



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**REAFINAMIENTO DE ESTRUCTURAS  
CRISTALOGRÁFICAS DE LACASAS DEPOSITADAS  
EN EL *PROTEIN DATA BANK* (PDB)**

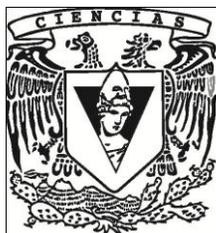
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A :**

**Campos Acevedo Adam Andres**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Enrique Rudiño Piñera**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Enrique Rudiño Piñera en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (**UNAM**), contando con el apoyo de:

**CONACYT**

**Proyecto 50581**

# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos especiales a mi director de tesis Enrique Rudiño Piñera por su apoyo, esfuerzo, orientación y dedicación en la realización de esta tesis, por haberme permitido formar parte de su grupo, por su confianza mostrada durante estos años, por poner a mi disposición su laboratorio y por brindarme la oportunidad de aprender de las lacasas y cristalografía.

Agradezco también a los investigadores que prestaron atención en este proyecto, en especial a la Dra. Brenda Valderrama, Dra. Viviana Escobar, Dr. Lorenzo Segovia, Dr. Luis Felipe Jiménez, M en C. Erika Chavira y al M. en C. Alfonso Vilchis, por su interés en que esta tesis saliera mejor, su tiempo invertido en ella y su apoyo.

Agradezco también a todo el personal que conforma el laboratorio a Sonia Rojas, Eleuterio, Eugenio De la Mora, Hugo Serrano, Francisco Gasteazoro, Héctor, Lupita, Ricardo, Adriana, y demás, por su inestimable ayuda en todo momento.

Agradecer también infinitamente por su cariño y su continuo apoyo a mi motor, mi energía, mis padres Guadalupe y Fernando, a mis hermanos, Fernando, Daniel, Nancy, a mis tíos Joel y Blanca y mis primas Tania y Belén, a mi novia Sonia gracias en verdad a todos ustedes por todo!!!!

Por ultimo agradecer al IBT y a la facultad de Ciencias, UNAM, por todo lo que conseguí a través de ella, conocimientos, experiencias, amigos (Adriana, Arturo, Carol, Erandi, Dario, Duhyadi, German, Pancho, Marco, Marel, Paula, Úrsula, y muchos más...).

A todas aquellas personas que han contribuido en una u otra forma en la elaboración de esta investigación. Gracias a todos.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Campos  
Acevedo  
Adam Andres  
57 60 28 05  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
302251850
2. Datos del tutor  
Dr.  
Enrique  
Rudiño  
Piñera
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Lorenzo Patrick  
Segovia  
Forcella
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
María Brenda  
Valderrama  
Blanco
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Luis Felipe  
Jiménez  
García
6. Datos del sinodal 4  
M en C.  
Erika  
Chavira  
Suárez
7. Datos del trabajo escrito  
Reafinamiento de estructuras cristalográficas de lacasas depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB).  
68 p.  
2010

# TABLA DE CONTENIDO

1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCION	
2.1 CRISTALOGRAFÍA DE PROTEÍNAS	4
2.1.1 Naturaleza y propiedades de los rayos X	5
2.1.2 Cristalografía y difracción de rayos X	7
2.1.3 MIR ( <i>Multiple Isomorphous Replacement</i> )	8
2.1.4 MAD ( <i>Multiple Anomalous Dispersion</i> )	9
2.1.5 MR ( <i>Molecular Replacement</i> )	9
2.1.6 Validación del modelo estructural	10
2.1.7 Resolución de los datos	13
2.1.8 Los electrones como dispersores de rayos X	13
2.1.8.1 Mecanismos de Interacción	14
2.1.8.2 Efecto fotoeléctrico	15
2.1.8.3 Dispersión de Compton	16
2.1.8.4 Daños por radiación	16
2.1.8.5 Especies reactivas de oxígeno	17
2.1.8.6 Interacción con el solvente	18
2.1.8.7 Dosis absorbida	18
2.2 OXIDOREDUCTASAS	20
2.3 EL COBRE EN SISTEMAS VIVOS	21
2.4 LACASAS	22
2.4.1 Sitio activo y estructura de lacasas	23
2.4.2 Excepciones del sitio activo de lacasas	26
2.4.3 Mutagénesis del sitio activo	27
2.4.4 Aplicaciones de lacasas en biotecnología	27
2.4.5 Mecanismo de reacción	28
2.4.6 Ciclo catalítico de lacasas	29
3 ANTECEDENTES	32
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivos generales	34
4.2 Objetivos particulares	34
5 JUSTIFICACIÓN	35

6	METODOLOGÍA	36
6.1	Búsqueda en el <i>Protein Data Bank</i> (PDB)	36
6.2	Selección de estructuras de enzimas trinucleares de cobre	36
6.3	Conversión de los factores de estructura .CIF a formato .MTZ a través de CCP4	37
6.4	Afinamiento en el programa PHENIX	38
6.5	Visualización y análisis de la estructura después del afinamiento en PHENIX, a través de COOT	39
6.6	Programas	40
7	RESULTADOS	41
7.1	Búsqueda en el PDB	41
7.2	Selección de estructuras	41
7.3	Primer análisis de afinamiento	41
7.4	Segundo análisis de afinamiento	42
7.4.1	Afinamiento de la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> , código 1HKZ	43
7.4.2	Afinamiento de la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> , código 1UVW	45
7.4.3	Afinamiento de la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> , código 1W6L	48
7.4.4	Afinamiento de la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> , código 1GSK	49
7.4.5	Afinamiento de la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> , código 1OF0	50
7.4.6	Afinamiento de la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> , código 2BHF	52
7.4.7	Afinamiento de la lacasa de CueO de <i>E. coli</i> , código 2FQD / 2FQE	54
7.4.8	Afinamiento de la lacasa de CueO de <i>E. coli</i> , código 1KV7	56
7.4.9	Afinamiento de la lacasa de <i>M. albomyces</i> , código 2IH8 / 2IH9	57
7.4.10	Afinamiento de la lacasa de <i>Coprinus cinereus</i> , código 1HFU	58
7.4.11	Afinamiento de la lacasa de <i>Coprinus cinereus</i> , código 1A65	59
8	DISCUSIÓN	60
8.1	Sitio de cobre T1	60
8.2	Sitio de cobre T2	60
8.3	Sitio de cobre T3	60
8.2	Enfoque general de la radiación sobre los metales en lacasas	61
8.3	Intermediario di-oxígeno en lacasas	63
9	CONCLUSIONES	64
10	PERSPECTIVAS	65
11	REFERENCIAS	66

# 1. RESUMEN

La determinación de estructuras cristalográficas por difracción de rayos X es una técnica poderosa que permite analizar, a nivel atómico, la estructura de una gran variedad de moléculas cristalizadas (desde moléculas orgánicas hasta macromoléculas biológicas). En un contexto bioquímico la determinación estructural por difracción por rayos X provee conocimientos detallados de componentes tales como proteínas, nucleótidos, enzimas, etc.

La cristalografía por difracción de rayos X es un método en donde un haz de rayos X interactúa con los átomos del cristal dispersándose en ciertas direcciones discretas (difracción). A partir del análisis de la posición e intensidad de estos rayos difractados, y al conocer el desfaseamiento causado por las distintas capas dentro de la red cristalina (problema de fases), es posible obtener mapas de densidad electrónica que representan al contenido molecular del cristal. Desde que esta técnica ha sido utilizada se han determinado alrededor de 50,000 estructuras de macromoléculas biológicas, lo que representa el 85% del número total de las estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB)<sup>1</sup>. El segundo método más utilizado para elucidar estructuras biológicas, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN ó NMR por sus siglas en inglés), ha producido alrededor de 8,000 estructuras. Esto representa el 13% del total de estructuras depositadas en el PDB<sup>1</sup>. Ambas técnicas presentan ventajas y desventajas, sin embargo, una de las ventajas de la cristalografía en comparación con la RMN, es que no presenta un límite en el tamaño de la molécula determinar (el límite para RMN es de 20 kDa aproximadamente).

Uno de los cuestionamientos importantes que se le han hecho a la cristalografía de rayos X es si los cristales representan una verdadera aproximación a las moléculas biológicas o si observamos estructuras diferentes de las que ocurren en el ambiente. Sin embargo, en la mayoría de los casos donde se combinan estudios de difracción de rayos X, RMN y microscopia electrónica, el resultado estructural es similar en las tres técnicas. A pesar de que se debe contender contra el hecho de que la estructura cristalográfica pueda estar influenciada por la red cristalina, ninguna otra técnica nos permite estudiar el nivel de detalle que la cristalografía alcanza.

---

<sup>1</sup> PDB (*Protein Data Bank*), <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>

Se tuvo el interés de analizar a las proteínas trinucleares de cobre, y en particular a las lacasas, debido a su composición estructural, ya que este tipo de proteínas contiene 4 átomos de cobre, que en su conjunto son necesarios para la catálisis al oxidar un amplio espectro de sustratos. Sin embargo, en el proceso de determinación estructural de la lacasa de *Corioloopsis gallica*, Eugenio De La Mora (estudiante de doctorado de nuestro grupo) encontró una inusual presencia y ausencia de cobres relacionados tanto con el pH, como con la fuente de rayos X empleada (De la Mora Lugo, 2007). De esta observación surge el interés de conocer si este comportamiento es común en otras lacasas previamente depositadas en el PDB, y si las ocupaciones variables de los átomos de cobre tienen repercusiones biológicas o causadas por la radiación absorbida por el cristal.

Se procedió a reafinar ciertas estructuras de lacasas al seguir un proceso de afinamiento único. De esta manera se generaron 31 re-afinamientos de lacasas previamente depositadas en el PDB. En esta tesis presento la comparación entre ambos grupos de estructuras al enfocarme en resolver los siguientes cuestionamientos: ¿es común o no la existencia de ocupaciones parciales en los átomos de cobre de las lacasas?, ¿se puede relacionar este comportamiento con algún efecto biológico o metodológico?, y por último, ¿qué tan distintas son las estructuras generadas con relación a las previamente depositadas?

Se comenzó con una búsqueda de depósitos de proteínas trinucleares de cobre "lacasas". Cabe aclarar que la palabra clave para la búsqueda fue "/accase", seguida por una selección de calidad estructural bajo criterios cristalográficos establecidos (resolución, R-free, R-value, fuente de radiación, pH, temperatura, etc.). Una vez obtenidas las estructuras que presentaban parámetros distintos a los que se consideran correctos para la determinación estructural, tratamos de corregir las estructuras a través del programa PHENIX (se describirá con detalle más adelante); el cual refina las estructuras al tomar como base las coordenadas del PDB, los factores de estructura (son las intensidades de los haces difractados del espectro tridimensional de difracción y, se obtiene así de ellas los módulos de los factores de estructura) y en algunos casos, se utilizaron diccionarios en caso de que PHENIX no reconociera un ligante. Los factores de estructura fueron transformados a un formato .mtz, en el programa CCP4, debido a que sólo así PHENIX los reconoce. Una vez obtenido las nuevas coordenadas y mapas de densidad electrónica, estos nuevos datos se corroboraron en el programa Coot, en el cual se puede visualizar los cambios obtenidos después y antes del afinamiento; lo que, concluye si se deberían hacer modificaciones en los sitios de cobre o en ciertas partes de la estructura.

En este trabajo se analizó el universo de lacasas depositados en el PDB, obteniendo de manera general que las diferencias entre los datos depositados y los generados después del afinamiento en PHENIX exhiben una disminución de alrededor de un 13%, en promedio, para las ocupaciones de todos los sitios de cobre. Se observó que los valores depositados originalmente mostraban una ocupación en los sitios mayor que los obtenidos por PHENIX. Si bien, sería deseable utilizar otro programa de afinamiento para corroborar esta observación (p. e. REFMAC5 o CNS).

Por otro lado, no se puede considerar que los daños por radiación sean la causa directa de la ausencia del cobre T2, así como de las ocupaciones parciales en los sitios de cobre restantes (sitio de cobre T1 y sitios de cobre T3), para todas las lacasas depositadas hasta el momento en el PDB; más bien, la ocupación parcial de los átomos de cobre en lacasas es consecuencia de una serie de combinaciones en las que por ejemplo la purificación, las condiciones cristalográficas, los mismos daños por radiación, el pH, etc. en conjunto están implicados en el fenómeno.

Otro factor por el cual el cobre T2 podría estar ausente de la estructura sería la deslocalización del ión o también, el que los nitrógenos de las histidinas que lo coordinan no estén apuntando al sitio del cobre T2, como fue el caso de la lacasa de *C. cinereus* (PDB 1A65) en la que el sitio de cobre T2 está desocupado. Toda esta cuestión acerca de la posición del cobre T2 se resume, por la existencia de un valor B mayor en el sitio de cobre T2 en ambos casos (deposito original/afinamiento en PHENIX) comparado con los otros sitios de cobre.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Cristalografía de proteínas

La difracción de rayos X es la única técnica que permite describir a nivel atómico la conformación estructural de una proteína (**Figura 1**). El *Protein Data Bank* (PDB) es el banco donde se depositan los modelos macromoleculares obtenidos a partir de datos experimentales. Contiene aproximadamente 50,000 modelos experimentales de proteínas y ácidos nucleídos determinados por cristalografía de rayos X. En total, el PDB contiene aproximadamente 55,000 modelos<sup>2</sup>, en su amplia mayoría proteínas, que han sido resueltos por cristalografía de rayos X, microscopia electrónica, resonancia magnética nuclear (NMR) espectroscópica. Existen muchas proteínas que aparecen en múltiples formas, por ejemplo, silvestres y mutantes, en presencia o ausencia de uno o varios *ligantes*, o que forman parte de complejos multiprotéicos o proteínas – ácido nucleídos; el número concreto de proteínas representado en el PDB es sólo una fracción de las secuencias protéicas conocidas). Finalmente, hay modelos teóricos, construidos por analogía con estructuras de proteínas conocidas que, tienen una similitud de secuencias o que se basan en la simulación de la conformación de la proteína.

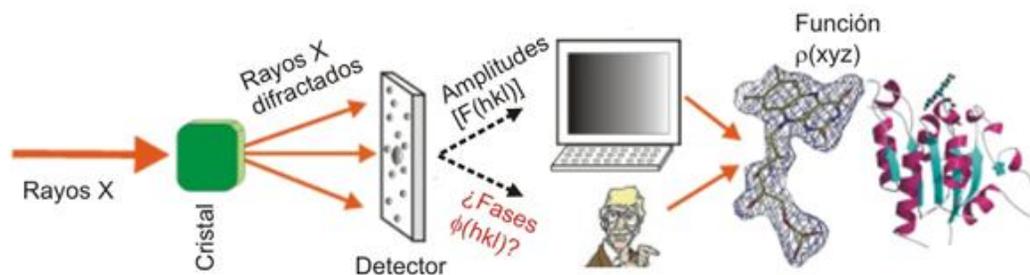


Figura 1. La cristalografía de rayos X es una técnica consistente en la interacción de un haz de rayos X con un cristal. El haz se escinde en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos en el cristal y da lugar a un patrón de difracción, donde el análisis de las intensidades permite la ubicación de los átomos (sólo al resolver el problema de fases). La posición de los puntos de difracción sigue la ley de Bragg<sup>3</sup>.

El primer cristal de una oxidasa de cobre azul fue obtenido de la ceruloplasmina de humano en 1962. Desde ese tiempo la ceruloplasmina ha sido cristalizada en diferentes especies (Messerschmidt, 1997). En lo que respecta a las lacasas, la primera estructura depositada en el PDB, en 1998, provenía del hongo *Coprinus cinereus*. Posteriormente, se fueron depositando más estructuras hasta obtener por el momento un total de 39 estructuras registradas en el *Protein Data Bank*<sup>4</sup>. De las cuales, 32 estructuras están liberadas y, 7 estructuras aún están por liberarse. Dichas estructuras presentan ligantes y, existe variación en cada

<sup>2</sup> Hasta el 10 de febrero del 2009

<sup>3</sup> <http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/>

<sup>4</sup> Hasta el 10 de febrero del 2009.

estructura de los 15 ligantes existentes para estas proteínas. Dentro de este conjunto estructural de lacasas existe cierta redundancia, en cuanto al organismo del cual provino esta proteína, sólo que se condiciona a distintos parámetros (resolución, sustrato, etc.) para obtener, de esta forma, lacasas de 14 organismos: *Coprinus cinereus* (2)<sup>5</sup>, *Trametes versicolor* (2), *Trametes hirsuta* (1), *Cerrena máxima* (1), *Rigidoporus lignosus* (1), *Echerichia coli* (4), *Bacillus subtilis* (7), *Melanocarpus albomyces* (4), *Trametes trogii* (2), *Coriolus zonatus* (1), *Corioloopsis gallica* (3), *Lentinus tigrinus* (1), *Streptomyces coelicolor* (1) y *Streptomyces antibioticus* (1), *Trametes ochracea* (1).

### 2.1.1 Naturaleza y propiedades de los rayos X

Los rayos X fueron descubiertos en 1895 por *Wilhelm Conrad Röntgen* en la Universidad de Würzburg, Bavaria. Inicialmente Röntgen observó que ciertos cristales de platinocianuro de bario, completamente sellados con papel negro, eran luminiscentes al producirse cerca de ellos una descarga generada por un tubo de rayos catódicos. Por este trabajo sobre rayos X, Röntgen recibió el primer premio Nobel de Física en 1901. Su similitud con la luz llevó a Röntgen a realizar pruebas cruciales para verificar si las propiedades ondulatorias, que ya eran conocidas para el rango óptico, eran satisfechas por este nuevo tipo de rayos, tales como la polarización, la difracción, la reflexión y la refracción.

Con disponibilidades experimentales limitadas, Röntgen no logró describir completamente las características de la nueva radiación, por lo que designó a estos rayos con una letra "X" (desconocido).

La naturaleza de los rayos X fue motivo de varias controversias. En 1906, *Barkla* encontró que en los experimentos de dispersión los rayos X podrían ser polarizados y por lo tanto deberían ser ondas. Por el contrario, los estudios de *W.H. Bragg* sobre ionización, indicaban que los rayos X deberían ser partículas.

Las teorías desarrolladas principalmente por los Bragg (padre e hijo) y von Laue se basaron en el hecho de que los electrones dispersan o difractan a los rayos X. Los rayos difractados se suman (interferencia constructiva) bajo condiciones particulares debidas al arreglo cristalino, lo que produce los puntos del patrón de difracción. El problema se facilita si visualizamos a los átomos del cristal como planos, tal como lo hizo Bragg (y sólo posible si consideramos a los átomos dentro de una red cristalina). Los planos se designan por tres índices *h, k, l* (de Miller) que identifican un conjunto de planos paralelos y perpendiculares.

Entonces cada punto o reflexión del patrón se caracteriza por tres índices enteros *h, k, l*, mas una intensidad *I* (*h, k, l*). Los índices especifican el número de planos por celda unitaria en el inverso de las tres direcciones del espacio tridimensional: *h*, en la dirección de *x*; *k*, en la dirección de *y*; *l* en la dirección de *z*, mientras que la intensidad es proporcional a la amplitud de onda (Perutz, 1985).

La suma de ondas, o interferencia constructiva, ocurrirá entre rayos dispersados por planos paralelos con un índice *h, k, l*, secuencial en la estructura interna del cristal, si y sólo si los rayos X de longitud de onda  $\lambda$  interactúan sobre los planos a un ángulo  $\theta$  que cumplen ciertas condiciones (ley de Bragg) (**Figura 2**).

---

<sup>5</sup> (n) número de depósitos de lacasa, obtenido del organismo dado.

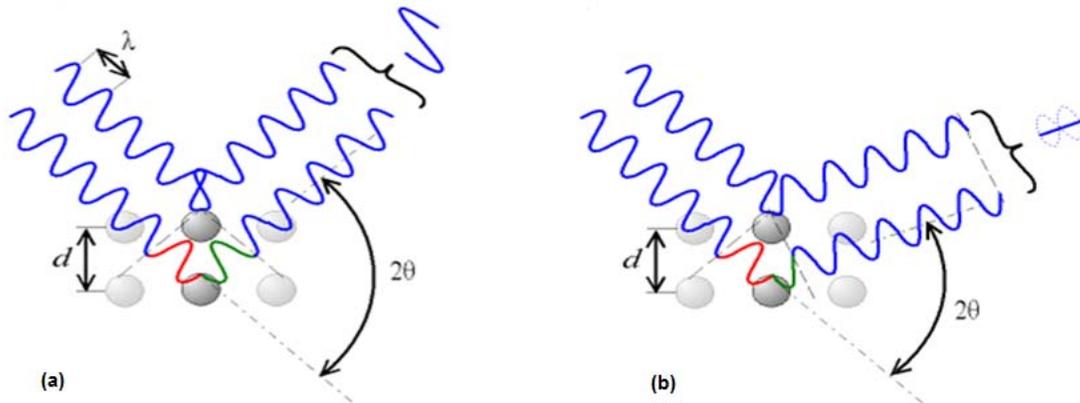


Figura 2.  $n\lambda = 2d \sin(\theta)$ ; donde  $n$ , es un número entero;  $\lambda$ , es la longitud de onda de los rayos X;  $d$ , es la distancia entre los planos de la red cristalina y;  $\theta$ , es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión. a) Cuando el ángulo de desviación es  $2\theta$ , el cambio de la fase de las ondas produce interferencia constructiva. b) Ondas que producen ondas de interferencia destructiva.

Finalmente, tras varios años de grandes aportes teóricos y evidencias experimentales en el área de la física atómica y nuclear, se pudo clasificar a los rayos X como radiación electromagnética con longitudes ondas comprendidas aproximadamente en el intervalo de 0.05 Å a 100 Å (si bien, las longitudes de onda empleadas en cristalografía de rayos X van de 0.7 hasta 1.8 Å). Ellos presentan una naturaleza dual “onda-partícula” como se ve reflejada en la siguiente relación:

$$E \text{ [keV]} = h\nu = \frac{12.397}{\lambda \text{ [Å]}}$$

Donde  $E$  es la energía de los rayos X,  $h$  la constante de Planck,  $\nu$  es la frecuencia de onda electromagnética y  $\lambda$  su longitud de onda. Cuando las ondas electromagnéticas exhiben el aspecto corpuscular de su naturaleza dual, las partículas individuales reciben el nombre de *fotones* ó *cuantos*.

Los rayos X poseen una serie de propiedades que podemos resumirlas de la siguiente manera:

- Se propagan en línea recta a la velocidad de la luz ( $3 \times 10^8$  m/s).
- Son absorbidos diferentemente al atravesar materia de composición, densidad y espesor variable.
- Son reflectados, difractados, refractados y polarizados.
- Son capaces de ionizar gases.
- Son capaces de afectar propiedades eléctricas de líquidos y sólidos.
- Son capaces de oscurecer placas fotográficas.
- Son capaces de liberar fotoelectrones y electrones de retroceso.

- Son capaces de producir tanto reacciones con implicaciones biológicas, como el daño y muerte de células. También producen mutaciones genéticas.
- Pueden ser emitidos en un espectro continuo.
- Pueden ser emitidos también como una línea espectral característica de los elementos químicos.

### 2.1.2 Difracción de rayos X por los cristales de proteína

Los rayos X se originan en el laboratorio en tubos de alto voltaje (bombardeo de una placa metálica con electrones acelerados), o bien, en instalaciones de sincrotrón (desvió, mediante campos magnéticos de la dirección de un haz de electrones a elevada velocidad). De ellos se selecciona una radiación monocromática, con una longitud de onda próxima a 1 Å (si bien, una de las ventajas de un sincrotrón consiste en modular la longitud de onda los rayos X generados sin comprometer su intensidad).

El proceso para la solución de una estructura o modelo a partir de difracción de rayos X se puede dividir en distintos subprocesos: cristalización, colecta de datos, procesamiento y determinación de simetrías, cálculo de fases, interpretación de la densidad electrónica (generación y afinamiento de un modelo) y, aunque no es parte de la determinación estructural en sí, el análisis de la relación estructura-función.

La cristalización es, para muchos, la pauta en el proceso de resolución de una estructura cristalográfica. Se logra explorando el espacio, o intervalo de concentraciones proteína-precipitante, que hay entre la solubilidad y precipitación de una proteína dada. Para ello se forman gotas constituidas por las soluciones en que se encuentra la proteína y la o las moléculas precipitantes a diferentes concentraciones. Luego deben optimizarse las condiciones en que aparecen estructuras cristalinas con el fin de obtener cristales de buena calidad. El tamaño mínimo que debe tener un cristal para difractar es de 50  $\mu\text{m}$  en su longitud más corta (si bien en algunas fuentes sincrotrón, llamadas microfocales, cristales de 3 micras de lado son suficientes). La calidad del cristal es importante.

Durante la colecta de datos (medición de las difracciones u obtención del patrón de difracción) lo más importante es la estrategia para obtener la mayor cantidad posible de observaciones (difracciones) que permitan determinar a la estructura. Esta última depende directamente del grupo espacial o simetría del cristal, la cual se calcula durante las primeras difracciones y es un parámetro propio de la red cristalina. También se debe cuidar que el sistema de enfriamiento y la humedad del ambiente no provoquen la formación de hielo alrededor del cristal, así como el decaimiento de la capacidad de difracción del mismo durante la medición. Después de la colecta de datos hay que procesarlos y confirmar la simetría del cristal. Durante el procesamiento se obtienen y se ordenan los índices  $h, k, l$ , e intensidades de cada difracción en el patrón (patrón de difracción y factores de estructura). *Grosso modo*, la simetría se obtiene al analizar la posición de las reflexiones y a partir de ellas deducir el arreglo (red cristalina) en que se encuentran. La posterior búsqueda de ausencias sistemáticas<sup>6</sup> permite afinar la selección del grupo espacial al comparar los datos experimentales con las ausencias sistemáticas que se conocen (han sido calculadas) para cada simetría.

El cálculo de fases, es uno de los problemas centrales en la determinación de estructuras macromoleculares por rayos X. Se pueden obtener por varios métodos, pero los más utilizados son derivados del uso de átomos

---

<sup>6</sup> Los puntos que no se encontraron en un patrón de difracción de un cristal con simetría "x".

pesados y mediante reemplazo molecular. El método de derivados de átomos pesados consiste en comparar el patrón de difracción de cristales nativos con los de cristales a los que se agrega sales metálicas por difusión. Esto con la finalidad de encontrar la posición de los átomos pesados y a partir de ellas aproximar las fases de toda la molécula. En el caso de reemplazo molecular se utiliza una estructura homóloga que se rota y traslada, dentro de la red cristalina medida, para determinar la orientación relativa de los ejes moleculares y su posición en el espacio con respecto a los elementos de simetría observados. Al conocer la orientación y posición es posible determinar un juego de fases iniciales a partir de las que se calcula un mapa de densidad electrónica. El modelo se va ajustando (afinando) sobre el mapa iterativamente hasta obtener el que mejor explique el patrón de difracción.

La interpretación de la densidad electrónica incluye la generación y afinamiento de un modelo a partir de las difracciones. Por afinamiento entendemos el método en el que un modelo es modificado para reducir la discrepancia entre los datos experimentales y el propio modelo; se respetan siempre las restricciones geométricas de los enlaces peptídicos (Kleywegt y Jones, 1995). En un visualizador gráfico se despliegan el mapa de densidad calculado y el modelo (los cuales deben de ajustar entre sí). Posteriormente se mueven los residuos hasta que el mayor número de átomos este dentro de la densidad y, enfatizar en los átomos de cadena principal y de mayor número de electrones (S, N y O).

La meta de obtener una estructura macromolecular es el encontrar las bases moleculares que la relacionan con su función. En general se localiza el sitio activo, aminoácidos catalíticos, y en caso de presentarse, el sitio de unión a otros ligantes (como cofactores). Sin embargo, un paso crucial para transformar amplitudes e índices de Miller en mapas de densidad electrónica consiste en solucionar el problema de fases. De manera concreta el problema de fases consiste en la imposibilidad de medir de manera directa el desfaseamiento que un haz de rayos X presenta al interactuar con dos átomos equivalentes dentro de una red cristalina, los cuales se encuentran en distintos lugares del cristal. Si este cambio de fase (debida a la distinta trayectoria que el haz de rayos X recorre al interactuar con dos átomos equivalentes) no es determinado, es imposible conocer la información tridimensional sobre la posición relativa de este par de átomos. La solución del problema de fase retardó la aplicación de la difracción de rayos X para macromoléculas hasta que, a partir de los años 1950, se desarrollaron formas de resolver esa indeterminación (llamados métodos de resolución estructural). Los principales son:

### **2.1.3 MIR, sustitución isomórfica o reemplazo isomórfico múltiple (*Multiple Isomorphous Replacement*)**

Para utilizar esta técnica es necesario obtener un cristal de la proteína “nativa” y una colección de cristales “derivatizados”. En estos últimos, se difunde una sal de un metal pesado, con el fin de alterar las intensidades de los patrones de difracción y, facilitar la identificación de la componente debida al metal pesado. La incorporación del metal no debe alterar ni la estructura de la proteína, ni la organización de la red cristalina; por lo que se obtienen cristales llamados isomorfos. Además, en algunos casos se dispone de información sobre la ubicación preferente de algunos átomos metálicos en las proteínas (por ejemplo, coordinados por residuos de cisteína, o bien se sustituye a los metales endógenos de las metaloproteínas). La fase obtenida para el átomo pesado es normalmente similar a la fase del resto de la proteína, por lo que la asignación de fases para todo y cada uno de los átomos de la proteína se facilita.

#### **2.1.4 MAD, dispersión anómala múltiple (*Multiple Anomalous Dispersion*)**

Todos los átomos son susceptibles de ser ionizados al interactuar con rayos X con una energía específica. Cuando la energía de los rayos X es capaz de escindir un electrón de la capa interna de un átomo dado, se produce un rearrreglo electrónico, en el que otro electrón de una capa superior ocupa el lugar del electrón escindido y se libera un fotón (fluorescencia). Si se compara un patrón de difracción colectado a una energía (longitud de onda) en la que este efecto de rearrreglo electrónico ocurre (llamado comportamiento anómalo), con otro en el que no, se puede disectar la componente del átomo con comportamiento anómalo. Al encontrar esta componente, y de manera análoga al método isomórfico, es posible calcular las fases del átomo anómalo y expandirlas al resto de la proteína. El azufre y el selenio poseen frecuencias de resonancia en el intervalo de los rayos X utilizados en difracción, y su contribución anómala al espectro puede ser analizada. Se puede aprovechar la presencia natural de átomos de azufre (cisteínas y metioninas), o bien, intercambiarlo por un mejor dispersor anómalo como lo es el selenio (selenocisteínas y/o selenometioninas). Esto último mediante técnicas de ingeniería genética sobre el ADN y clonación en sistemas auxótrofos a cisteína y/o metionina.

#### **2.1.5 MR, reemplazo molecular (*Molecular Replacement*)**

Si se dispone de la estructura ya determinada para una proteína con suficiente identidad de secuencia (presumiblemente, con la consiguiente homología estructural), se puede utilizar aquella para resolver las fases de un cristal de una proteína homóloga. La estructura conocida sirve como primer modelo para la proteína que se va a determinar, pero se utiliza tanto la celda unitaria, como la simetría del cristal problema. Se intenta entonces acomodar, mediante rotaciones y traslaciones, a la estructura modelo en la celda unitaria de la proteína problema. De esta manera se intenta reproducir las intensidades colectadas para el cristal problema. Con ello se asume que la reproducción de las posiciones e intensidades del experimento original, al utilizar el modelo homólogo, permitirá encontrar la posición de todos los átomos dentro del cristal. Los métodos tradicionales en el reemplazo molecular están basados en la función de Patterson. Estos métodos aun son usados casi universalmente. En contraste, los métodos basados en probabilidad están apenas desarrollándose. Sin embargo el uso de funciones de probabilidad máxima aplicados tanto a métodos de reemplazo molecular, como procesos de afinamientos fueron empleados en esta tesis (implementados en el programa PHENIX).

La función de Patterson es importante ya que podemos calcularla sin información sobre las fases. De esta manera podemos calcularla a partir de un modelo ajustado a una matriz cristalina, o bien, a un patrón de difracción en el que no se ha determinado el problema de fases. Entonces, si el modelo está orientado y colocado en la posición correcta con respecto a la celda nueva, los dos Patterson deben ser casi idénticos (o al menos similares). En esta simple aproximación, el problema del reemplazo molecular tiene seis dimensiones (tres parámetros para especificar la orientación y tres para especificar la posición). Para

contender con este escenario, la estrategia más común consiste en explorar estas dimensiones por separado, reducir el tamaño del problema. Una manera de dividirlo consiste en determinar primero la orientación (tres parámetros) y luego la traslación (tres parámetros de posición).

### 2.1.6 Validación del modelo estructural

El modelo estructural resultante debe además ser consistente con criterios estereoquímicos bien establecidos, como la ausencia de choques entre átomos (no se pueden aproximar más allá de sus radios de van der Waals), distancias y ángulos de enlace adecuados, compatibilidad con el espacio conformacional definido por el diagrama de Ramachandran y parámetros térmicos razonables (vibración de los átomos o valores B).

La simetría es uno de los temas esenciales, pero antes de ello hay que explicar conceptos básicos. La celda unitaria, es la unidad cristalina básica; un paralelepípedo definido por tres longitudes (a, b, c) y el mismo número de ángulos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que reproduce el volumen total del cristal al trasladarla en las tres dimensiones. La red cristalina (*lattice*) es el arreglo de puntos sobre los vértices, caras o centros de la celda unitaria, tales que alrededor de cada uno se encuentra el mismo ambiente y orientación que el que rodea a los equivalentes. Dentro de la celda unitaria el mínimo agregado de las moléculas que puede yuxtaponerse en otras entidades por operaciones de simetría es la unidad asimétrica. En el más simple de los casos la unidad asimétrica es una sola molécula de proteína, y, en este caso, la unidad asimétrica y la celda unitaria tendrían el mismo volumen.

Existen 230 grupos espaciales que describen la simetría de las moléculas contenidas en la celda unitaria. Se representan con una letra mayúscula (el tipo de red) seguida de tres números (con o sin subíndices) que indican los operadores de simetría ejecutables que reconstruyen el cristal (Rhodes, 2000). Las operaciones simétricas más simples son: rotación, traslación y reflexión (esta última prohibida en proteínas). Cuando se combinan dan origen a otras más complejas como son centros de simetría, ejes de rototraslación y planos de deslizamiento. Debido a que las proteínas son moléculas formadas mayoritariamente por un solo tipo de isómero óptico, ni los planos de espejo ni otro tipo de simetrías que las contengan pueden presentarse en cristales protéicos. Los únicos posibles, en este caso, son rotaciones, traslaciones y rototraslaciones. Las limitantes simétricas presentes en proteínas reducen el número de grupos espaciales posibles a 65. La descripción amplia de los 230 grupos, agrupados en 32 clases, 7 sistemas cristalinos y 14 redes cristalinas de Bravais se encuentra en las tablas internacionales para la Cristalografía de Rayos X<sup>7</sup>.

La resolución es un valor importante tanto para biólogos y bioquímicos que intentan entender la relación estructura-función de las proteínas al tratar de obtener estructuras tridimensionales con el mayor detalle posible. De manera concreta la resolución indica la distancia mínima que pueden tener dos "puntos" o átomos del cristal para asegurar que se trata de dos átomos diferentes, por lo tanto una resolución de 0.9 Å, da más detalle que otra de 3.0 Å. El término "alta resolución" se aplica a la estructura cristalina de algunas proteínas. Por muchos años este término ha significado que los datos de difracción de rayos X permitan una resolución cercana a 2 Å. Sin embargo, sólo en algunos casos era posible obtener datos completos con dicha

<sup>7</sup> [http://www.chem.qmw.ac.uk/surfaces/scc/scat1\\_1b.htm](http://www.chem.qmw.ac.uk/surfaces/scc/scat1_1b.htm)

resolución. Los avances tecnológicos recientes y el uso de sincrotrones han modificado mucho la colecta de datos. No todos los cristales de proteína difractan con una resolución mayor a 2 Å, pero ahora es posible obtener una colecta completa de datos para un sorprendente número de moléculas (con un solo cristal y a esa resolución). El resultado de esto es el incremento dramático en el número de estructuras que se han afinado a una resolución atómica (mejor que 1.2 Å).

La complejidad de un modelo afinado está limitada por el cociente entre el número de observaciones (las reflexiones) y el número de parámetros individuales de cada átomo del modelo (sus coordenadas espaciales – x, y, z-, su ocupación y su valor-B). En cristalografía, el número máximo de observaciones depende de la calidad del cristal, y por lo tanto, del límite máximo de resolución. Para los cristales de proteína, es importante comprobar que se cuenta con suficientes datos para realizar un afinamiento libre del modelo. En caso de contar con suficientes datos, el modelo estructural se puede simplificar reduciendo el número total de parámetros a ajustar en el modelo. Los beneficios de un modelo estructural simplificado son la base de muchas técnicas cristalográficas, como el afinamiento de cuerpos rígidos, el afinamiento torsional, el uso de simetrías no cristalográficas, el uso de tensores TLS, etc.

El factor de temperatura o valor-B puede ser usado como una medida de que tanto oscila o vibra el átomo alrededor de la posición especificada en el modelo. La difracción es afectada por esta variación en la posición atómica, por lo que lo mejor es asignar un valor-B a cada átomo, e incluirlo entre los parámetros para optimizar el proceso de afinamiento. Para los valores-B computados durante el afinamiento, se sabe que los átomos en la molécula tienen en su mayoría libertad de movimiento y, con esta información se analiza la “dinámica” del modelo.

La ocupación de un átomo es una medida de una fracción de moléculas en el cristal en la cual el átomo se encuentra presente. Si todas las moléculas en el cristal son precisamente idénticas, las ocupaciones para todos los átomos serán de 1.00. La ocupación es incluida entre los parámetros del afinamiento porque ocasionalmente dos o más conformaciones distintas pueden ser observadas para una región, como la superficie de un lado de la cadena proteica. El modelo puede ser afinado mejor si los átomos de esta región son asignados con ocupaciones iguales a la fracción del lado de la cadena de cada conformación. Por ejemplo: si dos conformaciones se presentan con la misma frecuencia, los átomos involucrados reciben ocupaciones de 0.5 en cada una de las dos posiciones posibles lo que incluye a las ocupaciones dentro de los parámetros del afinamiento. Con esto obtendremos un estimado de la frecuencia de cada conformación alternativa que, nos proporcionará; 1) Información adicional acerca de la dinámica conformacional de la proteína, y 2) La obtención de un modelo más exacto, que contribuirá al progreso en el afinamiento<sup>8</sup>.

Por razones técnicas y al considerar la estrategia de colecta de datos, las propiedades del cristal, y otros procesos esenciales para la cristalografía, la unidad asimétrica puede ser sólo una parte de la unidad funcional. Esto, algunas veces, genera problemas para los usuarios de modelos cristalográficos, ya que el archivo PDB contiene sólo las coordenadas de la unidad asimétrica. Por ejemplo, para la hemoglobina (código PDB 1HCO / 2HCO / 1IRD / 1A4F), sólo se encuentra un par alfa-beta, mientras que en la unidad biológica existen dos pares.

---

<sup>8</sup> <http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/ModQual/>

Una medida que censa la concordancia entre el modelo cristalográfico y los datos de difracción originales es el valor R de afinamiento (también llamado R-value). El valor R es usado para evaluar el progreso de la estructura afinada, y hace de esto una medida de la calidad en el modelo. De manera general, mientras el afinamiento avanza los valores R de afinamiento se reducen y esto indica, una mejor explicación del modelo a partir de los datos de difracción colectados.

Con el fin de aumentar la confiabilidad del proceso de afinamiento, desde los años 90 se generalizó el uso del cálculo de R-free (Brunger, 1992). El R-free es calculado de la misma manera que el valor R de afinamiento, pero se usa sólo un grupo de intensidades seleccionadas al azar (usualmente entre el 5 y el 10 % de las reflexiones totales). Se ha demostrado que la disminución del valor de R-free correlaciona con el mejoramiento de las fases del modelo atómico. En general, durante los estados intermedios del afinamiento, los valores de R-free son más altos que el valor R. Solamente en la fase final, los dos valores comienzan a ser similares, sin llegar a ser idénticos. Puesto que el cálculo de R-free se realiza con un grupo pequeño y no alterado de reflexiones, su valor y más aun su cercanía numérica con el valor R de afinamiento, conlleva a aumentar la confianza en el proceso de afinamiento.

El objetivo principal del afinamiento consiste en generar modelos atómicos con lo que se puedan construir mapas de densidad nuevos, que permitan examinar y corregir al modelo (manual o automáticamente). Los mapas provenientes del afinamiento son mejores comparados a los mapas iniciales que cuentan solo con las fases experimentales, ya que se siguen perfeccionando conforme mejora el modelo. Esto es particularmente cierto, si las fases experimentales son usadas en el afinamiento (como normalmente se realiza en el cálculo del R de afinamiento). De los mapas generados durante el proceso resaltan dos tipos:

- Mapas de densidad electrónica, " $2F_{obs} - F_{calc}$ ". Estos muestran un estimado de la densidad electrónica para la estructura. Es el mapa donde el modelo debe ser acoplado.
- Mapas de diferencia, " $F_{obs} - F_{calc}$ ". Estos mapas muestran el estimado de la diferencia entre los datos estructurales y el modelo. Idealmente, densidades positivas indican zonas donde deben de agregarse átomos al modelo. Las densidades negativas muestran zonas del modelo que deben ser eliminadas, ajustadas, sometidas a revisión en sus parámetros térmicos o de ocupación. La existencia de pares positivos/negativos indican que los átomos del modelo se deben mover alternativamente entre estas dos posiciones, o bien, que se necesita un ajuste fino en la posición de la cadena.

Durante los ajustes que se realizan en el proceso de afinamiento, es útil desplegar al mismo tiempo el mapa de  $2F_{obs} - F_{calc}$ , y los contornos positivos y negativos del mapa de diferencias. En general, los detalles en el mapa de diferencia muestran que algo está mal o faltante en el modelo. En las etapas iniciales del afinamiento es importante usar el mapa experimental inicial o generar uno con al menos una sección del modelo faltante (mapas de zona omitida), para evitar al máximo que el modelo afecte a los datos de difracción.

Es común que algunas zonas de la estructura estén pobremente definidas, y, por lo tanto, sea difícil (o imposible) mejorar el modelo. El mayor problema consiste en densidades presentes pero no interpretables, las cuales probablemente presenten zonas de conformaciones múltiples sobrepuestas, y, hasta el momento, no existen herramientas para solucionar el problema. Es usual encontrar zonas que ajustan perfectamente en el

modelo seguidas de zonas pobres. Es claro que estas áreas están fuertemente influenciadas por sus parámetros de desplazamiento.

Las moléculas de agua son una parte importante de la estructura: un grupo de aguas bien ordenadas contribuye más al poder dispersante sobre los rayos X que una zona de la proteína pobremente ordenada. Las moléculas de agua son claramente visibles en los mapas de densidad y, de manera particular, en los mapas de diferencia (al menos en resoluciones medias y altas). A resoluciones menores de 2.8 Å a 3.0 Å, las moléculas de agua no pueden colocarse de manera precisa en el modelo; sólo aquellas altamente conservadas y que se les han involucrado con funciones biológicas como cualquier otro residuo de la proteína. El valor residual R (R-free) es una buena herramienta para conocer 1) Si la adición de aguas mejora o no al modelo y 2) el nivel del procesamiento donde se adicione las moléculas de agua al modelo. Con esto evitar la constricción de dichas moléculas en sitios donde se puedan colocar otras moléculas como: moléculas unidas, cadenas laterales, iones, etc. Por ello, se recomienda corroborar una a una las moléculas de agua adicionadas al modelo.

### 2.1.7 Resolución de los datos

Normalmente, se realiza primero un análisis con un número limitado de puntos derivados de la difracción del cristal para, obtener una estructura de baja resolución. Si todo va bien, se miden los puntos y se perfeccionan los cálculos para obtener una resolución mayor. Si los cristales son de buena calidad se, alcanzarán resoluciones de más de 1 Å. Resolución suficiente para identificar tanto grupos de moléculas y átomos, como las interacciones entre ellos.

Para conseguir una resolución alta es importante realizar experimentos de difracción a temperatura baja (enfriamiento de la muestra con nitrógeno, como se menciona anteriormente). A menor temperatura se obtiene una menor movilidad vibratoria de los átomos, con lo que sus posiciones son más regulares en el cristal, se estabilizan las regiones con flexibilidad conformacional y, además, aumenta el tiempo de vida del cristal. Si bien, la característica responsable de la calidad de los datos de difracción es siempre la calidad del cristal difractado.

### 2.1.8 Los electrones como dispersores de rayos X

Los electrones se encuentran en el átomo distribuidos en los distintos niveles y subniveles de energía. Los electrones se sitúan en estos niveles ocupando primero aquéllos de menor energía hasta colocarse todos. A este estado de mínima energía del átomo se le denomina estado fundamental.

Si ahora bombardeamos estos átomos con un haz de electrones o con fotones de rayos X, una pequeña parte de la energía se invierte en la producción del espectro característico de rayos X de los elementos que componen la muestra bombardeada. El proceso de producción de este espectro característico puede esquematizarse del modo siguiente:

**Excitación:** el choque de un electrón o fotón incidente con un electrón de las capas internas del átomo, produce la expulsión de dicho electrón y queda el átomo en estado excitado.

**Emisión:** este átomo en estado excitado tiende a volver inmediatamente a su estado fundamental, para lo cual se producen saltos de electrones de niveles más externos para cubrir el hueco producido. En este proceso hay un desprendimiento de energía, igual a la diferencia de energía de los niveles entre los que se produce el salto electrónico, en forma de radiación electromagnética correspondiente a la región de rayos X (Figura 3).

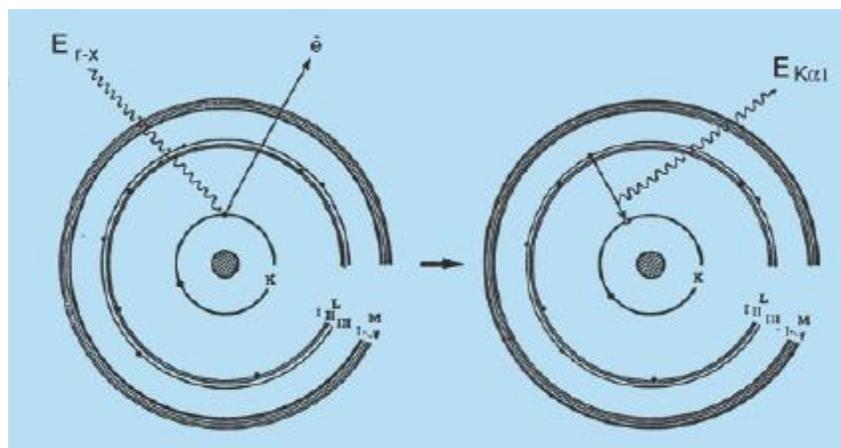


Figura 3. Excitación producida por bombardeo de electrones (excitación - emisión).

A la excitación producida por bombardeo de electrones se le denomina excitación primaria, y a la radiación así obtenida se le llama radiación X primaria. Los tubos de rayos X son fuentes de la radiación X primaria. Esta última; se produce también en la microscopía electrónica, al ser irradiada una muestra por un haz de electrones, donde se utiliza para el análisis químico de la muestra.

Al proceso de excitación con otra radiación X se le denomina excitación secundaria, y la radiación X producida por excitación de otra radiación X se denomina radiación X secundaria o radiación de fluorescencia. Es la radiación X secundaria característica la que se utiliza para el análisis químico en los espectrómetros de fluorescencia de rayos X.

### 2.1.8.1 Mecanismos de interacción

Los mecanismos de interacción que prevalecen para energías de algunas decenas de keV y aproximadamente 10 MeV son tres. Esto depende a predominio de cada uno de ellos del material absorbente y de la energía de la radiación. Estos mecanismos son:

- Efecto Fotoeléctrico
- Dispersión de Compton
- Producción de Pares

Los dos primeros involucran interacciones con electrones de los átomos del cristal bombardeado con rayos X.

La producción de pares se manifiesta para energías superiores a 1.02 MeV que es la energía equivalente a la masa en reposo de dos electrones. Este proceso se puede considerar como la interacción del rayo incidente con la nube electrónica del átomo en el que es totalmente absorbido y, emerge un electrón, denominado fotoelectrón. La probabilidad de ocurrencia de este proceso aumenta con la energía de unión, por lo que habitualmente el fotoelectrón pertenece a las capas K o L del átomo, que corresponden a las más próximas al núcleo y sus energías de unión son mayores.

### 2.1.8.2 Efecto fotoeléctrico

Mediante el efecto fotoeléctrico, un fotón incidente es absorbido y esto, causa la eyección de un electrón cuya vacancia es ocupada por otro electrón de una capa más externa, lo que da origen a la emisión de un fotón de fluorescencia o característico (**Figura 4**).

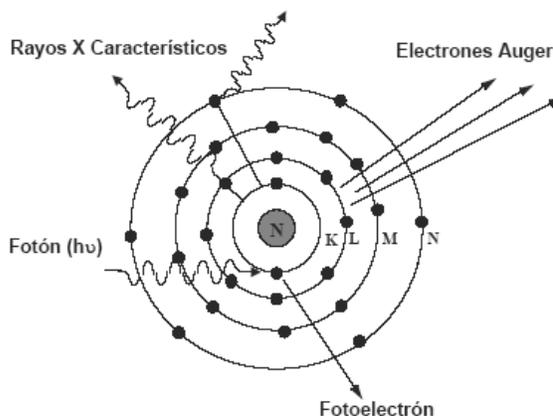
Dado que la sección eficaz de absorción fotoeléctrica tiene en cuenta la probabilidad de producir ionizaciones en todas las capas de un átomo, la misma puede ser descrita como una suma de probabilidades para la ionización de cada una de las mismas. En otras palabras:

$$t = t_k + (t_{L I} + t_{L II} + t_{L III}) + (t_{M I} + t_{M II} + t_{M III} + t_{M IV} + t_{M V}) + \dots$$

Cada término del segundo miembro expresa la sección eficaz de absorción fotoeléctrica para cada subcapa del átomo. El valor de  $t$  presenta un salto abrupto como función de la energía para valores iguales a las energías de ionización (bordes de absorción) de los electrones en cada capa del átomo.

El efecto fotoeléctrico presenta una fuerte dependencia con el número atómico que se manifiesta en su coeficiente de atenuación. Este coeficiente es proporcional a  $Z^5$ . Esto hace que por ejemplo, el plomo sea un excelente blindaje para rayos X de bajas energías.

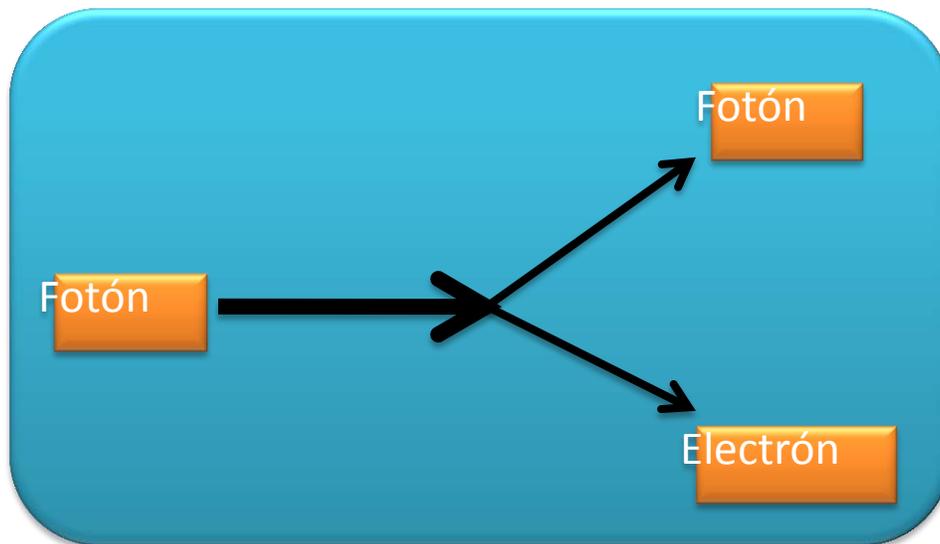
La vacante dejada por el fotoelectrón es cubierta por otro electrón que proviene de las capas superiores, con la emisión de radiación (rayos X característicos) que corresponde a la diferencia de energías entre ambos niveles, o bien, esta energía es transferida a un segundo electrón, que emerge del átomo y queda doblemente ionizado.



**Figura 4. Efecto fotoeléctrico.** Un fotón incidente es absorbido lo que, causa la eyección de un electrón cuya vacancia es ocupada por otro electrón de una capa más externa. Esto da origen a la emisión de un fotón de fluorescencia o característico.

### 2.1.8.3 Dispersión de Compton

Se considera a la dispersión de Compton una colisión elástica entre el fotón incidente y un electrón. El fotón, queda libre, por ser su energía mucho mayor que la de unión del electrón (**Figura 15**). El resultado es la desaparición del fotón con  $E_0$  y la aparición de otro fotón de energía  $E$  menor, acompañado de un electrón cuya energía cinética es aproximadamente la diferencia  $E_0 - E$ . Este proceso se muestra esquemáticamente a continuación:



Este mecanismo de interacción prevalece, en general, para fotones cuyas energías están comprendidas entre 0,5 y 10 MeV. Cada electrón en el medio absorbente actúa como un centro dispersor por lo que las características macroscópicas del medio dependen principalmente de la densidad electrónica por unidad de masa.

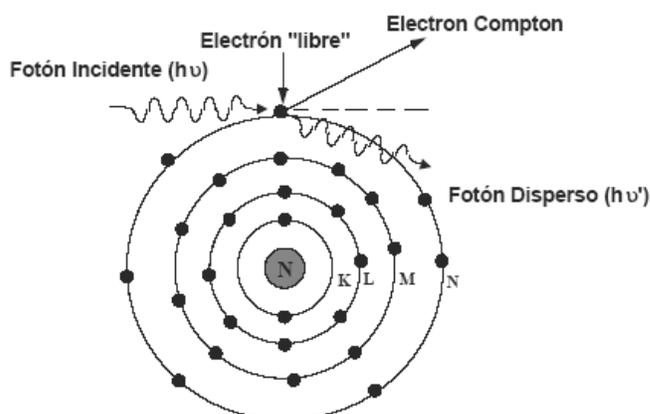


Figura 5. Dispersión de Compton. Una colisión elástica entre el fotón incidente y un electrón atómico, el que se supone libre por ser la energía del fotón mucho mayor que la de unión del electrón.

#### 2.1.8.4 Daños por radiación

Los daños por radiación representan un importante problema para la cristalografía macromolecular, especialmente si se trata de coleccionar datos de pequeños cristales usando una fuente de rayos X intensa. Este daño se reduce empleando criotemperaturas (de alrededor de 100K) lo que evita la pérdida de resolución en el patrón de difracción. Incluso antes de que ocurra una pérdida significativa de resolución, un daño estructural puede ser observado en sitios específicos de la proteína. Blake y Phillips, (1962), indican que el daño es proporcional a la dosis de radiación absorbida (medida en Gray, Gy= J Kg<sup>-1</sup>).

Para la caracterización del proceso de daños por radiación inducidos por rayos X en un cristal macromolecular crioprotectado, es necesario conocer la dosis absorbida. La energía se disipa en un cristal crioprotectado, y esto causa una variedad de procesos lo que, incluye: Un rompimiento de enlaces covalentes, ionización y producción de calor. Estos procesos resultaran en una degradación del orden cristalino, y esto, como consecuencia, repercute en la reducción del poder de difracción.

Después de una dosis absorbida, la difracción del cristal estará deteriorada hasta el punto donde, dependa del propósito de la colección de los datos (ejemplo: Fases experimentales, colección de datos a alta resolución, reemplazo molecular).

Los daños por radiación pueden ser clasificados de naturaleza primaria o secundaria. El daño primario (que no puede ser evitado) es la ionización de un átomo por un fotón de rayos X, a través de la absorción fotoeléctrica o dispersión de Compton. El daño secundario (depende de la química del cristal y la difusión de especies reactivas en el mismo) es debido a la formación de electrones secundarios con una energía de algunas decenas de keV. Esta información, inducirá eventos de excitación y ionización dentro de los átomos del cristal. Estos tipos de daños por radiación son un factor limitante que compromete la calidad del patrón de difracción, debido al incremento por daños por radiación. Las pérdidas graduales de intensidades en el patrón de difracción son constantes. La pérdida de difracción es más una medida indirecta que directa de los daños por radiación.

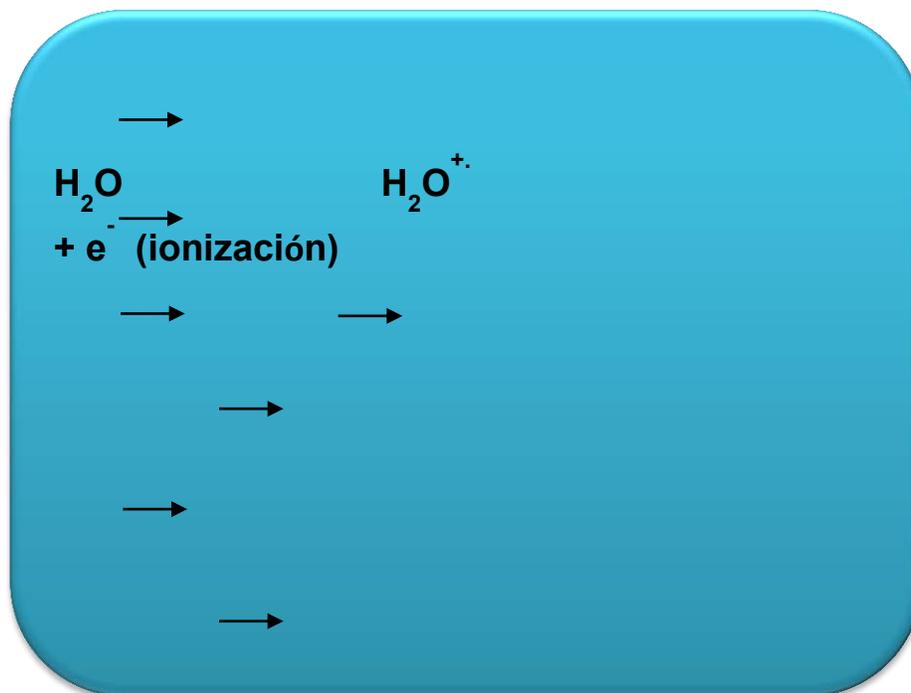
#### 2.1.8.5 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Las ROS son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción. Las distintas especies reactivas de oxígeno pueden participar en distintos tipos de reacciones en las que pueden sufrir procesos de oxidación o reducción. De menor a mayor grado de reducción son especies reactivas de

oxígeno: 1) el anión superóxido  $O_2^-$  que es un potente agente oxidante muy reactivo con el agua, 2) el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , 3) el radical hidroxilo  $OH$  que es el más reactivo. Aceptando un electrón más, el radical hidroxilo da lugar a una molécula de agua. También pertenecen a las ROS el óxido nítrico (NO) y el  $HONO_2^-$ . Al ser especies reactivas las ROS pueden producir efectos dañinos sobre las células como los daños en el ADN, daños producidos por oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos y daños producidos por reacciones con metales como el hierro y el cobre.

Los daños por rayos X y otras formas de radiación ionizante en materiales orgánicos fueron descritos por medio de estudios de resonancia de espín electrónica (ESR)<sup>9</sup>.

La interacción de los rayos X con el solvente es de esperar que produzca varias especies reactivas: radicales hidroxilos, electrones hidratados ( $e^-_{aq}$ ), protones, radicales hidrógeno e hidrógeno como gas, a través de la siguiente reacción:



Los cambios estructurales en cristales de proteína crioprotectados e inducidos por radiaciones sitio-específicas, fueron reportados por muchos investigadores en el 2000. Este daño específico fue observado en aminoácidos particulares en un orden bien definido: primero, la ruptura de puentes disulfuro, seguido por descarboxilación de ácidos glutámicos y residuos de ácidos aspárticos, la pérdida de OH de residuos de tirosina y después la

<sup>9</sup> Resonancia de spin electrónica (ERS), trata de encontrar formas de radiación ionizante en materiales orgánicos para encontrar formas de generación y propagación de radicales libres.

ruptura de la unión C-S en metioninas. El orden bien definido de susceptibilidad indica que algunos radicales libres se mantienen móviles a 100K. Si este no estuviera móvil, el daño específico podría ser observado en átomos con una gran absorción de rayos X (como centros metálicos), o para átomos con alta interacción, resultando fotoelectrones.

#### 2.1.8.6 Interacción con el solvente

Durante la exposición a los rayos X, existe una interacción entre el fotón proveniente de los rayos X con el solvente (generalmente agua) y las moléculas de la proteína del cristal.

Los radicales hidroxilos son extremadamente lábiles y, llevan la reacción de la mayoría de las moléculas orgánicas a un rango límite, dominado por la tasa de difusión (Swar y Swartz, 1983). De acuerdo a la medida ERS de Jones *et al.* (1983), el nitrógeno-liquido a temperatura (77K) las cargas positivas son atrapadas, y forman radicales amino en el esqueleto de la proteína, mientras que los electrones liberados por radiación ionizante tienen una movilidad significativa. Rao *et al.* (1983) encontró que los electrones agregados a las proteínas a 77K pueden moverse eficientemente dentro de la misma hasta encontrar uniones S-S. En ausencia de dichas uniones, y en presencia de otros grupos con alta afinidad electrónica, estos electrones permanecen en la proteína hasta o interactúan con amidas.

#### 2.1.8.7 Dosis de absorción

La dosis depositada en un cristal, puede ser calculada mediante el conocimiento de los coeficientes de absorción de los átomos presentes en el cristal, y de las condiciones experimentales de la difracción misma (tamaño del haz, su perfil, su energía y su flujo, el tamaño del cristal y el tiempo de irradiación). La energía del haz de rayos X tiene una influencia sobre el coeficiente de absorción de un átomo; en el máximo del comportamiento anómalo de un átomo dado, el coeficiente de absorción puede ser muchas veces más grande que a otra longitud de onda que, aumenta y localiza los daños por radiación. Este fenómeno permite elegir la energía incidente de acuerdo con el propósito de la colección de datos: si se requiere maximizar la alta resolución, habrá que alejarse del pico anómalo, mientras que si se requiere la señal anómala para determinar fases, se deberá contender con un aumento en los daños por radiación. Los síntomas mas obvios de los daños por radiación son varios: 1) Decaimiento de la intensidades difractadas, y por tanto, de la resolución, 2) Incremento a nivel atómico de los valores-B, 3) Incremento en el volumen de la celda unitaria y, 4) Cambio de color en el volumen irradiado de el cristal, y daño sitio-específico. Estos eventos ocurren en un orden bien definido. Se comienza por el rompimiento de uniones disulfuro, seguido por la descarboxilación de aspartatos, glutamatos y C-terminales y, termina con la perdida de grupo hidroxilo de las tirosinas. Estos daños por radiación dan lugar a la aparición de modificaciones estructurales, las cuales pueden dificultar la localización de las señales de dispersión necesarias para una exitosa determinación de fases (especialmente en técnicas de MAD, pero incluso en SAD). Los sitios activos y los centros metálicos parecen ser particularmente susceptibles a los daños por radiación, y estos, podrían dar lugar a una interpretación biológica equivocada (Raimond. Ravelli y Garman, 2006).

La energía usada por cristalografía macromolecular se encuentra en el intervalo de 5 a 17 keV. En ese intervalo de energía, alrededor del 2% del haz de rayos X interactúa directamente con la muestra orgánica de tres maneras: 1) Dispersión elástica (responsable del patrón de difracción), 2) Dispersión inelástica, y 3) Efecto fotoeléctrico. A 12.4 keV, se ha calculado que la dispersión elástica, la inelástica y el efecto fotoeléctrico interactúan, respectivamente, con el 8%, 8% y 84% del 2% de los rayos X incidentes en un cristal (lo que implica que 98 % de los rayos X incidentes en un cristal “se pasan de largo” y, no presentan interacción directa con el mismo).

Tradicionalmente los factores de escala y el valor-B se han aplicado para reducir los efectos de la radiación sobre la calidad de la difracción. Esto es insuficiente, sobre todo al considerar efectos como el cambio del volumen de la celda unitaria y cambios específicos en la estructura. El factor de estructura debería idealmente ser tratado en función de la dosis absorbida,  $F_{(dosis)}$ . De hecho esta aproximación se ha implementado en programas como RADOSSE, sin embargo, es fundamental la calibración previa de la fuente de rayos X para obtener resultados útiles (Murray, *et al.*, 2005).

En particular este trabajo se enfoca al análisis estructural de proteínas trinucleares depositadas en el PDB, al considera ciertas características. Estas características fueron: el nombre científico del organismo y, las **condiciones experimentales**, tanto del cristal como de la difracción. Dentro de estas últimas se tomó en cuenta el pH, la temperatura, el método de crecimiento del cristal y las condiciones de crecimiento del mismo. Respecto a la **difracción** se consideró la fuente de radiación, la resolución máxima de los datos y, la redundancia e integridad de los mismos. Dentro del **afinamiento** se analizaron los parámetros de los valores R de afinamiento (tanto R-value como R-free), el valor-B (también llamado valor de desplazamiento atómico o valor de temperatura) y la ocupación de los átomos de cobre. En las **características del cristal** se consideró el sistema cristalino, la celda unitaria, el contenido de la unidad asimétrica y el grupo espacial, (estos conceptos serán explicados más adelante). Todas estas características en conjunto fueron tomadas en consideración para evaluar a las estructuras trinucleares de cobre depositadas en el **Protein Data Bank**, y en su caso, para intentar explicar los cambios observados tras re-afinar a las estructuras cristalográficas.

## 2.2 Oxidoreductasas

Generalmente, son enzimas que transfieren electrones de una molécula (el oxidante) a otra molécula (el reductor), estas son llamadas oxidoreductasas. Estas enzimas catalizan la reacción de oxidación  $A+B^- \rightarrow A^+ + B$  (**Figura 6**).

Para realizar su función fisiológica, las oxidoreductasas emplean varios centros activos redox. Los centros están protegidos por el esqueleto polipeptídico de estas enzimas, los cuales pueden modular su selectividad, potencial redox, reactividad, estabilidad y resistencia a la inhibición. Los centros comunes redox incluyen residuos de aminoácidos (histidinas, tirosinas o cisteínas), iones o complejos metálicos (cobre, fierro, molibdeno, hierro-azufre, grupo hemo) y coenzimas (Flavin Mono Nucleótidos o FMN; Flavin Adenin Dinucleótido o FAD; pirroloquinolina quinona o PPQ) (Xu, 2005).

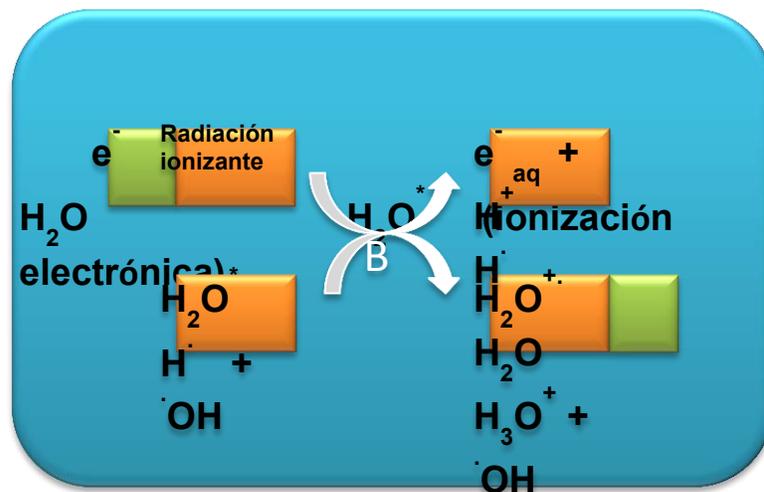


Figura 6. Reacción que catalizan las oxidoreductasas,  $A + B \rightarrow A + B^-$ ; donde A es el oxidante y B es el reductor.

Entre las pocas enzimas que son capaces de catalizar la reducción de oxígeno molecular a agua se encuentran los miembros de la familia de las enzimas trinucleares de cobre, las cuales poseen este metal en su sitio activo y catalizan reacciones de oxidación utilizando al oxígeno molecular como aceptor de electrones. Son proteínas involucradas en numerosas reacciones del metabolismo celular como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la homeostasis de iones metálicos y el catabolismo de nutrientes y componentes químicos tóxicos. Las lacasas constituyen una familia de enzimas que requieren O<sub>2</sub>, para oxidar fenoles, polifenoles, metoxi-fenoles, aminas aromáticas y diversos sustratos no fenólicos (Mayer y Staples, 2002).

Aplicaciones importantes de las oxidoreductasas, radica en su uso en diversas industrias tales como las relacionadas con la síntesis química especializada, la alimentaria, la médica, o bien, aplicadas en el campo de la remediación. Considerando que las enzimas son específicas y biodegradables, los biocatalizadores basados en oxidoreductasas se ajustan al desarrollo de industrias altamente eficientes, sostenibles y ambientalmente amigables (Xu, 2005).

### 2.3 El cobre en sistemas vivos

La bio-disponibilidad del cobre y otros metales ha cambiado dramáticamente durante la historia geológica de la tierra. Antes del advenimiento de la fotosíntesis, una tierra anaerobia favorecía al hierro reducido (Fe II) y al azufre. La bio-disponibilidad del hierro era preponderante debido a que los sulfatos de hierro eran más solubles que los sulfatos de cobre. Debido a que la atmósfera de la tierra aumentaba sus niveles de oxígeno por la acción temprana de los organismos fotosintéticos, el hierro fue oxidado lo que presentó una condición menos soluble (Fe III), de tal forma que precipitaba como metal oxidado. En contraste el cobre fue liberado en su forma oxidada (soluble) y permitió a los organismos incorporarlo como un metal nuevo dentro del repertorio atómico empleado en proteínas. El incremento de la bio-disponibilidad del cobre ocurrió al tiempo en que los organismos se adaptaban al nuevo ambiente oxigenado, el cual podría explicar por qué muchas proteínas de

cobre son encontradas en sistemas que median la química del oxígeno (MacPherson y Murphy, 2007). Las metaloproteínas constituyen la mitad del proteoma de los organismos vivos (Dal Peraro, *et al.* 2007). De todos los metales presentes en ellas, el cobre es de los más recientes en cuanto a su biodisponibilidad (Frausto Da Silva, *et al.* 2001).

Este elemento es un cofactor en una serie de reacciones biológicas de oxidación-reducción y está involucrado tanto en la transferencia externa de electrones, como en las proteínas azules de cobre en el sitio CuA de la citocromo oxidasa y la óxido nitroso reductasa. También se encuentra relacionado con la transferencia de electrones interna, en la unión, activación y reducción del di-oxígeno, nitrito y óxido nitroso (Trujillo, 2007). El cobre es uno de los metales de transición más relevantes en los organismos vivos y sus funciones biológicas están íntimamente relacionadas con sus propiedades redox.

## 2.4 Lacasas

### Características estructurales y sitios de unión al cobre

Las lacasas (p-difenol:di-oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) junto con las ferroxidasas, ascorbato oxidasas, ceruloplasmina y otras enzimas constituyen las proteínas multicobre oxidasas (MCOs). Las MCOs poseen secuencias y estructuras similares que intervienen en los sistemas redox relacionados con el ion cobre (Messerschmidt, 1997). También se denominan proteínas multicobre azules (MCBPs) por el hecho de que el ion cobre T1, tiene un máximo de absorción a 610 nm, y da color a estas proteínas.

Históricamente, los átomos de cobre en proteínas multicobre han sido clasificados en tres tipos (T1, T2 y T3) por sus propiedades espectroscópicas (Solomon *et al.*, 1996). En el espectro UV-visible, el cobre T1 (azul) muestra máxima absorción cerca de 610 nm, y el cobre T3 muestra una máxima absorción cerca de 330 nm. Los cobres T1 y T2 son detectables por resonancia electrónica paramagnética (EPR), mientras el cobre dinuclear T3 no es detectable.

Los aminoácidos de estos centros de unión al cobre están distribuidos en cuatro regiones altamente conservadas (L1, L2, L3 y L4) típicas de lacasas que se extienden desde 8 hasta 24 residuos a lo largo de la secuencia de la proteína e incluyen tanto los aminoácidos específicos de unión al cobre como otros no específicos (Kumar *et al.*, 2003) (**Figura 7**).

Generalmente, los sitios de unión del cobre T1 se encuentran dentro de un dominio. Pero las MCBPs poseen otros sitios de unión del cobre interdominios (IDCB), diferentes de los T1, que consisten solo de residuos de histidinas.

En las MCOs, como las lacasas y las ceruloplasminas, el sitio interdominio es trinuclear, compuesto de un cobre T2 y dos cobres T3 coordinados por ocho histidinas (cuatro de cada dominio) (**Figura 7**). En el caso de la nitrato reductasa, el sitio interdominio es un cobre T2 mononuclear coordinado por tres histidinas (dos del primer dominio y uno del segundo dominio).

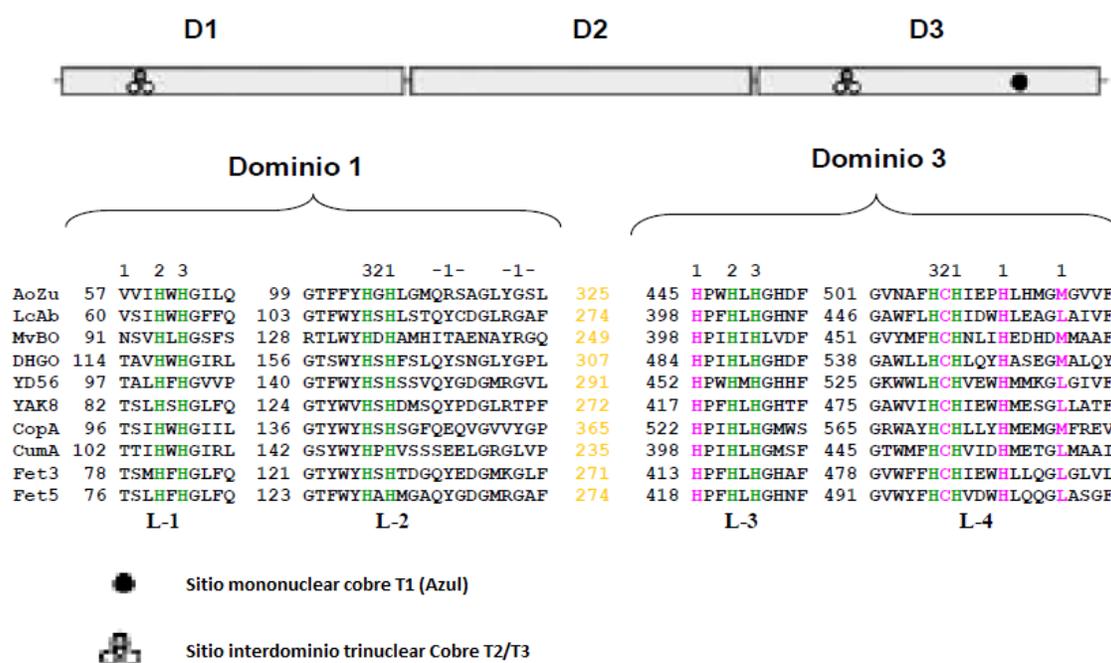


Figura 7. Organización de los dominios y sitios activos del cobre en MCBPs. Se muestra un alineamiento de varias secuencias MCBPs alrededor de los sitios de unión al cobre en el primero y último dominio. Estos sitios corresponden con las designaciones de L1-L4 de Kumar *et al.* (2003). Los números 1, 2 y 3 arriba de los alineamientos indican posiciones consenso de los residuos de unión al cobre T1, cobre T2 y cobre T3, respectivamente. Los residuos en color lila son del sitio del cobre T1 (azul). Los residuos en verde son los sitios IDCB cobre T2/T3. El número amarillo en la columna de la mitad es el número de residuos entre el segundo y tercer fragmento de las secuencias. La secuencia ID (SWISS-PROT) o número de acceso (NCBI), el nombre común (si lo hay), y el origen de cada secuencia son: AoZu: Ascorbato oxidasa de *Cucurbita pepo* var. *melepepo*; LcAb: Lacasa de *Agaricus bisporus*; MvBO: Bilirubina oxidasa de *Myrothecium verrucaria*; DHGO: Dihidrogeno oxidasa de *Aspergillus terreus*; YD56: De *Saccharomyces cerevisiae*; YAK8: De *Schizosaccharomyces pombe*; CopA: De *Pseudomonas syringae*; CumA: De *Pseudomonas putida*; Fet3: Ferric reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*; Fet5: Ferric reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*. (Modificado de Nakamura *et al.*, 2005).

### 2.4.1 Sitio activo y estructura de lacasas

El cobre T1 está presente como Cu (II) en estado de reposo de la enzima (Ducros *et al.*, 1998). El cobre T1 está coordinado por dos nitrógenos de dos histidinas y un azufre de una cisteína (**Figura 8**). Esta unión del cobre T1 al azufre, es responsable del color azul característico de estas enzimas. La geometría es descrita como una coordinación trigonal distorsionada bipiramidal, con una posición axial vacante donde el sustrato tiene entrada (Ducros *et al.*, 1998). La coordinación es inusual como los intermediarios entre los estados de

coordinación preferidos para Cu (I) y Cu (II). El residuo leucina está presente pero este, no coordina al cobre T1 directamente. El cobre T1 está por tanto solo coordinado por tres átomos (Ducros *et al.*, 1998).

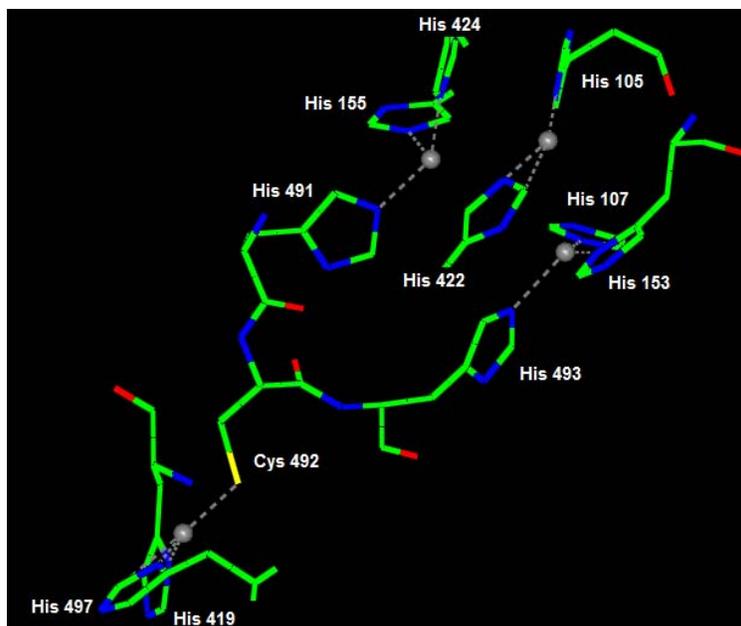


Figura 8. Modelo estructural, mostrando la coordinación de los átomos de cobre y ligantes en el sitio activo de la lacasa de *Bacillus subtilis*. Los átomos de cobre están en color gris, el azufre en amarillo y el oxígeno en rojo.

La estructura del sitio activo muestra que el cobre T2 y el cobre T3 están cercanos formando un centro trinuclear (Leontievsky *et al.*, 1997). En 1998 una estructura cristalográfica de lacasa (Figura 9), fue reportada con ausencia del cobre T2 de la lacasa de *Coprinus cinereus* (Ducros *et al.*, 1998). Estudios comparativos (Leontievsky *et al.*, 1997) y los descubrimientos por Ducros y colaboradores coincidieron. Los átomos en los sitios de cobre T2/T3 están coordinados por ocho histidinas, que están conservados en cuatro motivos de His-X-His. Los dos átomos de cobre T3 están coordinados por seis histidinas. Un puente hidróxido une el par de cobre T3, debido a un acoplamiento anti-ferromagnético, el cual es responsable del fenómeno del par de cobre T3, que en EPR es silenciado (Ducros *et al.*, 1998). (Figura 8). Mientras que el sitio de cobre T2 está coordinado por dos histidinas; debido a la menor fuerza de sus coordinaciones y a su mayor exposición al solvente, el CuT2 es el más lábil de los cuatro cobres.

Secuencias clonada de varias lacasas, muestran que las diez histidinas y el residuo de cisteína que son ligantes del cobre en la ascorbato oxidasa están conservadas en las secuencias de lacasas conocidas, a excepción de *Aspergillus nidulans* que tiene un ligante metionina en el sitio de cobre T1 (Leontievsky *et al.*, 1997). Estos residuos de cisteína e histidinas conservados, (Ducros *et al.*, 1998). La oxidación del sustrato ocurre en el cobre T1 y la reducción del O<sub>2</sub> en el centro trinuclear. Los electrones extraídos del sustrato deben ser transferidos del sitio e cobre T1 al centro de cobre T2/ cobres T3 que se encuentra a una distancia de ~13 Å. El transporte se realiza por la vía CuT1-Cys-His-CuT3: la conexión más directa entre los sitios de oxidación del sustrato y de reducción del oxígeno molecular (Figura 8).

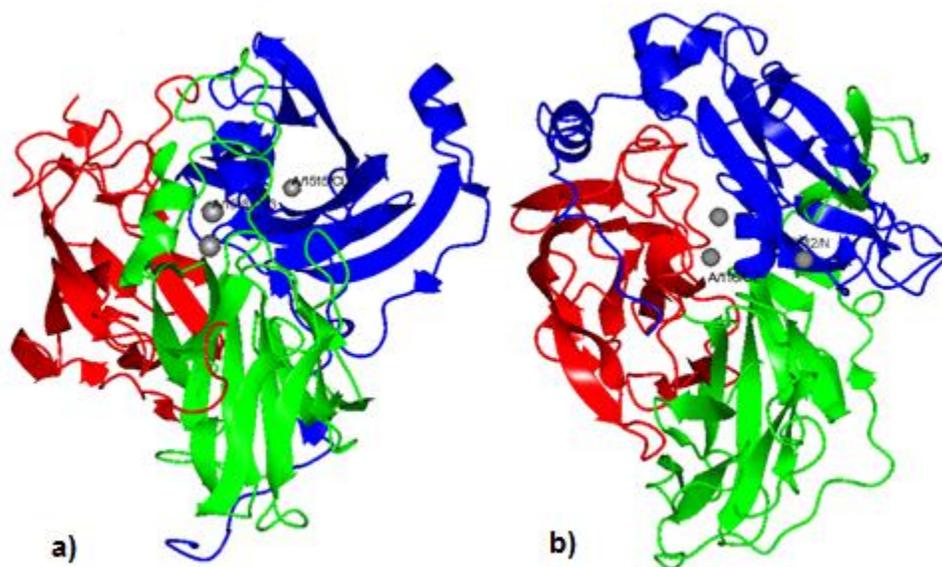


Figura 9. Estructura tridimensional de lacasa de a) *Melanocarpus albomyces* y b) *Coprinus cinereus*. Dominio A (rojo), incluye residuos que participan en la unión de los cobres en el centro trinuclear. Dominio B (verde) contiene residuos que toman parte en la unión de sustratos. Dominio C (azul) contiene residuos que participan en la unión de cobre mononuclear y el centro trinuclear. El sitio mononuclear es localizado entre el dominio C, y el centro trinuclear esta localizado entre la interface entre el dominio A y C, las figuras fueron construidas con CCP4mg.

La estructura cristalográfica de lacasa (Ducros *et al.*, 1998) muestra que la lacasa es una molécula monomérica que consiste en tres dominios tipo cupredoxina (**Figura 9**), que resulta en una estructura globular. El cobre T1 se localiza en una cavidad del dominio C. El centro trinuclear cobres T2/T3 está en la interfase de los dominios A y C. Los residuos que coordinan a los cobres están distribuidos equitativamente en cada dominio. En las enzimas de hongos, la estructura es estabilizada por dos puentes disulfuro que unen a los dominios B-C y B-A. El sustrato se une en una pequeña cavidad en la superficie cercana al cobre T1. El O<sub>2</sub> difunde por un canal de entrada que desemboca en los dos cobres T3. La arquitectura molecular, como ocurre en todas las oxidasa azules de cobre, contienen dominios barril- $\beta$  (**Figura 10a**). El tercer dominio tiene una conformación  $\beta$ -sandwich (**Figura 10b**), así como cuatro regiones helicoidales cortas.

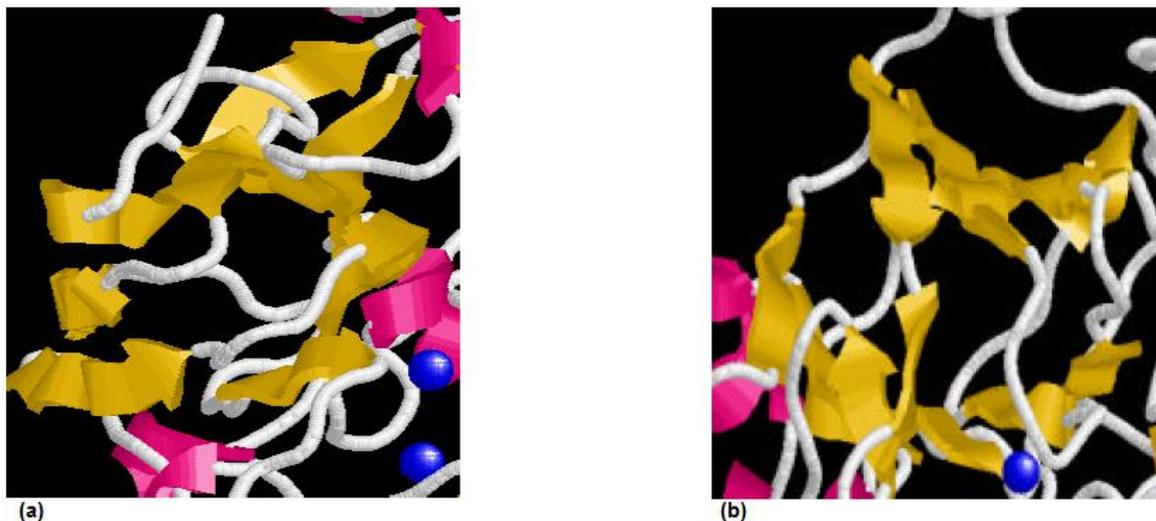


Figura 10. Barril- $\beta$  (a) y  $\beta$ -sandwich (b), conformación de dominios tipo cupredoxina descritas por Ducros y colaboradores de la lacasa de *Coprinus cinereus* con ausencia del sitio de cobre T2 (Tomada de Ducros *et al.*, 1998).

#### 2.4.2 Excepciones del sitio activo de lacasas

Aunque la mayoría de las lacasas se apegan a este fenómeno, existen ciertas lacasas con alta pureza, que no muestran los sitios de cobre característicos. Algunas lacasas reportadas no poseen los cuatro átomos de cobre (Thurston *et al.*, 1994) por molécula monomérica. En cultivos de *Pleurotus ostreatus* se ha aislado una lacasa que no posee el color azul característico debido a la falta del cobre T1 (azul) (Palmieri *et al.*, 1997). Curiosamente, en lugar de los cuatro átomos de cobre por cadena, esta lacasa blanca contiene dos iones zinc, un ion hierro y un ion cobre, y a pesar de ello exhibe una actividad lacasa. Sin embargo, el análisis de la secuencia de aminoácidos reveló que todos los residuos de unión al cobre están conservados. Otra lacasa blanca, extraída de *Phellinus ribis*, lleva dos iones de zinc y un ion manganeso (Min *et al.*, 2001). También otra lacasa blanca fue encontrada en *Volvariella volvacea* (Chen *et al.*, 2004).

La presencia de lacasa blanca plantea muchas dudas. Por ejemplo, es posible cambiar los iones cobre por otros metales?; también, el cambio de ion cobre por otro metal, haría perder la función de la enzima MCBP? Para responder la primera pregunta, Nakamura *et al.* (2005), propusieron que el cobre T1 puede ser reemplazado por Fe/Mn, así perdiendo el color azul; los cobres T3 serían reemplazados por iones zinc, y el cobre T2 permanecería igual.

La actividad es inhibida por interrupción de la transferencia electrónica (por haluros, azida, cianuro e hidróxidos) o por quelación del cobre y por modificación de los aminoácidos por cambios conformacionales (Gianfreda *et al.*, 1999). Diferentes lacasas tienen diferente tolerancia hacia estos inhibidores (Xu, 1996).

### 2.4.3 Mutagénesis del sitio activo

Varios modelos han sido generados para correlacionar el sitio de cobre y sus propiedades moleculares de la lacasa. En particular, se ha postulado que la coordinación geométrica y ligantes del cobre T1, podrían determinar el potencial redox de este sitio. Muchas lacasas han mostrado tener un residuo de leucina o metionina en la posición correspondiente al sitio de cobre T1 (Thurston, 1994; Ducros *et al.*, 1998; Aramayo y Timberlake; 1990; Leontievsky *et al.*, 1997). Xu *et al.* (1998) observó en la lacasa de *Trametes versicolor*, que esta tenía un alto potencial redox (0.8 V), presentando un residuo de fenilalanina en lugar de metionina o leucina y predijo que este residuo podría ser el responsable del alto potencial redox.

En 1996 Xu y sus colaboradores, mostraron tres lacasas con alto potencial redox tenían un tripéptido de leucina-glutamato-alanina, en lugar de el tripéptido valina-serina-glicina, encontrado en lacasas con bajo potencial redox. La posición del correspondiente tripéptido en el *pocket* del cobre T1, sirvió como parte del *pocket* de unión al sustrato (Xu *et al.*, 1996). Los efectos de la triple mutación en el potencial redox, sugiere que el complejo de unión al sustrato y la vía de transferencia de electrones del sustrato al cobre T1 se ve afectada. Esto probó que es posible regular la catálisis a través de la ingeniería molecular (Xu *et al.*, 1998).

### 2.4.4 Aplicaciones de lacasas en biotecnología

Los organismos productores de lacasas han evolucionado para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. En tales condiciones cuando las lacasas son secretadas, funcionan de manera inusual. Esta habilidad adaptativa es importante en términos de aplicaciones industriales, como por ejemplo, el blanqueo de textiles (Novozymes A/S, Dinamarca), y de pulpa de papel (Addleman y Archibald, 1993; Reid y Paice, 1994), síntesis orgánica, bioremediación y detergentes de lavado. También para desarrollar métodos con el fin de introducir características deseables a otras enzimas, como lo puede ser la estabilidad térmica a altas temperaturas (Suzuki *et al.*, 2003) o en la durabilidad a altas condiciones ácido/básicas (Xu *et al.*, 1998; Shirai *et al.*, 2001).

Las principales aplicaciones de las lacasas se encuentran en la industria del papel, concretamente en el blanqueo biológico y en la detoxificación de efluentes. Existen distintas patentes a base de lacasas inmovilizadas solas con mediadores como Pulp-Zyme®, Novo-Nordisk (que utiliza lacasa-ABTS).

En relación a la detoxificación de efluentes, existen procesos que se basan en la decoloración y detoxificación en continuo del efluente con los hongos inmovilizados, tal como el cultivo inmovilizado en alginato de *T. versicolor* productor de lacasa (Archibald *et al.*, 1990).

La lacasa fúngica mejor estudiada es la de *Trametes versicolor* (Bollag y Leonowicz, 1984). Es una p-difenol O<sub>2</sub> oxidoreductasa que se diferencia de la mayoría de fenoloxidasas en que produce agua en lugar de peróxido en la reducción del oxígeno. Son glucoproteínas de cuatro átomos de cobre y de peso molecular variable (D'Souza *et al.*, 1996). Los átomos de cobre están clasificados en tres tipos (T1, T2 y T3) con diferentes propiedades (Shin *et al.*, 1996; Yaropolov *et al.*, 1994):

Cobre T1: Es responsable del color azul de la proteína. Tiene una alta absorbanza en la región visible (610 nm) provocada por la unión covalente cobre-cisteína. Debido al alto potencial redox de este cobre es el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato.

Cobre T2: Se caracteriza por no presentar absorbanza detectable en la región del visible y por tener una alta afinidad por aniones ( $F^-$ ,  $CN^-$ ...) que actúan como inhibidores de la actividad del enzima.

Cobre T3: Es un complejo binario formado por un par de iones  $Cu^{2+}$ - $Cu^{2+}$  unidos por un puente hidróxido con un máximo de absorbanza a 330 nm y un espectro de fluorescencia característico.

La reacción que cataliza la lacasa es la siguiente:



Los cobres T2 y T3 forman un *centro* trinuclear que es el lugar donde se reduce el oxígeno (Thurston, 1994). El cobre T1 es el primer aceptor de electrones del sustrato. Después los electrones se transfieren secuencialmente al centro T2-T3 que tras recibir cuatro electrones reducen una molécula de oxígeno a agua. Así la oxidación monoeléctronica del sustrato va acoplada a la reducción por cuatro electrones del oxígeno molecular.

#### 2.4.5 Mecanismo de reacción

Las enzimas lacasas oxidan sustratos por remoción de un electrón a la vez y generan radicales libres con los que pueden ser polimerizadas (Bourbonnais y Paice, 1990). Las enzimas acumulan electrones de reacciones de oxidación individuales y estos estados totalmente reducidos contienen un total de cuatro electrones, así, la enzima puede transferir estos electrones a el oxígeno molecular para formar agua (Andréasson *et al.*, 1976).

El cobre T1 es el aceptor de electrones primario, y por lo menos uno de ambos electrones requeridos para reducir el sitio de cobre T3, aceptor de un par electrónico, proveniente de este sitio (Andréasso y, Reinhammar, 1976). La velocidad de reacción del cobre T1 es el paso limitante de la velocidad total de la reacción (Andréasson y Reinhammar, 1979). El sitio de cobre T2 es necesario para la oxidación aeróbica del sitio de cobre T3 reducido, en suma, esto le permite al sitio de cobre T3 actuar como un aceptor de dos electrones (Penner-Hahn *et al.*, 1984). El Papel que tiene el sitio de cobre T2 no está especificado a detalle, este podría estar implicado en la participación de la transferencia de uno de los electrones requeridos para reducir el sitio de cobre T3 (Andréasson y Reinhammar, 1976, 1979).

En el mecanismo catalítico de la enzima lacasa, se ha propuesto que el sitio de cobre T2 estabiliza un intermediario en la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ ; esto indica que el sitio de cobre T2 forma parte de la reducción del  $\text{O}_2$  en la enzima (Branden y Deinum, 1977). Se ha propuesto que la inhibición de la enzima a un elevado pH, es debida a la formación del complejo cobre  $\text{T2-OH}^-$ . Este ion cobre no puede permitir la reducción del sitio de cobre T3 hasta que el  $\text{OH}^-$ , allá sido disociado o transformado a una molécula de agua. A bajos valor es de

pH, una de las moléculas de agua formadas en la enzima reducida parece re-oxidarse para unirse al sitio de cobre T2 (Branden y Deinum, 1977).

Existe evidencia de que el sitio de cobre T2 tiene participación en la interacción del O<sub>2</sub> con el sitio de cobre T3, como lo sugirió Winkler *et al.* (1982), cuyos estudios en uniones exógenas, los sitios de cobre T2 y T3 demostraron que la unión peróxido ocurre solo en uno de los cobres, en el sitio del cobre T3 de la enzima nativa. Además, se mostró que el hidropéroxido, no está fuertemente unido a esta geometría si el cobre T2 no está presente. El cobre T2 aparentemente estabiliza el complejo cobre T3-hidropéroxido, para más tarde dar paso a la reducción a agua. El sitio de cobre T3 está constituido por un par no paramagnético de iones cobres que constituyen el sitio aceptor de dos electrones. La reducción de este sitio es inhibida, cuando hay un incremento en el pH (Andréasson y Reinhammar, 1979).

Andréasson *et al.* (1976) propone que en el mecanismo de re-oxidación de la lacasa, el oxígeno recibe tres electrones de la enzima reducida en una reacción rápida y un intermediario oxígeno es formado, por ejemplo un radical OH·. Comparando este, con otros dos donadores, el cobre T2 es lentamente oxidado. La descomposición del intermediario parece estar conectado a la re-oxidación del cobre T2, indicando la transferencia de electrones entre las dos especies con la subsecuente formación de agua (Branden y Deinum, 1977).

#### 2.4.6 Ciclo catalítico de lacasas

Solomon *et al.* (1996) hizo una revisión del mecanismo catalítico de lacasa y propuso que la velocidad de oxidación del sustrato es dependiente en esta reducción potencial. Esto implica que la transferencia de electrones del sustrato al sitio de cobre T1 (el aceptor inicial de electrones del sustrato) es el paso determinante de la reacción. Como se muestra en la (**Figura 11**), dos posibles mecanismos pueden ser provistos: (A) El cobre T1 transfiere este electrón al cobre T2 y después este es re-reducido; el cobre T1 y T2 transfieren dos electrones al cobre T3; el cobre T1 es re-reducido; el cobre T1 transfiere este electrón a el cobre T2 este queda re-reducido, resultando en una reducción total de la enzima. Este posible mecanismo podría ser consistente con el hecho de que exista un arresto total de la enzima en estado oxidado, el centro de cobre T3 actúa estrictamente como un aceptor de dos electrones. (B) El centro trinuclear es secuencialmente reducido por tres pasos de transferencia de un electrón del cobre T1. Desde la reducción del "intermediario nativo" no ha sido estudiado, la posibilidad permanece que las interacciones adicionales entre el cobre T2 y cobres T3 en el "intermediario nativo" permitan a los cobres T3 actuar como aceptor de un electrón (nótese que el orden en el cual los tres cobres son reducidos no se conoce).

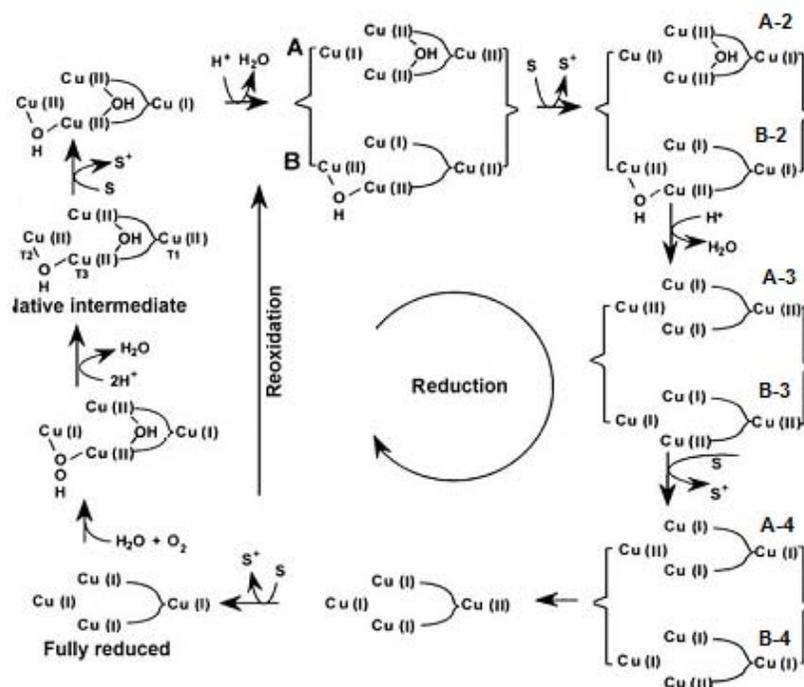


Figura 11. El ciclo catalítico de lacasas, mostrando el mecanismo propuesto por la reducción y la re-oxidación de los sitios de cobre. Los sustratos son reducidos por el cobre T1 "intermediario nativo", el cual después los electrones son transferidos a el *centro* trinuclear. Dos posibles mecanismos para la reducción del *centro* trinuclear son mostrados: A) El cobre T1 y cobre T2, juntos reducen a el par de cobres T3 y B) Cada cobre en el *centro* trinuclear es secuencialmente reducido por la transferencia de electrones del sitio de cobre T1, en este caso el sitio de cobre T3 no actúa como un aceptor de dos electrones. Un lento decaimiento del "intermediario nativo" permite el arresto de la enzima en un total estado oxidado (Tomada de Solomon *et al.*, 1996).

La lacasa presenta una amplia especificidad de sustrato puesto que cataliza la oxidación de orto y para difenoles, amino fenoles, dímeros de lignina fenólicos e incluso no fenólicos en presencia de algunos intermediarios, (Kawai *et al.*, 1987; Hatakka *et al.*, 1991). La oxidación puede estar controlada por las diferencias en potencial redox entre los sustratos reductores y el cobre T1 de la lacasa (Thurson, 1994). En general las lacasas tienen baja especificidad por estos sustratos en relación al oxígeno. La oxidación monoelectrónica de un sustrato por la lacasa implica la formación de un radical libre. Estos radicales posteriormente pueden ser oxidados a quinonas por el enzima o bien sufrir reacciones no enzimáticas variadas. La oxidación de fenoles frecuentemente produce reacciones de acoplamiento carbono-carbono y carbono-oxígeno entre los radicales, lo que origina productos de mayor peso molecular que los sustratos es decir reacciones de polimerización. La tendencia de esta enzima de provocar polimerización oxidativa de los contaminantes puede ser el método aceptable para su eliminación.

Mientras que las lacasas solo pueden oxidar directamente subunidades fenólicas de la lignina (más fáciles de oxidar pero menos abundantes), pueden reaccionar indirectamente con componentes no fenólicos de la lignina mediante la participación de mediadores redox que son componentes de bajo peso molecular fácilmente oxidados por estas produciendo radicales muy inestables y muy reactivos que pueden a su vez oxidar sustratos más complejos (**Figura 12**). Se han citado mediadores sintéticos como el [2.2'-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)] (ABTS) ó 1-hidroxibenzotriazol (Bourbonnais *et al.*, 1997; Pickard *et al.*, 1999) y naturales como 4-hidroxibenzol y 3-hidroxiantranilato (Bourbonnais y Paice, 1990, Eggert *et al.* 1996, 1997).

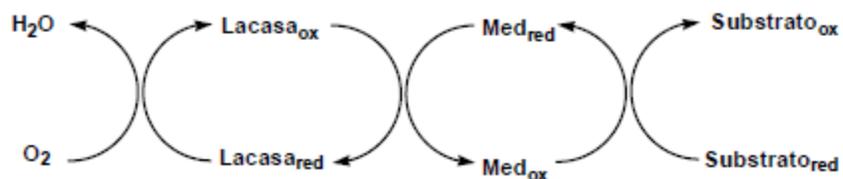


Figura 12. Ciclo catalítico del sistema lacasa-mediador.

## 2. ANTECEDENTES

Nuestro grupo trabajó con una estructura nativa de la lacasa de *Coriolopsis gallica* y la cristalizaron a diferentes valores de pH, correspondientes a tres diferentes estados de actividad de la enzima (pH 4.5 cercano al máximo de actividad, pH 5.5 actividad media y pH 7 la forma inactiva). Ellos encontraron que al pH óptimo para la actividad uno de los cuatro cobres (Cu T2) no estaba presente y otro (Cu T1) apareció con una ocupación muy baja. Esto correspondió a el estado de actividad media e inactiva de la enzima se presentaron los cuatro cobres. Además, en la estructura a pH 5.5 se observó una densidad electrónica entre los cobres del centro trinuclear. Dicha densidad, se interpretó como un intermediario de la reducción del O<sub>2</sub>. Este estudio clarificó que la difracción a diferentes pH determinan las propiedades estructurales que llevan a la inhibición de la enzima. Las ocupaciones finales a pH7 fueron 0.7 (CuT1), 0.3 (CuT2), 0.9 y 0.7 (CuT3) respectivamente. A pH 5.5 los sitios presentaron ocupaciones de (T1= 0.7, T2= 0.5 y ambos T3= 0.8). Por último, a pH 4.5 las ocupaciones de (T1=0.2, T2=No estuvo presente y ambos T3=0.7) (**Figura 13**).

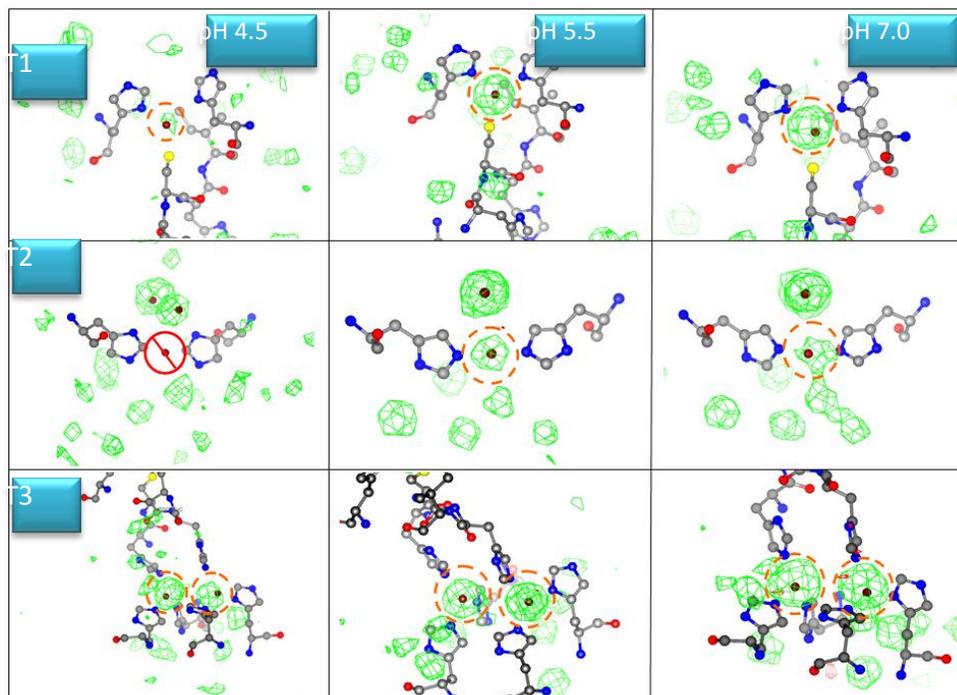


Figura 1. Densidad electrónica en los sitios de cobre de los cristales difractados a diferente pH. Mapa  $fo-fc$  a  $4.5 \sigma$ . En círculos de color naranja la densidad correspondiente a los cobres. El círculo rojo cruzado representa la ausencia de CuT2.

Por tanto, consideramos otro factor que podría afectar las ocupaciones de los cobres. El agente causante esta dado por los daños por radiación, como se mencionó anteriormente. Una forma de extraer este tipo de información es a través de un análisis de los modelos atómicos derivados de la difracción de rayos X.

En 1996, Hooft *et al.* Reportaron que en el PDB, existían alrededor de un millón de anomalías, y que recientemente han detectado diez veces más de anomalías en el PDB, siendo este diez veces más grande en cuanto a sus depósitos de estructuras. La mayoría de estas anomalías son de menor importancia, y una pequeña fracción son descubrimientos de errores genuinos que garantizarían posteriores estudios; sin embargo un número sustancial son errores serios.

Utilizando herramientas actuales, es posible corregir diversos errores estructurales, teniendo a disposición, los experimentos/datos originales obtenidos de la difracción por rayos X.

Atendiendo a lo dicho anteriormente, trabajos recientes, como el realizado por Robbie *et al.*, 2008, han establecido mejoras en el PDB, en base a la realización de re-afinamientos automatizados de estructuras, combinados con la validación estructural y análisis de picos de diferencia de densidad; con el objetivo de producir un catálogo de problemas estructurales en el PDB, que son factibles para su corrección automatizada.

En el 2009 Robbie *et al.* Realizó otro trabajo, en donde, presenta de igual forma un re-afinamiento de modelos de estructura existentes en el PDB, la diferencia entre el trabajo publicado por Robbie *et al.*, 2008, es que, en este trabajo los re-afinamiento fueron a una escala mayor con 16 807 estructuras tomadas del PDB; mostrando que estas estructuras pueden ser mejoradas en términos de ajuste a los datos depositados experimentalmente obtenidos por rayos X; así como en términos de calidad geométrica. El resultado de este estudio fue la realización de una base de datos, que contienen los modelos estructurales re-afinados, disponibles en el banco de datos PDB\_REDO ([http://www.cmbi.ru.nl/pdb\\_redo/](http://www.cmbi.ru.nl/pdb_redo/)).

Sin embargo, al analizar esta nueva base de datos y enfocarnos al universo de proteínas trinucleares de cobre (lacasas), estos nuevos depósitos seguían presentando ciertos errores estructurales en especial en el sitio activo de las lacasas, lo cual nos habla de que a pesar de este esfuerzo realizado por el autor mencionado, aun continúa habiendo ciertas errores estructurales.

## 4. HIPOTESIS

Las ocupaciones parciales de sitios de cobre en las estructuras de lacasas publicadas se deben a daño por radiación

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivos Generales

- Realizar la revisión estructural de macromoléculas depositadas en el PDB (lacasas), por medio del afinamiento estructural, a través del programa PHENIX.
- Generar información sobre si los daños por radiación son responsables de las ocupaciones parciales en proteínas trinucleares de cobre.

### 5.2 Objetivos particulares

- Obtener del *Protein Data Bank* (PDB), estructuras de proteínas trinucleares de cobre resueltas por cristalografía de rayos X, para realizar afinamientos a través del programa PHENIX.
- Analizar con criterios cristalográficos (factor B, R-free, R-value, ocupación, longitud de onda) los resultados de cada afinamiento a través del programa Coot y correlacionar las ocupaciones de los cobres con los daños causados por la incidencia de los rayos X (daño por radiación) u otros posibles factores.

## 6. JUSTIFICACIÓN

El propósito de quienes estudian proteínas es la conexión entre estructura y función. Como resultado de la gran variedad de estructuras de proteínas determinadas, fue necesario pensar en un banco de datos en el cual se almacenara toda la información obtenida del análisis de los datos estructurales. De ahí surgió una base de datos de macromoléculas biológicas: el *Protein Data Bank* (PDB) (Berman, 2000). Desafortunadamente, este banco aún no está completamente depurado a pesar de los esfuerzos. Un error común durante el análisis de las estructuras es la interpretación de los modelos (obtenidos ya sea por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear, *NMR*). Por lo que el análisis estructural en particular de proteínas trinucleares de cobre a través del programa de afinamiento en PHENIX, permitirá mejorar la caracterización estructural de estas enzimas al estandarizar el afinamiento a un solo programa.

Recientemente se ha puesto la atención en los cambios inducidos por los rayos X en proteínas (Lyashenko *et al.*, 2005). Los rayos X inducen cambios que pueden ocurrir en las oxidasas multicobre, por tanto, los estudios cristalográficos y espectroscópicos son esenciales para recolectar la información acerca de los estados de oxidación de estas enzimas. Es posible que los daños por radiación sean los causales de la modificación estructural. Esto puede ser debido a que la frecuencia natural de oscilación de sus electrones es próxima a la de la radiación X incidente. Se deduce que la incidencia de los rayos X, causa daños al cristal y se supone que este factor es una de las causas por las que los sitios catalíticos en lacasas presentan ocupaciones parciales en los cobres.

# 7. METODOLOGÍA

## 7.1 Búsqueda en el *protein data bank* (PDB)

La búsqueda de enzimas trinucleares de cobre se realizó a través de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB). La palabra utilizada para la búsqueda fue “laccase” que, desplegó 39 estructuras<sup>1</sup>. Además se, consideró el título del artículo científico (donde se discute a la estructura cristalográfica depositada en el PDB), junto con el nombre del organismo al cual pertenece la enzima, los autores, la fecha de liberación de la estructura, el método experimental, y algunos parámetros como: la resolución, el grupo espacial y los valores R de afinamiento (R-value, R-free). También se describe a la celda unitaria, la clasificación del grupo espacial (en la cual entre mayor sea el número, mayor será el número de simetrías presentes en el cristal), el número de cadenas presentes en la unidad asimétrica, el peso de la molécula y la imagen tanto del modelo, como de la densidad electrónica. Con ello utilizan a los datos depositados por cada autor, en cada caso específico.

A partir de estos depósitos se construyó una base de datos, con información más detallada de cada estructura (pH y temperatura de crecimiento del cristal, ocupación de los átomos de cobre, integridad de las difracciones, longitud de onda de los rayos X empleados, etc.).

Como primer criterio se eliminaron de la base de datos aquellas estructuras que no presentaran factores de estructura, debido a que sin ellas no se puede realizar un nuevo afinamiento.

## 7.2 Selección de estructuras de enzimas trinucleares de cobre

Los resultados desplegados por el PDB, fueron tabulados a partir de los siguientes criterios: genero, familia, pH de crecimiento del cristal, resolución, R-value, R-free, grupo espacial, condiciones de crecimiento cristalino, fuente de radiación, proceso de afinamiento, temperatura de crecimiento del cristal, ocupación de los átomos de cobre, integridad de las difracciones, sistema cristalino, redundancia de las difracciones colectadas y celda unitaria.

En una primera etapa se utilizaron parámetros que eliminaban a varias de las estructuras depositadas en el PDB. Dentro de este filtro, todos los criterios mencionados en el párrafo anterior fueron considerados, para eliminar cualquier estructura en la que no se reportara alguno de los datos. Por ejemplo, para mantener a una estructura en el banco, se tomó en cuenta a aquellas estructuras que presentaran en sus cobres (sitio catalítico) ocupaciones parciales, es decir, que la ocupación de los cobres no fuera igual a 1.0. También se tomaron en cuenta los valores R-free y R-value. Estos valores al presentar una diferencia mayor a 5 unidades se consideraba que el afinamiento fue defectuoso, por lo que la estructura se eliminó del banco de datos. Se seleccionaron también pares de estructuras en las que la única diferencia fuese la fuente de radiación, y se asumió que un ánodo rotatorio deposita menos dosis en un cristal que un sincrotrón. Ejemplos de esto fueron la lacasa de *Melanocarpus albomyces* y la lacasa CueO de *Escherichia coli*.

De las 39 lacasas depositadas en el PDB, siete de ellas no han sido liberadas por lo cual no se tiene acceso a sus datos (*Melanocarpus albomyces* – depósitos 3FU7, 3FU8, 3FU9 y 3DKH-; *Cerrena maxima* –deposito

---

<sup>1</sup> Hasta el 10 de febrero del 2009

3DIV-; secuencia con dominios tipo lacasa proveniente de un metagenoma –deposito 2ZWN-; *Panus tigrinus* –deposito 2HTP-), por lo que fueron descartadas para este estudio; así como también aquellas que no presentaran factores de estructura (3 no presentaron factores de estructura; *Trametes vericolor* PDB 1GYC/1KYA, *Rigidoporus lignosus* PDB 1V10. De la base de datos descrita anteriormente se descartaron también 14 estructuras. Esta eliminación se baso en la idea de solo tener un miembro por sistema cristalino y por organismo (bacterias y hongos). De esta forma se obtuvieron 15 estructuras para poder afinar nuevamente sus modelos cristalográficos. Posteriormente se adicionaron dos estructuras a este análisis debido a que también son lacasas pero la palabra “laccase” no existe en el titulo del depósito.

Dado que el método de selección de estructuras mencionado en los párrafos anteriores, no permitió concluir sobre la razón de la aparición de ocupaciones parciales en algunos átomos de cobre, se relajaron las condiciones de selección y se decidió afinar a las 31 estructuras de lacasas presentes en el PDB.

### **7.3 Conversión de los factores de estructura .CIF a formato .MTZ a través de CCP4**

Para poder afinar las estructuras en el programa PHENIX, es necesario contar con el archivo .pdb y los factores de estructura .cif (contenidos en el PDB, para cada una de las estructuras depositadas) y convertirlos a formato .mtz, y en caso de ser necesario, crear un diccionario para ligandos no reconocidos por el programa de afinamiento. Estos tres elementos juegan un papel importante en la determinación de la estructura final; los factores de estructura como ya se menciono, representan la información necesaria para generar a los mapas de densidad electrónica.

Los factores de estructura ( $F_{(hkl)}$ ) representan a las ondas resultantes de la dispersión de todos los átomos en cada una de las direcciones. Sus módulos están directamente relacionados con las intensidades de las reflexiones del espectro.  $h, k, l$  son los índices de Miller de las reflexiones (para identificar los diferentes planos y direcciones del cristal) y  $\Phi(hkl)$  representa las denominadas “fases” de las reflexiones (las fases de unas ondas respecto de otras), mientras que el archivo.pdb da las coordenadas de los átomos que conforman la estructura. El archivo de entrada de los factores de estructura que se obtiene del *Protein Data Bank* está en formato .cif, este formato se determinó para estandarizar a todos los archivos depositados en el PDB y, generan así un formato o “lenguaje” universal de parámetros estructurales. Ahora, ¿por qué se requiere un cambio de formato si el formato .cif es universal? Se requirió de un cambio de formato debido a que PHENIX trabaja o reconoce los factores de estructura solo en formato .mtz.

Para ello se hizo uso de la suite de programas CCP4, que es una colección de programas utilizados en cristalografía macromolecular. Dentro de las opciones del programa se encuentra “*Reflection Data Utilities*”. Esta opción despliega otra serie de opciones de la cual se tomó “*Convert to/modify/extend MTZ*”, donde, como requisitos, se tiene que tener el archivo de entrada. En este caso los factores de estructura de cada lacasa en formato .cif, el grupo espacial que tiene la enzima, las dimensiones de la celda y en caso de ser necesario, seleccionar un nuevo grupo de reflexiones usualmente el 5% del total de las mismas, para el cálculo de R-free lo que, genera un archivo de salida en formato .mtz.

En caso de que PHENIX no reconociera un ligando en el archivo .pdb, se tuvo que generar un diccionario para este ligando. El diccionario se construyó utilizando CCP4, en la opción de “*Refinement*”. Dentro de esta opción

se encuentra "*Monomer Library Sketcher*", en la cual se tenía como archivo de entrada el ligando que no reconociera PHENIX. Una vez cargado el archivo el programa escribía al diccionario con el nombre "ligando\_mon\_lib", y así ya se podía correr el afinamiento de la proteína y de su ligando.

#### 7.4 Afinamiento en el programa PHENIX

El programa PHENIX es un sistema altamente automatizado para determinar estructuras macromoleculares, que puede rápidamente llegar a obtener un modelo inicial parcial de una estructura sin intervención significativa del investigador, dando una resolución moderada y una buena calidad en los datos. En este caso se utilizó para afinar estructuras existentes y comprobar o mejorar estas. En principio cada archivo .pdb de cada lacasa seleccionada se le modificó manualmente las ocupaciones de los cobres sin importar si presentaban ocupaciones parciales o no. A todos los cobres se les cambió el valor de ocupación a 0.1, una ocupación artificialmente baja, y se afinaron en PHENIX tanto las coordenadas del modelo, como los valores B y las ocupaciones distintas de 1.0. Una vez obtenidos los archivos de salida, se aplicó el mismo fundamento, pero ahora con ocupaciones parciales en los cobres de 0.50. De igual forma se obtuvieron los datos de salida. Esto con el propósito de poner a prueba al programa PHENIX, y determinar si realmente estructuras que no presentaran ocupaciones parciales en los cobres, después del afinamiento en ocupación baja e intermedia, recuperaban las ocupaciones originales.

El funcionamiento de PHENIX, consta de tres pasos principales: lectura de los datos (modelo en formato PDB, reflexiones en formato .mtz, diccionario), mejoramiento de los protocolos del afinamiento (afinamiento de coordenadas, valores-B, etc.) y finalmente, escribir un modelo de salida afinado. Con esto se obtienen las estadísticas completas y mapas de densidades. PHENIX funciona con la siguiente línea comando:

```
phenix.refine <pdb-file(s)> <reflection-file(s)> <monomer-library-file(s)>
```

El programa automáticamente genera un archivo ".eff" que contiene todo acerca de los parámetros para el trabajo (por ejemplo un archivo lacasa\_refine\_001.eff se generara al empezar el afinamiento). Posteriormente, el programa interpreta a los archivos de reflexiones. Si existen datos equivocados estos son los primeros que son afinados. Al final del afinamiento el programa generara: 1) Un nuevo archivo PDB con el modelo afinado, llamado por ejemplo lacasa\_refine\_001.pdb, 2) Dos mapas de densidad electrónica: *mFo-DFc* y *2mFo-DFc* y,3) Un archivo de reflexiones con un mapa de coeficientes que. Además, puede ser usado en los programas Coot y XtalView (ejemplo lacasa\_refine\_001\_map\_coeffs.mtz).

#### 7.5 Visualización y análisis de la estructura después del afinamiento en PHENIX, a través de Coot

Los gráficos moleculares continúan jugando un papel muy importante en la determinación de la estructura de la proteína y usan datos de cristalografía de rayos X. Coot es un programa de modelamiento de estructuras de proteína con base en datos experimentales cristalográficos. Estas funciones incluyen: La generación de coordenadas, la utilización de las simetrías del cristal, mapa de densidad electrónica y, la facilidad de mover

las coordenadas en varias formas. Por lo cual, a través de Coot una vez obtenidos los nuevos mapas y un nuevo archivo PDB, se observaron cada una de las estructuras después de los diferentes afinamientos.

Como primer punto se superpuso en la opción "*SSM Superpose*" la estructura original junto con la estructura obtenida del afinamiento, para ver a primera vista cambios significativos entre estas dos estructuras. Se analizó que estructura era la mejor respecto a sus dos afinamientos previos (uno con ocupaciones parciales a 0.10 y otro a 0.50). Es decir, que estructura tenía menos densidad negativa o densidad positiva, en los mapas fo-fc, en caso de que faltara algo en la estructura y que la estructura embonara bien con la densidad electrónica.

Una vez que se presente que afinamiento era el mejor, se modificaron manualmente algunas estructuras ya que después de ambos afinamientos seguían presentando densidad negativa o positiva. Cada vez que se realizaba alguna modificación en las ocupaciones de los cobres, se volvía a correr PHENIX para afinar los datos y se obtuvo así, nuevos mapas y su archivo .pdb. Finalmente se continuó de esta manera hasta que los cobres presentaran densidad electrónica correcta.

Aquellas estructuras que no presentaron este tipo de problemas en cuanto a densidades positivas o negativas en los mapas fo-fc, sólo se les determinó que afinamiento proporcionaba mejores resultados en las ocupaciones de los cobres, y así obtener un mayor porcentaje de ocupación en cada uno de los sitios de cobre cercano a uno para, mejorar la estructura.

## 7.6 Programas

Programa	Referencia	Descripción
CCP4	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <a href="http://www.ccp4.ac.uk/main.html">http://www.ccp4.ac.uk/main.html</a></li> <li>❖ Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". <i>Acta Cryst.</i> D50, 760-763</li> </ul>	Es un proyecto computacional colaborativo en la cristalografía de proteínas. Conformado por una colección de programas que facilitan y estandarizan los formatos de los archivos que proveen la solución estructural de una molécula. Coordinado por el laboratorio Daresbury STFC.
CCP4mg	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <a href="http://www.ytbl.york.ac.uk/~ccp4mg/">http://www.ytbl.york.ac.uk/~ccp4mg/</a></li> <li>❖ <b>Developments in the CCP4 molecular-graphic project</b> L. Potterton, S. McNicholas, E. Krissinel, J. Gruber, K. Cowtan, P. Emsley, G. N. Murshudov, S. Cohen, A. Perrakis and M. Noble. <i>Acta Cryst.</i> (2004). <b>D60</b>, 2288-2294</li> </ul>	Es un programa cuyo propósito es proveer una herramienta general para la biología estructural. Proporciona herramientas para la solución de estructuras por rayos X, comparación y análisis de estructuras y presenta una gran calidad en gráficos estructurales.
PHENIX	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <a href="http://www.phenix-online.org/">http://www.phenix-online.org/</a></li> <li>❖ P.D. Adams, R.W. Grosse-Kunstleve, L.-W. Hung, T.R. Ioerger, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R.J. Read, J.C. Sacchettini, N.K. Sauter and T.C. Terwilliger. <i>Acta Cryst.</i> D58, 1948-1954 (2002)</li> </ul>	Python-based Hierarchical ENvironment for Integrate Xtallography; es un <i>software</i> automatizado para la determinación de estructuras macromoleculares ya que usa la cristalografía de rayos X y otros métodos.
Coot	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <a href="http://www.ytbl.york.ac.uk/~emsley/cool">http://www.ytbl.york.ac.uk/~emsley/cool</a></li> <li>❖ "Coot: model-building tools for molecular graphics" Emsley P, Cowtan K <i>Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography</i> <b>60</b>: 2126-2132 Part 12 Sp. Iss. 1 DEC 2004</li> </ul>	Es un programa fácil de usar y una plataforma para construir, desarrollar, validar e integrar modelos gráficos de moléculas. <i>Coot</i> despliega mapas que permiten la manipulación del modelo así como una idealización del espacio real del afinamiento, manual rotación/traslación, mejoramiento de cuerpos rígidos, búsqueda de ligantes, solvatación, mutaciones, rotámeros, por mencionar algunas.

# 8. RESULTADOS

## 8.1 Búsqueda en el PDB

De la búsqueda de proteínas con sitios trinucleares de cobre en el *Protein Data Bank* (PDB), resultaron 32 estructuras. Para disminuir el tamaño de la muestra y considerar a aquellas con mejor calidad se decidió tomar como primer criterio de exclusión aquellas estructuras que no tuvieran factores de estructura ya que sin estos datos, no es posible realizar ningún tipo de afinamiento; bajo esta exigencia se eliminaron las secuencias de *Trametes versicolor* PDB 1GYC/1KYA, *Rigidoporus lignosus* PDB 1V10, reduciendo el tamaño de la muestra a 29 depósitos.

## 8.2 Selección de estructuras

Del universo de 29 estructuras se seleccionaron por lo menos una estructura de cada sistema cristalino encontrado en las lacasas (triclínico, monoclínico, ortorrómbico, trigonal, hexagonal), al igual que el grupo espacial (P1, P2<sub>1</sub>, C2, P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, C222<sub>1</sub>, P321, P3<sub>1</sub>21, P6<sub>5</sub>). Con estas condiciones y al tomar en cuenta muestras que contenían ocupaciones parciales en los sitios de cobre, resultaron 15 estructuras seleccionadas. De estas quince lacasas, aquellas estructuras que no presentaran el cobre T2 (se ha reportado que es el cobre más lábil), formaron un subgrupo para intentar explicar la ausencia del átomo. Otro punto muy importante, tomado en consideración fue la fuente de radiación (ánodo rotatorio, SEALED TUBE, EMBL/DESY, HAMBURG, BSRF, ESRF). Debido a que existen estructuras con los mismos parámetros y diferir solamente en la intensidad de los rayos X incididos en el cristal. Esto puede influir de manera directa en las estructuras y mapas generados al depender de la intensidad de los rayos X, los daños por radiación y las posibles modificaciones resultantes que deben afectar al patrón de difracción.

De las 15 estructuras seleccionadas, se aumentaron a 17 debido a que existen dos estructuras homólogas a las lacasas (Fet3p, multicobre oxidasa PDB 1ZPU de *Saccharomyces cerevisiae*, CueO multicobre oxidasa de *Escherichia coli* PDB 1KV7).

## 8.3 Primer análisis de afinamiento

Tras el afinamiento de las 17 estructuras, los resultados obtenidos en relación a las estructuras depositadas en el PDB fueron muy similares, ya que las ocupaciones de los sitios de cobre no presentaron mejoría después del afinamiento, y en el caso particular del sitio de cobre T2, no se pudo concluir una razón por la cual exista una ocupación baja y/o nula.

Dado que el método de selección de estructuras mencionado en los párrafos anteriores y en la metodología no permitió concluir sobre la razón de la aparición de ocupaciones parciales en algunos átomos de cobre, se decidió: 1) afinar las 29 estructuras de lacasas presentes en el PDB, 2) afinar las otras dos estructuras

homologas de la lacasa y 3) añadir a tres estructuras más que se encontraban dentro del PDB en el 2008. Actualmente, estas estructuras se encuentran en la categoría de “obsoletas”<sup>1</sup>. Por dichas tres razones surge nuestro interés de investigar los cambios de categoría solicitados por los autores.

#### **8.4 Segundo análisis de afinamiento**

Esta sección muestra, tanto los resultados depositados en el PDB para cada estructura de lacasas como los obtenidos a partir del afinamiento en PHENIX. Los criterios evaluados fueron: (R-value, R-Free, valor-B y ocupación), con el fin de generar mejores modelos que expliquen los datos cristalográficos colectados. Es importante recordar que la nueva base de datos cuenta con la ventaja de usar un solo programa de afinamiento que controla de esta manera una de las fuentes de heterogeneidad en el PDB.

Para cada grupo de lacasa se elaboró (según el organismo de origen): 1) una tabla la cual muestra los criterios cristalográficos requeridos para este análisis, 2) una explicación de las estructuras en caso de presentar cierto cambio al afinarla y 3) la posible explicación de este cambio. A continuación se reportan las estructuras bacterianas de CotA.

La visualización de los mapas en *Coot* que a continuación se presentan contiene dos mapas. Uno de ellos es el mapa 2fo-fc el cual estará desplegado con un valor de  $1.00 \sigma$  (donde  $\sigma$  representa el valor de la densidad electrónica en el mapa debida a ruido estadístico). El segundo mapa fo-fc (representa las densidades negativas o positivas debidas a las diferencias entre el modelo construido y los datos difractados) estará desplegado con valores de  $\pm 3.00 \sigma$ .

---

<sup>1</sup> Fueron catalogadas como obsoletas a partir del 1 de enero del 2008

### 8.4.1 Afinamiento de la lacasa de *Bacillus subtilis*, código PDB 1HKZ

Tabla 1. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1HKZ)

PDB ID	1HKZ
Resolución Å	2.49
R-Value (%)	
Original	20%
Afinado	19%
R-Free (%)	
Original	25%
Afinado	25%
Ocupación T1	
Original	80%
Afinado	82%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	48.13
Afinado	46.40
Ocupación T2	
Original	50%
Afinado	43%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	45.91
Afinado	43.64
Ocupación T3	
Original	80%
Afinado	73%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	52.82
Afinado	45.32
Ocupación T3	
Original	70%
Afinado	61%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	56.05
Afinado	46.14

Todos los pasos del afinamiento<sup>2</sup> se hicieron en el programa PHENIX para todas las estructuras con el mismo procedimiento explicado en la sección de metodología. Una vez que el afinamiento en el programa PHENIX finaliza se crea una serie de nuevos datos (un archivo PDB con el modelo afinado, dos mapas de densidad electrónica (*mFo-DFc* y *2mFo-DFc*) y un archivo de reflexiones con un mapa de coeficientes. Al ser observados en el mapa de diferencias en el programa *Coot* los sitios de cobre generaron ocupaciones parciales más bajas que las reportadas. Estas ocupaciones finales, tras el afinamiento en PHENIX y la optimización manual, se describen en la **Tabla 1**. Las distancias entre los sitios de cobre se mantienen estables con respecto a lo reportado en la bibliografía. La distancia que existe entre el cobre T1 y los T3 es de alrededor de 13 Å. La distancia entre ambos T3 es de 4.47 Å y entre los cobres T3 y el cobre T2 la distancia es de 3.70 Å.

En los parámetros de desplazamiento o valores B existe una mejoría en la cuantificación de la deslocalización de los cobres (**Tabla 1**). Se deduce que existe una distribución mayor en las posiciones de esta sección particular. Esto es que la zona es muy móvil tanto en el sitio trinuclear como en el mononuclear. En los valores R-value y R-free se estableció una mejoría comparada con el depósito original, (**Tabla 1**).

Cabe mencionar que esta estructura fue catalogada como obsoleta<sup>3</sup> en el *Protein Data Bank* por lo que surge la pregunta más obvia: ¿qué criterio/s consideraron para retirarla de este depósito?. Al analizar su PDB obtenido antes de que fuera eliminada del banco se observó que su R-merge era demasiado alto (0.930). Esto significa que la posición de las reflexiones observadas con relación a las posiciones calculadas en el patrón de difracción no empalma correctamente, con lo que la estructura tendría enormes errores y discordancia en sus datos. Probablemente se debió a un error en el momento de poner la cifra de un R-merge de (0.093), lo cual no es más que una especulación.

Otro de los detalles que no fueron considerados en esta estructura fue la existencia de una densidad positiva entre los cobres T3. Una vez que esta densidad fue analizada surgió la posibilidad de la existencia de un intermediario: di-oxígeno, peróxido y/o agua (**Figura 14a**). Al realizar el modelamiento del di-oxígeno dentro de esta densidad, la correlación de este intermediario con la densidad positiva era óptima al afinar el modelo en PHENIX por segunda vez y visualizarla en *Coot*. Esto establecía al di-oxígeno sin picos de densidad

<sup>2</sup> Durante el afinamiento se modifica la posición y geometría del modelo y se calculan nuevas fases a partir de él hasta obtener el mejor ajuste del modelo con la densidad electrónica (calculada a partir de los datos experimentales). Eso nos da un nuevo archivo de coordenadas con mejores fases. A partir de ellas se puede calcular un mapa de densidad electrónica que tiene dos formas de representación. Una que incluye la densidad de todos los átomos modelados *2fo-fo* y un mapa de diferencia *fo-fo* en el que se representan la densidad electrónica positiva y negativa. La densidad electrónica positiva es la que se ha calculado a partir de los datos experimentales pero no ha sido representada en el modelo. La negativa es lo opuesto: densidad modelada que no explican los datos experimentales.

<sup>3</sup> Fue obsoleta desde el 1 de enero del 2008

negativa o positiva en los mapas de diferencia. Sin embargo, la forma de la densidad electrónica (mapa  $2fo-fc$ ) en esta posición no describía a un di-oxígeno por lo que se modeló por segunda vez cuando colocamos una molécula de agua y tomamos lectura en PHENIX. Con PHENIX se obtuvo una continuidad en la densidad electrónica (mapa  $2fo-fc$ ) entre los cobres T3 y la molécula de agua. Estos resultados permitieron un ajuste mejor en la densidad electrónica a  $1\sigma$  (**Figura 14b**). Inclusive, aumenta la ocupación de todos los sitios de cobre y se obtiene una ocupación en el sitio T1 de 0.88: para los sitios de cobre T3 0.82/0.71 y para el cobre T2 0.50.

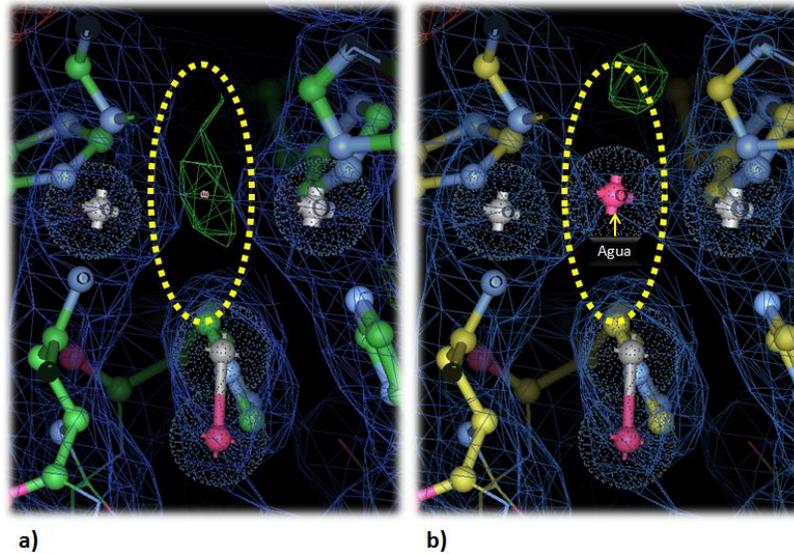


Figura 1. Estructura cristalográfica del sitio activo de la lacasa de CotA de *Bacillus subtilis* ("obsoleta" por el PDB) a) Densidad electrónica positiva entre los cobres T3 (no explicada por los autores). b) Ajuste de una molécula de agua. Mapas de densidad  $2fo-fc=1\sigma$  y  $fo-fc=3\sigma$ .

Lo deseable sería contar con los patrones de difracción y realizar nuevamente el proceso de integración para aclarar la existencia de este posible ligante. Este caso ejemplifica el porqué del cuidado que se debe tener al generar estructuras por medio de cristalografía.

### 8.4.2 Afinamiento de la lacasa de *Bacillus subtilis*, código PDB 1UVW

Tabla 2. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1UVW).

PDB ID	1UVW
Resolución Å	2.45
R-Value (%)	
Original	11%
Afinado	9%
R-Free (%)	
Original	14%
Afinado	11%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	85%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	42.78
Afinado	22.15
Ocupación T2	
Original	65%
Afinado	70%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	52.39
Afinado	42.64
Ocupación T3	
Original	80%
Afinado	70%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	52.96
Afinado	31.56
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	85%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	49.90
Afinado	29.17

Al analizar el mapa fo-fc en Coot, después del afinamiento en PHENIX, observamos diferencias en las ocupaciones parciales de los cobres. Estas diferencias resultaron un porcentaje menor con respecto a los datos depositados originalmente (Tabla 2). El cobre T2 presentó un aumento en la ocupación de 0.05. Dicha ocupación es considerable debido a que el cobre T2 es muy lábil. También existe la posibilidad de la deslocalización de este cobre en la estructura. De ahí la importancia de mencionar el aumento de ocupación en este sitio. La estructura de lacasa de *Bacillus subtilis* presenta un intermediario di-oxígeno con una posición inusual con respecto a los cobres T3; ya que se encuentra por arriba de ellos y no entre los dos sitios de cobre T3 (Figura 15a). Se ha reportado que el intermediario se localiza entre los sitios de cobre T3 (Figura 15b) durante el mecanismo de reacción. Esta observación no ha sido considerada en la explicación de la catálisis en lacasas, por lo que la comprobación de su existencia podría aportar a un mejor entendimiento del mecanismo catalítico.

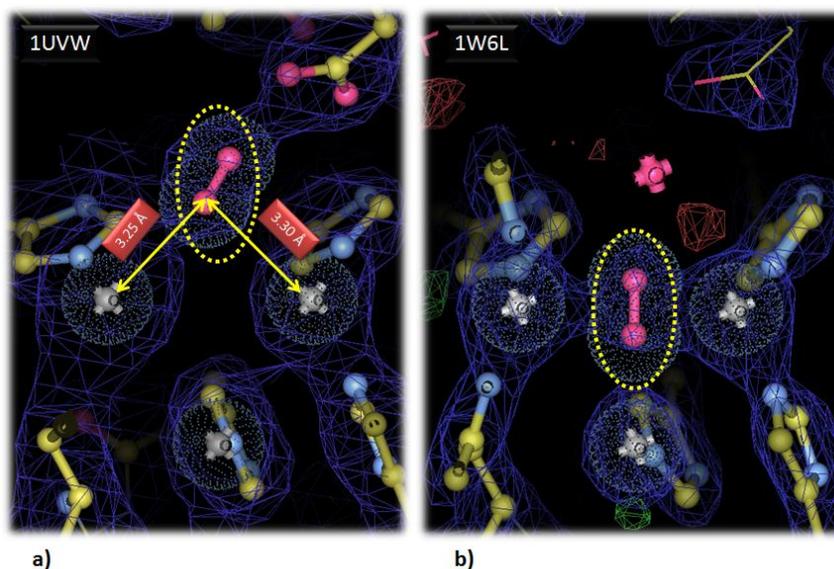
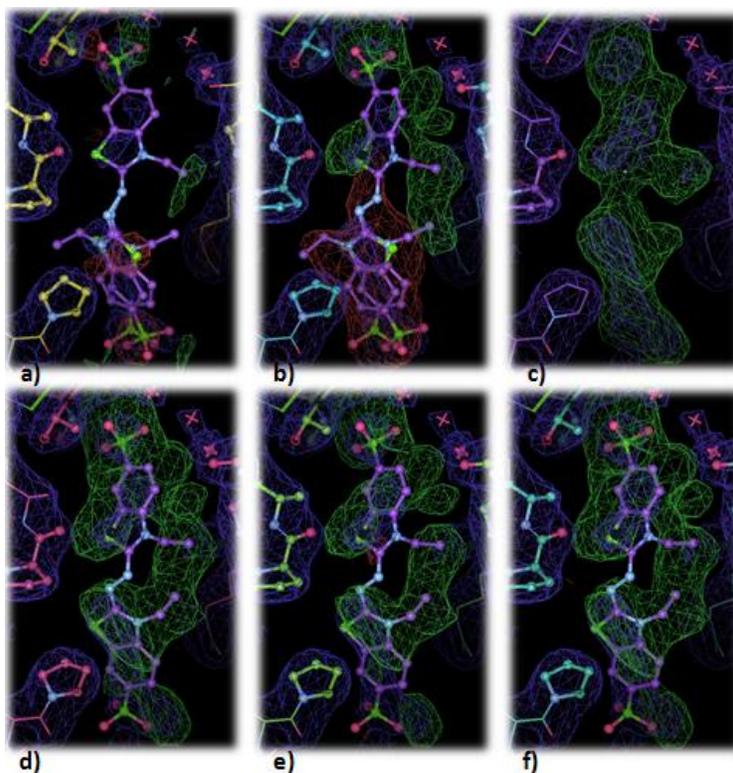


Figura 2. Posición del intermediario di-oxígeno con respecto a los sitios de cobre T3. a) Estructura de la lacasa de *Bacillus subtilis* (1UVW), intermediario di-oxígeno por encima de los sitios de cobre T3. b) Intermediario di-oxígeno, como se reporta en la bibliografía, lacasa de *Bacillus subtilis* (1W6L).

Además, esta estructura presenta un sustrato, ABTS<sup>4</sup>, el cual al observarlo en el modelo original (Figura 16a) no presenta una densidad electrónica clara (en su mapa 2fo-fc, e incluso presenta picos positivos y negativos en el mapa fo-fc). Al analizar los mapas del sustrato después del afinamiento se observó que el ABTS

<sup>4</sup> 2,2-azino-bis (3-etilbentiazolina-6-acido sulfónico)

presenta una larga densidad negativa alrededor de un fragmento de este (**Figura 16b**). Al eliminar el ABTS de la estructura se mostró una densidad positiva que modela la silueta de este sustrato. Se reporta en el artículo esta densidad positiva y se empalma al sustrato sobre la densidad positiva (**Figura 16c**)<sup>5</sup>. Posteriormente, disminuimos las ocupaciones a 0.3 (**Figura 16d**) y a 0.4 (**figura 16e**) de una parte del sustrato como factor que influía de manera directa en el mapa fo-fc. Al no observar cambio en los mapas afinamos los datos por tensores (TLS), para valorar la existencia de movimiento por parte del ABTS (**Figura 16f**). Pese al ajuste de las ocupaciones y el afinamiento por TLS, el modelo no mejoró los mapas de diferencia ni los mapas 2fo-fc.

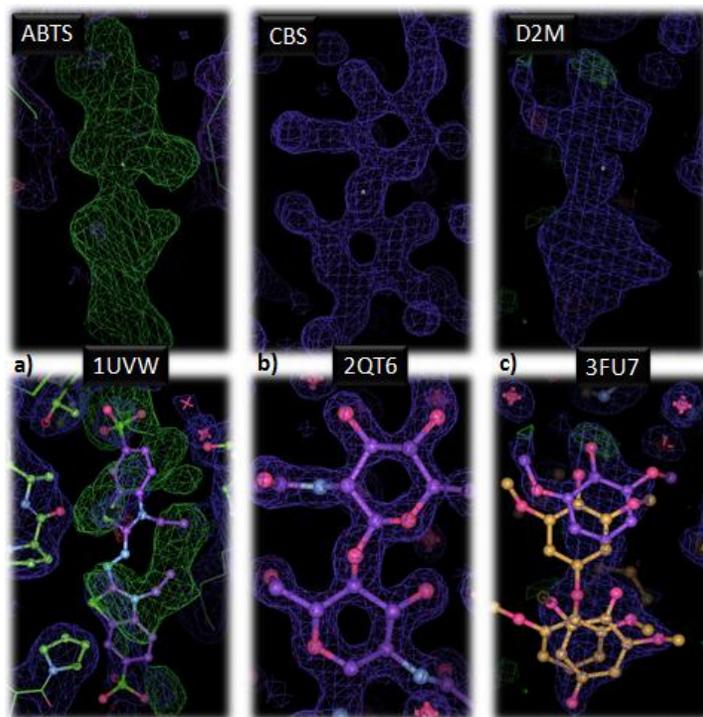


**Figura 3. Representación del sustrato ABTS. a) Estructura depositada en el PDB. b) Estructura después del afinamiento en PHENIX. Muestra en su mayoría densidades negativas. c) Sin ABTS. d/e) ABTS con ocupación de 0.3 y 0.4, respectivamente. f) Afinamiento del sustrato ABTS por tensores (TLS) .  $2fo-fc= 1 \sigma$  y  $fo-fc= 3 \sigma$ .**

Existe otra posibilidad para intentar explicar la representación del sustrato ABTS de esta lacasa de *Bacillus subtilis* (1UVW), y es modelando otros sustratos conocidos que junto con la lacasa, lleven a cabo la catálisis, con estructura parecida al ABTS (C18 H18 N4 O6 S4). Uno de ellos se encuentra en la lacasa de *Melanocarpus albomyces* (3FU7), mostrando un sustrato D2M [4-(2,6-dimetoxifenoxi)-2,6-dimetoxifenol] (C16 H18 O6); el otro sustrato se encuentra en la lacasa de *Lentinus tigrinus* (2QT6), mostrando un sustrato CBS

<sup>5</sup> Enguita, F.J., Marcal, D., Martins, L.O., Grenha, R., Henriques, A.O., Lindley, P.F., Carrondo, M.A. (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *J.Biol.Chem.* **279**: 23472-23476

[Di(N-acetil-D-glucosamina) (C<sub>16</sub> H<sub>28</sub> N<sub>2</sub> O<sub>11</sub>). Sin embargo al sobreponer estos sustratos, aun no es posible explicar el sustrato en el modelo, debido a que la densidad electrónica no justifica la estructura de estos sustratos en el mapa *fo-fc* (**Figura 17**).



**Figura 4.** Comparación del mapa *fo-fc*, del sustrato ABTS (1UVW) de *Bacillus subtilis* con distintos sustratos de similar estructura (D2M/CBS). a) Mapa de densidad electrónica del sustrato ABTS. b) Mapa de densidad electrónica del sustrato CBS (2QT6) de *Lentinus tigrinus*. c) Mapa de densidad electrónica del sustrato D2M (3FU7) de *Melanocarpus albomyces*.

A su vez, obtuvimos valores de R-value y R-Free bajos con una resolución baja. El conjunto de todos los datos aquí presentados muestran que los datos depositados en el PDB, están mal interpretados. Para demostrar esto, realizamos una búsqueda rápida en el PDB. Limitamos los depósitos con valores que oscilaban su R-value entre 0.05 y 0.11 y para R-Free entre 0.05 y 0.15. Con estos parámetros aparecieron 146 depósitos con un intervalo de resolución entre 0.5 y 2 Å. Dichos resultados señalan que a una resolución de 2.45 Å no es posible obtener valores R (value/free) tan bajos, como en el caso particular de esta estructura.

En los valores B sucede un caso similar a la estructura anterior (1HKZ). Es decir los valores B de los cobres de la estructura original son altos, sin embargo, los resultados dados después del afinamiento en PHENIX presentan una disminución notable de casi la mitad de los valores B originales. Esto a excepción del cobre T2 que inclusive reduce el valor en diez unidades con respecto al valor original. Lo anterior indica poco movimiento en esta parte de la molécula. Los valores de R-Free y R-value en ambos casos (datos originales/afinamiento) se mantienen por debajo de las 5 unidades porcentuales de separación. Inclusive, los valores del afinamiento hecho en PHENIX son más bajos, lo cual nos da una mejor confiabilidad en relación al ajuste del modelo y la densidad electrónica con respecto a los datos originales.

### 8.4.3 Afinamiento de la lacasa de *Bacillus subtilis*, código PDB 1W6L

Tabla 3. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1W6L).

PDB ID	1W6L
Resolución Å	2.00
R-Value (%)	
Original	14%
Afinado	15%
R-Free (%)	
Original	17%
Afinado	18%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	80%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	17.40
Afinado	7.05
Ocupación T2	
Original	67%
Afinado	65%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	18.42
Afinado	14.27
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	80%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	19.02
Afinado	8.36
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	80%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	19.28
Afinado	8.35

Esta estructura a diferencia de las otras dos determinadas por el mismo autor (1W6W / 1W8E), contiene un intermediario OXY (di-oxígeno). Debido a que en el artículo del depósito los autores tratan de proponer un mecanismo de reacción, así como también describir a la proteína CotA, se describieron estructuras en presencia de azida y peróxido. En particular, el cristal del depósito 1W6L fue remojado en una solución de  $\text{CuCl}_2$  (Figura 18a). El hecho de que PHENIX redujera en  $10 \text{ \AA}^2$  aproximadamente el valor B de los cobres y, al mismo tiempo, mantuviera los valores R y R-free originales, nos hace pensar que PHENIX (en este caso) sobre-afina los valores B y/o la ocupación de los cobres (Figura 18b). El análisis de los mapas fo-fc antes y después del afinamiento con PHENIX mostraron claramente que su versión automática no mejoró al modelo, sino lo desajustó. Esta observación subraya el hecho de que es necesario corroborar los resultados de las corridas automáticas y en ciertos casos, realizar alteraciones manuales para mejorar los resultados del afinamiento.

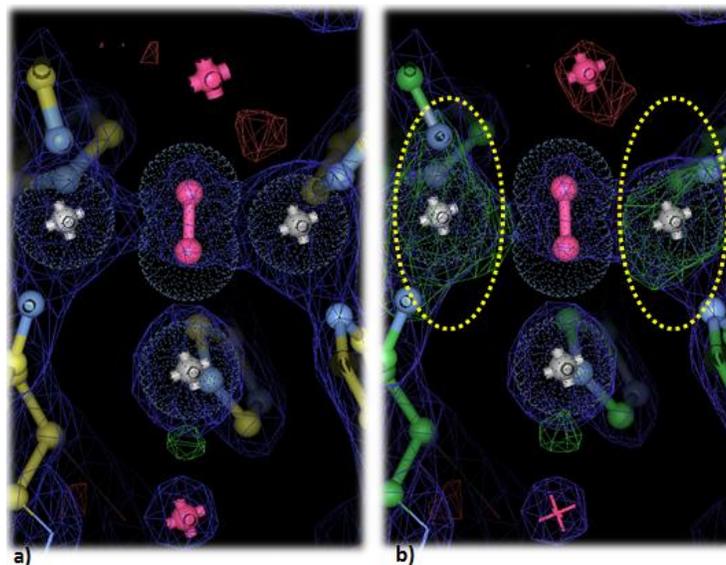


Figura 5. Representación del sitio trinuclear de la estructura de la lacasa de *Bacillus subtilis* (1W6L). a) Estructura original depositada en el PDB. b) Sobre-afinamiento de las ocupaciones de los cobres y los valores-B.

Tras el afinamiento en PHENIX, como sucedió y seguirá en casos posteriores nos enfocamos a los sitios de cobre. Estos sitios presentan una menor ocupación respecto a los datos originales sin ser estos últimos tan distantes (Tabla 3). Los valores B depositados originalmente son bajos (cerca de  $19 \text{ \AA}^2$ , de hecho los valores B globales del modelo completo son también de  $19 \text{ \AA}^2$ ). Sin embargo los valores después del afinamiento muestran una disminución mayor en los valores para cada uno de los cobres (Tabla 3).

#### 8.4.4 Afinamiento de la lacasa de *Bacillus subtilis*, código PDB 1GSK

Tabla 4. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1GSK).

PDB ID	1GSK
Resolución Å	1.70
R-Value (%)	
Original	16%
Afinado	17%
R-Free (%)	
Original	19%
Afinado	19%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	70%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	28.79
Afinado	22.52
Ocupación T2	
Original	50%
Afinado	4%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	49.79
Afinado	23.19
Ocupación T3	
Original	50%
Afinado	10%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	43.46
Afinado	21.67
Ocupación T3	
Original	50%
Afinado	15%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	40.23
Afinado	20.64

En la estructura depositada en el PDB, los sitios de cobre, tanto en el centro trinuclear como en el sitio mononuclear, presentan densidades negativas alrededor de estos (**Figura 19a**). Tras el afinamiento en PHENIX los sitios de cobre presentaron una menor ocupación respecto a los datos originales. Esto permitió resaltar una diferencia considerable (porcentaje de ocupación bajo) (**Tabla 4**). Para el T1 una ocupación de 0.70, para los cobres T3 de 0.15 y 0.10, y la ausencia de cobre T2. No se modeló el cobre T2 en la estructura obtenida después del afinamiento en PHENIX debido a: 1) la ocupación baja del cobre (0.04) en el mapa  $2fo-fc$  a  $1\sigma$  (**Figura 19b**). Los valores de R-Free y R-Value oscilan en un rango aceptable en ambos casos. Esto los mantiene en dos unidades porcentuales de separación por debajo de 5 unidades (**Tabla 4**).

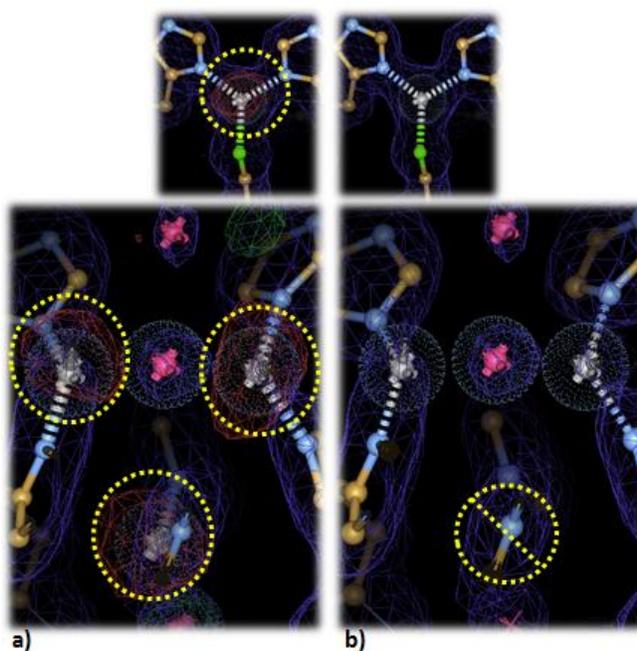


Figura 6. Representación de las densidades antes y después del afinamiento, en el sitio activo de la lacasa de *Bacillus subtilis* (1GSK). a) Densidades negativas alrededor de cada uno de los sitios de cobres. b) Desaparición del sitio de cobre T2 debido a su bajo valor de ocupación y la desaparición de las densidades negativas en el resto de los sitios de cobre  $2fo-fc= 1\sigma$  y  $fo-fc= 3\sigma$ .

### 8.4.5 Afinamiento de la lacasa de *Bacillus subtilis*, código PDB 1OF0

Tabla 5. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1OF0).

PDB ID	1OF0
Resolución Å	2.45
R-Value (%)	
Original	19%
Afinado	19%
R-Free (%)	
Original	25%
Afinado	23%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	59%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	41.20
Afinado	21.38
Ocupación T2	
Original	100%
Afinado	43%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	74.73
Afinado	30.02
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	61%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	45.23
Afinado	27.31
Ocupación T3	
Original	50%
Afinado	47%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	25.17
Afinado	20.30

Los sitios de cobre presentaron ocupaciones parciales menores a las obtenidas en la estructura depositada en el PDB (Tabla 5). Esta estructura presenta un intermediario di-oxígeno posicionado por encima de los cobres T3, como en el caso sucedido en la estructura (1UVW). Se observó una densidad positiva (+3  $\sigma$ ) bastante amplia entre los cobres T3. Esto sugiere que en esa posición debería ir el intermediario. Una forma de predecir que átomo embona empalma con el mapa de densidad es modelar la estructura con un agua. Sin embargo al modelar la estructura de esta forma desaparece su densidad positiva (Figura 20b) y no presenta densidad electrónica en el mapa  $2fo-fc$  a 1. En la estructura original se reporta una densidad negativa alrededor del intermediario observada a través del mapa  $fo-fc$ . En dicho mapa el intermediario presenta poca densidad electrónica en el mapa  $2fo-fc$  y la densidad positiva entre los cobres T3 se mantiene (Figura 20a).

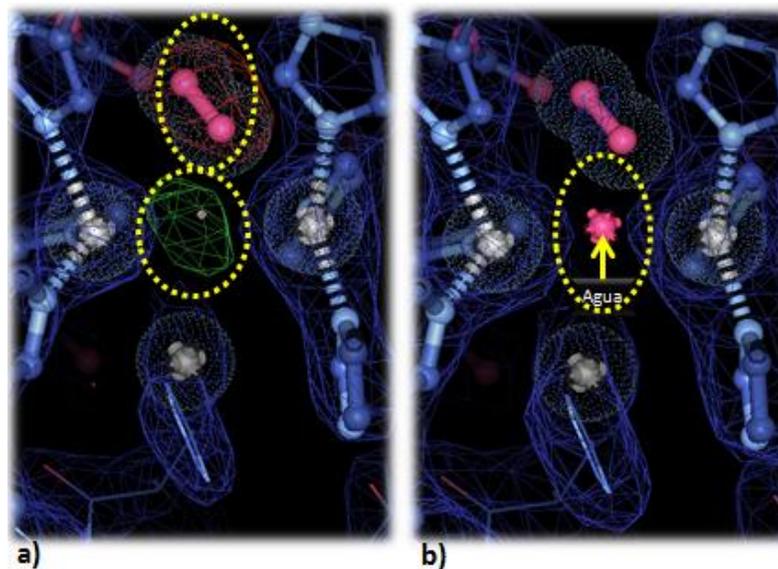


Figura 7. Estructura de la lacasa de *Bacillus subtilis* mostrando un intermediario di-oxígeno posicionado por encima de los cobres T3. a) Densidad negativa alrededor del intermediario y densidad positiva entre los sitios de cobre T3 en el PDB original  $2fo-fc= 1 \sigma$  y  $fo-fc= 3 \sigma$ . b) Ajuste de una molécula de agua la cual no presenta densidad electrónica entre los cobres T3. c)

Otro punto importante es la presencia del sustrato EBS ((3-etil-2-[(2Z)-(3-etil-6-sulfo-1,3-benzotiazol-2(3H)-ylodieno) hidrazino]-6-sulfo-3H-1,3-benzotiazol-1-ium) en la estructura. Sin embargo, no existe una densidad electrónica alrededor de este ni picos de densidad positiva en el mapa de diferencias (Figura 21a). El mismo

resultado se genera al afinar la estructura con PHENIX (**Figura 21b**). Para corroborar la ausencia de EBS, eliminamos al sustrato y afinamos nuevamente la estructura **Figura 21c**). Este último afinamiento mostró la falta de densidades en el mapa. Después, a la estructura original de CotA se empalmo con otra estructura de lacasa CotA de mayor resolución (PDB 1GSK). Observamos que algunas moléculas de agua se ajustan a ciertos sitios del EBS (**Figura 21d**, señaladas por flechas amarillas).

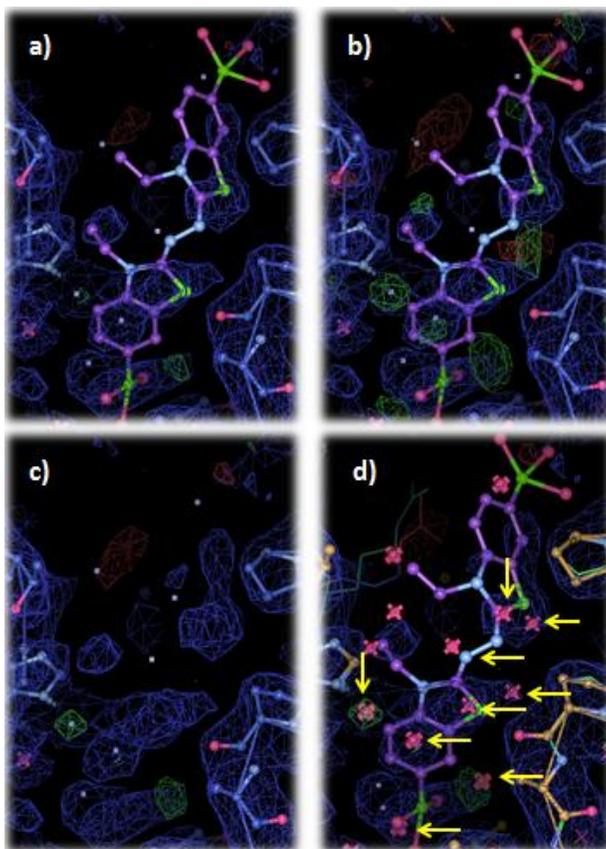


Figura 8. Representación del sustrato EBS de la lacasa *Bacillus subtilis* (1OF0). a) Densidad nula en el sustrato (EBS). b) Ligeros picos de densidad positiva en ciertas regiones del sustrato tras el afinamiento en PHENIX. c) Eliminación del EBS para comprobar la existencia de algún tipo de densidad la cual fue nula. d) Empalme de moléculas de agua que ajustan en ciertos sitios del EBS.  $2fo-fc=1\sigma$  y  $fo-fc=3\sigma$ .

### 8.4.6 Afinamiento de la lacasa de *Bacillus subtilis*, código PDB 2BHF

Tabla 6. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (2BHF).

PDB ID	2BHF
Resolución Å	2.50
R-Value (%)	
Original	17%
Afinado	17%
R-Free (%)	
Original	21%
Afinado	21%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	99%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	42.80
Afinado	42.67
Ocupación T2	
Original	50%
Afinado	48%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	43.47
Afinado	47.30
Ocupación T3	
Original	80%
Afinado	69%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	46.66
Afinado	42.41
Ocupación T3	
Original	30%
Afinado	29%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	48.47
Afinado	51.34

Las ocupaciones de los sitios de cobre presentan valores parciales menores a las obtenidas en la estructura depositada en el PDB (**Tabla 6**). Los valores B del cobre T3 y del cobre T2 aumentaron alrededor de 3 unidades con relación a los valores originales (**Tabla 6**). Uno de los intermediarios en el mecanismo de reacción es el di-oxígeno, el cual en la bibliografía, lo sitúan entre los sitios de cobre T3 (**Figura 22b**). Sin embargo, en esta estructura por encima de los cobres T3, se presenta una densidad positiva en el mapa fo-fc. Esto abre la posibilidad de que dicha densidad sea un intermediario como en el caso de (1UVV / 1OF0) o sea un agua posiblemente (**Figura 22a**).

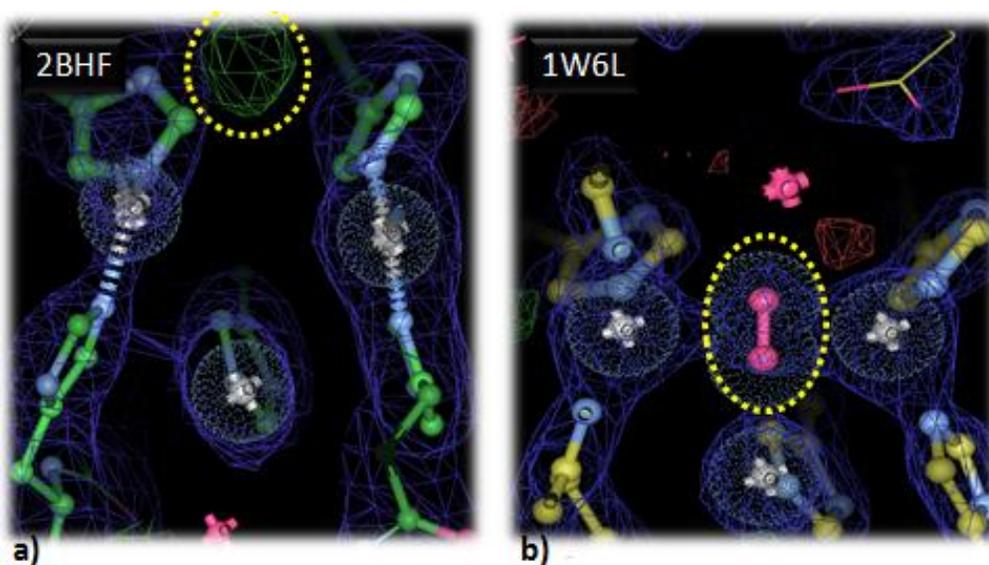


Figura 9. Representación del posible intermediario de la lacasa de *Bacillus subtilis* (2BHF). a) Posible intermediario y/o agua debido a la presencia de densidad positiva. b) Presencia del intermediario di-oxígeno entre los sitios de cobre T3 de la lacasa de *Bacillus subtilis* código PDB 1W6L

Se modelaron tanto un di-oxígeno como una molécula de agua con distintos parámetros en las ocupaciones (alta: 1, media: 0.50, baja: 0.20). Sin embargo, al igual que en la estructura 1HKZ, tras modelar no aparecen mapas de 2fo-fc a 2  $\sigma$  pero si desaparecen los picos positivos en el mapa fo-fc (a +3  $\sigma$ ) (**Figura 23**). Es de

importancia mencionar que existen dos estructuras con intermediarios di-oxígeno posicionados por encima de los T3. En esta estructura se maneja como una suposición por la densidad positiva presente en el modelo original y por la superposición entre las dos estructuras que presentan este intermediario y este modelo. Esto hace coincidir el sitio de densidad positiva con el intermediario de cualquiera de estas dos estructuras por lo que su presencia se podría considerar para un análisis posterior como uno de los pasos dentro de la catálisis de las lacasas.

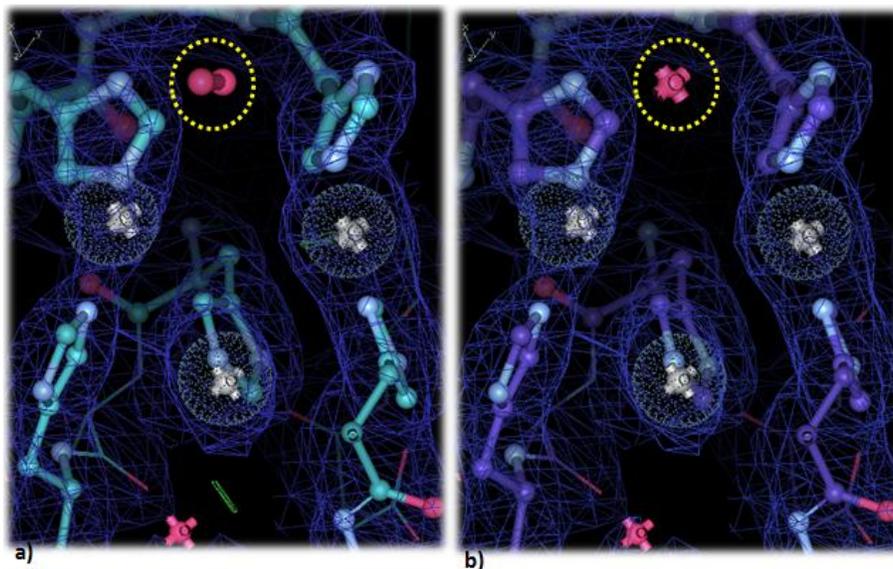


Figura 10. Representaciones del sitio trinuclear de la lacasa de *Bacillus subtilis* (2BHF) modelando diferentes intermediarios. a) Ajuste de una molécula de di-oxígeno, la cual no presentó densidad electrónica a  $1\sigma$  en el mapa de  $2fo-fc$ . b) Ajuste de una molécula de agua, sin la presencia de densidad electrónica a  $1\sigma$  en el mapa de  $2fo-fc$ .

#### 8.4.7 Afinamiento de CueO de *Escherichia coli*, código PDB 2FQD / 2FQE

Tabla 7. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (2FQD/2FQE).

PDB ID	2FQD	2FQE
Resolución Å	2.40	1.92
R-Value (%)		
Original	16%	16%
Afinado	16%	16%
R-Free (%)		
Original	22%	20%
Afinado	20%	20%
Ocupación T1		
Original	70%	80%
Afinado	62%	57%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	27.88	23.34
Afinado	21.73	15.49
Ocupación T2		
Original	---	20%
Afinado	---	20%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	---	18.47
Afinado	---	20.58
Ocupación T3		
Original	50%	30%
Afinado	53%	32%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	28.67	21.69
Afinado	25.87	26.52
Ocupación T3		
Original	80%	90%
Afinado	64%	62%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	26.51	16.10
Afinado	14.13	6.59

Las estructuras de *E. coli* 2FQD, 2FQE, 2FQF y la estructura 2FQG fueron resueltas por los mismos autores. Ellos variaron en estas cuatro estructuras las condiciones cristalográficas como la fuente de radiación. Las estructuras (2FQD / 2FQE) fueron difractadas en un sincrotrón (**Tabla 7**). El cristal de la 2FQE fue sumergido en una solución de CuCl<sub>2</sub>, mientras que los datos de las otras dos estructuras (2FQF / 2FQG) fueron colectados en ánodo rotatorio que disminuyó la incidencia de los rayos X en el cristal. Estos datos sugieren que en ambas estructuras existen cuatro cobres y que se genera una mejoría considerable en el cobre T2 sólo al sumergir el cristal en una solución de CuCl<sub>2</sub> (0.80) comparado con los datos originales. Sin embargo, al enfocar el problema acerca de los daños por radiación, son un agente causal para las ocupaciones parciales de los cobres, se realizó un prueba, en la que se tomó las dos estructuras difractadas en sincrotrón (**Tabla 7**). La primer estructura (2FQD), con una resolución de 2.40 Å, la cual no presenta el sitio de cobre T2 (**Figura 25a**) y la otra estructura (2FQE), con una resolución de 1.92 Å, presenta todos sus átomos de cobre en su sitio activo (**Figura 25b**); se decidió igualar el valor de resolución a 2.40 Å, para observar el comportamiento del sitio activo de la estructura de mayor resolución. Al afinarla en PHENIX y visualizar en Coot, el nuevo modelo presenta ciertos picos de densidad positiva en uno de los cobres T3 y un pico de densidad rojo en el sitio de cobre T2 (**Figura 25c**). Esto sugiere que la resolución aunado a los daños causados al cristal por la radiación, podrían estar afectando la presencia de los cobres en la enzima para este caso en particular.

En suma, las ocupaciones parciales de las estructuras difractadas en ánodo rotatorio presentan valores más altos que aquellas que fueron difractadas en sincrotrón.

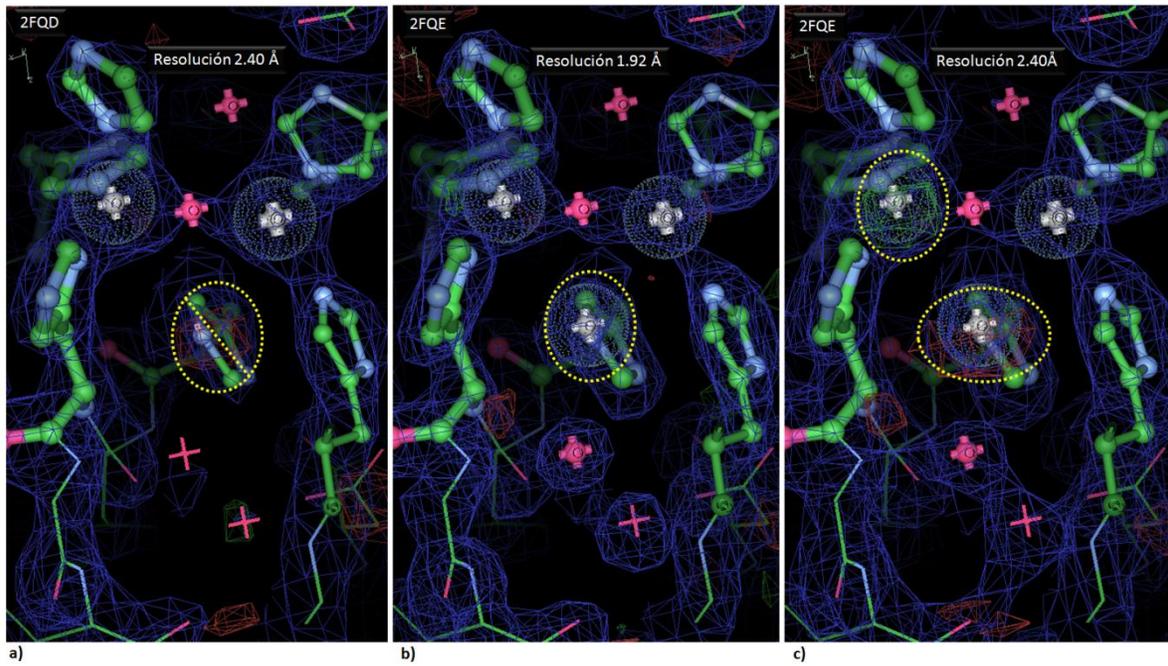


Figura 11. Comparación del valor de resolución entre dos estructuras de lacasas de CueO de *E. coli*, resueltas por los mismos autores. a/b) Estructuras difractadas en sincrotrón, a diferente resolución (2FQD 2.40Å), (2FQE 1.92Å). c) Estructura (2FQE), a una resolución de 2.40 Å, mostrando picos de densidad positiva en una de los cobres T3, así como picos de densidad negativa en el sitio de cobre T2.  $2fo-fc=1\sigma$  y  $fo-fc=3\sigma$ .

### 8.4.8 Afinamiento de CueO de *Escherichia coli*, código PDB 1KV7

Tabla 8. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1KV7).

PDB ID	1KV7
Resolución Å	1.40
R-Value (%)	
Original	18%
Afinado	17%
R-Free (%)	
Original	22%
Afinado	19%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	87%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	10.66
Afinado	9.63
Ocupación T2	
Original	100%
Afinado	42%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	30.44
Afinado	15.58
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	82%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	14.75
Afinado	12.82
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	64%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	22.50
Afinado	15.80

Las ocupaciones de los sitios de cobre presentan ocupaciones parciales menores a las obtenidas en la estructura depositada en el PDB. Esto denota la disminución del cobre T2 a la mitad de su valor de ocupación (Tabla 8). En el depósito original alrededor de los sitios de cobre se puede observar claramente densidad negativa por lo que se decidió bajar la ocupación para cada uno de los átomos de cobre manualmente y posteriormente, afinar la estructura para eliminar así la presencia de densidades negativas alrededor de los cobres.

Esta estructura presenta todos los sitios de cobre. En este caso para resolver la indeterminación del problema de fases, se utilizó el método de dispersión anómala múltiple (descrito en la introducción). A pesar de tomar longitudes de onda máxima de fluorescencia del cobre (1.377 Å y 1.380 Å) no existe un cambio evidente respecto a la ocupación de los sitios de cobre. No obstante, si muestran una alta ocupación (1.00) en el modelo original. Sin embargo, desde el depósito original existe un pico negativo sobre la posición del cobre (Figura 26a). Una vez valorados los datos de forma manual y después de afinar en PHENIX, las ocupaciones de los sitios de cobre bajaron y se, eliminaron las densidades negativas en estos sitios (Figura 26b).

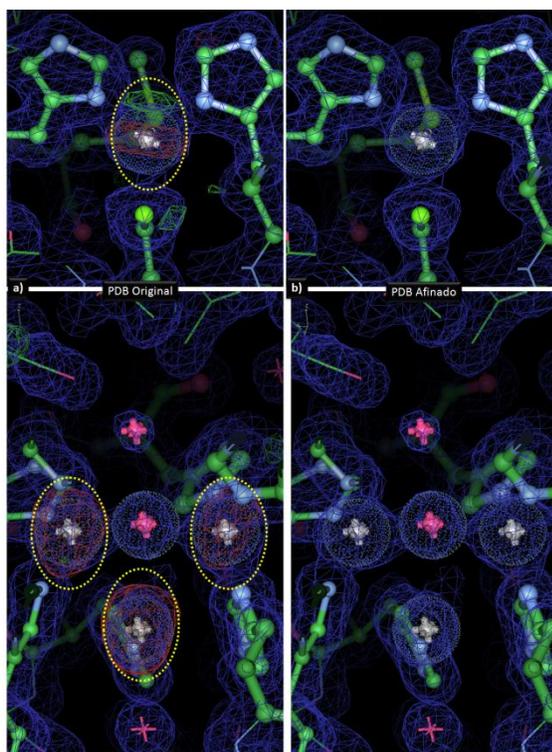


Figura 12. Representación de las densidades eléctricas de la lacasa CueO de *E.coli* (1KV7). a) Densidades negativas alrededor de los sitios de cobre modeladas en la estructura original. b) Con el afinamiento se eliminaron las densidades negativas y se estableció un valor real en las ocupaciones de estos sitios.

### 8.4.9 Afinamiento de la lacasa de *Melanocarpus albomyces*, código PDB 2IH8 / 2IH9

Tabla 9. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (2IH8/2IH9).

PDB ID	2IH8	2IH9
Resolución Å	2.00	2.00
R-Value (%)		
Original	18%	26%
Afinado	16%	25%
R-Free (%)		
Original	21%	29%
Afinado	20%	30%
Ocupación T1		
Original	100%	100%
Afinado	70%	82%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	15.84	16.06
Afinado	5.18	9.20
Ocupación T2		
Original	100%	100%
Afinado	71%	82%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	15.61	21.37
Afinado	7.30	13.88
Ocupación T3		
Original	100%	100%
Afinado	69%	87%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	18.57	16.40
Afinado	9.06	10.98
Ocupación T3		
Original	100%	100%
Afinado	73%	78%
Valor-B Å <sup>2</sup>		
Original	15.93	19.12
Afinado	6.92	12.35

Las ocupaciones de los sitios de cobre presentan ocupaciones parciales menores a las obtenidas en la estructura depositada en el PDB (Tabla 9). La difracción de uno de los cristales fue hecha a una baja dosis de radiación (Figura 27a).<sup>6</sup> Mientras que el cristal de la estructura (2IH9), se expuso a una dosis alta de radiación. Es importante señalar que la estructura irradiada a dosis baja (2IH8), presenta el intermediario di-oxígeno, y la estructura irradiada a dosis alta no, lo que resultó en la desaparición del intermediario di-oxígeno (Figura 27b). Esto puede ser atribuido directamente a los daños por radiación. La dosis es el único parámetro que varía; todas las demás condiciones son constantes en ambas estructuras y ambas estructuras fueron resueltas por los mismos autores.

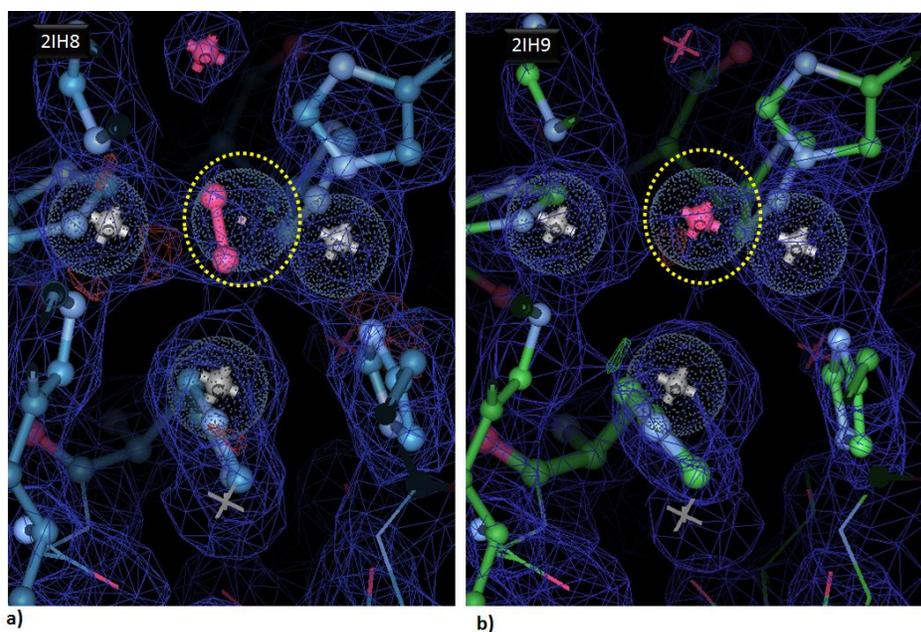


Figura 13. Representación de los intermediarios de la estructura de lacasa de *Melanocarpus albomyces*. a) El intermediario di-oxígeno se encuentra presente entre los sitios T3. Este ligando sólo aparece cuando la dosis colocada en el cristal es baja. b) Probable desaparición del intermediario di-oxígeno por una exposición mayor a rayos X en el cristal.

<sup>6</sup> Hakulinen, N., Kruus, K., Koivula, A., Rouvinen, J. (2006) A crystallographic and spectroscopic study on the effect of X-ray radiation on the crystal structure of *Melanocarpus albomyces* laccase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **350**: 929-934

### 8.4.10 Afinamiento de la lacasa de *Coprinus cinereus*, código PDB 1HFU

Tabla 10. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1HFU).

PDB ID	1HFU
Resolución Å	1.68
R-Value (%)	
Original	18%
Afinado	17%
R-Free (%)	
Original	20%
Afinado	21%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	81%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	20.87
Afinado	16.06
Ocupación T2	
Original	---
Afinado	---
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	---
Afinado	---
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	82%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	19.57
Afinado	14.83
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	74%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	23.34
Afinado	17.17

Las ocupaciones de los sitios de cobre presentan ocupaciones parciales y son similares a las obtenidas en la estructura depositada en el PDB (Tabla 10). En los valores de R-Free y R-value, hubo una variación pequeña en relación a los datos depositados (21% y 17% respectivamente).

En esta estructura se modeló el sitio de cobre T2 (Figura 29a) al representar el cobre T2 con una ocupación alta. Este muestra una densidad negativa. Al modelarlo con una ocupación baja éste no muestra densidad electrónica. En el modelo original si está presente una ligera densidad positiva en este sitio (Figura 29b). Una posible explicación por la cual no esté presente el CuT2 en su sitio es al observar una conformación alternativa de la His402 (Figura 29a) para este caso.

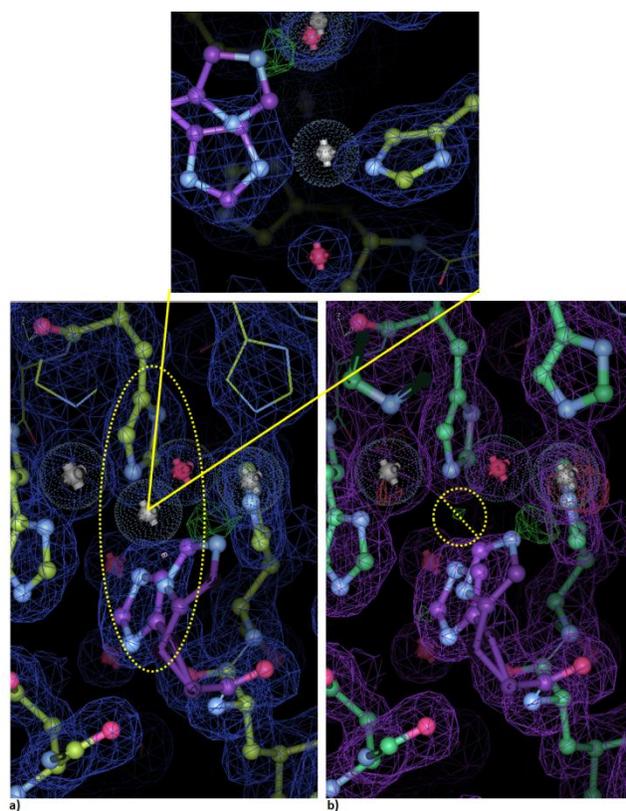


Figura 14. Representación del sitio de cobre T2 en la lacasa de *Coprinus cinereus*. a) Ajuste de un ión cobre en el sitio vacante, el cual no presenta densidad electrónica. El mapa  $2fo-fc$  se encuentra desplegado a  $1\sigma$  y el mapa  $fo-fc$  a  $\pm 3\sigma$ . b) Ausencia del sitio de cobre T2.

### 8.4.11 Afinamiento de la lacasa de *Coprinus cinereus*, código PDB 1A65

Tabla 11. Comparación de valores originales y re-afinados del modelo estructural (1A65).

PDB ID	1A65
Resolución Å	2.23
R-Value (%)	
Original	16%
Afinado	14%
R-Free (%)	
Original	22%
Afinado	18%
Ocupación T1	
Original	100%
Afinado	88%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	29.47
Afinado	22.34
Ocupación T2	
Original	---
Afinado	---
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	---
Afinado	---
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	86%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	21.38
Afinado	15.94
Ocupación T3	
Original	100%
Afinado	83%
Valor-B Å <sup>2</sup>	
Original	27.01
Afinado	19.82

Las ocupaciones de los sitios de cobre presentan ocupaciones parciales que son similares a las obtenidas en la estructura depositada en el PDB (Tabla 11).

Una consecuencia de la casi ausencia del cobre T2 en esta estructura es que una de las histidinas que coordinan al CuT2 cambia de conformación y apunta sus nitrógenos hacia uno de los cobres T3 (Figura 30a). Esto hace que el Cu T3 esté coordinado por 4 histidinas. El llamar “casi” ausencia al estado del cobre T2, se debe al hecho de que existe un pequeño pico de densidad positiva cerca del Ne2 de la His64 (mayor a  $+3\sigma$  en el mapa fo-fc, (Figura 30a). Sin embargo, al modelar un Cu en esta posición su ocupación disminuyó a 0.10 y no apareció señal en el mapa 2fo-fc a  $1\sigma$ . A pesar de esto, si desapareció el pico positivo, lo que hace suponer que el cobre T2, de existir, tiene una ocupación menor a 0.1. En la imagen de la figura 30 panel (b), se observa una estructura de CotA de *Bacillus subtilis* (PDB 1UVW) y muestra la forma en que deben estar coordinando las dos histidinas al sitio del Cu T2.

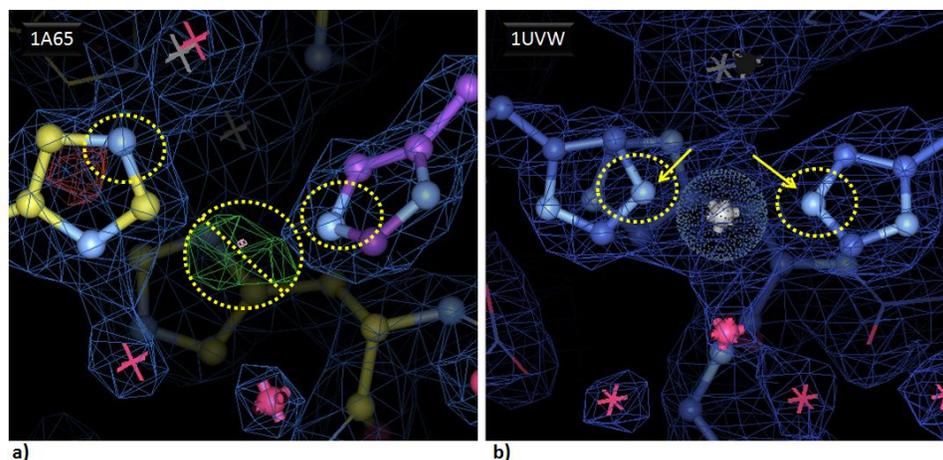


Figura 15. Conformación de las histidinas que coordinan al sitio de cobre T2. a) Cambio de conformación de las histidinas que coordinan al cobre T2. Posible ausencia del cobre en este sitio. b) Comparación de la posición de las histidinas al coordinar el sitio de cobre T2 en CotA de *Bacillus subtilis*.

# 9 DISCUSIÓN

La mayoría de las estructuras seleccionadas, después de los afinamientos, no presentaron cambios que necesitaran un afinamiento manual en sitios de cobre, a pesar de que si presentaron una ligera reducción en las ocupaciones de los mismos. Los mapas de diferencia no presentaban picos positivos o negativos en los átomos de cobre por lo que se puede deducir que estas estructuras están bien determinadas y que sus datos experimentales, a pesar de no ser los mejores de acuerdo a criterios cristalográficos estrictos, son los más óptimos para cada tipo de estructura de lacasa presente en este estudio. Cabe señalar que algunas de las estructuras no presentan bibliografía debido a que ya se liberó su estructura pero el artículo está por ser publicado.

Es importante destacar la participación de los sitios de cobre en la actividad catalítica lo cual conllevó a su análisis (tanto de los sitios mononuclear como trinuclear) en esta tesis. Para hacer más comprensible el papel de estos sitios de cobre se hará una breve síntesis de estos.

## 9.1 Sitio de cobre T1

El sitio de cobre T1 desempeña un papel fundamental en la oxidación desde el punto de vista estructural, catalítico y de estabilidad Durão *et al.*, 2006). En este trabajo encontramos que en esencia este sitio permanece sin cambios al analizarlo en todas las estructuras depositadas en el PDB. Las distancias de coordinación se mantienen casi constantes así como en la continuidad de la densidad electrónica entre las dos histidinas, la cisteína y el ligando axial (en mapas 2fo- $f_c$  a  $1\sigma$ ).

## 9.2 Sitio de cobre T2

La característica más notable del cobre T2 es la baja ocupación a excepción de algunas de ellas (2G23 / 2HRG / 2HZH / 2HRG / 2IH8 / 2IH9 / 2Q9O / 3G5W / 1KV7 / 1ZPU / 1GW0 / 1GYC / 1KYA / 1V10). En estas excepciones, los depósitos originales aparecen con una ocupación del 100% en el sitio de cobre T2 y crean un falso positivo. Esta afirmación se sustenta en que al afinar todas las estructuras en PHENIX, ninguna estructura en su sitio de cobre T2 alcanzó una ocupación tan alta como lo manejan las estructuras originales en el PDB. El rango del valor de ocupación de este sitio después del afinamiento oscila entre el 0 y el 65 %. La excepción a este comportamiento fue la estructura de *Melanocarpus albomyces* (2Q9O) a 1.30 Å de resolución, la cual muestra una ocupación del 92% en el sitio de cobre T2. De las catorce estructuras que tienen una ocupación del 100 % en el Cu T2, tres de ellas (1GYC, 1KYA y 1V10) no depositaron los factores de estructura, por lo que fue imposible comprobar que la ocupación fuera la que se reportó.

## 9.3 Sitio de cobre T3

En algunas de las estructuras la distancia entre los cobres T3 se reduce hasta 3.1 Å (normalmente esta distancia es de más de 4.9 Å). Al tratar de encontrar una correlación entre la reducción de las distancias de coordinación entre los CuT3 y la ausencia del CuT2 revisamos nuevamente los depósitos de lacasas en el PDB. En las dos estructuras depositadas de la lacasa de *C. cinereus* (PDB 1A65 y 1HFU), en las que el sitio T2 está desocupado, las distancias entre los cobres T3 son de 4.9 Å y 5.3 Å. En la lacasa de *B. subtilis* que

carece de CuT2 (PDB 1HL1) la distancia CuT3-CuT3 es de 3.6 Å. En las estructuras de lacasas de *B. subtilis* que presentan al CuT2 las distancias entre los CuT3 fluctúan en el intervalo de 4.3 a 4.7 Å con la excepción del PDB 1HL0 en el que la distancia entre los CuT3 es de 3.1 Å. Lo mismo ocurre en las estructuras 1GYC y 1KYA de *T. versicolor* en las que los tres cobres están presentes (1 CuT2 y 2 CuT3) y las distancias entre los CuT3 son de 3.8 y 3.9 Å respectivamente. Entonces, la distancia entre los CuT3 no depende solamente de la presencia/ausencia del CuT2.

Para poder considerar las diferencias entre los datos depositados y los generados después del afinamiento en PHENIX, se realizó un promedio global de la ocupación para cada uno de los sitios de cobre. Con ello se obtuvieron los siguientes resultados (**Tabla 12**).

**Tabla 12. Ocupaciones promedio antes y después del afinamiento en PHENIX**

SITIO DE COBRE	% DE OCUPACION GENERAL (datos originales)	% DE OCUPACION GENERAL (afinamiento en PHENIX)
COBRE T1	≈ 90%	≈ 74%
COBRE T2	≈ 66%	≈ 54%
COBRE T3	≈ 75%	≈ 58%
COBRE T3'	≈ 73%	≈ 63%

Como se observa, existe una disminución de alrededor de un 13%, en promedio, para las ocupaciones de todos los sitios de cobre. Podemos observar que los valores depositados originalmente mostraban una ocupación en los sitios mayor que los obtenidos por PHENIX. Si bien, sería deseable utilizar otro programa de afinamiento para corroborar esta observación (p. e. REFMAC5 o CNS). Se puede decir que los depósitos en el PDB muestran ocupaciones mayores a las reales particularmente en los átomos de cobre.

#### 9.4 Efecto general de la radiación sobre los metales en lacasas

En el inicio de este trabajo se hipotetizó que la pérdida, o las ocupaciones parciales, de los cobres eran consecuencia de los efectos de la radiación X. El efecto general de la radiación sobre los metales es la reducción química dependiente de la dosis. La cual produce la ruptura de ciertos enlaces y concentra los daños causados en el metal pesado y/o en su entorno. Esta es una posible explicación de la ausencia del cobre T2 y de la ocupación parcial de los demás sitios de cobre. Pero la presencia de los cobres T1, T2 y T3 en cristales difractados a una longitud de onda de 1.38 Å (donde los daños sobre el átomo de cobre serían máximos) atenta contra la hipótesis. Caso contrario a lo establecido para las demás estructuras de proteínas con sitios de cobre en donde en el análisis de G. Velázquez Figueroa<sup>7</sup>, esta hipótesis si se establecía de manera general (en esta tesis el universo explorado incluía a todas las proteínas con cobre pero excluía a las lacasas). Por lo que no podemos considerar de manera general que para todas las lacasas depositadas hasta

<sup>7</sup> Guadalupe Velázquez Figueroa (2009). Análisis y afinamiento de estructuras proteicas con cobre depositadas en el *Protein Data Bank*. UPEMOR.

el momento en el PDB los daños por radiación sean la causa directa de la ausencia del cobre T2, así como de las ocupaciones parciales en los sitios de cobre restantes. Para sustentar lo dicho anteriormente, la estructura de CueO de *E. coli* (PDB 2FQD) en la cual el cristal fue difractado en un sincrotrón no presenta al cobre y además, presenta ocupaciones parciales en sus demás sitios de cobre difractado a una longitud de onda de 1 Å. Sin embargo, en la lacasa de *L. tigrinus* (PDB 2QT6) en el cual el cristal fue difractado de igual forma en un sincrotrón, e incluso difractado a la longitud de onda para la emisión de fluorescencia máxima cobre (1.38 Å), presentan los cuatro cobres con ocupaciones parciales altas. Todos estos datos impiden extrapolar la hipótesis de la dosis/ocupación de los cobres para todo el universo de lacasas. Sin embargo, es un hecho que las lacasas muestran ocupaciones parciales en sus cobres y si este hecho no puede explicarse como resultado de los daños por radiación, cabría la posibilidad de que la ocupación parcial de estos átomos cruciales para la catálisis de las lacasas sea biológicamente importante. O de una manera más conservadora, que la ocupación parcial de los átomos de cobre en lacasas es consecuencia de una serie de combinaciones en las que por ejemplo la purificación, las condiciones cristalográficas, los mismos daños por radiación, el pH, etc. en conjunto están implicados en el fenómeno. Tal es el caso de la lacasa de *Corioliopsis gallica* en donde el factor pH es un posible causante de las ocupaciones en los sitios de cobre. La pregunta obligada es: ¿el cambio en el pH *per se* es el causante de la ausencia del CuT2? Al menos eso es lo que la evidencia cristalográfica indicó. En lo que a la parte bioquímica respecta, se pudo asumir, por los perfiles de actividad-pH y las pruebas in situ, que a pH 4.5 la lacasa contiene al CuT2 al menos en la misma proporción que los otros dos pH analizados. Debido a que los cristales provenían del mismo lote de proteína y a que en las condiciones de cristalización únicamente cambia la solución amortiguadora, se creyó poco probable que la pérdida del cobre T2 ocurra durante el proceso de cristalización y exclusivamente en la condición a pH 4.5 (E. de la Mora, 2009). Es común en las estructuras cristalográficas de lacasa encontrar el sitio de cobre T2 con una ocupación  $\leq 50\%$ . Esto ha sido explicado como pérdida del sitio durante el proceso de purificación, ya que el cobre T2 es el más lábil de los 4 cobres. Los resultados obtenidos por E. de la Mora muestran que la ocupación del sitio T2 no es únicamente consecuencia de la purificación ni del proceso de cristalización, sino del ambiente (pH de la solución) en que se encuentre el cristal y quizá del efecto de los rayos X.

Otro factor por el cual el cobre T2 podría estar ausente de la estructura sería la deslocalización del ión o también, el que los nitrógenos de las histidinas que lo coordinan no estén apuntando al sitio del cobre T2, como fue el caso de la lacasa de *C. cinereus* (PDB 1A65) en la que el sitio de cobre T2 está desocupado. Toda esta cuestión acerca de la posición del cobre T2 se resume, por la existencia de un valor B mayor en el sitio de cobre T2 en ambos casos (deposito original/afinamiento en PHENIX) comparado con los otros sitios de cobre. Esto, deriva en la desaparición o la baja ocupación debido a las posibles causas mencionadas anteriormente en ciertas estructuras tales como (PDB 1HL1 / 2FQD / 1HFU / 1A65 / 2VE0) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Valores-B promedio antes y después del afinamiento en PHENIX

Sitios de cobre	Valores-B promedio en los sitios de cobre (datos originales)	Valores-B promedio en los sitios de cobre (afinamiento en PHENIX)
Cobre T1	$\approx 25 \text{ \AA}^2$	$\approx 20 \text{ \AA}^2$
Cobre T2	$\approx 30 \text{ \AA}^2$	$\approx 22 \text{ \AA}^2$
Cobre T3	$\approx 25 \text{ \AA}^2$	$\approx 21 \text{ \AA}^2$
Cobre T3'	$\approx 27 \text{ \AA}^2$	$\approx 21 \text{ \AA}^2$

### 9.5 Intermediario di-oxígeno en lacasas

Como se explicó en la introducción, el di-oxígeno es un intermediario que está involucrado en uno de los pasos de la catálisis de la lacasa. Este intermediario di-oxígeno está posicionado entre los cobres T3 a una distancia de  $\approx 2 \text{ \AA}$  (Cu T3/OXY/ Cu T3'). Sin embargo, existen tres estructuras (1UVW / 1OF0 / 2BHF) en las cuales se presenta este mismo intermediario. Solamente difieren tanto en la distancia como en la posición de éste respecto a los sitios de cobre T3. Debido a que el ligante se encuentra por arriba de ellos y no entre los dos sitios de cobre T3. Esta observación aun no ha sido considerada en la explicación de la catálisis en lacasas por lo que la comprobación de su existencia podría aportar en el mejor entendimiento del mecanismo catalítico.

# 10 CONCLUSIONES

- El PDB contiene una porción de depósitos con baja calidad y/o incompletos, es decir, tienen una diferencia de R-value – R-Free mayor al 5% y carecen de factores de estructura (elementos que permiten un análisis más detallado de la estructura). Parte de los depósitos derivados de la búsqueda en el PDB fueron excluidos (20%) porque no contaban con los criterios mínimos para poder realizar el análisis.
- En algunos casos, del afinamiento a través de PHENIX, pueden resultar mejores modelos, incluso, que los obtenidos en el modelo original.
- La posibilidad de poder crear mejores estructuras en este caso de lacasas es posible si se les da un tratamiento adecuado a los datos experimentales de la difracción. Es decir, si la resolución es suficiente y los parámetros (valor-B, R-value, R-Free, porcentaje de ocupación) son congruentes con un buen modelo. La extracción de dicha información expande el nivel de descripción con el que se puede detallar una estructura obtenida por cristalografía de rayos X.
- Los daños por radiación no son la única causa por la que las lacasas presenten tanto parciales como ausencia de alguno de los sitios de cobre. Más bien, se debe a un conjunto de causas que incluyen a la radiación X, purificación, condiciones experimentales, pH, la colecta de datos errónea en la difracción, etc.
- PHENIX disminuye los valores de ocupación de manera general a un 13% para cada uno de los sitios de cobre. También disminuye sus valores-B a 5 unidades en promedio.
- No existe una metodología estándar para llegar al mejor modelo posible en lacasas, mas bien, habría que tratar a cada proteína como un sistema independiente.
- Las lacasas presentan cuatro sitios de cobre. Uno de ellos, sitio de cobre T2, se considera el sitio más móvil de los cuatro sitios de cobre. La modificación en las estructuras de lacasas se realizó para mejorarlas. Sin embargo, en algunas estructuras la afinación automática no lo logró. Esta observación subraya el hecho de que es necesario corroborar los resultados de las corridas automáticas y en ciertos casos, realizar alteraciones manuales para mejorar los resultados del afinamiento.
- Los cristales que no fueron sumergidos en soluciones con sales de cobre mostraron que el sitio CuT2 está en menor ocupación comparado a los tres cobres restantes. Es decir, la inmersión en líquido madre con  $\text{CuCl}_2$  no aumentó la ocupación del sitio a excepción de una estructura de CueO de *E.coli* (PDB 2FQE). Sin embargo, esta presentó una ocupación muy baja (0.20).
- Del total de 31 estructuras re-afinadas sólo un 22% de las estructuras tuvieron ajustes al modelo original. El resto se mantuvo sin ningún cambio notable.

# 11 PERSPECTIVAS

Al continuar con las mejoras en los *software* de cristalografía y las herramientas de validación, combinados con mejores datos depositados en el PDB, se tendrá la capacidad de desarrollar protocolos óptimos de afinamiento como se describió aquí. Esto llevará a una mejoría o una posible explicación de los errores en los modelos de estructura comparados con su depósito inicial. Se mostraron algunos ejemplos en el universo de las lacasas que pueden ser incorporados al PDB para incrementar su efectividad. Por lo que una de las perspectivas se proyectaría hacia la incorporación de mejores filtros de datos en el PDB para aumentar la confiabilidad en las estructuras depositadas por los diversos autores.

Otro posible campo de exploración para el afinamiento sería corroborar los datos obtenidos por PHENIX con otros programas de afinamiento para asentar esta observación (p. e. REFMAC5 o CNS), particularmente en los átomos de cobre.

## 12. REFERENCIAS

- Akulinen, N., Kruus, K., Koivula, A., Rouvinen, J. (2006). A crystallographic and spectroscopic study on the effect of X-ray radiation on the crystal structure of *Melanocarpus albomyces* laccase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **350**: 929-934
- Anthony J. Augustine, Liliana Quintanar, Christopher S. Stoj, Daniel J. Kosman, and Edward I. Solomon. (2007). *Spectroscopic and Kinetic studies of Perturbed Trinuclear Copper Cluster: The Role of Protons in Reductive Cleavage of the O-O Bond in the Multicopper Oxidase Fet3p*. *J. Am Chem Soc.* 129(43): 13118-13126.
- Bento, I., Martins, L.O., Gato Lopes, G., Armenia Carrondo, M., Lindley, P.F. (2005). *Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective*. *Dalton Trans* **7**: 3507-3513
- Bergfors, T. 1999. *Protein Crystallization. Techniques, Strategies, and Tips*. Internacional University Line. USA pp 299.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., Mougin, C. (2002) *Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics*. *Biochemistry* **41**: 7325-7333.
- Blundell, T.L. and L.N. Johnson. 1976. *Protein Crystallography*. Academic Press, New York, USA.
- Brünger, A. T. (1992). *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. *Nature (London)*, 355, 472–475.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. *Acta Cryst. D***50**, 760-763.
- De la Mora Lugo Eugenio. (2007). *Determinantes estructurales de la inactivación por pH en la lacasa de *Corioloopsis gallica**. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Ostergaard, P., Schneider, P., Svendsen, A., Davies, G.J. (2001) *Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms*. *Acta Crystallogr., Sect. D* **57**: 333-336.
- E. B. Krissinel, M. D. Winn, C. C. Ballard, A. W. Ashton, P. Patel, E. A. Potterton, S. J. McNicholas, K. D. Cowtan & P. Emsley (2004). *The new CCP4 Coordinate Library as a toolkit for the design of coordinate-related applications in protein crystallography*. *Acta Cryst. D***60**, 2250-2255.
- Elspeth F. Garman and Robin Leslie Owen. (2006). *Cryocooling damage in macromolecular crystallography*. *Acta crystallogr., Sec. D* **62**: 32-47.
- Elspeth Garman. (2003). *"Cool" crystal: macromolecular cryocrystallography and radiation damage*. *Structural Biology*, **13**: 545-551.
- Enguita, F.J., Marcal, D., Martins, L.O., Grenha, R., Henriques, A.O., Lindley, P.F., Carrondo, M.A. (2004) *Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis**. *J.Biol.Chem.* **279**: 23472-23476.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O., Carrondo, M.A. (2003) *Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties*. *J.Biol.Chem.* **278**: 19416-19425.
- Ferraroni, M., Myasoedova, N.M., Schmatchenko, V., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Scozzafava, A., Briganti, F. (2007) *Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases*. *Bmc Struct.Biol.* **7**: 60-60.
- Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Rizzi, M. (2004) *The structure of *Rigidoporus lignosus* Laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair*. *J.Mol.Biol.* **342**: 1519-1531.
- H. M. Berman (2008). *The Protein Data Bank: a historical perspective*. *Acta Cryst. A***64**, 88-95.
- H. M. Berman, T. Battistuz, T. N. Bhat, W. F. Bluhm, P. E. Bourne, K. Burkhardt, Z. Feng, G. L. Gilliland, L. Iype, S. Jain, P. Fagan, J. Marvin, D. Padilla, V. Ravichandran, B. Schneider, N.

- Thanki, H. Weissig, J. D. Westbrook & C. Zardecki (2002). *The Protein Data Bank. Acta Cryst. D58*, 899-907.
- H. Yang, V. Guranovic, S. Dutta, Z. Feng, H. M. Berman & J. D. Westbrook (2004). *Automated and accurate deposition of structures solved by X-ray diffraction to the Protein Data Bank. Acta Cryst. D60*, 1833-1839.
  - Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinen, J. (2002) *Crystal structure of a laccase from Melanocarpus albomyces with an intact trinuclear copper site. Nat.Struct.Biol. 9:601-605.*
  - Hakulinen, N., Andberg, M., Kallio, J., Koivula, A., Kruus, K., Rouvinen, J. (2008) *A near atomic resolution structure of a Melanocarpus albomyces laccase. J.Struct.Biol. 162: 29-39*
  - <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>
  - J. W. Murray, E. Rudiño-Piñera, R. L. Owen, M. Grininger, R. B. G. Ravelli and E. F. Garman (2005). *Parameters affecting the X-ray dose absorbed by macromolecular crystals J. Synchrotron Rad. 12*, 268-275.
  - Kleywegt, G.J. and Read, R. J. *Structure 5*, 1557-1569 (1997).
  - Kleywegt, G.J. *Use of Non-crystallographic Symmetry in Protein Structure Refinement. Acta Crystallographica D 52*, 842-857 (1996).
  - Li, X., Wei, Z., Zhang, M., Peng, X., Yu, G., Teng, M., Gong, W. (2007) *Crystal structures of E. coli laccase CueO at different copper concentrations. Biochem.Biophys.Res.Commun. 354: 21-26*
  - Lyashenko, A.V., Zhukhlistova, N.E., Gabdoulkhakov, A.G., Zaitsev, V.N., Bento, I., Lamzin, V.S., Betzel, C., Lindley, P.F., Koroleva, O.V., Zhukova, Y.N., Stepanova, E.V., Morgunova, E.Y., Voelter, W., Schirwitz, K., Tishkov, V.I., Kachalova, G.S., Cherkashyn, E.A., Mikhailov, A.M. (2006) *Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from Cerrena maxima Acta Crystallogr.,Sect.F 62: 954-957*
  - MacPherson I.S. and M. E. P. Murphy. (2007). *Review, Type-2-copper-containing enzymes. Cellular and Molecular Life Sciences. 64: 2887-2899.*
  - Mayer AM, Staples RC (2002). *Laccase: new functions for an old enzyme.* Department of Botany, The Hebrew University of Jerusalem, 60(6): 551-65.
  - Messerschmidt A, Huber R. (1990). *The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin – modeling and structural relationships. Eur J Biochem, 187(2):341-352.*
  - P. D. Adams (2006). *Automated structure determination with PHENIX. Acta Cryst. A62*, s85.
  - P. D. Adams, K. Gopal, R. W. Grosse-Kunstleve, L.-W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. K. Pai, R. J. Read, T. D. Romo, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter, L. C. Storoni & T. C. Terwilliger (2004). *Recent developments in the PHENIX software for automated crystallographic structure determination. J. Synchrotron Rad. 11*, 53-55.
  - P. D. Adams, R. W. Grosse-Kunstleve, L.-W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter & T. C. Terwilliger (2002). *PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. Acta Cryst. D58*, 1948-1954.
  - P. Emsley & K. Cowtan (2004). *Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Cryst. D60*, 2126-2132.
  - P. Emsley (2004). *GUI design of the graphical tools in COOT. Acta Cryst. A60*, s83.
  - P. Emsley (2008). *Macromolecular model-building and validation using COOT. Acta Cryst. A64*, C23.
  - P. Sharma, R. Goel y N. Capalash. (2006). *Bacterial laccases.* Department of Microbiology, Panjab University, Chandigarh, 160014, India Volume 23, Number 6 / junio de 2007
  - Perutz MF,Luisi BF, Nagai K, (1987). *X-ray crystallographic and functional studies of human haemoglobin mutants produced in Escherichia coli. Acta Haematol 78(2-3):85-9.*
  - Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T (2002) *Crystal structure of a laccase from the fungus Trametes versicolor at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers J.Biol.Chem. 277: 37663-37669*
  - Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I.( 2005). *TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. Plant Cell. (11):2966-80.*

- R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, P. H. Zwart, T. C. Terwilliger, N. W. Moriarty, A. Urzhumtsev & P. D. Adams (2007). *Phenix refine developments*. *Acta Cryst.* **A63**, s80.
- Raimond B.G. Ravelli and Elspeth F. Garman Radiation (2006). *Damage in Macromolecular CryoCrystallography*. Current Opinion of Structural Biology 16, 624-629.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM, Goffner D. (2002). *Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar*. *Plant Physiol.* (1):145-55.
- Rhodes, G. 2000. *Crystallography; Made Cristal Clear*. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press U.S.A. p. 43.
- Rhodes, G. 2000. *Crystallography; Made Cristal Clear*. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press U.S.A. p. 61.
- Robbie P. Joosten, Thomas Womack, Gert Vriend (2008) *Re-refinement from deposited X-ray data can deliver improved models for most PDB entries*. *Acta Cryst.* **D65**, 176-185.
- Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C., Montfort, W.R. (2002) *Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **99**: 2766-2771
- Robin Leslie Owen, Enrique Rudinño Piñera, and Elspeth F. Garman. (2006). *Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals*. *PNAS*. Vol.103. no.13
- Rudinño, E. 2001. *Estudios estructurales sobre el mecanismo de activación alostérica de la Glucosmina-6- fosfato desaminasa*. Tesis Doctoral por la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto de Biotecnología. México.
- Sakurai, T., and Kataoka, K. (2007). *Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase*. *Chem. Rec.* **7**, 220-229
- Sharma R, Goel R, Capalash N. (2007) *Bacterial laccases*. *World J Microbiol Biotechnol*, **23**:823-832.
- Smith, A.W., Camara-Artigas, A., Wang, M., Allen, J.P., Francisco, W.A. (2006) *Structure of Phenoxazinone Synthase from Streptomyces antibioticus Reveals a New Type 2 Copper Center*. *Biochemistry* **45**: 4378-4387
- Solomon EI, Augustine AJ, Yoon J (2008). *O2 reduction to H2O by the multicopper oxidases*. *Dalton Trans*; (30):3921-32.
- Solomon, E.; Sundaram, M., Machonkin, E. (1996). *Multicopper Oxidases and Oxigenases*. *Chem. Rev.* 96, 2563-2605
- Solomon, E.; Chen, P.; Metz, M.; Lee, S.; Palmer, A. 2001. *Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins*. *Angewandte Chemie-International Edition*. 40, 4570-4590.
- T. C. Terwilliger, R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, P. H. Zwart, L.-W. Hung, R. J. Read & P. D. Adams (2008). *Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard*. *Acta Cryst.* **D64**, 61-69.
- Taylor, A.B., Stoj, C.S., Ziegler, L., Kosman, D.J., Hart, P.J. (2005). *The copper-iron connection in biology: Structure of the metallo-oxidase Fet3p*. *Proc.Natl.Acad.Sci.Usa* **102**: 15459-15464
- Trujillo Robles Lizzete. (2007). *Síntesis de derivados monofénolicos oxidados utilizando una lacasa de origen fúngico*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de botecnología, UNAM.
- Velázquez Figueroa Guadalupe (2009). *Análisis y afinamiento de estructuras proteicas con cobre depositadas en el Protein Data Bank*. UPEMOR.
- Wang, G.; Li, Q.; Luo, B.; Chen, X. 2004. *Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase*. *Nature Biotechnology*. 22, 893 – 897.
- Xu Feng. (2005). *Applications of oxidoreductases: Recent progress*. *Industrial Biotechnology*, 1(1): 38-50.
- , E.P., Lindley, P.F. and Martins, L.O. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: Structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 514-526 (2006).