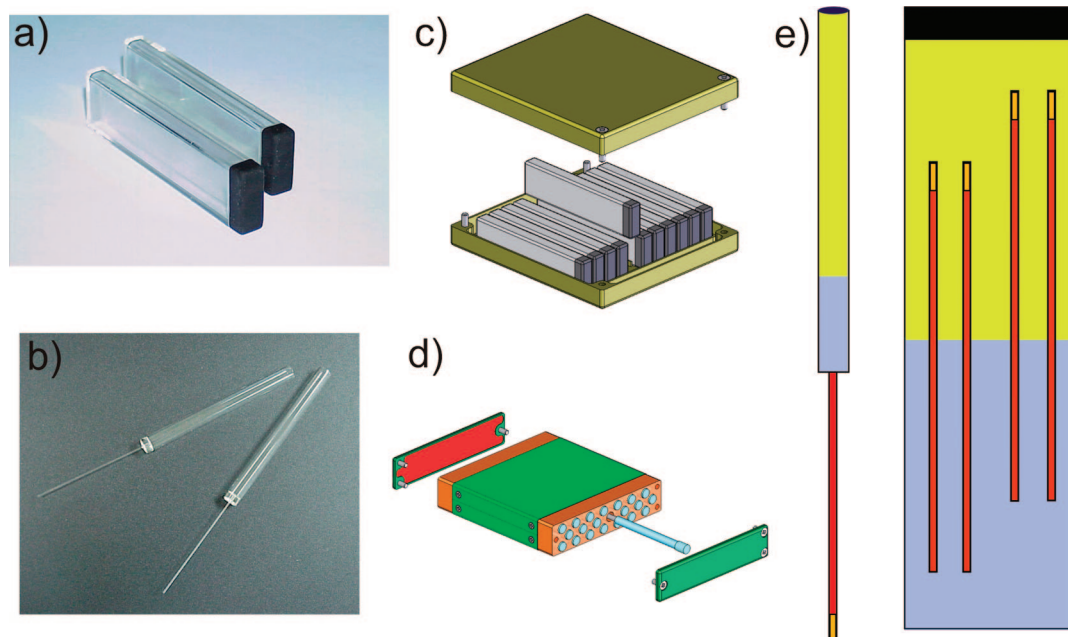


Figure 2. Panels a and b show the newly designed crystallization reactors, GCB-D and 3LC. A view of their integration inside the GCF-2 modules and a scheme of the setup of the counter-diffusion experiments using the reactors can be seen in panels c–e. In the scheme the precipitant is in yellow, the gel is in blue, the protein is red, and the orange is a plasticine plug to seal the capillaries. The 3LC is sealed with wax at the top. The implementation of the GCB-D shows an example with two different punctuation depths.

can therefore be configured and adapted to the needs and goals of each particular mission. Inside the GCF-2 a maximum of seven of these modules can be fitted. Depending on the final configuration, the seven GCF-2-modules can hold 308 or 294 experiments respectively if a GCB-D- or 3LC-only configuration is set.

Performance of the GCF-2 during the FOTON-M3 Mission

The GCF-2 has recently made its maiden voyage on board the Russian spacecraft FOTON. This capsule is a recoverable unmanned platform designed to carry experiments to space that is launched on top of a Soyuz rocket with typical orbiting times of around 10–14 days. The capsule was launched on the 14th of September 2007 from the Russian launching facility at Baikonur carrying on board, among many other experiments, the GCF-2.³⁷ The mission lasted 12 days after which the capsule was safely recovered (in the HTML version of this paper, see a video animation in Quicktime format summarizing the flight of the GCF-2).

For this mission the GCF-2 was setup with five modules loaded with 11 GCB-Ds each and one module loaded with 3LCs. The GCB-Ds and 3LCs were carrying standard counter-diffusion experiments as described previously. The seventh module of the GCF-2 was carrying 11 GCB-Ds that were holding inside cells with crystal seeds. This was a nonstandard experiment in which the goal was to study the history of the growth of crystals after recovery to observe changes between the part grown in space and that grown on Earth.

In total the GCF-2 carried 240 crystallization experiments with 19 different proteins from 11 different laboratories using the counter-diffusion technique, 33 experiments of crystal growth in space with crystal seeds and 9 test experiments of carbonate precipitation in space. The experiments were all prepared at the Baikonur launching site in a clean room at 20 °C two days before launch. The GCF-2 was the last payload to

be integrated inside the capsule. As a precaution against a possible 24 h delay of the launch date all the experiments, regardless of the type or reactor, GCB-D or 3LC, were duplicated using either different punctuation depth or length of the gel plug, to get at least half of the experiments nucleating and growing in space. However, the spacecraft was launched on the nominal date and therefore crystallization took place in space for both sets of experiments.

Several factors can be considered to analyze the performance of the facility during the mission. The first and more obvious was the tightness of all the containment levels, namely, the GCB-D and 3LC reactors, the modules, and the GCF-2 itself. The second was the performance of the temperature control system that was preset to a temperature of 20 °C. The third parameter was the mechanical stability of the counter-diffusion experiments, since there were questions regarding whether the small diameter capillaries used would mechanically hold their place in the gels after launch and landing despite the successfully passed vibration tests.

In every aspect the GCF-2 performed well within its specifications. The external housing was the only containment level required for the mission. Moreover, after the recovery we could verify that no spills of liquids had occurred in the modules and/or GCB-Ds and 3LCs. The temperature was controlled at 20 °C during the whole duration of the flight as can be seen in Figure 3, where the data from both temperature sensors are plotted. For comparison, we also show the recorded temperature inside the GCF during its flight on board the ISS together with that of a replica on the ground. In space, the GCF on board the ISS registered variations of up to 7 °C. These unstable temperature conditions translate into a lack of control of the experimental conditions and reduce the effectiveness of crystallization experiments in space. For the sake of clarity we have not included in the figure the temperature profile of the GCF-2 during the whole mission that shows the effectiveness of the GSE on keeping the temperature at 20 °C. Regarding the

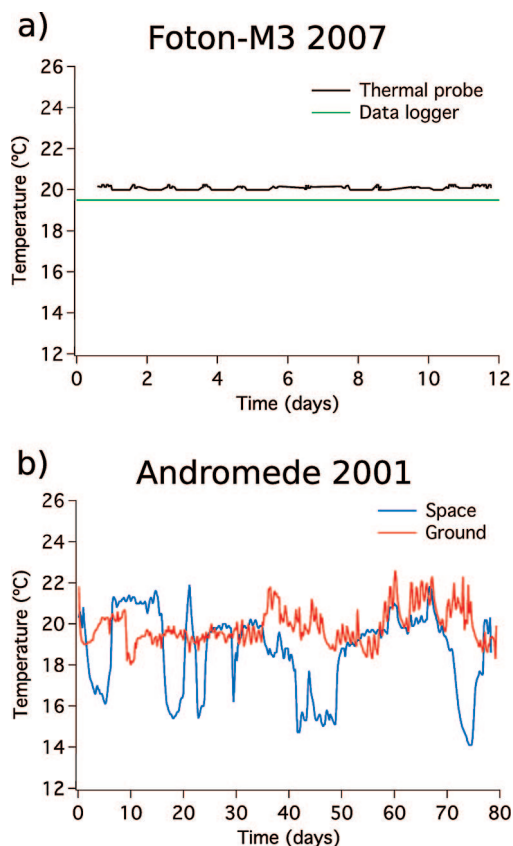


Figure 3. (a) Temperature profile recorded during the flight of the GCF-2 on-board the FOTON capsule. The black curve is data from the thermal probe used by the temperature control system that rounds up the temperature to a resolution of 0.1 °C. The green line is the temperature as recorded by the data logger that rounds up to 0.5 °C. (b) For comparison, the temperature recorded inside the GCF on-board the ISS during the Andromède mission and that of its mirror experiment on the ground are plotted. Variations of up to 7 °C were registered then for the space experiment.

mechanical stability inside the GCB-Ds, none of the capillaries showed signs of displacement from the position where they were punctured, not therefore being affected by the launching and landing shocks.

Discussion

Traditionally, facilities for crystallization of macromolecules in space have been designed for the production of diffraction quality crystals for structural data collection or for fundamental studies of crystal growth mechanisms. Both objectives have very different requirements and needs. The growth of quality crystals demands a commercial approach to the design of facilities, requiring a high density of experiments to maximize the success of the commonly used trial and error strategies, while at the same time reducing the costs of constructing and flying the facility. Moreover, the use of relatively cheap, even disposable, crystallization reactors is beneficial since it allows extensive testing of conditions on the ground which maximizes the chances of success in space. The volume of samples used in each experiment should be minimized due to the high cost associated with the obtaining of purified protein. Moreover, the ideal facility for crystallization of quality crystals in space should also be a simple and robust device to ensure its reliability and therefore maximize the success of the flight.

On the other hand, facilities designed for the study of crystal growth focus on diagnostics tools over other considerations and

try to include as many as possible. The ideal facility should be extensively modular, allowing the implementation of different diagnostics according to the needs of each experiment. The actual existing platforms are usually relatively large platforms carrying a small number of experiments that can however be thoroughly studied in situ, yielding an enormous amount of information. They are complex devices with many electronics and communications that need a thorough follow-up from a team on-ground to ensure the completion of the multiple tasks performed and for which replicas for on-ground testing are expensive and therefore small in number.

The crystallization facility presented in this publication falls clearly into the first category. Concerning the density of experiments, the GCF-2 offers the highest number of experiments per unit of useful volume (max 47 exp/L) currently available. The GCB-Ds and 3LC reactors are cheap devices that allow a large optimization of the crystallization conditions on ground before flying to space. The selection of counter-diffusion as the implemented technique automatically fulfills the third requirement for a commercial facility since the long protein chambers needed for fully exploiting the advantages of the technique are implemented with capillaries that can be as thin as 0.1 mm of internal diameter. For the standard 50 mm long capillaries that means a use of 0.39 μL of protein for each experiment, or the capability of performing 308 experiments with only 120 μL of purified protein. In addition, counter-diffusion gel acupuncture experiments using capillaries are the best replicas of microgravity conditions on ground, which validate the testing of conditions for crystallization on the ground. The use of X-ray capillaries also means reduced manipulation of the crystals during the diffraction studies, which reduces the chances of introducing defects in the crystals. The simplicity of the design of the GCF-2 offers a high reliability since it does not incorporate movable parts, is independent of human intervention after its integration in the space vehicle, and its only electronics, that of the temperature control system, do not need follow-up from the ground and would not prevent the experiment from being performed in the case of malfunction. Its reduced dimensions and energy consumption make it approximately 2 orders of magnitude cheaper than other available facilities of its kind.

The main characteristic of the GCF-2 is its modular design, which comprises four functional levels: first, we have the experiment level, which in our case is constituted by the 3LC and the capillaries inside the GCB-D. Second, we have the reactor level, which is constituted by the GCB-Ds themselves. The third level is the module level, and the fourth is constituted by the GCF-2 itself. This modular design bridges the gap between the two different philosophies for space crystallization of proteins mentioned above and makes possible the use of the facility to perform experiments for crystal growth studies using ex-situ diagnostics in ad hoc designed cells. For example, Tsukamoto and co-workers have performed experiments of this kind during the flight of the GCF-2 on the FOTON-M3 mission to study the different growth history of protein crystal seeds under space and ground conditions. The results of that successful experiment will be published elsewhere but it can be anticipated that they illustrate the capabilities of the GCF-2 as a facility for crystallization in space.

Summary

In this work we have presented the Granada Crystallization Facility-2 (GCF-2), a facility designed to perform routinely crystallization experiments in space. The GCF-2 is an improved

version of a previous design, the GCF, incorporating an active temperature control capable of keeping a temperature of 20 °C in its interior with an accuracy of 0.5 °C. The facility is designed as a versatile, multiuser, modular facility capable of fulfilling the requirements of low cost and high density of experiments for industrial users, while at the same time being capable of providing a temperature-controlled, highly reliable and human-independent facility to carry out crystal growth experiments for ex situ diagnostics that could interest the academic and research community. Together with the GCF-2, supporting ground electronics GSE were designed to extend the temperature control at all times from the recovery of the payload to the analysis of the experiments. The GCF-2 was flown successfully on its first flight in September 2007 on board the unmanned FOTON capsule during the ESA FOTON-M3 mission.

Acknowledgment. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) (PNE Projects ESP2005-23831-E and ESP2007-29071-E) and is part of the Consolider-Ingenio 2010 project "Factoria Española de Crystallization". We thank Olivier Minster, Antonio Verga, and Philippe DeGieter (ESA, Noordwijk, NL). Also thanks to NTE and Triana Science and Technology for the development of the facility and an acknowledgment to the Russian team at the Integration Hall in Baikonur, Kazakhstan.

Supporting Information Available: Video animation of the FOTON M-3 Mission showing the overall performance of the GCF-2 on board the Foton rocket as well as the implementation of the counter-diffusion technique using the 3L capillaries and GCB-D boxes and placing them into their corresponding modules; Photographs showing two views of the GCF: (a) The GCF filled with GCBs, the separator foam (red) and the data logger, (b) a view of the GCF after closing, (c) a standard closed polystyrene GCB. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- (2) Lorber, B. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2002**, *1599*, 1–8.
- (3) Ng, J. D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *974*, 598–609.
- (4) Vergara, A.; Lorber, B.; Sauter, C.; Giegé, R.; Zagari, A. *Biophys. Chem.* **2005**, *118*, 102–112.
- (5) Snell, E. H.; Helliwell, J. R. *Rep. Prog. Phys.* **2005**, *68*, 799–853.
- (6) Zegers, I.; Carotenuto, L.; Evrard, C.; García-Ruiz, J.; De Gieter, P.; Gonzalez-Ramirez, L.; Istasse, E.; Legros, J.-C.; Martial, J.; Minetti, C.; Otalora, F.; Queeckers, P.; Schockaert, C.; Van de Weerd, C.; Willaert, R.; Wyns, I.; Yourassowsky, C.; Dubois, F. *Microgravity Sci. Technol.* **2006**, 165–169.
- (7) Robert, M. C.; Lefauchaux, F. *J. Cryst. Growth* **1988**, *90*, 358–367.
- (8) Robert, M. C.; Vidal, O.; García-Ruiz, J. M.; Otálora, F. In *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*; Ducruix, A.; Giegé, R., Eds.; Oxford University Press: New York, 1999; pp 149–175.
- (9) Garcia-Ruiz, J. M.; Moreno, A. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1994**, *50*, 484–490.

- (10) Garcia-Ruiz, J. M.; Novella, M. L.; Moreno, R.; Gavira, J. A. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 165–172.
- (11) Maes, D.; Gonzalez-Ramirez, L. A.; Lopez-Jaramillo, J.; Yu, B.; De Bondt, H.; Zegers, I.; Afonina, E.; Garcia-Ruiz, J. M.; Gulnik, S. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2004**, *60*, 463–471.
- (12) Evrard, C.; Maes, D.; Zegers, I.; Declercq, J. P.; Vanhee, C.; Martial, J.; Wyns, L.; van De Weerd, C. *J. Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2161–2166.
- (13) Littke, W.; John, C. *Science* **1984**, *225*, 203–204.
- (14) Littke, W.; John, C. *Earth Oriented Appl. Space Technol.* **1985**, *5*, 63–66.
- (15) Littke, W.; John, C. *J. Cryst. Growth* **1986**, *76*, 663–672.
- (16) DeLucas, L. J.; Suddath, F. L.; Snyder, R.; Naumann, R.; Broom, M. B.; Pusey, M.; Yost, V.; Herren, B.; Carter, D.; Nelson, B.; Meehan, E. J.; McPherson, A.; Bugg, C. E. *J. Cryst. Growth* **1986**, *76*, 681–693.
- (17) Snyder, R. S.; Fuhrmann, K.; Walter, H. U. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 333–338.
- (18) Schoen, E.; Seifert, F. *Acta Astronaut.* **1988**, *17*, 1155–1160.
- (19) Long, M. M.; Bishop, J. B.; Nagabhushan, T. L.; Reichert, P.; Smith, G. D.; DeLucas, L. J. *J. Cryst. Growth* **1996**, *168*, 233–243.
- (20) Carter, D. C.; Wright, B.; Miller, T.; Chapman, J.; Twigg, P.; Keeling, K.; Moody, K.; White, M.; Click, J.; Ruble, J. R.; Ho, J. X.; Adcock-Downey, L.; Bunick, G.; Harp, J. *J. Cryst. Growth* **1999**, *196*, 602–609.
- (21) McPherson, A.; Malkin, A. J.; Kuznetsov, Y. G.; Koszelak, S.; Wells, M.; Jenkins, G.; Howard, J.; Lawson, G. *J. Cryst. Growth* **1999**, *196*, 572–586.
- (22) Snyder, R.; Miller, T. *Adv. Space Res.* **1993**, *13*, 47–57.
- (23) Koszelak, S.; Leja, C.; McPherson, A. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52*, 449–558.
- (24) Kundrot, C. E.; Judge, R. A.; Pusey, M. L.; Snell, E. H. *Cryst. Growth Des.* **2001**, *1*, 87–99.
- (25) Judge, R. A.; Snell, E. H.; van der Woerd, M. J. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2005**, *61*, 763–771.
- (26) Bosch, R.; Lautenschlager, P.; Potthast, L.; Stapelmann, J. *J. Cryst. Growth* **1992**, *122*, 310–316.
- (27) Riès-Kautt, M.; Broutin, I.; Ducruix, A.; Shepard, W.; Kahn, R.; Chayen, N.; Blow, D.; Paal, K.; Littke, W.; Lorber, B.; Thèobald-Dietrich, A.; Giegé, R. *J. Cryst. Growth* **1997**, *181*, 79–96.
- (28) Pletser, V.; Stapelmann, J.; Potthast, L.; Bosch, R. *J. Cryst. Growth* **1999**, *196*, 638–648.
- (29) Garcia-Ruiz, J. M. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: New York, 2003; Vol. 368, pp 130–154.
- (30) Vergara, A.; Lorber, B.; Zagari, A.; Giegé, R. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2003**, *59*, 2–15.
- (31) Garcia-Ruiz, J. M.; Otálora, F.; Novella, M. L.; Gavira, J. A.; Sauter, C.; Vidal, O. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 149–155.
- (32) Sauter, C.; Otálora, F.; Gavira, J. A.; Vidal, O.; Giegé, R.; Garcia-Ruiz, J. M. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2001**, *57*, 1119–1126.
- (33) Garcia-Ruiz, J. M.; Gonzalez-Ramirez, L. A.; Gavira, J. A.; Otálora, F. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2002**, *58*, 1638–1642.
- (34) http://www.nasa.gov/mission_pages/station/science/experiments/GCF.html.
- (35) Sato, M.; Tanaka, H.; Inaka, K.; Shinozaki, S.; Yamanaka, A.; Takahashi, S.; Yamanaka, M.; Hirota, E.; Sugiyama, S.; Kato, M.; Saito, C.; Sano, S.; Motohara, M.; Nakamura, T.; Kobayashi, T.; Yoshitomi, S.; Tanaka, T. *Microgravity Sci. Technol.* **2006**, 184–189.
- (36) Henisch, H. K. *Periodic Precipitation*; Pergamon Press: New York, 1991.
- (37) http://www.trianatech.com/GCF-2_FOTON_M3/index.html.

CG800788E

Artículo 4.

Structural study of the type II 3-dehydroquinase dehydratase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. D. Maes, **Luis A. González-Ramírez**, J. López-Jaramillo, B. Yu, H. De Bondt, I. Zegers, E. Afonina, J. M. García-Ruiz, S. Gulnik. (2004). Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **60**: 463-471.

Resumen.

En este trabajo se determinó la estructura de la enzima dehidratasa dehidroquinasa tipo II (DHQasa) de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la tercera enzima de la vía biosintética shikimase que une el metabolismo de carbohidratos a la síntesis de compuestos aromáticos. Esta biosíntesis se encuentra solamente en microorganismos y plantas pero no en animales. Se obtuvieron cristales en microgravedad y en condiciones terrestres a través de la técnica de contradifusión que difractaron hasta 1.7 Å. La estructura fue resuelta usando reemplazamiento molecular y refinada a alta resolución. Se describe la estructura completa de la enzima dodecamérica y comparada con estructuras de DHQasas de otras bacterias. Las DHQasas contienen un dominio flexible que, presumiblemente, se cierra sobre el sitio activo una vez que se ha unido el sustrato. La enzima puede existir en una conformación abierta o cerrada. La estructura obtenida en este trabajo muestra la conformación abierta, con un anión sulfato unido al sitio activo. La disponibilidad de esta estructura abre una ruta al diseño de antibióticos dirigidos contra esta bacteria patógena.

Structural study of the type II 3-dehydroquininate dehydratase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*

D. Maes,^{a*} L. A. Gonzalez-Ramirez,^b J. Lopez-Jaramillo,^b B. Yu,^{c,d} H. De Bondt,^d I. Zegers,^a E. Afonina,^{c,d} J. M. Garcia-Ruiz^b and S. Gulnik^{c,d}

^aULTR, Vrije Universiteit Brussel, Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie (VIB), Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium,

^bLaboratorio de Estudios Cristalográficos, Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, CSIC–Universidad de Granada, Av.

Fuentenueva s/n, 18002 Granada, Spain,

^cSequoia Pharmaceuticals Inc., 401 Professional Drive, Suite 100, Gaithersburg, MD 20879,

USA, and ^dTibotec BVBA, Generaal De Wittelaan 11B 3, B-2800 Mechelen, Belgium

Correspondence e-mail: dominique.maes@vub.ac.be

The structure of the type II dehydroquininate dehydratase (DHQase) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the third enzyme of the shikimate pathway, has been determined. Crystals diffracting to 1.7 Å were obtained in space and on earth using the counter-diffusion technique. The structure was solved using molecular replacement and refined to high resolution. The overall structure of the dodecameric enzyme is described and compared with structures of DHQases from other bacteria. DHQases contain a flexible loop that presumably closes over the active site upon substrate binding. The enzyme can exist in an open or closed conformation. The present structure displays the open conformation, with a sulfate anion bound in the active site. The availability of this structure opens a route to structure-based antibiotics targeting this pathogenic bacterium.

1. Introduction

This paper is concerned with the type II dehydroquinase (DHQase) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* (referred to here as Ap-DHQase). DHQase catalyses the dehydration of 3-dehydroquininate (DHQ) to 3-dehydroshikimate (Fig. 1), a reaction common to two metabolic pathways that are absent in animals: (i) the biosynthetic shikimate pathway, which is used for synthesis of aromatic compounds (present in microorganisms and plants), and (ii) the catabolic quinate pathway, which enables the use of quinate as a carbon and energy source (present in fungi and some microorganisms). DHQases have been found to fall into two main classes: type I and type II. Representative structures of DHQases of both types have recently been solved (Gourley *et al.*, 1999). The two classes of enzymes operate by entirely different mechanisms; their sequences are unrelated and they have different folds and subunit organization. The type I enzyme is a dimer of eight-stranded α/β -barrels, while the type II enzyme has a dodecameric quaternary structure. The existence of two distinct types of DHQase in microorganisms offers a unique opportunity to selectively inhibit some pathogenic microorganisms using the type II enzyme as a drug target (Coggin *et al.*, 2003).

Actinobacillus (formerly *Haemophilus*) *pleuropneumoniae* is an aetiological agent of porcine pleuropneumonia, a major respiratory disease in pigs (for recent reviews, see Bosse *et al.*, 2002; Lalonde *et al.*, 1994; Rycroft & Garside, 2000, and references therein). The wide spread of the disease causes severe economic losses to the pig industry worldwide. Infection is transmitted by contact or aerosol and the morbidity in susceptible groups can approach 100%. Infected animals develop acute fibrinous pneumonia, which leads to death or chronic lung lesions and reduced growth rates. Commercially available vaccines, which are generally composed of chemi-

Received 21 October 2003

Accepted 23 December 2003

PDB Reference: type II 3-dehydroquininate dehydratase, 1uqr, r1uqrsf.

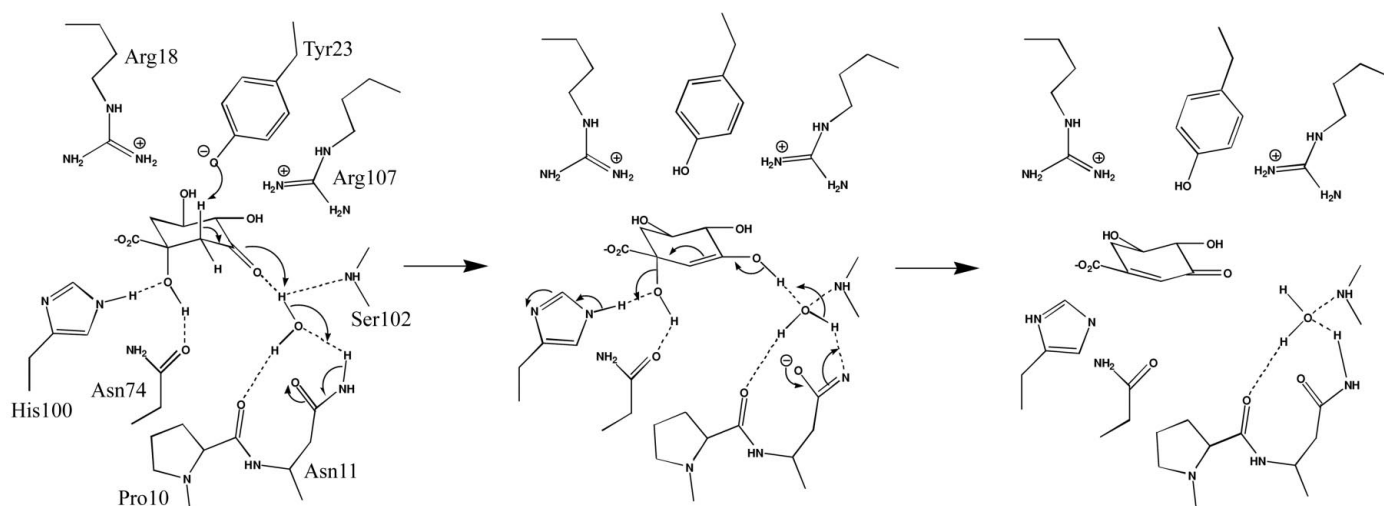


Figure 1
Summary of the reaction mechanism of type II dehydroquinases (Roszak *et al.*, 2002).

cally inactivated bacteria combined with oil adjuvants, have failed to prevent the disease. Moreover, whole-cell bacterins and surface-protein extracts often contain immunosuppressive components, which make pigs more susceptible to infection. Furthermore, these vaccines may reduce mortality but do not reduce the number of chronic carriers in a herd. Several antibiotics have been shown to be effective against *A. pleuropneumoniae*. As the overuse of animal drugs could spur the emergence of superbacteria in meat that can infect consumers and resist drugs used to treat humans, there is a clear need for effective and more specific antibiotics. In this respect, type II dehydroquinase (DHQase) may represent a good target for such increased-specificity drugs, since most common meat-contaminating bacteria that affect humans, such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and various *Salmonella* species, have structurally and mechanistically different type of DHQase (type I DHQase) and therefore will not develop resistance to type II inhibitors.

At present, the structures of type II DHQases from *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-DHQase; Gourley *et al.*, 1999), *Bacillus subtilis* (Bs-DHQase), *Streptomyces coelicolor* (Sc-DHQase; Roszak *et al.*, 2002) and *Helicobacter pylori* (Hp-DHQase; Lee *et al.*, 2003) have been solved and are available in the PDB. For Mt-DHQase the unliganded and sulfate-liganded structures have been solved, while the Bs-DHQase structure contains glycerol molecules, the Hp-DHQase structure contains the substrate dehydroquininate, and Sc-DHQase structures are available that are unliganded and phosphate-liganded as well as liganded with the transition-state analogue 2,3-anhydroquinic acid and with the product dehydroshikimate as well as tartrate and glycerol for the inactive R23A (Sc-DHQase numbering) mutated enzyme.

In this paper, we present the high-resolution (1.7 Å) crystal structure of the type II DHQase from *A. pleuropneumoniae* (Ap-DHQase) containing sulfate anions. Ap-DHQase was crystallized by the counter-diffusion technique both in space under microgravity conditions and on earth. The use of the counter-diffusion technique increased the diffraction limit

from the crystals from 3 to 1.7 Å. The structure of Ap-DHQase shows that it has a flavodoxin-like fold and a dodecameric quaternary organization with tetrahedral symmetry, similar to the other type II DHQase structures. The active-site region contains a flexible loop. This flexible loop, which is not visible in most of the other available unliganded structures of type II DHQases, could be traced in several subunits in the present structure. Different conformations were found, showing its flexibility. This loop domain, which includes the essential catalytic residues Arg18 and Tyr23 (Ap-DHQase numbering), forms a lid over the active site in the liganded structures.

Unless specified otherwise, Ap-DHQase numbering is used.

2. Material and methods

2.1. Cloning, expression and purification

Genomic DNA from *A. pleuropneumoniae* was obtained from ATCC. The Ap-DHQase gene (Lalonde *et al.*, 1994) was amplified by PCR using *A. pleuropneumoniae* genomic DNA as template and the following primers: sense, atatatCATATGAAAAAATTCTTCTGTAAACG; antisense, atatatGGATCCTTAGCCATTCATCATTTC. The PCR fragment was inserted into pET21a (Novagen) *via* *Nde*I and *Bam*HI sites. The sequence of the resulting construct, pET21DHQ *pne*, was confirmed by DNA sequencing. pET21DHQ *pne* was transformed into BL21(DE3) *E. coli* cells (Novagen, Milwaukee, WI, USA). A single colony was inoculated into 50 ml LB medium containing 0.1 mg ml⁻¹ ampicillin. The culture was grown overnight at 310 K with shaking. The cells from 10 ml aliquots were harvested by centrifugation, resuspended in 10 ml fresh LB/ampicillin and used to inoculate 1000 ml LB/ampicillin medium. The culture was maintained at 310 K with shaking until the OD at a wavelength of 600 nm reached 0.7. At this stage, the culture was induced by IPTG at a final concentration of 1 mM. After 3 h of further growth, the cells were harvested by centrifuga-

tion and stored at 193 K. The cell paste obtained from 1 l of culture was resuspended in 20 ml ice-cold 50 mM Tris–HCl pH 7.5 and sonicated twice for 2 min with a 10 min rest on ice in between. The crude cell extract was centrifuged at 47 000g at 277 K for 60 min and the supernatant was incubated at 348 K for 15 min with occasional stirring. The solution was then cooled on ice for 20 min and heat-denatured proteins were removed by centrifugation at 47 000g for 30 min. The proteins in the supernatant were precipitated with 65% saturated ammonium sulfate. The precipitate was collected by centrifugation at 26 000g for 30 min, redissolved in 5 ml 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.5 and chromatographed through a 2.6 × 60 cm Sephacryl S-200 column (Amersham) using an isocratic elution in the same buffer. Fractions containing Ap-DHQase were pooled and applied onto a 1.0 × 10 cm MonoQ column (Amersham). Pure protein was eluted using a 0–1 M linear gradient of NaCl in 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.5. The total yield of purified protein was 60 mg per litre of *E. coli* culture. The protein concentration was estimated based on the absorbance at 280 nm using a calculated extinction coefficient of 0.45 for 1 mg ml⁻¹ protein solution.

2.2. Crystallization

Crystals were grown by the gel-acupuncture method (Garcia-Ruiz *et al.*, 1998) implemented in the Granada Crystallization Box (GCB; Garcia-Ruiz *et al.*, 2002) both on earth and in space. The space experiments were performed in the Granada Crystallization Facility in the context of the Andromeda mission.

The GCB was filled to 2.7 cm in height with a gel consisting of 1% (w/v) agarose in 100 mM Tris–HCl pH 7.4 and 0.03% (w/v) sodium azide. Six X-ray capillaries with internal diameters of 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7 and 1 mm were filled with a solution of Ap-DHQase at a concentration of 20 mg ml⁻¹ in 100 mM Tris–HCl pH 7.4. The capillaries were punctured 1 cm into the gel layer to delay crystal growth for 72 h in order to be sure that the experiment was orbiting the Earth. Finally, the precipitating agent, consisting of 3.5 M ammonium sulfate in 100 mM Tris–HCl pH 7.4 and 0.03% (w/v) sodium azide, was poured onto the gel to a total height of 8 cm. The GCB flew to the International Space Station (ISS) in a Russian Progress M-45 logistics vehicle launched on 21 August 2001 and returned to Earth on board a Russian Soyuz TM-33 manned transport vehicle launched on 21 October that landed on 31 October 2001. The total length of this Andromeda Mission was therefore 72 d. A set of control experiments on ground were prepared using exactly the same conditions except that the protein solution was gelled inside the capillary with 0.1% agarose to prevent convective motion (Garcia-Ruiz, Novella *et al.*, 2001). As shown in Fig. 2, both ground and space experiments yielded numerous crystals distributed along the capillaries with the typical counter-diffusion crystal distribution along the capillary, with crystals becoming larger towards the top of the capillary.

2.3. Data collection and data processing

Two data sets were collected, one from a crystal grown in space and one from a crystal grown on earth, both crystals having the same size, morphology and habit. The crystals were removed from the capillaries and soaked in a cryobuffer consisting of 100 mM Tris–HCl pH 7.4, 2.5 M ammonium sulfate and 20% (w/v) glycerol. Data were collected at Hamburg EMBL synchrotron outstation (beamline BW7b) at 100 K in dose mode. The images were recorded on a MAR 345 image-plate detector placed at a distance of 270 mm with an oscillation angle of 0.3°. Data sets were scaled with *XSCALE*. Data reduction was carried out independently for each data set with the program package *XDS* (Kabsch, 1993) and neither overloads nor incomplete reflections (*i.e.* those for which the estimated intensity after profile fitting was less than 75% of the observed intensity) were included in the processing. Finally, common reflections from each data set were merged together in order to solve the structure.

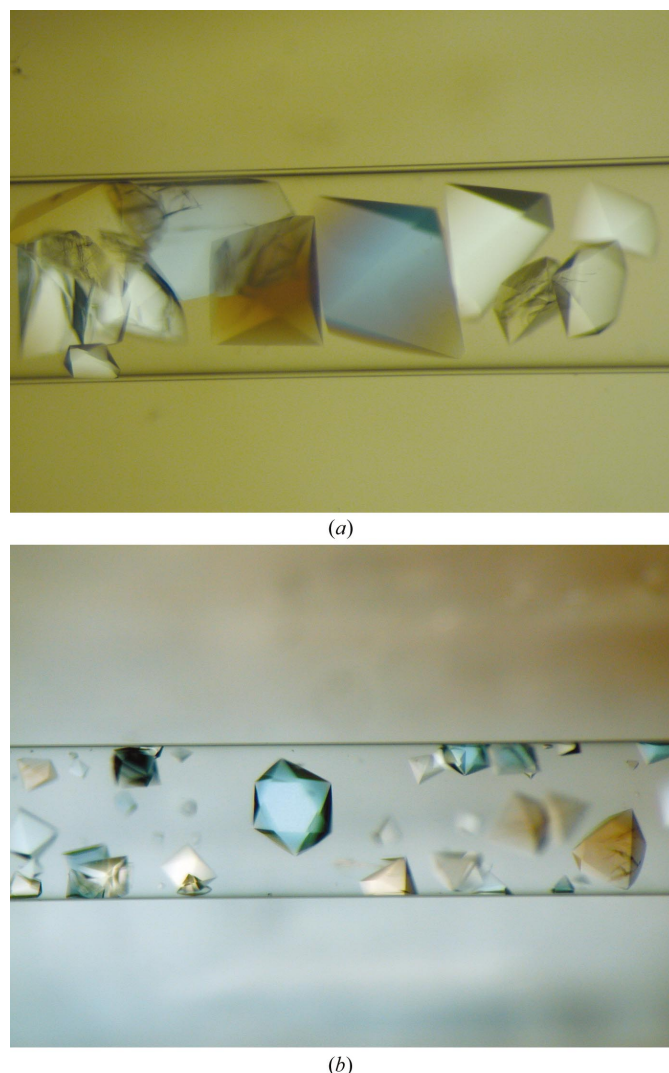


Figure 2
Crystals of DHQase grown (a) in space inside a 0.7 mm capillary and (b) on earth inside a 1.0 mm capillary.

2.4. Molecular replacement, model building, refinement and structure analysis

Molecular replacement was performed with the program *AMoRe* (Navaza, 1994, 2001) using the 1.7 Å data set from a ground-control crystal. For computational reasons, half of the dodecamer, consisting of chains *A* to *F*, of Sc-DHQase (PDB code 1d0i) was used as a search model. Because of the symmetry of the molecule, several solutions were found. Two non-overlapping solutions were chosen and this resulted in a model with an *R* factor of 48.9% after rigid-body refinement.

Manual rebuilding and computational refinement were performed using the programs *TURBO-FRODO* (Roussel & Cambillau, 1991) and *CNS* (Brünger *et al.*, 1998) running on an SGI O2 workstation. The parameters for ideal protein geometry of Engh & Huber (1991) were used for the refinement. Tris and sulfate molecules were identified based on the shape of the electron density and included in the model. Water peaks were assigned using the standard protocol as implemented in *CNS*. Briefly, peaks greater than 3σ in an $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ electron-density map with at least one potential hydrogen bond were added to the model and continuously updated during the refinement (*B* factors were not allowed to be greater than 62 \AA^2). Both *R* and R_{free} (5% of reflections in the test set) were used to monitor the progress of structural refinement (Brünger, 1992). The stereochemical quality of the refined structure was checked with the program *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993).

Superpositions were carried out with *LSQMAN* (Kleywegt & Jones, 1994) and *TURBO-FRODO* (Roussel & Cambillau, 1991). All C^α atoms except those in the terminal residues, in the residues in the flexible loop and in a small region around insertion 92 were superimposed (residues 5–17, 25–91, 97–142). Figures were drawn with *MOLSCRIPT* (Kraulis, 1991) and *Raster3D* (Merritt & Bacon, 1997). *CLUSTALW* (Aiyar, 2000) was used for multiple sequence alignment. For the comparison of the active sites, a short stretch of structurally well conserved residues (HL/IS/TN motif; residues 100–103; Evans *et al.*, 2002) involved in substrate recognition was superimposed.

3. Results and discussion

3.1. Protein production and purification

The Ap-DHQase gene was cloned from bacterial genomic DNA and inserted into the pET 21 vector for *E. coli* expression using conventional molecular biology techniques. The protein was overexpressed in soluble form and purified to apparent homogeneity using a simple purification procedure that takes advantage of the excellent thermal stability and high molecular weight of the dodecameric enzyme. Ap-DHQase remained folded at 348 K, while most of *E. coli* proteins underwent heat denaturation and were removed by centrifugation. Further purification was achieved by size-exclusion chromatography of the 205 kDa dodecamer. Ion-exchange chromatography on Mono-Q allowed separation of a significant amount of material absorbing at 254 nm, probably

Table 1

Data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

	Space	Ground
Beamline (DESY)	BW7b	BW7b
Wavelength (Å)	0.8463	0.8463
Distance to detector (mm)	270	270
Oscillation angle (°)	0.3	0.3
Images collected	100	416
No. crystals	1	1
Cryoconditions	Yes	Yes
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 129.09, b = 131.33,$ $c = 161.62,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	$a = 128.96, b = 131.35,$ $c = 160.84,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Resolution range (Å)	20.00–1.71 (1.80–1.71)	20.00–1.71 (1.80–1.71)
Unique reflection	210933 (27619)	288020 (39797)
Completeness (%)	71.5 (66.2)	98.2 (96.0)
R_{sym} (%)	3.3 (30.9)	3.5 (22.4)
Redundancy	1.64	5.12
<i>B</i> factor from Wilson plot (Å ²)	26.0	27.2
$I/\sigma(I)$	12.67 (2.90)	27.78 (7.30)
Completeness at $I/\sigma(I) \geq 2$ (%)	60 (37)	93 (79)

bound nucleic acids, and resulted in more than 99% pure protein as judged by SDS–PAGE analysis.

3.2. Crystallization by counter-diffusion

Iterative trials to crystallize DHQase by the vapour-diffusion technique never yielded crystals that diffracted beyond 3 Å using in-house diffraction facilities. Therefore, out-of-equilibrium counter-diffusion experiments were designed in order to improve crystal quality. The principle of counter-diffusion experiments involves the diffusion of a precipitant (ammonium sulfate in this case) into a long capillary containing the protein solution. A layer of gelled buffer initially separates the precipitant solution and the protein solution. The protein molecules diffuse out of the capillary much more slowly than the salt molecules. The coupling of the diffusing salt and protein molecules with the precipitation of the protein provokes a wave of supersaturation moving over the capillary. The crest of the wave lowers as the diffusion process proceeds and the precipitant reaches the upper part of the capillary. Thus, different parts of the capillary ‘see’ different crystallization conditions. In the capillary, a continuum of crystallization conditions is created from high supersaturation when the protein and salt first meet at the lower part of the capillary to low supersaturation at the upper part of the capillary. Thus, the out-of-equilibrium counter-diffusion method self-searches for the best crystallization conditions and the protein crystallizes in the region with supersaturation profiles that are best suited (Garcia-Ruiz, Otalora *et al.*, 2001). The starting conditions for counter-diffusion were based on previous vapour-diffusion conditions. Fig. 2 shows ground- and space-grown crystals. Both are faceted and display good optical quality. Owing to a lack of synchrotron time, X-ray crystallographic data were only collected from two crystals: one crystal grown in space and one

crystal grown on the ground. The results of the data analysis are summarized in Table 1. The use of counter-diffusion improved the resolution from 3.0 Å for the crystals grown in hanging drops to 1.7 Å. This result cannot be considered conclusive because of three reasons: (i) a proper comparative analysis of crystal quality between space and earth-grown crystals grown by counter-diffusion technique needs to be performed with a representative set of crystals because, as discussed above, the quality of the crystals varies as a function of their location along the capillary, (ii) although both data sets were collected with the same parameters (*e.g.* beam, exposure, distance to the detector, oscillation angle), direct comparison is not straightforward because the crystals were not oriented and the oscillation range of each data set is different and (iii) the thermal history of the space experiments was unknown.

3.3. The Ap-DHQase molecular structure

The crystal structure of Ap-DHQase was determined by molecular replacement using the Sc-DHQase structure (Roszak *et al.*, 2002) as a phasing model. The final model has good stereochemistry. Ap-DHQase exists as a homododecamer: four trimers are arranged in a tetrahedral manner (23 symmetry; Fig. 3*a*). Each subunit consists of a five-stranded parallel β -sheet core flanked by four α -helices (Fig. 3*b*). The interactions between the trimeric units are less extensive than those within the trimers. On forming the trimer, each monomer buries 1329 Å² of solvent-accessible surface (17% of the total surface). During assembly of the trimers, an additional surface of 813 Å² (10% of the total surface) is buried.

The asymmetric unit consists of the complete dodecamer. For most monomers there is only weak density for the C-terminal helix (residues 146–153) and for residues 18–25. This flexible loop forms a lid that closes over the active site on substrate binding. After several rounds of refinement and incorporation of water molecules, we were able to trace the flexible loop for four subunits and the C-terminal helix for five subunits. The side chain of Cys125 adopts three different conformations in all subunits. In one of its conformations Cys125 makes a hydrophobic intertrimeric contact with Val123. The 12 monomers are highly similar, with r.m.s. deviations ranging between 0.13 and 0.78 Å for the superposition of the main-chain C α atoms of all the possible pairs of monomers. The largest differences between monomers are located at the flexible loop and at the C-terminal helix. The refined model includes 2266 structured water molecules, four Tris molecules and 31 sulfate molecules. Refinement parameters and statistics are given in Table 2.

3.4. The active site and the flexible loop

The type II DHQases catalyze *trans*-dehydration *via* an enol intermediate (Fig. 1). The active site is composed of residues Pro10, Asn11, Arg18, Tyr23, Asn74, Ala77, Ser102 and Arg107 (Roszak *et al.*, 2002) and is located at the C-terminal end of the five-stranded parallel β -sheet (Fig. 3*b*). In the

Table 2

Refinement parameters and statistics for the final model.

Protein atoms	13650
Sulfate atoms	31
Tris atoms	4
Solvent atoms	2266
Resolution range (Å)	20–1.71
<i>R</i> factor (%)	17.8
<i>R</i> _{free} (%)	19.9
R.m.s. bond-length deviations (Å)	0.006
R.m.s. bond-angle deviations (°)	1.3
Average <i>B</i> factors (Å ²)	
Protein atoms	23.7
Sulfate atoms	38.6
Tris atoms	17.3
Solvent atoms	40.6
Ramachandran plot	
Most favoured regions (%)	92.6
Additional allowed regions (%)	6.8
Generously allowed regions (%)	0.5
Disallowed regions (%)	0.0

present structure, the 12 active sites are occupied by several structured water molecules and a sulfate ion bound in the carboxylate-recognition region making hydrogen bonds with the main-chain N atoms of Ile101 and Ser102 and with Asn74 ND2, His100 ND1 and Ser102 OG. The active-site residue Arg18 is located at the N-terminal region of the flexible loop. The deprotonated form of Tyr23, belonging to the loop, has been proposed to act as a general base, abstracting a proton from C2 of the substrate. Arg107 and to a lesser extent Arg18 could lower the p*K*_a of Tyr23. In none of the monomers does Tyr23 take up the position it should have for catalysis. It is more than 5 Å away from C2 of a modelled substrate. Thus, the different monomers in the present structure represent different conformations of the open form of Ap-DHQase. The loop residues are rather poorly defined (high temperature factors), showing their flexibility/mobility. Nevertheless, the complete flexible loop was traced in four subunits (*A, D, J, K*). The main chain follows the same trace in three subunits (*D, J, K*). For subunit *A* a completely different conformation was found for this loop. This is because of the close crystallographic packing contact in which this loop is involved: direct hydrogen bonds are formed with His34, Gln37, Ser38, Glu42, Lys130 and Asp133 of chain *C* as well as with Asp137 of chain *L*. Comparison of the two conformations of the loop found in the present structure and the typical closed conformation (*e.g.* torsion angles) shows that this loop motion cannot be seen as a hinge motion.

3.5. The non-specific ligands

A large number of ligands (four Tris molecules and 31 sulfate molecules) that were present in the crystallization solutions were identified in the electron density.

A Tris molecule is located on the threefold axis of each trimer. Its three symmetric O atoms make close contacts with the O atoms of the side chains of Glu54 and Thr81 from the three subunits forming the trimer.

31 sulfate molecules were clearly visible in the electron density. They can be divided in five different classes as follows (Fig. 3*b*).

(i) A sulfate (yellow) is located on the threefold axis of each trimer, 8.5 Å from the corresponding Tris molecule. The sulfate is hydrogen bonded to the main-chain N atoms of residues Glu54 and Glu55 of the monomers forming the trimer.

(ii) In all 12 subunits a sulfate ion (green) is located in the active site and is described in §3.4.

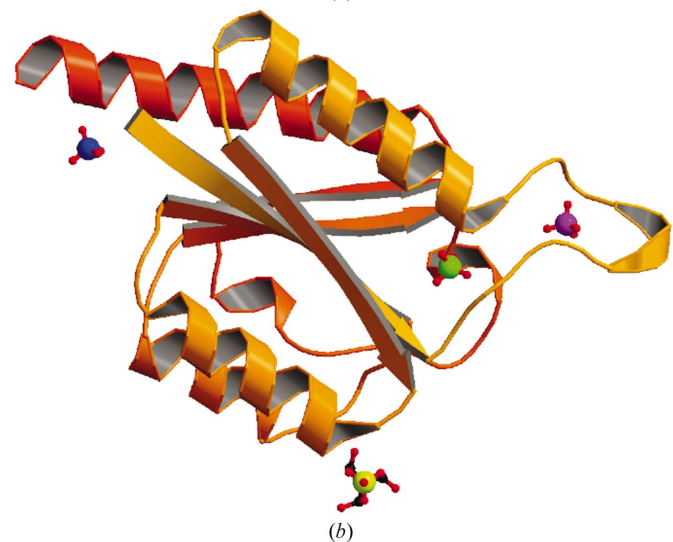
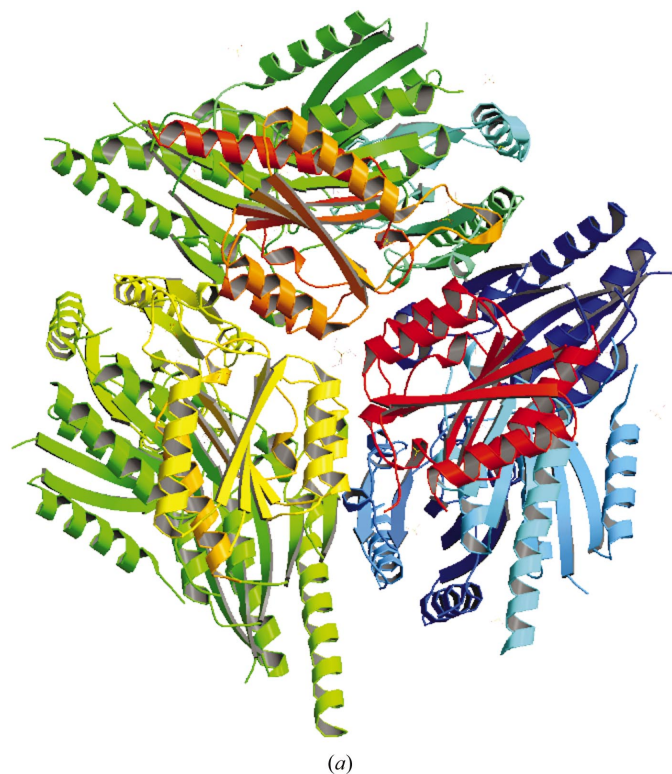


Figure 3
(*a*) Ribbon diagram of the dodecameric quaternary structure of Ap-DHQase. (*b*) Ribbon diagram of the orange-coloured subunit in the same orientation as in (*a*). The sulfates and the Tris molecule are shown in ball-and-stick representation.

(iii) In seven of the subunits a sulfate ion is located at the surface of the protein, making a contact with Thr27 OG1. The subunits that do not have this sulfate have packing contacts in this region. In the *F* chain this sulfate mediates a packing contact with the C-terminal region of the *K* chain.

(iv) In seven subunits a sulfate ion (violet) was modelled into the density at the entrance of the active site in the neighbourhood of the flexible loop. This sulfate always occupies the same position in the same conformation. We observe that in subunits in which we were able to trace the flexible loop (e.g. *K*), this sulfate is hydrogen bonded to the main-chain N atoms of Gly16, Lys17, Ile22, Tyr23 and Gly24 (five main-chain hydrogen bonds) and to Arg18 NH2 and His21 ND1. The latter contact is only present in chain *K*. In the other chains this histidine (if ordered in the structure) is in a different conformation. The presence of this sulfate, with its extensive main-chain contacts, probably results in a more rigid active-site loop. The absence of this sulfate in chain *A* is associated with a different conformation of the flexible loop.

(v) One sulfate ion (blue) is located in the N-terminal part of chain *K* at a distance of 3.7 Å from the N atom of Met1. This sulfate makes packing contacts with the side chains of Tyr48 and Gln36 of a symmetry-equivalent molecule and has a low temperature factor.

As expected, the first two classes of sulfates, which form a structured part of the molecule, have low temperature factors ($<30 \text{ \AA}^2$). In contrast, sulfates from the third class, which are located at the surface of the protein, and from the fourth class, which are located in a flexible region of the molecule, have high temperature factors ($>50 \text{ \AA}^2$).

3.6. Structural comparison with other DHQases

3.6.1. Molecular structure. The structures of Ap-DHQase, Sc-DHQase, Bs-DHQase, Hp-DHQase and Mt-DHQase were compared. The alignment of the amino-acid sequences is given in Fig. 4. As expected, the dodecameric quaternary structure organization as well as the polypeptide fold are strikingly similar for the four DHQases. Secondary-structure elements are highly conserved. Superposition of the C $^{\alpha}$ coordinates of Sc-DHQase (PDB code 1gu0), Bs-DHQase (PDB code 1gq0), Hp-DHQase (PDB code 1j2y) and Mt-DHQase (PDB code 1h05) on chain *K* of Ap-DHQase gives r.m.s.d.s of 1.2, 1.4, 1.4 and 1.2 Å, respectively. The strands forming the core of the enzyme have a lower r.m.s.d. than the helices. Superposition of the different structures shows that the largest differences are located in the flexible loop and at both termini of the polypeptide chain. Significant r.m.s. differences are also found in the loops at the C-terminal end of helix 1, helix 2 and helix 3, the last loop having an insertion of one residue in Sc-DHQase (Fig. 5). These three loops are located opposite the active site of the molecule.

Of the two intermonomeric salt bridges within the trimer (Arg86–Glu108 and Arg111–Asp87), the latter is present in all known type II DHQase structures. This interaction contributes to the closing of the active-site cleft. The first salt bridge is not found in Sc-DHQase and Hp-DHQase.

	1	β 1	10	20	30	α 1	40	β 2	50
Ap-DHQase	----	MKKILLLLNGP	NLNLMLGKREP	HIYGSQTLSD	IEQHLOQSAQ	AQG--YELDYFQ	ANGEE		
Sc-DHQase		PRSLA	NAPIMILLNGP	NLNLMLGKREP	EIYGSQTLSD	VEALCVKAAA	AHG--GTVDFRQ	SNHEG	
Mt-DHQase	----	ELIVNVINGP	NLGRLLGRREP	AVYGGTTHDE	LVALIEREAA	ELG--LKAVVRQ	SDSEA		
Hp-DHQase		MKILLVIQGP	NLNLMLGHRDP	RLYGMVTLDQ	IHEIMQTFVK	QGNLDVLEFFQ	TNFEF		
Bs-DHQase	----	MPHFLILNGP	NVNRLLGSRREP	EVFGRQTLTD	IETDLQFAE	ALH--IQLTFQ	SNHEG		
			*** *	** *	*** *	*** *	*** *	*** *	*** *
				fff	fffff				
	α 2	60	70	β 3	80	α 3	90	β 4	100
Ap-DHQase		SLINR	IHQAFQN--TDF	IIINPGAFTH	TSVAIRDALL	AVS-IPFIEVH	LSNVHAREPF	RHHS	
Sc-DHQase		ELVDW	IHEARLNH--CG	IVINPAAYSH	TSVAIRDALL	TCDGLPVVEVH	ISNIHQREPF	RHHS	
Mt-DHQase		QLLDW	IHQADAA--EP	VILNAGGLTH	TSVAIRDACA	ELS-APLIEVH	ISNVHAREEF	RRHS	
Hp-DHQase		EIIDK	IQESVGS-DYEG	IIINPGAFSH	TSIAIADAIM	LAG-KPVEVH	LTNIQAREEF	RKNS	
Bs-DHQase		DLIDA	IHEAEEQ--YSG	IVLNPGALSH	YSVAIRDAVS	SIS-LPVVEVH	LSNLYAREEF	RHQS	
		*	** *	*	*	** *	** *	** *	** *
	120	β 5	130	α 4	140	150	160		
Ap-DHQase		YLSOVA	KGVICGLGAK	GYDYALDFAI	SELQKIQLGE	MMNG-----	----		
Sc-DHQase		YVSQRA	DGVVAGCGVQ	GYVFGVERIA	ALAGAGSARA	-----	----		
Mt-DHQase		YLSPIA	TGVIVGLGIQ	GYLLALRYLA	EHVGT-----	-----	----		
Hp-DHQase		YTGAAC	GGVIMGFGLP	GYNMALMAMV	NILAEMKAFQ	EAQKNNPNNP	INNQK		
Bs-DHQase		VIAPVA	KGQIVGLGAE	GYKLAVRYLL	SQQGGESR--	-----	----		
		*	** *	** *	** *	** *	** *	** *	** *

Figure 4
Structural sequence alignment of Ap-DHQase, Sc-DHQase, Mt-DHQase, Hp-DHQase and Bs-DHQase. Active-site residues are in bold; an asterisk indicates conserved residues and an 'f' residues belonging to the flexible loop. Residues belonging to secondary-structure elements are coloured blue for β -strands and red for α -helices. Assignment was performed with *DSSP* and by visual inspection.



Figure 5
Superposition of the backbone of chain A (blue) and chain K (yellow) from Ap-DHQase, of the two conformations of the unliganded Bs-DHQase (chain A, brown; chain Q, purple; PDB code 1gq0), of the liganded Hp-DHQase (red; PDB code 1j2y) and of the unliganded (green; PDB code 1gu0) and liganded (light blue; PDB code 1gu1) Sc-DHQase. The active-site sulfate of Ap-DHQase is shown in ball-and-stick representation.

3.6.2. The flexible loop. The superposition of the different chains reveals six different traces for the flexible loop (Fig. 5); in the three liganded Sc-DHQase structures (with phosphate, with a transition-state analogue and with a product in the

R23A mutant; Sc-DHQase numbering, equivalent to Arg18 in Ap-DHQase) this loop is in the closed conformation. In the unliganded Sc-DHQase structure this loop is in an open conformation. In Bs-DHQase this loop adopts two different conformations: one conformation is the closed conformation, identical to the closed conformation of the Sc-DHQase structure, while the second conformation arises from packing contacts. Binding of glycerol is sufficient to close the loop, but the contacts the flexible loop makes are weaker than the packing contacts. In the Hp-DHQase structure, which possesses a substrate analogue in the active site, the loop is in the closed conformation. In the available structures of Mt-DHQase this loop is disordered and no coordinates are available. In the present Ap-DHQase

this loop is also in two conformations. In the first conformation it is partially similar to the closed conformation. The second conformation is an open conformation, making packing contacts. In contrast, in Sc-DHQase the flexible loop does not have an ordered helical lid domain and does not undergo a hinge movement in the present structure and in Bs-DHQase. Although this loop, which is involved in catalysis, shows large conformational flexibility, it is clear from this analysis that the closed form is identical for all DHQase structures; the open form has preferred conformations which are not similar in the DHQase structures.

3.6.3. The active site. The active-site residues are conserved in all known structures of type II DHQase and superimpose very closely. In Bs-DHQase Tyr23 is replaced by a phenylalanine. Although no activity data have been published for Bs-DHQase, it might be speculated that it is inactive owing to the lack of a catalytic base able to abstract a proton from the C2 of the substrate. In all other enzymes, the active-site Tyr23 is part of the flexible loop, which is either not visible or has different conformations in different subunits of the present structure.

In the active site, one of the structured water molecules is found in the same position in all known structures of type II DHQases. This water molecule has been proposed to play a role in the protonation of the enol intermediate and as such is of crucial importance for catalysis. Another water molecule in this region is bound to the main-chain O atom of Pro10 and is located in a position that could correspond to the carbonyl O atom of the substrate.

One of the sulfate atoms in the active site occupies the carboxylate-binding site of the dehydroshikimate in the mutant structure and of the 2,3-anhydroquinic acid in the native Sc-DHQase structure. It is ligated to Ser102 and Asn74, which are both conserved in the type II DHQases of known structure. We compared the sulfate position in the present

structure with the position of the sulfate and the phosphate in the Mt-DHQase and Sc-DHQase structures, respectively. The three anions occupy practically the same position. Nevertheless, it is surprising that the sulfate binds in a conformation that is similar to the phosphate in Sc-DHQase and that differs from the sulfate in Mt-DHQase (Fig. 6).

It has been speculated that a cavity behind His105 in Sc-DHQase may play a role in the release of the product of the reaction (Roszak *et al.*, 2002). In the present structure, this cavity is partially filled with Cys125, which still has enough space to take up three conformations in all 12 monomers. In Bs-DHQase this cavity is reduced by the larger side chains Leu, Tyr and Gln that respectively replace Val104, His105 and Val123 in Ap-DHQase. However, the biological significance of this finding is not clear since Bs-DHQase is likely to be inactive as discussed earlier.

3.6.4. The non-specific ligands. Firstly, we compared the molecules located on the four threefold axes of the molecule. In all the Sc-DHQase structures, a Tris molecule is located on each axis in the same position as in our structure. The sulfate molecule on each threefold axis is also present in the sulfate-liganded Mt-DHQase structure. It is located at a distance of 3.2 Å from the sulfate in our structure on the opposite site of the Tris molecule. In the phosphate-liganded Sc-DHQase structure, on the other hand, the phosphate occupies the same position as the sulfate in our structure. Nevertheless, the conformation is different, with the O atom of the anion pointing in the opposite direction: it points towards the Tris molecule in the Sc-DHQase structure and away from it in the present structure (Fig. 7). This O atom is surrounded by a symmetrical tetrahedral cluster of conserved waters. In our structure, this highly symmetric network makes contacts with

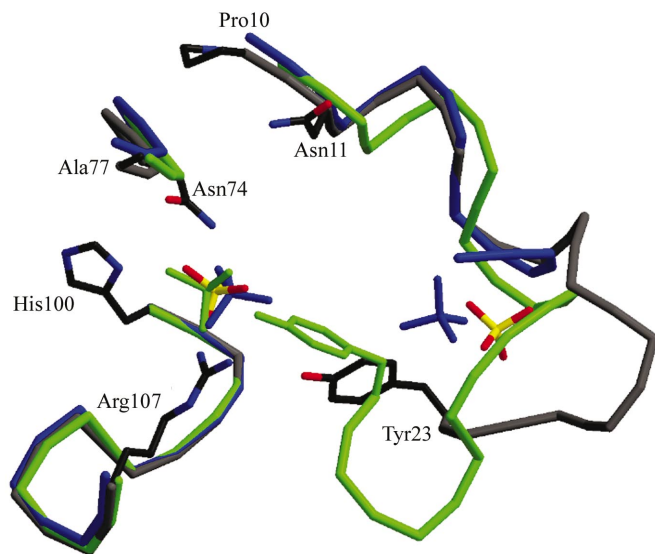


Figure 6
Superposition of the active site and the active-site anions of the present sulfate-liganded Ap-DHQase (main chain, grey; sulfates, yellow), the phosphate-liganded Sc-DHQase (green; PDB code 1d0i) and the sulfate-liganded Mt-DHQase (blue; PDB code 1h05). The active-site residues of the Ap-DHQase structure are shown, as well as Tyr23 from Sc-DHQase in the closed conformation.

the side chain of Glu55. The equivalent amino acid in Sc-DHQase is a glycine. The location of the side chain of His53 (Ap numbering) in Sc-DHQase, which is a glycine in Ap-DHQase, precludes the formation of this network in Sc-DHQase. Nevertheless, a similar network is found on the opposite side, bonded to the O atom on the threefold axis of the phosphate molecule. From this network the three waters symmetrically positioned around the threefold axis are also found in the present Ap-DHQase structure. None of the other DHQase structures has an anion positioned on the threefold axes.

A further comparison of the other sulfate positions in our structure with those in the sulfate-liganded Mt-DHQase structure shows that the sulfate at the entrance of the active site, which is liganded to the flexible loop, is in a different position in the two structures (2.3 Å apart) owing to the different conformation of the residues at the base of the flexible loop (Fig. 6). The surface sulfates in the two structures are located in different regions owing to the different composition of the neighbouring amino acids.

4. Conclusion

We have presented the crystal structure of DHQase from *A. pleuropneumoniae*. The use of the counter-diffusion technique increased the diffraction limit of the crystals from 3 to 1.7 Å. This high resolution allowed us to obtain a detailed view of the active site in the uncomplexed form.

It is a common feature of enzymes to have an active site that is partially rigid and partially flexible. This is particularly common for transferases. The X-ray structures of such enzymes show that in many cases the enzyme can exist in open

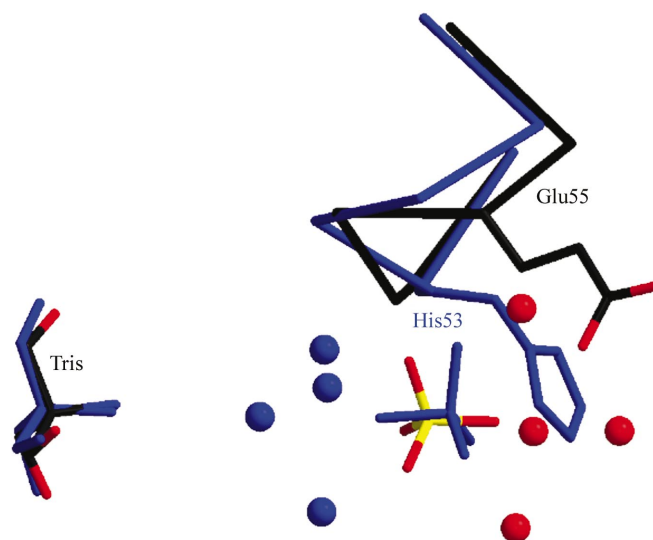


Figure 7
View of the water clusters (red balls) and the anions along the threefold axis after superposition of the Ap-DHQase (main chain and Tris in black, sulfate in yellow and red) and the phosphate-liganded Sc-DHQase (main chain, Tris and phosphate in blue; PDB code 1d0i). The side chain of Glu55 from Ap-DHQase and of His53 (Ap numbering) from Sc-DHQase are also shown.

or closed conformations, where ligand binding induces the closed conformation. The open form facilitates ligand binding and the closed form prepares, controls and protects the reaction intermediates. In the cases where information of the loop dynamics is available, the loop motion is either rate-limiting or closely coordinated with the chemical steps of the reaction (Desamero *et al.*, 2003; Rozovsky *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1999). In Ap DHQase the rigid part of the active site forms a pocket. The flexible loop is either completely disordered or present in one of two sulfate-bound conformations. The deprotonated form of Tyr23, which belongs to the loop, has been proposed to act as a general base, but in none of the monomers does it take up a position similar to the closed inhibitor-bound form of the enzyme (Roszak *et al.*, 2002). Thus, the different monomers in the present structure represent different conformations of the open form of Ap-DHQase.

In the present work, we have shown that a sulfate ion binds in the active site of Ap-DHQase in the position of the phosphate in the phosphate-liganded Sc-DHQase. A high percentage of known proteins bind or process compounds possessing phosphoryl groups. Because sulfates have similar physical properties and are of similar size, sulfate ions can bind in most phosphate-binding sites (except the HPO_4^{2-} site, which binds phosphate in its monobasic form and has a high degree of specificity). However, sulfate is less frequently implicated in a specific functional role than phosphate, resulting in a more limited biochemical interest in sulfate-binding sites, which are often located on the surface of a protein.

Our results suggest that a sulfate ion can bind in the active site with the flexible loop in the open conformation. The presence of the sulfate and the contacts it makes are not sufficient to stabilize the closed conformation as the phosphate does in the Sc-DHQase structure. An open conformation of an active-site flexible loop in the presence of a sulfate and a closed conformation in the presence of a phosphate have previously been observed in triosephosphate isomerase (TIM; Wierenga *et al.*, 1992); in the presence of sulfate, crystal-packing contacts were necessary in order to stabilize the closed conformation of this loop. For the enzyme TIM, evidence was provided for the view that loop motion and product release are concerted and might be one of the rate-limiting steps in catalysis. For the DHQase no conclusive evidence is yet available to support this idea.

LAG acknowledges CONACyT for financial support. We thank Professor Kabsch for providing XDS free of charge. We acknowledge the support of the European Space Agency and the European Community Action to Research Infrastructure Action of the Improving Human Potential Programme to the EMBL Hamburg Outstation, contract No. HPRI-CT-1999-00017. We thank Olivier Minster (ESA) for his support of

space science. The authors acknowledge the excellent work of Dr Eva Mañas in managing the logistics concerning the space mission. We thank Viscount Dirk Frimout for his support for space crystallization experiments.

References

- Aiyar, A. (2000). *Methods Mol. Biol.* **132**, 221–241.
- Bosse, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Simon, K. J. & Langford, P. R. (2002). *Microbes Infect.* **4**, 225–235.
- Brünger, A. T. (1992). *Nature (London)*, **355**, 472–474.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst. D* **54**, 905–921.
- Coggins, J. R., Abell, C., Evans, L. B., Frederickson, M., Robinson, D. A., Roszak, A. W. & Laphorn, A. P. (2003). *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 548–552.
- Desamero, R., Rozovsky, S., Zhadin, N., McDermott, A. & Callender, R. (2003). *Biochemistry*, **42**, 2941–2951.
- Engl, R. A. & Huber, R. (1991). *Acta Cryst. A* **47**, 392–400.
- Evans, L. D., Roszak, A. W., Noble, L. J., Robinson, D. A., Chalk, P. A., Matthews, J. L., Coggins, J. R., Price, N. C. & Laphorn, A. J. (2002). *FEBS Lett.* **530**, 24–30.
- Garcia-Ruiz, J. M., Gonzalez-Ramirez, L. A., Gavira, J. A. & Otalora, F. (2002). *Acta Cryst. D* **58**, 1638–1642.
- Garcia-Ruiz, J. M., Moreno, A., Otalora, F., Viedma, C., Rondon, D. & Zautscher, F. (1998). *J. Chem. Ed.* **75**, 442–446.
- Garcia-Ruiz, J. M., Novella, M. L., Moreno, R. & Gavira, J. A. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 165–172.
- Garcia-Ruiz, J. M., Otalora, F., Novella, M. L., Gavira, J. A., Sauter, C. & Vidal, O. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 149–155.
- Gourley, D. G., Shrive, A. K., Polikarpov, I., Krell, T., Coggins, J. R., Hawkins, A. R., Isaacs, N. W. & Sawyer, L. (1999). *Nature Struct. Biol.* **6**, 521–525.
- Kabsch, W. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 795–800.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1994). *CCP4/ESF-EACBM Newsl. Protein Crystallogr.* **31**, 9–14.
- Kraulis, P. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 946–950.
- Lalonde, G., O'Hanley, P. D., Stocker, B. A. & Denich, K. T. (1994). *Mol. Microbiol.* **11**, 273–280.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–291.
- Lee, B. I., Kwak, J. E. & Suh, S. W. (2003). *Proteins*, **51**, 616–617.
- Merritt, E. A. & Bacon, D. J. (1997). *Methods Enzymol.* **277**, 505–524.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst. A* **50**, 157–163.
- Navaza, J. (2001). *Acta Cryst. D* **57**, 1367–1372.
- Roszak, A. W., Robinson, D. A., Krell, T., Hunter, I. S., Frederickson, M., Abell, C., Coggins, J. R. & Laphorn, A. J. (2002). *Structure*, **10**, 493–503.
- Roussel, A. & Cambillau, C. (1991). *Silicon Graphics Geometry Partners Directory*, p. 81. Mountain View, CA, USA: Silicon Graphics.
- Rozovsky, S., Jogl, G., Tong, L. & McDermott, A. E. (2001). *J. Mol. Biol.* **310**, 271–280.
- Rycroft, A. N. & Garside, L. H. (2000). *Vet. J.* **159**, 18–36.
- Wang, G. P., Cahill, S. M., Liu, X., Girvin, M. E. & Grubmeyer, C. (1999). *Biochemistry*, **38**, 284–295.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. & Davenport, R. C. (1992). *J. Mol. Biol.* **224**, 1115–1126.

LISTA DE ARTÍCULOS PUBLICADOS A PARTIR DE ESTA TESIS QUE NO SE INCLUYEN EN EL MANUSCRITO

Como resultado de las investigaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral, he contribuido a la realización de los siguientes artículos los cuales no están incluidos como parte de esta tesis.

1. Two-step counterdiffusion protocol for the crystallization of haemoglobin II from *Lucina pectinata* in the pH range 4-9. *Nieves-Marrero C.A., Ruiz-Martinez C.R., Estremera-Andujar R.A., González-Ramírez L.A., Lopez-Garriga J. y Gavira J.A.* 2010. *Acta Crystallographica Section F. Struc. Biol. Cryst.* **66**: 264-268.
2. Capillary counterdiffusion experiments with Granada Crystallization Boxes. *García Ruiz J.M., González Ramírez L.A.* 2009. En "Protein Crystallization", 2nd ed. (ed. T. Bergfors), p. 395. International University Line, La Jolla, CA.
3. Phase behavior and crystallogenesis under counter-diffusion conditions of the collagen-model peptide (Pro-Pro-Gly)₁₀. *Vergara A., Castagnolo D., Carotenuto L., Vitagliano L., Berisio R., Sorrentino G., González-Ramírez L.A., García-Ruiz J., Zagari A.* 2009. *Journal of Crystal Growth* **311**: 304-309.

4. Studying the influence of supersaturation and supersaturation rate with the crystallization mushroom. *García Ruiz J.M., González Ramírez L.A.* 2009. En Protein Crystallization, 2nd ed (ed. T. Bergfors), p. 387. International University Line, La Jolla, CA.
5. Crystallization and diffraction patterns of the oxy and cyano forms of the *Lucina pectinata* haemoglobins complex. *Ruiz-Martinez C.R., Nieves-Marrero C.A., Estremera-Andujar R.A., Gavira J.A., Gonzalez-Ramirez L.A., Lopez-Garriga J., Garcia-Ruiz J.M.* 2009. Acta Crystallographica Section F. Struc. Biol. Cryst. **65**: 25-28.
6. Crystallization and preliminary crystallographic studies of an active-site mutant hydantoin racemase from *Sinorhizobium meliloti* CECT4114. *S. Martínez-Rodríguez, L. A. González-Ramírez, J. M. Clemente-Jiménez, F. Rodríguez-Vico, F. J. Las Heras-Vázquez, J. A. Gavira, J. M. García-Ruiz.* Acta Crystallographica Section F. Struc. Biol. Cryst. (2008). **64**: 50-53.
7. Structure of the mexicain-E-64 complex and comparison with other cysteine proteases of the papain family. *Gavira J.A., Gonzalez-Ramirez L.A., Oliver-Salvador M.C., Soriano-Garcia M., Garcia-Ruiz J.M.* 2007. Acta Crystallographica Section D. Biol. Crystallogr. **63**: 555-563.
8. Counterdiffusion protein crystallization in microgravity and its observation with PromISS (Protein Microscope for the International Space Station). *Zegers I., Carotenuto L., Evrard C., Garcia-Ruiz J., De Gieter P., Gonzalez-Ramirez L., Istasse*

E., Legros J.-C., Martial J., Minetti C., Otalora F., Queeckers P., Schockaert C., Van de Weerd C., Willaert R., Wyns I., Yourassowsky C. y Dubois F. 2006. *Microgravity Science and Technology XVIII*: 165-169.

9. Crystallization and preliminary crystallographic studies of the recombinant dihydropyrimidinase from *Sinorhizobium meliloti* CECT4114. *Martinez-Rodriguez S., Gonzalez-Ramirez L.A., Clemente-Jimenez J.M., Rodriguez-Vico F., Las Heras-Vazquez F.J., Gavira J.A., Garcia-Ruiz J.M.* 2006. *Acta Crystallographica Section F. Struc. Biol. Cryst.* **62**: 1223-1226.
10. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of mexicain. *Oliver-Salvador M.C., Gonzalez-Ramirez L.A., Gavira J.A., Soriano-Garcia M., Garcia-Ruiz J.M.* 2004. *Acta Crystallographica Section D. Biol. Crystallogr.* **60**: 2058-2060.
11. Structure of concanavalin A at pH 8: bound solvent and crystal contacts. *Lopez-Jaramillo F.J., Gonzalez-Ramirez L.A., Albert A., Santoyo-Gonzalez F., Vargas-Berenguel A., Otalora F.* 2004. *Acta Crystallographica Section D. Biol. Crystallogr.* **60**: 1048-1056.

PATENTES

I. *"Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas"*

Inventores: Juan Manuel García Ruiz (75%), Luis Antonio González Ramírez (25%).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 257 965**

21 Número de solicitud: 200500171

51 Int. Cl.:
C30B 7/00 (2006.01)
C30B 29/58 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **28.01.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2006**

Fecha de la concesión: **25.06.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **García Ruiz, Juan Manuel y
González Ramírez, Luis Antonio**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas.**

57 Resumen:

Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas.

El objeto de la presente invención es un procedimiento para el chequeo y búsqueda de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas mediante la técnica de contradifusión que utiliza agentes precipitantes, aditivos y tampones. La concentración del o de los agentes precipitantes en el medio (disolución o gel) es mayor que las corrientemente empleadas con otras técnicas de chequeo disponibles, tales como las de batch, microbatch ó difusión en fase vapor de tal forma que como resultado de la difusión a lo largo del capilar que contiene la macromolécula biológica se barran un amplio número de concentraciones del o de los agentes precipitantes usados en un mismo experimento

ES 2 257 965 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para el chequeo y búsqueda de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas mediante la técnica de contradifusión que utiliza agentes precipitantes, aditivos y tampones.

Estado de la técnica

Hoy en día es imposible predecir las condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas (en adelante MB, refiriéndose tanto a proteínas como a ácidos nucleicos, carbohidratos, virus o cualquiera de sus complejos o combinaciones). Por lo tanto, la única forma de encontrar las condiciones químicas bajo las cuales una MB cristaliza es realizar un chequeo experimental por ensayo y error de las variables que suelen afectar a la solubilidad de las MB. Tales variables son la temperatura, el pH, y el cambio de solubilidad que los llamados agentes precipitantes (AP) tienen sobre las disoluciones de proteínas. Esos chequeos se realizan habitualmente mediante el uso de unos "kits" o conjunto de disoluciones (ya sean caseras o comerciales) que se han mostrado históricamente o estadísticamente que son los más exitosos a la hora de cristalizar las MB [1] Jancarik and Kim (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* 24:409; [2] Cudney *et al.* (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Cryst. D* 50:414; [3] Gilliland *et al.* (2002) The Biological Macromolecule Crystallization Database: crystallization procedures and strategies. *Acta Cryst. D* 58 (6-1):916; [4] Kimber *et al.* (2003) Data mining crystallization databases: Knowledge-based approaches to optimize protein crystal screens. *Proteins* 51:562.1-4].

Esas disoluciones de AP o de aditivos se mezclan directamente con las disoluciones de MB (técnica de batch o microbatch) o bien se equilibran por evaporación con la disolución de MB (técnica de difusión en fase vapor). En esas técnicas, cada experimento chequea el efecto de un agente precipitante o un aditivo a una concentración determinada (técnica de batch o microbatch) o a un rango pequeño de concentraciones (técnica de difusión en fase vapor).

El objeto de la presente invención es un procedimiento para chequear las condiciones de cristalización de MB mediante la técnica de contradifusión. La técnica de contradifusión esta siendo usada en los últimos años como un método de cristalización de macromoléculas biológicas [5] J.M. García-Ruiz, Counterdiffusion Methods for Macromolecular Crystallization. *Methods in Enzymology*, Vol. 368 (2003) 130-154; [6] D.Maes, L.A. Gonzalez-Ramirez, J.López-Jaramillo, B. Yu, H. De Bondt, I. Zegers, E., Afonina, J.M. García-Ruiz and S. Gulnik, Structural study of the type II 3-dehydroquininate dehydratase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Acta Crystallographica D* 60 (2004) 463-471; [7] J.A. Gavira, D. Toh, F.J. López-Jaramillo, J.M. García-Ruiz and J.D. Ng. Ab Initio crystallographic structure determination of insulin from protein to electron density without crystal handling. *Acta Crystallographica D* 58 (2002) 1147-1154].

Existen varias patentes de diseño de dispositivos para crecer cristales de MB por contradifusión. Sin

embargo nunca ha sido anteriormente reivindicado el uso de la técnica para el chequeo y búsqueda de condiciones de cristalización de MB.

Explicación de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas mediante la técnica de contradifusión, que incluye las siguientes etapas.

- a) Introducción de una disolución, preferentemente acuosa, tamponada o no, de la macromolécula biológica a la que se aplica el chequeo de condiciones de cristalización en un dispositivo de geometría unidimensional, preferentemente en un capilar de vidrio o de plástico transparente o traslucido, y posterior cierre de uno de sus extremos.
- b) Preparación de un medio que contiene al menos un agente precipitante para macromoléculas biológicas tamponado para el mantenimiento del valor del pH entre 3 y 10.
- c) Introducción del extremo abierto del dispositivo de geometría unidimensional conteniendo la macromolécula biológica en el medio tamponado que contiene al menos un agente precipitante.
- d) Transporte difusivo de las moléculas del tampón y del o de los agentes precipitantes del medio a través de la disolución de macromolécula biológica contenida en el dispositivo de geometría unidimensional.

Los capilares que contienen la macromolécula biológica tienen un diámetro interior entre 1 micra y 1 milímetro, preferentemente entre 25 micras y 300 micras; una longitud comprendida entre 5 y 200 milímetros y son preferentemente transparentes a los rayos X.

La introducción de la macromolécula biológica en el capilar puede llevarse a cabo por capilaridad, o por inyección, ya sea manual o automáticamente. Los agentes precipitantes son sales solubles ó polímeros alcohólicos como los polietilenglicoles de diferente peso molecular. Se utilizan preferentemente dos ó más agentes precipitantes a la vez en el medio.

El medio que contiene el o los agentes precipitantes incluye adicionalmente detergentes, aditivos como cationes divalentes o azúcares, ó solventes volátiles como el etanol, metanol, isopropanol o el 2-metil-2,4-pentanodiol.

En el caso de que la disolución que contiene la macromolécula biológica esté tamponada, el medio que contiene el o los agentes precipitantes debe estar tamponado a una concentración mayor que la del tampón de la disolución de la macromolécula biológica, de tal forma que el pH de la disolución con la macromolécula biológica pueda cambiar a medida que difunden las moléculas del tampón del medio con el o los agentes precipitantes.

Opcionalmente, el medio que contiene el o los agentes precipitantes incluye sales de elementos pesados, tales como sales de mercurio, para ser usados como derivados de las macromoléculas biológicas, compuestos crioprotectores, por ejemplo glicol, para che-

quear condiciones de criocrystalografía o bien moléculas sustrato o cualquier otra molécula que pudiera tener como objetivo la incorporación a, o la interacción con la estructura cristalina de la macromolécula biológica.

El medio que contiene al menos un agente precipitante puede ser una disolución, preferentemente acuosa, o bien un gel térmico, preferentemente de agarosa, o químico, preferentemente de sílice o poliacrilamida y está generalmente contenido en un recipiente transparente u opaco, de vidrio, de plástico o de cualquier otro material que no interaccione químicamente con dicho medio de tal forma que no desvirtúe el efecto que sobre la cristalización pudieran tener los agentes precipitantes. Opcionalmente, el recipiente puede incluir una tapa removible que impida la evaporación de los solventes del medio y que permita el acceso a los capilares.

La concentración del o de los agentes precipitantes en el medio (disolución o gel) es mayor que las corrientemente empleadas con otras técnicas de chequeo disponibles, tales como las de batch, microbatch ó difusión en fase vapor de tal forma que como resultado de la difusión a lo largo del capilar que contiene la macromolécula biológica se barran en el capilar un amplio número de concentraciones del o de los agentes precipitantes usados en un mismo experimento.

En el caso de que se utilice un gel como medio para el o los agentes precipitantes, éstos pueden gelificarse directamente al hacer el gel o bien difundirse en dicho gel después de haberlo preparado de acuerdo con la interacción y estabilidad de los distintos agentes precipitantes con los distintos tipos de geles.

La introducción de los capilares en el medio que contiene el o los agentes precipitantes puede llevarse a cabo manualmente o automáticamente, mediante algún mecanismo de robótica.

Descripción de un modo de realización de la invención

Como un ejemplo de las ventajas del procedimiento de la presente invención se presenta un caso en que se utilizan geles de dos agentes precipitantes de distinto peso molecular, tales como el cloruro sódico y un polietilenglicol (PEG) de peso molecular 2000 Daltons tamponados con un tampón de acetato sódico a pH 4.5 100 mM. Los pasos para llevar a cabo el procedimiento de la invención son:

- 1) se prepara una disolución PEG 2000 al 50% p/v en buffer de acetato 150 mM.

- 2) Se añade la cantidad de cloruro sódico necesaria para que la concentración de cloruro de sodio en la disolución del paso 1 sea de 20%

- 3) Se añade a la disolución preparada en el paso dos una cantidad de agarosa necesaria para que la concentración de agarosa sea del 0.5% p/v

- 4) Se lleva la disolución en el paso 3 a una temperatura superior a la temperatura de fundido de la agarosa mientras que se agita fuertemente.

- 5) Cuando la disolución en el paso 4 está transparente, se vierte en un recipiente y se deja enfriar por debajo de la temperatura de gelificación para que se forme el gel.

- 6) Se toma un capilar de vidrio de 50 micras de diámetro interior y 400 milímetros de longitud.

- 7) Se rellena con una disolución de proteína que esta disuelta en agua o bien en un buffer con una fuerza de 50 mM.

- 8) Se cierra uno de los extremos del capilar por ejemplo con cera.

- 9) Se pincha el otro extremo del capilar en el gel.

- 10) Se cierra el recipiente que contiene el gel y el capilar

La difusividad de una molécula depende de su peso molecular como quedó establecido por la ley de Stokes-Einstein. Por lo tanto, el tampón de acetato y la sal empezaran a subir por el capilar y chequearan el efecto de la concentración de cloruro sódico a lo largo del todo el capilar que contiene la disolución de proteína. Las moléculas de PEG2000 de mucho mayor tamaño difundirán más lentamente y por lo tanto se chequeará el efecto de la concentración de PEG después que lo haya hecho la disolución de sal. Estas dos "ondas sucesivas de concentración" de moléculas diferentes hace que en un mismo experimento pueda chequearse no solo el efecto de un agente precipitante a una concentración (lo que hacen las técnicas ahora disponibles) sino el efecto de distintas concentraciones de dos o más agentes precipitantes de distinto peso molecular.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas mediante la técnica de contradifusión, **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas.

- a) Introducción de una disolución, preferentemente acuosa, tamponada o no, de la macromolécula biológica a la que se aplica el chequeo de condiciones de cristalización en un dispositivo de geometría unidimensional, preferentemente en un capilar de vidrio o de plástico transparente o traslucido, y posterior cierre de uno de sus extremos.
- b) Preparación de un medio que contiene al menos un agente precipitante para macromoléculas biológicas tamponado para el mantenimiento del valor del pH entre 3 y 10.
- c) Introducción del extremo abierto del dispositivo de geometría unidimensional conteniendo la macromolécula biológica en el medio tamponado que contiene al menos un agente precipitante.
- d) Transporte difusivo de las moléculas del tampón y del o de los agentes precipitantes del medio a través de la disolución de macromolécula biológica contenida en el dispositivo de geometría unidimensional.

2. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicación 1, **caracterizado** porque el capilar que contiene la macromolécula biológica tiene un diámetro interior entre 1 micra y 1 milímetro, preferentemente entre 25 micras y 300 micras; una longitud comprendida entre 5 y 200 milímetros y porque preferentemente es transparente a los rayos X.

3. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-2, **caracterizado** porque los agentes precipitantes son sales solubles ó polímeros alcohólicos como los polietilenglicoles de diferente peso molecular.

4. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque el medio que contiene al menos un agente precipitante incluye adicionalmente detergentes, aditivos como cationes divalentes o azúcares, ó solventes volátiles como el etanol, metanol, isopropanol o el 2-metil-2,4-pentanodiol.

5. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según

las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque si la disolución que contiene la macromolécula biológica esta tamponada, el medio que contiene al menos un agente precipitante debe estar tamponado a una concentración mayor que la del tampón de la disolución de la macromolécula biológica, de tal forma que el pH de la disolución con la macromolécula biológica pueda cambiar a medida que difunden las moléculas del tampón del medio con el o los agentes precipitantes.

6. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque el medio que contiene al menos un agente precipitante incluye opcionalmente sales de elementos pesados para ser usados como derivados de las macromoléculas biológicas.

7. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque el medio que contiene al menos un agente precipitante incluye opcionalmente compuestos crioprotectores para chequear condiciones de criocristalografía.

8. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque el medio que contiene al menos un agente precipitante incluye moléculas sustrato o cualquier otra molécula que pudiera tener como objetivo la incorporación a, o la interacción con la estructura cristalina de la macromolécula biológica.

9. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque el medio que contiene al menos un agente precipitante es una disolución, preferentemente acuosa.

10. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque el medio que contiene al menos un agente precipitante es un gel térmico, preferentemente de azarosa, o químico, preferentemente de sílice o poliacrilamida.

11. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque el medio que contiene al menos un agente precipitante está contenido en un recipiente transparente u opaco, de vidrio, de plástico o de cualquier otro material que no interaccione químicamente con dicho medio y que opcionalmente tenga una tapa removible que impida la evaporación de los solventes del medio.

12. Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas según las reivindicaciones 1-11, **caracterizado** porque el medio contiene preferentemente dos o más agentes precipitantes.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 257 965

② Nº de solicitud: 200500171

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C30B 7/00** (2006.01)
C30B 29/58 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA-RUIZ, J.M. et al.: "Granada Crystallisation Box: a New Device for Protein Crystallisation by counter-Diffusion Techniques", Acta Cryst. (2002) D58, pp.: 1638- 1642, todo el documento.	1-3,9,10, 12
X	GARCÍA-RUIZ, J.M.: "Counterdiffusion Methods for Macromolecular Crystallization", Methods in Enzymol., (1977), vol. 368, pp.: 130-154; en particular pp.: 140-147.	1-3,12
X	ES 2172363 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.09.2002, todo el documento.	1,3,12
A	BIERTÜMPFEL, C. et al.: "Crystallization of Biological Macromolecules Using Agarose Gel", Acta Cryst., (2002), D58, pp.: 1657-1659, todo el documento.	
A	CAROTENUTO, L. et al.: "Experimental Observations and Numerical Modelling of Diffusion-Driven Crystallisation Processes", Acta Cryst.(2002), D58, pp.: 1628-1632, todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.04.2006

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1

II. "Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión"

Juan Manuel García Ruiz (Inventor), Luis Antonio González Ramírez (colaborador no inventor). (Figura recogida en el Art. 4.1 del Real Decreto 55/2002 de 18 de enero de 2002 sobre explotación y cesión de invenciones realizadas en los entes públicos de investigación publicado en el B.O.E. núm. 26 de 30 de enero de 2002).



D. Juan Manuel García-Ruiz, Profesor de Investigación y Director del Laboratorio de Estudios Cristalográficos (IACT-CSIC), certifica que:

D. Luis Antonio González Ramírez es colaborador no inventor (figura recogida en el Art. 4.1 del Real Decreto 55/2002 de 18 de enero de 2002 sobre explotación y cesión de invenciones realizadas en los entes públicos de investigación publicado en el B.O.E. núm. 26 de 30 de enero de 2002) de la patente de invención que se detalla a continuación:

Título: **Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión.**

Titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Inventor: Juan Manuel García Ruiz.

Fecha de concesión: 27.07.2009.

Entidad: Oficina Española de Patentes y Marcas.

Número de publicación: 2 304 263.

Se extiende la presente en Granada a 10 de Diciembre de 2010.

Fdo.: Juan Manuel García-Ruiz



① Número de publicación: **2 304 263**

② Número de solicitud: 200401200

⑤ Int. Cl.:

C30B 7/00 (2006.01)

C30B 29/58 (2006.01)

C30B 30/08 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **19.05.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

Fecha de la concesión: **27.07.2009**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **12.08.2009**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.08.2009

⑦ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **García Ruiz, Juan Manuel**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión.**

⑦ Resumen:

Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión.

El objeto de la presente invención es un dispositivo que permite la cristalización (por ejemplo de macromoléculas biológicas) por el método de contradifusión. El dispositivo está constituido por un espacio unidimensional, por ejemplo un tubo capilar, que comprende tres partes de distinta geometría.

Constituye igualmente un objeto de la presente invención un bloque que agrupa varios de dichos dispositivos lo cual permite la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

Es otro objeto de la presente invención un procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en los dispositivos de geometría unidimensional, bien en condiciones terrestres de gravedad, bien en condiciones de gravedad reducida utilizando en este caso preferentemente el bloque que agrupa varios de dichos dispositivos.

ES 2 304 263 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión.

5 **Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención es un dispositivo que permite la cristalización (por ejemplo de macromoléculas biológicas) por el método de contradifusión. El dispositivo está constituido por un espacio unidimensional, por ejemplo un tubo capilar, que comprende tres partes de distinta geometría.

10 Constituye igualmente un objeto de la presente invención un bloque que agrupa varios de dichos dispositivos lo cual permite la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

Es otro objeto de la presente invención un procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en los 15 dispositivos de geometría unidimensional, bien en condiciones terrestres de gravedad, bien en condiciones de gravedad reducida utilizando en este caso preferentemente el bloque que agrupa varios de dichos dispositivos.

Estado de la técnica

20 La cristalización de macromoléculas biológicas en condiciones de baja gravedad o “microgravedad” en el espacio se lleva a cabo por diferentes métodos que pueden dividirse en dos grandes grupos. El primero de ellos agrupa a las técnicas en las que la cristalización tiene lugar en un pequeño volumen quasi-esférico y por tanto podemos llamarlas de geometría esférica. Entre ellas están las técnicas clásicas de difusión en fase vapor que son las técnicas más usadas hasta el año 2000 en los experimentos espaciales (US-5641681). Desde entonces se viene imponiendo la técnica de 25 contra difusión en condiciones lejos del equilibrio que se llevan a cabo en reactores alargados y por tanto pertenece al grupo que denominamos técnicas de geometría longitudinal (véase patentes ES 2164032 y ES 2172363). En estas técnicas de geometría longitudinal se pretende conseguir un cambio continuo en el espacio y en el tiempo de las condiciones de sobresaturación a lo largo del eje del reactor donde se lleva cabo el crecimiento de los cristales. En la técnica de contradifusión las disoluciones que van a reaccionar se colocan una frente a la otra bien en contacto directo o separadas mediante una membrana o por una cámara intermedia que actúa como buffer físico, es decir como una 30 cámara que hace más lenta la cinética del proceso de transporte. Esta cámara puede llenarse con un buffer químico o con un líquido cualquiera, por ejemplo agua. Por definición, las técnicas de contradifusión requieren que se evite la convección en la zona de cristalización. Hay dos formas de reducir la convección: desarrollar los experimentos en condiciones de microgravedad en el espacio o bien llevarlos a cabo medios gelificados. Ambos medios, microgravedad en 35 el espacio y geles, comparten la reducción de la convección provocada por flotación, la reducción de la concentración de impurezas en la superficie cristalina y la eliminación de la sedimentación de cristales y la nucleación secundaria de agregados de proteínas. Además, la microgravedad elimina la posible interacción química del gel con los reactivos incluyendo las propias proteínas. La técnica de contradifusión se ha utilizado en el espacio en reactores de volumen de varios microlitros que necesitan ser puestos en funcionamiento por la tripulación de la nave y se ha comprobado 40 mediante video-interferometría que la técnica funciona adecuadamente en condiciones de gravedad reducida (J.M. García-Ruiz, F. Otálora, M.L. Novella, J.A. Gavira, C. Sauter and O. Vidal. A supersaturation wave in protein crystallization. *Journal of Crystal Growth* 232, 2001, 149-155). Para obtener cristales de macromoléculas de forma simple y rápida en laboratorios terrestres se desarrolló el método de acupuntura en gel, que se basa en las propiedades de los geles que se usan para sujetar los capilares que contienen la solución de proteína sin gelificar, así como por ser un medio para la transferencia de materia del agente precipitante. El agente precipitante y la proteína se desplazan en contradifusión a través del gel poroso que sujeta los capilares. La solución de proteína se desplaza a menor velocidad debido a que la constante de difusión de las grandes macromoléculas es uno o dos órdenes de magnitud inferior a las 45 pequeñas moléculas que se utilizan como agente precipitante. Cuando entran en contacto va aumentando la concentración de proteína hasta que se alcanza el grado de sobresaturación que da lugar a la formación de cristales (J.M. García-Ruiz *et al.*, “Teaching protein crystallization by the gel acupuncture method”; *Journal of Chem. Education* 75, 1998, 442-446; F. Otálora y J.M. García-Ruiz, “Computer model of the diffusion/reaction interplay in the Gel Acupuncture Method”, *Journal of Crystal Growth* 169, 1996, 361-367; J. M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods for protein crystallisation. *Methods in Enzymology* 368 (2003) 130-154). La técnica de contradifusión desarrollada por J.M. Garcia-Ruiz y colaboradores se basa en comenzar los experimentos de cristalización en condiciones lejanas al 50 equilibrio buscando eventos múltiples de nucleación bajo condiciones que se acercan progresivamente al equilibrio. Con este procedimiento, el sistema experimenta fenómenos de precipitación que tienen lugar a diferentes valores de sobresaturación. Los primeros eventos de nucleación tienen lugar en condiciones muy lejanas al equilibrio dando lugar a precipitación amorfa. Los siguientes eventos ocurrirán en condiciones más cercanas al equilibrio con precipitación policristalina. De esta forma y conforme avanza el proceso, el sistema se acerca lentamente al equilibrio dando lugar a cristales más escasos y de mayor calidad. Cada una de estas precipitaciones ocurre en diferentes localizaciones del capilar. Estos experimentos se han realizado tanto por el método de acupuntura en gel como por el método de las tres 60 capas (H.K. Henisch, *Crystal growth in gels and Liesegang rings*, Cambridge University Press, 1988) en capilares de rayos X (Joseph D. Ng, José A. Gavira and Juan M. García-Ruiz, Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination, *Journal of Structural Biology* 142, 2003, 218-231). Para facilitar la experimentación se desarrolló un dispositivo denominado Granada Crystallisation Box (GCB) que permite implementar fácilmente el método de acupuntura en geles (J.M. García-Ruiz, L. A. González-Ramírez, J.A. Gavira and F. Otálora. Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques. *Acta Crystallographica D* 58, 2002, 1638-1642). Este dispositivo (GCB) puede funcionar correctamente en el espacio sin

necesidad de ser manipulado por la tripulación de la nave. Para este fin se realizaron unos contenedores especiales, denominados "Granada Crystallisation Facility" que cumplen los requerimientos de seguridad de la experimentación en vehículos orbitales tripulados y que pueden contener hasta 23 GCBs en un litro de volumen y un kilogramo de peso.

5 **Explicación de la invención**

Constituye un primer objeto de la presente invención un dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión constituido por un espacio de geometría unidimensional, preferentemente un tubo capilar, que comprende tres partes de distinta geometría:

- 15 a) un cilindro capilar con (un diámetro) una longitud comprendida entre 50 micras y 2 milímetros y longitud superior a 10 mm de tal forma que pueda desarrollarse apropiadamente la técnica de contradifusión como está definida J. M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods for protein crystallisation. Methods in Enzimology 368 (2003) 130-154.
- b) el vaso del capilar cuya geometría puede ser cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma pero cuyo volumen ha de ser mayor de cinco veces el volumen del cilindro capilar.
- 20 c) opcionalmente entre el cilindro capilar y el vaso del capilar puede existir un cuello o interfase (cuello del capilar) que tiene forma cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma y cuyo es menor que el volumen del vaso del capilar.

El tubo capilar puede construirse en vidrio o material polimérico transparente o no transparente a los RX. Opcionalmente, el vaso del capilar está provisto de una tapa que permite el cierre hermético del vaso por presión sobre el contorno exterior de dicho vaso.

El dispositivo de la invención puede utilizarse individualmente o integrado en un bloque que agrupe varios de dichos dispositivos lo cual permita la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones.

Dicho bloque para la realización simultánea de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión en espacios de geometría unidimensional, preferentemente capilares, consta de los siguientes elementos:

- 35 a) caja externa constituida por una carcasa de geometría prismática, cilíndrica o esférica que se cierra con dos tapas provistas de juntas de estanqueidad, ajustándose la más externa de dichas tapas a la carcasa mediante un conjunto de tornillos a presión.
- 40 b) una caja interna que se coloca centrada en el interior de la caja externa y que es un bloque macizo de geometría prismática, cilíndrica o esférica compatible con la correspondiente geometría de la caja externa que comprende vaciados periódicamente distribuidos que tienen la forma necesaria para encajar los dispositivos de geometría unidimensional y que se cierra con una tapa provista de una junta de estanqueidad.
- 45 c) un volumen libre entre la caja interna y la caja externa dividido en compartimentos que se rellenan con bolsas de material de cambio de fase que se utiliza para mantener la temperatura estable dentro de la caja.
- d) dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, dispuestos en los vaciados previstos a tal efecto en la caja interna.

La caja externa y la caja interna están fabricadas en cualquier material que no interaccione con los agentes químicos que se utilizan en los procesos de crecimiento de cristales, preferentemente en material polimérico, cerámico, metálico o vidrio.

Constituye igualmente un objeto de la presente invención un procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en dichos dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, y que comprende las siguientes etapas:

- 60 a) introducción de la solución con el producto a cristalizar en los capilares hasta enrasar con la parte inferior del cuello del capilar o del vaso del capilar.
- b) sellado de la parte inferior de los capilares mediante cera, grasa de vacío, lacre o cualquier otro producto que asegura la estanqueidad del cierre.
- c) opcionalmente relleno del cuello de los capilares con un gel químicamente inerte.
- 65 d) colocación sobre el gel inerte que rellena el cuello de los capilares o directamente sobre el vaso del capilar de la disolución de agente precipitante que ocupará total o parcialmente el vaso de los capilares.
- e) cierre hermético del vaso de los capilares.

ES 2 304 263 B1

f) comienzo del transporte de masa difusivo del agente precipitante hacia la disolución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar.

5 g) cristalización en el interior de los capilares de forma que a medida que avanza el proceso se obtienen cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

El compuesto a cristalizar es, preferentemente, una macromolécula biológica.

10 La solución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar está formada por un disolvente orgánico ó inorgánico, preferentemente agua, agua con un tampón de pH ó agua con un producto tensioactivo.

El gel inerte es un agente químicamente inerte tal como agarosa y materiales derivados, gel de sílice o poliacrilamida, o cualquier medio poroso que sirva para evitar la convección.

15 El agente precipitante es en general cualquier compuesto que reduzca la solubilidad del compuesto que se quiere cristalizar tal como una sal inorgánica, por ejemplo cloruro sódico o sulfato amónico o bien un polímero ó un alcohol, por ejemplo polietilenglicol.

20 El proceso puede llevarse a cabo en condiciones terrestres de gravedad, o bien en condiciones de gravedad reducida. En este último caso, el procedimiento se lleva cabo preferentemente en el bloque referido anteriormente y que agrupa a varios de los dispositivos de geometría unidimensional.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico.

Figura 2: Dispositivo de contradifusión con vaso paralelepípedo y sin cuello.

30 Figura 3: Sección del bloque para la realización simultánea de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión.

Figura 4: Sección de la caja interna donde se observa la disposición de los vaciados para colocar los dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares.

35 Descripción detallada de la invención

El dispositivo objeto de la presente invención se caracteriza por tener 3 partes de distinta geometría.

40 La primera es el cilindro capilar en sí que tiene una longitud mayor de 10 milímetros y un diámetro entre 50 micras y 2 milímetros. La segunda, que es opcional, es el cuello del capilar que tiene una forma en U y que tiene entre 0.1 y 2 milímetros de longitud. Por su forma el diámetro del cuello varía de forma continua o discontinua entre el diámetro del cilindro capilar y el diámetro del vaso. La tercera es el vaso del capilar que puede tener una longitud entre 10 y 30 milímetros y una anchura hasta 30 veces el diámetro del cilindro capilar. El capilar objeto de la presente invención se caracteriza por tener un aspecto geométrico de forma que el vaso tenga un volumen mayor de 5 veces el volumen del cilindro capilar. Esta geometría es fundamental para la cristalización por contradifusión porque asegura que -una vez alcanzado el equilibrio- la concentración de agente precipitante en el cilindro capilar sea parecida a la concentración inicial en el vaso. De esa forma se puede asegurar que la onda de sobresaturación recorrerá toda la longitud del capilar. Los capilares disponibles actualmente tienen una relación de volumen del vaso a volumen del cilindro capilar demasiado pequeña para que el procedimiento de contradifusión se produzca a todo lo largo del capilar.

El procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en los dispositivos de la presente invención consta de las siguientes etapas:

55 a) La solución con el producto que se quiere cristalizar se introduce en los dispositivos de vidrio hasta enrasar con la parte inferior del cuello del capilar. El disolvente utilizado para la solución que contiene el producto que se quiere cristalizar es agua, agua con un tampón de pH ó agua con un producto tensioactivo. El compuesto que se quiere cristalizar es en general una macromolécula biológica.

60 b) Se sella la parte inferior del capilar mediante el uso de cera, grasa de vacío o lacre o cualquier otro producto que asegure la estanqueidad del cierre.

65 c) El cuello del capilar se rellena con un gel. El gel es un agente químicamente inerte tal como agarosa y materiales derivados, gel de sílice o poliacrilamida, o cualquier medio poroso que sirva para evitar la convección.

d) Se coloca sobre el gel el agente precipitante y se cierra el capilar con un septo. El agente precipitante es en general cualquier compuesto que reduzca la solubilidad del producto que se quiere cristalizar, por ejemplo

ES 2 304 263 B1

una sal inorgánica tal como cloruro sódico o sulfato amónico o bien un polímero o un alcohol, por ejemplo polietilenglicol. También puede usarse como agente precipitante un cambio de pH del medio.

e) cierre hermético del vaso de los capilares.

A partir de ese momento comienza el transporte de masa difusivo del agente precipitante hacia la disolución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar, produciéndose la cristalización en el interior de los capilares de forma que a medida que avanza el proceso se obtiene cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

Otro objeto de la presente invención es un bloque (ver Figura 3) que agrupa varios de los dispositivos para el crecimiento de cristales por contradifusión descritos anteriormente y que permite la realización simultánea de experimentos de cristalización en diferentes condiciones y especialmente en el espacio, en condiciones de gravedad reducida. Este bloque optimiza el número de experimentos por unidad de peso y de volumen y facilita y reduce el tiempo necesario para implementar los experimentos antes de su integración en la nave espacial. El bloque objeto de la presente invención se compone de una caja externa (1) que consta de un cuerpo de caja y una tapa ajustables mediante juntas de estanqueidad (2) ("O-rings") y un conjunto de tornillos a presión que asegura un cierre hermético de la misma.

El cuerpo de la caja contiene en su interior y centrado en él una segunda caja (caja interna) (3) que es un bloque macizo en el que se han realizado una serie de vaciados (4) periódicamente distribuidos que tienen la forma necesaria para encajar los dispositivos de geometría unidimensional. En esos huecos se encajan los dispositivos, generalmente capilares, una vez realizado el protocolo de preparación del experimento anteriormente descrito. También puede incluir opcionalmente un vaciado (5) para acoplar un sensor para el registro de temperaturas.

La caja interna (ver Figura 4) puede estar hecha en material polimérico, cerámico, metálico, vidrio y en general de cualquier material que no interaccione con los agentes químicos que se utilizan en los experimentos de cristalización. El volumen libre entre la caja interna y la caja externa está dividido en compartimentos (6) que se rellenan con bolsas de material de cambio de fase que se utiliza para mantener la temperatura estable dentro de la caja. Los capilares, sean de vidrio o de plástico (transparente o no transparente a los rayos X) pueden tener un diámetro capilar comprendido entre 50 micras y 2 milímetros de diámetro.

Este bloque, además de tener las ventajas de la Granada Crystallisation Facility tiene las siguientes ventajas en relación a ella:

- a) se ajusta mejor a las ventajas de la técnica de contradifusión.
- b) aumenta el número de capilares por unidad de volumen.
- c) mejora la respuesta mecánica a la vibración
- d) facilita la implementación rápida y segura en tiempos reducidos.

Modo de realización de la invención

Ejemplo de dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico (ver Figura 1)

- 1) Un volumen capilar de vidrio (1) cilíndrico de 0.7 milímetros de diámetro y 50 milímetros de longitud. El volumen de este cilindro a rellenar de disolución de proteína es de 19,23 microlitros.
- 2) El vaso del capilar (3) está realizado en poliestireno y consta de dos cilindros contiguos. El cilindro inferior o cuello del capilar tiene dimensiones internas de 1,5 mm de diámetro y 20 milímetros largo con un volumen total de 35,33 microlitros. El cilindro superior o vaso del capilar propiamente dicho tiene unas dimensiones internas de 2 milímetros de diámetro, y 30 milímetros de altura, con un volumen total de 376,8 microlitros. El vaso del capilar tiene una tapa que cierra el mismo herméticamente por la parte exterior, de tal forma que el cierre no introduce presión en el interior del dispositivo. La tapa del vaso capilar está unida al vaso capilar mediante una cinta elástica de poliestireno.
- 3) El cuello del capilar (2) tiene un orificio centrado en su parte inferior por donde entra el capilar a ras de la parte inferior quedando sellado el capilar al cuerpo del vaso capilar sin que se obstruya el capilar.

Procedimiento de utilización del dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico en condiciones de gravedad terrestre

- 1) Se mezcla la cantidad apropiada de agarosa de bajo punto de gelificación al 0.12% en una disolución de acetato sódico tamponada a pH 4.5. Se calienta hasta ebullición y se deja enfriar hasta cinco grados por encima de la temperatura de gelificación.

ES 2 304 263 B1

- 2) Se mezcla entonces 25 microlitros de la solución de agarosa con 7.5 miligramos de lisozima para preparar una disolución de lisozima al 30%.
- 3) Cuando aun esta la disolución por encima del punto de gelificación se rellena el volumen capilar por capilaridad sumergiendo el extremo inferior del mismo en la disolución con azarosa. La disolución de proteína asciende hasta la parte superior del capilar a ras con la parte inferior del vaso del capilar.
- 4) Se cierra el extremo por el que se ha llenado el capilar mediante cera y se deja enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente para que la azarosa tenga consistencia.
- 5) Se vierte en el vaso-cuello del capilar 200 microlitros de una disolución 3 molar de cloruro sódico tamponada con acetato sódico a pH 4.5.
- 6) Se cierra la tapa del vaso capilar.

Ejemplo de dispositivo de contradifusión con vaso paralepipédico y sin cuello (ver Figura 2)

- 1) Un volumen capilar de vidrio (1) cilíndrico de 0.1 milímetro de diámetro y 40 milímetros de longitud. El volumen de este cilindro a rellenar de disolución de proteína es de 0,314 microlitros.
- 2) El vaso del capilar (2) está realizado en poliestireno y tiene unas dimensiones internas de 5 milímetros de ancho, 2.5 milímetros de profundidad y 20 milímetros de altura, con un volumen total de 250 microlitros. El vaso del capilar tiene una tapa (3) que cierra el mismo herméticamente por la parte exterior, de tal forma que el cierre no introduce presión en el interior del dispositivo. La tapa del vaso capilar esta unida al vaso capilar mediante una cinta elástica de poliestireno. El vaso del capilar tiene un orificio centrado en su parte inferior por donde entra el capilar a ras de la parte inferior quedando sellado el capilar al cuerpo del vaso capilar sin que se obstruya el capilar.

Procedimiento de utilización del dispositivo de contradifusión con vaso paralepipédico y sin cuello

- 1) Se rellena el volumen capilar por capilaridad sumergiendo un extremo inferior del mismo en la disolución de lisozima de 30 mg/ml de concentración tamponada con acetato a pH 4,5. La disolución de proteína asciende hasta la parte superior del capilar a ras con la parte inferior del vaso del capilar.
- 2) Se cierra el extremo por el que se ha llenado el capilar mediante cera.
- 3) Se vierte en el vaso del capilar 10 microlitros de una disolución 3 Molar de cloruro sódico tamponada con acetato sódico a pH 4.5. Se cierra la tapa del vaso capilar.

Procedimiento de utilización del dispositivo de contradifusión con vaso cilíndrico y con cuello cilíndrico en condiciones de gravedad reducida en el espacio

- 1) Se prepara una disolución de lisozima al 30% con 7.5 miligramos de lisozima y 25 microlitros de una disolución con acetato sódico a pH 4,5.
- 2) Se rellena el volumen capilar por capilaridad sumergiendo el extremo inferior del mismo en la disolución de lisozima tamponada con acetato a pH 4,5. La disolución de proteína asciende hasta la parte superior del capilar a ras con la parte inferior del vaso del capilar.
- 3) Se cierra el extremo por el que se ha llenado el capilar mediante cera y se deja enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente para que la azarosa tenga consistencia.
- 4) Se preparan 1 mililitro de una disolución de agarosa de bajo punto de gelificación al 0.12%. Se calienta hasta ebullición y se deja enfriar hasta cinco grados por encima de la temperatura de gelificación.
- 5) Cuando aún esta la disolución de agarosa fluida y por encima del punto de gelificación se rellena el cuello del capilar mediante una pipeta con 35 microlitros de la disolución de agarosa y se deja enfriar durante unos minutos a temperatura ambiente.
- 6) Se vierte en el vaso-cuello del capilar 200 microlitros de una disolución 3 Molar de cloruro sódico tamponada con acetato sódico a pH 4.5.
- 7) Se cierra la tapa del vaso capilar.

ES 2 304 263 B1

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión constituido por un espacio de geometría unidimensional, preferentemente un tubo capilar, **caracterizado** porque comprende tres partes de distinta geometría:
- a) cilindro capilar con un diámetro comprendido entre 50 micras y 2 milímetros y longitud superior a 10 mm.
 - b) vaso del capilar cuya geometría puede ser cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma pero cuyo volumen ha de ser mayor de cinco veces el volumen del cilindro capilar.
 - c) opcionalmente entre el cilindro capilar y el vaso del capilar puede existir un cuello o interfase (cuello del capilar) que tiene forma cilíndrica, prismática, cónica o de cualquier otra forma y cuyo volumen es menor que el volumen del vaso del capilar.
2. Dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tubo capilar se construye en vidrio o material polimérico transparente o no transparente a los RX.
3. Dispositivo para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el vaso del capilar está provisto de una tapa que permite el cierre hermético del vaso por presión sobre el contorno exterior de dicho vaso.
4. Bloque para la realización simultánea de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión en espacios de geometría unidimensional, preferentemente capilares, que consta de los siguientes elementos:
- a) caja externa constituida por una carcasa de geometría prismática, cilíndrica o esférica que se cierra con dos tapas provistas de juntas de estanqueidad, ajustándose la más externa de dichas tapas a la carcasa mediante un conjunto de tornillos a presión.
 - b) una caja interna que se coloca centrada en el interior de la caja externa y que es un bloque macizo de geometría prismática, cilíndrica o esférica compatible con la correspondiente geometría de la caja externa que comprende vaciados periódicamente distribuidos que tienen la forma necesaria para encajar los dispositivos de geometría unidimensional y que se cierra con una tapa provista de una junta de estanqueidad.
 - c) un volumen libre entre la caja interna y la caja externa dividido en compartimentos que se rellenan con bolsas de material de cambio de fase que se utiliza para mantener la temperatura estable dentro de la caja.
 - d) dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, según las reivindicaciones 1 a 3, dispuestos en los vaciados previstos a tal efecto en la caja interna.
5. Bloque para la realización simultánea en el espacio de procesos de crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la caja externa y la caja interna están fabricadas en cualquier material que no interaccione con los agentes químicos que se utilizan en los procesos de crecimiento de cristales, preferentemente en material polimérico, cerámico, metálico o vidrio.
6. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión en dispositivos de geometría unidimensional, preferentemente capilares, según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- a) introducción de la solución con el producto a cristalizar en los capilares de hasta enrasar con la parte inferior del cuello del capilar o del vaso del capilar.
 - b) sellado de la parte inferior de los capilares mediante cera, grasa de vacío, lacre o cualquier otro producto que asegura la estanqueidad del cierre.
 - c) opcional relleno del cuello de los capilares con un gel químicamente inerte.
 - d) colocación sobre el gel inerte que rellena el cuello de los capilares o directamente sobre el vaso del capilar de la disolución de agente precipitante que ocupará total o parcialmente el vaso de los capilares.
 - e) cierre hermético del vaso de los capilares.
 - f) comienzo del transporte de masa difusivo del agente precipitante hacia la disolución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar.
 - g) cristalización en el interior de los capilares de forma que a medida que avanza el proceso se obtienen cristales de mayor calidad por acercamiento a las condiciones de equilibrio.

ES 2 304 263 B1

7. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 6 **caracterizado** porque el compuesto a cristalizar es una macromolécula biológica.

5 8. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 6 y 7, **caracterizado** porque la solución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar está formada por un disolvente orgánico ó inorgánico.

10 9. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según la reivindicación 8 **caracterizado** porque el disolvente utilizado para la solución que contiene el compuesto que se quiere cristalizar es agua, agua con un tampón de pH ó agua con un producto tensioactivo.

15 10. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 6-9 **caracterizado** porque el gel inerte es un agente químicamente inerte tal como agarosa y materiales derivados, gel de sílice ó poliacrilamida, o cualquier medio poroso que sirva para evitar la convección.

20 11. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicaciones 6-10 **caracterizado** porque el agente precipitante es en general cualquier compuesto que reduzca la solubilidad del compuesto que se quiere cristalizar.

25 12. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicación 11, **caracterizado** porque el agente precipitante es una sal inorgánica, por ejemplo cloruro sódico o sulfato amónico.

30 13. Procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión según las reivindicación 11 **caracterizado** porque el agente precipitante es un polímero ó un alcohol, por ejemplo polietilenglicol.

35 14. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según las reivindicaciones 6-13, **caracterizado** porque todo el proceso se lleva a cabo en condiciones terrestres de gravedad.

40 15. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según las reivindicaciones 6-13, **caracterizado** porque el contacto entre el agente precipitante y la solución con el producto que se quiere cristalizar y la consiguiente cristalización en el interior de los capilares se lleva a cabo en condiciones de gravedad reducida.

45 50 55 60 65 16. Procedimiento para el crecimiento de cristales en contradifusión según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el procesos e lleva a cabo preferentemente en los dispositivos de geometría unidimensional integrados en un bloque según las reivindicaciones 4 y 5.

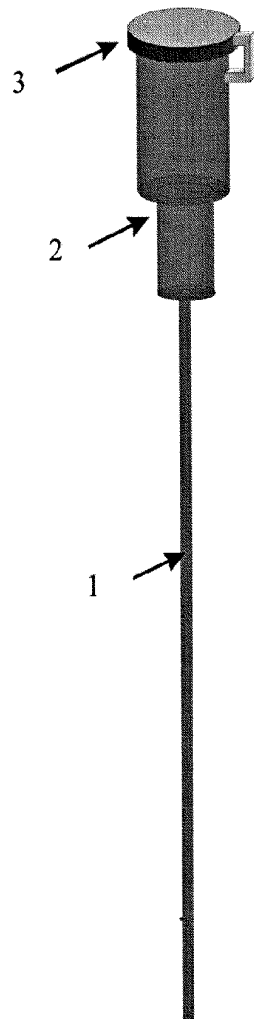


Figura 1

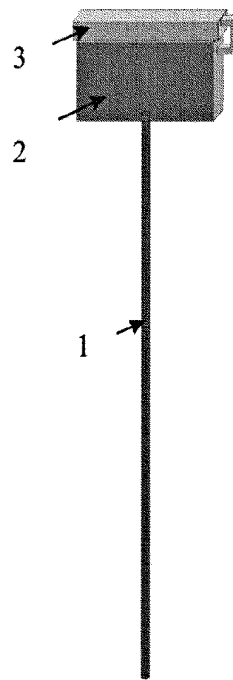
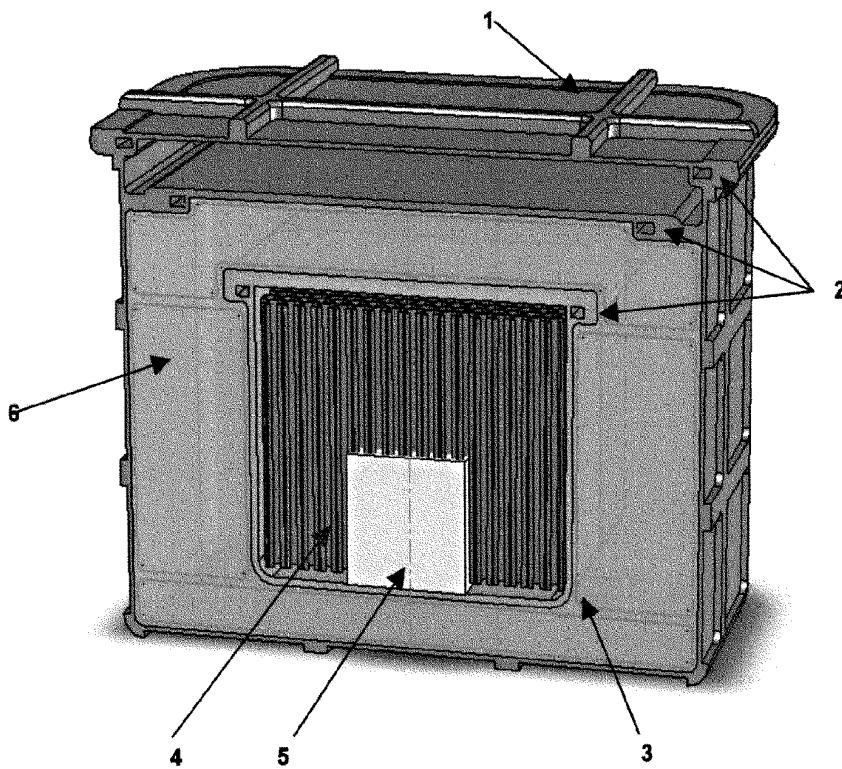


Figura 2

Figura 3



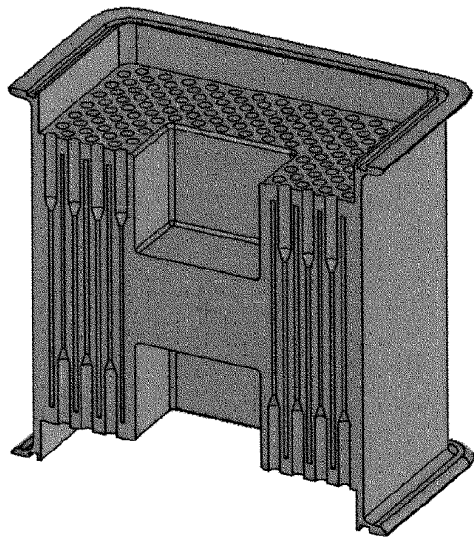


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 263

② Nº de solicitud: 200401200

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.05.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2164032 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.02.2002, todo el documento.	1-16
A	ES 2172363 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16.09.2002, todo el documento.	1-16
A	US 5641681 A (CARTER, D.C.) 24.06.1997, todo el documento	1-16
A	MX PA00003022 A (UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO) 08.03.2002, todo el documento.	1-16
A	US 6409832 B2 (WEIGL, B.H. et al.) 25.06.2002, todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.09.2005

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C30B 7/00 (2006.01)

C30B 29/58 (2006.01)

C30B 30/08 (2006.01)

Capítulo 6

Conclusiones y Perspectivas

6.1. CONCLUSIONES

6.1.1. Conclusiones parciales.

1. En el capítulo dos se describe el dispositivo diseñado para realizar experimentos de cristalización de proteínas por la técnica de contradifusión en capilares. El dispositivo, denominado “Granada Crystallization Box” (GCB), es muy versátil y de sencilla implementación. El uso de la GCB junto con el método de cristalización aplicado (GAME) tiene muchas ventajas frente a otras técnicas clásicas de cristalización de proteínas, ya que permite una búsqueda automática de las condiciones óptimas de cristalización y la posibilidad de llevar a cabo la recogida de datos de difracción de rayos X, sin la necesidad de una manipulación de los cristales fuera de los capilares. La fiabilidad de la GCB se constató con la cristalización de un conjunto amplio de proteínas. Otra ventaja adicional del dispositivo es que permite el seguimiento del experimento, en tiempo real, ya que admite la observación directa de los capilares con un microscopio óptico, al estar hecho el dispositivo de un material altamente transparente. Por otra parte, el análisis mediante difracción de rayos X de cristales crecidos en capilares dentro de la GCB es muy fácil y seguro ya que los capilares se pueden colocar directamente en el equipo de difracción de rayos X, sin necesidad de extraerlos ni manipularlos directamente.
2. La cristalización de las proteínas con la GCB aplicando la técnica de contradifusión, hace uso de geles que proporcionan un transporte de masa difusivo del agente precipitante hacia la solución de proteína, contenida en los capilares. Con objeto de evaluar la compatibilidad de los geles comúnmente utilizados en cristalización de proteínas frente a diversos agentes precipitantes y detergentes se planteo un estudio detallado de la compatibilidad de los geles. En el capítulo tres se describe este estudio en el cual se investigó el proceso de gelificación de varios

geles (2 tipos de agarosa, BGT y LGT, TMOS y acrilamida) en presencia de diversos agentes precipitantes, reguladores de diferentes valores de pH y diferentes tipos de detergentes utilizados en la cristalización de proteínas de membrana. Los resultados obtenidos demuestran que los geles son muy sensibles al entorno químico en el que gelifican. También el pH es un factor importante a considerar, ya que a algunos valores, se inhibe la formación del gel y en otros se modifica notablemente el tiempo de gelificación. Una conclusión importante de este capítulo es que aunque un entorno químico pueda inhibir la formación de un gel en particular, existe la alternativa de utilizar otro tipo de gel que al final nos proporcione el entorno difusivo deseado en la cristalización por contradifusión.

3. Una vez que se tuvieron los resultados de los capítulos dos y tres, en el capítulo cuatro se investigó, por un lado, la viabilidad de llevar a cabo experimentos de cristalización de macromoléculas biológicas en condiciones de microgravedad, utilizando la GCB y, por otro lado, se propuso hacer una comparación de la calidad cristalina de cristales obtenidos en dos ambientes difusivos diferentes: Uno en el que los cristales crecieron en tierra con el uso de geles en el medio de cristalización y otro en el espacio en un escenario de fuerza gravitatoria reducida. Se llevaron a cabo experimentos en tres misiones espaciales diferentes, dos en la Estación Espacial Internacional (misiones Andrómeda y Odissea) y una en una capsula espacial orbitando la tierra (misión Foton M-3). Para ello fue necesario diseñar contenedores especiales para albergar los experimentos durante las misiones espaciales. Posteriormente, para la tercera misión (misión Foton M-3) se re-diseñó la GCB para los que se fabricaron nuevos reactores (capilares 3L) para optimizar el diseño experimental de los ensayos. Además, al observarse variaciones importantes de temperatura en la misión anterior (Misión Odissea), se incorporó un sistema activo de control de temperatura en la misión Foton M-3. Este nuevo tipo de contenedores incluía un dispositivo electrónico de control de temperatura tanto en el contenedor de las cajas de cristalización (GCF), como también en cada una de las cajas de transporte especialmente fabricadas (GSE). Las cajas de transporte permitieron mantener la temperatura estable desde la preparación, recuperación y traslado de los experimentos hasta el laboratorio del

Sincrotrón en el que se estudiaron los cristales obtenidos mediante difracción de rayos X.

Todos los dispositivos de cristalización diseñados para las diferentes misiones y cuyos resultados describimos en este capítulo funcionaron de forma satisfactoria. Asimismo, la experiencia logística adquirida durante las diferentes fases de las misiones en las que participamos permitió elaborar un protocolo de utilización de la GCB y de la GCF para llevar a cabo experimentos de cristalización en el espacio.

A través del análisis de los datos de aceleración (g) se constató que el ambiente de microgravedad es mejor dentro de naves espaciales, como la que se utilizó en la misión Foton M-3, que el ambiente de microgravedad presente dentro de la ISS.

El control de temperatura usado durante la misión Odissea permitió hacer una comparación real de la calidad cristalina de cristales crecidos en dos ambientes difusivos diferentes estudiados (en condiciones de microgravedad en las misiones espaciales y en tierra usando geles). Los resultados de calidad cristalina no mostraron diferencias significativas entre los cristales crecidos en el espacio y los cristales crecidos en disoluciones gelificadas en tierra.

6.1.2. Conclusiones generales.

Durante el desarrollo de esta tesis se diseñaron nuevos dispositivos para llevar a cabo experimentos de cristalización de macromoléculas biológicas usando la técnica de contradifusión. Los nuevos dispositivos desarrollados, la GCB, la GCB-2, y los capilares 3L, demostraron ser prácticos para la realización de experimentos de cristalización y ofrecen numerosas ventajas con respecto a los dispositivos que hasta ahora se venían utilizando para implementar esta técnica.

La cristalización de proteínas mediante la técnica de contradifusión requiere de un transporte puramente difusivo para lo cual se utilizan una solución gelificada que supriman los flujos generados por convección. Por otra parte, en cristalización de proteínas se utiliza una gran variedad de agentes precipitantes, detergentes y adictivos, así como diferentes condiciones fisicoquímicas (pH). Esto hace que el comportamiento de los geles varíe y que unos geles sean más adecuados que otros en cada caso. Para ello se realizó un estudio de compatibilidad de diferentes tipos de geles para diferentes agentes químicos y condiciones de cristalización. Este estudio permitió analizar el comportamiento de una serie de geles diferentes que pueden usarse en estos experimentos y determinar cuál de ellos tiene el comportamiento más adecuado en cada caso.

Los resultados de los experimentos de cristalización en el espacio, es decir, en condiciones de microgravedad, validaron la utilización de la GCB para este tipo de experimentos. Asimismo, la experiencia adquirida permitió elaborar un protocolo estándar para la implementación de la técnica de contradifusión en este ambiente gravitatorio. De igual forma, permitió desarrollar dispositivos adicionales que aportaron mejoras en la implementación y ejecución de los experimentos, como por ejemplo, un dispositivo con control activo de temperatura, durante todas las etapas de las misiones espaciales descritas en este trabajo de tesis.

Los estudios de calidad cristalina demostraron que la técnica de contradifusión en geles implementada en condiciones terrestres produce cristales con calidad similar a aquellos obtenidos en condiciones de microgravedad.

El trabajo llevado a cabo sobre el diseño de los nuevos dispositivos de cristalización para la misión Foton M-3, permitió hacer una patente sobre los capilares 3L denominada: “Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión”, Juan Manuel García Ruiz (Inventor), Luis Antonio González Ramírez (colaborador no inventor). (Figura recogida en el Art. 4.1 del Real Decreto 55/2002 de 18 de enero de 2002 sobre explotación y cesión de invenciones realizadas en los entes públicos de investigación publicado en el B.O.E. núm. 26 de 30 de enero de 2002).

6.2. PERSPECTIVAS.

En base a los resultados de los trabajos realizados en esta tesis doctoral y en vista de las ventajas que ofrecen tanto la técnica de contradifusión como los dispositivos diseñados para la realización de experimentos de cristalización, se planteó la idea de elaborar un kit de cristalización de proteínas por contradifusión usando la GCB-2. El trabajo llevado a cabo para este fin, que no está descrito en esta tesis, derivó en otra patente, titulada: “Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas”, inventores: Juan Manuel García Ruiz (75%), Luis Antonio González Ramírez (25%); y en el desarrollo de un kit de búsqueda de condiciones de cristalización que se comercializa actualmente por la empresa Triana Science and Technology, empresa *spin-off* (Empresa de base tecnológica) del LEC-CSIC.

En el futuro se plantea llevar a cabo investigaciones adicionales para optimizar el kit antes mencionado con objeto de utilizarse no solamente como una opción de búsqueda de condiciones iniciales, sino también para la obtención de cristales adecuados para difracción de rayos X.

Por otra parte y con respecto a los experimentos de cristalización de macromoléculas biológicas en el espacio, sería muy interesante aprovechar los dispositivos diseñados y protocolos de logística para experimentos en el espacio para llevar a cabo estudios adicionales encaminados a entender procesos fundamentales del crecimiento cristalino en este ambiente de microgravedad, como podrían ser estudios de nucleación y crecimiento cristalino.

6.1 CONCLUSIONS

6.1.1. Partial Conclusions

1. In chapter 2 the device designed to carry out protein crystallization experiments using the capillary counter-diffusion technique was described. The device, called the “Granada Crystallization Box” (GCB), is very versatile and is of simple implementation. The use of the GCB together with the applied crystallization method (GAME) has many advantages over other more classic protein crystallization techniques, as it enables the automatic search for the optimal crystallization conditions and the possibility to carry out the collection of X-ray diffraction data without the need to remove the crystals from the capillaries. The reliability of the GCB was proven with the crystallization of a wide array of proteins. Another additional advantage of the device is that it allows one to follow the experiment in real time because one can observe the capillaries directly with an optical microscope, for the device is made of a highly transparent material. Furthermore, analysis using X-ray diffraction of the crystals grown in capillaries within the device is very easy and safe, since the capillaries can be placed directly in the X-ray diffraction machine without the need to extract or manipulate them directly.

2. The crystallization of the proteins with the GCB applying the counter-diffusion technique makes use of gels that provide a diffusive mass transport of the precipitating agent toward the protein solution contained in the capillaries. With the aim of evaluating the compatibility of the gels commonly used in protein crystallization as opposed to diverse precipitating agents and detergents, a detailed study of gel compatibility was determined. This study is described in Chapter 3. In this study, the gelling process of various gels (two types of agarose, BGT and LGT, TMOS and acrylamide) in the presence of diverse precipitating agents, regulators of different pH values, and different types of detergents used in the crystallization of membrane proteins, is investigated. The results obtained show that the gels are more sensitive to the chemical environment in which they set. pH is also an important factor to consider, given

that at some values the formation of the gel is inhibited and at other values the gelling time is modified notably. An important conclusion from this chapter is that, although a particular chemical environment can inhibit the formation of a particular gel, there is always the alternative of using another type of gel that provides the diffusive environment desired for counter-diffusion in crystallization.

3. Once the results of chapters 2 and 3 were obtained, in chapter 4 two parallel investigations were detailed: firstly, the viability of carrying out experiments of the crystallization of biological macromolecules in microgravity conditions using the GCB; and secondly, a comparison of the crystalline quality of the crystals obtained in two different diffusive environments was proposed: one in which the crystals would grow on earth with the use of gels in the crystallization medium, and the other in space in a setting of reduced gravitational force. Experiments were carried out in three different space missions: two in the International Space Station (the Andromeda and Odyssey missions) and one in a space capsule orbiting the Earth (the Foton M-3 mission). For this it was necessary to design special containers to house the experiments during the space missions. Subsequently, for the third mission (the Foton M-3 mission), the GCB was redesigned with newly created reactors (3L capillaries) to optimize the experimental design of the tests. Moreover, having observed significant variations of temperature in the earlier mission (the Odyssey mission), a new active temperature-control system was incorporated in the Foton M-3 mission. This new type of container included an electronic temperature-control device not only in the container with the crystallization cases (GCF), but also in each of the specially constructed transport cases (GSE). The transport cases allowed the maintaining of a stable temperature from the preparation, recovery, and transfer of the experiments to the Synchrotron Radiation Facility where the crystals obtained were studied using X-ray diffraction.

All of the crystallization devices designed for the different missions – the results of which are described in this chapter – functioned satisfactorily. Furthermore, the logistic experience gained during the different phases of the missions in

which we participated allowed the elaboration of a protocol of utilization for the GCB and the GCF to carry out crystallization experiments in space.

Through the analysis of the acceleration data (g), it was confirmed that the microgravity environment is better inside space vessels, such as the one used in the Foton M-3 mission, than that present in the ISS.

The temperature control used during the Odyssey mission allowed a real comparison of the crystalline quality of the crystals grown in the two different diffusive environments studied (in microgravity conditions in the space missions and on Earth using gel). The results of crystalline quality did not reveal significant differences between those crystals grown in space and those grown in gel solutions on Earth.

6.1.2. General Conclusions

During the development of this thesis, new devices were designed to carry out experiments of biological macromolecule crystallization using the counter-diffusion technique. The new devices developed, the GCB, the GCB-2 and the 3L capillaries, were shown to be practical for the effectuation of crystallization experiments and to offer numerous advantages over the devices that have been used to implement this technique up to now.

The crystallization of proteins using the counter-diffusion technique requires a purely diffusive mass transport for which a gel solution that suppresses the flows generated by convection. Furthermore, a great variety of precipitating agents, detergents and additives are utilized in protein crystallization, as well as different physical-chemical conditions (pH). This alters the behaviour of the gels, and some gels are more adequate than others in each case. For this reason a compatibility study of different types of gels for different chemical agents and

crystallization conditions was carried out. This study enabled the analysis of the behaviour of a series of different gels that can be used in these experiments and the determination of which gels have the most adequate behaviour in each case.

The results of the crystallization experiments in space – that is to say, in microgravity conditions – validated the use of the GCB for this type of experiment. Moreover, the experience acquired enabled the elaboration of a standard protocol for the implementation of the counter-diffusion technique in this gravitational setting. As well as this, it enabled, throughout the space missions described in this thesis work, the development of additional devices that brought improvements in the implementation and execution of the experiments, for example an active temperature-control device.

The crystal quality studies showed that the counter-diffusion technique in gels implemented in terrestrial conditions produce crystals of a similar quality to those obtained in microgravity conditions.

The work carried out on the design of the new crystallization devices for the M-3 Foton mission resulted in a patent for the 3L capillaries, called: “Dispositivo y procedimiento para el crecimiento de cristales por contradifusión (Device and procedure for the growth of crystals by counter-diffusion)”, Juan Manuel García Ruiz (Inventor), Luis Antonio González Ramírez (non-inventing collaborator). (Item collected under Article 4.1 of the Real Decreto (Royal Decree) 55/2002 of the 18th January 2002 on exploitation and granting of inventions carried out in public entities of investigation, published in the B.O.E., number 26, 30th January 2002).

6.2. PROSPECTS

Based on the results of the work carried out in this doctoral thesis and in view of the advantages offered by both the counter-diffusion technique and the devices designed to carry out the crystallization experiments, the idea arose to produce a

kit for protein crystallization by counter-diffusion using the GCB-2. The work carried out for this aim, which is not described in this thesis, resulted in another patent, entitled: “Procedimiento para el chequeo de condiciones de cristalización de macromoléculas biológicas” (Procedure for the checking of the conditions for biological macromolecule crystallization), inventors: Juan Manuel García Ruiz (75%), Luis Antonio González Ramírez (25%). It also resulted in the development of a kit for the searching of crystallization conditions that is currently being commercialized by the company Triana Science and Technology, a spin-off company (a technology-based company) from LEC-CSIC.

In the future it is proposed to carry out further investigations to optimize the above-mentioned kit with the aim of using it not only as an option for the searching of initial conditions but also for the obtaining of crystals suitable for X-ray diffraction.

Additionally, regarding the experiments of biological macromolecule crystallization in space, it would be extremely interesting to make use of the specially designed devices and logistic protocols for space experiments to carry out further studies directed at understanding the fundamental processes of crystal growth in microgravity conditions, for example fundamental studies of nucleation and crystal growth.