



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE QUÍMICA

***ESTUDIOS BIOFÍSICOS Y ESTRUCTURALES DEL MECANISMO DE
AGREGACIÓN/DESAGREGACIÓN DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS
ASISTIDAS POR CAMPOS ELÉCTRICOS Y MAGNÉTICOS***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

Q. CLAUDIA CARINA PAREJA RIVERA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

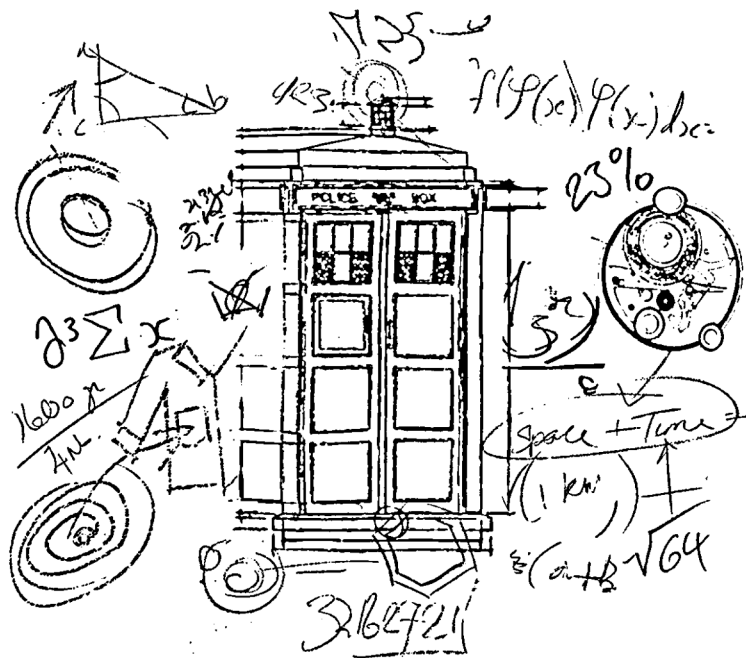
COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM
DRA. LOURDES ISABEL CABRERA LARA
CENTRO CONJUNTO DE INVESTIGACIÓN EN SUSTENTABLE UAEM-UNAM

CIUDAD DE MÉXICO; FEBRERO 2017

" I too used to believe in magic, but the Doctor has taught me about science. It is better to believe in science "

Leela, Horror of Frang Rock (1977)



JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Lauro Bucio Galindo	Instituto de Física, UNAM
Primer vocal	Dr. Abel Moreno Cárcamo	Instituto de Química, UNAM
Segundo vocal	Dra. Larissa Alexandrova	Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM
Tercer vocal	Dra. María de Jesús Rosales Hoz	Cinvestav
Secretario	Dr. Braulio Rodríguez Molina	Instituto de Química, UNAM
Tutor:	Dr. Abel Moreno Cárcamo	
Sustentante:	Q. Claudia Carina Pareja Rivera	

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica 5 del Departamento de Química de Biomacromoléculas en el Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Abel Moreno.

Partes de este trabajo se han presentado en la modalidad de póster en los siguientes eventos:

Pareja-Rivera Carina, Abel Moreno. *“Estudio del efecto de la temperatura en la cristalización de la Lipasa B de Candida antártica (CALB)”*. En el **Simposio Interno del Instituto de Química**, en el cual se obtuvo Mención Honorífica por mejor cartel de maestría. El 10 de junio de 2015, México, DF.

Pareja-Rivera Carina, Beatriz Quiroz, Nuria Esturau, Adela Rodríguez, Abel Moreno. *“Effect of the electromagnetic Fields in the structure of Glucose isomerase”*. En el **75 Aniversario del Instituto de Química**, el 8 de abril de 2016, México, DF.

Se realizó una **Estancia de Investigación** para estudiar *Influencia de los campos electromagnéticos en la estructura 3D de Proteínas* bajo la asesoría del Dr. Antonio Romero en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) del 1 de junio al 4 de agosto del 2016 en Madrid, España.

El registro de la **Patente** ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI) el *Dispositivo para la protección térmica y transporte de biomacromoléculas* de los inventores Abel Moreno Cárcamo y Claudia Carina Pareja Rivera, el cual tiene como número de expediente MX/a/2016/008614

Se publicó el **Artículo** *“Recent Advances in the Understanding of the Influence of Electric and Magnetic Fields on Protein Crystal Growth”* Carina Pareja-Rivera, Mayra Cuéllar-Cruz, Nuria Esturau-Escofet, Nicola Demitri, Maurizio Polentarutti, Vivian Stojanoff, and Abel Moreno. *Crystal Growth & Design* **2017** 17 (1), 135-145

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional y mixta otorgadas para realizar mis estudios de Maestría de la mejor manera (Número de becario 576597).

Al financiamiento del proyecto IT200215 por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM).

Al Posgrado de Ciencia e Ingeniería de Materiales por el apoyo académico recibido durante la realización de mis estudios de Maestría.

A mi mentor académico el Dr. Abel Moreno por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y enseñarme otra perspectiva de la ciencia.

Al Comité Tutor formado por la Dra. Cristina Piña Barba y la Dra. Lourdes I. Cabrera Lara por sus consejos para guiarme en el proyecto de maestría.

A los miembros del jurado por su tiempo y las valiosas correcciones.

Al Dr. Antonio Romero por abrirme las puertas de su laboratorio y la paciencia al transmitirme parte de su conocimiento, así como a mis compañeros del laboratorio B02.

A Dr. Nicola Demitri y al Dr. Maurizio Polentarutti (Elettra) por las facilidades en la colecta de datos en el laboratorio XRD1 de Elettra Synchrotron, Trieste (Italia)

A la Dra. Vivian Stojanoff por la colecta de datos en BL 14-1 del Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL), Stanford California, USA.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet y a la Dra. Beatriz Quiroz García por su apoyo en los experimentos de campos magnéticos en el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN).

A la Dra. Adela Rodríguez y a la M. en C. Georgina E. Espinosa Pérez por los experimentos realizados en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM).

DEDICATORIAS

A mis padres Carlos y Leticia, quienes con su incansable lucha por brindarme siempre lo mejor y por darme la oportunidad de acrecentar mis conocimientos al proporcionarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas y experiencia de vida.

A mi hermano Carlos, por tu amistad, comprensión y apoyo incondicional, alentándome siempre con palabras que me dan fuerza y valor para seguir adelante todos los días, recuerda que siempre estaré a tu lado.

En recuerdo de mi Tía Norma, quien me proporcionó los mejores consejos, gracias porque siempre estuviste conmigo para escucharme, darme tu apoyo incondicional y ánimo hasta el último momento, agradezco el tiempo que compartimos y eternamente te llevaré en mi corazón.

Como no sentirme afortunada, si tengo una familia llena de amor. Al igual que todos, tenemos altibajos, pero siempre los hemos superado unidos y en especial:

Gracias a mi tío Juan Manuel y a mis primos Keops, Thot, Renée y Kefren, por los inolvidables recuerdos de mi infancia y con cariño a Sofía, Saori y Dany.

A mis tíos José Luis y María del Rocío y a mis primos Luis Enrique y Rosy, por su amor, comprensión y el apoyo incondicional a lo largo de los años.

A mis mejores amigos, casi hermanos, José Luis Albiter, Luis Fernando Téllez, Abraham Colín y Fernanda Ruíz, por compartir conmigo mis mejores momentos, por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas, y ser mis mejores confidentes.

A mis amigos de maestría Elías, Amauri, Silvia, Miguel, Héctor, Antonio y Génesis, por esas tardes-noches de estudio intenso, comparando ideas para llegar a los mejores resultados y claro contando todas las farras. Espero que la ciencia siga entre nosotros muchos años más.

A mi compañera y amiga Angélica por la experiencia de vida, llena de aprendizaje y de compañerismo.

ACRÓNIMOS

[BMIM]BF ₄	Tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio
[C ₂ mim]Oac	Acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio
Abs	Absorbancia
AC	Corriente Alterna (Alternating Current)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BF	Campo Magnético (Magnetic Field)
CALB	Lipasa B Candida antarctica
CCP4	Collaborative Computational Project No. 4
Coot	Crystallographic Object-Oriented Toolkit
cm	Centímetros
cryo-EM	Criomicroscopía electrónica (Cryo-Electron Microscopy).
Da	Dalton
DC	Corriente Directa (Direct Current)
DLS	Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light scattering)
EF	Campo eléctrico (Electric Field)
EAN	Nitrato de etilamonio
GAME	Método de acupuntura en geles
GCB	Granada Crystallization Box
GI	Glucosa Isómerasa <i>Streptomyces rubiginosus</i>
h	Horas
HEWL	Lisozima de clara de huevo
HOPG	Highly Oriented Pyrolytic Graphite
Hz	Hertz
IL	Líquido Iónico (Ionic Liquid)
in	Pulgadas
IPD	Índice de polidispersidad
Ires	Número de residuo

ITO	Óxido de indio y estaño (Indium Tin Oxide)
keV	Kiloelectronvoltio
K_j	Susceptibilidad principal de un enlace peptídico
K_{\parallel}	Susceptibilidad paralela al plano del grupo éster
K_{\perp}	Susceptibilidad perpendicular al plano del grupo éster
ΔK	Diferencia de la anisotropía diamagnética molar de un grupo éster
LLDC	Cristalización por difusión líquido-líquido
LLPS	Separación de fases líquido-líquido
M	Molaridad
MC	Cadena principal (Main Chain)
mg	Miligramos
mL	Militro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N_{α}	Número de residuos en la estructura alfa
N_{β}	Número de residuos en la estructura beta
NIBS	Non-Invasive Back-Scattering
MF	Campo magnético (Magnetic Field)
nm	Nanómetros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)
$N_{\text{orientados}}$	Número de cristales orientados
ns	Nanosegundos
N_{total}	Número total de cristales
C	Celsius
PDB	Protein Data Bank
PDBe	Protein Data Bank in Europe
PISA	Proteínas, Interfaces, Estructuras y Montajes (Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies)
PEG	Polietilenglicol (Polyethylene glycol)

PET	Polietileno
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto Isoeléctrico
PM	Peso molecular
PM _R	Peso molecular reportado
R _H	Radio hidrodinámico
SC	Cadena lateral (Side Chain)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SLAC-SSRL	Stanford Synchrotron Radiation Lightsource
T	Temperatura
TEAB	Bromuro de Tetraetilamonio
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
u.a.	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Volt
V _f (%) al 1:1	Volumen final después de la mezcla 1:1
V _i	Volumen inicial
V _o	Porcentaje de volumen inicial de IL
Vol IL	Volumen de IL en μL
Vol Tc	Volumen Tacsimate
VT	Volumen total
XDS	Software del Detector de rayos-X (X-ray Detector Software)
XFEL	Laser de Electrones Libres de Rayos X (X-ray Free Electron Laser)
XRD	Difracción de rayos-X (X-ray Diffraction)
ϵ	Coefficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda (nm)
μA	Microampere
μL	Microlitros

RESUMEN

Esta propuesta utilizó métodos no convencionales que ayudaron a aumentar la tasa de éxito para el crecimiento de cristales de proteínas y el mejoramiento de su proyección estructural; la técnica para lograr este último objetivo fue la difracción de rayos X. Esta contribución presenta nuevos enfoques para la cristalización de proteínas, no sólo para el crecimiento de cristales, sino también para controlar el tamaño y orientación de los mismos. Uno de los métodos empleados en este trabajo fue el uso de campos magnéticos. La aplicación de este método resultó en la obtención de cristales ordenados. Las técnicas de rayos X de alta resolución mostraron una mejora en los mapas de densidad electrónica, lo que, ayuda a resolver la estructura de las proteínas. Esta propuesta indaga algunas ventajas, inconvenientes y realidades del papel de los campos electromagnéticos en la investigación de cristalización de proteínas y su efecto sobre los contactos cristalinos de la proteína. Además, se analiza la importancia de la temperatura ambiente y de la baja temperatura durante la colecta de datos. Por último, estudia el efecto de aplicar un fuerte campo magnético de 16.5 Tesla, en períodos de tiempo cortos y largos, el crecimiento de los cristales de proteínas sobre la estructura 3D de las dos proteínas modelo (Glucosa isomerasa y Lisozima). Un caso específico fue examinar el efecto que tienen los líquidos iónicos en la cristalización, los cuales son utilizados como aditivos que mejoran el crecimiento de los cristales.

ABSTRACT

In this contribution we use non-conventional methods that help to increase the success rate of a protein crystal growth, and consequently of structural projections using X-ray diffraction techniques such as the use of electric and magnetic fields. This contribution presents new approaches involving more sophisticated techniques of protein crystallization, not just for growing protein crystals of different sizes, but also for controlling crystal size and orientation. This latter was possible through the use of magnetic fields that allow the preparation of protein crystals suitable for both high-resolution X-ray and neutron diffraction crystallography where big crystals are required. This contribution discusses some advantages, disadvantages and realities of the role of electromagnetic fields in protein crystallization research, and their effect on protein crystal contacts. Additionally, we discuss the importance of room and low temperatures during data collection. Finally, we also discuss the effect of applying a rather strong magnetic field of 16.5 Tesla, for shorts and long periods of time, on protein crystal growth, and on the 3D structure of two model proteins (Glucose isomerase and Lysozyme). A specific case was to examine the effect of ionic liquids on crystallization, which are used as additives that improve the growth of crystals.