



Cristalización de lisozima en presencia de eosina

# UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES



Máster en Química

Área de Química Física - Departamento de Química Física

---

**CRISTALIZACIÓN DE LISOZIMA EN PRESENCIA DE EOSINA**

JULIO 2016

---

ALUMNO:

**BORJA KHATABI SOLIMAN TAMAYO**

—  
DIRECTORA:

**ANA MARÍA CÁMARA ARTIGAS**

Cristalización de lisozima en presencia de eosina





**MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN QUÍMICA**

---

## MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

---

CURSO ACADÉMICO:

CONVOCATORIA:  1

2

UNIVERSIDAD:

TÍTULO DEL TRABAJO:

Cristalización de lisozima en presencia de eosina

ESTUDIANTE:

Borja Khatabi Soliman Tamayo

TUTOR(es):

Dra. Ana María Cámara Artigas

Fecha: 08 de Julio de 2016

VºBº Tutor(es)

Fdo: Ana María Cámara Artigas

El Estudiante

Fdo: Borja Khatabi Soliman Tamayo

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



### **Agradecimientos**

**En primer lugar, he de agradecer a la Dra. Ana Cámara Artigas por haberme dado una oportunidad y enseñarme un mundo nuevo para mí, al cual he tenido que adaptarme y aprender de él. Agradezco todo su esfuerzo y paciencia conmigo para ayudarme en mi formación.**

**A Marina Plaza Garrido, por toda su ayuda, su interés y comprensión que ha depositado en mí, haciendo las horas trabajadas juntas más alegres y amenas.**

**Al resto de personas presentes en el laboratorio, Emilia Ortiz Salmerón y Montserrat Andújar Sánchez por su compañerismo, ayuda y gracias por el agua caliente para el té.**

**A María Dolores Ureña Amate por su ayuda para mejorar mi forma de expresarme y en la creación de presentaciones.**

**A mi pareja, Rosalía Martínez López, por su ánimo, ayuda y cariño que siempre ha mostrado aun estando a una gran distancia.**

**A mi familia por ayudarme en todo lo posible, haciendo un gran esfuerzo para poder conseguir mis propósitos y objetivos.**

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



## Índice

Resumen / Abstract.....	11
1. Objetivos.....	13
2. Introducción.....	15
2.1. Lisozima.....	15
2.2. Eosina Y.....	17
2.3. Cristalización de proteínas.....	18
3. Materiales y Métodos.....	27
3.1. Materiales.....	27
A. Instrumentación.....	27
B. Reactivos.....	27
3.2. Métodos.....	28
A. Cristalografía de proteínas.....	28
B. Cribado de las condiciones de cristalización.....	29
C. Optimización de las condiciones de cristalización.....	29
D. Capturado de las imágenes del crecimiento de los cristales.....	32
E. Espectroscopia UV-Visible para determinar las concentraciones y estabilidad del colorante a diferentes pHs.....	32
F. Medidas de fluorescencia para determinar la constante de unión y la estabilidad del colorante a diferentes pHs.....	33
G. Soaking.....	37
4. Resultados y Discusión.....	39
4.1. Optimización de cristales de lisozima-eosina Y.....	39
4.2. Estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs.....	42
4.3. Unión lisozima-eosina Y.....	44
4.4. Estructura.....	48
5. Conclusiones / Conclusions.....	55



Cristalización de lisozima en presencia de eosina

6. Referencias .....	57
7. Anexo .....	61

## Índice de figuras, gráficas y tablas.

Figura 1. Estructura de lisozima de clara de huevo de gallina (1HEW). .....	15
Figura 2. Orientación del triptófano 62 y el triptófano 108 en lisozima. ....	16
Figura 3. Estructura de Eosina Y y Eosina B. ....	17
Figura 4. Representación esquemática de la variación de la energía libre de Gibbs en función del radio del agregado. Se han representado por separado las contribuciones de volumen y superficie y la suma de ambas. ....	20
Figura 5. Representación esquemática del modelo de difusión en capa en el que se muestra como disminuye la concentración al alejarnos de la cara del cristal. ....	21
Figura 6. Diagrama de fases básico para una temperatura dada. ....	23
Figura 7. Representaciones gráficas de técnicas de cristalización mediante gota colgando y gota sentada. ....	24
Figura 8. Cristales formados de lisozima-eosina Y en las condiciones descritas en la tabla 1. ....	29
Figura 9. Cristales de lisozima y eosina Y en gota sentada. ....	32
Figura 10. Cristal de lisozima con eosina Y con decoloración por los bordes del cristal. ....	33
Figura 11. Tubos de ensayo con concentraciones crecientes de eosina en medio básico. ....	37
Figura 12. Pérdida de coloración de cristales de lisozima con eosina Y. ....	42
Figura 13. La estructura del complejo de lisozima unida al complejo eosina Y descrita por Baugher y la estructura de rayos x del cristal de lisozima con eosina. ....	49
Figura 14. Estructura obtenida por Pymol de 2LYZ. ....	50
Figura 15. Estructura y localización del bolsillo hidrofóbico propuesto con un área de $123.8 \text{ \AA}^2$ y un volumen de $148.1 \text{ \AA}^3$ . ....	52
Figura 16. Proteínas Abl-SH2 y TSG101-UEV en las cuales se añadió eosina Y. ....	53
Gráfica 1. Cálculo de la concentración óptima de eosina Y en negro concentración de eosina Y $5 \mu\text{M}$ , en rojo concentración de eosina Y $10 \mu\text{M}$ y en verde concentración de eosina Y $20 \mu\text{M}$ . ....	40
Gráfica 2. Comportamiento del colorante eosina Y a diferentes pHs mediante espectroscopia. ....	41

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

Gráfica 3. Estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs con el paso del tiempo mediante espectroscopia UV-Visible.....	43
Gráfica 4. Estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs con el paso del tiempo mediante fluorimetría.....	44
Gráfica 5. Representación de los datos obtenidos para fluorimetría de la unión lisozima-eosina Y para medio ácido.....	45
Gráfica 6. Representación de los datos obtenidos para fluorimetría de la unión lisozima-eosina Y para medio básico.....	46
Gráfica 7. Representación gráfica de concentración de ligando libre frente eje y fracción de saturación mediante ajuste hiperbólico para la unión de lisozima-eosina Y, en rojo la condición en medio ácido, en naranja la condición en medio básico, en amarillo la condición en medio ácido a alta fuerza iónica y en verde la condición en medio básico a alta fuerza iónica.....	47
Gráfica 8. Representación gráfica del ajuste linear por Scatchard para el cálculo de la unión de lisozima-eosina Y, en rojo la condición en medio ácido, en naranja la condición en medio básico, en amarillo la condición en medio ácido a alta fuerza iónica y en verde la condición en medio básico a alta fuerza iónica.....	48
Tabla 1. Cristalización de la lisozima en medio ácido con concentración creciente de agente precipitante cloruro sódico.....	28
Tabla 2. Barrido de pH para el colorante eosina Y.....	31
Tabla 3. Bolsillos hidrofóbicos pertenecientes a la lisozima (2LYZ).....	51

## **Resumen / Abstract**

La cristalización es el proceso mediante el cual las moléculas se ordenan de un modo natural formando un retículo repetitivo (cristal). En este trabajo, se cristalizó lisozima en presencia de eosina Y a pH ácido y básico. Además, se estudió la estabilidad del colorante eosina Y mediante espectroscopia UV-Visible y fluorescencia. Se calculó la constante de unión entre lisozima y eosina Y a diferentes pHs y su comportamiento en diferentes condiciones de fuerza iónica. Finalmente mediante el estudio de los bolsillos hidrofóbicos de la estructura de lisozima y el tamaño de la molécula de eosina Y, se propuso un lugar de unión para la molécula de eosina Y.

The process by which molecules are arranged in a natural way forming a repetitive reticulum or crystal is called crystallization. In this project, the lysozyme was crystallized in presence of eosin Y at acidic and basic pH. Moreover, the stability of eosin Y dye was studied by UV-Visible spectroscopy and fluorescence. Furthermore, the binding constant between lysozyme and eosin Y at different pHs and its behavior in different conditions of ionic strength were calculated. Finally, by studying the hydrophobic pockets of the structure of lysozyme and the size of the molecule Eosin Y, a binding site will be proposed for the molecule of eosin Y.

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



## 1. Objetivos

- ❖ Estudiar la cristalización de la proteína lisozima en presencia del colorante eosina Y.
- ❖ Estudio de la unión de la eosina Y a lisozima a diferentes pHs y fuerzas iónicas mediante fluorescencia: determinación de la constante de unión.
- ❖ Resolver la estructura de lisozima a partir de cristales obtenidos en presencia de eosina Y.

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



## 2. Introducción

### 2.1. Lisozima

En 1922, Alexander Fleming descubrió una sustancia en el moco nasal de un paciente que sufría de resfriado común, la cual podía matar a ciertas bacterias como la *Micrococcus lysodeikticus*<sup>1</sup>. Llamó a esta sustancia “lisozima”. La lisozima fue encontrada también en otros fluidos corporales como las lágrimas, la saliva y el suero sanguíneo, y en distintos tejidos humanos. La clara de huevo fue identificada como una rica fuente de lisozima. Los primeros trabajos con lisozima se atribuyen a Thompson<sup>2</sup>, mientras que una parte del descubrimiento de la lisozima es atribuida también a Maurois<sup>3</sup>. Sin embargo, la euforia inicial por la búsqueda de una sustancia antibacteriana, se torció por el resultado de que la lisozima tenía muy poco valor clínico antibacteriano, y tras el descubrimiento de la penicilina el interés de la lisozima se desvaneció. Recobró su interés cuando la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) fue purificada y aislada.

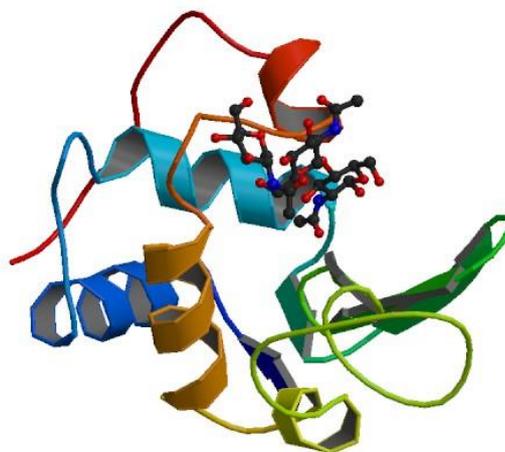


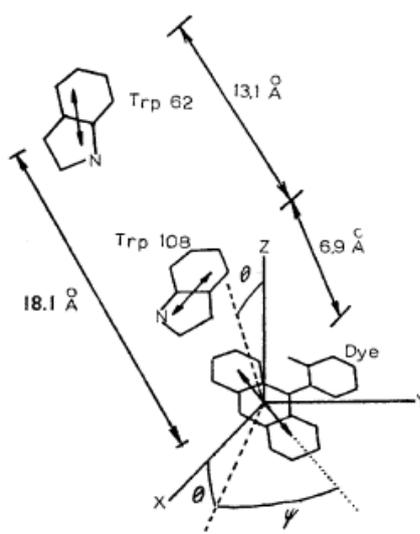
Figura 1. Estructura de lisozima de clara de huevo de gallina (1HEW).

Actualmente, HEWL es de las proteínas más populares utilizadas por los químicos (Figura 1). La HEWL es una cadena polipéptida simple con un peso molecular de 14.3 kDa, comprendida por 129 aminoácidos con cuatro puentes de disulfuro intramoleculares y un punto isoeléctrico cerca de 11.3 que es fácilmente soluble en medio acuoso<sup>4</sup>. Como enzima, HEWL cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 glicosídico entre el ácido N-acetil múramico y la N-acetil-D-glucosamina en peptidoglicano, un

carbohidrato encontrado en la pared celular bacteriana, este es el origen de su acción bactericida.

Históricamente, esta proteína es una de las proteínas más investigadas bioquímicamente y, al contrario que la mayoría de las proteínas, la cristalización de lisozima es fácil y da lugar a cristales de alta calidad que difractan muy bien. La estructura primaria completa de HEWL fue determinada en 1963<sup>5,6</sup>, e inmediatamente después en 1965, se resolvió la estructura tridimensional. La estructura secundaria presenta un 30.23 % de los aminoácidos implicados en estructura en  $\alpha$ -hélices (ocho) y un 6.20 % en láminas- $\beta$  (dos)<sup>7</sup> (Figura 1). Esta estructura fue la primera determinada para una enzima<sup>8</sup>. La determinación del complejo tridimensional de la estructura de HEWL unida a su sustrato, facilitó la comprensión de la especificidad y el mecanismo para su actividad catalítica, propuesta por Chipman y Sharon, 1969<sup>9</sup>. El proceso de plegamiento de esta proteína ha sido estudiado extensamente por Dobson y asociados<sup>10</sup>.

En este trabajo vamos a estudiar la unión de eosina Y a lisozima. Para ello podemos utilizar la fluorescencia propia del colorante o la fluorescencia intrínseca de la proteína. En el caso de la lisozima la fluorescencia intrínseca es debida fundamentalmente al triptófano 62 y el triptófano 108 (Figura 2), los cuales dan lugar aproximadamente el 80% de la emisión de fluorescencia ( $\lambda_{ex}=280$  nm), siendo la emisión de fluorescencia mayor en el triptófano 108<sup>11</sup>.



**Figura 2. Orientación del triptófano 62 y el triptófano 108 en lisozima. La molécula de eosina Y “muestra su localización” en el punto medio del bolsillo definido por el triptófano 28, el triptófano 111, la tirosina 23 y la metionina 105 y es coplanar con el triptófano 108.**

Como ya hemos comentado, la lisozima es una de las proteínas más fáciles de cristalizar, esto es debido a que es una proteína muy estable y posee una alta solubilidad. La lisozima muestra un incremento en su solubilidad debido a la presencia de argininas en su composición: 11 argininas<sup>12</sup>. La arginina es el aminoácido natural más básico con un punto isoeléctrico de 10.8, tiene la posibilidad de formar múltiples puentes de hidrogeno y además permite la unión de grupos cargados negativamente, lo que hace que a alta fuerza iónica sea muy estable. En este trabajo vamos a estudiar la unión de eosina Y a lisozima a diferentes fuerzas iónicas para lograr determinar la estructura de la eosina Y unida a lisozima.

## 2.2. Eosina Y

La eosina es un colorante xanténico artificial y de naturaleza química ácida. Es un derivado hidroxianténico halogenado con tres grupos arilo. Actualmente existen dos compuestos conocidos como eosina, la eosina Y ( $C_{20}H_8Br_4O_5$ ) comúnmente conocida como eosina amarilla, y la eosina B ( $C_{20}H_8Br_2N_2O_9$ ), también conocida como eritrosina B azulada. Las diferencias de coloración que existen entre ellas están motivadas por el tipo y número de átomos de halógeno (Figura 3).

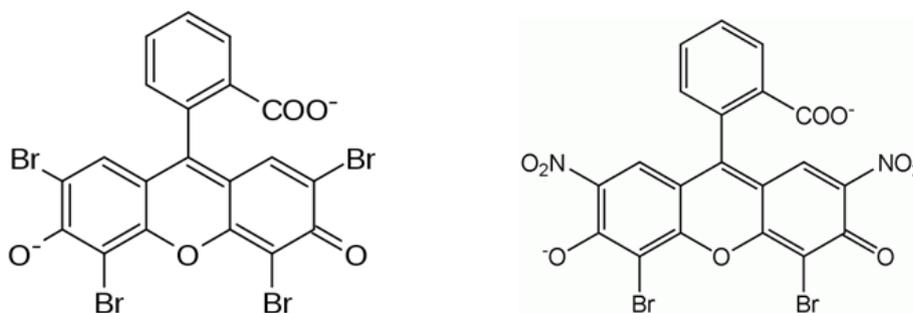


Figura 3. Estructura de Eosina Y (izquierda) y Eosina B (derecha).

La eosina Y (2',4',5',7'-tetrabromo fluoresceína) es un colorante rojo con fluorescencia verde, la cual ha sido ampliamente utilizada para la tinción de proteínas<sup>13,14,15,16</sup>. Por ejemplo, la eosina Y fue utilizada en 1986 como una tinción reversible para detectar electroforéticamente la separación de proteínas, con una alta recuperación de la proteína total<sup>13</sup>. En 1991, la eosina Y se aplicó para tinción de las proteínas en geles de policrilamida<sup>14</sup>.

En general, los colorantes xanténicos tienen fluorescencia espontánea y colorean los tejidos de diversas tonalidades entre rojo y rosado. Comúnmente, se difunden fácilmente en las estructuras hísticas, sobre todo en las más compactas, a las cuales tiñen debido a que, por su carácter ácido, son atraídos fuertemente hacia los radicales básicos de la histidina, lisina y arginina presentes en las proteínas.

Diversos trabajos han estudiado la unión que se produce entre la lisozima y la eosina  $Y^{17}$ , donde se han comprobado que la dependencia de la temperatura en la constante de disociación,  $K_D$ , conduce a la cuantificación de  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  para la unión de lisozima y eosina  $Y$ .

### **2.3. Cristalización de proteínas**

La cristalización de moléculas en solución es un fenómeno de equilibrio químico reversible cuya cinética y termodinámica están controladas por las características físicas y químicas del solvente y del soluto. Bajo ciertas condiciones el sistema segrega de la solución un precipitado que disminuye la energía libre del sistema (núcleo crítico o un agregado no específico)<sup>18</sup>. Esta disminución de energía libre es mayor cuanto más ordenada sea la fase segregada.

Se considera el fenómeno de crecimiento cristalino dividido en tres fases o etapas: nucleación, crecimiento y cese del crecimiento.

#### **A. Nucleación.**

La nucleación es el proceso por el cual una fase sólida se segrega de la solución para formar agregados cristalinos termodinámicamente estables. Cuando la formación de núcleos ocurre en el seno de una solución libre de partículas y superficies extrañas se denomina nucleación homogénea; la presencia de partículas extrañas puede provocar la aparición de los núcleos a unos valores de sobresaturación inferiores a los requeridos para que se produzca la nucleación homogénea (nucleación heterogénea). En ocasiones el desprendimiento de pequeños fragmentos de cristales procedentes de la nucleación primaria (homogénea o heterogénea) sirve de núcleos para la aparición de nuevos cristales, para este caso hablaremos de nucleación secundaria.

La fuerza motriz del cambio de fase de una partícula en solución a su estado sólido a presión y temperatura constantes viene determinada por el cambio de potencial químico,

$$\Delta\mu = k \cdot T \cdot \ln \beta \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $k$  representa la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $\beta$  la sobresaturación del sistema, definida como el cociente entre la concentración actual y la concentración de equilibrio (se asume que los coeficientes de actividad idénticos en ambos casos).

El cambio de energía libre ( $\Delta G_r$ ), asociada a la formación de un agregado de volumen  $V$  y superficie  $S$  es:

$$\Delta G_r = S \cdot \sigma - \frac{V}{v} \cdot k \cdot T \cdot \ln \beta \quad \text{Ecuación 2}$$

$\sigma$  representa la energía libre de superficie entre el agregado y la solución y  $v$  es el volumen molar. Para un agregado con geometría esférica la ecuación 2 se puede escribir como:

$$\Delta G_r = 4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \sigma - \frac{4 \cdot \pi \cdot r^3}{3 \cdot v} \cdot k \cdot T \cdot \ln \beta \quad \text{Ecuación 3}$$

Por simplicidad se toma la tensión superficial de agregados pequeños similar a la macroscópica y se desprecia el agotamiento de las unidades de crecimiento por la formación del núcleo.

En la representación del cambio de energía libre en función de radio del agregado (Figura 4) se comprueba como existe una barrera energética ( $\Delta G^*$ ) que debe de superarse para alcanzar un tamaño de agregado estable, núcleo ( $r^*$ ). El núcleo crítico corresponde al menor agregado que puede disminuir su energía libre aumentando de tamaño.

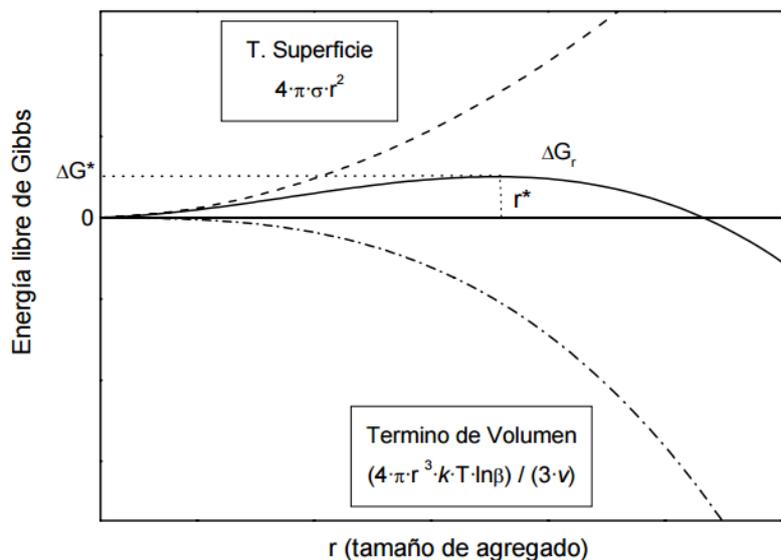


Figura 4. Representación esquemática de la variación de la energía libre de Gibbs en función del radio del agregado. Se han representado por separado las contribuciones de volumen y superficie y la suma de ambas.

Diferenciando  $\Delta G_r$  respecto de  $r$  y teniendo en cuenta que la derivada se hace nula en el máximo, encontramos un valor  $r^*$  (ecuación de Gibbs-Thompson)

$$r^* = \frac{2 \cdot \sigma \cdot v}{k \cdot T \cdot \ln \beta} \quad \text{Ecuación 4}$$

#### B. Crecimiento.

El crecimiento de un cristal implica una serie de pasos que describen la migración de las moléculas desde el seno de la solución a la superficie del cristal y su posterior incorporación desplazando las moléculas de solvente. Dependiendo de cuál de estos procesos sea el más lento, el crecimiento estará controlado por el transporte en el seno de la solución, el transporte sobre la superficie del cristal o la cinética de incorporación (Figura 5). Teniendo en cuenta que el transporte de masa se puede considerar de tipo difusivo a distancias cortas (cercasas al cristal) incluso en ambientes convectivos y considerando el cristal real descrito por el modelo de Burton-Cabrera-Frank<sup>19</sup>, el modelo de difusión en capa (Diffusion Layer Model) describe los posibles mecanismos de crecimiento de un cristal en solución apoyándose en las ecuaciones de difusión de Fick<sup>20</sup>.

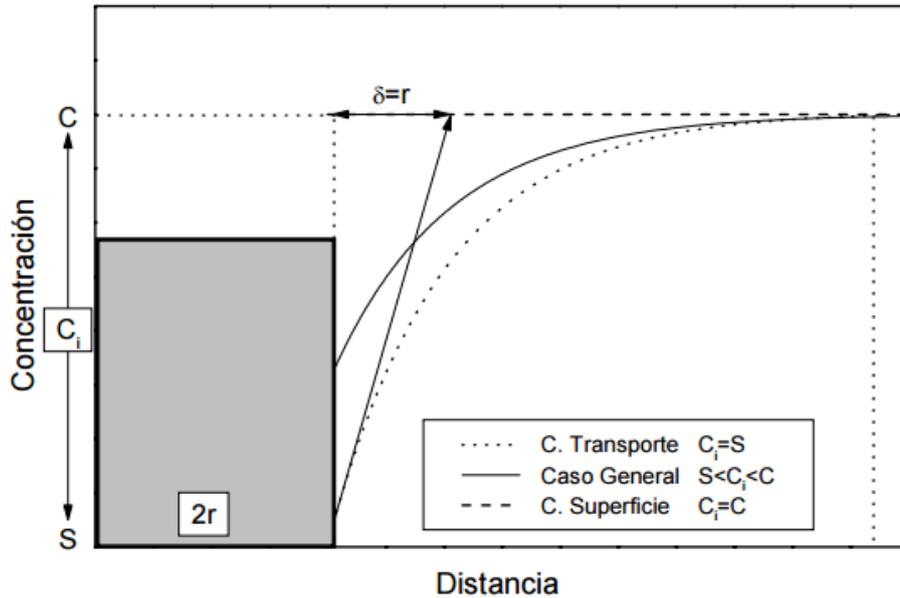


Figura 5. Representación esquemática del modelo de difusión en capa en el que se muestra como disminuye la concentración al alejarnos de la cara del cristal.  $C$ ,  $S$  y  $C_i$  representan los valores de concentración en el seno de la solución, la concentración de equilibrio y la concentración de la solución en la interfase cristal-solución. Cada una de las curvas muestra el gradiente de concentración al acercarnos a la cara del cristal cuando: el crecimiento está controlado por la difusión en el seno de la solución ( $C_i=S$ ), controlado por la difusión en la superficie del cristal ( $C_i=C$ ) ó es debido a una combinación de ambos.  $\Delta$  representa el espesor considerado como capa límite cuyo valor es igual a la mitad de la longitud característica del cristal ( $2r$ ) cuando el ambiente es difusivo y menor que  $r$ , cuando el transporte en el seno de la solución es convectivo.

Una amplia revisión de los posibles mecanismos implicados en el crecimiento de cristales de proteínas<sup>21</sup>, a partir de datos macroscópicos de medidas de velocidad de crecimiento (entendida como la velocidad de avance de una dirección característica del cristal a lo largo del tiempo) de cristales de lisozima, estos autores aplican las diferentes expresiones correspondientes a cada uno de los mecanismos propuestos por la teoría anteriormente descrita. Encuentran que los mejores ajustes se obtienen a partir de las expresiones que incluyen la fuerza motriz de cristalización ( $\ln\beta$ ), apuntando a un control de tipo cinético. Concluyen que los cristales de lisozima crecen de acuerdo con un mecanismo de nucleación (2D, crecimiento de las caras por expansión de un núcleo sobre la superficie del cristal) a sobresaturaciones ( $\beta$ ) superiores a 3, similar al encontrado para algunas sales inorgánicas. Sin embargo, la energía superficial es 100 veces menor que la de cristales inorgánicos cuando se toma en cuenta la unidad de área aunque del mismo orden en bases molares.

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

Ampliando la zona de estudio<sup>22</sup> a la región de bajas sobresaturaciones ( $1.2 \leq \beta \leq 10$ ) encuentran que, mientras a elevadas sobresaturaciones el mecanismo que mejor describe el crecimiento de los cristales de lisozima es la nucleación bidimensional (2D), a bajas sobresaturaciones los datos experimentales se ajustan a un mecanismo de crecimiento impulsado por la presencia de dislocaciones helicoidales (el cristal se desarrolla por expansión sobre la superficie del cristal y en la dirección normal a la cara del cristal). El avance de las caras de tipo  $\{110\}$  y  $\{101\}$  presentan una dependencia diferente con la sobresaturación del sistema dando lugar a cristales con hábito diferente en función de la sobresaturación. Esta diferencia es consecuencia de una diferencia en la energía superficial de área entre ambos tipos de caras ( $\sigma_{110}=2.3 \cdot kT$  y  $\sigma_{101}=1.9 \cdot kT$ ). Estos resultados son corroborados posteriormente a partir de simulaciones teóricas, *ex situ* microscopía electrónica e *in situ* microscopía de fuerza atómica<sup>23,24,25</sup>. Este último trabajo apunta un posible solapamiento de ambos mecanismos de crecimiento.

### C. Cese del crecimiento.

Un cristal puede dejar de crecer por diferentes razones. La más evidente es el consumo del nutriente. Podríamos recrecer el cristal añadiéndole más proteína; sin embargo, esto no funciona en el caso de los cristales de proteínas. Se comprobó que si partimos un cristal de lisozima en dos fragmentos y los hacemos recrecer, el tamaño final de los fragmentos es idéntico al original<sup>26</sup>. Sugieren que la acumulación de tensiones de la celdilla unidad se transmiten a la superficie del cristal e impiden la incorporación de nuevas unidades de crecimiento. Según este razonamiento, los cristales que presenten una tensión en la celdilla unidad solo podrán crecer hasta un determinado tamaño.

Un efecto similar se puede observar cuando el cristal incorpora impurezas sobre la superficie en crecimiento. La incorporación de estas impurezas aumenta la cantidad de defectos superficiales que interrumpen el crecimiento, las impurezas (moléculas de proteína con cierta desnaturalización, fragmentos proteicos u otras proteínas) no se incorporan preferentemente, ya que el número de contactos efectivos es menor que para una molécula en estado nativo. Sin embargo, conforme el cristal crece la concentración de impurezas aumenta, esta disminución de la razón entre la proteína nativa e impurezas hace que la probabilidad de que se incorpore una impureza aumente con el tiempo, o lo que es lo mismo, con el consumo de proteína<sup>18</sup>.

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

### D. Diagrama de fases.

Mediante un diagrama de fases podemos representar el cambio solubilidad de una proteína con el precipitante (Figura 6). Se observa que cuanto más alta es la concentración de precipitante menor es la concentración de proteína soluble, donde a una determinada concentración de precipitante existe un límite de solubilidad de proteína. La región metaestable representa la zona de supersaturación, en la cual pueden surgir núcleos de cristales que facilitarían el posterior crecimiento de los mismos. Este proceso está controlado cinéticamente y, por lo tanto, para que se pueda formar un núcleo mínimo del cual se desarrollara un cristal será necesario superar una barrera de energía.

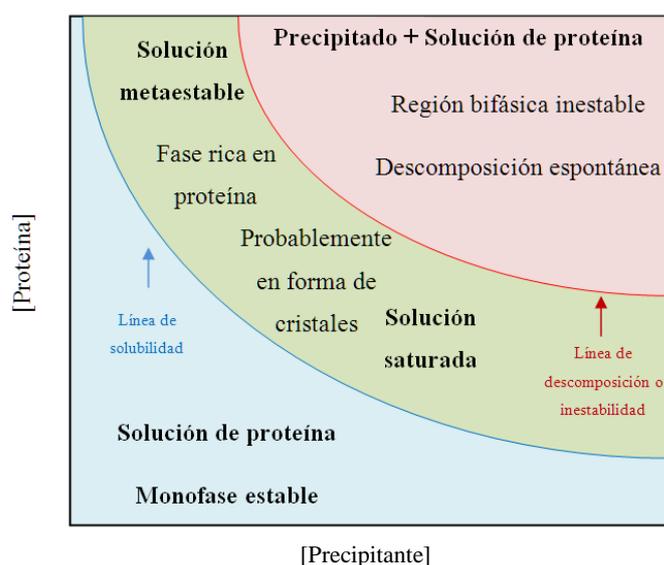


Figura 6. Diagrama de fases básico para una temperatura dada. La concentración de proteína está representada en el eje vertical y la concentración de precipitante en el eje horizontal. La línea de solubilidad separa la región que contiene una sola fase (de disolución de proteína) de una región con dos fases, que contiene proteína precipitada y una disolución saturada en equilibrio termodinámico.

### E. Uso de sales en cristalización.

Las sales son precipitantes comunes usados en experimentos de cristalización. Las proteínas son poli-iones ya que poseen residuos cargados expuestos en la superficie. Los iones presentes en las disoluciones salinas afectan a la solubilidad de las proteínas de una forma compleja. Cantidades pequeñas de sal a menudo incrementan la solubilidad de proteína (efecto salting-in), mientras que si seguimos aumentando la concentración de sal ocurre el fenómeno contrario (efecto salting-out) que reduce la solubilidad de esta<sup>27</sup>.

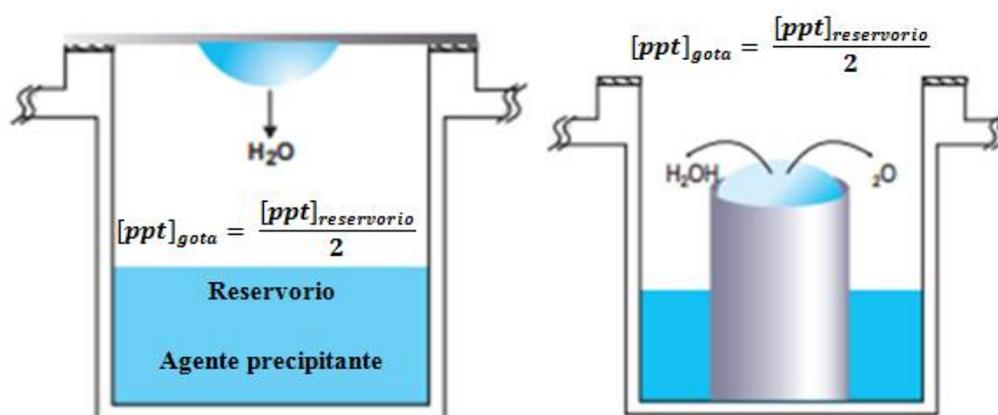
F. Uso de precipitantes orgánicos.

Además de las sales, los precipitantes más usados en cristalización son los polialcoholes orgánicos como por ejemplo el polietilenglicol (PEG), que es uno de los precipitantes más exitosos para el crecimiento cristalino<sup>27</sup>. La adición de PEGs siempre disminuye la solubilidad de proteína. Microscópicamente, el descenso en la solubilidad de proteína puede ser explicado por una competición de los polialcoholes por las moléculas de agua que están presentes en los alrededores de la proteína, así se fuerza a las proteínas a buscar interacciones entre ellas mismas más que con el disolvente polar de agua<sup>28</sup>.

G. Técnicas de cristalización.

En cuanto a técnicas de cristalización existen varios métodos, donde el más común en la cristalización de proteínas es el de difusión de vapor<sup>27,29</sup>, bien en su variante de gota colgante o de gota sentada. Precisamente estos son los métodos que se ha utilizado para cristalizar las proteínas en este trabajo.

Normalmente, la técnica mediante gota colgante es el método popular para la cristalización de macromoléculas cuando se preparan las condiciones de cristalización de forma manual gracias a su facilidad y comodidad. En aquellos casos en los que se usa un robot, el método utilizado es el de la gota sentada por difusión de vapor debido a limitaciones técnicas.



**Figura 7. Representaciones gráficas de técnicas de cristalización mediante gota colgando (izquierda) y gota sentada (derecha). La concentración de agente precipitante en la gota es igual a la mitad de la concentración de agente precipitante en el reservorio.**

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

En la Figura 7 se muestra un esquema de montaje que ilustra la técnica de gota colgante y gota sentada. En la gota se mezcla igual volumen de proteína y de agente precipitante. El vapor de agua difunde desde la disolución de proteína en la gota colgante o sentada hacia la disolución de agente precipitante del reservorio. En el caso del método de gota sentada la mezcla de proteína y precipitante se coloca en un soporte en la parte superior del montaje permitiendo la difusión de vapor de la gota hacia la disolución de precipitante en el reservorio. La bandeja entera se cubre con cinta adhesiva transparente para evitar la evaporación. Para el caso de gota colgante, el volumen de gota y agente precipitante se colocará en un cubre-objetos, el cual es del tamaño del reservorio, y que también se utilizará con la finalidad de sellar el reservorio.

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Materiales

##### A. Instrumentación

A continuación, se describen los instrumentos más utilizados en el laboratorio.

- Agitador Orbital Agimatic-S (J.P. Selecta): se ha utilizado para preparar todas las disoluciones.
- Bandejas de cristalización de 24 pocillos (marca Crystalgen): se ha utilizado para la cristalización de proteínas.
- Cubre-objetos (Thermo scientific) con un diámetro de 22 mm.
- Espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer) de UV-Visible: utilizado para medir la absorbancia y descomposición de eosina Y. Se utilizan cubetas de cuarzo con 1 cm de paso de luz.
- Espectrofotómetro luminiscente LS50B (Perkin Elmer) de fluorescencia: utilizando para medir intensidad de fluorescencia cubetas de cuarzo con 1 cm de paso de luz.
- Microscopio M205 C (Leica) equipado con una cámara LEICA IC80 HD: para observar y capturar fotos de los cristales formados.
- Micropipetas (Rainin): se utiliza para tomar volúmenes pequeños de 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ .

##### B. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en esta memoria son de grado para análisis. Fueron suministrados por las marcas: Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Riedel-de Hæn y Acros Organics.

Se describe a continuación la preparación de las disoluciones de uso más común.

- Preparación de Lisozima. Se prepara 2 ml de 100 mg/ml de lisozima por pesada. La disolución se centrifuga 5 minutos a 14500 rpm para eliminar restos insolubles. Posteriormente se comprueba la concentración de proteína mediante espectroscopia UV-Visible, recogiendo el espectro de longitudes de onda entre 240-400 nm. El coeficiente de extinción molar de la lisozima es  $38940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

- Preparación de Eosina Y. Se prepara 50 ml de una disolución de eosina 14.5 mM.
- Preparación de medio básico. Se prepara una disolución de nitrato sódico saturada y se ajusta el pH mediante bicarbonato sódico hasta 8.4, posteriormente se filtra y se comprueba el pH.

### 3.2. Métodos

#### A. *Cristalografía de proteínas*

Se comprobó las propiedades de cristalización de lisozima y de lisozima con eosina Y<sup>30</sup>, mediante la preparación de una bandeja de cristalización Crystalgen de 24 reservorios en gota sentada: Se usó una concentración de lisozima de 100 mg/mL y de eosina Y 1 mM, como agente precipitante se usó cloruro sódico en presencia de acetato sódico 0.2-1 M (pH 4.6) y PEG 4000 al 50 % (Figura 8). El tamaño de gota fue de 10  $\mu$ L. Estas condiciones nos sirvieron para comprobar la cristalización rápida de la lisozima (Tabla 1).

**Tabla 1. Cristalización de la lisozima en medio ácido con concentración creciente de agente precipitante cloruro sódico.**

	A	B	C	D	E	F
1	1 M Acetato sódico 0.2 M NaCl PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.4 M NaCl PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.6 M NaCl PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.8 M NaCl PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.9 M NaCl PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 1 M NaCl PEG 4000 50 %
2	1 M Acetato sódico 0.2 M NaCl 1 mM Eosina Y PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.4 M NaCl 1 mM Eosina Y PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.6 M NaCl 1 mM Eosina Y PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.8 M NaCl 1 mM Eosina Y PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 0.9 M NaCl 1 mM Eosina Y PEG 4000 50 %	1 M Acetato sódico 1 M NaCl 1 mM Eosina Y PEG 4000 50 %



Figura 8. Cristales formados de lisozima-eosina Y en las condiciones descritas en la tabla 1. La foto corresponde al pocillo F2.

### ***B. Cribado de las condiciones de cristalización***

A la hora de intentar cristalizar una proteína, es necesario empezar por un cribado de las posibles condiciones de cristalización.

Para este propósito se utilizó una bandeja de cristalización de Crystalgen, que consta de 24 reservorios donde se colocó la disolución de cristalización y de un pocillo para colocar las gotas para cada reservorio. La técnica de cristalización que se utilizó con esta bandeja es mediante la difusión de vapor por gota sentada.

En nuestro caso el cribado se llevará a cabo utilizando un volumen de gota total de 10  $\mu\text{L}$ : 5  $\mu\text{L}$  de la proteína en cuestión, en nuestro caso lisozima, probando diferentes concentraciones, desde 50 mg/mL hasta 120 mg/mL (ANEXO - Tabla 1) y 5  $\mu\text{L}$  de agente precipitante.

Como agente precipitante se utilizó una concentración de cloruro sódico 1 M en presencia de acetato sódico 0.1 M (pH 4.6). El volumen para cada reservorio de agente precipitante fue de 1 mL.

### ***C. Optimización de las condiciones de cristalización***

Una vez determinadas las condiciones en las que cristaliza la proteína, hay que optimizar los cristales mediante un barrido de las concentraciones del agente

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

precipitante y del aditivo/colorante (eosina Y en nuestro caso), variando también el pH y la temperatura.

Normalmente, una vez conocida la concentración de agente precipitante en la que cristaliza la proteína o con la cual aparecen microcristales (o cristales), se hace un barrido con concentraciones de dicho agente por encima y por debajo de la concentración de cristalización, el orden de variación será diferente según el agente precipitante utilizado. Lo mismo ocurre para el tampón, cuando se conoce la concentración a la cual la proteína cristaliza o con el que aparece un precipitado microcristalino se lleva a cabo un barrido probando tampones con pHs por encima y por debajo del pH de interés en un orden de  $\pm 1$  unidades de pH.

Para llevar a cabo este proceso de barrido se utilizó una bandeja con 24 reservorios en gota colgante. En este caso, al igual que en el anterior, el volumen de gota será de 10  $\mu\text{L}$ , y en cada reservorio se añade 1 mL de agente precipitante. Como lo que se pretende es hacer un barrido para comprobar que condiciones posibles existen y cuál es la condición óptima de cristalización, se variará la relación proteína-agente precipitante en medio ácido (ANEXO - Tabla 2).

El próximo paso es obtener cristales de la lisozima a diferentes pHs neutro/básico. Para ello se preparó una bandeja de cristalización Crystalgen de 24 reservorios en gota sentada con una concentración de lisozima 50-120 mg/mL, el agente precipitante fue una disolución nitrato sódico saturada y bicarbonato sódico, pH 8.4, el volumen de gota fue de 50  $\mu\text{L}$  (ANEXO - Tabla 3).

Comprobada la concentración óptima de lisozima y de agente precipitante, se comprobó que concentración de eosina Y era la adecuada para realizar el estudio de estabilidad mediante espectroscopia UV-Visible. La concentración utilizada de eosina Y fue de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ , como tampón se utilizó fosfato de potasio 50 mM (pH 7.5) y como blanco también se utilizó tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7.5). Se utilizó como recipiente una cubeta de cuarzo de 1 mL y la recogida de datos utilizada fue para un barrido de longitudes de onda entre 240-550 nm.

Comprobada la concentración adecuada de eosina Y, se realizó un barrido de pHs con eosina Y para ver su estabilidad a diferentes pHs, mediante espectroscopia UV-

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

Visible. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 mL (Tabla 2) con un volumen de tampón de 100  $\mu$ L con una concentración de eosina Y 10  $\mu$ M.

**Tabla 2. Barrido de pH para el colorante eosina Y.**

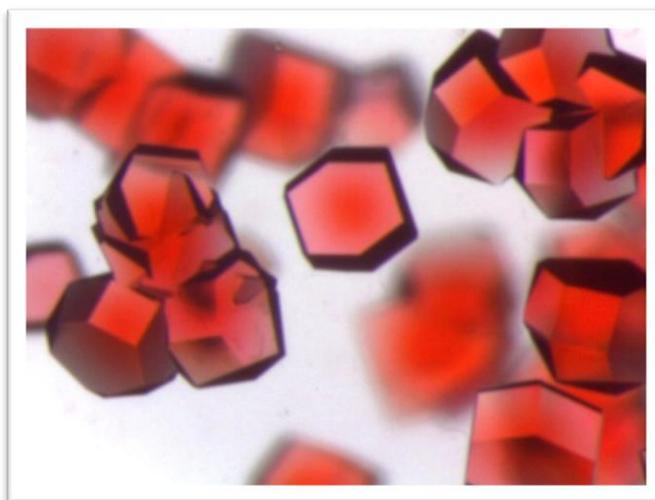
pH	Tampón
<b>3</b>	Citrato de sodio
<b>4.3</b>	Acetato de sodio
<b>4.6</b>	Acetato de sodio
<b>4.6</b>	Citrato de sodio
<b>5</b>	Acetato de sodio
<b>5.5</b>	Acetato de sodio
<b>5.6</b>	Citrato de sodio
<b>6</b>	Acetato de sodio
<b>6.5</b>	Cacodilato
<b>7</b>	MOPS
<b>7.5</b>	HEPES
<b>8</b>	TRIS
<b>8.5</b>	TRIS

Una vez obtenida la concentración de lisozima óptima y comprobada la estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs, se preparó una bandeja de cristalografía Crystalgen de 24 reservorios en gota colgante, con una concentración de lisozima de 100 mg/mL y una concentración de eosina Y desde 0.25-1.5 mM. Como agente precipitante se usó una disolución saturada de nitrato sódico y bicarbonato sódico a pH 8.4 con un 10 % de acetona como agente estabilizante<sup>31</sup>. El tamaño de gota fue de 10  $\mu$ L, estas condiciones nos sirvió para comprobar la cristalización de lisozima con eosina Y a pH básico (ANEXO - Tabla 4).

También se preparó una bandeja de cristalografía Crystalgen de 24 reservorios en gota colgante, con una concentración de lisozima de 100 mg/mL y una concentración de eosina Y desde 0.25-1.5 mM. Como agente precipitante se usó una concentración de cloruro sódico 1 M en presencia de acetato sódico 0.1 M. El tamaño de gota fue de 10  $\mu$ L. Estas condiciones nos sirvió para comprobar la cristalización de lisozima con eosina Y a pH ácido (ANEXO - Tabla 5).

#### ***D. Capturado de las imágenes del crecimiento de los cristales***

El microscopio se encuentra conectado a un ordenador. Leica Microsystems proporciona un programa llamado Leica LAS EZ que permite visualizar en la pantalla del ordenador todo lo que se vea por el microscopio. Este aparato está equipado con una cámara LEICA IC80 HD que permite fotografiar los cristales para poder comparar su crecimiento a lo largo del tiempo (Figura 9).



**Figura 9.** Cristales de lisozima y eosina Y en gota sentada.

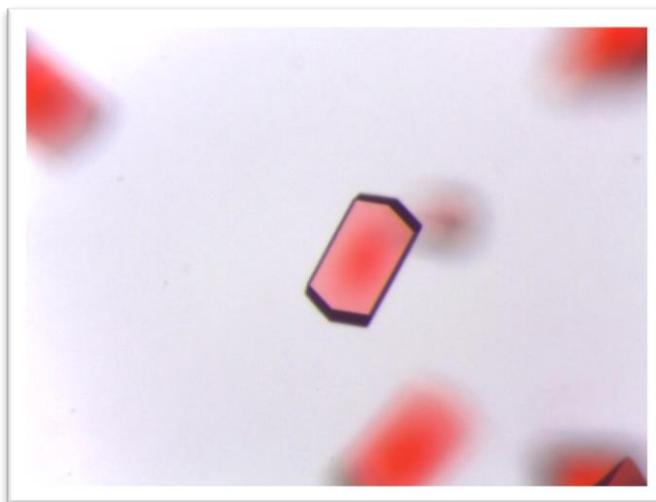
#### ***E. Espectroscopia UV-Visible para determinar las concentraciones y estabilidad del colorante a diferentes pHs***

- Determinación de la concentración de lisozima.

Para la determinación de la concentración de lisozima (previamente centrifugada durante 5 minutos a 14500 rpm) se midió su concentración mediante espectrometría UV-Visible. Se utilizará una recogida de datos entre 240-400 nm, se sabe que el triptófano agrupa al menos tres bandas de absorción bajo el espectro centrado a 280 nm. La cubeta utilizada será de cuarzo de 1 mm de longitud y de 1 mL, en cuanto el blanco utilizado será agua ultra pura.

- Estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs en el tiempo.

Como hemos visto anteriormente en el apartado 3.2.D, se comprobó la estabilidad de la eosina Y a pHs diferentes, pero se observó posteriormente que la eosina Y unida a la lisozima al cabo de dos semanas se decoloraba (Figura 10).



**Figura 10. Cristal de lisozima con eosina Y con decoloración por los bordes del cristal.**

Por lo tanto, se preparó el siguiente experimento para cuantificar la estabilidad de eosina Y con el paso del tiempo y la obtención de su espectro. Se preparó tubos de ensayo con un volumen de 3 mL de diferentes tampones con pHs comprendidos entre 3 y 8.5 pH. Todos los tubos tenían la misma concentración de eosina Y (10  $\mu$ M). Estas disoluciones se guardaron en cámara fría a 4 °C y cerradas para evitar pérdidas para su posterior medida cada 3 días mediante espectrometría UV-Visible y fluorescencia (3.2.F).

***F. Medidas de fluorescencia para determinar la constante de unión y la estabilidad del colorante a diferentes pHs***

La espectroscopia de fluorescencia es una herramienta común para examinar molécula de interés biológico como las proteínas, debido a la fluorescencia intrínseca del triptófano y tirosina y la facilidad de marcaje fluorescente de sitios específicos de unión. En nuestro caso hemos utilizado la fluorescencia intrínseca de la proteína para determinar la unión de la proteína lisozima a eosina Y.

En general, la unión de un ligando L a una proteína P es formulada esquemáticamente como:



donde PL es el complejo formado después de la unión. La constante de equilibrio o unión se expresa como:

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

$$K_B = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} \quad \text{Ecuación 6}$$

También se puede expresar esta constante de equilibrio en términos de constante disociación  $K_D$  de equilibrio inverso como medida de la afinidad de unión:

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} \quad \text{Ecuación 7}$$

A menudo se mide  $K_D$  a través de la fracción de saturación del ligando de unión de proteína, es decir, la relación entre la cantidad de proteína contenida en el ligando  $[PL]$ , a la cantidad total de proteína  $[P]_{tot}$  en la reacción, asumiendo que toda la proteína es libre en la solución o forma un complejo con el ligando, tal que  $[P]_{tot} = [P] + [PL]$ , obtenemos sustituyendo en la ecuación 7:

$$\frac{[PL]}{[P]_{tot}} = \frac{[L]}{[L] + K_D} \quad \text{Ecuación 8}$$

Esta función define una hipérbola rectangular con una representación isométrica de la proteína ocupada totalmente (saturada) por los ligandos cuando  $[L] \gg K_D$ .

Esta unión da una aproximación de la concentración de ligando  $[L]$  igual a la concentración total de ligando  $[L]_{tot}$  ( $[L] \approx [L]_{tot}$ ), este es el caso, por ejemplo, cuando la proteína está a muy baja concentración, lo que permite un eficaz exceso de ligando disponible para todas las medidas de concentración, esta última situación se aplica para la medida de unión a la membrana o a los receptores intracelular, es decir cuando las proteínas aun no son libres de difusión y cuando el volumen completo está disponible para el ligando.  $K_D$  podría así determinarse mediante la concentración del complejo formado en función de  $L$  añadido ya sea directamente por el ajuste hiperbólico usando una regresión no lineal o gráficamente usando una transformada lineal de la Ecuación 8 y por una ecuación similar al tradicional análisis de Scatchard<sup>32</sup>:

$$[PL] = -K_D \cdot \frac{[PL]}{[L]} + [P]_{tot} \quad \text{Ecuación 9}$$

El presente experimento involucra la difusión de un pequeño volumen de proteína libre con el ligando. Se espera que una significativa fracción de ligando añadida a la proteína (especialmente en concentraciones bajas de ligando) se unan como complejo PL (agotamiento del ligando). Sustituyendo  $[L] = [L]_{tot} - [PL]$  y  $[P] = [P]_{tot} - [PL]$  en la ecuación 7, obtenemos:

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

$$K_D = \frac{([P]_{tot} - [PL]) \cdot ([L]_{tot} - [PL])}{[PL]} \quad \text{Ecuación 10}$$

Pudiendo reorganizarse y resolverse como una ecuación cuadrática con [PL], obteniendo:

$$[PL] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ ([P]_{tot} + [L]_{tot} + K_D) - \sqrt{([P]_{tot} + [L]_{tot} + K_D)^2 - 4[P]_{tot} \cdot [L]_{tot}} \right\} \quad \text{Ecuación 11}$$

Mediante este experimento comprobaremos y aprovecharemos el hecho de que la proteína libre presenta una intensidad fluorescente,  $I_o$ , la cual es mucho mayor que la intensidad del complejo,  $I_c$ . Para determinadas concentraciones dadas de proteína y de complejo, el total observado de fluorescencia,  $[P]_{tot} I_{obs}$ , es simplemente la suma del total de fluorescencia de la proteína libre,  $[P] I_o$  y la fluorescencia total de la unión de la proteína con el ligando,  $[PL] I_c$ .

$$[P]_{tot} \cdot I_{obs} = [P] I_o + [PL] I_c \quad \text{Ecuación 12}$$

Esto es válido siempre que realmente existan solo dos posibles estados de emisión en la lisozima, que son, libre o con unión a la eosina Y únicamente, que será el caso de nuestro experimento. Sustituyendo  $[P] = [P]_{tot} - [PL]$ , en la ecuación 12 y recalculando obtendremos:

$$\frac{[PL]}{[P]_{tot}} = \frac{I_o - I_{obs}}{I_o - I_c} = \frac{\Delta I_{obs}}{\Delta I_{sat}} \quad \text{Ecuación 13}$$

donde  $\Delta I_{obs}$  es la amortiguación de fluorescencia observada para una concentración particular de ligando y  $\Delta I_{sat}$  es el máximo de amortiguación que observa para una concentración saturada de ligando.

Sustituyendo la ecuación 13 en la ecuación 11 obtendremos una ecuación para el amortiguamiento relativo, donde todos los parámetros distintos a  $K_D$  ( $[P]_{tot}$  y  $[L]_{tot}$ ) o medidas ( $[\Delta I_{sat}]$  y  $[\Delta I_{obs}]$ ) son conocidos.

$$\frac{\Delta I_{obs}}{\Delta I_{sat}} = \frac{1}{2[P]_{tot}} \cdot \left\{ ([P]_{tot} + [L]_{tot} + K_D) - \sqrt{([P]_{tot} + [L]_{tot} + K_D)^2 - 4[P]_{tot} \cdot [L]_{tot}} \right\} \quad \text{Ecuación 14}$$

Sabemos también que:

$$[P] = [P]_{tot} - n \cdot Y \cdot [PL] \quad \text{Ecuación 15}$$

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

donde  $n$  son los sitios de unión de la lisozima en nuestro caso, e  $Y = \frac{\Delta I_{obs}}{\Delta I_{sat}}$  (fracción de saturación).

Mediante fluorescencia se realizó dos experimentos: el primer experimento sirvió para comprobar la descomposición de la eosina Y en lisozima y el segundo experimento sirvió para comprobar la unión del ligando eosina Y a la lisozima.

- Descomposición de eosina a diferentes pHs con el paso del tiempo.

Para la medida de estabilidad mediante fluorescencia<sup>17</sup>, se optó por una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de eosina Y a diferentes pH, se utilizaron las mismas condiciones que en espectroscopia UV-Visible (apartado 3.2.E). Todas estas medidas se recogieron mediante un fluorímetro que fue configurado con una apertura de emisión y excitación de 2.5 mm y medido con una excitación,  $\lambda_{excitación}$ , de 490 nm y de emisión,  $\lambda_{emisión}$ , de 500 a 700 nm; para su conservación se guardaron las disoluciones en cámara fría a temperatura 4°C y en oscuridad para su posterior medida cada 3 días.

- Unión lisozima a eosina Y.

Se prepararon varias muestras para dos condiciones: una a medio ácido y otra a medio básico, pH 4.5 y 7.4 respectivamente, para las cuales se utilizó tubos de ensayo. Para su preparación, el volumen de disolución fue de 3 mL y para su medición se utilizó cubetas de cuarzo debido a que otros materiales como el plástico absorben la radiación a longitudes de onda en la zona del UV.

Para el caso de la condición en medio ácido, se preparó a una temperatura de 25 °C 17 muestras, 16 de ellas con una concentración de lisozima (2.5  $\mu\text{M}$ ) y una de ellas sin lisozima para comprobar el blanco (intensidad de fluorescencia en ausencia del fluoróforo), se añadió concentraciones crecientes de eosina Y (0-100  $\mu\text{M}$ ) en 0.1 M de tampón acetato sódico (pH 4.5). El espectro de emisión de fluorescencia fue recogido utilizando una apertura de emisión y excitación de 4 mm y una excitación,  $\lambda_{excitación}$ , de 280 nm y de emisión,  $\lambda_{emisión}$ , de 300 a 500 nm.

En cuanto al medio básico (Figura 11), se preparó a una temperatura de 25°C 23 muestras, 22 de ellas con una concentración de lisozima (2.5  $\mu\text{M}$ ) y una de ellas sin lisozima para comprobar también el blanco, se añadió concentraciones crecientes de eosina (0-150  $\mu\text{M}$ ) en 0.1 M de tampón HEPES (pH 7.4). El espectro de emisión de

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

fluorescencia fue recogido utilizando una apertura de emisión y excitación de 4 mm y una excitación,  $\lambda_{\text{excitación}}$ , de 280 nm y de emisión,  $\lambda_{\text{emisión}}$ , de 300 a 500 nm.

Para comprobar si la unión entre lisozima y eosina Y puede verse modificada por la concentración de sales utilizadas en los experimentos de cristalización, se llevaron a cabo dos experimentos a alta fuerza iónica (1 M cloruro sódico) a pH 4.5 y 7.4. La concentración de lisozima fue de 2.5  $\mu\text{M}$  y la concentración de eosina fue de 0-100  $\mu\text{M}$ . La configuración del fluorímetro fue la siguiente: apertura de emisión y excitación de 4 mm, medido con una excitación,  $\lambda_{\text{excitación}}$ , de 280 nm y de emisión,  $\lambda_{\text{emisión}}$ , de 300 a 500 nm. El volumen de disolución fue de 3 mL y para su medida se utilizó cubetas de cuarzo.



**Figura 11. Tubos de ensayo con concentraciones crecientes de eosina (0-150  $\mu\text{M}$ ) en medio básico.**

### ***G. Soaking***

El soaking de cristales con ligandos es a menudo el método de elección para obtener cristales de complejos de proteína-ligando debido a la facilidad de este método. Sin embargo, hay varios factores que considerar. Los cristales pueden ser frágiles, por lo que se requiere estabilizar el soaking en buffer, la presencia de aditivos puede ser necesaria para lograr una unión eficaz del ligando durante el soaking. Por último, es posible que existan cristales de un ligando complejo, por lo que intercambiar el ligando original con un ligando diferente (soaking de reemplazo) sería necesario. Aunque el

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

soaking de cristales con ligandos puede ser el método de elección para una proteína en particular, es preferible si es posible validar experimentalmente<sup>33</sup>.

Por lo tanto, se preparó dos bandejas Crystalgen de 24 reservorios, una de ellas en gota colgante con un volumen de gota de 10  $\mu\text{L}$  y otra en gota sentada con un volumen de gota de 50  $\mu\text{L}$ . La concentración de lisozima fue de 100 mg/mL, como agente precipitante se utilizó dos condiciones, una condición a pH 4.6 (medio ácido) y otra condición a pH 8.4 (medio básico), para medio ácido la concentración de cloruro sódico fue de 0.6-1 M en presencia de acetato sódico (0.1 M) pH 4.6, en presencia y ausencia de PEG 4000 al 30 %; para medio básico se utilizó una disolución saturada de nitrato sódico en presencia de bicarbonato sódico a pH 8.4, en presencia y ausencia de PEG 4000 al 30 % (ANEXO - Tabla 6). La concentración de eosina Y fue:

- Columna 2 y 3 se le añadió 1.5  $\mu\text{M}$  de eosina Y.
- Columna 4 se le añadió 3  $\mu\text{M}$  de eosina Y.
- Columna 5 se le añadió 4.3  $\mu\text{M}$  de eosina Y.
- Columna 6 se le añadió 1.5  $\mu\text{M}$  de eosina Y cada día durante 5 días.

Para verificar el soaking de cristales a baja concentración de lisozima (30-40 mg/mL) se preparó una bandeja Crystalgen de 24 reservorios en gota colgante con un volumen de gota de 10  $\mu\text{L}$ . Como agente precipitante se utilizó dos condiciones (medio ácido y básico), para medio ácido la concentración de cloruro sódico fue de 0.6-1 M en presencia de acetato sódico (0.1 M) pH 4.6 y PEG 4000 al 30 %; para medio básico se utilizó una disolución saturada de nitrato sódico en presencia de bicarbonato sódico a pH 8.4 y con PEG 4000 al 30 %, con un 10 % de acetona como agente estabilizante (ANEXO - Tabla 7). Se añadió las siguientes concentraciones de eosina Y a los cristales de mejor calidad obtenidos:

- B2 se le añadió 1.5  $\mu\text{M}$  de eosina Y.
- B5 se le añadió 1.5  $\mu\text{M}$  de eosina Y.

## 4. Resultados y Discusión

Inicialmente como hemos visto en el apartado 3.2.A, se preparó una bandeja Crystalgen con diferentes condiciones y se comprobó que la lisozima y la lisozima-eosina Y cristalizaban en menos de 6 horas y 24 horas respectivamente.

### 4.1. Optimización de cristales de lisozima-eosina Y

A partir del experimento propuesto en el apartado 3.2.B, ANEXO - Tabla 1, se observó que la concentración óptima para la cristalización de lisozima es de 100 mg/mL (7 mM).

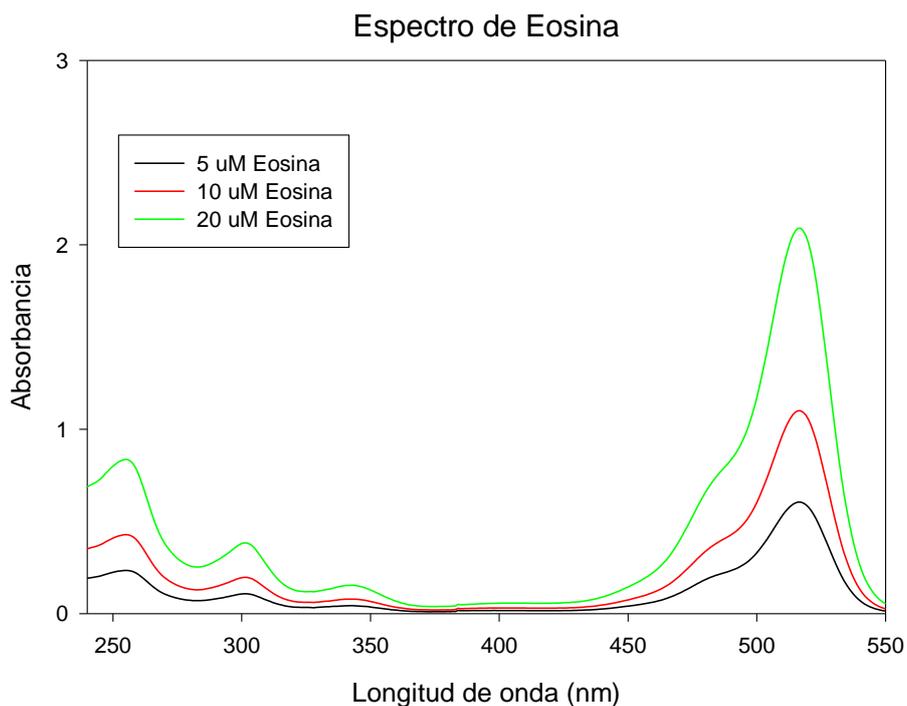
Posteriormente para optimizar los cristales de lisozima como vemos en el apartado 3.2.C, se preparó diferentes condiciones (medio ácido ANEXO - Tabla 2 y medio básico ANEXO - Tabla 3). Para medio ácido los resultados obtenidos fueron que la concentración óptima de agente precipitante sería 1 M de cloruro sódico, donde los cristales de mejor calidad y tamaño, se obtenían a una concentración de lisozima de 100 mg/mL. En cuanto a medio básico se comprobó que los cristales que se formaban con mejor calidad y tamaño serían con una concentración de 100 mg/mL de lisozima al igual que en medio ácido.

Una vez comprobada la concentración de lisozima óptima para ambos medios, se comprobaron si estas condiciones eran óptimas para el colorante eosina Y (Gráfica 1). Para ello primero se calculó la concentración óptima de eosina Y mediante espectroscopia UV-Visible. Mediante la ley de Lambert-Beer se obtuvo que:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot [Eosina]$$

$$[Eosina] = \frac{1}{86000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cong 10 \mu\text{M}$$

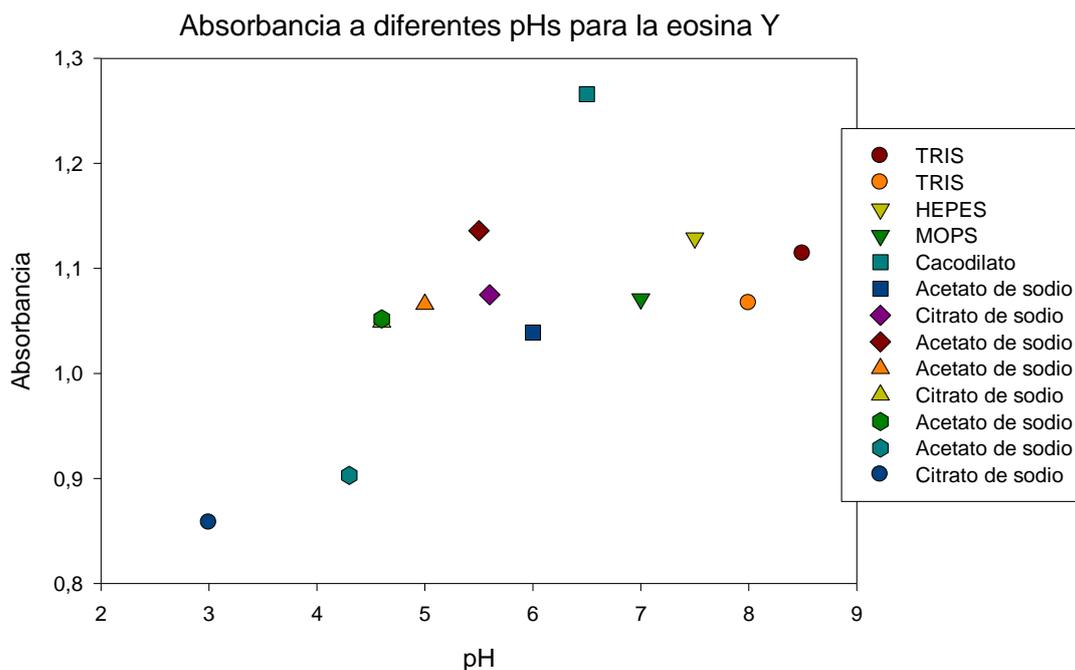
## Cristalización de lisozima en presencia de eosina



**Gráfica 1. Cálculo de la concentración óptima de eosina Y en negro concentración de eosina Y 5 μM, en rojo concentración de eosina Y 10 μM y en verde concentración de eosina Y 20 μM.**

Se comprobó que la concentración de eosina Y óptima para medir los espectros de UV-Visible es de 10 μM. A continuación, realizamos un barrido de pHs (Gráfica 2) para estudiar el comportamiento del colorante eosina Y. Se registró la absorbancia para un barrido de longitudes de onda entre 240-550 nm.

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina



**Gráfica 2. Comportamiento del colorante eosina Y a diferentes pHs mediante espectroscopia.**

- Cristalización de lisozima con eosina Y a pH 8.4.

A continuación, y como vemos en el apartado 3.1.C, también hemos estudiado la cristalización de lisozima en presencia del colorante eosina Y a pH básico. Para ello, se preparó como agente precipitante una disolución de nitrato sódico saturado y bicarbonato sódico (pH 8.4) al cual posteriormente se le añadió acetona al 10 % como agente estabilizante. La concentración de lisozima fue 100 mg/mL y la concentración de eosina Y varía entre 0.25-1.5 mM. Este barrido de concentraciones se realizó para determinar la concentración óptima de colorante sin que precipitara en la gota de cristalización. Es importante señalar que durante el proceso de cristalización hay que evitar la precipitación de otros componentes de la disolución, ya que ello puede modificar el comportamiento de la cristalización de la proteína de interés.

Los experimentos realizados nos indicaron que una concentración de eosina Y superior a 1 mM precipitaba la proteína. Por ellos se estimó una concentración óptima de eosina Y en medio básico de 0.25 mM y 0.5 mM para evitar su precipitación.

- Cristalización de lisozima con eosina Y a pH 4.6.

Como vemos en el apartado 3.1.C, para comprobar la cristalización del colorante eosina Y con lisozima a pH ácido, se utilizó como agente precipitante cloruro sódico 1

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

M en presencia de acetato sódico 0.1 M (pH 4.6), donde la concentración de lisozima fue 100 mg/mL y la concentración de eosina Y se varió entre 0.25-1.5 mM.

El resultado fue que a una concentración de eosina Y superior a 1 mM precipitaba la proteína. Se estimó una concentración óptima de eosina Y a 0.5 mM para evitar su precipitación.

### **4.2. Estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs**

Después de 1 semana los cristales con eosina Y empezaron a decolorarse en los bordes (Figura 12). Para observar si la eosina Y se descompone con el paso del tiempo, se realizó varios ensayos a diferentes pHs mediante espectroscopia UV-Visible y fluorescencia (apartados 3.2.E y 3.2.F respectivamente),

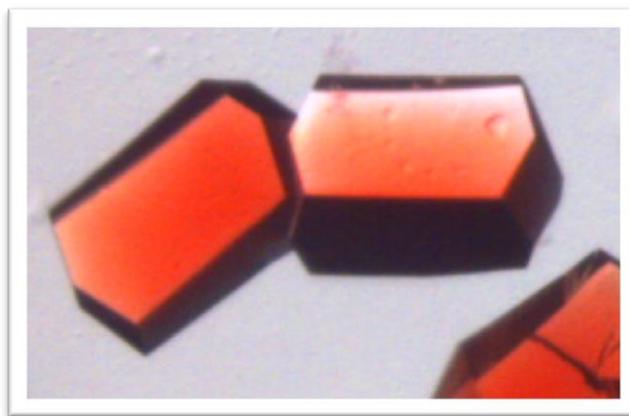
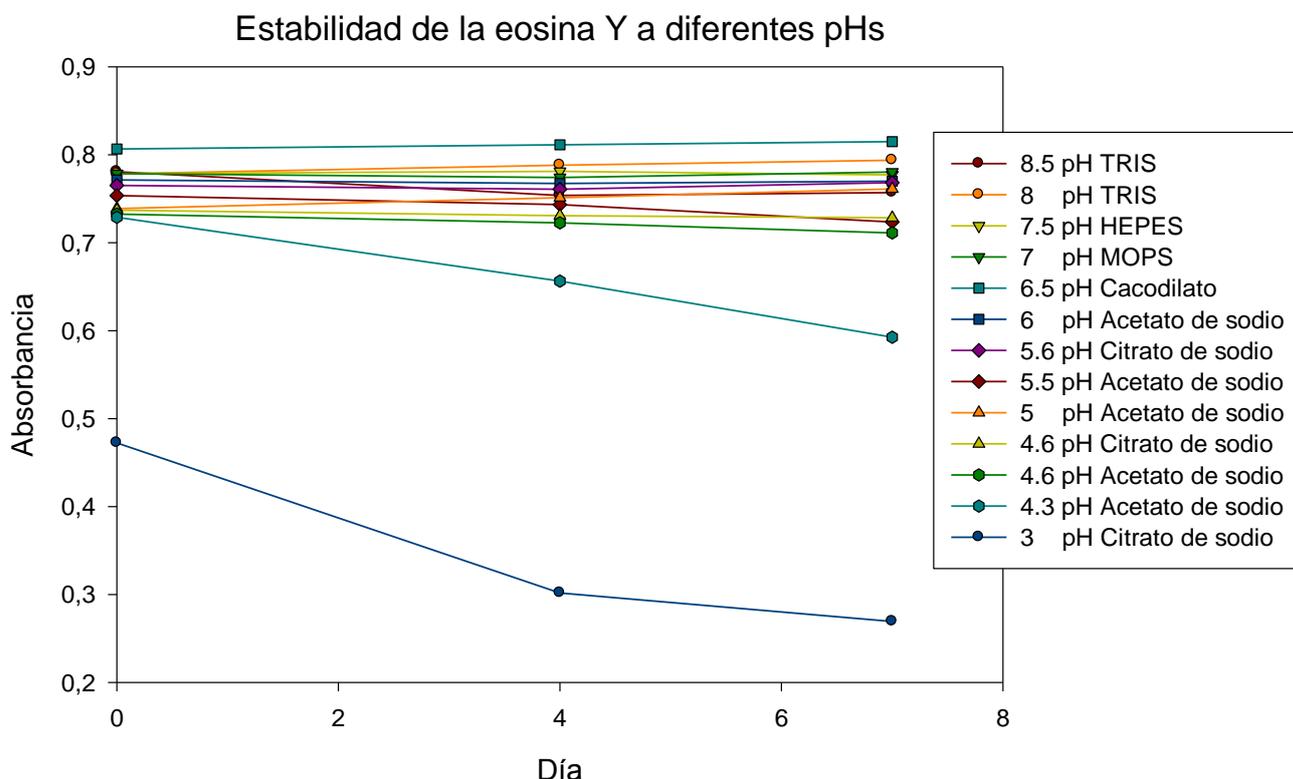


Figura 12. Pérdida de coloración de cristales de lisozima con eosina Y.

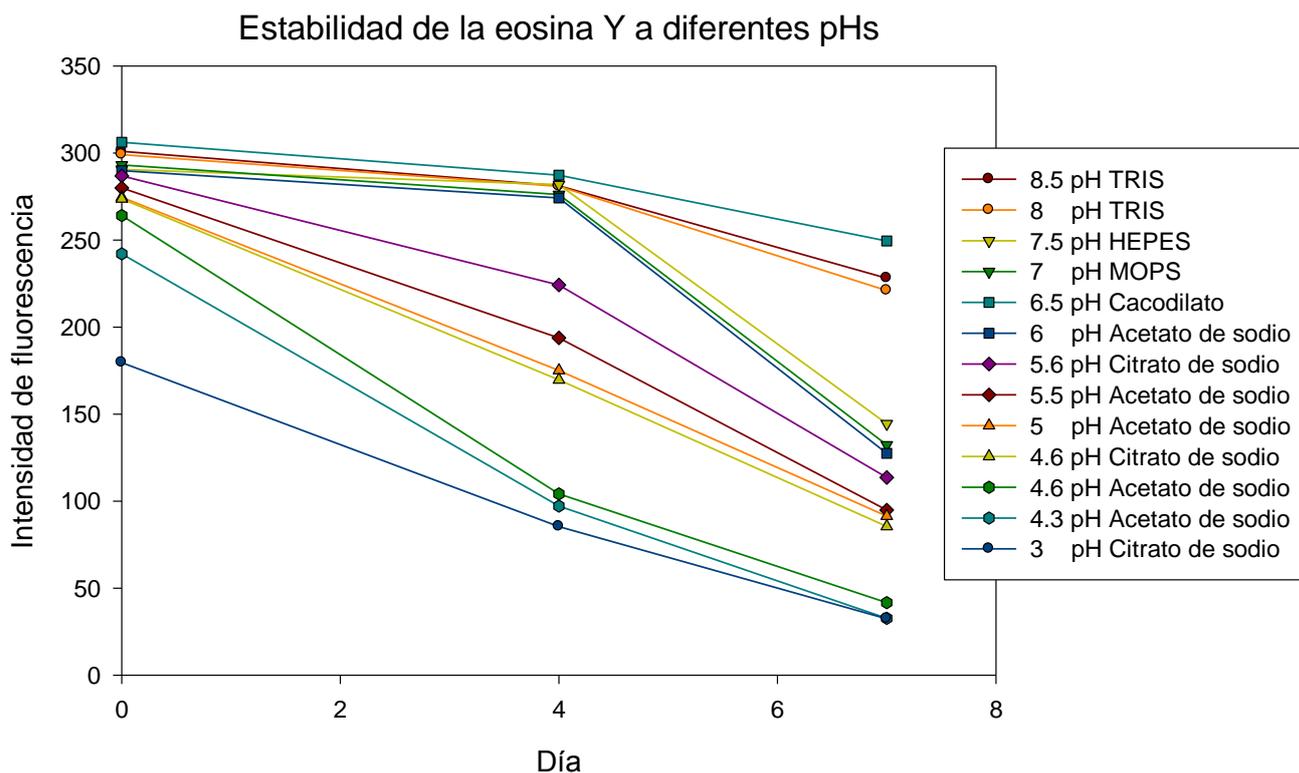
El análisis de las medidas mediante espectroscopia UV-Visible se recoge en la Gráfica 3:



Gráfica 3. Estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs con el paso del tiempo mediante espectroscopia UV-Visible.

Se puede observar mediante este gráfico, que la eosina Y es estable a pHs básicos y que a pHs ácidos existe una menor estabilidad, este efecto fue muy notable en menos de una semana para pHs por debajo de 4.6.

Como hemos descrito anteriormente se realizó el mismo experimento, pero utilizando fluorescencia donde las mediciones son de mayor sensibilidad (Gráfica 4) que en espectroscopia UV-Visible, y se pudo observar cambios del colorante que no son detectados en la técnica de UV-Visible. Se comprobó que la eosina Y con el paso del tiempo se descompone dando lugar a la decoloración en los cristales de lisozima, esta descomposición fue más pronunciada a pHs ácidos.



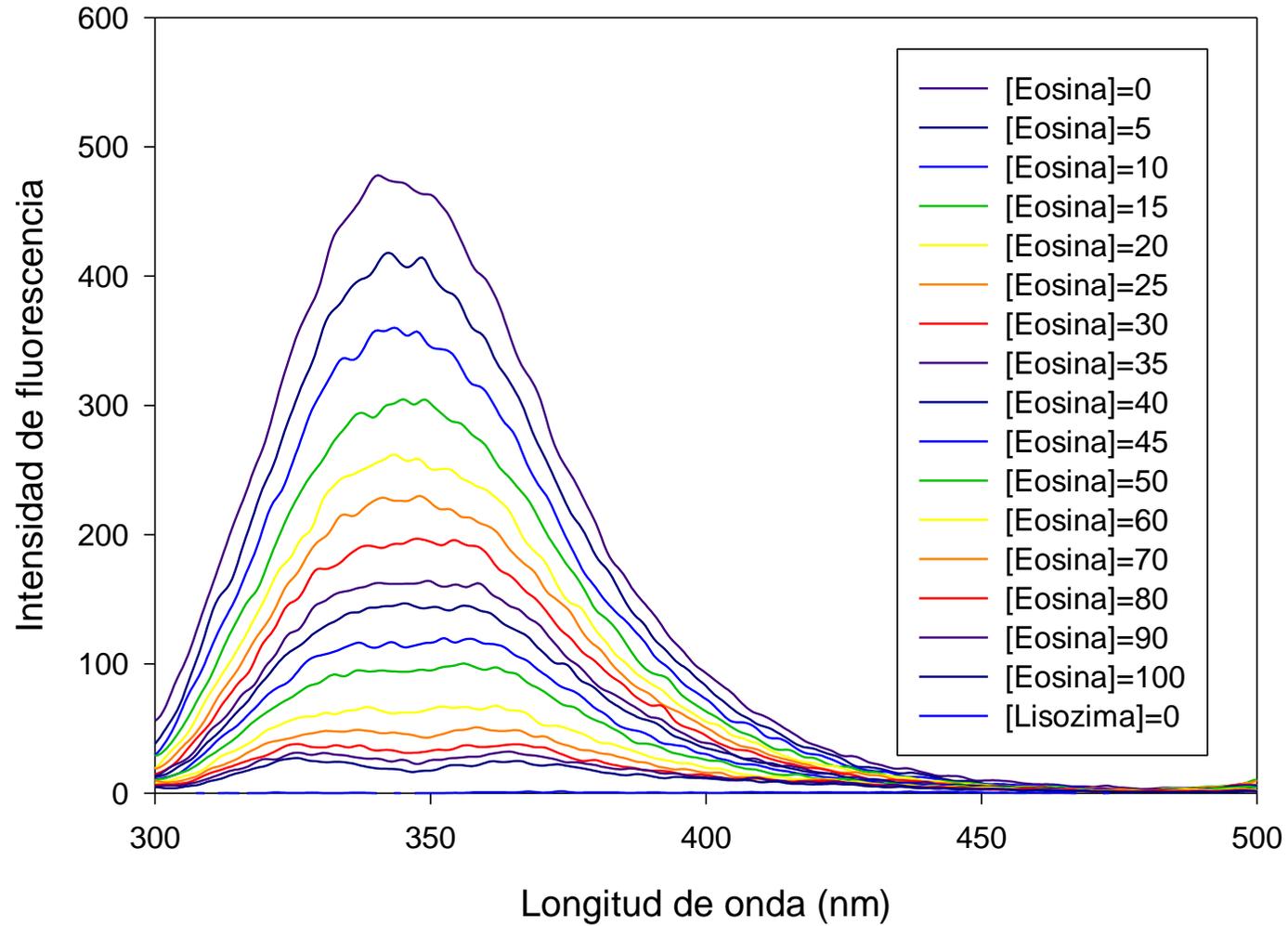
Gráfica 4. Estabilidad de la eosina Y a diferentes pHs con el paso del tiempo mediante fluorimetría.

### 4.3. Unión lisozima-eosina Y

Previamente al cálculo de la constante de unión de la eosina Y a la lisozima, comprobamos que las concentraciones de eosina Y, lisozima y de agentes precipitantes fuesen las óptimas. Para ello, mediante fluorescencia se hizo un barrido de concentraciones en condiciones básicas (ANEXO - Tabla 8) y ácidas (ANEXO - Tabla 9), gracias al cual se comprobó que las concentraciones eran las correctas.

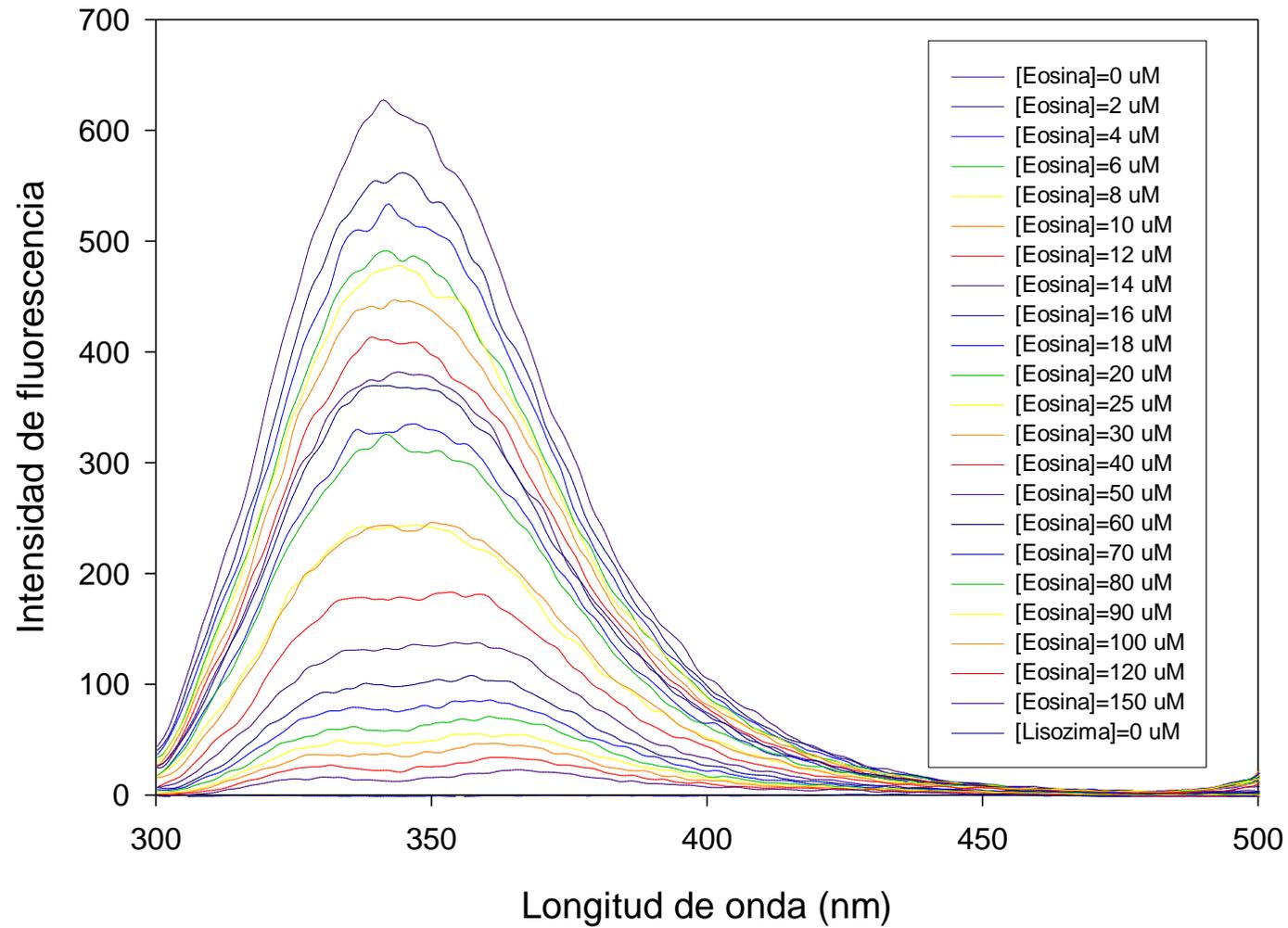
Una vez realizada esta comprobación, como hemos visto anteriormente en el apartado 3.2.F, se realizó dos experimentos para comprobar la unión existente entre lisozima y eosina Y en medio ácido y básico (Graficas 5 y 6). También para comprobar si la unión de lisozima y eosina Y puede verse modificada por la fuerza iónica, se realizó dos experimentos a alta fuerza iónica intentando reproducir las condiciones en las que se cristaliza la proteína en presencia del colorante.

### Unión a pH 4.5



Gráfica 5. Representación de los datos obtenidos para fluorimetría de la unión lisozima-eosina Y para medio ácido.

### Unión a pH 7.4

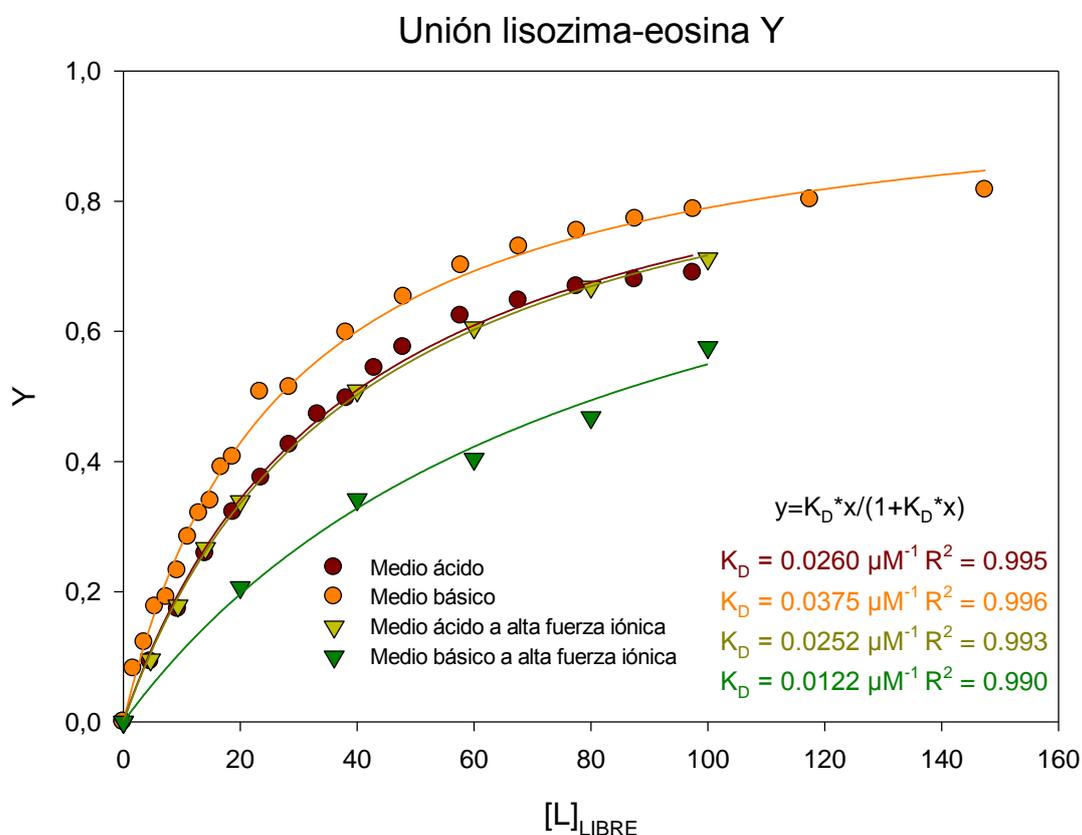


Gráfica 6. Representación de los datos obtenidos para fluorimetría de la unión lisozima-eosina Y para medio básico.

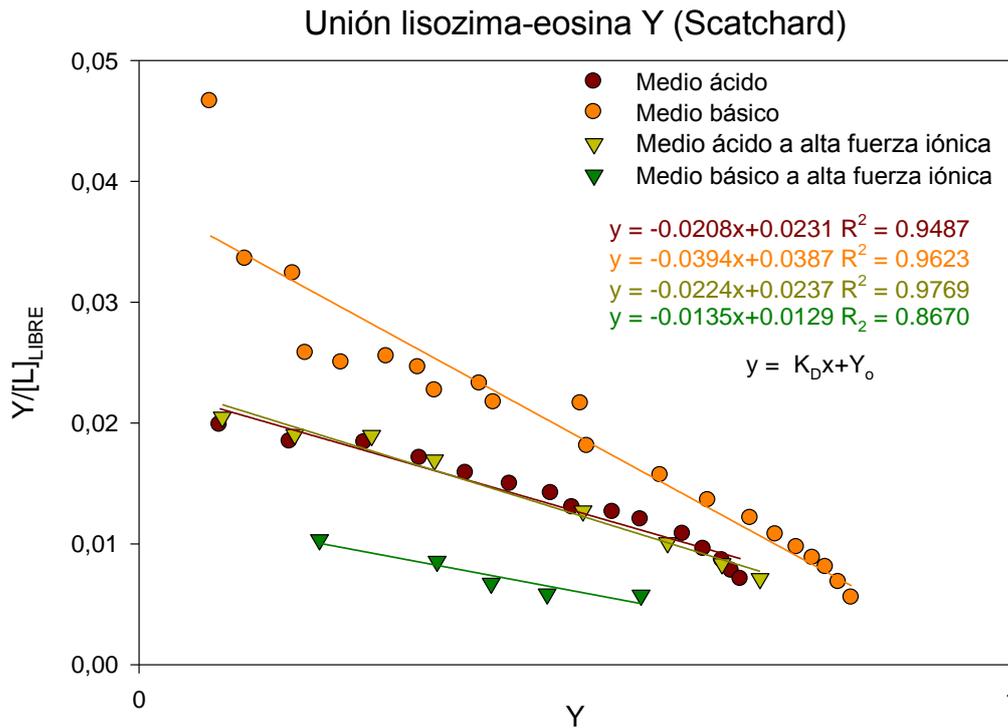
## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

Para el cálculo de la constante de unión  $K_D$  entre lisozima y eosina  $Y$ , se representó la fracción de saturación ( $Y$ ) frente a concentración de ligando libre ( $[L]_{LIBRE}$ ) y se ajustó hiperbólicamente, los parámetros fueron calculados como se muestra en el apartado 3.2.F. En este ajuste se tuvo en cuenta que la longitud de onda a la que se mide el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de la proteína, se produce la absorción por parte del colorante (ver espectro de UV-Visible de la Gráfica 1). Esto dificulta la medida de la intensidad de fluorescencia de la proteína saturada.

Por ello en el ajuste se aplicó un método iterativo que permitía corregir el valor de la saturación (Gráfica 7). También se realizó un ajuste lineal utilizando la representación de Scatchard<sup>32</sup> (Gráfica 8).



**Gráfica 7.** Representación gráfica de concentración de ligando libre frente eje y fracción de saturación mediante ajuste hiperbólico para la unión de lisozima-eosina  $Y$ , en rojo la condición en medio ácido, en naranja la condición en medio básico, en amarillo la condición en medio ácido a alta fuerza iónica y en verde la condición en medio básico a alta fuerza iónica.



Gráfica 8. Representación gráfica del ajuste lineal por Scatchard para el cálculo de la unión de lisozima-eosina Y, en rojo la condición en medio ácido, en naranja la condición en medio básico, en amarillo la condición en medio ácido a alta fuerza iónica y en verde la condición en medio básico a alta fuerza iónica.

El resultado mediante el ajuste lineal de Scatchard nos proporcionó información sobre el número de sitios de unión ( $n$ ), el cual sería igual a 1 y que la constante de unión,  $K_D$ , entre lisozima y eosina Y es mayor a pH básico que ácido. Además, se comprobó que un medio con alta fuerza iónica, afecta a la constante de unión entre lisozima y eosina Y, disminuyéndola. Obtenemos como conclusión que lisozima une a la eosina Y pero con una constante de unión sensiblemente más baja a altas fuerzas iónicas.

Estos resultados explican la dificultad de obtener los cristales de lisozima con la eosina Y unida como veremos en el apartado siguiente, ya que las condiciones para cristalizar la proteína requieren altas fuerzas iónicas para apantallar la carga positiva de las muchas argininas que tiene la lisozima.

#### 4.4. Estructura

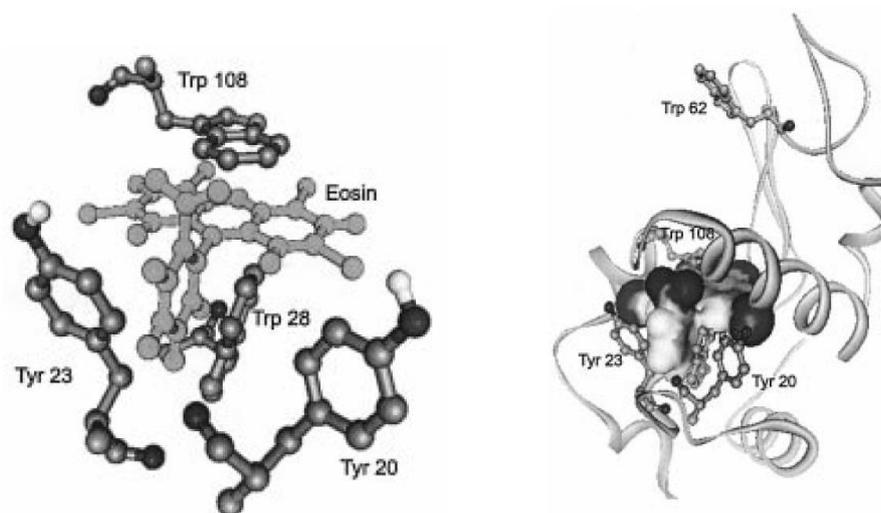
Como hemos visto en el apartado 3.2.G, se preparó varias muestras en medio ácido y medio básico (ANEXO - Tabla 6 y ANEXO - Tabla 7) donde se realizó un soaking con eosina Y en los cristales de lisozima. Este proceso se llevó a cabo para evitar la

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

descomposición del colorante. Por ello los cristales se sometieron a soaking en presencia del colorante uno o dos días antes de congelarlos para su posterior medida. Los cristales de mejor calidad fueron enviados al sincrotrón Alba de Barcelona para difractarlos y proceder al estudio de la estructura de la lisozima en presencia de eosina Y. Los resultados obtenidos por la difracción por rayos X en el sincrotrón Alba de Barcelona, nos mostró la estructura de la lisozima con alta resolución (1 Å), pero sin presencia del colorante unido a la proteína en ninguno de los cristales medidos en los dos pHs ensayados.

Aunque la tinción era evidente, lo que indica que el colorante está incorporado al cristal, la estructura no permite determinar donde se une la molécula de eosina Y. La coloración puede explicarse por el colorante atrapado en la red cristalina, pero con interacciones inespecíficas, por ejemplo, con las múltiples argininas presentes en la superficie de la proteína. Esto es posible debido al gran contenido de solvente de los cristales de proteína, que en algunos casos supera el 50 %, que permite la difusión e interacción inespecífica de la molécula en el cristal.

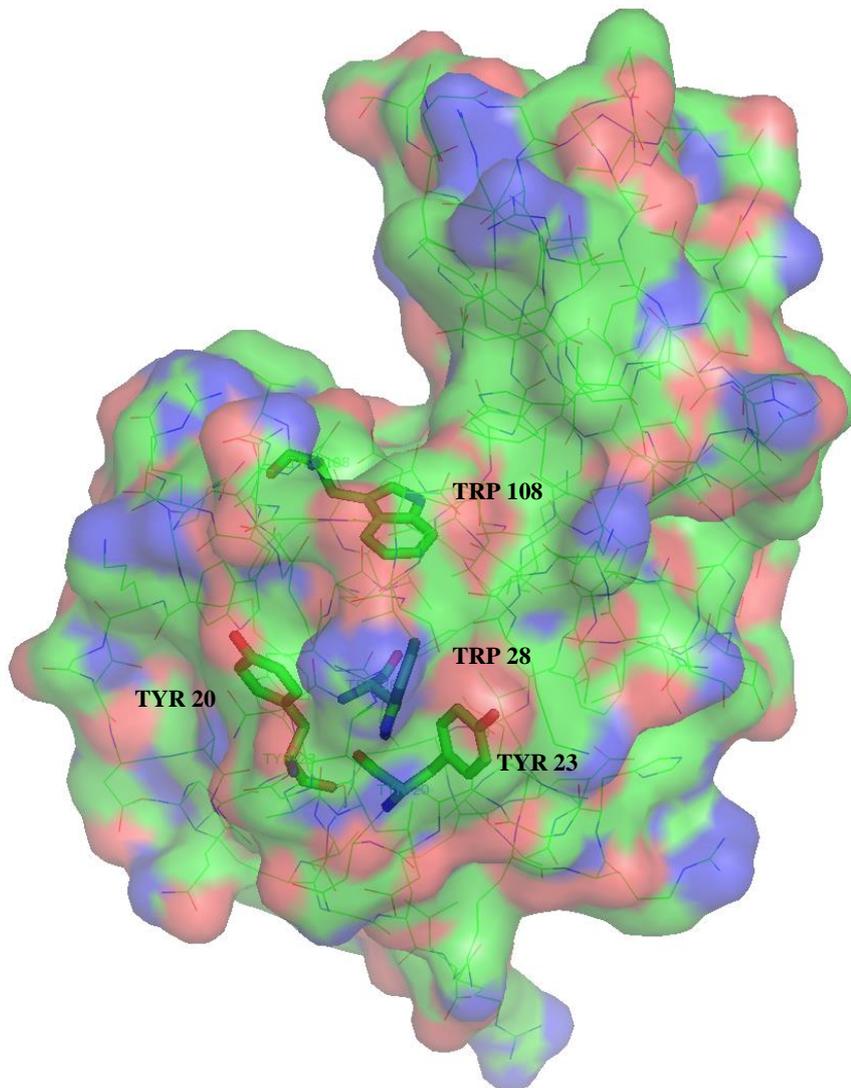
Aunque no se ha determinado estructuralmente el sitio de unión de la eosina Y, según Xanthipe J. Jordanides et Al<sup>34</sup>, la eosina Y se une mediante fuerzas de Van der Waals a un bolsillo hidrofóbico definido por los aminoácidos siguientes: triptófanos 28 y 111, tirosina 22 y metionina 105, siendo la eosina Y coplanar con los triptófanos 108 y 62 y formando dos puentes de hidrogeno con la tirosina 20 y 23 (Figura 13).



**Figura 13. La estructura del complejo de lisozima unida al complejo eosina Y descrita por Baugher (izquierda)<sup>35</sup> y la estructura de rayos x del cristal de lisozima con eosina (derecha)<sup>36</sup>.**

Cristalización de lisozima en presencia de eosina

Mediante el uso de programas de modelado de estructuras como Pymol, observamos que esta unión no es posible ya que este “supuesto” bolsillo hidrofóbico no existe (Figura 14).



**Figura 14.** Estructura obtenida por Pymol de 2LYZ. Señalado mediante barras se muestran los triptófanos 28 y 108, y las tirosinas 20 y 23.

La molécula de eosina Y es de un tamaño relativamente grande con un área de superficie polar de  $89.5 \text{ \AA}^2$  y un área de superficial molecular de  $453.40 \text{ \AA}^2$ . Por ellos

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

necesita un bolsillo que cumpla las características adecuadas de tamaño y potenciales interacciones para su unión. Mediante CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of proteins), utilizando el servidor web (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.php>) se obtuvo información del área y del volumen de los bolsillos hidrofóbicos que existen en la estructura cristalina de lisozima (Tabla 3).

**Tabla 3. Bolsillos hidrofóbicos pertenecientes a la lisozima (2LYZ).**

Bolsillo hidrofóbico	Área (Å <sup>2</sup> )	Volumen (Å <sup>3</sup> )	Aminoácidos
<b>1</b>	26.5	12.5	GLY 49, THR 51, ASP 66, ARG 68
<b>2</b>	28.9	14.5	ALA 31, GLU 35, LEU 56, TRP 108
<b>3</b>	5.1	9.4	TRP 62 y 63, ASN 103
<b>4</b>	32.4	17	ASN 65, ASP 66, GLY 67, THR 69, SER 72
<b>5</b>	43.2	25.2	TYR 53, GLY 54, LEU 56, ILE 58, SER 91
<b>6</b>	57.8	43.3	ASP 48, SER 50, ARG 61, THR 69, PHO 70 GLY 71
<b>7</b>	60.8	55.3	TRP 63, ILE 98, ASP 101, GLY 102 y 104, ASN 103, ALA 107
<b>8</b>	43.6	25	TRP 28 y 108, ALA 31, LEU 56, MET 105
<b>9</b>	67.9	51.2	CYS 76 y 94, ILE 78, LEU 83, ALA 90, ASN 93
<b>10</b>	96.6	71	LEU 8, MET 12, ALA 32, ILE 55 y 88, LEU 56, SER 91, VAL 92
<b>11</b>	126.2	72.9	THR 40, ILE 55 y 88, ALA 82 y 90, LEU 83, SER 85 y 91, ASP 87
<b>12</b>	123.8	148.1	GLU 35, ASP 52, GLN 57, ILE 58 y 98, ASN 59, TRP 63 y 108, ALA 107, VAL 109

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

Con esta información se pudo descartar los bolsillos hidrofóbicos que carecían de dicha área, por lo tanto, sabiendo que la eosina Y interacciona con el triptófano 62 y 108, se propone en este trabajo un sitio de unión para la molécula eosina Y en los cristales de lisozima (Figura 15):

- Bolsillo hidrofóbico con un área de  $123.8 \text{ \AA}^2$  y volumen de  $148.1 \text{ \AA}^3$ , formado por los aminoácidos siguientes: ácido glutámico 35, ácido aspártico 52, glutamina 57, isoleucina 58 y 98, asparagina 59, triptófano 63 y 108, alanina 107 y valina 109.

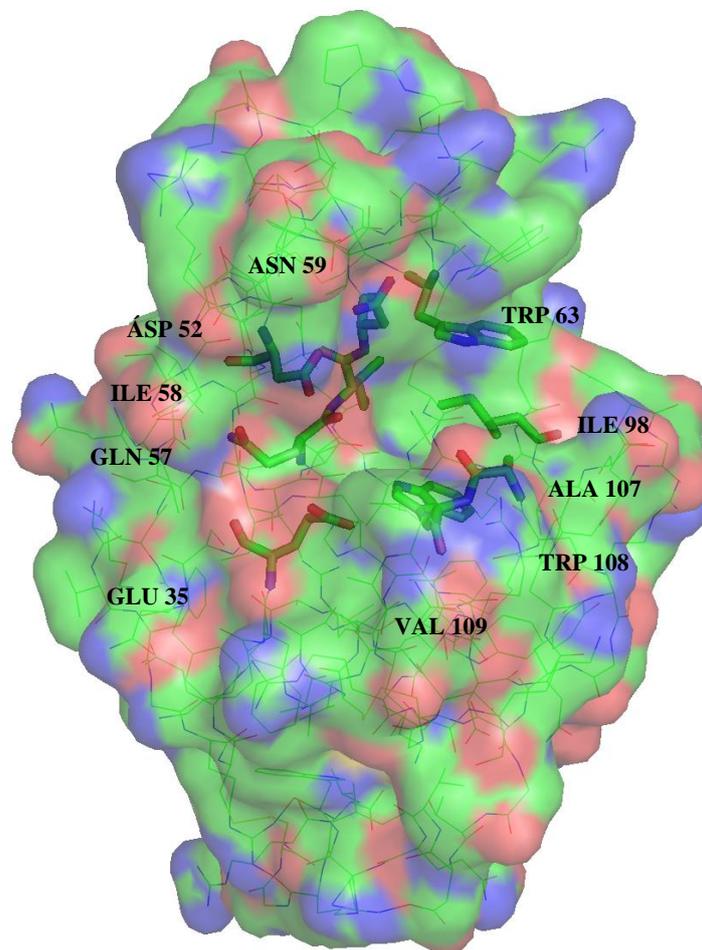


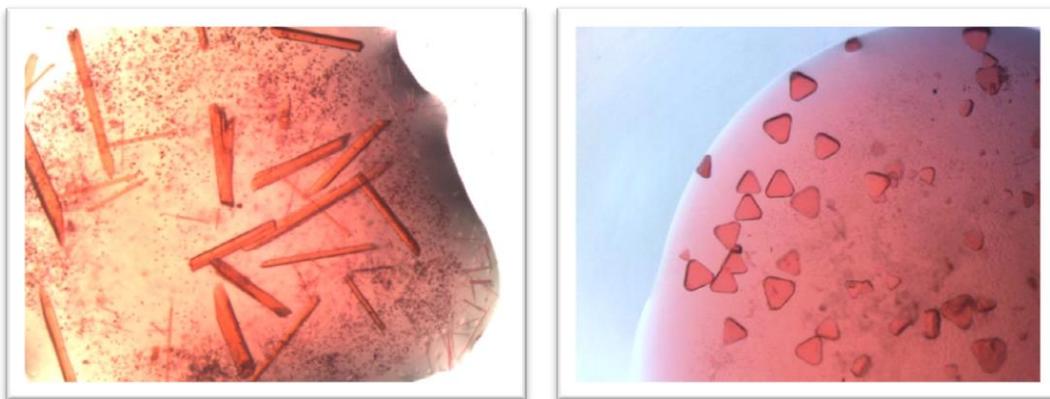
Figura 15. Estructura y localización del bolsillo hidrofóbico propuesto con un área de  $123.8 \text{ \AA}^2$  y un volumen de  $148.1 \text{ \AA}^3$ .

## Cristalización de lisozima en presencia de eosina

Este bolsillo permitiría la unión de una molécula del tamaño del colorante eosina Y y puede explicar tanto las interacciones de los anillos aromáticos del colorante con los residuos triptófano responsables de la fluorescencia.

Como resultado adicional de los estudios realizados con el colorante eosina Y y lisozima, comprobamos que los cristales de otras proteínas que no unen la eosina Y, como Abl-SH3 y la TSG101-UEV, todos ellos mostraba una tinción rojiza al ser añadido el colorante en la gota de cristalización. En este caso, al igual que se ha propuesto para la lisozima, la eosina Y está presente en los canales de agua de los cristales de estas proteínas. El estado de la molécula de eosina Y en estos canales de agua es de constante movimiento, y por ello no se encontró el colorante unido en su estructura mediante difracción de rayos X (Figura 16).

Estos resultados nos permiten proponer un método rápido y selectivo para comprobar si los cristales que aparecen en la gota se tratan de proteína o son cristales de sales. Estos últimos no se colorean por interacción preferente con el colorante, por lo que su color no variará.



**Figura 16. Proteínas Abl-SH2 (izquierda) y TSG101-UEV (derecha) en las cuales se añadió eosina Y.**

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



## 5. Conclusiones / Conclusions

- ❖ La estabilidad del colorante eosina Y en presencia de lisozima disminuye con el paso del tiempo, siendo más notable esta disminución a pHs ácidos.
  - ❖ La constante de unión en el complejo lisozima-eosina Y, es mayor a pH básico que ácido.
  - ❖ La unión entre lisozima y eosina Y se ve afectada por la fuerza iónica, disminuyendo sensiblemente la constante de unión a pH básico a alta fuerza iónica.
  - ❖ Se forman cristales de lisozima en presencia de eosina Y mediante difusión por vapor, estos cristales muestran una tinción rojiza debido a la eosina Y, pero la molécula de eosina Y no aparece en la estructura resuelta mediante difracción de rayos X debido a la disminución de la constante de unión entre lisozima y eosina Y a alta fuerza iónica.
- 
- ❖ The Eosin Y dye stability decreases in presence of lysozyme over time, being most notably this decrease at acid pHs.
  - ❖ The binding constant of the lysozyme-eosin Y complex is higher at basic pH than at acidic pH.
  - ❖ The binding between lysozyme and eosin Y is affected by ionic strength, decreasing the binding constant significantly at basic pH in high ionic strength.
  - ❖ Crystals of lysozyme are formed in the presence of eosin Y by vapor diffusion, these crystals show a reddish staining due to eosin Y, but the molecule of eosin Y does not appear in the structure determined by X-ray diffraction due to the decrease in the binding constant between lysozyme and eosin Y at high ionic strength.

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



## 6. Referencias

- <sup>1</sup>Fleming, A. *On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc. R. Soc. Lond.* **1922** B 93, 306–317.
- <sup>2</sup>Thompson, R. *Lysozyme and its relation to the antibacterial properties of various tissues and secretions. Arch. Pathol.* **1940**, 30, 1096–1134.
- <sup>3</sup>Maurois, A. *The Life of Sir Alexander Fleming. Penguin, London.* **1940**.
- <sup>4</sup>Wetter, L. R., Deutsch, H. F. *Immunological studies on egg white proteins IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. J. Biol. Chem.* **1951**, 192, 237–242.
- <sup>5</sup>Canfield, R. E. *The amino acid sequence of egg white lysozyme. J. Biol. Chem.* **1963**, 238, 2698–2707.
- <sup>6</sup>Jolles, J., Jauregui-Adell, J., Jolles, P. *The chemical structure of hen's egg-white lysozyme: detailed study. Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 78, 668–689.
- <sup>7</sup>José Antonio Gavira Gallardo. *Cristalización de proteínas en geles por métodos contradifusivos. CSIC Universidad de Granada.* **2000**.
- <sup>8</sup>Phillips, D. C. *The three-dimensional structure of an enzyme molecule. Sci. Am.* **1966**, 215, 78–90.
- <sup>9</sup>Chipman, D. M., Sharon, N. *Mechanism of lysozyme action. Science* **1969**, 165, 454–465.
- <sup>10</sup>Dobson, C. M., Evans, P. A., Radford, S. E. *Understanding how protein fold: the lysozyme story so far. Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 31–37.
- <sup>11</sup>J. W. Longworth and V. L. Koenig, Abstract, Sarasota, Fla. Amer. SOC. Photobiol. **1973**.
- <sup>12</sup>Ravi Charan Reddy K., Hauke Lilie, Rainer Rudolph, Christian Lange. *l-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. Protein Sci.* **2005**, 929–935.
- <sup>13</sup>M.E. Selsted, H.W. Becker. *Anal. Biochem.* **1986**, 155, 270.
- <sup>14</sup>F.Lin, W.Fan, G.W.Wisem. *Anal. Biochem.* **1991**, 196, 279.



- <sup>15</sup>A.A. Waheed, P.D. Gupta. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2000**, 42, 125.
- <sup>16</sup>M.S.C. Wang, J.S. Pang, M.E. Selsted. *Anal. Biochem.* **1997**, 253, 225.
- <sup>17</sup>Huisman, Andrew J.; Hartsell, Lydia R.; Krueger, Brent P.; Pikaart, Michael J. *Thermodynamic Exploration of Eosin-Lysozyme Binding: A Physical Chemistry and Biochemistry Laboratory Experiment. Journal of Chemical Education.* **2010**, 87, 3, 299-302.
- <sup>18</sup>Weber, P.C. *Adv. Prot. Chem.* **1991**, 41, 1.
- <sup>19</sup>Burton, W.K, Cabrera, N., Frank, F.C. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **1951**, A243, 299.
- <sup>20</sup>Nývlt, J., Söhnel, O., Matuchová, M. Y Broul, M. *The kinetics of industrial crystallization. Elsevier.* **1985**.
- <sup>21</sup>Fiddis, R.W., Longman, A.R., Calvert, P.D. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. Sect I.* **1979**, 75, 2753.
- <sup>22</sup>Durbin, S.D., Feher, G.H. *J. Cryst. Growth.* **1986**, 76, 583.
- <sup>23</sup>Durbin, S.D., Feher, G.H. *J. Cryst. Growth.* **1991**, 110, 41.
- <sup>24</sup>Durbin, S.D., Feher, G.H. *J. Mol. Biol.* **1990**, 212, 763.
- <sup>25</sup>Durbin, S.D., Carlson, E.W. *J. Cryst. Growth.* **1992**., 122, 71.
- <sup>26</sup>Feher, G. Kam, Z. *Methods Enzymol.* **1985**, 144, 77.
- <sup>27</sup>McPherson, A.; Gavira, J. A. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2014**, 70, 2.
- <sup>28</sup>Cooper D. R., Boczet T., Grelewska K., et al. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2007**, 63, 636-645.
- <sup>29</sup>Rupp, B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology.* **2009**.
- <sup>30</sup>M.M. Ries-Kautt, A. F Ducruix. *Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. The Journal of Biological Chemistry.* **1989**, 264, 745-748.



Cristalización de lisozima en presencia de eosina

- <sup>31</sup>Steinraug, L.K. *Acta Crystallogr.* **1967**, 23, 666.
- <sup>32</sup>Gordon G. Hammes, Sharon Hammes-Schiffer, *Physical Chemistry for the Biological Sciences.* **2015** 17, 383–414
- <sup>33</sup>Anne M. Hassell. et Al. *Crystallization of protein–ligand complexes.* *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2007**. D63, 72–79
- <sup>34</sup>Xanthipe J. Jordanides, Matthew J. Lang, Xueyu Song, Graham R. Fleming. *Solvation Dynamics in Protein Environments Studied by Photon Echo Spectroscopy.* *J. Phys. Chem. B.* **1999**, 103, 7995-8005
- <sup>35</sup>Baugher, J. F.; Grossweiner, L. I.; Lewis, C. J. *J. Chem. Soc., Faraday Trans 2* **1974**, 70, 1389.
- <sup>36</sup>Ramanadham, M.; Sieker, L. C.; Jensen, L. H. *Acta Crystallogr. Sect. B* **1990**, 46, 63.

Cristalización de lisozima en presencia de eosina



## 7. Anexo

ANEXO - Tabla 1.....	62
ANEXO - Tabla 2.....	63
ANEXO - Tabla 3.....	64
ANEXO - Tabla 4.....	65
ANEXO - Tabla 5.....	66
ANEXO - Tabla 6.....	67
ANEXO - Tabla 7.....	68
ANEXO - Tabla 8.....	69
ANEXO - Tabla 9.....	70

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	50 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 1 M Acetato sódico	50 mg/mL Lisozima 1 NaCl 1 M Acetato sódico				
2	80 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 1 M Acetato sódico					
3	100 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 1 M Acetato sódico					
4	120 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 1 M Acetato sódico					

ANEXO - Tabla 1

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	50 mg/mL Lisozima 0.5 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	50 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	50 mg/mL Lisozima 0.7 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	50 mg/mL Lisozima 0.8 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	50 mg/mL Lisozima 0.9 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	50 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 0.1 M Acetato sódico
2	80 mg/mL Lisozima 0.5 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	80 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	80 mg/mL Lisozima 0.7 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	80 mg/mL Lisozima 0.8 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	80 mg/mL Lisozima 0.9 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	80 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 0.1 M Acetato sódico
3	100 mg/mL Lisozima 0.5 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	100 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	100 mg/mL Lisozima 0.7 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	100 mg/mL Lisozima 0.8 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	100 mg/mL Lisozima 0.9 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	100 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 0.1 M Acetato sódico
4	120 mg/mL Lisozima 0.5 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	120 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	120 mg/mL Lisozima 0.7 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	120 mg/mL Lisozima 0.8 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	120 mg/mL Lisozima 0.9 M NaCl 0.1 M Acetato sódico	120 mg/mL Lisozima 1 M NaCl 0.1 M Acetato sódico

ANEXO - Tabla 2

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	50 mg/mL Lisozima NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4					
2	80 mg/mL Lisozima NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4					
3	100 mg/mL Lisozima NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4					
4	120 mg/mL Lisozima NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4					

ANEXO - Tabla 3

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 Gota control	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 1 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 1 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 1.5 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 1.5 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 1.5 mM Eosina Y
2	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 Gota control	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y
3	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 Gota control	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y
4	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 Gota control	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.75 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.75 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.75 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.75 mM Eosina Y	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.75 mM Eosina Y

ANEXO - Tabla 4

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 Gota control	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 1 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 1 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 1.5 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 1.5 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 1.5 mM Eosina Y
2	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 Gota control	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.25 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.25 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.25 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.25 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.25 mM Eosina Y
3	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 Gota control	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.5 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.5 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.5 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.5 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.5 mM Eosina Y
4	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 Gota control	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.75 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.75 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.75 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.75 mM Eosina Y	NaCl 1 M Acetato sódico 0.1 M pH 4.6 0.75 mM Eosina Y

ANEXO - Tabla 5

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	1 M NaCl 0.1 M Acetato sódico					
2	0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30%	0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30%	0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30%	0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30%	0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30%	0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30%
3	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4					
4	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30%	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30%	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30%	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30%	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30%	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30%

ANEXO - Tabla 6

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	40 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %
2	40 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima 0.6 M NaCl 0.1 M Acetato sódico PEG 4000 30 %
3	40 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %
4	40 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	40 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %	30 mg/mL Lisozima Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 PEG 4000 30 %

ANEXO - Tabla 7

Cristalización de lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 90 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 80 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 70 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 60 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL
2	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 90 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 80 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 70 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 60 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL
3	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 90 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 80 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 70 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 60 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL
4	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 90 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 80 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 70 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 60 mg/mL	Acetona 10% NaNO <sub>3</sub> saturado NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL

ANEXO - Tabla 8

Cristalización de la lisozima en presencia de eosina

	A	B	C	D	E	F
1	0.1 M Acetato sódico 0.1 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.3 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.4 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.6 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.8 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 1 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL
2	0.1 M Acetato sódico 0.1 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.3 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.4 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.6 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.8 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 1 M NaCl 0.25 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL
3	0.1 M Acetato sódico 0.1 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.3 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.4 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.6 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.8 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 1 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 100 mg/mL
4	0.1 M Acetato sódico 0.1 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.3 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.4 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.6 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 0.8 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL	0.1 M Acetato sódico 1 M NaCl 0.5 mM Eosina Y Lisozima 50 mg/mL

ANEXO - Tabla 9

